

図5. 有害事象の出現頻度の比

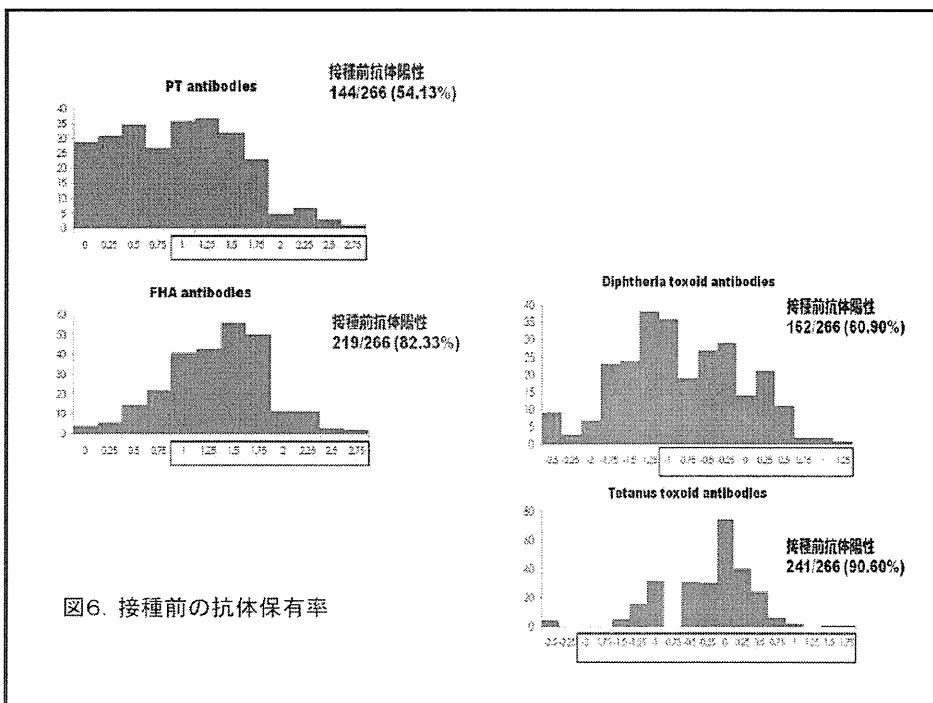


図6. 接種前の抗体保有率

表3. DT0.1ml /DTaP0.2ml /DTaP0.5ml 接種前後の平均抗体価

	DT 0.1ml		DPT 0.2ml		DPT 0.5ml	
	接種前GMT (95% CI)	接種後GMT (95% CI)	接種前GMT (95% CI)	接種後GMT (95% CI)	接種前GMT (95% CI)	接種後GMT (95% CI)
抗PT抗体	10.8 (6.38-18.29)	13.93 (8.98-21.61)	12.11 (9.21-15.94)	89.05 (70.54-112.41)	10.88 (8.27-14.32)	102.74 (82.91-127.32)
抗FHA抗体	24.92 (16.34-38.00)	31.2 (22.43-43.42)	33.73 (27.32-41.64)	252.82 (214.29-298.27)	25.83 (20.67-32.28)	302.06 (254.2-358.93)
凝集素(疎液)	31.5 (17.90-55.41)	38.13 (21.80-66.69)	44.16 (32.88-59.32)	179.95 (131.33-246.55)	33.93 (25.22-45.66)	188.01 (136.16-259.61)
凝集素(山口)	10 (7.13-14.02)	10.49 (7.49-14.70)	12.48 (10.05-15.49)	17.89 (14.12-22.66)	11.18 (9.38-13.46)	16.13 (12.98-20.05)
抗D抗体	0.23 (0.11-0.47)	40.14 (28.28-56.96)	0.22 (0.17-0.30)	46.17 (36.69-67.32)	0.16 (0.12-0.24)	46.78 (36.73-61.24)
抗T抗体	0.47 (0.28-0.81)	20.96 (13.37-32.84)	0.87 (0.70-1.09)	18.02 (14.90-21.80)	0.59 (0.44-0.79)	27.12 (22.79-32.27)

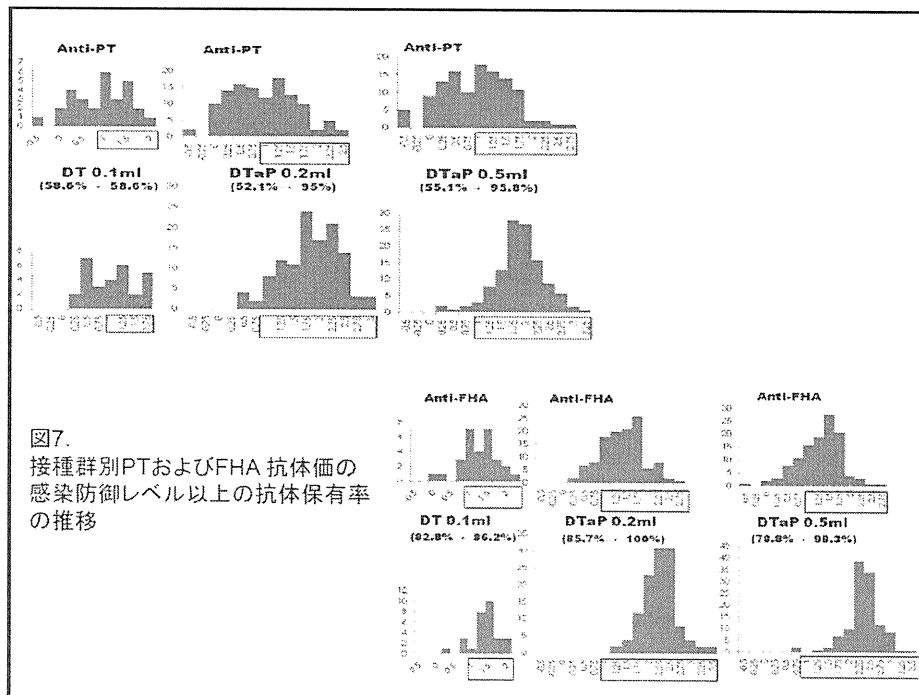


図7. 接種群別PTおよびFHA抗体価の感染防御レベル以上の抗体保有率の推移

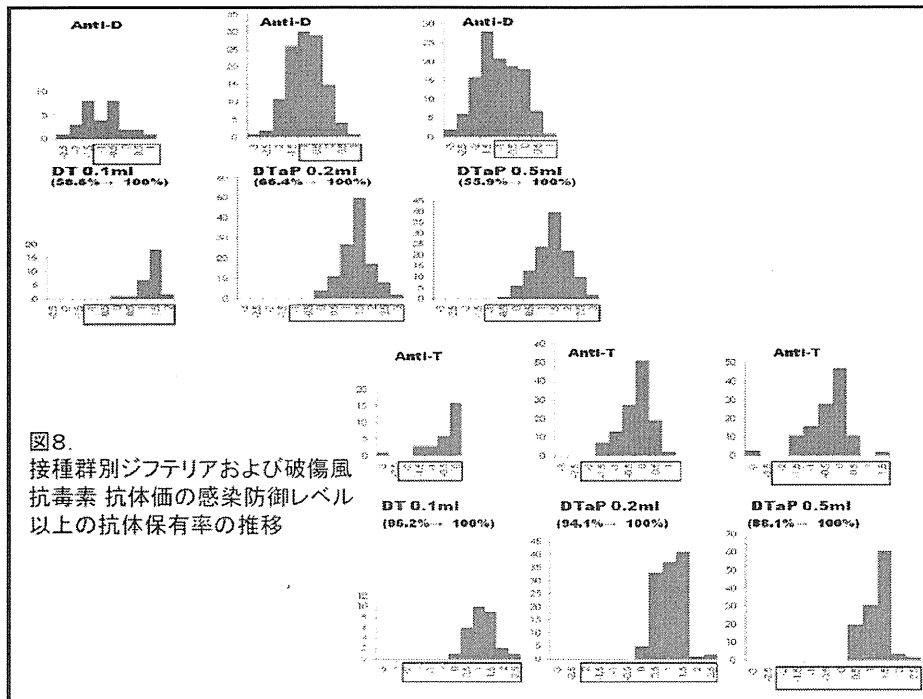


図8.
 接種群別ジフテリアおよび破傷風
 抗毒素 抗体価の感染防御レベル
 以上の抗体保有率の推移

本臨床試験は以下の29施設の多施設共同研究の成果である。

Study 1 免疫原性と安全性の検討

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| 国立病院機構 福岡病院 (岡田賢司) | 国立病院機構 三重病院 (中野貴司先生) |
| 都立駒込病院 (高山直秀先生) | 高知大学 (脇口 宏先生) |
| 川崎医科大学 (尾内一信先生) | 江南厚生病院子供医療センター (尾崎隆男先生) |
| 豊川市民病院 (加藤友親先生) | 千葉大学 (石和田稔彦先生) |
| 国立病院機構 東京医療センター (岩田 敏先生) | |

Study 2 安全性の検討

日本外来小児科学会 予防接種委員会： 永井崇雄先生

- | | |
|----------------------|---------------------|
| 永井小児科医院 (永井崇雄先生) | 岡藤小児科医院 (岡藤輝夫先生) |
| おさきこどもクリニック (尾崎貴視先生) | 加地医院 (加地はるみ先生) |
| 西さっほろ小児科 (鎌田 誠先生) | くまがい小児科 (熊谷卓司先生) |
| しらかわ小児科医院 (白川佳代子先生) | 杉村こどもクリニック (杉村 徹先生) |
| すずえこどもクリニック (錦江純史先生) | 鈴木小児科医院 (鈴木英太郎先生) |
| たはらクリニック (田原卓浩先生) | ひらおか公園小児科 (長田伸夫先生) |
| 西岡医院 (西岡敦子先生) | 橋本こどもクリニック (橋本裕美先生) |
| ふじおか小児科 (藤岡雅司先生) | 藤沢こどもクリニック (藤澤卓爾先生) |
| 小児科内科三好医院 (宮崎雅仁先生) | みやた小児科 (宮田章子先生) |
| あさぶ小児科 (由利賢次先生) | 横田小児科医院 (横田俊一郎先生) |

厚生労働科学研究費補助金（平成 21-23 年度）
新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業
分担研究報告書

百日咳の実験室診断

研究分担者：中山 哲夫（北里生命科学研究所）、
研究協力者：渡邊峰雄（北里生命科学研究所）
小口 薫、宮田 章子（みやた小児科）
吉田 菜穂子（国家公務員共済組合連合会立川病院 小児科）
藤野 元子（東京都済生会中央病院 小児科）
和山 行正（北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所）

【研究要旨】百日咳は whooping を伴う咳込み等典型的な症状から診断されるが、成人百日咳は典型的な症状を認めないため 2 週間以上持続する咳、夜間の発作性の咳、咳込み嘔吐などの症状から診断されている。増加する成人百日咳に対処するためには DT 接種時期に百日咳の成分を追加接種する必要があり平成 20 年 9 月から平成 21 年 8 月まで臨床試験を実施し DPT 0.2 ml と減量接種することで DT 0.1 ml と同等の安全性を有し百日咳に対しても強い抗体応答を示し DPT 0.5 ml 接種と有意差は認めなかった。ワクチン接種だけでなく百日咳の診断も重要で臨床的に百日咳が疑われた症例で従来の凝集素価、PT, FHA 抗体と共に、ワクチンに含まれていない catACT, cFHA, Fim3 抗原に対する抗体測定系を確立 Fim3 抗体がダイナミックに変動していた。パラ百日咳菌の分離された患者血清のプロテオーム解析の結果、パラ百日咳外膜タンパク(p150)、線毛抗原(p26)、低分子タンパク(p21)、ペプチドグリカン結合タンパク(p18)が陽性反応を示した。p150 と p21 抗体が有意な相関関係を示し、百日咳 PT 抗体と重複することは少なくパラ百日咳の診断が可能と考えられた。臨床的に百日咳が疑われた場合には百日咳 PT, DPT に含まれない Fim3, パラ百日咳外膜タンパク(p150)の血清抗体測定を組み合わせることで診断精度を高めることができる。

A. 研究目的

百日咳は乳幼児においては無呼吸発作や脳症を合併する重篤な感染症である。1950 年から全菌体百日せきワクチンが開発され接種が始まり、1974/75 年の副反応例から一時中止になり再開はされたものの接種率は低迷し 1981 年には百日咳菌の感染防御に関連する百日咳毒素(pertussis toxin: PT)、繊維状赤血球凝集素(filamentous hemagglutinin; FHA)等を精製した無細胞型百日咳ワクチンとジフテリア・破傷風トキソイドとを混合した沈降精製三種混合ワクチン(acellular pertussis combined with DT: DTaP)が開発された。DTaP 接種後では発熱等の副反応の出現率は極めて低く、DTaP 接種率も 90%近くになり百日咳患者報告数は減少してきた。

近年、大学キャンパスでの流行も報告されている。成人百日咳は典型的な症状を認めることは少なく、多くは慢性、遷延性の咳として百日

咳の疑いすら抱かれず、また確実な診断法はなく遺伝子診断法も開発されているが一般には普及してないための確な診断がなされていない。そのため成人百日咳の実態が明らかとなっていないのが現状である。成人の百日咳はワクチン接種前の乳幼児への感染源となり成人百日咳の制御は大きな課題となる。DPT ワクチンを接種しているにもかかわらず百日咳の増加の原因は諸外国と比較して欧米より 1-2 回接種回数が少ないことだけではなく他の原因も考慮しなければならない。

感染症対策は病原診断と予防対策(ワクチン政策)が両輪となる。百日咳の原因は *B. pertussis* であるが *Bordetella* 属には *B. pertussis* 以外にも *B. parapertussis*, *B. holmessi*, *B. bronchiseptica* の 4 種類が属しており百日咳の実験室診断は菌分離に頼ることになる。分離率は低く血清診断法は確立されていない。百日咳の実態を明らかとするためには百日咳、パラ百日咳の血清診断法を確立し、

併せて成人百日咳に対処するために百日咳成分を含むワクチンの追加接種を実現する百日咳対策が必要である。諸外国で使用されているTdapを新たに開発するには時間がかかるため現行のDPTの減量接種で対応可能かどうかを検討するために臨床試験を実施した。

【2010年度の成果】

DT接種時期の11-12歳児を対象にDT 0.1 ml, DTaP 0.2 ml, DTaP 0.5 mlの接種試験を2008年9月から2009年8月までに全国29の医療施設で実施した。DTaP初回免疫、追加接種を完了しているもの、もしくは3回以上DTaPの接種を受けており、かつDT接種を受けていないもの、代諾者の文書による同意が得られた555例を対象とした。安全性の検討はDT 0.1 mlは197例、DPT 0.2 ml接種群は178例、DPT 0.5 ml接種群は176例、免疫原性の対象はDT 0.1 mlは29例、DPT 0.2 ml接種群は119例、DPT 0.5 ml接種群は118例で検討した。

安全性の評価

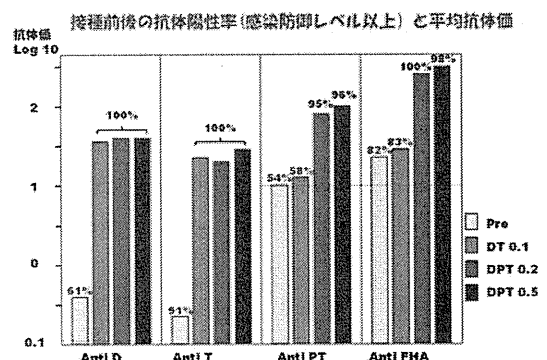
発赤、腫脹、疼痛、熱感、かゆみの出現頻度を表に示した。DTaP 0.2 ml接種群とDT 0.1 ml接種群の有害事象の出現頻度のリスク比を検定しDTaP 0.2 ml群はDT 0.1 ml接種群に比べて腫脹の出現率が1.31倍(95%CI:1.04-1.65)高くなるが他の症状の出現率には差が認めなかった。一方、DTaP 0.5 ml接種群はDT 0.1 ml接種群と比較して発赤の出現頻度は1.33倍(95%CI: 1.10-1.60)、腫脹の出現頻度は1.40倍(95%CI: 1.12-1.75)となり熱感、疼痛は1.62倍(95%CI: 1.33-1.98)、1.59倍(95%CI: 1.19-2.13)に増加した。

有害事象の出現頻度の比較

有害事象	DTaP 0.2mL(1) (N=178)*	DTaP 0.5mL(2) (N=176)	DT 0.1mL(3) (N=197)	有害事象の出現頻度のリスク比		
				(2) vs (1)	(1) vs (3)	(2) vs (3)
発熱	7(3.9%)	7(4.0%)	8(4.1%)	1.01 (0.36, 2.82)	0.97 (0.36, 2.62)	0.98 (0.36, 2.55)
局所腫脹	123(69.1%)	145(82.4%)	121(61.4%)	1.19 (1.06, 1.34)	1.13 (0.97, 1.30)	1.34 (1.19, 1.53)
発赤	95(53.4%)	109(61.9%)	92(46.7%)	1.16 (0.97, 1.39)	1.14 (0.92, 1.40)	1.33 (1.18, 1.50)
腫脹	90(50.6%)	95(54.0%)	76(38.6%)	1.07 (0.87, 1.30)	1.31 (1.04, 1.65)	1.40 (1.12, 1.75)
疼痛	83(46.6%)	116(65.9%)	80(40.6%)	1.41 (1.17, 1.71)	1.15 (0.91, 1.45)	1.62 (1.33, 1.98)
熱感	50(28.1%)	74(42.0%)	52(26.4%)	1.50 (1.12, 2.00)	1.05 (0.76, 1.48)	1.59 (1.19, 2.13)
かゆみ	81(45.5%)	83(47.2%)	75(38.1%)	1.02 (0.82, 1.28)	1.21 (0.95, 1.54)	1.24 (0.98, 1.57)

免疫原性の評価

接種前後での感染防御レベル以上の抗体保有率はPT抗体で54%が95-96%、FHA抗体でも82%から98-100%と上昇し、ジフテリア、破傷風トキソイド抗体も接種後には有効抗体保有率は100%と上昇した。接種後の百日咳抗体価DTaP 0.2 ml接種群と0.5 ml接種群で有意差は認めなかった。ジフテリアトキソイド抗体もDT 0.1 ml接種群と比較しても有意差を認めなかった。破傷風トキソイド抗体ではDTaP 0.5 ml接種群では0.2 ml接種群より高い抗体レスポンスを示したもののDTaP 0.2 ml接種群ではDT 0.1 ml接種群との差は認めなかった。



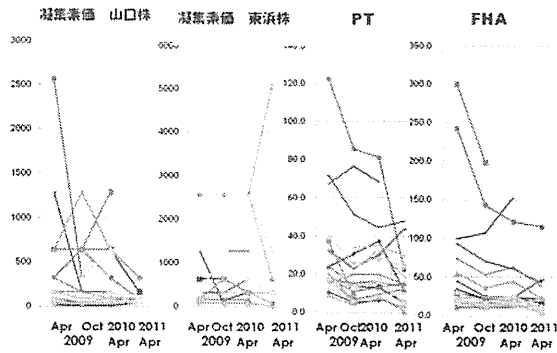
結論

DT接種時期のDT 0.1 ml接種をDTaP 0.2 ml接種に変更することで腫脹の出現率が多少高くなるがDT 0.1 ml接種と同様に安全に接種が可能である。DTaP 0.2 mlの接種で百日咳に対する有効な抗体反応を示し、ジフテリア、破傷風抗体もDT 0.1 mlと有意差は認めなかった。11-12歳でPT抗体の感染防御レベル以上の陽性率は60%以下、FHA抗体に関しても80%前後にまで低下しており、百日咳のコントロールのためにDTに代わってDTaP 0.2 mlを使用できるように早急な対応が望まれる。

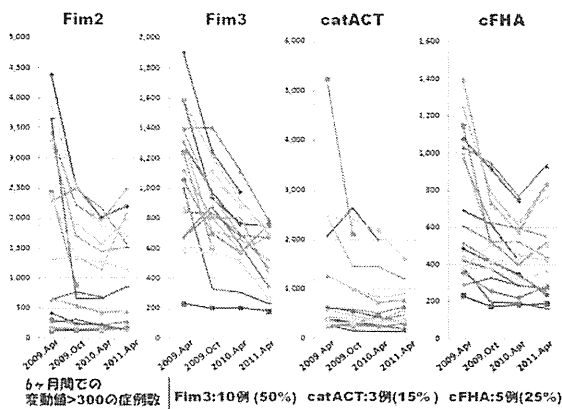
【2010年度の成果】

2008年末に百日咳が流行した地域の小児科医院のスタッフで臨床的に数名が百日咳と診断された22例についてその後の抗体について調査した。半年ごとに採血し山口株凝集素価、東浜株凝集素価、PT抗体、FHA抗体、ワクチン株に含まれていない抗原としてcatACT, cFHA, Fim3を精製し蛍光ELISA法で抗体価を

測定した。Fimbria 抗原のワクチン株は Fim2 で最近流行株はすべて Fim3 に変化している。



2009年4月には山口株に対する凝集素価, PT, FHA が高値を示す例は 2-3 例であった。他の例は 2 年後まで経過を見ても大きな変動は認めなかった。東浜株凝集素, PT, FHA はワクチンに含まれており自然感染により誘導されたものかワクチン免疫の鑑別は困難である。



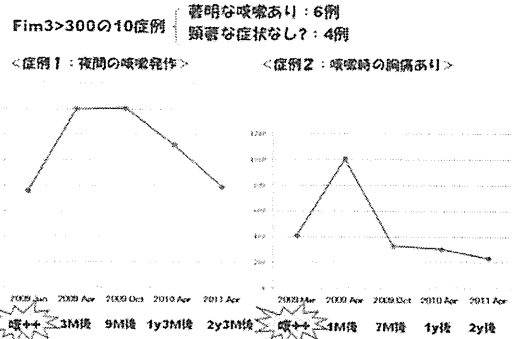
ワクチンに含まれていない catACT, cFHA, Fim3 とワクチン抗原である Fim2 に対する蛍光 EIA 抗体を測定した。catACT は大きな変動を認めなかったが Fim3 抗体はダイナミックに変動し Fim2 抗体も持ち上げられて変動した。Fim3, cFHA とともに高い抗体価は半年後には低下し 1 年以上持続していた。

一方、ワクチン接種前後の血清では Fim2 抗体は上昇するが Fim3 抗体は接種前後で変動はなかった。

2009 年 4 月から検査を始めたがその前に咳が続いた時期に採取されていた血清と併せて測定した。2009 年まで流行が持続し急性期の血清が得られていた症例 1 は 2009 年 4 月の測定時は咳が出始めて 3 か月後で Fim3 抗体は上

昇し 1 年 3 か月後には減少していた。症例 2 は咳が出始めて 1 か月後の血清で Fim3 抗体価が上昇し 7 か月後には減少していた。

【Fim3の変動値が高値の症例の臨床像】

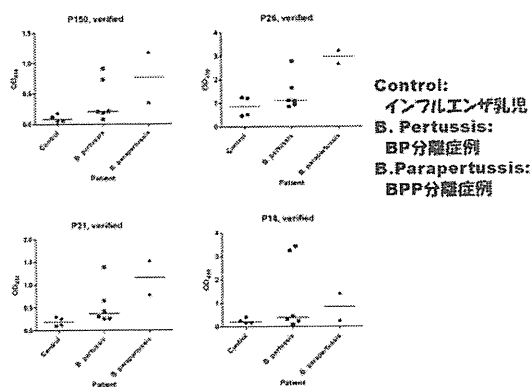


百日咳の実験室診断は菌分離、PCR, LAMP 法による遺伝子診断が直接的な診断方法であるが分離培地を常時準備しておくことが必要で、遺伝子診断にはそれなりの設備が必要である。乳幼児の百日咳は典型的な症状から痙攣期の早期には疑いが持たれ百日咳菌も菌量が多く排泄期間も長く、分離・遺伝子検査が有用である。一方、成人百日咳は典型的な症状をとることが少なく疑いが持たれるまでに時間がかかり、DPT ワクチン接種の既往があり、また抗菌剤の投与により菌量・排泄期間も短く分離・遺伝子検査の陽性率は数%にとどまる。成人百日咳ではペア血清による血清診断に依存することになる。東浜ワクチン株は 1950 年頃に分離された株でその性状が変化しておりワクチン株の Fimbria 抗原は Fim2 であるが、最近流行株は Fim3 に変化している。Fim3 抗体がダイナミックに変動しておりワクチン接種では Fim3 抗体は変動ないことから Fim3 抗体の測定が成人百日咳の診断に有用と思われる。

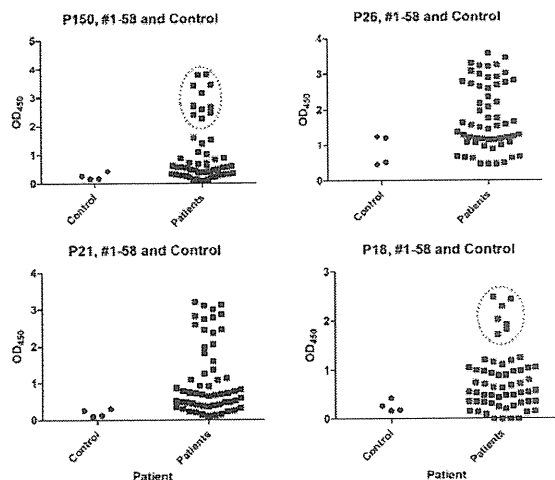
【2011 年度の成果】

パラ百日咳菌の外膜タンパク p150、線毛抗原 p26、低分子タンパク p21、ペプチドグリカン結合タンパク p18 のタンパクを大腸菌で発現させ精製しパラ百日咳抗原として使用した。P150, p26 は百日咳菌にはなくパラ百日咳菌に特異的なタンパクであるが p21, p18 は百日咳菌も発現しているが感染時には産生されていないと報告されている。

2010年の済生会中央病院での百日咳を疑った43例中3例から百日咳菌が分離されLAMP陽性が24例で24例が百日咳と診断された。パラ百日咳菌は3例から分離されLAMP法でも3例から遺伝子が検出された。臨床的百日咳の10%弱をパラ百日咳が占めていると考えられた。パラ百日咳の分離された2例はp150, p26, p21に対してコントロール群より高い抗体反応を示した。百日咳菌の分離された6例中에서도反応が認められたがコントロール群ではいずれの抗原に対しても低い反応であった。p18に対しては2例共に低い反応を示すのみでパラ百日咳の診断に利用できないと考えられた。

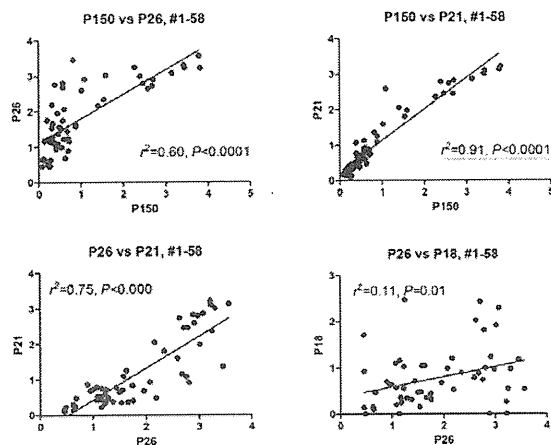


次に、臨床的に百日咳と診断され58例の血清を用いてパラ百日咳抗原に対するEIA抗体の検討し結果を示した。p150, p26, p21, p18抗原に対して高い抗体価を持つ例が存在し1群の低い症例とは異なるクラスターを示している様に思われた。



58例の血清の各抗原EIA抗体の相関関係を

検討し下図に示した。パラ百日咳菌が分離された症例の血清のp18抗原に対するEIA抗体価は低く他の抗原との相関関係は低くp26とp18の相関は $r^2=0.11$ と有意な相関は認めなかった。一方パラ百日咳菌に特異的なタンパクと考えられているp150とp26は $r^2=0.6$ 、p150とp21は $r^2=0.91$ と有意な相関関係を示した。



百日咳の中には8-10%弱にパラ百日咳であることがわかった。パラ百日咳は教科書的には百日咳と比較して軽症であるとされているが百日咳も無症候性感染、軽い咳程度から肋骨骨折を合併するものまで多彩であり症状から鑑別はできない。パラ百日咳菌はPTを産生することはないため現行のDPTワクチンでは効果がなくDPTワクチンの効果が減弱している原因の一つとしてパラ百日咳の流行が考えられる。その診断法は菌分離と遺伝子検索であるが百日咳と同様に受診するまでの期間が長く菌分離率が低く診断が困難である。

現在、パラ百日咳の血清診断法はなくパラ百日咳の実態は不明である。パラ百日咳菌の外膜タンパクp150、線毛抗原p26、低分子タンパクp21、ペプチドグリカン結合タンパクp18のタンパクがEIA抗原として診断法を検討した。ペプチドグリカン結合タンパクp18に対する反応性は低く診断抗原としては外膜タンパクp150、線毛抗原p26、低分子タンパクp21が候補になる。お互いの相関関係を見るとp150抗原はp26, p21にも有意な相関を示したことから診断抗原としてはp150に期待が持てる。

【まとめ】

成人百日咳の増加の原因の一つとして百日咳の成分を含んだ予防接種の回数が欧米諸国と比較して1-2回少ないことが考えられる。欧米ではジフテリア、百日咳の成分を減らしたTdapが用いられているがこれからTdapを開発するには時間がかかるためDT種接時期にDPTを0.2 mlと減量接種することで百日咳の抗体にブースターをかけ成人百日咳に対処することが可能でと考えられる。

成人百日咳では既にワクチン接種を受けており、また抗菌剤の投与を受けていることから百日咳、パラ百日咳の菌分離、遺伝子検出率は低く百日咳の実態を把握するためには血清診断法の開発が必要で、PT抗体、百日咳Fim3抗体、パラ百日咳菌外膜タンパクp150の3種類の抗原を組み合わせて検索することでこれらの鑑別が可能と思われ症例数を増やして検討することが必要である。

研究業績

1 論文発表

- 1) Nagai T, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama T. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. *J Med Virol* 81: 1094-1101, 2009
- 2) Sakata M, Komase K, Nakayama T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine Nagai M, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, strain is responsible for the temperature sensitivity. *Vaccine* 27: 234-242 2009
- 3) Nakamura A, Sakano T, Nakayama T, Shimoda H, Okada Y, Hanayama R, Nomoto K, Suto T, Kinoshita Y, Furue T, Ono H, Ohta T. Neonatal pertussis presenting as acute bronchiolitis: direct detection of the *Bordetella pertussis* genome using loop-mediated isothermal amplification. *Europ J Ped* 168 : 347-349, 2009
- 4) Ninomiya K, Kanayama T, Fujieda N,

- Nakayama T, Komase K, Nagata K, Takeuchi K. Amino acid substitution at position 464 in the hemagglutinin-neuraminidase protein of a mumps virus Urabe strain enhanced the virus growth in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Vaccine* 27: 6160-6165, 2009
- 5) Dong JB, Saito A, Mine Y, Sakuraba Y, Nibe K, Goto Y, Komase K, Nakayama T, Miyata H, Iwata H, Haga T. Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. *Virus Genes* 39: 330-334, 2009
 - 6) Yoshida N, Nakayama T. Leucine at position 383 of fusion protein is responsible for fusogenicity of wild-type mumps virus in B95a cells. *Intervirology* 53: 193-202, 2009
 - 7) 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: 7626-7633, 2010
 - 8) Sakata M, Nakayama T. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. *Vaccine* 29: 1107-1113, 2011
 - 9) Sawada A, Komase K, Nakayama T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. *Vaccine* 29: 1481-1490, 2011
 - 10) Ji Yi-Xin, Ihara T, Komase K, Nakayama T. Amino acid substitutions in Matrix, Fusion, and Hemagglutinin proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells. *Intervirology* 54, 217-228, 2011.
 - 11) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from a patients with subacute sclerosing panencephalitis possesses

typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity. J Virol 85, 11871-11882, 2011

学会発表 シンポジウム

1. 中山哲夫、岡田賢司、中野貴司、永井崇雄、高橋元秀、蒲地一成、岡部信彦、神谷 齊. 沈降精製百日咳ジフテリア破傷風ワクチン(DTaP)の追加接種試験-(DT)接種時期におけるDTaP接種の安全性の検討-第14回日本ワクチン学会学術集会 2010.12.11-12, 東京
2. 岡田賢司、中山哲夫、中野貴司、永井崇雄、高橋元秀、蒲地一成、岡部信彦、神谷 齊. 沈降精製百日咳ジフテリア破傷風ワクチン(DTaP)の追加接種試験-(DT)接種時期におけるDTaP接種の免疫原性の検討-第14回日本ワクチン学会学術集会 2010.12.11-12, 東京
3. 中山哲夫 2011年 ワークショップ2 百日咳の基礎から予防・診断まで
臨床における百日咳の問題点とワクチン
第60回日本感染症学会、第58回日本化学療法学会 合同学会 2011.10.26 - 28, 山形

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

大学における百日咳流行の予防・制御に関する研究

分担研究者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 大学、特に医学部における百日咳流行の実態を明らかにすることを目的に、わが国の医学部生を対象に百日咳保菌調査を実施した。2 大学の医学部生(2 年生および 5 年生)について遺伝子検査を実施した結果、第 1 回調査(検査対象者 105 名、2010 年 5 月実施)、第 2 回調査(101 名、2010 年 11 月)、第 3 回調査(100 名、2011 年 5 月)ともに陽性者は 0 名であった。このことから、医学部における集団感染は百日咳菌の施設侵入により引き起こされることが指摘され、集団感染防止策として保菌者の施設立入り制限が有効と考えられた。なお、第 3 回調査では百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の遺伝子検査を同時に実施し、1 名から同菌の遺伝子を検出した。

研究協力者

鱒坂裕美(国立感染症研究所・細菌第二部)

大塚菜緒(同上)

竹内啓晃(高知大学医学部附属病院)

八木哲也(名古屋大学医学部附属病院)

A. 研究目的

わが国では 2002 年以降成人の百日咳報告患者数が急増し、2007 年には複数の大学医学部で百日咳集団感染事例が発生した。また近年では中学・高校などでも集団感染が散発している。これまでの事例解析により、大学では大規模な集団感染に発展し易いこと、さらに終息までに数ヶ月を要することが示されている。特に医学部で発生した場合、併設する大学附属病院への波及防止に多大な労力と費用が必要とされ、医学部生には予防投薬や休講措置といった対策が講じられている。百日咳感染の危険因子として学校や保育園などが挙げられており、狭い空間で長時間共有するような施設に百日咳菌が侵入すると感染は容易に拡大することが指摘されている。

百日咳の流行シーズンは春から初夏とされ、非流行シーズンは秋から冬である。流行シーズンが存在する理由は不明であるが、毎年春から初夏にかけて患者報

告数が増加することから不顕性を含めた百日咳保菌者が年間を通して存在するものと考えられている。しかし、不顕性感染を始めとする百日咳保菌者の実態は不明であり、特に医学部生の百日咳保菌状況に関する知見は得られていない。そこで、本調査研究では医学生を対象に保菌調査を実施し、流行時と非流行時の百日咳保菌状況を把握すること、さらに、大学、特に医学部における百日咳感染の実態を明らかにし、集団感染の防止策を考察することを目的とした。

B. 研究方法

調査対象:国内 2 大学の医学部生(2 年生、5 年生)を対象に百日咳保菌調査を実施した。第 1 回調査は 2010 年 5 月(105 名)、第 2 回調査は 2010 年 11 月(101 名)、第 3 回調査は 2011 年 5 月(100 名)に行い、計 306 名について百日咳遺伝子検査を実施した。

百日咳菌の遺伝子検査:滅菌綿棒を用いて被験者から鼻腔分泌物を採取し、QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN)を用いて DNA 画分(溶出液量、25 μ l)を得た。遺伝子検査は国立感染症研究所細菌第二部で作製した百日咳 LAMP キット(百日咳毒素プロモーターを標的)を使用し、DNA 抽出物 4 μ l を LAMP 検査に供試した。検体採取ならびに LAMP 遺伝子検査は調査

協力大学において行い、判定は蛍光・目視検出試薬(栄研化学)またはアガロースゲル電気泳動により行った。なお、DNA 検体は国立感染症研究所細菌第二部に送付し、挿入配列 IS481 を標的としたリアルタイム PCR (IS481 real-time PCR)により確定検査を行った。

B. holmesii の遺伝子検査: *B. holmesii* の *recA* 遺伝子を標的とした LAMP 法(*B. holmesii*-LAMP)および *recA* real-time PCR 法により実施した。LAMP 法は国立感染症研究所細菌第二部で開発されたものを使用し、real-time PCR 法は既報(Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010, 48:1435-7)に従って行った。

(倫理面への配慮)

本調査研究は国立感染症研究所、高知大学医学部、名古屋大学医学部の医学研究倫理審査会の承認を得て実施した。

C. 結果

百日咳保菌調査は 2010 年 5 月から 2011 年 5 月までに計 3 回行い、A 大学医学部 150 名、B 大学医学部 156 名について遺伝子検査が実施された。調査協力大学および国立感染症研究所の確定検査において百日咳菌陽性者は確認されず、百日咳菌の保菌者は 0 名であった(表1)。一方、第 3 回調査では *B. holmesii* の遺伝子検査を同時に実施し、B 大学の医学部生 1 名(2 年生)から *B. holmesii* の遺伝子を検出した。異なる 3 種類の遺伝子検査が陽性となったことから、この 1 名を *B. holmesii* の保菌者と判定した(表2)。なお、IS481 real-time PCR と *recA* real-time PCR の Ct 値はそれぞれ 36.6、35.7 を示し、その保菌量は少ないことが判明した。

D. 考察

本調査研究では百日咳の流行シーズンに医学部生 205 名、非流行シーズンに 101 名を検査し、百日咳菌の検査陽性者は 0 名であった。百日咳 LAMP 法は IS481リアルタイム PCR と同等の感度を有すること、さらに百日咳菌に特異的であることから、医学部生の百日咳保菌者は 0 名と判断された。本調査において百日咳

菌保菌者が認められなかったことから、平常時に医学部生が百日咳保菌者となる可能性は低く、大学等で発生する集団感染は百日咳菌の施設侵入により引き起こされることが指摘された。このことから、医学部での集団感染防止には保菌者の施設立入り制限が有効であると考察された。

今回の調査では百日咳類縁菌 *B. holmesii* の遺伝子検査を同時に実施し、100 名中 1 名から同菌の遺伝子を検出した。*B. holmesii* は 1995 年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、主に 10 代の青年層に感染し、百日咳菌と同様な咳症状を引き起こす。わが国では *B. holmesii* は 2000 年代後半に初めて臨床分離され、主に青年・成人患者から 10 株ほどが分離されている。ただし、一般の病院検査室では *B. holmesii* の検査および同定は難しく、百日咳疾患に占める *B. holmesii* の割合は不明である。今回、健康な医学部生 1 名から *B. holmesii* が検出されたことから、百日咳集団感染では本菌と百日咳菌との鑑別診断が必要である。

E. 結論

医学部における百日咳集団感染は百日咳菌の施設侵入により引き起こされることが指摘され、集団感染防止策として保菌者の施設立入り制限が有効と考えられた。また、百日咳類縁菌 *B. holmesii* の保菌者が確認されたことから、本菌に対する鑑別診断の必要性が指摘された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, **Kamachi K**. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS ONE, 2012, 7(2): e31985.
- 2) Suzuki T, Kataoka H, Ida T, **Kamachi K**, Mikuniya T.

Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. J Infect Chemother, in press.

- 3) 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, 2011, 6(3): e17797.
- 4) 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 between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. Clin Microbiol Infect. 17:365-70, 2011.
- 5) Kamano H, Mori T, Taminato T, Ishida T, Kishimoto N, Katami T, Sato M, **Kamachi K**, Mochida Y. Analysis of *Bordetella pertussis* agglutinin titers during an outbreak of pertussis at a university in Japan. Jpn J Infect Dis, 63:108-12, 2010.

2. 学会発表

- 1) **蒲地一成**, 池田徹也, 伊瀬郁, 松本昌門, 石畝史, 烏谷竜哉, 江藤良樹, 山下和予, 柴山恵吾, 多屋馨子, 岡部信彦. 百日咳菌凝集素価法の診断精度について. 第 86 回日本感染症学会総会, 平成 24 年 4 月, 長崎(予定)
- 2) 大塚菜緒, 柴山恵吾, **蒲地一成**. 百日咳菌に認められる自己凝集能の解析. 第 95 回日本細菌学会総会, 平成 24 年 3 月, 長崎(予定)
- 3) 大塚菜緒, 吉野修司, 河野喜美子, 豊泉裕美, 柴山恵吾, **蒲地一成**. LAMP 法を用いた百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* 検出系の開発. 第 94 回日本細菌学会関東支部総会, 平成 23 年 10 月, 東京
- 4) Otsuka N, **Kamachi K**, Han H-J, Arakawa Y. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Japan. 9th International Bordetella symposium, 2010,

Baltimore, USA.

- 5) 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 between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. 9th International Bordetella symposium, 2010, Baltimore, USA.
- 6) 中村幸嗣, **蒲地一成**, 豊泉裕美, 齋藤良一, 鶴岡純一郎, 勝田友博, 立山悟志, 徳竹忠臣, 中島夏樹, 岡田賢司, 加藤達夫, 荒川宜親. 成人と小児における百日咳保菌量の差異について. 第 84 回日本感染症学会総会, 平成 22 年 4 月, 京都
- 7) **蒲地一成**. 分子疫学から見た百日咳流行株の細菌学的特性. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 22 年 3 月, 横浜
- 8) 大塚菜緒, **蒲地一成**, 豊泉裕美, 中村幸嗣, 齋藤良一, 荒川宜親. 百日咳菌における定着因子 Pm の欠損機構. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 22 年 3 月, 横浜
- 9) 中村幸嗣, **蒲地一成**, 豊泉裕美, 齋藤良一, 鶴岡純一郎, 勝田友博, 立山悟志, 徳竹忠臣, 中島夏樹, 岡田賢司, 加藤達夫, 荒川宜親. 成人と小児における百日咳保菌量の差異について. 第 84 回日本感染症学会総会, 平成 22 年 4 月, 京都
- 10) **蒲地一成**, 豊泉裕美, 中村敦, 中島夏樹, 石川隆, 多屋馨子, 荒川宜親, 岡部信彦, 岡田賢司. 咳嗽成人患者を対象とした百日咳保菌率調査. 第 83 回日本感染症学会総会, 平成 21 年 4 月, 東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: LAMP 法を用いた百日咳菌遺伝子検出方法およびこの方法に用いるプライマーセット. 特許第 4806749 号.
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表1. 百日咳検査成績

調査		大学	検査人数	百日咳菌陽性者数	<i>B. holmesii</i> 陽性者数
第1回 2010年5月	流行シーズン	A大学	50	0	NA
		B大学	55	0	NA
第2回 2010年11月	非流行シーズン	A大学	50	0	NA
		B大学	51	0	NA
第3回 2011年5月	流行シーズン	A大学	50	0	0
		B大学	50	0	1
総計			306	0	1

NA, 未実施

表2. *Bordetella holmesii* 陽性者(B大学2年生)の検査成績

検査項目	1次検査 (B大学)	確定検査 (感染研)	備考
百日咳菌-LAMP	-	-	
IS481 real-time PCR		+	Ct = 36.5
<i>B. holmesii</i> -LAMP		+	
<i>B. holmesii recA</i> real-time PCR		+	Ct = 35.7

平成 21-23 度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)
ワクチン戦略による麻疹および先天性風疹症候群の排除およびワクチンで予防可能疾患の疫学
並びにワクチンの有用性に関する研究

総合報告書

「百日咳データベース、および Hib データベースの運用」

国立感染症研究所感染症情報センター 大日康史

国立感染症研究所感染症情報センター 菅原民枝

国立感染症研究所感染症情報センター 多屋馨子

国立感染症研究所感染症情報センター 岡部信彦

要約

【目的】百日咳の成人層の増加の実態や Hib 感染症の発生動向をみるためには、発生動向調査では得ることができない。そこで、2008年より詳細なデータを収集し、今後の対策の参考にすることとした。

【方法】感染症情報センターの WEB サイトで、医師による自発的な報告システムとする。サマリーは、百日咳は、年齢別、月別、都道府県別、予防接種有無別、検査別、転帰とする。Hib は年齢別、月別、検査別、転帰とする。

【結果】「百日咳データベース」2008年5月8日～2011年12月27日報告で、報告百日咳症例数 1,095 例であった。「Hib データベース」2008年8月～2011年12月27日報告で、報告症例数 343 例であった。

【考察】データベースは、発生動向調査では得ることのできない詳細な情報を得ることができ有用である。これらは医師の自発的報告に任せられているので全数調査ではなく、報告できていない症例も多くあると思われる。今後も、協力を呼びかけていく予定であり、サマリーを定期的に報告する。

A. 研究目的

百日咳データベースは、2007年10代後半から20代を中心とする集団発生があり、2008年に成人で増加したことを背景に開始している。現在感染症発生動向調査では、百日咳は、5類定点把握で全国約3000箇所の定点医療機関からの報告で、定点医療機関は小児科のため、成人における発生状況については限られた情報であり、今後の対策を立案するためには、詳細な情報が必要である。かつ今後も集団発生した場合においては、迅速な対応を行うためには情報共有が不可欠である。そこでデータベースを構築し運用している。

Hib データベースは、2008年末から国内でもワクチン接種が可能となり、ワクチンによる Hib 感染症発生動向の変化をみるためにも、患者の発生状況の情報は必要である。しかし感染症発生動向調査では細菌性髄膜炎についてのみ行われているため、詳細は把握できていない。

どちらも発生動向調査では得ることのできない詳細なデータを今後の参考にする。

B. 研究方法

感染症情報センターのホームページに、WEB サイトでの、医師による自発的な報告シ

システムとする。

百日咳データベース

<http://idsc.nih.gov/disease/pertussis/pertu-db.html>

サマリーは、年齢別、月別、都道府県別、予防接種有無別、検査別、転帰とする。

Hib データベース

サマリーは、年齢別、月別、検査別、薬剤使用状況、転帰とする。

<http://idsc.nih.gov/disease/hib/hib-db.html>

倫理的配慮

患者の個人情報扱わない。

C.研究結果

百日咳データベース

2008年5月8日～2011年12月27日報告で、報告症例数1,097例であった。そのうち後に「百日咳を否定」が2例で、報告百日咳症例数1,095例であった。性別は、男性460例、女性635例、年齢:0歳1ヶ月～98歳(中央値27歳)であった。

転帰は、追跡調査ではなく、医師の自発的登録によるもので(複数回答)、外来で回復889(81.2%)、入院で回復42(3.8%)、合併症9(0.8%)、後遺症0、死亡1(0.1%)であった。

図1に発症週別報告数分布、図2に累積報告数の年齢別割合、図3に都道府県別報告数分布、図4に発症週別報告数分布、図5に年齢別予防接種歴別報告数分布、図6に検査診断の有無とその内容、図7に年齢別予防接種歴別報告数分布を示した。

Hib データベース

2008年8月～2011年12月27日報告で、

報告症例数343例であった。否定例はなかった。

転帰は、外来のみ治療は3例、通院中は10例、入院(退院)は238例、入院中は73例であった。

軽度後遺症(脳波、CT、MRIなどで異常所見)は33例、聴覚障害は7例、てんかんは3例、中程度後遺症(日常生活に支障ない程度の障害)は6例、重度後遺症(発達・知能・運動障害など)7例であった。死亡例は5例であった。

図8に年齢別、図9に年齢別転帰別、図10に年齢別診断別、図11に発症月別、図12に発症月別転帰別、図13に入院例年齢別、図14に診断名、図15に診断名(複数回答)、図16に薬剤使用状況、図17に検査状況、図18に薬剤使用状況と効果、図19に髄膜炎、脳炎、脳腫瘍、硬膜下腫瘍、水頭症が診断名に含まれていた者の薬剤使用状況を示した。

D.考察

百日咳データベース

発生動向調査では得ることのできない詳細な情報を得ることができ有用である。百日咳は、発生動向調査は小児科定点であるにもかかわらず、成人の割合が年々増加傾向にあるものの、小児科定点であるため、成人層の実態は明らかにならない。一方で予防接種状況や検査状況、転帰の情報は一切ない。その点で百日咳データベースから得られる情報量は大きい。百日咳データベースによって20歳以上の罹患者が多いことが明らかになった。しかし検査状況から、1回の検査が多く、確定診断であるかどうかは判断が難しいとおもわれた。確定診断の陽性例のみでの年齢分布においても20歳以上が多いことが明らかになった。

Hib データベース

発生動向調査では得ることのできない、報告数が明らかになること、予防接種状況、検査状況、薬剤使用状況の情報が明らかになった。

平成23年2月14日に、厚生労働省健康局結核感染症課より、ワクチンの効果を正確に把握するためにも、研究事業における細菌性髄膜炎患者の情報の登録について、本データベースの活用について、「細菌性髄膜炎患者等の発生動向の把握について」という事務連絡が発出された。

これら2つのデータベースは医師の自発的報告に任せられているので全数調査ではなく、報告できていない症例も多くあると思われる。今後も、協力を呼びかけていく予定であり、サマリーを定期的に報告することで、周知を図り参加を促す。

E. 結論

詳細な情報としてデータベースは活用され、

サマリーを報告した。Hib データベースについては、厚生労働省健康局結核感染症課より事務連絡が発出された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1)論文発表

2)学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1)特許申請

2)実用新案登録

3)その他

特になし

図1 発症週別報告数分布(百日咳データベース)

発症週別報告数分布:2008年5月8日~2011年12月27日報告

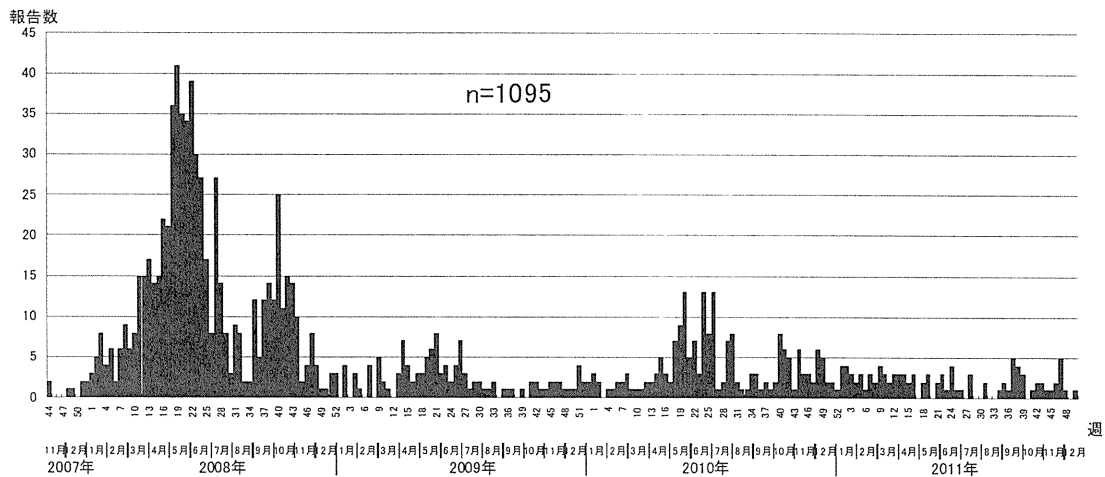


図2.累積報告数の年齢別割合(百日咳データベース)

累積報告数の年齢別割合:2008年5月8日~2011年12月27日報告

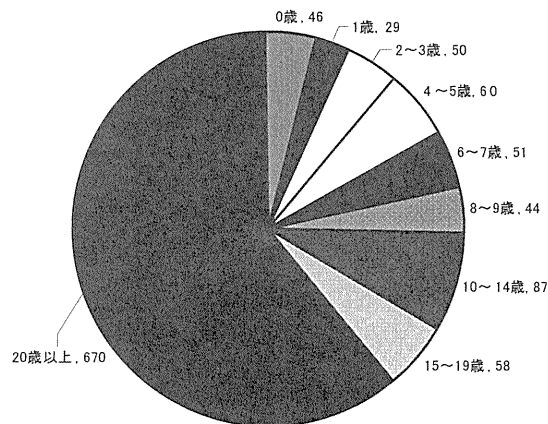


図 3.都道府県別報告数分布(百日咳データベース)

都道府県別報告数分布 : 2008年5月8日 ~ 2011年12月27日報告

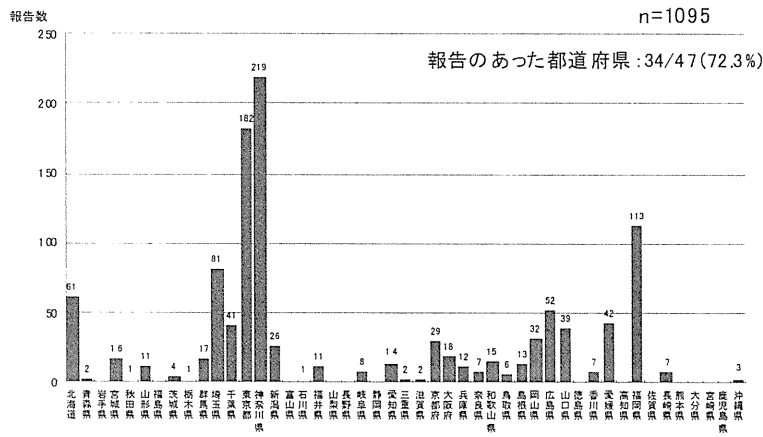


図 4.発症週別報告数分布(百日咳データベース)

発症週別報告数分布

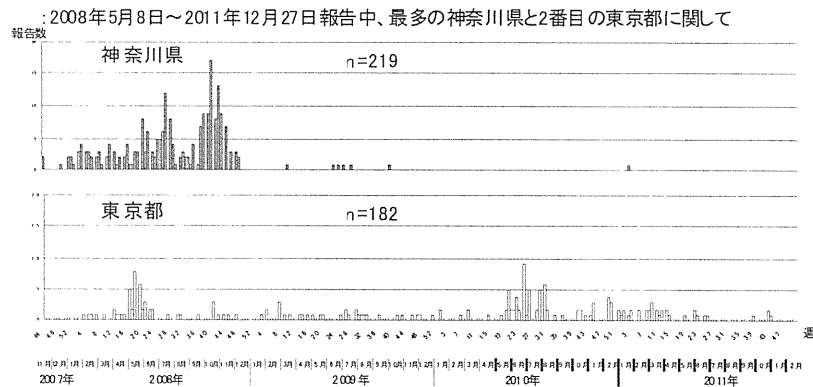


図 5.年齢別予防接種歴別報告数分布(百日咳データベース)

年齢別予防接種歴別報告数分布:2008年5月8日～2011年12月27日報告

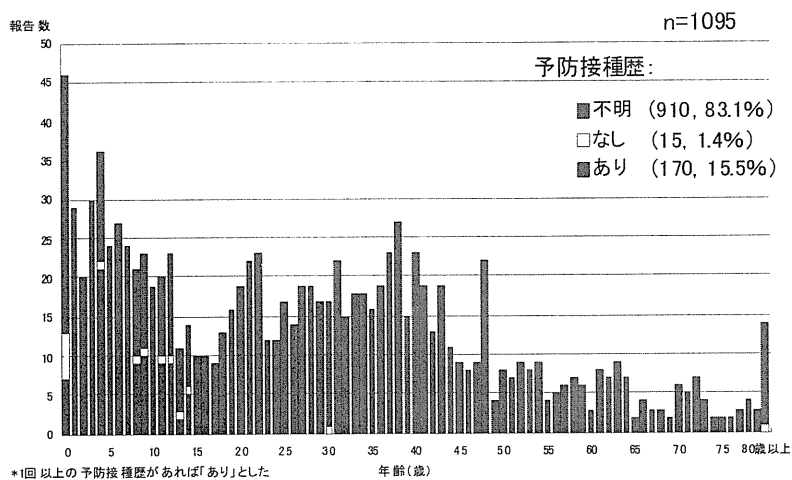


図 6.検査診断の有無とその内容(百日咳データベース)

検査診断の有無とその内容:2008年5月8日～2011年12月27日報告

検査依頼あり:あり1013(92.5%) なし82(7.5%)

		実施件数	陽性/検出件数
菌分離		134	9
菌凝集素価	ペア血清	82	66
	シングル血清	760	694
抗PT抗体・ 抗FHA抗体	ペア血清	9	8
	シングル血清	205	186
遺伝子検査(PCR, LAMP)		117	97
その他(詳細不明)		8	7