

厚生労働科学研究費補助金(国際医学協力研究事業)
分担研究報告書

上気道感染症における肺炎球菌およびインフルエンザ菌の病原性と
母体免疫による感染予防の検討

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
研究協力者： 保富宗城 和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科 講師

研究要旨

1. マクロライドによる Opaque 型肺炎球菌の抑制の検討

肺炎球菌 L82016 株(血清型 6 型)を用い、1/32MIC 濃度でクラリスロマイシンおよびアモキシシリンの肺炎球菌 L82016 株の増殖、Opaque 株比および莢膜多糖体量を検討した。肺炎球菌増殖期(対数中期)では、クラリスロマイシン群において Transparent 型コロニーの割合が上昇するとともに、莢膜多糖体量が減少した。

2. インフルエンザ菌バイオフィルムの形成におよぼす抗菌薬の効果の検討

インフルエンザ菌についてバイオフィルム内の細菌を死滅させる最小の抗菌薬濃度:最小バイオフィルム抑制濃度の検討をおこなった。また、アモキシシリン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンについて抗菌薬暴露時間および抗菌薬投与タイミングによる抗バイオフィルム作用について検討した。βラクタム剤では MIC と MBEC の乖離が大きいのに対して、マクロライド系抗菌薬のクラリスロマイシンでは臨床的組織濃度で MBEC に達していた。アモキシシリン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンとも抗菌薬暴露時間依存的な抗バイオフィルム作用は示さず、バイオフィルム形成前段階で抗菌薬を投与した場合には、バイオフィルム形成が抑制された。

3. 肺炎球菌 PspA 母体経鼻免疫による新生児マウスの肺炎球菌感染症予防の検討

肺炎球菌 PspA を抗原として、母体経鼻免疫による新生児マウスの肺炎球菌感染症予防の検討した。PspA の母体経鼻免疫により母マウス血清中および母乳中および新生児マウス血清中に抗 PspA 特異的 IgG 抗体が誘導され、新生児マウス鼻咽腔への肺炎球菌定着および肺炎が予防されるとともに肺炎球菌全身感染後の生存期間の延長が認められた。

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、近年の薬剤耐性菌の増加に伴い、

経口抗菌薬治療にも関わらず十分に改善しない難治例の増加が問題とされてきた。一方、肺炎球菌およびインフルエンザ菌は巧妙な感染機序を有しており、抗菌薬あるいは宿主免疫応答といった感染防御

機構から巧みに逃れ感染することが判明してきている。

本研究では、このような肺炎球菌およびインフルエンザ菌の感染機序に注目し、これら起炎菌の感染機序を抑制する治療方法の可能性について検討するとともに、乳幼児における感染症予防法について、母親マウスに免疫を行う母体免疫による、肺炎球菌感染予防効果について検討した。

B 研究方法

1. マクロライドによる Opaque 型肺炎球菌の抑制の検討

肺炎球菌 L82016 株(血清型 6 型)を用い、1/32MIC 濃度でクラリスロマイシンおよびアモキシシリンをそれぞれ培養液に添加し、A:対数前期 ($OD_{600}=0.3$) および B:対数中期 ($OD_{600}=0.5$) まで培養する。それぞれの時点で、肺炎球菌 L82016 株のコロニー数および肺炎球菌 Opaque 株比および莢膜多糖体量を検討した。肺炎球菌 Opaque 株数比はカタラーゼ含有 TSA 寒天培地上菌液希釈液を 18 時間、5%CO₂ 下で 37°C、18 時間培養した後にコロニー形態を評価した。莢膜多糖体量は、抗血清型 6B 型モノクロナール抗体を用いた競合 ELISA 法にて定量した。

2. インフルエンザ菌バイオフィルムの形成におよぼす抗菌薬の効果の検討

インフルエンザ菌を 96 ウェルマイクロプレートにて培養し、バイオフィルムを形成させた後に、各抗菌薬の段階希釈を作用させバイオフィルム内の細菌を死滅させる最小の抗菌薬濃度:最小バイオフィルム抑制濃度 (Minimal Biofilm Eradication Concentration: MBEC) の検討をおこなった。また、インフルエンザ菌を 96 ウェル培

養プレートにて、アモキシシリン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンを添加し培養した後にプレートに形成されるバイオフィルム量をクリスタルバイオレット法および操作電子顕微鏡にて検討し、抗菌薬暴露時間および抗菌薬投与タイミングによる抗バイオフィルム作用について検討した。

3. 肺炎球菌 PspA 母体経鼻免疫による新生児マウスの肺炎球菌感染症予防の検討

BALB/c byj マウス(4 週齢、雌)にコレラトキシシン B をアジュバントとして、肺炎球菌 PspA2 にて 1 週間に 2 回 3 週間経鼻免疫を行った後に、雄マウスと交配し仔マウスを得た。仔マウスが生まれた直後に、免疫母マウスと非免疫母マウスを交換し、A 群:免疫母マウス-免疫母マウス由来仔マウス(母乳+経胎盤移行抗体)、B 群:免疫母マウス-非免疫母マウス由来仔マウス(母乳)、C 群:非免疫母マウス-免疫母マウス由来仔マウス(経胎盤移行抗体)、D 群:非免疫母マウス-非免疫母マウス由来仔マウス(コントロール)に分類した後に、母マウス血清・母乳中および仔マウス血清中の抗 PspA 特異的 IgG、IgM、IgA 抗体価、および肺炎球菌の鼻腔への定着抑制、肺炎および腹腔内接種による全身感染の予防効果について検討した。

C 研究結果

1. マクロライドによる Opaque 型肺炎球菌の抑制の検討

肺炎球菌対数前期増殖期においては、クラリスロマイシンおよびアモキシシリンは肺炎球菌の増殖、フェーズ変化および莢膜多糖体量に影響を示さなかったが、対数中期増殖期では、クラリスロマイシン群において Transparent 型コロニーの割合が

上昇するとともに、莢膜多糖体量が減少した。

2. インフルエンザ菌バイオフィルムの形成におよぼす抗菌薬の効果の検討

MBECについては、アモキシシリン、セフトレンではMICとMBECの乖離が大きく、ヒトへの薬剤投与後の組織濃度ではMBECに達する菌株は見られなかった。マクロライド系抗菌薬のクラリスロマイシンでは臨床的組織濃度の6.3 μ g/mlで13%の菌株でMBECに達していた。アジスロマイシンではMBECがMICよりも低値を示した。ニューキノロン系抗菌薬のレボフロキサシンでは極めて低濃度でMBECに達していた。また、アモキシシリン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンとも抗菌薬暴露時間を24時間、48時間、72時間、96時間と延長させてもバイオフィルムを減量する濃度には変化が見られなかった。しかし、バイオフィルム形成前段階で抗菌薬を投与した場合には、バイオフィルム形成が抑制された。

3. 肺炎球菌 PspA 母体経鼻免疫による新生児マウスの肺炎球菌感染症予防の検討

PspAの母体経鼻免疫により母マウス血清中および母乳中に、抗PspA特異的IgG抗体およびIgA抗体が誘導され、IgG抗体が優位であった。また、PspAで経鼻免疫した母マウス由来の仔マウス(A群)では、経胎盤的に移行した抗PspA特異的IgG抗体が出生時から血清中に存在するとともに、母乳栄養により高いレベルで維持された。これらの、抗肺炎球菌PspA応答の誘導とともに、仔マウス鼻咽腔への肺炎球菌定着が予防、肺炎球菌性肺炎が予防され、肺炎球菌全身感染後の生存期間の延長が認められた。

D,E 考察および結論

上気道感染症において重要な起炎菌である肺炎球菌およびインフルエンザ菌は、薬剤耐性化の急増のみならず、自身の持つ巧妙な感染機序により、宿主の感染防御能および抗菌薬殺菌作用より逃れている。本研究では、このような肺炎球菌およびインフルエンザ菌の感染機序に注目し、従来までの抗菌薬の新たな有効性を検討した。

肺炎球菌は、感染環境にあわせて莢膜が厚く補体結合性が乏しくオプソニン貪食されにくいOpaque型と、莢膜構造が薄く付着に適したTransparent型に変化する。我々の検討では、急性中耳炎の鼻咽腔では付着に適したTransparent型が優位であるのに対して、中耳貯留液中では殺菌作用に抵抗を示すOpaque型が優位に検出される。本研究では、マクロライド系抗菌薬であるクラリスロマイシンがSub-MIC濃度で肺炎球菌のフェーズ変化を抑制し、Transparent型株優位に変化させることが判明した。一方、インフルエンザ菌のバイオフィルム形成に対しては、 β ラクタム薬ではバイオフィルム内細菌の殺菌作用、およびバイオフィルム量減量効果が不良であるのに対してマクロライド系、キノロン系の抗菌薬では抗バイオフィルム効果が良好であった。これらのバイオフィルム抑制作用は抗菌薬暴露時間によらず、バイオフィルム形成の早期での抗菌薬暴露が重要であることが判明した。これらのことより、難治化する上気道感染には、起炎菌の巧妙な感染機序も関与しており、これら起炎菌の感染機序を標的として既存の抗菌薬を効果的に使うことでより臨床効果が得られる可能性が示唆された。

また、上気道感染症の効果的な予防法の確立においては、乳幼児期は母体から

の胎盤移行抗体および母乳を介した免疫補助から、宿主自体による免疫応答への発育移行期であり、肺炎球菌感染症の好発時期でもある。母体経鼻免疫により、肺炎球菌特異的移行抗体を誘導することにより免疫能の未熟な乳幼児期に特異的免疫応答を誘導することが可能であり、肺炎球菌の鼻腔定着、肺炎および全身感染に対する効果的な予防方法となると考えられた。

F 研究発表

1) 論文発表

1. Kono M, Hotomi M, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Maternal immunization with pneumococcal surface protein A protects against pneumococcal infections among derived offspring. *PLoS One*. 2011;6(10):e27102.
2. Togawa A, Hotomi M, Tamura S, Yamanaka N. Clinical scoring system of acute pharyngotonsillitis. *Adv Otorhinolaryngol*. 2011;72:139-41.
3. Hotomi M, Kono M, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Protection of pneumococcal infection by maternal intranasal immunization with pneumococcal surface protein A. *Adv Otorhinolaryngol*. 2011;72:121-5.
4. Arai J, Hotomi M, Hollingshead SK, Ueno Y, Briles DE, Yamanaka N. *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluid and nasopharynx of children with acute otitis media exhibit phase variation. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr;49(4):1646-9.
5. 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 Aug;74(8):901-6.

6. 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 Oct;169(10):1221-5.
7. 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 Oct;37(5):594-600.

2) 学会発表

1. Hotomi M, Kono M, Masuno A, Takei S, Sugita G, Togawa A, Yamanaka N. Efficacy of laser assisted myringotomy against acute otitis media. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
2. Masuno A, Hotomi M, Kono M, Takei S, Ikeda Y, Sugita G, Togawa A, Tamura S, Yamanaka N. Clinical outcome of pediatric acute otitis media caused by β -lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae*. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
3. Sugita G, Hotomi M, Sugita R,

- Togawa A, Kono M, Hayashi M, Ikeda Y, Tatsumi Y, Tamura S, Yamanaka N. Clinical evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ODK-0902) for detection of *Haemophilus influenzae* antigen in nasopharyngeal secretion and middle ear fluids. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
4. Togawa A, Hotomi M, Takei S, Hayashi M, Kono M, Ikeda Y, Sugita G, Yamanaka N. Clinical efficacy of middle ear ventilation tube insertion against intractable acute otitis media. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 5. Kono M, Hotomi M, Ikeda Y, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Memory of PspA specific immune responses in offspring delivered from immunized mother mice. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 6. Ikeda Y, Hotomi M, Kono M, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Cross protection against *S. pneumoniae* infections by maternal immunization with PspA. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 7. Kono M, Hotomi M, Ikeda Y, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Induction of specific immune responses against *S. pneumoniae* by maternal immunization with pneumococcal surface protein A (PspA). 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 8. Arai J, Hotomi M, Kono M, Ogami M, Ueno Y, Hollingshead SK, Briles DE, Yamanaka N. Phase variation of *Streptococcus pneumoniae* simultaneously isolated from middle ear fluid and nasopharynx of children with acute otitis media. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 9. Tatsumi Y, Hotomi M, Sugita R, Sugita G, Kono M, Togawa A, Hayashi M, Takei S, Ikeda Y, Yamanaka N. Clinical evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ODK-0901) for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in nasopharyngeal secretion and middle ear fluids. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 10. Masuno A, Hotomi M, Hayashi M, Ogami M, Tamagawa S, Tatsumi Y, Togawa A, Tamura A, Yamanaka N, ATOMS group. Surveillance of causative pathogens of pediatric acute otitis media in Japan. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 11. Ikeda Y, Hotomi M, Hiraoka M, Sugita G, Masuno A, Takei S, Kono M, Beder LB, Togawa A, Yamanaka N. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution, antimicrobial resistance, and serotype composition of *Streptococcus pneumoniae* isolated from upper respiratory tract infections in Japan. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media,

- 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
12. Takei S, Hotomi M, Moriyama S, Hayashi M, Ikeda Y, Tamagawa S, Yamanaka N. Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae* isolated from otitis media. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 13. Hotomi M, Beder LB, Ogami M, Tatsumi Y, Tamagawa S, Yamanaka N. Detection of respiratory virus in pediatric acute otitis media. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 14. Togawa A, Hotomi M, Hiraoka M, Kono M, Ikeda Y, Hayashi M, Sugita G, Takei S, Yamanaka N. Delayed antimicrobial treatment does not change the clinical course of non-severe acute otitis media. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 15. Ogami M, Hotomi M, Sakai A, Moriyama S, Ikeda Y, Kono M, Masuno A, Takei S, Tatsumi Y, Yamanaka N. Quantitative determination of *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal secretion and middle ear fluid from children with acute otitis media. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.
 16. Sugita R, Yamanaka N, Hotomi M, Uno Y, Matsubara M, Hayashi Y, Sawada S. Efficacy of tosufloxacin, oral fluoroquinolone, for pediatric acute otitis media with special emphasis on severe, recurrent, or

prolonged cases. 10th International Symposium of Recent Advances in Otitis Media, 2011, June 5-9, NewOrleans, USA.

G. 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

肺炎球菌における抗原性タンパクの 迅速スクリーニング法の開発

研究分担者 荒川宜親 名古屋大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨

肺炎球菌ワクチンの抗原になりうる分子を探索する技術を構築する事を目的とし、肺炎球菌の細胞表面に存在しヒトにおいて抗体産生を誘発するタンパクを、ウェスタンブロッティングと質量分析によるタンパク同定法を組み合わせるスクリーニングする方法を開発した。これまでにヒトに対し抗原性が報告されている PspA、PsaA、及び PrtA を検出したことから、本スクリーニング法が有効に機能することが確認された。また、これまでに抗原性についての評価がなされていなかったコリン結合性タンパク（PcpA 及び PspC）、Clp プロテアーゼファミリー（ClpB、ClpC、及び ClpE）、及び機能未知分泌タンパク” Secreted 45 kDa protein” を新たに検出した。

研究協力者 長谷川 忠男
名古屋市立大学大学院医学研究科・教授
研究協力者 柴山 恵吾
国立感染症研究所細菌第二部・部長
研究協力者 岡本 陽
名古屋大学大学院医学系研究科・助教

A. 研究目的

肺炎球菌は小児の肺炎や中耳炎、侵襲性感染症の起原菌として問題となる病原菌の一つとして知られている。本邦では小児における髄膜炎の予防のため7価タンパク結合型ワクチン、また高齢者の菌血症などの

予防のために 23 価ワクチンが認可されており、接種が広まってきている。これらのワクチンは、ヒトに対し侵襲性の強い複数の血清型の肺炎球菌の莢膜糖鎖を抗原として含んだ多価の結合型ワクチンであり菌体表面の糖鎖構造を標的としている。7 価タンパク結合型ワクチンのキャリアタンパクとしてはジフテリアトキソイドが用いられている。米国などではより肺炎球菌に特化するため、肺炎球菌の細胞表面に存在するタンパクをキャリアとしたワクチンの開発がなされている。そこで本研究では、ウェスタンブロッティングと質量分析計による

タンパク同定を組み合わせた方法による肺炎球菌の細胞表面に存在する新しいワクチン抗原候補となりうるタンパクの迅速スクリーニング法を開発、評価した。

B. 研究方法

菌株として、当研究室に保存されていた臨床由来の *Streptococcus pneumoniae* 血清型 (ST) 3、4、6B、19F、23F を用いた。それぞれの菌株を Brain Heart Infusion 培地を用いて 16 時間 37°C で培養した後、菌体を回収してフレンチプレスで細胞を破碎し、遠心分離により不溶性分画 (細胞壁画分) を回収した。不溶性分画は TCA-アセトン沈澱により粗精製した後、二次元電気泳動によりタンパクを分離し、ポリアクリルアミドゲルから PVDF メンブレンに転写した。このメンブレンに対し、3 人の健康人由来の血清を 1 次抗体 (Serum 1~3)、また HRP-conjugated anti-human IgG を 2 次抗体としてウェスタンブロットティングを行った。このメンブレン上において検出されたスポットを直接切り取り、膜上でトリプシン消化によりペプチド断片を回収、質量分析計によりタンパクの同定を試みた。

C. 研究結果

ウェスタンハイブリダイゼーションの結果を図 1 から図 5 に示す。また、そのまとめた結果を表 1 に示す。

ST3 株では Serum3 にのみ PspA、ClpB、及び Secreted protein 45 (Sep45) が検出された。これらのタンパクは、Serum 1 及び 2 には見られなかった。ST4 株では Serum1~3 に共通して PcpA が検出され、PspA が Serum 1 及び 3、ClpE と Sep45 が Serum 2 及び 3、また PspC 及び ClpB が Serum 3 でのみ検出された。ST6B 株では Sep45 が Serum 1~3 に共通して検出され、ClpB が Serum 1 及び 2、PcpA 及び PsaA が Serum 3 でのみ検出さ

れた。ST19F では PspA、PspC、及び ClpE が Serum 1~3 で共通して検出され、ClpB 及び Sep45 が Serum 1 及び 3 で、また ClpC が Serum 2 でのみ検出された。ST23 株では PspC が全ての Serum 1~3 で共通して検出され、ClpB 及び Sep45 が Serum 2 及び 3 で、ClpE が Serum 1 でのみ、PrtA が Serum 2 でのみ、また PcpA 及び PspA が Serum 3 でのみそれぞれ検出された。

それぞれのタンパクの視点から評価すると、ClpB 及び Sep45 が 5 つの株で共通して検出され、次いで ClpE、PcpA、PspA、PspC が 3 株で、PsaA が 2 株で、また ClpC 及び PrtA が 1 株で検出された。

また血清の側から分析すると、ClpB、Sep45、ClpE、PcpA、PspA、及び PspC は全ての血清で反応しているが、PsaA、ClpC、及び PrtA はいずれかの 1 つの血清とのみ反応がみられた。

D. 考察

肺炎球菌は肺炎や中耳炎などの疾患を引き起こす病原性細菌としての側面を持つ一方で、健康人でも一定の割合で保菌している上気道常在細菌叢を構成する菌種としての側面も知られている。このことから、健康人においては鼻腔等に定着した肺炎球菌により、持続的な抗原刺激が発生し、肺炎球菌の表層分子に対する免疫グロブリンの価が高く維持され、肺炎や侵襲性の感染症の発症が防がれている可能性がある。そこで本研究では、少なくとも過去に肺炎球菌による重篤な感染症の病歴を持たない 3 人の健康人由来の血清を用いて、肺炎球菌の産生する抗原の中から、ヒトにおいて強い抗原性応答を誘発し、新規のワクチン抗原となりうる可能性のあるタンパクの探索を、質量分析法を駆使して試み、今回の方法が、実用性のあるスクリーニング法であること

を確認したという点において、新しい試みと考えられる。

これまでにヒトにおいて抗体産生を誘発する肺炎球菌の細胞表面タンパクとして、PspA、PsaA、及び PrtA が知られており、本研究においてもこれらのタンパクが検出されている。このことから、本方法によるタンパクのスクリーニングが機能している事が実証された。数種のコリン結合性タンパク (PcpA 及び PspC)、及び Clp プロテアーゼファミリー (ClpB、ClpC、及び ClpE) も本方法により検出されており、これらは、病原性に関与する細胞表面に局在するタンパクであることが知られていたが、これまでの報告では抗体産生誘導能については不明な点を残していた。今回の研究により、これらのタンパクに対する抗体が健常者の血清中に出現していることがはじめて確認され、肺炎球菌ワクチンのキャリア蛋白の候補となりうる事が示唆された。さらに本研究において Sep45 と命名した” Secreted 45 kDa protein” とアノテーションされている機能未知のタンパクが、試験に用いた5種類の異なる血清型の全ての株から検出され、また、全ての血清と反応した。このタンパクは分泌シグナルをもつことから、菌体外に分泌されていると考えられるが、本研究により細胞の不溶性画分から検出されていることから、細菌細胞の膜表層に局在し、同時に培養液中にも徐々に放出されているタンパクである可能性が示唆された。

これまでに抗原性タンパクとして報告されている PspA、PsaA、及び PrtA は、幅広い菌株においてよく保存されていると考えられていたものの、本研究では全ての株において共通には検出されなかった。この原因がアミノ酸配列の変異によるものなのか、あるいはそれぞれの菌株におけるタンパクの発現の差異によるものなのかを今後検討

する必要がある。一方でこれまでに抗原性タンパクとしてあまり注目されていなかった ClpB や、Sep45 などが全ての血清と反応し、幅広い菌株から検出された。新たなキャリアタンパクの候補物質としての可能性を含め、今後検討を継続する必要がある。

E. 結論

質量分析法を応用した方法により既知の抗原性タンパクが検出されるとともに、これまでに報告のない新しい細胞表面タンパクを検出することができた。このことから、肺炎球菌ワクチンの開発における新しいタンパク性抗原あるいはキャリアタンパクのスクリーニング法として、本スクリーニング法が有効に機能することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Application of LC-ESI-MS/MS for detection of potent immunogenic proteins utilized for future vaccine development and diagnosis.

*Akira Okamoto, Tadao Hasegawa, Keiko Yamada, Yoshichika Arakawa

November 14-15, 2011. 15th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting (Wakayama, Japan)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

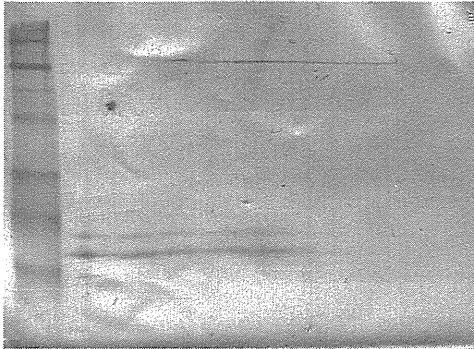
なし

表 1 抗原性タンパクとして検出されたタンパク一覧

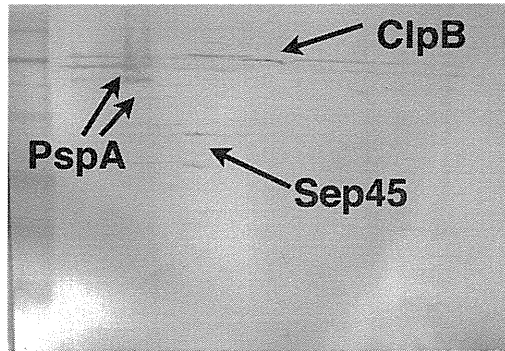
Protein	Strain (n=5)	Serum (n=3)
ClpB	5	3
Sep45	5	3
ClpE	3	3
PcpA	3	3
PspA	3	3
PspC	3	3
PsaA	2	1
ClpC	1	1
PrtA	1	1

図1 血清型3型(ST3)株のウェスタンブロッティング像

Serum 1



Serum 3



Serum 2

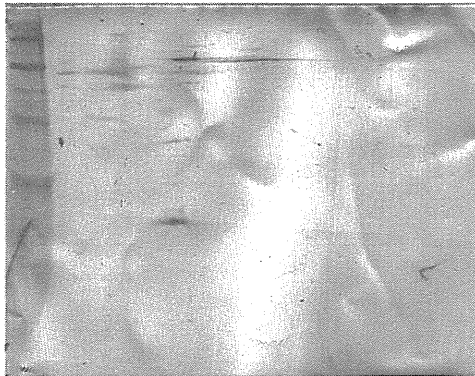
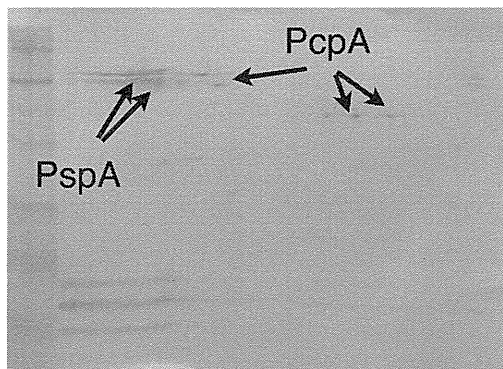
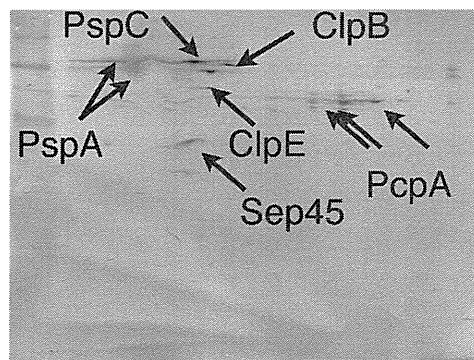


図2 血清型4型(ST4)株のウェスタンブロッティング像

Serum 1



Serum 3



Serum 2

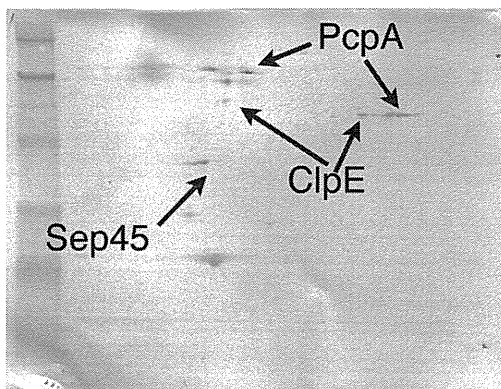
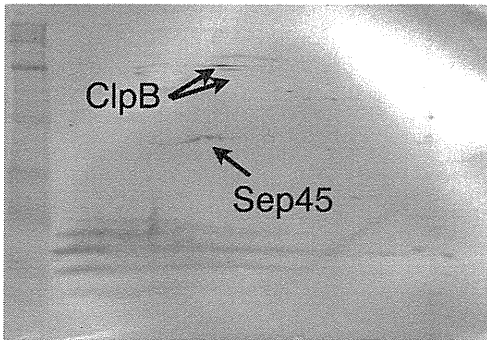
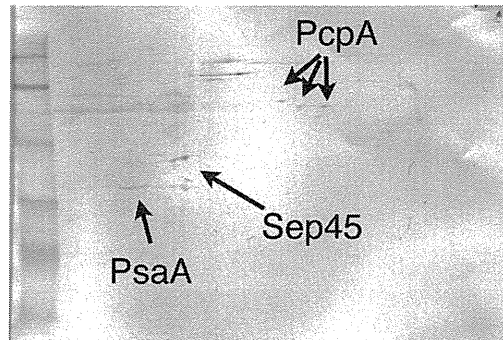


図3 血清型 6B 型 (ST6B) 株のウェスタンブロッティング像

Serum 1



Serum 3



Serum 2

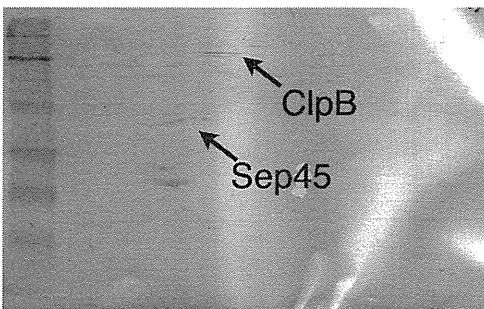
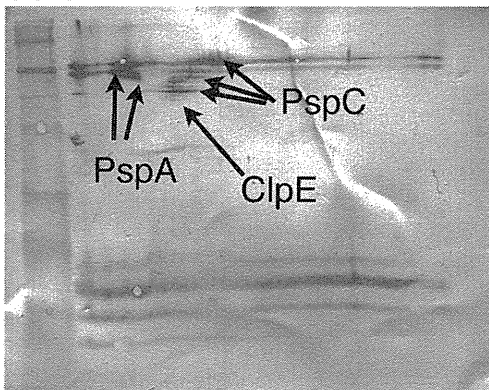
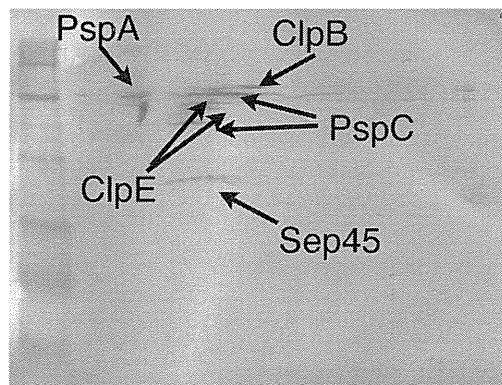


図4 血清型 19F 型 (ST19F) 株のウェスタンブロッティング像

Serum 1



Serum 3



Serum 2

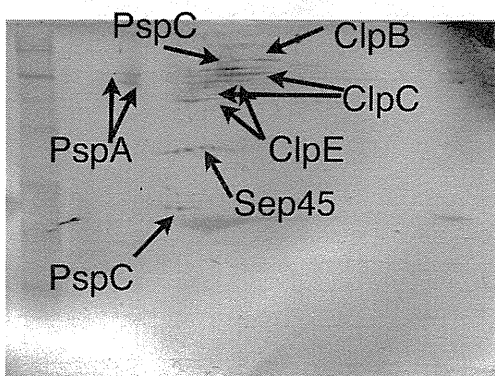
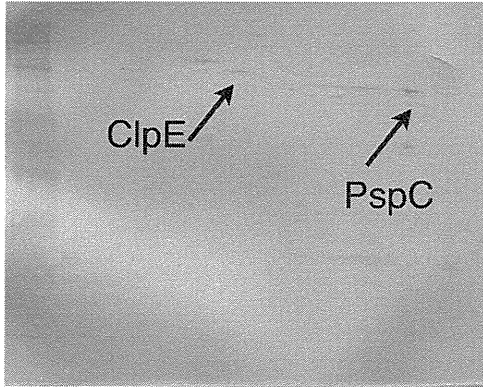
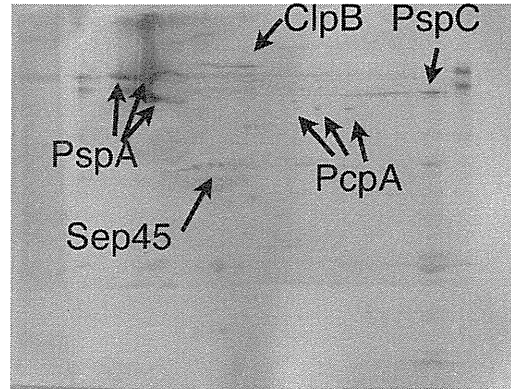


図 5 血清型 23F 型 (ST23F) 株のウェスタンブロッティング像

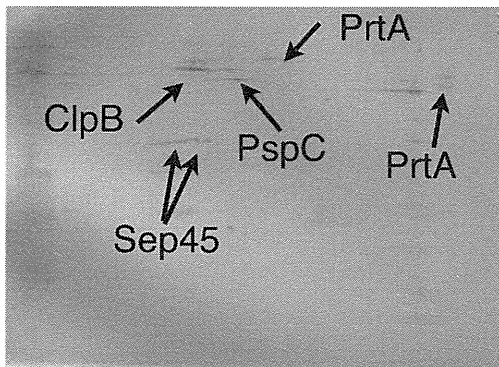
Serum 1



Serum 3



Serum 2



厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）
分担研究報告書

7 価肺炎球菌ワクチン導入前後の小児呼吸器感染症由来肺炎球菌血清型に関する検討

研究分担者 石和田稔彦 千葉大学医学部附属病院 感染症管理治療部・小児科

研究要旨

日本における 7 価肺炎球菌ワクチン（PCV7）導入の影響をはかる目的で、小児呼吸器検体由来の肺炎球菌の血清型解析を実施した。
解析結果から、PCV7 は小児市中肺炎に対しての有効性と集団免疫効果が期待されるが、PCV7 非含有血清型の肺炎球菌も多く分離されてきており、今後も継続的な調査が必要である。

A. 研究目的

小児呼吸器感染症由来肺炎球菌の血清型を解析し、7 価肺炎球菌ワクチン（PCV7）導入の影響と今後の課題を明確にする。

B. 研究方法

小児肺炎患者・気道感染症患者・健康小児（保育園通園児）の喀痰等呼吸器検体から分離された肺炎球菌の血清型及び multi-locus sequence type (ST) を調査する。

（倫理面への配慮）

千葉大学医学部倫理委員会の承認を得て、研究を行っている。

C. 研究結果

PCV7 導入前の小児肺炎症例から分離される肺炎球菌の 66.7% が PCV7 に含まれる血清型であった。

気道感染患者からは、PCV7 既接種者においても PCV7 に含まれる血清型が多数分離された。また、PCV7 導入後 1 年足らずで、6C

など PCV7 に含まれない血清型の肺炎球菌が、PCV7 既接種気道感染症患者から多く分離された。

80% 以上の高い PCV7 接種率の保育園での保菌調査では、肺炎球菌の保菌者は減少していた。PCV7 に含まれない血清型の肺炎球菌がワクチン接種児の分離菌の主体となっていた。

D. 考察

PCV7 導入前の肺炎球菌性肺炎の主体は、PCV7 含有血清型であり、PCV7 の導入効果が期待される。

気道感染症、健康小児の保菌においては、PCV7 導入早期において、既に PCV7 非含有血清型の肺炎球菌が原因となってきている。

E. 結論

PCV7 の肺炎球菌性肺炎予防効果及びに集団免疫効果が期待できる。

PCV7 導入後の気道からの分離菌の血清型調査を継続的に行っていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka J, Ishiwada N, Wada A, Chang B, Hishiki H, Kurosaki T, Kohno Y. Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in Streptococcus pneumoniae isolates in Japan. Epidemiol Infect. 30:1-11, 2011

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. 17:87-90, 2011

星野直, 石和田稔彦, 深沢千絵, 永井文栄, 阿部克昭, 会沢治朗, 石川信泰, 本田喜子, 田中純子, 菱木はるか, 河野陽一

喀痰より耐性菌が検出された小児細菌性気管支肺感染症の臨床背景に関する検討. 小児感染免疫 23 ; 251-256, 2011

2. 学会発表

Naruhiko Ishiwada : Current status of pediatric pneumococcal disease in Japan . 61st Korean Pediatric Society Annual Autumn Conference Seoul, Korea 2011.10.21

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

中国における市中気道感染症由来 *Haemophilus influenzae* の薬剤感受性及び水平伝播についての研究

分担研究者 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)
研究協力者 秦 亮 (久留米大学医学部 感染医学講座 臨床感染医学部門)

研究要旨 中国における気道感染症由来の *Haemophilus influenzae* を対象とし、薬剤感受性や伝播状況について検討した。2008 年 12 月から 2009 年 4 月の間、上海市の市中病院 11 ヶ所において 37 名の気道感染症患者より 37 株の *H. influenzae* が分離され、その内 2 株(5.4%)は *H. influenzae* serotype b であり、30 株(81.1%)は nontypeable *H. influenzae* であった。また、 β -lactamase-nonproducing ampicillin-sensitive *H. influenzae* は 16 株(43.24%)、 β -lactamase-producing ampicillin-resistant *H. influenzae* は 10 株(27.03%)、Low- β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae* は 11 株(29.73%)であったが、 β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *H. influenzae* は分離されなかった。最小発育阻止濃度(MIC₉₀)は、Ampicillin/sulbactam、Cefotaxime、Cefaclor、Azithromycin、Levofloxacin および Imipenem の順にそれぞれ 2, 0.05, 16, 2, 0.12, 4 であった。また、パルスフィールドゲル電気泳動法では 23 種類の遺伝子パターンが検出された。今回の研究結果より、中国においても薬剤耐性 *H. influenzae* が認められ、多種類の *H. influenzae* クローンが上海市中に伝播していることが示唆された。

A. 研究目的

中国では 1997 年に高病原性鳥インフルエンザ (H5N1)、2003 年には重症急性呼吸器症候群 (SARS) が発生し、世界的に問題となった新興感染症発生の起点となった。しかし、近年このような呼吸器疾患の新興感染症の発生があったにもかかわらず、呼吸器感染症の原因菌についての研究はまだ十分になされていないのが現状である。中国においても *Haemophilus influenzae* による市中気道感染症は、日常的にみられる呼吸器感染症であり、時に重症化することが知られている。我々は *H. influenzae* の薬剤感受性や伝播状況について以下の検討を行なった。

B. 研究方法

我々は上海復旦大学附属中山医院において現場調査に関する討論を行い、共同研究のプロトコルを作成した。上海市における 11 ヶ所の市中病院において、気道感染症外来患者を対象とし、文章によるインフォームドコンセントを行った上で、痰や咽頭拭い液の採取を行った。中山医院では送られた臨床検体より *H.*

influenzae を分離・同定し、血清型別、薬剤感受性、耐性遺伝子およびパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)などの解析を行った。

C. 研究結果

2008 年 12 月から 2009 年 4 月の間、上海市における 11 ヶ所の市中病院において市中気道感染症外来患者 37 名(男: 18 名, 女: 19 名)から 37 株の *H. influenzae* が分離され、その内 β -lactamase-nonproducing ampicillin-sensitive (BLNAS) *H. influenzae* は 16 株(43.24%)、 β -lactamase-producing ampicillin-resistant (BLPAR) *H. influenzae* (TEM-1)は 10 株(27.03%)、Low- β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant (BLNAR) *H. influenzae* は 11 株(29.73%)であったが、BLNAR 株は分離されなかった。また、血清型解析では b 型株は 2 株(5.41%)で、nontypeable 株は 30 株(81.1%)であった(Table 1)。

Table 1. Characteristics of strains and distribution of serotypes

Samples	Serotypes (%)				Sputum	Throat swab (%)
	b	c	d	Nontypeable		
BLNAS	0	1	2	13	5	11
BLPAR (TEM-1)	2	2	0	6	3	7
Low-BLNAR	0	0	0	11	4	7
BLNAR	0	0	0	0	0	0
Total	2 (5.4)	3 (8.1)	2 (5.4)	30 (81.1)	12 (32.4)	25 (67.6)

薬剤感受性成績は、ニューキノロン剤やカルバペネム剤などは良好な感受性を示したが、第一世代の経口セフェム剤やβ-ラクタマーゼ阻害薬配合ペニシリン剤に対しては一部耐性株が認められた(Table 2)。

Table 2. Results of antimicrobial susceptibility against selected antibiotics

Samples	MIC ₅₀ (MIC ₉₀) (Range) (μg/ml)					
	ABPC/SBT	CTX	CCL	AZM	LVFX	IPM
BLNAS	0.5 (0.5) (0.12-2)	0.015 (0.03) (0.008-0.06)	2 (4) (0.03-16)	1 (2) (0.25-4)	0.03 (0.12) (0.008-1)	0.5 (1) (0.06-4)
BLPAR (TEM-1)	1 (2) (0.25-4)	0.015 (0.03) (0.008-0.06)	2 (4) (2-4)	0.5 (1) (0.12-4)	0.015 (0.12) (0.008-0.25)	0.25 (1) (0.12-1)
Low-BLNAR	0.5 (1) (0.5-2)	0.03 (0.06) (0.008-0.06)	3 (32) (2-64)	1 (2) (0.25-2)	0.015 (0.03) (0.008-0.06)	1 (4) (0.25-4)
Total	0.5 (2) (0.12-4)	0.015 (0.03) (0.008-0.06)	2 (16) (0.03-64)	1 (2) (0.12-4)	0.015 (0.12) (0.008-1)	0.5 (4) (0.06-4)

PFGE 解析により、23 種類の遺伝子パターンが検出され、A パターンの株が最も優位であった。BLPAR 株では 2 株以外すべては A パターン株だった。Low-BLNAR 株では、4 株が A パターン株であるが、他の菌株は異なる遺伝子パターンを持っていた。BLNAS 株においては多彩な遺伝子パターンが示された。(Figure 1-3)

Figure 1. PFGE results of BLPAR (TEM-1) strains

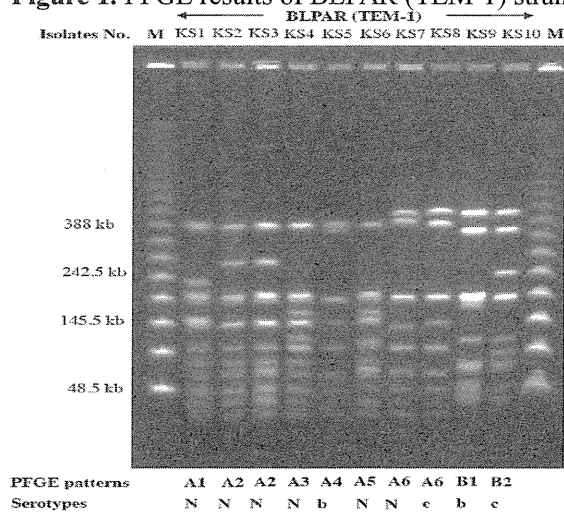


Figure 2. PFGE results of Low-BLNAR strains

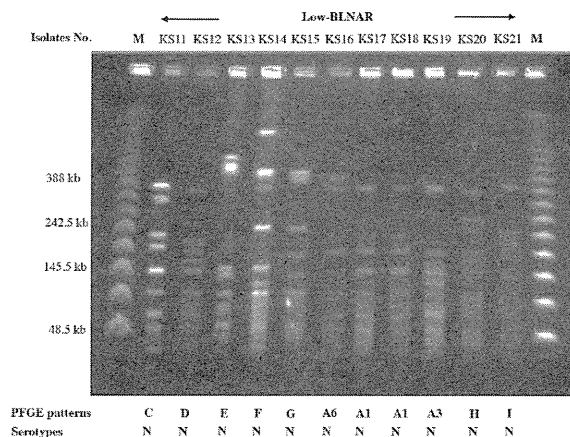
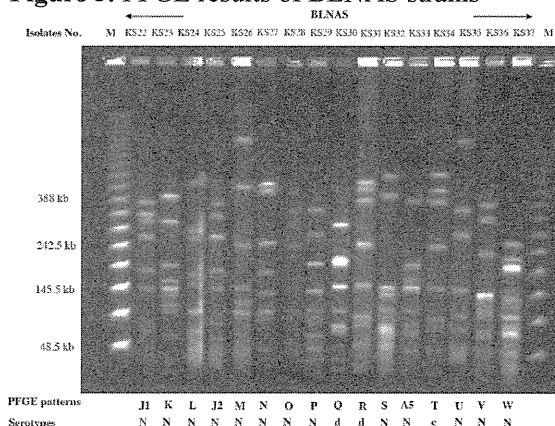


Figure 3. PFGE results of BLNAS strains



D. 結論および考察

本研究において、nontypeable 株の分離頻度が高く、日本で多くみられる BLNAR 株は今回認めなかった。しかし、Low-BLNAR 株を含めた耐性株は比較的多く分離されたことから、今後 BLNAR 株を含めた耐性菌の動向について、モニタリングの必要があると考えられた。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- Zhou Z, Qin L, Hu B, and Watanabe H. Expression of Legionella pneumophila virulence genes under biofilm condition. Chinese journal of microbiology and immunology 31(5): 413-416, 2011.
- Masaki H, Qin L, Zhou Z, Onizuka T, Watanabe K, Hu B, and Watanabe H. A prospective study of intrafamilial transmission and antimicrobial susceptibility for Moraxella catarrhalis. Microbiol Immunol 55(9): 599-604, 2011.

3. Hara K, Yahara K, Gotoh K, Nakazono Y, Kashiwagi T, Imamura Y, Hamada N, Khositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Maneekarn N, Sirisanthana T, and Watanabe H. Clinical study concerning the relationship between community-acquired pneumonia and viral infection in northern Thailand. *Intern Med*, 50: 991-998, 2011.
 4. 柏木孝仁、渡邊浩 「久留米大学試験問題プールシステム-Ku-Pool-」久留米コンピュータジャーナル Vol. 25., 2011.
2. 学会発表
1. 松田光弘、谷 直美、小野文武、田口千香子、名取宏記、渡邊 浩、安元慎一郎、橋本 隆 「ぶどう膜炎と多彩な粘膜症状を呈した HIV に伴った第 2 期梅毒の 1 例」日本性感感染症学会第 24 回学術大会、東京、2011.12.3.
 2. 渡邊 浩、日高秀信、秦 亮 「*Bacillus cereus* による院内食材の汚染事例とその対策」第 59 回日本化学療法学会西日本支部総会、奈良、2011.11.24.
 3. 秦 亮、渡邊 浩 「*Haemophilus influenzae* isolated from community acquired respiratory tract infection patients in China」第 59 回日本化学療法学会西日本支部総会、奈良、2011.11.24.
 4. 渡邊 浩 「教育セミナー、呼吸器感染症のトピックス、インフルエンザの基礎知識と対策」第 67 回日本呼吸器学会・日本結核病学会九州支部秋季学術講演会、福岡、2011.11.19.
 5. Kashiwagi T, Hara K, Hamada N and Watanabe H. The PA subunit of the influenza A virus RNA polymerase contributes its stable activity on thermal stress through the promoter binding. United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 15th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting. Wakayama, Japan, 2011.11.15
 6. Qin L, Goto K, and Watanabe H. Concurrent administration of antibiotics, the role of antimicrobial effect of imipenem for the nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infections Panel. Wakayama, Japan, 2011.11.14.
 7. Miura M, Masunaga K, Qin L, Kawano S, Watanabe M, Yamashita N, Sakamoto T, and Watanabe H. Infection control for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in advanced emergency medical service center monitored by molecular analysis. The 5th International Congress of the Asia Pacific Society of Infection Control (APSIC). Melbourne, Australia, 2011.11.8-11.
 8. 渡邊 浩 「若手医師と看護師のためのセミナー、MRSA 感染症の実態とその対策」第 20 回日本脊椎インストゥルメンテーション学会、久留米、2011.10.29.
 9. 渡邊 浩 「ICD 講習会、他職種多領域の連携と感染制御、久留米大学病院における ICD 活動の現状」第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、北九州、2011.10.8.
 10. 渡邊 浩 「シンポジウム 4、感染症ワクチン：日本人におけるワクチンマネージメント、海外渡航とワクチン」第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、北九州、2011.10.8.
 11. 原 好勇、渡邊 浩 「H5N1 インフルエンザウイルスの遺伝子再集合の制御機構：PB2 の機能的役割」第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、北九州、2011.10.8.
 12. 上村勇作、秦 亮、日高秀信、渡邊 浩 「肺炎球菌バイオフィルム観察システムの構築についての検討」第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会、北九州、2011.10.7.
 13. 濱田信之、原 好勇、中園陽子、柏木孝仁、渡邊 浩 「Inhibitory effect of human metapneumovirus (HMPV) M2-2 on RNA synthesis」第 15 回 国際ウイルス学会 (15th International Congress of Virology)、札幌、2011.9.13
 14. 中園陽子、原 好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊 浩 「Mutational analysis of the PB2 subunit of H5N1 influenza virus RNA polymerase required for the assembly of the functional hybrid ribonucleoprotein」第 15 回 国際ウイルス学会 (15th International Congress of Virology)、札幌、2011.9.13
 15. 渡邊 浩、日高秀信 「久留米大学病院海外旅行・ワクチン外来の現状」第 15 回日本渡航医学会学術集会、札幌、

- 2011.7.31.
16. 日高秀信、渡邊 浩「当院におけるワクチン接種後の副反応のまとめ」第15回日本渡航医学会学術集会、札幌、2011.7.31.
 17. 渡邊 浩、秦 亮「久留米大学病院高度救命救急センターにおけるMRSAアウトブレイクへの対応」第59回日本化学療法学会総会、札幌、2011.6.24.
 18. 秦 亮、渡邊 浩「中国における市中気道感染症由来 *Haemophilus influenzae* の薬剤感受性及び水平伝播についての研究」第59回日本化学療法学会総会、札幌、2011.6.24.
 19. Watanabe H. 日本久留米大学附院的锐器伤予防対策. Joint Meeting of the 20th National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 7th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Shanghai, China, 2011.5.26.
 20. Qin L and Watanabe H. ICT (Infection control team)在医院感染控制中的作用. Joint Meeting of the 20th National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association (CPMA) and the 7th Shanghai International Forum of Infection Control (SIFIC). Shanghai, China, 2011.5.26.
 21. Hidaka H, Watanabe H and Gotoh K. Comparison of travel clinic patients according to destination, in Kurume university hospital, Japan. Boston, USA, 2011.5.9-12.
 22. 濱田信之、今村 豊、原 好勇、柏木孝仁、今村宜寛、千々和勝己、渡邊 浩「オセルタミビル感受性株と抵抗性株がそれぞれ左右剖検肺から検出された新型インフルエンザウイルス A (H1N1/2009)のクローン解析」第85回日本感染症学会学術総会、東京、2011.4.22.
 23. 秦 亮、真崎宏則、渡辺貴和雄、渡邊 浩「A Prospective Study of Intrafamilial Transmission and Antimicrobial Susceptibility for *Moraxella catarrhalis*」第85回日本感染症学会総会、東京、2011.4.21.
 24. 柏木孝仁、原 好勇、今村宜寛、濱田信之、渡邊 浩「A型インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素から見た温度への適応について」第85回日本感染症学会学術総会、東京、2011.4.21.
 25. 原好 勇、柏木孝仁、渡邊 浩「A型インフルエンザウイルス遺伝子複製酵素の亜型間親和性を決定するアミノ酸解析」第85回日本感染症学会学術総会、東京、2011.4.21.
 26. 酒井義朗、中垣春美、有馬千代子、鶴田美恵子、大塚まり子、安達康子、川野佐由里、三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩「久留米大学病院におけるICT活動の成果ー消毒薬使用量の減少効果ー」第26回日本環境感染学会総会、横浜、2011.2.19.
 27. 三浦美穂、川野佐由里、升永憲治、渡邊 浩「久留米大学病院における職員の結核曝露対策〜QFTを導入して〜」第26回日本環境感染学会総会、横浜、2011.2.19.
 28. 升永憲治、藤内聖子、三浦美穂、渡邊 浩「小児科病棟における院内曝露に関する対策費の検討」第26回日本環境感染学会総会、横浜、2011.2.18.
 29. 加納昭子、仁多原紀子、梶山和美、野瀬千恵美、大塚まり子、安達康子、酒井義朗、三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩「イソジンスワブスティック導入による効果」第26回日本環境感染学会総会、横浜、2011.2.18.
 30. 渡邊 浩「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」日米医学協力研究会急性呼吸器感染症専門部会会議、東京、2011.1.18.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表