

分担研究報告書

23 価肺炎球菌ワクチンの再接種の安全性と免疫原性に関する研究

研究協力者 永井英明 （国立病院機構東京病院）
研究分担者 大石和徳 （大阪大学微生物病研究所）

研究要旨：

今回の初回接種から5年以上経過した慢性肺疾患患者を対象としたPPV再接種に関する臨床研究において、PPV再接種により初回接種より高頻度に、より強度の副反応を認めるものの、これらの副反応は無治療下で速やかに軽快した。また、PPVの再接種により主要な血清型に対する特異IgG抗体濃度の有意な増加を認め、再接種時の抗体増加比はその初回接種時のそれと比較して64～97%であった。これらの結果から、PPVの再接種は安全に実施可能であり、その特異IgG抗体誘導効果も初回接種の2/3以上に保たれていることが明らかになった。

A. 研究目的

23 価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPV）は1988年に我が国において、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。平成21年度に実施した再接種に関するアンケート調査研究と初回接種から5年以上が経過した慢性肺疾患患者における血清免疫学的検討結果から、PPV再接種の安全性は高く、また免疫学的見地からPPVの再接種が必要であると考えられた。

今回、我々はPPV再接種の安全性とその免疫原性を明らかにすることを目的として、PPV初回接種後5-6年が経過した慢性肺疾患患者50症例を対象として、医師主導の臨床研究を実施したので報告する。

B. 研究方法

1. 対象症例

国立病院機構東京病院を受診中で、5年以上前にPPV初回接種を実施した慢性肺疾患患者のうち、本臨床研究への参加の同意を書面にて得た者を対象とした。被験者の平均年齢は76.4歳（男性例、女性例）で、初回接種から再接種までの平均期間は7年7ヶ月（6年11ヶ月～8年）であった。尚、これらの被験者のPPV初回接種時の副反応の頻度と性状、および再接種前後の血清中特異IgG濃度については、これまでの調査結果を参照した。

（倫理面への配慮）

本臨床研究は国立病院機構東京病院の倫理委員会の承認後に実施した。また、被験者のPPV接種後の予期せぬ健康被害に対処するために補償制度を準備した（臨床研究保険加入）。

2. 研究デザインと評価項目

本研究は、PPV 初回接種後、5年以上経過した慢性肺疾患患者を対象とした非盲検試験である。事前の診察後に、PPV を接種し、被験者は再接種日、14日後および28日後に来院する。スクリーニング検査として、再接種前、接種14日後、28日後に血液学的検査、生化学的検査を実施した。血清中特異IgG抗体測定用の血清は再接種接種前と再接種28日後に行った。すべての被験者について、再接種後少なくとも15分間は即時型反応について観察した。その後の体温、接種部位の局所反応（腫脹、発赤、疼痛、全身症状）、その他の有害事象については、被験者にその所見をワクチン日誌に記載するよう依頼した。

3. 再接種前後の血清中特異IgG抗体濃度測定

50名の被験者のPPV再接種前、1ヶ月後の血清を採取し、血清中の血清型6B、14および19Fに対する荚膜ポリサッカライド(CPS)特異的IgG抗体濃度を第三世代ELISAのより測定した。6B、14、19Fは我が国の成人における呼吸器病原性肺炎球菌株のうち、主要な血清型である。

C. 研究結果

1. PPV再接種後の副反応

被験者の接種後平均体温は36.0～36.4℃であり、50名中6名に接種後1週間以内の一過性の発熱(37.4～39.4℃)を認めた。局所の腫脹・発赤は接種後1～3日に症例の38～65%に認められた。再接種2日後には症例の15%に10cm以上の腫脹・発赤を認めた。中等度の局所の疼痛も再接種2日後に15%程度に認められ、全身症状としては倦怠感が接種1日～2日後に15～20%に認められた。しかしながら、いずれ

の局所所見、全身所見は無治療下に再接種6日以内にすべて消失した。また、アナフィラキシーショックを含む重篤な副反応は認められなかった。

2. PPV初回接種時と再接種時の副反応の比較

局所の腫脹・発赤および疼痛は、初回接種時にはそれぞれ20%、14%と低頻度であったが、再接種では70%、68%と高頻度であった。全身症状としての頭痛、倦怠感、筋肉痛・間接痛も初回接種に比べ、再接種でその頻度は増加した。

3. PPV再接種の免疫原性

慢性肺疾患患者40例の血清中CPS特異IgG抗体濃度 $\mu\text{g/ml}$ (Geometric mean concentration: 再接種前、1カ月後)は血清型6Bでは1.41、2.57 $\mu\text{g/ml}$ 、血清型14では4.22、7.32 $\mu\text{g/ml}$ 、血清型19Fは2.94、5.67 $\mu\text{g/ml}$ 、血清型23Fは1.45、2.95 $\mu\text{g/ml}$ であった。PPV再接種1カ月後には、接種前に比較して有意に上昇していた。また、初回接種時と再接種時の接種前後の抗体濃度の増加比を比較したところ、血清型6B(初回接種:2.37, 再接種:1.81)、血清型14(初回接種:2.69, 再接種:1.73)、血清型19F(初回接種:1.99, 再接種:1.93)、血清型23F(初回接種:2.41, 再接種:2.04)であった。この結果から、再接種時の特異IgG抗体応答が初回接種時に比較し、その64～97%に低下することが示された。

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50症例を対象としてPPV再接種の安全性、免疫原性の臨床研究を実施した。再接種後の局所および全身の副反応は、初回接種時より高頻度でより強いことが示されたが、

いずれも無治療で、6日以内に完全に消失した。重篤な副反応も認められなかった。初回接種に比較して、再接種による副反応が高頻度で程度も強いという所見は、Jackson LAらの研究成績(JAMA 281: 243-248, 1999)とよく一致している。今後、再接種前の血清中特異IgG濃度と副反応との相関についても検討予定である。また、今回の検討結果では、PPV再接種時の特異IgG抗体は有意に増加するものの、初回接種時の抗体増加比の64-97%であることが明らかになった。この結果は、PPV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PPV接種後にメモリーB細胞が得られないことからよく説明される。

最近になって、我々はPPV初回接種により、少なくとも75歳以上の高齢者では全ての肺炎による入院頻度を低下させ、肺炎医療費も減少することを報告している。今回のPPV再接種の臨床研究から、PPV再接種により初回接種時の2/3以上の血清中特異IgG抗体濃度の増加が得られたことから、PPV再接種によっても高齢者の侵襲性感染症のみならず肺炎予防効果も期待できると推察された。

E. 結論

今回の初回接種から5年以上経過した慢性肺疾患患者を対象としたPPV再接種の臨床研究において、PPV再接種により初回接種より高頻度、より強度の副反応を認めるものの、これらの副反応は6日以内に無治療で軽快した。また、PPVの再接種により主要な血清型に対する特異IgG抗体濃度の有意な増加を認め、再接種時の抗体増加比はその初回接種時のそれと比較して64-97%であった。これらの結果から、PPVの再

接種は安全に実施可能であり、3つの主要な血清型についてはその特異IgG抗体誘導効果も初回接種の2/3以上に保たれていることが明らかになった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, Ishii KJ, Kataoka K, Oishi K. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-Like Receptor Agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine* 27:3181-3188, 2009

2. 大石和徳、川上和義、永井英明、砂川慶介、渡辺 彰. 肺炎球菌ワクチン再接種承認の必要性に関するアンケート調査研究. *日本呼吸器学会雑誌* 48(1): 5-19, 2010.

3. 川上健司、大石和徳. 肺炎球菌ワクチン-再接種の副反応と有用性-. *Medical Practice*. 26 (7):1161-1164, 2009.

4. 大石和徳. 23価肺炎球菌ワクチン. *内科*. 104(5):872-875, 2009.

2. 学会発表

1. 大島信治、永井英明、大石和徳他. 慢性呼吸器疾患患者への23価肺炎球菌ワクチン接種前後および5年経過後の血清型特異抗体濃度の検討. 第49回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009年6月12-14日.

2. 川上健司、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. 第49回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009年6月12-14日.

3. 坂東園子、岩垣明隆、内田隆一、大日康史、江澤和彦、大石和徳. 高齢者介護保険施設利用者を対象とした肺炎の前向き調査. 第 49 回日本呼吸器学会総会, 東京, 2009 年 6 月 12-14 日.

4. 大石和徳. 高齢者における肺炎予防ワクチンの現状と課題. 第 58 回日本感染症学会、第 56 回日本化学療法学会、東京、2009 年 10 月 30- 31 日.

5. 大石和徳、永井英明、川上和義. 肺炎球菌ワクチンの再接種の実態とその承認の必要性に関するアンケート調査. 第 13 回日本ワクチン学会、札幌. 2009 年 9 月 26- 27 日.

6. 川上健司、大日康史、大石和徳. 65 歳以上のインフルエンザワクチン定期接種下の高齢者に対する肺炎球菌ワクチンの臨床・費用対効果. 第 13 回日本ワクチン学会、札幌. 2009 年 9 月 26- 27 日.

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 55 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 Natural Killer T（NKT）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。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みられ、特に血清型 6B では有意な正の相関が認められた。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 NKT 細胞の何らかの関与が推察されたため基礎的検討を行った。最初に、末梢血リンパ球から精製した CD19⁺B 細胞を抗 μ 抗体で刺激する際に、NKT 細胞株とその活性化剤である α -galactosylceramide（ α -GalCer）の存在、非存在下で IgM、IgG 産生に及ぼす影響を検討したところ、活性化 NKT 細胞の存在下で IgM の低下、そして IgG の増加傾向が認められた。さらには、NKT 細胞を欠損した Ja18 遺伝子欠損（KO）マウスと野生型マウスにニューモバックス®を投与し血清中の血清型 3 に対する IgG 濃度を測定したところ、野生型マウスでは IgG 産生がみられたのに対して、Ja18KO マウスでは認められなかった。最後に、マウスにニューモバックス®を投与して血清中の血清型 3 に対する抗体濃度を測定する際に、NKT 細胞の活性化剤である α -GalCer 投与の影響について検討したところ、 α -GalCer 投与によって IgM の低下、IgG の増加傾向が観察された。以上の結果から、ニューモバックス®投与による抗体産生に NKT 細胞が深く関与する可能性のあることが示唆された。

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、2009 年 4 月からの新型インフルエンザの影響もあって最近急激に増加したものの、まだ欧米に比べて低い状況が続いている。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などが要因となっている。

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。

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行っており、これまでにワクチンによる抗体産生への Natural Killer T (NKT) 細胞の関与を示唆する結果を報告してきた。そこで、本年度の研究では、臨床研究の症例数をさらに増やすとともに、末梢血 B 細胞と NKT 細胞を用いた *in vitro* の実験、そしてマウスを用いた *in vivo* の実験によって、上記の可能性について検証を実施した。

B. 研究方法

1) 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 55 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 NKT 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 -galactosyl ceramide (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 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⁺ 細胞と定義し、NKT 細胞はさらに CD4、CD8 の発現によって CD4+NKT 細胞、CD8+NKT 細胞、double negative (DN) NKT 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 NKT 細胞数を算出した。

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、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、莢膜血清型 6B、14、19F、23F について測定した。

③ 末梢血 NKT 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)

2) ヒト B 細胞と NKT 細胞株を用いた *in vitro* 実験

健康人の末梢血から Ficoll-Paque により単核球 (PBMC) を採取し、磁気細胞分離装置 (Magnetic Cell Sorting : MACS) を用いて CD19⁺ B 細胞を精製した。また、PBMC を α -GalCer と IL-2 で刺激した後、定期的に α -GalCer をパルスした放射線照射 PBMC と IL-2 で再刺激することによって NKT 細胞株を作製した。B 細胞を、NKT 細胞と α -GalCer の存在または非存在下に抗 μ 抗体で刺激し、培養上清中の IgM、IgG 濃度を測定した。

3) マウスの実験

C57BL/6 マウス (6~8 週齢、オス) と NKT 細胞を遺伝的に欠損した Ja18KO マウス (千葉大学中山俊憲教授より供与) を用いた。C57BL/6 または Ja18KO マウスにニューモバックス®を腹腔内投与し、3 週後に血清中の肺炎球菌莢膜血清型 3 に対する IgM 及び IgG 濃度を ELISA にて測定し、両マウス間で比較検討した。また、C57BL/6 マウスにニューモバックス®を摂取し 3 週後の血清抗体濃度を測定する際に、 α -GalCer を腹腔内投与することによる影響についても検討を行った。

4) 統計解析

血清中抗体濃度は測定値の対数値を平均した Geometric mean concentration (GMC) で表した。応答者と低応答者間の抗体濃度の比較、応答者と低応答者間のワクチン接種 2 週後の DN NKT 細胞の変化数の比較は Mann-Whitney U-test を用いて検定した。NKT 細胞の変化数と抗体濃度の変化率の相関は Spearman's correlation-test を用いて検定した。さらに、in vitro における各群間の IgG 抗体濃度と IgM 抗体濃度の比較は Paired student's-t test を用いて検定した。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

(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。また、マウスを用いた実験では、東北大学の遺伝子実験委員会及び動物実験委員会からの承認を得ている。

C. 研究結果

1) 血清 IgG 抗体濃度の解析: IgG 抗体濃度については 4 週~3 ヶ月後をピークに増加が見られ、その後 1 年目にかけて低下したが、いずれの血清型においても接種前よりは高い値を維持していた。

2) NKT 細胞と血清 IgG 抗体濃度との関連性: 2 週後の NKT 細胞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、血清型 14 において CD4⁺CD8⁻ NKT 細胞との間で有意な正の相関傾向が、そしてそれ以外の血清型では正の相関傾向が認められた。一方、CD4⁺ NKT 細胞、CD8⁺ NKT 細胞、CD3⁺CD56⁺ 細胞では一定の傾向を示さなかった。

3) ヒト NKT 細胞株の樹立: ヒト NKT 細胞株を樹立する目的で、健常人の PBMC を α -GalCer 抗原および T 細胞の増殖因子

である IL-2 を用いて刺激した。樹立された細胞株は 90%以上の細胞が CD3⁺CD56⁺ 細胞であった。また、CD4、CD8 の発現は細胞全体の 40%と 70%に認められた。

4) ELISA 法による培養上清中 IgM、IgG 抗体濃度の測定: NKT 細胞による B 細胞からの抗体産生に与える影響を調べるために、膜結合免疫グロブリン (B 細胞抗原受容体) を架橋した CD19⁺ B 細胞と NKT 細胞株を α -GalCer 存在下で 3 日間培養し、IgM、IgG 産生量を測定した。抗 IgM 抗体及び架橋抗体による B 細胞刺激では、IgM 産生量が著明に増加したが、IgG 産生量は無刺激と差は認められなかった。NKT 細胞株の存在下では B 細胞からの IgM 抗体量は減少傾向を示し、さらに α -GalCer の存在下では有意に減少した。一方、IgG 抗体量は NKT 細胞株の存在下では変化は認められなかったものの、さらに α -GalCer の存在下では増加傾向を認めた。

5) マウスを用いた実験: 臨床研究から肺炎球菌ワクチンによる抗体産生に NKT 細胞が関与する可能性が予想されたため、マウスを用いた in vivo 実験によってこの点について検証を行った。J α 18KO マウスと野生型マウスとの比較では、野生型マウスで血清型 3 に特異的な IgG 産生が認められたのに対して、J α 18KO マウスでは有意な産生がみられなかった。また、NKT 細胞活性化剤である α -GalCer を投与したマウスでは、投与していないマウスに比べて血清型 3 に特異的な IgM 量が減少し、逆に IgG 量が増加する傾向が認められた。

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 NKT 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 13 例増えて 55 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。

昨年度の研究で、肺炎球菌ワクチン接種早期の 2 週後で見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り、特に増加するグループでは、NKT 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 4 週～3 ヶ月後にみられることから考えると、その前の時期である 2 週後に NKT 細胞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。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、血清型 14 で CD4⁺CD8⁺ NKT 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。

本研究で実施した臨床研究から、NKT 細胞が何らかの形で肺炎球菌ワクチンによる抗体産生に関与する可能性が浮かび上がってきた。近年の報告では、NKT 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、NKT 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、これらの知見からも NKT 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。

本年度の研究では、臨床研究に加えて、末梢血 B 細胞及び NKT 細胞株を用いた *in vitro* 実験、さらには NKT 細胞を遺伝的に欠損したマウスや特異的な NKT 細胞活性化剤を用いた動物実験など、基礎研究でも肺炎球菌ワクチンによる抗体産生と NKT 細胞の関係について解析を行った。その結果、いずれの実験においても、まだ十分な有意差は得られていないものの、臨床研究で浮かび上がった可能性を指示するものであった。今後は、さらに実験条件を整えながら、基礎研究からも上記の可能性を強く指示するような結果を得て行く必要があると考えられる。

E. 結論

本研究を通して、肺炎球菌ワクチンの臨床効果において NKT 細胞が何らかの役割を担っている可能性が推察された。今後は、さらに研究を進展させることで、NKT 細胞の作用機序が明らかにされ、さらに NKT 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川上和義: ワクチンによる肺炎予防とその免疫学的機序, 内科学会雑誌, 98: 291-297, 2009.
- 2) 川上和義: 肺炎球菌ワクチンによる肺炎予防効果とその持続期間、そして再接種問題について. 感染制御 5: 539-542, 2009.
- 3) 大石和徳, 川上和義, 永井英明, 砂川慶介, 渡辺 彰: 肺炎球菌ワクチン再接種の必要性に関するアンケート調査研究. 日呼吸会誌 48: 5-9, 2010.

2. 学会発表

- 1) 川上和義: ワクチンによる肺炎予防とその免疫学的機序, 第 106 回日本内科学会総会講演会 教育講演, 東京, 2009 年 4 月.
- 2) 宮坂智充、青柳哲史、内山美寧、國島広之、山本夏男、平潟洋一、石井恵子、大石和徳、賀來満夫、川上和義: 23 価肺炎球菌ワクチンに対する液性免疫応答と natural killer T 細胞の役割に関する検討. 第 83 回日本感染症学会総会学術講演会, 東京, 2009 年 4 月.
- 3) 大石和徳、永井英明、川上和義: 肺炎球菌ワクチンの再接種承認の実態と必要性に関するアンケート調査. 第 13 回日本ワクチン学会, 札幌, 2009 年 9 月.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医用機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業、ワクチン有用性向上の
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

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染実態調査に用いる検出法の検討

研究協力者 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

HPV が引き起こす病変は良性のコンジローマやイボから悪性の皮膚癌、子宮頸癌に至るまで遺伝子型によって異なる。しかも遺伝子型と血清型には強い相関があることから、我が国で流行している遺伝子型を正確に知ることは、HPV ワクチン戦略の基盤となる。これまでの HPV サーベイランスでは、生殖器粘膜から回収した試料中の HPV DNA を、主に各型に共通な配列をプライマーに応用した PCR で増幅し、アンプリコンの制限酵素切断や塩基配列を調べて遺伝子型を判定してきた。得られた成績に基づいて、我が国での流行型が報告されている。しかし、最近の海外の報告や我々の予備的調査では、従来の報告と異なり、複数の HPV に同時に感染している女性が多いことが示されている。従来の調査を再評価するために、よく使われてきた HPV DNA 検出方法の型別検出感度、試料中に複数の遺伝子型が混在する場合の干渉の有無等を調べた。従来の方法は型による検出効率が異なること、複数型が存在すると干渉する場合があることがわかった。HPV ワクチン導入のインパクトや次世代ワクチンの必要性を評価するには、試料中の複数型の HPV DNA を定量的に高感度で検出する方法を標準化し、それを用いた新たな HPV サーベイランスを行うことが求められている。

A. 研究目的

HPV は、キャプシド蛋白質 L1 をコードする遺伝子の塩基配列の相同性で分類され、これまでに 100 以上の遺伝子型が報告されている。各遺伝子型 HPV は皮膚か粘膜に感染し、皮膚指向性 HPV が粘膜に感染したり、粘膜指向性が皮膚に感染することは殆ど無い。良性のイボや尖型コンジローマの原因となる HPV が悪性腫瘍を引き起こすこともない。また、これまで調べられた限りでは、HPV キャプシドの血清型は遺伝子型に特異的である。従って、どのような HPV 型に感染しているかが、感染者の病変形成や予後にきわめて

重要である。

一方、HPV ゲノム DNA の検出方法が進歩し、海外では複数の遺伝子型に感染している女性が、従来想定されていたより多い可能性が指摘されている。我々の予備的調査でも、日本人女性の 50%は何らかの HPV に感染しており、感染者の 30%からは複数の HPV 型が検出されている。

我々は、これまでに使われた 3 種類の HPV-DNA 検出用 PCR プライマー (L1C1/C2、PGMY、MGP) を使い、1 種類または 2 種類の遺伝子型の HPV DNA が含まれる試料での HPV DNA 増幅効率を検討した。これまでの手技と報告を

再評価するための基盤情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) 試料は HPV6、16、18、31、51、52、58 型のゲノムをクローニングした環状プラスミドを用いた（ただし、58 型は L1 遺伝子のみを含む）。各遺伝子型 DNA が 600、60、6、0.6 コピー含まれる試料を調整した。また、600 コピーの 16 型 DNA と 600、60、6、0.6 コピーの 52 型 DNA を混合した試料を調整した。
- 2) プライマーの塩基配列、PCR 反応条件は、各手技のオリジナルに従った。PGMY、MGP のプライマーと同様に L1C1/C2 のアンチセンスプライマーも 5' 端にビオチンを付加し、全てのアンプリコンをラベルした。アンプリコンの有無は、アガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド染色によって確認した。
- 3) アンプリコン内部で各型に特異的な配列（L1C1/C2 では 20 塩基、PGMY では 29 塩基、MGP では 17-20 塩基）を持つ合成 DNA をラインプロッターを使ってナイロン膜に線上に固定し、このプローブとアンプリコンの結合の有無で型を判別した。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮

ヒト由来材料や実験動物の使用は無かった。

C. 研究結果

- 1) L1C1/C2 プライマーの検出限界は、18、51、52 型は 6 コピー、58 型は 60 コピー、6、16、31、型は 600 コピーであった。PGMY プライマーの検出限界は、6、52 型は 6 コピー、16、18、51、58 は 60 コピー、31 型は 600 コピーであった。MGP プライマーの検出限界は、全ての遺伝子型で 6 コピーであった。
- 2) PCR 反応液中に 600 コピーの 16 型 DNA と 600 コピーの 52 型 DNA が混在し

た場合、L1C1/C2 プライマーでは、16 型 DNA は検出されなかった。混在する 52 型 DNA の量が多くなるほど、16 型 DNA の検出感度が低下する傾向が見られた。PGMY プライマーでは、16 型と 52 型 DNA が混在した場合でも、それぞれ単独の場合と同等の検出感度が得られた。

D. 考察

- 1) 我が国の HPV サーベイランスでは、L1C1/C2 プライマーを使って増幅したアンプリコンを制限酵素で切断し、得られる断片群の長さを測定して型判定する方法が標準とされ、その改良としてはアンプリコンの塩基配列を直接調べる方法がとられてきた。この方法では、6、16、31 型に比べて 18、51、52 型が強調されている可能性が高い。

また、L1C1/C2 プライマーを使うと 16 型と 52 型の間に干渉がみられ、試料中の HPV DNA を忠実に反映する成績は得られない。他の遺伝子型の組み合わせでも同様な干渉が起こる可能性があり、複数型感染の場合誤った結論を得ている可能性がある。

- 2) HPV6、16、18、31、51、52、58 型の検出感度では、MGP プライマーを用いた方法が優れている。今後のサーベイランスに使う方法の選定には、PGMY、MGP プライマーを中心に複数の HPV 型の検出感度についてさらに詳細な検討が必要である。

- 3) これまで我が国で行われた HPV サーベイランスの信頼性は、必ずしも高くない。核酸増幅を含む手技で HPV ゲノム DNA を検出し、型判定を行うには、使用する器具や装置、試薬をバリデートし、標準作業手順書が完備した専用の診断ラボが必要である。従来の報告は、大学産婦人科の医局で小規模になされた調査によるもので、手技も一定していない。HPV ワクチン導入のインパクトや次世代 HPV ワクチンの必要性を評価するためには、厳密な HPV サーベイランスが必要である。

E. 結論

従来の HPV サーベイランスでは 6、16、31 型に比べて 18、51、52 型の検出頻度が強調されている可能性が高い。定量性に優れた手技を用いた再調査が求められる。

G. 研究発表

論文発表 (2009 年-in press のみ記載)

1) Kondo, K., Ishii, Y., Mori, S., Shimabukuro, S., Yoshikawa, H., and Kanda, T. : Nuclear location of minor capsid protein L2 is required for expression of a reporter plasmid packaged in HPV51 pseudovirions. *Virology*, 394:259-265, 2009

2) Sato, H., Matsuo, R. K., Ishii, Y., Mori, S., Nakahara, T., Ouchi, F. S., Kawana, K., Fujii, T., Taketani, Y., Kanda, T., and Kukimoto, I. : Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *BBRC*, 387:525-530, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得

「Vaccine antigen inducing cross-reactive neutralizing antibodies to high-risk group human papillomaviruses」

欧米、中国、インド、韓国、インドネシア、メキシコ等へ出願中

厚生労働科学研究費補助金（平成 21 年度）

医薬品・医用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

研究分担者 中山哲夫 北里生命科学研究所

沈降精製百日せきジフテリア破傷風ワクチン(DTaP)の追加接種臨床試験

－(DT)接種時期における DTaP 接種の安全性と免疫原性の検討－

日本ワクチン学会 ワクチン推進ワーキンググループ（岡部信彦、神谷 齊、中山哲夫）

百日咳ワーキンググループ

国立病院機構 三重病院（中野貴司）

東京都立駒込病院（高山直秀）

国立感染症研究所（高橋元秀、蒲地一成）

国立病院機構 福岡病院（岡田賢司）

北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所（和山行正）

日本外来小児科学会 予防接種委員会（永井崇雄）

【研究要旨】百日咳成分を含んだワクチン接種は 1-2 歳時の DPT 追加接種以降接種機会がないため DT 接種時期に DTaP を接種することの安全性を検討した。全国 29 の医療施設において 555 例を対象に臨床試験を行った。内訳は DT 0.1ml (199 例)、DTaP 0.2ml (179 例)、DTaP 0.5ml (177 例) で過去に DPT 接種を 3 回以上受けて DT 接種を受けていない DT 0.1ml 群 197 例、DTaP 0.2ml 群 178 例、DTaP 0.5ml 群 176 例を対象に接種後 1 週以内に出現した有害事象の出現頻度を検討した。全身症状として発熱は DT 0.1ml 群で 8/197(4.1%)、DTaP 0.2ml 群で 7/178 (3.9%)、DTaP 0.5ml 群で 7/176 (4.0%) と各群で差は認めなかった。頭痛 25 例、倦怠感 11 例、鼻汁 10 例等を認め各群での出現頻度には差が認めなかった。アレルギー反応として蕁麻疹 3 例 (DT 0.1ml 群 1 例、DTaP 0.5ml 群 2 例)、全身発赤 (DTaP 0.5ml 群 1 例) を認めた以外には重症な有害事象は認めなかった。何らかの局所反応を認めた例は DT 0.1ml 接種群で 121/197(61.4%)、DTaP 0.2ml 接種群で 123/178(69.1%)、DTaP 0.5ml 接種群で 145/176(82.4%) で DTaP 0.2ml 群は DT 0.1ml 接種群に比べて腫脹の出現率が 1.31 倍高くなるが他の症状には差は認めなかった。一方、DTaP 0.5ml 接種群は DT 0.1ml 接種群に比べて発赤、腫脹の出現頻度は 1.33 倍、1.40 倍となり疼痛、熱感の出現頻度は 1.62 倍、1.59 倍に増加した。有害事象の出現率、免疫原性の結果から DT 0.1ml 接種を DTaP 0.2ml に変更することは百日咳のコントロールに有効な手段と考えられる。

研究分担者：中山哲夫

北里生命科学研究所ウイルス感染制御 教授

A. 研究目的

百日咳は乳幼児においては無呼吸発作や脳症を合併する重篤な感染症である。1948 年から百日せきワクチンが開発され接種が始まり、副反応の少ないワクチンへの改良が進み 1981 年には百日咳菌の感染防御に関連する百日咳毒素

(pertussis toxin: PT)、繊維状赤血球凝集素 (filamentous hemagglutinin; FHA)等を精製した無細胞型百日咳ワクチンとジフテリア・破傷風トキソイドとを混合した沈降精製三種混合ワクチン (acellular pertussis combined with DT; DTaP)が開発された。DTaP 接種後では発熱等の副反応の出現率は極めて低く、DTaP 接種率も 90%近くになり百日咳患者報告数は減少してきた。

近年、成人百日咳の増加が注目され大学キャンパスでの流行も報告され、成人百日咳は典型的な症状を認めることは少なく、多くは慢性、遷延性の咳として百日咳の疑いすら抱かれず、また確実な診断法はなく遺伝子診断法も開発されているが一般には普及してないための確な診断がなされていない。そのため成人百日咳の実態が明らかとなっていないのが現状である。成人の百日咳はワクチン接種前の乳幼児への感染源となり成人百日咳の制御は大きな課題となる。欧米では成人百日咳の増加とともに乳幼児への感染が明らかとなり米国ではDTaP 初回免疫3回、初回免疫の追加接種1回、6歳時の5回目の接種だけでなく10歳代を対象に破傷風の成分は同量で百日咳、ジフテリアの成分を減少させたTdap ワクチンの追加接種を推奨している。我が国では乳幼児期の初回免疫と追加接種の計4回の接種以降は百日咳のコンポーネントを含んだワクチン接種は行われていないため成人に達するまでに追加接種を検討する必要がある。新たにTdapを開発するには時間がかかるため現状のDT接種をDTaPに変更し百日咳成分を含んだワクチンを追加接種することが有効な方法と考えられ、その有効性と安全性を評価するために臨床試験を実施した。

B. 研究方法

1) 対象

DT接種時期の11-12歳児を対象にDT 0.1ml, DTaP 0.2ml, DTaP 0.5 mlの接種試験を2008年9月から2009年8月までに全国29の医療施設で実施した(中央倫理委員会は国立病院機構三重病院で認可された)。接種の対象は11歳以上13歳未満の健康学童(11歳以上18歳未満まで接種可)で、DTaP初回免疫、追加接種を完了しているもの、もしくは3回以上DTaPの接種を受けているもの、かつDT接種を受けていないもの、代諾者の文書による同意が得られている者を対象としその内訳を図1に示した。接種試験の参加者は合計555例で、その内訳はDT 0.1ml (199例)、DTaP 0.2ml (179例)、DTaP 0.5ml (177例)で過去にDPT接種が3回以下の3例、DT接種

を受けていた1例の合計4例を評価対象から除外し、DT 0.1ml群197例、DTaP0.2ml群178例、DTaP 0.5ml群176例を対象とし接種後1週以内に出現した有害事象の出現頻度を検討した。

2) 安全性評価の方法

接種後健康観察日誌を保護者に渡し接種日を0日として8日間有害事象を観察してもらい、発熱、局所反応として発赤、腫脹、疼痛、熱感、かゆみは毎日観察し健康観察日誌に記載し、全身症状は出現したときに記載してもらった。健康観察日誌は4-6週後に回収した。有害事象の出現頻度はDT 0.1ml接種後に出現した頻度に対するリスク比で評価した。

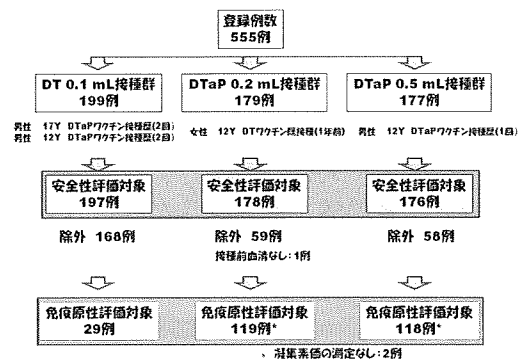


図1、臨床試験参加者と安全性、有効性評価対象の内訳

3) 解析対象者の背景

安全性評価の対象者の背景を表1に示した。DT 0.1 ml, DTaP 0.2ml, DTaP 0.5ml接種群で男女比の差はなく対象者の年齢も11-12歳とDTPaPの接種歴にも差は認めなかった。

表1. 安全性解析対象者の背景

安全性評価対象者の背景				
項目	DTaP 0.2mL (N=178) ^{a)}	DTaP 0.5mL (N=176)	DT 0.1mL (N=197)	合計 (N=551)
性別				
男	93(52.2%)	95(54.0%)	113(57.4%)	301(54.6%)
女	85(47.8%)	81(46.0%)	84(42.6%)	250(45.4%)
年齢				
11歳	97(54.5%)	95(54.0%)	73(37.1%)	265(48.1%)
12歳	68(38.2%)	68(38.6%)	111(56.3%)	247(44.8%)
その他	13(7.3%)	13(7.4%)	13(6.6%)	39(7.1%)
平均±SD	11.6±0.8	11.6±0.8	11.8±0.8	11.6±0.8
中央値	11.0	11.0	12.0	12.0
範囲(最小,最大)	(11,15)	(11,15)	(11,17)	(11,17)
過去のDPT接種歴				
I期1回目	178(100.0%)	176(100.0%)	197(100.0%)	551(100.0%)
I期2回目	178(100.0%)	176(100.0%)	197(100.0%)	551(100.0%)
I期3回目	172(96.6%)	172(97.7%)	193(98.0%)	537(97.5%)
I期追加	172(96.6%)	168(95.5%)	191(97.0%)	531(96.4%)

C. 結果

1) 有害事象の出現頻度

接種日を day 0 として 8 日間有害事象の出現を観察しまとめて表 2 に示した。全身症状として発熱は DT 0.1ml 群で 8/197(4.1%)、DTaP 0.2ml 群で 7/178 (3.9%)、DTaP 0.5ml 群で 7/176 (4.0%)と各群間で差は認めなかった。何らかの局所反応を認めた例は DT 0.1ml 群 121/197(61.4%)、DTaP 0.2ml 接種群で 123/178(69.1%)、DTaP 0.5ml 接種群で 145/176(82.4%)であった。DTaP 0.2ml 接種群は DT 0.1ml 接種群に対するリスク比は 1.13 で DTaP 0.5ml 接種群では 1.34 と局所反応の出現率が高くなる。個々の局所反応に関して DTaP 0.2ml 接種群と DT 0.1 ml 接種群の有害事象の出現頻度のリスク比を示した。DTaP 0.2ml 群は DT 0.1ml 接種群に比べて腫脹の出現率が 1.31 倍高くなるが他の症状の出現率には差が認めなかった。一方、DTaP 0.5ml 接種群は DT 0.1ml 接種群と比較して発赤、腫脹の出現頻度は 1.33 倍、1.40 となり熱感、疼痛は 1.62 倍、1.59 倍に増加した。かゆみの出現率は各接種群間で出現率に差は認めなかった。

表 2. 有害事象の発現率の比較

有害事象の出現頻度の比較

有害事象	DTaP 0.2mL(1)	DTaP 0.5mL(2)	DT 0.1mL(3)	有害事象の出現頻度のリスク比		
	(N=178) ^a	(N=176)	(N=197)	(2) vs (1)	(1) vs (3)	(2) vs (3)
発熱	7(3.9%)	7(4.0%)	8(4.1%)	1.01 (0.36, 2.82)	0.97 (0.36, 2.62)	0.98 (0.36, 2.65)
局所症状	123(69.1%)	145(82.4%)	121(61.4%)	1.19 (1.06, 1.34)	1.13 (0.97, 1.30)	1.34 (1.18, 1.53)
発赤	95(53.4%)	109(61.9%)	92(46.7%)	1.16 (0.97, 1.39)	1.14 (0.93, 1.40)	1.33 (1.10, 1.60)
腫脹	90(50.6%)	95(54.0%)	76(38.6%)	1.07 (0.87, 1.30)	1.31 (1.04, 1.65)	1.40 (1.12, 1.75)
疼痛	83(46.6%)	116(65.9%)	80(40.6%)	1.41 (1.17, 1.71)	1.15 (0.91, 1.45)	1.62 (1.33, 1.98)
熱感	50(28.1%)	74(42.0%)	52(26.4%)	1.50 (1.12, 2.00)	1.06 (0.76, 1.48)	1.59 (1.19, 2.13)
かゆみ	81(45.5%)	83(47.2%)	75(38.1%)	1.02 (0.82, 1.28)	1.21 (0.85, 1.54)	1.24 (0.98, 1.57)

2) 接種日毎の有害事象出現率

接種日毎の全身症状としての発熱、局所反応の出現頻度を図 2 に示した。発熱の出現日には一定の傾向はなかった。その他の全身症状として頭痛 25 例、倦怠感 11 例、鼻汁 10 例等を認め各群での出現頻度には差が認めなかった。アレルギー性の全身症状として蕁麻疹は 3 例 (DT 0.1ml 群 1 例、DTaP 0.5ml 群 2 例) に認められ、接種当日と接種 3 日後に出

現した。DTaP 0.5ml 接種群で 1 例において接種当日に全身発赤疹を認めた。

接種当日の局所反応は DT 0.1ml 群 42/197 (21.3%)、DTaP 0.2ml 接種群で 41/178(23.0%)、DTaP 0.5ml 接種群で 51/176 (29.0%)で差は認めなかったが、接種 1 日では DT 0.1ml 群 91/197(46.2%)、DTaP 0.2ml 接種群で 97/178 (54.5%)、DTaP 0.5ml 接種群で 131/176(74.4%)で DTaP 0.5ml 接種群で出現頻度は高くなる。接種第 2 日でも同様に接種第 3 日から出現頻度は減少してくる。DTaP 0.2ml 接種群は接種 4 日まで DT 0.1 ml 接種群と差は認められなかった。

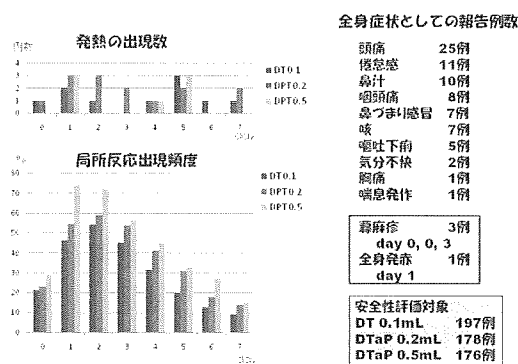


図 2. 全身反応と局所反応の出現頻度

接種日毎の発赤、腫脹の出現頻度と出現した症状の程度を図 3 に示した。接種 1-2 日で出現頻度は高くなり DTaP 0.5 ml 接種群で出現頻度が高く 5cm 以下の軽度—中等度の副反応では各群での差はないが 5cm 以上の重度の副反応は DTaP 0.5ml 接種群に多かった。

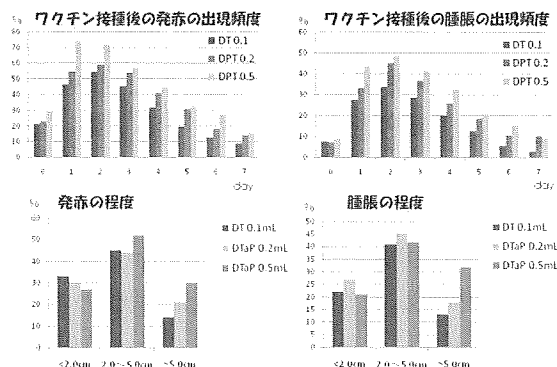


図 3. 接種日毎の発赤、腫脹の出現頻度と症

状の程度

疼痛と熱感の接種日毎の出現頻度を図4に示した。他の局所反応と同様に接種1-2日で出現頻度は増加し、疼痛はDTaP 0.5ml接種群で中等度の副反応の出現頻度は高くなる。

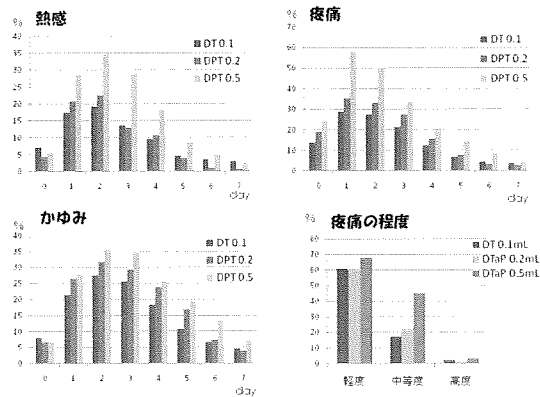


図4. 接種日毎の熱感、疼痛、かゆみの出現頻度と疼痛の程度

DTaP 0.2ml, DTaP 0.5ml 接種群における局所反応の出現率を DT 0.1ml 接種後の出現率とのリスク比と 95%信頼区域をまとめて図5に示した。DTaP 0.2ml 接種群では腫脹が DT 0.1ml 接種群より 1.31 倍頻度が高くなる以外は同等と考えられた。DTaP 0.5ml 接種群がすべての項目で DT 0.1ml より高い出現頻度で特に疼痛、熱感には 1.62 倍、1.59 倍と高くなる。

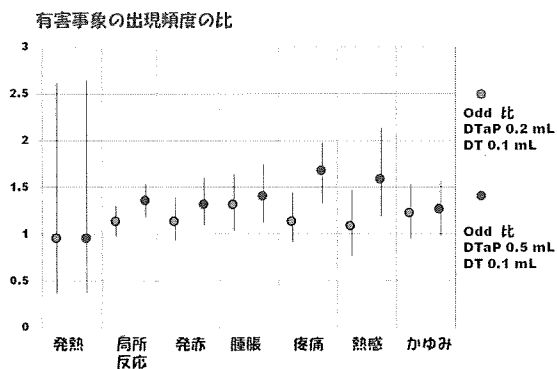


図5. DTaP 0.2 ml, 0.5 ml 接種群と DT 0.1 ml 接種群の局所反応の出現率のリスク比

D. 考案

2007 - 08 年より学園内、成人百日咳の流

行が認められ 2009 年にはこうした成人百日咳の症例から伝播したものと考えられる乳幼児期の百日咳の増加が認められている。欧米諸国と比較すると百日咳成分を含んだワクチンの接種回数が 1-2 回少ないことから流行に対処するためには百日咳の成分を含んだワクチンの追加接種が必要となる。既に外国では認可され使用されている Tdap を開発するには時間がかかるため現在使用されている DTaP を DT 接種時期の 11-12 歳時に追加接種することで対応できるかどうかを検討した。我が国で使用されている DTaP には PT, FHA 成分を主体とする B-type (阪大微研、化血研) とその他の抗原も含んでいる T-type (武田、北里、デンカ生研) があり各社その含有成分に差が認められる。DTaP の百日咳コンポーネントは製造工程、ワクチンの組成は各社で異なっているため各社のワクチンを用いて臨床試験を行った。我が国で使用されている DTaP の 0.5ml 中には PT (4.3~18.8 ug)、FHA (18.8~40.2 ug)、破傷風トキソイド (1.5~3.5 Lf)、ジフテリアトキソイド (13.5 Lf) が含まれている。DT ワクチンには破傷風トキソイド (0.5~1.0 Lf)、ジフテリアトキソイド (4 Lf) が含まれている。この抗原量は DTaP 0.2ml に相当する。この量だと PT (1.7~7.5 ug)、FHA (7.5~16 ug) となる。外国で開発され 10 歳代~成人に接種が推奨されている Tdap には PT (2.5~8ug)、FHA (5~8ug)、破傷風トキソイド (5Lf)、ジフテリアトキソイド (2~2.5Lf) が含まれている。現在 DT ワクチン接種は副反応の問題もなく安全に接種されておりこの抗原量にあわせた DTaP 0.2ml の接種量は外国で使用されている Tdap の百日咳の成分より FHA が若干多めとなるが、破傷風の成分が低くなる。DTaP の接種量を 0.2ml と 0.5ml の 2 群設定し DT 0.1ml 接種群との比較試験を行い安全性と免疫原性を検討した。

発熱を含めた全身反応は各群で差は認めなかった。局所反応に関して DTaP 0.2ml, DTaP 0.5ml 接種群における局所反応の出現率を DT 0.1ml 接種後の出現率とのリスク比と 95%信頼区域を検討すると DTaP 0.2ml 接種

群では腫脹が DT 0.1ml 接種群より頻度が 1.31 倍高くなる以外は同等と考えられた。DTaP 0.5ml 接種群がすべての項目において DT 0.1ml より高い出現頻度で特に疼痛、熱感 は 1.62 倍、1.59 倍と高くなる。DTaP 0.2ml 群と DTaP 0.5ml 接種群を比較しても疼痛、熱感で 0.5ml 接種群で出現頻度は高くなる。

参考までに破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド、百日咳 PT、FHA に対する抗体反応の結果を表 2 に示した。接種後の百日咳平均抗体価は DTaP 0.2ml 接種群と 0.5ml 接種群で有意差は認めなかった。ジフテリアトキソイド抗体も DT 0.1ml 接種群と比較しても有意差を認めなかった。破傷風トキソイド抗体では DTaP 0.5ml 接種群では 0.2ml 接種群より高い抗体レスポンスを示したものの DTaP 0.2 ml 接種群では DT 0.1ml 接種群との差は認めなかった

E. 結論

DT 接種時期の 11-12 歳を対象に DT 0.1ml、DTaP 0.2ml、DTaP 0.5ml 接種群の安全性と免疫原性を検討し、DTaP 0.2ml 接種は DT 0.1ml と同等の局所反応の出現頻度であるが、DTaP 0.5ml 接種は局所反応の出現頻度が高く特に疼痛、熱感の出現頻度が高い。免疫原性に関して百日咳 PT、FHA 抗体の陽性率、平均抗体価には DTaP 0.2ml、0.5ml 接種群で差はなくジフテリアトキソイド抗体の陽性率と平均抗体価は DT 0.1ml 接種群との差は認めなかったが、破傷風トキソイド抗体に関しては DTaP 0.5ml 接種群では 0.2ml 接種群より高い抗体価を示したものの DTaP 0.2 ml 接種群は DT 0.1ml 接種群との間では有意差は認めなかった。DT 接種時期の DT 0.1ml 接種を DTaP 0.2ml 接種に変更することで同等の安全性と百日咳に対して有効な免疫原性と共に過剰免疫とはならないことから百日咳のコントロールに有効な手段であると考えられる。

接種前後の平均抗体価

	DT 0.1ml		DPT 0.2ml		DPT 0.5ml	
	接種前 GMT (95% CI)	接種後 GMT (95% CI)	接種前 GMT (95% CI)	接種後 GMT (95% CI)	接種前 GMT (95% CI)	接種後 GMT (95% CI)
抗PT抗体	10.8 (6.38-18.29)	13.93 (8.98-21.61)	12.11 (9.21-15.94)	89.05 (70.54-112.41)	10.88 (8.27-14.32)	102.74 (82.91-127.32)
抗FHA抗体	24.92 (16.34-39.00)	31.2 (22.43-43.42)	33.73 (27.32-41.64)	252.82 (214.23-298.27)	25.83 (20.67-32.28)	302.06 (254.2-358.93)
凝集素 (藻浜)	31.5 (17.90-56.41)	38.13 (21.80-66.69)	44.16 (32.88-59.32)	179.95 (131.33-246.55)	33.93 (25.22-45.66)	188.01 (136.16-259.61)
凝集素 (山口)	10 (7.10-14.02)	10.49 (7.49-14.70)	12.48 (10.05-15.49)	17.89 (14.12-22.66)	11.18 (9.30-13.45)	16.13 (12.98-20.05)
抗D抗体	0.23 (0.11-0.47)	40.14 (28.28-56.98)	0.22 (0.17-0.30)	45.17 (35.59-57.32)	0.16 (0.12-0.24)	46.79 (35.73-61.24)
抗T抗体	0.47 (0.28-0.81)	20.96 (13.37-32.84)	0.87 (0.70-1.09)	18.02 (14.90-21.80)	0.59 (0.44-0.79)	27.12 (22.79-32.27)

表 2. DT 0.1 ml, DTaP 0.2ml, DTaP 0.5ml 接種群における接種前後の平均抗体価

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)
分担研究報告書（平成 21 年度）

ワクチンの意義に関する研究

研究代表者：神谷 齊（国立病院機構三重病院）

研究分担者：谷口孝喜（藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座）

研究協力者：神谷元（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究要旨：ヒトロタウイルスの血清型は多様であり、感染防御は血清型特異的とも、交叉反応性とも報告されており、わが国における血清型の分布状況を把握することは、将来的なワクチン導入に向けてきわめて重要である。そこで、三重県内の 5 病院から収集した小児の急性下痢症患者便中のロタウイルスの血清型（G タイプと P タイプ）を RT-PCR により調査した。その結果、G3P[8] が 76% と圧倒的な分布を示した。一方、地球レベルおよびわが国で例年分布が最も高い G1P[8] は、17% と低値を示した。

A. 研究目的

ロタウイルス感染症により、開発途上国を中心として年間 60 万人の乳幼児の死亡があると算定されており、わが国のような先進国においても、重篤な例が多く、医療経済的にも重視されている。ロタウイルスの感染力はきわめて高く、感染性ウイルス粒子 1～10 個でも感染が成立する。したがって、衛生状態をいかに改善しても、その制御は困難とされ、開発途上国のみならず開発国においても、ほぼ 100% の乳幼児が 5 歳までに感染し、発症すると報告されている。そこで、ワクチンによる防御が最優先とされ、2006 年に 2 種類の経口生ワクチン：RotaTeq と Rotarix が開発され、100 カ国以上で認可され、すでに多くの国で定期接種されている。

ロタウイルスの血清型は多様であり、VP7

が規定する G タイプは 15 種以上、P タイプは 25 種以上が報告されており、ヒトでもそれぞれ 10 種以上の存在が知られている。血清型の分布は地域により、年により異なり、ワクチンの導入にあっては、血清型の分布は重要な基礎的データとなる。そこで、ここでは、三重県の複数の医療機関よりロタウイルス陽性便を収集し、含まれるロタウイルスの G タイプおよび P タイプを決定した。

B. 研究方法

(1) 三重県内の 3 都市（津、松阪、伊勢）での 5 病院（鈴鹿中央病院、国立病院機構三重病院、国立病院機構三重中央医療センター、松阪中央総合病院、山田赤十字病院）における 5 歳未満小児の急性下痢症の患者便を入院時に収集した。迅速診断キットに

てロタウイルス感染の有無を検査し、陽性と判定されたサンプルについて、RT-PCR法によりロタウイルスのGタイプおよびPタイプを判定した。具体的には、便サンプルをPBSで10%便懸濁液とし、低速遠心後の上清を、破壊液(SDS, 2-mercaptoethanol, EDTA)でウイルスを分解しフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿でRNAを抽出した。抽出RNAについてA群ロタウイルスに共通のプライマーを使用した逆転写反応を用い、1st PCRを行い、続いて各GタイプあるいはPタイプに特異的なプライマーを用いた2nd PCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、増幅長を確認することでGタイプおよびPタイプを確定した。

C. 評価及び本サーベイランスの意義

ロタウイルス感染性胃腸炎入院症例の原因となったロタウイルスのGタイプとPタイプおよびその割合についての情報を得られる。また、ロタウイルスのGタイプとPタイプを調べることにより、既存ワクチン導入時のシミュレーションも可能となる。

D. 研究結果

108例の入院患者の便サンプルから得られたロタウイルスのGタイプ、Pタイプの組み合わせは圧倒的にG3P[8]が多かった(76%) (表1)。次いで、G1P[8](17%)、G9P[8](5%)、G2P[4](2%)であった。近年までG1P[8]が流行の主流であるとする世界各国およびわが国のサーベイランスデータとは異なる結果であった。三重県下の異なる3市におけるGタイプ、Pタイプの流行状況はおおむね同様であった(図1)が、Gタイプ、Pタイプに地域性があることは、血清型のサーベイランスの重要性、さらに

はワクチンの効果を考慮する上で重要な情報である。また、年次ごとにGタイプ、Pタイプの分布に差異が生じることが予想され、引き続き、長年にわたる調査が必要となる。

E. 今後の計画

GタイプおよびPタイプの分布状況については、今後も継続的に進めていく。

G3P[8]タイプが主流となることはめずらしく、ここで検出したG3P[8]ロタウイルスのVP7遺伝子およびVP4遺伝子の塩基配列を決定し、これまでに報告のあるG3P[8]ロタウイルスのそれら遺伝子の配列と比較検討する予定である。それにより、VP7およびVP4遺伝子の変異の動向を知ることができるであろう。

F. 研究発表

1) 学会発表

なし

2) 論文

Kamiya H, Yui A, Nakano T, Taniguchi K: Preferential distribution of G3P[8] of human rotavirus in Mie Prefecture in Japan and genetic analysis of their VP7 genes. (in preparation)

G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

H. 謝辞

GタイプおよびPタイプの決定に多大な協力を得た藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座の油井晶子研究員に深謝申し上げます。

表1. 三重県下におけるロタウイルス血清型別検出状況

	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G9P[8]	other	total
伊勢	4	0	25	3	0	32
松阪	3	0	28	0	0	31
津	12	2	29	2	0	45
total	19	2	82	5	0	108

図1. 三重県下におけるロタウイルス血清型別検出状況

