

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）
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究
平成 23-25 年度 分担研究報告書

**侵襲性肺炎球菌感染症由来肺炎球菌の疫学的解析および
呼吸器感染症起因菌である *Legionella pneumophila* の遺伝子解析**

研究分担者 倉 文明 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨

研究協力者

前川純子 国立感染症研究所 細菌第一部
常 彬 国立感染症研究所 細菌第一部

A. 研究目的

レジオネラ属菌は湖沼や土壌に生息する環境細菌だが、冷却塔水や浴槽水などの衛生管理が不十分だと増殖し、そこから生じる本菌を含んだエアロゾルを人が吸い込んだ場合に経気道感染し、レジオネラ肺炎やポンティアック熱などの呼吸器感染症を引き起こすことがある。予防ワクチンはなく、人が吸入する可能性のあるさまざまな水利用施設の水を適切に衛生管理することが重要である。

侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) は、ワクチン接種により予防可能な疾患となっている。7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV7)は、日本には 2010 年 2 月に導入され、2013 年 4 月 1 日から定期接種の対象となり、さらに 2013 年 11 月 1 日からは PCV7 に新たに 6 種類の血清型ポリサッカライドを加えた 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) に定期接種用ワクチンは変更された。一方、65 歳以上の高齢者またはハイリスクの 2 歳以上の個人には、23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン (PPSV23) の使用は可能であった。各ワクチンの当該ワクチンに含まれる血清型肺炎球菌が引き起す IPD に対する予防効果が期待され

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。ワクチン導入後のワクチンに含まれる血清型の肺炎球菌の莢膜遺伝子が非ワクチン血清型の遺伝子と置き換わる現象、いわゆる capsular switching (遺伝子組み換え) は serotype replacement の重要な原因といわれている。Multi Locus Sequencing Type (MLST) 法は capsular switching を観測できる有効な方法である。さらに、MLST 法により、分離株の遺伝子型別・比較が容易に行えるようになった。レジオネラ属菌の代表菌種である *Legionella pneumophila* についても MLST 法と同様の手法で、用いる遺伝子の種類が異なる Sequence-Based Typing (SBT) 法が行われている。MLST 法および SBT 法は、データベースも完備しているので、中国を初め、世界各国の菌株との比較が容易である。我々は本研究で、レジオネラ症を引き起こす可能性のある日本国内の環境に生息する *L. pneumophila* の SBT、および IPD 由来肺炎球菌の MLST を調べ、基礎疫学データを蓄積し、中国の分離株と比較を行った。

B. 研究対象と方法

1 *L. pneumophila* 血清群 1 の解析

日本国内の様々な環境から分離された *L. pneumophila* 血清群 1 分離株 141 株について、

EWGLI (European Working Group for *Legionella* Infections)の方法 (<http://www.ewgli.org/>) に従って、*flaA*、*pilE*、*asd*、*mip*、*mompS*、*proA*、*neuA* 遺伝子の一部の領域の塩基配列に基づく型別 (SBT) を行い、sequence type (ST)を決定した。7 遺伝子のアリル配列が決まった分離株を EWGLI のデータベースに登録すると、新しいアリル配列の組み合わせについては新たな ST ナンバーが付与される。

2 IPD 由来肺炎球菌に関する解析

2011 年から 2014 年 2 月現在まで、日本国内 IPD 由来肺炎球菌 441 株の血清型および MLST 解析を行った。血清型は、Statens Serum Institut 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した。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、sequence type (ST) を決定した。7 つ遺伝子のうち、5 つ以上の遺伝子は同じである場合、同一の clonal complex (CC) に分類する。本報告書のすべての集計は症例数をもとに行なった。

C. 研究結果

1 : *L. pneumophila* 血清群 1 環境分離株の解析結果

冷却塔水由来 90 株、浴槽水由来 20 株、噴水・修景水由来 18 株、シャワー水由来 8 株、給湯水由来 3 株、土壌由来 2 株の遺伝子型を決定したところ、合わせて 141 株は 39 種類の遺伝子型に分かれた。ST1 が 85 株と全体の 60% を占めた。冷却塔水由来株の 74%、噴水・修景水由来株の 72% が ST1 だった。シャワー水では 38%、給湯水では 33% が ST1 で、浴槽水では 5% が ST1 で、由来により ST1 の頻度は異なっていた。2 種類の環境にまたがって検出された ST は 5 種類あった。冷却塔水あるいは浴槽水からそれぞれ複数株検出された ST が 7 種類あり、残りの 26 種類の ST は 1 株のみの検出だった。ST1 が環境分離株の優占 ST だったが、それ以外の遺伝子型は多様であった。

2 : 肺炎球菌の解析結果

1) : IPD 由来肺炎球菌の ST 型

肺炎球菌は血清型によって、違った ST 型を示すことが多く見られた。世界中多くの地区から分離される ST 型 (血清型 3 型の ST180、15A 型の ST63、19F 型の ST236、22F 型の ST433 など) は日本でも分離された。同一血清型の肺炎球菌でも異なる ST 型を示すケースが多くみられた (H25 年度分担研究報告書「レジオネラおよび肺炎球菌の分子疫学」を参照)。

2) : 19A 型肺炎球菌に関して解析

19A 型肺炎球菌は PCV7 が導入後 replacement serotype として、世界各国で注目されていた。日本国内においても 19A 型肺炎球菌による小児 IPD 症例の増加がみられた (IASR 34: No.3 特集肺炎球菌感染症 2013 年 3 月現在)。本研究で収集した IPD 由来肺炎球菌 441 株のうち、19A 型は 103 株 (23.4%) で、最も多かった。

19A 型肺炎球菌は ST(CC)3111、ST320、ST(CC)2331、3 つのグループに分けられた。CC3111 は 75 株 (72.8%)、ST320 は 21 株 (20.4%)、CC2331 は 7 株 (6.8%) であった。CC3111 および CC2331 型肺炎球菌は日本各地の症例より分離されたが、ST320 型肺炎球菌は沖縄県のみでの分離であった。本研究で解析を行った 21 株の ST320 型 19A 肺炎球菌も β -lactam 抗菌薬のペニシリン G に 2-4 μ g/mL、セフトキシムに 1-8 μ g/mL、メロペネムに 0.5-1 μ g/mL の $\square\square\square\square$ を示した。CC3111 および CC2331 型 19A 肺炎球菌の各抗菌薬に対する MIC より高く、低感受性や耐性であった (図 1)。

現在まで、日本国内から ST320 型 19F 肺炎球菌が分離された報告がなく、さらに PCV7 が日本に導入される前の 2009 年に ST320 型 19A は沖縄県の症例から分離されたことから、日本国内に分離された ST320 型 19A 肺炎球菌は 19F の

capsular switching による変換されたタイプではなく、もともと存在していた可能性が示唆された。

D. 考 察

中国における *L. pneumophila* 血清群 1 の環境分離株 164 株 (冷却塔水由来 96 株、温泉由来 42 株、水道水由来 26 株) の遺伝子型別の結果も、ST1 が 49.4% を占め (Appl Environ Microbiol doi:10.1128, 2014) 次いで ST154 が中国 (6%) でも日本 (3%) でも多く、中国と日本で同様の傾向があることがわかった。日本の環境分離株の SBT 解析の結果、冷却塔水分離株は大きく 2 つのグループ (ST1 を含む C1 グループ、および ST154 を含む C2 グループ) に分かれた (Appl Environ Microbiol 12:4263, 2012) が、中国でも同様だった。温泉分離株の遺伝子型が多様であることも同様の結果だったが、冷却塔水分離株の多くが共通、あるいは似た遺伝子型であったのに対し、浴槽水・温泉分離株で共通の遺伝子型は、この 2 つの論文の比較では見られなかった。日本と中国で共通の遺伝子型についても、それぞれ独自の遺伝子型についても、臨床からも分離される遺伝子型が多くあり、それらの菌が生息する環境水が感染源となりうる危険性が示唆された。

本研究は、日本国内の IPD 由来肺炎球菌の MLST 解析を行った結果、アジアを含む世界各国で多く分離されている多剤薬剤耐性 ST320 型 19A 肺炎球菌は日本の特定な地域に分離された。欧米では、ST320 型 19A 肺炎球菌は PCV7 が導入された後、多剤耐性 ST320 型 19F 肺炎球菌の capsular switching によって変換されたタイプで、ワクチンによるセレクションされたと報告されている (BMC Genomics 10:642, 2009)。しかし、韓国 (Emerg Infect Dis 14:275, 2008)、中国 (PLOS ONE 8:e82361, 2013) では、日本と同様に、PCV7 が導入される前から ST320 型 19A 肺炎球菌の分離がみられた。欧米と異なって、ST320 型 19A 肺炎球菌による感染症の増加は抗菌薬によるセレク

ションされたと推測された (PLOS ONE 8:e82361, 2013)。

E. 結 論

SBT (MLST) 法により、分離株の遺伝子型別・比較が容易に行えるようになった。データベースも完備しているので、世界各国の菌株との比較が容易である。レジオネラ症は旅行に関連して発症することが知られており、日本と中国で菌株の情報を共有することが重要であると考えられた。肺炎球菌においては、血清型、ST 型および薬剤感受性の結果を総合的に解析することによって、capsular switching、serotype replacement および薬剤耐性菌の発生を観測し、早期に対策を講じることができるようデータの蓄積を行う必要がある。

F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

G. 研究発表

Oishi T, Wada A, Chang B, Toyabe S, and Uchiyama M. 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. Jpn. J. Infect. Dis. 64:341-344.

西山明宏, 石田直, 興梶陽平, 小西聡史, 坪内和哉, 伊賀知也, 國政啓, 岩破将博, 福山一, 仲川宏昭, 伊藤明広, 生方智, 吉岡弘鎮, 橋洋正, 有田真知子, 橋本徹, 前川純子. 2011. *Legionella pneumophila* serogroup 3 による呼吸器感染症の 4 症例. 感染症学雑誌 85:373-379.

Tanaka J, Ishiwata N, Wada A, Chang B, Hishiki H, Kurosaki T, and Khono Y. 2012. Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan.

Epidemiol. Infect. 140:1111-1121.

Amemura-Maekawa J, Kikukawa K, Helbig JH, Kaneko S, Suzuki-Hashimoto A, Furuhashi K, Chang B, Murai M, Ichinose M, Ohnishi M, Kura F; Working Group for *Legionella* in Japan. 2012. Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. Appl Environ Microbiol. 12:4263-70.

Ueno M, Ishii Y, Tateda A, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, and Nishiwaki Y. 2013. Prevalence and risk factors of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children in Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 66:22-25.

Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, Akeda Y, Ihara T, Nahm MH, Oishi K, the Japanese IPD Study Group. 2013. Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. Vaccine. 31:845-849.

Otsuka T, Chang B, Wada A, and Okazaki M. 2013. Molecular epidemiology and serogroup 6 capsular gene evolution of pneumococcal carriage in a Japanese birth cohort study. J. Med. Microbiol. 62:1868-1875.

Kanatani JI, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M,

Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Close genetic relationship between *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from sputum specimens and puddles on roads by sequence-based typing. Appl. Environ. Microbiol. 79(13):3959-3966.

Kanatani J, Isobe J, Kimata K, Shima T, Shimizu M, Kura F, Sata T, and Watahiki M. 2013. Molecular epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates identify a prevalent sequence type, ST505, and a distinct clonal group of clinical isolates in Toyama prefecture, Japan. J. Infect. Chemother. 19:644-52,

Ueno M, Ishii Y, Tateda K, Anahara Y, Ebata A, Iida M, Mizuno F, Inamura S, Takahata K, Suzuki Y, Chang B, Wada A, Sugita M, Tanaka T, Nishiwaki Y. 2014. Changes in *Streptococcus pneumoniae* serotypes in the nasopharynx of Japanese children after inoculation with a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine. Jpn. J. Infect. Dis. 67:40-43.

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

図1:血清型19A分離株のシーケンスタイプと β -lactam 抗菌薬感受性の関係 (n=103)

