

とに区別した。肺炎球菌の莢膜型はSerum Institute（デンマーク）より購入した型別用抗血清を用いて型別を行った。

両菌種における薬剤耐性遺伝子の解析は、私どもが開発したreal-time PCR用キット（タカラバイオ㈱）を用いて行った。

（倫理面への配慮）

菌株収集に際しては、各症例担当の主治医に対し、i) 患者家族に対して分離された菌株の精査を他の施設で実施すること、ii) 理由は治療抗菌薬が適切であるか否か解析していただき、至急確認したいこと、iii) その成績を自施設の成績と併せて治療上の参考にしたいこと、等のインフォームドコンセントを実施した旨の文書を菌株とともに送付を受けた。

なお、菌株等の受領の際には、症例の個人情報に配慮し、イニシャルのみとして個人が特定できないよう連結不可能匿名化を行うとともに、データ保管には十分な配慮が払われた。

## C. 研究結果

### 1. インフルエンザ菌

侵襲性感染症由来のインフルエンザ菌として送付を受けたのはわずかに4株であった。いずれの発症例も4歳以上であり、そのうちの2例は重篤な基礎疾患を有していた症例であった。

すべてが無莢膜型のNTHi株であった。これらの症例はHibワクチンの接種を受けていたが、接種回数は1回のみであった。

起炎菌の薬剤感受性は、遺伝子学的には3株が

BLNARであった。

### 2. 肺炎球菌

図1には、2013年4月から12月までの間に、小児・成人の侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）由来株として肺炎球菌の送付を受けた53例の年齢分布を示す。小児が38例でそのうちの63.2%は1歳以下であった。成人例はすべてが50歳以上であった。

小児のIPD由来株（n=38）の莢膜型と耐性遺伝子型との関係は図2に示す。PCV7に含まれる莢膜型によって発症していた症例は2例のみであった。そのうちの1例（莢膜型6Bによる発症）は9歳児でPCV7未接種例、残り1例は莢膜型23F菌による1歳児例、3回の接種を受けていた。

残りの36例はすべてPCV7に含まれない莢膜型（non-vaccine type：NVT）による発症であった。

最も多かった莢膜型は、PCV13に含まれる19A型の9例、次いで15A,15B,35B, その他であった。定期接種の肺炎球菌ワクチンとして切り替えられたPCV13による発症例の割合は36.8%に過ぎず、その他はすべてNVTであったことが注目された。つまり、収集株全体においてはワクチンでは感染が防げないNVTの割合が急速に増加していたことになる。

これらのNVTの中で症例数が多かった15A,35Bの多くは、遺伝子学的（genotype）ペニシリン耐性菌（PRSP）であった。

図3には、それらの株のマクロライド系薬耐性遺伝子の保持状況を示す。Sはマクロライド耐性遺伝子を保持しない肺炎球菌、mefAは菌体内へ取り込まれたマクロライド系薬を異物として認識

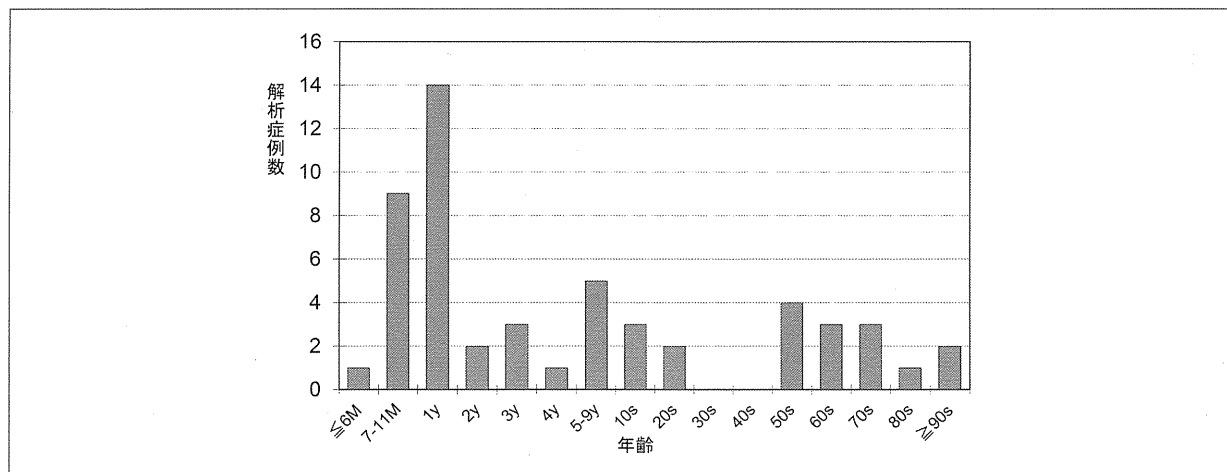


図1 2013年：侵襲性肺炎球菌感染症例（n=53）の年齢分布

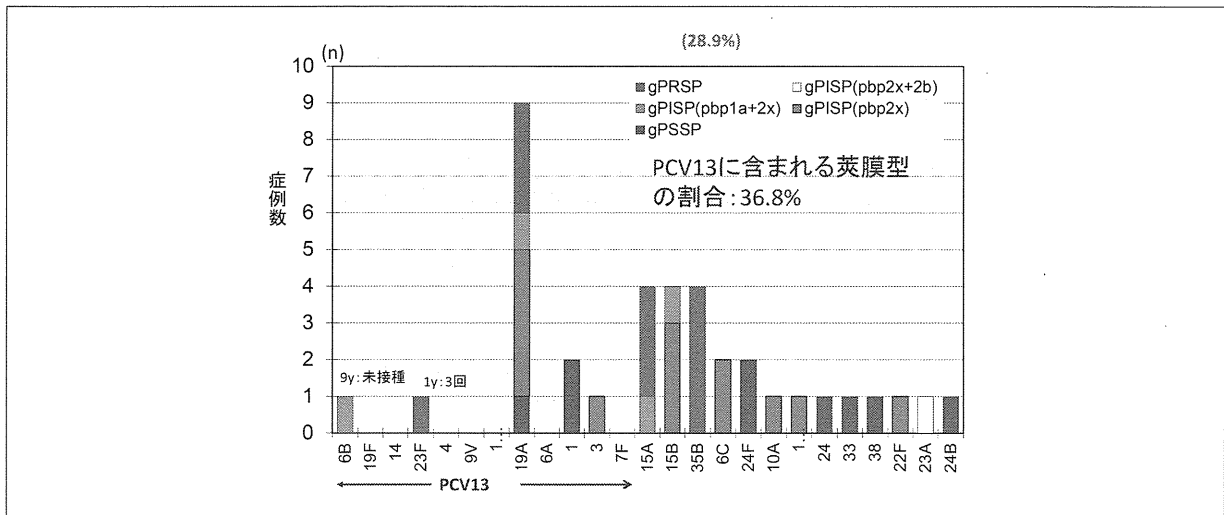


図2 2013年：小児由来株 (n=38) の莢膜型とβ-ラクタム系薬耐性

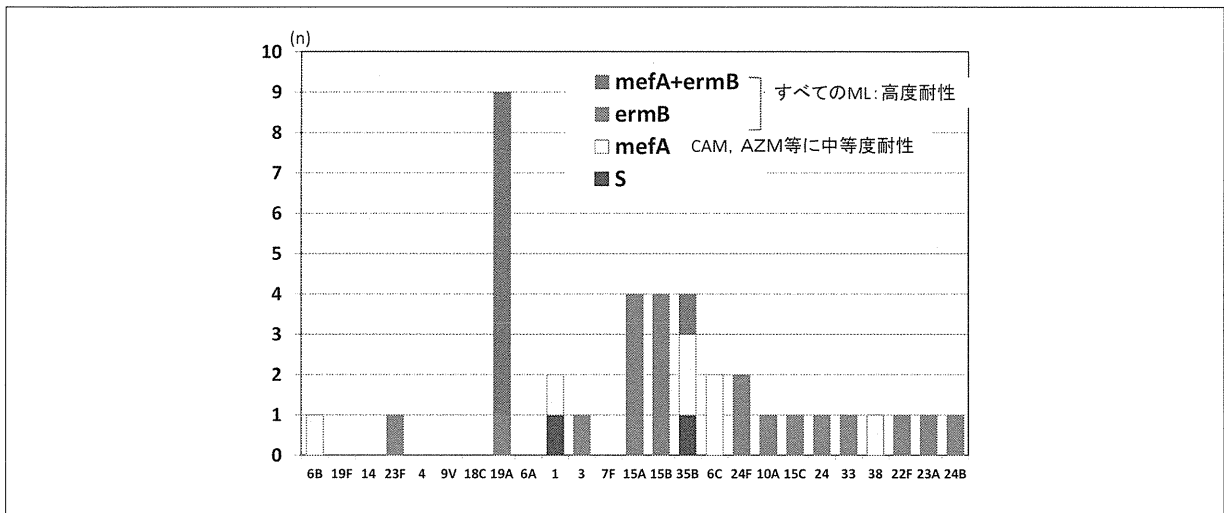


図3 2013年：小児由来株 (n=38) の莢膜型とマクロライド系薬耐性

して菌体外へ排出する遺伝子、ermBはマクロライド系薬の作用標的である23S rRNAをメチル化する酵素をコードする遺伝子を示す。前者はCAMやAZMに中等度耐性 (MICは2-16μg/ml)、後者はすべてのマクロライド系薬に32μg/ml以上の高度耐性を付加する。

#### D. 考察

急速に増加した19Aはマクロライド系薬耐性遺伝子のmefAとermBの両方を保持する高度耐性菌であった。また、15Aや15BもermB保持の高度耐性菌であり、その他のNVTも2株を除いてマクロライド系薬耐性遺伝子保持株であることが注目された。

図4には、PCV7の導入前の2010年と補助金事

業が開始された2年後におけるワクチン接種対象年齢における発症例の相対的増減率を示す。PCV7による発症例は有意に減少し、特に化膿性髄膜炎の起炎菌として多かった莢膜6Bの減少が著明であった。

他方、PCV7ではカバーできない19A, 15A, 15B, 15C, 24型が有意に増加していた。

成人のIPD由来株は15菌株のみであった。それらの莢膜型とβ-ラクタム系薬耐性との関係は図5に示す。

gPRSPは2株のみで、それ以外はセフェム系薬に軽度耐性を示すpbp2x変異株 (gPISP) とgPSSP株が主であった。PPV23に含まれる莢膜型の割合は73.3%であった。PCV13に含まれる莢膜型の割合は33.3%であった。

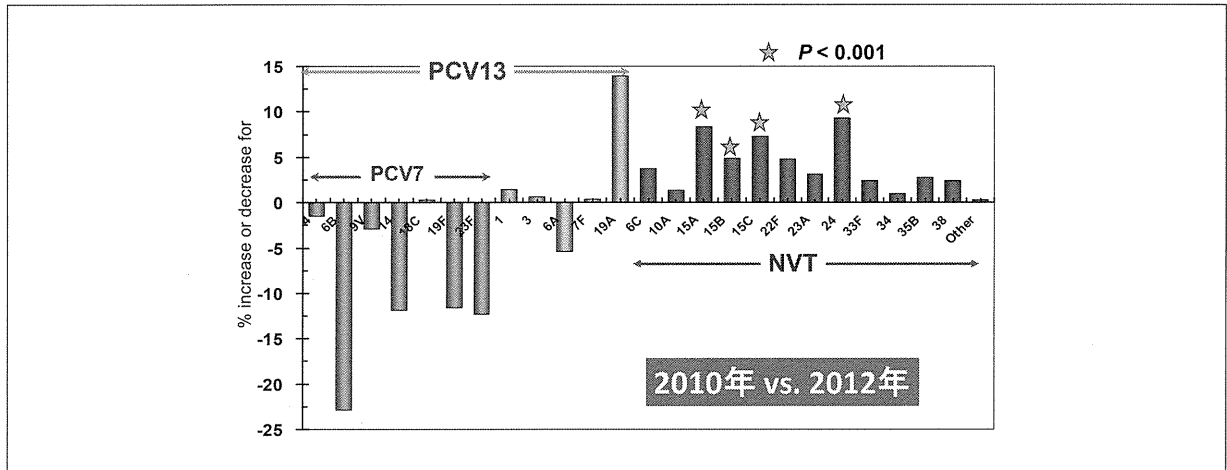


図4 小児における各莢膜型の相対的増減率 (< 5歳)

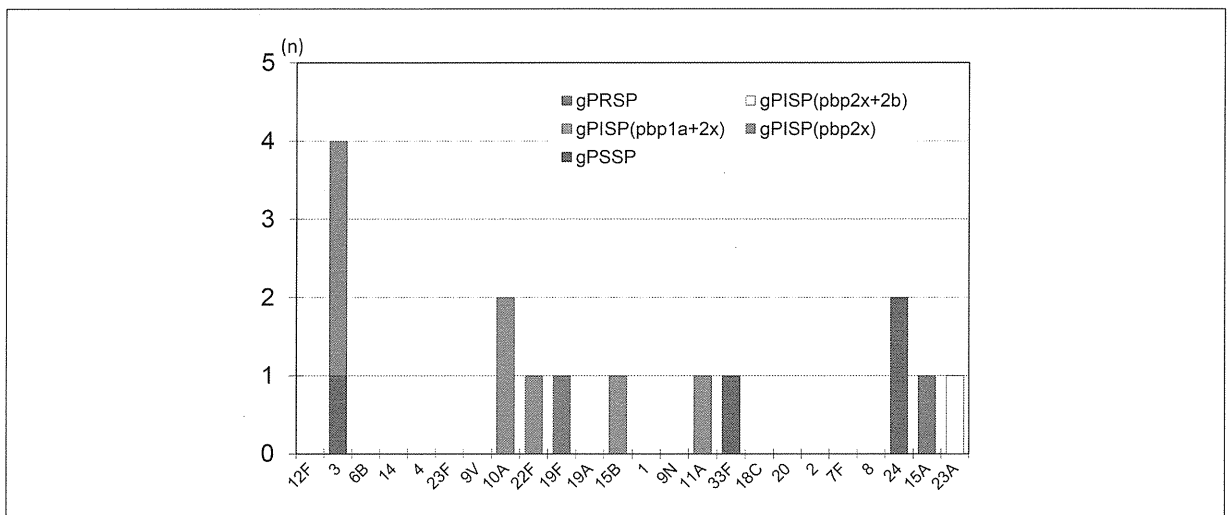


図5 2013年：成人由来株 (n=15) の莢膜型とβ-ラクタム系薬耐性

#### D. 考察

生後3ヶ月以降の乳幼児における小児化膿性髄膜炎の原因菌としては、インフルエンザ菌 (Hib) が60-65%、肺炎球菌が30%前後を占め、最も重要であった。しかし予後不良例が多く、救命しなくても生涯にわたって援助が必要になる例も多かった。このような背景から世界の多くの国においてHibワクチンや肺炎球菌のPCV7が定期接種化され、その効果が明らかにされていた。

わが国においては、2010 (H22) 年末に施行された「ワクチン接種緊急促進補助金事業」によって小児に対するHibとPCV7接種への公的助成が始まり、その接種率が急速に高まった。接種率は2011年が50-60%、2012年は90%以上と推定されている。加えて2013年度にはPCV7の定期接種化、同年暮れにはPCV7からPCV13へと切り替えられ

た。

結果に示したように、健常児に発症するHib感染症例は、ほぼ無くなったと推定される。侵襲性感染症例は何らかの基礎疾患を有する児で、しかも莢膜b型ではない無莢膜型のインフルエンザ菌によって発症していた。

一方、肺炎球菌によるIPD感染症の予防としてPCV7の導入が期待されていた。しかし、PCV7やPCV13は94種が知られる莢膜型の中で優位な莢膜型のみが対象とされ、作製されている。このため、ワクチン接種による急速な市井 (環境) 中の肺炎球菌の変化は、ワクチン効果に影響すると思われる。結果に示したように、PCV13でカバーできる症例の割合は35%と減少している。成人に対するPPV23のカバー率も70%である。

しかし、ワクチンによって化膿性髄膜炎を惹起

する6Bが激減したこと、PRSPが半減したことは明らかである。しかしPCV13で予防できないNVT型の中にPRSPが増加していること、さらにはPSSPであってもマクロライド系薬耐性であることが注目され、おそらく今後これらのNVTが増加すると思われる。今後ともその動向を継続的に調べていく必要がある。

そして、将来的には肺炎球菌に共通する抗原を用いた新たなワクチン開発が必要である。

## E. 結論

市中で発症する化膿性髄膜炎を含む侵襲性感染症の原因菌として、最も重要なインフルエンザ菌(Hib)と肺炎球菌に対するHibワクチン、PCV7あるいはPCV13、成人に対するPPV23の現状を明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, The Working Group of Nationwide Surveillance for Bacterial Meningitis : Longitudinal surveillance of Haemophilus influenzae isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. J Infect Chemother. 19 : 34-41, 2013.
- 2) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, Wajima T, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K, and 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. 19 : 308-315, 2013.
- 3) Morozumi M, Chiba N, Okada T, Sakata H, Matsubara K, Iwata S, Ubukata K : Antibiotic susceptibility in relation to genotype of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Mycoplasma pneumoniae responsible for community-acquired pneumonia in children. J Infect Chemother. 19 : 432-440, 2013.

- 4) Morozumi M, Wajima T, Kuwata Y, Chiba N, Sunaoshi K, Sugita K, Sakata H, Iwata S, Ubukata K. Associations between capsular serotype, multilocus sequence type, and macrolide resistance in Streptococcus agalactiae isolates from Japanese infants with invasive infections. Epidemiol Infect. 18 : 1-8, 2013.
- 5) Wajima T, Morozumi M, Chiba N, Shouji M, Iwata S, Sakata H, Ubukata K. Associations of macrolide and fluoroquinolone resistance with molecular typing in Streptococcus pyogenes from invasive infections, 2010-2012. Int J Antimicrob Agents. 42 : 447-449, 2013.
- 6) 生方公子. Control of pneumococcal infection in the vaccine Era. Physicians Therapy Manual 5 : 3-4, 2013.
- 7) 生方公子. 侵襲性肺炎球菌感染症. 日本臨床 24 : 57-60, 2013.

### 2. 学会発表

- 1) Chiba N, Shouji M, Morozumi M, Wajima T, Iwata S, Ubukata K. Impact of the introduction of 7-valent conjugate vaccine for children on Invasive Pneumococcal Diseases in Adults in Japan. 53回ICAAC (米国 Denver, 9月)
- 2) 生方 公子. グラム陽性球菌とマイコプラズマにおける耐性化とそのメカニズム. シンポジウム1 : 始まった市中型感染症原因菌の逆襲. 第86回日本細菌学会総会、2013年3月29日(千葉)
- 3) 生方 公子. 細菌性髄膜炎の遺伝子診断. シンポジウム3-8 : 中枢神経系感染症の遺伝子診断の進歩. 第54回日本神経学会学術大会、2013年5月31日(東京)
- 4) 千葉菜穂子, 荘司路, 諸角美由紀, 輪島丈明, 生方公子. 成人における侵襲性感染症由来肺炎球菌の分子疫学解析. 第87回日本感染症学会学術集会, 2013年6月5日(横浜)
- 5) 生方 公子. 外来診療で診る機会の多い呼吸器系感染症原因菌におけるワクチン導入後の変化. 小児科耳鼻咽喉科感染症フォーラム～

小児の呼吸器感染症治療を考える～（特別講演），2013年9月28日（京都）

- 6) 千葉 菜穂子, 岩田 敏, 生方 公子. 第62回東日本感染症学会地方会, 2013年10月（東京）
- 7) 生方 公子. 肺炎球菌ならびにインフルエンザ菌感染症のPCV7・Hib導入後における急速な変化. 第46回小児呼吸器学会, 2013年11月（佐賀）

- 7) 千葉 菜穂子, 岩田 敏, 生方 公子. 小児における侵襲性感染症由来肺炎球菌の分子疫学解析（2010年-2012年）. 第17回日本ワクチン学会, 2013年11月（三重）

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 肺炎球菌結合型ワクチン導入前後の小児市中肺炎由来肺炎球菌の血清型と 薬剤感受性に関する研究

研究分担者：石和田 稔彦（千葉大学医学部附属病院講師）

**研究要旨** 肺炎球菌結合型ワクチンの小児市中肺炎に対する効果をはかる目的で、7価結合型ワクチン（PCV7）導入前後の千葉市内在住者の小児市中肺炎入院罹患率調査と、肺炎例から分離された肺炎球菌の血清型・薬剤感受性について調査を行った。PCV7導入後、5歳未満の市中肺炎入院罹患率は有意に低下しており、特にPCV7に含まれる肺炎球菌による肺炎が減少していた。肺炎球菌結合型ワクチンは、乳幼児の市中肺炎予防に有効であることが示唆された。

### A. 研究目的

7価肺炎球菌ワクチン（PCV7）導入前後で、小児市中肺炎罹患率、肺炎症例から分離された肺炎球菌の血清型及び薬剤感受性に変化が認められたかどうかを検討し、PCV7導入効果をはかる。

### B. 研究方法

2008年4月～2009年3月（導入前）および2012年4月～2013年3月（導入後①）2013年4月～9月（導入後②）の期間に、千葉市在住者で市中肺炎で入院した16歳未満の患者数を調査票により、集計した。また、同時に千葉市内の小児科5施設に市中肺炎で入院した16歳未満小児の血液、あるいは喀痰より有意に分離された肺炎球菌に関して、莢膜膨化試験により血清型を、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を行い比較した。

（倫理面への配慮）

研究は千葉大学倫理委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

ワクチン導入後、5歳未満小児市中肺炎罹患率は有意に低下していた。5歳以上の罹患率は、導入後①の時期には、マイコプラズマ感染症の流行があり上昇していたが、導入後②の時期には、導入前と同程度に低下していた。

肺炎球菌の血清型・薬剤感受性に関しては、導入前の57株では、PCV7含有血清型は62.5%あり、PcG・CTX・TBPM・TFLXのMIC50（ $\mu\text{g/ml}$ ）は、

0.5・0.5・0.015・ $\leq 0.12$ であった。導入後の38株では、PCV7含有血清型は16.1%であり、PcG・CTX・TBPM・TFLXのMIC50（ $\mu\text{g/ml}$ ）は、0.25・0.25・ $\leq 0.008$ ・0.25であった。

### D. 考察

PCV7導入後、PCV7含有血清型は減少しており、 $\beta$ ラクタム系抗菌薬の薬剤感受性は改善傾向が認められたが、TFLXの薬剤感受性はわずかながら低下を認めた。ワクチンの普及と共に抗菌薬の適正使用を進めていくことが、小児市中肺炎の管理においても重要であることが示唆された。

### E. 結論

肺炎球菌結合型ワクチンは、日本において乳幼児の市中肺炎予防に有効である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Oikawa J, Ishiwada N, Takahashi Y, Hishiki H, Nagasawa K, Takahashi S, Watanabe M, Chang B, Kohno Y. Changes in nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* among healthy children attending a day-care center official financial support for the 7-valent pneumococcal

conjugate vaccine and Haemophilus influenzae type b vaccine in Japan. J Infect Chemother. (In press)

- 2) 石和田稔彦 細菌性髄膜炎予防ワクチン定期接種化のインパクトを考える 小児耳鼻咽喉科 34 : 61-66, 2013
- 3) 石和田稔彦 予防接種法改正 予防接種とワクチンの現状 小児肺炎球菌 小児科 54, 1715-1720, 2013

## 2. 学会発表

高橋 幸子, 常 彬, 田中 純子, 菱木 はるか, 高橋 喜子, 及川 純子, 長澤 耕男, 静野 健一, 石和田 文栄, 星野 直, 会沢 治朗, 石和田 稔彦 肺炎球菌ワクチン・新規経口抗菌薬導入前後の小児市中肺炎由来肺炎球菌の血清型と薬剤感受性第46回日本小児呼吸器学会 佐賀2013年11月

## 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

## 北海道の小児期細菌性髄膜炎の発症動向

研究分担者：富樫 武弘（札幌市立大学特任教授）  
研究協力者：堤 裕幸（札幌医科大学小児科教授）  
坂田 宏（旭川厚生病院小児科）  
生方 公子（北里大学生命科学研究所教授（現慶応大学医学部感染症学教室））  
石黒 信久（北海道大学病院感染制御部教授）  
高橋 俊司（市立札幌病院検査部）

**研究要旨** 2007年（平成19年）～2012年（平成24年）にひき続き2013年（平成25年）も北海道の小児期細菌性髄膜炎の発症動向を調査した。わが国では平成20年12月からHibワクチン、平成22年2月から7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）が市販されたが、任意接種ワクチンであったため接種率が低かった。しかし平成23年度から「子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進」事業によるHibワクチン、小児用肺炎球菌ワクチンに対する公費助成によって接種率が急速に上昇して、平成23年12月には90%を超えた（1歳未満児）。また平成25年4月から定期接種化され両ワクチンの接種率はさらに向上した。北海道では平成25年1～12月までの1年間インフルエンザ菌による髄膜炎の発症は1例、肺炎球菌による髄膜炎は1例（PCV7ワクチン既接種の1歳3ヵ月男児、血清型19F）と減少した。平成25年12月からは7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）は13価ワクチン（PCV13）に全国一斉に変更された。

### A. 研究目的

Hibワクチン、小児用肺炎球菌ワクチンの接種率が向上することにより、両ワクチンの対象疾患である小児期細菌性髄膜炎の発症が減少するか否かを知ることを目的とする。

両ワクチンの登場以前は、わが国で小児期に発症する細菌性髄膜炎の起因菌は常に第1位Hibで第2位が肺炎球菌である。この研究は医療圏が独立している北海道を調査対象として、ワクチン登場前後の小児期細菌性髄膜炎の発症状況を比較することによってワクチンの予防効果を検証することを目的とした。

### B. 研究方法

平成19年から毎年北海道内で小児科医が常駐しかつ入院施設を擁する病院（59病院）の小児科医長に目的を説明して協力をお願いした。内容は平成25年1月1日から12月31日までに発症した細菌

性髄膜炎患者の背景調査と起因菌調査である。脳脊髄液から細菌が分離された場合、細菌検査室を持つ施設では細菌を増菌し、外注する施設には外注業者によって増菌して、あらかじめ送付してあった返送用容器と症例表の返送を依頼した。細菌学検査はすべて北里大学で行った。インフルエンザ菌のb型の判別はHib遺伝子の解析と抗血清を用いた凝集試験によった。使用したキットはPASTEREXTMMeningitis（BIO-RAD、France）である。肺炎球菌の血清型はPneumococcus antisera（Statens Serum Institute、Denmark）、B群溶連菌の血清型はGBS型用免疫血清（デンカ生研）を用いて行った。平成25年にPCV7被接種者に発症した肺炎球菌の血清型およびオプソニン活性価は国立感染症研究所で行った。（倫理面への配慮）

患者検体提供に関して病院内倫理委員会の審査を要するとの返答のあった施設には研究の趣旨を



説明し、症例を記号化するなどの旨を説明して委員会の承認を得た。

### C. 研究結果

平成25年1月1日から12月31日に北海道内2病院から報告された細菌性髄膜炎は2例であった。起因菌はHibが1例（3歳7ヵ月男児、軽快アクトヒブ®未接種）、肺炎球菌が1例（1歳3ヵ月男児、軽快、7価プレベナー®3doses接種、血清型19F）であった。平成19年から25年までの北海道内で発症した細菌性髄膜炎を起因菌、予後、発症年齢を示す（表1、図1、図2、表2）。北海道の5歳未満児10万人あたりの細菌性髄膜炎の発症数はインフルエンザ菌で5.7/年（平成19-23年）が25年は0.5/年、肺炎球菌で1.7/年（平成19-23年）が25年は0.5/年であった。

平成23年12月の5歳未満児のHibワクチンと7価肺炎球菌ワクチンの接種率はそれぞれ44.8%、54.2%であり7ヵ月未満児の接種率はそれぞれ94.5%、92.1%（札幌市調べ）であり、24、25年の1歳未満児の両ワクチンの接種率はいずれも95%を超えていた。

### D. 考察

筆者らはHibワクチン（アクトヒブ®）と7価肺炎球菌結合型ワクチン（プレベナー®）の予防効果を知るために、両ワクチンの発売前後のHib

と肺炎球菌を起因菌とする細菌性髄膜炎の発症頻度調査を計画した。北海道は医療圏が独立していることから人口あたりの発症頻度を計算ことが可能である。この計画は平成18年秋に北海道内の小児科医師が常駐しており、入院病室を持つ64施設（平成20年以後は59施設）に協力を求め了解を得た。これらの施設にあらかじめ細菌を送る容器と症例用紙を送付しておき、平成19年1月1日以後に発症した細菌性髄膜炎の起因菌と症例表を収集した。各施設から症例報告があった場合には容器と症例表を追加送付した。細菌学検査は一括北里大学で行った。

この結果平成19-23年の5年間に発症したインフルエンザ菌による髄膜炎は60例（年平均12例）で、肺炎球菌による髄膜炎は20例（年平均4例）であったが、平成24年にはそれぞれ0、1例、平成25年にはそれぞれ1、1例となった。Hibは肺炎球菌とともに乳幼児の咽頭に常在菌として存在し、一部の乳幼児が菌血症を経て髄膜炎を発症する。環境からHibや肺炎球菌を無くするにはワクチンの接種率を高めて集団免疫効果を得る必要がある。平成23年、24年度は「子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業」によって、さらに25年4月からは定期接種としてHib、肺炎球菌ワクチン接種が公費負担となったことと、同時接種を含めて乳児期早期からの両ワクチン接種を勧奨した全国の小児科医の努力により1歳未満児の接種率が上昇した。

表1 細菌性髄膜炎の起因菌別発症数と予後

	症例数	インフルエンザ菌	肺炎球菌	GBS	大腸菌	その他
2007年	21	11	6 水頭症 1 高度難聴 1	2	1	1 水頭症 1
2008年	18	13 高度難聴 1	1 神経後遺症 1	2 神経後遺症（尿崩症） 1	1	1
2009年	19	12 高度難聴 2	4	1 神経後遺症 1	2	
2010年	18	13 死亡 1 神経後遺症 1	4	0	1	
2011年	18	11	5 難聴 1	1	1	
2012年	2	0	1 死亡 1	1	0	0
2013年	2	1	1	0	0	0
	98	61	22	7	6	2

北海道、2008年1月-2013年12月

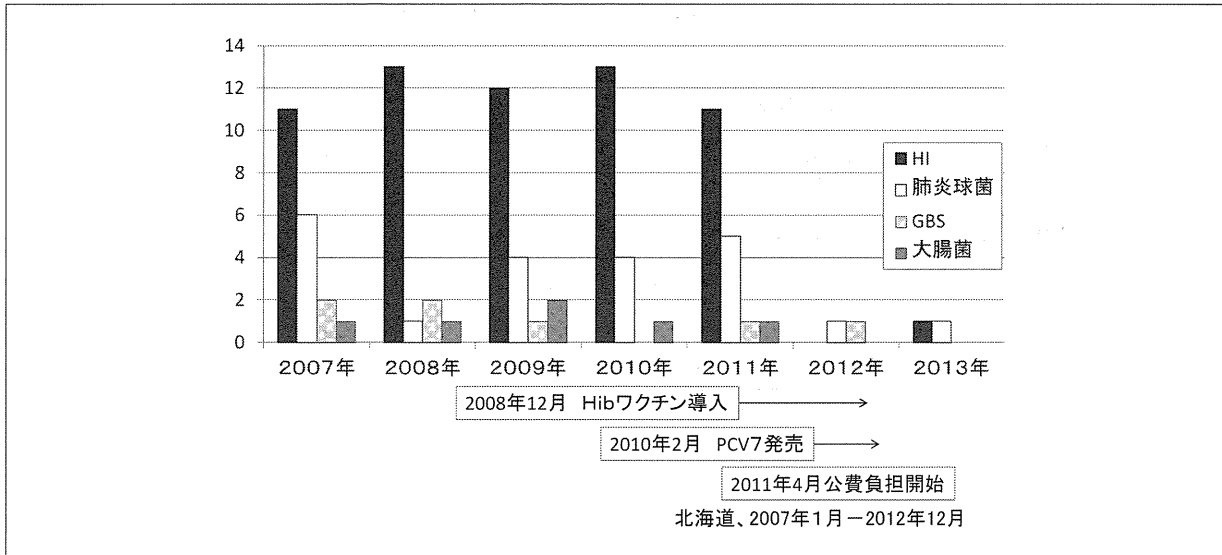


図1 細菌性髄膜炎の起因菌別分布

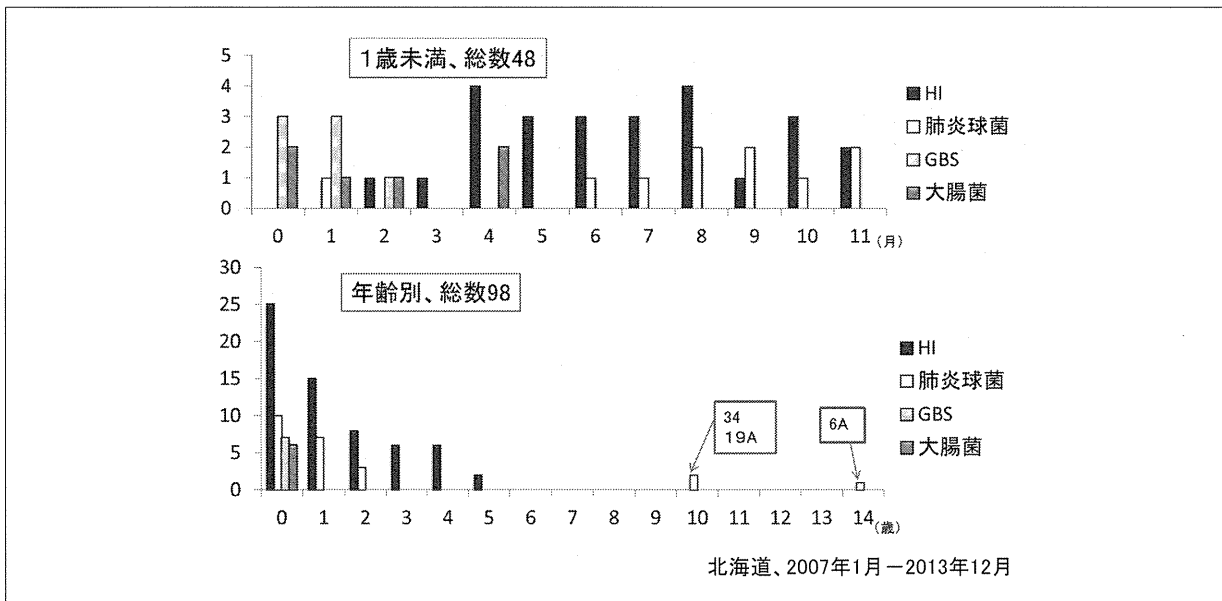


図2 細菌性髄膜炎の起因菌別年齢分布

この結果北海道においても平成24年、25年のインフルエンザ菌による髄膜炎がそれぞれ0、1例、肺炎球菌による髄膜炎がそれぞれ1、1例へと減少したものと考えられる。

またこの6年間に北海道で脳脊髄液から分離された肺炎球菌19株の血清型をみると、13/19 (68.4%) が7価肺炎球菌ワクチン (PCV7) に含まれる血清型であった。さらに6A1株、19A2株を加えた16/19 (84.2%) が平成25年12月から採用された13価肺炎球菌ワクチン (PCV13) に含まれる血清型であった (表3、図3)。平成22年に分離された2株の血清型は19Aであり、この血

清型はPCV7の普及した欧米で近年分離数が増大している。このことからわが国のPCV13への変更は必須であった。

### E. 結論

平成25年に北海道で発症した小児細菌性髄膜炎を報告した。発症数は2例でワクチン未接種の3歳7ヵ月男児1例 (Hib、軽快)、PCV7 3 doses 接種済みの1歳3ヵ月男児 (肺炎球菌血清型19F、軽快) であった。平成23年まで常に起因菌の第1、2位を占めていたインフルエンザ菌、肺炎球菌によるものはそれぞれ1例であった。Hib、7価肺

表2 細菌性髄膜炎の細菌学的検査所見

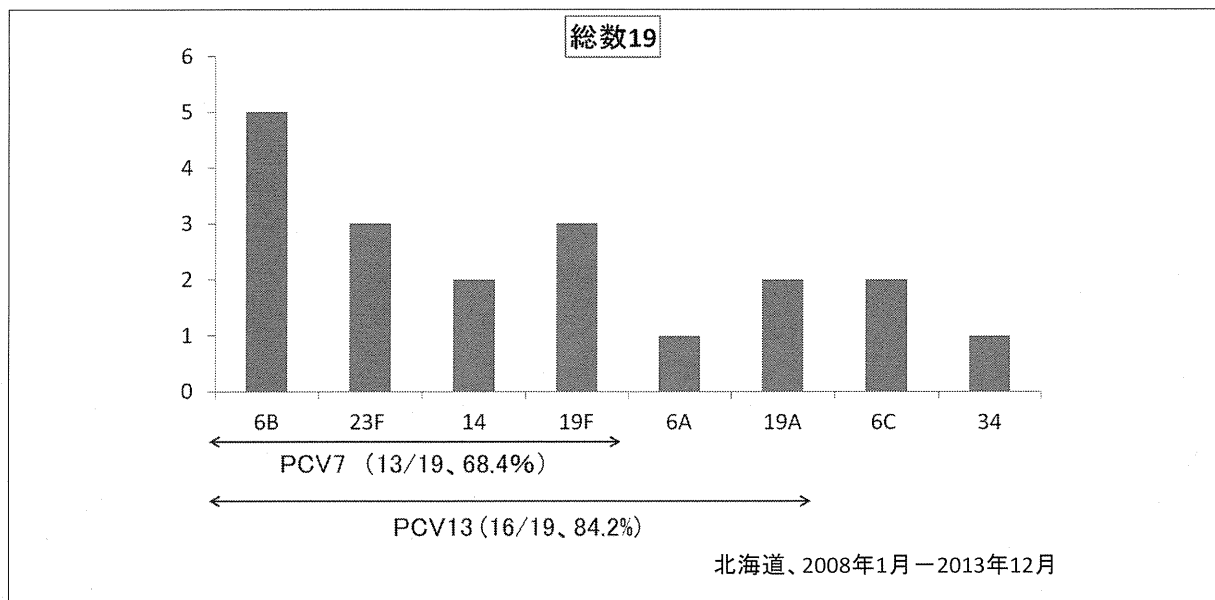
◆インフルエンザ菌 b型 54/55, 98.2%	
gBLNAR	31株
gLow-BLNAR	7株
gBLPAR	2株
gBLPACR- I	3株
gBLPACR- II	6株
gBLNAS	1株
◆肺炎球菌 PCV7(13/19) PCV13(16/19)	
6A (gPISP,PCV13含有)	1株
6B (gPRSP4株,gPISP1株,PCV7含有)	5株
6C (gPISP)	2株
14 (gPISP,PCV7含有)	2株
19A (gPISP1株,gPSSP1株,PCV13含有)	2株
19F (gPISP,PCV7含有)	3株
23F (gPRSP,PCV7含有)	3株
34 (gPSSP)	1株
◆GBS	I b,III,IV,V
◆髄膜炎菌	Y/W135

北海道、2008年1月－2013年12月

表3 肺炎球菌血清型の推移

	6B	23F	14	19F	6A	19A	6C	34
2007年	4	1		1	1			1
2008年	1	1						
2009年	3	2		1				
2010年	4		2			2		
2011年	5	1	2				2	
2012年	1	1						
2013年	1			1				
	19	5	3	2	3	1	2	2

北海道、2007年1月－2013年12月



北海道、2008年1月－2013年12月

図3 肺炎球菌血清型別頻度

炎球菌ワクチンの接種率向上（特に乳児期早期からの）の成果と考えられる。

## F. 研究発表

- 1) 富樫武弘、坂田 宏、堤 裕幸、生方公子。  
細菌性髄膜炎患者のヒブワクチン、小児用肺炎球菌ワクチン普及前後の比較。日本小児科学会雑誌117(11) : 1767-1774, 2013
- 2) Takehiro Togashi, Masako Yamaji, Allison Thompson, et al Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate

vaccine in healthy infants in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32(9) : 984-989, 2013

- 3) Riko Nakamura, Takehiro Togashi. Population-based incidence of invasive *Haemophilus Influenzae* and pneumococcal diseases before the introduction of vaccines in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32(12) : 1394-1396, 2013

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 7. 百日咳

## ワクチン抗原パートクチンを欠損する百日咳流行株の解析

研究分担者：蒲地 一成（国立感染症研究所細菌第二部室長）

研究協力者：宮地 悠輔（国立感染症研究所細菌第二部協力研究員）

大塚 菜緒（国立感染症研究所細菌第二部主任研究官）

**研究要旨** 近年、世界的にワクチン抗原パートクチン（Prn）を欠損する百日咳菌が出現し、ワクチン有効性との関係が論議されている。本研究ではPrn欠損株の出現理由を考察するため、Prn欠損に抗菌薬の選択圧が関与するという作業仮説について実験的検証を行った。Prn修復株（Prn<sup>+</sup>-BP59Sm）を各種抗菌薬（アミノグリコシド、ニューキノロン、マクロライド系）の存在下で継代培養し、PCRによりPrn欠損株を検索したところ、Prn欠損株の存在を示す*prn*欠損遺伝子（*prn*ΔSS）はすべての抗菌薬で検出されなかった。このことから、Prn欠損株の出現に上記抗菌薬が関与する可能性は低いと考察された。

### A. 研究目的

百日咳は百日咳菌（*Bordetella pertussis*）の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、ワクチン予防可能疾患（VPD）の一つに含まれる。わが国では1950年代に全菌体百日せきワクチン（wP）、1981年に無細胞百日せきワクチン（aP）が導入され、ワクチンの普及とともに患者数は激減した。しかし、近年わが国を含む多くの先進国で青年・成人患者の増加が認められ、これら保菌者が乳幼児への感染源となることが問題となっている。

百日咳再興の原因として、精製百日せきワクチンの免疫持続期間が4～12年と短いことが挙げられる。また、百日咳流行株には遺伝子的な変化が認められており、これが流行の一因である可能性も指摘されている。事実、近年の百日咳菌にはワクチン抗原パートクチン（Prn）を欠損する流行株が出現し、ワクチン有効性との関係が議論されている。Prnは菌体表面に局在する定着因子であり、わが国では1997年に初めてPrn欠損株が臨床分離され、近年では臨床分離株の約3割を占めるようになっている。

Prn欠損株は米国、フランスなど欧米でも出現が確認されているが、その出現理由はいまだ不明

のままである。欧米では精製百日せきワクチンの導入後にPrn欠損株が出現したことから、ワクチン選択圧が関与する可能性が指摘されている。また、その他の可能性として抗菌薬による選択圧が挙げられる。2000年以降、百日咳菌にはマクロライド耐性株ならびにキノロン低感受性株が見出されていることから、本菌が常時抗菌薬の選択圧を受けていることが推察される。なお、DNAジャイレース（GyrB）の阻害剤であるクーママイシン（CMRM）は*prn* mRNAの過剰発現を引き起こすことが報告されている（Graeff-Wohlleben et al., Mol Gen Genet, 1995）。以上の背景を踏まえ、本研究では上記の作業仮説、すなわち抗菌薬の選択圧がPrn欠損に与える影響について検証を行った。

### B. 研究方法

菌株：Prnの欠損遺伝子（*prn*ΔSS）を修復したPrn修復株（Prn<sup>+</sup>-BP59Sm株）を供試した。本株はシグナル配列中の84 bp欠失を相同組換えにより相補したものであり、成熟型のPrn蛋白質を発現する（Otsuka et al., PLOS ONE, 2012）。なお、親株であるPrn欠損株（Prn<sup>-</sup>-BP59Sm）とPrn修復株（Prn<sup>+</sup>-BP59Sm株）を共培養すると、Prn欠

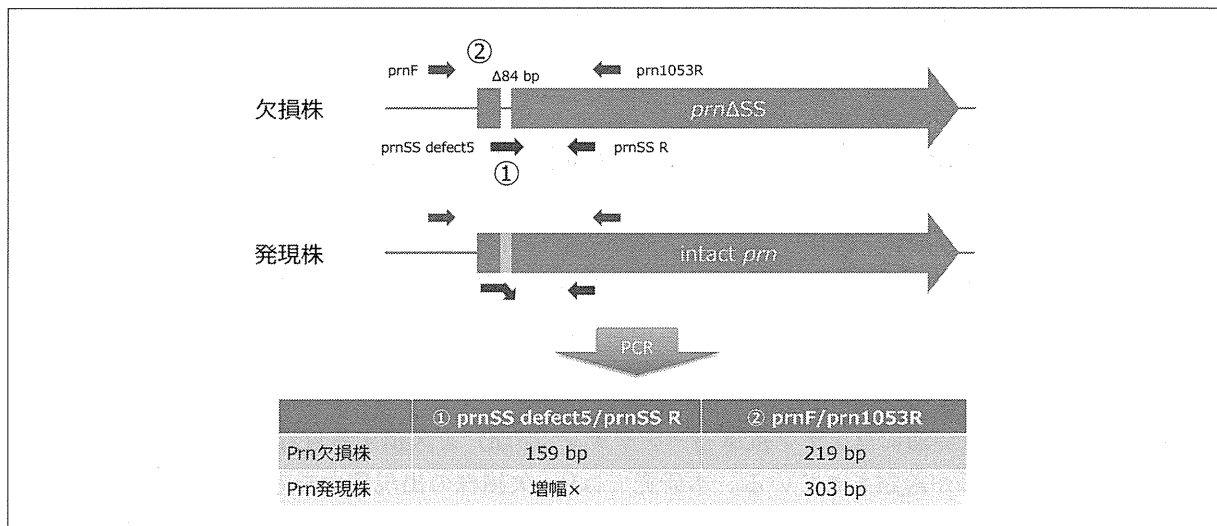


図1 PCRを用いたPrn欠損株 (*prn*ΔSS) の検出法

プライマーセットprnSS defect5/prnSS RはPrn欠損株の*prn*ΔSSを特異的に増幅する (159 bp)。一方、プライマーセットprnF/prn1053Rは欠損株と発現株の両者を増幅する (欠損株 219 bp、発現株 303 bp)。

表1 Prn修復株 (Prn<sup>+</sup>-BP59Sm) に対する各種抗菌薬のMICと選択圧濃度

薬剤	分類	標的分子	MIC (μg/mL)	選択圧濃度(μg/mL)
ストレプトマイシン(SM)	アミノグリコシド系	リボソーム	≥100	30
アルベカシン(ABK)	アミノグリコシド系	リボソーム	0.625	0.1
ノルフロキサシン(NF)	ニューキノロン系	DNA ジヤイレーズ	0.156	0.1
エリスロマイシン(EM)	マクロライド系	リボソーム	0.031	0.01
クーママイシン(CMRM)	GyrB 阻害剤	DNA ジヤイレーズ	0.0125	0.005

CMRM は *pm* mRNA を過剰発現させることが報告されている (Graeff-Wohlleben et al., Mol Gen Genet, 1995)

損株が優位となることが確認されている。

Prn欠損株の検出法：Prn欠損株の*prn*ΔSS遺伝子は2種類のPCRにより検出を行った (図1)。プライマーセットprnSS defect5/prnSS Rは欠損株を特異的に検出し (増幅産物159 bp)、一方、プライマーセットprnF/prn1053Rは欠損株 (219 bp) と発現株 (303 bp) の両者を検出するように設計した。PCR産物は3%アガロースゲルを用いて解析した。

薬剤選択圧：アミノグリコシド系抗菌薬としてストレプトマイシン (SM)、アルベカシン (ABK)、ニューキノロン系抗菌薬としてノルフロキサシン (NF)、マクロライド系抗菌薬としてエリスロマイシン (EM)、GyrB阻害剤としてCMRMを供試した。上記抗菌薬のPrn<sup>+</sup>-BP59Sm株に対するMIC濃度と選択圧濃度を表1に示した。

薬剤選択：Prn<sup>+</sup>-BP59Sm株をmodified SS培地 (2 ml) で36°Cで2日間振盪培養した後、10 μlの菌液を抗菌薬添加mSS培地 (2 ml) に移植した (図

2、抗菌薬の選択濃度は表1)。再度36°Cで2日間培養した後、10 μlの菌液を新しい抗菌薬添加mSS培地で培養した。抗菌薬添加mSS培地を用いて計4回継代培養した後、菌液 (100 μl) を煮沸することによりDNAを抽出した。DNA抽出液は蒸留水を用いて20倍希釈し、上記のPCR解析に供試した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト臨床材料および患者の診療情報を使用しないため、倫理上の問題は発生しない。

### C. 研究結果

Prn修復株 (Prn<sup>+</sup>-BP59Sm) を各種抗菌薬の存在下で培養し、継代4回目の菌液についてPrn欠損株の検出を行った (図3)。その結果、Prn欠損株を特異的に検出するPCRにおいて*prn*欠損遺伝子 (*prn*ΔSS, 159 bp) はすべての抗菌薬で認められなかった。同様にPrn欠損株と発現株の両者を検出するPCRでは完全長の*prn*遺伝子 (303

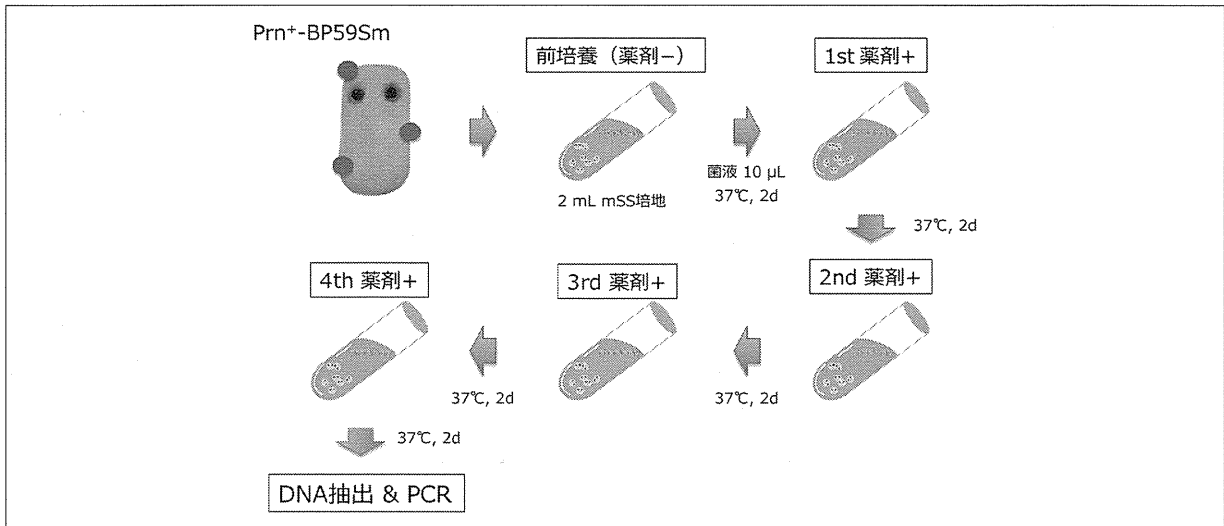


図2 抗菌薬選択圧の実施方法

Prn修復株 (Prn<sup>+</sup>-BP59Sm) をmSS培地で前培養した後、菌液10 µlを抗菌薬添加mSS培地に移植した。抗菌薬添加mSS培地で4回継代した後、DNAを抽出しPCR解析に供試した。

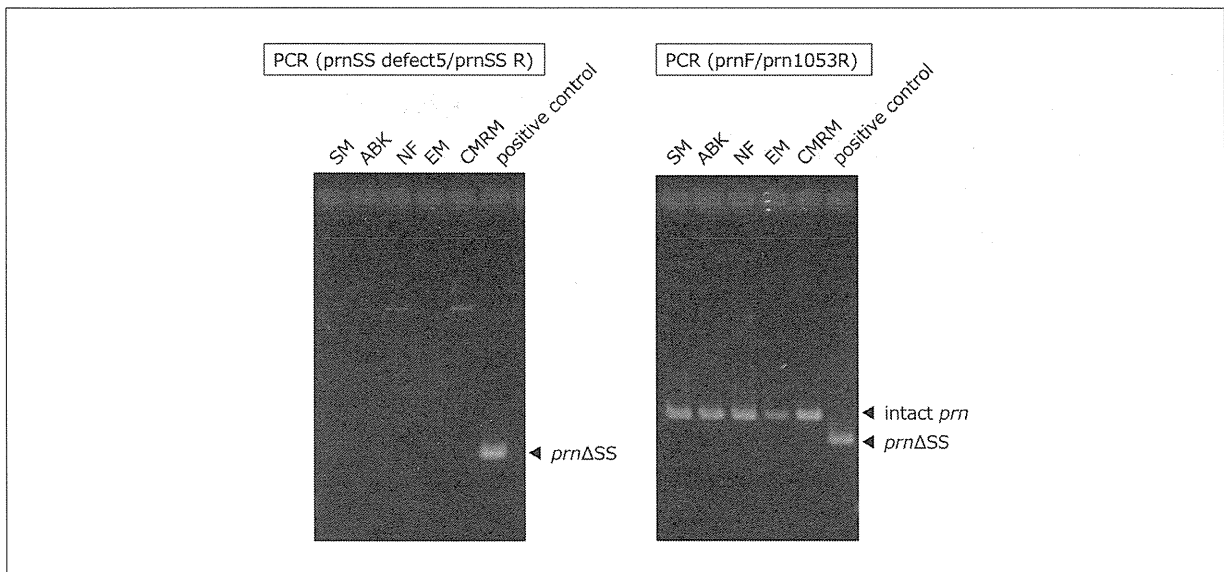


図3 PCRによるPrn欠損株の検出

Prn修復株 (Prn<sup>+</sup>-BP59Sm) を各種抗菌薬の存在下で培養し、PCRを用いて*prn*欠損遺伝子 (*prn*ΔSS) の検出を行った。陽性コントロールにはPrn欠損株 (Prn<sup>-</sup>-BP59Sm) のDNAを供試した。

bp) が検出され、*prn*ΔSSの遺伝子増幅 (219 bp) は認められなかった。

#### D. 考察

本研究では、抗菌薬がPrn欠損に関与するという作業仮説に対し実験的検証を行った。その結果、アミノグリコシド系抗菌薬であるSMならびにABK、ニューキノロン系のNF、マクロライド系のEM、その他GyrB阻害剤であるCMRMの選択圧ではPrn欠損株の出現を認めなかった。このこ

とから、Prn欠損株の出現に上記抗菌薬が選択圧となっている可能性は低いと考察された。

Prn修復株 (Prn<sup>+</sup>-BP59Sm) は相同組換えによりPrn欠損遺伝子 (*prn*ΔSS) を相補したものであり、その遺伝的背景はPrn発現を除き親株のPrn欠損株 (Prn<sup>-</sup>-BP59Sm) と同一である。Prn修復株はPrn欠損株に変化するための遺伝的背景を有し、さらにPrn合成にエネルギーを必要としないことからPrn発現株よりも高い増殖速度を持つという利点を有している。これらの利点を持つ



Prn修復株を用いて抗菌薬選択圧の可能性を検証したが、今回検討を行った抗菌薬ではPrn欠損株を検出することは出来なかった。今後はペニシリン系、セファエム系などの抗菌薬についても同様な検討が必要である。

2012年にワシントン州で発生した百日咳流行では、Prn欠損株は臨床分離株の73% (157/216) を占めた。また、百日咳類縁菌であるパラ百日咳菌でもPrn欠損株の出現が認められており、近年の宿主環境下ではPrn欠損は菌の生存に有利に働いているものと考えられる。抗菌薬以外にPrn欠損の選択圧としてワクチン選択圧が挙げられるが、ワクチンとの関係はいまだ明らかとなっていない。そこで、次年度はPrn欠損株のゲノム解析を実施し、ゲノム情報からPrn欠損理由を考察する予定である。

## E. 結論

Prn欠損株の出現にアミノグリコシド、ニューキノロン、マクロライド系の抗菌薬が関与する可能性は低く、その出現には抗菌薬以外の選択圧が関与する可能性が指摘された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. PLOS ONE. 8(10) : e77165, 2013.
- 2) 大塚菜緒, 蒲地一成. 百日咳. 新興・再興感染症up to date. 化学療法の領域2013年増刊号. p71-79, 医薬ジャーナル社, 大阪.

### 2. 学会発表

- 1) Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：  
百日咳の血清診断法（特願2013-77138, 平成25年4月出願）
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 百日咳の実験室診断法の確立

研究分担者：中山 哲夫（北里生命科学研究所ウイルス感染制御教授）

研究協力者：岡田 賢司（福岡歯科大小児科）

渡邊 峰雄（北里生命科学研究所）

小口 薫（さいわいこどもクリニック）

宮田 章子（さいわいこどもクリニック）

吉田 菜穂子（立川共済病院小児科）

藤野 元子（済生会中央病院小児科）

和山 行正（北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所）

**研究要旨** 百日咳はwhooping を伴う咳込み等典型的な症状から診断されるが、成人百日咳は典型的な症状を認めないため2週間以上持続する咳、夜間の発作性の咳、咳込み嘔吐などの症状から診断されている。百日咳の症状はB. pertussis以外にもB. parapertussisの感染でも同様の症状を示すことが知られている。2007年から東京都西部の立川市でも百日咳の流行を認め外来で百日咳と診断されLAMP陽性例が増加し小児科医院のスタッフの中でも咳嗽を認めるようになった。成人百日咳は受診まで日数を要し抗菌剤の服用、残存するワクチン免疫により菌分離、遺伝子検出が困難で血清反応に依存する事になる。血清診断法としてはPT抗体価が100 EU以上が基準値となっているが感度が低く、ワクチンに含まれていない野生流行株の抗原を用いて感度の高い血清診断法を検討した。Fim3, catACT, cFHAはワクチンに含まれていない抗原であり、PT, FHA, Fim2がワクチン抗原である2009年から2012年までに臨床的に百日咳が疑われた208例のうちLAMP陽性は23例、PT>100 EUは34例、Fim3抗体は115例が陽性であった。2009年から小児科医院のスタッフの百日咳抗体価の推移を検討し、2011年夏から百日咳の流行が認められ2011年3月と11月の間にPT, Fim2, Fim3抗体にブースター効果が認められた。Fim2, Fim3抗体の測定は百日咳の診断に有用な血清診断法と考えられた。

### A. 研究目的

百日咳は乳幼児においては無呼吸発作や脳症を合併する重篤な感染症である。1968年からDPTワクチンとして定期接種のワクチンとなった。当時は全菌体百日せきワクチンで副反応として発熱率は高いものの有効性は明白で1974年には百日咳の死亡例はなくなった。しかし、1974/75年の副反応例から一時中止になり再開はされたものの接種率は低迷し1981年には百日咳菌の感染防御に関連する百日咳毒素（pertussis toxin：PT）、繊維状赤血球凝集素（filamentous hemagglutinin；FHA）等を精製した無細胞型百日咳ワクチンと

ジフテリア・破傷風トキソイドとを混合した沈降精製三種混合ワクチン（acellular pertussis combined with DT：DTaP）が開発された。DTaP接種後では副

反応の出現率は極めて低く、DTaP接種率も90%近くになり百日咳患者報告数は減少してきた。しかしながら、2000年代から増加傾向を認め、2007/08年には大学キャンパスでの百日咳の流行が報告され成人百日咳が増加している。成人百日咳は典型的な症状を認めることは少なく、慢性、遷延性の咳嗽として百日咳の疑いすら抱かれず、また確実な診断法はなく遺伝子診断法も開発され

ているが一般には普及してないための確な診断がなされていない。そのため成人百日咳の実態が明らかとなっていないのが現状である。成人の百日咳は家族内感染を起こしワクチン接種前の乳幼児への感染源となり成人百日咳の制御は大きな課題となる。

百日咳の原因は*B. pertussis*であるがBordetella属には*B. pertussis*以外にも*B. parapertussis*, *holmessi*, *bronchiseptica*の4種類が属しており百日咳の症状は百日咳菌、パラ百日咳菌の感染によることが知られており最近の流行で*B. holmessi*が分離され百日咳菌以外の感染も考慮しなければならない。成人の百日咳は典型的な症状がなく長引く咳が主たる症状で医療機関を受診する事も少なく、ワクチン接種の既往歴があり、抗菌剤の内服により菌分離、遺伝子検出頻度が低く、現在一般的に行われているPT, FHA抗体による血清診断にも限界がある。

百日咳の実態を明らかとするためにはLAMP法を含めた簡便な遺伝子検索法の普及とともに感度の高い百日咳の血清診断法を確立する必要がある。

## B. 研究方法

### 1) 対象

東京都立川市さいわいこどもクリニックで百日咳のサーベイランスを続けており外来受診患者のうち臨床的に百日咳が疑われた症例からの百日咳

LAMP法により遺伝子が検出された例を図1に示した。2007年秋から臨床的に百日咳が疑われる患者が増加しLAMP法による遺伝子検索を始め2008年秋から2009年の春にかけて患者数は増加し2010年は検出例がなく2011年の夏以降に再び流行が観察された。2008年4月から2009年5月、2011年6月から2012年2月までとLAMP陽性例が多い時期には咳嗽を認める外来スタッフが増加した。2008-2012年に勤務していた36名について2009年から2012年まで原則2回毎年計7回測定経時的に採血してPT, FHA, Fim2, Fim3抗体価の推移を検討した。東京都済生会中央病院では2010年7月から流行が認められ11月には沈静化した。

### 2) 菌分離、遺伝子診断

百日咳の患者の後鼻腔拭い液をCharcol Regan-Lowe輸送培地に保存しBG培地で分離した。百日咳菌の確認はIS481, パラ百日咳菌の確認はIS1001のPCRで確認した。また、後鼻腔ぬぐい液200ulからDNAを抽出し百日咳のIS481領域、PT遺伝子の5'UTRに設定したLAMP法により遺伝子検索を行った。

### 3) 血清抗体

PT, FHA抗体はデンカ生研のELISA法で測定した。DPTワクチンに含まれていない抗原としてFim3, catACT, cFHAを用い、ワクチン抗原としてはFim2を精製した。抗体価の測定は蛍光EIA法で抗原wellの蛍光強度とコントロールwellの蛍光強度の比率を%表示し500以上(抗原well

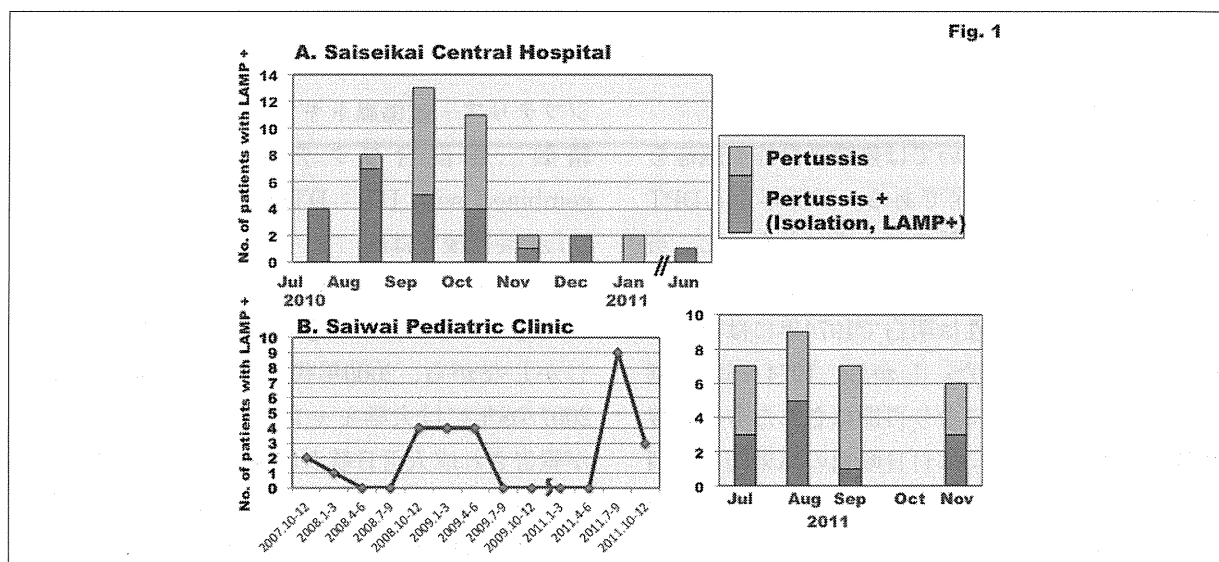


図1 東京都内2施設での百日咳の流行

表1 年齢別百日咳、パラ百日咳診断例  
(東京都済生会中央病院)

	百日咳		パラ百日咳	
	Isolation +	LAMP +	Isolation +	LAMP +
<1Y	6	1	1	1
1Y	4	0	2	0
2Y	3	0	1	1
3Y	4	0	2	0
4-6Y	12	2	8	1
7-12Y	9	0	5	0
>13Y	5	0	5	0
	43	3	24	3

臨床診断百日咳の小児の10%弱に*B. paraperfussis*が認められる。

の蛍光強度がコントロールwellの5倍以上)を陽性と判定した。

(本研究は北里研究所病院倫理委員会で承認された。)

### C. 結果

#### 1) 百日咳、パラ百日咳の流行状況

2010年の済生会中央病院で百日咳が疑われた43例中3例から百日咳菌が分離されLAMP陽性が24例で24例が百日咳と診断され、年齢別の陽性率を表1に示した。パラ百日咳は3例から分離されLAMP法でも3例から遺伝子が検出された。臨床的百日咳の10%弱をパラ百日咳が占めていると考えられた。

#### 2) 百日咳の年齢分布と診断

2009年から2012年まで東京都立川市のさいわいこどもクリニック(みやた小児科)の外来で百日咳が疑われた症例が208例で年齢分布を図2に示

した。7-12歳が最も多く52例であった。小児の年齢層とその両親の年齢層となる30-50歳と2極化していた。従来の血清診断法に基準であるPT>100 EUは34例でPT抗体が50-100 EUの例は22例であった。百日咳菌の分離は4例、LAMP法で百日咳遺伝子は23/208(11.0%)において検出され、7-12歳の年齢層での検出率が高かった。

#### 3) Fim2, Fim3, catACT, cFHA抗体陽性率

PT抗体価の結果から百日咳と診断された症例でのFim2, Fim3, catACT, cFHA抗体の陽性率を比較し表2に示した。PT>100 EUの34例中LAMP法による遺伝子検出は11例が陽性で、Fim3, catACT抗体は22例が陽性であった。同様に、PT 50-100 EUであった22例においてもFim3抗体は15例が陽性であった。LAMP法により遺伝子が検出された23例中22例において抗体価を測定した。Fim3, catACT抗体が15例において陽性であった。

表2 PT陽性例における他の抗体の陽性率

PT >100	LAMP +	Fim2+	Fim3 +	catACT +	cFHA +
N=34	11	10	22	22	15
PT 50-100					
N=22	4	3	19	15	11

表2-2 LAMP陽性例(23例)における抗体の陽性率

PT>100	FHA>100	Fim2+	Fim3 +	catACT +	cFHA +
9	5	7	15	15	10

Fim2, Fim3, catACT, cFHA 陽性:  
抗原well/コントロールwell >500以上

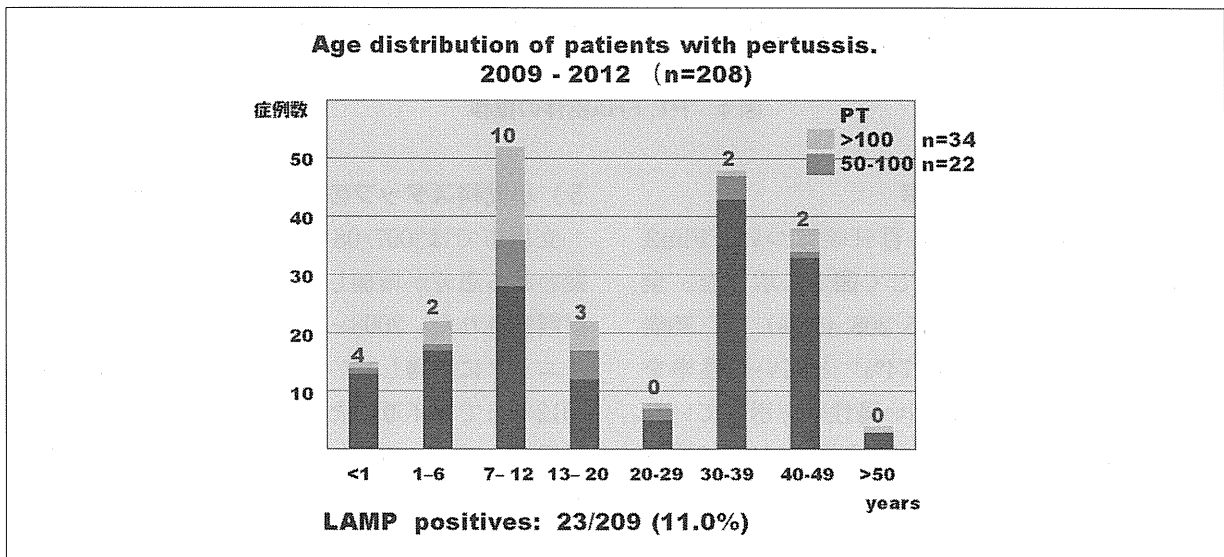


図2 百日咳外来患者の年齢分布と診断方法(棒グラフの上の数字はLAMP陽性例数)