

200/0718

厚生科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山 井 志 朗

平成14(2002)年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究	1
山井志朗	
II. 分担研究報告	
1. 髄膜炎菌の保菌者調査	11
井上博雄	
2. 髄膜炎菌の家族内感染に関する解析	21
山井志朗	
3. 病院を対象とした髄膜炎患者と髄膜炎菌感染症の調査研究 2	27
中島秀喜	
資料 1 : 髄膜炎菌アンケート集計結果	
資料 2 : アンケート調査票	
4. 髄膜炎菌の薬剤感受性に関する検討	35
相楽裕子、春田恒和	
5. 国内で分離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた網羅的な	47
分子疫学的分類に関する研究	
渡辺治雄	
6. 髄膜炎菌の簡易分類マーカー γ -glutamyl aminopeptidase	53
の有効性に関する研究	
渡辺治雄	
7. 髄膜炎菌の国際間比較研究	57
永武 毅	

平成13年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究

総括研究報告書

主任研究者 山井志朗 神奈川県衛生研究所細菌病理部長

研究要旨

細菌性髄膜炎の主要な原因細菌である髄膜炎菌の国内での発生・保有状況の把握、検査法の普及と検査並びに監視体制の確立、診断・治療法の検討を主体として、患者発生という健康危機管理状況に柔軟に対応できる体制づくりを目的として研究を進めた。平成13年度は保菌者調査(健康者および呼吸器感染症患者)並びに型別法の検討、分離菌株のMLSTの解析、髄膜炎菌鑑別法の検討、医療機関への髄膜炎菌感染症に関するアンケート調査の集計等を行った。

分担研究者

渡辺治雄 国立感染症研究所細菌部長
中島秀喜 聖マリアンナ医科大学教授
井上博雄 愛媛県立衛生環境研究所長
永武 毅 長崎大学熱帯医学研究所
相楽裕子 横浜市立市民病院
春田恒和 神戸市立中央市民病院

探り、耐性化の状況を調査した。

今年度は髄膜炎菌感染症の実態の把握として、保菌者調査、家族内感染の解析、患者の病態の分布調査、薬剤感受性値の解析と抗生物質による治療法の検討、疫学マーカーであるMLSTの実施方法の検討、*Neisseria*属菌の分類・鑑別に関する検討、髄膜炎菌感染症の国際間の比較を行った。

A. 研究目的

本研究は、検査法の普及とこれによる疾病監視態勢の強化とレファレンス機能の向上、および髄膜炎菌感染症の実態の把握による感染症対策策定に必要な情報の収集とワクチン導入の検討を目的としている。

昨年度は標準的な検査法を検討してこれを用いて地方衛生研究所を対象にした研修会を開催して検査法の普及を行い、流行の発生と耐性菌出現等に対する監視体制を確立して現行の感染症発生動向調査事業において正確な情報の収集が可能となる態勢の強化を図った。また、わが国における患者の病型の分布を調べるためにアンケート票を作成して全国の医療機関に配付した。さらに、健康保菌者の実態を把握し、感染症発生の潜在的な可能性を

B. 研究方法

本研究は、主任研究者と6人の分担研究者により行った。

1. 保菌者調査

1) 健康保菌者調査(分担:井上博雄、愛媛県立衛生環境研究所長)

わが国における髄膜炎菌感染の現状把握は不十分であり、特に細菌学的監視体制の強化が求められている。そこで昨年度に引き続き、検査法の普及を図るとともに特に健康保菌者の実態把握を行い、流行予防に資することを目的とした。山形県衛生研究所、福島県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、石川県保健環境センター、神戸市環境保健研究所、岡山県環境保健センター、香川県衛生研究所、愛媛県立衛生環境研究所、大分県衛生環境研究セ

ンター、長崎県衛生公害研究所、沖縄県衛生環境研究所の 11 地方衛生研究所が参加して調査を実施した。昨年度の調査は主として高校、短大、大学等の青年層が中心であったが、今年度は小児から高齢層までの幅広い年齢層に調査の対象を広げて実施した。調査対象者に協力を求め、咽頭粘液を採取して調査材料とした。調査の対象菌種は、髄膜炎菌とともに比較する目的で細菌性髄膜炎の主要原因菌であるインフルエンザ菌を含む *Haemophilus* 属菌および肺炎球菌を含むレンサ球菌とした。

昨年と同様に咽頭粘液の採取に先立ち、研究の目的と得られたデータの扱いについて説明し、インフォームドコンセントとして協力が「調査協力承諾書」に署名したものを回収した。承諾書が得られた協力者から咽頭粘液を滅菌綿棒で採取した。髄膜炎菌の分離・同定は、今年度各ブロックで行なわれた研修会での方法に準じて行なわれた。

2) 呼吸器感染症患者保菌者調査 (分担：井上博雄、愛媛県立衛生環境研究所長)

神戸市環境保健研究所および大分県衛生環境研究センターでは、内科あるいは小児科を受診した呼吸器感染症患者の同意を得た上で、患者の鼻咽頭検体から髄膜炎菌の分離を試みた。これにより呼吸器感染症患者における髄膜炎菌の保有状況を調査し、潜在的な髄膜炎菌感染症患者の存在を探った。

2. 病態の分布等に関するアンケート調査 (分担：中島秀喜、聖マリアンナ医科大学微生物学教室教授)

昨年度末に患者の病態、病型の発生状況や分布を調査する目的で、救急告示病院で内科あるいは神経内科を設置する一般病床が 100 床以上の病院 (2,257 施設) に対し、細菌性髄膜炎患者および髄膜炎菌の検出状況をアンケートにより調査した。今年度はこのアンケートの集計を行った。

3. 髄膜炎菌感染症発生の要因に関する解析 (分担：山井志朗、神奈川県衛生研究所細菌病理部長)

髄膜炎菌感染症由来の分離保存株の中から患者家族由来株に注目し、患者由来株と家族由来株の血清群、serotype と serosubtype および薬剤感受性値を比較して患者発生と家族の菌保有との関係を調べた。

4. MLST 法を用いた網羅的な分子疫学的分類 (分担：渡辺治雄、国立感染症研究所細菌部長)

髄膜炎菌感染症に関する疫学調査、流行株の解析、健康者の保菌状況の解析等には疫学マーカーは不可欠である。髄膜炎菌の疫学マーカーには群別、Serotyping、Serosubtyping、Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE)、Multilocus Sequence Typing (MLST) が主として用いられている。本年度は、MLST に重点をおいて調査を行った。

昨年度は分子疫学的マーカーとして近年開発された MLST を導入し、解析システムの確立を図った。基準株と健康保菌者由来株を用い、MLST 解析のために設置されたホームページに記載されている方法に準じ、実施法を改良しながら行った。髄膜炎菌のハウスキーピング酵素に関与する 7 つの遺伝子座の特定の配列部分の配列を解析し、得られた結果をホームページ上のデータベースに入力すると該当する ST (シークエンスタイプ) が知られるようになっている。

今年度は、保存菌株の中の一部の株について MLST 解析を行い型別を行った。さらに MLST 解析のためのシークエンスを委託により行った。

5. 髄膜炎菌の薬剤感受性に関する検討 (分担：相楽裕子、横浜市立市民病院感染症部長、春田恒和、神戸市立中央市民病院)

昨年度に行った髄膜炎菌の薬剤感受性値の測定の結果では薬剤耐性菌や感受性低下株の存在が明らかとなった。そこで、今年度は血清群別、検出年代別および菌株由来別に感受性値の比較を行い、さらに髄膜炎菌感染症患者に対する抗生物質による治療法の検討を行った。

6. 髄膜炎菌の分類・鑑別に関する研究(分担: 渡辺治雄、国立感染症研究所細菌部長)

髄膜炎菌の分類あるいは鑑別に重要なポイントとなる γ -glutamyl aminopeptidase を産生しないために誤同定されてしまった株が保菌者調査で見出されたため、保存菌株 230 株中の同様の変異を有する菌株の存在を調べた。さらに、 γ -glutamyl aminopeptidase 関連遺伝子の変異を調べた。

7. 髄膜炎菌の国際間比較(分担: 永武毅、長崎大学熱帯医学研究所内科学教授)

急性呼吸器感染症の共同研究拠点として整備協力してきた世界各地の大学、研究施設を中心に髄膜炎菌サーベイランス事業の展開に着手した。タイ国において施設内流行や国境地帯での流行情報が得られているので小児を中心とする保菌状況の調査を行うよう計画した。

(倫理面への配慮)

本研究において、健康者および呼吸器感染症患者からの髄膜炎菌の分離を試みた。これらの調査の対象者に対して、咽頭粘液検体の採取時に研究の目的を明らかにし、研究協力に対する同意が得られた上で検体を採取した。調査への協力者の個人情報は一切外部に漏れることがないように厳重に扱った。さらに、呼吸器感染症患者の保菌調査では個人を特定できる情報は本研究には提供されていない。

菌株が由来する患者や保菌者について、個人が特定されるような情報は一切公表しないなど、対象者に不利益になるようなことがないように十分に配慮した。

C. 研究結果

1. 保菌者調査

1) 健康保菌者調査

対象者は学生が主体で他に職員、在住外国人、幼少児、高齢者であった。総数 2623 名(男 847、女 1392、不明 384)のうち青年層(16~30 歳) 1794 名(男 504、女 1108、不明 182)と 68% を占めた。神奈川の調査では青年層 609 名中 8 名、1.3%、愛媛の調査では青年層 473 名中 5

名、1.1%の保菌率であった。

集団別に見ると、A 大学 379 名中 4 名(1.1%)、B 大学 82 名中 4 名(4.9%)、M 大学生 161 名中 2 名(1.2%)と一つの集団内で複数の保菌者がいて同一集団内での感染伝播が示唆された。また、M 大学生の 1 人は中国人名であった。

幼少児は神奈川・山形、高齢者については愛媛・沖縄で調査されたが保菌者は見出されていない。

同時に検出を試みた *Haemophilus influenzae* および A 群、B 群、C 群、D 群、G 群あるいは F 群に属する *Streptococcus* sp の検出率はそれぞれ 0.9~21.3% と 0.9~20% であった。

2) 呼吸器感染症患者保菌者調査

神戸市および大分県において内科あるいは小児科を受診した患者から採取された 2,211 名の検体のうち救急外科病棟の 40 歳患者 1 名のみから髄膜炎菌が検出された。

2. アンケート調査

アンケートを依頼した 2257 施設のうち、627 施設より回答があった。過去 10 年間で 17 施設が髄膜炎菌感染症の患者を経験し、髄膜炎症状が 11 症例、敗血症・DIC 症状が 7 症例、呼吸器症状が 1 例であった。回収が終了した段階で集計する予定である。

3. 髄膜炎菌感染症発生の要因に関する解析

髄膜炎菌感染症の 89 症例のうち 15 症例において患者の家族から分離した髄膜炎菌株が保存されていた。このうち例由来の分離保存株の中から患者家族由来株に注目し、患者由来株と家族由来株の血清群、serotype および薬剤感受性値を比較して患者発生と家族の菌保有との関係を調べた。

4. MLST 法を用いた網羅的な分子疫学的分類

髄膜炎菌の MLST を決定するには、7 種のハウスキーピング酵素に関与する遺伝子の決められた部位の DNA 配列を決めなければならない。MLST の通常の方法でシーケンス解析のための鋳型を PCR で作製すると複数のバンドが得られることが明らかとなった。

そのため、PCRの条件を検討し、シークエンスに供与可能な精度の一本の明瞭な鋳型DNAの合成を可能にした。

MLSTの解析には多大な労力と時間を要するため、塩基配列の解析は業務委託した。今年度は塩基配列の解析を行い、来年度にかけて各菌株のMLSTの決定を順次行っていく予定である。

5. 髄膜炎菌の薬剤感受性に関する検討

PCG、ABPC、CEZおよびEMに対して感受性が低下しており、TCでは耐性株が見出された。第3世代セフェム系薬やニューキノロン系薬およびRFPに対しては感受性が高かった。以上のことからペニシリン系薬は第1選択薬として使用できるが、必要に応じて第3世代セフェム系薬が使用できる。

6. 髄膜炎菌の分類・鑑別に関する研究

保存菌株230株中4株において γ -glutamyl aminopeptidaseの活性が検出されなかった。このうち3株は生化学的性状のプロファイルから明らかに髄膜炎菌であった。関連遺伝子についてPCRによる増幅を試みたところ、2株はコントロールと同じ長さのバンドが観察されたことから点変異があることが推測された。また1株はバンドが観察されなかったことから、プライマー部分の点変異あるいは欠損変異があるものと思われた。

7. 髄膜炎菌の国際間比較（分担：永武毅、長崎大学熱帯医学研究所内科学教授）

バングラディッシュにおいて小児髄膜炎の実態、抗菌化学療法等について報告した。タイやベトナムでは菌株の収集を行った。トルコとウガンダでは検査態勢の整備を行った。

D. 考察

髄膜炎菌性髄膜炎は髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) を原因とする、主要な細菌性髄膜炎の一つであり、唯一集団発生あるいは流行性に発生する髄膜炎であることから流行性脳脊髄膜炎とも呼ばれている、ヒト固有の疾患で

ある。諸外国においては髄膜炎菌性髄膜炎は細菌性髄膜炎のなかでも発生率が最も高く、しかも致命率が高いために、特に小児における細菌性髄膜炎の原因として、臨床的にも公衆衛生的にも重要視されている。髄膜炎菌感染症の中でも侵襲性髄膜炎菌感染症は髄膜炎や敗血症を呈し、現在でも致命率は10~15%を越える場合がある。過去30年間の先進国における髄膜炎菌感染症の発生率 (incidence) はおよそ1-3/100,000であり、発展途上国では10-25/100,000である¹⁾。英国、フランスおよび米国においては近年でもそれぞれ年間1,100~1,500症例、300~400症例、2,400~3,000症例が報告され、致命率は10~15%、5~10%程度および10%に達している²⁻⁴⁾。一方、アフリカ中部地域は髄膜炎ベルトと呼ばれるように多数の患者が発生し、流行時には発生率は1,000/100,000に達するとされている¹⁾。世界中では年間約50万人が発病し、うち約5万人が死に至ると推定されている。近年では、A群髄膜炎菌によるパンデミックがアフリカを中心にして発生し、またC群による集団発生がカナダ、米国および欧州諸国等で発生している。英国では1999年にC群髄膜炎菌による大規模な集団発生があり、1,500人が発症して150人が犠牲になったと推定されてワクチンが導入され⁵⁾、現在も継続して接種が行われている。世界的にB群髄膜炎菌による散発的な症例がもっとも多いが、B群の流行株による集団発生もある。こうした事態に対して海外ではA群やC群髄膜炎菌を中心としたワクチンの開発が進められ、実用化されている。患者の治療にはペニシリンとクロラムフェニコールの併用や第3世代セフェム剤の投与が推奨されているが、世界的に耐性化の傾向がみられる¹⁾。

日本では1945年の4,384人をピークに年間1,000人を越える患者の報告があったが、その後1950~60年代に激減して現在に至っている。しかし、無症状の菌保有者や海外からの持ち込みによる潜在的な流行の発生の危険性が多く存在していることが予想される。また不確実な診断や検査体制の不備等により正確な情報が収集されないために患者数が把握されていない可能性があるためと推察される。髄膜炎菌を対象にした調査研究が国内ではほとんどなく、患者

発生やその病態、流行の有無、健康保菌者の割合等、その実態はまったく把握されていないため、包括的な研究が必要であった。

本研究は平成12年度から、検査法の標準化とその普及、および髄膜炎菌感染症の実態の把握を研究目的として進めている。平成12年度および平成13年度の2年間で、標準的な検査法の設定とそれに基づくマニュアルの作成、作成されたマニュアルを使用した地方衛生研究所の担当者に対する検査法の研修会の開催、研修会に参加した地方衛生研究所が参加した保菌者調査、薬剤耐性菌の存在を調べるための感受性値の測定、MLST等の疫学マーカーの解析、医療機関に対する病態分布解析のためのアンケート調査、薬剤感受性値の測定に基づく抗生物質による治療法の検討等を行ってきた。これらの研究活動および調査により、地方衛生研究所では髄膜炎菌検査法が普及し、またこれまで不明であったわが国における髄膜炎菌感染症の実態がかなり明らかになったと考えられる。

髄膜炎菌感染症は諸外国においては、開発途上国のみならず先進国であっても患者発生率および致死率が高く、臨床的にも公衆衛生的にも重要な感染症として扱われ、患者発生や流行株の解析などの監視体制とワクチンの導入等による予防体制の整備に力が注がれている。国内において発生する髄膜炎菌性髄膜炎の患者は1950～60年以降から激減しているが、諸外国では多数の患者が毎年のように発生していることもあり、海外に由来する流行株の持ち込みや1940年代以前のように再興することによる集団発生ないしは流行がわが国において起こる可能性を否定することはできない。あるいは患者発生に関する情報の不備等により現在の実情が把握されていない可能性が高い。したがって、わが国における監視体制の確立と強化が不可欠である。さらに、薬剤への耐性化に対しては耐性菌の出現を監視し、薬剤感受性調査の結果により治療方針を決定しなければならない。

本研究で実施した健康保菌者調査では、対象者を高校生、大学生など20歳前後の集団を中心に、幼児から高齢者までとした。昨年度と今年度の調査の結果では、諸外国に比べて健康者の髄膜炎菌保有率は非常に低い数値

であった。この違いの原因として、検出技術、国内における地域性、様々な環境（天候や衛生状態）や宿主（人種）の違い等が挙げられる。検出技術の問題については、研修会を開催した後に本研究班で検討した標準的な方法を用いて調査を実施しているため、不確実な検出法が用いられることはなく、実施機関における技術的な差も小さいと考えられる。国内における地域性について、たまたま保有率の低い地域が対象となった可能性もあるが、東北、関東、東海、四国および九州における6地域で調査を実施しており、十分に分散した地域で調査を実施したと考えられる。来年度以降、さらに協力機関と対象地域を増やして調査を実施することを検討している。諸外国との様々な環境や宿主であるヒトの違いは、その要因が多様であり、検討することは非常に難しい。

抗生物質の投与が髄膜炎菌保有率を諸外国と比較して極めて低くしている原因とも考えられる。しかし、これが原因であるとするれば抗生物質に暴露される機会が多いと想定され、それにより薬剤感受性が低下する傾向が見られるはずであるが、保存菌株の薬剤感受性値の測定では、検出年代別に見ても感受性が著しく低下した薬剤は見出すことができなかった。したがって、菌保有率が低いことと抗生物質の投与に関連性があるという結論に至ることは難しいように思われる。一方で、第3世代セフェム系薬剤のような薬剤耐性を獲得し難く感受性値が低下しにくい抗生物質が関与している可能性を否定することもできない。オランダからの報告では、特定の菌株により多数の患者が発生している地域において保菌者調査を行ったところ、保菌は家族の構成人数やディスコ等の人の密集する場所への出入りに関連していたとしている。しかし、抗生物質の使用とは関連がなかった⁶⁾。

健康保菌者の調査結果が全体としては0.3%と低いものであったが、特定の集団に限って見てみると必ずしも保有率が低いとはいえない数値であった。たとえば、T大学では学生82名を調査したところ4名から髄膜炎菌が検出され、菌保有率は5%であった。こうした特定の集団において髄膜炎菌が流行性

に発生することがあるとしても、菌保有率の高い集団を見つけ出すということは現実的ではなくほぼ不可能である。患者が発生した場合に患者の背景を十分に調査し、特定の集団に属していることがわかればその集団を対象にした調査を実施し、保有率が高く患者発生に何らかの関連性があると判断されれば除菌等の対策を取る必要があると考えられる。

わが国の集団における髄膜炎菌の保菌調査は数少なく、断片的に行われたに過ぎないために健康保菌者に関する情報は極めて乏しい。そのような中で、集団における保菌率と患者の発生の関連性を推測させる事例がある。1969年に神奈川県内の教育隊においてC群による患者が発生していたが、この集団における保菌率は30～70%であり、保菌者から分離された菌も60%がC群であった。一方、1971～77年にかけて神奈川県内の短大生および小学生を対象に行った保菌調査では、短大生の平均保菌率が7.2%、小学生が4.3%であった。この調査で分離された菌はB群と非凝集株であった。これらの集団では髄膜炎菌感染症患者は発生していなかった。昨年度の報告書でも言及したように、健康保菌者に対する除菌の有用性については様々な議論がなされている。ノルウェーでは一般的に保菌者に対する除菌は推奨されていないが、健康者が高率に流行株を保有している状況がある。本研究の健康保菌者調査においては髄膜炎菌を保有することが認められた健康者に対する除菌について、その正当性を検討する必要があった。今後も継続的に薬剤の選択や投与方法等について検討していくが、流行性の感染症の伝播を抑えるためには状況に応じて抗生物質による除菌を実施する必要があると考えられる。除菌の判断材料としては、MLSTにより流行株と判定された場合がある。このためにも迅速なMLST解析を可能とする菌株収集および解析システムの構築が強く望まれる。

患者家族由来菌株の解析の報告では、患者発生時における家族の髄膜炎菌保有を積極的に実施することが推奨されることを述べた。この調査では、15症例のうち9症例で患者由来株と患者家族由来株が同一であったことから、患者発生における家族の菌株保有が大き

く関わっている可能性が示唆された。諸外国においても、髄膜炎菌の伝播に患者家族が重要な役割を演じていることが論じられている。

髄膜炎菌感染症の予防策の策定やワクチンの導入の検討には、保菌者の状況に関する情報を欠かすことはできない。これまでに本研究班では、髄膜炎菌保菌者調査と患者家族由来髄膜炎菌株の解析を行ってきた。Tzanakaki et al⁷⁾が論じているように、患者から分離された髄膜炎菌株を解析しただけでは疾病の伝播に関する情報はあまり得られず、保菌者調査が伝播を理解するのに不可欠である。しかしながら、無作為に抽出した対象者について保菌調査を実施することは困難であり、得られる情報もあまり意味のないものであることが予想される。患者が発生した場合にその周辺を積極的に調査することで有意義で重要な情報が得られるものと考えられる。

医療機関に対する髄膜炎菌感染症の病態等に関するアンケート調査では、返送された607施設のうち261施設が髄膜炎菌感染症患者を経験していた。症状の内訳は髄膜炎が84症例、敗血症・DICが15症例、呼吸器症状が3症例、その他が1症例であった。これは髄膜炎菌感染症の症状として髄膜炎と敗血症・DICがおよそ6：1の割合で見られたことになる。また髄膜炎菌が分離された部位は髄液が101症例、血液が23症例、その他が90症例であった。このようにわが国においても髄膜炎菌により髄膜炎のみならず敗血症が比較的高い割合で症状として顕れていることが明らかとなった。侵襲性髄膜炎菌感染症(invasive meningococcal infection)ではその症状として大まかに次の4つが挙げられている¹⁾。すなわち、①ショックを伴わない菌血症、②髄膜炎を伴わないがショックを伴う菌血症(例、劇症型髄膜炎菌性敗血症: fulminant meningococcal sepsis)、③ショックと髄膜炎、④髄膜炎のみ、である。侵襲性髄膜炎菌感染症であれば、髄膜炎菌が検出された部位が髄液であれ血液であれ、あるいは症状が髄膜炎であれ敗血症であれ、致命率はほぼ同じでいずれも高い値を示すとされている。

髄膜炎菌感染症の治療には、ペニシリンと

クロラムフェニコールとの併用、第3世代セフェム系薬剤、第3世代セフェム系薬剤とアンピシリンの併用が一般的であり、予防投薬としてリファンピシン、ミノサイクリンあるいは第3世代セフェム系薬剤の使用が勧められている⁸⁾。国内で分離された166株の薬剤感受性測定では、PCG、ABPC、CEZおよびEMに対して感受性が低下しており、TCに対して7株が耐性で、うち3株は高度耐性であった。髄膜炎菌性髄膜炎の治療には、感受性が低下した髄膜炎菌が検出されているが、ペニシリン系薬剤を第一選択薬とし、ペニシリンアレルギーを有する症例やペニシリン系薬剤で初期治療に失敗した場合には第3世代セフェム薬を選択薬とすることができる。保菌者に対する除菌の選択薬としては成人ではフルオロキノロン薬、小児ではRFPを投与すれば、高い除菌率を期待できる。

侵襲性髄膜炎菌感染症は極めて急速に進行して致命率も高いため、抗生物質の選択が救命の重要な鍵を握っている。薬剤の選択を慎重に行う必要があるとともに、耐性菌の出現や感受性値の動向を常に監視し、正しい情報を提供することが極めて重要である。治療における抗生物質の選択を誤ると患者は非常に危険な状態に陥ることが予想される。

Tzanakaki et al⁷⁾が述べているように髄膜炎菌感染症の発生を疫学的に解析するにはserotypeとserosubtypeによる解析の結果は十分に流行を反映しているとはいえず、MLEEやMLSTが適している。さらにserotypeとserosubtypeに用いられるモノクローナル抗体は一部市販されているものもあるが、多くは全世界の複数の研究者により維持され、好意により配付されているに過ぎない。またタイプによっては既に供給されていない抗体もある。そのためserotypeとserosubtypeを恒久的に利用することは難しい状況である。

MLEEはアイソエンザイムの泳動パターンにより型別する方法であるが、髄膜炎菌が本来有している8種のハウスキーピング酵素を解析するため、試薬が確保されれば安定的に実施することが可能である。しかし、8種の酵素を泳動しなければならず、その実施は非常に煩雑である。MLSTの利点は、DNAの配列に基づいて

型別されるためにその結果は安定していることである。しかし、1菌株について7遺伝子を解析しなければならないため多くの試薬を必要とする、したがって多くの予算を必要とする、DNA配列の決定に労力を要するなどの問題点もある。

本研究班では、以上の問題点等を検討してMLSTの導入を強力に行った。髄膜炎菌1株について7遺伝子を解析するため、収集・保存株の解析には多くの時間と労力を必要とする。研究班という限られた労力と時間の中で多数の菌株についてMLSTを解析することは非常に困難であったため、DNA配列の解析を業者に委託した。これにより送られてきたデータに基づいてDNA配列を決定する作業を進めている。

髄膜炎菌が患者から分離され、詳細に同定・鑑別が行われる場合には生化学的性状を調べて確定される。この場合、菌が持つ酵素プロファイルを利用した鑑別法が普及している。髄膜炎菌では γ -glutamyl aminopeptidaseの存在を確認する方法が確実な方法として用いられている。しかし、研究班で収集した菌株の中にこの酵素の活性が観察されない菌株が見出され、急速保存株中の本酵素活性欠損株の調査を行った。調査した200株中3株が活性が見られなかった。本酵素の活性は髄膜炎菌の鑑別法として信頼性の高いものとされている。今回の調査で酵素活性の見られない菌株が2%に見出されたことで、病原性*Neisseria*属菌の同定・鑑別を酵素プロファイルを用いて行う場合には髄膜炎菌を後同定する可能性が小さいながらもあることを示唆している。この点に注意しなければならないことは情報として還元する必要がある。

髄膜炎菌感染症のわが国における実態を詳細に解析し、髄膜炎菌保有率が低い原因等を解明するには、諸外国の状況と比較することが極めて重要である。今年度はアジア諸国およびアフリカに位置するウガンダとの共同研究の準備を行った。これらの国々での事態を調査しながら、わが国の実態と比較してその原因を解明することで髄膜炎菌感染症の予防に貢献することが期待される。

髄膜炎菌感染症の予防や治療方針の決定に

は菌株の収集は極めて重要である。髄膜炎菌感染症の対策という点からすれば幸いにして、髄膜炎菌はヒトのみに感染して病原性を発現して髄膜炎や敗血症等の症状を引き起こす病原体である。したがって、髄膜炎菌感染症の監視や予防対策はヒトのみを対象に行なえば充分である。髄膜炎菌性髄膜炎は感染症法では4類感染症（全数把握）に規定されている。現行の感染症発生動向調査事業では、4類感染症（全数把握）は診断した医療機関は1週間以内に保健所に報告することが定められている。しかし、報告は患者情報に限られており、菌株の取り扱いについては何も規定されていない。患者情報だけでは患者数が数値として把握されるに過ぎず、髄膜炎菌感染症の流行を正確に把握することは非常に難しい。また、薬剤感受性の動向や耐性菌の出現はまったく感知できない。医療機関の協力と保健所や地方衛生研究所との連携により菌株を収集し、疫学マーカーや薬剤感受性を解析することは、髄膜炎菌感染症の流行を把握し、あるいは耐性菌の出現を監視するために不可欠である。今後、菌株収集およびそれらを解析するシステムが構築されることが強く望まれる。

髄膜炎菌感染症は諸外国においては流行性に患者が発生していることが報告されており、対策としてワクチンの導入が図られている国もある。現在使用されているワクチンの効果は、使用する菌株に依存しており、流行の原因となっている株を使用しなければ効果がないとされている。このことはあらかじめ流行を予測してワクチンを導入しても患者発生を防ぐ効果は期待できないことを意味している。患者の発生状況に合わせてワクチンの導入を検討し、ワクチン製造のために原因菌株を確保し、ワクチンを製造しなければならない。わが国において特定の流行株により髄膜炎菌感染症患者が流行性に発生した場合に、既にワクチンを製造・貯蔵している国から緊急にワクチンを輸入しても同一流行株による流行でない限り、効果は小さいか、無いと考えられる。

E. 結論

本研究は標準的な検査方法を設定してその普及を図り、よって監視態勢並びにより一層正確な情報の収集が可能となる態勢とレファレンス機能の強化を導き、また流行発生の実態や薬剤耐性株の出現、保菌率の把握、患者の病態の分布の把握等、髄膜炎菌感染症の実態を把握して、感染症予防のための施策を策定するのに必要な情報を提供することを目的としている。そこで、平成12年度から平成13年度にかけて、標準的な検査方法の設定とマニュアルの作成、地方衛生研究所への検査法の普及による検査態勢の確立、髄膜炎菌感染症の検査法並びに検査室レベルの診断法の検討、型別法の導入、分離菌株の薬剤感受性測定、患者の病態の分布の把握、保菌者の実態の把握を行った。これらの研究内容と本研究の目的並びに期待される成果との関係を図1に示した。

今回の健康保菌者の調査では、健康者における保菌率は非常に低かった。しかし、集団によっては保菌率が約5%という結果が得られ、特定の集団において髄膜炎菌の保有率が高いことがあり、髄膜炎菌感染症の伝播にこのような集団が関与していることがあるものを窺わせた。また、患者家族から患者由来株と同一の株が分離される症例が多いことが明らかとなった。これは髄膜炎菌の保有率が高い集団が存在し、あるいは患者家族は原因菌を保有している可能性が高いことが患者発生に何らかの関連性があることを示唆している。このことは髄膜炎菌感染症の予防対策を策定する上で重要な情報となるものと考えられる。

今年度の保菌者調査は全国の11地方衛生研究所が協力して調査を実施したことで、より多くの地域での保有状況が検討できた。今後は、健康者から検出された菌株が流行株であるか否かを解析するために型別を行い、髄膜炎菌感染症の発症と健康保菌者の関連性について調査を進めることが必要であり、来年度に検討していかなければならない。

地方衛生研究所は感染症の原因病原体の疫学的解析を業務とし、調査研究機関、レファレンス機関および研修機関としての役割を果

たしており、検査態勢の確立は髄膜炎菌感染症発生の監視を強化するには不可欠である。監視態勢や情報収集態勢は、今後の髄膜炎菌感染症の発生の実態の把握や予防対策等の策定のために中・長期的に維持・継続されなければならない。

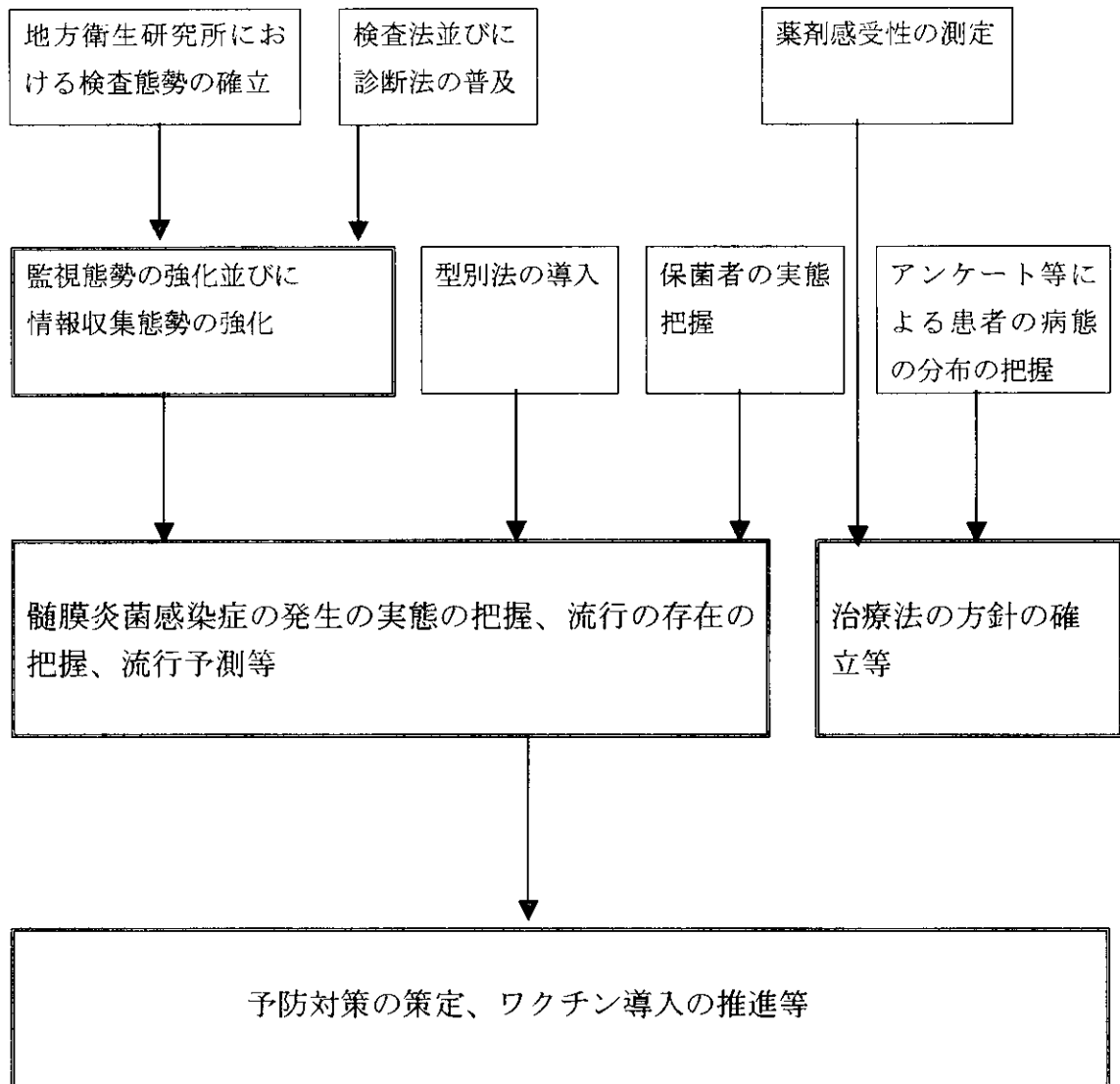
今年度は型別法として MLST に主眼を置き、多数の菌株を解析するために業者へ委託した。これにより分離菌株を解析し、流行株等の存在を把握することが可能となった。海外からの流行株の持ち込みや国内に既に存在している流行株による流行の発生を迅速に把握するためにも、臨床分離株や健康保菌者由来株の解析を行って流行株の分離状況や由来による型の違い等を解析し、流行の把握や予測を継続的に実施することが強く望まれる。

今年度の研究成果から次のような課題が生じた。すなわち、1) 髄膜炎菌感染症患者の病態の分布と髄膜炎菌性髄膜炎の報告基準、2) ワクチン導入の検討に必要な監視態勢の組織と機能、導入を決定するためのクライテリアの設定である。これらの課題について、来年度に詳細な検討を行う予定である。

F. 参考文献

1. Van Deuren, M., Brandtzaeng, P. and Van der Meer, J.W.M.: Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin. Microbiol. Reviews*, 13: 144-166; 2000.
2. Ramsay, M., Collins, M., Rush, M. and Kaczmarek, E.: The epidemiology of meningococcal disease in England and Wales, 1996 and 1997. *Eurosurveillance* 2:74-75; 1997.
3. Hubert, B., Goulet, V. and Riou, J.Y.: Surveillance of meningococcal disease in France, 1990-1997. *Eurosurveillance* 2:78-79; 1997.
4. Advisory committee on immunization practices : Prevention and control of meningococcal disease, and meningococcal disease and college students. Recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR RR-7*: 1-22; 2000.
5. Public Health Laboratory Service: The impact of conjugate group C meningococcal vaccination. *Commun. Dis. Rep. CDR Wkly*. 11:2; 2001.
6. Conyn-van Spaendonck, M.A., Reintjes, R., Spanjaard, L., van Kregten, E., Kraaijeveld, A.G. and Jacobs, P.H.: Meningococcal carriage in relation to an outbreak of invasive disease due to *Neisseria meningitidis* serogroup C in the Netherlands. *J. Infect.* 39:42-48; 1999.
7. Tzanakaki, G., Urwin, R., Musilek, M., et al : Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. *J. Clin. Microbiol.* 39:1235-1240; 2001.
8. 永武毅：髄膜炎菌性髄膜炎，感染症の診断・治療ガイドライン 生涯教育シリーズ51，日本医師会雑誌臨時増刊号，感染症の診断・治療研究会編，日本医師会，130-133；1999.

図1 研究の内容とそれにより導かれることが期待される成果並びに方向性の関係



□ : 研究の内容

□ : 期待される成果、方向性

平成13年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

髄膜炎菌性髄膜炎検査法の発生動向調査及び検出方法の研究

分担研究報告書

髄膜炎菌の保菌者調査

分担研究者 井上 博雄 愛媛県立衛生環境研究所長

研究要旨

昨年度に引き続き、髄膜炎菌検査法の普及拡大と監視体制の強化を図るため、多くの地研に当研究班への協力参加を呼びかけ、今年度は11地研の参加を得、調査集団対象への趣旨の周知とインフォームド・コンセントを徹底し、調査した。健常者の咽頭ぬぐい液での保菌者検出状況は、調査を行った青年層では神奈川13%、愛媛1.1%の保菌率であったが7地研では保菌者は見出されていない。学生集団で複数の保菌者がいてその集団内で感染伝播が繰り返されていることが示唆された。又、幼少児や高齢者には現在のところ、保菌者は見出されていない。また、インフルエンザ菌は5.1%、溶連菌は9.2%であった。

A. 研究目的

髄膜炎菌性髄膜炎は感染症法4類全数報告であり、その発生状況は毎年10例前後である。また、昨年度の調査で青年層の健康保菌者の存在が確認されている。さらに諸外国では多数の患者発生があり、海外に由来する流行株の持ち込みなどによる不測の集団発生や流行の可能性がある。しかし、わが国における髄膜炎菌感染の現状把握は不十分であり、特に細菌学的監視体制の強化が求められている。

本研究では昨年度に引き続き、検査法の普及を図るとともに特に健康保菌者の実態把握を行い、流行予防に資することを目的とする。

B. 研究方法

今年度は山形県衛生研究所、福島県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、石川県保健環境センター、神戸市環境保健研究所、岡山県環境保健センター、香川県衛生研究所、愛媛県立衛生環

境研究所、大分県衛生環境研究センター、長崎県衛生公害研究所、沖縄県衛生環境研究所の11地研の参加協力を得て、調査した。調査対象者への趣旨の周知とインフォームド・コンセント及び検査方法は昨年度の報告書に記した通りである。

各地研で行った検査対象、検体、検体採取から培地塗布までの時間は表1に示す。10地研では健常者での集団調査、2地研で患者調査を行っている。検体は咽頭ぬぐい液で塗布までの時間には若干のばらつきはあり、1地研では綿棒の凍結保存後の培養を行っていた。

（倫理面への配慮）

昨年度同様、趣旨の周知とインフォームド・コンセントの徹底を図った。

C. 研究結果

1. 健常者からの髄膜炎菌分離結果

表1に示すように対象者は学生（専門学校生、短大生、大学生など）が主体で他に職員、在住外国人、幼少児（幼稚園児な

ど)、高齢者(高齢者大学生、老人クラブ、老健施設入所者など)であった。その結果は表2に示す。神奈川、愛媛の調査で保菌者が見出されているが他の8地研ではなかった。総数2623名(男847、女1392、不明384)、そのうち青年層(16~30歳)1794名(男504、女1108、不明182)と68%を占めている。神奈川の調査では青年層609名中8名、1.3%、愛媛の調査では青年層473名中5名、1.1%の保菌率であった。

その内訳を調査集団ごとに示した結果を表3に示す。神奈川でのS大学生379名中4名(1.1%)、T大学生82名中4名

(4.9%)、愛媛でのM大学生161名中2名(1.2%)と一つの集団内で複数の保菌者がいて同一集団内での感染伝播が示唆される。また、M大学生の一人は中国人名であった。そこで県国際交流センターでの日本語研修に通う外国人12ヶ国36名の調査を行い、在住1年の26歳中国人男性から1株分離された。

幼少児、高齢者の調査結果は表2に示す。幼少児は神奈川・山形、高齢者については愛媛・沖縄で調査されたが保菌者は見出されていない。

2. *Neisseria* 属菌分離状況

表4に示すように、髄膜炎菌の他に *N.lactamica*1株、*N.subflava*17株、*N.spp*(同定未定)3株が分離されている。特に *N.subflava* は愛媛のI短大生140名中4名(2.9%)、高齢者大学生92名中7名(7.6%)、岡山の看護学生30名中2名(6.7%)であり、集団内での感染伝播がうかがえる。

3. 臨床検体からの分離結果

神戸、大分では咽頭ぬぐい液(粘液)の臨床検体から髄膜炎菌の分離が試みられ、表5に示すように2211検体中救急外科病棟の40歳患者1名(外国人名)から分離されている。

4. 健常者からのインフルエンザ菌、溶連菌分離結果

表6にインフルエンザ菌、表7に溶連菌の分離結果を示す。インフルエンザ菌については9地研で調査され、8地研で分離され地研ごとで0.9~21.3%の幅があり、全体で1989名中102名5.1%であった。神奈川、山形で幼少児に高率の傾向がある。溶

連菌については8地研で調査され、地研ごとに0.9%~20%の幅があるものの5地研は9.3%~13.3%に集中している。全体で1801名中165名9.2%であった。

D. 考察

今年度は11地研の参加協力を得て、主に健常者の保菌状態を調査した。昨年度同様、調査対象者には当調査研究の趣旨を周知し、インフォームド・コンセントの徹底に努めた。髄膜炎菌の調査では青年層で神奈川1.3%、愛媛1.1%であり、他の8地研では分離されなかった。神奈川の医大生で379名中4名(1.1%)、獣医学生82名中4名(4.9%)、愛媛M大学生161名中2名(1.2%)と特定学生集団で複数の保菌者がいることから時間空間を共有する集団内でひとたび保菌者が導入されるとその親密度、接触度に応じて感染伝播が繰り返されていることが推察された。7地研の青年層の調査で保菌者が見出されていないが、多数の集団を調査する等、調査対象の課題と検体採取から菌同定に至る技術的課題が提示される。当研究班の目的として技術の普及拡大を図るとともに精度管理システムの確立が望まれる。なお神奈川の幼少児(幼稚園児など)163名、愛媛の高齢者146名には保菌者は見出されていない。髄膜炎菌以外の *Neisseria* 属菌では *N.subflava* が広く侵淫していることが推察された。また、救急外科病棟の40歳患者1名(外国人名)の咽頭粘液から髄膜炎菌1株が分離されている。

インフルエンザ菌の調査では分離率が地研間で開きが大きいと全体で5.1%、幼少児で高い傾向にあった。溶連菌の分離率は昨年度同様、多くは10%前後であり、全体で9.2%であった。

E. 結論

1. 髄膜炎菌検査法の普及と細菌学的監視体制の強化を図り、今年度は11地研の協力参加を得て、調査対象者への当調査研究の趣旨の周知とインフォームド・コンセントの徹底の上調査した。検査法の普及拡大を図りつつ、精度管理体制の確立が望まれた。

2. 髄膜炎菌の健常者調査では青年層で1.1%~1.3%の保菌者がいた。特定の調査集団では複数の保菌者がいて、最高4.9%に達した。時間、空間を共有する集団内で感染伝播が繰り返されていることがうかがえた。この現象は広く侵淫していた *N.subflava* でも高齢者集団も含め観察された。なお、髄膜炎菌

は幼少児、高齢者両集団からは分離されていない。

3. 咽頭粘膜の臨床検体からも年間 2,211 検体中救急外科病棟の 40 歳患者 1 名（外国人名）から分離された。

4. 健常者でインフルエンザ菌は 5.1%、溶連菌は 9.2%の保菌率であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文、学会発表なし

協力研究者

山形県衛生研究所	大谷勝美
福島県衛生研究所	長沢正秋
神奈川県衛生研究所	黒木俊郎
石川県保健環境センター	芹川俊彦
神戸市環境保健研究所	村瀬 稔
岡山県環境保健センター	中嶋 洋
香川県衛生研究所	砂原千寿子
大分県衛生環境研究センター	帆足喜久雄
長崎県衛生公害研究所	山口仁孝
沖縄県衛生環境研究所	久高 潤
愛媛県衛生環境研究所	田中 博
国立感染症研究所	高橋英之

表1 各地研での検査対象・方法

地 研	対 象	検 体	塗布までの時間
山形	健常者(小児、成人)	咽頭ぬぐい液(両面)	2~4時間
福島	健常者 集団(学生)	咽頭ぬぐい液(両面)	20~90分
神奈川	健常者(幼稚園、大学生、県職員)	咽頭ぬぐい液(両面)	30~180分
石川	健常者(専門学校生)	咽頭ぬぐい液(両面)	10~60分
神戸	患者	咽頭粘液	
岡山	健常者 集団(専門学校生)	咽頭ぬぐい液(両面)	60分以内
香川	健常者(短大生)	咽頭ぬぐい液(両面)	5~30分
愛媛	健常者(専門学校生、短大生、大学生、 高齢者大学、老人クラブ、在住外国人)	咽頭ぬぐい液(両面)	120分以内
大分	健常者(専門学校生) 患者		
長崎	健常者(大学生、公務員)	咽頭ぬぐい液(片面)	綿棒を冷蔵保存、2時間以内に-80℃、2週間以内に塗布
沖縄	健常者(老健施設入所者、デイケア通所者)	咽頭ぬぐい液(両面)	2~6時間

表2 健常者からの髄膜炎菌分離結果

	年齢	男		女		合計	
		N数	分離数	N数	分離数	N数	分離数
神奈川	～5	65	0	71	0	136	0
	～10	15	0	12	0	27	0
	～15						
	～20	93	1	177	1	270	2(0.7)
	～30	167	5	172	1	339	6(1.8)
	31～60	3	0	7	0	10	0
	不明	61	0	2	0	63	0
	合計	404	6(1.5)	441	2(0.5)	845	8(0.9)
福島	16～20	16	0	59	0	75	0
	21～30	8	0	22	0	30	0
	31～60	3	0	4	0	7	0
	合計	27	0	85	0	112	0
石川	16～20	5	0	47	0	52	0
	21～30	13	0	98	0	111	0
	31～60	4	0	21	0	25	0
	合計	22	0	166	0	188	0
香川	16～20	1	0	50	0	51	0
	21～30	2	0	17	0	19	0
	31～60	4	0	1	0	5	0
	合計	7	0	68	0	75	0
愛媛	16～20	98	1	232	1	330	2
	21～30	61	3	69	0	143◇	3
	31～60			2	0	15◇	0
	61以上	75	0	71	0	146	0
	合計	234	4(1.7)	374	1(0.3)	634◇	5(0.8)
長崎	16～20	17	0	76	0	93	0
	21～30	26	0	64	0	90	0
	31～60	91	0	50	0	141	0
	61以上	2	0			2	0
	合計	136	0	190	0	326	0

山形		
年齢	N数	分離数
～5	34	0
～10	5	0
～15	35	0
～19	46	0
～29	23	0
～39	26	0
～49	27	0
～59	27	0
60以上	22	0
合計	245	0

岡山: 年齢21～29他, 女30人
分離 0

大分: 年齢19～21, 113人
分離 0

沖縄: 年齢61以上55人(男17,女38)
分離 0

総計 2,623 分離 12(0.5)
男 847 9(1.1)
女 1,392 3(0.2)
不明 384

16～30歳
総計 1,794 分離 12(0.7)
男 504 9(1.8)
女 1,108 3(0.3)
不明 182
神奈川 609 8(1.3)
愛媛 473 5(1.1)

(%)
◇性別不明を含む

表3 髄膜炎菌分離調査集団での結果

地 研	調査集団	年齢	男		女		合計	
			N数	分離数	N数	分離数	N数	分離数
神奈川	S大学生	15~20	86	0	57	0	143	0
		21~30	145	3	86	1	231	4
		不明	3	0	2	0	5	0
		合計	234	3(1.3)	145	1(0.7)	379	4(1.1)
	T大学生	15~20	2	1	1	1	3	2
		21~30	21	2	55	0	76	2
		31以上	1	0	2	0	3	0
合計	24	3(12.5)	58	1(1.7)	82	4(4.9)		
小計	258	6(2.3)	203	2(1.0)	461	8(1.7)		
愛媛	M大学生	15~20	56	1	46	0	102	1
		21~30	20	1*	39	0	59	1
		合計	76	2	85	0	161	2(1.2)
	I短大生	15~20	10	0	118	0	128	0
		21~30	4	1	8	0	12	1
		合計	14	1	126	0	140	1(0.7)
	S専門学生	15~20	6	0	48	1	54	1
		21~30	1	0	4	0	5	0
		合計	7	0	52	1	59	1(1.7)
	在住外国人※ 国際交流セ ンター利用者	15~20	1	0	2	0	3	0
		21~30	2	1**	3	0	18◇	1
		31以上			2	0	15◇	0
		合計	3	1	7	0	36◇	1(2.8)
小計	100	4(4.0)	270	1(0.4)	396	5(1.3)		

*: 中国人名 **: 中国人, 26歳男在住1年 ◇: 性別不明を含む (%)
 ※: 中国10, アメリカ5, イギリス5, カナダ4, ニュージーランド3, アイルランド・ブラジル各2,
 アルゼンチン・フィリピン・ラオス・マラケシ・LAO各1 全12ヶ国

表4 Neisseria属菌分離状況

地研	調査集団	年齢	N数	男	N数	女	
愛媛	M大学生	16~30	76	N.meningitidis 2 (Variant 1)	85	0	
	I短大生	16~30	14	N.meningitidis 1	126	N.subflava 4	
	S専門学生	16~30	7	N.subflava 1	52	N.meningitidis 1 N.lactamica 1 N.subflava 1	
	医学生	16~30	59	0	33	N.subflava 1	
	在住外国人	16~40	3	N.meningitidis 1 N.subflava 1	7	0	性別不明 26人中0
	高齢者大学	61~80	39	N.subflava 2	53	N.subflava 5	
	M町老人会	61~80歳代	36	0	18	0	
小計	N.meningitidis	16~40	159	4(2.5)	303	1(0.3)	
	N.lactamica	16~40	159	0	303	1(0.3)	
	N.subflava	16~40	159	2(1.3)	303	6(2.0)	8/488(1.6)
		61~80歳代 全年齢	75 234	2(2.7) 4(1.7)	71 374	5(7.0) 11(2.9)	11/634(1.7)
岡山	看護学生	16~29,43			30	N.subflava 2 N.spp. 3	(%)

表5 臨床検体からの分離結果

地研	検体	検査数	分離数	診療科	病名	患者年齢
神戸	咽頭粘液	2,118	1	救急外科		40 (外国人名)
大分	咽頭ぬぐい液	93	0 インフルエンザ菌 1 溶連菌 6	小児科	上気道炎	小児