

図 11.発症月別 (Hib 感染症データベース)

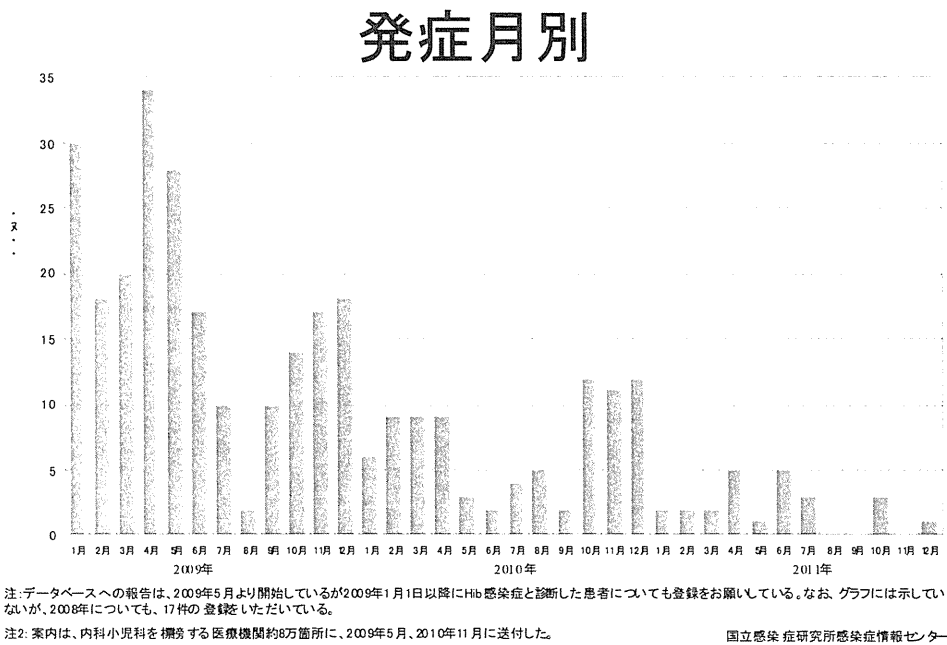


図 12.発症月別転帰別 (Hib 感染症データベース)

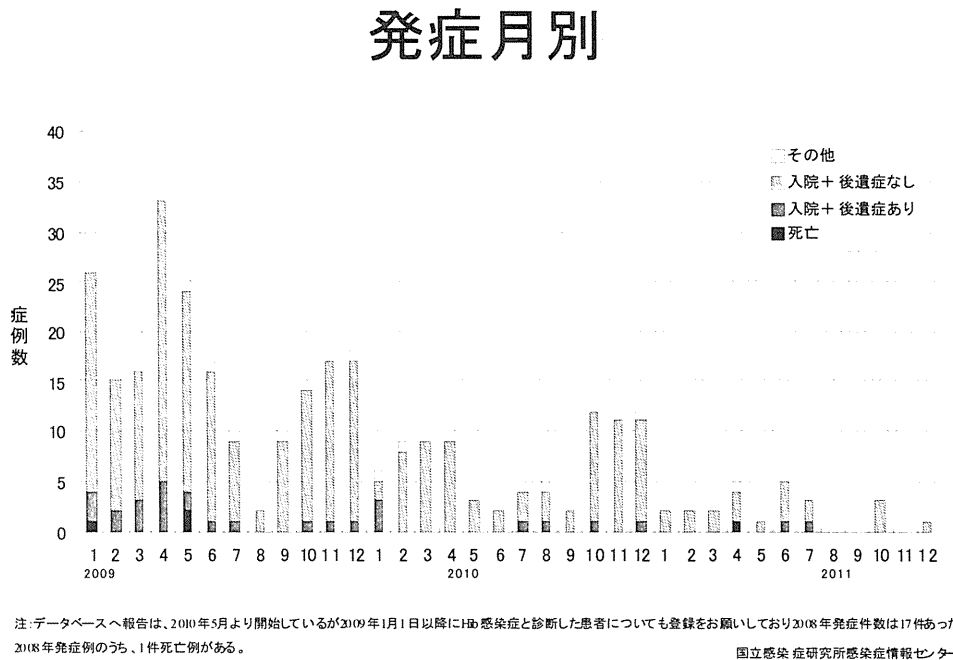


図 13.入院例 年齢別 (Hib 感染症データベース)

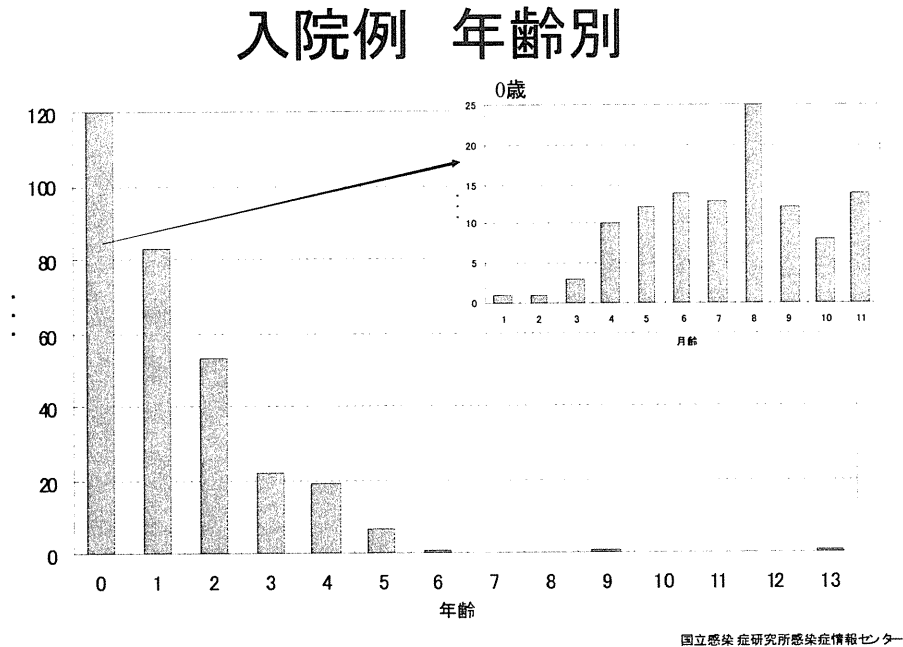


図 14. 診断名 (Hib 感染症データベース)

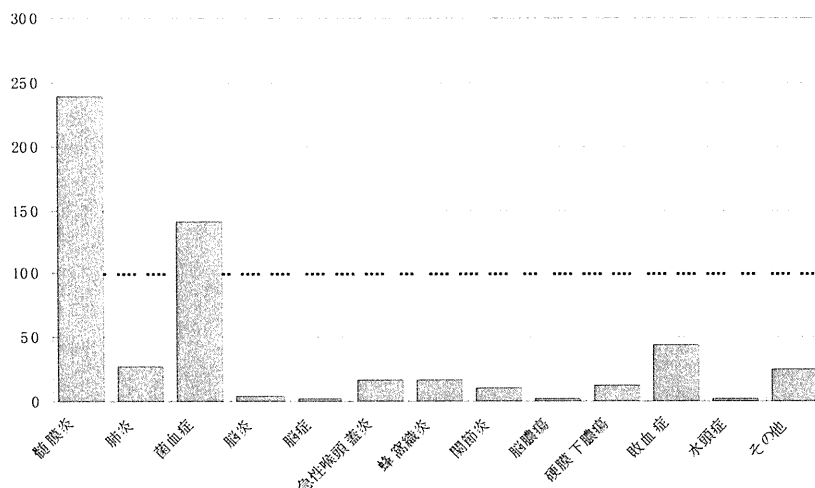
診断名

診断名	人数	%
髄膜炎／髄膜炎+菌血症／髄膜炎+敗血症／髄膜炎+硬膜下膿瘍／髄膜炎+菌血症+その他／髄膜炎+菌血症+硬膜下膿瘍／髄膜炎+菌血症+脳炎／髄膜炎+敗血症+その他／髄膜炎+水頭症+その他／髄膜炎+硬膜下膿瘍+敗血症／髄膜炎+脳炎／髄膜炎+菌血症+敗血症／髄膜炎+菌血症+水頭症／髄膜炎+菌血症+脳膿瘍+硬膜下膿瘍+敗血症+その他／髄膜炎+その他／髄膜炎+脳炎／髄膜炎+脳症+脳炎／髄膜炎+脳膿瘍+敗血症／髄膜炎+菌血症+蜂窩織炎+硬膜下膿瘍	236	68.8
菌血症／敗血症／菌血症+その他／菌血症+敗血症	33	9.6
肺炎／肺炎+菌血症／肺炎+その他	24	7.0
急性喉頭蓋炎／急性喉頭蓋炎+菌血症／急性喉頭蓋炎+敗血症	16	4.7
蜂窩織炎／蜂窩織炎+菌血症／蜂窩織炎+その他	15	4.4
関節炎／関節炎+菌血症／関節炎+敗血症+その他	10	2.9
髄膜炎+肺炎+敗血症／髄膜炎+肺炎+菌血症	4	1.2
その他	5	1.5

国立感染症研究所感染症情報センター

図 15. 診断名(複数回答)(Hib 感染症データベース)

診断名(複数回答)



国立感染症研究所感染症情報センター

図 16. 薬剤使用状況(Hib 感染症データベース)

薬剤使用状況

薬剤使用状況	人数	%
セフトリアキソン+メロペネム	54	15.7
パニペネム/ベタミプロン+セフトリアキソン	40	11.7
セフォタキシム+メロペネム	36	10.5
セフォタキシム	30	8.7
セフトリアキソン	26	7.6
パニペネム/ベタミプロン+セフォタキシム	14	4.1
セフトリアキソン+その他	12	3.5
アンピシリン	11	3.2
パニペネム/ベタミプロン+セフトリアキソン+メロペネム	11	3.2
アンピシリン+セフォタキシム	9	2.6
その他	100	29.2

国立感染症研究所感染症情報センター

図 17. 検査状況 (Hib 感染症データベース)

検査状況

	実施(人)		検査結果(人)		結果中 (人)	未実施 (人)
髄液細胞数	243	増加	223	正常	19	100
髄液蛋白濃度	202	増加	175	正常	26	141
髄液糖濃度	221	低下	159	正常	60	122
髄液細菌培養	235	陽性	203	陰性	30	108
髄液迅速(塗抹)	175	陽性	133	陰性	41	168
血液細菌培養	269	陽性	235	陰性	31	74
その他の部位からの細菌培養	124	陽性	94	陰性	28	219
血中白血球数	283	増加	204	低下 18 正常	61	60
CRP	276	陽性	271	陰性	5	67
その他の検査	31	陽性	28	陰性	3	312

国立感染症研究所感染症情報センター

図 18. 薬剤使用状況と効果 (Hib 感染症データベース)

薬剤使用状況と効果

	使用あり			
	(人)	有効と回答 (人)	無効と回答 (人)	効果不明 (人)
抗菌剤				
セフトリアキソン	175	162	92.6%	1 12
メロペネム	140	127	90.7%	1 12
セフトキシム	115	108	93.9%	1 5
パニペネム/ベタミブロン	83	67	80.7%	2 14
アンピシリン	37	32	86.5%	2 3
ペニシリン	1	1	100.0%	0 0
セフトジジム	2	2	100.0%	0 0
バンコマイシン	3	0	0.0%	1 2
その他	61	42	68.9%	5 14
ステロイド剤	183	129	70.5%	0 54

国立感染症研究所感染症情報センター

図 19. 髄膜炎、脳炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、水頭症が診断名に含まれていた者の薬剤使用状況
(Hib 感染症データベース)

髄膜炎、脳炎、脳膿瘍、硬膜下膿瘍、水頭症が 診断名に含まれていた者の薬剤使用状況

	人数	%
セフトリアキソン+メロペネム	52	21.7
パニペネム/ベタミプロン+セフトリアキソン	38	15.8
セフォタキシム+メロペネム	35	14.6
パニペネム/ベタミプロン+セフォタキシム	13	5.4
セフトリアキソン	12	5.0
パニペネム/ベタミプロン+セフトリアキソン+メロペネム	11	4.6
セフトリアキソン+メロペネム+その他	8	3.3
セフトリアキソン+その他	8	3.3
セフォタキシム	7	2.9
その他	56	23.3

国立感染症研究所感染症情報センター

厚生労働科学研究費補助金（平成 23 年度）
新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業
分担研究報告書

百日咳の実験室診断
-パラ百日咳の血清診断-

研究分担者：中山 哲夫（北里生命科学研究所）、

研究協力者：渡邊峰雄（北里生命科学研究所）

小口 薫、宮田 章子（みやた小児科）

吉田 菜穂子（国家公務員共済組合連合会立川病院 小児科）

藤野 元子（東京都済生会中央病院 小児科）

和山 行正（北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所）

【研究要旨】百日咳は whooping を伴う咳込み等典型的な症状から診断されるが、成人百日咳は典型的な症状を認めないため 2 週間以上持続する咳、夜間の発作性の咳、咳込み嘔吐などの症状から診断されている。百日咳の症状は *B. pertussis* 以外にも *B. parapertussis* の感染でも同じ症状を示すことが知られている。2010 年から東京都で地域的な百日咳の流行を認め 43 例が臨床的に百日咳と診断され百日咳菌は 3 例から分離され LAMP 法で 24 例から *B. pertussis* 遺伝子が検出され *B. parapertussis* も 3 例分離された。パラ百日咳菌の分離された患者血清のプロテオーム解析の結果、パラ百日咳外膜タンパク (p150)、線毛抗原 (p26)、低分子タンパク (p21)、ペプチドグリカン結合タンパク (p18) が陽性反応を示した。p18 はコントロール血清と差がなく診断価値は低く臨床的に百日咳と診断された血清では p150 と p21 抗体が有意な相関関係を示した。百日咳 PT 抗体と重複することは少なくパラ百日咳の診断が可能と考えられた。

A. 研究目的

百日咳は乳幼児においては無呼吸発作や脳症を合併する重篤な感染症である。1950 年から全菌体百日せきワクチンが開発され接種が始まり、1974/75 年の副反応例から一時中止になり再開はされたものの接種率は低迷し 1981 年には百日咳菌の感染防御に関連する百日咳毒素 (pertussis toxin: PT)、繊維状赤血球凝集素 (filamentous hemagglutinin; FHA) 等を精製した無細胞型百日咳ワクチンとジフテリア・破傷風トキソイドとを混合した沈降精製三種混合ワクチン (acellular pertussis combined with DT: DTaP) が開発された。DTaP 接種後では発熱等の副反応の出現率は極めて低く、DTaP 接種率も 90% 近くになり百日咳患者報告数は減少してきた。

近年、大学キャンパスでの百日咳の流行が報告されている。成人百日咳は典型的な症状を認めることは少なく、多くは慢性、遷延性の咳として百日咳の疑いすら抱かれず、また確実な診断法はなく遺伝子診断法も開発されているが

一般には普及してないための確な診断がなされていない。そのため成人百日咳の実態が明らかとなっていないのが現状である。成人の百日咳は家族内感染を起こしワクチン接種前の乳幼児への感染源となり成人百日咳の制御は大きな課題となる。DPT ワクチンを接種しているにもかかわらず百日咳の増加の原因は諸外国と比較するとワクチン接種回数が欧米より 1-2 回少ないことが一つの原因と考えられる。

百日咳の原因は *B. pertussis* であるが *Bordetella* 属には *B. pertussis* 以外にも *B. parapertussis*, *B. holmessi*, *B. bronchiseptica* の 4 種類が属しており百日咳の症状は百日咳菌、パラ百日咳菌の感染によることが知られており最近の流行で *B. holmessi* が分離され百日咳菌以外の感染も考慮しなければならない。*B. parapertussis* は臨床的に百日咳の 10% 前後を占め PT を産生してないことから DPT は効果がないことが知られている。

パラ百日咳の症状は百日咳と比較すると一般に軽症とされているが百日咳の症状は不顕性感染を含め軽症例も多く臨床像から診断は

困難で実験室診断に依存することになる。パラ百日咳の実験室診断は分離に頼ることになるが、分離率は低く血清診断法は確立されていない。百日咳の実態を明らかとするためにはパラ百日咳の実験室診断法を確立する必要がある。

B. 研究方法

1) 対象

東京都港区の済生会中央病院と立川市みやた小児科の2カ所で百日咳のサーベイランスを続けており結果を図1に示した。港区では2010年7月から流行が認められ11月には沈静化した。立川市では2011年の7月から流行が認められた。

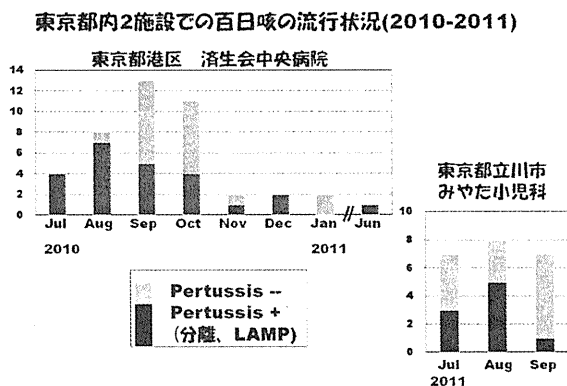


図1. 東京都内2施設での百日咳の流行

2) 菌分離、遺伝子診断

百日咳の患者の後鼻腔拭い液を Charcoal Regan-Lowe 輸送培地に保存し BG 培地で分離した。百日咳菌の確認は IS481, パラ百日咳菌の確認は IS1001 の PCR で確認した。また、後鼻腔ぬぐい液 200ul から DNA を抽出し百日咳の IS481, パラ百日咳菌の確認は IS1001 の領域に設定した LAMP 法により遺伝子検索を行った。

3) 血清抗体

PT, FHA 抗体は和光純薬の ELISA 法で測定した。DPT ワクチンに含まれていない抗原として Fim3 を用い、ワクチン抗原としては Fim2 を精製した。抗体価の測定は蛍光 EIA 法で抗原 well の蛍光強度とコントロール well の蛍光強度の比率を%表示し 400 以上(抗原 well の蛍光

強度がコントロール well の 4 倍以上)を陽性と判定した。

3) パラ百日咳菌の血清抗体価

パラ百日咳菌の外膜タンパク p150、線毛抗原 p26、低分子タンパク p21、ペプチドグリカン結合タンパク p18 のタンパクを大腸菌で発現させ精製しパラ百日咳抗原として使用した。P150, p26 は百日咳菌にはなくパラ百日咳菌に特異的なタンパクであるが p21, p18 は百日咳菌も持っているが感染時には産生されていないと報告されている。

(本研究は北里研究所病院倫理委員会で承認された。)

C. 結果

1) パラ百日咳の流行状況

2010 年の済生会中央病院での百日咳を疑った 43 例中 3 例から百日咳菌が分離され LAMP 陽性が 24 例で 24 例が百日咳と診断された。パラ百日咳は 3 例から分離され LAMP 法でも 3 例から遺伝子が検出された。臨床的百日咳の 10%弱をパラ百日咳が占めていると考えられた。

表1. 百日咳とパラ百日咳のしめる割合

	百日咳		パラ百日咳	
	Isolation +	LAMP +	Isolation +	LAMP +
<1Y	6	1	1	1
1Y	4	0	2	0
2Y	3	0	1	1
3Y	4	0	2	0
4-6Y	12	2	8	1
7-12Y	9	0	5	0
>13Y	5	0	5	0
	43	3	24	3

臨床診断百日咳の小児の10%弱にB. parapertussisが認められる。

2) パラ百日咳抗原に対する血清反応

パラ百日咳菌が分離された3例のうち2例から血清を採取することができ、百日咳菌が分離されもしくは LAMP 法で遺伝子が検出された6例から血清を得ることができた。インフルエンザと診断された4例をコントロール血清として使用しパラ百日咳抗原に対する EIA 抗

体価測定した。p150, p26, p21, p18 を EIA 抗原としてプレートに固相し希釈血清を反応させ OD 値で表示し結果を図 2 に示した。パラ百日咳の分離された 2 例は p150, p26, p21 に対してコントロール群より高い抗体反応を示した。百日咳菌の分離された 6 例中でも反応が認められたがコントロール群ではいずれの抗原に対しても低い反応であった。p18 に対しては 2 例共に低い反応でパラ百日咳の診断に利用できないと考えられた。

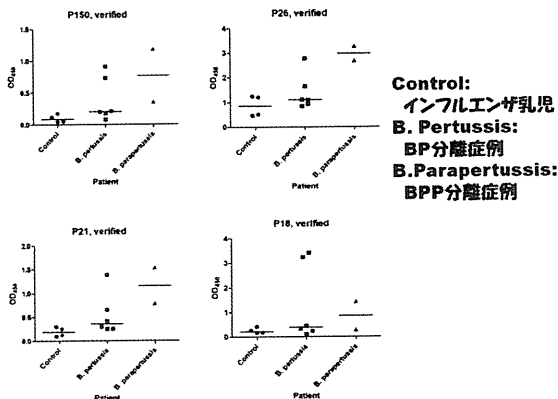


図 2. パラ百日咳抗原に対する抗体反応
次に、臨床的に百日咳と診断され 58 例の血清を用いてパラ百日咳の抗原に対する EIA 抗体の検討し結果を図 3 に示した。p150, p26, p21, p18 抗原に対して高い抗体価を持つ例が存在し 1 群の低い症例とは異なるクラスターを示している様に思われた。

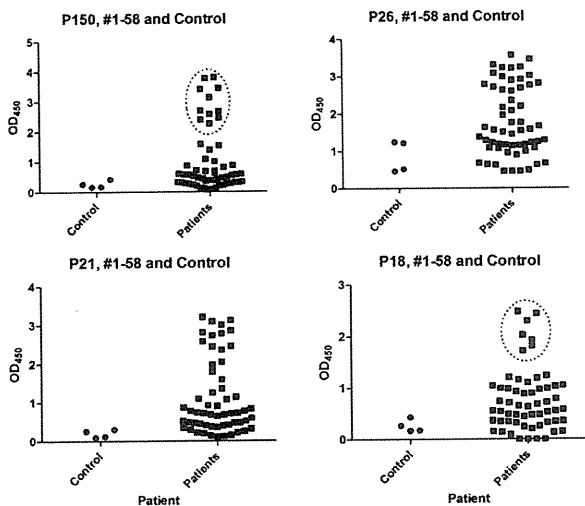


図 3. 百日咳の患者血清のパラ百日咳抗体

58 例の血清の各抗原に対する EIA 抗体の相関関係を検討し図 5 に示した。パラ百日咳菌が

分離された症例の血清の p18 抗原に対する EIA 抗体価は低く 他の抗原との相関関係は低く p26 と p18 の相関は $r^2=0.11$ と有意な相関は認めなかった。一方パラ百日咳菌に特異的なタンパクと考えられている p150 と p26 は $r^2=0.6$ 、p150 と p21 は $r^2=0.91$ と有意な相関関係を示した。

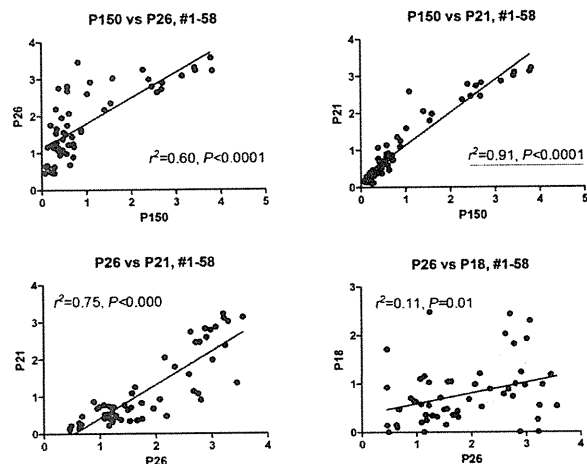


図 4. パラ百日咳抗体の相関関係

58 例の百日咳疑いの患者のパラ百日咳抗体と百日咳の PT 抗体の抗体価を患児別に図 5 に示した。コントロール群の p150, p26, p21, p18 の EIA の OD 値の平均値+3.0SD 以上を陽性と判断し 4 抗原すべてに陽性だった例は星印の 16 例がパラ百日咳の既往歴があるもしくは新規感染と考えられ百日咳 PT 抗体値が 100EU 以上の例は 12 例で PT 50-100EU の症例は 4 例であった。数例が重複して陽性であるが百日咳の中にはいずれかに抗体応答を示していた。

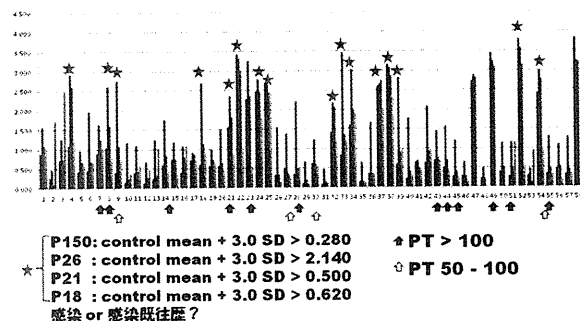


図 5. PT 抗体とパラ百日咳抗体

D. 考案

2010 - 11 年東京都内で成人百日咳の流行が

認められ同じ東京都内でも地域によって流行時期が異なりことが明らかとなった。臨床的に百日咳が疑われた患者 43 例中 24 例が百日咳と診断されパラ百日咳が 3 例診断され 8-10% 弱にパラ百日咳であることがわかった。パラ百日咳は教科書的には百日咳と比較して軽症であるとされているが、百日咳も無症候性感染、軽い咳程度から肋骨骨折を合併するものまで多彩であり症状から鑑別はできない。パラ百日咳菌は PT を産生することはないため現行の DPT ワクチンでは効果がなく DPT ワクチンの効果が減弱している原因の一つとしてパラ百日咳の流行が考えられる。その診断法は菌分離と遺伝子検索であるが百日咳と同様に受診するまでの期間が長く菌分離率が低く診断が困難である。

パラ百日咳の血清診断法は開発されてなくなくパラ百日咳の実態は不明である。パラ百日咳菌が分離された患児から血清を得てプロテオーム解析の結果のパラ百日咳菌の外膜タンパク p150、線毛抗原 p26、低分子タンパク p21、ペプチドグリカン結合タンパク p18 のタンパクがパラ百日咳患者血清と反応し遺伝子をクローニングし大腸菌で発現させ EIA 抗原として診断法を検討した。ペプチドグリカン結合タンパク p18 に対する反応性は低く診断抗原としては外膜タンパク p150、線毛抗原 p26、低分子タンパク p21 が候補になる。お互いの相関関係を見ると p150 抗原は p26、p21 にも有意な相関を示したことから診断抗原としては p150 に期待が持てる。58 例の百日咳疑いの患者血清でも PT 抗体と同時にパラ百日咳抗体が陽性になることは少なく百日咳患者の中にはパラ百日咳罹患者、感染者が存在すると考えられた。

百日咳 PT 抗体、百日咳ワクチンに含まれない Fim3 抗体、パラ百日咳菌外膜タンパク p150 の 3 種類の抗原を組み合わせて検索することで鑑別が可能と思われ症例数を増やして検討することが必要である。

E. 結論

臨床的に診断された百日咳の中に 10%弱のパ

ラ百日咳の患者が混在し、パラ百日咳菌の外膜タンパク p150 が有用な診断抗原となると考えられた。

2010 年度研究業績

1. 論文発表

- 1) Ji Yi-Xin, Ihara T, Komase K, Nakayama T. Amino acid substitutions in Matrix, Fusion, and Hemagglutinin proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells. *Intervirology* 54, 217-228, 2011.
- 2) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama T, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from a patients with subacute sclerosing panencephalitis possesses typical genome alterations and unique amino acid changes that modulate receptor specificity and reduce membrane fusion activity. *J Virol* 85, 11871-11882, 2011.

2. 学会発表 シンポジウム

1. 中山哲夫 2011 年 ワークショップ 2
百日咳の基礎から予防・診断まで
臨床における百日咳の問題点とワクチン
第 60 回日本感染症学会、第 58 回日本化学療法学会 合同学会 2011. 10. 26 - 28,
山形

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
3. その他
なし

厚生科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

大学における百日咳流行の予防・制御に関する研究

研究分担者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 大学、特に医学部における百日咳流行の実態を明らかにすることを目的に、昨年度に引き続き医学部生を対象とする百日咳保菌調査を実施した(第3回調査)。調査は百日咳の流行シーズンである5月に実施し、2大学の医学部生100名について遺伝子検査を行った。その結果、昨年度の第1回、第2回調査と同様に百日咳菌の陽性者は0名であり、保菌者は認められなかった。これまでの調査結果から、平常時に医学部生が百日咳保菌者となる可能性は低く、大学等で発生する集団感染は百日咳菌の施設侵入により引き起こされることが指摘された。なお、第3回調査では百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の遺伝子検査を同時に実施し、1名から同菌の遺伝子を検出した。

研究協力者

鯉坂裕美(国立感染症研究所・細菌第二部)

大塚菜緒(同上)

竹内啓晃(高知大学医学部附属病院)

八木哲也(名古屋大学医学部附属病院)

A. 研究目的

わが国では2002年以降成人の百日咳報告患者数が急増し、2007年には複数の大学医学部で百日咳集団感染事例が発生した。また近年では中学・高校などでも集団感染が散発している。これまでの事例解析により、大学では大規模な集団感染に発展し易いこと、さらに終息までに数ヶ月を要することが示されている。特に医学部で発生した場合、併設する大学附属病院への波及防止に多大な労力と費用が必要とされ、医学部生には予防投薬や休講措置といった対策が講じられている。百日咳感染の危険因子として学校や保育園などが挙げられており、狭い空間で長時間共有するような施設に百日咳菌が侵入すると感染は容易に拡大することが指摘されている。

百日咳の流行シーズンは春から初夏とされ、非流行シーズンは秋から冬である。流行シーズンが存在する理由は不明であるが、毎年春から初夏にかけて患者報

告数が増加することから不顕性を含めた百日咳保菌者が年間を通して存在するものと考えられている。しかし、不顕性感染を始めとする百日咳保菌者の実態は不明であり、特に医学部生の百日咳保菌状況に関する知見は得られていない。本調査研究では大学における集団感染防止策を考察するため、平成23年度に引き続き医学部生を対象とする百日咳保菌調査を実施した。

B. 研究方法

調査対象:国内2大学の医学部生100名(2年生50名、5年生50名)を検査対象者とし、2011年5月に調査を実施した。

百日咳菌の遺伝子検査:滅菌綿棒を用いて被験者から鼻腔分泌物を採取し、QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN)を用いてDNA画分(溶出液量、25 µl)を得た。遺伝子検査は国立感染症研究所細菌第二部で作製した百日咳 LAMP キット(百日咳毒素プロモーターを標的)を使用し、DNA抽出物4 µlをLAMP検査に供試した。検体採取ならびに LAMP 遺伝子検査は調査協力大学において行い、判定は蛍光・目視検出試薬(栄研化学)またはアガロースゲル電気泳動により行った。なお、DNA 検体は国立感染症研究所細菌第二部に送付し、挿入配列 IS481 を標的としたリアルタイム

PCR (IS481 real-time PCR)により確定検査を行った。

*B. holmesii*の遺伝子検査: *B. holmesii*の *recA* 遺伝子を標的とした LAMP 法(*B. holmesii*-LAMP)および *recA* real-time PCR 法により実施した。LAMP 法は国立感染症研究所細菌第二部で開発されたものを使用し、real-time PCR 法は既報(Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010, 48:1435-7)に従って行った。

(倫理面への配慮)

本調査研究は国立感染症研究所、高知大学医学部、名古屋大学医学部の医学研究倫理審査会の承認を得て実施した。

C. 結果

百日咳保菌調査は A 大学医学部 50 名、B 大学医学部 50 名について遺伝子検査が行われ、大学および国立感染症研究所の検査において百日咳菌陽性者は認められなかった(表1)。一方、B 大学では *B. holmesii* の遺伝子検査 (IS481 real-time PCR, *B. holmesii*-LAMP, *recA* real-time PCR) がすべて陽性となる医学生 1 名 (2 年生) が認められ、IS481 real-time PCR と *recA* real-time PCR の Ct 値はそれぞれ 36.6、35.7 を示した(表2)。異なる 3 種類の遺伝子検査が陽性となったことから、この 1 名を *B. holmesii* の保菌者と判定した。なお、リアルタイム PCR の Ct 値から、*B. holmesii* の保菌量は少ないことが示された。

D. 考察

第 3 回調査では百日咳の流行シーズンに医学部生 100 名を検査し、百日咳菌の検査陽性者を認めなかった。百日咳 LAMP 法は百日咳菌に特異的であること、さらに高感度な検査法であることから、医学部生の百日咳菌保菌者は 0 名と判断された。昨年度に実施した第 1 回調査と第 2 回調査においても百日咳菌保菌者が認められなかったことから、平常時に医学部生が百日咳保菌者となる可能性は低く、大学等で発生する集団感染は百日咳菌の施設侵入により引き起こされることが指摘された。このことから、医学部での集団感染防止には保菌者の施設立入り制限が有効であると考察さ

れた。

今回の調査では百日咳類縁菌 *B. holmesii* の遺伝子検査を同時に実施し、100 名中 1 名から同菌の遺伝子を検出した。*B. holmesii* は 1995 年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、主に 10 代の青年層に感染し、百日咳菌と同様な咳症状を引き起こす。わが国では *B. holmesii* は 2000 年代後半に初めて臨床分離され、主に青年・成人患者から 10 株ほどが分離されている。ただし、一般の病院検査室では *B. holmesii* の検査および同定は難しく、百日咳疾患に占める *B. holmesii* の割合は不明である。今回、健常な医学部生 1 名から *B. holmesii* が検出されたことから、百日咳集団感染では本菌と百日咳菌との鑑別診断が必要である。

E. 結論

医学部における百日咳集団感染は百日咳菌の施設侵入により引き起こされることが指摘され、集団感染防止策として保菌者の施設立入り制限が有効と考えられた。また、百日咳類縁菌 *B. holmesii* の保菌者が確認されたことから、本菌に対する鑑別診断の必要性が指摘された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, **Kamachi K**. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS ONE, 2012, 7(2): e31985.
- 2) Suzuki T, Kataoka H, Ida T, **Kamachi K**, Mikuniya T. Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. J Infect Chemother, in press.

2. 学会発表

- 1) **蒲地一成**, 池田徹也, 伊瀬郁, 松本昌門, 石畝史,

烏谷竜哉, 江藤良樹, 山下和予, 柴山恵吾, 多屋馨子, 岡部信彦. 百日咳菌凝集素価法の診断精度について. 第 86 回日本感染症学会総会, 平成 24 年 4 月, 長崎(予定)

- 2) 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. 百日咳菌に認められる自己凝集能の解析. 第95回日本細菌学会総会, 平成24年3月, 長崎(予定)
- 3) 大塚菜緒, 吉野修司, 河野喜美子, 豊泉(鯉坂)裕美, 柴山恵吾, 蒲地一成. LAMP 法を用いた百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* 検出系の開発. 第 94

回日本細菌学会関東支部総会, 平成 23 年 10 月, 東京

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: LAMP 法を用いた百日咳菌遺伝子検出方法およびこの方法に用いるプライマーセット. 特許第 4806749 号.
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表1. 百日咳検査成績(第3回調査)

大学	学年	検査人数	百日咳菌陽性者数	<i>B. holmesii</i> 陽性者数
A 大学	2年生	25	0	0
	5年生	25	0	0
B 大学	2年生	25	0	1
	5年生	25	0	0
総計		100	0	1

表2. *Bordetella holmesii* 陽性者の検査成績

検査項目	1次検査 (B 大学)	確定検査 (感染研)	備考
百日咳菌-LAMP	-	-	
IS481 real-time PCR		+	Ct = 36.5
<i>B. holmesii</i> -LAMP		+	
<i>B. holmesii recA</i> real-time PCR		+	Ct = 35.7

VI. Hib 感染症
肺炎球菌感染症
細菌性髄膜炎

厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
ワクチン戦略による麻疹および先天性風疹症候群の排除、およびワクチンで予防可能疾患
の疫学並びにワクチンの有用性に関する基礎的臨床的研究
分担研究報告書

北海道で発症した小児期細菌性髄膜炎の疫学的調査成績

分担研究者	富樫武弘	札幌市立大学特任教授
研究協力者	堤 裕幸	札幌医科大学小児科教授
	生方公子	北里大学北里生命科学研究所教授
	坂田 宏	旭川厚生病院小児科部長
	石黒信久	北海道大学病院感染制御部教授
	高橋俊司	市立札幌病院検査部

研究要旨

平成 23 年 1 月 1 日から 12 月 31 日までの 1 年間に北海道で小児期 (0~15 歳) に発症した細菌性髄膜炎は 16 例 (男 8 例、女 8 例) であった。起因菌はインフルエンザ菌 9 例 (56.3%うち 8 例が b 型、1 例は血清型不明)、肺炎球菌 5 例 (31.3%)、大腸菌 1 例 (6.3%)、GBS 1 例 (6.3%) であった。発症年齢は 0-4 ヶ月 3 例 (Hib 1 例、大腸菌 1 例、GBS 1 例)、4 ヶ月~1 歳未満 4 例 (Hib 3 例、肺炎球菌 1 例、GBS 1 例)、1~5 歳未満 9 例 (Hib 4 例、Hi 1 例、肺炎球菌 4 例) であった。Hib 8 株をアンピシリン感受性で分類すると gBLNAR が 5 株、gLowBLNAR 2 株、不明 1 株であった。肺炎球菌の血清型とペニシリン感受性は 6C (gPISP、7 価肺炎球菌ワクチン非含有) 2 株と 6B (gPRSP、7 価肺炎球菌ワクチン含有型) 1 株、23F (gPRSP、7 価肺炎球菌ワクチン含有) 1 株であった。予後では肺炎球菌による 0 歳 8 ヶ月女児が難聴・硬膜下血腫を遺したが死亡例はなかった。北海道の 5 歳未満人口 10 万人あたり Hib で 4.4 例/年、肺炎球菌が 2.7 例/年の発症頻度であった。平成 23 年 12 月までの北海道における Hib ワクチン (アクトヒブ®) のカバー率は大略 40%、PCV7 のそれも大略 40% であった。

A. 研究目的

乳幼児を対象としたインフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチン (アクトヒブ®) がわが国でも平成 19 年 1 月 26 日承認され、平成 20 年 12 月 19 日から市販された。しかし供給量が潤沢では無いため 22 年 10 月まで計画販売を余儀なくされたが、それ以降は潤

沢に供給されている。また 7 価肺炎球菌結合型ワクチン (プレベナー®) は平成 21 年 10 月 16 日に承認され平成 22 年 2 月 24 日市販された。

わが国で小児期に発症する細菌性髄膜炎の起因菌は常に第 1 位 Hib で第 2 位が肺炎球菌である。諸外国ではこれらの細菌によ

る重症感染症はワクチンによって防御できる疾病 (vaccine preventable diseases : VPD) とされている。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、ワクチン登場前後の小児期細菌性髄膜炎の発症状況を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 19 年、20 年、21 年に引き続き北海道内で小児科医が常駐しかつ入院施設を擁する病院 (59 病院) の小児科医長に目的を説明して協力をお願いした。内容は平成 22 年 1 月 1 日から 12 月 31 日までに発症した細菌性髄膜炎患者の背景調査と起因菌調査である。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。細菌学検査はすべて北里大学で行った。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。その成績から生方らの報告に基づいてインフルエンザ菌は gBLNAR (β ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性菌)、gLowBLNAR (β ラクタマーゼ非産生アンピシリン軽度耐性菌)、gBLPAR (β ラクタマーゼ産生アンピシリン耐性菌)、gBLPACR-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)、gBLPACR-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)、gBLNAS (β ラクタマーゼ非産生アンピシ

リン感受性菌)、肺炎球菌は gPRSP (ペニシリン耐性菌)、gPISP (ペニシリン中間耐性菌)、gPSSP (ペニシリン感受性菌) に分類した。インフルエンザ菌の b 型の判別は Hib 遺伝子の解析と抗血清を用いた凝集試験によった。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 Pneumococcus antisera(Statens Serum Institute、Denmark)、B 群溶連菌の血清型は GBS 型別用免疫血清 (デンカ生研) 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

平成 23 年 1 月 1 日から 12 月 31 日に北海道内 12 病院から報告された細菌性髄膜炎は 16 例 (男 8 例、女 8 例) であった。起因菌別にみるとインフルエンザ菌が 9 例 (56.3%、8 例が b 型、1 例が不明)、肺炎球菌が 5 例 (31.3%)、大腸菌 1 例 (6.3%)、GBS 1 例 (6.3%) であった。発症年齢は 0 ヶ月～4 ヶ月未満 3 例 (Hib 1 例、大腸菌 1 例、GBS 1 例)、4 ヶ月～1 歳未満 4 例 (Hib 3 例、Hi 1 例、肺炎球菌 1 例、GBS 1 例)、1～5 歳未満 9 例 (Hib 4 例、Hi 1 例、肺炎球菌 4 例) であった。Hib 8 株をペニシリン感受性で分類すると gBLNAR 5 株、gLow-BLNAR 2 株であった。肺炎球菌 5 株の血清型とペニシリン感受性は 6 C (gPISP、PCV7 非含有株) 2 株、6 B (gPRSP、PCV7 含有株) 1 株、23F (gPRSP、PCV7 含有株) であった。予後では肺炎球菌 23F によ

る0歳8ヵ月女児が難聴と硬膜下血腫の後遺症を遺したが死亡例はなかった。北海道の5歳未満児10万人あたりの発症数はHiが4.4例/年であり肺炎球菌が2.7例/年であった。平成23年12月の北海道のインフルエンザ菌B型ワクチン(アクトヒブ®)のカバー率は大略40%、結合型肺炎球菌ワクチン(プレベナー®)のそれも大略40%である。

D. 考察

わが国ではHibワクチン(アクトヒブ®)が平成19年1月に承認され平成20年12月市販となった。しかし製品の安全性の担保、安定供給の確保などに種々の関門があり、平成22年10月まで計画販売され、その後潤沢に供給された。一方7価肺炎球菌結合型ワクチン(プレベナー®)は平成21年10月承認され平成22年2月24日市販の運びとなった。

筆者らはこれらのワクチンの予防効果を知るために、発売前後の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。北海道は医療圏が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、脳脊髄液から分離した細菌の収集も可能である。この計画は平成18年秋に北海道内の小児科医が常駐しており入院病室を持つ64施設(平成20年には59施設)に協力を求め了解を得た。これらの施設にあらかじめ細菌を送る容器と症例表用紙を送付しておき、平成19年1月1日以後に発症した細菌性髄膜炎の起因菌と症例表を収集した。各施設からの症例報告があった場合には容器と症例表を追加送付した。細菌学検索は一括北里大学で行った。

この結果平成19年はHib11例、肺炎球菌6例、20年はHib13例、肺炎球菌1例、21年はHib12例、肺炎球菌4例、22年はHi15例、肺炎球菌4例、23年はHiが9例、肺炎球菌が5例報告された。この他の菌種はこの5年間にB群溶連菌(GBS)が6例、大腸菌が6例、リステリア菌1例、髄膜炎菌1例であった。

わが国では平成20年12月からHibワクチンが、22年2月から7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)の接種をはじめ当面任意接種としてスタートした。Hibは肺炎球菌とともに乳幼児の咽頭に常在菌として存在し、ほんの一部の乳幼児で菌血症となり髄膜炎を発症させるものと考えられる。環境からHibを無くしたり、侵襲性肺炎球菌感染症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。平成22年12月補正予算が通りHib、7価肺炎球菌ワクチンがHPVワクチンとともに平成24年度末まで公費負担が可能となった。平成23年3月に両ワクチンの接種一時見合わせがあったものの両ワクチンの接種率は着実に上がっている。今後は両ワクチンともに定期接種への採用が望まれる。また平成22年には2株の血清型19Aが検出された。この血清型はPCV7には含まれておらず、PCV7の普及した欧米で頻度が増大している。13価ワクチンにはこの血清型が含まれておりわが国にも早急な導入が待たれる。

E. 結論

平成23年に北海道で発症した細菌性髄膜炎を報告した。発症数は16例でHiが9例、肺炎球菌が5例、GBS1例、大腸菌1例であった。5歳未満人口10万人あたり

Hib が 4.4 例/年、肺炎球菌が 2.7 例/年であった。Hib ワクチンや 7 価肺炎球菌結合型ワクチンの広範な接種により、Hib 髄膜炎や侵襲型肺炎球菌の発症が抑えられることが予想される。両者のワクチンの定期接種化が喫緊の課題であり、さらに 13 価肺炎球菌ワクチンの早期の導入が待たれる。

G.研究発表

1. 論文発表

①Takehiro Togashi,2011 : My continuing efforts toward the eradication of vaccine-preventable diseases from Japan.
Vaccine 29:8466-8469

H.知的財産権の出願・登録状況。なし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書

肺炎球菌ワクチンと肺炎球菌血清型特異抗体価に関する研究

研究分担者 石和田 稔彦 千葉大学医学部附属病院 講師
研究協力者 高橋 喜子 千葉大学医学部小児病態学

若年成人と日本人献血由来免疫グロブリン製剤中の13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）に含まれる肺炎球菌血清型別 IgG 抗体価を測定した。日本人若年成人、日本人献血由来免疫グロブリン製剤では、血清型 6B、14、19A に対する抗体価は、血清型 4 に対する抗体価と比較し数倍高かった。免疫グロブリン中の肺炎球菌特異抗体価の保有状況は、米国の報告とは異なる結果であった。このことから自然歴で得られる抗体価は、社会環境により異なることが示唆された。免疫グロブリン製剤中には、肺炎球菌血清型別特異抗体は十分に含まれており、免疫グロブリン製剤投与により、重症肺炎球菌感染症に対する治療効果が期待できると考えられた。

A. 研究目的

日本人の自然歴での肺炎球菌血清型別抗体価を知る目的で、若年成人の13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）に含まれる肺炎球菌血清型別 IgG 抗体価を測定した。また、重症肺炎球菌感染症に対する治療の有効性を検討する目的で、日本人献血由来免疫グロブリン製剤中の、PCV13 に含まれる肺炎球菌血清型別 IgG 抗体価を測定した。

B. 研究方法

測定は Training manual for Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitation of *Streptococcus pneumoniae* serotype specific IgG にしたがって、ELISA 法にて行った。肺炎球菌血清型別 IgG 抗体価がそれぞれ 0.35 μ g/ml を超えてある場合、PCV7 でカバーされる感染症に対して防御能があるとされていることから、0.35 μ g/ml を抗体陽性の基準とした。

（倫理面への配慮）

研究は千葉大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

若年成人においては、少数ではあるが血清型のうち9V、23Fについて防御抗体価を有していないものが存在した。また、日本人若年成人、日本人献血由来免疫グロブリン製剤では、血清型 6B、14、19A に対する抗体価は、血清型 4 に対する抗体価と比較し数倍高かった。

D. 考察

免疫グロブリン中の肺炎球菌特異抗体価の保有状況は、米国の報告とは異なる結果であった。このことから自然歴で得られる抗体価は、社会環境により異なることが示唆された。免疫グロブリン製剤中には、肺炎球菌血清型別特異抗体は十分に含まれており、免疫グロブリン製剤投与により、重症肺炎球菌感染症に対する治療効果が期待できると考えられた。

E. 結論

7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）導入国では、小児の PCV7 関連血清型の肺炎球菌侵襲感染症が減少する一方、PCV7 非関連血清型の肺炎球菌の保菌や感染症が増加しており、13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）に切り替えている国も多い。日本における小児から成人の PCV13 関連肺炎球菌血清型別特異抗体価の保有状況を継続的に調査し、PCV13 の日本における適応について検討していく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) **Ishiwada N**, Honda Y, Tanaka J, Hishiki H, Kohno Y. Anti-polyribosylribitol phosphate antibody in pediatric patients with *Haemophilus influenzae* type b invasive disease. J Infect Chemother 17 : 397-400,2011

2) Tsuda K, Iwasaki S, Horiguchi H, Mori M, Nishimaki S, Seki K, Taguri M, Yokota S, **Ishiwada N**. Immune response to *Haemophilus influenzae* type

b conjugate vaccine in preterm infants. *Pediatr Int.*
2011 [Epub ahead of print]

3) Tanaka J, **Ishiwada N**, Wada A, Chang B, Hishiki
H, Kurosaki T, Kohno Y. Incidence of childhood
pneumonia and serotype and sequence-type
distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in
Japan. *Epidemiol Infect.* 30:1-11, 2011

2. 学会発表

1) 本田喜子、石和田稔彦、菱木はるか、及川純
子、田中純子、河野陽一 若年成人および免疫グ
ロブリン製剤における肺炎球菌血清型別特異抗

体価の測定 第43回日本小児感染症学会総会、
岡山、2011年10月

2) **Naruhiko Ishiwada**. Current status of pediatric
pneumococcal disease in Japan . 61st Korean Pediatric
Society Annual Autumn Conference. Seoul, Korea
2011.10.21

H. 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 |
| 3. その他 | なし |

厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

ワクチン戦略による麻疹および先天性風疹症候群の排除, およびワクチンで予防可能疾患の
疫学並びにワクチン有用性に関する基礎的臨床的研究

(研究代表者: 岡部 信彦)

分担研究報告書

全国規模で収集された化膿性髄膜炎由来・インフルエンザ菌(Hib)と肺炎球菌の
分子疫学解析(2011年)に関する研究

研究分担者 生方 公子 (北里大学北里生命科学研究所 特任教授)

研究協力者 「化膿性髄膜炎全国サーベイランス研究班」

研究協力者 千葉 菜穂子, 諸角 美由紀 (北里大学北里生命科学研究所 研究員)

研究要旨 平成23年1月から12月末日までの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インフルエンザ菌(Hib)と肺炎球菌について、莢膜型別、耐性遺伝子解析による耐性化動向を解析した。インフルエンザ菌は総計44株の送付を受けた。大多数は莢膜型b(Hib)株であったが、11.4%は無莢膜型で前年に比しその増加傾向を認めた。発症年齢は6ヶ月以下が最も多く、これに対し1歳以上のHib化膿性髄膜炎例は明らかに減少していた。**Hib髄膜炎の減少はHibワクチン導入の影響と推定される。**遺伝子変異を伴うβ-ラクタム系薬耐性のgBLNAR株は68%と前年度とほぼ同率で横ばい状態であった。死亡あるいは重篤な後遺症を残した例が12.6%に認められた。髄膜炎由来の肺炎球菌は小児39株、成人27株が収集された。gPRSPは46.3%、成人由来株で40%と耐性菌の増加が認められた。**肺炎球菌に対する小児の7価PCVカバー率は70%台であった。成人に対する23PPVのそれは78%**であった。小児へのHibワクチン導入によって発症例は確実に減少しているが、PCV7の効果はさらなる疫学解析が必要であると結論された。

A. 研究目的

細菌性化膿性髄膜炎(髄膜炎)は、小児においては死亡例や神経学的重度の後遺症を残しやすい致命率の高い疾患である。これらの疾患ではいかに的確に早期診断され、適切な抗菌薬がタイムリーに投与されるか否かが、児の予後に大きく影響するが、菌の耐性かも進

行している。

このような重篤な感染症を防ぐには、感染予防としてのワクチン接種が望ましいことはいままでもない。Hib ワクチンは既に任意接種が行なわれていたが、H23年度の「ワクチン接種緊急促進事業」により、Hibに加え肺炎球菌の7価結合型コンジュゲートワク