

症であり、調査した年の流行規模により入院患者数が異なる可能性がある。

ムンプスによる入院の最も多い原因は髄膜炎や脱水症等の合併症によるものであり、次いでムンプスの重症化である(表4)。合併症で入院する割合は全入院例の64.3~77.1%である。ムンプスの合併症で多いのは無菌性髄膜炎(68.0%)であり、次いで脱水症(15.3%)、精巣炎(10.0%)、難聴(3.1%)である⁹⁾。

ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎の入院患者数は、調査1では8人、調査2では3年間で40人であった^{8,9)}。アンケート回収率から推定される年間のムンプスワクチン後の入院を要する無菌性髄膜炎患者数は21~71人である。年間出生数を120万人、調査時のムンプスワクチン接種率を30%と仮定すると、無菌性髄膜炎発症率は10万接種あたり5~18人となる(発症率1/6,000~1/20,000接種)。この数字を用いると、勧奨接種となり接種率が90%になった時の推定入院患者数は年間63~213人となる。

4. 世界のムンプスワクチン

世界で使用されている代表的なムンプスワクチン株を表5に示した^{10,11)}。世界で広く使用されているのは、Jeryl Lynn(JL)株、Urabe AM9株、Leningrad Zagreb(LZ)株である。Urabe AM9株は JL 株に比べてコストが安い点がベネフィット

トである¹²⁾。JL 株は遺伝子型 A、Urabe AM9株を含めた本邦のワクチン株はすべて遺伝子型 B、LZ 株は遺伝子型 N である。現在世界の流行の主流は遺伝子型 G であり、遺伝子型 G と遺伝子型 A は系統樹解析では離れたところに位置している¹³⁾。JL 株の効果が Urabe AM9株よりも劣る要因として、JL 株接種で誘導された中和抗体が遺伝子型 G の野生株に対して中和活性が低下していることが示されている^{14,15)}。

1) Jeryl Lynn 株と Jeryl Lynn 株由来株

JL 株はフィラデルフィアのウイスター研究所で開発された株で、2種類の株が5:1で混合した株(mix population)である。JL 株の優位株を単離したのが RIT 4385株である。JL 株の特徴は安全性が優れている点である。代表的なムンプスワクチン株の無菌性髄膜炎の発症率を表6に示した。ドイツでの JL 株の自発報告による発症頻度は1,000,000接種に1人である^{10,12)}。

一方、JL 株の問題点は免疫原性が Urabe AM9株と比べて低い点である。スイスのムンプス流行時の調査では、JL 株を接種した群の有効率が62~78%であったのに対し、Urabe AM9株の有効率は73~87%と、10%程度 Urabe AM9株の方が、有効率が高率であった^{10,12)}。また、欧米ではムンプスワクチンを2回接種して

表5 世界と日本の代表的なムンプスワクチン株

ワクチン株	遺伝子型	製造国	使用細胞	備考
Jeryl Lynn	A	米国・英国	ニワトリ胚細胞	2種類の株が5:1で混合
RIT-4385	A	英国	ニワトリ胚細胞	Jeryl Lynn 株の優位株
Urabe-AM9*	B	フランス	発育鶏卵	
Leningrad-3	N	ロシア	ウズラ胚細胞	
L-Zagreb	N	クロアチア・インド	ニワトリ胚細胞	Leningrad-3株由来
S-12	H	イラン	MRC-5	
BBM-18	H	スイス	MRC-5	S-12由来、Rubini 株の後継
Urabe-AM9*	B	日本	ニワトリ胚細胞	製造休止
星野	B	日本	ニワトリ胚細胞	
鳥居	B	日本	ニワトリ胚細胞	
宮原	B	日本	ニワトリ胚細胞	販売一時休止
NK-M46	B	日本	ニワトリ胚細胞	製造中止

L: Leningrad, MRC-5: ヒト二倍体線維芽細胞

*フランス Sanofi 社と阪大微研会の Urabe-AM9株は継代歴が異なる

(文献11から作表)

表6 ムンプスワクチン株による無菌性髄膜炎の発症率

株	国	無菌性髄膜炎の頻度
Jeryl Lynn	USA	1/1,800,000
	Germany	1/1,000,000
Urabe	Canada	1/62,000
	France (Sanofi)	1/28,400
	France (GSK)	1/120,000
	United Kingdom	1/3,800~11,000
	Japan	1/900~18,686
Leningrad-Z	Brazil	1/3,390
	Croatia	1/2,020
Hoshino	Japan	1/2,000~20,000
Torii	Japan	1/2,000~20,000

(文献10から作表)

いても、高校生や大学生の集団でムンプスの再燃が起こっている¹⁶⁻¹⁹⁾。米国ではムンプス流行が再燃した集団では、麻疹ムンプス風疹 (measles mumps rubella, MMR) ワクチンの3回目の接種を推奨している¹⁹⁾。

2) その他のワクチン株

LZ株は、ロシアで開発された Leningrad-3株を、クロアチアの研究所でニワトリ胚細胞に継代することで更に病原性を低下させた株である¹⁰⁾。LZ株を用いてインド血清研究所で製造されたムンプスワクチンはアジアや中南米で使用されている。無菌性髄膜炎の発症頻度は本邦のワクチン株と同等である。東欧各国では、リスクベネフィットの観点から LZ株の無菌性髄膜炎発症率は容認できるとして LZ株を定期接種に用いている。

Urabe AM9株は本邦の阪大微生物病研究会 (微研) で開発された株で、サノフィはニワトリ胚細胞で更に継代後ワクチン株として用いている¹⁰⁾。無菌性髄膜炎発症率を指標としたときの安全性は JL株よりも劣るが、有効性は JL株よりも優れている¹²⁾。サノフィは有効性と価格面を重視し、中進国、途上国向けに輸出している。

スイスでは以前 Rubini 株を用いていたが、流行時の発症予防効果が低いため製造を中止した¹⁰⁾。現在はイランで開発された S-12株を線維芽細胞で更に継代した BBM-18株を用いている。

5. 日本のムンプスワクチン株

日本ではムンプスワクチン株は5株開発されたが、現在市販されているのは星野株と鳥居株の2株だけである¹¹⁾。いずれの株もニワトリ胚細胞を用いて製造されている。

1) 有効性

ムンプスが流行した保育園や学校における本邦ムンプスワクチンの有効率は79~90%である(表7)²⁰⁾。この有効率はスイスにおける Urabe AM9株の有効率と同等であ

り、数字上本邦ワクチン株は JL株よりも有効性は優っている。株ごとの有効率では、K小学校での流行時の調査によると、星野株82.9%、鳥居株82.3%と両株の間には有効率に差が認められていない²¹⁾。

三重県 K市では平成20年度から公費助成によるムンプスワクチンの接種を行っており、公費助成開始後のムンプスワクチンの接種率は83%に上がっている。平成20年度以降5年間の K市の定点から報告されるムンプス患者数は、平成19年度以前9年間のムンプス報告数と比べて87%減少している²²⁾。接種率向上により本邦のムンプスワクチン株によるムンプス流行抑制効果が認められている。

2) ワクチン後の耳下腺腫脹

ムンプスワクチン後の耳下腺腫脹率は3%とされている¹⁾。三重県の調査では、ムンプスワクチン接種を受けた11,459人中、野生株が分離された例を除いた72人が、接種後30日以内に急性耳下腺腫脹を来し、耳下腺腫脹率は0.63%と以前の報告よりも低率であった(表8)^{20,22)}。耳下腺腫脹率を年齢群別にみると、1歳群が0.32%と一番低く、年齢が上がるにつれて上昇し、7~10歳群の腫脹率は1.31%と1歳群と比較した時の RRは4.11と高率であった。

3) ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎

ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎は、接種

20日後頃に発症するが、1週間の経過で治癒し、後遺症を遺さない予後良好な副反応である¹²⁾。本邦では1989年からMMRワクチン接種が行われたが、ムンプスワクチンによる無菌性髄膜炎の発症率が予想よりも高かったために1993年に中止となっている²³⁾。ムンプスワクチンの無菌性髄膜炎発症率が、本邦ムンプスワクチン株を

用いた定期接種に向けての課題となっている。

この10年間に三重県下から国立病院機構三重病院に照会されたムンプスワクチン後の髄膜炎例は5例であった(表9)²²⁾。発症者の年齢は3~10歳と、ムンプスワクチン接種者の年齢構成よりも高く、全員男性で、耳下腺腫脹をとめない、ワクチン接種16~25日後に発症していた。

表7 ムンプスワクチンの効果 (三重県)

場 所	発症率 (%)		有効率 (%)	P 値
	未接種群	接種群		
保育園				
K	64.7(33/51)*	6.5(2/31)	90.0	<0.0001
S	50.8(30/59)	10.6(5/47)	79.1	<0.0001
合計	57.3(63/110)	9.0(7/78)	84.3	<0.0001
小学校				
K	46.8(73/156)	8.0(14/176)	82.9	<0.0001
星野株		8.3(11/132)	82.3	
鳥居株		8.7(2/23)	81.4	
家庭	46.9(15/32)	10.3(4/39)	78.1	0.0006

*発症者数/対象者数

(文献19,20から作表)

表8 年齢群によるムンプスワクチン後の耳下腺腫脹率 (野生株分離陽性例を除く)

年齢群	接種者数	腫脹者数	腫脹率	RR	P value
1歳	7,472	24	0.32	1	ref.
2~3歳	2,436	29	1.19	3.71	<0.0001
4~6歳	1,172	14	1.19	3.72	<0.0001
7~10歳	379	5	1.31	4.11	0.00178
合計	11,459	72	0.63		

ref: reference

ムンプスワクチン後の髄膜炎例は3歳男児の1例のみ (発症率: 1/11,500)

(文献21)

表9 ムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎例 (三重県)

症例	年齢 (歳)	性	接種株	接種から発症までの日数 (日)	耳下腺腫脹	細胞数	分離株	備考
KH	3	M	星野	19	あり	279	星野	
HO2	6	M	鳥居	25	あり	1800	鳥居	
TK	8	M	鳥居	16	あり	510	鳥居	
HO1	9	M	鳥居	25	あり	726	鳥居	
TT	10	M	星野	22	あり	N.T.	N.T.	臨床診断

N.T.: not tested

男:女 = 5:0

平均年齢: 7.2±2.8歳 (中央値8歳; 3~10歳)

発症までの日数: 21.4±3.9日 (中央値22日; 16~25日)

表7に示した年齢構成でムンプスワクチンを接種していたと仮定すると、ムンプスワクチン後の髄膜炎発症率は年齢が上がるにつれ上昇し、7～10歳群のORは19.28である(表10)。

本邦ムンプスワクチン株による無菌性髄膜炎発症率は、2,000～20,000接種あたり1人である^{24,25)}。一方、全国のムンプス入院患者数調査から推計されるムンプスワクチン後の髄膜炎発症率は調査1では1/20,000、調査2では1/6,000である^{8,9)}。いずれも年齢群別の無菌性髄膜炎発症率が不明である。

本邦では平成25年度から任意接種のワクチンも、接種後に入院を要するような有害事象が生

じた場合厚生労働省に届け出ることになっている。平成25年4～12月までの9ヶ月間にムンプスワクチンを接種し、無菌性髄膜炎の届け出があったのは11人である²⁶⁾。9ヶ月間の出庫数から推計される無菌性髄膜炎発症率は、出庫数10万あたり1.62人と今までの報告と比べて低率である(表11)。しかも無菌性髄膜炎を発症したのは、3歳1人、8歳1人、10～19歳5人、20歳代以上4人と、接種時の年齢が高いところに発症者は集中している。

三重県小児科医会では平成26年1月から、ムンプスワクチン後の安全性調査を行っている。1月から3月までの3ヶ月間に接種した1,374人の年齢構成を表12に示した。平成25年4月から12月までの9ヶ月間に在庫されたムンプスワクチンが、三重県と同じ年齢構成で接種されたと仮定すると、推定されるムンプスワクチン10万接種あたりの無菌性髄膜炎発症率は、1～3歳群では0.185と最も低く、JL株とほぼ同等であり、10～19歳群では13.87、20歳代以上では101.28と、年齢が高くなるにつれ上昇すると推定される。

表10 ムンプスワクチン後の髄膜炎発症リスク

年齢群	接種者数	ワクチン後の髄膜炎	OR
1歳	7,472	0	NA
2～3歳	2,436	1	1
4～6歳	1,172	1	2.08
7～10歳	379	3	19.28

OR: odds ratio, NA: not applicable

表11 調査期間中の出庫数あたりの無菌性髄膜炎発症率 (MHLW, 副反応報告制度)

調査期間	出庫数	髄膜炎報告数	発症率(10万接種)
H25.4.1～6.30	231,900	8	3.45
H25.7.1～12.31	446,387	3	0.67
合計	678,287	11	1.62

無菌性髄膜炎発症率が10万接種あたり1.62であると、年間出生数120万人、接種率90%とすると、年間接種者数は108万人となり、年間のムンプスワクチン後の無菌性髄膜炎発症者数は17.5人となる。(文献26から作表)

表12 三重県の年齢群別接種者数から算出した無菌性髄膜炎の発症リスク

	三重県	出庫数(全国)*	無菌性髄膜炎	OR	発症率(10万接種)
1～3歳	1,093	539,569	1	1	0.185
4～9歳	200	98,732	1	5.465	1.013
10～19歳	73	36,037	5	74.863	13.87
20歳～	8	3,949	4	546.5	101.28
合計	1,374	678,287	11	8.75	1.62

*出庫数から推定される全国の接種者数

6. ムンプスワクチンのリスクベネフィット

ムンプスワクチンは安全性が高い株ほど有効率が低く、有効率が高い株ほど無菌性髄膜炎を合併する頻度が高くなっている^{10,12)}。ムンプスワクチン株を選択するうえで問題となるのは、有効性と安全性のどちらを重視するかである。JL株と同じ安全性があり、JL株よりも免疫原性に優れた株の開発を求める意見がある²⁷⁾。

ムンプスは、発症時の年齢が高くなるほど耳下腺の腫脹率が高く、合併症である無菌性髄膜炎や難聴の発症率も、年齢が高くなるほど高頻度になる感染症である。ムンプスワクチン後の副反応の調査でも、耳下腺腫脹率や無菌性髄膜炎の発症率は、接種時の年齢が高くなるほど上昇する。ムンプスワクチンの有効性を重視し、副反応である無菌性髄膜炎の発症率をできる限り抑えるためには、有効性が高い株を無菌性髄膜炎発症率が低い低年齢で接種することが大切である。

ムンプス発症時のリスクとワクチン接種による安全性評価を表2に示した。ムンプスワクチンを定期接種化することで、無菌性髄膜炎は1/1,000以下に減少し、予後の悪い脳炎や難聴は極めてまれになる。リスクベネフィットを考えると、本邦ムンプスワクチン株は効果があるワクチンであり、2回接種でも医療経済性が認められている²⁸⁾。

現在本邦で市販されているムンプスワクチン株はJL株よりも有効性が高いと推察され、しかも1歳で接種すれば無菌性髄膜炎の発症率は低くなると推計されている。MMRワクチンによるトラウマにとらわれることなく、リスクベネフィットを考慮した科学的な判断が待たれている²⁹⁾。

7. まとめ

ムンプスワクチンは、安全性を重視すると有効性が低下し、有効性を重視すると安全性が低下する。ムンプスは発症時の年齢が高くなるほど臨床症状が典型的になり、合併症の発症率が増加する感染症である。ムンプスワクチンも接種時の年齢が高くなるほど副反応である耳下腺腫脹や無菌性髄膜炎の発症率が増加する。今ま

でのデータから、本邦ムンプスワクチン株を1歳児に接種すれば、効果的にしかもJL株と同等の安全性で接種できると推察される。過去のトラウマにとらわれることなく科学的に判断することで、ムンプスワクチン定期接種化の道が開かれることを期待する。

参考文献

- Galazka AM, Robertson SE, Kraigher A : Mumps and mumps vaccine : a global review. Bull World Health Organ 77 : 3-14, 1999 .
- 庵原俊昭, 落合 仁 : 年齢によるムンプス臨床像の相違. 小児科 43 : 217-222, 2002
- 庵原俊昭 : ムンプスとムンプスワクチン. 日本小児科医会会報 41 : 95-98, 2011
- 磯村思无 : ムンプスワクチン. 小児内科 10 : 1357-1361, 1988
- 庵原俊昭, 菅 秀, 浅田和豊, 東川正宗, 落合 仁, 二井立恵, 伊佐地真知子, 渡辺正博 : 安全性からみた本邦ムンプスワクチンの適切な接種年齢の検討. 日本小児科学会雑誌 118 : 1-99, 2014
- Vuori N, Lahikainen EA, Peltonen T : A study of 298 servicemen suffering from mumps. Acta Otolaryngol 55 : 231-236, 1962
- Hashimoto H, Fujioka M, Kinumaki H, Kinki Ambulatory Pediatrics Study Group : An office-based prospective study of deafness in mumps. Pediatr Infect Dis J 28 : 173-175, 2009
- 多屋馨子, 神谷 齊, 浅野喜造, 堤 裕幸 : 水痘, 流行性耳下腺炎重症化に関する全国調査. 厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)水痘, 流行性耳下腺炎, 肺炎球菌による肺炎等の今後の感染症対策に必要な予防接種に関する研究. 平成16年度総括・分担研究年度終了報告書 : 40-48, 2005
- 保坂シゲリ, 小森 貴, 保科 清, 峯 真人, 細矢光亮, 五十嵐 隆 : ムンプスウイルスおよび水痘・帯状疱疹ウイルス感染による重症化症例と重篤な合併症を呈した症例についての調査. 日本小児科医会会報 44 : 182-186, 2012
- Rubin SA, Plotkin SA : Mumps vaccine. In Vaccine, 6th ed, Saunders, Philadelphia, pp419-446, 2013
- 庵原俊昭 : ムンプス. 小児科 54 : 1753-1760, 2013

- 12) Bonnet M, Dutta A, Weinberger C, Plotkin SA : Mumps vaccine virus strains and aseptic meningitis. *Vaccine* 24 : 7037-7045, 2006
- 13) 木所 稔, 竹田 誠 : ムンプスウイルスの新たな分類基準と国内流行状況. *病原微生物検出情報* 34 : 224-225, 2013
- 14) 竹田 誠, 木所 稔, 庵原俊昭, 名木田章 : わが国のムンプスウイルスの流行解析基盤の構築. ワクチンにより予防可能な疾患に対する予防接種の科学的根拠の確立及び対策の向上に関する研究. 平成24年度総括・分担研究報告書 : 48-54, 2013
- 15) Dayton GH, Rubin S : Mumps outbreaks in the vaccinated populations : are available mumps vaccines effective enough to prevent outbreaks? *Clin Infect Dis* 47 : 1458-1467, 2008
- 16) Dayan GH, Quinlisk MP, Parker AA, Barskey ML, Hill Schwartz JM, Hunt K, Finley CG, Leschinsky DP, O'Keefe AL, Clayton J, Kightlinger LK, Dietle EG, Berg J, Kenyon CL, Goldstein ST, Stokley SK, Redd SB, Rota PA, Rota J, Daoling B, Roush SW, Bridges CB, Santibanez TA, Parashar U, Bellini WJ, Seward JF : Recent resurgence of mumps in the United States. *N Engl J Med* 358 : 1580-1589, 2008
- 17) Greenland K, Whelan J, Fancy E, Borgert M, Hulshof K, Yap K, Swaan C, Donker T, van Binnendijk R, de Melker H, Hahne S : Mumps outbreak among vaccinated university students associated with a large party, the Netherlands, 2010. *Vaccine* 30 : 4676-4680, 2012
- 18) Barskey AE, Schulte C, Rosen JB, Handschur FF, Rausch-Phung E, Doll MK, Cummings KP, Alleyne EO, High P, Apostolou A, Blog D, Zimmerman CM, Montana B, Harpaz R, Hickman CJ, Rota PA, Rota JS, Bellini WJ, Gallagher KM : Mumps outbreak in Orthodox Jewish communities in the United States. *N Engl J Med* 367 : 1704-1713, 2012
- 19) Nelson GE, Aguon A, Valencia E, Oliva R, Guerrero ML, Reyes R, Lizama A, Diras D, Mathew A, Camacho EJ, Monforte M, Chen T, Mahamud A, Kutty PK, Hickman C, Bellini WJ, Seward JF, Gallagher K, Fiebelkorn A : Epidemiology of a mumps outbreak in a highly vaccinated island population and use of a third dose of measles-mumps-rubella vaccine for outbreak control-Guam 2009 to 2010. *Pediatr Infect Dis J* 32 : 374-380, 2013
- 20) 庵原俊昭 : ムンプスワクチン : 現状と今後. *臨床とウイルス* 38 : 386-392, 2010
- 21) 落合 仁, 庵原俊昭, 中野貴司, 他 : 小学校におけるムンプスワクチン有効性の検討. *小児科臨床* 60 : 489-494, 2007
- 22) 庵原俊昭, 菅 秀, 長尾みづほ, 浅田和豊, 根来麻奈美, 谷口清州, 落合 仁, 渡辺正博, 二井立恵, 伊佐地真知子 : ムンプスワクチン効果に関する臨床的検討. ムンプスに関する重大なワクチンギャップを抜本的に解決するための研究. 平成25年度総括・分担研究報告書 : 17-24, 2014
- 23) Ueda K, Miyazaki C, Hidaka Y, Okada K, Kusuhara K, Kadoya R : Aseptic meningitis caused by measles-mumps-rubella vaccine in Japan. *Lancet* 346 : 701-702, 1995
- 24) Nagai T, Okafuji T, Miyazaki C, Ito Y, Kamada M, Kumagai T, Yuri K, Sakiyama H, Miyata A, Ihara T, Ochiai H, Shimomura K, Suzuki E, Torigoe S, Igarashi M, Kase T, Okuno Y, Nakayama T : A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine* 25 : 2742-2747, 2007
- 25) Nakayama T, Onoda K : Vaccine adverse events reported in post-marketing study of the Kitasato Institute from 1994 to 2004. *Vaccine* 5 : 25(3) : 570-576, 2007 Jan
- 26) 第9回厚生科学審議会予防接種・ワクチン分科会副反応検討部会(平成26年5月19日)資料
- 27) Plotkin SA : Mumps vaccine : Do we need a new one? *Pediatr Infect Dis J* 32 : 381-382, 2013
- 28) 菅原民枝, 大日康史, 多屋馨子, 及川 馨, 羽根田紀幸, 菊池 清, 加藤文栄, 山口清次, 吉川哲史, 中野貴司, 庵原俊昭, 堤 裕幸, 浅野喜造, 神谷 齊, 岡部信彦 : ムンプスワクチンの定期接種化の費用対効果分析. *日本感染症学会誌* 81 : 555-561, 2007
- 29) Plotkin SA : Is Japan deaf to mumps vaccine? *Pediatr Infect Dis J* 28 : 176, 2009

Changes in Capsule and Drug Resistance of Pneumococci after Introduction of PCV7, Japan, 2010–2013

Naoko Chiba, Miyuki Morozumi, Michi Shouji, Takeaki Wajima, Satoshi Iwata, Kimiko Ubukata, and the Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group

We aimed to clarify changes in serotypes and genotypes mediating β -lactam and macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from Japanese children who had invasive pneumococcal disease (IPD) after the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) was introduced into Japan; 341 participating general hospitals conducted IPD surveillance during April 2010–March 2013. A total of 300 pneumococcal isolates were collected in 2010, 146 in 2011, and 156 in 2012. The proportion of vaccine serotypes in infectious isolates decreased from 73.3% to 54.8% to 14.7% during the 3 years. Among vaccine serotype strains, genotypic penicillin-resistant *S. pneumoniae* strains also declined each year. Among nonvaccine serotype strains, 19A, 15A, 15B, 15C, and 24 increased in 2012. Increases were noted especially in genotypic penicillin-resistant *S. pneumoniae* isolates of serotypes 15A and 35B, as well as macrolide resistance mediated by the *erm(B)* gene in 15A, 15B, 15C, and 24.

Invasive pneumococcal disease (IPD), such as meningitis, sepsis, and empyema, substantially contributes to illness and death in children (1,2). After increasing numbers of cases caused by penicillin (PEN)-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) emerged and rapidly spread worldwide during the 1990s (3,4), the need for a vaccine effective in infants became clear. In the United States, a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) was introduced in 2000 and made available for routine use in all children 2–23 months of age and in children 24–59 months

of age at risk for pneumococcal infection (5). Subsequent surveillance studies demonstrated a marked decrease in prevalence of pneumococcal infection caused by vaccine serotypes, including PRSP (6–8). In particular, PCV7 appears to have decreased incidence of meningitis caused by vaccine serotypes (9), and cases caused by non-PCV7 serotype strains, such as PRSP with serotype 19A, have increased in the United States (8,10,11). Such changes suggest that nonvaccine serotypes are replacing vaccine serotypes in some countries (12–14).

A next-generation 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) was licensed for use in the United States in 2010 (15). PCV13 has been approved in 128 countries, and children in 83 countries have undergone routine PCV13 vaccination. Recently, Richter et al. reported that an increase of type 19A was halted by introduction of PCV13, whereas serotype 35B increased; coverage provided by PCV13 was effective in only 41.4% of children ≤ 5 years of age in 2010 and 2011 (16). Furthermore, Kaplan et al. reported a slight increase in serotype 33F (17).

In Japan, PRSP has increased rapidly as a cause of respiratory tract infections, acute otitis media, and IPD in children since the late 1990s (18,19). PCV7 received final approval in October 2009 and has been used clinically in infants on a voluntary basis since February 2010. Since November 2010, PCV7 use has been encouraged for children < 5 years of age throughout Japan by an official program, the Provisional Special Fund for the Urgent Promotion of Vaccination. As a result, estimated rates of PCV7 vaccination for such children were $< 10\%$ in 2010, 50%–60% in 2011, and 80%–90% in 2012.

PCV7 was incorporated into the routine vaccination schedule for children in Japan beginning in April 2013; before then, however, its coverage rate against IPD had decreased rapidly from 71.8% in 2006 to 51.6% in 2011 (20).

Author affiliations: Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan (N. Chiba, M. Morozumi, S. Iwata, K. Ubukata); Kitasato University, Tokyo (N. Chiba, M. Morozumi, K. Ubukata); National Cancer Center Hospital, Tokyo (M. Shouji); and Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, Tokyo (T. Wajima)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2007.131485>

Most recently, PCV13 was approved by the government in June 2013, later replacing PCV7 as a routine vaccination in November 2013. The purpose of our study was to clarify changes during April 2010–March 2013 of serotypes and genotypes mediating β -lactam and macrolide resistance in *S. pneumoniae* isolates from children <18 years of age who had IPD before and after PCV7 introduction.

Methods

Patients and Pneumococcal Strains

All study participants were children <18 years of age who had IPD. Pneumococcal isolates from normally sterile clinical samples, such as blood, cerebrospinal fluid, pleural effusions, and joint fluid, were collected and examined.

Medical institutions that had a microbiology laboratory and a pediatric department with hospitalization facilities were permitted to participate actively in surveillance. An estimated 25% of all general hospitals in Japan participated. Participating hospitals were distributed nearly uniformly throughout Japan (Figure 1). These hospitals took part in the surveillance project after the laboratory director or hospital director granted permission in writing. A questionnaire collecting information for every case-patient was completed anonymously in accordance with the ethical guidelines for conducting epidemiologic studies in Japan.

Pneumococcal isolates were collected nationwide during 3 periods. The first surveillance period was April 2010–March 2011, when voluntary vaccination with PCV7 was estimated to be <10% (vol-PCV7: 2010). The second period was April 2011–March 2012, when the estimated vaccination rate was 50%–60% because of the Urgent Promotion of Vaccination incentive (post-PCV7: 2011). The third period was April 2012–March 2013, when the vaccination rate was 80%–90% just before introduction of PCV13

(pre-PCV13: 2012). We collected a total of 602 isolates from 341 general hospitals: 300 in 2010, 146 in 2011, and 156 in 2012.

Serotypes and Antimicrobial Drug-Resistant Genotypes

Serotypes of all isolates were determined by the capsular quellung reaction using antiserum purchased from the Statens Serum Institute (Copenhagen, Denmark). Alterations in 3 penicillin-binding protein (PBP) genes mediating β -lactam resistance in *S. pneumoniae*—*pbp1a* (PBP1A), *pbp2x* (PBP2X), and *pbp2b* (PBP2B)—were identified by real-time PCR methods that we developed and reported previously (21). The PCR system detected the presence of amino acid substitution(s) in conserved amino acid motif(s), such as serine-threonine-methionine-lysine, in each PBP. The genes *mef*(A) and *erm*(B), which confer resistance to macrolide antimicrobial drugs, also were identified by real-time PCR (21).

Genotype (g) based on molecular analysis is represented here as penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (gPSSP) possessing 3 normal *pbp* genes; penicillin-intermediate *S. pneumoniae* (gPISP), further classified as gPISP (*pbp2x*), gPISP (*pbp1a+pbp2x*), or gPISP (*pbp2x+pbp2b*); or penicillin-resistant *S. pneumoniae* (gPRSP), possessing all 3 abnormal *pbp* genes (22). Relationships between susceptibilities to β -lactam agents among phenotypes of *S. pneumoniae* and resistance genotype were described previously (21). Genotypes involving macrolide resistance are represented here as the following: macrolide-susceptible *S. pneumoniae* not possessing any genes (MLS); intermediate macrolide resistance to 14- or 15-membered macrolides mediated by the *mef*(A) gene (MLR-*mef*[A]); high macrolide resistance to all macrolides mediated by the *erm*(B) gene (MLR-*erm*[B]); and high macrolide resistance possessing both genes (MLR-*mef*[A]+*erm*[B]).

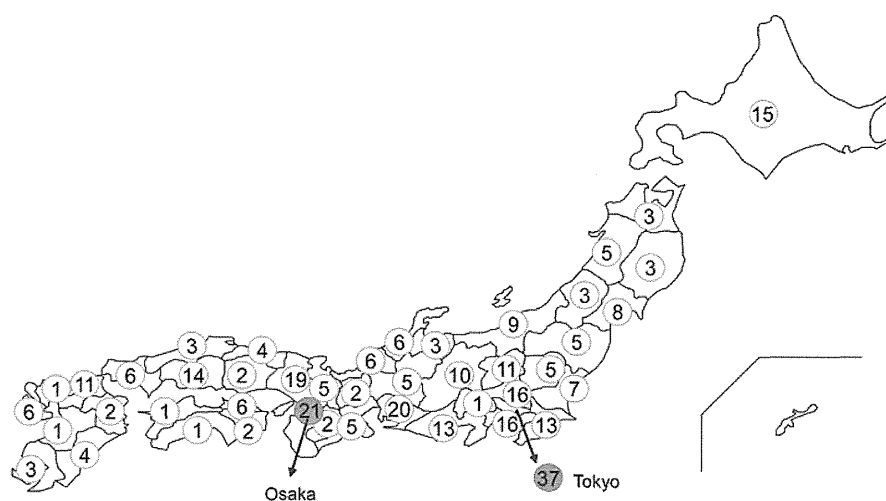


Figure 1. Distribution of general hospitals participating in surveillance for invasive pneumococcal disease, Japan, April 2010–March 2013. Numbers in gray shaded circles show the number of hospitals in Tokyo and Osaka; other numbers show the number of the hospitals in each prefecture.

For each strain transferred to our laboratory, we promptly identified capsular type by quellung reaction, and resistance genotype was determined by real-time PCR. Results were returned immediately to medical staff at the referring hospital. Medical personnel caring for the patients considered this surveillance and results reporting system very helpful, and it was continued for 3 years.

Multilocus Sequence Typing

Multilocus sequence typing for the strains collected was performed according to previously described methods with slight modifications (23). Primers listed on the website of the Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/alt-MLST-primers.htm>) were used. Multilocus sequence typing and eBURST analyses were performed according to published methods (<http://spneumoniae.mlst.net>).

Statistical Analysis

We assessed statistical significance of differences in serotype distribution between the 3 periods, age groups, and specific infectious diseases. We used χ^2 tests or the Fisher exact test, using Ekuseru-Toukei 2012 software for statistics (Social Survey Research Information Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Results

Patient Age and Coverage Rate by PCV7

Estimated rates of vaccination with PCV7 were <10% in 2010 (voluntary-PCV7) but rose to 50%–60% with funding in 2011 (post-PCV7) and to 80%–90% with enhanced implementation of PCV7 just before the transition from PCV7 to PCV13 in 2012 (pre-PCV13). *S. pneumoniae* isolates from patients with IPD, collected every year, decreased by half in 2011 and 2012 from those in 2010. In particular, vaccine serotypes decreased significantly among patients ≤ 4 years of age ($p < 0.001$) but not among those ≥ 5 years of age ($p = 0.733$) (Table 1). For all patients, coverage rate by PCV7 decreased rapidly from 73.3% in 2010 to 54.8% in 2011 to 14.7% in 2012, and prevalence proportion of nonvaccine serotypes increased for 3 years ($p < 0.001$).

Year-to-Year Changes in Vaccine and Nonvaccine Serotype Prevalence Proportion by Disease

We compared year-to-year changes in prevalence of vaccine and nonvaccine serotypes of *S. pneumoniae* in patients who had meningitis; sepsis and bacteremia; pneumonia; and other invasive infections, including cellulitis, arthritis, endocarditis, and empyema during each of the 3 years studied (Table 2). Pneumonia cases were included only when *S. pneumoniae* was isolated from blood cultures. Vaccine serotype strains decreased significantly in

Table 1. Vaccine and nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in children after introduction of PCV7, Japan, April 2010–March 2013*

Age group, y, and serotype	Isolates, no. (%)			p value
	2010, n = 300†	2011, n = 146‡	2012, n = 156§	
<1				<0.001
VT	51 (17.0)‡	26 (17.8)	3 (1.9)	
NVT	19 (6.3)	14 (9.6)	25 (16.0)	
1				<0.001
VT	103 (34.3)	25 (17.1)	9 (5.8)	
NVT	31 (10.3)	28 (19.2)	62 (39.7)	
2–4				<0.001
VT	55 (18.3)	23 (15.8)	6 (3.8)	
NVT	19 (6.3)	14 (9.6)	39 (25.0)	
≥ 5				0.733
VT	11 (3.7)	6 (4.1)	5 (3.2)	
NVT	11 (3.7)	10 (6.8)	7 (4.5)	
Total				<0.001
VT	220 (73.3)	80 (54.8)	23 (14.7)	
NVT	80 (26.7)	66 (45.2)	133 (85.3)	

*PCV7, 7-valent pneumococcal conjugate vaccine; VT, vaccine serotype (serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F); NVT, serotypes not included in PCV7.

†Voluntary vaccination with PCV7.

‡Implementation of Urgent Promotion of Vaccination incentive.

§Just before the introduction of 13-valent PCV.

patients with meningitis ($p = 0.006$), sepsis and bacteremia ($p < 0.001$), and pneumonia ($p < 0.001$).

Correlation between Serotype and Genotype

We also determined correlations between changes of serotypes and resistance genotypes in all 602 isolates for each period (Figure 2). These resistance genotypes were classified according to real-time PCR results concerning 3 PBP genes: *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b*.

Table 2. Year-to-year changes in prevalence of vaccine and nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in children after introduction of PCV7, Japan, April 2010–March 2013*

Disease and serotype	Isolates, no. (%)			p value
	2010, n = 300†	2011, n = 146‡	2012, n = 156§	
Meningitis				0.006
VT	42 (14.0)	17 (11.6)	6 (3.8)	
NVT	20 (6.7)	17 (11.6)	15 (9.6)	
Sepsis and bacteremia				<0.001
VT	111 (37.0)	42 (28.8)	13 (8.3)	
NVT	48 (16.0)	39 (26.7)	94 (60.3)	
Pneumonia				<0.001
VT	54 (18.0)	14 (9.6)	3 (1.9)	
NVT	8 (2.7)	6 (4.1)	21 (13.5)	
Other				0.147
VT	13 (4.3)	7 (4.8)	1 (0.6)	
NVT	4 (1.3)	4 (2.7)	3 (1.9)	
Total				<0.001
VT	220 (73.3)	80 (54.8)	23 (14.7)	
NVT	80 (26.7)	66 (45.2)	133 (85.3)	

*PCV7, 7-valent pneumococcal conjugate vaccine; VT, vaccine serotype (serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F); NVT, serotypes not included in PCV7.

†Voluntary vaccination with PCV7.

‡Implementation of Urgent Promotion of Vaccination incentive.

§Just before the introduction of 13-valent PCV.

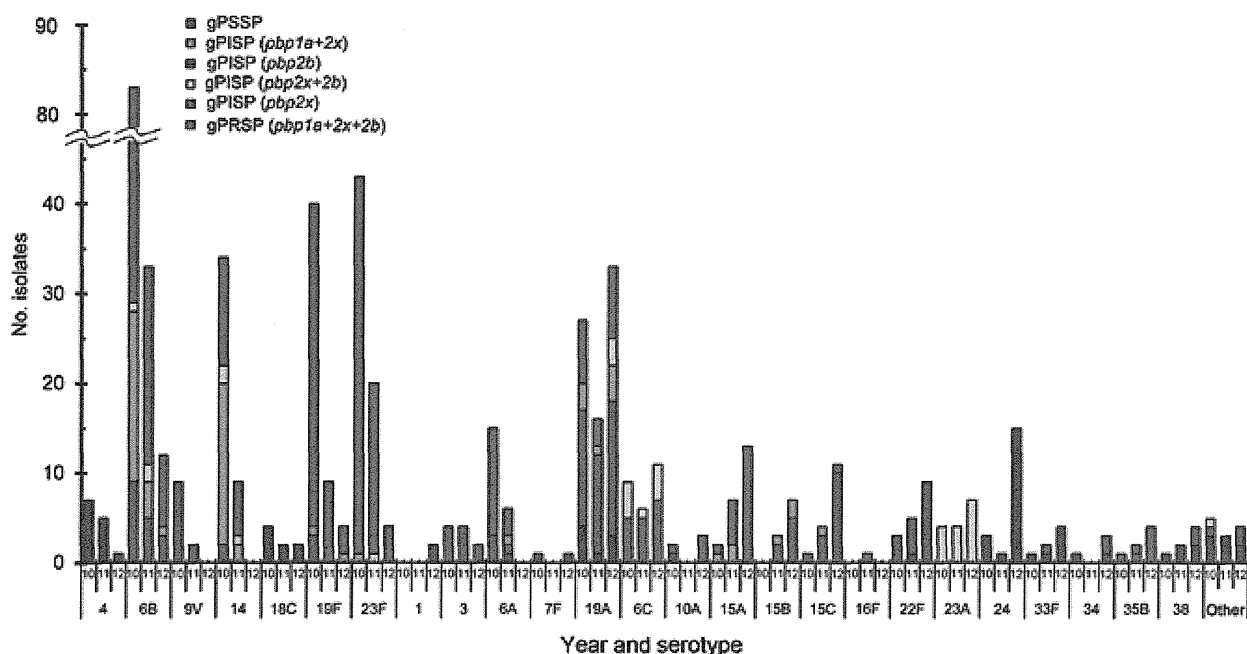


Figure 2. Changes in serotype number and penicillin resistance according to genotype, Japan, April 2010–March 2013. gPSSP, genotypic penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae*; gPISP, genotypic penicillin-intermediate resistant *S. pneumoniae*; gPRSP, penicillin-resistant *S. pneumoniae*. The parentheses express abnormal *pbp* gene mediating penicillin resistance. 2010 indicates first surveillance period (April 2010–March 2011); 2011 indicates second surveillance period (April 2011–March 2012); 2012 indicates third surveillance period (April 2012–March 2013).

Overall, gPRSP and gPISP (*pbp1a+pbp2x*), respectively, declined from 54.7% and 14.3% in 2010, to 47.3% and 8.2% in 2011, to 26.3% and 5.1% in 2012. Among them, vaccine serotypes 6B, 14, 19F, and 23F, including gPRSP and gPISP (*pbp1a+pbp2x*), which showed high frequency in 2010, decreased significantly during the 2 subsequent periods ($p < 0.001$). Of serotypes contained in PCV13, serotype 6A, showing cross-protective immunity with 6B, also decreased markedly in 2012, but prevalence of serotype 19A increased. Serotypes 1, 3, and 7F included a very small number of isolates.

Coverage rate of PCV13 decreased rapidly from 89.0% in 2010 to 72.6% in 2011 to 39.1% in 2012 ($p < 0.001$). Nonvaccine serotypes increased, especially serotypes 24 and 33F, identified as gPSSP; 15B, 15C; and 22F, gPISP (*pbp2x*); and 15A and 35B, gPRSP.

Main clonalities within major nonvaccine serotypes were identified as sequence type (ST) 3111 and ST2331 in serotype 19A, ST63 in serotype 15A, ST199 in serotypes 15B and 15C, ST433 in serotype 22F, ST338 of clonal complex (CC) 156 in serotype 23A, ST5496 of CC2572 in serotype 24, ST717 in serotype 33F, and ST558 in serotype 35B. STs in gPRSP among nonvaccine serotypes were as follows: major strains of serotype 15A belonged to ST63; serotype 15C belonged to ST83 of CC81;

serotype 35B belonged to ST558; and serotype 16F belonged to ST8351 of CC3117.

Yearly Changes in Macrolide Resistance

Macrolide resistance was classified into 4 groups: MLS, MLR-*mef(A)*, MLR-*erm(B)*, and MLR-*mef(A)+erm(B)*. Comparing results between 2010 and 2012, proportions of resistance types of MLR-*mef(A)*, MLR-*erm(B)*, and MLR-*mef(A)+erm(B)* in vaccine serotypes decreased, whereas that of MLR-*erm(B)* in nonvaccine serotypes increased significantly ($p < 0.001$) (Figure 3).

Relationships between serotypes and macrolide resistance genes changed from year to year (Figure 4). In contrast to decreases in vaccine serotype strains possessing *erm(B)* or *mef(A)* genes, nonvaccine serotypes 15A, 15B, 15C, and 24, which possess the *erm(B)* gene mediating high macrolide resistance, increased. Almost all strains of serotype 19A possessed both genes *erm(B)* and *mef(A)*.

Changes of Relative Ratios of Every Serotype

As for increases and decreases in the proportion of each serotype isolated from patients <5 years of age from 2010 (vol-PCV7) to 2012 (pre-PCV13), vaccine serotype strains 6B, 14, 19F, and 23F, and 6A (which shows cross-protective

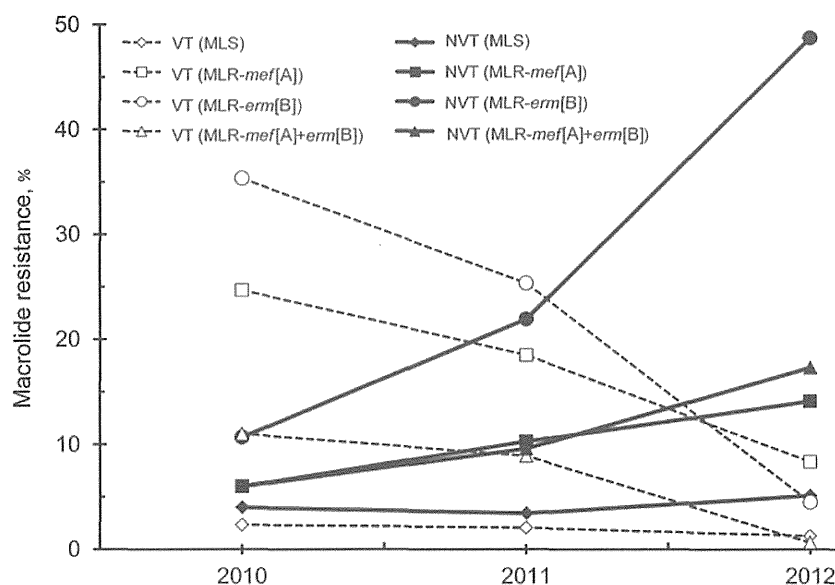


Figure 3. Proportional yearly changes in macrolide resistance according to resistance genes *erm*(B) and *mef*(A) identified by real-time PCR, Japan, April 2010–March 2013. The percentage of each resistance gene was calculated from the number of *Streptococcus pneumoniae* strains for each year. VT, vaccine serotype (serotypes 4, 9V, 18C, 6B, 14, 19F, 23F) included in the 7-valent pneumococcal vaccine; NVT, serotypes not included in the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine; MLS, macrolide-susceptible strains not possessing any resistance gene; MLR-*mef*(A), macrolide-resistant strain possessing the *mef*(A) gene; MLR-*erm*(B), macrolide-resistant strain possessing the *erm*(B) gene; MLR-*mef*(A)+*erm*(B), macrolide-resistant strain possessing both *mef*(A) and *erm*(B) genes.

immunity with 6B, occurring frequently among IPD cases) decreased markedly ($p < 0.001$ for 4 vaccine serotypes, $p = 0.005$ for 6A). Serotype 19A, included in PCV13, increased ($p < 0.001$). Other serotypes included in PCV7 or PCV13, except for 6A and 19A, changed minimally. Overall, proportions of nonvaccine serotypes not covered by PCV13 increased, particularly serotypes 15A, 15B, 15C, and 24 (each $p < 0.001$), and 22F ($p = 0.004$).

Patient Age and Vaccination History in 2012

Only 23 patients had infections caused by strains of vaccine serotypes (14.7%), 21 of whom had not received PCV7 (Table 3). Of the remaining 2 patients, a 1-year-old child infected with a strain of serotype 6B had received 2 doses of vaccine. The other patient, 5 years of age, was infected with a strain of serotype 19F; vaccination history was unknown.

Discussion

Introduction of PCV7 to prevent pneumococcal infections in children was credited with dramatic declines of the incidence of IPD in the United States (6,7), European Union countries (24,25), and many other nations (26).

During this implementation, increases in pneumococcal infections caused by serotype 19A and other nonvaccine serotypes, including those comprising many penicillin-nonsusceptible strains, has raised problems in clinical practice (10,11,27). Large-scale longitudinal surveillance showed that the rate of coverage by PCV7 decreased from 70% during 1999–2000 to 4.3% during 2008–2009 (16).

In light of these observations, PCV7 was replaced with PCV13 in the United States in 2010 (15). After the change to PCV13, penicillin-nonsusceptible strains and serotype 15A or 35B strains increased as they did after PCV7 was introduced (16).

In Japan, PCV7 vaccination of children <5 years of age began at the end of 2010 under the Provisional Special Fund for the Urgent Promotion of Vaccination. This measure led to routine vaccination with PCV7 beginning in April 2013 until the vaccine was changed to PCV13 in November 2013. Nationwide, the estimated rate of PCV7 vaccination for children <5 years of age in 2012 and 2013 was 80%–90% and >90%, respectively. We examined the influence of PCV7 against IPD infection in children in detail with active cooperation from 341 clinical laboratories at general hospitals. We therefore believe that our data are highly likely to reflect changes in trends of serotypes and strains causing IPD after PCV7 introduction in Japan. Unfortunately, we could not calculate a precise incidence of IPD per 100 000 children.

The decrease of IPD cases caused by strains of vaccine serotypes after promotion of PCV7 contributed to a reduction in overall IPD by half. Furthermore, dramatic reductions in number of cases caused by serotypes 6B, 14, 19F, and 23F—including mainly gPISP and gPRSP—have been beneficial.

However, the relative proportion of IPD caused by nonvaccine serotypes, such as 15A, 15B, 15C, 19A, 22F, 24, and 35B, increased year by year, and the PCV7 coverage rate fell drastically from 73.3% in 2010 to 14.7% in 2012. The impact of routine PCV13 vaccination implemented in

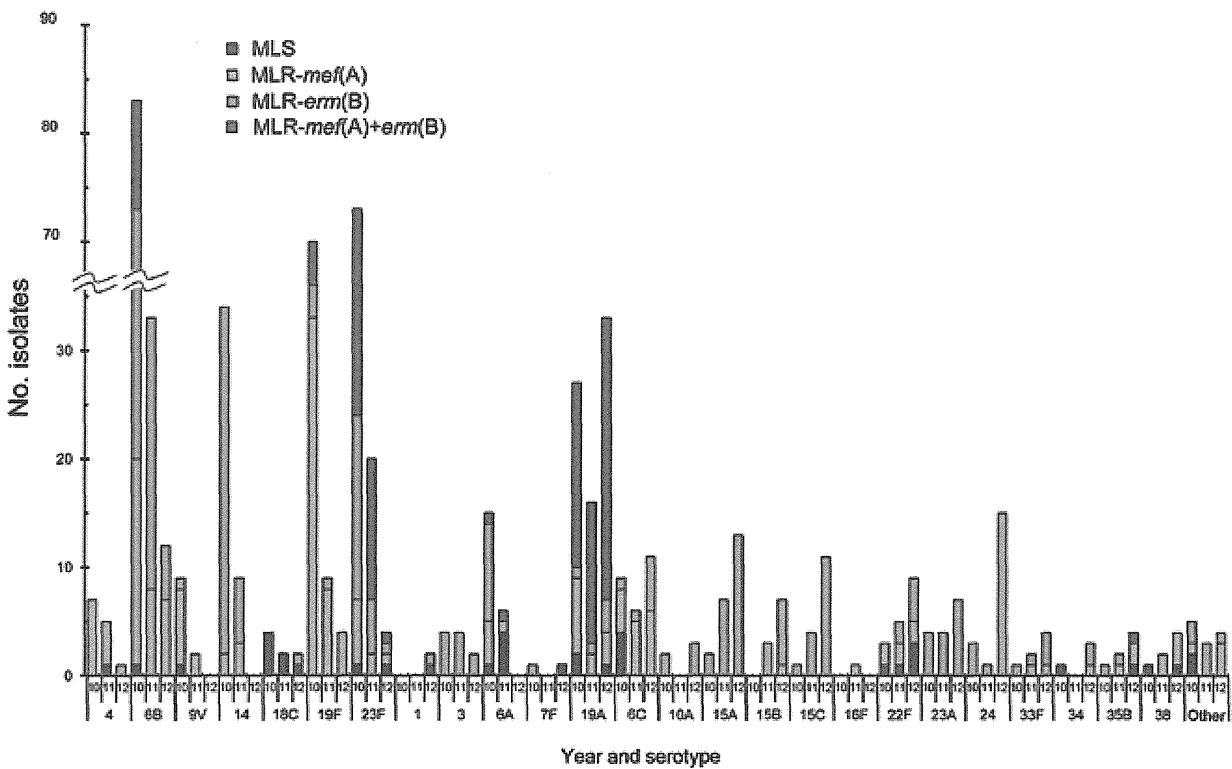


Figure 4. Changes in serotype number and macrolide resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains according to genotype, Japan, April 2010–March 2013. MLS, macrolide-susceptible strains not possessing any resistance gene; MLR-*mef(A)*, macrolide-resistant strain possessing the *mef(A)* gene; MLR-*erm(B)*, macrolide-resistant strain possessing the *erm(B)* gene; MLR-*mef(A)*+*erm(B)*, macrolide-resistant strain possessing both *mef(A)* and *erm(B)* genes.

December 2013 is likely to be much less than that from PCV7 because coverage already had declined to 39.1% in 2012. However, infections caused by serotype 3, included in PCV13, are expected to decrease. Although IPD caused by serotype 3 occurs infrequently among children in Japan, serotype 3 remains important as a pathogen causing acute otitis media in children and pneumonia or empyema in elderly persons.

Two findings in our study stand out. First, gPRSP strains were confirmed in serotypes 15A, 15C, 16F, and 35B. In particular, strains of serotypes 15A and 35B in 2012 all represented gPRSP. According to multilocus sequence typing analysis, serotype 15A in this study

belonged to ST63 of CC63, registered as Sweden 15A-25 in the Pneumococcal Molecular Epidemiology Network clone. Serotype 35B also belonged to ST558 of CC558 from the United States. In addition, gPRSP of serotype 15C corresponded to ST83 of CC81, previously reported from Taiwan. Only 1 serotype 16F strain representing gPRSP was newly identified as ST8351 of CC3117 in the present study. Increasing migration associated with economic development is spreading pneumococcal strains worldwide.

Our finding that vaccine serotype strains are being rapidly replaced by strains of nonvaccine serotypes, such as serotypes 15C and 24, was associated with increased high

Table 3. Pneumococcal vaccination history and age for 156 children with invasive pneumococcal disease, Japan, 2012*

No. vaccine doses administered	≤6 mo	7–11 mo	1 y	2 y	3 y	4 y	5–9 y	≥10 y	Total no. (%)
0		7 [3]	15 [8]	4 [1]	5 [2]	8 [3]	4 [1]	5 [3]	47 (30.1)
1			1		5	3	1		10 (6.4)
2	3		4 [1]	1		1			11 (7.1)
3	2	13	24	6					45 (28.8)
Booster			16	5					21 (13.5)
Unknown	1	2	11	3	2		1 [1]	1	22 (14.1)
Total	6	22	71	19	14	12	6	6	156 (100.0)

*Numbers in brackets indicate infections with a vaccine serotype.

macrolide resistance mediated by the *erm(B)* gene. In this context, wide use of 14-membered and azalide macrolides for children, in addition to adults, will be a major factor favoring resistance. Excessive use of macrolides in Japan also has resulted in substantial increases of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* (28) and macrolide-resistant *S. pyogenes* strains (29). This alarming problem suggests a need to strictly control macrolide use, beginning as soon as possible.

We could not analyze relationships between capsular type and death in children because deaths among children were extremely low (<2.2% every year). The low death rate reflects equal and easy access to hospitals because of Japan's universal health insurance system.

Recently, recombination of the *cps* gene encoding capsular polysaccharides among pneumococcal strains with different capsular types, called capsular switching, was observed by Brueggemann et al. (30). Capsular switching also is associated with recombination of PBP genes, considering that *pbp1a* and *pbp2x* genes which mediate β -lactam resistance, are positioned at both ends of the *cps* region. Dissemination of vaccine and excessive use of antimicrobial agents could favor *S. pneumoniae* with a new capsular type in the future.

In conclusion, sustained surveillance on a national and international scale is needed to control pneumococcal infections, especially considering the multifaceted consequences of vaccination programs. Also, controlling the use of antimicrobial agents is urgently needed to avoid increases in the resistant pathogens.

Our study was funded in part by a grant under the category, "Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases" (H22-013), from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare to K.U.

Dr Chiba is a microbiologist at Keio University School of Medicine. Her research interests include molecular epidemiology, particularly pathogens causing respiratory infection.

References

- World Health Organization. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec.* 2007;82:93–104.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al.; Hib and Pneumococcal Global Burden of Disease Study Team. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* 2009;374:893–902. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61204-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61204-6).
- Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin Infect Dis.* 1992;15:77–83. <http://dx.doi.org/10.1093/clinids/15.1.77>
- Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Lexau C, Reingold A, et al.; Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med.* 2000;343:1917–24. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200012283432603>.
- Advisory Committee on Immunization Practices. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* 2000;49(RR-9):1–35.
- Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, et al. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 2003;348:1737–46. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa022823>.
- Centers for Disease Control and Prevention. Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease—United States, 1998–2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2005;54:893–7.
- Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W, Craig AS, Hadler J, Reingold A, et al. Active Bacterial Core Surveillance of the Emerging Infections Program Network. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* 2006;354:1455–63. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa051642>.
- Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N Engl J Med.* 2009;360:244–56. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0800836>.
- Moore MR, Gertz RE Jr, Woodbury RL, Barkocy-Gallagher GA, Schaffner W, Lexau C, et al. Population snapshot of emergent *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A in the United States, 2005. *J Infect Dis.* 2008;197:1016–27. <http://dx.doi.org/10.1086/528996>.
- Hampton LM, Farley MM, Schaffner W, Thomas A, Reingold A, Harrison LH, et al. Prevention of antibiotic-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* with conjugate vaccines. *J Infect Dis.* 2012;205:401–11. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir755>.
- Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:760–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70090-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70090-1).
- World Health Organization. Changing epidemiology of pneumococcal serotypes after introduction of conjugate vaccine: July 2010 report. *Wkly Epidemiol Rec.* 2010;85:434–6.
- Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet.* 2011;378:1962–73. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62225-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62225-8).
- Centers for Disease Control and Prevention. Licensure of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and recommendations for use among children. Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010;59:258–61.
- Richter SS, Heilmann KP, Dohm CL, Riahi F, Dickema DJ, Doern GV. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999–2011. *Emerg Infect Dis.* 2013;19:1074–83. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1907.121830>.
- Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Romero JR, Bradley JS, Tan TQ, et al. Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:203–7. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e318275614b>.
- Ubukata K, Asahi Y, Okuzumi K, Konno M. Incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan, 1993–1995. *J Infect Chemother.* 1996;1:177–84. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02350645>
- Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Kobayashi R, Iwata S, Sunakawa K. Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-

- binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1488–94. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.5.1488-1494.2004>.
20. Chiba N, Morozumi M, Shouji M, Wajima T, Iwata S, Sunakawa K, et al.; Invasive Pneumococcal Diseases Surveillance Study Group. Rapid decrease of 7-valent conjugate vaccine coverage for invasive pneumococcal diseases in pediatric patients in Japan. *Microb Drug Resist.* 2013;19:308–15. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2012.0180>.
 21. Chiba N, Morozumi M, Ubukata K. Application of the real-time PCR method for genotypic identification of β -lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. *Microb Drug Resist.* 2012;18:149–56. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2011.0102>.
 22. Chiba N, Kobayashi R, Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Tajima T, et al.; Acute Respiratory Diseases Study Group. Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes, and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56:756–60. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dki302>.
 23. Sakai F, Chiba N, Ono A, Yamagata Murayama S, Ubukata K, Sunakawa K, et al. Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009. *J Infect Chemother.* 2011;17:334–40. <http://dx.doi.org/10.1007/s10156-010-0180-3>.
 24. Isaacman DJ, McIntosh ED, Reinert RR. Burden of invasive pneumococcal disease and serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates in young children in Europe: impact of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and considerations for future conjugate vaccines. *Int J Infect Dis.* 2010;14:e197–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2009.05.010>.
 25. Hanquet G, Kissling E, Fenoll A, George R, Lepoutre A, Lernout T, et al. Pneumococcal serotypes in children in 4 European countries. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1428–39. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1609.100102>.
 26. McIntosh ED, Reinert RR. Global prevailing and emerging pediatric pneumococcal serotypes. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10:109–29. <http://dx.doi.org/10.1586/erv.10.145>.
 27. Gertz RE Jr, Li Z, Pimenta FC, Jackson D, Juni BA, Lynfield R, et al.; Active Bacterial Core Surveillance Team. Increased penicillin nonsusceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era. *J Infect Dis.* 2010;201:770–5. <http://dx.doi.org/10.1086/650496>.
 28. Okada T, Morozumi M, Tajima T, Hasegawa M, Sakata H, Ohnari S, et al. Rapid effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. *Clin Infect Dis.* 2012;55:1642–9. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis784>.
 29. Wajima T, Morozumi M, Chiba N, Shouji M, Iwata S, Sakata H, et al. Associations of macrolide and fluoroquinolone resistance with molecular typing in *Streptococcus pyogenes* from invasive infections, 2010–2012. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42:447–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.022>.
 30. Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* 2007;3:e168. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030168>.

Address for correspondence: Kimiko Ubukata, Department of Infectious Diseases, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160-8582, Japan; email: ubukatak@a6.keio.jp

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

¹⁾ 大館市立総合病院臨床検査科, ²⁾ 北里大学北里生命科学研究所病原微生物分子疫学研究室
(現 慶應義塾大学医学部感染症学教室), ³⁾ 大館市立総合病院薬剤科, ⁴⁾ 大館市立総合病院内科,
⁵⁾ 大館市立総合病院感染制御室臨床検査科, ⁶⁾ 慶應義塾大学医学部感染症学教室

太田 和子¹⁾ 千葉菜穂子²⁾ 佐藤謙太郎¹⁾ 奈良 昇悦¹⁾
加藤 聡子³⁾ 金沢 久男³⁾ 池島 進⁴⁾ 高橋 義博⁵⁾
岩田 敏⁶⁾ 生方 公子²⁾

(平成 25 年 10 月 10 日受付)

(平成 26 年 2 月 21 日受理)

Key words: multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* (MDRSP), serotype 19F, nursing home, multilocus sequence typing (MLST)

要 旨

20XX 年 2 月から 12 月の間に, S 総合病院 (2 症例) および近位の A 病院 (4 症例) に入院となった計 6 症例から Cefotaxime の MIC が 16~32 μ g/mL, Meropenem のそれが 4~8 μ g/mL のペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) が分離された. 6 症例のうちの高齢者 5 名が介護施設や療養型施設から S 総合病院と A 病院に入院していた. すべての高齢入院者 (平均 81.7 歳) が入院時に肺炎と診断され, 当該 PRSP は入院時に施行された喀痰検査から分離されていた.

これらすべての PRSP 分離株は, *erm*(B) 遺伝子に支配されるマクロライド系薬耐性と *gyrA* と *parC* 遺伝子の突然変異によるフルオロキノロン薬に同時に耐性であった. それらは, 多くの抗菌薬に耐性化した多剤耐性肺炎球菌 (MDRSP) であった. すべての株の莢膜型は血清型 19F, multilocus sequence typing (MLST) では今までに報告されていない clonal complex (CC) 7993 に属していた. 介護施設内で拡散した MDRSP は, それらの菌によって惹起された高齢者の肺炎入院患者によって総合病院に持ち込まれたと結論された. 当該症例のうち, 1 例が予後不良であったが, 肺炎球菌感染症が直接的な原因とは推定されなかった.

介護施設から治療目的で患者を受け入れる総合病院では, 院内感染を防ぐためにそれらの施設と疫学的情報を共有することが必要であると結論された.

[感染症誌 88:444~451, 2014]

序 文

肺炎球菌は, 化膿性髄膜炎・肺炎・敗血症などの侵襲性感染症を惹起し, 市中型細菌感染症の原因菌の中でも最も重要な細菌である. その好発年齢は, 1 歳をピークとする乳幼児と, 60 歳~70 歳台にピークを認める成人にある¹⁾.

わが国においては 2010 年末から「子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進補助金事業: ワクチン接種事業」が開始され, 7 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7) ならびにインフルエンザ菌タイプ b (Hib) ワクチンが

2013 年 4 月から定期接種化された. このワクチン接種事業に伴い, 小児の侵襲性感染症由来の肺炎球菌は大きく変化してきている²⁾. 一方, 成人に対しては 23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン (PPV23) が既に市販されてはいるものの, 65 歳以上における接種率は 20% 以下に留まっているのが実態である.

わが国の人口統計によると, 65 歳以上の年齢層は急速に増加し, 加えて生活習慣病等の基礎疾患を有する高齢者の増加, さらには介護関連施設等への入所者も増加している. これらのことを反映し, 肺炎が再び成人の死亡原因の第 3 位に上昇してきている³⁾. 肺炎の原因として最も分離頻度の高い肺炎球菌は, ますま

別刷請求先: (〒017-8550) 秋田県大館市豊町 3-1

大館市立総合病院臨床検査科 太田 和子

す重要になってきていると思われる。

ペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: PRSP) は、わが国においても2000年以降急速に増加⁴⁾⁵⁾し、臨床的にも大きな問題を提起してきた。PRSPの耐性化には、細胞壁合成酵素のペニシリン結合タンパク (PBP) であるPBP1A, PBP2X, PBP2Bをそれぞれコードする遺伝子の変異が関与していることが明らかにされている⁶⁾。PRSPにおいてこれら3つの遺伝子の特定部位 (保存性アミノ酸配列)、あるいは近傍のアミノ酸置換が生ずると、β-ラクタム系薬の感受性は低下する。ペニシリン感受性菌 (penicillin-susceptible *S. pneumoniae*: PSSP) に対するPenicillinG (PCG) のMICは0.031μg/mL前後であるが、PRSPのそれは0.5~2μg/mLであり、感受性は明らかに低下している。同様に、PSSPとPRSPに対するCefotaxime (CTX) のMICは0.016μg/mLと0.5~2μg/mL、Meropenem (MEPM) のそれは0.016μg/mLと0.125~1μg/mL、Panipenem (PAPM) のそれは0.004μg/mLと0.031~0.125μg/mLである。PRSPのカルバペネム系薬感受性低下は小さいのが特徴である⁷⁾。

しかし、PRSPのPBP2Xにおいてさらに保存性アミノ酸配列に置換が加わると、CTXを始めとするセフェム系薬の感受性は一段と低下する。PBP2Bに同様のアミノ酸置換が生ずるとカルバペネム系薬の感受性がさらに低下する。しかし、そのような肺炎球菌の分離頻度は2005年の成績では5%以下と報告されている⁸⁾。

一方、PRSPの多くは14員環、アザライド系、16員環マクロライド (ML) 系薬にも同時に明らかな耐性を示し⁹⁾、それらの菌は多剤耐性肺炎球菌 (multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*: MDRSP) と呼ばれる。加えて、近年フルオロキノロン (FQ) 系薬にも耐性を示すMDRSPの出現も報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。このように次第に進行する肺炎球菌の耐性化について、さらに感受性の低下したMDRSPの出現が危惧されていた。

著者らは、当院とA病院の高齢者を含む6名から、短期間のうちにCTXを含むセフェム系薬への感受性が一段と低下し、加えてMEPM感受性も明らかに低下した肺炎球菌を分離した。それらはML系薬とFQ系薬にも高度耐性を示すMDRSPであった。将来このようなMDRSPが徐々に増加することが懸念されるため、それら分離された菌株の耐性遺伝子解析と症例の背景ならびに患者間の関連性について調べたので報告する。

対象と方法

1. 対象例

平成26年7月20日

S総合病院は、秋田県の北部に位置する大館鹿角二次医療圏の急性期型地域中核病院 (ベッド数: 443床) である。A病院は、同地区の療養病棟 (42床) と一般病棟 (62床) を併せもつ一般病院である。S総合病院の細菌検査室は、20XX年4月からA病院の細菌検査の受託を開始しているという経緯がある。また、B病院も療養病棟 (134床) と一般病棟 (10床) をもつ病院である。介護施設CとDの定員はそれぞれ80名と100名の比較的大きな施設である。

このような状況下において、20XX年2月より12月までの短期間に、MEPMに代表されるカルバペネム系薬、およびML系薬とLevofloxacin (LVFX) に同時に耐性を示すMDRSPが6症例の喀痰 (吸引痰を含む) から分離された。2株はS総合病院入院例、4株はA病院入院例からの分離株である。

これらの6症例について、菌検索時における患者背景、性別、年齢、疾患名、基礎疾患の有無、血液検査値 (WBCとCRP)、胸部X線画像からの肺炎の有無等、さらにはどのような経緯による入院であったのか等について、後方視的調査を行った。

なお、本研究は「疫学研究に関する倫理指針」に基づき、匿名化し連結不可能として解析が行われた。

2. 細菌培養

肺炎球菌を分離する培地には、羊血液寒天培地 M70 (栄研化学) を使用した。喀痰は血液寒天培地に画線塗抹した後、35℃にて20~24時間炭酸ガス培養を行った。翌日、培地上に発育したα溶血を示す肺炎球菌様コロニーを釣菌してさらに純培養を行った後、オプトヒンディスク (栄研化学) にて14mm以上の阻止円を認めたコロニーを肺炎球菌とした。

3. 莢膜型の判定と薬剤感受性測定

分離された肺炎球菌の莢膜型別はStatens Serum Institute (デンマーク) より購入した抗血清を用い、培養菌と抗血清とを反応させ顕微鏡下に莢膜膨化の有無を判定した。

著者らの病院では、日常の薬剤感受性検査にはVitek2 (シスメックス社) を使用、肺炎球菌には専用のAST-P598カードを用いている。カードに設定された抗菌薬は、PCG, Amoxicillin (AMPC), CTX, Ceftriaxone (CTRX), Imipenem (IPM), MEPM, Tetracycline (TC), Erythromycin (EM), Vancomycin (VCM), Ofloxacin (OFLX), LVFX, Chloramphenicol (CP), およびTrimethoprim/Sulfamethoxazole (ST) の13種である。

正確な薬剤感受性は、後日改めて寒天平板希釈法で実施された。測定薬剤はPCG, Ampicillin (ABPC), Cefditoren (CDTR), CTX, MEPM, PAPM, Clarithromycin (CAM), LVFX, およびVCMの9薬剤であ

Table 1 Background of six inpatients with pneumonia due to multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae*.

Case	Hospital	Date of admission	Age	Male/Female	Diagnosis	WBC (cells/ μ L)	CRP (mg/dL)	Underlying diseases	MDRSP isolated	Preceding residential facility
1	A	20XX.06.06	85y	M	Pneumonia	18,120	20.3	Diabetes	20XX.06.07	Nursing-care facility (D)
2	A	20XX.04.30	83y	F	Pneumonia	23,730	11.0	Parkinsonian tremor/ Disuse syndrome	20XX.05.11	Nursing-care facility (C)
3	A	20XX.06.10	93y	F	Pneumonia	5,350	11.1	Parkinsonian tremor/ Brain infarction/Hepatitis B	20XX.06.14	Nursing-care facility (C)
4	S	20XX.02.09	70y	M	Interstitial Pneumonia	12,990	2.9	Diabetes/Rectal cancer	20XX.02.24	B Hospital
5	A	20XX.11.16	71y	M	Pneumonia Sepsis	12,520	24.3	Thoracic aortic aneurysm rupture/Gallstone disease/ Gastric cancer	20XX.12.01	Home
6	S	20XX.07.08	88y	M	Pneumonia	6,310	6.9	Brain infarction/ Chronic renal failure	20XX.07.09	Nursing-care facility (D)

る。

4. 薬剤耐性遺伝子解析

β -ラクタム系薬に対する耐性化に関与する *pbp1a*, *pbp2x* および *pbp2b* 遺伝子上の変異の有無は耐性遺伝子解析キット (湧永製薬) を用いて行った。これらの遺伝子解析結果には, genotype の “g” を付して gPRSP あるいは gPISP (*pbp2x*) のように表現した⁸⁾。

いずれの菌株も明らかな β -ラクタム系薬耐性であったことから, 耐性化に関わる *pbp1a*, *pbp1b*, *pbp2x*, *pbp2a*, および *pbp2b* のそれぞれの遺伝子について全領域を解析した。そして, *pbp* 遺伝子変異を持たない標準株の gPSSP (R6) 株, および通常分離される gPRSP 株における各 *pbp* 遺伝子とアミノ酸置換の有無を比較した。

ML 系薬耐性については, 中等度耐性に関与する *mef* (A) 遺伝子, 高度耐性を付与する *erm* (B) 遺伝子の有無を前述のキットで同時に検索した。FQ 系薬耐性については, DNA gyrase の GyrA と GyrB, および topoisomerase IV の ParC と ParE をそれぞれコードする遺伝子を塩基解析し, 変異の有無を明らかにした。

5. Multilocus sequence typing (MLST)

分離された肺炎球菌 6 株について, ゲノム上の 7 つの housekeeping 遺伝子をそれぞれ増幅した後, 塩基配列を決定した。結果は MLST サイト (<http://spneumoniae.mlst.net/>) を通じてアレプロファイルを得た。次いでアレプロファイルから sequence type (ST) を検索, さらに eBURST を用いて当該 ST 番号の clonal complex (CC) を確定した。

なお, 7 遺伝子のいずれかが新たな遺伝子配列と推定された場合には, そのデータを MLST サイトへ送信し, 新規 ST 番号の付与を受けた。

結 果

1. MDRSP 分離例の背景と症例相互の関係

Table 1 には対象となった 6 症例の菌検索時における患者背景を示す。

症例 4 を除く 5 症例が, 胸部 X 線所見と血液検査値の WBC および CRP 値から定型肺炎と診断された。原因菌検索のために喀痰を採取, 一般細菌検査を施行した。それぞれの症例の喀痰から肺炎球菌が分離された (コロニー密度: 2 (++) ~ 3 (+++))。

症例 4 は糖尿病の基礎疾患があった。内分泌代謝神経内科病棟に入院し, 免疫抑制剤治療中に発熱のため呼吸器循環器内科外来に頼診され, 肺炎球菌が分離された (コロニー密度: 1 (+))。入院時は間質性肺炎と診断されており, 分離された肺炎球菌がその原因菌であったか否かは断定されていない。

6 症例の年齢は 70 歳から 93 歳, 平均は 81.7 歳と高齢であった。性別は男性 4 名, 女性 2 名であった。いずれの症例も明らかな基礎疾患を有していた。PPV23 の接種歴のある症例は 1 例もなかった。

最初に MDRSP が分離されたのは症例 4 である。20XX 年 2 月, 介護療養型医療施設である同市内の B 病院から S 総合病院の内分泌代謝神経内科病棟へ入院, 免疫抑制剤治療中の発熱で呼吸器循環器内科外来へ頼診され, 喀痰培養から MDRSP が分離された。本例は他の 5 症例とは直接的な関連はなかったが, 同市内の介護関連病院と関連があったという背景は共通していた。

症例 2 は, 4 月末に同市内の介護施設 (C) にショートステイで滞在中に肺炎を惹起し, A 病院へ入院し加療となった。入院当初はエンピリックセラピーが行われたが, 5 月 11 日に初回の喀痰培養を施行, MDRSP が分離された。A 病院での初の MDRSP の分離となった。なお, 介護施設 (C) には症例 3 も 199X 年から入所している。

A 病院で 2 番目に MDRSP が分離された症例 1 は, 20XX 年 6 月初旬, 長期に入所している同市内の介護施設 (D) から肺炎の診断にて入院となった。加療後, 6 月末日に退院となって元の施設に戻った。本例の MDRSP は A 病院入院時に施行された喀痰培養から

Table 2 Antibiotic susceptibility, resistance gene, and capsular serotype of *S. pneumoniae* isolates from elderly in-patients with pneumonia.

Strain No.	Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)									β -lactam resistance	Macrolide resistance*	Serotype
	PCG	ABPC	CDTR	CTX	MEPM	PAPM	CAM	LVFX	VCM			
Reference PSSP (ARD-258)	0.016	0.031	0.016	0.016	0.016	0.004	0.031	0.5	0.25	gPSSP	Negative	19A
Reference PRSP (ARD-39)	2	2	0.25	1	0.5	0.125	>64	0.5	0.25	gPRSP	<i>erm</i> (B)	19F
1	16	16	8	32	4	0.5	>64	≥ 16	0.25	gPRSP	<i>erm</i> (B)	19F
2	32	16	16	32	8	1	>64	≥ 16	0.25	gPRSP	<i>erm</i> (B)	19F
3	16	16	8	32	4	0.5	>64	≥ 16	0.5	gPRSP	<i>erm</i> (B)	19F
4	16	16	8	32	8	1	>64	≥ 16	0.25	gPRSP	<i>erm</i> (B)	19F
5	16	16	16	32	8	0.5	>64	≥ 16	0.5	gPRSP	<i>erm</i> (B)	19F
6	16	8	8	16	4	0.5	>64	≥ 16	0.25	gPRSP	<i>erm</i> (B)	19F

*Clinical isolates having *erm* (B) gene show high resistance to all macrolide antibiotics.

分離されており、介護施設からの持ち込みであることが推定された。

A病院で3番目のMDRSPの分離となった症例3は、介護施設(C)から20XX年6月10日に肺炎で入院し、6月14日に施行された喀痰の細菌検査から初めてMDRSPが分離された。本例は7月初旬に元の介護施設(C)へ戻った。本例のMDRSPも持ち込みと推定された。

A病院4番目の症例5は、11月10日に自宅からA病院に救急搬送された。胸部大動脈破裂による心タンポナーデと診断され、さらにE大学附属病院に救急転送されて保存的治療を受けた後、1週間後の16日に再びA病院に戻った。20XX年12月1日に肺炎症状がみられ、喀痰培養からMDRSPが分離された。その後、肺炎像は消失したが、12月14日に再び悪寒を伴う40℃の発熱が認められ、血液培養施行と同時にカルバペネム系薬が投与された。しかし、翌日に敗血症性ショックに陥り死亡した。12月14日に施行された血液培養は陰性で原因菌を特定できなかった。E大学附属病院では細菌検査が施行されていなかったが、同病院内サーベイランスではMDRSPの分離はなかったことを確認した。この症例と他の症例は、6月中旬にA病院に胆石症で入院した時期が重なっていた。

症例6は、症例1と同一介護施設(D)から同年7月初旬に急性肺炎でS総合病院へ入院している。その際の初回喀痰培養からMDRSPが分離され、S総合病院へは症例1のMDRSPと同一菌が持ち込まれたものと推定された。これら2症例は介護施設(D)の入所者であった。

2. 分離株の抗菌薬感受性と莢膜型

Table 2には、寒天平板希釈法で正確に測定された薬剤感受性成績ならびにPBPをコードする*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子の変異から判定された遺伝子学

的耐性型、ML耐性遺伝子の有無、そして抗血清による莢膜型の成績を示す。

参考のために、gPSSPの標準株ARD-258株と、典型的なgPRSPのARD-39の感受性成績を上段に示す。6例から分離された肺炎球菌に対するペニシリン系薬のMICはPCGが16~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ABPCが8~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、セフェム系薬のCTXが16~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CDTRが8~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と、通常のgPRSPが示すMICよりも8倍から32倍感受性が低下していた。MEPMのMICは4~8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PAPMのそれは0.5~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、通常のgPRSPよりも感受性が低下していた。ただし、PAPMに比してMEPMの感受性低下が明らかであった。

その他に、ML系薬のCAMのMICも>64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FQ系薬のLVFXのMICも $\geq 16\mu\text{g}/\text{mL}$ と高かった。耐性遺伝子検索では、全株が*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子に変異を有するgPRSP、23Sリボゾームをメチル化する酵素をコードする*erm* (B) 遺伝子保持株であった。

莢膜型はすべて19F型であった。

3. 各*pbp* 遺伝子およびFQ耐性に関わる遺伝子解析

Table 3には、*pbp1a*, *pbp1b*, *pbp2x*, *pbp2a* および *pbp2b* 遺伝子を解析した成績のうち、 β -ラクタム系薬の感受性低下に影響する保存性アミノ酸配列内あるいはその近傍におけるアミノ酸置換の成績を示す。併せてFQ耐性に関わる*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 遺伝子の解析結果に基づくキノロン耐性決定領域(quinolone resistance-determining region: QRDR)におけるアミノ酸置換についても示す。

pbp1a と *pbp2x* 遺伝子に認められたアミノ酸置換は、いわゆる一般的なgPRSPの遺伝子において報告されている保存性アミノ酸配列の置換と同じであった。すなわちPBP1AのSTMK (Ser-Thr-Met-Lys)

Table 3 Amino acid substitutions in PBPs, GyrA, and ParC enzymes deduced from DNA sequences for each gene in *S. pneumoniae* isolates.

Strain No.	Amino Acid substitutions in each PBP							a.a. substitution in the QRDR	
	PBP1A	PBP1B	PBP2X	PBP2A		PBP2B		GyrA	ParC
	-STMK-	-STTK-	-STMK-	-STIK-	E ₆₀₁ (near the KTG)	-SSNT ₄₄₅ -	Around the KTG	Ser ₈₁	Ser ₇₉
Reference PRSP (ARD-39)	-SAMK- or -SSMK-	---	-SAMK-	---	---	-SSNA	---	-	-
1	-SSMK-	---	-SAMK-	-SAIK-	-D-	-SSNA	a.a substitutions*	Phe	Tyr
2	-SSMK-	---	-SAMK-	-SAIK-	-D-	-SSNA	a.a substitutions*	Phe	Tyr
3	-SSMK-	---	-SAMK-	-SAIK-	-D-	-SSNA	a.a substitutions*	Phe	Tyr
4	-SSMK-	---	-SAMK-	-SAIK-	-D-	-SSNA	a.a substitutions*	Phe	Tyr
5	-SSMK-	---	-SAMK-	-SAIK-	-D-	-SSNA	a.a substitutions**	Phe	Tyr
6	-SSMK-	---	-SAMK-	-SAIK-	-D-	-SSNA	a.a substitutions*	Phe	Tyr

* Amino acid substitutions around the KTG motif were identified as follows; Ala₅₉₁ → Serine, Gly₅₉₆ → Pro, Thr₅₉₉ → Ala, Gln₆₂₇ → Glu.

** Amino acid substitutions around the KTG motif were identified 10 a.a.

Table 4 Multilocus sequence typing (MLST) of *S. pneumoniae* isolates from elderly inpatients.

Case (Strain) No.	Allelic profile*							Sequence type (ST)	Clonal complex (CC)
	<i>aroE</i>	<i>gdh</i>	<i>gki</i>	<i>recP</i>	<i>spi</i>	<i>xpt</i>	<i>ddl</i>		
1	242	11	10	1	6	1	527	7993	7993
2	242	11	10	1	6	1	527	7993	7993
3	242	11	10	1	6	1	527	7993	7993
4	242	359	10	1	6	1	527	7994	7993
5	242	11	10	1	6	1	106	7995	7993
6	242	11	10	1	6	1	527	7993	7993

*Housekeeping genes used for MLST were as follows; *aroE* (shikimate dehydrogenase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *gki* (glucose kinase), *recP* (transketolase), *spi* (signal peptidase I), *xpt* (xanthine phosphoribosyltransferase), *ddl* (D-alanine-D-alanine ligase)

はSSMK(Ser-Ser-Met-Lys)へ置換, PBP2XのSTMKはSAMK(Ser-Ala-Met-Lys)へ置換していた。*pbp1b*遺伝子には耐性に影響すると推定されるアミノ酸置換は認められなかった。最も注目されたのは*pbp2a*遺伝子である。当該遺伝子上の保存性アミノ酸配列STIK(Ser-Thr-Ile-Lys)はSAIK(Ser-Ala-Ile-Lys)へと置換していた。これらはいずれもβ-ラクタム系薬が結合するSerine残基に隣接するアミノ酸であった。

また、これらすべての菌株で*pbp2b*遺伝子の下流域に位置する保存性アミノ酸配列のKTG(Lys-The-Gly)の周囲に4個のアミノ酸置換が認められた。

FQ耐性に関しては、*gyrA*遺伝子のSer81のPheへの置換と、*parC*遺伝子のSer79のTyrへの置換がみられた。

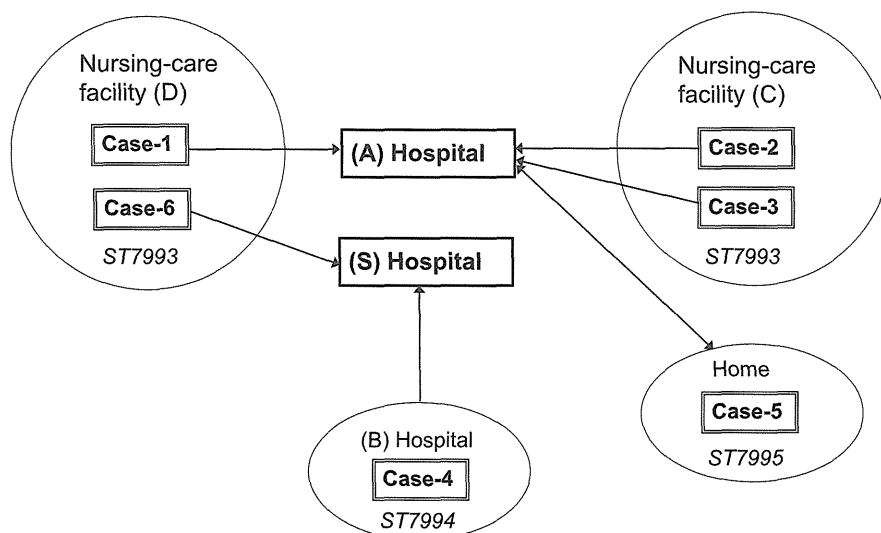
これらの成績から、6症例から分離された肺炎球菌は、β-ラクタム系薬に対して通常のgPRSPよりもさらに耐性度が上昇した高度耐性菌であり、高度耐性MDRSP(high-MDRSP:H-MDRSP)であると判定した。

4. MLST解析

6症例から分離されたMDRSP株のMLST解析結果についてはTable 4に示す。

それぞれのhousekeeping遺伝子はほとんど同一であったが、変異が挿入されて新たなST番号を付与された2株を認めた。すなわち、症例4由来株の*gdh*(glucose-6-phosphate dehydrogenase)遺伝子と症例5の*ddl*(D-alanine-D-alanine ligase)遺伝子である。アレプロファイルから、症例1, 2, 3および6はST7993, 症例4と5はその亜型であるST7994とST7995となった。CCでは6株すべてがCC7993となり、新たなSTとCCであった。結論として、6株はゲノム解析の上からほぼ同一であると判定された。

症例相互の関係およびST解析結果をFig. 1に示す。介護施設CとDから肺炎治療目的で入院となった症例1, 2, 3および6は、同一のST7993であったことが注目された。症例4と5由来の菌株のSTは、ST7993に極めて近似したMDRSPであったが、それぞれ異なるhousekeeping遺伝子に変異が認められた。

Figure 1 Correlation of six elderly patients isolated multidrug-resistant *S. pneumoniae* and the bacterial sequence type.

考 察

近年問題となっている MDRSP は、従来から知られている PBP をコードする *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子のそれぞれにさらに新たな変異を生じた PRSP であることに加え、ML 系薬と FQ 系薬にも同時に明らかな耐性を示す肺炎球菌と定義される。

このような耐性菌であっても、髄液への移行が最も考慮されなければならない化膿性髄膜炎を除き、肺炎、あるいは敗血症のような感染例に対する治療では、注射用ペニシリン系薬や CTX の投与で多くの場合臨床効果が得られている。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹²⁾ の注射薬に設定された breakpoint (BP) は臨床的 BP であるが、MEPM の BP は “resistant (R)” が 1 μ g/mL, “Intermediate (I)” は 0.5 μ g/mL となっている。PAPM はわが国と一部の国で使用されているのみであることから BP は設定されていない。日本において設定されている MEPM の BP は、日本化学療法学会により成人肺炎例に対する通常投与量に基づいて 2 μ g/mL と設定されており、それ以上が “R” と判定されている。

一方、遺伝子レベルでの解析はほとんど行われていないが、感受性成績からの MDRSP の報告はいくつか見受けられ、長期介護施設の outbreak も報告されている¹³⁾¹⁴⁾。MEPM の感受性が明らかに低下し、さらにペニシリン系薬や注射用セフェム系薬にさらに高度耐性化した H-PRSP は、既に Chiba ら⁸⁾ によって 2005 年に報告されているが、それらが FQ 系薬にまで耐性化したとの報告は見当たらない。今回、MLST 解析によっても新たな ST 番号が付与されたことは、このような耐性レベルの高い MDRSP は世界的にも極め

てまれであろうと推測される。

また、MDRSP が短期間に 6 症例から分離され、耐性遺伝子、莢膜型、および MLST 解析から起源を同じくする株と判定されたことは、臨床現場に極めて重要な問題を提起している。6 症例の関連を調べると、その背景には高齢化社会を迎えたわが国特有の医療体制が関わっていることが明らかである。すなわち、6 名中 4 名が介護施設において肺炎を発症し、治療目的で A 病院に 3 名、S 総合病院に 1 名入院となっていた。そのいずれもが入院時に既に MDRSP による肺炎を呈していた。また他の 1 名も療養型医療施設からの入院例、さらに残り 1 名は入退院をくり返している症例であった。総合病院においては各種疾患の治療のみが対象であり、対象疾患が快方に向かえば、症例は元の介護施設等へ戻されることが通例である。中にはショートステイで介護施設と関わりを有する場合も見受けられる。今回分離された MDRSP は、時間軸で経過を追うと介護施設内の拡散から始まったと推定される。

他方、6 例のいずれもが肺炎球菌ワクチンの接種を受けていなかった。耐性肺炎球菌による発症を防ぐためには、PPV23 の接種¹⁵⁾ や 13 価コンジュゲートワクチンの接種が望まれる。今後、介護施設入所者に対する肺炎球菌ワクチン接種の推奨など、肺炎球菌感染症の予防を啓発していく必要がある。

なお、発症例の治療には MEPM, Doripenem (DRPM), Sulbactam (SBT) /ABPC 等の β -ラクタム系薬が使用され、いずれの肺炎例も治癒していた。MDRSP が直接的原因と思われる死亡例は認められていない。使用された注射用抗菌薬の ABPC では、血