

当院での入院患者における細菌検出の調査□手術予定患者における 補中益気湯の内服による影響研究ための予備的検討

研究分担者 並木隆雄 千葉大学大学院医学研究院和漢診療学講座 准教授

研究要旨

入院を対象に、当院における鼻腔・喀痰・尿中等における MRSA など多剤耐性菌保菌者を含む菌の検出傾向とそれらの菌における抗生物質の感受性の動向を調べた結果、特に皮膚や喀痰で MRSA が検出されやすく、それらの部位に関連した手術や病巣を持つ患者に大きな問題になることが判明した。

A. 研究目的

手術前の患者でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）などの剤耐性菌保菌者があることはしばしば経験する。特に免疫の低下している患者や高齢者では、手術後の経過にも影響があることが多い。これらの保菌者の抗菌剤による除菌は、困難な場合がある。

次年度に「MRSA などの多剤耐性菌保菌者における手術患者予定者を対象とした補中益気湯の内服による除菌効果（自然免疫に及ぼす影響）と術後回復に及ぼす影響」を検討するため、以下の予備的検討を行った。

B. 研究方法

対象□社会保険群馬中央総合病院和漢入院を対象に、当院における鼻腔・喀痰・尿中等における MRSA など多剤耐性菌保菌者を含む菌の検出傾向とそれらの菌における抗生物質の感受性の動向を調べ、経年的な変化も検討して、背景調査をした。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、「ヘルシンキ宣言」

ならびに厚生労働省の「疫学研究に関する倫理指針」（平成 14 年 6 月 14 日策定、平成 20 年 12 月 1 日一部改訂）を遵守し行った。

C. 研究結果

1) 当院における MRSA などの多剤耐性菌保菌者を含む菌の検出傾向の検索
喀痰・皮膚・尿中等における MRSA の割合と抗菌剤に対する感受性の年次推移の検討。

2009 年の患者における培養結果（表 1）□全検体では MRSA 12% と最も多く、緑膿菌 11%、腸球菌 9%、大腸菌 8% などであった。内訳では喀痰（表 2）において、MRSA が 27% と最も多く、以下緑膿菌は 20%、肺炎球菌 8%、MSSA 8%、インフルエンザ菌 7%、などである。自力で喀痰せずに吸引痰では、緑膿菌と MRSA は入れ変わっており、緑膿菌 29% と最も多く MRSA は 11%、インフルエンザ菌 8%、MSSA 7% と上位 4 種類は変わらない。尿（表 3）では大腸菌 25%、緑膿菌 15%、腸球菌 15%、肺炎桿菌 7% で MRSA 4% と少ないことが判明した。皮膚軟部（表 4）では MRSA 15%、MSSA 12%、緑膿菌 10%、腸球菌 7% と球菌が多かった。また、血液培養（表 5）

では MRSA は 7% で 3 位、胆道系(表 6)では 4% で 8 位と少ない傾向であった。

2) 年次推移(表 1～6)：2005 年と 2009 年の菌検出を比較した。入院全体では 2005 年緑膿菌 19% に対し MRSA 16% で MRSA の比率が少なかった。喀痰で緑膿菌 19% に対し MRSA が 16% と少なく、最近 MRSA が増加してきているのがわかる。尿では MRSA 3% と少ないのに対し、皮膚軟部では MRSA 12%、緑膿菌 11%、MSSA 10% と変化がないのがわかった。

3) 抗菌薬の使用状況に関して：MRSA はバンコマイシン、リファンピシンなど限られた抗菌薬しか効かないが、2005 年と 09 年間では大きな年次変化はなかった。この間の抗菌薬の使用傾向は変わりなく、上記年次推移は抗生物質の変化によるものではないと推測された。

4) 外来と入院での MRSA 分離状況 (2009 年)(図 1) MRSA と MSSA の合計でのうち MRSA の占める割合を検討した。外来での 380 検体で MRSA は 17% の検出であったのに対し、入院では 649 検体で 44% と高値であった。

D. 考察

入院患者での、MRSA 菌の検出の割合は外来における MRSA の検出の約 2.5 倍であった。すなわち、入院患者では薬剤耐性菌の割合が高く、よりリスクが高い患者が多い結果であった。この間の抗菌薬の使用傾向は変わりなく、上記年次推移は抗生物質の変化によるものではないと推測された。また、部位別では、MRSA は喀痰や皮膚軟部組織からの検出が多い傾向にあった。次年度以降は、皮膚に関連した手術領域の患者とくに、形成外科領域における皮膚 MRSA 感染者における漢方薬による除菌効果の検討および周術期の合併症の検索をすることとしている。抗生物質を用いると菌交代を生じさせることが知られる。漢方薬を用いて、除菌の成功やそれに付随して栄養・免疫の

改善を認めた場合、少なくとも菌交代現象は生じない可能性が少なく、これらの部位の MRSA 有菌者においては、漢方薬の MRSA に対する有用性を検討することは意義深いと考えられた。

E. 結論

入院患者においては特に皮膚や喀痰で MRSA が検出される割合が多い。そのため、それらの部位に関連した手術や病巣を持つ患者に、手術侵襲時や免疫の低下する事象が加わるとリスク増大などの問題が生じることが多いことが判明した。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

(表1)全検体からの分離菌種 (入院)

	2005 年	2009 年
第 1 位	P.aeruginosa 12%	MRSA 12%
第 2 位	MRSA 9%	P.aeruginosa 11%
第 3 位	E.faecalis 9%	E.faecalis 9%
第 4 位	S.epidermidis 8%	E.coli 8%
第 5 位	E.coli 6%	MSSA 6%
第 6 位	MSSA 5%	S.epidermidis 6%
第 7 位	K.pneumoniae 4%	K.pneumoniae 4%
第 8 位	E.cloacae 3%	E.cloacae 3%
第 9 位	H.influenzae 3%	S. maltophilia 3%
	その他 41%	その他 39%

(表2)喀痰からの分離菌種

	2005 年	2009 年
第 1 位	P.aeruginosa 19%	MRSA 26%
第 2 位	MRSA 16%	P.aeruginosa 19%
第 3 位	H.influenzae 13%	S.pneumoniae 9%
第 4 位	S.pneumoniae 10%	MSSA 8%
第 5 位	MSSA 6%	H.influenzae 7%
第 6 位	S..maltophilia 5%	S..maltophilia 5%
第 7 位	K.pneumoniae 5%	K.pneumoniae 5%
第 8 位	B.catarhalis 5%	E.coli 4%
第 9 位	S.marcescens 3%	E. cloacae 3%
	その他 18%	その他 14%

(表 3)尿からの分離菌種

	2005 年		2009 年	
第 1 位	E.faecalis	18%	E.coli	25%
第 2 位	P.aeruginosa	17%	P.aeruginosa	15%
第 3 位	E.coli	15%	E.faecalis	15%
第 4 位	K.pneumoniae	5%	K.pneumoniae	7%
第 5 位	E.cloacae	4%	E.cloacae	5%
第 6 位	E.faecalis	4%	MRSA	4%
第 7 位	S.epidermidis	3%	P. mirabilis	3%
第 8 位	S.marcescens	2%	E.faecium	3%
第 9 位	MRSA	2%	S.epidermidis	2%
	その他	30%	その他	21%

(表 4)皮膚軟部組織からの分離菌種

	2005 年		2009 年	
第 1 位	MRSA	12%	MRSA	15%
第 2 位	P.aeruginosa	11%	MSSA	12%
第 3 位	MSSA	10%	P.aeruginosa	10%
第 4 位	S.epidermidis	9%	E.faecalis	7%
第 5 位	E.faecalis	8%	S.epidermidis	5%
第 6 位	E.coli	4%	E.coli	4%
第 7 位	S.marcescens	3%	E.faecium	3%
第 8 位	E.cloacae	2%	E.cloacae	3%
第 9 位	K.pneumoniae	2%	S. marcescens	2%
	その他	39%	その他	39%

(表5)血液からの分離菌種

	2005年		2009年	
第1位	S.epidermidis	16%	S.epidermidis	14%
第2位	E.coli	9%	E.coli	13%
第3位	MRSA	7%	MRSA	7%
第4位	K.pneumoniae	7%	P.aeruginosa	6%
第5位	MSSA	6%	E.faecalis	5%
第6位	E.faecalis	5%	K.pneumoniae	5%
第7位	P.aeruginosa	5%	MSSA	5%
第8位	E.faecium	4%	S.hominis	5%
第9位	B.cereus.	3%	S.ureolyticus	3%
	その他	39%	その他	37%

(表6)胆道系からの分離菌種

	2005年		2009年	
第1位	E.faecalis	11%	E.faecalis	16%
第2位	P.aeruginosa	9%	P.aeruginosa	8%
第3位	K.pneumoniae	7%	S.epidermidis	6%
第4位	E.cloacae	6%	E.faecium	6%
第5位	E.faecium	5%	K.pneumoniae	5%
第6位	A.hydrophilia	5%	K.oxytoca	4%
第7位	C.freundii	5%	E.coli	4%
第8位	K.oxytoca	4%	MRSA	4%
第9位	S.epidermidis	3%	E.cloacae	4%
	その他	45%	その他	43%

(図1) 当院のMRSA分離状況 2009年



十全大補湯によるヒトパピローマウィルスワクチンワクチン 接種時の副作用軽減効果およびアジュバント効果に関する研究

研究分担者 斎藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部（医学）産科婦人科学 教授
日高 隆雄 同上 准教授

研究要旨

ヒトパピローマウィルスワクチンによる子宮頸がん予防効果が実証され、本邦の実臨床においても広く使用されようとしている。しかし、その副作用として局所（注射部位）の特定した症状（疼痛、発赤、腫脹）および全身性の特定した症状（疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、蕁麻疹、失神）が報告されているが、有効な治療は確立されておらず、これらを改善する方法が期待される。それらの副作用軽減に対する漢方薬の効果に関するエビデンスはない。そこで、ワクチン接種時の副作用軽減に関する漢方薬（十全大補湯）の併用効果を漢方薬非投与症例と比較検討し、その効果を明らかにする。同時に十全大補湯によるヒトパピローマワクチンのアジュバント効果の有無も明らかにする。

A. 研究目的

ヒトパピローマウィルスワクチンによる子宮頸がん予防効果が実証され、本邦の実臨床においても広く使用されようとしている。しかし、その副作用として局所（注射部位）の特定した症状（疼痛、発赤、腫脹）および全身性の特定した症状（疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、蕁麻疹、失神）が報告されているが、有効な治療は確立されておらず、これらを改善する方法が期待される。それらの副作用軽減に対する漢方薬の効果に関するエビデンスはない。そこで、ワクチン接種時の副作用軽減に関する漢方薬（十全大補湯）の併用効果を漢方薬非投与症例と比較検討し、その効果を明らかにする。同時に十全大補湯によるヒトパピローマワクチンのアジュバント効果の有無も明らかにする。

B. 研究方法（図1）

1) 富山大学医学部附属病院産婦人科外来受診女性で自由意志により本研究に対しての参加の同意が文書にて得られている健康女性（登録時の年齢が18歳以上～30歳以下）を対象とした。なお、対象者の適格規準としては一般状態がよく、主要臓器（心、肝、腎など）の機能が保持されている者とし、また、除外規準としては、明らかな発熱（37.5℃以上）を呈している者、重篤な急性疾患にかかっていることが明らかな者、本剤の成分に対して過敏症を呈したことがある者、血小板減少症や凝固障害を有する者、心臓血管系・腎臓・肝臓・血液疾患、発育障害等の基礎疾患を有する者、痙攣の既往のある者、免疫不全の診断がなされている者、及び近親者に先天性免疫不全症の者がいる者、妊婦又は妊娠している可能性のある婦人、授乳婦、その他、担当医師が

本試験を安全に実施するのに不適当と判断したものとした。

漢方薬（十全大補湯医療用エキス；1日量7.5g）投与群と対照群（漢方薬非投与群）の2群に無作為に振り分ける（無作為化比較試験）。漢方薬投与群50例と対照群50例の総計100例を予定症例数とした。

十全大補湯はワクチン接種1ヶ月前から接種後1ヶ月まで投与し、登録時、ワクチン接種時、接種1ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月、36ヶ月後の各調査項目を測定し、漢方薬非投与者と比較検討する。今回、検討に用いる漢方薬は体力低下、疲労倦怠、冷え、貧血等の適応があり、既承認薬の適応内使用である。

ヒトパピローマウィルスワクチンは1回0.5mLを0、1、6ヵ月後に3回、上腕の三角筋部に筋肉内接種する。

2) 調査項目は副反応の軽減の有無を局所（注射部位）の特定した症状（疼痛、発赤、腫脹）および全身性の特定した症状（疲労、筋肉痛、頭痛、胃腸症状、関節痛、発疹、発熱、蕁麻疹）に分けて症状日記（別紙参照）を被験者に記載してもらうこととした。血液検体は生化学検査（BUN、Cre、GOT、GPT、 γ -GTP）および免疫学的検査（HPV抗体価）の測定に用いる。

（倫理面への配慮）

本研究は富山大学倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

上記臨床研究プロトコールを整備した。本臨床研究遂行にあたり、中高生へのヒトパピローマウィルスワクチンの無料接種が国内でひろく行われたこと、かつ、3月の東日本大震災の影響によりヒトパピローマウィルスワクチンの確保が平成22年度内で困難になった。現在、安定的なワクチン供給が可能になるまでプロトコール開始

を待機している状況である。（平成23年7月頃に供給安定との情報あり）

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

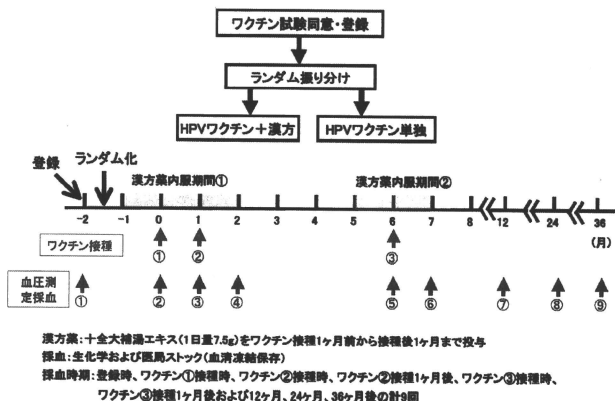
G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. 試験の概要



全身性の症状

現れた症状を以下に示された尺度に従って記入してください。
 大きさ: 最大の値を付けてください(ミリメートル mm)

体温: 毎晩、体温を測り、記入してください。1日に1回以上測った場合は最高の体温を記入してください。	凍瘡(じふましん)
疲労感、頭痛、胃痛(心臓、喉、下痢または腹痛を含む)、関節痛(肘関節より末梢のみ)	0: なし 1: 体の1ヶ所に凍瘡が発生 2: 体の2ヶ所に凍瘡が発生 3: 体の4ヶ所以上に凍瘡が発生
0: なし 1: 容易に癒える程度の症状 2: 日常生活に支障がある程度の症状 3: 日常生活が妨げられるほどの症状	

全身性の症状	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	6日目以降も継続しましたか?	症状が最後に 出た日(年月日)	医師の診察を 受けましたか?
体温 - C: □) 朝体温 □) 夜体温								□) いいえ □) はい □) わからない □) 不明	年 月 日	□) いいえ □) はい
疲労感 一強さ:								□) いいえ □) はい □) わからない	年 月 日	□) いいえ □) はい
頭痛 一強さ:								□) いいえ □) はい □) わからない	年 月 日	□) いいえ □) はい
胃痛(心臓 一強さ):								□) いいえ □) はい □) わからない	年 月 日	□) いいえ □) はい
関節痛 一強さ:								□) いいえ □) はい □) わからない	年 月 日	□) いいえ □) はい
筋肉痛 一強さ:								□) いいえ □) はい □) わからない	年 月 日	□) いいえ □) はい
発疹 一強さ:								□) いいえ □) はい □) わからない	年 月 日	□) いいえ □) はい
凍瘡 一強さ:								□) いいえ □) はい □) わからない	年 月 日	□) いいえ □) はい
その他の症状								□) いいえ □) はい	年 月 日	□) いいえ □) はい

症状日記

お名前 _____ 生年月日(昭和、平成) _____ 年 _____ 月 _____ 日 受診カード番号 _____

第(1, 2, 3)回目ワクチン接種 ワクチン接種日 平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日 (=0日目)

注射した部位に現れた症状

注射した部位に現れた症状を以下に示された尺度にしたがって記入してください。

大きさ：最大の直径を計ってください(ミリメートル：mm)。

注射した部位の痛み：	0：なし
	1：触ると痛い
	2：腕を動かすと痛い
	3：日常生活を妨げるほど痛い

注射した部位の症状	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	6日目以降も症状が続きましたか？	症状が最後に 出た日(年月日)	医師の診察を 受けましたか
注射した部位の 発赤 →大きさ(mm)								<input type="checkbox"/> いいえ <input type="checkbox"/> はい	年 月 日	<input type="checkbox"/> いいえ <input type="checkbox"/> はい
注射した部位の 腫れ →大きさ(mm)								<input type="checkbox"/> いいえ <input type="checkbox"/> はい	年 月 日	<input type="checkbox"/> いいえ <input type="checkbox"/> はい
注射した部位の 痛み →強さ								<input type="checkbox"/> いいえ <input type="checkbox"/> はい	年 月 日	<input type="checkbox"/> いいえ <input type="checkbox"/> はい

漢方ワクチンアジュバント開発のための 子宮内膜粘膜免疫におけるNK細胞の役割に関する研究

研究分担者 齋藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部（医学）産科婦人科学 教授
日高 隆雄 同上 准教授

研究要旨

異物である胎児が着床する部位の子宮の免疫系を検討することは、粘膜免疫の理解を深めることになる。我々はマウス白血病細胞 WEHI 3B を輸注するという白血病モデルを作製すると、1ヶ月後にCD25+NK細胞が増加し、このNK細胞は樹状細胞のMHC class II 抗原を減少させ、CTL 誘導を阻害することを報告した（J. Immunol 2006 : 176:4113-24）、妊娠マウスで検討すると、CD25+NK細胞は末梢血では増加しないが、妊娠子宮では80%以上がCD25+NKであった。しかも、これらNK細胞はIL-10、TGF β を高率に発現していた。NOD/SCIDマウスにBALB/C由来CD4+CD25+細胞のみ除去したリンパ球を輸注してTreg欠損マウスを作製した。同Treg欠損♀マウスをB6マウスと交配させると、33.8%に流産が生じた。一方、妊娠BALB/Cもしくは妊娠NOD/SCIDマウス子宮から分離したCD25+NK細胞をTreg欠損マウスに輸注し、B6マウスと交配させると、流産率はそれぞれ9.1%、5.7%に減少した。またNK細胞しか存在しないNOD/SCIDマウスに、抗CD25抗体を投与し、B6と交配させると、流産率は60%に増加した。以上よりCD25+NK細胞はアロ妊娠維持に重要な役割を果たすことが示された。

A. 研究目的

本研究班の目的は、粘膜免疫を理解し、粘膜ワクチン等の開発にある。このためには粘膜免疫を知ることが必要になる。子宮は上皮に被われており、子宮内腔には分泌物が分泌され、粘膜臓器となっており微生物等の防御を担っている。一方、子宮内には半異物 (semiallograft) である胎児が着床し、胎児を許容するシステムも存在する。子宮内の免疫担当細胞の主体を占めるのは、NK細胞であり約70-80%を占め、T細胞は10%程度しか存在しない。そこで、NK細胞のアロ妊娠に果たす役割を検討した。

これまでの知見として、白血病モデルではCD25+Thy1+c-kit+NK細胞が増加し、この

NK細胞は樹状細胞上のMHC class II分子発現を減少させ、CTL誘導を抑制することが知られている（J. Immunol 2006 : 176 : 4113-24）。そこで、妊娠子宮に同様のNK細胞が増加するか、また、これらのNK細胞はアロ妊娠維持にどのような役割を果たすかを検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は基礎研究であり、動物倫理として富山大学実験動物研究規則に準じて実施した。

C. 研究結果

1. 妊娠時におけるNK細胞分画の変化

非妊娠時末梢血では、CD25+NK 細胞、c-kit+NK 細胞は $5.0 \pm 1.2\%$ 、 $2.2 \pm 0.5\%$ しか認めなかった。妊娠 13.5 日目の末梢血でも同様であったが、妊娠子宮には CD25+NK 細胞が $87.3 \pm 6.7\%$ と著増し、c-kit+NK 細胞も BALB/C で $13.3 \pm 2.4\%$ 、NOD/SCID マウスで $93.3 \pm 3.4\%$ と増加した。

2. NK 細胞の細胞内サイトカイン (IFN γ 、IL-4、TGF β 、IL-10)

末梢血 NK 細胞ではサイトカインの変化はなかったが、妊娠子宮 NK 細胞中の TGF β +NK 細胞、IL-10+NK 細胞がそれぞれ $11.1 \pm 2.1\%$ 、 $66.6 \pm 5.7\%$ と非妊娠時の値 ($1.6 \pm 1.1\%$ 、 $3.9 \pm 1.5\%$) に比して有意に増加していた。

3. Treg 欠損マウスにおけるアロ妊娠時の流産率

Treg 欠損 NOD/SCID マウスに B6 を交配させると流産率は 33.8% に増加した。一方 NOD/SCID 妊娠マウス、BALB/C 妊娠マウスから純化した CD25+NK 細胞を輸注すると、流産率はそれぞれ 5.7%、9.1% まで減少した。一方、BALB/C 由来 CD25-NK 細胞を輸注した際の流産率は 21.9% と減少を認めなかった。

4. BALB/C \times B6、NOD/SCID \times B6 交配に抗 CD25 抗体投与した際の流産率

BALB/C \times B6 の流産率は 5.4% であったが、抗 CD25 抗体投与により 24% に流産率が高まった。一方、NOD/SCID \times B6 の流産率は 18.8% であったが、抗 CD25 抗体投与により 65% にまで流産率が増加した。

D. 結論

妊娠子宮には CD25+NK 細胞が増加し、これら NK 細胞は TGF β や IL-10 を産生し、免疫抑制に作用する。Treg 細胞を欠損するマウスではアロ妊娠させると流産率が増加するため、Treg 細胞はアロ妊娠維持に重要である。しかし、CD25+NK 細胞を輸注すると流産率が減少したので、Treg 以外にも CD25+NK 細胞がアロ妊娠維持に有用な役割を果たしていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Molvarec A., Shiozaki A., Ito M., Toldi G., Stenczer B., Szarka A., Nakashima A., Vásárhelyi B., Rigó J. Jr., Saito S. Increased prevalence of peripheral blood granulysin-producing cytotoxic T lymphocytes in preeclampsia. J Reprod Immunol in press.
- 2) Saito S., Nakashima A., Shima T.: Future directions of studies for recurrent miscarriage associated with immune etiologies. J Reprod Immunol. in press.
- 3) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y.: Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., Nature Nanotechnology. 6:321-328, 2011. (Epub ahead of print)
- 4) Molvarec A, Blois M S, Stenczer B, Toldi G, Tirado-Gonzalez I, Ito M,

- Shima T, Yoneda S, Vásárhelyi B, Rigó J., Saito S. Peripheral blood galectin-1-expressing T and natural killer cells in normal pregnancy and preeclampsia. *Clin. Immunol* 139:48-56, 2011.
- 5) Lin Y., Li C., Shan B., Wang W., Saito S., Xu J., Di J., Zhong Y., Li D.J.: Reduced stathmin-1 expression in NK cells associated with spontaneous abortion. *Am J Pathol.* 178:506-514, 2011.
- 6) Nakashima A., Ito M., Yoneda S., Shiozaki A., Hidaka T., Saito S.: Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am J Reprod Immunol.*, 63: 104-109, 2010.
- 7) Nakashima A., Ito M., Shima T., Bac N.D., Hidaka T., Saito S.: Accumulation of IL-17-positive cells in decidua of inevitable abortion cases. *Am J Reprod Immunol.* 64: 4-11, 2010.
- 8) Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K., Saito S.: Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance during early stage of pregnancy, but not necessary during late stage of pregnancy in allogeneic mice. *J. Reprod Immunol*, 85: 121-129, 2010.
- 9) Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M.: Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 63: 601-610, 2010.
- 10) Saito S., Shima T., Nakashima A., Lin Y.: Immune surveillance during pregnancy. *Ind. J. Physiol. Pharmacol.*, 54:60-63, 2010.
- 11) 島 友子, 中島彰俊, 齋藤 滋: 胎盤と免疫. *周産期医学*, 40: 1037-1042, 2010.
- 12) 齋藤 滋, 中島彰俊, 島 友子: 妊娠と免疫. *周産期医学*, 40: 1569-1573, 2010.
2. 学会発表
- 1) Saito S.: Regulatory T and NK cells during pregnancy. 2010 Vietnam Immunology meeting, 2010, 3, 4-5, Hanoi, Vietnam. (Invited lecture)
- 2) Saito S.: Regulatory T and NK cells during pregnancy. Lecture at Fudan University, 2010, 4, 8-11, Shanghai. (Invited lecture)
- 3) Saito S.: Immunoregulation in human and mouse pregnancy. *Immunologie van de voortplanting* 2010, 2010, 5, 26, Netherlands. (Invited lecture)
- 4) Saito S.: The role of regulatory NK cells and regulatory T cells in the maintenance of pregnancy. XI International Congress of Reproductive Immunology, 2010, 8, 15-19, Queensland, Australia. (Invited lecture)
- 5) Saito S., Shima T., Nakashima A.: Beyond Th1/Th2 - Leucocyte polarization in pregnancy. 8th

- European Congress on Reproductive Immunology, 2010, 11, 11-14, Munich, Germany. (Invited lecture)
- 6) Saito S: Paternal antigen specific Treg cells proliferate in uterine draining lymph nodes before the implantation and in the uterus after the implantation. 2010.11.29-12.2, Shanghai, China. (Invited lecture)
- 7) Shima T., Ito M., Nakashima A., Saito S.: Paternal antigen specific regulatory T cells proliferate in the draining lymph nodes before the implantation and proliferate in the uterus after the implantation, and are necessary for maintenance of allogeneic pregnancy. 30th American Society Reproductive Immunology Annual Meeting, 2010, 5, 17-20, Pittsburgh. (Travelers award 受賞)
- 8) Shima T., Ito M., Nakashima A., Saito S.: Paternal antigen specific regulatory T cells proliferate in the draining lymph nodes before the implantation and proliferate in the uterus after the implantation. XI International Congress of Reproductive Immunology, 2010, 8, 15-19, Queensland, Australia. (Travelers award 受賞)
- 9) 齋藤 滋、島 友子、中島彰俊:アロ妊娠維持には制御性 T (Treg) 細胞のみならず、制御性 NK (NKreg) 細胞も重要な役割を果たす. 第 63 回日本産科婦人科学会、(高得点演題)

3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント療法に 関する臨床試験の計画及び統計解析に関する研究

研究分担者 折笠 秀樹 富山大学大学院バイオ統計学・臨床疫学 教授
協力研究者 熊谷 直子 高知大学医学部附属病院臨床試験センター 助教

研究要旨

- 1) 臨床試験「高齢者に対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント効果ならびに臨床効果の検討」のプロトコル立案へ支援をした。
- 2) 上記臨床試験のランダム割り付け法ならびに症例数について、助言ならびに提案をした。
- 3) 市販ソフト「割付君」の準備をし、パラメータ設定などの支援をした。
- 4) 抗体価検査データの今後の統計解析へ向けて、所定の様式でデータを入手した後の作業手順を考案した。特に、共分散分析及び混合効果モデルの解析を柔軟に行える準備をし、現在ある健康人でのデータを用いて実証した。

A. 研究目的

われわれの任務は、漢方薬によるアジュバント療法の臨床効果ならびに抗体価への影響を検証するための臨床試験の計画・解析に関する支援をし、結果的に質の高い研究成果を得ることが目標である。今年度は、一つの臨床試験に関してプロトコル立案への支援を行い、ランダム割り付け法ならびに症例数設計について支援をした。さらに、今後の解析（共分散分析ならびに混合効果モデル解析）を行うための処理手順を明示することを目的とした。

B. 研究方法

ランダム割り付けについては、ウェブによる症例登録も同時に行えるシステムを開発した。実際には、市販ソフト「割付君」に必要なパラメータ設定を行った。さらに、抗体価検査データの統計解析の作業手順に

ついては、現在ある健康人でのデータを用いてテストした。

（倫理面への配慮）

本研究は富山大学倫理委員会の承認済みの臨床研究情報を用いて遂行した。

C. 研究結果

高齢者に対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント効果ならびに臨床効果の検討をするための臨床試験に関して、プロトコル立案に際して支援をした。具体的には、ランダム割り付けの手法として最小化法という動的割り付け法を提案した。症例数についても、除菌率の予想値を参考にして1群50例、合計100例という設計を行った。

割り付けシステムとしては、市販ソフトである「割付君」を採用した。そのパラメ

ータ設定に関しては、年齢（80歳未満か80歳以上で二分）、寝たきり度（C1-C2かそれ以外で二分）、栄養摂取方法（経管か経口で二分）の3因子を採用した。さらに、登録時に入力するデータ項目についても検討した。その結果、施設、担当医、性別、年齢、身長、体重、入所期間、原疾患（選択方式）、主な合併症（選択方式）、介護度、寝たきり度、日常生活動作、栄養摂取方法をうえぶ入力することに決定した。

抗体価検査データの統計解析の作業手順については、健康人に対して取られた数種類の抗体価（グループ別、0, 2, 4, 6, 10, 14週時の経時測定）データ（Excelで提供）を用いて検討した。まず、時間推移を示すグラフ（2群比較）を付録Aのように出力できるようにした。また、ExcelデータをJMPという統計ソフトへ変換し、その後JMPソフトを用いて共分散分析へ移行できるようにした（付録Bに、新株H1N1抗体価での結果を提示）。さらに、Excelデータを行列展開した後でJMPソフトへ変換し、JMPソフトを用いて混合効果モデル分析を行えるよう、その処理手順を整備した（付録Cに、新株H1N1抗体価での結果を提示）。

D. 考察

今年度は1つの臨床試験（高齢者に対する漢方薬のインフルエンザワクチンアジュバント効果ならびに臨床効果の検討）に関して、プロトコル立案の支援（割り付け法ならびに症例数設計など）を行った。また、今後頻繁に出現すると思われる抗体価の経時測定データに関して、統計解析（推移図描写、共分散分析、混合効果モデル分析）を柔軟にできるような作業手順を整備した。このことにより、来年度以降、各臨床試験で入手される抗体価を群間比較するための統計解析を実施できる体制を築いた。来年度は、複数個の臨床試験が開始される予定であり、それらの臨床試験の計画ならびに

統計解析を支援していく。

E. 結論

臨床試験の計画ならびに統計解析を支援するための作業手順を今年度は確立したので、来年度以降は複数個の臨床試験でそれを運用していく。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

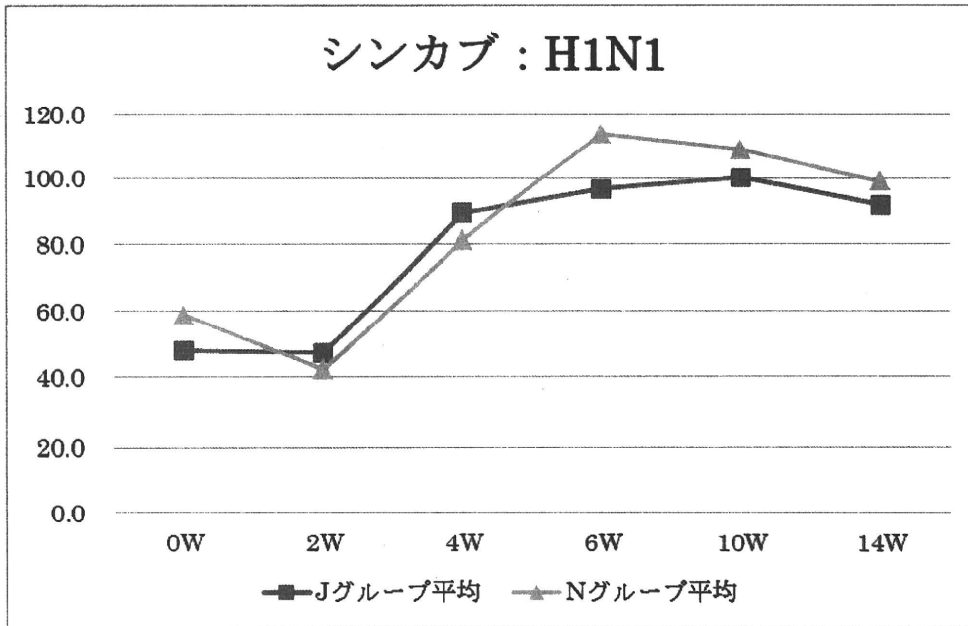
1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

付録A 抗体価に関する時間推移の群間比較（「EXCEL」による）

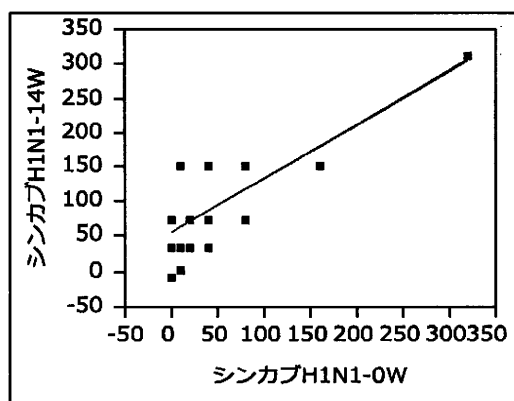
時点を横に展開したデータ様式から、時点・群別の平均値を求め、それを図示した。
なお、検出限界以下（<10）については、ゼロとして処理した。



付録B 抗体価に関する共分散分析による群間比較(市販ソフト「JMP」による)

時点を横に展開したEXCELデータをカンマ区切りcsvファイルへ保存し直し、それを統計ソフト「JMP」で読み込んだ。モデルのあてはめを選択し、14週時点のデータをY変数に設定し、0週時点(ベースライン)データを説明変数に設定し、さらにグループ識別変数も説明変数に含めたのち、実行した結果を示した。

シンカブH1N1



J
N

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob> t)
切片	53.143384	10.90188	4.87	<.0001*
シンカブH1N1-0W	0.7869248	0.133601	5.89	<.0001*
Group[J]	0.6252154	8.28649	0.08	0.9404

Analysis of Covariance, P=0.94

付録C 抗体価に関する混合効果モデル分析による群間比較(市販ソフト「JMP」による)

時点を横に展開したEXCELデータを、行列移動により、時点を縦に展開したEXCELデータへ変換した。そのファイルをカンマ区切りcsvファイルへ保存し直し、それを統計ソフト「JMP」で読み込んだ。モデルのあてはめを選択し、抗体価データをY変数に設定し、グループ識別変数(GROUP)を説明変数に設定する。さらに、被験者識別変数(ID)を説明変数に設定し、引き続きグループ識別変数を選択し、枝分かれを選択する。そうすると、ID[GROUP]と表示される。そして、属性から変量効果を選択するとID[GROUP]&変量効果と表示される。次に、連続変数で定義した時点(WK)を説明変数に追加した。なお、時点変数はあらかじめ、「REMOVE」という文字変数を使って、「WK」を削除し、連続変数データに設定しておいた。下記に実行した結果の一部を示した。

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	分母自由度	t値	p値(Prob> t)
切片	23.877714	26.44917	56.76	0.90	0.3705
Group[J]	-30.70685	21.95993	28	-1.40	0.1730
WK	4.3921569	2.456962	149	1.79	0.0759

Mixed effects model, P=0.17

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
J. Kunisawa, and H. Kiyono	Populations and Cytokine Productions	Edited by Stefan H. E. Kaufmann and Dieter Kabelitz	Methods in Microbiology	Academic Press	Boston	2010	183-193

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1) Kato S, Koizumi K, Yamada M, Inujima A, Takeno N, Nakanishi T, Sakurai H, Nakagawa S, Saiki I	A phagocytotic inducer from herbal constituent, pentagalloylglucose enhances lipoplex-mediated gene transfection in dendritic cells	Biol Pharm Bull.	33	1878-85	2010
Tokuhara D, Yuki Y, Nochi T, Kodama T, Mejima M, Kurokawa S, Takahashi Y, Nanno M, Nakanishi U, Takaiwa F, Honda T, Kiyono H.	Secretory IgA-mediated protection against <i>V. cholerae</i> and heat-labile enterotoxin-producing enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> by rice-based vaccine	Proc Natl Acad Sci USA	107	8794-9	2010
Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong IG, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H.	Nanogel antigenic protein-delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines	Nat Mater	9	572-8	2010
Yuki Y, Nochi T, Harada N, Katakai Y, Shibata H, Mejima M, Kohda T, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Ono F, Kozaki S, Terahara K, Tsukada H, Kiyono H.	In vivo molecular imaging analysis of a nasal vaccine that induces protective immunity against botulism in nonhuman primates	J Immunol	185	5436-43	2010
D. Y., Kim, A. Sato, S. Fukuyama, H. Sagara, T. Nagatake, I. G. Kong, K. Goda, T. Nochi, J. Kunisawa, S. Sato, Y. Yokota, C. H. Lee, and H. Kiyono	The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens	J Immunol	186	4253-63	2011