

水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究

ムンプスウイルスのラット脳内接種試験

主任責任者 岡部信彦（国立感染症研究所感染症情報センター）

研究協力者 斉加志津子、一戸貞人（千葉県衛生研究所感染症学研究室）

研究要旨 ムンプスワクチンにより無菌性髄膜炎が1000人に1例程度の頻度でおきることが知られている。より安全なワクチンを供給するためには、ワクチンの持つ神経病原性を検出できる動物モデルが必要である。哺乳ラットの脳内接種試験を行ったところ、臨床的に無菌性髄膜炎発生頻度が低いと評価されている Jeryl Lynn 株ではラットに水頭症を起こさなかったが、日本のワクチン株は全てラットに水頭症を起こし、側脳室の拡張率は、Jeryl Lynn 株に対して日本のワクチン5株は全て有意に大きい値を示した。ワクチン株の持つ神経病原性を検出しうる可能が示唆された。

A. 目的

ムンプスワクチンは、主に麻疹、風疹、ムンプスワクチンが混合されたMMRワクチンとして世界で広く使用されており、1回または2回接種されている。一度で3種類の予防接種が可能なMMRワクチンは、麻疹、ムンプス、風疹の3疾患の制圧に大きく寄与するとともに、予防接種する側、される側双方にとって経済的、肉体的負担の軽減となっている。日本でも1998年よりMMRワクチンが導入されたが、その後MMRワクチンに含まれていたムンプスワクチンによる無菌性髄膜炎が高頻度に発生することが報告され¹⁾²⁾、1993年MMRワクチンは中止された。より安全なムンプスワクチンを供給しMMRワクチンを復活するためにはムンプスワクチン株の安全性を確認できる動物モデルの確立が必要不可欠である。

最近、ムンプスウイルスの神経病原性を評価する有望な動物モデルとして、ラット³⁾及びマーモセット科サル⁴⁾を使う試験が報告されている。ヒトに近縁なサルで得られるデータはヒトでの病原性解明において有用性が高いが、価格が高く取り扱いが容易でない難点がある。一方、ラットは経済性及び飼育取り扱い上優れた実験動物である。この動物モデルの有用

性を検証する。

B. 材料と方法

1) ウイルス株

埼玉県の耳下腺炎患者から分離された Y7 株（1993 年）、千葉県の耳下腺炎患者から分離された K3 株（1993 年）及び秋田県の無菌性髄膜炎患者から分離された大館株（1993 年）（秋田県衛生研究所より分与）を野外分離株として用いた。

ワクチン株として、Jeryl Lynn(JL)株（メルク）、占部株（阪大微研）、鳥居株（武田薬品）、星野株（北研）、宮原株（化血研）、NK-M46 株（千葉血清）を用いた。ワクチン株は市販品を CE 細胞で 1 代継代し用いた。

2) ラット接種

生後24時間以内のルイスラット(LEW/sea)を用いた。10^{3.7}PFU/mlのウイルス液を0.02ml(10^{2.0}PFU/匹)脳内に接種した。対照としてウイルス希釈液を同様に接種した。接種4週後に脳を採取しホルマリン固定し、定法に従いHE病理標本を作成し、脳全体(小脳を除く)に対する側脳室の面積の割合(側脳室率)を求めた³⁾。

3) 統計解析

Dunnnett 検定により株間の側脳室率の比較を行った。p 値が 0.05 未満の場合を統計学的に有

意とみなした。

C. 結果

対照ラットと比較して JL 株を接種されたラットには側脳室拡大が認められなかったが、それ以外の野外株及びワクチン株を接種された全てのラットに脳室拡張が認められた。(図1)。それぞれの株の側脳室率を図2に示した。野外株の側脳室率は 32.3～46.2 であった。ワクチン株では JL 株が 0.0 であったのに対して、他の日本のワクチン株は 16.0～40.7 であった。Dunnett 検定により JL 株と他の野外株及びワクチン株間にはそれぞれ統計学的有意差が認められた(表1)。

D. 考察

ムンプスウイルスの神経病原性を評価する動物モデルを確立することは、安全性のより高いワクチンを供給し、ワクチンの接種率を高めるためには重要なことである。Rubin S et al.³⁾は哺乳ラット脳内接種により生じる水頭症の程度がヒトにおける神経病原性を反映していると報告している。そこで、野外分離株 3 株、JL 株及び日本のワクチン5株について哺乳ラット脳内接種試験を行った。その結果、世界中で広く使用され、その中枢神経系合併症が少ないと評価されている JL 株に較べて日本のワクチン株 5 株は、ラットにおいて脳室拡大を引き起こし、神経病原性が高いと考えられた。今回の試験は予備的試験ではあるが、哺乳ラットを用いてワクチン株の持つ神経病原性を検出できる可能性を示唆するものである。今後水頭症の程度に加えて、脳内ウイルス量、病理変化等についても時間経過を追って調べ、ムンプスウイルスのラットにおける神経病原性を評価する予定である。

参考文献

1) Sugiura, A. & Yamada, A. (1991). Aseptic meningitis as a complication of mumps vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 10, 209-213

2) Fujinaga, T., Motegi, Y., Tamura, H & Kuroume, T. (1991). A prefecture-wide survey of mumps meningitis associated with measles, mumps and rubella vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 10, 204-209.

3) Rubin, S.A., Pletnikov, M., Taffs, R., Snoy, P.J., Kobasa, D., Brown, E.G, Wright, K.E. & Cabone, K.M. (2000). Evaluation of a neonatal rat model for prediction of mumps virus neurovirulence in humans. *J Virol* 74, 5382-5384.

4) Saika, S., Kidokoro, M., Ohkawa, T., Aoki, A. & Suzuki, K. (2002). Pathogenesis of mumps virus in the marmoset. *J Med Virol* 66, 115-122

E. 結論

哺乳ラット脳内接種試験により、ワクチン株の持つ神経病原性が検出できる可能性が示唆された。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

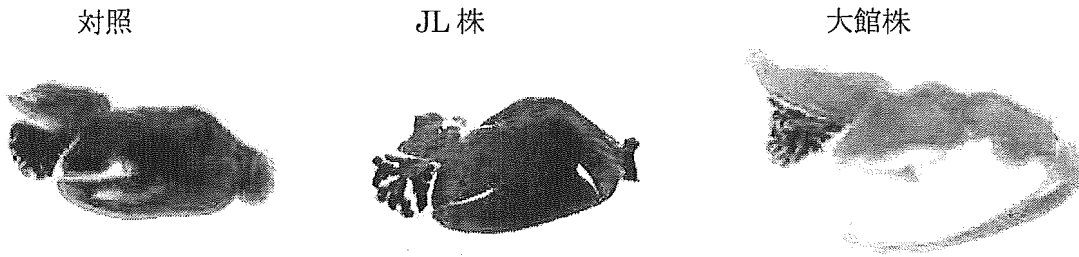


図1 ムンプスウイルス接種4週後のラット脳病理標本

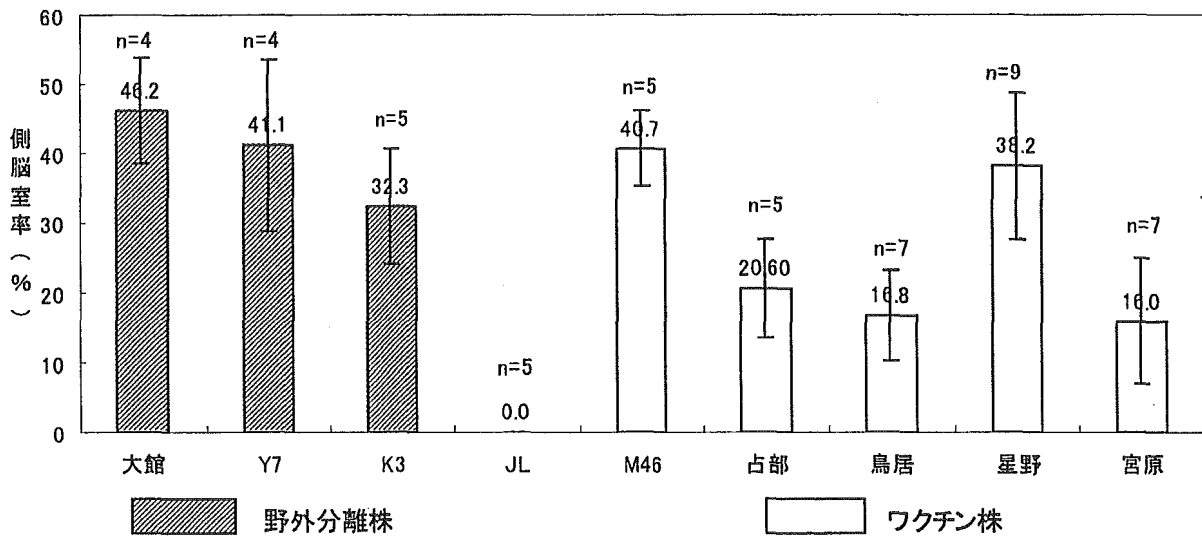


図2 ムンプスウイルス接種4週後のラット側脳室率の平均値とその95%信頼区間

表1 Dunnett検定による側脳室率の株間の比較 (対照グループはJL株)

ウイルス株		有意確率
野外株	大館 vs JL	0.000*
	Y7 vs JL	0.000*
	K3 vs JL	0.000*
ワクチン株	NK-M46 vs JL	0.000*
	占部 vs JL	0.004*
	鳥居 vs JL	0.013*
	星野 vs JL	0.000*
	宮原 vs JL	0.016*

* p<0.05

近年ムンプスウイルスの国内分離状況とその性状

加藤 篤、久保田 耐、田代真人(国立感染症研究所・ウイルス第三部)

研究要旨 2000 後半から 2002 前半にかけて流行性耳下腺炎(おたふくかぜ)の全国的に大きな流行が起きた。1981 年に国産弱毒生おたふくかぜワクチンが開発、使用される以前には、3-4 年周期でおたふくかぜの流行が起きていたが、ワクチンの普及につれてその規模も小さくなっており、大規模な流行は久しく見られなかった。各地の衛生研究所の協力を得てムンプスウイルス分離株を収集し、その遺伝子型別を行うことにより、どのような株が国内で流行しているのかを確かめるために現行ワクチン株との比較を行ったところ、新しい遺伝子型のウイルスであることは判明した。中和抗原を担う HN 遺伝子の配列にも変化が見られ、抗原性の変化が予見されたが、試した範囲では抗ワクチンウイルス抗体で新型株は従来型と同様に中和されワクチンの効果が薄れたという事実は見当たらなかった。

A. 目的

流行性耳下腺炎、通称おたふくかぜは、耳下腺の腫脹、発熱や全身倦怠感、食欲不振、頭痛などを特徴とするムンプスウイルスによって引き起こされる主に幼小 児の感染症である。おたふくかぜを予防する唯一の方法は乾燥弱毒生おたふくかぜワクチンの接種である。わが国のおたふくかぜワクチンは 1981 年に初めて弱毒生ワクチンとして出荷され、一時期麻疹、風疹ワクチンと混合して MMR ワクチンとして定期接種された時期もあった。しかし、現在は単味ワクチンとして任意接種されている。

ワクチンが開発される以前は、ほぼ 3-4 年毎におたふくかぜの大きな国内流行が起きていたが、ワクチンの普及に伴い 1989 年以降久しく見られなくなっていた。ところが、2000 後半から 2002 前半にかけて再び全国的に大きな流行が起きた(図 1)。そこで、我々は各地の衛生研究所の協力を仰いで、分離株を収集し、その遺伝子型別を行うことによりどのような株が国内で流行しているのかを確かめ、現行ワクチン株との比較を行うことを目的とした。

B. 材料と方法

自然感染症例の患者より分離されたムンプスウイルス株を各地の衛生研究所から分与を受けて試験に供した(表 1)。共通プライマーを用いた RT-PCR により SH 遺伝子部分を増幅して塩基配列を決定し、データベース上の他の株との相同性を比較して A-K の 11 種類の遺伝子型を同定した。それぞれの遺伝子型のウイルスから任意の一株を選んでその HN 遺伝子の塩基配列を決定し、HN 遺伝子に基づく株型別と SH の遺伝子に基づく株型別結果と比較した。ウイルス中和試験は、B 遺伝子型に属する

ワクチン株を接種したサル血清を用いて G 株と K 株に対して定法に従って行った。

C. 結果

(1) SH 遺伝子にもとづく株型別

北海道、岩手県、神奈川県、新潟県、愛知県、愛媛県、岡山県、鹿児島県の各地で 2000-2002 年に分離されたムンプスウイルス 70 株について SH 遺伝子の塩基配列を決定したところ、今までに報告されていない SH の塩基配列が 23 種類見つかった(表 1)。それぞれの株はこの新しい 23 種類の配列のどれか、あるいは過去に報告された配列のどれかに属した。同一地域でも異なる配列を持つウイルスが得られたことから、今回の流行は、時間的にも地理的にも単一株による流行ではないことを示された。

配列に基づいて株型別を行ったところ、大半の分離株は G(37/70)あるいは K(11/70)型に、この他の少数の株が H 型または A 型に属しており、現行生ワクチンが由来する 1989 年以前の国内分離株(B 遺伝子型)とは別の遺伝子型を示した(図 2)。ただし、旧来の B 遺伝子型がまったく無くなったわけではなく、少数(6/70 株)ではあるが依然として分離された(表 1)。今回の流行の主体になった株は以前から国内にあった株が再流行したものではなく、主に新しい株の流行であることが示された。

(2) HN 遺伝子の配列

ムンプスウイルスの SH 遺伝子に変異を許容する度合いが高く、遺伝子型別の標的として使われている。ところが、感染防御に関わる抗原性の変化には、むしろ HN あるいは F 遺伝子の変化が重要である。そこで、SH 遺伝子で A、B、G、H、I、K 遺伝子型に分類されたウイルスから任意に一株を選び、HN 遺伝

子の蛋白質コード部分の配列を決定した。HN 遺伝子の変化は SH 遺伝子に見られた変化よりも割合としては少ないものの確かに認められ、このことから近年流行株の抗原性が変わりつつあることが予想された(図未表示)。

(3) ウイルス中和試験

HN の配列に変化から HN の抗原性が変化している可能性があるものの、それが即ち B 遺伝子型のワクチンが他の遺伝子型の新型株に対して防御効果が弱くなっていることを示すものではない。そこで、より直接的に B 遺伝子型のワクチンである Hoshino 株を接種して3週後のカニクイザルの抗血清を用いて、同じ B 遺伝子型に属する Urabe 株と、新潟県で 2001 年に分離された K 遺伝子型に属する 02-49 株、北海道で 2002 年に分離された G 遺伝子型に属する MS/02 株との中和曲線を比較した。Vero 細胞を用いたプラック減少法で比較したところ、50%中和指数で三つの株の間で差は認められなかった(図 3)。このことから、少なくとも試験に用いた株に関する限り B 遺伝子型のウイルスと G あるは K 遺伝子型ウイルスの間には、決定的なウイルス中和抗原の違いは認められないという事を示した。

D. 考察

なぜ、2000 年～2002 年のムンプスウイルスの流行が起きたのかの原因を知ることは公衆衛生上大切なことである。そこで各地の地検の協力を得て流後期の 70 株を収集し、どのような株が流行したのかを SH 遺伝子型別により調査をした。この結果、配列の異なる複数の株が流行していたことが判った。遺伝子型別から流行の主体は、過去の分離株とは異なる G 型株が 37/70、K 遺伝子型 11/70 であり、ワクチン株と同じ B 遺伝子型は 6/70 であることが判明した。このことは、大幅な株の入れ替えが全国的に起こっていることを示している。このような新しい遺伝子型の株の出現は、日本だけにとどまらず、韓国、スウェーデンでも報告されており、世界規模で起きている可能性を示唆している。少なくとも SH 遺伝子に塩基置換が見られる場合には HN 遺伝子も頻度は低いが塩基置換が見られる。このことから、抗原性にも変化が現れている可能性も考えられるが、我々が実験した限りでは G 及び K 遺伝型の代表ウイルスは B 遺伝

子型のウイルスと同様に B 遺伝子型に属するワクチン抗体で同じように中和される。すべてのウイルスについて試してはいないものの、今のところは遺伝子型間で中和抗原エピトープには大幅な変化は起きていないと言えると思われる。

以上の結果は、現行ワクチンの効果が有意に減弱したという事実はないことになる。表に示した患者の年齢は幼少児であり、以前の流行パターンで見られる年齢構成と変化はない。仮に、ワクチンの効果が現弱していたならばより年齢の進んだ、二次性ワクチン効果不全(SVF)による患者の数が増えそうであるが、それは観察されていない。これらの事実は、ワクチンの有効性を支持しているものと考えられる。では、なぜ新しい遺伝子型の株が出現したのかについては、今回の試験ではウイルス学的あるいは免疫学的な要因を明らかにすることができなかった。集団内のムンプスウイルスに対する防御抗体保有率の低下が一因である可能性が高い。そのため、今後の対策としては、ワクチンの接種率の向上させることが大切ではないかと推察された。

E. 結論

今後も3-4年周期で流行性耳下腺炎が発生うる可能性が高く、これらに伴う健康被害、経済的損失を少なくするにはワクチンの摂取率をあげる事が必要であろう。このためには、安全で有効なワクチンの開発あるいは輸入が必要であると思われる。

F. 健康危害情報

流行性耳下腺炎の大規模な流行が全国的に起こった。

G. 研究発表

1. 論文発表
投稿中
2. 学会発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

Sample name	Isolation (year)	Genotype	Clinical symptoms	Source	Sex	Age (year)	Location (prefecture)	Accession number
1045	2000	G	P	TS	F	2	Ehime	AB115997
1443	2000	K	LN	TS	F	12	Ehime	
011184L	2000	G	P, M	-	F	-	Kanagawa	AB116014
001349L	2000	H	M	CSF	-	-	Kanagawa	AB116015
1282	2001	G	M	CSF	M	4	Ehime	AB115998
1498	2001	G	URI	TS	F	4	Ehime	AB115999
1631	2001	G	M	CSF	M	9	Ehime	
888	2001	G	P	TS	M	11	Ehime	AB116000
778	2001	G	F	TS	F	4	Ehime	AB116001
1083	2001	G	P	TS	M	5	Ehime	
1431	2001	G	F	TS	M	4	Ehime	AB116002
1162	2001	G	M	TS	M	5	Ehime	
1550	2001	G	F	TS	M	7	Ehime	AB116003
13	2001	G	M	TS	M	3	Ehime	
293	2001	G	F	TS	M	6	Ehime	AB116004
1589	2001	G	P	TS	M	3	Ehime	
804	2001	B	F	TS	M	4	Ehime	AB116006
850	2001	B	P	TS	F	9	Ehime	
1301	2001	B	P	TS	F	3	Ehime	AB116006
1315	2001	B	P	TS	M	5	Ehime	
938	2001	B	P	TS	F	5	Ehime	AB116006
851	2001	K	P	TS	F	8	Ehime	
893	2001	K	P	TS	F	4	Ehime	AB115970
975	2001	K	URI	TS	F	1	Ehime	
1199	2001	K	P	TS	M	5	Ehime	AB116016
96	2001	G	M	CSF	F	1	Ehime	
1155	2001	G	M	TS	F	3	Ehime	AB116007
1244	2001	G	M	CSF	M	4	Ehime	
1245	2001	G	F	TS	F	10	Ehime	AB116009
01-2204	2001	A	M	CSF	M	4	Kagoshima	
01-2205	2001	A	M	CSF	M	5	Kagoshima	AB116013
011107L	2001	G	M	CSF	-	-	Kanagawa	
011140ts	2001	G	M	TS	-	-	Kanagawa	AB116011
01-19	2001	K	P	TS	F	2	Niigata	
02-49	2001	K	P	TS	F	12	Niigata	AB116010
10879/00	2001	G	M	TS	M	8	Aichi	
20301/00	2001	G	M	TS, CSF	M	6	Aichi	AB116012
4-1172	2001	K	-	-	-	-	Okayama	
36-1073	2002	G	-	-	-	-	Okayama	AB116008
18-73	2002	G	-	-	-	-	Okayama	
20-747	2002	G	-	-	-	-	Okayama	AB116018
02-31	2002	G	P	TS	-	5	Niigata	
36-1079	2002	H	-	-	-	-	Okayama	AB115971
36-1172	2002	H	-	-	-	-	Okayama	
22-119	2002	B	-	-	-	-	Okayama	AB116017
62-23	2002	K	-	-	-	-	Okayama	
62-25	2002	K	-	-	-	-	Okayama	AB116017
62-20	2002	K	-	-	-	-	Okayama	
18-58	2002	G	-	-	-	-	Okayama	AB116017
18-59	2002	G	-	-	-	-	Okayama	
62-24	2002	G	-	-	-	-	Okayama	AB116017
MS/02	2002	G	M	CSF	M	3	Hokkaido	
FK02105T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	AB115971
FK02107T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	
FK02112T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	AB115971
FK02118T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	
FK02114T	2002	G	P	TS	-	-	Iwate	AB115971
K02-20	2002	A	-	-	F	-	Kagoshima	
02-3001	2002	A	P	TS	M	10	Kagoshima	AB116017
02-3002	2002	A	P	TS	M	5	Kagoshima	
02-3003	2002	A	P	TS	F	4	Kagoshima	AB116017
02-3004	2002	A	P	TS	M	3	Kagoshima	
02-3005	2002	A	P	TS	F	10	Kagoshima	AB116017
02-3006	2002	A	P	TS	F	5	Kagoshima	
02-3007	2002	A	P	TS	M	3	Kagoshima	AB116017
02-3008	2002	A	P	TS	F	2	Kagoshima	
02-3009	2002	A	P	TS	M	7	Kagoshima	AB116017
02-34	2002	G	P	TS	F	5	Niigata	

(表 1) 2000 年から 2002 年にかけて国内で分離されたムンプスウイルス

臨床症状は P; 耳下腺炎、M; 髄膜炎、URI; 上気道炎、F; 発熱を示す。材料は TS; 咽頭拭い液、CSF; 髄液を示す。遺伝子データベースの登録番号のないサンプルは、その塩基配列が既知あるいは、今回決めた塩基配列のどちらかに一致していたために登録しなかったものを示す。

年齢不詳のものもあるが、分かっている範囲では本流行期の罹患年齢は、12 歳以下であり成人が罹患例はこのリストにはない。

分離ウイルスは咽頭ぬぐい液、髄液と様々であり、特に髄膜炎患者由来の検体が多い事はない。

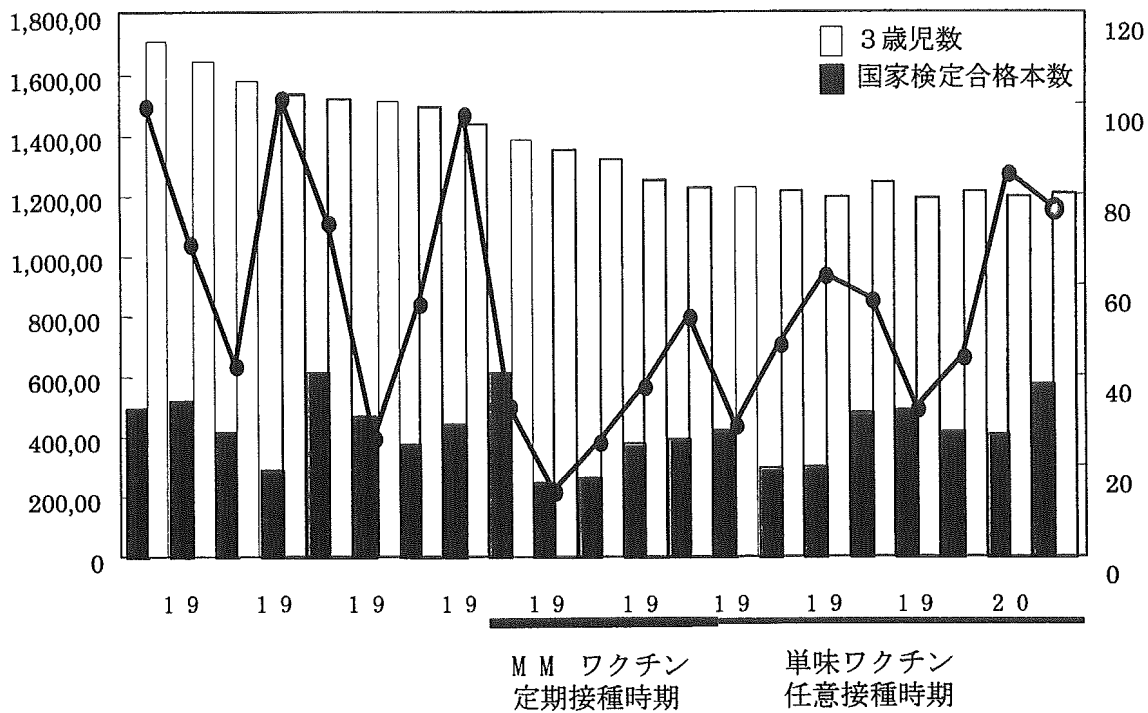


図1年別弱毒生おたふくかぜワクチン国家検定合格本数と国内3歳児童数、流行性耳下腺炎発生件数
 黒棒は年毎の国家検定合格本数を、白棒は3歳児の数を示す。折れ線は定点あたりの流行性耳下腺炎の報告数の年毎の和を示す。

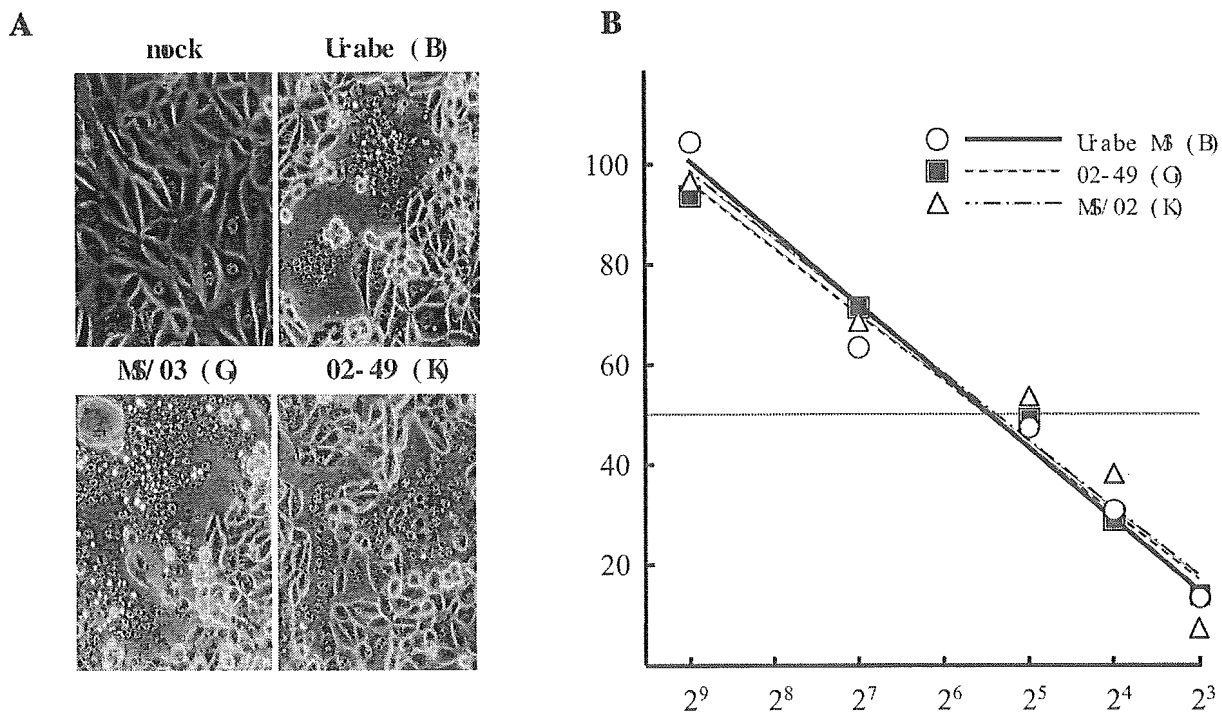


図3 新しく分離されたムンプスウイルスの感染像とワクチン抗体による中和
 従来型の Urabe 株(B 遺伝子型)と新しく分離された MS/03 株(G 遺伝子型)、02-49 株(K 遺伝子型)を Vero 細胞に感染させた。感染細胞に現れる細胞変性像(CPE)に大きな差はない(A)。それぞれのウイルスを市販ワクチン Hoshino 株(B 遺伝子型)で免疫した段階希釈したカニクイザルの血清での中和した(B)。

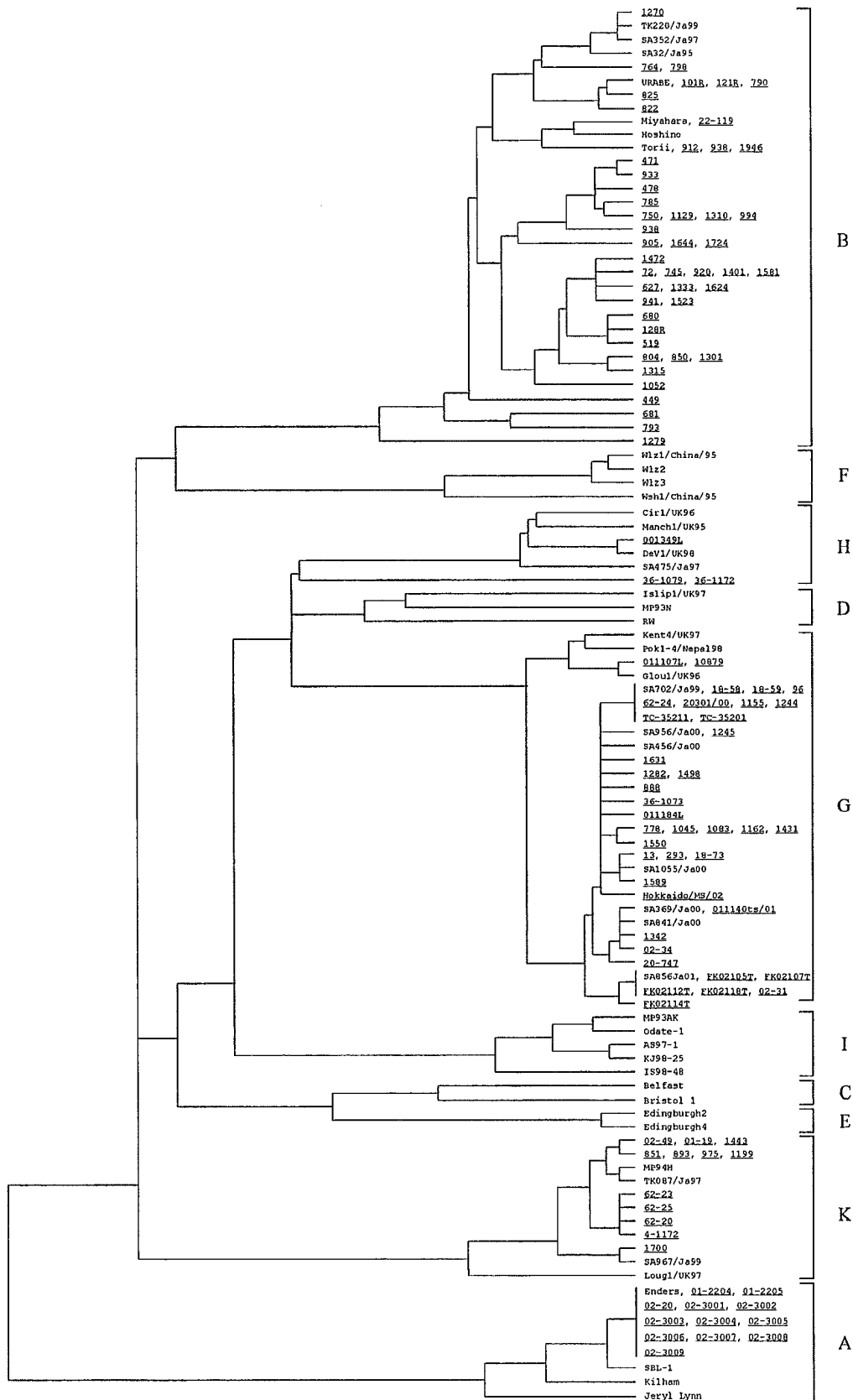


図1 国内分離ムンプスウイルスのSH遺伝子に基づく系統樹

SH遺伝子の塩基配列を基に、NJ法で計算した系統樹。現在までにムンプスウイルスはA-Kの11型別に分けられている。2000-2002の分離株は主にGとKi遺伝型に分類される。

平成 15 年度分担研究報告書

分担研究課題: 肺炎球菌感染症および肺炎球菌ワクチンの基礎研究

分担研究者: 生方 公子 (北里大学北里生命科学研究所, 感染情報学研究室)

〔研究要旨〕 過去 10 年間に, 化膿性髄膜炎・由来の肺炎球菌 286 株と髄液 PCR で肺炎球菌性と診断された 18 例の合計 304 例を解析対象とした。その内訳は小児が 199 例, 成人が 105 例であった。分離株の耐性遺伝子解析, 注射用抗菌薬の感受性, およびワクチンの基礎となる莢膜血清型について検討した。遺伝子学的に識別された gPRSP は 39.3%, gPISP は 17.1%, 日本特有の gPISP(2x) は 19.9%, PSSP は 23.1% であった。PRSP による発症は, 成人 (27.1%) に比べ小児 (45.3%) において高かった。PRSP に対する抗菌力は panipenem が $0.125 \mu\text{g/mL}$ と最も優れていた。

小児由来株の莢膜血清型は, 6B (25.4%), 19F (19.0%), 23F (13.8%), 6A (10.1%), および 14 型 (7.9%) の順に多く, 成人では 23F (16.5%), 22 (12.4%), 3 (11.3%), 6B (10.3%), 19F (9.3%) および 10 と 14 型 (6.2%) が多かった。両者間の血清型には明らかな違いが認められた。PRSP は小児由来株に多く認められる血清型に多かった。小児由来株に対する 7 価と 11 価の conjugate vaccine のカバー率は, それぞれ 76.7% と 81.7% であった。成人由来株に対するカバー率は, 43.8% と 56.3% と低かった。

上述した成績から, vaccine の早期導入の必要性が示唆された。

研究協力者:

千葉 菜穂子, 小林 玲子, 長谷川 恵子, (北里大学北里生命科学研究所, 感染情報学研究室)
砂川 慶介(北里大学医学部感染症学講座)

私達は, 起炎菌の精査を目的として 1999 年に「化膿性髄膜炎・全国サーベイランス研究班」を組織し, 研究を進めているが, H15 年度は, その精査が依頼された過去 10 年間の化膿性髄膜炎・由来株について, 主な注射用 β -ラクタム系薬感受性, 薬剤耐性遺伝子解析, および, ワクチン導入の key となる莢膜血清型について検討した。

A. 研究目的

肺炎球菌は, 髄膜炎, 敗血症, 肺炎などといった重症感染症を惹起する菌として広く知られるが, 中でも耐性肺炎球菌によるそれらの感染症は世界的に重要な問題となっている。

多くの国々において, 化膿性髄膜炎由来の肺炎球菌における薬剤感受性, 莢膜血清型, その発症率, ならびに死亡率等についてのサーベイランスが継続的に行われてきているが, 本邦においては, 同様の調査は定点疫学調査の対象としてその発症動向のみが追跡されている。

B. 研究方法

1. 収集菌株

過去 10 年間に送付を受けた化膿性髄膜炎由来の肺炎球菌は 286 株である。その他に, 18 例分の髄液が解析された。各施設からの菌株は, 当方で指定したバイオハザード基準に準ずる輸送方法で送られてきた。到着と同時に, PCR による菌種の同定と耐性遺伝子の検索が

行われ、それに基づいた抗菌薬感受性の推定 MIC 値と血清型の成績が、Fax あるいは E-mail によって参考資料として各検査室ならびに症例の担当医に返却された。

なお、症例の個人情報については、倫理面への配慮から、年齢、性別、氏名(イニシャル)のみ報告を受けた。

2. PCR による遺伝子検索

被験菌の PCR による菌種の同定と耐性遺伝子の検索は、すでに報告した方法に準じて実施した。遺伝子解析に基づく PCR の結果から、PSSP, PISP, および PRSP の区別は、次のような菌株と規定した。すなわち、(i) *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* のいずれにも耐性に影響を与える変異を持たない株を PSSP, *pbp2x* のみに変異を有する株を gPISP(2x), 2種類の遺伝子変異を持つ株を gPISP, 3つとも変異を有する株を gPRSP とした。

3. 血清型別

被験菌の血清型別は、型別用抗血清 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) を用いて莢膜膨化試験によって判定した。

C. 研究結果

1. 菌株の送付を受けた施設の内訳

菌株送付を受けた医療施設は 10 年間で総計 163 施設(参加施設中 59.3%)であった。病院の内訳で最も多かったのは、図 1 に示すように、市立・市民病院クラスで 86 症例(28.3%)、次いでその他(厚生連系, 社会保険系, 日本赤十字系, 財団系の病院)とした中規模クラスの病院が 63 症例(20.7%)、私立大学附属病院が 48 症例(15.8%)、県・都立病院と国立大学附属病院が各々 40 症例(13.2%)であった。その他に、検査センターと国立病院よりそれぞれ 14 症例(4.6%)、13 症例(4.3%)の送付を受けた。

2. 収集菌株の年次推移と耐性との関係

図 2 には、経年的な分離株数と耐性遺伝子解析の成績を示す。全国的なサーベイランスが開始された 2000 年から 2002 年末までの 3 年間における患者数の増加が著しかった。また、PRSP の動向は、既に 1999 年には 42.9%にまで増加し、その後現在に至るまで高い割合で持続していることが明らかにされた。gPISP(2x) や *pbp1a+2x* 遺伝子変異の gPISP は 1999 年以前にはごくわずかであったが、最近 3 年間の成績を集計すると、その割合は増加傾向にあるように思われた。

3. 発症年齢と耐性型との関係

図 3 には発症年齢と耐性型との関係を示す。総計 304 例のうち、17 歳以下の小児が 199 例、18 歳以上の成人が 105 例であった。小児における発症年齢のピークは 1 歳以下にあり、それらは小児全体の 60.8%を占めていた。その後、年齢の上昇とともに暫時減少していた。一方、成人例での好発年齢は 50-60 代にみられたが、30-40 代の症例も多いことが注目された。

PRSP は、図 4 に示したように、小児において 45.2%分離され、次いで gPISP(2x)が 16.1%、gPISP が 12.1%、PSSP は 20.6%にすぎなかった。それに対し、成人例では gPRSP の割合が 28.6%とやや低く、gPISP(2x)と PSSP はそれぞれ 25.7%、30.5%と、小児に比して高率に分離されていた。

4. 莢膜血清型

図 5 には、分離菌株の莢膜血清型の成績を小児と成人とに分けて示す。小児において最も多かったのは 6B (25.4%)、次いで 19F (19.0%)、23F (13.8%)、6A (10.1%)、14 型 (7.9%) の順であった。成人において最も多かった血清型は 23F (16.5%)、次いで 22 (12.4%)、3 (11.3%)、6B (10.3%)、19F (9.3%) および 10 と 14 型 (6.2%) の順であった。小児と成人から分離された肺炎球菌の血清型は明らかに異なっていた ($\chi^2 = 56.9656$, $p = 0.0000$ (**))。

耐性遺伝子と血清型との関係は図 6 に示した。gPRSP の大多数はワクチンに含まれる 19F, 6B, 23F, 6A, 14 に型別された。ムコイド型のコロニーを示す 3 型は 2 株のみが PSSP, 残りは gPISP(2x)であった。なお, 成人で多かった 22, 10, および 4 型は PSSP あるいは *pbp2x* 変異株であった。

5. 薬剤感受性と遺伝子変異との関係

図 7 には, 耐性遺伝子と治療用注射薬 4 剤 (ABPC, CTX, PAMP, MEPM) の感受性との関係を示す。PRSP には PAMP が最も優れ, MEPM の抗菌力は $0.5 \mu\text{g/mL}$ 程度で, 約 8 倍の開きが認められた。我が国で多く開発されたセフェム系薬 (CTM, CZOP, CZX など) の抗菌力は, カルバペネム系薬に比して明らかに劣り, 殺菌性も有意に劣っていた。

D. 考察 および E. 結論

耐性肺炎球菌はペニシリン系薬が第一選択薬として使われてきた欧米において先ず問題化した耐性菌である。日本においては 1980 年代前の後半までほとんど問題とならなかった。しかし, 1988 年に小児の化膿性髄膜炎から分離されるようになると, 急速に全国へと拡散した。現在, 本邦における PRSP の分離率は明らかに諸外国のそれを上回っている。

耐性菌が急速に増加してきた背景は, 外来患者に血中移行性の劣る経口セフェム系薬が多く処方されているということが挙げられる。セフェム系薬に軽度耐性の gPISP(2x) が 20% も分離されていることに反映されている。その他, 人口密度の高いこと, 免疫学的に未熟な保育園児の増加による耐性菌の容易な拡散等も増加因子となっている。

欧米においては, 肺炎球菌性・重症感染症は抗菌薬のみでは防ぐことができないという考えから, 23 価 polysaccharide vaccine に始まり, 7 価, 9 価, 11 価の conjugate vaccine へと開発が進み, 大規模なフィールドワークが実施され

ている。病原性を有する 90 種類のうち vaccine に含まれるのはその一部である。従って, それらの vaccine に含まれる型が起炎菌をどれだけカバー出来るかが重要なキーポイントとなる。

本研究において, 小児由来株の血清型は 7 価あるいは 11 価に含まれるものが多く, それぞれのカバー率は 76.7 % と 81.7 % であった。

一方, 成人由来株に対するカバー率は, 7 価 vaccine が 43.8%, 11 価 vaccine が 56.3% と低かった。特に, 本邦に多い 3 型が vaccine に加えられていない 7 価 vaccine のカバー率の低いことが問題であろうと考えられる。

F. 研究発表 (論文)

1. 生方公子 他: 本邦において 1998 年から 2000 年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学. 日治療誌, 51:60-70, 2003
2. Ubukata, K.: Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. J Infect Chemother 9:285-291, 2003
3. 千葉 菜穂子 他: 化膿性髄膜炎例から分離された *S.pneumoniae* の疫学解析. 日治療誌, 51: 551-560, 2003
4. Ubukata, K., et al: Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *S. pneumoniae* responsible for meningitis in Japan, 1999-2002. Antimicrob Agents Chemother, 48, No.5, 2004
5. Chiba, N., et al.: Surveillance study of causative *S.pneumoniae* from patient with meningitis in Japan. 43rd ICAAC. Sept. 2003

平成15年度厚生労働省科学研究費補助金

「水痘、流行性耳下腺炎、肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な
予防接種に関する研究」第2回班会議

平成16年3月8日(月) 15:30-19:30

国立感染症研究所 共用第二会議室

1. 挨拶 15:30-15:35

国立感染症研究所 感染症情報センター 岡部信彦

2. 研究班報告

(ア)水痘、ムンプス共通全国調査関連

- ① 15:35-15:45 「水痘・ムンプス症例の医療経済学的検討」
国立感染症研究所感染症情報センター 大日康史
- ② 15:45-16:00 「水痘・ムンプス重症化例の全国調査」
国立感染症研究所感染症情報センター 多屋馨子、砂川富正、中
島一敏
- ③ 16:00-16:05 「成人例の調査」国立感染症研究所感染症
情報センター 重松美加、森兼啓太

(イ)水痘

- ① 16:05-16:20 「水痘ワクチンの定期接種化を目指した水
痘重症例の把握」藤田保健衛生大学小児科 吉川哲史、浅野喜造
- ② 16:20-16:35 「VZV 弱毒化の機構解明」
大阪大学大学院医学系研究科微生物学講座 森 康子、山西弘一
- ③ 16:35-16:45 「繰り返し水痘疹を認め、治療に苦慮して
いる女児例」 都立清瀬小児病院 血液腫瘍科 金子 隆、田
口貴子、唐渡孝子、高山 順
- ④ 16:45-17:00 「水痘ワクチンアンケート調査」国立
三重病院 神谷 齊

(ウ)ムンプス

- ① 17:00-17:10 「ムンプスについて」国立三重病院 庵原
俊昭
- ② 17:10-17:25 「近年ムンプスウイルスの国内分離状況と
その性状」国立感染症研究所・ウイルス第三部 加藤 篤、久保田
耐、田代真人
- ③ 17:25-17:35 「ムンプスウイルスの神経病原性を解明す
るための動物モデル実験」千葉県衛生研究所 一戸貞人、齋加志
津子

(エ)水痘、ムンプス共通

- ① 17:35-17:50 「水痘、ムンプス重症化例の検討」札幌医
科大学小児科 堤 裕幸

- ② 17:50-17:55 「ムンプスと水痘のサーベイランスのまとめ」国立感染症研究所感染症情報センター、FETP 森 伸生
- ③ 17:55-18:05 「堺市の調査」堺市保健所医療対策課 安井良則、藤井史敏
- ④ 18:05-18:15 「論文レビュー」堺市保健所医療対策課 藤井史敏
- ⑤ 18:15-18:25 「金沢市の保育所水痘流行状況と罹患園児を抱えた家族へのアンケート調査」金沢市元町福祉保健センター 越田理恵
- ⑥ 18:25-18:35 「川崎市の調査」国立感染症研究所 感染症情報センター 多田有希
- ⑦ 18:35-18:40 「水痘、ムンプスの血清疫学調査」国立感染症研究所 感染症情報センター 佐藤 弘

(オ)肺炎球菌

- ① 18:40-19:55 「成人における呼吸器病原性肺炎球菌の血清型分布と肺炎球菌ワクチン接種後の特異抗体濃度の推移」長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療 大石和徳
- ② 18:55-19:05 「慢性呼吸器疾患患者における肺炎球菌ワクチン接種前後の抗体価の推移」国立療養所東京病院呼吸器科 永井英明
- ③ 19:05-19:15 「肺炎球菌ワクチンについて」国立三重病院小児科 中野貴史
- ④ 19:15-19:30 「化膿性髄膜炎例由来肺炎球菌の薬剤耐性化とその莢膜型の特徴 肺炎球菌ワクチンの基礎研究として」北里大学生命科学研究所感染情報研究室 生方公子