

**Figure 1. Distribution of the IgG antibody index and the time- and age-dependent proportion seropositive against parvovirus B19 in Japan from 2004-07.** A. The distribution of IgG antibody index against parvovirus B19. The antibody index was calculated as the ratio of the optical density of test sample to that of control. Using a logarithmic scale for the horizontal axis, a bimodal shape is clearly identified. B. The time- and age-dependent proportion of seropositive against parvovirus B19. The collection of serum samples took place in 2004 (unfilled circles with thin solid line), 2005 (crosses with dotted line), 2006 (diamonds with thick solid line) and 2007 (x marks with dashed line), respectively. doi:10.1371/journal.pone.0092519.g001

$\lambda = 31.8$  years old (given the absence of age-dependence in the risk of infection).

However, the goodness-of-fit for two other models were better than that of the constant force of infection model (Figure 2A). Employing the age-dependent force of infection either by the parametric or the non-parametric model, all expected values were included within the 95% CI of the observed proportion of seropositive. AIC values for models (i), (ii) and (iii) were 203, 60.1 and 60.3, respectively, indicating that models (ii) and (iii) were almost equally good and much better than the model (i) in describing the observed pattern of the data. Figure 2B compares the estimated force of infection by three different models. In the case of the age-dependent parametric model (ii), the peak of infection was expected to occur at around the age of 5 years, while the piecewise constant model (model (iii)) predicted that the highest force of infection 0.12 (95% CI: 0.00, 0.21) per year was seen among those aged 5–9 years and the second highest force of infection 0.05 (95% CI: 0.02, 0.10) among those aged 0–4 years. For model (iii), upper bounds of the force of infection among those aged 15–39 years and 40 years and older were 0.0059 and 0.0246 per year, respectively. The  $R_0$  using the age-dependent piecewise constant model was estimated to be 2.07 (95% CI: 1.33, 2.98), the expected value of which was smaller than the estimate based on the constant force of infection model, but the difference was not significant.

Figure 2C compares the observed age-specific proportions of seropositive between 1993 and 2004-07, both of which were used to parameterize the time- and age-dependent model (iv). Although no significant difference can be identified in the constant force of infection between 1993 and from 2004-07, we specifically employed model (iv) to describe the time-dependent shift in a dip in seropositive proportion from those aged 20-29 years in 1993 to 30-39 years from 2004-07. Comparing seroprevalence by birth year (Figure 2D), it can be seen that the dip in seroprevalence is observed in a birth cohort born from 1965-74. The relative frequency of age-dependent forces was similar to the age-only model (iii) in Figure 2B. The age-element of model (iv) was compared against the observed seroprevalence data from 2004-07

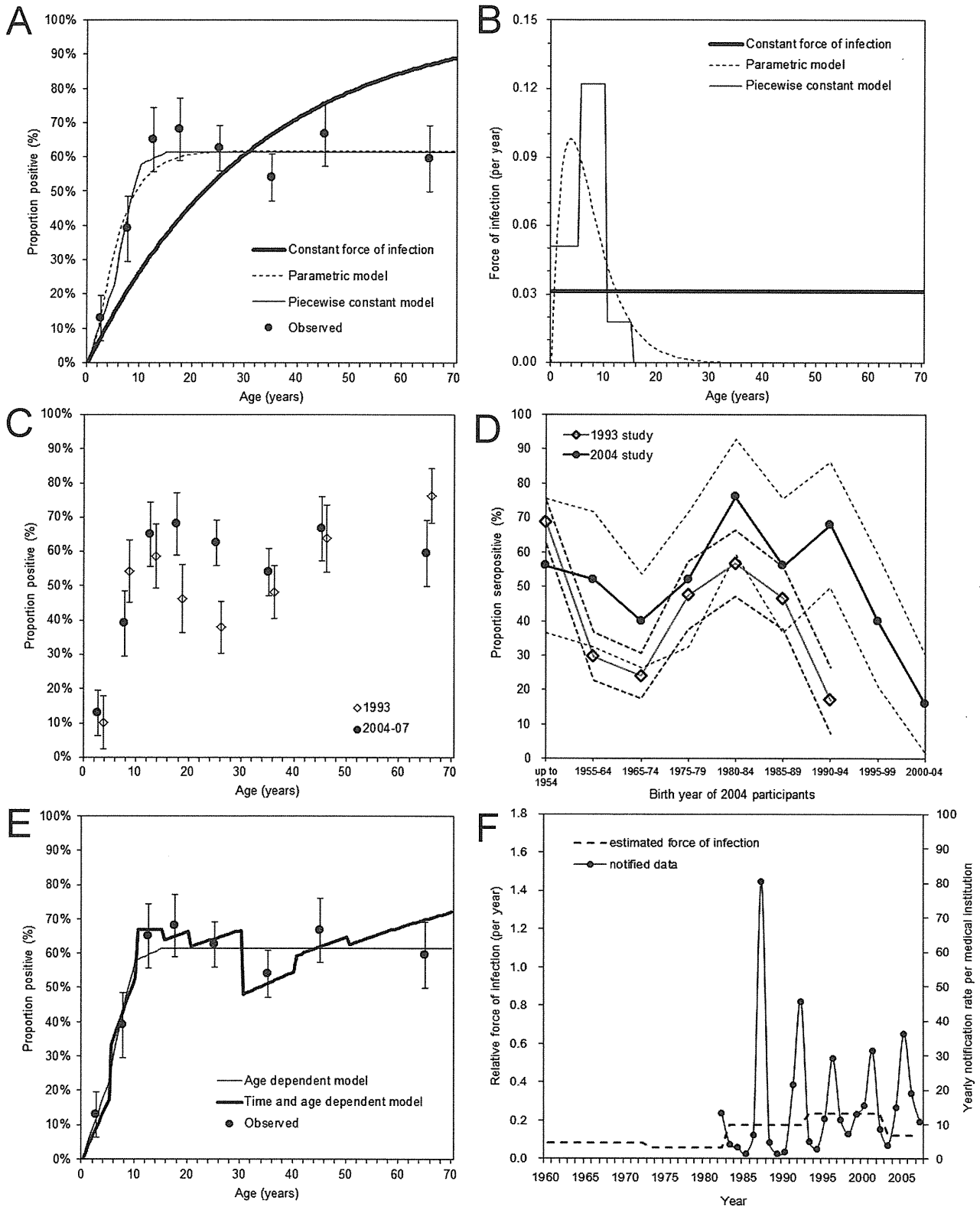
(Figure 2E) and the time-dependent element was compared against the notification data in Figure 2F. The average over the time-interval was only crudely captured (i.e. as was indicated by estimates, there was no dramatic time-dependent trend in the risk of infection), and a sharp peak in 1987 was perhaps smoothed out by adjacent years and was not reflected in the estimated force of infection from 1983-92. Although the time-element was thus not strongly aligned with the notification data, the predicted data allowed us to realize the dip in seroprevalence among those aged in their 30s (Figure 2E).

### Blood donors

Assuming a random sampling assumption of blood donors from the entire population, the age-specific proportion of antigen positive was calculated among blood donors as a possible direct measurement of the risk of infection. From 2001-07, a total of 38 million persons donated blood, among which 2,806 tested positive for antigen (prevalence: 7.4 (95% CI: 7.1, 7.7) per 100,000 donors). Figure 3A shows the age-specific proportion of antigen positive. Those aged 30-39 years yielded the highest prevalence and those aged 40-49 yielded the second highest estimate. Compared to those aged 20-29 years, the prevalence among those aged 30-39 and 40-49 years were 2.6 and 2.0 times higher, respectively. Figure 3B shows the age-specific proportion of IgM antibody positive. Of 651 samples, 8 tested positive (1.2% (95% CI: 0.4, 2.1)), and thus, the uncertainty was large, but the proportion positive declined almost monotonically with age.

### Pregnant women

Table 1 shows the estimated age-specific numbers of infection among women at child-bearing age and during pregnancy, along with rough corresponding estimates of fetal deaths and hydrops fetalis. Although the precision is limited in the estimates, up to 2374 infections are estimated to occur annually among pregnant women in Japan. Assuming that the risk of fetal death following PVB19 infection during the first 20 weeks of pregnancy is 9.0%, up to 107 fetal deaths are anticipated per year. Similarly, adopting



**Figure 2. Seroepidemiological investigation of parvovirus B19 infection in Japan.** A. Comparison between observed and predicted proportion of seropositive from 2004–07 without accounting for time-dependency. The mean of observed data are shown as filled circles with the 95% confidence intervals by whiskers. Thick solid line represents the prediction based on a constant force of infection model, dashed line a gamma-type age-dependent model, and thin solid line a piecewise constant age-dependent model. B. Estimated force of infection with parvovirus B19 in Japan. The differential styles of lines correspond to those in panel A. C. Comparison of observed seroprevalence data between 1993 and 2004–07.

Filled circles represent the observed data from 2004–07, while unfilled diamonds represent the data from 1993. Whiskers extend to both ends of the 95% confidence intervals. D. Comparison of seroprevalence data between 1993 and 2004 by birth year. Dashed lines represent the 95% confidence intervals. The horizontal line shows the birth year of 2004 participants, while the birth year of 1993 participants is calculated as the birth year minus 1 (i.e. those born from 1955–64 for 2004 participants are compared against those born from 1954–63 for 1993 participants). E. Comparison of predicted data from 2004–07 using age-dependent model and age- and time-dependent model. Filled circles represent the observed data, and whiskers extend to both ends of the 95% confidence intervals. Thick line shows the prediction based on time- and age-dependent assumption. F. The comparison between the time-dependent element of the force of infection (dashed line; left vertical axis) and the annual notification rate of erythema infectiosum from sentinel medical institutions in Fukuoka and Saga prefectures, Japan, from 1982 onwards (circles and solid line; right vertical axis). doi:10.1371/journal.pone.0092519.g002

2.9% as the risk of hydrops fetalis among pregnant women at weeks 9–20, up to 21 cases are estimated annually.

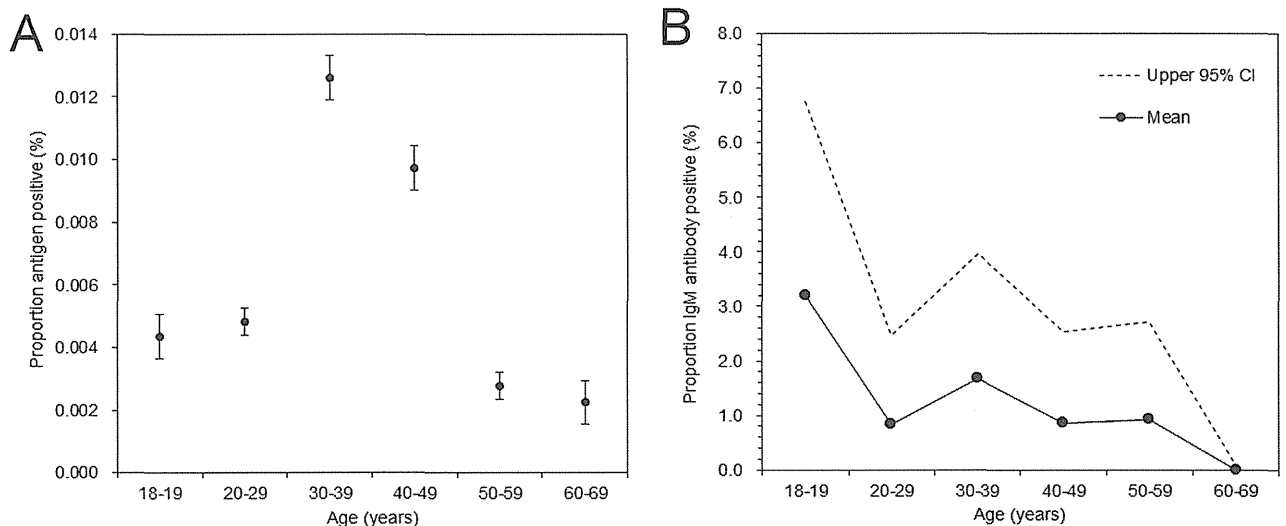
## Discussion

The present study investigated the seroepidemiological profiles of parvovirus B19 infection in Japan. Whereas various clinical studies had taken place in Japan in advance of the present study including those focused on pregnant women [26,27], to the best of our knowledge, the present study is the first to explicitly estimate the frequency of infection in blood donors and the burden of infection among pregnant women in this country. The estimated measure of the transmissibility,  $R_0$ , was 1.3–3.0, which did not deviate from an earlier estimate ranging from 2.6–3.5 based on seroprevalence survey in the Netherlands [4]. Across Japan, it was estimated that up to 2374 infections could have occurred during pregnancy, although the uncertainty bound was wide, ranging from 0 to 2374 (as was also the case in the UK study [8]). Similar estimates of the force of infection between Europe and Japan indicate that the level of endemicity for PVB19 (i.e. frequency of infection) and the contact pattern are likely similar to each other.

Two specific lessons should be learnt from our exercise. First, a strong age-dependency in the force of infection was observed, while no obvious indication of time-dependent change (e.g. declining trend) in the proportion of seropositive was seen from 1993 to 2007. The highest frequency of infection was seen among those aged below 10 years, and thereafter both parametric and non-parametric models agreed that the annual risk of infection was

at most 1%. That is, the transmission dynamics of PVB19 is likely regulated by and maintained among children, yielding very important implications for future control planning including age-dependent vaccination strategy. In fact, the risk of infection among pregnant women is known to be higher in households with small children than those without [10,12] (which could partly explain the observed peak among those in their 30s in Figure 3A), and thus, within household contact between pregnant women and children could play a key role in determining the optimality of controlling the transmission by targeting children [28]. The uncertainty in the age-dependent contact patterns could be a plausible explanation for observing differential risk of infection among pregnant women across European countries [12]. In the future, the age-dependency should be closely monitored even in the absence of vaccination, because a shift (e.g. delay) in the age at infection can vary (e.g. increase) the number of infections among pregnant women, as was observed for rubella under a partial vaccination [29,30].

Second, in addition to age-dependent estimates of the force of infection that could measure the incidence of infection among blood donors (Figure 2B), we also analyzed the antigen screening results among blood donors (Figure 3A). Age-specific proportion of antigen positive yielded the peak among those aged 30–39 years followed by 40–49 years. A similar age-specific antigen pattern was previously reported from the Netherlands [31], but no explicit reason has been clarified for this observation. The peak in prevalence among those in their 30s agreed well with the dip in age-specific seroprevalence, possibly reflecting the absence of



**Figure 3. Age-specific proportions positive for antigen and IgM antibody against parvovirus B19 among blood donors from 2001–2007 in Japan.** A. Observed proportion of antigen positive as a function of age. Filled circles represent the mean, and whiskers extend to both ends of the 95% confidence intervals. A receptor-mediated hemagglutination (RHA) assay was used. B. Observed proportion of IgM antibody positive. Solid line and filled circles represent the mean, with the upper 95% confidence interval given by dashed line. Lower bound is identical to the horizontal axis. doi:10.1371/journal.pone.0092519.g003

**Table 1.** Estimated age-specific annual numbers of parvovirus B19 infections and associated complications among women at child-bearing age in Japan.

Age group (years)	No. females	No. maternities	Total infections	Infections during pregnancy	Fetal deaths	Hydrops fetalis
15–19	2,958,000	13,273	156 (0–6,585)	1 (0–30)	0 (0–1)	0 (0–1)
20–24	3,116,000	104,053	164 (0–6,736)	5 (0–225)	0 (0–10)	0 (0–2)
25–29	3,546,000	300,350	187 (0–7,445)	16 (0–631)	1 (0–28)	0 (0–5)
30–34	3,987,000	373,452	210 (0–8,129)	20 (0–761)	1 (0–34)	0 (0–7)
35–39	4,785,000	221,245	251 (0–9,475)	12 (0–438)	1 (0–20)	0 (0–4)
40–44	4,609,000	37,435	8 (0–35,597)	0 (0–289)	0 (0–13)	0 (0–3)
Total	23,001,000	1,049,808	976 (0–73,967)	54 (0–2,374)	3 (0–107)	0 (0–21)

Maximum likelihood estimates with the 95% confidence intervals (inside parentheses) are shown for the right four columns. The 95% confidence intervals for the estimated force of infection based on a piecewise constant model were used: i.e., 0–0.0059 for those aged 15–39 years and 0–0.0246 for those aged 40 years and older. Risks of fetal death from gestational week 1–20 and hydrops fetalis from week 9–20 were assumed to be 9.0% and 2.9%, respectively [8,25].  
doi:10.1371/journal.pone.0092519.t001

major epidemics during childhood among those born during 1965–74 and substantial number of transmission events from children to parents. Nevertheless, the antigen positive estimates among those in their 30s and 40s were more than double of those in their 20s (while the fraction susceptible, based on seroprevalence survey, was not as different as the proportion of antigen positive). Moreover, IgM antibody data yielded an approximately monotonic decline in the age-specific proportion positive. These findings were not fully consistent with anticipating substantial child-to-parent transmissions in explaining the observed pattern, and other reasons might also explain observed phenomena (e.g. other factors, including age-dependent biological reaction to the virus and possible sampling effect (i.e. blood donors may not have well represented the general population), might also explain the observed pattern).

Four limitations should be noted. First, our subjects were limited to the population in Fukuoka and Saga prefectures, both of which are located on Kyushu Island, the western part of Japan. Our estimates involve a limitation in the representativeness of the finding and may not fully reflect that of entire Japan. Nevertheless, rather than ensuring the representativeness, the present study focused on two prefectures as the first attempt to explicitly characterize infection risks while allowing comparability between 1993 data and the result from 2004–07. Second, the estimated risk of infection among blood donors (Figure 3A) and pregnant women (Table 1) rested on an assumption that they were randomly sampled from the population irrespective of infection status. However, as briefly noted above, household structure (e.g. if a pregnant woman has any children) and other risk factors are known to influence the risk of infection with PVB19 during pregnancy. A more precise estimation would require us to account for known epidemiological risk factors using a more sophisticated

statistical model. Third, we have not considered the seasonality and periodicity in the model; however, the sample size was limited and the fluctuation is known to be smoothed out over a long time yielding only marginal impact on the estimate of the transmissibility [32]. Lastly, small errors in antigenic testing results, e.g. non-specific false positive results and involvement of repeaters of blood donation due to a long viremic period without symptoms, cannot be avoided in the empirical observation.

Despite these limitations, the present study characterized seroepidemiological profiles of PVB19 infection in Japan, with particular emphasis on the risk of infection in blood donors and the burden of infection among pregnant women. When a vaccine becomes available in the future, a similar seroepidemiological study is expected to play a key role in determining appropriate immunization policy. We believe that the present study contributed to clarifying the key element of the epidemiology of PVB19 in Japan.

### Acknowledgments

We wish to thank colleagues at the National Institute of Infectious Diseases for their technical support and useful advice, and Dr. Masahiro Satake and Mr. Shun'ya Momose of the Blood Service Headquarter, and Dr. Harumichi Matsukura of the Osaka Blood Centre, the Japanese Red Cross Society, for their valuable comments.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KN HS HN KT NO KO KM TH. Performed the experiments: KN HS KT. Analyzed the data: KN HS HN. Contributed reagents/materials/analysis tools: KN HS KT. Wrote the paper: KN HS HN KT NO KO KM TH.

### References

- Cohen BJ (1986) Human parvovirus B19 and fifth disease. In: Mortimer PP, Public Health Virology 12 Reports 1st edn. London: Public Health Laboratory Service. pp. 130–143.
- Okabe N, Koboyashi S, Tatsuzawa O, Mortimer PP (1984) Detection of antibodies to human parvovirus in erythema infectiosum (fifth disease). *Arch Dis Child* 59(11):1016–1019.
- Anderson MJ, Jones SE, Fisher-Hoch SP, Lewis E, Hall SM, et al. (1983) Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* 1(8338):1378.
- Zaaijer HL, Koppelman MH, Farrington CP (2004) Parvovirus B19 viraemia in Dutch blood donors. *Epidemiol Infect* 132:1161–1166.
- Bernstein DI, El Sahly HM, Keitel WA, Wolff M, Simone G, et al. (2011) Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine* 29:7357–7363.
- Taniguchi K, Hashimoto S, Kawado M, Murakami Y, Izumida M, et al. (2007) Overview of infectious disease surveillance system in Japan, 1999–2005. *J Epidemiol* 17:S3–S13.
- Gay NJ, Hesketh LM, Cohen BJ, Rush M, Bates C, et al. (1994) Age specific antibody prevalence to parvovirus B19: how many women are infected in pregnancy? *Commun Dis Rep CDR Rev* 4:R104–R107.
- Vyse AJ, Andrews NJ, Hesketh LM, Pebody R (2007) The burden of parvovirus B19 infection in women of childbearing age in England and Wales. *Epidemiol Infect* 135:1354–1362.

9. Kelly HA, Siebert D, Hammond R, Leydon J, Kicly P, et al. (2000) The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world. *Epidemiol Infect* 124:449–457.
10. Röhrer C, Gärtner B, Sauerbrei A, Böhm S, Hottenträger B, et al. (2008) Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiol Infect* 136:1564–1575.
11. Kooistra K, Mesman HJ, de Waal M, Koppelman MH, Zaaijer HL (2011) Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003–2009. *Vox Sang* 100:261–266.
12. Mossong J, Hens N, Friederichs V, Davidkin I, Broman M, et al. (2008) Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection. *Epidemiol Infect* 136:1059–1068.
13. Yamashita K, Matsunaga Y, Taylor-Wiedeman J, Yamazaki S (1992) A significant age shift of the human parvovirus B19 antibody prevalence among young adults in Japan observed in a decade. *Jpn J Med Sci Biol* 45:49–58.
14. Matsunaga Y, Takeda N, Yamazaki S, Kamata K, Kurosawa D (1995) Seroepidemiology of human parvovirus B19 using recombinant VP1 + VP2 particle antigen. *Kansenshogaku Zasshi*; 69:1371–1375 (in Japanese).
15. Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLW) Committee of NESVPD in National Institute of Infectious Diseases (2011) Procedure for the National Epidemiological Surveillance of Vaccine-Preventable Diseases (in Japanese).
16. Farrington CP (1990) Modelling forces of infection for measles, mumps and rubella. *Stat Med* 9:953–967.
17. Satou K, Nishiura H (2007) Transmission dynamics of hepatitis E among swine: potential impact upon human infection. *BMC Vet Res* 3:9.
18. Burnham KP, Anderson DR (2002) Model Selection and Multi-Model Inference. 2nd edition. Berlin: Springer.
19. Farrington CP, Kanaan MN, Gay NJ (2001) Estimation of the basic reproduction number for infectious diseases from age-stratified serological survey data. *J R Stat Soc C* 50:251–292.
20. Mossong J, Hens N, Jit M, Beutels P, Auranen K, et al. (2008) Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. *PLoS Med* 5:e74.
21. Ejima K, Omori R, Aihara K, Nishiura H (2012) Real-time investigation of measles epidemics with estimate of vaccine efficacy. *Int J Biol Sci* 8:620–629.
22. Nishiura H, Ejima K, Mizumoto K, Nakaoka S, Inaba H, et al. (2014) Cost-effective length and timing of school closure during an influenza pandemic depend on the severity. *Theor Biol Med Model* 11:5.
23. Efron B, Tibshirani RJ (1993) An Introduction to the Bootstrap. New York: Chapman & Hall.
24. Japanese Red Cross Society (2011) Annual report of blood products (in Japanese).
25. Miller E, Fairley CK, Cohen BJ, Seng C (1998) Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 105:174–178.
26. Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Uehara S, Okamura K, et al. (1999) Serologic study of human parvovirus B19 infection in pregnancy in Japan. *J Infect* 38:30–35.
27. Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Watanabe T, Uehara S, et al. (1998) The incidence of, and factors leading to, parvovirus B19-related hydrops fetalis following maternal infection; report of 10 cases and meta-analysis. *J Infect* 37:28–35.
28. Rohani P, Zhong X, King AA (2010) Contact network structure explains the changing epidemiology of pertussis. *Science* 330:982–985.
29. Anderson RM, Grenfell BT (1986) Quantitative investigations of different vaccination policies for the control of congenital rubella syndrome (CRS) in the United Kingdom. *J Hyg* 96:305–333.
30. Edmunds WJ, van de Heijden OG, Eerola M, Gay NJ (2000) Modelling rubella in Europe. *Epidemiol Infect* 125:617–634.
31. Kooistra K, Mesman HJ, de Waal M, Koppelman MH, Zaaijer HL (2011) Epidemiology of high-level parvovirus B19 viraemia among Dutch blood donors, 2003–2009. *Vox Sang* 100:261–266.
32. Whitaker HJ, Farrington CP (2004) Estimation of infectious disease parameters from serological survey data: the impact of regular epidemics. *Stat Med* 23:2429–2443.

# ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)

Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*

笠原 敬 Kei Kasahara, 小松祐子 Yuko Komatsu

## ▶▶ ペニシリン耐性肺炎球菌の判定基準

ペニシリン耐性肺炎球菌 (penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*; PRSP) とは、ペニシリンに耐性を獲得した肺炎球菌であるが、その判定は通常、米国臨床検査標準委員会 (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI) が発行する「抗菌薬感受性検査のための標準法」と呼ばれるマニュアルに基づいて行われる。本マニュアルは年1回改訂されるが、2008年1月の改訂 (M100-S18) で PRSP の判定に関する大きな変更が行われた。すなわち①ブレイクポイントを「髄膜炎」と「髄膜炎以外」に分けたこと、そして②「髄膜炎以外」の感染症において、ブレイクポイントを大幅に引き上げたこと、である (表1)。

CLSI は同様の変更をセフォタキシム、セフトリアキソン、セフェピムに対しても行っており、これらの抗菌薬は肺炎球菌感染症において経験的に使用される頻度が高いため、

十分に周知しておく必要がある (表2)。

## ▶▶ 疫学

わが国のサーベイランスで、呼吸器検体から分離される肺炎球菌に占めるペニシリン感受性菌の割合は2006年には99.6%であったが、2009年には93.7%に低下した<sup>1,2)</sup>。また髄膜炎のブレイクポイントでは、ペニシリン感受性菌の割合は2006年には64.6%であったが、2009年には55.9%まで低下した。セフォタキシム、セフトリアキソン、セフェピムの感受性率について、髄膜炎・非髄膜炎に分けて検討したわが国に大規模なデータはないが、MIC<sub>50</sub> や MIC<sub>90</sub> でみると、徐々に薬剤感受性は悪化しており、MIC が 8 μg/mL といった高度耐性株も検出されていて注意が必要である。

## ▶▶ 治療

肺炎球菌感染症が疑われ、薬剤感受性が不

## I

H. 感染症診療の現在  
H. 現在問題となっている耐性菌

表1 肺炎球菌のペニシリンに対するブレイクポイント

抗菌薬	MIC 判定基準値 (μg/mL)		
	S	I	R
CLSI M100-S17 まで	≤0.06	0.12~1	≥2
CLSI M100-S18 以降非髄膜炎	≤2	4	≥8
CLSI M100-S18 以降髄膜炎	≤0.06		≥0.12

表2 肺炎球菌のセフォタキシム、セフトリアキソン、セフェピムに対するブレイクポイント

抗菌薬	MIC 判定基準値 (μg/mL)		
	S	I	R
セフェピム (髄膜炎)	≤0.5	1	≥2
セフェピム (非髄膜炎)	≤1	2	≥4
セフォタキシム, セフトリアキソン (髄膜炎)	≤0.5	1	≥2
セフォタキシム, セフトリアキソン (非髄膜炎)	≤1	2	≥4

明な時点では経験的治療薬としてセフトキシムまたはセフトリアキソンが使用される場合が多い。しかし、髄膜炎ではセフトキシムまたはセフトリアキシンのMICが1 $\mu$ g/mL以上（非感受性）の場合は治療に失敗する可能性があり、感受性結果が判明するまではバンコマイシンの併用が推奨されている。

最終的に静注用ペニシリンのMICが判明し、感受性であれば、原則として静注用ペニシリンで治療できる。なお用法・用量にも注意が必要で、たとえば肺炎球菌性髄膜炎に対するセフトリアキシンの標準用法・用量は1回2gを12時間毎（1日4g）となる。

#### ▶▶肺炎球菌ワクチン

7価肺炎球菌ワクチンであるプレベナー7<sup>®</sup>により、本ワクチンでカバーされない血清型の肺炎球菌感染症の増加（serotype replacement）が指摘されていた。なかでも19A型の肺炎球菌はペニシリンを含む多種類の抗菌薬に耐性を示す。2013年11月からわが国で19A型もカバーする13価肺炎球菌ワクチン（プレベナー13<sup>®</sup>）が使用できるようになった。従来の23価肺炎球菌ワクチン（ニューモバックス<sup>®</sup>）も19A型をカバー

し、これらの肺炎球菌ワクチンによるカバー率は70～90%と報告されている<sup>3,4)</sup>。

#### ▶▶届け出

侵襲性肺炎球菌感染症が5類感染症として全数把握されており、それとは別にPRSP感染症は基幹定点病院による把握の5類感染症と指定されている。

#### 【文献】.....

- 1) Niki Y, *et al* : Nationwidesurveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Japanese Society of Chemotherapy in 2007 : general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother* 2009 ; 15 : 156-167.
- 2) Watanabe A, *et al* : Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the Surveillance Committee of Japanese Society of Chemotherapy, Japanese Association for Infectious Diseases, and Japanese Society for Clinical Microbiology in 2009 : general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *J Infect Chemother* 2012 ; 18 : 609-620.
- 3) Morozumi M, *et al* : Antibiotic susceptibility in relation to genotype of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Mycoplasma pneumoniae* responsible for community-acquired pneumonia in children. *Journal of infection and chemotherapy : J Infect Chemother* 2013 ; 19 : 432-440.
- 4) Chiba N, *et al* : Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Epidemiol Infect* 2010 ; 138 : 61-68.

## 血液培養

### Key Points

北 和也 笠原 敬\*

奈良県立医科大学 感染症センター \*講師

- ブドウの房状のグラム陽性球菌ではブドウ球菌属(黄色ブドウ球菌またはコアグラゼ陰性ブドウ球菌属)を考える。
- 長い連鎖のグラム陽性球菌では背景を確認し、赤血球形態が保たれていなければβ溶血性レンサ球菌を考える。
- 短い連鎖のグラム陽性球菌では肺炎球菌または腸球菌を考え、患者の臨床背景からいずれかを想定する。
- 血液培養は静脈血でよい、動脈血を取ろうとして鼠径動脈を穿刺するのは汚染の観点から絶対に避けるべきである。

### はじめに

血液培養は、感染症診療において、原因微生物診断の柱となる非常に重要な検査である。使い方によっては迅速にその結果を適切な抗菌薬選択を含めたマネジメントに最大限に活用することができるし、また解釈を誤ると不要な抗菌薬を投与することになる。

本稿ではまず代表的な血液培養のグラム染色写真を示し、続いてそのマネジメント、そして血液培養にまつわる種々の疑問について解説する。

必要不可欠である。グラム陽性球菌で集塊がブドウの房状を呈するものにはブドウ球菌属がある(図1)。好気ボトル・嫌気ボトルに発育するブドウ球菌属の菌体の形態および集塊の形態から、黄色ブドウ球菌とコアグラゼ陰性ブドウ球菌をある程度鑑別できるとする報告がある<sup>1,2)</sup>。ただし、メチシリン耐性かどうかまではグラム染色では分からない。グラム染色でブドウ球菌属が疑われる場合は、患者の臨床背景や重症度にもよるが、メチシリン耐性の可能性も考えて経験的治療薬として抗MRSA薬を選択することがある。

### 血液培養のグラム染色所見

#### 1 ブドウの房状のグラム陽性球菌

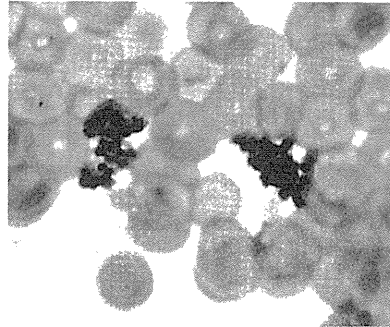
血液培養の結果を最大限に活かすためには、陽性になったボトルのグラム染色所見は

#### 2 長い連鎖のグラム陽性球菌

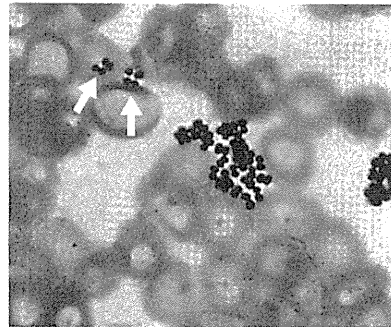
グラム陽性球菌で長い連鎖を呈する場合、背景の赤血球の形態から溶血性を推定することができる(図2)。赤血球の形態が保たれておらず、背景がベタツとした赤色になってい



㉑ 黄色ブドウ球菌



㉒ コアグララーゼ陰性ブドウ球菌

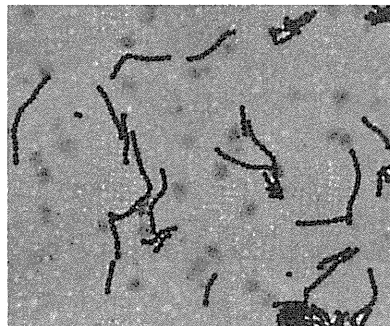


(カラー写真p 14)

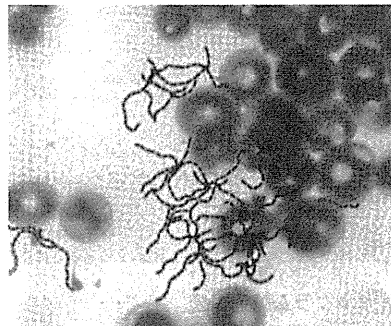
図1 ブドウ球菌属

- ㉑ 黄色ブドウ球菌の場合、嫌気ボトルでは菌体は小さく、集塊は大きくなる。また好気ボトルでは菌体は大きく、密集した集塊が見られる。菌体の周囲には赤い構造物を認めることもある。
- ㉒ コアグララーゼ陰性ブドウ球菌の場合、嫌気ボトルでは菌体は大きく、4菌体単位の集塊が散見される。好気ボトルでも4菌体単位の集塊と小さな集塊がみられる。  
矢印：4菌体単位の集塊。

㉓ β溶血性レンサ球菌



㉔ α溶血性レンサ球菌



(カラー写真p 14)

図2 長い連鎖球菌

- β溶血性レンサ球菌では、赤血球が溶血し、背景がベタツとした赤色になる。α溶血性レンサ球菌では、溶血が少なく、赤血球の形態が保たれている。

る場合は *Streptococcus pyogenes* (A群溶連菌) や、*Streptococcus agalactiae* (B群溶連菌) などのβ溶血性レンサ球菌を考える。一方、赤血球の形態が保たれている場合はα溶血を示すレンサ球菌(緑色レンサ球菌など)を考えるとよい。長い連鎖球菌はほとんどがペニシリン感受性であり、マクロライド系薬やキノロン系薬には耐性を示すことが多い。

### 3 短い連鎖のグラム陽性球菌

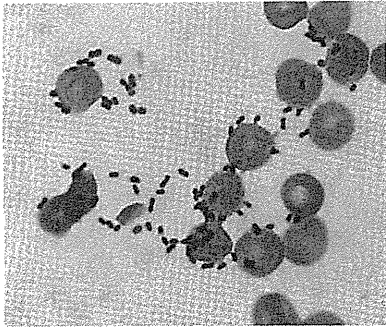
短い連鎖を示す場合は肺炎球菌または腸球

菌(特に *Enterococcus faecalis* または *Enterococcus faecium*) を考える(図3)。肺炎球菌と *E. faecalis* の鑑別は時に難しいが、患者の臨床背景と組み合わせることで、ある程度の推定はできる(後述:臨床像との照らし合わせ)。

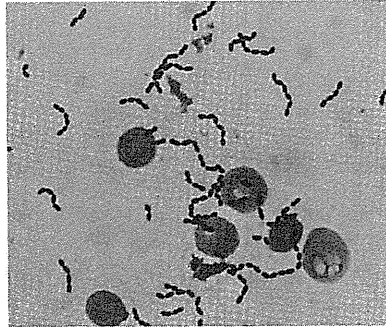
### 4 グラム陰性桿菌

グラム陰性桿菌は菌体が太く短く見えることの多い腸内細菌属と、細長く見える緑膿菌などがあるが、鑑別は時に困難である(図4)。腸内細菌群は、通常、通性嫌気性菌であり、

a 肺炎球菌



b 腸球菌(E. faecalis)

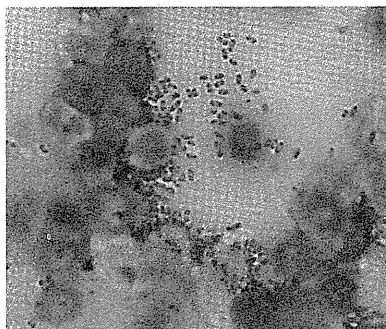


(カラー写真p 15)

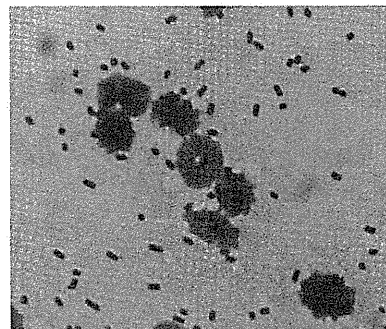
図3 短い連鎖球菌

肺炎球菌と腸球菌(特にE. faecalis)の鑑別は難しい。腸球菌は4つ(以上)つながることが多い。

a 大腸菌(腸内細菌群)



b 緑膿菌



(カラー写真p 15)

図4 グラム陰性桿菌

大腸菌などの腸内細菌群は、1つの菌体が太く、短めのことが多い。緑膿菌は細身・やや長めで染まりが弱いことが多い。また緑膿菌は偏性好気性菌であり、嫌気ボトルから検出されることはまれである。

好気ボトル・嫌気ボトルのいずれにも発育するが、緑膿菌は偏性好気性菌であり、好気ボトルのみに発育することが特徴である。

よりも菌体が大きい)などが血液培養から検出されることもある。

## 5 酵母様真菌

カンジダ属などの酵母様真菌はグラム陽性であり、一般細菌よりも菌体は大きい。Candida glabrata 以外のカンジダ属は、仮性菌糸と呼ばれる細長い菌糸状の構造物が見られることが多い(図5)。そのほかにクリプトコッカス属(墨汁染色によって明瞭な莢膜が観察される)やトリコスポロン属(カンジダ属

## 臨床像との照らし合わせ

グラム染色所見だけでは鑑別が困難なものも、患者の臨床背景と組み合わせて考えることで、より精度の高い推定ができる。例えば、血液培養から短い連鎖球菌が検出された場合、患者が呼吸器感染症または髄膜炎を呈していれば肺炎球菌の可能性が高く、尿路感染症や肝・胆道系感染症を呈していれば腸球菌

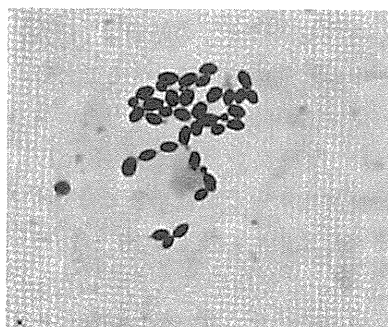
a *C. albicans*b *C. glabrata*

図5 酵母様真菌

矢印：*C. albicans*の仮性菌糸。*C. glabrata*は仮性菌糸を認めない。

(カラー写真p 15)

の可能性が高いと考える。

グラム陰性桿菌が検出された場合も、市中発症か院内発症か、あるいは直近に尿や喀痰で検出されたグラム陰性桿菌がないかなどの情報も参考にすることができる。

## よくある質問(FAQ)

### 1 血液培養を採取するタイミング

これは難しい。簡単に言えば「血液の中に菌がいると考えるとき」あるいは「血液の中に菌がないことを証明したいとき」となるが、一言で表すのは難しい。通常は悪寒戦慄を伴うような発熱が見られるときや意識障害、血圧低下などバイタルサインの変動が見られるとき、あるいは低体温や低血糖などを敗血症のサインとして考える。適切なタイミングで血液培養を採取できるよう「センス」を磨く必要がある。なお、感染性心内膜炎(特に緑色レンサ球菌や腸球菌など亜急性の感染性心内膜炎)は持続的な血流感染症を呈し、特に高熱や悪寒戦慄がなくても最低3セットの血液培養を採取して診断の一助とする。

### 2 セット数

最近はよく知られるようになってきているが、血液培養から検出される菌が「真の起炎菌かどうか」を判断するためには、通常、血液培養は「最低2セット」必要である。2セット採取が必要な理由は2つあり、1つは感度の問題、もう1つは特異度の問題である。例えば、1セットより2セット、2セットより3セット取る方が血中に存在する微生物を検出できる確率が高くなる。つまり、検査感度が高くなるわけである。緑膿菌や腸球菌、カンジダ属などは1セットの血液培養では検出感度が60～70%しかない(つまり30～40%を見過ごす)ことが報告されている<sup>3)</sup>。

バチルス属、コリネバクテリウム属、プロピオニバクテリウム属、コアグラレーゼ陰性ブドウ球菌属、緑色レンサ球菌やマイクロコッカス属などはコンタミネーションとして検出されやすいことが知られている。こういう細菌が例えば2セット、あるいは3セット中1セットしか検出されない場合、コンタミネーションの可能性が高いと考える。逆にこれらの細菌による血流感染症を強く疑う場合は3セット(まず2セット採取し、4～6時間空けて3セット目)を採取するという方法もある<sup>4)</sup>。

### 3 検体採取から培養陽性までの時間

検体採取から培養陽性までの時間は、菌の増殖速度や血中の初期菌量に依存することが多く、一般的にはこの時間が短いほど真の菌血症である可能性は高い。例えば、BacT/ALERT® systemを用いた血液培養では、肺炎球菌による重症感染症の多くは10～15時間で陽性になることが報告されている<sup>5,6)</sup>。一方で、カンジダ属などの真菌類は細菌に比べて陽性になるまでの時間が若干長く、48～72時間前後かかることが多い。前述の一般的にコンタミネーションと考えられる細菌が陽性になった場合、この培養陽性までの時間が長いと(例えば50時間以上など)、より積極的にコンタミネーションと考える根拠になるかもしれない。

### 4 採血量

ボトルに注入する血液と培地の比率は、一般的には1:4～1:9が最良とされている。市販ボトルの場合は、メーカーがある程度推奨を決めているものもあり、例えば、BacT/ALERT® SN, SAボトルでは培地が40mL入っており、血液は10mL入れることを推奨している。決められた量以上の血液を接種すると、血液中の殺菌物質に起因する菌のダメージによる陰性化や、白血球代謝による偽陽性反応などを生じる可能性があり、注意が必要である。

### 5 動脈血か、静脈血か

通常、血液培養は静脈血から採取するのが原則である。動脈血の方が静脈血よりも菌の検出感度が高いというエビデンスはない。仮にそうであったとしても、血液培養のセット数を増やす方がより効率良く感度を高めることができるだろう。動脈血の血液培養の最大の問題点は、それがしばしば「鼠径動脈」から

採血されるという点である。

通常、鼠径部は四肢よりも細菌汚染が高度であり、鼠径動脈からの血液培養のコンタミネーション率が30%以上であったという報告もある<sup>7)</sup>。動脈血を採取することにこだわって鼠径動脈を穿刺するようでは、血液培養としては本末転倒である。

### 6 ガスの産生

陽性反応を示したボトルからグラム染色用に検体を採取する際に、血液培養ボトルのゴムキャップが目で見えて明らかに膨隆していることがあり、これは腸内細菌科を疑う根拠になる。腸内細菌科はブドウ糖を発酵し、酸とガスを産生するため、培養ボトル内で発生したガスが培養ボトルの内圧を高め、このような現象が発生する。このようなボトルで内容液を取ろうと迂闊に注射器を刺すと、中身が吹き出すおそれがあるので注意が必要である。

### おわりに

血液培養はその限界を知っていれば、感染症診療において非常に有用な検査である。本稿ではグラム染色による鑑別を紹介したが、それに過度に依存するのは危険であり、実際には抗菌薬の前投与や培養時間、培養環境などにより、グラム染色の形態は修飾を受けることがある。基本的なスタンスとしては「経験的治療を外さない」ことをまず第一とし、その上で同定結果を確認することで経験値を高めていくとよいだろう。また、そのためには「適切に」血液培養を採取することが重要である。

#### 引用文献

- 1) 近藤成美ほか：血液培養液中のブドウ球菌属の塗抹グラム染色による形態学的鑑別。感染症誌，82：656-

- 657, 2008.
- 2) Murdoch DR, et al : Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. J Clin Pathol, 57 : 199-201, 2004.
  - 3) Lee A, et al : Detection of bloodstream infections in adults : how many blood cultures are needed? J Clin Microbiol, 45 : 3546-3548, 2007.
  - 4) Doern GV : Blood cultures for the detection of bacteremia. UpToDate®, 2013.
  - 5) Neuman MI, et al : Time to positivity of blood cultures for children with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. Clin Infect Dis, 33 : 1324-1328, 2001.
  - 6) Peralta G, et al : Time to positivity in blood cultures of adults with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. BMC Infect Dis, 6 : 79, 2006.
  - 7) 大城雄亮ほか : *Corynebacterium striatum*による感染性心内膜炎. 感染症誌. 87 : 7-15, 2013.



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Infection and Chemotherapy

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jic>

## Note

Serotype 35B *Streptococcus pneumoniae*, Japan, 2002–2012Kei Kasahara, MD, PhD<sup>a,\*</sup>, Yuko Komatsu<sup>a</sup>, Akira Koizumi<sup>b</sup>, Bin Chang<sup>c</sup>, Makoto Ohnishi<sup>c</sup>, Tetsuro Muratani<sup>d</sup>, Keiichi Mikasa<sup>a</sup><sup>a</sup> Center for Infectious Diseases, Nara Medical University, Japan<sup>b</sup> Central Clinical Laboratory, Nara Medical University, Japan<sup>c</sup> Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Japan<sup>d</sup> Department of Clinical Laboratory, Kyurin Medical Laboratory, Japan

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 September 2013

Received in revised form

6 October 2013

Accepted 10 November 2013

## Keywords:

*Streptococcus pneumoniae*

Pneumococcal vaccine

Serotype replacement

## ABSTRACT

Among 641 pneumococcal isolates recovered from 2002 to 2012 in Japan, 19 (3.0%) were serotype 35B. Twelve of the 19 were ST558 (single-locus variant of Utah35B-24-ST377) and seven were ST2755. Continuous monitoring of serotypes and their clonal association is important, especially in Japan where PCV7 was licensed only in 2010.

© 2013, Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine, which contains capsular polysaccharides of serotypes 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, and 23F (PCV7), led to dramatic reductions in the incidence of invasive pneumococcal disease (IPD) both in vaccinated young children and among non-vaccinated groups due to herd immunity [1,2]. On the other hand, an increase in non-vaccine serotypes (NVTs) has occurred and is called “serotype replacement” [3]. Such examples of NVTs are 7F, 15, 19A, 22F, and 33F.

In 2010, a 13-valent pneumococcal vaccine (PCV13) was introduced in the United States. PCV13 covers the 7 serotypes in PCV7 as well as serotypes 1, 3, 5, 6A, 7F, and 19A. Richter et al. recently reported that the increase of infection caused by serotype 19A has stopped, whereas serotype 35B is the only serotype that kept increasing after introduction of PCV13 [4].

We previously reported a relatively high prevalence of serotype 35B pneumococci (4.8%) in Japan, in a pilot surveillance study performed between 2001 and 2003 [5]. PCV7 was introduced in 2010 in Japan and we herein report the change in the prevalence and characteristics of serotype 35B pneumococcal isolates from 2002 to 2012.

The present study was conducted at Nara Medical University, a tertiary care hospital with 850 beds in Nara prefecture, which is located in central Japan. *Streptococcus pneumoniae* isolates were consecutively collected from clinical specimens, from both in-patients and outpatients, submitted to the laboratory of clinical microbiology at our university hospital over a 11-year period (2002–2012). In order to avoid duplication of samples, isolates consecutively isolated from the same individual were excluded. Pneumococcal isolates were identified using standard techniques, including Gram stain, colonial morphology, optochin susceptibility, and bile solubility. Determination of the capsular serotype was first screened by the slide agglutination method using a panel of commercially obtained antisera (Seiken Co., Tokyo, Japan) and further determined by capsular swelling reaction with antiserum (the Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Customized MIC panels of antimicrobial agents (Eiken Co., Tokyo, Japan) were used to determine MIC by broth microdilution method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Penicillin and macrolide resistant gene analysis were performed according to the previously described methods [5]. Multilocus sequence typing (MLST) was performed as described previously [6]. Briefly, internal fragments of each of the seven housekeeping genes, *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt* and *ddl*, were amplified by PCR and their sequence types (STs) were determined by reference to a database (<http://spneumoniae.mlst.net/>).

A total of 641 pneumococcal isolates were analyzed, 19 (3.0%) of which were serotype 35B. The origin, isolate date, antibiotic

\* Corresponding author. Center for Infectious Diseases, Nara Medical University, 840 Shijo Town, Kashihara City, Nara 634-8522, Japan. Tel.: +81 744 22 3051; fax: +81 744 24 9212.

E-mail address: [kassan@naramed-u.ac.jp](mailto:kassan@naramed-u.ac.jp) (K. Kasahara).

**Table 1**  
Description of serotype 35B isolates from 2002 to 2012.

Case no.	In/out	Age (year)	Specimen	Date of recovery	MIC (µg/mL)					<i>pbp1a</i>	<i>pbp2b</i>	<i>pbp2x</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA/E</i>
					ST	PCG	CTX	EM	CLDM					
1	In	2 month	Blood	11/12/02	558	2	0.5	4	≤0.12	-	-	-	-	+
2	Out	1	Otorrhoea	01/14/03	558	1	0.5	≤0.12	≤0.12	-	-	-	-	-
3	Out	67	Sputum	04/03/03	558	1	0.5	≤0.12	≤0.12	-	-	-	-	-
4	Out	36	Bartholine gland	04/30/03	558	1	0.5	≤0.12	≤0.12	-	-	-	-	-
5	In	62	Sputum	06/12/03	558	1	0.5	4	≤0.12	-	-	-	-	+
6	Out	39	Sputum	01/20/04	558	1	0.5	≥8	≤0.12	-	-	-	-	+
7	Out	70	Sputum	11/04/04	2755	0.12	0.5	≥8	≥8	-	+	-	+	-
8	Out	68	Sputum	07/19/06	558	1	0.5	4	≤0.12	-	-	-	-	+
9	Out	77	Otorrhoea	03/26/08	558	1	0.5	≥8	≤0.12	-	-	-	-	+
10	In	74	Bronchoalveolar fluid	07/28/08	2755	0.03	≤0.03	≥8	≥8	+	+	-	+	-
11	Out	1	Throat	09/10/08	558	2	0.5	4	≤0.12	-	-	-	-	+
12	In	67	Sputum	09/09/09	558	1	1	≥8	≤0.12	-	-	-	-	+
13	Out	77	Sputum	02/10/11	2755	0.06	0.25	≥8	≥8	+	+	-	+	-
14	In	53	Sputum	02/24/11	558	2	1	≤0.12	≤0.12	-	-	-	-	-
15	Out	63	Oral abscess	04/25/11	558	1	0.5	4	≤0.12	-	-	-	-	+
16	Out	69	Nasal discharge	08/01/11	2755	0.06	0.25	≥8	≥8	+	+	-	+	-
17	Out	53	Sputum	03/07/12	2755	0.06	0.25	≥8	≥8	+	+	-	+	-
18	Out	64	Sputum	03/18/12	2755	0.03	0.25	≥8	≥8	+	+	-	+	-
19	Out	64	Sputum	07/09/12	2755	0.06	0.25	≥8	≥8	+	+	-	+	-

In, inpatient; Out, outpatient, ST, sequence type; PCG, penicillin G; CTX, cefotaxime; EM, erythromycin; CLDM, clindamycin; VCM, vancomycin; if *pbp1a*, *pbp2b*, and *pbp2x* were not amplified by PCR due to mutations in these genes, the results are expressed as "-"; if *ermB* and *mefA/E* were not amplified by PCR due to the absence of these genes, the results are expressed as "-".

susceptibility data, antibiotic resistant genes and MLST data are shown in Table 1.

The first 35B isolate was recovered from the blood culture of 2-month-old child in 2002. MLST revealed that this belonged to ST558, which is a single-locus variant of Utah35B-24-ST377. Twelve ST558 isolates were recovered from 2002 to 2011; all isolates had the same mutations in *pbp1a*, *pbp2b*, and *pbp2x* found in Utah35B-24-ST377. Eight of the 12 ST558 isolates were resistant to erythromycin but susceptible to clindamycin due to a *mefA/E* gene not found in Utah35b-24-ST377.

In 2004, an ST2755 isolate was recovered from sputum of 70-year-old female. As compared to ST558, all ST2755 isolates exhibited low penicillin MICs and were highly resistant to both erythromycin and clindamycin due to the *ermB* gene. Interestingly, the frequency of ST2755 among serotype 35B increased after 2011, although ST558 was still recovered in 2011 (Fig. 1).

ST558 is a single-locus variant of Utah35B-24-ST377 which was reported in 2002 as a penicillin-nonsusceptible and invasive strain

in the United States [7]. ST558 was present in Massachusetts before the widespread use of PCV7 and the increase of ST558 after introduction of PCV7 has been reported worldwide [8,9]. Our study clearly shows that ST558 was also present in Nara before the introduction of PCV7 in Japan. Togashi et al. collected 66 pneumococcal isolates from children with community-acquired pneumonia in Chiba, Japan and found two ST558 clone in a study performed from 2008 to 2009 [10]. Ohishi et al. also found one ST558 isolate among 63 nasopharyngeal pneumococcal isolates in a study performed in Niigata, Japan from 2007 to 2008 [11]. These findings show that ST558 was present throughout Japan before the introduction of PCV7.

We also found that infections caused by ST2755 emerged in 2004 and apparently increased thereafter. This ST is penicillin susceptible but highly resistant to macrolides and clindamycin due to the presence of the *ermB* gene. Emergence of ST2755 has not been previously reported to our knowledge. The MLST database (<http://spneumoniae.mlst.net/sql/burstspadvanced.asp>, accessed

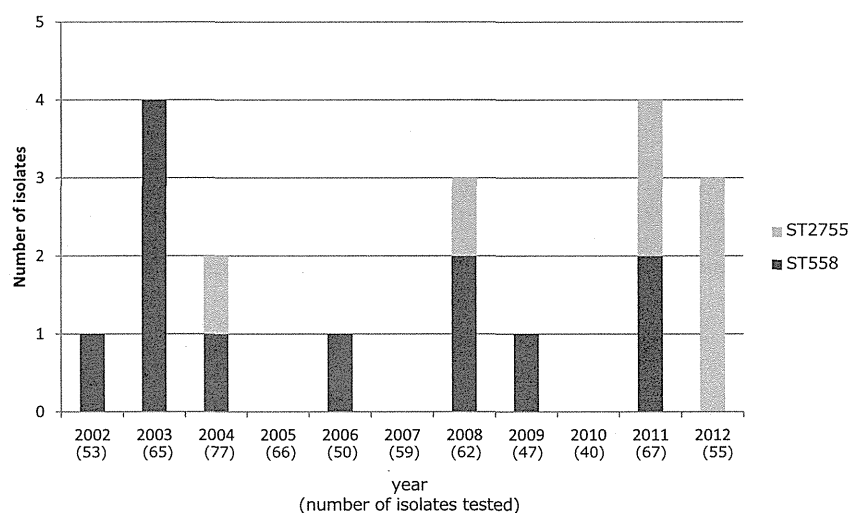


Fig. 1. Proportion of ST558 and ST2755 among *Streptococcus pneumoniae* serotype 35B isolates, Nara, Japan, 2002–2012.

on July 14th, 2013) shows that a total of five ST2755 isolates have been submitted, with the first one submitted in 2004 from China. Another four ST2755 isolates were submitted from Japan after 2011, all of which were recovered either from cerebrospinal fluid or blood culture. This shows that ST2755 can cause invasive disease. The relationship between the introduction of PCV7 in 2010 in Japan and the emergence of ST2755 is unknown.

Our study shows that serotype 35B isolates have been present in Nara, Japan since at least 2002, and that these are found in two different ST types, ST558 and ST2755, with ST2755 becoming dominant. Both ST558 and ST2755 have the potential to cause invasive disease. Considering recent studies that show an increase of serotype 35B after introduction of PCV7 and PCV13 in the United States, continuous monitoring of serotypes and their clonal association is important, especially in Japan where PCV7 was licensed only in 2010.

### Acknowledgements

We are grateful to Professor Paul H. Edelstein for his valuable and constructive suggestions. Also we are grateful to Tomoko Asada for her excellent technical support. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Labor and Welfare Programs from the Ministry of Health, Labor and Welfare Japan (H24-Shinko-Ippan-014).

### References

- [1] Rodenburg GD, de Greeff SC, Jansen AG, de Melker HE, Schouls LM, Hak E, et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine 2 years after its introduction, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2010;16:816–23.
- [2] Ruckinger S, van der Linden M, Reinert RR, von Kries R, Burckhardt F, Siedler A. Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. *Vaccine* 2009;27:4136–41.
- [3] Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 2011;378:1962–73.
- [4] Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Diekema DJ, Doern GV. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999–2011(1.). *Emerg Infect Dis* 2013;19:1074–83.
- [5] Kasahara K, Maeda K, Mikasa K, Uno K, Takahashi K, Konishi M, et al. Clonal dissemination of macrolide-resistant and penicillin-susceptible serotype 3 and penicillin-resistant Taiwan 19F-14 and 23F-15 *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan: a pilot surveillance study. *J Clin Microbiol* 2005;43:1640–5.
- [6] Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998;144(Pt 11):3049–60.
- [7] Beall B, McEllistrem MC, Gertz Jr RE, Boxrud DJ, Besser JM, Harrison LH, et al. Emergence of a novel penicillin-nonsusceptible, invasive serotype 35B clone of *Streptococcus pneumoniae* within the United States. *J Infect Dis* 2002;186:118–22.
- [8] Hanage WP, Huang SS, Lipsitch M, Bishop CJ, Godoy D, Pelton SI, et al. Diversity and antibiotic resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates in the post-heptavalent conjugate vaccine era. *J Infect Dis* 2007;195:347–52.
- [9] Sanchez-Tatay D, Arroyo LA, Tarrago D, Lirola MJ, Porras A, Fenoll A, et al. Antibiotic susceptibility and molecular epidemiology of nasopharyngeal pneumococci from Spanish children. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:797–801.
- [10] Tanaka J, Ishiwada N, Wada A, Chang B, Hishiki H, Kurosaki T, et al. Incidence of childhood pneumonia and serotype and sequence-type distribution in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Japan. *Epidemiol Infect* 2012;140:1111–21.
- [11] Oishi T, Wada A, Chang B, Toyabe S, Uchiyama M. Serotyping and multilocus sequence typing of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the blood and posterior nares of Japanese children prior to the introduction of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Jpn J Infect Dis* 2011;64:341–4.



総 説

## 全身性カンジダ症の増悪における iNKT 細胞の関与

樽 本 憲 人<sup>1,2</sup> 金 城 雄 樹<sup>2</sup> 北 野 尚 樹<sup>2</sup> 渋谷 和 俊<sup>3</sup>  
前 崎 繁 文<sup>1</sup> 宮 崎 義 継<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 埼玉医科大学感染症科・感染制御科

<sup>2</sup> 国立感染症研究所真菌部

<sup>3</sup> 東邦大学医学部病院病理学

### 要 旨

カンジダ属は、院内の血流感染症の原因菌の中でも頻度が高く、全身性カンジダ症が致死的な転帰をたどることもまれではない。カンジダ感染症に対する宿主の生体防御反応においては、感染早期の自然免疫においては好中球などの食細胞が、獲得免疫においては CD4T 細胞が重要な役割を示す。近年、自然免疫応答にも関与するリンパ球である NKT 細胞が、さまざまな微生物の感染症における免疫応答に関与することが示唆されているが、カンジダ感染における NKT 細胞の関与については明らかではない。私たちは、全身性カンジダ症のマウスモデルにおける NKT 細胞の役割について確認した。まず、NKT 細胞欠損マウスである  $J\alpha 18$ KO マウスを用いて解析を行ったが、その役割は限定的であった。一方で、糖脂質を投与して NKT 細胞を活性化させたところ、生存期間が著明に短縮し、腎臓内菌数が有意に増加していた。加えて、末梢血および骨髄中の好中球数が減少していた。さらに、 $IFN\gamma$ KO マウスでは、NKT 細胞活性化によるカンジダ感染の増悪がほぼ消失した。また、腸管内常在性の細菌とカンジダ属を共感染させたところ、カンジダ単独感染群と比較して、真菌排除が低下し、この感染増悪には細菌感染により誘導された  $IFN\gamma$  が重要であることが明らかになった。以上の結果より、細菌との共感染などによって過剰に  $IFN\gamma$  が産生される状況では、全身性カンジダ症が増悪する可能性が示唆された。

**Key words :** *Candida albicans*,  $IFN\gamma$ , iNKT, co-infection,  $\alpha$ -GalactosylCeramide

### NKT 細胞とは

Natural killer T (NKT) 細胞は T リンパ球の一種であり、 $\alpha\beta$  型 T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) と NK 細胞の受容体を両方発現している<sup>1,2)</sup>。NKT 細胞は複数の亜群に分けられ、主要なものは  $V\alpha 24J\alpha 18$  (マウスでは  $V\alpha 14J\alpha 18$ ) 遺伝子で再構成された多様性に乏しい (invariant) TCR を発現する細胞群であり、invariant NKT 細胞 (iNKT) と称される<sup>1,2)</sup>。通常、CD4T 細胞や CD8T 細胞の TCR は、抗原提示細胞上に発現した major histocompatibility complex (MHC) 分子に提示される抗原を認識する。一方、NKT 細胞の TCR は、抗原提示細胞に発現する、MHC class I 様分子である CD1d 分子に提示された糖脂質抗原を認識する<sup>1-5)</sup>。そ

のため、CD1d 拘束性リンパ球として特徴づけられる。NKT 細胞は糖脂質抗原認識によりすみやかに多量のサイトカイン (IL-4 や  $IFN\gamma$  など) を産生することにより、抗腫瘍免疫、自己免疫、感染免疫、アレルギーなどの免疫応答に関与し、自然免疫と獲得免疫の両方に影響を及ぼすことが示唆されている<sup>3-5)</sup>。

### カンジダ症の感染免疫

カンジダ属は腸内や膣などの粘膜や皮膚に常在菌として存在する酵母様真菌であり、皮膚・粘膜のバリアが破綻した場合、トランスロケーションを起こして深在性真菌症を発症する<sup>6)</sup>。カンジダ血症は、血管内留置カテーテル、広域抗菌薬の投与、好中球減少などが危険因子である<sup>7,8)</sup>。また、カンジダ属は院内菌血症の原因微生物

別冊請求先：樽本憲人

〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 38

埼玉医科大学感染症科・感染制御科

tarumoto@saitama-med.ac.jp

金城雄樹

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所 真菌部第三室 (免疫制御研究室)

ykinjo@niid.go.jp

のなかでも上位に取り上げられ<sup>9, 10)</sup>, なかでも *Candida albicans* の頻度が高い<sup>11, 12)</sup>. 全身性カンジダ症の死亡率は, 報告により 5~71% と幅広いが<sup>13)</sup>, 寄与死亡率は 31~41% に上る<sup>14)</sup>. このため, 全身性カンジダ症の病態を解析することは重要である.

全身性カンジダ症の生体防御において, 自然免疫と獲得免疫は双方重要である<sup>15-18)</sup>. 好中球やマクロファージなどの食細胞は, カンジダの成分 ( $\beta$ -D-グルカンやマンナン, ほか) を認識する受容体 (C-type lectin receptors, ほか) などを通じて真菌を感知する. そして IL-1, IL-12, TNF $\alpha$  や IFN $\gamma$  などの炎症性サイトカインを産生するとともに, 抗真菌活性を発揮する. また, 抗原提示能が高い樹状細胞により Th1 型 CD4 T 細胞などの獲得免疫が誘導され, 菌体排除が促進される. 粘膜免疫においては, Th17 型 CD4 T 細胞がカンジダ症の免疫に重要であることが報告されている<sup>19)</sup>. NKT 細胞は, IL-12 などのサイトカインにより活性化され<sup>20)</sup>, IFN $\gamma$  などの炎症性サイトカインを放出することが知られており, NKT 細胞もカンジダ感染免疫に影響を及ぼす可能性がある. そこで, 筆者らは NKT 細胞によるカンジダ感染免疫に及ぼす役割について検討した.

## NKT 細胞と細菌感染症

NKT 細胞の免疫学的役割を解析するためには, NKT 細胞の欠損マウスを用いることが有用である. 抗原提示分子である CD1d の knockout (KO) マウス (CD1dKO マウス) や, TCR の V $\alpha$ 14J $\alpha$ 18 遺伝子の欠損マウス (J $\alpha$ 18KO マウス) が存在するが, 前者は CD1d 拘束性の NKT 細胞がすべて欠損しているのに対し, 後者は iNKT 細胞のみが特異的に欠損している. これらの NKT 細胞欠損マウスを用いた解析により, NKT 細胞は種々の微生物感染に対する免疫応答に重要な役割を及ぼすことが報告されている. たとえば, 細菌においては, CD1dKO マウスまたは J $\alpha$ 18KO マウスで *Pseudomonas aeruginosa*<sup>21)</sup>, *Listeria monocytogenes*<sup>22)</sup>, *Borrelia burgdorferi*<sup>23-25)</sup>, *Streptococcus pneumoniae*<sup>26, 27)</sup>, *Sphingomonas capsulata*<sup>28)</sup>, *Chlamydia pneumoniae*<sup>29)</sup> などによる感染の増悪が報告されており, iNKT 細胞はこれら細菌感染症において, 感染防御に寄与していると考えられる. 一方で, *Legionella pneumophila* 感染では, J $\alpha$ 18KO マウスにおいて感染抵抗性が高いことが報告されており<sup>30)</sup>, iNKT 細胞が感染による炎症を増強することもあると考えられる.

## 真菌症に対する NKT 細胞の役割

真菌感染症における NKT 細胞の役割についての報告は少ない. *Aspergillus fumigatus* 感染や *Cryptococcus neoformans* 感染において, J $\alpha$ 18KO マウスで感染が増悪することが報告されている<sup>31, 32)</sup>. しかし, カン

ジダ感染防御における NKT 細胞の関与については分かっていない. そこで, 筆者らは, 全身性カンジダ症における NKT 細胞の役割を明らかにするために, J $\alpha$ 18KO マウスに *C. albicans* を静脈内投与し, 生存率や臓器内 (肝・腎・脾臓) 菌数やサイトカイン産生を解析した. しかし, J $\alpha$ 18KO マウスと野生型マウスの間に差を認めなかった<sup>33)</sup>. この理由の一つとして, *C. albicans* は NKT 細胞を強く刺激する糖脂質抗原をもっていない可能性が考えられた.

同じ真菌である *C. neoformans* 感染症における NKT 細胞欠損マウスでの検討では, 感染増悪が認められた<sup>32)</sup>. この機序として, 菌体の排除に重要である IFN $\gamma$  産生を主体とした Th1 反応の誘導を, 感染早期に肺に集積した NKT 細胞が増強する, ことが考えられている. カンジダにおいても, IFN $\gamma$  KO マウスではカンジダ感染の増悪をきたすことなどから<sup>34-36)</sup>, IFN $\gamma$  は菌体排除に重要な役割を果たすと考えられている<sup>17)</sup>. これらのことから, 全身性カンジダ症において NKT 細胞が主要な IFN $\gamma$  産生細胞ではないため, カンジダ感染の病態に影響を与えなかった可能性も推察された. しかし, ヒトの全身性カンジダ症や, 粘膜性のカンジダ症における NKT 細胞の役割は不明であり, 今後の検討が必要である.

## 活性化 NKT 細胞と感染について

NKT 細胞が認識する抗原として初めて同定されたのは, 海綿由来の糖脂質を基に合成された  $\alpha$ -GalactosylCeramide ( $\alpha$ GalCer) という単糖型のスフィンゴ糖脂質で, 糖と脂質が  $\alpha$ アノマー結合しているという特徴がある.  $\alpha$ GalCer の脂質部分が CD1d 分子の抗原結合部位の二つの溝に結合し, 糖が表層に露出する. NKT 細胞は, TCR にて CD1d 分子により提示された糖脂質を認識することにより強く活性化され, すみやかに大量の IFN $\gamma$  や IL-4 などのサイトカインを分泌して, 免疫応答を刺激することが知られている<sup>5, 37)</sup>. 感染免疫に関しては, モデル抗原である  $\alpha$ GalCer などの糖脂質による NKT 細胞の活性化でウイルスや細菌の感染が軽快することが報告されてきた (Table 1)<sup>26, 27, 38-44)</sup>.

真菌感染においては, クリプトコックス症において NKT 細胞を活性化すると Th1 反応が増強して, クリプトコックスの排除が促進されることが報告されている<sup>44)</sup>. しかし, カンジダ感染についての報告はない. 筆者らは *C. albicans* 感染における NKT 細胞活性化の影響を解析した. *C. albicans* 感染早期のマウスに,  $\alpha$ GalCer を投与して生存期間を観察したところ, 予想に反して  $\alpha$ GalCer 投与マウスでは生存率が顕著に短縮した. また,  $\alpha$ GalCer 投与マウスでは感染 2 日目の腎臓内菌数の顕著な増加を認め, さらに心臓にも真菌が播種した病理所見が得られたことから, 真菌感染の増悪により播種性カンジダ症を起こしたと考えた<sup>45)</sup>. マウス腎臓の病理所見として, 感染増悪の程度のわりには好中

Table 1. List of pathogenic infections improved with glycolipid treatment and its route of administration

pathogen	route of glycolipid injection	Refs
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	intratracheal	26, 27
<i>Escherichia coli</i>	intraperitoneal	38
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>	intraperitoneal	39
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	intraperitoneal	40
Coxsackievirus B3	intraperitoneal	41
hepatitis B virus	intravenous	42
murine cytomegalovirus	intraperitoneal	43
<i>Cryptococcus neoformans</i>	intraperitoneal	44

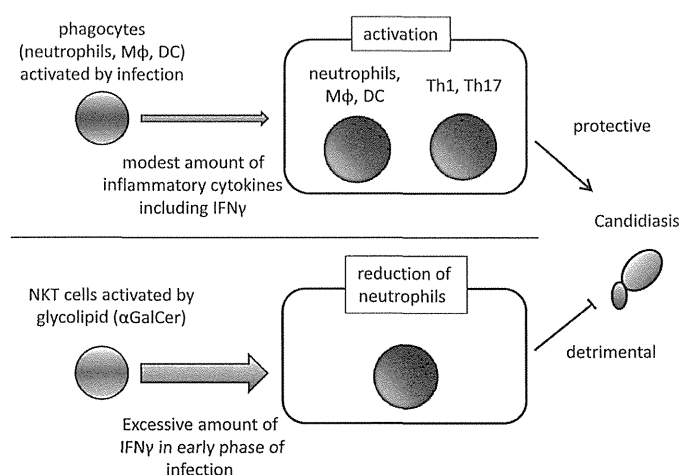


Fig. 1. The different outcome of *Candida albicans* infection induced by IFN $\gamma$

球の集積が少ないため、好中球遊走因子として知られる KC, MIP-2, G-CSF, IL-17 の産生を解析した。しかし、これらは減少していなかったため、別の機序の存在が示唆された。

### IFN $\gamma$ は骨髄の好中球分化を抑制してカンジダ感染を悪化させる

糖脂質投与による NKT 細胞活性化が、*C. albicans* 感染早期の免疫応答にどのような影響を及ぼすのだろうか。筆者らは、糖脂質投与したマウスでは投与翌日には末梢中の IFN $\gamma$  が高値を示したことから、IFN $\gamma$  は NKT 細胞が産生する主要なサイトカインの一つであることから、IFN $\gamma$  に着目して解析を行った。*C. albicans* を感染させて糖脂質を投与しない場合、IFN $\gamma$  KO マウスでは野生型マウスと比較して有意に生存率の低下を認めた。IFN $\gamma$  KO マウスでは、感染後 10 日を過ぎた頃からマウスが死亡したことから、これまでに報告されているように、カンジダ感染に対する獲得免疫の誘導に IFN $\gamma$  が重

要であることが確認された。しかし興味深いことに、糖脂質を投与した場合、野生型マウスとは異なり、IFN $\gamma$  欠損マウスでは糖脂質投与群と非投与群間で有意な生存率の違いを認めなかった<sup>45)</sup>。同様に、IFN $\gamma$  KO マウスでは糖脂質投与群と糖脂質非投与群で有意な菌数の増加を認めなかった。これらの結果から、IFN $\gamma$  がカンジダ感染における獲得免疫においては感染防御に重要な機能をもつのに対し、感染早期における過剰な IFN $\gamma$  はカンジダの排除に負の影響を及ぼすということを示していた。さらに解析した結果、過剰な IFN $\gamma$  により骨髄中の好中球減少が惹起され、末梢血中の好中球減少が引き起こされることが示唆された。

前述のとおり、カンジダ症における獲得免疫において、IFN $\gamma$  は感染防御的に働く<sup>35, 46-49)</sup>。しかし、IFN $\gamma$  がカンジダ感染の増悪に働くという報告もある<sup>50)</sup>。過剰な IFN $\gamma$  は造血幹細胞の分化に障害を及ぼし<sup>51, 52)</sup>、特に著しい好中球減少により、カンジダ感染が増悪したと考えられた (Fig. 1)。

Table 2. Microbial glycolipids

organisms	glycolipid	Refs
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	phosphatidylinositol mannosides	58
<i>Sphingomonas</i> spp.	$\alpha$ -glucuronosylceramides $\alpha$ -galacturonosylceramides	28, 59, 60
<i>Borrelia burgdorferi</i>	$\alpha$ -galactosyldiacylglycerols	61
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$\alpha$ -glucosyldiacylglycerols	62
group B <i>Streptococcus</i>		
<i>Bacteroides fragilis</i>	$\alpha$ -galactosylceramide	63
<i>Helicobacter pylori</i>	cholesteryl $\alpha$ -glucosides	64
<i>Chlamydia muridarum</i>	glycolipid exoantigen	65
<i>Aspergillus</i> spp.	asperamide B	66
<i>Leishmania donovani</i>	lipophosphoglycan	67
<i>Entamoeba histolytica</i>	lipopeptidophosphoglycan	68

### 細菌・カンジダ共感染における真菌感染増悪について

これまで、敗血症の報告の多くは単一病原体によるものであったが、複数病原体による敗血症に関する報告も少なくなく、複数病原体が同時に検出された場合、予後が悪くなることが報告されている<sup>53)</sup>。カンジダと細菌の共感染においても、治療開始後のカンジダ陰性化が得られにくく<sup>54)</sup>、カンジダ単独感染より予後が悪いとされるが<sup>55, 56)</sup>、その理由は明らかではない。私たちは、その病態がNKT細胞やIFN $\gamma$ 産生を介しているのではないかと仮定した。ヒト腸管内常在菌でブドウ糖非発酵性グラム陰性菌の一つであるスフィンゴモナスとカンジダ属の共感染マウスと、カンジダ単独感染群で真菌の排除に関して比較解析を行った<sup>46)</sup>。

細菌・カンジダ共感染群では、カンジダ単独感染群と比較して、腎臓内の真菌数およびIL-6産生が有意に増加し、末梢血中のIFN $\gamma$ が高値を示していた。そして、NKT細胞はIFN $\gamma$ の主要な産生細胞であることが分かった。さらに、IFN $\gamma$ 欠損マウスやJ $\alpha$ 18KOマウスでは、細菌共感染による真菌排除の有意な低下を認めなかったことから、細菌感染におけるNKT細胞の活性化およびIFN $\gamma$ 産生が真菌排除の低下をもたらしていると考えられた。スフィンゴモナスのみならず、同じブドウ糖非発酵性グラム陰性菌に属する緑膿菌の共感染においても、カンジダ単独感染に比較して真菌排除の低下を認めた。細菌との共感染でNKT細胞が活性化され、過剰のIFN $\gamma$ が誘導される状況では、カンジダ感染が増悪する可能性がある。また、緑膿菌に代表されるブドウ糖非発酵性グラム陰性菌は、多くの抗菌薬に耐性を示す。このような細菌と真菌の共感染では、感染が重篤化する可能性が示唆される。

ヒトにおいても、侵襲性真菌感染症の発症に先行する細菌感染がリスクとなる可能性が報告されている<sup>57)</sup>。

本研究のマウスモデルにて認められた真菌感染増悪機構は、ヒトの侵襲性真菌感染症の発症または増悪機序を理解するうえで有用な知見となる可能性が示唆される。

### おわりに

スフィンゴモナス以外に、NKT細胞を活性化させる病原体としては、*Streptococcus pneumoniae*, group B *Streptococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis*, *Aspergillus* spp.などが知られている (Table 2)<sup>28, 58-68)</sup>。糖脂質抗原によるNKT細胞の活性化が菌体排除の促進に導くのか、または、感染増悪に導くのか、その機序が解明されることを期待したい。

### 謝 辞

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金 (H25-新興-指定-001, H25-新興-指定-002, H25-新興-一般-006), 武田科学振興財団, 持田記念医学薬学振興財団, 加藤記念バイオサイエンス振興財団の助成を受けた。

### 文 献

- 1) Kinjo Y, Ueno K: *i*NKT cells in microbial immunity: recognition of microbial glycolipids. *Microbiol Immunol* 55: 472-482, 2011.
- 2) Kinjo Y, Kitano N, Kronenberg M: The role of invariant natural killer T cells in microbial immunity. *J Infect Chemother* 19: 560-570, 2013.
- 3) Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M: The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5: 405-417, 2007.
- 4) Bendelac A, Savage PB, Teyton L: The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25: 297-336, 2007.