

マクロライドの治療効果を評価し、適切な治療薬を決めて行く必要がある。

E. 結論

2011年から日本において流行しているマイコプラズマ肺炎患者からは、subtype 1の *M. pneumoniae* が多く分離され、その他には variant 2a と 2c があつた。分離株のうち、マクロライド耐性株が 65.7% だつた。外来治療なしで入院した症例に限ると、マクロライドは治療効果が認められなかつた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kenri T, Ohya H, Horino A, Shibayama K., Identification of *Mycoplasma pneumoniae* type 2b variant strains in Japan. J. Med. Microbiol. 2012 Nov;61(Pt 11):1633-5

鈴木里和 堀野敦子 見理 剛 佐々木裕子 柴山恵吾、安井良則 谷口清州. 2011

年流行時における *Mycoplasma pneumoniae* 感染症による入院患者の臨床的検討 IASR Vol. 33 p. 162-163: 2012年6月号

2. 学会発表

見理 剛. 次世代型 DNA シークエンサーによるマイコプラズマゲノムの解析研究. 日本マイコプラズマ学会 第 39 回 学術集会 2012年5月24-25日 盛岡市.

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

分担研究報告書

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究

分担研究者 大石和徳（国立感染症研究所）

研究協力者 朴貞玉、明田幸宏（大阪大学微生物病研究所）

研究要旨：本研究においては、肺炎球菌表層タンパク質抗原の一つである肺炎球菌表面タンパク質 A (PspA) を抗原とするワクチンの効果を調べるために、いくつかの融合型 PspA を作成した。その結果、ある特定の融合型 PspA 免疫によって得られたマウス特異抗体が全てのクレードの PspA に対して結合交差性を示し、また各種クレード発現肺炎球菌菌体に対する結合性、それらの致死感染モデルに対して感染防御効果を示した。また、その免疫血清を用いた抗体結合試験において、広範な臨床分離肺炎球菌株に対して PspA 特異 IgG の結合が見られた。

A. 研究目的

現在市販されている肺炎球菌ワクチンでは 90 を越える肺炎球菌血清型から最大 23 価の各莢膜ポリサッカライドが抗原として含有されている。しかしながらその感染防御免疫は血清型特異的なもので、ワクチン非含有血清型による感染症に対しては効果が認められない。さらに莢膜ポリサッカライドのみでは 2 歳未満の小児に対して特異免疫誘導できない等の欠点がある。小児用のコンジュゲートワクチンが開発されたが、ワクチン使用後の非ワクチン型による侵襲性感染症の増加が問題となってきた。本研究においては、以上のような現行肺炎球菌ワクチンの欠点を補う目的で、肺炎球菌表層タンパク質抗原の一つである肺炎球菌表面

タンパク質 A (PspA) の融合タンパク質を抗原とするワクチンの効果を調べた。PspA は、その抗原エピトープ領域の遺伝子配列により、大きく 3 つのファミリーに分類され、さらに 6 つのクレードと呼ばれる亜群に分類される。臨床より分離される肺炎球菌の PspA ファミリーは、ファミリー 1 および 2 で 98% 以上を占める。本研究において、いくつかのファミリー 1 とファミリー 2 の融合 PspA タンパク質を作成し、より広域な交差性を示すものを選別した。

B. 研究方法

1. 融合タンパク質の作成および精製

PspA のファミリー 1 とファミリー 2 の抗原エピトープが存在する部分の遺伝子

領域を制限酵素 *EcoRI* サイトで融合させ、pET28a(+)ベクターに挿入して、融合 PspA タンパク質発現ベクターを作成した。作成した各融合 PspA タンパク質発現ベクターを *E. coli* BL21(DE3)にそれぞれ形質転換し、これをカナマイシン 30 μ g/ml を含む LB 培地にて 37 $^{\circ}$ C で震盪培養した。吸光度 600nm が約 0.8 になった培養液に、IPTG(終濃度 0.5mM)を添加し、さらに3時間震盪培養を続け、融合 PspA タンパク質を大量発現させた。回収した菌体から融合 PspA タンパク質を抽出し、N末端に存在するポリヒスチジンタグを用いて、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーおよびゲル濾過法により精製した。精製した融合タンパク質は SDS-PAGE および抗 PspA 抗体を用いたウエスタンブロットイングにより、目的の融合タンパク質であることを確認した。

2. 融合タンパク質をマウスへ免疫

各融合タンパク質 0.1 μ g とアジュバント (Alum+CpGK3)を LPS フリーの PBS で調製し、6週齢の♀の C57/BL6j マウスに皮下接種した。同じ免疫グループあたり5匹のマウスを用いた。接種は、1週間おきに合計3回行った。最終免疫から1週間後に採血し、血清を得た。

3. 融合 PspA タンパク質免疫血清中 IgG の各 PspA クレードへの結合能

各クレードの精製 PspA 抗原タンパク質を 5 μ g/ml に調製し、96 ウエルプレートに 100 μ l/ウエルずつ添加した。これを一晩 4 $^{\circ}$ C に静置し、抗原をプレートにコー

ティングした。段階希釈した免疫血清サンプルを 50 μ l/ウエルずつ添加し、37 $^{\circ}$ C で培養後、アルカリホスファターゼ標識抗マウス IgG ヤギ抗体を添加し、室温、遮光下で培養し、OD405nm の吸光度を測定した。陰性コントロールの吸光度を引いた吸光度が 0.1 になる希釈率を Log2 で示し、これを血清中に含まれる抗 PspA 抗体価とした。

4. 融合 PspA タンパク質免疫血清中 IgG の各 PspA クレード肺炎球菌表面への結合能

肺炎球菌は、PspA クレード 1～5 の 5 種類を用いた。血液寒天培地で一晩培養した肺炎球菌株を、血液寒天培地で 4～5 時間継代培養した後、肺炎球菌を PBS にて収集した。約 1 x10⁷ CFU の肺炎球菌溶液 90 μ l と 10 μ l の免疫血清 (同じ免疫グループの混合血清) を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。さらに FITC 標識抗マウス IgG ヤギ抗体と反させた後、洗浄遠心し、菌体に結合する蛍光強度をフローサイトメトリー法で測定した。結合率は 10000 個当たりの免疫血清中 IgG 結合菌数を%で表した。

5. 融合 PspA タンパク質免疫によるマウス致死的肺炎モデルの感染防御効果

方法 2 と同じ方法でマウスに融合 PspA タンパク質の免疫を行った。最終免疫の 2 週間後にマウスに PspA のクレード 1～5 を発現する肺炎球菌株 5 株を経鼻接種し、マウス致死的肺炎モデルを作成した。マウス 1 匹に対して、クレード 1 は 2 x10⁷ CFU、クレード 2 は 2 x 10⁷ CFU、クレード

3は 5×10^6 CFU、クレード4は 1×10^8 CFU、クレード5は 5×10^5 CFUの致死的な菌量を感染させた。1群の匹数は10匹または8匹とした。免疫マウスへの肺炎球菌感染後、2週間にわたってその生存率を観察した。

C. 研究結果

1. 融合 PspA タンパク質の免疫誘導

融合 PspA タンパク質 A、B および C のいずれの免疫血清は、各クレードの PspA に対して結合性を示した。さらに、融合 PspA タンパク質 A と C の免疫血清は、融合 PspA タンパク質 B の免疫血清に比較して、高い結合性を示した。

2. 融合 PspA タンパク質免疫血清中 IgG の各 PspA クレードの肺炎球菌表面への結合能

融合 PspA タンパク質 C の免疫血清は、クレード 1～5 のいずれの肺炎球菌株に対しても高い結合性を示した。融合 PspA タンパク質 A および B の免疫血清は、クレード 3 に対しては若干低い結合性を示したが、これ以外のクレードの肺炎球菌に対しては、高い結合性を示した。

3. 融合 PspA タンパク質免疫によるマウス致死的肺炎モデルの感染防御効果

融合 PspA タンパク質 C による免疫マウスでは、PspA クレード 1～5 の肺炎球菌株のいずれを感染させた場合でも有意な生存率の改善が認められた。融合 PspA タンパク質 A および B による免疫マウスでは、PspA クレード 2、4 または 5 の肺炎

球菌株を感染させた場合に有意な生存率の改善が認められた。

4. 免疫血清中の IgG の臨床分離肺炎球菌株への結合能

肺炎球菌菌体表層に存在する PspA タンパク質に対する免疫血清中 IgG の結合が、感染防御効果に必須であることから、肺炎球菌への IgG 結合能を基準に様々な臨床分離肺炎球菌株に対する各融合 PspA タンパク質のカバー率を評価した。融合 PspA タンパク質 A、B および C による免疫血清のいずれにおいても、ほぼ全ての臨床分離肺炎球菌株 (93.5%) に対する IgG 結合能 (結合率 10%以上) を示した。さらに、融合 PspA タンパク質 C は融合 PspA タンパク質 A および B に比べて比較的高い IgG 結合能を示した。

D. 考察

融合 PspA タンパク質 C による免疫マウスにおいて PspA クレード 1～5 の肺炎球菌すべての肺炎モデルにおいて有意な生存率の改善が認められた。融合 PspA タンパク質 C による免疫血清中 IgG は臨床分離肺炎球菌株への広域で高い結合能を示した。これらの結果から、融合 PspA タンパク質 C は新規の肺炎球菌ワクチンの有望な抗原になり得ると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
1. Miyasaka T, Tetsuji Aoyagi T, Uchiyama B, Oishi K, Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata Y, Kaku K, Kawakami K. A possible relationship of natural killer T cells with humoral immune response to 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in clinical settings. *Vaccine*, 30(22): 3304-3310, 2012
2. Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, Akeda Y, Ihara T, Nahm MH, Oishi K, the Japanese IPD Study Group. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. *Vaccine*, 31: 845-849, 2013
3. Mori S, Ueki Y, Hirakata N, Oribe M, Oishi K. Impact of tocilizumab therapy on antibody response to influenza vaccine in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:2006-10.
4. Mori S, Ueki Y, Akeda Y, Hirakata N, Oribe M, Shiohira Y, Hidaka T, Oishi K. Pneumococcal polysaccharide vaccination in rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab therapy. *Ann Rheum Dis* 2013 Jan 23. [Epub ahead of print]
5. 日本内科学会成人予防接種検討ワーキンググループ編著. 二木芳人、大石和徳、川上和義、谷口清州、渡辺彰、渡邊浩. 成人予防接種のガイドンス. *日本内科学会雑誌*. 101 : 3585-3597、2012
6. 原田真菜、中村明日香、李翼、新妻隆広、木下恵司、大日方薫、大石和徳、和田昭仁、石和田稔彦、清水俊明. 7価肺炎球菌結合型ワクチン1回接種後に24F血清型肺炎球菌性髄膜炎を発症した1例. *小児感染免疫*. 24 : 253-257, 2012
7. 明田幸宏、大石和徳. 肺炎球菌ワクチン診断と治療. *100(3) : 455-458, 2012*
8. 竹内壇、大石和徳. <特集関連情報>タイにおける豚レンサ球菌感染症. *病原微生物検出情報*. 33(8) : 9-10、2012
- 田村和世、大石和徳. 話題の疾患と治療
9. 田村和世、大石和徳. 話題の疾患と治療 肺炎球菌ワクチン. *感染炎症免疫*. 42(4) : 63-65、2012
10. 竹内壇、大石和徳. 豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) による人獣共通感染症. *感染症*. 43(1) : 24-28、2013
- 著書

1. 大石和徳. 二次細菌感染対策とは？. (福岡)、2012. 11.
インフルエンザの最新知識Q&A 167-170, 2012
医薬ジャーナル社
 2. 朴 貞玉、大石和徳. マウス二次性肺炎
球菌性肺炎に対するPspAワクチンの感染防御
効果. 69-80, 2012. 医薬ジャーナル社.
2. 学会発表
1. 大石和徳. シンポジウム：抗インフルエン
ザ薬とインフルエンザワクチン. インフルエ
ンザ二次性細菌性肺炎の重症化とワクチンの
展望. 第86回日本感染症学会総会. (長崎)、
2012. 4
 2. 大石和徳. イブニングセミナー1。結合型
肺炎球菌ワクチンが拓く新時代. 第86回日本
感染症学会総会. (長崎)、2012. 4
 3. 明田幸宏、江副浩和、大石和徳. マイク
ロアレイを用いたインフルエンザウイルス感
染に伴う二次性細菌性肺炎発症に関与する宿
主および細菌性因子の網羅的解析. 第86回日
本感染症学会総会. (長崎)、2012. 4
 4. 明田幸宏、山本倫久、濱口重人、関雅文、
朝野和典、大石和徳. インフルエンザウイル
スの相違による二次性細菌性肺炎の病態比較.
第55回日本感染症学会中日本地方会学術集会
 5. 明田幸宏、古泉ゆか、大石和徳. Hibワク
チン免疫マウスにおける抗PRP IgG ELISA, 血
清殺菌能測定法の確立. 第16回日本ワクチン
学会学術集会. (神奈川)、2012. 11.
 6. 古泉ゆか、明田幸宏、大石和徳. ヒト血清
中Hib PRP IgG ELISA法の確立とこれを用い
た特異抗体 Avidity の測定. 第16回日本ワク
チン学会. 横浜. 11月17-18日, 2012年.
 7. 朴 貞玉、明田幸宏、石井 健、朝野和典、
大石和徳. Pneumococcal surface protein A
をベースとする肺炎球菌ワクチン. 第16回日
本ワクチン学会. 横浜. 11月17-18日, 2012
 8. 大石和徳、田村和世、明田幸宏、Chang Bin,
庵原俊昭. 小児侵襲性肺炎球菌感染症におけ
る感染血清型に対する血清抗体応答. 第16回
日本ワクチン学会. 横浜. 11月17-18日, 2012
 9. 大石和徳. 特別企画1 高齢者を中心とす
る呼吸器感染症ワクチンの新展開
肺炎球菌ワクチンの定期接種化を見据えて.
第52回日本呼吸器学会. 神戸. 4月20日-22日、
2012年
 10. 大石和徳. 細菌ワクチンの臨床免疫学：
今後の定期接種化を見据えて. 日本アレルギー
学会春季大会. 大阪5月19日、2012年

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

本邦における上気道感染症由来の肺炎球菌の PspA 型、薬剤感受性、
血清型の分布の検討

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・頭頸部外科准教授

研究要旨

本邦において現在臨床使用されている莢膜抗原を用いたワクチンによる肺炎球菌性感染症の予防効果は、ワクチンに含まれる血清型に限られる点が問題とされる。本研究では、本邦において上気道感染症から分離された肺炎球菌臨床分離株の血清型、薬剤感受性および肺炎球菌表面蛋白抗原型(PspA family)の分離頻度について検討した。

上気道感染症(急性中耳炎、急性鼻副鼻腔炎、急性咽喉頭扁桃炎)患者 251 名から分離された肺炎球菌分離株 251 株を用いた。PspA 型の分離頻度は、PspA1 が 44.6%に、PspA2 が 49.4%に検出された。PspA 型の分離頻度は、年齢、性別、分離部位、ペニシリン G に対する感受性で差を認めなかった一方、*mefA* 遺伝子陽性株、血清型 15B 株、血清型 19F 株では、PspA2 株が多く認められた。

中耳貯留液、鼻汁、副鼻腔分泌液、咽頭分泌物から分離される肺炎球菌のほとんどは、PspA1 あるいは PspA2 のいずれかに分類された。PspA 型の分離頻度は、莢膜血清型とは関連を示さず、これらのことから PspA を含めた肺炎球菌ワクチンは、血清型に関係なく肺炎球菌を広くカバーすることが可能であり、次世代の肺炎球菌ワクチン抗原として有用であると考えられた。

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、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。そのため、ワクチンによる肺炎球菌感染症の予防が注目される。本邦において、現在臨床使用されている肺炎球菌ワクチンは、莢膜多糖体を抗原として用いている。23 価莢膜ワクチン(23PPV)は成人例では肺炎球菌感染に対する予防効果を示す反面、2 歳以下の小児では予防効果は乏しい。一方、7 価蛋白結合ワクチン(PCV7)は、5 歳以下の小児における侵襲性感染症に対する予防効果や急性中耳炎に対する予防効果、鼻咽腔保菌の抑制効果が認められているが、

これらの予防効果はワクチンに含まれる血清型に限られる。欧米ではすでに、肺炎球菌ワクチンに含まれない非ワクチン血清型肺炎球菌による感染症の増加が問題となっている。理想的なワクチンとしては、肺炎球菌感染症の好発時期である乳幼児～幼児にも免疫原性を示すと共に、血清型に制限されない免疫応答を誘導できることが重要となる。

本研究では、本邦における上気道感染症由来の肺炎球菌株における、薬剤感受性、血清型および次世代の肺炎球菌ワクチン抗原として注目されている肺炎球菌表面蛋白抗原(PspA)型の分離頻度について検討した。

B 研究方法

1. 肺炎球菌株

2003年1月から5月に耳鼻咽喉科領域感染症サーベイランスにより得られた肺炎球菌株251株を用いた。肺炎球菌は、 α -溶血、コロニー形態、グラム染色、オプトヒン感受性、胆汁酸反応と、*ply* 遺伝子の検出により同定した。

上気道感染症(急性中耳炎、急性鼻副鼻腔炎、急性咽頭扁桃炎)患者は、0~68歳で、女性125人、男性126人であった。全251株の内訳は57株(22.7%)が中耳貯留液から、88株(35.1%)が鼻汁あるいは副鼻腔分泌液、106株(42.2%)が咽頭分泌物から分離された。

2. 薬剤感受性

ペニシリンGに対する感受性は米国 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)標準法に基づき検討し、ペニシリンGに対するMICが、 $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ をペニシリン耐性菌(PRSP)、 $0.1\sim 1 \mu\text{g/ml}$ をペニシリン中等度耐性菌(PISP)、 $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ をペニシリン感受性菌(PSSP)とした。

3. 血清型

血清型は、Statens社製抗血清を用いた莢膜膨化反応によりおこなった。

4. PspA型(PspA family)

PspA型、PCR法により分類した。プライマーは、LSM12、SKH63、SKH52、SKH41、SKH42、SKH02、*ply1*、*ply2*を用いた。PCR法による分類は以下の通りである。

PspA 1 : LSM12/SKH63、PspA2 : LSM12/SKH52、PspA3 : SKH41/SKH42。

pspA 遺伝子 : LSM12/SKH02。

pneumolysin 遺伝子 : *ply1/ply2*。

PCR法は、 $95^{\circ}\text{C}\cdot 3$ 分で処理した後に、 $95^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 分、 $62^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 分、 $72^{\circ}\text{C}\cdot 3$ 分で30サイクルの増幅、 $72^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 分の処理を行った。至適 annealing 温度は 62°C で行い、増幅を認めない場合には、 58°C から 55°C へと段階的に温度を下げて反応をおこなった。いずれの annealing 温度にてもPCR反応が起こらない場合には、*pspA* 遺伝子および pneumolysin 遺伝子を確認した後に、型別不能 PspA (PspA

NT)とした。また、*pspA* 遺伝子が検出されない場合には、PspA null型とした。

C 研究結果

1. 薬剤感受性分布と血清型分布

PSSPは93株(37.0%)に、PISPは104株(41.4%)、PRSPは54株(21.6%)に認めた。性別、分離部位によるPRSPの検出頻度の差は認めなかった。一方、薬剤耐性肺炎球菌(DRSP: PISP+PRSP)は2歳以下で多く検出された(OR 4.5, 95% CI 2.4-8.3, $p<0.001$)。

最も高頻度に検出された血清型は、19F(20.7%)であった。その他の主な血清型は、23F型(16.3%)、6B型(14.7%)、14型(8.0%)、6A型(6.4%)、3型(5.6%)であった。血清型分布と薬剤感受性には関連性があり、3型はPSSPを多く認めるのに対して、14型、19F型ではDRSPが多く認めた。主な血清型である19F型、23F型、6B型、6A型、14型はDRSPの79.1%をしめた。

一方、マクロライド感受性は、*ermB* 遺伝子陽性株は106株(42.2%)に、*mefA* 遺伝子陽性株は75株(29.8%)に、両陽性株は15株(6.0%)に、両陰性株は55株(22.0%)に認めた。性別、分離部位によるマクロライド耐性菌の分離頻度に差は認めなかった。血清型別に見たマクロライド耐性菌の分離頻度では、*mefA* 遺伝子陽性株は19F型に多く認めた。分離頻度の高い6つの血清型: 19F型、23F型、6B型、6A型、14型、3型で総肺炎球菌株の60.6%をマクロライド耐性菌の77.6%をしめた。

2. PspA型と血清型・薬剤感受性の関係

PspA1は44.6%に、PspA2は49.4%に認め、総肺炎球菌の94.0%がPspA1あるいはPspA2に分類された。一方、PspA3は8株(3.2%)に、型別不能PspAは4株(1.6%)に、PspA null株は、3株(1.2%)に認めるのみであった。PspA型の分布は、性別、年齢、分離部位による差は認めなかった。一方、PspA2株は、*mefA* 遺伝子陽性株に多く認められた。血清型別に見たPspA型の分布は、19F型、15B型で

は PspA2 が多く認められたのに対して、3 型、14 型では PspA1 が多く認められた。しかし、その他の多くの血清型では、PspA1 あるいは PspA2 は同頻度で認められ、特定の血清型と PspA 型の分布は認めなかった。

3. ワクチンカバー率

7 価 (PCV7)、10 価 (10PCV)、13 価 (13PCV) の蛋白結合型肺炎球菌ワクチンおよび 23 価莢膜多糖体ワクチン (23PPV) による肺炎球菌カバー率はそれぞれ 62.2%、62.9%、76.9%、70.5% であった。DRSP カバー率は 74.7%、75.3%、82.9%、78.5% であった。マクロライド耐性菌のカバー率は、68.4%、68.9%、81.1%、74.5% であった。一方、PspA1 および PspA2 を含めたワクチンによる総肺炎球菌カバー率は 94.0%、DRSP カバー率は 94.9%、マクロライド耐性肺炎球菌カバー率は 94.4% であった。

D 考察および結論

肺炎球菌表面蛋白抗原 (PspA) は、肺炎球菌の重要な病原因子であり、signal peptide、

alpha-helical charged region、proline-rich domain、choline-binding domain の 5 つの domain からなり、alpha-helical charged region の塩基配列の違いにより 6 つの clade、3 つの family に大きく分類される。PspA に対する免疫応答は、マウスモデルでは鼻腔保菌抑制だけでなく侵襲性感染症に対しても防御効果を示す。また、PspA1 および PspA2 に対する免疫応答は、交差反応を示すことが知られている。肺炎球菌の薬剤感受性や莢膜血清型の分離頻度は、各国により異なることから、ワクチンによる肺炎球菌感染症予防においては、その国特有の肺炎球菌の分離頻度および抗原性の違いを検討することが重要となる。今回の検討では、本邦における上気道感染症由来の肺炎球菌では、PspA1 と PspA2 は莢膜血清型とは無関係に、同様の分離頻度を示した。これらのことから、PspA を含むワクチンが現在利用できる血清型ベースのワクチンと比較して肺炎球菌のワクチンの予防効果を向上させることができる可能性を示した。

F 研究発表

1) 論文発表

1. Takei S, Hotomi M, Yamanaka N. Minimal biofilm eradication concentration of antimicrobial agents against nontypeable Haemophilus influenzae isolated from middle ear fluids of intractable acute otitis media. J Infect Chemother. 2013, in press.
2. Hotomi M, Togawa A, Kono M, Ikeda Y, Takei S, Hollingshead SK, Briles DE, Suzuki K, Yamanaka N. PspA family distribution, antimicrobial resistance and serotype of Streptococcus pneumoniae isolated from upper respiratory tract infections in Japan. PLoS One. 2013;8(3):e58124.
3. Hotomi M, Togawa A, Takei S, Sugita G, Sugita R, Kono M, Fujimaki Y, Kamide Y, Uchizono A, Kanetsada K, Sawada S, Okitsu N, Tanaka Y, Saijo Y, Yamanaka

N. Evaluation of a rapid

- immunochromatographic ODK-0901 test for detection of pneumococcal antigen in middle ear fluids and nasopharyngeal secretions. PLoS One. 2012;7(3):e33620.
4. Mahadevan M, Navarro-Locsin G, Tan HKK, Yamanaka N, Sonuwan N, Wang P, Dung NTN, Restuti RD, Hashim SSM, Vijayasekaran S. A review of the burden of disease due to otitis media in the Asia-Pacific. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2012, 76:623-635

2) 学会発表

1. Hotomi M, Kono M, Sugita G, Togawa A, Ikeda Y, Yamanaka N: Clinical evaluation of a rapid immunochromatographic ODK-0901 test for detecting pneumococcal antigen in middle ear fluids and nasopharyngeal secretions. The

8th International Symposium on
Pneumococci and Pneumococcal Diseases.
Iguacu Falls, Brazil, 2012

2. Hotomi M, Arai J, Kono M, Yamanaka N:
Reduction of opaque phase variant of
Streptococcus pneumoniae by sub-MIC
levels of macrolides. The 8th International
Symposium on Pneumococci and
Pneumococcal Diseases. Iguacu Falls,
Brazil, 2012
3. Kono M, Hotomi M, Hollingshead S,
Briles D, Yamanaka N: Memory of PspA
specific immune responses in offspring
delivered from immunized mother mice.
The 8th International Symposium on
Pneumococci and Pneumococcal Diseases.
Iguacu Falls, Brazil, 2012.

- G. 知的財産の出願、登録状況
予定なし。

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

小児市中肺炎に対する7価肺炎球菌ワクチン（PCV7）導入の影響

研究協力者 石和田稔彦 千葉大学医学部附属病院感染症管理治療部 講師

研究要旨

小児市中肺炎に対するPCV7導入効果をはかる目的で、千葉市において調査を行ったところ、5歳未満小児市中肺炎入院数と、肺炎球菌性肺炎入院数の減少傾向があり、特にPCV7含有血清型は著明な減少を認めた。

A. 研究目的

7価肺炎球菌ワクチン（PCV7）は海外において乳幼児の市中肺炎に対する予防効果が報告されているが、小児肺炎球菌性肺炎に対する予防効果は明らかになっていない。我々は2008年に千葉市の小児市中肺炎の疫学調査を行い、5歳未満の肺炎入院症例は人口千人当たり17.6人/年と報告した。また、2008年4～9月の期間に喀痰を採取した265例のうち、78例（29.4%）から肺炎球菌が分離され、その67%がPCV7含有血清型であった。今回PCV7導入効果をはかる目的で同様の調査を行った。

B. 研究方法

2012年4月1日より9月30日まで、千葉市近郊の小児科入院18施設において市中肺炎入院症例数を調査し、うち5施設より血液、喀痰培養陽性の肺炎球菌株を回収し、莢膜膨化試験により血清型を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は千葉大学倫理審査委員会の承認を得て行っている。

C. 研究結果

肺炎入院症例は人口千人当たり3.03人/6か月であった。喀痰を採取した266例中52例が細菌性肺炎と診断され、内訳は肺炎球菌18例（6.8%）、インフルエンザ菌28例、モラクセラ・カタラーリス6例であった。血液培養陽性肺炎球菌株は19A、22F、15A（2株）の4株であった。喀痰培養陽性18株のうち16株を解析し、PCV7含有血清型は6B、14、19F、9Vの計4株（25%）であった。対象者のうち5歳未満小児のPCV7接種率は72%であった。

D. 考察

千葉市における5歳未満小児市中肺炎と肺炎球菌性肺炎は減少傾向にあり、特にPCV7含有血清型は著明な減少を認めた。これは、新規抗菌薬が使用可能となったことの影響もあると考えられるが、血清型分布をみるとPCV7の予防効果が示唆された。なお、現在、1年間を通じた調査を実施中である。

E. 結論

日本の小児市中肺炎に対して PCV7 による予防効果が認められている。

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.* 140:1111-21, 2012.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

肺炎球菌とインフルエンザ菌におけるバイオフィームと莢膜の関連に関する基礎的研究

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・助教）

研究要旨 中耳炎、肺炎、髄膜炎など様々な感染症の重要な原因菌である肺炎球菌とインフルエンザ菌のもつ莢膜とバイオフィーム産生に関する研究を行った。26 株の β -lactamase-negative ampicillin-susceptible, 22 株の β -lactamase-negative ampicillin-resistant, 28 株の TEM-1 type β -lactamase-producing ampicillin-resistant -Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) と 23 株の *H. influenzae* type b (Hib) における Microtiter biofilm assay (MBA) の平均値はそれぞれ 0.57, 0.50, 0.34, 0.08 であった。Hib 株の多くは NTH 株に比べバイオフィーム産生は極めて低かったが、バイオフィーム産生を有する Hib 株は PCR で莢膜が欠損していたことが確認された。また、TIGR4 *S. pneumoniae* の莢膜欠損株を作成し、野生株との間でバイオフィーム産生の比較検討を行った。実験 1, 2 日目の MBA は莢膜欠損株でそれぞれ 1.77, 1.74 に対し、野生株ではそれぞれ 0.76, 0.33 であった。Confocal laser scanning microscopy によるバイオフィームの厚さは莢膜欠損株 12.22 μ m に対し、野生株 6.29 μ m であり、莢膜欠損株の産生するバイオフィームの厚みは野生株の約 2 倍であった。以上の結果より、肺炎球菌とインフルエンザ菌では莢膜はバイオフィーム産生に対し抑制的に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

肺炎球菌とインフルエンザ菌は中耳炎、肺炎、髄膜炎など様々な感染症の重要な原因菌である。この両菌は近年感染症難治化の原因とされるバイオフィームを産生することが明らかとなった。莢膜は細菌の病原性とバイオフィーム産生のいずれにも関与しているとされており、我々はこの両菌における莢膜とバイオフィームの関連について以下の検討を行なった。

B. 研究方法

血清型別および PCR で判定された 26 株の β -lactamase-negative ampicillin-susceptible (BLNAS), 22 株の β -lactamase-negative ampicillin-resistant (BLNAR), 28 株の TEM-1 type β -lactamase-producing ampicillin-resistant (BLPAR) - Nontypeable *H. influenzae* (NTHi) と 23 株の *H. influenzae* type b (Hib) に対して Microtiter biofilm assay (MBA) によるバイオフィーム産生の比較検討を行った。TIGR4 *S. pneumoniae* の莢膜欠損株を作成し、野生株との間で MBA, Confocal laser scanning microscopy (CLSM) によるバイオフィーム産生の比較検討を行った。

C. 研究結果

26 株の BLNAS, 22 株の BLNAR, 28 株の BLPAR-NTHi と 23 株の Hib に対する MBA の平均値はそれぞれ 0.57, 0.50, 0.34, 0.08 であった (図 1)。

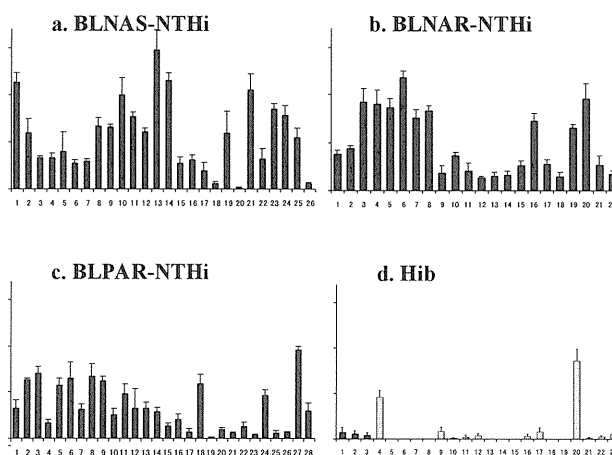


図 1 各種インフルエンザ菌における MBA の比較

23 株の Hib に対する PCR による解析では、バイオフィームをほとんど産生しない 18 株は Hib *cap* loci と IS1016 を有していたが、バイオ

フィルムを産生した5株はいずれもこれらの遺伝子を保有しておらず、自然に莢膜が脱落したものと推察された。

また、cps4D disruption plasmid により TIGR4 *S. pneumoniae* の TIGR4cps4D⁻ mutant (莢膜欠損株) を作成した。走査型および透過型電子顕微鏡により莢膜の欠損が確認された (図2)。

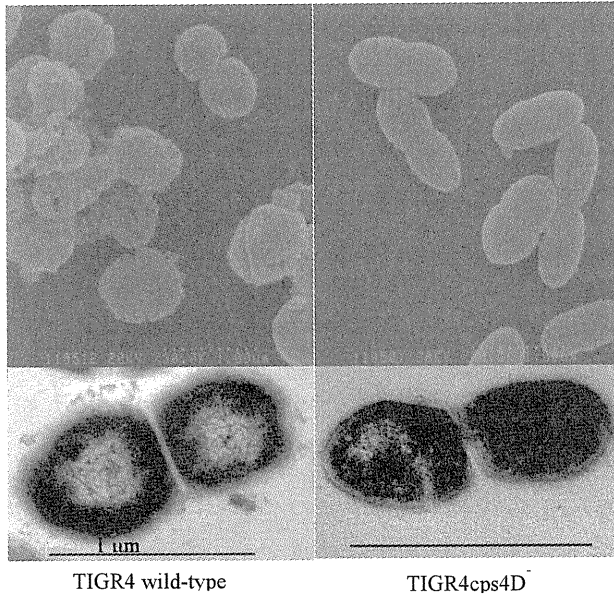


図2 野生株と莢膜欠損株の電子顕微鏡写真の比較

実験1, 2日目の莢膜欠損株のMBAの平均値がそれぞれ1.77, 1.74であるのに対し、野生株ではそれぞれ0.76, 0.33と低かった (図3)。

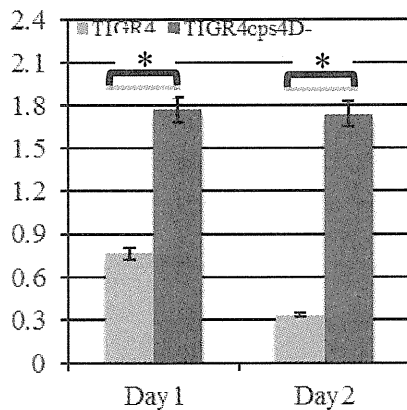


図3 野生株と莢膜欠損株のMBAの比較

CLSMによる観察でも、莢膜欠損株は野生株に対し明らかにバイオフィーム産生が多く、バイオフィームの厚さは莢膜欠損株12.22μmに対し、野生株6.29μmであり、莢膜欠損株の産生するバイオフィームの厚みは野生株の約2倍であった (図4)。

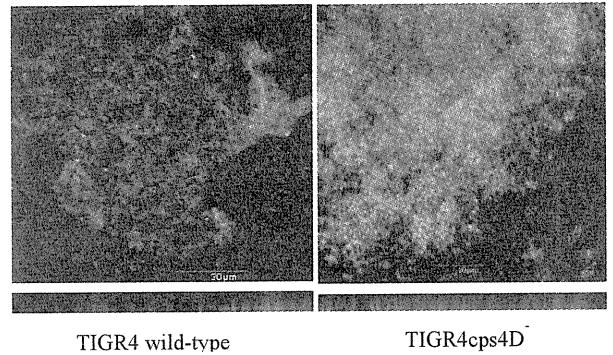


図4 野生株と莢膜欠損株のCLSMの比較

D. 結論および考察

本研究の結果より、肺炎球菌とインフルエンザ菌では莢膜はバイオフィーム産生に対し抑制的に関与していることが示唆された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- Umeyama T, Ohno H, Minamoto F, Takagi T, Tanamachi C, Tanabe K, Kaneko Y, Yamagoe S, Kishi K, Fujii T, Takemura H, Watanabe H, and Miyazaki Y. Determination of epidemiology of clinically isolated *Cryptococcus neoformans* strains in Japan by multilocus sequence typing. *Jpn J Infect Dis* 66: 51-55, 2013.
- 日本内科学会成人予防接種検討ワーキンググループ編著: 二木 芳人、大石和徳、川上 和義、谷口 清州、渡辺 彰、渡邊 浩「専門医部会 成人予防接種のガイドンス。」日本内科学会雑誌、101:3585-3597, 2012.
- Qin L, Kida Y, Imamura Y, Kuwano K and Watanabe H. Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lower virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Chemother*, 2012 Dec 11. [Epub ahead of print]
- Hamada N, Imamura Y, Hara K, Kashiwagi T, Imamura Y, Nakazono Y, Chijiwa K, and Watanabe H. Intrahost emergent dynamics of oseltamivir-resistant virus of pandemic influenza A (H1N1) 2009 in a fatally immunocompromised patient. *J Infect Chemother* 18:865-871, 2012.
- Nakazono Y, Hara K, Kashiwagi T, Hamada N, and Watanabe H. The RNA

polymerase PB2 subunit of influenza A/HongKong/156/

1997(H5N1) restricts the replication of reassortant ribonucleoprotein complexes. PLoS ONE 7(2) e32634: 1-9, 2012.

6. Qin L, Zhou Z, Hu B, Yamamoto T, and Watanabe H. Antimicrobial susceptibilities and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from community acquired respiratory tract infection patients in Shanghai City, China. J Infect Chemother, 18: 508-514, 2012.
 7. Toyotome T, Yamaguchi M, Iwasaki A, Watanabe A, Taguchi H, Qin L, Watanabe H, Kamei K, Fetuin A, a serum component, promotes growth and biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. Int J Med Microbiol, 302: 108-116, 2012.
2. 学会発表
1. Watanabe H and Qin L. The relationship between biofilm formation and capsule in *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 16th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting. Singapore, 2013.3.13.
 2. Kashiwagi T, Hara K, Nakazono Y, Uemura Y, Imamura Y, Hamada N and Watanabe H. The N-terminal fragment of influenza A virus (H5N1) PB2 subunit strongly inhibits its RNA-dependent RNA polymerase. United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 16th US-Japan Acute Respiratory Infections Panel Meeting. Singapore, 2013.3.13.
 3. 高橋大輔、北島牧子、秋田真依、山田真衣子、首藤敏夫、三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩 「尿管理に関連した環境改善に向けた取り組み」 第28回日本環境感染学会総会、横浜、2013.3.1.
 4. 棚町千代子、橋本好司、田代尚崇、堀田吏乃、矢野知美、三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩、石井一成、中島 収 「当院に設置してある製氷機で作成された製氷の細菌汚染調査」 第28回日本環境感染学会総会、横浜、2013.3.1.
 5. 原 好勇、中園 陽子、柏木 孝仁、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルス RNP の活性発現には PB2-PA の組み合わせが重要である」 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.14.
 6. 柏木 孝仁、原 好勇、中園 陽子、今村 宜寛、濱田 信之、渡邊 浩 「インフルエンザウイルスのPB2サブユニットによるRNAポリメラーゼの阻害効果」 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2012.11.14.
 7. 秦 亮、上村勇作、酒井義郎、渡邊 浩 「Gene Expression Relevant to CPS Impaired *Streptococcus pneumoniae* in Biofilms and Planktonic Conditions」 第55回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第60回日本化学療法学会西日本支部総会 合同大会、福岡、2012.11.7.
 8. 酒井義郎、内藤哲哉、鶴田美恵子、三浦美穂、秦 亮、日高秀信、升永憲治、渡邊 浩 「ワルファリンとリネゾリドにおける相互作用の検討」 第55回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第82回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第60回日本化学療法学会西日本支部総会 合同大会、福岡、2012.11.5.
 9. 渡邊 浩 「医療安全講習会、胸部外科医のための感染予防・アウトブレイク対策」 第65回日本胸部外科学会定期学術集会、福岡、2012.10.17.
 10. 渡邊 浩 「シンポジウム3、予防接種の新たな時代へーすべての渡航者にワクチンを、トラベルクリニックと予防接種」 第16回日本渡航医学会学術集会、大阪、2012.7.21.
 11. 渡邊 浩 「ランチョンセミナー、デング熱の臨床と予防」 第16回日本渡航医学会学術集会、大阪、2012.7.21.
 12. 渡邊 浩 「シンポジウム2、渡航医学の普及に向けてートラベルクリニックサポート事業、我が国における渡航医学の現状」 第16回日本渡航医学会学術集会、大阪、2012.7.21.
 13. Qin L and Watanabe H 「Hospital Environmental Microbiology and Nosocomial Infections」 The annual joint congress of 21st National Conference on Nosocomial Infection of Chinese Preventive Medicine Association and 8th

Shanghai International Forum of Infection Control(SIFIC). Ji'nan, China. 2012.5.25.

14. 渡邊 浩 「教育講演 8、インフルエンザ菌感染症とバイオフィーム；その治療」 第 60 回 日本化学療法学会学術集会、長崎、2012.4.27.
 15. 秦 亮、日高秀信、渡邊 浩 「肺炎球菌バイオフィーム産生についての臨床的検討」 第 60 回 日本化学療法学会学術集会、長崎、2012.4.27.
 16. 酒井義朗、鶴田美恵子、三浦美穂、秦亮、日高秀信、升永憲治、渡邊 浩 「感染症カンファランス導入による抗菌薬使用状況の変化」 第 60 回 日本化学療法学会学術集会、長崎、2012.4.26.
 17. 濱田信之、原 好勇、松尾勇作、今村宜寛、柏木孝仁、後藤憲志、大津 寧、本廣 孝、渡邊 浩 「重症心身障害児施設でのヒト・メタニューモウイルス集団感染における新規迅速診断キットの有用性」 第 86 回 日本感染症学会総会、長崎、2012.4.26.
 18. 原 好勇、柏木孝仁、濱田信之、渡邊浩 「インフルエンザウイルスの PB2 と PA は遺伝子再集合を制御する」 第 86 回 日本感染症学会総会、長崎、2012.4.26.
 19. 柏木孝仁、原 好勇、今村宜寛、濱田信之 「インフルエンザウイルスの遺伝子再集合を応用した阻害薬の開発」 第 86 回 日本感染症学会総会、長崎、2012.4.26.
 20. 秦 亮、渡邊 浩 「中国上海における一般病院由来インフルエンザ菌の薬剤感受性及び水平伝播についての研究」 第 86 回 日本感染症学会総会、長崎、2012.4.25.
 21. 豊留孝仁、秦 亮、渡辺 哲、渡邊 浩、亀井克彦 「血清糖タンパク質 fetuin A が *Aspergillus fumigatus* 生育に及ぼす影響」 第 86 回 日本感染症学会総会、長崎、2012.4.25.
 22. 重松紗有、堺 みゆき、曾原洋二、田島絵美、三浦美穂、升永憲治、渡邊 浩 「当院における清拭車運用状況と清拭車廃止に向けての取り組み」 第 27 回 日本環境感染学会総会、福岡、2012.2.4.
3. 著書、総説
 1. 渡邊 浩 「呼吸器疾患 2. インフルエンザ」今日の診療のためにーガイドライン外来診療 2012 日経メディカル開発 26-32, 2012.
 2. 秦 亮、渡邊 浩 「3章 細菌感染症： 3-2 インフルエンザ菌感染症」感染症事典 オーム社 57-62, 2012.
- 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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
渡邊 浩	呼吸器疾患 2. インフルエンザ	泉 孝英	今日の診療のためにーガイドライン外来診療 2012	日経メディカル開発	東京	2012	26-32
秦 亮 渡邊 浩	3章 細菌感染症: 3-2 インフルエンザ菌感染	感染症事典編集委員会	感染症事典	オーム社	東京	2012	57-62

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okumura A., Morishima T	Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan.	J Clin Virol	56(1)	25-30	2013
Yashiro M., Morishima T	Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice	Crit Care Med	41(1)	171-81	2013
Okumura A., Morishima T.	Unexpected cardio-pulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan.	Influenza Other Respi Viruses.			2012
Sakabe S, et al.	Differences in cytokine production in human macrophages and in virulence in mice are attributable to the acidic polymerase protein of highly pathogenic influenza A virus subtype H5N1.	J Infect Dis	207	262-271	2013

Takano R, et al.	Molecular mechanisms underlying oseltamivir resistance mediated by an I117V substitution in the NA of H5N1 avian influenza viruses.	J Infect Dis	207	89-97	2013
Uraki R, et al.	Virulence determinants of pandemic A(H1N1)2009 influenza virus in a mouse model.	J Virol	87	2226-2233	2013
Inagaki A, et al.	Competitive incorporation of homologous gene segments of influenza A virus into virions.	J Virol	86	10200-10202	2013
Hamamoto I, et al.	High yield production of influenza virus in Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells with stable knockdown of IRF7	PLoS One	8(3)	e59892	2013
高橋裕明,他	小児におけるインフルエンザ HA ワクチン接種量変更による効果と安全性の検討	感染症誌	87 巻 2 号	195-206	2013
Nakano T, et al.	Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during early post-marketing phase vigilance	Scand J Infect Dis	Early online publishing.	Early online publishing.	2013
Zaraket H, et al.	Genetic diversity and antiviral drug resistance of pandemic H1N1 2009 in Lebanon.	J Clin Virol	51 巻 3 号	170-174	2011