

3. 麻疹ワクチン

中山 哲夫

北里生命科学研究所

ウイルス感染制御 I

麻疹ワクチンは1954年に分離されたEdmonston株を親株としてニワトリ胎児胚細胞をはじめとした本来の感受性宿主以外の細胞で継代することにより高度弱毒生ワクチンが樹立された。麻疹ワクチンの普及により麻疹患者報告例数は減少し南北アメリカは麻疹排除に成功し、我が国を含めた太平洋西部地域は2012年を麻疹排除の目標達成年度としている。近年の分子生物学的手法の進歩により麻疹ウイルスRNAをcDNAクローン化し感染性ウイルスを回収するreverse geneticsが確立され、弱毒の分子基盤が解明され麻疹ウイルスの性状が解析されてきた。また、こうした分子生物学的な手技を応用し既存の方法では有効なワクチンが開発されていない感染症に対して既に安全性と有効性が確立されている弱毒麻疹ワクチンを生ワクチンウイルスベクターのプラットフォームとする新規の組換え生ワクチンへの応用、ワクチン株をベースとするoncolytic measles virusへの展開を述べる。

はじめに

麻疹ウイルスは、1954年にEnders博士により麻疹に罹患した患児の血液からEdmonston株が分離された。ウイルス粒子は長径100-150nmの球形ウイルスで(-)センスの非分節一本鎖RNAで15,894の遺伝子を持つパラミクソウイルス科(*Paramyxoviridae* family)、パラミクソウイルス亜科(*subfamily Paramyxoviridae*)、モルビリウイルス属(*genus Morbillivirus*)に属する。ウイルス粒子の外殻タンパクには麻疹ウイルスレセプターと結合する赤血球凝集抗原(Hemagglutinin: H)タンパクと膜融合(Fusion: F)タンパクが存在する。Hタンパクは4量体を形成し細胞膜に存在するCD46, CD150の麻疹ウイルスreceptorと結合し、Fタンパクは三量体を形成しHタンパクと共働でウイルス膜と細胞膜融合に働きウイルスが細胞に感染する吸着、膜融合、侵入の感染の最初のステップに働くタンパクである¹⁾。

ウイルス粒子内にはNucleocapsid(N), Phospho(P), Large(L)タンパクがウイルス遺伝子とともにRibonucleocapsid(RNP)を形成し、Membrane(M)タンパクはウイルス粒子内側に存在しウイルス粒子を安定化する働きがある。麻疹ウイルスの遺伝子構成はゲノム3'末端からN, P, M, F, H, Lの順番にならびP翻訳領域からはPタンパク以外にもV, Cタンパクが翻訳されウイルスの転写・複製活性を修飾している¹⁾。

ウイルス粒子が細胞膜レセプターと結合し細胞融合によりRNPが細胞内に侵入しウイルス構成タンパクの転写・翻訳とウイルス遺伝子の複製が始まる。翻訳されたNタンパクは6個のRNA遺伝子を巻き取り多量体形成し遺伝子を保護しPタンパクと結合する²⁾。Pタンパクは4量体を形成しN, Lタンパクと結合し、LタンパクはPolymeraseとしてRNAを合成する。ウイルス構成タンパクが転写・翻訳されると、+センスの相補的RNAが合成され次に(-)センスの娘RNA遺伝子が合成される。新規合成されたゲノムRNAはNタンパクと結合し新規にRNPを形成する。翻訳されたH, Fタンパクは細胞膜表面に輸送されMタンパクと結合しRNPを取り込み新たにウイルス粒子が形成される¹⁾。

連絡先

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1
北里生命科学研究所
ウイルス感染制御 I
TEL : 03-5791-6269
FAX : 03-5791-6130
E-mail : tetsuo-n@lisci.kitasato-u.ac.jp

麻疹の臨床象と免疫応答

麻疹は古くから伝染する病気として知られ、脳炎、細菌性肺炎を併発し命定めめの病気として認識され致死の合併症から快復しても失明などの重篤な後遺症を残していた。麻

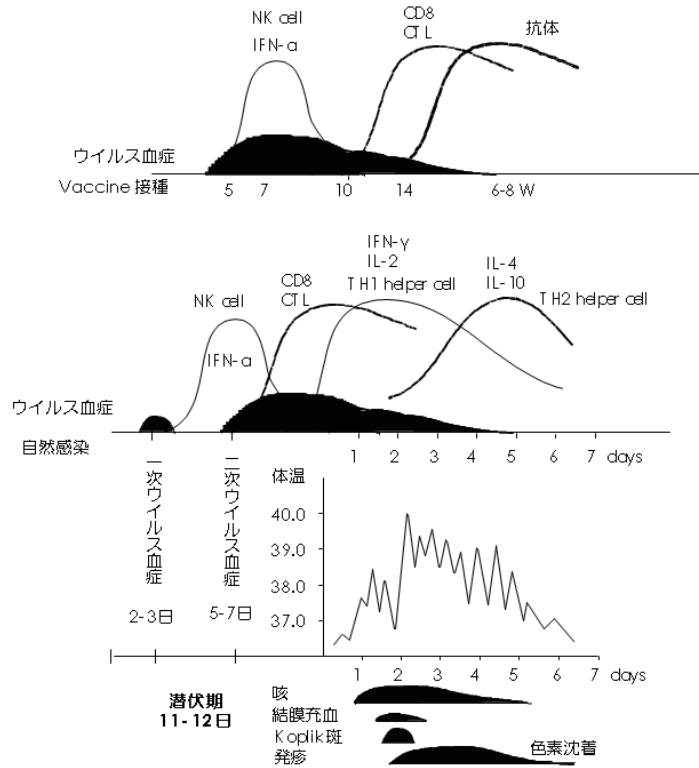


図1 麻疹の臨床症状と免疫応答

麻疹の自然感染の潜伏期間は11-12日で一次ウイルス血症をおこし二次ウイルス血症時に発熱，発疹が出現する．感染初期には非特異的免疫能としてNK細胞が活性化されインターフェロンが産生され，次いで細胞性免疫能としてCTLが出現しTh1応答が刺激されCTL活性を増強しその後Th2応答にシフトし抗体産生を刺激する．

上段にワクチン接種後の免疫応答を示した．ワクチンは皮下に接種することで一次ウイルス血症の期間が短縮されウイルス血症のピークは接種5-7日後となる．

疹の典型的な臨床経過を図1に示した．麻疹ウイルスの感染は麻疹患者の咳やくしゃみから放出された空气中に漂う飛沫核が感染源となり，上気道粘膜組織に感染しウイルスは所属リンパ節で一時増殖し証明はされていないが一次ウイルス血症をおこし更にリンパ球に感染し二次ウイルス血症を起こし全身諸臓器に撒布される．通常，麻疹は約12日の潜伏期間後に眼球結膜の充血，上気道のカタル症状が出現し二峰性発熱とともにコプリック斑，色素沈着を残す発疹等の臨床的な特徴を有しており，多くは自然に治癒するが中には脳炎，肺炎，中耳炎，失明等の重篤な合併症をおこす．コプリック斑は口腔内頬粘膜に多発する特徴的な所見で，発疹は融合し色素沈着を残して軽快する^{1,3)}．乳幼児で微量に残っている移行抗体により非典型的な修飾麻疹や，ワクチン接種後数年経って麻疹に罹患するSecondary vaccine failure (SVF)では軽症から通常の麻疹まで多彩でこうした修飾麻疹ではコプリック斑が出現しない例が多く，典型的な発疹を認めず診断が困難である⁴⁾．

麻疹ウイルス感染の初期には，非特異的な感染防御能と

してNatural killer (NK)細胞が活性化され，感染したリンパ球からインターフェロン (Interferon; IFN) が産生される．次に，ウイルス特異的な感染防御能として感染細胞を排除するウイルス特異的なCD8依存性のcytotoxic T cell (CTL)が誘導される．急性期血清中にはインターロイキン (Interleukin; IL)-2，やIFN- γ が検出される．これらのサイトカインはTh1 helper cellから産生されCTL活性を増強する作用がある．発疹が出現する時期にはIL-4, IL-10といったTh2 helper cell系の反応に変化し，抗体産生を増強すると同時に細胞性免疫を抑制するようになる^{1,3,5)}．細胞性免疫，液性免疫により通常7-10日で自然に軽快する．治癒に至るには感染細胞を攻撃する細胞性免疫能としてのCTLが重要な役割を果たしており発疹の出現はこうした細胞性免疫能の一環と考えられている．先天性免疫不全，特にT細胞系に異常をもつ場合には重症化し，麻疹ウイルスの増殖を制御できずに発疹も出現せずに麻疹巨細胞性肺炎で死亡に至る⁶⁾．ワクチン接種により皮下に接種されたウイルスはリンパ球，抗原提示細胞に感染し一次ウイルス

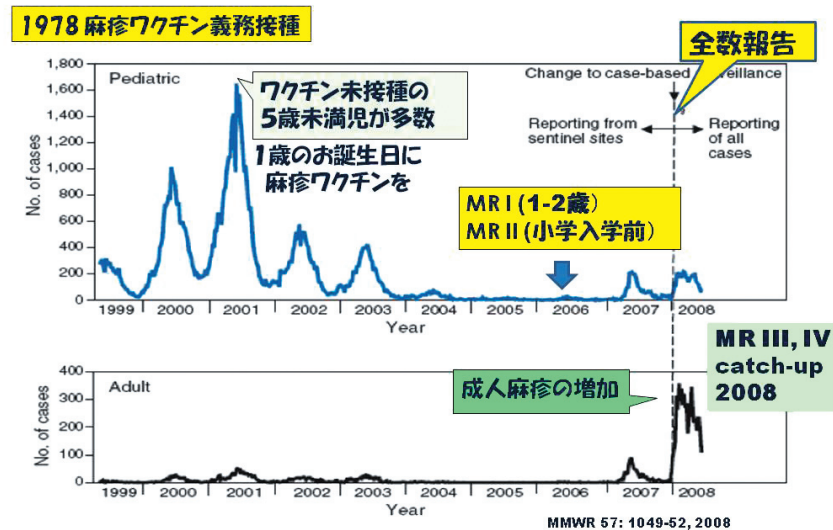


図2 麻疹のサーベイランスとワクチン政策

麻疹ワクチンは1978年から義務接種となり2006年から2回接種となった。麻疹の流行状況を確実に把握するために2008年から全数把握のサーベイランスが始まった。2007年麻疹の流行に際しすべての学童・児童が2回接種の恩恵を受けるように5年計画でMR III, IVのcatch upが始まった。

血症をおこすことなく二次ウイルス血症となりIFNの産生、その後は自然感染と同様に免疫応答を獲得する。ワクチン接種後10日で特異的な細胞性免疫能を獲得し、自然感染の潜伏期間とワクチンによるIFNの産生、特異的細胞性免疫の出現の差から施設内感染の緊急接種が有効となる⁷⁾。

麻疹に罹患すると一過性に免疫能が低下し二次的に細菌性肺炎や細菌性下痢症を合併するため特に低開発国での乳幼児死亡の重大な原因となっている。麻疹ウイルスはT, B細胞、マクロファージの免疫担当細胞に感染するが、麻疹ウイルスが感染しているリンパ球は末梢リンパ球の数%程度にすぎない。にもかかわらず、リンパ球増殖の抑制、IL-12, IFN- γ 産生を抑制する広範な免疫抑制がみられる。麻疹ウイルスが感染したリンパ球機能を抑制するだけでなくサイトカインによるアポトーシスの誘導とIL-2レセプターに対する反応性の抑制が認められ細胞の活性化、増殖が抑制される^{1,8)}。

麻疹ウイルスは中枢神経系に親和性があり重篤な合併症として脳炎は麻疹患者の1000-2000例に1例の頻度で出現する。麻疹急性期の発疹期から2週間以内に意識障害、けいれんで発症する。発症機序としては、髄液から感染性ウイルスが分離されることは稀で、血管周囲に炎症細胞の浸潤、脱髄が観察されることから自己免疫応答が考えられている⁹⁾。

麻疹ウイルスは持続感染することが知られており、免疫担当細胞から隔絶された中枢神経細胞に持続感染し、麻疹罹患後数年たって性格の変化、退行現象、ミオクローヌス、

けいれんが徐々に進行し最終的には不幸な転機をとる亜急性硬化性全脳炎 (Subacute Sclerosing Panencephalitis; SSPE) が約100万例の中に8.5例の頻度で認められる。Mタンパクの異常と発現量の減少により感染性ウイルス粒子形成ができなくなることや、Fタンパクのウイルス粒子内にあたる領域に種々の異常が認められ、SSPEから検出された麻疹ウイルスのFタンパクの異常は細胞融合を起こしやすいことが報告されている¹⁰⁾。

麻疹に罹患後数ヶ月から1年ぐらいの間に、基礎疾患として免疫不全を持つ児において急激に進行する意識障害、ミオクローヌス、けいれんの神経障害を認める。麻疹ウイルスの感染した細胞は特異的な細胞性免疫反応により排除されるが、細胞性免疫に異常があるとウイルス感染の拡大を制御できなくなり中枢神経系には特徴的な核封入体が認められる麻疹封入体脳炎 (Measles Inclusion Body Encephalitis; MIBE) がHIV感染者、免疫不全状態にある児に認められる¹⁰⁾。

麻疹ワクチン開発の歴史

麻疹ウイルスの感染は飛沫核を吸入することで感染する空気伝播 (飛沫核感染) で強い伝播力を持っている。毎年流行し幼児期までにはほとんどの子供たちが罹患し重篤な合併症により死亡原因の第一位を占めていたことからワクチン開発が1960年代から始まった。アメリカでは1963年にホルマリン不活化ワクチンと生Edmonston B株ワクチンが認可されたが、開発当初の生ワクチンはワクチンと呼ぶにはほど遠く感染実験に相当するものでその副反応を軽

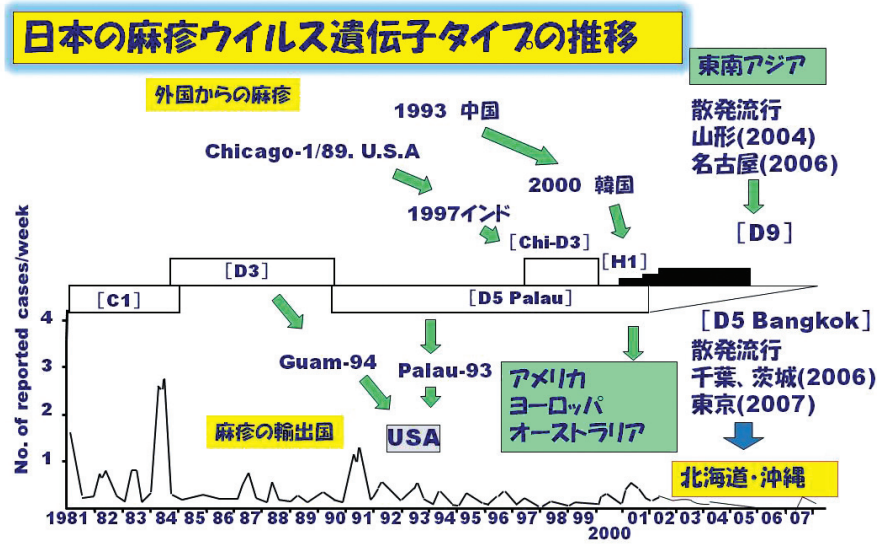


図3 日本の麻疹ウイルス遺伝子タイプの推移
 1984年以前の流行株はC1, 1985-1990年まではD3, 1990-1997年まではD5 Palau-type, 1997-2000年まではD3 Chicago-type, 2000-2005年までH1, 2005-6年はD5, 2007年の流行はD5 Bangkok-typeと大きな流行毎に異なる遺伝子型のウイルスが流行してきた。散発的にD9が流入していたが大きな流行にはならなかった。

減するために免疫グロブリンと同時に投与する方法や、不活化ワクチンと組み合わせて使用された時代があった。不活化ワクチン接種後に自然感染をうけた時に重症の異型麻疹が発生することから1967年には不活化ワクチンの接種は中止となった。不活化ワクチンは麻疹ウイルスの外殻タンパクのFタンパクが変性することでFタンパクに対する抗体が誘導できず有効な中和活性効果が得られず、また感染細胞を排除する細胞性免疫の誘導がないことに起因することがわかった³⁾。

最初に分離されたEdmonston株をニワトリ胎児胚細胞に継代することでEdmonston A株とB株のワクチン候補株が樹立された。現在世界中で使用されているワクチン株はEdmonston A株からSchwarz株が樹立され、日本に輸入され、独自に弱毒化した株がSchwarz FF8株である。Edmonston B株は発育鶏卵羊膜細胞を経て胎児胚細胞に継代することでMoraten, Connaught株が樹立され、ヒト二倍体細胞を経てEdmonston-Zagrebが樹立されている。我が国のワクチン株はSchwarz FF8以外にAIK-C株, CAM株が独自に開発された。AIK-C株はEdmonstonワクチン株ではなく分離初期の野生株から羊腎細胞、鶏胎児胚細胞で継代することで独自に開発され、CAM-70株は日本の分離株から樹立されている。中国分離株からShanghai-191,ロシアではLeningrad-16株が開発されている^{3,11)}。

麻疹ワクチンの効果と流行疫学

2000年以前は、世界中で毎年3000万人の子供たちが麻

疹に罹患し、87万人が麻疹に関連して死亡していると推定されていた。WHOは予防接種拡大計画(Expanded Programme on Immunization: EPI)を1975年から展開し、2005年までには2000年以前のレベルの半以下にすることを目標とし2005年には34.5万人と減少しその目標は達成された。更に、2010年までに麻疹の死亡を2000年のレベルの1/10以下に減少させる目標を掲げており、2006年には世界全体の麻疹ワクチン接種率は80%となり死亡報告例数も24.2万人まで減少している¹²⁾。

わが国では、1978年から麻疹ワクチンが定期接種のワクチンとして予防接種法に組み込まれ1983年から感染症サーベイランス事業が始まり、麻疹患者報告数は毎年2-3万人で、実数は把握できないが約10倍の患者がいるものと想定され図2にサーベイランスの報告例数の変化を示した。2001年には大きな流行があり33,812例が報告され、5歳未満の麻疹ワクチン接種を受けていない乳幼児が多く罹患し「1歳のお誕生日に麻疹ワクチンを」のキャンペーンが始まり麻疹患者報告例数は減少し、2005年には麻疹報告例数は535例と過去最低数となった。更に2006年からは1歳代と小学入学前の6歳を対象に2回接種が始まり麻疹はコントロールされるかに思えた。しかしながら2007年には大学生・成人の麻疹が大流行となり社会的な問題となった。2006年から麻疹ワクチン2回接種が始まったが、年長児、中高生はその対象から外れており、すべての学童が2回接種を受けられるように2008年からは中学1年、高校3年生を対象にCatch-up campaignが5年間の予定でスタート

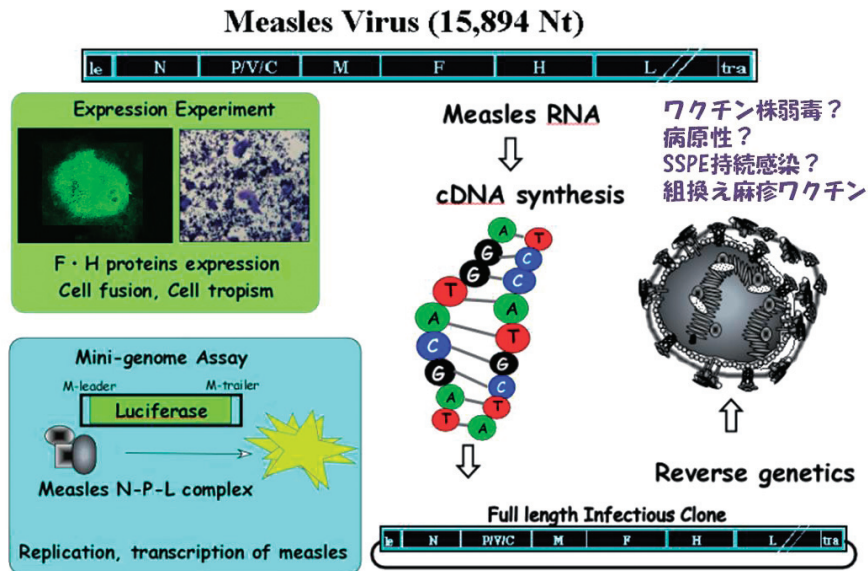


図4 麻疹ウイルスの性状解析

1) 麻疹ウイルスの細胞融合能

麻疹ウイルス F, H 発現プラスミドを作製し発現実験を行い細胞融合能を評価する。

2) 麻疹ウイルス Mini-genome assay

麻疹ウイルスの 3', 5' 非翻訳領域の間に Luciferase 遺伝子を導入した麻疹ウイルス Mini-genome を作製し麻疹ウイルス N, P, L 発現プラスミドと共に transfection し Luciferase 活性を測定することで麻疹ウイルスの転写・複製能を検討する。

3) Reverse genetics

麻疹ウイルス RNA から全長 cDNA を合成し、感染ウイルスを回収し、回収されたウイルスの性状を解析する。

し、日本が属する WHO 太平洋西部地域では 2012 年を目標に麻疹排除に向かっている^{13, 14)}。

現在、世界の麻疹ウイルスは 23 の遺伝子タイプに分類されており世界の各地で特徴的な遺伝子型の分布が知られており伝播経路の解析に用いられている¹⁵⁾。我が国の流行株は大きな流行毎に異なる遺伝子型の麻疹ウイルスが流行してきた(図3)。1985 年以前の流行株は C1, 1985-1990 年には D3, 1990-1995 年までが D5, この時期に日本人旅行者から麻疹が伝播し「麻疹の輸出国」と揶揄された¹⁶⁾。1997-1999 年は Chicago type D3, また 2000 年頃には D5 に戻っており、2000-01 年の流行に際し中国由来の H1 が検出されその後の主流行株になった¹⁷⁾。その後、流行規模が小さくなり地域的な散発流行で D9 が山形の中学校で小流行を起こしたことが報告されている。D9 はインドネシア、東南アジアの流行株でこうした地域への旅行した経験はなく東京に遊びにきて感染したと推定される¹⁸⁾。2006 年に東京・関東地域で麻疹の小流行があり北海道、沖縄に伝播し、2007 年には高校生・大学生を中心に大流行し社会問題となった。この流行に際し分離されたウイルスは D5 に属するウイルスであった。1990 年代から 2004 年ぐらいまで流行していた D5 は Palau.BLA/93 (1993 年に日本人旅行者

がばらまいたウイルス株) で、2007 年の流行株は Bangkok. THA/93/1 に属する異なる sub-cluster であることがわかった。Bangkok type のウイルスは 2002 年カンボジアのプノンペン、2003 年台湾で検出されており日本の 1990 年代のウイルスが変異を蓄積したと考えるよりは東南アジアから流入してきたものと考えられる。2007 - 2008 年にヨーロッパやアメリカで報告された麻疹ウイルスの遺伝子配列は Bangkok type のもので日本からの旅行者が輸出したものと考えられている¹⁹⁾。EU では地域的にワクチン接種率の低い国が存在しこうした国での麻疹の流行が EU 内に伝播していることから 2010 年の排除の目標達成は困難としている²⁰⁾。

日本固有の株が外国に輸出されるだけでなく、外国由来株が流入してくる危険性が今までの麻疹ウイルスの解析でも明らかになっている。世界中で使用されているワクチン株は Genotype A に属し抗原性の変異が危惧されるが流行野生株との間には抗原性に変異はないことを報告している¹³⁾。

麻疹は終生免疫で、生ワクチン接種後の免疫能も長期間維持されると考えられてきたが、麻疹ワクチンの普及に伴い麻疹の流行規模が小さくなり不顕性感染を受ける機会が少なくなることでワクチン接種により獲得した免疫にブー

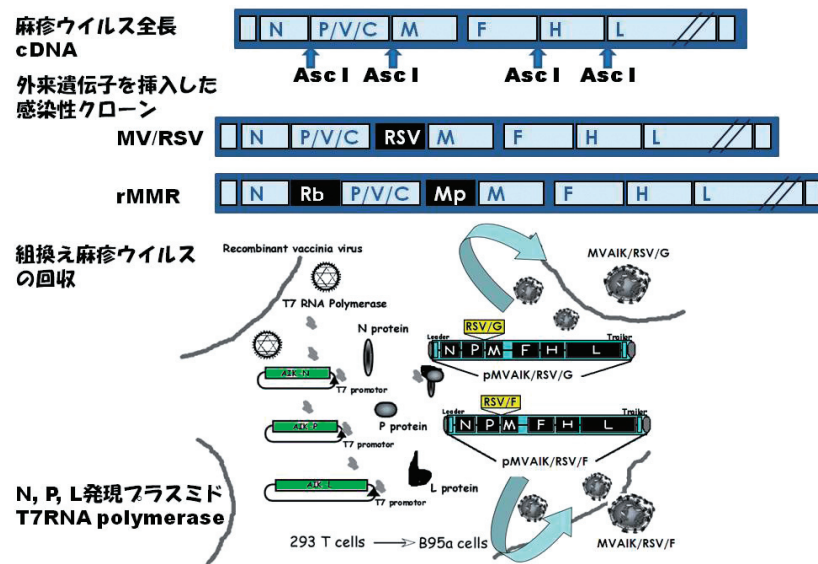


図5 組換え麻疹ワクチン株の構築

全長 cDNA の N/P, P/M, F/H, H/L junction に AscI 制限酵素部位を導入しクローニングした外来遺伝子を挿入する。N, P, L 発現プラスミドと共に組換え cDNA を transfection し感染性ウイルスを回収する。外来ウイルスタンパクを発現する組換え麻疹ウイルスを回収できる。

スター効果が期待できなくなり、麻疹の流行がなくなった地域ではワクチン接種 6 - 7 年経つと中和抗体陰性者が 10% となりさらに 20 歳代では 20 - 25% が中和抗体陰性となる²¹⁾。

麻疹ウイルスの分子基盤と Reverse genetics (RG) の開発

1990 年代の後半になって今まで困難とされていた RNA ウイルスを遺伝子操作することで全長 cDNA から感染性ウイルスを回収する Reverse genetics (RG) 法が確立され、麻疹ウイルスの性状の解析に利用され分子生物学的アプローチが始まった²²⁾。現在、広く使用されている生ワクチンは感受性動物以外の細胞で継代を繰り返すことや、更に低温で増殖する株をクローニングすることで樹立されたもので偶然の賜物である。その弱毒化のポイントやその機序が解明されているワクチン株は少ない。北里研究所で開発された麻疹ワクチン AIK-C 株は 1954 年に分離された Edmonston 野生株からヒツジ腎細胞、鶏胎児胚細胞を用いて 33℃ で継代し small plaque cloning を行い樹立された株で、弱毒化のポイントは 39℃ でのウイルス増殖が 33℃ の増殖の約 1/10,000 以下となる温度感受性 (temperature sensitivity: ts) と考えられ接種後生体内での増殖能が低いことが副反応の少ないことに関連していると考えられる²³⁾。これらの性状の解析法を図 4 に示した。

1) 麻疹ウイルスの細胞融合能の解析; AIK-C と親株の Edmonston 株の F, H タンパク発現プラスミドを作製し細

胞融合能を検討した結果 F タンパク 278 位の Leu が small plaque 形成に関与する²⁴⁾。

2) 麻疹ウイルス Mini-genome による解析; 麻疹ウイルスの転写・複製活性を解析するために麻疹ウイルスの leader と trailer 配列を残し翻訳領域を luciferase 遺伝子に置き換えた Mini-genome を作製し Mini-genome RNA を合成し N, P, L 発現プラスミドと共に細胞内に transfection し luciferase 活性を測定することで麻疹ウイルスの転写・複製活性を検討し AIK-C の P タンパク 439 位の Pro が温度感受性を担う重要なアミノ酸であることがわかった²⁵⁾。

3) 麻疹ワクチン AIK-C 株の RG; AIK-C 株をベースとした全長感染性 cDNA を構築し N, P, L 発現プラスミドと共に 293T 細胞に transfection し B95a 細胞と混合培養することで感染性ウイルスを回収する。上記の解析の結果からワクチン株の性状に関連するアミノ酸を親株の wild-type Edmonston 株に導入し、逆に AIK-C の全長 cDNA に野生株のアミノ酸を導入することで 2 カ所のアミノ酸の重要性が確認され F タンパク 278 位の Leu が small plaque, P タンパク 439 位の Pro が温度感受性を担う遺伝子であることが RG でも確認された^{24, 25)}。

RG 法を用いた生ワクチンウイルスベクターの開発

現在、用いられている生ワクチンは長い臨床使用経験からその安全性が確認されている。新たに生ワクチンを開発しその評価を得るには治験レベルの臨床例では不十分で生

ワクチンの開発研究には多大な労力を必要とし事実上困難と思われる。既に世界中で広く利用されている弱毒麻疹生ワクチンを生ワクチンウイルスベクターとして外来性遺伝子を挿入しワクチンの開発されていないウイルス感染症や、現行ワクチンに問題があるウイルス感染症に対する新規概念のワクチン開発の道が開かれた²⁶⁾。世界中の麻疹生ワクチンのなかで RG 法が確立されている麻疹ワクチンは Schwarz, Moraten, AIK-C 株でこれらの感染性 cDNA 麻疹クローンの中に HBV, SARS, HIV, West Nile, Dengue の感染防御抗原遺伝子を挿入し組換え麻疹生ワクチンウイルス株を作製したことが報告されている^{27, 28, 29, 30, 31, 32)}。麻疹生ワクチンは新規生ワクチンベクターとしての基盤を確立しつつある。弱毒麻疹ワクチン AIK-C の弱毒のメカニズムを解析し P439, F278 の翻訳領域にあることがわかり、非翻訳領域に外来性遺伝子を導入し生ワクチンウイルスベクターの開発を行ってきた。AIK-C ワクチンは我が国を中心に既に 2000 万人が接種を受け重篤な副反応は少なく、アフリカ、ロシア等の開発途上国で 6 か月の乳幼児に対する接種試験の結果からも世界中の麻疹生ワクチンの中でも最もすぐれた麻疹ワクチンの一つであると評価されている^{33, 34, 35)}。既に有効性と安全性が確立されていることから、ワクチンとして使用されることがない Sendai, Adeno ウイルスベクターと比較して健康な子供たちに広く使用するワクチンのベクターとしては安全性が高いと考えられる。

RG 法を用いて多価抗原発現麻疹ウイルスの cDNA クローンの作製を **図 5** に示した。外来遺伝子挿入部位として N/P, P/M, F/H, H/L junction に Asc I 制限酵素部位を新たに導入し外来性遺伝子をクローニングして全長が 6 の倍数になるように全長 cDNA を構築する²⁾。293T 細胞に T7 RNA polymerase を発現する非増殖性の組換えワクシニアウイルスを感染させ全長 cDNA を N, P, L 発現プラスミドとともに co-transfection し 2 日後に B95a 細胞と混合培養し細胞変性効果を目標とし感染ウイルス粒子を回収する。挿入できる遺伝子は約 3000 塩基まで挿入可能で P/M junction 部位が安定してウイルスを回収できた。N/P junction への挿入は N タンパクと P タンパクの mRNA のバランスが崩れるためウイルスの増殖が遅くなるが感染性ウイルスは回収可能であった^{24, 25)}。

挿入する外来遺伝子として、ワクチンが開発されていない SARS, West Nile 等の新興感染ウイルス感染症だけでなく Dengue 等の組換え麻疹ウイルスが報告されている。小児にありふれた呼吸器系ウイルスの中で Respiratory syncytial virus (RSV) は未熟児、心奇形、呼吸器系基礎疾患を持つ児は細気管支炎をおこし重症化し世界中で毎年 6400 万人が罹患し 16 万人が死亡していると言われている³⁶⁾。基礎疾患を有する乳幼児には RSV F タンパクに対するヒト型単クローン抗体の予防投与が行われているが、流行期に毎月投与が必要で高価なものであり、ワクチンの開発が

望まれている。RSV は 1960 年代からワクチン開発が行われ、ホルマリン不活化ワクチンは F タンパクが変性し有効な中和抗体が誘導されず、局所 IgA 抗体、細胞性免疫も誘導されず、ワクチン接種者で RSV の感染を抑えることはできず、逆に RSV に感染した際に重症化したことから不活化ワクチンの開発は中断した³⁷⁾。現在はウシパラインフルエンザにヒトパラインフルエンザの HN と RSV F タンパクを組み込んだ組換え生ワクチンが Phase II まで進んだが免疫原性が低いことから頓挫している³⁸⁾。AIK-C 麻疹ワクチンは 6 か月から接種可能であり RSV 遺伝子を組み込んだ AIK-C の経鼻投与経路を想定し AIK-C 遺伝子の P/M junction に RSV G, F 遺伝子を挿入した組換え麻疹ウイルスを作製した。コトトラットに接種し RSV F タンパクを組み込んだウイルスは麻疹ウイルスに対する抗体だけでなく RSV に対する中和抗体を誘導し、RSV subgroup A を組み込んだ subgroups B に対しても交叉免疫反応を示した。

わが国でも予防接種を効率よく実施するために MMR の復活が望まれているがその障壁となることは無菌性髄膜炎の原因となったムンプスワクチン成分である。無菌性髄膜炎の頻度は 2000-3000 例に 1 例の頻度と報告されている³⁹⁾。Jeryl Lynn 株の免疫原性は日本で使用されているワクチン株より低いが無菌性髄膜炎の頻度は 10 万例に 1 例と報告されている。世界の MMR は Jeryl Lynn 株、もしくはこの株からクローニングした株が用いられている。ムンプスワクチンに関しては免疫原性と安全性のバランスが難しいワクチンである⁴⁰⁾。風疹ウイルスの感染防御能は HA 活性を有する E1 領域と考えられ、ムンプスウイルスの F, HN タンパクが中和反応に関する抗原エピトープと考えられており、麻疹 AIK-C の N/P junction に風疹ウイルス E1, P/M junction にムンプス HN 遺伝子もしくはムンプス F 遺伝子を挿入した rMMR を作製しその性状を解析した。麻疹ウイルスは麻疹ウイルス N タンパク monoclonal 抗体、風疹 E1 タンパク monoclonal 抗体、ムンプス polyclonal 抗体で免疫蛍光染色を行い導入したウイルスタンパクは細胞内に発現していることが確認された。挿入されたムンプスウイルスの外殻タンパクは組換え麻疹ウイルス粒子には取り込まれずムンプスウイルスとしての組織親和性を示すことはないと考えられ理論的にも無菌性髄膜炎の頻度は極めて低いと考えられる。RSV, rMMR だけでなくインフルエンザ HA, NA, 日本脳炎 preM+E, HIV gag 遺伝子を挿入した組換え麻疹ウイルスを作製し、麻疹ウイルスの感受性実験動物であるコトトラットに接種し免疫応答を検討している。

腫瘍溶解性麻疹ウイルス (Oncolytic measles virus)

への応用

Burkitt lymphoma に罹患している小児が麻疹に罹患した際に腫瘍が縮小したことが記載されている⁴¹⁾。麻疹ウイル

スに対する細胞側のレセプターとしてCD46, SLAM の存在が知られた。また、第三のレセプターの存在も考えられている。野生株はSLAMを使用し、ワクチン株は選択的にCD46を利用している⁴²⁾。SLAMは活性化されたリンパ球、単球、成熟樹状細胞に発現しておりバーキットリンパ腫の腫瘍細胞に感染し腫瘍細胞を溶解したものと考えられる。CD46は赤血球以外細胞に発現しており腫瘍細胞の中にはCD46を高発現している細胞が多いことが知られており実験動物レベルでは麻疹ワクチン株の感染により抗腫瘍効果と周辺細胞にアポトーシスが観察されている。腫瘍細胞に高頻度に発現されているとはいっても正常細胞にも発現しているためHタンパクに変異を導入しCD46, SLAMをレセプターとして使用するのではなくCD46, SLAMに結合するHタンパクの親和性ドメインに変異を導入しさらに腫瘍細胞にのみ特異的に発現している標的分子を認識する一本鎖抗体遺伝子を付加し癌標的麻疹ウイルスを構築することが考えられている^{43,44)}。

組換え麻疹ウイルスの課題

麻疹ワクチン AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして用い、RSV, インフルエンザ, 日本脳炎, 風疹, ムンプスウイルス等の感染防御抗原を発現する組換え麻疹ウイルスを作製した。中和抗体誘導能, 細胞性免疫能の誘導を含めて検討する必要がある。ワクチン製剤化するためには以下の改良と検証が必要となる。

- 1) 鶏胎児胚細胞で増殖すること
- 2) 感染性ウイルス回収の過程で293T, B95a細胞と生ワクチン製造に認可されていない細胞を用いているので改善が必要である。
- 3) 回収過程で非増殖性のVaccinia virusを用いている。
- 4) カルタヘナ条約(組み換えDNAウイルスの拡散防止規約)

以上の課題を克服する必要がある。既に安全性と有効性の確立された弱毒麻疹ワクチンをワクチンウイルスベクターとして用いる技術は、いまだに有効なワクチンが開発されていない感染症に対するワクチン開発の有用なツールとなる。我が国ではカルタヘナ条約による組換えウイルスに対する制限が多いがアメリカ合衆国は条約に参加してなく組換えウイルスワクチンが開発され臨床治験まで進んでいる製剤もあり、欧州においても制約が緩和される傾向にあり、理論的に安全性が確保されているベクターを使用するこうした新規ワクチンの開発が進んでいる。

文献

- 1) Griffin DE. Measles virus. In: Fields Virology, 5th edn, New York, N.Y: Lippincott- Williams & Wilkins, 2007, pp 1551-1585.
- 2) Calain P, Roux L. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. J Virol 1 67: 4822-30, 1993.
- 3) Strebel PM, Papania M, Halsey NA. Measles vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Vaccines. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2004, pp389-440.
- 4) Glass K, Grenfell BT. Waning immunity and subclinical measles infections in England. Vaccine 22: 4110-6, 2004.
- 5) Griffin DE, Ward BJ. Differential CD4 T cell activation in measles. J Infect Dis 168: 275-281, 1993.
- 6) Van Binnendijk RS, Poelen MCM, Kujipers KC, Osterhaus AD, UytdeHaag FG. The predominance of CD8+ cells after infection with measles virus suggests a role of CD8+ class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. Clonal analysis of human CD8+ class I MHC restricted CTL. J Immunol 144:2394-2399, 1990.
- 7) Nakayama T, Urano T, Osano M, Nakagawa M, Maehara N, Sasaki K, Yamamura AM, Makino S. Evaluation of live trivalent vaccine of measles AIK-C strain, mumps Hoshino strain and rubella Takahashi strain, by virus-specific interferon- γ production and antibody response. Microbiol Immunol 34: 497-508, 1990.
- 8) Vuorinen T, Peri P, Vainionpaa R. Measles virus induces apoptosis in uninfected bystander T cells and leads to granzyme B and caspase activation in peripheral blood mononuclear cell cultures. Eur J Clin Invest 33: 434-442, 2003.
- 9) Johnson RT, Griffin DE, Hirsch RL, Wolinsky JS, Roedenbeck S, Lino de Soriano I, Vaisberg A. Measles encephalomyelitis-clinical and immunological studies. N Engl J Med 310: 137-141, 1984.
- 10) Rima BK, Duprex WP. Molecular mechanisms of measles virus persistence. Virus Research 111: 132-147, 2005.
- 11) Hirayama M. Measles vaccines used in Japan. Rev Infect Dis 5: 495-503, 1983.
- 12) CDC. 2007. Progress in global measles control and mortality reduction, 2000-2006. MMWR 56: 1237-1241.
- 13) Nagai M, Ji Yi-Xin, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama T. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. J Med Virol. 81: 1094-1101, 2009.
- 14) CDC. Progress toward measles elimination-Japan, 1999-2008. MMWR 57: 1049-1052, 2008.
- 15) WHO: New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes. Wkly Epidemiol Rec 80:347-351, 2005.
- 16) Rota JS, Heath JL, Rota PA, King GE, Celma ML, Carabana J, Fernandez-Munoz R, Brown D, Jin L, Bellini WJ: Molecular epidemiology of measles virus: identification of pathways of transmission and implications for measles elimination. J Infect Dis 173: 32-37, 1996.
- 17) Zhou J, Fujino M, Inou Y, Kumada A, Aoki Y, Iwata S, Nakayama T. H1 genotype of measles virus was detected in outbreaks in Japan after 2000. J Med Virol 70: 642-648, 2003.
- 18) Mizuta K, Abiko C, Murata T, Yamada K, Ahiko T, Sakamoto M, Tsuchida S, Matsuzaki Y, Hongo S, Sunagawa T, Kudo K: An outbreak of measles virus

- infection due to a genotype D9 at a junior high school in Yamagata, Japan in 2004. *Jpn J Infect Dis* 58: 98-100, 2005.
- 19) CDC. Multistate measles outbreak associated with an international youth sporting event-Pennsylvania, Michigan, and Texas, August-September 2007. *MMWR* 57: 169-173, 2008.
 - 20) Muscat M, Bang H, Wohlfahrt J, Glismann S, Molbak K EUVAC MET group. Measles in Europe: an epidemiological assessment. *Lancet* 373: 383-389, 2009.
 - 21) Okafuji T, Okafuji T, Fujino M, Nakayama T : Current status of measles in Japan: molecular and serological studies. *J Infect Chemother* 12: 343-348, 2006
 - 22) Radecke F, Spielhofer P, Schneider H, Kaelin K, Huber C, Dotsh G, Christiansen G, Billeter MA. Rescue of measles viruses from cloned DNA. *EMBO J* 14: 5773-84, 1995.
 - 23) Sasaki K. Studies on the modification of the live AIK measles vaccine. I. adaptation of the further attenuated AIK measles virus (the strain of AIK-L33) to chick embryo cells. *Kitasato Arch Exp Med* 47: 1-12, 1974.
 - 24) Nakayama T, Komase K, Uzuka R, Hoshi A, Okafuji T. Leucine at position 278 of the AIK-C measles virus vaccine strain fusion protein is responsible for reduced syncytium formation. *J Gen Virol* 82: 2143-2150, 2001.
 - 25) Komase K, Nakayama T, Iijima M, Miki K, Kawanishi R, Uejima H. The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype. *Vaccine* 24: 826-834, 2006.
 - 26) Spielhofer P, Bachi T, Fehr T, Christiansen G, Cattaneo R, Kaelin K, Billeter M, Naim H. Chimeric measles viruses with a foreign envelop. *J Virol* 72: 2150-2159, 1998.
 - 27) Combredet C, Labriusse V, Mollet L, Lorin C, Delebecque F, Hurtrel B, McClure H, Feinberg MB, Brahic M, Tangy F. A molecular cloned Schwarz strain of measles virus vaccine induces strong immune responses in Macaques and transgenic Mice. *J Virol* 77: 11546-11554, 2003.
 - 28) Singh M, Cattaneo R, Billeter M. A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. *J Virol* 73: 4823-4828, 1999.
 - 29) Singh M, Billeter M. A recombinant measles expressing biologically active human interleukin-12. *J Gen Virol* 80: 101-106, 1999.
 - 30) Wang Z, Hangartner L, Cornu TI, Martin LR, Zuniga A, Billeter MA, Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses. *Vaccine* 19: 2329-2336, 2001.
 - 31) Lorin C, Mollet L, Delebecque F, Combredet C, Hurtrel B, Charneau P, Brahic M, Tangy F. A single injection of recombinant measles vaccine expressing HIV-1 clade B envelop glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J Virol* 78: 146-157, 2004.
 - 32) Despres P, Combredet C, Frenkiel MP, Lorin C, Brahic M, Tangy F. Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis *J Infect Dis* 191: 207-214, 2005.
 - 33) Tidjani O, Grunitsky B, Guerin N, Levy-Bruhl D, Lecam N, Xuereff C, Tatagan K. Serological effects of Edmonston-Zagreb, Schwarz, and AIK-C measles vaccine strains given at ages 4-5 or 8-10 months. *Lancet* II: 1357-1360, 1989.
 - 34) Bolotovskii VM, Grabowsky M, Clements CJ, Albrecht P, Brenner ER, Zargaryants AI, Litvinov SK, Mikheyeva IV. Immunization of 6- and 9- month-old infants with AIK-C, Edmonston-Zagreb, Leningrad-16 and Schwarz strains of measles vaccine. *Int J Epidemiol* 23: 1069-1077, 1994.
 - 35) Nkrumah FK, Osei-Kwasi M, Dunyo SK, Koram KA, Afari EA. Comparison of AIK-C measles vaccine in infants at 6 months with Schwarz vaccine at 9 months: a randomized controlled trial in Ghana. *WHO Bull* 76: 353-359, 1998.
 - 36) van Drunen Littel-van den Hurk S, Mapletoft JW, Arsic N, Kovacs-Nolan J. immunopathology of RSV infection: prospects for developing vaccines without this complication. *Rev Med Virol* 17: 5-34, 2007.
 - 37) Collins PL, Murphy BR. Vaccines against human respiratory syncytial virus. In *Respiratory syncytial virus*. Cane P edited Elsevier, Amsterdam, pp233-277, 2007.
 - 38) Tang RS, Spaete RR, Thompson MW, MacPhail M, Guzzetta JM, Ryan PC, Reisinger K, Chandler P, Hilty M, Walker RE, Gomez MM, Losonsky GA. Development of a PIV-vectored RSV vaccine: preclinical evaluation of safety, toxicity, and enhanced disease and initial clinical testing in healthy adults. *Vaccine* 26: 6373-6382, 2008.
 - 39) Nagai T, Okafuji T, Miyazaki C, Ito Y, Kamada M, Kumagai T, Yuri K, Sakiyama H, Miyata A, Ihara T, Ochiai H, Shimomura K, Suzuki E, Torigoe S, Igarashi M, Kase T, Okuno Y, Nakayama T. A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine* 25: 2742-2747, 2007.
 - 40) Plotkin SA. : Mumps vaccine. In: *Vaccine*. 4th edition. Plotkin SA, Orenstein WA, editors. Saunders, Philadelphia, 2004, p441-469
 - 41) Bluming AZ, Ziegler JL. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *Lancet* 2: 105-106, 1971.
 - 42) Yanagi, Y., Ono, N., Tatsuo, H., Hashimoto, K., Minagawa, H. Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virol* 299, 155-161, 2002.
 - 43) Fielding AK. Measles as a potential oncolytic virus. *Rev Med Virol* 15: 135-142, 2005.
 - 44) Nakamura T, Peng KW, Harvey M, Greiner S, Lorimer IA, James CD, Russell SJ. Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat Biotechnol* 23: 209-214, 2005.

Measles Vaccine

Tetsuo NAKAYAMA

Laboratory of Virus Infection, Kitasato Institute for Life Sciences

Further attenuated live measles vaccine strains were developed through passages in chick embryo cells or other non-permissive cells from the Edmonston strain. The number of measles patients has reduced through worldwide acceptance of measles vaccine. Measles elimination was achieved in American continents and the goal of measles elimination in Western Pacific region was aimed by 2012. Recent development of molecular techniques facilitates the reverse genetics to recover the infectious virus from the cDNA clone constructed from measles RNA genome. Using this technology, characteristics of attenuated measles vaccine strain were investigated and new approach has started to develop the recombinant measles vaccine expressing foreign virus antigen(s) against the infectious diseases for which no effective vaccine is available. Besides infectious diseases, the oncolytic measles virus based on measles vaccine strains was developed for targeting cancer cells.