

に、一部のプライマー配列を改良して実施)、ならびに *bexB* 遺伝子に対する PCR 法 (Davis G et al. J. Clin. Microbiol. 49: 2594-2601, 2011) を実施した。

β-lactamase 活性試験: ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」(日水製薬)または、セフィナーゼディスク (ベクトン・ディッキンソン) を用いて、分離株の β-lactamase 産生性を調べた。

薬剤感受性試験: E-test (AB BIODISK) を用い、試験用培地には Haemophilus Test Medium (HTM, ベクトン・ディッキンソン) を用いた。薬剤としてアンピシリン (ABPC)、アンピシリン/スルバクタム (ABPC/SBT)、ピペラシリン (PIPC)、メロペナム (MEPM)、セフォタキシム (CTX)、セフトリアキソン (CTRX) を用いた。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の微量液体希釈法の感受性等の基準を参考値とした。

細菌性髄膜炎疑い患者由来の髄液等中の細菌遺伝子解析方法:

対象 9 県における細菌性髄膜炎疑い症例由来の髄液 33 検体、硬膜下膿瘍ならびに脳膿瘍のドレナージ液 2 検体の計 35 検体についてライブラリーを作製し、うち、16 検体について MiSeq による配列解析を実施した。

髄液検体からの核酸抽出は、以下の方法で実施した。DNA は、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、DNA 増幅の有り、無しの 2 種類の鋳型を用意した。DNA 増幅には、random hexamer を用い 30°C

にて 8 時間増幅した (GenomiPhi, GE Healthcare)。RNA は、Lysozyme 処理後、RNeasy kit (QIAGEN) で抽出し、DNase 処理を Turbo DNA-free (AMBION) で行った。得られた RNA は、random hexamer を用いて double-strand cDNA に変換した (SuperScript choice system for cDNA synthesis, Life Technology)。

細菌共通領域である 16S rRNA 遺伝子の可変領域 V3-V4 を含む約 550bp 長の領域を PCR 法で増幅した。以下の二通りのライブラリー作製法について検討した: 1) DNA 増幅無しの鋳型を nested-PCR 法で増幅する作製法、2) DNA 増幅有りの鋳型を single-PCR 法で増幅する作製法。加えて、一部の検体で cDNA の鋳型を single-PCR で増幅する作製法についても検討した。

使用した PCR プライマー配列は、以下のとおり。nested-PCR 1 回目 PCR 用、10F >GTT TGA TCG TGG CTC A、1050R

>CAC GAG CTG ACG AC (Sasaki T et al. PDF J 51: 242-247); nested-PCR 2 回目または single-PCR 用、

16SV3_V4_illumina_Forward >TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG、

16SV3_V4_illumina_Reverse

>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C、W: A/T、V: A/C/G、H: A/C/T (Illumina)。

得られた PCR 産物に、特異配列からなる Index 配列を 2 個付加し、MiSeq (Illumina) を用いて、300bps 配列解読

用試薬でPaired-end法にて配列を決定した。各 read 配列をFastqに変換後、細菌の16S rRNA 遺伝子データベース (GreenGeens) と照合させ、細菌の属ならびに種名を予測した。

(倫理面への配慮) 菌株ならびに髄液の解析については、「国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」の承認を得て実施した。本研究のために新たに検体を採取することはなく、臨床診断目的で採取された検体の一部をインフォームドコンセントを得て解析に用いた。診療情報は匿名化され、対照表は協力医療機関側において厳重に管理された。

C. 研究結果

侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株の解析：

感染症発生動向調査における侵襲性インフルエンザ菌感染症の全国報告数は、2014年の1週から52週までの累計報告数105例のうち、5歳未満が12例(11%)、2015年の1週から3週までの累計報告数14件のうち、5歳未満が1例(7%)であった (Infectious Diseases Weekly Report Japan, IDWR)。このうち、今年度、本研究班の対象9県において分離された菌株数は、2014年に3症例から3株、2015年1月までで1症例から1株の4株であった。診断名は、髄膜炎0例、菌血症を伴う肺炎2例、菌血症2例であった。

今年度の分離菌株の荚膜型別ならびに薬剤感受性試験結果を表1に示す。荚膜型解析において、Hibの検出0株、他型の荚膜株の検出0株、Non-typable *H. influenzae* (NTHi)4株と同定された。薬剤感受性に関しては、1株が β -lactamase陽性を示した。

表2ならびに図1に、2007年以降の対象9県の小児侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来 *H. influenzae* 株における荚膜b型株(Hib)、他の荚膜型株、Non-typable *H. influenzae* の検出割合の年次推移を示す。Hibワクチン定期接種の開始1年目となる2014以降、Hibの分離は無い。一方、他の荚膜株の増加は、現時点では確認されていない。分離株は、いずれもNTHiである。

表3に、薬剤感受性試験結果結果を示す。表に示さないものの、ピペラシリンについてもE-test値の高い株は、定期接種開始後に分離されていない。また、 β -lactamase陽性株検出の割合は、Hibワクチンの開始前、任意接種開始後、任意接種開始後(全国公的補助開始後)、定期接種開始後の4期間で18.1%(13/72株)、10.1%(16/158株)、10.5%(11/105株)、12.5%(1/8株)であり、定期接種開始後も大きな変化は見られなかった。

細菌性髄膜炎疑い症例由来培養陰性髄液の細菌遺伝子の網羅的解析：

髄液等における細菌遺伝子の網羅的解析の手技の検討を行った。一つ目の検討

事項として、配列を解読するためのライブラリー作製法について検討した。検証法として、昨年度報告した種特異的 real-time PCR法を用いて種特異的な細菌遺伝子が検出されている髄液等5検体（既知の検体）と、種特異的解析結果が陰性であった2検体（未知の検体）の合計7検体を用いて網羅的解析を実施し、両方法で同等の結果が得られるかについて検討した。結果、1) DNA増幅無しの鋳型を二段階nested-PCR法で増幅したライブラリーでは、既知の検体中4/5検体で、また、未知の検体中1/2検体で主要な細菌属の推定が可能であった。一方、2) DNA増幅有りの鋳型をsingle-PCR法で増幅したライブラリーについては、既知の検体中1/5検体、また未知の検体中0/2検体で主要な細菌属の推定が可能であった。

また、cDNAを鋳型にsingle-PCRを実施したライブラリーは、供試した5検体中PCR産物が得られたのは1検体のみであり、配列解析結果は不明瞭であった。

二つ目の検討事項として、本手技による細菌分類上の検出レベルについて検討を行った。属レベルの検出においては、図2に示すように、*Streptococcus*属や*Haemophilus*属の遺伝子との相同性を示すread数の割合が96%あるいは33%と高い髄液検体があり、これらの髄液は、16S rRNA遺伝子を検出するPCR法の解析において、*S. pneumoniae*あるいは、*H. influenzae*が陽性であった。一方、種レベルでは、*Streptococcus*属の*S.*

pneumoniae, *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis*, *S. infantis*, *S. tigurinus*が混在して検出された。複数の検体で*S. tigurinus*がdominantに検出された。*Haemophilus*属においては、*H. influenzae*, *H. aegyptius*が検出された。

三つ目の検討事項として、既知の種特異的PCR法等においてターゲットにならなかった菌種の検出について検討した。基礎疾患に形態学的奇形があり、複数の細菌種の遺伝子がPCRで検出された髄液検体については、MiSeqによる解析で新たに*Staphylococcus*属の遺伝子が検出された。また、既存のPCR法では起因菌不明であった別の髄液検体1例で*Acinetobacter*属の遺伝子が検出された。

臨床検体中に混入したと考えられる土壌細菌等の環境菌（*Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*等）の遺伝子が多い検体、あるいは、*Pseudomonas*, *Sphingomonas*等の遺伝子が多い検体については、解析結果は不明瞭であった。ただし、このような検体においても大腸菌を含む*Escherichia*属は検出されなかったことから、大腸菌性髄膜炎の診断の妨げにはならないことが予想された。

D. 考 察

Hib 定期接種開始から2年目となる今年度のHib検出は0株であり、かつ、HiaやHif等のワクチンでカバーできない莢膜株の分離も対象9県においては、確認されなかった。とはいえ、これまで、対象9県以外において、少なくとも髄膜炎2

症例を含む3症例のHifによる小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症が報告されている(2012年に髄膜炎1例、神奈川県、2013年に髄膜炎1例、愛知県、ならびに菌血症1例、香川県、平成25年度報告書を参照)。本感染症が全数把握疾患となった現在、全症例の分離株の莢膜型別解析の実施体制の整備がサーベイランスにおける急務である。

他の莢膜型の株の病原性については、実験動物(乳飲みラット)を用いた*H. influenzae* 莢膜株 Hia, Hib, Hic, Hid, Hie, Hif の病原性比較解析の解析報告がある(*Infect Immun* 35: 95-104, 1982)。暴露動物の半数が感染する菌量を示すED50の値は、Hia(3株)のED50の値は1.2 CFUから100 CFU(コロニー形成ユニット)であり、Hib(5株)のED50値1 CFUから230 CFUと同等の病原性が報告されている。Hic, Hid, Hie, Hifは、ED50値が 10^3 CFUから 10^8 CFUと病原性が低いものの、実験に供試されたのは、莢膜型毎に数少ない株数のみであること、継代による莢膜発現低下も起こりうることから、実験室内で病原性が低いとされた他の莢膜型株についても監視が必要である。実際、Hibワクチン導入後の諸外国において、Hia(北米等)ならびにHifやHie(イングランドとウェールズ)等による侵襲性インフルエンザ菌感染症が発生し増加傾向を示している(*Lancet Infect Dis* 14: 70-82, 2014; *Emerging Infect Dis* 18: 725-732, 2012)。今後も継続した監視を

行い、HiaやHif等の分離株を収集して病原性解析の資材とする必要がある。

第二のテーマである髄液中の細菌遺伝子の網羅的解析について、今年度は、手技の確立を検討した。肺炎球菌やGBSを含む*Streptococcus*属、インフルエンザ菌を含む*Haemophilus*属、ブドウ球菌等を含む*Staphylococcus*属、*Acinetobacter*属等を検出した。種レベルの解析結果については、特に*Streptococcus*属において検討課題が残った。2012年に新しく種として提唱された*S. tigurinus*は、*S. pneumoniae*と系統的に近縁で、かつ、髄膜炎、心内膜炎、脊椎椎間板炎といった侵襲性感染症の起因菌となることが報告されている(*Int J System Evol Microbiol* 62: 2941-2945)。今回の解析における*S. tigurinus*陽性検体については、*S. tigurinus*特異的遺伝子検出を検討する予定である。一方、*S. pneumoniae*、*S. pseudopneumoniae*、*S. mitis*間の16S rRNA遺伝子の相同性が99%と高いことから、これらの菌については、本解析法でのスクリーニングに加えて、本研究班で使用している*S. pneumoniae* 特異的*lytA*遺伝子検出用realtime-PCR法の解析との組み合わせが必要となる。

今回の供試検体には含まれなかったが、今回検討した手法は、臨床における通常の培養法で培養陰性となる*Mycoplasma*属、*Listeria*属等の遺伝子も検出可能である。ただし、*Mycoplasma pneumoniae*性髄膜炎・脳炎では髄液中にマイコプラズマが

存在する直接機序に加えて、マイコプラズマとヒト糖脂質の抗原類似により抗ガラクトセレブロシド抗体や抗ガングリオシド抗体が産生されて脳炎等を惹起する間接機序がある。間接機序による症例では、髄液中から菌や菌遺伝子が検出されないことから、本方法は、マイコプラズマの直接機序に限って有用となる。

細菌遺伝子を増幅する今回の方法を用いても、髄液中の起因菌遺伝子の量が少なく、環境菌等の遺伝子が多い検体では、解析は困難である。今回、比較を行った検体においては、PCR法等で種特異的遺伝子が検出された検体では、環境菌混入の影響は、少ないことが示唆された。種特異的検出法との組み合わせにより、起因菌推定の精度を上げることに役立つ手法であると考えられた。今回示した nested-PCR法によるライブラリー作製法とMiSeqによる配列解析は、操作が簡便な上に自動解析結果(図2)が表示されることから、臨床の検査室での実施も可能だと考えられる。感染症発生動向調査における「PCR法による病原体遺伝子の検出」、「核酸検出(PCR, LAMP等)」(調査票記載項目)の精度向上に役立つ手技であることが示唆された。

E. 結論

平成26年度に小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例から分離された4株は、いずれもNTHiであり、Hibならびに他の莢膜型を有する株は、対象9県において

分離されなかった。

髄膜炎症例由来髄液等における細菌の網羅的解析手技を確立した。細菌の属レベルの推定に有用で、既存の方法との組み合わせにより、病原体検出の精度向上が図れることが示唆された。

F. 健康危機情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

佐々木裕子、他、小児の侵襲性感染症患者から分離された *Haemophilus influenzae* の莢膜型別解析について：国内外の動向：Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 35: 231-232, 2014

2. 学会発表

佐々木裕子、久保田眞由美、柴山恵吾、細菌性髄膜炎疑い患者由来の髄液における微生物遺伝子検出手法の検討、第9回日本ゲノム微生物学会、2015年3月6-8日、神戸

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、平成 26 年度に対象 9 県において小児の侵襲性感染症患者より分離された *Haemophilus influenzae* 菌株の解析結果

莢膜型別解析結果

菌株番号	入院日	年齢	診断名	検体	莢膜型
Iha402	2014/4/14	1歳2ヶ月	肺炎 菌血症	血液	NTHi *
Iha403	2014/4/17	1歳0ヶ月	菌血症	血液	NTHi *
Iha404	2014/7/13	1歳5ヶ月	菌血症	血液	NTHi *
Iha405	2015/1/5	3ヶ月	肺炎 菌血症	血液	NTHi *

* 抗血清存在下での菌凝集反応ならびに遺伝子解析 *a-f*, *bexA*, *bexB*いずれも陰性

薬剤感受性試験結果

β -lactamase	Ampicillin	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin	Meropenem	Cefotaxim	Ceftriaxone
陰性	0.25	0.25	0.016	0.064	0.016	0.0006
陰性	1.5	1.5	0.064	2	0.5	0.25
陰性	2	2	0.023	0.25	0.75	0.25
陽性	256	16	32	1	1.5	0.5

表 2、対象 9 県の小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来 *Haemophilus influenzae* 株における荚膜 b 型株 (Hib)、他の荚膜型株 *、Non-typable *H. influenzae* の検出割合の年次推移

(* 対象 9 県における分離例なし)

	接種開始前	接種開始前	任意接種開始後	任意接種開始後	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)、定期接種開始後	定期接種開始後	定期接種開始後
年 (入院時)	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015 (1月)
b型	27/27 (100%)	58/60 (96.7%)	60/60 (100%)	87/90 (96.7%)	37/39 (94.9%)	10/19 (52.6%)	1/2 (50%)	0/4 (0%)	0/1 (0%)
非b型 (Non-typable <i>H. influenzae</i>)	0/27 (0%)	2/60 (3.3%)	0/60 (0%)	3/90 (3.3%)	2/39 (5.1%)	9/19 (47.4%)	1/2 (50%)	4/4 (100%)	1/1 (100%)

症例数による集計結果を示す

表3、対象9県の小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 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	接種開始前	任意接種開始後	任意接種開始後(ワクチン緊急接種事業開始後)	定期接種開始後
薬剤	2007.6~ 2008.11	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2013.3	2013.4~ 2015.1
Ampicillin	56.9% (41/72)	50.0% (79/158)	49.5% (52/105)	37.5% (3/8)
Ampicillin/ Sulbactam	56.9% (41/72)	48.0% (76/158)	48.6% (51/105)	37.5% (3/8)
Piperacillin	CLSI基準値情報なし			
Meropenem	100% (72/72)	94.3% (149/158)	95.2% (100/105)	75% (6/8)
Cefotaxim	100% (72/72)	99.3% (157/158)	99.0% (104/105)	100% (8/8)
Ceftriaxone	100% (72/72)	100% (158/158)	100% (105/105)	100% (8/8)

図1、対象9県の小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来 *Haemophilus influenzae* 株における荚膜 b 型株(Hib)、他の荚膜型株*、Non-typable *H. influenzae* の検出割合の年次推移

(*対象9県における分離例なし)

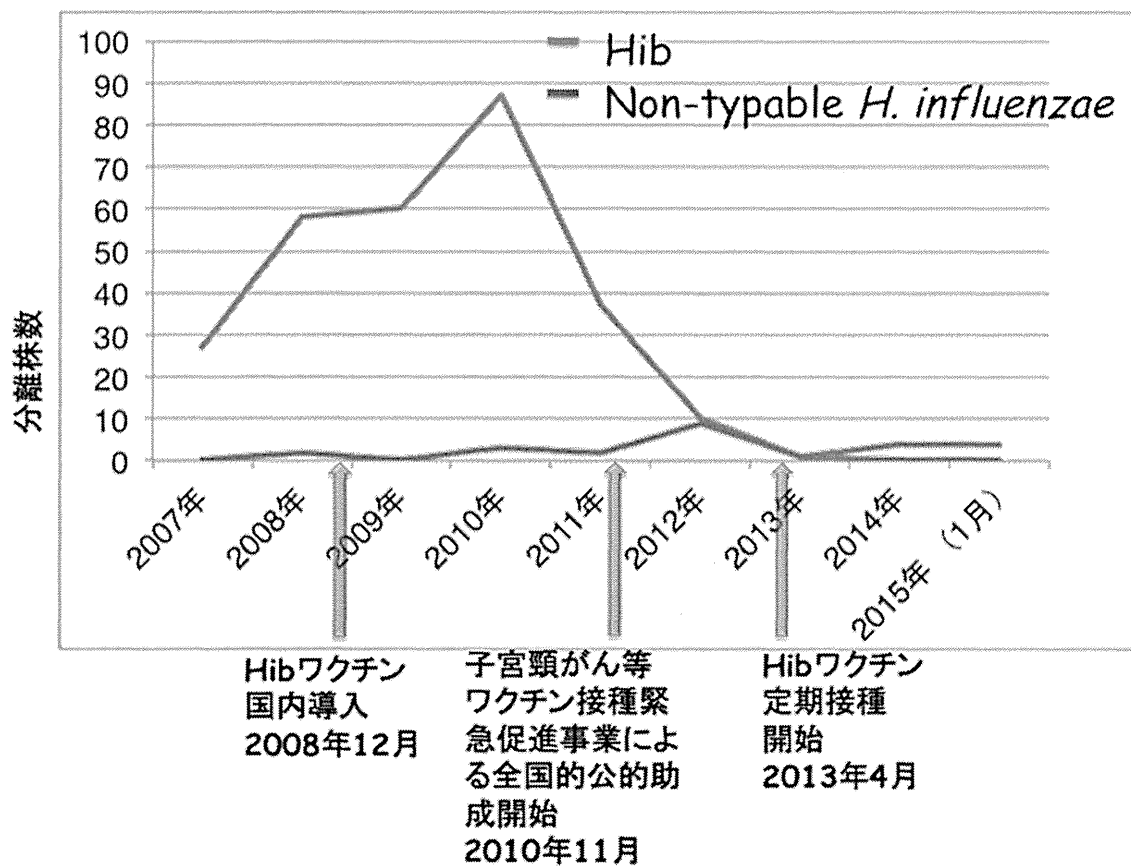
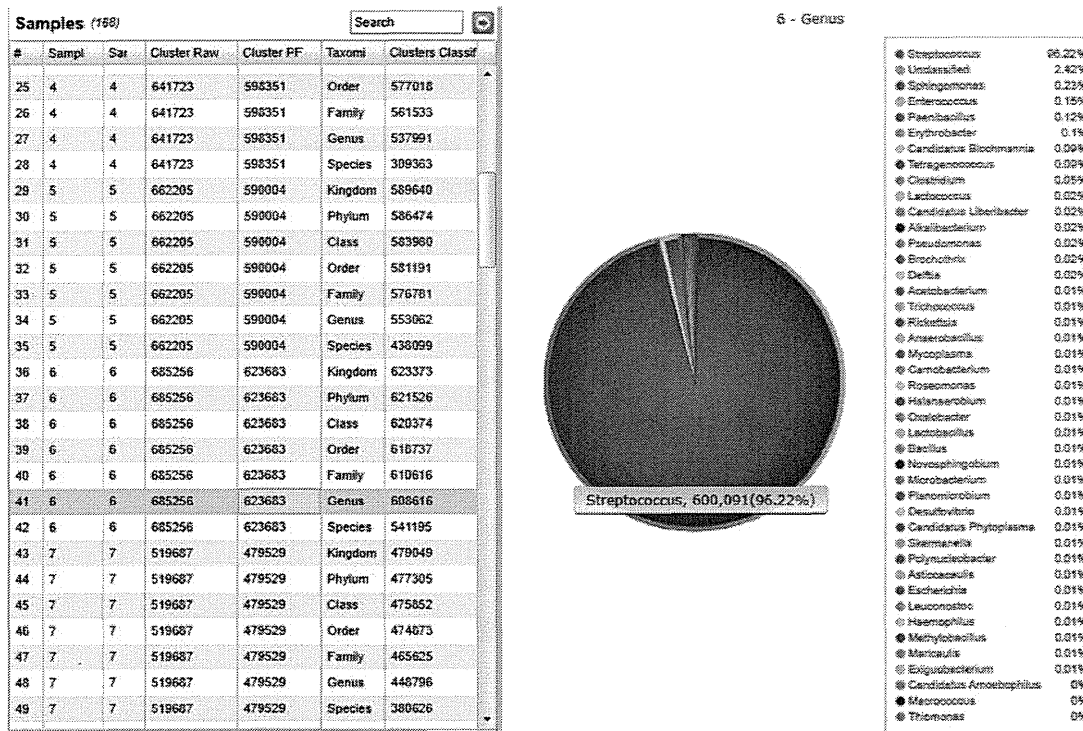
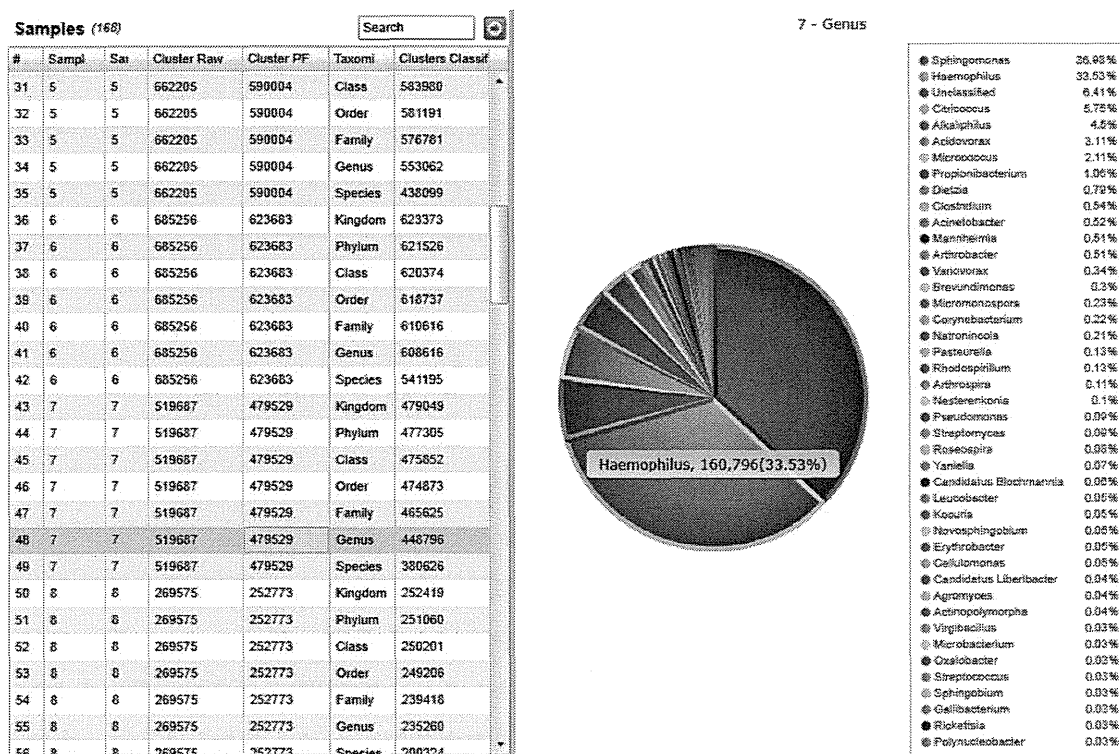


図2、細菌性髄膜炎疑い症例の細菌培養陰性髄液中の細菌遺伝子の網羅的解析の結果例

A. *Streptococcus*属細菌と相同性が高いreadが96%を占める髄液検体(三重県)



B. *Haemophilus*属細菌と相同性が高いreadが33%を占める髄液検体(鹿児島県)



H26 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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

分担研究報告書

小児における侵襲性肺炎球菌感染症患者の
肺炎球菌コンジュゲートワクチン接種前後の血清免疫学的研究

研究分担者 大石和徳 国立感染症研究所 感染症疫学センター
研究協力者 明田幸宏 大阪大学微生物病研究所
常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨： PCV13 導入に伴い、PCV13 の血清型に対する ELISA IgG, OPA の測定の体制を構築し、2014 年に依頼のあった小児の侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) 6 例と菌血症を伴わない反復肺炎患者の血清中血清型特異的 IgG 濃度及びオプソニン活性を解析した。PCV7 の 4 回接種後に発症した 19F による vaccine failure 例を経験した。発症 2 ヶ月後の血清中 OPA は 19F のみならず他の 4, 18C などの血清型でも opsonophagocytic assay (OPA) titer は低値であったことから、宿主要因の関与が示唆される。また、本症例では菌血症発症後に PCV13 接種が試みられたが、原因血清型である 19F に対する OPA の増加は認められなかった。また、今回 PCV13 接種後の breakthrough 感染例についても評価した。PCV13 接種後の 19A による IPD 症例では発症 40 日後の 19A に対する OPA は比較的高かった。また、6A による菌血症を伴わない肺炎例でも、発症時の 6A に対する OPA は感度以下であった。今後も小児 IPD 患者における血清免疫学的検査の継続が必要である。

A. 研究目的

2009 年 10 月に小児における侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) の予防ワクチンとして 7 価コンジュゲートワクチン (PVC7; プレベナー®) が薬事承認され、その後 2010 年 10 月に小児に対する公費助成が開始された。そして 2013 年 4 月からは定期接種化され、2013 年 11 月からは PCV7 が 13 価コンジュゲートワクチン (PCV13) に置きかわった。我々は、これまでに小児 IPD の発症時の感染血清型に対する血清中特異 IgG 濃度とオプソニン活性を測定することで、血清オプソニン活性はすべて低値 (< 4) であるこ

とを報告した (Oishi T, et al. Vaccine 31:845-9, 2013)。さらに我々は、ワクチン血清型による小児 IPD14 例のうち 6 例に感染血清型に特異的な低応答が起こることを報告した (Tamura K, et al. Vaccine 32:1444-50, 2014)。

今回は、小児における PCV13 の接種に伴い、PCV13 血清型による小児 IPD における breakthrough infection、ワクチン不応例に対応する目的で、肺炎球菌に対する血清中特異 IgG 濃度及びオプソニン活性の測定法をこれまでの PCV7 含有血清型から PCV13 含有血清型をカバーできるように、血清型

1, 3, 5, 6A, 7F, 19A の血清型を拡充した。本法を用いて、2009～2013年に引き続き小児の侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) 患者の血清中血清型特異的 IgG 濃度及びオプソニン活性を測定した。

(倫理面への配慮)

対象症例が乳幼児であるため、インフォームド・コンセントは患児の両親あるいは後見人が代諾者として対応するものとした。本臨床研究に関して大阪大学微生物病研究所の倫理委員会の承認を取得した。

B. 研究方法

1. IPD 症例と血清サンプルの収集

本班会議の分担研究者および全国の医療機関の医師が、IPD をはじめとする小児患者の親権者からインフォームドコンセント取得のもとに血清検体を採取し、その症例記録表とともに大阪大学微生物病研究所に冷凍輸送し、 -80°C で保存した。2009年～2013年までに受領した IPD 症例の血清検体につき、抗体測定、オプソニン活性測定とデータ解析を行なった。すべての症例において、血液もしくは髄液から分離された肺炎球菌の血清型の決定は国立感染症研究所細菌第一部において行った。

2. 特異 IgG 抗体濃度測定

乳幼児において PCV7 接種による集団レベルでの侵襲性感染症の予防閾値は、第 2 世代 ELISA で血清中特異 IgG 抗体 $0.35\ \mu\text{g}/\text{ml}$ とされ、これは血清中 OPA titer 8 と相関するとされている (WHO 2005)。そして 22F CPS 阻害による ELISA (第 3 世代 ELISA) では血清中特異 IgG の $0.20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ を感染予防閾値として提案している (Henckaerts I, et al. *Clin*

Vacc Immunol 13:356-60, 2006)。本研究では血清中の 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A 19F, 23F の PCV13 含有血清型に対する莢膜ポリサッカライド (CPS) 特異的 IgG 抗体濃度を 22F CPS 阻害による ELISA (第 3 世代) で測定した。

3. Multiple opsonophagocytic assay (MOPA)

血清中の PCV13 含有血清型と 6C の血清型に対するオプソニン活性を opsonophagocytic assay (OPA) titer として既報に準じて測定した (Burton RL, et al. *Clin Vaccine Immunol* 13:1004-9, 2006)。

C. 研究結果

1. 2014 年に依頼のあった 6 症例の臨床的特徴

血清検体を受領した症例のうち、原因血清型が判明した 6 例につき解析した。男児 2 名、女児 5 名であった。臨床診断は菌血症のみ 3 例、髄膜炎 1 例、菌血症を伴う肺炎 1 例、菌血症を伴わない肺炎 1 例であった。IPD の原因菌の血清型は 19A (n=2), 19F (n=1), 23F (n=1), 19F (n=1) であった。菌血症を伴わない肺炎の原因菌 (吸引痰由来) は 6A (n=1) であった。

2. 特徴的症例の血清中特異 IgG 濃度と OPA titer

1) PCV7 の 4 回接種後の 19F による IPD 例 (vaccine failure) (23 ヶ月、基礎疾患なし)

PCV7 の 4 回接種後に菌血症を発症 (2013 年 12 月)、発症 2 ヶ月後の血清で 19F に対する OPA は 27 と低値であった。その後 2014 年 6

月に PCV13 を追加接種したが接種後の 19F の OPA は<4 であり、感染血清型に対する低応答が確認された。

2) PCV7 の 1 回, PCV13 の 2 回接種後の 19A による IPD 例 (breakthrough infection) (生後 9 ヶ月、基礎疾患なし)

PCV7 の 1 回, PCV13 の 2 回接種後に菌血症を発症した。発症 40 日後の血清中の 19A に対する OPA は 4197 と高値を示した。

3) PCV7 の 2 回, PPSV23 の 1 回接種後の 6A による菌血症を伴う肺炎例 (6 歳 8 ヶ月、基礎疾患：脳性マヒ)

PCV7 の 2 回, PPSV23 の 1 回接種後の肺炎を発症し、吸引痰から 6A の肺炎球菌が分離された。この時、喀痰中にグラム陽性球菌を確認した。この時の血清中の 6A に対する OPA は<4 であったため、PCV13 を接種した。その後の 6A に対する血清中 OPA は 17496 と高値を示した。

D. 考察および結論

PCV7 の 4 回接種後に発症した 19F による菌血症例を経験した。本症例の発症原因は不明であるが、発症 2 ヶ月後の血清中 OPA は 19F のみならず他の 4, 18C などの血清型でも OPA は低値を示した。本症例の宿主要因の関与が示唆される。また、本症例では菌血症発症後に PCV13 接種が試みられたが、原因血清型である 19F に対する OPA の増加は認められなかった。この所見は、これまでの知見 (Tamura K, et al. Vaccine 2014) に矛盾しない。

また、今回 PCV13 接種後のブレイクスルー感染例の評価も可能であった。PCV13 接種後の 19A による IPD 症例では発症 40 日後の

19A に対する OPA は比較的高かった。これまでの成績では発症 1 ヶ月以内の感染血清型に対する血清オプソニン活性はすべて低値 (< 4) である所見 (Oishi T, et al. Vaccine, 2013) とは矛盾するが、本症例では 19A による菌血症の発症から 40 日経過したことで宿主応答としてオプソニン活性の高値が観察された可能性もある。また、6A による菌血症を伴わない肺炎例でも、発症時の 6A に対する OPA は感度以下であった。

E. 健康危険情報
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takahashi Y, Ishiwada N, Hishiki H, Tanaka J, Akeda Y, Shimojo N, Oishi K, Kohno Y. IgG levels against 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in non pneumococcal conjugate vaccine immunized healthy Japanese and intravenous immunoglobulin preparations. J Infect Chemother 20(12):794-8, 2014
2. Oishi K, Tamura K, Akeda Y. Global control of pneumococcal infections by pneumococcal vaccines. Trop Med Health. 42 (2) Suppl 83-86, 2014
3. Namkoong H, Funatsu Y, Oishi K, Akeda Y, Hiraoka R, Takeshita K, Asami T, Yagi K, Kimizuka Y, Ishii M, Tasaka S, Suzuki Y, Iwata S, Betsuyaku T, Hasegawa N. Comparison of the immunogenicity and safety of polysaccharide and protein-conjugated pneumococcal

- vaccines among the elderly aged 80 years or older in Japan: An open-labeled randomized study. *Vaccine* 33(2):327-32, 2015.
4. Piao Z, Akeda Y, Takeuchi D, ^a Ken J, Ishii KJ, Ubukata K, Briles DE, Tomono K, Oishi K. Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine* 32:5607-5613, 2014
 5. Katsura H, Piao Z, Iwatsuki-Horimoto K, Akeda Y, Watanabe S, Horimoto D, Oishi K, Kawaoka Y. A bivalent vaccine based on a replication-incompetent influenza virus protects against *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus infection. *J Virol* 88:13410-7, 2014
 6. Kuroki T, Ishida M, Suzuki M, Furukawa I, Ohya H, Watanabe Y, Konnai M, Aihara Y, Chang B, Ariyoshi K, Oishi K, Ohnishi M, Morimoto K. Outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 pneumonia among extremely elderly people in a nursing home unit in Kanagawa, Japan, 2013. *J Am Geriatr Soc* 62:1197-8, 2014
 7. 高山直秀、崎山弘、大石和徳、岡部信彦、城 青衣、梅本 哲. 麻疹・風疹混合(MR)ワクチン1期および2期接種の全国累積接種率調査. *小児科臨床* 68(3) 391-395, 2015
 8. 高山直秀、崎山弘、大石和徳、岡部信彦、城 青衣、梅本 哲. 全国 BCG, DPT3 種混合ワクチン累積接種率. *小児科臨床* 68(3) 397-401, 2015
 9. 高山直秀、崎山弘、大石和徳、岡部信彦、城 青衣、梅本 哲. 日本脳炎ワクチン第I期1, 2回目および追加接種の全国累積接種率調査: 2013年の調査結果. *日本医師会雑誌*. 142: 2689-2694, 2014
 10. 大石和徳. 高齢者医療と予防ワクチン: 成人の肺炎球菌ワクチンとその現状. *日本内科学会雑誌*103(9) 2247-2251, 2014
 11. 大石和徳. 最近の新興感染症の動向〜 MERS, 鳥インフルエンザA (H7N9). *日本内科学会雑誌*104(1) 114-119, 2015
 12. 大石和徳. 日本のワクチン政策決定プロセス. *最新医学* 69(4) 780-785, 2014
 13. 田村和世、大石和徳. 肺炎球菌ワクチン. *感染症道場*. 3(2) 4-9, 2014
2. 学会発表
 1. Oishi K. Protective properties of the fusion PspA protein vaccine against pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae* with five different clades in mice. A Joint Meeting of IDSA, SHEA, HIVMA, and PIDS. Philadelphia, USA, November 2014.
 2. 福住宗久、大石和徳. シンポジウム10. ワクチン導入による微生物への影響: サーベイランスの意義. 小児結合型肺炎球菌ワクチン導入に伴う小児及び成人における血清型置換. 第63回日本感染症学会総会学術集会 2014年10月31日、東京
 3. 福住宗久、常彬、牧野友彦、西順一郎、丸山貴也、渡邊浩、金城雄樹、砂川富正、大西真、大石和徳. 成人侵襲性肺炎球菌感染症の臨床像と原因血清型分布に関する記述疫学 (2013年) 日本ワ

クチン学会学術集会. 2014年12月7日、福岡

4. 濱口重人、明田幸宏、朝野和典、大石和徳. 「肺炎球菌に対する乳幼児期の血清疫学調査」第88回日本感染症学会学術講演会第62回日本化学療法学会総会合同学会 福岡 2014年6月
5. 田村和世、松原康策、石和田稔彦、西順一郎、常彬、明田幸宏、庵原俊昭、大石和徳. 「日本におけるIPD罹患小児の7価肺炎球菌コンジュゲートワクチンへの免疫応答」第88回日本感染症学会学術講演会第62回日本化学療法学会総会合同学会 福岡 2014年6月

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

H26 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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

「Hib、肺炎球菌、HPV 及びロタウイルスワクチン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」分担研究報告書

ワクチンの意義に関する研究
～ロタウイルスワクチン導入前後の入院および外来患者の疫学調査

研究代表者：庵原俊昭（国立病院機構三重病院）

研究分担者：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、長尾みづほ、菅秀、藤澤隆夫（国立病院機構三重病院）、田中滋己、井戸正流（国立病院機構三重中央医療センター）、伊藤美津江、東川正宗（伊勢赤十字病院）、田中孝明（川崎医科大学）梅本正和（うめもとこどもクリニック）、黒木春郎（外房こどもクリニック）、Francis Dennis（東京医科歯科大学）、伊東宏明、神谷元（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究要旨

ロタウイルス感染症は全世界において乳幼児の重症急性胃腸炎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。

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による乳幼児胃腸炎の後ろ向き（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1,000人当たり年間に4～5人のロタウイルス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。また外来患者に関しては、三重県津市における5歳未満のロタウイルス胃腸炎患者の受診率を調査し、1,000人年あたり306.3人と推計した。

本邦では、2011年11月に1価のロタウイルスワクチンが、2012年7月に5価のワクチンが導入された。本研究はワクチン導入後も調査を継続しており、ロタウイルス胃腸炎患者の入院率や株型、臨床症状を調べている。ワクチン導入前後のロタウイルス胃腸炎の疾病負荷を比較し、ロタウイルスワクチンの効果を評価、検討した。

A. 研究目的

本研究の目的は日本におけるロタウイルスによる乳幼児胃腸炎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 サーベイランスを実施している。本研究班で

は入院率、外来受診率等の報告をこれまで行ってきたが、2011年11月に1価のロタウイルスワクチンが、2012年7月に5価のロタウイルスワクチンが導入されて、ワクチン導入前後の入院率や外来受診率、分離されるウイルスの遺伝子型について比較、検討することが可能になった。今年度はロタウイルスワクチンの効果の評価を中心に研究を実施した。

目的

ワクチン導入前後において、三重県津市と伊勢市における5歳未満の急性胃腸炎による入院率と外来受診患者数の推移（外来受診患者数については津市のみ）を解析する。

B. 研究方法

(1) 本サーベイランスは、三重県津市、伊勢市、千葉県いすみ市における5歳未満小児の急性胃腸炎の疫学調査であり、観察期間は7シーズン（2007/08～2013/14、1シーズンは11月から翌年の10月までとする）。なお、伊勢市に関しては2009/10、2010/11シーズンに関してはデータ欠損のため解析から除外している。

(2) 入院症例の調査：前向き観察研究。参加施設は、津市の小児二次救急医療をカバーする2つの国立病院機構病院（三重病院、三重中央医療センター）とした。なお、津市周辺の入院施設（三重県鈴鹿市、松阪市）にも参加していただき、津市在住の患者が受診した場合報告してもらおう。

(3) 入院症例において、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) 入院症例は、入院時に施設共通の調査票（添付資料）を担当医に記入してもらおう。質問事項は、住所（市のみ）、年齢、性

別、入院時の臨床所見、迅速検査施行の有無と結果、ロタウイルスワクチン接種歴などである。

(5) 入院症例の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ウイルスの遺伝子型を判定した。具体的な方法は、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。

(6) 外来症例の調査：後向き観察研究。参加施設は、2定点医療機関（津市：うめもとこどもクリニック、千葉県いすみ市：外房こどもクリニック）とした。2010/11～2013/14シーズンの間に、定点医療機関を受診し、ロタウイルス胃腸炎と診断された患者数の推移を調査した。

（登録対象患者：入院症例）

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

- ・三重県津市に在住している
- ・生後14日以上5歳未満
- ・2007年11月1日～2014年10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。

評価及び本サーベイランスの意義

上記の方法により、調査対象となる地域の人口をもとにしたロタウイルス胃腸炎の入院率とウイルス遺伝子型を、ワクチン導入前後でどのように推移したのか評価することができる。また入院時の臨床所見も合わせて調査し、ロタウイルス胃腸炎の重症度を評価することができる。

外来患者に関しては、感染性胃腸炎の患者数をもとに、ワクチン導入前後で比較検討する。しかし導入後のデータは、導入直後のため評価は難しいと思われる。

C. 研究結果

1) ワクチン導入前後の入院率の比較 (三重県津市)

ワクチン導入前後の入院率を図1に示す。

ワクチン導入前(2007/08~2011/12)の入院率は1,000人・年あたり4.2であった。ワクチン導入後の入院率は、2011/12が3.0、2012/13が3.5、2013/14が0.8であった。年齢別の入院割合をみると、図2に示すように、ワクチン導入後では1歳未満、1歳児の入院割合が明らかに減少していた(統計学的に有意差あり)。

2) ワクチン導入前後の入院率の比較 (三重県伊勢市)

ワクチン導入前後の入院率を図3に示す。ワクチン導入前(2007/08~2008/09)の入院率は1,000人・年あたり2.9であった。ワクチン導入後の入院率は、2011/12が1.9、2012/13が4.3、2013/14が0.2であった。年齢別の入院割合をみると、図4に示すように、ワクチン導入後では3歳未満の入院割合が減少していた(統計学的に有意差なし)。

3) ワクチン導入前後の外来における感染性胃腸炎の患者数 (三重県津市)

定点医療機関を受診した感染性胃腸炎の症例数を図5に示した。ワクチン導入前のシーズンと比較し、ロタウイルス胃腸炎と診断された患者数は減少している。ロタウイルス胃腸炎の流行がピークとなる3~5月と、それ以外6月~翌年2月で、調査期間を区切り年齢別の平均報告数を見ると、流行期の2歳以下で減少率が高かった(図6)。

4) ワクチン導入前後の外来における感染性胃腸炎の患者数 (千葉県いすみ市)

定点医療機関を受診した感染性胃腸炎の症例数を調査した。いすみ市は、2013年4月よりロタウイルスワクチンの全額公費助成を開始した。そのため、定点医療機関を受診し、ロタウイルス胃腸炎と診断されたものを在住地(いすみ市内在住とそれ以外)に分けて検討した。5歳未満児ロタウイルス胃腸炎患者数を図7に示す。毎年ほぼ同数のロタウイルス胃腸炎患者の報告があっ

たが、ワクチンが全額公費助成となった翌年のシーズンでは市内の方が患者数が少なくなった。さらに、ワクチン接種機会があった2歳未満を比較するとその差はさらに著明となった(図8)。

D. 考察

本年度は、ワクチン導入前後の入院率、外来における感染性胃腸炎の患者数を中心に調査した。

ワクチン導入後3年が経過し、次第にワクチン接種率が上昇しており、各地でロタウイルス胃腸炎患者数の減少が認められた。三重県津市では2014年度1歳半検診にてワクチン接種率を調査した。その結果、RV1とRV5を合わせた1回目の接種率は56.5%、2回目は54.9%であった。伊勢市では、実施率のみ情報として収集できたが、2012年35%であった実施率はその後、68%(2013年)、80%(2014年)と順調に上昇していた。また、千葉県いすみ市は2013年度の規定回数分のワクチン接種率(2013年度の公費情報によって規定回数のロタウイルスワクチンを接種した人数/2013年10月1日時点のいすみ市内の乳児人口)が82.2%であった。いずれの地域もワクチン接種率(あるいは実施率)が上昇するにつれ、ロタウイルス胃腸炎患者数の減少を認めている。ただし、流行の規模がシーズンによって異なるため、ワクチン導入後に入院率が低下したとは、現時点ではいえない。しかし、年齢別の入院割合、あるいは外来患者数の報告をみると、ワクチン接種機会が与えられた2歳以下の患者の割合が明らかに減少していた。三重県津市での入院率は4.2/1000人・年から0.8/1000人・年へと81%の減少を認め、これは年間40人のロタウイルス胃腸炎患者の入院が予防されたことになる。この値を全国の5歳未満の患者に用いると年間で17,813人の5歳未満の小児のロタウイルス胃腸炎入院患者がワクチ

ンによって予防されたことになる。

外来では、2定点からの感染性胃腸炎の報告数をみると、ワクチン導入後の患者数は減少しており、特にワクチンの接種率が高くなりだした1歳以下の小児の減少幅が大きい。外来症例は必ずしも便検体が受診時に確保できず、ロタウイルス感染症患者を全員捉えられているわけではないので正確な減少率は不明であるが、今回の2定点のデータにより患者数の減少はワクチンの効果であること(特にいすみ市のデータ)が強く示唆された。

ワクチンが広く普及しつつあり、今後は乳幼児においてロタウイルス胃腸炎の入院および外来患者が減少してゆくことが予想される。

E. 今後の計画

本研究で継続点していくことは、①入院および外来患者数の把握(疾病負荷)、②ワクチン導入前後のウイルス遺伝子型の変化、などである。課題としては、①ワクチン接種率を調査すること、②ワクチン未接種者への間接効果の評価、③費用対効果の調査(退院時アンケート)をまとめること、である。また、重症症例があれば、その情報(ウイルス血症、頻度、など)を収集する。

F. 研究発表

1) 学会発表

- 1) 神谷元、ワクチンの必要性和課題
第117回日本小児科学会シンポジウム14
2014年4月愛知県名古屋市
- 2) 田中孝明、中野貴司、神谷元、伊東宏明、浅田和豊、長尾みづほ、菅秀、伊藤美津江、井戸正流、梅本正和、尾内一信、谷口孝喜、庵原俊昭. ワクチン導入期前後におけるロタウイルスの遺伝子型推移. 第46回日本小児感染症学会. 2014年10月. 東京都
- 3) 浅田和豊、菅秀、長尾みづほ、藤澤隆夫、

田中滋己, 井戸正流, 梅本正和, 田中孝明, 伊東宏明, 庵原俊昭, 神谷元, 谷口孝喜, 中野貴司. ワクチン導入前後のロタウイルス胃腸炎の疫学調査. 第46回日本小児感染症学会. 2014年10月. 東京都

4) 神谷元, Control and prevention of pediatric viral enteritis: Significance of epidemiological study of rotavirus acute gastroenteritis: 第62回日本ウイルス学会学術集会シンポジウム5 2014年11月 神奈川県横浜市

5) 伊東宏明, 黒木春郎, 神谷元, 中野貴司, 庵原俊昭: 千葉県いすみ市におけるロタウイルスワクチン公費助成後のロタウイルス胃腸炎患者数の推移. 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年12月. 福岡県福岡市

2) 論文発表

1) 神谷元, 河野有希, 伊東宏明, 庵原俊昭, 神谷齊, 浅田和豊, 菅秀, 木下麻衣子, 藤澤隆夫, 長尾みづほ, 根来麻奈美, 谷口清州, 中野貴司, 田中孝明, 油井晶子, 谷口孝喜, 梅本正和, 黒木春郎, Francis Dennis, 井上正和, 東川正宗, 伊藤美津江, 神谷敏也, 井戸正流, 田中滋己. ロタウイルス胃腸炎サーベイランス～エビデンスに基づいたワクチンの導入と評価を目指して～病原微生物検出情報 (月報) Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 35 巻 3 号

(No.409) 71-73 2014

2) 中野貴司. ワクチンの定期接種化日本医

事新報 No.472025-30. 2014

3) 中野貴司. ワクチンで予防できる病気とワクチン接種小児看護 38 巻 3 号 278-282 2015

4) 浅田和豊. ロタウイルスワクチンは、どうして生後早い時期に接種するのですか? ワクチンジャーナル Vol.2, No.137. 2014 発行. 中山書店, 東京.

5) 神谷元. ワクチンの必要性と課題～ロタウイルスワクチン～臨床とウイルス 42 巻 4 号 2014

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, Jackie Tate, Cathherine Yen (Division of Viral Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Center for Disease Control and Prevention, USA)、感染性胃腸炎患者の便検体収集にあたり多大なご協力をいただいている各施設の協力者の皆様方、データの管理をいただいている国立病院機構三重病院長尾みづほ先生、藤澤隆夫先生、根来麻奈美様 (臨床検査部)、研究全体についての事務管理等を行っていただいている国立病院機構三重病院木下麻衣子様 (名誉院長秘書) に深謝申し上げます。