

協力施設

Study 1: 日本ワクチン学会ワクチン推進ワーキンググループ百日咳ワーキンググループ

国立病院機構福岡病院小児科および関連施設（岡田賢司）、国立病院機構三重病院小児科および関連施設（庵原俊昭）、高知大学小児科および関連施設（脇口 宏）、都立駒込病院小児科および関連施設（高山直秀）、藤田保健衛生大学小児科および関連施設（浅野喜造）、川崎医科大学小児科および関連施設（尾内一信）、江南厚生病院子供医療センターおよび関連施設（尾崎隆男）、千葉大学小児科および関連施設（石和田稔彦）、国立病院機構東京医療センター（岩田 敏）

Study 2: 日本外来小児科学会予防接種委員会（永井崇雄委員長）

永井小児科医院（永井崇雄）岡藤小児科医院（岡藤輝夫）おさきこどもクリニック（尾崎貴視）加地医院（加地はるみ）西さっぽろ小児科（鎌田 誠）くまがい小児科（熊谷卓司）しらかわ小児科医院（白川佳代子）杉村こどもクリニック（杉村 徹）すずえこどもクリニック（鈴木純史）鈴木小児科医院（鈴木英太郎）たはらクリニック（田原 卓浩）ひらおか公園小児科（長田 伸夫）西岡医院（西岡 敦子）橋本こどもクリニック（橋本裕美）ふじおか小児科（藤岡雅司）藤沢こどもクリニック（藤澤卓爾）三好医院（宮崎 雅仁）みやた小児科（宮田 章子）あさぶ小児科（由利 賢次）横田小児科医院（横田 俊一郎）

【評価項目】

1. 免疫原性の主要評価項目

DTaP 初回免疫を終了し DT 接種時期に DTaP を接種することで百日咳の免疫能強化が本臨床試験の目的である。主評価項目は、抗 PT 抗体価 ≥ 10 EU/mL、抗 FHA 抗体価 ≥ 10 EU/mL の陽性率と GMT を DTaP 0.2ml, 0.5ml 接種群で比較し容量設定の妥当性を評価する。ジフテリア、破傷風トキソイドの抗原量は DT0.1ml と比較すると DTP0.2ml 接種では、約 1/2～ほぼ同等、0.5ml 接種では約 3～5 倍となる。副評価項目として DT 群との抗 D 抗体、抗 T 抗体の陽性率と GMT を比較し DTaP 0.2ml 接種群との

同等性を検討する。

2. 安全性評価項目

ワクチン接種 7 日後までに発現した有害事象および副反応（試験薬接種との因果関係が「関連あり」と判定された有害事象）の種類、程度、発現日、持続期間および発現率を比較する。

【試験実施期間】: 2008 年 9 月から 2009 年 8 月までの 1 年間

C. 研究結果

2009 年 1 月中旬までにいただいた症例数を表 1、接種後の有害事象を表 2 に示す。局所反応を認めた例数は DT0.1ml 接種群と比較して DTP0.5ml 接種群が有意に多かった。

表 1 これまでの接種数

	目標症例数	接種済症例数
Study 1	400	102
Study 2	300	127

表 2. Study 1 (102 例) 接種後の有害事象出現頻度

	発熱	局所反応を認めた例数	発赤	腫脹	疼痛	熱感	かゆみ	全身反応
DT 0.1 (n=12)	0	5 (41.7%) (15.1-73.0%)	4 (33.3%) (9.0-65.6%)	3 (25%) (5.5-57.2%)	3 (25%) (5.5-57.2%)	1	2	
DPT 0.2 (n=48)	2	31 (64.6%) (51.0-78.1%)	21 (43.8%) (29.8-57.8%)	17 (35.4%) (21.9-48.9%)	17 (35.4%) (21.9-48.9%)	12	11	5
DPT 0.5 (n=42)	3	31 (73.8%)* (60.5-87.1%)	17 (40.5%) (25.7-55.3%)	15 (35.7%) (21.2-50.2%)	26 (61.9%)* (47.2-76.6%)	13	13	11

発熱は観察期間中 37.5℃以上を認めた症例数

各観察項目については記載された症例数とその出現頻度、下段は出現頻度の95%信頼区域

*は DT 0.1ml 接種群と比較して有意に頻度が高い。

熱感、かゆみ、全身反応はDT 0.1ml 接種群における出現数が少ないので解析しなかった。

局所反応（発赤・腫脹・疼痛）の接種後の出現日と持続、および発赤・腫脹の長径を図 1～図 5 に示す。

図 1. 局所の発赤出現日

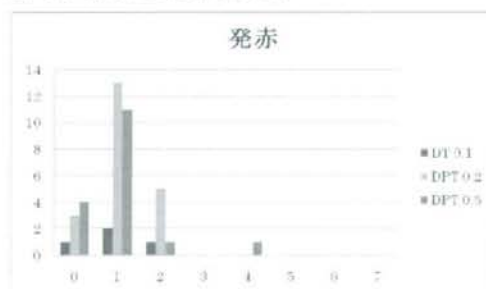
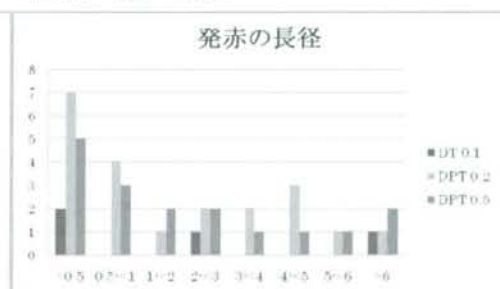


図 2. 発赤の長径



多くは3日以内に軽快している。発赤の長径は、3群とも0.5cm未満が多い。DT 接種群より DTP 接種群が多い。

図 3. 腫脹の出現日

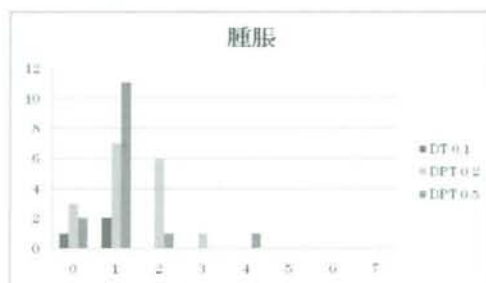
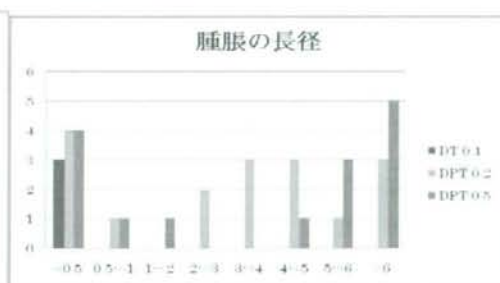


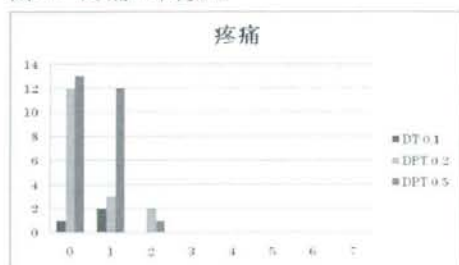
図 4. 腫脹の長径



いずれの群でも接種翌日が多く DT0.1ml DTP0.2ml DTP0.5ml の順に多い。4日以内で軽快

することが多い。腫脹の長径は、DT0.1ml 群に 0.5cm 未満が多いが、DTP0.5ml 群は 6cm 以上の大きな腫脹もみられる。

図 5. 疼痛の出現日



局所の疼痛は DT0.1ml 群に比較して DTP0.2ml 群および DTP0.5ml 群は多い。DTP0.2ml 群は接種当日が多く、DTP0.5ml 群は当日・翌日に目立つ。疼痛の持続は、DTP0.5ml 群が長い傾向にあった。

全身反応は、いずれの群も軽微で接種との関連を示唆するような兆候はなかった。

E. 結論

DT0.1ml 接種群に比較して、DTP0.5ml 接種群は有意に局所反応を認めた例が多かったが、試験の継続に支障のあるような重大な有害事象は認められなかった。

分担研究報告書

23 価肺炎球菌ワクチン再接種承認の必要性に関する研究

研究協力者 大石和徳 大阪大学、微生物病研究所
永井英明 国立病院機構東京病院

研究要旨：日本呼吸器学会の理事、代議員、および日本感染症学会の理事、評議員の総数 989 名を対象に、23 価肺炎球菌ワクチン(PV)の再接種に関する匿名によるアンケート調査を実施し、その回収率は 40%であった。調査対象者の 75%が患者に PV を接種した経験があり、その 38%は PV の再接種禁忌が原因で初回接種を控えた症例を経験していた。PV 接種経験のある調査対象者のうち PV 再接種の経験者は 16%に過ぎなかったが、その 84.3%が PV 再接種は必要との認識を示した。PV 再接種を受けた 49 例の患者の平均年齢は 74.3 歳、その基礎疾患は慢性肺疾患、慢性心疾患などであった。再接種に伴う副反応は 4 例で報告されたが、いずれも軽症であった。一方、慢性肺疾患患者 79 例の初回接種前、1 ヶ月、5-6 年後の血清中血清型特異 IgG 抗体濃度を測定し、血清型 14 以外の血清型では接種前直近くまで特異抗体濃度が低下することを確認した。

今回の研究結果から、初回接種から 5 年以上が経過した慢性肺疾患などの患者においては、血清免疫学的見地から PV の再接種が必要であり、また PV 再接種の安全性は高いと結論される。我が国の高齢者の感染症対策の一環として、PV 再接種の承認は急務である。

A. 研究目的

23 価肺炎球菌荚膜ポリサッカライドワクチン (PV) は我が国で 1988 年に、その成人における侵襲性感染症に対する予防効果から臨床承認された。しかし、その際に再接種時により強い局所反応が発生する懸念から、再接種・追加接種をしてはならない旨が添付文書に記載された。一方、米国予防接種諮問委員会(the Advisory Committee on Immunization Practice; ACIP)は 65 歳以下で PV を接種し、その後 5 年が経過した場合には再接種が推奨されている。平成 18 年 10 月からは、PV は製造方法が変更されたニューモボックス[®]NP として臨床の現場

で使用されているが、その再接種は禁止されたままである。しかしながら、臨床の現場では PV の再接種承認を求める声が日に日に高まっている。本研究では、我が国における PV 再接種の必要性を明らかにすることを目的として、成人における PV 再接種使用実態調査を実施し、あわせて PV 再接種後 5-6 年が経過した慢性肺疾患患者 79 症例の血清中特異抗体濃度の推移について検討した。

B. 研究方法

1. PV 再接種の実態調査
- 1) 実態調査の内容と方法

今回、我々は日本呼吸器学会と日本感染症学会の協力のもとに、日本呼吸器学会の理事、代議員、および日本感染症学会の理事、評議員の総数 989 名を対象に、平成 20 年 12 月から平成 21 年 1 月にかけて、匿名回答による郵送アンケート調査を実施した。アンケート調査内容としては、1) PV 接種状況、2) PV 再接種実施の有無(接種対象の基礎疾患、再接種の理由)、3) 再接種による副反応の有無、4) 再接種の必要性、5) 再接種禁忌の与える初回接種への影響などであった。平成 21 年 1 月末までに回収されたアンケート調査票を解析した。

2. 初回接種後 5-6 年経過した慢性肺疾患症例の血清中特異 IgG 抗体濃度測定

国立病院機構東京病院に通院する慢性肺疾患 79 症例(平均年齢 74 歳、男性 45 名、女性 29 名)を対象とし、PV の接種前と接種 1 ヶ月後、5-6 年後に血清を採取した。血清型 6B, 14 および 19F の莢膜ポリサッカライド(CPS)特異的 IgG 抗体濃度を第三世代 ELISA で測定した。

C. 研究結果

1. PV 再接種の実態調査

1) アンケート対象者

送付された 989 通のアンケート調査用紙のうち 398 通(40%)が回収され、そのうち解析可能な調査用紙は 382 通であり、有効回答率は 96%であった。回答者の性別は男性が 95.5%、平均年齢は 53.2 歳(SD:8.49)であった。回答者の所属医療機関は、大学附属病院 38.0%、国公立病院 28.3%、私立病院 14.7%、診療所・クリニック 11.0%の順で、診療科別では呼吸器内科 55.5%、一般内科 14.1%、感染症内科 8.8%の順であった。この結果から、調査対象者の約 8 割が内科医と考えられた。

2) PV 接種状況

これまでに患者に PV 接種の経験がある調査対象者は 287 名(75%)であり、その接種の動機は医師の推奨が 53%であり、患者本人の希望は 48.6%であった。接種の対象となった疾患は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、その他の慢性肺疾患、脾摘出・脾機能不全患者、慢性心不全、糖尿病の順に多かった。接種を推奨する年齢については 75 歳以上 39.3%、65 歳以上 38.7%、80 歳以上 22.1%の順であった。また、調査対象者 382 名のうち、PV の再接種が禁忌であることが、初回接種を控える原因となったとする回答が 144 名(38%)から得られた。さらに、これらの回答者が上記の理由から PV 初回接種を控えたとする患者数は平均 19 例(SD 26.8 例)であった。

3) PV 再接種の状況

PV 接種の経験のある調査対象者 287 名のうち、45 名(16%)が PV 再接種の経験ありと回答した。また、PV を再接種した 49 症例が報告され、これらの症例の平均年齢は 74.3(SD:10.3)であり、その基礎疾患の内訳は、COPD を含む慢性肺疾患が 19 例、慢性心不全 7 例などであった。初回接種から再接種までに期間は、平均 63 ヶ月(SD:11.8)であった。再接種の理由は、49 例(88.6%)は本人もしくは家族の希望によるものであり、医師の推奨は 5 例(11.4%)のみであった。また、299 名の調査対象者のうち、252 名(84.3%)が PV の再接種は必要との認識を示した。

4) PV 再接種に伴う副反応

PV 再接種経験のある調査対象者 45 名のうち、

4名がPV再接種に伴う副反応を報告した。副反応の内容としては、注射部位の局所的腫脹2例、発疹、筋肉痛、倦怠感がそれぞれ1例に経験されている。注射部位の腫脹をきたした2例のうち1例は10cm以上の腫脹、他の1例は10cm以下の腫脹であり、特別な治療なしに軽快した。いずれもアナフィラキシーなど重篤な副反応はなかった。

2. 血清中CPS特異IgG抗体濃度

慢性肺疾患患者79例の血清中CPS特異IgG抗体濃度 $\mu\text{g/ml}$ (Geometric mean concentration: 接種前、1カ月後、5-6年後) は血清型6Bでは1.44、4.18、1.95 $\mu\text{g/ml}$ 、血清型14は3.25、8.74、5.89 $\mu\text{g/ml}$ 、血清型19Fは2.62、5.21、3.24 $\mu\text{g/ml}$ であった。PV接種1カ月後には、接種前に比較して有意に上昇していたが、血清型14以外は5-6年経過後には接種前値近くまで低下していた。

D. 考察

今回の国立病院機構東京病院における慢性肺疾患患者の研究結果から、PV初回接種から5年以上経過した患者に対しては、PV再接種が必要であるという理論的根拠が明確になった。PVはT細胞非依存性抗原であるCPSを免疫原としていることから、初回PV接種後のB細胞メモリー機能が得られず、PV再接種時の血清中特異IgG応答は、初回接種時のそれより同等か、やや低下するとされている。また、これまでにPV再接種による感染防御効果のエビデンスは明らかではない。

一方、今回のアンケート調査からは、再接種を行った医師のうち、副反応を経験した医師は10%以下であり、また報告された副反

応の内容も無治療で改善する軽症例であった。これらの結果は、PV再接種の安全性に関する海外の研究成績と矛盾しない。

PV初回接種後の特異IgG抗体上昇に伴う感染防御効果を長期間に維持するためには、現状ではPV再接種しか手段が無い。このような背景から、PV初回接種から5年以上経過した慢性肺疾患などの基礎疾患を有する患者の多くは、担当医に患者自らPV再接種を希望し、一部の医師は患者の希望に応じたPV再接種の実態が浮き彫りになった。一方では、多くの医師が再接種の必要性を認識しつつも、PV再接種が禁止されていることから、患者の再接種の要望に応えられない医師のジレンマも垣間見られた。また、PVを患者に接種した経験のある医師の約4割が、PV再接種の禁忌を理由に、PVの初回接種を控える患者を経験していたことも注目に値する。

このように、我が国ではPV再接種が禁忌であるがために、本来であればPV接種により期待される侵襲性感染症などの予防効果が継続的に得られないだけでなく、PV接種の普及を妨げる一因となっていると考えられる。

E. 結論

日本呼吸器学会の理事、代議員、および日本感染症学会の理事、評議員の総数 989名を対象に、PVの再接種に関する匿名によるアンケート調査を実施し、その回収率は40%であり、対象者の約80%が内科医であった。調査対象者の75%にPVを患者に接種した経験があり、その38%はPV再接種が禁忌であることが原因で初回接種を控えた症例

を経験していた。PV 接種経験者のうち PV 再接種経験者は 16%であったのに対し、その 84.3%が PV 再接種は必要であると認識していた。PV 再接種を受けた 49 例の患者の平均年齢は 74.3 歳、その基礎疾患は慢性肺疾患、慢性心疾患などであった。また、再接種に伴う副反応は 4 例で報告されたが、いずれも軽症であった。

一方、慢性肺疾患患者 79 例の初回接種前、1 ヶ月、5-6 年後の血清中 CPS 特異 IgG 抗体濃度を測定し、血清型 14 以外の血清型では接種前値近くまで特異抗体濃度が低下することを確認した。

今回の研究結果から、初回接種から 5 年以上が経過した慢性肺疾患などの患者においては、血清免疫学的見地から PV の再接種が必要であり、また PV 再接種の安全性は高いと結論される。我が国における高齢者の感染症対策の一環として、PV 再接種の承認は急務である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Furumoto A, Ohkusa Y, Chen M, Kawakami K, Masaki H, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Nagatake T, Oishi K. Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. *Vaccine* 26:4284-4289, 2008
2. Chen M, Ssali F, Mulungi M, Awio P, Yoshimine H, Kuroki R, Furumoto A, Tanimura S, Kityo C, Nagatake T, Mugenyi P, Oishi K. Induction of opsonophagocytic killing activity with pneumococcal conjugate vaccine in

human immunodeficiency virus-infected Ugandan adults. *Vaccine* 26:4962-4968, 2008

3. Watanabe H, Asoh N, Kobayashi S, Watanabe K, Oishi K, Kositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia among HIV-infected patients in northern Thailand. *J Infect Chemother.* 14: 105-109, 2008
 4. Gotoh K, Qin L, Watanabe K, Anh DD, Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT, Oishi K, Watanabe H. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with resistant genes isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. *J Infect Chemother.* 14:349-353, 2008
 5. 川上健司, 大石和徳. 肺炎球菌ワクチンの新しい考え方. *感染制御JICP.* 4: 259-262, 2008
 6. 大石和徳. 医学と医療の最前線 肺炎球菌ワクチン—5 年後の再接種の是非—. *日本内科学会雑誌.* 97: 836-841, 2008
 7. 大石和徳. 呼吸器疾患診療マニュアル インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチン. *日本医師会雑誌特別号.* 137: 330-331, 2008
 8. 大石和徳. 細菌ワクチンの現状. *Medical Science Digest.* 34: 444-447, 2008
- #### 2. 学会発表
1. 大間敬太, 大石和徳: Flt3 プラスミドを

- 用いた PspA 経鼻粘膜免疫の肺炎予防効果. 第 82 回日本感染症学会総会, 島根, 2008 年 4 月 17-18 日.
2. 坂東園子, 大石和徳. ;ウガンダ成人における肺炎球菌コンジュゲートワクチンの免疫原性: 血清特異的 IgG のオプソニン活性の意義. 日本ワクチン学会, 熊本, 2008 年 11 月 8-9 日.
3. 川上健司, 大日康史, 大石和徳. : 65 歳以上の成人における肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果に関する検討. 日本ワクチン学会, 熊本, 2008 年 11 月 8-9 日.
4. 大間敬太, 趙 吉子, 大石和徳. : PspA に対する TLR ligand の粘膜アジュバント効果の比較. 日本化学療法学会西日本支部総会, 広島, 2008 年 12 月 6-7 日.
5. Oma K, Zhao J, Oishi K. Comparative analysis on mucosal adjuvancity of TLR ligands against PspA. 108 th General Meeting, American Society for Microbiology. 1-5 June, 2008, Boston, USA.
6. Uchida R, Oishi K, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Tanaka Y, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Evaluation of correlation among bacterial carriage in nasopharynx, socioeconomic, and pediatric pneumonia: an interim report of case control study in Bangkok. The 13th Congress of Asia Pacific Society of Respiriology, Bangkok, Thailand. Nov 21, 2008
7. Uchida R, Oishi K, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Evaluation of nasopharyngeal Pneumococcus for etiology of pediatric pneumonia. the 1st National Pneumococcus Symposium, Bangkok, Thailand. Nov 26, 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

分担研究報告書

肺炎球菌ワクチン接種による末梢血自然免疫リンパ球と血清抗体価の変動と その関連性に関する臨床免疫学的研究

研究協力者 川上和義、東北大学大学院医学系研究科

研究要旨：一般市中病院の呼吸器内科に通院中の慢性呼吸器疾患患者 42 症例を対象に、肺炎球菌ワクチン（ニューモバックス®）の接種前後における末梢血自然免疫リンパ球（NKT 細胞、 γ δ T 細胞）の動態及び血清 IgM 及び IgG 抗体濃度（血清型 6B、14、19F、23F）の変動について解析した。IgM 抗体濃度はワクチン接種後ほとんど変動が見られなかった。一方、IgG 抗体濃度については 2~4 週後をピークに増加がみられたが、19F 及び 23F では 1 年後に接種前の値にまで低下を示した。また、ワクチン接種前の IgG 抗体濃度が $2\mu\text{g/ml}$ 以下の患者の 10~20%ではピーク時の濃度が前値の 2 倍に到達しなかった。2 週後の自然免疫リンパ球の増加数とピーク時の IgG 抗体濃度の前値に対する増加率との関係では CD4-CD8-NKT 細胞で正の相関傾向が認められ、また IgG 抗体濃度が 2 倍以上の増加を示した患者の中でこれらの細胞が多い傾向がみられた。これらの結果から、肺炎球菌ワクチンによる抗体産生への自然免疫リンパ球、特に CD4-CD8-NKT 細胞の何らかの関与が推察された。

A. 研究目的

肺炎は高齢者の主要な死亡原因であり、高齢化社会を迎えたわが国ではその予防が重要な対策となる。肺炎球菌は成人肺炎の最も頻度の高い起炎菌であり、65 歳以上の高齢者や慢性心肺疾患を有する患者では肺炎球菌ワクチンの接種が推奨されている。しかしながら、わが国のワクチン摂取率は欧米に比べて極めて低く、高齢者のわずか 4%にとどまっているのが現状である。その背景としては、肺炎球菌ワクチンの低い認知度や接種経費の問題、被接種者の副作用に対する不安などに加えて、本ワクチンの作用機序が必ずしも十分には解明されていないことや、臨床的有効性についてのわが国のエビデンスが十分に確立されていないことが重要な要因となっている。

現行の肺炎球菌ワクチンは 23 価の莢膜多糖体を含んだもので、胸腺非依存性抗原

であることから、産生される抗体の class switching や affinity maturation が限定され、メモリー細胞が誘導されないことからブースター効果が期待できない。このような免疫学的特徴とも関連して、敗血症や髄膜炎など侵襲性感染症への予防効果はみられるものの、肺炎や中耳炎など粘膜領域感染症ではその臨床効果がエビデンスとして十分には確立されていない状況である。また、ワクチン接種後経年的に抗体価が低下するものの、副反応の問題などからわが国では再接種が認められていない。

このような背景から、本研究では、肺炎球菌ワクチンの臨床効果とその免疫学的機序との関連性について明らかにする目的で、ワクチン接種症例を対象とした臨床免疫学的解析を実施した。

B. 研究方法

本研究では、宮城県白石市の公立刈田総合

病院（内山美寧呼吸器内科部長）との共同研究を実施している。昨年度に引き続き、同病院呼吸器内科外来に通院中の慢性呼吸器疾患患者 42 症例から得られた末梢血あるいは血清検体を用いて以下の研究を実施した。

① 肺炎球菌ワクチンの抗体産生誘導効果における自然免疫リンパ球（NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞）の役割を調べるために、ワクチン接種前及び接種 2 週、4 週、3 ヶ月、6 か月後に採血を行い、分離精製した末梢血単核球（PBMC）をこれらの細胞表面マーカーである α -galactosylceramide（ α -GalCer）/ CD1d-tetramer（千葉大学大学院医学研究院 中山俊憲教授より供与）、抗 CD4、CD8、CD3、CD56、 $\gamma\delta$ T 細胞受容体抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。NKT 細胞は α -GalCer/CD1d-tetramer+細胞（iNKT 細胞）、または CD3+CD56+細胞（NKT 細胞）と定義し、iNKT 細胞はさらに CD4、CD8 の発現によって CD4+iNKT 細胞、CD8+iNKT 細胞、double negative（DN）iNKT 細胞に分類した。また、同時に調べた白血球数、分画からリンパ球数を求め、得られたフローサイトメトリーのデータとから各自然免疫リンパ球数を算出した。

② ワクチン接種後の血清抗体濃度の推移を調べるために、接種前、接種 2 週、4 週、3 ヶ月、6 ヶ月後、そして一部の症例では 1 年後に血清を採取した。血清 IgG 抗体濃度は、WHO によって推奨されている第三世代 ELISA を用いて、荚膜血清型 6B、14、19F、23F について測定した。また、血清 IgM 抗体濃度についても同方法に準じて測定を行った。

③ 末梢血 NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞の変化数及び血清抗体濃度の変化率については以下のように解析した。

(1) 細胞変化数 = (2 週後の細胞数) - (接種前の細胞数)

(2) 抗体濃度変化率 = [(ピーク時の抗

体濃度) - (接種前の抗体濃度)] / (接種前の抗体濃度)

(倫理面への配慮)

本研究については、東北大学及び公立刈田総合病院の倫理委員会の承認を受けており、十分なインフォームドコンセントの上で被験者の同意を得ることとした。

C. 研究結果

1) 血清 IgM 抗体濃度の解析：6B、14、19F、23F について血清 IgM 抗体濃度を測定したところ、いずれにおいても少なくとも 6 ヶ月までは大きな変動は見られなかった。

2) 血清 IgG 抗体濃度の解析：IgG 抗体濃度については 2~4 週後をピークに増加が見られた。6B、14 についてはその後 1 年に渡りある程度の濃度が維持されたが、19F 及び 23F では 1 年後に接種前の値、あるいは前値近くにまで低下を示した。また、ワクチン接種前の IgG 抗体濃度が 2 μ g/ml 以下の患者では、6B、14、19F、23F において 21、15、13、22%でピーク時の濃度が前値の 2 倍に到達しなかった。

3) 末梢血自然免疫リンパ球の動態解析：昨年度の解析と同様、ワクチン接種 2 週後での末梢血 NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞数は増加する例と減少する例がみられた。経時的な推移をみると、全症例における NKT 細胞、iNKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞数の平均値はいずれのサブセットでも顕著な変化はみられなかったが、接種 2 週後の早期に増加が見られたグループだけで解析すると iNKT 細胞で 2 週後と 3 ヶ月後にピークを有する 2 峰性のグラフを示す傾向が認められた。

4) 自然免疫リンパ球と血清 IgG 抗体濃度との関連性：2 週後の自然免疫リンパ球の増加数とピーク時の IgG 抗体濃度の前値に対する増加率との関係について検討したところ、6B、19F、23F において

CD4-CD8-iNKT 細胞との間で正の相関傾向が、そして 14 では有意な正の相関が認められた。一方、CD4+iNKT 細胞、CD8+iNKT 細胞、CD3+CD56+細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞では一定の傾向を示さなかった。さらに、IgG 抗体濃度が 2 倍以上の増加を示した患者では、2 倍未満の患者に比べて CD4-CD8-iNKT 細胞が少ない傾向が見られ、特に 19F では有意差が認められた。

D. 考察

本研究で我々は、肺炎球菌ワクチン接種前後における末梢血中の自然免疫細胞の動態、血清中の莢膜血清型特異的抗体価の推移、そしてこれらの関連性について臨床免疫学的な解析を実施した。症例数は昨年度より 18 例増えて 42 例となり、一部の症例では最長 1 年後まで追跡し得た。

従来から多糖体のような胸腺非依存性抗原では、T 細胞の関与がないため IgM 産生 B 細胞から IgG 産生細胞へのスイッチが見られないと考えられていた。しかしながら今回の検討では、いずれの血清型においてもワクチン接種による血清 IgM 抗体濃度の増加は検出されず、IgG 抗体濃度が明らかな増加を示したことから、本ワクチンに関しては必ずしも該当しないものと考えられた。その理由については不明であるが、T 細胞以外の何らかの細胞によって IgM から IgG へのスイッチを誘導するサイトカインが産生していることが推察され、自然免疫リンパ球がこれに関わっている可能性がある。今後は IgG のサブクラスについても検討する必要があるものと考えられる。

今回の検討では、19F、23F に対する血清 IgG 抗体濃度が 1 年後という予想外に短い期間で低下を示した。米国における初期の検討から血清抗体価は 5~10 年程度持続すると考えられてきた。わが国において生涯に 1 度しか本ワクチンを接種

できないことを考慮すると、抗体価の持続期間に関する解析は極めて重要であり、今後わが国における独自のエビデンスの蓄積が重要になるものと思われる。

自然免疫リンパ球は免疫応答早期の段階で機能することが知られていることから、ワクチン接種早期の 2 週後でみると増加する症例と減少する症例に分かれることが明らかになった。特に、増加するグループでは、iNKT 細胞において 2 週後と 3 ヶ月後に 2 つのピークをもつ 2 峰性のグラフを示していた。血清 IgG 抗体濃度のピークが 2~4 週後に見られることから考えると、その前の時期である 2 週後に自然免疫リンパ球数が増加することは、これらの細胞が抗体産生と何らかの関わりをもつことを示唆していると考えられる。このような観点から、接種前から 2 週後の自然免疫リンパ球の細胞数変化と接種前からピーク時の血清 IgG 抗体濃度の変化率との関係について解析を行った。今回の検討では、14 で CD4-CD8-iNKT 細胞の変化数と血清 IgG 抗体濃度の変化率との間で正の相関、その他の血清型でも相関傾向が観察されたが、昨年度に見られた CD4+iNKT 細胞の変化数との負の相関傾向は検出されなかった。

近年の報告では、iNKT 細胞と B1-B 細胞との機能的相互連携の可能性が明らかにされつつある。B1-B 細胞も自然免疫リンパ球に属し、細菌の普遍的な抗原に対する抗体を極めて早期に産生分泌することで初期の感染防御に重要な役割を担うことが知られている。肺炎球菌が気道粘膜細胞に付着する際にアドヘジンとして重要なホスホリルコリンに対する抗体の産生にもこの細胞が深く関与している。これまでに、iNKT 細胞は肺炎球菌抗原に対する抗体産生において必須な細胞であること、そして特異的活性化剤である α -GalCer を投与することで肺炎球菌感染に対する抵抗性が高まることがマウスモ

デルを用いた研究で明らかにされており、これらの知見から iNKT 細胞と肺炎球菌感染とが密接な関わりを有している可能性が強く推察される。本研究を通して肺炎球菌ワクチンの臨床効果におけるこれら自然免疫リンパ球の役割、そしてその免疫学的機序が解明されることによって、iNKT 細胞を標的とした新規アジュバント開発の可能性が高まるものと期待される。

E. 結論

- 1) 肺炎球菌ワクチン接種によって IgM よりむしろ IgG 産生が誘導されることが明らかになった。
- 2) 血清 IgG 抗体濃度については 19F 及び 23F では 1 年後のように比較的短期間で低下する可能性が出てきた。
- 3) 肺炎球菌ワクチンによる抗体産生への自然免疫リンパ球、特に CD4-CD8-NKT 細胞の何らかの関与が推察された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 川上和義：病院・市中・施設の高齢者に必要なワクチンは何をどう打つのか？ 第 14 回東北院内感染対策研究会、仙台、2008 年 12 月。
2. 川上和義：感染症における分子パターン認識機構と自然免疫、第 53 回日本臨床検査医学会九州地方会、福岡、2009 年 2 月。

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

分担研究報告書

第二世代ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染予防ワクチンの開発に関する研究

神田 忠仁 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター長

研究要旨

15種類の発癌性 HPV の感染が子宮頸癌の原因になる。HPV キャプシドは L1 蛋白質で作られる正二十面体の骨格に、L2 蛋白質が組み込まれた構造で、L2 蛋白質の一部はキャプシド表面にでている。L1 蛋白質のみを細胞で高発現させるとウイルス様粒子 (VLP) が形成される。我々は、HPV16 型の L2 表面領域の抗原性を詳細に調べ、アミノ酸 57 から 75 領域に交差性中和エピトープ (L2-エピトープ) が存在することを見出し、このエピトープを HPV16 型 VLP に組み込んだキメラ VLP を作製した。キメラ VLP をウサギに免疫して得た抗血清は、少なくとも 16、18、31、33、35、51、52、58 型を中和した。L2-エピトープに対する抗血清が結合した HPV は、細胞へ吸着、侵入するが、その後のゲノムの核移行が阻害されるらしい。また、HPV データベースに登録されている HPV51 型は L2 表面領域に変異があり、感染性が低いことがわかった。感染において L2 表面領域が重要な役割を担うことが確認された。キメラ VLP は、発癌性 HPV 群の感染を幅広く予防するワクチン抗原になる可能性がある。

A. 研究目的

欧米で開発された第一世代 HPV 感染予防ワクチンは、15種類の発癌性 HPV 群のうち 16 型と 18 型の VLP を抗原としており、16 型と 18 型に特異性の高い中和抗体を誘導する。我々は HPV16 型 L2 蛋白質のアミノ酸 57 から 75 領域に発癌性 HPV 群に共通と考えられるエピトープ (L2-エピトープ) を見出したので、このエピトープを HPV16 型 VLP に挿入した第二世代ワクチン抗原を作製した。この抗原で誘導される抗体の中和能、中和機構の解析を進めた。

B. 研究方法

1) L2-エピトープを HPV16 型 L1 蛋白質のアミノ酸 430 と 433 の間に挿入したキメラ VLP をバキュロウイルス・夜盗蛾由来 sf9 細胞系で作った。精製したキメラ VLP

をウサギ皮下に接種し、抗血清を得た。
2) HPV が増殖する実用的な培養細胞系は無いので、発現プラスミドを使って L1、L2 蛋白質を発現させ、生じたキャプシドにレポーターを組み込んだ感染性偽ウイルスを使って抗体の中和活性を測定している。HPV キャプシド蛋白質をコードする mRNA は通常の培養細胞核内で分解されてしまうため、キャプシド蛋白質の発現には、アミノ酸配列を変えずに塩基配列を変えたコドン変異体が必要である。新たに、HPV33、35、51 型の L1、L2 蛋白質のコドン変異体を作製し、感染性偽ウイルスを作製した。偽ウイルスと抗血清を混合し、感染性の低下を測定する方法で、抗体の感染中和能を調べた。
3) キャプシドに対する抗体と標識したレポーター DNA を使って、HPV16 型偽ウイルスの感染からレポーターの発現までを追

跡した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮

動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管に関する基準」、「国立感染症研究所動物実験に関する基本方針」等を踏まえ、適切に行われるよう配慮した。

C. 研究結果

1) キメラ VLP をウサギに免疫して得た抗血清は、HPV16、18、31、52、58 型に加え、新たに作製した 33、35、51 型の感染性偽ウイルスも中和した。中和力価は、1:50 から 1:6,000 を示した。

2) HPV51 型 L2 遺伝子は、HPV データベースに登録されている米国株の塩基配列と国内で分離された日本株の一部が異なる。これらの L2 蛋白質を持つ偽ウイルスは日本株が米国株に比べて著しく高い感染性を示した。日本株に米国株の配列を導入した変異体の解析から、米国株の L2 蛋白質の表面領域のアミノ酸配列が、低い感染性の原因であることが判った。

3) HPV16 型偽ウイルスを細胞に接種すると、速やかに細胞表面に結合した。37 度で 60 分経つと、細胞表面を低濃度のトリプシンに暴露させてもキャプシド蛋白質が分解されず、細胞内に侵入したことが示唆された。抗 L1 抗体を使い、共焦点レーザー顕微鏡でキャプシドを追跡すると、細胞内侵入が確認できた。さらに 24 時間経つと、ゲノムが L1 蛋白質から離れ、核内に移行した。偽ウイルスに抗 L2-エпитープ抗体を結合させた後、同様に細胞に接種すると、細胞へ侵入するがゲノムの核移行が起こらなかった。

D. 考察

1) 全ての発癌性 HPV の L2-エピトープ相当領域のアミノ酸配列は、16、18、31、33、35、51、52、58 型のいずれかとほぼ同じであるため、これまでの中和実験の成績は、抗 L2-エピトープ抗体が全ての発癌性 HPV を中和することを強く示唆して

いる。また、HPVDNA を導入したヒト表皮角化細胞をラフト培養する方法で少量の HPV 粒子を得ることができる。米国の研究グループは、この方法で得た HPV16、18、31 型粒子を、我々が提供した抗 L2-エピトープ抗体が効率良く中和することを確認した (HPV 国際学会発表及び私信)。重要な知見なので、我々も同様の実験系を構築しており、HPV 粒子が得られ次第追試する。

2) HPV51 型米国株の L2 蛋白質のアミノ酸 95 から 99 領域の配列は DLWHH で日本株の EPIAP と異なり、これが米国株の感染性を下げていた。塩基配列をみると、285 番目の塩基が欠失し、297 番目に塩基が挿入されており、この間のフレームのずれがアミノ酸変化を起こしたのだと推定された。癌細胞に組み込まれた HPVDNA に由来する配列なので、細胞複製時に生じた変化であろう。いずれにしろ、L2 蛋白質の表面領域が感染に重要であることを再確認できた。

2) 抗 L2-エピトープ抗体が結合した HPV は、細胞に吸着、侵入できるが、その後の感染過程が阻害されるらしい。侵入したウイルス粒子の構造が変化し、ゲノムが放出され、核へ移行する過程は全ての発癌性 HPV に共通で、L2 蛋白質の機能が重要だと思われる。抗 L2-エピトープ抗体は、この過程を阻害すると考えられる。詳細な解析を続ける。

E. 結論

キメラ VLP は、発癌性 HPV 全てを中和する抗 L2-エピトープ抗体を誘導することが期待でき、次世代 HPV ワクチン抗原となりうる。

G. 研究発表

論文発表 (2008 年-in press のみ記載)

- 1) Ochi, H., Kondo, K., Yasugi, T., Hirai, Y., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Neutralizing Antibodies against Human Papillomavirus Types of 16, 18, 31, 52, and 58 in the Serum Samples from Women in Japan with Low Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia.

- Clinical and Vaccine Immunology 15:1536-1540, 2008.
- 2) Kanda, T and Kondo, K.: Development of an HPV vaccine for a broad spectrum of high-risk mtypes. Human Vaccine, 5:1-3, 2008.
- 3) Kukimoto, I., Mori, S., Sato, H., Takeuchi, T., and Kanda, T.: Transcription factor hSkn-1a enhances replication of human papillomavirus DNA through the direct binding to

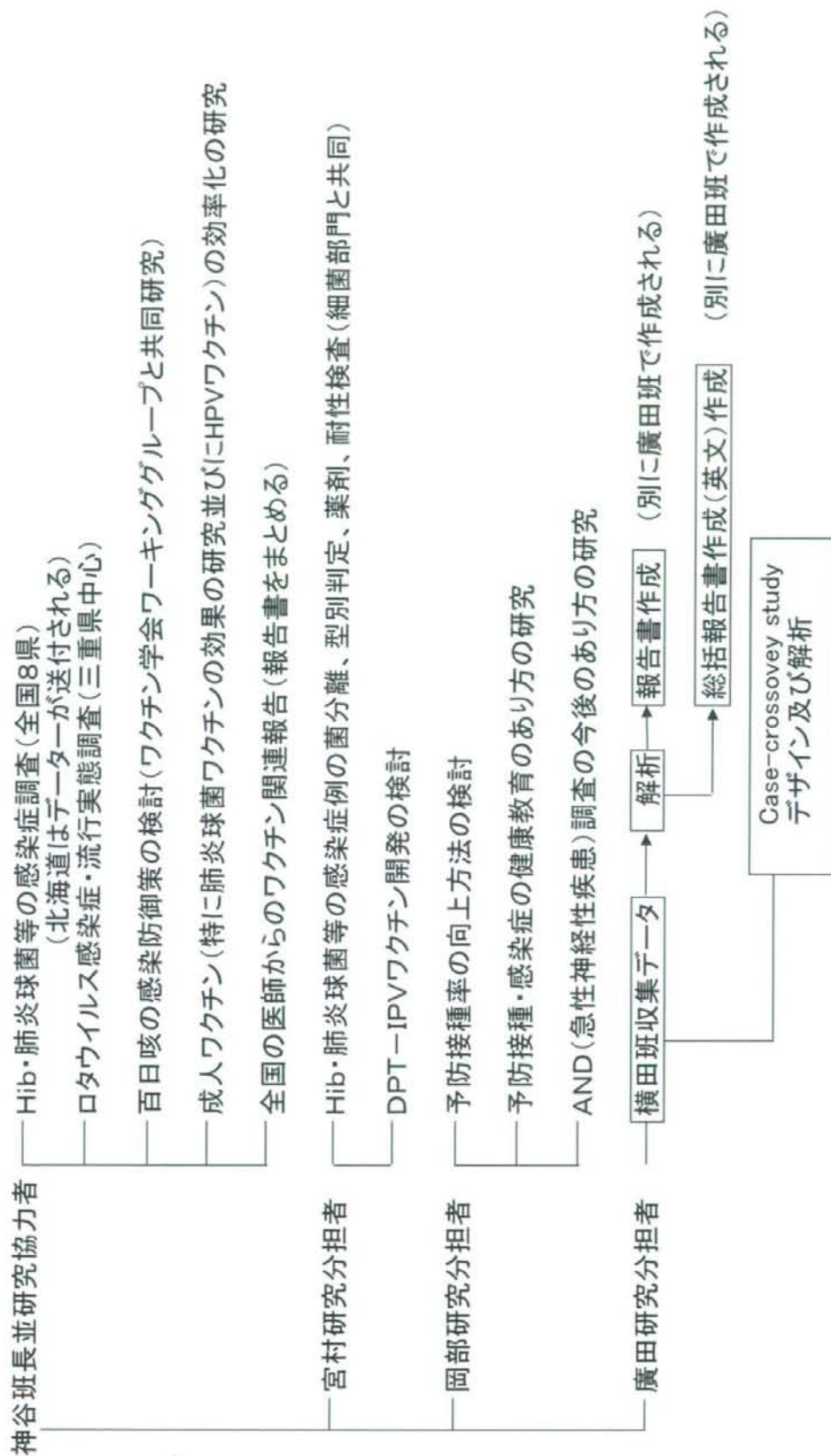
two sites near the viral replication origin. FEBS J., 275(12):3123-35, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
「粘膜指向性ヒトパピローマウイルス群の感染予防ワクチン抗原」出願中
識別番号 110000109

II. 分担研究報告

平成20年度研究概要



厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「ワクチンの有効性向上のためのエビデンス及び方策に関する研究」
分担研究報告書

小児における侵襲性感染症由来の肺炎球菌及び B 群連鎖球菌の疫学的解析

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所所長
協力研究者 荒川宜親 同細菌第二部
木村幸司 同細菌第二部
和田昭仁 同細菌第一部

研究要旨

2007年7月から2008年12月まで、8県から85症例に由来する97株の肺炎球菌、および9症例に由来するB群連鎖球菌(GBS)16株が集められた。肺炎球菌7価コンジュゲートワクチン血清型菌の分離率は、6B, 24.7% (21症例); 14, 15.3% (13症例); 19F, 11.8% (10症例); 23F, 10.6% (9症例); 4, 7.1% (6症例); 9V, 4.7% (4症例); 18C, 3.5% (3症例)であり、カバー率は77.6%であった。6Bと交叉反応性が見られる6A (7.1%, 6症例)を含めると、全体のカバー率は84.7%となった。6B, 19F, 23Fからは高頻度にペニシリンGの低感受性-耐性の株が分離された。GBSの血清型はIa (1症例), Ib (1症例), II (2症例), III (4症例), VIII, (1症例)であった。ペニシリン低感受性を示すB群連鎖球菌(PRGBS)を検索する目的で、ディスク法によるスクリーニングを行ったが、検出されなかった。

A. 研究目的

欧米においては、すでに小児用肺炎球菌コンジュゲートワクチンが導入され、ワクチンタイプの肺炎球菌による侵襲性感染および髄膜炎に対する有効性が示されている(1, 2)。この分担研究は、肺炎球菌コンジュゲートワクチン導入前に分離される菌の調査を行い、導入後の比較対象としての情報

を提供することを目的としている。また、B群連鎖球菌(GBS)に関しては、ペニシリン等のβ-ラクタム薬への感受性の状況の変化を考慮しつつ、今後のワクチンの必要性に関する議論の基礎データを提供することを目的としている。

B. 研究対象と方法

2007年7月から2008年12月まで、

8 県から送付された小児侵襲性感染症由来の肺炎球菌 85 症例(97 株)を対象とした。由来検体は血液(70 株)、髄液(19 株)、鼻咽頭(4 株)、胸水(1 株)、不明(3 株)であった。GBS は 9 症例(16 株)を対象とした。由来検体は血液(6 株)、髄液(5 株)、その他(5 株)であった。肺炎球菌に対しては、血清型別、微量液体希釈法による薬剤感受性試験、マルチローカスシーケンスタイピング(MLST)解析を行った。GBS に対しては、血清型別、セフチブテンディスクなどを用いたペニシリン低感受性 GBS (PRGBS)のスクリーニング、微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行った。

C. 結果

a) 肺炎球菌

集計は症例数をもとに行った。

血清型別の結果を表 1 に示す。

表 1

血清型	分離頻度 (症例数)
6B	24.7% (21)
14	15.3% (13)
19F	11.8% (10)
23F	10.6% (9)
4	7.1% (6)
6A	7.1% (6)
9V	4.7% (4)
18C	3.5% (3)
1	2.4% (2)
12F	2.4% (2)
38	2.4% (2)
3	1.2% (1)
10A	1.2% (1)
15B	1.2% (1)
15C	1.2% (1)

19A	1.2% (1)
23A	1.2% (1)
24	1.2% (1)
計	100% (85)

(下線はワクチンタイプの血清型)

7 価コンジュゲートワクチンのカバー率は 77.6%であった。6B と交叉反応性が見られる 6A を含めると、全体のカバー率は 84.7%となった。

薬剤感受性は、2007 年までの CLSI の基準による集計で、PSSP, 45.9%; PISP, 41.2%; PRSP, 12.9%であり、PISP の半数以上はペニシリン G の MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。血清型別に見ると 6B, 19F, 23F の菌は感受性が悪く、それぞれの型で、ペニシリン G の MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の菌の割合は 71.4%, 90.0%, 66.7%であった。一方、血清型 14 の分離株および非ワクチンタイプの分離株の全てはペニシリン G の MIC が 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であり、血清型 4, 9V, 18C の分離株の全てはペニシリン G の MIC が 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であった。CLSI によるセフォタキシム感受性(MIC 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下)の菌の割合は 85.9%であったが、その約半数は 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示し、感受性が良好であるとはいえなかった。イミペネム非感受性(MIC 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上)の菌の分離はなかった。

MLST 解析により、血清型 6B, 19F, 23F の中でペニシリンの MIC が 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の菌は、特定のシーケンスタイプの菌によって占められていることが明らかになった(6B [ST90, ST902], 19F [ST236], 23F [ST242])。

b) GBS

分離された血清型は Ia (1 症例), Ib (1 症例), II (2 症例), III (4 症例), VIII (1 症例)であった。PRGBS を検索する目的で、ディスク法によるスクリーニングを行ったが、検出されなかった。ペニシリン G の MIC は全株で 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

D. 考察

本邦においては、肺炎球菌コンジュゲートワクチンが未承認であるため、小児侵襲性感染症からは、ワクチンタイプの血清型の菌が多く分離される。米国の調査によると、5歳未満小児のワクチンタイプの菌による侵襲性感染症の年間罹患率(人口 10 万人当たり)は、1998-1999(ワクチン導入前)と 2004 年(導入後)でそれぞれ、78.9, 2.7 となり、減少率 96.5%であった(1)。また、5歳未満小児のワクチンタイプの菌による髄膜炎感の年間罹患率(人口 10 万人当たり)は、1998-1999, 2004-2005 でそれぞれ、9.08, 0.72 となり、減少率 92.1%であった(2)。米国ワクチン導入前の肺炎球菌の血清型調査によると、7 価ワクチンカバー率は 84.3%であり(3)、今回の集計による率 77.6%と大差ない数字である。しかし、米国でのワクチンの効果は、年間 1000 万・2000 万 dose の接種(接種率約 90%)を 5 年間継続したことにより得られた個体免疫と集団免疫を合わせた結果である(4)。本邦においても早期の承認、接種率拡大に向けたキャンペーンと積極的な行政の支援が不可欠である。

GBS による新生児感染症を減少さ

せるためには、母体からの検体のスクリーニング法の改善とともに、海外で広く行なわれている GBS 陽性の妊婦における分娩前のペニシリン等抗生剤投与の国内での一層の普及が望まれる。ペニシリンに低感受性を獲得した PRGBS (5)の検出頻度は現在、2%程度と推定される(6)ため、今回検査した 16 株中には幸いなことに PRGBS は確認されなかったが、PRGBS が新生児敗血症や髄膜炎などの侵襲性感染症の起因菌としてどの程度、臨床的な危険性を示すかは現時点では不明である。そこで、引き続き新生児 GBS 髄膜炎起因株における、ペニシリン等 β -ラクム薬への感受性状況の変化の監視を行ない、GBS ワクチンの開発や導入の必要性に関する科学的根拠を確保するため、基礎データの収集と蓄積が重要であると考えられる。

E. 参考文献

1. Hicks, L.A. et al., *J. Infect. Dis.* 2007, 196:1346-1354.
2. Hsu, H.E. et al., *NEJM* 2009, 360:244-256.
3. Gertz, R.E et al., *J. Clin. Microb.* 2003, 41:4194-4216.
4. Poehling, K.A., et al., *JAMA* 2006, 295:1668-1674.
5. Kimura, K. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52:2890-2897.
6. Nagano, N. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52:4258-4267.