

で3~4割ぐらいいか上がってこないのですが、アジュバント入りでは100%近いというのがGSKのワクチンのデータです。

柏木 永井先生はノバルティスのワクチンの治験もされたのですか。

永井 やっておりません。ただ、国内では行われています。成人では抗体陽転率は78.6%、抗体保有率が80.6%というデータがあります。

柏木 アジュバントワクチンは小児でもきちっと抗体価が上がるのですね。高齢者にも接種されたのですか。

永井 健康成人で64歳以下までです。病院のスタッフですので、基礎疾患のある方やいわゆる寝たきりの方には打っていません。

柏木 ハイリスクグループ、高齢者を対象とした治験はされていないのですか。

永井 はい。

アジュバントワクチンの副反応

柏木 このワクチンについてどのように思われますか。

永井 免疫原性は非常によいですね。ただ、問

題は副反応だと思います。筋注であることが原因かどうかはわかりませんが、局所の痛みがやはりだいぶ強いですね。アジュバントがあることによって痛みが強くなるのでしょうか、ほぼ必発で局所の痛みがあります。発赤、腫脹は逆に目立ちにくいという印象があります(図1)。

城野 厚生労働省が発表している資料でも、発赤は7~13%で、腫脹もその程度ですね。

柏木 全身反応はどうですか。

永井 発熱はそれほどでもなかったのですが、



齋藤昭彦氏

表1 新型インフルエンザワクチン(GSK)の免疫原性

有効性評価項目	接種後採血時期	N	n	Value	97.5% CI	
					LL	UL
抗体陽転率	1回目 21日後	100	94	94%	86.4	98.1
	2回目 21日後	100	100	100%	95.7	100
抗体保有率	前	100	6	6%	1.9	13.6
	1回目 21日後	100	95	95%	87.7	98.6
	2回目 21日後	100	100	100%	95.7	100
抗体増加率	1回目 21日後	100	-	26.3	20.6	33.5
	2回目 21日後	100	-	55.4	45.6	67.2
幾何平均抗体価	前	100	-	8.8	7.3	10.5
	1回目 21日後	100	-	230.3	177.7	298.4
	2回目 21日後	100	-	485.0	420.3	559.7

(独立行政法人医薬品医療機器総合機構公開資料より)

座談会

DISCUSSION

全身倦怠感や筋肉痛、頭痛など、そういった全身症状が強く出る人がいます(図2)。季節性のワクチンではあまり遭遇しないような強さです。入院するほどではないのですが、打った次の日の仕事が少しやりにくいという人が数名いました。50名接種して4~5人です。

柏木 1割弱ですね。

永井 ただ、接種して2日目には大体おさまっており、そのために寝込んでしまうということではないのですが、強い症状が出る人がいらっしゃるのです。

柏木 今回は2回接種されたのですね。

永井 2回打っています。

柏木 1回目も2回目も副反応はほぼ同じ出現の仕方ですか。

永井 2回目のほうがやや強く出る傾向があります。

柏木 1回でかなり免疫原性はあるのですか。

永井 はい。

柏木 国産のワクチンとアジュバントワクチンでは、どちらをお勧めされますか。

永井 その対象となる疾患の重症度や危険性を加味して考えます。アジュバントワクチンの免疫原性は非常によいですから、そのような効果を期待するのであれば、なおかつ非常に重篤化するような新型のインフルエンザということであれば、それは当然免疫原性のよいほうを選ぶ可能性はあります。

柏木 重症化防止、あるいは予防効果を期待しようと思ったら、やはりアジュバントワクチンをお勧めすることがあるわけですね。

永井 今回の新型は比較的軽症例が多いので、そのあたりのバランスをどうするかは、また別になりますが……。

柏木 医療従事者にはどちらを勧めますか。

永井 それはどうでしょうね。悩ましいですね。

このアジュバントワクチンは、当然欧米でももうすでに治験をやっているわけですが、副反応の出方もほとんど同じなのです。痛みも非常に強く出るし、全身倦怠感の出る頻度もほとんど同じです。日本では、ちょっと副反応があるとすぐにみんな引いてしまうのですが、欧米ではこれを受け

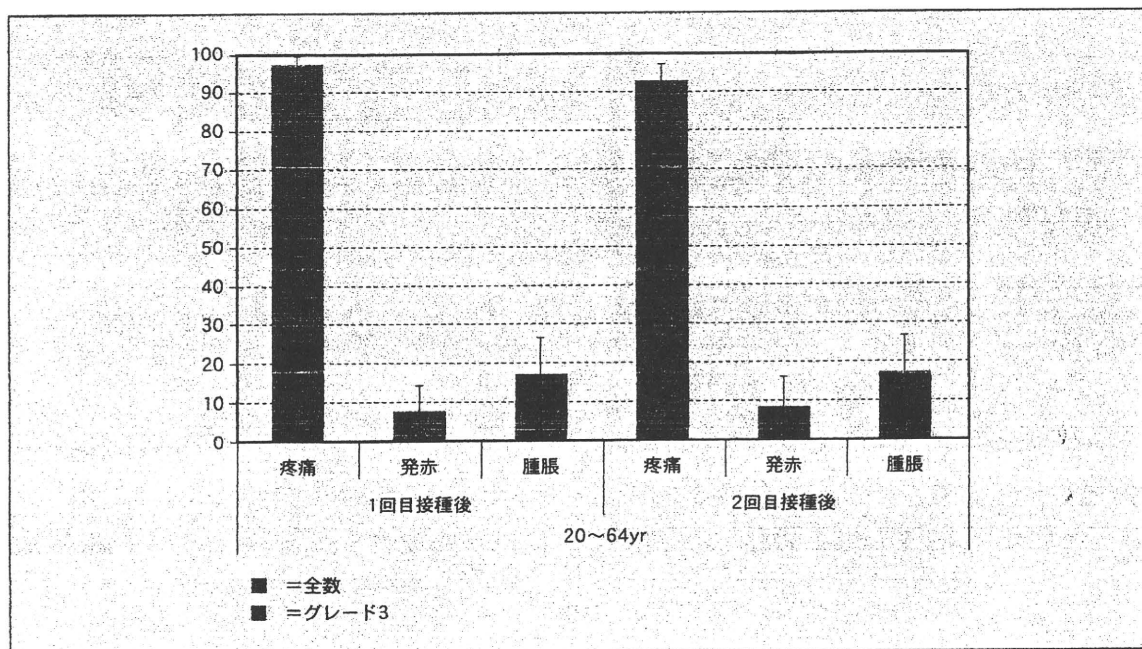


図1 局所の特有害事象(GSK ワクチン)

(独立行政法人医薬品医療機器総合機構公開資料より)

入れて打っているわけです。われわれ国民を含めて、副反応についての考え方、受け止め方をしっかり議論していくべきだと思います。副反応が出ないワクチンがよいワクチンという話になってしまうと、すべてのワクチンが排除されてしまうような状況になりかねません。

柏木 そこが一番問題だと思います。やはり今からアジュバントのよさ、欠点をきちっと検証して、勧めるときには勧めるということが必要だと思います。

永井 そうですね。

柏木 齋藤先生、小児についてはいかがですか。小児科がワクチンで筋注を用いるのは画期的だと思うのですが、それについてはどのようにお考えですか。

齋藤 われわれもこの治験では、上腕の三頭筋に筋注したわけですが、筋注でワクチンを接種することに対する抵抗はほとんどありませんでした。

柏木 小児科医の先生でも反対な人はあま



永井英明氏

りいないのですか。

齋藤 そうですね。むしろ皮下注において本当に皮下に入っているのかという疑問も現場の医師からよく聞かれます。一方で発赤や腫脹などの局所の反応も大体2割から3割ぐらいでした。

柏木 非常に少ないですね。痛みはどうか。

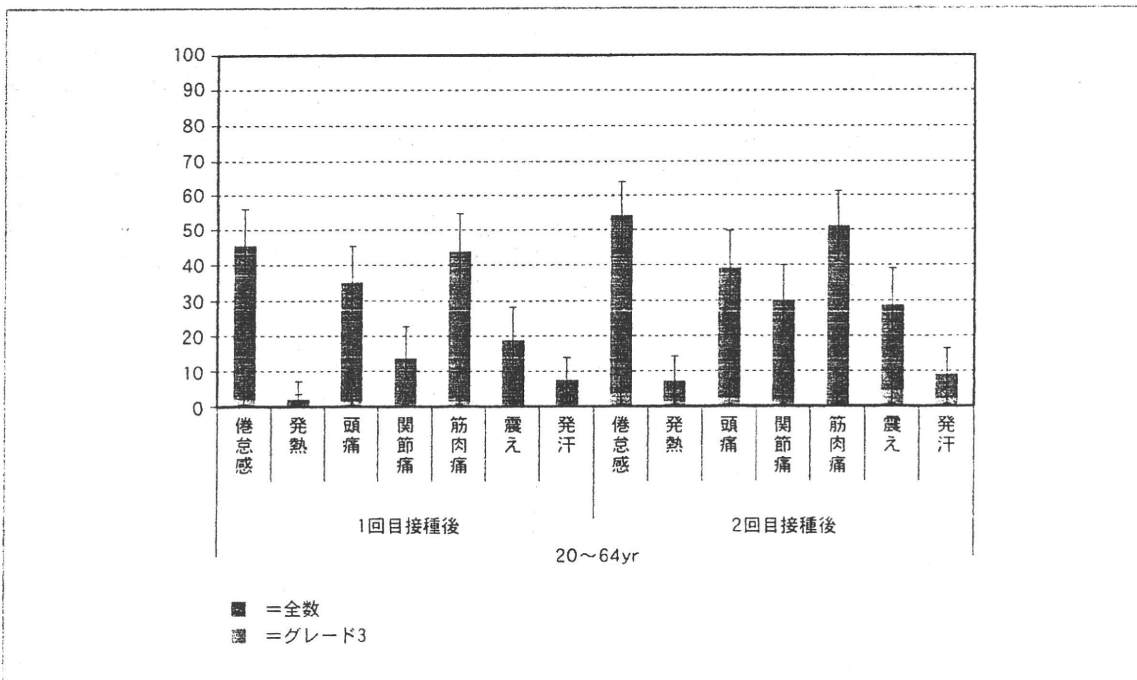


図2 全身性の特定有害事象(GSK ワクチン)

(独立行政法人医薬品医療機器総合機構公開資料より)

座談会

DISCUSSION

齋藤 特に3歳以下では、客観的な評価は本人がうまく訴えることができないので難しいですが、大体7割ぐらいの方が痛みを訴えました。3歳以上ではやはり大人と同様で、9割以上の方が接種したあとも痛みを訴えました。

柏木 保護者の方が非常に困られたというケースはないのですか。

齋藤 特にありません。

柏木 よくこれだけの治験をされましたね。

齋藤 すべてのワクチンを皮下注で行うのは、もうすでに限界にきていると思います。小児の結合型の肺炎球菌ワクチンや注射型のポリオ、それからB型肝炎のユニバーサルワクチンなど、海外の先進国では通常行われているワクチンがまだ国内では行われていません。そのようなワクチンを今後、日本に導入し、同時接種する際には、局所反応の少ない筋注でないとおそらくすべてを接種できないと考えます。免疫原性という意味でも、筋注のほうが高くなるということが知られています。

柏木 局所反応は成人に比べて少ないようですが、発熱して困ったということはありませんか。

齋藤 今回の新型インフルエンザのワクチンにおける発熱の割合は、2割から3割といったところですが、一過性の発熱で、解熱剤を服用し、特に問題なく軽快しています。

柏木 では、永井先生にお聞きしたのと同じ質問ですが、国産のワクチンとこのアジュバントワクチンがあったら、どちらをお勧めされますか。

齋藤 まず1つは、先ほど永井先生がおっしゃられたのと同様に、1日も早く免疫を獲得し、子どもたちを疾患から守るべきときには、やはりアジュバントワクチンの意味はきわめて大きいと思います。そのような患者さんというのは、いわゆる免疫不全の患者さん、化学療法を受けられている患者さん、移植後の患者さんなどがあげられます。高い免疫原性をもって抗体価を可能な限り早く上げたいという場合には、1つの重要なオプションになると考えています。

もう1つの側面として、現在のように国産のワクチンがあって、国外のワクチンが輸入されて余っているという状況において、小児科学会は国産のワクチンを推奨しています。岡山大学の森島先生が小児科学会のなかで新型インフルエンザのワーキンググループを作られ、そのなかで小児の症例を集められております。そのなかで特に10月、11月に入院された患者さんのほとんどが発症してからおよそ24時間ほどで入院しており、低酸素血症をともなう肺炎を併発しています。そのような患者さんのなかには、特に軽い喘息の既往のある患者さんが多く、IgEを調べてみるときわめて高値の方がいらっしゃいます。すなわち、アレルギー素因をもった人たちが、新型インフルエンザ感染に対してより感受性があるのではないかと、重症化しやすいのではないかと推測がされています。

ここでワクチンに対する反応を考えた場合に、アジュバントが入っているとそのようなアレルギー反応を惹起すると懸念されておられます。

城野 新型H1N1ウイルスの自然感染でもI型アレルギーで肺炎が起きていると森島先生はいわれており、通常のインフルエンザとは全く違うというお話でした。河岡先生のグループのサルでの試験でも、通常のウイルスとは違って、やはり肺炎を惹起する力は強いという結果が出ています。一般的な自然感染は非常に軽く済んでいるのですが、特殊な集団においては非常に重篤になりやすいのです。

齋藤 そこにワクチンが関与する可能性があるわけですね。

柏木 アジュバントはやはり異物と考えたほうがよいと思います。oil-in-waterではいわゆるアジュバント病はないのですか。

城野 オイル系のアジュバントは速やかに拡散し、投与された部分に長くとどまるわけではないようです。

柏木 わが国では小児に対して、できるだけ国産のワクチンを使おうということですが、小児に

に対する免疫原性は、格段にアジュバントワクチンのほうがよいのですよね。

齋藤 そうですね。最近の米国のデータで、アジュバントを使っていないワクチンをみても、3歳以下では抗体価の上昇がみられるのは4割から5割ぐらいです。特にこの年齢層においては、アジュバントワクチンは非常に魅力的だと思います。

柏木 今回の新型インフルエンザとアレルギー疾患の関連についてはどう思われますか。

齋藤 決して重症な喘息のある方ではなくて、過去に喘息があって具合が悪くなると $\beta 2$ 刺激薬を適宜使う方が急に具合が悪くなって来院するケースが多かったようです。

永井 成人では入院は6~7人しかいないのですが、そのうちの1例は過去に小児喘息の既往のある25歳の男性で、喘息発作を起こして緊急入院になりました。

城野 アジュバントワクチンは高齢者では使用歴があるのですが、小児で使われるのは今回が初めてなので、もう少し様子をみたほうがよいと思います。ワクチン抗原が通常の季節性と少し違っていて、それとアジュバントを組み合わせることで、自然感染で起きるようなI型のアレルギーを惹起すると困りますので、そのようなことがないと確認できない限り、広く子どもに使うのはまだ少し早いかもしれませんね。

柏木 永井先生の施設のアジュバントワクチン接種者がインフルエンザに感染したという報告はありますか。

永井 今のところありません。

柏木 齋藤先生のところではどうですか。

齋藤 特にワクチン接種後に感染したという報告は受けておりません。

柏木 新型インフルエンザに対する感染予防効果についてのデータは出るのでしょうか。

城野 そこは私たちも興味のあるところで、今回ほとんどの方が前抗体がないという状況でワクチンを接種していることになるので、ワクチンの有効性をきちんと評価できる土壤があったと思う

のですが、実際に研究調査がどこで行われているのか私もよく把握していません。

柏木 感染者は圧倒的に小児ですが、小児を対象とした study はないと思います。

城野 米国では通常季節性インフルエンザの死亡は65歳以上の高齢者に多くみられますが、今回のH1N1では死亡者の90%は65歳以下であったと報告されています。また、入院については、45%程度が18歳以下と報告されており、必ずしも小児の集団ではないところでかなり患者がいるようなのです。いずれにしても、国によって疫学的な状況は異なっているようです。

齋藤 アルゼンチンのデータでは1歳以下の症例がきわめて多いのですが、日本のピークは5歳から6歳ぐらいですね。

柏木 日本ではなぜ1歳以下は感染しないのでしょうか。

齋藤 韓国が同じような年齢パターンだという話を韓国の小児科医に聞いたことがあります。もしかすると宿主の遺伝子因子の関与が一部あるのかもしれないね。

柏木 インフルエンザワクチンの救済制度ができたというのは本当ですか。

城野 新しい臨時接種という範疇になるのかもしれませんが、新型インフルエンザワクチンの枠組みについての法案が国会で審議されています。

柏木 それからワクチン接種後に患者さんが亡くなったという新聞報道がいくつかありましたが、ワクチンとの因果関係はあるのでしょうか。

永井 因果関係を明確にするのは大変な作業ですね。情報もそれほど多くはありません。ワクチンを打たなくても高齢者に起こり得る疾患が多いので、因果関係をただちに明確に指摘するのは難しい症例が多いですね。

柏木 明らかに新型インフルエンザワクチン接種で容態が悪くなったという症例はないのですね。

永井 今までのところではないと思います。

柏木 ありがとうございます。

座談会

DISCUSSION

インフルエンザワクチン政策

柏木 ほかに何か言い足りないことはありますか。

齋藤 今回のようにワクチンが急遽必要になったときに、現行のワクチン政策では対応が後手にまわってしまいます。米国では、ACIP(Advisory Committee on Immunization Practices)と呼ばれるグループがあります。ここでは常時、インフルエンザワクチンに関するワーキンググループがあり、継続的に政策を立てています。今回の新型インフルエンザに関しても、2009年の8月末にはもうすでにその方針がMMWRというCDCの週報に出されています。日本もそのようなワクチン政策を検討する政府側近の委員会を作らないと、これから発生しうる新興・再興感染症への対応が難しくなると感じました。

柏木 全く同感です。城野先生、ワクチンメーカーも被害者なのですね。やはり国策としてワクチンメーカーを保護しなければいけないのではないかというのが私の持論なのですが、いかがでしょうか。

城野 今回も紆余曲折がありまして、最初は足りないという話があったのですが、軽症例が多いことがわかるとあまり使われなくて、今度は余るという話になりました。しかしながら、パンデミック対策はいつ起こるかわからないうちから手を施さないといけないという、危機管理の最たるものだと思うのですが、やはり最悪のケースのシナリオを考えて行動する必要があります。使われなかったからといっていろいろなことを求められると、われわれも対応に窮することになります。

柏木 永井先生は何かありますか。

永井 私は齋藤先生と全く同感で、日本でも

ACIPのような組織がぜひ必要だと思います。今回の一連のワクチン政策の流れをみると、どこでどのように決められているのかよくわからないのです。やはり専門家が集まって、なおかつ国民の意見も聞きながら、会議を開ける場がないと不安です。数年前にACIPのような組織を作るという話があったはずなのですがなかなか進んでいません。

また、アジュバントに関する日本の報道をみると、アジュバントは副反応を起こす悪者的な扱いが多くて、アジュバントがないほうがよいというような話もあるわけです。ただ、アジュバントがあることによって免疫原性が非常に高まり、使用する抗原量が少なくて済むのです。たとえばGSKのワクチンは国産のワクチンに対して4分の1の量でよいわけです。国産のワクチンを2,700万人分用意できるという場合に、このアジュバントがあれば、その4倍の1億人以上のワクチンがあつという間に揃うのです。

副反応は当然あってはならないのですが、そういったアジュバントのよい面も含めて議論して、そのワクチンを使うかどうか決めるべきです。将来的にはやはりACIPのような組織が必要だと思います。

柏木 これは私個人の意見ですが、一般市民はもちろん、一般のドクターもほとんどワクチンのことを知らないのです。もちろん小児科の先生はよくご存じなのでしょうが、内科医はほとんど知りません。これからは、永井先生がいわれたような方向になんとかもっていきたいと思います。

今日は本当に有益なお話をありがとうございました。

(2010年2月17日(水) 於・東京)

報告

新型インフルエンザワクチン 10ml バイアル使用時における死腔の少ない新しいシリンジの有用性

加藤達夫*¹ 山口晃史*² 菅原美絵*³ 石井由美子*⁴
栗山 猛*⁵ 中村秀文*⁶ 齋藤昭彦*⁷

はじめに

2009年5月の新型インフルエンザ国内発生以来、医薬品や医療機器については例年以上に需要が拡大している¹⁾。特に、インフルエンザワクチンについては、医療機関等に対して、「バイアル製剤においては、ワクチンの取扱い上の注意等を留意した上で、その効率的な使用に努めること」と通知されている状況である²⁾。

そこで、本研究ではこれらの課題への対策の1つとしてワクチンを接種するためのシリンジに注目し、限られたワクチンの効率的な準備方法を評価した。

I. 目的

新型シリンジによるワクチン充填の効率性について検証する。

II. 方法

1. 実施場所および実施期間

2009年10月21日～23日および同年11

月17日に、国立成育医療センター(当時)にて医療従事者を対象とした新型インフルエンザワクチン接種の準備時に実施した。

2. 評価医療機器

評価に用いたシリンジは次の2種類で、いずれも厚生労働省の承認を受け、販売されているシリンジである。1つは、通常使用しているシリンジ(1ml)と注射針(太さ26G、長さ13mm)をセットして用いるもので、これを「通常シリンジ」とした。もう1つは、通常シリンジよりデッドボリュームが小さい新型のシリンジ「FNシリンジ™(太さ27G、長さ13mmの針植え込み式)」を用いた(いずれもテルモ製)。

3. 用いた新型インフルエンザワクチン

当院に納品されたのは「A型インフルエンザHAワクチンH1N1『化血研』」10mlで、評価には16バイアルを用いた。

4. 研究対象者

新型インフルエンザワクチンをバイアルからシリンジに充填する業務に携わった看護師8名(いずれも看護師長クラス)を対象とした。

5. 実施方法

- ①シリンジを開封(通常シリンジの場合は針も開封してシリンジと接合)し、これを20本行うのに要した時間を測定した(針のキャップは付いている状態)。
- ②ワクチンを充填する順番はクロスオーバー法とし、対象者は最初に通常シリンジまたはFNシリンジ™を用いて10mlバイアルから

Effectiveness of Low-Dead-Volume Syringe for Influenza Vaccine

*¹Tatsuo Kato, *²Koshi Yamaguchi, *³Yoshie Sugawara, *⁴Yumiko Ishii, *⁵Takeshi Kuriyama, *⁶Hidefumi Nakamura, *⁷Akihiko Saitoh : National Center for Child Health and Development

*¹国立成育医療研究センター理事長・総長, *²母性医療診療部母性内科, *³看護部副看護師長, 感染管理認定看護師, *⁴副院長, *⁵薬剤部治験管理主任, *⁶治験管理室長, *⁷内科系専門診療部感染症科医長

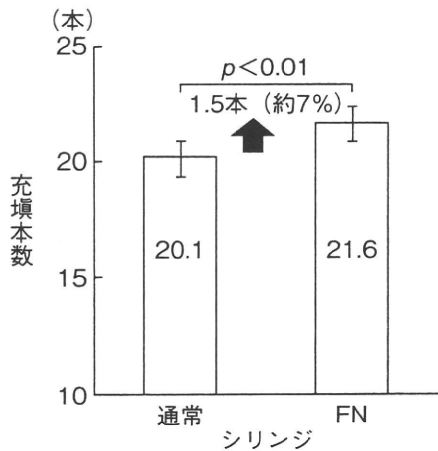


図1 1バイアル (10ml) からワクチンを充填 (0.5ml/本) できたシリンジの本数
16 バイアル充填時のシリンジ別平均値 (n = 8)

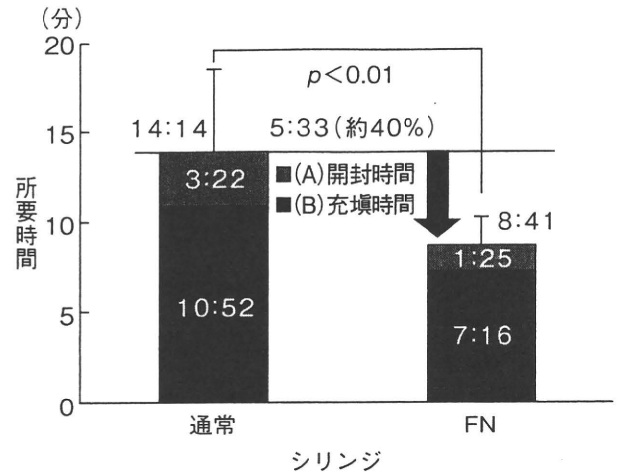


図2 20本分のシリンジへのワクチン充填所要時間 (n = 8)

ワクチンを連続的に充填し、時間を測定した。
③②の充填完了後、シリンジの種類を変えて、別の10mlバイアルからワクチンを連続的に充填し、時間を測定した。

6. 評価項目

主要評価項目は「10mlバイアルからワクチンを充填できたシリンジの本数」とした。副次評価項目は「20本分のシリンジへのワクチン充填所要時間 (下記A+B)」および「エア抜き of 負担感」とした。

副次評価項目の前者は1本目から最後に充填できたシリンジまでの所要時間からシリンジ1本当たり所要時間を算出し、20を乗じた時間と定義した。なお、Aは20本のシリンジを開封して充填可能な状態にするのに要した時間 (開封時間) であり、Bは20本のシリンジにワクチンを充填するために要した時間 (充填時間) である。また、副次評価項目の后者は、シリンジ内のエア抜きの手間を5段階で評価したものとした (大変負担を感じた、やや負担を感じた、どちらとも言えない、あまり負担を感じなかった、全く負担を感じなかった)。

III. データ解析

連続量については paired t-test, 順序尺度については Wilcoxon signed rank test を用い、有

意水準は 5% とした。

IV. 個人情報保護の方法

対象者は ID No. を付与し、個人が特定されないように管理した。

V. 結果

主要評価項目とした「10mlバイアルからワクチンを充填できたシリンジの本数 (平均値 ± 標準偏差)」は、FN シリンジ™ で 21.6 ± 0.5 本と、通常シリンジの場合 (20.1 ± 0.4 本) に比べて約 7% 有意に多かった ($p < 0.01$) (図 1)。

副次評価項目である「20本分のシリンジへのワクチン充填所要時間」は、FN シリンジ™ の場合は平均 8 分 41 秒であり、通常シリンジの場合に比べて約 40% (5 分 33 秒) 有意に短かった ($p < 0.01$)。

これを手順ごとにみると、(A) 20本のシリンジを開封して充填可能な状態にするのに要した時間は、FN シリンジ™ で 1 分 25 秒と、通常シリンジの場合に比べて約 60% (1 分 57 秒) 有意に短かった ($p < 0.01$)。また、(B) 20本のシリンジにワクチンを充填するために要した時間についても、FN シリンジ™ で 7 分 16 秒と、通常シリンジの場合に比べて約 30% (約 3 分 36 秒) 有意に短かった ($p < 0.01$) (図 2)。

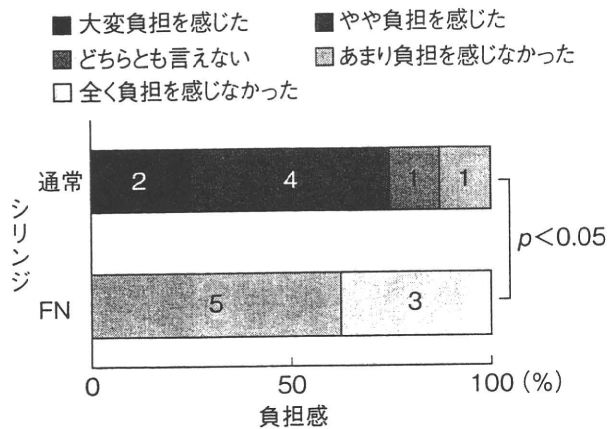


図3 エア抜きの手間の負担感 (n = 8)

シリンジ内のエア抜きの手間については、FNシリンジ™では負担が有意に軽かった ($p < 0.05$) (図3)。

VI. まとめ

以上の結果から、新型インフルエンザワクチンをFNシリンジ™で充填することで、通常シリンジより有意に多くのシリンジに充填できるという有用性が明らかになった。

副次評価項目であるワクチン充填所要時間においてはFNシリンジ™により約40%の短縮傾向がみられ、さらにワクチンを充填する人の間でのばらつきも小さい傾向がみられたことから、医薬品の有効利用だけでなく業務効率の面においても有用だと考えられた。

さらに、「エア抜きの手間」といった主観評価においてもFNシリンジ™で有意に良好であったことから、業務負担感の面でも有用だと考えられた。

VII. 本研究の限界

本研究では手技に熟練した者が操作を行ったことから、操作者が経験の少ない場合の有用性については検証されていない。

用いたバイアル (10ml) は当院に納品された1種類のみであったため、他のメーカーや容量が1mlのバイアルの場合については検証されていない。

文献

- 1) 厚生労働省医政局経済課長通達「新型インフルエンザの流行を受けた医薬品、医療機器等の安定供給について」. 医政経発 0907 第1号, 平成21年9月7日.
- 2) 厚生労働省医政局経済課長, 健康局結核感染症課長, 医薬食品局血液対策課長通達「季節性インフルエンザワクチン安定供給, 接種等にかかる取扱いについて」. 医政経発 0728 第1号, 健感発 0728 第2号, 薬食血 0728 第1号, 平成21年7月28日.

受付日 平成22年6月28日
 連絡先 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1
 国立成育医療研究センター
 加藤達夫

特集／新型インフルエンザ AH1N1 の流行を振り返って

新型インフルエンザワクチン — 小児

庄 司 健 介 齋 藤 昭 彦

はじめに

2009年4月、新型インフルエンザ A/(H1N1) (以下、新型インフルエンザ) はメキシコ・米国南西部で最初に報告された。その1ヵ月後には日本でも新型インフルエンザの確定症例の報告があり、急速に世界的な広がりを見せた。そのような状況の中で新型インフルエンザ感染症に対する対策の一つとしてワクチンの開発が進められた。しかしながら、実際に接種を始めるに至るまでには様々な問題が生じた。まずは、十分な生産量が確保されず、数の限られたワクチンを、どのような優先順位で接種を進めていくかということであった。更には、新しいワクチンであるため、その効果や、有害事象、安全性についての検討も十分とは言えない状況での接種が続いた。したがって、小児に対してどれだけの接種量で、何回接種すれば良いのかなど、不明な点が多かった。本稿では、2009年度に実施された小児に対する新型インフルエンザワクチンの接種状況と、現時点までに明らかになっている新型インフルエンザワクチンの小児に対する有効性や安全性について検討する。

I. 小児に対するワクチン接種

2009年8月、世界に先駆けて米国の Center for Disease Control and Prevention (CDC) から新型インフルエンザワクチンの優先接種対象者が発表された¹⁾(表1)。これは、ワクチンの製造量がまだ十分でない時期に限られたワクチンをいかに有効に活用するかという視点で決められたものである。すなわち、感染した場合に重症化するリスクが高いと考えられる者、感染する機会が多いと考えられる職業に従事している者、まだワクチンが接種できない年齢(6ヵ月未満)の小児と接触する機会が多い家族、または職業に従事している者

が優先対象となっている。この報告によると、基礎疾患の有無にかかわらず6ヵ月以上の小児と、6ヵ月未満の小児をケアする職業の成人はワクチン接種対象となっている。この理由は、6ヵ月未満の乳児は新型インフルエンザに罹患すると重症化のリスクが高いが、この年齢層にはワクチン接種ができないため、この年齢層に接する機会の多い者の感染をワクチンで予防することによって感染の機会を減らし、間接的にこの年齢層の小児を新型インフルエンザから守るためである。一方、日本では2009年10月に厚生労働省よりワクチン接種の概要が発表された(表2)。小児に対する新型インフルエンザのワクチン接種対象における米国と日本の違いは、米国が6ヵ月から24歳までの年齢層すべてに接種を推奨しているのに対し、日本では1歳から小学校低学年相当までの年齢層への推奨に留まっていたことである。しかし、これらの優先規準はあくまでワクチン生産量が不十分であった時期のものであり、ワクチン量が十分になれば当然見直されるべきものである。事実、米国で2010年8月に発表された2010年度のインフルエンザに対するワクチン計画では、6ヵ月以上のすべての国民がワクチンの接種対象者となると記載されている²⁾。日本では2010年度のインフルエンザワクチン接種対象者は通年通りであるが、

表1 米国における新型インフルエンザワクチンの優先接種対象者

優先接種対象者
妊婦
6ヵ月未満の乳児と同居しているもしくはケアする機会のある者
医療従事者もしくは救急医療関係者
6ヵ月から24ヵ月までの者
25~64歳で重症化する恐れのある基礎疾患を有する者

表 2 日本における新型インフルエンザワクチンの優先接種順位

対象者	理由
インフルエンザ患者の診療に直接従事する医療従事者	インフルエンザ患者から感染するリスクが高い、また、業務量負荷の増大が懸念され、医療体制に支障をきたす恐れがある
妊婦	他の者と比較し、新型インフルエンザに罹患して、重症化、死亡する割合が高い
基礎疾患を有する者	
小児（1歳～小学校低学年）	10歳未満の小児の罹患率が高く、重症例が多くみられている
1歳未満の小児の保護者等	1歳未満の小児は、予防接種による効果が小さい（又は接種できない者がいる）ため

米国のそれと同様に接種可能な年齢層にはできる限り接種することが流行の拡大の阻止、重症化の抑制の観点からは重要であると考えられる。そのためには、必要な国民すべてに接種できるようにワクチンの生産量を十分確保することが重要である。

II. 新型インフルエンザワクチンの効果の検討

新型インフルエンザワクチンが接種開始となった時点ではその効果や副反応に対する報告が十分であったとはいえない。しかし、接種開始後、各国より報告がなされ、効果や安全性に対する情報が集積されていった。以下、特に小児における報告について検討する。

III. 季節性インフルエンザワクチンとの交叉免疫性

新型インフルエンザに対する、従来の季節性インフルエンザワクチン接種による交叉免疫性に関していくつかの報告が出された。その中には小児が対象に含まれている研究もあるが、いずれの研究でも小児に対する季節性インフルエンザワクチン接種による新型インフルエンザへの交叉免疫性は認められないと結論づけられている³⁴⁾。これらの結果より、小児においては2009年までの季節性インフルエンザワクチンの接種では新型インフルエンザに対する防御免疫の獲得は出来ないことが確かめられ、新型 H1N1 に対するワクチンの開発が必要であることが改めて認識された。

IV. 新型インフルエンザワクチンの免疫原性

小児における新型インフルエンザワクチンの免疫原性についてはいくつかの報告がある^{5) - 7)}。

Zhu らは3歳から77歳までの年齢層に2,200人

にアジュバントありとアジュバントなしの、15 μg もしくは30 μg の新型インフルエンザワクチンを2回接種し抗体価の上昇を検討した。その結果、12歳以上であればアジュバントなしの15 μg のワクチンの1回接種で十分な免疫反応が得られるが、12歳未満の小児では2回接種が必要であると結論づけている。同様に Liang らは3歳以上の小児と成人12,691人に7.5~30 μg の新型インフルエンザワクチンの接種を行い検討した結果、12歳以上であれば7.5 μg の1回接種で十分な抗体価の上昇が得られるが、12歳未満では2回接種が必要であるとしている。一方、Nolan らは6ヵ月から9歳以下の小児370人を対象に、15 μg もしくは30 μg の新型インフルエンザワクチン接種を21日間隔で2回接種を行い、その免疫原性を比較したが、この報告では15 μg の新型インフルエンザワクチン1回接種後に92.5%の小児がHI法 (Hemagglutination inhibition) で1:40以上となっており、筆者らは小児においても15 μg 1回接種で十分である可能性があるとして結論づけている。これらの報告をまとめると、小児においては2回接種であればほぼ確実な効果が認められ、場合によっては1回接種でも十分な免疫反応が得られる可能性がある。しかしながら、その接種年齢、回数においては、国、機関ごとに相違があった(表3)。その中で日本は国内での治験の結果を踏まえ、2009年度は13歳以上の小児と成人においては1回接種が、13歳未満の小児では2回接種が推奨された。

V. 新型インフルエンザワクチンの安全性

米国には Vaccine Adverse Event Report System (VAERS) と呼ばれるワクチンの副反応の報告を集積するシステムがあり、このシステムによる新型インフルエンザワクチンの副反応に対する検討が2009年12月に報告されている⁸⁾。この報告

表 3 小児における新型インフルエンザワクチン接種回数の国際比較

機 関, 国	接 種 回 数
WHO	すべての年齢で1回接種を推奨(できる限り多くの小児にワクチン接種を行うため)
ACIP(米国)	9歳以下の小児は2回接種, それ以外の年齢では1回接種を推奨
European Medicines Agency	ワクチン接種可能なすべての年齢で2回接種を推奨
日本	13歳未満の小児は2回接種, それ以外の年齢では1回接種を推奨

WHO: World Health Organization, ACIP: Advisory Committee on Immunization Practices

によると, 従来の季節性インフルエンザワクチンと新型インフルエンザワクチンによる副反応の頻度は季節性ワクチンが47件/1,000,000接種に対し新型ワクチンが82件/1,000,000であったものの, 重篤な有害事象については両者に明らかな差はないとの結果であった。また, 前項で記述した, 免疫原性を調査した報告では同時にワクチンの副反応に対する調査も行われていたが, いずれの報告においても死亡等の重大な副反応の報告はなかった。全身性の副反応としては発熱など, 局所の副反応としては局所の腫脹, 発赤などが認められたがいずれの報告でもそれらは許容範囲であったと結論付けている。国内の報告でも, 過去のワクチンと比較して, 明らかに高い有害事象, 副反応は, 認めていない。これらの結果からは, 予防接種による感染予防というメリットが, 副反応というデメリットを大きく上回ることを国民に対して啓発し, 接種率の向上に努める必要があると考えられる。

VI. アジュバント入りインフルエンザ A/H1N1 2009 ワクチンの免疫原性と安全性

日本において, 国内4社による新型インフルエンザワクチンの接種が開始されたが, 2009年8月には, 国内で生産されるワクチン量では, 明らかに不足することが懸念され, 国外のアジュバント入りワクチンが輸入され, 国内で治験が行われた。これらのワクチンは, 1回の接種にて, 高い免疫原性を示し, また, 特別な有害事象, 副反応などの報告はされなかった。小児においても, 同様の結果が得られたのは, 特記すべきことである⁹⁾。特に, 幼児において, 1回の接種によって高い免疫原性が確認されたこと, また, 筋肉内注射でワクチン接種が行われた価値は大きいと考える。今後, H5N1を含めた新興インフルエンザ感染症に対して, 早急に抗体価を上昇させる必要がある場

合, また, 抗原量を少なく, 出来るだけ多くの小児にワクチン接種を行う際にも, この治験の果たした役割は大きいものとする。

VII. 日本における小児のインフルエンザワクチン接種量について

新型インフルエンザワクチンの接種量は, 現行のインフルエンザワクチンと同じ接種量で行われたが, 国内の小児に対するインフルエンザワクチンの量について, 現行量では, 不足しているのではないかとの声が上がっている¹⁰⁾。欧米では, 不活化インフルエンザワクチンの接種量が6ヵ月から35ヵ月では, 0.25mL, 3歳以上は, 0.5mLであり, 9歳未満で最初にインフルエンザワクチンを接種する場合は, 4週間を空けて2回接種を行い, あとは, 原則1回接種である。日本では, 1歳未満は0.1mL, 1~5歳は0.2mL, 6~12歳は0.3mL, 13歳以上は0.5mLとその年齢によって, 接種量が異なる。また, 0~12歳では, 初回だけでなく, 毎年2回接種が推奨されている。この比較からも分かるように, 国内で推奨されている接種量は少なく, その効果が疑問視されている理由は, そこにあるのかもしれない。今後, その接種量の変更が必要である。

ま と め

2009年, 新型インフルエンザは医療の現場に多くの混乱をもたらしたが, 臨床的なデータの蓄積がなされつつある。ワクチンに関してはその安全性と効果が証明されており, 2010~2011年に関しては十分量のワクチンの確保が見込まれるため, 必要な対象に積極的にワクチンを接種し, ワクチン株として選定されたインフルエンザによる感染の更なる拡大を防ぐことが重要である。

文 献

1) National Center for, I. et al.: Use of influenza A (H1N1)

- 2009 monovalent vaccine: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2009. MMWR Recomm Rep, 58(RR-10): p.1-8, 2009.
- 2) Fiore, A. E. et al.: *Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010.* MMWR Recomm Rep. 59(RR-8): p.1-62, 2010.
 - 3) Hancock, K. et al.: *Cross-reactive antibody responses to the 2009 pandemic H1N1 influenza virus.* N Engl J Med, 361(20): p.1945-1952, 2009.
 - 4) Centers for Disease, C. and Prevention: *Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 58(19): p.521-524, 2009.
 - 5) Zhu, F. C. et al.: *A novel influenza A (H1N1) vaccine in various age groups.* N Engl J Med, 361(25): p.2414-2423, 2009.
 - 6) Liang, X. F. et al.: *Safety and immunogenicity of 2009 pandemic influenza A H1N1 vaccines in China: a multi-centre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial.* Lancet, 375(9708): p.56-66, 2009.
 - 7) Nolan, T. et al.: *Immunogenicity of a monovalent 2009 influenza A (H1N1) vaccine in infants and children: a randomized trial.* JAMA, 303(1): p.37-46, 2009.
 - 8) Centers for Disease, C. and Prevention: *Safety of influenza A (H1N1) 2009 monovalent vaccines-United States, October-November 24, 2009.* MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 58(48): p.1351-1356, 2009.
 - 9) Saitoh, A. et al.: *Safety and immunogenicity of an AS03-adjuvanted A/H1N1v pandemic Influenza vaccine in Japanese children aged 6 months to 17 years: a preliminary report.* XII International Symposium on Respiratory Viral Infections, Taipei, March, 2010.
 - 10) 神谷齊: 現行インフルエンザワクチンの小児への投与量の検討. 第10回日本ワクチン学会学術集会 (2009年札幌).
-

Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing of *slpA* and its application to direct typing

Haru Kato,¹ Hideaki Kato,² Yoichiro Ito,³ Takayuki Akahane,⁴
Sayuri Izumida,² Toshiyuki Yokoyama,⁵ Chiharu Kaji¹
and Yoshichika Arakawa¹

Correspondence

Haru Kato
cato@nih.go.jp

¹Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

²Toyokawa City Hospital, Aichi, Japan

³Gifu Red Cross Hospital, Gifu, Japan

⁴Azumino Red Cross Hospital, Nagano, Japan

⁵Kumiai Kosei Hospital, Gifu, Japan

A typing system for *Clostridium difficile* using sequencing of the surface-layer protein A encoding gene (*slpA*) was evaluated and used to analyse clinical isolates in Japan. A total of 160 stool specimens from symptomatic patients in Japan was examined and 87 *C. difficile* isolates were recovered. *slpA* sequence typing was found to have reliable typability and discriminatory power in comparison with PCR ribotyping, and the typing results were highly reproducible and comparable. *slpA* sequence typing was used to type *C. difficile* in DNA extracted directly from stool specimens. Among the 90 stool specimens in which direct typing results were obtained, 77 specimens were positive for *C. difficile* culture, and typing results from isolated strains agreed with those from direct typing in all 77 specimens. The *slpA* sequence type smz was dominant at all four hospitals examined, and this endemic type was detected by culture and/or direct typing in 61 (62%) of 99 stool specimens positive for toxic culture and/or direct *slpA* sequence typing. Comparison of epidemic strains reported throughout the world revealed one isolate identified as *slpA* sequence type gc8, which was found to correspond to PCR ribotype 027 (BI/NAP1/027), whereas no isolates were found with the *slpA* gene identical to that of PCR ribotype 078 strain. *slpA* sequence typing is valuable for comparison of *C. difficile* strains epidemic in diverse areas because the typing results are reproducible and can easily be shared. In addition, *slpA* sequence typing could be applied to direct typing without culture.

Received 6 October 2009

Accepted 28 January 2010

INTRODUCTION

Clostridium difficile is one of the important organisms causing healthcare-associated infections. Specific strains have been documented to cause multiple outbreaks (Kato *et al.*, 2001; McDonald *et al.*, 2005; Samore *et al.*, 1997),

Abbreviations: CDI, *Clostridium difficile* infection; CDT, *Clostridium difficile* binary toxin; REA, restriction endonuclease analysis.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers (*slpA* sequence type) for the *slpA* genes reported in this study are AB259785 (ar-02), AB258978 (cr-01), AB258979 (cr-02), AB258980 (cr-03), AB236153 (fr-01), AB249984 (gr-01), AB231583 (hr-01), AB258982 (kr-02), AB258981 (kr-03), AB239686 (xr-01), AB239685 (xr-02), AB261625 (xr-03), AB180242 (smz-01), AB181350 (smz-02), AB256018 (smz-04), AB240196 (yok-01), AB257283 (yok-02), AB236725 (hj2-01), AB236726 (j41-01), AB258983 (gc11-01), AB259787 (og39-01), AB538230 (y05-01), AB259786 (t25-01), AB269265 (g13-01), AB249986 (gc8-01) and AB470267 (078-01).

and patients infected with particular strains are more likely to develop severe disease (Barbut *et al.*, 2007; Goorhuis *et al.*, 2007, 2008), suggesting that strain differences play some role in the pathogenicity of this organism. Recent reports documented that a variant strain, characterized as restriction endonuclease analysis (REA) type BI, PFGE type NAP1 and PCR ribotype 027, caused a large number of outbreaks in North America and Europe (Kuijper *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005; Warny *et al.*, 2005). In addition, PCR ribotype 078 has been noted as another hypervirulent strain, and has been recovered not only from calves and pigs (Keel *et al.*, 2007) but also from humans (Goorhuis *et al.*, 2008). Among numerous schemes for typing *C. difficile*, PCR ribotyping and PFGE typing are widely used in Europe and North America to identify epidemic strains. However, it is not easy to share typing results by these schemes, which depend on banding-pattern

analysis among multiple laboratories. In the present study, a typing method involving the sequencing of the gene encoding the surface-layer protein A (*slpA*) was evaluated. Previous reports have documented that the low-molecular-mass peptide of the surface-layer protein varies among *C. difficile* isolates (Calabi & Fairweather, 2002; Eidhin *et al.*, 2006), and a variation of the gene has been used for typing *C. difficile* (Karjalainen *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2005a). In this study, clinical isolates from Japan were analysed by sequencing of *slpA* and the method was applied to type *C. difficile* from DNA extracted directly from stool specimens.

METHODS

Bacterial strains and stool specimens. The reference strains of F (ATCC 43598), G (ATCC 43599), H (ATCC 43600) (Delmee *et al.*, 1986) were obtained from the ATCC. The GAI 97660 strain was used as a reference strain for the PCR ribotype smz, *slpA* sequence type smz and serogroup JP (Kato *et al.*, 2001, 2005a). Included in the present study were strains US36 (REA type J/PCR ribotype 001), NL8 (REA type Y/PCR ribotype 014), US37 (REA type G/PCR ribotype 002), US42 (REA type BI/PFGE type NAP1/PCR ribotype 027; Killgore *et al.*, 2008) and UMCG12(3) (PCR ribotype 078; Goorhuis *et al.*, 2008). Stool specimens were obtained with the informed consent of patients who were hospitalized from 2003 to 2007 with a diagnosis of antibiotic-associated diarrhoea or colitis. A total of 147 stool specimens from patients admitted to four hospitals (A, B, C and D) and 13 specimens from sporadic cases from six other hospitals in Japan were tested. Hospitals A and D were located in different cities of the same prefecture (Gifu), whilst hospitals B and C were in different prefectures, Aichi and Nagano, respectively. The stool specimens were frozen at -80°C until transportation, and were tested at the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

Culture. *C. difficile* was isolated on cycloserine-cefoxitin-mannitol agar (Nissui Pharmaceutical) from stool specimens, which were treated with alcohol for spore selection, and identified as described previously (Kato *et al.*, 1998). The presence of the non-repeating sequences of the toxin B gene (*tcdB*) and the repeating sequences of the toxin A gene (*tcdA*) was examined by PCR as described previously (Kato *et al.*, 1998, 1999). PCR detection of the gene encoding the binding component of *C. difficile* binary toxin (CDT) was performed as described by Stubbs *et al.* (2000).

DNA extraction. DNA extraction from cultured isolates for PCR ribotyping and *slpA* sequence typing was performed using a High Pure PCR template preparation kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. DNA was extracted directly from stool specimens using a QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions (Kato *et al.*, 2005a, b).

Typing of isolates. Typing of isolates by sequencing *slpA* was carried out with the primer set *slpAcom19/slpAcom22*, as described previously (Kato *et al.*, 2005a). Both strands of the amplified products were sequenced. Isolates were assigned to different major types when they had 20 or more amino acid differences, and to subtypes (01, 02, 03 and 04) when they had fewer than 20 such differences. PCR ribotyping of isolates was performed using the modified methods described by Stubbs *et al.* (1999). Briefly, the reaction volume for PCR was scaled down to 30 μl , and 1 μl DNA extracted by the method described above was used. The thermal profile was 35 cycles comprising 95°C for 20 s and 55°C for 120 s, followed by incubation at 75°C for 5 min, and the resultant PCR products were

separated in 2.5% agarose gel at a constant voltage of 125 V for 3.5 h. A new PCR ribotype was identified when a banding pattern showed two or more band differences from previously identified patterns.

Detection of *tcdB* by nested PCR of DNA from stool specimens.

The *tcdB* gene was detected by nested PCR on DNA extracted from stool specimens as described previously (Kato *et al.*, 2005b).

Direct typing by sequencing *slpA* of DNA from stool specimens.

Amplification of *slpA* by a nested PCR was performed on DNA extracted from stool specimens that were PCR positive for *tcdB* by the nested PCR. The primer pair used for the first PCR was *slpAcom19/slpAcom22* (Table 1), which was used for the typing of isolates. The *slpA* sequences of the 17 isolates representing different *slpA* sequence types were compared, and 5 forward primers (*slpAcom33*, *slpAy32-1*, *slpAxr-1*, *slpAyok-9* and *slpAog39-3*) and 2 reverse primers (*slpAcom30* and *slpAog39-6*) were selected for the second PCR for direct typing (Table 1). The primer pair *slpAcom33/slpAcom30* was selected from the *slpA* sequences of eight isolates (GenBank accession nos AB180242, AB258978, AB258979, AB236153, AB249984, AB231583, AB236725 and AB236726); *slpAy32-1* was from those of two isolates (AB258981 and AB258983); *slpAxr-1* was from two isolates (AB239686 and AB239685); *slpAyok-9* was from two isolates (AB240196 and AB257283); and *slpAog39-3* and *slpAog39-6* were from three isolates (AB259787, AB538230 and AF458880). The *slpA* sequences (AF458880) of ATCC 43597 (the reference strain of serogroup D) were available from the GenBank database. The thermal profiles were 35 cycles comprising 95°C for 20 s and 55°C for 180 s, followed by incubation at 75°C for 5 min for the first PCR, and 35 cycles comprising 95°C for 20 s and 55°C for 120 s, followed by incubation at 75°C for 5 min for the second PCR. After the first PCR with the primer pair *slpAcom19/slpAcom22*, a second PCR was performed by the primer pair *slpAcom33/slpAcom30*, which was designated primer set A. When no amplification was produced by the PCR with primer set A, the second PCR was performed separately by primer set B, consisting of primers *slpAy32-1*, *slpAxr-1*, *slpAyok-9* and *slpAcom30*, and set C, consisting of primers *slpAog39-3* and *slpAog39-6*. The PCR product was purified and sequenced with the same primers used for the second PCR in the same manner described for the *slpA* sequence typing on DNA extracted from isolates. Both strands of the amplified products were sequenced.

RESULTS

Typing of the reference strains

Typing analysis was performed on some epidemic strains that have been reported from around the world. ATCC 43598 strain, which was previously characterized as toxin A negative and toxin B positive ($A^{-}B^{+}$) and as serogroup F/PCR ribotype 017 (Delmee *et al.*, 1986; Stubbs *et al.*, 1999), was typed as *slpA* sequence type fr-01 (GenBank accession no. AB236153). The US36 strain (REA type J/PCR ribotype 001) (Killgore *et al.*, 2008) and ATCC 43599 strain had the same *slpA* sequences of type gr-01 (GenBank accession no. AB249984); NL8 strain (REA type Y/PCR ribotype 014) (Killgore *et al.*, 2008) and ATCC 43600 strain were identical by both *slpA* sequence typing (type hr-01, GenBank accession no. AB231583) and PCR ribotyping. The *slpA* sequences of the US37 strain (REA type G/PCR ribotype 002), US42 strain (REA type BI/PFGE type NAP1/PCR ribotype 027) (Killgore *et al.*, 2008) and UMCG12(3) strain (PCR ribotype 078) (Goorhuis *et al.*, 2008) were

Table 1. Primers for *slpA* sequence typing

Primer	Direction	Sequence (5'→3')	Nt position of primer for 2nd PCR (GenBank accession no. of <i>slpA</i> of the representative isolate)
1st PCR			
slpAcom19	Forward	GTTGGGAGGAATTTAAGRAATG	
slpAcom22	Reverse	GCWGTYTCTATTCTATCDTYWCC	
2nd PCR			
Set A			
slpAcom33	Forward	TAGGYGATGGDRAWTAYGTWG	311–331 (AB180242)
slpAcom30	Reverse	CATAWBBYTYAGCTAAAKHTTBWGC	832–856 (AB180242)
Set B			
slpAy32-1	Forward	TAGGYGATGGAAAATAYGTTC	287–307 (AB258981)
slpAxr-1	Forward	TAGGTGATGGAGATTTAGTATC	299–320 (AB239686)
slpAyok-9	Forward	GTTGCAGATGGTGAACAGGC	157–177 (AB240196)
slpAcom30	Reverse	CATAWBBYTYAGCTAAAKHTTBWGC	853–877 (AB258981)
Set C			
slpAog39-3	Forward	GTTGYWRATRHRARAKTATGTTG	364–385 (AB259787)
slpAog39-6	Reverse	TTAWWSCATCAKARTCWGTTGC	955–976 (AB259787)

examined and registered as type yok-01 (GenBank accession no. AB240196), type gc8-01 (GenBank accession no. AB249986) and type 078-01 (GenBank accession no. AB470267), respectively.

Typing analysis of recovered isolates

A total of 160 stool specimens was examined and 87 *C. difficile* isolates were recovered. Of the 87 isolates, 75 were A⁺B⁺ and 12 were A⁻B⁺. Three of the A⁺B⁺ isolates were positive for PCR detecting the binary toxin gene (A⁺B⁺CDT⁺). By *slpA* sequence typing, the 87 isolates were typed into 14 major types and further divided into 18 subtypes (Table 2). In one isolate, DJNS 0403, the *slpA* gene could not be amplified by the primer set slpAcom19/sl pAcom22, but was sequenced using slpAcom19 and a reverse primer (5'-GCTGTTTGTATTCTGTCCATCACC-3'). This isolate was typed as *slpA* sequence type ar-02 (Table 2). Among the 87 isolates, 18 different PCR ribotypes were identified (Fig. 1). Typing results by *slpA* sequence typing were found to be concordant with those by PCR ribotyping (Table 2). A total of 51 isolates belonging to PCR ribotype smz was classified into three *slpA* sequence subtypes (smz-01, smz-02 and smz-04), and the sequences of subtypes smz-02 and smz-04 differed by one and two deduced amino acids from that of smz-01. Two isolates showed the same PCR ribotype pattern (PCR ribotype og39), but their *slpA* amino acid sequences shared only 23% homology. All of the 12 A⁻B⁺ isolates examined in the present study had the same *slpA* gene (type fr-01) but were typed into three different PCR ribotypes, 017, trf and sgf.

Direct typing by sequencing of *slpA*

A nested PCR detecting *tcdB* was performed on DNA extracted from the 160 stool specimens, and 109 (68%)

were found to be positive for *tcdB* by the nested PCR, and *tcdB*-positive *C. difficile* was detected in 86 (79%) of the 109 stool specimens by culture (Table 3). No specimens negative for PCR detecting *tcdB* but positive for toxic culture were found. The 109 specimens that were PCR positive for *tcdB* were examined by a PCR detecting *slpA*. *slpA* was amplified by a nested PCR and sequenced in 90 (83%) of the 109 stool specimens tested; of these 90 specimens, *slpA* typing results were obtained in 83 and 7 specimens by primer sets A and B, respectively (Tables 2 and 3). Of the 90 stool specimens in which direct typing results were obtained, 77 specimens were positive for *C. difficile* culture, and typing results from isolated strains agreed with those from direct typing in 76 specimens. In one stool specimen, the typing result on the recovered isolate (*slpA* sequence type og39-01) differed from that by direct typing with primer set A (*slpA* sequence type smz-01). *C. difficile* culture was repeated in the stool specimen, and ten colonies were selected randomly and tested. Of the ten colonies examined for PCR ribotyping, eight and two were typed as PCR ribotype smz and og39, respectively. The *slpA* genes of two of the eight smz isolates and both og39 isolates obtained were sequenced, and PCR ribotype smz and og39 isolates were typed as *slpA* sequence types smz-01 and og39-01, respectively. Second PCRs with primer sets B and C were performed on the PCR product from the first PCR from this stool specimen; *slpA* sequence type og39-01 was obtained by PCR with primer set C. In 13 stool specimens, *C. difficile* was not cultured, but typing results were obtained by direct *slpA* sequence typing (Table 3). Of the 13 stool specimens, 6 were collected after vancomycin treatment had started. No amplification product was produced by PCRs for *slpA* in nine stool specimens that were positive for *C. difficile* culture.

Table 2. Typing results of recovered isolates and direct typing results obtained from 160 stool specimens

<i>slpA</i> sequence type*	GenBank accession no.	PCR ribotype	Toxin production	No. of isolates/no. of stool specimens typed directly				Second primer set for direct typing		
				Recovered at hospital:					Other (13†)	Total (160†)
				A (36†)	B (44†)	C (26†)	D (41†)			
ar-02	AB259785	km0403	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺	1/0				1/0	NA‡	
cr-02	AB258979	km0429	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	1/1				1/1	A	
cr-03	AB258980	g9376	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺				1/1	1/1	A	
fr-01	AB236153	017§	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻					1/1	A	
		trf	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻				8/9	2/3	10/12	A
		sgf	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻					1/1	1/1	A
gr-01	AB249984	001§	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻			2/1	2/2		4/3	A
hr-01	AB231583	014§	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻		1/1		3/1		4/2	A
		gc0637	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻				2/1		2/1	A
kr-02	AB258982	nt0442	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻					1/1	1/1	B
xr-03	AB261625	gc0577	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻				1/1		1/1	B
smz-01	AB180242	smz	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	13/14	8/12		9/9	1/1	31/36	A
smz-02	AB181350	smz	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	9/13	5/5	1/1			15/19	A
smz-04	AB256018	smz	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻			5/5			5/5	A
yok-01	AB240196	002§	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻		1/0			2/2	3/2	B
yok-02	AB257283	tk0437	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻		1/1				1/1	B
og39-01	AB259787	og39	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻				1/		1/	C
t25-01	AB259786	og39	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻		1/0				1/0	NA‡
gc11-01	AB258983	gc0578	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻				1/1		1/1	B
gc13-01	AB269265	gc0636	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻				1/1		1/1	B
gc8-01	AB249986	027§	A ⁺ B ⁺ CDT ⁺				1/1		1/1	A
Total no. isolates/ total no. specimens typed				24/28	17/19	8/7	30/27	8/9	87/90	

*Isolates were assigned to different *slpA* sequence major types when they had 20 or more amino acid differences, and to subtypes (01, 02, 03 and 04) when they had fewer than 20 such differences.

†No. of stool specimens examined.

‡NA, No PCR products were amplified by any of the second primer sets used.

§The nomenclature of Stubbs *et al.* (1999) was used for PCR ribotypes 017, 001, 014, 002 and 027.

||In one specimen, two *slpA* sequence types, smz-01 and og39-01, were identified.

Endemic and sporadic types at hospitals in Japan

slpA sequence type smz (subtypes smz-01, smz-02 and smz-04)/PCR ribotype smz isolates were identified in 51 (59%) of 86 stool specimens from which *tcdB*-positive *C. difficile* was cultured, and *slpA* of type smz was detected in 60 (67%) of 90 stool specimens in which direct typing results could be obtained. In total, *slpA* sequence type smz was detected by culture and/or direct typing in 61 (62%) of 99 stool specimens positive for toxic culture and/or direct *slpA* sequence typing. Type smz was found most frequently at each of the four hospitals examined here; two subtypes (smz-01 and smz-02) were predominant at hospitals A and B, and only smz-01 was found at hospital D. *slpA* sequence subtype smz-04 was found to be unique to hospital C. In the present study, eight patients suffered from *C. difficile* infection (CDI) caused by A⁻B⁺ isolates at hospital D,

which were all typed into *slpA* sequence type fr-01/PCR ribotype trf. Among the A⁻B⁺ isolates examined in this study, one isolate of PCR ribotype 017 and one isolate of PCR ribotype sgf were recovered from patients admitted to the same hospital in 2004 and 2007, respectively. Both patients suffered from CDI with severe complications; the patient with the PCR ribotype 017 isolate died of CDI and the patient with PCR ribotype sgf survived after emergency colectomy. *slpA* sequence types gr, hr and yok were recovered from sporadic cases but were not predominant at any of the hospitals examined in this study. One A⁺B⁺ CDT⁺ isolate was found to be *slpA* sequence type gc8-01/PCR ribotype 027 in this study (Kato *et al.*, 2007). No isolates with the *slpA* gene identical to that of PCR ribotype 078 (Goorhuis *et al.*, 2008) were found among the 87 isolates tested.

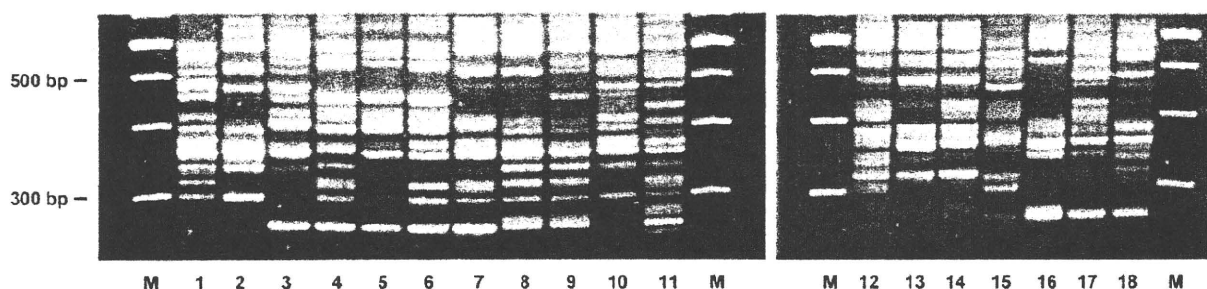


Fig. 1. PCR ribotype patterns of *C. difficile* isolates representing 18 different ribotypes. Lanes: 1, PCR ribotype km0403; 2, km0429; 3, g9376; 4, 017; 5, tfr; 6, sgf; 7, 001; 8, 014; 9, gc0637; 10, nt0442; 11, gc0577; 12, smz; 13, 002; 14, tk0437; 15, 027; 16, gc0578; 17, gc0636; 18, og39; M, 100 bp ladder.

DISCUSSION

slpA sequence typing was found to have reliable typability and discriminatory power in comparison with PCR ribotyping. To date, 24 different *slpA* sequence major types and 56 subtypes have been found among *tcdB*-positive isolates (data not shown). Typing results by *slpA* sequence typing exhibited a high concordance with those by PCR ribotyping with the exception of two isolates, which belonged to the same PCR ribotype but were classified as different major types, suggesting a high variability of the *slpA* gene in this PCR ribotype. However, the limitations of this study include the low number of strains examined for each *slpA* sequence type and PCR ribotype except for types smz and fr, so further analysis using more clinical isolates is warranted to compare the typing results of the two systems.

A definite advantage of sequence-based typing techniques is the transportability of typing results from laboratory to laboratory. When an increase in the incidence of CDI or in the severity of CDI cases is perceived, or one type is found to spread to multiple patients in a healthcare facility or an area, it is prudent to ascertain whether the epidemic or endemic strain corresponds to one of the hypervirulent strains already reported worldwide (Barbut *et al.*, 2007;

Goorhuis *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2005; Warny *et al.*, 2005). Especially in areas or countries where there is no experience of isolating the above-mentioned strains, identification of specific strains by typing systems, which depend on banding pattern analysis such as PCR ribotyping or PFGE analysis, is difficult without obtaining previously characterized reference strains. However, if the sequence results have been registered previously in the database, obtaining reference strains for comparison is unnecessary. Although *slpA* sequence typing requires sequencing steps, once the typing results are obtained, it is easier and more objective to compare typing results of tested strains with those typed previously without repeating experiments. On this point, typing by sequencing analysis is not always time-consuming.

slpA sequence typing was applied successfully to direct typing. Of 13 stool specimens from which *C. difficile* was not cultured but typing results were obtained by direct *slpA* sequence typing, six were collected after vancomycin treatment had started; vancomycin in the stool specimens might inhibit the growth of *C. difficile*. *slpA* sequence typing could be used to analyse *C. difficile* in some stool specimens that are inadequate for culture, such as those obtained after starting treatment with vancomycin or metronidazole. Direct typing by sequencing of *slpA* at present has the limitation of the tedious steps required. As this typing method depends on the variability of the *slpA* gene, three sets of primers for the second PCR are needed to amplify the variable region of the gene, which complicates the procedure. Although the procedure must be simplified for practical use, the method could be valuable for detecting epidemiologically important strains.

Toxin B-positive *C. difficile* was recovered from 86 (54%) of 160 stool specimens tested. The stool specimens tested in this study were obtained from patients who had symptoms that were considered severe and so the samples were sent to the National Institute of Infectious Diseases for further analysis. This is the major reason for the high prevalence.

The type smz strain has been documented to cause healthcare-associated infection in many hospitals in Japan

Table 3. Comparison of results of *tcdB*⁺ *C. difficile* culture and direct PCR for the detection of *tcdB* and *slpA* in 160 stool specimens

<i>tcdB</i> ⁺ <i>C. difficile</i> culture	Direct PCR for:		No. of stool specimens (n=160)
	<i>tcdB</i>	<i>slpA</i>	
+	+	+	77
+	+	-	9
-	+	+	13
-	+	-	10
-	-	ND	51

ND, Not done.

(Kato *et al.*, 2001, 2005a; Sawabe *et al.*, 2007). Killgore *et al.* (2008) tested 42 *C. difficile* isolates from four countries in North America and Europe using seven techniques including *slpA* sequence typing, and none was identified as *slpA* sequence type smz. In another report, only 3 of 33 isolates recovered from an outbreak in the USA were type smz (Kato *et al.*, 2001, 2005a). Joost *et al.* (2009) examined the *slpA* sequences of their *C. difficile* isolates and compared the sequence results with those registered in the database; they found type smz in only 3% of isolates recovered from CDI patients at a university hospital in German. Whilst these limited studies suggest that type smz is not frequently isolated in North America or Europe, the real prevalence is unknown. *slpA* sequence typing could be useful for studying the distribution of the smz strain worldwide.

A⁻B⁺ *C. difficile* has been reported to cause nosocomial outbreaks (Komatsu *et al.*, 2003; Kuijper *et al.*, 2001) and to be predominant in Ireland, Poland (Barbut *et al.*, 2007; Pituch *et al.*, 2007) and Korea (Kim *et al.*, 2008), as well as in Japan (Rupnik *et al.*, 2003), indicating the emergence of CDI caused by A⁻B⁺ *C. difficile*. As far as we know, A⁻B⁺ isolates that have 1.8 kbp deletions in the repeating sequences of *tcdA* (Kato *et al.*, 1999), including the ATCC 43598 strain, are all typed into the *slpA* sequence major type fr together with exceptional isolates that belonged to serogroup X (data not shown). Notably, A⁻B⁺ *C. difficile* was isolated from two patients representing two sporadic cases with severe complications, although no specific characteristics were found in these isolates. In the present study, 1 isolate was identified as PCR ribotype 027; none of the 87 isolates tested was PCR ribotype 078. To date, we have found only sporadic CDI cases caused by *slpA* sequence type gc8/PCR ribotype 027 isolates in Japan, which were historic isolates (Kato *et al.*, 2007; Sawabe *et al.*, 2007). It has been documented that PCR ribotype 078 more frequently causes community-associated diseases (Goorhuis *et al.*, 2008). All patients examined in this study had healthcare-associated infection, which might be one of the reasons why CDI caused by PCR ribotype 078 was not found. Typing by sequencing of *slpA* could be a reliable tool for discovering CDI cases and outbreaks due to these epidemic strains, which may have been overlooked.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank G. E. Killgore, B. Limbago, A. Thompson and L. C. McDonald (Centers for Disease Control and Prevention, USA); S. Johnson, W. Zukowski, S. P. Sambol and D. N. Gerding (Hines VA Hospital, USA); J. Brazier (University Hospital of Wales, UK); E. J. Kuijper and R. J. van den Berg (Leiden University Medical Center, The Netherlands); J. Pepin and E. H. Frost (University of Sherbrooke, Canada); B. Nicholson and C. Woods (Duke University School of Medicine, USA); and P. Savelkoul (VU University Medical Center, The Netherlands) for providing the US36, NL8, US37 and US42 strains and strain information; and E. J. Kuijper and D. Bakker (Leiden University Medical Center, The Netherlands) for providing the UMCG12(3) strain; and M. Nagasawa, Y. Kajihara and S. Ono (National Defense Medical College Hospital, Japan);

A. Nakamura, Y. Iwashima and Y. Wakimoto (Nagoya City University Hospital, Japan); and T. Tazawa and J. Okada (Kanto Medical Center NTT EC, Japan) for their assistance in the collection of specimens. The technical assistance of Y. Yoshimura, K. Kai and Y. Taki is also gratefully acknowledged. A grant-in-aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, and a grant (H19-Shinko-011) from the Ministry of Health, Labour, and Welfare, Japan, supported this study.

REFERENCES

- Barbut, F., Mastrantonio, P., Delmee, M., Brazier, J., Kuijper, E. & Poxtton, I. (2007). Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. *Clin Microbiol Infect* 13, 1048–1057.
- Calabi, E. & Fairweather, N. (2002). Patterns of sequence conservation in the S-layer proteins and related sequences in *Clostridium difficile*. *J Bacteriol* 184, 3886–3897.
- Delmee, M., Laroche, Y., Avesani, V. & Cornelis, G. (1986). Comparison of serogrouping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 24, 991–994.
- Eidhin, D. N., Ryan, A. W., Doyle, R. M., Walsh, J. B. & Kelleher, D. (2006). Sequence and phylogenetic analysis of the gene for surface layer protein, *slpA*, from 14 PCR ribotypes of *Clostridium difficile*. *J Med Microbiol* 55, 69–83.
- Goorhuis, A., Van der Kooij, T., Vaessen, N., Dekker, F. W., Van den Berg, R., Harmanus, C., Van den Hof, S., Notermans, D. W. & Kuijper, E. J. (2007). Spread and epidemiology of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. *Clin Infect Dis* 45, 695–703.
- Goorhuis, A., Bakker, D., Corver, J., Debast, S. B., Harmanus, C., Notermans, D. W., Bergwerff, A. A., Dekker, F. W. & Kuijper, E. J. (2008). Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis* 47, 1162–1170.
- Joost, I., Speck, K., Herrmann, M. & von Muller, L. (2009). Characterisation of *Clostridium difficile* isolates by *slpA* and *tcdC* gene sequencing. *Int J Antimicrob Agents* 33, S13–S18.
- Karjalainen, T., Saumier, N., Barc, M. C., Delmee, M. & Collignon, A. (2002). *Clostridium difficile* genotyping based on *slpA* variable region in S-layer gene sequence: an alternative to serotyping. *J Clin Microbiol* 40, 2452–2458.
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Iwai, N., Nakamura, H., Yamamoto, T., Suzuki, K., Kim, S. M., Chong, Y. & Wasito, E. B. (1998). Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J Clin Microbiol* 36, 2178–2182.
- Kato, H., Kato, N., Katow, S., Maegawa, T., Nakamura, S. & Lyerly, D. M. (1999). Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. *FEMS Microbiol Lett* 175, 197–203.
- Kato, H., Kato, N., Watanabe, K., Yamamoto, T., Suzuki, K., Ishigo, S., Kunihiro, S., Nakamura, I., Killgore, G. E. & Nakamura, S. (2001). Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. *J Clin Microbiol* 39, 1391–1395.
- Kato, H., Yokoyama, T. & Arakawa, Y. (2005a). Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. *J Med Microbiol* 54, 167–171.
- Kato, H., Yokoyama, T., Kato, H. & Arakawa, Y. (2005b). Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 43, 6108–6112.

- Kato, H., Ito, Y., Van den Berg, R. J., Kuijper, E. J. & Arakawa, Y. (2007). First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. *Euro Surveill* 12, E070111–E070113.
- Keel, K., Brazier, J. S., Post, K. W., Weese, S. & Songer, J. G. (2007). Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. *J Clin Microbiol* 45, 1963–1964.
- Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S., Brazier, J., Kuijper, E., Pepin, J., Frost, E. H., Savelkoul, P., Nicholson, B. & other authors (2008). Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *J Clin Microbiol* 46, 431–437.
- Kim, H., Riley, T. V., Kim, M., Kim, C. K., Yong, D., Lee, K., Chong, Y. & Park, J. W. (2008). Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 46, 1116–1117.
- Komatsu, M., Kato, H., Aihara, M., Shimakawa, K., Iwasaki, M., Nagasaka, Y., Fukuda, S., Matsuo, S., Arakawa, Y. & other authors (2003). High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 22, 525–529.
- Kuijper, E. J., de Weerd, J., Kato, H., Kato, N., Van Dam, A. P., Van der Vorm, E. R., Weel, J., Van Rhee, C. & Dankert, J. (2001). Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20, 528–534.
- Kuijper, E. J., Barbut, F., Brazier, J. S., Kleinkauf, N., Eckmanns, T., Lambert, M. L., Drudy, D., Fitzpatrick, F., Wiuff, C. & other authors (2008). Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* 13, 433–439. Medline
- McDonald, L. C., Killgore, G. E., Thompson, A., Owens, R. C., Jr, Kazakova, S. V., Sambol, S. P., Johnson, S. & Gerding, D. N. (2005). An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 353, 2433–2441.
- Pituch, H., Van Leeuwen, W., Maquelin, K., Wultanska, D., Obuch-Woszczatynski, P., Nurzynska, G., Kato, H., Reijans, M., Meisel-Mikolajczyk, F. & other authors (2007). Toxin profiles and resistances to macrolides and newer fluoroquinolones as epidemicity determinants of clinical isolates of *Clostridium difficile* from Warsaw, Poland. *J Clin Microbiol* 45, 1607–1610.
- Rupnik, M., Kato, N., Grabnar, M. & Kato, H. (2003). New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J Clin Microbiol* 41, 1118–1125.
- Samore, M., Killgore, G., Johnson, S., Goodman, R., Shim, J., Venkataraman, L., Sambol, S., DeGirolami, P., Tenover, F. & other authors (1997). Multicenter typing comparison of sporadic and outbreak *Clostridium difficile* isolates from geographically diverse hospitals. *J Infect Dis* 176, 1233–1238.
- Sawabe, E., Kato, H., Osawa, K., Chida, T., Tojo, N., Arakawa, Y. & Okamura, N. (2007). Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26, 695–703.
- Stubbs, S. L., Brazier, J. S., O'Neill, G. L. & Duerden, B. I. (1999). PCR targeted to the 16S–23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. *J Clin Microbiol* 37, 461–463.
- Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B. & Popoff, M. (2000). Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 186, 307–312.
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E. & McDonald, L. C. (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet* 366, 1079–1084.