

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 8 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 22 年度～平成 24 年度

課題番号：22790589

研究課題名（和文）肺炎球菌ワクチン（PCV-7）の導入により、新たな流行クローンは出現する  
のか？研究課題名（英文）Evaluating the occurrence of new virulent pneumococcal clones after  
the introduction of PCV-7 in Japan

研究代表者

河原 隆二（KAWAHARA RYUJI）

大阪府立公衆衛生研究所 感染症部・主任研究員

研究者番号：10332454

研究成果の概要（和文）：2010 年に日本において発売開始となった肺炎球菌ワクチン（PCV-7）の普及とともに、IPD 症例数が激減し、そのワクチン効果がすでに現れつつあることが明らかとなった。ワクチン非対応血清型のわずかな増加傾向があるものの、海外で観察されたような代償的な流行株は、国内では今のところ見られていない。しかし、ペニシリンやマクロライド等に対する耐性率は依然として高く、今後も注意を要すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：As the spread of pneumococcal vaccine (PCV-7) in Japan, which was launched in 2010, number of Invasive pneumococcal disease (IPD) cases has decreased. The results shows high effectiveness of PCV-7 also in Japan. Although there was a slight increase of non-vaccine serotypes, there was no sign of outbreak with a new epidemic strain. However, it is important to survey IPD's isolates in the future since resistance rates to macrolides and penicillin was still high.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：母子保健 肺炎球菌 ワクチン 薬剤耐性 分子疫学

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)は、中耳炎や副鼻腔炎など軽度の感染症の原因となる一方で、肺炎、髄膜炎、発熱を伴う菌血症といった重篤な侵襲性肺炎球菌疾患(invasive pneumococcal disease: IPD)を引き起こす。従来、本感染症への対策としては、抗菌薬投与による治療を行うことであったが、近年、もともと有効であったペニシリン~セフェム系薬剤に耐性を獲得したペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)が世界的に増加し、我が国でも小児の IPD 由来株で極めて高率に検出されるようになるなど、臨床上的大きな問題点となった。さらに PRSP は、マクロライド、ニューキノ

ロン、テトラサイクリンといった薬剤にも耐性を示す「多剤耐性株」となったため、肺炎球菌ワクチンを軸とした予防戦略にシフトした。2000 年より米国で小児の定期予防接種として導入された 7 価のポリサッカライド結合型ワクチン(PCV-7)は、IPD 発生率を顕著に低下させるなど高い効果が観察され、日本においても 2010 年より販売が開始となり、公費による助成が始まったことにより現在普及が進みつつある。

しかしスペインでは PCV-7 導入にともない、ワクチン対応血清型株による IPD が 60~80% と著明に減少した一方で、非ワクチン対応血清型株による IPD 発病のリスクが上昇し、トータルでの IPD の発生率の減少はわずか 12%

となったことが報告された。また、同時期に特定の多剤耐性 clone が増加しつつあり、それがイスラエルや韓国でも分離された”International clone”であることも報告されている。これらの報告は、PCV-7 導入は期待通りの効果をもたらす一方で、非対応血清型株による代償的な流行と、さらに、より病原性の高い clone の浸潤を誘導した可能性を示唆するものであった。

## 2. 研究の目的

日本において PCV-7 導入前の国内臨床分離株のカバー率は、IPD 由来株で約 70%、急性中耳炎由来株で約 60%であり、海外と同様に高い予防効果が期待されている。しかし、非ワクチン対応血清型株への流行のシフト、”International clone”の侵入やまったく新しい流行 clone の出現、いずれの可能性もあると考えられ、PCV-7 の導入にともなう詳細なサーベイランスおよび解析の実施が必要と思われた。そこで、本研究では、PCV-7 導入期において、IPD 由来肺炎球菌がどのような clone 集団を形成しているのか、すなわち”population”の解析を行い、その変動から流行のシフトや新たな流行 clone の出現をとらえることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 菌株の収集

研究協力医療機関で IPD 等と診断された症例由来の肺炎球菌を収集した。2008～2012 年に小児 119 例（髄膜炎 2 例、肺炎 1 例、潜在性菌血症他 116 例）・成人 4 例（死亡 2 例、髄膜炎 1 例、潜在性菌血症 1 例）の血液・髄液等無菌部位より分離された肺炎球菌 123 株を対象とした。

### (2) 血清型別および薬剤感受性試験の実施

血清型別は、型別用血清(デンカ生研および Statens Serum Institute)を用い、スライド凝集反応にて行った。薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standard Institute のガイドラインに基づき、微量液体希釈法により最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。ペニシリン G (PCG) の MIC 値 (ug/mL) により、PSSP ≤ 0.06、0.06 < PISP < 2、2 ≤ PRSP と分類し、その他の薬剤については CLSI の基準に基づいて判定した。

### (3) 薬剤耐性関連遺伝子の検索および解析

#### ① ペニシリン・セフェム系薬剤耐性関連遺伝子

ペニシリンの標的分子で、細菌外層膜のペプチドグリカンを生合成するペニシリン結合タンパク(penicillin binding protein: PBP)の遺伝子配列を解析した。すなわち、PBP 遺伝子(*pbp1a*、*pbp2b*、*pbp2x*)のコード領域の一部を PCR にて増幅し、ダイレクトシーケンスによってその遺伝子配列を決定した。

#### ② マクロライドおよびテトラサイクリン耐性関連遺伝子

マクロライド耐性関連遺伝子として *erm(B)* および *mef(A/E)*、テトラサイクリン耐性関連遺伝子として *tet(M)* が関わっており、これらを標的としたリアルタイム PCR を構築し、解析に用いた。

#### (4) Multi Locus Sequence typing (MLST)を用いた菌株間の疫学的解析

既報に従い、7つのハウスキーピング遺伝子を PCR およびダイレクトシーケンスにて解析した(<http://spneumoniae.mlst.net/>)。得られた MLST のデータを「eBURST (<http://eburst.mlst.net/>)」にて解析し、菌株の分子疫学的な”Population”について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) IPD 症例数の年次変移と血清型

図 1 に各年次ごとの IPD 症例数を全血清型、PCV-7 血清型、非 PCV-7 血清型それぞれについて示した。

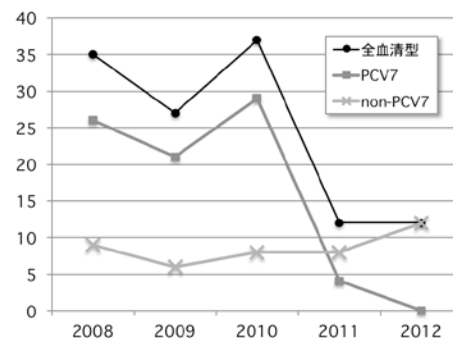


図 1 症例数の年次変移

PCV-7 普及前 (2008～2010 年)における年平均症例数は 33、普及後 (2011～2012 年)は 12 と大きく減少し、その減少率は約 64%であった。この減少を血清型について見ると、PCV-7 血清型の減少が著しく、2011 年には 4 例、2012 年には 0 例となった。一方で、非 PCV-7 血清型については、ワクチン普及前後でほとんど変わりがなく、2011 年までの年平均 7.8 例から 2012 年には 12 例とやや増加傾

向が見られた。

(2) ペニシリン薬剤耐性の動向

全期間（2008～2012年）におけるペニシリン耐性株の割合は、50.4%（PRSP+PISP）であった。PCV-7血清型、非PCV-7血清型それぞれでは、59.3%、33.3%となり、非PCV-7血清型におけるペニシリン感受性は比較的良好なことが示された。

しかしながら、各年ごとの耐性率について検討したところ、2010年以前に比べてやや低下したものの、2011年、2012年ともに41.7%と底をうったものと思われた（図2）。このことから、2012年はすべて非PCV-7血清型となっており、これらのペニシリン耐性率がやや上昇傾向にあることを示す結果となった。

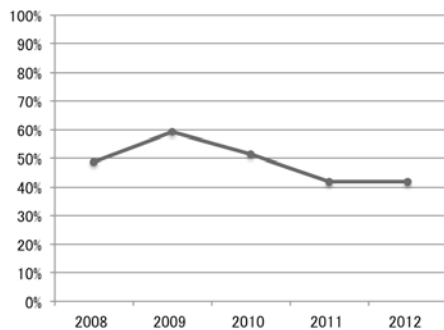


図2 ペニシリン耐性率の年次変移

(3) マクロライド・テトラサイクリン薬剤耐性の動向

マクロライドおよびテトラサイクリン耐性関連遺伝子の保有状況について検討した。

検出されたマクロライド耐性遺伝子は *erm(B)* と *mef(E)* で、そのいずれかを持っている菌株の割合は 89.4% であった。一方、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tet(M)* は全菌株の 91.1% から検出された。

また各年ごとの耐性率を図3に示したが、いずれも全期間を通じて90%前後と高く、

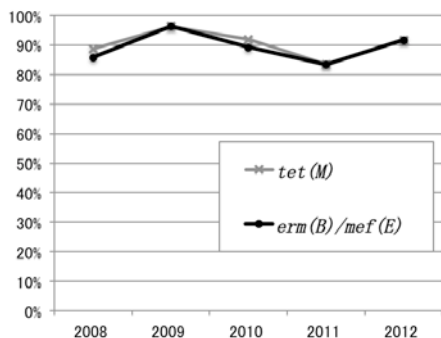


図3 マクロライドおよびテトラサイクリン耐性遺伝子保有率の年次変移

PCV-7による影響は見られなかった。

(4) MLST 型別と”Population”の検討

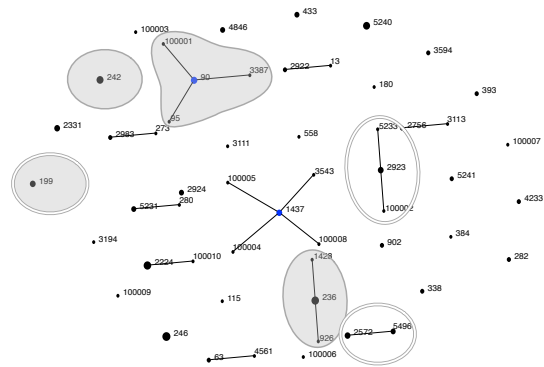


図4 eBURSTによる”Population Snapshot”

MLST型	検出株数	血清型	PMEN
ST246	8	4	
ST236	7	19F	Taiwan19F-14
ST2224	7	6B	
ST242	6	23F	Taiwan23F-15
ST90	5	6B	Spain6B-2
ST5240	5	14	
ST199	4	15B, 15C	Netherlands15B-37
ST1437	4	23F	
ST2572	4	24B, 24F	
ST2923	4	6B, 6C	

表 検出数の上位10となったMLST型

全株についてMLSTを実施し、eBURSTにて解析したところ、11のグループと25のSingletonに分類された（図4）。また表に、検出株数の多かった上位10個のMLST型について、血清型、PMENタイプを示した。

図4中のグレーの範囲に、国際流行株（PMEN）と一致したMLSTのグループまたはSingletonを示した。それぞれのPMENタイプは、Taiwan19F-14、Taiwan23F-15、Spain6B-2、Netherlands15B-37であり、日本国内においても、このような国際流行株が分布していることが明らかとなった。

また、トップ10のうち、PCV-7血清型は7つを占めており、2011年以降これらの流行クローンが抑制されたことが明らかとなった。一方で、図4中に2重線で示した非PCV-7血清型のグループおよびクローンによるIPDは今後も発生すると考えられ、これらが代償的な流行株へと移行しないか継続した調査が必要と考えられた。

MLST型とPBP遺伝子型との関連性についても解析を行っており、同一MLST型であってもPBP遺伝子型が大きく異なる株など興味深い結果が得られている。今後さらに詳細な解析を予定している。

## (5) まとめ

以上の結果から、PCV-7は海外と同様に日本でも高いワクチン効果が現れつつあることが明らかとなった。現在の傾向としては、ワクチン対応血清型のIPD発生が抑制される一方で、一定数の非ワクチン対応型が継続して発症に関与していると考えられる。これは、海外の報告とは異なり、特定のクローンなどによる代償的な非ワクチン対応型の流行が生じていないということを示しているが、まだPCV-7の導入・普及から数年しかたっており、今後もその動向を調査する必要がある。

また、IPD発生は抑えられてきたものの、抗菌薬への耐性率は依然として高い。特にマクロライド系薬剤は、これまで同様約9割が耐性で、今後もほぼ使えないと考えられた。ペニシリン系薬剤についても約4割は効きにくいと考えられ、髄膜炎等重篤な症例においては留意が必要である。

### 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1件)

(1) 武内一, 河原隆二, 田中充, 嶋田聡, 中川元, 鈴木礼, 保育園入園1年間での上咽頭培養で分離されるインフルエンザ菌および肺炎球菌の保菌状況の変化, 外来小児科, 査読有, 15(4), 2012, 525-526

[学会発表] (計2件)

(1) H. Takeuchi, R. Kawahara, 他

A prospective study of community-acquired bacteremia in Japan

28th Annual Meeting of The European Society for Paediatric Infectious Diseases, 2010年5月7日, France

(2) 河原隆二, 2007~2010年に分離された侵襲性肺炎球菌の薬剤耐性動向と分子疫学, 日本感染症学会総会, 2011年4月21日, 東京

[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]

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

河原 隆二 (KAWAHARA RYUJI)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任  
研究員

研究者番号: 10332454