

クチンの導入を希求してきた。この研究は医療圏が独立している北海道を調査対象として、ワクチン登場前の小児期細菌性髄膜炎の発症状況を調査し、ワクチン流通後の発症状況と比較することによってワクチンの予防効果を検証することを目的とした。

B. 研究方法

平成18年10月に小児科医が常駐しかつ入院施設を擁する北海道内の病院64か所(平成20年末には59病院)の小児科医長あてに、研究目的を説明し協力をお願いした。内容は平成19年1月1日以後に発症した細菌性髄膜炎患者の背景調査と起病菌調査である。脳脊髄液から細菌が分離された場合、細菌検査室を持つ施設では細菌を増菌し、外注する施設には外注業者によって増菌して、あらかじめ送付してあった返送用容器と症例表の返送を依頼した。細菌の送付先は市立札幌病院検査部と旭川厚生病院検査部のいずれかである。臨床的に細菌性髄膜炎と診断されても脳脊髄液から細菌が得られなかった場合には脳脊髄液を凍結保存し別途PCR法に供した。2施設に集まった検体が一定数に達した後に北里大学に送付して細菌学的検査に供した。インフルエンザ菌と肺炎球菌は、PBP(ペニシリン結合蛋白)の遺伝子変異をPCRキットであるインフルエンザ菌遺伝子検出試薬(湧永製薬株式会社)とペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)遺伝子検出試薬(湧永製薬株式会社)を用いて行った。その成績から生方^{2),3)}の報告に基づいてインフルエンザ菌はgBLNAR、glowBLNAR、gBLPAR、gBLPCR-I、gBLPACR-II、gBLNAS、肺炎球菌はgPRSP、gPISP、gPSSPに分類した。インフルエンザ菌におけるb型の判別はHib遺伝子の解析(Hasegawaら⁴⁾)と

抗血清を用いた凝集試験によって行った。使用したキットはPASTEREX™Meningitis (BIO-RAD、France)である。肺炎球菌の血清型はPneumococcal antisera(Statens Serum Institute、Copenhagen、Denmark)、B群溶連菌の血清型はGBS型別用免疫血清(デンカ生研)、髄膜炎菌の血清型はPASTEREX™Meningitis (BIO-RAD、France)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

患者検体提供に関して病院内倫理委員会の審査を要するとの返答のあった施設には研究の趣旨を説明し、症例を記号化するなどの旨を説明して委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 平成19年1月1日～12月31日に発症した細菌性髄膜炎(表1、表2、表3)

平成19年に北海道内15病院から21例(男12例、女9例)の報告があった。発症年齢は生後5日から14歳に分布し、生後1か月未満2例(B群溶連菌1、大腸菌1)、生後2か月～1歳未満10例(インフルエンザ菌7、肺炎球菌2、B群溶連菌1)、1～5歳未満7例(インフルエンザ菌4、肺炎球菌2、リステリア菌1)、5歳以上2例(肺炎球菌2)であった。発症月は1月2例、2月2例、3月2例、4月1例、5月2例、6月3例、7月1例、9月1例、10月2例、11月2例、12月3例であった。起病菌はインフルエンザ菌11例のうち5例の荚膜型が検査されうち4例がb型、アンピシリン感受性は5例で検査されそれぞれgBLNAR 2例、glowBLNAR 1例、gBLPAR 1例、gBLNAS 1例であった。肺炎球菌は6例のうち4例の血清型とペニシリン感受性が検査され6A型(gPISP)、19F型

(gPRSP)、23F型(gPRSP)、34型(gPSSP)であった。B群溶連菌は2例でそれらの血清型はI b、IIIであった。治療に使用された抗菌薬はABPC、PAPM/BP又はMEPMのいずれかとCTX又はCTRXであり、ステロイドは16例に使用され残る5例では使用されていない。予後は水頭症が2例(リステリア菌1例、肺炎球菌1例)、高度難聴1例(肺炎球菌)と計3例で後遺症を遺したが死亡例はなかった。

2. 平成20年1月1日～12月31日に発症した細菌性髄膜炎(表1、表2、表3)

平成20年に北海道内14病院から18例(男11例、女7例)の報告があった。発症年齢は生後29日から6歳11か月に分布し、生後1か月未満1例(B群溶連菌)、生後2か月～1歳未満5例(インフルエンザ菌2例、肺炎球菌、B群溶連菌、大腸菌各1例)、1～5歳未満10例(インフルエンザ菌10例)、5歳以上2例(インフルエンザ菌、髄膜炎菌各1例)であった。発症日は1月1例、2月2例、3月4例、4月1例、5月4例、6月1例、9月1例、10月2例、12月2例であった。起因为インフルエンザ菌13例全例の莢膜型が検査されいずれもb型であり、アンピシリン感受性も13例全例で検査されそれぞれgBLNAR 7例、glowBLNAR 2例、gBLPACR-II 3例、gBLPAR 1例であった。肺炎球菌は1例で血清型、ペニシリン感受性は6B(gPRSP)であった。B群溶連菌は2例のうち1例で血清型が検査されV型であった。髄膜炎菌は1例でその血清型はY/W135であった。治療に使用された抗菌薬はABPC、PAPM/BP又はMEPMのいずれかとCTXまたはCTRXであり、ステロイドは17例に使用されていた。

予後は生後1か月14日に発症したB群溶連菌髄膜炎男児が発達障害、視力障害、尿崩症を遺し、1歳5か月に発症したHib髄膜炎女児が聴力障害を遺したが死亡例はなかった。

3. 2年間に発症したインフルエンザ菌性髄膜炎

2年間に39例の細菌性髄膜炎の報告がありその起因为インフルエンザ菌のうち24例(61.5%)を占めた。その莢膜型は検査された18例中17例(94.4%)がb型で、アンピシリン感受性は検査された18例中17例が耐性であった。発症年齢は0歳台9例で最も多く次いで1歳台6例、2歳台4例、3、4歳台各2例、5歳台1例であった(図1)。発症月は2月から12月までに平均して分布し好発季節は無かった(図2)。この2年間に5歳未満で23例発症し、5歳未満人口10万あたり発症率は5.5であった。

4. 2年間に発症した肺炎球菌性髄膜炎

39例中7例(17.9%)の起因为肺炎球菌であった。7例中5例について血清型とペニシリン感受性検査されそれぞれ6A(gPISP)、6B(gPRSP)、19F(gPRSP)、23F(gPRSP)、34(gPSSP)であった。国内治験を終了し現在承認申請中の7価肺炎球菌ワクチン(PCV7)はPRSPの6B、19F、23Fをカバーし、国内治験中の13価ワクチンがPISPの6Aをカバーしていた。この2年間に5歳未満で5例発症し5歳未満人口10万あたり1.2であった。

D. 考察

小児期の細菌性髄膜炎をはじめとする全身感染症を引き起こす2大起因为インフルエンザ菌b型(Hib)と肺炎球菌である。これらのHibと肺炎球菌感染症を予防するワクチンは欧米を中心とする

に市販されておりその予防効果は劇的である^{5) 6)}。一方わが国では平成19年1月ようやくHibワクチン(アクトヒブ®)が製造承認された。その後国家検定、自社検定を経て平成20年12月ようやく市販のはこびとなった。しかし製品の安全性の担保、安定供給の確保など種々の関門があり、現在やむなく計画販売されている。一方結合型7価肺炎球菌ワクチン(PCV7)は国内治験を終了し、現在承認申請中である。

筆者らはこれらのワクチンの予防効果を知るために、発売前のHibと肺炎球菌を起因菌とする細菌性髄膜炎の発症頻度調査を計画した。北海道は医療圏として独立していることから人口あたりの発症頻度を計算することが可能であり、脳脊髄液中から分離同定された細菌の収集も可能である。これらの計画を平成18年10月に小児科医が常駐し小児の入院施設をもつ64病院(平成20年12月には59施設に減少)の小児科医長に説明し理解を求めた。症例および起因菌の蒐集は小児期(出生から15歳)に発症する全細菌性髄膜炎とし、あらかじめ配布しておいた細菌送付用の容器と症例表を市立札幌病院検査部と旭川厚生病院検査部のいずれかに返送してもらった。

この度平成19、20年の2年間に総計39例(男23例、女16例)の症例が寄せられた。その起因菌はインフルエンザ菌24例、肺炎球菌7例、B群溶連菌4例、大腸菌2例、リステリア菌、髄膜炎菌各1例であった。発症率は5歳未満人口10万あたりインフルエンザ菌、肺炎球菌それぞれ5.5、1.2であり、インフルエンザ菌の99.4%がb型を占めた。また承認申請中のPCV7に含まれる血清型は検査された肺炎球菌5菌株中3株(60%)を占めていた。この度まとめた

2年間の症例は幸いにも死亡例がなかったがB群溶連菌による1か月男児が発達障害、視力障害、尿崩症の後遺症を遺し、リステリア菌による2歳女児と肺炎球菌による1歳女児が水頭症を、肺炎球菌による1歳女児、Hibによる1歳5か月女児が難聴を遺した。

Hib重症感染症の発症頻度については1996~1997年に6都道府県で実施された前向き調査によると髄膜炎で8.6(5歳未満10万人口対)⁷⁾、Sakata⁸⁾が重症感染症の1996~2005年北海道の調査で20.8、石和田ら⁹⁾による全身感染症の千葉県の調査で2003年8.3、2004年13.4、2005年16.5と年々増加傾向にあり、西村ら¹⁰⁾の2003年から4年間の調査で髄膜炎が30.9と報告している。Hibワクチン導入前の米国を含む諸外国の髄膜炎の頻度が11~54とされ¹¹⁾、米国では24.0(1984年)から導入後3.7(1991年)へと激減したと報告されている¹²⁾。一方肺炎球菌による重症感染症の発症頻度についてはさらに報告は少ないが、西ら¹³⁾は髄膜炎が近年増加傾向にあり2007年には4.8、坂田ら¹⁴⁾は菌血症で30.9と報告している。2000年にPCV7が導入された米国では前後を比較して2歳未満児10万人口対で侵襲性肺炎球菌疾患が70.3(1999年)から13.1(2004年)へと減少したと報告している¹⁵⁾。

わが国では平成20年12月中旬にHibワクチンの接種がはじまったが当面任意接種としてスタートした。市立砺波病院小児科の中林ら¹⁶⁾は、分子疫学的に同一のHibにより同時期に発症した5か月男児と1歳9か月女児2例の髄膜炎症例を報告した。前者の兄と後者は同一の保育園に通っており集団保育環境が感染に関与したと考えられると結んでいる。Hibは乳幼児の咽頭に常在菌として存在

し(健康キャリアー)、ほんの一部の乳幼児で菌血症となり全身感染すると考えられる。環境から Hib を無くするためには幅広くワクチンを接種して、集団免疫効果を得る必要がある。このためにはワクチンの定期接種への採用が望まれる。また現在承認申請中の7価肺炎球菌ワクチン(PCV7)も承認の暁には早期の定期接種化が望まれる。

E. 結論

平成19年、20年に医療圏として独立している北海道で発症した細菌性髄膜炎を調査して報告した。発症数は39例で起病菌はインフルエンザ菌が24例で5歳未満人口10万あたり5.5、肺炎球菌が7例で1.2であった。インフルエンザ菌のアンピシリン耐性は94.4%、肺炎球菌のペニシリン耐性は80.0%であった。このほかB群溶連菌4例、大腸菌2例、リステリア菌、髄膜炎菌各1例であった。今後この調査を継続してHibワクチンの接種状況とインフルエンザ菌髄膜炎の発症動向の関係を明らかにする予定である。さらに今後承認市販される予定の7価肺炎球菌ワクチンと、その後に13価肺炎球菌ワクチンの導入の影響調査の基礎データに資する予定である。

本編に使用した略語

1. インフルエンザ菌に関する略語

BLNAR: β ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性菌

lowBLNAR: β ラクタマーゼ非産生アンピシリン軽度耐性菌

BLPAR: β ラクタマーゼ産生アンピシリン耐性菌

BLPACR-I: β ラクタマーゼ産生アモキシシリン/クラバン酸耐性菌I型

BLPACR-II: β ラクタマーゼ産生アモキシシリン/クラバン酸耐性菌II型

BLNAS: β ラクタマーゼ非産生アン

ピシリン感受性菌

2. 肺炎球菌に関する略語

PRSP: ペニシリン耐性肺炎球菌

PISP: ペニシリン中間耐性肺炎球菌

PSSP: ペニシリン感受性肺炎球菌

3. 抗菌剤に関する略語

ABPC: アンピシリン

PAPM/BP: パニペネム/ベタミブロン

MEPM: メロペネム水和物

CTX: セフトキシムナトリウム

CTRX: セフトリアキソンナトリウム

2. 文献

- 1) 富樫武弘, Hib ワクチン, 臨床と微生物 2005;32:511-516.
- 2) 生方公子, 千葉菜穂子, 小林玲子, 他. 本邦において1998年から2000年の間に分離された *Haemophilus influenzae* の分子疫学解析—肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ—, 日化療会誌 2002; 50: 749-804.
- 3) 生方公子, 小林玲子, 千葉菜穂子, 他. 本邦において1998年から2000年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学解析—肺炎球菌等による市中感染症研究会収集株のまとめ—, 日化療会誌 2003; 51: 60-70.
- 4) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance* 2003;9:39-46
- 5) Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Progress toward eliminating *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children—United States, 1987-1997. *MMWR Weekly*

- Report 1998;47:993-998.
- 6) Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *New Engl J Med* 2009;360:244-256.
 - 7) 加藤達夫、上原すゞ子、神谷 斎、他.わが国における Hib 髄膜炎の発生状況. *小児感染免疫* 1998;10:209-214.
 - 8) Sakata H. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in children in Kamikawa subprefecture, Hokkaido, Japan, 1996-2005, before the introduction of *H. influenzae* type b vaccination. *J Infect Chemother* 2007;13:30-34.
 - 9) 石和田稔彦、黒崎知道、寺嶋 周、他.インフルエンザ菌による小児全身感染症罹患状況. *日児誌* 2007;111:1568-1572.
 - 10) 西村龍夫、深沢 満、吉田 均、他. b型インフルエンザ菌菌血症・髄膜炎の発症頻度. *日児誌* 2008;112:1373-1378.
 - 11) Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21 st century : global analysis of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbio Rev* 2000; 13:302-317.
 - 12) Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the vaccine era. *JAMA* 1993; 269:221-226.
 - 13) 西 順一郎、亀之園 明、徳田浩一. Hib ワクチン導入へ向けた鹿児島県小児細菌性髄膜炎の全数把握による疫学研究. 厚生労働科学研究費補助金「ワクチンの有効性向上のためのエビデンス及び方策に関する研究」平成 19 年度報告書 2008;41-43.
 - 14) 坂田 宏. 小児における *Streptococcus pneumoniae* 菌血症の臨床疫学的検討. *感染症誌* 2005;79:1-6.
 - 15) Kyaw MH, Lynfield R, Schffner W, et al . Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *New Engl J Med* 2006;354:1455-1463.
 - 16) 中林玄一、住田 亮、嶋 大二郎、他.分子疫学的に同一の BLNAR 株インフルエンザ菌で発症した細菌性髄膜炎の 2 例. *日児誌* 2007;111:573-576

1. 表

表1. 北海道で発症した小児期細菌性髄膜炎 (2007年、2008年)

表2. 北海道で発症した小児期細菌性髄膜炎の細菌学的検査所見

表3. 細菌性髄膜炎症例報告者

表1. 北海道で発症した小児期細菌性髄膜炎 (2007、2008年)

合計 39例 (男23例、女16例)

起因菌

インフルエンザ菌	24例
肺炎球菌	7例
B群溶連菌	4例
大腸菌	2例
リステリア菌	1例
髄膜炎菌	1例

発症年齢

1か月未満	3例 (B群溶連菌2例、大腸菌1例)
～1歳未満	15例 (インフルエンザ菌9例、肺炎球菌3例、 B群溶連菌2例)
1～5歳未満	17例 (インフルエンザ菌14例、肺炎球菌3例、 リステリア菌1例)
5歳以上	4例 (インフルエンザ菌1例、肺炎球菌2例、 髄膜炎菌1例)

予後

発達遅延、視力障害、尿崩症1例 (B群溶連菌1か月男児)
水頭症2例 (肺炎球菌1歳女児、リステリア菌2歳女児)
難聴2例 (肺炎球菌1歳女児、インフルエンザ菌1歳女児)

発症頻度 (5歳未満10万人口あたり)

インフルエンザ菌髄膜炎	23例	5.5
肺炎球菌	5例	1.2

表 2. 北海道で発症した小児期細菌性髄膜炎の細菌学的検査所見

インフルエンザ菌	b型 (19/20、95%)
	gBLNAR 9例
	glowBLNAR 3例
	gBLPAR 2例
	gBLPACR-II 3例
	gBLNAS 1例
肺炎球菌	6A (gPISP、PCV13 含有)
	6B (gPRSP、PCV7 含有)
	19F (gPRSP、PCV7 含有)
	23F (gPRSP、PCV7 含有)
	34 (gPSSP)
B群溶連菌	I b、III、V
髄膜炎菌	Y/W135

表3. 細菌性髄膜炎症例報告者（順不同）

1. 名寄市立病院 室野晃一、平野至規
2. 北海道社会保険病院 澤田博行、中山承代
3. 帯広協会病院 青柳勇人、泉 岳
4. 北見赤十字病院 三河 誠、小林一郎
5. 市立釧路病院 足立憲昭、池本 亘
6. 国立療養所西札幌病院 長尾雅悦
7. 函館五稜郭病院 遠藤満智子、岩井 崇
8. 釧路赤十字病院 永島哲郎、濱野貴通、佐藤泰征、藤原伸一
9. 小樽協会病院 飯田一樹
10. 札幌徳洲会病院 岡 敏明、喜屋武 元、大島美保
11. 帯広厚生病院 松本憲則、藤原伸一
12. 旭川医科大学 藤枝憲二、古谷野 伸
13. 手稲溪仁会病院 窪田 満
14. 市立函館病院 依田弥奈子、橋本 真
15. 市立江別病院 梶井直文、信太 知
16. 天使病院 飯塚 進、脇口定衛、小旗菜穂
17. 日鋼記念病院 岩田正道、小杉山清隆
18. 旭川厚生病院 坂田 宏
19. 富良野協会病院 角谷不二雄、藤保洋明
20. 岩見沢市立病院 佐藤俊哉
21. 函館中央病院 山田 豊、石倉亜矢子
22. 網走厚生病院 立花幸晃
23. 王子総合病院 内藤宏行、兼次洋介、鈴木秀久
24. KKR 札幌医療センター 高橋 豊、盛一享徳、佐藤泰征
25. 苫小牧市立病院 小原敏生、久保憲昭
26. 北海道小児総合保健センター 皆川公夫、大柳玲嬉

図1. インフルエンザ菌性髄膜炎の年齢、性別発症数

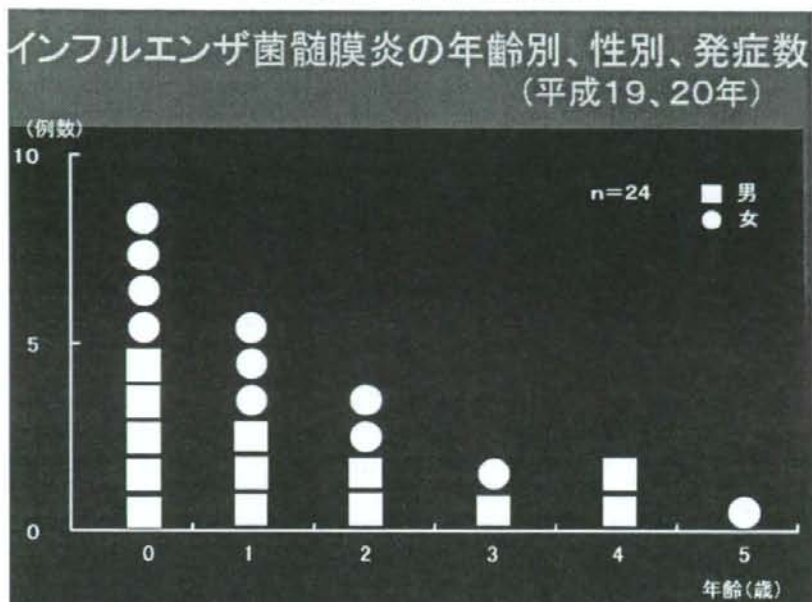
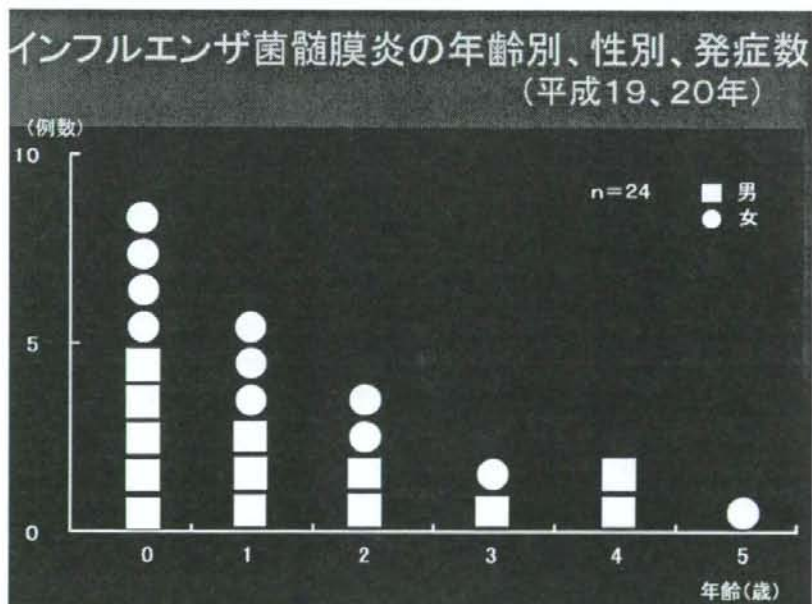


図2. インフルエンザ菌性髄膜炎の月別、性別発症数



水痘帯状疱疹ウイルス感染症及び水痘ワクチンの臨床的研究

分担研究者 浅野喜造（藤田保健衛生大学小児科教授）

研究要旨 水痘ワクチンの定期接種化を目指し、全国の小児科入院施設を持つ病院へ医原性免疫不全宿主における水痘あるいは帯状疱疹重症化例についてのハガキによるアンケート調査を実施した。また、LAMP法による水痘野生株とワクチン株の簡便な鑑別方法の開発を行った。観察期間は平成19年1月1日から20年12月31日の二年間。アンケートについては、1829施設（54.4%）から返答があった。そのうち解析可能なものは1686施設（50.2%）で、8施設から症例ありとの報告があった。また、既に開発したLAMP法による水痘野生株とワクチン株の鑑別方法をさらに改変し、特異プライマーを用いることによりアガロースゲル電気泳動することなく両者の鑑別ができるシステムを開発した。

A. 研究目的

米国では1995年に水痘ワクチンの universal immunization がスタートし、接種率の向上に伴い水痘罹患例と入院例の減少が報告されている。一方、我が国では未だその接種率は35%程度と低迷しており、毎年水痘の流行が認められている。なるべく早く、他の先進国並みに有効なワクチンを定期接種化することにより、わが国の小児を vaccine preventable disease から守ることが我々に強く求められている。これまでの研究で、成人の入院患者が比較的多いことや、免疫不全患者の水痘罹患例があることが明らかになった。今年度の研究では、免疫不全患児に発生した重症水痘の全貌を明らかにするため、全国アンケート調査を行った。

さらに、将来的にワクチンが定期接種化された後、水疱性皮膚疾患患者においてはワクチン株か野生株かの迅速な判別が必要となる。米国ではリアルタイムPCR法による鑑別法が開発されているが、昨年度の研究で loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による、より迅速で簡便な判別法を確立した。しかしながら、その方法ではLAMP産物を制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動でバンドサイズを確認する必要がある。そこで、今年度はより簡便な判別法の開発をめざし、ワクチン株、野生株に特異的なプライマーを作成し、濁度上昇で各LAMP産物を確認する方法の確立を目指した。

B. 研究方法

1) 医原性免疫不全宿主における水痘あるいは帯状疱疹重症化例についてのアンケート調査

対象は、小児科入院施設を持つ全国の病院 3357施設へ、ハガキ（図1）によるアンケート調査を行った。観察期間は平成19年1月1日から20年12月31日の二年間。医原性免疫不全宿主に発症した、水痘あるいは帯状疱疹に関連した重症例

（肺炎、肝炎、脳炎、播種性 or 出血性水痘、帯状疱疹汎発化）と死亡例について調査した。

図1. 一次アンケート調査用紙

医療機関名： _____

記載者： _____

連絡先：住所： _____
e-mail： _____

平成19年1月から平成20年12月までの2年間に、原発性あるいは後天性（医原性）免疫不全患児が水痘あるいは帯状疱疹に関連して死亡したり、重症化した症例がありましたか。
あり・なし（左のいずれかに○をつけ、症例があれば以下の表の記載をお願いします）。

症例	性別	年齢	疾患	予後	基礎疾患
1	男・女	歳	水痘・帯状疱疹	1.死亡 2.重症化	
2	男・女	歳	水痘・帯状疱疹	1.死亡 2.重症化	
3	男・女	歳	水痘・帯状疱疹	1.死亡 2.重症化	
4	男・女	歳	水痘・帯状疱疹	1.死亡 2.重症化	
5	男・女	歳	水痘・帯状疱疹	1.死亡 2.重症化	

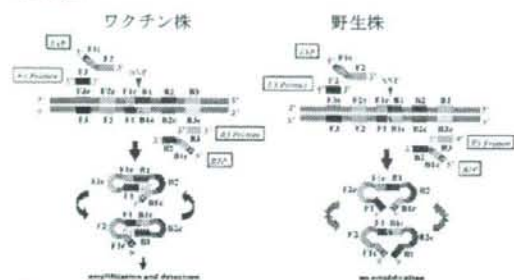
2) LAMP法によるVZV野生株とワクチン株の鑑別

LAMP法によるDNA増幅起点はダンベル構造にある。ワクチン、野生株を識別するため、遺伝子変異が多く見られるORF62を標的としてプライマーを設計した。今回のプライマー設計の特徴は、FIP、BIPによって生じるループのDNA伸長ポイントに遺伝子変異部を配置し、野生株、ワクチン株においてプライマーがマッチしない場合

はダンベル構造ができず、以降の LAMP 反応が進行しない様にした(図 2)。

ワクチン株、野生株それぞれの標的領域をサブクローニングし、コピー数を決定したプラスミドを段階希釈して以下の検討を行った。最初にワクチン株特異的プライマーの設計を行った。

図 2. SNPs を検出するための LAMP プライマーの配列



- ① いくつかのプライマーセットを設計し、これらの組み合わせから最も優れた感度を示すセットを選択した。
- ② 最も優れた感度を示したプライマーセットを使い、LAMP 用のミクスチャー組成 (Mg、d-NTP 濃度) の検討を行った。
- ④ 特異性の検討

C. 研究結果

1) 医原性免疫不全宿主における水痘あるいは帯状疱疹重症化例についてのアンケート調査結果

アンケートについては、1829 施設 (54.4%) から結果が返送された。そのうち解析可能なものは 1686 施設 (50.2%) で、8 施設から症例ありとの報告があった。7 例について患児情報についての記載があった。各症例の概要は以下の通りである。症例 1: 18 歳の腎疾患男児で、水痘罹患に伴い腎不全の悪化。症例 2: 4 歳のファロー四徴症の女児で、水痘脳炎に罹患。症例 3: 5 歳の悪性腫瘍男児で、肺炎、肝炎の合併。症例 4: 5 歳の悪性腫瘍女児で、水痘脳炎発症。症例 5: 7 歳の悪性腫瘍男児で、播種性水痘を発症し死亡。症例 6: 4 歳の悪性腫瘍男児で、水痘脳炎発症。症例 7: 4 歳の悪性腫瘍男児で DIC を合併。

2) LAMP 法による VZV 野生株とワクチン株の鑑別

① プライマーの検討

表 1 にワクチン株特異的プライマーによる感度を示す。すべてのワクチン株プライマーセットで野生株との交差反応が認められた。

表 1. 各プライマーにおける感度

ワクチン プライマー		感度		鑑別能
FIP	BIP	ワクチン	野生株	
VA-FIP1	VA-BIP1	10^3	10^6	10^3

VA-FIP1	VA-BIP1	10^3	10^7	10^4
VA-FIP2	VA-BIP1	10^2	10^8	10^6
VA-FIP1	VA-BIP2	10^4	10^7	10^3

③ クチン株 LAMP 法の条件設定

Mg と d-NTP 濃度について、それぞれ 2.8mM、4mM、6.4mM (Mg 濃度)、300 μ M、500 μ M、800 μ M (d-NTP) の 3 濃度について LAMP 反応の条件設定を行った。最も優れた感度を示したのは、Mg 濃度 4mM、d-NTP 800 μ M の組み合わせで、ワクチン株は反応あたり 10 コピーまで検出できるのに対し、野生株を検出するには 10^8 コピーが必要で、交差反応をかなり抑えることができた。

④ ワクチン特異的 LAMP 法の特異性

高いコピー数 (10^8 コピー/反応) の野生株では交差反応が認められたが、他のヒトヘルペスウイルスとの交差反応は認められなかった。

D. 考察

アンケート調査により、調査期間中の 2 年間で全国の 8 施設から該当症例の報告があった。回収率が 50% 程度と低いため、現在再度報告依頼を行っている。今後、アンケートの信頼性を上げるため、70% 程度の回収率を目指している。今回のアンケート対象となっている、医原性免疫不全症例における水痘あるいは帯状疱疹重症化例は、大病院、小児病院や地域の基幹病院に入院することが多いと予想される。よって、このような病院からの回収率を上げることが調査の信頼性を向上させることになるため、何らかの方策を考えてゆきたい。

7 例の水痘あるいは帯状疱疹重症化例のうち、症例 2 については医原性免疫不全宿主には該当しない可能性があり、二次調査で明らかにしてゆきたい。今回の調査では、先のファロー四徴症患児を含め水痘脳炎が 3 例見つかった。水痘脳炎は一般に二次性脳炎と考えられており、医原性免疫不全あるいは基礎疾患のある患児で特に合併頻度が上昇するとは考えにくい。今後二次調査において、これら患児に発症した脳炎の病態解明につながる情報収集が必要と考えられる。

重症例の中で 1 例は死亡しており、高額な医療資源が投入されたことがうかがわれる。その他の症例も含め、水痘ワクチンの定期接種化を目指す基礎データとするためには、これら症例の医療費がどの程度かかっているか明らかにすることが重要と思われる。そのためには、各病院の医療事務部署の協力が必要となり、なかなか十分な情報が得られない懸念はあるが、今後実施する二次調査の重要課題ととらえ努力してゆきたい。

VZV ワクチン株、野生株を簡便に鑑別する方法として、昨年度の研究で LAMP 法により水疱拭い液から直接 VZV 遺伝子を増幅し、増幅産物を制限酵素で切断、切断パターンを比較することによ

り識別することに成功した。今年度はより簡便な方法の確立を目指し、ワクチン株、野生株の SNIPs に特異的なプライマーを準備し、それぞれの増幅を確認することにより、制限酵素による LAMP 産物の切断、アガロースゲル電気泳動の省略を目指した。残念ながら、いずれのプライマーも両株間での交差反応性があり、1塩基の違いを確実に区別するのは困難であった。ミクスチャー組成を変更し、なるべく交差反応を抑えるような条件設定を決定できたが、実用化に向けては新たな strategy が必要と思われた。今後、PCR 法による SNIPs 検出でも用いられているブロックオリゴによる特異性向上などの手段を検討する予定である。

E. 結論

免疫不全宿主における水痘重症化例の重要性が、特に小児において明らかとなった。水痘野生株とワクチン株の迅速な鑑別法の開発に成功した。LAMP 法による、より簡便な VZV ワクチン株、野生株鑑別法作成のための基礎的検討を行った。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

学会発表

井平 勝、吉川哲史、菅田 健、須賀定雄、浅野喜造

LAMP 法を用いた VZV ワクチン株、野生株鑑別法確立

第 54 回日本ウイルス学会学術集会

11/19-21/06、名古屋

論文発表

Discriminating between varicella-zoster virus vaccine and wild type strains by loop-mediated isothermal amplification. Higashimoto Y, Ihira M, Ohta A, Inoue S, Usui C, Asano Y, Yoshikawa T. J Clin Microbiol 2008 ;46:2665-70.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

I. 研究協力者

吉川哲史 (藤田保健衛生大学、医学部、小児科)

井平 勝 (藤田保健衛生大学、医療科学部、臨床工学)

肺炎球菌および Hib ワクチン接種の基盤となる分離細菌の分子疫学研究

研究分担者 生方 公子

(北里大学北里生命科学研究所 病原微生物分子疫学研究室 教授)

研究要旨 平成 20 年 1 月から 12 月の 1 年間に、「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」によって全国から収集された肺炎球菌とインフルエンザ菌について、ワクチン接種の基礎となる荚膜型別、耐性遺伝子からみた薬剤耐性化動向についての解析を行った。インフルエンザ菌は総計 109 株の送付を受け、そのうちの 96.3%は荚膜型 b(Hib)株であった。型別不能は 3.7%に過ぎなかった。遺伝子変異を伴う β -ラクタム系薬耐性菌の gBLNAR は 56.7%へと増加していた。一方、肺炎球菌は合計 52 株であったが、遺伝子変異を有する gPRSP は 34.6%と減少傾向がみられた。ワクチンと関連する荚膜型としては、gPRSP が多い 6B, 23F, 19F, 14, が優位に分離されていた。肺炎球菌の 7 価 PCV のカバー率は 74.0%, 13 価 PCV のそれは 88.0%であった。両菌種において耐性菌が多いこと、重症例と予後不良例も多いことから、医療経済的にもすべての小児に対するこれらのワクチン接種が必要であると結論された。

研究協力者

- ・ 「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」協力者 (285 医療施設の細菌検査技師)
- ・ 北里大学・北里生命科学研究所
村山 琮明, 千葉 菜穂子, 諸角 美由紀, 岸井 こずゑ

炎菌であるインフルエンザ菌と肺炎球菌において、治療の第一選択薬として推奨されてきた β -ラクタム系薬に耐性を示す菌が急速に増加し、治療上問題化している。

重篤な侵襲性感染症を防ぐためには、予防対策としてのワクチン接種が望ましいが、ワクチン導入後の効果を判断する上でも、現状の分離細菌に対するカバー率を毎年算出しておくことが必要である。

A. 研究目的

市中において発症する小児の細菌性化膿性髄膜炎(髄膜炎)は、抗菌薬の発達した現在においても、重度の後遺症や致命率の高い疾患である。

加えて、これらの疾患ではいかに早急に診断され、適切な抗菌薬がタイムリーに投与できるかにある。化膿性髄膜炎の主要な起

平成 20 年度は、「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」を通じ、平成 20 年 1 月から 12 月までの間に、全国規模で収集された肺炎球菌とインフルエンザ菌を対象とし、菌の遺伝子レベルでの耐性化率と、現状でのワクチンカバー率を算出することを目的とした。

B. 研究方法

被験菌株は、自主参加の「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究」協力者によって、個人情報情報が連結不可能にされたイニシャルのみの依頼用紙(症例担当医によるインフォームドコンセント実施済みに関するサインが記載されている)とともに、北里大学北里生命科学研究所、病原微生物分子疫学研究室へ送付を受けた。菌は小児の化膿性髄膜炎を含む侵襲性感染症由来株である。研究班への参加医療機関(細菌検査室)は285施設である。

1年間に収集されたインフルエンザ菌は、109株、肺炎球菌は52株であった。インフルエンザ菌の莢膜型は、PCRによる遺伝子解析でtype bとそれ以外の型を保持する株、莢膜を有しない株(NT)とに区別した。肺炎球菌の莢膜型はSerum Institute(デンマーク)より購入した型別用抗血清を用いて型別を行った。

両菌種における薬剤耐性遺伝子の解析もPCR用キット(湧永製薬株)で行った。

(倫理面への配慮)

菌株収集に際しては、各症例担当の主治医に対し、□患者家族に対して分離された菌株の精査を他の施設で実施すること、□理由は治療抗菌薬が適切であるか専門家によって解析していただき至急知りたいこと、□その成績を自施設の成績と併せて治療上の参考にしたいこと、等のインフォームドコンセントが文書にて実施された。

菌株送付時には、当該文書のコピーが同封されてきている。

なお、菌株受領の際には、症例の個人情報に配慮し、イニシャルのみとして個人が特定できないようにするとともに、データ保管には十分な配慮が払われた。

C. 研究結果

1. インフルエンザ菌

侵襲性感染症由来として109株の送付を受けたが、図-1に示すように、そのうち化膿性髄膜炎由来株は89株、その他に敗血症、化膿性関節炎、喉頭蓋炎、蜂窩織炎などの由来株があった。

図-2にはこれらの症例の年齢分布とHib株の割合を示した。発症年齢は年々低年齢化し、1歳未満が38.5%を占め、1歳の33.9%と併せると、1歳以下が72.4%を占めた。これらの起炎菌は、4例を除いた大多数株は莢膜bを保持するHib(96.3%)であった。

図には示さないが、分離株中に占める耐性菌の割合は、低年齢層ほど遺伝子学的解析によるβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌(gBLNAR)の分離が多かった。

109株に占める耐性パターンの異なる菌株別の成績では、gBLNARが56.7%と突出しており、その他のgLow-BLNARは19.9%、gBLPACR-Iは1.9%、gBLPACR-IIは6.7%、β-ラクタマーゼ産生のgBLPARは5.8%、遺伝子変異と持たない感性菌のgBLNASは9.6%とわずかであった。

図-3には、1999年から2008年までの化膿性髄膜炎由来インフルエンザ菌における耐性化動向を示す。経年的耐性化動向をみると、gBLNARは依然として増加していることが示されている。今後はβ-ラクタマーゼとPBP3の遺伝子変異を併せもつgBLPACR-IIの動向にも注目する必要がある。

なお、インフルエンザ菌による発症例においては、基礎疾患を有する児は少なかった。予後については調査が難しく、明確なデータは得られなかった。

2. 肺炎球菌

図-4には、1年間に収集された52症例の疾患の内訳を示す。化膿性髄膜炎由来株が約60%を占めていた。耐性度と遺伝子との関係はgPISP(*pbp2x*)、あるいはgPISP(*pbp1a+pbp2x*)のように記される。遺伝子変異のみられない株はgPSSP、そして*pbp1a*、*pbp2x*、および*pbp2b*の3遺伝子の変異した株はgPRSPと表現される。

分離菌における感性/耐性の内訳では、gPSSPの分離は13.4%と極めて少なく、分離菌の大半は何らかの遺伝子変異を持つgPISP(52.0%)とgPRSP(34.6%)であった。以前に比較するとgPRSPの分離には減少傾向が認められた。

発症例の年齢分布は図-5に示す。40.3%が1歳未満、1歳児を併せると63.4%と低年齢化していることが示された。

収集菌株の荚膜型は図-6に示す。化膿性髄膜炎以外の症例も含めると、6B型が最も多く、19F、23F、14などであった。7価PCVのカバー率は74.0%、13価PCVのそれは88.0%であった。

D. 考察

小児の化膿性髄膜炎の原因菌としては、インフルエンザ菌と肺炎球菌が最も重要であるが、これらに耐性菌が出現し治療上の問題となって久しい。

ようやくにしてHibワクチンの任意接種が開始されたが、結果で述べたように、インフルエンザ菌、肺炎球菌の発症例の多くが1歳未満である。このことは、ワクチン接種は生後できるだけ早い時期、少なくとも2回目接種が生後6ヶ月までに行われていることが理想である。

一方、近年、成人の重症感染症において従

来ほとんど分離されていなかった荚膜型の肺炎球菌による発症例が増加しているが、小児においても今後ワクチンに組み込まれていない荚膜タイプによる発症例が増加する懸念がある。

今後侵襲性感染症由来株の荚膜型の動向には、引き続き注目していく必要がある。

E. 結論

市中で発症する最も重篤な疾患である化膿性髄膜炎等の起炎菌であるインフルエンザ菌と肺炎球菌について、耐性菌が急速に増加していること、それらはワクチン接種によって予防できる型であることを明らかにした。

F. 研究発表

1) 論文発表

- ・ 生方公子, 中山栄一: 肺炎球菌の耐性化とワクチン. 小児科, 49: 301-307, 2009
- ・ Kimiko Ubukata: Simultaneous and rapid detection of causative pathogens in community-acquired pneumonia by real-time PCR. Japan Medical Association Journal (JMAJ), 51: 46-50, 2008
- ・ Hope L. Johnson, K. Ubukata, et al.: pneumococcal global serotype project. Summary report. (GAVI's PneumoADIP), 2007
- ・ Chiba N., Murayama S. Y., Morozumi M., Nakayama E., Okada T., Iwata S., Sunakawa K., and Ubukata K: Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. J Infect Chemother., (印刷中), 2009
- ・ Chiba N., Morozumi M., Sunaoshi K.,

Takahashi S., Takano M., Komori T., Sunakawa K., Ubukata K. and IPD surveillance study group: Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Epidemiology and Infection*, (印刷中), **2009**

- ・ 砂川慶介, 生方公子, 千葉菜穂子, 長谷川 恵子, 野々山勝人, 岩田敏, 秋田博伸, 佐藤吉壮: 本邦における小児化膿性髄膜炎の動向(2005-2006). *感染症学雑誌*, **82**: 187-197, **2008**
- ・ 黒川いく, 真崎純子, 千葉菜穂子, 生方公子: 急性中耳炎例の中耳貯留液から分離された肺炎球菌の莢膜型と薬剤耐性遺伝子解析. *日本臨床微生物学雑誌*(印刷中), **2009**

2) 学会発表

- ・ Chiba N, Morozumi M., Ubukata K., Sunakawa K.: Serotype distribution and

antimicrobial resistance in invasive pneumococcal disease (IPD) in Japan. Poster No. C2-257, 48th ICAAC/IDSA,

- ・ 青木泰子, 千葉菜穂子, 生方公子: 成人における肺炎球菌菌血症の臨床, および細菌学的検討. *日本感染症学会総会*, **2009**

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

図-1. インフルエンザ菌の分離された疾患名(n=109)

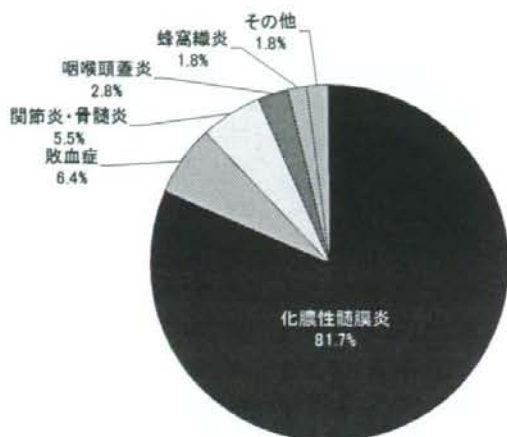


図-2. インフルエンザ菌陽性例の年齢分布

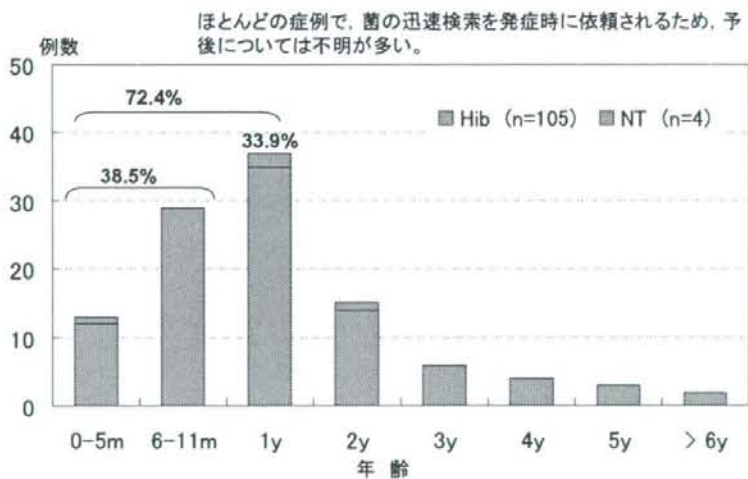


図-3. 化膿性髄膜炎由来インフルエンザ菌の経年的耐性化

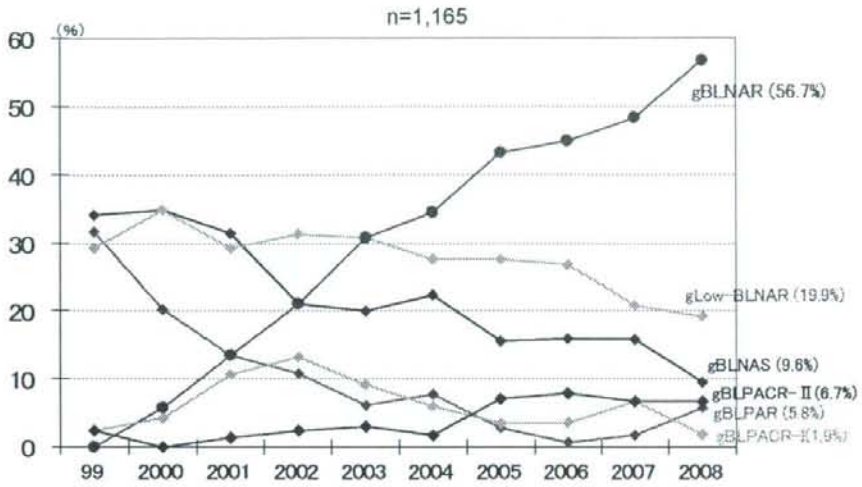


図-4. 肺炎球菌による侵襲性感染症(n=52)

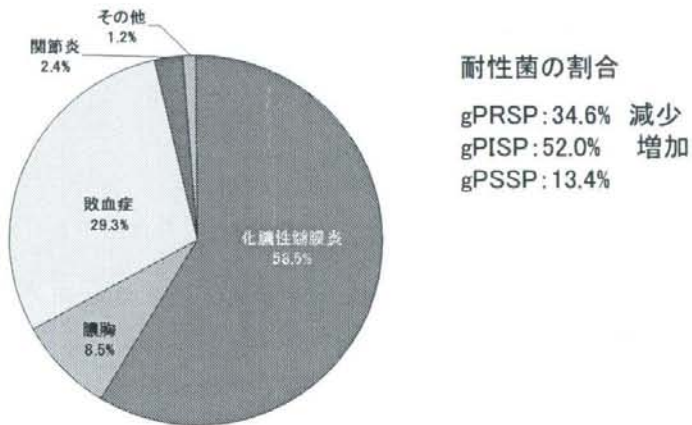


図-5. 肺炎球菌性・侵襲性感染症の発症年齢 (n=52)

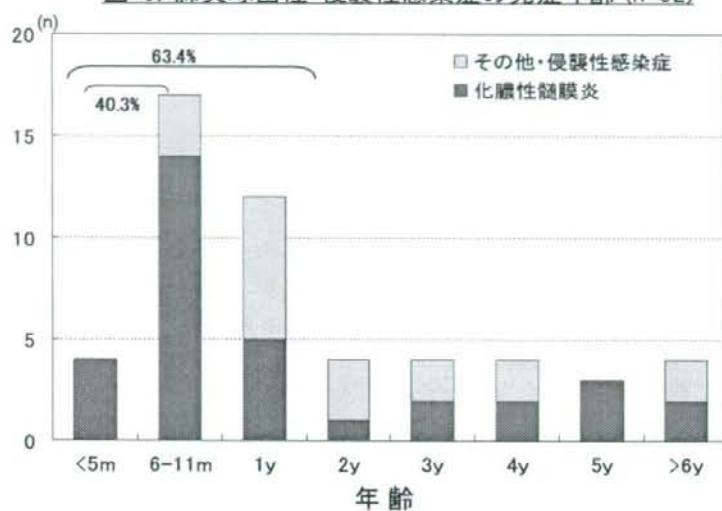


図-6. 侵襲性感染症由来肺炎球菌の荚膜型 (n=50)

