

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462546

研究課題名(和文)肺炎球菌ワクチン導入後の小児急性中耳炎由来肺炎球菌の質量分析による細菌学的解析

研究課題名(英文) Microbiological analysis of Streptococcus pneumoniae in middle ear fluid isolates on acute otitis media in Japanese children after seven-valent pneumococcal conjugate vaccine.

研究代表者

沖津 尚弘(okitsu, naohiro)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：20375059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：7価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV7)の小児急性中耳炎に対する本邦での影響を評価すべく2013年4月から2013年10月までの間に0-3歳児の急性中耳炎児の中耳貯留液から分離された176株の肺炎球菌の解析を行った。その結果、PCV7による菌交代現象で血清型19A、15A、3が増加しており、特に次世代の13価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV13)でもカバーできない15A型多剤耐性肺炎球菌が増加していることを明らかとした。また、multilocus sequence typingで1株を除く血清型15Aの肺炎球菌が同じクローナルコンプレックス63に属する遺伝的近縁性の高い菌株であることを解明した。

研究成果の概要(英文)：We surveyed the serotypes and antimicrobial susceptibility profile of 176 *S. pneumoniae* isolates obtained from the middle ear fluid of Japanese children with AOM between April and September 2013, aim to evaluate the impact of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7). Serotype 19A, 15A and 3 showed a high frequency and we revealed the serotype replacement of PCV7. Serotype 15A is not included in second-generation vaccine (13-valent pneumococcal conjugate vaccine), and all isolates of serotype 15A in this study showed multi-drug resistance. Furthermore, by multilocus sequence typing, we revealed all serotype 15A isolates except one was included in clonal complex 63 and was genetically close.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：7価結合型肺炎球菌ワクチン 急性中耳炎 血清型 薬剤感受性 質量分析

### 1. 研究開始当初の背景

急性中耳炎は生後1歳までに75%の小児が罹患するとされ、小児における発熱の原因として常に念頭に置いておかななくてはならない疾患である (Pediatr Infect Dis J. 17:1105-13,1998)。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。

本邦では7つの血清型の肺炎球菌に対するワクチンとしてPCV7が2010年に認可され、小児に接種されてきた。現在、厚生労働科学研究事業研究班の主導による全国調査で小児の侵襲性肺炎球菌感染症 (=肺炎球菌による髄膜炎・菌血症) がPCV7導入以後、著明に減少していることが報告されている (IASR 33:71-72,2012)。

一方で急性中耳炎においては小児急性中耳炎ガイドライン 2013年度版で本邦のPCV7の血清型カバー率を62.9% (薬剤耐性肺炎球菌の78.0%) とし、予防効果は34.4~62.5% (薬剤耐性肺炎球菌に対する予防効果は39.8~49.1%) が期待されると示しているが、本邦の急性中耳炎においてPCV7導入以後の肺炎球菌の細菌学的特徴に主眼をおいた全国的な調査はまだ行われていないのが現状である。

また、現在、培養微生物検体を質量分析 (Time Of Flight Mass Spectrometry; TOFMS) で解析し、微生物を構成するタンパクのマススペクトルのパターンをデータベースと照合することで微生物の同定を行う技術が確立されている (Anal Bioanal Chem 400: 1905-11,2011)。この技術は従来の微生物検体の培養検査とくらべて約24時間早く微生物の同定を行うことができることから、臨床検査の現場で急速に普及している。しかし、現段階では微生物の薬剤感受性に関しては質量分析での解析法は確立していないため、細菌同定後に従来法での薬剤感受性の測定が行われているため、菌種の決定後から薬剤感受性の決定までは従来通り1-2日程度の時間を要するのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究ではPCV7認可後の全国の小児の中耳貯留液・耳漏から分離された肺炎球菌に関して、薬剤感受性、血清型などの細菌学的特徴や Multilocus Sequence Typing (MLST) による遺伝的近縁性の解明を第1の目的としている。

さらに本研究では、現在まだ確立されていないTOFMSによる質量分析での肺炎球菌の薬剤感受性などの細菌学的特徴の解析法を新たに構築していくことを第2の目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

国内全域から3歳以下の急性中耳炎の中耳貯留液または耳漏より分離された肺炎球菌176株を収集し、解析対象とした。菌株の収集期間はPCV7が小児で定期接種されていた2013年4月~2013年10月とした。

#### (2) 方法

##### 薬剤感受性試験

米国臨床検査標準協会 (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) により定められた微量液体希釈法によって抗菌薬の最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentrations; MIC) を測定した。測定にはペニシリンG、アンピシリン、セフトリアキソン、セフトロレン、メロペネム、テビペネム、レボフロキサシン、トスフロキサシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、クリンダマイシン、スルファメトキサゾール・トリメトプリム、バンコマイシンの13種類の抗菌薬を用いた。

対象とした全菌株の薬剤感受性はCLSI推奨のブレイクポイントに基づいて感性 (susceptible; S)、中等度耐性 (intermediate; I)、耐性 (resistant; R) に分類した。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おこない、ペニシリンGのMICをもとにペニシリン感性肺炎球菌 (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*; PSSP)、ペニシリン中等度耐性肺炎球菌 (penicillin-intermediate *S. pneumoniae*; PISP)、ペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *S. pneumoniae*; PRSP) に分類した。また、セフトロレン、テビペネム、トスフロキサシンについてはCLSI推奨のブレイクポイントが定められていないためブレイクポイントによる分類は行わなかった。

##### 血清群 / 血清型の解析

各々の血清群 / 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 社、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群 / 血清型分類を行った。

##### MLST による sequence type (ST) と clonal complex (CC) の解析

血清型15Aの25株について、MLSTによる遺伝的近縁性の解析を行った。肺炎球菌の7種類のハウスキーピング遺伝子 (aroE, gdh, gki, recP, spi, xpt, ddl) についてPCR法によるDNAの増幅を行った。

得られたPCR産物の塩基配列をMLSTウェブサイト (<http://spneumoniae.mlst.net>) のデータベースで照合し、各ハウスキーピング遺伝子のアレル番号を決定し、アレル番号の組み合わせからSTを決定した。決定したSTはMLSTウェブサイト内のeBURST v3 (<http://eburst.mlst.net/>) を用いて解析し、遺伝

の近縁性を示す集合群である CC に分類した。

### TOFMS による質量分析

肺炎球菌をペニシリン感受性に従ってグループ分けし、島津製作所製の質量分析装置 AXIMA を用いて TOFMS による肺炎球菌の質量分析を行い、各々の菌株グループ内での同源性、菌株グループ間での相違性を比較検討した。TOFMS のマトリックスには微生物同定に用いられる  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシクイ皮酸(CHCA)を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

全 176 株中ペニシリン感性肺炎球菌は 45.5%、ペニシリン中等度耐性肺炎球菌は 42.6%、ペニシリン耐性肺炎球菌は 11.9% の内訳であった。

#### 結果: 薬剤感受性試験(全菌株)

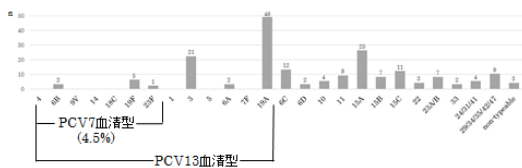
薬剤名	MIC分布範囲 (mg/L)	MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)	S %	I %	R %
ペニシリンG	≤0.03-4	0.125	2	45.5	42.6	11.9
アンピシリン	≤0.03-8	0.25	2	42.0	35.8	22.2
セフトリアキソン	≤0.06-8	0.25	1	95.4	2.3	2.3
セフトレム	≤0.06-8	0.25	1	-*	-	-
メロベネム	≤0.03-2	≤0.03	0.25	90.9	8.0	1.1
テビベネム	≤0.03-0.25	≤0.03	0.06	-*	-	-
レボフロキサシ	≤0.125-2	1	1	100	0.0	0.0
トスフロキサシ	≤0.125-0.5	≤0.125	0.25	-*	-	-
テトラサイクリン	≤0.5-16	>16	>16	8.0	6.2	85.8
エリスロマイシン	≤0.125-8	>8	>8	7.4	5.1	87.5
クラリシマイシン	≤0.125-8	>8	>8	23.3	2.3	74.4
スルファホキサソール トリホプリム	≤0.12-2.38- >4.76	1/19	2/38	44.3	45.3	7.4
バンコマイシン	≤0.5	≤0.5	≤0.5	100	-	-

MIC: 最小発育阻止濃度、S: 感性、I: 中等度耐性、R: 耐性  
(S、I、RはCLSIが定めるMICによるブレイクポイント分類)

\*セフトレム、テビベネム、トスフロキサシはブレイクポイント分類なし

最も多くみられた血清型は 19A(27.3%)で、15A(14.2%)、3(11.9%)と続いた。PCV7 でカバーされる血清型は 4.5%で、PCV13 でカバーされる菌株は 44.9%だった。

#### 結果: 血清群/血清型の解析



PCV7: 7価結合型肺炎球菌ワクチン、PCV13: 13価結合型肺炎球菌ワクチン

血清型 15A はすべての菌株がペニシリン非感性株かつ多剤耐性肺炎球菌であった。

#### 結果: 血清型15A(25株)の薬剤感受性(25株)

薬剤名	MIC分布範囲 (mg/L)	MIC <sub>50</sub> (mg/L)	MIC <sub>90</sub> (mg/L)	S %	I %	R %
ペニシリンG	0.125-2	1	2	0.0	72.0	28.0
アンピシリン	0.06-4	2	4	4.0	44.0	52.0
セフトリアキソン	≤0.06-4	0.5	2	88.0	8.0	4.0
セフトレム	≤0.06-4	0.25	1	-*	-	-
メロベネム	≤0.03-0.5	0.25	0.25	92.0	8.0	0.0
テビベネム	≤0.03-0.06	0.06	0.06	-*	-	-
レボフロキサシ	0.5-1	1	1	100	0.0	0.0
トスフロキサシ	≤0.125-0.25	≤0.125	0.25	-*	-	-
テトラサイクリン	8-16	>16	>16	0.0	0.0	100
エリスロマイシン	0.5-8	>8	>8	0.0	4.0	96.0
クラリシマイシン	≤0.125-8	>8	>8	4.0	8.0	88.0
スルファホキサソール トリホプリム	90.5/9.5- >2/38	1/19	1/19	4.0	96.0	0.0
バンコマイシン	≤0.5	≤0.5	≤0.5	100	-	-

MIC: 最小発育阻止濃度、S: 感性、I: 中等度耐性、R: 耐性  
(S、I、RはCLSIが定めるMICによるブレイクポイント分類)

\*セフトレム、テビベネム、トスフロキサシはブレイクポイント分類なし

また、血清型 15A の比率は2歳未満で多く、2歳以降で減少する傾向が見られた。

#### 結果: 年齢別の血清群/血清型(全菌株)

血清群/血清型	全年齢(%)	0歳(%)	1歳(%)	2歳(%)	3歳(%)
19A	27.3	37.5	23.2	30.0	23.8
15A	14.2	12.5	17.9	10.0	4.8
3	11.9	7.5	6.3	20.0	38.1
6C	6.8	0.0	9.5	15.0	0.0
15C	6.3	2.5	8.4	0.0	9.5
29/34/35/42/47	5.1	5.0	5.3	5.0	4.8
11	4.5	5.0	5.3	0.0	4.8
15B	4.0	5.0	4.2	5.0	0.0
23A/B	4.0	0.0	7.4	0.0	0.0
19F	2.8	7.5	2.1	0.0	0.0
10	2.3	2.5	1.1	5.0	4.8
24/31/41	2.3	0.0	3.2	5.0	0.0
22	1.7	2.5	1.1	5.0	0.0
non-typeable	1.7	2.5	2.1	0.0	0.0
6A	1.1	2.5	1.1	0.0	0.0
6B	1.1	2.5	0.0	0.0	4.8
6D	1.1	0.0	1.1	0.0	4.8
33	1.1	5.0	0.0	0.0	0.0
23F	0.6	0.0	1.1	0.0	0.0

血清型 15A の菌株の MLST 解析では ST63 が 84.0%を占め、新型 ST の 1 株を除く全株が ST63 を中心とした CC63 に属する ST であった。

#### 結果: 血清型15AのMLST解析(25株)

株番号	ST	ハウスケーピング遺伝子のアレル番号								CC	地域
		actB	gdh	gki	recP	spiI	spiR	tdiI	*		
5	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
8	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
14	7874	2	5	389	12	17	21	14	63	中国地方	
15	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
30	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
60	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
62	63	2	5	36	12	17	21	14	63	九州地方	
65	9646	6	5	36	12	17	21	14	63	北海道・東北地方	
72	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
76	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
79	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
86	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
87	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
95	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
98	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
104	9094	2	5	36	12	17	520	14	63	中国地方	
111	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
114	63	2	5	36	12	17	21	14	63	九州地方	
120	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
132	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
134	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
137	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
158	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
165	63	2	5	36	12	17	21	14	63	中国地方	
175	63	2	5	36	12	17	21	14	63	九州地方	

MLST: multilocus sequence typing、ST: シーケンスタイプ、CC: クロニカルコンプレックス

\*新型の遺伝子型なし

質量分析による解析では薬剤感受性ごとにグループ分けを行った肺炎球菌のマススペクトルの対比を行ったが、グループ間での有意なマススペクトルの相違を示すことはできなかった。

### (2) 考察

本邦における PCV7 導入前の報告では 2007 年に神谷らが小児急性中耳炎から検出された肺炎球菌の PCV7 カバー率は 62.7%であったことを報告している(感染症学雑誌 81: 59-66, 2007.)。本研究における PCV7 のカバー率は 4.5%で神谷らの報告と比較して減少していることがわかった。このことは PCV7 導入後の菌交代現象が本邦の小児急性中耳炎においても発生している可能性を示唆すると考えられた。

小児急性中耳炎における PCV7 導入後の肺炎球菌の血清型の変化に関しては、本邦に先行して PCV7 を導入した国でいくつかの報告がされており、そのいずれもが PCV7 導入後には血清型 19A が最も多くみられるようになることを報告している(Pediatr Infect Dis J. 29: 304-9, 2010. Pediatr Infect Dis J. 32: e128-33, 2013. Diagn Microbiol Infect Dis. 68: 89-92, 2010. Pediatr Infect Dis J. 30: 551-5, 2011.)。本研究においても最も多かったのは血清型 19A であったが、血清型 19A に次いで血清型 15A が多かったことは本邦特有の傾向であった。

また、本研究で血清型 15A の多剤耐性肺炎球菌が 2 歳以降よりも 2 歳未満に多く見られたことは、2 歳未満でなりやすいとされる難治性急性中耳炎の病態の一因として留意すべき事柄かもしれない。

MLST 解析結果から、本邦における小児急性中耳炎症例の中耳貯留液から分離される血清型 15A の菌株は遺伝的近縁性の高い菌株であることがわかった。ST63 を中心とした CC63 に属する ST は多剤耐性肺炎球菌にみられる ST として知られており、本研究において新型の ST を除く血清型 15A の全例が CC63 に属し、かつ多剤耐性肺炎球菌であったことは、過去の報告を裏付けるとともに CC63 と多剤耐性肺炎球菌の関連性を示唆する結果であった (Emerg Infect Dis 20: 1848-56, 2014. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27: 929-35, 2008. J Antimicrob Chemother 70: 1960-4, 2015. J Infect Dis 182: 1153-60, 2000. J Infect Dis 201: 770-5, 2010.) 血清型 15A は PCV13 でもカバーされないため PCV13 導入後には血清型 15A の比率が高くなっていく可能性がある。血清型 15A の増加は難治性急性中耳炎の増加の要因となりうるため、今後の血清型 15A の動向には注意が必要である。

### (3) 結論

本研究では本邦における PCV7 導入後の 3 歳以下の小児急性中耳炎症例の中耳貯留液から分離された肺炎球菌の血清型および薬剤感受性を解析し、血清型 15A の菌株には MLST による解析を行った。PCV7 導入前は小児急性中耳炎から検出された肺炎球菌の PCV7 カバー率は 62.7% であったことが報告されているが、本研究では PCV7 でカバーされる血清型の肺炎球菌は全菌株の 4.5% と少なく、本邦の小児急性中耳炎においても PCV7 による菌交代現象が起きている可能性が示唆された。

さらに本研究では血清型 15A の占める割合が 2 歳以降よりも 2 歳未満のほうが高いこと、血清型 15A はペニシリン非感受性かつ多剤耐性肺炎球菌で新型 ST の 1 株を除いて CC63 に属する遺伝的近縁性の高い ST であることがわかった。急性中耳炎は 2 歳未満で難治化しやすいとされ、本研究の結果は 2 歳未満の難治性急性中耳炎の病態の一因として留意すべき事柄と考えられた。また、血清型 15A は PCV13 でもカバーされないため PCV13 導入後には血清型 15A の割合が高くなっていく可能性がある。血清型 15A の増加は難治性急性中耳炎の増加の要因となりうるため、今後も血清型 15A の動向に注意しながら継続的な血清型の調査が必要であると考えられた。

### 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 2 件)

Ozawa D, Yano H, Endo S, Hidaka H, Kakuta R, Okitsu N, Kanamori H, Ogawa M, Ichimura S, Shimojima M, Inomata S, Kaku M, and Katori Y. : Impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on acute otitis media in Japanese children: Emergence of serotype 15A multi-drug resistant Streptococcus pneumoniae in middle ear fluid isolates. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34:e217-21. DOI:10.1016/j.jiac.2014.07.014. 査読有

Ozawa D, Yano H, Hidaka H, Kakuta R, Komatsu M, Endo S, Kanamori H, Kaku M, Katori Y. : Twelve-year survey (2001-2012) of the antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae isolates from otorhinolaryngology clinics in Miyagi Prefecture, Japan. *J Infect Chemother*.2014;20(11):702-8. DOI:10.1097/INF.0000000000000776. 査読有

[学会発表](計 3 件)

小澤大樹、矢野寿一、日高浩史、沖津尚弘、角田梨紗子、香取幸夫、7 価結合型肺炎球菌ワクチン導入後に本邦の小児急性中耳炎症例から分離された肺炎球菌の分子疫学的解析、第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2016 年 5 月 18-21 日(名古屋国際会議場・名古屋市)

小澤大樹、矢野寿一、遠藤史郎、角田梨紗子、猪股真也、鈴木由希、斎藤恭一、藤川祐子、馬場啓聡、賀来満夫、7 価結合型肺炎球菌ワクチン導入後に本邦の小児急性中耳炎症例から分離された肺炎球菌の分子疫学的解析、第 90 回日本感染症学会、2016 年 4 月 15-16 日(仙台国際センター・仙台市)

小澤大樹、矢野寿一、角田梨紗子、金森肇、遠藤史郎、青柳哲史、八田益充、具芳明、徳田浩一、賀来満夫、宮城県の耳鼻咽喉科から分離された肺炎球菌における薬剤感受性の解析：2001 年から 2012 年までの 12 年間の推移、第 88 回日本感染症学会、2014 年 6 月 18 - 20 日(ヒルトン福岡シーホーク・福岡市)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

沖津 尚弘 (Okitsu, Naohiro)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：20375059

#### (2) 研究分担者

矢野 寿一 (Yano, Hisakazu)

奈良県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20374944

日高 浩史 (Hidaka, Hiroshi)

東北大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：40302103