

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)

Hib、肺炎球菌、HPV及びロタウイルスワクチン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 25 年度 分担研究報告書

髄膜炎等の侵襲性細菌感染症症例由来の*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微生物遺伝子解析

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

侵襲性インフルエンザ菌感染症症例から分離された *Haemophilus influenzae* 株の荚膜型別解析と薬剤感受性試験を実施した。Hib ワクチン導入効果を評価するため、2007 年以降を 4 つの期間、Hib ワクチン接種開始前 (期間 1)、任意接種開始後 (期間 2)、任意接種開始後かつワクチン緊急接種事業開始後 (期間 3)、定期接種開始後 (期間 4) に分けて集計した。分離株中の Hib の割合は、期間 1 では 97.2%(70/72 株)、期間 2 では 97.4%(154/158 株)、期間 3 では 83.0%(68/82 株)、期間 4 では 33.3%(1/3 株)だった。Hib 以外の株は、全て Non-typable *H. influenzae* と判定された。参考情報として、2012-2013 年に全国で少なくとも 3 症例の荚膜 f 型の Hif による侵襲性感染症が報告され菌株が分離されている。海外においては Hia, Hie, Hif による侵襲性感染症症例の増加が報告されている。我が国においても継続した監視が必要であると考えられる。薬剤耐性については、4 期間中、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感性株の割合が、期間 1 で 56.9%であったが、期間 2-4 では、約 50%に低下した。ピペラシリン、メロペネム、セフォタキシム、セフトリアクソンについては 4 期間を通して大きな変化は認めなかった。二つ目の研究テーマである細菌性髄膜炎疑い症例の髄液中の微生物遺伝子解析については、本研究班でこれまでに解析した 34 検体中、7 検体で何らかの細菌遺伝子が検出された。推定された菌種は、*S. pneumoniae* 4 症例、*H. influenzae* 3 症例、*N. meningitidis* 2 症例、*S. agalactiae* 2 症例で、うち 2 症例においては、複数菌種の遺伝子が検出された。平成 25 年度に感染症法に基づく医師の届出の対象感染症が改定され、髄膜炎菌性髄膜炎、侵襲性肺炎球菌感染症ならびに侵襲性インフルエンザ菌感染症がそれぞれ全数把握 5 類感染症とされ、上記 3 種以外の起因菌

による髄膜炎が細菌性髄膜炎として5類基幹定点把握感染症とされた。現在、細菌性髄膜炎として届け出られる感染症でも、細菌培養陰性や起因菌不明の場合が多いため、今後幅広い菌種の検出が可能な方法の確立が必要である。

研究協力者

佐々木裕子、増田まり子、久保田眞由美、見理 剛（国立感染症研究所、細菌第二部）

A. 研究目的

平成25年に、感染症法に基づく医師の届出の対象感染症が改定され、*Haemophilus influenzae*（インフルエンザ菌）による侵襲性インフルエンザ菌感染症が、第5類感染症として全数報告の対象疾患となった。同時期から、*H. influenzae* 莢膜b型(Hib)ワクチンの小児への定期接種が開始された。本研究では、Hibワクチン導入効果の評価を目的として、ワクチン接種開始前の2007年以降、小児の侵襲性感染症症例由来の*H. influenzae* 菌株のPopulation-basedサーベイランスを実施してきている。分離された*H. influenzae* 菌株中のHib検出率の推移をHibワクチン接種開始前、任意接種、任意接種（ワクチン緊急接種事業開始後）、定期接種の4つの時期に分けて解析した。同時に、Hibワクチンによる予防が期待できないHib以外の*H. influenzae* による小児の侵襲性感染症についてもデータを集積した。

一方、平成24年度まで、*H. influenzae* による髄膜炎が含まれていた第5類感染症の細菌性髄膜炎（髄膜炎菌性

（*Neisseria meningitidis*）髄膜炎を除く）は、平成25年度以降、侵襲性インフルエンザ菌感染症と侵襲性肺炎球菌（*Streptococcus pneumoniae*）感染症が別枠になったことで、小児の主要な髄膜炎起因菌3種 *N. meningitidis*、*H. influenzae* ならびに *S. pneumoniae* による髄膜炎が含まれなくなった。平成24年度年の時点で感染症発生動向調査に報告された細菌性髄膜炎の分離菌の約半数242/466(52%)は、その他の菌、細菌培養陰性や起因菌不明であった。本研究では、小児における細菌性髄膜炎疑い患者の髄液から微生物遺伝子を検出する方法を改良し、細菌性髄膜炎の起因菌の同定の精度を向上させることを目的とする。

B. 研究方法

調査対象地域と対象菌種：調査対象9県（福島、新潟、千葉、三重、岡山、高知、福岡、鹿児島、沖縄）における小児の侵襲性感染症症例の髄液、血液等から分離された*H. influenzae* 菌株を解析に用いた。

調査期間：

調査を開始した2007年から2014年2月までについての結果を報告する。Hibワクチンの導入と、分離菌の性状の変化との関連を解析する目的で、Hibワクチン

接種状況が異なる以下の4期間に分けて集計を行った。期間1) Hib ワクチン接種開始前にあたる2007(平成19)年6月～2008(平成20)年11月、期間2) Hib ワクチン任意接種開始後で、かつ全国公的補助金無支給の期間にあたる2008(平成20)年12月～2010(平成22)年12月、期間3) Hib ワクチン任意接種開始後で、かつ、子宮頸癌ワクチン等緊急接種事業によるHib ワクチン接種への全国公的補助金支給開始後にあたる2011(平成23)年1月～2013(平成25)年3月、期間4) Hib ワクチン定期接種開始後にあたる2013(平成25)年4月～2014(平成26)年2月。

菌株の莢膜型別：

抗血清存在下での菌体凝集法による莢膜型別解析：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 Non-typable *H. influenzae* (NTHi) とした。

菌株の莢膜関連遺伝子の増幅による莢膜型別：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、Fall a 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。

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)、アンピシリン/スルバクタム (ABPC/SBT)、ピペラシリン (PIPC)、メロペネム (MEPM)、セフォタキシム (CTX)、セフトリアキソン (CTRX)を用いた。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の微量液体希釈法の感受性等の基準を参考値とした。

細菌性髄膜炎疑い患者由来の髄液からの微生物遺伝子検出方法：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*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* の4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)、*N. meningitidis*, *ctrA* 遺伝子(AbdelDaim 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)、*Mycoplasma hominis* 16SrRNA 遺伝子(Pascual A, et al. Int J Microbiology, 2010, doi:10.1155/2010/317512)に対するプライマーならびにプローブを用いた。

(倫理面への配慮) 菌株ならびに髄液の解析については、「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」の承認を得た。本研究のために新たに検体採取することはなく、臨床診断目的で採取された検体の一部をインフォームドコンセントを得て解析に用いた。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

髄膜炎等の侵襲性細菌感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株の解析:

本研究班の対象9県における2007年から2013年2月までの侵襲性感染症患者由来の *H. influenzae* 菌株数の推移を症例

の入院時期により経時的に示した(図1)。同時期の当該9県におけるHibワクチン出荷本数を5歳未満人口(2010年10月1日時点、本研究班、平成23年度 総括・分担研究報告書、p.9-16より引用)で割った値の累積割合(%)を菌株数の図に重ねて示した(図1)。その結果、初期の研究体制の構築時に菌株数が少ないことを除けば、症例の入院時期に季節的な差はあるものの、2010年12月までは、*H. influenzae* 侵襲性感染症からの分離菌株数に大きな変化は認められなかった。変化が見られたのは、2011年1月以降で、総分離数が減少し、NTHi 菌株が散見された。この時期は、期間3、すなわちHibワクチン任意接種開始後で、かつ、子宮頸癌ワクチン等緊急接種事業によるHibワクチン接種への全国公的補助金支給開始後にあたる。期間3内では、Hibワクチン出荷本数を5歳未満人口で割った値の累積割合が当該事業開始時(2011(平成23)年1月)の50%程度から200%(2013(平成25)年1月)に変化した。Hibワクチンは、通常の初期接種で3回接種される。期間2ないし3における3回接種者の割合は不明なものの、期間3での接種率の増加が推測される。一方、定期接種開始後の期間4(2013年4月から2014年2月まで)では、本研究班におけるHibワクチン接種歴を有する症例由来の菌株は無く、Hibワクチン未接種1症例からHibが1株分離されたのみであった。(図中には示さず)。

Hib ワクチン接種開始前の 2007 年から、定期接種開始後の 2014 年 2 月までの期間に侵襲性感染症患者より分離された *H. influenzae* 菌株の莢膜型別結果を表 1 に示す。Hib 分離株数の減少により、NTHi 分離率が相対的に高くなっている。本研究班においては、現時点までに、b 型以外の莢膜型の *H. influenzae* は、分離されていない（参考情報を参照）。

同 4 期間における薬剤感受性試験結果を表 2 に示す。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感受性株は、期間 1 では 56.9%であったが、期間 2 以降は約 50%になっていた。Hib ワクチンの接種率と明らかな相関はないと考えられる。ピペラシリン、メロペネム、セフトキサシム、セフトリアクソンに対する感受性株の割合は供試菌において大きく変化していないものと推察される。

今年度は、入院日が 2013 年 4 月から 2014 年 2 月までの 3 症例由来の 4 菌株について解析を行った。症例の内訳は、Hib 髄膜炎 1 例（福岡県）、NTHi 髄膜炎 1 例（福岡県）、NTHi 非髄膜炎 1 例（福岡県）である。このうち、Hib ワクチン未接種の Hib 髄膜炎 1 例（生後 2 ヶ月齢）においては、血液からの分離株と髄液からの分離株（各 1 株ずつ）が異なる表現形を示した。すなわち、b 型の莢膜関連遺伝子がいずれの 2 株からも検出されたものの、抗血清による莢膜型別解析においては、血液由来株 (Iha399) が Hib となり、髄液由来株 (Iha398) が a-f 型のいずれの抗血清存在

下においても凝集を示さなかった。このことから、髄液由来株においては、b 型の莢膜多糖関連遺伝子を有するが、莢膜多糖の発現不全が起きていたことが示唆された（当該症例は、Hib による侵襲性感染症と考えられる）。アンピシリンとアンピシリン/スルバクタムの両剤に対する薬剤感受性試験において、髄液由来株 (Iha399) が 4 µg/ml と耐性を示し、血液由来株 (Iha398) が 1 µg/ml と感受性を示した。ピペラシリン、メロペネム、セフトキサシム、セフトリアクソンに対しては、いずれの 2 株とも感受性を示した。一方、本症例の発症 3 日後に同胞（兄と姉、いずれも複数回の Hib ワクチン接種歴あり）の鼻腔から分離された *H. influenzae* 各 1 株は、莢膜関連遺伝子解析結果においても、抗血清による莢膜型別結果においても a-f 型のいずれの莢膜型にも該当しない NTHi であったことから、兄弟あるいは姉弟間での Hib 感染経路は、証明されなかった。

参考情報：本研究班の対象地域以外における b 型以外の莢膜型の *H. influenzae* による侵襲性感染症症例について。莢膜 f 型株 (Hif) が神奈川県 1 件（2012 年、髄膜炎）、愛知県 1 件（2013 年、髄膜炎）ならびに香川県 1 件（2013 年、菌血症）で分離された。

細菌性髄膜炎疑い症例由来培養陰性髄液の微生物遺伝子解析：

今年度は、1 検体の髄液について、これまでに解析したうち 34 検体中、7 検体で何

らかの細菌遺伝子が検出された(表3)。推定された菌種は、*S. pneumoniae* 4症例、*H. influenzae* 3症例、*N. meningitidis* 2症例、*S. agalactiae* 2症例で、うち2症例においては、複数菌種の遺伝子が検出された。今年度は、1検体の髄液について、Realtime-PCRにより解析を実施した。以下の菌種についての解析結果は陰性であった。*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*。

D. 考 察

Hib ワクチンの定期接種開始以降 2014 年 2 月現在まで、当該対象地域における Hib を含む *H. influenzae* による小児の侵襲性感染症の症例数ならびに分離菌株数は少ない状態が継続されている。今年度における 1 例の Hib 髄膜炎症例は、Hib ワクチン未接種の生後 2 ヶ月齢の症例であった。Hib ワクチンの接種開始年齢が生後 2 ヶ月であることから、早期の Hib ワクチン接種が好ましいことが示唆される。Hib ワクチン接種歴(1 回接種を含む)を有する症例とその分離菌株は無かった。一方、全国においては、Hib ワクチンによる予防効果が見込めない f 型の莢膜を有する *H. influenzae*(Hif) が少なくとも 3 株、髄膜炎 2 症例を含む侵襲性感染症症例から分離されている。Hif については、小児科、耳鼻科および内科領域疾患症例

において鼻腔あるいは喀痰からの分離が国内で報告されている(IASR 34: 192-193, 2013)。さらに、国内の上記診療領域で Hif 以上の分離菌数が報告される莢膜 e 型の Hie(IASR 34: 192-193, 2013)についても侵襲性感染症の起因为として分離されるか否かについて監視していく必要がある。我が国より早期に Hib ワクチンが導入された他国の状況においても非 b 型の莢膜株の出現が報告されている。Hif, Hie による侵襲性感染症は、欧米で増加してきており、イングランドとウエールズにおいては、2004-2010 年の年間上昇率が 11% で増加し、2009-2010 年の 10 万人当たりの罹患率は、1 歳未満小児において Hif が 0.09、Hie が 0.03 となっている(Emerging Infect Dis 18: 725-732, 2012)。また、莢膜 a 型の Hia による侵襲性感染症が北米ならびに南米での増加が懸念されている(Lancet Infect Dis 14: 70-82, 2014)。これら Hie, Hif, Hia による侵襲性感染症の報告は、Hib ワクチン定期接種開始後、数年かかって増加してきており、本研究班における継続性のある小児の侵襲性感染症の全数把握により、新たな莢膜型を有する *H. influenzae* の早期解析が期待できる。加えて、我が国における侵襲性インフルエンザ菌感染症の発生動向調査に伴う病原微生物検出に際し、*H. influenzae* 分離菌株の莢膜型別解析の実施体制の充実が急務である。

細菌性髄膜炎疑い症例由来培養陰性髄液の微生物遺伝子解析については、本研

究班でこれまでに解析した 34 検体中、7 検体で何らかの細菌遺伝子を検出し起因菌が推定された。これまでは、*N. meningitidis*(髄膜炎菌)、*S. pneumoniae*(肺炎球菌)、*H. influenzae*といった細菌性髄膜炎の主要な起因菌にターゲットをおいた解析を実施してきた。髄膜炎菌性髄膜炎に加え、今年度からは、侵襲性肺炎球菌感染症ならびに侵襲性インフルエンザ菌感染症が別枠に変更され、上記3種以外の起因菌による症例が細菌性髄膜炎として届け出られる。しかしながら、細菌培養陰性や起因菌不明での届出についての精度の向上が求められる。我々は、これまでにマイコプラズマ 2 種 (*M. pneumoniae*, *M. hominis*) を含めた細菌遺伝子解析 Real-time PCR の系を立ち上げている。さらに、細菌性髄膜炎の起因菌を明らかにする観点からも幅広い菌種の検出が可能な系への改良が必要だと考えられた。

E. 結 論

平成 25 年度(2013 年 4 月)の Hib ワクチンの定期接種開始、ならびに侵襲性インフルエンザ菌感染症症例の届出開始以降の対象 9 県における小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症由来 *H. influenzae* 菌株について解析した。3 症例からの 4 株を解析し、うち 1 株のみが Hib、残りの 3 株は NTHi であった。Hib が分離された

症例は、Hib ワクチン未接種の生後 2 ヶ月齢の髄膜炎であり、早期接種が本疾患の予防に重要であることが示唆された。対象地域に該当しない他県において、Hib ワクチンによる予防が見込めない莢膜 f 型の *H. influenzae*(Hif)による小児の侵襲性感染症(髄膜炎 2 例、菌血症 1 例)が 2012-2013 年に少なくとも 3 例報告されており、b 型以外の莢膜を有する Hia, Hie, Hif による侵襲性感染症に対する監視を継続する必要性が示唆された。

F. 健康危機情報

とくになし

G. 研究発表

佐々木 裕子、他、*Haemophilus influenzae* b 型菌(Hib)ワクチン導入前後の侵襲性感染症由来 *H. influenzae* 分離株の解析:9 県における検討、Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 34: 195-197, 2013

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、侵襲性感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株における荚膜型 b 型(Hib)別の割合の推移

	接種開始前	接種開始前	任意接種開始後	任意接種開始後	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)、定期接種開始後	定期接種開始後
年 (入院時)	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014(1-2月)
b型	100% (27/27)	96.7% (58/60)	100% (60/60)	96.7% (87/90)	94.9% (37/39)	52.6% (10/19)	50% (1/2)	0% (0/1)
非b型 (Non-typable <i>H. influenzae</i>)	0% (0/27)	3.3% (2/60)	0% (0/60)	3.3% (3/90)	5.1% (2/39)	47.4% (9/19)	50% (1/2)	100% (1/1)

症例数による集計結果を示す

表 2、侵襲性感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株における供試薬剤に対する感受性株*の割合と株数

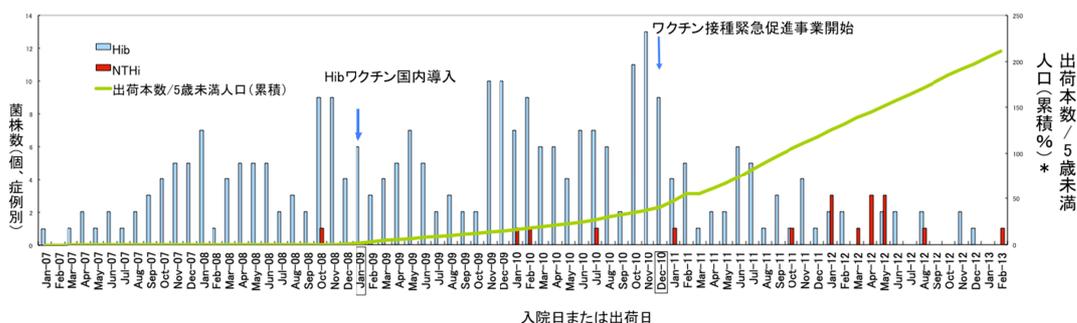
期間	接種開始前		任意接種開始後		任意接種開始後(ワクチン緊急接種事業開始後)		定期接種開始後	
	2007.6	2008.11	2008.12	2010.12	2011.1	2013.3	2013.4	2014.2
Ampicillin	56.9% (41/72)		50.0% (79/158)		49.5% (52/105)		50.0% (2/4)	
Ampicillin/ Sulbactam	56.9% (41/72)		48.0% (76/158)		48.6% (51/105)		50.0% (2/4)	
Piperacillin	CLSI 基準値情報なし							
Meropenem	100% (72/72)		94.3% (149/158)		95.2% (100/105)		100% (4/4)	
Cefotaxim	100% (72/72)		99.3% (157/158)		99.0% (104/105)		100% (4/4)	
Ceftriaxone	100% (72/72)		100% (158/158)		100% (105/105)		100% (4/4)	

注) * 微量液体希釈法による値を参考値とした場合
検体受理日で集計した。

表 3、細菌性髄膜炎疑い症例由来髄液等から検出された遺伝子情報をもとに推定された菌種

検体番号	検体採取日	検体	地域	年齢	診断名	検出された遺伝子情報をもとに推定された菌種
Zuk-001	2007/7/26	髄液	鹿児島県	5か月	髄膜炎	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Zuk-009	2008/10/7	髄液	岡山県		髄膜炎	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>
Zuk-011	2008/10/31	髄液	三重県	3歳	化膿性髄膜炎	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>
Zuk-012	2008/1/14	髄液	鹿児島県	5歳4か月	髄膜炎	<i>Neisseria meningitidis</i>
Zuk-016	2009/9/1	ドレナージ液	高知県	1歳2か月	硬膜下膿瘍	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Zuk-027	2010/12/22	髄液	鹿児島県	4歳	髄膜炎	<i>Haemophilus influenzae</i>
Zuk-030	2011/4/1	髄液	新潟県	2か月	髄膜炎	<i>Streptococcus agalactiae</i>

図 1、対象 9 県における侵襲性感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株数（症例数別）と Hib ワクチン出荷本数の経時的変化



* Hib ワクチン集荷本数を各県の 5 歳未満人口（2010 年 10 月 1 日）で割った値の累積% を緑色の線で示す。

出典：佐々木裕子、他、*Haemophilus influenzae* b 型菌(Hib)ワクチン導入前後の侵襲性感染症由来 *H. influenzae* 分離株の解析：9 県における検討、Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 34: 195-197, 2013、一部改変

図2、侵襲性感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株における荚膜 b 型菌(Hib)の検出割合の推移

