

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591476

研究課題名(和文) ヒブワクチン効果に影響するインフルエンザ菌莢膜遺伝子重複の細菌学的・疫学的研究

研究課題名(英文) Bacteriological and epidemiological study of multiple amplification of capsulation locus in Haemophilus influenzae type b (Hib).

研究代表者

徳田 浩一 (TOKUDA, KOICHI)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・准教授

研究者番号：10518400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性感染症(髄膜炎や菌血症)の小児由来のインフルエンザ菌b型(Hib)を対象に、ワクチン不全と関連するcapb遺伝子の重複を調査した。以前の研究で、ヒブワクチン導入前後に遺伝子重複の増加(前9.5%、後23.1%)を認めたと、患者が激減し調査困難となった。一方、無莢膜型インフルエンザ菌(NTHi)の侵襲性感染症が漸増し、血液・髄液、呼吸器由来NTHi66株のバイオフィルム形成能やNTHi付着遺伝子を調査した。バイオフィルム形成能は侵襲性感染症由来株で高かったが、有意差はなかった。NTHi付着遺伝子については、線毛遺伝子と付着タンパク質遺伝子hiaの頻度が呼吸器由来株で有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：We studied multiple amplification of the capsulation (capb) locus which may influence vaccine efficacy for Haemophilus influenzae type b (Hib) using the strains detected in the patients of invasive Haemophilus influenzae disease (IHD). Our study from 2004 to 2011 revealed increasing trend in the locus amplification prevalence rate (pre-Hib vaccine era, 9.5%; post-vaccine era, 23.1%). Although we conducted the follow-up researches, it is impossible to continue our study because of the dramatic decrease of IHD after introducing Hib vaccine program in 2008. On the other hand, the invasive infection caused by nontypable Haemophilus influenza (NTHi) have being increasing. We studied 66 strain of NTHi for biofilm formation by a quantitative biofilm assay and for adhesion genes a biofilm-related gene by PCR. Variabilities among isolates were observed in their ability to form biofilms and detection rate of adhesion genes.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：インフルエンザ菌b型 ワクチン不全 capb遺伝子の重複 無莢膜型インフルエンザ菌 バイオフィルム
形成能 付着遺伝子

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチンの導入により髄膜炎が激減した西欧諸国では、近年 vaccine failure (ワクチン不全) が報告されている。2008 年より鹿児島県で開始した vaccine failure に関与する Hib 遺伝子の解析により、鹿児島県における本要因の増加傾向が判明した。

2. 研究の目的

小児細菌性髄膜炎の全数把握が続けられている鹿児島県でより詳細なデータを集積し、ワクチン導入前後の vaccine failure 要因の変遷を把握するとともに、国内の他地域における傾向についても調査研究し、日本および世界的に有用なワクチン計画への提言を実施する。

- (1) 侵襲性インフルエンザ菌感染症 (IHD) 患者の髄液や血液由来 Hib 株の *capB* 領域多様性について、パルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) やサザンブロッティングにより調査し、ワクチン導入前後の変遷を評価する。
- (2) 無莢膜型インフルエンザ菌 (NTHi) による侵襲性感染症が近年増加傾向にあり、NTHi について細菌学および疫学的に調査し、病原性の違い (バイオフィーム形成能と付着遺伝子の多様性) を明らかにする。
- (3) 上記結果と患者情報 (年齢、ワクチン接種歴など) の総合的解析から vaccine failure 関連要因 (リスク) を評価し、vaccine failure を発生しにくいワクチン計画を検討する。

3. 研究の方法

(1) Hib 株の *capB* 領域多様性

他大学病院や全国に細菌検査センターを有する検査関連企業などに依頼して、全国の医療機関から集められた侵襲性感染症由来 Hib 株を譲り受け、*capB* 領域の多様性を調査し、患者の疫学的情報 (年齢、性別、予防接種歴など) と合せて vaccine failure 関連要因を検討する。

菌 DNA を制限酵素 *KpnI* と *SmaI* で処理した後、パルスフィールド・ゲル電気泳動法 (PFGE 法) により遺伝子型別を行う。DIG 標識 *capB* 遺伝子プローブでサザンブロッティング法を実施し、検出バンドのサイズにより *capB* 領域のコピー数を調べる。

(2) NTHi の病原性 (バイオフィーム形成能と付着遺伝子の多様性)

biofilm 形成能 (マイクロタイタープレート法) は、過去の報告 (Murphy TF, et al. BMC Microbiol. 2:7, 2002) を参考にしたが、一部以下のように変更して実施した。

BHI 液体培地で一晚培養した菌液 5 μ l を各ウェル 200 μ l に加える。培養後の 96 穴マイクロタイタープレートを洗浄し、その後各ウェルに 0.5% クリスタルバイオレット液を加え 5 分間染色。その後、再

度洗浄後 95% エタノールを 200 μ l 加え攪拌して OD595 を測定した。実験は 1 検体につき triplicate で行い、同実験を 3 回実施し、平均 OD 値を biofilm 形成能とした。

付着遺伝子 (*hmw*, *hia*, *hap*, *hifA*) や線毛遺伝子 (*fimbrial gene*) をはじめとした病原遺伝子については過去の論文 (西順一郎、蘭牟田直子、徳田浩一ら . 日本小児呼吸器疾患学会雑誌 17(2), 143-150, 2006) を参考にプライマーを設定し PCR 検査を実施した。

4. 研究成果

- (1) 平成 21 ~ 23 年度の我々の研究で、鹿児島県内で発生した IHD 患者由来株を対象に *capB* 遺伝子重複を調査したところ、ワクチン導入前後で増加傾向 (2008 年以前 9.5%、2009 年以降 23.1%) を認めたことから、ワクチン不全の患者発生が強く懸念され、国内外に向けて学会や論文で報告した。その後、さらに Hib 株を収集して調査を進めていく計画であったが、ヒブワクチン導入後、Hib 髄膜炎が全国的に激減し、菌株収集が困難となった。全国的にワクチン不全の報告も認めず、研究の継続が不可能となった。
- (2) Hib による侵襲性感染症が激減した一方、NTHi による侵襲性感染症が漸増している。侵襲性感染症由来 NTHi 31 株、呼吸器由来 NTHi 31 株のバイオフィーム形成能や NTHi 付着遺伝子の分布を検討した (4 株は検体種類不明)。平均 biofilm 形成能は侵襲性感染症由来株は 0.521、呼吸器由来株が 0.341 と侵襲性感染症由来株で高かったが、有意差はなかった (Mann-Whitney 検定、 $p=0.118$) (図 1)。

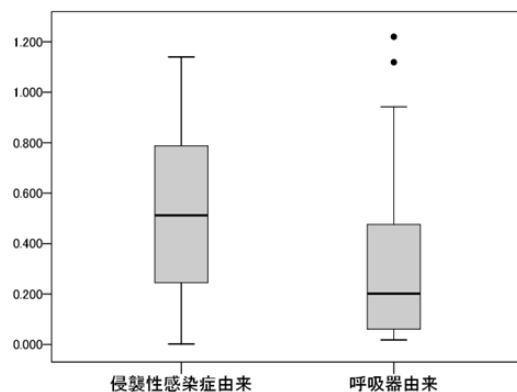


図 1 biofilm 形成能

侵襲性由来株 31 株のうち biofilm 形成能が 0.5 以上の株は 14 株 (45.2%) みられ、呼吸器由来株の 6 株 (19.3%) に比べその頻度は有意に高かった (Fischer Exact test, $p=0.029$)。侵襲性由来株 31 株のうち biofilm 形成能が 0.2 以上の株は 22 株

(71.0%)みられ、呼吸器由来株の15株(48.4%)に比べてその頻度は高かったが、有意差はみられなかった(Fischer Exact test, $p=0.07$)。

NTHiの付着遺伝子の保有状況は、遺伝子ごとに大きな差が見られた(図2)。線毛遺伝子と付着タンパク質遺伝子 *hla* の頻度は、侵襲性感染症由来株よりも呼吸器感染症由来株で有意に高かった(それぞれ $p=0.043$, $p=0.05$)が、*hmw* と *hap*, *hifA* に差はみられなかった(図3)。

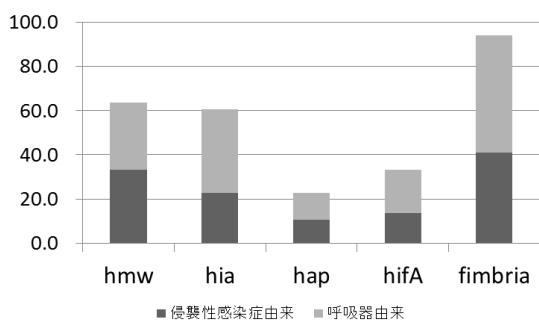


図2 NTHiの付着遺伝子の保有状況

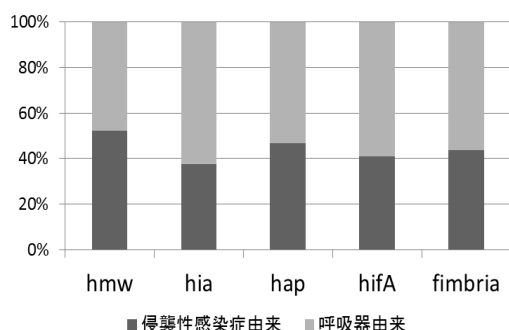


図3 病態別にみた付着遺伝子別検出状況

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

- (1) Kawamura H, Matsumoto K, Shigemi A, Orita M, Nakagawa A, Nozima S, Tominaga H, Setoguchi T, Komiya S, Tokuda K, Nishi J. A bundle that includes active surveillance, contact precaution for carriers, and cefazolin-based antimicrobial prophylaxis prevents methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in clean orthopedic surgery. *Am J Infect Control*. 査読有、2016 Feb;44(2):210-4.
- (2) Kawamura H, Tokuda K, Imuta N, Kubota

T, Koriyama T, Miyanochara H, Hashiguchi T, Kawano Y, Nishi J. Epidemiological Analysis of Nosocomial MRSA Outbreaks Using Phage Open-Reading Frame Typing in a Tertiary-care Hospital. *Jpn J Infect Dis*. 査読有、2016 Jan 8. [Epub ahead of print]

- (3) Suga S, Chang B, Asada K, Akeda H, Nishi J, Okada K, Wakiguchi H, Maeda A, Oda M, Ishiwada N, Saitoh A, Oishi T, Hosoya M, Togashi T, Oishi K, Ihara T. Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in Japanese children: Effects of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine*. 査読有、2015 Nov 9;33:6054-60.
- (4) Inomata S, Yano H, Tokuda K, Kanamori H, Endo S, Ishizawa C, Ogawa M, Ichimura S, Shimojima M, Kakuta R, Ozawa D, Aoyagi T, Gu Y, Hatta M, Oshima K, Nakashima K, Kaku M. Microbiological and molecular epidemiological analyses of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care hospital in Japan. *J Infect Chemother*. 査読有、2015 Oct;21(10):729-36.
- (5) Tokuda K, Kunishima H, Gu Y, Endo S, Hatta M, Kanamori H, Aoyagi T, Ishibashi N, Inomata S, Yano H, Kitagawa M, Kaku M. A survey conducted immediately after the 2011 Great East Japan Earthquake: evaluation of infectious risks associated with sanitary conditions in evacuation centers. *J Infect Chemother*. 査読有、2014 Aug;20(8):498-501.
- (6) Matsumoto K, Kanazawa N, Shigemi A, Ikawa K, Morikawa N, Koriyama T, Orita M, Kawamura H, Tokuda K, Nishi J, Takeda Y. Factors affecting treatment and recurrence of *Clostridium difficile* infections. *Biol Pharm Bull*. 査読有、2014;37(11):1811-5.
- (7) Kanamori H, Tokuda K, Ikeda S, Endo S, Ishizawa C, Hirai Y, Takahashi M, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Yano H, Weber DJ, Kaku M. Prevacination antibody screening and immunization program for healthcare personnel against measles, mumps, rubella, and varicella in a Japanese tertiary care hospital. 査読有、*Tohoku J Exp Med*. 2014;234(2):111-6.

[学会発表](計2件)

- (1) Koichi Tokuda, Yuichiro Yahata, Tomimasa Sunagawa. Secondary Household Transmission Associated with Shiga

toxin-producing *Escherichia coli*
Outbreaks in Japan. IDWeek 2015. 7-11
Oct. 2015, San Diego, USA.

- (2) Koichi Tokuda, Ayako Tanouchi, Mitsuo
Kaku. Age-specific clinical features of
norovirus gastroenteritis associated
with foodborne outbreaks in elder-care
facilities. IDWeek 2015. 7-11 Oct. 2015,
San Diego, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 微生物学分野

http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~bacterio/archive_earticle.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳田 浩一 (TOKUDA KOICHI)

鹿児島大学・医歯学域医学部歯学部附属病院・准教授

研究者番号： 1 0 5 1 8 4 0 0

(2) 研究分担者

西 順一郎 (NISHI JUNICHIRO)

鹿児島大学・医歯学域医学部・教授

研究者番号： 4 0 2 9 5 2 4 1

(3) 連携研究者

蘭牟田 直子 (IMUTA NAOKO)

鹿児島大学・医歯学域医学部・助教

研究者番号： 0 0 6 4 3 4 7 0