

7. 百日咳

百日咳流行株の解析とワクチン株の評価に関する研究

研究分担者：蒲地 一成（国立感染症研究所細菌第二部室長）
研究協力者：平松 征洋（国立感染症研究所細菌第二部研究員）
宮地 悠輔（国立感染症研究所細菌第二部協力研究員）
大塚 菜緒（国立感染症研究所細菌第二部主任研究官）

研究要旨 2002～2012年に国内で臨床分離された百日咳菌134株について細菌学的解析（遺伝子アレル、病原因子）を実施し、現行ワクチン株の再評価を行った。国内流行株のアレルは *ptxP1* から *ptxP3*、*ptxA2* から *ptxA1*、*prn1* から *prn2* へのシフトが確認され、わが国の流行株は2000年以降欧米型の流行株（*ptxP3-ptxA1-prn2*）に変化していることが判明した。また、定着因子であるパータクチンの欠損株が出現し、わが国でも欧米と同様な現象が生じていることが確認された。さらに、国内流行株の多くは定着因子である線毛3のみを発現し、線毛2を発現しないことが示された。ワクチン株である東浜株は線毛2のみを発現することから、現行の精製百日せきワクチンはワクチン抗原として線毛3を含有しない。国内流行株の解析から、新たなワクチン抗原として線毛3の必要性が指摘された。

A. 研究目的

百日咳は主に百日咳菌 *Bordetella pertussis* により引き起こされる急性呼吸器感染症である。百日咳はワクチン予防可能疾患（VPD）の一つであり、わが国では1950年代に全菌体百日せきワクチン（wP）が導入され、その後1981年にwPワクチンに代わり精製百日せきワクチン（aP）が導入された。有効なワクチンの普及とともに患者数は激減したが、近年わが国を含む先進国では青年・成人患者の増加が認められている。青年・成人患者の臨床像は非典型的であり、これら保菌者が乳児への感染源となることが問題となっている。

青年・成人患者の増加原因として、現行aPワクチンの免疫持続期間が4～12年と短いことが指摘されている。また、百日咳流行株には抗原変異が認められ、これが百日咳再興の一因となっている可能性も指摘されている。百日咳菌における抗原変異は百日咳毒素（*ptxA*）、パータクチン（*prn*）、線毛3（*fim3*）などに認められ、その他百日咳毒素のプロモーター（*ptxP*）にもアレル変

異が認められている。また、近年の流行株には定着因子であるPrnの欠損株が出現するとともに、線毛2から線毛3への入れ替わりが生じている。これらの変化はワクチン選択圧、すなわち百日咳菌がヒトのワクチン免疫に適応するために生じた可能性が論議されている。

わが国では2008～2010年に大規模な百日咳流行が発生し、その際遺伝子型MT27d株の増加が認められた（Miyaji et al., PLOS ONE, 2013）。MT27d株の多くは線毛3を発現し、線毛2を発現するワクチン株と異なることが指摘された。わが国では1981年から精製百日せきワクチンの製造株として東浜株が使用されているが、これまでワクチン株としての再評価はされてこなかった。そこで、本研究では国内流行株の遺伝子アレルと病原因子を解析し、現行ワクチン株との比較を行った。

B. 研究方法

菌株：2002～12年にわが国で臨床分離された百

日咳菌134株を供試した。菌株は分離年により、2002～04年（23株）、2005～07年（39株）、2008～10年（33株）、2011～12年（39株）に分けて解析した。

DNA解析：常法に従い *ptxP*、*ptxA*、*prn*、*fim3* 遺伝子をPCRで増幅し、その塩基配列をABI 3130xlまたは3730 Genetic Analyzerにより解析した。得られた塩基配列からアレルタイプを決定した。

Prn発現解析：菌体をSDS-lysis bufferに懸濁し、超音波と加熱処理により全タンパク質を抽出した。全タンパク質1 μgを10% SDS-PAGEに供試し、イムブロット法によりPrn蛋白質を検出した。

線毛タイプ：ELISA法により線毛2 (Fim2) と線毛3 (Fim3) の発現を解析した。1次抗体はマウス抗Fim2モノクローナル抗体 (NIBSC: 04/154) ならびにマウス抗Fim3モノクローナル抗体 (NIBSC: 04/156) を使用し、陽性コントロール

株にはFim2(+)/Fim3(+)の百日咳菌18,323株を供試した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト臨床材料および患者の診療情報を使用しない。よって、倫理上特段の問題は発生しない。

C. 研究結果

国内臨床分離株の遺伝子アレルを解析したところ、経年的に *ptxP3*、*ptxA1*、*prn2* アレルの割合増加が認められた (重相関係数 $R^2 > 0.9$) (図1)。一方、*fim3* アレルは2008～10年の百日咳流行時に *fim3B* の増加を示したが、*ptxP*、*ptxA*、*prn* アレルとは異なり経年的な増加を認めなかった。なお、東浜株のアレルは *ptxP1-ptxA2-prn1-fim3A* を示した。

表現型としてPrnの蛋白質発現を解析したところ、Prn欠損株は2008～10年に一時的に減少した (図2)。さらに1990年から2014年までの臨床分離

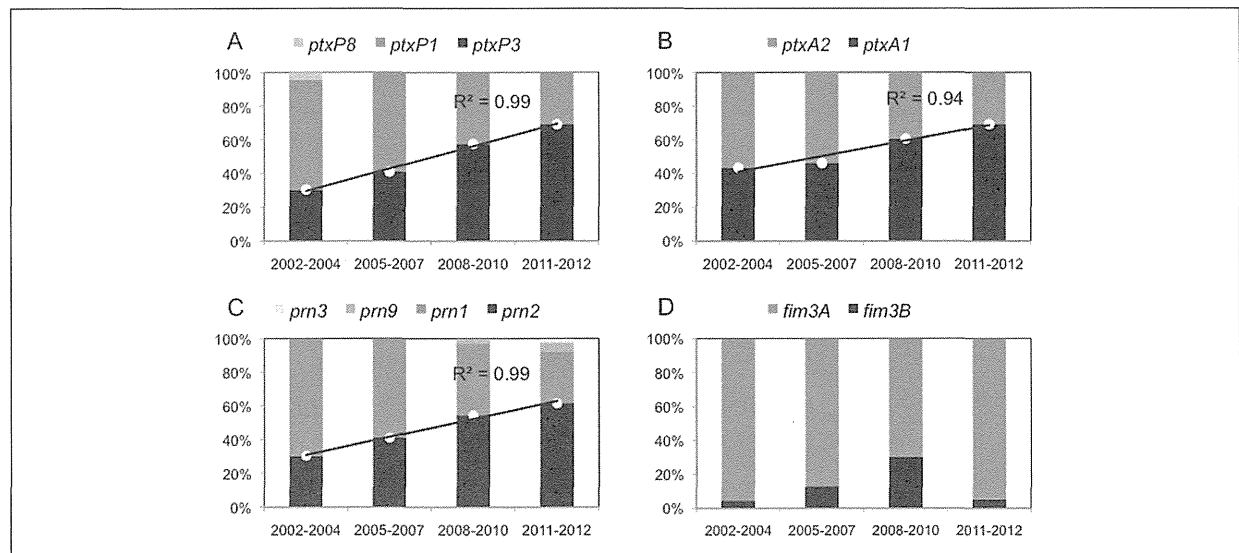


図1 百日咳臨床分離株134株における *ptxP*、*ptxA*、*prn*、*fim3* アレルの経年変化

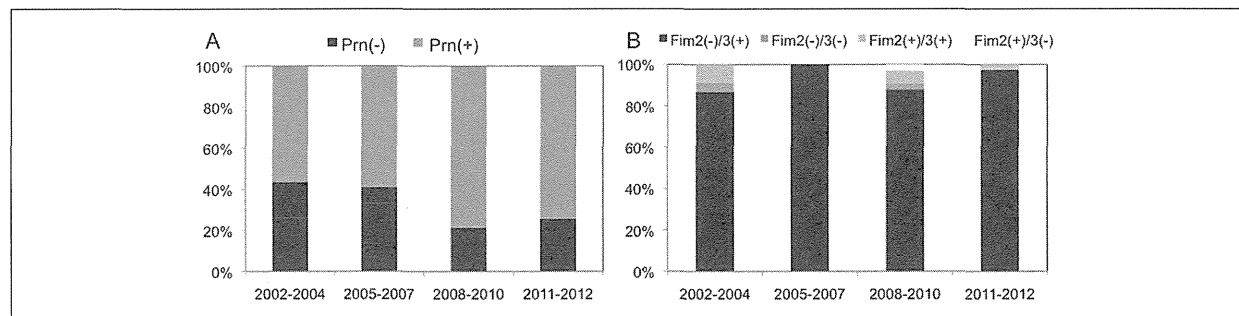


図2 百日咳臨床分離株134株におけるPrn発現とFim発現の経年変化

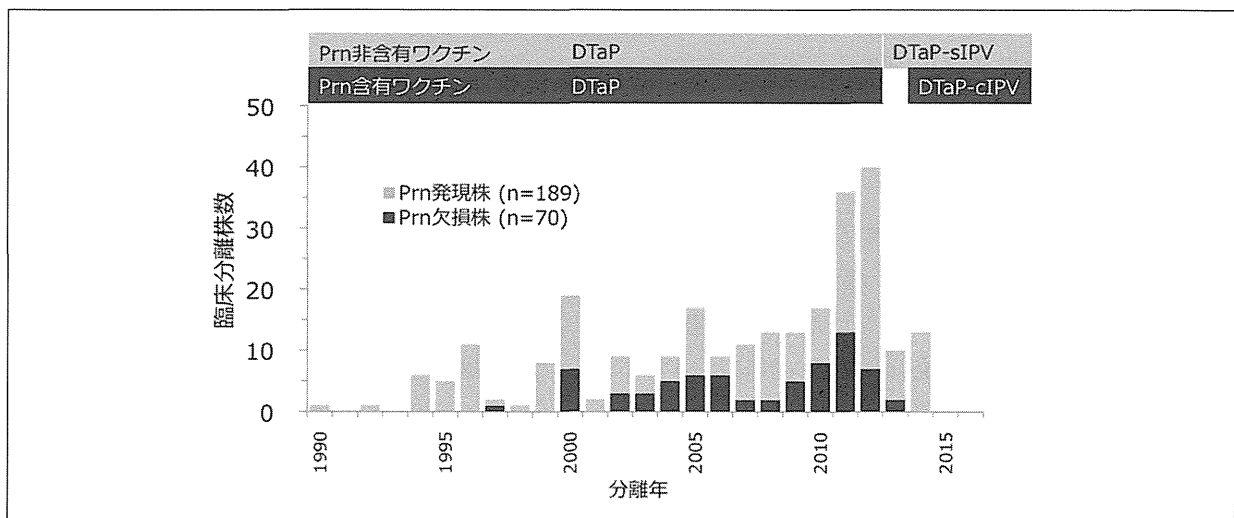


図3 百日咳臨床分離株におけるPrn欠損株の年次推移。2011年以降Prn欠損株は減少し、2014年はすべてPrn発現株であった

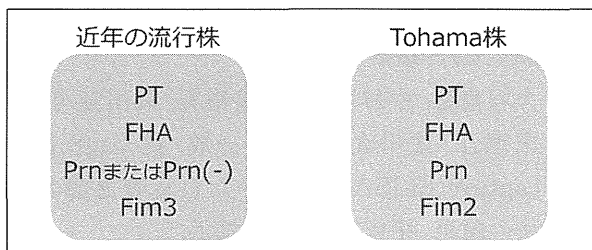


図4 百日咳菌の流行株と東浜株におけるワクチン抗原の発現差異

株を加えて解析したところ、Prn欠損株は2011年以降分離数が減少し、2014年の臨床分離株14株はすべてPrn発現株であった(図3)。一方、Fim2とFim3の蛋白発現を解析したところ、2002~12年の4期間で大きな変動は認められず、全期間を通してFim3のみを発現するFim2(-)/Fim3(+)株が優勢であった。図4に国内流行株と東浜株の差異について概略を示した。

D. 考察

本研究では国内臨床分離株を解析し、現行ワクチン株である東浜株との相違について検討を加えた。その結果、遺伝子アレルを指標とした場合、国内流行株は2000年以降欧米の流行株に変化していることが示された。また、ワクチン抗原Prnを欠損する臨床分離株が認められ、2000年代に分離率が上昇したことが判明した。さらに、国内臨床分離株の多くはFim3を発現し、Fim2を発現するワクチン株との間に差が認められた。

現在、欧米先進国の百日咳流行株は主要なアレ

ル(*ptxP3-ptxA1-prn2*)に集約され、百日咳毒素のプロモーターである*ptxP3*は毒素産生量が高く、ヒトへの病原性も高いと報告されている。また、Prn欠損株はワクチンを回避するために出現した可能性が指摘されており、わが国では1997年に初めてその出現が確認された。さらに、欧米の流行株は過去にはFim2発現株が優勢であったが、近年ではFim3が大勢を占めるようになっている。このように国内流行株は欧米の流行株と同様な変化を遂げており、ワクチン株は現在の流行株に合わせた選択が必要となる。今回の解析では、東浜株(Fim2)と流行株(Fim3)の間に線毛の発現パターンに差が認められ、新たなワクチン抗原としてFim3の必要性が指摘された。

現行ワクチン株である東浜株はFim2のみを発現することから、わが国の精製百日せきワクチンはFim3を含有していない。Fim2とFim3はワクチン抗原としてPT、FHA、Prnに次いで重要な防御抗原とされ、欧米の一部のワクチンにはFim2とFim3の両抗原が含まれるものもある。現在の国内流行株を考慮した場合、より有効なワクチンにはFim2とFim3の両者を産生する新たなワクチン株が必要である。ただし、ワクチン株の選定には、増殖性、抗原蛋白質の産生性、安全性についての検討が必要となり、短期間での選定は困難である。東浜株はワクチン製造株として30年以上の実績があること、さらにゲノム情報が公開されていることから、遺伝子操作により東浜株に

Fim3を強制的に発現させることも選択肢の一つとなる。今後はワクチン株の改良と評価に関する研究が必要である。

E. 結論

わが国の百日咳流行株の多くはFim3を発現し、Fim2を発現するワクチン株との間に相違が認められた。百日せきワクチンにはFim3が抗原として有用と考えられ、現行ワクチン株について再評価が必要となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

a. 英文

- 1) Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5: e01074, 2014.
- 2) Miyaji Y, Otsuka N, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. *PLOS ONE*. 8(10): e77165, 2013.
- 3) Suzuki T, Kataoka H, Ida T, Kamachi K, Mikuniya T. Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. *J Infect Chemother*, 2012; 18: 272-5.

b. 和文

- 1) 蒲地一成. 微生物ABC 百日咳. up-to-date 子どもの感染症. 2(2): 18-21, 2014.
- 2) 大塚菜緒, 蒲地一成. 百日咳. 新興・再興感染

症 up to date. 化学療法の領域2013年増刊号. p71-79, 医薬ジャーナル社, 大阪

2. 学会発表

- 1) 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfim structure. 第88回日本細菌学会総会, 平成27年3月, 岐阜.
- 2) 平松征洋, 大塚菜緒, 柴山恵吾, 鈴木英里, 渡邊峰雄, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の自己凝集抑制因子 BipA に関する研究. 第88回日本細菌学会総会, 平成27年3月, 岐阜.
- 3) 宮地悠輔, 大塚菜緒, 豊泉裕美, 蒲地一成. 2008~2010年に認められた百日咳流行の細菌学的解析. 第87回日本感染症学会総会, 平成25年6月, 横浜.
- 4) 大塚菜緒, 中村幸嗣, 豊泉裕美, 岡田賢司, 柴山恵吾, 荒川宜親, 蒲地一成. 抗Vag8 IgM capture ELISA法を用いた百日咳血清診断法の開発. 平成25年6月, 横浜.
- 5) Miyaji Y, Otsuka N, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. 10th International Symposium on *Bordetella*. September 2013, Dublin, Ireland.
- 6) Otsuka N, Nakamura Y, Yamazaki M, Gondaira F, Okada K, Miyaji Y, Toyoizumi-Ajisaka H, Shibayama K, Arakawa Y, Kamachi K. A novel IgM-capture ELISA assay using recombinant Vag8 fusion protein for accurate diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. 10th International Symposium on *Bordetella*. September 2013, Dublin, Ireland.
- 7) Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.
- 8) 渡邊峰雄, 山口哲也, 大塚菜緒, 蒲地一成. 国内で分離された *Bordetella holmesii* に対す

るDPTワクチンの効果. 第16回日本ワクチン学会学術集会, 平成24年11月, 横浜

- 9) 砂川富正, 神谷 元, 八幡裕一郎, 松本道明, 羽賀將衛, 蒲地一成. 強化サーベイランスにより得られるわが国の百日咳の姿. 第16回日本ワクチン学会学術集会, 平成24年11月, 横浜
- 10) 蒲地一成, 池田徹也, 伊瀬 郁, 松本昌門, 石畝史, 烏谷竜哉, 江藤良樹, 山下和予, 柴山恵

吾, 多屋馨子, 岡部信彦. 百日咳菌凝集素価法の診断精度について. 第86回日本感染症学会総会, 平成24年4月, 長崎

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: 百日咳の血清診断法 (特願2013-77138、平成25年4月出願)
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

百日咳の実験室診断法の確立 Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法と血清診断法

研究分担者：中山 哲夫（北里生命科学研究所周ウイルス感染制御教授）

共同研究者：庵原 俊昭（国立病院機構三重病院）

岡田 賢司（福岡歯科大小児科）

渡邊 峰雄（北里生命科学研究所）

小口 薫（さいわいこどもクリニック）

宮田 章子（さいわいこどもクリニック）

吉田 菜穂子（立川共済病院小児科）

藤野 元子（済生会中央病院小児科）

和山 行正（北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所）

研究要旨 百日咳は whooping を伴う咳込み等典型的な症状から診断されるが、成人百日咳は典型的な症状を認めないため2週間以上持続する咳、夜間の発作性の咳、咳込み、嘔吐などの症状から診断されている。百日咳の実験室診断として、菌分離、Loop mediated isothermal amplification (LAMP) 法による遺伝子診断、血清診断法としてワクチンに含まれていない野生流行株の Fim3 抗原、ワクチン株の Fim2 抗原を用いて蛍光 EIA 法を検討し以下の研究成果を得ることができた。

1) 2010年の流行時期の総合病院小児科で43例の百日咳疑いの小児から百日咳菌が3例、パラ百日咳菌3例が分離され、24例からLAMP法で百日咳遺伝子が検出された。臨床的に診断された百日咳の10%弱にパラ百日咳が混入する。

2) 小児科開業のクリニックで208例の百日咳疑いの患者の内訳は7-12歳を中心とした小児とその保護者の30-50歳と二極化していた。208例中LAMP陽性は23例で成人での陽性率が低かった。血清診断基準となるPT>100 EUを示した例は34例で百日咳と診断された。現在の流行野生株はFim3に代わっておりFim3抗体は115例が陽性であった。

3) 流行時期には再感染を起こし抗体反応だけを示す不顕性感染例から長引く咳発作による肋骨骨折まで多彩な症状を示す。

4) 百日咳の社会での侵淫状況を知るために小学1年、中学1年、専門学校1年生のPT抗体の分布を検討した。DPT3回以上接種している児童では小学1年生で128/243 (53%) が陰性で、中学1年生では250/624 (40%)、専門学校では20/78 (26%) とその間ワクチン接種歴はないが陰性率が減少し陽性に転じていることからその間百日咳の侵淫が認められるものと考えられた。

A. 研究目的

百日咳は乳幼児においては無呼吸発作や脳症を合併する重篤な感染症である。1968年からDPTワクチンとして定期接種のワクチンとなったが、当時は全菌体百日せきワクチンで副反応として発

熱率が高いものの有効性は明白で1974年には百日咳感染による死亡例はなくなった。しかし、1974/75年の副反応例から一時中止になり再開はされたものの接種率は低迷し1981年には百日咳菌の感染防御に関連する百日咳毒素 (pertussis

toxin: PT)、線維状赤血球凝集素 (filamentous hemagglutinin; FHA) 等を精製した無細胞型百日咳ワクチンとジフテリア・破傷風トキソイドとを混合した沈降精製三種混合ワクチン (acellular pertussis combined with DT: DTaP) が開発された。DTaP接種後では副反応の出現率は極めて低く、DTaP接種率も90%近くになり百日咳患者報告数は減少してきた。

しかしながら2007/08年には大学キャンパスでの百日咳の流行が報告され成人百日咳の報告が増加している。成人百日咳は典型的な症状を認めることは少なく、慢性、遷延性の咳嗽として百日咳の疑いすら抱かれず、また確実な診断法はなく遺伝子診断法も開発されているが一般には普及してないための確な診断がなされていない。そのため成人百日咳の実態が明らかとなっていないのが現状である。成人の百日咳は家族内感染を起しワクチン接種前の乳幼児への感染源となり成人百日咳の制御は大きな課題となる。

成人の百日咳は典型的な症状がなく長引く咳が主たる症状で医療機関を受診する事も少なく、ワクチン接種の既往歴があり、抗菌剤の内服により菌分離、遺伝子検出頻度が低く、現在一般的に行われているPT、FHA抗体による血清診断にも限界がある。

百日咳の実態を明らかとするためにはLAMP法を含めた簡便な遺伝子検出法の普及とともに感度の高い百日咳の血清診断法を確立する必要がある。

B. 研究方法

1) 対象

東京都立川市さいわいこどもクリニックで百日咳のサーベイランスを続けており外来受診患者は2009年の春にかけて患者数は増加し2010年は検出例がなく2011年の夏以降に再び流行が観察された。2013年までに208例が臨床的に百日咳と診断され後鼻腔拭い液、急性期血清を採取した。小児科スタッフの血清についても2009年から経時的に採血し百日咳血清抗体を測定した。

東京都済生会中央病院小児科において2010年の流行期に小児を対象に百日咳、パラ百日咳の菌分離と遺伝子診断を行った。

社会での百日咳の侵淫を知るために小学1年生

243例、中学1年生624例、専門学校1年生86例から血清を採取した。

2) 遺伝子診断

百日咳患者の後鼻腔拭い液をCharcol Regan-Lowe輸送培地に保存しBG培地で菌分離を行った。後鼻腔ぬぐい液200ulからDNAを抽出しPT遺伝子の5'UTRに設定したLAMP法により遺伝子検出を行った。

3) 血清抗体

PT、FHAのEIA抗体はデンカ生研のELISA法で測定した。DPTワクチンに含まれていない抗原としてFim3、ワクチン抗原としてはFim2を精製した。抗体価の測定は蛍光EIA法で抗原wellの蛍光強度とコントロールwellの蛍光強度の比率を%表示し500以上(抗原wellの蛍光強度がコントロールwellの5倍以上)を陽性と判定した。

(倫理面への配慮)

(本研究は北里研究所病院倫理委員会、慶應義塾大学倫理委員会、国立病院機構三重病院倫理委員会で承認された。)

C. 結果

1) 百日咳、パラ百日咳の流行状況

2010年の済生会中央病院で百日咳が疑われた43例中3例から百日咳菌が分離されLAMP陽性が24例で24例が百日咳と診断され、年齢別の陽性率を表1に示した。パラ百日咳は3例から分離されLAMP法でも3例から遺伝子が検出された。臨床的百日咳の10%弱をパラ百日咳が占めていると考えられた。

2) 百日咳の年齢分布と診断

2009年から2012年まで東京都立川市のさいわいこどもクリニックの外来で百日咳が疑われた症例

表1 年齢別百日咳、パラ百日咳診断例
(東京都済生会中央病院)

	百日咳		パラ百日咳	
	Isolation +	LAMP +	Isolation +	LAMP +
<1Y	6	1	1	1
1Y	4	0	2	0
2Y	3	0	1	1
3Y	4	0	2	0
4-6Y	12	2	8	1
7-12Y	9	0	5	0
>13Y	5	0	5	0
	43	3	24	3

臨床診断百日咳の小児の10%弱にB. paraptussisが認められる。

が208例で年齢分布を図2に示した。7-12歳が最も多く52例であった。小児の年齢層とその両親の年齢層となる30-50歳と2極化していた。従来の血清診断法に基準であるPT>100 EUは34例でPT抗体が50-100 EUの例は22例であった。百日咳菌の分離は4例、LAMP法で百日咳遺伝子は23/208 (11.0%)において検出され、7-12歳の年齢層での検出率が高かった。20歳以上の成人百日咳では4例のみが陽性であった。Fim2抗体が500以上の陽性は71例、野生株の抗原Fim3抗体では115例(55.3%)が陽性であった。小児例ではFim2抗体はFim3抗体より陽性率が低く、一方成人の症例ではFim2、Fim3抗体の陽性率には差が認められなかった。Fim2、Fim3抗体が1,000以上を示す例は73例(35.1%)でPT抗体より高い陽性率を示しFim2、Fim3抗体の測定は有用な血清診断法となる。

3) 小児科スタッフの抗体推移と不顕性感染

立川市では2008年秋から臨床的に百日咳が疑われる患者が増加し2011年の夏以降に再び流行が観察された。2008-2012年に勤務していた36名について2009年から2012年まで毎年原則として2回計7回経時的に採血してPT、FHA、Fim2、Fim3抗体価の推移を検討した。

PT、FHA抗体の推移を図1に示した⇔の期間で百日咳の流行した時期を示した。

2009年の4月の血清ではPT>100 EUの百日咳と診断される例は1例のみで2年後にはPT抗体は50 EU以下に低下し2011年の秋の流行期の血清、2012年3月の血清で上昇を認め、数名が咳嗽を認めていた。FHA抗体は2009年の4月の血清で3例が100 EU以上と高値を示しその後低下し2011年の流行を挟んで有意に上昇した例はPT抗体反応より低値であった。

36例のスタッフのシリーズ血清でFim2、Fim3抗体の推移を図2に示した。2009年4月の血清ではFim2抗体は11/20 (55%)で陽性でその後低下し2011年の流行期に上昇が認められる。Fim3抗体に関しては2009年の血清では1例を除いて全例が陽性で、2年間のうちに低下し2011年の流行期に上昇が認められた。

看護スタッフの中で特徴的な症状を認めた3例のFim3抗体の推移を図3に示した。

(Case 1) 2009年1月に咳嗽を認め、得られた血清は発生から3か月後の2009年4月にはFim3抗体が1,400と上昇し2年3ヶ月で低下し2011年

表2 年齢別LAMP法陽性率と、Fim2、Fim3抗体陽性率

Age	LAMP +	PT>100	Fim2	Fim3	>1000 Fim2 or 3
<1 (n=15)	4	2	3	4	1
1-6 (n=22)	2	4	1	8	4
7-12 (n=52)	10	16	6	25	10
13-19 (n=22)	3	5	3	13	5
20-29 (n=8)	0	1	1	7	1
30-39 (n=47)	2	1	29	31	26
40-49 (n=38)	2	4	25	24	25
>50 (n=4)	0	1	3	3	1
(n=208)	23	34	71	115	73

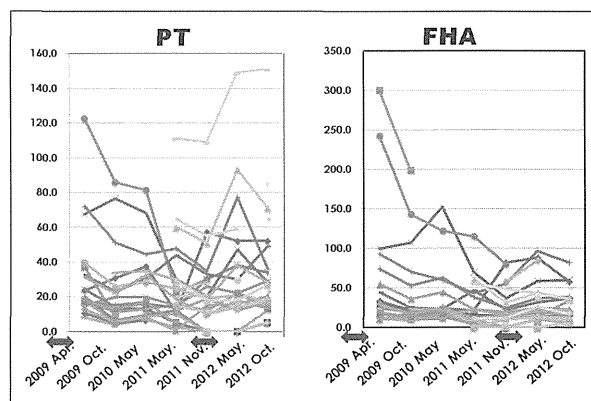


図1 PT、FHA抗体の推移

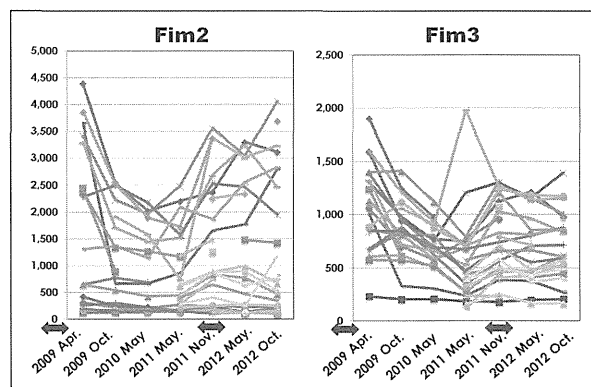


図2 Fim2、Fim3抗体の推移

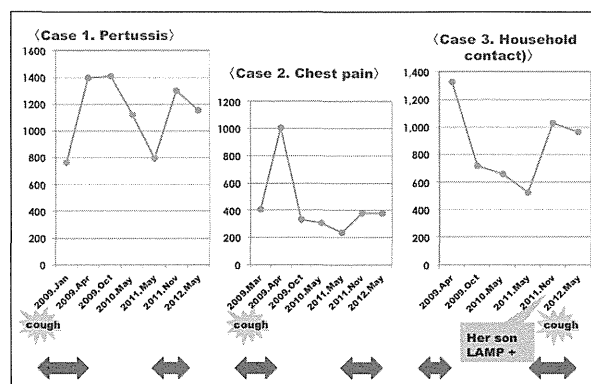


図3 不顕性感染、胸痛、家族内感染を起こした看護スタッフFim3抗体の推移

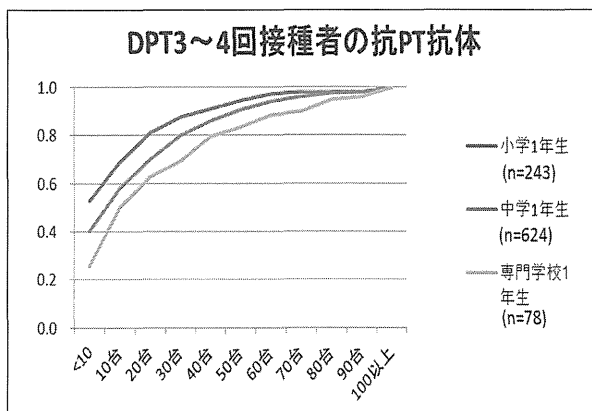


図4 小学1年、中学1年、専門学校のPT抗体の推移

の流行ではFim3抗体は上昇しても咳嗽も認めず、不顕性感染と考えられた。

(Case 2) 咳嗽と共に胸痛を認めた例で1か月後のFim3抗体が上昇した。

(Case 3) 2011年の流行時に咳嗽を認めFim3抗体も上昇し本人だけでなく8歳の息子さんも咳嗽が長引き鼻咽頭拭い液からLAMP法で遺伝子が検出された。家族内感染が証明された。

4) PT抗体価の推移

2カ所の小児科で百日咳の患者は小学校低学年にピークが認められることから社会での侵淫度を調べるために小学1年生、中学1年生、専門学校1年生を対象に血清を採取した。DPTワクチンはI期追加接種が2歳には終了しその後百日咳の成分を含んだワクチンの接種は行われていない。DPTワクチンを3回以上接種している児のPT抗体の累積陽性率を図4に示した。DPT3回以上接種している児童では小学1年生で128/243 (53%)がPT抗体陰性で、中学1年生では250/624 (40%)、専門学校では20/78 (26%)とそれぞれの6年間に陰性率が減少しPT抗体価は陽性に転じて抗体の累積度数分布は高い方にシフトしていた。小学1年から中学1年までの6年間、また、次の6年間に百日咳に罹患していると考えられ社会では百日咳が侵淫していると考えられた。

D. 考案

2010-11年東京都内で百日咳の流行が観察され小児科領域だけでなくその保護者にあたる年齢層で咳嗽が持続する例が増加した。百日咳が疑われたが、PT抗体による血清診断法ではPT>100 EU

の基準では34/208例と診断陽性率は低く成人百日咳の実態を把握するためには感度、特異性の高い臨床検査法の開発が必須となる。

感染症の診断には病原微生物の分離、遺伝子検索がgold ruleとなるがワクチン接種の既往、抗菌剤の投与により定着期間も短く菌量も少ないことから分離率、遺伝子検出率が低くなる。今回の調査でも2施設での百日咳菌の分離率は3/43、4/208と低く分離は困難であった。LAMP法による遺伝子診断は流行期の小児を対象にすると24/43 (56%)と高い陽性率であった。一方、成人を含めた調査では23/208 (11%)と陽性率は低くなり百日咳菌を捉えることには限界があり感染した後の血清抗体を検出する血清診断法を検討した。

従来のPT抗体価の上昇では34/208 (16%)が百日咳と診断された。DPTワクチンの接種率は90%以上でPT、FHAがワクチンに主要抗原であり特に小児期の感染ではワクチン免疫か感染によるものが判別できない。今回、ワクチンに含まれていない成分としてFim3とワクチンに含まれているFim2抗原を用いて蛍光EIA法により検討した。PT抗体、LAMP法で診断された例で検討するとFim3抗体陽性例が多く208例の検討でも115/208 (55%)においてFim3抗体が陽性で野生株の感染が強く疑われた。成人例では感染により同時にワクチン株に含まれるFim2抗体も高値を示したが小児例ではワクチン接種後数年でありFim2抗体の反応が低いものと考えられた。ワクチン接種後の血清ではFim2に対する抗体のみが増加し、Fim3に対する抗体は変動がない。

小児科クリニックの医療スタッフを長期間follow upし流行の2年後にはFim3抗体は陽性基準500以下と陰性化する例が多く、成人医療スタッフは図3で示したようにFim3の野生株と同時にFim2抗体も上昇し交叉反応が考えられる。スタッフの経年的血清調査でも野生株の感染でFim3抗体だけでなくFim2抗体も増加していることが明らかとなった。また、流行の度に再感染をおこしており、症例3で示したように家族内伝播の発端となることが明らかとなった。抗体反応を認めた例の中に咳嗽を認めない不顕性感染も存在していた。

菌分離と遺伝子検出を比較すると臨床的に百日咳が疑われた患者43例中24例が百日咳と診断され

3例のパラ百日咳が診断され10%以下にパラ百日咳が混在することがわかった。パラ百日咳の血清診断法を確立する必要と共に百日咳PT、Fim2、Fim3抗体測定例数を増やし特異性、感度を確認する必要がある。

また、血清疫学調査では小学1年生では半数以上がPT抗体は陰性化、中学1年生では40%と陰性率が低下し社会全体で百日咳の侵淫を示唆する結果であった。

E. 結論

臨床的に診断された百日咳の中に10%弱のパラ百日咳の患者が混在する。小児の百日咳においてLAMP法による遺伝子診断は流行期の小児では60%が陽性となるが、成人では陽性率は低い。成人では過去のワクチン接種、抗菌剤の投与により菌量も少なく分離、遺伝子診断は感度が低く血清診断に依存することになる。ワクチン抗原には含まれない流行野生株のFim3蛍光抗体測定法は感度が高く過去の感染歴を見ている可能性があるため長引く咳のエピソードが百日咳の感染を正確に把握するにはIgM Fim3抗体の測定法の開発が必要と思われる。百日咳の抗体は減衰が早いことから小学入学前の追加接種のスケジュールを検討する必要がある。

F. 研究業績

1. 論文発表

2014年

- 1) Kashiwagi Y, Miyata A, Kumagai T, Maehara K, Suzuki E, Nagai T, Ozaki T, Nishimura N, Okada K, Kawashima H, Nakayama T. Production of inflammatory cytokines in response to diphtheria-pertussis-tetanus (DPT), haemophilus influenzae type b (Hib), and 7-valent pneumococcal (PCV7) vaccines. *Human vaccine & Immunother* 2014; 10: 677-685.
- 2) Kashiwagi Y, Maeda M, Kawashima H, Nakayama T. Inflammatory responses following intramuscular and subcutaneous immunization with aluminum-adjuvanted or non-adjuvanted vaccines. *Vaccine* 2014;

32: 3393-3401.

- 3) Yamaji Y, Nakayama T. Recombinant measles viruses expressing respiratory syncytial virus proteins induced virus-specific CTL responses in cotton rats. *Vaccine* 2014; 32: 4529-4536.
- 4) Kumagai T, Yoshikawa T, Shiraki K, Yoshida M, Nakayama T, Ihira M, Asano Y. Virus specific cell-mediated immunity may play a role in controlling reactivated human herpes virus 6B in patients under measles induced immunosuppression. *J Med Virol* 2014; 86: 658-665.
- 5) Kumagai T, Nakayama T, Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Okafuji T, Ochiai H, Nagata N, Tsutsumi H, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T. Humoral immune response to influenza A(H1N1) pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. *Viral Immunology* 2014; 27: 368-374.
- 6) Jin L, Örvell C, Myers R, Rota PA, Nakayama T, Forcic D, Hiebert J, Brown KE. Genetic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev Med Virol* 2014; DOI: 10.1002/rmv.1819

2013年

- 1) Matsubara K, Fujino M, Takeuchi K, Iwata S, Nakayama T. A new method for the detection of neutralizing antibodies against mumps virus. *PLOS ONE* 2013; 8: e65281.
- 2) Nakayama T. Vaccine chronicle in Japan. *J Infect Chemother* 2013; 19: 787-98.
- 3) Ikeno S, Suzuki MO, Muhsen M, Ishige M, Kobayashi-Ishihara M, Ohno S, Takeda M, Nakayama T, Morikawa Y, Terahara K, Okada S, Takeyama H, Tsunetsugu-Yokota Y. Sensitive detection of measles virus infection in the blood of humanized mouse by one step quantitative RT-PCR.

Front Microbiol 2013; 11 October doi:
10.3389/fmicb.2013.00298

- 3) Sawada A, Yamaji Y, Nakayama T. Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains. J Infect Chemother 2013; 19: 480-485.
- 4) Nakayama T, Sawada A, Kubo H, Kaida A, Tanaka T, Shigemoto N, Komase K, Takeda M. Simple method for differentiating measles vaccine from wild-type using loop-mediated isothermal amplification. Microbiol Immunol 2013; 57: 246-251.

2012年

- 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.

- 2) Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-a djuvanted 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 Chemother 18: 466-471, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他

百日咳 Fim2、Fim3 抗体 研究用試薬として
臨床検査センターで測定可能となった。

8. VPDのサーベイランス 構築

福島県内における小児重症感染症等の前方視的発生動向調査に関する研究

研究分担者：細矢 光亮（福島県立医科大学小児科学講座）

研究要旨 定期接種されている麻疹・風疹・水痘の入院数、定期接種に組み込まれていない流行性耳下腺炎の入院数、髄膜炎、脳炎・脳症や重症肺炎などの重篤な感染症の入院数を全県的に把握することを目的とする。

また福島県内の小児科入院施設を有する病院間で、県内における重症感染症入院患者情報を共有することにより、病院機関での注意喚起や患者さんへの情報提供に応用することが出来る。

A. 研究目的

小児においては感染症やその合併で入院を要することが多いにも関わらず、全国において小児重症感染症患者がどれくらい発症しているかを継続的に把握する調査は行われていない。そこで、定期接種されている麻疹・風疹の入院数、定期接種に組み込まれていない水痘、流行性耳下腺炎の入院数、髄膜炎、脳炎・脳症や重症肺炎などの重篤な感染症の入院数を全県的に把握することを目的とする。同時に福島県内の小児科入院施設を有する病院間で、県内における重症感染症入院患者情報を共有することにより、病院機関での注意喚起や患者さんへの情報提供に応用することが出来る。

B. 研究方法

0歳から15歳までの流行性感症（麻疹、風疹、水痘、流行性耳下腺炎、インフルエンザ、RSウイルス感染症、アデノウイルス感染症、ロタウイルス胃腸炎）、中枢神経感染症（脳炎・脳症、細菌性および無菌性髄膜炎、熱性けいれん重積、胃腸炎関連けいれん、ADEM、MS、ギランバレー症候群）、呼吸器感染症（酸素投与や人工呼吸器管理を要する重症肺炎、呼吸窮迫症候群）、その他（尿路感染症、血球貪食症候群、溶血性尿毒症症候群）に罹患し、福島県内の病院に入院した患者全例。福島県内の小児入院可能な全病院に協力

してもらい、毎週、対象患者の報告をメーリングリストを通して報告する。各病院の報告を集計し、各病院へフィードバックする。福島県立医科大学の倫理委員会承認済。

（倫理面への配慮）

調査は疾患名、年齢、性別のみであり個人を特定される情報はない。

C. 研究結果

平成25年12月2日より福島県下の重症感染症の全数入院報告を開始した。現在までのところ、全病院より毎週報告されており、また集計を行いフィードバックを行っている。

RSウイルス感染症、インフルエンザウイルス感染症及びロタウイルス胃腸炎による入院数は、定点報告数と比例して増減していた。入院したRSウイルス感染症の患者さんは約80%が2歳未満であり、酸素使用例は約30%で酸素使用例の80%が2歳未満であった。平成25年49週から平成26年42週まで、麻疹及び風疹の入院は1名ずつであったが、水痘と流行性耳下腺炎の入院はそれぞれ16人、51人と多かった。酸素投与が必要な重症下気道炎はRSウイルス感染症やインフルエンザの流行に関係なく、一定数発症しているが、若年ほどRSウイルスによる入院の割合が高かった。

D. 考察

RSウイルスによる入院が約1年弱で695人あり、感染症の入院の中で一番多い。また約8割が2歳未満で酸素使用率が高いことを考えると、早期のRSVウイルスに対する予防策が必要と思われる。また、流行性耳下腺炎の入院が比較的多く、流行性耳下腺炎の定期接種による入院数の減少が見込まれる。

E. 結論

RSVウイルスのワクチンは、乳児期早期に導入することにより、RSVの入院数を減らすことが期待出来る。今後も、重症小児患者の入院動向

を把握することによって、ワクチンの効果判定にも役立つと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

9. ワクチンの リスクコミュニケーション

ワクチンに関するリスクコミュニケーションに関する研究

研究分担者：吉川 肇子（慶應義塾大学教授）

研究協力者：奥野 英雄（国立感染症研究所感染症疫学センター）

佐藤 弘（国立感染症研究所感染症疫学センター）

牧野 友彦（国立感染症研究所感染症情報センター併任）

研究要旨 予防接種の重要性への認識欠如や、副反応に対する不安により、国民の予防接種への受け入れは十分とは言えない現状にある。本研究では、行動科学の観点から、親が児に予防接種を打たせる（受諾する）際に鍵となる情報や意思決定プロセスを実験的に解明し、ワクチンに関する適切なリスクコミュニケーションのあり方につき検討を行うことで、今後の予防接種推進政策に役立てる。

A. 研究目的

我が国のワクチン政策は他の先進諸国と比較しても多くの問題を抱える。第一に、導入されているワクチンが少ない。第二に、接種率が低く、集団免疫効果を得るに足らないものがある、その結果、改善されつつあるものが多いものいまだに疫学状況に変化のないワクチン予防可能疾患（VPD）が見られ、国際的な信用失墜や経済・社会・教育活動への支障も指摘されている。また、完璧なまでの安全性を望むあまり実際には効性の定かでないワクチンが求められたり、逆に国民の不安感が高まり安全性が十分に評価されていないワクチンの導入が強く求められたりするなど、十分な議論のないまま政治的に判断がなされる危険性もある。

我が国の予防接種体制の制度上の弱点の改善を求める一方、ワクチンの意義と価値、およびデメリットを含めてその情報を適切に伝え、国民の生命と健康を守るために最善の判断を国民自らが行えるよう、適切なリスクコミュニケーションを推進する必要がある。

特に個々の予防接種を決める段階において受け手（本人ないし親）に対する情報提供において、受諾を促す説明や介入の方法につき行動科学の観点から研究し、最善の方法を提言する。

B. 方法

2つの実験によって、ワクチンのリスクコミュニケーションの効果を検討する。

(1) 意思決定に関するインターネット調査

2014年2月20日～22日の間に、インターネット調査会社に登録しているモニターを対象に行った。有効回答数は1,017名（17歳～85歳）であった。

実験計画：後悔の予期（3条件：予防接種を受けて副反応が出て後悔する程度を予期/予防接種を受けずに感染して後悔する程度を予期/後悔を予期しない）×当事者性（2条件：自分に影響が出る/子どもに影響が出る）×説明順序（2条件：ワクチンの効果→ワクチンの副反応/ワクチンの副反応→ワクチンの効果）を独立変数とする3要因の被験者間計画である。

手続き：最初に架空のワクチン（「BIBB」）についての説明を読ませた。その後、このワクチンについての後悔の程度を7段階で予期させた。その後、架空のワクチンの説明のわかりやすさや予防接種意図を含む質問項目に回答させた。

従属変数：説明のわかりやすさ（効果の説明、および副反応の説明）、ワクチンの必要性、ワクチンの効果への期待、予防接種意図、後悔。

その他の質問項目：科学技術に対する態度、15歳以下の子どもの有無、予防接種に対する知識。

独立変数の操作：実在しない架空のワクチンについてシナリオ実験で行った。まず、最初の画面で後悔予期の評定を行わせた（7段階のリッカートスケール）。次に、説明の順序を変えて提示する。最後に、従属変数の測定を行った。

従属変数の測定：説明への理解度、ワクチンの有用性への期待度、副反応への不安、科学技術への態度を5段階のリッカートスケールで測定した。

また、実験計画には直接関係ないが、ワクチン接種に対する一般的な態度、おたふく風邪、日本脳炎に対する態度もあわせて測定した。

(2) 介入実験

新生児を持つ母親に対して、説明の方法を変えることによって接種意向が異なるかどうかを、介入実験によって明らかにする

実験計画：説明の順序（2条件：リスク→ベネフィット/ベネフィット→リスク）と接種スケジュールについての説明（2条件：カレンダーを渡すのみ/スケジュールを説明者と共にカレンダーに記入）の2要因を独立変数とする2×2の被験者間要因計画である。

実験協力者：ワクチン接種の対象となる小児を持つ母親（本報告時点第1回の調査参加者67名、第2回の調査参加者56名）

手続き：出産後退院前に、最初の介入（説明）を行い、従属変数を測定した後、1ヶ月健診で再

度従属変数の測定を行う。

従属変数の測定：説明への理解度、ワクチンの有用性への期待度、副反応への不安、科学技術への態度などを5段階のリッカートスケールで測定する。

C. 研究結果

(1) インターネット調査

後悔の予期、当事者性、説明順序の3要因の分散分析を行った。

ワクチンの効果の説明については、後悔の予期の主効果のみ有意であった ($F(2,1005) = 4.09, p < .05$)。すなわち、副反応がおこったときの後悔を予測した対象者は、受けなくて感染した時の後悔を予測した対象者および、後悔を予測しなかった対象者よりも、効果の説明がわかりにくいと評価していた。他方、副反応の説明のわかりやすさについては、どの要因の効果も有意ではなかった。

ワクチン接種の必要性については、後悔の主効果が有意であった ($F(2,1005) = 5.39, p < .01$, 図1)。すなわち、副反応が起きた時の後悔を予測した者は、ワクチンを接種する必要性が理解できないと評価していた。また、後悔を予測しない条件は、ワクチンを受けなくて発病した場合の後悔を予測する条件よりも、必要性が理解できないと評価していた。

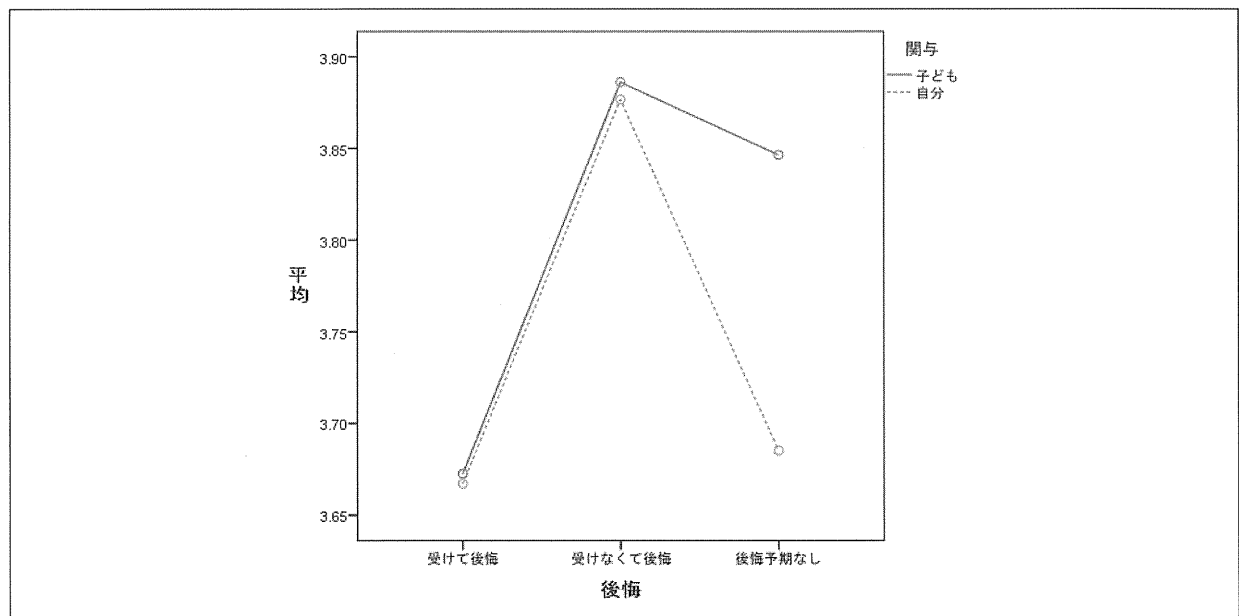


図1 ワクチンの必要性の評価

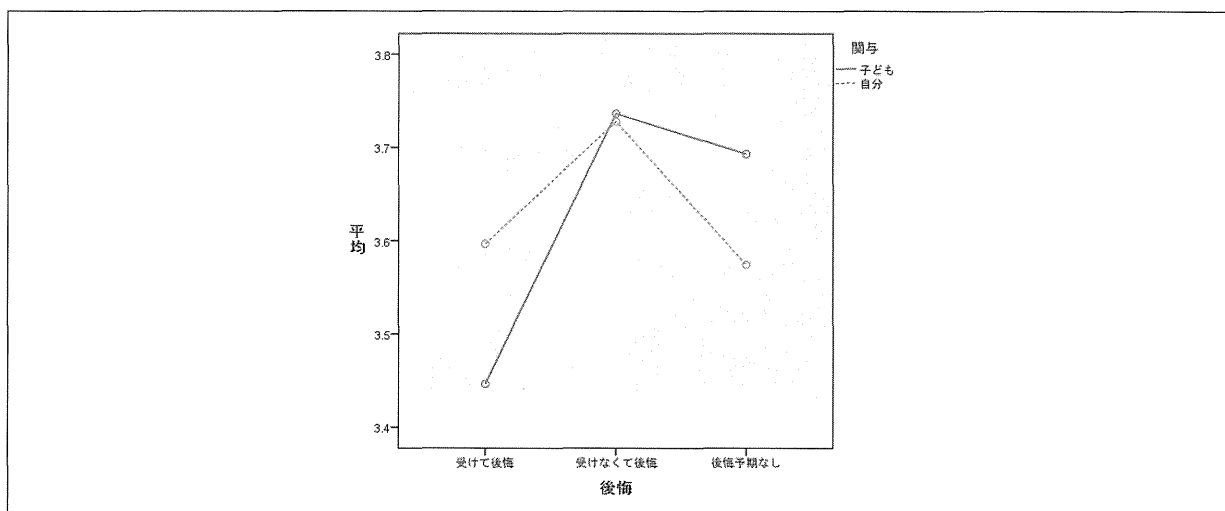


図2 ワクチンの効果に対する期待

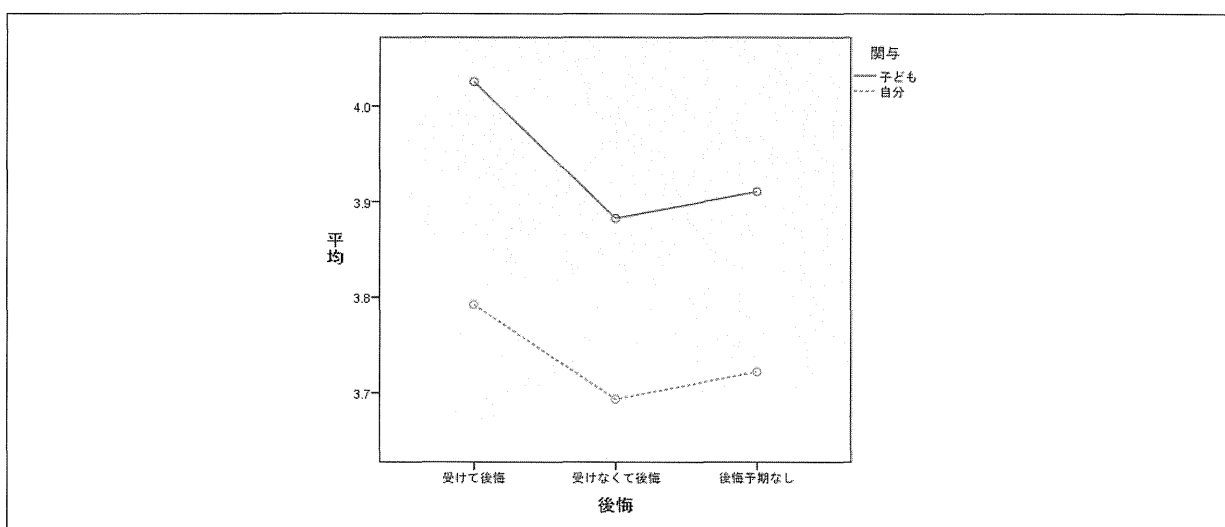


図3 ワクチンの副反応が出たときの後悔

ワクチンの効果の期待については、後悔の主効果のみ有意であった ($F(2,1005) = 5.93, p < .01$ 、図2)。すなわち、副反応の後悔を予期した対象者は、ワクチンの効果の期待が最も低く、次いで、後悔予期をしない条件、発病した時の後悔を予期する条件の順となっていた。

予想接種の副反応が出た場合の後悔の程度と、ワクチンを受けずに感染した場合の後悔の程度については、いずれも当事者性の主効果が有意であり (それぞれ、 $F(1, 1005) = 15.00$ 、図3; $p < .00$; $F(1, 1005) = 51.95, p < .001$ 、図4)、子どもに影響が出た場合に、後悔が大きいと予測していた。

接種意図については、当事者性の主効果及び後悔の主効果が有意であった (それぞれ、 $F(1,1005) = 25.14, F(2,1005) = 24.49, p < .01$ 、図5)。すな

わち、副反応を予期した対象者と後悔を予期しない条件の対象者で接種意図が低かった。これに対して、ワクチン接種をしないために発病した時の後悔を予期した条件の対象者は接種意図が相対的に高かった。また、当事者性、後悔、及び説明の3要因の交互作用が有意であった ($F(2,1005) = 3.03, p < .01$)。

なお、参考のため、おたふく風邪、日本脳炎に対する態度の結果を表1-5に掲載した。

(2) 介入調査

本報告時点で、すべてのデータの分析が終了していないため、中間報告として報告する。

説明への理解度、ワクチンの有用性への期待度、副反応への不安のいずれの従属変数においても、説明の順序及びカレンダーに接種予定日を記入す

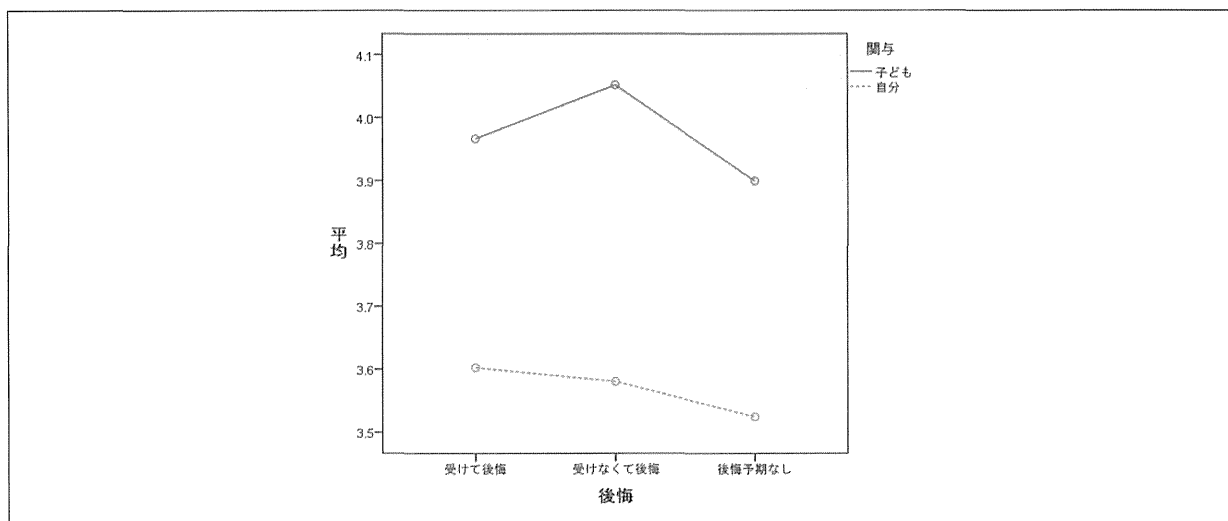


図4 接種しなくて病気にかかった時の後悔

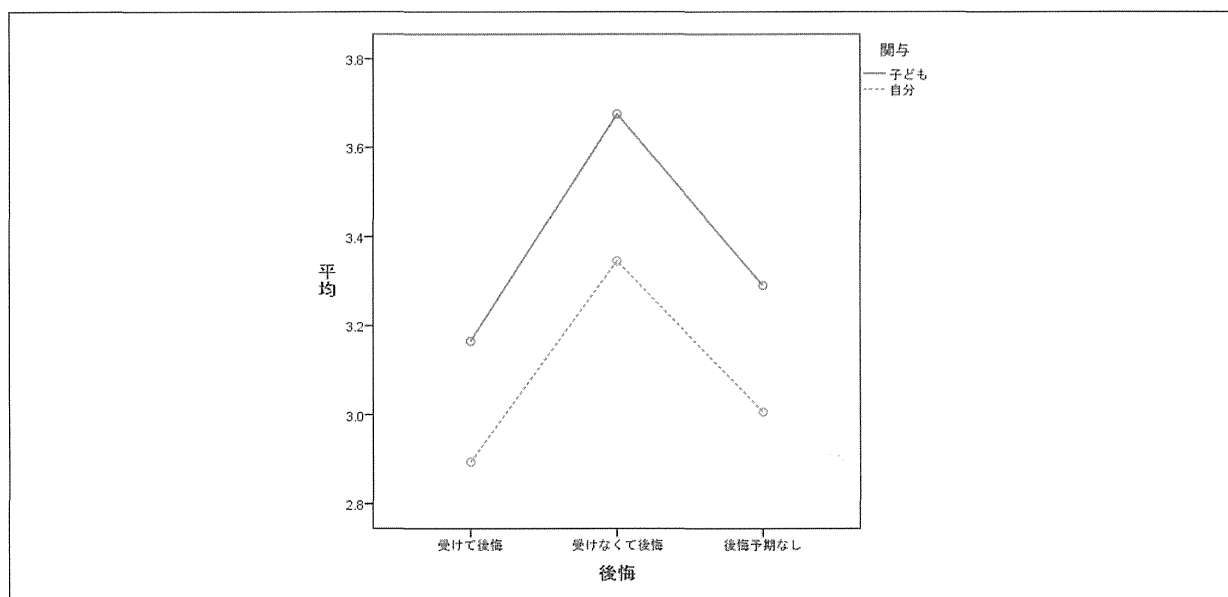


図5 ワクチンの接種意図

表1 現在おたふく風邪のワクチン接種を受けましたか？

	度数	パーセント	有効パーセント	累積パーセント
有効数 受けた	269	26.5	26.5	26.5
受けていない	407	40.0	40.0	66.5
わからない	341	33.5	33.5	100.0
合計	1017	100.0	100.0	

ることによる差は見られなかった。肺炎球菌の接種意図については、説明の順序とカレンダー記入の有無の交互作用に傾向があった ($F(1,67) = 3.79, .05 < p < .10$)。

現在のところ、有意な差が見られているのは、ワクチンを打たずに後悔をする程度を予測させた

ところである。結果として2要因の交互作用が有意であった ($F(1, 66) = 4.91, p < .05$)。すなわち、カレンダーで接種予定日を記入するという作業をしない場合には、説明の順序によって、後悔の程度に差はないが、カレンダーに予定日を記入するという作業をした場合においては、効果を先に説