

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591390

研究課題名（和文） ヒブワクチン導入前後のインフルエンザ菌莢膜遺伝子重複と抗体親和力の研究

研究課題名（英文） A study of avidity of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) antibody and multiple copies of capsulation loci in the strains as possible factors of Hib vaccine failure in Japan.

研究代表者

徳田 浩一（TOKUDA KOICHI）

東北大学・病院・講師

研究者番号：10518400

研究成果の概要（和文）： 小児に髄膜炎などの重篤な感染症を起こすインフルエンザ菌 b 型（ヒブ）に対するワクチンが日本でも 2008 年 12 月に導入されたが、ヒブの保有する特定の遺伝子重複に関連したワクチンフェーラー（ワクチン接種によっても免疫が獲得されない人）が海外で報告されている。本研究において、2004～2011 年に鹿児島県で発生した髄膜炎患者から検出されたヒブを対象として調査研究したところ、問題となる遺伝子重複がヒブワクチンの普及前に既に存在する（2004～2008 年 9.5%、2009～2011 年 23.1%）ことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： *Haemophilus influenzae* type b (Hib) occasionally causes invasive bacterial diseases such as meningitis especially among young children. In recent years, vaccine failure associated with multiple amplification of the capsulation (*capb*) locus has been increasingly reported in Europe. We examined Hib strains from Japanese children with Hib meningitis and founded that the proportion of strains with three or four copies of the *capb* locus already exist before the popularization of Hib vaccination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ヒブワクチン、vaccine failure、Hib 莢膜遺伝子 *capb* 領域の重複、Hib 抗体の avidity 低下

1. 研究開始当初の背景

本邦では、2008 年 12 月にインフルエンザ菌 b 型 (Hib、ヒブ) ワクチンが開始されたが、

主に 1990 年代に導入された西欧諸国では、近年 vaccine failure が報告されており、これには Hib 莢膜遺伝子 *capb* 領域の 3 コピー

以上の重複による細菌側要因と、抗体の avidity 低下による宿主側要因が関連するとされている。本邦においては、これらの要因に関してこれまで研究がなされていない。

2. 研究の目的

(1) ワクチン導入前後における、細菌側要因としての *capb* 領域多様性の変遷を把握する。

(2) ワクチン導入前後における、宿主側要因としての抗体 avidity の変遷を把握する。

(3) 研究結果から vaccine failure 関連要因を評価し、ワクチン導入により新たに出現する可能性のあるリスクの検討など、ワクチン計画に有用な提言を行う。

3. 研究の方法

(1) 鹿児島大学小児科で保存中の Hib 髄膜炎患者由来株と 2009 年以降の新規 Hib 髄膜炎患者由来株を対象として、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) やサザンブロッティングなどの手法による遺伝子解析を行う。

(2) 2009 年以降、各医療機関に保存された Hib 髄膜炎患者の血清を対象として、ELISA 法による抗 Hib 抗体価測定と、チオシアン酸塩溶出法による avidity 測定 (avidity index 算出) を行う。

4. 研究成果

(1) Hib 遺伝子解析 (細菌側要因の解析)

Hib における *capb* 領域は、多くの株が 2 コピーの重複を有するのに対し、vaccine failure に関与する株では 3 コピーの重複が多いことが報告されている。今回、鹿児島県で発生した Hib 髄膜炎患者由来株についてサザンブロッティングにより分析したところ、ワクチンフェーラーの原因となる可能性のある 3 コピー以上の重複を有する Hib が、ワ

クチン普及前に既に存在すること (2004～2008 年 21 株中 2 株 (9.5%)、2009～2011 年 13 株中 3 株 (23.1%)) が明らかとなった (図 1)。さらに、最近 3 年間では、3 コピー以上の重複を保有している Hib が 20%以上に及んでいることや、統計学的有意差は認めないものの、増加傾向にある可能性が示されたことから、ヒブワクチン接種率が今後向上しても、同様の機序によるワクチンフェーラーが本邦でも発生する可能性も考えられ、本要因の継続的モニタリングやワクチンフェーラーを防止するためのワクチン計画の検討が必要といえる。

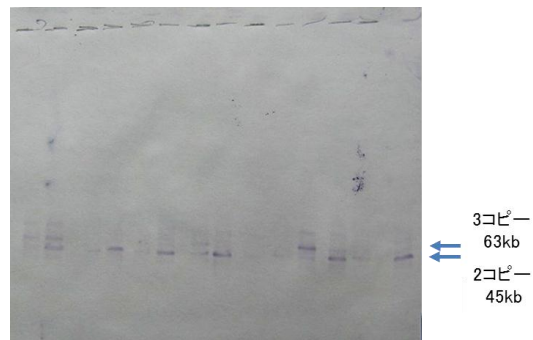


図 1 サザンブロッティングによる分析結果の一部

(2) 抗 Hib 抗体 avidity の解析 (宿主側要因の解析)

保護者から承諾を得て採取した Hib 髄膜炎患者由来血清 (12 例、17 検体) について、ELISA 法により抗 Hib 抗体価を測定した (表 1)。検体は、6 例は急性期 (入院日) のみ、2 例は回復期 (発病 13 日後) のみ、4 例は急性期 (入院日) と回復期 (13 日～3 か月) のペア血清を入手し得た。測定の結果、急性期に Hib 感染予防に必要な抗体価 (最小感染阻止レベル) である $0.15 \mu\text{g/ml}$ 以上を保有していた患者は 10 人中 1 人もいなかった (0%)。また、回復期に抗 Hib 抗体が $0.15 \mu\text{g/ml}$ 以

上に上昇した患者が6人中3人(50%)いたものの、長期の感染予防に必要な抗体価(長期感染阻止レベル)である $1\mu\text{g/ml}$ 以上に上昇した患者はいなかった。最小感染阻止レベルのHib抗体を保有していた2例の患者由来血清2検体を用いて avidity index (AI: 抗原に付着したヒブ抗体を50%溶出させるのに要したチオシアン酸の濃度)を調べたところ0.033及び0.053であり、コントロール(ワクチン接種歴のない成人由来血清4検体)の平均0.028(幅0.024-0.03)と比較して、avidity低下は認めなかった。

表1 髄膜炎患者の抗Hib抗体価

症例番号	年齢	急性期 ($\mu\text{g/ml}$)	回復期 ($\mu\text{g/ml}$)
1	4歳	0.03	0.03
2	4か月	0.01	0.02
3	2歳		0.40
4	8か月	0.00	0.73
5	11か月	0.02	0.20
6	3歳	0.14	
7	2か月		0.02
8	5か月	0.02	
9	11か月	0.04	
10	5か月	0.02	
11	6か月	0.03	
12	4歳	0.06	

鹿児島県では、小児の細菌性髄膜炎に対する全数サーベイランスを実施しており、本研究期間中に発生した新規のHib髄膜炎患者についても全数把握されているが、これまでのところ vaccine failure によるHib髄膜炎患者の発生は認められていない。したがってヒブワクチン導入によるHib髄膜炎患者の発病要因や疫学的背景の変化については、本研究期間内には明らかにすることができなかった。vaccine failure の患者が少なかったことには、ヒブワクチン接種率の低さ(2010年1月現在、鹿児島市乳児35%、5歳未満児約11%)も関連していると考えられ、今後も

継続的な調査研究が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Kawamura H, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Miyahara H, Hashiguchi T, Zenmyo M, Yamamoto T, Ijiri K, Kawano Y, and Komiya S. Quantitative analysis of biofilm formation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains from patients with orthopaedic device-related infections. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 査読有、63, 2011, 10-15.

② Ueno K, Nishi J, Imuta N, Tokuda K, Kawano Y. Presence of multiple copies of capsulation loci in invasive Haemophilus influenzae type b (Hib) strains in Japan before introduction of the Hib conjugate vaccine. Microbiol Immunol, 査読有 54, 2010, 160-163.

[学会発表] (計2件)

① Tokuda Koichi. Detection and Control of a Pertussis Outbreak in a Medical School and University Hospital. The 2012 International Conference on Emerging Infectious Diseases. 12. May. 2012, Atlanta, USA.

② Tokuda Koichi. Assessment of sanitary and infectious risk factors in evacuation centers after the great east Japan earthquake. The 49th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. 21. Oct. 2011, Boston,

USA.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 浩一 (TOKUDA KOICHI)

東北大学・病院・講師

研究者番号：10518400

(2) 研究分担者

西 順一郎 (NISHI JUNICHIRO)

鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・講師

研究者番号：40295241

(3) 連携研究者