

に高値となった。

2. 水痘皮内抗原検査

水痘ワクチン追加接種4週間後に水痘皮内抗原検査を実施した。水痘抗原「ビケン」を使用して実施した。抗原検査判定は添付文書に従い、接種後発赤長径が5mm未満は(-)陰性、5~9mmは(+)陽性、10mm以上は(++)中等度陽性とした。接種間隔による皮内抗原検査の比較では、発赤径の大きさ、陽性率ともに両群間で有意差は認めなかった。全体で82%に陽性率であった。

3. 接種後の副反応

水痘ワクチン追加接種が終了した34名において、特に問題となる副作用は認められなかった。

4. Breakthrough varicellaの発生状況

水痘罹患の有無を追加接種後12カ月ごとに調査した。10名について回答を得た。観察期間は12カ月~20カ月。皮内高原検査は9名が陽性、1名が陰性であった。ワクチン接種後水痘罹患は全例なかった。

D. 考察

水痘ワクチンを3~13カ月間隔で2回接種し、IAHA、gp-ELISA法で抗体価の推移を解析した結果、全例で抗体陽転を確認した。また追加接種後抗体価は、初回接種時比べ高い抗体価(ブースター効果)を示し、十分な免疫誘導が可能と考えられた。しかしながら、接種間隔が3~4カ月と短い群が、8~13カ月群と比較して追加接種後のgp-ELISA抗体価がわずかながら有意に低い値を示した。細胞性免疫を示す皮内抗原検査では発赤径、陽性率に3群間の有意差は認めなかった。今後は、検査対象数を増やすことが課題となる。

以上の結果を踏まえると、保育園へ通っているあるいは兄弟がいるなどの感染リスクの高い児でも可能であれば6カ月の間隔を開け、感染リスク

の低い児であれば6カ月から1年の間隔を開けて二回目を接種するといったように、感染リスクを考慮しながら適切な接種時期を決めるのが望ましいと考えられる。

E. 結論

水痘ワクチンの追加接種は、安全に実施可能であり、かつ十分な抗体反応や細胞性免疫が得られることが示唆された。しかしながら対象数が少なく、今後症例の蓄積が必要と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) MRワクチンと水痘ワクチン同時接種の効果ならびに安全性, 大橋正博ら, 日児誌, 2013, 117; 1416-1423
- 2) Cycling probe technology to quantify and discriminate between wild-type varicella-zoster virus and Oka vaccine strains. Ihira M, Higashimoto Y, Kawamura Y, Sugata K, Ohashi M, Asano Y, Yoshikawa T. J Virol Methods 2013; 193: 308-313.

2. 学会発表

- 1) 大橋正博, 河村吉紀, 吉川哲史

本邦における水痘ワクチン二回接種の適切なスケジュールに関する検討, 第54回日本臨床ウイルス学会

- 2) 大橋正博, 三浦浩樹, 松岡恵里奈, 河村吉紀, 飯田 史, 鈴木恭子, 吉川哲史

水痘ワクチン二回接種の適切なスケジュールに関する検討, 第18回日本ワクチン学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

水痘ワクチン製剤の遺伝子レベルの解析

研究分担者：井上 直樹（岐阜薬科大学感染制御学研究室・教授）

研究要旨 弱毒生水痘ワクチン（岡株）は安全性・有効性に優れたワクチンであり、本年度から定期接種となった。定期接種化に伴い、接種直後や一定期間後に発症した水痘・帯状疱疹がワクチン株由来であるのかを明確にすることや、本ワクチンが元来mix populationであるために特定の配列セットを有する株が接種後水痘などの副反応に関連するかなど、ワクチンの有効性と安全性という観点からの基礎的知見の蓄積が求められる。本年度は、遺伝子レベルでの製剤に関する解析を行い、1)承認されて以降現在まで、水痘ワクチンのmix populationの遺伝子構成に変化がみられないこと、2)海外のライセンス及び非ライセンス製剤とは差があること、3)ワクチン製剤を出発材料として長期継代培養した場合に起こる遺伝子構成の変化は、少なくとも培養細胞レベルではランダムな現象と思われることを明らかにした。

A. 研究目的

弱毒生水痘ワクチン（岡株）は、高橋らにより世界に先駆けて開発されたワクチンで、その安全性・有効性はWHO専門家委員会においても高く評価されている。これまで、水痘は年間100万人程度が罹患し、合併症や重症化に伴い4,000人の入院、10人程度の死亡が推測されてきた。今年度秋から定期接種に組み込まれたことで、罹患患者数・入院者数・死亡者数の激減が期待されている。定期接種化に伴い、接種直後や接種後一定期間後に発症した水痘・帯状疱疹がワクチン株に由来するものであるのか野生株由来であるかを明確にすることや、本ワクチンが元来mix populationであるために特定の配列セットを有する株が接種後水痘などの副反応に関連するかなど、ワクチンの有効性と安全性という観点からの基礎的知見の蓄積が一層求められている。本年度は、遺伝子レベルで水痘ワクチン製剤の解析を行うことで、その遺伝子構成の安定性を検討した。

B. 研究方法

異なるロットの水痘ワクチン製剤 1×10^4 PFU相当をヒト二倍体細胞に感染し、その後は非感染細胞と1:5~1:10の比で、24代（約4ヶ月）共培

養で継代した。感染細胞及び用法に従い水で溶解したワクチン製剤から、QIAamp DNAm mini kit（QIAGEN）を用いてDNAを精製し、塩基配列解析に用いた。

ウイルスゲノム配列の一部については、プライマーの量比を変えた非対称PCRを50 μ lのスケールにて、95 $^{\circ}$ C 10分の初期ステップ、95 $^{\circ}$ C 30秒、58 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 30秒の40-45サイクル、72 $^{\circ}$ C 4分の最終ステップの条件で行った。PCR産物は、アガロース電気泳動により確認後、その10 μ lを0.2XSSC、2.5mM MgCl₂を含む反応液（全量20 μ l）をキャピラリーに充填しLight Cycler（ロシュ）によるmelting curve analysisに用いた。LightCycler条件は95 $^{\circ}$ C 1秒、0.95 $^{\circ}$ C/秒で40 $^{\circ}$ Cまで冷却後4秒保温、0.4 $^{\circ}$ C/秒で95 $^{\circ}$ Cまで加温する過程でTm値測定を行った。Tm値測定は自動解析モード及び各ピークの相対的面積はTm値 \pm 2.0 $^{\circ}$ C間のデータシートで得られる0.2 $^{\circ}$ Cごとの蛍光測定値を積算して求めた。

（倫理面への配慮）

本年度は、臨床材料を用いた研究を実施していない。

C. 研究結果

1. 本邦水痘ワクチンの遺伝子構成の安定性

水痘帯状疱疹ウイルスのゲノムは約12.5万塩基対より成り、ワクチン株とその親株の全塩基配列の比較から、1)両株間での差異は42箇所の配列のみに過ぎないこと、2)いくつかの配列部位では親株とワクチン株配列の“混じり”が存在することが報告されている。100%がワクチン株の配列部位もある一方で野生型が混じっている配列部位もあることから、水痘ワクチンは、いわゆるmixed populationであることが知られている。我々はこれまでに蛍光エネルギー移動 (FRET) を応用したLightCyclerによるTm値解析法を用いて野生株型塩基配列の混在を遺伝子レベルで定量化し、製剤の品質管理に利用できる可能性を示してきた。今回、1988年～2012年の間に、6種類のワーキングシードより製造された12ロットの水痘ワクチン最終製品について、親株と差のある42塩基配列部位のうち、18部位について、ワクチン型及び野生型(親株)配列の割合を検討したところ、ワクチン製剤で配列がワクチン型のみ部位では、すべてワクチン型のみであり、ワクチン型と野生型が混じっている部位では、野生型の割合の平均に対して、その5～15%差の範囲内で全てが一致した結果であった。

2. 海外製剤の遺伝子構成

本邦メーカーよりライセンス供与されたメルク社の製剤、ならびに、ライセンス供与を受けずに由来不明のウイルスシードを用いている海外製剤の2製品について、遺伝子構成を比較した。メルク社製剤では、ORF6, ORF9Aなどいくつかの配列部位で、野生型の割合が増加していた。一方、非ライセンス品は、全体としてはOka株由来であることが確認できるが、ワクチン型と野生型配列が混在する部位では、ワクチン型のみ、野生型のみというどちらか一方のみの配列に変わっていた。

3. 長期培養による遺伝子構成の変化

生物学的製剤基準では、マスターシードから10代以内のウイルスストックを用いた製造を求めているが、非ライセンス品については本邦の最終製品より10～15代継代数が多いものが用いられていると思われる。そこで、本邦の最終製品を長期に

継代培養した場合、どの程度遺伝子構成に変化があるかを検討した。

異なる3ロットの最終製品を出発材料として得られたストックのうち、1ロット由来のものは全ゲノム125kbの配列を決定した(表1)。その結果、親株やワクチン株とは無関係な1塩基変異が7箇所に発生していることがわかった。また、最終製品においてワクチン型のみ14箇所の配列部位のうち12部位はワクチン型のみままであったが、2部位は野生型(親株)配列に戻っていた。最終製品でワクチン型・野生型が混在した28部位のうち5部位は、そのまま混在配列であったが、10部位がワクチン型配列のみに、13部位が野生型配列のみとなっていた。

残る2ロット由来のストックについては、ワクチン株で変異が集中しているORF62遺伝子のみについて、塩基配列を決定し、混在配列がストックによりワクチン型と野生型の別方向になっている部位があった(表2)。

D. 考察

これまでの検討で、過去25年間のワクチン製剤の物理化学的組成に変化が無いことを示したが、更に、遺伝子構成に変化が無いことが確認されたことから、ワクチン接種後に起こる副反応などの事象の頻度の変化は、製剤に起因するものというよりも、接種環境や接種条件によるものと考えられ、今後、定期接種化に伴って予測されない事象がたとえ起こったとしても、製剤の変化に起因するという可能性は低いと思われた。

ワクチン株では、温度感受性、モルモット細胞での増殖性、皮膚での増殖性が、親株で異なることが知られているが、こうした指標に対応した遺伝子変異がどれであるかについては依然として、不明である。日本で開発されたワクチン株を用いた海外製剤は、本来、その遺伝子構成に変化が無いことが期待されるが、一定の変化があることから、こうした製剤が日本で用いられる場合には、遺伝子構成の変化が免疫原性などの生物学的活性にどのような影響を与えるか、慎重な検討が求められる。

海外製剤、特に非ライセンス製品、の変化の要因としては、培養条件によるものがあると思われる。

表1 ワクチン製剤間ならびに長期培養後ウイルスの遺伝子構成の比較

ORF	V-Oka株 塩基番号	アミノ酸配列 変異	親株	塩基配列 (親株配列の割合%)			
				ビケン製剤	長期培養#1	メルク製剤	非ライセンス
0	177		G	G	C		
0(V)	559	*→R	T	C	C		
0(V)・1	702		T	T/C	t/C(10)		
0(V)・1	760	S→G(0),L→P	A	A	G		
0(V)・1	762		T	T/C	C		
2	1837		C	G	C		
NCR	2514		T	T/C	C		
6	5744	S→P	A	G (10)	G	A/G (65)	G
9A	10899	R→W	T	T/C (50)	T	T/c (90)	C/t (<20)
10	12778	A→A/V	C	T/C (55)	C	C	C
14	19385		T	T/C	C		
14	20825	K→N	C	C	C/A (50)		
14	20867	K→N	C	C	c/A(10)		
18	26076		A	G	G		
21	31683	T→I	C	T/C (65)	C	C	T/c (<20)
22	37987		T	T/c	T		
22	39178		T	T/G	T		
31	56967	S→A	T	T	G		
31	58482	I→V	A	A/G (50)	G	A/G (35)	
31	59174		A	A/G (65)	G	A/G (65)	G
35	63952		A	G	A/g (80)		
35	64197	V→L	A	A	a/G (10)		
39	71137	M→T	T	T/C (65)	C	T/C (40)	
45	82109		A	A/G	A		
47	83975		G	G/A	G		
50	87154		A	A/G	G		
50	87180	S→G	T	T/C (65)	T/c (80)	T/C (65)	
51	89608		A	A/G (65)	A	A	
52	90409	I→V	A	A/G (65)	A	A/g (80)	
54	94041		T	C	C	t/C (10)	C
55	97353	V→A	T	T/c (75)	T	T/C (50)	
55	97622	A→T	G	G/A (50)	g/A (10)	A/G (60)	g/A (<20)
55	97670	C→K	T	T/C (65)	T	T/C (65)	
59	100960	P→L	A	A/G (55)	A/g (90)	A/G (65)	
62	105298	L→S	A	A/G	G		
62	105344	V→I	T	C	C		
62	105532	V→A	A	G	G		
62	105693		T	C	C		
62	106250	K→C	T	C	C	C	C
62	106698		A	A/g	A	A	A
62	107124		T	C	C	C	C
62	107240	S→G	T	C	C	C	C
62	107587	V→A	A	A/G	G	A	G
62	107785	L→P	A	A/G	A/G (50)	A	A/g (70)
62	108099		T	C	C	C	C
62	108298	H→R	T	T	C	T	T
62	108826	M→T	A	A/G	G	G	A
NCR	109125		A	A/G	A		
NCR	109188		A	A/G	na		
64	111744	Q→K	A	G	G		

表2 長期培養後のウイルスのORF62配列の3ストック間での比較

V-Oka株 塩基番号	アミノ酸配列 変異	親株	塩基配列 (親株配列の割合%)			
			ビケン製剤	長期培養#1	長期培養#2	長期培養#3
105298	L→S	A	A/G	G	G	G
105344	V→I	T	C	C	C	C
105478	Q→R	T	T	T	C	T
105532	V→A	A	G	G	G	G
105693		T	C	C	C	C
106250	K→C	T	C	C	C	C
106698		A	A/g	A	A	A
106924	V→A	A	A	A	G	A
107124		T	C	C	C	C
107240	S→G	T	C	C	C	C
107587	V→A	A	A/G	G	A	G
107785	L→P	A	A/G	A/G (50)	A	A/g (70)
108099		T	C	C	C	C
108298	H→R	T	T	C	T	T
108826	M→T	A	A/G	G	G	A

実際、長期培養により、混合配列がワクチン型もしくは野生型の方に収束する傾向があった。ORF62で3つのストックの配列を比較した場合、ワクチン型と野生型の配列がほぼ同じところから開始された4部位での変化は、各部位でワクチン型と野生型にストックに分かれており、選択圧が見られなかった。全ゲノムレベルでも、ワクチン型ばかりとか野生型ばかりに収束したわけではないことから、多くの混合配列からの変化はランダムな現象と思われる。なお、長期培養中にワクチンとは無関係に発生した突然変異の出現率は、継代当り 4×10^5 塩基に1箇所程度であり、DNAウイルスで予想されるレベルであった。副反応が発生した場合に得られる株の配列の変化が、予想の範囲内なのか特定の選択圧があるかを推測する上で、今回の情報を利用することができると思われる。

E. 結論

- 1) 水痘ワクチン製剤は、承認以降現在まで、mix populationの遺伝子構成に変化はない。
- 2) 海外のライセンス及び非ライセンス製剤とは遺伝子構成に差があるため、それらが導入される時には、慎重な対応が必要と思われる。
- 3) 水痘ワクチン株を長期継代培養した場合、混合配列がワクチン型もしくは野生型にランダムに収束すると思われる。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

水痘ワクチンの力価測定に関する研究

研究分担者：森 康子（神戸大学大学院医学研究科・教授）

研究協力者：村上 宏起（神戸大学大学院医学研究科）

研究要旨 組換え水痘ウイルスの性状解析において、ルシフェラーゼ活性を指標とした増殖能の評価方法を確立した。

A. 研究目的

我々はこれまでに、水痘ウイルス（VZV）をベクターとして、ムンプスウイルスの表面抗原であるF蛋白や、HN蛋白を発現させた組換え水痘多価ワクチンウイルスを作製しており、それらのワクチンウイルスをモルモットに接種することで、VZVとムンプスウイルスの両方に対する中和抗体が誘導されることを既に報告している。

組換え水痘ウイルスの作製の際、外来抗原遺伝子発現カセットを、VZVのORF13領域と置換している。このORF13の欠損による組換えウイルスの増殖性や病原性への影響を確認するため、増殖性を評価する指標として、簡便に測定が可能なルシフェラーゼ活性を利用できるか否かを検討した。

B. 研究方法

①ルシフェラーゼ発現組換え水痘ウイルス（recombinant vOka-Luc, rvOka-Luc）の作製

これまでの組換え水痘ウイルスの作製と同様に、ルシフェラーゼ発現カセットを、VZV ORF13領域と置き換えたrvOka-Lucゲノムを作製し、MRC-5細胞に導入、ウイルスの再構築を行い、ルシフェラーゼ発現組換え水痘ウイルス（rvOka-Luc）を得た。

②ウイルス力価とルシフェラーゼ活性の測定

rvOka-LucセルフリーウイルスをMRC-5細胞に感染させ、経時的に感染細胞からウイルスを回収し、そのウイルス力価を測定した。同時に、Dual-

Luciferase® Reporter Assay System（QIAGEN社）を用いて、ルシフェラーゼ活性も経時的に測定した。

（倫理面への配慮）

本実験は神戸大学大学院医学研究科で行い、組換えウイルス実験に関しては文部科学大臣の確認および当該研究機関における遺伝子組換え安全委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

①ルシフェラーゼ発現組換え水痘ウイルス（rvOka-Luc）の作製

作製したrvOka-LucゲノムをMRC-5細胞に導入したところ、ウイルスの再構築が起これ、水痘特異的CPE（細胞変性効果）が観察された。さら

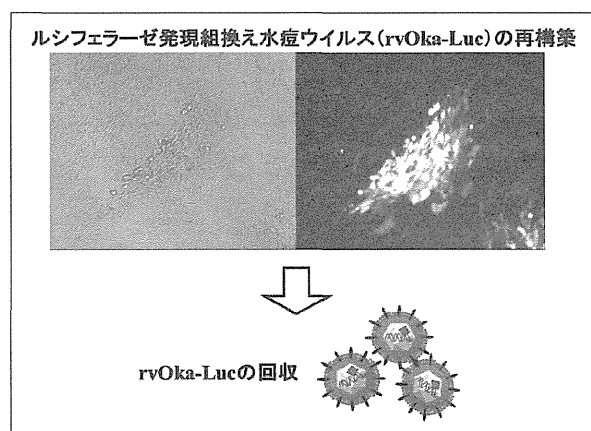


図1 水痘特異的CPEとGFPの発現
水痘特異的CPEと同じ部位で、GFPの蛍光が観察された。感染細胞からrvOka-Lucを回収した。

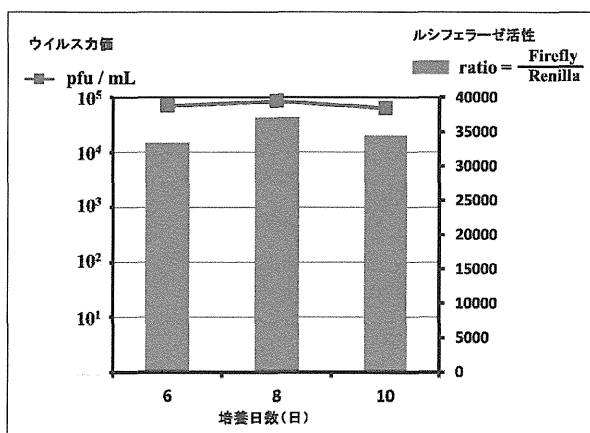


図2 rvOka-Lucの増殖曲線とルシフェラーゼ活性
rvOka-Luc感染6~10日後の増殖曲線(赤線)はほぼ一定であった。その期間のルシフェラーゼ活性もほぼ一定であった。

に、同じ部位で、ウイルスゲノム内のBAC配列に含まれるGFPの蛍光が観察されたため、これらの細胞からrvOka-Lucを回収した。

②ウイルス力価とルシフェラーゼ活性の測定

rvOka-Luc感染6日後から、増殖曲線はほぼ横ばいであり、感染10日目までウイルス力価はほぼ一定であった。さらにルシフェラーゼ活性も同様に、感染6日後から10日目まではほぼ一定であり、ウイルス力価とルシフェラーゼ活性間には相関が認められた。

D. 考察

rvOka-Luc ゲノムから、ウイルス再構築により感染性のあるルシフェラーゼ発現組換え水痘ウ

イルス (rvOka-Luc) の作製に成功した。また、rvOka-Lucの増殖曲線と発現したルシフェラーゼの活性には相関があった。これにより、ORF13を欠損させた組換え水痘ウイルスとORF13を保持した組換え水痘ウイルスの増殖能の比較を行う場合などに、ルシフェラーゼ活性を用いることができると考えられる。

E. 結論

組換え水痘ウイルスの性状解析において、ルシフェラーゼ活性の測定を用いることにより、増殖能の評価を行うことができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第62回日本ウイルス学会学術集会

「2014年11月10日(月)~11月12日(水)」

ポスター発表「組換え水痘ウイルスのルシフェラーゼ活性による増殖能の評価について」

2014年11月10日(月) 発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

ムンプスウイルスの流行解析ならびに病原性発現の分子機構解析

研究分担者：木所 稔（国立感染症研究所ウイルス第三部第三室長）

研究協力者：庵原 俊昭（国立三重病院）

渡辺 正博（すずかこどもクリニック）

落合 仁（落合小児科医院）

名木田 章（水島中央病院小児科）

斎藤 博之（秋田県健康環境センター）

中田 歩（仙台市衛生研究所）

小森 はるみ（茨城県衛生研究所）

小倉 惇（千葉県衛生研究所）

田中 俊光（千葉市環境保健研究所）

佐野 貴子（神奈川県衛生研究所）

田村 務（新潟県保健環境科学研究所）

児玉 洋江（石川県保健環境センター）

池ヶ谷 朝香（静岡県環境衛生科学研究所）

皆川 洋子（愛知県衛生研究所）

柴原 乃奈（静岡市環境保健研究所）

赤地 重宏（三重県保健環境研究所）

小菅 裕也（滋賀県衛生科学センター）

中田 恵子（大阪府立公衆衛生研究所）

秋吉 京子（神戸市環境保健研究所）

山本 美和子（広島市衛生研究所）

松本 一繁（高知県衛生研究所）

戸田 昌一（山口県環境保健センター）

坂田 和歌子（北九州市環境局環境科学研究所）

吉岡 健太（熊本県保健環境科学研究所）

研究要旨 日本国内におけるムンプスウイルスの流行状況を把握するため、20ヶ所の地方衛生研究所の協力のもと、情報の収集と解析を行った。その結果、今年度は27件のウイルス検出情報を集約できた。解析の結果、2014年の流行の主体は従来同様に遺伝子型Gであったが、昨年度までとは異なり、いわゆる西日本型（Gw）のみが全国的に流行していた。

昨年度見出されたワクチン株による水平感染由来株の中枢神経病原性について、元のワクチン株との違いをラット感染モデルで評価した。その結果、星野株由来株においては明確な有意差は得られなかったが、鳥居株由来株においては、元株に比べて病原性が統計学的に有意に昂進していた。また、水平感染が起こる原因を特定するため、ワクチン中に含まれるバリエーションウイルスの解析を次世代シーケンスを用いて行ったが、ワクチンからは水平感染例株特有のL遺伝子内の変異は検出されなかった。

A. 研究目的

日本国内ではMMRワクチンの中止以降ムンプスワクチンの接種率が低迷し、おたふくかぜの流行はいまだに制御できていない。こうした現状を踏まえ、ムンプスワクチンの定期接種化の社会的ニーズが高まっている。

一方、欧米先進諸国においてはMMRワクチン2回接種の普及にもかかわらず、おたふくかぜのたび重なるアウトブレイクが問題となっている。

今後ワクチンの導入によっておたふくかぜ流行の制御を確実なものにするためには、ムンプスウイルスの国内における流行動態の把握、抗原性の解析、病原性発現機構の解明など、いくつかの解決すべき課題がある。なかでも、国内での流行動態を把握するための網羅的、持続的な分子疫学データの集積が、ワクチン効果を的確に評価し行政上の施策に反映させる上で必須である。しかしながら、それを実現するための全国的なサーベイランスのネットワークシステムはいまだ無く、その構築は急務となっている。そこで我々はこの研究班において、地方衛生研究所（地衛研）や定点病院等の協力を仰ぎ、その基礎となるべき病院や地衛研と国立感染症研究所（感染研）とを繋ぐネットワークの構築し、それによってムンプスウイルスの国内流行状況の概要を把握することを目指してきた。

また、これら一連の研究の過程で見出されたムンプスワクチン株による水平感染例について、その分離株の病原性と水平感染発生のメカニズムについての解析を行った。

B. 研究方法

(1) 全国的なサーベイランス網の構築

昨年度に引き続き、全国20ヶ所の地衛研から協力を得た。

(2) 分子系統学的解析

今年度地衛研から提供を受けた27株のSH遺伝子領域の塩基配列を、2010年のWHO Mumps Nomenclature Update Meetingで新たに提案された遺伝子型標準株の塩基配列を基に、NJ法を用いて分子系統解析を行った。

(3) ワクチン株による水平感染例由来分離ウイルスのラットモデルによる中枢神経病原性の評価

平成25年度までの研究で見出された、国産ワクチン株（星野株、および鳥居株）と同一配列を持つ分離ウイルス5株（内、水平感染例株は3株（それぞれ星野株由来2株、鳥居株由来1株）、およびワクチン副反応例由来株2株（いずれも星野株由来））について、生後24時間以内の新生ラットに脳内接種し、1ヶ月後に脳室拡張の程度（NVT score）をMRI撮像によって測定した。対照として、星野株および鳥居株も同一条件で評価した。

(4) 次世代シーケンサ（NGS）によるムンプスワクチンに含まれるバリエーションウイルスの解析

水平感染の発生メカニズムを知るため、元のワクチン（星野株、および鳥居株）についてNGSによるディープシーケンシングを行い、今回分離された水平感染例株と同じ変異を持つバリエーションウイルスがワクチン中に含まれているかどうかを解析した。解析方法としてまず、ワクチン液からQIAamp Viral RNA kitによって精製したウイルスRNAを直接NGSで解析するRNA sequencing法を行った。しかし、この方法では解析に導入できるRNA量に制約があるため全体のcoverageが90リード前後と低かったため、含有率の低いバリエーションは検出できない可能性が考えられた。そこで、星野株については、ゲノムRNAから、全領域を11領域に分けてRT-PCRによって増幅し、そのcDNAを解析するReplicon sequencingも試み、両者の解析結果を比較した。

（倫理面への配慮）

本研究に用いる検体、および検体に関連する患者情報を収集するに当たっては、国立感染症研究所倫理審査委員会において、研究計画の内容に関する審査を受け、承認を得た上で行った。

また、動物実験は全て国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、動物に対する苦痛低減措置、および使用個体数が適切であるという承認を得た上で、国立感染症研究所動物実験委員会実施規程に基づき実施した。

C. 研究結果

(1) 全国的なサーベイランス網の構築と国内流行株の解析

昨年度に引き続き全国20ヶ所の地衛研からムンプスのサーベイランス情報と検体の提供の協力を

得ることができた。その結果、27例のムンプスウイルスの検出情報（塩基配列、および検体に係わる患者情報）を、感染研に提供して頂いた（図1、2）。

その内の19例が2014年の分離例で、残り8例は

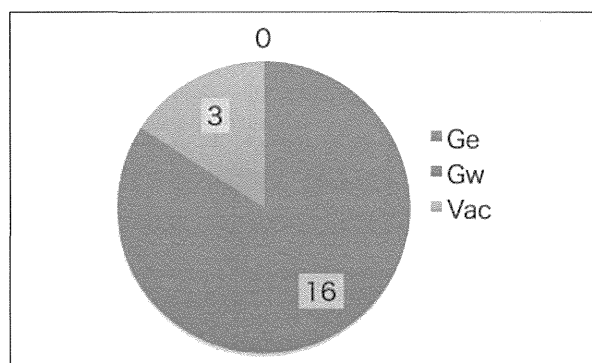


図1 2014年度に検出された遺伝子型

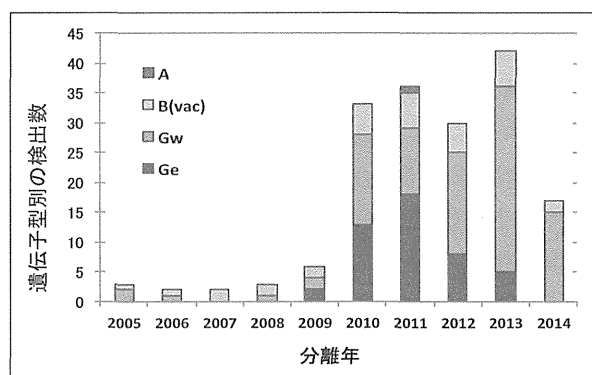


図2 地方衛生研究所で検出された遺伝子型の経年変化

2013年分離例であった。19例中3例がワクチン株（ワクチン接種後の副反応例）であった（図1）。ワクチン株以外の分離例は全て遺伝子型Gであり、しかもその全てがいわゆる西日本型（Gw）であった。今回提供を受けた検体の内、2例以外は東日本地域の地衛研から提供されたものであることから、2014年の流行はGwが主流となっていることが推察された。

(2) ワクチン株による水平感染例由来分離ウイルスのラットモデルによる中枢神経病原性の評価

3株の水平感染例株と2株の副反応例由来株、および対照として元のワクチン株2株を新生ラットに脳内接種し、中枢神経病原性を比較検討した（図3）。

星野株由来株では、いずれの株においても比較的脳室拡張の程度が大きかったが、ばらつきが大きく、水平感染例株と副反応例由来株、およびワクチン株間で比較しても、統計学的有意差は認められなかった。

一方、鳥居株ではワクチン株に比べて水平感染例株のNVTscoreは有意に大きくなっていった ($p=0.02$)。

(3) ワクチン株による水平感染例由来分離ウイルスのゲノム解析

昨年度の解析の結果発見されたムンプスワクチ

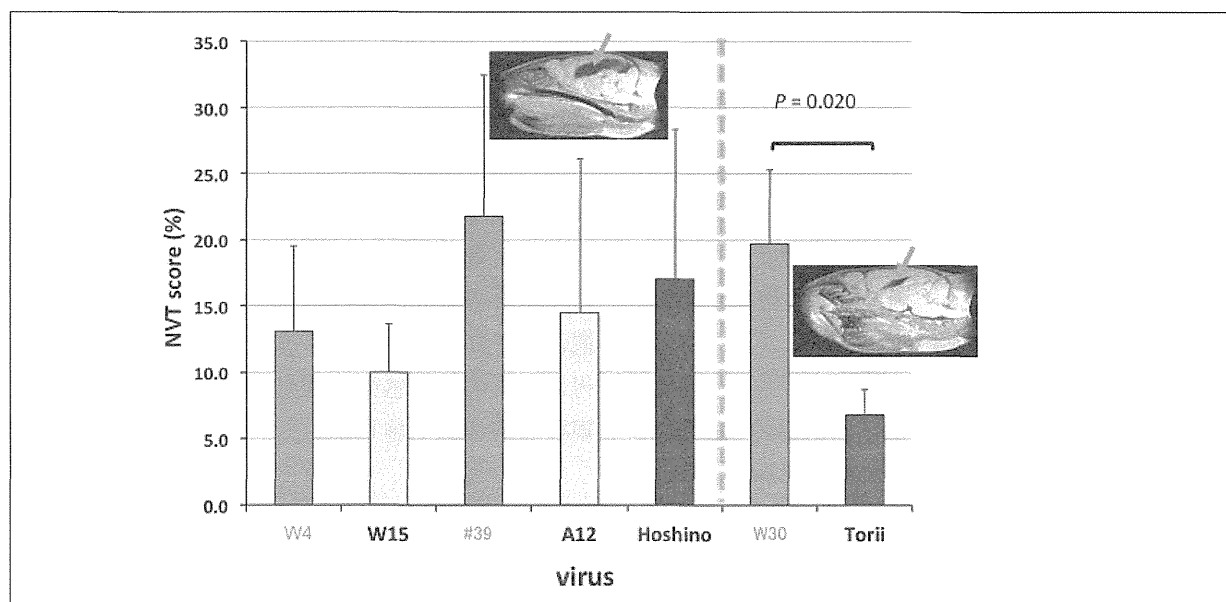


図3 水平感染例株のラットモデルによる中枢神経病原性の評価

赤字(W4、#39、W30)が水平感染例株。その他は、副反応例由来株(W15、A12)、およびワクチン株。鳥居株由来ウイルスはW30のみ。

ンウイルスによる水平感染例では、副反応由来株には無い特徴的な変異がL遺伝子内に見出された。今年度、新たな3例の副反応由来ウイルスのゲノムを解析したところ、それらにはこうしたL遺伝子内のアミノ酸置換は認められなかったことから、L遺伝子内の変異は水平感染の発生メカニズムに何らかの関連があると推察された。そこで、水平感染が起こる原因の解明と、発生のリス

ク評価のため、元のワクチンにこうした変異を持ったウイルスが存在しているかどうかを次世代シーケンサ (NGS) を用いたディープシーケンシングによって解析した。まず、2種類のワクチン液からウイルスRNAを抽出し、直接RNA sequencingによって解析した(図4A、B、図5A、C)。導入したウイルスRNA量が十分では無かったため得られたcoverageは平均で90リード程度と低

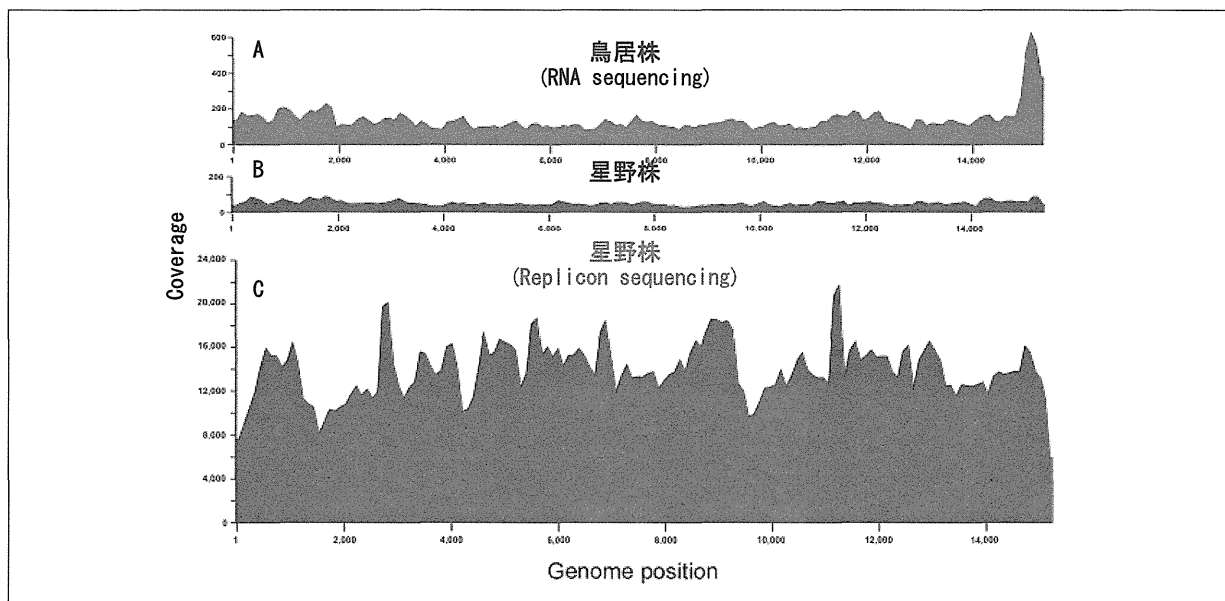


図4 次世代シーケンサによるワクチン含有バリエーション配列の評価(coverage)

鳥居株(A)ではRNA sequencingのみ、星野株ではそれに加え、cDNAを鋳型としたreplicon sequencingも行った(C)。縦軸はcoverage(ゲノム位置ごとのリード数)、横軸はウイルスのゲノム上の位置を示す。

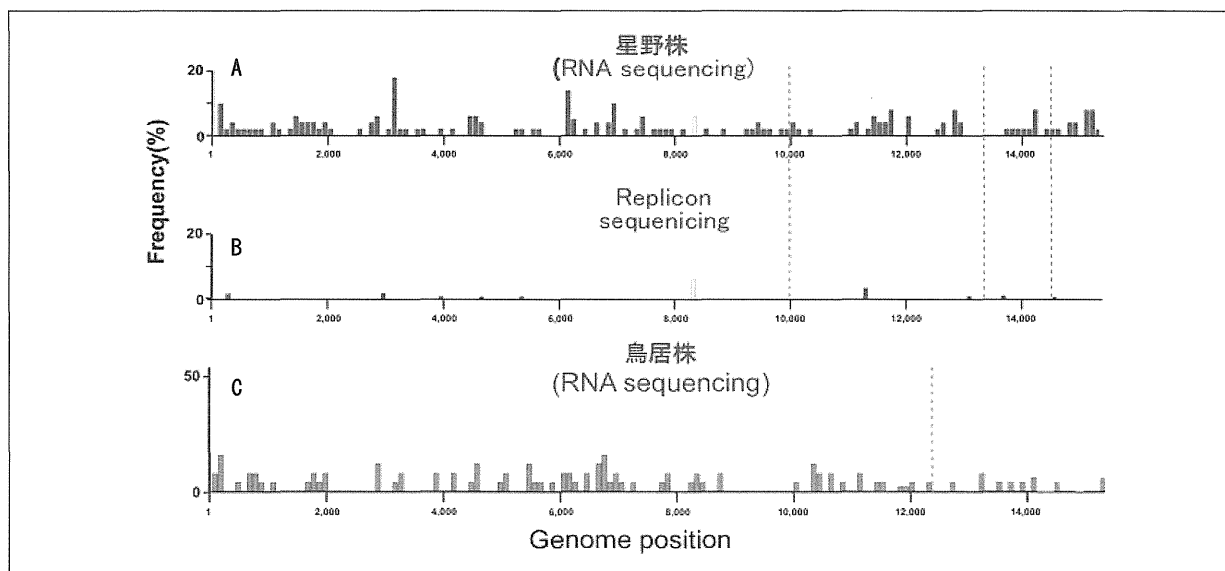


図5 次世代シーケンサによるワクチン含有バリエーション配列の評価

上段2つ(A、B)は星野株の結果を示す(AはRNA sequencingの結果、BはcDNAを鋳型としたreplicon sequencingの結果)。鳥居株ではRNA sequencingのみ行った(C)。縦軸は検出された変異の頻度、横軸はムンプスウイルスのゲノム上の位置を示す。赤の破線は水平感染由来株で検出された変異部位を示す。星野株の結果(AおよびB)で黄色で色分けされたバーは2種類の解析方法で共通して検出された変異を示している。

かった。しかし、いずれのワクチン株においても、ゲノム全体で100ヶ所前後の変異が検出された（星野株：102ヶ所、鳥居株：95ヶ所）。しかし、いずれの株でも水平感染例株で見出されたL遺伝子の変異部位に一致する変異は検出されなかった。しかし、全体のcoverageが低いため、バリエーションの含有率が数%以下の場合には検出されない可能性が高い。そこで、星野株について、ゲノムRNAをRT-PCRによって増幅したcDNAについてReplicon sequencingを試みた(図4C、図5B)。その結果、ゲノム全域にわたり平均で10,000リードを超える高いcoverageを得ることができた。しかし、水平感染例株に一致する変異は検出されなかった。それだけで無く、得られたバリエーションの頻度はRNA sequencingに比べて著しく低く、変異部位も1ヶ所を除いて、全く一致しなかった。しかも、両者で共通する1ヶ所の変異はアミノ酸置換を伴わないsilent mutationであった。こうした結果から、NGSによるディープシーケンシングの結果を評価するにはサンプル調製による結果へのバイアスをどのように排除するかを検討しなければ判断できないことが考えられる。今回の結果だけでは、ワクチン中に水平感染例株と同じ変異が含まれるかどうかは判断できないと考えられる。

D. 考察

今年度も昨年度に引き続き20ヶ所の地衛研から協力を得ることができた。2014年はムンプスの流行そのものが無かったために、報告例が来ないという施設がほとんどであった。それでも、5施設から27例のムンプスウイルスの検出情報を集めることができた。

これらの内、ワクチン株を除く野外株については全てが遺伝子型Gであり、2013年における国内流行は依然としてG型で占められており、いわゆる西日本型Gwのみが検出され、全国的にGw系統の寡占状態が更に進んでいることが示唆された。

昨年までの解析で検出されたワクチン株による水平感染例の3株について、中枢神経病原性をラットモデルで評価したところ、星野株由来株では元のワクチン株との有意差は認められなかつ

た。一方の鳥居株由来株では、元株に比べて有意に病原性が上昇していることが判明した。しかし、星野株由来株では、ラットにおける病原性が野外株と同程度に高く、これはラットモデルが必ずしもヒトでの病原性を正確に反映していないことを示唆するものであり、このモデルの限界を示すものである。今後は、水平感染の成立に影響が大きいと想定される、ウイルスの排出の程度や、感染力の強さなどを、別の感染モデル（例えばマウセット）などで評価する必要がある。

水平感染が発生するメカニズムを解明すると共に、そのリスクを評価するために、NGSを用いてワクチンに含まれるバリエーション解析を行った。その結果、水平感染例株と同じ変異は検出されなかったが、RNA sequencingによる解析ではcoverageが低いため低頻度のバリエーションは検出できず、また増幅したcDNAによるReplicon sequencingでは高いcoverageは得られたものの、RNA sequencingとの結果に齟齬が認められることから、前提となる解析方法の更なる検討が必要であることが明らかとなった。

E. 結論

- (1) 20ヶ所の地衛研の協力によって、27例のムンプスウイルス検出例を収集、解析できた。
- (2) 2014年の国内流行株は全てが遺伝子型Gw系統であった。
- (3) 水平感染例由来株のラットにおける中枢神経病原性を評価したところ、星野株由来株では有意差は認められず、鳥居株由来株では有意な上昇が認められた。
- (4) 2種類の国産ワクチンについてNGSを用いて水平感染例由来株と同じ変異を持つバリエーションウイルスの検出を試みたが、検出されなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

- 1) Katoh H, Kubota T, Kita S, Nakatsu Y, Aoki N, Mori Y, Maenaka K, Takeda M, Kidokoro M. Heat shock protein 70 regulates degradation of the mumps virus

phosphoprotein via the ubiquitin-proteasome pathway. 2014; J Virol. 2014 Dec 31. pii: JVI.03343-14.

- 2) Ohashi T, Nakamura T, Kidokoro M, Zhang X, Shida H. Combined cytolytic effects of a vaccinia virus encoding a single chain trimer of MHC-I with a Tax-epitope and Tax-specific CTLs on HTLV-I-infected cells in a rat model. Biomed Res Int. 2014; 2014: 902478.
- 3) Kidokoro M, Shida H. Vaccinia Virus LC16m8Δ as a Vaccine Vector applicable to Humans. 2014; Vaccines, 2, 755-771.

(和文)

なし

2. 学会発表

- 1) 木所 稔, 國吉香織, 清田直子, 横井 一, 佐野貴子, 皆川洋子, 中田恵子, 竹田 誠, ムンプスの国内サーベイランス網構築の試みと近年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55回日本臨床ウイルス学会学術集会 札幌 2014.6
- 2) 木所 稔, 落合 仁, 渡辺正博, 青木なつ子, 竹田 誠, 庵原俊昭, ムンプスワクチンによる

る水平感染疑い例由来ウイルスの解析, 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.11

- 3) 永田典代, 岩田奈織子, 鈴木忠樹, 高橋健太, 佐多徹太郎, 長谷川秀樹, 網 康至, 久保田耐, 加藤 篤, 田代真人, 竹田 誠, 木所 稔, 動物モデルを用いたムンプスウイルスの神経病原性に関する病理学的検討 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 2014.11
- 4) 木所 稔, 落合 仁, 渡辺正博, 竹田 誠, 庵原俊昭, ムンプスワクチンによる水平感染疑い例由来ウイルスの解析, 第18回日本ワクチン学会学術集会, 福岡, 2014.12

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

中村貴史, 木所 稔, 志田壽利, 他、「マイクロRNA制御組換えワクシニアウイルス及びその使用」、出願番号: PCT/JP2011/056693、2014年11月28日登録

2. 実用新案登録

木所 稔, 加藤大志、「ムンプスウイルスの弱毒化方法、ムンプスウイルス、及び、生ワクチン」、出願番号: 特願2014-244999号、2014年12月出願

3. その他: なし

3. 日本脳炎

乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンの接種動向に関する研究： 第3報（福岡市：平成26年度）

研究分担者：宮崎 千明（福岡市立心身障がい福祉センター長）

研究要旨 乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンは平成22年4月から接種勧奨が一部再開され、その後も勧奨の拡大が図られた。施策変更に伴うワクチン接種動向を、福岡市において継続的に調査を行ってきた。平成24年度と25年度の第1期、2期の接種数や接種時期に大きな変化はみられなかった。1期初回の接種率は勧奨差し控え前にほぼ戻ったが、第2期の接種率が十分でなかった。特例対象者への接種は平成24年度に比して25年度で低下した。急性散在性脳脊髄膜炎（ADEM）の報告頻度は117万回接種に1回以下であった。

A. 研究目的

乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンは、平成21年6月から市販され、1期の定期接種として用いられるようになった。平成22年4月以降、国は積極的勧奨を再開し、接種勧奨差し控え中に機会を逸した特例措置対象者（平成7年4月2日～平成19年4月1日生まれの者）に対して20歳未満まで定期接種で行える政令改正がなされた。

平成25年度は7～8歳の第1期初回接種と9～10歳の1期追加、および18歳での第2期接種が勧奨された。さらに、平成26年度は8～9歳の第1期接種と、18歳の第2期接種が勧奨された。

国の施策変更により予防接種動向がどのように変化したか、福岡市で本年度も調査し検討したので報告する。

B. 研究方法

福岡市における乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンの月別、期別、接種実数、対象者数を市の保健福祉局より提供を受け、調査、解析した。調査期間における1期接種対象年齢の福岡市の年間出生数は約13,000～14,000人だった。

また、福岡市立東部センターを平成26年4月～平成26年11月までに初めて受診した0～6歳の児167名における各定期接種ワクチンの接種を母子

手帳を元に調査した。

個人情報を取り扱わず、接種数のみをデータとして用いた。

C. 研究結果

図1に、福岡市における平成16年度から平成24年度末までの日本脳炎ワクチンの期別年間接種数の推移を示した。組織培養ワクチンの使用が始まった平成21年度～22年度に接種数が急増し、平成23年度以降は比較的安定し、平成24年度に比して平成25年度は若干減少した。

2期接種数は緩やかに回復していたが、24年度と平成26年度はほぼ同水準であった。

図2に実施率（接種対象数に対する接種数の割合）を示した。細胞培養ワクチンの発売後、平成22年からの積極的勧奨の再開に応じて実施率が急上昇し、見かけ上100%を越えた。平成23年度以降は実施率が落ち着きつつあるが、1期初回の実施率がなお100%前後であり、接種漏れ者がキャッチアップとして接種していることがわかる。

平成25年度の月別接種数をみると、4月～10月、特に7月～8月にかけて接種数がピークを示し、秋から冬に接種数が減少するが、年度末の3月に接種が上昇する傾向がみられた（図3）。

第2期接種は8月にピークを作り、第1期より

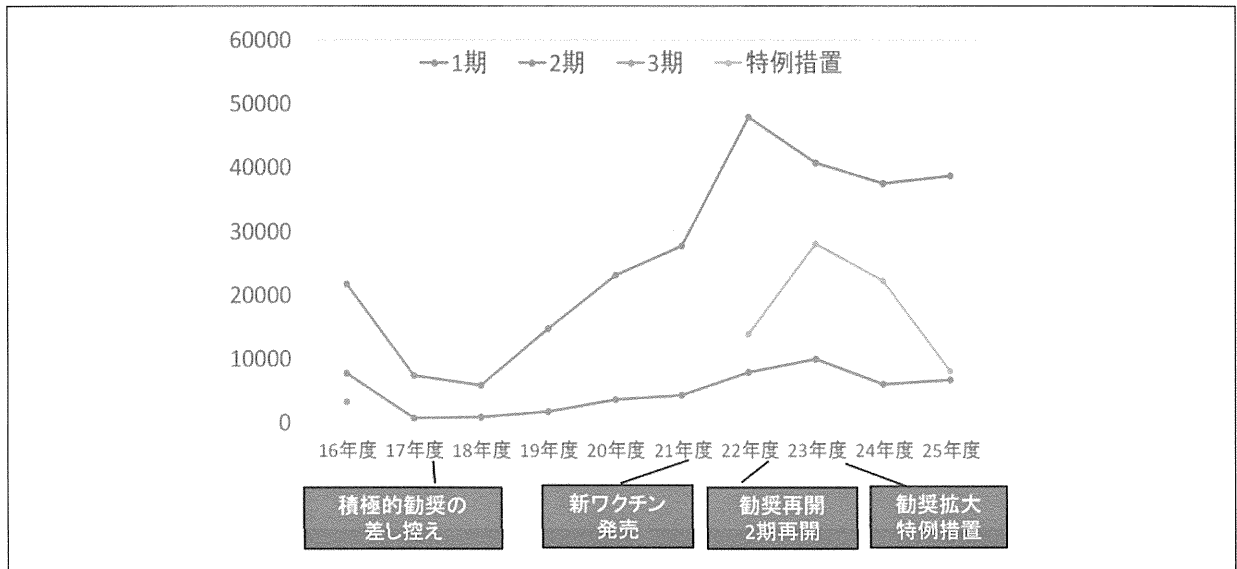


図1 福岡市における日本脳炎ワクチンの接種実数施策変更との関連 平成16～25年度

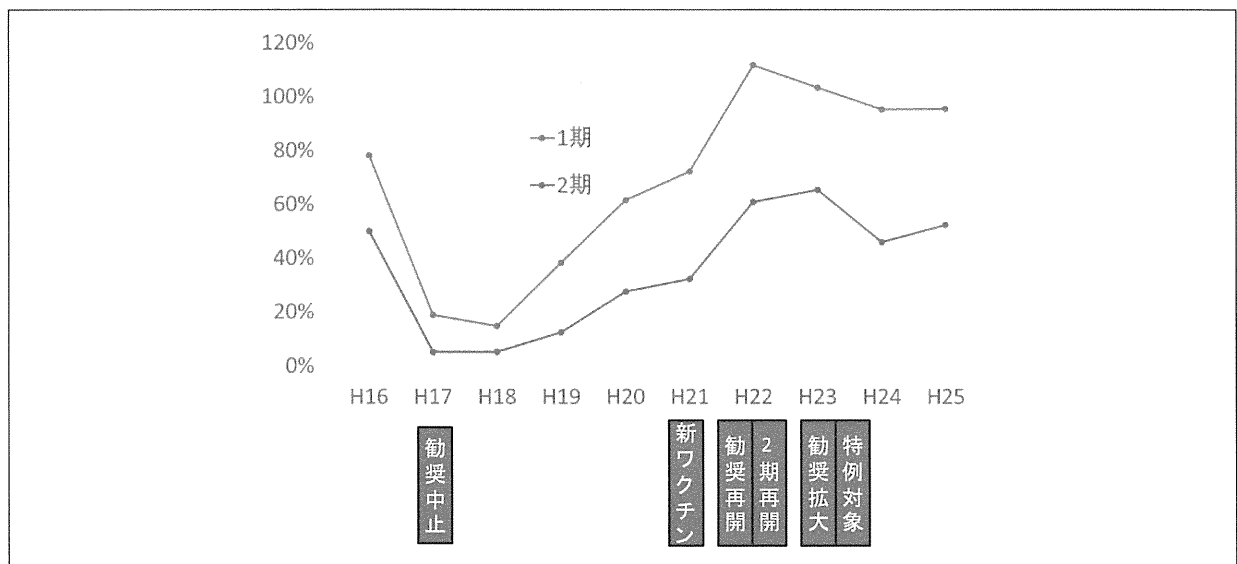


図2 福岡市における日本脳炎ワクチン実施率 H16～ H25年度

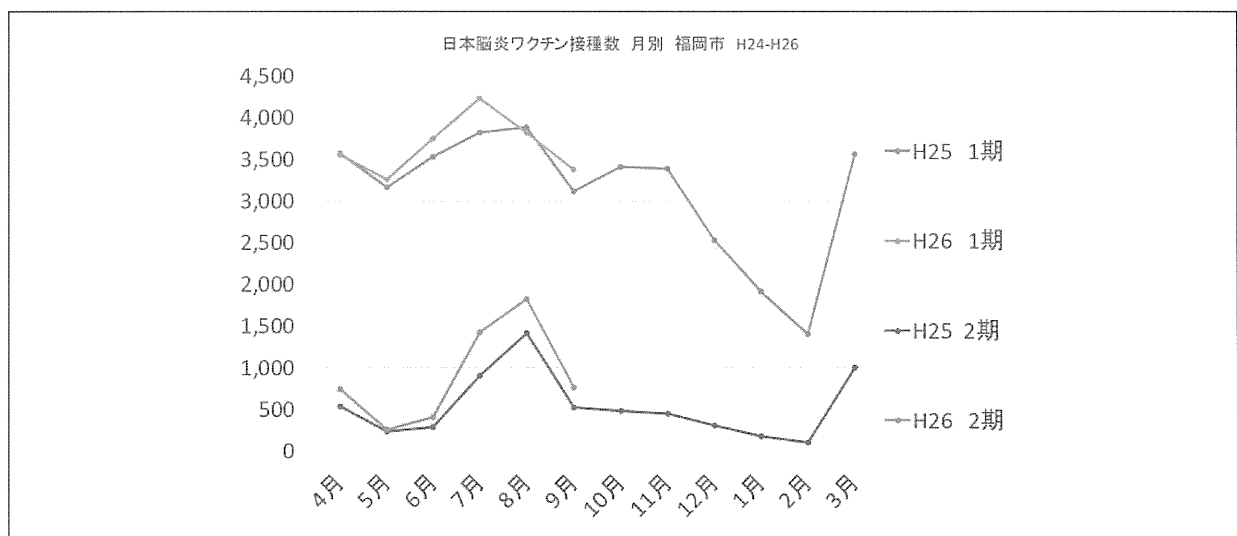


図3 福岡市における1期・2期接種 月別接種数 H25～ H26年度上半期

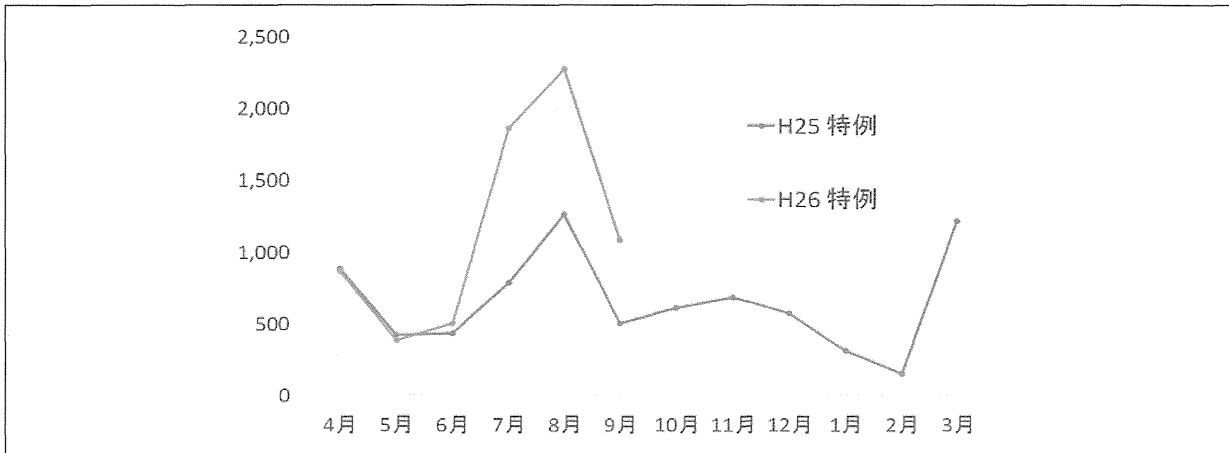


図4 特例対象者における月別接種 H24～H26年度(平成7年4月2日～平成19年4月1日生まれの者)

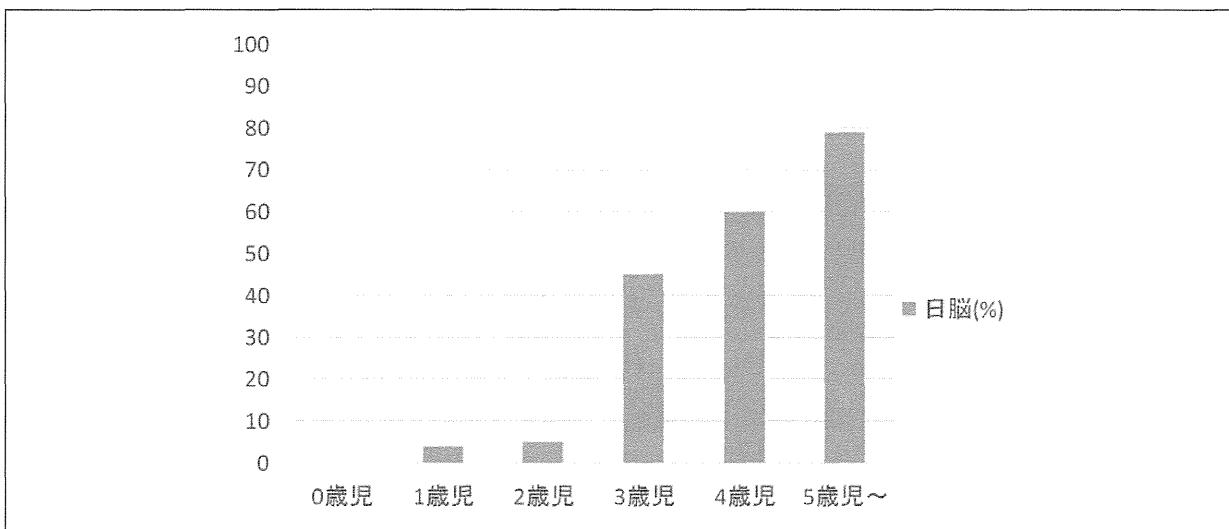


図5 福岡市H療育センター外来受診児の年齢別日本脳炎ワクチン接種率(%) H26年度 福岡 n=167

短い期間に集中する傾向があった。

図4に、特定対象者(平成7年4月2日～平成19年4月1日生まれの者)に対する接種を示した。全体的に接種数が少ないこと、8月に接種が集中することが判明した。

図5に平成25年度(4月～11月まで)の暫定接種数を示した。第1期は通年的に接種されるようになり、第2期接種や特例対象者の接種が少なく、かつ、8月に集中し、接種が短期間に限られる傾向が続いていた。

実施率や接種数だけでは実際の接種動向を把握するため、そこで、福岡市立東部療育センターを平成26年4月から11月までに初めて受診した新患児(0～6歳)の日本脳炎ワクチンの接種歴を調査し、図5に示した。3歳未満での接種はほとんどなく、3歳で45%、4歳で60%、5歳以上で78%の接種率であり、第1期の接種率はまだ回復

し切れておらず、かつ接種開始年齢が遅かった。

厚生科学審議会予防接種ワクチン分科会副反応報告部会の複数の資料を表1にまとめた。ADEMの報告頻度(有害事象)は年によってばらつきが大きいですが、平均では117万接種に1例以下であった。

D. 考察

表2に平成17年5月以来の国の施策変更をまとめた。平成22年4月以来毎年接種勧奨対象年齢が拡大した。平成25年度には、7～8歳の第1期初回と9～10歳の第1期追加、および18歳での第2期接種が勧奨された。

2005年5月の日本脳炎ワクチンの積極的勧奨差し控え後10シーズンが経過した。

乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンは平成21年6月から1期接種のみに定期接種が認められ、平成22

表1 新ワクチンでのADEM報告頻度 副反応報告と薬事法に基づく報告の合計 2009 (H21)年6月～2014 (H26)年9月末

	報告数	接種回数	報告頻度
2009 (H21)年度	0	152万6,771	0
2010 (H22) 年度	3	436万7,716	146万回接種に1例
2011 (H23) 年度	7	561万1,321(推定)	80万回接種に1例
2012 (H24) 年度 (9月末)	1	294万5,263(推定)	295万回接種に1例
2013 (H25) 年度 ～	6	547万7,097(推定)	92万回接種に1例
平成26年度(9月末)			
合計	17	1992万8,160(推定)	117万回接種に1例

備考
・副反応報告と薬事法に基づく報告を合わせた数
 ・接種日を基準に分類・重複例、取り下げ例を除く
 ・平成25年度と平成26年度症例は副反応検討部会資料を参照。うち2例は他のワクチンとの同時接種
 ・平成21年度は旧ワクチンの実績(2か月分)を含む
 ・平成23年度および平成24年度(9月末まで)は、平成22年度の出荷数と接種者数の比を用いて計算した数値
 ・平成25年度以降は医療機関への納入数量を接種回数として計上

厚生科学審議会 予防接種・ワクチン分科会 副反応検討部会資料等より

表2 まとめ

- ・乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンは積極的勧奨再開され、キャッチアップ接種も進み、実際の接種動向を福岡市で継続的に調査した。
- ・平成24年度と25年度の第1期、2期の接種数や接種時期に大きな変化はみられなかった。
- ・1期初回の接種率は勧奨差し控え前にほぼ戻ったが、2期の接種率が十分でなかった。
- ・特例対象者への接種は平成24年度に比して25年度で低下した。
- ・厚生労働省による平成24年度の健康状況調査報告の公開が遅れており、発熱や局所反応等の通常起こりうる副反応について本年度は新たな解析ができなかった
- ・予防接種・ワクチン分科会副反応報告部会資料等によれば、乾燥細胞培養ワクチン接種後にみられる急性散在性脳脊髄膜炎(ADEM)の報告頻度は117万回接種に1回以下であった。
- ・乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンは、海外でも臨床試験が行われた。我が国の承認前、市販後調査と同様、マウス脳由来ワクチンと比較して、抗体産生が良く、局所反応は低いが、1期初回接種のみ発熱率がやや高い傾向が示された。

年4月に3歳の第1期初回に積極的勧奨を再開、2期にも定期接種が可能になった。また、積極的勧奨を差し控える間に接種できなかった者に、1期の接種回数の残り回数を1期、または2期の定期接種年齢の間に定期接種できる施策がとられた。平成23年度には特例対象者(平成7年4月2日～19年4月1日生まれ)に20歳未満まで定期接種を可能とする政令改正が行われた。

福岡市において平成25年と平成26年上半年期の接種動向をみると、平成24年度と25年度の第1期、2期の接種数や接種時期に大きな変化はみられなかった。1期初回の接種率は勧奨差し控え前にほぼ戻ったが、2期の接種率が十分でなかった。特例対象者への接種は平成24年度に比して25年度で低下した。キャッチアップ接種が一段落して落ち

着いてきている。見かけ上の予防接種実施率は1期で高く保たれているが、接種を差し控えていた者も落ち込み分をほぼ取り戻したに過ぎない。平成26年度の小児の年齢別接種率を見てもわかるように、第1期の実質的な接種率は、3歳で約50%、4歳で約60%、5歳で約80%と、接種開始年齢が遅く、かつ最終的な接種率も決して高くないので、今後も積極的な勧奨が必要と思われる。

マウス脳由来ワクチンの積極的勧奨の差し控える直接的な原因になった日本脳炎ワクチン接種後のADEMに関しては、副反応報告(正確には有害事象報告)

E. 結論

表2にまとめを示した。乾燥細胞培養日本脳炎

参考) 日本脳炎の積極的勧奨の差し控えに対する平成27年度の
対応について(案) H27.1.9 基本方針部会

1. 第1期の予防接種について

積極的な接種勧奨を差し控えていた平成17年度から平成21年度の間3歳又は4歳になった者(以下「対象者」という。)については、第1期の初回接種及び第1期の追加接種(以下「1期接種」という。)が十分に行われていないことから、平成23年度から1期接種の不足分として、積極的な勧奨を行ってきたが、平成26年度末で対象者への積極的な勧奨は終了する。

2. 第2期の予防接種について

平成27年度に18歳となる者(平成9年4月2日から平成10年4月1日までに生まれた者)については、第2期の予防接種(以下「2期接種」という。)が十分に行われていないことから、平成27年度中に、第2期接種の不足分について、積極的な勧奨を行う。

3. その他

積極的勧奨の差し控えが行われた期間に、定期の予防接種の対象者であった者のうち、1期接種を完了していた者に対しては、市町村長等が実施可能な範囲で、2期接種の積極的な勧奨を行っても差し支えない。

ワクチンは、接種勧奨の拡大に応じて接種数が増加しているが、第2期接種や特例対象者の接種はなお低迷している。さらなる勧奨が必要である。また、参考として表3に平成27年度の国の接種方針を挙げた。

F. 研究発表(日本脳炎関連分)

1. 論文発表(原著)

- 1) Miyazaki C, Okada K, Ozaki T, et al.: Phase III clinical trials comparing the immunogenicity and safety of Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine ENCEVAC® with those of mouse brain-derived vaccine using the Beijing-1 strain. *Clinical Vaccine Immunology* 21(2): 188-195, 2014
- 2) 古藤雄大, 岡部里香, 宮崎千明, 稲垣次郎, 山岸義晃, 田辺拓也, 永井利三郎: 特別支援学校に在籍する小児の予防接種実施状況に関する調査(第2報) - 予防接種に関する養育者の要望 - . *小児保健研究*. 73(5): 721-727, 2014

2. 論文発表(総論)

- 1) 宮崎千明: 予防接種の最新情報. *小児保健研究* 73(2): 193-197, 2014
- 2) 宮崎千明: 予防接種の現状と今後の展望. *臨床と研究*. 92(11): 103-108, 2014
- 3) 宮崎千明: 小児疾患臨床のための病態生理1(第5版)日本脳炎. *小児内科46増刊号*: 1027-1030, 2014
- 4) 宮崎千明: 日本脳炎ワクチンの接種法. *小児*

- 科ピクシス4全面改定版予防接種. 五十嵐隆, 渡辺博編集, 中山書店, 東京, 2014, p210-211
- 5) 宮崎千明: 日本脳炎ワクチンの副反応. *小児科ピクシス4全面改定版予防接種*. 五十嵐隆, 渡辺博編集, 中山書店, 東京, 2014, p212-214
- 6) 宮崎千明: 日本脳炎の流行状況. *小児科ピクシス4全面改定版予防接種*. 五十嵐隆, 渡辺博編集, 中山書店, 東京, 2014, p214-215
- 7) 宮崎千明: 乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンの効果. *小児科ピクシス4全面改定版 予防接種*. 五十嵐隆, 渡辺博編集, 中山書店, 東京, 2014, p216-217
- 8) 宮崎千明: 日本脳炎ワクチン未接種者への対応. *小児科ピクシス4全面改定版予防接種*. 五十嵐隆, 渡辺博編集, 中山書店, 東京, 2014, p218-219
- 9) 宮崎千明: 予防接種 - 副反応 -. *小児科研修ノート改訂第2版*, 永井良三, 五十嵐隆他編集, 診断と治療社, 東京, 2014, p296-298

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

文献

厚生労働省の日本脳炎ワクチンに関する政令改正、省令改正、諸通知文書を適宜参照した。

4. ポリオ