

平成 22～24 年厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

新しく開発された Hib、肺炎球菌、ロタウイルス、HPV 等の各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究
分担研究報告書

沖縄県における小児の細菌性髄膜炎および全身性感染症の発生状況に関する研究

研究協力者： 安慶田英樹 沖縄県立南部医療センター・こども医療センター

研究要旨

2008 年から侵襲性細菌感染症の全数把握調査を継続している。2011 年に開始された公費助成制度により両ワクチンが普及した結果、2012 年にはインフルエンザ菌髄膜炎と非髄膜炎、肺炎球菌非髄膜炎の罹患率の減少が認められた。2008 年から 2011 年までの平均罹患率と 2012 年の罹患率を比較すると、2012 年の減少率はインフルエンザ菌髄膜炎で 100%、インフルエンザ菌非髄膜炎では 68.8%、肺炎球菌非髄膜炎では 64%であった。今後、接種率の向上と継続により、さらなる成果が期待される。

一方で、インフルエンザ菌では non-typable の分離、肺炎球菌では 19A 型および非 13 価ワクチン血清型の菌の増加傾向が認められ、replacement すなわち菌側の生態の変化が出現していると考えられる。今後の監視が必要である。また、19A 型の増加への対策として 13 価肺炎球菌結合型ワクチンの早期導入が望まれる。

A 研究目的

インフルエンザ菌 b 型 (Hib) ワクチンおよび 7 価肺炎球菌ワクチン (PCV7) 導入前後の、沖縄県における小児の細菌性髄膜炎および全身性細菌感染症の発生動向を明らかにすることにある。あわせて両ワクチンの有用性を検討する。

B 研究方法

対象疾患は市中感染による細菌性髄膜炎および全身性感染症であり、対象細菌はインフルエンザ菌、肺炎球菌、

B 群溶連菌 (GBS) である。小児科の急性期病床を有する全 16 病院に協力を呼びかけ、2008 年以来、前方視的全数把握調査を継続している。対象年齢は生後 0 日から 15 歳未満とした。研究内容は各病院より症例の調査票の提出を受けて臨床情報を集計すること、国立感染症研究所において分離菌の血清型・感受性を検査することである。本研究は国立病院機構三重病院の倫理委員会の承認を得て行われた。

C 研究結果

初めに沖縄県の Hib ワクチンと PCV7 の接種状況について報告する。公費助成制度の開始時期は市町村ごとに異なっていたが、人口の多い那覇市で 2011 年 5 月に開始されたこともあり、県全体の公費助成制度が整備されたのは 2011 年 5 月頃である。一方、メーカーからの報告によれば、出荷数を 5 歳未満の人口で割ることで求められる普及率については、公費助成制度開始以後、沖縄県は全国上位の高い実績を示したとされている。

公費助成制度によるワクチン普及の効果は、2011 年には明らかではなかったが、2012 年にその効果が表れている。表 1 に 2008 年以降の侵襲性細菌感染症の年間患者数の実数を示す。インフルエンザ菌髄膜炎の患者は、2012 年には発生が認められなかった。また、インフルエンザ菌非髄膜炎の患者数は 4 人に減少している。肺炎球菌髄膜炎の患者数は 4 人であり減少していなかった。肺炎球菌非髄膜炎は 25 人に減少している。GBS 髄膜炎は 2 例であった。

表 2 に他の地域との比較のために、5 歳未満人口 10 万あたりの罹患率を示した。括弧内は研究班で得られた 1 道 9 県全体の罹患率であり、全国の罹患状況を反映しているとみなされている。沖縄県の 2012 年の罹患率をみると、インフルエンザ菌髄膜炎は 0 であった。インフルエンザ菌非髄膜炎は 4.9 に減少していた。肺炎球菌髄膜炎は 4.9 であり、減少していない。肺炎

球菌非髄膜炎は 30.9 に減少していた。GBS 髄膜炎は 2.5 であった。

2008 年から 2011 年までの 4 年間の平均罹患率と 2012 年の罹患率を比較し、減少率を表 3 に示した。インフルエンザ菌髄膜炎は 100%、インフルエンザ菌非髄膜炎は約 69% と明らかな減少を認めた。肺炎球菌髄膜炎は、5.8% とわずかな減少にとどまっていた。肺炎球菌非髄膜炎は 64% 減少していた。

肺炎球菌髄膜炎の 5 年間の原因菌の血清型を表 4 に示した。年により検査率が異なるが 2011 年と 2012 年は全例検査されていた。2012 年は、PCV7 の血清型である 6B による症例が一例認められたが、残り 3 例は PCV7 に含まれず PCV7 では予防できない血清型が原因菌であった。なお、6B による髄膜炎の症例は先天性免疫不全症 IRAK4 欠損症と報告されている。2012 年の肺炎球菌髄膜炎症例が減少しなかった理由は、免疫不全症の紛れ込みと非 PCV7 型の菌の罹患という 2 点にあることが判明した。

侵襲性感染症由来の肺炎球菌の血清型のワクチンカバー率を表 5 に示した。2009 年～2011 年までの PCV7 の平均カバー率は 76.3% であった。2012 年は発症数の減少に伴い、菌株数が減少している。同時に PCV7 のカバー率が 27.6% に低下している。一方、米国で PCV7 普及後に増加し replacement serotype と呼ばれている 19A 型の比率が徐々に増加し、41.4% に達していることが注目される。2012 年に分

離された 19A 型の MLST をみると ST320 が 8 株、ST3111 が 3 株、ST2331 が 1 株であった。ST320 の PCG の MIC は 2~4 μ g/ml と高いことより、ST320 が原因菌の場合は治療薬の選択を考慮する必要がある。また、PCV13 に含まれない血清型の比率が、2011 年まではおおよそ 6%以下であったが、2012 年は 31%に増加していることが注目される。PCV7 の普及により 7 価ワクチンの血清型が減少し、非 7 価ワクチン血清型が増加しており、地域において、肺炎球菌の生態が変化しつつあると思われる。

表 6 に侵襲性感染症から分離されたインフルエンザ菌の血清型を示す。2009 年~2011 年までに検査が行われた菌は全て b 型であった。2102 年は b 型が 2 例、non-typable が 2 例であった。Non-typable の分離は全国においても増加傾向が報告されている。

GBS 2 例の血清型は I a と III であった。

D 考察

2011 年までの 4 年間と 2012 年と比較すると、最大の変化は侵襲性インフルエンザ菌感染症の罹患率が減少したこと、肺炎球菌感染症では髄膜炎は減少していないが、非髄膜炎で罹患率の減少が見られたことである。沖縄県の Hib ワクチンと PCV7 の接種は、公費助成制度に基づき 2011 年の後半から積極的に行われた。前述した普及率は全国 2 位と報告されている。2012 年の罹患率の減少は、ワクチンの効果

であることが明らかである。今後、高い接種率を維持・継続することによって罹患率のさらなる減少が期待できる。

インフルエンザ菌の場合、b 型による侵襲性感染症がほとんどを占め、ワクチンのターゲットを 1 血清型に絞ることが可能であった。そのため、肺炎球菌の場合と比較して、Hib ワクチンの効果が顕著に表われたものと考えられる。

2012 年のもう一つの変化として、血清型の変化が注目される。肺炎球菌感染症の場合、患者数の減少に伴い分離株数の総数は減少しているが、血清型では 7 価型が減少し、非 7 価型の比率が増加している。具体的には 13 価型である 19A と非 13 価型の双方の比率の増加が注目される。Replacement と称される細菌の生態の変化が既に始まっており、PCV7 の開始後、比較的短期間に進行している可能性がある。この事態に対する対策としては、19A 型に対応可能である 13 価ワクチンの早期導入が期待される。同時に、非 13 価型の原因菌の動向を監視する必要がある。

インフルエンザ菌の場合も、non-typable の分離の増加が全国的な傾向として指摘されている。国によっては、a 型、f 型の増加が報告されている。わが国においても、インフルエンザ菌の生態の変化として今後の動向を監視する必要がある。

E 結論

2008年から侵襲性細菌感染症の全数把握調査を継続している。2011年に開始された公費助成制度により両ワクチンが普及した結果、2012年にはインフルエンザ菌髄膜炎と非髄膜炎、肺炎球菌非髄膜炎の罹患率の減少が認められた。今後、接種率の向上と継続により、さらなる成果が期待される。

一方で、インフルエンザ菌では nontypable の分離、肺炎球菌では 19A 型および非 13 価ワクチン血清型の菌の増加傾向が認められた。Replacement、すなわちワクチン普及の影響により菌側の生態の変化が出現していると考えられる。今後の監視が必要である。一方、19A 型の増加に対して 13 価肺炎球菌結合型ワクチンの早期導入が望まれる。

G 研究発表

1 論文発表 なし

2 学会発表: 沖縄小児科学会第 75 回例会 2012 年 9 月 沖縄県における小児侵襲性細菌感染症の発生動向
安慶田英樹ほか

H 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

表1 侵襲性細菌感染症の年間患者数
5歳未満 沖縄県

	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年
インフルエンザ菌 髄膜炎	4	4	8	3	0
インフルエンザ菌 非髄膜炎	10	16	11	14	4
肺炎球菌 髄膜炎	4	6	3	4	4
肺炎球菌 非髄膜炎	77	62	74	66	25
GBS 髄膜炎	1	2	2	3	2
GBS 非髄膜炎	0	3	3	1	0

表2 侵襲性細菌感染症罹患率 沖縄県
(5歳未満人口10万人あたり)

	2008年 ()は全国	2009年 ()は全国	2010年 ()は全国	2011年 ()は全国	2012年 沖縄県
インフルエンザ菌 髄膜炎	4.9 (8.3)	4.9 (7.1)	9.9 (7.8)	3.7 (3.3)	0
インフルエンザ菌 非髄膜炎	12.3 (3.8)	19.5 (5.2)	13.6 (6.3)	17.3 (3.0)	4.9
肺炎球菌 髄膜炎	4.9 (3.3)	7.3 (2.8)	3.7 (2.3)	4.9 (2.1)	4.9
肺炎球菌 非髄膜炎	95.0 (21.4)	75.6 (21.3)	91.3 (23.8)	81.5 (18.1)	30.9
GBS 髄膜炎	1.2 (1.2)	2.4 (1.3)	2.5 (1.3)	3.7 (1.3)	2.5
GBS 非髄膜炎	0 (1.1)	3.6 (1.4)	3.7 (1.0)	1.2 (1.1)	0

表3 2012年における侵襲性細菌感染症の増減
沖縄県 5歳未満人口10万人あたりの罹患率

	2008~2011年 平均罹患率	2012年 罹患率	減少率 %
Hib髄膜炎	5.8	0	100%
Hib非髄膜炎	15.7	4.9	68.8%
肺炎球菌 髄膜炎	5.2	4.9	5.8%
肺炎球菌 非髄膜炎	85.8	30.9	64%

表4 肺炎球菌髄膜炎 原因菌の血清型
沖縄県

	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年
PCV7 血清型	6B 14 23F	14 14		9V 18C 23F	6B
PCV13 血清型			6A		19A
その他の 血清型			6C	6C	15C 15C
未検査	◆	◆◆◆	◆		
合計	4例	6例	3例	4例	4例

表5 侵襲性感染症由来の肺炎球菌の
ワクチンのカバー率 沖縄県

	2008年	2009年	2010年	2011年	2012年
7価ワクチン カバー率	42株/65株 64.6%	28株/36株 77.7%	50株/66株 75.7%	37株/49株 75.5%	8株/29株 27.6%
13価ワクチン カバー率	53株/65株 81.5%	33株/36株 91.6%	61株/66株 92.4%	46株/49株 93.8%	20株/29株 69%
19A型 比率	5株/65株 7.7%	3株/36株 8.3%	7株/66株 10.6%	6株/49株 12.2%	12株/29株 41.4%

表6 侵襲性感染症由来のインフルエンザ菌の血清型別
沖縄県

	2009年	2010年	2011年	2012年
症例数	20例	19例	17例	4例
インフルエンザ菌 b型	10例	12例	11例	2例
Non-typable				2例

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
新しく開発されたHib、肺炎球菌、ロタウイルス、HPV等
の各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究
平成 22-24 年度 分担研究報告書

小児侵襲性感染症由来肺炎球菌の疫学的解析

研究分担者 柴山恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨

2007 年 7 月から 2013 年 2 月現在まで、9 県で発症した小児侵襲性感染症 664 例(うち髄膜炎 89 症例)に由来する肺炎球菌の解析を行った。肺炎球菌感染症の発症時期を、肺炎球菌 7 価コンジュゲートワクチン(PCV7)導入前(2007 年 7 月-2010 年 1 月)、PCV7 任意接種開始後(2010 年 2 月-2011 年 3 月)、9 県の PCV7 公費助成開始後(2011 年 4 月-2013 年 2 月現在)の三期間に分けて、分離された肺炎球菌の血清型と薬剤感受性の解析結果をまとめた。三期間に分離された肺炎球菌の PCV7 のカバー率は時間順に 76.6%、78.7%、43.8%であった。Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) の 2007 年までに使われた基準による集計で、2011 年 4 月以後の PISP と PRSP の分離率は PCV7 が導入される前の 2010 年 1 月以前に比べ、約 10% の減少が見られた。しかし、PCV7 非含有血清型の 19A、15A、15B、15C、22F については 2011 年 4 月以後に分離率の増加が見られた。19A は日本にも導入される予定である 13 価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)に含まれる血清型であるため、PCV13 による予防効果が期待できる。しかし、15A、15B、15C、22F は小児に使用できる PCV7、PCV13 および 10 価肺炎球菌結合型ワクチン(GSK 社)にも含まれていない血清型であるため、今後これらの血清型による症例の増加が懸念される。

研究協力者

常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部

A. 研究目的

肺炎球菌による侵襲性感染は、ワクチン接種により予防可能な疾患となっている。本邦においても、2010 年 2 月から 7 価小児用肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV7)が導入され、2011 年度から PCV7 は公費助成の対象となり、接種率の増加とともに、ワクチンの効果が期待されている。一方、ワクチンに含

まれない血清型による侵襲性感染罹患率の増加(Serotype replacement)の懸念がもたれている。本分担研究は、1 道 9 県で行われた 15 歳未満小児侵襲性感染症の人口あたり発症率調査の一部として行われ、分離された肺炎球菌の解析を行い、PCV7 導入前後の疫学データを比較し、ペニシリン等の β -ラクタム薬への感受性の状況の変化を考慮しつつ、ワクチンの効果を評価できる基礎疫学データを提供することを目的とした。

B. 研究対象と方法

2007年7月から2013年2月現在まで、9県から送付された小児侵襲性感染症664例（うち髄膜炎89症例）由来の肺炎球菌を対象とし、血清型別、薬剤感受性試験およびマルチローカスシークエンスタイピング（MLST）解析を行った。血清型は、Statens Serum Institut 製血清および、自家調製血清を用い莢膜膨潤法により決定した。薬剤感受性試験は微量液体希釈法で測定を行い、その結果は2007年まで使われたCLSIの基準によって統計学的解析を行った。MLST解析では、分離株の7つのアリル(*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*)の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net>にて検索を行い、MLST遺伝子型を決定した。本報告書のすべての集計は症例数をもとに行った。

C. 研究結果

1：小児侵襲性感染症由来肺炎球菌の血清型分布

2007年7月から2013年2月現在まで、9県の小児侵襲性感染症664例由来肺炎球菌の血清型分布およびワクチンカバー率を図1に、症例数を図2に示す。三期間に分離された肺炎球菌のPCV7のカバー率はそれぞれ76.6%、78.7%、43.8%であった。2011年4月以後のPCV7に含まれている6B、14、23F、19F型肺炎球菌の分離率の減少とともに、カバー率にも明らかな減少が見られた。その一方、PCV7非含有血清型の19A、15A、15B、15C、22Fについては2011年4月以後に分離率の増加が見られた（図1、2）。

2：PCV7接種歴があり侵襲性感染患児から分離された肺炎球菌の解析結果

PCV7を接種したにもかかわらず、侵襲性感染症が起った症例は全部で68例、そのうち髄膜炎症例は12例であった。2010年2月-2011

年3月および2011年4月-2012年12月の期間にそれぞれ5例と63例であり、それぞれ期間の症例の2.3% (5/216) と32.8% (63/192) を占めた。これらの侵襲性感染症症例から分離された肺炎球菌の血清型分布の結果を図3に示す。PCV7のカバー率は11.8%であった。2011年4月以後に分離率の増加が見られた19A、15A、15B、15C、22F型肺炎球菌による症例はそれぞれ20 (29.4%)、8 (11.8%)、5 (7.4%)、5 (7.4%)、5 (7.4%) 例であった。68症例中8症例はPCV7に含まれる血清型肺炎球菌による感染であり（Breakthrough infection または Vaccine failure）、5例は6B型、3例は23F型肺炎球菌によるものであった（表1）。Breakthrough infectionは予定されたワクチンスケジュールの途中またはスケジュールを遵守しなかったなど、不完全なワクチン接種での発症である。予定されたワクチンスケジュールを遵守したにも関わらずに発症した場合はVaccine failureと言われる。これらの患児では感染血清型に対する血中オプソニン活性が低いことはBreakthrough infection や Vaccine failure の原因であると考えられた（Vaccine 31: 845-849, 2013）。

3：小児侵襲性感染症由来肺炎球菌の薬剤感受性

2007年まで使われたCLSIのペニシリンに対する基準により、肺炎球菌の分離部位に関わらず、微量液体希釈法により測定したMICが ≤ 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.12-1$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をそれぞれ、ペニシリン感受性（PSSP）、ペニシリン低感受性（PISP）、ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）と判別した。しかし、2008年、ペニシリンに対する感受性は肺炎球菌の分離された部位により異なる基準に変更された。新しい基準では、髄膜炎由来肺炎球菌はペニシリンのMICが ≤ 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$

と $\geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、PSSP と PRSP に判別した。その一方、髄膜炎以外の感染症由来肺炎球菌はペニシリンの MIC が $\leq 2\mu\text{g/mL}$ 、 $4\mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 8\mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、PSSP、PISP、PRSP と判別した。2008 年以後の新基準で肺炎球菌のペニシリンに対する感受性を個別の感染症を評価することで、髄膜炎を除く肺炎球菌感染症のペニシリンを使用できる範囲が広まり、医療費の削減が期待され、適切だと考えられた。しかし、本研究のような広範囲での肺炎球菌による侵襲性感染症の疫学調査においては、髄膜炎以外の感染症由来肺炎球菌は同一患者でも、違う患者にでも髄膜炎を引き起こす可能性がある。さらに、肺炎球菌は感染を起す時、どんな感染症を引き起こすのかを予測できないため、肺炎球菌の抗菌薬に対する感受性の評価には 2007 年以前の CLSI の基準が適切だと考えられた。従って、本報告書の結果は 2007 年までの CLSI の基準によって統計学的解析を行った。

侵襲性感染 664 症例由来肺炎球菌のペニシリン G に対する薬剤感受性は、PSSP: 40.1%; PISP: 45.7%; PRSP: 14.2%であった。三期間に分けると、非感受性株 (PISP と PRSP) が占める割合は 64.1%、61.6%、52.6%であった。2011 年 4 月以後の PISP と PRSP の分離率は PCV7 が導入される前の 2010 年 1 月以前に比べ、約 10% の減少が見られた。血清型ごとにペニシリン G に対する薬剤感受性を見ると、6B、19F、23F は非感受性株が多く、各々が属する血清群の分離菌の中で、非感受性株が占める割合は 86.5% (6B)、100% (19F)、95.7% (23F)であった。血清型 14 の分離株の中では 38.6% が非感受性株であった。血清型 4、9V、18C では、PISP と PRSP は見られなかった。2011 年 4 月以後分離率の増加が見られた 19A、15A、15B、15C、22F の非感受性株が占める割合は 52.6% (19A)、

100% (15A)、18.2% (15B)、27.3% (15C)で、22F のすべては PSSP であった。

664 株の肺炎球菌のペニシリン G 以外の抗菌薬に対する MIC を測定した結果では、103 株 (15.5%) はセフトキシム低感受性 (MIC = $1\mu\text{g/mL}$)、37 株 (5.5%) はセフトキシム耐性 (MIC $\geq 2\mu\text{g/mL}$) を示した。また、メロペネム非感受性 (MIC $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ 以上) は 37 株 (5.5%) が分離された。パニペネムの MIC $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ の肺炎球菌の分離は見られなかったため、すべての分離菌はパニペネム感受性であった。また、615 株 (92.6%) はエリスロマイシン非感受性 (MIC $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ 以上) を示した。三期間の分離菌のセフトキシム、メロペネムおよびエリスロマイシンに対する耐性率には差が見られなかった。

D. 考 察

本研究は、PCV7 導入前から同一地域における小児侵襲性感染症の疫学調査を始めたため、ワクチンの効果を継続的に把握することができた。公費助成が始まった 2011 年 4 月以後、PCV7 含有血清型による小児肺炎球菌性侵襲性感染症例の減少が見られ、血清型カバー率の低下が見られた。この血清型カバー率の低下は、PCV7 含有血清型による小児肺炎球菌性侵襲性感染症例数の減少と 19A をはじめとする PCV7 非含有血清型による症例数の増加に起因している。今後も PCV7 導入後の小児肺炎球菌性侵襲性感染の感染血清型や薬剤感受性の推移を継続して調べる必要がある。

E. 結 論

2011 年 4 月以後に分離された肺炎球菌の血清型別解析より、PCV7 含有血清型による小児肺炎球菌性侵襲性感染症例の減少が

みられた。日本においてPCV7による小児侵襲性感染に対する予防効果があったと考えられた。

F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

G. 研究発表

1: Bin Chang, Taketo Otsuka, Atsushi Iwaya, Minoru Okazaki, SatokoMatsunaga, and Akihito Wada. 2010. Isolation of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D from the nasopharyngeal mucosa of healthy Japanese children. Japanese Journal of Infectious Diseases. 63:381-383.

2: Tomohiro Oishi, Akihito Wada, Bin Chang, Shinichi Toyabe, and Makoto Uchiyama. 2011. Serotyping and multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the blood and posterior nares of Japanese children prior to the introduction of 7-Valent pneumococcal conjugate vaccine. Japanese Journal of Infectious Diseases. 64:341-344.

3: Junko Tanaka, Naruhikolshiwata, Akihito Wada, Bin Chang, HarukaHishiki, Tomomichi Kurosaki, and Yoichi Khono. 2012. Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in

Japan. *Epidemiology and Infection*, 140:1111-1121.

4: Masahiro Ueno, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda, Yoshiko Anahara, Akiko Ebata, Masaei Iida, Seiko Inamura, KahoriTakahata, Yoko Suzuki, Bin Chang, Akihito Wada, Minoru Sugita, Taichiro Tanaka, and Yuji Nishiwaki. 2013. Prevalence and Risk Factors of Nasopharyngeal Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Healthy Children in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 66:22-25.

5: Tomohiro Oishi, Naruhikolshiwada, Kousaku Matsubara, Junichiro Nishi, Bin Chang, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda, Toshiaki Ihara, Moon H. Nahm, Kazunori Oishi, the Japanese IPD Study Group. 2013. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. *Vaccine*. 31:845-849.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1.9 県の Breakthrough infection や Vaccine failure 症例の特徴

症例	年齢	診断名	発症日	PCV7 接種回数	血清型
1	1y	髄膜炎、菌血症	2010/5/1	1	6B
2	2y6m	菌血症	2010/8/5	1	6B
3	0y8m	菌血症	2010/12/17	3	6B
4	1y5m	髄膜炎、菌血症、肺炎	2011/5/9	2	6B
5	1y8m	髄膜炎、菌血症	2012/3/2	1	6B
6	0y4m	髄膜炎	2010/11/7	1	23F
7	0y11m	菌血症	2011/4/25	2	23F
8	2y11m	髄膜炎、菌血症	2011/12/2	1	23F

図1: 9 県の小児侵襲性感染症から分離された肺炎球菌の血清型分離率

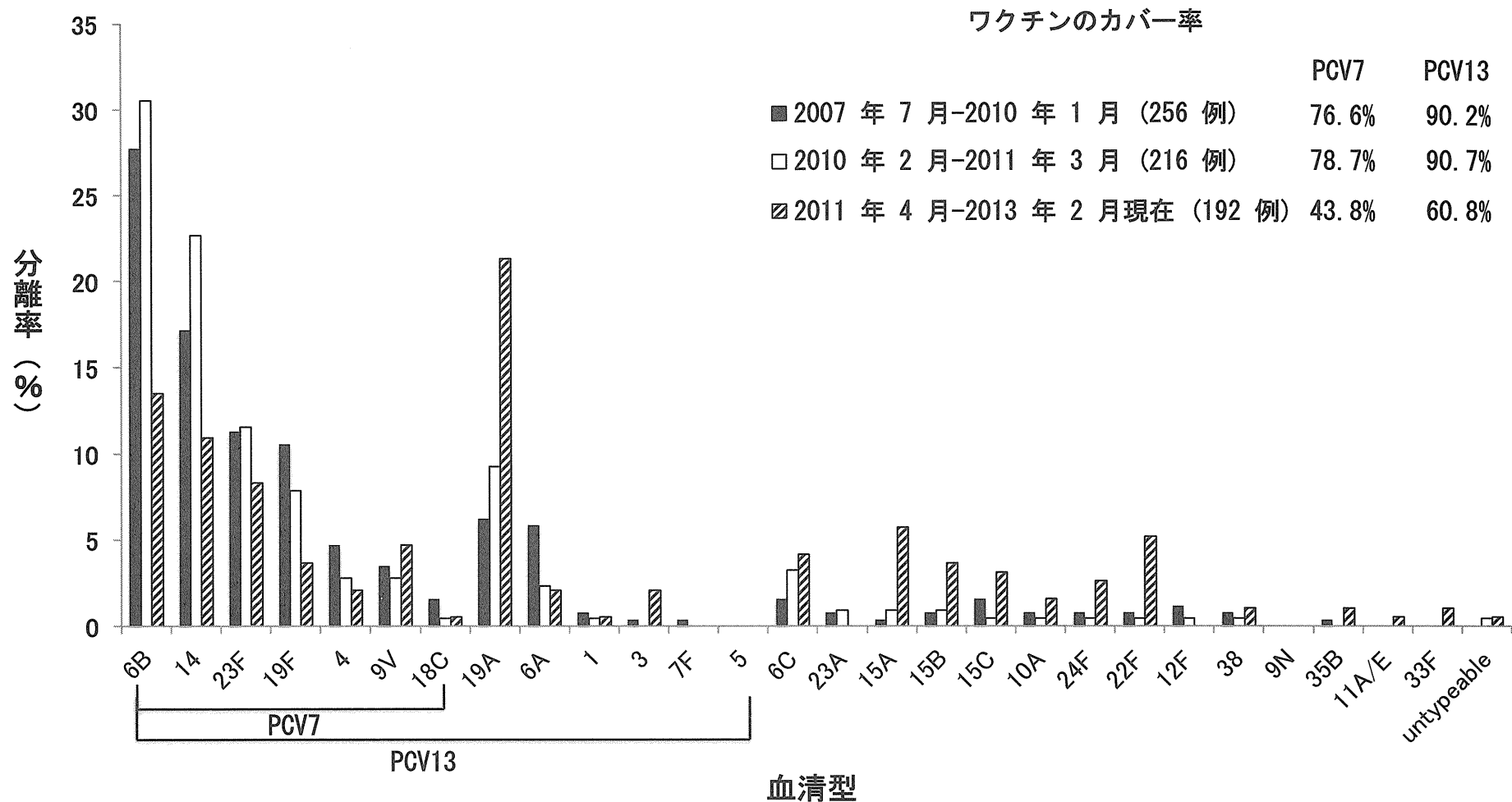


図2: 9 県の各血清型肺炎球菌を原因とする小児侵襲性感染症症例数

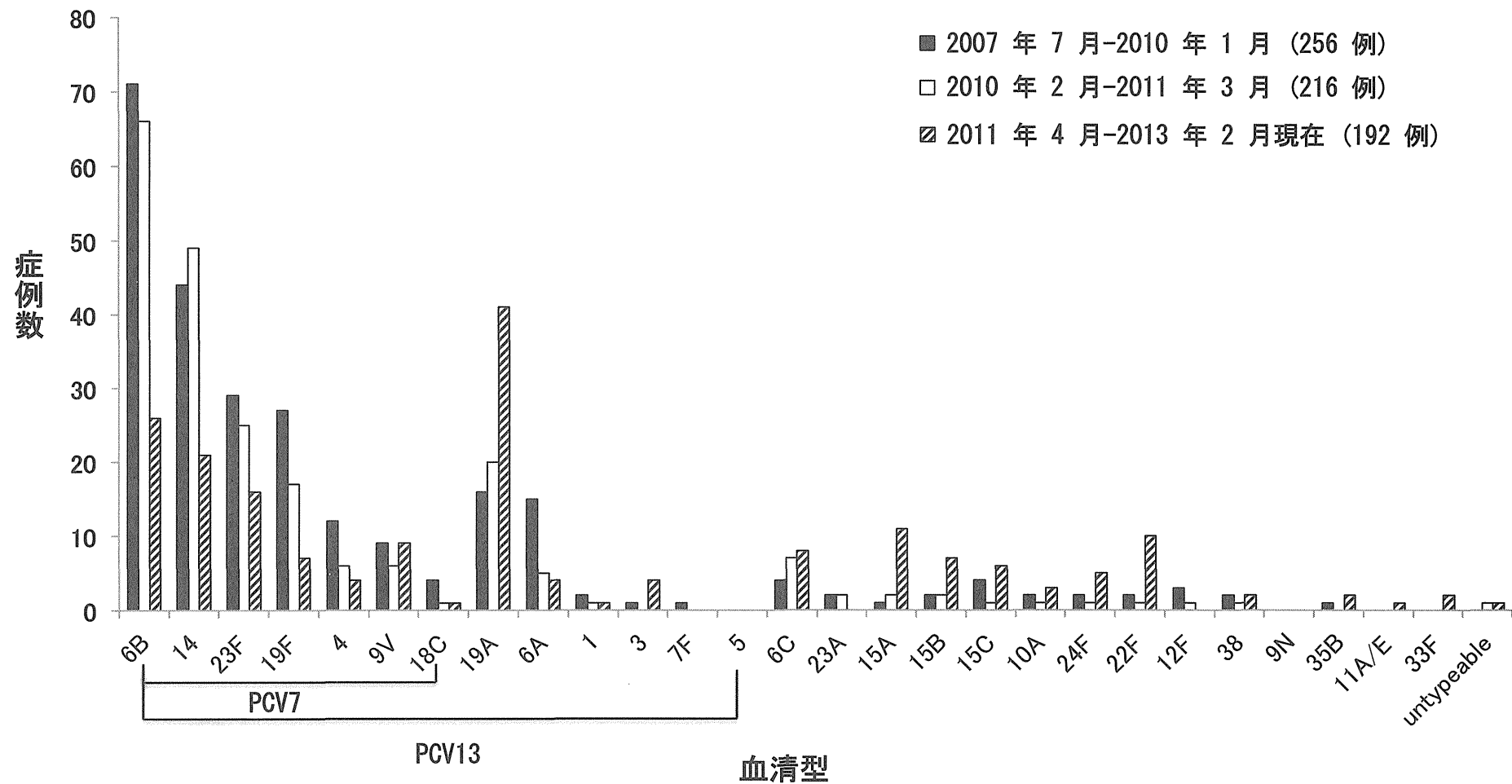
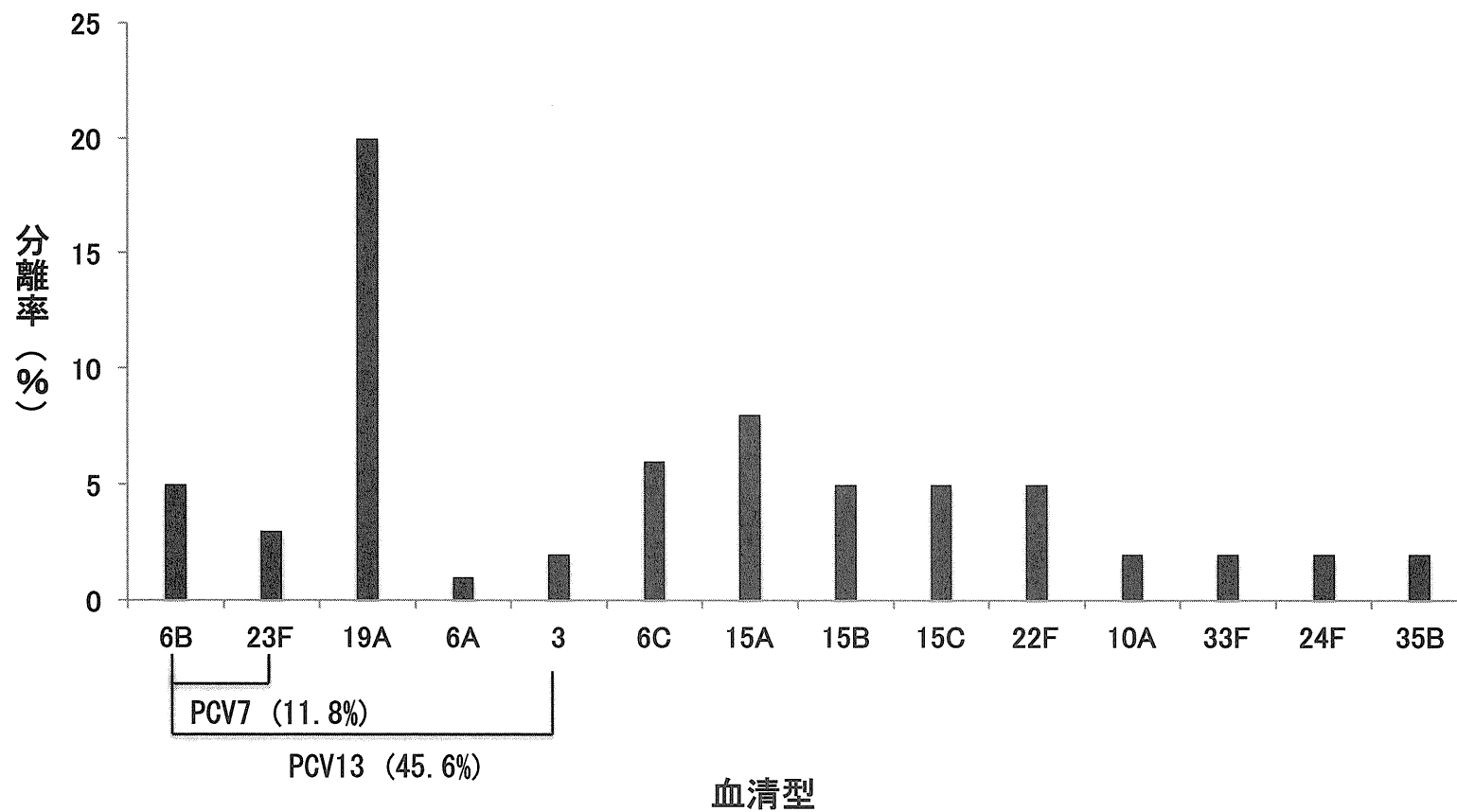


図3: 9県の PCV7 接種歴がある小児侵襲性感染症由来肺炎球菌の血清型の分離率



厚生労働科学研究費補助金

(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

新しく開発された Hib、肺炎球菌、ロタウイルス、HPV等の各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法
に関する基礎的・臨床的研究

平成 22-24 年度 分担研究報告書

髄膜炎等の侵襲性細菌感染症患者由来の*Haemophilus influenzae*臨床分離株の解析並びに 細菌性髄膜炎疑い症例由来培養陰性髄液の細菌遺伝子解析

研究分担者 柴山恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨

*Haemophilus influenzae*による侵襲性感染症のうち、*H. influenzae* 莢膜型 b 型株 (Hib) による侵襲性感染症の予防対策として Hib に対するワクチンが導入された。Hib ワクチンの導入前後における菌の生態から Hib ワクチンの効果を評価するため、侵襲性感染症患者由来 *H. influenzae* 臨床分離株の莢膜型解析等を実施した。分離株受領期間をワクチン未導入期 (期間 1)、ワクチン任意接種開始後 (期間 2)、ならびに、ワクチン任意接種開始後で補助金開始後 (期間 3) の三期間に分けて解析結果を比較した。Hib 分離株数ならびに全分離株中の割合は期間 3 で減少した。一方、莢膜(a~f)に対する 6 種類の抗血清存在下のいずれにおいても菌凝集を起こさない Non-typable *H. influenzae* (NtHi) 分離割合が期間 1, 2 の数%から期間 3 の約 17%と増加傾向を示した。NtHi が分離された疾患の診断名は菌血症ならびに菌血症を伴う肺炎例が多いものの、髄膜炎が 1 例あった。髄膜炎患者の髄液由来 NtHi 1 株、Hib 1 株ならびに菌血症を伴う肺炎患者の血液由来 NtHi 1 株について走査電子顕微鏡 (SEM) による形態観察を実施した結果、3 株間で違いが見られた。Hib ワクチン接種歴を持つ Hib による侵襲性感染症の大半は接種歴が 1 回だったが、3 回接種歴を有する髄膜炎例についても報告された。薬剤感受性試験の結果、供試 6 薬剤の感受性株の割合は、三期間で大きな差は無かった。調査初期に比べ、2009 年以降アンピシリン耐性 β -lactamase 非産生株が増加傾向を示したが、ワクチン普及時期とは一致していない。細菌性髄膜炎疑い症例の細菌培養陰性髄液における細菌遺伝子解析の結果、8/29 症例で細菌遺伝子が検出された。

研究協力者

佐々木裕子、木村幸司、新谷三春、甲斐久美子、吉村由美子、瀧 世志江、増田まり子、見理 剛、松岡・久保田真由美、加藤はる、近田俊文 (国立感染症研究所、細菌第二部) 永田典代 (同、感染病理部)

することで引き起こされる疾患の総称である。*Haemophilus influenzae*による侵襲性感染症は、感染部位により、髄膜炎、菌血症などがある。このうち、髄膜炎のみは、現在、他の起因菌による髄膜炎と同様に感染症法に定める 5 類感染症定点把握疾患の細菌性髄膜炎 (髄膜炎菌性髄膜炎は除く) に含まれているが、平成 25 年度以降は、侵襲性 *H. influenzae* 感染症としての集計が開始される予定である。侵襲性感染症では、髄膜炎や

A. 研究目的

侵襲性細菌感染症とは健常な状態において無菌的な身体の部位に細菌が侵入し増殖

菌血症が起きる。一般に血液中で細菌は宿主の殺菌作用により死滅するが、*H. influenzae* の莢膜多糖 (polyribosylribitolphosphate, PRP) を有する株は、PRP で菌表面を覆うことにより宿主免疫に抵抗し、その結果、血清耐性を有する。本菌の莢膜多糖には株毎の多様性があり、a, b, c, d, e, f 型の 6 種類の抗原性の異なる莢膜型の株が存在する。この 6 種類の莢膜に対する抗血清に反応しない株は、Non-typable *H. influenzae* (NtHi) と称される。疫学解析において *H. influenzae* 莢膜型 b 型 (以下、Hib) が、侵襲性感染症の起原因菌として圧倒的に高率であったことから、b 型の莢膜多糖に対するワクチンが開発され使用されている。我が国では、任意接種が 2008 年 12 月より開始され、補助金制度が 2011 年以降 (地域により時期は異なるものの) 導入された。さらに、2013 年 4 月以降の定期接種化が予定されている。本研究では、*H. influenzae* による侵襲性感染症における菌の生態への Hib ワクチン導入の影響を理解し、予防対策における基礎的理解を深めるため、ワクチン導入前後における侵襲性 *H. influenzae* 感染症患者からの臨床分離株を用いて莢膜型別やワクチン接種歴との関連等を中心に解析を行った。さらに、Hib と NtHi の病原性の違いを理解する一環として、細胞膜表面構造の走査電子顕微鏡 (scanning electron microscopy, SEM) による観察を行い両者の比較を行った。一方で、細菌性髄膜炎の起原因菌情報の充実をはかるため、細菌性髄膜炎疑い症例由来髄液 (細菌培養陰性) における細菌遺伝子解析を検討した。

B. 研究方法

供試菌株 : *Haemophilus influenzae* による髄膜炎、関節炎、肺炎 (菌血症を伴う症例に限る) 等患者の髄液、関節液、血液等から分

離された *H. influenzae* 株を対象菌株とした。菌の受入れ時期により以下の三期間を設定し、期間間での比較を行った。期間 1) Hib ワクチン未導入期 (2007 年 6 月～2008 年 11 月)、72 症例 76 株 (うち 72 株を集計)、期間 2) Hib ワクチン任意接種開始後 (2008 年 12 月～2010 年 12 月)、158 症例 198 株 (うち 158 株を集計)、期間 3) Hib ワクチン任意接種開始後で補助金開始後 (2011 年 1 月～2013 年 2 月)、78 症例 101 株 (全株を集計)。

莢膜型別解析 : インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いた菌体凝集法により解析した。a, b, c, d, e, f 株に対する抗血清で凝集しない株を NtHi とした。

遺伝子解析による莢膜型別 : 一部の菌株については、抗血清による菌体凝集法に加えて、a～f 型莢膜遺伝子の有無について、polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて解析した。菌株からの DNA 抽出には、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用い、得られた DNA を鋳型にし Premix Taq (Takara) を用いて遺伝子増幅を行った。*H. influenzae* 莢膜型特異的遺伝子に対する PCR 法は、Falla TJ *et al.* J. Clin. Microbiol. 32: 2382-2386 (1994) をもとに、一部のプライマー配列を改良して実施した。(供試株において菌体凝集法と PCR 法の解析結果に一致が見られたことから、期間 3 の殆どの株では、菌体凝集法のみを実施した)。

β -lactamase 活性試験 : ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」(日水製薬) または、セフィナーゼディスク (ベクトン・ディッキンソン) を用いて、分離株の β -lactamase 産生性を調べた。

薬剤感受性試験 : E-test (AB BIODISK) を用い、試験用培地には *Haemophilus Test Medium* (HTM, ベクトン・ディッキンソン)

を用いた。薬剤としてアンピシリン (ABPC)、スルバクタム／アンピシリン (ABPC/SBT)、ピペラシリン (PIPC)、メロペネム (MEPM)、セフトキシム (CTX)、セフトリアキソン (CTRX) を用いた。

髄液検体：29 症例の臨床症状、髄液所見等による細菌性髄膜炎疑い症例における細菌培養陰性の髄液等について、細菌遺伝子解析による起因菌推定を実施した。

髄液からの細菌遺伝子検出方法：髄液検体より QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を使用して DNA を精製した。抽出 DNA を鋳型とし 16S-23S rRNA 遺伝子間領域を nested PCR 法 (LMC Hall *et al.* Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1995, 14, p.1090-1094) により増幅し、*H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* の 4 細菌種の遺伝子検出を行った。加えて、平成 23 年度以降、高感度で検査時間の短縮が可能な Real-time PCR 法を実施した。*H. influenzae*, *pdh* 遺伝子 (Dunne EM, *et al.* J Clin Microbiol 50: 1034-1038, 2012) ならびに *S. pneumoniae*, *lytA* 遺伝子 (Dunne EM, *et al.* J Clin Microbiol 50: 1034-1038, 2012 ならびに Sasaki, Y. 未発表)、*M. meningitidis*, *ctrA* 遺伝子 (Abdelaim GMK, *et al.* BMC Microbiology, 10: 310, 2010) 、*S. agalactiae*, *sip* 遺伝子 (Bergseng H, *et al.* J Med Microbiol 56: 223-228, 2007) 、*Mycoplasma pneumoniae*, MPN372 遺伝子 (Sasaki, Y. 未発表) に対するプライマーならびにプローブを用いた。

SEM による *H. influenzae* の観察：ヘミン含有 Brain-Heart infusion 液体培地中に滅菌済ガラス板を入れた容器中にて 5%CO₂ 存在下で *H. influenzae* を 35°C にて 20 時間培養した。ガラス板上の菌体を 0.1M カコジル酸

緩衝液にて洗浄、2.5% グルタルアルデヒド 1% パラフォルムアルデヒド含有 0.1M カコジル酸緩衝液にて前固定後、1% 四酸化オスミウムならびに 1% タンニン酸含有カコジル酸緩衝液にて固定したものを脱水、置換、乾燥、プラチナイオンコーティング工程を経て、SEM (JSM-6700F、JEOL 社) にて観察した。

(倫理面への配慮) 髄液における髄膜炎起因菌推定については、「国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」の承認を得て実施した。しかし、本研究のために新たに髄液採取することはなく、インフォームドコンセントを得た上で、臨床診断目的で採取・使用終了後、通常では廃棄される髄液検体の一部を用いた。診療情報は匿名化され、対照表は協力医療機関側において厳重に管理された。

C. 研究結果

1. 分離株の莢膜型別解析結果：全症例数の分離菌株における Hib の割合は、期間 1、2、3 で、それぞれ 95.8% (69/72)、97.4% (154/158)、83.0% (68/82) であった。非 b 型菌 (NtHi) は、期間 1、2、3 で、それぞれ 4.2% (3/72)、2.5% (4/159)、17.0% (14/82) であった (表 1)。期間 3 で Hib 分離率が減少し、かわりに NtHi 分離率が増加傾向にあることは、Hib ワクチンの普及に伴い Hib 感染症例 (特に髄膜炎) が減少傾向にあることを反映したものである。一方、肺炎症例 (髄膜炎を伴わない。血液からの菌分離を伴う) のみの 3 期間での比較結果を表 2 に示す。Hib の割合は、期間 1、2、3 で、それぞれ 80.0% (4/5)、84.6% (11/13)、71.4% (10/14) と期間 3 で若干の減少傾向が見られたものの現段階で明確な減少とは言いきれず、継続した観察が必要と考えられた (表 2)。NtHi は、2 例のみ髄膜炎患者の髄

液から分離されたが、あとの 18 例は、菌血症のみあるいは、菌血症・肺炎（6 例）や菌血症・中耳炎（1 例）、菌血症・副鼻腔炎（2 例）患者の血液から分離された。

解析に用いた検体の割合は、期間 1、2、3 で、それぞれ、髄液が 69.4%、41.8%、35.6%、血液が 29.4%、54.0%、61.4%であった。

2. Hib ワクチン接種歴を持つ症例由来分離株の解析結果：15 例の報告があり、特に期間 3 においては、ワクチン接種歴を持つ患者が複数報告された（表 3）。うち、Hib による症例が 8 例（髄膜炎 5 例、菌血症を伴う肺炎 2 例、菌血症 1 例）であった。8 例中 6 例は、ワクチン接種歴が 1 回のみ免疫スケジュール途中での発症例だが、ワクチン 3 回接種後の Hib 感染症発症例も 2 例（髄膜炎 1 例、菌血症 1 例）報告された。この髄膜炎例においては、千葉大学にて血中抗体価測定が実施されている。これら 8 例からの分離株の薬剤感受性に関しては、ワクチン 1 回接種後の髄膜炎症例由来株 1 株が、 β -ラクタマーゼ産生株であり、アンピシリン、アンピシリン/スルバクタム、ピペラシリンで高い E-test 値を示したが、メロペネム、セフトアキシム、セフトリアキソンの値は低かった。

3. 分離株の薬剤感受性試験結果： β -ラクタマーゼ産生株の割合と菌株数は、期間 1、2、3 で、それぞれ 18.1% (13/72)、10.1% (16/158)、10.5% (11/105) であり、三期間で大きな差は認めなかった（表 4）。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の微量液体希釈法の基準を参考値とした場合に感受性と考えられる株の割合を表 5 に示す。供試した薬剤における感受性株の割合は、三期間で大きな差は無かった。一方、アンピシリンならびにアンピシリン/スルバクタムに対する耐性株中の β -lactamase 非産生株の割合を表 6 に示す。アンピシリンに対する耐

性株中の β -lactamase 非産生株の割合が、期間 1 に比べて、期間 2 ならびに 3 で増加傾向にあることが示唆された。ワクチンが普及した期間 3 特有の変化は観察されなかった。

4. 培養陰性髄液における細菌遺伝子解析結果：解析された 29 症例の検体中、8 症例において細菌遺伝子が検出され、*S. pneumoniae* 4 例、*H. influenzae* 3 例、*S. agalactiae* 2 例、*M. meningitidis* 2 例であった。うち 2 例（1 例は奇形を有する）においては、複数菌の遺伝子が検出された。

5. SEM による *H. influenzae* の観察像：*NtHi* が髄膜炎患者の髄液や菌血症患者の血液から分離された。これらの *NtHi* と Hib について SEM による形態観察を行った。*NtHi* として髄膜炎患者の髄液由来 Kam/lha347 ならびに菌血症を伴う肺炎患者の血液由来株 Kam/lha349 株を、Hib として髄膜炎患者の髄液由来 Kam/lha344 株を用いた。Hib 表面には、菌体を被う膜状の物質が存在した（図 1, A）。一方、*NtHi* の 2 株には、菌体を被う膜状の物質は、明瞭には観察されなかった。しかしながら、Kam/lha347 においては、観察箇所によっては、薄い膜に類似した物質が存在した（図 1, B）。Kam/lha349 は、粘液性の物質を認めた（図 1, C）。また、菌体の長さは、約 0.5-6 μm 程度の菌体が多く観察されるものの、株により多様性が認められた。

6. 参考情報、Hib ワクチン接種歴を持つ髄膜炎患者からの莢膜型 f 型菌の分離例

本研究班非対象県において、2013 年、Hib ワクチン 3 回接種後に髄膜炎を発症した患者の血液から莢膜 f 型菌が分離された。本菌については、a~f 型の抗血清中、f 型のみと凝集すること、ならびに菌抽出 DNA を鋳型とした莢膜 a~f 型の型特異的遺伝子増幅系において、f 型遺伝子のみを増幅することを認めた（図 2）。

D. 考 察

Hib ワクチン導入前と導入後普及していく期間3においては、Hib 分離率の明らかな違い（低下）が認められた。期間3が補助金導入に地域差がある中での解析であったことを考えれば、定期接種開始後の変化は、より短期間に生じる可能性が予想される。調査した三期間における髄液検体数の推移ならびに髄液由来株の減少の両者は、Hib 髄膜炎の減少を反映するものと考えられる。一方で、現時点で NtHi による侵襲性感染症例数自体が増加していることは示唆されない。解析実施期間中、調査対象県においては、全症例において他の有莢膜型の a, c, d, e, f 型株は検出されなかった。しかしながら、非対象県からの莢膜 f 型菌分離例を参考情報として記載した。国外では、莢膜型 a 型株や f 型株による症例報告がある。Hib ワクチン定期接種導入後においても、他の莢膜型菌の台頭についての監視が必要である。

Hib ワクチン定期接種導入後の全国の侵襲性 *H. influenzae* 感染症の分離菌における莢膜型解析においては、侵襲性感染症の定義に基づき、検査検体についての統一をはかる事が精度向上の為に必要だと考えられる。侵襲性 *H. influenzae* 感染症の定義は、脳脊髄液、血液、胸水、腹水、関節液など無菌的部位からの *H. influenzae* が分離された症例が確定例であり、症状等から当該疾患が疑われながらも無菌的部位からの菌分離がされていない症例が可能性例である。確定例及び可能性例における非無菌的部位由来の分離株の紛れ込みを無くす必要性が考えられる。本研究班において複数例の Hib 髄膜炎患者で、髄液からは Hib が、咽頭からは NtHi が分離されているが、これらの NtHi は起因菌では無いと考えられ解析から外している。

髄膜炎患者の髄液から検出された NtHi 株

の病原性に興味を持たれた。Hib と NtHi の膜表面の SEM 像からは、髄膜炎患者の髄液由来の Hib と菌血症を伴う肺炎患者の血液由来の NtHi については、莢膜の有無を SEM 像から推し量れる可能性が示唆されたものの、髄膜炎患者の髄液由来 NtHi 株のような判断に困る株も存在した。莢膜の厚さは培養後の継代数や培養条件により変化することが知られている。Kam/Iha347 において薄い膜類似の物質が何であるのか、また、NtHi による粘液性の物質が血清抵抗性に関与するのかは、未解決の課題として残された。

薬剤感受性試験結果は、アンピシリンに対する耐性株中の β -lactamase 非産生株の割合が増加傾向にあった。他の薬剤については、解析期間中の三期間で大きな差は認められなかった。供試薬剤の感受性株の割合は、メロペネムにおいては、94%程度だが、セフトキサシムならびにセフトリアキソンにおいてはほぼ全てが感受性を示した。Hib 感染症発生データベース（国立感染症研究所）の 2011 年 10 月集計における薬剤使用状況と効果において、髄膜炎等が診断名に含まれていた症例に使用される薬剤としては、セフトリアキソン+メロペネムが 21.9%と最も高く、また、メロペネム、セフトキサシム、セフトリアキソンの使用を有効と回答している方は 90-94.5%と報告されている。

侵襲性 *H. influenzae* 感染症の定義中、細菌遺伝子解析結果陽性例は菌分離と同等に診断定義を満たす。本研究班で実施した細菌培養陰性の髄液における細菌遺伝子解析については、薬剤投与前、かつ、硬膜下膿瘍例、あるいは形態学的奇形を有する髄膜炎頻発症例において検出可能であることが示唆された。髄液中の菌量が少ない状態での検出には限界があり、そのような状態の検体において培養法を補うことには適さないと考えら

れた。一般的には、細菌遺伝子検出法は、むしろ、通常の培養法で培養が困難あるいは期待されない菌種（例えば、*Mycoplasma hominis* 等）を含め、原因不明の細菌性髄膜炎について研究対象としていく方向が考えられる。

E. 結論

*Haemophilus influenzae*による侵襲性感染症患者由来菌株は、Hib ワクチン導入前後において莢膜型別結果に差があることが示唆された。Hib ワクチンが普及した補助金導入後に Hib が減少した。6種類の抗血清 a~f 型のいずれの存在下で菌凝集を起こさない株 (Non-typable *H. influenzae*, NtHi) の割合がワクチン導入前の数%から、ワクチン普及後の約 17%に増加傾向を示した。これまで分離された 20 株の NtHi のうち 2 例のみが髄膜炎患者の髄液由来株であり、他は菌血症を伴う肺炎等や菌血症患者の血液由来株であった。髄膜炎患者の髄液由来 Hib 1 株、NtHi 1 株、菌血症を伴う肺炎患者の血液由来 NtHi 1 株について SEM による菌体の形態を観察した結果、3 株間で形態に違いがあること、粘液性物質を有する NtHi 株があることが示唆された。Hib ワクチン接種歴を有する Hib による侵襲性感染症患者 8 例のうち、6 例が 1 回接種歴、1 例の髄膜炎患者と 1 例の菌血症患者が 3 回接種歴を有していた。薬剤感受性

については、調査初期の 2007-2008 年頃に比べ、2009 年以降アンピシリン耐性 β -lactamase 非産生株が増加傾向を示したが、ワクチン普及時期とは一致していない。アンピシリン/スルバクタム、ピペラシリン、メロペネム、セフォタキシムならびにセフトリアキソンの感受性菌の割合は、調査した 3 期間で大きな変化を認めなかった。

関連資料：

「細菌性髄膜炎（髄膜炎菌性髄膜炎をのぞく）検査マニュアル」を国立感染症研究所ホームページに掲載した。

F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1、侵襲性 *Haemophilus influenzae* 感染症（全症例）の臨床分離株における莢膜型別解析の結果

	ワクチン 未導入	任意接種 開始後	任意接種開始 後(補助金開 始後)
期間	2007.6~ 2008.11	2008.12~ 2010.12	2011.1~ 2013.3
b型	95.8% (69/72)	97.4% (154/158)	83.0% (68/82)
非b型 (全てNon- typable <i>H.</i> <i>influenzae</i>)	4.2% (3/72)	2.5% (4/158)	17.0% (14/82)

注) 症例数で集計した。髄膜炎患者の咽頭スワブ由来株を除く。