

日常的な小児の診療に従事している。対峙する中心となる疾患は必然的に日常的な感染症ということになる。感染症に関するサーベイランス情報はあらゆるソースから入手可能であるが、日常診療にとっては、国全体や都道府県単位のそれよりも、学区や園の単位での動向はより重要であり、実際的である。

そこで、地域という視点、あるいは一般的な市中病院の小児科という視点で、感染症サーベイランスの模索を継続している。単独施設では特に症例数の点で不十分になりがちであるところ、「静岡小児感染症サーベイランス研究会」を立ち上げ、随時研究協力施設を募りながら研究を進めていく体制とした。本研究の対象疾患として、昨年度に引き続いてインフルエンザと細菌性髄膜炎を取り上げた。また、昨年度まで大きな流行があったマイコプラズマ感染症に関して、新しく登場した迅速検査キットに着目して新たな研究を開始した。

インフルエンザは、平成 24 年度に新しい出席停止基準¹⁾が示されて 2 年が経過しようとしている。「発症した後五日を経過し、かつ、解熱した後二日（幼児にあつては、三日）を経過するまで」出席停止とする新しい基準に対して、当初の混乱が少しずつ落ち着いてきつつあるように感じられる。従来は、解熱から 2 日も経過し、元気になりさえすれば、ウイルスは消失し、周囲への感染力もなくなっているだろうと漠然と考えられてきた。しかし、これまでの我々の研究から、元気になったというだけでは鼻汁中からのウイルスの消失を必ずしも意味しないこと、それでも現在の基準に従えばその懸念がだいぶ払拭できそうであることがわかっ

てきた。ただし、ウイルスの型やそのシーズンごとの違いにもよるところがあるようであり、さらに検証を重ねていく必要がある。

インフルエンザウイルスの薬剤感受性については、2011/2012 および 2012/2013 シーズンの流行の主体であった A 型/H3N2 と B 型（Yamagata および Victoria 系統）ウイルスで、NAI に対して概ね良好な感受性が維持されていた。ところが、2013/2014 シーズンに入って A 型/H1N1pdm09 ウイルスの再燃が見られ、かつその耐性株が散見されている²⁾ことから、引き続きこの点でのサーベイランスの継続が不可欠である。我々の研究では、A 型/H3N2 と B 型ウイルスについて、NAI の使用が単純に薬剤感受性の低下をもたらすものではないことがうかがえる。薬剤耐性の獲得のメカニズムにも今後注目していきたいところである。

平成 19 年に Hib ワクチン、平成 21 年に肺炎球菌ワクチンが我が国に導入されて以降、小児における細菌性髄膜炎の発生頻度が大幅に減少しつつあることは各種の調査・研究から明らかである^{3,4)}。日常診療の中でも、細菌性髄膜炎のみならず、肺炎や気管支炎などの下気道炎、それに中耳炎等の減少から、ワクチンの効果を間接的に実感するところである。しかしながらやはり細菌性髄膜炎については、身近な地域での客観的なデータが、より納得でき、かつワクチン接種率の向上に結び付く具体的な道筋となると考えた。静岡県における登録システムで、40 を超える病院小児科のうち、現時点では実質的に約 3 分の 1 程度の施設・専門科からの協力が得られているに過ぎないが、それでもすでに傾向が捉えられつつある。協力施設をさらに増やし、より精度の高いシステムとしていきたいと考える。そ

のことが、一般の保護者にワクチンの有効性を具体的に説明する根拠となるほか、医療関係者自身のワクチンを接種するよりどころとなるはずである。

マイコプラズマもまた、より身近な感染症であるが、これまでは血清学的な診断が中心であったところ、新しく抗原を簡便に捉えられる迅速検査キットが登場した。期待が高まるころではあるが、その精度が問題である。簡便法であるが故に 100%の正確性にはなり得ないものの、果たしてどのくらいの信頼性であるかを把握して診療の参考としていくべきである。共同研究としては開始されたばかりであり、特に陽性例を中心として、引き続き症例を積み重ねていきたい。

E. 結論

身近な地域の状況を把握し、日常診療に直結する感染症サーベイランス、新規導入および定期接種化が期待されるワクチンの効果を実感し、接種率の向上と維持、そして当該疾患の制圧につながるような感染症サーベイランスの体制を、一つの試みとして静岡県において整え、情報発信していけるようにしたいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(論文発表)

1. 田中敏博. 薬剤耐性インフルエンザウイルスの動向:小児内科 45:1978-1982, 2013
2. 中野貴司. 抗インフルエンザ薬. 小児内科 45:1957-1964, 2013
3. 中野貴司. 学校保健安全法. 小児科診療 76:1463-1469, 2013
4. 中野貴司(分担執筆). 全国の入院サーベイランスの現状について. 河合直樹 編

著、よくわかるインフルエンザのすべて. P56-58. 2013年8月20日初版発行. 医薬ジャーナル社、大阪.

5.. 中野貴司(分担執筆). 園学校での注意、特に学校保健安全法等による出席停止期間について. 河合直樹 編著、よくわかるインフルエンザのすべて. P78-86. 2013年8月20日初版発行. 医薬ジャーナル社、大阪.

(学会発表)

1. 田中敏博、中野貴司. 第45回日本小児感染症学会総会・学術集会(2013年10月26~27日). ノイラミニダーゼ阻害薬に対する耐性ウイルスの監視:治療前後の鼻汁検体を用いた3シーズンの継続調査. 2013年10月26日. 札幌.
2. 村上知隆、田中敏博、他. 第132回日本小児科学会静岡地方会(2013年11月3日). 静岡県における細菌性髄膜炎サーベイランスシステムの紹介. 2013年11月3日. 静岡
3. 田中敏博、他. 静岡市静岡小児科医会臨床懇話会(2014年1月30日). マイコプラズマ抗原迅速診断キットの有用性の検討:多施設共同研究の中間報告. 2014年1月30日. 静岡

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

《参考文献》

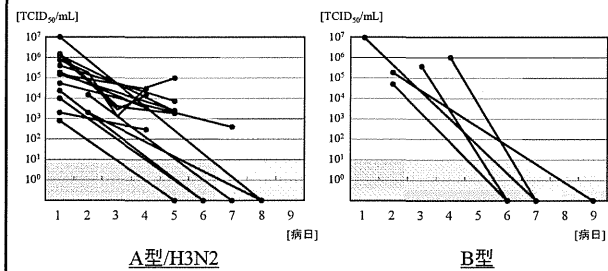
- 1) 学校保健安全法施行規則 [イーガブ Website]. 2012-3-30 掲載. 参照: <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S33/S33F03501000018.html>. 2014-2-9 閲覧.
- 2) Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M: A community

cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013.

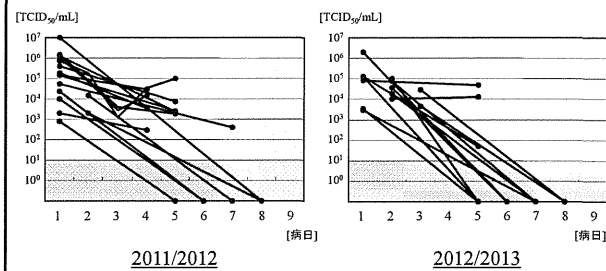
Eurosurveillance, Volume 19, Issue 1, 09 January 2014

- 3) 鹿児島県の小児細菌性髄膜炎(ヒブ肺炎球菌)疫学調査(鹿児島スタディ)
[鹿児島大学微生物学分野 Website]. 掲載日不詳. 参照 :
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~bacterio/nishi/kennkyu/meningitis.htm>. 2014-2-9 閲覧.
- 4) Hib(b型インフルエンザ菌)感染症発生データベース [国立感染症研究所 Website]. 掲載日不詳. 参照 :
http://www.niid.go.jp/niid/images/epi/hib_db/hib_20130331.pdf.
2014-2-9 閲覧.

資料1-1. 2011/2012シーズン
鼻腔吸引液中のウイルス量

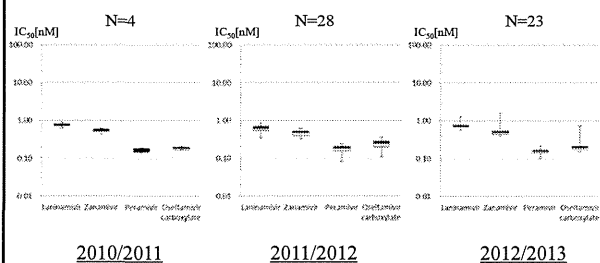


資料1-2. A型/H3N2ウイルス
鼻腔吸引液中のウイルス量



資料1-3. 治療前の鼻腔吸引液中から検出された
ウイルスの薬剤感受性

A型/H3N2ウイルス



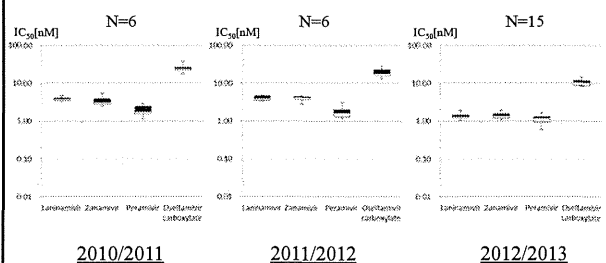
2010/2011

2011/2012

2012/2013

資料1-4. 治療前の鼻腔吸引液中から検出された
ウイルスの薬剤感受性

B型ウイルス



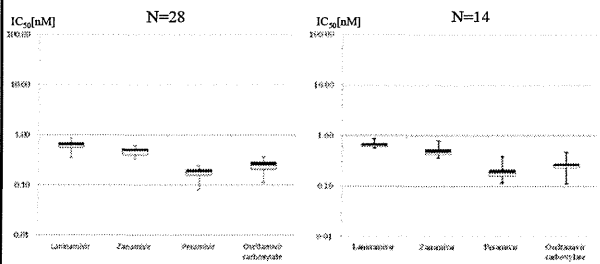
2010/2011

2011/2012

2012/2013

※全例、Victoria系 ※Victoria系とYamagata系が各3例 ※全例、Victoria系

資料1-5. 2011/2012 A型/H3N2ウイルス
治療前後の薬剤感受性の比較

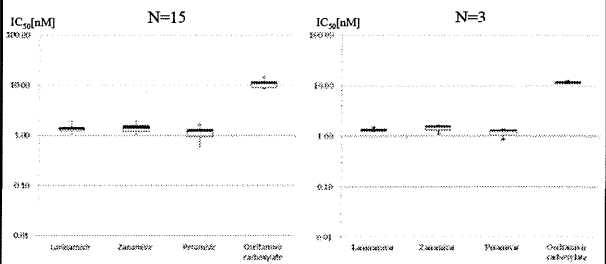


治療前

治療後

※全例、NAIを投与

資料1-6. 2012/2013 B型ウイルス
治療前後の薬剤感受性の比較

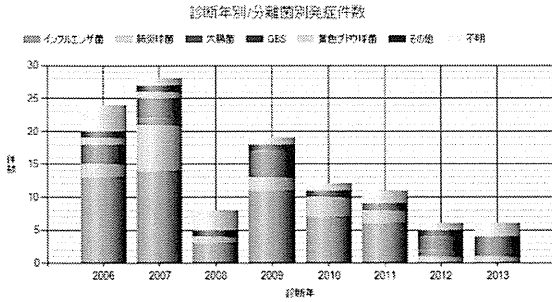


治療前

治療後

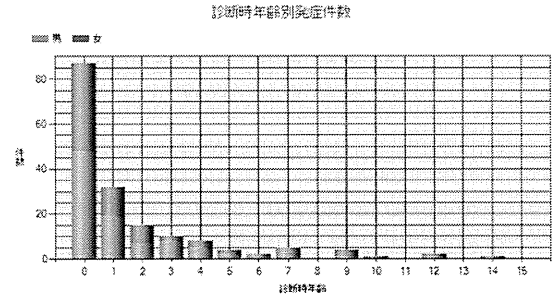
※全例、Laninamivirを投与

資料2-1. 静岡県内における 小児細菌性髄膜炎サーベイランス

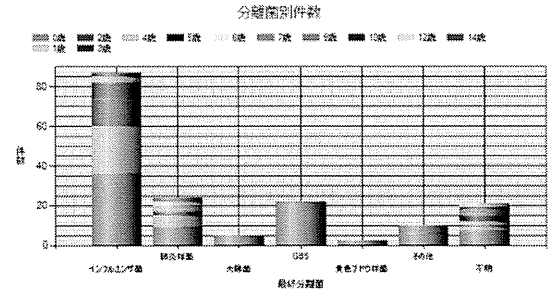


(<https://www.evermedica01.jp/zuimakuen/share/graph.aspx>)

資料2-2. 静岡県内における 小児細菌性髄膜炎サーベイランス



資料2-3. 静岡県内における 小児細菌性髄膜炎サーベイランス



資料3. マイコプラズマ抗原迅速診断キットの 有用性の検討

中間解析 (35症例)

		PCR法			PCR法			PCR法			
		+	-	計	+	-	計	+	-	計	
リポテスト®	+	1	5	6	0	1	1	2	0	2	
	-	1	28	29	2	32	34	0	33	33	
	計	2	33	35	2	33	35	2	33	35	
感度: 1/2 = 50.0%						感度: 0/2 = 0%				感度: 2/2 = 100%	
特異度: 28/33 = 84.8%						特異度: 32/33 = 97.0%				特異度: 33/33 = 100%	

平成 25 年度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）「自然災害時を含めた感染症サーベイランスの強化・向上に関する研究」（研究代表者：松井珠乃）分担研究報告書

「本邦における 2012-2013,2013-14 年シーズンにおける RS ウイルスの分子疫学的動向」

研究分担者 齋藤玲子

新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野

研究協力者：イゾルデ・ダパット、菖蒲川由郷、齋藤孔良、日比野亮信

（新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野）、鈴木宏（新潟青陵大学）、

研究要旨

【背景と目的】

2012-2013 年、2013-14 年の 2 シーズンにかけて、日本各地から採取した臨床検体において RS ウイルス (RSV) における A、B 血清型 (以後 A,B と記載) のセロタイピングおよび A、B それぞれにおけるジェノタイピングを行うことで、本邦の RSV の分子疫学的動向を調査した。全国 15 都府県の小児科医院及び病院小児科の外来または入院患者の臨床検体計 267 件 (2012-13 年シーズン)、および 300 件 (2013-14 年シーズン) の計 567 検体を調査した。昨 2012-13 シーズンのタイプ A,B の割合は、全国平均では A が 85%、B が 15% であり、A が主に流行したが、今 2013-14 年シーズンでは、現時点では A が 47%、B が 53% で A,B の割合がほぼ拮抗している。ジェノタイプに関しては、2 シーズン共に A は全てがジェノタイプ NA1 と ON1、B は全てジェノタイプ BA7,9,10 に属していた。

A. 研究目的

RSV はいわゆる感冒を引き起こす急性呼吸器感染症ウイルスの一つであるが、乳児では細気管支炎、肺炎や無呼吸など重篤な症状を引き起こす重要な病原体である。本邦でも 2003 年より国レベルの RSV サーベイランスが開始され、季節性などの特徴が明らかにされつつあるが、分子疫学的解析は未だ十分に行われていない。我々は、2001 年から新潟市の小児科医の協力により、地域レベルでの RSV の分子疫学的動向の調査を行ってきた。また 2012-13 シーズンから、全国各地の小児科医と協力し、本邦における RSV の流行株に関する分子疫学的動向の調査も継続している。以上の調査により、2012-2013、2013-14 年と 2 シーズンにかけて本邦で流行した RSV の分子疫学的動向に関する調査結果を得たので報告する。

B. 研究方法

2012 年 9 月から 2013 年 1 月 (2012-13 年シーズン) および 2013 年 7 月および現在 (2013-14 年シーズン) にかけて 15 地域 (青森、新潟、千葉、東京、神奈川、静岡、愛知、三重、滋賀、大阪、兵庫、香川、山口、福岡、熊本)、16 医療機関 (小児医院または小児科) で、急性呼吸器症状を呈した小児に対し、十分なインフォームドコンセントを得た上で、主治医が小児の鼻腔ぬぐい、または鼻腔吸引液を採取し、性、年齢、受

診日について記録した。RSV 迅速診断キットによる診断を行った。採取された検体は、新潟大学に輸送後、オリジナル臨床検体及び HEp-2 細胞を用いてウイルス分離された培養検体を用いて A、B 血清型 (以後 A,B と記載) を判定するセロタイピングと、タイプ A、B それぞれにおけるジェノタイピングを行った。タイピングは、RSV の G あるいは F 蛋白遺伝子の A、B 特異的な領域の PCR による増幅により判定した。ジェノタイピングは、G 蛋白遺伝子の第 2 可変領域を PCR により遺伝子増幅後、シーケンスを行い、得られた配列を用いた系統樹解析により判定した。

(倫理面への配慮)

本調査においては、検体採取と患者情報聴取に当たって、各医療機関にて患者及保護者に十分な説明を行い、調査については新潟大学医学部倫理委員会にて承認を受けた。

C. 研究結果

RSV 検体の収集状況

2012-13 年シーズンに 12 地域 (青森、新潟、千葉、東京、神奈川、静岡、愛知、大阪、兵庫、香川、福岡、熊本) の小児科医院及び病院小児科の外来または入院患者の臨床検体計 267 件の検体が採取され、2013-14 年シーズンでは、14 地域 (青森、新潟、千葉、東京、神奈川、静岡、愛知、三重、滋

賀、大阪、兵庫、山口、福岡、熊本) から、計 300 件の臨床検体を収集した(2014 年 1 月 31 日現在、表 1)。

A,B 血清型別の全国的、地域的動向

2012-13 シーズンでは、PCR 陽性臨床検体 164 件のうち、A が 140 件 (85%) で、B が 24 件 (15%) であり、A が主に流行していた(図 1 A)。地域別では、調査を行った 12 地域全てで A が優勢で各都府県の RSV 陽性検体全体の 60-100%を占めた。また、青森、東京、神奈川、静岡、兵庫、福岡、熊本では A のみが検出された。それに対して B は、12 地域中新潟、千葉、愛知、大阪、香川と 5 地域のみでしか検出されなかった。

(図 1 A)。A,B 両方が検出された 5 地域では、A,B の割合が、新潟 (A:B=8:2)、千葉 (6:4)、愛知(9:1)、大阪(6:4)、香川(6:4)でそれぞれ A,B の割合が各地域で異なっていた。

2013-14 シーズンでは、PCR 陽性臨床検体 234 件のうち、A が 110 件 (47%) で、B が 124 件 (53%) であり、昨シーズンと異なり A,B の割合が拮抗していた(図 1 B)。A は調査を行った 14 都府県のうちの 7 県である青森(A:B=9:1)、千葉(7:3)、神奈川(7:2)、三重(7:3)、大阪(8:2)、山口(7:3)、福岡(10:0)で優勢であったが、愛知と兵庫では A は検出されなかった。B の動向は、昨シーズンとは対照的に、調査を行った 14 地域のうち、福岡以外の 13 地域全てで検出され、さらに、新潟(A:B=2:8)、静岡(2:8)、滋賀(1:9)、熊本(1:9)の 4 県では B が優勢であり、その中でも愛知、兵庫では B のみが検出された。東京は A,B の割合が等しかった(図 1 A,B)。

ジェノタイプ別の全国的、地域的動向

遺伝子系統樹解析により、ジェノタイプングできた検体は、2012-2013 年シーズンの A 型 140 件中 130 件 (93%) で、B 型 24 件中 18 件 (75%) であり、A ではほぼ終わっているが、B では 1/4 が PCR による遺伝子増幅効率が悪い等の理由でジェノタイプングができなかった。2013-14 年シーズンに関しては、A 型 110 件に対し、89 件 (81%) でジェノタイプングが終了しており、B では 124 件中 55 件 (44%) でジェノタイプングが終わっているが、残り 69 件 (56%) ではまだ未了である。2 シーズンを通じて、A と比較して B のジェノタイプングの効率が悪くなってきていることから、未同定の B と現在使用している B のジェノタイプング用の PCR プライマー配列に相違が生じている可能性がある。現在新しくプライマーを入手し、再びジェノタイプングを行っている。

検出されたジェノタイプの種類に関しては、2012-13 年シーズンは、A でジェノタイプングができた検体 130 件中 NA1(ON1 以外)は 124 件、また、遺伝子型分類上 NA1 に属するが、G 蛋白第 2 可変部位に 72 塩基対の挿入配列をもった ON1 が 6 件検出された。2013-14 年シーズンは、現在までのところジェノタイプングできた 89 件中 79 件は NA1 で、残り 10 件が ON1 であった。B は、2012-13 年シーズンはジェノタイプングができた 18 件中 17 件が BA9、1 件のみ BA7 であった。2013-14 年シーズンは、ジェノタイプングが終了している 55 件中 BA10 が 27 件、BA9 が 22 件、BA7 が 4 件、BA6 が 2 件であった。

NA1 (ON1 以外) は、2 シーズンを通じ、全体として 89%の高いブーツストラップ値を示し他のジェノタイプとは独立していた。NA1 内の遺伝子型を詳細に検討したところ、数個あるいは数 10 件の株からなる小、中規模のクラスターを形成していた。それらを、Peret (1998) らの報告に基づき、クレード (ブーツストラップ値が 70%以上; CL) とサブタイプ (相互の遺伝子相同性が 96%以上; ST) に分類した。2012-13 年シーズンには、新潟で CL1 と ST2 が、東京で ST3 のグループがみられた。2013-14 年シーズンには、青森で CL2、大阪で ST4、福岡で ST5、山口で ST6 のグループが認められた。それぞれ、1 シーズンのみみにみられ、地域に限定した遺伝子型であるため、特定の遺伝子型が保育園などを通じ地域流行を起こしている可能性があり、今後、背景情報を詳細に検討する予定である。

ON1 の全国的、地域的動向は、2012-13 年シーズンでは、2012 年 11 月のみ、新潟と神奈川の 2 地域でそれぞれ 5 件と 1 件と計 6 件検出された(RSV 陽性検体の約 4%)。2013-14 年は千葉、神奈川、静岡、三重、滋賀、山口の 6 地域で、それぞれ 1 件、3 件、1 件、2 件、2 件、1 件の計 10 件検出され、最初に検出されたのは 2013 年 9 月であった (RSV 陽性検体の約 3%)。ON1 はカナダのグループにより初めて報告されて以来 (Eshaghi, 2012)、アジアでは中国、韓国、日本、フィリピン、タイ、マレーシア、インド、ヨーロッパではドイツ、イタリア、アフリカではケニア、南アフリカで検出されている。これらのグローバルな ON1 と今回本研究で検出された ON1 を合わせて系統樹解析を行うと、日本の ON1 は 2 つのクラスターに分かれた。一つは、最初に報告されたカナダの ON1 と遺伝子配

列が比較的近いグループであり (Japan1)、2シーズンを通じ千葉、神奈川、静岡、三重、滋賀の6地域で検出され、16件中13件とほとんどのON1はJapan-1に属していた。もう1つの小さなクラスターは主にイタリアのローマで検出されたグループ (Roma) に近いグループであり (Japan-2)、2013-14年のみで神奈川と滋賀でそれぞれ1件ずつ計2件検出されている。なお、Japan-2に属するYokohama株は遺伝子データベースに登録された他施設株である。自検例の神奈川の1件はRomaのクラスターに属していた。

B血清型のジェノタイプの全国的、地域的動向に関しては、以前当教室で報告したBA10 (Dapat, 2010) が、2012-13年シーズンと翌2013-14年シーズンで主に新潟で検出された (他に愛知の1件のみ)。これらは、遺伝子相同性が96%以上であるサブタイプ (ST) であった (図4)。BA9は、2012-13年シーズンでは、新潟、千葉、愛知、大阪、香川、熊本とBが検出された5地域全てで検出され、2013-14年シーズンでは、青森、千葉、神奈川、愛知、滋賀、大阪、熊本の7地域で検出された。BA7は、2012-13年シーズンは新潟の1地域のみでの検出であったが、2013-14年シーズンでは、新潟、滋賀、山口、熊本の4地域で検出された。BA6に類似したRSVが2013-14年シーズンのみ三重と山口で各1件のみ検出された。 (図4)。

D. 考察

当教室では2001年以降、新潟市の小児科医院より検体を新潟大学に送付してもらい、RSV分離培養、A,B血清型別および遺伝子解析を地域レベルで行ってきた。また、昨シーズンからは全国15地域の小児科医に同様に検体を送付してもらい、RSV分離培養、型別、遺伝子解析を行い、全国規模のRSVの分子疫学的動向を調査中である。

A,B血清型、各遺伝子型の動向に関して2シーズンを通じて考察すると、昨シーズンでは、全国的にも、地域的にもAが優勢であったが、今シーズンは、全国的にはA,Bの検出件数が拮抗し、地域的にもAが優勢の地域が7地域、Bが優勢の地域が6地域と拮抗していた (図1)。しかし、Bが2シーズン続けて優勢であった地域は本研究では現時点までに確認されなかった。

各遺伝子型の動向に関して2シーズンを通じて考察すると、NA1 (ON1以外) に関しては、系統樹解析で見出された8種類のST

とCLはほぼ同じ地域でのみ検出されている (図2)。また、2012-13年シーズンの新潟と東京で検出されたST1,2,3とCL1は、2013-14年では検出されなかった。また、2013-14年シーズンで青森、大阪、福岡、山口で検出されたST4,5,6も昨シーズンは同じものは検出されていない。このことから、これらのCL、STは1シーズンのみの発生である可能性がある。各地域で血清型A,Bのどちらが優勢になるかを左右する因子は解析の途中であり、いまだに不明であるが、興味深い事実は、RSV-Aの系統樹上の8種類のST,CL全てがA優勢だった地域で検出されている事であり、地域的なST,CLの発生と、地域的なA,Bの動向とは関連があるかも知れない。保育園での集団発生など、今後は背景因子を検討する予定である (図2)。

RSV-Aに属するON1の動向に関して2シーズンの動向を踏まえて考察すると、2012-13シーズンは新潟、神奈川の2地域のみ、2013-14シーズンは千葉、神奈川、静岡、三重、滋賀の5地域のみでの検出にとどまっており、また検出率は2シーズンを通じRSV陽性検体中3-4%であり、地域的かつ限定的な流行にとどまっていることが示唆された (表1、図3)。今回の調査で検出されたON1のほとんどはJapan-1に属するカナダで最初に報告されたON1と類似の配列をもっていた。その結果を踏まえると、ON1の系統樹上の相対的な遺伝子進化はあまり進んでいないことが示唆され、このことが日本のON1が地域的、限定的な流行にとどまっている理由かもしれない。しかし一方で、カナダのON1から比較的進化しているJapan-2に属するON1も滋賀と神奈川のみと地域的ではあるが発生しており、今後流行につながる可能性は否定できない (図3)。

B血清型のBAはBA6類似、BA7,BA9,BA10であり、その他のタイプのBAは検出されなかった (図4)。BA10は2013-14年シーズンのみ、主に新潟 (1件のみ愛知) でのみ検出されたことから、2013-14年シーズンにおける新潟で優勢だったBの大半を占めていたが、NA1のCL1,ST1,2同様1シーズンのみの発生に終わるかも知れない。BA9は、2シーズンを通じ、お互いにほぼ同じ遺伝子配列であり進化していないものと、経常樹上のお互いの距離が比較的離れており、遺伝子進化が進んでいると思われるものがあり、遺伝子進化の進んでいるものは来シーズンも発

生するかもしれない。BA7 は2シーズンを通じて各地域で検出されたが、系統樹上でそれぞれ1つのクラスター内にまとまっており、2シーズンを通じて遺伝子進化が比較的進んでいないことが示唆された。BA6 類似の BA は、2013-14 年シーズンのみ、三重と山口の2地域、各1件のみ検出されたため、限定的な発生にとどまっていると思われる。(図4)。B型では、我々の既存のプライマーセットで遺伝子解析ができない株が増えており、新規に別のプライマーを取得し、再検査を行っている。これら不明の株を解析することで、新たな遺伝子型(ジェノタイプ)を見いだすことができるかもしれない。

E. 結論

我々は過去12年以上にわたり新潟市でRSVの分子疫学的調査を行ってきたが、2012-2013年、2013-2014年シーズンは新潟市での調査に加え、更に全国15都府県の調査を行い、調査を行ったほとんどの地域で、各シーズン、各地域によって異なる血清型と、同じジェノタイプにおける異なるサブタイプの流行が発生した可能性を提示した。今回の調査で得られた結果から導き出された考察は、更なる疫学的、分子疫学的調査の継続と充実によって裏付けられる必要がある。また、検体採取と同時に提供された患者情報と血清型、遺伝子型を比較することにより、RSVによる呼吸器疾患の重症化を左右するリスクファクターの解明も重要な課題である。地域的、全国的なRSVの分子疫学的動向の調査、研究の継続は国の感染症発生動向調査やWHOのグローバルサーベイランスではなしえないことであり、日本の臨床医、患者、そして世界

的にも意義の高いものと考えられる。

F. 補足

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 荳蒲川由郷、Isolde Dapat、齋藤孔良、永井崇雄、田中敏博、佐野康子、近藤大貴、Clyde Dapat、八神錬、鈴木翼、日比野亮信、佐藤康平、横田千尋、竹内拓未、齋藤玲子. 2012-13 シーズンにおける全国小児科医院より検出したRSVウイルス(RSV)の分子疫学的解析. 外来小児科学会. 2013年8月31日-9月1日. 福岡.

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

RSV調査協力医：佐野康子先生、池澤 滋先生、加地はるみ先生、斉藤 匡先生、白川佳代子先生、杉村 徹先生、瀬尾智子先生、武井智昭先生、田中敏博先生、富本和彦先生、中村 豊先生、西村龍夫先生、田中 敏博先生、谷口清州先生、島田康先生、西藤成雄先生、鈴木英太郎先生、永井 崇雄先生

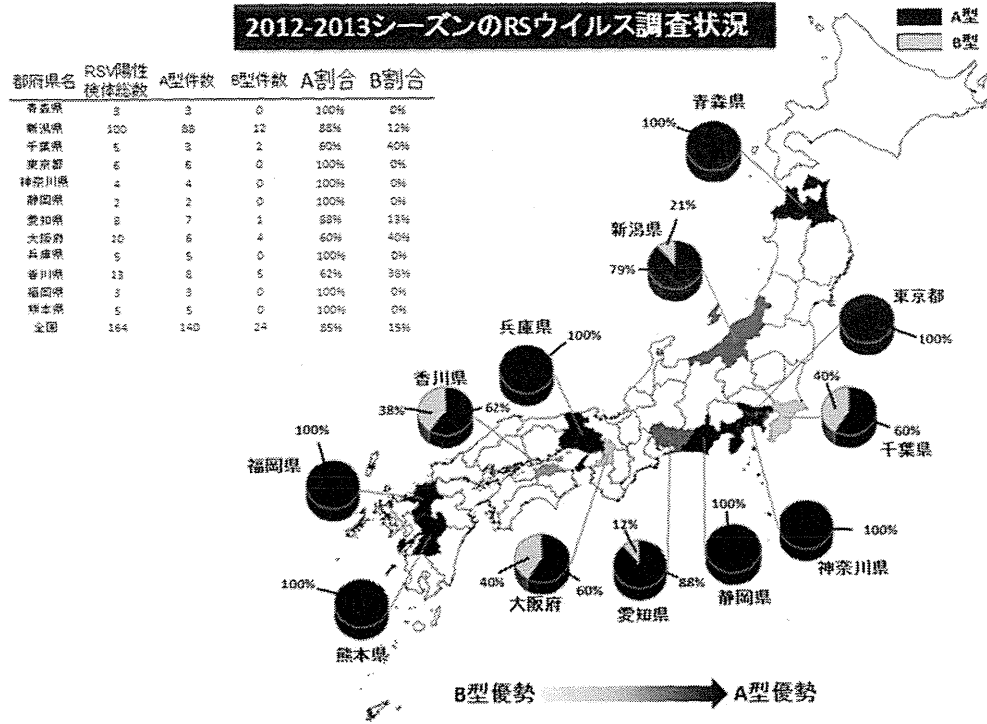
表1 2013-14年のRSV全国調査結果の進捗状況

2013-2014年シーズン RSVウイルス全国調査結果_2014.1.31現在

	総検体数	PCR陽性	PCR陽性率§	年齢平均(才)	血清型						遺伝子型							ウイルス増養陽性	RSV陰性		
					A	B	Aの割合(%)	Bの割合(%)	不明#	再検査※	A		B(BA)				判定不能▲			再検査\$	
											NA1	NA1 ON1	BA6	BA7	BA9	BA10					
青森	22	22	100%	1.45	19	3	86%	14%	0	0	18	-	-	1	-	2	1	4	0	青森	
新潟	109	65	64%	1.19	13	48	21%	79%	4	7	6	-	1	-	24	10	20	2	37	新潟	
千葉	10	10	100%	1.54	7	3	70%	30%	0	0	5	1	-	2	-	2	0	8	0	千葉	
東京	6	6	100%	0.65	3	3	50%	50%	0	0	2	-	-	-	-	1	3	6	0	東京	
神奈川	25	25	100%	0.92	17	8	68%	32%	0	0	12	3	-	7	-	3	0	14	0	神奈川	
静岡	9	6	67%	0.62	1	5	17%	83%	0	0	0	1	-	-	-	2	3	2	3	静岡	
愛知	12	12	100%	0.83	0	11	0%	100%	1	0	-	-	-	2	1	8	1	0	0	愛知	
三重	16	12	80%	0.93	8	4	67%	33%	0	1	5	2	1	-	-	1	3	1	3	三重	
滋賀	16	13	87%	1.57	2	11	15%	85%	0	1	-	2	-	1	5	-	2	3	2	滋賀	
大阪	11	11	100%	1.11	9	2	82%	18%	0	0	8	-	-	1	-	1	1	10	0	大阪	
兵庫	6	6	100%	1.11	0	6	0%	100%	0	0	-	-	1	-	-	-	3	3	1	0	兵庫
山口	24	22	96%	1.81	15	7	68%	32%	0	1	13	1	1	-	-	0	6	9	1	山口	
福岡	15	15	100%	1.48	15	0	100%	0%	0	0	10	0	-	-	-	5	0	10	0	福岡	
熊本	19	14	74%	0.64	1	13	7%	93%	0	0	-	-	1	4	-	7	2	1	5	熊本	
全国	300	239	82%	1.16	110	124	47%	53%	5	10	79	10	2	4	22	27	22	46	70	51	全国

§ 総検体数から、血清型判定中(※)の件数を引いた検体数におけるRSV陽性検体の割合
 # RSV陽性だが、血清型の判定不能であった検体
 ※ ウイルス遺伝子量が少ない等の理由でPCRによる血清型判定不能
 ▲ ウイルス遺伝子量が少なく、遺伝子型判定のためのシーケンスが行えなかった検体
 \$ PCRにおいて非特異的な遺伝子増幅が多くみられるため、PCR条件の再検討の上で再検査を行う検体

図1 2012-2013年シーズンのA,B血清型別の発生動向 (A)



2013-2014年シーズンのA,B血清型別の発生動向 (B)

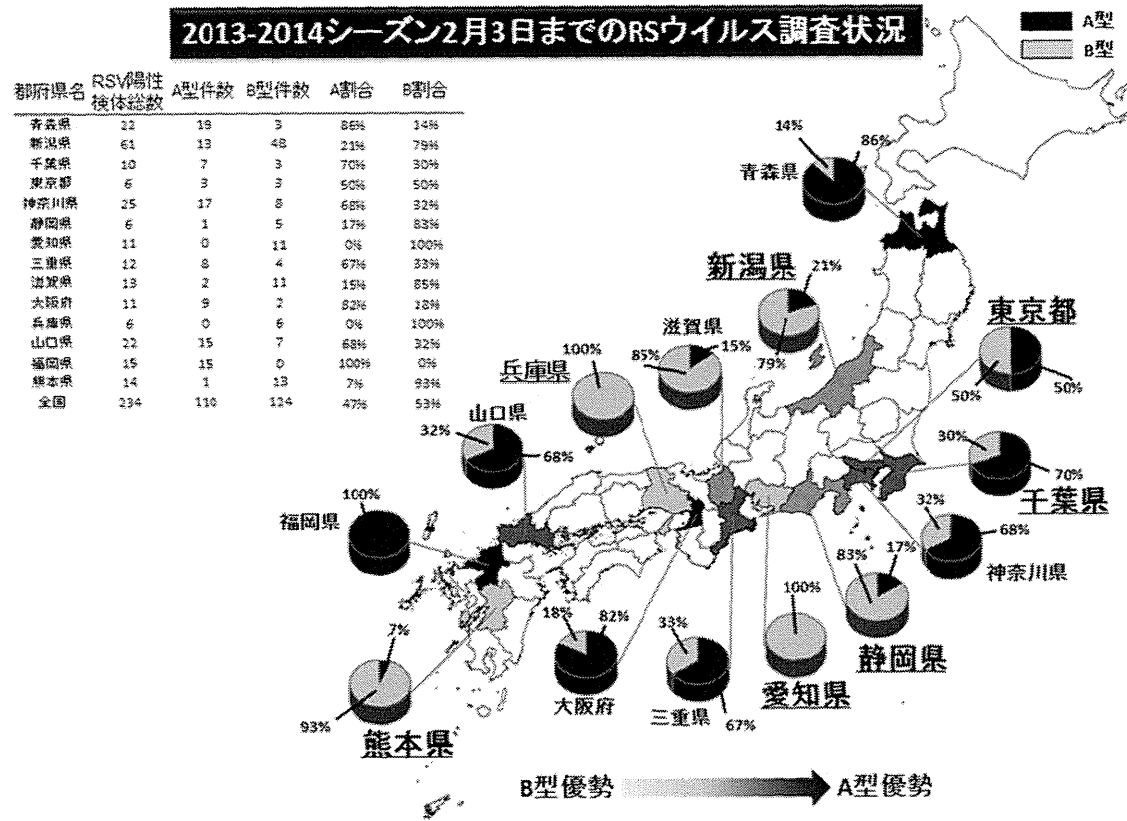


図2 2シーズンにおけるRSV-Aの系統樹解析 (●および○が本研究で採取及び解析されたRSV検体)

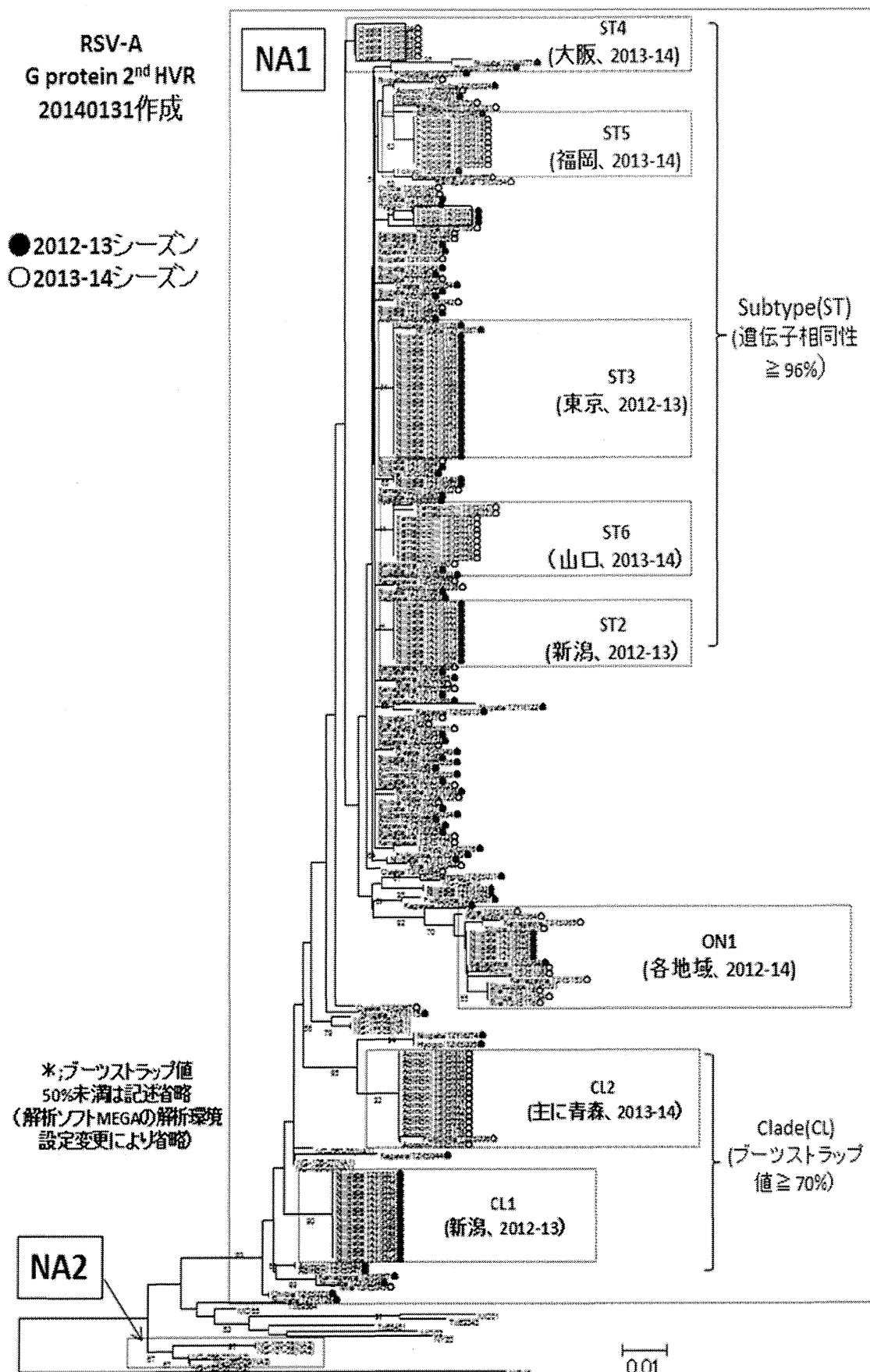


図3 2シーズンにおけるON1(RSV-A)の系統樹解析 (●および○が本研究で採取及び解析されたRSV検体)

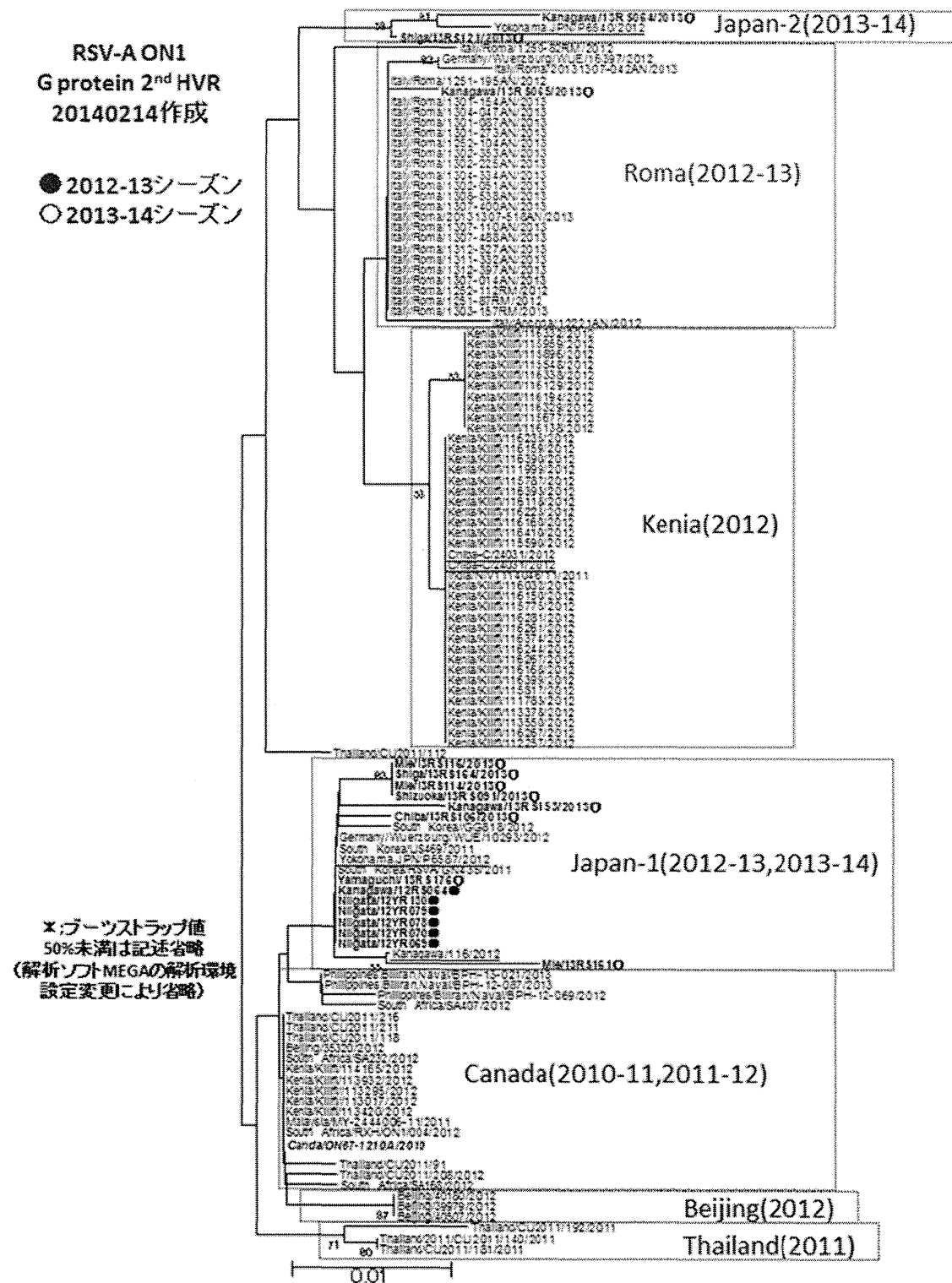
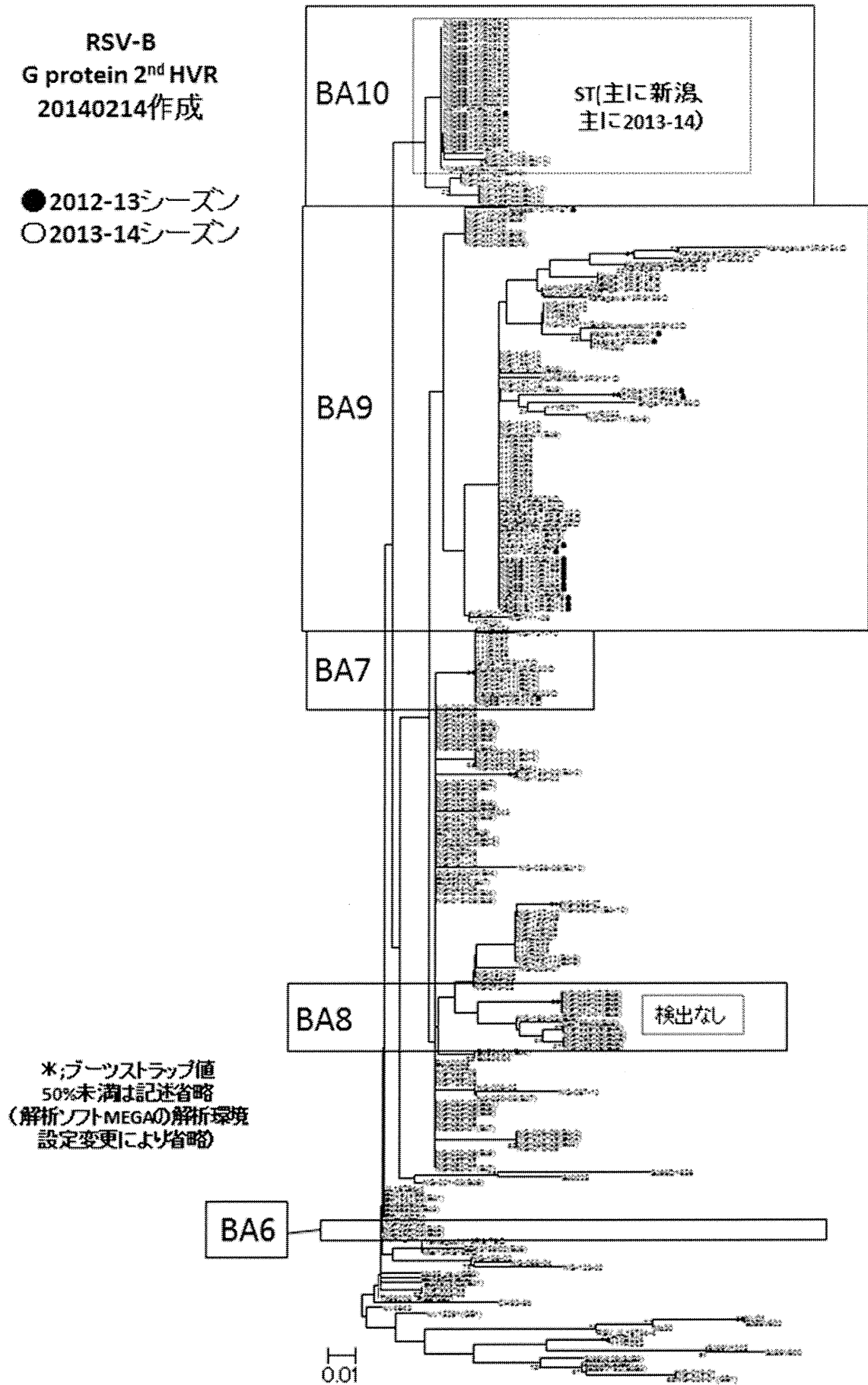


図4 2シーズンにおけるRSV-Bの系統樹解析 (●および○が本研究で採取及び解析されたRSV検体)



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

急性呼吸器感染症起因ウイルスの流行実態調査

研究分担者 佐多 徹太郎 富山県衛生研究所

研究協力者 小渕 正次、滝澤 剛則 富山県衛生研究所ウイルス部

研究要旨 インフルエンザウイルス以外の急性呼吸器感染症（ARI）起因ウイルスの流行実態を明らかにするため、平成 25 年 10 月から平成 26 年 1 月にかけて富山県内の小児科医院で採取された鼻腔ぬぐい液検体を用いて、ARI 患者からウイルスの検出・同定を試みた。その結果、34 例中 20 例からライノウイルス B、RS ウイルス A、RS ウイルス B、パラインフルエンザウイルス 1 型、コロナウイルス OC43 株、エンテロウイルス、アデノウイルス B およびヒトボカウイルスが検出された。コロナウイルス OC43 株が全検出例の 50%を占め、最も多く検出された。

A. 研究目的

インフルエンザウイルスを除いた急性呼吸器感染症（ARI）起因ウイルスには、乳幼児の下気道炎や喘息憎悪に関わる RS ウイルスやライノウイルスなど臨床的に重要なウイルスが含まれる。しかし、これらウイルスは病原体サーベイランスの対象外であるため、本邦におけるインフルエンザウイルス以外の呼吸器ウイルスの流行実態は明らかでない。

そこで、本研究では呼吸器ウイルスの遺伝子検出診断系を構築し、ARI 患者検体を収集してウイルスの検出・同定を試みた。

B. 研究方法

富山県内 2 カ所の小児科医院において、インフルエンザを除く ARI で受診した小児（各医院で毎週 1～2 名）から、鼻腔ぬぐい液を採取した。Katano et al. (J Med Virol, 83:322-330, 2011) の方法を改良し、19 種類の呼吸器ウイルス（ライノウイルス A・B、RS ウイルス A・B、パラインフルエンザウイルス 1・2・3 型、A・B・C 型インフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、コロナウイルス OC43・229E・NL63 株、エンテロ

ウイルス、アデノウイルス B・C・E、ヒトボカウイルス）を対象とした duplex リアルタイム RT-PCR の系を構築し、本法によりウイルスを検出・同定した。

また、受診時に迅速診断キットで RS ウイルス陽性を示した患者の検体については、HEp-2 細胞を用いてウイルス分離も行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、富山県衛生研究所倫理審査委員会に申請し、承認された（平成 25 年度 受付番号 4 および 9）。

C. 研究結果

平成 25 年 10 月から平成 26 年 1 月の期間に、急性咽頭炎や気管支炎等の患者（0 歳 7 ヶ月～12 歳 0 ヶ月）34 名から検体が採取された。これら検体から、ライノウイルス B（1 例）、RS ウイルス A（2 例）、RS ウイルス B（3 例）、パラインフルエンザウイルス 1 型（1 例）、コロナウイルス OC43 株（10 例）、エンテロウイルス（2 例）、アデノウイルス B（1 例）およびヒトボカウイルス（2 例）が

検出された(図)。ヒトボカウイルスはいずれもコロナウイルス OC43 株との重複感染として検出された。しかし、14 検体からはいずれのウイルスも検出されなかった(全体の 41%)。

今回採取された 34 検体のうち、迅速診断キットによる RS ウイルス陽性例は 6 例みられたが、リアルタイム RT-PCR で検出できたのはサブグループ B が 1 例のみであった(データ未提示)。ウイルス分離では、リアルタイム RT-PCR において RS ウイルス陰性の 2 例からサブグループ A のウイルスが分離された。

D. 考察

今回の調査では、検索対象とした 19 種類の呼吸器ウイルスのうち、8 種類が検出された。その中で、コロナウイルス OC43 株が最も多く検出された(10/20 例、重複感染 2 例を含む)。本ウイルス感染症は普通感冒の 15~35%を占めるといわれるが、流行の季節消長等の詳細を明らかにするため、今後も本調査を継続する必要がある。

また、今回の検体採取期間中には、RS ウイルス感染症の全国的な流行がみられたが、本調査では RS ウイルス A、B がそれぞれ 2 例と 3 例検出されたただけであった(全検出ウイルスの 23%)。しかし、迅速診断キット陽性の患者検体においても検出されない例がみられたことから、今回用いたリアルタイム RT-PCR の検出感度や特異性をさらに検討することも必要である。

E. 結論

今回の調査では、ARI の小児 34 名から 8 種類の呼吸器ウイルスが検出された。その中で、コロナウイルス OC43 株が最も多く検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Obuchi M, Adachi Y, Takizawa T and Sata T. Influenza A(H1N1)pdm09 virus and asthma. *Front. Microbiol.* 4:307, 2013.

2. 学会発表

なし

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

本研究の実施にあたり、臨床検体の採取にご協力いただいた小栗小児科医院の小栗絢子先生ならびに八木小児科医院の八木信一先生に深謝いたします。

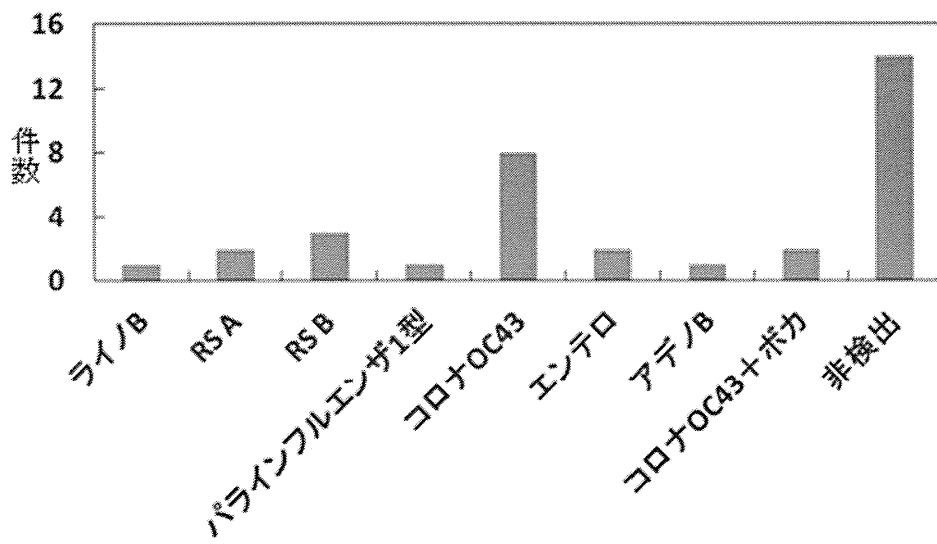


図 ARI患者検体からの呼吸器ウイルスの検出

別紙 3

平成 25 年度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)
自然災害時を含めた感染症サーベイランスの強化・向上に関する研究

分担研究報告書

「肺炎球菌および腸内細菌の薬剤耐性サーベイランス事業に対する提言」

研究分担者 笠原 敬 奈良県立医科大学感染症センター講師

研究要旨

【目的】 感染症法に基づく感染症発生動向調査をより有効なものとする提言を行うため、肺炎球菌および腸内細菌の薬剤感受性および患者臨床背景について検討を行う。

【方法】 奈良県立医科大学附属病院で分離された肺炎球菌および大腸菌について細菌学的検討を行い、さらに菌が分離された患者診療録を用いて臨床的検討を行った。

【結果】 2002 年～2012 年に分離された肺炎球菌 641 株のうち、19 株が現行の肺炎球菌ワクチンに含まれない血清型 35B 型であった。これらのうちほとんどはペニシリン耐性またはマクロライド耐性であった。また 2008 年 1 月～2013 年 5 月に当院で血液培養から大腸菌が分離された 127 例のうち 31 例が ESBL 産生大腸菌であり、患者予後が有意に不良であった。特に薬剤耐性遺伝子で CTX-M に加え IMP-6 を保有していた大腸菌による敗血症患者 3 名は全例が死亡していた。

【考察】 肺炎球菌に関しては薬剤感受性はもちろん、血清型を含めたサーベイランスが必要である。また大腸菌など腸内細菌による感染症では薬剤耐性菌による敗血症や死亡例が認められ、わが国における細菌学的検討および臨床的検討を早急にすすめ、包括的なサーベイランスを行う体制作りが必要と考えられた。薬剤耐性菌による感染症発生動向調査では臨床情報の収集のみでなく、菌株の収集を併せて行うことでより有用な調査できるものと考えられる。

A. 研究目的

感染症法に基づいた感染症発生動向調査において、薬剤耐性菌感染症については、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌感染症、バンコマイシン耐性腸球菌感染症、ペニシリン耐性肺炎球菌感染症、メチシリン耐性

黄色ブドウ球菌感染症、薬剤耐性アシネトバクター感染症、薬剤耐性緑膿菌感染症の 6 種類が五類感染症に指定されている。

しかしこれらの動向調査を有効に活用していくためには、日本における耐性菌感染症の現状をよく把握した上で動向調査の内容を吟味し、アップデートしていく必要があ

る。本研究では肺炎球菌感染症および大腸菌感染症について日本における現状を明らかにし、薬剤耐性菌感染症に関する感染症発生動向調査に対して提言を行っていくことが目的である。

B. 研究方法

奈良県立医科大学附属病院で分離された肺炎球菌と大腸菌および患者診療録を用いた。肺炎球菌・大腸菌については薬剤感受性検査と薬剤耐性遺伝子検査を行い、肺炎球菌についてはさらに血清型別検査と **multi-locus sequence typing (MLST)** を行った。またそれぞれの菌が分離された患者の診療録を参照した。

※倫理面への配慮

分離菌と診療録の解析においては連結可能匿名化を行った。また大腸菌感染症の解析については当院倫理委員会の審査を得た。

C. 研究結果

・肺炎球菌に関する検討

2002～2012年に当院で分離された肺炎球菌 641 株のうち、19 株が血清型 35B 型であった。そのうち 12 株が ST558, 7 株が ST2755 であった。ST558 はほとんどがペニシリン耐性、マクロライド中等度耐性、ST2755 は全てペニシリン感受性、マクロライド高度耐性であった。

・大腸菌に関する検討

2008年1月～2013年5月に当院で血液培養から大腸菌が分離された 127 例のうち、31 例が ESBL 産生大腸菌によるものであった。ESBL 産生大腸菌による敗血症患者では、ESBL 非産生大腸菌による敗血症患者と比べて介護施設入所歴が多く、14 日以内死亡率が高かった。また発症 24 時間以内の適切な抗菌薬の開始率が低く、初期の不適切な抗菌薬治療が死亡率に関係する可能性が考えられた。耐性遺伝子の検討では ESBL の原因遺伝子である CTX-M に加えてカルバペネマーゼの原因遺伝子である IMP-1 を同時に保有していた 3 例は全例死亡していた。

D. 考察

肺炎球菌感染症については、2013年4月1日から侵襲性肺炎球菌感染症が 5 類感染症に指定された。5 類感染症には肺炎球菌感染症が 2 種類指定されていることになり、今後はそれぞれの位置づけをより明確にする必要があると考えられる。今回我々が検討した血清型 35B 型の肺炎球菌は現在日本で使用できる 7 および 13 価の肺炎球菌ワクチンではカバーされていない。肺炎球菌感染症については侵襲性肺炎球菌感染症に代表される「重症度」とペニシリン耐性肺炎球菌に代表される「薬剤感受性」に加えて、ワクチンの有効性の指標となる「血清型」に関する評価が必要であり、今後のサーベイランスにおいては血清型も含めた検討が必要と考えられる。

大腸菌を含めた腸内細菌は、感染症発生動向調査の対象になっていない。しかし当院での約 5 年間の大腸菌敗血症 127 例のう

ち約1/4がESBL産生大腸菌によるものであり、そのうち約20%が死亡しているという現実には、腸内細菌およびその耐性菌に関しても何らかのサーベイランスが必要であることを示唆している。当院ではバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌やバンコマイシン耐性腸球菌、多剤耐性アシネトバクターは今まで一度も分離されたことがない。このような稀な耐性菌の検出を早期に察知するサーベイランスとは別に、実際に公衆衛生学的に大きなインパクトを与えている耐性菌感染症について、一刻も早く対応することが必要である。

E. 結論

肺炎球菌感染症については、重症度や耐性菌の把握以外に、ワクチンの有効性をモニタリングしていくためには実際に菌株を収集して血清型を含めて検討する必要がある。

大腸菌を含めた薬剤耐性腸内細菌による公衆衛生学的影響は大きいと考えられる。こちらにも実際に菌株の収集を行い、サーベイランスの体制を至急に整える必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Koizumi A, Kasahara K, Komatsu Y, Ui K, Mizuno F, Nakayama A, Mikasa K.

Evaluation of the Vitek 2 AST-N269 Card for Detection of Meropenem Resistance in Imipenem-Susceptible

Meropenem-Resistant Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2013;51:3908.

- Kasahara K, Komatsu Y, Koizumi A, Chang B, Ohnishi M, Muratani T, Mikasa K. Serotype 35B *Streptococcus pneumoniae*, Japan, 2002-2012. J Infect Chemother (Accepted for publication)

2. 学会発表

- 宇井孝爾, 中山章文, 小泉 章, 内池敬男, 西川文子, 笠原 敬, 三笠桂一, 喜多英二. Extended Spectrum- β -Lactamase および Metallo- β -Lactamase を同時産生する *Escherichia coli* の分子生物学的解析(一般演題). 第24回日本臨床微生物学会. 2013年2月2日. 横浜市.
- 小泉 章, 中山章文, 宇井孝爾, 内池敬男, 高橋克也, 藤吉章雄, 笠原 敬, 三笠桂一. ESBL およびカルバペネマーゼ産生 *Escherichia coli* と *Klebsiella pneumoniae* における VITEK2 の各世代薬剤感受性カードの比較(一般演題). 第24回日本臨床微生物学会. 2013年2月2日. 横浜市.
- 前田光一, 小川 拓, 米川真輔, 中村(内山)ふくみ, 宇野健司, 笠原 敬, 古西 満, 三笠桂一. 奈良県立医科大学での外来患者喀痰由来の肺炎球菌とインフルエンザ菌の感受性推移(一般演題). 第87回日本感染症学会学術講演会・第61回日本化学療法学会総会合