

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：11301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2020
課題番号：17K16885
研究課題名(和文) 13価肺炎球菌ワクチン導入後に小児急性中耳炎から分離した肺炎球菌の分子疫学的解析

研究課題名(英文) Molecular epidemiological analysis of Streptococcus pneumoniae in middle ear fluid isolates on acute otitis media in children after thirteen-valent pneumococcal conjugate vaccine introduction

研究代表者
小澤 大樹(OZAWA, DAIKI)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：80792267
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の13価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV13)導入後の菌交代現象の解明のため、2017年3月から2018年2月までの小児急性中耳炎の中耳貯留液から検出された肺炎球菌44株の血清型と薬剤感受性検査を解析した。血清型は15A(15.9%)が最多で、次いで23B(11.4%)であった。7価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV7)でカバーされる血清型は0%で、PCV13でカバーされる血清型は9.1%であった。血清型15Aはすべての株がペニシリン非感性株だった。ペニシリン耐性率の高い血清型15Aが多く認められたことは、小児難治性急性中耳炎の病態の一因として留意しなければならないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
肺炎球菌は急性中耳炎の代表的な原因菌である。13価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV13)は導入後にPCV13が効果を示さない血清型の肺炎球菌が増加する菌交代現象が問題となる。本研究によりPCV13では効果がなく、なおかつペニシリン非感性の血清型15Aが増加していることがわかり、今後の小児急性中耳炎の難治化の原因になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We surveyed the serotypes and antimicrobial susceptibility profile of 44 S. pneumoniae isolates obtained from the middle ear fluid of children with acute otitis media from March 2017 to February 2018, in order to research serotype replacement after the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) introduction in Japan. The most prevalent serotypes found were serotype 15A (15.9%), and serotype 23B (11.4%). 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) types accounted for 0% of all strains, while 9.1% were PCV13 types. Serotype 15A strains were 100% non-susceptible to penicillin G. Finally, the high prevalence of non-susceptible serotype 15A highlights the serotype 15A should be noted as a cause of intractable acute otitis media in children.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：急性中耳炎 肺炎球菌 血清型 薬剤感受性 13価肺炎球菌ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は急性中耳炎の代表的な原因菌のひとつで、2012年の日本感染症学会・日本化学療法学会・日本臨床微生物学会の3学会合同抗菌薬感受性サーベイランス事業では急性中耳炎からの肺炎球菌の検出頻度は29.2%で、全検出菌の中で最も検出頻度が高い菌であった(日本耳鼻咽喉科感染症・エアロゾル学会誌 2015;3:5-19.)。

結合型肺炎球菌ワクチン(pneumococcal conjugate vaccine; PCV)は高いワクチン効果が期待される反面、導入後徐々にワクチンではカバーできない血清型が増加してくる菌交代現象が起こることが知られている(J Infect Dis. 2007;196:1346-54.)。そのため、7価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV7)に新たに6種類の血清型(1, 3, 5, 6A, 7F, 19A)を追加して計13種類の血清型をカバーすることができる13価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV13)が開発され、本邦では2013年11月にPCV7からPCV13への切り替えが行われた。

本研究に先行して我々が行った研究では2013年4月から9月(PCV7導入後かつPCV13導入前)に収集した3歳未満の小児急性中耳炎由来の肺炎球菌176株の解析を行い、本邦の小児急性中耳炎においてPCV7導入後の菌交代現象がおきていることを初めて明らかにし、報告した(Pediatr Infect Dis J. 2015;34:e217-21.)。先行研究においてはPCV7でカバーされる血清型は4.5%に減少しており、PCV7ではカバーされない血清型19A(48株:27.3%)、15A(25株:14.2%)、3(21株:11.9%)の割合が高くなっていることが示されている。

2. 研究の目的

本研究はPCV13導入後の小児急性中耳炎由来の肺炎球菌の細菌学的・分子疫学的特徴を解析し、PCV13導入後の菌交代現象の影響を明らかにし、本邦のワクチン行政や次世代肺炎球菌ワクチン開発、小児急性中耳炎診療ガイドライン策定に関わる知見を得ることを目的として行われた。

3. 研究の方法

(1)対象菌株

2017年3月から2018年2月までの1年間に、東北労災病院耳鼻咽喉科を受診し、急性中耳炎と診断された小児の中耳貯留液検体から分離された肺炎球菌44株を対象とした。同一患者からの菌株に関しては初回分離株のみを対象とし、重複例は除外した。

(2)血清型の判定

分離した44株の肺炎球菌は、各々の血清型の莢膜抗原に対して特異的な免疫血清であるNeufeld antisera (Statens Serum Institut、コペンハーゲン、デンマーク)を用いた莢膜膨化反応により血清型分類を行った。

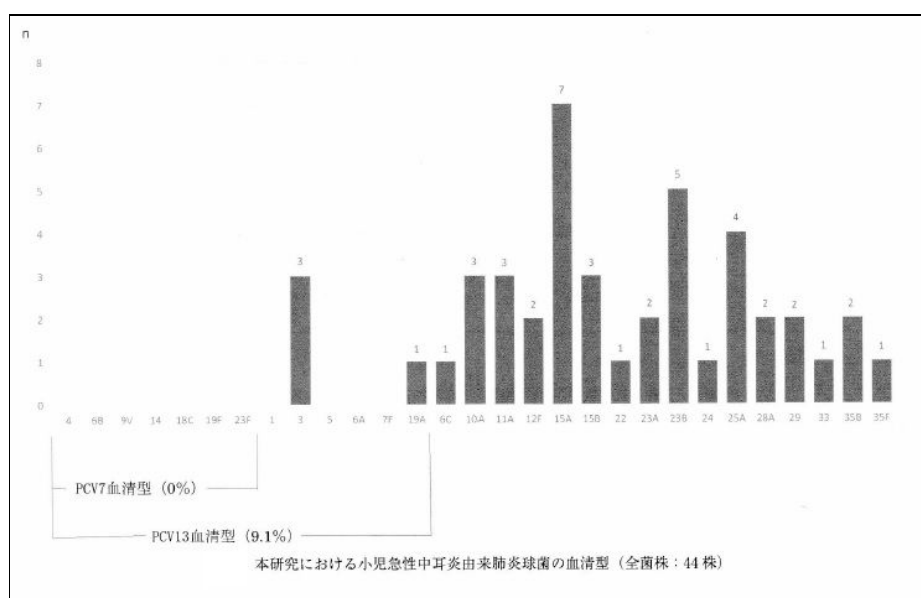
(3)薬剤感受性試験

米国臨床検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute : CLSI) に準拠の微量液体希釈法 (オプトパネル MP、極東製薬工業) により、最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentrations : MIC) を測定した。測定した抗菌薬は、penicillinG (PCG)、ampicillin (ABPC)、ampicillin/sulbactam (ABPC/SBT)、amoxicillin/clavulanic acid (AMPC/CVA)、ceftriaxone (CTRX)、cefditoren (CDTR)、panipenem (PAPM)、meropenem (MEPM)、clindamycin (CLDM)、erythromycin (EM)、levofloxacin (LVFX) の 11 種類とした。ペニシリン系薬剤に関しては 2008 年以前の CLSI 推奨ブレイクポイントに基づいて分類を行い、PCG の MIC をもとに 0.06 $\mu\text{g/mL}$ をペニシリン感受性肺炎球菌 (penicillin-susceptible *S. pneumoniae* : PSSP)、0.125 ~ 1 $\mu\text{g/mL}$ をペニシリン中等度耐性肺炎球菌 (penicillin-intermediate *S. pneumoniae* : PISP)、2 $\mu\text{g/mL}$ をペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *S. pneumoniae* : PRSP) に分類した。その他の抗菌薬は、CLSI M100-S26 のブレイクポイントに基づき分類を行った。また、精度管理菌株として *S. pneumoniae* ATCC49619 を用いた。

4. 研究成果

(1) 結果

血清型の解析において全 44 株の中で最も多くみられたのは、血清型 15A で 7 株 (15.9%) であった。次いで血清型 23B が 5 株 (11.4%)、血清型 25A が 4 株 (9.1%)、血清型 3・15B・10A・11A がいずれも 3 株 (6.8%) と続いた。PCV7 でカバーされる血清型は 44 株中 0 株で、PCV13 でカバーされる血清型は 4 株 (9.1%) であった。PCV7 でも PCV13 でもカバーされない血清型 (非ワクチンタイプ) は 40 株 (90.9%) であった。



年齢別に血清型を解析すると、最も多く検出された血清型 15A は 2 歳未満 (0 歳、1 歳) であった。次に多く検出された血清型 23B は 1 歳と 2 歳でみられた。また PCV13 でカバー

される血清型は 4 株検出され、その中で血清型 3 は全例 3 歳以上で 3 株が検出され、血清型 19A は 0 歳で 1 株のみ検出された。

血清型	全年齢 (n=44)	(%)	0 歳 (n=14)	(%)	1 歳 (n=16)	(%)	2 歳 (n=6)	(%)	3 歳以上 (n=8)	(%)
15A	7	(15.9)	3	(21.4)	4	(25.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
23B	5	(11.4)	0	(0.0)	3	(18.8)	2	(33.3)	0	(0.0)
25A	4	(9.1)	2	(14.3)	0	(0.0)	2	(33.3)	0	(0.0)
3	3	(6.8)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	3	(37.5)
15B	3	(6.8)	0	(0.0)	3	(18.8)	0	(0.0)	0	(0.0)
10A	3	(6.8)	1	(7.1)	0	(0.0)	0	(0.0)	2	(25.0)
11A	3	(6.8)	1	(7.1)	1	(6.3)	0	(0.0)	1	(12.5)
23A	2	(4.6)	1	(7.1)	1	(6.3)	0	(0.0)	0	(0.0)
12F	2	(4.6)	0	(0.0)	2	(12.5)	0	(0.0)	0	(0.0)
28A	2	(4.6)	1	(7.1)	0	(0.0)	1	(16.7)	0	(0.0)
29	2	(4.6)	1	(7.1)	0	(0.0)	1	(16.7)	0	(0.0)
35B	2	(4.6)	2	(14.3)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
6C	1	(2.3)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(12.5)
19A	1	(2.3)	1	(7.1)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
22	1	(2.3)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(12.5)
24	1	(2.3)	1	(7.1)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
33	1	(2.3)	0	(0.0)	1	(6.3)	0	(0.0)	0	(0.0)
35F	1	(2.3)	0	(0.0)	1	(6.3)	0	(0.0)	0	(0.0)

薬剤感受性試験では PCG の薬剤感受性測定結果から、全 44 菌株中 PSSP は 17 株 (38.6%)、PISP は 18 株 (40.9%)、PRSP は 9 株 (20.5%) であった。PCG の MIC50 は 0.12 μg/mL、MIC90 は 2 μg/mL であった。感性の割合が高かった薬剤は、AMPC/CVA (100%)、CTRX (100%)、LVFX (97.7%) で、一方 EM (18.2%) では高率に耐性を示した。

抗菌薬	MIC 分布範囲 (μg/mL)	MIC ₅₀ (μg/mL)	MIC ₉₀ (μg/mL)	S	(%)	I	(%)	R	(%)
PCG	≤0.016-2	0.12	2	17	(38.6)	18	(40.9)	9	(20.5)
ABPC	≤0.06-4	0.12	4	—	—	—	—	—	—
ABPC/SBT	≤0.06-0.03-4/2	0.12/0.06	4/2	—	—	—	—	—	—
AMPC/CVA	≤0.12-2	≤0.12	2	44	(100.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
CTRX	≤0.03-0.5	0.25	0.5	44	(100.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
CDTR	≤0.016-0.5	0.12	0.25	—	—	—	—	—	—
PAPM	≤0.008-0.25	≤0.008	0.12	—	—	—	—	—	—
MEPM	≤0.008-0.5	0.016	0.5	34	(77.3)	10	(22.7)	0	(0.0)
CLDM	≤0.12 >16	≤0.12	>16	26	(59.1)	1	(2.3)	17	(38.6)
EM	≤0.06 >8	2	>8	8	(18.2)	6	(13.6)	30	(68.2)
LVFX	≤0.12 >8	1	2	43	(97.7)	0	(0.0)	1	(2.3)

各血清型を PCG の感受性に基づき解析すると、最も多く検出された血清型 15A は、PSSP が 0%、PISP が 14.3%、PRSP が 85.7% で、すべての株がペニシリン非感性株であった。次に多く検出された血清型 23B は、PSSP が 80%、PISP が 20% であった。また PCV13 でカバーされる血清型のうち、血清型 3、血清型 19A とともにすべての株が PSSP であった。

血清型	菌株数	PSSP (%)	PISP (%)	PRSP (%)
15A	7	0 (0.0)	1 (14.3)	6 (85.7)
23B	5	4 (80.0)	1 (20.0)	0 (0.0)
25A	4	1 (25.0)	3 (75.0)	0 (0.0)
3	3	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
15B	3	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0.0)
10A	3	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (0.0)
11A	3	1 (33.3)	2 (66.7)	0 (0.0)
23A	2	0 (0.0)	2 (100.0)	0 (0.0)
12F	2	1 (50.0)	1 (50.0)	0 (0.0)
28A	2	0 (0.0)	2 (100.0)	0 (0.0)
29	2	0 (0.0)	1 (50.0)	1 (50.0)
35B	2	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (100.0)
6C	1	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
19A	1	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
22	1	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
24	1	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)
33	1	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
35F	1	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

血清型 15A の薬剤感受性について解析した結果、血清型 15A で非感性株の割合が高かった薬剤は PCG (100%)、MEPM (85.7%)、CLDM (85.7%)、EM (100%) で、すべての血清型 15A の菌株が 3 系統以上の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性肺炎球菌であった。

本研究における血清型 15A 肺炎球菌 7 株の薬剤感受性						
抗菌薬	S	(%)	I	(%)	R	(%)
PCG	0	(0.0)	1	(14.3)	6	(85.7)
ABPC	—	—	—	—	—	—
ABPC/SBT	—	—	—	—	—	—
AMPC/CVA	7	(100.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
CTRX	7	(100.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
CDTR	—	—	—	—	—	—
PAPM	—	—	—	—	—	—
MEPM	1	(14.3)	6	(85.7)	0	(0.0)
CLDM	1	(14.3)	1	(14.3)	5	(71.4)
EM	0	(0.0)	0	(0.0)	7	(100.0)
LVFX	6	(85.7)	0	(0.0)	1	(14.3)

(2) 考察

小児急性中耳炎は近年、新規小児用経口抗菌薬の開発、PCV の普及などにより、臨床像が大きく変化してきている(耳鼻臨床 108: 177-186.)。

PCV の影響として、米国では IPD の発現率が大きく減少することや、集団免疫効果でワクチン非接種群に接種群と同様の効果が表れることが報告されている(N. Engl. J. Med. 354: 1455-1463.)。PCV7 から PCV13 へとワクチンが変遷し普及していく一方で、ワクチン接種後の変化としてワクチンに含まれないタイプの肺炎球菌の増加が報告されている(Emerg. Infect. Dis. 20: 1132-1139.)。

本研究では、PCV13 導入後の調査を行い、最も多かった血清型は 15A (15.9%) で、次いで 23B (11.4%)、25A (9.1%) であった。PCV7 のカバー率は 0% で、PCV13 カバー率は 9.1% であった。PCV7 のカバー率の更なる減少および PCV13 カバー率の減少は PCV7 の菌交代現象に続き、PCV13 による菌交代現象が発生していることが考えられた。

肺炎球菌の薬剤感受性は、PCV 導入後に PCG への感受性が良好となる傾向が報告されている(J. Infect. Chemother. 20: 702-708.)。しかし、今回の我々の研究では、PSSP38.6%、PISP40.9%、PRSP20.5% と再びペニシリン感受性が耐性側へシフトしている傾向がみられた。これは非 PCV13 タイプの血清型である、血清型 15A の割合が高くなったことが要因の一つと推察される

本研究では 2 歳未満 (0 歳児 3 名、1 歳児 4 名) で多剤耐性肺炎球菌の血清型 15A が検出されていた。急性中耳炎は 2 歳未満で難治化しやすいとされており(Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 7: 39-49.)、2 歳未満で血清型 15A が検出された本研究の結果は難治性急性中耳炎の病態の一因として血清型 15A が関与する可能性を示唆していると考えられた。

(3) 結論

本研究では、PCV13 でカバーされていない血清型が 90% を超えて検出され、PCV13 による菌交代現象が進んでいるものと推測された。2 歳未満でのペニシリン非感性肺炎球菌血清型 15A による急性中耳炎の増加は、難治性中耳炎の増加となる可能性を示唆しており、今後さらに継続的な調査が重要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 高島且統、真崎純子、小澤大樹	4. 巻 31
2. 論文標題 小児急性中耳炎より分離された肺炎球菌のワクチン導入後における血清型と薬剤感受性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高島 且統 (Takashima Katsunori)		
研究協力者	真崎 純子 (Masaki Junko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------