

の比較検討の必要性がある。また、菌側の病原性因子についても興味深い。Hib ワクチン接種歴を持つ症例数は、期間3に入り報告例が増加傾向を示した。表3に示すように、ワクチン3回接種1例（肺炎、0歳7ヶ月）、1回接種5例（肺炎2例ならびに髄膜炎3例、0歳8ヶ月～2歳3ヶ月）からの分離株は、2株が無莢膜型、4株が莢膜型b型であった。ワクチン3回接種歴がある肺炎症例由来株は無莢膜型であった。ワクチン接種歴を持つ症例においては、通常ワクチンスケジュールによる免疫付与失敗例であるのか、非b型による感染例であるのかを理解するため、少なくとも莢膜型別の解析は必須だと考えられる。薬剤感受性試験結果は、今回比較した三期間で大きな差は認められなかった。供試薬剤の感受性株の割合は、メロペネムにおいては、94%程度だが、セフトリアキソンならびにセフトリアキソンにおいては1株を除き全てが感受性を示し98-100%と良い結果が得られていた。Hib 感染症発生データベース（国立感染症研究所）の2011年10月集計における薬剤使用状況と効果において、髄膜炎等が診断名に含まれていた症例に使用される薬剤としては、セフトリアキソン+メロペネムが21.9%と最も高く、また、メロペネム、セフトリアキソン、セフトリアキソンの使用を有効と回答している方は90-94.5%と報告されている。

細菌培養陰性の髄液における細菌遺伝子解析については、これまでに陽性結果が得られた髄液検体としては、薬剤投与前であり、かつ、硬膜下膿瘍や繰り返す髄膜炎などの細菌の侵入を容易にする形態学的奇形を有する可能性がある症例由来であった。当該解析法の感度には、菌遺伝子がある程度の量ある髄液が適していると考えられる。

E. 結論

期間3において、Hib ワクチン接種歴を持つ症例数が増加傾向を示し、これらの症例からは、無莢膜型株とb型株が分離された。また、期間3の分離株中の無莢膜型株の割合も若干の増加傾向にあるが、髄膜炎は1例のみで、髄膜炎において無莢膜型株が起因菌になる傾向が出てきているのかについては、現時点では判断できず、今後の監視が求められると考えられた。

F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

G. 研究発表

なし

H. 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

表1、侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症の臨床分離株における莢膜型別解析の結果

	ワクチン 未導入	任意接種 開始後	任意接種開始 後(補助金開 始2ヶ月後)
期間	2007.6～2008.11	2008.12～2010.12	2011.1～2012.2
b型	95.8% (69/72)	98.1% (156/159)	90.6% (58/64)
非b型 (全て無莢 膜型)	4.2% (3/72)	1.9% (3/159)	9.3% (6/64)

注) 症例数で集計した

表 2、侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症の臨床分離株における無莢膜型株が分離された症例の診断名と細菌培養に供した検体

期間	菌株番号	診断名	検体	菌株受理日
未導入(期間1)	Kam41	菌血症	血液	2008.2月
未導入(期間1)	Kam79	肺炎、菌血症、副鼻腔炎	血液	2008.10月
未導入(期間1)	Kam173 Kam174	肺炎	血液、 喀痰	2010.2月
導入後(期間2)	Kam186	菌血症	血液	2010.3月
導入後(期間2)	Kam226	菌血症	血液	2010.7月
導入後(期間2)	Kam238	菌血症	血液	2010.8月
導入後、補助金交付開始後(期間3)	Kam288	菌血症	血液	2011.2月
導入後、補助金交付開始後(期間3)	Kam297 Kam298	菌血症	血液、 喀痰	2011.2月
導入後、補助金交付開始後(期間3)	Kam337	菌血症	血液	2011.11月
導入後、補助金交付開始後(期間3)	Kam347	髄膜炎	髄液	2012.1月
導入後、補助金交付開始後(期間3)	Kam349	肺炎、菌血症	血液	2012.1月
導入後、補助金交付開始後(期間3)	Kam350	肺炎、菌血症	血液	2012.2月

表3、Hib ワクチン接種歴を持つ侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症例由来菌株の莢膜型と薬剤感受性

発症時年齢	入院年月	都道府県	診断名	採取検体	接種回数	最終接種から発症まで	感染研菌株ID	莢膜型別	β-lactamase産生性	Ampicillin	Ampicillin/Subactam	Piperacillin	Meropenem	Ceftaxime	Ceftriaxone
0歳9ヶ月	2009.11月	千葉県	髄膜炎、菌血症	髄液	1	不明	Kam197	b	neg	0.75	0.75	0.032	0.25	0.032	0.008
2歳3ヶ月	2011.6月	新潟県佐渡市	髄膜炎	髄液	1	4日後	Kam317	b	pos	>256	2	8	0.125	1	0.25
0歳10ヶ月	2011.6月	沖縄県	肺炎、菌血症	血液	1	5ヶ月後	Kam318	b	neg	1	1	0.064	0.38	1	0.19
0歳8ヶ月	2011.6月	福岡県	髄膜炎、菌血症	血液	1	不明	Kam345	b	neg	1	1	0.047	0.125	0.75	0.25
0歳7ヶ月	2012.1月	福岡県	肺炎、菌血症	血液	3	3ヶ月後	Kam349	無莢膜型	neg	0.25	0.25	0.032	0.125	0.016	0.004
1歳8ヶ月	不明	千葉県	肺炎、菌血症	血液	1	不明	Kam350	無莢膜型	neg	2	3	0.064	0.38	0.75	0.25

表4、侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症の臨床分離株におけるβ-ラクタマーゼ産生株の割合(%)と株数

	ワクチン未導入	任意接種開始後	任意接種開始後 (補助金開始2ヶ月後)
期間	2007.6～2008.11	2008.12～2010.12	2011.1～2012.2
Positive (%)	18.1 (13/72)	10.1 (16/159)	13.6 (11/81)
Negative (%)	81.9 (59/72)	89.9 (143/159)	86.4 (70/81)

表5、侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症の臨床分離株における供試薬剤に対する感受性株の割合(%)と株数

期間	ワクチン 未導入	任意接種開始後	任意接種開始後(補助金 開始2ヶ月後)
薬剤	2007.6～2008.	2008.12～2010.12	2011.1～2012.2
Ampicillin	56.9 (41/72)	49.7 (79/159)	58.0 (47/81)
Ampicillin/ Sulbactam	56.9 (41/72)	47.8 (76/159)	56.8 (46/81)
Meropenem	100 (72/72)	93.7 (149/159)	95.1 (77/81)
Cefotaxim	100 (72/72)	99.4 (158/159)	98.8 (80/81)
Ceftriaxone	100 (72/72)	100 (159/159)	100 (81/81)
Piperacilin	CLSI基準値情報なし		

表6、AmpicillinならびにAmpicillin/Sulbactamに対する耐性株中のβ-lactamase非産生株の割合

6-1 Ampicillin

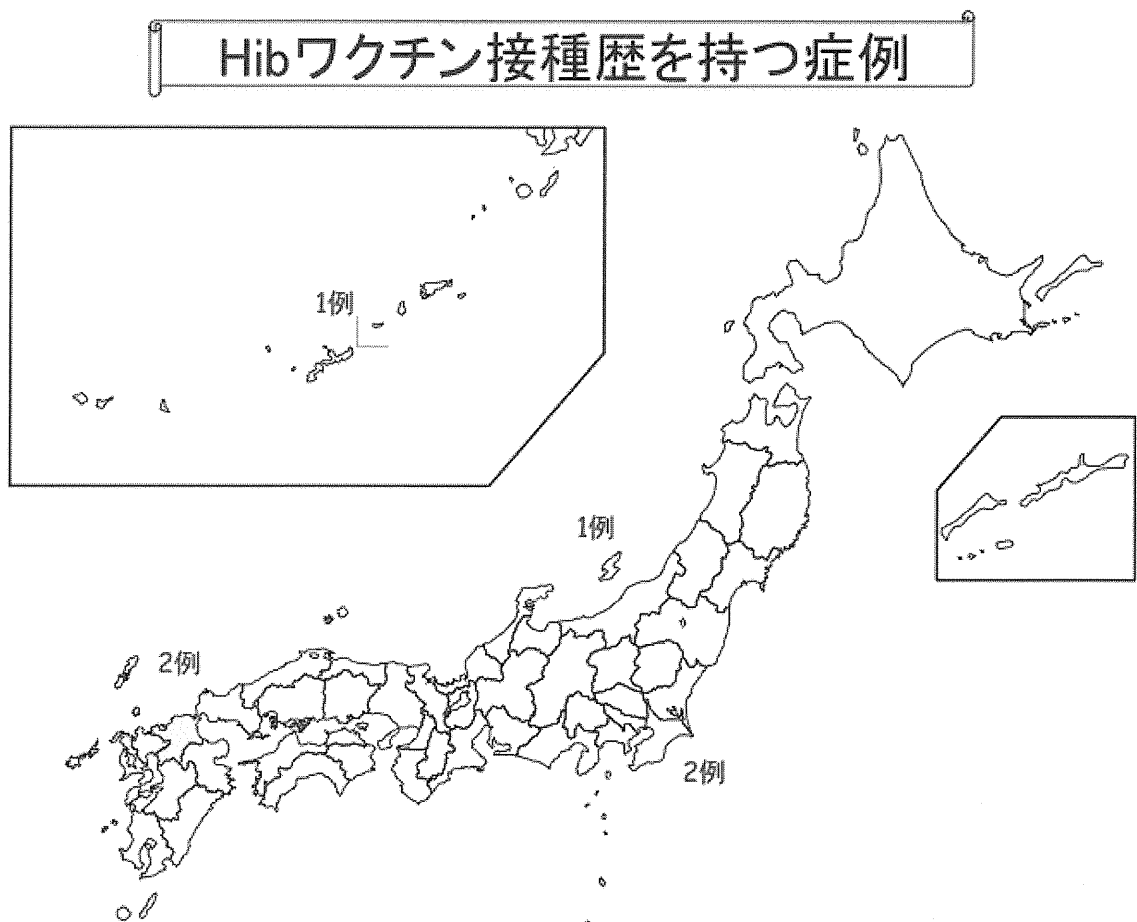
Ampicillin	2007.6 ~ 2008.11	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2012.2
Sensitive株 (%)	56.9	49.7	58.0
Intermediate株 (%)	23.6	34.0	22.2
Resistance株 (%)	19.4	16.4	19.8
Resistance株中のβ-lactamase非産生株 (%)	7.1	38.5	26.7

6-2 Ampicillin/Sulbactam

Ampicillin/ Sulbactam	2007.6 ~ 2008.11	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2012.2
Sensitive株 (%)	56.9	47.8	56.8
Resistance株 (%)	43.1	52.2	43.2
Resistance株中のβ-lactamase非産生株 (%)	41.9	18.1	31.4

sulbactam: β-lactamase inhibitor

図1、Hib ワクチン接種歴を持つ侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症症例数



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 23 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」

『わが国で流行するヒトロタウイルスの血清型の解析』

主任研究者：庵原俊昭（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）

研究協力者：フランシス・エコウ・デニス（東京医科歯科大学）

研究要旨：三重県、岡山県、千葉県内の 5 医療施設から収集した小児の急性胃腸炎患者（外来および入院）便 255 例中のロタウイルスの血清型（G タイプと P タイプ）を調査した。その結果、G1P[8]が 78 例(30.6%)、G3P[8]が 153 例(60.0%)、G9P[8]が 3 例(1.2%)、G2P[4]が 8 例(3.1%)、未決定が 13 例(5.1%)と、前回の調査と同様、G3P[8]がもっとも高い頻度で検出された。また、千葉県では、G3P[8]を示す例がなく、岡山県では G1P[8]がないなど、地域差がみられた。

A. 研究目的

下痢、嘔吐を主症状とする胃腸炎の病原体は、細菌、ウイルス、原虫など多数存在する。その中で、ロタウイルスによる胃腸炎は約 40%と頻度が高く、また脱水症状を呈し、重篤化する頻度も高い。地球レベルでは、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は、死亡例は稀であるものの、重篤な例が多く、その結果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。また、胃腸炎以外の疾患（脳炎、脳症を含む中枢神経疾患など）との関連も指摘されている。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、予防には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 が開発された。すでに 100 カ国以上で認可され、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、Rotarix は 2012 年 1 月から投与が開始され、RotaTeq では 2012 年 5 月から投与が開始される予定である。

ロタウイルスの血清型は多様であり、動物を含めると、VP7 が規定する G タイプは

19 種以上、P タイプは 27 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、年によりかなり異なり、また複数の血清型が同時に分布する。そこで、ワクチンの導入にあたっては、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、これまでの三重県における入院例のみならず、岡山県、千葉県を加え、外来、入院例の双方について、血清型の分布を調査した。

B. 研究方法

(1) 三重県内の国立病院機構三重病院(入院患者)、国立病院機構三重中央医療センター(入院患者)、うめもとこどもクリニック(外来患者)、岡山県の川崎医大病院(入院および外来患者)、千葉県の外房こどもクリニック(外来患者)における 5 歳未満小児の急性下痢症の患者便を収集した。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 を用いて、10% アクリルアミド電気泳動でロタウイルス特有の RNA パターンを確認した。また、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 タイプあるいは各 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。1st PCR 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

わが国にロタウイルスワクチンがまさに導入される時期において、血清型の違いによるロタウイルスワクチンの効果を把握すること、および生ワクチンであるロタウイルスワクチンの投与により排泄されたワクチン株のロタウイルスの疫学に及ぼす影響を把握する上で、ロタウイルスの血清型(遺伝子型)を調査する意義は大きい。

これまで、ブラジルにおいて Rotarix 投与後 G2 の分布が著しく増加したこと、オーストラリアでは、RotaTeq 投与地域では G3 が、Rotarix 投与地域では G2 が増加したと報告されるなど、ワクチン投与の血清型分布に及ぼす影響が認識されている。

ロタウイルスワクチン投与が本格化される前に、わが国におけるロタウイルス血清型の分布状況を把握し、基本的データを得ることは意義深い。

D. 研究結果と考察

三重県、岡山県、千葉県内の 5 医療施設から収集した小児の急性下痢症患者(外来および入院)便 255 例について、RT-PCR により G タイプ、P タイプを決定した。その結果、G1P[8] が 78 例(30.6%)、G3P[8] が 153 例(60.0%)、G9P[8] が 3 例(1.2%)、G2P[4] が 8 例(3.1%)、未決定が 13 例(5.1%)と、前回の調査と同様、G3P[8] がもっとも高い頻度で検出された。また、千葉県では、G1P[8] が 67%、G3P[8] が 29%、岡山県では G1P[8] が 0%、G3P[8] が 54%であるなど、地域差がみられた。

また、G と P の組合せとしては稀である、

G3P[4]やG1P[4]が検出された。こうした組合せを有するウイルス株は、他の RNA セグメントの由来もコモンなタイプではない場合が多いので、塩基配列決定により、確認を急ぎたい。

全体として、G3P[8]がもっとも多い傾向は、前回の 2007～2009 年の調査結果とほぼ同じである。こうした傾向がいつまで続き、その後、どの血清型が多くなるのか、その推移を注意深く調査する必要がある。

今回、ほぼすべての下痢便について抽出 RNA を用いて、ポリアクリルアミド電気泳動による RNA パターンの解析を行った。今後、RNA electropherotype の分類により、RNA パターンと血清型との関連や、どの程度の異なる種類のロタウイルスが分布しているかを解析する必要がある。

わが国における血清型の分布状況を把握することは、今後のワクチン投与の血清型分布に対する影響を検証するために、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、岡山県、千葉県における 5 医療施設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 タイプの分布状況の調査を今後も長期間（少なくとも 3 年）推し進める必要がある。前回に引き続き、代表的な株、非定型的な株について、VP7 遺伝子、VP4 遺伝子の塩基配列解析を進めていく。外来と入院における血清型の違いを中心として、胃腸炎の重篤度と血清型の関連を解析する。日本各地における地理的な違いによる血清型の違いについても解析する。さらに多くの地域（たとえば、沖縄県）を含めて、調査を拡大することも検討したい。

本研究期間中に、多くの施設より、胃腸炎以外の疾患との関連について、ロタウイ

ルス検出の依頼を受けた。今後も、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

なし

2) 論文

1. Nakano I, Taniguchi K, Ueda H, Maeno Y, Yamamoto N, Wakata Y, Matsubara T, Ozaki N. Matsubara T, Ozaki N: Sudden death from systemic rotavirus infection: a case report. *J Clin Microbiol* 49(12): 4382-4385, 2011
2. Kamiya H, Nakano T, Kamiya H, Yui A, Taniguchi K, Parashar U, the Rotavirus Epidemiology Study Group: Rotavirus-associated gastro-enteritis hospitalizations among Japanese children aged <5 years: active rotavirus surveillance in Mie Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis* 64(6):482-487, 2011
3. Yokoyama T, Sugimoto N, Taniguchi K, Komoto S, Yuno T, Ohta K, Hashimoto H, Seno A, Ashida A, Fujieda M, Nishio S, Ueno K, Shimizu M, Yachie A.: Molecular and immunochemical detection of rotavirus in urinary sediment cells of children with rotavirus gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 17(8), 1190-1193, 2011
4. Sugata K, Taniguchi K, Yui A, Nakai

H, Asano Y, Hashimoto S, Ihira M, Yagasaki H, Takahashi Y, Kojima S, Matsumoto K, Kato K, Yoshikawa T
Analysis of rotavirus antigenemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. Transplant Infect Dis 14(1):49-56, 2012

G. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

H. 謝辞

下痢便の収集、処理にあたり、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、うめもとこどもクリニック、川崎医大病院、外房こどもクリニックのスタッフの皆さまに多大なご協力をいただきました。ここに深謝申し上げます。

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 23 年度)

ワクチンの意義に関する研究
三重県津市、および千葉県いすみ市におけるロタウイルス感染症による
外来患者と株型の調査

主任研究者：庵原俊昭、神谷 齊 (国立病院機構三重病院)

分担研究者：中野貴司 (川崎医科大学小児科教授)

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、菅秀 (国立病院機構三重病院)、田中孝明 (川崎医科大学小児科)、
梅本正和 (うめもとこどもクリニック)、黒木春郎、伊東宏明 (外房こどもクリニック)、
Francis Dennis (東京医科歯科大学)、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要原因となっている。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。

アメリカをはじ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、我が国でもまもなく両方のワクチンが使用可能となる。本研究班ではこれまで三重県の5病院にてロタウイルス感染による小児下痢症の後ろ向き(2003-2007)、および前向き(2008-2009)のサーベイランスを実施し、5歳未満の小児1000人当たり年間に4~5人のロタウイルス感染性胃腸炎による入院患者がいることを報告した。この結果をもとに我が国のロタウイルス感染性胃腸炎による入院患者は年間おおよそ3万例、医療費は66億円(1例22万円との中込らの報告を採用)と試算した。今年度は、外来受診例のロタウイルス感染性胃腸炎の疾病負荷に関する調査を全国2か所(三重県津市、千葉県いすみ市)で実施した。諸外国の医療事情と異なり、我が国でのロタウイルス感染性胃腸炎の多くの患者は外来で治療されていることが予想されることから、外来におけるロタウイルス感染性胃腸炎の疾病負荷を求めることはわが国におけるロタウイルス感染症の疾患及び経済的負荷をより正確に推測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 2 地域（三重県津市、千葉県いすみ市）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費の負担や罹患者の経済的負担、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. 三重県津市、千葉県いすみ市における 5 歳未満の急性胃腸炎による外来受診症例のうち、ロタウイルス感染によるものの割合を求める。
2. 日本におけるロタウイルス感染性急性胃腸炎の血清型を調べる。

B. 研究方法

(1) 本サーベイランスは、三重県津市、千葉県いすみ市における 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 1 年間である（2011 年 1 月 1 日～2011 年 12 月 31 日）。

(2) 参加機関は三重県津市内で小児科を標榜する医療機関、千葉県いすみ市（外房こどもクリニック）である。なお、津市周辺の小児科標榜施設（三重県鈴鹿市、亀山市）にも参加していただき、津市在住の患者の未報告してもらう。

(3) 三重県津市に関しては、定点医療機関（梅本こどもクリニック）において、千葉県いすみ市では外房クリニックにおいて急性胃腸炎と診断された患者に関して後に

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) 受診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。三重県津市の定点以外の施設に関しては急性胃腸炎と診断された患者の受診月、年齢、性別を報告してもらう。

(5) 千葉県いすみ市に関しては外房こどもクリニックが唯一の小児科標榜医療機関であるため、全数サーベイランスとなる。

(6) 三重県津市に関しては定点である梅本こどもクリニックにおける患者報告をもとに、津市内医療施設から報告された急性胃腸炎患者の中のロタウイルス感染性胃腸炎患者数を推計する。

(7) 診断は迅速キットを用いて行い、陽性と診断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感染を確認し、陽性サンプルに関しては株型を判定した。具体的方法は、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（三重県津市、千葉県いすみ市）
- ・ 生後 14 日以上 5 歳未満
- ・ 2011 年 1 月 1 日から 2011 年 12 月 31 日までに参加施設を受診した者
- ・ 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
- ・ 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

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。また本研究は国立病院機構三重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 2 地域の人口をもとにしたロタウイルス感染性胃

腸炎外来受診症例の罹患率、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外来症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で、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

1) 三重県津市

三重県津市の人口は 280,294 人、5 歳未満の人口は 12,549 人であり、津市並びにその周辺（鈴鹿市、亀山市）の医療機関 41 施設が対象となった。結果としては参加医療機関全体から報告された急性胃腸炎患者の総数は 3404 人、うち定点機関である梅本こどもクリニックからは 864 人が登録されているが、現在データクリーニング、および未報告患者に関する追加調査を実施している。なお、定点においては 864 例中 129 例（14.9%）がロタウイルス陽性となっている。

2) 千葉県いすみ市

千葉県いすみ市の人口は 42,305 人、5 歳未満の人口が 1260 人（平均年間出生数 220 人）である。当クリニックに受診したいすみ市在住の感染性胃腸炎の患者数は 440 人、うち迅速検査を実施できた人数が 80 名（18.2%）、陽性者が 33 人（41.3%）であった。これらの検査実施者の年齢分布、性別、受診月をもとに、検査非実施者で急性胃腸炎と診断された患者のロタウイルス感染者を推計すると調整後の患者数は 135 名となり、5 歳未満の 1000 人当たりの患者数は 122.7/1000 人年となった。

E. 今後の計画

本年度実施した外来ロタウイルスサーベイランスの特に三重県津市のデータの解析を

急ぎ実施し、いすみ市の結果と合わせて外来症例の疾病負荷を把握する。また、外房こどもクリニックではロタウイルス検査陽性例の中で42.4%の患者が点滴加療を受けており、外来での医療費に関しても入院例と合わせて調査する必要がある。

F. 研究発表

1) 学会発表

なし

2) 論文発表

Rotavirus-Associated Acute Gastroenteritis Hospitalizations among Japanese Children Aged ≤ 5 Years: Active Rotavirus Surveillance in Mie Prefecture, Japan
Hajime Kamiya*, Takashi Nakano, Hitoshi Kamiya, Akiko Yui, Koki Taniguchi, and Umesh Parashar, for the Rotavirus Epidemiology Study Group

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, Cathherine Yen (Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Center for Disease Control and Prevention, USA)、サーベイランス、便検体収集にあたり多大なご協力をいただいているうめもとこどもクリニック、外房こどもクリニック、感染性胃腸炎患者の受診者数の報告を毎月行ってくださった三重県津市、鈴鹿市、亀山市の小児科標榜医療機関の皆様、データ収集にご協力いただいた国

立病院機構三重病院名誉院長室秘書木下麻衣子様、データ入力を行ってくださった国立感染症研究所感染症情報センター臨時研究補助員河野有希様、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・寄生虫学講座スタッフの皆様に深謝申し上げます。

ロタウイルス感染症 症例調査票 (外来)

施設内患者番号 _____ 施設名 _____

受診日 ____ / ____ / ____ 診断医名 _____

【患者情報】

患者イニシャル _____

住所： (_____) 県 (_____) 市 《市までの記載で可》

受診時年齢 ____ 歳 ____ ヶ月

性別 男性 女性

既往歴 なし あり (病名： _____)

【初診時の臨床所見】

発症してから受診するまでの最高体温 _____ °C

嘔吐 なし あり ありの場合 24 時間以内に _____ 回
嘔吐の症状 _____ 日目 (発症日を
1)

下痢 なし あり ありの場合 24 時間以内に _____ 回
下痢の症状 _____ 日目 (発症日を
1)

重度脱水 (5%以上の体重減少) なし あり

血清ナトリウム値 (検査してあれば) _____ mEq/L

血糖値 (検査してあれば) _____ mg/dl

【初診治療】 (複数回答可)

経過観察 (処置なし)

ORS (_____ 日間)

点滴 (_____ 日間)

処方薬 (薬名 _____ 日間)

高次医療機関へ紹介 その他 (_____)

【転帰】

軽快* 後遺症 死亡 入院 (_____ 日間) 不明

*軽快の場合外来受診回数 (_____ 回)

【便検体の情報】

便検体採取 できた 検体採取日時 ____ / ____ / ____
 できなかった

ロタウイルス迅速診断キットの結果 陽性 陰性 未実施

【ロタウイルスワクチン接種歴】

なし あり 1 回目：接種日 H ____ 年 ____ 月 ____ 日 (Rotarix・Rotateq)

2 回目：接種日 H ____ 年 ____ 月 ____ 日 (Rotarix・Rotateq)

3 回目：接種日 H ____ 年 ____ 月 ____ 日 (_____ ・Rotateq)

厚生労働科学研究費補助金(平成 23 年度)

「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

有効性と安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究」

ワクチンの投与方法:同時接種、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でおこなわれてきた。ヒトパピローマワクチンのサーバリックスは 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。筋拘縮症の病理所見は実験動物で再現されることが知られており、現在我が国で使用されているワクチンをマウスに 1 回接種し組織の変化を検討し 3 パターンに分類できた。インフルエンザ、日本脳炎、Hib のアルミアジュバントを含んでいないワクチンでは接種部位の物理的な障害の後に修復機転が働き炎症細胞の浸潤、繊維性癒痕化が認められた。アルミアジュバントを含んだワクチン(DPT, PCV7, HPV)では帯状もしくは結節性癒痕化を伴う異物性肉芽種が認められた。HPV サーバリックス接種後にはアルミを貪食したマクロファージが集簇しマクロファージ結節を認めた。いずれも筋束と筋束の間に帯状の結節を形成するものと筋束内の筋線維と筋線維の間を押し広げるように結節を形成するタイプで、DPT の皮下接種と筋注を比較しても繊維化・癒痕化は同様に観察され大腿四頭筋拘縮症に観察された広範な筋肉の変性・萎縮は観察されなかった。

2011 年 3 月に同時接種後の死亡例が報告され、突然死症候群と判定され同時接種は再開されたものの同時接種の安全性が懸念されている。ワクチンは獲得免疫を誘導するものであるが免疫獲得には自然免疫への刺激が必須である。ヒト末梢リンパ球を DPT, Hib, PCV7 の単独、もしくは複数のワクチン製剤で刺激し産生されるサイトカインを調べた。サイトカインの中では IL-1 β , IL-6, TNF- α の炎症性サイトカインが産生され IL-1 β は PCV の刺激での産生量が多く DPT/Hib の二種の刺激と同じ量の IL-1 β の産生がみられ、PCV7 を含む二種の刺激で産生量は増加したが三種の刺激においては 2 種刺激と同量の IL-1 β 産生量であった。ワクチン製剤の刺激で IL-6 の産生が顕著で IL-6, TNF- α 等の炎症性サイトカインの産生と発熱等の副反応の出現との関係は更に検討する必要がある。

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)、Monophosphoryl lipid A (MPL) とアルミの混合アジュバントをもちいたヒトパピローマワクチン(HPV)サーバリックス、さらにはアルミ単味アジュバントのガーダシルと欧米で使用されているワクチンが相次いで認可された。HPV は筋注のワクチンとして接種が始まった。

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。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し、過去の大腿四頭筋拘縮症の所見と比較し筋注と皮下注のワクチン接種方法を評価することを目的とした。

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。この時期には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。ワクチンの安全性に関して 2011 年 3 月に同時接種後の死亡例が相次いで報告され突然死症候群と考えられ、頻度を比較すると 10 万接種あたり 0.1–0.2 と諸外国での頻度と有意差は認められないところから 4 月には接種は再開された。その後も同時接種での死亡例が報告されている。ワクチンは獲得免疫を誘導する目的で使用され、獲得免疫の誘導には自然免疫への刺激が入り I 型 IFN、炎症性サイトカインとして、IL-1 β 、IL-6、TNF- α が誘導され CD4 helper T 細胞を Th1、Th2 応答に分化させ獲得免疫を誘導することが知られてきた。逆に、こうした炎症性サイトカインは発熱等の immunotoxicity とも関連していると考えられる。ワクチン製剤の中にはアジュバントを含んでいるものもあり、ワクチンの成分自体も自然免疫に刺激を与える。各ワクチンについて自然免疫系への刺激の入る可能性を検討し表 1 に示した。ヒト末梢リンパ球を用いて各ワクチン製剤を組み合わせ刺激し産生されるサイトカインを測定した。

表 1. 各ワクチンの自然免疫への刺激

ワクチンのアジュバントと成分による自然免疫系の刺激

Vaccines	Adjuvant (in 0.5 ml)	Innate immunity
BCG	– (cell membrane) ssRNA cpG/DNA Polysaccharide	TLR2, 4 TLR8 TLR9 C type lectin
DPT	Alum (150 μ g)	NLRP3
Hib T-conjug	Polysaccharides	C type lectin
PCV7	Alum (125 μ g) Polysaccharides	NLRP3 C type lectin
HBV	Alum (250 μ g)	NLRP3
MMR	–(measles HA) ssRNA, dsRNA	TLR2 MDA
VZV	– Envelop prot. dsRNA	TLR2?
HPV	サーバリックス MPL 50 μ g + Alum 500 μ g ガーダシル Alum 225 μ g	TLR4, NLRP3 NLRP3

現行のインフルスフットワクチンは理論的にはどこにも刺激が入らない!!!

B. 材料と方法

B-1. 筋注と皮下注の病理所見の検討

使用したワクチンはインフルエンザワクチン、日本脳炎ワクチン、DPT、Hib、PCV7、HPV（サーバリックス、ガーダシル）をもちいた。各群 3–4 匹の BALB/c マウスにワクチンを 0.1ml 接種し4週後にホルマリン固定し HE 染色とアルミ染色 (Lumogallion 染色)を行った。

B-2. リンパ球のサイトカイン産生能

ヒト末梢リンパ球を 10⁶/ml に調整し 0.5 ml 培養し

ワクチン製剤 50 μ l で刺激し 24 時間後に培養上清を採取し BioPlex ヒトサイトカイン 17plex でサイトカインを測定した。

C. 結果

C-1. 現行ワクチンの皮下接種の結果

現在、小児に使用されているワクチンをマウス各 3–4 匹の大腿外側に筋肉内接種し1か月後の組織の HE 染色の結果を図 1 に示した。

PBS を接種したマウスでは何も変化は認められなかった。DPT 接種後では 3 匹中 2 匹に筋束と筋束の帯状結節性病変が認められた。中心部はやや灰白色を帯びた不定形無構造の壊死組織で、周囲には好中球、マクロファージ、リンパ球および形質細胞が浸潤した異物性肉芽腫が観察された。

Hib ワクチン接種後の 3 匹中1匹において限局的な小壊死巣が認められた。病巣部の筋線維は硝子様に変性あるいは細片化し、横紋構造は消失していた。壊死筋線維には弱好塩基性物質の沈着が見られた。変性、壊死した筋線維を取り巻くように衛星細胞ないし筋芽細胞が増殖するとともに、マクロファージも浸潤していた。

PCV7 接種後の 3 匹すべてに結節性病変が認められた。筋周膜から筋束中心へ向けて病巣を拡大し大型化する結節も認められた。結節の中心部はやや灰白色を帯びた不定形無構造の壊死組織で、壊死を取り囲むように好中球、マクロファージ、リンパ球および形質細胞が浸潤していた。それら結節周囲の炎症細胞は変性、壊死傾向にあった。加えて、結節内には線維芽細胞も散見された(異物性肉芽腫)。

インフルエンザワクチン接種後では 4 匹中 1 匹に病変が観察された。筋束内に限局的な壊死巣が認められ壊死筋線維には好塩基性の石灰が沈着していた。Hib ワクチン接種後の所見と同様であった。日本脳炎ワクチン(JEV)接種後の 4 匹中 1 匹においての筋束内に限局的な変性巣が認められた。病巣内の筋線維は、硝子様に膨化、空胞変性あるいは断裂塊状化していた。他の 3 匹には何の変化も観察されなかった。

HPV ワクチンは 2 種類のワクチンが市販されており MPL+アルミの複合アジュバントを用いたサーバリックスとアルミアジュバント単独のガーダシル接種後の所見を比較して図 2 に示した。

HPV ガーダシル、サーバリックス接種例すべてに結節性病変が認められた。筋束と筋束の間に帯状の結節を形成するものと筋束内の筋線維と筋線維の間を押し広げるように結節を形成するタイプが認められた。ガーダシル接種後の結節には中心部に灰白状壊死が認められその周囲を炎症性細胞が浸潤していた。サーバリックス接種後の結節は全体が腫大したマクロファージの集簇により構成されていた(マクロファージ結節)。アルミ染色では集簇したマクロファージ内にアルミが貪食されている所見が観察された。ガーダシル接種後の結節でもアルミは浸潤した炎症細胞、マクロファージに貪食されていた。

アルミ染色の結果をまとめて図3に示した。DPT, PCV, ガーダシル接種部位の結節に一致してびまん性にアルミが検出されるが、サーバリックス接種部位ではマクロファージに貪食され細胞質内にアルミが検出され他のワクチンとは異なる反応を示していた。アルミアジュバントを含んでいない Hib, 日本脳炎、インフルエンザワクチンでは検出されなかった。

ワクチン筋注後の所見は以下の3群に分類される。

- 1) 針をさすことによる物理的な限局的な組織破壊と修復過程
- 2) アルミを含んだワクチン成分による異物性肉芽腫
- 3) アルミを貪食したマクロファージ結節

C-1. ワクチンの同時刺激によるサイトカイン産生能

25名の健康小児2か月から6歳までの末梢リンパ球を乳児期に同時接種の対象となるDPT, Hib, PCV7の単味、2種、3種を同時刺激し24時間後の培養上清を採取しサイトカインプロファイルを検討した。17種類のサイトカインの中で単独接種、二種、三種の刺激で変動が見られたサイトカインはIL-1 β , IL-6, TNF- α の炎症性サイトカインで、IFN- α , PGE2には変化が認められなかった。IL-1 β をEIA法で測定し結果を図4に示した。Hib単独刺激ではDPT単独刺激と同様でそれぞれ50.8 pg/ml, 42.5 pg/mlで有意差は認めなかった。PCV単独刺激では81.5 pg/mlとDPT, Hibの単独刺激よりは高くDPT/Hibの同時刺激と同等の産生

量であった。PCVを含む2種刺激、3種同時刺激では200 pg/ml前後と高いIL-1 β の産生が認められた。

ヒト末梢リンパ球の単独刺激と同時刺激によるIL-1 β 産生能 (EIA)

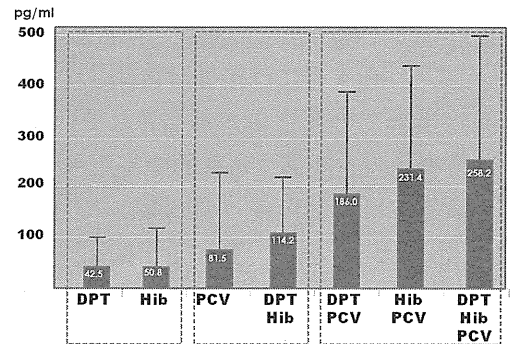


図4. 不活化ワクチン単独刺激と同時刺激のIL-1 β 産生能

他の、炎症性サイトカインとしてTNF- α も増加しDPT, PCV, Hibの単独刺激でも産生の増加がみられTNF- α の産生を図5に示した。IL-1 β と異なりHibの単独刺激でもTNF- α 産生能が高くHibを含んだ複数刺激で産生能が増加した。

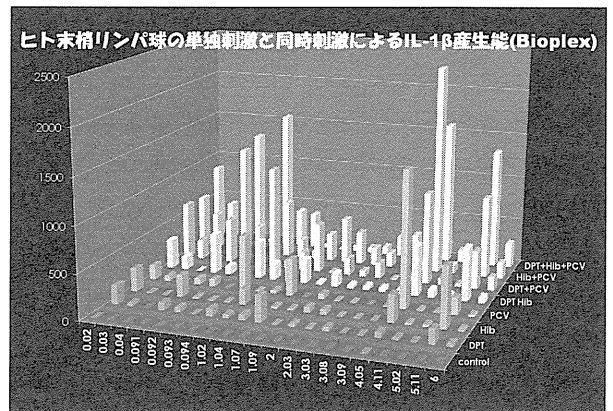


図5. 不活化ワクチン単独刺激と同時刺激のTNF- α 産生能

一方、IL-6はDPT, PCV, Hibの単独刺激でも高値の産生が認められBioplexでの測定上限を振り切りEIA想定系でも高いIL-6の産生が認められている。

D. 考案

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大腿四頭筋短縮症と診断され話題となり全国から多くの患者報告があがってきた。