

# 臨床疫学手法の重要性

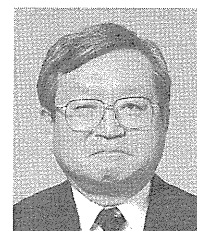
## —北海道発インフルエンザ脳症と細菌性髄膜炎

札幌市立大学特任教授

富樫 武弘

日本小児科医会会報 別刷  
第44号 (2012)

# 臨床疫学手法の重要性—北海道発 インフルエンザ脳症と細菌性髄膜炎



札幌市立大学特任教授 富樫 武弘

## 抄 録

平成6年(1994年)12月に経験した4歳男児に発症したインフルエンザ脳症をはじめ第27回日本小児感染症学会(平成7年, 和歌山市)に報告した。当初は北海道の地方病との指摘を受けたが, やがて日本全国さらには世界各地に存在することが証明された。また北海道は医療圏が独立しており, 約20分の1の人口を有する。全国に疾患が満遍なく発症しているとする, 全数を把握すれば20倍すると全国での発症数となる。本フォーラムでは北海道発のインフルエンザ脳症とワクチン普及前の小児細菌性髄膜炎の発症状況を紹介して臨床疫学手法の重要性を解説した。

キーワード: インフルエンザ脳症, サイトカインストーム, 血管内皮細胞障害, 細菌性髄膜炎, 結合性ワクチン

## はじめに

北海道は医療圏が独立しており全国の約20分の1の人口を占めている。したがってある時期にある疾患が全国で満遍なく発症しているとする, 北海道での発症者総数を知れば20倍することによって全国の発症数を推定することが可能となる。本稿では北海道から発したインフルエンザ脳症の存在の報告と, ワクチン普及前の北海道の細菌性髄膜炎の発症状況を紹介して臨床疫学手法の重要性を解説する。

### 1. インフルエンザ脳症

平成6年(1994年)4月1日付けで筆者は北大医学部小児科を離れ市立札幌病院小児科に移動した。その年の暮れの12月29日が筆者にとって初日直の勤務日だった。これまで全く健康に成長していた4歳の男児が前日12月28日午前3時から38.6℃の発熱とともに2~3分の全身痙攣を起こした。同日午前中に近所の小児科診療所を訪ね「熱性けいれん」と診断されて投薬を受けて帰宅した。翌29日午前0時30分, 40℃の発熱とともに再度全身痙攣と意識混濁を起こし, 午前3時

救急車で市立札幌病院の救急部に搬送された。9時に対光反射消失, 9時30分にCT室に移動中に心肺停止, AEDで蘇生されたが同日11時35分死亡した。発熱開始から死亡まで全経過わずか32時間であった。初日直だった筆者はCT室に移動中の児の心肺停止場面に遭遇したわけである。救急部に搬送された時に正常であった脳CT像は(図1)9時30分には全体浮腫, 視床・脳幹の左右対称の低電位像(水口 雅氏の提唱した小児急性壊死性脳症のCT像に一致)(図2)。筆者の北大小児科在職期間中にはこのような発病から急速に病勢が進行して死の転帰をとるという症例を経験したことがなかった。

筆者はこの年の夏から市立札幌病院小児科外来を訪れる高熱を呈する小児の鼻咽頭スワブ材料を採取していた。ウイルスの分離同定材料採取を北海道衛生研究所から依頼されていたためである。この症例を経験した12月はインフルエンザウイルスA(H1N1)が分離同定されはじめた時期であり, この症例がインフルエンザウイルスに関連して発症したものと直感した。現在ならば迅速診断キットでいち早くインフルエンザAの診断が可能であったであろう。当時北海道には小児科医が常駐しており小児科の入院ベッドを持つ病院が59カ所あり, 1994/95インフルエンザシーズンの終わりにこれらの病院の小児科部長に同様な症例の有無を

Takehiro Togashi(札幌市立大学看護学部)  
〒060-0011 北海道札幌市中央区北11条西13丁目

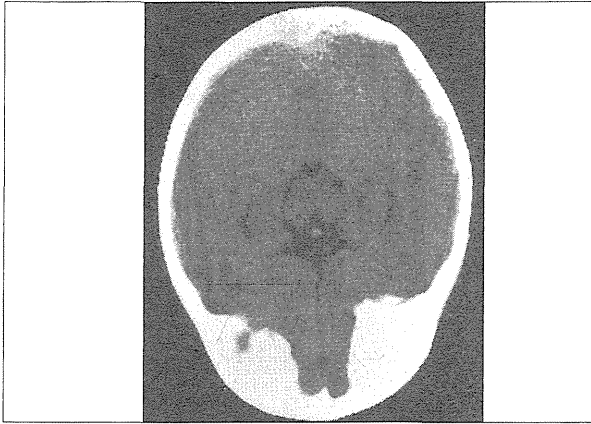


図1 4歳男児の脳CT像（ほぼ正常）、12月29日午前3時撮影

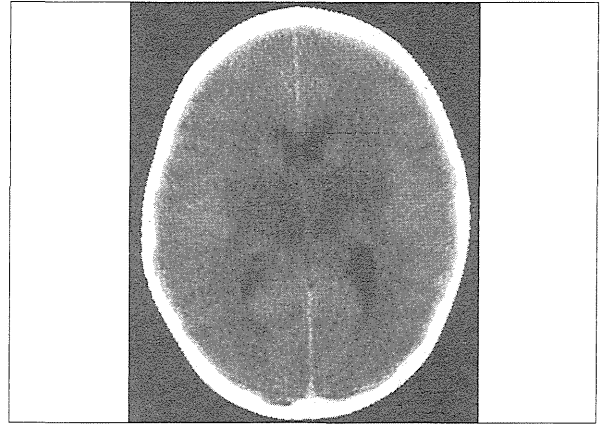


図2 同脳CT像、午前9:30撮影、視床の左右対称の低吸収域

たずねた。この結果このシーズンにトータル12例の発症（6例死亡、3例の神経学的後遺症）が確認された。そしてその発症のピークと北海道衛生研究所でのインフルエンザウイルスの分離ピーク、北海道のインフルエンザ様疾患の発症ピークが完全に一致した。すなわちこの疾患がインフルエンザウイルスの感染に関連して発症することが疫学的に推定されたわけである（図3）。

この疫学的手法は夕張地方で猖獗を極めたポリオの研究を始めた北大山田尚達名誉教授や札幌大故中尾亨名誉教授に指導され、北大の故田中哲夫先生、檀上保先生、札幌大の千葉峻三名誉教授に受け継がれた両大学のウイルス学研究の基礎をなすものであった。

この北海道で発症したインフルエンザ関連疾患の詳細を、平成7年（1995年）11月和歌山市で開催された第27回日本小児感染症学会（会長小池通夫教授）で報告した。また平成8年（1996年）に松菌嘉裕先生が日本小児科学会雑誌に<sup>1)</sup>、平成9年（1997年）に筆者が日本臨床に「インフルエンザ流行中の小児期急性脳炎・脳症」として誌上報告した<sup>2)</sup>。内外の小児科の教科書には脳炎あるいは脳症の原因ウイルスにインフルエンザウイルスが記載されてはいたものの、当時はこのような急激な経過をとるインフルエンザ関連疾患が多発するとの認識は一般的ではなかった。このためにこの疾患が北海道にのみ存在する地方病ではないかとの疑問が呈された。またライ症候群との関連で北海道ではまだインフルエンザに対してアスピリンを使用しているのかとの疑問も呈された（当然アスピリンの使用は皆無であった）。しかしながら2年、3年と症例を蓄積していくうちに日本全国にも同様の経過、症状を呈する症例が少なからず存在することがわかってきた。厚生省（当時）の医官であった葛西健

先生（現在WHOアドバイザーでハノイ在住）がいち早くこの疾患の重大性に気づかれ<sup>3)</sup>、その肝いりで平成8年（1996年）厚生科学研究インフルエンザ脳症研究班（班長森島恒雄現岡山大学教授）が立ち上げられるに至った。国際的には1998年第22回国際小児科学会（Amsterdam）、2000年第4回インフルエンザコントロールオプション会議（Crete）、2001年第23回国際小児科学会（Beijing）、2002年第1回ヨーロッパインフルエンザ会議（St-Julians, Malta）に出席、発表してこの疾患の存在と重大さを強調したが当初は無視されがちであった。森島班長の国際誌への報告や欧米のインフルエンザ研究者への粘り強い説得が功を奏して、ようやく2002年のMaltaの会議あたりからインフルエンザ関連脳症として認められるに至った。

北海道の症例につきインフルエンザシーズンの終わりに毎年報告を求め、1994/95から2003/04シーズンの10シーズン間に集積された症例は103例（年平均10.3例）となった。男児にやや多く（男女比1.3:1）、平均年齢 $4.5 \pm 2.9$ 歳、発熱—神経症状発現まで $1.6 \pm 1.7$ 日であり、予後は死亡34.0%、後遺症19.4%であった（表1、図4）。全国一律に発症していると仮定すると一年に平均200例の発症となり、研究班の成績もこれと一致した。

当時千歳市にいた武越靖郎先生と旭川市にいた長野奈緒子先生の粘り強い説得によって得られた貴重な2症例の剖検検体を、当時鳥取大学獣医学部におられた新矢恭子先生に病理学的、ウイルス学的検索をお願いした。2症例の剖検脳は、グリア細胞反応を伴う血管原性浮腫、血管壁の硝子変性、血漿成分の漏出、微小繊維素血栓と共通的特徴的所見がみられた（図5、6）<sup>4)</sup>。さらに肺、小腸、脾臓など全身諸臓器にも病変が及んでいた。国立感染症研究所（当時）におられ

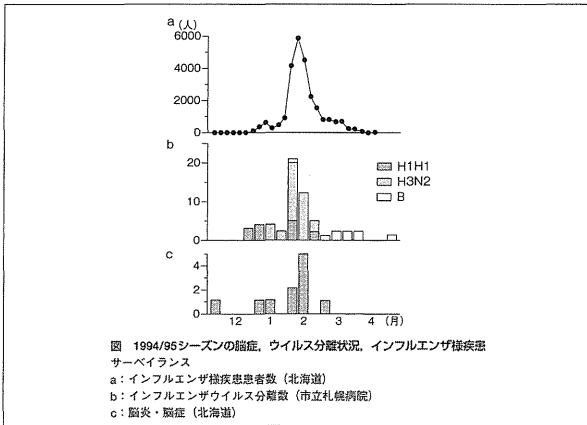


図3 1994/95シーズンの脳症，ウイルス分離状況，インフルエンザ様疾患

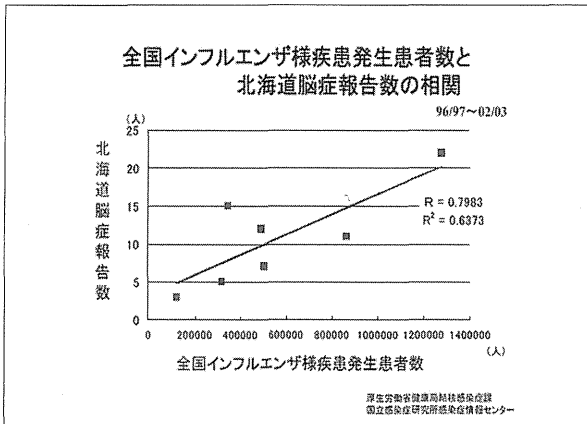


図4 北海道で発症したインフルエンザ脳症と全国のインフルエンザ様疾患の相関

表1 北海道で発症したインフルエンザ脳症，10シーズンのまとめ

インフルエンザ脳症 (北海道 1994/95~2003/04 10シーズン)											
	'94/95	'95/96	'96/97	'97/98	'98/99	'99/00	'00/01	'01/02	'02/03	'03/04	合計
北海道におけるインフルエンザの流行	A1 A3 B	A1 A3	A3 B	A3 B	A3 A1	A3 A1 A3	B A1 A3 B	A1 A3 B	A3 B	A3 B	
症例	12	14	5	22	11	7	3	15	12	2	103
性(男/女) (性比)	9/3	9/5	3/2	15/7	6/5	3/4	1/2	5/10	7/5	0/2	58/45 (1.3:1)
平均年齢 (歳)	3.1 (1-9)	3.9 (1-10)	5.0 (0-12)	4.5 (1-11)	2.5 (1-4)	3.9 (1-8)	4.9 (2-7)	5.1 (1-9)	5.0 (1-9)	6.5 (1-12)	4.5±2.9
発熱-神経症状 (日)	2.5 (1-6)	2.9 (1-10)	3.2 (2-5)	1.2 (0-3)	0.8 (0-1)	1.1 (0-4)	1.0 (0-2)	1.6 (0-5)	0.5 (0-1)	0.0 (0)	1.6±1.7
転帰											
死亡	6	7	3	7	5	1	0	4	2	0	35(34.0%)
後遺症	3	2	1	6	1	1	0	3	3	0	20(19.4%)
軽快	3	5	1	9	5	5	3	8	7	2	48(46.6%)

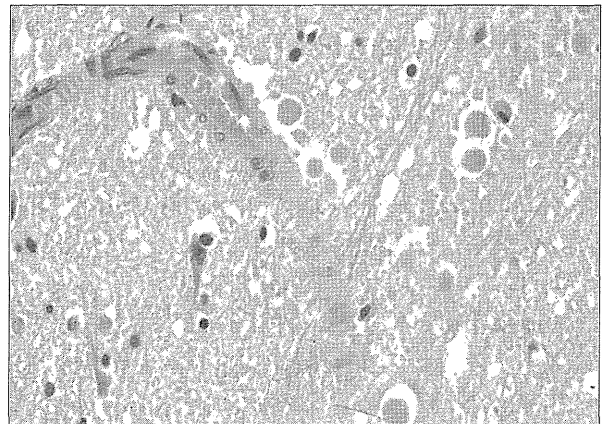


図5 症例1の剖検脳組織，血管原性浮腫，血漿成分の血管外漏出，血管内血栓

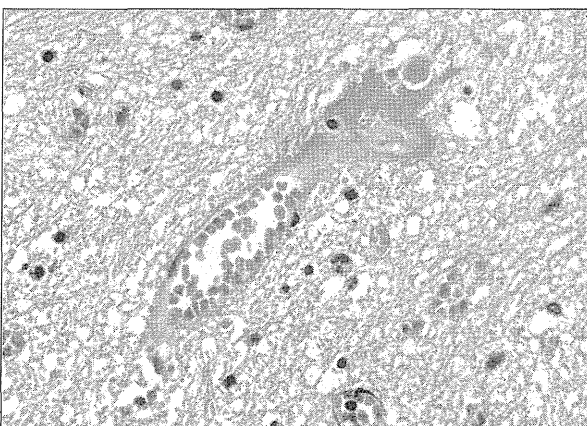


図6 症例2の剖検脳組織，同一所見

表2 各症例のIL-6, TNF-α, 急速な経過をとって死亡した例できわめて高値をとった。

表 各症例のIL-6, TNF-α				
	検体	採取年月日	IL-6 pg/mL	TNF-α pg/mL
症例1	CSF*	98.2.7	62,250	159
	血清	98.2.7	>700,000	1,059
症例2	CSF	98.3.14	104,300	801
	血清	98.3.14	415,400	916
症例3	CSF	96.2.26	134	10.2
	脳室液	96.3.3	1,058	11.4
症例4	血清	96.3.3	86.9	51.3
	CSF	98.1.30	855.2	<7.5
対照				
症例5**	CSF	96.1.30	26.9	28.5
症例6**	CSF	97.8.2	10.2	<7.5
症例7**	CSF	98.2.10	16.2	<7.5

\*1: cerebrospinal fluid  
 \*\*2: 4歳女，熱性けいれん  
 \*\*3: 1歳男，顔面神経麻痺  
 \*\*4: 5歳男，熱性けいれん，急速な経過をとって死亡した例で，極めて高値をとった。

た岩崎琢也先生により気管支上皮にインフルエンザAウイルスのNP抗原が証明されたが，剖検脳からはウイルス抗原は一切証明されなかった。これらの所見から「脳炎・脳症」と称していたものを「脳症」と統一

した。脳脊髄液中のIL-6, TNF-αを当時北大小児科にいた成田光生，板倉 治先生に測定してもらったところ，急速な進行で死亡した2例で極めて高値であった(表2)<sup>5)</sup>。このことからこの疾患は全身の血管内

表3 北海道で発症した細菌性髄膜炎の起因菌別発生数と予後, 平成19-23年

細菌性髄膜炎: 予後、起因菌						
症例数	インフルエンザ菌	肺炎球菌	GBS	大腸菌	その他	
2007年	21	11	6	2	1	1
		水頭症 1 高度難聴 1				水頭症 1
2008年	18	13	1	2	1	1
		高度難聴 1	神経後遺症 1	神経後遺症 (尿崩症) 1		
2009年	19	12	4	1	2	
		高度難聴 2		神経後遺症 1		
2010年	18	13	4	0	1	
		死亡 1 神経後遺症 1				
2011年	16	9	5	1	1	
		難聴 1				
	92	58	20	6	6	2

北海道細菌性髄膜炎、平成19-23年\*

表4 細菌性髄膜炎の起因菌別細菌学所見

細菌性髄膜炎: 細菌学的検査所見	
◆ インフルエンザ菌 b型 51/52, 98.1%	
gBLNAR	30株
gLowBLNAR	5株
gBLPAR	1株
gBLPACR-I	3株
gBLPACR-II	5株
gBLNAS	1株
◆ 肺炎球菌 PCV7(11/17), PCV13(14/17)	
6A (gPISP, PCV13含有)	1株
6B (gPRSP, PCV7含有)	4株
6C (gPISP)	2株
14 (gPISP, PCV7含有)	2株
19F (gPISP, PCV7含有)	2株
19A (gPISP, PCV13含有)	2株
23F (gPRSP, PCV7含有)	3株
34 (gPSSP)	1株
◆ GBS	
I b, III, IV, V	

北海道細菌性髄膜炎、平成19-23年

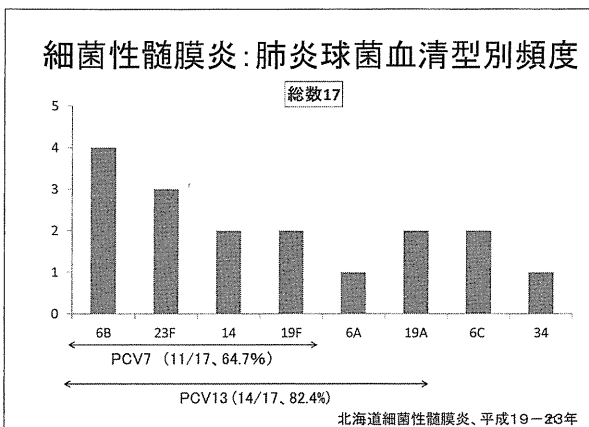


図7 肺炎球菌株の血清型

表5 肺炎球菌株血清型の年次推移

細菌性髄膜炎: 肺炎球菌血清型年別発症数								
	6B	23F	14	19F	6A	19A	6C	34
平成19年	4	1		1	1			1
平成20年	1	1						
平成21年	3	2		1				
平成22年	4		2			2		
平成23年	5	1	2				2	
	17	4	3	2	1	2	2	1

※平成23年肺炎球菌ワクチン2回接種後細菌性髄膜炎発症 血清型: 6C  
最終接種日23年1月27日、平成23年5月12日発症

北海道細菌性髄膜炎、平成19-23年

皮細胞が障害されてサイトカインストームが惹起されて発症するものと想定されるが本態はまだ不明な点が多い。

2005年 のNew England J. Medicineに2003-2004シーズンの米国でインフルエンザに関連して死亡した18歳未満153例の報告が載った<sup>6)</sup>。96例(63%)が5歳未満児であり、43例(31%)が病院に転送される前に死亡、45例(29%)がインフルエンザ発症3日以内の死亡と報告されている。わが国の「インフルエンザ脳症」との比較検討が待たれる。

## 2. 北海道の細菌性髄膜炎

筆者はHibワクチン(アクトヒブ<sup>®</sup>)<sup>7)</sup>、7価肺炎球菌結合型ワクチン(プレベナー<sup>®</sup>)<sup>8)</sup>の国内治験責任医師として両ワクチンのわが国への導入に協力した。諸外国には両ワクチン導入前後のHib、肺炎球菌による侵襲性感染症の疫学データが存在しており、ワクチン導入効果を知ることができた。しかしわが国にはこれらのデータはほとんど皆無に等しかった。そこで平成

18年暮れにインフルエンザ脳症発症調査に協力いただいた、北海道の小児科施設の小児科部長に細菌性髄膜炎の発症状況と起因菌の蒐集をお願いした。蒐集した細菌の細菌学的検査は北里大学の生方公子先生をお願いした。

この結果5年間の細菌性髄膜炎は平成19年21例、20年18例、21年19例、22年18例、23年18例の合計94例(男48, 女46例, 年平均18.8例)発症したとの報告を受けた(表3)。このうちインフルエンザ菌によるものは各年それぞれ11, 13, 12, 13, 11例(合計60例, 年平均12.0例)、肺炎球菌によるものが各年それぞれ6, 1, 4, 4, 5例(合計20例, 年平均4.0例)であった。その他GBS 6例, 大腸菌 6例, リステリア菌 1例, 髄膜炎菌 1例であった。この5年間で平均すると5歳未満の人口10万人あたりインフルエンザ菌による髄膜炎は5.7人, 肺炎球菌による髄膜炎は1.7人となった。インフルエンザ菌の莢膜型は検査された54検体中53検体(98.1%)がb型であり、アンピシリン感受性で分類すると46株中45株(97.8%)が耐性株であり感受性

株はわずか1株にすぎなかった。肺炎球菌の血清型は17株で検索され血清型6A (gPISP, PCV13含有) 1株, 6B (gPRSP, PCV7含有) 4株, 6C (gPISP) 2株, 14 (gPISP, PCV7含有) 2株, 19A (gPISP, PCV13含有) 2株, 19F (gPISP, PCV7含有) 2株, 23F (gPRSP, PCV7含有) 3株, 34 (gPSSP) 1株であった(表4)。従って7価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV7)含有株は11株(64.7%)であった。現在国内治験中の13価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV13)含有株は14株(82.4%)であった(図7)。患者から得られた肺炎球菌株の年次変化を表示したが(表5),平成22年に19Aが2株, 23年に6Cが1株得られた。この期間中該当ワクチン被接種者からの髄膜炎発症者は血清型6Cによる肺炎球菌髄膜炎の1例のみであった。Hibワクチンは平成20年12月, 7価結合型肺炎球菌ワクチンは平成22年2月から市販されたが, 任意接種で開始されたため接種率は低迷していた。しかしながら平成23年4月から両ワクチンの公費助成が始まって接種率が急速に高まり現在に至っている(平成23年末の札幌市の5歳未満児でHibワクチン44.8%, PCV7ワクチン54.2%の接種率, 7カ月未満児でそれぞれ94.5, 92.1%の接種率である)。北海道では平成23年10月25日発症のHib髄膜炎男児, 5月29日発症の肺炎球菌髄膜炎女児以降, インフルエンザ菌, 肺炎球菌を起因菌とする細菌性髄膜炎の発症報告は無い(平成24年10月現在)。

## おわりに

北海道から提唱したインフルエンザ脳症との出会い

と北海道で発症した細菌性髄膜炎の5年間の集積を報告して, 臨床疫学手法の重要性を強調した。

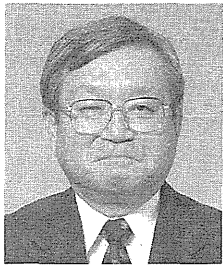
この論文の要旨は平成24年6月9日(土)第23回日本小児科医会総会フォーラムで会頭講演として報告した。

## 文 献

- 1) 松菌嘉裕, 穴倉迪彌, 富樫武弘他: インフルエンザ流行期にみられた脳炎・脳症の多発. 日本小児科学会雑誌100(7): 1258-1259, 1996
- 2) 富樫武弘, 松菌嘉裕, 穴倉迪彌他: インフルエンザ脳症. インフルエンザ流行中の小児期脳炎・脳症. 日本臨牀55(10): 2699-2705, 1997
- 3) Kasai T, Togashi T, Morishima T: Encephalopathy associated with influenza epidemics. Lancet 355: 1558-1559, 2000
- 4) 富樫武弘, 松菌嘉裕, 武越靖郎, 長野奈緒子: 小児期インフルエンザ脳炎・脳症の2割検例. 日本小児科学会雑誌106(1): 76-80, 2002
- 5) 富樫武弘, 松菌嘉裕, 板倉 治, 成田光生: インフルエンザ流行中にみられる小児期脳炎・脳症の脳脊髄液中IL-6, TNF- $\alpha$ . 日本小児科学会雑誌103(1): 16-19, 1999
- 6) Bhat N, Wright JG, Broder KR, et al: Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004. New Eng J Med 353: 2559-2567, 2005
- 7) 富樫武弘: インフルエンザ菌b型ワクチン(Hibワクチン, DF-098)の第3相臨床試験—初回接種の成績—. 小児感染免疫14(3): 241-245, 2002
- 8) 富樫武弘, 岩田 敏, 丹後俊郎, William Gruber: 7価肺炎球菌結合型ワクチンの接種成績—初回接種および追加接種の免疫原性と安全性—. 感染症学雑誌85(1): 42-48, 2011

# Hibワクチン

Hib vaccine



**富樫 武弘**

Takehiro TOGASHI

札幌市立大学看護学部

© Hib(インフルエンザ菌b型)ワクチンが2008年12月に市販された。市販当初から任意接種とされ、複数回(標準4回)接種が必要なため接種率が低迷していた。しかし、2011年度から“子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業”としてHPVワクチン、PCV7(7価肺炎球菌結合型ワクチン)とともに公費補助の対象となり、急速に接種率が上昇した。このワクチンの予防対象疾患はHibの菌血症によって起こる細菌性髄膜炎であり、その発症時期は生後2~3カ月から2歳までの乳幼児期に集中している。このワクチンが定期接種に取り入れられた国々ではHibによる髄膜炎の発症が激減している。Hib感染症の防御は、菌の莢膜多糖体(PRP)に対する抗体が担う。18カ月未満の幼児はPRPのみを接種しても十分な抗体を産生せず、PRPにキャリア蛋白を結合したワクチンが開発され、2カ月児でも効率的に抗体が産生され、接種が可能となった。わが国で認可されているワクチンはフランスのサノフィパスツール社で開発されたPRP-T(キャリア蛋白として破傷風トキソイドを使用、アクトヒブ®)である。生後2カ月から4週ごとに3回接種(初回接種)して、生後12カ月を過ぎて追加接種するのが標準的である。この初回接種の時期は、PCV7、DPT-IPV(百日咳・ジフテリア・破傷風・不活化ポリオワクチン)やロタウイルスワクチンの接種時期と重なっている。日本小児科学会はこれらのワクチンの同時接種を基本とした学会が推奨する接種スケジュールを公表している。PCV7とともに定期接種対象ワクチンに採用される日が待たれる。



**Key word** Hibワクチン, 小児細菌性髄膜炎, 結合型ワクチン, 同時接種

2008年12月、Hib(インフルエンザ菌b型)ワクチンが市販された。フランス・サノフィパスツール社のアクトヒブ®(ActHIB®)である。このワクチンが定期接種に取り入れられた国々ではHibによる細菌性髄膜炎が激減している。わが国では導入当初から任意接種とされたことから、接種率が低迷していた。しかし、2010年秋に国により“子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業”(補正予算)としてHPV(ヒトパピローマウイルス)ワクチン、PCV7(7価肺炎球菌結合型ワクチン)とともにHibワクチンも公費補助の対象となって接種率が急速に上昇した。このため乳幼児期に発症するHibによる細菌性髄膜炎をはじめとする全身感染症が激減している。

本稿ではHibワクチン導入前のわが国のHibに

よる全身感染症と、Hibワクチンの現状を概説する。

## ● 細菌性髄膜炎

細菌性髄膜炎は小児にとって最重症な感染症であり、罹患すると時に死に至ったり重篤な神経系の後遺症を遺す。そして、その起因菌はインフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)が第1位、第2位を肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)が占めている。インフルエンザ菌は莢膜の有無によって莢膜型と無莢膜型に分類され、莢膜型はa~fの6種類の血清型に分類される。中耳炎などの局所感染症を引き起こす菌が無莢膜型であるのに対して、髄膜炎、肺炎、喉頭蓋炎など菌血症を伴う全身感染症を引き起こす菌はおもに莢膜型で、その

ほとんどがb型(Hib)である。

臨床症状は、高熱、頭痛、悪心・嘔吐、不きげん、痙攣などであるが、病初期は風邪などの症状と似ており、早期診断が難しい。

1996～1997年に6都道府県で実施された前向き調査によると<sup>1)</sup>、インフルエンザ菌髄膜炎の罹患率は年8.6人(5歳未満人口10万人対、以下同じ)であり、年間患者数は500人以上となる。全身感染症の頻度に関して石和田らは千葉県で、2007年6.4、2008年13.5、2009年11.2と報告し<sup>2)</sup>、西村らは2003年から4年間の調査で髄膜炎が30.9と報告している<sup>3)</sup>。厚生労働科学研究による全国10道県による班研究(神谷・庵原班)によると、2008年8.3、2009年7.1、2010年7.8と報告されており、人口から計算して2010年の全国の発症数を412例と算出している<sup>4)</sup>。

北海道では2007～2011年の5年間で58例の報告があり(5歳未満;表1)、年平均の発症数は5歳未満人口10万人当たり5.7となった<sup>5)</sup>。発症年齢では0歳代は26例(44.8%)、1歳代は15例(25.9%)と、両者合わせた2歳未満が41例(70.7%)を占めた(図1)。予後は死亡1例(1.7%)、重症神経後遺症1例(1.7%)、高度難聴3例(5.2%)であったが、ほかは後遺症なく治癒した。起因菌の莢膜血清型

表1 2007～2011年インフルエンザ菌性髄膜炎の発症状況(北海道, 5歳未満)

	インフルエンザ菌	総数
2007年	11	19
2008年	12	16
2009年	12	19
2010年	12	16
2011年	11	18
合計	58	88

別ではb型が51/52(98.1%)を占め、アンピシリン感受性検査では30/45(66.7%)がβラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性(BLNAR)株であり、アンピシリン感受性株は1/45(2.2%)であった(表2)。

### Hibワクチンとその効果

Hib感染症の防御は、Hibがもつ莢膜多糖体(polyribosyl ribitol phosphate: PRP)に対する抗体が担う。Hibワクチンは当初PRPワクチンがアメリカで開発され、1985年認可された。ところが、PRP単独では18カ月未満児で十分な免疫原性を発揮できなかった。そこでPRPにキャリア蛋白を結合させたHib結合体ワクチンが開発され、

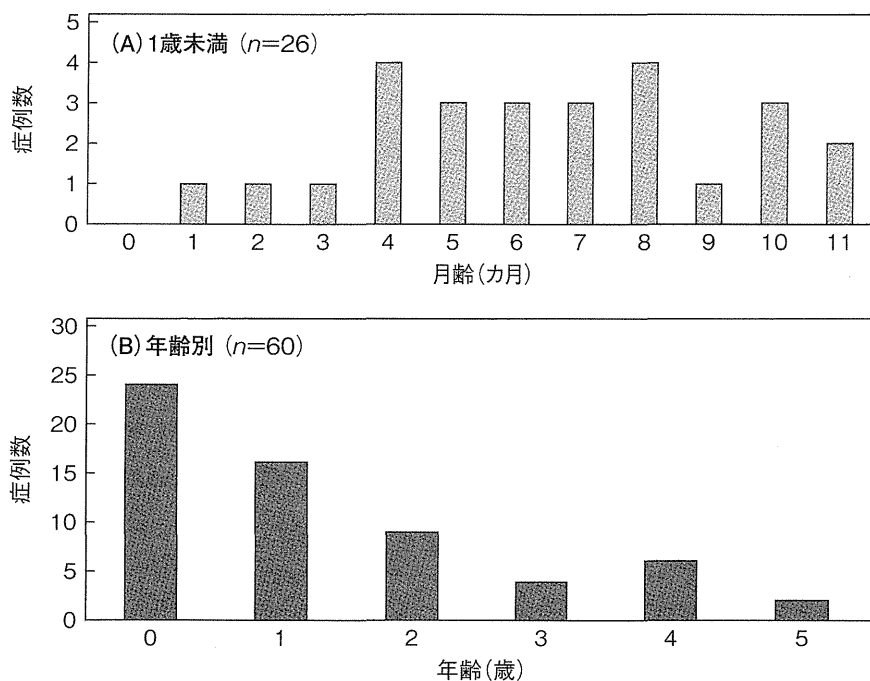


図1 2007～2011年インフルエンザ菌性髄膜炎の発症数(北海道)  
A: 月齢別, B: 年齢別。



表 2 2007～2011年インフルエンザ菌性髄膜炎患者から分離された細菌の血清型と遺伝子型(北海道)

インフルエンザ菌 b 型 : 53/54, 98.1%
gBLNAR 30株( $\beta$ ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性菌)
glowBLNAR 6株( $\beta$ ラクタマーゼ非産生アンピシリン軽度耐性菌)
gBLPAR 1株( $\beta$ ラクタマーゼ産生アンピシリン耐性菌)
gBLPACR-I 3株( $\beta$ ラクタマーゼ産生アモキシシリン/クラブラン酸耐性菌 I 型)
gBLPACR-II 5株( $\beta$ ラクタマーゼ産生アモキシシリン/クラブラン酸耐性菌 II 型)
gBLNAS 1株( $\beta$ ラクタマーゼ非産生アンピシリン感受性菌)

1990年に2カ月以上の児に接種可能となった。このワクチンが広く接種された結果、アメリカのインフルエンザ菌髄膜炎の罹患率は1984年24.0人(5歳未満児10万人対)から1991年3.7人へと激減した。

Hib 結合体ワクチンはすでに90カ国以上で小児の定期予防接種プログラムに組み込まれている。WHOは1998年にこのワクチンを定期予防接種プログラムに組み込むことを推奨した。

著者らは2000年2月～2002年6月の間に全国19の施設の小児科で、2～6カ月齢の健康小児を対象に、Hib ワクチンの安全性と有効性(免疫原性)試験を行った<sup>6)</sup>。用いたワクチンは、フランスのサノフィパスツール社で開発・製造されたPRP-T(キャリア蛋白として破傷風トキソイドを使用、

ActHIB<sup>®</sup>, 日本名アクトヒブ<sup>®</sup>)ワクチンである。1バイアル中にHibPRP 多糖体10 $\mu$ gを含む凍結乾燥製剤で、使用前添付溶剤0.5 mLで溶解して皮下接種した。初回接種として3回(3～8週間隔)、その1年後に追加接種した。初回接種および追加接種のそれぞれ前後の4回採血し、抗PRP 抗体価を測定した。安全性の確認のため、接種医師は接種30分以内の有害事象を観察し、接種当日に保護者に健康調査日誌を手渡しその記入を依頼した。日誌には接種7日後までの体温や接種部位の発赤腫脹の有無・程度の記入欄があり、次回来院時に回収した。

19施設で122例に接種され、抗体価測定は119例で行った。119例中初回接種前後の1 $\mu$ g/mL以上(長期保護レベル)の抗体保有率はそれぞれ2.5%(3/119), 92.4%(110/119)であり、0.15 $\mu$ g/mL以上(保護レベル)の抗体保有率はそれぞれ13.4%(16/119), 99.2%(118/119)であった。抗体価の幾何平均値は、接種前0.06 $\mu$ g/mL, 初回接種後9.68 $\mu$ g/mLであった。また、116例が追加接種を完了した。追加接種4週間後には1 $\mu$ g/mL以上の抗体保有率が100%(116/116)となり、GMTが117 $\mu$ g/mLであった(図2)。

### 副反応

臨床試験で用いられたHib ワクチンは、フランスでは1992年、アメリカでは1993年に承認され、現在100カ国以上で発売されている。すでに安全

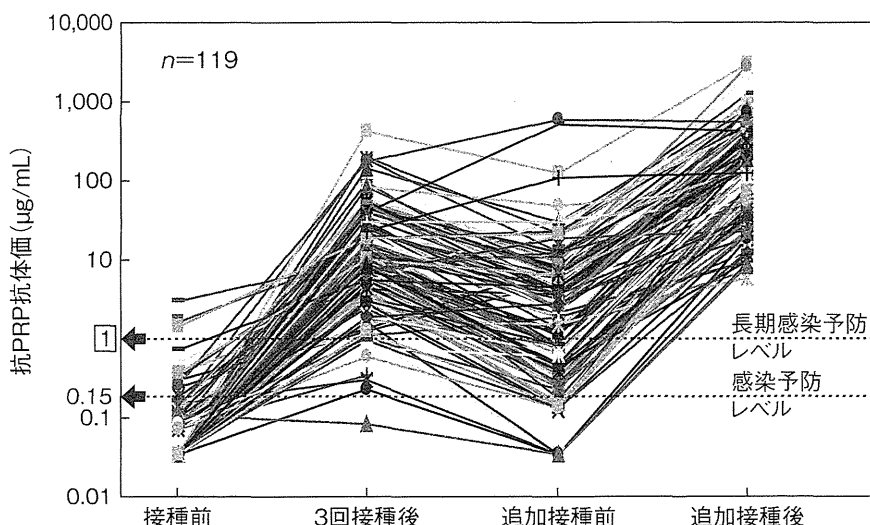


図 2 Hibワクチン初回接種(3回)と追加接種(1回)接種前後の抗PRP抗体価の推移

性と有効性は約 111,000 例の臨床試験で検討されており、副反応は全般的に軽微かつ一過性であった。わが国で行われた臨床試験でも副反応はおもに局所反応であり、注射部位の発赤(最高発現率 45.9%)、腫脹(同 23.1%)、硬結(同 21.5%)、および疼痛(同 9.1%)であったが、いずれも一過性であった。全身反応は発熱(最高発現率 4.1%)、不きげん(同 23.0%)、食欲不振(同 13.2%)、下痢(同 10.7%)、嘔吐(同 8.3%)などが認められたが、外国臨床試験ですでに報告されている症状と類似していた。

### ● 同時接種

前述のように細菌性髄膜炎の発症時期は 2 歳未満(70.7%)、とくに 1 歳未満の乳児(44.8%)に集中していた。したがって、このワクチンは生後 2~3 カ月齢に初回接種(0.5 mL, 皮下接種)し、1~2 カ月間隔で 3 回接種、その後 1 年を過ぎて 1 回追加接種するのが標準的である。この接種時期は PCV7(プレベナー®)の接種時期と一致する。また、百日咳・ジフテリア・破傷風・不活化ポリオ(セービン株)ワクチン(テトラビック®, クアトロバック®)が 3 カ月齢から 1~2 カ月間隔で 3 回接種、その後 1 年を過ぎて 1 回追加接種する時期とも一致する。したがって、この生後 2~6 カ月の間は複数のワクチンを同時に接種することが必然となる。さらには、あらたに登場した内服用ヒトロタウイルスワクチン(ロタリックス®, ロタテック®)の接種時期とも重なっている。

著者らはインフルエンザ菌 b 型ワクチン(アクトヒブ®)と国産沈降精製百日咳・ジフテリア・破傷風混合ワクチン(DPT)を同時接種した際の免疫原性および安全性を、アクトヒブ®の製造販売後試験として検討した。その結果、同時接種群と DPT 単独群とも、免疫原性も副反応発現率いずれも同等であった<sup>7)</sup>。

日本小児科学会は、生後 2 カ月からスタートし、同時接種を基本とした学会が推奨する予防接種ス

ケジュールを公表して、ホームページと学会雑誌に掲載した<sup>8)</sup>。ワクチンの種類が増加したり接種回数が増えたりした場合には適宜内容が更新される。

### ● おわりに

Hib ワクチンについて現状を概説した。このワクチンは“子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業”の接種対象ワクチンとして、1 年ごとの補正予算により市町村への地方交付税の形で補助されている。市町村によっては補助が受けられない自治体もあり、1 年ごとの更新などという不安定な状況は改められなければならない。ワクチン接種で予防することができる疾患(vaccine preventable diseases: VPD)は、すべての国民が無料で予防できる環境づくりが急がれる。これには予防接種法の全面改正が急務である。

### 文献/URL

- 1) 加藤達夫・他：わが国における Hib 髄膜炎の発生状況—1996-1997 年のプロスペクティブ調査結果。小児感染免疫, **10**: 209-214, 1998.
- 2) 石和田稔彦・他：2007 年から 2009 年のインフルエンザ菌・肺炎球菌全身感染症罹患状況。日本小児科学会誌, **115**: 50-55, 2011.
- 3) 西村龍夫・他：b 型インフルエンザ菌菌血症・髄膜炎の発症頻度。日本小児科学会雑誌, **112**: 1373-1378, 2008.
- 4) 庵原俊昭・他：「小児細菌性髄膜炎および全身性感染症調査」に関する研究(全国調査結果)。厚生労働科学研究費補助金「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」平成 23 年度総括・分担研究報告書, 2011, pp.9-16.
- 5) 富樫武弘・他：北海道における小児期細菌性髄膜炎の疫学調査成績。日本小児科学会雑誌, **114**: 473-478, 2010.
- 6) 富樫武弘：Hib ワクチン。臨床と微生物, **32**: 511-516, 2005.
- 7) 吉岡和子・他：インフルエンザ菌 b 型結合体ワクチンの製造販売後臨床試験。日本小児科学会雑誌, **115**: 570-577, 2011.
- 8) 日本小児科学会が推奨する予防接種スケジュール。日本小児科学会雑誌, **116**(11), 2012. (<http://www.jpeds.or.jp/jps-j.html>)

\* \* \*

〔OAP要旨〕 *Haemophilus influenzae* type b 髄膜炎患者より  
分離された髄液・血液・鼻咽頭由来株の  
制限酵素多型性解析

星野 直<sup>1,2)</sup> 石和田 稔彦<sup>1,3)</sup> 河野 陽一<sup>1)</sup>

(2012年4月5日受付, 2012年4月18日受理)

*Haemophilus influenzae* type b (Hib) ワクチン導入前の10年間に、22例の髄膜炎患者の髄液・血液・鼻咽頭から同時に分離されたHib 22組66株に対して、パルスフィールドゲル電気泳動法を用いた制限酵素多型性 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) 解析を行った。22例中18例では3部位由来株が同一のRFLPパターンを呈しており、鼻咽頭保菌を契機に菌血症を介し髄膜炎を発症する経路が確認された。残る4例もほぼ同一のRFLPパターンを示したが、3部位のうち1部位由来株の1本のバンドが約20kbシフトしていた。Cap-b遺伝子1コピーの分子量は18kbであり、バンドの相違はcap 1コピーの増幅あるいは脱落を示すものと考えられた。Hibは、capのコピー数を変化させることで生体の免疫機構を回避しながら、髄膜炎を発症しているものと推察された。

Key words: *Haemophilus influenzae* type b, PFGE, RFLP, cap

---

<sup>1)</sup> 千葉大学大学院医学研究院小児病態学

<sup>2)</sup> 千葉県こども病院感染症科

<sup>3)</sup> 千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部

Phone: 043-292-2111. Fax: 043-292-3815. E-mail: t.hshn12@pref.chiba.lg.jp

[ Original Paper ]

## Restriction fragment length polymorphism analysis of *Haemophilus influenzae* type b strains isolated simultaneously from cerebrospinal fluid, blood, and nasopharynx of Japanese children with bacterial meningitis

Tadashi Hoshino<sup>1,2)</sup>, Naruhiko Ishiwada<sup>1,3)</sup> and Yoichi Kohno<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba 260-8670.

<sup>2)</sup>Division of Infectious Diseases, Chiba Children's Hospital, Chiba 266-0007.

<sup>3)</sup>Division of Control and Treatment of Infectious Diseases, Chiba University Hospital, Chiba 260-8677.

(Received April 5, 2012, Accepted April 18, 2012)

### SUMMARY

During the 10 years preceding the introduction of the *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccine, restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using pulsed-field gel electrophoresis was performed on 66 strains (22 sets) of Hib isolated simultaneously from cerebrospinal fluid, blood, and nasopharyngeal samples of 22 patients with meningitis. Strains from the 3 types of samples showed identical RFLP patterns in 18 of the 22 patients, confirming the pathway of Hib infection starting from the nasopharynx and leading to meningitis through bacteremia. In the remaining 4 patients, the RFLP patterns from the 3 sample types were also nearly identical. However, a single band in the RFLP patterns of strains from 1 of the 3 sample types showed a shift of about 20 kb. One copy of the cap-b gene had a molecular weight of 18 kb, and the discrepancy in the band's molecular weight indicated an amplification or loss of a single copy of the cap. These findings suggest that Hib caused meningitis by changing the number of copies of the cap to evade the host's immunological response.

**Key words:** *Haemophilus influenzae* type b, PFGE, RFLP, cap

### I. Introduction

In 2008, a *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccine was introduced in Japan. However, even in 2011, Hib remains the major causative organism of bacterial meningitis in Japanese children because it is vaccinated voluntarily. Bacterial meningitis develops

when bacteria carried in the nasopharynx spread, causing bacteremia, and then cross the blood-brain barrier[1]. Therefore, bacterial strains isolated from the nasopharynx, blood, and cerebrospinal fluid samples from patients with meningitis should be identical; however, few studies have reported the genetic homology between them[2]. In this study, we confirmed the pathway of development of bacterial meningitis in children by performing a restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of Hib isolates from the nasopharynx, blood, and cerebrospinal fluid of patients with meningitis.

---

Address correspondence to Dr. Tadashi Hoshino.  
Division of Infectious diseases, Chiba Children's Hospital, 579-1 Heta cho, Midori-ku, Chiba-City 266-0007, Japan.  
Phone: +81-43-292-2111. Fax: +81-43-292-3815.  
E-mail: t.hshn12@pref.chiba.lg.jp

## II. Materials and Methods

This study was conducted on 38 patients with Hib meningitis who were admitted to Chiba Children's Hospital and Chiba University Hospital during the 10-year period before the introduction of the Hib vaccine from 1998 to 2007. Before initiation of antimicrobial therapy, cerebrospinal fluid, blood, and/or nasopharyngeal samples were collected from patients in order to perform bacterial culture. The 22 patients from whom Hib was isolated in all 3 sample types were selected as study participants (Table 1). Other 16 patients were excluded because only 2 samples, CSF and blood, were collected. A slide agglutination test was performed at the time of isolation, and identification using an antiserum (DENKA SEIKEN Co., Ltd.) confirmed that the 66 bacterial strains from the 22 sets of samples were serotyped as b. The bacterial strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ , and subcultures of the strain were kept to a minimum in order to prevent capsular loss.

RFLP analysis was performed using the PFGE method [3]. Bacterial genomic DNA was digested using the restriction enzyme *Sma*I (or *Apa*I for some samples) and was embedded in 1% agarose gels. Electrophoresis was then performed in  $0.5 \times$  TBE buffer with run conditions of 170 V for 22 h at  $14^{\circ}\text{C}$  and pulse times of 5-50 s (for *Sma*I) or 2-25 s (for *Apa*I), ramped linearly using the CHEF-DR II system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

## III. Results

Figure 1 shows the RFLP patterns of the bacterial strains from the cerebrospinal fluid, blood, and nasopharynx by *Sma*I digested PFGE. In 18 of the 22 patients (patients 3-9 and 11-21), the RFLP patterns from the 3 types of samples were identical (Fig. 1-a). For the remaining 4 patients (patients 1, 2, 10, and 22), bacterial strains from one of the samples showed a shift

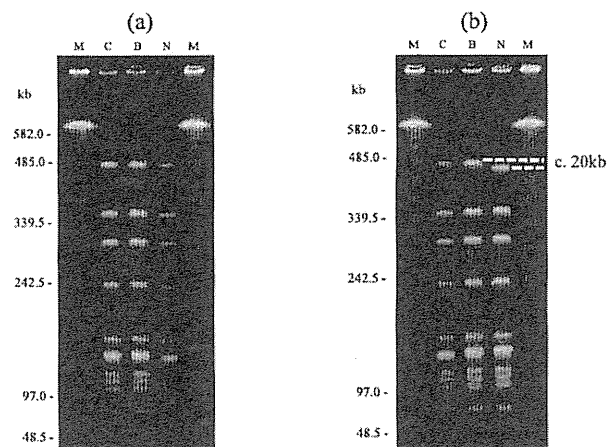


Fig. 1 Examples of RFLP patterns of *Sma*I digested DNA of *H. influenzae* type b strains from patients with purulent meningitis. In 18 patients (patients 3-9 and 11-21), RFLP patterns of the 3 isolates were identical (Fig. 1-a). In 4 patients (patients 1, 2, 10, and 22), the patterns were identical except 1 strain in which a single band shift of approximately 20 kb was identified (Fig. 1-b). Lanes: C, isolate from cerebrospinal fluid; B, from blood; N, from nasopharynx; M, lambda ladder molecular size marker.

Table 1 Patient number, year, age, sex, and criteria for RFLP patterns of 22 pediatric patients with purulent meningitis caused by *H. influenzae* type b.

Patient No.	Year	Age/Sex	Criteria for RFLP pattern* of 3 strains	Patient No.	Year	Age/Sex	Criteria for RFLP pattern* of 3 strains
1	1998	2y/M	Closely related	12	2002	2m/M	Indistinguishable
2	1999	3y/F	Closely related	13	2003	11m/M	Indistinguishable
3	2000	8m/M	Indistinguishable	14	2003	1y/M	Indistinguishable
4	2000	8m/M	Indistinguishable	15	2004	3m/F	Indistinguishable
5	2000	9m/M	Indistinguishable	16	2004	1y/M	Indistinguishable
6	2001	3y/F	Indistinguishable	17	2005	5m/F	Indistinguishable
7	2001	1y/M	Indistinguishable	18	2005	7m/M	Indistinguishable
8	2001	1y/M	Indistinguishable	19	2005	1y/M	Indistinguishable
9	2001	1y/M	Indistinguishable	20	2006	1y/M	Indistinguishable
10	2002	1y/F	Closely related	21	2006	1y/F	Indistinguishable
11	2002	3y/F	Indistinguishable	22	2007	11m/M	Closely related

\*Tenover FC, et al. J. Clin. Microbiol 1995; 33: 2233-9.

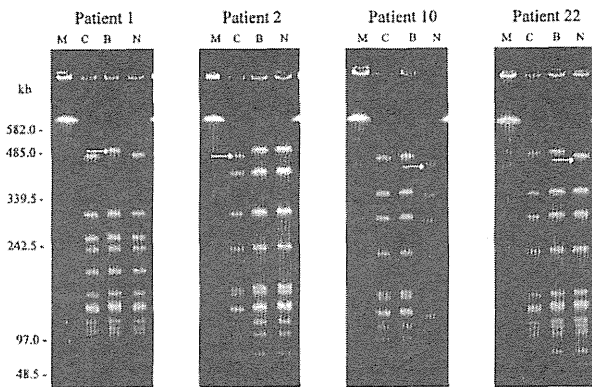


Fig. 2 Discrepancy of RFLP patterns of *SmaI* digested DNA between isolates from cerebrospinal fluid, blood, and nasopharynx of 4 patients. In all patients, a difference in the  $\sim 485$  kb fragment was observed in 1 of 3 strains (arrow). Patient 1, the isolate from the blood showed a single-band shift of approximately  $+20$  kb; patient 2, the strain from the cerebrospinal fluid showed a shift of approximately  $-20$  kb; patients 10 and 22, strains from the nasopharynx showed a shift of approximately  $-20$  kb shift. Lanes: C, isolate from cerebrospinal fluid; B, from blood; N, from nasopharynx; M, lambda ladder molecular size marker.

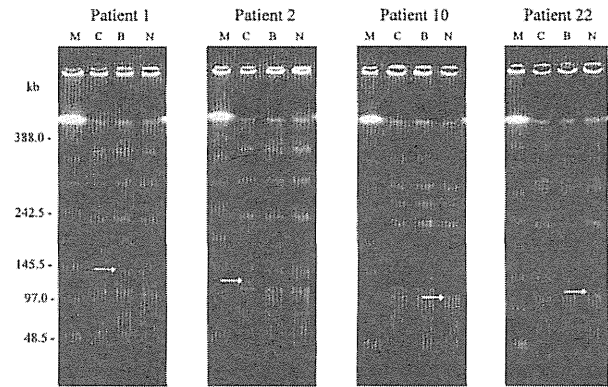


Fig. 3 Discrepancy of RFLP patterns of *ApaI* digested DNA between isolates from cerebrospinal fluid, blood, and nasopharynx of 4 patients. In all patients, a difference in the  $\sim 120$  kb fragment was observed in 1 of 3 strains (arrow). Patient 1, the isolate from the blood showed a single-band shift of approximately  $+20$  kb; patient 2, the strain from the cerebrospinal fluid showed a shift of approximately  $-20$  kb; patients 10 and 22, strains from the nasopharynx showed a shift of approximately  $-20$  kb shift. Lanes: C, isolate from cerebrospinal fluid; B, from blood; N, from nasopharynx; M, lambda ladder molecular size marker.

in molecular weight of about 20 kb for 1 band in the electrophoresis pattern (Fig. 1-b). Figure 2 shows the electrophoresis results of bacterial strains from the 4 patients whose RFLP patterns after *SmaI* digested PFGE showed differences. In all 4 patients, the band with the different electrophoretic mobility had a molecular weight of about 485 kb. For patient 1, this band showed a shift of  $+20$  kb in the strain isolated from the blood sample compared to those from the 2 other specimens. For patient 2, the band showed a shift of  $-20$  kb in the cerebrospinal fluid isolates, and for patients 10 and 22, a shift of  $-20$  kb was found in the nasopharyngeal isolates. The electrophoretic patterns of the strains isolated from those 4 patients were also compared after *ApaI* digestion (Fig. 3). Differences were found in a band of about 120 kb. As with *SmaI* digestion, the band showed a shift in molecular weight of  $+20$  kb in blood isolates from patient 1, a shift of  $-20$  kb in the cerebrospinal fluid isolate from patient 2, and a shift of  $-20$  kb in the nasopharyngeal isolate from patients 10 and 22.

#### IV. Discussion

In this study, isolates from cerebrospinal fluid, blood, and nasopharynx showed identical RFLP patterns in 18 of the 22 patients with Hib meningitis. For the remaining 4 patients, one of the bands had a slight difference in only 1 of the 3 sample types. The strains isolated from the 3 types of samples collected from the 18 patients that showed identical RFLP patterns were classified as "indistinguishable," and those from the 4 patients that showed a single band shift in the RFLP patterns were classified as "closely related" interpreted using the criteria proposed by Tenover *et al*[4] (Table 1). As such, in patients whose RFLP patterns showed differences, the strains from the 3 different specimen types were also considered identical in nature. These findings demonstrate a pathway whereby bacterial strains carried in the nasopharynx led to the development of meningitis through bacteremia.

In all 4 patients, the size difference between the bands was about 20 kb. The expression level of the capsule (*cap*), which is the main virulence factor in

capsulated *H. influenzae* strains, is regulated by the cap gene, which has a molecular weight of about 18 kb. Although Hib normally has 2 copies of the cap, this number of copies can change easily[5]. The difference in molecular weight was equivalent to the molecular weight of a single copy of the cap, suggesting that an amplification or deletion of the cap gene might have occurred between the isolates from the 3 types of samples. Similar findings have previously been reported about *H. influenzae* type a meningitis[6]. In that report, the RFLP pattern by PFGE revealed a band with a shift of 35 kb, that corresponded 2 copies of caps, between isolates from cerebrospinal fluid and blood. The quantitative real-time PCR analysis revealed that isolate from blood lost 2 copies of caps[6].

In 3 of the 4 patients (patients 1, 10, and 22), a band of approximately 485 kb in *SmaI* digested RFLP pattern of blood isolates showed a shift of about +20 kb compared to that in nasopharyngeal isolates. A similar shift was also found in a band of approximately 120 kb in *ApaI* digested RFLP pattern. Thus, it is likely that a single copy of the cap had been added. Hib has been reported to increase its resistance to complement-mediated opsonization by increasing the number of copies of the cap[7]; likewise, our findings suggest that the number of copies of the cap in Hib might have increased upon invading the bloodstream in 3 patients. In addition, for 2 patients (patients 1 and 2), a band of ~485 kb in *SmaI* digested RFLP pattern of the cerebrospinal fluid isolates and a band of ~120 kb in *ApaI* digested RFLP pattern showed a shift of about -20 kb compared to that of blood isolates, suggesting a loss of one copy of the cap. In a previous study conducted on patients with vaccine failure, the number of copies of the cap was lower in isolates from patients with meningitis than in those with other systemic infections[8]. This may be because the thickness of the capsule impairs the expression of surface factors binding to cerebrovascular endothelial cells[8]. Accordingly, in the case of these 2 patients, the loss of the cap occurred when the Hib reached the subarachnoid space after having passed from the blood into the brain.

In this study, the number of copies was not

confirmed by Southern blot[5] or quantitative real-time PCR[6]. However, the differences in RFLP patterns suggested that during the development of meningitis, Hib changed the number of copies of the cap to evade the host's immunological response. There was no difference of clinical features between the patients in whom the RFLP patterns from 3 types of samples showed identical and those in whom the RFLP patterns were not same. However, changes in the number of copies of the cap have suggested to be associated with vaccine failure. According to previous reports, the incidence of strains with 3 or more copies of the cap is significantly higher in patients with vaccine failure, and the odds ratio of invasive Hib disease increases with the number of copies[8]. Although it has only been a short time since the Hib vaccine was introduced in Japan, Hib strains with more than 3 copies of the cap had been found in 16.7% of isolates from patients with meningitis even before the introduction of the vaccine[9]. The occurrence of vaccine failure will require attention in the future.

#### Acknowledgements

This manuscript has not been submitted or accepted for publication elsewhere.

#### References

- 1) Feigin RD, Cutrer WB. Bacterial meningitis beyond the neonate period. In: Feigin RD, Cherry JD, Demmler-Harrison GJ and Kaplan SL eds, Textbook of Pediatric Infectious Disease 6th ed, Philadelphia: W. B. Saunders, 2009: 439-71.
- 2) Saito M, Umeda A and Yoshida S. Subtyping of *Haemophilus influenzae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 1999; 37: 2142-7.
- 3) Mitsuda T, Kuroki H, Ishikawa N, Imagawa T, Ito S, Miyamae T, Mori M, Uehara S and Yokota S. Molecular epidemiological study of *Haemophilus influenzae* serotype b strains obtained from children with meningitis in Japan. J Clin Microbiol 1999; 37: 2548-52.
- 4) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995; 33: 2233-9.
- 5) Corn PG, Anders J, Takal AK, Kärhty H and Hoiseth SK.

- Genes involved in *Haemophilus influenzae* type b capsule expression are frequently amplified. J Infect Dis 1993; 167: 346-64.
- 6) Ohkusu K, Nash KA, and Inderlied CB. Molecular characterization of *Haemophilus influenzae* type a and untypeable strains isolated simultaneously from cerebrospinal fluid and blood: novel use of quantitative real-time PCR based on the *cap* copy number to determine virulence. Clin Microbol Infect 2005; 11: 637-43.
  - 7) Noel GJ, Brittingham A, Granato AA and Mosser DM. Effect of amplification of the Cap b locus on complement-mediated bacteriolysis and opsonization of type b *Haemophilus influenzae*. Infect Immun 1996; 64: 4769-75.
  - 8) Cerquetti M, Cardines R, Ciofi Degli Atti ML, Giufré M, Bella A, Sofia T, Mastrantonio P and Slack M. Presence of multiple copies of the capsulation b in invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) strains isolated from children with Hib conjugate vaccine failure. J Infect Dis 2005; 192: 819-23.
  - 9) Ueno K, Nishi J, Imuta N, Tokuda K and Kawano Y. Presence of multiple copies of capsulation loci in invasive *Haemophilus influenzae* type b (Hib) strains in Japan before introduction of the Hib conjugate vaccine. Microbiol Immunol 2010; 54: 160-3.
-



## 原著

# 同一血清型の肺炎球菌性髄膜炎を反復した 1 例

福岡 将治<sup>1)</sup> 星野 直<sup>1)</sup> 深沢 千絵<sup>1)</sup>  
 蓮見 純平<sup>1)</sup> 永井 文栄<sup>2)</sup> 阿部 克昭<sup>2)</sup>  
 本田 喜子<sup>3)</sup> 田中 純子<sup>3)</sup> 菱木 はるか<sup>3)</sup>  
 石和田 稔彦<sup>3)</sup> 河野 陽一<sup>3)</sup>

**要旨** 生後 11 カ月時と 1 歳 2 カ月時に血清型 6B の肺炎球菌性髄膜炎を反復した女児。分離菌の multilocus sequence typing 解析より、同一株による再発と判明した。初発、再発後に 7 価肺炎球菌結合型ワクチンを接種したが、6B に対する抗体価が上昇しなかった。一部の血清型の肺炎球菌上咽頭常在例や、侵襲性肺炎球菌感染症罹患後には、ワクチン接種後の抗体価上昇が不良な場合があるとされており、注意を要する。このような例を防ぐためにも、早急な PCV7 の定期接種化が望まれる。

## はじめに

細菌性髄膜炎の再発はまれで約 5~6%とされ、小児に関しては 1%程度と報告される<sup>1)</sup>。今回われわれは、血清型 6B 同一株による肺炎球菌性髄膜炎反復例を経験した。経過中に 7 価肺炎球菌結合型ワクチン (7-valent pneumococcal conjugate vaccine: PCV7) の接種を行うとともに、PCV7 含有血清型別特異抗体価を測定したので、その結果と併せ報告する。

## I. 症 例

**症例:** 当院初診時 1 歳 2 カ月の女児。

**家族歴, 既往歴:** 特記すべきことなし。

**現病歴:** 生後 11 カ月時発症の肺炎球菌性髄膜炎に対し、panipenem/betamipron (PAPM/BP),

ampicillin (ABPC) による治療を 12 日間行い、後遺症なく治癒し、退院 1 週間後に PCV7 初回接種を行った。退院から 6 週間後 (PCV7 接種から 5 週間後) に 40°C 台の発熱を認め、近医で clarithromycin の処方を受けた。第 2 病日に全身性強直性けいれんを発症し、前医へ緊急入院となった。入院時、髄膜刺激徴候はみられなかったが、血液検査で WBC 21,100/ $\mu$ l, CRP 15.2 mg/dl と炎症反応は上昇していた。また、髄液検査で細胞数 76/3, 蛋白 25 mg/dl, 糖 70 mg/dl と細胞数が軽度増加しており、塗抹検査でグラム陽性球菌を認め、ラテックス凝集法による肺炎球菌抗原が陽性であった。以上より肺炎球菌性髄膜炎と診断され、PAPM/BP 160 mg/kg/day, cefotaxime 300 mg/kg/day, dexamethasone 0.15 mg/kg $\times$ 4/day が開始となった。入院時の頭部 CT 検査で右前頭部に硬膜下血

**Key words:** 肺炎球菌性髄膜炎, 7 価肺炎球菌結合型ワクチン, 血清型特異抗体価

- 1) 千葉県こども病院感染症科  
〔〒266-0007 千葉市緑区辺田町 579-1〕
- 2) 千葉市立海浜病院小児科
- 3) 千葉大学大学院医学研究院小児病態学

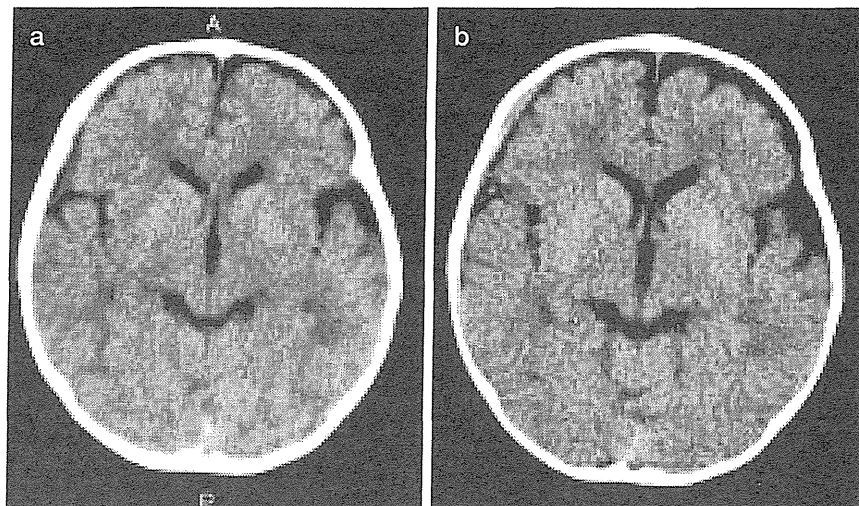


図 1 頭部 CT

a : 第 2 病日

b : 第 5 病日

右前頭部に少量の硬膜下血腫を認めた。

腫が認められ (図 1 a), 脳外科的処置の可否の判断のために第 3 病日に当院へ転院となった。

**転院時現症:** 体温 37.0°C, 血圧 90/45 mmHg, 心拍数 120/min, 呼吸数 30/min, 咽頭発赤なし。意識は清明で, 髄膜刺激徴候はみられなかったが, 膝蓋腱反射は両側で軽度亢進していた。鼓膜所見は正常であった。

**転院時検査所見:** 血液検査で WBC 16,600/ $\mu$ l (Stab 1.0%, Seg 82.0%), CRP 19.5 mg/dl と炎症反応は高値であったが, 電解質, 生化学所見に異常はみられなかった。

**転院後経過:** 前医で施行された血液, 髄液培養で肺炎球菌が分離されたため, PAPM/BP 160 mg/kg/day 単剤とし治療を継続した。抗菌薬感受性検査の結果, 原因菌は penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* (PSSP) と判明し, 第 5 病日に抗菌薬を ABPC 300 mg/kg/day に変更した。また, 同日施行した髄液検査で細菌は検出されなかった。転院後は発熱を認めず, 血清 CRP 値も順調に低下し, 第 17 病日に 0.73 mg/dl となり抗菌薬を中止した。また, 第 5 病日に頭部 CT 検査を行ったが, 右前頭部の硬膜下血腫は増大しておらず (図 1 b), 第 12 病日の頭部 MRI 検査で血腫は消失していたため, 脳外科的処置は要さなかった。第 25 病日に合併症なく退院となり, 第 29 病日に PCV7 追加接種を行った。

**各種検査:** 国立感染症研究所に依頼し, 初発時の髄液, 血液, 再発時の髄液, 血液, 喀痰より分離された肺炎球菌に対し, 微量液体希釈法による

抗菌薬感受性試験, 膨潤法による莢膜血清型判定試験, multilocus sequence typing (MLST) 法による遺伝子解析<sup>2)</sup>を行った結果, 分離された菌すべてが血清型 6B の PSSP で, シークエンスタイプも同一であることが判明した (表 1)。

肺炎球菌性髄膜炎を反復した原因については, 免疫不全症や解剖学的異常を考慮し, 精査を行った。免疫グロブリン, IgG サブクラス分画, 血清補体価, 好中球殺菌能, 貪食能はいずれも正常であった (表 2)。また, 肺炎球菌, 黄色ブドウ球菌などの細菌感染症を繰り返す免疫不全症として知られている interleukin-1 receptor associated kinase 4 (IRAK4) 欠損症<sup>3)</sup>の検索を九州大学で行ったが, 否定的であった。解剖学的異常に関しては, 頭部 CT, MRI 検査を施行したが, 骨折や頭蓋骨の奇形, Mondini 奇形などの内耳異常はみられなかった<sup>4)</sup>。

さらに, 大阪大学に依頼し, 再発 60 日前 (初発時), 49 日前 (初回治癒後), 第 1 病日, 第 18 病日, 第 39 病日の患児の凍結保存血清を用いて, PCV7 含有血清型別特異 IgG 抗体価を測定した。なお, PCV7 は再発から 39 日前に初回接種を, 第 24 病日に 2 回目接種を行った。PCV7 初回接種後に 6B 以外の血清型に対する抗体価は明らかに上昇したが, 6B に対する抗体価のみほとんど上昇を認めなかった (図 2)。

## II. 考 察

髄膜炎再発の厳密な定義はないが, 一般的には

表 1 分離された肺炎球菌の抗菌薬感受性試験，莢膜血清型判定試験，multilocus sequence typing 法による遺伝子シーケンスタイプング (ST)

		MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				血清型	ST
		PCG	ABPC	CTX	PAPM/BP		
初発時	髄液	0.03	<0.03	0.25	<0.008	6B	2983
	血液	0.06	<0.03	0.5	<0.008	6B	2983
再発時	髄液	0.03	<0.03	0.25	<0.008	6B	2983
	血液	0.06	0.06	0.25	<0.008	6B	2983
	喀痰	0.06	0.06	0.25	<0.008	6B	2983

分離された菌すべての ST は 2983 (*aroE* 5, *gdh* 6, *gki* 1, *recP* 2, *spi* 6, *xpt* 1, *ddl* 271) で同一であった。

表 2 免疫機能検査所見

IgA	65 mg/dl	IgG1	381 mg/dl
IgM	87 mg/dl	IgG2	124 mg/dl
IgG	711 mg/dl	IgG3	27.2 mg/dl
C3	174.5 mg/dl	IgG4	5.0 mg/dl
C4	54.9 mg/dl	好中球貪食能	73%
CH50	83.6 U/ml	好中球殺菌能	95%

原因菌が異なる場合，もしくは前回感染の治療完了から 3 週間以上経過している場合とされる<sup>1,5)</sup>。本症例では，初回の髄膜炎治療終了から再罹患するまで 6 週間が経過していたが，MLST 解析により同一株による髄膜炎反復と判明したことから，再罹患時に硬膜下血腫を認めたことから，局所の残存菌による再燃も考えられた。しかし，再発 53 日前の頭部 MRI では血腫や水腫は認めておらず，初発時と同様に再罹患時の血液培養からも肺炎球菌が検出されていた。これらを考慮すると，上咽頭に常在する同一菌株による再発であった可能性が高い。Tebruegge らによると，細菌性髄膜炎再発の原因は外傷や手術による頭蓋底の損傷，内耳奇形，骨欠損，髄膜瘤などの解剖学的異常が 59% で最も多く，免疫不全症候群が 36%，中耳炎，副鼻腔炎，骨髄炎などの慢性感染症が 5% であった<sup>6)</sup>。本症例においても，各種免疫不全，解剖学的異常に関する精査を行ったが，検索し得た限り異常は認められなかった。

患児は，6B の肺炎球菌による髄膜炎を反復し，さらに初回発症後と再発後に計 2 回の PCV7 の

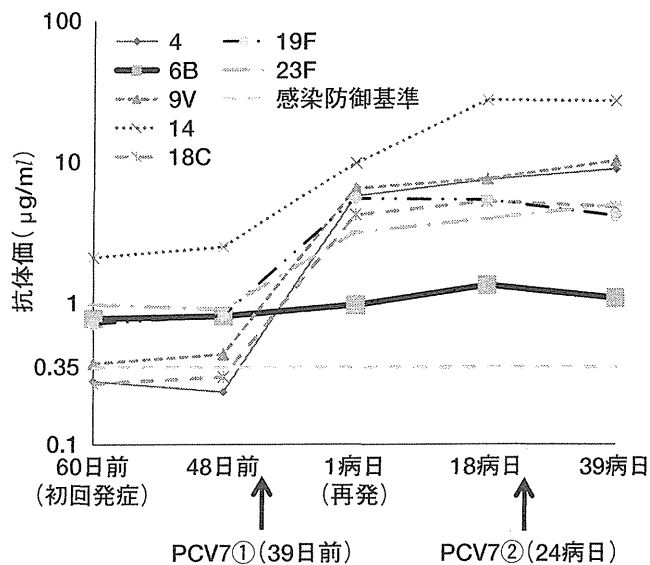


図 2 PCV7 含有血清型別 IgG 抗体価の推移

接種を行っていたが，6B に対する抗体価の上昇は認められなかった。Dagan らは，PCV7 接種以前に 6B, 19F, 23F いずれかの肺炎球菌が上咽頭に常在している場合，PCV7 を 2 回，ないし 3 回接種した後でも，常在する血清型の肺炎球菌に対する抗体価の上昇が得られなかったと報告している<sup>7)</sup>。本症例では，再発時の喀痰から 6B の肺炎球菌が分離されており，血清型を未確認ではあるものの初発時の喀痰からも肺炎球菌が検出されていた。したがって，髄膜炎発症以前から 6B の肺炎球菌が上咽頭に常在していた可能性があり，そのため 6B に対する抗体価だけが上昇しなかったとも推測される。また，侵襲性肺炎球菌感染症 (inva-

sive pneumococcal disease : IPD) 発症後にワクチンによる抗体産生が不応となることが報告されており<sup>8)</sup>, IPD に繰り返し罹患したことにより抗体価の上昇がみられなかった可能性も考えられる.

なお, 本症例では 6B に対する抗体価は 0.35  $\mu\text{g/ml}$  とされる感染予防基準値<sup>9)</sup>を超えていたにもかかわらず, 6B の肺炎球菌による髄膜炎を再発した. この点に関しては, オプソニン活性の測定を検討している. いずれにせよ, 髄膜炎再発の原因に関してはまだ不明な点も残っており, 今後も抗体価の測定や, ワクチンの追加接種を行うなど慎重な経過観察を要する.

PCV7 が IPD の予防に有用であることは明らかであるが, 呈示したような例を防ぐためには, 肺炎球菌に曝露される機会が少ない時期, すなわち, 乳児期早期から PCV7 を接種開始する必要がある. また, PCV7 の接種率が高まれば, IPD が減少するとともに, 集団免疫効果による未接種者への予防効果も期待される<sup>10,11)</sup>. 早急な PCV7 の定期接種化が望まれる.

謝辞 : IRAK4 欠損症の検索を行っていただいた九州大学大学院医学研究院 高田英俊先生, 肺炎球菌血清型およびシークエンスタイピングを施行していただいた国立感染症研究所 和田昭仁先生, 常彬先生, 肺炎球菌血清型別抗体価を測定していただいた大阪大学微生物病研究所 大石和徳先生に深謝いたします.

なお, 本稿の内容は, 第 42 回日本小児感染症学会 (仙台) において発表した.

## 文 献

- 1) Drummond DS, et al : Recurrent meningitis in the pediatric patient—the Otolaryngologist's role. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 48 : 199-208, 1999
- 2) Multi locus sequence typing ; spneumoniae. mlst. net (<http://spneumoniae.mlst.net/>)
- 3) 吉川秀人, 他 : 本邦初の Interleukin-1 receptor associated kinase 4 欠損症兄弟例の臨床的特徴. *日児誌* 111 : 750-754, 2007
- 4) 工藤典代, 他 : 髄膜炎を反復した両側 Mondini 型内耳奇形の一症例. *Otol Jpn* 7 : 207-212, 1997
- 5) Durand ML, et al : Acute bacterial meningitis in adults. *N Engl J Med* 328 : 21-28, 1993
- 6) Tebruegge M, et al : Epidemiology, Etiology, Pathogenesis, and Diagnosis of Recurrent Bacterial Meningitis. *Clin Microbiol Rev* 21 : 519-537, 2008
- 7) Dagan R, et al : Nasopharyngeal Carriage of Streptococcus pneumonia Shortly before Vaccination with a Pneumococcal Conjugate Vaccine Causes Serotype-Specific Hyporesponsiveness in Early Infancy. *J Infect Dis* 201 : 1570-1579, 2010
- 8) Borrow R, et al : Serotype-Specific Immune Unresponsiveness to Pneumococcal Conjugate Vaccine following Invasive Pneumococcal Disease. *Infect Immun* 76 : 5305-5309, 2008
- 9) Jodar L, et al : Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. *Vaccine* 21 : 3265-3272, 2003
- 10) 石和田稔彦 : Hib ワクチンと肺炎球菌結合型ワクチン—期待される効果と今後の課題. *小児科臨床* 60 : 1795-1800, 2007
- 11) Poehling KA, et al : Invasive pneumococcal disease among infants before and after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *JAMA* 295 : 1668-1674, 2006

- 1) Drummond DS, et al : Recurrent meningitis in the