

表3. 各種費用

	Age groups				
	0 to <1	1 to <2	2 to <3	3 to <4	4 to <5
Direct medical Cost ;Yen					
bacteremia episode; survive	419,153	419,153	419,153	392,802	392,802
bacteremia episode; death	1,032,126	1,032,126	1,032,126	1,010,205	1,010,205
menigitis episode; survive	852,642	852,642	843,867	843,867	843,867
menigitis episode; death	1,470,421	1,470,421	1,470,421	1,510,669	1,510,669
pneumonia episode;survive	221,133	221,133	221,133	164,916	164,916
Otitis media episode	31,990	35,313	61,927	43,659	44,359
sequale: lost hearing*	79,422	79,422	79,422	78,057	78,057
sequale: other than deafness	420,464	420,464	420,464	380,671	380,671
Average hourly wage for Japnaese women labourers aged 25-39	1,328				
Care-giver's productivity loss (hours) per episode; hours					
Bacteremia episode	57.6	57.6	57.6	53.2	53.2
Menigitis episode	123.2	123.2	123.2	115.6	115.6
pneumonia episode	24.28	24.28	24.28	16.57	16.57
sequale: lost hearing	2920	2920	2920	2920	2920
sequale: other than deafness	2920	2920	2920	2920	2920
Otitis media episode	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2
Cost of per vaccination; JPY	10,000				

表4. 接種者に対する疾病予防効果および接種率に応じた集団免疫
(5歳未満未接種者に対する疾病予防効果)

	Effect to vaccinee (%)	Herd immunity (%)							
		vaccine uptake rate							
		10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	>=80%
IPD									
aged 0 to <1	72.3	-	-	33.7	49.6	58.9	64.9	69.2	72.3
1 to <2	75.1	-	35.9	52.2	61.1	66.6	70.3	73.1	75.1
2 to <3	73.4	-	19.4	47.5	59.1	65.3	69.1	71.6	73.4
3 to <4	69.0	-	8.9	44.5	56.6	62.4	65.7	67.7	69.0
4 to <5	58.5	-	26.8	40.6	48.0	52.4	55.2	57.2	58.5
all-causes hospitalized pneumonia (x-ray confined)									
aged 0 to <1	27.0	-	-	-	-	-	-	18.7	27.0
1 to <2	27.0	-	-	-	-	2.0	13.1	21.0	27.0
2 to <3	27.0	-	-	-	-	4.8	15.3	22.2	27.0
3 to <4	27.0	-	-	-	-	11.5	19.2	24.0	27.0
4 to <5	27.0	-	-	-	-	16.3	21.3	24.7	27.0
serotype otitis media									
aged 0 to <1	59.0	-	-	-	-	12.4	25.3	34.3	59.0
1 to <2	59.0	-	-	-	7.7	20.8	29.7	36.2	59.0
2 to <3	59.0	-	-	-	9.3	23.1	31.5	37.1	59.0
3 to <4	59.0	-	-	-	17.4	28.5	34.7	38.5	59.0
4 to <5	59.0	-	-	15.6	26.0	32.3	36.4	39.1	59.0

表5. 結果1－集団免疫を考慮しない場合

	No herd immunity									
	Including direct medical costs only					including both direct medical costs and productivity loss				
	costs (¥)	Incremental cost (¥)	Effec (QALY)	Inceremetal Effect (QALY)	ICER (¥/QALY)	costs (¥)	Incremental cost (¥)	Effec (QALY)	Inceremetal Effect (QALY)	ICER (¥/QALY)
vaccine uptake rate										
0%	49,189	-	30.97264	-	-	82,476	-	30.97264	-	-
10%	51,384	2,195	30.97293	0.00028	7,727,864	85,469	2,993	30.97293	0.00028	10,539,364
20%	53,579	4,389	30.97321	0.00057	7,727,864	88,462	5,986	30.97321	0.00057	10,539,364
30%	55,774	6,584	30.97349	0.00085	7,727,864	91,455	8,980	30.97349	0.00085	10,539,364
40%	57,968	8,779	30.97378	0.00114	7,727,864	94,448	11,973	30.97378	0.00114	10,539,364
50%	60,163	10,974	30.97406	0.00142	7,727,864	97,441	14,966	30.97406	0.00142	10,539,364
60%	62,358	13,168	30.97435	0.00171	7,727,864	100,435	17,959	30.97435	0.00171	10,539,364
70%	64,552	15,363	30.97463	0.00199	7,727,864	103,428	20,952	30.97463	0.00199	10,539,364
80%	66,747	17,558	30.97492	0.00227	7,727,864	106,421	23,945	30.97492	0.00227	10,539,364
90%	68,942	19,752	30.97520	0.00256	7,727,864	109,414	26,939	30.97520	0.00256	10,539,364
100%	71,137	21,947	30.97548	0.00284	7,727,864	112,407	29,932	30.97548	0.00284	10,539,364

表6. 結果2－集団免疫を考慮する場合

	With herd immunity									
	Including direct medical costs only					including both direct medical costs and productivity loss				
	costs (¥)	Incremental cost (¥)	Effec (QALY)	Inceremetal Effect (QALY)	ICER (¥/QALY)	costs (¥)	Incremental cost (¥)	Effec (QALY)	Inceremetal Effect (QALY)	ICER (¥/QALY)
vaccine uptake rate										
0%	49,189	-	30.97264	-	-	82,476	-	30.97264	0.00000	-
10%	51,384	2,195	30.97293	0.00028	7,727,864	85,469	2,993	30.97293	0.00028	10,539,364
20%	53,457	4,268	30.97329	0.00064	6,616,917	88,287	5,812	30.97329	0.00064	9,010,244
30%	55,248	6,059	30.97368	0.00104	5,848,181	90,543	8,068	30.97368	0.00104	7,787,335
40%	56,004	6,815	30.97415	0.00151	4,510,155	90,964	8,489	30.97415	0.00151	5,618,008
50%	56,271	7,082	30.97471	0.00207	3,426,171	90,463	7,987	30.97471	0.00207	3,864,023
60%	57,506	8,317	30.97513	0.00249	3,338,757	91,879	9,403	30.97513	0.00249	3,774,889
70%	59,938	10,749	30.97537	0.00273	3,935,756	95,370	12,894	30.97537	0.00273	4,721,506
80%	63,200	14,010	30.97548	0.00284	4,931,502	100,255	17,779	30.97548	0.00284	6,258,029
90%	67,168	17,979	30.97548	0.00284	6,328,323	106,331	23,855	30.97548	0.00284	8,396,841
100%	71,137	21,947	30.97548	0.00284	7,727,864	112,407	29,932	30.97548	0.00284	10,539,364

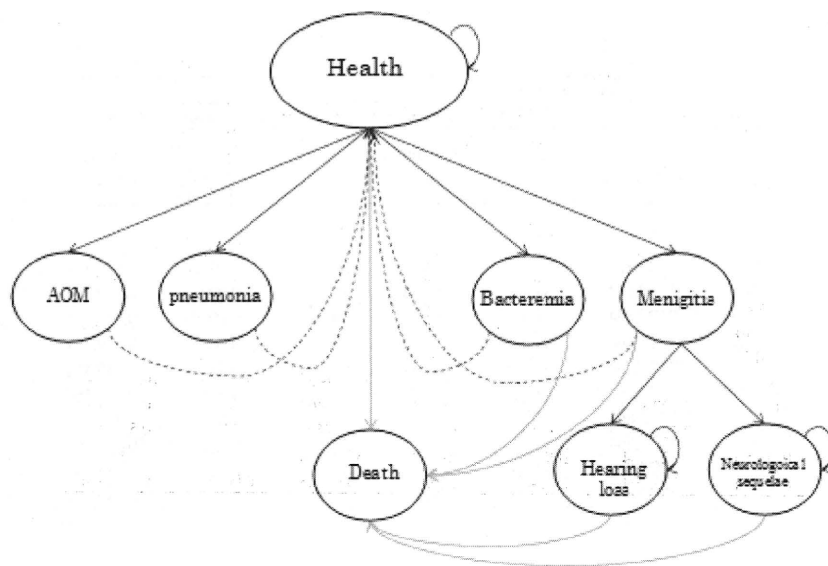


図1.マルコフ・モデル

マルコフ・モデルには6つの健康状態を設定した(図1)。(1)健常者、(2)肺炎球菌による菌血症、(3)肺炎球菌による髄膜炎、(4)入院を要する肺炎、(5)肺炎球菌による急性中耳炎(AOM)、(6)死亡(菌血症、髄膜炎、その他の原因による死亡)。図の矢印は健康状態から健康状態への移動状況を表す。髄膜炎に発展した患者の一部は難聴また神経後遺症(水頭症 12.7%、発達遅滞 21.6%、麻痺 17.1%、癲癇 31.9%)が発生する。PCV-7接種によって発生した副反応が少ないと報告されているため、モデルでは副反応の組み入れを省略した。

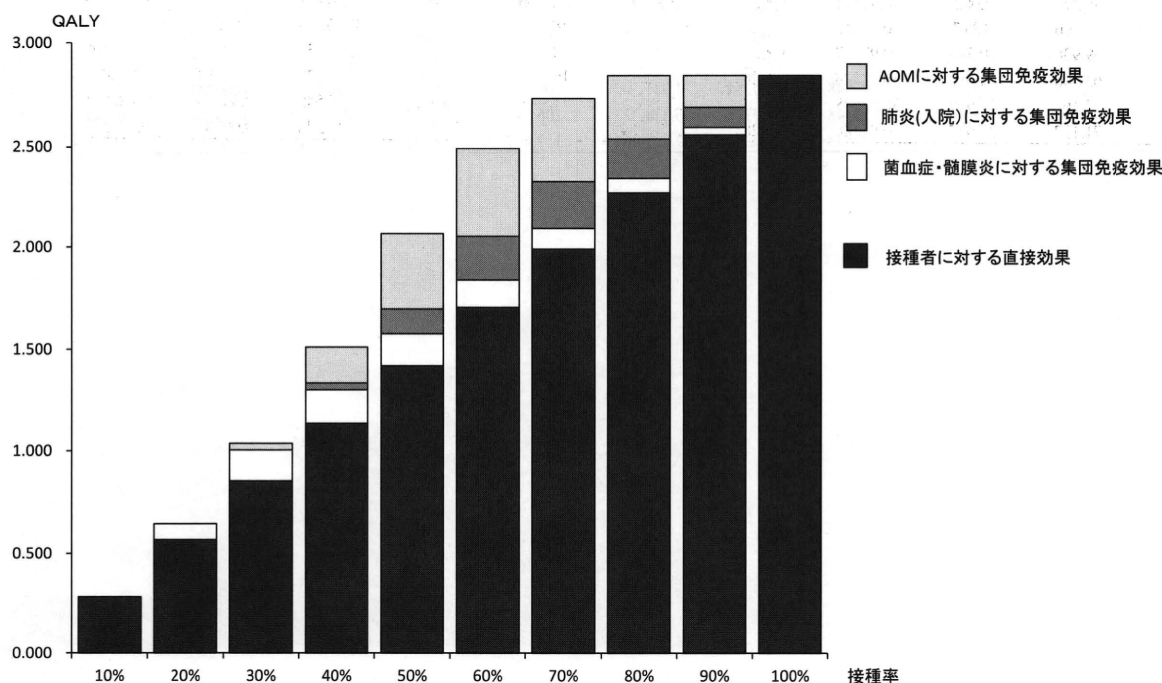


図2. 接種率別1000人当たりの増分効果(接種率0%との比較)およびその内訳

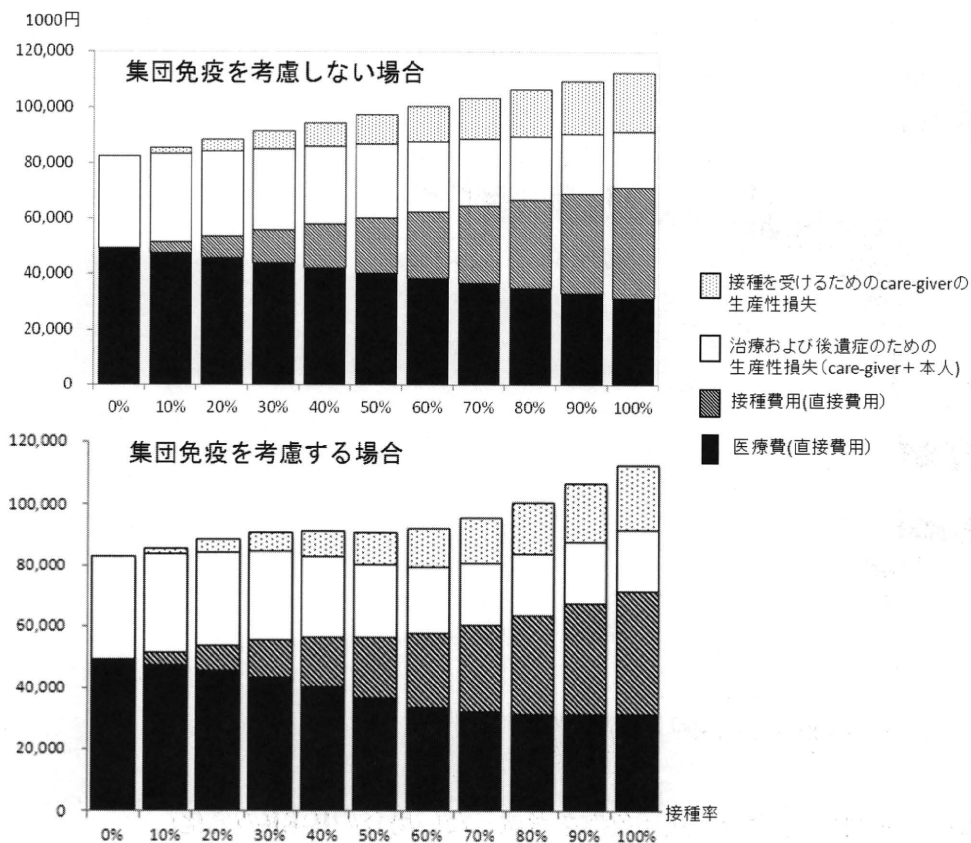


図3. 接種率別1000人当たりの費用およびその内訳

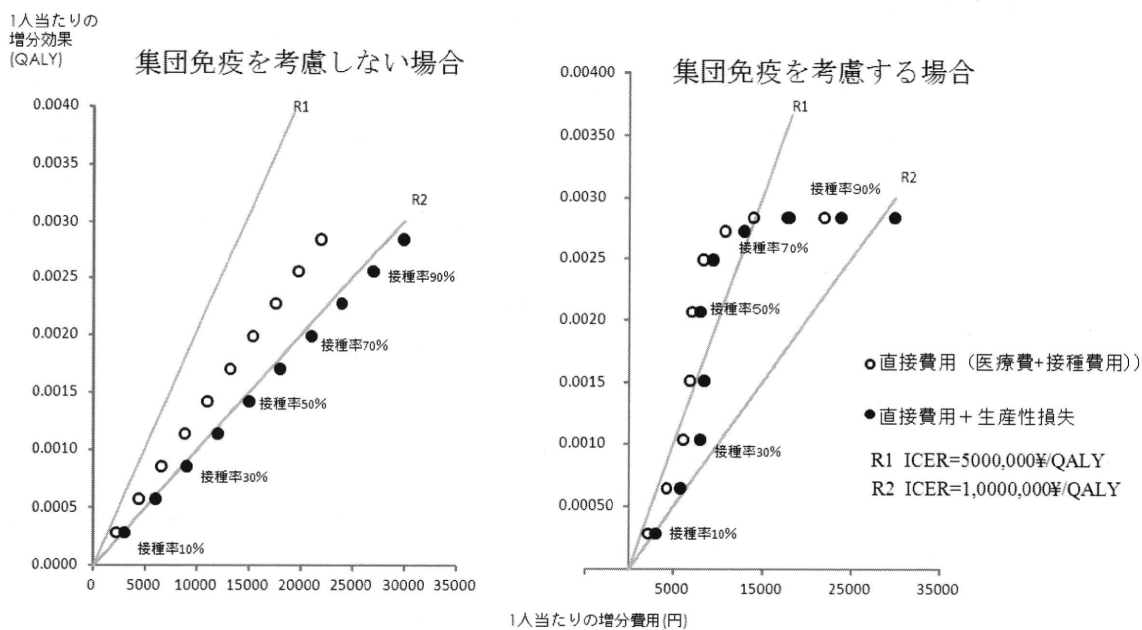


図4. 増分効果平面図 (0%接種率と比較する)

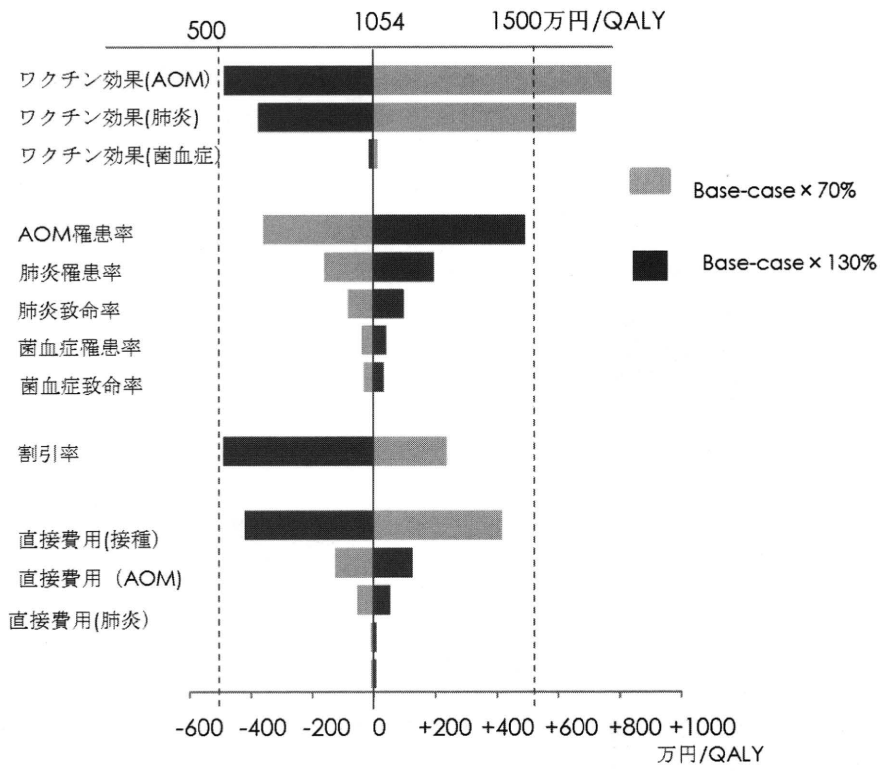


図5. 一元感度分析の結果(生産性費用を含む、集団免疫を考慮しない場合のICERの変化)

6) 微生物検索・病原診断分科会

リアルタイムRT-PCR法によるサンプル中の 新型インフルエンザウイルス（AH1N1pdm）核酸の定量

研究分担者：中田 恵子（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課研究員）

研究分担者：小島原典子（東京女子医科大学医学部衛生学公衆衛生学第二講座准教授）

研究分担者：加瀬 哲男（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課課長）

研究要旨

2009年5月より日本各地で流行した新型インフルエンザウイルス（AH1N1pdm）の病原診断法として国立感染症研究所は、定性的なリアルタイムRT-PCR法（以下、感染研法）を提示した。ターゲット遺伝子領域を含むプラスミドDNAを作製し、感染研法を用いてウイルスコピー数の定量を可能とし、サンプル中の新型インフルエンザウイルス（AH1N1pdm）のウイルスコピー数を算出した。MDCK細胞を用いたウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットによる検査結果とサンプル中のウイルスコピー数を比較し、ウイルス分離および迅速診断キットが陽性になったサンプルで有意にウイルス量が多いことが明らかになった（ $P<0.0001$, $P=0.0025$ ）。

また、患者情報（性別、年齢、来院時体温、最高体温、発熱から受診までの時間）とサンプル中のウイルスコピー数を比較したところ、それぞれウイルスコピー数との間に有意な差はみられなかった（ $P=0.53$, $P=0.94$, $P=0.60$, $P=0.53$, $P=0.62$ ）。

A. 研究目的

2009年5月に国立感染症研究所は新型インフルエンザウイルス（AH1N1pdm）の病原診断法としてリアルタイムRT-PCR法を提示したが、それは定性的な方法であった。従来からウイルス実験室病原診断法として細胞培養を用いたウイルス分離があるが、この方法は核酸検査法と異なり、感染性ウイルス粒子を検出するという利点がある。また、ベットサイドの診断法として、近年汎用されている方法としてイムノクロマト迅速診断キットがある。

今回、感染研法がターゲットとしている新型インフルエンザウイルス（AH1N1pdm）のHA遺伝子を有するプラスミドDNAを作製し、そのプラスミドDNAの希釈列とサンプルのCT値を比較することでサンプル中のウイルスコピー数の定量化を試みた。

本研究では、サンプル中のウイルスコピー数を算出する方法を確立し、サンプル中のウイルスコピー数とウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットの結果との関係を明らかにすること、また、患者特性や発熱温度などの症状とウイルスコピー数との関係を検討することを目的とした。

B. 研究方法

東京女子医科大学医学部の協力医療機関で2009年10月-2010年3月にかけてインフルエンザを疑った患者から採取された咽頭スワブ検体のうち感染研法で新型インフルエンザウイルス（AH1N1pdm）が陽性であると確定された78検体を材料として用いた。

感染研法がターゲットとしている新型インフルエンザウイルス（AH1N1pdm）のHA遺伝子をターゲットとしてTOPOTAクローニングキット（Invitrogen社）を用いてプラスミドDNAを作製した。リアルタイムRT-PCR法には、反応試薬としてQuantiTect Probe RT-PCR kit（キアゲン社）を用いて、核酸増幅検出装置にはアプライドバイオシステムズ社の StepOnePlus™リアルタイムPCRシステムを用いた。プライマーとTaqManプローブは国立感染症研究所、新型インフルエンザウイルス検出マニュアルVer.1を参照した。

ウイルス分離は、MDCK細胞を用いて大阪府立公衆衛生研究所で行われている標準法に従った。

ウイルス分離およびイムノクロマト迅速キット検査結果とウイルスコピー数を比較した結果の検定お

よび患者特性とウイルスコピー数を比較した結果の検定法として、Wilcoxonの順位和検定、Kruskal-Wallis検定、傾向性の検定(Mantel-extension法)、Fisherの直接確率検定を用いた。

C. 研究結果

新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)が陽性であると確定された78検体の患者特性は男性が43名(55.1%)、女性35名(44.9%)、平均年齢が9.4歳(中央値9.5歳)最高18歳、最低1歳であった。また、来院時体温は平均38.4℃(中央値38.5℃)最高温度40℃、最低温度36.4℃であった。最高体温の平均は39.1℃(中央値39.1℃)最高温度40.4℃、最低温度38.0であった(表1)。

作製したプラスミドDNAを用いた検量線は、 $10^1 \sim 10^7$ コピーで良好な直線性を示し、サンプル中の新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)の定量が可能となった(図1)。定量したサンプルの抽出RNA5 μ l中のウイルスコピー数の平均は14,713.7コピー(中央値6,341.3コピー)、最大値138,285.5コピー、最小値5.9コピーであった。また、61検体(78%)のウイルスコピー数は1,000~100,000コピーであった(図2)。

ウイルス分離法およびイムノクロマト迅速診断キットによる検査結果とサンプル中のウイルスコピー数を比較した結果、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットが陽性になったサンプルで有意にウイルスコピー数が多かった($P < 0.0001$, $P = 0.0025$) (図3)。また、ウイルスコピー数が多いほど、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットが陽性になる傾向があることが示された($P = 0.0001$, $P = 0.0093$) (表2)。患者情報(性別、年齢、来院時体温、最高体温、発熱から受診までの時間)とサンプル中のウイルスコピー数を比較した結果、それぞれウイルスコピー数との間に有意な差はみられなかった($P = 0.53$, $P = 0.94$, $P = 0.60$, $P = 0.53$, $P = 0.62$) (図4)。

D. 考察

国立感染症研究所が提示したリアルタイムRT-PCR法は新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)の病原診断のために、多くの自治体の衛生研究所で実施された。この方法は定性法であったため、サンプル中のウイルスコピー数を定量することができなかった。これまで、この感染研法の結果とウイルス分離などの従来法およびベットサイドで汎用されたイムノクロマト迅速キットの結果は比較されてきたが、サン

プル中のウイルスコピー数との関係は明らかではなかった。そこで我々は定量が可能となるようにプラスミドDNAを作製し、感染研法を用いてウイルスコピー数の算出を可能とした。実際に感染研法にて陽性になった2009年10月から2010年3月に採取された検体中のウイルスコピー数を算出した結果、78検体中61検体(78%)はウイルスコピー数が1,000~100,000コピーであった。一方、感染研法陽性検体の最低コピー数は5.9コピーとなり、感染研法が非常に高感度であったことが示された。

算出したウイルスコピー数とウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットの結果を比較した際、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットが陽性になったサンプルで有意にウイルスコピー数が多いことが明らかになった。また、ウイルスコピー数が多いほど、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速キットが陽性になるという傾向性が示された。このことは、新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)の病原診断法において、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットの検査結果とリアルタイムRT-PCR法で算出されたウイルスコピー数が正の相関を持つことを示している。一方で、患者情報(性別、年齢、来院時体温、最高体温、発熱から受診までの時間)とサンプル中のウイルスコピー数を比較した結果、すべてにおいて有意な差はみられなかった。性、年齢、(最高)体温あるいは発熱からの検体採取までの経過時間とサンプル中のウイルスコピー数に有意な差が見られなかったことは、新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)においてもこれまでのインフルエンザと同様に、上気道粘膜上に存在するウイルス量と病態の関係は希薄であり、特にこれまでの考え方と矛盾しないと思われた。

しかしながら、本研究で行った方法を用いて定量的にサンプル中のウイルスコピー数を算出し、詳細な患者特性と比較することは、新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)による重症化の程度やワクチン接種と排出ウイルス量との関係を明らかにできる可能性を示している。

E. 結論

2009年5月より日本各地で流行した新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)の病原診断法として、国立感染症研究所が提示した検査法で定量が可能となるようにプラスミドDNAを作製し、定量リアルタイムRT-PCR法を実施した。この方法を用いて、2009年

10月から2010年3月に採取された検体中、感染研法で陽性になった検体のウイルスコピー数を算出し、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットの検査結果とウイルスコピー数、患者情報とウイルスコピー数を比較した。その結果、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速診断キットが陽性になったサンプルで有意にウイルス量が多いことが明らかになった。また、ウイルスコピー数が多い程、ウイルス分離およびイムノクロマト迅速キットが陽性になるという傾向があることが示された。一方で、患者情報(性別、年齢、来院時体温、最高体温、発熱から受診までの時間)とサンプル中のウイルスコピー数を比較した結果、すべてにおいて有意な差はみられなかった。

本研究で開発された方法を用いて、サンプル中のウイルスコピー数と新型インフルエンザウイルス(AH1N1pdm)の臨床の関係を検討することが可能になったと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 加瀬哲男 新型インフルエンザ検査診断 小児科 51(12)、1681-1686、2010
- 2) 加瀬哲男 ウイルス検査の意義 総合臨床 59(3)、367-371、2010

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 患者特性

患者特性	n = 78 (%)			
男	43 (55.1)			
	平均	中央値	最高値	最低値
年齢 (歳)	9.4	9.5	18	1
来院時体温 (°C)	38.4	38.5	40	36.4
最高体温 (°C)	39.1	39.1	40.4	38

図 1. リアルタイム RT-PCR における作製したプラスミド DNA の検量線

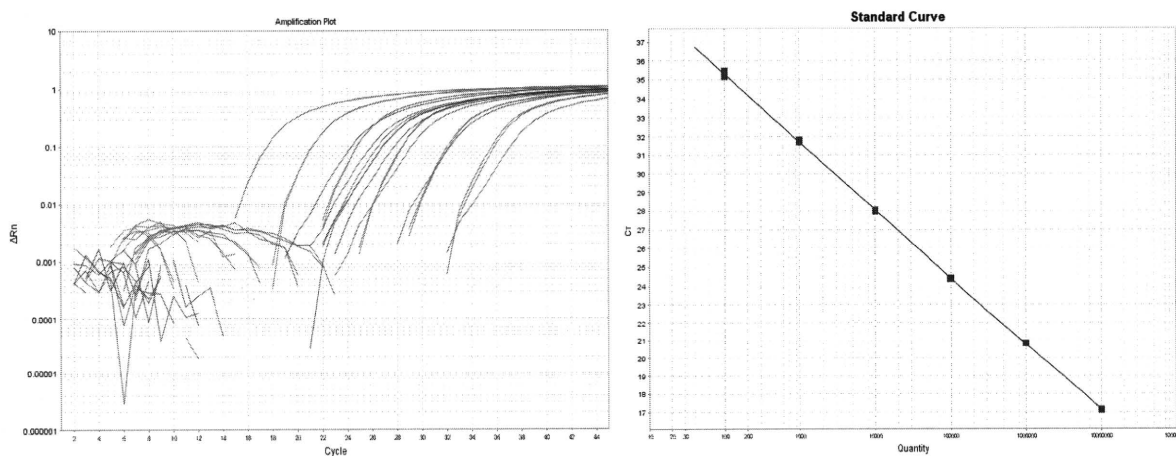
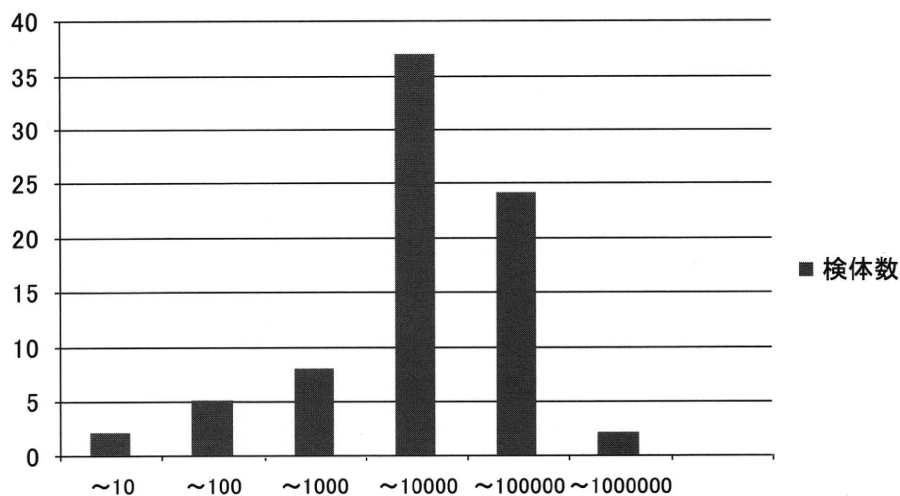


図 2. サンプル中のウイルスコピー数



検体数	平均(コピー)	最大値	最低値	標準偏差
78	14713.7	138285.5	5.9	25268.7

図 3. ウイルス分離およびイムノクロマト迅速キットの検査結果とウイルスコピー数の比較

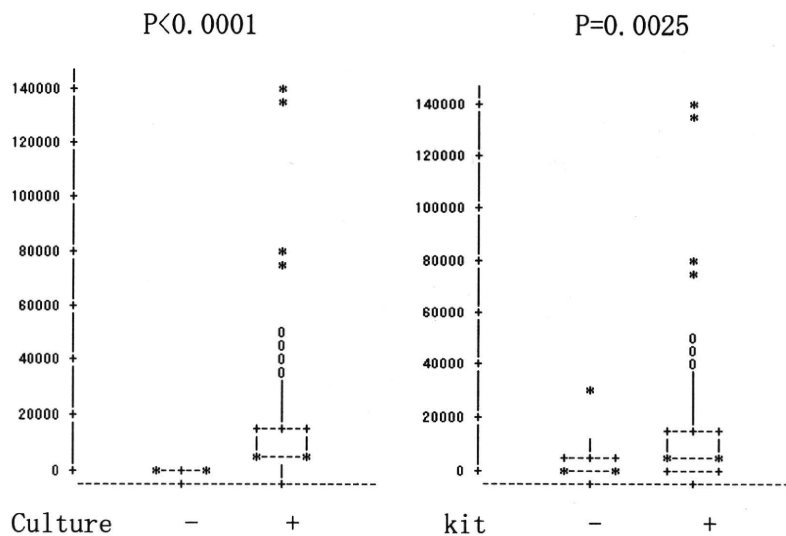
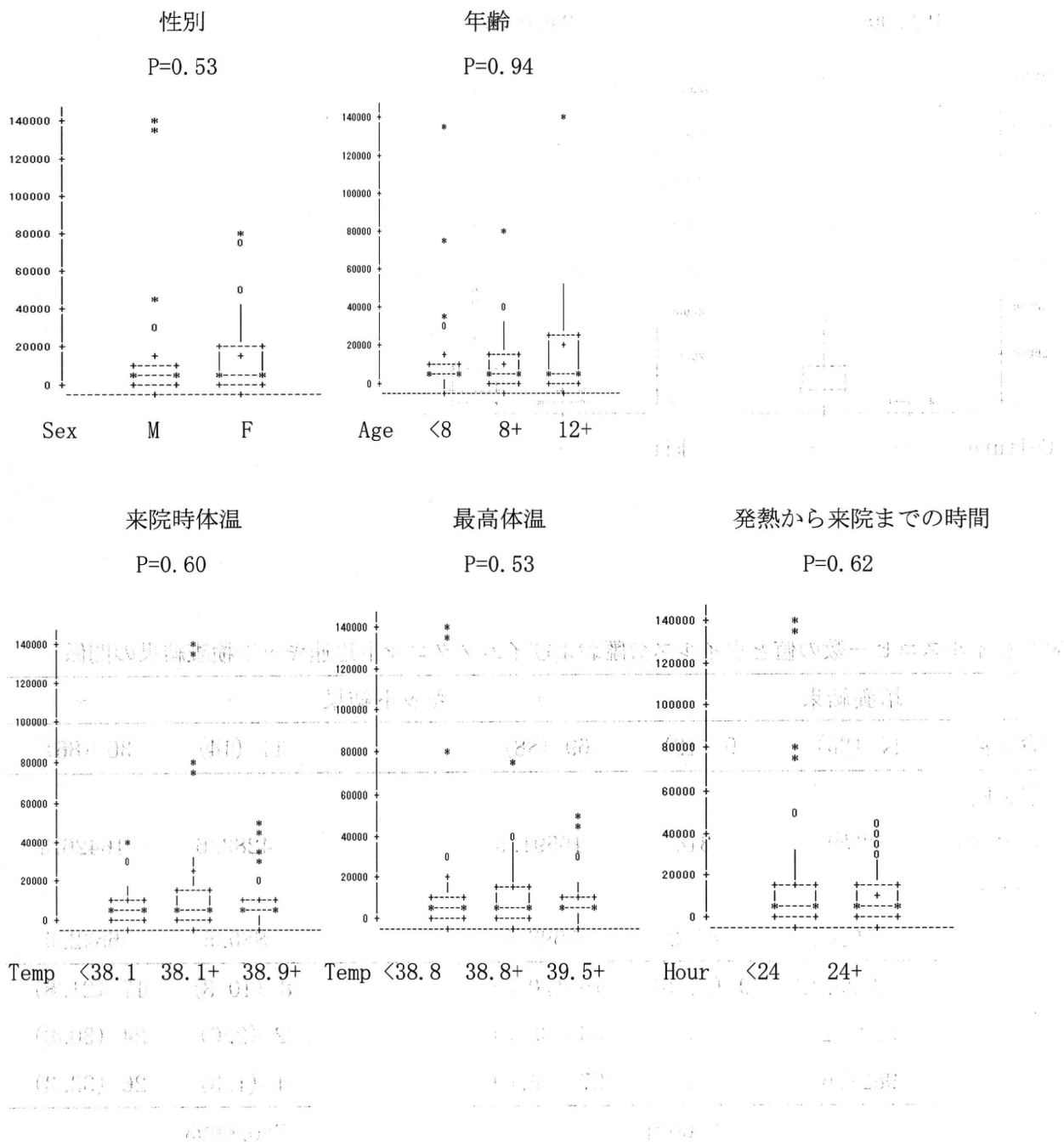


表 2 ウイルスコピー数の値とウイルス分離およびイムノクロマト迅速キット検査結果の関係

培養結果		-	+	キット結果		-	+
検体数	N (%)	9 (12)	69 (88)	11 (14)	36 (86)		
定量値							
(コピー)	平均	314	16591.9	4283.6	16426.1		
/5 μ l	中央値	41.2	6699.5	880.5	6542.4		
	<3633.12	9 (11.5)	16 (20.5)	8 (10.3)	17 (21.8)		
	3633.2+	0	26 (33.3)	2 (2.6)	24 (30.8)		
	9827.6+	0	27 (34.6)	1 (1.3)	26 (33.3)		
P<0.0001				P=0.0093			

図 4. 患者情報とウイルスコピー数の比較



ウイルス性呼吸器感染症の診断方法の開発 -新型インフルエンザ流行期における他の呼吸器疾患ウイルスの検出

研究分担者：加瀬 哲男（大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課長）

研究協力者：森川佐依子（大阪府立公衆衛生研究所主任研究員）

研究協力者：廣井 聡（大阪府立公衆衛生研究所研究員）

研究要旨

新型インフルエンザ発生時に、新型インフルエンザウイルスが検出されなかった症例についてその他の呼吸器系ウイルスの検出を試みた。その結果、検査した334検体からA型インフルエンザ35検体、ライノウイルス/エンテロウイルス44検体、パラインフルエンザウイルス13検体、ヒトメタニューモウイルス18検体、RSウイルス11検体、アデノウイルス2検体、が陽性となった。これらの中には2種以上のウイルスの重複感染例が5症例認められた。以上のことはインフルエンザ様疾患が様々な原因ウイルスによって起こること、および臨床的に季節性を有する疾患であっても、病原体のサーベイランスに関しては、季節性にとらわれることなく検索する必要性があることを示している。

A. 研究目的

インフルエンザ様疾患は、インフルエンザウイルスを始めとして、様々な呼吸器ウイルスによって起こることが報告されている。その病原体を特定することは、ワクチンの効果判定における誤分類を回避するため、あるいは公衆衛生学的には感染症サーベイランスの精度を高めるために、非常に重要である。

そこで、我々は、新型インフルエンザの流行期に、他のウイルスが原因となったインフルエンザ様疾患がどの程度含まれていたのかを検討するために、リアルタイムPCRの構築を行った。

B. 研究方法

平成21年5月22日から9月18日に新型インフルエンザが疑われ、保健所において行政検査が必要と判断され当所に搬入された患者の上気道由来検体1,456検体について、リアルタイムPCR法(国立感染症研究所、新型インフルエンザウイルス検出マニュアルVer.1:以下、感染研法)により新型インフルエンザが否定された334検体および抽出RNAについて以下のウイルス検出を行った。

検出を目的としたウイルスは、A型インフルエンザウイルスH1亜型、H3亜型、ライノウイルス・エン

テロウイルス、パラインフルエンザウイルス1型、3型、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、RSウイルスである。

感染研法のリアルタイムRT-PCR法は、新型インフルエンザウイルスのHA遺伝子部分をターゲットとしたプライマーと、A型に共通するMP遺伝子部分をターゲットとした2種のPCR反応を行うものである。両者とも陽性であった場合を新型インフルエンザと同定した。MP遺伝子の検出のみが陽性であったものはA型インフルエンザ陽性と判定した。

新型インフルエンザと判定された検体は、上気道由来検体からMDCK細胞を用い分離培養を行った後、HIによる血清型別を行って同定したが、分離陰性であったものは季節性インフルエンザを検出するリアルタイムPCR法(感染研法)で型別した。型別に至らなかったものはA型・亜型不明とした。

ライノウイルス・エンテロウイルスはseminested PCR法¹⁾、5' non coding regionの一部からVP4全域とVP2の一部を含む共通領域を増幅した。増幅産物はアガロースゲルから切り出した後、ダイレクトシーケンスによりVP4領域の塩基配列を決定し、BLASTによる相同性の検索により型別を行った。

パラインフルエンザウイルス1型、3型²⁾、アデノ

ウイルス³⁾、ヒトメタニューモウイルス⁴⁾、RSウイルス⁵⁾はそれぞれ文献に従いプライマーおよびTaqManプローブを作成した(表1)。プライマー、TaqMan プローブは北海道システムサイエンス社にて合成した。リアルタイムPCRに用いる検体は、RNA検体5 μ Lとランダムプライマーを用いReverTra Ace qPCR RT Kit(TOYOBO)にて逆転写反応したものを滅菌蒸留水にて2倍希釈し、各々2 μ Lずつ使用した。リアルタイムPCR反応は、Realtime PCR Master Mix(TOYOBO)を用い、文献の温度条件に従い行った。使用機器はABI社のStepOne plusを用いた。

C. 研究結果

図1に示すように、新型インフルエンザウイルスが陰性であった334検体のうち、A型インフルエンザ35検体、ライノウイルス・エンテロウイルス44検体、パラインフルエンザウイルス13検体、ヒトメタニューモウイルス18検体、RSウイルス11検体、アデノウイルス2検体が検出された。また、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、RSウイルス、アデノウイルスについては重複感染症例が認められた。今回の検査において陰性となった検体は220検体であった。

検体採取日別でみると、エンテロウイルスは夏期に集積傾向にあり、ヘルパンギーナの発生時期に一致して集中しているように思われた。他のウイルスには特徴的な集積性は認められなかった(図2)。

D. 考察

インフルエンザ様疾患の原因には様々あり、多数の病原微生物が候補にあがっている。大阪における2009年の新型インフルエンザは、突発的に通常のインフルエンザの非流行期に起こった。その中でインフルエンザを疑った1,456症例のなかで1,122症例からは新型インフルエンザウイルスが検出され、77.1%の高い検出率が示された。しかしながら、334症例は、別の病原体による疾病である可能性が高かった。この新型インフルエンザウイルス陰性検体について詳細な病原体検索をすることは、新型インフルエンザ対策だけでなく、ウイルス性呼吸器感染症の感染症サーベイランスの精度を高めるという点および、インフルエンザ様疾患の病理を理解するために、非常に重要であると考えられた。

検出を目的としたA型インフルエンザウイルスH1

亜型、H3亜型、ライノウイルス・エンテロウイルス、パラインフルエンザウイルス1型、3型、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、RSウイルスは全て検出された。このことはインフルエンザ様疾患が様々な原因ウイルスによって起こることが再確認させた。特にエンテロウイルスやアデノウイルスなどの夏期に流行すると思われるウイルスだけでなく、秋期から冬期に主に流行すると思われていたインフルエンザウイルスやヒトメタニューモウイルス、RSウイルスが多く検出されたことは、興味深いことであった。これらのことは臨床的に季節性を有する疾患であっても、病原体のサーベイランスに関しては、季節性にとらわれることなく検索する必要性を示しているのかもしれない。

E. 結論

新型インフルエンザ流行初期に新型インフルエンザウイルス陰性検体について他のウイルス検索を行った。その結果、A型インフルエンザウイルス H1亜型、H3亜型、ライノウイルス・エンテロウイルス、パラインフルエンザウイルス1型、3型、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、RSウイルスが検出された。

文献

- 1) 石古博昭、島田康司、與那覇麻理、栄賢司：遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定 臨床とウイルス 1999 27(4): 283-293
- 2) K.E.Templeton, S.A.Scheltinga et. al. Rapid and sensitive method using multiplex Real-Time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenzaB viruses, Respiratory syncytial virus, and Parainfluenza viruses 1,2,3and 4. J.Clin.Microbiol. 2004 42(4) 1564-1569
- 3) He and Jiang Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by Real-Time PCR. Appl.Environ.Microbiol. 2005 71(5)2250-2255
- 4) Raymond et.al. Comparison of automated microarray detection with Real-Time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. J.Clin.Microbiol. 2009 47(3) 743-750
- 5) Mentel et.al Real-Time PCR to improve the diagnosis of respiratory syncytial virus infection. J.Med Microbiol. 2003 52 893-896

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 加瀬哲男、森川佐依子、廣井 聡：新型インフルエンザ検査診断 小児科, 51(12), 1681-1686, 2010
- 2) 加瀬哲男：ウイルス検査の現状 総合臨床, 59(3) 367-371, 2010

2. 学会発表

- 1) 森川佐依子、山崎謙治、加瀬哲男：新型インフルエンザ(AH1N1pdm)流行初期における他の呼吸器ウイルスの検出状況, 第53回日本感染症学会中日本地方会学術集会, 京都, 2010.11.12.
- 2) Tetsuo Kase, Saeko Morikawa and Satoshi Hiro, Pandemic influenza H1N1 2009 in Osaka, Japan. 5th International conference on microbiology of food, health and environment: problems and prospects in developing countries, Dhaka, Bangladesh, 2010.12.24-26.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 リアルタイムPCRに使用した標的遺伝子と増幅サイズ

	ウイルス	ターゲット領域	増幅サイズ(bp)	文献
1	PIV1	HN	135	Templeton et.al J.Clin.Microbiol. 2004 p1564-1569を改変
2	PIV3	HN	161	
3	Adeno	hexon	164	He and jiang Appl.Environ.Microbiol. 2005 p2250-2255
4	RSV	polymerase L	89	Mentel et. al. J. Med.Microbiol. 2003 p893-896
5	hPMV	M	152	Raymond et.al. J.Clin.Microbiol. 2009 p743-750

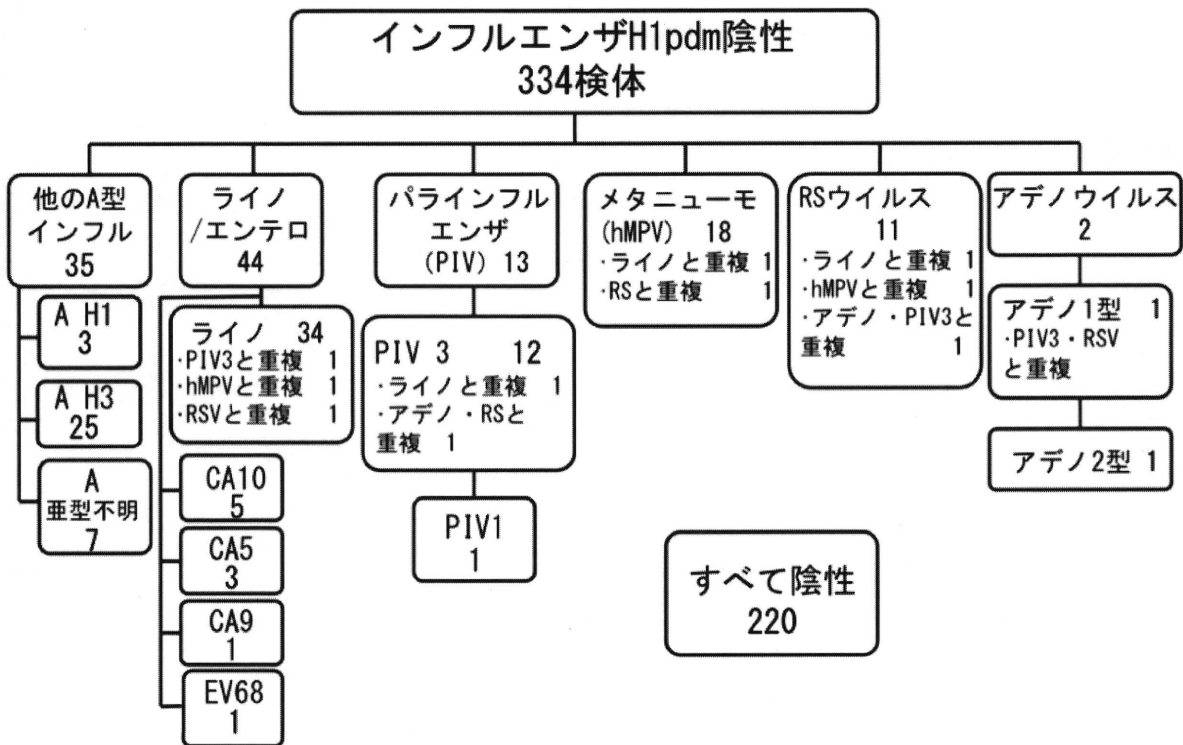


図1 新型インフルエンザ陰性検体におけるウイルス検索

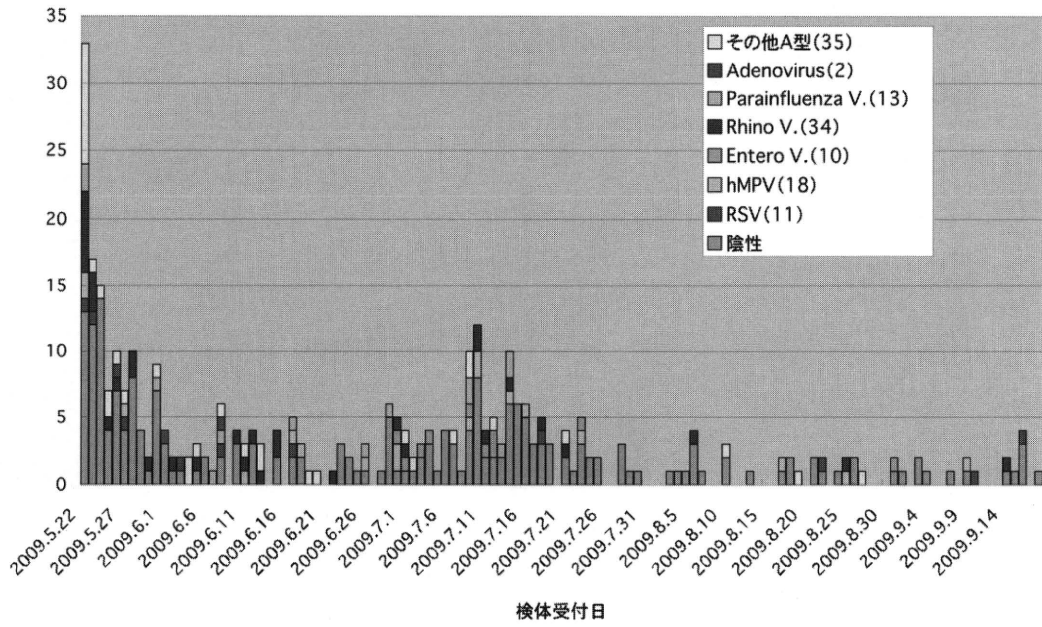


図2 新型インフルエンザ以外の呼吸器ウイルスの日別検出状況

7) 指針等作成分科会

乳幼児におけるインフルエンザワクチンの免疫原性に関する 臨床家向け資料作成

研究分担者：入江 伸（医療法人相生会九州臨床薬理クリニック）
研究協力者：伊藤 一弥（大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学）
研究協力者：麦谷 歩（大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学）
研究協力者：都留 智巳（医療法人相生会ピーエスクリニック）
研究協力者：石橋 元規（医療法人相生会九州臨床薬理クリニック）
研究協力者：真部 順子（医療法人相生会九州臨床薬理クリニック）

研究要旨

わが国では諸外国に比べ、乳幼児へのインフルエンザワクチンの接種量が少なく、現行接種量での免疫原性には議論があり、現在接種量の変更が検討されている。しかし、接種量と免疫原性の関連について良好にデザインされた研究は今までにない。これら免疫原性に関するデータが整備されていないことが、インフルエンザワクチンの優先接種の対象者である乳幼児において接種率が向上しない一因となっている。そこで、我々が過去に実施したインフルエンザワクチンの免疫原性に関する研究データに加え、本邦および国外の先行研究を系統的に検討した。今後、国内規定量を検討する上での論拠を提供するとともに、臨床現場で活用できる資料を作成したいと考えている。

A. 研究目的

インフルエンザワクチン接種は、インフルエンザウイルス感染症およびそれに起因する重篤な合併症を予防するための最も有効な方法と考えられている。米国疾病管理センター（CDC）予防接種諮問委員会（ACIP）でもインフルエンザ合併症のハイリスク者、あるいは彼らのうち、特定グループ、あるいは特定の年齢層に該当する者に対しては毎年ワクチン接種を受けるよう勧告している。

若年小児では、インフルエンザ流行期におけるインフルエンザ関連入院率が年長小児よりも高く、65歳以上の入院率に匹敵する。小児の間でのインフルエンザ関連死亡は多くはないが、ワクチンで予防できる死亡のかなりの部分を占める。

我々が過去に実施したインフルエンザワクチンの免疫原性に関する研究データに加え、本邦および国外の先行研究を系統的に検討した。今後、国内規定量を検討する上での論拠を提供するとともに、臨床現場で活用できる資料を作成したいと考えている。

B. 研究方法

2005/2006シーズンと2006/2007シーズンに実施したインフルエンザワクチンの免疫原性に関する解析結果、および本邦および国外の先行研究を系統的に検討した。

なお、2005/2006シーズンは本邦規定量（1歳未満0.1mL、1歳以上0.2mL）の三価不活化インフルエンザワクチンを乳幼児259人（0歳64、1歳65、2歳64、3歳66）に接種、2006/2007シーズンには欧米規定量（3歳未満0.25mL、3歳以上0.5mL）を269人（0歳63、1歳72、2歳69、3歳65）に接種し、赤血球凝集抑制抗体価を測定した。両シーズンとも、免疫原性の効果尺度はGMT、抗体価上昇倍数、SPR、SCRおよび抗体価4倍上昇とし、多変量ロジスティック回帰分析を用いて交絡因子を調整し、年齢等との関連を検討した。

先行研究の系統的な検討にはデータベースとしてPubMedを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究班の主要メンバーによって過去に実施された研究については、各施設の臨床試験審査委員会において承認を得ている。

C. 研究結果

1. 2005/2006シーズンおよび2006/2007シーズン調査データの解析結果

2005/2006シーズン、2006/2007シーズンともに、接種前抗体価が1:10未満の対象者は、抗体応答が低かった。0歳児および1歳児は対象者の大部分が接種前抗体価1:10未満であったため、2回接種後も2歳児および3歳児と比較すると抗体応答が低かった。また、多変量ロジスティック回帰分析の結果、抗体応答に対する年齢の調整オッズ比は正の関連が得られた。同量接種した年齢階級間でも年齢が上がるほど抗体応答が高まったことから、乳幼児におけるインフルエンザワクチンの免疫原性には年齢が影響を与えていると考えられた。

2. 先行研究の検討

PubMedをデータベースとして用い、検索式“(influenza vaccines) AND hemagglutination inhibition” “Limits Activated: Humans, English, Japanese, All Infant: birth-23 months, Preschool Child: 2-5 years” に該当した164件のうち、総説4件をのぞいた先行研究160件を対象に検討を行った(図1)。なお、2010年版米国予防接種諮問委員会(ACIP)勧告において引用されている文献のうち、上記検索条件に該当するものは網羅していることを確認した。

HI抗体価を評価した先行研究1416件のうち、3歳未満の乳幼児を対象とした研究は非常に限られていた(160/1416)。なお、そのほとんどは年齢階級ごとの免疫原性は評価されていないか、幅広い年齢層の小児を対象とした研究の中のsubgroup analysisであった。

月齢6ヶ月以上の小児では、ACIP勧告に従った回数インフルエンザワクチンの接種を受けると、当該ウイルスに対する防御レベルの抗インフルエンザ抗体が産生されることが考えられた。若年小児では、2回接種後に抗体応答が高まるという報告、抗体応答は年齢が上がるにしたがって高まるという報告もあり、初めてワクチン接種を受ける6ヶ月～8歳のすべての小児には、4週間以上の間隔をあけて2回接種すべきというACIP勧告の論拠として引用されている。また、われわれの研究結果とも整合するものであった。

D. 考察

乳幼児を対象とした研究において、年齢階級ごとの免疫原性を適切に評価し得る大きさの対象集団を

構成することは困難を極める。しかし、2005/2006シーズン、2006/2007シーズンに実施した前向きコホート研究では、疫学者、臨床家、測定施設ならびに調査研究コーディネーターが綿密に連携する組織を構築し、この実施困難性を克服した。4歳未満の乳幼児について、2005/2006シーズンには259人(0歳64、1歳65、2歳64、3歳66)、2006/2007シーズンには4歳未満の乳幼児269人(0歳63、1歳72、2歳69、3歳65)の免疫原性データを収集した。その結果、年齢階級ごとの対象者数は十分かつ均一となり、免疫原性の年齢階級間での比較が可能となった。これらの研究結果は臨床家にとっても、非常に貴重な論拠となると考えられる。

E. 結論

ワクチンの免疫原性を評価した先行研究、ならびに2005/2006シーズン、2006/2007シーズンに実施したわれわれの前向きコホート研究の結果は、接種前抗体価の低い乳幼児では、防御レベルの抗体応答を得るには、2回接種が必要であること、抗体応答は年齢が上がるにしたがって高まることを支持するものであった。

先行研究について検討を進め、今後の国内規定量を検討する上での論拠を提供したいと考えている。なお、HI抗体価以外の効果指標を用いた研究についても検討したいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし