

して圧倒的に高率であったことから、b 型の莢膜多糖に対するワクチンが開発され使用されている。我が国では、任意接種が 2008 年 12 月より開始され、補助金制度が 2011 年以降（地域により時期は異なるもの）導入された。さらに、2013 年 4 月以降の定期接種化が予定されている。本研究では、*H. influenzae* による侵襲性感染症における菌の生態への Hib ワクチン導入の影響を理解し、予防対策における基礎的理解を深めるため、ワクチン導入前後における侵襲性 *H. influenzae* 感染症患者からの臨床分離株を用いて莢膜型別やワクチン接種歴との関連等を中心に解析を行った。これまでに期間 1) Hib ワクチン未導入期 (2007 年 6 月～2008 年 11 月)、期間 2) Hib ワクチン任意接種開始後 (2008 年 12 月～2010 年 12 月)、期間 3) Hib ワクチン任意接種開始後で補助金開始後 (2011 年 1 月～2013 年 2 月) における解析結果の比較を実施してきた。今年度 (2012 年 4 月～2013 年 2 月) は、期間 3 に含まれる。

さらに、Hib と NtHi の病原性の違いを理解する一環として、細胞膜表面構造の走査電子顕微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) による観察を行い両者の比較を行った。

## B. 研究方法

供試菌株：菌の受入れ時期は、Hib ワクチン任意接種開始後で補助金開始後の期間に含まれる。2012 (平成 24) 年 4 月から 2013 (平成 25) 年 3 月に受領した 19 症例の患者由来の無菌的部位から分離された 22 株の *H. influenzae* 株を対象菌株とした。症例の診断名の内訳は以下の通り：髄膜炎 6 症例、菌血症を伴う肺炎 5 症例、菌血症 2 症例、菌血症を伴う関節炎 2 症例、菌血症を伴う副鼻腔炎 2 例、菌血症を伴う中耳炎 1 例。

抗血清を用いた菌体凝集法による莢膜型別解析：インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血

清「生研」(デンカ生研)を用いた菌体凝集法により解析した。a, b, c, d, e, f 株に対する抗血清で凝集しない株を NtHi とした。

遺伝子解析による莢膜型別：一部の菌株については、抗血清による菌体凝集法に加えて、a～f 型莢膜遺伝子の有無について、polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて解析した。菌株からの DNA 抽出には、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用い、得られた DNA を鋳型にし Premix Taq (Takara) を用いて遺伝子増幅を行った。*H. influenzae* 莢膜型特異的遺伝子に対する PCR 法は、Fall a T J *et al.* J. Clin. Microbiol. 32: 2382-2386 (1994) をもとに、一部のプライマー配列を改良して実施した。

$\beta$ -lactamase 活性試験：ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」(白水製薬)または、セフィナーゼディスク (ベクトン・ディッキンソン) を用いて、分離株の  $\beta$ -lactamase 産生性を調べた。

薬剤感受性試験：E-test (AB BIODISK) を用い、試験用培地には Haemophilus Test Medium (HTM, ベクトン・ディッキンソン) を用いた。薬剤としてアンピシリン (ABPC)、スルバクタム/アンピシリン (ABPC/SBT)、ピペラシリン (PIPC)、メロペネム (MEPM)、セフォタキシム (CTX)、セフトリアキソン (CTRX) を用いた。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の微量液体希釈法の感受性等の基準を参考値とした。

SEM による *H. influenzae* の観察：ヘミン含有 Brain-Heart infusion 液体培地中に滅菌済ガラス板を入れた容器中にて 5%CO<sub>2</sub> 存在下で *H. influenzae* を 35°C にて 20 時間培養した。ガラス板上の菌体を 0.1M カコジル酸緩衝液にて洗浄、2.5% グルタルアルデヒド 1% パラフォルムアルデヒド含有 0.1M カコジル酸緩衝液にて前固定後、1% 四酸化オスミウ

ムならびに1%タンニン酸含有カコジル酸緩衝液にて固定したものを脱水、置換、乾燥、プラチナイオンコーティング工程を経て、SEM(JSM-6700F、JEOL社)にて観察した。

(倫理面への配慮) 髄液における髄膜炎起因菌推定については、「国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」の承認を得て実施した。しかし、本研究のために新たに髄液採取することはなく、インフォームドコンセントを得た上で、臨床診断目的で採取・使用終了後、通常では廃棄される髄液検体の一部を用いた。診療情報は匿名化され、対照表は協力医療機関側において厳重に管理された。

### C. 研究結果

ワクチン導入前後における解析結果は、平成22-24年度報告書に記載した。今年度の結果のみを本単年度報告書に記載する。

1. 分離株の莢膜型別解析結果：19症例のうち、11症例(57.9%)からはHibが、他の8症例(42.1%)からはNtHiが分離された。Hibが分離された患者の診断名は、髄膜炎4症例、菌血症を伴う肺炎3症例、菌血症を伴う関節炎2症例、菌血症1症例であった。2症例のHib髄膜炎患者のいずれにおいても、髄液ならびに血液由来株はHibであったが、咽頭あるいは咽頭ぬぐい液由来株はNtHiであった(咽頭由来NtHi株は、侵襲性感染症由来株から除外している)。髄膜炎発症時に採取された咽頭由来株は、髄膜炎の起因菌では無い可能性が高い。

また、今年度、菌血症の有無が不明な肺炎症例由来の*H. influenzae* 12株(喀痰由来7株、咽頭ぬぐい液1株、検体不明5株)を解析する機会を得た。12株全てがNtHiであった。侵襲性感染症の対象外として集計から除外した。

一方、NtHiが分離された患者の診断名は、髄膜炎1症例、菌血症を伴う肺炎2症例、菌血症を伴う副鼻腔炎2症例、菌血症を伴う中耳炎1症例、菌血症2症例であった。

2. Hib ワクチン接種歴を持つ症例由来分離株の解析結果：今年度、ワクチン接種歴を持つ9症例が報告された(表1)。うち、Hibによる症例が4症例(髄膜炎2症例、菌血症を伴う肺炎1症例、菌血症1症例)であった。4例中2例は、ワクチン接種歴が1回のみの免疫スケジュール途中での発症例だが、別の2症例は、ワクチン接種歴が3回ある発症例(髄膜炎1症例と菌血症1症例)であった。この髄膜炎症例においては、千葉大学にて血中抗体価測定が実施されている。

3. 分離株の薬剤感受性試験結果：今年度に解析した22株は、全てβ-lactamase非産生株であった。アンピシリンのE-test値が4以上の株(耐性とした)9株を含んでいたが、ピペラシリン、メロペネム、セフォタキシム、セフトリアキソンのE-test値は低かった。

4. SEMによる*H. influenzae*の観察像：昨年度の解析において、NtHiが菌血症患者の血液のみならず髄膜炎患者の髄液から分離された。これらのNtHiとHibについてSEMによる形態観察を行った。NtHiとして髄膜炎患者の髄液由来Kam/Iha347ならびに菌血症を伴う肺炎患者の血液由来株Kam/Iha349株を、Hibとして髄膜炎患者の髄液由来Kam/Iha344株を用いた。Hib表面には、菌体を被う膜状の物質が存在した(図1, A)。一方、NtHiの2株には、菌体を被う膜状の物質は、明瞭には観察されなかった。しかしながら、Kam/Iha347においては、観察箇所によっては、薄い膜に類似した物質が存在した(図1, B)。Kam/Iha349は、粘液性の物質を認めた(図1, C)。また、菌体の長さは、約0.5-6μm程

度の菌体が多く観察されるものの、株により多様性が認められた。

#### 5. 参考情報、Hib ワクチン接種歴を持つ髄膜炎患者からの莢膜型 f 型菌の分離例

本研究班非対象県において、2013 年、Hib ワクチン 3 回接種後に髄膜炎を発症した患者の血液から莢膜 f 型菌が分離された。本菌については、a~f 型の抗血清中、f 型のみと凝集すること、ならびに菌抽出 DNA を鋳型とした莢膜 a~f 型の型特異的遺伝子増幅系において、f 型遺伝子のみが増幅することを認めた (図 2)。

#### D. 考 察

Hib ワクチン任意接種開始後で補助金開始後にあたる期間 3 における分離菌株 78 症例 101 株のうち、今年度分は、19 症例 22 株のみであった。今年度の解析株は、半数近くの 7 例が NtHi で占められ、Hib は 11 症例で割合にすると約 58%に過ぎなかった。分離される Hib の減少が Hib ワクチンの普及時期に一致していることが示唆され、今年度の Hib 髄膜炎症例の減少を反映するものと考えられる。今年度は、当該研究班の対象県においては、他の有莢膜型の a, c, d, e, f 型株は検出されなかったものの、非対象県からの莢膜 f 型菌の分離について参考情報が寄せられた。莢膜 f 型が分離されたのは、Hib ワクチン接種歴が 3 回ある髄膜炎患者で髄液から分離された。過去に Hib ワクチンが導入された国における b 型以外の有莢膜型菌 (f 型を含む) による髄膜炎発症例が報告されており、継続した他の莢膜型菌の台頭についての監視が必要である。一方で、現時点で NtHi による侵襲性感染症例数自体が増加していることは示唆されない。

今年度は、当研究班の対象外ではあるが、肺炎患者の喀痰由来 *H. influenzae* 分離株 (全て NtHi) を解析する機会を得た。肺炎や

中耳炎における血液培養の実施が望まれる。侵襲性 *H. influenzae* 感染症の分離菌における莢膜型解析においては、侵襲性感染症の定義に基づき、検査検体についての統一をはかる事が精度向上の為に必要だと考えられる。届出基準における侵襲性 *H. influenzae* 感染症の定義は、髄液、血液からの *H. influenzae* が検出された症例である。検査材料は、髄液、血液となっており、分離・同定による菌の検出と PCR 法による病原体の遺伝子の検出のいずれかとなっている。届出基準に明らかなように、可能性例における他の非無菌的部位からの分離菌の紛れ込みを無くす指導が必要だと考えられる。

髄膜炎患者の髄液から検出された NtHi 株の病原性に興味を持たれた。Hib と NtHi の膜表面の SEM 像からは、髄膜炎患者の髄液由来の Hib と菌血症を伴う肺炎患者の血液由来の NtHi については、莢膜の有無を SEM 像から推し量れる可能性が示唆されたものの、髄膜炎患者の髄液由来 NtHi 株のような判断に困る株も存在した。莢膜の厚さは培養後の継代数や培養条件により変化することが知られている。Kam/lha347 において薄い膜類似の物質が何であるのか、また、NtHi による粘液性の物質が血清抵抗性に関与するののかは、未解決の課題として残された。

薬剤感受性試験結果は、 $\beta$ -lactamase 非産生でアンピシリンの E-test 値が高い株が複数存在した。今年度に限った変化ではないことから、ワクチン普及との時的な一致は認められなかった。

#### E. 結 論

*Haemophilus influenzae* による侵襲性感染症患者由来 Hib 分離株は、Hib ワクチンが普及した補助金導入後と同時期、特に今年度に減少した。他の有莢膜型 a, c, d, e, f 型菌について、今年度は、当該研究班の対象県で

は分離されなかったものの、非対象県で分離されたことから継続した監視が必要である。6種類の抗血清 a～f 型のいずれの存在下で菌凝集を起こさない株 (Non-typable *H. influenzae*, NtHi) が菌血症を伴う肺炎等や菌血症患者の血液から分離された。これまでに分離された髄膜炎患者の髄液由来 Hib 1 株、NtHi 1 株、菌血症を伴う肺炎患者の血液由来 NtHi 1 株について SEM による菌体の形態を観察した結果、3 株間で形態に違いがあること、粘液性物質を有する NtHi 株があることが示唆された。今年度解析した Hib ワクチン接種歴を有する Hib による侵襲性感染症患者 3 例のうち、2 例が 1 回接種歴、1 例の髄膜炎患者ならびに 1 例の菌血症患者が 3 回接種歴を有していた。薬剤感受性については、今年度もアンピシリン耐性β-lactamase 非産生株が分離されたが、ワクチン普及と時期的な一致を認めなかった。ピペラシリン、メロペネム、セフトキシムならびにセフトリアキソン

の感受性菌の割合は、今年度、大きな変化を認めなかった。

関連資料：

「細菌性髄膜炎（髄膜炎菌性髄膜炎をのぞく）検査マニュアル」を国立感染症研究所ホームページに掲載した。

#### F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

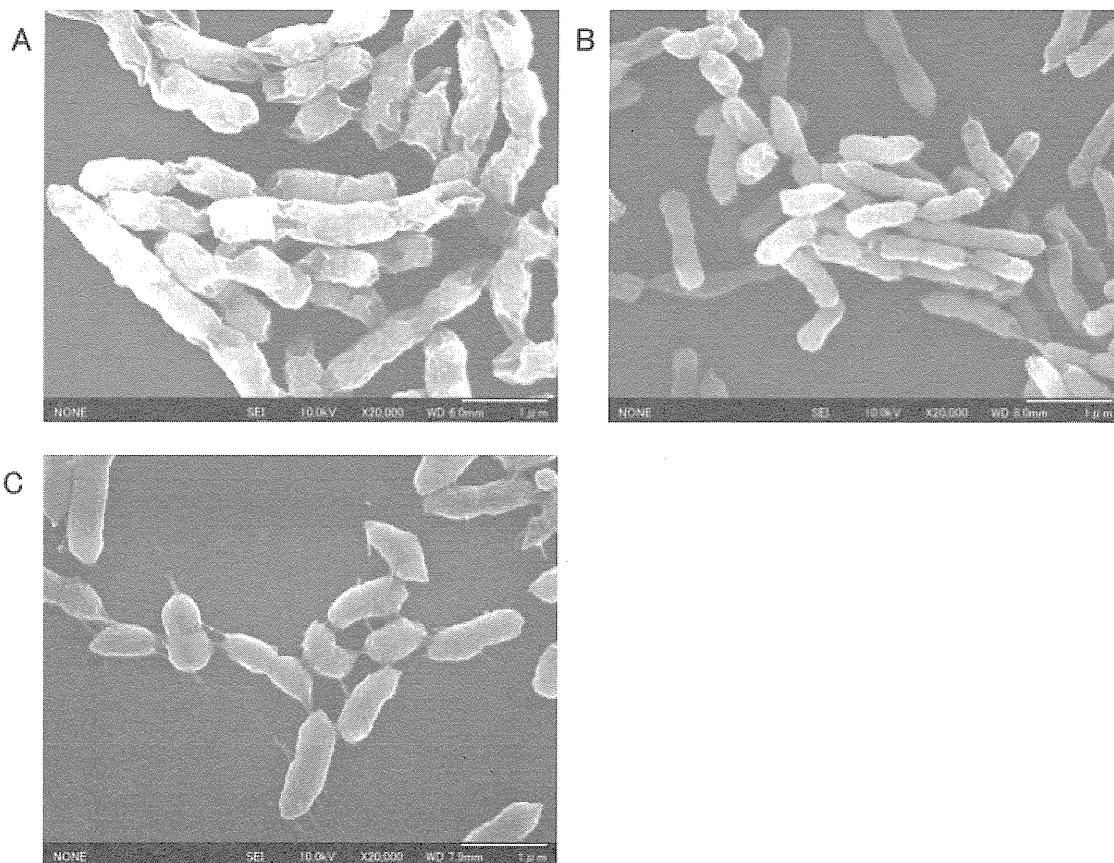
##### 3. その他

なし

表 1、Hib ワクチン接種歴を持つ侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症例由来菌株の莢膜型と薬剤感受性（平成 24 年度）

番号	発症時齢	入院年月	都道府県	診断名	採取検体	Hib ワクチン接種歴	最終接種から入院まで	感染研菌株ID	莢膜型	$\beta$ -lactamase 産生性	Ampicillin	Ampisillin/Sulbactam	Piperacillin	Meropenem	Ceftaxime	Ceftriaxone
7	0歳7ヶ月	2011.8月	福岡県	菌血症 肺炎	血液	あり(2回)	不明	Iha363	nonT	neg	1	1	0.094	0.125	0.5	0.25
8	4歳4ヶ月	2012.5月	福岡県	菌血症 肺炎	血液	あり(1回)	2年4ヶ月	Iha364	nonT	neg	4	4	0.25	0.25	1	0.38
9	1歳10ヶ月	2012.4月	沖縄県	菌血症	血液	あり(4回)	不明	Iha368	nonT	neg	12	12	0.094	0.125	1.5	0.38
10	1歳3ヶ月	2012.5月	沖縄県	菌血症 中耳炎	血液	あり(1回)	8ヶ月	Iha369	nonT	neg	2	2	0.094	0.25	1	0.38
11	0歳2ヶ月	2012.6月	千葉県(同一患者)	髄膜炎 菌血症	髄液	あり(1回)	1日	Iha385	b	neg	4	4	0.064	0.5	0.75	0.25
			千葉県(同一患者)	髄膜炎 菌血症	血液	あり(1回)		Iha386	b	neg	3	3	0.047	0.38	0.75	0.25
12	1歳1ヶ月	2012.8月	千葉県	髄膜炎 菌血症	咽頭ぬぐい	あり(3回)	9ヶ月	Iha389	nonT	neg	1.5	1.5	0.032	0.38	0.016	0.008
			千葉県(同一患者)	髄膜炎 菌血症	血液	あり(3回)		Iha390	b	neg	8	8	0.064	0.38	1	0.38
			千葉県(同一患者)	髄膜炎 菌血症	髄液	あり(3回)		Iha391	b	neg	8	8	0.064	0.38	1	0.38
13	1歳8ヶ月	2013.1月	沖縄県	肺炎 菌血症	血液	あり(1回)	不明	Iha393	b	neg	1	1	0.047	0.19	0.064	0.023
14	1歳3ヶ月	2012.11月	沖縄県	菌血症	血液	あり(3回)	9ヶ月	Iha396	b	neg	2	2	0.125	0.38	0.25	0.125
15	1歳4ヶ月	2013.2月	岡山県	髄膜炎	髄液	あり(3回)	9ヶ月	Iha397	nonT	neg	3	3	0.125	0.25	1	0.38

図 1、走査電子顕微鏡 (SEM) での観察像

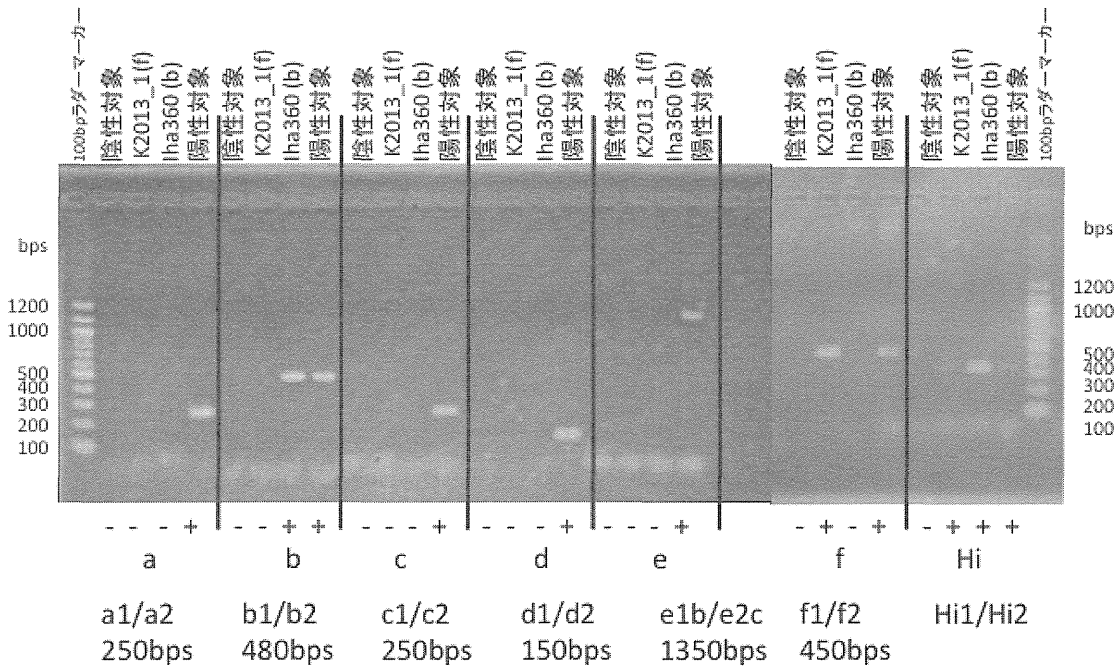


1-A. *Haemophilus influenzae* 莢膜型 b (髄膜炎患者、髄液由来株 Kam/Iha344)

1-B. Non-typable *Haemophilus influenzae* (髄膜炎患者、髄液由来株 Kam/Iha347)

1-C. Non-typable *Haemophilus influenzae* (肺炎患者、血液由来株 Kam/Iha349)

図2、*Haemophilus influenzae* 莢膜型 b 型ならびに f 型菌における莢膜型特異的遺伝子の増幅例



平成 24 年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)

分担研究報告書 (平成 24 年度)

研究課題「新しく開発された Hib、肺炎球菌、ロタウイルス、HPV等の各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究」

『わが国で流行するヒトロタウイルスの血清型の解析』

主任研究者：庵原俊昭 (国立病院機構三重病院)

分担研究者：谷口孝喜 (藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学)

中野貴司 (川崎医科大学医学部小児科)

研究協力者：神谷元 (国立感染症研究所感染症情報センター)、フランシス・エコウ・デニス (東京医科歯科大学) 浅田和豊、菅秀 (国立病院機構三重病院)、田中孝明 (川崎医科大学小児科) 梅本正和 (うめもとこどもクリニック)、黒木春郎、伊東宏明 (外房こどもクリニック)

研究要旨：2011-2012 シーズンにおいて、三重県、岡山県、千葉県内の 6 医療施設から収集した小児の急性胃腸炎患者 (外来および入院) 便 171 例中のロタウイルスの血清型 (G タイプと P タイプ) を調査した。その結果、2011-2012 シーズンでは、G1 が 102 例 (59.6%)、G2 が 1 例 (0.6%)、G3 が 35 例 (20.5%)、G9 が 14 例 (8.2%) であった。2007-2009 シーズン、2010-2011 シーズンでは、G3 の頻度がそれぞれ 73.1%、62.9% ともっとも高頻度であったが、2011-2012 シーズンには、G3 は 20.5% に減少し、G1 がもっとも多く検出され、わが国において G タイプの分布の顕著な変遷が観察された。

#### A. 研究目的

ロタウイルス感染症により、開発途上国を中心として年間 40~60 万人の乳幼児の死亡があると算定されている。一方、わが国のような先進国においては、死亡例は稀であるものの、重篤な例が多く、その結果入院に占める割合が高く、医療経済的にも重視されている。また、胃腸炎以外の疾患 (脳炎、脳症を含む中枢神経疾患など) との関連も指摘されている。

ロタウイルスの感染力はきわめて高く、

衛生状態をいかに改善しても、その制御は困難とされ、開発途上国のみならず開発国においても、ほぼ 100% の乳幼児が 5 歳までに感染し、発症すると報告されている。そこで、予防にはワクチンによる防御が最優先とされ、2006 年に 2 種類の経口生ワクチン：RotaTeq と Rotarix が開発された。すでに 100 カ国以上で認可され、約 30 カ国で定期接種されている。わが国においても、Rotarix は 2011 年 11 月から、RotaTeq は 2012 年 7 月から投与が開始されている。ま



だ投与率は低く、ワクチンによる影響は少ないが、今後、投与率の拡大とともに、ワクチン投与による野生株の分布に与える影響の有無を検討する意義は大きくなる。

ロタウイルスは、コア、内層、外層の3層構造からなる。外層には、VP7とVP4の2種のタンパク質（ともに感染防御抗原を担う）が存在し、それぞれ、Gタイプ、Pタイプを規定する。ロタウイルスの血清型は多様であり、動物を含めると、Gタイプは27種以上、Pタイプは35種以上が報告されており、ヒトでもそれぞれ10種以上の存在が知られている。GタイプおよびPタイプの分布は地域により、年によりかなり異なり、また複数のGタイプおよびPタイプが同時に分布する。そこで、ワクチンの導入にあたっては、GタイプおよびPタイプの分布は重要な基礎的データとなる。本研究では、三重県を主として、岡山県、千葉県を加え、外来、入院例の双方について、GタイプおよびPタイプの分布を調査した。

## B. 研究方法

(1) 三重県内の病院（国立病院機構三重病院、国立病院機構三重中央医療センター；入院患者）、うめもとこどもクリニック（外来患者）、岡山県の川崎医大病院（入院および外来患者）、千葉県の外房こどもクリニック（外来患者）における5歳未満小児の急性下痢症の患者便を収集した。2011年10月～2012年9月を対象とし、2011-2012シーズンと規定した。迅速診断キットにてロタウイルス感染の有無を検査し、陽性と判定されたサンプルについて、RT-PCR法によりロタウイルスのGタイプおよびPタイプを判定した。具体的には、便サンプルをPBSで10%便懸濁液とし、低速遠心後の上清を、破壊液（SDS, 2-mercaptoethanol, EDTA）でウイルスを分解しフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿でRNAを

抽出した。抽出RNAを用いて、10%アクリルアミド電気泳動でロタウイルス特有のRNAパターンを確認した。また、A群ロタウイルスに共通のプライマーを使用した逆転写反応を用い、1st PCRを行い、続いて各Gタイプあるいは各Pタイプに特異的なプライマーを用いた2nd PCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、増幅長を確認することでGタイプおよびPタイプを決定した。

## C. 研究結果と考察

三重県、岡山県、千葉県内の医療施設から収集した小児の急性下痢症患者（外来および入院）便171例について、RT-PCRによりGタイプ、Pタイプを決定した。

2011-2012シーズンでは、G1が102例（59.6%）、G2が1例（0.6%）、G3が35例（20.5%）、G9が14例（8.2%）であった。Pタイプについては、一部未決定であるが、1例のP[6]、P[4]を除いて、すべてP[8]であった。

2007-2009シーズンでは、G1P[8]が14.4%、G2P[4]が2.5%、G3P[8]が73.1%、G9P[8]が10.0%と、G3P[8]が圧倒的に多数を占めた。また、2010-2011シーズン（256例）では、G1P[8]が32.4%、G2P[4]が3.1%、G3P[8]が62.9%、G9P[8]が1.2%であった。こうして、2010-2011シーズンまでG3P[8]がもっとも高頻度であったが、2011-2012シーズンにはG1P[8]がもっとも多く検出され、ロタウイルスのタイプの分布の顕著な変遷が観察された。

地域別では、2011-2012シーズンにおいて、三重県では、G1が68.3%、G3が11.4%であったのに対して、千葉県では、G1P[8]が35.3%、G3P[8]が35.3%、岡山県ではG1P[8]が37.5%、G3P[8]が46.9%であったなど、地域差がみられた。

わが国における血清型の分布状況を把握

することは、今後のワクチン投与の血清型分布に対する影響を検証するために、きわめて重要な基礎データであると考え。

2011-2012 シーズンにおいては、わが国ではきわめてまれにしか検出されない、G3P[6]が検出され、今後分析を進めたい。こうした組合せを有するウイルス株は、他の RNA セグメントの由来もコモンなタイプではない場合が多いので、塩基配列決定による解析を進めたい。

今後、Gタイプ、Pタイプの決定に加えて、代表的な株、非定型的な株について、VP7 遺伝子、VP4 遺伝子の塩基配列解析を進めていき、自然に存在するロタウイルス株遺伝子の変遷を究める。また、投与されたロタウイルスワクチンはともに生ウイルスであるので、被投与者の便中に排泄されることになり、それが投与を受けていないヒトに感染することが起きるようになる。すでに諸外国で報告のある、野生株とのリアソートメントなどのサーベイも行う必要がある。さらに、外来と入院における血清型の違いを中心として、胃腸炎の重篤度と血清型の関連を解析する。日本各地における地理的な違いによる血清型の違いについても解析する。

## F. 研究発表

### 1) 学会発表

### 2) 論文

1. Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Nakai H, Asano Y, Hashimoto S, Ihira M, Yagasaki H, Takahashi Y, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell

transplant recipients. *Transplant Infect Dis* 14(1):49-56, 2012

2. Kawamura Yoshiki, Sugata Ken, Nakai Hidetaka, Asano Yoshizo, Ohashi Masahiro, Kato Tomochika, Nishimura Naoko, Ozaki Takao, Yui Akiko, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi: Correlation between serum matrix metalloproteinase and antigenemia levels in patients infected with rotavirus. *J Med Virol* 84:986-991, 2012
3. Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N: Whole genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenomic reassortment events. *J Gen Virol* 98:1700-1705, 2012

## G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

## H. 謝辞

下痢便の収集、処理にあたり、国立病院機構三重病院、国立病院機構三重中央医療センター、うめもとこどもクリニック、川崎医大病院、外房こどもクリニックのスタッフの皆さまに多大なご協力をいただきました。ここに深謝申し上げます。また、GタイプおよびPタイプの決定に協力を得た藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座の油井晶子元研究補助員に深謝申し上げます。

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)  
分担研究報告書 (平成 24 年度)

ワクチンの意義に関する研究  
三重県津市におけるロタウイルス感染症による  
外来患者の疫学調査

主任研究者：庵原俊昭、神谷 齊 (国立病院機構三重病院)

分担研究者：中野貴司 (川崎医科大学小児科学)

谷口孝喜 (藤田保健衛生大学ウイルス・寄生虫学講座)

研究協力者：浅田和豊、菅秀 (国立病院機構三重病院)、田中孝明 (川崎医科大学小児科学)  
梅本正和 (うめもとこどもクリニック)、黒木春郎、伊東宏明 (外房こどもクリニック)、  
Francis Dennis (東京医科歯科大学)、神谷元 (国立感染症研究所感染症情報センター)

#### 研究要旨

ロタウイルス感染症は全世界において重症小児下痢症の主原因となっている。アメリカの5歳未満の子どもでのロタウイルス感染症の現状は年間死亡例 20~60、入院例 55,000~70,000、外来受診例 600,000 と推定されている。

アメリカをはじめ諸外国ではすでに2種類のロタウイルスワクチンが定期接種として導入されており、我が国でも両方のワクチンが使用可能である。本研究班ではこれまで三重県の5病院にてロタウイルス感染による小児下痢症の後ろ向き(2003-2007)、および前向き(2008-2009)のサーベイランスを実施し、5歳未満の小児1000人当たり年間に4~5人のロタウイルス感染性胃腸炎による入院患者がいることを報告した。この結果をもとに我が国のロタウイルス感染性胃腸炎による入院患者は年間おおよそ3万例、医療費は66億円(1例22万円との中込らの報告を採用)と試算した。

今年度は、2011年に三重県津市で実施した外来受診例のロタウイルス胃腸炎の疾病負荷に関する調査の最終データと解析結果を報告する。諸外国と比べて医療機関へのアクセスが容易な我が国において、ロタウイルス胃腸炎の多くの患者は外来で治療されていることが予想され、外来におけるロタウイルス胃腸炎の疾病負荷を求めることにより、わが国におけるロタウイルス感染症の疾患及び経済的負荷をより正確に推測することが出来るとともにロタウイルスワクチンを日本に導入した場合のインパクトを推測する基礎データとなる。ロタウイルス胃腸炎の入院率及び原因ウイルスの株型、治療費などに関する情報は、医師や政策担当者によるロタウイルスワクチンの日本への導入決定において非常に重要な資料となると考えられる。

## A. 研究目的

この研究の目的は日本におけるロタウイルスによる小児期胃腸炎の罹患率を推定することであり、その目的達成のために laboratory confirmed population-based サーベイランスを実施した。これまでに入院例に関しては報告したが、今回は三重県津市において1年間外来サーベイランスを実施した。これにより収集されたデータから、現在ロタウイルス胃腸炎により生じる医療費の負担や罹患者の経済的負担、さらにはロタウイルスワクチンを導入した場合の影響が推定でき、将来のワクチン導入を判断する上での情報として活用することが可能である。今年度の分担研究では、三重県津市における5歳未満の急性胃腸炎による外来受診症例のうち、ロタウイルス感染によるものの割合を求めめることを目的とした。

## B. 研究方法

(1) 本サーベイランスは、三重県津市における5歳未満小児の急性下痢症の前向き観察研究であり観察期間は1年間である(2011年1月1日～2011年12月31日)。

(2) 参加機関は三重県津市内で小児科を標榜する医療機関である。なお、津市周辺の小児科標榜施設(三重県鈴鹿市、亀山市)にも参加してもらい、津市在住の患者が受診した場合報告してもらう。

(3) 定点医療機関(梅本こどもクリニック)において、急性胃腸炎と診断された患者に関して後に示すサーベイランス参加条件を満たす患者のみを登録する。

(4) 受診時に各施設共通の調査事項(質問表、添付)を担当者に記入してもらう。質問事項は、住所(市のみ)、年齢、性別、入院時所見、迅速検査施行の有無と結果な

どであり、治療後の経過を含め必要性があればカルテから情報を収集する。定点以外の施設に関しては急性胃腸炎と診断された患者の受診月、年齢、性別を報告してもらう。

(5) 定点である梅本こどもクリニックにおける患者報告をもとに、津市内医療施設から報告された急性胃腸炎患者の中のロタウイルス感染性胃腸炎患者数を推計する。

(6) 診断は迅速キットを用いて行い、陽性と診断されたサンプルは藤田保健衛生大学ウイルス寄生虫学教室に送られ、PCR法によりロタウイルスの感染を確認し、陽性サンプルに関しては株型を判定した。具体的な方法は、便サンプルをPBSで10%便懸濁液を調製し、上澄み液をフェノール・クロロホルム処理しRNAを抽出する。抽出したRNAにすべてのG、あるいはP血清型に共通のプライマーを使用して逆転写反応を用いた1st PCRを行い、続いて各血清型に特異的なプライマーを用いた2nd PCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、増幅長を確認することで株型を確定した。

(登録対象患者)

### a.参加条件

以下の全ての条件を満たすものがこの研究の参加対象者となる

- ・ 三重県津市に在住している
- ・ 生後14日以上5歳未満
- ・ 2011年1月1日から2011年12月31日までに参加施設を受診した者
- ・ 以下の症状を認めて急性胃腸炎と診断されたもの

- 下痢(24時間以内に下痢便を3回以上排出 または
- 24時間以内に1回以上の嘔吐

- ・ 病気の症状が発症から 10 日以内のもの
- b.除外条件  
以下の条件を 1 つでも満たせばこの研究の対象とはならない。
  - ・ 参加施設の所在地外に住んでいる
  - ・ 生後 14 日未満、または 5 歳以上
  - ・ 入院前 10 日以内に急性胃腸炎の症状が認められた場合
  - ・ 急性胃腸炎以外の疾患により嘔吐や下痢を呈していると考えられる場合
  - ・ 基礎疾患として明らかな免疫不全症を合併している場合
  - ・ 両親、または家族がいない場合

参考：他の臨床研究に参加していても構わない

(倫理面について)

本研究は、患者が病院受診時、あるいは入院中に自然排せつした便をサンプルとして用いており、侵襲的な処置はしていない。また、住所、年齢などの個人情報個人が特定できないよう特別な ID で管理した。また本研究は国立病院機構三重病院の倫理委員会により承認されている。

### C. 評価及び本サーベイランスの意義

上記の方法により調査対象となる地域の人口をもとにしたロタウイルス胃腸炎外来受診症例の罹患率、及び原因となったロタウイルスの株型の種類と割合についての情報が得られる。この情報を得ることにより、全国における 5 歳未満の急性胃腸炎による外来症例のうちロタウイルスが関与している症例数の割合が推測できる。また、ロタウイルスの株型を調べることにより、既存ワクチン導入時のシミュレーションも可能となる。

### D. 研究結果

#### 1) 調査結果全体像

三重県津市の人口は 280,407 人、5 歳未満の人口は 12,118 人であり、津市並びにその

周辺(鈴鹿市、亀山市)の医療機関 41 施設が対象となった。結果としては参加医療機関全体から報告された急性胃腸炎患者の総数は 4,630 人、報告された症例間に性別の偏りは認められなかった。

#### 2) 定点からの報告

患者総数 4,630 人中定点機関である梅本こどもクリニックからは 866 例(18.7%)が登録された。定点においてロタウイルス迅速キット検査実施例は 183 例(21.1%)であった。

月別の報告数を見ると、津市全体からの報告とトレンドは連動しており(図 1)、また定点における迅速テスト実施率も年間を通してほぼ一定しており(図 2)、定点の検査結果の陽性の割合を月別及び年齢で調整して全体の報告数に掛け合わせてロタウイルス感染性胃腸炎の患者数を推測することは妥当と考えられた。

なお、定点の迅速検査におけるロタウイルス陽性例は 1 月から 6 月にかけて認められた。これは同地区で過去 8 年間ロタウイルス感染性胃腸炎の入院患者を調査した結果と一致しており、調査年度においてロタウイルスの流行が過去の流行と大幅に変化していたとは考えにくいことがうかがえた。

#### 3) 患者数の推定

定点における急性胃腸炎の迅速検査について年齢、受診月別に解析し、その割合を定点で検査を実施しなかった症例、および定点以外の急性胃腸炎報告例に適応した結果を示す(表)。受診率は 1000 人年あたり 306.3 人であった 1 歳児が最も多く、5 歳未満の受診率は 134.8/1000 人年となった。

#### 4) 入院症例との比較

津市地区で同時に行っているロタウイルス胃腸炎入院患者サーベイランスの結果と今回の受診率を合わせて表示したものが図 3 である。これを見ると、1 歳児の外来受診率が多い割に入院率は 2 歳児と大きく異なる。1 歳児の下痢は児にとって初めて

のため、保護者が軽症な段階ですぐ外来受診をしていることを示唆している。また、血清型の比較については（図4）入院例、外来例ともにG3P[8]の割合が多く、他の血清タイプの出現率も変わらないことから、血清タイプが重症度に関与している可能性は低いと考えられた。

#### E. 今後の計画

外来例は入院例と異なり、保護者が便を持参したり、受診中に排便がないと迅速検査が行い難い。入院例がほぼ100%迅速検査を実施されているのに対し、外来例では約20%であった。このため、定点での割合をそのまま年齢、受診月のみの調整で推定患者を算出する今回の方法はさらなる検討が必要である。しかしながら、諸外国からの同様の報告でも検査率はほぼ20%であり、本調査の検査率が有意に低いというわけではない。

このほかにも、ロタウイルスの流行の程度は毎年異なるが1年のみの結果しかなく、重複感染した児に関しては調査できていないこと、三重県津市の結果のみから全国状況を推定することなど検討すべき点があり、同様の調査を複数の地域で継続して実施することで、外来患者の疾病負荷がより正確に推定できると考えられる。

また、わが国では外来で点滴をすることも多く、外来治療の医療費に関しても入院例と合わせて調査する必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1) 学会発表

なし

##### 2) 論文発表

・田中孝明、中野貴司：ロタウイルス。小児科。53巻4号：431-436, 2012.

#### G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

#### H. 謝辞

本研究の計画立案と実施に際して、常に指導と助言をいただいている Drs. Umesh D. Parashar, Catherine Yen (Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Center for Disease Control and Prevention, USA)、サーベイランス、便検体収集にあたり多大なご協力をいただいているうめもとこどもクリニック、外房こどもクリニック、感染性胃腸炎患者の受診者数の報告を毎月行ってくださった三重県津市、鈴鹿市、亀山市の小児科標榜医療機関の皆様、データ収集にご協力いただいた国立病院機構三重病院名誉院長室秘書木下麻衣子様、データ入力を行ってくださった国立感染症研究所感染症情報センター臨時研究補助員河野有希様、並びに株型判定に多大なご協力をいただいている藤田保健衛生大学ウイルス・寄生虫学講座スタッフの皆様に深謝申し上げます。

以下図表

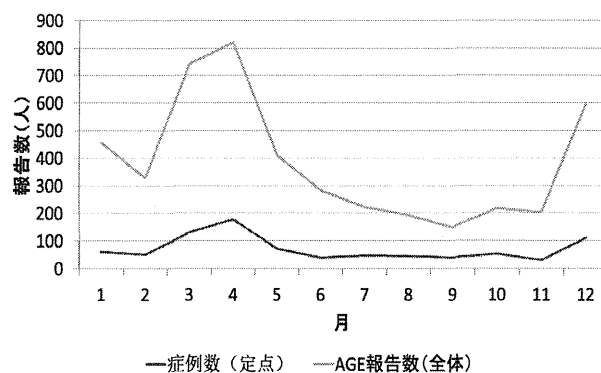


図1. 定点とそのほかの医療機関からの月別急性胃腸炎患者報告数の変化

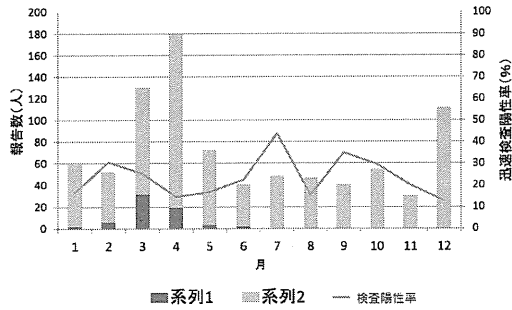


図2 定点における月別ロタ陽性検体の割合と迅速診断検査実施率

	人口	調整後患者数	受診率(1000人・年)	95%信頼区間
0-5か月	1127.5	70.0	62.1	(48.8-78.0)
6-11か月	1127.5	141.1	125.2	(106.9-146.5)
1歳	2424.0	742.4	306.3	(313.7-339.7)
2歳	2420.0	364.5	150.6	(136.1-166.2)
3歳	2474.0	225.0	90.9	(79.6-103.4)
4歳	2545.0	90.5	35.6	(29.1-43.0)
合計	12118	1633.5	134.8	(128.3-141.4)

表.年齢群別ロタウイルス感染性胃腸炎の推定受診者数

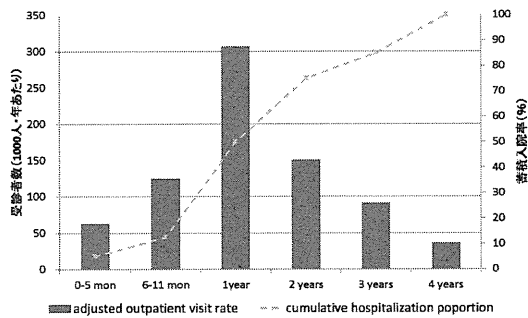


図3.津市における年齢別外来受診率と蓄積入院率(2011年)

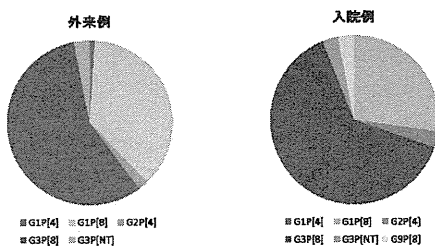


図4.2011年三重県津市におけるロタウイルス胃腸炎患者の入院例と外来受診例における分離ウイルス株型の比較

# ロタウイルス感染症 症例調査票 (外来)

施設内患者番号 \_\_\_\_\_ 施設名 \_\_\_\_\_

受診日 \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ 診断医名 \_\_\_\_\_

## 【患者情報】

患者イニシャル \_\_\_\_\_  
住所： ( \_\_\_\_\_ ) 県 ( \_\_\_\_\_ ) 市 《市までの記載で可》  
受診時年齢 \_\_\_\_ 歳 \_\_\_\_ ヶ月  
性別  男性  女性  
既往歴  なし  あり (病名： \_\_\_\_\_ )

## 【初診時の臨床所見】

発症してから受診するまでの最高体温 \_\_\_\_\_ °C  
嘔吐  なし  あり ありの場合 24 時間以内に \_\_\_\_\_ 回  
嘔吐の症状 \_\_\_\_\_ 日目 (発症日を 1)  
下痢  なし  あり ありの場合 24 時間以内に \_\_\_\_\_ 回  
下痢の症状 \_\_\_\_\_ 日目 (発症日を 1)  
重度脱水 (5%以上の体重減少)  なし  あり  
血清ナトリウム値 (検査してあれば) \_\_\_\_\_ mEq/L  
血糖値 (検査してあれば) \_\_\_\_\_ mg/dl

## 【初診治療】 (複数回答可)

経過観察 (処置なし)  
 ORS ( \_\_\_\_\_ 日間)  
 点滴 ( \_\_\_\_\_ 日間)  
 処方薬 (薬名 \_\_\_\_\_ 日間)  
 高次医療機関へ紹介  その他 ( \_\_\_\_\_ )

## 【転帰】

軽快\*  後遺症  死亡  入院 ( \_\_\_\_\_ 日間)  不明  
\*軽快の場合外来受診回数 ( \_\_\_\_\_ 回)

## 【便検体の情報】

便検体採取  できた  できなかった  
検体採取日時 \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_  
ロタウイルス迅速診断キットの結果  陽性  陰性  未実施

## 【ロタウイルスワクチン接種歴】

なし  あり  
1 回目：接種日 H \_\_\_\_ 年 \_\_\_\_ 月 \_\_\_\_ 日 (Rotarix・Rotateq)  
2 回目：接種日 H \_\_\_\_ 年 \_\_\_\_ 月 \_\_\_\_ 日 (Rotarix・Rotateq)  
3 回目：接種日 H \_\_\_\_ 年 \_\_\_\_ 月 \_\_\_\_ 日 ( \_\_\_\_\_ ・Rotateq)



【研究要旨】 2011年3月に同時接種後の死亡例が報告され、突然死症候群と判定され同時接種は再開されたものの同時接種の安全性が懸念されている。ワクチンは獲得免疫を誘導するものであるが免疫獲得には自然免疫への刺激が必須である。ヒト末梢リンパ球を DPT, Hib, PCV7 の単独、もしくは複数のワクチン製剤で刺激し産生されるサイトカインを調べた。サイトカインの中では IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, TNF- $\alpha$  の炎症性サイトカインが産生され単独では PCV7 の刺激による IL-1 $\beta$  の産生量が多く DPT/Hib の二種の刺激では同じ量の IL-1 $\beta$  の産生がみられ、PCV7 を含む複数の刺激で産生量は増加した。Hib の刺激で高値の IL-6 の産生が認められるが複数の刺激による差は認められなかった。G-CSF, TNF- $\alpha$  は複数のワクチン刺激で産生の増加が認められた。ワクチン接種後48時間以内に発熱を認めた児の血清中ではサイトカインが上昇しており、発熱を認めなかった児と比較すると G-CSF が発熱児で高値を示した。こうした炎症性サイトカインは発熱等の副反応関連している事が想定され炎症性サイトカインの産生の少ない同時接種の組み合わせを検討し本年は日本脳炎ワクチンと MR の刺激では産生の増強がない事を確認した。また DPT と不活化ポリオの組み合わせも炎症性サイトカインの産生の増強は認めなかった。

## A. 研究目的

新たに認可されたインフルエンザ桿菌(Hib)、肺炎球菌ワクチン(PCV7)は接種の対象年齢が2カ月から早期に接種することで有効な感染症対策が期待できる。この時期には接種スケジュールが過密になることから同時接種が勧められている。ワクチンの安全性に関して 2011 年 3 月に同時接種後の死亡例が相次いで報告され突然死症候群と考えられ、頻度を比較すると 10 万接種あたり 0.1-0.2 と諸外国での頻度と有意差は認められないところから 4 月には接種は再開された。その後も同時接種での死亡例が報告されている。ワクチンは獲得免疫を誘導する目的で使用され、獲得免疫の誘導には自然免疫への刺激が入り I 型 IFN, 炎症性サイトカインとして、IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  が誘導され CD4+helper T 細胞を Th1, Th2 応答に分化させ獲得免疫を誘導することが知られてきた。逆に、こうした炎症性サイトカインは発熱等の immunotoxicity と関連していると考えられる。ワクチン製剤の中にはアジュバントを含んでいるものもありワクチンの成分自体も自然免疫に刺激を与える。各ワクチンに

ついて自然免疫系への刺激の入る可能性を検討し表 1 に示した。ヒト末梢リンパ球を用いて各ワクチン製剤を組み合わせ刺激し産生されるサイトカインを測定した。

表 1. 各ワクチンの自然免疫への刺激

### ワクチン成分とアジュバントによる自然免疫系の刺激

Vaccines 生ワクチン	Adjuvant (in 0.5 ml)	Innate immunity
BCG	cell membrane ssRNA CpG DNA Polysaccharide ssRNA dsRNA	TLR2, 4 TLR7/8 TLR9 C type lectin. TLR7/8, MDA RIG I
MMRV		
不活化ワクチン(細菌性)		
DPT	Alum (0.150mg)	NLRP3
Hib T-conjugated	Poly saccharides	TLR2, 4
PCV7	Alum (0.125mg) Poly saccharides	NLRP3 TLR2, 4
不活化ワクチン(ウイルス性)		
B型肝炎	Alum (0.25mg)	NLRP3
A型肝炎	ssRNA	TLR7/8
狂犬病	ssRNA	TLR7/8
日本脳炎	ssRNA	TLR7/8
不活化ポリオ	ssRNA	TLR7/8
HPV サーバリックス ガーダシル	MPL 50ug + Alum 0.5mg Alum 0.225mg	TLR4, NLRP3 NLRP3

## B. 材料と方法

### B-1. リンパ球のサイトカイン産生能

ヒト末梢リンパ球を 10<sup>6</sup>/ml に調整し 0.5 ml 培養しワクチン製剤 50  $\mu$ l で刺激し 24 時間後に培養上清を採取し BioPlex ヒトサイトカイン 17plex でサイトカインを測定した。使用したワクチンは DPT、Hib、

PCV7、IPV、日本脳炎ワクチン、MR ワクチンをもたらした。

### C. 結果

#### C-1. ワクチンの同時刺激によるサイトカイン産生能

25名の健康小児2か月から7歳までの末梢リンパ球を乳児期に同時接種の対象となるDPT、Hib、PCV7の単味、2種、3種を同時刺激し24時間後の培養上清を採取しサイトカインプロファイルを検討し結果を図1に示した。17種類のサイトカインの中で単独接種、二種、三種の刺激で変動が見られたサイトカインはIL-1 $\beta$ 、IL-6、G-CSF、TNF- $\alpha$ の炎症性サイトカインで、別途EIA法で測定したIFN- $\alpha$ 、PGE2には変化が認められなかった。

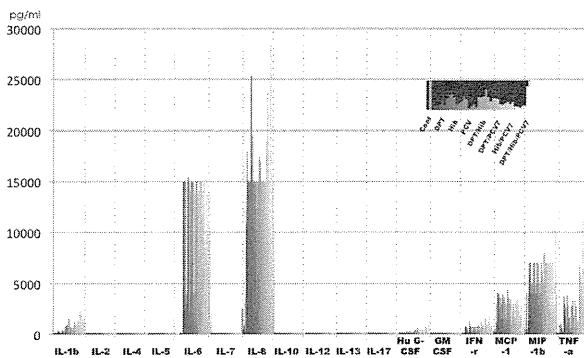


図1. ワクチン刺激によるサイトカイン産生

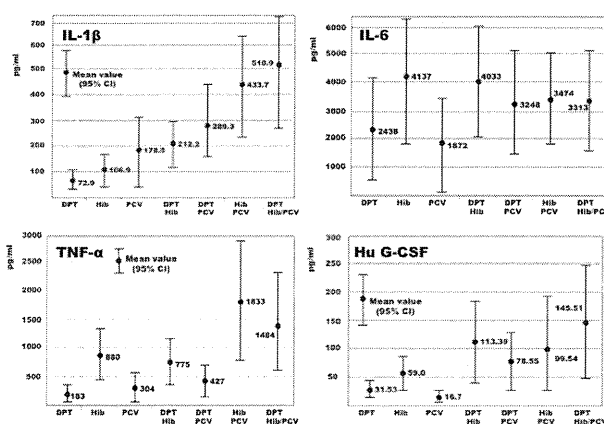


図2. ワクチンの同時刺激によるIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、G-CSF産生

ワクチンによる同時刺激で変動がみられたIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、G-CSF産生能を図2に示した。IL-1 $\beta$ はDPT、Hib、PCV7の内ではPCV7での刺激で高値の産生量を示しDPT/Hibの二種の刺激

はPCV7単独と同じ量のIL-1 $\beta$ の産生がみられ、PCV7を含む複数の刺激で産生量は増加した。Hibの刺激で高値のIL-6の産生が認められるが複数の刺激による差は認められなかった。G-CSF、TNF- $\alpha$ は複数のワクチン刺激で産生の増加が認められた。

#### C-2 ワクチン接種後の発熱例の血清中のサイトカイン

リンパ球をワクチン製剤で刺激するとIL-1 $\beta$ 、IL-6、G-CSF、TNF- $\alpha$ の炎症性サイトカインの産生が認められた。炎症性サイトカインは発熱と関連しワクチン接種後の副反応とも関連すると考えられとくにIL-1 $\beta$ は発熱因子と考えられている。ワクチン接種後24時間以内に発熱を認め48時間以内に得られた血清と、ワクチン接種後48時間以内に発熱を認めなかった例のサイトカインを検討した。発熱例52例から血清が得られ組み合わせは1例が日本脳炎ワクチンで他はすべてPCV7単独もしくはPCV7を含んだ同時接種であった(表2)。

表2. 発熱例と非発熱例のワクチンの組み合わせ

Fever + (n=52)		Fever - (n=20)	
DPT/Hib/PCV7	21	DPT/Hib/PCV7	4
DPT/Hib/PCV7/Rota	3	DPT/Hib/PCV7/Rota	1
DPT/Hib/PCV7/BCG	1	PCV7/Hib	6
PCV7/Hib	6	PCV7	4
PCV7/Hib/Rota	4	DPT/Hib	1
PCV7/DPT	1	DPT	2
PCV7/MR	3	Influenza	2
PCV7/Influenza	1		
PCV7/IPV/MR	1		
PCV7/IPV	1		
PCV7	9		
JEV	1		

表3. ワクチン接種後の血清中のサイトカイン

ワクチン接種後発熱の有無による血清サイトカインプロファイル				
	IL-1 $\beta$	IL-6	G-CSF	TNF- $\alpha$
Fever + (n=52)	0.84 (0.47-1.2)	29.93 (18.96-34.91)	67.07 (36.08-98.07)	12.89 (4.77-21.00)
Fever - (n=20)	0.93 (0.3-1.57)	23.23 (7.59-38.86)	9.01 (5.11-12.9)	17.44 (1.17-33.72)

(95%CI)

ワクチン接種後の発熱例においては炎症性サイトカインが高値を示す事が予想されたが、IL-1 $\beta$ はほとんど検出されず、IL-6、TNF- $\alpha$ も発熱の有無に関わらずに検出され発熱例では唯一G-CSFが67.07pg/ml(95%CI: 36.08-98.07)と発熱を認めなかった20例の9.01pg/ml(95%CI: 5.11-12.9)よりも高値を示した。

### C-3. 日本脳炎とMR ワクチン

DPT, Hib, PCV7 の細菌性ワクチン以外の組合わせとして日本脳炎ワクチンとMR ワクチンを検討し結果を図3に示した。1歳代で日本脳炎、MR ワクチンの接種を受けていない4例の検討を行った。同時刺激でサイトカイン産生が増強する傾向は認めなかった。全粒子不活化ウイルスワクチンと生ワクチンの組合わせになるので炎症性サイトカイン以外にもI型IFNの産生能も検討したところ培養1日目から60-100 pg/mlのIFNが産生され5日間培養で産生の増加は認めなかったが、1例は同時刺激で5日後に産生が認められた(図4)。

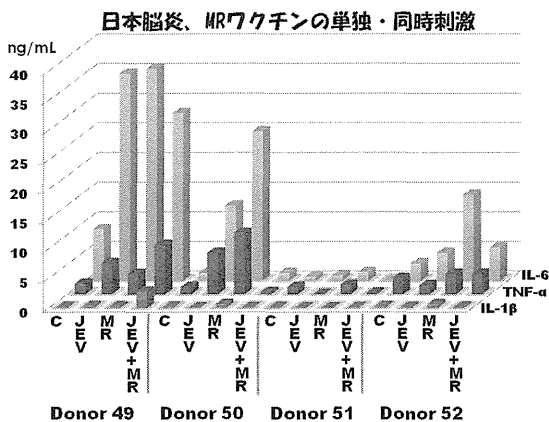


図3. 日本脳炎ワクチン(JEV)とMRワクチンの同時刺激による炎症性サイトカインの産生能

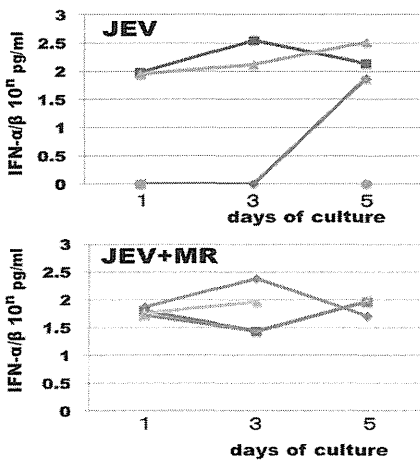


図4. 日本脳炎ワクチン(JEV)とMRワクチンの同時刺激によるIFN産生能

### C-4. DPT とIPV の同時刺激

2012年9月から生ポリオワクチンに代わって不活化ポリオワクチン(Inactivated polio vaccine: IPV)が定期接種のワクチンとなり更にDPT/IPV4種混合ワクチンが認可された。

今後、同時接種の軸はDPTからDPT/IPVにシフトすると考えられる。3ヶ月でDPT, IPVの接種を受けていない乳児3例のリンパ球をワクチン製剤で刺激し炎症性サイトカインの産生図5に示した。

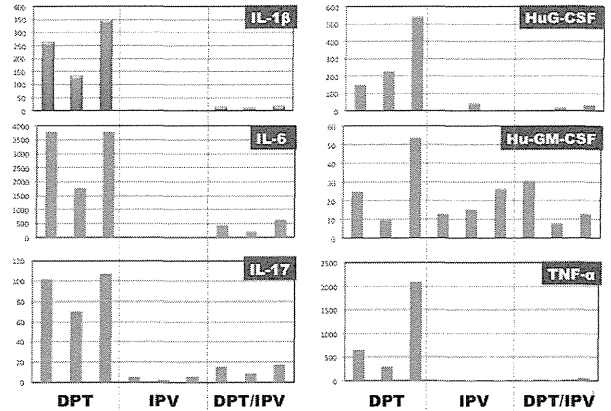


図5. 3ヶ月児3例のDPT, IPV, 同時刺激によるサイトカイン産生能

DPT 単独刺激でIL-1β, IL-6, IL-17, HuG-CSF, TNF-αが産生されるが、IPVは炎症性サイトカインの産生は認めず、同時刺激でDPT 単独刺激より低下する。

### D. 考案

ワクチンは自然免疫系に刺激を入れることでサイトカインを誘導する。I型IFNはMHC Iと共に認識される co-stimulatory molecule の発現を増強しCD8+細胞に認識されCTL活性を誘導する。また、炎症性サイトカインはMHC IIとともに認識される co-stimulatory molecule の発現を増強することでCD4+Tリンパ球に抗原が認識されTh1, Th2 応答へと分化誘導され獲得免疫を調節する。産生されるサイトカインが免疫応答を調節するとともにワクチン接種後の副反応としての発熱に関連すると考えられる。ワクチン接種後の免疫応答と副反応は別の反応と考えられてきたが自然免疫応答を表裏でみていたにすぎない。

今まで自然免疫の観点からワクチン効果を検討した研究は極めて限られたものである。マウスレベルではインフルエンザの抗体産生にはIFN-α/βの刺激が必要であることが知られておりIL-1β, IL-6等の炎症性サイトカインはCD4+helper 応答に関与し、IFN-γはTh1 応答を誘導することがしら

れている。現行ワクチンの中でアルミアジュバントが使用されているワクチン接種では組織破壊による漏出した DNA は尿酸を形成し Inflammasome の NOD-like receptor のなかの NLRP-3 を刺激し caspase を活性化し Pro IL-1 $\beta$  を IL-1 $\beta$  に変換する。今回、リンパ球培養をワクチン製剤で刺激し BioPlex でヒト17種類のサイトカイン応答を調べた。アルミアジュバントを含むワクチンは inflammasome を刺激し炎症性サイトカインを誘導する。細菌性ワクチンの Hib, PCV7 の莢膜多糖類は TLR2, 4 を刺激することで NF $\kappa$ B を活性化し IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の炎症性サイトカインを誘導する。PCV7 を含む複数刺激で IL-1 $\beta$  の産生量は増加していた。Hib の刺激で IL-6 は高値を示し同時刺激で増強は認めなかった。G-CSF, TNF- $\alpha$  産生も増加しており、こうしたサイトカインの中でどのサイトカインがワクチン接種後の免疫応答に関連しどのサイトカインが副反応として発熱と関連しているかは不明である。免疫原性と副反応を区別できるバイオマーカーのヒントがあると考えられる。

IL-1 $\beta$  は免疫不全症の周期性発熱に関連しておりリンパ球培養で PCV7 を含む同時刺激で IL-1 $\beta$  産生が増強され、PCV7 接種後では発熱の出現頻度が高く PCV7 を含んだ同時接種で発熱率が高くなることからワクチン接種後の発熱例でこうした炎症性サイトカインが高値を示すのでは考えた。同時接種を含めたワクチン接種後の発熱は24時間以内に出現し48時間以内に採取された血清52例と発熱を認めなかった20例を比較すると IL-1 $\beta$  は検出されず、IL-6、TNF- $\alpha$  が検出されたが発熱のなかった症例と差はなく G-CSF のみが発熱例で高値を示した。G-CSF は好中球を増加させ遊走させるサイトカインでワクチン接種後局所には好中球、単球、マクロファージ、樹状細胞が集まって来ている。G-CSF の増加と発熱との関連例は不明であるが PGE2 を含めた今後の検討が必要である。

## E. 結語

同時接種は欧米で通常行われているワクチンに関する医療行為であるがその評価についての基礎的な検討は行われていない。末梢リンパ球の培養を検討すると DPT, Hib, PCV 単独、複数刺激で IL-1 $\beta$ 、IL-6、G-CSF、TNF- $\alpha$  が誘導される。ワクチン接種後の発熱例の血清中には炎症性サイトカ

インは検出されるが発熱を認めなかった例との差はなく G-CSF が発熱例で高値を示した。PCV を含めた同時接種で発熱率が高くなることと G-CSF の関連性を検討すると共に炎症性サイトカインの誘導の低い同時接種の組み合わせについて DPT/IPV を軸に検討する必要がある。

## F. 2012 年度研究業績

### 1. 論文発表

- 1) [Nakayama T](#), Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine* 30, 3885-3890, 2012
- 2) [Nakayama T](#), Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine* 30, 7662-7666, 2012
- 3) Matsubara K, Iwata S, [Nakayama T](#). Antibodies against mumps virus component proteins. *J Infect Chemotherapy* 18, 466-471, 2012
- 4) Sawada A, Yamani Y, [Nakayama T](#). Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains. *J Infect Chemother* DOI 10.1007/s10156-012-0515-3