

TABLE 1. Neutralization of HPV16, -18, -31, -52, and -58 PVs with rabbit antisera obtained by immunization with HPV16, -18, -31, -52, and -58 VLPs

| Antiserum | Neutralizing titer of antibody against: | | | | |
|----------------|---|-----------|-----------|---------|---------|
| | HPV16 | HPV18 | HPV31 | HPV52 | HPV58 |
| Anti-HPV16 VLP | 204,800 | <40 | 800 | <40 | <40 |
| Anti-HPV18 VLP | <40 | 1,638,400 | <40 | <40 | <40 |
| Anti-HPV31 VLP | 200 | <40 | 1,638,400 | <40 | <40 |
| Anti-HPV52 VLP | <40 | <40 | <40 | 409,600 | 400 |
| Anti-HPV58 VLP | <40 | <40 | <40 | 25,600 | 409,600 |

and 11 months, however, because the lesions that progressed to CIN3 were surgically removed.

Rabbit antisera against HPV16, -18, -31, -52, and -58 VLPs. The recombinant baculovirus expressing HPV16, -18, -31, -52, or -58 L1 was inoculated into Sf9 cells (five flasks containing 175 cm² culture) and incubated for 72 h at 27°C. The cells were collected and suspended in 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% NP-40. After incubation for 10 min at room temperature, the cells were centrifuged at 10,000 × g at 4°C for 15 min to precipitate nuclei. The nuclei were suspended in PBS containing CsCl (1.28 g/ml) and lysed with brief sonication (Sonifier250; Branson, Germany). The solution was centrifuged at 34,000 rpm for 20 h at 20°C in an SW50.1 rotor (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA). The fractions with buoyant densities around 1.28 g/ml were pooled and dialyzed against PBS supplemented with 0.5 M NaCl at 4°C to remove CsCl. Then, the solution was layered on the top of a discontinuous sucrose density gradient (5% and 60%) in PBS and centrifuged at 31,000 rpm for 2 h at 4°C in an SW50.1 rotor. The particles between the 5% and 60% sucrose layers were collected and dialyzed against PBS supplemented with 0.5 M NaCl at 4°C to obtain purified VLPs.

Japanese white rabbits (2.3 to 3.0 kg in weight) were subcutaneously injected with a mixture of each purified VLP and Freund's complete adjuvant (injection performed by Scrum Inc., Tokyo, Japan). Immunization was repeated four times at 2-week intervals, and serum samples were obtained 1 week after the last immunization. The antisera were filtered (Steradis25; Kurabo Inc., Osaka, Japan) before use for the assays in this study.

Preparation of PVs. Five plasmids (pYSEAP, expressing secreted alkaline phosphatase [SEAP]; p16L1h, expressing HPV16 L1; p16L2h, expressing HPV16 L2; p18L1h, expressing HPV18 L1; and p18L2h, expressing HPV18 L2) were gifts from J. T. Schiller. Six plasmids (p31L1h, expressing HPV31 L1; p31L2h, expressing HPV31 L2; p58L1h, expressing HPV58 L1; p58L2h, expressing HPV58 L2; p52L1h, expressing HPV52 L1; and p52L2h, expressing HPV52 L2) had previously been constructed (10, 11).

293FT cells (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), which had been seeded in two 10-cm culture dishes (6 × 10⁶ cells/dish) 16 h before transfection, were transfected with a mixture of an L1 plasmid (13.5 µg), an L2 plasmid (3 µg), and pYSEAP (13.5 µg) by using Eugene HD (Rosch Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Sixty hours later, PVs were extracted and purified from the cells as described previously (11). The infectivity of the purified PV was estimated from the SEAP activity of the culture medium of cells infected with PVs by a colorimetric SEAP assay (<http://home.ccr.cancer.gov/leo/ColorimetricSEAP.htm>).

Neutralization test. The serum samples were diluted with a neutralization medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [without phenol red] containing 10% FBS, 1% nonessential amino acids, and 1% GlutaMax-1). Fifty microliters of a serum sample was mixed with 50 µl of neutralization medium containing an aliquot of the PV stock sufficient to induce an optical density at 405 nm of approximately 1.0 of SEAP under our assay conditions (400 pg L1 for HPV16, 800 pg L1 for HPV18 and HPV52, 200 pg L1 for HPV31, and 125 pg L1 for HPV58) and incubated for 1 h at 4°C. The numbers of PVs used were in the linear range of dose-response relation. Then, the mixture was inoculated into 293FT cells, which had been seeded in a well of a 96-well plate (1 × 10⁴ cells) 16 h before the inoculation. The culture medium was harvested after incubation of the cells for 4.5 days at 37°C, and the SEAP activity of the culture medium was measured. The neutralization titer was presented as the reciprocal of the maximum dilution of serum that reduced the SEAP level to half of that for the sample not treated with serum.

HPV DNA detection and typing. HPV DNA was detected in the cervical swabs by a PCR-based method as described previously (23). In brief, total cellular DNA was extracted from each specimen by the standard procedure. HPV DNA was amplified by PCR using the consensus primers for the HPV L1 region. HPV

TABLE 2. Numbers of CIN-affected women negative and positive for neutralizing antibody

| HPV type | No. of women | | | | | | | |
|----------|----------------|----|--------------------|----|-----|-----|-----|--------|
| | Neutralization | | Neutralizing titer | | | | | |
| | - | + | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | ≥1,280 |
| HPV16 | 167 | 50 | 11 | 14 | 8 | 8 | 6 | 3 |
| HPV18 | 194 | 23 | 8 | 4 | 5 | 2 | 2 | 2 |
| HPV31 | 187 | 30 | 9 | 6 | 4 | 6 | 4 | 1 |
| HPV52 | 174 | 43 | 12 | 18 | 6 | 3 | 2 | 2 |
| HPV58 | 155 | 62 | 10 | 11 | 13 | 9 | 12 | 7 |

types were identified on the basis of restriction fragment length polymorphism, which has been shown to identify at least 26 types of genital HPV (23).

RESULTS

Neutralization of HPV16, -18, -31, -52, and -58 PVs with rabbit antisera obtained by immunization with HPV16, -18, -31, -52, or -58 VLPs. The rabbit anti-VLP serum prepared in this study was found to type-specifically and efficiently neutralize the PV used for immunization (Table 1). The neutralizing activity of the antiserum was evaluated from the reduction of infectivity of the PV that had been incubated with the diluted serum. Although anti-HPV18 VLP did not cross-neutralize the PVs of the heterologous types tested, the other antisera showed very limited cross-neutralization between phylogenetically closely related HPV16, -31, -52, and -58 PVs (4). The cross-neutralizing titers of anti-HPV16 VLP against HPV31 PV, anti-HPV31 VLP against HPV16 PV, anti-HPV52 VLP against HPV58 PV, and anti-HPV58 VLP against HPV52 PV were 1/256, 1/8,192, 1/1,024, and 1/16, respectively, of the titers neutralizing the homologous PVs. The data strongly suggest that, like VLPs, natural HPV virions have highly type-specific dominant neutralization epitopes (as revealed in the rabbit experiments), which are likely to be recognized by humans in the natural infection.

Neutralization of HPV16, -18, -31, -52, and -58 PVs with serum samples from women with CIN1 or CIN2. Diluted serum samples from 217 women with CIN1 or CIN2 were each mixed with one of the PVs, and the resulting reductions of infectivity were measured. Serum samples that did not reduce the infectivity to less than half at a dilution of 1:40 were tentatively defined as negative for neutralization. Under this cutoff condition, 137 samples (63%) were found to neutralize PVs of one or more of the following: HPV16, -18, -31, -52, and -58.

Table 2 shows the numbers of women negative and positive for neutralization. Neutralizing antibodies against HPV16, -18, -31, -52, and -58 were detected in 50 (24%), 23 (11%), 30 (19%), 43 (21%), and 62 (30%) samples, respectively. The titers of the majority (94% for HPV16, 91% for HPV18, 98% for HPV31, 95% for HPV52, and 90% for HPV58) of the neutralizing sera ranged between 40 and 640.

Table 3 shows the numbers of women positive for neutralizing antibodies against one or multiple HPV types. One woman had antibodies against four types (HPV16, -18, -31, and -58). Seventeen women had antibodies against three types, and 35 women had antibodies against two types. Titers of antibodies against HPV16 and 52 did not correlate with titers of

TABLE 3. Numbers of CIN-afflicted women positive for neutralizing antibody

| HPV type(s) | No. of women |
|--------------------|--------------|
| 16, 18, 31, 52, 58 | 0 |
| 18, 31, 52, 58 | 0 |
| 16, 31, 52, 58 | 0 |
| 16, 18, 52, 58 | 0 |
| 16, 18, 31, 58 | 1 |
| 16, 18, 31, 52 | 0 |
| 16, 18, 31 | 2 |
| 16, 18, 52 | 2 |
| 16, 18, 58 | 0 |
| 16, 31, 52 | 1 |
| 16, 31, 58 | 4 |
| 16, 52, 58 | 3 |
| 18, 31, 52 | 1 |
| 18, 31, 58 | 0 |
| 31, 52, 58 | 4 |
| 16, 18 | 3 |
| 16, 31 | 5 |
| 16, 52 | 3 |
| 16, 58 | 6 |
| 18, 31 | 1 |
| 18, 52 | 3 |
| 18, 58 | 3 |
| 31, 52 | 2 |
| 31, 58 | 3 |
| 52, 58 | 6 |
| 16 | 21 |
| 18 | 6 |
| 31 | 6 |
| 52 | 18 |
| 58 | 33 |
| None | 80 |

antibodies against HPV31 and -58, respectively (data not shown), strongly suggesting that the titers were not influenced by the cross-neutralization found by the hyperimmune rabbit antisera (Table 1).

Table 4 shows the numbers of women positive for both serum neutralizing antibody and corresponding HPV DNA by the cervical swabbing assay, positive for neutralizing antibody but negative for HPV DNA, and negative for neutralizing antibody but positive for HPV DNA. The cervical swabs, which

TABLE 4. Numbers of CIN-afflicted women with and without neutralizing antibody and HPV DNA

| HPV type | Presence of HPV DNA | No. of women | |
|----------|---------------------|----------------------------|-------------------------------|
| | | With neutralizing antibody | Without neutralizing antibody |
| HPV16 | + | 24 | 14 |
| | - | 23 | |
| HPV18 | + | 5 | 4 |
| | - | 15 | |
| HPV31 | + | 4 | 3 |
| | - | 26 | |
| HPV52 | + | 24 | 16 |
| | - | 19 | |
| HPV58 | + | 23 | 7 |
| | - | 39 | |

TABLE 5. Fluctuation of HPV-neutralizing titers between serum samples collected after a 24-month interval

| Antibody | Neutralizing titer for indicated group | | |
|------------|--|---------------------------|---------------------|
| | Descent ^a | Conservation ^b | Ascent ^c |
| Anti-HPV16 | 12 | 37 | 10 |
| Anti-HPV18 | 5 | 17 | 8 |
| Anti-HPV31 | 10 | 20 | 4 |
| Anti-HPV52 | 7 | 34 | 12 |
| Anti-HPV58 | 9 | 51 | 11 |

^a For the descent group, neutralizing titers decreased by more than half or converted from positive to negative.

^b For the conservation group, neutralizing titers fluctuated between half and twofold.

^c For the ascent group, neutralizing titers increased more than twofold or converted from negative to positive.

were collected at the time of serum collection, were examined for the presence of HPV DNA by PCR amplifying the L1 region with the consensus primers. Although there were women positive for both neutralizing antibody and HPV DNA, approximately half (HPV16 and -52) or more than half (HPV18, -31, and -58) of the women were positive for neutralizing antibody without detection of HPV DNA. The neutralizing titers of the serum samples from the DNA-positive women were not statistically different from those from the DNA-negative women. Furthermore, some serum samples from the women positive for HPV DNA were not neutralizing. The data indicate that the presence of HPV DNA, which is clear evidence of HPV replication shortly prior to serum collection, did not always correlate with the presence of neutralizing antibody or with a boost of the level of neutralizing antibody.

Neutralizing titers of serum samples collected 24 months later. The majority of women conserved their levels of serum neutralizing antibodies for 24 months. The second samples were collected 24 months after the first collection. Nine, 7, 4, 10, and 9 women converted from negative to positive for serum neutralizing antibodies against HPV16, -18, -31, -52, and -58, respectively. Eight, three, six, seven, and three women lost neutralizing activity against HPV16, -18, -31, -52, and -58, respectively. The titers of the majority of the serum samples fluctuated between half and twofold (Table 5).

The ascent of the neutralizing titer was not associated with detection of HPV DNA in the cervical swabs. Table 6 shows the neutralizing titers of the 21 paired serum samples collected from women whose first cervical swabs were negative for HPV DNA and whose second swabs were positive for HPV DNA. Although the neutralizing titers for 6 women rose slightly, those for 15 women did not. The data, in agreement with the data shown in Table 3, indicate that the presence of cervical HPV DNA does not necessarily boost the level of serum neutralizing antibody.

DISCUSSION

Accumulating data indicate that HPV infection induces highly type-specific neutralizing antibody. The recipients injected with the HPV vaccine containing HPV16 and -18 VLPs develop antibodies neutralizing HPV16 and -18 exclusively (7). The rabbits immunized with HPV16, -18, -31, -52, and -58

TABLE 6. Neutralizing titers of pairs of serum samples from women negative for HPV DNA at the first blood collection and positive for HPV DNA at the second blood collection

| Neutralizing antibody | Neutralizing titer for indicated serum sample | | No. of patients |
|-----------------------|---|--------------------------------|-----------------|
| | First (HPV DNA ⁻) | Second (HPV DNA ⁺) | |
| Anti-HPV16 | <40 | <40 | 3 |
| | 320 | 160 | 1 |
| Anti-HPV18 | <40 | <40 | 1 |
| | <40 | 40 | 2 |
| | 320 | 320 | 1 |
| Anti-HPV52 | <40 | <40 | 4 |
| | <40 | 80 | 1 |
| | <40 | 160 | 1 |
| | <40 | 640 | 1 |
| | 160 | 80 | 1 |
| Anti-HPV58 | 80 | 40 | 1 |
| | <40 | 320 | 1 |
| | 40 | 40 | 1 |
| | 80 | 80 | 1 |
| | 160 | 160 | 1 |

VLPs developed antibodies neutralizing homologous HPV efficiently with very limited cross-neutralization (Table 1). Thus, the past and the persistent infections of women with HPV could be traced by detection of anti-HPV type-specific neutralizing antibody. In this study, we examined serum samples from 217 Japanese women with CIN1 or CIN2 for neutralizing antibodies against HPV16, -18, -31, -52, and -58, the types common in CIN1 and -2 in Japan (13).

One hundred thirty-seven (63%) serum samples were positive for neutralizing antibodies against one or more HPV types tested (Table 2). The neutralizing titers of the majority of the serum samples, which ranged between 40 and 640 (Table 2), fluctuated within the narrow range, between half and twofold, after 24 months (Table 5). The data strongly suggest that women infected with an HPV develop a low-level anti-HPV neutralizing antibody and keep the level for a long period.

The titers for the serum samples from women positive for HPV DNA by the cervical swabbing assay were similar to those for women negative for HPV DNA. Detection of HPV DNA in the second swabbing did not correlate with a marked rise in neutralizing titers in the second serum samples (Table 6). The cervical swabs probably did not contain HPV propagated in the lower genital tract (22). Low-level propagation of HPV usually continues in CIN1 and -2 lesions. Therefore, a negative result for HPV DNA may be due, at least partly, to inappropriate sampling and to low sensitivity in the detection method and must be carefully interpreted. But a positive result for HPV DNA indicates that HPV propagated at a detectable level. The data strongly suggest that the level of anti-HPV neutralizing antibody is not boosted by HPV propagation.

The inefficient immune response of the women to the infecting HPV may be associated with the HPV life cycle: propagation in the terminally differentiating cells with a limited burst size. During the long history of virus and human, the life cycle may have evolved to escape the host immune systems. A

low level of neutralizing antibody may not be protective against repeated infection with the homologous HPV type. Repeated infection may raise the risk of integration of the HPV E6/E7 oncogenes into cell DNA, leading to the initial step for cell immortalization by HPV.

The serum samples from 53 (24%) women were positive for neutralization against two or more HPV types tested (Table 3). Cross-neutralization does not seem to contribute to neutralization of multiple HPV types, because the anti-HPV16 titers did not correlate with the anti-HPV31 titers and the anti-HPV52 titers did not correlate with the anti-HPV58 titers. The data strongly suggest that the women whose sera neutralized multiple types were infected with those multiple HPVs.

The tentative cutoff used in this study probably grouped the serum samples containing very low levels of neutralizing antibody into the negative group, explaining at least partly why the 80 (37%) women with CIN1 and CIN2, the lesions caused by HPV infection, were negative for the neutralizing antibodies against the tested HPV types, which cover the major types detected in CIN1 and -2 in Japan (13). Enhancing the sensitivity of the neutralization assay would be desirable for further studies of natural HPV infection and the host immune response against it.

Recently, Steel et al. (20) measured neutralizing antibody in sera of young women by using HPV16 and -18 PVs produced similarly to those in this study. They found that most of the women seroconverted and kept their neutralizing activity for a long time, while some failed to seroconvert, which is consistent with the data obtained in this study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Akira Mitsuhashi, Takuma Fujii, Tsuyoshi Iwasaka, Nobuo Yaegashi, Yoh Watanabe, Yutaka Nagai, and Tomoyuki Kitagawa for the sample collection and Kunito Yoshiike for critical reading of the manuscript.

This work was supported by grants-in-aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare for the Third-Term Comprehensive 10-year Strategy for Cancer Control; from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (number 12218102); and from the Smoking Research Foundation.

REFERENCES

- Buck, C. B., D. V. Pastrana, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 2004. Efficient intracellular assembly of papillomaviral vectors. *J. Virol.* 78:751-757.
- Buck, C. B., N. Cheng, C. D. Thompson, D. R. Lowy, A. C. Steven, J. T. Schiller, and B. L. Trus. 2008. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J. Virol.* 82:5190-5197.
- Chen, X. S., R. L. Garcea, I. Goldberg, G. Casini, and S. C. Harrison. 2000. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol. Cell* 5:557-567.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, T. R. Broker, H. U. Bernard, and H. zur Hausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Doorbar, J. 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin. Sci.* 110:525-541.
- Giannini, S. L., E. Hannon, P. Moris, M. Van Mechelen, S. Morel, F. Dessy, M. A. Fourneau, B. Colau, J. Suzich, G. Losonksy, M. T. Martin, G. Dubin, and M. A. Wettendorf. 2006. Enhanced humoral and memory B cellular using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 24:5937-5949.
- Giroglou, T., M. Sapp, C. Lane, C. Flügge, N. D. Christensen, R. E. Streeck, and R. C. Rose. 2001. Immunological analyses of human papillomavirus capsids. *Vaccine* 19:1783-1793.
- Harper, D. M., E. L. Franco, C. M. Wheeler, A. B. Moscicki, B. Romanowski, C. M. Roteli-Martins, D. Jenkins, A. Schuid, S. A. Costa Clemens, G. Dubin, et al. 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet* 367:1247-1255.

9. Kirnbauer, R., F. Booy, N. Cheng, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:12180-12184.
10. Kondo, K., Y. Ishii, H. Ochi, T. Matsumoto, H. Yoshikawa, and T. Kanda. 2007. Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* **358**:266-272.
11. Kondo, K., H. Ochi, T. Matsumoto, H. Yoshikawa, and T. Kanda. 2008. Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. *J. Med. Virol.* **80**:841-846.
12. Koutsky, L. A., K. A. Ault, C. M. Wheeler, D. R. Brown, E. Barr, F. B. Alvarez, L. M. Chiacchierini, and K. U. Jansen. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **347**:1645-1651.
13. Maehama, T. 2005. Epidemiological study in Okinawa, Japan, of human papillomavirus infection of the uterine cervix. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* **13**:77-80.
14. Mbulawa, Z. Z., A. L. Williamson, D. Stewart, J. A. Passmore, L. Denny, B. Allan, and D. J. Marais. 2008. Association of serum and mucosal neutralizing antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) with HPV-16 infection and cervical disease. *J. Gen. Virol.* **89**:910-914.
15. Muñoz, N., F. X. Bosch, X. Castellsague, M. Diaz, S. Sanjose, D. Hammonda, K. V. Shah, and C. J. L. M. Meijer. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? *Int. J. Cancer* **111**:278-285.
16. Pastrana, D. V., C. B. Buck, Y. Y. Pang, C. D. Thompson, P. E. Castle, D. C. FitzGerald, S. Kruger Kjaer, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 2004. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. *Virology* **321**:205-216.
17. Pisani, P., F. Bray, and M. Parkin. 2002. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* **97**:72-81.
18. Schiffman, M., P. E. Castle, J. Jeronimo, A. C. Rodriguez, and S. Wacholder. 2007. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* **370**:890-907.
19. Smith, J. F., M. Brownlow, M. Brown, R. Kowalski, M. T. Esser, W. Ruiz, E. Barr, D. R. Brown, and J. T. Bryan. 2007. Antibodies from women immunized with Gardasil cross-neutralize HPV 45 pseudovirions. *Hum. Vaccin.* **3**:109-115.
20. Steele, J., S. Collins, K. Wen, G. Ryan, C. Constantinou-Williams, and C. B. J. Woodman. 2008. Measurement of the humoral immune response following an incident HPV16 or HPV18 infection in young women by a pseudovirion-based neutralizing antibody assay. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**:1387-1390.
21. Villa, L. L., R. L. Costa, C. A. Petta, R. P. Andrade, K. A. Alut, A. R. Giuliano, C. M. Wheeler, L. A. Koutsky, C. Malm, M. Lehtinen, F. F. Skjeldestad, S. E. Olsson, M. Steinwall, D. R. Brown, R. J. Kurman, B. M. Ronnett, M. H. Stoler, A. Frency, D. M. Harper, G. M. Tamms, J. Yu, L. Lupinacci, R. Raikar, F. J. Taddeo, K. U. Jansen, M. T. Esser, H. L. Sings, A. J. Saah, and E. Barr. 2005. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* **6**:271-278.
22. Winer, R. L., Q. Feng, J. P. Hughes, M. Yu, N. B. Kiviat, S. O'Reilly, and L. A. Koutsky. 2007. Concordance of self-collected and clinician-collected swab samples for detecting human papillomavirus DNA in women 18 to 32 years of age. *Sex. Transm. Dis.* **34**:371-377.
23. Yoshikawa, H., T. Kawana, K. Kitagawa, M. Mizuno, H. Yoshikura, and A. Iwamoto. 1991. Detection and typing of multiple genital papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**:524-531.



松本市におけるインフルエンザ (2007/08年期)の疫学的病因的調査

—特に再感染の検討—

まつおか い つ お
松岡伊津夫^{※1}

まつおか た か ふ み
松岡高史^{※1}

まつおか あ き こ
松岡明子^{※1}

かすお し す 子
粕尾しず子^{※2}

要 旨

迅速診断キットを多用し、同時に分離培養を併用すればインフルエンザの疫学的病因的調査に役立つ。流行株の推移および抗原性、ワクチンの有効性に有力な資料となる。2007/08年期の流行は例年になく小規模で、特に中学生以上に顕著であった。キット検査ではA型が大部分、B型は僅かで、分離培養によるとAソ連型主流だが、後半(2月中旬以後)はA香港型が加わった混合流行で小さな二峰型になった。Aソ連型、A香港型、B型の分離株はいずれもワクチン株との抗原変異が目立ち、したがって小規模流行の主因はワクチン効果とは考え難く、むしろ流行株に対する抗体保有率が、特に10歳代以降に高かったためかと思う。

数年間における再感染例を追跡した結果、分離株が同型でも、ある程度の期間を経て遺伝子系統樹解析上、変異が大きくなれば再罹患があり得る実態を知った。その「きっかけ」は4年間に5回罹患した症例の病因究明からである。

[小児科臨床 61:2251,2008]



KEY WORDS

インフルエンザ, 疫学, 再感染

はじめに

毎年のごとく流行するインフルエンザ(以下「イ」と略す)は、最大最強の感染症であるため、長年にわたり衆智を集めてその対策が講じられてきた。数年来優れた迅速診断キット、抗「イ」薬が発見、市販されてから診断・治療面では歴史的進歩を遂げた。しかし、「イ」に対する

積極的防禦対策はワクチン接種であるが、依然として期待する程の進歩は見られず、特に重篤な新型「イ」の発生が危惧される現今、緊急な課題と考えられている。「イ」の疫学的病因的調査は防疫対策ならびにワクチン株の選択、評価に有力な資料を提供するので、私共は地方中都市である長野県松本市において、20数年来当院および市内小中学校生徒の罹患状況を中心に観察を続けてき

※1: 松岡小児科医院 (〒399-0002 長野県松本市芳野11-6)

※2: 長野県環境保全研究所

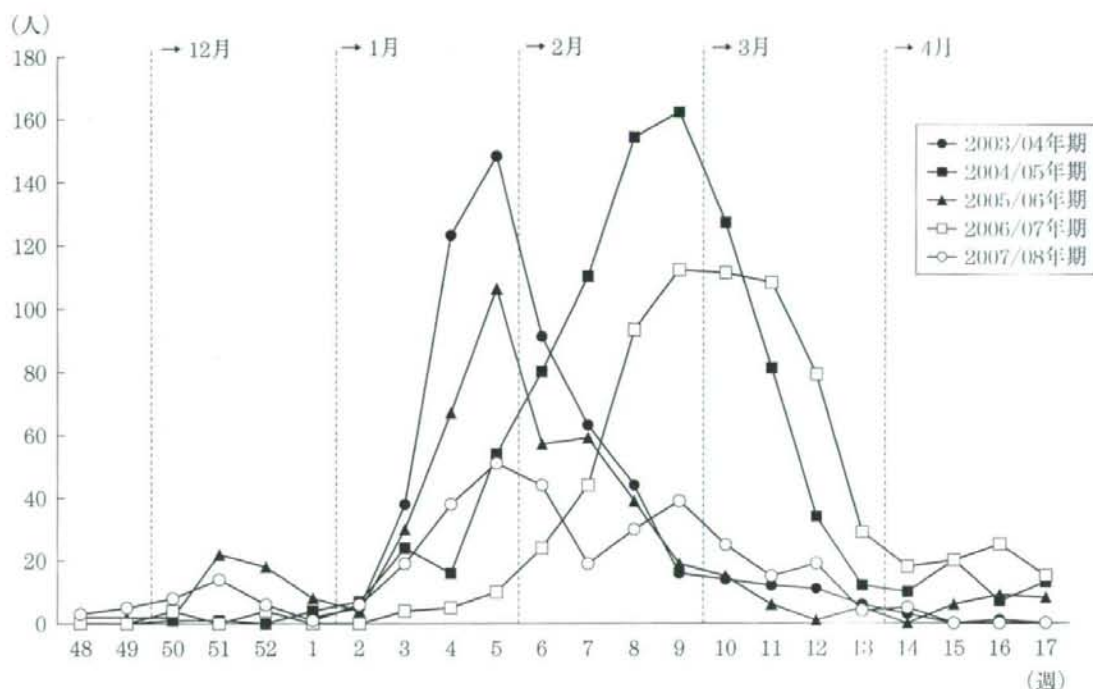


図1 2004～2008年期中におけるインフルエンザ様疾患の週別発生数

た。そして近年は迅速診断を多用し、更に培養分離検査を併用することにより、ある程度の成果を上げることができた¹⁾²⁾。

今シーズンも以上の観点に基づき努めた結果、2～3の知見を得、更に再感染の実態に関心を抱いたので報告する。

疫学的調査

調査は2007年11月～2008年4月までに当院を訪れた「イ」様患者数、市内小・中学校の「イ」治療証明書届出数により行った。

1. 当院における「イ」患者週別発生数(図1)

「イ」は例年より早く11月下旬3名に発生、12月に入りやや増加して計28名の局地的流行があった。年末年始の長期学校休暇により一時減退したが1月中旬から増加、下旬～2月上旬(5～6週ごろ)にピークへ達し、2月中旬から下降した。下旬から再燃、拡大(8～9週)したが、3月中～下旬に漸次減少、4月上旬にはほぼ終息した。

2. 市内小・中学校の「イ」罹患届出率

松本市は2005年4月、周囲4村と合併したが、

これらは小規模校が多いので近隣を纏めて2グループとし統計処理を行った。生徒数は2007年11月現在とする。

1) 小学校の状況

25校の総生徒数13,282名中届出数は1,508名(11.3%)であった。各校の内訳は、22.6～20%以上3校、15%以上4校、10%以上と5%以上および5%未満はいずれも6校で学校差は著しく、感染は全校へ蔓延した。これを「2007年11～12月」、「2008年1～2月前半」と「2月後半～4月上旬」の3群に分け届出率を比較してみると、10%を超えた学校はそれぞれ1校、7校、4校であり、流行期間に“ズレ”があった。(図2左)

2) 中学校の状況

17校の総生徒数6,992名中届出数は293名(4.1%)で、各校の内訳をみると13.1%～10%以上1校、5%以上3校、他の13校は5%未満で全校へ波及したが極めて軽微であった。これを小学校の場合と同様、流行期間を3群に分けてみると、届出率が5%を超えた学校はそれぞれ0校、2校、4校に過ぎなかった。(図2右)

なお、4月に入って小学校で12名、中学校で10

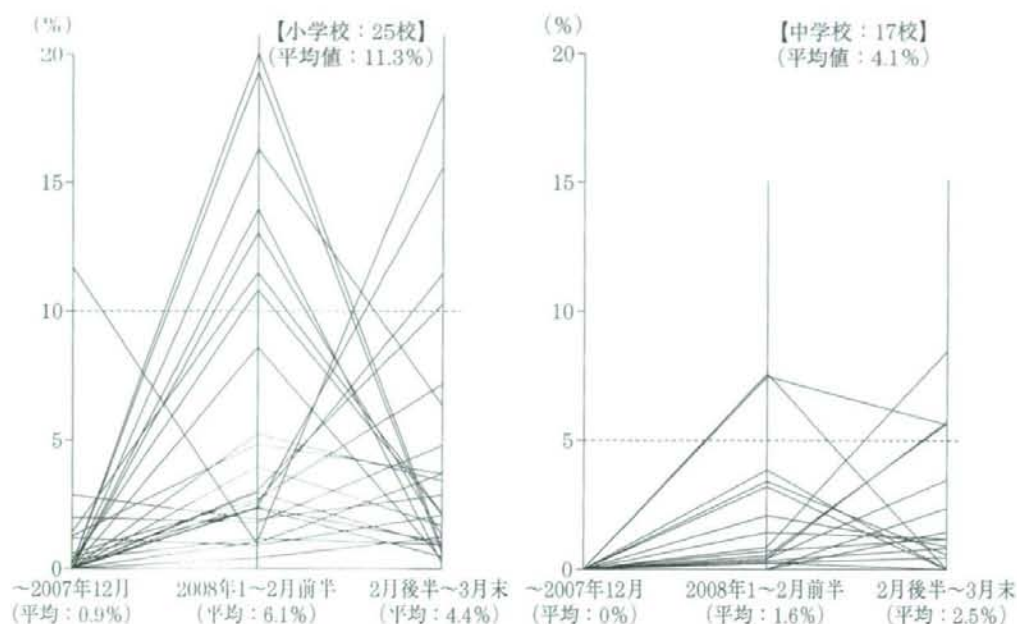


図2 各小・中学校におけるインフルエンザ届出率の推移

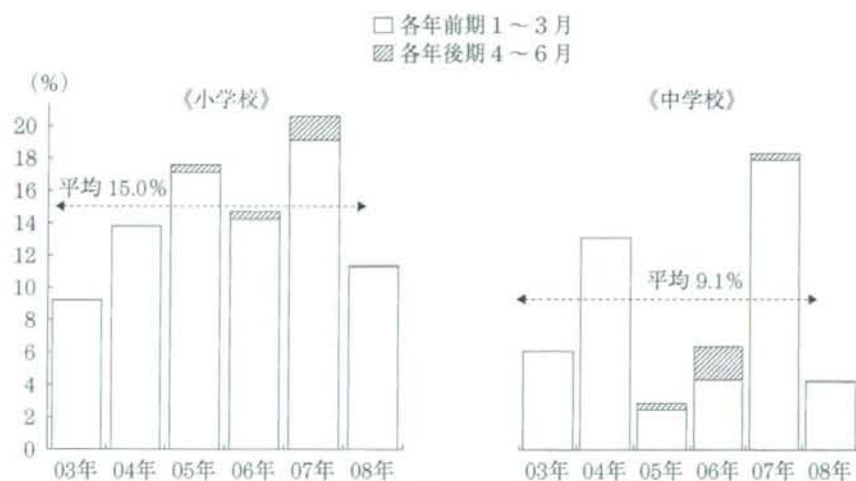


図3 2003～2008年期の松本市内小・中学校におけるインフルエンザ罹患届出率の推移

名の散発発生があった。

3. 2003～2008年期における小・中学校の「イ」罹患届出率比較 (図3)

2003～2007年期の5年間における小・中学校の平均罹患率はそれぞれ15.0%、9.1%であった²⁾が、今シーズンは11.3%、4.1%といずれもかなり低く、特に中学校の減少が著しかった。また小・中学校間の較差をみると、2005年(14.7%)、2006年(10.0%)に次いで7.1%と際立っている。また、2月15日を境に流行の“前半”と“後半”

に分けて検討すると、小学校は前半6.1%に対し後半は4.4%と1.7%減少したが、中学校では前半1.6%に対し後半2.5%とむしろやや増加した。(図2)

病因的調査

1. 迅速診断キットによる調査

2007年11月～2008年4月まで「イ」と思われる症例から恒常的に鼻咽頭ぬぐい液を採取、迅速診断キット(クイック Ex-Flu「生研[®]」)を用いて

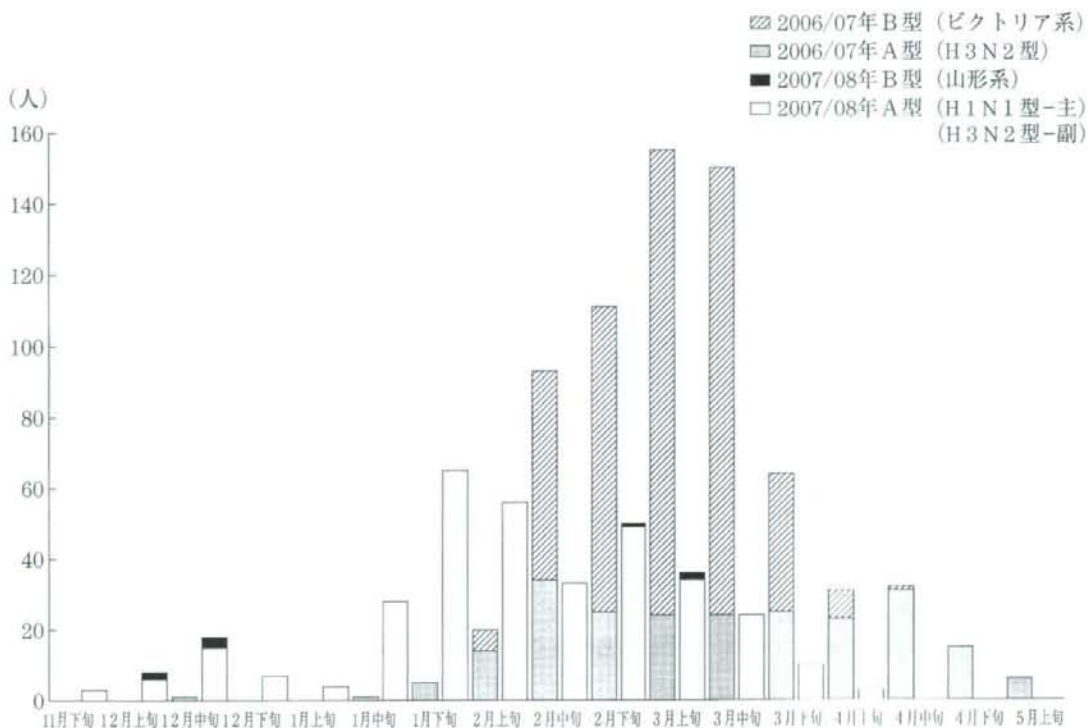


図4 2006/07～2007/08年期の迅速診断キットによる旬月別陽性者推移

診断した。

1) 旬, 月別発生調査

本キット陽性群(検査実施者ならびにその家族の発病者を含む)は345名で、そのうちA型群(以下、A型と略)は337名(97.7%)、B型群(以下、B型と略)は8名(2.3%)で、B型は2007年12月に2家族5名、2008年2月下旬と3月上旬に計3名の散発的発生に留まった。A型を月別にみると、2007年11月～12月は31名(9.2%)、1月は97名(28.8%)、2月は138名(40.9%)、3月は68名(20.2%)、4月は3名(0.9%)で、1月下旬～2月上旬で特に多発した。(図4)

2) 年齢群別調査

年齢群を0～4歳、5～9歳、10～14歳、15歳以上の4群に分けてA型の発生率を比較した。5～9歳群が130名(38.6%)と最も多く、0～4歳群は89名(26.4%)でこれに次ぎ、10～14歳群は55名(16.3%)、15歳以上群の63名(18.7%)とほぼ同程度であった。なお、成人では子どもと同居する30歳代に罹患者が多くみられた。これを流行の“前半”と“後半”に分けて5～9歳群と

10～14歳群とを比較すると、前者は前半42.0%に対し後半は33.6%と8.4%減、後者は前半13.0%に対し後半は21.2%で8.2%増であり、両群間で流行期間にかなりの隔たりがあった。

2. 分離培養・同定検査(表1)

1) 分離培養検査

迅速診断陽性者から95名を無作為に抽出し、検体を長野県環境保全研究所に依頼して分離培養・同定検査を行った結果、90名からウイルスが検出され分離率は94.7%と極めて高かった。型別にみると、A型85名[H1N1型(ソ連型)66名、H3N2型(香港型)19名]、B型(山形系統)5名(5.6%)であった。分離株と分離日日の関係をみると、A型では2007年11月25日初分離以後2008年2月上旬までの47株はすべてソ連型であったが、2月15日に香港型が初めて検出されて以降次第に増え、2月後半はソ連型：香港型が9：7、3月は両型が10株ずつで同率となり、4月上旬の2例は香港型のみであった。B型は2007年12月前半に2株と2008年2月下旬と3月上旬に各1例のみ分離された。2月中旬までとそれ以後との関係を明ら

表1 当院における「イ」ウイルスの検出状況とワクチン株に対するHI価

(長野県環境保全研究所)

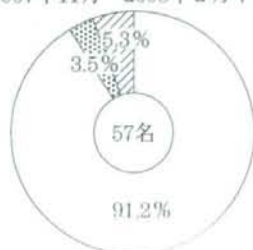
| 倍 | 月 | 2007年 | | | | | | 2008年 | | | | | | HI試験 | | | | | | | | | |
|---------------|-------|-------|---|---|-----|---|----|-------|---|----|----|---|---|------|---|---|----|----|---|----|----|-------|-------|
| | | 11月 | | | 12月 | | | 1月 | | | 2月 | | | 3月 | | | 4月 | | | 株数 | % | | |
| | | 上 | 中 | 下 | 上 | 中 | 下 | 上 | 中 | 下 | 上 | 中 | 下 | 上 | 中 | 下 | 上 | 中 | 下 | | | | |
| ソ連型 (H1N1) | 40 | | | | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 4 | | 6 | | | | | | 1 | | | 23 | 34.8 | |
| | 80 | | | | | | 2 | | 7 | 12 | | 2 | 5 | 3 | 2 | 4 | 3 | | | | 40 | 60.6 | |
| | 160 | | | | | | | | | | | 2 | | 1 | | | | | | | 3 | 4.5 | |
| | 320 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 | |
| | ※640 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 | |
| 合計 | | | | 2 | | | 10 | | | 25 | | | | 19 | | | | 10 | | | 0 | 66 | 100.0 |
| 香港型 (H3N2) | 40 | | | | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | 1 | 5.3 | |
| | 80 | | | | | | | | | | | | 2 | 2 | | | | | | | 4 | 21.1 | |
| | 160 | | | | | | | | | | | 1 | | | 2 | 5 | 1 | 2 | | | 11 | 57.9 | |
| | 320 | | | | | | | | | | | | 2 | | | | | | | | 2 | 10.5 | |
| | 640 | | | | | | | | | | | 1 | | | | | | | | | 1 | 5.3 | |
| | ※1280 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 | |
| 合計 | | | | 0 | | | 0 | 0 | | 0 | 7 | | | 10 | | | | 2 | | | 19 | 100.0 | |
| B型 (山形系統) | 160 | | | | 2 | 1 | | | | | | | | | 1 | 1 | | | | | 5 | 100.0 | |
| | 320 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 | |
| | ※640 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 0 | 0.0 | |
| 合計 | | | | 0 | | | 3 | 0 | | 0 | 1 | | | 1 | | | | 0 | | | 5 | 100.0 | |

《注》今シーズンの抗血清 抗A/Solomon Islands/3/2006 (H1N1型)
 抗A/広島/52/2005 (H3N2型)
 抗B/Malaysia/2506/2004 (Victoria系統)
 抗B/上海/361/2002 (山形系統)

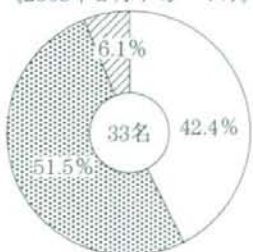
2007/08 年 期 ワク チ ン 株
 ※ホモ価：標準抗原に対する抗血清が2倍差以内は抗原性類似とは全く反応なし

■2007/2008年 期 B 型 ワク チ ン 株 (ビクトリア系)

《2007年11月～2008年2月中旬》



《2008年2月下旬～4月》



□ Aソ連型
 ▨ A香港型
 ▩ B型

《総計》

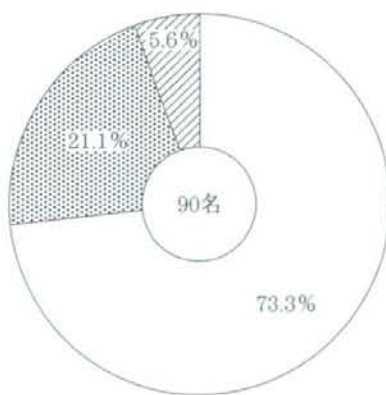


図5 2007/2008年 期 の 流 行 型 別 分 離 率 推 移

かにするため図5を提示した。

2) 当院における分離株のワクチン株に対する赤血球凝集抑制試験 (HI と略) 結果

HI 価測定に用いた抗血清を表1に示した。H₁N₁型はワクチン株 (ホモ価640倍) の類似株が3例 (4.5%) に過ぎず、大部分の63株 (95.4

%) は変異が目立つ。H₃N₂型はワクチン株 (ホモ価1280倍) の類似株は3株 (15.8%), かなり変異した株は16例 (84.2%) と大部分であった。一方、B型は5検体と少数だがワクチン株であるVictoria系統には反応せず、全例が山形系統に属した。

2001年/02年から2007年/08年における 「イ」の再感染例について (表2)

1999年迅速診断キットが発売されて以来、陽性者から毎年100例近くを抽出して分離同定を行ってきたので、各シーズンにおける流行株の型、抗原性を詳細に検討できた。この間、A型はソ連型と香港型、B型は山形系統と Victoria 系統がその規模に相異はあるが流行を繰り返している。2002年来迅速診断および培養により再感染の回数を確認できたのは、5回、4回、3回、2回がそれぞれ1例、5例、35例、145例の計186例であった。その中、罹患年度と型が同じ症例をグループとして纏めると、5回は1組、4回は2組、3回は22組、2回は32組の計57組となった。各シーズンにおける流行規模を、当院および全国情報³⁾を基にして主流株を「主」、併発株を「副」、散发株を「僅」として表示した。表中にある各回のA、B記号の右側にある数字は件数、その傍らにある○印はAH₁N₁型、●印はAH₃N₂型、△印はB型山形系統、▲印はB型 Victoria 系統の分離株数である。

2001/02年～2007/08年期では、上記4種の型または系統株を異にする場合に2～4回再感染することは理解できるが、今回4年間で5回罹患した症例に遭遇し、「何故か？」関心を抱いた。この件について検討したところ、2007年/08年期のA香港型分離株はA/広島/52/2005の変異株(ホモ価1280倍に対し160倍)であったが、2004/05年期のそれはA/Wyoming/3/2003の類似株であり抗原性が大きく変異していた⁴⁾ので、同型間に再感染があり得ることが判った。更に、3回罹患患者の中にこれと同様な1症例がみられた。また、2006/07年期の広島株と2003/04年期および2004/05年期のA/福建/411/2002類似株との間に再感染が4例、2004/05年期の福建類似株と2002/03年期のA/Panama/2007/99との間に再感染が1例あった。

B型 Victoria 系統においても、2006/07年期のB/Malaysia/2506/2004と2002/03年 期 および

2001/02年期のB/山東/7/97類似株の間に計4例の再感染例がみられた。なお、個人間とは別に2006/07年期のB型 Victoria 系統と2004/05年期のB型山形系統の間に再感染18グループがあった²⁾。2004/05年期にA型とB型の重感染についてはすでに報告した⁵⁾が、同年度でA型とB型に別々に罹患した44例、2007/08年期にはAとA香港型と罹った1例に遭遇した。

考 察

従来、当院における「イ」様疾患の疫学的調査は、流行期間の感染環境や臨床症状を主眼とした臨床診断により行ってきた。冬期には他種のかぜウイルスも流行するので臨床所見のみでは鑑別困難である。このことから、「イ」様疾患を即インフルエンザにするのは不確実の謗りを免れない。1999年来診断価値が極めて高い迅速診断キットが発売され、正確な疫学的病因的調査が可能となった。週旬月別、年齢別、流行規模、再罹患の有無を調べ、同時に分離培養を併用すれば「イ」の疫学的病因的調査に役立ち、流行株推移、分離株の抗原性、ワクチンの有効性、翌シーズン株の選定に有力な資料となる。そこで、今期のAソ連型が小規模に終わった要因、ワクチン株選択の評価、再感染の実態を知り得たのでそれぞれに考察を行った。

2007/08年期の疫学的調査をみると、例年より早く11月下旬に初発があり、12月上旬に散发し早期流行が予想されたが、実際は小流行に終わった。年末年始の長期休暇により一時途絶えたが、小・中学校の授業再開後の1月中旬から急に増加、1月下旬から2月上旬にピークへ達し、2月中旬には半減したが同月下旬再燃、3月上旬に減少、下旬はかなり減り、4月上旬にはほぼ終息した。全貌をみると、例年に比べかなり小規模で拡大も徐々、小さな二峰性を呈した。

小・中学校の「イ」届出数をみると、小学校では例年より4%近く下回り、昨シーズンの約半数であった。中学校では特に少なく例年の二分の一に留まった。2月中旬を境に小学校では“後半”が“前半”の約三分の二に対し、中学校は“後

表2 2001/2002～2007/2008年期の再罹患状況

| | | 流行年 | | 07/08年 | 06/07年 | 05/06年 | 04/05年 | 03/04年 | 02/03年 | 01/02年 |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------|------------------|----------|----------|-----------|------------------|
| A型 | | (主) 山形 | (主) 山形 | (主) H1N1 H3N2 | (主) H3N2 | (主) H1N1 H3N2 | (主) H3N2 | (主) H3N2 | (主) H3N2 | (主) H1N1 H3N2 |
| B型 | | (主) 山形 | (主) ビクトリア | (主) 山形 | (主) ビクトリア | (主) 山形 | (主) 山形 | (主) 山形 | (主) ビクトリア | (主) ビクトリア |
| VPI | 08年1組1例 | 1 | A1 ● | B1 ▲ | A1 ○ | A1 | | | | |
| | 08年 2組5例 | 3 | A2 ○○ | B3 ▲▲ | A3 ●● | B3 | | | | |
| IV回 | 08年 2組5例 | 2 | A2 ○ | A2 | | B2 | A2 | | | |
| | | 3 | A3 ○ | B3 | | A3 ● | | | | |
| III回 | 22組 32例 | 08年 7組 12例 | 3 | A3 ○ | B3 ▲ | | B3 | | | |
| | | | 2 | A2 | | A2 ●● | B2 △ | | | |
| | | | 1 | A1 ○ | | B1 | A1 | | | |
| | | 1 | A1 ○ | A1, B1 | | | | | | |
| | | 1 | A1 ○ | B1 | | A1 | | | | |
| | | 1 | A1 ● | | A1 ○ | A1 ● | | | | |
| | | 07年 11組 19例 | 4 | | B4 | | B4 △ | A4 ●● | | |
| | | | 3 | | B3 | | B3 | | | |
| | | | 3 | | A3, B3 ▲ | | A3 | | | |
| | | | 2 | | B2 ▲ | A2 ○○ | A2 ● | | | |
| | | | 1 | | B1 ▲ | A1 | | | A1 ● | |
| | | | 1 | | B1 | | A1 | A1 ● | | |
| | 06年 2組2例 | 1 | | A1 ● | | A1 ● | B1 | | | |
| | | 1 | | | | A1 ○ | | | | |
| | | 1 | | | | | | A1 ● | | |
| | | 1 | | | | | | A1 ● | | |
| | 11回 | 08年 7組 47例 | 20 | A20 ●● | B20 ▲ | | | | | |
| | | | 10 | A10 ○ | | A10 ●● | | | | |
| | | | 8 | A8 ●● | A8 ● | | | | | |
| | | | 3 | A3 ●● | | | A3 | | | |
| | | | 3 | A3 ●● | | | B3 | | | |
| | | | 2 | B2 ●● | | | A2 | | | |
| | | | 1 | AA1 ● | | | | | | |
| | | | 07年 11組 41例 | 10 | | B10 ▲ | A10 ●● | | | |
| | | 5 | | | B5 ▲▲ | | A5 ●● | | | |
| | | 4 | | | B4 | | B4 | | | |
| | | 3 | | | A3 | | B3 | | | |
| | | 1 | | | A1 | B1 | | | | |
| 1 | | | | A1 ● | | | A1 | | | |
| 1 | | | | A1 ● | | | B1 ▲ | | | |
| 1 | | | | B1 | | | B1 | | | |
| 06年 7組 27例 | | 16 | | | | A16 ●● | B16 △ | | | |
| | 4 | | | | A4 ○○ | A4 ● | | | | |
| | 2 | | | | A2 ○ | | A2 | | | |
| | 1 | | | | A1 ● | | A1 | | | |
| | 1 | | | | A1 ● | | B1 | | | |
| | 1 | | | | A1 ○ | | A1 ● | | | |
| | 2 | | | | AB2 | | | | | |
| | 05年 7組 30例 | 11 | | | | B11 △△ | A11 ●●● | | | |
| 4 | | | | | B4 | | | A4 ○○ | | |
| 2 | | | | | B2 | | A2 | | | |
| 1 | | | | | A1 ● | | A1 | | | |
| 1 | | | | | A1 | | B1 | | | |
| 10 | | | | | A1 ● | | | A1 ○ | | |

(1) ○AH1N1型, ●AH3N2型, △B型山形, ▲B型ビクトリア系の分離株数を示す
 ※A型とB型の重感染各1例を含む, □は同型による再感染例を示す

半”が“前半”の約1.5倍に増えた。

迅速診断キットによる陽性者の約95%がA型でB型は極めて僅かであった。分離培養検査では2月中旬まではAソ連型が大部分であったが、以後はA香港型が漸増して3月にはほぼ同程度となり、4月の2例は香港型であった。したがって、二峰性の第一の山はAソ連型、第二の山はA香港型との混合流行で罹患年齢は後者がやや高い。

分離株のワクチン株に対するHI価測定結果では、Aソ連型、A香港型のそれぞれ95.4%、84.3%が著しく変異し、B型は5例と少数だがワクチン株のVictoria系統とは全く異なる山形系統であった。国立感染症研究所感染症情報センターでは、2007/08年期の流行シーズン前（ワクチン接種前）の国民の免疫（抗体）保有状況をHI法により調査した結果と感染防止に有効な抗体価は40倍を基準に考える⁹⁾と述べた。今シーズンのワクチン株 A/Solomon Islands/3/2006 (H₁N₁亜型)では基準値を超えた割合が10～14歳群、15～19歳群においてそれぞれ62%、72%と高値であるが、5～9歳群は40%未満で中程度、0～4歳群は14%内外で低値であったという。したがって、今シーズンの流行が小規模（特に中学校以上）に終わったのは、比較的高いワクチン接種率による影響とは考え難く、10～15歳以上の年齢層は流行株に対する抗体保有率が高値であったためと思われる。

一地方都市における流行株の推移を長年観察していると、全国のそれと極めてよく類似していることが判った。したがって、一地域の詳細な研究は本邦の状況も類推できると思う。今シーズンの終盤に発生した株は翌シーズンの流行株になる可能性が大きい⁷⁾ので、来期はA香港型変異株、B型山形系統の流行が予想される。WHOが発表した2008/09年期中半球用インフルエンザワクチン推奨株は、AH₁N₁型が A/Brisbane/59/2007、AH₃N₂型が A/Brisbane/10/2007、B型が B/Florida/4/2006類似株⁸⁾で、国内製造株は日本国内の分離ウイルス解析結果を基に決定されるが、今シーズンの状況を踏まえた対策が望まれる。今期におけるAソ連型主流によるA香港型と

の混合流行は小規模に終息したが、2005/06年期の両A型混合⁹⁾、2006/07年期のB型を除くA香港型流行規模と比較すると（図4）それほど差は見られず、近年のA型流行の勢力がかなり衰えている状況が窺われる。したがって、このことが近年A型ウイルスが大きく変異した新型インフルエンザの発生を警戒視する一要因と思う。

ここ数年来の流行株をみると、2001/02年期はAH₁N₁型（主）とAH₃N₂型（副）およびB型Victoria系（副）、2002/03年期はAH₃N₂型（主）とB型Victoria系（主）、2003/04年期はAH₃N₂型（主）とB型山形系（僅）、2004/05年期はAH₃N₂型（主）およびB型山形系（主）、2005/06年期はAH₁N₁型（主）とAH₃N₂型（主）およびB型Victoria系（僅）、2006/07年期はAH₃N₂型（主）とB型Victoria系（主）、今期はAH₁N₁型（主）とAH₃N₂型（副）およびB型山形系（僅）で混合流行を繰り返している。したがって、異型の流行株によって再感染が発生し、時には同年に2種類または重感染する例があっても不思議ではない。しかし、この間5回罹患した症例をはじめとして数例に同型株の再感染例を経験した。A香港型の症例では2～3年、B型Victoria系では4～5年間経過した後であり、分離株の遺伝子系統樹解析をみると両者間に抗原構造の大きな変異があった¹⁰⁾。今回、Aソ連型、B型山形系統ではそのような現象に遭遇してはいないが、今後同型間における再感染と流行株の抗原変異との関係に関心を持ちたい。

まとめ

1. シーズンのインフルエンザは例年より早く流行が始まったが、緩やかに小規模に終わった。特に中学生以上が顕著に少ない。
2. 迅速診断キットによる検査では、A型が97.8%、B型は僅かであった。病因ウイルスはAソ連型が主流だが、後半（2月中旬以後）はA香港型が加わった混合流行で小さな二峰型となった。
3. Aソ連型、A香港型、B型の分離株はいずれもワクチン株と抗原性が大きく変異していた。し

たがって、小規模流行の主因がワクチン効果とは考え難い。

4. 数年間において再感染例を追跡した結果、分離株が同型でもある程度の期間を経て遺伝子系統樹解析上、変異が大きければ再感染があり得る実態を知った。

本文の要約は第113回日本小児科学会甲信地方会(2008年6月8日)にて発表した。

欄筆に当たり、疫学的調査にご協力いただいた松本市医師会、松本市内小中学校養護教諭各位に深甚な感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 松岡伊津夫他：松本市におけるインフルエンザ(2005/06年)の疫学的病因的調査—迅速診断・培養分離に基づいて—, 日本医事新報 No. 4308: 69~74, 2006
- 2) 松岡伊津夫他：松本市におけるインフルエンザ(2006/07年)の疫学的病因的調査—B型主流の実態—, 日本医事新報 No. 4379: 67~74, 2008
- 3) 木村三生夫他：予防接種のてびき(第11報), 近代出版, 東京, p. 230~231, 2006
- 4) 川上千春：横浜市衛生研究所ホームページ：横浜市における2006/2007シーズンのインフルエンザウイルス流行株の解析, 検査情報月報, 2007年8月号, p. 1~4, 2007
- 5) 松岡伊津夫他：松本市地域のインフルエンザ流行時(2004/05年)期, A, B迅速診断キットにより試みた疫学的病因的観察, 小児科臨床 58: 2189~2197, 2005
- 6) 横浜市感染症発生動向調査委員会報告：定点報告インフルエンザ, 2008年4月期, p. 1~4, 2008
- 7) 松岡伊津夫他：松本市におけるインフルエンザ(1980~1986年)の疫学的病因的観察—特にその予防に関連して—, 小児科臨床 40: 1151~1161, 1987
- 8) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報調査(IASR), 2008/09インフルエンザシーズンに推奨されるワクチン株—WHO, vol. 29: 107, 2008
- 9) 国立感染症研究所, 病原微生物検出情報(IASR), 平成18年度(2006/07シーズン)インフルエンザワクチン株の選定経過, vol. 27: 267~268, 2006

Epidemiologic investigation of influenza (2007~2008) in Matsumoto city
—with special reference to the reinfection—

Itsuo Matsuoka¹⁾, Takafumi Matsuoka¹⁾, Akiko Matsuoka¹⁾ and Sizuko Kasuo²⁾

¹⁾ Matsuoka Pediatric Clinic

²⁾ Nagano Environmental Conservation Research Institute

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆

原 著

麻疹ワクチン，風疹ワクチン，ポリオ生ワクチン 全国累積接種率：2007年度調査報告

高山直秀*¹ 崎山 弘*² 清水博之*³
宮村達男*⁴ 加藤達夫*⁵ 梅本 哲*⁶

はじめに

ワクチン接種は感染症予防ないし制圧に有効な手段であり，費用対効果比も大きいことが知られている¹⁾。しかし，ワクチン接種が感染症予防手段として十分な効果をあげるためには，小児期の適切な時期に高い接種率を達成することが必要である²⁾。従来の予防接種率は，「(被接種者数/接種対象者数)×100」で算定されているが，分母である接種対象者数が，市区町村や年度により一様でなく，分子となる被接種者数の範囲も必ずしも一定していなかった³⁾。このため，算定数式は同一であっても，内容は異なり，各市区町村で算出された数値から全国のワクチン接種率を推定できなかつた。また，この算定方式から特定の年齢におけるワクチン接種率を知ることは不可能で，予防接種に関する施策の効果を判定することもできなかつた。

上記の問題点を解決すべくわれわれは，2002年度に厚生労働省新興・再興感染症研究事業「成人麻疹の実態把握と今後の麻疹対策の方向

性に関する研究」班活動の一部として，月齢別ワクチン累積接種率(以下，累積接種率)^{4,5)}を採用し，各市区町村の協力を得て，初めて全国麻疹ワクチン累積接種率を報告した⁶⁾。その後，「ポリオ及び麻疹の現状とその予防接種の効果に関する研究」班(2003～05年度)の活動として，麻疹ワクチン累積接種率と共に，2003年度からはポリオ生ワクチンの累積接種率を⁷⁾，2004年度からは風疹ワクチン累積接種率を加えて調査を行った^{8,9)}。2006年度からは「麻疹・風疹(MR)混合ワクチンの接種効果・安全性・接種率に関する研究」班と「ポリオ野生株ウイルスの封じ込め対策に関する研究」班が共同で調査を行った¹⁰⁾。

本稿では2007年度に行った麻疹ワクチン，風疹ワクチン，ポリオ生ワクチン全国累積接種率調査の結果を報告する。

I. 対象と方法

全国の麻疹，風疹，ポリオ生ワクチン累積接種率調査は全国から5,000人の3歳児を無作為に抽出し，抽出された3歳児が居住する市区町村に麻疹，風疹，ポリオ生ワクチンを接種した月齢の調査を依頼し，回収された調査票を基に累積接種率を算出した。各市区町村に調査を依頼する標本数の決定や各市区町村での調査手順はこれまでと同様に行った^{6,7)}。

なお，今回の調査では，2007年10月1日ま

*たかやま・なおひで：東京都立駒込病院小児科部長，昭和43年千葉大学医学部卒業。主研究領域／小児感染症。

*さきやま・ひろし：崎山小児科医院院長。*しみず・ひろゆき：国立感染症研究所ウイルス第二部第二室長。*みやむら・たつお：国立感染症研究所所長。*かとう・たつお：国立成育医療センター総長。*うめもと・さとし：医療産業研究所所長。

で3歳に達した小児を対象としている。そのため、ポリオ生ワクチンは生後3～90か月未満の間が接種期間となるが、麻疹および風疹ワクチンに関しては、単抗原の麻疹および風疹ワクチンを生後12～90か月に個別に受ける制度が、麻疹・風疹混合(MR)ワクチン接種を生後12～24か月に1期接種として受ける制度に改定された移行期の世代であり、一部の3歳児は旧制度で麻疹および風疹ワクチン接種を、一部は新制度でMRワクチン接種を受けている。

本稿で用いる「月齢別ワクチン累積接種率」は「調査対象となる月齢人口」を分母とし、「調査対象の月齢に達したときまでにワクチン接種を済ませている者の数」を分子にして求める。たとえば、生後36か月での累積接種率では、調査対象となる月齢36か月の人数が分母となり、生後36か月(満3歳)までにワクチン接種を済ませた人数が分子となる。また、月齢を横軸にとり、縦軸に月齢別の累積接種率をとって描画される曲線が累積接種率曲線である。

II. 結果

1. 回収率

2002～2006年に引き続き、2007年秋に全国1,957市区町村から無作為抽出された5,000人の3歳児が居住する1,216市区町村に調査依頼状を発送した。2008年1月29日現在で、1,042か所の市区町村から回答が寄せられたので、市区町村数から算出した回収率は85.7%となった。無作為抽出した3歳児の数(標本数)5,000名のうち4,258名分の記録が返送されたので、標本数から算出した回収率は85.2%となった。この回収率は、2005年度の82.8%、2006年度の76.7%を上回っていた。

回収された記録のうち、麻疹ワクチンに関する記載が不完全なもの(記入なしまたは非協力と記載されたもの)が27名分、ポリオ生ワクチン1回目ないし2回目に関する記載が不完全なものがそれぞれ40名分、風疹ワクチンに関

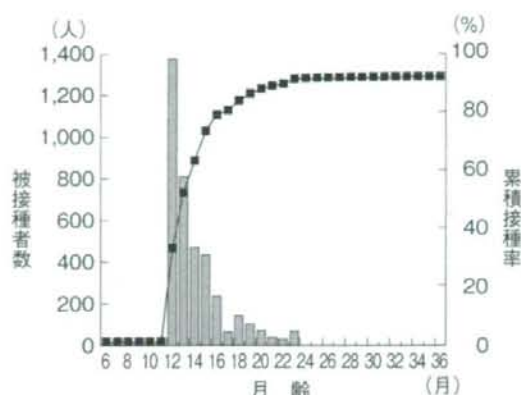


図1 2007年度全国麻疹ワクチン累積接種率曲線

する記載が不完全なものが43名分あったため、これらを除外し、麻疹ワクチンに関しては4,231名分を、ポリオ生ワクチン1回目と2回目に関しては4,218名分を、風疹ワクチンに関しては4,215名分の記録を集計した。ただし、ワクチン接種日が不明との回答は累積接種率を算定する場合に分母の数に含めた。

2. 麻疹ワクチン累積接種率および年度別比較

2007年度に満3歳に達した小児における麻疹ワクチン累積接種率曲線を図1に示した。生後15か月での累積接種率は73.4% [95%信頼区間(95% CI)=72.0～74.7%], 生後18か月では84.0%(95% CI=82.8～85.1%), 24か月では91.7%(95% CI=90.9～92.5%), 36か月では92.2%(95% CI=91.4～93.0%)であった。

2002年度からの調査結果と比較すると、2002～2006年度までは年々累積接種率が上昇している。特に、1歳代で大きな改善がみられた。2007年度も生後12～27か月は2006年度を上回っていたが、28か月からは2006年度よりわずかながら低い累積接種率となっていた(図2)。すなわち、生後12か月での累積接種率は2006年度の29.7%から2007年度には32.8%に、15か月では70.1%から73.4%へ、18か月では81.5%から84.0%へ、24か月で

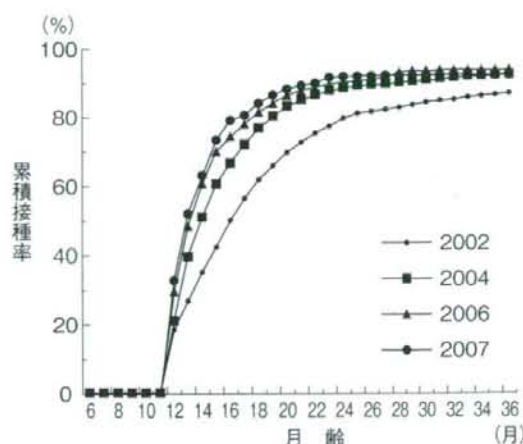


図2 2002, 2004, 2006, 2007年度の全国麻疹ワクチン累積接種率曲線の比較

は90.0%から91.7%へと上昇していたが、36か月では、2006年度の94.0%から2007年度は92.2%に低下していた。

3. 風疹ワクチン累積接種率および年度別比較

2007年度に満3歳に達した小児における風疹ワクチン累積接種率を、2004～2006年度に引き続いて調査した。2007年度の風疹ワクチン累積接種率は、2006年度より改善して、生後15か月で37.2% (95% CI=35.8～38.7%)、18か月で77.7% (95% CI=76.5～79.0%)、24か月で89.7% (95% CI=88.8～90.6%)、36か月では91.1% (95% CI=90.2～91.9%)に達していたが(図3)、まだ麻疹ワクチンの累積接種率には及ばなかった。

麻疹ワクチンと風疹ワクチンの接種日が同一であった3歳児が、集計対象者4,215名中507名(12.0%)いた。これらの3歳児は、生後18～20, 23か月に多くみられ、MRワクチンを接種したものと推定された。

風疹の累積接種率曲線を2006と2007年度で比較すると、2007年度では、生後15～27か月の間で累積接種率が12～29%向上していた(図4)。

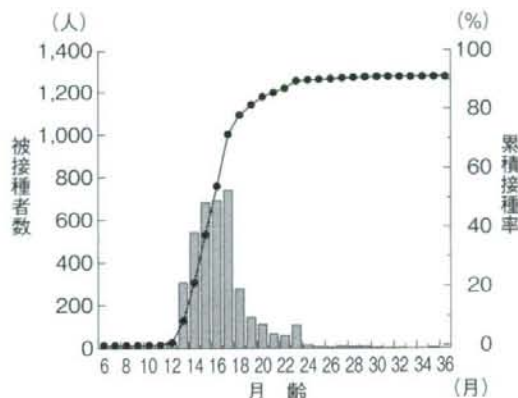


図3 2007年度全国風疹ワクチン累積接種率曲線

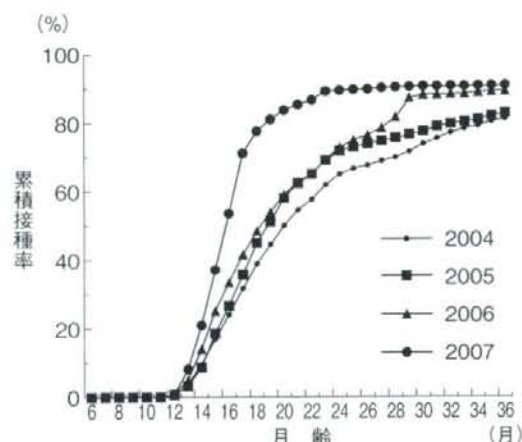


図4 2004～2007年度の全国風疹ワクチン累積接種率曲線の比較

4. ポリオ生ワクチン累積接種率および年度別比較

2007年度のポリオ生ワクチン1回目の累積接種率曲線は生後3か月から立ち上がり、生後6, 7か月で急速に上昇している。生後8～11か月では上昇は緩やかになっているが、生後12, 13か月で上昇がやや急になり、それ以降はゆっくりと上昇している。生後6～7か月と生後12～13か月で上昇が急になるのはポリオ生ワクチンがこの月齢の小児を対象に年2回の集団接種で行われている地域が多いためと考えられる(図5左)。生後6か月での累積接種率は

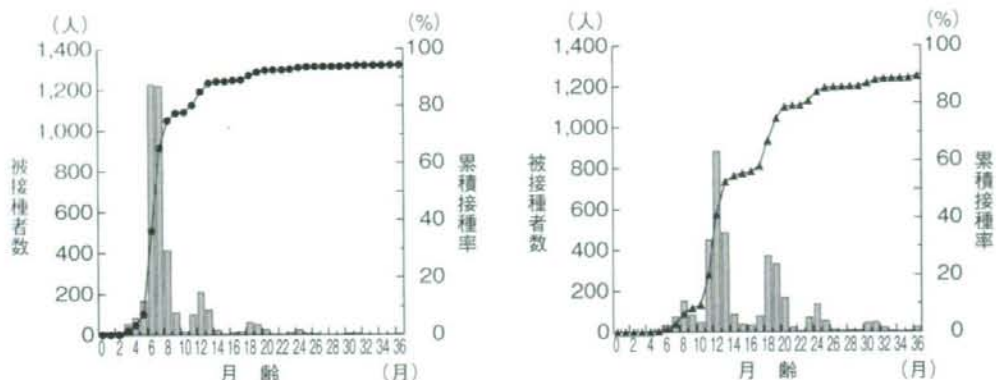


図5 2007年度全国ポリオ生ワクチン1回目(左)および2回目(右)累積接種率曲線

36.3% (95% CI = 34.8~37.8%), 12か月では85.0% (95% CI = 83.9~86.1%), 24か月では93.4% (95% CI = 92.6~94.1%), 36か月では94.2% (95% CI = 93.5~94.9%)であった。

2007年度のポリオ生ワクチン2回目の累積接種率曲線は生後6か月から立ち上がり、生後11~13か月で急速に上昇している、生後13~17か月では上昇は緩やかになっているが、生後17~19か月で上昇が再び急になり、それ以降は、生後23~24か月でやや急になるものの、ゆっくりと上昇している。生後17~19か月と生後23~24か月で上昇が急になるのは、1回目接種と同じ理由によると考えられる(図5右)。生後12か月での累積接種率は41.1% (95% CI = 39.6~42.6%), 18か月では66.8% (95% CI = 65.4~68.2%), 24か月では84.1% (95% CI = 82.9~85.2%), 36か月では89.4% (95% CI = 88.4~90.3%)であった。

2006年度の調査結果と比較して、2007年度のポリオ生ワクチン1回目の累積接種率は、生後6か月で9.3%低く、累積接種率曲線の立ち上がりが遅かった。その後の伸びは例年とはほぼ同様であったが、2006年度を超えることはなかった。2回目の累積接種率も、生後12か月で3.5%、18か月で3.2%低くなっており、36か月でも1.2%2006年度より低くなっていた。

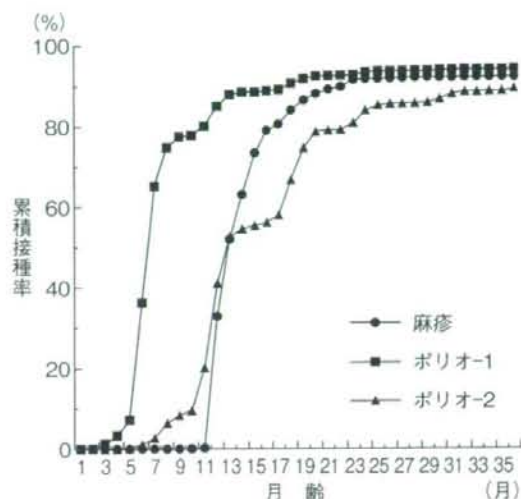


図6 2006年度全国麻疹ワクチン、ポリオ生ワクチン1回目、2回目の累積接種率曲線

ポリオ生ワクチンは多くの自治体で集団接種されているため、個別接種している麻疹ワクチンや風疹ワクチンのように累積接種率曲線が滑らかにはならない。

5. ポリオ生ワクチン接種と麻疹ワクチン接種との時間的關係

ポリオ生ワクチン接種と麻疹ワクチン接種との時間的關係を知るために、麻疹ワクチン、ポリオ生ワクチン1回目、同2回目の累積接種率曲線を同一のグラフに図示した(図6)。ポリオ生ワクチン1回目の累積接種率曲線は、生後24か月まで、麻疹ワクチンの累積接種率曲線と重なることはなく、時間的に競合することはない。

いと考えられたが、ポリオ生ワクチン2回目の累積接種率曲線は、これまでの調査と同様に、生後12~13か月で麻疹ワクチン累積接種率曲線と近付いており、この時期にポリオ生ワクチンの2回目接種と麻疹ワクチン接種が時間的に競合していることが推測された。

III. 考 察

日本では、予防接種関係者の努力と全国的に展開された麻疹ワクチン早期接種運動により、1歳児の麻疹ワクチン接種率は上昇を続け、2007年度には生後24か月での累積接種率が約92%に達した。同時に小児科定点からの麻疹患者報告数は減少し、特に1~3歳の麻疹患者の減少が著しい¹¹⁾。現在では、高校生、大学生、若年成人における麻疹の局地的流行が問題となっており、その原因として幼児期の麻疹ワクチン接種によって抗体産生がみられなかった一次性ワクチン効果不全(primary vaccine failure)、およびワクチン接種によって産生された抗体が時間の経過と共に感染防御レベル以下に減弱して発病した二次性ワクチン効果不全(secondary vaccine failure)が考えられている。この状況を打開するために、2006年6月からMRワクチンを生後1歳(第1期)と就学前1年(第2期)に接種する、麻疹ワクチン2回接種方式が導入された¹²⁾。

2回接種方式の導入は麻疹制圧にとって一歩前進といえるが、麻疹ワクチンの接種期間が従来の「生後90か月に達するまで」から、「24か月に達するまで」に短縮されたため、接種漏れ者が増加することが危惧される。2007年度の生後36か月での麻疹ワクチン累積接種率は2006年度より低く、2004年度と同等であった。今後も、接種期間が短縮されたことが原因と考えられる生後24か月以降での累積接種率の低下が認められれば、MRワクチンの接種率を高く維持するために市区町村での新たな取り組みが必要となる可能性もある。また、中学・

高校での麻疹発生を抑制するためには、就学前のMRワクチン追加接種の接種率が高く維持されることが不可欠である。2006年度のMRワクチン第2期接種初年度の累積接種率は最終的に80.3%にすぎなかった¹³⁾。今後はMRワクチンの第1期接種のみでなく、第2期接種に関しても、全国累積接種率を継続的に調査し、結果に応じて対策を講じる必要がある。

ポリオ生ワクチンの全国累積接種率は、1、2回目共に、調査を開始した2003年度からはほぼ同様に高い累積接種率を維持していたが、今回の調査では1、2回目接種共に、2006年度より若干の累積接種率低下がみられた。今回の低下が一時的なものか否か、今後の推移に注目する必要がある。さらに、2005年度からBCGワクチンの接種期間が従来の「生後4歳に達するまで」から「出生後から生後6か月に達するまで」に変更された¹⁴⁾。接種期間短縮によるBCGワクチン累積接種率の低下は認められていないが¹⁵⁾、両ワクチンの接種時期が重なり、ポリオ生ワクチン1、2回目の接種時期の遅れや接種漏れのために、累積接種率が低下する可能性がある。今後さらにポリオ生ワクチンの累積接種率調査を続け、その変化の有無に注意する必要がある。

本研究は厚生労働省新興・再興感染症研究事業による研究費補助を受けた。

文 献

- 1) 大谷 明: ワクチンの思想. 国立予衛生研究所学友会編. ワクチンハンドブック. 丸善, 東京, 1994; 3-5.
- 2) 予防接種ガイドライン等検討委員会: 予防接種ガイドライン2006年版. 予防接種リサーチセンター. 東京.
- 3) 磯村思无, 山本直彦: 麻疹予防接種の効果的な実施方式に関する研究. 厚生労働省新興・再興感染症研究事業「成人麻疹の実態把握と今後の麻疹対策の方向性に関する研究」平成14年度報告書, 2003; 229-234.
- 4) 崎山 弘: 予防接種率算定方法としての累積接種率と接種完遂率の有効性. 外来小児 2001; 4: 287-297.
- 5) 高山直秀: 麻疹ワクチン接種率調査における累積接種率曲線の有用性. 医事新報 2002; 4094: 27-29.

- 6) 崎山 弘, 梅本 哲, 高山直秀: 全国調査によって求めたわが国の麻疹ワクチン累積接種率. 医事新報 2003; 4150: 26-29.
- 7) 高山直秀, 崎山 弘, 宮村達男他: 麻疹ワクチン及びポリオ生ワクチン累積接種率全国調査結果. 感染症誌 2005; 79: 7-12.
- 8) 高山直秀: 麻疹の現状とその予防接種の効果に関する研究. 厚生労働省新興・再興感染症研究事業「ポリオ及び麻疹の現状とその予防接種の効果に関する研究」平成16年度報告書. 2005; 11-29.
- 9) 高山直秀, 崎山 弘, 宮村達男他: 麻疹, 風疹, ポリオ生ワクチン 2005 年全国累積接種率調査結果. 医事新報 2006; 4299: 69-74.
- 10) 高山直秀, 崎山 弘, 清水博之他: 麻疹ワクチン, 風疹ワクチン, ポリオ生ワクチン全国累積接種率 2006 年度調査結果. 小児臨 2007; 60: 1811-1818.
- 11) 国立感染症研究所感染症情報センター: 麻疹・風疹 2006 年 3 月現在. IASR (病原微生物検出情報) 2006; 27: 85-86.
- 12) 木村三生夫, 平山宗宏, 堺 春美編: 予防接種の手びき 第 11 版. 近代出版, 東京, 2006; 197-202.
- 13) 高山直秀, 崎山 弘, 加藤達夫他: 就学前麻疹・風疹混合(MR)ワクチン追加接種の全国累積接種率調査結果. 小児臨 2008; 61: 773-776.
- 14) 高松 勇: これからの BCG 接種体制の注意点と今後の問題点. 小児科 2005; 46: 324-332.
- 15) 高山直秀, 崎山 弘, 岡部信彦: 改正結核予防法 2005 年施行後の全国 BCG ワクチン累積接種率調査. 日小児会誌 2007; 111: 1042-1044.

受付日 平成 20 年 6 月 12 日

連絡先 〒113-8677 東京都文京区本駒込 3-18-22
東京都立駒込病院小児科
高山直秀

麻疹，風疹，ムンプス ワクチンの現状

Clinical and epidemiological aspects of measles, rubella, and mumps vaccine



庵原 俊昭

国立病院機構三重病院 小児科

庵原 俊昭 (いはら としあき)
1974年三重県立大学医学部卒業，同大学小児科。81-83年フィラデルフィア小児病院留学。88年国立療養所三重病院小児科医長。92年同病院副院長。2004年国立療養所三重病院から国立病院機構三重病院に病院名変更。05年国立病院機構三重病院院長。研究テーマ：ワクチン予防可能疾患の病態の究明（特にムンプス，麻疹，水痘，風疹）

Key Words: measles vaccine, rubella vaccine, mumps vaccine, MR vaccine, MMR vaccine

■ Abstract ■

麻疹，風疹，ムンプスは，いずれも人から人に感染する感染症であり，ワクチンにより集団免疫率が維持されるならば流行の排除が可能な疾患である。2012年の麻疹排除を目指し，2006年からMRワクチンの2回接種が始まり，更に2008年度からは5年間の時限措置で，中学校1年生に相当する年齢の者（3期），高校3年生に相当する年齢の者（4期）へのMRワクチン定期接種が開始された。MRワクチンの使用により風疹排除も期待される。一方，ムンプスワクチンは任意接種のため，接種率は30%と低率であり，流行排除にほど遠い状態である。1994年の麻疹ワクチンおよび風疹ワクチンの男女小児への接種開始以降，麻疹風疹の流行規模は縮小し，免疫賦活の機会が減少している。麻疹風疹の流行排除を目指すためには，少なくとも高い接種率（ $\geq 95\%$ ）で2回MRワクチンを接種することが大切である。

■はじめに

人から人に感染する感染症では，多くの人が免疫を持つと流行排除が可能である。この流行を排除することができる免疫率が集団免疫率であり，麻疹では90-95%，風疹では80-85%，ムンプスでは85-90%である（表1）¹⁾。集団免疫率が高い感染症ほど，一人の人が周囲の免疫のない人に感染させる数（基本再生産数）が高く，流行周期も短期間である。集団免疫率を人為的に維持する方法がワクチン接種であり，移行抗体の消失後早期に接

触しないと，集団免疫率の維持は困難である。

多くの子どもの麻疹，風疹，ムンプスの移行抗体消失時期は1歳であり²⁾，このため1歳早期に麻疹・風疹混合(MR)ワクチン接種が勧められている。本稿では，麻疹ワクチン，風疹ワクチン，ムンプスワクチンの日本の現状を紹介する。

■麻疹ワクチンの現状

日本では1969年に麻疹弱毒生ワクチンが開発された。最初は任意接種としてスタートし，1978年になり定期接種に加えられた。1989年からは麻疹ムンプス風疹(MMR)ワクチンが，定期接種として麻疹ワクチンと併用されたが，ムンプスワクチンによる無菌性髄膜炎の発症率が高かったため，1993年にMMRワクチンの実施が見合わされた。1994年から麻疹ワクチンと風疹ワクチンがそれぞれ単独で1歳以上の小児に男女とも接種されるようになり，その後2005年7月からは麻疹ワクチン，風疹ワクチンに加え麻疹風疹混合(MR)ワクチンの接種が可能となった。

本邦は，世界保健機関(WHO)西太平洋地域(WPR)の方針にしたがい，2012年までに麻疹を排除する計画を立てている。そのためには，①麻疹

■Toshiaki Ihara
National Hospital Organization Mie National Hospital