

しかし日本脳炎ワクチンの接種期(年齢群)別予防接種副反応報告数および健康被害救済認定諸例数が国立感染症研のホームページ上のQand Aに公表されたので、期別推計接種者数からリスクを推計した。1期は300万~500万接種に1例、2期は1000万接種に1例以下、3期は120万~180万接種に1例であり少なくとも1期2期に関しては他のワクチンにおける頻度より高くないと思われた(表2)。

小児ADEM頻度の動向:表3に4種の調査から小児ADEMの頻度を抜粋した。小児人口10万人あたりのADAEM発症頻度は0.33-0.64であり、日本脳炎ワクチンの積極的勧奨の差し控えの前(2003-04年)と後(2005-06年)を対象に行われた2つの全国調査でその発生頻度がほとんど変化しなかった(小児人口10万あたり0.33-0.34)。表4に小児ADEM調査の結果のまとめを示した。

#### 日本脳炎ウイルス感染リスクの推計

幼児の日本脳炎ウイルス感染率を組織培養日本脳炎ワクチンの臨床試験から推計した。ワクチン接種前抗体陽性幼児は極めて少数で、推定年間感染リスクは0.07%だった(表5)。

小中学生(~20歳)の感受性者(約250万人)が同じ危険率でウイルスに曝露するとすれば1~2年間に1例程度の発症になる。

現在の患者発生数からみて、20歳以上の年齢層では真の感受性者200万人あたり年間1例程度の発症頻度推察される。

#### D. 考察

日本脳炎ワクチンの積極的勧奨が差し控えられてから既に4シーズンが過ぎ、2006年には3歳の小児患者が発生した。5シーズン目を目前にして、組織培養ワクチン(B社)が2009年2月に製造承認された。新ワクチン導入に向けて、現時点での日本脳炎の罹患リスクとワクチン副反応リスクを検討した。表4にリスク推計に関与する因子をまとめた。今回検討した事項以外に、ウイルスの流行株やその病原性の検討、さらに広汎な血清疫学が重要である。

また、日本脳炎ワクチンの積極的勧奨の差し控え前後に相次いで行われた2つの全国調査(岡部班:2003-04年と森島班:2005-06年)により、小児のADEM症例数(発生頻度)は変化しなかったこと、ワクチン接種後のADEM頻度の数値等から、現行ワクチンの安全性に重大な疑義があるとは思われず、ADEMとの疫学的因果関係は証明できない。

豚における日本脳炎ウイルスの活動性は西日本地域においてはなお活発である。患者発生もそれに関連して西日本地域に多いが、2008年度には茨城県で2名、愛知県で1名の

日本脳炎患者が発生しているので、関東地方も安全とは言えない。

未接種者が蓄積されたままでは、かつてのように小児に日本脳炎が増加してくる危険性が次第に高まってくる。感染すれば発症のリスクが相対的に高い未接種者には現行ワクチンの接種と同時に新ワクチンの定期接種としての導入が望まれる。現状における日本脳炎のまとめ(表6)と、組織培養ワクチンの導入に関する私見を示した。

#### E. 結論

日本脳炎患者数は年間10例未満だが、地域差が顕著である。近年の患者数の減少は感染者数の減少が大きな要因の一つと思われる。ワクチンの積極的勧奨の前後でADEMの発生頻度に差はなく、現行ワクチンの安全性に重大な疑義があるとは思われない。現行マウス脳由来ワクチンの製造供給が近い将来不可能になり、組織培養ワクチンが承認されたので、多くの未接種者に対して定期接種として接種が開始されることを期待する。

#### F. 文献

- 1) 国立感染症研究所:日本脳炎に関するQ&A.<http://idsc.nih.go.jp/disease/JEencephalitis/QAJE.html>
- 2) 国立感染症研究所:感染症流行予測調査報告日本脳平成19年度調査暫定結果<http://idsc.nih.go.jp/yosoku/JEmenu.html>
- 3) 鳥巢浩幸ら:小児急性散在性脳脊髄炎およびその類縁疾患に関する疫学的研究。難治性疾患克服対策事業、免疫性神経疾患に関する調査研究平成15年度総括・分担研究報告書,p86-89,2004年
- 4) 宮崎千明:小児の急性神経系疾患。小児科診療 67:2056-2062,2004
- 5) 宮崎千明ら:小児の急性散在性脳脊髄炎の疫学に関する研究。水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌等による肺炎の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究班平成15~17年度報告書 p185-188,2006
- 6) 和田智顕ら:小児における急性脳炎・脳症の病態解明と診断法の確立に向けてー急性脳炎・脳症全国調査(2005-2006)現状報告ー。第39回日本小児感染症学会学術集会抄録集 p148,2007

## G. 研究発表（日本脳炎関連分）

### 1. 論文発表（原著）

1) Abe M, Okada K, Hayashida K, Matuo F, Shiosaki K, Miyazaki C, Ueda K, and Kino Y: Duration of neutralizing antibody titer after Japanese encephalitis vaccination. *Microbiology and Immunology* 51(6):609-616, 2007

### 2. 論文発表（総論）

2) 宮崎千明：日本脳炎ワクチン日本医師会雑誌.135(10): 2179-2183, 2007

3) 宮崎千明：日本脳炎ワクチン. 日本小児科医会報 33:15-21, 2007

4) 宮崎千明：日本脳炎ワクチンの今後. 小児科臨床 60:1780-1786, 2007

5) 宮崎千明：日本脳炎予防接種の動向. 母子保健 10月号：6-7, 2007

6) 宮崎千明：日本脳炎ワクチン. チャイルドヘルス 11:21-23, 2008

7) Miyazaki C: Japanese encephalitis vaccines. *Japan Medical Association Journal* Vol 51(3). 1-6, 2008

### 3. 著書（分担）

1) 宮崎千明：ウイルス関連脳炎および脳症. 開業医の外来小児科学第5版、南山堂、東京 p 369-374, 2007

2) 宮崎千明：日本脳炎ワクチンの接種法. 小児科臨床ピクシス4 予防接種. 五十嵐隆ら編、中山書店、p 146-147, 2008

3) 宮崎千明：日本脳炎ワクチンの副反応. 小児科臨床ピクシス4 予防接種. 五十嵐隆ら編、中山書店、p 148-149, 2008

4) 宮崎千明：日本脳炎ワクチンの流行状況. 小児科臨床ピクシス4 予防接種. 五十嵐隆ら編、中山書店、p 150-151, 2008

5) 宮崎千明：新旧日本脳炎ワクチンの違い. 小児科臨床ピクシス4 予防接種. 五十嵐隆ら編、中山書店、p 152-153, 2008

6) 宮崎千明：日本脳炎ワクチン未接種者への対応. 小児科臨床ピクシス4 予防接種. 五十嵐隆ら編、中山書店、p 154-155, 2008

## H. 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

図1

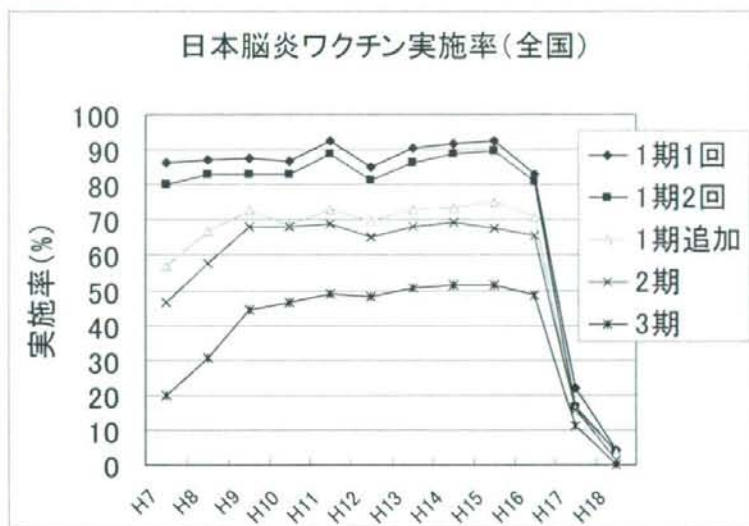
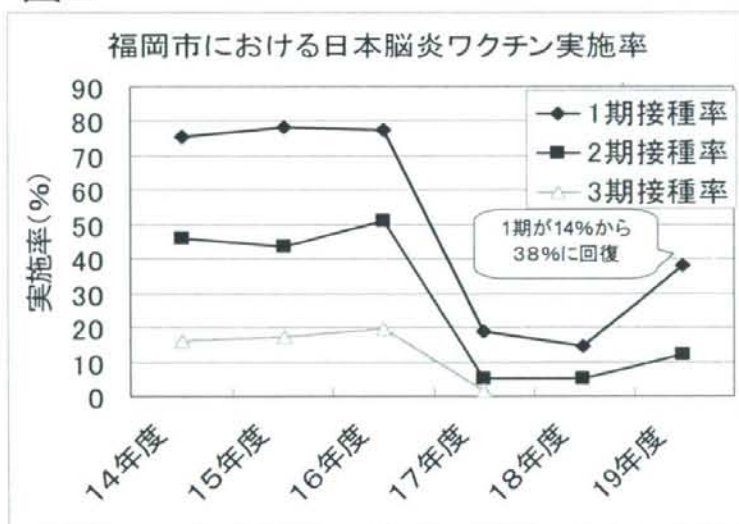


図2



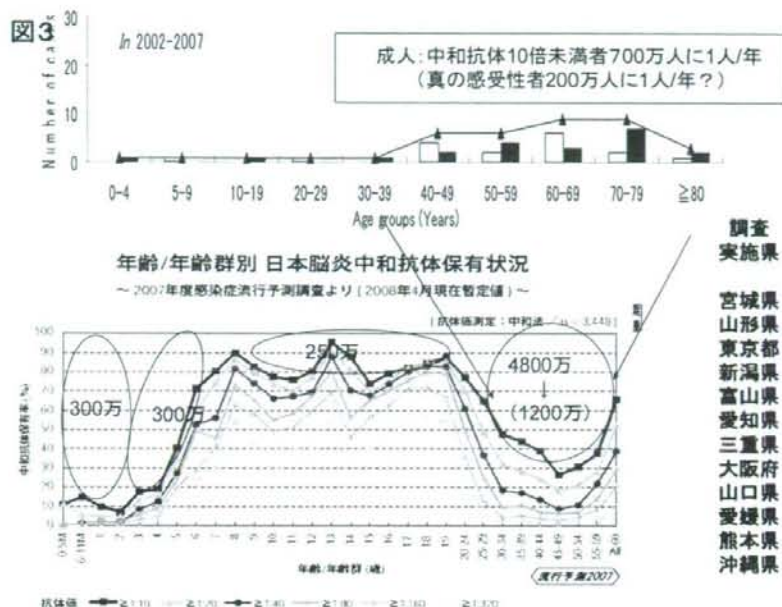


表1 日本脳炎患者報告数:地域別・年次別

期間	総数 (年平均)	関東 甲信越	中部	近畿	中国・ 四国	九州・ 沖縄
1982- 1991	308(30.8)	26	21	59	58	144
1992- 2001	39(3.9)	1	3	3	15	17
2002- 2007	39(6.5)	1	5	3	16	14
合計	386	28	29	65	89	175
相対危険 1982-2007		1	2.2	4.7	11.5	18.0
人口比		33.2%	15.9%	16.4%	9.2%	11.5%

人口比はH17年データ

相対危険は、関東甲信越を1とした時の、人口あたりの発生率で表示

表2) 日本脳炎ワクチン接種後ADEM頻度

厚労省の文書	H18年8月31日付け文書 記載内容
予防接種副反応報告	70万~200万回に1回 (H8-H16 23例)
法による健康被害救済	平成1年~17年5月17年間で14名(死亡4例)

国立感染研感染症情報センターHP上の日本脳炎Q&Aの記載

	期間	1期(3-7歳)	2期(10歳)	3期(14-15歳)	計
予防接種副反応報告	H6-18 (13年間)	14人 1/300万	1人 1/1000万	6人 1/120万	21 1/260万
健康被害認定	H1-18 (18年間)	10人 1/500万	0人	6人 1/180万	16 1/480万
年間平均接種者数	1年間	280万	80万	60万	420万

注:接種数や頻度の数値は概数

表3) 小児のADEM頻度(4調査より)

	地域	対象	調査年	例数	頻度 小児人口10 万あたり
九大小児科	福岡県	15歳以下	1998-03 5年間	26例 5例/年	0.64
AND調査	特定 4地域	15歳未満	1994-02 各4年間	24例 6例/年	0.38
岡部班	全国	15歳以下 2001/3323#	2003-04 2年間	102例(118)* 51例(59)/年*	0.33
森島班	全国	小児 1337/2828#	2005-06 2年間	122例 61例/年	0.34

#: 調査表返送医療機関数/調査票発送医療機関数

\*: ( )内はADEMの類縁疾患である視神経炎と横断性脊髄炎を加えた数

#### 表4) ADEM調査のまとめ

- ADEMは種々の原因で起こりうる(感染)免疫性中枢神経疾患である。
- 小児に好発し、小児人口10万人あたり、年間0.30-0.64程度の発症頻度(年間60-120人程度)
- 原因の特定は困難な場合が少なくないが、感染後ADEMは7日頃(4-14日)に好発する
- 日本脳炎ワクチン接種との密接な疫学的相関(接種後日数、季節・年齢等)はない。
- 岡部班と森島班の比較により、日本脳炎ワクチンの積極的勧奨を中止してもADEMは減少しなかった
- 紛れ混みを含めた日脳ワクチンの神経系副反応報告率は中学生では上昇する可能性がある
- ADEM以外の小児の脳炎・脳症の発生は1歳にピークがあるので、接種年齢をさげすぎると脳炎・脳症の紛れ込みが増える可能性もある

#### 表4) 日本脳炎患者数の動向の推定因子

- 豚の感染率(西日本で高率)
- 媒介蚊からのウイルス分離(可能)
- 患者数 = 感受性者数 × 感染率 × 顕性発症率
- 年齢階層別・地域別感受性者数  
→ 感染研血清疫学データ(抗体陰性率)  
予防接種率
- 年齢階層別・地域別自然感染率  
→ 感染研血清疫学データ(抗体陽性率)  
治験参加小児血清データ  
NS-1抗体(小西)による推計
- ウイルスの病原性 → 動物実験、海外疫学データ

表5 日本脳炎ウイルス感染と発症リスクの推計

1)組織培養日脳ワクチンK社第3相臨床試験2集団からの推計:

①2003年 468名(平均3歳):接種前抗体陽性1名

②2008年 474名(熊本県): 々 1名

陽性率0.21% → 3歳までの年間平均感染率=0.07%

2)現行ワクチンの接種率と抗体陽性率からの推計:

日脳ワクチン接種率80%、感染率0.07%として、

10歳代の感受性者250万人×0.07%/年=感染1750人/年

3)中高年層の中和抗体10倍未満者は約4800万人(真の感受性者は1200万人程度か?)

年平均6-7人の発症者→1/200万人(真の感受性者)

表6) まとめ:日本脳炎とワクチン

- 現行ワクチンを接種しても、副反応リスクは小さい。
- ワクチンを接種しない時の感染リスクには大きな地域差がある。
- 患者発生数は下げ止まり、西日本ではやや上昇する傾向にある。
- 小児の発症は、全国的には2年に1例前後の発症リスクだが、今後接種勧奨の差し控えが長引けば、発症危険率は上昇していくと思われる。
- 新ワクチンは追加臨床試験中であり市販まで1年強～数年かかる。
- 現在でも希望すれば定期接種できるが、現行ワクチンの供給には限界がある。
- ハイリスク地域の未接種者へは基礎免疫を与えることが望ましい。

## 組織培養日本脳炎ワクチンの導入法私案

- 2009年2月に組織培養不活化日本脳炎ワクチン製造承認されるが当初の供給量に限界がある、年度中に現行ワクチンの在庫消失の可能性がある
- 新ワクチンの市販後安全性・有効性調査  
→国(予防接種後健康状況調査と副反応報告を利用)とメーカーが実施
- 積極的勧奨一時差し控え中に定期接種年齢を超過した者の救済  
→法による救済
- 蓄積した未接種者:供給量によって接種の優先順位を考慮  
→供給量の不足が予想されれば未接種者の1期2回優先
- 法的な位置づけ  
→1類で再開し、類型の見直しの中で再検討する



## 百日咳 LAMP 法と血清診断

中山哲夫 1)、渡辺峰雄 2)、宮田章子 3)

- 1) 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 2) 北里生命科学研究所 免疫機能制御  
3) みやた小児科

【研究要旨】百日咳の実験室診断は、菌の分離が困難であることから遺伝子診断として PCR, LAMP 法が用いられている。しかしながら、成人百日咳は医療機関を受診するまでの期間が長かったり、抗生剤の投与により、また既にワクチン接種を受けており菌の排泄期間も短いことから遺伝子検出率も低いことから成人百日咳の診断には苦慮する。成人百日咳に対しては菌分離、遺伝子検索よりも血清診断の利点が大いと考えられ、PT, FHA-EIA 法と同時に、ワクチン成分には含まれない adenylate cyclase toxin catalytic region (CatACT), FHA C-terminal (C-FHA)を抗原として EIA を行った。臨床的に百日咳が疑われた成人 28 例、幼児・学童 15 例を対象に後鼻腔拭い液と血清を採取した。LAMP 法で成人からは 1/28、幼児学童では 2/15 と百日咳遺伝子が検出されたが検出率は低かった。EIA 抗体 4 抗原中 3 抗原以上陽性を百日咳と考えると成人では 20/28、幼児学童では 11/15 が血清学的に百日咳と診断された。一方、LAMP 法で診断された新生児期の百日咳 3 例では血清学的診断はできなかった。百日咳の診断は遺伝子診断と血清診断を併用する必要がある。

### 【背景】

百日咳は無細胞型百日咳・ジフテリア・破傷風ワクチン(DTaP)が開発されワクチン接種率も 90-95%となり報告される百日咳の患者数は減少してきた。しかしながら、近年青年層を含めた成人の百日咳の増加が問題となっている。成人の百日咳は典型的な症状を示すことが少なく長引く咳が唯一の症状であり診断されずに家庭内に持ち込み DTaP 接種前の乳幼児の百日咳の原因となっている。

臨床診断が困難であり、細菌の分離率が低く、PCR といった遺伝子診断に頼ることになるが実施できる施設が限られている。青年、成人の百日咳の状況を把握するため、乳幼児の百日咳を含め、簡便で感度の高い迅速診断法の開発が望まれている。LAMP 法は約 200 塩基領域を target として特異的な LAMP primer を設定し、63°C の恒温で DNA の増幅し、特異性、感度共に高い DNA 増幅法である。臨床検体から遺伝子を抽出後 60 分以内に結果が得ることが可能で臨床現場での迅速診断法として期待されている。

遺伝子検索とともに血清学的診断は感染症

の診断に重要な検査法である。40 歳代以下の世代はすでにワクチンを受けておりワクチン株(東浜株)と野生株(山口株)に対する凝集素価を測定し比較することで野生株の感染か否かを判定してきた。しかしながら、判定は曖昧であり、ワクチン成分には含まれていない抗原を用いて EIA 法で鑑別する方法を利用し成人百日咳の診断を試みた。

【方法】①臨床的に百日咳が疑われた成人 28 例、幼児・学童 15 例、3 歳未満の乳幼児 5 例と百日咳疑いで入院した新生児・乳児 4 例を対象に後鼻腔拭い液と血清を採取した。② LAMP 法はすでに報告した IS481 領域の LAMP、PT 非翻訳領域の 2 か所で行った (1, 2)。③FHA, PT は市販の EIA キットを使用した。CatACT, FHA C-FHA は遺伝子発現させ精製抗原を使用した(3)。

### 【結果】

1) LAMP 法で  $2.5 \times 10^5$  cfu/100ul の東浜株から抽出したゲノム DNA の  $10^{-5}$  希釈まで検出できた。パラ百日咳は百日咳 LAMP 法では増幅されなかった。新生児の 3 例の無呼吸症例から百日咳の遺伝子が検出され、3 週間は検

出された(図1)。家族内の調査を行ない、一家族において父親から百日咳が検出されたが、経過からは新生児からの感染と思われた。

2) 2週間以上続く咳を認めた成人からは1/28、幼児・学童では2/15とLAMP法による遺伝子検出率は低かった。

3) 3歳未満の乳幼児、3-20歳未満の幼児・学童、20歳以上の成人に分けてFHA, PT, CatACT, C-FHAに対するEIA抗体陽性例を表1に示した。FHA, CatACTの陽性率は89%とほぼ同程度で、PT, C-FHAの陽性率も71%であった。これら4種類の抗原に対して3種類以上の抗原に対するEIAが陽性である例を野生株感染と考えると乳幼児で1/5、幼児・学童では11/15、成人では20/28が最近の百日咳と診断された。

【考按】 IS481領域に設定したLAMP法は2.5 cfu/100ulの百日咳菌を検出可能であり、single assayあたりでは0.1 cfuが検出可能レベルと算出された。百日咳菌群のなかに*B. parapertussis*, *B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, *B. hinzii*が存在するが*B. parapertussis*とは交差反応を示さなかった。PTのnon-codingに設定したLAMP法では他の百日咳菌と交叉反応を示さないことが報告されており、IS481 LAMP陽性例はこのプライマーセットでも陽性であった(1, 2)。新生児の百日咳症例において血清学的検索を行った症例はいずれの抗原に対しても陰性であったことから、新生児期では遺伝子検索が有用と考えられた。

成人百日咳は典型的な症状をとることが少なく、百日咳を念頭に検査を行ってもすでにワクチン免疫で百日咳菌が早期に排除され、もしくは抗生剤の投与を受けており菌の検出期間が短くLAMP法でも診断が困難であることから、血清診断が必要とされる。DPTワクチンの接種率は90%を超え百日咳がある程度コントロールされワクチンで獲得した免疫能の持続に関する知見はない。しかしながら、ワクチンで獲得した免疫能の低下により感染し非定型な症状を呈するためその実態を把握する必要がある。長期間持続する咳の患者

を対象に検索したがLAMP法で3例に遺伝子が検出されたのみで検体採取の時期が問題と考えられる。

血清診断の抗原としてPT, FHAは百日咳菌が分泌し培養液から精製しワクチンの成分となっている。FHAは367KDのタンパクであるが最初の71アミノ酸残基はシグナルペプチドであり切断され、またproteaseにより切断されN末220KDがFHAとして分泌される。C末端部(C-FHA)は百日咳菌膜に残りワクチン成分には理論上含まれないタンパクである。ACTは百日咳菌の病原因子の一つで感染者において抗体を誘導しcatalytic domainは百日咳菌に特異的な領域と考えられている。この2種のタンパクはワクチンに含まれていない抗原でこれらの抗体が検出されることはワクチン免疫ではなく3種類以上の抗原に対するEIAが陽性であるものは最近の感染があったものと考えられる。

#### 【文献】

- 1) Nakamura A et al. Neonatal pertussis presenting as acute bronchiolitis: direct detection of the *Bordetella pertussis* genome using loop-mediated isothermal amplification. *Eur J Pediatr* 2008. DOI 10.1007/s00431-008-0744-8
- 2) Kamachi K., et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1899-1902
- 3) Watanabe M., et al. Characterization of serological responses to pertussis. *Clinical and vaccine immunology* 2006; 13: 341-348

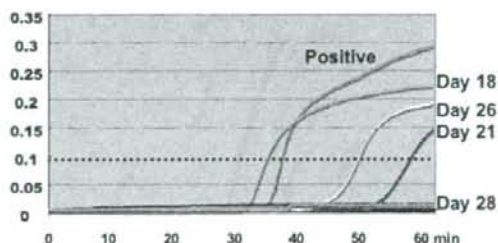


図1. 新生児百日咳からの経時的遺伝子検出

表1 百日咳抗体陽性率

	FHA (+)	PT (+)	CatACT	C-FHA	1+	2+	3+	4+
<3Y (n=5)	2	1	3	2	2	2	0	1
3-19Y (n=15)	13	11	14	10	0	4	3	8
>20Y (n=28)	25	21	25	20	1	7	4	16

FHA: filamentous hemagglutinin, PT: pertussis toxin,

CatACT: catalytic region of adenylate cyclase toxin,

C-FHA: c-terminal region of FHA

水痘ワクチン株における性状解析

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: 腰塚哲朗、吉井洋紀

医薬基盤研究所・基盤研究部・研究員

研究要旨

水痘ワクチン株(vOka)はワクチンとしての高い安全性、免疫原性が確認されている。vOka は親株である pOka と比較して弱毒化しており、その責任遺伝子の決定が試みられている。我々は、その性状解析のため、水痘ワクチン株全ゲノムを bacterial artificial chromosome (BAC) にクローニングし、独立したクローンを得ることを試みた。BAC にクローニングすることによって二つの異なったクローンを得ることができた。In vitro においてその増殖能を比較したところ、二つのクローンは、同等の増殖能を示した。一方、我々は pOka と vOka で大きな変異の生じている遺伝子の一つ、ORF0 に焦点を当て、その性状解析を行った。ORF0 は C 末端付近に膜貫通ドメイン(TMD)を持つ。pOka ORF0 と vOka ORF0 では、TMD 以降の C 末端領域に大きな違いが存在している。このため、pOka ORF0 と vOka ORF0 は分子量に差が確認できる。また精製ウイルス粒子外側を protease により消化すると vOka ORF0 の分子量に大きな変化が見られたことから ORF0 は C 末端側をウイルス粒子外側に向けていることが分かった。

A. 研究目的

ワクチン株全長をクローニングし、独立したクローンを得ることによってその性状を分子学的に解析することを目的とした。

一方、vOka 株においてアミノ酸置換がみられる遺伝子の一つ、ORF0に焦点をあて、その解析を行った。

ORF0 は C 末端付近に膜貫通ドメイン(TMD)を持つ。pOka ORF0 においてストップコドンとなる部分に、vOka ORF0 では点変異が生じておりアルギニンに置換される。このため、vOka ORF0 では C 末端に新たな配列の付加が起こっている。

## B. 研究方法

(A) Bacterial Artificial Chromosome (BAC) system を用いて Oka ワクチン株(vOka)ゲノム全長をクローニングした。得られた各々の独立したクローンについて分子学的性状解析を行った。

### (B) 1. ORF0 発現プラスミドの構築

pOka 由来 ORF0 および各種 vOka 由来 ORF0 をコードする cDNA を pCAGGS ベクターへ組み込み、真核発現系を構築した。

### 2. 特異抗体の作成

GST と ORF0 の N 末端部分の融合タンパク質 GST-ORF0 を大腸菌内で発現させた。精製タンパク質をウサギに免疫し、特異抗体を得た。

### 3. Protease による消化実験

精製したウイルス粒子を 1% Triton X-100 存在あるいは非存在下において 500ug/ml Proteinase K (ProK) で処理した。得られたサンプルはウエスタンブロット法によって検討した。

## C. 研究結果

(A) BAC system を用いて vOka ゲノムをクローニングした結果、大腸菌内において vOka ゲノムが安定的に保持された複数のクローンを得た。

Oka 親株(pOka)と vOka の間では、アミノ酸置換を伴う塩基配列の置換が 20ヶ所存在することが明らかとなっているため、得られた BAC クローンについて、これら 20ヶ所の塩基配列を解析した。その結果、BAC クローン間では ORF62 において 1ヶ所のみ塩基配列が異なっ

ており、このことに基づき今回得られたクローンは 2グループに分けられた。

2グループの各 1クローンの vOka-BAC DNA を MRC-5 細胞に transfection した結果、5日後に GFP の蛍光を伴った VZV 特異的 plaque が観察された。組換えウイルスを作製し、これらの cell free virus を調製して MRC-5 細胞における増殖性を Infectious center assay を用いて比較した。その結果、得られた vOka-BAC クローンはクローン間での増殖性の差は見られないものの、pOka、rpOka(pOka-BAC DNA より得られた組換えウイルス)及び vOka と比較して有意な増殖性の低下が観察された。

(B) 作成した特異抗体を用いてウエスタンブロット法を行ったところ、ORF0 は pOka と vOka において分子量に違いがあることが確認できた。

精製したウイルス粒子を ProK で処理することにより、pOka ORF0 は分子量に大きな変化が見られなかった。さらに Triton X-100 を加えウイルスエンベローブを壊すと、pOka ORF0 は検出できなくなった。一方、vOka ORF0 は ProK 処理により分子量に変化が見られ、pOka ORF0 とほぼ同程度のサイズにシフトダウンした。Triton X-100 添加により、vOka ORF0 も検出できなくなった。

## D. 考察

(A) 今回の研究で得られたクローンはシーケンズ上 2グループに分けられたが、vOka は少なくとも 9種類の塩基配列が異なるクローン

からなると報告されている。従って、今後さらに多種類の vOka-BAC クローンを得てそれらの分子学的性状を解析することが望まれる。

得られた組換えウイルスの増殖性は vOka より若干ではあるが有意に、また pOka と比較するとさらに大きく減少していた。

(B) 感染細胞ライセートを用いたウエスタンブロットニングの結果から、pOka ORF0 と vOka ORF0 の見た目の分子量の相違は、vOka ORF0 の C 末端領域に原因があると推測される。この結果は、スプライシングを受けた vOka ORF0 に何らかの翻訳後修飾が起きていることを示唆する。

Protease による消化実験の結果から、ORF0 は N 末端側をウイルス粒子の内側に向けて存在していることが分かった。Triton X-100 を添加しない条件では、ウイルス粒子の外側のみが消化される。この条件では vOka ORF0 は pOka ORF0 と同程度の分子量として検出されたことから、vOka ORF0 の C 末端側のみ消化されたと考えられた。このことから vOka ORF0 の分子量変化は C 末端部分に原因があることが確認された。

#### E. 結論

(A) 二種類の異なった rvOka クローンを得た。それらの増殖能に差は認められなかった。しかし、それらの増殖能は、pOka に比較して低かった。(B) VZV ORF0 は N 末端側をウイル

ス粒子内側に向けて、C 末端側をウイルス粒子外側に向けていることが判明し、pOka、vOka 間における ORF0 分子量の違いは、その C 末端側部分に原因があることが明らかとなった。今後は、本遺伝子が、ワクチン弱毒化にどのように寄与しているかを解析する必要があると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特に健康状態に問題はない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yoshii H, Somboonthum P, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. Cloning of full length genome of varicella-zoster virus vaccine strain into a bacterial artificial chromosome and reconstitution of infectious virus. *Vaccine*. 25: 5006-5012, 2007

Yoshii H, Sadaoka K, Matsuura M, Nagaike K, Takahashi M, Yamanishi K, Mori Y. Varicella-zoster virus ORF 58 gene is dispensable for viral replication in cell culture. *Virology Journal*. 5: 54, 2008

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshii H, et al.	Cloning of full length genome of varicella-zoster virus vaccine strain into a bacterial artificial chromosome and reconstitution of infectious virus.	Vaccine	25	5006-5012	2007
Yoshii H, et al.	Varicella-zoster virus ORF 58 gene is dispensable for viral replication in cell culture.	Virology Journal	5: 54	Online Journal	2008

予防接種で予防可能疾患の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究

## 成人を対象とした百日咳に関する基礎・臨床疫学的研究

分担研究者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

**研究要旨** 百日咳は小児の急性呼吸器感染症であるが、近年多くの先進国で青年・成人層の罹患率増加が認められている。本研究では百日咳ワクチンの接種プログラムの再評価を目的に、わが国の成人百日咳について基礎ならびに臨床疫学的な検討を行った。その結果、成人患者の増加に百日咳菌の主要病原因子は関与しないことが指摘され、さらに 2007 年の成人百日咳集団感染事例は複数の流行株によって引き起こされたことが判明した。また、急性・遷延性の咳嗽成人患者の 28.8% に百日咳菌 DNA が検出され、咳嗽成人患者は小児に対する感染源となることが再確認された。

### 研究協力者

韓 賢子(国立感染症研究所 細菌第二部)

豊泉裕美(国立感染症研究所 細菌第二部)

岡田賢司(国立病院機構 福岡病院)

に臨床疫学的研究により得られた知見を基に、わが国の百日せきワクチン接種プログラムを再評価した。

### A. 研究目的

百日咳はワクチン予防可能疾患の一つであり、ワクチンの普及に伴い世界の百日咳患者は激減した。しかし、先進国では成人の百日咳患者が増加傾向にあり、青年・成人層における百日咳感染が新たな問題となっている。百日咳は青年・成人層が感染しても重篤化することはないが、小児、特にワクチン未接種の乳幼児が感染すると重篤化し易い。百日咳菌を保有した青年・成人患者は乳幼児への感染源となる可能性が指摘されており、先進国では「大人から子供」への感染を防止するためワクチン接種プログラムの見直しを進めている。

本研究では、わが国の成人百日咳の実態を把握することを目的に、1) 成人から分離された百日咳臨床分離株の細菌学的解析、2) 百日咳の成人集団感染事例の分子疫学、3) 咳嗽成人患者の百日咳保菌率調査、を実施した。これら基礎ならび

### B. 研究方法

#### 百日咳菌の細菌学的解析

菌株: わが国の成人患者から分離された百日咳臨床分離株(5株)を解析に供試した。比較対象には、1991-2006年に乳幼児から分離された百日咳臨床分離株(50株)を供試した。

PFGE 解析: 制限酵素 *Xba*I を用いて 1% アガロースゲルにより分離した。系統樹解析は Diversity Database software (PDI) を用いて UPGMA 法により行った。

シーケンス解析: 百日咳菌の主要病原遺伝子である *ptxS1*, *prn*, *shaB*, *fim2*, *fim3*, *tcfA* について解析を行った。

#### 百日咳集団感染事例の分子疫学

百日咳集団感染事例: 2007年に青森県消防署、岡山県中高一貫校、高知大学医学部・附属病院で発生した集団感染事例について MLST 解析を実施した。さらに、愛媛県宇和島市の百日咳小流



行(2007年)についても解析を行った。

検査材料: 上記集団感染事例において、百日咳遺伝子診断用に採取・調製された患者スワブDNAを供試した。精製はQIAamp DNA Micro kit (QIAGEN)により行い、LAMP 遺伝子診断において陽性を示した検体について MLST 解析を実施した。

MLST: 患者スワブ DNA を鋳型に Nested-PCR により3種類の病原遺伝子(*ptxS1*, *prn*, *fim3*)を増幅し、シーケンス解析により allele タイプを決定した。

#### 咳成人患者の百日咳保菌率調査

調査協力機関: 2007～2008年に国内の4医療機関(施設A～D、国立病院機構福岡病院、名古屋市立大学附属病院、医療法人中島医院、医療法人社団丸の内クリニック)の協力を得て、患者検体を採取した。

調査対象者: 急性・遷延性咳嗽(原則14日以上)を主訴とする成人患者を対象に、検体採取に同意が得られた267名から鼻腔スワブを採取した。

遺伝子検査: 患者検体を国立感染症研究所・細菌第二部に送付し、QIAamp DNA Micro kit を用いてDNA画分を精製した。得られたDNA検体を百日咳LAMP検査に供試した。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査の承認を得て実施し、臨床検体は非連結匿名化により個人が特定できないよう配慮した。

## C. 結果

### 百日咳菌の細菌学的解析

わが国の成人層から分離された百日咳菌5株の遺伝子型を解析した。その結果、これら菌株は異なるPFGEパターンを示し、系統樹解析により菌株間の遺伝的相同性は63～92%と算出された。また、乳幼児から分離された百日咳菌(50株)とその遺伝子型を比較したところ、成人分離株に特異的

な遺伝子型は認められなかった。さらに、MLST解析により、成人分離株は5株中4株が *ptxS1B/prn1/fhaB-1/fim2-1/fim3-1/tcfA2*、1株が *ptxS1A/prn2/fhaB-1/fim2-1/fim3-1/tcfA2* の allele type を持つことが示された。この MLST を乳幼児分離株のものと比較したところ、成人分離株と乳幼児分離株の間に allele type の違いは認められなかった。

### 百日咳集団感染事例の分子疫学

わが国の百日咳臨床分離株(1991～2007年分離株)は MLST-1 から MLST-5 の5種類に分類され、MLST-1 は全菌株の50%を占めた。一方、MLST-4 と MLST-5 は *fim3B* を有し、これらの MLST は2005年以降の分離株に特徴的に認められた。百日咳集団感染事例について臨床検体からの MLST 解析を実施したところ、高知大学由来の患者検体はすべて MLST-1 ( $n=11$ )、岡山県由来の検体は MLST-2 ( $n=1$ )に分類された。一方、愛媛県宇和島市由来の患者検体は2種類の MLST (MLST-1, -2) を示し、4検体が MLST-2、3検体が MLST-1 を示した。なお、青森県消防署事例で分離された2株は MLST-3 に分類された。

### 咳成人患者の百日咳保菌率調査

咳嗽を主訴とする成人患者267名について LAMP 法による百日咳遺伝子診断を実施したところ、その陽性率は28.8%(77名/267名)を示した。その内訳は施設Aが31.6%(61/177)、Bが15.4%(3/16)、Cが33.3%(3/7)、Dが23.1%(9/38)であった。同時期の施設Aにおける小児の LAMP 陽性率は32.4%(122名/377名)であり、成人患者とほぼ同様な値を示した。また、施設Aにおける月別陽性数を小児のものと比較したところ、成人と小児における検体数ならびに陽性数は2008年4～7月に多く、成人と小児の流行時期は一致した。

## D. 考察

本研究により、成人百日咳患者から分離された百日咳臨床分離株は乳幼児分離株と等しい遺伝

子型と主要病原遺伝子を持つことが明らかとなった。このことは、わが国の成人患者増加に百日咳菌の主要病原因子 (Ptx, Prn, Fha, Fim2/3, Tcf) は関与しないことを強く示唆し、成人の百日咳感染は現行のワクチン抗原により防御可能と考えられた。また、臨床検体からの菌タイピング法を確立し、2007年の百日咳成人集団感染事例に適用したところ、成人集団感染の3事例は事例間において MLST が異なることが判明した。この結果は事例間において疫学的な関連性が無いことを指摘し、集団感染を引き起こし易い流行株の存在を否定した。さらに、2007年の百日咳流行では複数の MLST が確認されたことから、これの流行に菌側の要因、例えば病原性や抗原性の変化が関与した可能性は低いものと考察された。

臨床疫学的調査により、わが国の咳嗽成人患者は高い LAMP 陽性率 (28.8%) を示すことが判明し、小児と同様に成人も百日咳菌の保菌者となることが再確認された。また、成人と小児の流行時期が一致したことから、「大人から子供」または「子供から大人」への感染が高頻度に起きている可能性が指摘された。百日咳の「大人から子供」への感染防止には、成人保菌者に対する抗生剤投与とワクチン接種による感染防御が挙げられる。しかし、成人保菌者を臨床症状から早期に探知することは困難な状況にあり、乳幼児への百日咳感染を防止するためには青年・成人層へのワクチン接種が有効な手段と考えられた。

わが国の百日せきワクチンの接種回数は追加接種を含め計4回実施されているが、米国では青年期までに計6回の接種プログラムが行われている。そのため、わが国の百日咳対策にはワクチン接種プログラムの見直しが優先課題となる。しかし、現在わが国では乳幼児の患者報告数に増加は認められず、現行の予防接種プログラムは小児の百日咳対策には十分に機能しているといえる。そのため、わが国では費用対効果を含めた効果的なワクチン接種プログラムの確立が必要である。

## E. 結論

細菌学的な解析から、わが国の成人百日咳に流行株の病原性と抗原性の関与は低いものと考察された。また、臨床疫学的な解析により、成人から乳幼児への百日咳感染防止にはワクチン接種プログラムの見直しが必要と考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (出版図書等)

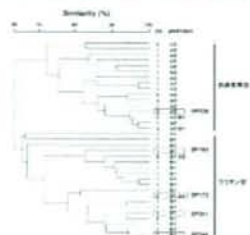
- 1) 蒲地一成, 岡田賢司, ワクチンで予防可能な疾患の病原診断とその読み方 6 百日咳. 小児科, 50:35-41 (2009)
- 2) 持田恵子, 蒲地一成. 百日咳ワクチン. 感染制御, 4(6):535-538 (2008).
- 3) 蒲地一成. 百日咳菌. バイオセーフティーの辞典. 編集 バイオメディカル研究会, PP.166-168 (2008).
- 4) 蒲地一成. 微生物の基礎知識: 百日咳. 感染と消毒, 15:91-94 (2008).
- 5) 蒲地一成. 感染制御のための微生物学講座: 百日咳. 感染制御, 4(3):255-258 (2008).
- 6) Han HJ, Kamachi K, Okada K, Toyoizumi-Ajisaka H, Sasaki Y, Arakawa Y. Antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates recovered from adults and children in Japan. Vaccine 26:1530-4 (2008).
- 7) 蒲地一成, 遠藤美代子, 小宮貴子, 豊泉裕美, 八柳潤, 齊藤志保子, 内村真佐子, 杉山明, 村上光一, 堀川和美, 柳川義勢, 堀内善信, 荒川宜親, 諸角聖, 高橋元秀. わが国の小児科担当医療従事者における百日咳・ジフテリア菌の感染リスク評価. 感染症学雑誌, 81:155-161 (2007).
- 8) Kamachi K, Arakawa Y. Development of safer

- pertussis DNA vaccine expressing nontoxic C180 polypeptide of pertussis toxin S1 subunit. Vaccine 25:1000-6 (2007).
- 9) Kamachi K, Sota M, Tamai Y, Nagata N, Konda T, Inoue T, Top EM, Arakawa Y. Plasmid pBP136 from *Bordetella pertussis* represents an ancestral form of IncP-1 $\beta$  plasmids without accessory mobile elements. Microbiology 152:3477-84 (2006).
- 10) Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, Horiuchi Y, Kojima K, Takahashi M, Arakawa Y. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol 44:1899-902 (2006).
2. 学会発表
- 1) 蒲地一成, 豊泉裕美, 中村敦, 中島夏樹, 石川隆, 多屋馨子, 荒川宜親, 岡部信彦, 岡田賢司. 咳嗽成人患者を対象とした百日咳保菌率調査. 第 83 回日本感染症学会総会, 平成 21 年 4 月, 東京 (発表予定)
- 2) 蒲地一成, 韓賢子, 豊泉裕美, 荒川宜親. 百日咳菌の新規タイピング法の確立とその応用. 第 82 回日本細菌学会総会, 平成 21 年 3 月, 名古屋 (発表予定)
- 3) 蒲地一成. 百日咳毒素-予防・診断・疫学への応用-. 第 82 回日本感染症学会総会, 平成 20 年 4 月, 島根
- 4) 韓賢子, 蒲地一成, 桑江朝臣, 阿部章夫, 荒川宜親. 百日咳流行株におけるタイプ III エフェクター BopC の発現差異について. 第 81 回日本細菌学会総会, 平成 20 年 3 月, 京都
- 5) 蒲地一成, 荒川宜親. スライド凝集反応における *Bordetella pertussis* の自然凝集と菌型の関係について. 第 19 回日本臨床微生物学会総会, 平成 20 年 1 月, 東京
- 6) 蒲地一成, 岡田賢司, 豊泉裕美, 佐々木裕子, 荒川宜親. 成人層から分離された百日咳菌の分子疫学的解析. 第 11 回日本ワクチン学会学術総会, 平成 19 年 12 月, 横浜
- 7) 韓賢子, 蒲地一成, 豊泉裕美, 荒川宜親. 成人層から分離された百日咳菌の遺伝子解析. 第 80 回日本細菌学会総会, 平成 19 年 3 月, 大阪

#### H. 知的所有権の出願・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

成人百日咳患者から分離された百日咳菌床分離株の遺伝子型



成人分離株 (BP173, BP183, BP230, BP241, BP245) の遺伝子型を 50株の乳幼児分離株と比較した。

Table 2. 成人分離株の遺伝子型と主要抗原遺伝子 (ABoX type)

NPI number	PFGE type	ABoX type					
		ptxS1	ptm	ptd	ptp2	ptx2	act
BP173	vacuome	0	1	1	1	1	2
BP183	vacuome	0	1	1	1	1	2
BP230	non-vacuome	4	3	1	1	1	2
BP241	vacuome	0	1	1	1	1	2
BP245	vacuome	0	1	1	1	1	2

Table 3. 成人分離株と乳幼児分離株 (2014) と主要抗原遺伝子の分布

Strain	Year	% Frequency (%)	
		ptxS1 type	ptm type
ptxS1	ptxS1	30 (1)	41 (3)
	ptxS2	30 (1)	34 (2)
ptm	ptm1	30 (1)	34 (2)
	ptm2	30 (1)	43 (2)
ptd	ptd1	100 (5)	100 (5)
	ptd2	0	0
ptp2	ptp2-1	100 (5)	100 (5)
	ptp2-2	0	0
ptx2	ptx2-1	100 (5)	100 (5)
	ptx2-2	0	0
act	act1	0	0
	act2	100 (5)	100 (5)
act3	act3-1	0	0
	act3-2	0	0

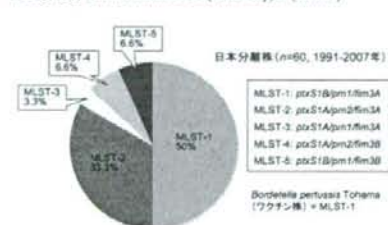
2014: 2014年成人分離株  
 act: actinin  
 ptd: pertactin  
 ptp: pertussin toxin  
 ptx: pertussin toxin  
 ptm: pertussin toxin  
 act: actinin

表 4. 2007年の百日咳菌床分離株の遺伝子型

菌株	患者	MLST型別	
		菌株数 (n)	MLST型別 (%)
東京府立総合医療センター	成人、青年	95	11 (12)
岡山県立総合医療センター	青年	1	1 (100)
東京都立総合医療センター	成人、青年	1	1 (100)

MLST: Multi-locus sequence type

百日咳流行株の multilocus sequence type (MLST)



わが国の百日咳菌床分離株 (60株, 1991-2007年分離) について MLST 解析を 実施し、その分布を示した。

百日咳菌床感染事例 (2007年) における流行株の MLST



患者スワブDNAから *ptxS1*, *ptm*, *ftm3* 3遺伝子領域を Nested-PCR により増幅し、シーケンス解析により MLST を決定した。愛知県中津島市は百日咳の小流行を示す。