

<http://cneoformans.mlst.net> and <http://mlst.mycologylab.org> are used for this study and the study of Mihara et al., respectively. To compare STs in this study with the large-scale investigation by Simwami et al. (14), we adopted the former database. A Chinese epidemiological study has shown that the majority of *C. neoformans* isolates exhibited the same ST, in which the nucleotide sequences of 5 loci examined (*GPDI*, *IGS1*, *LAC1*, *PLB1*, and *SOD1*) are identical to those of ST46 (19). Similarly, the nucleotide sequences of all 7 loci in the major ST of clinical isolates in Korea are the same as those of ST46 in this study (20). Together, ST46, a predominant ST in Japan (determined in this study), has so far been isolated in Thailand, China, Korea, and Japan, which are geographically close to each other, suggesting that ST46 isolates from Asia may have the same origin.

Seven strains from the facility G in the Kyushu region (NIIDCr0034–0040) were isolated within a year (2008–2009). Usually, this facility only diagnoses 1 or 2 cases of cryptococcosis per year. Therefore, the high frequency of cryptococcosis could indicate a possibility of outbreaks occurring in the vicinity of the facility G. MLST analysis of these 7 isolates in this study revealed that 6 isolates belong to ST46. The cases at the facility E in the Kanto region showed similar patterns: 7 strains (NIIDCr0024–0027 and 0030–0032) were isolated in 1 year (2010–2011) and 6 isolates exhibited ST46. Local molecular epidemiology restricted to a small area should be able to indicate that these 2 cases were potential outbreaks; however, using our cryptococcal MLST database, the ST46 strain can be recognized as the predominant strain type that is widespread in Japan. Therefore, the present MLST analysis seems less useful for predicting or tracing the infection route or infection source of cryptococcosis outbreaks in Japan. To investigate the actual origin of these outbreaks, novel epidemiological tools such as multilocus microsatellite typing and whole genome sequencing will be required.

In conclusion, we analyzed clinical isolates of *C. neoformans* obtained from multiple locations widely distributed in Japan by MLST, a molecular epidemiological method. Most clinical isolates belong to the same ST (ST46), and there is little geographic bias among the areas studied. This database will be useful for public health officials in designing and prioritizing efforts to prevent, diagnose, and treat cryptococcal disease.

Acknowledgments The authors would like to thank Hiroko Kusachi for the technical support. We also thank medical doctors; Akiko Takeuchi, Masaki Ohyagi, Etsuko Sawabe, Noboru Takayana-gi, Naho Kagiya, Kazumitsu Sugiura, Masatomo Kimura, Shigeru Kohno, and Hideki Kawamura, who provided us with *C. neoformans* isolates.

This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H24-shinkou-ippan-013, H23-shinkou-ippan-007, H23-shinkou-ippan-018, H22-shinkou-ippan-008, and H21-shinkou-ippan-009).

Conflict of interest None to declare.

REFERENCES

- Park, B.J., Wannemuehler, K.A., Marston, B.J., et al. (2009): Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23, 525–530.
- Franzot, S.P., Salkin, I.F. and Casadevall, A. (1999): *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 838–840.
- Lengeler, K.B., Cox, G.M. and Heitman, J. (2001): Serotype AD strains of *Cryptococcus neoformans* are diploid or aneuploid and are heterozygous at the mating-type locus. *Infect. Immun.*, 69, 115–122.
- Xu, J., Luo, G., Vilgalys, R.J., et al. (2002): Multiple origins of hybrid strains of *Cryptococcus neoformans* with serotype AD. *Microbiology*, 148, 203–212.
- Heitman, J., Kozel, T.R., Kwon-Chung, K.J., et al. (2010): *Cryptococcus neoformans* from Human Pathogen to Model Yeast. ASM Press, Washington, D.C.
- Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J.E. (1978): Distribution of α and β mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am. J. Epidemiol.*, 108, 337–340.
- Fraser, J.A., Giles, S.S., Wenink, E.C., et al. (2005): Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nature*, 437, 1360–1364.
- Lin, X., Litvintseva, A.P., Nielsen, K., et al. (2007): α AD α hybrids of *Cryptococcus neoformans*: evidence of same-sex mating in nature and hybrid fitness. *PLoS Genet.*, 3, 1975–1990.
- Meyer, W., Castañeda, A., Jackson, S., et al. (2003): Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 189–195.
- Meyer, W., Aanensen, D.M., Boekhout, T., et al. (2009): Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.*, 47, 561–570.
- Bovers, M., Hagen, F., Kuramae, E.E., et al. (2008): Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet. Biol.*, 45, 400–421.
- Ngamskulrungrong, P., Gilgado, F., Faganello, J., et al. (2009): Genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLoS ONE*, 4, e5862.
- Litvintseva, A.P., Thakur, R., Vilgalys, R., et al. (2006): Multi-locus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*, 172, 2223–2238.
- Simwami, S.P., Khayhan, K., Henk, D.A., et al. (2011): Low diversity *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* multilocus sequence types from Thailand are consistent with an ancestral African origin. *PLoS Pathog.*, 7, e1001343.
- Mihara, T., Izumikawa, K., Kakeya, H., et al. (2012): Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med. Mycol.* Doi: 10.3109/13693786.2012.708883.
- Barreto de Oliveira, M.T., Boekhout, T., Theelen, B., et al. (2004): *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1356–1359.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10, 512–526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., et al. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28, 2731–2739.
- Chen, J., Varma, A., Diaz, M.R., et al. (2008): *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 14, 755–762.
- Choi, Y.H., Ngamskulrungrong, P., Varma, A., et al. (2010): Prevalence of the VNIC genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea. *FEMS Yeast Res.*, 10, 769–778.
- Yasuoka, A., Kohno, S., Yamada, H., et al. (1994): Influence of molecular sizes of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide on phagocytosis. *Microbiol. Immunol.*, 38, 851–856.

成人予防接種のガイドンス

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

日本内科学会雑誌 第101巻 第12号別刷

2012年12月10日

成人予防接種のガイドンス

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¹⁾ 大石 和徳²⁾ 川上 和義³⁾ 谷口 清州⁴⁾
渡辺 彰⁵⁾ 渡邊 浩⁶⁾

[日内会誌 101 : 3585~3597, 2012]

Key words 肺炎球菌ワクチン, インフルエンザワクチン, 麻疹・風疹ワクチン, 帯状疱疹ワクチン, 高齢者

はじめに

感染症は今日、複雑・難治化の傾向を認め、その背景には医療の高度化や高齢人口の増大、さらには各種の新興・再興感染症の発生、薬剤耐性病原菌の増加などがあると思われます。この様な感染症は時に治療は困難を極め、予後不良を招くことも高齢者や基礎疾患を有する患者では稀ならずあります。従って、可能な限りその発症や重症化を予防することが望まれます。ワクチンなどの予防接種はその一つの手段として広く応用されているものですが、わが国では欧米に比べその理解と普及に若干の遅れが指摘されてきました。しかし2009年に我々は新型インフルエンザのパンデミックを経験し、その際

に予防接種の重要性によりやく気付かされたと言っても過言ではないでしょう。

小児科領域では昨今相次いで新しいワクチンも導入され、日本小児科学会では学会の推奨する小児の予防接種のスケジュールなども公表されています。今回、日本内科学会では、現在我が国で接種可能な成人の予防接種について現在の状況をまとめ、有効性に関するエビデンスが認められ、広く一般にもコンセンサスの得られているものを一つの指針として本ガイドンスを公表いたします。

1. 一般に推奨される予防接種

1) 肺炎球菌ワクチン

1) 昭和大学臨床感染症学講座；ワーキンググループ責任者, 2) 国立感染症研究所感染症情報センター, 3) 東北大学大学院医学系研究科保健学専攻, 4) 三重大学小児科, 5) 東北大学加齢医学研究所抗感染症薬開発研究部門, 6) 久留米大学医学部感染医学講座臨床感染医学部門

Guidance for vaccination in adult.

Yoshihito Niki¹⁾, Kazunori Oishi²⁾, Kazuyoshi Kawakami³⁾, Kiyosu Taniguchi⁴⁾, Akira Watanabe⁵⁾ and Hiroshi Watanabe⁶⁾ :

¹⁾Department of Clinical Infectious Diseases, Showa University School of Medicine, Japan, ²⁾Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Japan, ³⁾Department of Medical Microbiology, Mycology and Immunology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Japan, ⁴⁾Department of Pediatrics, Mie University Graduate School of Medicine, Japan, ⁵⁾Research Division for Development of Anti-Infective Agents, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Japan and ⁶⁾Division of Infectious Diseases, Department of Infectious Medicine, Kurume University School of Medicine, Japan.

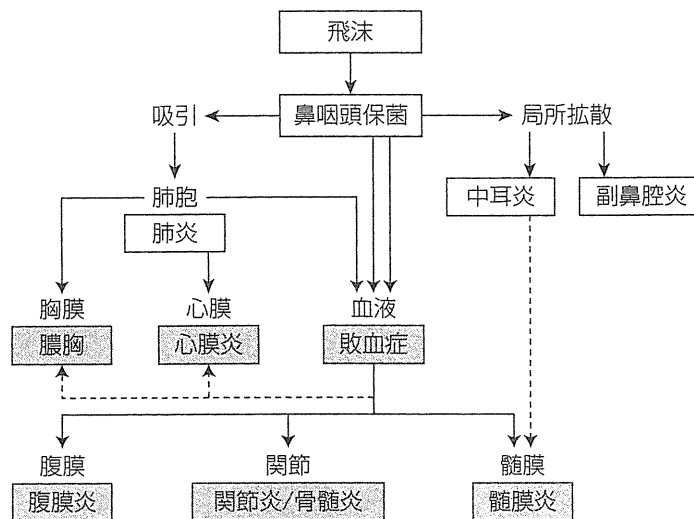


図. 肺炎球菌感染症の臨床像

小児の鼻咽頭には高頻度に肺炎球菌が保菌され、本菌は鼻咽頭から直接進展により中耳炎を発症し、また下気道への吸引により肺炎を発症することが想定されている（グレーの背景は侵襲性肺炎球菌性感染症）。（文献1より引用）

肺炎球菌感染症について

肺炎球菌は気道親和性のグラム陽性双球菌です。菌表層の莢膜ポリサッカライド(CPS)は最も重要な病原性因子であり、その血清型を決定する抗原です。小児の鼻咽頭には高頻度に肺炎球菌が保菌され、子供と親との間での菌伝播が知られています。本菌は鼻咽頭から直接進展により中耳炎を発症し、また下気道への吸引により肺炎を発症することが想定されます(図)¹⁾。肺炎はわが国における死因の第3位であり、2011年には12.4万人(10万人あたり99人)が肺炎で死亡しています。とりわけ80歳以上の高齢者で肺炎による死亡率は急激に増加します。成人の市中肺炎の大半は菌血症を伴わない肺炎であり、その20~40%が肺炎球菌に起因するとされています。また、成人の肺炎球菌性肺炎は、しばしばインフルエンザウイルス感染時の二次性細菌性肺炎として発症します。

一方、本菌は血液中に侵入し敗血症、髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症(invasive pneumo-

coccal disease : IPD)も惹起します。わが国の成人におけるIPD 303症例の解析では、敗血症と肺炎がそれぞれ38%、37%を占め、髄膜炎は18.8%でした²⁾。全症例の69%が基礎疾患(悪性腫瘍、糖尿病、心血管、肝疾患など)を有し、高い致命率(22%)が報告されています。

23価肺炎球菌ポリサッカライドワクチンについて

含有血清型
肺炎球菌感染症において血清型特異的な抗CPS抗体による補体依存性オプソニン活性が主要な感染防御機構と考えられています。このため、主要な23血清型のCPSを含有する23価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン(PPV23)が成人用肺炎球菌ワクチンとして臨床応用されています。成人のIPDの主要血清型分布は3, 6B, 14, 23F, 19A, 4の順に多く、市中肺炎の主要血清型も3, 19F, 23F, 6B, 14の順であり、IPDと市中肺炎ではほぼ同様の血清型分布となっています。従って、成人のIPD由来株と市中肺炎由来株の

表 1. 23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチンの接種対象者

2 歳以上で肺炎球菌による重篤疾患に罹患する危険が高い次のような人及び患者
(1) 脾摘患者における肺炎球菌による感染症の発症予防
(2) 肺炎球菌による感染症の予防
1) 鎌状赤血球疾患, あるいはその他の原因で脾機能不全である患者
2) 心・呼吸器の慢性疾患, 腎不全, 肝機能障害, 糖尿病, 慢性髄液漏等の基礎疾患のある患者
3) 高齢者
4) 免疫抑制作用を有する治療が予定されている者で治療開始まで少なくとも 14 日以上の余裕のある患者

PPV23 に含有される頻度はそれぞれ 82.7%, 82.5% と同等です^{2,3)}。

臨床効果

これまでに免疫不全のない成人や種々の基礎疾患を有する成人において, PPV23 の IPD に対する予防効果が報告されています。一方, これまで PPV23 の肺炎予防効果は明らかではありませんでした。しかし, 最近になって, 丸山らは高齢者介護施設入所者を対象に PPV23 が肺炎球菌性肺炎の予防に有効であり, 肺炎球菌性肺炎による死亡率を減少させることを明らかにしました⁴⁾。さらに, 川上らはインフルエンザワクチン接種後の 65 歳以上の高齢者を対象に PPV23 接種を行い 75 歳以上の高齢者, 慢性肺疾患症例に対する有意な肺炎予防効果を示しました⁵⁾。また, 65 歳以上の全症例, 75 歳以上の高齢者, 慢性肺疾患症例における PPV23 の肺炎医療費の削減効果も明らかになりました。これらの研究成果から, 2011 年 3 月に厚生省予防接種部会ワクチン評価に関する小委員会は, 毎年わが国の 65 歳コホート全員 (約 175 万人) に PPV23 を接種し, その効果が 5 年間持続すると仮定すると, この 65 歳コホートにおける医療費が毎年約 5,115 億円削減されると推定しています⁶⁾。

接種対象者

PPV23 の接種対象は, 2 歳以上で肺炎球菌による重篤疾患に罹患する危険が高い個人及び患者となっています。その詳細については, 表 1 を参照ください⁷⁾。なお, 脾摘患者への接種につ

いては保険給付の対象となります。

接種方法

1 回 0.5 ml を筋肉内又は皮下に接種します。生ワクチンの接種を受けた者は, 通常 27 日以上, また他の不活化ワクチンの接種を受けた者は, 6 日以上間隔をおいて本ワクチンを接種します。ただし, 医師が必要と認めた場合には PPV23 とインフルエンザワクチンを同時に接種できます。この場合には, それぞれのワクチンを異なる腕に別々に注射することになります。

副反応と再接種

PPV23 の副反応として, 一般に発熱, 注射部位の疼痛, 発赤, 腫脹がみられます。注射部位の局所反応は通常数日以内に軽快します。重篤な副反応としては, アナフィラキシー様反応が海外において報告されています (頻度不明)。

再接種については, 1988 年にわが国において本ワクチンが承認されて以来認められていませんでしたが, 2009 年 10 月に厚生労働省は前回接種から 5 年以上の間隔をおいて再接種できるとしました。再接種の対象者は表 1 を参照ください。具体的には, 過去 5 年以内に本ワクチンを接種されたことのあるものでは, 再接種時の副反応の発現が前回接種時よりも頻度が高く, 程度が強いとされていますので, 前回接種から 5 年以上経過後の再接種が勧められます。

アナフィラキシー様反応症状が出現した場合の対応については, 日本感染症学会ホームページ上の「肺炎球菌ワクチン再接種に関するガイ

ドライン」⁸⁾をご参照ください。

文 献

- 1) Bogaert D, et al: *Streptococcus pneumoniae* colonisation the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 4: 144-154, 2004.
- 2) Chiba N, et al: Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Epidemiol Infect* 138: 61-68, 2010.
- 3) Oishi K, et al: Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology* 11: 429-436, 2006.
- 4) Maruyama T, et al: Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents: double blind, randomized and placebo controlled trial. *BMJ* 340: c1004, 2010.
- 5) Kawakami K, et al: 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.
- 6) 厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会：ワクチン評価に関する小委員会報告書 肺炎球菌ポリサッカライドワクチン（成人用）。2011.3.11 <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000014wdd.html>.
- 7) Center for Disease Control: Prevention of pneumococcal diseases: Recommendations of Advisory Committee on Immunization Practice. *MMWR* 46 (RR8): 1-23, 1997.
- 8) 日本感染症学会肺炎球菌ワクチン再接種問題検討委員会：肺炎球菌ワクチン再接種に関するガイドライン。日本感染症学会，東京，2009.10.19 <http://www.kansensho.or.jp/>.

2) インフルエンザワクチン

インフルエンザについて

インフルエンザという疾患は、オルソミクソウイルス科に属するインフルエンザウイルスA型およびB型による急性熱性感染症です。2012年4月現在では、A型ではA/H1N1pdmとA/H3N2の二つの亜型のウイルスとB型、あわせて3種類のウイルスが毎年いろいろな比率で流行しています。これらのウイルスは人の免疫から逃れるために毎年少しずつ変異しており、例えば、同じA/H3N2亜型のウイルスでも、毎年異なる抗原性を持つウイルス株が流行します。本来は自然軽快傾向の疾患ですが、毎年冬季におこる季節性の流行では、急速な感染伝播により爆発

的に患者数が増加し、高い罹患率を特徴とします。また、インフルエンザが流行すると常に、インフルエンザの合併症として、あるいは他の病態の増悪を含めた疾病の罹患と総死亡数が増加することが知られており、これもまたインフルエンザの疫学的な特徴の一つであります。特に循環器疾患、脳血管疾患、腎疾患などを基礎疾患にもつ患者においては、インフルエンザに伴う二次性の細菌性肺炎やインフルエンザの感染による原疾患の悪化で死亡することもあり、長期療養施設入所者で基礎疾患のあるヒトのインフルエンザに関連した死亡率は年間2.8%との報告もあります。インフルエンザはHIV感染症、また妊娠の第二期と第三期において重症となり、致死的となりえます。

重症ではない典型的なインフルエンザでも健康へのインパクトは無視できるものではなく、平均5～6日の生活上の制限、3～4日の臥床を伴い、3日間の仕事あるいは学校を休むことになると推定されており、学校の100人の生徒あたり、37日の学校の欠席と両親の20日の欠勤の原因となっているとも報告されています。

インフルエンザワクチンについて

ワクチンの組成

インフルエンザワクチンは、不活化ワクチンであり、ウイルスを不活化してバラバラにしたものが入っています。毎年の流行は上述のA/H1N1pdm, A/H3N2, Bの3種類が、単独、またいくつかが組み合わせたりして起こりますが、どのような組み合わせになるかはわからないので、3種類それぞれのウイルスで、次のシーズンに流行しそうなウイルス株をそれぞれ一つずつワクチンに入れます(ワクチン株)。このため世界保健機関(World Health Organization: WHO)は、毎年会議を開催し、世界中のインフルエンザのデータと専門家を結集して次のシーズンのワクチンに入れるべくウイルス株(ワクチン株)を選定しています。

接種方法

インフルエンザワクチンの接種量及び接種回数は一般的には次のとおりとなっておりますが、医師の判断により、(1)、(2)の場合でも確実に基礎免疫がある方では1回接種、また(3)の場合でも免疫抑制状態では2回接種とすることも可能です。一部のワクチンでは、(1)については「1歳以上3歳未満の方 1回 0.25 ml 2回接種」となっています。

(1) 6カ月以上3歳未満の方 1回 0.25 ml 2回接種

(2) 3歳以上13歳未満の方 1回 0.5 ml 2回接種

(3) 13歳以上の方 1回 0.5 ml 1回接種

一般にはインフルエンザワクチン接種後2週目ごろから5カ月間程度効果が持続するとされていますので、12月頃までに接種を完了することが望まれますが、既に流行シーズンに入っても、自分の地域での流行がなければ遅すぎると言うことはありません。

副反応

季節性インフルエンザワクチンで比較的多くみられる副反応には、接種した場所(局所)の発赤、腫脹、疼痛など(10~20%)、全身性の反応としては、発熱、頭痛、倦怠感など(5~10%)がありますが、通常2~3日でなくなり特別に処置をする必要はありません。

また、ワクチン接種後の重大な副作用として、ギランバレー症候群、急性脳症、急性散在性脳脊髄炎、けいれん、肝機能障害、喘息発作、紫斑などが稀に報告されますが、必ずしも因果関係が証明されるわけではありません。これも稀ですが、接種直後から概ね30分ぐらいまでの間に、アナフィラキシーショック(急性のアレルギー反応)、あるいは全身の皮膚の変化や蕁麻疹、呼吸困難などが起こることがありますので、この間は接種者が院内にいるようにしておくことが望まれます。

インフルエンザワクチンの効果¹⁾

現行の三価不活化ワクチンによって65歳以下の健常成人において検査確定インフルエンザを70~90%予防することが示されており、健常成人におけるインフルエンザワクチンの接種は、ワクチン株と流行株がよく合致している場合には欠勤数、医療機関への受診が減少し、インフルエンザ関連の入院を減少させる効果も報告されています。インフルエンザ合併症のリスクとなる基礎疾患をもつ65歳以下の成人では健常成人よりも検査確定インフルエンザに対する予防効果は減少しますが、観察研究においてインフルエンザに関連する入院や死亡を減少させることが示されています。

60歳以上の地域に暮らす成人における無作為比較対照試験では検査確定インフルエンザに対して58%の予防効果が、70歳以上でも57%の効果があったとの報告が、高齢者療養施設入所者において医療機関に受診する必要がある呼吸器感染症に対する効果は20~40%との推計があります。いくつかの研究によってワクチン接種は、インフルエンザ関連死亡を80%までの範囲で予防効果があることが示されており、施設に居住しない高齢者では27~70%の肺炎あるいはインフルエンザによる死亡を予防すると報告されています。

系統的なレビュー²⁾とメタ解析³⁾による研究では、6歳以上の小児と65歳以下の健常成人では検査確定インフルエンザの予防効果を示していますが、肺炎の罹患、入院や死亡、また65歳以上や基礎疾患のある群では良質なエビデンスは限られているとの報告もあり、これには、倫理的な理由で無作為比較対照試験が困難であることも挙げられていますが、高齢者においては、肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用によって入院と死亡が減少し⁴⁾、医療費も減少させうるといふ報告⁵⁾があることも考慮して、予防接種の勧奨を行うべきであると考えられま

す。また、Charuらが、学童にインフルエンザワクチンを接種することによって高齢者における死亡を抑制していたと報告しているように、ワクチンの間接的な効果も報告されています。

予防接種の対象

インフルエンザは予防接種法上、二類疾病に分類され、対象者は①65歳以上の者、及び②60歳以上65歳未満の者であって、心臓、腎臓または呼吸器系の機能により自己の身の日常生活活動が極度に制限される程度の障害を有する者及びヒト免疫不全ウイルスにより免疫の機能に日常生活がほとんど不可能な程度の障害を有する者と定めています。

主に個人予防目的のために行われているものであるため、これらの対象者は自らの意志と責任で接種を希望することが基本とされていますが、この意味からは、定期接種に定められている対象者に限らず、6カ月以上の小児を含め、すべてのインフルエンザを予防しようとする方たちが対象となります。

特にインフルエンザに罹患することにより、重症化するリスクの高い医学的背景（慢性呼吸器疾患、心血管疾患、腎疾患、肝疾患、血液疾患、神経筋疾患、代謝性疾患）のある方、免疫抑制剤により免疫機能が低下している方、インフルエンザシーズン中に妊娠中、あるいは妊娠の可能性のある方、18歳までの長期アスピリン療法を受けている方、長期療養施設に入所されている方、そしてこれらのハイリスク者と5歳未満の小児、特に6カ月以下の乳児に接する方と医療従事者においては一般的に接種を考慮すべきでしょう。

市町村や企業によっては予防接種法の定期接種に記載されている対象者以外にも、様々な助成が行われていますので、詳細はそれぞれの担当者にお問い合わせ頂くとよいでしょう。

文 献

- 1) CDC: Prevention and Control of Influenza with Vaccines. : Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. MMWR 59(rr08) : 1-62, 2010.
- 2) Michiels B, et al : A systematic review of the evidence on the effectiveness and risks of inactivated influenza vaccines in different target groups. Vaccine 29 (49) : 9159-9170, 2011.
- 3) Osterholm MT, et al : Efficacy and effectiveness of influenza vaccines : a systematic review and meta-analysis. Lancet Infect Dis 2 (1) : 36-44, 2012.
- 4) Nichol KL : The additive benefits of influenza and pneumococcal vaccinations during influenza seasons among elderly persons with chronic lung disease. Vaccine 17 : S91-S93, 1999.
- 5) Kawakami K, et al : 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.

3) 一般に推奨される予防接種

麻疹・風疹ワクチン

麻疹 (measles) は麻疹ウイルスの感染による発熱、発疹を主徴とする疾患で、空気感染、飛沫感染、接触感染のいずれでもヒト-ヒト感染がおこります。10~12日の潜伏期の後に、眼球結膜の充血、上気道のカタル症状が出現し、二峰性の発熱を呈します。この時期には口腔内頬粘膜にKoplik班を認める。発疹は融合し色素沈着を残して軽快します¹⁾。最近の成人麻疹の検討によれば、患者の大半は麻疹ワクチン未接種、麻疹の既往が無かったとされています²⁾。また、小児例と比較して、脳炎、急性散在性脳脊髄炎(ADEM)の中枢神経系合併症が多いとされています。1978年に弱毒生麻疹ワクチンが定期接種に導入されましたが、ワクチンの接種率が低く4~5年ごとに大規模な国内流行が発生していました。2001年の流行では、全国で約28.6万人が麻疹を発症したと推計されています。さらに、最近では2007年に麻疹の大規模な流行があり、10~20代の若者が多く発症したため、多数の大学や高校が休校になりました。この事態を受けて、2008年か

ら「麻疹に関する特定感染症予防指針」が厚生労働省から告示され、これまで感染症法の5類感染症定点報告疾患であった麻疹と風疹の届出は同5類感染症全数報告疾患となりました。麻疹あるいは風疹を診断した医師すべてに対して、診断後可能な限り24時間以内（風疹は7日以内）の保健所への届出は法律で義務づけられています。また、2008年から2012年までの措置として第3期（中学1年）、第4期（高校3年）の麻疹・風疹ワクチン（MRワクチン）の定期接種が開始されました。全数報告開始初年度の2008年も引き続き大規模な国内流行が発生し、ワクチン未接種あるいは1回接種の10～20代に加えて、ワクチン未接種の乳幼児も多く発症しました。2009年～2011年にかけて麻疹報告数は著明に減少しています。成人、小児を問わず、麻疹に対する免疫がない、あるいは免疫が不十分な人が麻疹ウイルスに暴露されると麻疹あるいは修飾麻疹を発症します。従って、麻疹の罹患歴がなく、麻疹ワクチンの接種歴がない成人にはMRワクチンの接種が勧められます。ただし、妊娠している人、免疫機能に異常がある人、免疫抑制剤による治療を受けている人などは接種禁忌です。

風疹（rubella）は、発熱、発疹、リンパ節腫脹を特徴とするウイルス性発疹症です。飛沫によりヒト-ヒト感染します。14～21日の潜伏期の後に、発熱、発疹、リンパ節腫脹がみられます。発熱は風疹患者の約半数にみられ、発疹は顔面から出現し、頸部、体幹、四肢へと広がります。合併症としては、一過性の関節炎が年長児や成人で見られます。また、免疫のない女性が妊娠初期に風疹に罹患すると、風疹ウイルスが胎児に感染して、出生児に先天性風疹症候群（CRS）を引き起こすことがあります^{1,3)}。2004年以降には国内での報告数は減少傾向でしたが、2011年～2012年にかけて再び報告数が増加しています。とくに、2012年の5～6月に報告数が急速に

増加し、とりわけ20～40歳代の男性が約60%を占めていました。このことは、1977年～1994年にわが国で女子中学生にのみ風疹ワクチンの接種が実施されていたことに起因しています。また、2011年度の感染症流行予測調査によれば、30歳代～50歳前半の男性の約20%は風疹に対する抗体がないことから、これまでに風疹の罹患歴のない、あるいは風疹の予防接種を受けたことがない成人では、MRワクチンの接種が推奨されます。なお、成人女性の場合は妊娠していない時期にワクチン接種を行い、その後2カ月間の避妊が必要です。

文 献

- 1) 多屋馨子：小児臨 65:335-346, 2012.
- 2) 高山直秀, 菅沼明彦：感染症誌 77:815-821, 2003.
- 3) IASR 32:250-252, 2011.

4) 今後応用可能な予防接種

現在、内科領域の今後応用可能なワクチンとして以下の2つのワクチンが挙げられます。

成人用13価肺炎球菌結合型ワクチン

現在、成人用肺炎球菌ワクチンとして23価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン（PPV23）が使用されています。PPV23は免疫学的メモリーを誘導できないため、二回目以降の接種によって初回接種以上の特異抗体を誘導できません。また、PPV23は免疫低下状態にある成人に対しては、髄膜炎、敗血症などの侵襲性肺炎球菌感染症に対する予防効果が不十分です。このような背景から、欧米では小児に使用されている免疫学的メモリーの誘導が可能な13価肺炎球菌結合型ワクチン（コンジュゲートワクチン：PCV13）が50歳以上の成人を対象とした肺炎球菌ワクチンとして承認されています。これまでに、7価PCV（PCV7）のHIV感染成人におけるワクチン含有血清型と血清型6Aによる侵襲性肺炎球菌感染症に対する予防効果が示されています¹⁾。しかしながら、PCV13の成人の肺炎に対する臨

床効果は未だ明らかではありません²⁾。現在、わが国における65歳以上の高齢者に対するPPV23の推定接種率は17%まで高まっていることから、今後の高齢者におけるPPV23とPCV13との使い分けについて十分な議論が必要です。

带状疱疹ワクチン

水痘・带状疱疹ウイルスの初感染により水痘を発症した後にウイルスは神経節に潜伏感染します。带状疱疹はその後のストレス、加齢、抗がん剤治療、日光などの刺激によりウイルスの再活性化が起こることで発症します。わが国における带状疱疹の罹患率は年間4.14/1,000人とされています³⁾。米国メルク社は水痘ワクチンのウイルス力価の約10倍を含む带状疱疹ワクチンを開発しています。Oxmanらは米国で大規模な無作為二重盲検試験を実施し、带状疱疹ワクチン接種後の带状疱疹の罹患率がプラセボに比較し51.3%減少し、带状疱疹発症後の神経痛は66.5%減少したと報告しています⁴⁾。一方、わが国でも2004年に微研研究会製の水痘ワクチンの免疫賦活効果はその用法に追加されて、同社は带状疱疹ワクチンとしての開発を進めています。また、GlaxoSmithKline社はリコンビナント带状疱疹ワクチンの臨床開発を進めています。

文 献

- 1) French N, et al: A trial of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in HIV-infected adults. *N Eng J Med* 362: 812-822, 2010.
- 2) Musher DM, et al: The potential role for protein-conjugate pneumococcal vaccine in adults: what is the supporting evidence? *Clin Infect Dis* 52: 633-640, 2011.
- 3) 神谷 齊, 他: 带状疱疹とその予防に関する考察. *感染症誌* 84: 694-701, 2011.
- 4) Oxman MN, et al: A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Eng J Med* 352: 2271-2284, 2005.

2. 特定の集団、機会に推奨される予防接種

1) 高齢者への予防接種～集団居住施設を含めて～

高齢者では予防接種がなぜ重要か？

高齢者では、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの接種が特に重要です。なぜでしょうか？肺炎はわが国の死因統計で第3位を占めています。近年増加しており、90歳以上では悪性新生物、心疾患を抜いて第1位を占めるようになります。肺炎の死亡数の95%以上は65歳以上で占められており、高齢化が急速に進んでいるわが国では肺炎への対処が重要であることが理解できます。さらに、インフルエンザに罹患すると、高齢者ほど細菌性肺炎を併発しやすく、死亡につながり易いこともよく知られています。肺炎を起こしてから治療も勿論重要ですが、肺炎を起こさないように予防する方がより効果的であり、医療経済上もメリットのあることが最近知られるようになりました。

高齢者の肺炎をどう抑えるか？どう予防するか？

肺炎への対処は、早期診断と早期治療が肝要であり、日本呼吸器学会の市中肺炎診療ガイドライン¹⁾等にその骨子が述べられていますが、それ以上に効果があるのは肺炎を予防することです。肺炎の予防には種々の方法があり、それらを組み合わせることが重要です。生活習慣の適正化、食事栄養の確保、寒冷への対処などは基本的な対策であり、肺炎を起こし易い要因を一つ一つ抑えることが大事です。

肺炎を起こし易い要因として種々の基礎疾患(心疾患、呼吸器疾患、糖尿病、腎臓病、その他)の存在やインフルエンザの罹患などがあり、これらの疾患の治療並びにコントロールが重要です。また、虫歯や歯槽膿漏などの口腔疾患の治

療も重要であり、それに関連して普段からの口腔ケアが求められます。高齢になるほど多い誤嚥性肺炎の発症と重症化を抑えることが出来ます。

これらの基本的な対策に次項のワクチン接種を加えることで予防の効果が上がります。

予防接種で高齢者の肺炎をどれだけ予防できるか？

インフルエンザでは、その重症化をワクチンで抑えられることが既によく知られていますが、肺炎ではどうでしょうか？これまでも、免疫不全のない成人や種々の基礎疾患を有する成人における成人用23価肺炎球菌ワクチン（PPV23）の侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）に対する予防効果が報告されています。ところが、肺炎そのものに関しては、PPV23の予防効果は、わが国ではこれまで明らかではありませんでした。

しかし、最近、先にも述べたように丸山ら²⁾、川上ら³⁾の勝れた臨床試験成績が報告され、2011年の厚労省予防接種部会ワクチン評価に関する小委員会の「医療費の大幅な削減を図ることが可能」という試算の根拠の1つとなりました。

海外では、この2つのワクチンの併用接種が有用であるとする報告は多数あり、たとえば高齢者で増加する慢性呼吸器疾患保有者では、それぞれのワクチン単独でもインフルエンザや肺炎による入院及び死亡を有意に減少させ得るが、2つのワクチンの併用では入院と死亡がさらに減少するという報告⁵⁾などがあります。

以上より、高齢者ではインフルエンザワクチンの接種と共に、肺炎球菌ワクチンを併用接種することが望めます。成人用23価肺炎球菌ワクチンは2歳以上が対象ですが、その添付文書の適応対象の最初に「65歳以上の高齢者」が記載されています。なお、海外と同様、平成21年10月からはわが国でも肺炎球菌ワクチンの再接種、およびインフルエンザワクチンとの同時接種が可能になりました。

高齢者集団居住施設におけるインフルエンザと肺炎の予防

最近、わが国で発行された医療・介護関連肺炎診療ガイドライン⁶⁾でも、高齢者に多い医療・介護関連肺炎（Nursing and health-care associated pneumonia：NHCAP）の予防に関して、インフルエンザワクチンと肺炎球菌ワクチンの接種が重要であることが強調されています。わが国では、高齢者集団居住施設が増加していますが、そのような施設における肺炎球菌感染症の集団発生は、ワクチン接種率が居住者の5%以下の場合に発生しています⁷⁻⁹⁾。しかし、新たに居住者へのワクチン接種を行ったところ、肺炎の発生が抑えられ、多剤耐性肺炎球菌の保菌者も減少した、との報告があります⁹⁾。高齢者施設へ初めて入居する際に接種するのが実際的かつ効果的と言えます。

高齢者集団居住施設では、ワクチン接種を励行していてもインフルエンザの集団発生が見られることがあり、さらに、肺炎の続発などで死亡する例の見られることがあります。ワクチン接種による予防効果は100%ではないからです。そのような流行的な発生に直面した場合には、抗インフルエンザ薬を予防投与するのが効果的です。わが国でも、感染症関連の学会から抗インフルエンザの予防投与に関するガイドラインが発行される予定ですから、参照して頂きたいと思います。

予防接種の費用負担

インフルエンザワクチンは現時点では、65歳以上の高齢者と基礎疾患のある60~64歳の方を除けば任意接種の扱いとなり全額の自己負担が必要ですが、多くの自治体が高齢者の接種費用の一部負担を行っていますので、詳細は各医師会あるいは各自治体に問い合わせてください。

一方、肺炎球菌ワクチンも現時点では、任意接種のワクチンであるため全額の自己負担が必要ですが、近年、全国の自治体が公費助成を拡

大しています。2012年11月1日現在、全国の1,742の自治体中、882(51%)の自治体が接種費用の一部あるいは全額分の公費助成を行っていますが、助成を受けられる年齢や助成の方法、助成額、その他がそれぞれ異なりますので、詳細は各医師会あるいは各自治体に問い合わせてください。

文 献

- 1) 日本呼吸器学会：呼吸器感染症に関するガイドライン：成人市中肺炎診療ガイドライン。日本呼吸器学会，東京，2007，1-86.
- 2) Maruyama T, et al: Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents double blind, randomized and placebo controlled trial. *BMJ* 340: p.c1004, 2010.
- 3) Kawakami K, et al: 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) 厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会：ワクチン評価に関する小委員会報告書 肺炎球菌ポリサッカライドワクチン（成人用）。2011.3.11 <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r98520000014wdd.html>.
- 5) Nichol KL: The additive benefits of influenza and pneumococcal vaccinations during influenza seasons among elderly persons with chronic lung disease. *Vaccine* 17: S91-S93, 1999.
- 6) 日本呼吸器学会：医療・介護関連肺炎診療ガイドライン。日本呼吸器学会，東京，2011，1-39.
- 7) Quick RE, et al: Underutilization of pneumococcal vaccine in nursing home in Washington State: report of a serotype-specific outbreak and a survey. *Am J Med* 94: 149-152, 1993.
- 8) CDC: Outbreaks of pneumococcal pneumonia among unvaccinated residents of chronic-care facilities-Massachusetts, October 1995; Oklahoma, February 1996; and Maryland, May-June 1996. *MMWR* 46: 60-62, 1997.
- 9) Nuorti JP, et al: An outbreak of multidrug-resistant pneumococcal pneumonia and bacteremia among unvaccinated nursing home residents. *N Engl J Med* 338: 1861-1868, 1998.

2) 職業感染対策としての予防接種

医療関係者

医療機関では院内感染としてさまざまな感染症が起こるため、適切な感染対策が求められま

す。医師，看護師，薬剤師などの医療従事者は患者と直に接触することから，十分な免疫をもたない感受性者は感染を受ける危険性が高いと考えられます。逆に，感染性病原菌を保有する医療従事者は患者や周囲の職員へ感染を拡げる可能性があります。

このような感受性者に対する感染対策としてワクチンは有効な方法です。ワクチンの接種対象者には，医療従事者はいうまでもなく，事務員や清掃などの委託業者，実習生など患者と接する可能性のあるすべての医療関係者が含まれます。

対象となるワクチンには，B型肝炎，インフルエンザ，麻疹，風疹，水痘，流行性耳下腺炎などがあります。日本環境感染学会は，医療関係者へのワクチンを混乱なく適切に接種できるようにすることを目的として，2009年「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を作成しました¹⁾。本ガイドラインは，前述の6疾患について，ワクチンの基本的事項，接種対象者，接種方法，効果，副反応などについてわかりやすくまとめています。また，2011年に米国CDCは，医療関係者へのワクチン接種に関するACIP（予防接種諮問委員会）の推奨についてわかりやすく解説しています²⁾。ここでは，ワクチン接種に関するポイントをまとめて表2に示します。

医療関係者へのワクチンは，強制力をともなうものではなく，あくまで任意接種ですが，自らの感染予防と自らが患者や周囲の職員への感染源とならないために，そして欠勤などによる病院の機能低下を招かないためにも，医療機関による積極的な取り組みが重要であると考えられます。

その他の職業

救急救命士，消防士，警察官，高齢者施設職員，小学校・幼稚園教諭，保育士などは職業感染対策としての予防接種が望ましいと考えられます。明確な指針はないようですが，上記のワ

クチンの中でそれぞれの職業に応じたワクチンの接種が望まれます。

文 献

- 1) 日本環境感染学会 ワクチン接種プログラム作成委員会：院内感染対策としてのワクチンガイドライン. 日環境感染症会誌 2009;24 (Suppl). http://www.kankyokanse.n.org/modules/publication/index.php?content_id=4.
- 2) Immunization of health-care personnel: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practice (ACIP): MMWR 60:1-45, 2011. <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6007.pdf#search>.

3) 海外渡航時のワクチン

近年わが国の海外渡航者数は増加し、年間1,500万人以上になっています。渡航先や形態にも変化がみられ、仕事のため家族連れで長期間途上国に赴任する場合や、冒険旅行などの様に従来とは異なる地域に足を踏み入れる場合も多くなっており、海外渡航者が様々な感染症に罹患する危険性が増加しています(表3)¹⁾。

海外渡航時のワクチンは、①麻疹やポリオなど自らの感染予防のみならず周囲への感染を防止するため主に小児期より定期接種するもの、②黄熱ワクチンのように入国時などに予防接種証明書を要求されることがあるもの、③A型肝炎、破傷風、狂犬病など渡航先で流行している感染症で、わが国では存在しないか、感染する危険性が少ない病気を予防するという個人防衛の意味があるものの3種類があります。ワクチンによって接種回数、効果の持続期間が異なるので、常にワクチンの記録は怠らず、次の接種はいつ行うかを知っておくことが大切です。

現在、わが国では海外で通常に使用されているワクチンの多くが国内で未承認であり、狂犬病ワクチンやA型肝炎ワクチンなどの国産ワクチンの品薄が慢性的に持続している、ワクチンを接種できる医療機関が十分に整備されていない、また海外渡航者に対するワクチンの必要性の啓発が十分にできておらず、渡航者が海外ほど積

極的にワクチン接種を行わないなどの問題があり、海外渡航者のためのワクチン接種の環境が十分に整っているとは言えない状況です。

日本渡航医学会は、2010年海外渡航者にとって本来必要なワクチンを大きな支障なく接種できるようにすることを目的として「海外渡航者のためのワクチンガイドライン2010」を発刊しました²⁾。本ガイドラインには各ワクチンの解説だけでなく、接種法についてのわが国と国際基準の比較、法律的事項、ワクチン基礎講座も示されています。ワクチン実施機関は厚生労働省検疫所のFORTH海外で健康に過ごすために(<http://www.forth.go.jp/>)や日本渡航医学会のホームページ(<http://www.travelmed.gr.jp/>)などで検索ができます。日本渡航医学会は、2011年よりいまだ我が国では数少ないトラベルクリニックを全国に普及させることを目的としたトラベルクリニックサポート事業を開始しました。

日本人が以前より気軽に海外渡航するようになり、渡航地に存在する感染症に罹患する機会は今後も増加することが予想されます。楽しい旅をするには渡航前に観光、ショッピングなどのみならず、健康や安全への備えが大切です。ワクチンで全ての病気を防ぐことはできませんが、少なくとも渡航地に存在し、罹患率の高い疾患、重症化しやすい疾患あるいは致死率の高い疾患でワクチンにより予防可能な疾患については事前のワクチン接種を検討すべきと思われる。今後わが国における海外渡航者のためのワクチンの環境整備が向上するとともに、海外渡航者が事前に渡航地の感染症情報を収集し、必要な感染症対策を準備する習慣をもてるよう啓発していくことが大切です。

文 献

- 1) 海外渡航者に対する予防接種のあり方に関する研究班：海外旅行者の予防接種Q&A. 厚生労働科学研究費補助金・新興再興感染症研究事業, 2008.
- 2) 海外渡航者のためのワクチンガイドライン2010作成委員

表 2. 医療関係者のためのワクチン接種

	対象者	不適応者	接種時期	方法	効果	全身性副反応	備考
B型肝炎	医師、看護師、臨床検査技師など患者の血液・体液及びこれらが付着した環境表面に触れる可能性があるすべての医療関係者(事務員、委託業者、実習生などを含む)でHBs抗原、HBs抗体陰性者	・明らかな発熱者 ・重篤な急性疾患の罹患者 ・本剤のアナフィラキシー既往者	就業(実習)前に1シリーズのワクチン接種を終了していることが望ましい	・0.1,5~6カ月の3回接種(1シリーズ) ・3回目接種1~2ヶ月後にHBs抗体検査 ・抗体陽性にならなかった場合はもう1シリーズの接種を考慮	・初回の1シリーズで85~95%で抗体陽性化(>10 mIU/ml) ・追加の1シリーズで再接種者の30~50%で抗体陽性化 ・2シリーズでも抗体陽性化しない場合はそれ以上の追加接種は推奨されていない	・発熱、全身倦怠感 ・ショック、アナフィラキシー様症状(まれ)	・環境中でも7日以上感染性がある ・応答者では経年的な抗体価の低下にもかかわらずワクチン効果が持続するため欧米では追加接種は不要とされているが、まだ議論の分かれるところである
インフルエンザ	すべての医療関係者(事務員、委託業者、実習生などを含む)	・明らかな発熱者 ・重篤な急性疾患の罹患者 ・本剤のアナフィラキシー既往者	流行期の前までには接種を完了することが勧められる	通常毎年1回接種	・効果が現れるまで約2週間程度かかり、約5ヶ月間効果が持続する ・65歳以下の健康成人での発症予防効果は70~90%	・発熱、頭痛、悪寒、倦怠感 ・ショック、アナフィラキシー様症状(まれ)	・過去に接種歴がない場合、2回接種した方がより抗体価が上昇するとの報告がある
麻疹	患者と接触する可能性のある医療関係者で、血清抗体価が基準を満たさない者(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・明らかな発熱者 ・重篤な急性疾患の罹患者 ・本剤のアナフィラキシー既往者 ・明らかな免疫低下者 ・妊婦	就業(実習)前にワクチン接種を終了していることが望ましい	・麻疹と風疹は混合ワクチンと単独ワクチンがある ・1回または2回接種(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・1回接種で95%以上の免疫獲得が期待される	・発熱、発疹、全身倦怠感 ・ショック、アナフィラキシー様症状(まれ) ・脳炎(まれ)	・免疫のない成人は重症化する可能性がある ・ワクチン接種記録、罹患記録を医療機関と本人の両方で保管する
風疹	患者と接触する可能性のある医療関係者で、血清抗体価が基準を満たさない者(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・明らかな発熱者 ・重篤な急性疾患の罹患者 ・本剤のアナフィラキシー既往者 ・明らかな免疫低下者 ・妊婦	就業(実習)前にワクチン接種を終了していることが望ましい	・麻疹と風疹は混合ワクチンと単独ワクチンがある ・1回または2回接種(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・1回接種で95%以上の免疫獲得が期待される	・リンパ節腫脹、関節痛 ・ショック、アナフィラキシー様症状(まれ)	・免疫のない成人は重症化する可能性がある ・ワクチン接種記録、罹患記録を医療機関と本人の両方で保管する
水痘	患者と接触する可能性のある医療関係者で、血清抗体価が基準を満たさない者(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・明らかな発熱者 ・重篤な急性疾患の罹患者 ・本剤のアナフィラキシー既往者 ・明らかな免疫低下者 ・妊婦	就業(実習)前にワクチン接種を終了していることが望ましい	・単独ワクチン ・1回または2回接種(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・1回接種で95%以上の免疫獲得が期待される	・発熱、発疹、水疱 ・ショック、アナフィラキシー様症状(まれ)	・免疫のない成人は重症化する可能性がある ・ワクチン接種記録、罹患記録を医療機関と本人の両方で保管する
流行性耳下腺炎	患者と接触する可能性のある医療関係者で、血清抗体価が基準を満たさない者(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・明らかな発熱者 ・重篤な急性疾患の罹患者 ・本剤のアナフィラキシー既往者 ・明らかな免疫低下者 ・妊婦	就業(実習)前にワクチン接種を終了していることが望ましい	単独ワクチン ・1回または2回接種(詳細は「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」を参照)	・1回接種で95%以上の免疫獲得が期待される	・発熱、耳下腺腫脹・無菌性髄膜炎、難聴、精巣炎(まれ) ・ショック、アナフィラキシー様症状(まれ)	・免疫のない成人は重症化する可能性がある ・ワクチン接種記録、罹患記録を医療機関と本人の両方で保管する

参考文献: 日本環境感染学会「院内感染対策としてのワクチンガイドライン」日環境感染会誌Vol.24 Suppl., 2009 (http://www.kankyokansen.org/modules/publication/index.php?content_id=4)

表 3. 海外でかかりやすい感染症

感染経路	生活上の注意	感染症	主な流行地域	主な症状	予防接種の有無
飲食物から感染	・ミネラルウォーターを飲む ・加熱した料理を食べる	旅行者下痢症	発展途上国	下痢, 嘔吐	
		A型肝炎	発展途上国	発熱, 黄疸, 全身倦怠感	○
		ポリオ	南アジア, アフリカ	発熱, 手足の麻痺	○
		腸チフス	発展途上国(とくに南アジア)	発熱, 腹痛	○*
		細菌性赤痢	発展途上国	発熱, 腹痛, 下痢, 血便	
		コレラ	発展途上国	水様性下痢, 脱水症状	○*
患者の飛沫などで感染	・手洗いやウガイ ・人ごみを避ける	インフルエンザ	全世界	発熱, 咽頭痛	○
		結核	発展途上国	咳・たん, 体重減少	○
		流行性髄膜炎	西アフリカなど	発熱, 意識障害, 頭痛	○*
蚊に媒介	・皮膚を露出しない ・昆虫忌避剤を塗る ・殺虫剤を散布する	マラリア	発展途上国(熱帯・亜熱帯)	発熱, 悪寒	
		デング熱	東南アジア, 中南米	発熱, 発疹	
		日本脳炎	アジア	発熱, 意識障害	○
		黄熱	熱帯アフリカ, 南米	発熱, 黄疸	○
性行為で感染	・行きずりの性行為を控える ・医療行為にも注意	B型肝炎	アジア, アフリカ, 南米	発熱, 黄疸, 全身倦怠感	○
		梅毒	発展途上国	性器潰瘍, 皮疹	
		HIV感染症	全世界(とくに発展途上国)	発熱, リンパ節腫脹	
動物から感染	・動物に近寄らない	狂犬病	全世界(とくに発展途上国)	恐水発作, けいれん	○
傷口から感染	・傷口を消毒する	破傷風	全世界	口が開かない, けいれん	○

*腸チフス, コレラ, 流行性髄膜炎には予防接種はあるが日本では認可されていない。

(海外旅行者の予防接種Q&A. 厚生労働科学研究費補助金・新興再興感染症研究事業 海外渡航者に対する予防接種のあり方に関する研究班より引用, 一部改変) MMWR Vol.60 No.7, 2011 (<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6007.pdf#search>)

会：海外渡航者のためのワクチンガイドライン 2010. 日本渡航医学会, 2010.

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：二木芳人；講演料(アステラス製薬, MSD, グラクソ・スミスクライン, 塩野義製薬, 第一三共, 大正富山医薬品, 大日本住友製薬, バイエル薬品, ファイザー), 研究費・助成金(アステラス製薬), 寄付金(武田薬品工業, ファイザー), 寄付講座(アステラス製薬, 科研製薬, 杏林製薬, 塩野義製薬, 第一三共, 大正製

薬, 大日本住友製薬, 大鵬薬品工業, 富山化学工業, Meiji Seikaファルマ), 大石和徳；講演料(MSD), 寄付金(MSD) 渡辺彰；講演料(アボットジャパン, MSD, 大塚製薬, グラクソ・スミスクライン, 塩野義製薬, 第一三共, 大正富山医薬品, 大日本住友製薬, 田辺三菱製薬, 富山化学工業, バイエル薬品, ファイザー), 原稿料(協和企画, ユニオンエース), 寄付金(アステラス製薬, 第一三共), 寄付講座(杏林製薬, 塩野義製薬, 第一三共, 大正製薬, 大日本住友製薬, 大鵬薬品工業, 富山化学工業, Meiji Seikaファルマ)

Impaired capsular polysaccharide is relevant to enhanced biofilm formation and lower virulence in *Streptococcus pneumoniae*

Liang Qin · Yutaka Kida · Yoshihiro Imamura · Koichi Kuwano · Hiroshi Watanabe

Received: 9 August 2012 / Accepted: 25 September 2012
© Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2012

Abstract *Streptococcus pneumoniae* has been reported to form biofilms. Many different surface molecules, including capsular polysaccharide (CPS), may play a fundamental role in pneumococcal biofilm development. We designed a CPS mutant, TIGR4cps4D⁻, from the TIGR4 strain and detected enhanced biofilm formation. The pathogenic diversities of the mutant were also investigated with the in vitro expression levels of *pavA*, *lytA*, *IgA1*, *piaA*, *psaA*, *ply*, and *spxB*. The mean OD₅₉₅ of TIGR4cps4D⁻ biofilm was 1.77 and 1.74, whereas that of TIGR4 was 0.76 and 0.33 on day 1 and day 2, respectively. Scanning electron microscopy and confocal laser scanning microscopy showed TIGR4cps4D⁻ formed a biofilm that was significantly thicker than that formed by TIGR4 (~12.22 vs. ~6.29 μm). Compared to TIGR4, the gene expression of *lytA*, *IgA1*, and *psaA* in TIGR4cps4D⁻ was 1.9×10^{-5} -, 2.4×10^{-5} -, and 3.2×10^{-3} fold lower under the planktonic condition, and 1.9×10^{-5} - and 9.7×10^{-5} fold lower in biofilms, respectively. Furthermore, TIGR4cps4D⁻ seemed to induce less cell death, compared to the results of TIGR4 (21.38 vs. 33.47 %, after a 5-h exposure; $P < 0.05$). Our data indicate that impaired pneumococcal CPS may increase biofilm formation and be involved in inhibition of virulence, possibly by influencing the gene expression.

Keywords Biofilm · Capsular polysaccharide (CPS) · Gene expression · *Streptococcus pneumoniae* · Virulence

Introduction

Streptococcus pneumoniae is an important human pathogen that is recognized as a major cause of community-acquired pneumonia, acute sinusitis, otitis media, meningitis, bacteremia, and other conditions. Since the first case of penicillin-resistant *S. pneumoniae* was reported in the 1970s, drug-resistant *S. pneumoniae* has spread all over the world. Consequently, the treatment of both invasive and chronic infections caused by *S. pneumoniae* has become an important issue [1–5]. Recently, *S. pneumoniae* was reported to form biofilms, which is thought to be a unique mechanism by which the pathogen escapes the host immune response and antimicrobial elimination [6–10]. Biofilms are highly structured, sessile microbial communities, characterized by bacteria attached to either a surface or interface, that are embedded in a matrix of extracellular polymeric substances. Hence, the rate at which bacteria attach to a surface is an important determinant of biofilm formation [11, 12]. *S. pneumoniae* are enveloped by capsule polysaccharides (CPSs). It is well known that pneumococcal CPS is usually synthesized by the Wzx/Wzy-dependent pathway, except for types 3 and 37, which are synthesized by the synthase pathway. The 5'-portion of the *S. pneumoniae* cps loci, encoding the first four genes (*cpsA*–*cpsD*), is common to most serotypes of *S. pneumoniae*, which are located at the chromosomal cps locus between *dexB* and *aliA* [13–15]. CpsA, which does not seem to be essential for encapsulation, has been shown to be a transcriptional activator of the cps locus in *Streptococcus agalactiae*. CpsB is a manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase that

L. Qin (✉) · Y. Imamura · H. Watanabe
Division of Infectious Diseases, Department of Infectious Medicine, Kurume University School of Medicine,
67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan
e-mail: braverok@hotmail.com; shin_ryou@med.kurume-u.ac.jp

Y. Kida · K. Kuwano
Division of Microbiology, Department of Infectious Medicine,
Kurume University School of Medicine, Fukuoka, Japan

is required to dephosphorylate CpsD. CpsC and CpsD are predicted to function together in polymerization and export of CPS in a fashion similar to ExoP in exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* and Wzc from *Escherichia coli*. CpsC is required for CpsD tyrosine phosphorylation. CpsD is an autophosphorylating protein-tyrosine kinase, and point mutations in the *cpsD* gene attenuate its activity and regulate CPS production [6, 16, 17].

Expression of CPS is essential for systemic virulence because of its antiphagocytic properties, which has been well characterized [15, 18]. CPS was also reported to be involved in the adherence of pneumococci to host cells [9], and encapsulated clinical pneumococcal isolates were reported to have impaired biofilm formation [6]. The thickness of the CPS may also influence the degree of exposure of other important pneumococcal surface structures, such as the adhesins, which are required during the initial colonization phase. These results indicate that CPS may play an important role in pneumococcal pathogenicity and biofilm formation. Previous studies reported that recombinational exchange at the CPS biosynthetic locus may lead to frequent serotype changes [19], and strains with spontaneous CPS switching had even been detected in clinical trials [20, 21]. On the other hand, adherence and virulence protein A (*pavA*), the autolysin (*lytA*), the immunoglobulin A1 protease (*IgA1*), the ion transporters (*psaA* and *piaA*), the pneumococcal cytotoxin pneumolysin (*ply*), and pyruvate oxidase (*spxB*) were reported as a part of genes that were considered important in promoting carriage or disease [22–24]. Modification of CPS may also influence expression of these key genes during colonization and sequentially change the pathogenicity.

In the present study, we attempted to provide direct evidence to prove that impaired CPS enhances *S. pneumoniae* biofilm formation, and investigated the pathogenic diversities, as well as the mRNA expression of seven genes relevant to adherence and virulence in different life conditions.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmid, media, and serotyping

The serotype 4 *S. pneumoniae* ATCC BAA-334 strain (TIGR4) [25], the genome of which had been sequenced, and the laboratory-derived TIGR4cps4D⁻ strain, were used in this study. Pneumococcal strains were grown on Trypticase soy agar (TSA II) supplemented with 5 % defibrinated rabbit blood (Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) at 37 °C in 5 % CO₂ for 18 h. A single colony was selected and used to inoculate brain heart infusion (BHI) broth, which was then cultured overnight. Serotype

identification of the strains was performed using a Pneumotest-Latex kit according to the manufacturer's instructions (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Agglutination within 5–10 s was indicative of a positive serotype test. The plasmid pMPM-A4Ω (6,455 kb), which contained ampicillin and spectinomycin resistance genes as the selection markers, was kindly provided by the National Institute of Genetics (Shizuoka, Japan) [26].

Construction of cps4D disruption plasmid

Chromosomal DNA from pneumococcal isolates was prepared as previously described [27]. Briefly, DNA was extracted by suspending bacterial colonies in 50 μl distilled water, followed by boiling for 5 min. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using Ex Taq DNA polymerase. *Cps4D* (SP_0349) was amplified in 50 μl, using 2 μl of pre-prepared bacterial lysate as the DNA template. The PCR profile included denaturation at 95 °C for 1 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s, annealing at 55 °C for 20 s, extension at 72 °C for 20 s, and a final extension at 72 °C for 10 min. The following TIGR4cps4D⁻-specific primers were used: forward primer sequence [corresponding to TIGR4 (GenBank AE005672) *cps4D* nucleotides 127–156] 5'-CTC GAG CTC GAG GAT ATC ACG TTT ATT CGC CTC ACC TGT TGC-3' (underlining indicates *XhoI* restriction site), and reverse primer sequence (corresponding to TIGR4 *cps4D* nucleotides 608–636 bp) 5'-AGA TCT AGA TCT GCA GAA GAA TAT TAC AAT GCC TTG TGT AC-3' (underlining indicates *BglII* restriction site). The 484-bp PCR products were digested using *XhoI* and *BglII* and then cloned into a pMPM-A4Ω plasmid. The resultant plasmid was named pΔcps4D.

Transformation procedures

The transformation method used in this study was a modification of previously reported methods [28, 29]. In brief, an overnight culture of TIGR4 was diluted to an optical density of approximately 0.5 OD₄₉₀ in competence medium [BHI broth containing 0.2 % bovine serum albumin (BSA) and 0.01 % CaCl₂] and aliquoted for storage at –80 °C after addition of 10 % glycerol. TIGR4 was transformed as follows. Competent cells (200 μl) were thawed, followed by addition of 20 μl pΔcps4D (43.25 μg/ml). The mixture was incubated at 37 °C for 2 h and then plated onto TSA II agar containing ampicillin (40 μg/ml) and streptomycin (40 μg/ml). Insertion of pΔcps4D into the *cps4D* gene was confirmed by PCR using PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara, Shiga, Japan). The PCR profile included denaturation at 98 °C for 3 min, followed by 30 cycles of

denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 55 °C for 15 s, extension at 68 °C for 9 min, and a final extension at 68 °C for 5 min. Primers were designed from the region 500 bp upstream and downstream of the *cps4D* gene: forward primer sequence (1833693–1836731), 5'-ATA ACC GGA CCT TCT GAA TC-3'; reverse primer sequence (1838421–1838441), 5'-GAA TAT ACG AGT ACC ACG CGA-3'.

Scanning electron microscopy (SEM)

Bacteria were incubated in 2.5 % glutaraldehyde for 1 h at room temperature. Cells were centrifuged at 1,500 rpm for 5 min, and the supernatant was decanted. After washing with 7.5 % sucrose (1 h), fixation was performed by incubation in 1 % OsO₄ [2 % OsO₄ was diluted with 7.5 % sucrose (1: 1)] for 1 h (4 °C). Specimens were continuously dehydrated by critical-point drying, which involves the replacement of water in the cells with graded ethanol from 50 % to 100 % and use of 100 % *t*-butyl alcohol for freeze drying. Samples were coated with gold in an ion-sputter coater and observed with an SEM (S-800, Hitachi, Tokyo, Japan) [30].

Transmission electron microscopy (TEM)

Bacteria were incubated in 2.5 % glutaraldehyde for 1 h at room temperature. Subsequently, the bacteria were washed for several hours in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.0) containing 7.5 % sucrose and then postfixed in 1 % OsO₄ for 1.5 h at 4 °C. The fluid was removed and the specimens were dehydrated in graded acetone (50–100 %), transferred into dibutyl glycidyl ether, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (70 nm) were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined using TEM (H-7000; Hitachi, Tokyo, Japan) [30].

Microtiter biofilm assay (MBA)

Biofilm formation by *S. pneumoniae* strains was assessed using 96-well (flat bottom) polystyrene (PST) microtiter dishes (NUNC, Roskilde, Denmark) as previously described [31]. Briefly, the concentration of bacteria was initially adjusted with brain–heart infusion (BHI) broth to a turbidity of 0.05 (OD₄₉₀). After a 24- or 48-h incubation, the culture medium containing planktonic cells was stained with 1 % crystal violet at room temperature. After strongly washing the medium with water three times, the dye bound to the biofilm was extracted with 230 µl 95 % ethanol for 15 min. The extracted dye was quantified by measuring the absorbance at 595 nm with a microplate reader. All strains were tested in triplicate, and the average ± SD of each experiment was calculated.

Biofilm growth in a continuous-flow chamber

Strains were grown to mature biofilms in a continuous-flow cell chamber as described by Davies et al. [32]. Strains were grown in BHI broth to the mid-log phase and then diluted to an optical density of 0.1 (OD₄₉₀). A 1 ml aliquot of the cell suspension, approximately $1 \times 10^{8-9}$ colony-forming units (CFU)/ml, was used to inoculate a flow-cell chamber (37 × 5 × 5 mm), followed by incubation at 37 °C for 2 h. During this incubation, bacteria were expected to tightly adhere to the glass coverslip. The chambers used in the present experiment were designed to reduce fluid shear on the biofilms relative to that induced by typical wells that are 1 mm deep. The chambers were subsequently incubated in BHI for 24 or 48 h at 37 °C under continuous flow (flow speed <500 µl/min).

Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Biofilm architecture was investigated by using inverted CLSM (Olympus, Tokyo, Japan) as described previously [31]. Pneumococcal biofilms were rinsed with PBS and then stained with Live/Dead BacLight from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Cells with a compromised membrane that are considered to be dead or dying stain red, whereas cells with an intact membrane stain green. To ensure reproducibility, each experiment was performed in triplicate. Images were analyzed using FV10-ASW Viewer Ver. 1.7b (Olympus); projections through the *x*–*y* plane and the *x*–*z* plane were obtained.

RNA isolation

Pneumococcal strains were grown in BHI broth in 50-ml tubes for 24 h. Planktonic cells (approximately 10⁷ CFU/ml) were recovered by centrifugation at 8,000 rpm for 5 min at 4 °C. A 15-ml aliquot of the cell suspension (approximately 1×10^6 CFU/ml) was inoculated into 150-cm² film-made lid tissue culture flasks (Iwaki, Japan) and cultured for 24 h. The culture medium was removed and the flasks were vigorously washed three times with PBS (–) buffer. The bottom of flasks to which biofilm had tightly adhered were scratched; then the cells were recovered using 200 µl of an RNA Stabilization Solution (Ambion, Japan). Total RNA was isolated using a commercial high-purity RNA isolation kit, following the manufacturer's manual (Roche, Mannheim, Germany). Finally, RNA of each sample was eluted in 100 µl RNase-free water. Quantification and crude quality assessment were done by a micro-volume spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), and a visual examination on a 0.8 % ME

agarose gel in Tris–borate–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer stained with ethidium bromide. Aliquots of total RNA were stored at -80°C until use.

Real-time PCR analysis

The qualified RNA was then used for cDNA synthesis, which was performed by random priming (Random 6 mers) on total RNA by using a real-time (RT)-PCR kit as described by the manufacturer (Takara, Japan). Genes (*pavA*, *lytA*, *IgA1*, *piaA*, *psaA*, *ply*, and *spxB*) relative to adherence and virulence were selected to test in the quantitative real-time PCR with SYBR green detection (Table 1). The primers were designed according to the published genomic sequence of TIGR4 (GenBank AE005672). Primer-pair efficiency was analyzed using varying concentrations of TIGR4-derived DNA template, and the C_T values obtained corresponded to the expected relative concentrations of template. The optimal concentrations of primers used in these studies were determined empirically in accordance with the manufacturer's instructions. Each reaction was conducted in duplicate two-step multiplex real-time PCRs with SYBR premix Ex Taq GC (TaKaRa, Japan) on a Real Time System TP800 (Takara, Japan). 16S ribosomal RNA (16S rRNA) served as an internal reference gene. The relative expression level

was measured by using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method described by Livak and Schmittgen [33].

Cytotoxicity detection assay

Prepared 100 μl medium (without antibiotics) containing BEAS-2B cells (human bronchial epithelium cells), about $10^5/\text{ml}$ for each well of a 96-well plate, was incubated for 48 h at 37°C with 5 % CO_2 . Bacteria were diluted to 10^5 CFU/ml for each strain. Then, 100 μl of each diluted bacteria suspension was added into previously prepared 96-well plates after removing the culture medium, except for the low control wells, and were then continually cultured for 24 h at the same condition. We quantitated the cytotoxicity in 96-well plates 24 h after infection using a Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche, Mannheim, Germany). Assay followed the manufacturer's protocol. In brief, 5 μl lysis solution was added to the high control wells and incubated for an additional 15 min; 100 μl reaction mixture was added to each well, and incubated for up to 30 min at room temperature. Finally, 50 μl stop solution was added to each well to stop the reaction. Optical density of each sample was measured at 490 nm by a microplate reader. All infection studies were tested in triplicate, and the average \pm SD of each experiment was calculated.

Table 1 Primer sequences of housekeeping gene and genes relative to adhesion or virulence

Genes	Forward primer sequences (5'–3')	Reverse primer sequences (5'–3')	Accession number (gene ID)	Function	Size (bp)
16S ^a <i>rRNA</i>	TCTTGACATCCCTCTGACCGC	CCAACATCTCACGACACGAGC	SP rrnaA16S (929754)	16S ribosomal RNA	100
<i>pavA</i>	TCCACCAAGTGCCTAACGACC	GGGAGTCAGAGCCTTATCAAGCG	SP 0966 (931286)	Adherence and virulence protein A	95
<i>lytA</i>	CGGATTATCACTGGCGGAAAG	CAGGCACCATTATCAACAGGTCC	SP 1937 (931994)	Autolysin	100
<i>IgA1</i>	CAA CCT GAG ACT GGT GTA G	GTC ACT TAC TAC AGC TTC G	SP 1154 (931668)	Immunoglobulin A1 protease	96
<i>piaA</i>	CAGTTCATCTGATAAAGGAGACGG C	CTTCAAAGGCAGGAATAGTTGCT C	SP 0243 (930044)	Iron ABC transporter iron-binding protein	92
<i>psaA</i>	CACACGAATACGAACCACTTCTCTG	GCATTGCCACCTGTTTCAAGG	SP 1650 (931186)	Manganese ABC transporter manganese-binding adhesion lipoprotein	97
<i>ply</i>	TCAAGAAGGCAGTCGCTTTACAG	AAGGTCGCAACTACATTGTCACG	SP 1923 (931915)	Pneumolysin	90
<i>spxB</i>	CAATCTACGGTATCCCATCAGGAAC	CGTGGCGAACTTGTAAGAAACG	SP 0730 (930680)	Pyruvate oxidase	90

^a 16S rRNA was analyzed as the housekeeping gene

Statistical evaluation

Data were analyzed using the Student's paired *t* test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Construction of the CPS-impaired mutant TIGR4cps4D⁻

To confirm the role of CPS in *S. pneumoniae* biofilm formation, we constructed a CPS-impaired mutant. Several drug-resistant colonies were chosen from the selective blood agar plate containing ampicillin and streptomycin (40 µg/ml). Insertion of the DNA fragment within the *cps4D* gene was confirmed by PCR (Fig. 1a). In the wild-type TIGR4 strain, a 1,728-bp segment spanning 500 bp up- and downstream of the *cps4D* gene was amplified. By contrast, an 8,183-bp DNA fragment was amplified in TIGR4cps4D⁻, which confirmed insertion of the plasmid vector into the *cps4D* gene site.

Morphological characteristics were investigated. The TIGR4 colony phenotype observed using SEM was smooth or mucoid (Fig. 1b), and TEM showed the considerable thickness of the CPS (Fig. 1d). These results suggest that TIGR4 produced a considerable amount of CPS. By contrast, the CPS of the mutant TIGR4cps4D⁻ had a rough outer surface (Fig. 1c), and the amount of CPS-related material evenly distributed over the cell surface was very small (Fig. 1e). These observations prove that the *cps4D* gene was mutated and that TIGR4cps4D⁻ produced an impaired CPS.

A mutation in the *cps4D* gene affected CPS expression and, consequently, may change the serotype. Therefore, the serotypes of TIGR4 and TIGR4cps4D⁻ were determined using a rapid latex agglutination test, as described in "Materials and methods." According to the protocol, agglutination of latex pool sera A and R was observed simultaneously, which indicated that TIGR4 was serotype 4. By contrast, no agglutination was observed for TIGR4cps4D⁻. This result indicates that secretion of CPS was interrupted by the DNA insertion into TIGR4cps4D⁻.

Characterization of biofilm formation

Using an in vitro batch biofilm assay performed in 96-well microtiter plates, both TIGR4 and mutant TIGR4cps4D⁻ were proven capable of biofilm formation (Fig. 2). There were no significant differences in planktonic growth (OD₄₉₀) between strains on day 1, and even TIGR4 seemed to grow better than TIGR4cps4D⁻ on day 2. However, there were differences in the optical densities of the

biofilms. The mean OD₅₉₅ of TIGR4cps4D⁻ was 1.77 on day 1 and 1.74 on day 2, whereas that of TIGR4 was 0.76 and 0.33, respectively. These results indicate TIGR4cps4D⁻ was more capable of forming a biofilm in vitro than its parental strain.

Next, biofilms were grown in a continuous-flow cell system for 24 or 48 h under once-through flow conditions. Biofilm architectures were visualized at 400× magnification after staining to show the viable cells in green and dead cells in red fluorescence. Flow-cell experiments were performed in triplicate, as described in "Materials and methods." The CLSM images depicted in Fig. 3 show horizontal three-dimensional (3-D) reconstructions scanned in the *x-y* and *x-z* planes. The results are typical for biofilms after 24 h of culture. Each image shows a mature biofilm structure composed of a large cluster of cells. The CPS-impaired TIGR4cps4D⁻ formed a biofilm with a depth of ~12.22 µm (Fig. 3b), which was a much higher density and thickness than the biofilm formed by TIGR4 with wild-type CPS (~6.29 µm) (Fig. 3a). Data observed after 48 h of culture showed congruent results (data not shown).

Despite its destructive nature, scanning electron microscope (SEM) observations provided useful information on the different cellular morphologies present in the biofilms (Fig. 3c, d). The definition of biofilm was the recognition of slime and a multilayer formation of bacteria. As in biofilms formed under static conditions, the TIGR4 strain was seen to compose a dense aggregate of individual bacteria (Fig. 3c), whereas the TIGR4cps4D⁻ strain was recognized to contribute a 3-D conformation structure similar to biofilms observed at 24 h. The pellicle was formed by the biofilm matrix at the top of the biofilm structure of each strain, and fibrils extending between bacteria were also observed from both strains at 48 h. The TIGR4cps4D⁻ strain seemed to form a denser network of cells, and the biofilms occupying the coverslip were larger and thicker (Fig. 3d).

Real-time PCR analysis

Total bacterial RNA extracted from TIGR4 and the mutant TIGR4cps4D⁻ grown under planktonic conditions and biofilms were used to investigate the in vitro expression levels of the seven genes (*pavA*, *lytA*, *IgA1*, *piaA*, *psaA*, *ply*, and *spxB*). Compared to TIGR4, of the seven genes analyzed, four genes (*pavA*, *piaA*, *ply*, and *spxB*) showed increased expression of 0.9×10^1 -, 1.4×10^1 -, 2.9×10^1 -, and 0.7×10^1 -fold change in TIGR4cps4D⁻ under planktonic conditions, respectively, whereas the expressions of *lytA*, *IgA1*, and *psaA* were decreased 1.9×10^{-5} -, 2.4×10^{-5} -, and 3.2×10^{-3} fold, respectively (Fig. 4a). Furthermore, under biofilm conditions, *pavA*, *piaA*, *psaA*, *ply*, and *spxB* of TIGR4cps4D⁻ showed increased expression that was