

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460835

研究課題名(和文)肺炎球菌ワクチン導入による菌株遷移と新たな高病原性菌発生リスクの解析

研究課題名(英文) Dynamics of Pneumococcal carriage and emergence of high virulence clone after introduction of vaccine in Japan

研究代表者

河原 隆二 (Kawahara, Ryuji)

大阪府立公衆衛生研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：10332454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：健康な人における肺炎球菌の保菌にワクチンが影響するのか、また保菌株に新たな高病原性株が出現しているかについて、研究を実施した。2014年に健康保育園児の保菌調査を行ったところ、保菌率は従来と変化がなかったが、ワクチン対応血清型の割合が低下し、非ワクチン血清型が増加していることがわかった。

特に、15A型の増加が顕著であり、侵襲性感染症由来株と関連性があることが明らかとなった。さらに、そのほとんどが国際流行クローンであるSweden15A-25とタイプが一致しており、今後警戒が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the impact of pneumococcal vaccine on carriage of Streptococcus pneumoniae and emergence of a high virulent clone in Japan. While the carriage rate didn't change than previous studies, the rate of vaccine-serotypes and non-vaccine-serotypes decreased and increase respectively. Furthermore, the result showed relatedness of serotype 15A, most frequently isolated in the study, between carriage and invasive pneumococcal disease strains. Since most of the 15A strains were identical with Sweden15A-25, it is suggested that the 15A clone might be epidemic clone in the near future.

研究分野：病原細菌学

キーワード：肺炎球菌 ワクチン 保菌 侵襲性感染症

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、気管支炎など軽度の感染症や、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(IPD)を引き起こす、特に小児や高齢者で重要な病原菌である。近年、ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)の急増が大きな問題となっており、これに対応するため、海外では2000年頃より7価多糖蛋白結合ワクチン(PCV-7)を導入した。

海外からは約10年遅れたものの、我が国では2010年よりPCV-7が導入され、厚生労働省の「ワクチン接種緊急促進事業」の一環として、公費助成の対象となるなど普及がすすめられた。その後、2013年11月から13価(PCV-13)へ切替が行われた。

その結果、小児におけるIPDの発生数は2011年以降約4割まで減少し、特にワクチンに含まれる血清型によるものはほとんど見られなくなった。一方で、ワクチン非対応型が代償的に増加傾向にあるものの、特定の血清型や遺伝子型株によるものではなかった。

このように、PCV-7/PCV-13の普及はIPDの抑制に一定の効果があったと考えられたが、肺炎球菌のReservoirである「健康保菌者」についての効果についてはほとんど検討されておらず、IPDの流行状況などへの影響や新たな病原性クローンの出現の有無などは明らかではない。

2. 研究の目的

申請者らは、ワクチンの保菌に及ぼす影響を検討するため、先行研究として2011~2012年にかけて健康な保育園児の肺炎球菌保菌調査を実施した。これはPCV-7が国内に導入されて約1年後で、まだ普及が進んでいない時期の調査であった。本研究では、ワクチンがほぼ普及した2014~2015年にほぼ同様の保菌調査を実施し、PCV-7/PCV-13の接種が保菌に与える影響について検討した。

また、保菌株から新たな流行株が発生しているかどうか検討するために、同時期に発生したIPD由来株との関連性についても解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 保菌調査の対象と検体採取

2014年4月、大阪府内5保育所に新規入所した44名の0歳児の中で、1月末で退園した1名を除く43名を対象とした。1年間にわたり毎月1回、上咽頭拭い液を採取するとともに、ワクチン接種歴の確認を行った。上咽頭拭い液は速やかに肺炎球菌の培養を行い、検出された菌株について、同定試験を実施した。

(2) 分離菌株の細菌学的解析

検出された肺炎球菌の血清型は、デンカ生研およびStatens Serum Instituteの血清を用い、スライド凝集法にて型別し、その結果をさらにマルチプレックスPCRを用いて確認した。

ペニシリンGおよびエリスロマイシンへの薬剤感受性は、アメリカ臨床検査標準化協会(CLSI; M100-S23)の方法に準拠し、微量液体希釈法(ドライプレート“栄研”、栄研化学)で測定した。なお、現在のPCGの基準は病態により分けられ、かつ従来の判定と大きく異なるため、本研究では従来と同じbreak pointが設定されている経口ペニシリンの基準を当てはめ、0.06 µg/mL以下をペニシリン感性肺炎球菌(PSSP)、0.12~1 µg/mLをペニシリン中間耐性肺炎球菌(PISP)、2 µg/mL以上をペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)とした。

(3) 薬剤耐性関連遺伝子の検索および解析

ペニシリン・セフェム系薬剤耐性関連遺伝子として、ペニシリン結合タンパク(PBP: *pbp1a*, *pbp2b*, *pbp2x*)を対象としてPCRとダイレクトシーケンスを実施し、遺伝子配列の解析を行った。さらに、マクロライド系薬剤耐性遺伝子の *erm(B)* および *mef(E)*、テトラサイクリン系薬剤耐性遺伝子の *tet(M)* をターゲットとしたリアルタイムPCRを実施し、これらの有無について検討した。

(4) 分子疫学的解析

分子疫学的解析としてMulti Locus Sequence Typing (MLST)を実施した。すなわち、7つのハウスキーピング遺伝子をマルチプレックスPCRにて増幅し、ダイレクトシーケンスを実施した。得られたデータはStreptococcus pneumoniae MLST Databases (<http://pubmlst.org/spneumoniae/>)にて解析を行い、ST型を決定した。

(5) IPD由来株の収集と解析

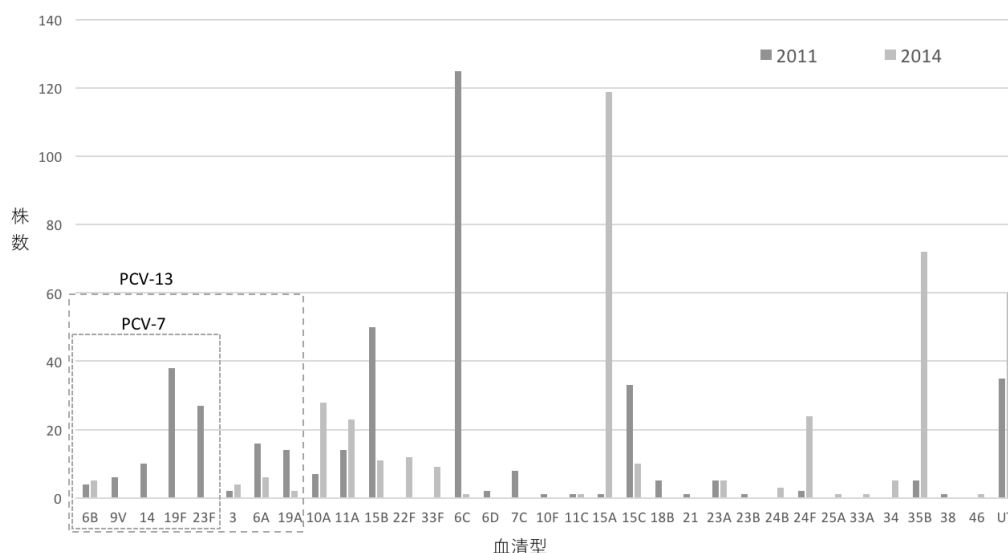
2013年以降、大阪府内の医療機関で検出されたIPD症例由来株について収集を行った。得られた菌株は保菌株と同様に解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 健康保育園児における肺炎球菌の保菌率と分離株の血清型

対象者43名の肺炎球菌の保菌割合は、2014年4月が58%、7月81%、9月53%、12月93%、翌年3月77%であった。2011年に同様に実施した調査では35~87%となっており、PCV-7普及・PCV-13切り替え以降

図1. 健康保育園児保菌株の血清型の遷移



も、保菌率に関しては明らかな変化は見られなかった。

一方、保菌菌株の血清型を調べたところ、ワクチンに含まれる血清型は、2014年が4%であったのに対して、2011年はPCV-7血清型が19%、PCV-13血清型が25%と、著しく減少したことが明らかとなった(図1)。特に2011年調査では、ワクチン血清型の中でも19F、23Fが多かったが、今回の調査ではこの二つの血清型は皆無であり、これはワクチンの効果によるものと推測された。しかし、今回検出されたワクチン血清型の3、6Aおよび6Bは、2011年よりも若干増加傾向にあり、血清型によってはあまりワクチンの効果がない、何らかの流行要因があるなどの原因が考えられた。

非ワクチン血清型全体では、15Aが31%と最も多く、次いで35Bが17%、10Aが7%、24Fが6%、11Aが5%等となった。図1に示したように、特に15A、35Bは2011年に比べその増加が顕著であった。

これらの結果から、PCV-7・PCV-13の普及は、健康小児におけるワクチン血清型の保菌をある程度抑制する効果があった一方で、代償的な非ワクチン血清型の増加を招いていることが示唆された。

(2) 保菌株の薬剤感受性状況

今回の調査で得られた保菌株のうち、ペニシリン感受性肺炎球菌(PSSP)は49%、ペニシリン中間耐性肺炎球菌(PISP)は37%、ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)は14%であった。ワクチンとの関連性で見ると、対応血清型15株のうち、11/15株(73%)はPSSPで、残る4/15株(27%)はPISPであった。一方、PRSPとなった株は、すべて非ワクチン血清型であった。

また、同じくエリスロマイシンについては、耐性株が94%を占めており、保菌であっても

マクロライド系薬剤はほぼ無効であることが示された。ニューキノロン系薬剤であるレボフロキサシンには全株が感受性であった。

(3) 15A型の保菌株、IPD株の関連性の検討

今回の保菌調査で多く検出された15A型は国内の小児IPD症例において19A、24Fについて多い血清型である。そこで保菌株とIPD株との関連性を検討することを目的として検討を行った。

検討の対象は、保菌株のうちランダムに選択した15A型14株、IPD株としては、2013年8月以降に収集した菌株のうち、15A型と判定された14株とした(表)。

表 保菌・IPD由来15A型株の比較

株番号	年齢	年	pbp耐性遺伝子型	マクロライド耐性遺伝子	テトラサイクリン耐性遺伝子	MLST
保菌1	0	2014	gPISP	ermB	tetM	63
保菌2	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌3	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌4	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌5	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌6	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌7	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌8	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌9	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌10	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	4561
保菌11	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌12	0	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌13	0	2015	gPRSP	ermB	tetM	63
保菌14	0	2015	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD1	63	2013	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD2	1	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD3	86	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD4	0	2014	gPSSP	ermB	tetM	63
IPD5	77	2014	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD6	3	2014	gPISP	ermB	tetM	63
IPD7	67	2014	gPISP	ermB	tetM	63
IPD8	57	2015	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD9	84	2015	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD10	64	2015	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD11	63	2015	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD12	1	2015	gPISP	ermB	tetM	63
IPD13	1	2015	gPRSP	ermB	tetM	63
IPD14	48	2015	gPISP	ermB	tetM	63

保菌株 14 株はすべて PCG $\geq 1\mu\text{g/mL}$ を示し、内訳は PRSP=8 株、PISP=6 株であった。IPD 株は 1 株のみ PCG $\leq 0.06\mu\text{g/mL}$ の PSSP で、他は PRSP=9 株、PISP=4 株となった。また、マクロライド(エリスロマイシン)は全株耐性であったが、テトラサイクリンの MIC 値は $\leq 0.25\sim 8$ と幅広く、保菌株・IPD 株の耐性率はそれぞれ 37% と 79% であった。

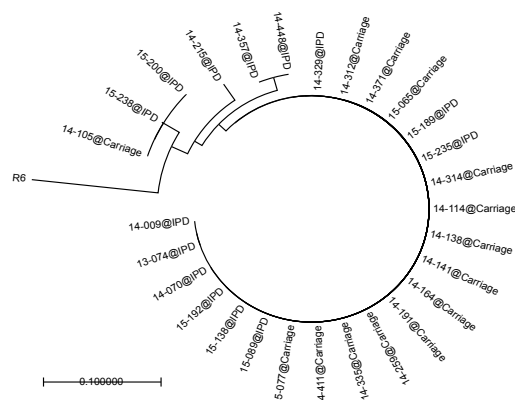
薬剤耐性遺伝子については、*pbp* 遺伝子型は薬剤感受性の結果とほぼ同様で、IPD 由来の PSSP1 株を除き、gPISP \sim gPRSP となった。各菌株間の遺伝子配列を比較したところ、gPRSP となった株においてはほぼ同一の遺伝子配列を保有することが示された(図 2)。

また、マクロライドとテトラサイクリン耐性遺伝子については、保菌株および IPD 株のすべてが *erm(B)* と *tet(M)* が陽性であった。

MLST は保菌株のうち 1 株が ST4561 となったが、他の全株は ST63 であった。なお、ST4561 は ST63 と *xpt* のみことなるタイプであった。また、15A 型・ST63 というタイプは、国際流行クローンである Sweden^{15A-25} と一致した。

これらの結果から、15A 型の保菌株と IPD 株とは強い関連性が示唆され、健康保菌者と IPD 患者との間で相互に伝播している可能性があると考えられた。

図 2 15A 型株における *pbp1a/2b/2x* 遺伝子の関連性



(4) まとめ

健康な保育園児においては、肺炎球菌の保菌率は 53-93% であり、ワクチンの普及前と保菌率については変化は見られなかった。一方で、ワクチン非対応血清型株の増加が著しく、15A 次いで 35B が多かった。特に 15A 型は、IPD 株と保菌株が類似 \sim 同一であり、PRSP の比率も高く、さらに国際的に流行している高病原性クローンと同型であることから、今後の流行動向に注意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)

- ① 武内一, 河原隆二, 田中充, 嶋田聡, 中

川元, 高雄礼, 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保育園入園 1 年間での変化—ワクチン接種との関連性—, 外来小児科, 査読有, Vol.16, No.2, 2013, pp.140-147

- ② 河原隆二, 青柳哲史, 高橋弘毅, 武田博明, 田邊嘉也, 笠原敬, 西順一郎, 藤田次郎, 丸山貴也, 山崎一美, 横山彰仁, 渡邊浩, 牧野友彦, 高橋琢理, 大日康史, 松井珠乃, 砂川富正, 石岡大成, 奥野英雄, 佐藤弘, 新井智, 木村博一, 多屋馨子, 大石和徳, 常彬, 大西真, 金城雄樹, 2013 年度の侵襲性肺炎球菌感染症の患者発生動向と成人患者由来の原因菌の血清型分布, IASR, 査読無, Vol.35, 2014, 179-181, <http://www.nih.go.jp/niid/ja/id/1373-disease-based/ha/streptococcus-pneumoniae/idsc/iasr-news/4729-pr4132.html>

[学会発表] (計 3 件)

- ① 河原隆二, 勝川千尋, 松井陽子, 福村和美, 大平文人, 久米田裕子, 大阪府における侵襲性肺炎球菌感染症の調査について. 第 35 回衛生微生物技術協議会総会, 2014, 東京
- ② 武内一, 河原隆二, 森裕一, 保育園 0 歳児の入園後 1 年間における Hib および肺炎球菌保菌に関する前方視調査, 第 25 回日本外来小児科学会年次集会, 2015, 仙台市
- ③ 河原隆二, 森裕一, 井澤恭子, 浜端朋子, 勝川千尋, 武内一, 大阪における健康保育園児の保菌由来肺炎球菌と侵襲性感染症由来肺炎球菌との関連性について, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016, 大阪市

[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]

ホームページ等

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

(2) 研究分担者

武内 一 (TAKEUCHI, Hajime)
佛教大学・社会福祉学部・教授
研究者番号：30552806