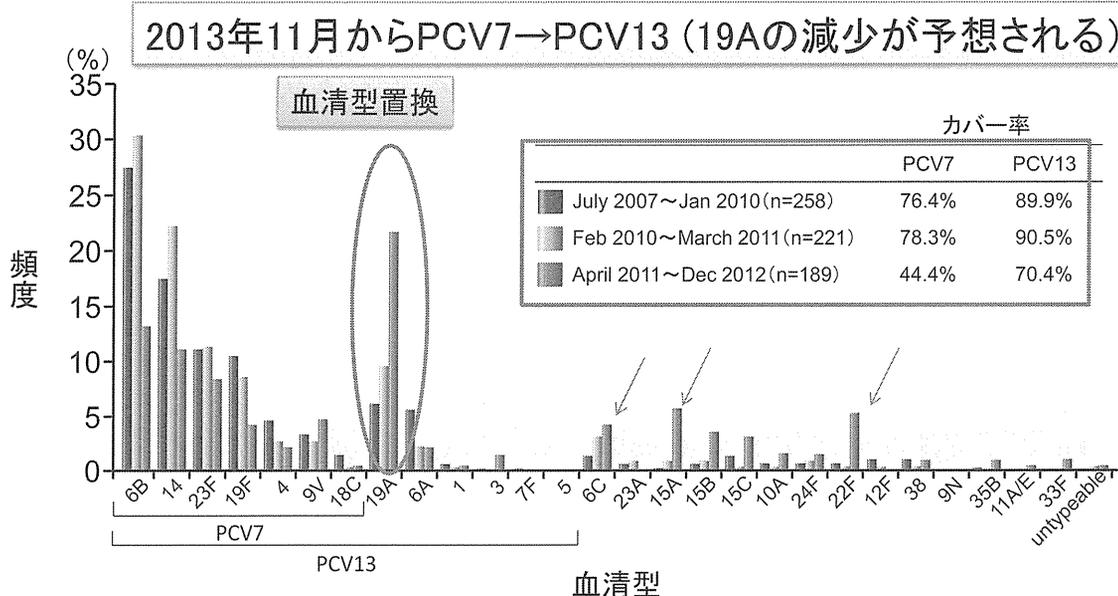


侵襲性肺炎球菌感染症の血清型分布 (2007～2012)



小児侵襲性肺炎球菌感染症(n=668)
9県における病原体サーベイランス

常 彬ほか:IASR 34(3):64, 2013

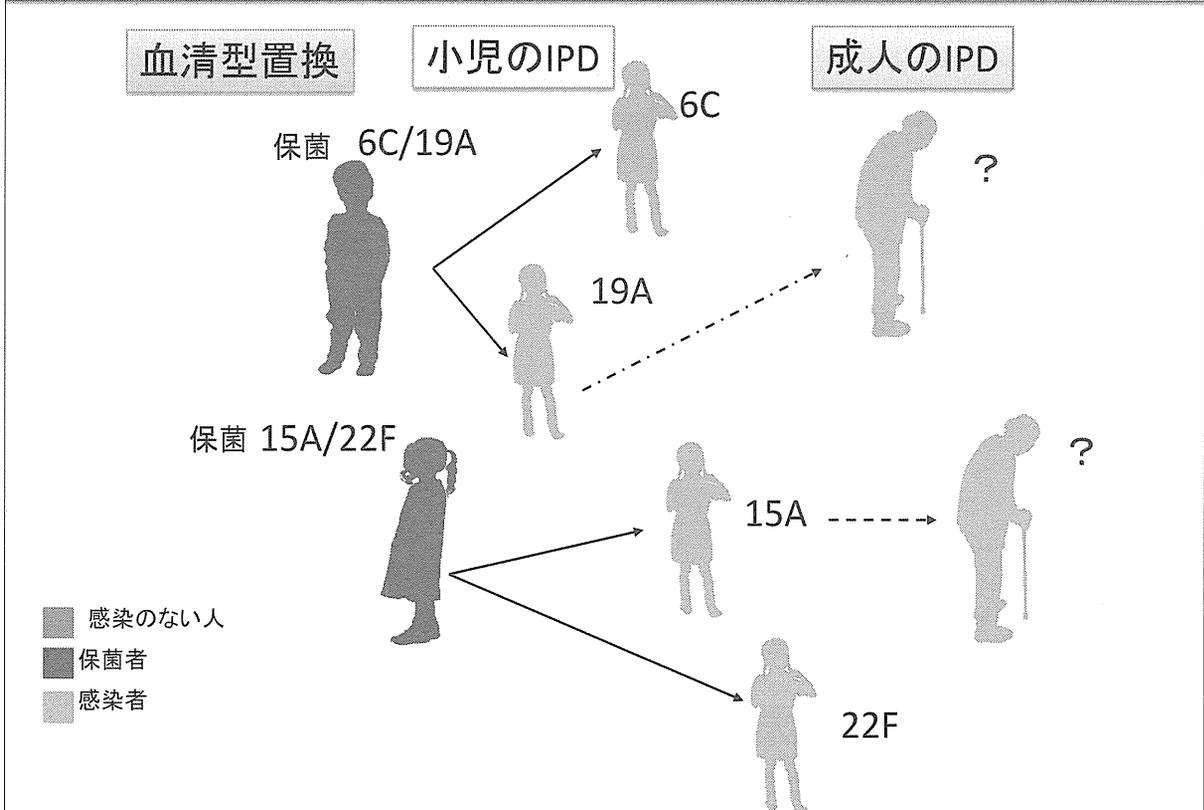
侵襲性インフルエンザ菌感染症の莢膜型

| | 接種開始前 2007/6～2008/11 (1年6か月) n=71 | 任意接種開始後 2008/12～2010/12 (2年1か月) n=158 | 全国公的補助開始後 2011/1～2013/3 (2年3か月) n=82 |
|------|--|--|---|
| Hib | 69 (97.2%) | 154 (97.5%) | 68 (83.0%) |
| NTHi | 2 (2.8%) | 4 (2.5%) | 14 (17.0%) |

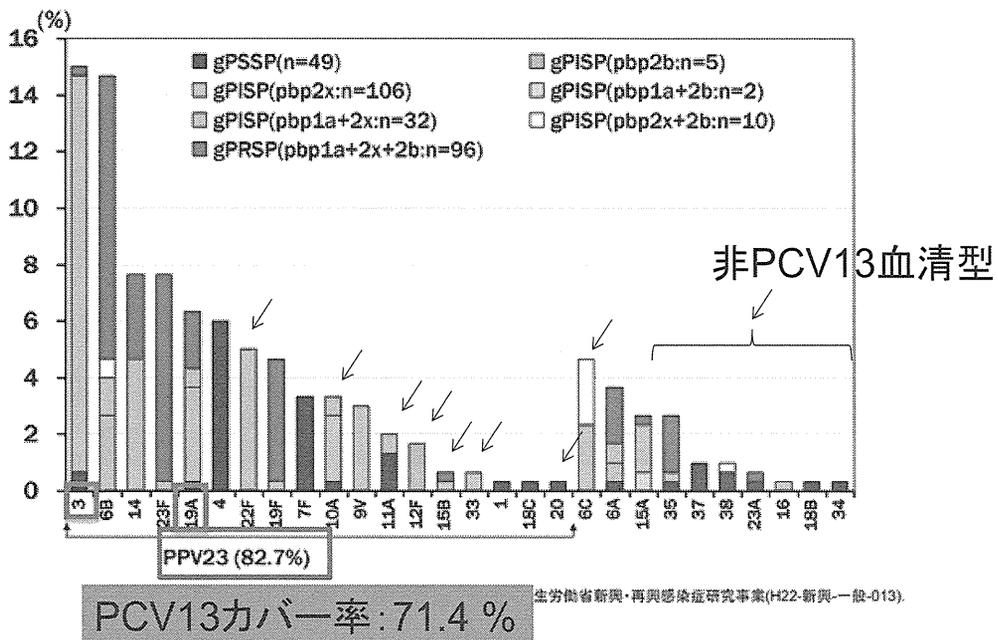
Hibワクチン導入後のNTHi株の増加

(Sasaki Y, et al. IASR, Vol 34 No7, 2013)

PCV7の定期接種化と血清型置換の影響



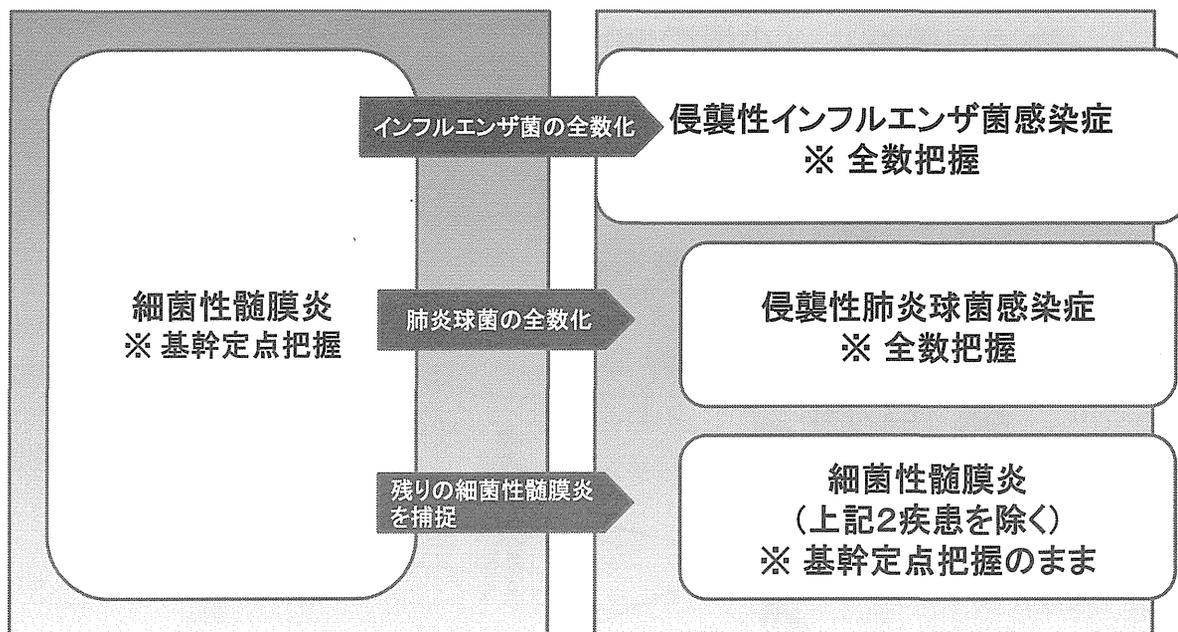
成人の侵襲性感染症の血清型分布 (2010年)



サーベイランス変更点

【昨年度まで】

【今年度から】



IPDは感染症法に基づく5類全数把握疾患となる

※ 上記いずれも感染症法施行規則第6条を改正

IASR

<速報> 侵襲性肺炎球菌感染症・侵襲性インフルエンザ菌感染症の発生動向
— 2013年4月からの5類全数届出の状況について —

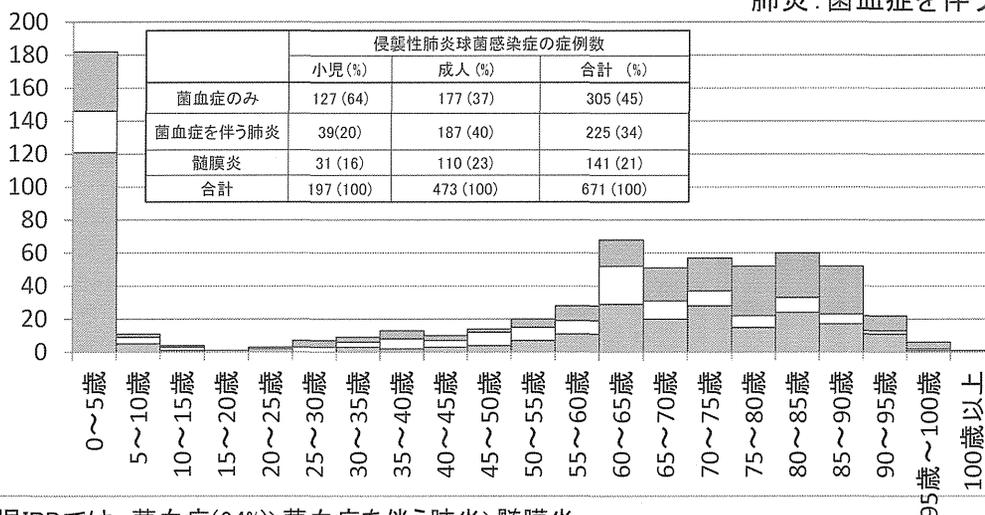
2013年4月より5類全数把握

(掲載日 2014/1/7)

年齢別の侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)発生動向と臨床像

■ 菌血症 □ 髄膜炎 ■ 肺炎

肺炎: 菌血症を伴う肺炎

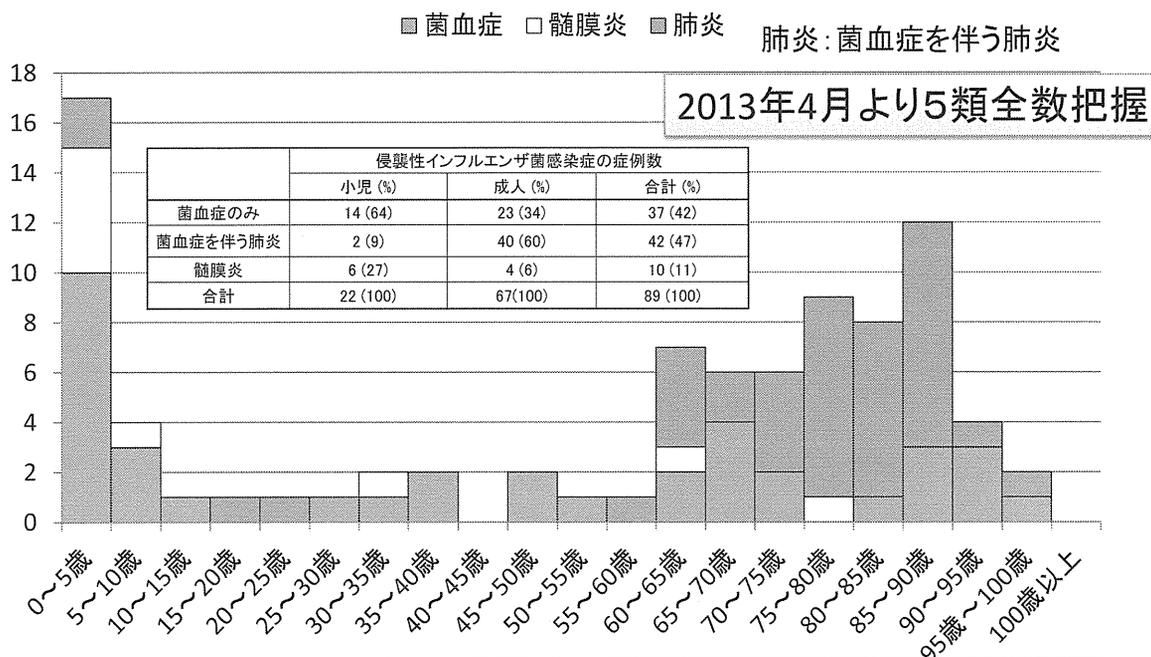


小児IPDでは、菌血症(64%)>菌血症を伴う肺炎>髄膜炎

成人のIPDでは、菌血症を伴う肺炎、菌血症がいずれも約4割>髄膜炎は2割

今後、経年的な発生動向と原因菌の血清型の変化から肺炎球菌ワクチン定期接種の影響を評価する

年齢別の侵襲性インフルエンザ菌(IHD)感染症の発生動向と臨床像



IHDの総数はIPDの13%ながら、成人の高齢者におけるIHDの集積が明らかになった。
 小児のIHDでは、菌血症(64%)>髄膜炎(27%)>菌血症を伴う肺炎。
 成人のIHDでは、菌血症を伴う肺炎(60%)が最多>菌血症(34%)>>髄膜炎(6%)
 今後、経年的な発生動向と原因菌の血清型の変化からHibワクチン定期接種の影響を評価する

高齢者にみられたNTHiによる侵襲性インフルエンザ菌感染症

症例:76歳 男性

現病歴:入院2日前より感冒様症状が出現した。しかし、入院当日まで症状の改善なく、近医を再受診しようとして当日朝に自宅を出たところ、AM8:55に自宅前で倒れたため救急要請となった。救急隊到着時には心肺停止状態であったため、心肺蘇生術を施行されながら搬送された。

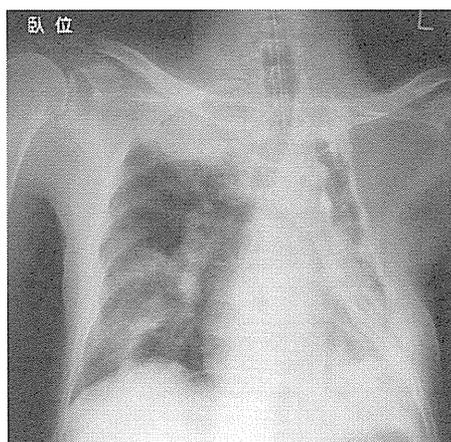
既往歴:肝硬変(HCV)、陳旧性肺結核(左胸郭形成術)

身体所見:意識レベル Glasgow Coma Scale: E1V1M1、
 血圧 63/46mmHg、心拍 66回/分、対光反射消失

血液生化学所見:WBC 13330 / μ l, Hb 11.2 g/dl, Plt 8.2万/ μ l, AST 459 IU/l, ALT 171 IU/l, γ -GTP 21 IU/l, ALP 316 IU/l, LDH 1101 IU/l, CPK 1567 IU/l, AMY 92 IU/l, T-bil 1.9 mg/dl, BUN 35 mg/dl, Cr 1.38 mg/dl, CRP 2.16 mg/dl

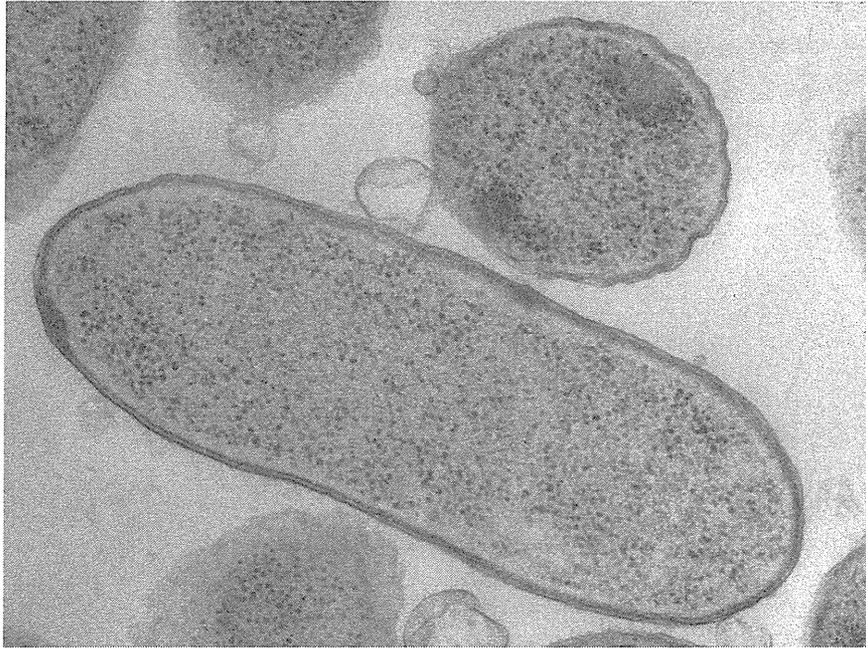
- 胸部レントゲン検査では、左肺の虚脱および右上下肺野に浸潤影を認め、心肺停止、ショックを伴う重症市中肺炎の診断となった。
- 入院時の喀痰グラム染色ではグラム陰性桿菌を多数認め、喀痰、血液からインフルエンザ菌が分離された。入院当日からメロペネムとシプロキサンの併用投与を開始したが、入院第3病日に死亡した。

胸部X線所見

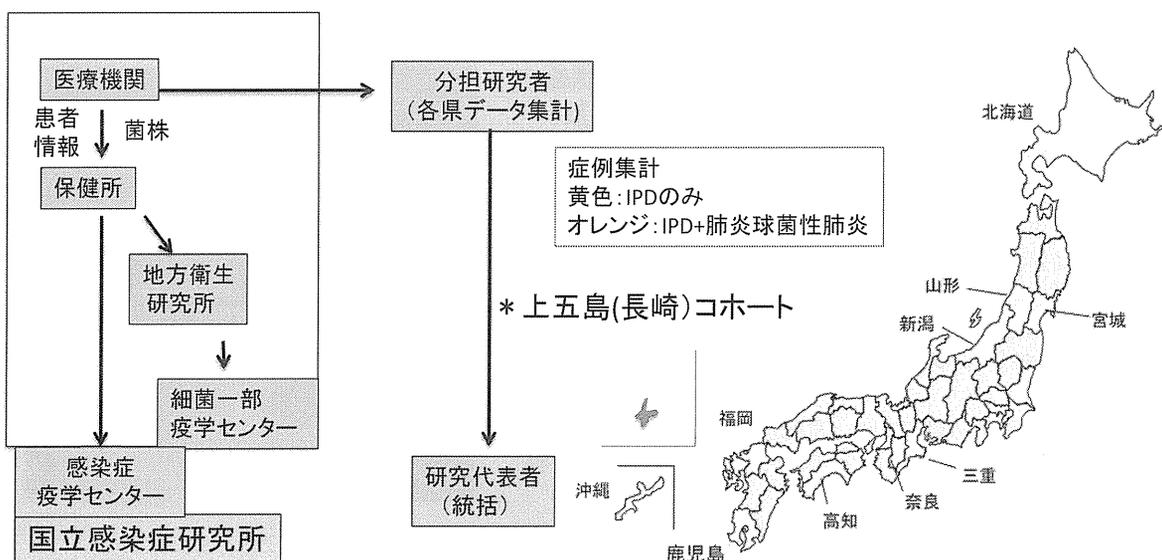


(Hamaguchi S, et al. IASR July 2013)

血液分離株の走査型電顕写真(x 50,000)



10道県におけるIPD/IHDの発生動向と原因菌の動向: さあこれから



肺炎球菌分離株のPspA cladeの分布に関する研究

研究分担者：金城 雄樹（国立感染症研究所真菌部室長）

研究協力者：常 彬（国立感染症研究所細菌第一部主任研究官）

大西 真（国立感染症研究所細菌第一部部長）

朴 貞玉（大阪大学微生物病研究所特任研究員）

研究要旨 本研究では、成人の肺炎球菌性肺炎や侵襲性肺炎球菌感染症をおこす菌株の細菌学的特徴を把握する目的で、全ての肺炎球菌に認められ、病原性因子として重要なpneumococcal surface protein A (PspA) 蛋白に着目して解析を行った。成人の肺炎球菌性肺炎症例の喀痰から分離した4株及び侵襲性肺炎球菌感染症症例の血液または髄液から分離した12株について、PspA蛋白のcladeを決定した。侵襲性肺炎球菌感染症症例由来の菌株では、clade 1が58.3%、clade 3が8.3%、clade 4が33.3%という結果であった。血清型や分離部位とclade分布の関係性について解析したところ、血清23A型の2株がどちらもclade 1であった。また、血液由来の株がFamily 1とFamily 2が半々であるのに対し、髄液由来の2株はどちらもclade 1であった。また、肺炎球菌性肺炎症例由来の菌4株の解析では、半数がFamily 1、残りの半数がFamily 2であった。血清型とclade分布の関係においては、血清3型の2株が全てclade 1であった。肺炎球菌性肺炎及び侵襲性肺炎球菌感染症をおこす菌株のPspA cladeの分布を把握するために、今後さらに解析を継続したい。

A. 研究目的

肺炎は日本人の死因の第3位である。肺炎球菌は成人の市中肺炎の主要な原因菌であり、しばしば重症肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症をおこす。そのため、肺炎球菌性肺炎や侵襲性肺炎球菌感染症検出率の向上及び原因菌の動向調査を行うことを目的とした細菌学的解析研究が必要と考えられる。

肺炎球菌は菌体表層に存在する多糖抗原の違いから90種類以上の血清型に分類される。また、菌体表層に存在する蛋白抗原の一つにpneumococcal surface protein A (PspA) という蛋白があり、肺炎球菌の重要な病原因子の一つと考えられている。PspAはFamily 1, 2, 3に分類されるが、ほとんどの菌株はFamily 1またはFamily 2に分類される。また、Family 1はclade 1とclade 2、Family 2はclade 3、clade 4及びclade 5に分類される。肺炎球菌性肺炎や侵襲性肺炎球菌感染症の症例から分離された菌株の細菌学的特徴を把握するうえで、血清型やPspAの分布を解析することは重要であ

る。本分担研究では、肺炎球菌性肺炎症例及び侵襲性肺炎球菌感染症症例から分離した菌株のPspA蛋白のclade解析を行った。

B. 研究方法

1) 肺炎球菌株：

2013年9月から2014年1月の間に、肺炎球菌性肺炎症例の喀痰から分離した4株、侵襲性肺炎球菌感染症症例の血液または髄液から分離した12株（血液由来10株、髄液由来2株）の肺炎球菌を用いた。菌株に関する詳細については、分担研究「成人侵襲性肺炎球菌感染症由来株の細菌学的解析」報告書（分担研究者 常 彬）参照いただきたい。

2) 肺炎球菌ゲノムDNAの精製：

HighPure PCR Product Purification Kitを用いて、血液寒天培地にて37°C、5% CO₂下で一晩培養した肺炎球菌のゲノムDNAを精製した。

3) PspA遺伝子のPCRとシークエンス解析：

PspA遺伝子を増幅させるために、各臨床分離肺炎球菌株のゲノムDNAをテンプレートとして、LSM12プライマーとSKH2プライマー（表1）、Quick Taq™ HS DyeMixを用いてPCRを行った。PCRは、初回サイクル94℃、2分、その後、94℃、30秒、55℃、30秒、68℃、1分を30サイクル、その後、68℃、5分で行った。電気泳動にてPCR産物を確認後、精製し、SKH2プライマーを用いて、PspA遺伝子シークエンス解析を行った。

4) PspA clade判定：

PspA蛋白のプロリンリッチ領域の上流約400bpの塩基配列（clade同定領域、図1参照）をfamily, cladeが同定されている参照株のPspA塩基配列と比較し、同定を行った。

（倫理面への配慮）

国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会からの承認を得ている。

C. 研究結果

1) PspA clade判定法の確立：

PspA clade判定するための解析法の流れと概略を表2に示した。

研究室保存株を用いてこの方法で解析を行い、PspA cladeが判定できることを確認した。

表1 プライマー

PspAのPCRで使用したプライマーの配列を示した。

Primers

LSM12 CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT

SKH2 CCACATACCGTTTTCTTGTTCCAGCC

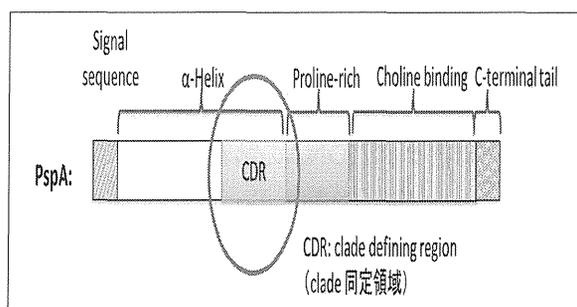


図1 PspA蛋白の模式図

PspA蛋白の構造とclade同定領域の模式図を示した。

2) 侵襲性肺炎球菌感染症症例由来菌株のPspA clade：

侵襲性肺炎球菌感染症症例の血液または髄液から分離された12菌株について、PspA clade解析を行った。表2に示した方法により、どの菌株も参照株との相同性が96%以上であり、大部分の菌株は何れかの参照株と相同性が100%であった。12株中7株がFamily 1（58.3%）、5株がFamily 2（41.7%）であった。Family 1は全てclade 1、Family 2のうち1株がclade 3、4株がclade 4であった（表3）。

また、血清型とclade分布の関係性について解析を行ったところ、血清23A型の2株がclade 1であった（表4）。

血液または髄液から分離された菌株の血清型とPspA clade結果のまとめを示した。

次に、菌株分離部位とclade分布の関係につい

表2 PspA clade 判定法の概略

| 解析法の概要 | |
|---------------------|------------------------------------|
| 1. PCR: | 肺炎球菌株のゲノムDNAを用いてPspA遺伝子のPCR |
| 2. シークエンス: | PspA PCR産物、SKH2プライマーを用いてシークエンス |
| 3. Cladeの決定: | 参照株のClade 同定領域の塩基配列との比較によるCladeの決定 |

表3 侵襲性肺炎球菌感染症症例由来株のPspA clade判定

血液または髄液から分離された菌株のPspA clade判定結果のまとめを示した。

| | PspA family 1 | | PspA family 2 | | |
|-------|---------------|---------|---------------|---------|---------|
| | clade 1 | clade 2 | clade 3 | clade 4 | clade 5 |
| 菌株数 | 7 | 0 | 1 | 4 | 0 |
| 割合(%) | 58.33 | 0 | 8.33 | 33.33 | 0 |

表4 侵襲性肺炎球菌感染症症例由来株の血清型とPspA clade結果

血液または髄液から分離された菌株の血清型とPspA clade結果のまとめを示した。

| 血清型 | PspA family 1 | | PspA family 2 | | |
|-----|---------------|---------|---------------|---------|---------|
| | clade 1 | clade 2 | clade 3 | clade 4 | clade 5 |
| 3 | 1 | | | | |
| 6C | | | | 1 | |
| 10A | 1 | | | | |
| 15A | | | | 1 | |
| 15B | | | | 1 | |
| 15C | | | | 1 | |
| 19F | | | 1 | | |
| 23A | 2 | | | | |
| 24F | 1 | | | | |
| 33F | 1 | | | | |
| 38 | 1 | | | | |
| 合計 | 7 | 0 | 1 | 4 | 0 |

表5 侵襲性肺炎球菌感染症症例由来株の分離部位とPspA cladeの関係

血液または髄液から分離された菌株の分離部位とPspA clade結果のまとめを示した。

| 検体由来 | PspA family 1 | | PspA family 2 | | |
|------|---------------|---------|---------------|---------|---------|
| | clade 1 | clade 2 | clade 3 | clade 4 | clade 5 |
| 血液 | 5 | | 1 | 4 | |
| 髄液 | 2 | | | | |
| 合計 | 7 | 0 | 1 | 4 | 0 |

て解析を行ったところ、血液由来の株はFamily 1、Family 2が半々であったのに対し、髄液から分離された2株はどちらもFamily 1 (clade 1)であった(表5)。

3) 肺炎球菌性肺炎症例由来菌株のPspA clade:

肺炎球菌性肺炎症例の喀痰由来の菌4株についてPspA clade解析を行ったところ、半数がclade 1、残りの半数がclade 4であった(表6)。

また、血清型とclade分布の関係においては、血清3型の2株が全てclade 1であった(表7)。

表6 肺炎球菌性肺炎症例由来株のPspA clade解析結果

喀痰から分離された菌株のPspA clade結果のまとめを示した。

| | PspA family 1 | | PspA family 2 | | |
|-------|---------------|---------|---------------|---------|---------|
| | clade 1 | clade 2 | clade 3 | clade 4 | clade 5 |
| 菌株数 | 2 | | | 2 | |
| 割合(%) | 50 | | | 50 | |

表7 肺炎球菌性肺炎症例由来株の血清型とPspA cladeの関係

喀痰から分離された菌株の血清型とPspA clade結果のまとめを示した。

| 血清型 | PspA family 1 | | PspA family 2 | | |
|-------|---------------|---------|---------------|---------|---------|
| | clade 1 | clade 2 | clade 3 | clade 4 | clade 5 |
| 3 | 2 | | | | |
| 11A/E | | | | 1 | |
| 35B | | | | 1 | |
| 合計 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 |

D. 考察

本研究では、肺炎球菌性肺炎症例及び侵襲性肺炎球菌感染症症例から分離した菌株のPspA蛋白のclade解析を行った。

大部分の菌株は何れかの参照株と相同性が100%であったことから、本研究で用いた方法は有用と考えられる。

侵襲性肺炎球菌感染症症例由来の12株についてPspA cladeの解析を行ったところ、Family 1が56%、Family 2が44%であった。海外の報告では、Family 1とFamily 2の比率は、半々であるという報告、Family 1の方が多い、またはFamily 2が多いという報告があるが、何れの報告も極端な違いはない。今回の解析でも、およそ半々であるという点は、諸外国の報告と同様であると考えられる。また、Family 1の中では、clade 1が大部分であ

ることが報告されており、今回の解析結果も一致した所見と考えられる。しかし、Family 2 に関しては、clade 3が最も多いという報告がいくつかあり、今回の解析結果とは異なる所見である。小児用ワクチン定期接種により血清型分布に変化が認められるが、PspA cladeもそのことと関係があるのか今後、解析を継続して分布を把握する必要がある。血清型とPspA clade分布の関係については、血清23A型の2株がどちらもclade 1であった。また、菌株分離部位とclade分布の解析においては、血液由来の株は、Family 1、Family 2が半々であったのに対し、髄液から分離された2株はどちらもFamily 1 (clade 1) であった。

肺炎球菌性肺炎症例の喀痰由来の4株についてPspA clade解析を行ったところ、半数がclade 1、残りの半数がclade 4であった。また、血清型とPspA clade分布の関係については、血清3型の2株はどちらもclade 1であった。

以上の解析結果については特徴的な傾向を示している可能性が考えられるものの、現時点では解析数が少ないため、成人の肺炎球菌性肺炎及び侵襲性肺炎球菌感染症をおこす菌株のPspA cladeの分布を把握するためには、今後さらなる菌株の解析が必要である。

E. 結論

本研究では、肺炎球菌性肺炎症例及び侵襲性肺炎球菌感染症症例から分離した菌株のPspA蛋白

のclade解析を行った。

侵襲性肺炎球菌感染症症例由来の菌株では、clade 1が58.3%、clade 3が8.3%、clade 4が33.3%という結果であった。血清型や分離部位とclade分布の関係性について解析したところ、血清23A型の2株がどちらもclade 1であった。髄液由来の2株はどちらもclade 1であった。また、肺炎球菌性肺炎症例由来の菌4株の解析では、半数がFamily 1、残りの半数がFamily 2であった。血清型とclade分布の関係においては、血清3型の2株が全てclade 1であった。今後さらに解析を継続し、成人の肺炎球菌性肺炎及び侵襲性肺炎球菌感染症をおこす菌株のPspA cladeの分布を把握したいと考えている。

F. 健康危険情報

なし

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

Ⅲ. 研究成果の 刊行に関する一覧表