

Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. The defensive role of a novel interferon-  $\gamma$  -producing subpopulation of immature myeloid cells in severe invasive group A Streptococcus infections. 99th Annual

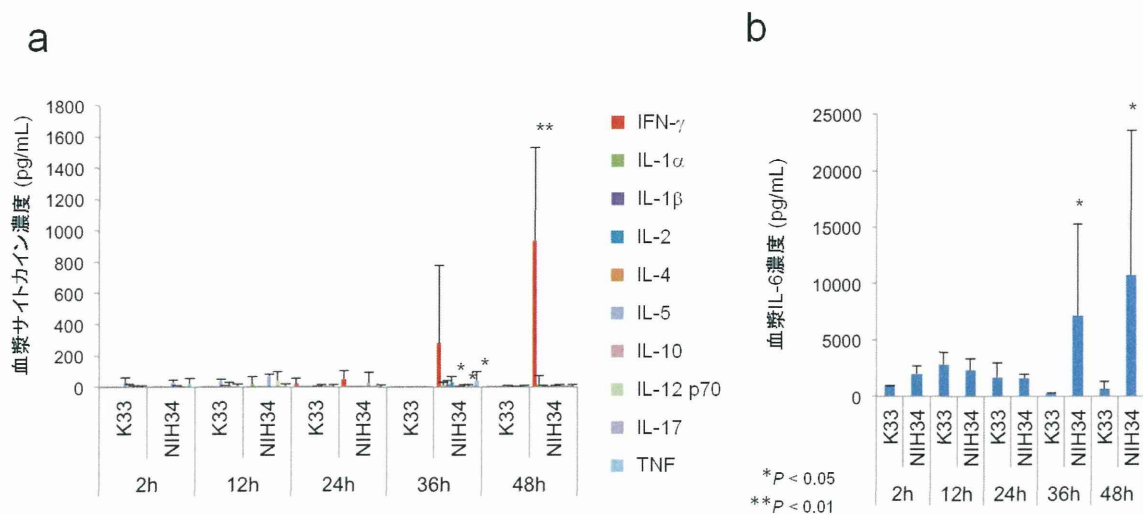
meeting The American Society of Immunologists (Boston). 2012.5.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表-1 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者における血清サイトカイン産生

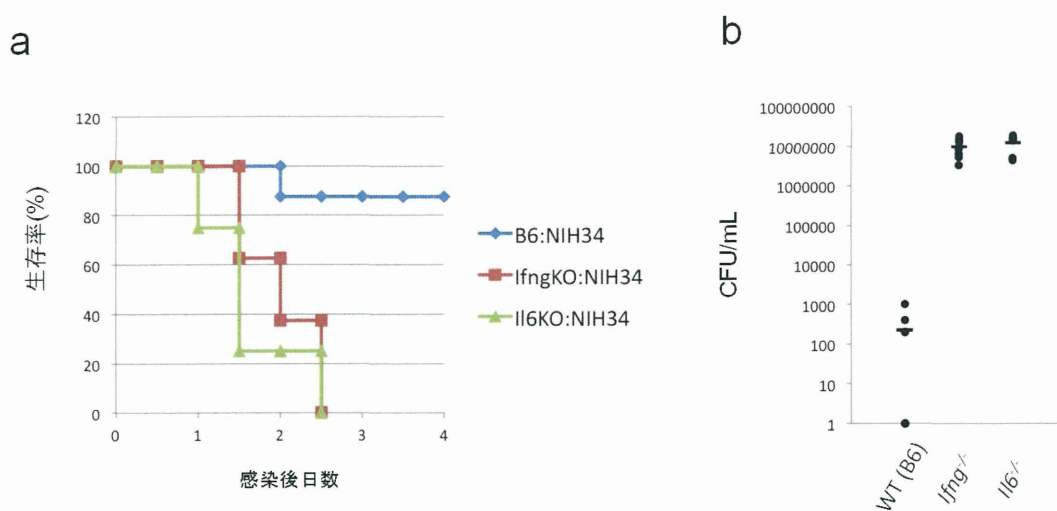
	急性期: n=10 (pg/mL)	慢性期／回復期: n=4 (pg/mL)
IL-6	15915 ± 32357 (1017-106953)**	463 ± 751 (21-1587)
IFN- $\gamma$	5532 ± 12616 (0-40740)*	4 ± 8 (0-16)
IL-8	2510 ± 1655 (165-5400)*	389 ± 579 (24-1253)
IL-10	2381 ± 4069 (2-13077)**	11 ± 22 (0-44)
IL-1 $\beta$	1855 ± 4559 (0-14793)*	Not detected
IL-17A	790 ± 841 (0-2167)*	30 ± 32 (0-63)
IL-2	300 ± 284 (0-671)	21 ± 43 (0-86)
IL-4	114 ± 186 (0-433)	49 ± 97 (0-195)
TNF	56 ± 85 (0-291)*	4 ± 6 (0-13)
IL-5	33 ± 47 (0-122)	21 ± 42 (0-83)
IL-12 p70	11 ± 28 (0-87)	Not detected
LT	Not detected	Not detected

means ± SD (range); \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



非劇症型感染分離株K33および劇症型感染分離株NIH34感染C3H/HeNマウスの血漿中  
a. 各種サイトカイン産生 b. IL-6濃度

図-1 劇症型溶血性レンサ球菌感染症マウスモデルにおける  
血液中サイトカイン産生の経時的変化



IFN- $\gamma$ またはIL-6欠損マウスの劇症型感染におけるa.マウスの生存曲線およびb.血液中菌数  
図-2 IL-6 欠損マウスにおける劇症型溶血性レンサ球菌感染症に対する感染感受性

## 分担研究報告書

### 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の細菌学的解析および重症化に係わる病原因子の解析

研究分担者 池辺 忠義 国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官

研究分担者 阿戸 学 国立感染症研究所免疫部 第二室長

研究協力者 松村 隆之 国立感染症研究所免疫部 第二室研究員

#### 研究要旨

劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株において、*csrR/csrS* 遺伝子以外に、*rgg* 遺伝子のような毒素遺伝子の発現を負に制御する制御因子に変異が起きており、この変異は、劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株の約 45%で見られた。一方、咽頭炎などの非侵襲性感染臨床分離株では、1.7%しかこれら遺伝子に変異が見られなかった。劇症型感染症患者分離株のうち、ムコイド型のコロニーを形成するものがある。多くは、*csrS/csrR* 遺伝子に変異が見られる。しかしながら、一部の株において、*csrS/csrR* 遺伝子に変異がないが、ムコイド型のコロニーを形成するものが存在する。このうち、昨年度報告した転写制御因子である *rocA* 遺伝子以外に新たに *spy0218* 遺伝子に変異があるものを見いだした。この変異株は、好中球の遊走能を阻害し、また、好中球殺傷能を増大することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の高いことが知られている。その主な原因菌は、A群レンサ球菌である *Streptococcus pyogenes* であり、小児に咽頭炎などを引き起こすありふれた病原体である。最近の我々の研究 (Ikebe et al., 2010) で、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、病原因子の発現を抑制している制御因子 (*CsrS/CsrR*, *Rgg*) をコードする遺伝子に変異が見られ、この変異により、好中球の機能障害を引き起こし、劇症型溶血性レンサ球菌感染症のような重篤な症状を引き起こすことを見いだした。しかしながら、我々は、これらの変異がなくても、好中球に障害を与える劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株が存在する

ことを見いだした。その臨床分離株は、ムコイドといわれる粘液状のコロニーを形成していた。本研究では、ムコイドとなった株の原因遺伝子を解明し、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株にどのくらいの頻度この原因遺伝子に変異があるか調べることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. 生物材料と培養方法

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株は、国立感染症研究所と地方衛生研究所からなる衛生微生物技術協議会レファレンスセンターシステムに集められた164株を用いた。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の診断基準は、Working Group on Severe Streptococcal Infections (1993) Defining the group A

streptococcal toxic shock syndrome. JAMA 269: 390–391.に従った。A群レンサ球菌の生育には、固形培地としてコロンビア5%羊血液寒天培地 (Becton Dickinson), 液体培地としてTodd Hewitt Broth (Becton Dickinson) を用いた。スペクチノマイシンは、Sigmaより購入し、50 µg/mLの濃度で使用した。

## 2. ゲノムDNAの調製

血液寒天培地に塗末した菌株をTE (pH8.0) に懸たく後、mutanolysin (Sigma) を添加し、37°Cで1時間処理した後、DNA精製キットを用いて精製した。

## 3. 塩基配列の決定

Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzerを用いて、塩基配列を決定した。

## 4. *emm*遺伝子型別

CDCのホームページの方法に従い、primer 1 (TATT(C/G)GCTTAGAAAATTAA), primer 2 (GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT) を用いて、PCRにより増幅する。PCR産物をHigh Pure PCR Product purification kit (Roche) で精製し、*emm* seq2 (TATTCGCTTAGAAAATTAAAAA CAGG) プライマーを用いて塩基配列を決定した。決定した塩基配列をBlast-*emm*検索サイト (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>) に入力し、*emm*遺伝子型を決定した。

## 5. 好中球遊走試験

*S. pyogenes*  $3 \times 10^6$  cfuを、好中球遊走活性をもつケモカインIL-8 と37°Cで60分インキュベートした後、トランスウェル 3415 (Corning社) の下室に、また、好中球  $3 \times 10^5$  を上室に入れ、さらに37°Cで60分インキュベートして、下室に遊走した好中球の割合をフローサイトメトリー (Becton Dickinson社) で解析した。好中球の生死はpropidium iodineの細胞内取り込みによって判定した。

## 6. *spy0218*遺伝子の塩基配列の決定

*spy0218*遺伝子を含む領域をPCRにより増幅し、塩基配列を決定した。アミノ酸配列の変換

は、GENETYX Ver. 11遺伝情報処理ソフトウェア (ゼネティックス) を用いた。

## (倫理面への配慮)

本研究で行われた遺伝子組換え実験は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいた国立感染症研究所組換えDNA実験実施規則に準拠し、国立感染症研究所組換えDNA実験安全委員会の承認のもと、執り行われた。

## C. 研究結果

### 1. 発現調節因子をコードする遺伝子の比較

昨年度の研究で、ムコイド株の1株において*rocA*遺伝子に変異があることが判明した。しかしながら、その他の2株は、破壊することによりムコイドを示す既知の遺伝子に変異が見られなかった。昨年度の研究より、好中球の遊走能と好中球への殺傷能の増加に起因していることを考えると、個々の毒素遺伝子の変化よりも発現制御因子の変異が起きている可能性が高い。そこで、発現調節因子をコードする136遺伝子の塩基配列を決定し、インタクトの塩基配列と比較した。1株は4つの遺伝子に、もう1つの株は2つの遺伝子に変異が見られた。

### 2. 変異遺伝子におけるコロニー形態と好中球の機能障害の影響

変異の見られた遺伝子について、インタクトの遺伝子をクローニングしたプラスミドを作製し、ムコイド株に導入した。導入後、血液寒天培地に接種し、コロニーの形態を観察した。その結果、1つの株において、*spy0218* 遺伝子を導入した株でムコイドを形成しなかった。もう1つの株は、変異のあったどの遺伝子を導入してもムコイドコロニーのままであった。次に、*spy0218*遺伝子が好中球の機能障害の責任遺伝子であるか調べた。*spy0218*変異を持った劇症型溶血性レンサ球

菌感染症患者分離株にインタクトの*spy0218*遺伝子を導入した結果、好中球の機能障害が減少した(図-1)。このことから、*spy0218*遺伝子の変異が原因であることが証明された。

### 3. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株における*spy0218*遺伝子の変異頻度

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株164株の*spy0218*遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、本研究で使用した1株でこの変異が見られたが、それ以外の株で変異は見られなかった。非侵襲性感染患者分離株では、この遺伝子に変異は見られなかった。

## D. 考 察

本研究において、*spy0218*遺伝子の変異でムコイドコロニーを形成することを見いだした。この遺伝子は、glucokinaseと相同性がある。glucokinaseは、グルコースをグルコース6リン酸にリン酸化する酵素であり、糖代謝と関係がある。Spy0218は転写因子であると考えられていることから、代謝系と莢膜多糖や好中球の機能障害に関与する遺伝子発現の共役に重要な役割を果たしていると考えられる。

## E. 結 論

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、*spy0218*遺伝子に変異がある株が存在することが明らかとなった。この遺伝子の変異株は、ムコイドコロニーを形成し、好中球の機能障害を引き起こすことが明らかとなった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) McMillan DJ, Drèze P, Vu T, Bessen DE, Guglielmini J, Steer AC, Carapetis JR, Melderer LV, Sriprakash KS, Smeesters PR, The M Protein Study Group. Updated model of group A *Streptococcus* M proteins based on a comprehensive worldwide study. Clin Microbiol Infect. 2013; in press.

### 2. 学会発表

- 1) 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の細菌学的解析. 第21回Lancefieldレンサ球菌研究会および第44回レンサ球菌感染症研究会合同学会(大阪). 2012.6.
- 2) 池辺忠義, 奥野ルミ, 緒方喜久代, 嶋智子, 大屋日登美, 渡邊治雄, 大西真. 2006-2010年に分離された劇症型溶血性レンサ球菌感染症分離株の遺伝子型と薬剤感受性. 第86回日本感染症学会総会(長崎). 2012.4.
- 3) 千葉一樹, 渡邊奈々子, 菅野奈美, 遠藤嘉子, 小黒祐子, 佐藤弘子, 池辺忠義. 溶血性レンサ球菌レファレンスセンターの活動について. 第44回福島医学検査学会(福島). 2012.5.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

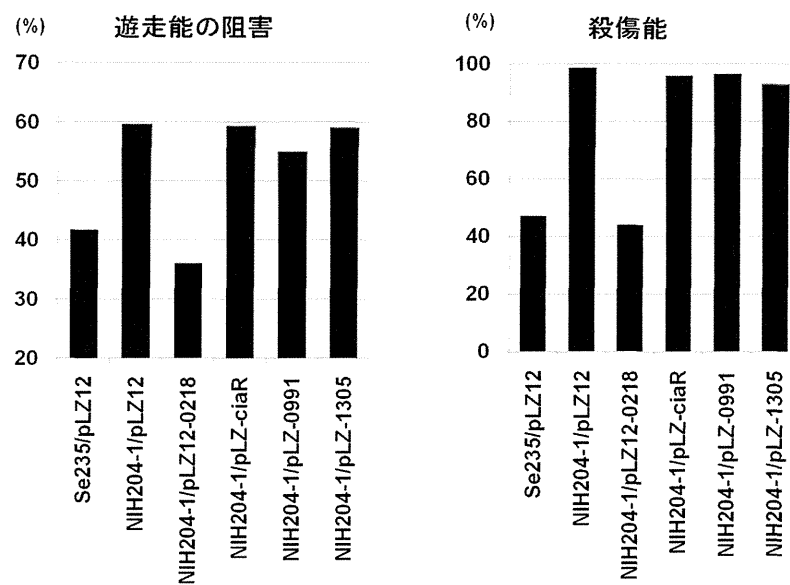


図-1 spy0218 変異による好中球の機能障害

## 分担研究報告書

### 新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と 診断・治療に関する研究

研究分担者 秋山 徹

独立行政法人・国立国際医療研究センター・研究所感染症制御研究部 感染免疫遺伝研究室長

#### 研究要旨

新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と、診断・治療に関する研究を行うため、起因菌である *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) の感染症のマウスモデルを用いた分子レベルでの研究を行う。同菌感染症の疫学調査結果から、発症者には悪性新生物や糖尿病などの基礎疾患が高頻度に存在することが明らかとなっている。本研究では、これまでに、1)糖尿病マウスモデルの感染実験で SDSE 感受性が増加していること、2)その際の宿主側因子網羅発現解析で、SDSE 特異的な炎症関連遺伝子発現が高進していること、3)SDSE 感染糖尿病マウス血清中には G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-1 $\alpha$ , IL-6, CXCL10, CXCL1, MCP-1, RANTES, MDC および TIMP-1 が大量放出されていること、4)とくに産生量の高い IL-6 の作用を抑制するため、その受容体に対する抗体を調製し、SDSE 感染糖尿病マウスモデルにおいて、SDSE 感染前に同抗体を事前投与したところ、SDSE のマウス病原性が著明に抑制されることを明らかにしている。本年度は抗 IL-6 受容体抗体の作用機構を明らかにするため、同抗体投与時の SDSE 誘導サイトカイン産生量を抗体非投与時と比較した。その結果、抗体投与によりサイトカインの大量産生、すなわちサイトカインストームの発生が抑制されていることが明らかとなった。これらの結果は、糖尿病時の SDSE 感染時の劇症化の宿主側における分子基盤を明らかにし、治療法確立への方策を提供するものと考えられる。

#### A. 研究目的

劇症型レンサ球菌感染症 (STSS) は致死率が 50%にも及ぶ感染症であり、本研究班が実施した調査では A 群レンサ球菌 (GAS) 以外に G 群レンサ球菌および C 群レンサ球菌、とくに *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) による症例が増加している。SDSE の劇症型感染症は GAS 劇症型感染症とは異なり、高齢者および糖尿病などの基礎疾患保有患者で著明に高頻度であり、今

後の日本社会状況を考える場合、その対策は重要である。しかしながら GAS の場合と異なり SDSE の研究は進んでいない。筆者等はすでに GAS をマウスに腹腔投与するモデルが、GAS による STSS 症例の疫学データと一致するという結果を報告している。本研究では昨年度までに STSS 症例および動物由来の SDSE 分離株 16 株の病原性をマウスモデルで比較し、SDSE 研究のための菌株選定を行い、さらにストレプトゾシン誘発糖尿病

マウスおよび 2 型糖尿病自然発症マウスでは、非糖尿病マウスと比較して SDSE 感染への感受性が有意に増加していることを明らかにした。また全ゲノム情報が利用可能でなかった SDSE GGS\_124 株の全ゲノム配列を世界に先駆けて明らかにした。さらに、日本人に頻発する 2 型糖尿病のマウスモデルを用いて、選定された SDSE 株を感染させた場合のマウス遺伝子の発現変化の網羅解析を実施することで、宿主側の SDSE 感染劇症化に影響する因子の探索を試み、糖尿病マウスに特異的で、かつ SDSE 感染に特異的な炎症反応が発生することを明らかにした。同現象は血清中サイトカインの網羅的解析でも確認でき、糖尿病マウスで SDSE 感染時に産生が高進しているサイトカインのうちとくに産生量が高かったもののひとつは IL-6 であった。IL-6 は代表的な炎症性サイトカインであり、また関節リウマチなどの疾患に関与している。そこで、IL-6 の作用を抑制するため、抗 IL-6 受容体抗体を投与したところ、SDSE 感染糖尿病マウスモデルにおいて、SDSE による致死的効果が有意に抑制されることが明らかとなった。そこで本年度は同抗体の作用機構を明らかにするため、同抗体投与時のマウスにおける SDSE 誘導サイトカイン産生量を抗体非投与時と比較した。

## B. 研究方法

### 1. 共試菌株

SDSE 菌株は東京女子医科大学微生物学免疫学教室および北里大学北里生命科学研究所病原微生物分子疫学研究室より分与を受けた。増菌は、凍結保存されているレンサ球菌をブレイン・ハートインフュージョン培地に植菌し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37°C、5%で一晩培養することで行った。マウス感染実験時の対照菌株として *Staphylococcus aureus* N315 株と *Streptococcus pyogenes* 476 株を使用した。

### 2. SDSE のマウス感染実験

菌を一晩培養後、3100rpm、10min 遠心、培地を除き 1×PBS(－) 5mL に懸濁した後、ボルテックス処理を 30 秒間行った。ボルテックス後の菌液を 1×PBS(－) で 0.5mL 投与時に LD50 の 5 倍となるように希釈し、マウスに腹腔内投与した。2 型糖尿病モデルとして糖尿病自然発症型マウスである db/db マウスを使用し、対照として糖尿病非発症型である db/m+マウスを使用した。

### 3. 抗 IL-6 受容体抗体の調製

マウス cDNA より抗 IL-6 受容体遺伝子を発現ベクター内にクローニングし、大腸菌で His-Tag 蛋白質として発現させて、タグを利用したアフィニティー精製により精製した。得られた精製蛋白質をウサギに免疫し、得られた血清から抗体をプロテイン G アフィニティー精製により精製した。

### 4. SDSE 感染糖尿病マウスでの抗 IL-6 受容体抗体の効果の評価

精製抗 IL-6 受容体抗体または対照抗体を直前に投与したマウスに、SDSE を投与し、4 時間後に安楽死後、採取した心臓血から調製した血清をサイトカイン測定用検体とした。サイトカイン測定は Millplex マウスサイトカインキットにより実施した。

### (倫理面への配慮)

動物実験については独立行政法人・国立国際医療研究センター研究所動物実験委員会にて計画の審査・承認を受けて実施した。本計画で使用した菌株は感染症法の対象となる病原体ではないが、所内バイオセーフティ委員会による使用の承認を受けて実施した。

## C. 研究結果

昨年度までの研究結果から、2 型糖尿病マウスである db/db マウスとその対照非糖尿病マウスである db/m+マウスとの比較では、SDSE を投与した糖尿病マウス血清中には、



非糖尿病マウスまたは黄色ブドウ球菌投与糖尿病マウスと比較して、炎症性サイトカインのうち、G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-13, IL-1 $\alpha$ , IL-6, CXCL10, CXCL1, MCP-1, RANTES, MDC および TIMP-1 が高レベルであることが明らかとなっている。また、組換え蛋白質の免疫で調製した抗 IL-6 受容体抗体を投与したマウスでは、SDSE の病原性が低下した。この効果は SDSE 感受性が上昇している糖尿病マウスに加えて、野生型マウスでも認められた。本年度の解析では、抗 IL-6 受容体抗体投与による SDSE のマウス病原性抑制が、大量に産生されている炎症性サイトカインの産生抑制によるものであることを示唆する結果を得た。この結果は、SDSE の病原性の基盤は炎症性サイトカインの過剰産生(サイトカインストーム)によるものであり、抗 IL-6 受容体抗体により、サイトカインストームを抑制可能であることを示す。

## D. 考 察

これまでに実施した 2 型糖尿病マウスモデルへの SDSE 投与時の宿主遺伝子発現の網羅解析の結果、および 2 型糖尿病マウスモデルを用いた SDSE 感染時の宿主側因子の網羅的液性因子産生測定に黄色ブドウ球菌の投与実験の結果から、SDSE 感染時に特異的に発生する宿主側応答の様相が明らかとなった。すなわち糖尿病マウスでは、非糖尿病マウスと比較して、SDSE 投与により非常に強い炎症反応が発生し、正常な免疫応答がほとんど起きないことが示された。さらに、SDSE 感染糖尿病マウスでは炎症性サイトカインとして知られる TNF $\alpha$  がほとんど産生されず、IL-6 が大量に産生されるという、特徴的な炎症性サイトカイン産生パターンを示すことを明らかにしている。また、抗 IL-6 受容体抗体を用いた実験から、大量に産生されている IL-6 がマウスにおける SDSE の病原性に大きな役割を果たしてい

ることが強く示唆された。抗 IL-6 受容体抗体の作用機序は SDSE により誘発されるサイトカインストームの抑制によるものであると考えられた。一方、GAS においては、IL-6 の産生量は相対的に少なく、そのマウス病原性への寄与も限定的であり、SDSE と GAS は共有する病原因子が多数存在するにもかかわらず、病原性機構の根幹には明白な違いがあることが示唆された。抗ヒト IL-6R 抗体であるトシリズマブとして関節リウマチなどへの適用がある承認済みの薬剤であることを考えると、SDSE による劇症型感染症にはトシリズマブの奏功する可能性があると考えられる。そのためには SDSE 感染症と GAS 感染症の鑑別診断法の開発が必要と思われる。

今回、IL-6 が SDSE の病原性に重要な役割を果たすことが示唆されたことから、現在パスウェイ解析等により、増悪機構の分子基盤を検討中である。

## E. 結 論

SDSE の糖尿病マウスへの投与モデルを利用した宿主側液性因子の産生の網羅的解析で、SDSE による劇症型感染症の重症化の機構に、糖尿病背景での炎症反応、とくに IL-6 の産生の増加が SDSE 感染症の増悪に関与することが強く示唆された。抗 IL-6 受容体抗体は SDSE による劇症型感染症の治療法として有用と考えられる。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Okumura K, Shimomura Y, Murayama SY, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, **Miyoshi-Akiyama T**. Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens. BMC Genomics. 2012; 13: 404. doi: 10.1186/1471-2164-13-404.
- 2) Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T,

Takamatsu D, Osaki M, Miyoshi-Akiyama T. Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a strain that shows an unusual growth profile and is representative of an endemic cluster in Japan. J Bacteriol. 2012; 194(11): 3014. doi: 10.1128/JB.00437-12.

## 2. 学会発表

1)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## Web サイト更新報告書

代表研究者 生方公子 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 特任教授

本研究事業では、啓発活動を目的として初年度(H22 年(2010 年)9 月末日)に Web サイトを構築し公開した。

H23 年 11 月(2011 年)に解析データの大幅な更新を行なったが、2012 年においては、「ワクチン接種緊急促進事業」に含まれる肺炎球菌の PCV7 の効果により、侵襲性肺炎球菌感染症由来の肺炎球菌が著しく変動し莢膜型が変化した。

ちなみに、2010 年の PCV7 カバー率 71%から 2011 年には 59%, そして 2012 年には 20%前後となっていることを速報として Web サイト上へ公開した。

その他に、溶血性レンサ球菌の急速なマクロライド系薬耐性化状況や重症例における患者背景因子ならびに検査所見について死亡と関連するリスクファクターについて多変量解析したデータを公開した。

# 重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と 病因解析、その診断・治療に関する研究

HOME > 速報(平成24年度・疫学解析) : 収集菌株

速報(平成24年度・疫学解析)

## I. 収集菌株

### II. 肺炎球菌

### III. β溶血性レンサ球菌

#### 1. 収集菌株

#### 2. A群溶血性レンサ球菌

(GAS)

#### 3. C,G群溶血性レンサ球菌

(SDSE)

#### 4. B群溶血性レンサ球菌

(GBS)

総論

肺炎球菌

β溶血性レンサ球菌

参加施設・分担者・参考文献

附：マイコプラズマ

このホームページに関するお問合せ

〒108-8641  
東京都港区白金5-9-1  
北里大学北里生命科学研究所  
病原微生物分子疫学研究室  
FAX: 03-5791-6386  
e-mail: [shinko13@iisci.kitasato-u.ac.jp](mailto:shinko13@iisci.kitasato-u.ac.jp)  
[u.ac.jp](http://u.ac.jp)

## 速報(平成24年度・疫学解析)

### I. 収集菌株

2010年4月から2012年10月までの約2年半に、343医療機関から送付を受けた侵襲性感染症由来株は合計2,500株でした(図-1)。すべてが平素無菌的な検査材料(髄液、血液、胸水、関節液、閉鎖性胆汁、深部組織など)から分離された菌株です。

内訳は、肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)が

1,073株(42.9%)、A群溶血性レンサ球菌(GAS; *Streptococcus pyogenes*)が287株

(11.5%)、B群溶血性レンサ球菌(GBS; *Streptococcus agalactiae*)が467株(18.7%)、C,

G群溶血性レンサ球菌(SDSE; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*)が608株

(24.3%)、そしてその他のレンサ球菌といった割合でした。

菌種別の割合を2006年度の収集株(n=987)と比較しますと、それぞれの菌種の割合はほぼ同じで変動は認められませんでした。後述いたしますが、レンサ球菌のなかでもGASに比べてGBSとSDSEによる症例数が非常に多いのは、高齢者の発症例がさらに増加していることによるものです。

菌株をお送りいただいた医療機関の内訳は、地域の基幹病院、すなわち市立・市民病院、県立病院、各地の赤十字病院、その他財団系の病院が圧倒的に多く、次いで私立大学医学部附属病院、なかでも第三次救急医療機関となっている検査室を有する施設でした。つまり、これらの細菌による侵襲性感染症の多くの例は、地域医療を担う基幹病院を受診していることとなります。

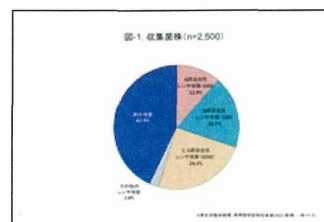


図-1

ページの先頭に戻る

## 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
高橋 孝	溶血性レンサ球菌感染症(含む TSLS)	感染症事典編集委員会	感染症事典	オーム社	東京	2012	204-209
Matsumura T, Kobayashi K, <u>Ato M.</u>	Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and their related cell subpopulations.		The Research and Biology of Cancer	iConcept Press	Australia	2012	ISBN: 978-14775 549-9

### 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
<u>Chiba N.</u> , Morozumi M, Shouji M, Wajima T, Iwata S, Sunakawa K, <u>Ubukata K.</u> , the Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group	Rapid Decrease of 7-Valent Conjugate Vaccine Coverage for Invasive Pneumococcal Diseases in Pediatric Patients in Japan.	Microb Drug Resist	Epub ahead of print		2013
Morozumi M, Chiba N, Okada T, Sakata H, Matsubara K, Iwata S, <u>Ubukata K</u>	Antibiotic susceptibility in relation to genotype of <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , and <i>Mycoplasma pneumoniae</i> responsible for community- acquired pneumonia in children.	J Infect Chemother	DOI 10.1007/s10156-012-0500-x		2012
<u>Ubukata K.</u> , Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, The Working Group of Nationwide Surveillance for Bacterial Meningitis	Longitudinal surveillance of <i>Haemophilus influenzae</i> isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011.	J Infect Chemother	DOI 10.1007/s10156-012-0448-x		2012
Okada T, Morozumi M, Sakata H, Takayanagi R, Ishiwada N, Sato Y, Oishi T, Tajima T, Haruta T, Matsubara K, Chiba N, Iwata S, <u>Ubukata K</u>	A practical approach estimating etiologic agents using real-time PCR in pediatric inpatients with community-acquired pneumonia.	J Infect Chemother	18	832-840	2012
Chiba N, Morozumi M, <u>Ubukata K</u>	Application of the Real-Time PCR Method for Genotypic Identification of $\beta$ -Lactam Resistance in Isolates from Invasive Pneumococcal Diseases.	Microbial Drug Resist.	18	149-156	2012
千葉菜穂子, 諸角美由紀, <u>生方 公子</u>	$\beta$ -ラクタム系薬耐性肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する経口抗菌薬作用後の形態変化.	The Japanese Journal of Antibiotics	65	323-334	2012
千葉 菜穂子, <u>生方 公子</u>	肺炎球菌とインフルエンザ菌.	臨床と微生物	39	515-521	2012
輪島丈明, 砂押克彦, <u>生方公子</u>	$\beta$ 溶血性レンサ球菌	臨床と微生物	39	523-529	2012
<u>Sakata H</u>	Evaluation of intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of early-onset group B streptococcal infection.	J Infect Chemother	18	853-857	2012
<u>坂田 宏</u>	侵襲性肺炎球菌感染症の小児から分離された <i>Streptococcus pneumoniae</i> の抗菌薬感受性.	感染症誌	87	1-5	2013
Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, Akeda Y, Ihara T, Nahm MH, <u>Oishi K.</u> , the Japanese IPD Study Group.	Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease.	Vaccine	31	845-849	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kerdsin A, Dejsirilert S, Akeda Y, Sekizaki T, Hamada S, Gottschalk M and <b>Oishi K</b>	Fifteen <i>Streptococcus suis</i> serotypes identified by multiplex PCR.	<i>Journal of Medical Microbiology</i>	61	1669-1672	2012
Miyasaka T, Tetsuji Aoyagi T, Uchiyama B, <b>Oishi K</b> , Nakayama T, Kinjo Y, Miyazaki Y, Kunishima H, Hirakata, 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	3304-3310	2012
Mori S, Ueki Y, Akeda Y, Hirakata N, ribe M, Shiohira Y, Hidaka T and <b>Oishi K</b> .	Pneumococcal polysaccharide vaccination in rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab therapy.	<i>Annals of the Rheumatic Diseases</i>	In press		2013
Takeuchi D, Kerdsin A, Pienpringam A, Loetthong P, <b>Oishi K</b> , et al.	Population-Based Study of <i>Streptococcus suis</i> Infection in Humans in Phayao Province in Northern Thailand	<i>Streptococcus suis</i> in Phayao province	7(2)	1-7	2012
一二三亭, 井上潤一, <b>藤島清太郎</b>	ER・ICU で問題となる感染症 壊死性筋膜炎	救急・集中治療	25	33-38	2013
<b>藤島清太郎</b>	救急・集中治療領域における感染症と予防対策：序 重症・劇症型感染症診療と感染制御対策	化学療法の領域	28	218-219	2012
多村知剛, <b>藤島清太郎</b>	救急・集中治療領域における感染症と予防対策：I 救急・集中治療と重症・劇症型感染症：1. 重症・劇症型感染症の早期診断と重症度評価	化学療法の領域	28	221-228	2012
林田 敬, <b>藤島清太郎</b>	Sepsis の急性期治療 適切な抗菌薬を速やかに投与する.	救急・集中治療	24	1132-1138	2012
<b>藤島清太郎</b>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i> 感染症	化学療法の領域	26	70-78	2010
Hayashida K, <b>Fujishima S</b> , Sasao K, Orita T, Toyoda Y, Kitano M, Hori S	Eary Administration of sivelestat, the neutrophil elastase inhibitor, in adults for acute lung injury following gastric aspiration	Shock	36	223-227	2011
Okumura K, Shimomura Y, Murayama SY, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, <b>Miyoshi-Akiyama T</b> .	Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens.	BMC Genomics.	13	404.	2012
Okumura K, Arai R, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D, Osaki M, <b>Miyoshi-Akiyama T</b> .	Complete genome sequence of <i>Melissococcus plutonius</i> DAT561, a strain that shows an unusual growth profile and is representative of an endemic cluster in Japan.	J Bacteriol.	194	3014	2012
<b>坂田 宏</b>	2001～2010 年までの <i>Streptococcus pneumoniae</i> の $\beta$ -lactam 抗菌薬に対する感受性の変動.	小児感染免疫	23	395-400	2012
Hamaguchi S, Hirose T, Akeda Y, Matsumoto N, Irisawa T, Seki M, Hosotsubo H, Tasaki O, <b>Oishi K</b> , Shimazu T, Tomono K.	Identification of neutrophil extracellular traps in blood of patients with systemic inflammatory response syndrome.	<i>The Journal of International Medical Research</i>	In press		2013
明田幸宏, <b>大石和徳</b> .	肺炎球菌ワクチン	診断と治療	100	455-458	2012
竹内 壇, <b>大石和徳</b>	豚レンサ球菌( <i>Streptococcus suis</i> )による人獣共通感染症	感染症	43	24-28	2013
Takesue Y, Oda S, <b>Fujishima S</b> , et al.	Clinical efficacy and safety of intravenous itraconazole in the management of invasive candidiasis in patients of surgery and critical care	J Infect Chemother	18	515-521	2012
<b>藤島清太郎</b>	急性肺損傷(ALI)/急性呼吸窮(促)迫症候群(ARDS)	Emergency Care	25	658-663	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
小林陽介, <u>藤島清太郎</u>	敗血症の治療戦略 ガイドラインを踏まえた初期治療 Q34.経験的治療薬の選択：敗血症と敗血症性ショックを対象に	救急・集中治療	24	1518-1524	2012
<u>藤島清太郎</u>	Sepsis 診断におけるプロカルシトニンの意義	化学療法領域	27	134-141	2011
Nakato G, Hase K, Suzuki M, Kimura M, <u>Ato M</u> , Hanazato M, Tobiume M, Horiuchi M, Atarashi R, Nishida N, Watarai M, Imaoka K, Ohno H.	Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor.	Journal of Immunology	189(4)	1540-1544	2012
Riyapa D, Buddhisa S, Korbsrisate S, Cuccui J, Wren B, Stevens M, <u>Ato M</u> , Lertmemongkolchai G.	Neutrophil extracellular traps exhibit antibacterial activity against Burkholderia pseudomallei and are influenced by bacterial and host factors.	Infection and Immunity.	80(11)	3921-3929	2012
<u>Takahashi T</u> , et al.	Infectious diseases after the 2011 Great East Japan Earthquake.	J Exp Clin Med	4 (1)	20-23	2012
Takei T, Ubukata K, <u>Takahashi T</u> , et al.	Respiratory distress in human metapneumovirus infection with high inflammatory cytokinemia.	J Exp Clin Med	4 (3)	334-340	2012
Murayama T, <u>Takahashi T</u> , et al.	Anti-cytomegalovirus effects of triclin are dependent on CXCL11.	Microbes Infect	14 (12)	1086-1092	2012
<u>Takahashi T</u> , et al.	Guidelines for nonmedical care providers to manage the first step of emergency triage of elderly evacuees: downloaded via smart phones in Japan.	J Exp Clin Med	4 (5)	296-297	2012
Takei T, Ubukata K, <u>Takahashi T</u> , et al.	Late onset invasive group B streptococcal infection with serotype VIII in a neonate having congenital biliary atresia.	Pediatr Neonatol	54 (1)	(in press)	2013
Takei T, Ubukata K, <u>Takahashi T</u> , et al.	Clinical features of Mycoplasma pneumoniae infections in the 2010 epidemic season: report of two cases with unusual presentations.	Pediatr Neonatol	54 (3)	(in press)	2013
Ogawa M, <u>Takahashi T</u> , et al.	Perirenal and renal abscesses: assessment by multiplanar reformat imaging of computed tomography.	J Exp Clin Med	5 (3)	(in press)	2013

# Rapid Decrease of 7-Valent Conjugate Vaccine Coverage for Invasive Pneumococcal Diseases in Pediatric Patients in Japan

Naoko Chiba,<sup>1</sup> Miyuki Morozumi,<sup>1</sup> Michi Shouji,<sup>2</sup> Takeaki Wajima,<sup>1</sup> Satoshi Iwata,<sup>3</sup> Keisuke Sunakawa,<sup>4</sup> Kimiko Ubukata,<sup>1</sup> and the Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group

In Japan, the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) has been introduced on a voluntary basis since February 2010, and official financial support for children under 5 years started in November 2010. The impact of PCV7 on invasive pneumococcal diseases (IPD) in children is unknown. There are 340 medical institutions that actively participated in our surveillance project throughout Japan. We collected 252 strains from patients with IPD in 2006 (pre-PCV7), 280 strains in 2010 (under 10% immunization achieved), and 128 strains in 2011 (50% to 60% immunization). Serotypes and penicillin-resistance genotypes (g) were compared between these years. Multilocus sequence typing was also carried out on these strains. Due to the official promotion, IPD significantly decreased in 2011 ( $p < 0.001$ ). In particular, meningitis and sepsis caused by vaccine type (VT) strains declined ( $p = 0.033$ ,  $p < 0.001$ ). In less than 2 years, among nonvaccine types (NVT), 15A and 22F increased in 2011 ( $p = 0.015$ ,  $p = 0.015$ ). Coverage by PCV7 decreased from 71.8% in 2006 to 51.6% in 2011. Sequence-type diversities accompanied by evolution to gPRSP occurred in both VT and NVT strains. Reduction of IPD caused by VT strains was accomplished, but a rapid increase of NVT raises concern about a future decrease in the efficacy of PCV7.

## Introduction

*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* is a leading etiologic agent in children with severe invasive infections that contribute importantly to morbidity and mortality.<sup>19</sup> Invasive pneumococcal diseases (IPD) caused by penicillin G (PEN)-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) have emerged and spread rapidly worldwide.<sup>2,17</sup>

In the United States, heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) was introduced in February 2000 and added to the immunization schedule for children in October 2000.<sup>1</sup> Subsequent surveillance studies have demonstrated a decrease in the prevalence of pneumococcal infection caused by vaccine type (VT) serotypes and PRSP.<sup>4,22</sup>

Currently, children in over 100 countries have undergone PCV7 immunization, followed by substantial regional decreases of IPD.<sup>18</sup> However, increases in pneumococcal infections caused by nonvaccine types (NVT), such as PRSP with serotypes 19A and 6A,<sup>12</sup> suggest that NVTs are emerging and are replacing VT serotypes in some

countries.<sup>15,16,21</sup> Other NVT serotypes such as 15A and 35B have been reported to be increasing in the US<sup>13</sup> and elsewhere.<sup>14</sup>

In Japan, PRSP has increased as a causative pathogen among children with respiratory tract infections, acute otitis media, and IPD since the late 1990s.<sup>6,26,27</sup> PCV7 was approved in October 2009 and has been clinically used in infants on a voluntary basis since February 2010, but the vaccination rate was estimated to be under 10% in that year. From November 2010, PCV7 vaccination was encouraged for the children under 5 years old throughout Japan by an official program, the Provisional Special Fund for the Urgent Promotion of Vaccination. As a result, PCV7 immunization was estimated to have reached 50% to 60% in 2011.

In the present study we aimed to clarify the changes in serotypes and genotypes favoring resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in *S. pneumoniae* isolated from pediatric patients with IPD. A possible relationship between the results of multilocus sequence typing (MLST) and serotype or genotype was also evaluated.

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University, Tokyo, Japan.

<sup>2</sup>Laboratory of Bacterial Research, National Cancer Center Hospital, Tokyo, Japan.

<sup>3</sup>Center for Infectious Diseases and Infection Control, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan.

<sup>4</sup>Kitasato University School of Medicine, Tokyo, Japan.



Materials and Methods

Patients and pneumococcal strains

All subjects were pediatric patients under 18 years old with IPD. Isolates from sterile clinical samples such as blood, cerebrospinal fluid, pleural effusion, and joint fluid were examined. Clinical laboratories serving 340 Japanese medical institutions actively participated in this surveillance project after written permission was granted by the laboratory director or hospital director. Surveillance was performed from May 2006 to April 2007 (designated 2006), May 2010 to April 2011 (designated 2010), and May 2011 to April 2012 (designated 2011). The 3 periods, respectively, correspond to the year preceding the introduction of PCV7 (pre-PCV7); the year of voluntary immunization (vol-PCV7; less than 10% immunization achieved); and the year of official promotion (post-PCV7; 50% to 60% immunization).

Clinical isolates were promptly sent to our laboratory, accompanied by a survey form filled out anonymously by the attending physician. The following information was collected from all patients: patient age at onset, sex, specifics of the disease, prognosis, and blood test results, sequel, and outcome. Our survey form was based on the format of the Active Bacterial Core Surveillance case report (ABCs).

Serotypes and antibiotic-resistant genotypes

Serotypes of all isolates were determined by the capsular quellung reaction, using antiserum purchased from the Statens Serum Institute (Copenhagen, Denmark).

Alterations in 3 PBP genes mediating  $\beta$ -lactam resistance in *S. pneumoniae*—*pbp1a* (PBP1A), *pbp2x* (PBP2X), and *pbp2b* (PBP2B)—were identified by real-time PCR methods that we have reported previously.<sup>7</sup> The *lytA* gene encoding the autolysin enzyme specific to *S. pneumoniae* was analyzed similarly. The genes *mef* (A) and *erm* (B), which confer resistance to macrolide (ML) antibiotics, were also identified.<sup>7</sup>

Genotype (g) based on molecular analysis is represented here as penicillin (PEN)-susceptible *S. pneumoniae* (gPSSP) possessing 3 normal *pbp* genes; PEN-intermediate *S. pneumoniae* (gPISP), further classified as gPISP (*pbp2x*), gPISP (*pbp1a*+*pbp2x*), or gPISP (*pbp2x*+*pbp2b*); or PEN-resistant *S. pneumoniae* (gPRSP) possessing all 3 abnormal *pbp* genes. The relationship between susceptibility to parenteral agents among phenotype *S. pneumoniae* and resistance genotype was described previously.<sup>7</sup>

Results of serotype and resistance genotype analysis for each strain were immediately relayed to the referring pediatrician and local laboratory technicians.

Multilocus sequence typing

MLST was performed on a total of 408 strains obtained in 2010 and 2011 according to the previously described methods,<sup>11</sup> with slight modifications. Primers posted on the CDC website ([www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/alt-MLST-primers.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/alt-MLST-primers.htm)) were used except for the forward primer for the *ddl* gene.<sup>25</sup> MLST and eBURST analyses were performed according to the MLST website (<http://spneumoniae.mlst.net>).

Statistical analysis

Microsoft Excel 2010 for Statistics (SSRI, Tokyo, Japan) was used for data analyses. Categorical variables were compared using chi-squared tests.

Results

Patient age and capsular serotype

The age distribution of patients with IPD according to the serotype of isolates (VT vs. NVT) and the year when isolated are shown in Table 1.

Specimens were collected throughout Japan in 2006 (*n*=252), 2010 (*n*=280), and 2011 (*n*=128). The years corresponded to pre-PCV7, vol-PCV7 (PCV7 immunization rate below 10%), and post-PCV7 (50% to 60% PCV7 immunization rate).

The total number of cases in 2011 was significantly lower compared with that in 2006 or 2010, especially in patients under 2 years old (*p*<0.001). Overall, coverage by PCV7 in the 3 periods decreased from 71.8% in 2006 to 51.6% in 2011. Inversely to the proportion of VT, the proportion of NVT serotypes increased from 28.2% in 2006 to 48.4% in 2011(*p*<0.001).

Year-to-year changes in VT and NVT prevalence by disease

Table 2 compares the VT and NVT serotype prevalence among the isolates from various types of IPD: meningitis, sepsis and bacteremia, pneumonia, etc., during each of the 3 years studied. Pneumonia was confined to cases in which *S. pneumoniae* was isolated from blood culture. VT strains decreased significantly in meningitis and sepsis cases through the three periods (*p*=0.033, *p*<0.001).

Year-to-year changes in serotype and resistance genotype

Year-to-year changes in the serotypes and resistance genotypes in children under 5 years old subjected to immunization by the official promotion are shown in Figs. 1 and 2.

TABLE 1. VACCINE-TYPE AND NONVACCINE TYPE FOR 3 YEARS, ACCORDING TO AGE

Age	Serotype	Year			p-Value
		2006 (n=252)	2010 (n=280)	2011 (n=128)	
≤1 year	VT <sup>a</sup>	113	141	40	<0.001
	NVT <sup>b</sup>	38	45	43	
2–4 years	VT	60	54	20	0.347
	NVT	16	22	10	
≥5 years	VT	8	9	6	0.492
	NVT	17	9	9	
Total	VT	181 (71.8) <sup>c</sup>	204 (72.9)	66 (51.6)	<0.001
	NVT	71 (28.2)	76 (27.1)	62 (48.4)	

<sup>a</sup>VT, serotypes (4, 9V, 18C, 6B, 14, 19F, 23F) included in PCV7.  
<sup>b</sup>NVT, serotypes not included in PCV7.  
<sup>c</sup>The number of cases is followed by the percentage in parentheses.  
VT, vaccine type; NVT, nonvaccine types; PCV7, pneumococcal conjugate vaccine.

TABLE 2. YEAR-TO-YEAR CHANGES VACCINE-TYPE AND NONVACCINE TYPE PREVALENCE BY DISEASE

Diseases	Serotype	2006 (n=252)	2010 (n=281)	2011 (n=128)	p-Value
Meningitis	VT <sup>a</sup>	46	40	13	0.033
	NVT <sup>b</sup>	21	18	17	
Sepsis and bacteremia	VT	90	98	33	<0.001
	NVT	37	45	40	
Pneumonia	VT	38	51	12	0.715
	NVT	10	9	3	
Other	VT	7	15	8	0.832
	NVT	3	4	2	
Total	VT	181	204	66	<0.001
	NVT	71	76	62	

<sup>a</sup>VT, serotypes (4, 9V, 18C, 6B, 14, 19F, 23F) included in PCV7.  
<sup>b</sup>NVT, serotypes not included in PCV7.

Resistance genotypes were classified according to the presence or absence of 3 abnormal PBP genes, *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b*, identified by real-time PCR methods.<sup>7</sup> All strains of serotypes 6B, 19F, 14, and 23F were gPRSP, gPISP (*pbp1a+pbp2x*), gPISP (*pbp2x+pbp2b*), or gPISP (*pbp2x*). The number of serotype 14 and 19F decreased in 2011, representing the post-PCV7 period ( $p=0.003$ ,  $p=0.044$ ).

The numbers of NVT 15A and 15C increased significantly in 2011 ( $p<0.001$ ,  $p=0.046$ ). Strains identified as gPRSP, which showed MICs of 0.5 to 4.0 µg/ml for PEN and 1 to 8 µg/ml for cefotaxime, were evident among serotypes 15A, 16F, and 35B.

Changes in the proportion of individual serotypes

Increases and decreases in the proportion of each serotype under 2 years old between 2006 (pre-PCV7) and 2011 (post-PCV7) are shown in Fig. 3. VT serotype 14, which was com-

mon among IPD cases, decreased considerably ( $p=0.007$ ). The serotypes of 6B, 18C, and 23F were little changed. Serotype 19A, which is included in a newer vaccine, PCV13, tended to increase ( $p=0.056$ ). Other PCV13 serotypes showed minimal changes. Proportions of NVT serotypes, especially serotypes 15A and 22F, increased (both  $p=0.015$ ).

Multilocus sequence type

MLST was performed on all VT and NVT strains in 2010 and 2011. As presented in Table 3, the sequence type (ST) and clonal complex (CC) were diversified to number 113 for ST and 35 for CC, respectively. Sixty-six of the STs (61.1%) were registered from Japan.

Considering the associations between ST and serotype in gPRSP, 30 strains of serotype 6B were ST90, including CC156, which was submitted as a Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) clone of Spain<sup>6B-2</sup>, followed by ST2224 in CC2224, ST902 and ST6413 in CC490, and ST5232 (singleton). Most gPRSP in other VT strains were ST343 in serotype 14, which had evolved from Sweden ST554; ST236 in serotype 19F, representing the Taiwan<sup>19F-14</sup> clone; ST1437, which was identified in Japan or ST242 of the Taiwan<sup>23F-15</sup> clone in serotype 23F. Notably, gPRSP strains in serotypes 6A and 19A expanded to 11 STs, including ST3111, which had evolved from the original US strain (Alaska; MIC for PEN, 0.03 µg/ml); ST2756, identified in China; and ST282, which developed from the original Vietnam strain. ST81 ( $n=2$ ) and ST156 ( $n=1$ ), recorded as Spain<sup>23F-1</sup> and Spain<sup>9V-3</sup> clones, respectively, were very few.

Meanwhile, STs of gPRSP in NVT serotypes were mainly seen ST63 in serotype 15A submitted from Sweden<sup>15A-25</sup>, originally showing an MIC of 0.12 µg/ml for PEN; ST8351 of serotype 16F, registered in Japan during study; and ST558 in serotype 35B, registered in the US and showing an MIC of 2.0 µg/ml for PEN.

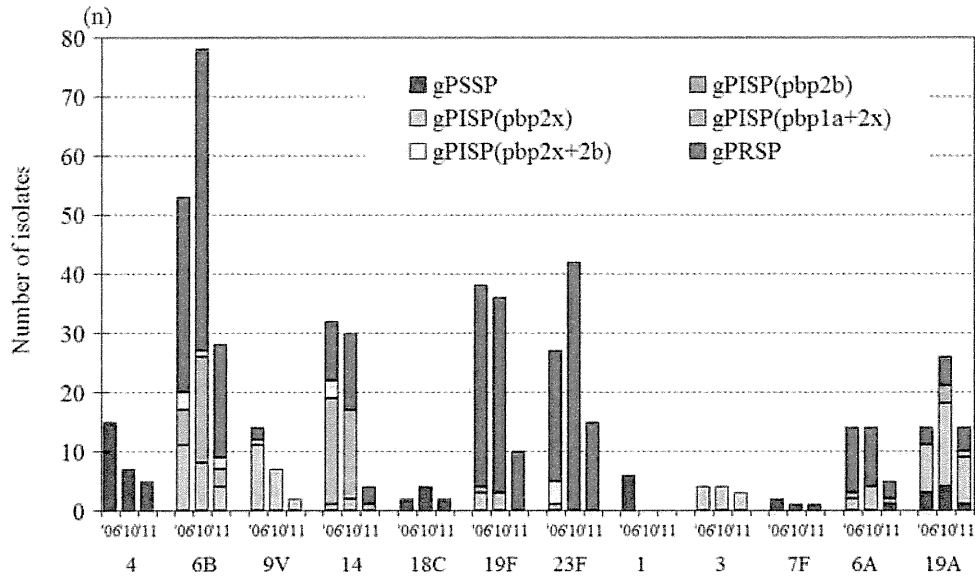


FIG. 1. Changes in the number of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes and those additionally covered by PCV13, and changes in penicillin resistance genotype in the three periods, 2006, 2010, and 2011. This results were limited to isolates from young children under 5 years old. PEN, penicillin; gPSSP, genotypic PEN-susceptible *Streptococcus pneumoniae*; gPISP, genotypic PEN-intermediate *S. pneumoniae*; gPRSP, genotypic PEN-resistant *S. pneumoniae*.

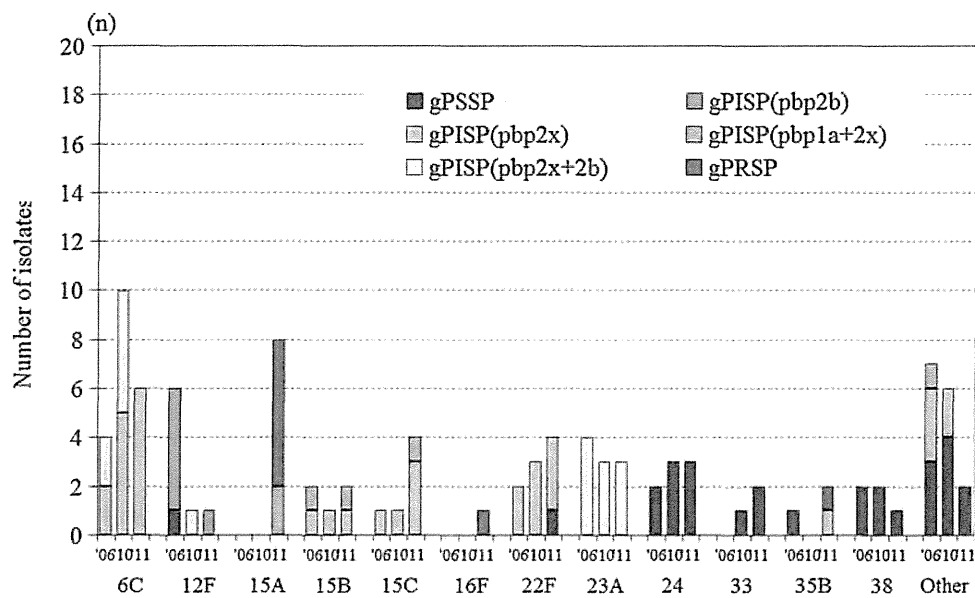


FIG. 2. Changes in the number of nonvaccine serotypes (excluding strains covered by PCV13) and in penicillin-resistant genotypes, in the three periods, 2006, 2010, and 2011.

Variation in the STs and genotypes in serotype 6C and STs in serotype 23A were evident. In addition, gPISP (*pbp2x*) strains with ST199 submitted as the Netherlands<sup>15B-37</sup> clone had evolved to gPISP (*pbp1a+2x*) by way of *pbp1a* gene alterations in serotypes 15B and 15C.

Notably, 10 cases of capsular switching suggested the following relationships to ST and serotype as follows: between serotypes 15B and 15C in ST199; 14 and 19F in ST236; 6B and 23F in ST242; 23A and 23F in ST338; 6A and 6B in ST2756; 6A, 6B, and 6C in ST2923 and ST3787; 6B and

6C in ST2924; 22F and 24 in ST5496; and 6B and 19F in ST6183.

On the other hand, 93.6% of all strains isolated in 2010 and in 2011 possessed *mef(A)* and/or *erm(B)* genes mediating ML antibiotic resistance.

Discussion

Prevention of IPD, well known for high morbidity and mortality in immunologically immature infants, is an

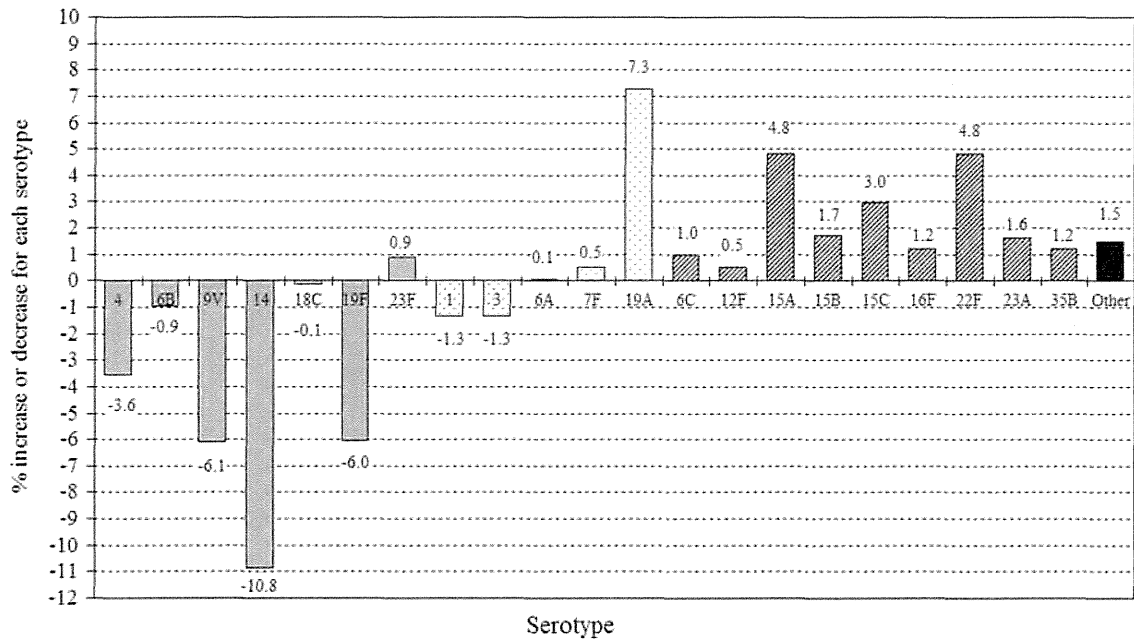


FIG. 3. Proportional increases and decreases in each serotype in 2006 and 2011. This result was limited to isolates from young children under 2 years old. Gray, serotypes covered by PCV7; Stippled, serotypes additionally covered by PCV13; Black, nonvaccine serotypes not covered by PCV13.

TABLE 3. RELATIONSHIPS BETWEEN MULTILOCUS SEQUENCE TYPES, SEROTYPES, AND PENICILLIN-RESISTANCE GENOTYPES, IN INVASIVE PNEUMOCOCCAL ISOLATES (N=408)

Serotype	CC	n	Genotype	ST (n: PMEN clone)	
6B	156	50	R	90(30: Spain <sup>6B</sup> -2), 95(1), 273(2: Greece <sup>6B</sup> -22), <b>5497(1), 7870(1)</b>	
			2x+2b	<b>5830(1)</b>	
			1a+2x	<b>2983(8), 5497(2), 7824(1)</b>	
			2x	<b>2983(3)</b>	
	242	1	R	242(1: Taiwan <sup>23F</sup> -15)	
	490	20	R	902(5), <b>6413(3), 7492(2), 8345(1), New(1)</b>	
			2x+2b	902(1)	
			2x	<b>2923(5), 5245(1), 6430(1)</b>	
	2224	14	R	2224(6), <b>7835(1)</b>	
			1a+2x	2224(7)	
	2924	4	2x+2b	<b>8348(1)</b>	
			1a+2x	<b>6183(1)</b>	
			2x	<b>2924(2)</b>	
	3787	6	R	2756(1), 3787(5)	
	7834	2	1a+2x	<b>7834(2)</b>	
	Group 358 singleton	1	R	<b>7967(1)</b>	
		8	R	<b>5232(7), 5244(1)</b>	
14	554	12	R	343(9), 3388(1), <b>7971(1), 7974(1)</b>	
	230	9	1a+2x	<b>5240(7), 7966(1), 7973(1)</b>	
	15	7	1a+2x	<b>2922(7)</b>	
	156	3	R	<b>5493(1)</b>	
			2x	124(1), <b>7972(1)</b>	
	199	1	R	876(1)	
	320	1	R	236(1: Taiwan <sup>19F</sup> -14)	
	singleton	1	R	<b>New(1)</b>	
		19F	320	43	R
				2x	236(2: Taiwan <sup>19F</sup> -14)
156	1		R	<b>8352(1)</b>	
242	1			<b>New(1)</b>	
2924	1		2x	<b>6183(1)</b>	
23F	2924		31	R	<b>1437(28), 6434(1), 7836(1), 7872(1)</b>
	242		25	R	242(21: Taiwan <sup>23F</sup> -15), 1435(1), 1444(1), <b>7968(1), 8343(1)</b>
	156		1		338(1: Colombia <sup>23F</sup> -26)
4	490		11	S	246(10), <b>New(1)</b>
	Group 457		1	S	<b>5872(1)</b>
9V		156	9	2x	280(6), <b>5231(3)</b>
18C	3594	6	S	3594(5), <b>7829(1)</b>	
6A	3787	11	R	2756(4), <b>6432(1), 6437(1), 8350(1)</b>	
			1a+2x	3787(1)	
			2x	<b>3113(1), 7969(1), 3787(1)</b>	
			R	282(2), 81(2: Spain <sup>23F</sup> -1)	
	81	4	R	3115(1)	
	3115	1	R		
	490	1	2x	<b>2923(1)</b>	
	singleton	1	R	<b>7871(1)</b>	
		1	S	<b>8347(1)</b>	
	19A	3111	25	R	3111(7)
1a+2x				3111(4)	
2x				3111(13)	
S				<b>8339(1)</b>	
2331		13	2x	2331(9)	
			S	2331(3), <b>5842(1)</b>	
156		1	R	156(1: Spain <sup>9V</sup> -3)	
320		1	R	320(1)	
3		180	7	2x	180(6: Netherlands <sup>3</sup> -31), <b>New(1)</b>

(continued)