

本症例は、病院到着後、蘇生を継続到着後16分で心拍再開、精査の結果重症肺炎球菌性肺炎に伴う肺炎と判断し、

人工呼吸管理を含めた集学的治療目的にICU入室。抗菌薬、昇圧剤、PMXなどの治療を行うも改善乏しく、来院翌日（平成26年2月5日）16時に死亡された。

病原体検索：

喀痰：得られず

尿中抗原：肺炎球菌陽性

血液培養：*S. pneumoniae* (PISP) 陽性

インフルエンザ迅速キット：

鼻咽頭ぬぐい液：陰性、吸引痰：A陽性

Multiplex PCR：H1N1pdm09陽性、肺炎球菌陽性

本症例は血液培養にて肺炎球菌が検出されたため、侵襲性肺炎球菌感染症と診断された。さらに詳細な菌株の解析を実施予定である。

D. 考察

沖縄県においては、侵襲性肺炎球菌感染症、および侵襲性インフルエンザ菌感染症の症例の届出の多いことが示された。今後菌株の解明を通して感染症発症の病態を明らかにした。

また小児における侵襲性肺炎球菌感染症のワクチン接種歴から考慮してワクチンの血清型以外の肺炎球菌によるものの可能性が示唆された。

インフルエンザウイルス感染症に合併する肺炎球菌感染症の死亡例を経験した。本症例においては、血液培養から肺炎球菌を検出していることから、今後菌株の解析を実施することにより菌株の由来を明確にしたい。

E. 結論

沖縄県における侵襲性肺炎球菌感染症、および侵襲性インフルエンザ菌感染症の実態を明らかにした。今後菌株の解析が求められる。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kohno S, Tateda K, Kadota JI, Fujita J, Niki Y, Watanabe A, Nagashima M. Contradiction between in vitro and clinical outcome : Intravenous followed by oral azithromycin therapy demonstrated clinical efficacy in macrolide-resistant pneumococcal pneumonia. J Infect Chemother. 2013 Dec 11.
- 2) Nakayama Y, Yamazato Y, Tamayose M, Atsumi E, Yara S, Higa F, Tateyama M, Fujita J. Increased expression of HBZ and Foxp3 mRNA in bronchoalveolar lavage cells taken from human T-lymphotropic virus type 1-associated lung disorder patients. Intern Med. 2013 ; 52(23) : 2599-609.
- 3) Kohno S, Yanagihara K, Yamamoto Y, Tokimatsu I, Hiramatsu K, Higa F, Tateyama M, Fujita J, Kadota J. Early switch therapy from intravenous sulbactam/ampicillin to oral garenoxacin in patients with community-acquired pneumonia : a multicenter, randomized study in Japan. J Infect Chemother. 2013 Dec ; 19(6) : 1035-41.
- 4) Kohno S, Niki Y, Kadota J, Yanagihara K, Kaku M, Watanabe A, Aoki N, Hori S, Fujita J, Tanigawara Y. Clinical dose findings of sitafloxacin treatment : pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of two clinical trial results for community-acquired respiratory tract infections. J Infect Chemother. 2013 Jun ; 19(3) : 486-94.
- 5) Higa F, Tateyama M, Tasato D, Karimata Y, Nakamura H, Miyagi K, Haranaga S, Hirata T, Hokama A, Cash HL, Toma H, Fujita J. Imported malaria cases in Okinawa Prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis. 2013 ; 66(1) : 32-5.
- 6) Fujita J, Haranaga S, Higa F, Hokama A. Gravity-dependent opacity in pure influenza viral pneumonia. Intern Med. 2013 ; 52(3) :

411-2.

- 7) Fujita J, Higa F, Hokama A, L Cash H. Evaluation of lung volume in patients with community-acquired pneumonia. Intern Med. 2013 ; 52(2) : 293-4.
- 8) Fujita J, Niki Y, Kadota J, Yanagihara K, Kaku M, Watanabe A, Aoki N, Hori S, Tanigawara Y, Cash HL, Kohno S. Clinical and bacteriological efficacies of sitafloxacin against community-acquired pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae : nested cohort within a multicenter clinical trial. J Infect Chemother. 2013 Jun ; 19(3) : 472-9.
- 9) Fujita J, Tohyama M, Haranaga S, Cash HL, Higa F, Tateyama M. Hamman-Rich syndrome revisited : how to avoid misdiagnosis. Influenza Other Respir Viruses. 2013 Jan ; 7(1) : 4-5.
- 10) Sunagawa S, Higa F, Cash HL, Tateyama M, Uno T, Fujita J. Single-dose inhaled laninamivir : registered in Japan and its potential role in control of influenza epidemics. Influenza Other Respir Viruses. 2013 Jan ; 7(1) : 1-3.

2. 学会発表

- 1) Fujita J. Recent trends and new insights in respiratory infection -focusing on epidemiology, pathogenesis and treatment- 4. Viral infection
Post-graduate course 3, 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Nov 11, 2013, Yokohama, Japan)
- 2) Fujita J, Ohtsuki Y, Higa H, Azuma M, Yoshinouchi T, Haranaga S, Futoshi Higa F, Tateyama M. Clinicopathological findings of four cases of pure influenza virus A infection
18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Nov 11-14, 2013, Yokohama, Japan)
- 3) Nakayama Y, Yamazato Y, Tamayose M,

Atsumi E, Yara S, Higa F, Masao Tateyama M, Fujita J. Evaluation of Hbz and Foxp3 mRNA expression in bronchoalveolar lavage cells from human T-lymphotropic virus type 1-associated lung disorder patients (oral)

18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Nov 11-14, 2013, Yokohama, Japan)

- 4) Sunagawa S, Fujita J, Iha Y, Tomishima M, Mukatake S, Owan T, Higa F, Tateyama M. Prevention of a nosocomial infection caused by influenza virus A using prophylactic administration of oseltamivir : with review of literatures
18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Nov 11-14, 2013, Yokohama, Japan)
- 5) Karimata Y, Kinjo T, Nabeya D, Uehara A, Iha Y, Sunagawa S, Onaga K, Miyagi K, Haranaga S, Higa F, Tateyama M, Fujita J. Clinical and radiological characteristics of human metapneumovirus pneumonia in an outbreak at a long-term care facility
18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Nov 11-14, 2013, Yokohama, Japan)
- 6) Iha Y, Higa F, Sunagawa S, Naka M, Nakamura H, Tasato D, Nakamatu M, Miyagi K, Haranaga S, Tateyama M, Fujita J. Influenza epidemics during 2007 and 2013 in Okinawa, subtropical region in Japan : surveillance of rapid antigen results
18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (Nov 11-14, 2013, Yokohama, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 : 該当なし
2. 実用新案登録 : 該当なし
3. その他 : 特記事項なし

成人の侵襲性肺炎球菌性感染症の罹患率および起因菌についての検討

研究分担者：山崎 一美（独立行政法人国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター長）

研究協力者：大川 大介（長崎県上五島病院・内科）

研究要旨 成人の侵襲性肺炎球菌性感染症（invasive pneumococcal diseases：IPD）のpopulation-basedの罹患率および起因菌の成因と割合については不明である。本研究は長崎県の西端にある離島・上五島住民を対象に行っている。島内の有床医療機関は186床の上五島病院のみであり、当地区で発症した入院を要する肺炎患者はほとんどが上五島病院に入院することになり、島内の罹患率および起因菌の精査において障害は少ない。2013年9月1日から観察開始し、2013年12月31日までに28例が登録された。28例の登録例のうち、肺炎球菌性肺炎は5例（18%）であった。このうちIPDまで至った症例は1例、20%というのが現時点の結果である。またインフルエンザの流行はあったものの、続発的に肺炎を発症した症例はいなかった。

A. 研究目的

成人の侵襲性肺炎球菌性感染症（invasive pneumococcal diseases：IPD）のpopulation-basedの罹患率および起因菌の成因と割合については不明である。研究の対象地区である上五島は、長崎県に西端にある離島で、人口は現在2万1千人。本土までの移動手段は航路のみで、高速船で1時間半、フェリーで2時間半を要し、天候の影響を受けやすい。このような環境であることから入院を要する肺炎を発症した場合、航路で本土に移動することは身体的負担が極めて高く、ほとんどの患者は島内の医療機関を利用する。島内の有床医療機関は186床の上五島病院のみであり、入院を要する肺炎患者は上五島病院に入院する。このような背景からpopulation-based studyを行うこの障害は少ない。我々の研究の目的は、成人の肺炎における肺炎球菌性肺炎および侵襲性肺炎球菌性感染症（IPD）の罹患率および起因菌の成因、最終転帰について明らかにしていくことである。3年間の研究期間の1年目である本年の報告書は、症例の登録状況についてまとめる。

B. 研究方法

症例の登録基準は、上五島病院・内科を受診し、15歳以上の肺炎像を認める呼吸器感染症例とした。なお解析対象の除外基準として、1) 誤嚥性肺炎、2) 間質性肺炎や薬物吸引による化学性肺炎の患者、3) 院内肺炎4) 本研究に同意が得られなかった症例とした。対象者は、一般血液検査のほか喀痰培養・血液培養・尿中肺炎球菌抗原を施行し起因菌について評価する。培養に菌株得られれば血清型の同定も行った。

登録は2013年9月1日から開始した。1年間の登録期間を予定しているが、本報告では2013年12月31日までの登録症例について検討した。菌株が得られた症例については血清型も同定した。

また2013年12月18日からインフルエンザウイルス感染状況についても調査を行い、続発性肺炎の頻度を合わせて検討した。

（倫理面への配慮）

研究の遂行にあたり、患者の個人情報はずべて秘匿された状態で扱った。

C. 研究結果

1) 登録症例の背景

2013年9月1日から2013年12月31日までの登録症例は28例であった。28例の背景を表1に示す。

2) 起因菌の成因

期間中登録された28例の喀痰培養で同定された起因菌の内訳を図1に示す。肺炎球菌は5例18%であった。もっとも多かったのは*K. pneumoniae* 9例32%であった。

登録例28例において市中感染例19例の起因菌を図2に示した。肺炎球菌は2例10%であった。

表1 全登録例の患者背景

症例	28例
男 n (%)	16例 (57%)
平均年齢	81才 (64~95才)
市中肺炎 n (%)	19例 (68%)
介護関連肺炎	9例 (12%)
入院加療 n (%)	22例 (79%)
肺炎球菌性肺炎	5例 (18%)
侵襲性肺炎球菌感染症	1例 (3%)
担癌症例 n (%)	7例 (25%)
死亡 n (%)	1例 (3%)

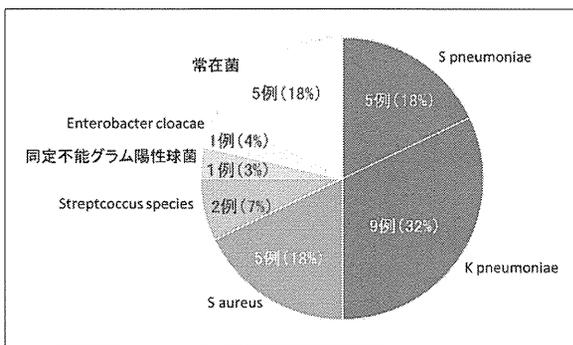


図1 登録全28例の起因菌

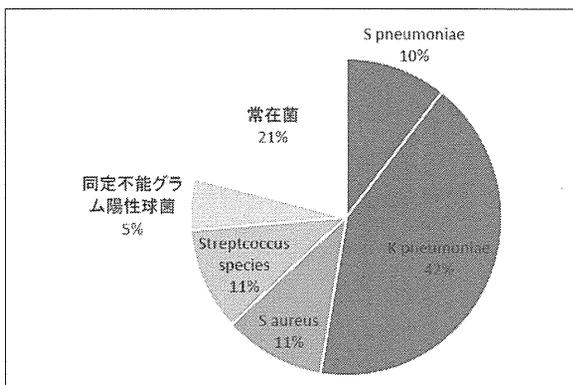


図2 市中感染19例の起因菌

市中感染以外の発症者9例は介護施設入所者であった。この9例の起因菌の内訳を図3に示す。肺炎球菌は3例34%と最も多かった。

3) 肺炎球菌性肺炎の背景と血清型

起因菌が肺炎球菌であった5例の背景因子を表2に示す。

このうち喀痰・血液にて菌株が得られた3例について血清型を確認した。その結果と廃液を表3に示す。同定された3例のうち2例が3型であった。いずれも肺炎球菌ワクチンの接種歴はなく、インフルエンザウイルスの先行感染もなかった。

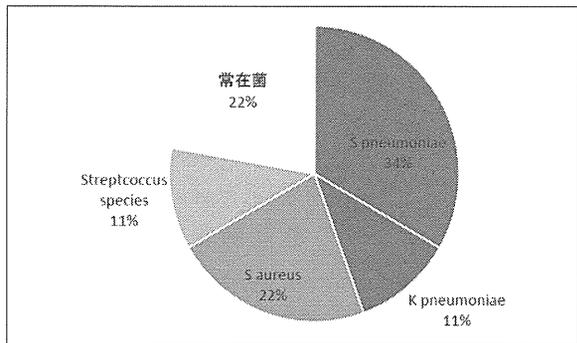


図3 介護施設感染9例の起因菌

表2 肺炎球菌性肺炎症例5例の背景

症例	5例
男 n (%)	2例 (40%)
平均年齢	78才 (70~84才)
市中肺炎 n (%)	2例 (40%)
介護関連肺炎	3例 (60%)
入院加療 n (%)	5例 (100%)
喀痰培養陽性	5例 (100%)
尿中肺炎球菌抗原陽性	4例 (不明1例)
血液培養陽性	1例 (20%)
侵襲性肺炎球菌感染症	1例 (20%)
担癌症例 n (%)	0例 (0%)
死亡 n (%)	0例 (0%)

表3 肺炎球菌の血清型が同定された3例の背景

症例	感染機会	血清型	血液培養	ADL
79才女	市中	3	-	自立
84才女	介護	11A/E	-	車椅子
81才女	介護	3	+	自立

なお、対象例ではないが、同じ登録機関に発症した誤嚥性肺炎のうち喀痰培養で肺炎球菌が同定され、菌株が得られた3例についても血清型を確認した。3型1例、35B型1例、死滅1例であった。この3例も肺炎球菌ワクチンの接種歴はなかった。

4) インフルエンザ発症状況

2013年12月18日から同地域におけるインフルエンザの発症者の登録を開始した。2014年1月31日までの登録期間において、発生数293例。A型247例(84%)、B型46例(16%)。平均年齢:30.3歳(0.5~96才)。65歳以上21人(7%)であった。続発性肺炎の発生例は0例。また死亡例0例であった。

D. 考察

Population based studyの手法において成人の肺炎の罹患率、起因菌の同定を行い、さらに肺炎球菌性肺炎および侵襲性肺炎球菌性感染症(invasive pneumococcal diseases: IPD)の罹患率を明らかにしていくことが、本研究の目的である。ひいては肺炎球菌ワクチンの定期接種化後のワクチン効果をモニタリングできる国の仕組み造りに繋げられることも想定している。

長崎県の西端の離島である上五島地区を対象にこの研究を開始した。この地域は有床医療機関が上五島病院のみであり、入院を要する肺炎患者はすべて上五島病院に入院する。

当該地域の2013年10月1日現在の人口は20,625人(男性10,150人、女性11,566人)である。65歳以上の高齢者人口は7,333人(35.6%)と国内と比較して高齢化が進んだ自治体である。総務省の国勢調査によれば2010年の我が国の高齢化率は23.0%であった。国立社会保障・人口研究所の日本の将来人口推計の報告では、2025年には高齢化率が30.3%、2040年にはいまの上五島地区と同じ35%に達すると予測されている。この地域におけ

る肺炎のpopulation based studyは将来の日本の肺炎対策に有用なモデルとなると期待される。

平成25年度の今回の我々の報告書では、2013年12月31日時点での集積されたコホート集団の詳細を記載した。また2013年12月18日の途中からであるが、インフルエンザウイルスの発症登録も追加した。

28例の肺炎登録で、肺炎球菌性肺炎は5例(18%)であった。このうちIPDまで至った症例は1例、20%というのが現時点の結果である。またインフルエンザの流行はあったものの、続発的に肺炎まで至った成人肺炎例はなかった。

今後も登録を継続し、2014年8月31日までの1年経過した時点で第一次報告を行う。その後も症例の登録は継続していく。肺炎球菌性肺炎の発生状況、血清型の評価を踏まえたワクチンの効果の評価などが今後行えることが期待される。

E. 結論

長崎県・上五島地区で発生した肺炎のコホート集積状況について報告した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

研究発表

1. 特許取得: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし

成人市中肺炎における病原体プロファイルと重症度

研究分担者：木村 博一（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究協力者：倉井 大輔（杏林大学医学部付属病院呼吸器内科）

皿谷 健（杏林大学医学部付属病院呼吸器内科）

石井 晴之（杏林大学医学部付属病院呼吸器内科）

滝澤 始（杏林大学医学部付属病院呼吸器内科）

佐々木 佳子（群馬県衛生環境研究所）

塚越 博之（群馬県衛生環境研究所）

丹羽 祥一（群馬県衛生環境研究所）

小澤 邦壽（群馬県衛生環境研究所）

野田 雅博（国立感染症研究所感染症疫学センター）

石岡 大成（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究要旨 2012年8月～13年8月までの1年間、杏林大学医学部付属病院にて、入院を要した成人市中肺炎患者45例を対象に細菌・呼吸器ウイルスを含めた病原体網羅解析およびA-DROP scoreを基盤とした重症度解析を行った。その結果、45例中、19例（43%）は細菌単独検出、3例（7%）にウイルス単独検出、3例（7%）にウイルスと細菌の混合検出および1例（2%）に真菌検出を認めた。細菌単独検出例では、肺炎球菌、インフルエンザ菌およびマイコプラズマの頻度が高かった。ウイルス単独検出例ではヒトメタニューモウイルス（HMPV）2例、ヒトパラインフルエンザウイルス（HPIV）1例であった。ウイルスと細菌の重複検出例では、*S.pneumoniae* + *H.influenzae* + HRV、*S.pneumoniae* + HRVおよび*S.pneumoniae* + HMPVが各1例ずつであった。今回の検討でウイルスが検出された症例は、すべて呼吸不全を呈した高齢者であったが、これらの症例において、統計学的に重症度の有意差は見られなかった。以上のことから、臨床的に入院を必要とする成人市中肺炎においては、通常検出される細菌・真菌のみならず呼吸器感染症の起因となるウイルス（HMPVやHPIVなど）も検出されることが明らかになった。

A. 研究目的

成人市中肺炎（CAP）の原因病原体は約半数の症例で不明と推定される。この原因の一つとして、CAP病原体解析に関する多くの報告は、細菌検出を主体としたもので、呼吸器ウイルスに関する検討は行われていない^{1,2)}。しかし、インフルエンザウイルスやRSウイルスをはじめとする呼吸器ウイルスがCAPに関与することが明らかになりつつある^{3,4)}。しかし、その詳細は不明である。そこで、本研究においては、入院加療を要したCAP症例において気道検体から、細菌・ウ

イルスを網羅的に検出し、病原体プロファイルを明らかにするとともに検出病原体と重症度と関連に関する研究を行った。

B. 研究方法

1. 研究デザイン：前向き観察研究
2. 対象患者：2012年8月から8月に杏林大学医学部付属病院を受診し、市中肺炎と診断され、18歳以上の入院肺炎症例で患者もしくは代諾者に文書にて同意が得られた症例を対象とした。肺炎の診断は、喀痰・発熱・呼吸困難などの臨床症状に

加え、胸部単純エックス線写真で新たな陰影や陰影の増悪を認める症例と定義した。また、医療介護関連肺炎は除外した。

3. 検体採取方法：喀痰、鼻咽頭拭い液、気管支肺胞洗浄液の何れかを採取した。喀痰、気管支肺胞洗浄液が採取できた症例については、常法により細菌培養を行い、分離同定を行った。呼吸器ウイルスの検出対象は、インフルエンザウイルス (subtype AおよびB、Flu (A and B)、RSウイルス (RSV)、ヒトパラインフルエンザウイルス (HPIV)、ヒトライノウイルス (HRV)、エンテロウイルス (EV)、ヒトメタニューモウイルス (HMPV)、コロナウイルス (CoV)、アデノウイルス (AdV) およびヒトボカウイルス (HBoV) とした。これらのウイルス検出はRT-PCRを基盤とした既報に準じて行った⁵⁾。

観察項目：主要調査項目は市中肺炎における原因微生物の検出頻度とし、副次項目は、年齢や性別等の臨床情報に加え、30日内の死亡率や入院期間及び肺炎重症度及び人工呼吸器・昇圧剤使用の有無とした。市中肺炎の重症度は、日本呼吸器学会の定める市中肺炎の重症度分類によるA-DROPを用い、3点以上を重症とし、2点以下の中等症・軽症と区別した。

原因微生物の診断基準は、①良質の喀痰から培養された細菌、②血液培養陽性で他の原因臓器なし、③肺炎球菌・レジオネラ尿中抗原陽性、④マイコプラズマCF抗体ペア血清で4倍以上の上昇もしくはシングル血清でPA320倍以上、呼吸器検体からPCR法で呼吸器ウイルス・マイコプラズマ・クラミドフィラが陽性と定義した。

C. 研究結果

臨床的特徴

観察期間中の対象症例は45例であった。年齢の中央値 (最小値-最大値) は72 (18-89) 歳、男性29例：女性16例、入院期間の中央値は13 (2～101) 日であった (表1)。

肺炎の原因微生物

原因微生物が確定した症例は全体の25/45 (56%) であった。細菌単独感染19例 (43%)、ウイルス単独感染3例 (7%)、細菌・ウイルス混合感染3例 (7%)、真菌感染1例 (2%)、不明19例であった。このうち、肺炎球菌が11例と原因細菌として最も頻度が高く、インフルエンザ菌・マイコプラズマがともに4例と次いで、多く検出された (図1)。また、呼吸器ウイルスは6例 (13%) で検出された。全例が76歳以上と高齢者であり、呼吸不全を呈していた。そのうち、ウイルスが単独で検出された症例は3例であり、その内訳は、HMPV 2例、HPIV 1例であった。残りの3例は細菌・ウイルスの混合検出例であった。その内訳は、*S.pneumoniae* + *H.influenzae* + HRV 1例、*S.pneumoniae* + HRV 1例および *S.pneumoniae* + HMPV 1例であった。なお、インフルエンザウイルスは本症例からは検出されなかった。

肺炎の重症度と呼吸器ウイルス

本研究の対象45例中、2例 (4%) で30日以内の死亡が認められたが、ウイルスが検出された症例での死亡症例はなかった (表1)。また、重症度別のウイルス検出頻度は軽症及び中等症 (ADROP score 2点以下) では9%であったのに対し、重症例 (ADROP 3点以上) では30%で

表1 本症例の臨床的特徴および病原体検出の概要

	Total (N=45)	Bacteria (N=19)	Virus (N=3)	Bacteria/Virus (N=3)	ND/Others (N=20)
年齢 (才)	72 (18-89)	66(40-89)	78(76-80)	77(76-81)	71(41-85)
男/女	29/16	11/8	1/2	2/1	15/5
A-DROP	2(0-4)	1(0-3)	3(2-3)	2(2-4)	2(0-3)
入院期間(日)	13(2-101)	12(3-101)	11(9-19)	8(7-27)	14.5(2-71)
30日以内死亡	2(4%)	1(5%)	0(0%)	0(0%)	1(5%)
呼吸不全	33(73%)	13(68%)	3(100%)	3(100%)	14(70%)
人工呼吸管理もしくは昇圧剤	4(9%)	1(5%)	0(0%)	1(33%)	2(10%)

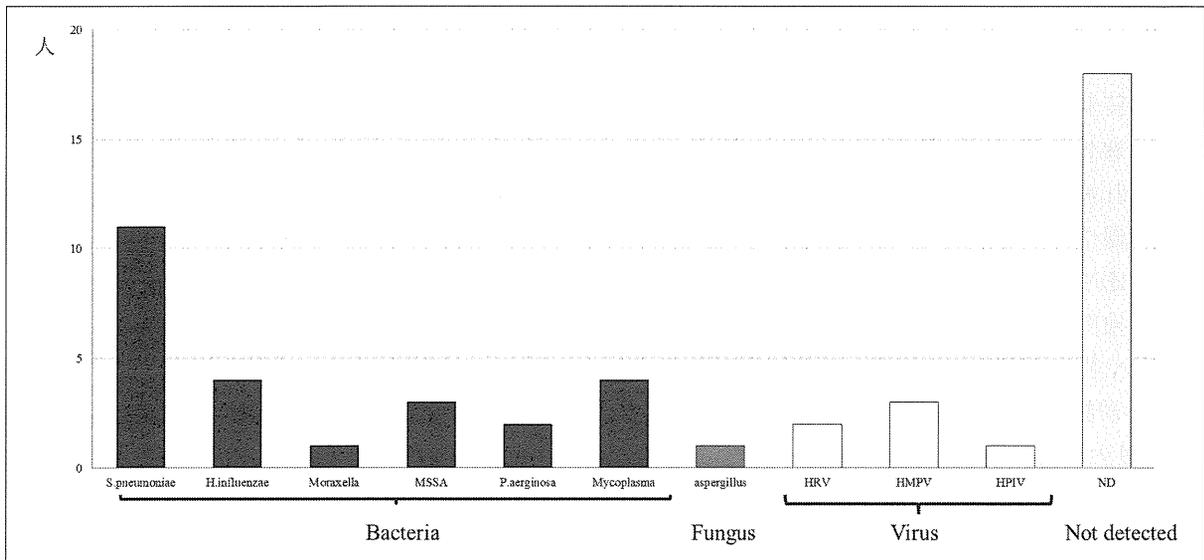


図1 検出病原体のプロファイル

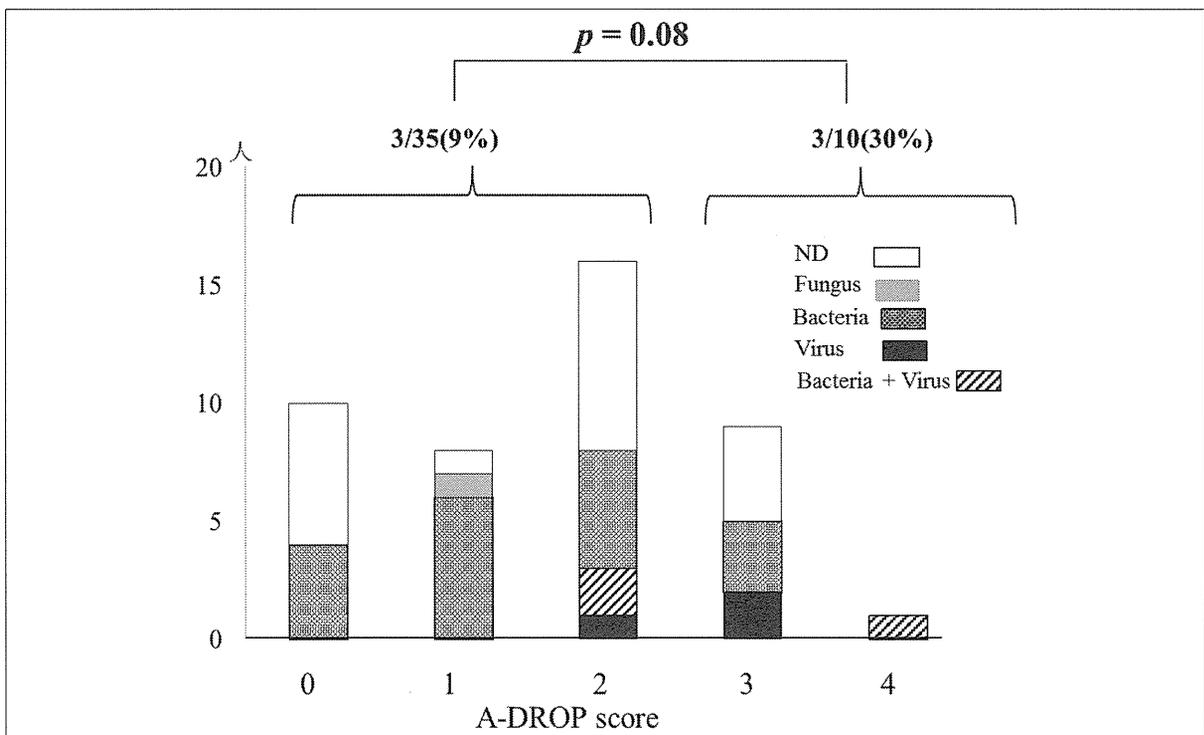


図2 検出病原体とA-DROP score

あったが統計学的に有意差は見られなかった ($p=0.08$, 図2)。また、入院期間、人工呼吸管理・昇圧剤の使用率など、いずれの項目においてもウイルス検出の有無による統計学的な有意差は見られなかった。

D. 考察

本研究において、入院を必要とした成人市中肺炎症例の56%で原因となりうる病原体が検出され

た。呼吸器ウイルス (HMPV、HRV、HPIV) が約13%に検出された。また、今回の調査では、過去の報告と同様に細菌においては、肺炎球菌、インフルエンザ菌およびマイコプラズマの頻度が高かった。さらに、呼吸器ウイルス、HMPVやHPIVが一定の割合で本症例に検出された。呼吸器ウイルスが重症度に寄与する可能性も示唆されたが、症例が少なく、生命予後、入院期間の延長、人工呼吸管理や昇圧剤の使用などの集中治療との

関連性は症例数が少ないため統計学的有意差は認められなかった。

市中肺炎における呼吸器ウイルスの検出割合は海外の報告15-39%と比較し低値であった⁶⁻¹⁰⁾。また、これらの報告で検出頻度が比較的高値であった呼吸器ウイルスはFlu、HRAであった。HMPV、RSV、HPIVおよびCoVは研究デザインや施設により、検出頻度が大きく異なっていた。これは、地域差や特定のウイルス流行が大きく関与していることが推測される。また、本検討において、Flu陽性の肺炎症例が存在しないことが過去の報告と異なっていた⁶⁻¹⁰⁾。この理由として、①我が国での抗インフルエンザ薬使用量の多さ、②大学病院の特性、③医療介護関連肺炎の除外、④調査期間中、下気道炎・肺炎を起こしやすいA (H1N1) pdm09が流行していなかったことなどが考えられる。

以上のことから、本研究は、呼吸器ウイルスの流行も考慮し、数年間の観察期間が必要である。また、外来治療が可能な市中肺炎軽症例、医療介護関連肺炎にも対象を広げることも検討課題としては重要であると思われる。さらに、胸部単純レントゲン写真で肺炎との鑑別が困難な呼吸不全を呈する他の呼吸器疾患（COPD増悪・喘息発作・間質性肺炎急性増悪等）でも呼吸器ウイルスの影響を調査して必要があると推定された。

E. 結論

我が国の入院を要した成人市中肺炎（CAP）の大半（約56%）に原因となる病原体が判明し、一定の割合（13%）に呼吸器ウイルスが検出された。よって、CAPには細菌のみならず呼吸器ウイルスも関与することが推定された。

参考文献

- 1) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会 成人市中肺炎診療ガイドライン 2008.
- 2) Lim WS, Baudouin SV, George RC et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults : update 2009. Thorax. 2009 ; 64 Suppl 3 : iii1-55.
- 3) Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, Marrie TJ. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia : prevalence, pathogens, and presentation. Chest 2008 ; 134 : 1141-8.
- 4) Jennings LC, Anderson TP, Beynon KA, et al. Incidence and characteristics of viral community-acquired pneumonia in adults Thorax. 2008 ; 63 : 42-8
- 5) Fujitsuka A, Tsukagoshi H, Arakawa M, Goto-Sugai K, Ryo A, Okayama Y, Mizuta K, Nishina A, Yoshizumi M, Kaburagi Y, Noda M, Tashiro M, Okabe N, Mori M, Yokota S, Kimura H. A molecular epidemiological study of respiratory viruses detected in Japanese children with acute wheezing illness. BMC Infect Dis. 2011 ; 11 : 168.
- 6) Lieberman D, Shimoni A, Shemer-Avni Y et al. Respiratory viruses in adults with community-acquired pneumonia. Chest 2010 ; 138 : 811-6.
- 7) Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A et al. Etiology of community-acquired pneumonia : increased microbiological yield with new diagnostic methods. Clin Infect Dis 2010 ; 50 : 202-9
- 8) Takahashi K, Suzuki M, Minh le N et al. The incidence and aetiology of hospitalised community-acquired pneumonia among Vietnamese adults : a prospective surveillance in Central Vietnam. BMC Infect Dis 2013 ; 13 : 296.
- 9) Luchsinger V, Ruiz M, Zunino E et al. Community-acquired pneumonia in Chile : the clinical relevance in the detection of viruses and atypical bacteria. Thorax 2013 ; 68 : 1000-6.
- 10) Huijskens EG, Koopmans MP, Palmén FM et al. The value of signs and symptoms in differentiating between bacterial, viral and mixed aetiology in patients with a community-acquired pneumonia. J Med Microbiol 2013, doi : 10.1099/jmm.0.067108-0.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第87回日本感染症学会学術講演会2013年6月5日
横浜

18th Congress of the Asian Pacific Society of
Respirology 2013年11月13日 横浜

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

成人侵襲性肺炎球菌感染症由来株の細菌学的解析

研究分担者：常 彬（国立感染症研究所細菌第一部主任研究官）

研究協力者：前川 純子（国立感染症研究所細菌第一部）

研究要旨 2013年7月から2014年1月現在まで、本研究班に含まれる10道県中の5県で発症した成人侵襲性肺炎球菌感染症22例（うち髄膜炎9症例）から分離された肺炎球菌のうち、23価肺炎球菌ワクチン（PPSV23）に含まれる血清型の分離率は50.0%であった。PPSV23に含まれる血清型のうち、血清型3型肺炎球菌による症例は3例で、最も多かった。19Aによる症例は2例で、10A、15B、19F、22F、23F、33F型による症例はそれぞれ1例であった。PPSV23に含まれていない血清型は15A（2例）、23A（2例）、24F（2例）、15C（1例）、35B（1例）、38（1例）であった。2010年2月に導入された小児用7価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV7）に含まれる血清型（4、6B、9V、14、18C、19F、23F）による症例は2例（9.1%）のみであって、PCV7による集団免疫効果が示唆された。

A. 研究目的

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。本邦においては、23価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPSV23）、7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）および13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）が承認されている。現在、日本国内ではPCV13は小児を対象とする定期接種ワクチンとして使われている。一方、PPSV23が65歳以上の高齢者を対象に、2014年10月に定期接種（B類）になる。PPSV23は免疫不全のない高齢者において、今後の接種率の増加によって、ワクチン血清型によるIPDの発症率の減少が期待されている。一方、小児用PCV7の導入後におきたPCV7に含まれない血清型によるIPD罹患率の増加（serotype replacement）のような現象（Pilishvili T et al. JID 201；31-41, 2010）がおこる懸念も持たれている。本分担研究は、日本国内の10道県で行われた成人IPDの人口あたり発症率調査の一部として行われ、成人IPDより分離された肺炎球菌の細菌学的解析を行い、ペニシリンG等の抗菌薬への感受性の状況の変化も併せて調査し、PPSV23の効果を評価す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

1：成人IPD症例由来肺炎球菌

2013年7月から2014年1月現在まで、5県から送付された成人侵襲性感染症22例（うち髄膜炎9症例）由来の肺炎球菌を対象とした。血液寒天培地にて37°C、5%CO₂下で一晩培養した肺炎球菌を用いて解析を行った。

2：血清型別

肺炎球菌の血清型はStatens Serum Institute製血清を用いて、莢膜膨潤法により決定した。

3：薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は微量液体希釈法によって行った。薬剤感受性試験の結果は2008年から使われたCLSIの基準によって判別を行った。すなわち、髄膜炎由来肺炎球菌のペニシリンG（PCG）のMICが $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.12-1 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ 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、セフトキシムに対するMICが $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、セフトキシム感受性、低感受性、

耐性と判別した。髄膜炎以外IPD由来肺炎球菌のPCG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、セフトキシムに対するMICが $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 、 $2 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、セフトキシム感受性、低感受性、耐性と判別した。

4：マルチローカスシークエンスタイピング (MLST) 解析

MLSTでは、分離株のゲノムDNAを精製し、肺炎球菌のゲノム上にある7つのハウスキーピング遺伝子 (*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つの遺伝子のうち、5つ以上の遺伝子が同じである場合、同一のclonal complex (CC) に分類した。

C. 研究結果

1：成人IPDの患者背景

22例IPDの症例情報を表1に示す。患者年齢は33-89歳、平均は62.8歳で、男女それぞれ11名であった。65歳以下の患者は11名で、全体の半数を占めていて、そのうちの7名には基礎疾患はなかった。22名の患者のうち、PPSV23を接種されていたのは1名のみで、5名の患者の肺炎球菌ワクチンの接種歴は不明で、残る16名の患者にはPPSV23の接種歴はなかった。

22症例IPDのうち、髄膜炎は9症例 (40.9%)、菌血症を伴う肺炎の症例は8例 (36.4%)、菌血症のみは5例 (22.7%) であった。1症例に感染性腹部大動脈瘤、1症例に中耳炎の症状がみられた。

2：成人IPD由来肺炎球菌の血清型分布

22例の成人IPD由来肺炎球菌の血清型別の結果を図1に示す。血清型3型肺炎球菌による症例は3例 (13.6%) で、最も多かった。19A、15A、23A、24F型肺炎球菌はそれぞれ2症例から分離され、分離率は9.1%であった。10A、15B、15C、19F、22F、23F、33F、35B、38型による症例はそれぞれ1例であった。PPSV23に含まれる血清型の分離率は50.0%であった。海外で成人にも承認されているPCV13のカバー率は31.8%であった。2010年2月に日本に導入された小児用PCV7に含まれる血清型 (4、6B、9V、14、18C、19F、

23F) による症例は2例 (9.1%) のみであった。また、PPSV23の接種歴のある1症例より分離された肺炎球菌 (表1、ASP27) は血清型23Fで、PPSV23に含まれるタイプであった。

3：成人IPD由来肺炎球菌の薬剤感受性

22例の成人IPD症例 (髄膜炎9症例、髄膜炎以外13症例) 由来肺炎球菌の薬剤感受性を調べた。

髄膜炎由来肺炎球菌9株のうち、5株はPSSP、4株はPISPであった。セフトキシム感受性菌は8株、低感受性は1株であった。9株ともメロペネム感受性であった。菌血症から分離された13株はすべてPSSPで、セフトキシム感受性菌を示した。そのうちの2株はメロペネムに対するMICは $0.5 \mu\text{g/mL}$ で、低感受性であった。22株の肺炎球菌にはPRSPおよびセフトキシム耐性菌がみられなかった。すべての株はパニペネム、バンコマイシンおよびトシル酸トスフロキサシンに感受性を示した。その一方、21株 (95.5%) はエリスロマイシン耐性であった。

4：成人IPD由来肺炎球菌のST型

成人IPD由来肺炎球菌のMLSTの解析結果を表1に示す。22株の肺炎球菌のうち、2株 (ASP13とASP24) はデータベースに登録されていない新規STタイプであった。世界中の多くの地域から分離されるST型 (血清型3型のST180、15A型のST63、19F型のST236、23A型のST338、23F型のST242など) は成人IPD症例からも分離された。一方、ASP13のST型は新規STタイプ (5、35、2、1、45、39、18) で、ST717 (5、35、29、1、45、39、18) と*gki*遺伝子の配列が異なった近縁タイプであった。ASP13は血清型3型で、日本国内で分離された血清型3型の肺炎球菌の多くはST180 (7、15、2、10、6、1、22) またはその近縁タイプであった。一方、ST717は血清型33F肺炎球菌には多くみられるSTであったため、ASP13は血清型33F肺炎球菌のcapsular switching (遺伝子組み換え) である可能性が示唆された。今後、ワクチン (PCV13またはPPSV23) のセレクションによるワクチンに含まれる血清型の荚膜遺伝子が非ワクチン血清型にcapsular switchingするケースが増加することが懸念される。

表1 成人IPD症例の患者情報と解析結果

菌株番号	血清型	症例診断名	年齢	性別	PPSV23 接種歴	基礎疾患の有無	PCG	CTX	MEPM	PAPM	EM	VCM	TFLX	ST (CC)
ASP1	15A	髄膜炎	55	F	なし		0.25	0.5	0.06	0.015	≥8	0.25	0.25	374
ASP2	15C	菌血症	84	F	不明		0.06	0.5	0.015	≤0.008	4	0.25	≤0.12	7793
ASP3	6C	菌血症	71	F	なし	低栄養状態	0.03	0.12	0.015	≤0.008	2	0.25	≤0.12	2923
ASP4	15B	菌血症、肺炎	86	F	不明	糖尿病	0.06	0.5	0.03	≤0.008	≥8	0.25	≤0.12	7793
ASP5	10A	髄膜炎	61	F	なし	糖尿病	0.06	1	0.015	≤0.008	4	≤0.12	≤0.12	5236
ASP6	3	菌血症、感染性腹部大動脈瘤	73	M	なし	悪性腫瘍	0.03	0.12	0.015	≤0.008	≥8	0.5	0.5	180
ASP7	15A	髄膜炎	36	F	なし		0.25	0.25	0.06	0.015	≥8	0.25	0.25	63
ASP8	23A	菌血症	77	F	なし	無脾症	0.25	0.5	0.06	0.015	2	0.25	0.25	338
ASP9	24F	髄膜炎	33	M	なし		≤0.015	≤0.03	≤0.008	≤0.008	≥8	0.25	0.5	4982
ASP10	33F	菌血症	46	M	なし		≤0.015	≤0.03	≤0.008	≤0.008	≥8	0.25	0.25	717
ASP13	3	菌血症、肺炎	81	F	不明		≤0.015	≤0.03	0.015	≤0.008	≥8	0.25	≤0.12	CC717
ASP17	23A	髄膜炎	62	M	なし		0.25	0.25	0.06	0.015	≥8	0.25	0.25	338
ASP18	19F	菌血症、肺炎	89	F	なし		2	0.5	0.5	0.06	2	0.25	0.25	236
ASP19	38	菌血症、肺炎	71	M	不明	微小変化型ネフローゼ症候群	0.03	0.12	0.015	≤0.008	≥8	0.25	0.25	6429
ASP21	3	髄膜炎、中耳炎	56	F	なし		0.03	0.25	0.015	≤0.008	≥8	0.25	0.25	180
ASP22	22F	髄膜炎	44	M	なし	悪性腫瘍術後	0.03	0.5	0.015	≤0.008	≥8	0.25	0.25	7158
ASP23	19A	菌血症、肺炎	74	M	なし		0.03	0.25	0.015	≤0.008	≥8	0.25	0.25	3111
ASP24	19A	髄膜炎	54	F	なし	悪性腫瘍	0.06	0.5	0.015	≤0.008	≥8	0.25	≤0.12	CC3111
ASP25	6C	髄膜炎	43	M	なし	自己免疫疾患	0.12	0.25	0.12	0.015	≤0.12	0.25	≤0.12	5241
ASP26	35B	菌血症、肺炎	69	M	不明		0.06	0.25	0.015	≤0.008	≥8	0.25	0.25	2755
ASP27	23F	菌血症、肺炎	82	M	あり	無脾症	1	1	0.5	0.06	≥8	0.25	≤0.12	242
ASP28	24F	菌血症、肺炎	35	M	なし		≤0.015	≤0.03	0.015	≤0.008	≥8	0.25	≤0.12	2572

MIC の単位: $\mu\text{g}/\text{mL}$

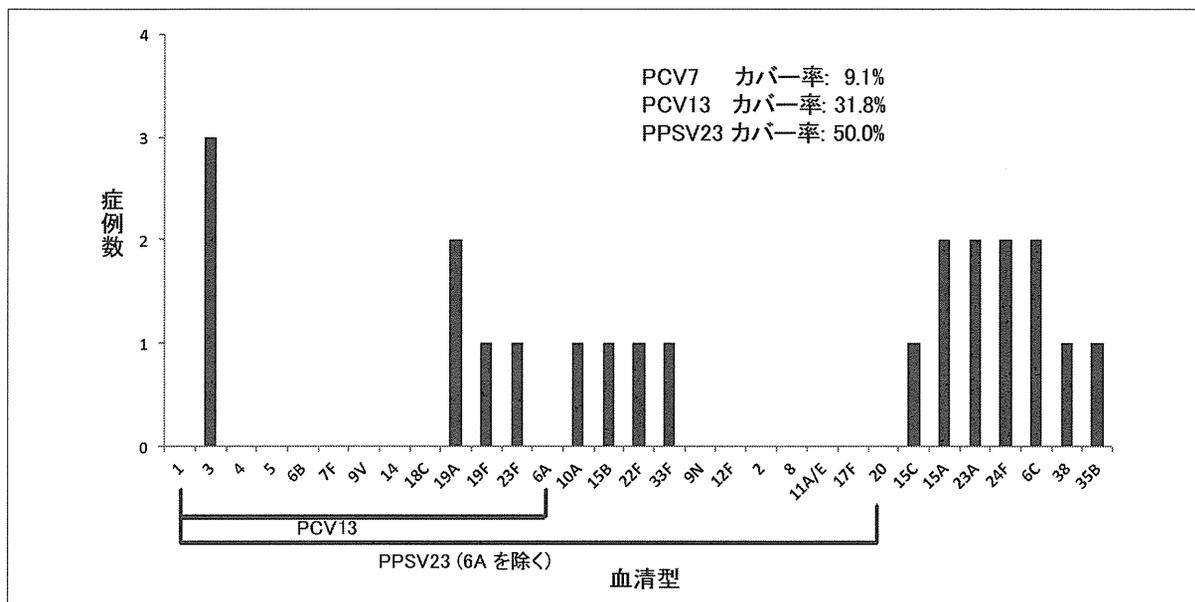


図1 2013/7-2014/2月現在で各血清型肺炎球菌を原因とする成人IPD症例数 (n=22)

D. 考察

日本ではPPV23が1988年に薬事承認されたが、現在のところ自費のため、接種率はまだ低いと思われる。本研究の同一地域における成人IPDの疫学調査は、侵襲性肺炎球菌感染症が2013年4月1日から全数把握疾患に指定された後、さらに2014年10月にPPSV23が定期接種（B類）の対象になる前の両期間を含む形で始まったため、PPSV23の効果をリアルタイム、かつ正確に反映することが期待されている。本分担研究は、現段階では菌株数は少ないものの、成人IPD由来肺炎球菌の半分はPPSV23に含まれないnon-vaccine型であった。日本国内にPCV7が導入される前は小児IPD由来肺炎球菌の76.6%と90.2%がそれぞれPCV7とPCV13に含まれていたという調査結果（常彬ら、IASR 34：64-66）に比べて、成人IPD由来肺炎球菌の血清型は多様性を示し、ワクチンタイプが占めている割合は低かった。後者の理由としては、小児用ワクチンPCV7の普及は、PCV7に含まれる血清型の肺炎球菌による小児IPDの減少のみならず、成人への効果（集団免疫効果）も果たしたためと考えられる。

2014年10月からPPSV23の定期接種が始まり、対象者の接種率の増加に伴い、高齢者における肺炎球菌性感染症の予防効果や医療費の削減効果が期待されている。一方、PCV7導入により19A型やその他のPCV7に含まれない血清型の肺炎球菌

によるIPD罹患率の上昇の懸念も持たれる。今後、PPSV23の予防効果とともに、serotype replacementおよびcapsular switchingの有無を継続して調べる必要がある。

E. 結論

2013年7月から2014年1月現在までに成人IPDから分離された肺炎球菌はnon-vaccine型が半数を占めていた。PCV7による成人への集団免疫効果が現れた可能性が示唆された。一方、PPSV23の予防効果を評価するために、IPD由来肺炎球菌の収集と細菌学的解析を続ける必要がある。

F. 健康危機情報

特記すべきもの無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

地方衛生研究所への肺炎球菌Serotyping PCR検査法の導入および インフルエンザ菌の収集

研究分担者：石岡 大成（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究協力者：鈴木 裕（山形県衛生研究所）

細谷 美香子（新潟県保健環境科学研究所）

永井 佑樹（三重県保健環境研究所）

田辺 純子（奈良県保健環境研究センター）

金山 知代（高知県衛生研究所）

岡元 冬樹（福岡県保健環境研究所）

濱田 まどか（鹿児島県環境保健センター）

岡野 祥（沖縄県衛生環境研究所）

新垣 絵里（沖縄県衛生環境研究所）

倉井 大輔（杏林大学医学部附属病院呼吸器内科）

皿谷 健（杏林大学医学部附属病院呼吸器内科）

石井 晴之（杏林大学医学部附属病院呼吸器内科）

野田 雅博（国立感染症研究所感染症疫学センター）

木村 博一（国立感染症研究所感染症疫学センター）

研究要旨 平成25年4月から侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症が、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律により規定された5類感染症に追加された。このため、これら疾患の起因病原体の検査を地方衛生研究所等における公的検査機関で実施することを目的として、分離菌株の地方衛生研究所への収集方法について検討した。また、これらの病原体に関するラボレベルでの細菌研修について実施する必要性が生じたことから、一部の地方衛生研究所の研究員を対象に肺炎球菌のMultiplex serotyping PCR検査法を中心とした実技研修を実施することとした。さらには、今年度研究分担医療機関から送付された肺炎球菌およびインフルエンザ菌の精査を行ったところ、肺炎球菌はMultiplex serotyping PCR法にて3、15、23Aなどの血清型が検出された。また、インフルエンザ菌については、莢膜型別用免疫血清およびPCR法により検討した3菌株のすべてがnon-typable *Haemophilus influenzae*であった。これらの検査法は、地方衛生研究所に導入可能な検査法であり、今後これら病原体に関する血清型の流行を自治体レベルで監視、把握していくためにも、必要な検査であることが示唆された。

A. 研究目的

平成25年4月から、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下、感染症法）の一部が改正され、「侵襲性肺炎球菌感染症」および「インフルエンザ菌感染症」が5類感染症に追加された。それにともない、地方自治体はそれ

ぞれの疾病についての発生状況を各々の自治体レベルで把握することができるようになった。一方、侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症の予防のため、平成25年度から小児を対象としたPCV7（11月からPCV13に移行）、Hibワクチンが公費助成の対象となったことから、現

在発生しているそれぞれの患者から分離される菌株の血清型が注目される¹⁻³⁾。一方、肺炎球菌は成人の市中肺炎の主要な原因菌であり、これらの約10%が侵襲性肺炎球菌感染症であると推定される。また、平成24年5月に予防接種部会が23価肺炎球菌ワクチンを予防接種法対象ワクチンへの追加を示唆した。また、インフルエンザ菌も成人の市中肺炎の原因菌であるが、本邦における成人の侵襲性インフルエンザ感染症に関する詳細はよくわかっていない。したがって、成人における重症肺炎サーベイランス体制の構築は急務であり、しかも自治体レベルでの侵襲性細菌感染症の罹患率や原因菌の血清型を把握することが重要である。しかしながら、これらの病原菌に関する細菌検査のほとんどは医療機関またはコマーシャルラボで実施されており、地方衛生研究所などの公的研究機関ではルーチン検査として実施されていないのが現状である。

そこで、本研究においては、地方自治体における感染症の検査、研究機関である地方衛生研究所が関与したサーベイランス体制の構築を目的として、地方衛生研究所における侵襲性細菌感染症に関する細菌検査体制について検討を行った。

B. 研究方法

1. 対象地方衛生研究所：本研究実施上適切な人口規模を持つ地域を県単位で抽出した。
2. 菌株の収集：それぞれの自治体の事情に応じた収集方法を、本庁担当課、地方衛生研究所および感染症情報センター、本研究班との協議によって決定した。
3. 侵襲性細菌感染症実技研修：地方衛生研究所を対象に、侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症に関する実技研修についての希望を調査し、実技研修のプログラミングについて検討を行った。また、希望する地方衛生研究所を対象に実技研修を実施した。
4. 肺炎球菌およびインフルエンザ菌の血清型別：地方衛生研究所における肺炎球菌およびインフルエンザ菌を対象とした細菌検査を想定して、特に、血清型別についての検査法を検討した。肺炎球菌に関しては、Multiplex Serotyping PCR法の導入を検討した^{4,5)}。すなわち、肺炎球菌の各

血清型を8グループに選別し、それぞれのグループで血清型に特異的なプライマーを用いてmultiplexによるPCR反応を行った。その後、電気泳動およびエチジウムブロマイド染色により血清型を決定した。なお、複数のバンドが観察された場合は対象となる血清型のプライマーを用いてsingle PCRを実施して血清型を決定した。インフルエンザ菌に関しては、市販血清であるインフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清を用いた凝集反応による方法で血清型を確認した。また、莢膜抗原に関する遺伝子の有無を確認するために、single PCR法を実施、検討した⁶⁻⁸⁾。これらの検査法を実施するにあたり、今年度本研究の分担研究者が所属する医療機関から国立感染症研究所に送付された菌株およびDNAを用いた。

C. 研究結果

地方衛生研究所の選定

本研究を実施する上で、適切な人口規模と思われる地域として以下の10自治体を抽出した。すなわち、北海道、宮城県、山形県、新潟県、三重県、奈良県、高知県、福岡県、鹿児島県、および沖縄県である（図1）。侵襲性細菌感染症患者発生時には、医療機関からこれらの自治体に属する地方衛生研究所等に菌株を搬送し、血清型別などの細菌検査を実施する協議を各自治体等と行った。しかしながら、自治体ごとに様々な行政上の事情を抱えており、新たな病原体を医療機関等から地方

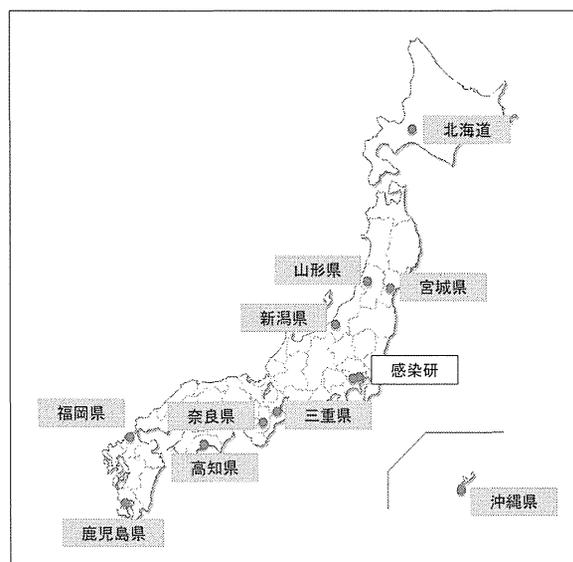


図1 菌株収集の対象エリア

衛生研究所に搬送することは、一朝一夕には実現困難であることが判明した。そこで、まずは、菌株収集について対応可能な自治体および地方衛生研究所を対象に、国立感染症研究所において侵襲性細菌感染技術研修を実施することとなった。

侵襲性細菌感染症技術研修の実施

希望する地方衛生研究所の研究員を対象に、標記研修を実施することとした。平成26年2月25日～27日に国立感染症研究所戸山庁舎において実施した。研修参加を希望した地方衛生研究所は、山形県衛生研究所、新潟県保健環境科学研究所、三重県保健環境研究所、奈良県保健研究センター、高知県衛生研究所、福岡県保健環境研究所、鹿児島県環境保健センター、および沖縄県衛生環境研究所であった。主たる内容は、血清型のスクリーニング検査としての肺炎球菌Multiplex serotyping PCR法の技術供与である。肺炎球菌の血清型は、必ずしもPCR法のみでは決定できないので、最終的には国立感染症研究所において莢膜膨化法により決定する(図2)。インフルエンザ菌についても市販抗血清による凝集反応のみならず、PCR法^{6,7)}による血清型別を実施した。また、両菌種とも一般的な同定方法について研修を実施し

た。

肺炎球菌の血清型およびインフルエンザ菌の血清型

今回抽出した10地域における研究協力者(基幹医療機関)から先行搬送された肺炎球菌株(DNA)16検体、インフルエンザ菌株3検体について精査した。Multiplex serotyping PCR法によって、血清型3が4検体、10Aが2検体、15F/15Aが2検体、15B/15Cが2検体、23Aが2検体、6C/6Dが1検体、24(24F/24A/24B)が1検体、33F/(33A/37)が1検体、35Bが1検体検出された(図3)。これらの結果は、本研究班における他の研究協力者が実施している莢膜膨化法による血清型別の結果

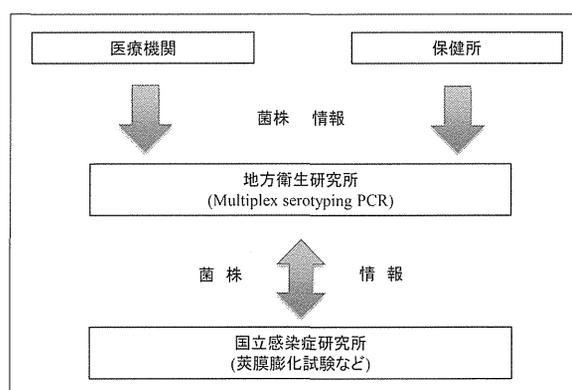


図2 地方衛生研究所および国立感染症研究所の役割

Reaction 1 ¹⁾	検出数	Reaction 2 ¹⁾	検出数	Reaction 3 ¹⁾	検出数	Reaction 4 ¹⁾	検出数
6A/6B/6C/6D ²⁾	1	8		19F		24(24A/24B/24F)	1
3	4	33F/(33A/37)	1	12F/(12A/44/46)		7C/(7B/40)	
19		15A/15F	2	11A/11D		4	
22F/22A		7F/7A		38/25F/25A		18(18A/18B/18C/18F)	
16		23A	2	35B	1	9V	

Reaction 5 ¹⁾	検出数	Reaction 6 ¹⁾	検出数	Reaction 7 ¹⁾	検出数	Reaction 8 ¹⁾	検出数
14	39			23B		21	
1		10F/(10C/33C)		35A/(35C/42)		2	
23F	5			34		20	
15B/15C	2	35F/47F		9N/9L		13	
10A	2	17F		31			

1) すべての反応系に陽性コントロールとしてcpsA 検出プライマーを含む

2) 6型群が検出された場合 additional reaction を実施

図3 Multiplex serotyping PCRの反応群別プライマー構成および遺伝子検出状況

に対して矛盾しないものであり、このことから、地方衛生研究所においても Multiplex serotyping PCR法は肺炎球菌の血清型別のスクリーニングに十分対応できることが示唆された。また、搬送されたインフルエンザ菌株の3株は、すべての検体が莢膜型別用免疫血清で特異的凝集を示さず、また、PCR法^{6,7)}によっても特異的バンドは検出されなかったため、non-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi) と判定した。この3菌株はいずれも菌血症を伴う高齢者の血液検体から分離されていた。これらの菌株はセフィナーゼ試験によりβ-lactamase非産生株であり、供試薬剤に対しても明確な耐性を示さなかった。

考察

平成25年度から侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症が五類感染症として位置づけられたこと、およびワクチン接種に関する公的助成の実施の観点から、地方自治体における本疾患に関する情報収集、細菌検査などのサーベイランス体制を構築することは重要である。特に、本邦における高齢者に対する23価肺炎球菌ワクチンの肺炎予防効果について示されており⁹⁾、また、予防接種部会においても成人用肺炎球菌ワクチンは定期接種として位置づけられたことから、成人の侵襲性肺炎球菌感染症のサーベイランスは重要である。しかも、成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症に関しては、罹患状況などの詳細について不明であることから、これらのサーベイランス構築は急務であると考えられる。

本研究において、一部の地方衛生研究所が積極的に侵襲性細菌感染症技術研修に参加し、自施設において Multiplex serotyping PCRを中心とした細菌検査の導入を検討することになったのは、侵襲性細菌感染症に関するサーベイランスを構築する第一歩となったと考えられる。まずは、地方衛生研究所でスクリーニングを実施し、その後国立感染症研究所で精査する体制作りは、我が国の感染症行政における基本である。

今回、先行搬送された肺炎球菌のDNAを血清型別したところ、Multiplex serotyping PCR法によって、ワクチン非含有血清型が少なからず検出されたことから、地方衛生研究所における本検査

の重要性は大きいと思われる。また、インフルエンザ菌に関しても、ワクチン導入により、いわゆる Hib の発生が減少し b 型以外の血清型や NTHi の発生が認められていることから、今後地方衛生研究所における検査体制を鑑みたサーベイランスは重要であると考えられた。

なお、本研修は初めて実施することから、研修人数に制限を設けた。今後は他の地方衛生研究所の希望により同様の研修を実施する予定である。

D. 結論

侵襲性細菌感染症由来菌株の収集については、全国統一的方法は無く、各自治体の事情に応じた収集方法を考案しなければ効率的かつ確実に地方衛生研究所および国立感染症研究所に搬入されることは難しいことが判明した。しかしながら、侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症由来菌株の血清型を決定することは、今後のワクチン開発および感染症行政対応における重要なファクターであることから、今後も継続して菌株の収集方法や地方衛生研究所における検査導に関する検討を重ねることが必要不可欠であることが示唆された。

参考文献

- 1) Professor David Salisbury, Director of Immunisation at the Department of Health ; Introduction of prevenar 13 into the childhood immunisation programme ; Dear colleague letter ; Department of Health ; 8 February 2010.
- 2) ACIP Provisional Recommendations for Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13) Among Infants and Children, February 24, 2010.
- 3) CDC. Licensure of a 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13) and Recommendations for Use Among Children ACIP. MMWR March 12, 2010 : 258-261.
- 4) Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of Clinical*

- Microbiology. 2006 : 44 : 124-131.
- 5) Carvalho Mda G, Pimenta FC, Gertz RE Jr, et al. PCR-based quantitation and clonal diversity of the current prevalent invasive serogroup 6 pneumococcal serotype, 6C, in the United States in 1999 and 2006 to 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009 : 47 : 554-559.
 - 6) Falla, T. J., Crook, D. W. M., Brophy, L. N., Maskell, D., Kroll, J. S. and Moxon, E. R. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 1994 : 32 : 2382-2386.
 - 7) van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol.* 1990 : 33(4) : 271-276.
 - 8) Davis GS, Sandstedt SA, Patel M, Marrs CF, Gilsdorf JR. Use of *bexB* to detect the capsule locus in *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 2011 : 49(7) : 2594-2601.
 - 9) Maruyama T, Taguchi O, Niederman MS, Morser J, Kobayashi H, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Nakayama S, Nishikubo K, Noguchi T, Takei Y, Gabazza EC. Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents : double blind, randomised and placebo controlled trial. *BMJ.* 2010 : 8 ; 340 : c1004.
 - 10) Agrawal A, Murphy TF. *Haemophilus influenzae* infections in the H. influenzae type b conjugate vaccine era. *J Clin Microbiol.* 2011 : 49(11) : 3728-3732.
 - 11) Shuel M, Hoang L, Law DK, Tsang R. Invasive *Haemophilus influenzae* in British Columbia : non-Hib and non-typeable strains causing disease in children and adults. *Int J Infect Dis.* 2011 : 15(3) : e167-173.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

資料

侵襲性細菌感染症技術研修

平成 26 年 2 月 25～27 日

於国立感染症研究所細菌第一部

研修担当者：石岡 大成（国立感染症研究所 感染症疫学センター5 室）

常 彬（国立感染症研究所 細菌第一部）

1. Multiplex serotyping PCR 法による肺炎球菌の血清型別

5%ヒツジ血液寒天培地にて一晚培養した肺炎球菌（serotype 3）のコロニーから、High Pure PCR Product Purification Kit（Roche）を使用してゲノム DNA を精製した。抽出した DNA は 5 倍希釈して PCR 用テンプレートとして用いた。PCR 反応には QIAGEN Multiplex PCR Kit（QIAGEN）を用いて、8 セットの Multiplex PCR を行った。電気泳動は 10 μ L の PCR 産物を TBE で作製した 2% Nusieve 3:1 Agarose gel（タカラバイオ）にアプライし、50V で 1.5 時間泳動を行った。マーカーは 50 bp DNA ladder を用いた。泳動後、Et-Br 液で 30 分染色し、その後 DDW で 10 分脱色した。脱色後、ゲル撮影装置で DNA バンドの有無を確認した。serotype 3 の場合は、Reaction 1 において、371 bp のバンドが確認され、他の Reaction ではバンドは確認されなかった（図 1）。また、positive control として *cpsA* のバンドが 160 bp に確認された。

2. PCR 法によるインフルエンザ菌の血清型別

チョコレート血液寒天培地にて一晚培養したインフルエンザ菌（serotype a）のコロニーを TE buffer（pH 8.0）に懸濁し（McFarland 1～2 程度）、12,000 rpm、2 分間遠心処理した。上清を取り除き、200 μ L 程度の TE buffer で再懸濁してこれを DNA 抽出用サンプルとし、High Pure PCR Product Purification Kit（Roche）を使用してゲノム DNA を精製した。PCR 反応には Green GoTaq（Promega）を用いて、conventional single PCR を行った。電気泳動は 10 μ L の PCR 産物を TBE で作製した 2% Nusieve 3:1 Agarose gel（タカラバイオ）にアプライし、50V で 1.5 時間泳動を行った。マーカーは 50 bp DNA ladder を用いた。泳動後、Et-Br 液で 30 分染色し、その後 DDW で 10 分脱色した。脱色後、ゲル撮影装置で 260 bp（serotype a）のバンドが確認された（図 2）。