

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：33906

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593541

研究課題名(和文)高齢者福祉施設における肺炎球菌保菌と莢膜型の分子疫学解析～高齢者肺炎予防に向けて

研究課題名(英文)Molecular epidemiological analysis and serotyping of Streptococcus pneumoniae colonized in the pharynx of elderly care facility users: The study for prevention of pneumonia of elderly adults

研究代表者

石原 由華 (Ishihara, Yuka)

椋山女学園大学・看護学部・教授

研究者番号：30369607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：咽頭ぬぐい液を直接短時間混合増菌培養後DNAを抽出し、肺炎球菌に特異的な遺伝子(自己融解遺伝子)lytAをPCRで検出することができた。またPCRにより23価ワクチンに含まれる莢膜型に特異的なプライマーを用いて、lytA陽性者の莢膜型を決定することができた。我々が改良した混合増菌培養からのPCR検出法による成人健康者の肺炎球菌保菌率は、従来の分離培養法による保菌率より数倍高く検出感度が高かった。また個人の熟練に依存せず検出に要する時間も分離培養法に比べて短時間であった。

研究成果の概要(英文)：Detection of Streptococcus pneumoniae colonized in the pharynx of healthy carriers has relied on conventional culture methods of direct plating of pharyngeal swab specimens. The accurate measurement of the carriage of pneumococci, however, has not been necessarily achieved with these methods. A PCR-based detection method of specific lytA as well as PCR serotyping of S. pneumoniae was recently developed and their effectiveness was confirmed. We modified the reaction conditions of these methods to improve the detection rate and applied them to the detection of S. pneumoniae carried in healthy adults. The DNA template preparations were then used for PCR-based serotyping with primers specific for each of the types included in pneumococcal PPV23. We recommend PCR-based identification and serotyping of S. pneumoniae in broth enrichment culture of pharyngeal swab specimens as a reliable method for the surveillance of healthy carriers with low density colonization.

研究分野：感染管理

キーワード：肺炎球菌 莢膜型 23価肺炎球菌ワクチン 自己融解遺伝子 PCR 混合増菌培養

1. 研究開始当初の背景

肺炎は、わが国における死因別死亡率の第4位で年間死亡者数は約11万5千人である。また、肺炎による死亡者を年齢別に見ると65歳以上の高齢者が占める割合は全体の95%と極めて高い。(厚労省平成20年人口動態統計年報主要統計表)

高齢化社会を迎えて高齢者のインフルエンザ感染が重要視されている。しかし高齢者はインフルエンザウイルス感染そのものによって死亡するよりも、細菌性肺炎を合併して死亡することが多いことが明らかとなり、原因菌として肺炎球菌が全体の55%で最も多く検出されている。その予防はワクチン接種が有効な手段であり、わが国においても平成13年度の予防接種法改正によりインフルエンザが予防接種対象疾患に加えられ、ワクチン接種率は近年急増している。高齢者肺炎球菌肺炎に対しては、23価肺炎球菌ワクチンが重症化と死亡とを有意に抑えることが知られている。また、高齢者に対するインフルエンザワクチンと23価肺炎球菌ワクチンの併用によって、ワクチン接種群は非接種群に比して侵襲性肺炎球菌感染症の発症が52%低く抑えられ、全体での死亡は57%低かったと報告されている。しかし、わが国における65歳以上の高齢者の23価肺炎球菌ワクチン接種率は、アメリカやカナダ、オーストラリアでは60%以上の接種率であるのに対して5%前後であり先進国の中で最も低いことが以前指摘され、現在でもその状況はそれほど変わっていない。また、23価肺炎球菌ワクチン未接種の高齢者施設において肺炎球菌肺炎がアウトブレイクしたとの報告もある。さらに、主要治療薬のペニシリン系抗生物質に対して耐性の肺炎球菌が増加して治療に難渋する例が増えている。従って、高齢者に対して23価肺炎球菌ワクチンによる予防対策のさらなる普及が必要

であるが、近年欧米では23価ワクチンに含まれない莢膜型の肺炎球菌による肺炎が増加している。23価ワクチンは23種類の莢膜多糖体を混合したワクチンであり、そこに含まれる莢膜型菌の感染は予防できるが、それ以外の莢膜型の菌に対しては免疫が成立しない。したがってワクチンの有効性を保つためには、日本の高齢者が保菌する肺炎球菌の莢膜型が23価ワクチンに含まれるかどうか、常に監視することが必要である。しかし病院で分離される菌の莢膜型については2,3の報告があるものの、それらは10年以上前の調査報告であって現在市中に広く保菌されている菌株の莢膜型とは一部異なるかもしれない。また高齢者が保菌する肺炎球菌の莢膜型については、これまで全く調査されていない。これではまるで、“風向きを調べずに航海に出る”ようなものであり、毎年流行する抗原型を調べてワクチンを準備するインフルエンザ感染と比べて対照的である。我々は肺炎による死亡の予防のために、現在日本の中で高齢者が保菌する肺炎球菌に対して“23価ワクチンが当たっている”かどうか早急に知る必要があり、本研究はそのために立案された。なお、すでに予備実験でPCRによる菌の検出を確認した。

肺炎球菌の保菌調査は、これまでの培養検査による検出では培養や検出の感度が低く、信頼できる結果が必ずしも得られなかった。肺炎球菌は通常血液寒天培地で培養するが自己融解するため増菌培養が困難であること、他の溶血性連鎖球菌との区別や膨化反応による莢膜型の判別も非常に難しいことなどによる。しかし近年米国CDCのグループから、PCRによる特異的遺伝子検出と、さらに莢膜型遺伝子の検出によって非常に簡便に菌の検出と莢膜型の同定ができる方法が発表された。我々は本研究においてこの方法を用いて遺伝子検出による

肺炎球菌の検出を行う。

23 価肺炎球菌ワクチン接種の普及活動による高齢者の肺炎防止は医師及び看護師の役割であるにも関わらず、高齢者福祉施設で働く看護師や介護職員等のスタッフにはワクチン接種の必要性に関する十分な情報が不足しているのが現状である。そのことが接種率の低さの原因の一つである。また米国では年末の最終週から翌年の第 1 週にかけて高齢者肺炎発生の鋭いピークが見られ、それはクリスマスから新年にかけて家族が集まり接触する中で小さい子供から高齢者が感染することが指摘されているが、日本においては幼稚園児などからの感染について全くわかっていない。本研究ではその感染経路も明らかにできるので、高齢者肺炎予防にとって重要な問題提起ができると考える。

2. 研究の目的

肺炎はわが国における死因別死亡率の第 4 位で、65 歳以上の高齢者が占める割合は全体の 95%と極めて高い。また高齢者はインフルエンザ罹患後に肺炎球菌性肺炎の合併による死亡が多い。予防対策として 23 価肺炎球菌ワクチン接種が推奨されている。しかし日本の高齢者施設入所者等が保菌する肺炎球菌の莢膜型が 23 価ワクチンに含まれる型かどうかは不明であり、含まれなければワクチンは効果が無い。したがって高齢者が保菌する肺炎球菌の莢膜型を定期的に調べることは重要であるが、検出の困難さにより行われていない。本研究では新たに考案された PCR 高感度遺伝子検出法により、高齢者における肺炎球菌検出・莢膜型決定を行い、高齢者肺炎予防のための 23 価ワクチンの有効性の検討と普及に資することを目的とする。

3. 研究の方法

1)新規 PCR 法による肺炎球菌検出法と莢膜

型決定法を確認し、方法を改良して高感度化する。

2)高齢者福祉施設の利用者ならびに入所者を対象に、採取した咽頭ぬぐい液から PCR を用いた肺炎球菌の保菌検出と莢膜型別を実施する。

3)肺炎球菌の莢膜型と 23 価肺炎球菌ワクチン接種との関連性ならびに肺炎球菌の感染経路についての調査結果をもとに被験者とその家族に個別に健康指導を行う。

4. 研究成果

健常者の肺炎球菌保菌調査はこれまで咽頭培養によって行われてきた。しかし健常者に少数保菌されている肺炎球菌を、溶血を示す多数の常在口腔レンサ球菌の中から検出するのは容易ではなく、保菌頻度が低く見積もられる恐れがある。近年 PCR による肺炎球菌検出法が報告されているので、我々は健常者咽頭ぬぐい液の混合増菌培養液から PCR によって肺炎球菌を検出し、さらに莢膜型を決定する改良法を検討した。2011 - 2013 年に名古屋市内の 40 才以上の健常者 110 名から咽頭ぬぐい液を採取し、混合増菌培養液から DNA を抽出して PCR により肺炎球菌特異的遺伝子 *lytA* を検出した。さらに *lytA* 陽性混合培養液から PCR により、23 価ワクチンに含まれる莢膜型遺伝子を個別に検出した。その結果 110 名中 36 名(32.7%)が *lytA* 陽性で、肺炎球菌を咽頭に保菌していると考えられた。この結果は従来の培養法による健常者保菌報告と比べて高かった。したがって PCR 検出法は健常者の肺炎球菌保菌をより高感度に検出すると思われる。さらに、36 名の *lytA* 陽性混合培養液から 28 名の 23 価莢膜型菌保有者を PCR で決定することができた。検出された莢膜型の頻度は 14 型が最も多く、次いで 4、18C、6A/B、の順だった。1、5、10A 型菌はそれぞれ少数検出された。なお、*lytA* 陽性者 36 名の中で PPV23 を接種していたの

は5名であり、そのうち4名が保菌する菌がPPV23に含まれていた。本研究により、PCRによる莢膜型同定は、型血清による莢膜型決定法が不可能な混合培養菌液でも可能であり、検出感度も良く、再現性に優れていることが明らかとなった。

今回の被験者の中に、PPV23を接種しているにもかかわらずPPV23に含まれている莢膜型を保有しているものが4名いた。したがってPPV23による免疫は、いわゆる粘膜免疫によって肺炎球菌の咽頭保菌を減少させるというよりも、敗血症などの重症化を防ぐ効果が期待されるワクチンと考えられる。あるいは、PPV23の効果に個人差があり、感染防御に必要な十分な抗体価を得られなかった可能性もある。

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)

石原由華、岡本陽、太田美智男、改良 PCR 法を用いた健常成人の肺炎球菌保菌検出と様薬型同定、感染症学雑誌、査読有、Vol. 89、No.3、2015、pp375-381.

〔学会発表〕(計 1 件)

石原由華、太田美智男、咽頭ぬぐい液から PCR による肺炎球菌検出および莢膜型決定法の検討、第 88 回日本感染症学会総会・学術集会(福岡) 平成 26 年 6 月 20 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石原 由華 (Yuka Ishihara)
椋山女学園大学看護学部・教授
研究者番号：30369607

(2)研究分担者

太田 美智男 (Michio Ohta)
椋山女学園大学看護学部・教授
研究者番号：20111841

社本 生衣 (Ikue Shamoto)
椋山女学園大学看護学部・助教
研究者番号：40593512

佐藤 晶子 (Akiko Sato)
椋山女学園大学看護学部・助教
研究者番号：20593510

宇佐美 久枝 (Hisae Usami)
椋山女学園大学看護学部 ・准教授
研究者番号：80587006

(3)連携研究者

()

研究者番号：