

ムンプスワクチン効果に関する臨床的検討

研究分担者：庵原俊昭（国立病院機構三重病院 院長）

研究協力者：菅 秀（国立病院機構三重病院小児科）

長尾みづほ（国立病院機構三重病院小児科）

浅田和豊（国立病院機構三重病院小児科）

根来麻奈美（国立病院機構三重病院小児科）

谷口清州（国立病院機構三重病院小児科）

落合 仁（落合小児科）

渡辺正博（すずかこどもクリニック）

二井立恵（白子クリニック小児科）

伊佐地真知子（白子クリニック小児科）

研究要旨 ムンプスはワクチン予防可能疾患である。本邦のムンプスワクチン株は先進国で使用されている Jeryl Lynn 株と比べると、免疫原性は優れているが安全性に懸念が持たれている。今回の検討で本邦のムンプスワクチン株は、接種率が高くなると高い流行抑制効果を示し、優れた免疫原性があることを確認した。また、自然ムンプスでは発症時の年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎を合併するリスクが高くなり、ワクチン後の無菌性髄膜炎も接種時の年齢が高いほど発症リスクが高率になると推定された。ワクチン後の耳下腺腫脹の検討では、接種時の年齢が高くなるにつれ耳下腺腫脹率が有意に上昇していた。以上の結果から、本邦のワクチン株は1回接種でも優れた免疫原性を有しており、ムンプスワクチン後の髄膜炎合併率を減らすためには、耳下腺腫脹を合併する頻度が低く、無菌性髄膜炎発症リスクが低いと推定される1歳が適切な接種時と判断された。

A. 研究目的

ムンプスはワクチン予防可能疾患である。ムンプスワクチンとして、欧米では Jeryl Lynn (JL) 株と JL 株由来の RIT-4385 株が広く用いられており、Leningrad-Zagreb (LZ) 株や Urabe-AM9 株も世界で広く使用されている。本邦では5株が開発されたが、現在市販されて

いるのは星野株と鳥居株の2株だけである。ムンプスワクチンで問題となるのは、有効性と安全性のバランスである。現在までのところ、本邦ワクチン株は、いずれも JL 株と比べると有効性は優るが、安全性は劣ると評価されている。本研究では、本邦ムンプスワクチン株の有効性および安全性について、疫学的ならびに臨

床ウイルス学的に検討することを目的として行っている。

B. 研究方法

(1) ムンプス流行抑制に対するムンプスワクチンの効果

平成 20 年度からムンプスワクチンの公費助成を行っている K 市のムンプスワクチン率を調査し、同時に、三重県感染症サーベイランス事業に参加している K 市の医療機関（1 定点）から報告される、平成 11 年から平成 24 年までのムンプスおよび突発性発疹（突発疹）患者数を、近隣の市（津市、鈴鹿市、四日市市）の報告数と比較検討した。

(2) 年齢とムンプス髄膜炎発症リスクの検討

ムンプス髄膜炎で国立病院機構三重病院小児科および伊勢赤十字病院（伊勢日赤）小児科に入院した 73 人の年齢分布を調査した。ムンプス患者数の年齢分布は、平成 11 年から 24 年までの 15 年間に三重県感染症サーベイランス事業に報告があった患者数から求めた。ムンプスの顕性感染率は、磯村らの報告（小児内科 1988:10;1357）を基に算出した。

(3) ムンプスワクチン接種年齢と耳下腺腫脹リスクとの関係

三重県下の 5 医療機関で接種したムンプスワクチン接種者数および接種後耳下腺腫脹を認めた症例数を調査した。耳下腺腫脹を認めた症例では唾液を採取し、Vero 細胞を用いてウイルス分離を行い、由来株を同定した。

(4) ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎の臨床像の検討

ムンプスワクチン後に無菌性髄膜炎を

発症した 5 例(年齢 3~10 歳、中央値 8 歳)の臨床像を調査し、4 例では髄液からのウイルス分離を行った。

(倫理面の配慮)

ムンプスワクチン後に耳下腺腫脹を認めた症例からの唾液の採取、ムンプスワクチン後の髄膜炎症例からの髄液の採取は、保護者の同意を得てから行った。発表に当たっては、氏名が同定されないよう配慮した。

C. 研究結果

(1) ムンプス流行抑制に対するムンプスワクチンの効果

平成 20 年度からの 1 歳児のムンプスワクチン接種率は、65.0~81.8%（平均 74.4%）であり、同時に調査した MR ワクチンおよび水痘ワクチンの平均接種率は、それぞれ 96.9%、73.1%であった（表 1）。公費助成は 5 歳まで認められており、5 歳までの累積接種率では、ムンプスワクチン 79.0~90.0%（平均 83.3%）、水痘ワクチン 73.0~84.1%（平均 82.1%）と、接種率はいずれも約 10%上昇した。

K 市からの三重県感染症サーベイランスの 1 年あたりのムンプス報告数は、助成開始前の 10 年間では、69.8/年であったが、助成開始後の 5 年間では 10.0/年と、85.7%減少していた。この減少率は、Y 市の 50.8%、T 市の 58.4%、S 市の 70.2%と比べると有意の減少であった（表 2）。このムンプス患者報告数の減少が、ワクチン接種率の上昇によるものかを確認するために、突発疹の減少率と比較した。K 市の突発疹の減少率は 38.6%であり、ムンプス患者報告数は突発疹よりも有意に減少していた($P<0.0001$)。また、K 市の

突発疹の減少率は、他の 3 市の減少率と同等であった。

（２）年齢とムンプス髄膜炎発症リスクの検討

ムンプスの好発年齢は 4～6 歳であった。顕性感染率から求めた調査期間中のムンプスウイルス推定感染者数は、1 歳 3,875 人、2-3 歳 5,999 人、4-6 歳 11,551 人、7-9 歳 4,798 人、10-14 歳 1,520 人であり、1 歳児の髄膜炎発症リスクを 1 とすると、各年齢群の発症リスクは、2-3 歳 1.61、4-6 歳 2.43、7-9 歳 3.84、10-14 歳 7.01 と、年齢が高くなるにつれ上昇した（表 3）。なお、今回対象としたムンプス髄膜炎例は全例耳下腺腫脹を認めていた。

（３）ムンプスワクチン接種年齢と耳下腺腫脹リスクとの関係

11,459 人を対象に年齢群別の耳下腺腫脹率を検討した。全年齢の耳下腺腫脹率は 1.0% (111/11,459) であった（表 4）。ウイルス分離を行った 107 例中、野生株が分離されたのが 39 例(36.4%)、ワクチン株が分離されたのが 38 例(35.5%)、分離陰性が 30 例(28.0%)であった。分離陰性例の 30 例、ウイルス分離を行わなかった 4 例がワクチン由来と推定すると、ワクチン接種と関連した耳下腺腫脹者数は 71 人となり、ワクチンによる耳下腺腫脹率は 0.63%であった。年齢群ごとのワクチンが関係していると思われる耳下腺腫脹率は、1 歳 0.32%と最も低く、年齢が大きくなるにつれ耳下腺腫脹率は上昇し、7-10 歳群の腫脹率は 1.31%であった（表 4）。

（４）ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎の臨床像の検討

ムンプスワクチン後の髄膜炎例の臨床像を表 5 に示した。全例男性であり、耳下腺腫脹を伴い、ワクチン接種後 16～25 日 (21.4±3.9 日、中央値 22 日) に発症していた（表 5）。髄液からウイルス分離を行った 4 例からは、全例接種したワクチン株が分離された。

D. 考察

欧米で使用されている JL 株は無菌性髄膜炎の合併率が低く(1/1,000,000 接種)、安全性は優れているが、2 回接種していても野生株の曝露を受けた時に発症し、地域流行を認めることがあり、免疫原性に問題が指摘されている。一方、Urabe 株を含めた本邦ワクチン株は免疫原性が優れているが、ワクチン後の無菌性髄膜炎発症率は 1/20,000 と比較的頻度が高いことが問題となっている。

本邦のムンプスワクチン株の流行抑制効果に関する検討では、接種率が 80%程度に維持されると、ムンプスの流行規模は 85.7%減少していた。また、公費助成により接種率が高くなった市では、任意接種でムンプスワクチンを接種している近隣の市よりもムンプス発症者数が有意に減少していた。以上の結果から、集団免疫の面からも本邦ムンプスワクチン株は有効性が高いワクチンであることが確認された。なお、三重県のムンプス患者の定点あたりの報告数は、平成 11 年からの 10 年間では 52.8/年・定点であったが、平成 20 年からの 5 年間では 25.2/年・定点に 52.3%減少しており、全国の減少率 29.2%よりも有意に減少していたが（表 6）、突発疹では有意の減少は認められなかった。この結果は、三重県のムンプス

ワクチン接種率は、他の都道府県よりも高いことを示唆している。

ムンプスの耳下腺腫脹率は 1 歳では 20%と低率であるが、年齢が上がるにつれ上昇し、4 歳以降では 90%である。また、ムンプスの代表的な合併症として無菌性髄膜炎と難聴があるが、ムンプス難聴に関しては成人発症例の方が小児よりも発症頻度が高率である。今回のムンプス髄膜炎の年齢による発症リスクの検討でも、年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎の発症リスクが上昇していた。以上の結果から、ムンプスでは主症状である耳下腺腫脹だけではなく、合併症である髄膜炎も年齢が高くなるにつれ発症リスクが高くなることが示された。

ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎例の検討では、全例が男性で耳下腺腫脹を認め、6 歳以上が 5 例中 4 例(80%)と、接種年齢が高い症例の割合が高率であった。地域のムンプスワクチンの接種者の割合が表 5 に示す割合と同じと仮定すると、ワクチン後の髄膜炎の発症リスクは、2-3 歳群を 1 としたとき、4-6 歳群の発症リスクは 2.08、7-10 歳の発症リスクは 19.28 歳となった(表 7)。以上の結果から、自然感染、ワクチン接種後のいずれにおいても、年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎を合併しやすく、無菌性髄膜炎を合併したほとんどの症例は耳下腺腫脹を伴うことが示された。

耳下腺腫脹を伴わなければ無菌性髄膜炎の発症率が低くなると仮定し、年齢群別のムンプスワクチン後の耳下腺腫脹率を検討した。ムンプスワクチンはムンプス流行時に接種者数が増加する傾向がある。野生株による紛れ込みを除いた 1 歳

群における耳下腺腫脹率は 0.32%であり、年齢が高くなるにつれ耳下腺腫脹率も上昇し、7-10 歳群では RR は 4.11 であった。

以上の結果から、耳下腺腫脹率が低い 1 歳でムンプスワクチンを接種すると、耳下腺腫脹だけではなく、無菌性髄膜炎を合併するリスクも減少すると推察された。

E. 結論

本邦のムンプスワクチン株は、接種率が高くなると高い流行抑制効果が認められた。また、自然ムンプスでは発症時の年齢が高くなるにつれ無菌性髄膜炎を合併するリスクが高く、ワクチン後の無菌性髄膜炎も接種時の年齢が高いほど発症率が高い傾向があり、すべて耳下腺腫脹を合併していた。耳下腺腫脹もワクチン接種時の年齢が高くなるにつれ、有意に上昇した。以上の結果から、ムンプスワクチン後の髄膜炎合併を減らすためには、1 歳で接種することが効果的と判断された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 庵原俊昭：ムンプス．小児科 54:1753-1760, 2013
- 2) 庵原俊昭：ワクチンによる医療従事者の麻疹・風疹・ムンプス・水痘・インフルエンザ感染予防対策．医療 67(5):206-209, 2013
- 3) 庵原俊昭：ムンプスウイルス感染症：流行性耳下腺炎(おたふくかぜ)．日本臨牀 24:s459-s462, 2013
- 4) 庵原俊昭、落合 仁：ムンプスワクチンの有効性と安全性．病原微生物検出情報 2013;34: 221-222

2. 学会発表

- 1) 木所 稔、庵原俊昭、中山哲夫、竹田 誠：国内で流行するムンプスウイルスの分子系統学的解析. 第 54 回日本臨床ウイルス学会 2013.6.8-9
- 2) 田中敏博、木所 稔、渡辺正博、庵

原俊昭：授乳婦に対するムンプスワクチン接種の安全性. 第 17 回日本ワクチン学会学術集会 2013.11.30-12.1 津

H. 知的財産の出願・登録状況
特記する事項なし。

(表1) K市における1歳児の各種ワクチン接種率

	単年度ワクチン接種率(%)			累積ワクチン接種率(%)	
	MR	ムンプス	水痘	ムンプス	水痘
H20年度	95.0	76.6	74.8	90.0	84.1
H21年度	95.9	65.0	62.6	79.5	73.0
H22年度	99.6	72.7	71.9	86.1	82.4
H23年度	96.6	75.7	72.3	79.0	75.4
H24年度	97.3	81.8	83.9	81.5	83.9
平均	96.9	74.4	73.1	83.3	82.1

(表2) 助成開始前後のムンプスおよび突発疹の定点あたり報告数

	定点あたりの報告数			RR	95%CI	P値
	K市助成前 (H11-H19)	K市助成後 (H20-H24)	減少率 (%)			
ムンプス						
K市	69.8	10.0	85.7	1		
三重県	52.8	25.2	52.3	0.61	0.46-0.81	
Y市	39.8	19.5	50.8	0.59	0.43-0.82	
T市	47.5	19.7	58.4	0.68	0.53-0.88	
S市*	388.0	100.6	70.2			0.00761
突発疹						
K市	108.6	68.8	36.6	1		
三重県	52.9	35.6	32.7	0.89	0.56-1.41	
Y市	42.6	25.3	40.5	1.11	0.71-1.72	
T市	45.1	21.7	51.8	1.42	0.93-2.04	
S市*	305.3	158.8	47.8	1.31		0.04416

*S市は報告数

CI：信頼区間

K市の突発性発疹減少率を1とするとK市のムンプス減少率のRRは2.34となり、ムンプスは突発疹に比べてワクチン導入後報告数が有意に減少している (P<0.0001)。

(表3) ムンプス自然感染における年齢群別の無菌性髄膜炎合併リスク

年齢群	報告数	顕性感染率 (%)	推定感染者数	髄膜炎数	発症 RR
1 歳	775	20	3875	4	1
2-3 歳	4271	71.2	5999	10	1.61
4-6 歳	10362	89.7	11551	29	2.43
7-9 歳	4304	89.7	4798	19	3.84
10-14 歳	1363	89.7	1520	11	7.01

報告数：三重県感染症サーベイランス

顕性感染率：磯村等：小児内科 1988;10;1357

推定感染者数＝報告数/顕性感染率×100

ムンプス髄膜炎：国立病院機構三重病院小児科および伊勢赤十字病院小児科の入院例

(表4) ムンプスワクチン後の耳下腺腫脹とウイルス分離

年齢群	接種者	耳下腺腫脹例				腫脹率* (%)	RR	P 値
		ウイルス分離		未実施	合計			
		野生株	V 株					
1 歳	7472	8	15	9	0	32(24)	0.32	1
2-3 歳	2436	11	14	12	3	40(29)	1.19	3.71 <0.0001
4-6 歳	1172	14	5	8	1	28(14)	1.19	3.72 <0.0001
7-10 歳	379	6	4	1	0	11(5)	1.31	4.11 0.00178
合計	11459	39	38	30	4	111(72)	0.63	

() 内は野生株が分離されなかった耳下腺腫脹例の数

*腫脹率＝野生株が分離されなかった耳下腺腫脹例/接種者数×100

ムンプスワクチン後の髄膜炎例：3 歳男児（全体 1/11459、耳下腺腫脹例 1/68）

(表5) ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎例（三重県）

症例	年齢 (歳)	性	接種株	接種から発症 までの日数	耳下腺 腫脹	髄液 細胞数	分離株	備考
KH	3	男	星野	1 9	あり	279	星野	
HO2	6	男	鳥居	2 5	あり	1800	鳥居	
TK	8	男	鳥居	1 6	あり	510	鳥居	
HO1	9	男	鳥居	2 5	あり	726	鳥居	
TT	10	男	星野	2 2	あり	NT	NT	臨床診断

NT：not tested

(表6) 三重県と全国のムンプスおよび突発疹の報告数の推移

	定点あたりの年間報告数		減少率 (%)	P 値
	H11-H19	H20-H24		
ムンプス				
三重県	52.8	25.2	52.3	
全 国	48.5	36.3	29.3	0.00429
突発疹				
三重県	52.9	35.6	32.7	
全 国	38.0	30.7	19.2	0.14491

(表7) 三重県のムンプスワクチン接種者の年齢構成から見た
ムンプスワクチン髄膜炎発症リスク

年齢群	接種者数	髄膜炎数	RR
1 歳	7472	0	
2 - 3 歳	2436	1	1.0
4 - 6 歳	1172	1	2.08
7 -10 歳	379	3	19.28

ムンプスワクチン効果に関する基盤的研究

研究分担者：中山哲夫（北里生命科学研究所 所長）

研究要旨 ムンプス弱毒生ワクチンは免疫原性と安全性の受容幅が狭く感受性のない細胞に継代する通常の方法での開発は困難と考えられる。新規生ワクチンの発想として、既に有効性と安全性が担保されている麻疹ワクチン AIK-C を生ワクチンウイルスベクターとして使用する事を検討した。全長遺伝子の P/M junction にムンプスウイルスの HN, F 遺伝子翻訳領域を導入し感染性ウイルスを回収した。回収したウイルスの感染細胞に HN, F タンパク質発現を確認した。培養上清からショ糖密度勾配超遠心法によりウイルス粒子を精製し麻疹ウイルスのバンドの部分にムンプスウイルスタンパク質は検出されず麻疹ウイルス粒子には挿入したムンプスタンパク質は組込まれていない事が明らかになった。

A 研究目的

ムンプス弱毒生ワクチンは1981年に製造承認されたが、接種率は低迷しムンプスは数年毎に流行を繰り返していた。1989年には麻疹・風疹・ムンプスの三種混合MMRワクチンが導入されたがワクチン接種後の無菌性髄膜炎が問題となり、1993年には中止となった。以降、安全性に優れたワクチンの開発が望まれてきた。欧米ではJeryl Lynn株が使用されており、無菌性髄膜炎の頻度は極めて低いものの免疫原性が低くムンプスの流行を制御するにはいたっていない。

弱毒生ワクチンの樹立法は、野生分離株を本来の宿主以外の動物細胞で継代を重ねることで弱毒化する。Jeryl Lynn株は野生分離株を鶏胎児胚細胞で継代して樹立されている。我が国で使用されている2株（武田薬品の鳥居株、北里研究所の星野株）は1960年代の野生分離株から鶏胎児胚細胞で継代したものであ

る。鳥居株、星野株共に無菌性髄膜炎の副反応が数千例に1例の頻度である。有効性と安全性の容認継代幅が狭く有効で安全なワクチン株の樹立が困難なウイルスである。こうした既存の弱毒生ワクチン株の樹立方法では有望なムンプスウイルス株を開発できる可能性は低い。また、仮に樹立できたとしても、真の安全性はヒトに数十万人に接種されないと評価が難しい。

ムンプスの感染防御には液性抗体だけでなく細胞性免疫の誘導が重要な働きをしており不活化ワクチン、スプリットワクチンでは通常困難である。従来の弱毒生ワクチンに代わって近年の分子生物学的手法の進歩によりウイルスRNAから感染性ウイルスを作成するreverse geneticsの技術が確立されこの技術を生ワクチンウイルス株の樹立に応用できる。我々は、麻疹ワクチン株AIK-C

株の全長RNA遺伝子から感染性ウイルスを回収しreverse geneticsの技法を確立し外来遺伝子を挿入し他のウイルスタンパク質を発現する組換え麻疹ワクチンウイルスを作成している。麻疹ワクチンウイルスベクターを用いムンプスウイルスのHN, Fタンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスを作成し新規ムンプス生ワクチンとしての可能性を検討する事を目的とした。

B 研究方法

B-1 組換え麻疹ウイルスの作成

麻疹ウイルスの全長 cDNA を構築し P/M junction の 3373 位の前に GGCGCG 配列を挿入し GGCGCGCC の Asc I 制限酵素部位を新規に導入した。更に R1, R2 配列を挿入し Nco I, Not I を挿入する事で外来遺伝子を挿入する。構築した cDNA を模式的に図 1 に示した。ムンプスワクチン星野ワクチンシード株から HN 遺伝子翻訳領域 582 アミノ酸をクローニングして pMVAIK/MpHN を作成した。F タンパク質遺伝子の transmembrane から cytoplasmic region を欠失させた F タンパク質 486 アミノ酸を導入した pMVAIK/MPF Δ TM、F タンパク質の細胞融合活性に関連する HR1 (64 アミノ酸), HR2 (40 アミノ酸) を導入した pMVAIK/MpF-HR1, pMVAIK/MpF-HR2 の cDNA を構築した。

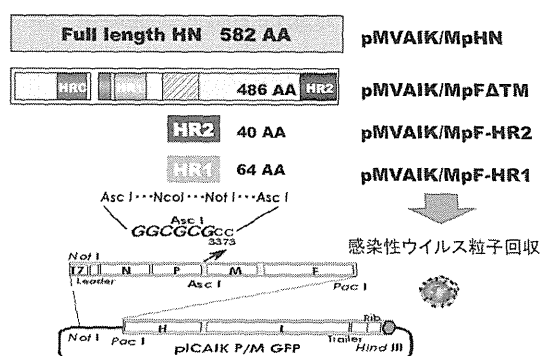


図1. ムンプスウイルスHN, Fタンパク質遺伝子を挿入した組換え麻疹ウイルスcDNAの構築

B-2 感染性ウイルスの回収

293T細胞にT7RNAPolymeraseを発現する組換えワクシニアウイルス感染させる。次に、全長感染性ウイルスcDNAとともに麻疹ウイルスAIK-CのN, P, Lタンパク質を発現するhelper plasmidsをtransfectionする。3日後にB95a細胞と混合培養し細胞変性効果の出現を観察する。

B-3 ムンプスHN, Fタンパク質の発現

回収したウイルスをB95a細胞に感染させ3日後に固定し、麻疹ウイルスNタンパク質に対する単クローン抗体、ムンプスウイルスに対するpolyclonal抗体で免疫染色を行った。

B-4 精製ウイルス粒子のタンパク質解析

Vero細胞に回収した組換えウイルスを感染させ培養上清を採取し60, 45, 30%の不連続ショ糖密度勾配遠心法に境界面からの分画を採取した。SDS pageで展開後Western blottingを行い麻疹ウイルス、ムンプスウイルスのpolyclonal抗体を用いてタンパク質解析を行った。

C. 結果

C-1 感染性ウイルスの回収

4種類の感染性cDNAを構築しウイルス回収を試みた。HN, FΔTM, HR-2を導入したcDNAから感染性ウイルスを回収できた。HR-1の組換えウイルスは回収できなかった。

C-2 ムンプスウイルスタンパク質発現

それぞれの組換えcDNAから感染性組換え麻疹ウイルスMVAIK/MPHN, MVAIK/MpFΔTM, MVAIK/FHR-2をB95a細胞に感染させ免疫蛍光染色を行い結果を図2に示した。麻疹ウイルスのNタンパク質に対するmonoclonal抗体を用いた。感染細胞内でspeckle様に発現が観察された。MVAIK/FHR-2はムンプスのpolyclonal抗体では発現が確認できなかったが、G, Fタンパク質の発現を確認できた。

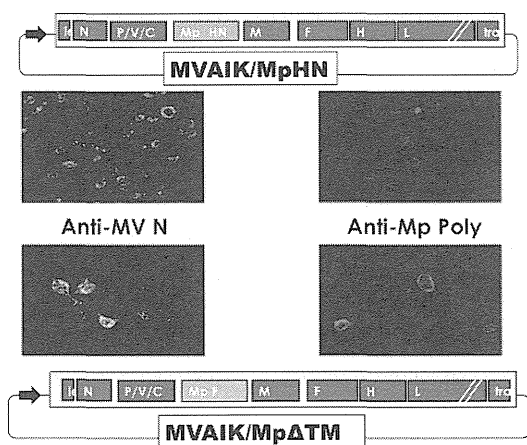


図2. 挿入したムンプスHN, Fタンパク質の発現

C-3 組換え麻疹ウイルス粒子の構成タンパク質

組換え麻疹ウイルスMVAIK/MPHN, MVAIK/MpFΔTMをVero細胞に接種し培養上清を採取し蔗糖密度勾配遠心によりウイルス粒子を精製し、粒子の構成タン

パク質を解析し結果を図3に示した。不連続蔗糖密度勾配の各境界面のtopからFraction 1, 30-40%の境界からFraction 2, 45-60%の境界面からFraction 3の各分画を採取した。ウイルス粒子のバンドはFr3に確認された。Fraction 1, 2, 3をSDS phageに展開後Western blottingでメンブレンに転写後麻疹, ムンプスのpolyclonal抗体で解析を行った。コントロールとして麻疹ウイルスAIK-Cの精製ウイルス粒子(MV)と同じバンドがFraction 3の分画から検出された。Fraction 3には麻疹ウイルス粒子が検出されムンプスウイルスのpolyclonal抗体で染まるムンプスFタンパク質は検出されず麻疹ウイルス粒子には挿入したムンプスFタンパク質は取り込まれていない事が明らかとなった。

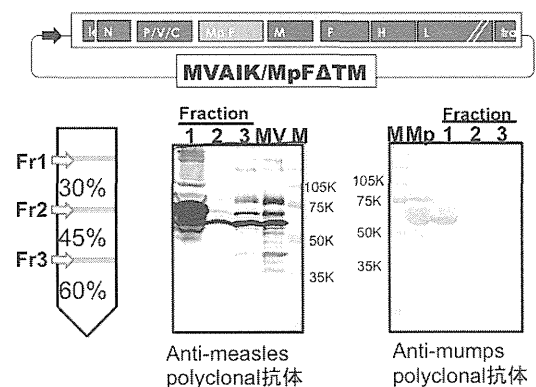


図3. 組換え麻疹精製ウイルスの構成タンパク質解析

麻疹ウイルス粒子はFraction 3にバンドが認められる。麻疹ウイルスAIK-C(MV), ムンプスKO3ワクチン株(Mp)をコントロールとして使用した。

D. 考案

ムンプスの好発年齢は4-5歳でワクチンは開発されたが任意接種のワクチンのままで接種率は40%で数年毎に流行を繰

り返している。欧米では Jeryl Lynn 株を用いた MMR ワクチンの 2 回接種が行われているがワクチン 2 回接種者でもムンプスに罹患し、世界的にも流行が続いている。現在世界中で使用されているムンプス生ワクチンは有効性と安全性のバランスに問題があり安全性の高いワクチンは免疫原性が低い。逆に免疫原性の高いワクチンは安全性に課題を残している。ワクチンの免疫原性が問題であるだけでなく世界的に流行している Genotype G とワクチン株の Genotype A の抗原性に差が認められ genotype A のワクチン接種後の血清では現在の野生流行株に対する中和活性が低い。一方、日本のワクチン株は Genotype B で流行野生株との間での中和抗原性の差はない。

麻疹ワクチン AIK-C 株の有効性と安全性は確立されており、ムンプスワクチンとは異なり強い免疫応答を誘導し抗体産生、細胞性免疫能も優れており挿入したムンプスウイルスの感染防御抗原に対しても強い免疫応答が期待できる。また導入したムンプスウイルスは星野ワクチン株で流行野生株との抗原性のずれもなく有効性が期待される。

ムンプスウイルスの感染には HN タンパク質が細胞のシアル酸に結合し F タンパク質の立体構造に変化を来し fusion domain を隣接する細胞膜の脂質二重膜に突き刺して細胞膜融合が始まる。F タンパク質には数カ所の機能ドメインがあきらかとされており、ムンプスの中和には HN タンパク質と F タンパク質が関与しており特に F タンパク質については HR-1 と HR-2 が安定した 6-helix bundle を形成している。HR-2 を導入した組換え麻疹ウイルス中和能を誘導するどうか興味を持た

れる。

ムンプスタンパク質を導入した組換え麻疹ウイルスではその細胞親和性が変化するかどうかの問題となる。麻疹ウイルス粒子に F タンパク質が組込まれないようにタンパク質のアンカーとなる transmembrane から cytoplasmic と欠失させ導入した。麻疹ウイルス粒子画分からムンプス F タンパク質は検出されなかったので新たな病原性の付加はないもの考えられた。今後、これらの組換えウイルスをコットラットに接種して免疫原性を検討する。

E. 結語

ムンプスウイルス HN, F タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルス MVAIK/MPHN, MVAIK/ MpFΔTM, MVAIK/FHR-2 を作成した。ムンプスウイルスタンパク質の発現を確認した精製ウイルス粒子には取り込まれていない事を確認した。

G. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Matsubara K, Fujino M, Takeuchi K, Iwata S, Nakayama T. A new method for the detection of neutralizing antibodies against mumps virus. PLOS ONE 2013; 8: e65281.
- 2) Nakayama T. Vaccine chronicle in Japan. J Infect Chemother 2013; 19: 787-98.
- 3) Ikeno S, Suzuki MO, Muhsen M, Ishige M, Kobayashi-Ishihara M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S,

- Takeyama H, Tsunetsugu- Yokota Y. Sensitive detection of measles virus infection in the blood of humanized mouse by one step quantitative RT-PCR. *Front Microbiol* 2013; 11 October doi: 10.3389/fmicb.2013.00298
- 4) Yui I, Fujino M, Sawada A, Nakayama T. Novel clinical features of recurrent human respiratory syncytial virus infection. *J Med Virol* 2013; Oct 25. doi: 10.1002/jmv.23809.
- 5) Sawada A, Yamaji Y, Nakayama T. Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains. *J Infect Chemother* 2013; 19: 480-485.
- 6) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. Simple method for differentiating measles vaccine from wild-type using loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol* 2013; 57: 246–251.
- H. 知的財産の出願、登録状況
1. 特許取得 なし

ムンプス特異的細胞性免疫ならびにサイトカイン変動の測定

研究分担者: 竹田 誠 (国立感染症研究所 ウイルス第三部 部長)
研究協力者: 久保田耐 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)
染谷健二 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)
安楽正輝 (国立感染症研究所 ウイルス第三部)

研究要旨 ムンプスは重要な小児感染症であり、定期接種化が必要とされている。しかしながら、ムンプスワクチンの副反応である無菌性髄膜炎の発生頻度が、国産ワクチンの接種の場合、比較的高い（0.02%程度）ため、定期接種化への障害となっている。一方、世界中で最も広く用いられているJeryl-Lynn株（以下JL株）では、この無菌性髄膜炎の発生率は極めて低い。ただし、過度の弱毒化のため、有効性がやや劣るとの指摘もあり、検証が必要である。実際に、JL株を含むMMRワクチンの2回接種が定期接種化されている欧米諸国においてもムンプスの流行が繰り返し報告されている。本研究班では、現行ワクチン（JL株と国産ワクチン株）を用いた相互補完的な免疫方法による、より安全で有効なムンプスワクチンの接種プログラムについて検討する。本研究班全体として、ワクチンの評価系としてマーモセットを用いるが、本分担研究班では、マーモセットの細胞性免疫の評価系、ならびにマーモセットのサイトカイン変動の解析法を開発し、最終的には、国産ワクチン株とJL株との免疫原性の違いを明らかにするとともに、最も有効なワクチン接種プログラム（例えば一回目の接種をJL株、二回目の接種を国産ワクチン株など）の確立に役立てる。本年度の検討の結果、細胞性免疫の解析については、（1）刺激抗原をJL株の全粒子とし、サンドイッチELISA法（U-CyTec biosciences社のCytoMax ELISAキットを用いる）を用いて末梢血単核球から分泌されるIFN- γ を測定すること、（2）Fujiiらの手法（PLoS One 2013, 8:e56296）によるRT-PCR法にて、末梢血単核球中の各種サイトカイン遺伝子の発現変動を測定すること、（3）フローサイトメトリーにて末梢血中のリンパ球サブセットの変動を測定することを決定した。

A. 研究目的

ムンプスは重要な小児感染症であり、定期接種化が必要とされている。しかしながら、ムンプスワクチンの副反応である無菌性髄膜炎の発生頻度が、国産ワクチンの接種の場合、比較的高い（0.02%

程度）ため、定期接種化への障害となっている。一方、世界中で最も広く用いられているJeryl-Lynn株（以下JL株）では、この無菌性髄膜炎の発生率は極めて低い。ただし、過度の弱毒化のため、有効性が

やや劣るとの指摘もあり、検証が必要である。実際に、JL株を含むMMRワクチンの2回接種が定期接種化されている欧米諸国においてもムンプスの流行が繰り返し報告されている。本研究班では、現行ワクチン（JL株と国産ワクチン株）を用いた相互補完的な免疫方法による、より安全で有効なムンプスワクチンの接種プログラムについて検討する。本研究班全体として、ワクチンの評価系としてマーモセットを用いるが、本分担研究班では、マーモセットの細胞性免疫の評価系、ならびにマーモセットのサイトカイン変動の解析法を開発し、最終的には、国産ワクチン株とJL株との免疫原性の違いを明らかにするとともに、最も有効なワクチン接種プログラム（例えば一回目の接種をJL株、二回目の接種を国産ワクチン株など）の確立に役立てることを目的とする。

B. C. 研究方法と研究結果

1. ムンプス特異的細胞性免疫応答の測定

(1) ELISPOT法を用いるか、(2) ELISA法により直接IFN- γ を測定するか、(3) RT-PCR法によりmRNAレベルを測定するか、いずれの方法が適当（実施可能）であるかを検討した。マーモセットを用いる場合には、得られる血液量が少量であることを十分に考慮する必要がある。ELISPOT法においては、マーモセットのIFN- γ に対する抗体の選別（あるいは作成）から始める必要があること、また、安定的な結果を出せる系を立ち上げるためには、相当な期間を要すると予想され

ること、また、十分な期間を用いても、（得られる血液量の不足のため）安定的な結果を出せる系の樹立が困難である可能性が高いことが予想された。結果U-CyTec biosciences社のCytoMax ELISAキットを用いたサンドイッチELISA法で、分泌されるIFN- γ を直接測定することを選択した。刺激抗原は、JL株の全粒子とした。IFN- γ のmRNAレベルの測定については、ELISAの結果を見た後に検討することにした。

2. 各種サイトカイン遺伝子の発現変動の測定

今回、実験にはマーモセットを用いるため、サイトカインの測定に利用できる市販抗体の数は、仮にクロス反応の見られる他の動物種に対する抗体を用いたとしても、制限がある。そこで、末梢血単核球中の各種サイトカインの変動を定量RT-PCR法を用いたmRNA量の測定で行うこととした。ウイルス増殖の確認のためにも、末梢血単核球から総RNAの精製は実施するため、同じRNA試料を用いて、サイトカインmRNAの測定を行うことを計画した。方法論は、Fujiiらの手法（PLoS One 2013, 8:e56296）に準拠することにした。本法で測定可能なサイトカインならびに細胞表面マーカー遺伝子は、CD3 ϵ 、CD4、CD8 α 、CD20、IL1- β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12 β 、IL-13、IFN- γ 、TNF- α である。

3. 末梢血中のリンパ球サブセットの変動測定

予備実験(細胞のサイズや解析条件の設定のため)としてマーモセットの末梢血をFACSにて解析した。縦に個体番号を並べ、横に死細胞が染まる7-AADの有無を示した(図1)。更に有無それぞれ群の中で、singlet及びlive cellにゲーティングし、7-AADで染めた群についてはviabilityを出した(図1)。結果的にどの個体も細胞のviabilityは95%以上あり、染色の行程における細胞へのダメージは小さく、今後、有効にフローサイトメトリ解析が実施できることが確認できた。

D. E. 考察と結論

中和抗体の血清レベルが、最もムンプスウイルスの感染阻止に有効であると考えられ、ムンプスワクチンの有効性は、液性免疫(主に中和抗体価)を評価することが、最も重要と考えられる。ただし、細胞性免疫の誘導能を評価することは、ワクチンの免疫原性を評価する上で非常に重要な指標であり、最も効果的なワクチン接種スケジュールを検討する上で不可欠である。液性免疫と細胞性免疫の各々が、ムンプスウイルス感染の阻止、あるいは感染からの回復にどのように関与しているかは、今後、明らかにしていく必要がある。また、ムンプスウイルスにおいては、ウイルス株によっては、抗原性に多少のズレや違いが見られることが指摘されており、その場合には、ワクチン株で誘導される中和抗体の有効性が減弱する可能性がある。実際、JL株(遺伝子型A)と近年の流行株との間には抗原性の乖離が見られるとの指摘もある。このような株間の乖離が細胞性免疫の誘

導においてもみられるのかを、今後明らかにする必要がある。JL株を含むMMRワクチンの2回接種が定期接種化されている欧米諸国においてもムンプスの流行が繰り返し起こることの原因を明らかにすることにもつながると考えている。そして、これら異なるワクチンスケジュール毎の免疫誘導能の総合的評価が、今後のワクチン施策の決定に大いに貢献すると考えている。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagata S, Maedera T, Nagata N, Kidokoro M, Takeuchi K, Kuranaga M, Takeda M, Kato A. Comparison of the live attenuated mumps vaccine (Miyahara Strain) with its parent in preadapted position of attenuation process. Journal of Vaccines & Immunization [in press] (2013).
- 2) 木所稔、竹田誠:ムンプスウイルスの新たな分類基準と国内流行状況、病原微生物検出情報(IASR) 34(8)、224-225(2013)

2. 学会発表

- 1) 木所稔、庵原俊昭、中山哲夫、竹田誠:国内で流行するムンプスウイルスの分子系統学的解析、第54回日本臨床ウイルス学会総会、2013年6月
- 2) 加藤大志、齋加志津子、久保田耐、網康至、須崎百合子、加藤篤、竹田誠、

木所稔：ムンプスウイルス P タンパク
質に導入されたアミノ酸変異による病
原復帰機構の解析、第 61 回日本ウイ
ルス学会総会、2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

特記事項なし

実用新案登録

特記事項なし

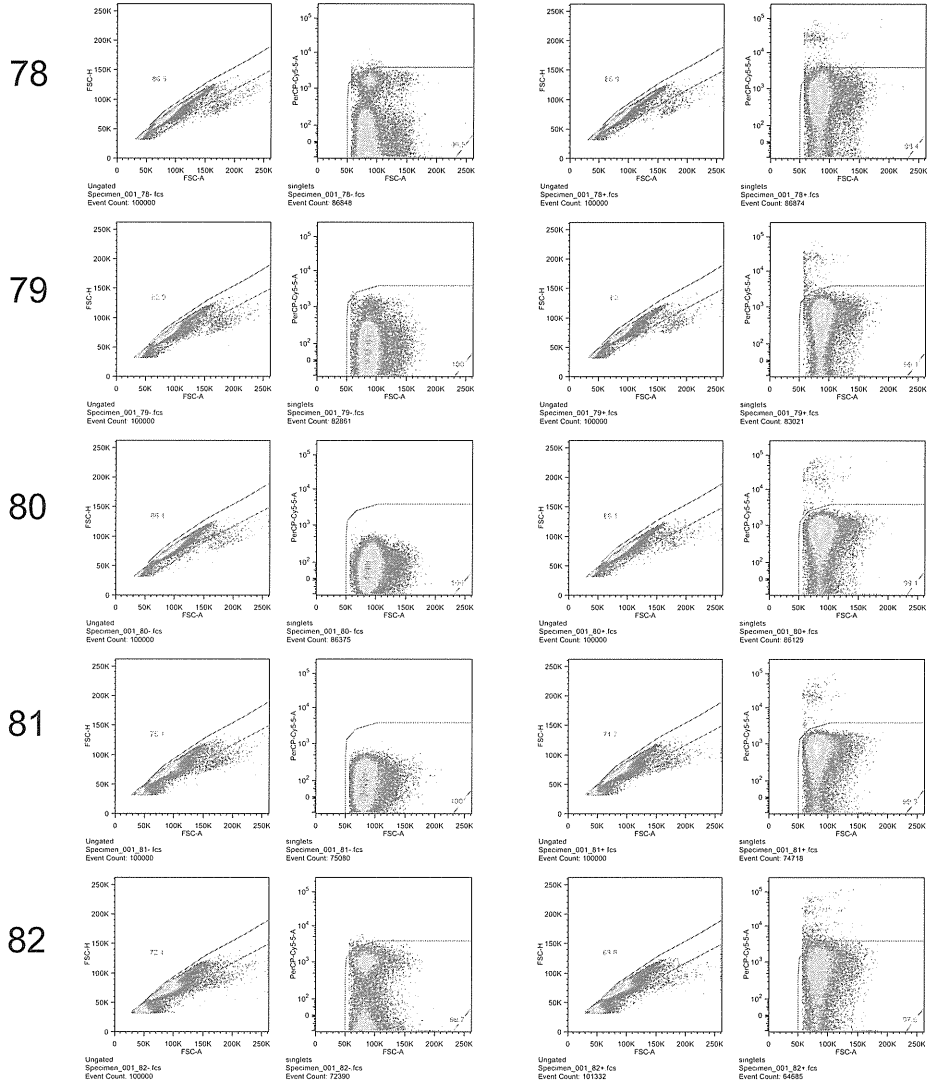
その他

特記事項なし

140217
Marmoset
Peripheral Blood

7-AAD(-)

7-AAD(+)



分担研究報告書

ムンプスウイルス神経病原性の病理学的解析

研究分担者：長谷川 秀樹（国立感染症研究所 感染病理部 部長）

研究協力者：小谷 治（国立感染症研究所 感染病理部）

岩田 奈織子（国立感染症研究所 感染病理部）

鈴木 忠樹（国立感染症研究所 感染病理部）

高橋 健太（国立感染症研究所 感染病理部）

永田 典代（国立感染症研究所 感染病理部）

研究要旨 本研究では、ムンプスウイルスの神経病原性を解明する目的で、主に動物モデルの病理学的解析を行う。今年度は、動物モデルとして使用している霊長類と齧歯類の神経細胞を分類するため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片における神経細胞マーカーの有用性について免疫組織化学法を用いて検討した。その結果、カニクイザルとマーモセットの脳組織標本において神経細胞、神経幹細胞、各種のグリア細胞と上衣細胞を分類することが可能な抗体を選出することができた。

A. 研究目的

ムンプスウイルスは無菌性髄膜炎を引き起こすため、神経病原性を発揮することが知られているが、ヒトにおける病態病理は不明である。この神経病原性の評価系動物モデルとしては、ワクチンの安全性評価法の一つの神経毒力試験に用いられているマカク属サル脳内接種法が使用されてきた。また近年では、この試験の代替法として、新生仔ラットの脳内接種法が報告されている(Rubin SA *et al.*, 1998)。一方で、Saikaらはマーモセットがムンプスウイルスに高い感受性を示す事を報告した(Saika S *et al.*, 2002)。

本研究では、ムンプスウイルスの神経病原性を明らかにする目的で

主に動物モデルの病理学的解析を行う。そこで今年度は、ムンプスウイルス神経病原性を解析する上で必要な、非ヒト霊長類と齧歯類の神経細胞マーカーの選択を行った。

B. 研究方法

神経細胞、神経幹細胞、各種グリア細胞、上衣細胞と対象とした神経マーカーの抗体はいずれも市販品を用いた(表)。また、当部に参照標本として保管していた、カニクイザル、マーモセットおよびマウス(ddY)の正常脳組織のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を用いた。これらを使用して、ポリマー法による免疫組織化学法を行い、神経マーカー抗体の染色性について評価した。

抗原賦活化には pH6.0 抗原賦活化液（ニチレイバイオサイエンス株式会社, Tokyo, Japan）を用い、121°C10 分オートクレーブ処理を行った。また、0.3%過酸化水素水メタノール液を用いた室温 30 分の反応により内因性ペルオキシダーゼ反応を阻止した。ポリマー法は、Envision+システム（ウサギ一次抗体用あるいはマウス一次抗体用）(Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) あるいはヒストファイン マウス組織用（ニチレイバイオサイエンス株式会社）を用いてプロトコール通りに行った。酵素基質の発色には 3,3'-ジアミノベンジジンを用い、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。

C. 結果

18 種類の神経マーカーによる検索結果を表にまとめた。動物種によって使用可能な抗体が異なるものの、神経細胞、神経幹細胞、各種のグリア細胞と上衣細胞を分類することが可能な抗体が明らかとなった。報告書に詳細は記載しないが、評価結果から、抗原賦活化法など、それぞれの抗体のスタンダードプロトコールを決定した。

D. 考察

動物種によって使用可能な抗体が異なることに注意が必要である。同時に、ホルマリン固定期間や固定の善し悪しによって染色結果は異な

る。今後、ムンプスウイルス感染実験標本を用いてウイルス感染細胞の同定を行う予定であるが、今回、モノクローナル抗体を中心に選出できたので、抗ムンプスウイルスポリクローナル抗体との多重蛍光免疫染色が可能である。

E. 結論

ホルマリン固定パラフィン包埋切片における神経細胞マーカーの有用性について免疫組織化学法を用いて検討し、カニクイザルとマーモセットの脳組織標本において神経細胞、神経幹細胞、各種のグリア細胞と上衣細胞を分類することが可能な抗体を選出した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Watanabe T, Kiso M, Fukuyama S, Nakajima N, Imai M, Yamada S, Murakami S, Yamayoshi S, Iwatsuki-Horimoto K, Sakoda Y, Takashita E, McBride R, Noda T, Hatta M, Imai H, Zhao D, Kishida N, Shirakura M, de Vries RP, Shichinohe S, Okamatsu M, Tamura T, Tomita Y, Fujimoto N, Goto K, Katsura H, Kawakami E, Ishikawa I, Watanabe S, Ito M,