

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

Hib、肺炎球菌、HPV 及びロタウイルスワクチンの各ワクチンの有効性、安全性並びにその投与方法に関する基礎的・臨床的研究

平成 26 年度 分担研究報告書

侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株の解析、並びに 細菌性髄膜炎疑い症例由来培養陰性髄液中の微生物遺伝子解析

研究分担者 柴山恵吾 国立感染症研究所 細菌第二部 部長

研究要旨

小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症のアクティブサーベイランスの一環として、症例由来 *Haemophilus influenzae* 臨床分離株における莢膜型別解析を *H. influenzae* 莢膜 b 型(Hib)ワクチン導入以前から継続して実施している。Hib ワクチン定期接種開始から 2 年目となる平成 26 年度は、4 症例由来 4 株の Non-typable *H. influenzae* (NTHi) が分離され、Hib ならびに他の莢膜型株は分離されなかった。

細菌性髄膜炎疑い症例由来髄液中の細菌遺伝子の網羅的解析手技について検討した。細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域の約 550bp 配列を nested-PCR 法にて増幅後に MiSeq を用いて、300bp 長の Paired-end 法で配列を解読した。得られた配列を細菌の 16S rRNA 遺伝子データベースで検索し相同性の高い read 数の割合を調べた結果、複数の検体で *Haemophilus* 属、*Streptococcus* 属等の遺伝子が高い割合で検出された。これらの検体は、PCR 法等においても *H. influenzae* や *S. pneumoniae* 等が検出された検体であり、既存の種特異的検出法と今回実施した網羅的解析法間で同等の結果が得られた。また、既存の種特異的検出法では検出できなかった *Staphylococcus* 属等の遺伝子が髄液検体から検出され、本手法の広範な起因菌のスクリーニングへの有用性が示唆された。

研究協力者

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

A. 研究目的

侵襲性インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)感染症についてのアクティブサーベイランスを行っている。とりわ

け、*H. influenzae* 莢膜 b 型(Hib)ワクチン導入前の平成 19(2007)年以降、研究班の調査対象となる 9 県において分離菌株の莢膜型別解析を行い、Hib ワクチンの有効性、ならびにワクチンで予防できない型の菌株の出現を監視している。侵襲性インフルエンザ菌感染症は、平成 25(2013)年度以降、第 5 類感染症として全数把握の対象となったものの、病原体サーベイランス体制の全国整備が不十分である。殊に、Hib ワクチンの有効性評価、ならびに新たな莢膜型株による侵襲性感染症の台頭を監視するために重要な分離株の莢膜型情報収集が得られていない。このため、本研究では、Hib ワクチン定期接種の有効性評価ならびに新たな莢膜型株の監視を目的として、調査対象 9 県における分離株の莢膜型別解析を実施した。

加えて、髄膜炎の起因微生物同定の精度を向上させることを目的に、遺伝子解析法の改良を行った。平成 25 年度以降、第 5 類感染症として、侵襲性インフルエンザ菌感染症、侵襲性肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 感染症、侵襲性髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) 感染症、ならびに、これら 3 菌種が分離されない細菌性髄膜炎がある。感染症発生動向調査報告において、起因菌不明の細菌性髄膜炎疑い症例も多い。これらは、臨床で実施される通常の細菌培養検査陰性の検体である。そこで、当該研究班で解析依頼された細菌性髄膜炎疑い症例の培養陰性髄液中の細菌遺伝子の網羅的解

析手法について検討した。

B. 研究方法

調査対象地域、対象疾患と対象菌種：調査対象地域は、福島、新潟、千葉、三重、岡山、高知、福岡、鹿児島、沖縄の 9 県とし、対象疾患は、小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症とした。対象菌種は、症例の髄液、血液等から分離された *H. influenzae* 菌株とした。供試髄液等については、後述する。

調査期間：

調査を開始した 2007 年から 2015 年 1 月までについての結果を報告する。

菌株の莢膜型別：

抗血清存在下での菌体凝集法による莢膜型別解析：インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いた菌体凝集法により解析した。a, b, c, d, e, f 株に対する抗血清で凝集しない株を Non-typable *H. influenzae* (NTHi) とした。

菌株の莢膜関連遺伝子の増幅による莢膜型別：a~f 型特異的莢膜遺伝子の有無について、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて解析した。菌株からの DNA 抽出には、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用い、得られた DNA を鋳型にし Premix Taq (Takara) を用いて遺伝子増幅を行った。莢膜型関連遺伝子の検出として、*H. influenzae* *bexA* 遺伝子、ならびに a-f 特異的遺伝子 (Falla TJ *et al.* J. Clin. Microbiol. 32: 2382-2386, 1994) をもと

に、一部のプライマー配列を改良して実施し、ならびに *bexB* 遺伝子に対する PCR 法 (Davis G et al. J. Clin. Microbiol. 49: 2594-2601, 2011) を実施した。

β-lactamase 活性試験 : ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」(日水製薬)または、セフィナーゼディスク(ベクトン・ディッキンソン)を用いて、分離株の β-lactamase 産生性を調べた。

薬剤感受性試験 : E-test (AB BIODISK) を用い、試験用培地には Haemophilus Test Medium (HTM, ベクトン・ディッキンソン)を用いた。薬剤としてアンピシリン(ABPC)、アンピシリン/スルバクタム(ABPC/SBT)、ピペラシリン(PIPC)、メロペネム(MEPM)、セフォタキシム(CTX)、セフトリアキソン(CTRX)を用いた。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の微量液体希釈法の感受性等の基準を参考値とした。

細菌性髄膜炎疑い患者由来の髄液等中の細菌遺伝子解析方法 :

対象 9 県における細菌性髄膜炎疑い症例由来の髄液 33 検体、硬膜下膿瘍ならびに脳膿瘍のドレナージ液 2 検体の計 35 検体についてライブラリーを作製し、うち、16 検体について MiSeq による配列解析を実施した。

髄液検体からの核酸抽出は、以下の方法で実施した。DNA は、QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出し、DNA 増幅の有り、無しの 2 種類の鋳型を用意した。DNA 増幅には、random hexamer を用い 30

にて 8 時間増幅した (GenomiPhi, GE Healthcare)。RNA は、Lysozyme 処理後、RNeasy kit (QIAGEN) で抽出し、DNase 処理を Turbo DNA-free (AMBION) で行った。得られた RNA は、random hexamer を用いて double-strand cDNA に変換した (SuperScript choice system for cDNA synthesis, Life Technology)。

細菌共通領域である 16S rRNA 遺伝子の可変領域 V3-V4 を含む約 550bp 長の領域を PCR 法で増幅した。以下の二通りのライブラリー作製法について検討した : 1) DNA 増幅無しの鋳型を nested-PCR 法で増幅する作製法、2) DNA 増幅有りの鋳型を single-PCR 法で増幅する作製法。加えて、一部の検体で cDNA の鋳型を single-PCR で増幅する作製法についても検討した。

使用した PCR プライマー配列は、以下のとおり。nested-PCR 1 回目 PCR 用、10F >GTT TGA TCC TGG CTC A、1050R >CAC GAG CTG ACG AC (Sasaki T et al. PDF J 51: 242-247) ; nested-PCR 2 回目または single-PCR 用、16SV3_V4_illumina_Forward >TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG、16SV3_V4_illumina_Reverse >GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C、W: A/T、V: A/C/G、H: A/C/T (Illumina)。

得られた PCR 産物に、特異配列からなる Index 配列を 2 個付加し、MiSeq (Illumina) を用いて、300bps 配列解読

用試薬で Paired-end 法にて配列を決定した。各 read 配列を Fastq に変換後、細菌の 16S rRNA 遺伝子データベース (GreenGeens) と照合させ、細菌の属ならびに種名を予測した。

(倫理面への配慮) 菌株ならびに髄液の解析については、「国立感染症研究所 ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会」の承認を得て実施した。本研究のために新たに検体を採取することはなく、臨床診断目的で採取された検体の一部をインフォームドコンセントを得て解析に用いた。診療情報は匿名化され、対照表は協力医療機関側において厳重に管理された。

C. 研究結果

侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株の解析：

感染症発生動向調査における侵襲性インフルエンザ菌感染症の全国報告数は、2014年の1週から52週までの累計報告数105例のうち、5歳未満が12例(11%)、2015年の1週から3週までの累計報告数14件のうち、5歳未満が1例(7%)であった (Infectious Diseases Weekly Report Japan, IDWR)。このうち、今年度、本研究班の対象9県において分離された菌株数は、2014年に3症例から3株、2015年1月までで1症例から1株の4株であった。診断名は、髄膜炎0例、菌血症を伴う肺炎2例、菌血症2例であった。

今年度の分離菌株の莢膜型別ならびに薬剤感受性試験結果を表1に示す。莢膜型解析において、Hibの検出0株、他型の莢膜株の検出0株、Non-typable *H. influenzae* (NTHi)4株と同定された。薬剤感受性に関しては、1株が β -lactamase陽性を示した。

表2ならびに図1に、2007年以降の対象9県の小児侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来 *H. influenzae* 株における莢膜b型株(Hib)、他の莢膜型株、Non-typable *H. influenzae* の検出割合の年次推移を示す。Hibワクチン定期接種の開始1年目となる2014以降、Hibの分離は無い。一方、他の莢膜株の増加は、現時点では確認されていない。分離株は、いずれもNTHiである。

表3に、薬剤感受性試験結果結果を示す。表に示さないものの、ピペラシリンについてもE-test値の高い株は、定期接種開始後に分離されていない。また、 β -lactamase陽性株検出の割合は、Hibワクチンの開始前、任意接種開始後、任意接種開始後(全国公的補助開始後)、定期接種開始後の4期間で18.1%(13/72株)、10.1%(16/158株)、10.5%(11/105株)、12.5%(1/8株)であり、定期接種開始後も大きな変化は見られなかった。

細菌性髄膜炎疑い症例由来培養陰性髄液の細菌遺伝子の網羅的解析：

髄液等における細菌遺伝子の網羅的解析の手技の検討を行った。一つ目の検討

事項として、配列を解読するためのライブラリー作製法について検討した。検証法として、昨年度報告した種特異的 real-time PCR法を用いて種特異的な細菌遺伝子が検出されている髄液等5検体（既知の検体）と、種特異的解析結果が陰性であった2検体（未知の検体）の合計7検体を用いて網羅的解析を実施し、両方法で同等の結果が得られるかについて検討した。結果、1) DNA増幅無しの鋳型を二段階nested-PCR法で増幅したライブラリーでは、既知の検体中4/5検体で、また、未知の検体中1/2検体で主要な細菌属の推定が可能であった。一方、2) DNA増幅有りの鋳型をsingle-PCR法で増幅したライブラリーについては、既知の検体中1/5検体、また未知の検体中0/2検体で主要な細菌属の推定が可能であった。

また、cDNAを鋳型にsingle-PCRを実施したライブラリーは、供試した5検体中PCR産物が得られたのは1検体のみであり、配列解析結果は不明瞭であった。

二つ目の検討事項として、本手技による細菌分類上の検出レベルについて検討を行った。属レベルの検出においては、図2に示すように、*Streptococcus*属や*Haemophilus*属の遺伝子との相同性を示すread数の割合が96%あるいは33%と高い髄液検体があり、これらの髄液は、16S rRNA遺伝子を検出するPCR法の解析において、*S. pneumoniae*あるいは、*H. influenzae*が陽性であった。一方、種レベルでは、*Streptococcus*属の*S.*

pneumoniae, *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis*, *S. infantis*, *S. tigurinus*が混在して検出された。複数の検体で*S. tigurinus*がdominantに検出された。*Haemophilus*属においては、*H. influenzae*, *H. aegyptius*が検出された。

三つ目の検討事項として、既知の種特異的PCR法等においてターゲットにならなかった菌種の検出について検討した。基礎疾患に形態学的奇形があり、複数の細菌種の遺伝子がPCRで検出された髄液検体については、MiSeqによる解析で新たに*Staphylococcus*属の遺伝子が検出された。また、既存のPCR法では起因菌不明であった別の髄液検体1例で*Acinetobacter*属の遺伝子が検出された。

臨床検体中に混入したと考えられる土壌細菌等の環境菌（*Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*等）の遺伝子が多い検体、あるいは、*Pseudomonas*, *Sphingomonas*等の遺伝子が多い検体については、解析結果は不明瞭であった。ただし、このような検体においても大腸菌を含む*Escherichia*属は検出されなかったことから、大腸菌性髄膜炎の診断の妨げにはならないことが予想された。

D. 考 察

Hib 定期接種開始から2年目となる今年度のHib検出は0株であり、かつ、HiaやHif等のワクチンでカバーできない莢膜株の分離も対象9県においては、確認されなかった。とはいえ、これまで、対象9県以外において、少なくとも髄膜炎2

症例を含む 3 症例の Hif による小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症が報告されている(2012 年に髄膜炎 1 例、神奈川県、2013 年に髄膜炎 1 例、愛知県、ならびに菌血症 1 例、香川県、平成 25 年度報告書を参照)。本感染症が全数把握疾患となった現在、全症例の分離株の莢膜型別解析の実施体制の整備がサーベイランスにおける急務である。

他の莢膜型の株の病原性については、実験動物(乳飲みラット)を用いた *H. influenzae* 莢膜株 Hia, Hib, Hic, Hid, Hie, Hif の病原性比較解析の解析報告がある(*Infect Immun* 35: 95-104, 1982)。暴露動物の半数が感染する菌量を示す ED50 の値は、Hia (3 株) の ED50 の値は 1.2 CFU から 100 CFU (コロニー形成ユニット) であり、Hib (5 株) の ED50 値 1 CFU から 230 CFU と同等の病原性が報告されている。Hic, Hid, Hie, Hif は、ED50 値が 10^3 CFU から 10^8 CFU と病原性が低いものの、実験に供試されたのは、莢膜型毎に数少ない株数のみであること、継代による莢膜発現低下も起こりうることから、実験室内で病原性が低いとされた他の莢膜型株についても監視が必要である。実際、Hib ワクチン導入後の諸外国において、Hia (北米等) ならびに Hif や Hie (イングランドとウェールズ) 等による侵襲性インフルエンザ菌感染症が発生し増加傾向を示している (*Lancet Infect Dis* 14: 70-82, 2014; *Emerging Infect Dis* 18: 725-732, 2012)。今後も継続した監視を

行い、Hia や Hif 等の分離株を収集して病原性解析の資材とする必要がある。

第二のテーマである髄液中の細菌遺伝子の網羅的解析について、今年度は、手技の確立を検討した。肺炎球菌やGBSを含む *Streptococcus* 属、インフルエンザ菌を含む *Haemophilus* 属、ブドウ球菌等を含む *Staphylococcus* 属、*Acinetobacter* 属等を検出した。種レベルの解析結果については、特に *Streptococcus* 属において検討課題が残った。2012年に新しく種として提唱された *S. tigurinus* は、*S. pneumoniae* と系統的に近縁で、かつ、髄膜炎、心内膜炎、脊椎椎間板炎といった侵襲性感染症の起因菌となることが報告されている (*Int J System Evol Microbiol* 62: 2941-2945)。今回の解析における *S. tigurinus* 陽性検体については、*S. tigurinus* 特異的遺伝子検出を検討する予定である。一方、*S. pneumoniae*、*S. pseudopneumoniae*、*S. mitis* 間の 16S rRNA 遺伝子の相同性が 99% と高いことから、これらの菌については、本解析法でのスクリーニングに加えて、本研究班で使用している *S. pneumoniae* 特異的 *lytA* 遺伝子検出用 real time-PCR 法の解析との組み合わせが必要となる。

今回の供試検体には含まれなかったが、今回検討した手法は、臨床における通常の培養法で培養陰性となる *Mycoplasma* 属、*Listeria* 属等の遺伝子も検出可能である。ただし、*Mycoplasma pneumoniae* 性髄膜炎・脳炎では髄液中にマイコプラズマが

存在する直接機序に加えて、マイコプラズマとヒト糖脂質の抗原類似により抗ガラクトセレブロシド抗体や抗ガングリオシド抗体が産生されて脳炎等を惹起する間接機序がある。間接機序による症例では、髄液中から菌や菌遺伝子が検出されないことから、本方法は、マイコプラズマの直接機序に限って有用となる。

細菌遺伝子を増幅する今回の方法を用いても、髄液中の起因菌遺伝子の量が少なく、環境菌等の遺伝子が多い検体では、解析は困難である。今回、比較を行った検体においては、PCR法等で種特異的遺伝子が検出された検体では、環境菌混入の影響は、少ないことが示唆された。種特異的検出法との組み合わせにより、起因菌推定の精度を上げることに役立つ手法であると考えられた。今回示した nested-PCR法によるライブラリー作製法とMiSeqによる配列解析は、操作が簡便な上に自動解析結果(図2)が表示されることから、臨床の検査室での実施も可能だと考えられる。感染症発生動向調査における「PCR法による病原体遺伝子の検出」、「核酸検出(PCR,LAMP等)」(調査票記載項目)の精度向上に役立つ手技であることが示唆された。

E. 結論

平成 26 年度に小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例から分離された 4 株は、いずれも NTHi であり、Hib ならびに他の莢膜型を有する株は、対象 9 県において

分離されなかった。

髄膜炎症例由来髄液等における細菌の網羅的解析手技を確立した。細菌の属レベルの推定に有用で、既存の方法との組み合わせにより、病原体検出の精度向上が図れることが示唆された。

F. 健康危機情報

とくになし

G. 研究発表

1. 論文発表

佐々木裕子、他、小児の侵襲性感染症患者から分離された *Haemophilus influenzae* の莢膜型別解析について：国内外の動向：Infectious Agents Surveillance Report (IASR) 35: 231-232, 2014

2. 学会発表

佐々木裕子、久保田眞由美、柴山恵吾、細菌性髄膜炎疑い患者由来の髄液における微生物遺伝子検出手法の検討、第 9 回日本ゲノム微生物学会、2015 年 3 月 6-8 日、神戸

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1、平成 26 年度に対象 9 県において小児の侵襲性感染症患者より分離された *Haemophilus influenzae* 菌株の解析結果

莢膜型別解析結果

菌株番号	入院日	年齢	診断名	検体	莢膜型
lha402	2014/4/14	1歳2ヶ月	肺炎 菌血症	血液	NTHi *
lha403	2014/4/17	1歳0ヶ月	菌血症	血液	NTHi *
lha404	2014/7/13	1歳5ヶ月	菌血症	血液	NTHi *
lha405	2015/1/5	3ヶ月	肺炎 菌血症	血液	NTHi *

* 抗血清存在下での菌凝集反応ならびに遺伝子解析 a-f, bexA, bexBいずれも陰性

薬剤感受性試験結果

β -lactamase	Ampicillin	Ampicillin/ Sulbactam	Piperacillin	Meropenem	Cefotaxim	Ceftriaxone
陰性	0.25	0.25	0.016	0.064	0.016	0.0006
陰性	1.5	1.5	0.064	2	0.5	0.25
陰性	2	2	0.023	0.25	0.75	0.25
陽性	256	16	32	1	1.5	0.5

表 2、対象 9 県の小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来 *Haemophilus influenzae* 株における莢膜 b 型株(Hib)、他の莢膜型株*、Non-typable *H. influenzae* の検出割合の年次推移

(*対象 9 県における分離例なし)

	接種開始前	接種開始前	任意接種開始後	任意接種開始後	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)	任意接種開始後 (ワクチン緊急接種事業開始後)、定期接種開始後	定期接種開始後	定期接種開始後
年 (入院時)	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015 (1月)
b型	27/27 (100%)	58/60 (96.7%)	60/60 (100%)	87/90 (96.7%)	37/39 (94.9%)	10/19 (52.6%)	1/2 (50%)	0/4 (0%)	0/1 (0%)
非b型 (Non-typable <i>H. influenzae</i>)	0/27 (0%)	2/60 (3.3%)	0/60 (0%)	3/90 (3.3%)	2/39 (5.1%)	9/19 (47.4%)	1/2 (50%)	4/4 (100%)	1/1 (100%)

症例数による集計結果を示す

表3、対象9県の小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来の *Haemophilus influenzae* 臨床分離株における供試薬剤に対する感受性株*の割合と株数

期間	接種開始前		任意接種開始後		任意接種開始後(ワクチン緊急接種事業開始後)		定期接種開始後	
	2007.6	2008.11	2008.12	2010.12	2011.1	2013.3	2013.4	2015.1
薬剤								
Ampicillin	56.9%		50.0%		49.5%		37.5%	
	(41/72)		(79/158)		(52/105)		(3/8)	
Ampicillin/ Sulbactam	56.9%		48.0%		48.6%		37.5%	
	(41/72)		(76/158)		(51/105)		(3/8)	
Piperacillin	CLSI 基準値情報なし							
Meropenem	100%		94.3%		95.2%		75%	
	(72/72)		(149/158)		(100/105)		(6/8)	
Cefotaxim	100%		99.3%		99.0%		100%	
	(72/72)		(157/158)		(104/105)		(8/8)	
Ceftriaxone	100%		100%		100%		100%	
	(72/72)		(158/158)		(105/105)		(8/8)	

図1、対象9県の小児の侵襲性インフルエンザ菌感染症症例由来 *Haemophilus influenzae* 株における莢膜 b 型株(Hib)、他の莢膜型株*、Non-typable *H. influenzae* の検出割合の年次推移
 (*対象9県における分離例なし)

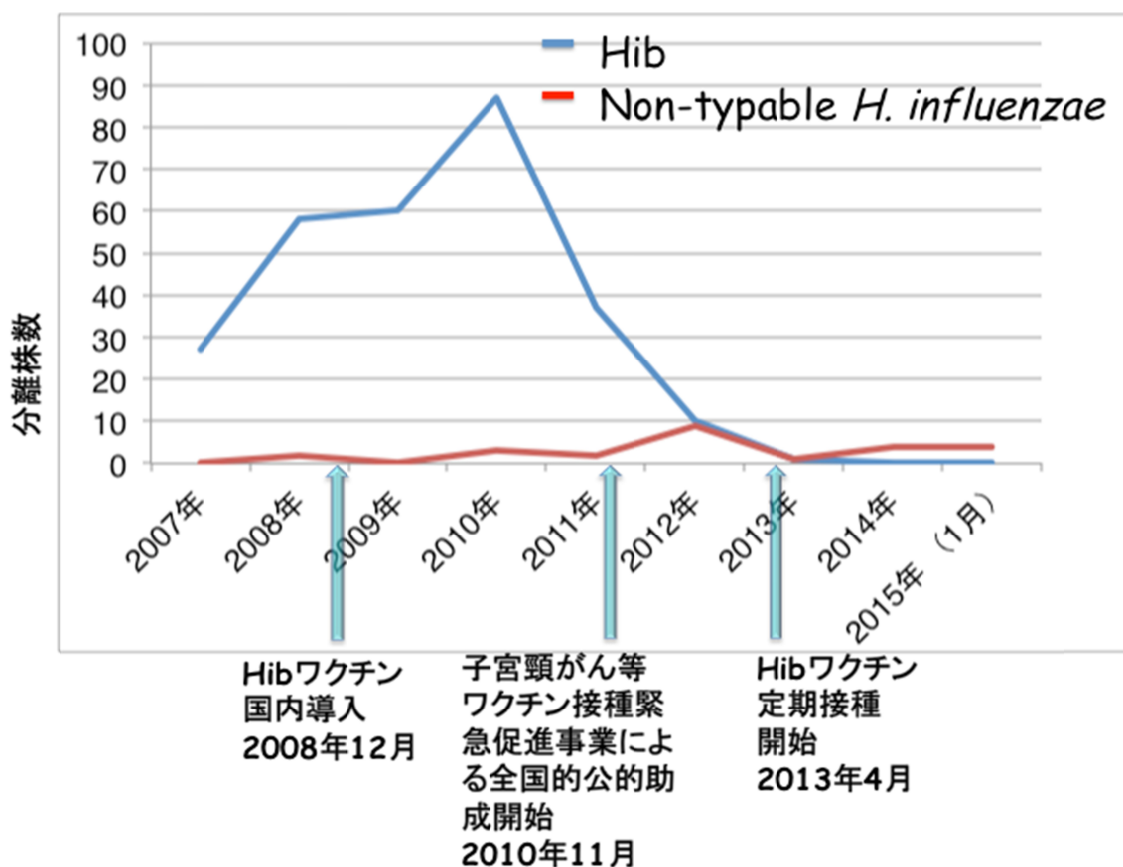
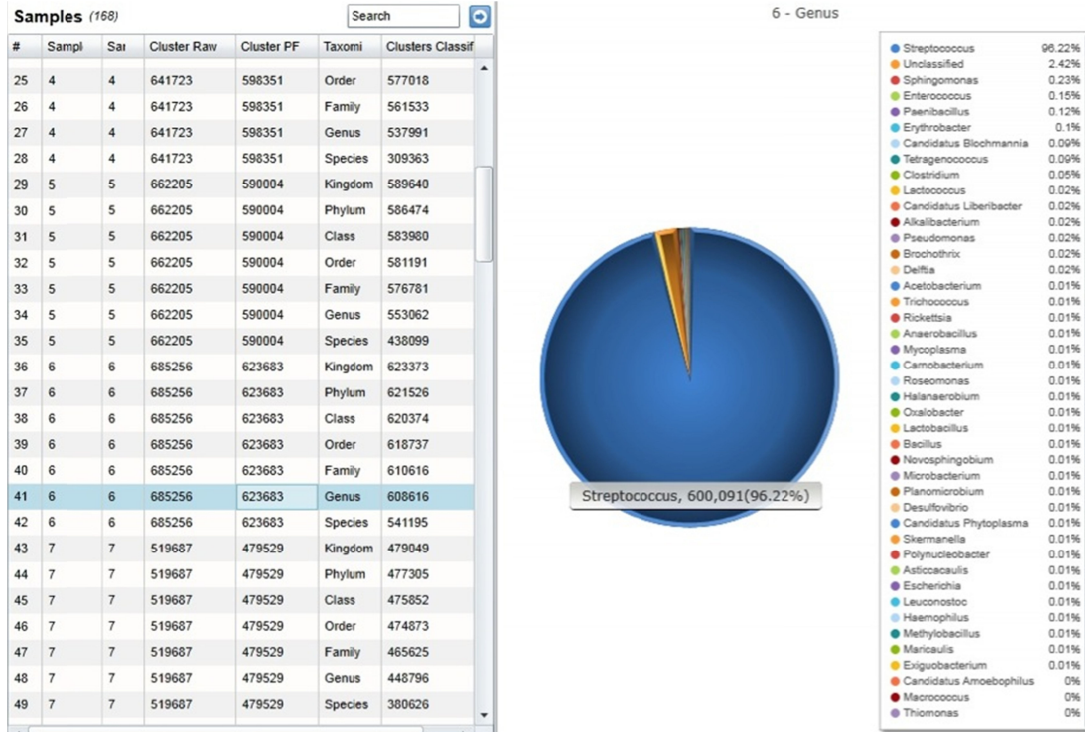


図2、細菌性髄膜炎疑い症例の細菌培養陰性髄液中の細菌遺伝子の網羅的解析の結果例

A. *Streptococcus*属細菌と相同性が高い read が96%を占める髄液検体(三重県)



B. *Haemophilus*属細菌と相同性が高い read が33%を占める髄液検体(鹿児島県)

