

図1 プレベナー発売前後の小児侵襲性感染由来肺炎球菌の血清型

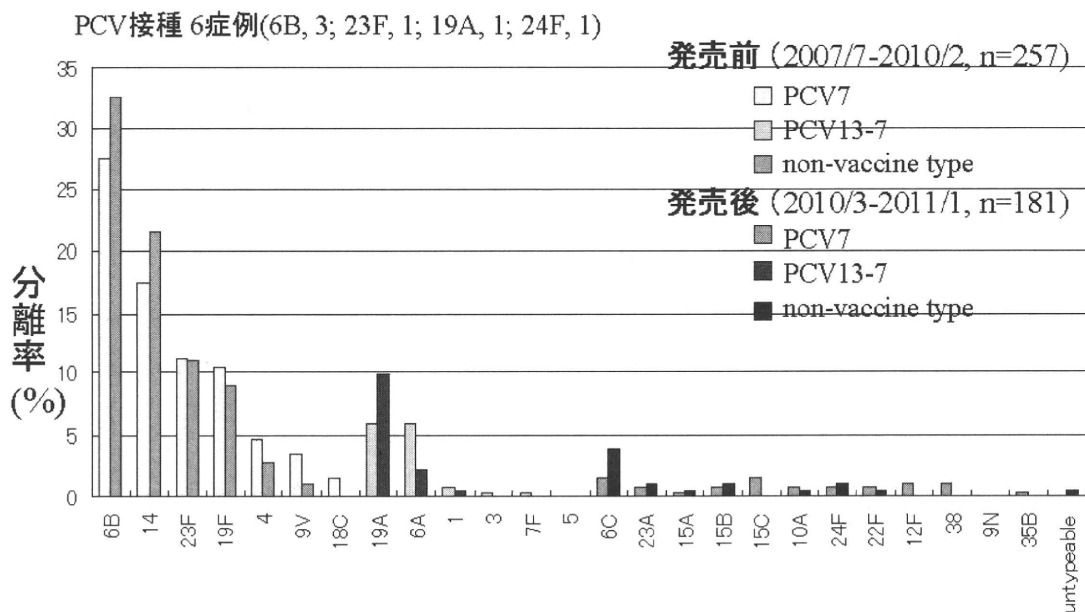


図2 血清型19A肺炎球菌の薬剤感受性とシークエンスタイプ

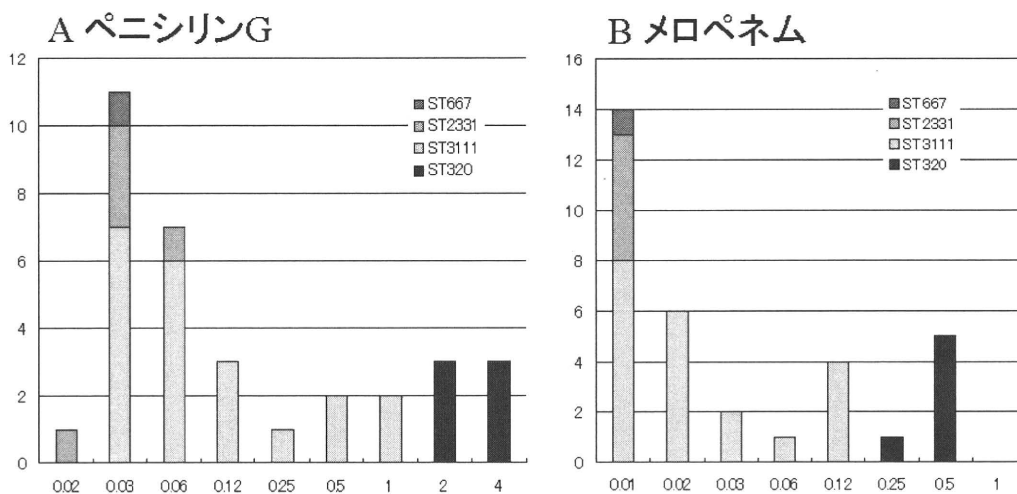
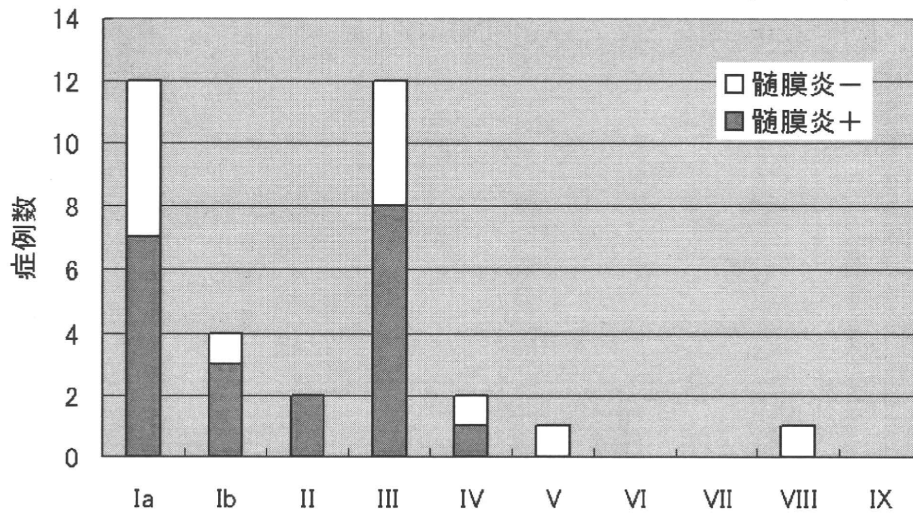


図3 GBSの血清型と髄膜炎症例 (n=34)



新しく開発された Hib、肺炎球菌、ロタウイルス、HPV 等  
の各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究

## 小児侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症分離株の解析並びに小児細菌性髄膜炎症 例からの培養陰性髄液検体における PCR による起因菌推定の検討

研究分担者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

**研究要旨** 本分担研究では小児侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症例からの分離菌を収集し、血清型別、薬剤感受性試験等を行うことにより、ヘモフィルス b 型ワクチン(Hib ワクチン)の導入前、普及過程の分離菌株の細菌学的特性について把握を行った。また、細菌性髄膜炎疑い症例において、培養陰性であった髄液検体について遺伝子増幅法(polymerase chain reaction, PCR)により起因菌推定を行った。平成 19 年 6 月～平成 20 年 11 月に 9 県で分離された 72 株(第 1 群)と平成 20 年 12 月～平成 22 年 12 月に 9 県で分離された 159 株(第 2 群)の血清型別、薬剤感受性試験を行い、両群の比較検討を行った。血清型は両群ともに b 型が大部分を占め、第 1 群で 97.2% (70/72)、第 2 群で 98.1% (156/159)が b 型であった。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌株は、第 1 群で 18.1% (13/72)、第 2 群で 10.3% (16/159)であった。3 検体の培養陰性髄液検体のうち、1 検体において *H. influenzae* に特異的な遺伝子が検出され、残りの 2 検体では陰性であった。

### 研究協力者

木村幸司	感染研細菌第二部
久保田眞由美	同 上
佐々木裕子	同 上
加藤はる	同 上

### A. 研究目的

*Haemophilus influenzae* type b (b 型インフルエンザ菌, Hib) による侵襲性感染症は、小児における敗血症、髄膜炎などの重篤な感染症であるが、Hib ワクチンの定期接種化により先進諸国では発症数が激減したと報告されている。我が国でも平成 20 年 12 月に任意接種が開始された。研究班全体の目的にはこのワクチンの有効性を疫学的に実証するため、10 道県において当該感染症を全数把握しワクチン導入前後における罹患率等の変化を追跡することである。本分担研究はそのうち 9 県における症例からの分離菌を収集し、

血清型別、薬剤感受性試験等を行い、ワクチン導入に伴う分離菌株における変化を検討することを目的とした。本分担研究では、臨床分離 *H. influenzae* 菌株の血清型別および薬剤感受性試験を行い、平成 19 年 6 月～平成 20 年 11 月に分離された 72 株(第 1 群)と平成 20 年 12 月～平成 22 年 12 月に分離された 159 株(第 2 群)の比較検討を行った。

また、起因菌の分離ができなかった細菌性髄膜炎疑い症例において、髄液検体中の細菌遺伝子検出により、起因菌の推定を行った。

### B. 研究方法

**供試菌株**：菌株は平成 19 年 6 月～平成 22 年 12 月に、9 県の共同研究者/主治医から送付された。これらの菌株は侵襲性感染症(髄膜炎、菌(敗)血症、関節炎等)患児の髄液または血液等から日

常診療の一環としての細菌培養同定検査により分離され *H. influenzae* と同定された。

**血清型別**：インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清「生研」（デンカ生研）を用いた。

**PCR法による莢膜型別**： Falla TJ *et al.* J. Clin. Microbiol. 32: p2382-2386 (1994)を一部改良して実施した。

**$\beta$ -ラクタマーゼ活性検出**：ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」（日水製薬）または、セフィナーゼディスク（ベクトン・ディッキンソン）を用いた。

**薬剤感受性試験**：Etest（AB BIODISK）を用い、試験用培地には Haemophilus Test Medium（HTM, ベクトン・ディッキンソン）を用いた。薬剤としてアンピシリン（ABPC）、スルバクタム／アンピシリン（ABPC/SBT）、ピペラシリン（PIPC）、メロペネム（MEPM）、セフォタキシム（CTX）、セフトリアキソン（CTRX）を用いた。

**髄液検体**：髄液 3 検体が共同研究者／主治医から送付された（国立感染症研究所検体番号 Zuk023, 024,ならびに 027 とした。）。これらは臨床症状、髄液所見等から細菌性髄膜炎が疑われたが、髄液培養が陰性であった症例からの検体で、PCR による起病菌推定のため送付された。

**髄液からの細菌遺伝子検出**：髄液検体を QIAamp DNA Mini kit（QIAGEN）を使用して、DNA を精製した。抽出 DNA を鋳型として LMC Hall *et al.*の方法(Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1995, 14, p.1090-1094)に従い、16S-23S rRNA spacer region を nested PCR 法により増幅し、*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* の 4 細菌種の遺伝子検出を行った。

**（倫理面への配慮）** 髄液における PCR による髄膜炎起病菌推定については、本研究のために新たに髄液採取することはなく、日常的な診療における臨床診断目的で採取・使用終了後、通常では廃棄さ

れる髄液検体の一部を用い、事前にインフォームドコンセントを得た上で実施した。研究の内容については、「国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」の審査と承認を経て研究が実施された。なお、診療情報は匿名化され、対照表は協力医療機関側において厳重に管理された。

## C. 研究結果

平成 19 年 6 月より平成 20 年 11 月までに 72 症例 76 株（第 1 群）、平成 20 年 12 月より平成 22 年 12 月までに 159 症例 198 株（第 2 群）の送付を受けた。1 症例は Hib ワクチン 1 回接種の経歴があったが、それ以外は Hib ワクチン接種歴のある患児からの分離菌株はなかった。

複数部位から菌が分離された症例については無菌的部位からの 1 株を選び、*H. influenzae* 第 1 群 72 株、第 2 群 159 株について以下に集計・記述した。

莢膜血清型は b 型が大部分を占め、第 1 群で 97.2% (70/72)、第 2 群で 98.1% (156/159)が b 型であった。b 型と判定されなかった 5 株については、凝集法および PCR 法による莢膜型別により、すべて、non-typable と判定された。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌株は、第 1 群で 18.1% (13/72)、第 2 群で 10.3% (16/159)であった。第 1 群 72 株、第 2 群 159 株の薬剤感受性試験結果を図 1 に示した。参考として、微量液体法で設定されている the clinical and laboratory standard institute (CLSI)のブレイクポイントを適合させたところ、アンピシリンでは、第 1 群で、感性 41 株(56.9%)、中間 15 株(20.8%)、耐性 16 株(22.2%)となり、第 2 群で、感性 79 株(49.7%)、中間 39 株(24.5%)、耐性 41 株(25.8%)であった。アンピシリン／スルバクタムでは、第 1 群で、感性 41 株(56.9%)、耐性 31 株(43.1%)であり、第 2 群では、感性 76 株(47.8%)、耐性 83 株(52.2%)であった。メロペネムでは、第 1 群で、感性 72 株(97%)、第 2 群で、感性 149 株(93.7%)であったが、第 2 群では 10 株が非感性 (MIC, 0.75-1  $\mu$ g/ml) であっ

た。セフトリアキソンでは、第1群、感性72株(100%)、第2群、感性159株(100%)であった。セフォタキシムに対しては、第1群、感性72株(100%)、第2群、感性158株(99.4%)であったが1株は非感性(MIC, 4 µg/ml)であった。

髄液3検体から抽出したDNAを鋳型として行ったPCRについては、Zuk027で、*H. influenzae*のみが陽性となった。他の検体からは、検討した細菌遺伝子は検出されなかった。

#### 〇. 考 察

Hib ワクチン定期接種化以前の欧米諸国と同様に侵襲性感染症由来株の血清型は大部分がb型であった。Non-typable株によっても低頻度ながら侵襲性感染症を引き起こされることは内外に報告がある。欧米ではHib コンジュゲートワクチン定期接種化後にa型、f型などによる侵襲性感染症の増加が報じられている。我が国でも今後、Hib コンジュゲートワクチンでは予防できないb型以外の血清型菌による侵襲性感染症が増加する可能性があるため、侵襲性感染症由来*H. influenzae*株の血清型の監視の継続が必要と考えられる。

β-ラクタマーゼ産生株は、第1群13株(18.1%)、第2群16株(10.3%)で、約30%と報告されている米国、カナダより頻度は低かった。国内では10数%の頻度の報告が多く、本研究においても同様であった。

現在小児侵襲性*H. influenzae*感染症に対する標準的選択薬剤の一つとされるメロペネムのMinimum inhibitory concentration (MIC)が高い菌株が少なくなかった。つまり、メロペネムについては10株(6.3%)が感性(S)カテゴリーの上限(0.5 µg/ml、CLSI基準に拠る)を超えるMIC値を示した。

本検討では、MIC測定のためにEtestを用いているが、Etestの製造者はCLSI基準に準拠して*H. influenzae* MIC測定用培地としてHaemophilus test medium

(HTM)を指定している。しかしこの培地は*H. influenzae*には至適ではなく、一部が生育不良となり、MIC測定不能、或いはMIC測定困難で再現性が悪かったため、それらの菌株についてはチョコレートII寒天培地を用いてMICを再測定した。これは*H. influenzae*に対するMIC測定法として残された課題である。

#### エ. 結 論

平成19年6月から平成22年12月までに9県で分離された*H. influenzae*菌株において、血清型別、薬剤感受性試験を行い、第1群(平成19年6月から平成20年11月)および第2群(平成20年12月から平成22年12月)に分けて、両群の比較検討を行った。血清型はb型が大部分を占め、第1群で97.2%(70/72)、第2群で98.1%(156/159)がb型であった。現在標準的に使用されているセフォタキシムとメロペネムに対してほとんどの株が感性(S)カテゴリー内にはとどまるものの、MIC値がブレイクポイントを超える菌株が散見された。

平成20年12月にHibワクチンの任意接種が開始されたが、未だワクチンの普及率が低い状況であることから、現時点ではHibワクチン導入による病原体の血清型などにおける影響を検討/評価するのは難しく、今後も研究の継続が必要である。

#### フ. 健康危機情報

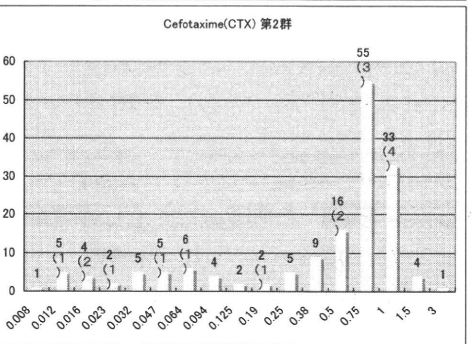
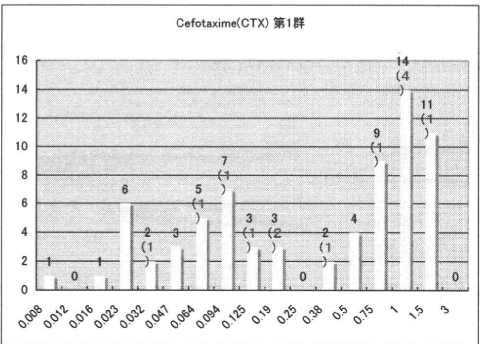
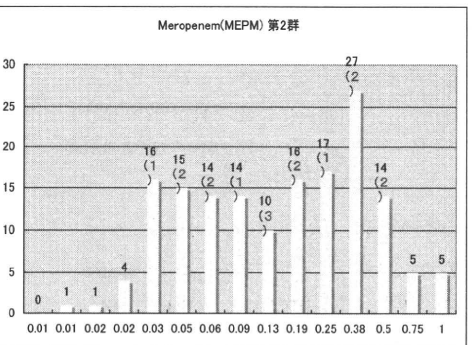
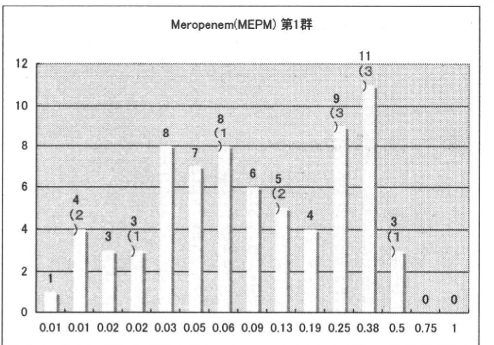
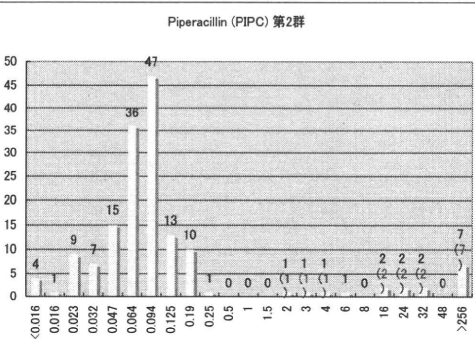
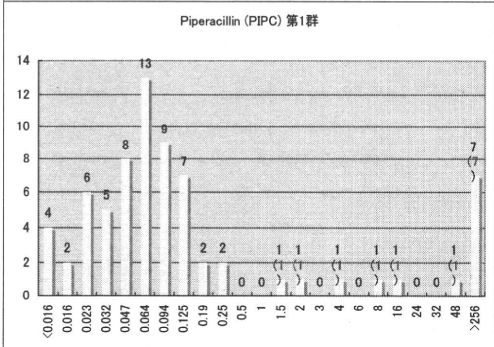
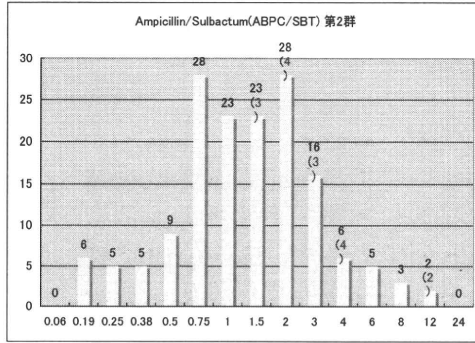
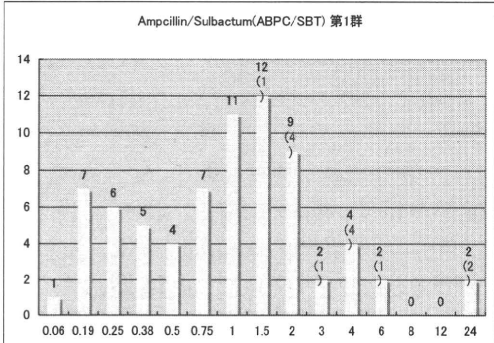
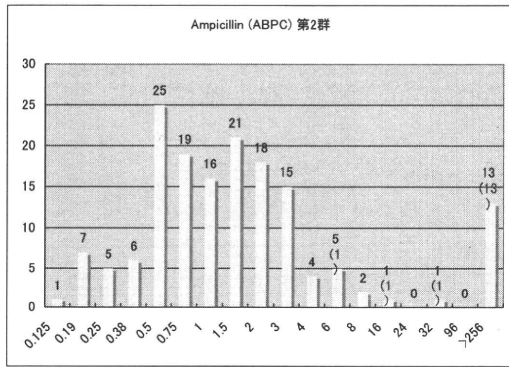
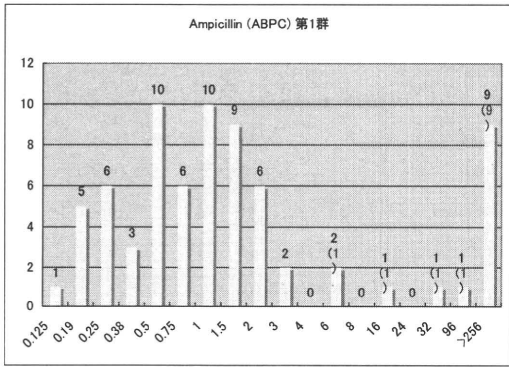
特記すべきもの無し。

#### グ. 研究発表

1. 論文発表  
現在、執筆中
2. 学会発表  
なし

#### ヒ. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



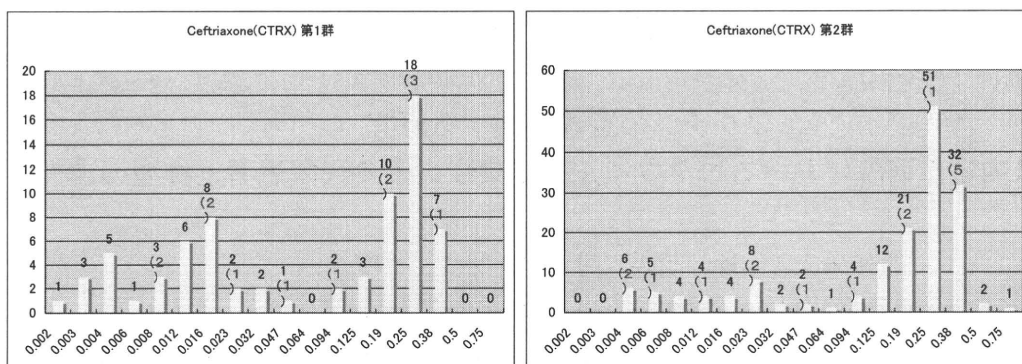


図1. 検討分離菌株における抗菌薬のMIC分布 (第1群72株、第2群159株)

横軸：MIC (μg/ml)

縦軸：株数 (括弧内はベータラクタマーゼ産生株数)

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書 (平成 22 年度)

ワクチンの意義に関する研究  
三重県内定点病院におけるロタウイルス感染症による入院患者と株型の調査

主任研究者：神谷 齊 (国立病院機構三重病院)

分担研究者：中野貴司 (国立病院機構三重病院)

谷口孝喜 (藤田保健衛生大学ウイルス・寄生虫学講座)

研究協力者：浅田和豊、庵原俊昭 (国立病院機構三重病院)、井上正和、東川正宗 (山田赤十字病院)、神谷敏也 (松阪中央総合病院)、井戸正流、田中滋己 (国立病院機構三重中央医療センター)、神谷元 (国立感染症研究所感染症情報センター)

#### 研究要旨

ロタウイルス感染症は全世界において重症小児下痢症の主原因となっている。アメリカの5歳未満の子どもでのロタウイルス感染症の現状は年間死亡例 20~60、入院例 55,000~70,000、外来受診例 600,000 と推定されている。

アメリカを始め諸外国ではすでに2種類のロタウイルスワクチンが定期接種として導入されており、我が国でも治験が進んでいる。日本でもロタウイルス感染症は重症小児下痢症の原因となるが、現在のところロタウイルス感染症による負荷及び治療費についての情報は限られている。したがって、我々は三重県における5病院にてロタウイルス感染による小児下痢症のサーベイランスを行うこととした。これらの病院で感染性胃腸炎の診断にて入院した5歳未満の症例のうち、検査キットにてロタウイルス感染症と診断された症例の数、および感染した型について調査する。これらの結果を合わせることで日本におけるロタウイルス感染症の疾患及び経済的負荷を提示することが出来るとともにロタウイルスワクチンを日本に導入した場合のインパクトを推測することが可能となる。ロタウイルス感染症による下痢症の入院率及び株型、治療費などに関する情報は医師や政策担当者がロタウイルスワクチンの日本に導入決定において非常に重要な役割を果たすことになるであろう。

#### A. 研究目的

この研究の目的は日本におけるロタウイルス感染による小児下痢症の罹患率を推定することであり、その目的達成のために laboratory confirmed population-based サ

ーベイランスを3都市(津、松阪、伊勢)で行う。これにより収集されたデータから、現在ロタウイルス感染により生じる医療者の負担や罹患者の経済的負荷、さらにはロタウイルスワクチンを導入した場合の影響



が推定でき、将来のワクチン導入を判断する上で大きな影響を与えることが可能である。

目的

1. 三重県内3都市（津、松阪、伊勢）における5歳未満の下痢症による入院症例のうち、ロタウイルス感染によるものの各都市での罹患率を求める
2. 日本におけるロタウイルス感染症関連入院例の株型を調べる。

## B. 研究方法

(1) 本サーベイランスは、三重県内の複数施設における5歳未満小児の急性下痢症の前向き観察研究であり観察期間は3年間である(2007年11月1日～2010年10月31日)。

(2) 参加機関は三重県内5病院である(鈴鹿中央病院、国立病院機構三重病院、国立病院機構三重中央医療センター、松阪中央総合病院、山田赤十字病院)。なお、鈴鹿中央病院に関しては津、松阪、伊勢各市在住の受診患者のみを登録する。

(3) 各施設において急性胃腸炎、または下痢症、脱水症の診断にて入院し、後に示すサーベイランス参加条件を満たす患者のみを登録する。

(4) 入院時に各施設共通の調査事項(質問表、添付)を担当者に記入してもらう。質問事項は、住所(市のみ)、年齢、性別、入院時所見、迅速検査施行の有無と結果などであり、治療後の経過を含め必要性があればカルテから情報を収集する。

(5) 入院時に患児の便サンプルを採取する。サンプル(便)は症状出現後14日以内に採取されたものであればよい。病院滞在中にサンプルが採取できれば各施設に置いて迅速キットにてロタウイルス感染の有無を検査する。

(6) 便は検査結果のいかに問わず国立

病院機構三重病院へ送付される。集められたサンプルは感度が高いとされるRotaclone(ELISA法)にて、再度ロタウイルス感染の有無を確認する(ただし、1年目のサーベイランスで迅速検査キットの感度、特異度が高いことが判明したため、2年目以降は迅速キットの結果のみで陽性と判断した)。

(7) Rotacloneにて陽性(2年目以降は迅速診断キットで陽性)と判定されたサンプルは藤田保健衛生大学ウイルス寄生虫学教室に送られ、PCR法によりロタウイルスの株型を判定した。具体的な方法は、便サンプルをPBSで10%便懸濁液を調製し、上澄み液をフェノール・クロロホルム処理してRNAを抽出する。抽出したRNAにすべてのG、あるいはP血清型に共通のプライマーを使用して逆転写反応を用いた1st PCRを行い、続いて各血清型に特異的なプライマーを用いた2nd PCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、増幅長を確認することで株型を確定した。

(登録対象患者)

### a.参加条件

以下の全ての条件を満たすものがこの研究の参加対象者となる

- ・参加施設の所在地に在住している(津市、松阪市、伊勢市)
- ・生後14日以上5歳未満
- ・2007年11月1日から2010年10月31日までに参加施設に入院したもの
- ・以下の症状を認めて急性胃腸炎と診断されたもの

- 下痢(24時間以内に下痢便を3回以上排出 または
- 24時間以内に1回以上の嘔吐

- ・病気の症状が発症から10日以内のもの

### b.除外条件

以下の条件を1つでも満たせばこの研究の

対象とはならない。

- ・ 参加施設の所在地外に住んでいる
- ・ 生後 14 日未満、または 5 歳以上
- ・ 発症後 48 時間以上経過してから他病院入院中の患者が搬送された場合
- ・ 入院前 10 日以内に急性胃腸炎の症状が認められた場合
- ・ 急性胃腸炎以外の疾患により嘔吐や下痢を呈していると考えられる場合
- ・ 基礎疾患として明らかな免疫不全症を合併している場合
- ・ 両親、または家族がいない場合
- ・ すでに一度この研究に参加した場合

参考：他の臨床研究に参加していても構わない

(倫理面について)

本研究は、患者が病院受診時、あるいは入院中に自然排せつした便をサンプルとして用いており、侵襲的な処置はしていない。また、住所、年齢などの個人情報個人が特定できないよう特別な ID で管理した。また各病院の倫理委員会により承認されている。

### C. 評価及び本サーベイランスの意義

上記の方法により調査対象となる各都市の人口をもとにしたロタウイルス感染性胃腸炎入院症例の罹患率、及び原因となったロタウイルスの株型の種類と割合についての情報を得られる。この情報を得ることにより、全国における 5 歳未満の急性胃腸炎による入院例のうちロタウイルスが関与している症例数の割合が推測できる。また、ロタウイルスの株型を調べることにより、既存ワクチン導入時のシミュレーションも可能となる。

### D. 研究結果

2010 年 10 月末時点で、三重県下 3 市全体で 224 例（津市 133 例、松阪市 72 例、

伊勢市 19 例）が登録されている。ただし、入院中に便検体が採取されなかった症例も少なからず存在したため、これらの症例について年齢と入院時期を調整してロタ陽性患者を推計した。この調整された結果をもとに人口 1000 人当たりの罹患率を求めた（表 1）。これらの数字は、津、松阪では 2003 年から 5 年間入院患者を調査した際の値と非常に近似しており、この地区でのロタウイルス感染性胃腸炎の疾病負荷を示していると考えられた。また、ロタワクチンを導入し成果を上げている先進国のワクチン導入前の入院率と大きな差はなかった（アメリカ 2.7、イギリス 5.2）。伊勢に関しては過去 5 年の調査と比較し患者数が減少した。現地スタッフのインタビューではスタッフ減少のため入院適応を厳しくしたとのことであった。実際に患者が少なくなったかどうかについての判断は今後の調査結果を待つ必要がある。累積入院率をみると（図 1）、各市とも、ロタウイルス感染性胃腸炎により入院した患者の 7 割が 2 歳までに入院している。これより、ワクチンを導入する際には、2 歳までには接種が終わっている必要があると考えられた。

入院患者のサンプルから得られたロタウイルスの株型は G3 が多かったが（表 2）、108 例のサンプルから得られた G タイプ、P タイプの組み合わせは圧倒的に G3P[8]が多く、近年まで G1P[8]が流行の主流であるとする世界各国及び国内のデータと異なる結果であった。塩基配列解析の結果 G3 タイプと判定された 12 名由来の G3 ウイルス株の塩基配列は同一で、高度に保存されたまま県内で流行していることが示唆された。またその塩基配列は、近年世界各地で検出された G3 タイプの配列と同じ系統に属していることが判明した。G9 タイプについては、塩基配列が類似しているものの異なる 2 種類のウイルスが県内に流行していた。

株型のサーベイランスは適切なワクチンを選択する上で重要な情報であり、さらにはワクチン導入後の株の選択などへの影響を判断する上でも貴重な情報であると考えられた。

#### E. 今後の計画

過去3年間の本研究で、三重県の3地域での疾病負荷はある程度把握できた。ただし、ロタウイルスの真の疾病負荷を把握するには外来、救急外来受診者数を調査する必要がある。同地域で外来ベースのサーベイランスを行う予定である。また、地域性についての検討も必要であるため、同様のサーベイランスを今後他地域でも行っていく。さらに、ロタウイルス感染による脳炎・脳症合併例のような重症例、実際に要した入院費用、ロタウイルスワクチンに対する意識調査(KAPスタディー)などのデータを収集した上で、ロタウイルス導入を検討する必要があると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1) 学会発表

・第12回日本ワクチン学会

三重県下2病院におけるロタウイルス感染による急性胃腸炎の5歳未満児入院例の調査結果

神谷元 Emory University Rollins School of Public Health, Atlanta Georgia、中野貴司 国立病院機構三重病院、井上正和 山田赤十字病院、神谷斉 国立病院機構三重病院

・第13回日本ワクチン学会

三重県下3市におけるロタウイルス感染による急性胃腸炎の5歳未満児入院例の調査結果

神谷元国立感染症研究所感染症情報センター、中野貴司 国立病院機構三重病院、井上正和山田赤十字病院、神谷敏也 松阪中

央病院、神谷 斉 国立病院機構三重病院  
2) 論文

Kamiya H, Nakano T, Inoue M, Kamiya H, Abd TT, Patel M, Orenstein WA, Parashar UD. A Retrospective evaluation of hospitalizations for acute gastroenteritis at 2 sentinel hospitals in central Japan to estimate the health burden of rotavirus. J Infect Dis. 2009 Nov 1; 200 Suppl 1:S140-6.

#### G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

#### H. 謝辞

本研究の計画立案と実施に際して、常に指導と助言をいただいている Drs. Umesh D. Parashar, Catherine Yen (Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Center for Disease Control and Prevention, USA)、並びに株型判定に多大なご協力をいただいている藤田保健衛生大学ウイルス・寄生虫学講座油田晶子先生に深謝申し上げます。

#### 図表

表1. 三重県下3市におけるロタウイルスの人口1000人当たりの罹患率

City	Rotavirus Positive AGE Hospitalization Cases	Crude incidence of Rotavirus positive hospitalization† (per 1000 person year)	Adjusted Rotavirus Positive AGE Hospitalization Cases	Adjusted incidence of Rotavirus positive hospitalization† (per 1000 person year)	Risk of hospitalization per child by age 5
Ise	19	1.65 (95%CI: 1.02, 2.53)	2.59	1.88 (95%CI: 1.27, 2.68)	1 in 111
Matsusaka	72	4.81 (95%CI: 3.79, 6.02)	8.85	5.4 (95%CI: 4.36, 6.58)	1 in 41.7
Tsu	133	5.29 (95%CI: 4.15, 6.26)	18.97	6.96 (95%CI: 5.17, 7.01)	1 in 38.3

図1. ロタウイルス感染症による入院例の年齢による累積入院分布

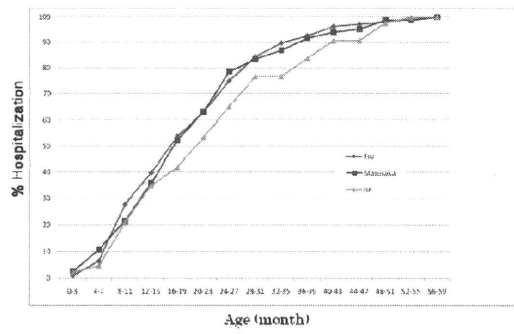


表 2.入院例のサンプルをもとに行ったロタウイルスの株型の解析結果

	G1P[8]	G2P[4]	G3P[8]	G9P[8]	other	total
山田赤十字病院	4	0	25	3	0	32
松阪中央病院	3	0	28	0	0	31
三重病院	12	1	22	2	0	37
三重中央医療センター	0	1	7	0	0	8
<b>total</b>	<b>19</b>	<b>2</b>	<b>82</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>108</b>

添付文書

## ロタウイルス感染性下痢症調査票 (H22 年度)

施設内患者番号 (ID 番号) \_\_\_\_\_

施設名: 鈴鹿中央病院

(1つ〇印) 国立三重病院

入院日時 \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

国立三重中央病院

入院時診断名 \_\_\_\_\_

松阪中央病院

山田日赤病院

### 患者情報

患者イニシャル \_\_\_\_\_

住所 津 松阪 伊勢 鳥羽 志摩 度会郡 多気郡

年齢 \_\_\_\_\_ 歳 \_\_\_\_\_ ケ月

生年月日 \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

性別 男性 女性

### 臨床所見 (入院時)

体温 \_\_\_\_\_℃

嘔吐 なし あり ありの場合 24 時間以内に \_\_\_\_\_ 回  
症状発症から \_\_\_\_\_ 日目

下痢 なし あり ありの場合 24 時間以内に \_\_\_\_\_ 回  
症状発症から \_\_\_\_\_ 日目

脱水所見 なし あり ありの場合認める項目をチェックしてください  
傾眠傾向 不眠/いらだち 経口摂取悪い  
眼球陥没 皮膚緊張低下 その他 \_\_\_\_\_

### 結果

退院日時 \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

結果 退院 転院 死亡 不明 その他 \_\_\_\_\_

### 検体情報

検体採取日時 \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

迅速キット結果 陽性 陰性 実施せず

記入者名 \_\_\_\_\_

日時 \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

## 厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書 (平成 22 年度)

研究課題「新しく開発された Hib、肺炎球菌、ロタウイルス、HPV等の各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究」

『三重県において分布するヒトロタウイルスの VP7 遺伝子の解析』

主任研究者：神谷 齊 (国立病院機構三重病院)

分担研究者：谷口孝喜 (藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座)

研究協力者：神谷元 (国立感染症研究所感染症情報センター)

研究要旨：三重県内の 5 病院から収集した小児の急性下痢症患者便中のロタウイルスの血清型 (G タイプと P タイプ) では、G3P[8]が 76%と圧倒的な分布を示した。また、数年前に主流であった G9P[8]の分布もみられた。本研究では、三重県に分布する G3P[8]株および G9P[8]株の G タイプを規定する VP7 遺伝子の塩基配列を決定し、これまで報告されている塩基配列と比較検討した。

### A. 研究目的

下痢症の起因病原体は多種類存在するが、その中で、ロタウイルスによる胃腸炎は約 40%と多く、また脱水症状を呈する頻度も高く、重篤化しやすい。それゆえ、ロタウイルス感染症により、開発途上国を中心として年間 60 万人の乳幼児の死亡があると算定されている。一方、わが国のような先進国においても、死亡例は稀であるものの、重篤な例が多く入院に占める割合が高く、医療経済的にも重視されている。ロタウイルスの感染力はきわめて高く、感染性ウイルス粒子 1～10 個でも感染が成立する。したがって、衛生状態をいかに改善しても、その制御は困難とされ、開発途上国のみならず開発国においても、ほぼ 100%の乳幼児が 5 歳までに感染し、発症すると報告されている。そこで、ワクチンによる防御が最

優先とされ、2006 年に 2 種類の経口生ワクチン：RotaTeq と Rotarix が開発され、100 カ国以上で認可され、すでに多くの国で定期接種されている。わが国においても、これら 2 種のロタウイルスワクチンの承認申請がされており、近い将来、その導入が期待されている。

ロタウイルスの血清型は多様であり、VP7 が規定する G タイプは 15 種以上、P タイプは 25 種以上が報告されており、ヒトでもそれぞれ 10 種以上の存在が知られている。血清型の分布は地域により、年により異なり、ワクチンの導入にあっては、血清型の分布は重要な基礎的データとなる。これまでの調査により、三重県下のロタウイルス胃腸炎患者での血清型は G3P[8]がきわめて高頻度であり、数年前に主流であった G9P[8]の分布もみられた。本研究では、三重県に分

布する、G3P[8]株およびG9P[8]株のGタイプを規定するVP7遺伝子の塩基配列を決定し、これまで報告されている塩基配列と比較検討した。

## B. 研究方法

(1) 三重県内の3都市(津、松阪、伊勢)での5病院(鈴鹿中央病院、国立病院機構三重病院、国立病院機構三重中央医療センター、松阪中央総合病院、山田赤十字病院)における5歳未満小児の急性下痢症の患者便を入院時に収集した。迅速診断キットにてロタウイルス感染の有無を検査し、陽性と判定されたサンプルについて、RT-PCR法によりロタウイルスのGタイプおよびPタイプを判定した。具体的には、便サンプルをPBSで10%便懸濁液とし、低速遠心後の上清を、破壊液(SDS, 2-mercaptoethanol, EDTA)でウイルスを分解しフェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿でRNAを抽出した。抽出RNAについてA群ロタウイルスに共通のプライマーを使用した逆転写反応を用い、1st PCRを行い、続いて各GタイプあるいはPタイプに特異的なプライマーを用いた2nd PCRを行い、生成物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、増幅長を確認することでGタイプおよびPタイプを確定した。1stPCRにより得られたPCR産物を精製し、塩基配列決定用サンプルとした。

## C. 評価及び本サーベイランスの意義

ロタウイルス感染性胃腸炎入院症例の原因となったロタウイルスの主要なGタイプについて、2種の感染防御抗原をコードするVP7遺伝子とVP4遺伝子の塩基配列、推定アミノ酸配列を把握することにより、分布しているロタウイルスの性状を知ることができる。これらの遺伝子情報をもとに

今後の分布ロタウイルスの変遷をトレースすることができ、それにより今後導入が予想されるロタウイルスによる影響も捉えることが可能となる。

## D. 研究結果

RT-PCRにより決定したGタイプ、Pタイプの中で、もっとも高頻度で検出したG3株について、三重県下の異なる病院、異なる年から集めた12名由来のG3ウイルス株のVP7遺伝子の全塩基配列を決定した。その結果、1例が1塩基の違いがあったものの、それ以外についてはすべて同一の塩基配列であった。以上の結果より、三重県下で流行しているG3特異性を有するロタウイルスは、高度に保存されたまま県内で流行していることが示唆された。また系統関係を検討した結果、その塩基配列は、近年世界各地で検出されたG3タイプの配列と、同一のクラスターに属していることが判明した(図1)。

さらに、数年前に主要であったG9タイプについても、7株について、VP7遺伝子の全塩基配列を決定した。その結果、互いに類似しているものの、異なる2種類のG9ロタウイルスが分布していることが判明した。アミノ酸置換は、VP7の8、46、65番目の残基にみられ、抗原構造に違いは生じていないと考えられた。これら2種類のG9株についても、近年世界各地で検出されたG3タイプの配列と、同一のクラスターに属していることが判明した(図2)。

わが国における血清型の分布状況と主要な遺伝子の塩基配列の情報を把握することは、近い将来のロタウイルスワクチン導入に向けてきわめて重要な基礎データであると考えられる。

## E. 今後の計画

三重県下における5病院での入院患者および外来患者におけるロタウイルス胃腸炎患者由来ロタウイルスのGタイプおよびPタイプの分布状況および遺伝子配列解析については、今後も継続的に進めていく。さらに三重県以外の数県でも、同様の検討を行う。これらの検討により、GタイプおよびPタイプ、そしてGとPタイプの組み合わせについて、年次ごとの変化、日本各地における地理的な違いによる変化、外来と入院での相違を詳細に把握することができる。

RT-PCRによる、GタイプおよびPタイプの検討とともに、検出した主要なGタイプおよびPタイプについて、さらには、マイナーなGタイプおよびPタイプを示すVP7遺伝子およびVP4遺伝子について塩基配列を決定し、系統関係を明らかにする。

また、特徴的と思われるウイルスについては、すべての遺伝子(11本)についても塩基配列を決定し、そのウイルスの性状を把握する。

加えて、これらのロタウイルス胃腸炎の便サンプルを集める際、胃腸炎以外の疾患との関連が疑われる症例があった場合は、

遺伝子解析を詳細に進めるとともに、培養細胞によるロタウイルスの分離に努め、乳飲みマウスでの感染実験を試みる。また、血液、髄液中でのロタウイルス抗原、感染性粒子の存在について検討する。

## F. 研究発表

### 1) 学会発表

油井晶子、神谷元、中野貴司、谷口孝喜：  
三重県下におけるA群ロタウイルスのGタイプおよびPタイプの分布状況 第58回  
日本ウイルス学会、徳島、2010

### 2) 論文

なし

## G. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

## H. 謝辞

GタイプおよびPタイプの決定に多大な協力を得た藤田保健衛生大学医学部ウイルス・寄生虫学講座の油井晶子研究員に深謝申し上げます。



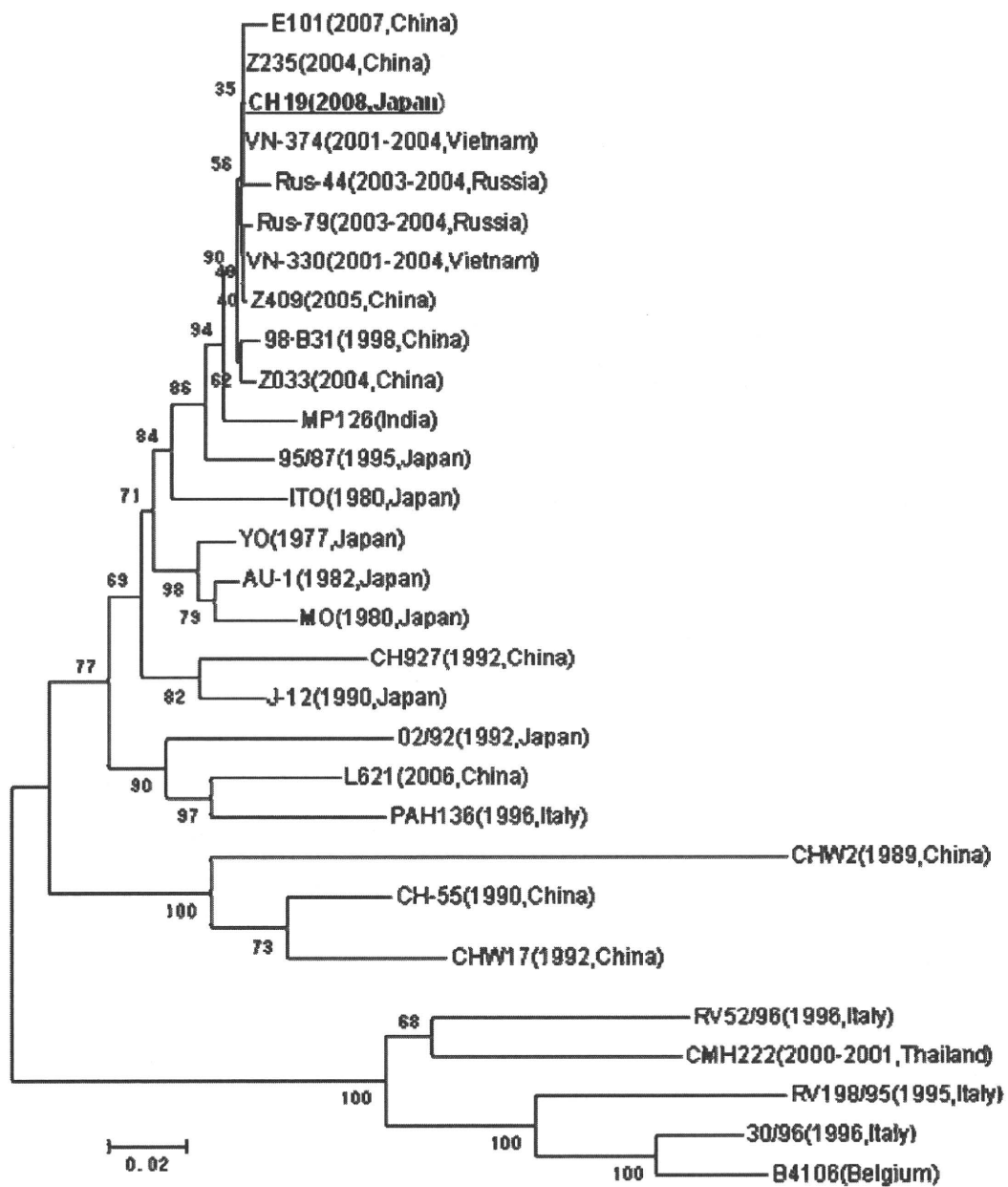


図1 三重県で分布する G3P[8] ヒトロタウイルスの VP 遺伝子の系統樹

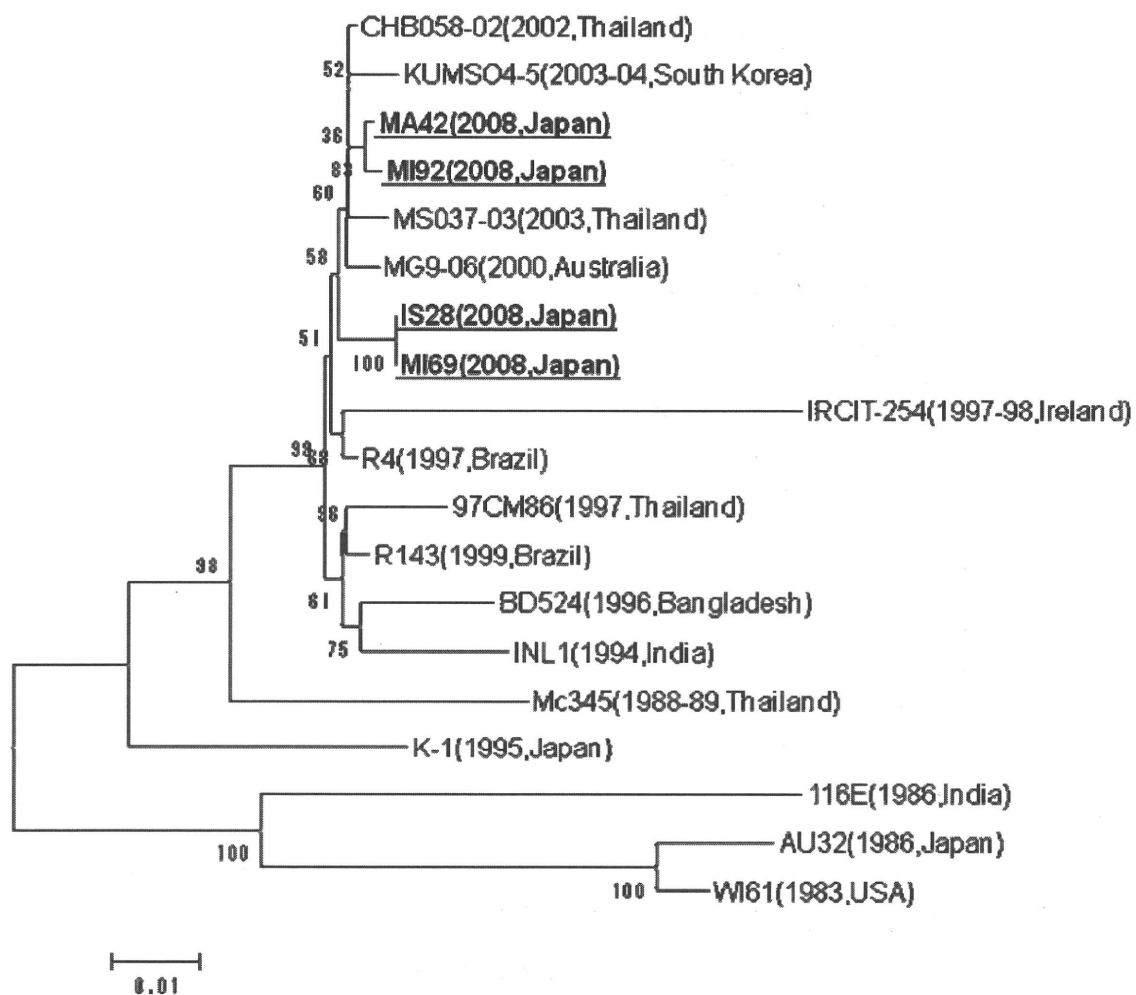


図2 三重県で分布する G9P[8] ヒトロタウイルスの VP 遺伝子の系統樹

## ワクチンの投与方法：特に皮下注、筋肉注射の有効性。安全性に関する研究

研究分担者 中山哲夫 北里生命科学研究所

【研究要旨】2008 年以降インフルエンザ桿菌、肺炎球菌、ヒトパピローマワクチンと欧米で使用されているワクチンが相次いで認可され 2011 年 4 月からは一部公費負担で接種ができるようになった。諸外国においてワクチンは筋肉注射が通常行われているが、我が国では大腿四頭筋拘縮症の問題から長い間皮下接種がおこなわれている。ヒトパピローマワクチンは Monophosphoryl lipid A をアジュバントとして用いていることから筋注でワクチン接種が始まった。大腿四頭筋拘縮症の歴史的背景を考察し筋注と皮下注射の局所反応と全身反応を評価するための評価系を構築するための基礎研究をおこなった。

研究分担者：中山哲夫

北里生命科学研究所ウイルス感染制御 教授

### A. 研究目的

諸外国でワクチンは筋注で接種されその安全性は確立されているとも言える。2008 年以降インフルエンザ桿菌(Hib)、肺炎球菌(PcV7)、ヒトパピローマワクチン(HPV)と欧米で使用されているワクチンが相次いで認可され、HPV は筋注のワクチンとして接種が始まった。我が国ではかつて抗生剤と鎮痛解熱剤の混合接種により大腿四頭筋拘縮症、三角筋拘縮症の医療訴訟が起り整形外科学会、小児科学会筋拘縮症委員会からの提言から筋注の医療行為が正当化されていない現状で、ワクチンは皮下接種が通常の投与方法となっている。また、新たに認可されたワクチンは接種の対象年齢が 2 カ月から早期に接種することで有効な感染症対策が期待できる。接種スケジュールが過密になることから同時接種が勧められている。大腿四頭筋拘縮症の文献考察を行い、現在認可されているワクチンの筋注と皮下接種の安全性を検討すること、これらのワクチンの同時接種の安全性を評価することを目的とした。

### B. 大腿四頭筋拘縮症の文献的考察

昭和 48 年山梨県富士川流域の鰍沢町で 3 歳

児健診において歩き始めの遅い、お座りのできない、歩行障害の子供が多いことに保健婦が気付きこの子供たちは鰍沢町の Y 産婦人科小児科医にかかっている子供たちで保健所長、町長が対応し山梨県立中央病院の整形外科を受診し大腿四頭筋短縮症と診断され話題に上り全国から多くの患者報告があがってきた。同様の症例は最初、昭和 21 年に東大整形外科から報告されたがその原因は先天性?と考えられていた。その後、湯河原整形外科を初めとして整形外科から相次いで報告された。大腿四頭筋以外にも三角筋の拘縮症も報告されてきた。その原因は先天性のものではなく 1 歳までに筋肉注射を受けていることが直接の原因であることが分かってきた。感冒等による発熱で医院を受診し、安易に解熱剤と抗生物質の注射が行われていたこと、特に注射薬を混合して接種していたことが原因と考えられた。子供たちの発熱の原因は圧倒的に上気道感染症のウイルス感染症で抗生剤の必要はないものであったが、内科小児科、産婦人科小児科などで一時的とは言え解熱効果に優れていることから筋肉注射がおこなわれていた。抗生物質はペニシリンが使用されていたがショックの問題から使用が控えられるようになり次いでストレプトマイシン、クラムフェニコール懸濁製剤が筋注製剤として使用された。懸濁液はその pH は生理的範囲ではなく浸透圧もた

かく組織障害性が高いことが大腿四頭筋拘縮症の原因となっていたと考えられ、特に、発熱を抑えるための鎮痛解熱剤のスルピリンと混合注射されたことが原因となっていた。ワクチン製剤は pH, 浸透圧も生理的な範囲で製造されておりワクチン接種による筋拘縮症の報告は見当たらない。

外国では、昭和 21 年ペニシリンを筋注しその生検組織所見から筋肉内に塊状の壊死像、炎症細胞の浸潤と繊維芽細胞の増殖を認め動物実験の結果と一致していることが報告されておりクロマイ、スルピリンの組織障害性は動物実験で確認されている。動物による薬剤の組織障害性の評価はヒトの反応性と一致している。したがって、動物実験で組織障害性を検討する必要がある。

昭和 50 年には日本整形外科学会から「大腿四頭筋拘縮症および類似疾患の発症が注射によることが多いと考えられるので、注射を必要とする場合には十分な配慮を行うこと」と要望書が出されている。それに呼応して昭和 51 年には日本小児科学会筋拘縮症委員会からの提言が出されている。

1. 筋肉注射に安全な部位はない。
2. 筋肉注射に安全な年齢はない。
3. 筋肉注射の適応は通常の場合において極めて少ない。
4. 筋肉注射を必要とするときは原則として保護者または本人の納得を得てから行う。

以上の提言が小児科学会からの提言されておりワクチン製剤の筋注・皮下注の安全性を検討する必要がある。

### C. 研究方法

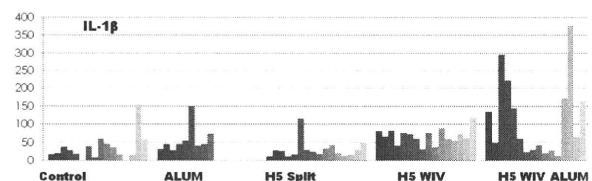
#### 1) 局所反応

現在 DPT, Hib, Pcv7, JEV, HPV, Influenza ワクチンが不活化ワクチンとして認可され、HPV は Monophosphoryl lipid A をアジュバントとして含有する HPV は筋注薬として認可されておりわが国でも筋注ワクチンとして認可された。Hib, Pcv7 も外国では筋注のワクチンであるが皮下接種のワクチンとして臨床試験が実

施され臨床現場でも皮下接種されている。これらのワクチンをマウスに接種し局所の組織切片の病理学的検査を行う。

2) 筋注と皮下注射では全身的な副反応の出現頻度には差がないと考えられるがワクチンの性状による差があると考えられる。全身的副反応の評価システムの検討を行うための基礎実験を行った。

ヒトの末梢リンパ球を 100 万/ml と 200 万/ml の調整しインフルエンザの全粒子ワクチン 3ug/well で刺激し 24 時間後の培養液を採取し BioPlex ヒトサイトカイン 17plex でサイトカインを測定した。インフルエンザワクチンの製剤によりサイトカイン産生量に差が認められた。H5N1 全粒子不活化ワクチンにアルミニウムアジュバントを加えたワクチンは IL-1 $\beta$ 、IL-6 の炎症性サイトカインの産生が他のワクチン製剤（スプリット、全粒子不活化）より高値を示した。



### D. 平成 23 年度の予定

- 1) DPT, Hib, Pcv7, JEV, HPV, Influenza のワクチンをマウスに筋注と皮下注射をして 24 時間後の血清を採取しサイトカインを測定する。マウス脾細胞をワクチン抗原で刺激し 24 時間後サイトカインプロファイルを測定する。
- 2) マウスに DPT+Hib, DPT+Pcv7, Hib+Pcv7, DPT+Hib+Pcv7 の同時接種して血清中のサイトカインプロファイルを検討する。
- 3) ヒト末梢リンパ球をワクチン抗原で刺激してサイトカイン産生量を調べる。
- 4) ワクチン接種後の発熱等の全身的副反応を認めた症例の血清のサイトカインを検査する。
- 5) ワクチン接種後の局所の病理学的検討を行う。

### E. 2010 年業績

- 1) Yoshida N, Nakayama T. Leucine at