

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10097

研究課題名(和文)肺炎球菌ワクチン導入後、ワクチン不応株感染症増加を招いた細菌側・宿主側因子の解明

研究課題名(英文) Investigation causes of the increasing non vaccine type pneumococcal infections after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine

研究代表者

石和田 稔彦 (Naruhiko, Ishiwada)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：30344980

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)：13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)普及後、乳児の肺炎球菌保菌率はワクチン導入前と比較し差は認めなかったが、全て非PCV13含有血清型に変化していた。また、肺炎球菌無莢膜株の保菌率の増加を認めた。PCV13導入後、血清型12Fの侵襲性感染症が増加したが、相同性の高い株であった。PCV13未接種の基礎疾患を有する小児のPCV13血清型特異抗体価は健康児に比べて相対的に低く、PCV13接種の必要性が示唆された。PCV13既接種者の非PCV13含有血清型肺炎球菌に対する免疫応答は様々であり、PCV13接種により非PCV13血清型の免疫応答に影響が出るかどうかは明らかにならなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCV13定期接種化後、PCV13含有血清型の侵襲性肺炎球菌感染症の激減と同時に、PCV13既接種乳児の鼻腔内肺炎球菌分離率は変わらないが、全てPCV13非含有血清型に変化していたことを証明したことは、PCV13定期接種化の効果とワクチン接種を継続する意義を明確にした。一方、同一性の高い血清型12Fや無莢膜株の顕在化は、継続した肺炎球菌サーベイランスの重要性を示唆するものであった。本研究により基礎疾患を有する小児では、PCV13型肺炎球菌に対する免疫原性が低いことが明らかとなり、本邦においても肺炎球菌感染症ハイリスク小児に対してPCV13を積極的に勧奨すべき重要なデータと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Nasopharyngeal carriage rate of Streptococcus pneumoniae in Japanese infants didn't change before and after the introduction of 13th-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13). Among carriage pneumococcus strains, all strains changed non PCV13 serotypes and nontypeable S.pneumoniae strains increased after the introduction of PCV13. Clonally related serotype 12F, that is one of non PCV13 serotypes, increased the pathogen of invasive pneumococcal diseases (IPD) in Japan.

The titers of PCV13 serotype specific antibodies in non PCV13 immunized Japanese children with underlying disease was relatively lower than healthy Japanese children. This study result suggests that the recommendation of PCV13 is needed for non PCV13 immunized Japanese children with underlying diseases. The titers of non PCV13 serotype specific antibody in PCV13 immunized children with IPD were varied. The effects of PCV13 immunization against immune response of non PCV13 specific serotype pneumococcus was not clarified.

研究分野：細菌感染症

キーワード：肺炎球菌 13価肺炎球菌結合型ワクチン 非PCV13含有血清型 免疫原性

1. 研究開始当初の背景

(1) *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) は、菌血症・髄膜炎などの侵襲性感染症(血液・髄液などの無菌部位から細菌が検出される重症感染症)の主要な原因菌であると同時に、肺炎、中耳炎などの呼吸器感染症の主要な原因菌でもある。肺炎球菌の大多数は、その病原性の主体として莢膜を有しており、有莢膜株は90種類以上の血清型に分類される。莢膜株の中でも病原性は異なり、肺炎球菌感染症を惹起しやすい血清型がある。

(2) 成人領域においては23種類の血清型の莢膜多糖体を含む23価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン(PPSV23)が1980年代に導入されたが、このワクチンは2歳未満の乳幼児に対して、十分な免疫を誘導することが出来なかった。その後、乳児からの予防が可能な7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)が開発され、2010年日本に導入された。我々は国内においてPCV導入前から継続的に小児侵襲性感染症・小児市中肺炎のサーベイランスを行っており、その中でPCV7導入後、PCV7含有株の肺炎球菌感染症は激減したが、ワクチンに含まれない血清型19Aを中心とした肺炎球菌感染症が増加し問題となっていることを報告した¹⁾²⁾³⁾。これは海外でも同様な状況であり、このような背景をもとに、新たに19Aを含む6種類の血清型を追加した13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)が、PCV7に代わり2013年、日本に導入された。しかし、PCV13導入後、今度はPCV13非含有株による肺炎球菌感染症が増加し、世界的な問題となっている。

2. 研究の目的

小児へのPCV13普及後、PCV13に含まれない莢膜型の侵襲性肺炎球菌感染症(invasive pneumococcal disease: IPD)が増加している。しかしながら、これらPCV13導入後、PCV13不応株による肺炎球菌感染症が増加する細菌側と宿主側の機序は不明である。本研究では、細菌側と宿主側の両面から解析し、肺炎球菌感染症に対する新たな治療・予防策を提唱する上で不可欠なワクチン不応株感染症増加メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) PCV13導入後、顕在化する肺炎球菌株に対して、病原性や遺伝子学的解析を行い、問題点を明らかにする。

(2) 乳児上咽頭細菌叢の継時的解析(肺炎球菌血清型の変化)を行い、PCV13接種が乳児の細菌叢に与える影響について検討する。

(3) PCV13未接種者・既接種者のPCV13含有株・PCV13非含有株に対する血清中の特異抗体価・

オプソニン活性を測定し、ワクチン接種が宿主の免疫原性に与える影響を検討する。

4. 研究の成果

(1) 継続的に IPD 分離菌の血清型解析を行い、PCV13 接種との関連性に関して解析を行った。千葉県において、2017 年、小児の IPD 罹患率は、5 歳未満人口 10 万人あたり 11.9 であった。罹患患者のうち 15%の症例が PCV13 含有血清型による感染症であったが、これらの感染症の患者は全て PCV13 未接種であった。一方、残りの 85%の症例は非 PCV13 血清型であったが、その主体は PCV13 接種歴のある小児であった。2018 年以降、罹患率は低下し、PCV13 含有血清型は認められなくなった。

表 1 千葉県における小児 IPD 罹患率と PCV13 血清型分離率の推移

年	2017 年	2018 年	2019 年
罹患率 (5 歳未満人口 10 万人あたり)	11.9	9.6	6.6
分離菌に占める PCV13 含有血清型の割合	15%	0%	0%

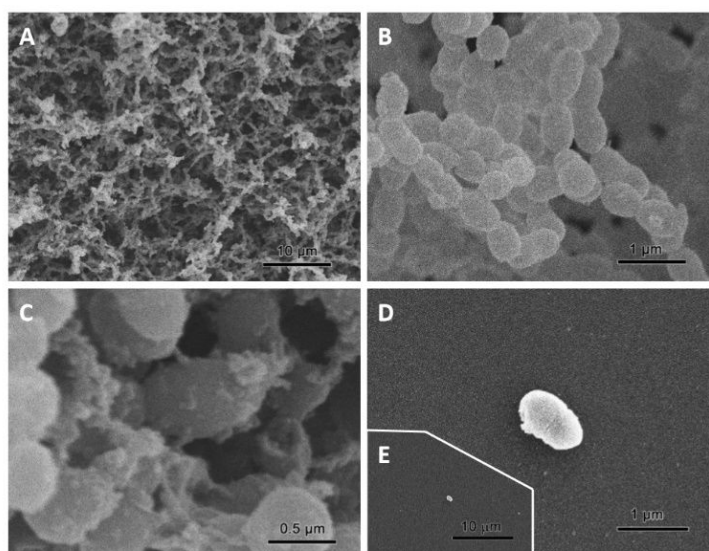
(2) 千葉県内を中心に、小児 IPD 症例から分離された肺炎球菌株について血清型解析を実施したところ、2017 年に PCV13 非含有血清型である血清型 12F が増加していた。数種類の遺伝子解析方法: Multilocus sequence typing (MLST)・pulse field gel electrophoresis (PFGE)・multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)を用いて検討したところ、流行していた 12F 型は全て ST4846 で、類縁性の高い株のアウトブレイクと考えられ、MLVA が最も解析に優れていた。

表 2 国内で分離された血清型 12F の遺伝子学的解析結果

No.	Strain no.	Year of isolation	Isolation site	Age (years)	Place of isolation	Outbreak strain/control strain	MLST	MLVA	PFGE
1	16P5	2016	Blood	4	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
2	16P27	2016	Blood	3	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
3	16P66	2016	Synovial fluid	1	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
4	16P92	2016	Blood	7	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
5	16P95	2016	Blood	1	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
6	17P6	2017	Blood	1	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
7	17P10	2017	Blood	7	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
8	17P12	2017	Blood	2	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
9	17P61	2017	Blood	3	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
10	17P114	2017	Blood	1	Chiba	Outbreak	ST4846	B	a
11	17P116	2017	Blood	1	Chiba	Outbreak	ST4846	A	a
12	17P176	2017	Blood	2	Chiba	Outbreak	ST4846	B	a
13	17P177	2017	Blood	3	Chiba	Outbreak	ST4846	B	a
14	17P76	2005	Blood	15	Chiba	Control	ST4846	A	a
15	8P34	2008	Blood	1	Chiba	Control	ST4846	C	a
16	8P43	2008	Sputum	2	Chiba	Control	ST4846	D	a
17	15P55	2009	Otorrhoea	7	Chiba	Control	ST4846	D	a
18	13P100	2014	CSF	9	Tokyo	Control	ST4846	A	a
19	15P26	2015	Sputum	6	Chiba	Control	ST4846	B	a
20	16P18	2016	Sputum	1	Chiba	Control	ST4846	A	a
21	16P37	2016	Blood	1	Nagano	Control	ST4846	E	b
22	16P93	2016	Blood	1	Tokyo	Control	ST4846	B	a
23	16P3	2016	Blood	61	Chiba	Control	ST4846	B	a
24	17P145	2017	Blood	4	Tokyo	Control	ST4846	B	a
25	17P54	2017	Blood	36	Chiba	Control	ST4846	A	a
26	17P55	2017	Blood	74	Chiba	Control	ST4846	A	a

(3) 保育園に通園している乳幼児を対象に、上咽頭の細菌解析を実施した。PCV13 ワクチン接種を 1~3 回受けた乳児の上咽頭細菌叢を解析した結果、2017 年分離された肺炎球菌の血清型は、PCV13 ワクチン非含有型が主体となっていた。これは、PCV13 ワクチン導入直後の状況とは異なっており、特徴的な点としては、血清型 19A (PCV13 含有血清型) が激減したこと、ペニシリン低感受性株として、血清型 35B (PCV13 非含有血清型) の増加が認められたことがあげられる。また、ペニシリン低感受性の無莢膜型肺炎球菌が複数の小児から検出された。2018 年の保菌株に関しても、PCV13 接種回数に関わらず、全て PCV13 非含有血清型となっており、その主体は、血清型 15A、35B などの多剤耐性傾向のある血清型であった。なお、1 人の保育園児から、PCV13 含有血清型を含む複数の肺炎球菌血清型が分離されるかどうかについて検討を行ったが、基本的には 1 種類の血清型のみが認められた。特に肺炎球菌無莢膜株に関しては、バイオフィーム産生能を解析したところ、莢膜株と比較し、バイオフィーム産生能が高いことが明らかとなり、また、MLST 解析結果から水平伝播する可能性も疑われるため、今後、難治性呼吸器感染症の重要な原因菌となることが示唆された。

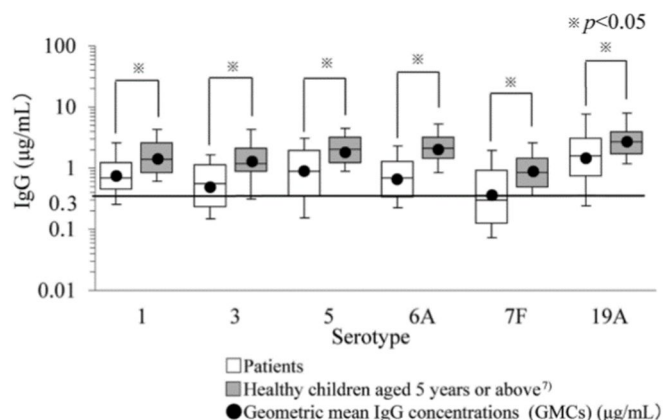
図 1 肺炎球菌無莢膜株 (A~C) と莢膜株 (D~E) の電顕像



無莢膜株でバイオフィーム産生が認められた

(4) IPD 罹患者、肺炎球菌感染症に対する感染リスクの高い血液腫瘍患者、無脾症患者の PCV13 血清型に対する特異抗体測定とオプソニン (OPA) 活性を実施した。症例により、感染した肺炎球菌血清型に対する特異抗体価ならびに OPA 活性が誘導されにくい症例が存在したが、重症化との関連性は明らかではなかった。一方、血液腫瘍患者・無脾症患者の特異抗体価は、健常児に比べて低かった。しかし、血清型により抗体価の値は異なっていた。

図2 健常児と血液腫瘍性疾患を基礎疾患にもつ小児の PCV13 血清型特異抗体保有状況



(5) 国内で、重症化、耐性菌による感染が問題となっている血清型 10A (非 PCV13 含有血清型) の特異抗体価測定系を確立し、PCV13 接種済で血清型 10A の IPD に罹患した小児の抗体価測定を行った。血清型 10A に対する抗体価は症例により異なり、感染後上昇している症例、上昇の認められない症例があり、PCV13 接種により非 PCV13 血清型の免疫原性に影響が出るのかどうかは明らかにはならなかった。今後、血清型 10A に対する OPA 活性測定系を確立し、抗体の質的評価を行う必要がある。

<引用文献>

- 1) Ishiwada N, Kurosaki T, Terashima I, Kohno Y. The incidence of pediatric invasive pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan (2003-2005). *Journal of Infection* 2008; 57: 455 -8.
- 2) Ishiwada N, Hishiki H, Nagasawa K, Naito S, Sato Y, Chang B, Sasaki Y, Kimura K, Ohnishi M, Shibayama K. The incidence of pediatric invasive *Haemophilus influenzae* and pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan before and after the introduction of conjugate vaccines. *Vaccine*. 2014; 32: 5425-31.
- 3) Naito S, Tanaka J, Nagashima K, Chang B, Hishiki H, Takahashi Y, Oikawa J, Nagasawa K, Shimojo N, Ishiwada N. The impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on the incidence of childhood community-acquired pneumonia and bacteriologically confirmed pneumococcal pneumonia in Japan. *Epidemiol Infect*. 2016; 144: 494-506.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takeuchi N, Ohkusu M, Wada N, Kurosawa S, Miyabe A, Yamaguchi M, Nahm MH, Ishiwada N	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular typing, antibiotic susceptibility, and biofilm production in nonencapsulated <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolated from children in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.02.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 和田 紀之, 黒澤 サト子, 菅野 明則, 牧野 郁夫, 萩原 温久, 細部 千晴, 伊藤 圭子, 柴田 雄介, 時田 章史, 白井 泰生, 諏訪 美智子, 千葉 昭典, 泉田 直己, 沼口 俊介, 塙 佳生, 竹内 典子, 石和田 稔彦	4. 巻 36
2. 論文標題 保育園児から分離された肺炎球菌の薬剤感受性、血清型推移について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 東京小児科医会報	6. 最初と最後の頁 37-40
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshita K, Ishiwada N, Takeuchi N, Takahashi Y, Naito S, Nagasawa K, Hishiki H, Hoshino T, Shimojo N	4. 巻 71
2. 論文標題 Pneumococcal IgG levels against 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in Japanese children with a medical history of hematopoietic neoplasms and solid tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 13-21
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 -

1. 著者名 Ohkusu M, Takeuchi N, Ishiwada N, Ohkusu K.	4. 巻 68
2. 論文標題 Clonal spread of serotype 12F ST4846 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Med Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1383-1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001047.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takeshita K. Ishiwada N. Takeuchi N. Fukasawa C. Hishiki H. Hoshino T. Shimojo N
2. 発表標題 Current pneumococcal vaccination status and serotype specific IgG levels of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Japanese asplenic children
3. 学会等名 11th The International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiwada N, Takeuchi N, Ohkusu M, Naito S, Abe K, Omata Y, Hoshino T
2. 発表標題 Epidemiological change of invasive pneumococcal disease and community-acquired pneumonia in children before and after the introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine era in Japan
3. 学会等名 11th The International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ishiwada N
2. 発表標題 Epidemiological change in pediatric community-acquired pneumonia before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccine era in Japan
3. 学会等名 The 13th Congress of Asian Society for Pediatric Research Symposium Fight against Pneumonia in Asian Children (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ishiwada N
2. 発表標題 Impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on community-acquired pneumonia and pneumococcal pneumonia in children in Japan
3. 学会等名 The 30th International Congress of Chemotherapy and Infection (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大楠美佐子、竹内典子、石和田稔彦
2. 発表標題 肺炎球菌血清型12Fについての検討
3. 学会等名 第29回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石和田稔彦
2. 発表標題 ワクチン普及による肺炎球菌感染症と肺炎球菌の変化 .
3. 学会等名 第52回日本小児呼吸器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石和田稔彦、竹内典子、竹下健一、菱木はるか、大楠美佐子、常彬
2. 発表標題 千葉県内侵襲性インフルエンザ菌・肺炎球菌・GBS感染症罹患状況 2019年 .
3. 学会等名 第215回日本小児科学会千葉地方会
4. 発表年 2020年

〔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	竹内 典子 (Takeuchi Noriko)	千葉大学真菌医学研究センター・感染症制御分野・特任助教	

6. 研究組織（つづき）

	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	大楠 美佐子 (Ohkusu Misako)	千葉大学真菌医学研究センター・感染症制御分野・技術職員	
研究協力者	竹下 健一 (Takeshita Kenichi)	千葉大学大学院医学研究院・小児病態学・大学院生	