

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）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」
(H23-新興-一般-010)

分担研究報告書（H23-25 年度）

「GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発、および健常成人における細胞培養日本
脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果」

研究分担者 高橋 和郎（大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長）

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博、加瀬 哲男

（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課）

研究要旨：

1. GENECUBE®を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

GENECUBE 法によりDV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられた。WNV に対しては低感度であり今後の検討課題である。

2. 健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果

成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が<10である群の陰転化率は37.5%と高値であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群（高齢者が多数を占める）では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。

健常人における日本脳炎ワクチン接種2年後の幾何平均中和抗体価はわずか9.4%まで減少し、陰転率も39%と高く1年後の陰転率の約2倍となった。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。

日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

A. 研究目的

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

現在、地方衛生研究所では、アルボウイルスの遺伝子診断について、患者検体および蚊やカラス検体を対象にPCR法と塩基配列の決定により確定診断を行っている。しかし、蚊の検体数は多く、検査には3-5日を要する。今般、遺伝子検査を2時間以内で判定可能な自動核酸検出装置を使用し、迅速で高感度な検出方法の開発を目的とした。この実験診断法が確立すると、地方衛生研究所では、より効率的で高性能な診断法が導入でき、より迅速な感染症対策に寄与できることが期待される。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

本邦で使用されている日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであるため、抗体価は接種後5~10年で低下するといわれている。厚生労働省感染症流行予測調査の結果では、40~50代の抗体保有率が低く、近年発生する日本脳炎患者の3~4割はこの年代である。また、2009年から新しい乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが定期接種に使用されているが、成人における使用例は少なく、その効果に関する情報は少ない。そこで、本研究では、成人における新規日本脳炎ワクチン接種による抗体応答とその持続効果について解明することを目的とした。

B. 研究方法

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. 対象ウイルスとPCR法の設計

対象ウイルスはデングウイルス(DV)1-4型、ウエストナイルウイルス(WNV)、日本脳炎ウイルス(JEV)である。DVのプライマーとプローブはウイルス遺伝子の3'端近傍に位置し、4種の型に共通する配列を選定した。WNVとJEVについては、プライマーはこれらに共通する配列を選定し、プ

ローブは1塩基異なる配列の部位を選定した。

2. PCR反応と検出感度の検討

既知の力価のウイルスからRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを作製してKODポリメラーゼによりPCR反応を行い、プローブと反応することにより特異性が検証される。検出感度は抽出したRNAを、また上記PCR産物DNAを段階希釈することにより検討した。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1) 対象

本研究に同意を得た一般健常人272名 年齢:20~72歳(中央値43歳)に乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン(阪大微研 ジェービック V[®])を接種し、ワクチン接種前と、接種約1ヶ月後に採血を実施し、ワクチン接種により抗体が陽転した対象者のうち154名について接種1年後に再度採血を実施した。

2) 中和抗体価測定

日本脳炎ウイルス(JEV) Beijing-1株に対する中和抗体価を50%フォーカス減少法(FRNT₅₀)を用いて測定した。このとき、血清希釈10倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。幾何平均抗体価は、中和抗体価10倍未満を0.5として算出した。

なお、本研究は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会で承認を受けており、検体提供者へはインフォームドコンセント及び検体の匿名化など倫理面への配慮がなされている。

C. 研究結果

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. ウイルス遺伝子の検出と検出感度の検討

DVは1-4型すべて検出可能であった。検出感度は4型が10コピー、3型が100コピーで、1,2型は今後精査し行う予定である。最少検出ウイルス力価は1型 2.3×10^{-2} PFU, 2型 6.0×10^{-4} PFU, 3型 3.2×10^{-3} FFU, 4型 2.3×10^{-2} FFUであった。

JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} FFU であった。

WNV NY株に対する検出限界は、NY株のPCR産物をテンプレートとした場合 10^4 コピーと非常に低感度であった。

[健全成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1. ワクチン接種前後の JEV に対する中和抗体価

日本脳炎ワクチン接種者 272 名のうち、104 名 (38%) はワクチン接種前より JEV に対する中和抗体を保有していた。1 回のワクチン接種により JEV 中和抗体価が 2 倍以上上昇したのは 239 名 (88%) で、JEV に対する幾何平均抗体価は接種前 2.7 倍、接種後 50.4 倍と約 19 倍の有意な上昇が認められた。ワクチン接種前より抗体を保有していた 104 名は、接種により全員 2 倍以上抗体価が上昇した。

2. ワクチンにより誘導された抗体価の持続性

ワクチン接種者 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上であり、2 年間継続調査ができた全 142 名の幾何平均抗体価の推移は、ワクチン接種 1 か月後 91.7 から 1 年後には 20.9 と約 1/4 に低下し、2 年後には 8.59 と約 1/10 に低下した (表 1)。1 年後に抗体価が <10 となった陰転率は 23% であったが、2 年後には 39% (56/142) が陰転した。接種後 160 倍以上の対象者では陰転化した例は認められなかった。

142 名の対象者のうち、ワクチン接種前中和抗体価が ≥ 10 (n=59) と <10 (n=83) の 2 群に分けると、ワクチン接種 1 か月後では幾何平均抗体価はそれぞれ 305, 39 であったが、2 年後にはそれぞれ 77, 1.8 と減少し、それぞれ 25%, 4.6% に減少した。2 群における抗体価の差は、接種 1 か月後は 7.8 倍であったが、2 年後には 43 倍と差がさらに拡大した。2 群での抗体価の差はいずれの時期も有意差が認められた。

上記 2 群におけるワクチン接種 1 および 2 年後の抗体陰転率を検討した。ワクチン接種前

の中和抗体価が ≥ 10 であった 59 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 1 例 (1/59, 1.7%) であった。この例はワクチン接種前抗体価 10 で、接種後 1 か月の抗体価が 20 と低抗体価の例であった。接種 2 年後に陰転した例は認められなかった。一方、接種前の中和抗体価が <10 である 83 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 32 例 (32/83, 38.5%) であり、1 年後に陰転化した 33 例の 97.0% を占めた。2 年後さらに陰転化した例は 23 例で、総計 55 例が陰転化し、陰転率は 66% (55/83%) であった。陰転化した総数 56 例の 98% を占めた。

3. 年齢群別の中和抗体価の持続状況について

接種 1 か月後、2 年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体の有無に分けた 2 群ともに、年齢が上昇するにつれて低下した (例外は 20 歳代で接種前抗体が陰性の群のみ)。年齢群別の抗体価減少率は接種前抗体陽性群は年齢と関係なく 70-80% であったが、接種前抗体陰性群では年齢と共に減少率は増加した。さらに、各年齢群別の抗体陰転率は年齢と正の相関を示し、20 歳代が 33% であったが、50-61 歳代では 78% と大きく増加した。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

ワクチン接種者 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上の陽性者のうち 24 例について、日本脳炎ウイルス G1 および G5 遺伝子型に対する交差中和抗体価を測定した。その結果、Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、抗体価は G1 株に対して約 50%, G5 株に対しては約 11% と低下した。Beijing-1 株と G1 株に対する抗体価は正の相関が認められたが、G5 株に対しては相関が認められなかった。

D. 考察

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENEUCUBE 法による DV に対する検出感度は 10-100 コピー(DV3,4 型)であり、ウイルス力価として 1 型 2.3×10^{-2} PFU, 2 型 6.0×10^{-4} PFU であった。また、JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} PFU であったことから、これらウイルスに対する検出限界は コピー数としては 10-100 コピー程度と推定されるので、遜色ない感度と考えられる。

2. WNV に対しては低感度であり、使用した WNV NY99 株のプライマーとプローブの塩基配列に変異があることも推定されるので、今後の検討課題である。

[健全成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

今回使用した細胞培養由来ワクチンは成人でも 100% のブースター効果がみられ、有効性が確かめられた。また、陽転率は 80.4% となり、成人に対する接種も有効であることが確認できた。陽転率は年齢とともに低下することから、年齢により免疫応答能が低下していることが示唆された。また 60 代以上では低年齢でのワクチン接種歴がない場合が多く、初期免疫がないために抗体価が上昇しにくい可能性が考えられた。本研究において、ワクチン 1 回および 2 回接種後の総陽転率は 93.8% であり、初回 2 回接種後の小児の陽転率が 99.2% (添付文書記載) であることと比較すると、成人での陽転率は十分高いと考えられる。ただし、一回の接種で抗体価が 10 倍以下で上昇しない場合が 1 割ほどあることが想定され、50 代以上では 2 回接種が望ましいと考えられた。

本研究班の研究結果では、健全成人において、日本脳炎ワクチンの 1 回接種により接種 1 か月後に中和抗体陽性者 (≥ 10) は 88% となり、その中和抗体陽性者では 1 年後の抗体価は 23% に減少し、陰転率は 23% であった。2 年後の抗体価はさらにわずか 9.4% まで減少し、陰転率も 39% と高く 1 年後の陰転率の約 2 倍となった。日本脳炎の発症を阻止する最少中和抗体価については結論が

得られていないが、中和抗体価 10 は十分な発症阻止抗体価であると考えられている。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は 2 回接種が勧められ、1 回接種の場合は、旅行者ワクチンとして 1 年後も接種を受けることが勧められる。

ワクチン接種前の中和抗体の保有の有無の観点から 2 群における抗体価の減少を検討すると、接種前中和抗体陽性群では、陰性群と比較して 2 年後の幾何平均抗体価の減少率 (25% vs 4.6%)、陰転率 (1.7% vs 66%) ともに有意な差を認め、抗体価が維持されていた。この事実はワクチン接種後の抗体の持続能にワクチン接種前の免疫記憶能が大きく影響を与えていることを示唆している。本研究では被接種者におけるワクチン接種歴は明確に調査できなかったため不明である。接種前中和抗体陽性群は小児期での日本脳炎ワクチン歴が十分であり、陰性群はワクチン歴がないか不十分であるか、あるいは 1 次、2 次ワクチン不全者と考えられる。

中和抗体価の経時的減少について年齢群別に検討すると、2 年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体保有の有無に関わらず年齢と逆相関を示した。免疫応答能、免疫記憶能は年齢とともに低下することを反映している。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

本研究結果では、日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、抗体価は G1 株に対して約 50%, G5 株に対しては約 11% と低下した。しかし、Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられる。

E. 結論

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENECUBE 法によりDV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられる。WNV に対しては低感度であり今後の検討課題である。

[健康成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1. 本研究結果から、成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が<10である群の陰転化率は37.5%であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群(高齢者が多数を占める)では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。
2. 健康人における日本脳炎ワクチン接種2年後の幾何平均中和抗体価はわずか9.4%まで減少し、陰転率も39%と高く1年後の陰転率の約2倍となった。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。
 1. 日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均

抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

F. 健康危機情報

近年、40～50 代の日本脳炎患者報告も増加し、2011 年には日本脳炎の輸入症例が報告された。今後、抗体保有率の低い年代については、ワクチンの追加接種を考慮する必要があると考えられる。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし