

表2、侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症（肺炎症例）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 開始後)
期間	2007.6~ 2008.11	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2013.3
肺炎(髄膜炎を伴 わない、血液から の菌分離を伴う) 症例数	5	13	14
<i>H. influenzae</i> b型菌検出数	80.0% (4/5)	84.6% (11/13)	71.4% (10/14)
Non-typable <i>H.</i> <i>influenzae</i> 検出数 (血液)	20.0% (1/5)	15.4% (2/13)	28.5% (4/14)

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

番号	発症時齢	入院年月	都道府県	診断名	採取検体	Hibワクチン 接種歴	最終接 種から	感染研 株ID	莢膜 型	β -lactamase 産生性	Ampicillin	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin	Meropenem	Ceftaxime	Ceftriaxone
1	0歳9ヶ月	2009.11月	千葉県	髄膜炎 菌血症	髄液	あり(1回)	不明	Kam197	b	neg	0.75	0.75	0.032	0.25	0.032	0.008
2	2歳3ヶ月	2011.6月	新潟県 佐 渡市	髄膜炎	髄液	あり(1回)	4日	Kam317	b	pos	>256	2	8	0.125	1	0.25
3	0歳10ヶ月	2011.6月	沖縄県	肺炎 菌血症	血液	あり(1回)	5ヶ月	Kam318	b	neg	1	1	0.064	0.38	1	0.19
4	0歳8ヶ月	2011.6月	福岡県	髄膜炎 菌血症	血液	あり(1回)	不明	Kam345	b	neg	1	1	0.047	0.125	0.75	0.25
5	0歳7ヶ月	2012.1月	福岡県	肺炎 菌血症	血液	あり(3回)	3ヶ月	Kam349	nonT	neg	0.25	0.25	0.032	0.125	0.016	0.004
6	1歳8ヶ月	不明	千葉県	肺炎 菌血症	血液	あり(1回)	不明	Kam350	nonT	neg	2	3	0.064	0.38	0.75	0.25
7	0歳7ヶ月	2011.8月	福岡県	菌血症 肺炎	血液	あり(2回)	不明	Iha363	nonT	neg	1	1	0.094	0.125	0.5	0.25
8	4歳4ヶ月	2012.5月	福岡県	菌血症 肺炎	血液	あり(1回)	2年4ヶ月	Iha364	nonT	neg	4	4	0.25	0.25	1	0.38
9	1歳10ヶ月	2012.4月	沖縄県	菌血症	血液	あり(4回)	不明	Iha368	nonT	neg	12	12	0.094	0.125	1.5	0.38
10	1歳3ヶ月	2012.5月	沖縄県	菌血症 中耳炎	血液	あり(1回)	8ヶ月	Iha369	nonT	neg	2	2	0.094	0.25	1	0.38
11	0歳2ヶ月	2012.6月	千葉県	髄膜炎 菌血症	髄液	あり(1回)	1日	Iha385	b	neg	4	4	0.064	0.5	0.75	0.25
			千葉県(同 一患者)	髄膜炎 菌血症	血液	あり(1回)		Iha386	b	neg	3	3	0.047	0.38	0.75	0.25
12	1歳1ヶ月	2012.8月	千葉県	髄膜炎 菌血症	咽頭ぬぐい	あり(3回)	9ヶ月	Iha389	nonT	neg	1.5	1.5	0.032	0.38	0.016	0.008
			千葉県(同 一患者)	髄膜炎 菌血症	血液	あり(3回)		Iha390	b	neg	8	8	0.064	0.38	1	0.38
			千葉県(同 一患者)	髄膜炎 菌血症	髄液	あり(3回)		Iha391	b	neg	8	8	0.064	0.38	1	0.38
13	1歳8ヶ月	2013.1月	沖縄県	肺炎 菌血症	血液	あり(1回)	不明	Iha393	b	neg	1	1	0.047	0.19	0.064	0.023
14	1歳3ヶ月	2012.11月	沖縄県	菌血症	血液	あり(3回)	9ヶ月	Iha396	b	neg	2	2	0.125	0.38	0.25	0.125
15	1歳4ヶ月	2013.2月	岡山県	髄膜炎	髄液	あり(3回)	9ヶ月	Iha397	nonT	neg	3	3	0.125	0.25	1	0.38

表4、侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症の臨床分離株におけるβ-lactamase 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 (補助金開始後)
期間	2007.6~ 2008.11	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2013.3
Positive (%)	18.1 (13/72)	10.1 (16/158)	10.5 (11/105)
Negative (%)	81.9 (59/72)	89.9 (142/158)	89.5 (94/105)

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(補助金開始後)
薬剤	2007.6~ 2008.	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2013.3
Ampicillin	56.9 (41/72)	50.0 (79/158)	49.5 (52/105)
Ampicillin/ Sulbactam	56.9 (41/72)	48.0 (76/158)	48.6 (51/105)
Piperacilin	CLSI基準値情報なし		
Meropenem	100.0 (72/72)	94.3 (149/158)	95.2 (100/105)
Cefotaxim	100.0 (72/72)	99.3 (157/158)	99.0 (104/105)
Ceftriaxone	100.0 (72/72)	100.0 (158/158)	100.0 (105/105)

注) * 微量液体希釈法による値を参考値とした場合

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~ 2013.3
Sensitive株 (%)	56.9	49.4	49.5
Intermediate株 (%)	23.6	34.2	25.7
Resistance株 (%)	19.4	16.5	24.8
Resistance株中のβ-lactamase非産生株 (%)	7.1	38.5	26.7

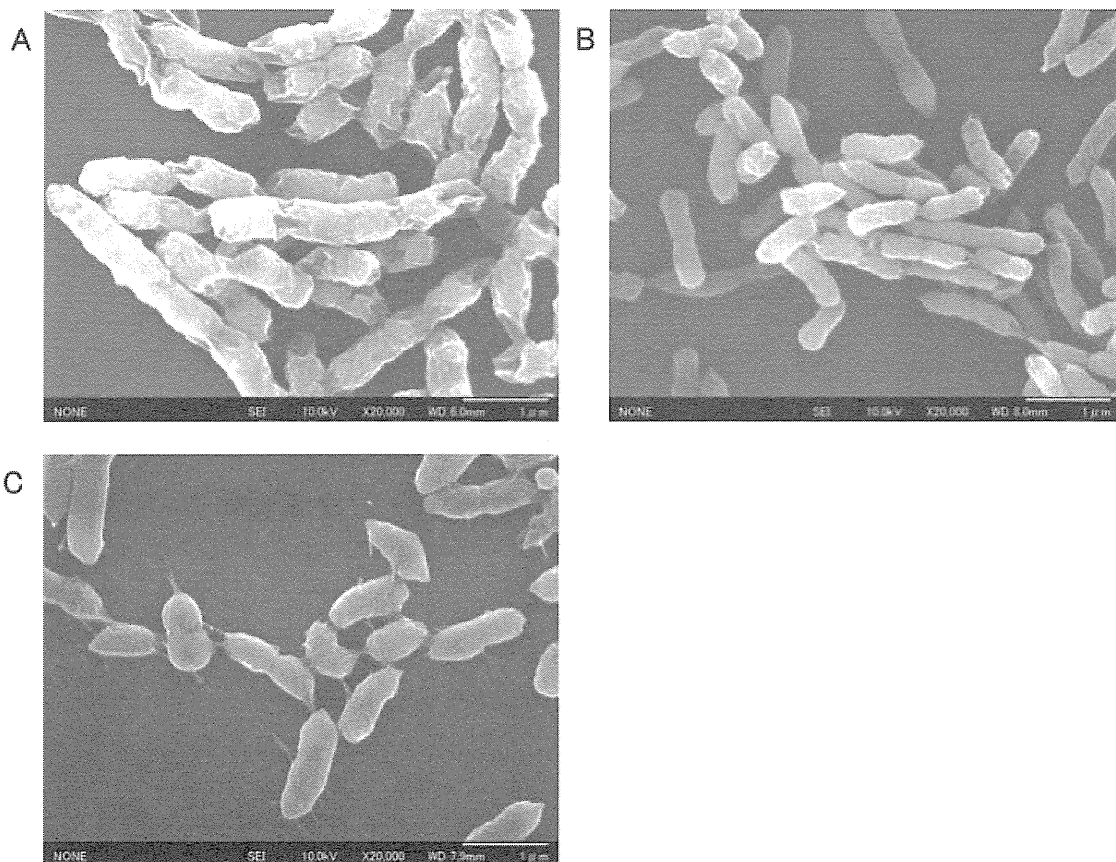
6-2 Ampicillin/Sulbactam

Ampicillin/ Sulbactam	2007.6 ~ 2008.11	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2013.3
Sensitive株 (%)	56.9	47.5	48.6
Resistance株 (%)	43.1	52.5	51.4
Resistance株中のβ-lactamase非産生株 (%)	41.9	18.1	31.4

sulbactam: β-lactamase inhibitor

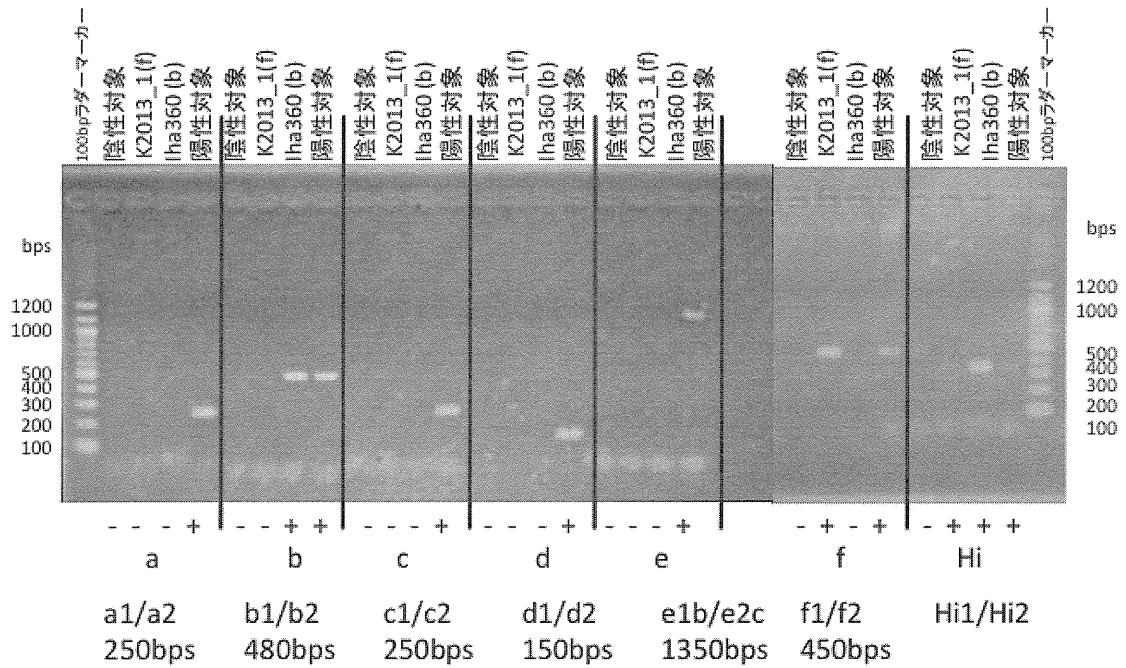
注) * 微量液体希釈法による値を参考値とした場合

図 1、走査電子顕微鏡 (SEM) での観察像



- 1-A. *Haemophilus influenzae* 莢膜型 b (髄膜炎患者、髄液由来株 Kam/Iha344)
- 1-B. Non-typable *Haemophilus influenzae* (髄膜炎患者、髄液由来株 Kam/Iha347)
- 1-C. Non-typable *Haemophilus influenzae* (肺炎患者、血液由来株 Kam/Iha349)

図2、*Haemophilus influenzae* 莢膜型 b 型ならびに f 型菌における莢膜型特異的遺伝子の増幅例



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 (平成 22-24 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)

中野貴司 (川崎医科大学医学部小児科)

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)、フランシス・エコウ・デニス (東京医科歯科大学)、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)

研究要旨：三重県、岡山県、千葉県内の 6 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、2007-2009 シーズン (160 例) では、G1P[8] が 14.4%、G2P[4] が 2.5%、G3P[8] が 73.1%、G9P[8] が 10.0% と、G3P[8] が圧倒的に多数を占めた。2010-2011 シーズン (256 例) では、G1P[8] が 32.4%、G2P[4] が 3.1%、G3P[8] が 62.9%、G9P[8] が 1.2% であった。さらに、2011-2012 シーズン (171 例) では、G1 が 59.6%、G2 が 0.6%、G3 が 20.5%、G9 が 8.2% であった。こうして、2010-2011 シーズンまで G3P[8] がもっとも高頻度であったが、2011-2012 シーズンには G1P[8] がもっとも多く検出され、タイプの分布の顕著な変遷が観察された。また、稀にしか検出されない、G3P[6] G2P[8]、G3P[4] や G1P[4] の検出が見られた。G3 および G9 の一部の株については、VP7 遺伝子および VP4 遺伝子の解析を行い、近年世界各地で検出された G3 および G9 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。

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 40~60 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、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 ヶ国以上で認可され、約 30 ヶ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 2011 年 11 月から投与が開始され、RotaTeq では 2012 年 7 月から投与が開始されている。まだ投与率は低く、ワクチンによる影響は少ないが、今後、投与率の拡大とともに、ワクチン投与による野生株の分布に与える影響が少なからず生ずると思われる。

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 27 種以上、VP4 が規定する P タイプは 35 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。G タイプおよび P タイプの分布は地域により、年によりかなり異なり、また複数の G タイプおよび P タイプが同時に分布する。そこで、ワクチンの導入にあたっては、G タイプおよび P タイプの分布は重要な基礎的データとなる。本研究では、三重県を主として、岡山県、千葉県を加え、外来、入院例の双方について、G タイプおよび P タイプの分布を調査した。

B. 研究方法

(1) 三重県内の 3 都市（津、松阪、伊勢）での病院（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；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。ロタウイルス感染症の流行時機を考慮し、1 シーズンは 10 月 1 日より次年の 9 月 30 日までとした。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 タイプを決定した。一部のサンプルについては、1st PCR により得られた PCR 産物を精製し、VP7 遺伝子あるいは VP4 遺伝子の塩基配列を決定した。

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の前後において、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おいて排泄されたワクチン株による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。

また、G タイプおよび P タイプを規定する 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. 研究結果と考察

三重県、岡山県、千葉県内の 6 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 587 例（2007-2009 シーズン：160 例；2010-2011 シーズン：256 例；2011-2012 シーズン：171 例）について、RT-PCR により G タイプ、P タイプを決定した。

2007-2009 シーズンでは、G1P[8]が 14.4%、G2P[4]が 2.5%、G3P[8]が 73.1%、G9P[8]が 10.0%と、G3P[8]が圧倒的に多数を占めた。2010-2011 シーズンでは、G1P[8]が 32.4%、G2P[4]が 3.1%、G3P[8]が 62.9%、G9P[8]が 1.2%であった。さらに、2011-2012 シーズンでは、G1 が 59.6%、G2 が 0.6%、G3 が 20.5%、G9 が 8.2%であった。こうして、2010-2011 シーズンまで G3P[8]がもっとも高頻度であ

ったが、2011-2012 シーズンには G1P[8]がもっとも多く検出され、タイプの分布の顕著な変遷が観察された。

地域別では、2010-2011 シーズンにおいて、千葉県では、G1P[8]が 71.1%、G3P[8]が 26.3%、岡山県では G1P[8]が 0%、G3P[8]が 94.4%であるなど、地域差がみられた。

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える。

2010-2011 シーズン、2011-2012 シーズンにおいては、わが国ではきわめてまれにしか検出されない、G3P[6]および G2P[8]や G3P[4] および G1P[4]がそれぞれ検出されたことは興味深い。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、塩基配列決定による解析を進めたい。

2010-2011 シーズンのサンプルについては、多く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。

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。

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。

E. 今後の計画

三重県、岡山県、千葉県における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 5 年）推し進める必要がある。タイピングに加えて、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き、自然に存在するロタウイルス株遺伝子の変遷を究める。また、投与されたロタウイルスワクチンとともに生ウイルスであるので、被投与者の便中に排泄されることになり、それが投与を受けていないヒトに感染することが起きようなる。野生株とのリアソートメントなどのサーベイも行う必要がある。さらに、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ことも課題としたい。

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

1. 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
2. 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
3. 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
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
 5. Kawamura Yoshiki, Sugata Ken, Nakai Hidetaka, Asano Yoshizo, Ohashi Masahiro, Kato Tomochika, Nishimura Naoko, Ozaki Takao, Yui Akiko, Taniguchi Koki, Yoshikawa Tetsushi:
Correlation between serum matrix metalloproteinase and antigenemia levels in patients infected with rotavirus. J Med Virol 84:986-991, 2012
 6. Ghosh S, Shintani T, Urushibara N, Taniguchi K, Kobayashi N: Whole

genomic analysis of a human G1P[9] rotavirus strain reveals intergenomic reassortment events. J Gen Virol 98:1700-1705, 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。また、GタイプおよびPタイプの決定に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元研究補助員に深謝申し上げます。

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 (平成 22-24 年度)

ロタウイルスワクチン導入の意義に関する研究
～ロタウイルス胃腸炎による入院および外来患者の疫学調査

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)

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

わが国では近年 2 種類のロタウイルスワクチンが使用可能となり、接種の普及とともに流行疫学が変化する可能性がある。また、今後の定期接種化も念頭に置いて、ワクチンによる効果を評価するために、現状でサーベイランス情報を解析しておくことは不可欠である。本分担研究では、わが国の小児におけるロタウイルス胃腸炎の実態と疾病負担を明らかにし、流行ウイルス型に関する情報も収集した。2 年間の前向き観察研究による入院サーベイランスの結果では、子どもたちは 5 歳になるまでに 38 人から 111 人に 1 人がロタウイルス胃腸炎による入院を経験していた。入院患者の年齢は、生後 6 か月以上 2 歳未満が最も目立った。外来サーベイランスでは、受診率は 1,000 人年あたり 306.3 人で 1 歳児の受診が最も多く、5 歳未満の受診率は 134.8/1,000 人年であった。調査期間中の流行ウイルス型の種類は、入院例、外来例ともに G3P[8]の頻度が最も高く、G1P[8]がそれに次ぎ、その他 G9P[8]、G2P[4]などが分離された。そして、地域や流行年による差異があることが示唆された。入院・外来サーベイランス調査の結果、ロタウイルス胃腸炎は小児にとって大きな疾病負担であり、わが国でもワクチンの普及による予防の必要性が示された。また、今後も継続して研究を実施することにより、予防接種普及による効果を評価することが可能となる。

A. 研究目的

わが国のロタウイルス胃腸炎に関するサーベイランスは、5 類感染症定点把握疾患「感染性胃腸炎」の一部として実施されているのみで、国内患者数の実態を把握でき

る情報が不十分である。そして、わが国では近年 2 種類のロタウイルスワクチンが使用可能となり、接種の普及とともに流行疫学が変化する可能性がある。また、わが国でロタウイルスワクチンは任意接種である

が、海外では定期接種としてすべての子どもたちを対象に接種されている国もある。今後の定期接種化も念頭に置いて、ワクチンによる効果を評価するために、現状でサーベイランス情報を解析しておくことは不可欠である。

本分担研究により、わが国の小児におけるロタウイルス胃腸炎の実態と疾病負担が明らかになる。また、流行ウイルスの型に関する情報も収集することができる。これら得られた情報より、予防接種普及による効果を評価することが可能となる。

B. 研究方法

(1) 入院サーベイランス

三重県内3都市（津、松阪、伊勢）で2年間の前向き観察研究を行い、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罹患率を求めた。

(2) 外来サーベイランス

三重県津市の小児科を標榜する医療機関において5歳未満小児の急性下痢症の前向き観察研究を1年間実施した。本研究で定めた定点医療機関での患者報告をもとに、津市内医療機関を受診したロタウイルス胃腸炎の患者数を推計した。

(3) その他の地域でのサーベイランス

千葉県いすみ市で外来サーベイランス、岡山県倉敷市で外来・入院サーベイランスを実施した。

(4) 流行ウイルス型の解析

迅速検査で陽性と判定された検体は、PCR法によりロタウイルスの株型を判定した。PBSで便検体の10%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を抽出した。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。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者が外来受診時、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審議承認された。

C. 研究結果

(1) 入院サーベイランス

2年間の前向き観察研究で224例が登録された。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1,000人当たりの罹患率を求めた（表1）。

累積入院率をみると（図1）、ロタウイルス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た。生後6か月以降に患者数は増加する傾向があった。

(2) 外来サーベイランス

参加医療機関全体から1年間に報告された急性胃腸炎患者の総数は4,630人であった。定点機関からは866例（18.7%）が登録された。定点においてロタウイルス迅速キット検査実施例は183例（21.1%）であった。陽性例は1月から6月にかけて認められた。定点における急性胃腸炎の迅速検査について年齢、受診月別に解析し、その割合を定点で検査を実施しなかった症例、および定点以外の急性胃腸炎報告例に適応した結果を示す（表2）。受診率は1,000人あたり306.3人であった1歳児が最も多く、5歳未満の受診率は134.8/1,000人年であった。

(3) その他の地域でのサーベイランス

千葉県いすみ市の外来サーベイランスでは、ロタウイルス胃腸炎の患者数推計値は、5歳未満児 1,000 人当たり 122.7/1,000 人年であった

(4) 流行ウイルス型の解析

調査各地域を総合すると、入院例、外来例ともに G3P[8]の頻度が最も高く、G1P[8]がそれに次ぎ、その他 G9P[8]、G2P[4]などが分離された。

限られた期間での中間解析結果であるが、岡山県倉敷市では G1P[8]が分離されず、千葉県いすみ市では G1P[8]が最も高頻度という地域差も認められた。現在最終結果を取りまとめ中である。

D. 考察

入院・外来サーベイランス調査の結果、ロタウイルス胃腸炎は小児にとって大きな疾病負担であることが示された。そして、人口 1,000 人当たりの入院率(表 1)は、ロタウイルス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)。これら結果より、わが国でもロタウイルスワクチンの普及による本疾患の予防が必要なことが示された。

月齢による累積入院率(図 1)の結果より、ロタウイルス胃腸炎は乳児早期から患者が認められ、生後 6 か月以降増加し、2歳未満の患者が多数を占めることから、乳児早期からの予防が大切と考えられた。

近年わが国で最も高頻度に流行しているロタウイルスの型は G3P[8]と考えられた。ただし、流行型には地域や流行年による差異があることが示唆された。

E. 結論

本分担研究により、ワクチン普及前のわが国のロタウイルス胃腸炎に関するサーベイランスデータを得ることが出来た。ロタ

ウイルス胃腸炎は、小児にとって大きな疾病負担であり、乳児早期からのワクチンの普及により予防に努めたい。また、流行疫学についてはワクチンの導入により変化することが予想され、株型の解析含めた継続的なサーベイランスが大切である。

F. 研究発表

学会発表、論文発表については、各年度の報告書を参照。

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。

以下図表

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: 4.45 ,6.26)	18.97	6.06 (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

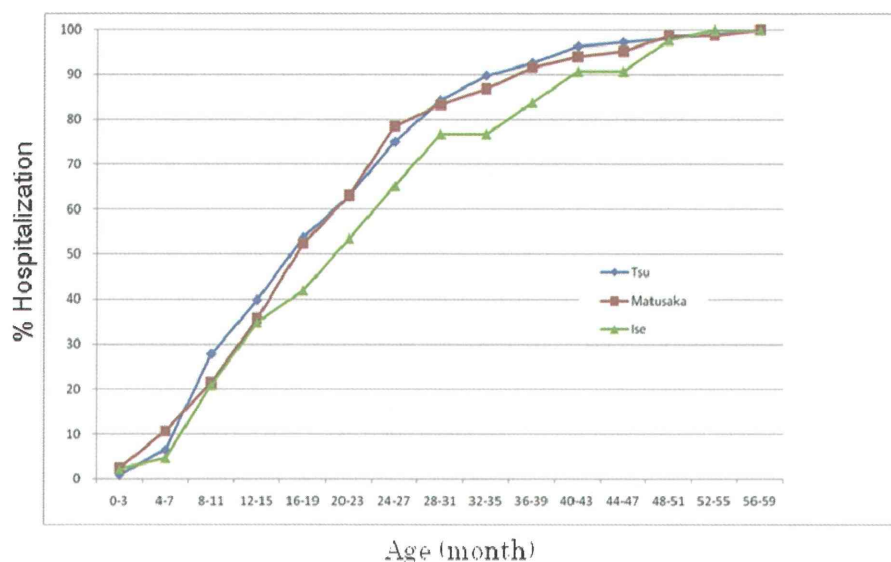


表 2. 年齢群別ロタウイルス感染性胃腸炎の推定受診者数

	人口	調整後患者数	受診率(1000人・年)	95%信頼区間
0-5か月	1127.5	70.0	62.1	(48.8-78.0)
6-11か月	1127.5	141.1	125.2	(106.9-146.5)
1歳	2424.0	742.4	306.3	(313.7-339.7)
2歳	2420.0	364.5	150.6	(136.1-166.2)
3歳	2474.0	225.0	90.9	(79.6-103.4)
4歳	2545.0	90.5	35.6	(29.1-43.0)
合計	12118	1633.5	134.8	(128.3-141.4)

厚生労働科学研究費補助金(平成22-24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、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: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、ヒトパピローマウイルス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いる。ヒトパピローマワクチンのサーバリックスは Monophosphoryl lipid A(MPL)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。ヒトの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が認められる、もしくは何も所見が認められない。アルミアジュバントのみを含んだワクチン(DPT, PCV7, HPV4価)では帯状もしくは結節性瘢痕化を伴う炎症性肉芽腫が認められた。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た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し、かつて大腿四頭筋拘縮に認められた筋細胞の破壊、壊死は認めなかった。DPT をモデルとして初回 3 回接種後 6 ヶ月後に追加接種を行った。皮下接種と筋注を比較しても炎症性肉芽腫、繊維化・瘢痕化は同様に観察され、こうした炎症性肉芽腫は瘢痕化し 6 ヶ月から縮小傾向を認め 1 年で消失するものもみられた。

A. 研究目的

諸外国では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。

昭和30年代後半から大腿四頭筋短縮症、筋拘縮症の報告が増加し、抗生剤と鎮痛解熱剤の混合接種が筋拘縮症の原因である事が明らかとされ、昭和 48 年からの山梨筋短縮症裁判を始めとした医療訴訟が起こり整形外科学会から「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」の要望書が出された。翌年昭和51年に小児科学会筋拘縮症委員会からは以下の提言が出された。

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。

以降、筋注という医療行為は封印され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。筋拘縮症委員会の報告書の中でヒトの筋拘縮症の病理組織所見は動物で再現できる事から筋注製剤は実験動物を用いて検証する事と提言されている。しかし、こうした検討は行われずになし崩し的に筋注が行われている。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。

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 筋肉内接種し 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。DPT0.1ml を初回 3 回接種、6 ヶ月後に追加接種を筋注と皮下接種で行い 3 ヶ月、6 ヶ月、12ヶ月後の接種部位の病理学的検討を行った。

C. 結果

C-1. 現行ワクチンの筋注の組織像

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。アルミアジュバントを含むワクチンと含まないワクチンでは反応性が異なりアルミアジュバントを含有していない日本脳炎、Hib、インフルエンザワクチンではなにも所見を認めないものが多く Hib、インフルエンザを接種した 1 匹に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。物理的な損傷に伴う修復機転を思わせる軽微な所見が観察された。

DPT 接種後では 3 匹中 2 匹に筋束と筋束の間に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炎症性肉芽腫が観察された。

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。

HPV ワクチンは 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の 2 種類のワクチンが市販されている。接種例すべてに結節性病変が認められた。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が認められた。

C-2. 筋注後の組織のアルミ染色

アルミを含有していないワクチン接種後では何も所見がないもしくは軽度の炎症修復像であった。アルミ含有ワクチン接種では炎症性肉芽腫像が認められ、組織のアルミ染色を行い図 2 に結果を示した。PBS、Hib 接種群ではアルミは染色されなかった。DPT、PCV、ガーダシル接種後の炎症性肉芽腫には共通の所見が認められ、結節の中心部に灰白状壊死が認められその周囲はアルミを貪食した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が集簇したマクロファージ結節を形成していた。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。

C-3. 筋注と皮下注後の変化

DPT をモデルとして筋注と皮下接種の長期的な組織変化を比較して図 3 に示した。筋注 3 ヶ月後までは肉芽腫性結節の大きさは変化しないようであるが 6 ヶ月から縮小傾向が認められ 9 ヶ月後までは筋注も皮下接種後でも炎症性肉芽腫の大きさは変化がなかった。6 ヶ月後に追加接種して 3 ヶ月後は同様に大きな結節を認めるようになる。

筋注、皮下接種で初回免疫 3 回接種し 1 年後の HE 染色、アルミ染色の結果を比較して図 4 に示した。筋注群 3 匹中 1 匹に小さな帯状痕を認めアルミが沈着しているが、他の 2 匹では異常所見は認めなかった。一方、皮下接種群 3 匹中 2 匹でアルミが沈着している痕痕性結節を認めた。

C-4. マクロファージの性状

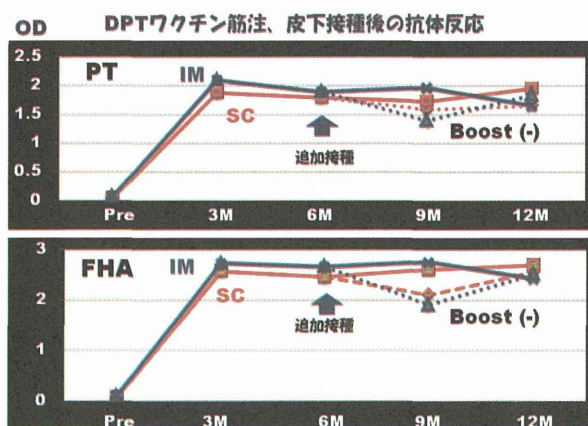
アルミアジュバントを含んだワクチン接種により局

所に炎症性細胞が浸潤してくる事が明らかとなった。アルミ単独のアジュバントを使用している DPT, PCV, ガーダシルは同じ組織所見を示しているが MPL との複合アジュバントを用いているサーバリックスはマクロファージが収束するマクロファージ結節を作り炎症性肉芽腫も 6 ヶ月でも縮小傾向は認めない(図5)。

DPT, ガーダシル、サーバリックスワクチン接種1カ月後の組織を F4/80, iNOS, Arginase I 染色を行い図6に結果を示した。DPT, ガーダシルともに F4/80, iNOS, Arginase I が陽性であるが、サーバリックス接種後の組織は iNOS 陰性で M2 マクロファージが集簇しているものと考えられた。

C-5. 筋注と皮下注の抗体反応

DPT 筋注と皮下接種のマウスの血清の PT, FHA 抗体の推移を図7に示した。



DPT ワクチン 0.1ml を初回免疫 3 回筋注群、皮下接種群にわけ 1 ヶ月ごとに接種し 6 ヶ月後に 0.1ml を追加接種した。3、6、9、12ヶ月でマウス 3 匹から全採血を行いデンカ生研百日咳 PT, FHA 抗体測定キットの二次抗体を抗マウス IgG 抗体に変更し吸光度を測定し 3 匹の平均値を示した。筋注群が経過中若干高い抗体価を示すものの有意差は認めなかった。

筋注と皮下接種のまとめ

- 1) 現在使用されているワクチンは筋注してもかつての筋拘縮症にみられた広範な筋細胞の変性、壊死、繊維性萎縮は認めなかった。
- 2) アルミを含んでいないワクチンは何も反応がないか、物理的は刺激による損傷からの修復過程と

思われる軽度の炎症反応が認められる。

3) アルミアジュバントを含有したワクチンを筋注すると好中球やアルミを貪食したマクロファージが炎症性肉芽腫を形成する。組織所見は筋注も皮下接種も同じ所見で 6 ヶ月から縮小傾向を認め筋注の方が早く吸収される傾向にある。

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。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ではないかとされていた。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、特に当時開発されたクロラムフェニコール・ゾルと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主たる原因となっていた。家兎をもちいた接種実験の病理組織を図 8 に示した。クロラムフェニコール・ゾル 2 回筋注後の組織所見ではゲル状態で薬液が残存し筋細胞の変性が認められる。オキシテトラサイクリン(浸透圧35)を 2 回接種後では広範な筋の変性と癒痕化がみとめられる。AB-PC+MPI-PC 接種後では限局的な筋萎縮像が認められる。

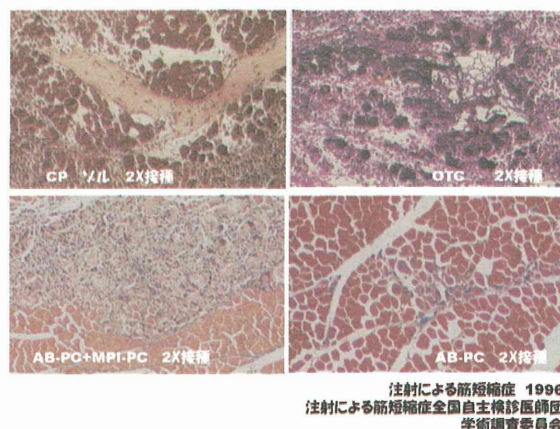


図8. 大腿四頭筋拘縮症の家兎モデル

現行のワクチン製剤は pH, 浸透圧共に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認められていない。

今回の検討の結果ではアルミアジュバントを含有していないワクチンは何も所見がないか、軽微な炎症所見を認めるのみであったがアルミアジュバントを含んだワクチンの筋注では炎症性肉芽腫を形成するが皮下接種でも同じ所見が観察され6ヶ月を過ぎてから縮小傾向が認められ、1年経つ筋注の方が早く吸収される傾向が認められる。

アルミを含んだワクチン接種後ではアルミを貪食した炎症細胞、マクロファージが浸潤し肉芽腫を形成している。異物肉芽腫は皮下接種でも筋注でも同様に形成されておりワクチン接種の安全性に関して差はないように思われる。また、現行のワクチン製剤によって筋拘縮症に見られた筋肉組織の広範な変性壊死は認められないことから筋注という接種行為は皮下接種と同等に評価されるべき考える。また、筋肉内は血流、リンパ液が皮下より多く循環しており好中球、マクロファージ、樹状細胞が集まり免疫応答も迅速に反応し、また吸収も早いものと考えられる。

ワクチンによる免疫応答には自然免疫が大きな役割を担っており、すべての有効なワクチンは自然免疫系に刺激を入れる事によりサイトカインを誘導し獲得免疫を調節している事が明らかとなってきた。ワクチン抗原自体も自然免疫を活性化し、含有するアジュバントも自然免疫、inflammasomeを活性化する。ワクチン接種の最初の部位でこうした反応が起こっていると想定される。産生されるサイトカインは獲得免疫を調節する一方immunotoxicityとして局所の副反応に関与している事が考えられる。3年間の研究でワクチン接種後1ヶ月からの局所の病理学的な研究を主体としてきたが、ワクチン接種後早期に局所で起こる反応、特に自然免疫系の活性化に関する研究は必要になる。

E. 結語

筋注は欧米で通常行われている医療行為であるが、その評価についての基礎的な検討は行われていない。今回の検討で

1) アルミアジュバントを含有していないワクチンの筋注は何も所見がない、もしくは軽微な炎症反応のみで、アルミアジュバントを含有したワクチンの筋注は組織学的には皮下接種と同様に炎症性肉芽

腫を認める。

2) かつての筋拘縮症に見られる広範な筋の変性・壊死・瘢痕化の所見は認められなかった。

F. 2011年度研究業績

1 論文発表

- 1) Okada K, Komiya T, Yamamoto A, Takahashi M, Kamachi K, Nakano T, Nagai T, Okabe N, Kamiya H, Nakayama I. Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers. *Vaccine* 28: 7626-7633, 2010
- 2) Sakata M, Nakayama I. Protease and helicase domains are related to the temperature sensitivity of wild-type rubella viruses. *Vaccine* 29: 1107-1113, 2011
- 3) Sawada A, Komase K, Nakayama I. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. *Vaccine* 29: 1481-1490, 2011
- 4) Ji Yi-Xin, Ihara T, Komase K, Nakayama I. Amino acid substitutions in Matrix, Fusion, and Hemagglutinin proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells. *Intervirology* 54, 217-228, 2011.
- 5) Seki F, Yamada K, Nakatsu Y, Okamura K, Yanagi Y, Nakayama I, Komase K, Takeda M. The SI strain of measles virus derived from a patient 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
- 6) Nakayama I, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine* 30, 3885-3890, 2012
- 7) Nakayama I, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young

children. Vaccine 30, 7662-7666, 2012

8) Matsubara K, Iwata S, Nakayama T.

Antibodies against mumps virus component proteins. J Infect Chemotherapy 18, 466-471, 2012

9) Sawada A, Yamani Y, Nakayama T. Mumps

Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains. J

Infect Chemother DOI

10.1007/s10156-012-0515-3

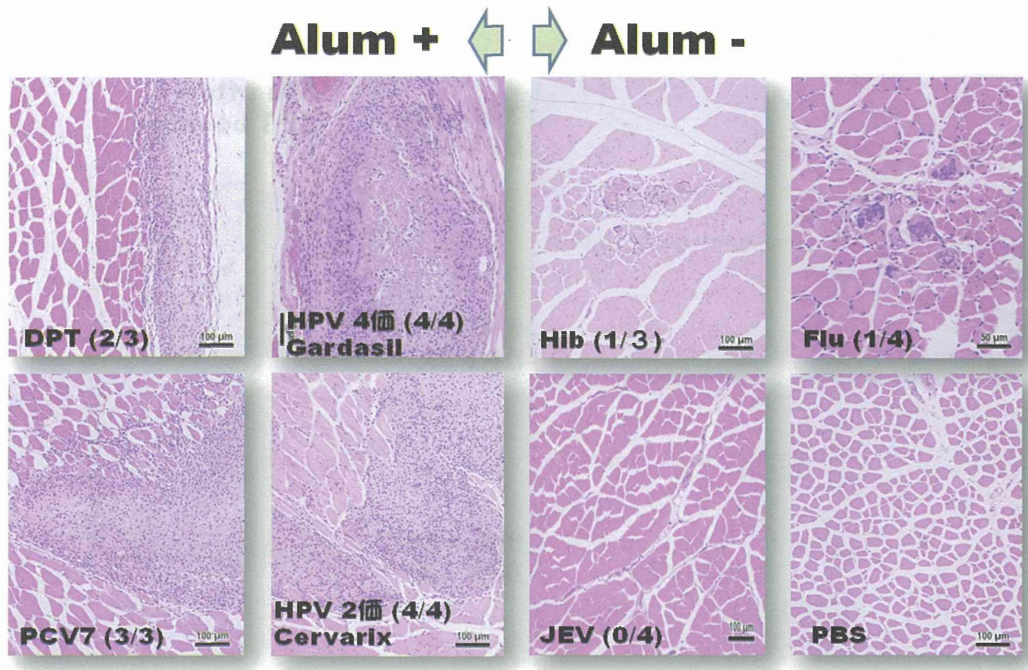


図 1. ワクチン接種 1 か月後の筋注部位の HE 染色

アルミを含んでいない Hib, 日本脳炎(JEV), インフルエンザ(Flu)、アルミ含有の DPT, PCV7, HPV(2 価、4 価)ワクチンを 3-4 匹に接種し 1 ヶ月後の筋肉の組織所見。Hib 接種後 3 匹中 1 匹に Flu 接種後 4 匹中 1 匹に所見を認め DPT, PCV7, HPV は全例に所見を認めた。

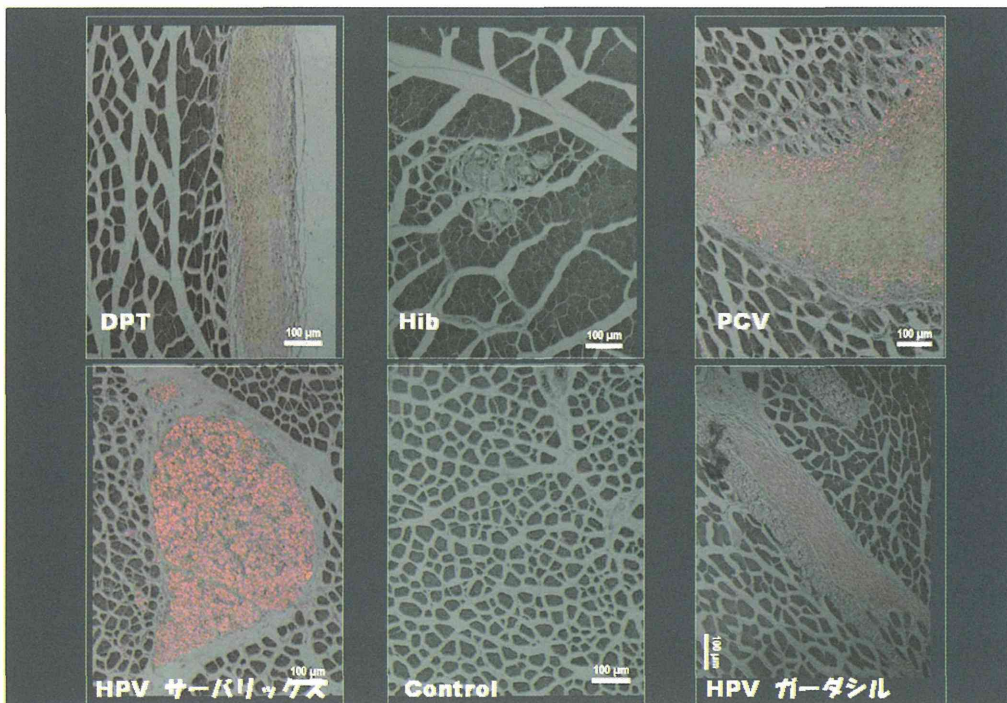


図 2. DPT, Hib, PCV, HPV(2 価、4 価)ワクチン接種後の lumogallin 染色(アルミ染色)

アルミアジュバントを含有していない Hib は染まらないがアルミアジュバントを含んだ DPT, PCV, HPV ワクチンはアルミを貪食した炎症細胞の浸潤が認められる。