

with pneumococcal conjugate vaccine in human immunodeficiency virus-infected Ugandan adults. Vaccine 26:4962-4968, 2008

3. 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

4. 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.

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

6. 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.

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

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

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と
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

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 領域に中和エピトープ (L2-エピトープ) が存在することを見出したので、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、52、58 型を中和した。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。また、従来 of 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 of 方法 is 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。

A. 研究目的

現行の 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 16 型の L2 蛋白質に見出したので、このエピトープをワクチン抗原に応用することをめざした。

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) を用い、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) HPV16 型 L2 蛋白質のアミノ酸 57 から 75 領域 (L2-エピトープ) をコードする遺伝子断片を合成し、HPV16 型 L1 遺伝子の

3'近傍に挿入したキメラ遺伝子を作製した。キメラ遺伝子を発現する組み換えバキュロウイルスを作製し、夜盗蛾由来 sf9 細胞で発現させた。キメラ蛋白質の自律集合で形成された粒子を sf9 細胞核から抽出し、塩化セシウム密度平衡遠心で精製後、透過型電子顕微鏡で形態を調べた。精製した粒子をウサギ皮下に接種し、抗血清を得た。HPV が増殖する実用的な培養細胞系は無い。HPV16、18、31、52、58 型 L1 蛋白質、L2 蛋白質のコドン変異体を作製してヒト 293FT 細胞で発現させ、生じたキャプシドにレポータープラスミドを組み込ませた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。

2) 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。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。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。

C. 研究結果

1) HPV16 型 L1 蛋白質のアミノ酸 430 と 433 の間に L2-エピトープを挿入したキメラ蛋白質は、sf9 細胞核内で、直径 20-60nm のウイルス様粒子 (キメラ VLP) を形成した。キメラ VLP には、合成ペプチドをウ

サギに免疫して得た抗 L2-エピトープ抗体が結合した。キメラ VLP をウサギに免疫して得た抗血清は、L2-エピトープ配列を持つ合成ペプチドと結合した。HPV16、18、31、52、58 型の感染性偽ウイルスを中和した。交差性中和力価は、1:50 から 1:6,000 を示した。

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) L2-エピトープはキメラ VLP 表面に提示されており、キメラ VLP をウサギに免疫して得た抗血清には、抗 HPV16VLP 抗体と抗 L2-エピトープ抗体が含まれていた。キメラ VLP は、HPV16 型 VLP の抗原性を失わずに、L2-エピトープに対する抗体を誘導できることが示された。キメラ VLP で誘導される交差性中和抗体価は、感染予防効果があると期待できる。

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。

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。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。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

1) キメラ VLP は、現行のワクチンの抗原性を維持したまま、交差性中和エピトープを挿入した抗原であり、発癌性 HPV 群に幅広く有効な感染予防ワクチン抗原になる可能性がある。
2) 従来 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うえ、複数感染を把握しきれていない。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

1. Kondo, K., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. *J. Med. Virol.*, in press, 2008.
2. Ishii, Y., Kondo, K., Matsumoto, T., Tanaka, K., Shinkai-Ouchi, F., Hagiwara, K., Kanda, T.: Thiol-reactive Reagents Inhibits Intracellular Trafficking of Human Papillomavirus Type 16 Pseudovirions by Binding to Cysteine Residues of Major Capsid Protein L1. *Virology Journal*, 4:110, 2007.
3. Sato, K., Takeuchi, T., Kukimoto, I., Mori, S., Yasugi, T., Takatani, Y., and Kanda, T.: Human Papillomavirus

Type 16 P670 Promoter is Negatively Regulated by CCAAT Displacement Protein. *Virus Genes*, 35:473-481, 2007.

4. Kondo, K., Ishii, Y., Ochi, H., Matsumoto, T., Yoshikawa, H., and Kanda, T.: 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, 2007.
5. 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
6. 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

「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

「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

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 価の荚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。 $P < 0.05$ を有意差有りとして判定した。

(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。 $J\alpha 18KO$ 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、 $J\alpha 18KO$ 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、血清中の荚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（平成 20-21 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】 2007-08 にかけて成人百日咳の増加が報告され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 を接種することの免疫原性と安全性を検討するための臨床試験を立案した。平成 20 年度には臨床試験のプロトコルを作製し臨床試験の準備を行い、平成 20 年 9 月から平成 21 年 8 月まで臨床試験を実施し平成 21 年 10 月から免疫原性と安全性の解析を行った。全国 29 の医療施設において 555 例に接種を行い、DT 0.1ml 群 197 例、DTaP0.2ml 群 178 例、DTaP 0.5ml 群 176 例を解析対象とした。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。何らかの局所反応を認めた例は DT 0.1ml 接種群 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 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は差が認めなかった。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、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。

近年成人の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、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

いため的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の有効性と安全性を評価するために臨床試験を立案した。

B. 研究方法

1) 臨床試験のプロトコールとスケジュール

DT接種時期の11-12歳児を対象にDT 0.1ml, DTaP 0.2ml, DTaP 0.5 mlの接種試験のプロトコールを作製し中央倫理委員会は国立病院機構三重病院で認可された。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を3回以上接種を受け、かつDT接種を受けていないもので同意が得られている者を対象とし5社のワクチンを用いてDT 0.1ml, DTaP 0.2ml, DTaP 0.5 mlの接種群の割り振りを図1に示した。

Study 1 免疫原性と安全性の検討

対象: DT接種時期(11-13歳:18歳まで可) 400 例
 ワクチン接種群: DTワクチン0.1ml 接種 40 例
 DTaPワクチン(0.2ml)を追加接種 36 例 X 5社
 DTaPワクチン(0.5ml)を追加接種 36 例 X 5社
 評価項目: 抗PT, FHA 抗体, 抗D, T抗体
 安全性

Study 2 安全性の検討

対象: DT接種時期(11-13歳:18歳まで可) 300 例
 ワクチン接種群: DTワクチン0.1ml 接種 36 例 X 5社
 DTaPワクチン(0.2ml)を追加接種 12 例 X 5社
 DTaPワクチン(0.5ml)を追加接種 12 例 X 5社
 評価項目: 安全性

DT 0.1ml: 220例
 DTaP 0.2ml: 240例
 DTaP 0.5ml: 240例

図1. 臨床試験の接種予定者の割り振り

2008年9月から臨床試験を開始しそのスケジュールを図2に示した。

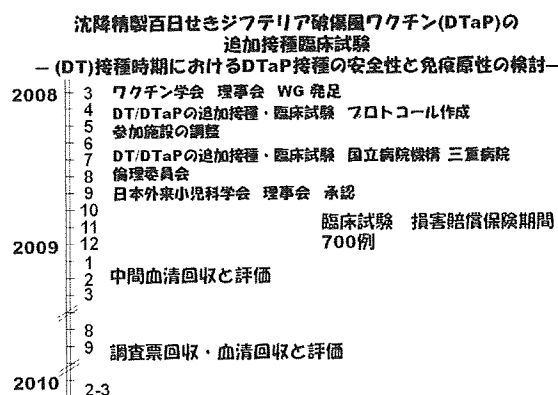


図2. 臨床試験のタイムスケジュール

2) 臨床試験

臨床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、DTaP 0.2ml群178例、DTaP 0.5ml群176例を対象とした(図3)。

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、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。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。

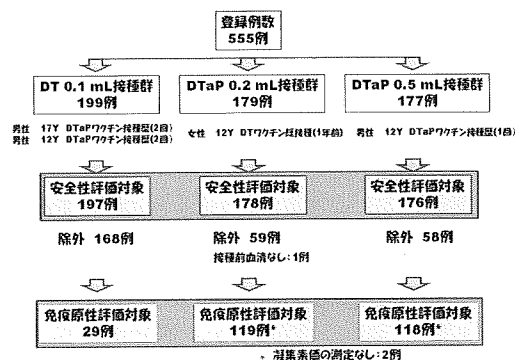


図3. 臨床試験参加者と安全性、有効性評価

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 1 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。アレルギー性の全身症状としてとして蕁麻疹は 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。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。

表 1. 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) (N=178)*	DTaP 0.5mL(2) (N=176)	DT 0.1mL(3) (N=197)	有害事象の出現頻度のリスク比		
				(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 (0.95, 1.54)	1.24 (0.98, 1.57)

有害事象の出現頻度の比

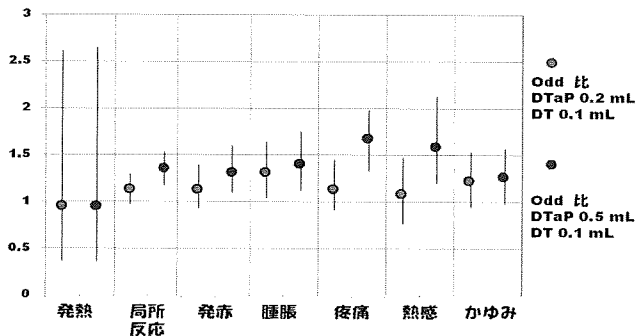


図 4. DTaP 0.2 ml, 0.5 ml 接種群と DT 0.1 ml 接種群の局所反応の出現率のリスク比

DTaP 0.2ml 接種群における局所反応の出現率は DT 0.1ml 接種後と比較するとリスク比は 1.13 で、DTaP 0.5ml 接種群では 1.34 と高くなる。個々の局所反応で 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 (図 4)。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 となり疼痛、熱感の出現率は 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。

2) 接種日毎の有害事象出現率

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 5 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。

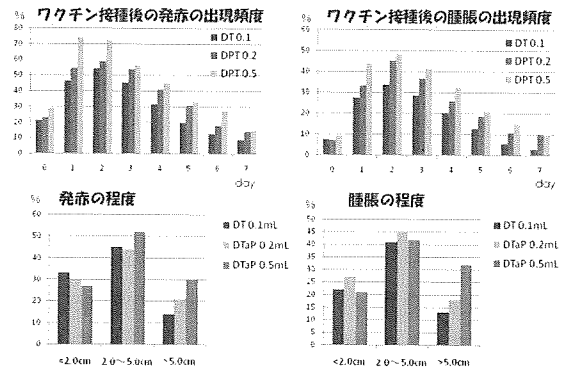


図 5. 接種日毎の発赤、腫脹の出現頻度と症状の程度

D. 考案

2007 - 08 年より学园内、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。

接種前後での感染防御レベル以上の抗体保有率は PT 抗体で 54%が 95-96%、FHA 抗体でも 82%から 98-100%と上昇し、ジフテリア、破傷風トキソイド抗体も有効抗体保有率は 100%と上昇した。接種後の百日咳抗体価は 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。

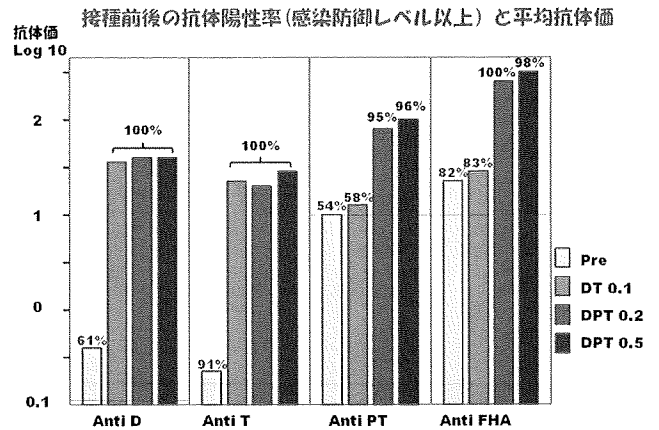


図6.ワクチン接種前後の抗体陽性率と平均抗体価

E. 結論

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関与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。

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—

臨床試験の結果

作成日：2.14.2009

ワクチン学会

ワクチン推進ワーキンググループまとめ

(神谷班、岡部班研究を含む)

【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 を接種することの抗体反応と安全性を検討した。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の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 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。

免疫原性の評価対象は DT 0.1ml 群 29 例、DTaP 0.2ml 群 119 例、DTaP 0.5ml 群 118 例であった。ジフテリア、破傷風トキソイド抗体、百日咳 PT、FHA 抗体を測定し感染防御レベル以上の抗体獲得率と接種後平均抗体価を検討した。ジフテリア抗体は接種前 61%から 3 群とも 100%、破傷風抗体は 91%から 100%、PT 抗体も 54%から 95%、FHA 抗体は 82%から 98-100%と良好な抗体反応を示し PT、FHA 抗体の平均抗体価には有意差は認めず、また、ジフテリアトキソイド抗体にも 3 群で差は認めなかった。破傷風トキソイド抗体価は DTaP 0.5ml 接種群は DTaP 0.2ml 接種群より高い抗体価を示したが DTaP 0.2ml 接種群は DT 0.1ml 接種群と同等であった。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。

近年成人の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ていない。また確実な診断法はなく遺伝子診断法も開発されてはいるが一般には普及してないための確か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。

【対象と方法】

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に示した。除外対象となった症例の詳細は参考資料 1 に示した。

接種試験は study 1 と 2 に分かれており以下の予定症例数であった。

Study 1; 免疫原性と安全性の検討 (予定症例数 400 例)

Study 2; 安全性のみの検討 (予定症例数 300 例)

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、DTaP 0.2ml 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。

免疫原性の評価対象は Study 1 参加者の DT 0.1ml 群 29 例、DTaP 0.2ml 群 119 例、DTaP 0.5ml

群 118 例が対象となった。

2) 安全性評価の方法

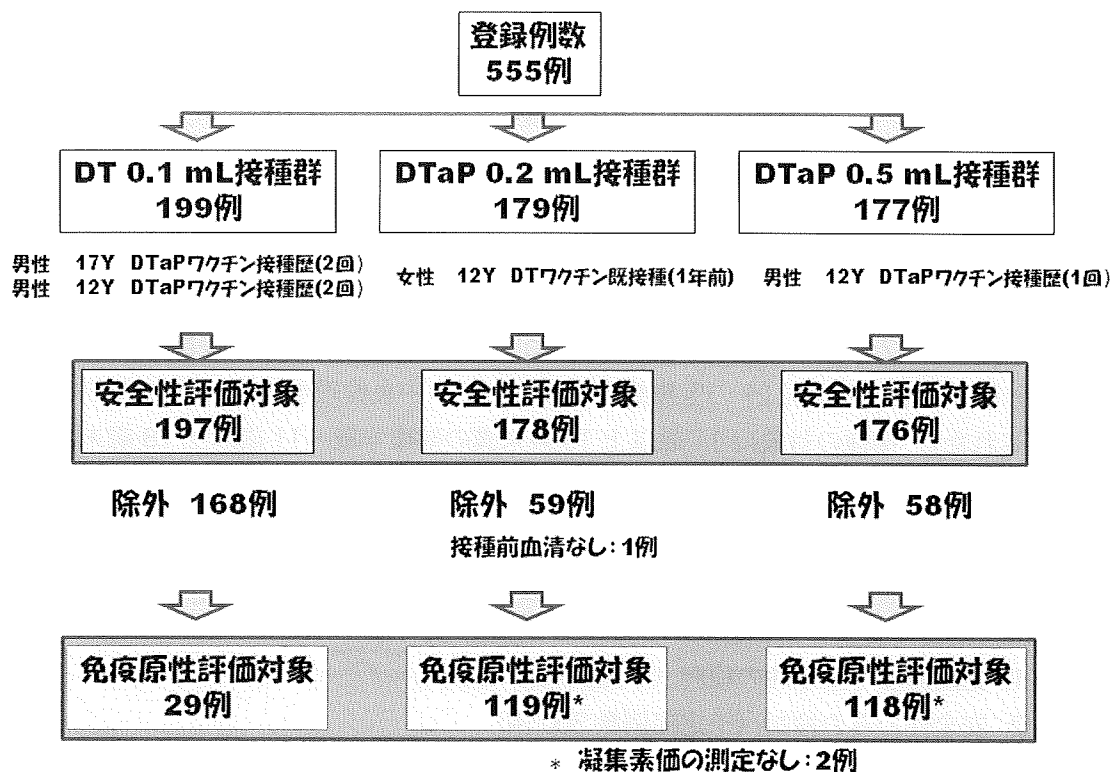
接種後健康観察日誌を保護者に渡し接種日を0日として8日間有害事象を観察してもらい、発熱、局所反応として発赤、腫脹、疼痛、熱感、かゆみは毎日観察し健康観察日誌に記載し、全身症状は出現したときに記載してもらった。健康観察日誌は4-6週後に回収した。有害事象の出現頻度はDT 0.1ml接種後に出現した頻度に対するリスク比で評価した。

3) 免疫原性の評価

採血前と4-6週後で採血し血清を分離して2本のセラムチューブに分注し-20℃以下で凍結保存した。検体は登録症例について連結匿名化でラベルし検査施設に送付しペア血清で測定した。

ジフテリアトキソイド抗体価、破傷風トキソイド抗体価は国立感染症研究所において市販キット(化血研)を用いて測定した。抗PT抗体価・抗FHA抗体価は北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所において市販ELISAキット(和光純薬)を用いて測定した。

感染防御レベルは抗ジフテリアトキソイド抗体価 ≥ 0.1 IU/mL、抗破傷風トキソイド抗体価 ≥ 0.01 IU/mL、抗PT抗体価 ≥ 10 EU/mL、抗FHA抗体価 ≥ 10 EU/mLと考えられている。抗体価を測定した全被験者数に対する「抗体価が感染防御レベル以上の被験者数」の割合(百分率)を抗体保有率としワクチン接種前後の抗体保有率、平均抗体価を比較した。



【結果】

1. 安全性の評価

1-1 安全性評価対象の背景

DT 0.1ml、DTaP 0.2ml、DTaP 0.5 ml 接種群で性差、年齢、過去の DPT 接種歴に偏りは認められなかった（参考資料 2）。

1-2 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 (95%CI; 0.97-1.30)で差は認めなかったが、DTaP 0.5ml 接種群では 1.34 (95%CI; 1.18-1.53)と DT 0.1ml 接種群より局所反応の出現率が高くなる。個々の局所反応として、発赤、腫脹、疼痛、熱感、かゆみの出現頻度を表に示した。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検定し 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 (95%CI; 1.04-1.65)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の出現頻度は 1.33 倍 (95%CI; 1.10-1.60) 、腫脹の出現頻度は 1.40 倍 (95%CI; 1.12-1.75)となり熱感、疼痛は 1.62 倍 (95%CI; 1.33-1.98)、1.59 倍(95%CI; 1.19-2.13)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。

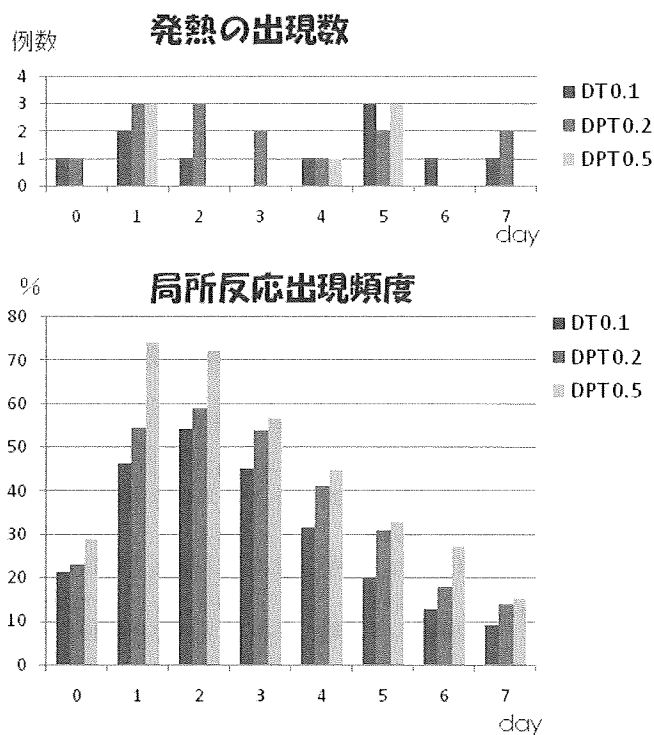
有害事象の出現頻度の比較

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 (0.95, 1.54)	1.24 (0.98, 1.57)

1-3 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に示した。発熱はDT 0.1ml 群で8例、DTaP 0.2ml 群で7例、DTaP 0.5ml 群で7例に認められ、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日後では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%)とDTaP 0.2 ml 接種群はDT 0.1ml 接種群に比べて局所反応の出現リスク比は 1.18 (95% CI; 0.96-1.44) で差は認めなかったがDTaP 0.5 ml 接種群での出現頻度のDT 0.1 ml 接種後に対するリスク比は 1.61 (95% CI; 1.35-1.92)と高く、接種2日後もDTaP 0.5 ml 接種群の局所反応のリスク比は 1.33 を示し、各接種日毎の局所反応出現頻度はDTaP 0.5 ml 接種群で高くなる。（参考資料 3-1、3-2）



全身症状としての報告例数

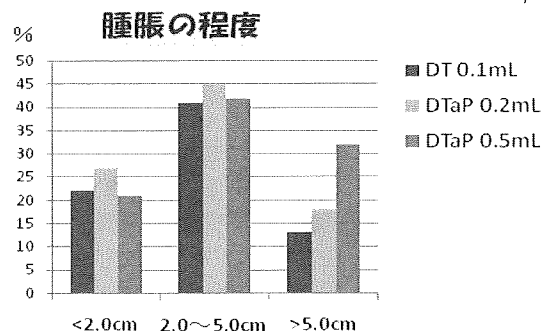
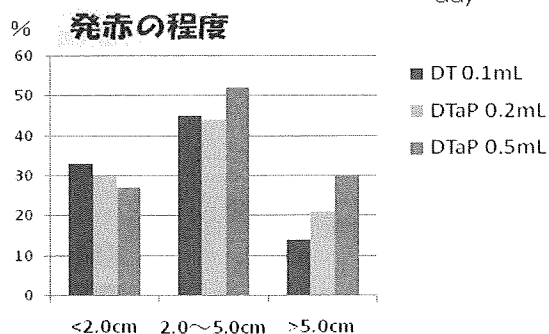
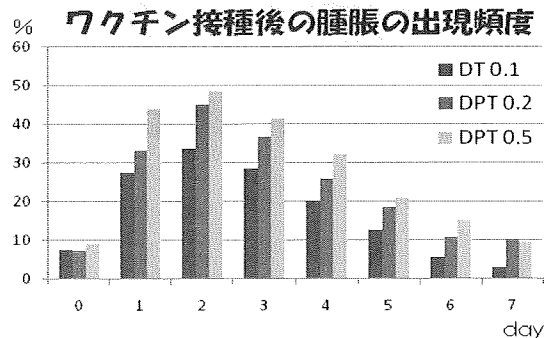
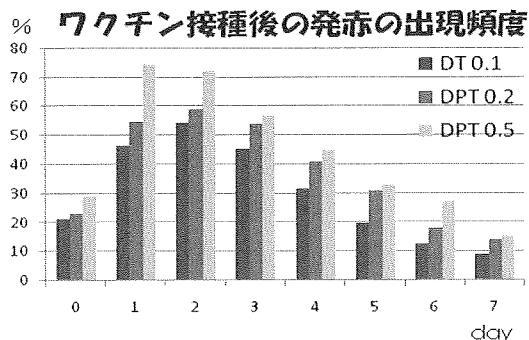
頭痛 25例
 倦怠感 11例
 鼻汁 10例
 咽頭痛 8例
 鼻つまり感冒 7例
 咳 7例
 嘔吐下痢 5例
 気分不快 2例
 胸痛 1例
 喘息発作 1例

蕁麻疹 3例
 day 0, 0, 3
 全身発赤 1例
 day 1

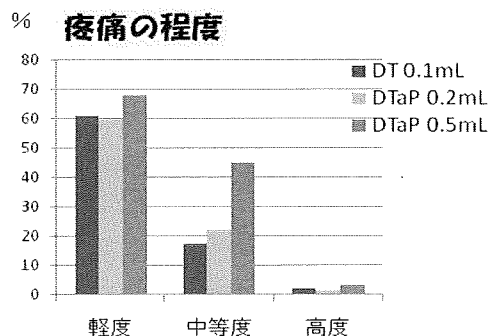
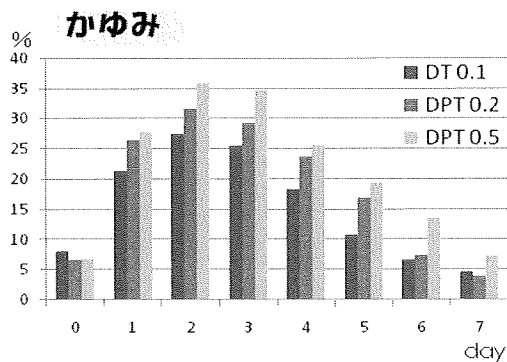
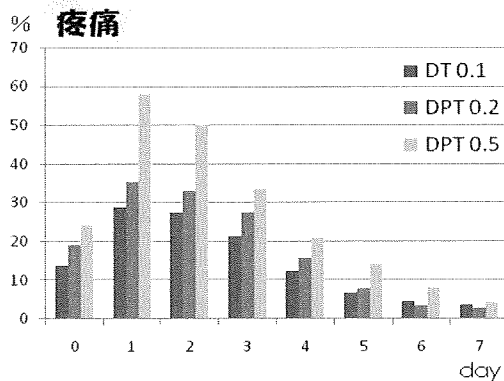
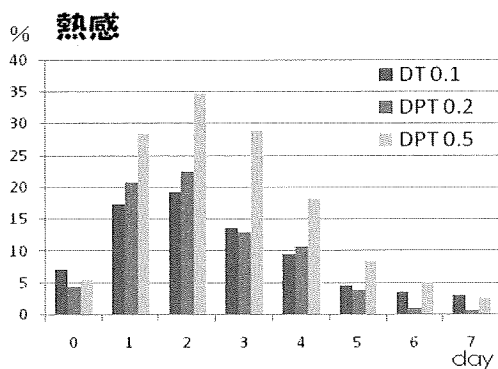
安全性評価対象
 DT 0.1mL 197例
 DTaP 0.2mL 178例
 DTaP 0.5mL 176例

有害事象の発現日と持続日数を調べたがすべての局所反応は接種当日、翌日に出現し多くの症例は3-4日間持続し、腫脹は長く残る傾向がみられた。（参考資料 4）

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に示した。接種 1-2 日で出現頻は高くなり 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。



疼痛と熱感の接種日毎の出現頻度を図に示した。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。



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 は 1.62 倍、1.59 倍と高くなる。

有害事象の出現頻度の比

