

- 性について—東京の一小学校での経験. インフルエンザ 2005 ; 6 : 215-220.
- 11) 庵原俊昭. インフルエンザの流行. 小児科診療 2007 ; 70 : 2105-2108.
- 12) 加藤達夫. 定期予防接種実施に関する法改正. 小児科 2006 ; 47 : 421-427.
- 13) 藤野元子, 中山哲夫. MMR ワクチン. 小児科臨床 2007 ; 60 : 1771-1779.
- 14) 宮崎千明. 日本脳炎ワクチン. 日本医師会雑誌 2007 ; 135 : 2179-2183.
- 15) 中山哲夫. ワクチンのもつ医学的・社会的意義. 臨床検査 2010 ; 54 : 1210-1212.
- 16) 堺市・大阪大学子どものこころの分子統御機構研究センター, 堺市・大阪大学発達障害児支援研究. 堺市の発達障害児支援の実情に関するアンケート調査平成19年度報告書. 大阪 : 堺市子ども青少年局子ども青少年総務課, 2008.
- 17) 林 隆. 発達障害外来における発達障害児の親支援. 小児科臨床 2008 ; 61 : 2675-2681.
- 18) 安東信行, 隅田佐知, 高井経之, 他. 自閉症児・者の保護者が歯科医療機関を選択する要因—テキスト・マイニングによる探索的分析—. 障害者歯科 2007 ; 28 : 95-101.
- 19) 安井良則, 砂川富正, 藤井史敏, 他. 大阪における麻疹および麻疹ワクチン調査. 化学療法の領域 2003 ; 19 : 358-365.
- 20) 根路銘安仁, 今中啓之, 藤山りか, 他. 種子島の保育所・幼稚園における予防接種状況第2報—予防接種に対する意識調査—. 小児保健研究 2006 ; 65 : 827-831.
- 21) 菅谷憲夫. 新型インフルエンザ日本の抗インフルエンザ薬の備蓄. 臨床と研究 2008 ; 85 : 1696-1700.
- 22) Mikiko KIMURA, Harumi KUNO-SAKAI, Kazuyo OSAKI. Pertussis Vaccine Acceptance Rates and Incidence of Pertussis in Forty Seven Districts (Prefectures) in Japan Since 1977. Tokai J Exp Clin Med 1988 ; 13 : 9-13.

[Summary]

In the present study, a questionnaire survey was conducted involving 3,799 parents of children who attend schools for special needs education, and 1,752 responses were obtained (response rate : 46.1%). My previous paper reported the backgrounds of the children and their immunization status. The present paper reports the results of a content analysis of the subjects' requests in relation to immunization, stated in the comments field of the questionnaire.

The subjects' requests included : [Consideration should be given to the place of immunization] ; [its period] ; [its fee] ; [More information should be provided] ; and [Special consideration should be given to children with developmental problems and an impaired motor function]. As it is more difficult to manage the health condition of children of special education school compared to normal children, it is necessary to provide them and their parents with support, including an improvement in the environment and the provision of adequate information, so that they will have less difficulty with immunization.

[Key words]

vaccination, special education school, content analysis

第60回日本小児保健協会学術集会 教育講演

予防接種の最新情報

宮崎 千明 (福岡市立西部療育センター)

I. はじめに

諸外国に比べてわが国では、市販ワクチンが少ない、定期接種ワクチンが少ない、接種部位や接種間隔にわが国独特の基準がある等が指摘され、ワクチンギャップと呼ばれていた。ヒブワクチン、小児用肺炎球菌ワクチン、ヒトパピローマウイルスワクチンの導入と定期接種化等でギャップは埋まりつつあるが、新しいワクチンが次々に登場したため、乳児期のワクチンスケジュールは混み合い、各ワクチンの効果や副反応情報を的確につかむことが求められている。そこで、学会終了後の状況の変化も含め、2013年11月末時点におけるワクチンの最新情報を簡潔にご紹介したい。

II. 予防接種法改正

わが国のワクチンギャップを解消し、国際標準に近づけるために、2013年4月に予防接種法の一部が改正された。その内容は表1に示すとおりである。

1. 従来、国の事業として行われてきたヒブワクチン、小児用肺炎球菌ワクチン、ヒトパピローマウイルスワクチンが定期接種化された。
2. 予防接種副反応報告が義務化され、副反応が否定できない有害事象を診た場合、直接厚生労働省に報告することとなり、ワクチン毎の報告基準（症状と出現期間）が示された¹⁾。また、法によらない接種（任意接種）で行われたワクチンの報告も一本化し、医薬品医療機器総合機構（PMDA）や副反応検討部会で迅速に調査し、総合的な分析を行うこととした。
3. 厚生科学審議会の下に、新たに予防接種・ワクチン

表1 予防接種法の一部改正（H25年4月）

諸外国とのワクチンギャップの解消をめざして

改正の概要

- ・定期接種の対象疾病の追加
 - ・副反応報告制度の法定化
 - ・評価・検討組織への付議
- 予防接種の総合的な推進を図るための計画の策定

厚生科学審議会 予防接種・ワクチン分科会の設置

- ・予防接種基本方針部会
- ・研究開発および生産・流通部会
- ・副反応検討部会

国会の附帯決議 平成25年度までに他のワクチンの定期化も検討

出典：第183回国会（常会）提出法律案 予防接種法の一部を改正する法律案の概要（平成25年3月1日提出）

ン分科会を設置し、さらに予防接種基本方針部会、研究開発および生産・流通部会、副反応検討部会を置いた。基本方針部会では予防接種基本計画の策定に向けて議論が続けられている。

4. 厚生労働大臣が予防接種に関する施策を変更する場合には上記の分科会の意見を聞くこととし、検討組織の位置付けと役割がより明確になった。

III. ワクチン別情報

現在わが国で使用している主なワクチンを表2に示した。ワクチン毎の最新情報を簡潔に述べたい。

1. ヒブワクチンと小児用肺炎球菌ワクチン

小児の細菌性髄膜炎の主な起炎菌である Hib と肺炎球菌に対するワクチンが導入された前後（2008～2010年と2012年の比較）で、Hib 髄膜炎は92%、肺

表2 わが国で使用されている主なワクチンの種類

	生ワクチン	不活化ワクチン
定期接種 (A類)	BCG (結核)	ジフテリア D 百日咳 P 破傷風 T ポリオ IPV
	麻疹 M 風しん R	
		日本脳炎
		ヒブ 小児用肺炎球菌 子宮頸がん
新しい定期接種 (A類)		インフルエンザ(高齢者)
定期接種 B類		B型肝炎
任意	水痘*	インフルエンザ(小児他)
	おたふくかぜ	B型肝炎・A型肝炎
	ロタウイルス	成人用肺炎球菌*

*平成26年10月より水痘 (A類) と成人用肺炎球菌 (B類) が定期接種になる。

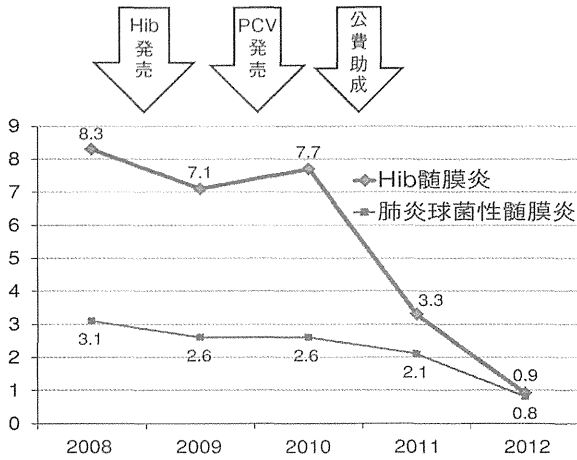


図1 Hib：ヒブワクチン (アクトヒブ®), PCV：小児用肺炎球菌ワクチン (プレバナー®) の接種による細菌性髄膜炎患者数の動向

炎球菌性髄膜炎は73%減少し、ワクチンの効果は絶大である (図1)。小児用肺炎球菌ワクチンは7価のプレバナー®が使用されてきたが、2013年11月1日より、13価ワクチンに一斉に切り替えられた。その結果、7価ワクチンで途中まで接種していた児は残りの回数を13価ワクチンで接種を受けることとした (表3)。7価ワクチンで定期接種を終了した児は最終接種から8週以上間隔をあけて13価ワクチンを1回追加接種することが望ましいが、任意接種となる。

2. DPT-IPV 4種混合ワクチン

2012年9月からポリオワクチンが生から不活化ワクチンに切り替えられた。同年11月からDPT3種混合ワクチンに不活化ポリオワクチン (IPV) を加えた4種混合ワクチンが使用され始めた。

3. BCG

定期接種対象年齢が6か月未満から12か月未満に広がり、標準的な接種月齢を5~8か月未満とした。これは乳児期前半にワクチン接種が集中すること、接種時期を6か月未満にした頃からBCG骨炎・骨髄炎の報告が増加していたためである。今回の改訂によって、小児結核が増加しないかどうか、BCG骨炎等が減少するかどうか、注目していく必要がある。

4. ロタウイルスワクチン

1価弱毒ヒトロタウイルスワクチン (ロタリックス®; 2回接種) と5価弱毒遺伝子組換えワクチン (ロタテック®; 3回接種) が市販され、任意で接種されている。両ワクチンとも、重症ロタウイルス感染症を9割予防できるとされている。副反応としての腸重積の発生を

表3 小児用肺炎球菌ワクチン (プレバナー®; PCV) 7価→13価へ (11月1日一斉切り替え)

	補助的追加接種 (supplemental dose)				
	初回 1回目	初回 2回目	初回 3回目	追加接種	補助的 追加接種
標準月齢	2か月	4か月	6か月	12~15か月	
未接種者	PCV13	PCV13	PCV13	PCV13	不要
1回接種者	PCV7	PCV13	PCV13	PCV13	不要
2回接種者	PCV7	PCV7	PCV13	PCV13	不要
初回接種完了者	PCV7	PCV7	PCV7	PCV13	不要
PCV7接種完了者	PCV7	PCV7	PCV7	PCV7	PCV13*

*PCV7接種完了者に対して、完了2か月後以降にPCV13を1回追加接種することで、PCV7に含まれない血清型6価についても、抗体が獲得できるので、任意での接種が勧められる。

表4 ロタウイルス経口生ワクチン

	ロタリックス® (GSK)	ロタテック® (MSD)
株の由来	1価 弱毒ヒトロタウイルス	5価 ヒト・ウシ再集合 ロタウイルス
血清型	G1P [8]	G1・G2・G3・G4・P[8]
回数	2回 (6週～24週)	3回 (6週～32週)
承認	2011.7.1	2012.1.18

ともに90%以上の重症ロタウイルス感染症を予防する。初回接種の1週間以内の腸重積のリスクがやや上昇する。初回接種は生後14週6日までに行うことが推奨されている。

減らすため、生後6週から15週未満で接種を開始するが、1回目の接種後1週間で、やや腸重積の頻度が高くなるようである(表4)。しかしWHOやCDCはワクチン効果を重要視し、接種を勧めている。わが国でも定期接種化の議論に向けて作業部会が作られ、ファクトシートの作成中である³⁾。

5. B型肝炎ワクチン

世界的には新生児期から乳児期の全員接種を行っている国が大多数であるが、わが国においては1986年から母子感染予防として行われてきた。妊婦検診にてキャリア母を特定し、出生後HBIGとHBワクチンを組み合わせて垂直感染を予防する方法である。これで約95%は児のキャリア化が予防できる。しかし、父子感染等の家族内感染や、接種漏れ等による児の感染がなお報告されている。また、近年、欧州から持ち込まれた遺伝子型AのHBウイルスが性感染症として都市部を中心に広がりつつあり、成人でも感染が遷延化しやすいとされている。これらのことから乳幼児全員に接種するユニバーサルワクチンの考え方がわが

国でも議論されている。これとは別に、B型肝炎母子感染予防方法が国際的な方法に準じるように改められる。具体的には、B型肝炎ウイルスのキャリアー母から生まれた児には、出生後(できれば)12時間以内にHBグロブリンとHBワクチンの1回目を投与する。HBワクチンの2回目は生後1か月、3回目は生後6か月で接種する(図2)。詳細は参考文献を参照⁴⁾。

6. ヒトパピローマウイルスワクチン

ヒトパピローマウイルス(HPV)は皮膚や粘膜のイボやがんの原因ウイルスである。中でもHPV16型、18型が子宮頸がんの原因として最も重要である。またHPV6型、11型は外陰部のイボである尖圭コンジローマの主因である。HPVワクチンとして、前者2種に対応するサーバリックス®と4種に対応するガーダシル®がある(表5)。定期接種化後に副反応が問題になり、2013年6月以来、積極的勧奨が差し控えられている。定期接種のままなので希望すれば接種できる。痛み恐怖による失神、しばらく続く局所の疼痛は比較的多くみられるが、問題になっているのはより長期に複数部位に痛みが持続する症例である。複合性局所疼痛症候群(CRPS)を含め、現在、副反応検討部会において、報告された症例の詳細な検討や、CRPSそのものの研究も厚生労働省の研究班で行われている。なるべく早期に副反応検討部会から明確な見解が出ることを期待している。諸外国では日本の状況も踏まえつつ、ワクチンによる直接の副反応とは考えにくいとの見解が示されている。

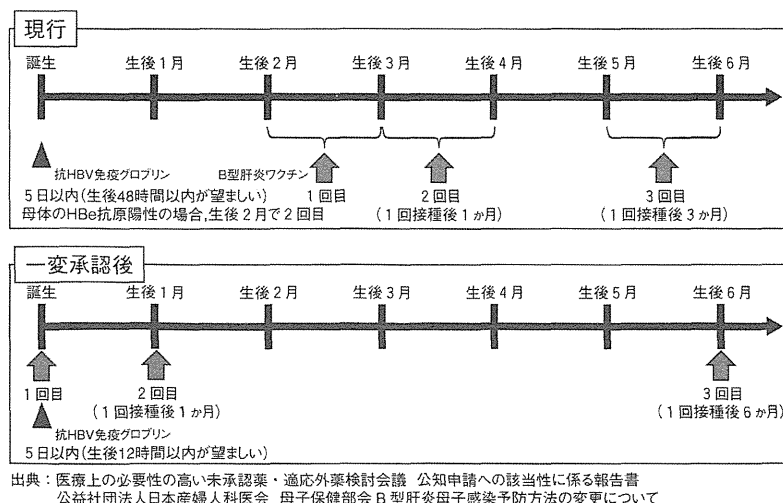


図2 B型肝炎ウイルス母子感染予防 新旧法の比較

表5 ヒトパピローマウイルス (HPV) ワクチンの組成

	ガーダシル®MSD	サーバリックス®GSK
HPV 型	⑥ ⑪ ⑬ ⑱	⑬ ⑱
1バイアル当たり用量 (μg)	20/40/40/20	20/20
ターゲット	子宮頸がん・ 尖圭コンジローマ	子宮頸がん
L1 VLP 産生の技術 VLP=ウイルス様粒子	酵母	昆虫細胞基質
アジュバント (免疫増強物質)	アルミニウム塩	アルミニウム塩 + 脂質 (Lipid A)
アジュバントの用量	225 μg	500 μg /50 μg
承認	2011.7.1	2009.10.16

表6 風しんワクチン接種の勧め
(風疹に関する特定感染症指針策定予定)

<ul style="list-style-type: none"> 未接種・未罹患の人、または接種歴不明の人 結婚や妊娠を控えている思春期・成人女性 結婚・妊娠前に風疹抗体を検査し、陰性（または弱陽性）の人 妊婦の夫や他の同居家族 妊婦健診で風疹抗体陰性の人（弱陽性の人）は出産後早期に（産科入院中でも可能）ワクチンを接種して次の妊娠に備える 抗体陰性者の多い20～50歳の男性 抗体陽性の人にワクチン接種をしても害にはならないので、感染の既往やワクチン接種歴が不明な場合は、抗体検査なしでワクチンを接種できる

7. 水痘ワクチン

日本で開発されたワクチンで、欧米では定期接種化した国が多くなってきた。わが国では任意接種のため、約40%の接種率と思われる。接種後罹患もみられるが、軽症で終わる。2回接種が望ましく、定期接種化が大いに期待されているワクチンである。副反応の問題はほとんどない（平成26年10月から定期接種化の予定）。

8. おたふくかぜ（ムンプス）ワクチン

1989年度から4年間、麻しんおたふくかぜ風しん混合（MMR）ワクチンが使用されたが、ムンプスワクチンによる髄膜炎の多発により中止され、現在わが国ではおたふくかぜ単独ワクチンが使用されている。ムンプスによる髄膜炎が約2%（成人ではその率が高い）、ムンプス難聴（片側の高度感音難聴）が0.1%にみられるので、ワクチン接種が望ましいが、国内で市販されているムンプスワクチンによる髄膜炎が0.05%にみられることから、国は現行ワクチンを使用しての定期接種化には慎重な姿勢を示している。

9. 風しんワクチン

麻しん風しん混合（MR）ワクチンの3期、4期接種は2012年度末で終了した。2012～2013年にかけて関東や関西を中心に風疹が流行し、先天性風疹症候群児が約30名出生している。MR ワクチンの1期、2期接種を徹底し、免疫のない成人への積極的な接種が望まれる（表6）（平成26年4月に「風しんに関する特定感染症予防指針」が策定され、「先天性風疹症候群ゼロと、2020年までに風疹排除」を旨とする）。

IV. 接種方法

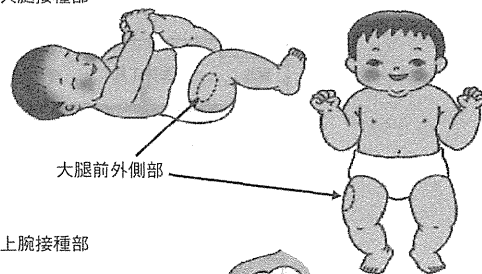
1. 接種スケジュール

乳児期に接種するワクチンの数が増えるに従い、複数ワクチンの同時接種が一般化してきた。同時接種のメリットは早く免疫を獲得できること、来院回数を減らせることなどである⁵⁾。両上腕だけでなく、両大腿前外側部が接種部位として用いられる（図3）。同時接種の場合、異なるワクチンを混合してはならず、同一部位に接種する場合には2.5cm（1インチ）以上間隔をあける。

2. 接種間隔

同時接種しない場合、生ワクチン接種後は27日（4週）、不活化ワクチン接種後は6日（1週）間隔をあけて接種することになっている。生—生の4週間隔は国際的にも同じであるが、その他の組み合わせの間隔は日本独自の規定である。つまり、生—生以外のワクチンの組み合わせでは免疫の干渉が起らず、間隔は

1) 大腿接種部



2) 上腕接種部

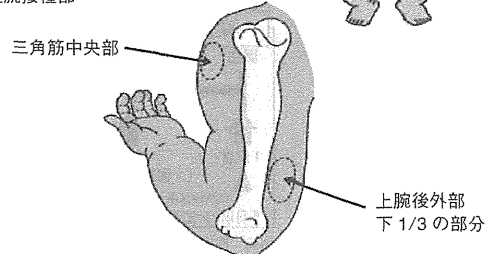


図3 日本小児科学会が勧める接種部位

任意に選べるとされている。日本では副反応の出現時期が重ならないよう現在の規定があるが、ワクチンの数が増える中で、国際標準への変更が議論されてきている。

また、同じワクチンの接種間隔について、例えば、6～28日の間隔で接種するワクチンで、その日数を超えて接種した場合、定期接種の対象年齢であっても定期と見なさない市町村がある。これでは接種漏れを救済できないので、予防接種基本方針部会で接種間隔規定を緩和し、標準的な上限を超えても定期接種年齢の範囲内であれば定期接種として認めることが承認された（平成26年4月施行予定）。

3. 接種部位

わが国は長くワクチンは皮下接種されてきた。しかし諸外国では生ワクチンを除いて多くの不活化ワクチンは筋肉注射である。これも議論していく必要のある問題である。

V. おわりに

ワクチン後進国と言われたわが国も、新しいワクチンの導入によって諸外国とのギャップを埋めつつある。しかし、ムンプスワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタウイルスワクチンなどの定期接種化にはなお予算等の障壁がある。

今後は、更なるワクチンの混合化（5種混合、6種混合）、多価化や、国内外メーカーのコラボレーションも進むと思われる。小児の健康を守るために、必要なワクチンを用意し、無料で安全に接種できるような体制をつくる必要がある。予防接種基本計画の策定と実行に期待したい。国の予防接種・ワクチン分科会や部会の議論の資料や議事録は厚生労働省のホームページに逐次アップされている。日本小児科学会のホームページと共に、ご参照いただきたい。

文 献

- 1) 厚生労働省. 定期の予防接種による副反応の報告等の取り扱いについて. <http://www.mhlw.go.jp/topics/bcg/tp250330-1.html>
- 2) 厚生労働省. 予防接種に関する基本的な計画(案). http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/0000029872_1_1_2_2.pdf
- 3) ロタウイルス作業班. ロタウイルス作業班中間報告について. http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/0000030086_2.pdf
- 4) 日本産婦人科医会. B型肝炎母子感染予防方法の変更について. <http://www.jaog.or.jp/news/img-1025.pdf>
- 5) 日本小児科学会. 予防接種・感染症. http://www.jpeds.or.jp/modules/general/index.php?content_id=5

その他、予防接種に関して総合的に記載された刊行物（2013年に発売）を数点挙げておく。

- 6) 田原卓浩, 藤岡雅司編. 予防接種マネジメント. 総合小児医療. 中山書店, 2013.
- 7) 小児科11月増大号. 特集 予防接種法改正予防接種とワクチンの現状54巻(12). 金原出版, 2013.
- 8) 小児内科45巻増刊号, 予防接種Q & A. 改訂第3版. 東京医学社, 2013.

私の診療経験から

予防接種の現状と今後の展望

宮 崎 千 明

はじめに

我が国の予防接種に関して、認可されたワクチンが少ない、定期接種ワクチンが少ない、混合ワクチンが少ない、我が国独自の規制があるなど、諸外国との違いが「ワクチンギャップ」として問題になっていた。2013年4月に予防接種法が改正され、2014年度も引き続き種々の改正があり、ワクチンギャップは徐々に解消されつつある。一方で、ヒトパピローマウイルスワクチン接種後の副反応問題がなお尾を引いている。本稿では予防接種をめぐる最新の話題と今後の展望について述べたい。

I. 予防接種法改正と予防接種・ワクチン分科会

我が国の予防接種施策に関する検討組織は、厚生労働省健康局結核感染症課長の諮問機関であった予防接種に関する検討会を経て、2009年12月から厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会(2009年12月～加藤達夫部会長)が設置され、そこで2013年4月の予防接種法改正案が議論された。法改正の概要を以下に示した。

1. 国の緊急事業として行われてきたヒブワクチン、小児用肺炎球菌ワクチン(PCV)、ヒトパピローマウイルス(HPV)ワクチンをA類(従来は1類)対象疾病として定期接種化した。ちなみに従来は2類はB類に呼称変更された。
2. 厚生科学審議会に予防接種・ワクチン分科会(岡部信彦分科会長)を設置し、国の予防接種施策の策定や変更時に厚生労働大臣は分科会の意見を聞かなければならないとした。分科会の下に、基本方針部会、研究開発および生産流通部会、副反応検討部会の3部会を

福岡市立心身障がい福祉センター センター長

おいた。これらの分科会や部会は、医学専門家以外に法律、自治体、マスコミ、経済各会からも委員が選出されており、議事は公開で、傍聴者からも発言を受けるシステムができてきた。

3. 予防接種の副反応報告が義務化された。予防接種後に、副反応が否定できない比較的重篤な症状(有害事象)が出た場合、厚労省に直接報告することとし、報告基準(表2)を新たに作り、法によらない接種(任意接種)後の報告も一本化した。そして医薬品医療機器総合機構(PMDA)や副反応検討部会で迅速かつ総合的に検討することとした。
4. 予防接種に関する中長期的なビジョン(計画)を、基本方針部会を中心に検討することとした。

また、法改正に伴い、国会の付帯決議で、ヒブ、小児用肺炎球菌、ヒトパピローマウイルス以外のワクチンも定期化に向けた議論を続けて平成25年度内に結論を出すよう要請があった。また、予防接種に係る費用負担に関して、A類疾病ワクチンについてはその費用の9割(従来は約3割)を国が地方交付税で措置することが財務、総務、厚労3大臣合意で決まった。

II. 平成25年における主な動き

法改正後、新たに設置された予防接種・ワクチン分科会や各部会で種々の検討が継続され、以下のような追加施策がとられた。

1. 2012年から2013年の風疹流行を受け、風疹に関する特定感染症予防指針が策定され、平成26年4月から施行された(表1)。先天性風疹症候群を速やかにゼロにし、2020年(東京オリンピック)までに風疹排除を目指すことを目標に挙げた。今般の流行が過去の予防接種施策を反映して、成人(特に男性)を中

表 1 風しんに関する特定感染症予防指針

<p>○目標</p> <p>早期に先天性風しん症候群の発生をなくすとともに、平成32年度までに風しんの排除を達成することを目標とする。</p> <p>○定期予防接種の接種率目報（95%以上）の達成・維持</p> <p>風しんの定期接種（1歳児，小学校入学1年前の2回）の接種率をそれぞれ95%以上とする。</p> <p>○成人に対する抗体検査・予防接種の推奨</p> <p>企業等と連携し、雇用時等の様々な機会を利用して、従業員等が罹患歴又は接種歴を確認できるようにするとともに、いずれも確認できないものに対して、抗体検査や予防接種を推奨する。</p> <p>（注）平成26年度については、検査費用の助成を実施（平成25年度補正予算 約12億円）</p> <p>○先天性風しん症候群の児への医療等の提供</p> <p>日本医師会や関係学会等と連携し、先天性風しん症候群と診断された児が症状に応じ適切な医療や支援制度を受けられるよう、情報提供及び制度のより適切な運用等を行う。</p> <p>○公布日</p> <p>平成26年3月28日（平成26年4月1日適用）。</p>

表 2 水痘ワクチンの接種対象者・接種方法等について

<p>【対象者】</p> <p>○生後12月から生後36月に至るまでの間にある者。</p> <p>※予防接種を受けることが適当でない者については特記事項なし。</p> <p>（発熱や急性疾患などワクチン全般に共通するもの以外なし。）</p> <p>【接種方法】</p> <p>○乾燥弱毒生水痘ワクチンを使用し、合計2回皮下に注射する。3月以上の間隔をおくものとして、接種量は毎回0.5mlとする。</p> <p>【標準的な接種期間】</p> <p>○生後12月から生後15月に至るまでに初回接種を行い、追加接種は初回接種終了後6月から12月に至るまでの間隔をおいて1回行う。</p> <p>【経過措置】</p> <p>○生後36月から生後60月に至るまでの間にある者を対象とし、1回注射する。</p> <p>ただし、平成26年度限りとする。</p> <p>【その他】</p> <p>○既に水痘に罹患したことがある者は接種対象外とする。</p> <p>○任意接種として既に水痘ワクチンの接種を受けたことがある者は、既に接種した回数分の接種を受けたものとみなす（経過措置対象者も含む）。</p> <p>○当該疾病はA類疾病として規定される。</p>
--

心としたものだったので、MR（麻疹風疹混合）ワクチンの定期接種（1期，2期）の更なる徹底と、ハイリスクである妊婦周辺の家族や他の成人（特に20～40歳代）の男性，出産直後の褥婦，妊娠可能女性等への接種が期待される。国は抗体検査用の費用を一部予算化しているが、実際の接種への補助が是非必要である。

2. 平成26年10月から水痘ワクチン（A類）と成人用肺炎球菌ポリサッカライドワクチン（23価）の定期接種化（B類）が決まった。

3. B型肝炎ワクチンとおたふくかぜワクチンに関しては定期接種化が見送られ、ロタウイ

ルスワクチンはワーキンググループの報告を待って議論することになっている。

4. ヒトパピローマウイルスワクチンの副反応問題が大きくとりあげられ、平成25年6月に積極的勧奨が差し控えられた。副反応検討部会で詳細な検討がなされたが、本原稿執筆時点では最終結論が出ていない。
5. 同一ワクチン同士の接種間隔に関する実施規則や要領が緩和された。
6. 予防接種対象年齢に関する記載の解釈の整理がなされた。
7. 「予防接種に関する基本的な計画」が平成26年4月に施行された。

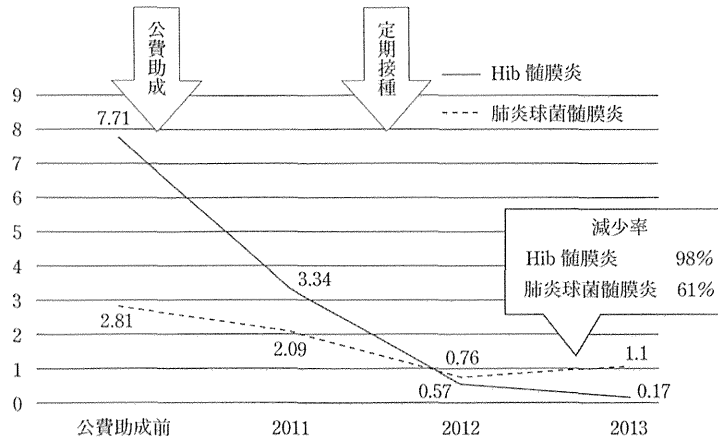


図 1 公費助成前後の小児の髄膜炎 (5歳未満人口10万あたり)

Ⅲ. 予防接種に関する基本的な計画

予防接種に関する基本的な計画 (予防接種基本計画) が平成26年3月28日に公布され、4月1日から施行された。基本計画の骨子は以下のとおりである。

1. 予防接種・ワクチンで予防できる疾病はワクチンで予防することを基本とすることが示された。
2. 国と自治体、医療機関等の役割分担を整理した。
3. 予防接種行政の総合的、計画的推進の目標を、ワクチンギャップの解消、接種率の向上、新ワクチンの開発、普及啓発とした。
4. 予防接種の適正実施のために、国、自治体の費用負担やワクチン価格を再検討する、健康被害救済制度の充実、予防接種記録の整備 (平成26年5月12日プレス発表では、予防接種記録を国が一括して保存するためのシステムを構築し、2017年度からの運用を目指すことになった)。
5. 新ワクチンの開発と安定供給を図る。
6. 安全性の確保のため、副反応報告制度の充実、科学的データの収集、予防接種従事者の資質向上をめざす。
7. 国際連携を強化する。
8. 効率的な接種のため、同時接種、接種間隔、接種時期、接種部位等を検討し、他省・部局、自治体、医療関係者との連携を図ること。

Ⅳ. ワクチン別の概要

ワクチン毎に最近の変更点や重要な点を略述する。

1. ヒブワクチン：国の緊急接種事業と平成25年度からの定期接種化により、Hib 髄膜炎患者がワクチン導入前に比して激減している (図1)。今後はDPT-IPVにHibを加えた5種混合ワクチンの開発が進む。
2. 小児用肺炎球菌ワクチン：定期接種化により、髄膜炎患者が減少したが、ワクチンに含まれる莢膜の血清型以外の菌種 (例えば19Aなど) による侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) が増加しており、IPDの減少率はHibほどではなかった。平成25年11月に7価から13価に切り替えられたことによりIPDがさらに減少することを期待したい。13価ワクチンは65歳以上の高齢者にも適応がとれた。また平成26年3月末に別の小児用肺炎球菌ワクチン (10価) が承認申請され、審議中である。
3. DPT-IPV4種混合ワクチン：平成24年9月にポリオ生ワクチンが不活化ポリオワクチン (IPV) に切り替えられ、同年11月にDPTとIPVを混合した4種混合ワクチンが発売され定着した。製造所はDPTワクチンの製造を中止するとしているが、切り替えが完了するまでしばらくは市場に供給していただきたい。
4. BCG：平成17年度からツ反なしでBCGを6ヵ月未満で接種する (事情があれば12ヵ月未満まで可) としていたが、乳児期前半に他のワクチン接種が込み合うこと、BCGが生ワ

表 3 成人用肺炎球菌ワクチンの接種対象者・接種方法等について

<p>【接種対象者】</p> <p>① 65歳の者（経過措置終了後の平成31年度より実施）。</p> <p>② 60歳以上65歳未満の者であって、心臓、腎臓若しくは呼吸器の機能又はヒト免疫不全ウイルスによる免疫の機能に障害を有する者（インフルエンザの定期接種対象者と同様。）。</p> <p>※予防接種を受けることが適当でない者については特記事項なし。</p>
<p>【接種方法】</p> <p>○肺炎球菌ワクチン（ポリサッカライド）を使用し、1回筋肉内又は皮下に注射する。接種量は0.5mlとする。</p>
<p>【経過措置】</p> <p>○平成26年度から平成30年度までの間は、前年度の末日に各64歳、69歳、74歳、79歳、84歳、89歳、94歳、99歳の者（各当該年度に65歳、70歳、75歳、80歳、85歳、90歳、95歳、100歳となる者）を対象とする。</p> <p>例：平成26年度における65歳への接種については、平成25年度末日に64歳の者（生年月日が昭和24年4月2日～昭和25年4月1日の者）が対象となる。</p> <p>○平成26年度は、平成25年度の末日に100歳以上の者（平成26年度101歳以上となる者）を定期接種の対象とする。</p>
<p>【その他】</p> <p>○既に肺炎球菌ワクチン（ポリサッカライド）の接種を受けたことがある者は対象外とする。</p> <p>○平成31年度以降の接種対象者については、経過措置対象者の接種状況や、接種記録の保管体制の状況等を踏まえ、改めて検討する。</p> <p>○当該疾病はB類疾病として規定する。</p>

クチンであり、BCG 骨髄炎等の副反応報告が最近増加していることを受けて、接種月齢を正式に生後12ヵ月未満までとし、標準的な接種時期を生後5ヵ月～8ヵ月未満に変えた。小児結核と副反応の動向を注視したい。

5. 水痘ワクチン：我が国で開発された水痘ワクチンが、いよいよ平成26年10月から定期接種化される（A類）。12～36ヵ月未満で2回接種する。36～60ヵ月未満児には経過措置として、平成26年度末までに限り、1回のみ接種を認める。ただし、水痘罹患者は除き、任意で接種した回数は接種したものとみなすことになっている（表2）。
6. 成人用肺炎球菌ワクチン：65歳以上の高齢者を対象に23価ポリサッカライドワクチンの1回接種が、平成26年10月から定期接種化（B類）されることが決まっている。5歳間隔（65歳、70歳、75歳）で接種対象者を設定し、キャッチアップを図る案になっている（表3）。
7. ロタウイルスワクチン：1価と5価の2種の経口生ワクチンが任意で接種されている。作業部会が定期接種化に関する検討を行っており、近く報告書が出される予定である。両ワクチンとも、腸重積の合併症を減らすため、初回接種を6～15週未満としているが、接種の1週間後（とくに1回目）は腸重積のリスクがやや上昇することが明らかになってきた。

8. B型肝炎（HB）ワクチン：健康保険によって母子感染予防がなされているが、接種時期が変わった。生後12時間以内にHBIGとHBワクチンを接種し、生後1ヵ月、6ヵ月でHBワクチンを接種し、9～12ヵ月でHBs抗原抗体検査を行うこととした（図2）。母以外の家族内感染もあるので、ぜひ接種したい。欧州から持ち込まれた遺伝子型AのHBウイルスが成人間で性感染症として広がりつつあり、しかも感染が遷延化しやすい。小児期の水平感染予防も含め、ユニバーサル接種（定期接種）化への議論が行われている。乳幼児期の水平感染の実態、遺伝子型Cで作成したHBワクチンの他の型に対する有効性、どの年齢層に接種するか（新生児・乳幼児？思春期前？）等が検討課題として挙げられている。
9. ヒトパピローマウイルス（HPV）ワクチン：20歳～30歳代の女性の子宮頸がんが増加しており、がん予防ワクチンとして期待されて、国の緊急接種事業を引き継ぐ形で平成25年度から定期接種化されたが、接種後の遷延する痛み症例等の報告が相次ぎ、積極的勧奨が差し控えられている。副反応部会で詳細な検討がなされている（詳細は副反応検討部会の資料参照）。ちなみに諸外国ではこのワクチンの有効性を認め、重篤な副反応との関連は低いとの見解が出されている。

	妊検	0	1	2	3	4	5	6
旧方式	母+	HBIG		(HBIG)				
				VAC1	VAC2		VAC3	

*キャリアー母から出生後, HBIG と HBワクチンを12時間以内に(健康保険で)								
	妊婦検査	0	1	2	3	4	5	6
新方式	母+	HBIG*						
		VAC1	VAC2					VAC3

*母がキャリアーでない児は, ワクチンのみ, 0~2ヵ月から接種開始
父や他の家族がキャリアーの場合, ぜひ接種しましょう(任意)

	妊婦検査	0	1	2	3	4	5	6	7	8
一般	母-*			VAC1	VAC2					VAC3

図 2 B型肝炎ワクチンの新生児・乳児接種

10. ムンプスワクチン：ムンプスは無菌性髄膜炎（約2%）や片側高度感音難聴（約0.1%）等の合併症があるので2回（1歳と就学前）接種したいが、現行市販ムンプスワクチンでも頻度は低いながら無菌性髄膜炎が起こる可能性があり、定期化が見送られている。MMR（麻疹、ムンプス、風疹混合）ワクチンの復活も含め、ムンプスワクチンは我が国が乗り越えなければならない重要な課題である。

V. 接 種 方 法

1. 接種スケジュール：乳児期前半に接種すべきワクチンが集中しており、同時接種が一般化している。国も接種医の判断で同時接種を可能としている。原則として同時接種するワクチンの種類や本数に制限はない。来院回数を減らし、早期に免疫をつける意味で同時接種は避けられないが、接種に際して複数ワクチンをシリンジ内で混合してはならず、接種部位も1インチ以上あける。
2. 接種間隔：同時接種しない場合、生ワクチン接種後は4週（27日）以上、不活化ワクチン接種後は1週（6日）以上間隔をあけて他のワクチンを接種する。ただし、生ワクチン-生ワクチンの4週間隔は国際標準であるが、他はワクチン毎の副反応の観察期間をとるという日本独自の基準である。乳幼児期のワクチンの種類と接種回数が増えてきたので、国際標準にする案（要望）が出ている。
また、同じワクチン同士の接種間隔について、

予防接種実施要領等に記載された間隔を超えた場合、定期接種とみなさない自治体があったため、今般、省令等を改正し、同一ワクチン同士の接種間隔上限を撤廃し、定期接種年齢内であれば標準的な接種間隔を越えても定期接種とすることとした。あくまで標準的な方法で、適切な時期に迅速に免疫を付与することを基本にしていだきたいが、諸事情で接種が遅れても定期接種としての対応が可能となった。

3. 接種部位：我が国では大腿四頭筋短縮問題があり、長く予防接種は皮下注（一部の経口ワクチン、皮内ワクチンを除く）であった。しかし過去の経験からもワクチン接種で筋短縮が起きた例はなく、諸外国ではアジュバントを含む不活化ワクチンは腫れが目立ちにくく、かつ抗体上昇がよい筋注が基本である。HPVワクチン（A型肝炎ワクチンでも可能）は筋注されているが、他のワクチンについても筋注解禁の要望が出ている。

VI. 今 後 の 展 望

1. 4価結合型髄膜炎菌ワクチンが承認され、腸チフスワクチンや10価結合型肺炎球菌ワクチンが承認申請中である。
2. インフルエンザワクチン：現行の季節性インフルエンザワクチンはアジュバント無添加スプリット型3価不活化ワクチンで、乳幼児に対して有効性が必ずしも高くない。経鼻噴霧型の生ワクチンが米国などで接種されているが、経鼻型不活化ワクチンも含め、より有

効なワクチン開発が期待される。3価を4価 (AH1N1, AH2N3 と B 型インフルエンザの異なる2タイプを混合) にする計画が進んでいる。また、細胞培養ワクチンの開発も進みつつある。

3. 世界的に疾病負担の大きいマラリア, 小児の細気管支炎の原因になるRSウイルス, 年齢を問わず多発しているノロウイルス, 発がんのリスクが高いC型肝炎ウイルスなどに対するワクチンの開発が期待される。
4. 混合ワクチン: 異なる病原体のワクチンを混合する混合ワクチンの開発が進むはずである。我が国でもDPT-IPV4価ワクチンが実用化されたが, 諸外国では既に5価 (DPT-IPV-Hib) や6価 (DPT-IPV-Hib-HBV) や, 生ワクチンでもMMRV (MMR+水痘) ワクチンが実用化されている。
5. 多価ワクチン: 同じ病原体の複数の血清型をまぜる多価ワクチンは, インフルエンザ (3価), ポリオ (3価) や肺炎球菌 (7価, 13価, 23価), HPV (2価, 4価), ロタウイルス (5価) 等で実用化されているが, 更なる多価化が研究されている。我が国ではMMRワクチンの復活やMMRV (MMR+水痘), MRV (MR+水痘) ワクチンなども課題である。

終 わ り に

予防接種とワクチンの現状と今後の方向性 (可能性) について述べた。予防接種施策に関して予防接種・ワクチン分科会ができたこと, 予防接種基本計画が策定されたことは大きな進展であるが, なお予防接種に係る予算の獲得や議論を科学的に進めていくことなどに関して, 諸外国に学ぶべき点が多々ある。今後も副反応に対する注意を怠らず, さらに「予防できる感染症はワクチンで予防する」という原則のもとに, ワクチン開発と予防接種施策がさらに進むことを期待している。

参考文献, サイト

- 厚生労働省のホームページ→分野別の政策→健康→感染症・予防接種情報→予防接種全般へと進むと, 国の施策や分科会, 部会の資料や議論の内容が検索できる。本稿もそれらを広範に参照した。また, 最近発刊の本や冊子 (一部未刊) を以下に挙げる。
- 1) 五十嵐隆, 渡辺博編: 小児科臨床ピクシス4. 予防接種—全訂新版, 中山書店, 2014.
 - 2) 渡辺博: わかりやすい予防接種改訂第5版. 診断と治療社, 2014.
 - 3) 予防接種ガイドライン等検討委員会編: 予防接種ガイドライン2014年度版. 予防接種リサーチセンター, 2014.
 - 4) 予防接種ガイドライン等検討委員会編: 予防接種必携2014年度版. 予防接種リサーチセンター, 2014.
 - 5) 岡部信彦, 多屋馨子編: 予防接種に関するQ & A集2014年版. ワクチン産業協会, 2014.
 - 6) 国立感染症研究所感染症疫学センター編: 予防接種における間違いを防ぐために. 2014.
(<http://www.nih.go.jp/niid/ja/accine-j.html>)

日本脳炎

Japanese Encephalitis

宮崎千明* MIYAZAKI Chiaki

1 基本病因, 発症機序

日本脳炎は、フラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルス (JEV) がコガタアカイエカなどによって媒介されて起こる急性脳炎である。JEV は西ナイルウイルス, セントルイス脳炎ウイルス, マレーバレー脳炎ウイルスと血清学的に近縁である^{1,2)}。JEV は日本, 朝鮮半島, 中国, 東南アジア, インド, ネパール, パキスタンなどに広く分布し, 数万例の患者発生がみられている。JEV の自然宿主としては渡り鳥などが想定されているが, 東南アジアから渡り鳥などによって中国などを經由して日本にもたらされていることが JEV の分子疫学で判明してきた。

ブタは無症状で高いレベルのウイルス血症を起こす増幅動物である。わが国では4~10月に未感染ブタの間で感染が広がり, その血液を吸ったコガタアカイエカの中腸で増殖し, 吸血時に唾液を介してヒトに感染する。ヒトや馬は脳炎を起こすが終末宿主であり, ウイルス血症は一過性で量も少なく, ヒトからヒトへの感染はない³⁾。

わが国では1992年以降, 10例未満 (患者の約8割は40歳以上) の発生にとどまっているが, 西日本を中心にブタの JEV 感染率は高く, 患者発生も多い (図1)。患者数激減の原因は, 広汎なワクチン接種の継続のほか, 水田耕法の変化, 豚舎の大規模集約化, エアコンの普及など, ウイルスとヒトとの接触の減少が関与していると思われる。

JEV 感染者のなかで脳炎を発症するのは100~1,000人に1人と考えられ, 多くは不顕性感染や

軽度の熱性疾患, 時に無菌性髄膜炎で終わる。非神経組織で1次増殖した後, ウイルス血症を経て, 中枢神経系に達すると, 神経組織の破壊が起こり, 発症すると重篤で致死率も高い。

2 基本病態

脳炎を発症した患者において, ウイルス抗原は神経細胞の体部, 軸索, 樹状突起などにみられ, 神経細胞間感染で広がる。病理学的には, 脳や髄膜にうっ血, リンパ球やマクロファージを中心とした血管周囲リンパ球浸潤がみられる。神経細胞の変性と貪食, ミクログリアの増殖の小結節形成, 微小出血が観察され, 小脳ではプルキンエ細胞の脱落とグリアの増生がみられる。視床や黒核にもっとも強い病変がみられるが, 脳, 脳幹, 脊髄などにも炎症が広くみられ, 脳浮腫が起こる。慢性期病変の報告では, 視床, 黒核, アンモン角に対称性の病変がみられ, 広汎なミクログリアの増殖や, 壊死組織を取り巻くように形成された小結節が散在性に観察される。血中や髄液中中和抗体, INF- α が感染の広がりを制御する一方, neurofilament やミエリン塩基性蛋白に対する抗体が悪化要因になるとの報告もある。

3 病態生理からみた臨床症状

脳炎として発症する場合, 潜伏期は5~15日。急な高熱, 頭痛, 悪寒, 食思不振, 悪心, 嘔吐, めまい, 傾眠などの症状が2~4日持続する。その後, 項部硬直などの髄膜刺激症状, 羞明, 味覚異常, 意識障害, けいれんへと進行する。そのほか, 無気力顔貌, 筋強直, 不随意運動, 振戦などの基底核症状, 麻痺, 病的反射の出現などがみられる (図2)。

* 福岡市立心身障がい福祉センター (小児科)
〔〒810-0072 福岡市中央区長浜1-2-8〕
TEL 092-721-1611 FAX 092-712-5918
E-mail : t.miyazaki01@fc-jigyoudan.org

VI. 感染症

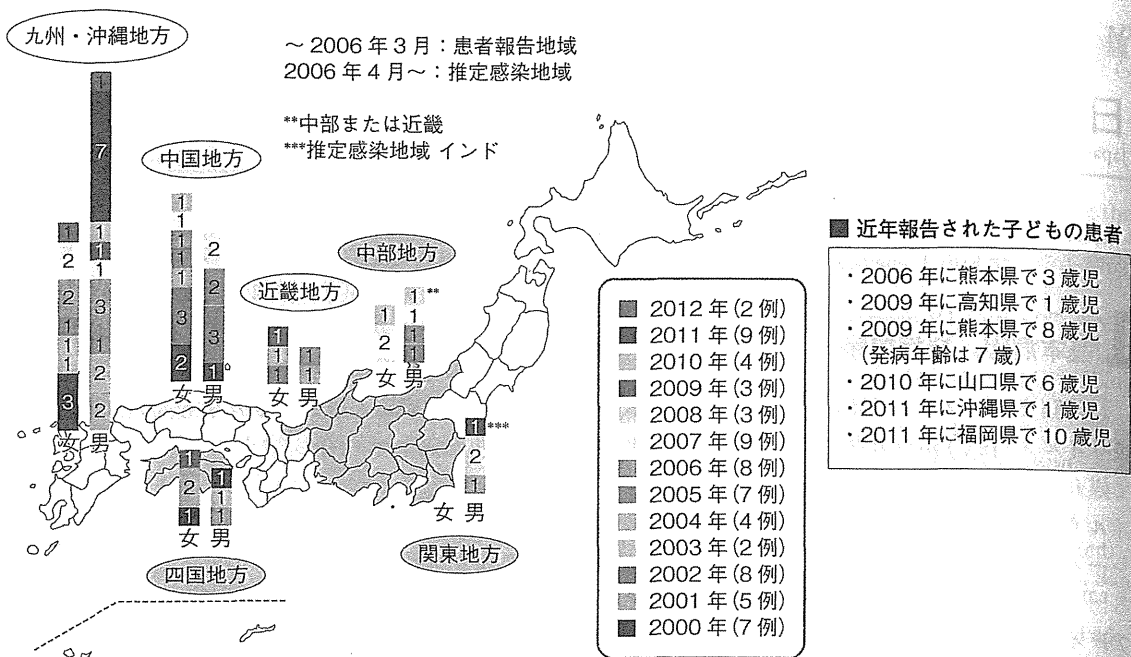


図1 地域別日本脳炎患者報告数(発病年別, 2000～2012年9月)
(国立感染症研究所ホームページより)

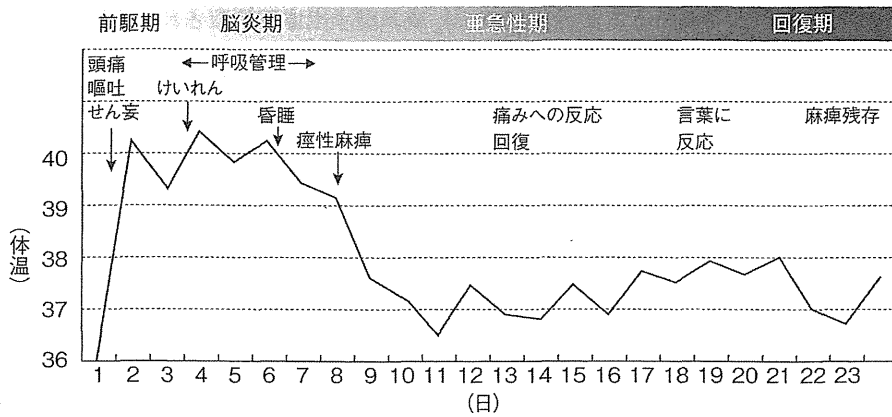


図2 日本脳炎の臨床像(典型例の経過)(宮崎⁴⁾, 2004)

脳炎症状を呈せず無菌性髄膜炎で終わる例もあり、通常は無菌性髄膜炎と区別がつかず生命予後も良好である。

4 病態生理からみた診断のための臨床検査⁴⁾

臨床検査データでは、病初期に末梢白血球数の増多や赤沈の亢進がみられる。脳脊髄液検査では、細胞数増多(20～500/μL, 初期には好中球

優位からリンパ球優位へ変化)、蛋白の軽度上昇(50～100/dL)、糖正常、髄液圧の亢進などがみられる(脳圧亢進が疑われる場合には先にCT/MRIをとり、治療で脳圧を下げてから髄液を採取する)。尿所見として、無菌性膿尿、顕微鏡的血尿、蛋白尿などがよくみられる。

CTでは広汎な白質の浮腫や視床、基底核、橋などの造影剤で増強されない低吸収域などがみられる。MRIのT2強調画像では、多くは両側性に

表 日本脳炎のウイルス学的診断基準

1. JEV が髄液または血液から分離される (検出頻度は低い)。
2. JEV 遺伝子が RT-PCR 法で髄液または血液から検出される (有用)。
3. JEV 特異 IgM 抗体が髄液や血液で検出される (必須, ペア血清での確認が望ましい)。
4. JEV 抗体 (HI, NT, CF, EIA-IgG) がペア血清で陽転または有意上昇する (必須)。

注1: 抗体はデング熱, 西ナイル脳炎などと抗原的に交差するので渡航歴のある者については鑑別が重要 (国立感染症研究所ウイルス第2部など)。

注2: 急性期に死亡しペア血清が採取できない場合には, 1~3に加え, 脳底部組織からのウイルス分離や抗原染色, 遺伝子検索が確定診断に有用。

視床や基底核の異常所見 (時に出血も), さらに脊髄にも異常所見を認め, 病理学的な病変部位と一致する⁵⁾。脳波所見は広汎な δ 波を認め, 鋭波やけいれん波はあまりみられない。

髄液および血清の IgM 捕捉 ELISA 法による JEV 特異的 IgM 抗体や RT-PCR 法などによるウイルス検索を行う^{1,6)}。髄液や血液からのウイルス分離率は高くない。赤血球凝集抑制 (HI) 試験, 補体結合 (CF) 試験, 中和 (NT) 試験, ELISA 法などで, 急性期と回復期のペア血清 (2週間あける) で抗体陽転または4倍以上の上昇を確認する (表)。

死亡例では剖検または経鼻腔的な脳底部穿刺による組織材料において視床, 中脳, 海馬, 側頭葉皮質, 小脳プルキンエ細胞, 脳幹網様体などに JEV 抗原が検出できる。

夏期から秋に発生した脳炎患者や髄膜炎患者では JEV 感染を必ず鑑別する。血清抗体価はほかの近縁フラビウイルスと血清学的な交差があるので注意する。

5 治療目標とその手順, および症状・検査所見からみた効果判定指標

まずは脳炎に対して救命目的に集中的な全身管理を行う。特異的抗ウイルス療法はないので補助療法が予後を左右する。脳浮腫対策 (マンニトールやその他の脳圧を下げる薬剤), 水・電解質バランスの維持, 抗けいれん薬, 呼吸管理, 錐体外路症状に対する薬剤 (塩酸トリヘキシフェニジルやドーパミン類似薬), 二次感染の予防と治療などを行う。 α -IFN やデキサメサゾン, リバビリン, γ グロブリン製剤などの効果は確立していない。

致死的な例は通常発症からほぼ5日以内に死亡する。1週間以上経過すると治癒過程に入ってくる。亜急性期から回復期にかけて筋力低下, 萎縮, 強直, まひなどがみられることがあり, 早期からの理学療法などのリハビリテーションが必要となる。ヒト-ヒト感染はないので急性期も患者隔離の必要はない (標準予防策をとる)。

6 よくある合併症の病態生理とその診断・治療・予防

中枢神経系以外にも, 心筋, 肺, 肝臓, 脾臓, リンパ節などの網内系の増殖などが病理学的に観察されている¹⁾。後遺症として, 運動麻痺, 知的退行, てんかん, 高次脳機能障害などがみられることがある。その場合, 心理発達検査 (田中ビネー, WPSSI, WISC, K-ABC など) により理解力や認知力を評価し, 必要に応じて理学療法, 作業療法, 言語療法, 認知療法を行う。回復期リハビリテーションと教育はとくに重要である。てんかんに対しては抗てんかん薬の投与を行う。

日本脳炎はワクチンによって予防できる。わが国では Vero 細胞を用いた乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが 2009 年から市販され, 定期接種として使用されている。標準的には 3 歳で 1 期初回接種 (6~28 日間隔で 2 回), 4 歳で 1 期追加接種 (1 期初回接種後 6 か月以上おおむね 12 か月後に), 2 期接種 (9~13 歳未満) の計 4 回を皮下接種する。2005 年 5 月からマウス脳由来の旧ワクチンの積極的勧奨が差し控えられていたが, 2010 年 4 月から段階を追って接種勧奨が再開され, 一時非常に低下していた小児の抗体保有率が徐々に回復してきた (図 3)。通常の定期接種年齢以外に, 接種勧奨の差し控えにより接種機会を逃した

VI. 感染症

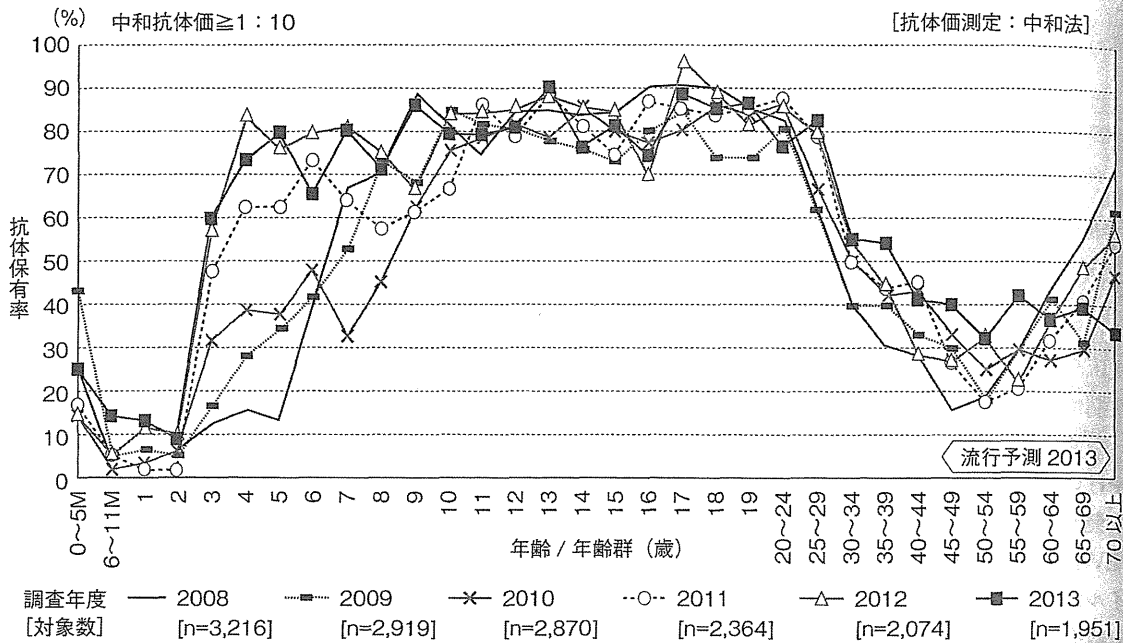


図3 年齢/年齢群別の日本脳炎中和抗体保有状況の年度比較, 2008~2013 (2013年度感染症流行予測調査より)
 (国立感染症研究所感染症疫学センター: 感染症流行予測事業 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/y-graphs/4632-je-yosoku-year2013.html>)

特例対象者 (平成7年4月2日~平成19年4月1日) は20歳未満まで定期接種ができる³⁾。

7 症状経過, 検査所見からみた予後判定

症状の早い進行, コントロール不良のけいれん重積, 呼吸不全, 遷延する発熱, 錐体外路兆候, 病的反射などは予後不良兆候である。発病後1週間以内の急性期死亡が多い。死亡率は5~30% (最近の日本では約20%), 生存例の半数には種々の後遺症が認められる。

文献

- 1) Halstead SB, Jacobson J, Dubischar-Kastner K: Japanese encephalitis vaccines. In Plotkin SA, et

- al (eds): Vaccines, 6th ed, Elsevier, Erlanger TE, pp312-351, 2013
- 2) Weiss S, Keizer J, et al: Past, present and future of Japanese encephalitis. *Emerging Infect Dis* **15**: 1-7, 2009
- 3) 宮崎千明: 日本脳炎—乾燥細胞培養ワクチンと接種勧奨の再開. *医学のあゆみ* **244**: 79-85, 2103
- 4) 宮崎千明: 日本脳炎. *小児内科* **36**: 1105-1108, 2004
- 5) Shoji H, Hiraki Y, et al: Japanese encephalitis in Kurume region of Japan: CT and MRI findings. *J Neurology* **236**: 255-0259, 1989
- 6) 日本感染症学会 (編): フラビウイルス感染症. 感染症専門医テキスト 第1部解説編, 南江堂, 東京, p817-820, 2011

〈関連ウェブサイト〉

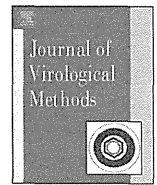
- ・国立感染症研究所: 日本脳炎とは <http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/na/je.html> (2014年9月26日アクセス)

* * *



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviromet

Cycling probe technology to quantify and discriminate between wild-type varicella-zoster virus and Oka vaccine strains

Masaru Ihira^{a,*}, Yuki Higashimoto^b, Yoshiki Kawamura^b, Ken Sugata^b, Masahiro Ohashi^b, Yoshizo Asano^{b,1}, Tetsushi Yoshikawa^b^a Faculty of Clinical Engineering, Fujita Health University School of Health Sciences, Toyoake, Aichi, Japan^b Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan

A B S T R A C T

Article history:

Received 19 January 2013

Received in revised form 13 June 2013

Accepted 21 June 2013

Available online 29 June 2013

Keywords:

VZV

Oka vaccine

Cycling probe

Real-time PCR

Molecular epidemiology

Rapid differentiation between wild-type varicella zoster virus (VZV) and Oka-vaccine (vOka) strains is important for monitoring side reactions of varicella vaccination. To develop a high-throughput molecular diagnostic method for the differentiation of wild-type VZV and vOka strains based on cycling probe technology. The primers were designed to amplify common sequences spanning a single nucleotide polymorphism (SNP) in gene 62 of VZV. DNA–RNA chimeric probes (cycling probes) were designed to detect the SNP at nucleotide 105705. The cycling probe real-time PCR assays for VZV wild-type and vOka strains specifically amplified plasmids containing target sequences that ranged between 10 and 1×10^6 copies per reaction. The inter- and intra-assay coefficients of variation were less than 5%. After initial validation studies, the clinical reliability of this method was evaluated using 38 swab samples that were collected from patients suspected of being zoster. Compared to the loop mediated isothermal amplification method, which is defined as the gold standard, cycling probe real-time PCR was highly sensitive and specific. The cycling probe real-time PCR technology is a reliable tool for differentiating between wild-type VZV and vOka strains in clinical samples.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Varicella is a common childhood disease caused by varicella-zoster virus (VZV). VZV infects latently dorsal root ganglia after primary infection and it can reactivate in elderly individuals or immunocompromised hosts causing zoster. Live attenuated vaccine (Oka-vaccine strain; vOka) was developed initially for the prevention of varicella in children (Takahashi et al., 1974), and it has been used for universal vaccination in several countries (Marin et al., 2008; Pozza et al., 2011; Quian et al., 2008). Additionally, recent studies have shown that vOka could prevent VZV reactivation in elderly individuals, which may reduce the frequency of zoster and post-herpetic neuralgia (Oxman et al., 2005). Because

there are rare cases of mild adverse reactions to VZV vaccination in healthy children (Ota et al., 2008), as well as the development of zoster following VZV vaccination, it is important to determine whether these reactions are caused by vOka or wild-type strain (Gershon et al., 1986; LaRussa et al., 2000). In addition, the transmission of the vaccine strain to susceptible individuals has been demonstrated (LaRussa et al., 1997, 2000), therefore necessitating molecular epidemiological analyses to allow the precise evaluation for side reaction of the VZV vaccine.

The initial method to differentiate between the wild-type strain and the vOka strain was restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the viral genome (Hayakawa et al., 1986). Then, several other molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR)–RFLP (LaRussa et al., 1992), loop-mediated isothermal amplification (LAMP)–RFLP (Higashimoto et al., 2008), and real-time PCR (Campsall et al., 2004; Loparev et al., 2000; Parker et al., 2006) were developed. Our previous reports demonstrated the utility of the LAMP–RFLP method (Higashimoto et al., 2008) for differentiating between the wild-type strain and the vOka strain in a small number of samples because of its ease to perform and low cost; however, real-time PCR is better than LAMP assay for the analysis of a large number of samples and quantitation of viral DNA. Therefore, we would like to develop a new molecular method to

* Corresponding author at: Faculty of Clinical Engineering, Fujita Health University School of Health Sciences, 1-98, Kutsukake-cho, Dengakugakubo, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan. Tel.: +81 562 93 2629; fax: +81 562 95 0290.

E-mail addresses: mihira@fujita-hu.ac.jp (M. Ihira), yhigashi@fujita-hu.ac.jp (Y. Higashimoto), kyoshiki3@hotmail.com (Y. Kawamura), ksugata@fujita-hu.ac.jp (K. Sugata), mohashi@fujita-hu.ac.jp (M. Ohashi), yasano@czc.hokudai.ac.jp (Y. Asano), tetsushi@fujita-hu.ac.jp (T. Yoshikawa).

¹ Current address: Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, Kita 20 Nishi 10, Kita-ku, Sapporo 001-0020, Japan.

monitor VZV vaccine safety that satisfies the following requirements: easy to perform, low-cost, high-throughput, and low risk of contamination.

Cycling probe technology is an appropriate method for the detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) because of the ease for designing sequence-specific probes to detect SNPs (Duck et al., 1990). The sequence-specific DNA–RNA chimeric probe hybridizes to a complementary target DNA sequence, thus becoming a substrate for RNase H (Bekkaoui et al., 1996). Previous studies have suggested the use of cycling probe real-time PCR for the detection of SNPs because it is easy to design a chimeric probe that anneals to SNP sequences (Dapat et al., 2012; Suzuki et al., 2010; Yabutani et al., 2009).

2. Objective

In this study, a rapid assay system was developed using cycling probe real-time PCR to discriminate between wild-type and vOka strains, and for the quantitation of viral DNA load.

3. Materials and methods

3.1. Viruses and samples

A live attenuated varicella vaccine (Biken; lot BVZ0038), manufactured by the Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University, was used as the vOka strain. The Kawaguchi strain, which was a kind gift from the Foundation for Microbial Diseases of Osaka University, was used as the reference wild-type virus strain. Thirty-eight swab specimens were collected from vesicular skin lesions or crusts of patients suspected of having varicella or zoster. These patients were seen at the outpatient clinic of Fujita Health University Hospital. After written informed consent was obtained from the patients or their guardians, swab specimens were collected and placed into 1 ml of sterilized water for storage at -20°C .

3.2. DNA extraction

Viral DNA was extracted from varicella vaccine fluid, Kawaguchi strain stock, and patient swab samples using a QIAamp Blood Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). After extraction, the DNA was eluted in 100 μl of TE buffer and stored at -20°C . Swab samples without DNA extraction and the DNA extracted from the swab samples were used for the analysis of clinical specimens.

3.3. Primers, probes, and conditions for the cycling probe real-time PCR

Locations and sequences of the primers and probes for the cycling probe real-time PCR are shown in Fig. 1. The primers (VZORF62.F and VZORF62.R) were designed to amplify common sequences spanning the SNPs in gene 62 of the wild-type and vOka strains. In order to discriminate between the wild-type strain and the vOka strain, two different cycling probes were labeled with different fluorescent dyes (hexachloro-fluorescein for the wild-type strain and carboxyfluorescein for the vOka strain). The probes for wild-type (VZORF62p.wild) and vOka strains (VZORF62p.vac) were designed to detect the SNP (C to T substitution) at nucleotide 105705 (vOka: Accession AB097932.1 and pOka (Dumas): X04370.1).

Cycling probe real-time PCR was carried out using the Cycleave[®] PCR Reaction Mix (Takara Bio, Otsu, Japan) according to manufacturer's instructions and a StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR conditions were as follows: initial

denaturation for 10 s at 95°C and 45 cycles-denaturation for 5 s at 95°C , primer annealing for 15 s at 55°C , and extension/emission of fluorescence for 25 s at 72°C . The 20 μl of cycling probe real-time PCR reaction mixture contained 10 μl of 2 \times Cycleave reaction mixture, 5 μl of extracted DNA, 0.3 μM of primer, and 0.25 μM of wild-type cycling probe (VZORF62p.wild) or 0.25 μM vOka strain cycling probe (VZORF62p.vac). The samples were diluted with RNase-free water (50-fold) to avoid nonspecific amplification.

3.4. Construction of positive control plasmids

The plasmid containing wild-type strain sequences and vOka strain sequences were constructed using the PCR products resulting from amplification of each strain with common PCR primers (VZORF62.F and VZORF62.R). The purified PCR products were ligated and cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The constructed plasmids (pVZV ORF62-wild and pVZV ORF62-vOka) were used as positive controls for quantitative analysis of the target DNAs.

3.5. TaqMan real-time PCR for VZV

The real-time PCR is used to evaluate the reliability of quantitative analysis of the target DNAs by the newly developed cycling probe real-time PCR. The sequence of primers and probes of the real-time PCR has been described by Kimura et al. (2000). PCRs were performed using the TaqMan PCR Fast Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions.

3.6. LAMP-RFLP analysis

In order to discriminate between wild-type and vOka strains in clinical samples, previously reported VZV LAMP-RFLP analysis (VR-1 VZV LAMP targeting SNP 105705) was used in this study. The LAMP reaction was performed using the Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. The LAMP products were detected based on turbidity using a LA-200 (Teramecs, Kyoto, Japan). The LAMP product (2 μl) was incubated with the appropriate restriction enzyme, then each sample was electrophoresed on a 1.5% agarose gel, and the gel was stained with ethidium bromide.

4. Results

Serial dilutions of pVZV ORF62-wild and pVZV ORF62-vOka plasmids containing the target sequences of wild-type and vOka strains, respectively, were used to evaluate the specificity and sensitivity of the cycling probe real-time PCR. The threshold cycle (Ct) value for each strain was determined by measuring the background fluorescence intensity for the amplification of 1×10^8 copies of plasmid DNA with non-matching primers. No cross reaction was observed (Fig. 2). The optimized Ct values for the cycling probe real-time PCRs of the wild-type and vOka strains were 0.03 and 0.3 (mean + 3SD), respectively. It should be noted that no amplified DNA was detected in the sample containing herpes simplex virus type-1 and -2 DNAs, despite the fact that they belong to the same herpes virus subfamily as VZV (data not shown).

To evaluate the sensitivity and reproducibility of the cycling probe real-time PCR assays, inter- and intra-assay variability were evaluated. Ten-fold serial dilutions of the positive control plasmids (pVZV ORF62-wild and pVZV ORF62-vOka) were assayed. The Ct values of the standard curves were measured in duplicate and the mean Ct values and coefficients of variation were calculated on five consecutive days to determine the intra-assay variability. A strong linear relationship was detected for both the

A: ORF 62 sequence of Dumas (upper: GenBank accession number X04370.1*) and vOka (lower: GenBank accession number AB097932.1**)

```

105576   CGTCTCCGCGGCCCAAAACCGGGCGGCCACATTACTCTGGGAATCGGGGGAGGGCATT
105564   CGTCTCCGCGGCCCAAAACCGGGCGGCCACATTACTCTGGGAATCGGGGGAGGGCATT
*****
VZORF62_F
105636   CCGAGCCTCGTCCGCCGACGCATACAGCGCCACCACCGACCGCCACGGGTGGAAGCAC
105624   CCGAGCCTCGTCCGCCGACGCATACAGCGCCACCACCGACCGCCACGGGTGGAAGCAC
*****
SNP:105705
105696   GAGTGGTTCTGCGGCAGGGTCGGGTTCAGCAGGGCGTGCGGCAAAACACCCCTCGCCCA
105684   GAGTGGTTCGGCGGCAGGGTCGGGTTCAGCAGGGCGTGCGGCAAAACACCCCTCGCCCA
*****
VZ ORF62p_wild ACCAAGACG
VZ ORF62p_vac  CAAGGCGC

105756   GGTGGGTACGTCGCCGGCCTCCGGCCCGCGGCCCGGTCCTCCGTCCCTCGGGAAGGAA
105744   GGTGGGTACGTCGCCGGCCTCCGGCCCGCGGCCCGGTCCTCCGTCCCTCGGGAAGGAA
*****
VZORF62_R
    
```

B

	Name of primer and probes	Sequence (5'-3')	Location
Primer	VZ ORF62_F	5'-GGGCGGCCACATTACTC-3'	*105597-105613
	VZ ORF62_R	5'-GGCGACGTACCCACCT-3'	*105755-105770
Probe	VZ ORF62p_wild	5'-Eclipse-GC <u>A</u> GAACCA-HEX-3'	*105699-105707
	VZ ORF62p_vac	5'-Eclipse-CGCG <u>A</u> AC-FAM-3'	**105689-105696

Fig. 1. (A) Comparison of the nucleotide sequences from ORF62 of wild-type and vOka strains that were used to design the cycling probe real-time PCR. The primer binding sites are underlined. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the strains are indicated in bold. The cycling probe sequences containing the SNP are indicated for each viral strain. (B) The names, sequences, and locations of primers and probes used for the cycling probe real-time PCR. (*pOka Dumas: Gene Bank accession no. X04370.1, **vOka: Gene Bank accession no. AB097932.1.)

wild-type ($R^2 = 0.992$) and vOka ($R^2 = 0.982$) positive control plasmids between the concentrations of 10 and 1×10^6 copies per reaction (Fig. 3). In order to evaluate the reproducibility of the method, a coefficient of variation that is defined as the ratio of the standard deviation to the mean was calculated. As shown in Table 1, the coefficients of variation of the intra-assay experiments ranged from 0.4% to 1.5% for the wild-type strain and 1.0% to 2.9% for the vOka strain. To evaluate the inter-assay

reproducibility, the Ct values of five replicates were determined. The coefficients of variation for the inter-assay studies ranged from 0.5% to 2.1% for the wild-type strain and 0.4% to 3.7% for the vOka strain.

In order to evaluate the reliability of the cycling probe real-time PCR for analysis of clinical specimens, swab samples collected from skin lesions of 38 patients were assayed. The LAMP-RFLP analysis was used as a gold standard for discrimination between the

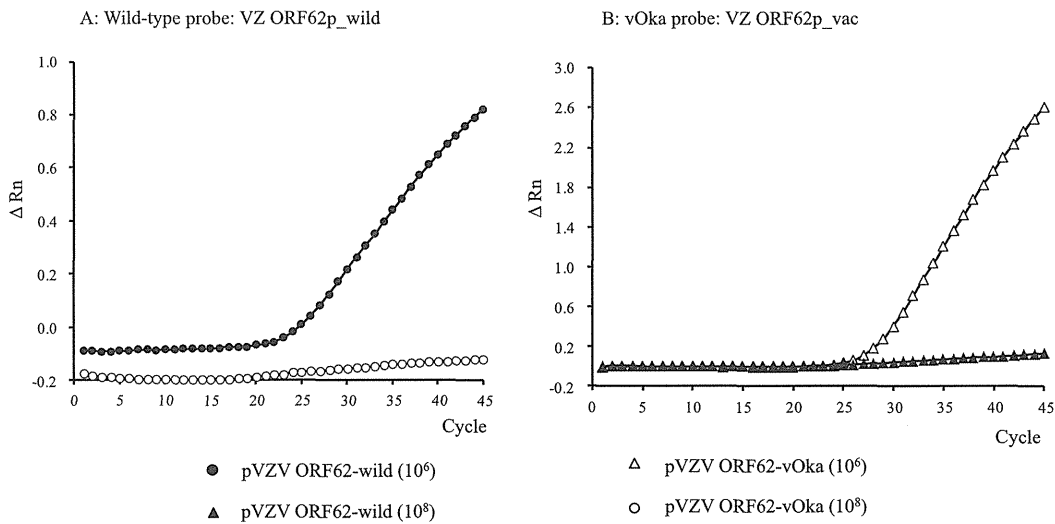


Fig. 2. Amplification plots of cycling probe real-time PCR using wild-type probe (A) and vOka probe (B). No cross reaction was detected between wild-type and vOka strains. The threshold cycle (Ct) levels for each viral strain were determined using the background fluorescence intensity for amplification of plasmid DNA (1×10^8 copies) that contained opposite target sequences.

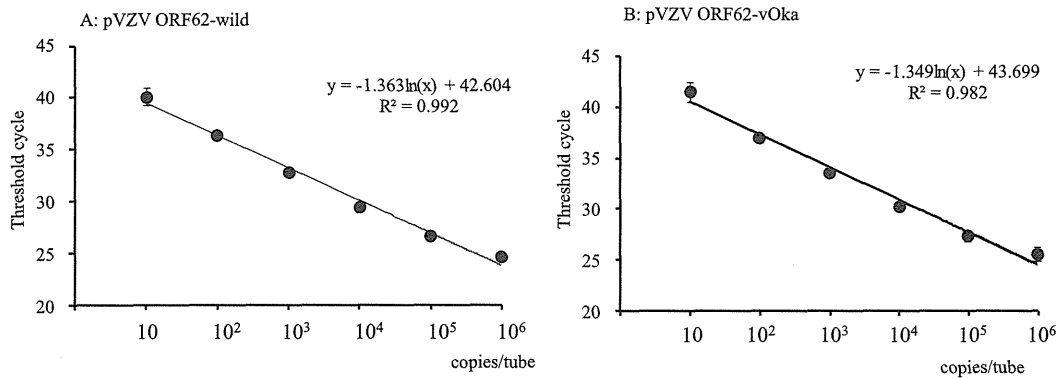


Fig. 3. Standard curves were generated by amplification of the plasmids pVZV ORF62 wild-type (A) and pVZV ORF62-vOka (B) that were serially diluted between 10 and 1×10^6 copies per reaction. The Ct values according to PCR cycle number were plotted against the copy number of each viral standard.

Table 1
Intra- and inter-assay variability of VZV wild-type strain and vOka strain cycling probe real-time PCRs.

Plasmid (/reaction)	Intra-assay (5 days)						Inter-assay (n=5)					
	Wild-type			vOka			Wild-type			vOka		
	Ct	SD	CV%	Ct	SD	CV%	Ct	SD	CV%	Ct	SD	CV%
1×10^6	23.3	0.3	1.1	25.5	0.7	2.9	24.4	0.5	2.1	24.2	0.9	3.7
1×10^5	25.5	0.2	0.8	27.3	0.5	1.8	26.5	0.5	1.9	26.0	0.7	2.5
1×10^4	28.4	0.1	0.4	30.2	0.4	1.3	29.4	0.3	1.1	28.7	0.4	0.4
1×10^3	31.7	0.2	0.5	33.6	0.4	1.1	32.8	0.3	0.9	32.1	0.4	0.4
1×10^2	35.2	0.2	0.7	37.0	0.4	1.0	36.2	0.3	0.8	35.5	0.5	0.5
10	39.0	0.6	1.5	41.5	0.6	1.5	40.2	0.6	0.5	39.6	0.7	1.7

Ct, threshold cycle; SD, standard deviation; CV, coefficients of variation. The coefficient of variation is expressed by an average and the ratio of standard deviation of the Ct value.

wild-type and vOka strains. Meanwhile, VZV real-time PCR was used to measure copy numbers of VZV DNA in the samples. As shown in Table 2A, using the LAMP-RFLP method wild-type DNA was detected in 25 of the 38 samples. Meanwhile, 23 of these 25 samples were positive for wild-type DNA using the cycling probe real-time PCR method. An additional three samples were positive in the cycling probe real-time PCR even though no viral DNA was detected using the LAMP-RFLP assay. vOka DNA was detected in only one swab sample by either LAMP-RFLP or the cycling probe real-time PCR. In comparison to the standard LAMP-RFLP, the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the wild-type-specific cycling probe real-time PCR were 92.0%, 75.0%, 88.5%, and 81.5%, respectively. Meanwhile, using swab

samples without DNA extraction, a sample that was positive by the cycling probe real-time PCR using extracted DNA was later found to be negative (Table 2B). Thus, sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the direct (without DNA extraction) wild-type cycling probe real-time PCR were 92.0%, 83.3%, 92.0%, and 83.3%, respectively.

In order to evaluate the reliability of the cycling probe real-time PCR for quantitative analysis, threshold cycles determined by this method were compared to the results of real-time PCR. Strong correlations were observed between threshold cycles determined by TaqMan real-time PCR and wild-type cycling probe real-time PCR in samples with ($R^2 = 0.8493$) and without ($R^2 = 0.7559$) DNA extraction (Fig. 4). The efficiency of the cycling probe real-time

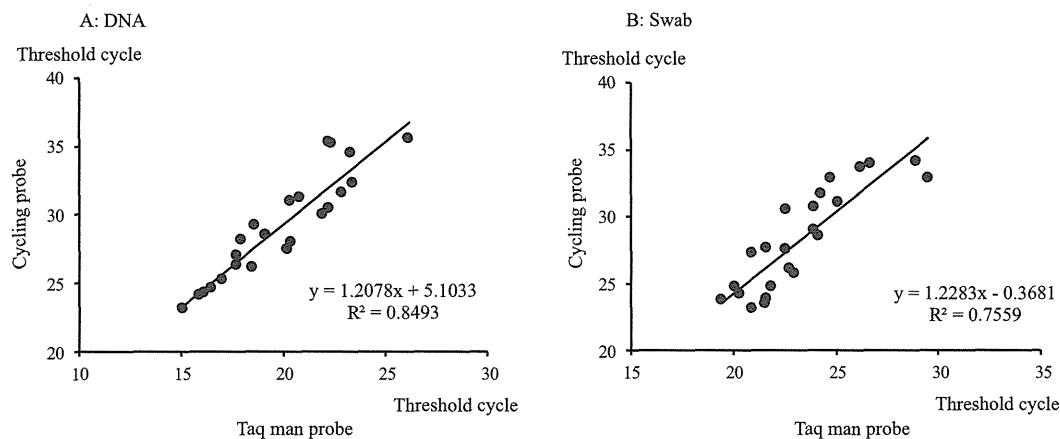


Fig. 4. Comparison of the threshold cycle for TaqMan PCR and cycling probe real-time PCR using swab samples with DNA extraction (A) or without DNA extraction (B).