

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893212

研究課題名(和文)新規遺伝学的手法による肺炎球菌の血清型および薬剤耐性の分子疫学的解析

研究課題名(英文)Molecular epidemiological analysis of Streptococcus pneumoniae for serotype distribution and drug resistance with the use of novel genetic methods

研究代表者

川口谷 充代(Kawaguchiya, Mitsuyo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70733062

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文):PCV7およびPCV13定期接種期間に分離された非侵襲性肺炎球菌2057株を研究対象とし、以前解析したPCV7任意接種期間のデータを加えて血清型とマクロライド耐性遺伝子の変化を調査した。加えて、非PCV13血清型薬剤株の薬剤感受性を測定した。結果、小児由来株ではPCV7含有血清型の減少に伴い、非PCV13血清型が有意に増加し、15A,15C,23Aの多くがerm(B)を保有していた。薬剤感受性試験では、42.0%が多剤耐性を示した。血清型15Aは全て多剤耐性、ペニシリン非感受性株(PRSP又はPISP)で、全PRSP-15AはST63に属し、北海道におけるこのクローンの出現が明らかとなった。

研究成果の概要(英文):Changes in serotypes and its relationship to macrolide resistance genes were investigated for 2057 noninvasive isolates of *S. pneumoniae* during the PCV7- and PCV13-routine immunization periods and compare it with previous data of the PCV7 voluntary immunization period. In addition, susceptibility to antibiotics was tested for the isolates with non-PCV13 serotypes. As a result, PCV7 serotypes decreased among children, while the rates of non-PCV13 serotypes increased significantly, and serotypes 15A, 15C, and 23A mostly harbored erm(B). In the antimicrobial susceptibility testing, 42.0% of the non-PCV13 serotypes isolates showed multidrug resistance (MDR). All the serotype 15A isolates were MDR and non-susceptible to penicillin (PRSP or PISP), and all the PRSP-15A isolates were classified into ST63, indicating the emergence of the clone in Hokkaido.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺炎球菌 分子疫学 血清型 薬剤耐性 ワクチン サーベイランス 予防医学

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)は臨床最重要な病原菌の一つであり、特に小児および成人における市中肺炎の第一位の起因菌である。肺炎球菌は、小児において致命的となる髄膜炎、敗血症等の侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD: invasive pneumococcal diseases) を引き起こすほか、中耳炎等の非侵襲性感染の原因にもなる。肺炎球菌は、莢膜多糖体の抗原性により、95 種類以上の血清型 (莢膜型) に分類される。肺炎球菌ワクチンには、2 歳未満の小児に使用される結合型ワクチン (PCV7、切り替え後は PCV13) と成人用の 23 価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン (PPSV23) があり、PCV13 は 2014 年に成人に対しても適応拡大されている。

PCV7 は、IPD の原因となる代表的な七つの血清型 (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) を含有している。米国においては、PCV7 が 2000 年に承認され翌年に定期接種となり、その後 2010 年に PCV7 でカバーされずに増加しつつある 19A を含めた PCV13 (PCV7 + 血清型 1, 3, 5, 6A, 7F, 19A) に切り替えられている。わが国における PCV の導入は、欧米よりも 10 年遅れて 2010 年 2 月に PCV7 が任意接種として導入され、2013 年 4 月に定期接種に移行し、11 月に PCV13 に切り替えられた。

欧米における PCV7 導入後の調査報告によると、小児だけではなくワクチンを接種していない成人における罹患率も減少しており、ワクチンの集団免疫効果が確認されている (Hammit et al., J infect Dis., 2006)。しかしながら、PCV7 導入後の問題点として、血清型の急速な変化が起きていることが、欧米を中心に数多く報告されている。また、PCV7 および PCV13 をすでに導入している海外諸国の報告によると、PCV7、13 に含まれていない血清型の増加及びその薬剤耐性が問題となっている。さらに近年、特に  $\beta$ -ラクタムやマクロライド系抗菌薬に対する耐性化が国内外で問題となっており、各血清型における薬剤耐性の状況を明らかにし、それら増加しつつある菌株の遺伝学的系統を解明することは重要である。

我々は、PCV7 任意接種期間 (2011 年 1 月 -12 月) に北海道内各地の医療機関から分離収集された非侵襲性肺炎球菌分離株 1061 株 (小児由来 998 株、成人由来 63 株) を研究対象とし、血清型の分布および薬剤感受性を調査した。この研究における PCV7 のカバー率は 47.5%、PCV13 のカバー率は 60.3% と低く、また殆どの株 (96.3%) がエリスロマイシン耐性であった。PCV7/PCV13 は IPD の予防が目的であるが、非侵襲性感染の起因菌や定着株の血清型や薬剤耐性は、IPD 起因菌株とよく関連し、その特徴を反映しており、非侵襲性感染起因菌の調査も有意義であると考えられている。欧米の報告では、PCV7 導入後は、そのカバー率が 10% 以下にまで減少し、PCV7 でカバーできない血清型の急激な上昇

およびその血清型における薬剤耐性が問題となっている。現在日本においても、PCV7/PCV13 の定期接種導入に伴い、ワクチン導入が先行している欧米と同様の変化が進行中であると考えられ、それゆえ血清型および薬剤耐性のサーベイランスは日本においても重要である。

2. 研究の目的

小児・老人において重要な肺炎球菌感染症のうち、主要な血清型の菌株による感染はワクチンによる予防が可能である。わが国では 2013 年より肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7、後に PCV13) の定期接種が始まったばかりであり、肺炎球菌の血清型・薬剤耐性の動向を把握することはワクチンの有効を予測する上で重要である。本研究の第一の目的は、肺炎球菌の血清型を同定する新規遺伝学的方法を確立し、それを用いて PCV7 任意接種導入期間・PCV7 定期接種期間・PCV13 定期接種期間の 3 つの期間における血清型の変化を明らかにすることである。第二にマクロライド薬剤耐性遺伝子 [*erm(B)*, *mef(A/E)*] の分布状況を血清型別に解析し、耐性菌の遺伝学的系統を解明することである。第三に増加しつつある血清型の薬剤耐性状況およびその遺伝学的系統を MLST 解析によって明らかにすることである。

研究成果はワクチン導入による肺炎球菌の血清型・薬剤耐性の変化の状況や日本における流行菌株の特徴を明らかにし、ワクチンに基づく肺炎球菌感染症対策に寄与するものであると考えられる。

3. 研究の方法

研究協力機関である札幌臨床検査センターにおいて、PCV7 (2013 年 4 月 -10 月) と PCV13 定期接種期間 (2013 年 11 月 -2014 年 11 月) に北海道内各地の医療機関の外来患者から分離収集された非侵襲性肺炎球菌 2057 株を研究対象とし、我々が以前解析した PCV7 任意接種期間 (2011 年) の分離株 1061 株を加え、全 3118 株の莢膜血清型とマクロライド耐性遺伝子の推移を小児・成人由来別に SPSS を用いて統計解析を行い、比較検討した。

各期間において解析した数を小児・成人由来別に以下の表に示す。

期間	小児	成人	合計
PCV7任意接種期間	998株	61株	1061株
PCV7定期接種期間	975株	122株	1097株
PCV13定期接種期間	873株	87株	960株

まず、多くの検体の血清型を簡便に決定するために、最初に、新規遺伝学的手法による血清型の判別方法の開発を試みた。血清型の判別には、従来の連続多重 PCR に、頻度が高いと考えられる血清型をより早い段階が判別できるよう改良を加え、さらにこの方法で判別ができない血清型 6 亜型 (6A/B/C/D) に

対しては、我々が考案した mutagenic PCR と PCR-RFLP で亜型を判別した。しかし、新規血清型 6E が 2013 年に報告され、その鑑別も必要となったため、多重 PCR 法による新規検出法を考案した。この血清型鑑別法を用いて全被検菌株の血清型を判別し、さらにマクロライド耐性遺伝子 [*erm*(B), *mef*(A/E)] を多重 PCR で検出した。

また、PCV7/13 の導入により、非 PCV13 血清型の増加およびその薬剤耐性が懸念されているため、得られた結果より、2014 年 7 ~ 11 月に小児外来患者から分離された非侵襲性肺炎球菌 293 株のうち非 PCV13 血清型 231 株 (78.8%) を研究対象とし、全株に対して微量液体希釈法による 18 種の薬剤感受性試験 (Dry Plate 栄研) を行った。この薬剤感受性試験の結果から、ペニシリン非感受性株を頻度の高い各血清型から選択し、MLST 解析を行った。

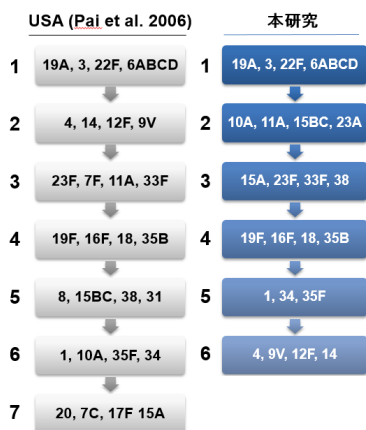
#### 4. 研究成果

##### (1) 新規遺伝学的手法による肺炎球菌血清型の判別

###### 連続多重 PCR 法の改変

2011 年の解析では 2006 年に米国の Pai et al. (J Clin Microbiol. 2006) らが報告した連続多重 PCR 法を用いて血清型の判別を行ったが、本研究では、ワクチン導入によって増加が予想される血清型を早い段階で決定できるよう、各 PCR 反応における血清型の組み合わせを以下のように改変した。

図 1. 連続多重 PCR 法の改変



これにより、本研究では、反応 1- 2 で 75%、反応 3 までに約 90% の血清型を迅速に判別することを可能にした。

###### 新規血清型 6E の検出法

新規血清型 6E に対しては、多重 PCR 法による新規検出法を考案し、報告を行った (Kawaguchiya et al., Microb Drug Resist. 2015)。以下の図 2 は、6E 検出の PCR ために考案したプライマーの配置で、図 3 は、その PCR 産物の電気泳動写真である。*wzd* 遺伝子 (6A/6B 特異的) と *wzh* 遺伝子 (6E 特異的) の配列から

プライマーを作成し、多重 PCR で判別した (写真 a)。さらに、6E 特異的遺伝子である *wze* (写真 b) と 6E の *wciN* 遺伝子と *wciO* 遺伝子の間に存在する 300bp の IS (挿入配列) の検出も行なった (写真 c)。この方法により、2011 年に分離され、解析した 6A から 6E を 4.2% (1/45)、6B からは 6E を 77.3% (140/181) 検出した。

この検出法によって、従来の 6A/6B から、新規 6E の判別が可能となった。

図 2. プライマーの配置

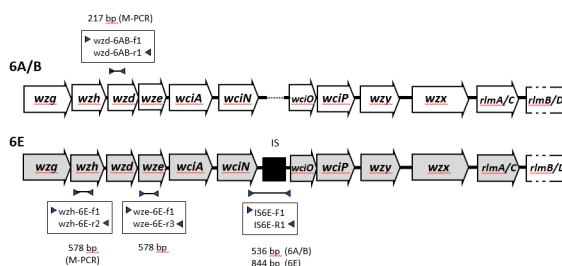
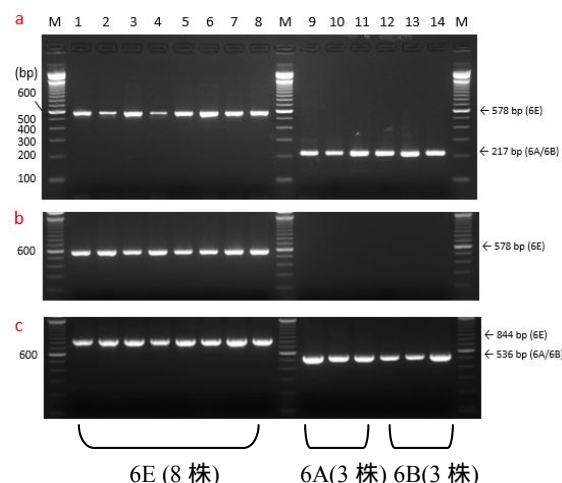


図 3. 6E 検出用 PCR の電気泳動写真

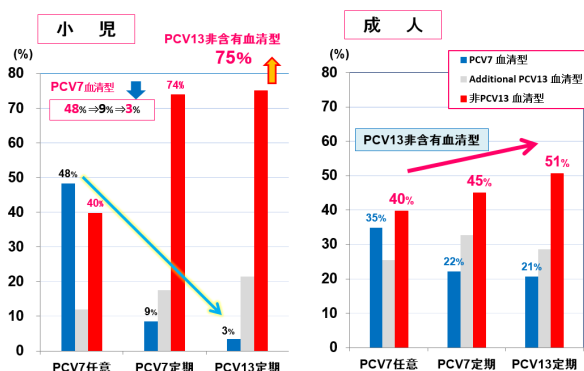


##### (2) 肺炎球菌の血清型および薬剤耐性の分子疫学的解析

肺炎球菌血清型における経時的変化が見られた。小児由来株においては、PCV7 含有血清型の有意な減少 (48.3% から 3.3%) に伴い、PCV13 非含有血清型が 39.7% (PCV7 任意接種期間) から 75.1% (PCV13 定期接種期間) に増加していた (図 4)。特に PCV13 非含有血清型においては、15A (0.9% から 11.8%)、23A (4.5% から 11.2%)、11A (2.5% から 8.5%) が有意に増加していた。成人由来株においては、一貫して血清型 3 が優勢で、同期間の比較において、PCV7 含有血清型が 34.9% から 20.7% に減少した。PCV13 に移行後は、PCV7 非含有血清型の 19A, 6C, 15A, 23A で全体の 52.5% を占めていた。2000 年に小児への PCV7 が導入された米国では、小児のみならず成人においても、ワクチン血清型による侵襲性・非侵襲性肺炎感染症が減少している。本研究においても同様に、PCV7 血清型の減少が見られ、成人においても緩やかな同様の変化が見ら

れた。

図 4. 各接種期間のワクチン含有・非含有血清型の割合



マクロライド耐性遺伝子[*erm*(B), *mef*(A/E)]の検出においては、PCV13 定期接種期間の全 960 株中、*erm*(B) , *mef*(A/E) の検出率はそれぞれ 75.1%、31.6%で、19A の 76.9%が両方の遺伝子を有し、PCV13 非含有血清型 15A、15C、23A の>99% が *erm*(B) を保有していた。結果として、PCV13 非含有血清型におけるマクロライド耐性が明らかとなった。

### (3) 非 PCV13 血清型株における薬剤感受性

得られた結果より、小児由来株の非 PCV13 血清型 231 株 (2014 年 7-11 月)を研究対象とし、全株に対して 18 種 penicillin, ampicillin, ampicillin-sulbactam, erythromycin, clarithromycin, azithromycin, clindamycin, cefepime, cefuroxime, ceftriaxone, imipenem, meropenem, levofloxacin, moxifloxacin, gatifloxacin, vancomycin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole の薬剤感受性試験を行った。同定された主要な血清型は 6C,15A,23A,35B で全体の 55.9%を占め、全株の 93.9% がエリスロマイシンに、91.3%がテトラサイクリンに耐性を示し、42.0%が多剤耐性 (ペニシリン非感受性および 2 種類以上の系統の異なる薬剤に対して耐性)であった。ペニシリン非感受性株 (PRSP または PISP)は、血清型 15A (100%)、23A (96.9%)、6C (41%)、35B (33.3%) に多く、15A の 21.6%が PRSP、8-10 種の薬剤に耐性を示し、それらは ST63 に属していた。ST63 は、Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) (<http://web1.sph.emory.edu/PMEN/>) において、international clone Sweden15A-ST63 として世界的に知られている遺伝子型である。本研究で、多剤耐性 Sweden15A-ST63 clone の北海道における分布が明らかとなった。また血清型 35B は ST558、23A は ST338、6C は ST242、ST5832 等であった。血清型 35B/ST558 は Utah 35B-24/ST377 の single locus variant (SLV)で、血清型 23A-ST5242 は Colombia23F-26/ST338 の SLV である。また血清型 6C/ST242 は、Taiwan23F-15 と同じ ST である。薬剤耐性傾向の非 PCV13 血清型において、PMEN clone とそのバリエーションが北海道で分布している

ことが判明した。

本研究において、肺炎球菌結合型ワクチンの導入による血清型の推移と、増加した非 PCV13 血清型の薬剤耐性状況も明らかとなり、今後の動向も調査すること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 3 件)

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Morimoto S, Ito M, Kudo K, Sumi A, Kobayashi N. Emerging non-PCV13 serotypes of noninvasive *Streptococcus pneumoniae* with macrolide resistance genes in northern Japan. *New Microbes New Infect.* 2015;9:66-72. 査読有り

Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. High prevalence of genotype 6E (putative serotype 6E) among noninvasive/colonization isolates of *Streptococcus pneumoniae* in northern Japan. *Microb Drug Resist.* 2015, 2:209-214. 査読有り

Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Kuwahara O, Morimoto S, Ito M, Kudo K, Kobayashi N. Serotype distribution and susceptibility to penicillin and erythromycin among noninvasive or colonization isolates of *Streptococcus pneumoniae* in northern Japan: a cross-sectional study in the pre-PCV7 routine immunization period. *Microb Drug Resist.* 2014;5:456-465. 査読有り

[学会発表](計 8 件)

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Kobayashi N. Temporal changes in serotypes and macrolide resistance genotypes of *S. pneumoniae* in Hokkaido. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016.3.23. 大阪国際交流センター (大阪府大阪市).

[招待講演] 川口谷充代. 7 価および 13 価肺炎球菌結合型ワクチン導入による非侵襲性肺炎球菌臨床分離株の血清型の変化. 第 2 回北海道臨床微生物フォーラム. 2015. 11.13. 札幌医科大学記念ホール (札幌)

Kawaguchiya M, Sumi A, Kobayashi N. 非侵襲性肺炎球菌の荚膜血清型とマクロライド耐性遺伝子型の推移. 第 74 回日本公衆衛生学会総会. 2015.11.4. 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

Kobayashi N, Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS. Change in serotypes of non-invasive pneumococcal isolates in northern Japan after introduction of PCV7

and PCV13 as routine immunization program. The 5<sup>th</sup> Asian Vaccine Conference. June 12, 2015. Vietnam, Hanoi.

Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. PCV7 および PCV13 導入による非侵襲性肺炎球菌臨床分離株の血清型の変化. 第 89 回日本感染症学会総会. 2015. 4.16. 国立京都国際会館 (京都府京都市)

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Kobayashi N. Changing trends in serotypes and macrolide resistance genotypes of pneumococci in the PCV7 era.

第 88 回日本細菌学会総会. 2015.3.26. 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市)

Kawaguchiya M, Sumi A, Kobayashi N. 7 価小児用肺炎球菌結合型ワクチン導入後における肺炎球菌血清型の分布状況. 第 73 回日本公衆衛生学会総会. 2014.11.5. 栃木県総合文化センター (栃木県宇都宮市)

Kobayashi N, Kawaguchiya M, Urushibara N. Change in serotypes of noninvasive pneumococcal isolates from children after introduction of PCV7 as routine immunization program in northern Japan. The 7<sup>th</sup> Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases. October 12, 2014. Beijing, China.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

川口谷 充代 (KAWAGUCHIYA MITSUYO)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70733062