

者の発症リスクが有意に低かった。

観察期間 1 年間の場合と 3 年間の場合とで HR を比較すると、1 年間の方がやや明確な HR を示したが、その後の期間においても陽性群の発症リスクが有意に低い結果であった。(表 1) また、浮腫においても同様の傾向が認められた。(表 2)

(4) 発症者と未発症者の水痘皮内反応の結果

テーマ B 登録者のうち、観察期間中に帯状疱疹を発症した 175 人と、未発症であった 5,508 人について、登録時の水痘皮内反応の結果を比較したところ、紅斑長径、浮腫長径ともに発症群が有意に小さい値を示した (図 3)。

(5) 水痘皮内反応の検査結果

テーマ C 登録者に対して、登録から 4 回全ての検査を実施した者のうち、期間中に帯状疱疹を発症しなかった 260 人の水痘皮内反応の紅斑長径を年度別に比較したところ、登録時から 1 年後、1 年後から 2 年後に増大傾向が認められ、2 年後から 3 年後には有意な変動が認められなかった。増大の原因は、同時期に起こった水痘流行の影響と、水痘皮内反応の同一部位への実施による促進反応の可能性が示唆された。

(6) 水痘皮内反応実施者と未実施者の発症リスク比較

登録時に水痘皮内反応を実施していないテーマ A 登録者と、水痘皮内反応を実施したテーマ B 登録者とで、登録後 3 年間の帯状疱疹発症リスクを比較したところ、テーマ B 登録者の HR は 0.98 (95%信頼区間: 0.80-1.20) であり、両者の発症リスクに有意な差はなかった。

(7) 液性免疫の測定結果

テーマ C 登録者について、登録から 3 年後に各種抗体価を測定した 307 人のうち、期間内に帯状疱疹を発症した 7 人を除いて測定結果を集計したところ、gp-ELISA 価 (Log10) 平均値 3.81、標準偏差 0.35、IAHA 価 (Log2) 平均値 5.43、標準偏差 1.49、中和抗体価 (Log2) 平均値 6.10、標準偏差 1.27 であった。

各種抗体価とも性別では差がなく、年齢階層別では高齢者群で高かった。これは、前年度までの報告と同様の傾向であった。

(8) 急性期疼痛と皮疹重症度および知覚異常との関係

1) 皮疹重症度

帯状疱疹発症者について、皮疹重症度スコア 6

未満の軽症群 (n=192) と 6 以上の重症群 (n=102) の 2 群間で、疼痛重症度を比較したところ、疼痛スコアは軽症群では 41.4 ± 4.7 、重症群では 82.9 ± 6.5 と、皮疹重症群で疼痛重症度が有意に高いことが判明した。

2) 知覚異常

①知覚過敏を伴った帯状疱疹患者群 (n=298) と知覚過敏を伴わなかった患者群 (n=70) について、疼痛スコアを比較したところ、知覚過敏群で疼痛スコアが有意に高いことが明らかとなった (知覚過敏群: 67.2 ± 4.0 、非知覚過敏群: 22.9 ± 8.2)。

②知覚鈍麻を伴った帯状疱疹患者群 (n=91) と知覚鈍麻を伴わなかった患者群 (n=277) について、疼痛スコアを比較したところ、知覚鈍麻群で疼痛スコアが有意に高いことが明らかとなった (知覚鈍麻群: 80.3 ± 7.3 、非知覚鈍麻群: 51.7 ± 4.2)。

(9) PHN と皮疹重症度および知覚異常との関係

1) 皮疹重症度

帯状疱疹発症者について、皮疹重症度スコア 6 未満の軽症群 (n=192) と 6 以上の重症群 (n=102) の 2 群間で、PHN の発症率を比較したところ、軽症群で 6.3%、重症群で 27.5%と、皮疹重症群の方が高率に PHN に移行することが明らかとなった。

2) 知覚異常

①知覚過敏を伴った帯状疱疹患者群 (n=298) と知覚過敏を伴わなかった患者群 (n=70) について、PHN の発症率を比較したところ、知覚過敏群で 17.4%、非知覚過敏群で 5.7%と、知覚過敏を有する群の方が高率に PHN に移行することが明らかとなった。

②知覚鈍麻を伴った帯状疱疹患者群 (n=91) と知覚鈍麻を伴わなかった患者群 (n=277) について、PHN の発症率を比較したところ、知覚鈍麻群で 27.5%、非知覚過敏群で 11.2%と、知覚鈍麻を有する群の方が高率に PHN に移行することが明らかとなった。

③特に、知覚過敏・知覚鈍麻の両方が認められなかった患者 (n=46) では、PHN の発症率は 0%であった。一方、知覚過敏・知覚鈍麻のいずれかを有する患者では、発症率は 17.3%であった。

(10) 細胞性免疫応答測定のために用いた 2 種類の試験の各結果間における相関性

本研究においては、IFN- γ ELISPOT 試験と水痘皮内反応の 2 種類の細胞性免疫測定法が用いられている。本年度はテーマ C 登録者のうち 298 人に対してそれらの試験を行った。その結果、昨年度までの 3 年間の各試験結果と同様に IFN- γ ELISPOT 試験データと水痘皮内反応データとの

間に弱い相関が見られた。(図 4)

(11) 加齢による VZV 特異的細胞性免疫応答の変化

本研究のこれまでの 3 年の IFN- γ ELISPOT 試験のデータから、加齢と共に IFN- γ ELISPOT 試験の値が低下することが示唆されている。そこで 4 年目についてもその傾向が続いてみられているのか、テーマ C 登録者に対して実施した IFN- γ ELISPOT 試験のデータを用いて検討した。その結果、1 年目、2 年目、3 年目と同様に 4 年目も加齢に伴い測定値が低下する傾向が認められ、加齢による VZV 特異的な細胞性免疫応答の低下が明らかとなった。(図 5)

(12) 男女別での VZV 特異的細胞性免疫応答の比較

本年度、得られた IFN- γ ELISPOT 試験データから VZV 特異的細胞性免疫応答の男女間の相違について検討し、男性の方が女性よりやや高いことを見出した。(図 6)

(13) 帯状疱疹発症者の発症時における VZV 特異的細胞性免疫応答の変化

本年度、帯状疱疹発症者 100 人から発症時及び回復時の血液検体を採取し IFN- γ ELISPOT 試験を実施し、VZV 特異的細胞性免疫応答の相違について検討した。その結果、回復期(発症 3 か月後)と比べて発症時において細胞性免疫応答が高値であることが明らかとなった。(図 7)

(14) 生活習慣や社会心理的要因と帯状疱疹発症との相関

帯状疱疹発症に関連する危険因子として以下の 8 因子、PHN 発症に関連する危険因子として以下の 1 因子が挙げられた。結果一覧を表 3 に示す。また、以下本文中各項目別に更なる検討結果を記述する。括弧内はハザード比 (HR) と 95%信頼区間を示す。

1) 喫煙

喫煙について、現在喫煙群と現在禁煙群の 2 群に分類し比較したところ、現在喫煙群の発症率が有意に低かった[HR0.58(0.40-0.84)]。また、非喫煙群、過去喫煙群、現在喫煙群の 3 群に分類し比較しても、現在喫煙群の発症率が有意に低かった[HR0.58(0.38-0.89)]。なお、過去罹患歴がある者を除外して検討しても同様の結果が確認された。結果を表 4 に示す。

2) 野菜・大豆製品摂取頻度

摂取頻度について、「3 回以上/日」「2 回/日」「1 回/日」「5-6 回/週」「3-4 回/週」「1-2 回/週」「食べない」の回答を毎日摂取群とそれ以外の 2 群に分類し比較したところ、毎日摂取群はそれ以外の群に比べ、発症率が有意に高かった[野菜: HR1.58(1.14-2.20)、大豆製品: HR1.28(1.05-1.56)]。しかし、本結果は交絡因子について、帯状疱疹発症と関連があるものとして抽出された他の因子(喫煙、飲酒、生きがい、基礎疾患、癌、兄弟帯状疱疹罹患歴、自己申告の健康状態)を加えて検討した場合(以下、多変量解析)、有意差は確認されなかった。

3) 飲酒

飲酒について、「3 合以上/日」「2 合くらい/日」「1 合くらい/日」「1 合未満/日」「付き合い程度」「やめた」「もともと飲まない」の回答を、2 合以上/日群とそれ以外の 2 群に分類し比較したところ、2 合以上/日群はそれ以外の群に比べ、発症率が有意に低かった[HR0.63(0.41-0.98)]。しかし、喫煙の検討と同様に、現在飲酒群と現在禁酒群の 2 群、現在飲酒群、過去飲酒群と非飲酒群の 3 群に分類すると有意差は確認できず、量反応性は確認できなかった。

4) 生きがい

生きがいの程度について、「大いに感じている」「感じている」「あまり感じていない」「全く感じていない」の回答を「大いに感じている」群とそれ以外の 2 群に分類し比較したところ、生きがいを大いに感じている群はそれ以外の群に比べ、発症率が有意に低かった[HR0.56(0.35-0.90)]。これは、癌の既往がある者や過去罹患歴がある者を除外しても同様の結果が確認され、また、多変量解析の場合も同様であった。結果を表 5 に示す。

5) 基礎疾患

基礎疾患の種類に寄らず、何らかの基礎疾患がある者はない者に比べ、発症率が有意に高かった[HR1.38(1.10-1.72)]。これは、過去罹患歴がある者を除外した場合、多変量解析の場合も同様の結果が確認された。

6) 癌

基礎疾患の中でも、特に癌の者は発症率が有意に高かった[HR1.60(1.02-2.51)]。これは過去罹患歴がある者を除外した場合は同様の結果が確認されたが、多変量解析を行うと、有意差が確認されなかった。

7) 兄弟の帯状疱疹罹患歴

家族の帯状疱疹罹患歴の中で、唯一兄弟の帯状疱疹罹患歴がある者はない者に比べ、発症率が有意に高かった[HR1.61(1.07-2.45)]。これは多変量解析の場合も、同様の結果であったが、本人の過去罹患歴がある者を除外した場合は有意差が確認されなかった。

8) ライフイベント

「この1年間で、あなたが経験したことで、あてはまる項目はありますか?」という質問に対し、(1)仕事や生活環境の大きな変化(転職、退職、引越し、事故、盗難など)、(2)人間関係の変化(離婚、家族・親しい人の死亡、家族・親しい人とのトラブルなど)、(3)経済的にかなり困難な状況(収入の減少、借金など) (1)から(3)のいずれかがあったと回答した群(ライフイベント有群)といずれもない(ライフイベント無群)と回答した群の2群に分類し比較したところ、帯状疱疹の発症には有意差はなかった[HR0.98(0.79-1.21)]にも関わらず、PHNの発症率がライフイベント有群は有意に高かった[HR1.76(1.03-3.01)]。これは、帯状疱疹罹患患者396名のみで検討しても同様の結果であった[HR1.86(1.07-3.23)]。

D. 考察

(1) VZV に対する液性免疫及び細胞性免疫の測定と帯状疱疹との相関について

水痘皮内反応に関与する細胞性免疫の程度が高い者ほど帯状疱疹の発症リスクが低いことが明らかになった。この結果から、水痘皮内反応が帯状疱疹発症のバイオマーカーとして、高発症リスク群の抽出に利用できることが示唆された。また、発症者の紅斑長径、浮腫長径が、未発症者と比較して小さいことも、細胞性免疫の発症への関与を強く裏付けるものであり、上記を支持する結果であった。

水痘皮内反応の検査結果が、検査実施から1年間での発症リスクを示すことは、前研究の段階から示唆されていた。しかし、わが国には水痘の流行がある等、免疫の程度に影響を及ぼす様々な外的要因が存在するため、時間の経過に伴い、登録時に測定した登録者の免疫の程度が変動し、有意なHRを示さなくなるのではないかと懸念されていた。しかし、本研究3年間の観察期間において、陰性群と陽性群との間に、有意なHRが確認された。このことから、水痘皮内反応は実施後3年間の発症リスクを十分に示し得ることが示唆された。

細胞性免疫の程度は加齢に伴い減衰する一方、液性免疫は加齢に伴い増強することが、前研究及び本研究から示唆された。また、本研究により高齢年齢群の発症リスクが高いことが明らかになった。これらの結果から、帯状疱疹の発症には液性免疫より細胞性免疫が強く関与していることが推察された。

テーマC登録者の水痘皮内反応は、年度によっては増大傾向が確認されたが、同一部位への反復接種による局所的な促進反応の影響であることが示唆された。水痘皮内反応実施群と未実施群の3年間の発症リスクに差がなかったことから、水痘皮内反応の実施によって全身的な細胞性免疫は上昇しないことが推察された。

(2) 帯状疱疹の痛み及び持続について

帯状疱疹発症者では、皮疹の重症度だけでなく、知覚過敏や知覚鈍麻などの知覚異常の有無が、急性期疼痛ならびにPHNの発症に影響を及ぼしていることが明らかとなった。特に、知覚過敏、知覚鈍麻の両方がみられなかった患者では、PHNへの移行が全く認められなかった点は、注目に値する。今回の結果から、帯状疱疹の診療においては、知覚過敏や知覚鈍麻の有無を正確に把握することが、予後を判定する上で非常に有用であることが判明した。

(3) IFN γ -ELISPOT 試験を用いた水痘帯状疱疹特異的免疫に関する検討

本研究で用いた2種類のVZV特異的細胞性免疫測定法による各結果間に相関が認められたが、その程度は弱いものであった。考えられる理由としては、2種類の測定法で用いた抗原が異なることや各測定における免疫学的作用機序が異なっていることなどが挙げられる。そのため、今後はどちらの試験方法がよりの確に帯状疱疹発症を予測でき得るのかについて検討する必要があると考えられる。

帯状疱疹は、宿主に潜伏するVZVの再活性化により発症する。その再発には、VZVに対する細胞性免疫応答の低下が関与していると考えられている。今回我々は、大コホートによる疫学調査により、60歳以上の健常人において加齢に伴いVZV特異的な細胞性免疫応答が減少することを明らかにした(図5)。しかし、細胞性免疫応答がどの程度まで抑制されることにより帯状疱疹発症に至るのかについては未だに不明であり、更なる検討が必要であると考えられる。

帯状疱疹発症時における細胞性免疫応答の変化について調べた結果、発症直後の細胞性免疫応

答は回復時(発症3カ月後)より高値を示した(図7)。細胞性免疫応答の持続期間や高い細胞性免疫応答が再発の予防にどのように寄与するかも今後の検討課題になり得る。

(4) 帯状疱疹の発症頻度及び、生活習慣や社会心理的要因と帯状疱疹発症との相関について

帯状疱疹の発症は小児期の水痘既往歴や年齢、細胞性免疫の低下が危険因子であるといわれてきたが、本研究にて生活習慣や社会心理的要因との関連に言及することが可能となった。

今回、喫煙者と生きがいが大いにある者において、帯状疱疹の発症リスクが有意に低く、基礎疾患のある者、特に癌の既往者が帯状疱疹の発症リスクが有意に高いことが分かった。本最終結果はこれまで中間報告として発表してきた帯状疱疹の発症に関連する危険因子とほぼ同様の結果であった。

なお、喫煙については、帯状疱疹の発症を抑制する因子であることを支持する結果となったが、喫煙は一般的に肺がんや慢性閉塞性肺疾患(COPD)発症の危険因子である事が証明されているため、今回の結果をもって、喫煙を推進する事はない。また、生きがいについては、個人の価値観によるものであるため、帯状疱疹を予防する生活指導の具体策を講じる事はいささか困難であるが、生きがいを大いに感じる事が帯状疱疹の予防に繋がることを確認できた事は、今後のメカニズムを研究する上で評価に値すると考える。

また、PHN発症のリスク因子としては、唯一ライフイベントが関係することが示された。

これまでの海外の先行研究でも生活習慣とPHNの関係を検討したものはなく、新たな知見が得られた。

E. 結論

本研究によって、日本人の高齢者における帯状疱疹の正確な発症率が明らかになった。その他、細胞性免疫が帯状疱疹の発症に関与することや、発症及び重症化の抑制に必要な細胞性免疫の程度、免疫の持続期間が明らかになるなど、ワクチン開発に有益な疫学の知見が得られており、今後、様々な発症予防策の検討が可能になる。

高齢者に既存の水痘ワクチンを接種することで、細胞性免疫が増強されることは、過去の研究(平成12年厚生科学研究費補助金 帯状疱疹神経痛の予防を目的とする成人高齢者への水痘ワクチン接種による免疫増強に関する研究 Takahashi M, et al. Vaccine 21:3845-3853, 2003)によって、既に公知となっている。当該研

究の結果を本研究結果と組み合わせると、水痘ワクチンの免疫増強効果は、帯状疱疹の発症及び重症化の抑制に有効なものであることが確認された。これによって、既存の水痘ワクチンを帯状疱疹の予防に利用できる可能性が大いに高まったといえる。

今後、これらの結果をもとに詳細な検討を重ね、国内初の帯状疱疹ワクチンが早期に開発されることを期待する。

F. 健康危険情報

本研究により、研究対象者の健康への危険情報は報告されていない。

G. 研究発表

1. 英文発表

1) Takao Y, Miyazaki Y, Onishi F, Kumihashi H, Gomi Y, Ishikawa T, Okuno Y, MHRi Y, Asada H, Yamanishi K, Iso H, fHR the SHEZ Study group, The Shozu Herpes Zoster (SHEZ) Study: Rationale, Design, and Description of a Prospective Cohort Study. *J emidmiol* **22**(2): 167-174. 2012

2) Tang H, Moriishi E, Okamoto S, Okuno Y, Iso H, Asada H, Yamanishi K, Mori Y: A community-based survey of varicella-zoster virus-specific immune responses in the elderly. *J Clin Virol* **55**(1): 46-50, 2012

3) Asada H, Nagayama K, Okazaki A, Mori Y, Okuno Y, Takao Y, Miyazaki Y, Onishi F, Okeda M, Yano S, Kumihashi H, Gomi Y, Maeda K, Ishikawa T, Iso H, Yamanishi K: An inverse correlation of VZV skin-test reaction, but not antibody, with severity of herpes zoster skin symptoms and zoster-associated pain. *J Dermatol Sci* **69**(3): 243-9, 2013

4) Okuno Y, Takao Y, Miyazaki Y, Ohnishi F, Okeda M, Yano S, Kumihashi H, Gomi Y, Maeda K, Ishikawa T, Mori Y, Asada H, Iso H, Yamanishi K: Assessment of skin test with varicella-zoster virus antigen for predicting the risk of herpes zoster. *Epidemiol Infect* **141**(4):706-13, 2013

2. 邦文発表

- 1) 浅田秀夫: ウイルス抗体価の読み方, 今日の皮膚疾患治療指針, 医学書院, p147-150, 2012
- 2) 浅田秀夫: 思春期のウイルス感染症で重症化しやすいものは? 思春期の皮膚トラブルFAQ, 診断と治療社, p179-184, 2012
- 3) 浅田秀夫: 帯状疱疹, 高齢者によくみられる皮膚疾患アトラス- 鑑別と治療のポイント, 医薬ジャーナル社, p153-157, 2013
- 4) 浅田秀夫: 単純疱疹, 皮膚疾患最新の治療2013-2014, 南江堂, p173-174, 2013
- 5) 浅田秀夫, 帯状疱疹, 今日の治療指針 2013年版, 医学書院, p1053, 2013

3. 学会発表

- 1) 第 60 回日本ウイルス学会学術集会教育セミナー-2 香川県小豆郡における帯状疱疹疫学研究 “SHEZ Study”
- 2) 第 23 回日本疫学会学術総会
喫煙習慣と帯状疱疹の発症との関連 Shozu Herpes Zoster (SHEZ) Study
- 3) 第 23 回日本疫学会学術総会
自覚的生きがいの程度と帯状疱疹発症との関連 Shozu Herpes Zoster (SHEZ) Study

H. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
なし

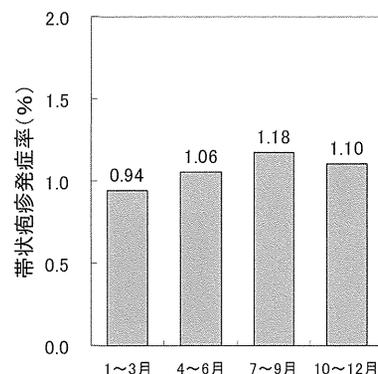
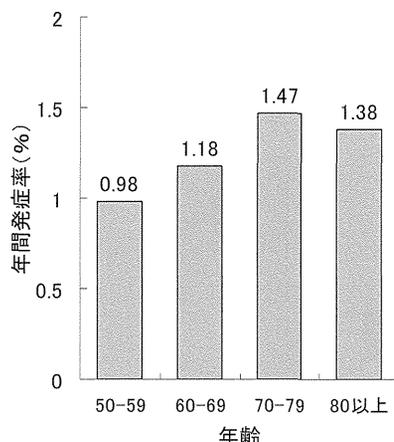
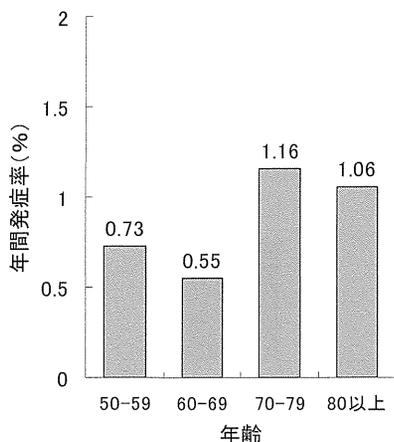


図1 性別・年齢階層別の帯状疱疹年間発症率

図2 四半期別の帯状疱疹発症率

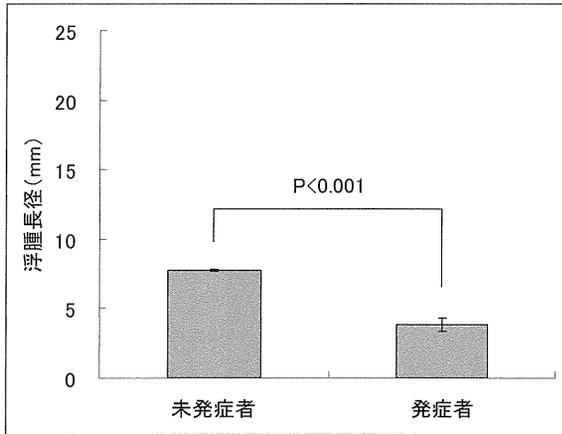
表1 紅斑長径による発症リスク (Cox 回帰分析 調整因子：年齢、性別、HZ 過去罹患歴)

Pattern	Cut off value	Judgment	前回Paper時点のデータ<調査期間:1年>					最終データ<調査期間:3年>				
			Person -year	No. at cases	Incidence rate(%)	Hazard ratio	95% confidence interval	Person -year	No. at cases	Incidence rate(%)	Hazard ratio	95% confidence interval
1	<5mm	Negative	1,037	29	2.80	1	(Reference)	3,006	74	2.46	1	(Reference)
	≥5mm	Positive	4,468	31	0.69	0.23	0.14 - 0.39	13,544	91	0.67	0.27	0.20 - 0.38
2	<10mm	Negative	1,744	42	2.41	1	(Reference)	5,117	103	2.01	1	(Reference)
	≥10mm	Positive	3,760	18	0.48	0.18	0.10 - 0.32	11,432	62	0.54	0.27	0.19 - 0.37
3	<5mm	Negative	1,037	29	2.80	1	(Reference)	3,006	74	2.46	1	(Reference)
	≥5mm, <10mm	Weakly Positive	708	13	1.84	0.63	0.33 - 1.21	2,111	29	1.37	0.55	0.36 - 0.85
	≥10mm	Positive	3,760	18	0.48	0.15	0.08 - 0.28	11,432	62	0.54	0.21	0.15 - 0.31
4	≥5mm, <10mm	Weakly Positive	708	13	1.84	1	(Reference)	2,111	29	1.37	1	(Reference)
	≥10mm	Positive	3,760	18	0.48	0.24	0.12 - 0.50	11,432	62	0.54	0.39	0.25 - 0.61

表2 浮腫長径による発症リスク (Cox 回帰分析 調整因子：年齢、性別、HZ 過去罹患歴)

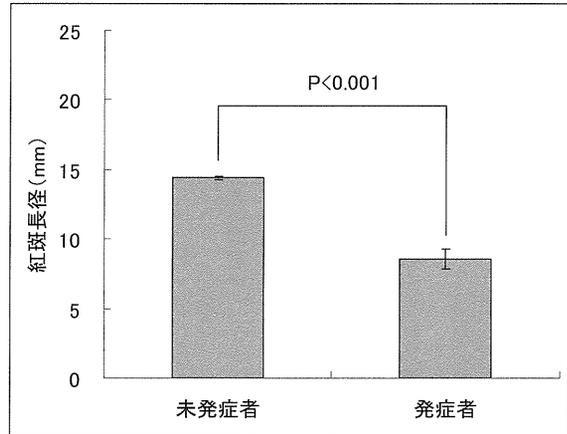
Pattern	Cut off value	Judgment	前回Paper時点のデータ<調査期間:1年>					最終データ<調査期間:3年>				
			Person -year	No. at cases	Incidence rate(%)	Hazard ratio	95% confidence interval	Person -year	No. at cases	Incidence rate(%)	Hazard ratio	95% confidence interval
1	0mm	Negative	1,712	40	2.34	1	(Reference)	4,997	101	2.02	1	(Reference)
	>0mm	Positive	3,945	23	0.58	0.24	0.14 - 0.42	11,983	74	0.62	0.32	0.23 - 0.44
2	<5mm	Negative	2,032	45	2.21	1	(Reference)	5,953	117	1.97	1	(Reference)
	≥5mm	Positive	3,625	18	0.50	0.22	0.13 - 0.39	11,027	58	0.53	0.28	0.20 - 0.39
3	<10mm	Negative	3,527	58	1.64	1	(Reference)	10,464	156	1.49	1	(Reference)
	≥10mm	Positive	2,129	5	0.23	0.14	0.06 - 0.36	6,516	19	0.29	0.21	0.13 - 0.33
4	<5mm	Negative	2,032	45	2.21	1	(Reference)	5,953	117	1.97	1	(Reference)
	≥5mm, <10mm	Weakly Positive	1,496	13	0.87	0.38	0.21 - 0.72	4,511	39	0.86	0.45	0.31 - 0.65
	≥10mm	Positive	2,129	5	0.23	0.10	0.04 - 0.26	6,516	19	0.29	0.15	0.09 - 0.25

紅斑長径



	未発症者	発症者
紅斑長径 調整平均(mm)	14.42	8.55
人数	5,362	165

浮腫長径



	未発症者	発症者
浮腫長径 調整平均(mm)	7.72	3.85
人数	5,508	175

図3 発症者と未発症者における水痘皮内反応検査結果の比較
(共分散分析 調整因子：年齢、性別、HZ 過去罹患歴)

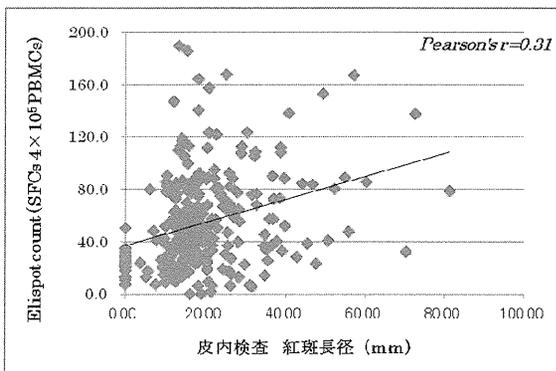


図4 細胞性免疫測定法のデータの相関性

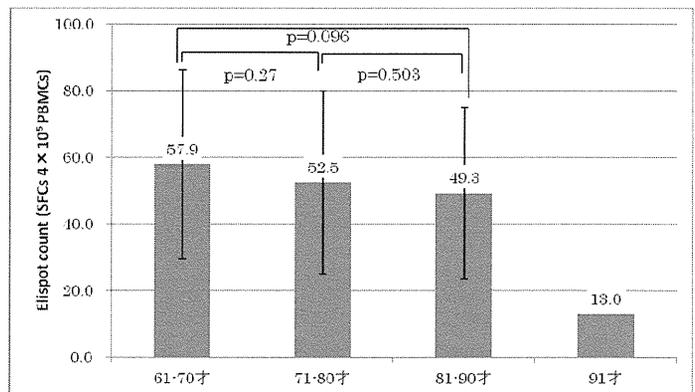


図5 IFN- γ ELISPOT 数の年齢別分布

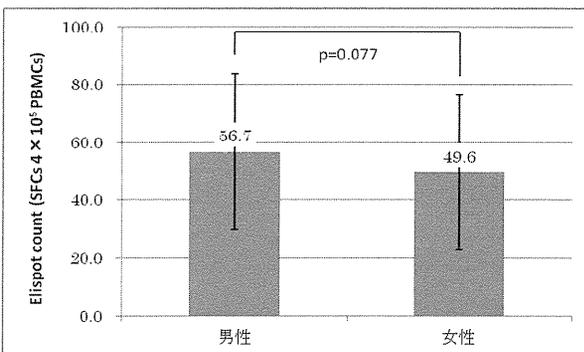


図6 男女別におけるVZV特異的細胞性免疫応答の比較

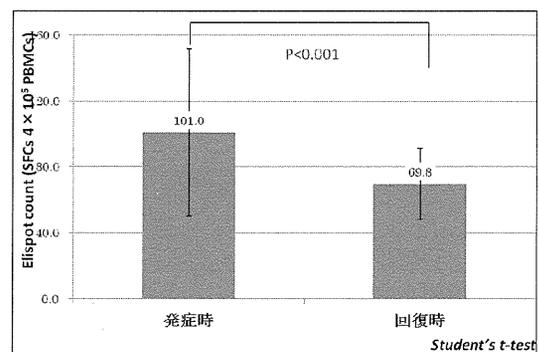


図7 発症時におけるVZV特異的細胞性免疫応答の増強

表 3. 帯状疱疹及び帯状疱疹後神経痛のリスク因子

因子	母数	帯状疱疹				帯状疱疹後神経痛				
		発症者	発症率	HR	95%CL	発症者数	発症率	HR	95%CL	
喫煙	現在喫煙	2,152	36	1.7%	0.58	0.40-0.84	4	0.2%	0.51	0.17-1.49
	現在禁煙	10,207	359	3.5%	1	Ref.	52	0.5%	1	Ref.
	30本以上/日	392	4	1.0%	0.38	0.13-1.05	0	0.0%	-	-
	20-29本/日	684	14	2.0%	0.74	0.40-1.34	1	0.1%	0.36	0.05-2.96
	10-19本/日	745	12	1.6%	0.55	0.29-1.03	2	0.3%	0.6	0.13-2.79
	1-9本/日	331	6	1.8%	0.57	0.25-1.30	1	0.3%	0.57	0.07-4.36
	やめた	2,762	83	3.0%	1	0.71-1.43	11	0.4%	0.76	0.30-1.91
	もともと吸わない	7,445	276	3.7%	1	Ref.	41	0.6%	1	Ref.
野菜摂取 頻度	毎日	10,322	354	3.4%	1.58	1.14-2.20	50	0.5%	1.42	0.61-3.33
	毎日食べない・食べない	2,023	38	1.9%	1	Ref.	6	0.3%	1	Ref.
大豆製品 摂取頻度	毎日	4,404	168	3.8%	1.28	1.05-1.56	24	0.5%	1.23	0.72-2.09
	毎日食べない・食べない	7,939	226	2.8%	1	Ref.	32	0.4%	1	Ref.
飲酒	2合以上/日	1,424	24	1.7%	0.634	0.41-0.98	4	0.3%	0.94	0.31-2.83
	2合未満/日・やめた・飲まない	10,928	371	3.4%	1	Ref.	52	0.5%	1	Ref.
生きがい	有	922	18	2.0%	0.56	0.35-0.90	1	0.1%	0.2	0.03-1.47
	無	11,415	377	3.3%	1	Ref.	55	0.5%	1	Ref.
基礎疾患	有	7,575	275	3.6%	1.38	1.10-1.72	44	0.6%	1.9	0.99-3.68
	無	4,776	120	2.5%	1	Ref.	12	0.3%	1	Ref.
癌	有	417	20	4.8%	1.6	1.02-2.51	3	0.7%	1.61	0.50-5.17
	無	11,934	375	3.1%	1	Ref.	53	0.4%	1	Ref.
家族罹患 歴(兄弟)	有	465	24	5.2%	1.61	1.07-2.45	2	0.4%	0.99	0.24-4.09
	無	11,884	371	3.1%	1	Ref.	54	0.5%	1	Ref.
ライフベ ント	有	4,390	133	3.0%	0.98	0.79-1.21	25	0.6%	1.76	1.03-3.01
	無	7,953	262	3.3%	1	Ref.	31	0.4%	1	Ref.

表4 喫煙と帯状疱疹発症の関係

	Number of Cases	Person years	Incidence rate*	HR (95% confidence interval)		P value
				Age and Sex adjusted	Multivariable adjusted**	
Total						
Never	276	22,073	12.5	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	
Former	83	8,090	10.3	1.00 (0.70-1.42)	0.98 (0.69-1.41)	0.928
Current	36	6,429	5.6	0.58 (0.38-0.89)	0.61 (0.40-0.94)	0.025
No. of cigarettes consumed per day among current smokers						
1-19	18	3,208	5.61	0.56 (0.38-0.89)	0.59 (0.35-0.99)	0.046
≥20	18	3,222	5.59	0.61 (0.35-1.06)	0.65 (0.38-1.13)	0.128
Without past history of herpes zoster						
Never	236	17,971	13.1	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	
Former	68	6,854	9.92	0.88 (0.60-1.28)	0.86 (0.59-1.26)	0.29
Current	31	5,886	5.27	0.51 (0.32-0.79)	0.54 (0.34-0.85)	0.03
No. of cigarettes consumed per day among current smokers						
1-19	15	2,930	5.12	0.47 (0.27-0.83)	0.50 (0.28-0.88)	0.017
≥20	16	2,956	5.41	0.55 (0.31-0.98)	0.59 (0.33-1.05)	0.072

* Per 1000 person-years

** Adjusted for age, sex, past history of herpes zoster, underlying disease, vegetable intake, supporter existence

表5 生きがいと帯状疱疹発症の関係

生きがい	有効回答数	発症	OR (95%CL)		
			Age/Sex/History of HZ	Age/Sex/History of HZ	Multivariable adjusted *
大いに感じている	922	18 (2.0)	0.34 (0.17-0.69)	0.33 (0.16-0.67)	0.35 (0.17-0.74)
感じている	7800	273 (3.5)	0.64 (0.37-1.12)	0.62 (0.36-1.09)	0.67 (0.37-1.22)
あまり感じていない	3377	91 (2.7)	0.50 (0.28-0.90)	0.49 (0.28-0.89)	0.54 (0.29-0.98)
全く感じていない	239	13 (5.4)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
大いに感じている	922	18 (2.0)	0.56 (0.35-0.90)	0.55 (0.34-0.88)	0.54 (0.34-0.88)
感じている	7800	273 (3.5)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
あまり感じていない	3377	91 (2.7)	0.50 (0.28-0.90)	0.49 (0.28-0.89)	0.54 (0.29-0.98)
全く感じていない	239	13 (5.4)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
大いに感じている	922	18 (2.0)	0.63 (0.38-1.04)	0.62 (0.38-1.02)	0.62 (0.37-1.04)
感じている	7800	273 (3.5)	1.194 (0.95-1.50)	1.18 (0.94-1.48)	1.19 (0.94-1.51)
あまり感じていない	3616	104 (2.9)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
全く感じていない	3616	104 (2.9)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
癌の既往歴の無い者			Age/Sex/History of HZ	Age/Sex/History of HZ	Multivariable adjusted **
大いに感じている	898	17 (1.9)	0.55 (0.34-0.90)	0.54 (0.33-0.88)	0.53 (0.33-0.87)
感じている	7800	273 (3.5)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
あまり感じていない	11022	358 (3.3)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
全く感じていない	239	13 (5.4)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
大いに感じている	898	17 (1.9)	0.61 (0.36-1.02)	0.60 (0.36-1.00)	0.59 (0.35-0.99)
感じている	7543	257 (3.4)	1.15 (0.91-1.45)	1.14 (0.91-1.44)	1.14 (0.90-1.45)
あまり感じていない	3479	101 (2.9)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
全く感じていない	3479	101 (2.9)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
過去罹患歴の無い者			Age/Sex-adjusted	Age/Sex/smoking - adjusted	Multivariable adjusted ***
大いに感じている	766	16 (2.1)	0.59 (0.36-0.98)	0.58 (0.35-0.96)	0.56 (0.34-0.93)
感じている	7800	273 (3.5)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
あまり感じていない	9605	319 (3.3)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
全く感じていない	239	13 (5.4)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
大いに感じている	766	16 (2.1)	0.68 (0.40-1.15)	0.66 (0.39-1.12)	0.64 (0.37-1.10)
感じている	6537	231 (3.5)	1.21 (0.95-1.55)	1.20 (0.94-1.53)	1.18 (0.91-1.52)
あまり感じていない	3068	88 (2.9)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)
全く感じていない	3068	88 (2.9)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)	1.00 (Reference)

* Adjusted for age, sex, history of HZ, smoking, intake vegetables, intake soy, drinking, basic diseases, cancer, family history of HZ and condition.

* Adjusted for age, sex, history of HZ, smoking, intake vegetables, intake soy, drinking, basic diseases, family history of HZ and condition.

* Adjusted for age, sex, smoking, intake vegetables, intake soy, drinking, basic diseases, cancer, family history of HZ and condition.

血管内皮機能改善に基づく糖尿病性腎症治療薬の開発

国立循環器病研究センター研究所 細胞生物学部
望月直樹

研究要旨 DDAH1 活性化作用を有する化合物のスクリーニング系を構築し、化合物ライブラリー評価に着手した。候補化合物を培養細胞で検討できるシステムを構築した。

研究分担者

(1)トーアエイヨー株式会社 福島研究所 千葉俊樹

A. 研究目的

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) は、内因性 NO 合成酵素 (NOS) 阻害因子であり、糖尿病、高血圧、慢性腎臓病 (CKD) などで血漿中 ADMA 濃度が上昇していることから、心血管イベントのバイオマーカーとして注目されている。ADMA は血管内皮細胞の一酸化窒素合成酵素 NO Synthase (eNOS) を阻害するために、血管内皮細胞が直接かかわる心血管系疾患 (CVD) の障害分子として認識されるだけでなく、腎臓系球体の毛細血管障害に起因する CKD の増悪にも関与することが知られている。健常人に ADMA を静脈内投与すると、腎血流量が低下し、腎血管抵抗が上昇する。したがって、ADMA 高値を示す糖尿病患者において ADMA を低下させることができれば、血管内皮機能の改善に基づき、糖尿病性腎症の発症及び進展を阻止できることが期待される。糖尿病性腎症は医療経済的に負担の大きい血液透析 (500 万円/人、日本国内年間推定 1.3 兆円の医療費がかかる) に至る糖尿病合併症として深刻な病態であり、その早期治療法の開発は急務である。しかし、糖尿病性腎症に有効な治療薬は未だになく、CKD の治療標的分子も不明な点が多く残されている。

ADMA 量は分解酵素 Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) により支配されている。DDAH は全身に広く分布し、ADMA に対する基質特異性が高く、動物においては ADMA の約 90%を、ヒトでは約 80%を速やかに分解する。DDAH には DDAH1 と DDAH2 の 2 つのアイソフォームが存在する。DDAH1 の組織分布が主に脳・腎臓・肝臓・脾臓であるのに対し、DDAH2 は心臓・腎臓・胎盤に発現が認められている。

本研究では ADMA 低下分子として DDAH1 に着目し、DDAH1 活性化剤の糖尿病性腎症治療薬としての有用性を確認すべく、DDAH1 活性化作用を有する化合物のスクリーニング及び糖尿病性腎症モデルの特性の解析に着手した。

昨年度までの検討で DDAH1 の活性を調べるのに不活性型 DDAH1 を用いていたが、従来のアッセイ方法では検出限界があると判断した。このため、我々は新規 DDAH1 活性評価法である CPM Assay (蛍光法) を構築し、良好な S/N 比

を示す評価条件の検討に着手した。また、患者数が多い II 型糖尿病の腎症発症・進展における ADMA の役割を明らかにするために、II 型糖尿病モデルである ZDF ラットを用いた検証を行った。

B. 研究方法と材料

1) Human DDAH1 タンパクの作製及び化合物評価

(1) リコンビナント Human DDAH1 の作製
昨年度構築した融合蛋白質発現プラスミド (pGEX6p-1-DDAH1) を用いて、大腸菌から GSH で濃縮し、precision で GST を切断後精製 DDAH1 として用いた。

(2) DDAH1 活性評価 (L-Citrulline Assay)

DDAH1 活性は基質である ADMA の分解に伴い生じる L-citrulline 産生量を指標とした。化合物評価を行う際は、DDAH1 タンパクを H_2O_2 (0.3 mM) 及び $ZnCl_2$ (0.1 μ M) で 15 min 処理したものを、不活性化 DDAH1 として、評価化合物の DDAH1 活性に与える影響評価に用いた。

(3) DDAH1 活性評価 (CPM アッセイ)

DDAH1 活性は、基質である S-methyl-L-thiocitrulline (SMTC) の分解に伴い生じる methanethiol が蛍光物質 (7-Diethylamino-3-(4-maleimidophenyl)-4-methylcoumarin; CPM) と反応することで生じる蛍光強度 (Ex/Em=380/485 nm) を指標とした。

化合物評価の際は、DDAH1 酵素活性への影響評価 ([DDAH1] 群) 及び評価化合物の自家蛍光測定 ([Chem] 群) を実施した。評価化合物はトーアエイヨー株式会社保有の化合物ライブラリー (約 18,000 化合物) を使用した。

(4) 結果解析

・L-Citrulline Assay

不活性化 DDAH1 群を [Low]、未処理群を [High]、化合物処理群を [Data] とし、以下の式で DDAH1 活性回復率を算出した。

$$\text{DDAH1 活性回復率 (\%)} = \frac{([\text{Data}] - [\text{Low}])}{([\text{High}] - [\text{Low}])} \times 100$$

・CPM Assay

[DDAH1]群の蛍光強度値から[Chem]群の蛍光強度値を除算した数値を解析に用いた。化合物処理群の蛍光強度値から High Control の蛍光強度値を除算し、 Δ 蛍光強度値 >3 万の化合物をリアッセイ候補化合物とした。

2) 糖尿病性腎症モデルの特性解析

7週齢の Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラットを用いた。タンパク尿、アルブミン尿、尿中 TGF- \cdot 1 測定を行った。ラットを代謝ケージで 24 時間飼育し尿を採取した。

・腎臓 DDAH 活性測定は、新鮮凍結腎臓をホモジェナイズして疎抽出液に Citrulline 発色液を加えて DDAH 活性を測定した。

・血漿中ならびに尿中 ADMA の測定
血漿中及び尿中 ADMA 濃度は、内部標準物質として ADMA の重水素置換体 (ADMA- d_7 (Cambridge Isotope Laboratories) を用い、血漿及び尿をアセトニトリルにより除タンパクした後、LC-MS/MS により測定した。

・病理学的検査：腎臓を摘出後ホルマリン固定後 HE 染色で標本を作製した。

3) DDAH の血管内皮細胞への作用の検討

ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVECs)は、通常の血管内皮細胞培養液(HuMedia-2 (血清と supplementary growth factor 含む)で培養した。燐酸化 Akt とリン酸化 eNOS 抗体を用いて、angiopoietin(Ang1)あるいは、VEGF-A 依存性のリン酸化について DDAH1 存在下での影響を検討した。

4) DDAH を血管内皮細胞で安定に発現する系の構築：

血管内皮細胞に DDAH1,DDAH2 を発現させるためにアデノウイルスを作製した。それぞれ internal ribosomal entry signal (IRES) に EGFP, nlsExRed を発現させ、感染効率を確認できるようなアデノウイルスを作製した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA の実験は、国立循環器病研究センターの組換え DNA 実験委員会で承認された研究計画に従って行った (承認番号 12-34)。

トーアエイヨー株式会社における実験動物の飼育管理及び動物実験 (動物を利用する試験研究) の計画・実施に際し、科学的及び動物福祉の観点からも遵守すべき事項を定め、実験動物の飼育管理及び動物実験を適正に実施することを目的に制定された、トーアエイヨー実験動物利用に関する規程に基づき実施した。

C. 研究結果

1. 化合物評価 (L-Citrulline Assay)

前年度、不活性化 DDAH1 を用いた化合物スクリーニングより、数字上、DDAH1 活性回復作用を示す化合物群 (2 系統; ID115153 及び

ID116833 系統) が散見された。そこで当試験では各系統の関連化合物 (計 58 化合物) の再現性確認試験を実施した。その結果、いずれの化合物とも、評価化合物自身が発色試薬と反応し、呈色反応を示すことが判明した。従っていずれの化合物群も擬陽性であり、真のヒット化合物とは断定できなかった。

2. CPM Assay による評価系の構築

CPM の溶解補助剤として 0.02% Tween20 を含む PBS を Assay buffer とし、CPM 及び SMTC の最終濃度を 1 μ M 及び 10 μ M とすることで、十分な S/N 比及び well 間のバラツキを抑えた条件で、化合物評価が可能であることが確認された。この系で評価を行ったが、一次スクリーニング時には理論上、酵素活性化が 1.2 倍になった時に得られる Δ 蛍光強度値 >3 万を満たす 96 化合物が見出されたものの、全てが評価化合物の自家蛍光に起因又はバラツキによる擬陽性と判明し、現在までにリアッセイにて再現性良く DDAH1 活性化作用を示す候補化合物は見出せていない。

3. 糖尿病性腎症モデルラット

DF ラットにおける糖尿病性腎症の発症を確認するために、腎障害のマーカーとなるタンパク尿、アルブミン尿、尿中 TGF- \cdot 1 排泄量の週齢変化を検討した。ZDF ラットのタンパク尿は、12 週齢の時点でコントロールラットよりも有意に高値であった。その後、24 週齢において著しい増加が認められ、32 週齢にはさらに増加した。コントロールラットにおいて、加齢によるタンパク尿の顕著な増加は認められなかった。ZDF ラットのアルブミン尿は、12 週齢の時点でコントロールラットよりもわずかに高値を示し、18 週齢で約 3 倍に増加した。さらに、24 週齢では著しい増加が認められ、32 週齢にはさらに増加した。血漿中 ADMA 濃度、尿中 ADMA 排泄量の週齢変化を検討した。血漿中 ADMA 濃度は、ZDF ラット、コントロールラット共に同様の推移を示した。尿中 ADMA 排泄量は、12 週齢の ZDF ラットにおいて、コントロールラットよりもわずかに高値を示し、18 週齢で約 3 倍に増加した。ZDF ラットでは、その後加齢に伴って尿中 ADMA 排泄量は増加し続けた (Table 2)。一方、コントロールラットにおいて、加齢による尿中 ADMA 排泄量の増加は認められなかった。

ZDF ラットの腎臓病理学的評価を行った。38 週齢の ZDF ラットの腎臓は、腎盂の拡張、糖尿病性糸球体硬化 (び慢性メサンギウムの増生、結節性及び滲出性の糸球体病変)、円柱、尿細管の拡張、再生 (萎縮)、グリコーゲン変性、間質の線維化を示し、臨床において観察される糖尿病性腎症の病理所見が認められた。

4. Ang1 による Akt リン酸化と eNOS リン酸化への DDAH1 発現の影響

Ang1 依存性の Akt のリン酸化、eNOS の燐酸化を DDAH1、EGFP (コントロール) を発現する HUVECs で調べた。DDAH1 の発現の増加状態でも Ang1 刺激による Akt, eNOS のリン酸化の誘導に著変は認めなかった。

5. VEGF-AによるAktのリン酸化へのDDHAの影響

Ang1と同様にVEGF-Aも血管内皮細胞のAktのリン酸化を顕著に誘導することが知られており、DDAH1の発現によるVEGF-Aの効果についても検討した。VEGF-AによるAktのリン酸化は、コントロールの細胞でもDDAH1発現細胞でも同様に認められた。DDAH1の効果がより強くみられることはなかった。

以上の実験系では、DDAH1の発現増加は確認しており、DDAH1の発現の有無により大きくAkt, eNOSのリン酸化がAng1, VEGF-Aで変化することはなかった。

D. 考察

DDAH活性の測定方法について、従来のL-Citrulline Assay(吸光度法)は測定感度及び測定限界があり、わずかの活性差を検出するには測定感度の不足が懸念されたために、新たに(CPM Assay、蛍光法)を用いて化合物のスクリーニングを開始した。良好なS/N比を示す評価条件を確定させた。しかし、確立したCPM Assayにて、化合物ライブラリー評価(約18,000化合物)を実施したものの、現在までに真にDDAH1活性化作用を有するヒット化合物を見出すことはできていない。

CPM Assayは384 well plateでの測定が可能でスループットが良好であることから、今後、約15万化合物を対象に、継続して非不活性化DDAH1を用いた化合物探索を実施する予定である。

ZDFラットを用いた検討では、経過的にタンパク尿、アルブミン尿の増加が認められたことから、ZDFラットでは加齢により腎障害が進展していることが示唆された。アルブミン尿の増加が、タンパク尿増加に先行して認められる点は、臨床において観察されている糖尿病性腎症病態と類似しており、また病理検査においても糖尿病性腎症に特徴的な所見が観察されていることから、ZDFラットが糖尿病性腎症の研究に有用であると考えられた。本モデルにおける腎臓DDAH活性はDDAHアイソフォームの区別が考慮されていないが、腎臓ではDDAH1の発現量が多く、その発現は再吸収に大きく寄与する近位尿細管に認められる。したがって、本モデルで認められた尿中ADMA排泄量の増加は、尿細管における再吸収障害に加え、尿細管におけるDDAH1の活性低下による機序で認められた可能性が考えられた。したがって、スクリーニングでヒット化合物が得られた場合には、直ちにラットでの薬剤効果を検討できるモデルと考えられた。

本年度は、ADMAの分解を促進することによりADMAによるeNOSの阻害を抑制すると予想してDDAH1の過剰発現によるAktのリン酸化とeNOSのリン酸化を培養血管内皮細胞を用いて調べた。予想に反してAng1, VEGF-Aによる

Aktのリン酸化、eNOSのリン酸化への影響は、ほとんど認めなかった。これまでに、DDAH1の過剰発現だけで、Aktのリン酸化が見られるという報告があったが、我々の実験系では確認できなかった。この反応もADMAの分解を促進した結果とは考えられておらず、いずれにしてもDDAH1の発現増加あるいは活性化がADMAの減少につながる直接の影響を調べることが重要であると考えた。DDAH1, DDAH2のアデノウイルスを作製できたために、成体での効果をラット腎臓に対して検討可能になった。

E. 結論

DDAH活性を調べる新規アッセイ系を立ち上げ15,000化合物について検討したが、ヒット化合物は得られなかった。今後さらに150,000化合物のスクリーニングを行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H, and Mochizuki N. Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene* (in press) 2012

(2) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N. The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice. *J. Clin. Invest.* 122: 1416-1426, 2012

2. 学会発表

特になし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

多価ボツリヌストキソイドワクチンの有効性及び安全性の検討

国立感染症研究所
山本 明彦

研究要旨 厚生労働研究班によって作製された多価ボツリヌストキソイドをボツリヌス研究者及び抗毒素製造従事者のボランティア被験者に接種を4施設45名に実施した。このうち1施設では昨年度の4週間隔3回の基礎免疫に引き続き1年後の追加免疫が実施できた。被験者の血清中に含まれる各毒素型に対する抗毒素価をELISA法、マウス法およびラット中和法で定量した。追加免疫を行った1施設での被験者の抗体価は解析結果から、3回接種後の抗体価は上昇が認められる確率が高いことが明らかとなった。また、基礎免疫の被験者についてもELISA抗体価は3回のトキソイド接種により、何らかの毒素型に対し抗体価が上昇し、全ての毒素型に対し抗体価の上昇がみられた。一方、健康調査表による副作用解析では、接種部位の軽度の腫脹・発赤・搔痒感などの副作用を一部に認めたが、重大な有害事象は認められなかった。

研究分担者

- (1) 一般財団法人化学及血清療法研究所 銀永明弘
- (2) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 小崎俊司
- (3) 大阪大学大学院医学系研究科 杉本 央

A. 研究目的

ボツリヌス毒素は、最も致死活性の高い物質であることから、ボツリヌス毒素は最も生物兵器として利用される可能性の高いものの一つと考えられている。生物兵器による被害は当初においては感染症として認知されることから、救急医療関係者や保健行政担当者が兵器に暴露されることが予想され、これらの人々に対する防疫体制の確立が肝要である。しかし、現在、世界中で承認販売されているボツリヌストキソイドワクチンはない。このため、2007年に厚生労働研究班によって、多価ボツリヌストキソイド (Lot 4) が製造された。昨年度に引き続き、本トキソイドの有効性及び安全性を検討する目的で、臨床研究として研究者・抗毒素製造従事者に接種し、同時に採血を行って血中抗毒素価をELISA法、マウス中和法及びラット中和法で測定した。また、その接種時の有害事象に関して、発生例と内容を評価した。

B. 研究方法

1. 血清中和抗体価の測定 (参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製及び被接種者血清の毒素中和抗体価測定)

(1) 参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製

臨床研究開始前に本トキソイドを接種していた6名のボランティアから得られた血清をプールして、

マウス中和法によりボツリヌス毒素中和抗体価を測定した。マウス中和法はA、B、E及びF型標準抗毒素を0.2 IU/mLを中心として5希釈作製し、プールした被接種者血清は原液から3倍間隔で5希釈作製した。各型標準抗毒素に対する相対値から、毒素中和抗体価を求め、これを参照ヒトボツリヌス抗毒素血清と定めた。

(2) 三回接種1ヵ月後の被接種者血清の毒素中和抗体価測定

三回接種1ヵ月後の被接種者血清(9名)の毒素中和抗体価はマウス中和法及びラット中和CMAP法により測定した。マウス中和法では、まず各型試験毒素量の設定を行った。A、B、E及びF型の試験毒素の量を変化させて、各型標準抗毒素0.2及び0.1 IU/mLと等量混合して反応させマウスの腹腔内に0.5 mL投与し、投与後4日間観察した。0.2 IU/mLでは全数生存し、0.1 IU/mLでは全数死亡する試験毒素量を求め、これを用いて被接種者血清の毒素中和抗体価を測定した。血清と各型試験毒素を等量混合し反応させた後にマウスの腹腔内に0.5 mL投与し、投与後4日間観察した。マウスが全数生存した場合、血清中の毒素中和抗体価は0.2 IU/mL以上、死亡していた場合は0.2 IU/mL未満であると判定した。

ラット中和CMAP法はA、B、E、F型標準抗毒素を階段希釈し検量線用とした。被験者血清は原液を使用した。試験毒素量はA、B、E、F型それぞれ

れ定めた。希釈抗毒素及び血清を各型試験毒素とそれぞれ等量混合し、反応させた後、ラットの左側腓腹筋に 0.1 mL ずつ 5 匹に投与し、投与 1 日後の CMAP を測定した。各型標準抗毒素の CMAP 振幅値から検量線を作成し、被験者血清の CMAP 振幅値を検量線に代入して毒素中和抗体価を算出した。ラット中和本測定に用いた CMAP 法では 0.01 IU/mL 以上の毒素中和抗体価を測定し、0.01 IU/mL 未満の場合は測定限界以下とした。

2. 被検者への研究説明、ワクチン接種と採血、副反応成績調査

ボツリヌス毒素研究に関わる研究者として、4 地域 45 名 (A : 9 名、B : 15 名、C : 15 名、D : 6 名) に対して、研究責任医師が臨床研究の目的及び実施要綱を十分に説明した。さらに、文書による同意を得た上で、沈降多価トキソイドを A 施設については、追加免疫の 1 回接種を実施した。B、C 及び D 地域については、4 週間隔で 3 回の接種を行い、その際、接種後の健康調査表による副作用解析を行った。トキソイド接種前に、血液を 5 ml 前後採血した。

3. ELISA 法による血清中の抗ボツリヌス毒素

(A, B, E および F 型)抗体価の測定

血清中の抗ボツリヌス毒素抗体価の測定は、ELISA 法にて実施した。

4. 有効性の統計解析

本研究の現在までに実施された基礎免疫の後追加免疫まで終了した施設で採取した血清の抗体価について、ELISA 抗体価を用いた前提的な解析とマウス中和法及びラット中和 CMAP 法での測定結果を用いた検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究にかかわる試験は、研究組織のすべての研究室等から、所属するヒト倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. 血清中和抗体価の測定 (参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製及び被接種者血清の毒素中和抗体価測定)

1) 参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の作製

参照血清の毒素中和抗体価は A 型 0.6 IU/mL、B 型 0.61 IU/mL、E 型 0.25 IU/mL 及び F 型 0.24 IU/mL であった (表 1)。

(2) 三回接種 1 ヶ月後の被接種者血清の毒素中和抗

体価測定

マウス中和法により血清中の毒素中和抗体価を測定したところ、0.2 IU/mL 以上の毒素中和抗体価をもつ被接種者は、A 型 1 名、B 型 1 名、E 型 3 名及び F 型 2 名であった (表 2)。さらに、ラット中和 CMAP 法により血清のより微量の毒素中和抗体価を測定したところ、0.01 IU/mL 未満のものが A 型及び F 型でそれぞれ 2 名存在したが、それ以外は 0.01 IU/mL 以上であった (表 3)。

2. 被検者への研究説明、ワクチン接種と採血、副反応成績調査

1) 接種者の背景

接種者それぞれの 1 回目接種時の背景を表 4 に示す。

2) 安全性

(1) 有害事象の内訳

有害事象の発現件数は表 5 のとおりである。

有害事象は 45 件であり、いずれも非重篤であった。有害事象のうち、疲労、腹痛、鼻漏、咳嗽、歯周病、鼻咽頭炎は、いずれも本剤との因果関係は否定された。有害事象のうち、注射部位関係は 32 件、全身性関係は 9 件であった。有害事象の発現症例率は 1 回目接種時 41.7% (= 10/24)、2 回目接種時 41.7% (= 10/24)、3 回目接種時 30.4% (= 7/23) であった。全体では 38.0% (= 27/71) であった。主な有害事象は注射部位疼痛、注射部位そう痒感、注射部位腫脹、注射部位紅斑であった。また、有害事象の発現件数は 1 回目接種と 2 回目接種には差は認められなかったが、3 回目接種では半分に減少した。

(2) 副作用発現状況

副作用の発現件数は表 6 のとおりである。

副反応は 39 件で、すべて非重篤であった。副反応のうち、注射部位関係は 32 件、全身性関係は 7 件であった。副反応の発現症例率は 1 回目接種時 29.2% (= 7/24)、2 回目接種時 41.7% (= 10/24)、3 回目接種時 30.4% (= 7/23) であった。全体では 33.8% (= 24/71) であった。主な副反応は注射部位疼痛、注射部位そう痒感、注射部位腫脹、注射部位紅斑であった。

(3) 中止事例について

これまでに臨床研究を中止した症例が 4 症例存在する。その内訳は、臨床研究と直接関係のない理由で協力できなくなった症例が 2 例、診療研究責任医師の判断によって中止を決定した症例が 2 例である。その内訳は、トキソイド蛋白質以外のワクチン構成成分に対すると推測されるアルザス反応惹起例とワクチン接種による抗体産生の増強と推察される II 型アレルギー反応による皮膚炎症例である。

3. ELISA 法による血清中の抗ボツリヌス毒素 (A, B, E および F 型) 抗体価の測定

今年度は、昨年度実施した ELISA の条件を改良し、抗体価を決定するための陰性コントロール血清を決め、陰性コントロール血清が示す OD 値の 2 倍の OD 値を示す希釈倍率を被検血清の抗体価とした。毎回同じ血清をプレート毎におくことにより、昨年度よりも客観的に抗体価を測定することが可能となった。

血清希釈倍数を 64 (26) 倍から 131,072(217) 倍希釈とした。陰性コントロールと OD 値の差が認められなかった場合は、検出限界以下とした。

過去のボツリヌストキソイド接種経験者は、一部例外者を除き、今回の第 1 回目のトキソイド接種時は検出限界以下であったが、一か月後には抗体価が上昇した。また、この抗体の上昇は、その後の複数回のトキソイド接種により、上昇し続けるのではなく、ある一定の値を維持または低下する傾向があった。

今回が初めてのトキソイド接種者は、一部例外者を除き、第 2 回目のトキソイド接種 1 か月後に抗体価の上昇がみられた。しかし、3 回のトキソイド接種 1 か月後も検出限界以下の者もいた。抗体価の上昇が確認されなかった者が多かった毒素型は A 型であり、昨年度同様に、A 型は他の B, E および F 型に比べて抗体価の上昇が遅い傾向があった。しかし、3 回のトキソイド接種により、何らかの毒素型に対し抗体価が上昇し、全ての毒素型に対し抗体価の上昇がみられなかった者はいなかった。

4. 有効性の統計解析

マウス中和法および中和 CMAP 試験による抗体価 (IU/mL) は全ての血清サンプルについて測定しないので、全てを測定する ELISA 抗体価の解析は、抗体価の推移の概略をみる解析である。表 7 に基礎免疫、追加免疫後の ELISA 抗体価を表した。各接種後の ELISA 抗体価の上昇を参考的に解析するため、表 8 のデータを基に、抗体価が < 6 の回数と、抗体価が ≥ 6 の回数に区分けして表 2 とした。このデータを用いて、各採血後の抗体価の上昇傾向をノンパラメトリックの Steel-Dwass 多重比較検定で解析した。その結果を表 9 に示した。なお、Steel-Dwass 多重比較検定は総組み合わせ検定である。この表での比較検定によって、 p 値 (有意確率) が 0.05 未満であれば、抗体価の上昇について統計学的に有意の差が認められると判定できる。

D. 考察

毒素中和抗体価との相関性を外挿するための参照とするために、毒素中和抗体価が明らかな参照ヒトボツリヌス抗毒素血清を作製し、そのマウス中和抗体価を測定した。三回接種 1 か月後の被接種者血清 (9 名) の毒素中和抗体価測定において、0.01 IU/mL 未満のものが A 型及び F 型でそれぞれ 2 名存在し、その他は

0.01 IU/mL 以上の毒素中和抗体が産生されていた。型による違いはあるが、多くの被接種者で毒素中和抗体の産生が認められた。

トキソイドの被験者は 4 施設 45 名となり、目標症例数である 50 名に近い希望者を集めることができた。接種時の安全性に関しては、有害事象の大部分は接種部及び接種前に試験的に行った比内接種部位の局所的異常であった。内容は疼痛、搔痒感、腫張、発赤などであり、時速期間も 3, 4 日と短いものであった。アレルギー反応に起因すると思われる 2 症例も 1 週間程度で回復し重篤な有害事象と判定された事例はなかった。

一方、ELISA で定量した血中抗体価については、3 回のトキソイド接種で 4 つの毒素型全ての抗体が上昇したのは、過去のボツリヌストキソイド接種経験者であった。また今回が初めてのトキソイド接種者は、4 つの毒素型のうち、いずれかの抗体価の上昇がみられたものの、全ての毒素型に対する抗体の上昇が観察された者は、わずかであった。今後、これら全ての血清中の毒素中和抗体価について各型 0.2 IU/ml を基準値としマウス中和法により測定を行う。同一人物で抗体価の継時的な高低差が大きい検体については、再検査を行う必要がある。

血清抗体価データの統計的解析による有効性の検討では、表 9 の解析結果から、3 回接種後の抗体価は上昇が認められる確率が高いといえる。ただし、これが感染防御に必要な抗体価かどうかは、中和法による試験のデータの解析が必要である。そこで、中和法の測定値を CDC ガイドラインで Protective として推奨される抗体価 (> 0.02 IU/mL) 以上を有効とする場合、今回の中和抗体試験においては、9 名のうち、A 型は 3 名、B 型は 9 名、E 型は 7 名、および F 型は 7 名が、有効抗体価が得られたことが明らかとなった。

E. 結論

多価ボツリヌストキソイドをボツリヌス研究者及び抗毒素製造従事者のボランティア被験者に接種を 4 施設 45 名に実施した。このうち 1 施設では昨年度の 4 週間隔 3 回の基礎免疫に引き続き 1 年後の追加免疫が実施できた。そのマウス中和抗体価を測定した。

三回接種 1 か月後の被接種者血清 (9 名) の毒素中和抗体価測定において、0.01 IU/mL 未満のものが A 型及び F 型でそれぞれ 2 名存在し、その他は 0.01 IU/mL 以上の毒素中和抗体が産生されていた。型による違いはあるが、多くの被接種者で毒素中和抗体の産生が認められた。被験者の血清中に含まれる各毒素型に対する抗毒素価を ELISA で定量した。3 回のトキソイド接種により、何らかの毒素型に対し抗体価が上昇し、全ての毒素型に対し抗体価の上昇がみられた。過去のトキソイド接種経験者は、今回初めてトキソイ

ド接種した者に比べて、抗体価の上昇は顕著であった。
ELISA 抗体価の上昇に伴う毒素中和抗体の有無については未実施であるが、ELISA 抗体価を上昇させるためには、基礎免疫が必要であることが明らかになった。
また、追加免疫まで終えた被験者の A,B,E,及び F 型ボツシヌス毒素に対する抗体価の有効性が示唆された。
一方、健康調査表による副作用解析では、接種部位の軽度の腫脹・発赤・搔痒感などの副作用を一部に認めしたが、重大な有害事象は認められなかった。

F. 健康危険情報

本年度は特に健康危険情報として報告すべきものはなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 参照ヒトボツリヌス抗毒素血清の毒素中和抗体価

型	マウス中和抗体価 (IU/mL)
A	0.60
B	0.61
E	0.24
F	0.25

表 2. マウス中和法の測定結果

被接種者番号	A	B	E	F
2011	—	—	—	—
2736	—	—	—	—
4118	—	—	—	—
4835	—	—	+	—
4873	—	—	+	+
6500	—	—	—	—
6812	—	—	—	—
9190	—	—	—	—
9560	+	+	+	+

+: 0.2 IU/mL以上(全数生存)
 —: 0.2 IU/mL未満(死亡例あり)

表 3. ラット中和 CMAP 法の測定結果

被接種者番号	抗体価(IU/mL)			
	A	B	E	F
2011	0.011	0.173	0.010	N.D.
2736	0.012	0.178	0.040	>0.1
4118	N.D.	0.117	0.012	N.D.
4835	0.026	0.171	>0.2	>0.1
4873	0.015	0.169	>0.2	>0.2
6500	N.D.	0.177	0.057	>0.1
6812	0.060	0.156	0.022	>0.1
9190	0.012	0.149	0.028	>0.1
9560	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2

N.D. : Not Detected (0.01 IU/mL未満)

表4 接種者の背景

接種者背景項目	カテゴリ	症例数			
		A	B	C	D
性別	男	4	10	11	1
	女	5	5	4	5
	計	9	15	15	6
年齢	20～30 歳未満	2	1	5	2
	30 歳以上 50 歳未満	4	5	4	3
	50 歳以上	3	9	6	1
	計	9	15	15	6
過去の接種の有無	無	8	15		
	有	1	0		
	計	9	15		
アレルギーの有無	無	9	15		
	有	0	0		
	計	9	15		
既往歴の有無	無	4	6		
	有	5	9		
	計	9	15		
基礎疾患の有無	無	6	11		
	有	3	4		
	計	9	15		
合併症の有無	無	9	13		
	有	0	12		
	計	9	15		

表5 有害事象発現状況

接種回数	有害事象発現状況一覧表												
	1回目			2回目			3回目			4回目			合計 ^{注5)}
調査施設数	2			2			2						6
接種症例数	24			24			23						71
有害事象の発現症例数	10			10			7						27
有害事象の発現件数	18			18			9						45
有害事象の発現症例率	41.7%			41.7%			30.4%						38.0%
重篤度													
MedDRA/JのPT (基本語)	計	非 重 篤	重 篤	計	非 重 篤	重 篤	計	非 重 篤	重 篤	計	非 重 篤	重 篤	
注射部位疼痛	5	5		3	3		3	3					11
注射部位そう痒感				3	3		2	2					5
注射部位腫脹	1	1		3	3		1	1					5
注射部位紅斑	2	2		2	2		1	1					5
注射部位出血	3	3											3
注射部位硬結				1	1								1
注射部位発疹	1	1											1
注射部位変色							1	1					1
倦怠感	2	2		1	1								3
異常感	1	1		1	1		1	1					3
疲労				1	1								1
発熱				1	1								1
腹痛				1	1								1
鼻漏	1	1											1
咳嗽	1	1											1
歯周病	1	1											1
鼻咽頭炎				1	1								1
計	18	18		18	18		9	9					45

注5) 合計は、各接種回数における項目数を独立とみなして、全接種回数の延べ項目数とした。以下も同じ。

表6 筋肉内接種における副反応発現状況

接種回数	副反応発現状況一覧表												
	1回目			2回目			3回目			4回目			合計
調査施設数	2			2			2						6
接種症例数	24			24			23						71
副反応の発現症例数	7			10			7						24
副反応の発現件数	15			15			9						39
副反応の発現症例率	29.2%			41.7%			30.4%						33.8%
重篤度													
MedDRA/JのPT (基本語)	計	非 重 篤	重 篤	計	非 重 篤	重 篤	計	非 重 篤	重 篤	計	非 重 篤	重 篤	
注射部位疼痛	5	5		3	3		3	3					11
注射部位そう痒感				3	3		2	2					5
注射部位腫脹	1	1		3	3		1	1					5
注射部位紅斑	2	2		2	2		1	1					5
注射部位出血	3	3											3
注射部位硬結				1	1								1
注射部位発疹	1	1											1
注射部位変色							1	1					1
倦怠感	2	2		1	1								3
異常感	1	1		1	1		1	1					3
発熱				1	1								1
計	15	15		15	15		9	9					39