

今週の話題：

<発展途上国における腸管毒素原性大腸菌ワクチンの研究に対する将来的方向性>

* 背景：

1998年12月、WHOは、腸管毒素原性大腸菌（ETEC）と腸管出血性大腸菌の疫学とワクチン開発に関する国際学会を日本で開催した。そこで、疫学の現状とワクチン戦略を見直し、一連の提言を行った¹。5年後の2003年、モントルー（スイス）で行われた学会では、発展途上国の子供のためワクチン推薦案を再考し、ワクチン研究の必要性を決定するために、ETECワクチンの開発状況、発展途上国の子供達に対するワクチンの試験接種の成否を検証した。参照¹：No. 13, 1999, pp. 98-101

* 下痢性疾患とETECの役割における世界的負担：

ETECは、発展途上国で下痢を起こす第一要因であり、5歳以下の子供に年間2億8000-4億、5歳から14歳に1億の下痢を引き起こしている。さらに、ETECは発展途上国の成人の主な疾患の原因であり、15歳以上の年間約4億症例の疾患を引き起こす。ETECは、旅行者の下痢の最も多い原因であり、アフリカ、アジアおよびラテンアメリカへの旅行者の下痢の3分の1から2分の1の原因である。ETECは、小腸にコロニーを形成し、非耐熱性(LT)または耐熱性(ST)エンテロトキシンにより疾患を引き起こす。症状は、3-5日続き、脱水症状なしの軽い下痢からコレラのような重いものまでである。症状は軽いが、特に幼児において、推定30-50万人の死亡の原因となる。しかし、最近の下痢による被害の結果と過去を見比べると、死亡率は減少しているが、発生率は同じである。発展途上国の5歳以下では、子ども1人当たりの年間下痢発症回数は3.2回（中央値）であり、以前と同様である。5歳以下の下痢性疾患が原因の死亡率は1年に子供4.9/1000人である。死亡率は、1959-1979年の1年につき13.6/1000人、1980-1989年5.6/1000人に比べ減少している。この減少は、1歳以下の乳児で最も顕著であった。

5つの発展途上国で、WHOによって行われた調査では、3歳以下の11-18%にETECが確認された。ETEC株の分離は一概に対照群より高いが、健康な人もETEC保菌者であることも多いことから、ETEC株を持つ子供の下痢性疾患発症のodds ratioを計算することの重要性が強調されている。

* 発展途上国に於けるETECの疫学：

発展途上国3ヶ国（バングラデシュ、エジプト、ギニア・ビサウ）において行われた最近の長期研究では、ETECの自然暦による感染への新しい考察があった。

バングラデシュでは、ETEC感染は下痢を伴う疾患の2歳以下の子供と、乳児の最も一般的な細菌性病原であった。成人、特に65歳以上に於いて重篤な疾患と関わっている。耐熱型は、最も一般的で春に最も多く見られ、定着因子の(CFA)1とCS5、CS6抗原は最も一般的な増殖要因であった。

ギニア・ビサウでは、長期のコホート調査を新生児から2歳児（中央値：18.4ヶ月）の子供200人に毎週便検体を収集することで行った。一次感染の割合は、3から6ヶ月以後の子供において、ETECの種類により増えることが判明した。調査中、ETECの小さな流行が確認された。流行は雨期におこり、主にSTh陽性の菌によるものであった。しかしLT陽性だけのETECには病原性のないものがみられた。

エジプトでは、ナイル川デルタ地帯で調査が実施され、乳幼児にETECと下痢の自然暦がみられた。子供たちは何度もETECによる下痢を経験していることがわかった。CFA/Iの感染は後に起こる感染に対して防御を起こすが、他のトキシン表現型は防御できなかった。他の増殖要因は下痢に関係なかった。

* ETECワクチン開発の現況：

疫学的調査およびボランティアによる研究は線毛増殖要因に対する抗体が反応防御に役立つことを立証する。少なくとも20種の繊毛CFsの異なる抗原が確認され、そのうち7つ（CFA/IとCS1-CS6を含む）の割合が多い。不活経口ETECワクチンは臨床調査では最も研究されているが、最近別の取り組みも進歩してきた。

* ETEC感染に対する不活経口ワクチン：

開発は次の原理に基づいている。

最も罹患率の多いETEC病原体(50-80%はCFA/IとCS1-CS6)を代表する線毛抗原を含む必要がある。従って、CFA/I、CS1-CS6およびLTトキソイドを含む多価ETECワクチンは約80%のETECの防御が可能であると予想される。組み換えコレラトキシンB（CTB）も含まれる。

バングラデシュとエジプトでCTB-CF ETECワクチンの第1、第2相テストで、成人被験者はワクチンに耐え、腸粘膜の免疫を高める事が示された。被験者の65-95%の末梢血液中中にrCTBとETECの増殖要因に対する抗体分泌細胞が確認された。同様の臨床テストをバングラデシュとエジプトの生後6ヶ月までの子供に行った。その結果、成人と同様な免疫と耐久性（バングラデシュの乳児を除く）が認められた。バングラデシュの6-18ヶ月の乳児に度々嘔吐が見られる事から投与量を調節すると、1/4なら耐えられることがわかった。

rCTB-CF ETECワクチンの防御効果に関するいくつかの調査が先進国から発展途上国アジア、アフリカ、ラテンアメリカの国に行く旅行者に対して始められた。最初のヨーロッパからの旅行者を対象とした少数例の予防調査では82%の防御効果がみられた。

より大規模なメキシコとガテマラに行く 700 人のアメリカ人旅行者に対照群をおいた調査では軽症でない ETEC の下痢に対しては効果的であったが、軽症例を含めると有意な効果はなかった。350 人のエジプトの子供に行われたワクチン効果のダブルブラインドテストでは、家庭訪問と便培養で分析したが、有意なワクチンの効果は認められなかった。

* 他の不活化 ETEC ワクチンのアプローチ :

精製不活性ワクチンは高額で蛋白分解に敏感であるため経口免疫としては欠陥があるが、いくつかのアプローチが行われた。胃の中で線毛が消化されるのを防ぐためにマイクロスフェアの中に入れられた CS1 と CS3 の結合、組み替えられた CS6 を予防接種したが、ETEC に対して効果は認められなかった。

* 生 ETEC ワクチン :

ヒトの被験者の研究で CS1 と CS3 を発現するが LT と ST を欠く株が生ワクチンとして 75% の効果があった。

* 多価の赤痢/ETEC ワクチン :

米国メリーランド大学ワクチン開発センターは ETEC 抗原の遺伝子発現と配送経路開発のため弱毒赤痢生ワクチンを開発している。赤痢菌株は、エンテロトキシン遺伝子を完全に削除することにより弱毒化され、プレ臨床実験で、安全で免疫性があることが示された。その上、その赤痢菌株は、動物モデルにおいて防御免疫反応を引き出すことができた。この赤痢菌株を多価の生経口赤痢-ETEC 抗原ワクチンへのアプローチとして使用された。

最も一般的な 6 つの線毛抗原タイプを含むことは不可欠であるので、CFA/ I、CS2、CS3、および CS4 抗原をコード化する遺伝子を各々クローン化してプラスミドにクローン化した。さらに、LT を無毒化した遺伝子又は B サブユニットを設計し、プラスミドにクローン化した。それぞれのプラスミドは、弱毒赤痢菌株で、抗原を大量に発現させることができ、モルモットで血清と腸粘膜反応を引き出すことができた。

無毒化 LT 変異体と B-サブユニットは、モルモットで抗体応答をおこし、Y1 細胞の野生型毒素活性を中和することができた。それぞれ個々の ETEC 抗原を発現する 5 つの株の混合物は、大腸菌抗原に対する抗体応答と赤痢自体に対する抗体応答を引き出すことができた。さらに、赤痢菌で複数の ETEC 抗原の遺伝子発現を導くプラスミドが開発された。モルモットの接種ではそれぞれの抗体に強い血清と腸粘膜反応を示した。ETEC-CFA/ I と CS3 を発現する *S. flexneri* 2a と CS4 無毒された LT を発現する *S. sonnei* を同時に投与すると、4 つの ETEC 抗原と赤痢に対して免疫原性を示した。ETEC 抗原を発現する弱毒性赤痢菌を接種された動物は、Sereny テストで野生型赤痢の攻撃を防いだ。

さらに、異なる赤痢菌由来のハイブリッドワクチンが作られている。それは、変異した LT に加えて重要な線毛の増殖要素 (CF) を弱毒性赤痢株に発現させる。異なった CS 抗原と改変した LT を発現する 2 つ以上の赤痢菌株を同時にモルモットの腸粘膜接種すると、免疫反応が赤痢自身の O-抗原と ETEC 抗原に対して認められた。これらはモルモットとマカク属の猿の両方で安全性と免疫原性をテストされた。

* 生経口ワクチンとしての遺伝学的に弱毒化された ETEC 菌株 :

別のアプローチとして Johns Hopkins 大学では弱毒化した ETEC 菌株が試られている。毒素陰性で CS1 と CS3 陽性の ETEC 菌株に、3 つの異なった組み合わせで欠失変異を染色体に導入し、さらに弱毒化した 2 つの菌株を評価した。被験者に一回投与して評価したところ安全で免疫性があることが認識された。一つは CS1 と CS3 の両方に対して野生型株と同等の免疫反応を引き起こすことが示された。

* ETEC のための皮下予防接種方法 :

皮下予防接種は、アジュバントと抗原を投与する新しい方法である。アジュバントと抗原は、ランゲルハンス細胞を標的とする。CS6 抗原を含み、LT を含むあるいは含まない組換え型のサブユニット・ワクチンがパッチ形式でつくられた。臨床的安全性と免疫性を評価するため、成人のボランティアに 0、1、および 3 ヶ月に渡り 3 回投与された。そして、CS6 への反応は LT がいないときには全くなかった。LT 接種を受けた総てのボランティアが、アンチ LT IgG を持ち 90% はアンチ LT IgA 血清を持っていた。又、LT 単独で安全を調べるため、第 2 相調査が 200 人のボランティアに行われた。ワクチン関連の重篤な副作用はなく、全身の副作用としての変化もなかった。LT は、パッチテストした部位に約 10% の部分的紅斑を認めた。

* ETEC 結合ワクチンへのアプローチ :

国立衛生研究所 (米国) では、ETEC における結合ワクチンの開発が進められた。原理は、口の中に住む少量の微生物が空腸に達するとき、腸内の微生物になり、それらを通じて腸粘膜に血清 IgG を誘導することである。腸疾患に対する非経口ワクチン (小児麻痺、腸チフス、およびコレラ) のいくつかの例が知られている。例えば、ベトナムで 2-5 才児の腸チフスに対する Vi-rEPA 結合ワクチンは、91.5% の効力を示した。*S. sonnei* O-特有の多糖体ワクチンは、4 つの臨床研究でイスラエルの成人ボランティアに顕著な予防効果を示した。4-7 歳では、*S. sonnei* と *S. flexneri* 2a の接合ワクチンは、安全で免疫性があるのを示した。

* WHO の勧告 :

1. ETEC 疾患発生率の世界的な評価は、地域、時代、および臨床的重症度によって再評価されるべきであり、評価には対照グループを含む必要がある。より軽度の ETEC 疾患だとしても、発生の衰えと発生遅延の分析を含むべきである。地域人口あたりについての研究は、明白な方法論を使用することが必要である。また、詳細な調査を行うためには年齢構成がわかっている調査地区の確立が必要とされる。
2. 使用されている実験の技術と方法の標準化が行われるべきである。ETEC 研究を含めるように実験室を強化することによって、既存の幼児下痢性疾患の地域ネットワークを発展させるべきである。そのためには、しっかりとした ETEC の明確な分析評価の標準化を必要とするだろう。ETEC のための WHO 共同センターの設立が強く奨励される。
3. 防御抗体を作る CFs の原則証明分析がワクチン候補とともに実施されるべきである。流行地域の子供に行う前に、大人のボランティアで行うことができる。
4. 免疫保護の指標がまだ不明確であり、研究は様々な免疫保護メカニズムの役割を明確に調べるべきである。平行した調査で、どの指標が重要であるかを解明する研究も同時におこなわれるべきである。
5. 新しい ETEC ワクチン候補の開発は流行地域の子供に利用できる ETEC ワクチン候補の臨床的評価と同様に強く奨励される。予防接種スケジュールはその国独自の接種日程を反映すべきである。血清学的研究は EPI 抗原への影響がないことを確認するべきである。
6. 不活経口 ETEC ワクチンの更なる研究は、このワクチン候補の安全性と免疫原性が流行地域の 12-24 ヶ月未満の子供で保証されるなら推奨される。また、研究を進める時には、ワクチン特異性抗原に関連した重症例や入院を防ぐという初期の到達目標を利用すべきである。
7. WHO は発展途上国のワクチン規定が国際基準に達するよう、その国の調整当局に援助を提供し続ける。さらに、ETEC ワクチンのためにどのようなハードルが存在するかを見つけるよう勧告した。

(市村由美子、安藤啓司、高田哲)