

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 庵原俊昭：ムンプスウイルス. 小児感染症学会編, 小児感染症マニュアル, 東京医学社, 東京, 304-311, 2012
- 2) 庵原俊昭：ムンプスワクチン. 小児科学レクチャー 2: 365-370, 2012
- 3) 庵原俊昭, 落合 仁：ムンプスワクチン-合併症に対する予防効果. 小児科診療75: 121-125, 2012
- 4) 庵原俊昭：ムンプス. 小児科 54: 1753-1760, 2013
- 5) 落合 仁, 庵原俊昭：2度の水痘流行を経験した保育園における水痘ワクチンの効果の検討. 日本小児科医会会報 46: 159-162, 2013
- 6) 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
- 7) 庵原俊昭：ウイルス感染症に既罹患か否か検査を行うのはCF法, HI法, EIA法のどれがよいですか？ 田原卓浩総編集, 総合小児医療「プライマリ・ケアの感染症」, pp38-41, 2013 中山書店, 東京
- 8) 庵原俊昭：水痘ワクチンが定期接種となると聞きました. 対象年齢や回数, 接種医として知っておくべき注意点などを教えて下さい. ワクチンジャーナル 2: 22-23, 2014
- 9) 庵原俊昭：ワクチンによる感染予防. 日本医師会雑誌 143(2): S40-S45, 2014
- 10) 庵原俊昭：ウイルス感染症の検査法. JOHNS 30: 1545-1548, 2014
- 11) 庵原俊昭, 落合 仁：ムンプスワクチン：定期接種化への流れ. 臨床とウイルス 42: 174-182, 2014
- スワクチン・水痘ワクチンの有効性の検討. 第53回日本臨床ウイルス学会（豊中, 2012年6月）
- 3) 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（倉敷, 2013年6月）
- 4) 菅 秀, 浅田和豊, 庵原俊昭：家族内感染による水痘罹患に伴った劇症型溶連菌感染症の1乳児例. 第54回日本臨床ウイルス学会（倉敷, 2013年6月）
- 5) 庵原俊昭：日本で開発された水痘ワクチンが果たしてきた役割と今後の期待. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会（札幌, 2013年10月）
- 6) 庵原俊昭：ムンプスワクチン：定期接種化への流れ. 第117回日本小児科学会（名古屋, 2014年4月）
- 7) 落合 仁, 庵原俊昭, 菅 秀：水痘ワクチン緊急接種有効性の検討. 第117回日本小児科学会（名古屋, 2014年4月）
- 8) 庵原俊昭：ムンプスワクチン接種の意義～ワクチンのリスク・ベネフィットと将来展望～. 第55回日本臨床ウイルス学会（札幌, 2014年6月）
- 9) 庵原俊昭, 菅 秀, 落合 仁, 渡辺正博, 二井立恵：各種水痘抗体価測定方法の互換性の検討. 第55回日本臨床ウイルス学会（札幌, 2014年6月）
- 10) 庵原俊昭：水痘ワクチン：開発から定期接種化まで. 第19回大阪小児感染症研究会（大阪, 2014年10月）
- 11) 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年12月）

### 2. 学会発表

- 1) 庵原俊昭, 菅 秀, 落合 仁：保育園流行時における水痘ワクチン有効性の検討. 第17回東海ヘルペス群ウイルス感染症研究会（名古屋, 2012年3月）
- 2) 庵原俊昭, 菅 秀, 浅田和豊：専門学校生におけるムンプス・水痘の血清疫学とムンプ

## 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

## 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

研究分担者：吉川 哲史（藤田保健衛生大学医学部教授）

研究協力者：河村 吉紀（藤田保健衛生大学小児科）

藤田 彩乃（藤田保健衛生大学小児科）

飯田 史（藤田保健衛生大学小児科）

大橋 正博（豊川市民病院小児科）

加藤 伴親（豊川市民病院小児科）

**研究要旨** 水痘ワクチンの追加接種の適切な接種間隔を明らかにするため、本学ならびに豊川市民病院の予防接種外来を受診した健康小児を対象に、水痘ワクチンの2回接種を実施し、接種間隔と免疫反応の関連について解析した。追加接種後抗体は、IAHA法、gp-ELISA法ともに全例陽転であった。また追加接種後抗体価は初回接種後抗体価に比較し高い抗体価（ブースター効果）を示した。ただし、接種間隔が3～4ヵ月と短い群が、8～13ヵ月群と比較して追加接種後のgp-ELISA抗体価が低い傾向が見られた。細胞性免疫能については皮内テストで評価したが、接種間隔による皮内抗原検査結果の比較では、発赤径の大きさ、陽性率ともに両群間で差は認めなかった。また全例で、初回接種、追加接種ともに特に問題となる副反応はなかった。

### A. 研究目的

平成26年秋から、念願の水痘ワクチン定期接種化が決定された。定期接種化に伴い、高い接種率の達成と十分な感染防御能の誘導には、MRワクチンとの同時接種に加え水痘ワクチン2回接種が必須である。我々はこれまで厚生労働科研の分担研究として、MRワクチンと水痘ワクチンの同時接種の効果と安全性について評価し、その結果を報告した（大橋正博ら、日児誌、2013、117;1416-1423）。本研究では、引き続き重要な課題である水痘ワクチン2回接種の適切な接種間隔の決定、およびその効果、安全性を評価することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1. 対象

大学病院および豊川市民病院小児科へ水痘ワクチン接種を希望して来院した患児の中で、水痘ワクチン2回接種に同意した1歳以上の健康小児と

した。

#### 2. 方法

2回のワクチン接種前、接種4週間後に血清3mlを採取しウイルス抗体価の推移を評価するとともに、4回目の採血時（2回接種の4週間後）に水痘細胞性免疫を評価するため水痘抗原皮内反応検査を実施した。2回のワクチン接種間隔は3から12ヵ月とし、副反応については、記録用紙を用いて保護者に4週間記録を依頼した。

#### 検査項目

- ① 血清中水痘ウイルス抗体価測定：IAHA法、gp-ELISA法を使用。（抗体測定は採血後分離した血清を本学にて連結可能匿名化し、ID番号をつけた上で阪大微生物病研究会、観音寺研究所へ送り測定）
- ② 水痘皮内抗原検査：市販の水痘抗原を皮内注射し24時間、48時間後の発赤径を測定し評価した。

- ③ 副反応調査：記録用紙を保護者へ渡し、接種後1ヵ月間観察。調査項目：体温測定、発疹の有無など。
- ④ 接種1年後、2年後の水痘罹患調査：往復はがきによる調査。調査項目：罹患時期、発疹数、発熱の有無、感染源、治療の有無。

(倫理面の配慮)

以下のような対策を講じ、本学倫理審査委員会で本研究計画は承認された (No.12-018)。

- ① プライバシー保護：登録された患者の個人情報、名前が特定される形では公表されない。連結可能匿名化により個人情報を保護する。対照表は暗号化した上で、パスワードにて管理されたエクセルファイルにて管理する。検体輸送に際し、検体ラベルにはコード番号のみを記載し、別に保管した対照表を基に主任研究者のみ連結化が可能となるような形をとる。
- ② 予想される利益と不利益：被験患児に対する利益としては、VZVに対する免疫の付与がある。不利益及び危険性：水痘ワクチンおよび水痘皮内抗原は実際に臨床現場で使用されているものであり、危険性はない。不利益としては、接種前後に抗体反応、細胞性免疫能評価のため皮内検査を実施されることがあげられる。
- ③ 利益相反：本研究において利益相反はない。使用する水痘ワクチンは研究費で購入し被験者へ無償供与される。研究費は厚生労働科学研究費を使用する。
- ④ 説明と同意：本研究の実施に際しては、説明文書に従い保護者へ説明を行い、自由意志に基づく同意が得られた上で行なう。
- ⑤ 検体の再利用：本研究以外に検体の使用はしない。研究終了後廃棄する。

### C. 研究結果

平成27年1月31日までに47名の被験者に水痘ワクチンを接種し、そのうち34名で追加接種が完了した。現段階で全ての抗体価測定結果が得られた33名についての結果を示す。

表1

症例	接種間隔(月)	初回接種				
		Pre		Post		
		IAHA	gp <sup>-</sup> ELISA	IAHA	gp <sup>-</sup> ELISA	
A群 n=11	1	3	<2	<50	32	909
	2	3	<2	<50	8	198
	3	3	<2	<50	16	280
	4	3	<2	<50	16	116
	5	3	<2	<50	<2	<50
	6	3	<2	<50	16	98
	7	3	<2	<50	16	64
	8	3	<2	<50	32	407
	9	4	<2	<50	<2	116
	10	4	<2	<50	64	613
	11	4	<2	<50	4	109
陽性率 (%)					81.8	90.9
B群 n=12	12	5	<2	<50	64	719
	13	5	<2	<50	n.d.	79
	14	5	<2	<50	<2	<50
	15	5	<2	<50	<2	<50
	16	6	n.d.	<50	64	630
	17	6	<2	<50	16	371
	18	6	<2	<50	16	198
	19	6	<2	<50	<2	<50
	20	6	<2	<50	-	-
	21	6	<2	<50	16	236
	22	6	<2	<50	8	79
	23	7	<2	<50	<2	<50
陽性率 (%)					60.0	63.6
C群 n=10	24	9	<2	<50	<2	<50
	25	10	<2	<50	32	364
	26	10	<2	<50	32	119
	27	11	<2	<50	8	74
	28	11	<2	<50	32	89
	29	11	<2	<50	32	186
	30	12	<2	<50	16	82
	31	12	<2	<50	<2	<50
	32	12	<2	<50	<2	<50
	33	14	<2	<50	<2	118
陽性率 (%)					60.0	70.0

n.d.: not determined

## 1. 水痘抗体価

### 1) 初回接種時の水痘抗体価の推移

初回接種後IAHA法では31例中21例(67.7%)、gp-ELISA法では32例中24例(75.0%)で抗体陽転した。

### 2) 追加接種時の水痘抗体価の推移

追加接種前には7例でIAHA法、gp-ELISA法の両方で検出感度以下であった。さらに、追加接種により全例がIAHA、gp-ELISA法ともに抗体陽性となった。

表2

	症例	追加接種				Skin test (mm)
		Pre		Post		
		IAHA	gp-ELISA	IAHA	gp-ELISA	
A群 n=11	1	32	369	64	6125	8
	2	32	126	64	4140	22
	3	<2	97	8	709	11
	4	<2	81	64	3969	15
	5	<2	<50	128	9749	5
	6	<2	88	32	3576	12
	7	4	169	64	3730	5
	8	<2	296	128	10447	10
	9	<2	56	32	2687	4
	10	16	380	64	3824	8
	11	n.d.	99	128	7497	15
陽性率(%)		40.0	90.9	100	100	
B群 n=12	12	8	627	≥256	21543	12
	13	<2	65	128	9972	6
	14	n.d.	195	128	4081	10
	15	<2	<50	64	4776	1
	16	4	304	≥256	22818	15
	17	<2	182	64	5708	13
	18	<2	144	32	5138	3
	19	<2	50	32	2518	4
	20	<2	101	64	4176	10
	21	<2	135	16	1375	-
	22	<2	170	128	14628	15
23	8	539	64	6007	15	
陽性率(%)		27.3	91.7	100	100	
C群 n=10	24	<2	152	32	2578	4
	25	<2	399	64	4749	7
	26	n.d.	666	128	8666	0
	27	4	258	≥256	17393	10
	28	8	984	64	5778	7
	29	<2	685	32	4290	12
	30	<2	401	128	8323	25
	31	<2	<50	-	-	7
	32	<2	<50	32	1997	9
	33	<2	243	128	10296	3
陽性率(%)		22.2	80.0	100	100	

n.d.: not determined

表3

Sampling time		IAHA (log 2)		
		Month since dose 1		
		A群 3-4month	B群 5-7 month	C群 8-13month
1 dose	Before	All Negative	All negative	All negative
	After	3.4±2.0	2.7±2.5	3.0±2.5
2 doses	Before	1.6±2.2	0.7±1.3	0.7±1.6
	After	5.8±1.2	6.4±1.5	6.6±1.4

表4

Sampling time		p value		
		A vs. B	B vs. C	A vs. C
1 dose	After	0.57	0.53	0.56
	Before	0.47	0.56	0.29
2 doses	After	0.49	0.53	0.24

表5

Sampling time		gp-ELISA (log 10)		
		Month since dose 1		
		A群 3-4month	B群 5-7 month	C群 8-13month
1 dose	Before	All negative	All negative	All negative
	After	2.3±0.4	2.1±0.5	2.1±0.4
2 doses	Before	2.1±0.3	2.2±0.4	2.4±0.5
	After	3.6±0.3	3.8±0.4	3.9±0.3

表6

Sampling time		p value		
		A vs. B	B vs. C	A vs. C
1 dose	After	0.40	0.54	0.36
	Before	0.45	0.39	0.28
2 doses	After	0.23	0.52	<b>0.04</b>

### 3) ブースター効果

接種間隔毎のブースター効果を比較した結果、A群3~4ヵ月間隔、B群5~7ヵ月間隔、C群8~13ヵ月のいずれにおいてもIAHA法では、3群間に有意な抗体価の差は認めなかった。一方、gp-ELISA法では、C群の平均値がA群に比べ有意に高値となった。

表7

判定結果	Skin test		
	Month since dose 1		
	A 群 3-4month	B 群 5-7 month	C 群 8-13month
(-)	1	3	2
(+)	4	1	5
(++)	6	8	4
発赤長径(mm)	10.5±5.4	9.8±5.2	8.5±6.3
陽性率	90.9%	75.0%	81.8%

## 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したがい、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%の陽性率であった。

## 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ヵ月をめぐりに調査した。10名について回答を得た。観察期間は12ヵ月~20ヵ月。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ヵ月間隔で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ヵ月と短い群が、8~13ヵ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ヵ月の間隔を開け、感染リスクの低い児であれば6ヵ月から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

## 水痘の流行解析のための血清学・免疫学検査法の改良とワクチン製剤の分析

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）

（H24-25年：国立感染症研究所ウイルス第一部・室長）

**研究要旨** 弱毒性水痘ワクチン（Oka株）は安全性・有効性に優れたワクチンであり、26年度秋から定期接種となった。水痘ワクチン接種後の抗体陽転率の低下が近年疑われているが、製剤の物理化学的特性や遺伝子レベルで変化していないことを示した。また、小分け製品を出発材料に長期に培養細胞で継代するとワクチンの遺伝子構成が変化することから、海外と本邦の製品の遺伝子構成差が製造過程でのウイルス培養条件による可能性を示唆した。ワクチン接種者における水痘（breakthrough水痘）発生に対して、水痘の感染防御の詳細な理解が必要であるため、水痘带状疱疹ウイルス（VZV）特異的細胞性免疫の標的となる抗原を検索した結果、ORF61、ORF63などに対し多くの成人ボランティア末梢血で反応が見られた。血清学検査にはVZV感染細胞ライセートが用いられているが、VZVがコードする糖蛋白E（gE）とgB発現細胞のライセートを用いる検査で同等の感度があった。

### A. 研究目的

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いる。弱毒生水痘ワクチン（Oka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。米国をはじめとした多数の国においては、水痘ワクチンの定期化により、罹患者数・入院者数・死亡者数の激減が、すでに実証されている。26年度秋より、本邦においても水痘ワクチンが定期接種となったことで、同様の効果が期待される。

近年、水痘ワクチン接種後の抗体陽転率が低下しているとの危惧があることに対して、20年以上に亘って製造されてきたワクチン製剤の物理化学的特性や遺伝子レベルでの同質性の検証を行った。また、海外データとの比較のために、同一株由来である海外製品との遺伝子レベルでの比較や差異の原因について検討を行った。

ワクチン接種者における水痘（breakthrough水痘）の発生は、2回接種を的確に行うことによ

り減少可能であるが、breakthrough水痘のリスク要因は明確になっていない。また、加齢に伴う細胞性免疫の減弱により带状疱疹が発症する（Burke他1982）のに対して、ワクチン接種により細胞性免疫の増強が可能であることが示され（Takahashi他2003; Oxman他2008）、米国においては、水痘ワクチンと同じOka株を用いた带状疱疹ワクチンが承認されている。水痘の感染防御の主体は、水痘带状疱疹ウイルス（VZV）初感染1-2週後より出現するVZV特異的細胞性免疫である（Arvin他1982）、しかしながら、感染防御に重要な細胞性免疫の標的となっている抗原・エピトープの解析は限られており、網羅的に標的抗原を検討した研究は過去にないので、本研究では細胞性免疫の主要な抗原・エピトープの探索を行った。

現在検査センターなどで用いられるVZVに対するIgG測定用のELISA製品は、全て抗原として、感染細胞を用いている。このため、他のヘルペスウイルスなどと弱い交差反応があり、時として、陰性者において判定保留となるグレーゾーン

の結果を起こすことがある。そこで、VZVの特定の蛋白のみを発現させて、感度と特異性を向上させることができないかを検討した。

## B. 研究方法

### 1. VZVの力価測定

牛胎児血清 (FBS) 添加MEM培地で培養したヒト二倍体細胞にVZV感染、メチルセルロース重層条件で7日間培養、固定染色後、プラークを計数し力価を決定した。

### 2. VZVの抗原量・DNA量測定

抗原量は、最終製品をELISA用プレートにコーティングし、IE62及びgEに対するモノクローナル抗体、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体を順次反応後、発色反応を行い、吸光度を測定した。総蛋白量は、ローリー法により求めた。感染細胞、最終製品、もしくはDNase処理後の最終製品からQIAamp DNAm mini kit (QIAGEN) を用いてDNAを精製した。VZV DNA量や細胞DNA量は、TaqMan PCR法を用いて定量した(Fukui他2009)。

### 3. 感染細胞・遺伝子導入細胞からの抗原調製

ワクチン株V-OkaのゲノムDNAより、各ORFに対応するDNA断片をPCRで増幅し、pcDNA3にクローニングした。血清学検査に、以下のORFをコードするプラスミドを用いた：ORF4、9A (gN)、14 (gC)、16、31 (gB)、37 (gH)、40、44、50 (gM)、60 (gL)、61、62、63、66、67 (gI)、68 (gE)。細胞性免疫反応性の検討には、以下のORFをコードするプラスミドを用いた：ORF4、8、16、29、33、36、43、44、48、61、62、63、66。

293T細胞にリン酸カルシウム法を用いて発現ベクターDNAを導入し、2日間培養後、細胞を回収した。細胞性免疫の抗原として用いる場合には、核画分を調製した。細胞もしくは核画分を凍結融解・超音波破碎後、遠心した上清を抗原として用いた。

モルモット線維芽細胞GPLを10%FBS添加F12培地にて培養し、ワクチン株をMOI 0.01程度で感染後7日目に細胞を回収した。

### 4. VZV特異的細胞性免疫能の定量

神戸大森 康子先生らの方法 (Sadaoka他2008) を元に、以下の条件で定量を行った。抗ヒトインターフェロン (IFN)  $\gamma$  抗体をコーティングした疎水性PVDFフィルターのプレート (IP) に、末梢血単核球と各種の抗原を加えて、38時間培養した。培養液を除き、プレートをブロッキングした後、ビオチン標識ヒトIFN  $\gamma$  抗体、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンと順次反応させ、TMBにより発色させた。陽性対照としてPHA、陰性対照として未感染細胞抽出液、もしくは、空ベクターを遺伝子導入した293T細胞の核抽出抗原を用いた。スポット数は実体顕微鏡下で計数した。なお、末梢血単核球は、Lymphosepar で分離後、 $1 \times 10^7$  cells/mlにセルバンカーに懸濁後 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存したものを融解して用いた。

### 5. 血清学検査

デンカ生研社のウイルス抗体EIA「生研」水痘IgGを市販キットとして用いた。蛍光抗体法 (IFA) 用には、VZV感染Vero細胞をスライドに塗布したデンカ生研製品を用いた。いずれも、製品添付書の条件で、反応を行った。

遺伝子導入細胞を用いたELISAは、 $1 \mu\text{g}/\text{well}$ で抗原をコート後、一般的条件で実施した。また、IFA用には遺伝子導入及び未導入の細胞を滴下し乾燥後アセトンで固定したスライドを用意した。

### 6. ワクチン株と野生株の分別

感染研「病原体検査マニュアル」に記載したPCR産物の制限酵素切断によるRFLP法を標準として用いた。新たに検討したnested PCR法には、3'端配列がワクチン株と野生株で異なるプライマーを4種類用意した。

(倫理面への配慮)

本研究は材料として健常人ボランティアから得たヒト末梢血を使用した。国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査会において承認された内容に則り、採血の際に十分な説明を行った上で同意を得た。また、検体から個人が特定できないように検体を管理することで、個人情報の保護に配慮して研究が実施された。

## C. 研究結果

### 1. ワクチン製剤の同質性の解析

水痘ワクチン製剤が承認・販売後25年間製造に用いられた6つのワーキングシード由来の12の小分け製品ロットにおいて、1ドーズ中の総蛋白量、抗原量、ウイルス力価、ウイルス粒子中DNA量、フリーのDNAも含めたウイルスDNA量、混入している細胞由来のDNA量のいずれも、平均のほぼ2倍以内の増減の範囲であり、特段の減少もしくは増加するトレンドは見られなかった。アジュバントとして作用する可能性のある細胞DNA量も少なく量的変化もなかった。

また、遺伝子レベルでワクチン株と親株とで差のあることが知られる42塩基配列部位のうち、mix populationとなっている部位を中心に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、全ての部位で遺伝子構成が一致していた。一方、メルク社製剤との間には一部配列の違いが見られた。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収束していた。

小分け製剤を出発材料として長期培養した場合、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結果を得た。

### 2. 特異的細胞性免疫の標的抗原の同定

感染防御のマーカーとなる特異的細胞性免疫反応を誘導するVZV抗原を同定するため、293T細胞に核内局在性を有する13種類のVZV蛋白を個別に発現させ、核画分を抗原として、IFN $\gamma$ を産生する末梢血単核球中の応答細胞数をELISPOT法で求めた。成人20名のボランティアを検討した結果、75%以上の成人がORF8、61、62、63、66の各蛋白に強い反応性を有し、中でもORF61及びORF63に対して強い反応が見られた。反応ドメインの解析により、ORF61のアミノ酸配列348-378の領域に強いエピトープがマップされた。

### 3. 遺伝子発現VZV抗原を用いたELISAの検討

VZVの特定蛋白のみを発現させて、血清学検査の感度と特異性を向上させることができないか

を検討した。ウイルス粒子表面に発現する8種類の糖蛋白、および感染細胞で発現量が多いものや潜伏感染時にも発現が知られるものなど8種類の蛋白を抗原として、ELISAを行った。gE及びgHについては、それぞれgI及びgLと複合体を形成するため、これらについては複合体として発現させた細胞抽出液も検討した。比較として、市販のデンカ生研のキットを用いた。市販キットでは、成人ボランティア36人の血清検体中、30検体が陽性、4検体が判定保留、2検体が陰性であった。一方、16種類のVZV抗原のうち、gB、gC、gE、gE/gI、gH/gL及びORF62蛋白を抗原とした場合のみ、陽性反応が見られた。最終的に、gB及びgEを抗原としたELISAの結果が比較的良好であり、gBとgEの両者を抗原とすると市販キットと高い相関が見られた。

### 4. ワクチン株と野生株のPCR分別法の検討

定期接種化に伴って、ワクチン接種直後及び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どうかを明確にすることが求められる機会が増加すると思われる。水疱内容液を用いれば、1回のPCRで十分なDNA産物を得ることができるが、髄液や血液検体では、ウイルス量が少なくnested PCRが必要となることもあり、現行のRFLP法では対応できない場合がある。そこで、nested PCRを実施する際に、ワクチン株と野生株で異なる配列を3'端にもつプライマーをデザインする工夫により、1st PCR産物の精製や制限酵素処理を行わなくてもPCRのみでワクチン株を同定できる方法を確立した。実際の臨床材料を用いて、方法の検証ができた。

## D. 考察

### 1. 水痘ワクチン製剤の品質管理について

製剤の物理化学的特性ならびに遺伝子構成が、発売以降、安定していることを確認し、水痘ワクチン製剤のシードロット管理が適切になされていることを示した。一方、同じOkaワクチン株から製造されているが、海外製品とは遺伝子構成に差があり、その原因として継代など培養条件があると考えられた。水痘ワクチン株は、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り、今後の課題として解決が必要である。また、海外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、慎重な検討が必要と思われた。

## 2. VZVに対する細胞性免疫について

VZV特異的細胞性免疫の測定には、感染細胞やウイルス粒子が抗原とされることが多く、感染防御の主体である蛋白が明確ではなかった。gEやORF62蛋白が、抗原蛋白として用いられてきたが、ORF61やORF63が、より反応性に優れることを今回見出し、ORF61のエピトープ領域を同定した。こうしたエピトープを用いて、より簡便なELISPOT法やテトラマー検査法を樹立していくことが今後の課題と考えられる。

## 3. 血清学検査について

様々なVZV抗原を検討する中で、gE、gBが主要なVZV抗体の標的であることを明らかにする一方、gCに対して反応する血清が、わずかであり、欧州で「Line assay」として商業化されているgCに対する抗体を指標にした自然感染とワクチン接種の分別は、方法として不可能であると思われた。

成人と比して小児ではgBやgEを抗原とした血清学検査で偽陰性のものが出てくることから、これらの抗原に対する抗体形成に時間がかかる、もしくは自然曝露によるブースターが必要であるなどのことが考えられた。

## 4. ワクチン株と野生株の分別法について

「病原体検出マニュアル」に記載した方法の限界である感度と煩雑さを、nested PCRプライマーのデザインにより改善することができた。しかし、問題点としては、nested PCR産物を電気泳動するため、PCR法の管理が不十分であると以後の検査で偽陽性が発生する懸念がある。

nested PCRとした部分の反応をリアルタイムPCRとするなど、今後の改良が必要と思われる。

## E. 結論

- 1) 水痘ワクチン接種後の抗体陽転率の低下が疑われているが、製剤の物理化学的特性や遺伝子構成に変化はなかった。
- 2) 長期に培養細胞で継代するとワクチン株の遺伝子構成が変化することから、海外製品と本邦製品の遺伝子構成の差が製造過程での培養条件による可能性がある。
- 3) VZV特異的細胞性免疫の標的となる抗原として、ORF61、ORF63を同定し、ORF61の細胞性免疫エピトープを決定した。
- 4) 血清学検査にはVZV感染細胞ライセートが用いられているが、VZVがコードするgEとgBの両糖蛋白発現細胞ライセートで、同等の感度が得られた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kakuta R, Okata U, Funakoshi T, Fujio Y, Inoue N, Takahashi S, Amagai M, Ohyama M. Unusually extensive disseminated herpes zoster with multiple ulcer formation in a methotrexate-treated rheumatoid arthritis patient. *J Dermatol* 41: 181-2, 2014

### 2. 学会発表

- 1) 金井亨輔, 谷口留美, 湯 華民, 森 康子, 井上直樹: 水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する抗原の探索. 第16回日本ワクチン学会学術集会, 横浜, 2012年11月
- 2) 金井亨輔, 湯 華民, 森 康子, 井上直樹: 水痘帯状疱疹ウイルス特異的細胞性免疫を誘導する抗原の探索. 第60回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012年11月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 水痘ワクチンウイルス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を行うために、水痘ウイルスのORF13に対する抗体を作製した。また、ルシフェラーゼ活性を指標にした、組換え水痘ウイルスの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を発現させた組換え水痘多価ワクチンウイルスを既に作製しており、こ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報告している。

それらの組換え水痘ウイルスの作製に際して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ため、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必要がある。その組換え水痘ウイルスの性状解析のために、VZV ORF13に対する抗体の作製を行い、また、増殖性を評価する指標として、簡便に測定できる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・VZV ORF13抗体の作製

VZV ORF13の発現プラスミドを細胞にトランスフェクションして回収後、抗原蛋白質の精製を行った。その抗原をウサギに免疫して抗ORF13ウサギ血清を得た。

#### ・ウェスタンブロッティング

VZVワクチン株（vOka）感染細胞および

ORF13発現細胞、また、ネガティブコントロールとして、非感染細胞およびORF13欠損組換え水痘ウイルス感染細胞を用いて、作製した抗ORF13抗体によるウェスタンブロッティングを行った。

#### ②・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

ルシフェラーゼ発現カセットを、VZV ORF13領域と置換したrvOka-Lucゲノムを作製した。そのrvOka-LucゲノムをMRC-5細胞に導入し、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。

#### ・ウイルス力価とルシフェラーゼ活性の測定

得られたrvOka-Lucのウイルス力価およびルシフェラーゼ活性の測定を行った。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セルフリーウイルス回収し、それぞれ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った。当該研究機関における承認済みの動物実験計画書に基づいて動物実験を行った。

組換えウイルス実験に関しては大臣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 VZV ORF13抗体の作製

#### ・ウェスタンブロットティング

作製したORF13に対する抗体を用いたウェスタンブロットティングを行ったところ、VZV ORF13を発現するvOka感染細胞（図1レーン3）およびORF13発現293T細胞（図1レーン5）において、バンドが確認できた。ORF13欠損組換え水痘ウイルス感染細胞（図1レーン2）ではバンドは確認できなかった。

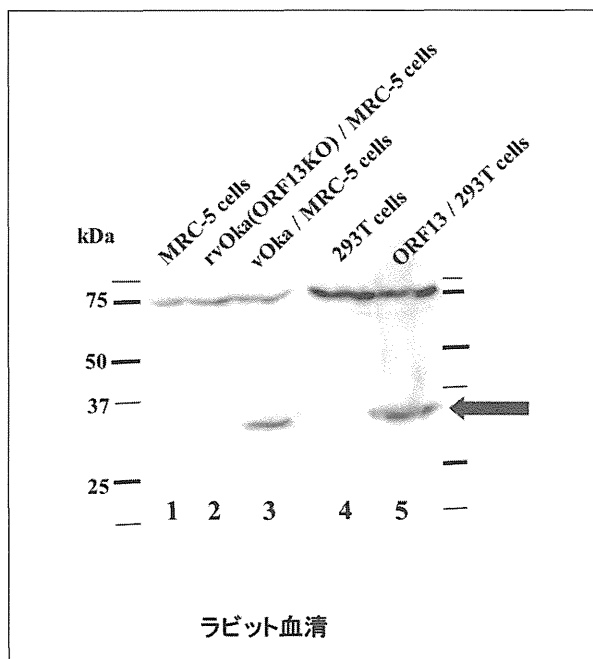


図1 抗ORF13抗体を用いたウェスタンブロットティング

ウサギ血清を一次抗体として使用し、vOka感染細胞（レーン3）およびORF13発現293T細胞（レーン5）において、バンドが確認できた。

### ② ルシフェラーゼ発現組換え水痘ウイルス (rvOka-Luc) の作製

#### ・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となっていて、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。

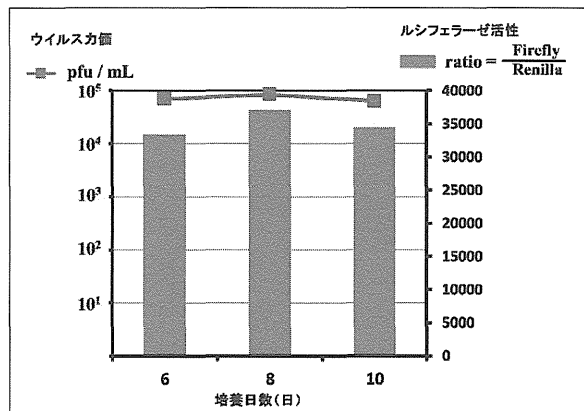


図2 rvOka-Lucの増殖曲線とルシフェラーゼ活性

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。

## D. 考察

抗VZV ORF13ウサギ血清を用いたウェスタンブロットティングにおいて、ORF13の検出に成功したため、本抗体は組換え水痘ウイルスの性状解析を行う上で有用であると考えられる。また、rvOka-Lucの増殖曲線とルシフェラーゼ活性には相関が認められたため、この測定により、組換え水痘ウイルスの増殖能の評価をより簡便に行うことができると考えられる。

## E. 結論

抗ORF13抗体の作製に成功した。また、ルシフェラーゼ発現組換え水痘ウイルスを作製し、その活性を測定することにより、その増殖能を評価することができた。

## 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）  
竹田 誠（国立感染症研究所ウイルス第三部）  
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）  
西村 秀一（仙台医療センター）  
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、サーベイランスネットワークの構築をめざし、6ヶ所の医療機関、および20ヶ所の衛生研究所の協力を得て、1986年から2014年までに分離された508例（内ワクチン副反応例由来が38例）の検体、および配列と検体に関する情報を収集した。これらの配列情報を解析した結果、国内でのムンプスウイルスの流行はほぼ10年間隔で大きく変化しており、80年代の遺伝子型Bのみの流行から90年代はBとJの並行流行に変わり、2000年前後からは遺伝子型Gの寡占的流行に入れ替わっていた。また、G型には2系統が併存しており、いわゆる西日本型（Gw）の流行から始まり、後から東日本型（Ge）の流行が重なるという傾向が認められた。また、近年ではGw系統の流行が寡占的であることが明らかとなった。これら一連の研究の過程で3例のワクチン株による水平感染例由来株を検出した。それらのゲノムを解析したところ、いずれの株においてもL遺伝子にのみアミノ酸変異が認められた。これらの変

異は、通常のワクチン副反応例から分離されたウイルスでは認められなかった。また、水平感染例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。水平感染が起こる原因を特定するため、次世代シーケンスを用いて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行ったが、ワクチン中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、ムンプス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）や医療機関の協力を仰ぎ、その基礎となるべきサーベイランスのネットワークを構築し、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、その分離株のゲノム解析、中枢神経病原性の評価、および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

国立病院機構三重病院をはじめ、全国の6ヶ所の医療機関の協力を得て、271例の分離株および検体を収集した。同時に、全国の地衛研の担当者へ、研究の趣旨と協力を求めるメールを送付し、20ヶ所の地衛研から協力を得、174例の検体および配列情報を収集した。これらに、感染研で過去に収集した95例の配列情報を加えて、解析を行った。

### (2) 分子系統学的解析

今年度地衛研から提供を受けたSH遺伝子領域の塩基配列情報を、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) 水平感染例由来株のゲノム解析

一連の系統解析の結果、遺伝子型Bの分離株の中にワクチン株（星野株、および鳥居株）と同一配列を持つ分離ウイルスが5株存在した。その内、由来する患者にワクチン履歴が無い3株（星野株由来2株（W4、#39）、鳥居株由来1株（W30））と、接種履歴があった2株（星野株由来（A12、W15））について、ダイレクトシーケンシングによって全ゲノム配列を決定し、元となるワクチン株のゲノム配列と比較した。更に、追加で星野株による副反応例から分離された3株についてもゲノム配列を解析した。

### (4) 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。

### (5) 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、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

当初、6ヶ所の医療機関の協力により、271検体に上る分離ウイルス、および臨床検体（1993年～2012年分離）を収集し、それらのゲノム解析を

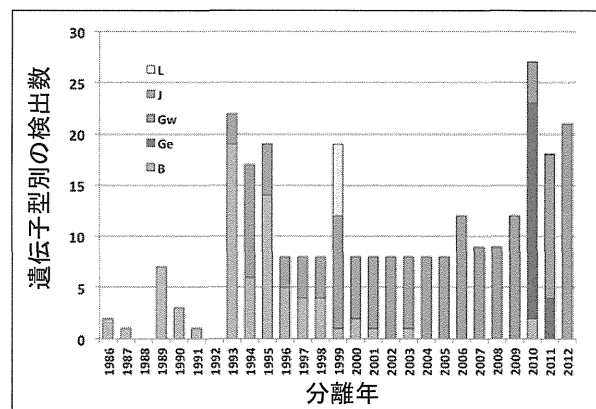


図1 医療機関で検出された遺伝子型の変遷

行った（図1）。その結果、1980年代（1986～1992年）はBのみが流行し、1990年代（1993～1998年）はB型とJ型が拮抗する状態で流行していたが、1999年に突然G型とL型に取って代われ、2000年以降はG型が流行の主流を占めることが判明した。1999年以降流行しているG型は、大きく2つのクレードに分かれ、年によって流行するクレード一方から他方へと変化していることが判明した。二つのクレードの一方は主に横浜などの首都圏で分離されており、他方は三重県や岡山など西日本で主に分離されている。そこでこれらのクレードをそれぞれ東日本型（Ge）、および西日本型（Gw）と名付けた。

その後、国内流行の全体像を把握するために観測点を増やす目的から、全国の地衛研に情報提供の協力を呼びかけたところ、山形県から熊本県までの20ヶ所の地衛研から協力を得ることができた。その結果、各地衛研に集積されているムンプスウイルスの検出情報（2005年から2014年までの検出情報；塩基配列、および検体に係わる患者情報）176例を集計解析できた（図2）。それらの内33例はワクチン接種後の副反応例であった。それ以外の143例の野外株の遺伝子型は1例を除いてGであった。1例はA型であった。G型の内、西日本型（Gw）が96例、東日本型（Ge）は46例であった。地衛研からのデータを集計した結果ではGwとGeの地理的分布に明確な違いは認められず、むしろ流行時期に違いが認められた。つまり、Gの国内流行はまずGwから始まり、それ以来現在まで流行が継続している。特に2013年以降には全国的に流行の主流を占めており、2014年の流行

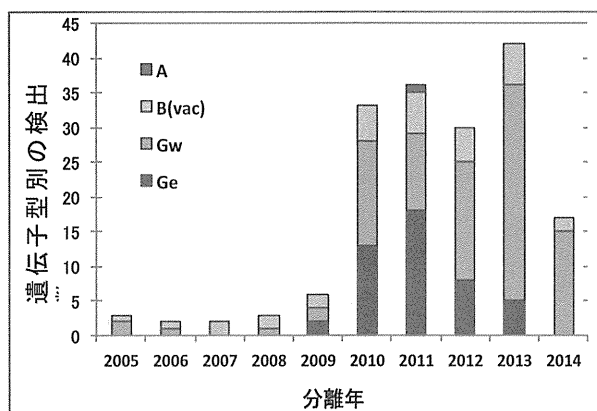


図2 地方衛生研究所で検出された遺伝子型の経年変化

はGwのみが流行の主流となっていることが推察された。一方、Geの流行は2009年頃から始まり、2010、2011年にピークに達した後、2012年以降は流行が急速に下火になっている傾向が見て取れる(図2)。

2011年に熊本県で1例だけ分離された遺伝子型Aは詳細な解析の結果、Enders株に最も近縁であることが判明した。遺伝子型Aは主に欧米で主流であった古い遺伝子型であり、近年では欧米でも報告が無い。なぜ日本でA型が検出されたのか、その原因や由来は不明である。

### (2) 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

当初、医療機関において野外株として分離され、その後の解析の結果、ワクチン株(星野株、および鳥居株)と同一配列を持つことが判明した分離ウイルス5株について、由来する患者のワクチン履歴を調べた結果、2株については接種履歴があり、分離された時期から、ワクチン接種による副反応例と判断された。しかし、残り3株(星野株由来2株、鳥居株由来1株)については、ワクチン

接種の履歴が無かったことから、ワクチンウイルスによる水平感染例であることが判明した。

そこで、水平感染が発生した原因を明らかにするために、まず、遺伝子レベルで水平感染ウイルスが元のワクチンウイルスから変化しているかどうかを調べるため、これらのウイルスの全ゲノム配列をダイレクトシーケンスによって決定した。対照として、同時期にワクチン副反応例から分離された2例に加えて個別に副反応例から分離された3例についても同様に解析した。

その結果、副反応例由来株ではワクチン株との間に塩基配列の違いが認められなかったのに対し、水平感染ウイルスにおいては、由来するワクチン株に係わらず3株全てで、L遺伝子内に1ヶ所以上のアミノ酸置換を伴う塩基置換が認められた(図3)。株ごとに変異部位と変異の数には違いが認められたものの、変異部位はL遺伝子内に限局して認められ、その殆どがL蛋白質の機能ドメイン上に位置していた。

### (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

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4)。

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( $p=0.02$ )。

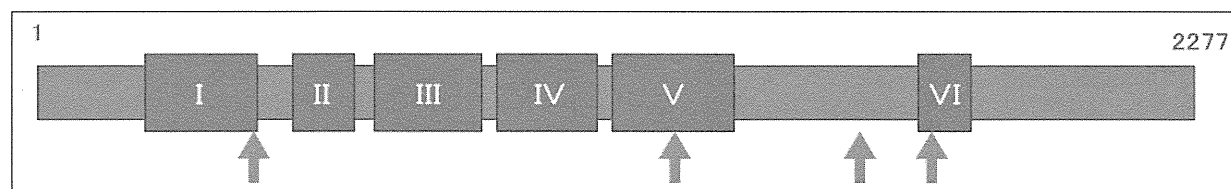


図3 ムンプスウイルスL蛋白質の機能ドメインと水平感染例株で検出された変異部位

I～VIのボックスはパラミクソウイルス間で保存された機能ドメイン。矢印は水平感染ウイルス3株で検出された変異部位。



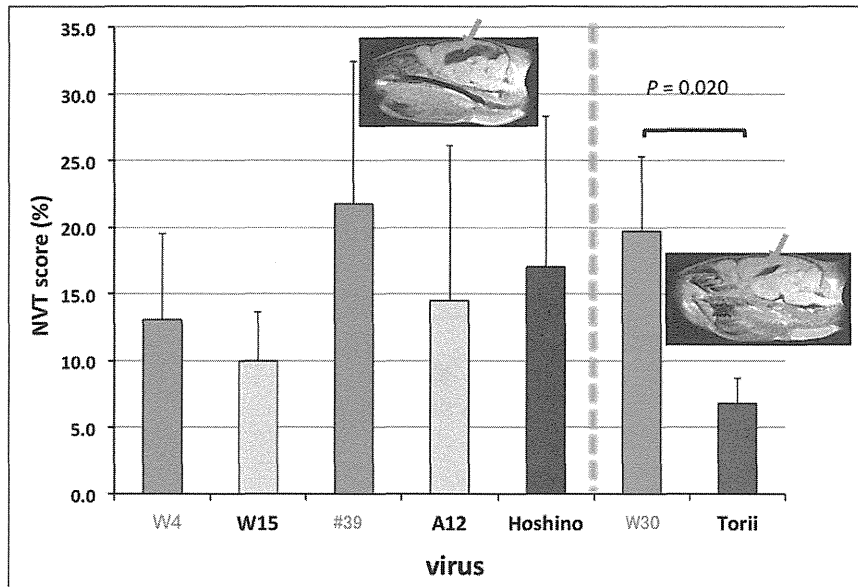


図4 水平感染例株のラットモデルによる中枢神経病原性の評価

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。

#### (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ントウイルスの解析

昨年度の解析の結果発見されたムンプスワクチンウイルスによる水平感染例では、副反応例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例の副反応例由来ウイルス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

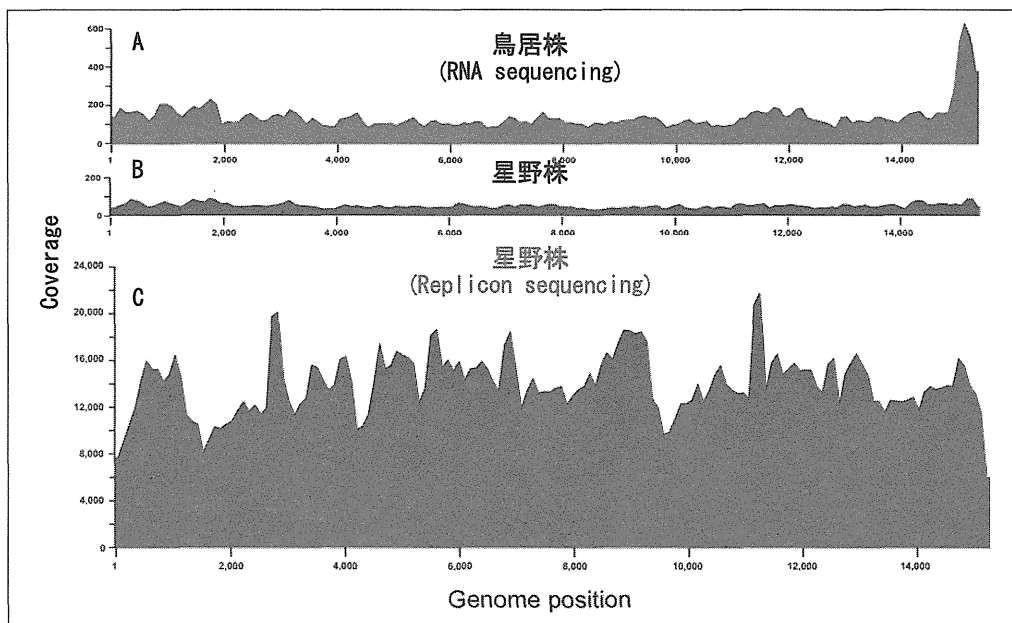


図5 次世代シーケンサによるワクチン含有バリエント配列の評価 (coverage)

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。

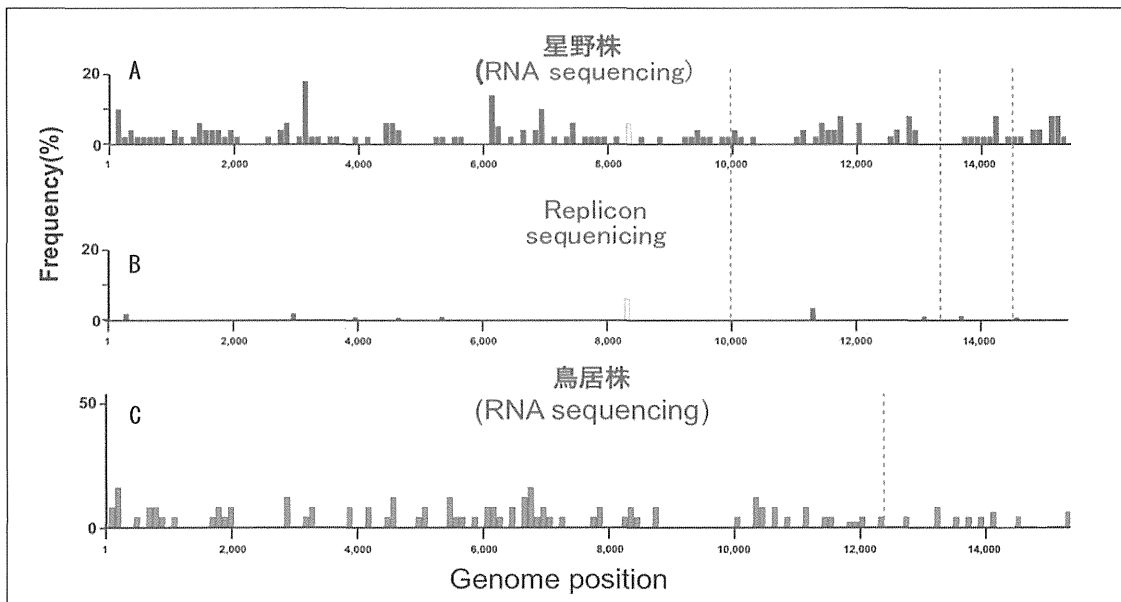


図6 次世代シーケンサによるワクチン含有バリエーション配列の評価

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例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。

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5 A、B、図6 A、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5 C、図6 B)。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

6ヶ所の医療機関と20ヶ所の地衛研からの協力により、1986年から2014年までに分離された508例 (その内ワクチン副反応例由来が38検体) の検体、および配列と検体に関する情報を収集できた。これらの塩基配列情報を解析することにより、日本国内におけるムンプスウイルスの流行状況を概観することができた。つまり、国内流行株はほぼ10年間隔で大きく変化しており、80年代では遺伝子型Bのみ、90年代はBとJの並行流行に変わり、2000年前後からは遺伝子型Gの寡占的流行に入れ替わっていた。G型には2系統が存在し、国内流行は、まずいわゆる西日本型 (Gw) から始まり、後から東日本型 (Ge) の流行が重なるという傾向が認められた。また、Ge系統の流行は2010～11年をピークに2012年以降は下火となり、現在では再びGw系統の流行が寡占的となっているこ

とが示唆された。

一連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、全ゲノム配列を決定したところ、副反応例由来株では検出されないL遺伝子内のアミノ酸置換を伴う変異を持っていた。これらの変異部位のほとんどは、L蛋白質の機能ドメイン上にいちしており、L遺伝子はウイルスのRNAポリメラーゼとして転写と複製に直接関わる重要な因子であることから、これらのウイルスの性状に何らかの変化が生じている可能性がある。ワクチンの副反応例から分離されたウイルスではL遺伝子内に変異がないことから、2次感染を起こす上で、L遺伝子の変異が何らかの関わりを持つ可能性が示唆される。

そこで、水平感染例由来株の中脳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ったものの、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有り、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（例えばマーマセツ）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が低いために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。従って、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。

## E. 結論

- (1) 6ヶ所の医療機関と20ヶ所の地衛研の協力によって、1986年から2014年までに分離された508例の情報を収集・解析した。
- (2) 一連の解析によって、1980年代から現在までのムンプスウイルスの国内流行状況は10年ごとに大きく変化していることが確認できた。
- (3) 解析の過程で、3例のワクチン株による水平感染例を見出した。
- (4) 全ての水平感染例由来株ではL遺伝子内にアミノ酸置換を伴う変異が認められた。
- (5) 水平感染例由来株のラットにおける中脳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。
- (6) 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.
- 4) Sato H, Jing C, Isshiki M, Matsuo K, Kidokoro M, Takamura S, Zhang X, Ohashi T, Shida H. Immunogenicity and

- safety of the vaccinia virus LC16m8Δ vector expressing SIV Gag under a strong or moderate promoter in a recombinant BCG prime-recombinant vaccinia virus boost protocol. *Vaccine*. 2013; 31(35):3549–3557.
- 5) 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*. 2013, 1(2), 13–21.
  - 6) Saitoh M, Takeda M, Gotoh K, Takeuchi F, Sekizuka T, Kuroda M, Mizuta K, Ryo A, Tanaka R, Ishii H, Takada H, Kozawa K, Yoshida A, Noda M, Okabe N, Kimura H. (2012) Molecular evolution of hemagglutinin (H) gene in measles virus genotypes D3, D5, D9, and H1. *PLoS One*. 7: e50660.
  - 7) Tahara M, Ito Y, Brindley M, Ma X, He J, Xu S, Fukuhara H, Sakai K, Komase K, Rota P, Plemper R, Maenaka K, Takeda M. (2013) Functional and structural characterization of neutralizing epitopes of measles virus hemagglutinin protein. *J. Virol*. 87:666–75.
  - 8) Tahara M, Ohno S, Sakai K, Ito Y, Fukuhara H, Komase K, Brindley MA, Rota PA, Plemper RK, Maenaka K, Takeda M. The Receptor-binding Site of the Measles Virus Hemagglutinin Protein Itself Constitutes a Conserved Neutralizing Epitope. *J Virol*. 2013 Jan 2.
- (和文)
- 1) 木所 稔, 竹田 誠 (2013): 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*, 34(8): 224–225
  - 2) 駒瀬勝啓, 竹田 誠 (2012): ヨーロッパの麻疹の状況と今後の日本の課題. *病原微生物検出情報*, 33, 29–30
  - 3) 駒瀬勝啓, 竹田 誠 (2012): ウイルス感染症検査診断の新しい展開. 麻疹, 風疹, ムンプスの検査診断の現状. *臨床と微生物*, 39, 656–662
  - 4) 關 文緒, 竹田 誠 (2012): 麻疹のウイルス型. *日本医事新報*, 4613, 58–59
- ## 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
  - 5) 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, 倉敷, 2013年6月
  - 6) 新妻隆広, 大日方 薫, 木所 稔: 授乳婦へのムンプスワクチン接種後, 母乳中より検出されたムンプスワクチンウイルス. 第54回日本臨床ウイルス学会総会, 倉敷, 2013年6月
  - 7) 新妻隆広, 大日方 薫, 木所 稔: ムンプスウイルス耳下腺炎の経過中に発症した自己免疫性辺縁系脳炎. 第54回日本臨床ウイルス学会総会, 倉敷, 2013年6月
  - 8) 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