

6. Hib·肺炎球菌

肺炎球菌ワクチン（PPSV23、PCV7、PCV13）及びインフルエンザ菌 b型（Hib）ワクチンの免疫原性とその評価法に関する研究

研究分担者：明田 幸宏（大阪大学微生物病研究所）

研究協力者：沖中 敬二（国立がん研究センター中央病院）

福田 隆浩（国立がん研究センター中央病院）

研究要旨 本邦において定期接種化された肺炎球菌結合型ワクチン（PCV）、インフルエンザ菌b型（Hib）ワクチン、肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPSV23）の様々な集団における免疫原性について検討することは、当該集団でのワクチン接種の有効性を確かめる上で重要である。本研究では、侵襲性肺炎球菌感染症の発症率・死亡率が高い同種造血幹細胞移植後患者における肺炎球菌ワクチン（PPSV23、PCV13-PPSV23）接種の免疫原性及びその安全性を検討した。その結果、PPSV23では、接種前と比較して、有意な特異抗体量及びOPAの上昇がワクチン接種後1年まで維持されることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、様々なワクチンが本邦において承認され、いくつかのものについては定期接種化されている。しかしながら、本邦独自のワクチン免疫原性に関する臨床データが不足しているケースが少なからず見受けられる。このような現状は、本邦において新しいワクチン接種導入を積極的におこなう上でのエビデンスが不十分であり、さらなるデータの蓄積が必要である。また、免疫不全症例などの様々な症例に対するワクチン免疫原性に関するデータは、さらに少ない現状である。このような症例の1つに、同種造血幹細胞移植後（HSCT）患者がある。HSCT患者における侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）のリスクは一般人口に比して約50倍のリスクであるとの報告があり、また、HSCT後の血流感染症を伴う肺炎球菌肺炎における死亡率は約15%と高いことが知られている。このため世界的にはHSCT後症例には肺炎球菌ワクチンを接種してIPDを予防することが推奨されている。欧米ではより免疫原性の高いコンジュゲートワクチン（PCV）の複数回接種及び23価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPV23）接種の併用が推奨されているが、国内では、現在

日本造血細胞移植学会のワクチンガイドラインでPPSV23の1回接種のみが推奨されているが、現在のところ、本邦におけるHSCT患者での肺炎球菌ワクチンの免疫原性に関するエビデンスは見当たらない。以上のことから、本研究ではHSCT患者におけるPPSV23及び13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）の免疫原性、安全性について検討を行った。

B. 研究方法

①HSCT患者におけるPPV23の免疫原性評価

造血幹細胞移植後患者に対するPPV23接種前及び接種1ヶ月後、6ヶ月後、12ヶ月後血清検体の免疫原性、また、それに伴う副反応を確認し安全性の評価を行った。免疫原性評価は、莢膜ポリサッカライド（血清型4、6B、9V、14、18C、19F、23F）に対する特異抗体量を第3世代ELISA法を用いて測定した。また、肺炎球菌に対する特異抗体による補体依存性殺菌能をmultiplex opsonophagocytic assay（MOPA）法により測定した。

②HSCT患者におけるPCV13-PPSV23の免疫原性評価

造血幹細胞移植後患者をPCV13の3回接種群

と4回接種群にランダムに割りあて、それぞれの接種スケジュールを完遂した後、PPV23 1回接種を行い、最終的にワクチン接種前後の計5点で採取した(予定)血清検体を用いて免疫原性を①に示した方法で評価し、同時に安全性評価を行う。(倫理面への配慮)

研究実施にあたり、当該施設の倫理委員会の承認を取得し、登録症例については、研究参加にあたり文書による同意を得ている。

C. 研究結果

①HSCT患者におけるPPSV23の免疫原性評価

30例の登録症例について、PPSV23接種前後血清検体を用いた免疫原性評価をおこなった。各血清型における、1ポイント以上の有効抗体価(OPA/IgG)を獲得した割合の平均は80%/56%であり、PPSV23の免疫原性上昇における有効性が示された。各抗体価の幾何平均は接種1か月後に有意な上昇を認め6、12ヶ月後にかけて減衰したが、OPAは接種1年後も接種前より有意な抗体価上昇を維持していた。抗体価(OPA)獲得率上昇へ影響を与える因子として、以下が抽出された。a) ドナーソースが骨髄よりも末梢血幹細胞、b) CD4リンパ球数が $500/\mu\text{L}$ 以上、c) プスルファン、シクロホスファミドによる移植前処置。安全性評価として、問題となる副作用は認められなかった。

②HSCT患者におけるPCV13-PPSV23の免疫原性評価

現在9施設より33症例の登録があり、ワクチン接種後の抗体価のフォロー及び新規症例のリクルートを行っている。

D. 考察

HSCT後のナイーブなB細胞から産生されたIgGの機能は不十分な可能性があり、ELISAによるIgG量の測定結果の意義は定まっていない。このため今回は患者血清と肺炎球菌を直接混ぜ合わせ、その殺菌活性を測定するfunctional assayであるOPAの測定を併用することで、より実際的な感染防御効果を評価した。

近年、小児へのPCV導入に伴う市中における侵襲性肺炎球菌感染症疫学の変化に伴い、カバー

する血清型の種類が多いPPSV23は今後も重要な役割を担うと考えられる。

抗体価獲得率へ影響を与える因子等、今回の研究で新たに得られたデータは、今後の移植後PPSV23接種の推進に貢献すると期待される。また、現在進行中のPCV13-PPSV23研究に関しては、PPSV23単独接種よりも複数回のPCV接種を併用することによってより良い免疫学的効果が得られることが、海外の事例から期待されており、引き続き研究を継続することで、その効果を正しく評価することを目指す。

E. 結論

造血幹細胞移植後患者におけるPPSV23接種の免疫原性は、接種前と比較して有意に上昇していることが明らかにされ、特にOPAに関しては、接種後1年後の時点においても、いずれの肺炎球菌血清型に対して有意な上昇を保っており、今後、本データによって本邦における造血幹細胞移植後患者におけるPPSV23接種の推奨がより進展する可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ho Namkoong, Yohei Funatsu, Kazunori Oishi, Yukihiro Akeda, Rika Hiraoka, Kei Takeshita, Takahiro Asami, Kazuma Yagi, Yoshifumi Kimizuka, Makoto Ishii, Sada-tomo Tasaka, Yukio Suzuki, Satoshi Iwata, Tomoko Betsuyaku, Naoki Hasegawa. Comparison of the immunogenicity and safety of polysaccharide and protein-conjugated pneumococcal vaccines among the elderly aged 80 years or older in Japan: An open-labeled randomized study. *Vaccine* 33, 327-332 (2015)
- 2) Kazunori Oishi, Kazuyo Tamura, Yukihiro Akeda. Global control of pneumococcal infections by pneumococcal vaccines. *Tropical Medicine and Health* 42, 83-86 (2014).
- 3) Yoshiko Takahashi, Naruhiko Ishiwada, Haruka Hishiki, Junko Tanaka, Yukihiro Akeda, Naoki Shimojo, Kazunori Oishi,

Yoichi Kohno. IgG levels against 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in non pneumococcal conjugate vaccine immunized healthy Japanese and intravenous immunoglobulin preparations. *Journal of Infection and Chemotherapy* **20**, 794-798 (2014).

2. 学会発表

- 1) 濱口重人, 明田幸宏, 朝野和典, 大石和徳. 「肺炎球菌に対する乳幼児期の血清疫学調査」第88回日本感染症学会学術講演会第62回日本化学療法学会総会合同学会 福岡 2014年6月

- 2) 田村和世, 松原康策, 石和田稔彦, 西順一郎, 常彬, 明田幸宏, 庵原俊昭, 大石和徳. 「日本におけるIPD罹患小児の7価肺炎球菌コンジュゲートワクチンへの免疫応答」第88回日本感染症学会学術講演会第62回日本化学療法学会総会合同学会 福岡 2014年6月

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

肺炎球菌の分子疫学解析とCapsular Switchingに関する研究

研究分担者：生方 公子（慶應義塾大学医学部感染症学教室非常勤講師）

研究協力者：千葉 菜穂子（慶應義塾大学医学部感染症学教室研究員）

諸角 美由紀（慶應義塾大学医学部感染症学教室助教）

研究要旨 平成26年4月から12月末日までに、全国の医療機関に所属する小児科医から解析依頼を受けた侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）由来株（n=144）について、莢膜型別、耐性遺伝子解析による耐性化動向を調べた。

IPD例は1歳が最も多く次いで7-11か月児であった。PCV7に含まれる莢膜型菌による発症はわずか4例であり、3例はワクチン未接種児であった。PCV13に含まれる莢膜型菌による発症例も減少してきているが、19A型のみ明らかなワクチン効果は今のところ明確ではない。PCV13のカバー率は、H26年は27.8%であった。この反面、非ワクチンタイプの菌（莢膜型24、15A、15Bなど）によるIPDが次第に増加しつつあった。マクロライド薬の耐性率は90%と高かったが、PRSPは有意に減少していた。

また、今までPRSPの認められなかったムコイド3型菌にCapsular Switchingにより耐性を獲得した新たな菌が出現したことを明らかにした。

A. 研究目的

肺炎球菌あるいはインフルエンザ菌による侵襲性感染症は、小児および高齢者においては致命的となることが多く、また救命し得ても神経学的な重度の後遺症を残しやすい疾患である。特に、高齢者においてはQOLの低下が問題である。このような重篤な感染症を防ぐには、感染予防としてのワクチン接種が望ましいことはいままでのない。

2013年11月、小児用肺炎球菌結合型ワクチンはPCV7からPCV13へと切り替えられ、さらに成人に対するPPSV23の定期接種化も変則的ながら2014年10月に開始されている。

ワクチン導入後の疾病対策効果を判断する上でも、これら両菌が原因となる侵襲性感染症の変化、ならびに菌側の変化を明らかにしておくことが重要である。

本研究においては、肺炎球菌ワクチンの定期接種化後に本菌の莢膜型がどのように変化しつつあ

るのか、また、薬剤耐性菌はどのように変化しているのか、新たな莢膜型を有するPRSPの成り立ち（Capsular Switching: 莢膜型変換）について解析した。

B. 研究方法

被験菌株は、連結不可能匿名化にされた先方からの依頼用紙（症例担当医によるインフォームド Consent 実施済みのサインがなされている）とともに、私どもに送付を受けた。2014年に収集された小児の侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）由来株は144株であった。

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。

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（タカラバイオ株）を用いて行った。Genotype解析による耐性菌には“g”を付して標記した。

莢膜型3型のPRSPにおけるCapsular Switchingの詳細に関しては、PBP1A、PBP2X、PBP2B遺伝子の解析を行い、これらの遺伝子に挟まれた莢遺伝子(*cps* gene)の比較を行った。

(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、菌株をお送りいただく際に、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. 小児における肺炎球菌の解析

1) IPD発症年齢と疾患

図1には、小児におけるIPD発症年齢と疾患との関係を示す。依頼された144例のうち、1歳が最も多く、次いで7-11ヶ月例であった。化膿性髄膜炎例は16例と少なく、敗血症・菌血症が105例と多数を占めた。これらの発症例においては先天性基礎疾患を有する児が23例、腎疾患保持例が5例、肝疾患が2例、その他が8例、合計38例で、発症例の26.3%を占めた。

各症例におけるワクチン接種歴を見ると、106例(73.6%)はPCV7あるいはPCV13の接種歴あり、ワクチン未接種は18例(12.5%)に過ぎなかった。

2) 肺炎球菌の莢膜型とβ-ラクタム薬耐性

IPDの144例から分離された肺炎球菌の莢膜型とβ-ラクタム系薬耐性に関わるPBP遺伝子との関係を図2に示す。

PCV7に含まれる莢膜型株による発症例はわずか4例のみで、3例は未接種、1例は3回接種の児であった。PCV13の莢膜型菌による発症例も減少してきているが、19Aのみは26例と最も多かった。このうちの5例はワクチン未接種であった。

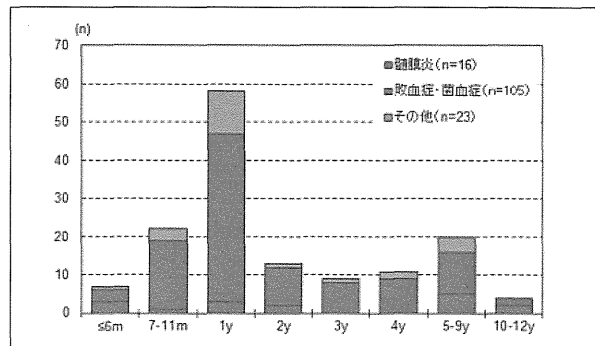


図1 小児IPD例の年齢分布(n=144)

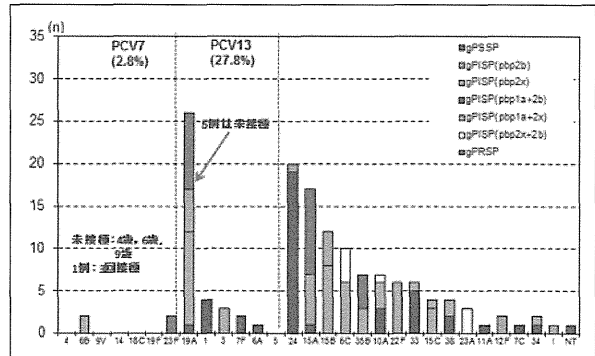


図2 肺炎球菌の莢膜型とβ-ラクタム系薬耐性

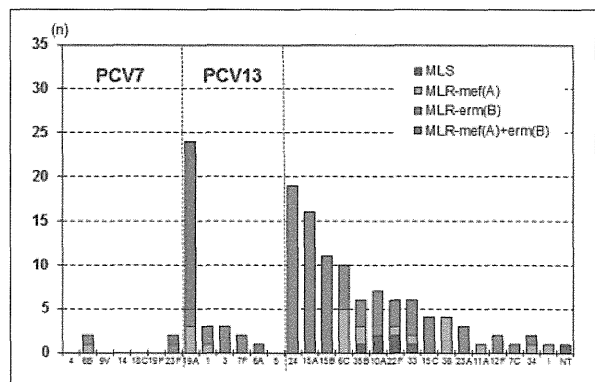


図3 肺炎球菌の莢膜型とマクロライド薬耐性

注目すべきは、ワクチンに含まれない莢膜型株(非ワクチン型:NVT)による発症例が69.4%を占めていたことである。有意に多かったのは、莢膜型24、15A、15B、6C、35B、10A等であった。中でもgPSSP(ペニシリン感性菌)が大多数を占める24型が最も多いのが注目された。15Aと35BにはgPRSPが多く認められた。

3) 肺炎球菌の莢膜型とマクロライド薬耐性

それぞれの菌の莢膜型とマクロライド系薬耐性との関係は図3に示す。

mefA 遺伝子保持株はクラリスロマイシンやアジスロマイシンに中等度耐性、*ermB* 保持株はすべてのマクロライド系薬に高度耐性であるが、先

のgPSSPを示した莢膜型24はすべてマクロライド系薬高度耐性株であった。その他にNVTで分離率の高かった15Aと15Bも高度耐性株であった。

4) β-ラクタム系薬の耐性率の変化

PCV7の導入前、2010年までのIPDに占めるペニシリン耐性菌 (gPRSP) の割合は、50%前後で推移していた。「ワクチン接種緊急促進事業」開始後、2年目にあたる2012年とPCV13に切り替わった2014年におけるgPRSP、gPISP、gPSSPの割合の変化を図4に示す。

2012年にはgPRSPの割合は26%と半減していたが、2014年にはさらに減少し、17%であった。そのため、gPSSPは21%から26.5%へと有意に増加した (p<0.001)。ただし、セフェム系薬に明らかな耐性を示すgPISP (*pbp1a+pbp2x*) が増加していた。

2. Capsular Switching (莢膜型置換)

肺炎球菌においては95種類の莢膜型が知られているが、図5に示すように莢膜をコードするcps遺伝子の近位にβ-ラクタム系薬耐性に関わる*pbp2x*と*pbp1a*遺伝子とがコードされている。*pbp2b*遺伝子はゲノム上反対側に位置している。

近年このような肺炎球菌に対し、分子疫学解析としてMultilocus Sequence typing (MLST) 解析が行われ、ゲノム全体の近似性が世界的に比較可能である。

過去3年間に収集された菌株の中で、成人の25%に重症肺炎を惹起するムコイド型肺炎球菌は、従来gPISP (*pbp2x*) のみであったが、その中にgPRSP (*pbp1a+pbp2x+pbp2b*) が見いだされた。

この株はMLST解析においてClonal Complex (CC) 242、ST242であり、今までムコイド型で多かったCC180、ST180とはゲノム全体が明らかに異なることが判明した。この事実は、ST242型菌に莢膜遺伝子部分が挿入された可能性を示唆するものであった。

多数株のMLST解析を行うと、ST242型菌にはPMEN cloneのTaiwan^{23F}-15というムコイド型ではないgPRSPが認められた。

Donor株、Recipient株と推定される株と、ムコイド型のgPRSPの計3株について*pbp1a*、*pbp2x*、

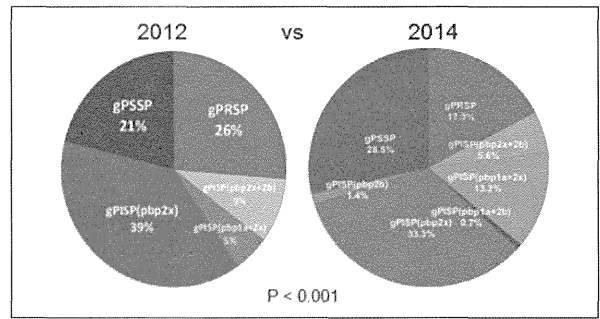


図4 β-ラクタム薬耐性率の変化

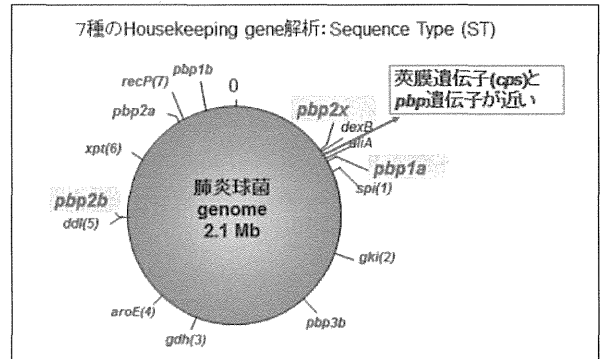


図5 Multilocus Sequence Typing (MLST)

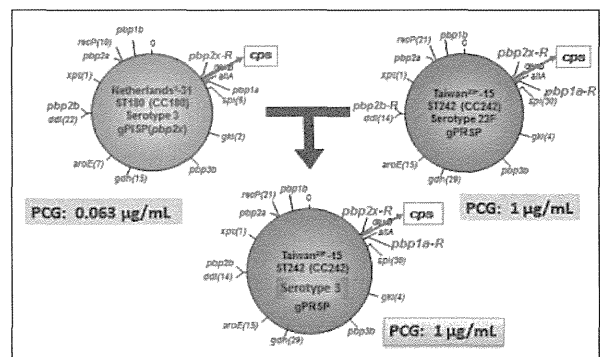


図6 Capsular Switching (1)

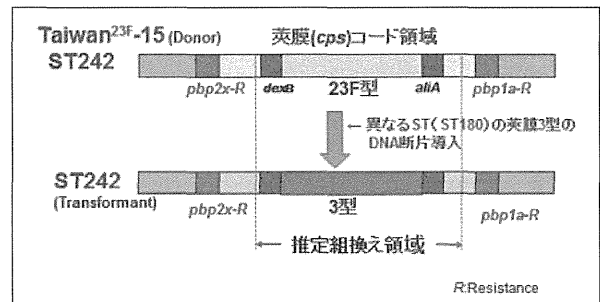


図7 Capsular Switching (2)

*pbp2b*の3遺伝子の遺伝子解析を行った (図6)。

ちなみに、Donor株のPCG感受性は0.063 μg/ml、Recipientと推定される莢膜型23FのPCG耐性は1 μg/ml、そしてムコイド型3型でST242のgPRSPはPCG1 μg/mlであった。

ムコイド型3型のgPRSPの*pbp1a*、*pbp2x*、そして*pbp2b*遺伝子にコードされたそれぞれのPBPにおけるアミノ酸置換は、莢膜型23Fと完全に一致していた。そしてムコイド3型のgPISP (*pbp2x*)株のPBP2Xにおけるアミノ酸置換は耐性菌のそれとは明らかに異なっていることを確認した。

この事実から、対象とした耐性ムコイド株のCapsular Switchingは図7のように推定された。

D. 考察

「ワクチン接種緊急促進事業」による小児へのPCV7、あるいはPCV13の普及は、肺炎球菌による小児の化膿性髄膜炎、敗血症を有意に減少させた。

その反面、莢膜型が95種もある本菌に対するワクチンの普及は、ワクチンでカバーできない非ワクチンタイプの莢膜型株による敗血症や肺炎を次第に増加させている。それらが今後どのように推移していくのか、わが国のみの特徴なのか、あるいは世界と共通の現象なのかを見極める必要がある。

一方、侵襲性感染症から分離されるムコイド株は大半がgPISP (*pbp2x*)であったが、その中にgPRSPが認められ、Capsular Switchingが生じていることが強く示唆された。肺炎球菌において遺伝子組み換えが生じやすいことは知られている現象である。病原性に最も関わる莢膜遺伝子は、 β -ラクタム系薬感受性に関わるPBP遺伝子の近位にあるがゆえに、抗菌薬の選択圧によるPBP変異とともに、ワクチンの選択圧も重なって莢膜遺伝子部分も複雑な組み換えを起こした肺炎球菌を選択していくことが推定される。

E. 結論

小児への肺炎球菌結合型ワクチンの導入に伴い、急速な莢膜型置換 (Serotype Replacement) が生じている。小児ならびに成人の肺炎球菌感染症の動向について、今後とも精度の高い分子疫学解析が必要と結論される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, Wajima

T, Iwata S, Ubukata K, and the Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group. Changes in Capsule and Drug Resistance of Pneumococci after Introduction of PCV7, Japan, 2010–2013. *Emerging Infectious Diseases* 20: 1132–1139, 2014

2) 太田和子, 千葉菜穂子, 佐藤謙太郎, 奈良昇悦, 加藤聡子, 金沢久男, 池島 進, 高橋義博, 岩田 敏, 生方公子. 介護施設入所の高齢者肺炎例から分離されたmeropenem耐性を含む多剤耐性肺炎球菌の遺伝子学的解析. *感染症誌*, 88: 444–451, 2014

2. 学会発表

1) 生方公子. 成人リスク患者における肺炎球菌感染症の実態とその予防. 第57回日本糖尿病学会. 教育セミナー. 2014年5月23日 (大阪)

2) 千葉菜穂子, 荘司 路, 諸角美由紀, 生方公子, 岩田 敏. 小児へのPCV7導入による成人侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) 由来株の変化. 第88回日本感染症学会学術講演会. 一般演題, 2014年6月19日 (福岡)

3) 千葉菜穂子. PCV7導入後における侵襲性肺炎球菌感染症由来株の莢膜型の変化. 呼吸器感染症ワクチン研究会2014. 特別講演. 2014年6月28日 (東京)

4) 生方公子. PCV7導入前後にみられる肺炎球菌の変化. -分子疫学解析が示す菌の本質-. 第84回日本感染症学会西日本地方会学術集会. 教育セミナー. 2014年10月24日 (名古屋)

5) Chiba N, Morozumi M, Wajima T, Iwata S, Ota k, Ubukata K. Analysis of Streptococcus pneumonia isolates showing high resistance to β -lactam Agents from pneumococcal infections. 54回 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 一般演題. 2014年9月6日 (Washington DC)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：該当なし
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：なし

結合型ワクチン普及後のインフルエンザ菌・肺炎球菌の細菌学的研究

研究分担者：石和田 稔彦（千葉大学真菌医学研究センター准教授）

研究要旨 インフルエンザ菌b型ワクチン、肺炎球菌結合型ワクチンの普及により、ワクチンに含まれる血清型の侵襲性感染症は激減したが、ワクチンでカバーされない血清型の感染症が問題となってきた。インフルエンザ菌においては、f型ST124が髄膜炎症例から分離され、肺炎球菌においては、15A型、24F型など13価結合型ワクチン非含有血清型が多く分離されるようになってきた。今後これらの株の病原性解析が重要となる。

A. 研究目的

インフルエンザ菌b型（Hib）ワクチンと肺炎球菌結合型ワクチン普及後に問題となるインフルエンザ菌・肺炎球菌を明らかにする。

B. 研究方法

千葉県及び全国から収集した侵襲性感染症由来インフルエンザ・肺炎球菌の血清型及び病原性解析を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は千葉大学倫理審査の承認を得て、実施している。

C. 研究結果

Hibワクチン、肺炎球菌結合型ワクチンの定期接種化後、侵襲性感染症由来株の主体はワクチン非含有株が主体となっている。インフルエンザ菌においては、Hibワクチン接種後の髄膜炎症例から、f型株が分離されており、MLST解析したところST124型という欧米で侵襲性Hif感染症の主体となっているST型であった。また、肺炎球菌に関しては、血清型15A、24Fといった13価結合型ワクチン（PCV13）に含まれない血清型が主体となってきた。

D. 考察

Hibワクチン、PCV13の定期接種化、急速な普及により、日本における侵襲性インフルエンザ菌、

肺炎球菌感染症の主体はワクチン非含有株が主体となってきた。侵襲性感染症症例の主体は、両ワクチン既接種者であり、血清型解析はワクチンの効果をはかる上においてもより重要となっている。

E. 結論

小児への結合型ワクチン導入、普及により疫学状況は大きく変化している。今後侵襲性株の病原性解析が重要となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Oikawa J, Ishiwada N, Takahashi Y, et al. (2014) 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.* 20, 146-149.
- 2) Tamura K, Matsubara K, Ishiwada N, et al. (2014) Hyporesponsiveness to the infecting serotype after vaccination of children with seven-valent pneumococcal conjugate vaccine following invasive pneumococcal disease. *Vaccine.* 32, 1444-1450.

- 3) Takahashi Y, Ishiwada N, Hishiki H, et al.(2014) IgG levels against 13-valent pneumococcal conjugate vaccine serotypes in non pneumococcal conjugate vaccine immunized healthy Japanese and intravenous immunoglobulin preparations. J Infect Chemother. 20, 794-8.
- 4) Ishiwada N, Hishiki H, Nagasawa K, et al.(2014)The incidence of pediatric invasive Haemophilus influenzae and pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan before and

after the introduction of conjugate vaccines. Vaccine. 32, 5425-31.

2. 学会発表

- 1) Naito S, Ishiwada N et al. Serotype Distribution and Drug Resistance of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from Children with Community Acquired Pneumonia in Japan. CIPP XIII (2014.6.28 ブルージュ)

G. 知的財産権の出願・登録状況

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(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）～2013年（平成25年）に引き続き2014年（平成26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26年1～12月までの1年間B群溶連菌による髄膜炎が1例、インフルエンザ菌、肺炎球菌による髄膜炎の発症は0例であった。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した。

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原菌は常に第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26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原菌調査である。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列表の返送を依頼した。細菌学検査はすべて慶応大学で行った。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PASTEREXTM Meningitis (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。

（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26年1月1日から12月31日に北海道内1病院から報告された細菌性髄膜炎は1例であった。起因菌はB群溶連菌1例（血清型Ⅲ、生後14日男児）であった。平成19年から26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)。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26年は0/年、肺炎球菌で1.7/年(平成19-23年)が26年は0/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、26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することが可能である。この計画は平成18年秋に北海道内の

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(リステリア菌) 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(髄膜炎菌)
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
2014年	1	0	0	1 神経後遺症1	0	0
	99	61	22	8	6	2

北海道、2007年1月-2014年12月

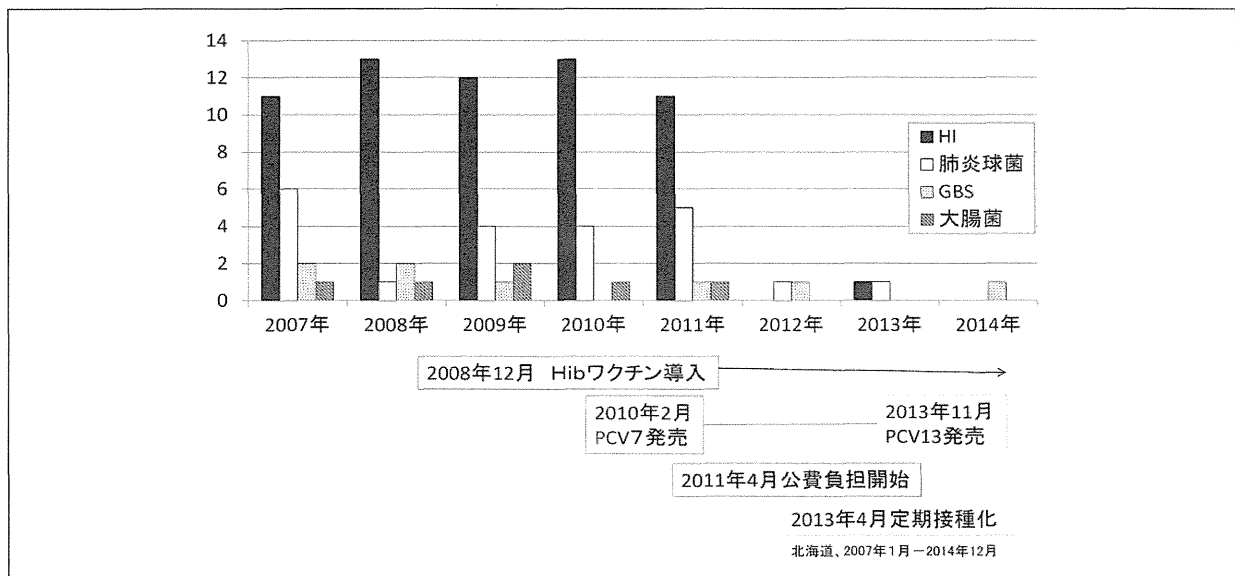


図1 細菌性髄膜炎の起因菌別分布

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、25年以降は慶応大学で行った。

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、平成26年はそれぞれ0、0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。この結果北海道においても平成24年、25年、26年のインフルエンザ菌による髄膜炎がそれぞれ0、1、0例、肺炎球菌による髄膜炎がそれぞれ1、1、0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6A 1株、19A 2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。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26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1例で起因菌はB群溶連菌（血清型Ⅲ）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0例であった。Hib、7価肺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

論文発表

- 1) Takehiro Togashi, Kenji Okada, Masako Yamaji, et al Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine given with DTaP vaccine in healthy infants in Japan. *Pediatric Infectious Disease Journal* (in press) 2015.
- 2) Chiaki Miyazaki, Kenji Okada, Takao Ozaki, Mizuo Hirose, Kaneshige Iribe, Hiroyuki Yokote, Yuji Ishikawa, Takehiro Togashi, Koji Ueda. Phase III clinical trials comparing the immunogenicity and safety of the Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine Encevac with those of mouse brain-derived vaccine by using the Beijing-1 strain. *Clinical and vaccine Immunology* 21(2): 188-195, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

川崎市における侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）のサーベイランス状況 及び肺炎球菌の血清型分布状況

研究分担者：岡部 信彦（川崎市健康安全研究所）
研究協力者：淀谷 雄亮（川崎市健康安全研究所）
飯高 順子（川崎市健康安全研究所）
宮下 安子（川崎市健康安全研究所）
松尾 千秋（川崎市健康安全研究所）
大嶋 孝弘（川崎市健康安全研究所）
丸山 絢（川崎市健康安全研究所）
三崎 貴子（川崎市健康安全研究所）
常 彬（国立感染症研究所細菌第一部）

研究要旨 侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）の届出が義務化されたことを受け、川崎市におけるIPDの発生状況について調査した。小児での届出は20例であった。19例にワクチン接種歴があり、髄膜炎例及び死亡例はなく、19例でワクチン接種歴があった。最も多く分離された血清型は19Aであった。7価肺炎球菌ワクチン（PCV7）接種にもかかわらず、ワクチンに含まれる血清型19Fが分離された事例があった。成人では42例の届出があり、髄膜炎例が2例、死亡例3例あり、ワクチン接種歴のある例はなかった。最も多く分離された血清型は3であった。血清型の判明した36例中24例でPPV23に含まれる血清型であった。今後も13価肺炎球菌ワクチン（PCV13）の導入と23価肺炎球菌ワクチン（PPV23）定期接種化後の肺炎球菌血清型分布状況の変化を注視する必要があると考える。

A. 研究目的

侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）は5類全数把握疾患として届出が義務づけられた。ワクチンは定期接種化され、小児では7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）から13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）に切り替えられ、成人では23価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPV23）が定期接種ワクチンとなった。肺炎球菌ワクチンの切り替え及び制度変更を踏まえ、IPDにおけるワクチンの接種状況を含めた発生状況及び肺炎球菌血清型の分布状況の調査を行った。

B. 研究方法

2013年4月から2014年11月までに、川崎市においてIPDの届出のあった者を対象として調査

し、患者血液及び髄液から分離された肺炎球菌菌株の血清型別を実施した。

（倫理面への配慮）

個人情報にかかわるデータはない。また研究実施にあたっては、川崎市健康安全研究所倫理審査委員会の承認を経ている。

C. 研究結果

届出は65例であった。15歳以下の小児は23例であり、5例が肺炎を、4例が中耳炎を発症していた。髄膜炎の発症例はなく、死亡例はなかった。ワクチン接種歴があった19例はPCV7を3回以上接種しており、うち4例はPCV7を3回接種後、PCV13を1回接種していた。

22例で血清型が判明し、19Aが最も多く8例で

対象

川崎市において平成25年4月～平成26年11月に届出のあった全65例
 (小児23例、成人42例)、肺炎26例(小児5例、成人21例)、髄膜炎2例
 (成人2例)、死亡3例(成人3例)

※ 15歳未満を小児とする

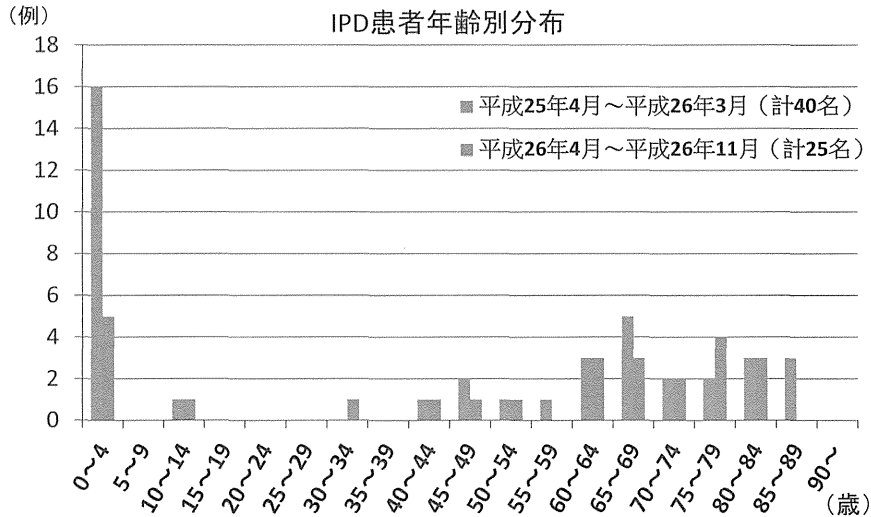
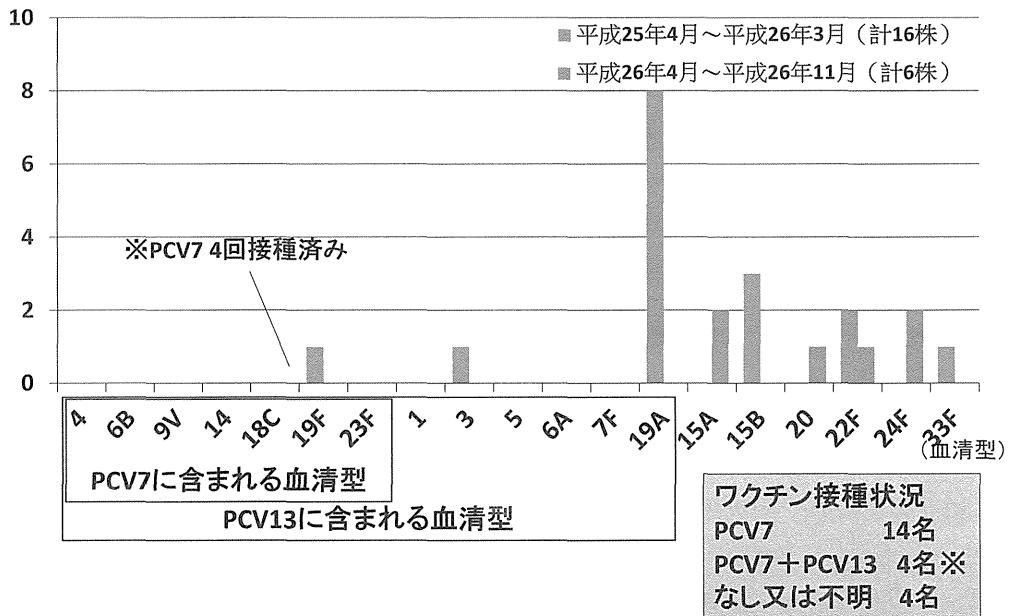


図1

(分離株数)

小児における肺炎球菌血清型分離状況



※分離された血清型 15A(1名), 22F(1名), 24F(2名)

図2

あった。19Fの1例以外、分離された血清型はいずれもPCV7に含まれていなかった。19Fによる1例は、PCV7を4回接種したにもかかわらず、肺炎、中耳炎を伴うIPDを発症した。

成人は42例であり、21例が肺炎、2例が髄膜炎を発症し、3例が死亡した。成人でPPV23を接種した例はなかった。36例で血清型が判明し、3が最も多く9例であった。血清型が判明した36例中

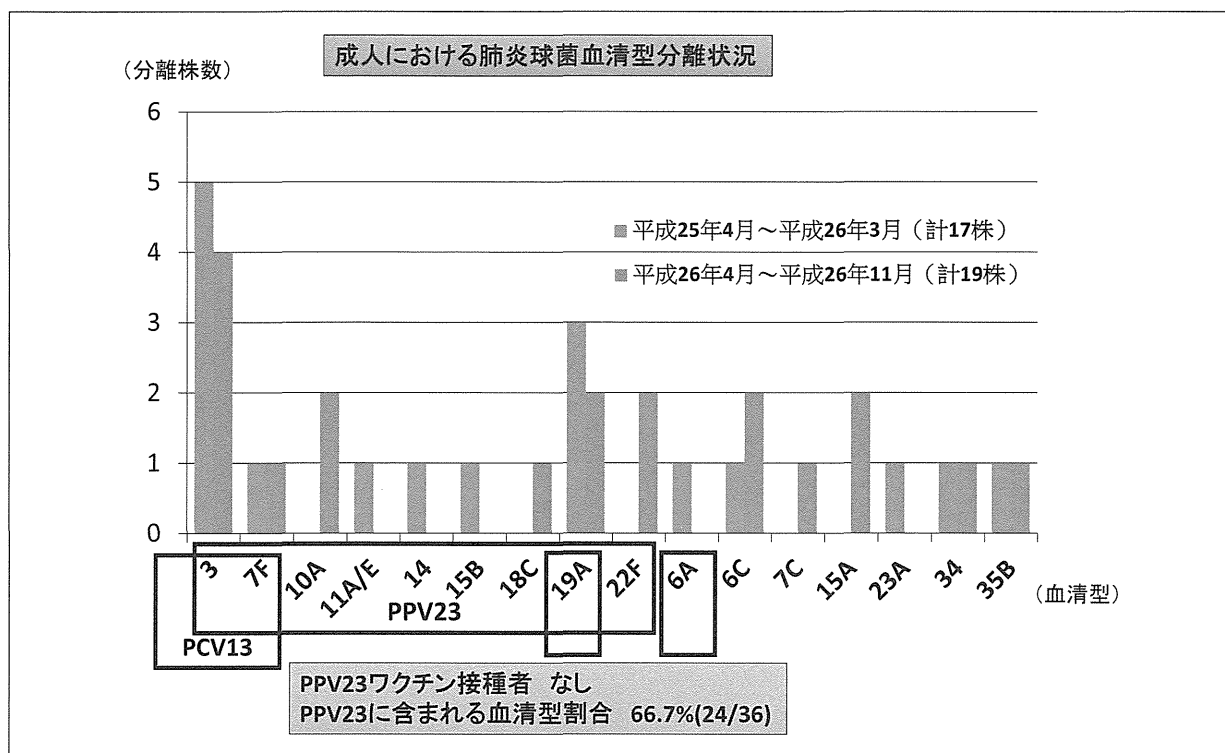


図3

24例がPPV23に含まれる血清型であった。

D. 考察 および E. 結論

PCV7に続くPCV13導入（小児）とPPV23定期接種化およびPCV13の高齢者への使用承認後の肺炎球菌血清型分布状況の変化を継続して監視することが、肺炎球菌感染症対策の考えるうえで、医学的・公衆衛生学的に重要であると考え。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 7th Asian Congress of Pediatric Infectious Disease (2014.10.12-15. 北京)
- 2) 第46回日本小児感染症学会総会・学術集会 (2014.10.18-19 東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

7. 百日咳

定着因子パータクチンを欠損する百日咳流行株に関する研究

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：大塚 菜緒（国立感染症研究所細菌第二部主任研究官）

平松 征洋（国立感染症研究所細菌第二部研究員）

研究要旨 1990～2014年に国内で臨床分離された百日咳菌について、定着因子パータクチン (Prn) の欠損状況を調査した。Prn欠損株は1997年に出現し、2000年代に分離率の上昇が認められた。2011年の分離株は36%がPrn欠損株であったが、2012～13年にかけて分離率が低下し、2014年の分離株はすべてPrn発現株となった。Prn欠損株の分離月と患者年齢の分布はPrn発現株と差が認められず、その発生動向は従来の百日咳菌感染と等しいと考えられた。遺伝子型解析からは、Prn欠損株が近縁な遺伝子型に属することが判明した。

A. 研究目的

百日咳は主に百日咳菌 *Bordetella pertussis* によって引き起こされる急性呼吸器感染症である。百日咳はワクチンによる予防が最も効果的であり、わが国では生後3ヶ月から3歳までに計4回のワクチン接種が行われている。現行の沈降精製百日せきワクチン (aP) は1981年に世界に先駆けて導入され、その後高いワクチン接種率を維持してきた。百日せきワクチンの普及により国内の百日咳患者は漸減し、特に0歳児の患者数は全報告数の1割以下に低下した。一方、わが国の百日咳サーベイランスは小児科定点からの報告であるにもかかわらず、2000年代中頃から青年・成人患者の報告数が増加している。成人患者は、ワクチン免疫を持たない乳児の感染源になることが問題となっている。

青年・成人患者の増加は他の先進諸国でも認められ、米国、オーストラリアなどでは新たな百日咳対策として成人用百日せきワクチン (Tdap) の接種を開始した。しかし、2010～13年には、米国、オーストラリア、英国で大規模な百日咳流行が発生し、Tdapワクチンの免疫持続期間が予想以上に短いことが明らかとなった。先進国における百日咳再興の原因として、1) aPの免疫持続期間4～12年程度と短いこと、2) 高感度なPCR検査

の普及により検出率が上昇したこと、3) 流行株に抗原変異が進行していること、などが推察されている。

現行aPは1950年代に国内臨床分離された百日咳菌 Tohama株をワクチン株として製造されている。Tohama株は百日咳毒素 (PT)、繊維状赤血球凝集素 (FHA)、パータクチン (Prn)、線毛 (Fim) などの主要抗原を効率良く産生するが、流行株ではこれらの遺伝子に抗原変異が認められている。また、流行株では抗原タンパク質の発現にも変化が認められ、定着因子であるパータクチン (Prn) の欠損株が日本、フランス、米国、オーストラリアなど多くの先進国で出現している (Otsuka et al., 2012, PLoS One)。また、Fimタンパク質発現の状況も、現行ワクチン株と国内流行株では発現パターンが異なり、Tohama株がFim2のみを産生するのに対し、現在の流行株ではFim3のみを産生する株が圧倒的に優勢となっている (Miyaji et al., 2013, PLoS One)。

百日咳再興に現行ワクチン株と流行株の抗原ミスマッチが関与する可能性が指摘されることから、本研究では国内流行株におけるPrnタンパク質の発現状況を解析した。

B. 研究方法

菌株：1990～2014年に国内で臨床分離された百日咳菌259株を解析に供試した。解析には疫学的な関連性がない菌株、Prn発現株が計189株、Prn欠損株が計70株を使用した。

Prn発現解析：百日咳菌のPrnタンパク質発現は免疫プロット法により解析した。菌体をSDS-lysis bufferに懸濁後、超音波処理により破菌させ全タンパク質を抽出した。タンパク質濃度はTCA-Lowry法により測定した。全タンパク質1 μ gを10%SDS-PAGEで分離し、1次抗体にはマウス抗Prn1抗体(500倍希釈)、2次抗体にはヤギ抗マウスIgG-HRP(3,000倍希釈)を使用した。化学発光はECL detection (GE healthcare)を用いて行い、ルミノ・イメージアナライザーLAS-3000 (FUJIFILM)により検出した。

MLVA：百日咳菌ゲノム上に存在する6ヶ所のVNTR領域におけるリピート数の組み合わせによりMLVA type (MT)を決定した。各VNTR領域は蛍光プライマーを用いたPCRにより増幅し、ABI 3130xlまたは3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)で分離するとともに、GeneMapper softwareを用いてフラグメントサイズの解析を行った。

次世代シーケンス解析：1994～2013年にわが国で臨床分離された百日咳菌94株について、illumina HiSeqを用いた全ゲノム解析を実施した(江南厚生病院、Crucellとの共同研究)。

統計処理：Prn発現株と欠損株の分離月および分離患者年齢の分布比較は、それぞれカイ二乗検定およびフィッシャーの正確確率検定により統計処理を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト臨床材料を使用しない。臨床分離株の解析において患者年齢を使用したが、患者個人は特定できないよう配慮した。よって、倫理上特段の問題は発生しない。

C. 研究結果

図1に1990～2014年の国内臨床分離株におけるPrn発現株の年次推移を示した。わが国では1997年に初めてPrn欠損株が出現し、その後Prn欠損株の分離率は微増傾向を示した。2011年には分離

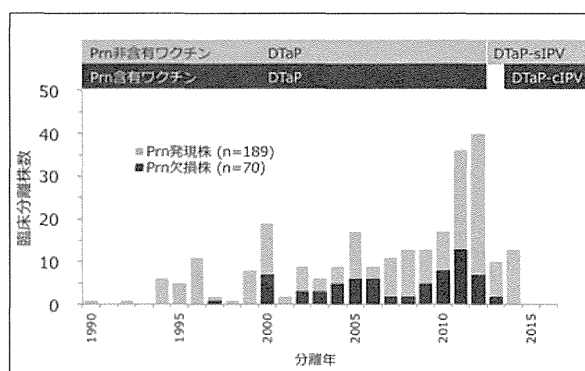


図1 百日咳臨床分離株におけるPrn欠損株の年次推移
1990～2014年に国内で臨床分離された百日咳菌259株についてPrnタンパク質の発現を免疫プロット法により解析した

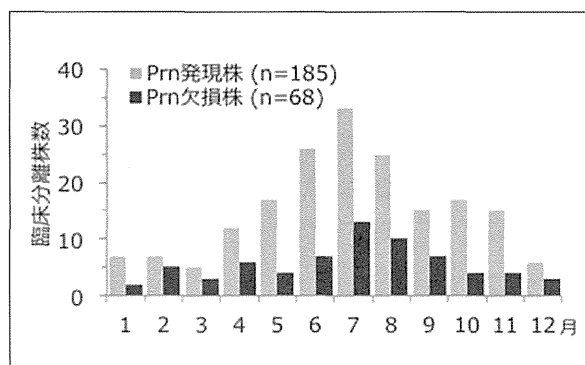


図2 百日咳菌のPrn発現株と欠損株の月別分離数
1990～2014年に分離された国内臨床分離株のうち、分離月が判明している253株(Prn発現株185株、Prn欠損株68株)を比較した。両者の分離月に統計学的な有意差は認められなかった (Chi-square test, $P=0.93$)

株の36%がPrn欠損株となったが、2012～13年にかけて分離率の低下が認められ、2014年にはPrn欠損株は不検出となった。

Prn欠損株の出現理由を考察するため、Prn発現株と欠損株の分離月および患者年齢の分布について比較解析を行った。分離月が判明しているPrn発現株($n=185$)とPrn欠損株($n=68$)を比較したところ、両者の分布に統計学的な有意差を認めなかった($P=0.93$) (図2)。また、Prn発現の有無に関わらず、わが国では6～8月に菌分離率が高い傾向を示した。次に患者年齢が判明しているPrn発現株($n=156$)とPrn欠損株($n=62$)について、患者年齢を比較した(図3)。なお、患者年齢は7群(3ヶ月未満、4～11ヶ月、1～4歳、5～9歳、10～14歳、15～19歳、20歳以上)に分けて比較した。解析の結果、Prn発現株と欠損株の患者年齢に有意差を認めなかった($P=0.77$)。

1990～2014年に臨床分離されたPrn欠損株($n=$

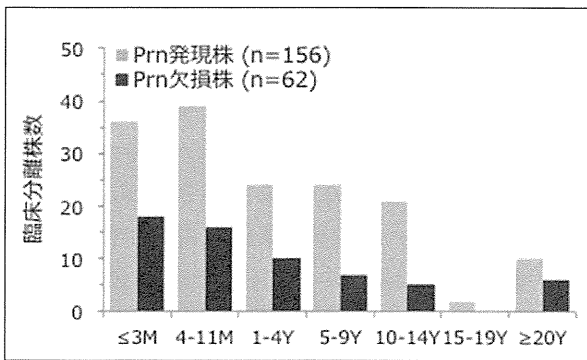


図3 百日咳菌のPrn発現株と欠損株の患者年齢分布
1990～2014年に分離された国内臨床分離株のうち、患者年齢が判明している218株(Prn発現株156株、Prn欠損株62株)を比較した。両者の患者年齢に有意差は認められなかった(Fisher's exact test, $P=0.77$)

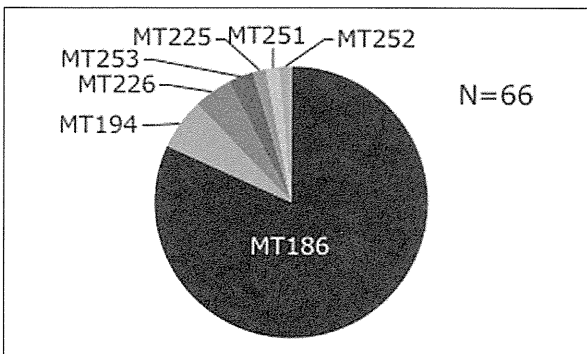


図4 Prn欠損株の遺伝子型

1990～2014年に臨床分離されたPrn欠損株66株についてMLVAタイプの内訳を示した。Prn欠損株は7種類のMLVAタイプに分類され、欠損株の82%がMT186に属した

66)について、遺伝子型MTを決定した(図4)。その結果、Prn欠損株のうち82%がMT186に属することが判明した。その他のPrn欠損株はMT186以外の6つの異なるMTsに属したが、これらはMT186とsingleもしくはdouble variantの関係を示した。遺伝子型解析から、Prn欠損株は近縁な遺伝子型に属することが明らかとなった。

Prn欠損株の遺伝子的背景を探索することを目的に、次世代シーケンサー HiSeq (illumina) を用いた全ゲノム解析を行った。Prn欠損株のうち、prn遺伝子のシグナル配列(prn Δ SS)を欠損原因とする菌株は遺伝子的に近縁な関係にあることが判明した。さらに、Prn欠損株に共通する遺伝子変異が見出された。

D. 考察

本研究では、わが国のPrn欠損状況および欠損

要因について解析を加えた。その結果、Prn欠損株は2011年以降減少傾向を示し、欧米とは異なる状況にあることが判明した。さらに、Prn欠損株の分離月と患者年齢の分布はPrn発現株と等しく、その発生動向は従来の百日咳菌感染と同じと考えられた。また、ゲノム解析からは、Prn欠損株(prn Δ SS)が遺伝的に極めて近縁な関係にあることが示された。さらにPrn欠損株に共通する遺伝子変異が見出されたことから、これらの変異とPrn欠損の関係について詳細な検討が必要である。

2010年以降、海外ではPrn欠損株の著しい分離率上昇が認められている。わが国でもPrn欠損株の分離率が上昇すると考えられたが、2014年には1株の欠損株も認められなかった。米国とオーストラリアではPrn欠損株の急速な増加が報告されており、近年の分離率は70～80%という高値を示している。さらに、Prn欠損株の遺伝的背景もわが国とこれらの国々では異なっており、日本のPrn欠損株がクローナルであるのに対し、米国、オーストラリアでは遺伝的に多様な欠損株の存在が確認されている。このことから、Prn欠損株はワクチン選択圧、すなわちワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性が指摘されている。米国ではPrn欠損株の分離率がワクチン既接種者で高いとされており、わが国とは異なる分離状況を示している。現在、日本ではPrnをワクチン抗原として含有するDPT-sIPVと含有しないDPT-cIPVの2種類が接種されていることから、Prn欠損株の発生動向については継続した監視が必要である。

E. 結論

百日咳菌のPrn欠損株は2011年以降減少傾向を示し、欧米と異なる分離状況にあることが判明した。さらにPrn欠損株の分離月と患者年齢の分布はPrn発現株と等しく、その発生動向は従来の百日咳菌感染と同じであると考察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK,