

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461564

研究課題名(和文)重症感染症を惹起するインフルエンザ菌無莢膜株の社会的重要性とその病原因子解析

研究課題名(英文)Clinical and bacteriological analysis of nontypeable Haemophilus influenzae isolated from invasive diseases

研究代表者

石和田 稔彦 (ISHIWADA, NARUHIKO)

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：インフルエンザ菌b型(Hib)ワクチン普及後に問題となる小児重症インフルエンザ菌感染症の実態を明らかにする目的で、小児侵襲性インフルエンザ菌無莢膜株(NTHi)感染症28症例28株に関して臨床背景・分離菌の病原因子の解析を行った。本研究により、国内で発症した侵襲性NTHi感染症は、Hib感染症に比べ、予後良好な感染症ではなく分離されたNTHi株は多様性に富むことをはじめて明らかにした。Hibワクチン普及後、日本における重症インフルエンザ菌感染症はワクチンで予防できないNTHi株に変化しており、今後もその病原性解析を進めていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：After the introduction of Haemophilus influenzae type b (Hib) vaccine, invasive H. influenzae infection is now mainly due to nontypeable H. influenzae (NTHi). We investigated the clinical characteristics of invasive NTHi disease in children by clarifying the pathogenicity of NTHi strains isolated from invasive diseases. Most of the strains were biotype II or III. Two β -lactamase positive ampicillin-clavulanate resistant strains were found. Other penicillin non-susceptible strains had multiple amino acid substitutions. The average of biofilm formation of hia or pilli positive strains were higher than negative strains. IS1016 was positive in 10.7% of the tested strains. Invasive NTHi strains from our study showed a wide variety of characteristics. Continuous monitoring of the NTHi responsible for invasive diseases in children is important to detect the changes in the epidemiology of invasive H. influenzae infection in the post Hib vaccine era.

研究分野：小児感染症

キーワード：インフルエンザ菌 Hibワクチン 無莢膜株 薬剤耐性 MLST解析 侵襲性感染症

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児の細菌性髄膜炎などの重症感染症(侵襲性感染症と言われる)の代表的な起炎病原体のひとつが、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)である。インフルエンザ菌は莢膜を有する莢膜株と無莢膜株(non-typeable *H. influenzae*:NTHi)があり、莢膜株は a-f の 6 種類に分類される。インフルエンザ菌の中で b 型莢膜株(*H. influenzae* type:Hib)は最も病原性が高く、侵襲性感染症の主体となっていた。しかし、Hib に対するワクチンが開発され普及したことにより、世界では侵襲性 Hib 感染症は激減している。

(2) 日本には、世界から遅れること 20 年、2008 年 12 月から Hib ワクチンが使用できるようになった。Hib ワクチンの国内での普及、定期接種化により侵襲性 Hib 感染症は激減したが、その一方で、Hib 以外の莢膜型のインフルエンザ菌や NTHi による侵襲性感染症が出現するようになった。しかしながら、その社会的な重要性や病原因子に関しては解明されていなかった。

2. 研究の目的

小児の無菌部位(血液・髄液)から分離された侵襲性感染症由来インフルエンザ菌株を全国から収集し、臨床背景の解析を行う。また、菌株の詳細な血清型解析を行い、侵襲性感染症由来インフルエンザ菌の生物学的な性質を検討する。以上の点から日本国内で Hib ワクチン普及後に発生したインフルエンザ菌侵襲性感染症の臨床的特徴と細菌学的特徴を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Hib ワクチン普及後に発症した侵襲性インフルエンザ菌感染症の臨床背景の解析

Hib ワクチン導入後に発生した小児侵襲性インフルエンザ菌感染症の臨床背景を収集し、その特徴を調査する。

(2) 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌の血清型解析

小児の無菌部位から分離されたインフルエンザ菌について抗血清を用いた凝集法、PCR 法を用いて莢膜多糖体遺伝子(Cap)に特有の配列の有無を確認する。

(3) 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌の表現型の解析

生物型の解析：インフルエンザ菌はインドール産生能、ウレアーゼ・オルニチン活性により 9 つの生物型に分類される。侵襲性株と非侵襲性株では生物型の分布が異なることが報告されており、収集株で検討する。

接着因子の解析：侵襲性株は非侵襲性株と比較し、気道上皮細胞への付着能が低下し、

相対的に組織内へ侵入しやすくなることが予想されるため、接着因子の解析を行う。

バイオフィーム産生能の解析：Hib は NTHi に比較しバイオフィーム産生能が低いことが報告されている。侵襲性由来の NTHi のバイオフィーム産生能が呼吸器感染症由来株と比較して相違があるかどうかを検討する。

薬剤感受性と薬剤耐性遺伝子の有無の解析：インフルエンザ菌の薬剤耐性化は進んでおり、侵襲性感染症由来株においても同様な傾向がみられるかを解析する。

(4) 侵襲性感染症由来インフルエンザ菌遺伝子型解析：

日本国内で発生した侵襲性非 b 型株、NTHi が単一菌の流行によるものか、多様な菌種であるか判明していない。MLST (Multilocus Sequence Typing)解析(PCR 法を用いて house keeping gene を同定すること)により、菌をグループ分けすることができる。MLST 解析により菌同士の近縁関係を明確にする。

病原因子の検討(全ゲノム配列の同定)：次世代シーケンサー (MiSeq, イルミナ社)を用いて全ゲノム配列を同定することにより、侵襲性 NTHi に共通する酵素や蛋白などを明らかにする。また、ゲノム配列を同定することにより、本来は Hib に特異的とされる遺伝配列 (IS1016) などを持つかどうかを、既存の Hib ゲノム配列データなどと比較することで検討する。

4. 研究成果

インフルエンザ菌 b 型(Hib) ワクチン導入後に発症した小児侵襲性感染症の血液・髄液等無菌部位から分離されたインフルエンザ菌 28 症例 28 株に関して臨床背景・分離菌の病原因子の解析を行った。血清型に関しては、全株、PCR 法にて無莢膜株(NTHi)と同定された。菌株は 7 道県から収集した。発症者は、2 歳未満(17 例)が主体であったが、年長児にも認められた。基礎疾患を有する者が 10 例いた。病型は菌血症が主体であったが、死亡者を 3 例認めており、Hib に比べ予後が良好とは結論づけることは出来なかった。細菌学的検討において、生物型は気道分離株に多い、II 型(12 株)と I 型(10 株)が主体となっていた。薬剤感受性に関しては、19 株にペニシリン結合蛋白に変異を認め、うち 2 株はラクタマーゼ産生アモキシシリン/クラバン酸耐性株であった。接着因子の有無、バイオフィーム産生能に関しては、呼吸器由来の NTHi 株と比較し、特徴は認められなかったが、有意差はなかったものの、侵襲性分離株の方が、バイオフィーム産生能が高い傾向を認めた。

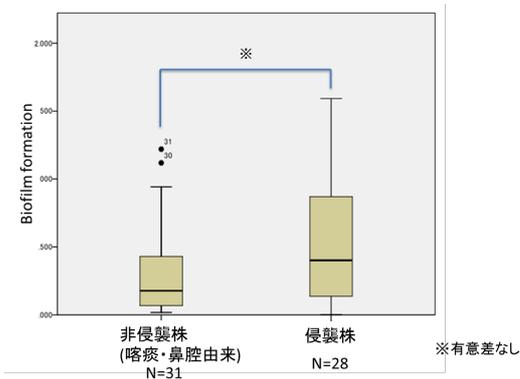


図1 侵襲性 NTHi 株と呼吸器由来 NTHi 株のバイオフィーム産生能の比較

また、莢膜株が保有する特異的な塩基配列である IS1016 を 10.7%の株が保有しており、全ゲノム解析でも確認できた。MLST 解析においては 28 株中 26 株が異なる ST 型を示した。

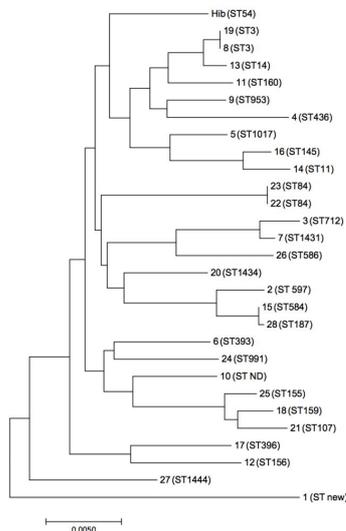


図2 侵襲性感染症由来 NTHi 株の MLST 解析結果

本研究により、国内で発症した侵襲性 NTHi 感染症は、死亡率が高く予後良好な感染症ではないことをはじめて明らかにした。また、分離された侵襲性感染症由来 NTHi 株は多様性に富むことをはじめて明らかにした。

さらに侵襲性感染症由来非 b 型株に関しても MLST 解析を行い、国内で患者発生が認められた Hif 型株(3 症例 3 株)が海外で侵襲性 Hif 感染症の主体となる ST124 型であったことを明らかにした。

また、血清型解析をより簡便に行うため、質量分析計 (MALDI TOF-MS) を利用したインフルエンザ菌血清型別法を検討し、国内で分離される (Hib、Hie、Hif、NTHi) の鑑別が可能であることを明らかにした。

Hib ワクチン普及後、日本における侵襲性インフルエンザ菌感染症の原因菌の主体は、ワクチンで予防できない非 b 型株、NTHi 株に変化しており、本研究成果は Hib ワクチン接種を今後も継続していくことの重要性と侵襲

性インフルエンザ菌感染症治療・予防対策のため、非 b 型株、NTHi 株の病原性解析を進めていく必要があることを示唆する重要な根拠を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

石和田稔彦: ワクチンのメリットとデメリット 各論 1. 細菌ワクチン(4) インフルエンザ菌 b 型ワクチン. 化学療法の領域増刊号. 査読無 33: S88-96, 2017 Hoshino T, Hachisu Y, Kikuchi T, Tokutake S, Okui H, Kutsuna S, Fukasawa C, Murayama K, Oohara A, Shimizu H, Ito M, Takahashi Y, Ishiwada N.: Analysis of *Haemophilus influenzae* serotype f isolated from three Japanese children with invasive *H. influenzae* infection. J Med Microbiol. 査読有 64: 355-358, 2015 doi: 10.1099/jmm.0.000031.

石和田稔彦: 解説 [] 小児科領域における肺炎球菌ワクチンとインフルエンザ菌 b 型ワクチンの効果と今後の問題. 感染症. 査読無 46: 9-15, 2016

石和田稔彦: 話題の感染症 インフルエンザ菌 b 型ワクチンは日本の小児感染症に変化をもたらしたか? モダンメディア. 査読無 62: 191-195, 2016

朽名悟, 星野直, 深沢千絵, 徳武翔子, 奥井秀由起, 澤田恭子, 佐藤洋子, 高橋喜子, 石和田稔彦: 小児臨床検体由来インフルエンザ菌非 b 型莢膜株に関する検討. 感染症誌. 査読有 89: 237-243, 2015

石和田稔彦: 1. Hib ワクチン、肺炎球菌結合型ワクチンの普及と効果. 日小医会報. 査読無 49: 11-16, 2015

〔学会発表〕(計 6 件)

竹内典子, 石和田稔彦, 大楠美佐子, 瀬川俊介, 村田正太, 土田祥央, 佐藤守, 野村文夫: 質量分析計 (MALDI-TOF-MS) を用いた *Haemophilus influenzae* の莢膜型決定法の検討. 第 28 回日本臨床微生物学会総会学術集会 2017 年 1 月 21 日 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市)

石和田稔彦: ワクチン普及により変化する感染症と求められる臨床微生物検査. 第 28 回日本臨床微生物学会総会学術集会 2017 年 1 月 21 日 長崎ブリックホール (長崎県・長崎市)

徳武翔子, 星野直, 澤田恭子, 佐藤万里, 佐藤洋子, 石和田稔彦: 小児臨床検体由来インフルエンザ菌非 b 型莢膜株の Multilocus Sequence Typing (MLST) 法による分子疫学的検討. 第 27 回日本臨床微生物学会総会学術集会 2016 年 1 月 21 日 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

Naruhiko Ishiwada: Clinical and bacteriological analysis of non-typeable *Haemophilus influenzae* isolated from blood on pediatric patients. US-Japan ARI panel meeting 13th Jan. 2016 Washington DC (USA)

石和田稔彦：ワクチン普及により変化する細菌感染症.第26回日本臨床微生物学会総会学術集会 2015年2月1日 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

徳武翔子, 星野直, 蜂巢友嗣, 奥井秀由起, 朽名悟, 深沢千絵, 高橋喜子, 澤田恭子, 佐藤洋子, 石和田稔彦：小児臨床検体由来インフルエンザ菌非 b 型莢膜株の Multilocus Sequence Typing (MLST) 法による分子疫学的検討.第63回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会 2014年10月30日 東京ドームホテル(東京都・文京区)

高橋 弘喜 (TAKAHASHI, Hiroki)
西 順一郎 (NISHI, Junichiro)

〔図書〕(計2件)

石和田稔彦:別冊 医学のあゆみ 小児用ワクチン UPDATE2017 編集 五十嵐隆 Hib ワクチン・13 価肺炎球菌結合型ワクチン 医歯薬出版株式会社 2017年 160 ページ

石和田稔彦:小児の予防接種ハンドブック 編集 渡辺博 ワクチンの最新情報 インフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチン 総合医学社 2016年 272 ページ

〔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

http://www.chiba-u.ac.jp/research/coe_group/result/result42.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石和田 稔彦 (ISHIWADA, Naruhiko)
千葉大学・真菌医学研究センター・准教授
研究者番号: 30344980

(4) 研究協力者

星野 直 (HOSHINO, Tadashi)
菱木 はるか (HISHIKI, Haruka)
内藤 幸子 (NAITO, Sachiko)
竹内 典子 (TAKEUCHI, Noriko)
大楠 美佐子 (OHKUSU, Misako)
瀬川 俊介 (SEGAWA, Shunsuke)
土田 祥央 (TSUCHIDA, Sachio)
佐藤 守 (SATO, Mamoru)