

分担研究報告書

上気道感染症の起炎菌と病原性の検討

研究分担者 山中昇 和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科教授

研究要旨

1. 肺炎球菌およびインフルエンザ菌における薬剤耐性化の変化

2007年から2008年までに、肺炎球菌711株、インフルエンザ菌644株を用い、PCR法に基づく薬剤耐性菌の分離頻度の検討を行った。肺炎球菌の約31%でペニシリン結合蛋白遺伝子 *pbp1a*、*2b*、*2x* 遺伝子の変異が認められた。*pbp* 遺伝子に変異を認めない株は、わずかに7%に認めるのみであった。マクロライド耐性遺伝子を有する株は、約70～80%に認められた。一方、インフルエンザ菌の約43%に *ftsI* 遺伝子の変異が認められた。ペニシリン耐性肺炎球菌は依然として小児急性中耳炎患児より高頻度に分離されるとともに、近年ではβラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌の増加が注目された。

2. 急性中耳炎における肺炎球菌のフェーズ変化

肺炎球菌の莢膜は病原性と密接に関連しているが、莢膜はその構造の差により2つのコロニー形態を示すことが報告されている。すなわち、莢膜構造が薄く、透光性の高いTransparent型コロニーと、莢膜構造が厚く、透光性の低いOpaque型コロニーに分類される。急性中耳炎患児において、中耳腔および鼻咽腔より分離される肺炎球菌の形態を検討した結果、鼻咽腔分離株ではOpaque株は約45%に存在するのに対して、中耳貯留液分離株ではほとんどがOpaque株であった。同一患者から分離された鼻咽腔Transparent型肺炎球菌と中耳Opaque型肺炎球菌はPFGEによる検索により、同一の株であることが証明された。このように肺炎球菌はその増殖部位によりフェーズを変化し、表面に存在する様々な病原因子を変化させると考えられた。

A 研究目的

急性中耳炎をはじめとする上気道感染症の臨床像は、近年大きく変化している。とりわけ、急性中耳炎および急性鼻副鼻腔炎では、従来まで経口抗菌薬により容易に改善したものが、経口抗菌薬治療にもかかわらず

十分に改善しない難治例が増加し問題となっている。これらの背景には、2大起炎菌である肺炎球菌およびインフルエンザ菌の薬剤耐性化が重要な要因となっている。本研究では、上気道感染症の2大起炎菌である肺炎球菌とインフルエンザ菌について

て、薬剤耐性化の現状を検討するとともに、病原性の検討をおこなった。

## B 研究方法

2007年より急性中耳炎の臨床エビデンスの検討と起炎菌サーベイランスを目的とした研究グループ(ATOMS)を結成し、急性中耳炎の起炎菌の分離頻度の検討を行ってきた。2007年から2008年までに、肺炎球菌711株、インフルエンザ菌644株を用い、PCR法に基づく薬剤耐性菌の分離頻度の検討を行った。

急性中耳炎にて外来受診をした患児の中耳・鼻咽腔からの肺炎球菌の莢膜形態、すなわちTransparent型およびOpaque型の割合を、catalaseを含有したTryptic soy agar寒天培地を用いて検討した。さらに鼻咽腔と中耳の菌の遺伝子学的同一性についてパルスフィールドゲル電気泳動法

(PFGE:pulse-field gel electrophoresis)を用いて検討した。

## C 研究結果

肺炎球菌の約31%でペニシリン結合蛋白遺伝子*pbp1a*、*2b*、*2x*遺伝子の変異が認められた。*pbp*遺伝子に変異を認めない株は、わずかに7%に認めるのみであった。マクロライド耐性遺伝子を有する株は、約70-80%に認められた。一方、インフルエンザ菌の約43%に*ftsI*遺伝子の変異が認められた。

肺炎球菌は鼻咽腔ではTransparent型優位、中耳貯留液中ではOpaque型優位で存在

していた。しかし同一患児の鼻咽腔と中耳から分離された菌株のPFGEの泳動パターンは同一であった。

## D 考察および結論

中耳炎および鼻副鼻腔炎の起炎菌サーベイランスおよび起炎菌の薬剤耐性化の検討ではペニシリン耐性肺炎球菌は依然として小児急性中耳炎および鼻副鼻腔炎患児より高頻度に分離されるとともに、近年ではβラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌の増加が日常臨床における大きな問題となってきている。すなわち、診療ガイドラインの普及によりアモキシシリンの高用量治療が行われるようになり、治療成績の向上が認められているが、同時に治療失敗例や遷延・反復例ではBLNAR(β-ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性インフルエンザ菌)が高率に検出される。さらに本年度から普及すると考えられる7価蛋白結合型肺炎球菌ワクチン(Prevenar)の上気道の常在細菌叢や中耳炎、鼻副鼻腔炎の起炎菌、さらに薬剤耐性肺炎球菌にどのような影響を与えるか、継続的なサーベイランスが極めて重要と考える。

肺炎球菌の病原性について、1996年にWeiserらは、肺炎球菌は莢膜構造の差により2つのコロニー形態を示すことを報告している。すなわち、莢膜構造が薄く、透光性の高いTransparent型コロニーと、莢膜構造が厚く、透光性の低いOpaque型コロニーに分類される。Opaque型肺炎球菌は、その厚い莢膜構造のため、補体結合性が低く、オプソニン化後の食

食処理に抵抗を示すとともに、局所組織内に長期に存在することに適する。一方、Transparent型肺炎球菌は、莢膜が薄く、細菌の付着因子の発現が高いとされ、肺炎球菌が上皮細胞に付着することにより有利に働くと考えられる。このように、肺炎球菌は、莢膜構造を変化させることで環境に適合し、宿主に効率的に感染するとともに、上皮細胞内に侵入することにより、巧妙に宿主の免疫防御機能から逃れ、鼻咽腔あるいは中耳腔局所に存在することにより急性中耳炎をはじめとする上気道感染症の遷延化を引き起こすと考える。本研究では、肺炎球菌は中耳貯留液中でOpaque型優位で存在しており、さらに鼻咽腔と中耳では遺伝子学的に同一菌であった。このことから肺炎球菌は、莢膜構造を変化させることで環境に適合し、巧妙に宿主の免疫防御機能から逃れ急性中耳炎を発生する可能性が示唆された。

## F 研究発表

### 1) 論文発表

1. Ito M, Hotomi M, Maruyama Y, Hatano M, Sugimoto H, Yoshizaki T, Yamanaka N. Clonal spread of beta-lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant (BLPACR) strains of non-typeable *Haemophilus influenzae* among young children attending a day care in Japan. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74(8):901-6.
2. Ogami M, Hotomi M, Togawa A, Yamanaka N. A comparison of conventional and molecular microbiology in detecting differences in pneumococcal colonization in healthy children and children with upper respiratory illness. *Eur J*

*Pediatr* 2010; 169(10): 1221-5.

3. Hotomi M, Kono M, Togawa A, Arai J, Takei S, Ikeda Y, Ogami M, Murphy TF, Yamanaka N. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in tonsillar cultures of adults with acute pharyngotonsillitis. *Auris Nasus Larynx* 2010; 37(5):594-600.
4. Hotomi M, Arai J, Billal DS, Takei S, Ikeda Y, Ogami M, Kono M, Beder LB, Toya K, Kimura M, Yamanaka N. Nontypeable *Haemophilus influenzae* isolated from intractable acute otitis media internalized into cultured human epithelial cells. *Auris Nasus Larynx* 2010;37(2):137-44.
5. Billal DS, Hotomi M, Yan SS, Fedorko DP, Shimada J, Fujihara K, Yamanaka N. Loss of erythromycin resistance genes from strains of *Streptococcus pyogenes* that have developed resistance to levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;64(2):225-8.
6. Beder LB, Hotomi M, Ogami M, Yamauchi K, Shimada J, Billal DS, Ishiguro N, Yamanaka N. Clinical and microbiological impact of human bocavirus on children with acute otitis media. *Eur J Pediatr* 2009;168(11):1365-72.
7. Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N. Intermittent preventive treatment with antimalarial drugs. *Lancet* 2009;373(9657):28-9.

### 2) 学会発表

1. Yamanaka N, Takei S, Moriyama S, Hotomi M. Impact of biofilm formation by *Haemophilus influenzae* on clinical outcomes of acute otitis media. 10<sup>th</sup> International Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology 2010, June 5-8, Pamplona, Spain.

2. Ogami M, Hotomi M, Yamanaka N. Quantitative serotype determination of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. 10<sup>th</sup> International Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology 2010, June 5-8, Pamplona, Spain.
  3. Sugita R, Hotomi M, Sugita G, Togawa A, Ogami M, Kono M, Yamanaka N. Clonal spread of *Streptococcus pneumoniae* in Japan. 10<sup>th</sup> International Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology 2010, June 5-8, Pamplona, Spain.
  4. Masuno-Horie A, Hotomi M, Ogami M, Togawa A, Takei S, Tamura S, Yamanaka N. Surveillance of causative pathogens among pediatric acute otitis media in Japan. 10<sup>th</sup> International Congress of the European Society of Pediatric Otorhinolaryngology 2010, June 5-8, Pamplona, Spain.
  5. Yamanaka N: Moving Towards a New Era in the Research of Tonsil and Mucosal Barriers. The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways 2010. July 7-10, Asahikawa, Japan
  6. Togawa A, Hotomi M, Tamura S, Yamanaka N: Clinical Scoring System of Acute Pharyngitis and Acute Tonsillitis. The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways 2010. July 7-10, Asahikawa, Japan
  7. Arai J, Hotomi M, Ogami M, Kono M, Takei S, Ikeda Y, Yamauchi K, Togawa A, Tamura S, Yamanaka N: Phase Variation of *Streptococcus Pneumoniae* isolated from Middle Ear Fluid and Nasopharynx of Children with Acute otitis Media The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways 2010. July 7-10, Asahikawa, Japan
  8. Takei S, Hotomi M, Moriyama S, Togawa A, Yamanaka N: Minimal Biofilm Eradication Concentration of Antimicrobial Agents against *Haemophilus Influenzae* Isolated from Otitis Media The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways 2010. July 7-10, Asahikawa, Japan
  9. Hotomi M, Kono M, Susan K Hollingshead, David E. Briles, Yamanaka N: Protection of Pneumococcal Infection by Maternal Intranasal Immunization with Pneumococcal Surface Protein A (PspA) The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways. 201. July 7-10 Asahikawa, Japan
  10. Ikeda Y, Togawa A, Inui K, Hotomi M, Tamura S, Yamanaka N: Clinical Efficacy of Garenoxacin (GRNX) for Adult Acute Pharyngitis and Tonsillitis -Pharyngo- Tonsillitis Study Group (PHATONS) Surveillance- The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways 2010. July 7-10, Asahikawa, Japan
  11. Kono M, Hotomi M, Togawa A, Tamura S, Yamanaka N: Production of IL-17 by Splenocytes of Offspring Delivered from PspA-Immunized Mother Mice The 7<sup>th</sup> International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways. 2010. July 7-10, Asahikawa, Japan
- G 知的所有権の取得状況：無し

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業））  
分担研究報告書

日本人小児における市中肺炎の罹患率および  
肺炎球菌の血清型とシーケンスタイプの分布

研究分担者 石和田稔彦 千葉大学医学部附属病院小児科 講師

**研究要旨**

PCV7 の日本における小児市中肺炎に対する予防効果を推測する目的で、小児市中肺炎の罹患率、肺炎球菌の分離率ならびに、分離された肺炎球菌の薬剤感受性、分子疫学を解析した。検討結果から、PCV7 は日本の小児市中肺炎患者由来の肺炎球菌に対して高いカバー率を有しており、小児市中肺炎、とりわけ薬剤耐性菌による肺炎に対する予防効果が期待される。

**A. 研究目的**

7 価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）は肺炎に予防効果があると海外では報告されているが、小児市中肺炎例における肺炎球菌分離頻度や血清型に関する報告は少ない。今回、PCV7 の日本における小児市中肺炎に対する予防効果を推測する目的で、小児市中肺炎の罹患率、肺炎球菌の分離率ならびに、分離された肺炎球菌の薬剤感受性、分子疫学を解析した。

**B. 研究方法**

2008 年 4 月 1 日から 2009 年 3 月 31 日まで千葉市および千葉市周辺施設を対象として千葉市在住 16 歳未満小児の市中肺炎入院症例数を集計した。また、千葉市内小児科 6 施設において肺炎入院例に対して血液培養および喀痰培養を採取し、肺炎球菌の分離頻度を調査した。分離された肺炎球菌株に関して、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を、莢膜膨化試験により血清型別を

行った。また Multilocus sequence typing（MLST）を <http://spneumoniae.mlst.net/> に記載されている方法に基づき行った。（倫理面への配慮）

本研究は千葉大学倫理委員会の承認を得て行った。

**C. 研究結果**

千葉市における 5 歳未満小児は年間 17.7/千名であった。6 施設での肺炎の入院症例は 626 名あり、肺炎球菌は血液培養から 5 例（0.8%）、喀痰培養から 92 例（15%）で有意に分離された。血清型は血液では 6B、19F、19A、喀痰では 6B、23F、19F の順に多く、PCV7 のカバー率は血液由来株で 80%、喀痰由来株で 67%であった。MLST 解析では国際流行多剤耐性クローンが血液由来株の 40%、喀痰由来株の 49%を占め、PCV7 はこれらクローンの血液由来株 100%、喀痰由来株 87%をカバーした。

#### D. 考察

PCV7 は小児市中肺炎患者由来の肺炎球菌に対して高いカバー率を有し、小児市中肺炎、とりわけ薬剤耐性菌による肺炎に対する予防効果が期待される。

田中純子 石和田稔彦 他：

小児市中肺炎患者より分離された肺炎球菌の血清型別および Multilocus sequence typing による解析 第 84 回日本感染症学会 2010. 4. 6

#### E. 結論

本邦における PCV7 普及のためには、早期の定期接種化が強く望まれる。

#### G. 知的所有権の取得状況

特記すべきことなし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hishiki H, Ishiwada N, Fukasawa C, Abe K, Hoshino T, Aizawa J, Ishikawa N, Kohno Y.: Incidence of bacterial coinfection with respiratory syncytial virus bronchopulmonary infection in pediatric inpatients. J Infect Chemother. 11: 2010 [Epub ahead of print]

##### 2. 学会発表

石和田稔彦：小児用肺炎球菌ワクチン  
第 84 回東京小児科医会学術講演会 教育講演 2010.3.14

石和田稔彦：こどもの髄膜炎はワクチンで予防する 第 28 回 千葉県母性衛生学会学術集会 特別講演 2010.6.5

石和田稔彦：妊婦さんに知っていただきたいワクチン-Hib ワクチンと小児用肺炎球菌ワクチン- 日本産婦人科医会千葉県支部・日本産科婦人科学会千葉地方部会 平成 22 年度 秋季学術講演会教育講演 2010.10.16

## 小児肺炎における呼吸器ウイルス-細菌の相互応答

研究分担者 大石和徳、大阪大学微生物病研究所

### 研究要旨:

我々はタイ王国、バンコク市中の2病院において2007-9年にかけて、5歳以下の小児肺炎患者（n=320）と健常小児（n=320）における呼吸器ウイルス、鼻咽頭における肺炎球菌、インフルエンザ菌の保菌、およびペア血清中 pneumolysin (Ply), OMP P6 に対する血清 IgG 応答、鼻咽頭上皮細胞における肺炎球菌/インフルエンザ菌レセプターの mRNA 発現、肺炎の重症度との関連性について検討した。

患者群の呼吸器ウイルス検出頻度は RSV (37.5%) が最も高く、54.4% でいずれかのウイルスが検出された。RSV は非重症肺炎で高頻度に検出されたのに対し、hMPV は重症肺炎で高頻度に検出された。鼻咽頭の SP および HI の患者群 vs 健常群の保菌頻度は、SP (19% vs 16%)、HI (17% vs 12%) であり、両群間に有意差を認めなかった。また、患者群における抗菌薬投与の保菌率に対する影響は認められなかった。

一方、ペア血清の得られた患者（n=245）のうち、Ply IgG および P6 IgG 抗体応答は 19 (7.8%) と 13 (5.3%) に認められた。また、患者群（n=68）の鼻咽頭上皮細胞の細菌レセプター mRNA 発現は、健常群（n=40）に比較し、PAFR, ICAM-1 が急性期に増加し、回復期に低下した。しかしながら、これらの mRNA 発現上昇と SP, HI の保菌頻度は相関しなかった。また、RSV 感染例（n=40）では、RSV 非感染例（n=28）と比較して、PAFR mRNA 発現増強が明らかとなったが、mRNA 発現レベルと肺炎球菌の保菌率とは相関しなかった。

本前向き臨床研究において、小児の鼻咽頭付着菌の肺炎発症への関与は明らかでなかった。また、肺炎患者で呼吸器ウイルスが高頻度に検出されたが、細菌性肺炎を示唆する症例は約 10% 程度であった。肺炎患者の鼻咽頭上皮細胞の PAFR や ICAM-1 の mRNA 発現は増強したが、肺炎球菌やインフルエンザ菌との保菌率と相関しなかった。

### A. 研究目的

小児においては、上気道の呼吸器病原性菌の保菌が高頻度に認められ、その肺炎発症への関与が示唆されている。しかしながら、小児肺炎の菌血症の頻度は低く、細菌性肺炎の診断は困難である。また、肺炎球菌感染症に先行して肺炎球菌の鼻咽頭保菌が認められ、その下気道感染の進展に重要な役割を果たすことが示唆されている

(Bogert D, et al. Lancet Infect Dis, 2004)。一方、*in vitro* の呼吸器ウイルス感染実験結果から、ウイルス感染後の気道上皮細胞の菌受容体 mRNA の発現増強および菌付着増加による二次性肺炎の発症メカニズムが示唆されている。また、Mahdi SA, らは南アフリカの乳幼児に肺炎球菌コンジュゲートワクチンを接種することで、ウイルス関連性肺炎が 22-45% 減少したこと

から、小児肺炎における二次感染の原因として肺炎球菌の重要性を示唆している (Nature Med, 2004) .

今回、我々はタイ王国の都市部において、小児肺炎患者における鼻咽頭保菌が肺炎発症に関与するか否か、また呼吸器ウイルス感染が細菌レセプター遺伝子発現を増加させ、鼻咽頭保菌を増加させることによって二次性肺炎発症に関与するか否かを明らかにする目的で以下の検討を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 症例登録

タイ、バンコク市中の Vajira 病院, Queen Sirikit National Institute of Child Health (小児病院) において 2007 ~9 年にかけて、5 歳以下の小児 (平均 18 ヶ月) における市中肺炎患者 320 名を、症例の親権者から書面によるインフォームドコンセントを得た後に登録した。倫理的な観点から超重症患者は除外した。また、同病院において健常小児 320 名を同じシーズンに年齢と性別を一致させて登録した。

### 2. 採取検体と検査

肺炎患者、健常小児から鼻咽頭洗浄液、鼻腔スワブ 2 本を採取し、肺炎患者からは急性と回復期 (退院 1 月後) のペア血清を採取した。

### 3. 呼吸器ウイルス検出

鼻咽頭洗浄液を用いて呼吸器ウイルスとして RS ウイルス (RSV)、human metapneumo virus (hMPV)、アデノウイルス (AdV)、インフルエンザウイルス A/B (Inf A/B) をリアルタイム PCR 法で検出した。

### 4. 呼吸器細菌の定量培養

フレキシブル咽頭スワブを用いて呼吸器病原細菌、とりわけ肺炎球菌とインフルエンザ菌を定量培養・同定した。

### 5. 細菌レセプターの mRNA 発現

コットンスワブから RNA を抽出し、肺炎球菌のレセプターとして PAF receptor (PAFR), polymeric Ig receptor (pIgR), マインフルエンザ菌のレセプターとして PAFR に加えて ICAM-1 について mRNA 発現を定量的に測定した。

### 6. 細菌特異的 IgG 抗体測定

肺炎球菌特異的な抗原として pneumolysin (Ply)、インフルエンザ菌特異的抗原として OMP P6 のリコンビナント蛋白質を精製、ペア血清を用いて Ply, P6 特異的 IgG タイターを ELISA 法で測定した。ペア血清で 4 倍以上の上昇を示した症例を Ply IgG, P6 IgG 応答者とした。

### 7. 臨床記録の評価

登録者の性別、年齢、肺炎のリスク因子などについて調査し、肺炎症例では WHO 基準に従い重症肺炎の有無を決定した。尚、本研究はタイ王国医科学局倫理審査委員会による承認を受けた。

## C. 研究結果

### 1. 肺炎のリスク因子

肺炎群 (n=320) と健常群 (n=320) の比較において、肺炎の既往 (P=0.0001)、ダイケアの利用 (P=0.0005)、早期あるいは晩期分娩 (P<0.0001)、家族の呼吸器疾患 (P<0.0001) が肺炎群と有意に相関した。

### 2. 鼻咽頭保菌の頻度



肺炎球菌の保菌は肺炎群、健常群でそれぞれ 19% vs 16%と有意な差はなかった。また、インフルエンザ菌の保菌も肺炎群、健常群でそれぞれ 17% vs 12%と有意差を認めなかった。また、肺炎群において、入院前の抗菌薬の使用は 48%であった。抗菌薬使用の有無による肺炎球菌の保菌率は 6% vs 11%であり、また抗菌薬使用の有無によるインフルエンザ菌の保菌率は 10% vs 12%であり、いずれも保菌率に有意な差はなかった。

### 3. 呼吸器ウイルス検出

肺炎群における呼吸器ウイルス検出頻度 RSV (37.5%)、hMPV (9.7%)、AdV (7.5%)、Inf A (5.0%)、Inf B (0.9%)であり、54.4%でいずれかのウイルスが検出された。一方、健常群では RSV (2.8%)、hMPV (2.5%)、AdV (2.8%)、Inf A (0.9%)、Inf B (0%)であり全体の 9.1%でいずれかのウイルスが検出された。

また、RSV の検出は重症肺炎より、非重症肺炎と有意に相関した ( $P=0.006$ )。これに対し、hMPV の検出は重症肺炎と有意に相関した ( $P=0.025$ )。

### 4. 血清 Ply IgG, P6 IgG 応答者

ペア血清の得られた患者 ( $n=245$ ) のうち、Ply IgG および P6 IgG 抗体応答は 19 (7.8%) と 13 (5.3%) に認められた。Ply IgG 応答者では末梢血好中球数が Ply IgG 非応答者より有意に高値を示した ( $P=0.048$ )。一方、P6 IgG 応答者については明らかなマーカーは認められなかった。さらに、これらの Ply IgG 応答者、P6 IgG 応答者について、特定のウイルス陽性あるいはいずれかのウイルス陽性との相関も明らかでなかった。

### 5. 細菌レセプター

患者群 ( $n=68$ ) の鼻咽頭上皮細胞の細菌レセプター mRNA 発現は、健常群 ( $n=40$ ) に比較し、PAFR, ICAM-1 が急性期に有意に増加し ( $P<0.01$ ) した。一方、pIgR は急性期に有意に減少した ( $P<0.01$ )。しかしながら、これらの mRNA 発現上昇と急性期あるいは回復期の肺炎球菌、インフルエンザ菌の保菌頻度は相関しなかった。また、RSV 感染例 ( $n=40$ ) では、RSV 非感染例 ( $n=28$ ) と比較して、PAFR mRNA 発現増強が明らかとなったが、mRNA 発現レベルと肺炎球菌の保菌率とは相関しなかった。

### D. 考察

タイ王国の都市部の小児における肺炎患者 (平均 18 ヶ月) の肺炎球菌の鼻咽頭保菌率は 19% と低率であり、健常群の保菌率 (16%) と有意差が無かった。また、インフルエンザ菌についても同様であった。これらの結果は、これらの患者の肺炎発症には鼻咽頭保菌は関与しないことが示唆された。南アフリカにおける乳幼児における肺炎球菌の保菌率は 50-70% と高率であることが知られており、本研究の結果には、対象小児の鼻咽頭保菌が比較的 low rate であったことが影響したことが示唆された。

肺炎患者において、19 例 (7.8%) において Ply IgG 応答者が確認された。また、これらの Ply IgG 応答者は非応答者に比較して、末梢血好中球数が有意に増加し、肺炎球菌性感染症の存在が示唆された。一方、13 例 (5.3%) の P6 IgG 応答者では末梢血好中球数との相関は見られなかった。

また、本研究では小児肺炎急性期に鼻

咽頭上皮細胞における細菌レセプターである PAFR, ICAM-1 遺伝子の mRNA 発現が亢進することを明らかにし、とくに RSV 感染と PAFR 遺伝子の mRNA 発現亢進の相関を明らかにした。これまで *in vitro* の気道上皮細胞を用いた研究では RSV と PAFR や ICAM-1 の遺伝子発現亢進が示されていたが、我々は *in vivo* とくに肺炎患者の鼻咽頭上皮細胞の PAFR, ICAM-1 mRNA 発現亢進について初めて報告した。しかしながら、鼻咽頭上皮細胞における細菌レセプター遺伝子発現増加は保菌率とは相関しなかった。この結果は、ヒト鼻咽頭上皮細胞の mRNA 発現と細胞表層の機能的な細菌レセプター発現の乖離を示唆している。

#### E. 結論

タイ王国、バンコク市における前向き臨床研究において、小児の鼻咽頭付着菌の肺炎発症への関与は明らかでなかった。また、肺炎患者で呼吸器ウイルスが高頻度に検出されたが、細菌性肺炎を示唆する症例は約 10%程度であった。肺炎患者の鼻咽頭上皮細胞の PAFR や ICAM-1 の mRNA 発現は増強したが、肺炎球菌、インフルエンザ菌の保菌率と相関しなかった。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K,<sup>1</sup> Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y,

Gottschalk M, Sawanpanyalert P, Oishi K. Clinical features of *Streptococcus suis* serotype 2 infections in relation to the genotypic profiles of isolates in Thailand. *Emerg Infect Dis* (in press).

2. Ezoe H, Akeda Y, Piao Z, Aoshi T, Koyama S, Tanimoto T, Ishii KJ, Oishi K. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. *Vaccine* 29:1754-1761, 2011.

3. Kawakami K, Ohkusa Y, Kuroki R, Tanaka T, Koyama K, Harada Y, Iwanaga K, Yamaryo T, Oishi K. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia and cost analysis for the elderly who receive seasonal influenza vaccine in Japan. *Vaccine*, 28:7063-7069, 2010

4. Kerdsin A, Uchida R, Verathamjamrus C, Puangpatra P, Kawakami K, Pathom Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K. Development of triplex SYBR green real-time PCR for detecting *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella* spp., without extraction of DNA. *Jap J Infect Dis* 63: 173-180, 2010

5. Champunot R, Tanjatham S, Kerdsin A, Puangpatra P, Wangsai S, Treebuphachatsakul P, Tasnsuphaswasdikul S, Kiatvitchukul C,

Kasyanan H, Yimsabai J, Akeda Y, Kawakami K, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S, Oishi K. Impact of severity of pandemic influenza (H1N1) virus-associated community-acquired pneumonia among adults in a tertiary hospital in Thailand. *Jap J Infect Dis*, 63:251-256, 2010

6. 大石和徳、永井英明. 肺炎球菌ワクチンの複数回接種は必要か? 医学のあゆみ. 234:213-216, 2010.

7. 川上健司、大石和徳. 2. 任意接種のワクチン、4) 肺炎球菌. *臨床検査* 54: 1358-1363, 2010.

8. 田村和世、大石和徳. 23 価肺炎球菌荚膜多糖体ワクチン (ニューモバックス®) の新たなエビデンス. *呼吸* 29: 996-1001, 2010.

9. 川上健司、大石和徳. 肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチン. *Modern Physician*. 30:704-707, 2010.

10. 大石和徳. 肺炎球菌ワクチン. *臨床とウイルス*. 38(5): 490-498, 2010

11. 明田幸宏、大石和徳. 高齢者感染症における重症化の予測因子 (微生物側の因子). *老年医学* 48:1301-1306, 2010

12. 江副浩和、大石和徳. ウイルス感染-最近の話題-. *THE LUNG perspectives*. 18: 343-346, 2010

## 2. 学会発表

1. Kawakami K, Yamaro T, Oishi K. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia and cost analysis for the elderly who receive seasonal influenza vaccine. IDSA 48 th annual meeting. Vancouver, Canada, October 21-24, 2010.

2. 坂東園子、岩垣明隆、大石和徳他. 高齢者介護施設利用者での肺炎の前向き調査と肺炎球菌血清型特異 IgG 濃度の基礎値についての検討. 第 50 回日本呼吸器学会総会, 京都, 2010 年 4 月 23-25 日.

3. 坂東園子、岩垣明隆、大石和徳他. 高齢者における肺炎球菌ワクチン接種後の multiple opsonophagocytic assay による血清オプソニン活性の評価. 第 84 回日本感染症学会総会, 京都, 2010 年 4 月 4-5 日.

4. 大石智洋、羽生政子、大石和徳. 小児の肺炎球菌敗血症 4 症例における液性免疫能測定および予備的検討. 第 14 回日本ワクチン学会学術集会, 東京, 2010 年 12 月 11-12 日.

5. 大石和徳、田村和世、西順一郎、中野貴司. 23 価肺炎球菌ワクチン接種後に発症した肺炎球菌性髄膜炎の 2 症例: その血清型特異 IgG 濃度とオプソニン活性の乖離について. 第 14 回日本ワクチン学会学術集会, 東京, 2010 年 12 月 11-12 日.

6. 大石和徳. 教育講演 5. 肺炎球菌ワクチンの重要性. 第 55 回日本透析医学会、神戸. 2010 年 6 月 18-20 日.

7. 大石和徳. 教育講演 1. 肺炎の感染病態とワクチン戦略. 第 49 回中部医学検査学会. 金沢、2010 年 9 月 18-19 日.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 肺炎球菌による重症感染症のリスクファクターの評価

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所細菌第二部部长  
協力研究者 和田昭仁 同細菌第一部室長

### 研究要旨

1991年から2010年に見られた肺炎球菌による成人重症感染症例25例の解析をおこなった。男性19例、女性6例、平均年齢61.0歳（24-86歳）と、成人全年齢層にわたり発症が見られた。転帰は死亡19例（76%）、回復6例、免疫不全をきたす基礎疾患を持つ症例は2例（原発性マクログロブリン血症1例、脾摘後1例）だけであった。血清型、薬剤感受性と予後との関連は見られなかった。重症化の原因究明のためには、分離菌の網羅的遺伝子解析と前方視的な臨床疫学研究を組み合わせた集中的な解析が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

肺炎球菌は、小児の中耳炎、肺炎、菌血症、髄膜炎、高齢者の肺炎、菌血症、髄膜炎の主要な起炎菌である一方、上咽頭に常在菌叢の一部として存在する。肺炎球菌による侵襲性感染のうち、急速に病態が進行し予後不良の重症感染症は、近年、日本において複数の報告が見られるようになった。本年度の研究では、1991-2010年発症の肺炎球菌による成人重症感染症の疫学解析を行った。

### B. 材料ならびに方法

感染症研究所に検査依頼のあった1991-2010年発症の成人侵襲性感染

症例25例を対象とした。血清型は、Statens Serum Institute製型別血清およびNY State Dept. Health製血清をもちい、菌体膨潤化法により決定した。薬剤感受性は、ドライプレート（栄研化学）を用い、CLSI M100-S18に準拠し測定した。

<http://spneumoniae.mlst.net/>に記載されている方法に基づき、肺炎球菌の遺伝子(*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*)を解析し、分離菌のシーケンスタイプを決定した。

### C. 結果

症例を表1に示す。男性19例、女性6例と男性の症例が多く、平均年齢

61.0 歳 (24-86 歳) と、成人全年齢層にわたり発症が見られた。転帰は死亡 19 例 (76.0%)、回復 6 例、免疫不全をきたす基礎疾患を持つ症例は 2 例 (原発性マクログロブリン血症 1 例、脾摘後 1 例) だけであった。血清型と予後の関係を図 1 に示す。23F によるものが 5 例と最多であったが、全体で 10 種類の血清型の菌が分離されていた。莢膜を持たない untypeable の菌の分離も 1 例で見られた。予後と特定の血清型との関連は見られなかった。ペニシリン G 感受性と予後の関係を図 2 に示す。ペニシリン G の MIC が  $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ ,  $0.12-1 \mu\text{g/mL}$ ,  $2 \mu\text{g/mL}$  の菌はそれぞれ 15 株、7 株、3 株であった。死亡例 19 例中ペニシリン G の MIC が  $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$  である菌は 12 例 (63.2%) から分離されており、薬剤感受性と予後の関連は見られなかった。血清型 23F が分離された 5 例のうち、4 例の分離菌のシーケンスタイプは ST242、1 例が ST5246 によるものであった。ST242 は、全国の小児、成人の無菌検体 (血液、髄液など) および非無菌検体 (呼吸器検体など) から分離されているシーケンスタイプである。ST5246 も本邦での分離例が見られている。一方、2008 年、62 歳男性から分離された untypeable の菌と 2010 年 59 歳男性から分離された血清型 4 の菌のシーケンスタイプはともに ST5872 (*aroE*, 2; *gdh*, 128; *gki*, 4; *recP*, 1; *spi*, 14; *xpt*, 1; *ddl*, 72) であり、日本で一般的に分離される血清型 4 のシーケンスタイプ

ST246 (*aroE*, 16; *gdh*, 13; *gki*, 4; *recP*, 5; *spi*, 6; *xpt*, 10; *ddl*, 18) とは 6 個のアリルが異なっていた。これらの菌は、何らかの病原因子を共通に持っている可能性が考えられた。

#### D. 考察

表 1 に示すように、予後不良の重症成人侵襲性感染症の原因となっている菌は、様々な血清型を示す。また、近年、肺炎球菌の  $\beta$ -ラクタム剤耐性化が問題となっているが、高感受性株の中にも予後不良例が見られていた。症例の中には大葉性肺炎をきたしたのも、先行する呼吸器感染が見られず受診時にはすでに敗血症性ショックをきたしていたものもある。観察された多彩な病態は、近年の菌の変化、ホストの要因、診断と治療までの経過など複雑な要因が重なった結果であると考えられる。今後、増加が懸念されるこれらの重症感染症に対応するには、分離菌の網羅的遺伝子解析と前方視的な臨床疫学研究を組み合わせることが必要であると考えられる。

#### E. 結論

肺炎球菌による重症感染症は、特定のクローンにより引き起こされているわけではない。原因究明のためには、集中的な研究が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

1. B. Chang et al., Isolation of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D from the nasopharyngeal mucosa of healthy Japanese children. Jpn. J. Infect. Dis. 63:381-383, 2010.

## H. 知的財産権の出願 登録状況

なし

表 1 成人重症感染症例

発症年	地域	年齢	性	診断名	転帰	検体	PCG MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	血清型
1991	福岡県	43	M	劇症型敗血症	死亡	血液 髄液	0.06	12F
1998	千葉県	46	M	重症肺炎球菌感染症	死亡		1	23F
2003	東京都	26	M	敗血症、多臓器不全	死亡	静脈血	0.25	22F
2004	埼玉県	42	M	ショック、多臓器不全	回復	血液	0.06	10A
2004	大阪府	67	M	壊死性筋膜炎、敗血症 性ショック、原発性マクロ グロブリン血症	死亡	水泡内容液	2	19F
2004	新潟県	64	M	敗血症、多臓器不全	死亡	静脈血	0.06	4
2004	東京都	61	F	敗血症、髄膜炎、 多臓器不全	死亡	静脈血	0.06	22F
2005	新潟県	30	F	産褥期肺炎球菌感染症	死亡	血液	0.06	12F
2003	東京都	84	F	敗血症	死亡	動脈血	0.015	22F
2003	東京都	76	M	敗血症	死亡	動脈血	0.015	4
2004	東京都	77	F	敗血症、髄膜炎	死亡	動脈血、髄液	0.03	12F
2004	東京都	82	M	敗血症	死亡	動脈血	0.015	3
2006	東京都	80	M	敗血症、髄膜炎	死亡	動脈血、髄液	2	6A
2006	埼玉	70	M	敗血症、肺炎	死亡	静脈血、喀痰	0.015	10A
2007	埼玉	55	M	敗血症、肺炎	回復	気管支吸引痰	0.015	3
2007	富山	74	M	敗血症、肺炎	死亡	血液	0.25	23F
2007	埼玉	66	F	敗血症、化膿性関節炎	死亡	動脈血、関節 液	0.03	19A
2008	福岡	55	M	髄膜炎、敗血症(海外か ら帰国直後発症)	死亡	髄液、血液	0.015	4
2008	富山	84	F	敗血症	死亡	血液	1	6A
2008	東京	62	M	敗血症、脾摘後	死亡	血液	0.015	untypeable
2008	新潟	57	M	敗血症、電撃性紫斑病	回復	血液	1	23F
2010	新潟	61	M	敗血症、髄膜炎	死亡	血液	1	23F
2010	長野	74	M	敗血症、軟部組織壊死	回復	血液	1	23F
2010	東京	59	M	肺炎、敗血症、髄膜炎	回復	血液、髄液、 喀痰	0.015	4
2010	東京	38	M	肺炎、菌血症	回復	血液	2	14



図 1 分離された肺炎球菌の血清型と予後の関係

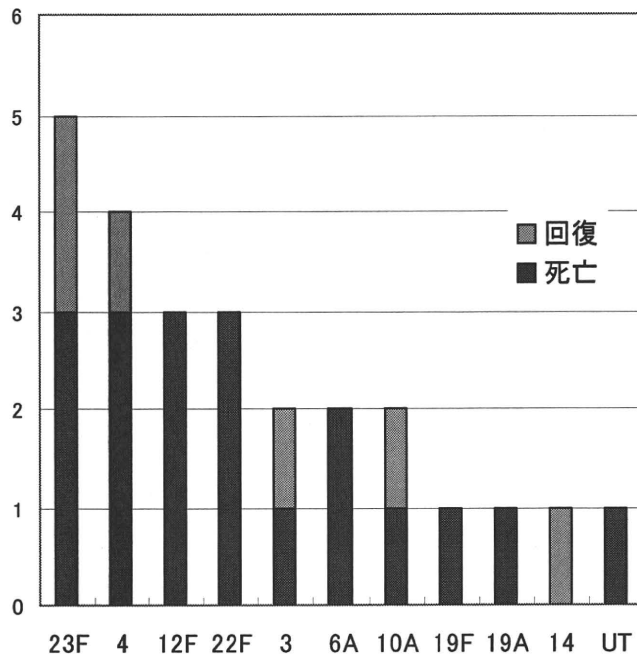
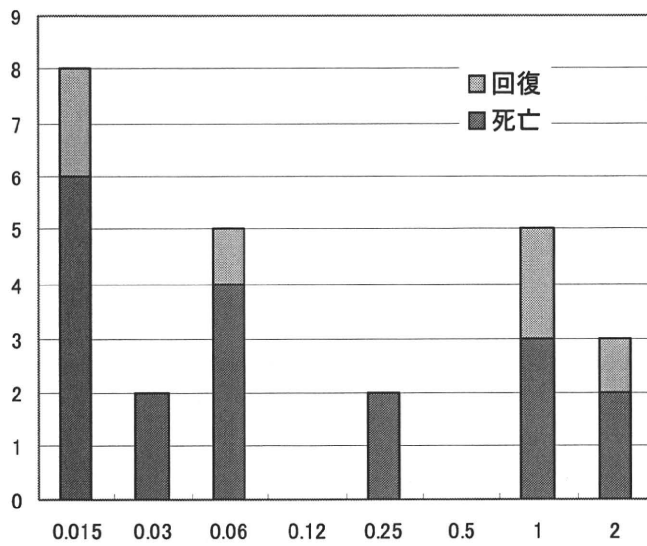


図 2 分離された肺炎球菌のペニシリン G MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )と予後の関係



## インフルエンザ菌による小児急性中耳炎の難治化に関する検討

研究分担者 渡邊 浩 久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門 教授

**研究要旨** 近年、インフルエンザ菌による小児急性中耳炎の難治化が臨床上の問題となっている。2006年7月から2007年7月までに東北労災病院耳鼻咽喉科を受診した3歳未満の小児急性中耳炎症例のうち、中耳貯留液からインフルエンザ菌が分離された67例を対象とし、分離されたインフルエンザ菌のバイオフィーム産生能および細胞内侵入性を解析し、難治化との関連について検討した。鼓膜所見スコア4点以上のグループをH群、3点以下をL群とすると、バイオフィーム産生能については、吸光度の平均がH群  $1.14 \pm 0.90$ 、L群  $1.15 \pm 0.88$  と有意差は認めなかったが、細胞内侵入性は、H群  $0.38 \pm 1.08$  (%)、L群  $0.11 \pm 0.21$  (%)とH群に高い傾向がみられた。また、中耳炎の再燃についてもバイオフィーム産生よりも細胞内侵入性の関与が強い傾向であった。小児急性中耳炎の難治化は、免疫未発達など宿主側の要因も考えられるが、インフルエンザ菌の細胞内侵入性が菌側の要因として関与している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

急性中耳炎は小児においてよく見られる疾患のひとつであるが、近年、インフルエンザ菌による小児急性中耳炎の難治化が臨床上の問題となっている。今回我々は、小児急性中耳炎症例から分離されたインフルエンザ菌のバイオフィーム産生能および細胞内侵入性を解析し、臨床経過や鼓膜所見を踏まえ、難治化との関連について検討した。

### B. 研究方法

2006年7月から2007年7月までに東北労災病院耳鼻咽喉科を受診した3歳未満の小児急性中耳炎症例のうち、中耳貯留液からインフルエンザ菌が分離された67例を対象とした。急性中耳炎の鼓膜所見は、鼓膜発赤（0～3点）と膨隆（0～3点）の2項目の点数を合計ス

コアリングを行った。分離されたインフルエンザ菌は、96穴マイクロプレートを用いた *Microtiter biofilm assay* にてバイオフィーム産生能を測定し、細胞内侵入性は、BEASE-2B細胞を用いた *gentamicin killing assay* にて定量した。

### C. 研究結果

鼓膜所見スコア4点以上のグループをH群、3点以下をL群とすると、バイオフィーム産生能については、吸光度の平均がH群  $1.14 \pm 0.90$ 、L群  $1.15 \pm 0.88$  と有意差は認めなかった（図1）。一方、細胞内侵入性は、H群  $0.38 \pm 1.08$  (%)、L群  $0.11 \pm 0.21$  (%)と有意差は見られなかったが、H群に高い傾向がみられ、1%以上の高度侵入菌はすべてH群であった（図2）。

いったん貯留液が消失したが再発したもの

を再燃と定義し、バイオフィーム産生能と細胞内侵入性についての相関を検討した。バイオフィーム産生能については、再燃群  $1.12 \pm 0.73$ 、非再燃群  $1.16 \pm 0.95$  と有意差は認めなかったが(図 3)、細胞内侵入性については再燃群  $0.62 \pm 1.41$  (%), 非再燃群  $0.09 \pm 0.19$  (%) と再燃群で高い傾向がみられた(図 4)。

(共同研究者)

久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門：秦 亮、東北大学大学院臨床微生物解析治療学：矢野寿一、東北労災病院耳鼻咽喉科：沖津尚弘、長野県立須坂病院感染症科：山崎善隆

図 1

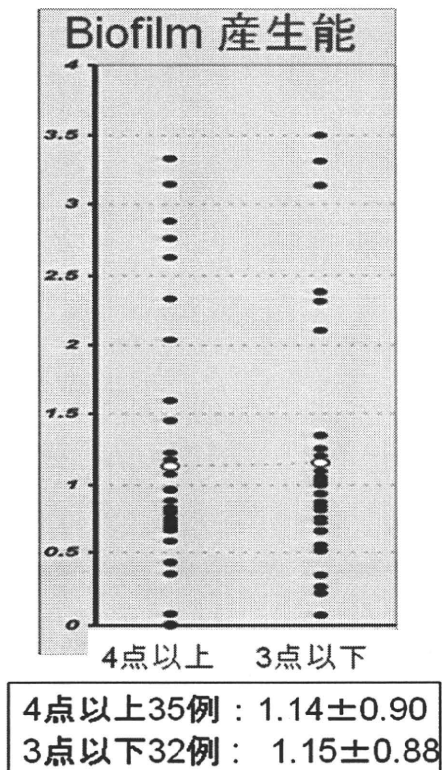


図 2

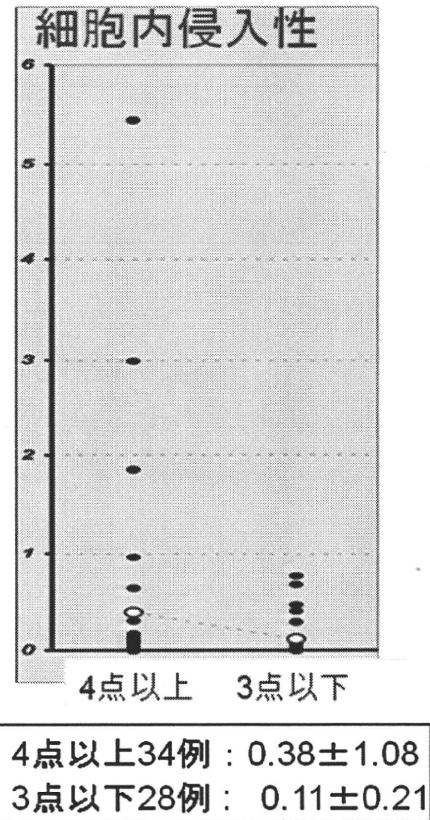


図 3

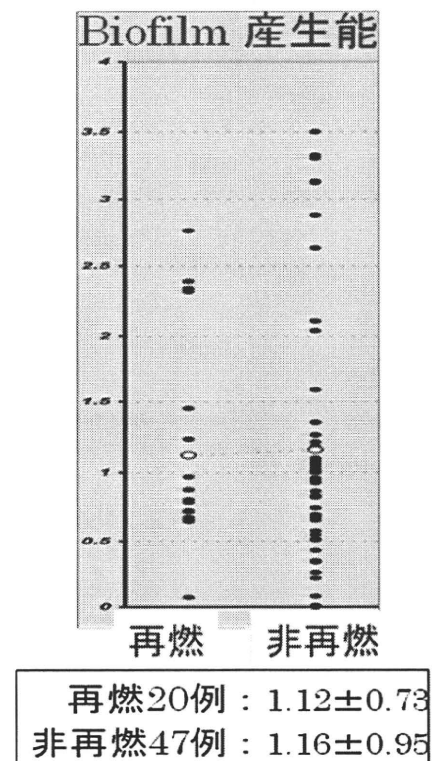
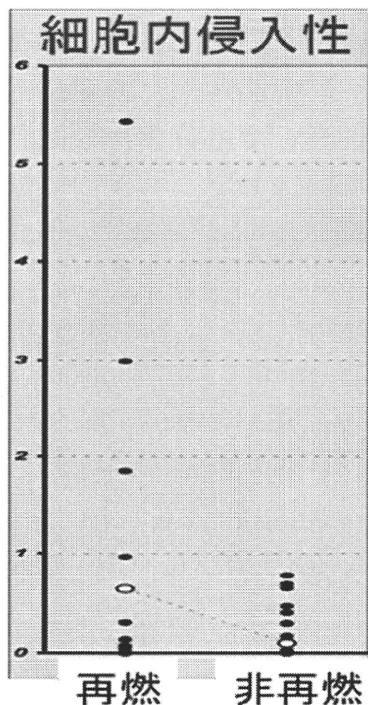


図 4



再燃19例 :  $0.62 \pm 1.41$   
 非再燃42例 :  $0.09 \pm 0.19$

#### D. 考察

小児急性中耳炎の難治化は、免疫未発達など宿主側の要因も考えられるが、本研究においては小児急性中耳炎症例の鼓膜所見スコアは細胞内侵入性菌で高い傾向にあった。インフルエンザ菌の細胞内侵入性が菌側の要因として小児急性中耳炎の難治化に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

本研究の結果より、小児急性中耳炎の難治化の菌側の要因としてインフルエンザ菌の細胞内侵入性が関与している可能性があり、特に難治例の抗菌化学療法においてはインフルエンザ菌に感受性をもつのみでなく、細胞内へ移行しやすい薬剤を選択する必要があると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yahara K, Miura M, Masunaga K, Matsumoto K, Miyao T, Tanimachi C, Hashimoto K, Sagawa K, and Watanabe H. Comparison of two control measures of weatherstripping in reducing blowing dust during hospital renovations. *J Infect Chemother*, 16: 431-435, 2010.
2. Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Hamada N, and Watanabe H. Artificial hybrids of influenza A virus RNA polymerase reveal PA subunit modulates its thermal sensitivity. *PLoS ONE* 5(12) e15140: 1-11, 2010.
3. Morinaga Y, Yanagihara K, Masunaga K, Hashiguchi M, Okamura T, Watanabe H, Kohno S, and Kamihira S. Invasive pneumococcal diseases in a traveler who returned from the philippines: A case report and in vivo study of the isolate. *J Travel Med*, 17: 63-65, 2010.
4. 今村宜寛、濱田信之、大津 寧、原 好勇、渡邊 浩「九州北部でのヒト・メタニューモウイルスに対する中和抗体保有調査」 *医学検査* 59: 767-772, 2010.

##### 2. 学会発表

###### 国際学会

1. Qin L, Zhou Z, Hu B, and Watanabe H. Pilot study of causative pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection in China. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene 59th Annual meeting, Atlanta, USA.* 2010.