

2014-20039A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

ムンプスに関する重大なワクチンギャップを
抜本的に解決するための研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：木所 稔

平成 27(2015)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

ムンプスに関する重大なワクチンギャップを
抜本的に解決するための研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：木所 稔

平成 27(2015)年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

- ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
木所 稔

II. 分担研究報告書

1. マーモセット感染モデルによるムンプスワクチンの安全性・有効性の解析・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
木所 稔 他
2. ムンプスワクチン効果に関する臨床的検討・・・・・・・・ 19
庵原 俊昭 他
3. 麻疹 AIK-C ワクチンをベクターとした組換えムンプスワクチン・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
中山 哲夫
4. 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・・・・・・・・・・・・・・・・ 28
竹田 誠 他
5. ムンプスウイルス神経病原性の病理学的解析・・・・・・・・ 34
長谷川 秀樹 他
6. ムンプスウイルス動物モデルに関する基盤的研究・・・・・・ 38
網 康至 他
7. 新規ワクチン開発のための基盤的研究・・・・・・・・ 42
加藤 大志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告書

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

総括研究報告書

ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究

研究代表者：木所 稔（国立感染症研究所ウイルス第三部第三室・室長）

研究要旨

我々は、安全で有効なワクチンプログラムを短期間で確実に実現するため、現行ワクチンの長所を生かし、欠点を補う相互補完的免疫プログラム（JL株で基礎免疫を行い、追加免疫を国産ワクチン株で行う）の確立をめざす。その評価のためにマーマセットを用いた動物モデルの確立を検討すると共に、リバースジェネティクス等の最新の技術や臨床的研究からの情報に基づいた新規ワクチンの開発も併せて検討する。

研究分担者：

- 庵原俊昭（国立病院機構三重病院 院長）
- 中山哲夫（北里生命科学研究所 所長）
- 竹田 誠（国立感染症研究所ウイルス第三部 部長）
- 長谷川 秀樹（国立感染症研究所感染病理部 部長）
- 網 康至（国立感染症研究所動物管理室 主任研究官）
- 加藤大志（国立感染症研究所ウイルス第三部 研究員）

いるが、国産ワクチンは有効性が高い反面、副反応としての無菌性髄膜炎が導入の障壁となっている。一方、世界中で用いられているJeryl-Lynn株（以下JL株）は安全性が高い反面、有効性が疑問視されている。安全性と有効性を高い次元で両立させた新規ワクチンが望まれるが、過弱毒化しやすいというムンプスウイルス（以下MuV）の持つ本質的特性のために従来の開発方法では実現は困難である。

そこで我々は、現行ワクチン（JL株と国産ワクチン株）のそれぞれの長所生かした相互補完的免疫プログラム（JL株で安全に基礎免疫を付与した後、国産ワクチン株で強力な追加免疫を行う）ことによって、安全で有効なワクチンプログラムを短期間で確実に確立することをめざす。そして、その評価のためにマーマセットを用いた動物モデルの確立を検討する。一方で、リバースジェネティクス等の最新の技術と臨床的研究からの情報に基づいて、安全性と有効性を両立させ、ま

A. 研究目的

MMRによる2回接種が定期接種されている他の先進諸国とは異なり、我が国ではおたふくかぜ（以下ムンプス）ワクチンの接種率が低迷しているため、ムンプスの流行はいまだに制御されていない。現在、難聴等の合併症への懸念から、我が国においてもムンプスワクチンの定期接種化が強く求められて

た、より利便性の高い新規ワクチンの開発を併せて検討する。

B. 研究方法

本研究班は研究代表者1名と臨床および基礎の研究者6名の分担研究者から構成されており、「ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究」について、多角的な研究を行っている。具体的研究方法の詳細は各分担研究報告書を参照。

(倫理面への配慮)

本研究において国立感染症研究所における動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

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) 研究代表者：木所 稔、他

今年度はワクチンによって誘導される防御活性を評価するために、マーモセットに対する MuV 強毒株（大館株）の経鼻感染による攻撃接種を試みた。その結果、非免疫群では3頭中2頭で、明確な体温の上昇を認めると共に、全頭で高レベルのウイルス血症を観察した。一方、免疫個体群ではいずれの現象も観察されなかった。また、非免疫個体群では、中枢神経系組織での炎症像や、肺炎、および精巣炎など、ヒトと類似したムンプスに特

異的な病理学的変化が確認された。肺炎と精巣炎を発症した個体では血中のアミラーゼ活性の上昇が観察され、また、精巣病変部にウイルス抗原が検出された。病理学的変化を伴う組織からは全て MuV ゲノムが検出された。また、病理学的変化は認められなかったものの、2頭においては耳下腺にウイルスゲノムが検出された。こうした動物モデルにおける経鼻感染による発熱を伴う発症は、MuV では初めての報告例となる。一連の結果から、マーモセットがヒトにおけるムンプスの病態を忠実に再現しうる優れたモデル動物であることが確認された。これらの結果と、昨年度の接種用量の検討結果を踏まえ、マーモセットにおける相互補完的免疫法の評価のための免疫を開始した。

(2) 研究分担者：庵原 俊昭、他

ムンプスワクチンの定期接種化を目指し、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研究を行っている。有効性の面では、本邦ムンプスワクチン株は、1回接種で優れた流行抑制効果を示し、小学校就学前に2期を接種すると効果的な二次免疫応答を認めた。安全性の面では、髄膜炎発症率は10万接種あたり0.13で以前の報告程高くなく、接種時の年齢が上がるにつれ髄膜炎発症率が上昇した。ムンプスの発症予防抗体価は確立されていないが、NT抗体4倍に一致する抗体価は、デンカの EIA-IgG 抗体価では2.9と算出され、現行のデンカ EIA-IgG 抗体測定試薬の再検討が必要と思われた。

(3) 研究分担者：中山 哲夫

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は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株 AIK-C をウイルスベクターとして使用する組換え二価ワクチンを検討した。2013 年度までに AIK-C 全長遺伝子の P/M junction に MuV の HN, F 遺伝子を導入した組換えウイルスを作製した。これらの組換えウイルスをコトンラットに 2 回接種したところ、抗麻疹抗体と共にムンプス中和抗体が検出された。しかし、脾臓細胞を MuV で刺激し CTL 活性を持つと考えられる CD8+/IFN- γ 陽性細胞の検出を試みたが検出できなかった。そこで、MuV 感染の細胞性免疫能のターゲットと考えられる MuV の N タンパク質遺伝子を組み込んだ組換え AIK-C を作成し、Vero 細胞に感染させたところ、麻疹ウイルスのタンパク質、と共に MuV の N タンパク質の発現を確認した。また、コトンラットで組換えワクチンの性能を評価するための基礎実験としてコトンラットに MuV 野外株を筋肉内接種したが感染は成立しなかった。

(4) 研究分担者：竹田 誠、他

抗ヒト用抗体として市販されているモノクローナル抗体でそれぞれのアイソタイプコントロールを用いて染色した結果、目的のマーモセットリンパ球表面マーカーである CD3、CD4、CD8、CD62L、NKG2D の検出に成功した。次に、ワクチン免疫個体由来のマーモセットの脾臓細胞を用いて、MuV 抗原刺激後の IFN- γ 陽性の細胞の検出を試みたところ、抗原刺激無しの細胞に比べ、IFN- γ 陽性細胞数が有意に上

昇した。また、免疫個体由来の末梢血リンパについても JL 株で感染量(moi)を変えて刺激を加えたところ、IFN- γ 陽性の細胞数は moi に依存せず、むしろ高 moi で低下した。しかし、CD62L 陽性細胞数は moi に依存して増加が認められた。

(5) 研究分担者：長谷川 秀樹 他

今年度は、MuV 野生株を経鼻接種し 5 週間経過したマーモセット 3 頭の病理組織学的解析を行った。その結果、全頭で中枢神経系に種々の程度で髄膜炎あるいは脈絡叢炎の所見が認められた。また、そのうち 2 頭は肺、腎に巨細胞形成を認めた。しかしながら、脳、肺、腎にそれぞれ認められた組織病変でウイルス抗原は検出されていないが、一方で、1 頭に、慢性膵炎像とウイルス感染を伴う精巣炎所見が認められた。このうち慢性膵炎所見については、血中アミラーゼ活性の経時的上昇が確認されており、感染後に発症、解剖直前には増悪したことが示唆されている。また、精巣に関しては、病変部位に一致してウイルス抗原が検出され、さらにウイルス学的検索によって、ウイルスゲノムも他の臓器に比べて多量に検出された。ことから、少なくとも精巣の所見に関しては、感染に伴う病変であると結論された。

(6) 研究分担者：網 康至、他

ムンプスウイルス野外株である大館株を 3 頭のコモンマーモセットに 10^4 PFU 経鼻接種し、血中の LDH およびアミラーゼを経時的に測定したところ、1 頭にアミラーゼの上昇を認めた。この個体では解剖時に病理学的な膵炎像が認められ、MuV ゲノムも陽性であったことから、ムンプス膵炎を発症したものと考えられた。また、ワクチ

ン株である Jeryl Lynn 株と星野株を 10^2 PFU 皮下接種し、血漿中の LDH 変動率について解析を行った。Jeryl Lynn 株接種個体では、接種後 11～14 日に有意な変動を 50%の個体が示したのに対して、星野株接種した個体では、接種後 7 日に有意な変動を 67%の個体が示した。

(7) 研究分担者：加藤 大志 他

上衣細胞に高発現する microRNA である miR449 の相補配列をゲノムに導入した組換え MuV (rOdate/miR449)を作出し、その増殖能および神経病原性を評価した。Vero 細胞における rOdate/miR449 の増殖能は親株である rOdate と同等であった一方、ラットの脳における rOdate/miR449 の接種後のウイルス量は rOdate と比べ、著しく低下していた。また rOdate 接種群の脳で観察された脳室周辺の脈絡叢炎が、rOdate/miR449 接種群ではほぼ観察されず、上衣細胞で検出される抗原量もわずかであった。rOdate/miR449 接種群では脳室拡張を指標とする中枢神経病原性も減弱しており、miR449 相補配列をゲノムに組み込む手法はより安全なおたふくかぜワクチンの開発に有用であると考えられた。

D. 考察

今年度は、相互補完的免疫によって誘導される感染防御能を評価するための攻撃接種の条件を検討した。使用した大館-3 株は、ヒトでの中枢神経病原性が高く、マーモセットにおいても静脈内接種によって髄膜炎を引き起こす (Saika S. *et al.*, *J. Med. Virol.* 2002)。今回は、より自然感染に近い経鼻接種での攻撃接種を試みた結果、非免疫群では 2/3 の個体で明確

な発熱を観察すると共に、全頭で高レベルのウイルス血症を確認した。また、全頭で体重の減少が観察された。感染後 5 週目での病理解剖による病理学的な検索の結果では、3 頭それぞれに異なる病態を示した。いずれもヒトにおける病態を再現するものであり、特に経鼻感染による発熱や、膵炎、精巣炎および髄膜炎の発症はムンプスの動物モデルでは初めての報告である。また、膵炎を発症した個体では、血中のアミラーゼ活性が上昇しており、血中アミラーゼ活性がムンプスの病態を反映するバイオマーカーになり得ることを示している。一方、免疫群では攻撃接種後の発熱、およびウイルス血症は観察されず、発症を示す兆候は認められず、体重も増加していた。以上の結果から、野外強毒株の経鼻感染による攻撃接種によって、ワクチンで誘導される感染防御能が評価しうることを示された。この結果と昨年度に行ったワクチンの接種適正用量の結果を踏まえ、相互補完的免疫法の評価をマーモセットにおいて開始した。

今年度の研究結果から、本邦ムンプスワクチン株は 1 回接種において優れた免疫原性を有しており、1 歳児に接種した時の髄膜炎合併率は、Jeryl-Lynn 株と同等であることが示され、本邦ワクチン株を用いて定期接種を行っても、1 歳児に接種すれば安全性は容認されると思われた。また、接種後の抗体応答の結果から、2 期目の接種時期としては小学校就学前が適切と考えられた。なお、現行の国産 EIA-IgG 抗体測定試薬には抗体陽性閾値の設定に問題があることや、他メーカー

品との成績の不一致が認められることから、精度の高いムンプスの血清疫学研究を行うためには適切なムンプス抗体測定方法の開発が必要と思われた。

現行ムンプスワクチンの問題点を抜本的に解決し、且つ利便性の高い新規ワクチンを開発するため、安全性と有効性に定評のある麻疹ワクチン株 AIK-C に、MuV の中和標的抗原をコードする HN および F 遺伝子を組み込んだ組換え二価ワクチンを作製した。これらの組換えウイルスで免疫したコットンラットでは、抗麻疹抗体と共に抗ムンプス抗体も誘導された。しかし、感染からの回復に必須である細胞性免疫を担う MuV に対する細胞障害性 T 細胞 (以下 CTL) 活性は検出されなかった。そこで、CTL の主要な標的抗原である MuV の N 遺伝子を導入した AIK-C を作製し N 蛋白質の発現を確認した。また、コットンラットで組換えワクチンの性能を評価するための基礎実験としてコットンラットに MuV 野外株を筋肉内接種したが感染は成立しなかった。今後は麻疹ウイルスと MuV に感受性を持つマーモセットで、組換え AIK-C の評価を行う予定である。

今年度の研究において、マーモセットの CD3⁺CD8⁺CTL の検出に成功した。Th1 細胞の検出に必要な CD4 抗体による検出が不安定であり、今後の更なる検討が必要である。加えて、マーモセット脾細胞は JL 株を用いて再刺激した実験系では moi に依存して IFN- γ 陽性細胞の変動が見られたものの、高 moi では減少した。一方で完全なリンパ球の変動マーカーとは言えないが、セントラルメモリー様 T 細胞の分画を示す CD62L

陽性細胞は増加を示した。これらの結果からワクチン株間の抗原性の違いを評価する際には、IFN- γ 陽性細胞の変動のみならず、メモリー細胞分画の評価や再刺激によるリンパ球のクローン増殖による評価系の構築も検討しなければならない。

神経病原性が比較的強い野生株を 3 頭のマーモセットに経鼻接種し、5 週間後に病理解剖を行った結果、全頭で中枢神経系に種々の程度で髄膜炎あるいは脈絡叢炎の所見が認められた。また、そのうち 2 頭は肺、腎に巨細胞形成を認めた。しかしながら、MuV 抗原が陰性であったことから、これらの組織病変が、ウイルス感染によるものであるという証明にはまだ至っていない。一方で、1 頭に、慢性膵炎像とウイルス感染を伴う精巣炎所見が認められた。このうち慢性膵炎所見については、経時的採血による血液検査で、アミラーゼの経時的上昇が確認されており、感染後に発症、解剖直前には増悪したことが示唆されている。また、精巣に関しては、少数ではあるものの、病変部位に一致してウイルス抗原が検出されており、さらにウイルス学的検索によって、ウイルスゲノムも他の臓器に比べて多量に検出されたことから、少なくとも精巣の所見に関しては、感染に伴う病変であると結論された。

今回、マーモセットでの野外株経鼻感染では、ヒトにおける病態の一つである膵炎発症個体が観察され、一致して血中アミラーゼの上昇が認められた。これまでムンプスウイルス感染における膵炎発症の病態モデルはなく、マーモセット感染モデルのさらなる有用性を示すものと考えられる。ワ

クチン株間の皮下接種での比較において、血漿中の LDH（乳酸脱水素酵素）変動率では、Jeryl Lynn 株接種個体に比較して、星野株接種群で早期の接種後 7 日に 2/3 の個体が有意な変動を示した。血中の LDH 上昇が局所リンパ節におけるウイルス増殖を意味するものと考え、国産株は体内でより早期にウイルスが増殖すると考えられ、増殖性が Jeryl Lynn 株に比較して高いことが予想される。国産株は Jeryl Lynn 株に比較して、ワクチン副反応としての髄膜炎発症率が低いことが知られており、マーモセットにおける増殖性の違いで、その発症率の差を検出することが可能かもしれない。このように、マーモセットへの皮下接種における血中 LDH 変動率の解析は、ウイルス株の性状のひとつと考えられ、新規生ワクチン開発において、弱毒性評価の一つとして有用と考えられる。LDH の有意な変動が認められない個体が両ワクチン株接種群に存在し、今後これら個体の抗体価、ウイルス血症の推移を調べ、それとともに評価することで、LDH の有意な変動に対する意味付けを行っていく計画である。野外株経鼻接種では、その有意な変動を認めないことから、接種経路により感染動態が異なるかもしれない。Jeryl Lynn 株免疫群への野外株経鼻接種では有意な変動が認められることから、それらは特異的な免疫反応による可能性も考えられる。

rOdate/miR449 のラットの脳内における増殖および中枢神経病原性が親株である rOdate に比べ著しく減弱したことから rOdate/miR449 は miR449 が高発現する上皮細胞において増殖が阻害され、結果として神経病原性が低下したと考えられた。

一方で、rOdate/miR449 の Vero 細胞における増殖能は、rOdate と同等であったことから、miRNA 相補配列の挿入は miR449 発現の低い細胞での MuV 増殖能への影響が軽微であることが示唆された。以上の結果より、miR449 相補配列を有する組換え MuV は防御免疫を付与するのに十分な末梢での増殖能を保持しつつ、無菌性髄膜炎発生リスクの低い新規ワクチン候補株になりうると思われる。今後は rOdate/miR449 の全身感染における増殖および病原性の評価および免疫原性についてさらなる解析が必要である。

E. 結論

攻撃感染モデルとして、野外強毒株大館-3 株をマーモセットに経鼻接種したところ、非免疫群では明確な発熱とウイルス血症のほか、複数の標的組織にムンプス特有の病理変化が認められた。一方、ワクチン免疫群ではいずれも観察されず、耐過した。以上の結果から、強毒株による経鼻感染によって、ワクチンで誘導される防御免疫を評価しうることを示された。また、マーモセットがムンプスのモデル動物として有用であることが示された。

本邦ムンプスワクチン株は、1回接種で優れた流行抑制を示した。また、2期接種を小学校就学前にすると効果的な二次免疫応答を認めた。安全性の面では、髄膜炎発症率は以前の報告程高くなく、1歳児に接種したときの無菌性髄膜炎発症率は10万接種あたり0.13であり、接種時の年齢が上がるにつれ、髄膜炎発症率が上昇した。ムンプスの発症予防抗体価は確立されて

いないが、NT抗体4倍に一致する抗体価は、デンカEIA-IgG抗体価では2.9と算出され、現行のデンカEIA-IgG抗体測定試薬の再検討が必要と思われた。

麻疹ワクチン株AIK-Cに、MuVの中和抗体の標的抗原をコードするHNおよびF遺伝子を組み込んだ組換え二価ワクチンを作製した。これらのウイルスをコトンラットに2回免疫したところ、抗麻疹抗体と共に抗ムンプス抗体も誘導された。しかし、MuVに対するCTL活性は検出されなかった。そこで、CTLの標的抗原であるMuVのN遺伝子を発現するAIK-Cを作製し、N蛋白質の発現を確認した。

マーモセットのCD3⁺CD8⁺CTLの検出に成功した。加えて、マーモセット脾細胞はJL株を用いて再刺激した実験系ではmoi に依存してIFN-g陽性細胞の変動が見られたものの、高moiでは減少した。一方で、セントラルメモリー様T細胞の分画は増加を示した。これらの結果からワクチン株間の抗原性の違いを評価する際には、IFN- γ 陽性細胞の変動のみならず、メモリー細胞分画の評価や再刺激によるリンパ球のクローン増殖による評価系の構築も検討しなければならない。

マーモセット3頭にMuV野生株を経鼻接種し5週間目の病理学的検索を行った結果、個体によって異なる病態を示し、ムンプスウイルス感染症の合併症に類似した髄膜炎・脈絡叢炎、脾炎、あるいは精巣炎が観察された。

コモンマーモセットに種々のムンプスウイルス株を経鼻接種あるいは皮下接種し、血中のLDH変動率およびアミラーゼについて解析を行った。野外株経鼻接種では、アミラーゼ上昇を認めたが、ワクチン

株接種では認められなかった。ワクチン株間、Jeryl Lynn株接種個体と星野株接種した個体では、LDH変動率の動態が異なり、星野株では接種後早期に有意な変動を示した。これら結果から、マーモセットにおける株間のウイルス増殖性の差を、血中LDH、アミラーゼの動態により評価できると考えられた。

MuVの標的組織で高発現するmiRNAの相補配列をゲノムに組み込む手法は、免疫原性を付与するのに必要な増殖能を維持しつつ、現行の国産おたふくかぜワクチンの問題である無菌性髄膜炎の発生リスクを軽減する理想的なワクチン株の開発につながると期待される。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

論文発表および学会発表については各分担報告書に記載。

H. 知的財産の出願・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制御組換えワクチン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

II. 分担研究報告書

平成26年度厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業））

「ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究」

分担研究報告書

マーモセット感染モデルによるムンプスワクチンの安全性・有効性の解析

研究代表者：木所 稔（国立感染症研究所 ウイルス第三部）

研究協力者：網 康至（国立感染症研究所 動物管理室）

須崎 百合子（国立感染症研究所 動物管理室）

加藤 大志（国立感染症研究所 ウイルス第三部）

永田 典代（国立感染症研究所 感染病理部）

青木 なつ子（国立感染症研究所 ウイルス第三部）

研究要旨 ムンプスワクチンの定期接種化を短期間で確実に実現するために、Jeryl-Lynn 株と国産ワクチン株の利点を生かした、相互補完的免疫法を考案した。今年度はこの免疫法によって誘導される防御活性を評価するために、マーモセットに対するムンプスウイルス強毒株（大館株）の経鼻感染による攻撃接種を試みた。その結果、非免疫群では3頭中2頭で、明確な体温の上昇を認めると共に、全頭で高レベルのウイルス血症を観察した。一方、免疫個体群ではいずれの現象も観察されなかった。また、非免疫個体群では、中枢神経系組織での炎症像や睪炎、および精巣炎など、ヒトと類似したムンプスに特異的な病理学的変化が確認された。睪炎と精巣炎を発症した個体では血中のアミラーゼ活性の上昇が観察され、また、精巣病変部にウイルス抗原が検出された。病理学的変化を伴う組織からは全てムンプスウイルスゲノムが検出された。また、病理学的変化は認められなかったものの、2頭においては耳下腺にウイルスゲノムが検出された。こうした動物モデルにおける経鼻感染による発熱を伴う発症は、ムンプスウイルスでは初めての報告例となる。一連の結果から、マーモセットがヒトにおけるムンプスの病態を忠実に再現しうる優れたモデル動物であることが改めて確認された。これらの結果と、昨年度の接種用量の検討結果を踏まえ、マーモセットにおける相互補完的免疫法の評価のための免疫を開始した。

A. 研究目的

おたふくかぜ(以下ムンプス)ワクチンは現在最も早期の定期接種化が求められているワクチンの一つである。しかし、国産ムンプスワクチンにおいては、副反

応としての無菌性髄膜炎が普及の足かせとなっている一方、世界中で最も広く用いられている Jeryl-Lynn 株(以下 JL 株)は安全性が高い反面、その有効性に疑義が生じている。新規ワクチンの開発が望

まれるが、過弱毒しやすいというムンプスウイルス(以下 MuV)の本質的特性故に従来のワクチン開発の手法ではムンプスワクチンにおける安全性と有効性の両立は容易では無い。

そこで我々は、既存のワクチンの利点を生かした相互補完的免疫法 (JL 株で基礎免疫を行い、追加免疫を国産ワクチン株で行う) によって、確実にかつ早期に、安全で有効なワクチンプログラムの実現をめざす。同時に、その評価のためにコモンマーモセットを用いた動物モデルの確立をめざす。

今年度はワクチン接種によって誘導される感染防御能を評価するための攻撃接種の条件を検討するため、野外強毒株をマーモセットに経鼻接種し、臨床経過を観察すると共に、病理解剖による病理学的検索とウイルス学的検索を行った。また、これらの結果と昨年度に行ったワクチンの接種適正用量の結果を踏まえ、相互補完的免疫法の評価をマーモセットにおいて開始した。

B. 研究方法

1) マーモセット攻撃接種実験

体温測定用発信プローブ TA10TA-F40 (プライムテック) を腹腔内に挿入した♂のコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) (日本クレア) (EDM:C.Marmoset(Jic)) 5 頭 (内 2 頭は JL 株 650 PFU で昨年度免疫した個体 (#5181、#5183)、残り 3 頭 (#5185、#5186、#5189) は非免疫個体) に麻酔下で大館-3 株を、10,000 PFU/頭の用量で両鼻腔内に滴下した (表 1)。接種後、体温と活動性のリアルタイム測定、体重

測定と臨床観察を行うとともに、麻酔下で経時的に大腿静脈より採血を行った。EDTA 処理血液から血漿と末梢血リンパ球を分離し、中和抗体価と攻撃ウイルスのゲノムコピー数を測定した。接種後 5 週目で非免疫個体群のみを病理解剖し、中枢神経系、主要臓器、およびリンパ系組織を採取し、病理学的検索およびウイルス学的検索を行った。

2) リアルタイム PCR

EDTA 処理血液から血漿を分離した後、RNeasy Blood Mini Kit (QIAGEN) を用いて、末梢血リンパ球の総 RNA を抽出した。各臓器からの総 RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いた。次に、PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて、総 RNA からランダム 6mer により cDNA を合成し、リアルタイム PCR に供した。リアルタイム PCR による MuV ゲノムコピー数の測定は、MuV の NP 遺伝子 1,398nt-1,455nt 領域を標的として、Universal ProbeLibrary #62 (Roche)、LightCycler480 Probes Master 試薬 (Roche) と LightCycler 480 システム (Roche) を用いて行った。各検体のゲノムコピー数は、1 μ g RNA 量当たりで算出した。

3) 補体添加中和法

56°C で 30 分間非働化したマーモセット血漿を、1%トレハロース、0.2%ゼラチン、5%FCS を含むイーグル MEM で 4^{-1} から 4^{-6} 倍まで階段希釈し、そこに希釈血清の半分量の 100 希釈モルモット補体 (デンカ生研) および MuV 液 (野外分離株 Y#01 株、遺伝子型 G) をそれぞれ加え、十分に混和した後、37°C で 2 時間インキュベーションした。Vero 細胞を培養した 24 ウェル

プレートに接種した後、37°Cで1時間吸着させ、0.5%アガロースを含むイーグル培地を重層し、4日間培養した。そこにニュートラルレッドを含むイーグル培地を重層し、細胞を染色した後、グルタールアルデヒドで細胞を固定し、プラーク数をカウントした。中和抗体価は、ウイルス対照のプラーク数を50%減じる血清の希釈倍率として算出した。

4) マーモセットのワクチン株による免疫

体温測定用発信プローブ TA11TA-F10 または TA10TA-F40 (プライムテック) を腹腔内に挿入した♂のマーモセット (日本クレア) 9頭 (生後1歳7ヶ月~2歳) を3群に分け、今年度はそれぞれ、JL株+JL株、JL株+星野株、星野株+星野株の組み合わせで実験を開始した (表2)。実験スケジュールは、初回免疫の後8週目に追加免疫を行い、さらにその8週後に大館-3株で経鼻接種による攻撃感染を行う (図7)。ワクチンの接種ドースは昨年度の至適接種用量の検討結果から100 PFU/頭とした。

(倫理面の配慮)

一連の動物実験は、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1) マーモセットにおける強毒株経鼻接種後の体温、活動性のリアルタイム測定

ムンプスワクチンによって誘導された防御免疫を評価するための攻撃感染を想定して、野外強毒株大館-3株の経鼻接種による感染実験を行った。免疫群として、

昨年度に高用量 (650 PFU/頭) のJL株を皮下接種した2頭 (#5181 および#5183) を、また非免疫群として3頭 (#5185、#5186 および#5189) を用いた。体重の変化に加え (図1)、マーモセットの腹腔内に体温測定用発信プローブを埋め込み、経時的に体温と活動性を測定することにより、ワクチン接種後の体温と活動性の変化を測定した (図2)。

体重変化において、ワクチン免疫群では接種後はいずれの個体においても増加が認められたのに対し、非免疫群では全頭で接種時の体重と比較して、解剖時の体重に若干の減少が認められた (図1)。

体温はいずれの個体においても規則的な日周期変動を示したが、非免疫群3頭の内2頭 (#5186 および#5189) において、接種後2~3週目で顕著な体温上昇を観察した。特に#5189においては、3日間にわたり体温上昇が認められ、その間の活動性も低下する傾向が認められた。一方ワクチン接種群の2頭では攻撃接種後の体温の上昇などの変化は認められなかった。また、活動性についても、変化は認められなかった (図2)。

2) リアルタイムPCRによる攻撃ウイルスのウイルス血症の測定

攻撃接種後の攻撃ウイルスの感染動態を評価するため、経時的に採取した末梢PBLに含まれる攻撃ウイルスゲノム量をリアルタイムPCRで測定した (図3)。

ワクチン免疫群 (#5181 および#5183) ではウイルスゲノムが全く検出されず、強毒株による感染に耐過した。一方、非免疫群では全頭で高いレベルの ($10^4 \sim 10^5$ コピー) ウイルスゲノムが検出され、接

種後 28 日まで持続した。特に、発熱を呈した 2 頭ではウイルス血症の立ち上がりが早く（接種後 7 日目）、かつピーク時のウイルス量も、発熱を示さなかった個体（#5185）より 1 オーダー高かった。発熱の無かった個体ではウイルス血症の開始が他の 2 頭に比べて 7 日遅く、そのレベルも低いものであった。こうしたウイルス血症の違いは、病態の違いにも関連しているようである。

3) 中和抗体価の変動

非免疫群では、ウイルス血症の開始時期に呼応して中和抗体価の劇的な上昇が認められた（図 4）。接種後一週目でウイルス血症が観察された 2 頭（#5186、#5189）では接種後 2 週目にはワクチン接種では誘導され得ない^{46.0} 近い高い中和抗体価が誘導された。ウイルス血症が遅れた個体においても、その 1 週間後には同程度の抗体価が検出されている。

一方、ワクチン接種群では劇的な抗体価の変動は認められなかった。特に攻撃時の抗体価が高い（^{44.8}）個体 #5181 では、抗体価の上昇は認められず、むしろ観察期間中に暫減していた。一方、攻撃時の抗体価が ^{43.6} と比較的低かった #5183 では劇的な変動はないものの、接種後 10 日目から抗体価が上昇する傾向を示した。

4) 非免疫群における野外強毒株接種後の病理学的所見

攻撃接種後 5 週目で非免疫群 3 頭を病理解剖し、中枢神経系と主要臓器、およびリンパ系組織について病理学的検索、およびウイルス学的な検索を行った。その結果、3 頭それぞれが異なる病態を示した（図 5、図 6）。

ウイルス血症の開始が遅く、発熱を示さなかった個体 #5185 では、耳下腺、膵臓、脾臓、精巣から MuV ゲノムが検出されたが、中枢神経系の組織からは検出されなかった（図 5）。これらの組織の中で特に、膵臓と精巣に顕著な炎症像が認められ、精巣からは MuV 抗原も検出された（図 6）。また、この個体ではヒトでのムンプス肺炎で観察されると同様に血中のアミラーゼ活性が攻撃後 4 週目から上昇していた（網康至分担報告書参照）。

一方、ウイルス血症の開始が早く、接種後 20 日に軽い発熱を示した個体 #5186 においては、耳下腺および脾臓からウイルスゲノムが検出されたものの、これらの臓器に病理学的な変化は認められなかった。しかし、小脳周辺の髄膜にリンパ球の浸潤による髄膜炎像が認められた（図 6）。

顕著な発熱を呈した個体 #5189 では小脳、橋、脊髄など中枢神経系全体からウイルスゲノムが検出され、第 4 脳室の脈絡叢には炎症像が認められた。これらの結果は、この個体が髄膜炎を発症したことを強く示唆するものである。実験動物、特に霊長類において、MuV の自然感染と同じ経鼻感染によって発熱を伴う髄膜炎の発症が確認されたのは、これが最初の報告である。

5) 相互補完的免疫プログラムのマーマセットモデルによる評価

JL 株と国産ワクチン株とを相互補完的に用いるワクチンプログラムをマーマセットで評価するため、昨年度からワクチンの適正接種用量の探索、およびワクチンで誘導される感染防御能を評価するための攻撃接種の条件検討を行ってきた。

これらの結果を踏まえ、今年度後半から表3に示すように3群の接種群で、図7の実験スケジュールに従って、免疫実験を開始した。現時点では免疫の途中段階であり、まだ最終的な結果は得られていない。次年度においては、更に2群の免疫群（JL株+鳥居株、鳥居株+鳥居株）を追加し、最終的な評価を行う。

D. 考察

今年度は、相互補完的免疫によって誘導される感染防御能を評価するための攻撃接種の条件を検討した。

攻撃接種に使用した大館-3株は、1993年に山形県大館市周辺で発生した70%という高い無菌性髄膜炎発症率を伴うアウトブレイクの際に分離された野外株であり、マーモセットにおいても静脈内接種によって髄膜炎を引き起こすことで知られている（Saika S. *et al.*, *J. Med. Virol.* 2002）。今回我々は、ワクチンで誘導される感染防御能を適確に評価するために、より自然感染に近い感染経路（経鼻接種）での攻撃接種を試みた。その結果、非免疫群では2/3の個体で明確な発熱を観察すると共に、全頭で高レベルのウイルス血症を確認した。また、全頭で体重の減少が観察された。感染後5週目での病理解剖による病理学的な検索の結果では、3頭それぞれに異なる病態を示した。いずれもヒトにおける病態を再現するものであり、特に経鼻感染による発熱や、膵炎、精巣炎および髄膜炎の発症はムンプスの動物モデルでは初めての報告である。改めてマーモセットが優れた感染モデルになり得ることを示す結果と言える。また、膵炎を発症した個体では、血中のアミラ

ーゼ活性が接種後4週目から上昇していた。こうした反応もヒトにおける現象を再現しており、また、マーモセットの血中アミラーゼ活性がムンプスの病態を反映するバイオマーカーになり得ることを示している。

一方、ワクチン免疫群では攻撃接種後の発熱、およびウイルス血症は観察されず、攻撃前に高い中和抗体価を示した個体では、攻撃後の抗体価上昇も観察されず、完全に耐過した。一方、比較的抗体価の低い個体では、攻撃後に抗体価の上昇が認められ、部分的な感染のリークが生じた可能性が示唆された。しかし、発症を示す兆候は認められず、体重も増加していた。以上の結果から、野外強毒株の経鼻感染による攻撃接種によって、ワクチンで誘導される感染防御能が評価しうることが示された。

野外強毒株による攻撃感染の結果と昨年度に行ったワクチンの接種適正用量の結果を踏まえ、相互補完的免疫法の評価をマーモセットにおいて開始した。

E. 結論

攻撃感染モデルとして、野外強毒株大館-3株をマーモセットに経鼻接種したところ、非免疫群では明確な発熱とウイルス血症のほか、複数の標的組織にムンプス特有の病理変化が認められた。一方、ワクチン免疫群ではいずれも観察されず、耐過した。以上の結果から、強毒株による経鼻感染によって、ワクチンで誘導される防御免疫を評価しうることが示された。また、マーモセットがムンプスのモデル動物として有用であることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katoh H, Kubota T, Kita S, Nakatsu Y, Aoki N, Mori Y, Maenaka K, Takeda M, Kidokoro M. (2014) Heat shock protein 70 regulates degradation of the mumps virus phosphoprotein via the ubiquitin-proteasome pathway. J Virol. In press.
- 2) Kidokoro M, Shida H. (2014) Vaccinia Virus LC16m8Δ as a Vaccine Vector for Clinical Applications. Vaccines, 2, 755-771.
- 3) Ohashi T, Nakamura T, Kidokoro M, Zhang X, Shida H. (2014) 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. 2014:1-13.

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

H. 知的財産の出願・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

表 1 攻撃接種実験に使用したマーモセットと接種用量

| Animal No. | Born | Sex | Immunization dose (PFU/head) | Challenge Dose (PFU/head) |
|------------|------------|-----|------------------------------|---------------------------|
| 5181 | 2012.10.14 | M | 650 | 10,000 |
| 5183 | 2012.10.23 | M | 650 | 10,000 |
| 5185 | 2013.01.15 | M | mock | 10,000 |
| 5186 | 2013.01.22 | M | mock | 10,000 |
| 5189 | 2013.02.26 | M | mock | 10,000 |

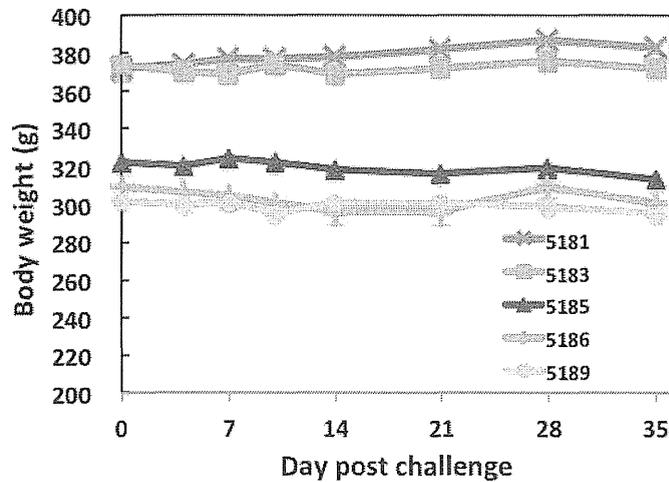


図 1 攻撃接種後のマーモセットの体重変化

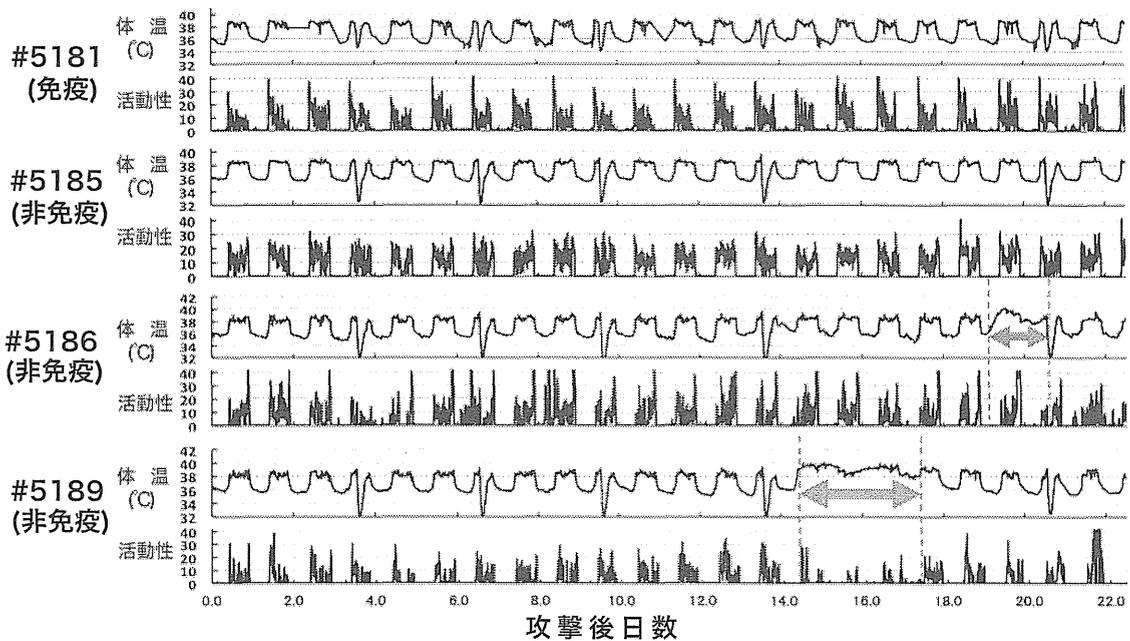


図 2 マーモセットの体温と活動性の変化
横軸は攻撃接種後の日数、矢印は発熱期間を示す

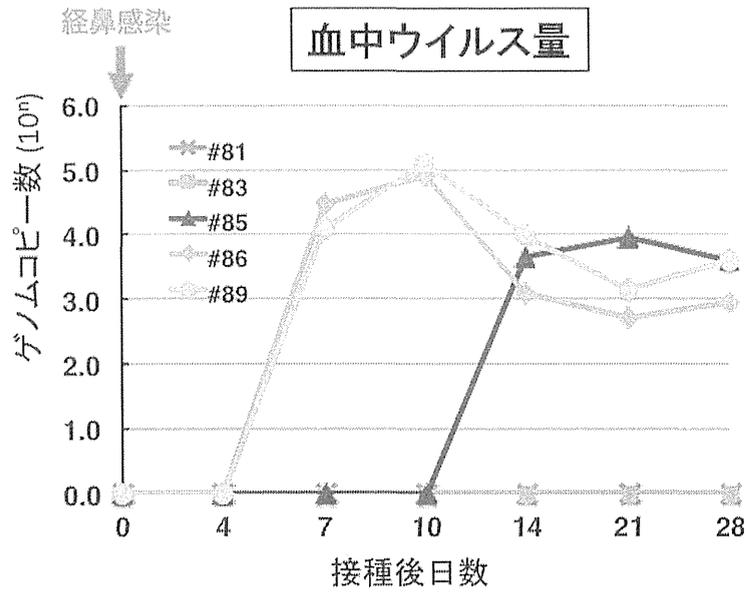


図3 大館株攻撃接種後の末梢 PBL 中ウイルスゲノム数の変化

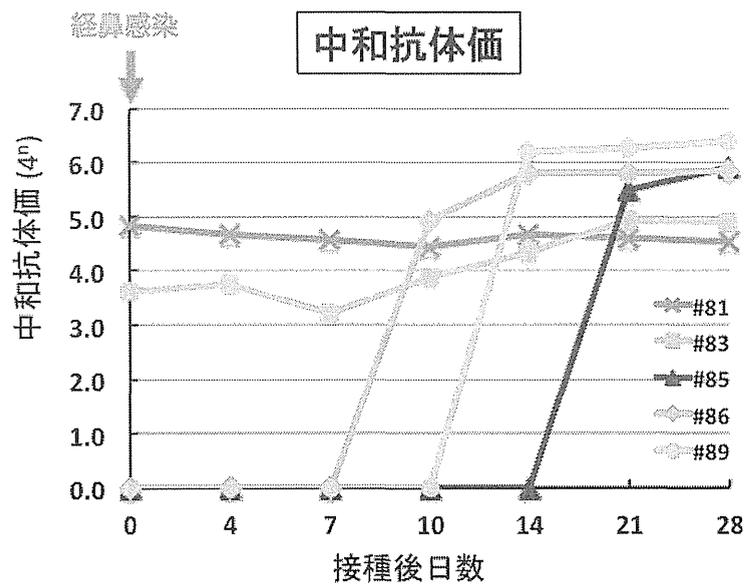


図4 大館株攻撃接種後の中和抗体価の推移