

図5 攻撃接種後5週目における標的組織のウイルス量

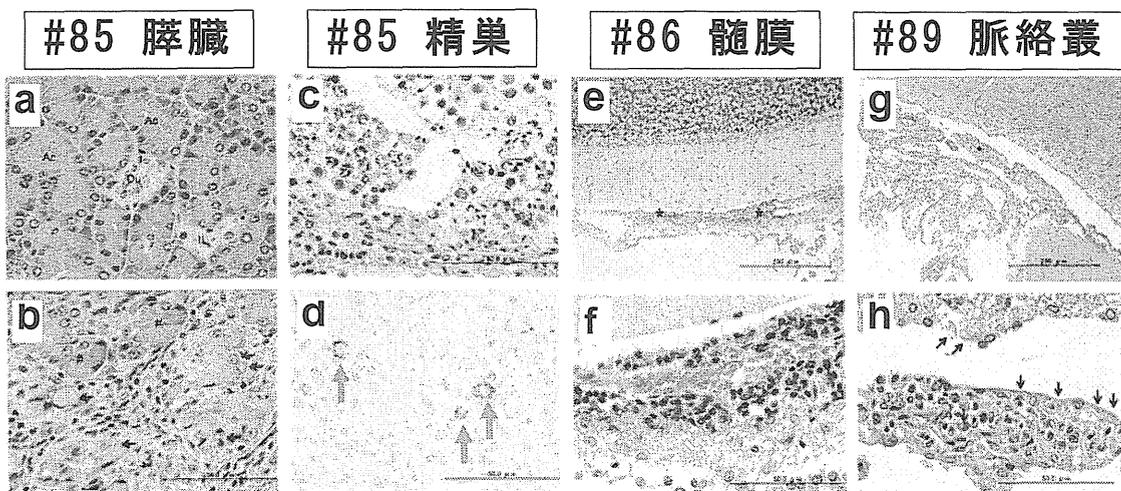


図6 攻撃接種後5週での標的組織における病理像

- a:膵臓の正常部位、b:膵臓の炎症性細胞浸潤像
- c:精巣の炎症像、d:精巣炎症部位におけるウイルス抗原陽性細胞(矢印)
- e, f:小脳における髄膜炎像、g, h:第四脳室脈絡叢における炎症像

表2 相互補完的免疫スケジュールに使用したマーモセット

Group	1 st vaccination	2 nd vaccination	Number of animals	Immunization dose
A	JL	JL	3	100 PFU
B	JL	Hoshino	3	100 PFU
C	Hoshino	Hoshino	3	100 PFU
mock	-	-	3	-

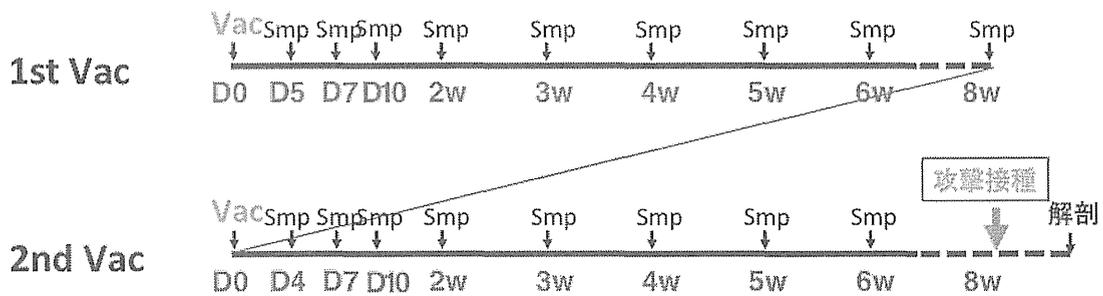


図7 マーモセットにおける相互補完的免疫法評価のための免疫スケジュール
 Vac:ワクチン接種、smp:検体採取

分担研究報告書

ムンプスワクチン効果に関する臨床的研究

研究分担者 庵原俊昭（国立病院機構三重病院小児科）
研究協力者 菅 秀、浅田和豊、中村晴奈、根来麻奈美、長尾みづほ
（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）

研究要旨 先進国でムンプスワクチンが定期接種になっていない国は本邦だけである。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た。接種後の抗体価は、1年で低下するが、その後はプラトーになると推察され、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。

以上の結果から、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。なお、ムンプスの血清疫学研究を行うために、適切なムンプス抗体測定方法の開発が必要と思われた。

A. 研究目的

ムンプスは感染力が強い全身性ウイルス感染症である。世界各国でムンプスワクチンが使用されている。先進国や経済興隆国で定期接種になっていないのは日本だけである。欧米では安全性は高いが、免疫原性が劣るJeryl-Lynn (JL) 株を用いている。本邦では現在星野株と鳥居株が市販されており、JL株よりも安全性は劣るが、有効性は高いと評価されている。近年、本邦ワクチン株は、以前の報告よりも耳下腺腫脹率が低いという報告がある。現在、本邦ムンプスワクチン株の有効性、安全性について再評価を行っており、今回今までの研究成果について報告する。

B. 研究方法

1) 本邦ムンプスワクチン株の流行抑制効果

三重県K市では平成20年度(2008年)からムンプスワクチンの公費助成を行っている。公費助成開始後のムンプスワクチンの接種率、およびK市の感染症サーベイランス定点のムンプス患者数を調査した。

2) 本邦ムンプスワクチン接種後の抗体価の推移

ムンプスワクチンの接種を受けた70人を対象に、ムンプスワクチン後のEIA-IgM抗体およびEIA-IgG抗体を測定した。なお、抗体測定にはデンカ生研のムンプスEIA-gM抗体測定試薬およびムンプスEIA-IgG抗体測定試薬を用いた。

3) 本邦ムンプスワクチン株の無菌性髄膜炎合併率

2013年4月から2014年7月までの16か月間にムンプスワクチン接種後無菌性髄膜炎を合併したとPMDAに報告された症例要約を、厚生労働省予防接種・ワクチン分科会副反応部会の資料から入手し、検討した。

4) ムンプスワクチン2期接種の免疫原性

ムンプスワクチン1期を1歳児に受けた41人を対象に、小学校就学前にムンプスワクチンの2回目を接種した。なお、40人は麻疹風疹混合(MR)ワクチンと同時に接種し、1人は

ムンプスワクチンの単独接種を行った。ムンプスワクチン接種前、および接種4週後に採血し、EIA-IgG抗体を測定した。

5) ムンプス発症予防抗体価の検討

ムンプス発症予防抗体価は確立されていないが、理論上の発症予防抗体価は中和(NT)抗体4倍である。同意を得て採取した219血清を用いて、中和抗体4倍に相当するデンカEIA-IgG抗体価について、ROC解析および回帰直線を用いて検討した。中和抗体測定には星野株を用いた。また、176血清を用いて、デンカEIA-IgG抗体とシーメンスEIA-IgG抗体の陽性閾値の相関について検討した。

(倫理面への配慮)

血清を採取するに当たっては、保護者または本人の同意を得てから採取し、測定結果を保護者または本人に還元した。また、結果の公表に当たっては氏名が特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

1) 本邦ムンプスワクチン株の流行抑制効果

ムンプスワクチン1回接種が公費助成となった平成20年度からのムンプスワクチン接種率は、1歳児においては66.3%~98.3%、出生年度別の累積接種率は82.3%~98%となった(表1)。ムンプス報告数は、公費助成開始前の平成11年~19年の平均報告数は70例/定点であったが、公費助成開始後の平成20年からの年間報告数は、2~14例/定点に激減した(平均減少率87.1%)。

2) 本邦ムンプスワクチン接種後の抗体価の推移

ムンプスIgM抗体については、接種1か月以内では5例中3例が陽性であり(陽性率60%)、その後陽性率は低下するものの、接種4~6ヶ月群までムンプスIgM抗体は検出された(表2)。一方、ムンプス平均IgG抗体は、接種1年後から低下し始め(表3)、接種19か月以降では、抗体陰性者が増加したが、その後の低下は認められなかった。

3) 本邦ムンプスワクチン株の無菌性髄膜炎合併率

平成2013年4月から2014年7月までの無菌性髄膜炎報告数は21例あり、発症者の年齢は、1歳から40歳代まで分布していた(表4)。調査期間中のムンプスワクチンの在庫数は

2,531,563 doseであり、三重県の小児科医療機関におけるムンプスワクチンの年齢別の接種者数から、全国の年齢別のムンプスワクチン接種者数を推定した。推定接種者数を基に算出した無菌性髄膜炎発症率は、1歳に接種すると10万接種あたり0.13例となり、その後年齢が上がるにつれ上昇し、10-19歳群では10万接種あたり6.69と、1歳に接種するよりも52.4倍の発症率であった。

報告された株ごとのワクチン後の無菌性髄膜炎発症日は、星野株(9例)20.1±9.4日に対して、鳥居株(10例)24.2±4.2日と、鳥居株の発症日の方が、有意に接種から発症までの期間が長期間であった(表5)。

4) ムンプスワクチン2期接種の免疫原性

1歳時に、MRワクチンとムンプスワクチン星野株を接種した41人を対象に、17人に鳥居株を、24人に星野株を接種した。なお、40人はMRワクチンとの同時接種を行った。接種前後の抗体価をみると、麻疹、風疹、ムンプスともに有意に上昇していた(表6)。

なお、麻疹、風疹ともに接種前の抗体価が低いほど、2期接種後の抗体上昇率(接種後抗体価/接種前抗体価)が有意に高値であった(麻疹:抗体上昇率(\log_2) = $-0.38 \times$ 接種前抗体価(\log_2) + 2.98 (R=0.5317、P=0.00042)、風疹:抗体上昇率 = $-0.64 \times$ 接種前抗体価 + 3.18 (R=0.86851、P<0.0001)。相関直線から求められる、2倍以上の抗体上昇を示す抗体価は、麻疹37.0 EIA価以下、風疹10.6 EIA価以下であった。ムンプスでは、接種前の抗体価に関わらず、41例中40例で抗体価の有意上昇(2倍以上の上昇)が認められており、2倍以上の抗体上昇を示す抗体価は算出できなかった。

株ごとの追加接種効果では、鳥居株の方が優れた免疫原性が認められた(表7)。

5) ムンプス発症予防抗体価の検討

ROC解析によると、感度および特異度から中和抗体4倍に相当する \log_2 EIA価は1.561(2.95 EIA価)に相当した。また、2を底とする対数に変換してNT抗体とデンカEIA-IgG抗体の相関を検討したところ、両者の間には有意の相関があり(R=0.7278、P<0.0001)、相関直線は $Y=0.3576X+0.8435$ となった。相関直線からNT抗体4倍(X=2)を示す \log_2 EIA価(Y)は1.550となり、2.928 EIA価と算出された。

次に、デンカとシーメンスのIgG抗体の相

関を検討した。添付文書通りにデンカの判定保留域を2~4EIA価とすると、178血清中57血清(32.4%)が判定保留域に含まれていた(表8)。一方、シーメンスの場合は添付文書通りの判定保留域に設定すると、判定保留血清は18(9.1%)と少数であった。また、デンカの判定保留57血清中39血清(68.4%)はシーメンスで陽性となった。

デンカの判定保留サンプル数を減らすために、判定保留域を 2^1 ~ $2^{1.5}$ (2.8EIA価)に設定し、シーメンスとの間の相関を検討したところ、特異度、陽性一致率および全体一致率は上昇した。

D. 考察

ヨーロッパ各国を対象にした調査では、ムンプスワクチンを1回定期接種している国ではムンプスの患者数が90%、2回定期接種をしている国では患者数が99%減少している。本邦のムンプスワクチン株の集団における効果については今まで報告されていない。今回の検討では、公費助成により1歳児の接種率が77%になった初年度から、ムンプス患者数は91.4%に減少した。平成25年まで6年間追跡したが、この間ムンプスの流行はなく、平均減少率は87.1%と、ヨーロッパでの調査と同様の結果であった。また、この間にワクチンフェーラー例を認めなかった。この結果は、本邦ムンプスワクチン株は、1回接種によって優れた免疫原性を有していることを示唆している。

ムンプスワクチン初回接種後の抗体持続では、接種1年を経過すると、デンカのIgG抗体測定試薬を用いて検討すると、抗体陰性例が増加する傾向を認めた。しかし、平成20年度からの6年間には、公費助成で接種した児のワクチンフェーラー例は認められなかった。この結果から、ムンプスワクチンは1回目の接種率が上昇すると、ムンプスの流行を抑制し、接種後の抗体価が低下しても、曝露機会がなくなり、ワクチンフェーラー例が減少すると推察された。

ムンプスワクチン初回接種後の抗体価(\log_2 EIA価)の持続に関しては、接種1年後(1.63 ± 1.22)、接種2年後(1.72 ± 0.42)、および接種5年後(1.83 ± 0.99)の平均IgG抗体価は同等であった。以上の結果から、ワクチン接種によって一度上昇した抗体価は、1年後に低下するものの、その後は同じレベルで持続すると推察された。

ムンプスワクチンの安全性に関しては、ワ

クチン後の耳下腺腫脹は2~3%とされていたが、近年の本邦ワクチン株の耳下腺腫脹率は0.25%に低下しており、しかも1歳児に接種すると一番腫脹率が低く、接種時の年齢が高くなるにつれ、耳下腺腫脹率が増加することが示されている。

今回のムンプスワクチン後の髄膜炎の副反応発症頻度の調査では、10万接種あたり0.83と、以前の報告の1/5~1/50であった。この結果は、近年の耳下腺腫脹率の減少と一致する結果であり、興味深い結果と思われたが、原因は不明である。

また、三重県で接種している年齢構成で、全国でムンプスワクチンが接種されたと仮定した時のムンプスワクチン後の髄膜炎発症頻度は、1歳児が10万接種あたり0.13であり、その後年齢が上がるにつれ上昇していた。この結果は、発症頻度は異なるものの、自然感染でもムンプス髄膜炎は、ムンプス発症時の年齢が高くなるにつれ発症率が増加するという報告と一致する結果であった。また、1歳児の無菌性髄膜炎発症率は、欧米のJL株接種時の髄膜炎発症率である10万接種あたり0.1と同等の結果を示している。この結果から、本邦ワクチン株は、1歳児に接種すればJL株と同等の安全性があると推察された。

ムンプスでは発症予防抗体価は確立されていないが、全身性ウイルス感染症では、NT抗体4倍が理論上の発症予防抗体価である。NT抗体4倍に相当するデンカEIA-IgG抗体価を求めたところ、2.9EIA価に相当した。この値は、デンカEIA-IgGの抗体陽性閾値4.0EIA価よりも低値であり、デンカEIA-IgG抗体測定試薬の陽性閾値の再検討が必要と思われた。なお、デンカの判定保留域に該当する57サンプル中29サンプルはシーメンスでは陽性であり、デンカのEIA-IgG抗体価の陽性閾値を $2^{1.5}$ (2.8EIA)としたとき、シーメンスとの陽性一致率や全体一致率は上昇した。これらの点からもデンカEIA-IgG抗体測定試薬の見直しが必要と思われた。

E. 結論

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。接種後の抗体価は、1年で低下するが、その後はプラトーになると推察され、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1)庵原俊昭：ムンプス．小児科診療 77: s164-s166, 2014

2)庵原俊昭：幼稚園における感染症の実態とその予防．小児科臨床 67:1997-2004, 2014

3)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

2. 学会発表

1)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 2014.6.14-15 札幌

2)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 2014.4.11-13 名古屋

3)庵原俊昭、菅 秀、浅田和豊、東川正宗、落合 仁、二井立恵、伊佐地真知子、渡辺正博：安全性からみた本邦ムンプスワクチンの適切な接種年齢の検討．第 117 回日本小児科学会 2014. 4. 11-13 名古屋

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2014.12.6-7福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特記することなし。

2. 実用新案登録

特記することなし。

3. その他

特記することなし。

(表1) ムンプスワクチン接種率とムンプス報告数

年度	接種率		ムンプス	
	1歳	累積	報告数	減少率(%)
H11-H19	不明	不明	70	0
H20	77.1	97.6	6	91.4
H21	66.3	82.3	14	80.0
H22	70.0	88.0	13	81.4
H23	76.3	84.0	3	95.7
H24	81.8	88.6	14	80.0
H25	98.3	98.3	2	97.1

(表2) ムンプスワクチン接種後のIgM抗体の検出

接種後の期間	陽性	判定保留	陰性	合計
<1ヶ月	3	0	2	5
2~3ヶ月	2	1	9	12
4~6ヶ月	2	0	17	19
7~11ヶ月	0	1	18	19
12~18ヶ月	0	0	17	17
19~24ヶ月	0	0	4	4

(表3) ムンプスワクチン接種後の平均IgG抗体価

接種後の期間	例数	平均抗体価(log ₂ EIA価)
<4ヶ月	15	2.32±1.25
5~8ヶ月	19	2.49±0.92
9~12ヶ月	5	2.22±0.85
13~18ヶ月	15	1.63±1.22
19~31か月	16	1.72±0.42

(表4) 副反応報告による年齢群別ムンプス髄膜炎発症率

年齢群	髄膜炎	接種者数		髄膜炎	
		三重県	全国推定	発症率(/10万接種)	OR
1歳	2	850	1566105	0.13	1.00
2-3歳	2	243	447722	0.45	3.50
4-6歳	3	144	265317	1.13	8.85
7-9歳	1	56	103179	0.97	7.59
10-19歳	9	73	134501	6.69	52.40
20-29歳	1	2	3685	27.14	212.50
30-39歳	2	5	9212	21.71	170.00
40-49歳	1	1	1482	52.47	425.00
合計	21	1374	2531563	0.83	

(表5) 株によるムンプスワクチン後の髄膜炎発症日

株	例数	平均発症日	P値
鳥居株	9	24.22±4.18	
星野株	10	20.10±3.07	0.0244

(表6) MRワクチンとムンプスワクチン同時接種の免疫原性

感染症	例数	平均抗体価 (log ₂ EIA価)		P値
		接種前	接種後	
麻疹	40	3.01±1.30	4.82±1.14	<0.0001
風疹	40	2.58±1.51	4.10±0.77	<0.0001
ムンプス	40	1.82±1.00	4.81±1.61	<0.0001

(表7) ムンプスワクチン株による免疫原性

感染症	例数	平均抗体価 (log ₂ EIA価)	
		接種前	接種後
ムンプス 全例	41	1.83±0.99	4.89±1.66
鳥居株	17	2.11±0.73	5.74±1.72*
星野株	24	1.62±1.10	4.29±1.37*

*P=0.00274

(表8) デンカとシーメンスのIgG抗体の相関

(1)条件1 : デンカの判定保留域を2~4 EIA価

		シーメンス			合計
		陰性	保留	陽性	
デンカ	陰性	27	3	2	32
	保留	13	5	29	57
	陽性	5	8	74	87
	合計	45	16	115	176

(2)条件2 : デンカの判定保留域を2~2.8 (2^{1.5}) EIA価

		シーメンス			合計
		陰性	保留	陽性	
デンカ	陰性	27	3	2	32
	保留	9	1	16	26
	陽性	9	12	97	118
	合計	45	16	115	176

(3)デンカの判定保留域による検討

	条件1	条件2
感度	85.1%	82.2%
特異度	53.9%	69.0%
陰性一致率	78.7%	65.5%
陽性一致率	64.4%	84.3%
全体一致率	69.3%	77.8%

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

研究分担者 中山哲夫 北里生命科学研究所

【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 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。2013 年度までに AIK-C 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。回収した組換えウイルスをコットンラットに接種し 2 回接種後からムンプス中和抗体が検出された。脾臓細胞をムンプスウイルスで刺激し 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。細胞性免疫のターゲットと考えられるムンプス N タンパク質を組み込んだ組換え麻疹ウイルスを作成し Vero 細胞に感染させ麻疹ウイルスのタンパク質、ムンプスウイルスの N タンパク質の発現を確認した。

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。世界で広く使用されているJeryl Lynn株は無菌性髄膜炎の出現頻度が低いものの免疫原性が低くことが知られている。ムンプスは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。

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cDNA遺伝子から感染性ウイルスを回収する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もち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。昨年度までHN, Fタンパク質遺伝子を導入した組換えウイルスをコットンラットに接種し2回免疫することで中和抗体を誘導することを報告した。免疫後の脾臓細胞の採取しムンプスウイルス特異的は細胞性免疫能をCD8+/IFN- γ +細胞をFlow cytometryで検討したが検出できなかった。Nタンパク質が細胞性免疫の標的と考えられておりNタンパク質遺伝子を発現する組換え麻疹ウイルスを作成することを目的とした。

B 研究方法

B-1) IFN- γ mRNA の検出

F, HN 発現組換え麻疹ウイルス(MVAIK/MPHN, MVAIK/MpF Δ TM)を2回接種後の脾臓細胞、胸腺細胞を紫外線不活化ウイルス抗原で刺激し 24 時間培養し細胞内の RNA を抽出しコットンラット IFN- γ mRNA を測定し β -actin を内部コントロールとしてコントロ

ール細胞と比較して表示した。

B-2) 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 *Ase 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* 配列を付加する事で外来遺伝子を挿入する。ムンプスワクチン星野ワクチンシード株から N タンパク質遺伝子翻訳領域をクローニングして pMVAIK/Mp N を作成した。

B-3) 感染性ウイルスの回収

293T 細胞に T7RNA polymerase 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-4) 麻疹ウイルス、ムンプス N タンパク質の発現

回収したウイルスを Vero 細胞に感染させ 3 日後に固定し、麻疹ウイルス、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-5) ムンプスウイルスはコットンラットに感染するか？

RSV、インフルエンザウイルスの感染防御抗原を組み込んだ組換え麻疹ウイルスを作成しコットンラットに免疫し、攻撃試験を行い免疫原性、感染防御能を検討してきた。ムンプスウイルスの HN, F, N タンパク質を組み込んだ組換えウイルスの検討に関してコットンラットに感受性があるかどうかは報告がない。コットンラットにムンプスウイルス genotype G の流行株を皮下接種、経鼻接種し 1 週後に感染性ウイルスの検出を試みた。

C 結果

C-1) IFN- γ mRNA の検出

HN, F 発現組換え麻疹ウイルス(MVAIK/MPHN, MVAIK/Mp Δ TM) 単独、2 種を混合接種し 2 回接種後 5 週後の脾臓細胞、胸腺細胞を採取し AIK-C、ムンプス星野株、流行株を紫外線不活化抗原で刺激しコットンラット IFN- γ mRNA コピー数をコントロールと比較して示した。MVAIK/MPHN 接種後の脾臓細胞で星野ワクチン株の抗原で IFN- γ mRNA 検出されたが有意ではなかった。MVAIK/MPHN と MVAIK/Mp Δ TM の 2 種類で免疫後の脾臓細胞を不活化 AIK-C、星野ワクチン株不活化抗原で刺激すると IFN- γ mRNA が増加したが有意ではなかった。

胸腺細胞では AIK-C 不活化抗原刺激でコントロールと比較して 3 倍の IFN- γ mRNA が検出された。

RT-PCR (IFN- γ)

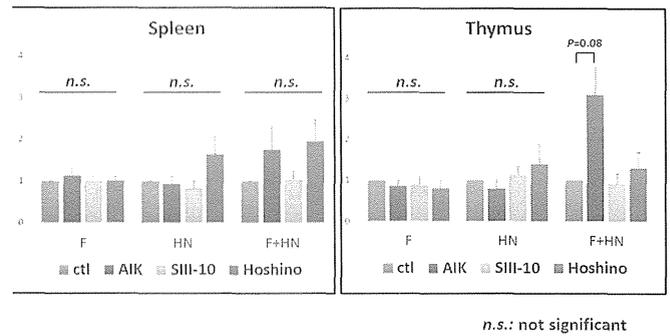


図 1. 脾臓、胸腺細胞の IFN- γ mRNA 量

C-2) 感染性ウイルスの回収とタンパク質発現

ムンプスワクチン星野株の N タンパク質翻訳領域をクローニングし AIK-C の cDNA に組み込んだ組換えウイルス MVAIK/MP N を作成した。

Vero 細胞に組換えウイルスを接種し免疫蛍光染色を行い結果を図 2 に示した。ムンプスウイルス、麻疹ウイルスをウサギに免疫して得られた免疫血清を用いて N タンパク質の発現を検討した。

星野株、AIK-C 株は Vero 細胞に細胞融合を認め巨細胞が形成されている。一方、MVAIK/MP N の細胞融合は小さい傾向が認められる。星野株の免疫血清で染まっており挿入したムンプス N タンパク質の発現を確認できた。ベクターの麻疹ウイルスタンパク質の発現も確認された。

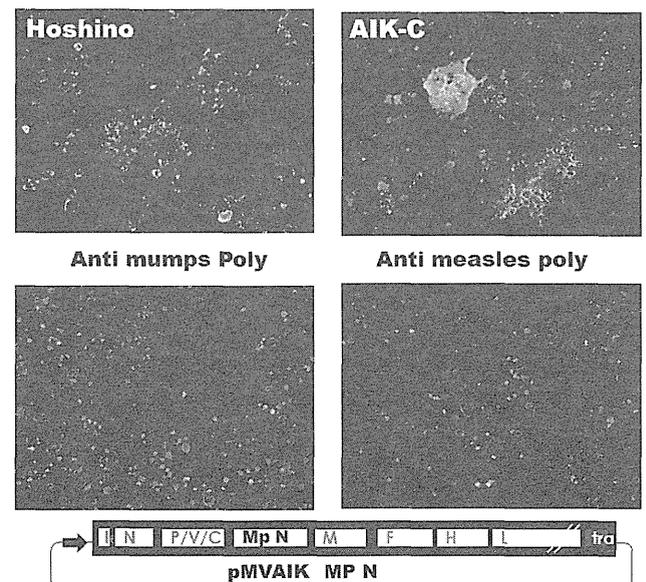


図 2. 挿入したムンプス N タンパク質の発現

C-3) ムンプスウイルスはコットンラットに感染しない。

流行野生株をコットンラットに筋注し 1 週間後の中枢神経、咽頭、鼻甲介、肺、胸腺、脾臓、肝臓、リンパ節からウイルス分離を試みたが感染性ウイルスは検出できなかった。経鼻感染後も同様であった。

D 考案

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、細胞性免疫誘導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。

F, HN タンパク質は細胞への吸着、膜融合に関連し感染防御に関連する中和抗体を誘導する。感染細胞を排除するにはウイルス特異的な細胞性免疫能の働きにより感染の拡大を抑えることになる。細胞性免疫能のターゲットは N タンパク質で N タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルスを作成したが、細胞性免疫能を検討する測定系の開発が必要である。脾細胞を刺激し CD8+/IFN- γ +細胞を Flow cytometer で検討したが検出できず、今回の検討では IFN- γ mRNA コピー数の増加が認められたものの感度が低く測定系の改良が必要である。

E. 結語

ムンプスウイルス N タンパク質を発現する組換え麻疹ウイルス MVAIK/MP N を作成した。MVAIK/MPHN, MVAIK/MpF Δ TM とのカクテル免疫による免疫応答を検討する必要がある。これらの組換えウイル

スを免疫した後の細胞性免疫能の評価系を確立する必要がある。

F. 2014 年度研究業績

1. 論文発表

- 1) Kashiwagi Y, Miyata A, Kumagai T, Maehara K, Suzuki E, Nagai T, Ozaki T, Nishimura N, Okada K, Kawashima H, Nakayama T. Production of inflammatory cytokines in response to diphtheria-pertussis-tetanus (DPT), haemophilus influenzae type b (Hib), and 7-valent pneumococcal (PCV7) vaccines. *Human vaccine & Immunother* 2014; 10: 677-685.
- 2) Kashiwagi Y, Maeda M, Kawashima H, Nakayama T. Inflammatory responses following intramuscular and subcutaneous immunization with aluminum-adjuvanted or non-adjuvanted vaccines. *Vaccine* 2014; 32: 3393-3401.
- 3) Yamaji Y, Nakayama T. Recombinant measles viruses expressing respiratory syncytial virus proteins induced virus-specific CTL responses in cotton rats. *Vaccine* 2014; 32: 4529-4536.
- 4) Kumagai T, Yoshikawa T, Shiraki K, Yoshida M, Nakayama T, Ihira M, Asano Y. Virus specific cell-mediated immunity may play a role in controlling reactivated human herpes virus 6B in patients under measles induced immunosuppression. *J Med Virol* 2014; 86:658-665.
- 5) Kumagai T, Nakayama T, Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Okafuji T, Ochiai H, Nagata N, Tsutsumi H, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T. Human immune response to influenza A(H1N1) pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. *Viral Immunology* 2014; 27:368-374.
- 6) Jin L, Orvell C, Myers R, Rota PA, Nakayama T, Forcic D, Hiebert J, Brown KE. Genetic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev Med Virol* 2014; DOI:10.1002/rmv.1819

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

分担研究報告書

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：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、定期接種化が望ましいとされている。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%)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非常に低い。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を行っている。本研究班では、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を構築し、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の確立に役立てる。本年度の検討の結果、新たにマーモセットのリンパ球サブセットを定量するためにフローサイトメトリーによる評価系の構築に成功した。

A. 研究目的

ムンプスは重要な小児感染症であり、定期接種が望ましいとされている。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%)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非常に低い。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。本研究班では、ワクチンの評価系としてマーモセットを用いているが、本分担研究班ではマーモセットの細胞性免疫の評価系の構築し、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の確立に役立てる。

しかしながら、マーモセットを用いたムンプスウイルスの細胞性免疫評価系において、これまで明確な知見はない。そこで、本分担研究班では新たにフローサイトメトリーを用いたリンパ球サブセットの定量法を構築し、ムンプスワクチンの接種プログラム中でそれらの変動を解析することにより、ワクチンの免疫原性を評価する事を目的とした。

B. 研究方法

1. フローサイトメトリーを用いたマーモセットのリンパ球サブセットの同定

死細胞を除いた細胞集団中のリンパ球サブセットの変動を測定する事により免疫応答を評価し、ムンプスウイルスの抗原性を評価する。一般にウイルス感染時において細胞障害性 T 細胞及びヘルパー T 細胞の一種である Th1 細胞が増殖を見せる。これら 2 つのリンパ球サブセットを標的として検出するために、細胞表面上を抗 CD3、CD4、CD8、CD62L の蛍光抗体により多重染色し、フローサイトメトリー(BD 社 FACS Canto II)を用いてこれらの抗原の検出を目指した。

一般にフローサイトメトリーに用いるための抗

マーモセット抗体の種類は少ない。まずはこれらの標的分子を検出するために、クローンが異なるそれぞれのモノクローナル抗体が標的分子を認識するか、単染色かつアインタイプコントロールを用いて条件を検討した。

2. リンパ球サブセットにおけるサイトカイン変動の測定

ウイルス感染における免疫反応において各種細胞から分泌されるサイトカインは重要な因子である。これらを検出する事によって、T細胞が抗原による刺激を受けたかどうか判断できる基準となる。そこで、検出するリンパ球サブセットにおいて、IFN-gをマーカーとして検出することにより、サイトカインの変動を測定し、ムンプスウイルスワクチン株間での変動がみられるかを検討した。

3. 末梢血中のリンパ球サブセットの変動測定

上記の条件を決定した後、多重染色により、フローサイトメトリーを用いて目的のリンパ球サブセットの検出を行った。細胞はJL株を接種したマーモセットの脾臓細胞を単離し、それらをさらにJL株を用いて再刺激したものをそれぞれ目的の標的分子に結合する抗体により染色し解析した(図1)。解析はFlowJo(Tomy digital)を用いた。

(倫理面への配慮)

マーモセットを用いた感染実験は国立感染症研究所・動物実験委員会の承認を得て、実施した。

C. 研究結果

1. フローサイトメトリーを用いたマーモセットのリンパ球サブセットの同定

抗ヒト抗体で市販されているモノクローナル抗体をそれぞれのアインタイプコントロールを用いて染色した結果、Pacific blue-CD3 (BD:SP34-2)、FITC-CD4 (BD:L200)、PE-CD8 (TONBO:Hit8a)、biotin-CD62L (Miltenyi Biotec:145/15)、biotin-NKG2D (Miltenyi Biotec:1D11)により目的抗原の検出に成功した(図2)。biotin化抗体では2次抗体をAPC/Cy7もしくはPE/Cy7で標識したstreptavidin化抗体により染色し、検出した(図3)。

2. リンパ球サブセットにおけるサイトカ

イン変動の測定

ワクチンスケジュールに用いた#79、81、82、83のマーモセットの脾臓細胞を単分離し、10%ウシ胎児血清及び50mMメルカプトエタノールを加えたRPMI1640の培地に浸した。その後、PMA/ionomycinを至適濃度により再刺激した。刺激した後にbrefeldinによりゴルジストップさせ細胞を固定、浸透処理をした。これらをAPC標識したIFN-g抗体(オリエンタル酵母:5G3)を用いて染色した結果、PMA/ionomycinで刺激した細胞は未刺激の細胞に比べてIFN-g陽性の細胞数が増加した(図4)。

3. 末梢血中のリンパ球サブセットの変動測定

上記の条件を決定した後、マーモセットの脾臓細胞にJL株によりMOIを変えて再刺激した。これらの細胞を7-AAD、CD3、CD4、CD8、CD62L、IFN-gにより多重染色し、フローサイトメトリーにより評価した。CD4抗体によるシグナルが検出することが出来なかったため、CD3+CD8+の細胞障害性T細胞の分画により、IFN-gとCD62Lの変動を評価したところMOIに依存的なIFN-gの変動は見られず、高いMOIではむしろ減少を見せた。一方でCD62LはMOIに依存して細胞集団の増加が認められた。

D. 考察と結論

本研究において、マーモセットのCD3+CD8+細胞障害性T細胞のフローサイトメーターを用いた検出系の構築に成功した。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、マーモセット脾臓細胞は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が、高い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。これらことからワクチン株間の抗原性の違いを評価する際に、IFN-g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することも考えなければならない。

E. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

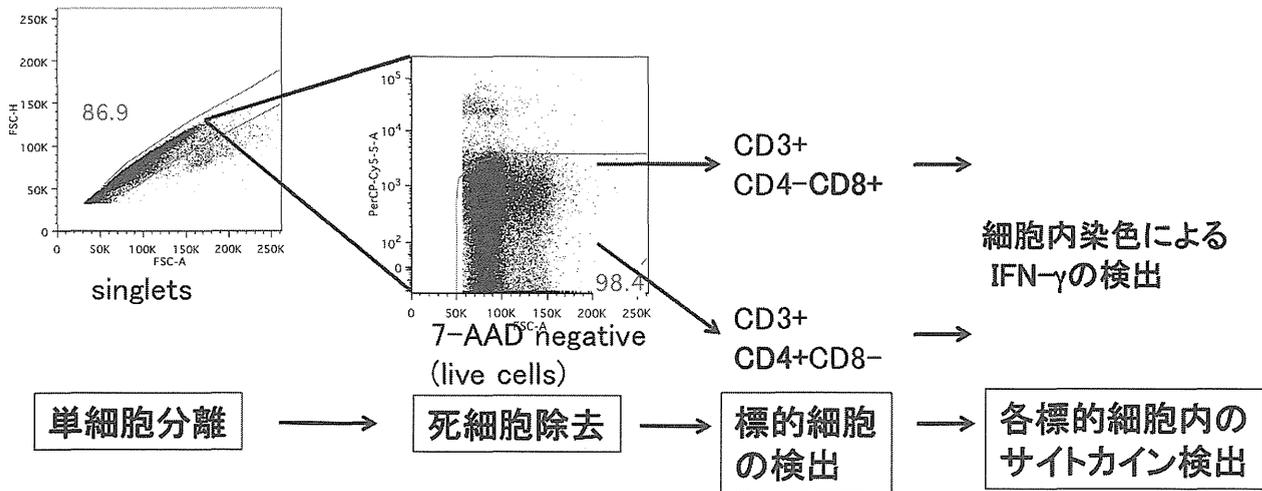


図1. フローサイトメリーを用いたリンパ球サブセットの検出方法

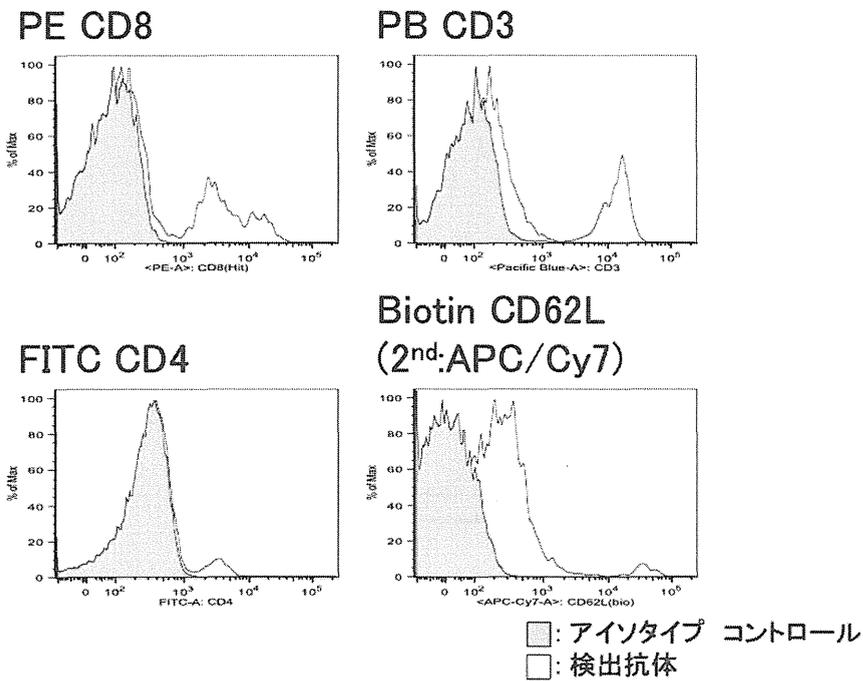


図2. モノクローナル抗体によるマクロファージ細胞表面上の標的分子の検出

FACS profile (6 colors)

Label : FITC / PE / PerCP / APC /APC-Cy7/Pacific blue

Antigen : CD4 / CD8 /7-AAD / IFN- γ / CD62L / CD3

抗原	標識	クローン	動物種	メーカー
CD3	PB	SP34-2	ヒト	BD
CD4	FITC	L200	ヒト	BD
CD8	PE	Hit8a	ヒト	TONBO
CD62L	Biotin	145/15	ヒト	Miltenyi Biotec
NKG2D	Biotin	1D11	ヒト	Bio Legend
IFN- γ	APC	5G3	マーマセット	オリエンタル酵母

図3.マーマセットの細胞表面抗原検出に用いた抗体の蛍光標識とクローン

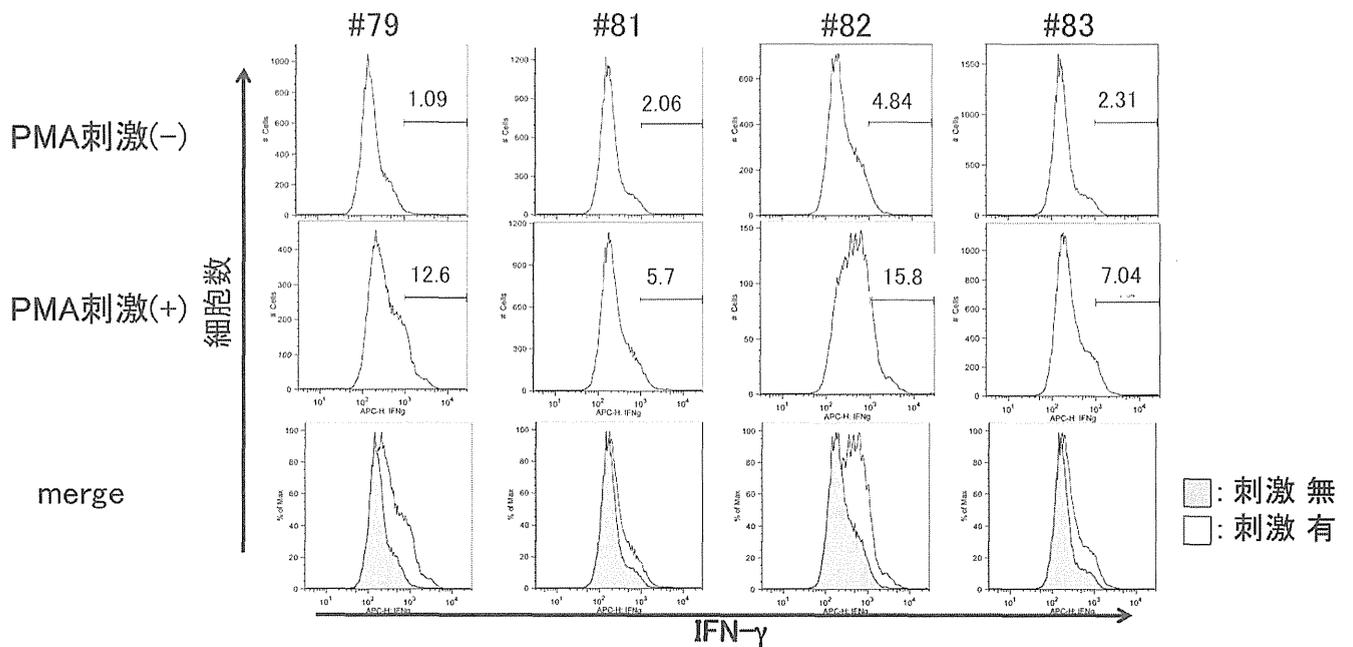


図4. PMA 刺激による IFN-g陽性細胞の検出

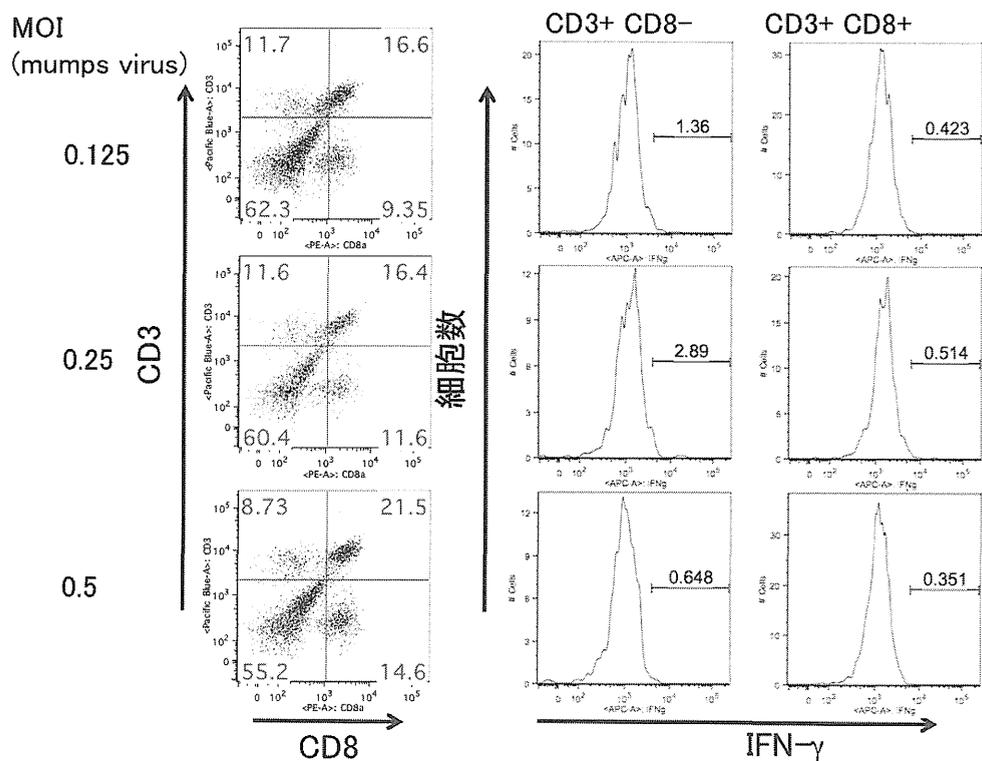


図 5. リンパ球サブセットの IFN-g 陽性細胞の評価

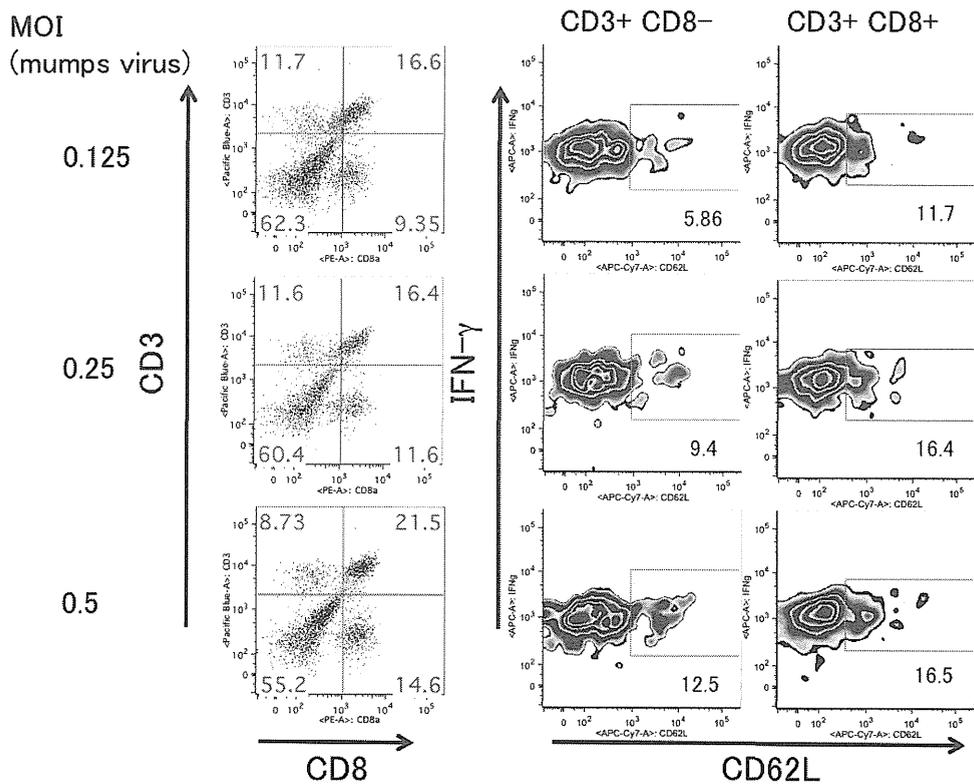


図 6. リンパ球サブセットの CD62L 陽性細胞の評価

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

「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

研究協力者 佐藤由子、岩田奈織子、永田典代

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、ムンプスウイルス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、すべての個体の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、そのうち1頭は、慢性膵炎像とウイルス感染を伴う精巣炎所見を示した。これらの所見は、ムンプスウイルス感染症で認められる合併症と類似しており、感染モデル動物としての有用性が期待される。

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。そこで本研究では、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。ムンプスウイルス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)。我々は、すでに、ムンプスウイルスをマーモセットに脳内接種すると、ウイルスは、脳室と脈絡叢の上皮細胞に感染し、脳室・脈絡叢炎、脳実質における血管周囲性細胞浸潤と髄膜炎を引き起こすことを確認した。また、野生株と弱毒株では脳内接種後のウイルスの増殖性と病原性に差がみられることを明らかにした。よって、マーモセットを用いたムンプスウイルス感染モデルの有用性が期待されている。今年度、本研究班では、より自然感染に近い動物モデルを確立する目的で、ムンプスウイルス野生株をマーモセットに経鼻接種し5週間経過観察を行い、種々の検索を行った。本報告書では、このうちの病理学的検索について報告する。

B. 研究方法

マーモセット(Callithrix jacchus、雄、18-19ヶ月齢、日本クレアより購入)を3頭用い、Odate-3株を104 pfu/頭として、両鼻腔内に

半量ずつマイクロピペットで滴下し、接種した。接種5週間経過観察を行い、その後、過麻酔殺し、病理解剖を行った。検索対象臓器は、中枢神経系、耳下腺、顎下腺、膵、脾、精巣、胸腺、扁桃、心、肺、肝、腎、リンパ節とし、10%緩衝ホルマリン液で浸漬固定した。常法どおりパラフィン包埋後、組織切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色による組織検索の他、免疫組織化学法を用いてウイルス抗原の検出を試みた。一次抗体には、抗ムンプスウイルス抗体(ウサギ高度免疫血清)を使用し、LSAB法(Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark)を用いてプロトコール通りに反応を行った。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。

(倫理面への配慮)

なお、本動物実験は、国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って実施した。

C. 研究結果

得られた所見を表にまとめた。以下、個体別に所見を記載する。
個体番号#5185(病理番号140623)。
肺の一部の細気管支、肺胞道に多層化した上皮を認めた。腎盂周囲にわずかな単核系細胞浸潤が見られた。頤髄の髄質に一カ所、グリオシスを確認した。さらに、膵門部付近を中心に一部、慢性炎症を示唆する所見が存在し(図1)、病変部の膵外分泌部の構造は乱れ、小葉間に中等度の単核系細胞浸潤とそれに伴う線維化が観察された。いずれの部位もウイルス抗原は陰性であった。一方、精巣の曲精細管の一部にウイルス抗原が検出され、この周囲の小葉結合織に軽度な炎症所見が

認められた(図2)。
個体番号#5186(病理番号140624)。
肺胞壁内の巨細胞形成とそれに伴うリンパ球を主体とした炎症巣が、肺のほぼ全葉にわたり散在する。腎皮髄の数カ所に単核系細胞浸潤が存在し、巨細胞形成も認められる。小脳と大脳後頭葉の髄膜に軽度の単核系細胞浸潤を認める。いずれもウイルス抗原は陰性であった。

個体番号#5189(病理番号140625)。
一部の肺葉の肺胞内に巨細胞形成とリンパ球主体の炎症性細胞浸潤が認められる。腎髄質の一部に単核系細胞浸潤がみられ、巨細胞も存在した。第四脳室の脈絡叢に単核系細胞浸潤を伴う炎症像が認められた(図3)。いずれもウイルス抗原は陰性であった。
いずれの個体においてもその他の臓器に著変はみられなかった。

D. 考察

今回使用した野生株は、脳内接種によりマーモセットに対する神経病原性が比較的に強いことが証明されている。この株を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、脳、肺、腎にそれぞれ認められた組織病変が、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、慢性膀胱炎像とウイルス感染を伴う精巣炎所見が認められた。このうち慢性膀胱炎所見については、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。

いずれにしる、以上のような髄膜炎・脈絡叢炎、膀胱炎、精巣炎所見は、ムンプスウイルス感染症で認められる合併症と類似しており、マーモセットのムンプスウイルス感染モデル動物としての有用性が期待され、今後のより詳細な解析が望まれる。

E. 結論

マーモセット3頭にムンプスウイルス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、個体によるものの、ムンプスウイルス感染症の合併症に類似する髄膜炎・脈絡叢炎、膀胱炎、あるいは精巣炎が観察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology*. 2014 Sep 28. doi: 10.1111/neup.12171.

2. 学会発表

- 1) 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年11月

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 ムンプスウイルス Odate-3 株経鼻接種後のマーマセットにおける組織病変

動物番号	#5185	#5186	#5189
肺	±	+1	+1
腎	+	+1	+1
耳下腺/顎下腺	-	-	-
膵	++	-	-
精巣	+2	-	-
脊髄	+	-	-
髄膜	-	+	-
脳室	-	-	+
リンパ系組織	-	-	-

+, 炎症所見を認める；1, 巨細胞を認める；2, ウイルス抗原陽性細胞を認める

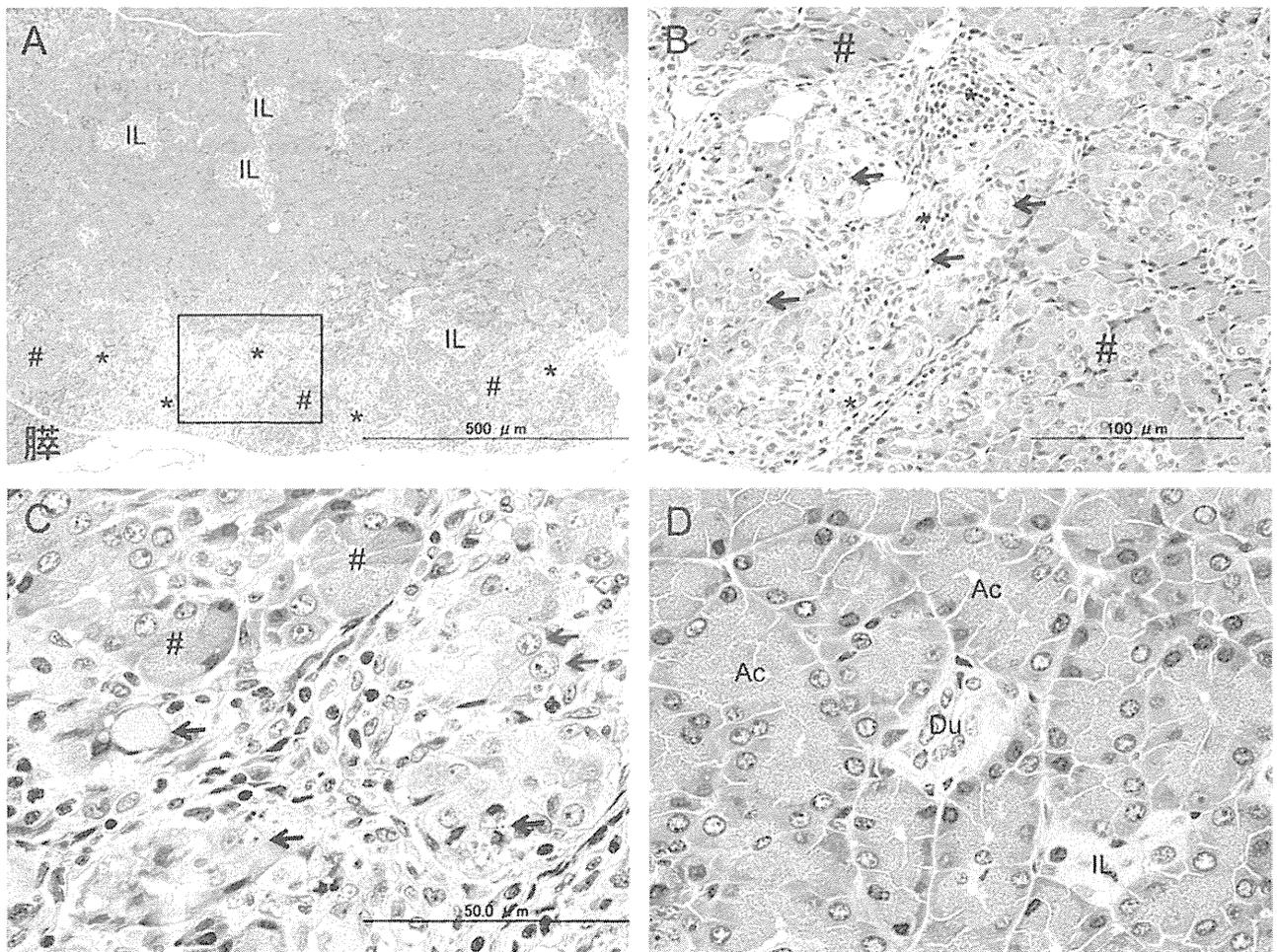


図 1 個体番号 5185 (病理番号 140623) に認められた慢性膵炎像。膵外分泌部の一部に中等度の炎症性細胞浸潤を認める (A, *)。炎症部位の腺房の配列は乱れ (B, 矢印)、小葉間に単核系細胞浸潤が見られる (B, *)。病変部周囲の残存する腺上皮細胞は変性し、好酸性の細胞質と濃縮した核を有する (C, #)。病変部位の上皮細胞は、細胞質内に好酸性物を貯留あるいは破砕物を容れる (C, 矢印)。また、同部位には、核小体が明瞭で、比較的大きな核を有する淡明な細胞が多数、存在する。ウイルス抗原は陰性 (データは示さない)。D, 同個体の膵正常部位。Ac, 腺房細胞、Du, 膵管、IL, ラングエルハンス島。全てヘマトキシリン・エオジン染色。