

201028029A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

成人感染が問題となりつつある 小児感染症への対応に関する研究

(H21 - 新興 - 一般 - 011)

平成 22 年度 総括・分担・協力研究報告書

研究代表者	加 藤 達 夫	国立成育医療研究センター
分担研究者	吉 川 哲 史	藤田保健衛生大学
	荒 川 宜 親	国立感染症研究所
	庵 原 俊 昭	国立病院機構 三重病院
	岡 田 賢 司	国立病院機構 福岡病院

平成 23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

成人感染が問題となりつつある 小児感染症への対応に関する研究

(H21-新興-一般-011)

平成 22 年度 総括・分担・協力研究報告書

研究代表者 加藤 達夫 国立成育医療研究センター

研究分担者 吉川 哲史 藤田保健衛生大学
荒川 宜親 国立感染症研究所
庵原 俊昭 国立病院機構 三重病院
岡田 賢司 国立病院機構 福岡病院

平成 23 (2011) 年 3 月

【研究協力者】

中島夏樹 中島医院院長
新庄正宜 慶應義塾大学医学部小児科
慶應義塾大学病院感染対策室助教
高山直秀 東京都立駒込病院小児科
菅沼明彦 東京都立駒込病院感染症科
柳澤如樹 東京都立駒込病院感染症科
中山栄一 都立駒込病院小児科
多屋馨子 国立感染症研究所感染症情報センター室長
山口晃史 国立成育医療研究センター母性医療診療部母性内科医長
花岡正智 国立成育医療研究センター周産期診療部
久野 道 国立成育医療研究センター母性医療診療部母性内科医長
齋藤昭彦 国立成育医療研究センター内科系専門診療部感染症科医長
勝田友博 国立成育医療研究センター内科系専門診療部感染症科
森 康子 神戸大学大学院医学研究科臨床ウイルス学分野、
医薬基盤研究所、感染制御プロジェクト
大橋正博 豊川市民病院小児科
大塚菜緒 国立感染症研究所細菌第二部
中村幸嗣 国立感染症研究所細菌第二部
蒲地一成 国立感染症研究所細菌第二部
権平文夫 デンカ生研株式会社
菅 秀 国立病院機構三重病院小児科
浅田和豊 国立病院機構三重病院小児科
二井立恵 白子クリニック小児科
伊佐地真知子 白子クリニック小児科
加藤 孝 かとう小児科
落合 仁 落合小児科
渡辺正博 すずかこどもクリニック
植田浩司 西南女学院大学
目野郁子 西南女学院大学

目 次

I.	総括・分担・協力研究報告書	
	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	
	55
III.	研究成果の刊行物・別刷	
	61
IV.	参考資料	
	185

I .総括・分担・協力研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
平成 22 年度 総括・分担・協力研究報告書

成人感染が問題となりつつある小児感染症への対応に関する研究

研究代表者 加藤 達夫 独立行政法人 国立成育医療研究センター 理事長・総長

研究要旨：成人感染が問題となりつつある小児感染症への対応として予防接種を中心に研究した。

(1) 百日咳：百日咳は特有の痙攣性の痙咳発作を特徴とする急性気道感染症で、原因は百日咳菌やパラ百日咳菌の飛沫感染で感染力は強く、本来、乳幼児に発症する疾患であるが、近時、成人患者が年々増加している。国立感染症研究所感染症情報センターによると 2010 年第 24 週における百日咳患者の内、20 歳以上の感染者は全体の 51.3%、1,241 例にも上っている。即ち、乳児に予防接種が行われることにより、乳児期の発生率は低く、今日、百日咳は乳幼児を中心に流行する疾患とばかりは言えない。

成人感染症が増多している原因として考えられることは、我が国では、DPT ワクチンは第 1 期接種として 4 回接種が行われているものの、第 2 期接種には DT ワクチンが接種されていることが挙げられる。

百日咳の流行が一般的でなくなった現在、乳幼児期にのみ百日咳ワクチンを接種し続ければ自然のブースターが得られ難く成人期に百日咳菌に対する免疫能が失われる可能性が高い。

成人期に発症する百日咳は成人間で感染するばかりでなく成人がワクチン未接種の乳幼児に感染させることも十分考えられる。

本研究では初年度に引き続き成人の百日咳の臨床症状の確認、成人に対して DPT ワクチンを接種し、その安全性の確認、接種前後血清での抗体価を測定し、その有効性の確認を行った。

又、成人は乳児のような特有の症状がみられない可能性と初年度の研究結果より、成人百日咳では得られる菌量が極めて少ないことを確認したことより確定診断が難しいと考え、より感度の高い血清学的診断方法に関して研究を展開した。

(2) 水痘：水痘は小児期に多発する感染症であるが、成人後には帯状疱疹として発症し、極めて強い疼痛を伴う。岡部らの平成 17 年度の調査によれば、帯状疱疹による我が国の入院患者は 8,173 人、死亡 14 人である。

一方、我が国ではこの帯状疱疹の原因であるウイルスに対する水痘ワクチンが定期接種化されておらず、任意接種の為、その接種率は約 30%といわれる。岡部らの平成 17 年度の調査によれば、我が国の水痘による入院患者は 1,276 人、死亡 3 人である。

又、初年度の本研究班での結果、水痘の大病院での病院内発生は3年間で51%、保健所内での発生は5年間で70%に達している。

軽症と思われがちな水痘は、その発症により死亡例もあること、集団生活内で発生すると種々の社会的問題が生ずるところから、その発症そのものを防止することが望ましい。

本研究では1期、2期麻疹・風疹ワクチン(MRワクチン)接種時に、同時に水痘ワクチンを接種し、その安全性・有効性に関して検証すると同時に、少数例ではあるが、水痘特異的細胞免疫能に関する検討も行った。

(3) 麻疹・風疹：我が国は西太平洋WHOの方針により2012年迄に麻疹の排除を行うことを政策としている。この目的達成の為、平成18年からは5年を限りに13歳、18歳時にMRワクチン3期、4期を接種することとなった。

MR1期、2位の接種率が向上したこともあり、患者の全数報告がはじまった2008年は11,015人であったが、2009年は741人、2010年では457人と報告されている。

今後残る年数の間で国内流行ゼロが目標である。この当初の目標が達成できたか否かの指標は人口100万人当たりの患者が1人未満である。即ち、患者総数を年間120人程度まで減少させる必要がある。3期、4期の接種が未だ目標より低いことから、今後更にワクチン接種の啓発がなされるべきである。

本研究では、成人における麻疹、風疹の抗体価の測定を行い、抗体価の十分ないものに対しMRワクチンを接種し、その安全性・有効性に関して検討した。

百日咳

1 研究分担者：岡田賢司、研究協力者：植田浩司、目野郁子は、「女子大学生を対象としたDTaPワクチン接種の有効性と安全性」を行った。

研究要旨

DT2期接種対象の児に、百日咳に対する追加免疫を賦与するために、薬事法で承認を受けている現行のDTPワクチン接種を行った。百日咳に対する免疫原性はDT接種より優れ、0.2ml接種でも0.5ml接種でも同等な効果が認められた。ジフテリアおよび破傷風に関しては、規定のDT0.1mlと比較して抗体反応はDTP0.2mlおよび0.5ml接種は同等であった。安全性の観点からは、局所反応発生率は3群間で差はなかったが、発赤、腫

脹などの程度はDTP0.5ml接種群が大きかった。

A. 研究目的

全国の大学で学生の百日咳集団発生が報告されている。医療系学生の病院実習での感染も認められる。今回、看護学生の病院実習前にDPTワクチン0.5mL1回接種により百日せき・ジフテリア・破傷風の血清学的有効性及び安全性を検討した。

B. 研究方法

対象：書面で同意を得た西南女学院大看護学科2年生68名(事前登録76名中8名脱落)
接種ワクチンと用量：化血研製DPT(Lot 40K)、0.5mL/doseの1回上腕伸側に皮下接種
接種後の経過観察：体温と局所症状(発赤、腫脹、疼痛、熱感、かゆみ、その他症状)、

及び全身症状の観察。観察期間は接種当日から接種後7日目まで毎日。

抗体価測定：ワクチン接種日と1カ月後に採血しペア血清で保存。PT-IgG および FHA-IgG 抗体価(ELISA)と百日咳菌凝集素価(18323株)、ジフテリア抗体価(Vero中和法)、破傷風抗体価(KPA法)の項目を測定した。

(倫理面への配慮)

採血を行なうため、分担研究者が倫理委員会での承認を得た。調査票回収時は接種学生の氏名などを特定できないように研究協力が配慮した。

C. 研究結果

研究参加者の概要を表1に示す。68名全員女性で、20歳が82%を占めた。DTP ワクチンは、68名中61名(89.7%)の接種歴が確認できた。4回接種が確認できた学生は55名(80.9%)であった。今回のワクチン追加接種前の抗体陽性率は、PT抗体26.5% FHA抗体61.8%、ジフテリア抗毒素抗体66.2%、破傷風抗毒素抗体100%であった。

(1) ワクチン接種後の血清学的有効性
DPT ワクチン0.5ml追加接種前後の各抗体価と接種前後比を表2に示した。百日せき抗体(PT・FHA)、ジフテリア、破傷風抗体価は、ともに高く上昇した。接種前後での各抗体価の上昇比の平均値はそれぞれ29.8、24.7、49.1及び15.0倍であった。化血研製DPTワクチンは凝集原を含んでいないため、凝集素価の上昇は認められなかった。今回の追加接種により、百日せき(PTおよびFHA)抗体、破傷風抗体は全例感染防御レベル(それぞれ10 EU/mL、10 EU/mL及び0.01 IU/mL)以上の抗体を保有できた。ジフテリアに関して、1名のみ接種後の抗体価に上昇が認められず(<0.01 IU/mL→≤0.01 IU/mL)、感染防御抗体レベルの0.1 IU/mLに達しなかった。この学生のワクチン接種歴は母子手帳がなく、

不明であった。

(2) ワクチン接種後の安全性

ワクチン接種後の発現日毎の有害事象の発現頻度を図1に示す。有害事象として局所反応が多く、とくに疼痛が27.9%で最も頻度が高く、接種1日後の発生が多かった。発熱は1名(1.5%)のみであった。表3に有害事象の程度について表2に示した。接種局所の発赤、腫脹で5cm以上の大きな副反応はなかった。疼痛は高度1名、熱感の高度なし、かゆみは高度1名であり、全体的に強い反応は少なかった。

D. 考察

今回と同じ、化血研製DTPワクチンを成人35名(23~62歳)に0.5mL皮下接種した報告¹⁾との比較で考察する。DTPワクチン接種後4週後に採血(本報告と同じ)、ワクチン接種後の健康観察は本研究では7日、高山らは15日間であった。

血清学的有効性に関しては、本報告では、ジフテリアに対し感染防御レベルに達しなかった例を1名認めた(1/68)。高山らの報告では百日せきPT抗体で2名(2/35)、破傷風で6名(6/35)が感染防御レベルに達していなかったが、本報告ではこれらの抗体は全例で抗体価上昇を認めた。ジフテリア抗体価が上昇しなかった1名は、DTaP/DT ワクチン接種歴は母子手帳がなく、不明であった。この例では、破傷風抗体価も接種前抗体価も感染防御レベル未満であったが、1回の接種で上昇した(百日咳抗体価も同様)。高山らの報告との抗体反応の差は、事前のワクチン接種歴、性別、年齢など多くの因子の影響が考えられる。

百日せき菌凝集素価は、本研究も高山らの報告もわずかな上昇のみであった。検査誤差の可能性が考えられる。

安全性に関しては、発熱は本研究で1名(38.0℃)、高山らの報告でも1名(37.8℃)のみであった。局所反応は、疼痛(本研究：27.9%、高山らの報告：40.0%)、発赤(本

研究：13.2%、高山らの報告：66%）と高山らの報告が発現頻度は高かった。但し、同じ条件による研究ではないため、これらの成績を直接比較することはできない。本研究や高山らの報告では、一定頻度の局所反応は見られたが、発熱などの有害事象の発現は低い傾向にあることが確認された。一方で抗体価はDPTワクチンの1回接種で十分な抗体上昇が認められ、DTPワクチン追加接種の有用性が確認できた。

E. 結論

看護系の女子大学生にDTPワクチン0.5ml 1回の追加接種で、百日咳およびジフテリア、破傷風に対して十分な抗体価上昇が認められた。全身性副反応は少なく、疼痛などの局所反応は認められたが、日常生活に支障をきたす程度ではなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1) 岡田賢司：百日咳の臨床—成人と小児—日本内科学会雑誌. 99(5):150-157,2010
- 2) Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Otsuka N, Saito R, Tsuruoka J, Katsuta T, Nakajima N, Okada K, Kato T and Arakawa Y : Marked difference between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. *Clinical Microbiology and Infection*.17 (3) : 365-370, 2011
- 3) Okada K, Komiya T, Yamamoto A, Takahashi M, Kamachi K, Nakano T, Nagai T, Okabe N, Kamiya H, Nakayama T : Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers. *Vaccine*. 28(48) :

- 7626-7633, 2010
- 4) 岡田賢司：百日咳 *JOHNS* 26(11) : 1783-1786 2010
- 5) 岡田賢司：微生物学 破傷風抗体価が低い年齢層 *日本医事新報* No.4485 (4) : 82-83, 2010
- 6) 岡田賢司：百日咳、結核を中心とした細菌感染症の院内制御 *小児感染免疫* 22 (2) : 173-179, 2010
- 7) 岡田賢司：百日咳 診断と治療—最近の感染症にどう挑むか— 診断と治療社 98(8) : 1257-1263,2010
- 8) 岡田賢司：成人百日咳の診断方法 - 質疑応答 - *日本医事新報* No4504 : 78-79, 2010.8.21
- 9) 岡田賢司：増える成人の百日咳 - 早期診断で乳児への感染防止を - *Medical Tribune* 43(34):57 2010.8.26
- 10) 岡田賢司：百日咳疑い例の診断・質疑応答 - *日本医事新報* No4508 : 79-80, 2010.9.18
- 11) 岡田賢司：ジフテリア・破傷風・百日咳 (DTP) ワクチン *小児内科* 東京医学社 42(12):1980-1983,2010.
- 12) 岡田賢司：DTP ワクチン (DTP-IPV も含めて) -百日咳、破傷風対策・臨床とウイルス *日本臨床ウイルス学会* 38 (5) : 393-399, 2010.
- 13) 岡田賢司：DTaP ワクチン. *医薬ジャーナル*.47 (2) : 73-7, 2010
- 14) 岡田賢司：百日咳 P100-101 *小児科診療・小児の治療指針・診断と治療社* 2010.04.30
- 15) 岡田賢司：百日咳・ジフテリア P2437-2438 六訂版 *家庭医学大全科* 法研 2010.10.10
- 16) 岡田賢司：百日咳とボルデテラ属 P510-512 *戸田新細菌学改訂* 33 版 南山堂 2010.9.30

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 研究参加者の概要

項目	
被験者数 ^a	68
男：女	0：68
接種部位 右：左	2(2.9%)：66(97.1%)
年齢 19歳：20歳：その他	8(11.8%)：56(82.4%)：4(5.9%)
平均±SD	20.1±1.0
中央値（最小、最大）	20（19,26）
DTaP 接種 ^b あり：なし：不明	61：0：7
回数 4；3；2；1	55；3；1；1
DT 接種 ^b あり：なし：不明	20：41：7
接種前の抗体陽性率 ^c	
抗 PT 抗体 (≥10 EU/mL)	18/68 (26.5%)
抗 FHA 抗体 (≥10 EU/mL)	42/68 (61.8%)
凝集素価 (≥10 倍)	14/68 (20.6%)
抗 D 抗体 (≥0.1 IU/mL)	45/68 (66.2%)
抗 T 抗体 (≥0.01 IU/mL)	68/68 (100.0%)

a) 健康調査票に有害事象の観察がされた者

b) ワクチン接種歴は母子手帳で確認（不明は母子手帳なし）

c) 抗体陽性率の分母は抗体価を評価可能な解析対象者数。

対象は、全員女性で平均年齢は 20.1±1 歳と特定の集団。母子手帳で確認された DTaP ワクチン接種率は 89.7%であった。接種回数は 4 回が最多で、1 回・2 回はそれぞれ 1 名であった。DT 接種歴はあり 20 名、なし 41 名であった。

表2 DPTワクチン接種前後の抗体価

項目	接種前 N=68 ^a	接種4週後 N=68 ^a	接種前後比 (4倍以上の有意上昇者) (GMTは前後比:GMR)
抗PT抗体(EU/mL)			
抗体陽性者(%) ^b (95%CI)	18(26.5) (16.5-38.6)	68(100.0) (94.7-100.0)	65(95.6) (87.6-99.1)
GMT ^c (95%CI)	4.02 (2.93-5.51)	119.88 (94.79-151.61)	29.83 (22.91-38.84)
抗FHA抗体(EU/mL)			
抗体陽性者(%) ^d (95%CI)	42(61.8) (49.2-73.3)	68(100.0) (94.7-100.0)	63(92.6) (83.7-97.6)
GMT (95%CI)	12.4 (9.11-16.88)	306.21 (247.34-379.09)	24.7 (18.97-32.17)
凝集素価(倍)			
抗体陽性者(%) ^e (95%CI)	14(20.6) (11.7-32.1)	20(29.4) (19.0-41.7)	1(1.5) (0.0-7.9)
平均値($5 \times 2^{n-1}$) (95%CI)	0.28 (0.13-0.43)	0.38 (0.22-0.54)	1.07 (1.01-1.14)
抗D抗体(IU/mL)			
抗体陽性者(%) ^f (95%CI)	45(66.2) (53.7-77.2)	67(98.5) (92.1-100.0)	65(95.6) (87.6-99.1)
GMT (95%CI)	0.13 (0.09-0.18)	6.27 (4.52-8.70)	49.07 (36.81-65.42)
抗T抗体(IU/mL)			
抗体陽性者(%) ^g (95%CI)	68(100.0) (94.7-100.0)	68(100.0) (94.7-100.0)	63(92.6) (83.7-97.6)
GMT (95%CI)	0.24 (0.17-0.32)	3.53 (2.96-4.20)	14.96 (10.85-20.64)

a) Nは健康調査票に有害事象の観察がなされた者。

b) GMTはGeometric Mean Titer。

c) 抗PT抗体 ≥ 10 EU/mLを陽性とした。

d) 抗FHA抗体 ≥ 10 EU/mLを陽性とした。

e) 凝集素価 ≥ 10 倍を陽性とした。

f) 抗D抗体 ≥ 0.1 IU/mLを陽性とした。

g) 抗T抗体 ≥ 0.01 IU/mLを陽性とした。

図1 ワクチン接種後の発現日毎の有害事象の発現頻度(初回発現日)

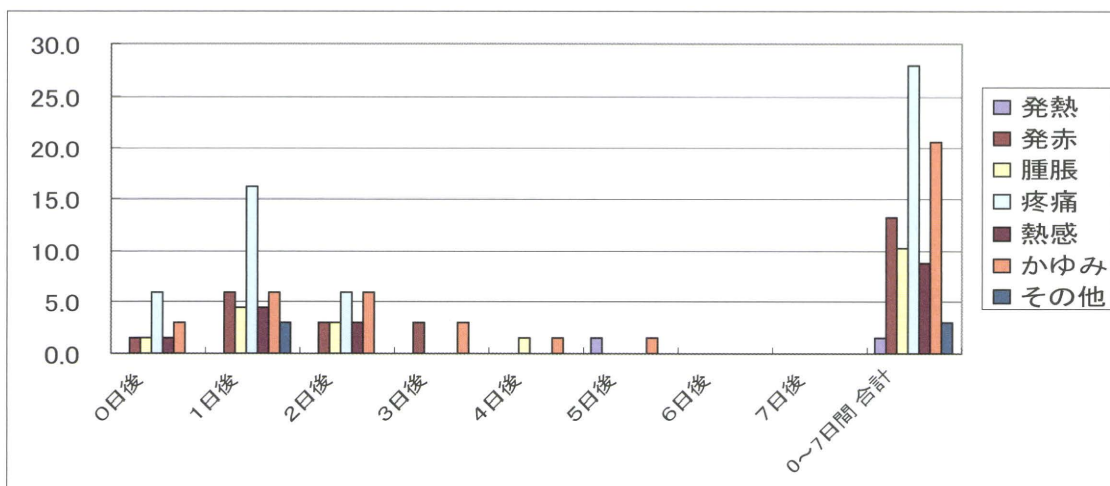


表3 有害事象の程度

有害事象	N=68 ^a
発熱	1(1.5%)
37.5°C~38.9°C	1(1.5%)
≥39.0°C	0(0%)
局所症状	28(41.2%)
発赤	9(13.2%)
<2.0cm	6(8.8%)
2.0~5.0cm	3(4.4%)
>5.0cm	0(0.0%)
腫脹	7(10.3%)
<2.0cm	5(7.4%)
2.0~5.0cm	2(2.9%)
>5.0cm	0(0.0%)
疼痛	19(27.9%)
軽度	14(20.6%)
中等度	4(5.9%)
高度	1(1.5%)
熱感	6(8.8%)
中等度	6(8.8%)
高度	0(0.0%)
かゆみ	14(20.6%)
軽度	11(16.2%)
中等度	2(2.9%)
高度	1(1.5%)
その他 ^b	2(2.9%)

a) Nは健康調査票に有害事象の観察がなされた者。

b) その他は「筋肉痛」:1件、「ふれると軽度の疼痛」:1件。

② 研究分担者：荒川宜親、研究協力者：大塚菜緒、中村幸嗣、蒲地一成、権平文夫らは、「新規百日咳血清診断法の開発に関する研究」を行った。

研究要旨

成人・青年層での百日咳患者の正確な診断を提供するため、百日咳新規血清診断法の開発を行った。百日咳患児血清を用いた抗原スクリーニングにおいて protein X が新たに診断用抗原として同定され、protein X は *Bordetella* 属細菌の中で百日咳菌に特異的であること、さらに国内製造所 4 社の DTaP ワクチンには protein X が含まれないことが示された。組換え protein X を用いた ELISA 測定系を構築し、百日咳患児血清、ワクチン未接種健常児血清、ワクチン接種健常児血清中の抗 protein X IgG 抗体価を評価した。その結果、患児血清と両健常児血清では抗体価に有意差 ($p < 0.01$) が認められ、さらに患児血清では急性期から回復期にかけて抗 protein X 抗体価が上昇することが判明した。以上の結果から、protein X はワクチン接種の影響を受けない新規血清診断用抗原となるものと考察された。

A. 研究目的

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症である。百日咳菌は百日咳毒素 (PT)、繊維状赤血球凝集素 (FHA)、パータクチン (Prn)、繊毛、アデニル酸シクラーゼ毒素など様々な病原因子を産生し、その感染力は極めて高い。百日咳はワクチン予防可能疾患の一つであり、現在わが国では PT お

よび FHA を主成分とする精製百日せきワクチン (DTaP) が接種されている。百日せきワクチンの導入により、乳幼児の百日咳患者は激減したが、近年では世界的に成人・青年層での罹患者増加が認められている。成人患者の臨床像は非典型的であり、これらの保菌者がワクチン接種前の乳児への感染源となることが問題視されている。

百日咳の検査法として、細菌学的検査 (菌培養)、遺伝子検査 (PCR、LAMP 法)、血清学的検査 (菌凝集素価法、抗 PT IgG を測定する ELISA 法) が利用可能である。菌培養検査はワクチン既接種者に対する陽性率が低いため、青年・成人患者の実験室診断としては不適である。遺伝子検査は感度と特異性に優れるが、診断キットが市販されていないため民間検査会社や病院検査室での実施が難しい状況にある。一方、血清学的検査である菌凝集素価法はわが国で広く活用されているが、感度が低いことから WHO ではその使用を推奨していない。一方、抗 PT 抗体を測定する ELISA 法は感度・特異性に優れるが、百日せきワクチンには PT が含まれるためワクチン効果との区別、すなわち判定に注意が必要とされている。事実、WHO では百日せきワクチン接種 3 年以内の患者には本法による診断を推奨していない。

ワクチン既接種者である青年・成人患者にはワクチン接種の影響を受けない血清学的検査が必要となるが、これまでに PT 以外に有効な診断用抗原は同定されていない。そこで本研究では、成人・青年百日咳患者の診断に適した新規血清診断法の開発を目的に、診断用抗原の検索ならび組換え抗原を用いた ELISA 測定系の構築・評価を行っ

た。

B. 研究方法

百日咳菌膜タンパク質の調製：百日咳菌東浜株を cyclodextrin solid medium (CSM) plate に生育させ、菌体を 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF に懸濁した。超音波処理により菌体の破碎を行った後、低速遠心後の上清を超遠心 (140,000 g, 1 h, 4°C, Beckman Type 90 Ti) に供試した。得られた沈殿物を膜タンパク質画分とした。

新規抗原のスクリーニング：百日咳菌膜タンパク質を対象としたイムノブロット法により診断用抗原を探索した。1次抗体に百日咳患児血清、健常児血清およびワクチン接種健常児血清(各 250 倍希釈)、2次抗体にヤギ抗ヒト IgA+IgG+IgM 抗体を用いて解析した。化学発光は ECL detection kit (GE healthcare) を用いてルミノ・イメージアナライザーLAS-3000 (FUJIFILM)により検出した。

質量分析：SDS-PAGE から目的とするバンドを切り出し、トリプシンで断片化したペプチドの質量を nanoLC-ESI-Q-TOF により測定した。タンパク質同定は Mascot データベース検索により行った。

protein X の発現解析：2004-2009 年にわが国で分離された百日咳臨床分離株 30 株および *Bordetella* 属細菌 (*B. parapertussis* 6 株、*B. holmesii* 1 株、*B. bronchiseptica* 1 株、*B. hinzii* 1 株、*B. avium* 1 株) を供試し、各菌株における protein X の発現をイムノブロットにより解析した。1次抗体にマウス抗 protein X 抗体 (500 倍希釈)、2次抗体にヤギ抗マウス IgG-HRP を使用し

た。

組換え protein X の調製：protein X をコードする遺伝子 (202-1998 bp) を pMAL-c2x に挿入し、大腸菌 BL21 を用いてマルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として protein X-MBP を発現させた。protein X-MBP を含むタンパク画分は尿素で一度可溶化させた後、25 mM Tris-HCl (pH 7.5) に透析し、アミロースレジンカラムおよびイオン交換カラムを用いて protein X-MBP を精製した。

DTaP ワクチン接種マウスにおける抗 protein X 抗体価：国内製造所 4 社の DTaP ワクチンをマウス腹腔内に注射し、2 週間後に尾静脈および 4 週間後に心臓より採血を行った。マウスは 1 群 3 匹を供試した。百日咳患児および健常乳児の血清：国立感染症研究所細菌第二部に保存されている百日咳患児血清 7 検体、健常乳児血清 12 検体、DTaP 接種乳児血清 5 検体を供試した。なお、患児血清は回復期のものを供試した。抗体価測定：マウス血清中の抗 protein X IgG、抗 PT IgG、抗 Prn IgG 抗体価を ELISA 法により測定した。各抗原は 100 ng/50 μ l/well の条件でイムノプレート (マキシソープ, Nunc) にコーティングした。マウス血清は 10% FCS-PBS にて 50 倍希釈したものをウエルあたり 100 μ l を供試し、2次抗体にはヤギ抗マウス IgG-AP を用いた。ヒト血清は FCS/PBS-NaCl (10% FCS, 0.5M NaCl) を用いて 100 倍希釈したものをウエルあたり 100 μ l を供試し、2次抗体にはウサギ抗ヒト IgG-AP (1000 倍希釈) を用いた。*p*-nitrophenylphosphate-2Na を発色基質に用い、405 nm の吸光度を測定した。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所細菌第二部に保存されている乳児血清を供試し、研究協力者には患者個人が特定出来ないよう配慮した。また、患者の個人情報削除し、倫理上問題が発生しないよう配慮した。

C. 研究結果

百日咳菌膜タンパク質を対象としたスクリーニングにより、患児血清と強く反応する抗原として protein X が新たに同定された。2004-2009年に臨床分離された百日咳菌30株における protein X の発現を調べたところ、全株でタンパク発現が認められ、一方、百日咳菌以外の *Bordetella* 属細菌では発現を認めなかった。このことから、protein X は百日咳菌に特異的なタンパク質であると判断された。

国内製造所4社のDTaPワクチンをマウスに接種し、protein X に対する抗体価が上昇するか否かについて検討を行った(図1)。PT、FHAに対する血中抗体価はワクチン接種後2週間、4週間と経過するにつれ上昇したのに対し、抗 protein X IgG 抗体の上昇は認められなかった。従って、現行のDTaPワクチンは抗原として protein X を含有せず、ワクチン接種により protein X 抗体は誘導されないものと判断された。なお、わが国のDTaPワクチンは製造所によって製法が異なり、B製造所とC製造所のDTaPワクチンには Prn がほとんど含まれないことが知られている。本研究においても、上記2製造所のワクチンは抗 Prn IgG 抗体を誘導しないことが確認された。

次に、百日咳菌分離症例の百日咳患児血清、ワクチン未接種健常児血清、ワクチン接種

健常児血清に含まれる抗 protein X 抗体価を測定した(図2)。百日咳患児血清では、7検体全てが吸光度0.1以上を示し、健常児血清およびワクチン接種児血清との間に有意差が認められた($p<0.01$)。また、百日咳患児の急性期と回復期のペア血清を測定した結果、患児5名ともに回復期での抗体価上昇が認められた(図3)。

D. 考察

成人百日咳患者の血清診断法の開発を目的に診断用抗原の検索を行った結果、新たな抗原として protein X が同定された。

protein X は *Bordetella* 属細菌のうち百日咳菌に特異的であること、さらに国内DTaPワクチンには protein X が含まれないことから、抗 protein X 抗体価を指標とする ELISA 測定系はワクチン既接種者である青年・成人患者に対し有用な診断系を与えるものと考察された。

protein X (915 aa) は百日咳菌の菌体表面に局在する95-kDaの蛋白質であり、他の病原因子とともに bvg 系の発現制御を受けることが知られているが、その機能はまだ明らかとなっていない。protein X のC末端(649-895 aa)には Prn、BrkA、tracheal colonization factor (Tcf) と共通する autotransporter ドメインが存在し、アミノ酸配列の相同性解析から56-58%の相同性を持つことが指摘された。そこで、本研究では診断用抗原として共通ドメインを削除した組換え蛋白質(38-636 aa)を作製し、特異性の向上を図った。今回、protein X の全長を持つ組換え抗原との比較を行っていないためその効果は不明であるが、共通ドメインの削除は特異性の向上に少なからず

寄与するものと考えられた。

本研究では protein X を用いた ELISA 測定系を構築し、百日咳菌分離症例の乳児血清を用いて診断系の評価を試みた。その結果、乳児の回復期血清では抗 protein X 抗体価の上昇が認められ、本診断系の有用性が示唆された。ただし、評価に供試した検体数が少ないため、今後、患者血清、特に成人患者血清を広く収集し、本法の有用性評価を行うことが必須である（国立感染症研究所医学研究倫理審査会に承認申請中）。また、IgM を指標にした ELISA 測定系は早期診断に有用であることから、平成 23 年度はこの点についても検討を加える予定である。

E. 結論

百日咳の新規血清診断法として protein X を用いた ELISA 測定系を構築した。protein X は百日咳菌に特異的なこと、現行の DTaP ワクチンに含まれないことから、ワクチン接種の影響を受けない新たな血清診断法となるものと期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Han H-J, Kuwae A, Abe A, Arakawa Y, Kamachi K. Differential expression of type III effector BteA protein due to IS481 insertion in *Bordetella pertussis*. PLoS ONE, in press.
- 2) Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Otsuka N, Saito R, Tsuruoka J, Katsuta T, Nakajima N,

Okada K, Kato T, Arakawa Y. 2011.

Marked difference in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs between adults and children. Clin Microbiol Infect, 2011; 17:365-370.

2. 学会発表

- 1) 大塚菜緒, 蒲地一成, 豊泉裕美, 中村幸嗣, 荒川宜親. 百日咳菌における定着因子 Prn 欠損株の細菌学的特性. 第 93 回日本細菌学会関東支部総会, 平成 22 年 10 月, 東京
- 2) Otsuka N, Kamachi K, Nakamura Y, Han HJ, Arakawa Y. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. 9th International Bordetella symposium. Sept. 2010, Baltimore, USA.
- 3) Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Otsuka N, Saito R, Tsuruoka J, Katsuta T, Nakajima N, Okada K, Kato T, Arakawa Y. Marked difference in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs between adults and children. 9th International Bordetella symposium. Sept. 2010, Baltimore, USA.

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

その他：なし

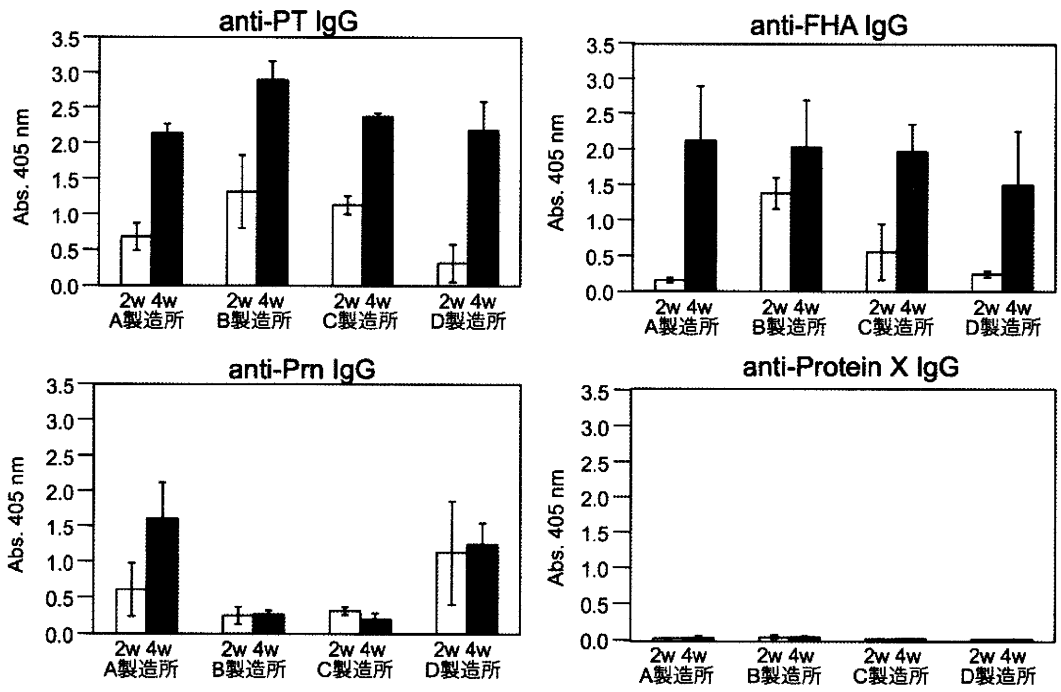


図1. DTaP ワクチン接種マウスにおける抗 protein X 抗体価

国内 4 製造所の DTaP ワクチンをマウスに接種し、14 日と 28 日後に抗 protein X IgG 抗体価とワクチン抗原である PT、Prn、FHA に対する IgG 抗体価を測定した

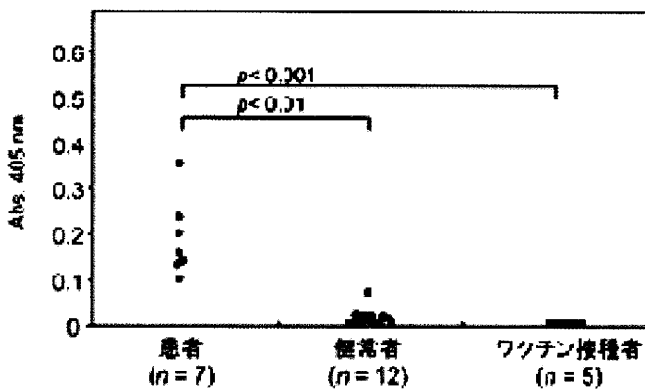


図2. 百日咳患児における抗 protein X IgG 抗体価

百日咳患児、健常児(ワクチン未接種)、ワクチン接種児との比較。百日咳患児血清は回復期のものを供試した。抗 MBP 抗体価を blank として引いた値を示した

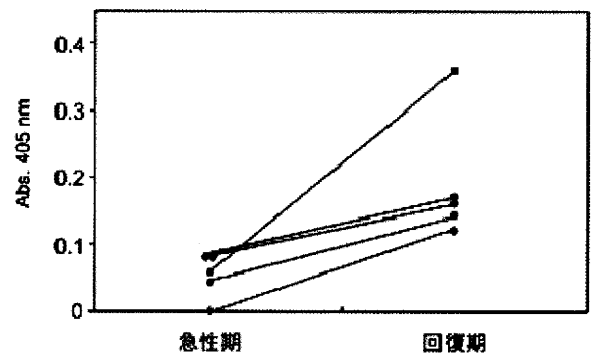


図3. 百日咳患児における抗 protein X IgG 抗体価

急性期と回復期の血清が得られた 5 名について示した。抗 MBP 抗体価を blank として引いた値を示した

③ 研究代表者：加藤達夫、研究協力者：新庄正宜、蒲地一成は、「成人における百日咳の把握に関する研究」を行った。

研究要旨

近年、百日咳は、年長児から成人において増加している。成人百日咳確定例 18 例の解析を行い、7 割の症例で連続する咳や急に始まるせき込みを呈した。疲労骨折を 1 例認めたが、多くは軽症であるため受診が遅れ、長期間感染源となることから、彼らへの予防が望まれる。

A. 研究目的

近年、年長児、成人の百日咳が増加し、周囲への感染性も問題となっていることから、彼らへの百日咳の予防が大切であることが注目されている。この研究では、第二期における、DT から DTaP への変更の重要性を示すため、まずは成人（以下、中学卒業以降を指す）の百日咳の症状を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

百日咳の疑われる成人、すなわち特徴的な咳（連続性咳、吸気笛声）、あるいは 14 日以上咳（発作性、咳き込み嘔吐）を認めた患者で、①細菌学的（遺伝子検査あるいは培養）、あるいは②血清学的に百日咳と診断された場合、「百日咳データ&アンケート用紙」を用いて、個々の臨床データを医療施設（当院関連施設等）から集積する。この情報に基づき、症状・所見・データを集計し、成人百日咳の特徴を知る。

（倫理面への配慮）

ヘルシンキ宣言を遵守し、プライバシー等の個人の人権が侵害されることがないように

行う。別途作成した「百日咳データ&アンケート用紙」のデータについて、協力医療機関の主治医から得た臨床情報は、個人識別情報を含まない新たな症例番号（通し番号）によって、協力医療機関において連結可能な匿名化を行う（「百日咳データ&アンケート用紙」の 1 枚目が連結表となり、連結表は各協力医療機関で管理され、2 枚目以降が慶應義塾大学医学部に送付される）。慶應義塾大学医学部へはその「通し番号」のみでアンケート&データ用紙が送付されるため、当方で個人を特定することはできない。研究の過程では、臨床情報および試料は「通し番号」だけで扱い、試料等提供者個人を特定しない。すなわち、慶應義塾大学医学部では連結不可能匿名化される。研究が終了した時点で、記入された「百日咳データ&アンケート用紙」は匿名化したまま破棄する。

なお、本研究の内容は、慶應義塾大学医学部倫理委員会において、平成 22 年 1 月 25 日に承認された（受付番号 2009-222）。

C. 研究結果

集計結果は、図 1、表 1 の通りである。

抗体価で診断された患者が最も多く、平均年齢は 39 歳（中央値は 33 歳）であった。感染源が不明の症例が多かった。痰のからむ咳、急なせき込み、連続性咳嗽が多くの症例で見られたが、小児で見られるような whoop（せき込んだ後にヒューと音のする息）はほとんど見られなかった。診察所見、酸素飽和度、炎症反応においては特記すべきことはなく、レントゲン所見においても、咳による骨折 1 例を除き所見はなかった。また、小児で見られるような白血球やリンパ球増多も見られなかった。ほぼ全例にマクロライド系薬剤が約 2 週間処方されており、

症状出現から治療開始までも平均約2週間であった。

D. 考察

成人百日咳について、岡田・蒲地らの報告 (<http://idsc.nih.go.jp/iasr/29/337/graph/dt33772.gif>) における、LAMP 法陽性症例と比較した。今回の報告では、白血球増加、リンパ球数、咳による夜間覚醒の頻度は同程度であったが、その他の症状の頻度は、概ね低かった。また、受診までの期間も短かった（平均16日 VS 5週）。本症例の患者年齢が低かった（中央値33.5歳、平均39.6歳 VS 中央値あるいは平均値51歳）ことが、これらの結果に影響している可能性もあるが、Nが少ないため結論を出すには至らない。

成人百日咳は、時に咳症状が強く骨折を認めるほどになるが、乳児でみられるような特徴的な症状はなく、一般的には全身状態が保たれる。

E. 結論

概ね全身状態が保たれるため、受診が遅れ、長期間、感染源となる。小児期に接種した百日咳の予防接種（三種混合）の効果は、成人期には期待できないため、成人期の予防接種が必要である。

F. 健康危険情報

該当せず。

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

以下、該当せず。

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

表1 成人百日咳 18 例の概要 (2010 年 4 月～10 月)

内 容	結 果	%	解析症例数
診断根拠内訳			18
遺伝子検査陽性 (LAMP 法)	2	(11)	
凝集素価の対血清上昇	1	(6)	
抗 PT \geq 94 EU/mL	15	(83)	
発症年齢 (歳)			18
中央値	33.5		
平均	39.6		
範囲	21-75		
性別			18
男	10	(56)	
女	8	(44)	
基礎疾患、既往歴			
あり	8	(44)	18
喘息	4	(25)	16
高血圧	3	(17)	18
副鼻腔炎	2	(12)	17
百日咳含有ワクチン歴			18
不明あるいはなし	13	(72)	
あり	5	(28)	
周囲での咳患者			18
あり	7	(39)	
なし	11	(61)	
聴診所見			15
異常なし	15	(100)	
血液検査所見 中央値			17
白血球 / μ l	7330		
範囲	3330-13520		
リンパ球%	29		
リンパ球数 / μ l	1807		
範囲	908-4251		
異型リンパ球%	0		
CRP mg/dl	0.21		
経皮酸素飽和度% 中央値	98		15
レントゲン所見			10
異常なし	8	(80)	
骨折	1	(10)	
気管支拡張	1※	(10)	
抗菌薬投与			18
CAM (クラリスロマイシン) 単独	15	(83)	
CDTR (セフトロキシム) →CAM	2	(11)	
GRNX (ガレキサン)	1	(6)	
なし	0	(0)	
抗菌薬投与期間 (日) 平均	13		18
中央値	14		
範囲	5-30		
症状出現～治療開始 (日) 平均	15		18
中央値	8		
範囲	1-34		

※基礎疾患の所見