

肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定法の確立に関する研究

所 属 国立感染症研究所感染症情報センター

研究者 岡部信彦

分担研究者

1. 国立感染症研究所感染症情報センター 新井 智
2. 国立感染症研究所 大谷明
3. 株式会社BML研究開発本部 高野昇一、斉藤剛
4. 国立療養所東京病院 永井英明
5. 長崎大学医学部熱帯医学研究所 大石和徳、古本郎嗣、松本慶蔵
6. 万有製薬(株)研究開発本部 高橋透
7. 東京専売病院 島田馨

要旨

肺炎球菌ワクチンの効果を評価することの可能な標準的抗体価測定方法の確立を目指し、ELISAシステムの構築を行った。その結果、肺炎球菌精製ポリサッカライドを抗原に使用する方法で抗体価測定が可能となった。日本で発生している肺炎球菌性肺炎の主な原因である、血清型6B、血清型14、血清型19F、血清型23Fの4種類について血清抗体価を測定した。その結果、ワクチン接種を受けることで健常者は、血清型6Bでは平均約4倍、14Aでは平均約30倍、19Fでは平均約4倍、23Fでは平均約8倍に抗体価が上昇することが確認された。今後、他の血清型についても抗体価の測定を実施していく予定である。

1研究目的

肺炎球菌は、グラム陰性の単桿菌で人が感染し発症すると重篤な肺炎や髄膜炎を引き起こす公衆衛生上重要な細菌である。近年では、薬剤耐性肺炎球菌の出現により、その治療が困難になりつつあり、ワクチンなど効果的に発症を予防する方法を確立する必要が出てきた。これまでに肺炎球菌ワクチンとしては、23種類の血清型を含んだ23価ポリサッカライドワクチンや、7種類の血清型を含んだ7価のコンジュゲイトワクチンが実用化されている。日本では23価のポリサッカライドワクチンのみが導入されている。

しかし、ワクチンを実施してもワクチンに含まれていない血清型については感染・発症することや、ワクチンに含まれている血清型全てに等しく免疫効果を付与できない、抗体価の上昇に個人差がある、各国で発生している肺炎球菌の血清型に違いがあり、含まれる血清型の種類によってはワクチン実施国の肺炎球菌性肺炎の発生状況にあわせた血清型を選択する必要があるなど検討を要する点がある。

ワクチンの効果の判定には、いくつかの方法が存在し海外ではワクチンによる免疫の効果を抗体価ではなく、マクロファージの貪食能で評価するファゴサイトーシスアッセイ法を用いて評価することを提案する研究者も存在する。実際には、抗体価の上昇した検体では貪食能も上昇しているという結果が得られている。そこで、ワクチンの効果の判定や免疫レベルの判定の重要な要因の一つである血清抗体価の標準的測定方法の確立を目指し、これまでの血清抗体価測定方法の再現と新しい測定方法の検討を行った。また、感染と発症のメカニズムが詳細に明らかにされていないため、肺炎球菌製肺炎の発症抑制に必要な抗体価が決定されていないので、発症メカニズムについても解析するために、肺炎球菌性肺炎を発症した患者からの肺炎球菌の分離と血清抗体価の関係を解析した。

2研究方法

1. 健常人ボランティアの肺炎球菌ワクチン接種前後の血清抗体価の測定。

抗体価の測定は、肺炎球菌精製ポリサッカライドを用いたELISA法を用いて測定した。すなわち、精製ポリサッカライドをELISAプレートに結合させ、洗浄後、被検ヒト血清を1:50から2段階希釈し一時間反応させた。反応後、洗浄し、更に二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgGと一時間反応させ、洗浄後吸光度を測定した。抗体価は、標準血清との相対比較で算出した。

ワクチン接種前後の健常人血清は、株式会社BML川越診療所において、ボランティアを募り、23価ポリサッカライドワクチンを接種し、接種前後の血清を採取した。接種後の血清は、ワクチン接種後4週後に採血した。血清分離後、血清は測定直前まで-80℃で凍結保存し、測定に使用した。

2. 慢性呼吸器疾患患者の23価ポリサッカライドワクチン接種前後の肺炎球菌抗体価の測定

肺炎球菌感染のハイリスクグループである、慢性呼吸器疾患患者に23価ポリサッカライドワクチンを接種し、ワクチン接種前後の抗体価を測定した。また、ワクチン接種者が肺炎球菌に感染した場合は、肺炎球菌を分離し、血清型を決定してワクチンの効果についても検討した。

3. 肺炎患者から分離された肺炎球菌株の血清型の同定。

国立療養所東京病院において肺炎患者から分離された肺炎球菌株は、確認後速やかに10%スキムミルクに溶解、小分け分注し、-80℃で凍結保存した。血清型の同定は、デンマークのState Serum Institute より入手した型特異血清を用いて決定した。

3. 研究成果

肺炎球菌の抗体価測定方法を確立するためにELISA法を試みた結果、精製ポリサッカライドを抗原として用いる方法で抗体測定が可能であることが明らかになった。そこで、健常者の23価ポリサッカライドワクチン接種前後の血清を用意し、ELISA法によってワクチンの効果を評価できるか検討した。ポリサッカライドワクチンには23種類の血清型が含まれているが、日本で臨床検体から分離頻度の高い血清型6B、血清型14、血清型19F、血清型23Fの4種類について血清抗体価を測定した。その他の血清型についても、血清型1、血清型4、血清型5、血清型7F、血清型9V、血清型18Cについては測定が可能となった。血清型6B、14、19F、23Fの4種類について抗体価を測定したところワクチン接種を受けることで健常者は、血清型6Bでは平均約4倍、14Aでは平均約30倍、19Fでは平均約4倍、23Fでは平均約8倍に抗体価が上昇することが明らかになった。

慢性呼吸器疾患患者は、肺炎球菌感染のもっともハイリスクなグループに相当する人たちである。これらのヒトの肺炎球菌に対する抗体価を測定することは、肺炎球菌感染の病態を理解する上で貴重な情報となる。特に、ワクチン接種後に発症した場合、その発症メカニズムを解析し、リスクファクターを明らかにすることは今後の肺炎球菌感染メカニズムの解析や対策を考える上で重要なデータである。そこで慢性呼吸器疾患患者のワクチン接種前後の血清抗体価測定を行った。現在までに我々が採取、保管した慢性呼吸器疾患患者の血清は、150名分(接種前155、接種後150、合計305検体)である。そのうち、約40検体について血清型6Bの抗体価を測定した。その結果、接種前に平均7.23ug/mlであった血清抗体価が、接種後に平均14.53ug/mlに上昇した。現在、残りの血清について抗体価の測定を実施している。

更に肺炎球菌性肺炎患者からの肺炎球菌の分離も行った。臨床的に肺炎を発症した患者から菌を分離し、現在までのところ、分離できた肺炎球菌は107株で、血清型を決定したところ、血清グループ19、血清グループ23と血清型3、血清グループ35の順に多く分離されている。来年度、血清型と血清抗体価の間にはどのような関係が存在するか検討する予定である。

4. 考察

ELISA法によるヒトの肺炎球菌ポリサッカライドに対する抗体価測定に成功した。肺炎球菌は、健常者でも数%が上咽頭に本菌を保有していることが報告されており、菌保有がそのまま発症につながる訳ではない点が解析を難しくしている。しかし、血清抗体価が感染防御に関与している明らかな報告が複数存在し、発症メカニズムのはっきりしない現在では、血清抗体価の上昇を指標に感染防御効果を判定する方法がもっとも有力である。今回我々が抗体価測定に成功したELISA法は、非常に簡便で、しかも定量性があるため、その利用価値は非常に大きい。

一方で、我々が用いているELISA法は、標準血清に使用しているコントロール血清に対する相対評価で血清抗体価を算出しているため、抗体量の絶対量が測定できない。標準血清も、海外からの提供を受けているため大量の検体を測定する場合など試薬の準備に時間がかかるなどの問題点も存在する。来年度の研究では、現在提供を受けている標準血清に置き換わる新しい標準血清の作成が必要である。幸い、使用している二次抗体をアルカリフォスファターゼ標識ProteinGに変更することでウサギやヤギで作成した免疫血清をコントロールとして使用することも理論上可能であり、プレリミナリーな結果だが良好な結果を得ている。今後希釈濃度や反応時間の条件設定を行い、ヒト血清以外を標準血清とした測定系を確立する予定である。

今回、23価のポリサッカライドワクチンの接種を受けた慢性呼吸器疾患患者155名のうち、2名からワクチン接種後、肺炎球菌を分離することに成功した。2名から分離された肺炎球菌は、それぞれ血清型35と血清型23であった。この2症例は、肺炎球菌ワクチンの効果や作用を理解する上で非常に興味深い。現在、臨床的に肺炎球菌性肺炎を発症した患者からも肺炎球菌の分離を行い、宿主免疫応答、菌の血清型や病原性、遺伝子性上など多方面からの解析を模索している。

5. まとめ

1. 定量性のある肺炎球菌抗体の抗体測定法に成功した。
2. 確立した抗体測定法を用いて、健常人ボランティアの肺炎球菌ワクチン接種前後抗体価測定を実施した。
3. 慢性呼吸器疾患患者のワクチン接種前後の抗体価の測定も実施した。

来年度は、発症とワクチン効果および肺炎球菌の病原性についても解析を行う。また、現在海外から提供を受けている標準血清を自前で作成する予定である。

6. 研究発表

1)学会発表

齊藤剛、新井 智、高野昇一、岡部信彦。肺炎球菌 第3回抗体測定法研究会。2003年。

2) 論文発表

1. 予防接種に関するQ&A集 2002年8月 細菌製剤協会 監修 岡部信彦・多屋馨子
2. 大石和徳。肺炎球菌ワクチン。日本呼吸器学会雑誌、41巻(増刊号)p25, 2003.

7. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得: なし
- 2) 実用新案登録: なし
- 3) その他: なし