

図2. Time-scaled evolutionary tree (MCMC法)

## 2. 上五島地域における2014/15シーズンのインフルエンザウイルスAH3型の分子疫学

### a) 臨床的特徴

対象症例は64例（男性34例、女性30例）で、年齢は、 $25.3 \pm 24.6$ 歳であった。その中には、死亡例（1例）、呼吸不全での入院例（1例）も含まれていたが、ほとんどは入院を必要としない軽症例であった。

### b) 時系列系統解析結果

分子系統解析の結果、上五島の2014/15シーズンでは、2系統（Linage1あるいは2）のAH3が流行していたことが明らかとなった（図2）。また、各系統の患者在住地域、時系列患者発生データおよび検出されたAH3の塩基配列を詳細に解析した結果、島内での時系列的な伝播が以下のように推定された。まず、10月下旬に青方地区からLinage1由来株の流行が始まり、島南部にまで伝播し、その流行はいったん11月上旬には終息した。しかし、その後12月中旬から、10月の流行原因となった株とは遺伝学的に異なるLinage1由来のAH3型が島中央部を中心に流行した。さらに、12月下旬以降は上述した2つの株と遺伝学的に異なる株が流行した。

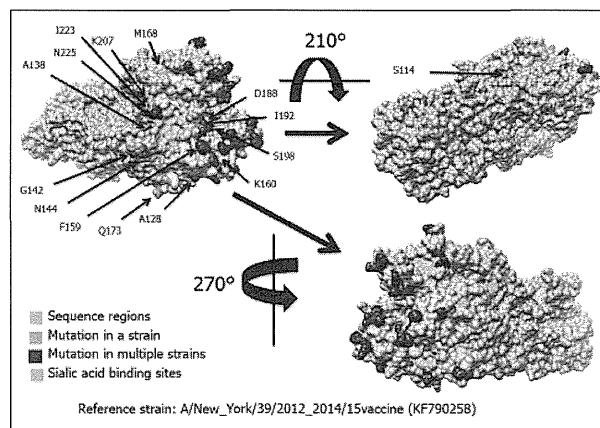


図3. Hemagglutinin structure of influenza virus subtype AH3

加えて、*HA* 遺伝子の解析領域における進化速度は $1.04 \times 10^{-2}$  substitution/site/yearであり、極めて速い速度で進化していることが明らかになった。また、本研究において検出された株は、当該シーズンのAH3ワクチン株と比較して、多数のアミノ酸置換を認めていることが明らかとなった（図3）。なお、解析領域において、positive selection siteはなかった。

## D. 考察

### 1. 成人の重症肺炎サーベイランス構築

本研究において、入院を必要とした成人市中肺炎症例の61.8%から病原微生物が検出された。このうち、細菌単独例は39.5%で認められ、中でも肺炎球菌が最も多く検出された。これは過去の国内外の報告とも一致していた<sup>2)</sup>。また、ウイルス単独検出群は全体の10.5%を占め、HMPVが最も多く検出された。HMPV、RSV、InfV-A、HPIVなどの呼吸器ウイルスは、単独でも成人市中肺炎の原因になり得ると考えられた。CMVはHMPVに次いで多く検出されたが、不顕性感染の可能性もあるため、肺炎への関与は判断し難い。また、今回検出された主な呼吸器ウイルス（HMPV、RSVおよびHRV）は、多様なサブグループおよび遺伝子型を示していた。

PSIによる重症度評価では、4群間に統計学的有意差は認められなかった。しかし、ウイルス検出患者群（ウイルス単独検出群+ウイルス・細菌混合検出群）において、細菌単独検出群に比べ、呼吸不全の合併頻度が有意に高かった。さらに、統計学的有意差には至らなかったものの、ウイルス・細菌混合検出群では細菌単独群より、人工呼吸器治療症例が多く認められた。これらの結果から、細菌性肺炎にウイルス感染を合併することは、呼吸不全を重症化させる可能性が示唆された。Johanssonらは、ウイルス・細菌混合検出患者が、細菌単独検出患者よりも有意に頻呼吸を呈し、酸素投与を必要とする期間が長いことを報告しており<sup>8)</sup>、今回の我々の結果を支持するものと考えられた。

今後、さらに調査を継続し、検体数を増やして解析する必要がある。また、外来治療が可能な市中肺炎軽症例にも対象を広げることも検討が必要であると思われた。

### 2. 上五島地域における2014/15シーズンのインフルエンザウイルスAH3型の分子疫学

本研究では、上五島町における2014/15シーズンの詳細なAH3型流行の分子疫学解析を行った。その結果、2系統のAH3型のインフルエンザウイルスが、時系列的に特徴のある流行をしていたことが明らかになった。また、HI遺伝子の解析領域における進化速度は非常に速く、多数のアミ

ノ酸置換を起こしながら、遺伝学的に多様な株が島内で伝播していたことも明らかになった。

本研究期間においては、遺伝学的に異なる2系統のAH3型の流行が認められた。Linage1の流行は10月下旬から始まり、3月まで続いたのに対し、Linage2の流行は12月下旬に始まり2月上旬には収束していた。検出数もLinage1が多く、このシーズンのAH3型の流行はLinage1がdominant typeと考えられた。また、短期間で、複数の塩基置換・アミノ酸置換を起こしながら、dominant typeを形成し、伝播・流行していくことが明らかとなった。

AH3の伝播は青方地区から始まり、地理的に近い地域に順次伝播していた。今回の検討における初発患者は、青方地区在住であり発症2日前まで長崎に出かけていた。そのため長崎から持ち込まれた株が青方地区で伝播し、上五島でのインフルエンザAH3の流行が開始したものと推定された。その後の他地域への伝播は、ヒトの移動・交流に伴い生じたと推定されるが、個別の伝播追跡は今回の検討では困難であった。

次に、今回の解析株におけるHI遺伝子の進化速度は $1.04 \times 10^{-2}$  substitutions/site/yearであった。これは他の呼吸器ウイルス（RSウイルス主要抗原）の主要抗原の進化速度と比較しても非常に速いことが示唆された<sup>9-11)</sup>。また、当該年度のワクチン株と比較して複数の非同義塩基置換によるアミノ酸置換も認められた。

加えて、解析症例の中に2例の重症例（死亡例1例、呼吸不全での入院例1例）が含まれていた。それぞれの患者から検出された株はともに軽症例を多数含むLinage1に属しており、遺伝学的な特徴は認められなかった。

## E. 結論

### 1. 成人の重症肺炎サーベイランス構築

入院を要した成人市中肺炎患者の約22%から呼吸器ウイルスが検出された。ウイルス単独検出は全症例の約10%を占め、HMPVやRSVは単独でも成人市中肺炎の原因になり得ると考えられる。また、成人市中肺炎におけるウイルス感染は、呼吸不全に関与することが示唆された。

## 2. 上五島地域における2014/15シーズンのインフルエンザウイルスAH3型の分子疫学

2014/15シーズンの上五島地域におけるインフルエンザウイルスAH3型 (hemagglutinin 1 (H1) 遺伝子) の系統解析を基盤とした詳細な分子疫学解析を行った。その結果、調査シーズンに流行したAH3型は、2系統に分類された。また、各系統の株の詳細な解析により、各地域で流行していたAH3型の時系列的な伝播が明らかになった。さらに、H1遺伝子解析部位の進化速度はきわめて速く、当該シーズンに使用されていた同亜型のワクチン株のH1蛋白に複数のアミノ酸置換が見られた。以上のことから、調査期間中、上五島地域においては、2系統の遺伝学的に多様なAH3型が流行していたことが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Saraya T, Kurai D, Ishii H, Ito A, Sasaki Y, Niwa S, Kiyota N, Tsukagoshi H, Kozawa K, Goto H and Takizawa H. Epidemiology of virus-induced asthma exacerbations: with special reference to the role of human rhinovirus. *Front Microbiol.* 2014; 5: 226.
- 2) Saraya T, Kurai D, Nakagaki K, Sasaki Y, Niwa S, Tsukagoshi H, Nunokawa H, Ohkuma K, Tsujimoto N, Hirao S, Wada H, Ishii H, Nakata K, Kimura H, Kozawa K, Takizawa H, Goto H. Novel aspects on the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia and therapeutic implications. *Front Microbiol.* 2014; 5: 410.
- 3) Kurai D, Sasaki Y, Saraya T, Ishii H, Tsukagoshi H, Kozawa K, Ryo A, Ishioka T, Kuroda M, Oishi K, Takizawa T, Kimura H. Pathogen profiles and molecular epidemiology of respiratory viruses in Japanese inpatients with community-acquired pneumonia. *Respiratory Investigation* in press.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 参考文献

- 1) Mandell LA et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Inf Dis.* 2007; 44: S27-72.
- 2) Lim WS et al. BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults. *Thorax.* 2009; 64: 1-55.
- 3) Luchsinger V et al. Community-acquired pneumonia in Chile: the clinical relevance in the detection of viruses and atypical bacteria. *Thorax.* 2013; 68(11): 1000-6.
- 4) Atmar RL: Influenza Viruses; in Murray PR, et al (eds): *Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY*, 9th ed. Washington, ASM press, 2006, pp 1340-51.
- 5) Wright PE, et al: Orthomyxoviruses; in Knipe DM, et al (eds): *Fields Virology*, ed 5, revised. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pp 1691-740.
- 6) Fine MJ et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N Engl J Med.* 1997; 336(4): 243-50.
- 7) Saitoh M et al. Molecular evolution of HA1 in influenza A (H3N2) viruses isolated in Japan from 1989 to 2006. *Intervirology.* 2008; 51(6): 377-84.
- 8) Johansson N et al. Clinical impact of combined viral and bacterial infection in patients with community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis.* 2011; 43(8): 609-15.
- 9) Hirano E et al. Molecular evolution of human respiratory syncytial virus

- attachment glycoprotein (G) gene of new genotype ON1 and ancestor NA1. *Infect Genet Evol.* 2014; 28: 183–91.
- 10) Nagasawa K et al. Molecular evolution of the hypervariable region of the attachment glycoprotein gene in human respiratory syncytial virus subgroup B genotypes BA9 and BA10. *Infect Genet Evol.* 2015; 36: 217–23.
- 11) Kimura H et al. Molecular evolution of haemagglutinin (H) gene in measles virus. *Sci Rep.* 2015; 5: 11648.

## 成人侵襲性肺炎球菌感染症由来株の細菌学的解析に関する研究

研究分担者：常 彬（国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官）

研究協力者：前川 純子（国立感染症研究所 細菌第一部）

**研究要旨** 2013年7月から2015年12月現在まで、本研究班に含まれる10道県で発症した15歳以上成人の侵襲性肺炎球菌感染症464例（うち髄膜炎82症例）から分離された458の肺炎球菌（臨床検体3件を含む）の解析を行った。そのうち、沈降13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）および23価肺炎球菌ワクチン（PPSV23）に含まれる血清型の分離率はそれぞれ45.2%と67.9%であった。血清型3型肺炎球菌による症例は80例で、最も多かった。PCV13とPPSV23のいずれにも含まれない血清型肺炎球菌の分離率は30.3%で、血清型の内訳は15A（27例）、23A（27例）、6C（23例）、35B（21例）、34（10例）、24F（9例）、38（8例）、15C（5例）、7C（3例）、6D（2例）、18B、13、31および37型はそれぞれ1例であった。小児用沈降7価肺炎球菌コンジュゲートワクチン（PCV7）に含まれる血清型（4、6B、9V、14、18C、19F、23F）による症例は51例（11.1%）であった。2014年に分離された肺炎球菌のPCV7のカバー率（12.9%）に比べ、2015年分離株のPCV7のカバー率（8.3%）の低下がみられ、PCV7による集団免疫効果が示唆された。また、464症例のうちに5年以内にPPSV23が接種された症例は29例がみられた。PPSV23に含まれるタイプの肺炎球菌による症例（Vaccine failure）は14例であった。

### A. 研究目的

侵襲性肺炎球菌感染症（IPD）は、ワクチン接種により予防可能な疾患である。本邦においては、23価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPSV23）、沈降7価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV7）、沈降13価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）および沈降10価肺炎球菌結合型ワクチンが承認されている。現在、日本国内ではPPSV23とPCV13が販売されている。PCV13は5歳未満小児を対象とする定期接種ワクチン（A類疾病）として使われている。一方、PPSV23が65歳以上の成人を対象に、2014年10月に定期接種（B類疾病）になった。PPSV23は免疫不全のない成人において、今後の接種率の増加によって、ワクチン血清型によるIPDの発症率の減少が期待されている。また、PCV13は2014年6月に65歳以上の成人への適応が追加承認された。本分担研究は、日本国内の10道県で行われた人口あたりの成人

IPD罹患率調査の一部として行われている。成人IPDより分離された肺炎球菌の血清型別を行い、ペニシリンG等の抗菌薬への感受性の状況の変化も併せて調査し、PPSV23の効果を評価する基礎疫学データを提供することを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 成人IPD症例由来肺炎球菌

2013年7月から2015年12月現在まで、10道県から送付された成人IPD由来の455株肺炎球菌および臨床検体3件を対象とした。肺炎球菌は血液寒天培地にて37℃、5% CO<sub>2</sub>の条件下で一晩培養したものをを用いて解析を行った。臨床検体において、検体から直接にDNAを抽出し、血清型別に使用した。

#### 2. 血清型別

肺炎球菌の血清型はStatens Serum Institut製

血清を用いて、莢膜膨潤法により決定した。臨床検体の血清型別は、Multiplex PCR法で行った。また、血清型11E型肺炎球菌は新しく11A型から分けられた血清型で、現在販売されている抗血清およびMultiplex PCR法では11Aと11Eを区別できないため、11A/Eと記入した。

### 3. 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は微量液体希釈法によって行った。薬剤感受性試験の結果は2008年から使われ始めたCLSIの基準によって判別を行った。すなわち、髄膜炎由来肺炎球菌のペニシリンG (PCG)のMICが $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、ペニシリン感受性 (PSSP)、ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) と判別し、セフトキシムに対するMICが $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、セフトキシム感受性、低感受性、耐性と判別した。髄膜炎以外のIPD由来肺炎球菌についてはPCGのMICが $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ 、 $4 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、PSSP、ペニシリン低感受性 (PISP)、PRSPと判別し、セフトキシムに対するMICが $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ 、 $2 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、セフトキシム感受性、低感受性、耐性と判別した。また、分離部位に関係なく、メロペネムに対するMICが $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 、 $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ をそれぞれ、メロペネム感受性、低感受性、耐性と判別した。

### 4. マルチローカスシーケンスタイピング (MLST) 解析

MLSTでは、分離株のゲノムDNAを精製し、肺炎球菌のゲノム上にある7つのハウスキーピング遺伝子 (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*)の配列を決定し、<http://spneumoniae.mlst.net>にて検索を行い、sequence type (ST) を決定した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

## C. 研究結果

### 1. 成人IPD症例の背景

2013年7月から2015年12月現在まで、10道県で成人IPD症例464例が報告された。そのうち、2例の臨床情報が不明であった。462症例の患者年齢は15-103歳、平均は69歳で、男女それぞれ293名と169名で、男女比は1.7:1であった。65歳以上の患者は305名で、全体の66.0%を占めていた。464名の患者のうち、5年以内にPPSV23を接種されていたのは29名で、PCV13を接種されていたのは2名であった。313名の患者にはPPSV23の接種歴はなく、残る120名の患者の肺炎球菌ワクチンの接種歴は不明であった。464例IPDのうち、髄膜炎は82症例 (17.7%)、菌血症を伴う肺炎の症例は268例 (57.8%)、菌 (敗) 血症のみは77例 (16.6%) であった。37症例 (8.0%) は菌血症に肺炎以外の合併症状がみられた。

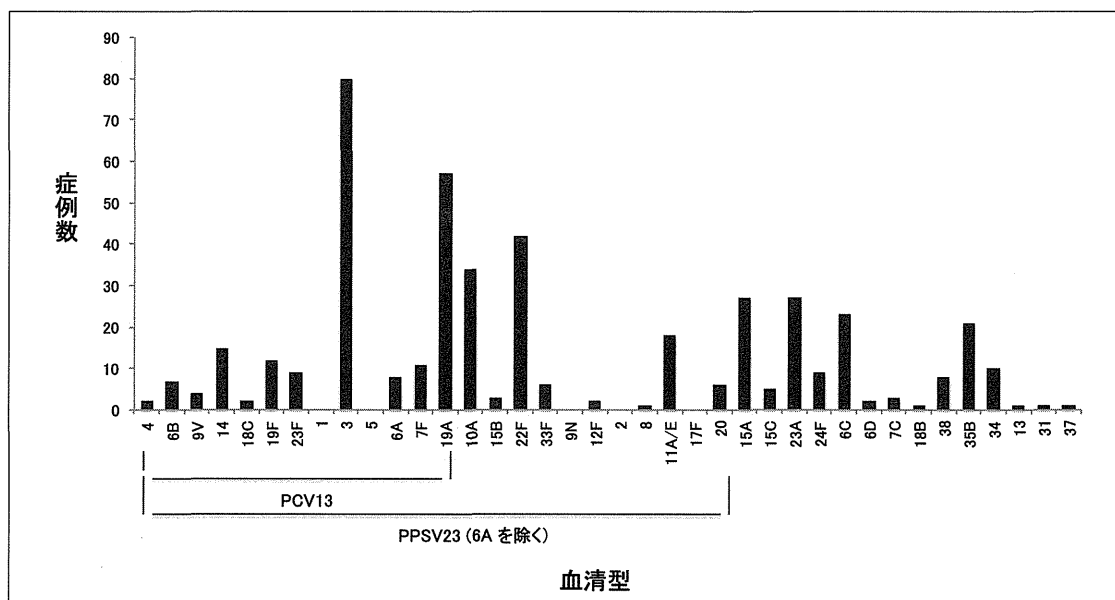


図1. 2013/4-2015/12月に肺炎球菌を原因とする成人IPD症例数 (n=458)

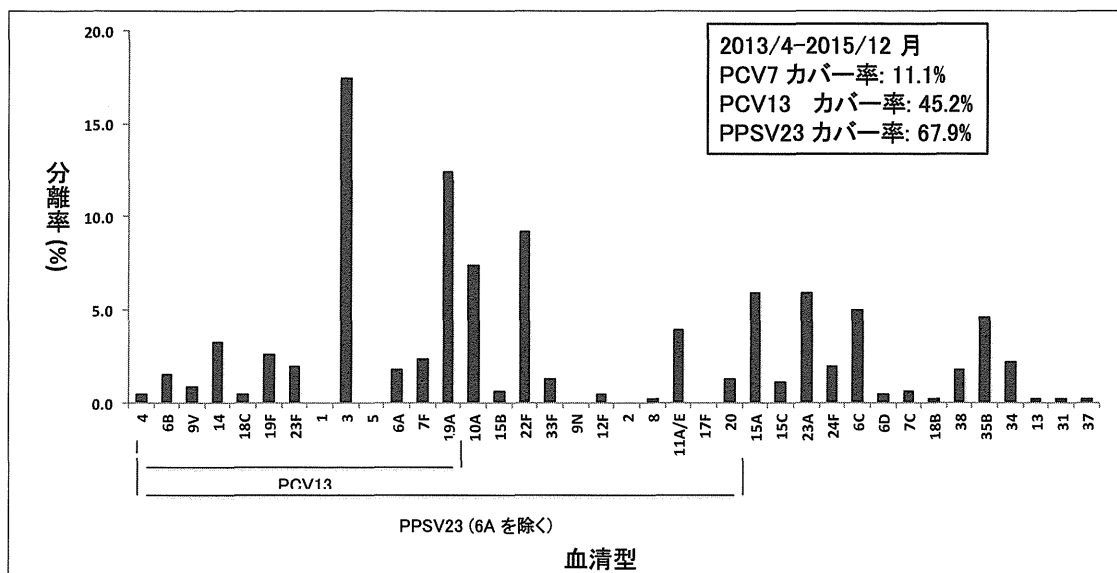


図2. 2013/4-2015/12月に成人IPD由来肺炎球菌の血清型分布 (n=458)

## 2. 成人IPD由来肺炎球菌の血清型分布

464症例のうち、455例から肺炎球菌が分離され、3症例の髄液または血液検体より肺炎球菌のDNAが検出された。6症例の分離菌と臨床検体を収集できなかった。458症例を引き起した肺炎球菌の血清型別を行った。その結果を図1と2に示す。血清型3型肺炎球菌による症例は80例(分離率17.5%)で、最も多かった。10症例以上から分離された血清型は19A(57例、12.4%)、22F(42例、9.2%)、10A(34例、7.4%)、15A(27例、5.9%)、23A(27例、5.9%)、6C(23例、5.0%)、35B(21例、4.6%)、11A/E(18例、3.9%)、14(15例、3.3%)、19F(12例、2.6%)、7F(11例、2.4%)および34(10例、2.2%)で、PCV13およびPPSV23

に含まれる血清型の分離率のそれぞれは45.2%と67.9%であった(図2)。PCV13とPPSV23のいずれにも含まれないnon-vaccine型肺炎球菌の分離率は30.3%で、血清型は15A(27例)、23A(27例)、6C(23例)、35B(21例)、34(10例)、24F(9例)、38(8例)、15C(5例)、7C(3例)、6D(2例)、18B、13、31、37型はそれぞれ1例であった。2010年2月に日本に導入された小児用PCV7に含まれる血清型(4、6B、9V、14、18C、19F、23F)による症例は28例で、11.1%を占めた。PPSV23の接種後5年以内に発症されたIPD症例29例中、28例より分離された肺炎球菌の血清型別を行い、14例はPPSV23ワクチンに含まれる血清型による症例で、Vaccine failureであった(図3)。2症

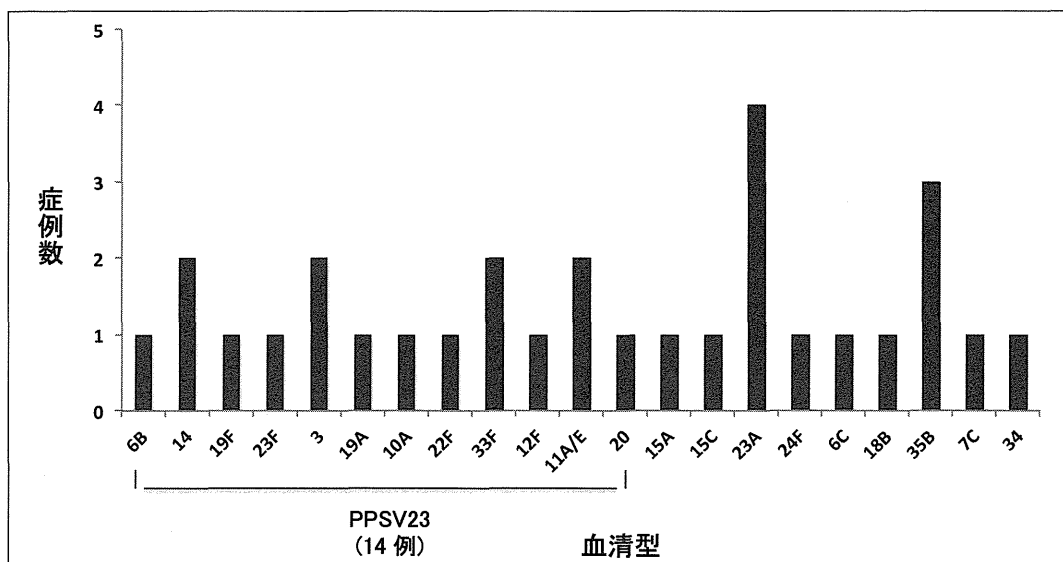


図3. PPSV23接種歴のあるIPD由来肺炎球菌の血清型分布 (n=28)

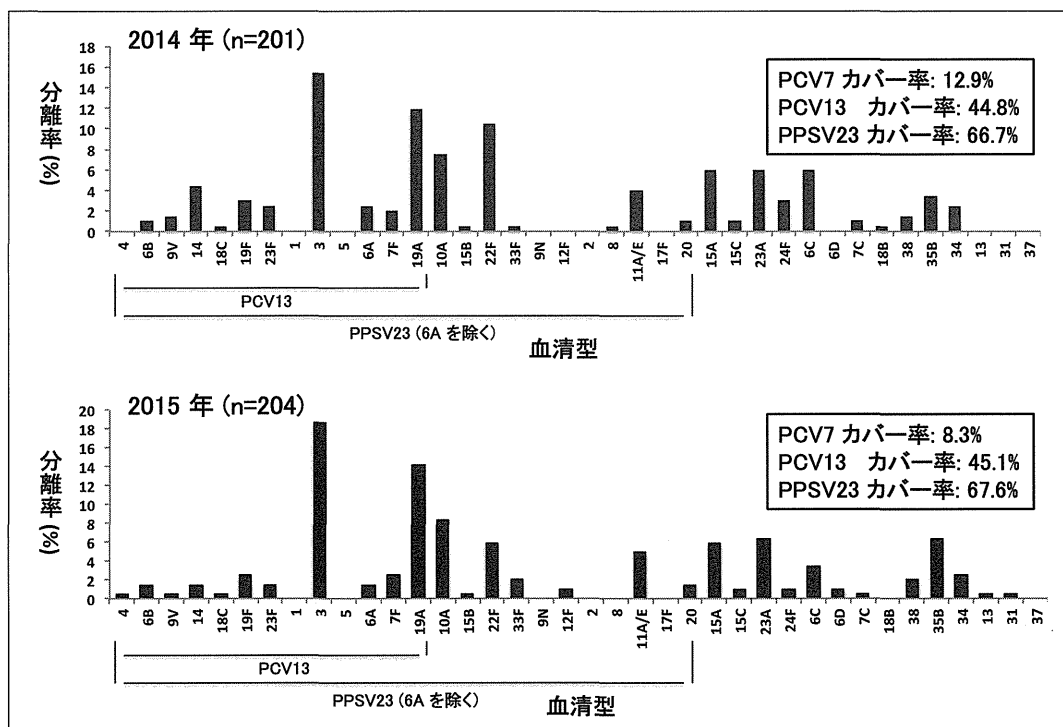


図4. 成人IPD由来肺炎球菌の血清型分布の比較

例はPCV13が1回接種され、起因菌の血清型はそれぞれ11A/Eと12Fで、非PCV13タイプであった。

### 3. 成人IPD由来肺炎球菌の血清型分布の年別の比較

本研究期間中の2013年、2014年および2015年、10道県から報告された成人IPD症例数はそれぞれ53、206と205症例であった。そのうち、起因菌または臨床検体が収集できたのは53、201と204例であった。2013年には研究班が始まり、症例の収集システムの設立に時間がかかり、菌株の回収が少なかったと思われる。2014年と2015年に報告された症例数および起因菌の株数は同程度であったため、2014年と2015年成人IPDを引き起した肺炎球菌の血清型分布の比較を行い、その結果を図4に示す。

2014年と2015年において、各血清型肺炎球菌の分離率は多少違いがあったが、全体的な分布傾向には大きな変化がみられなかった(図4)。しかし、2014年に分離された肺炎球菌のPCV7のカバー率(12.9%)に比べ、2015年分離株のPCV7のカバー率(8.3%)の低下がみられ、PCV7による集団免疫効果が示唆された。一方、PCV13お

よびPPSV23のカバー率には大きな変化が見られなかった(図4)。

### 4. 成人IPD由来肺炎球菌の薬剤感受性

455症例(髄膜炎79例、髄膜炎以外376例)由来肺炎球菌の薬剤感受性を調べた。

髄膜炎由来肺炎球菌79株のうち、51株はPSSP、28株はPRSPであった。セフトキシム感受性菌は75株、低感受性は3株、耐性は1株であった。6株はメロペネムに対するMICが0.5 μg/mLで、低感受性を示した。メロペネム耐性株の分離がなかった。

菌血症から分離された376株のうち、371株はPSSPで、2株はPISPで、3株はPRSPであった。セフトキシム感受性菌は363株、低感受性は3株、耐性菌は10株を占めた。また、メロペネムに対する低感受性であった肺炎球菌は23株で、耐性を示した株は5株であった。

(成人IPD由来肺炎球菌の薬剤感受性の詳しい解析結果は平成27年度分担報告書にて報告する。)

### 5. 成人IPD由来肺炎球菌のST型

成人IPD由来肺炎球菌455株のMLSTの解析を行った。455株のうち、38株はデータベースに登



録されていない新規STであった。世界中の多くの地域から分離されるST（血清型3型のST180、15A型のST63、19F型のST236、23A型のST338、23F型のST242など）は日本国内の成人IPD症例からも分離された。一方、血清型3型の新規STであるST9607（5、35、2、1、45、39、18）は、ST717（5、35、29、1、45、39、18）と*gki*遺伝子の配列が異なった近縁タイプであった。日本国内で分離された血清型3型の肺炎球菌の多くはST180（7、15、2、10、6、1、22）とその近縁タイプであった。一方、ST717は血清型33F肺炎球菌には多くみられるSTであったため、この肺炎球菌は血清型33F肺炎球菌のcapsular switching（遺伝子組み換え）である可能性が示唆された。このような肺炎球菌はほかにも、15A型には6A型の遺伝子型を、15B型には23F型の遺伝子型を、6A型には35B型の遺伝子型を示す菌株が分離され、capsular switchingの可能性が高いと考えられた。今後、ワクチン（PCV13またはPPSV23）のセレクションによるワクチンに含まれる血清型の莢膜遺伝子が非ワクチン血清型にcapsular switchingするケースが増加することが懸念され、観測を続ける必要がある。

#### D. 考察

日本ではPPSV23が1988年に薬事承認され、2014年10月からB類疾病として65歳以上の成人対象に定期接種が始まった。また、PCV13の65歳以上の成人への適応も追加承認されたため、今後の接種率の増加が予測される。その一方、接種率の上昇とともに、小児用PCV7の導入後におきた非PCV7血清型によるIPD罹患率の増加（serotype replacement）のような現象（Pilishvili T et al. JID 201:31-41, 2010）がおこる懸念も持たれている。本研究の同一地域における成人IPDの疫学調査は、PPSV23が定期接種の対象になる前後の両期間を含む形で2013年に始まったため、PPSV23の効果およびserotype replacementの有無をリアルタイム、かつ正確に反映することが期待されている。

本分担研究の調査では、2013年から2015年までの3年間に、成人IPD由来肺炎球菌の30.3%はPCV13とPPSV23のいずれにも含まれていない

血清型で、PCV7とPCV13タイプが占めている割合はそれぞれ11.1%と45.2%であった。日本国内にPCV7が導入される前は小児IPD由来肺炎球菌の76.6%と90.2%がそれぞれPCV7とPCV13に含まれていたという調査結果（常 彬ら、IASR 34: 64-66）に比べて、成人IPD由来肺炎球菌の血清型は多様性を示し、PCV7とPCV13のカバー率は低かった。また、小児PCV7が導入後serotype replacementとしてみられた血清型19A型の、成人IPDからの分離率が血清型3型に続いて、2番目に高かった。さらに、2014年分離株に比べ、2015年に分離された肺炎球菌のPCV7のカバー率が低かった（図4）。これらの結果の理由としては、小児用ワクチンの普及は、PCV7とPCV13に含まれる血清型の肺炎球菌による小児IPDの減少のみならず、成人への効果（集団免疫効果）も果たしたためと考えられる。また、成人IPD起因菌の中に最も多く分離される血清型3型はPCV13にも含まれるタイプであるため、PPSV23の直接の予防効果のみならず、今後PCV13の免疫効果による3型成人IPDの減少も期待されている。

2014年10月からPPSV23の定期接種が始まり、対象者の接種率の増加に伴い、高齢者における肺炎球菌性感染症の予防効果や医療費の削減効果が期待されている。一方、19A型やその他のPPSV23に含まれない血清型の肺炎球菌によるIPD罹患率の上昇の懸念も持たれる。今後、PPSV23の予防効果とともに、serotype replacementおよびcapsular switchingの有無を継続して調べる必要がある。

#### E. 結論

2013年7月から2015年12月現在までに成人IPDから分離された肺炎球菌はPCV7とPCV13に含まれない血清型が多く占めていて、特に2015年分離菌のPCV7のカバー率の低下もみられたため、PCV7による成人への集団免疫効果が現れた可能性が示唆された。一方、PPSV23の予防効果を評価するために、成人IPD由来肺炎球菌の収集と細菌学的解析を行い続ける必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Capsule switching and antimicrobial resistance acquired during repeated *Streptococcus pneumoniae* pneumonia episodes. Chang B, Nariai A, Sekizuka T, Akeda Y, Kuroda M, Oishi K, Ohnishi M. J Clin Microbiol. 2015, 53: 3318-3324.

### 2. 学会発表

- 1) 李 相太, 笠原 敬, 今北菜津子, 米川真輔, 中村ふくみ, 小川 拓, 梶田明裕, 平田一記, 平位暢康, 今井雄一郎, 小川吉彦, 宇野健司, 前田光一, 三笠桂一, 山崎正晴, 常 彬. セフトリアキソン耐性・マクロライド耐性肺炎球菌による侵襲性肺炎球菌感染症の一例. 第85回日本感染症学会西日本地方総会学術集会・第58回日本感染症学会中日本地方総会学術集会・第63回日本化学療法学会西日本支部総会合同学会. 2015年.
- 2) 福住宗久, 西 順一郎, 丸山貴也, 渡邊 浩, 大島謙吾, 青柳哲史, 高橋弘毅, 武田博明, 田邊嘉也, 笠原 敬, 藤田次郎, 横山彰仁, 山崎一美, 常 彬, 大西 真, 高橋琢理, 松井珠乃, 砂川富正, 大石和徳. 成人侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) の臨床像と原因菌血清型分布に関する記述疫学 (2013年-2014年). 第64回日本感染症学会東日本地方総会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 2015年.
- 3) 黒沼幸治, 小林智史, 錦織博貴, 常 彬, 大石和徳, 高橋弘毅. 北海道における成人侵襲性肺炎球菌感染症のサーベイランス. 第64回日本感染症学会東日本地方総会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 2015年.
- 4) 鈴木博貴, 佐藤千紗, 土田文広, 常 彬, 山本友香, 西塚 碧, 渡邊麻莉, 大石和徳, 武田博明. 当院の *Streptococcus pneumoniae*

の莢膜血清型およびPPSV23の接種効果の検討. 第64回日本感染症学会東日本地方総会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 2015年.

- 5) 西 順一郎, 徳田浩一, 常 彬. 鹿児島県における小児と成人の侵襲性インフルエンザ菌・肺炎球菌感染症サーベイランス - Hib ワクチンと肺炎球菌結合型ワクチンの効果と課題 -. 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年.
- 6) 福住宗久, 常 彬, 牧野友彦, 西 順一郎, 丸山貴也, 渡邊 浩, 金城雄樹, 高橋琢理, 松井珠乃, 砂川富正, 大西 真, 大石和徳. 成人侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) の臨床像と原因菌血清型分布に関する記述疫学 (2013年). 第18回日本ワクチン学会学術集会. 2014年.
- 7) 西 順一郎, 藺牟田直子, 徳田浩一, 川村英樹, 常 彬, 石岡大成, 吉家清貴. 鹿児島県における小児・成人侵襲性肺炎球菌・インフルエンザ菌感染症の病原体サーベイランス. 第57回日本感染症学会中日本地方学術集会, 第84回日本感染症学会西日本地方学術集会, 第62回日本化学療法学会西日本支部総会合同開催. 2014年.
- 8) 佐藤千紗, 土田文広, 常 彬, 山本友香, 西塚 碧, 渡邊麻莉, 鈴木博貴, 大石和徳, 武田博明. 当院の *Streptococcus pneumoniae* の薬剤感受性および莢膜血清型の検討. 第63回日本感染症学会東日本地方総会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 2014年.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 成人の侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) の臨床像と原因菌血清型分布に 関する疫学 (2013年4月-2015年12月)

研究協力者：福住 宗久 (国立感染症研究所 実地疫学専門家養成コースFETP)  
西 順一郎 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
丸山 貴也 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
渡邊 浩 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
大島 謙吾 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
青柳 哲史 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
高橋 弘毅 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
武田 博明 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
田邊 嘉也 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
笠原 敬 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
藤田 次郎 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
横山 彰仁 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
山崎 一美 (成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班)  
高橋 琢理 (国立感染症研究所感染症疫学センター)  
大日 康史 (国立感染症研究所感染症疫学センター)  
木村 博一 (国立感染症研究所感染症疫学センター)  
砂川 富正 (国立感染症研究所感染症疫学センター)  
松井 珠乃 (国立感染症研究所感染症疫学センター)  
大石 和徳 (国立感染症研究所感染症疫学センター)  
常 彬 (国立感染症研究所細菌第一部)  
大西 真 (国立感染症研究所細菌第一部)  
金城 雄樹 (国立感染症研究所真菌部)

**研究要旨** 【背景】侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) に対する小児のPCV導入による集団免疫効果に伴う成人IPD原因菌の血清型置換が海外同様、我が国でも明らかになりつつある。また2014年6月にPCV13の65歳以上の成人に対する適応拡大が承認され、2014年10月からは65歳以上の成人に対する23価肺炎球菌ワクチン (PPSV23) の定期接種 (B類) が開始された。

【方法】2013年4月-2015年12月に成人重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班における10道県のネットワークで収集された調査票と菌株情報をもとに、成人IPDの臨床像と原因菌の血清型分布についてまとめた。生存例及び死亡例における臨床像と原因菌血清型を比較しリスク因子を推定した。

【結果】登録された433例のうち菌株と質問票の両方を収集できた414例 (96%) を解析対象とした。年齢平均値は69歳 (標準偏差 (SD):  $\pm 16$ ) で男性が64% (264/414) であった。菌血症が15% (62/414)、髄膜炎が18% (76/414)、菌血症を伴う肺炎が58% (241/414) であった。質問票収集時点で死亡の記載のあった症例は18% (73/414) であった。基礎疾患のある患者は75% (298/399)、免疫不全を伴う患者は38% (150/392) であった。原因菌 (n=414) におけるPCV13含有血清型の割

合は46%、PPSV23含有血清型の割合は67%であった。死亡群の平均年齢は76歳 (SD: ±13) に対し生存群では67歳 (SD: ±16) ( $p < 0.002$ ) であった。菌血症を伴う肺炎患者の原因菌におけるワクチン含有血清型の割合は髄膜炎患者及び菌血症患者の原因菌におけるワクチン含有血清型の割合よりも、それぞれ有意に高かった。免疫不全のない患者における原因菌のPCV13非含有原因菌の割合は47%、免疫不全者では67%であった ( $p < 0.05$ )。

【結論】成人IPDの原因菌のPCV13含有血清型の減少は、小児PCV導入に伴う集団免疫効果に起因する血清型置換と考えられた。高齢は成人IPD患者における死亡のリスク因子であった。菌血症を伴う肺炎の原因菌は菌血症、髄膜炎と比較してワクチン含有血清型の割合が高かった。免疫不全者では原因菌としてPCV13非含有血清型の割合が高かった。

## A. 研究目的

侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) に対する我が国のワクチン政策において、小児に対しては7価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7) が2010年11月から公費助成 (子宮頸がん等ワクチン接種促進事業) が始まった。その後、2013年4月からPCV7の小児に対する定期接種が開始され、2013年11月からはPCV7が13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) に切り替わった。このような状況から、海外同様、わが国においても小児のPCV導入による集団免疫効果に伴う成人IPD原因菌の血清型置換が明らかになりつつある<sup>1)</sup>、一方、成人では1988年に23価肺炎球菌ワクチン (PPSV23) が承認され、2014年6月にPCV13が65歳以上の成人に対して適応拡大がされた。また、2014年10月からは65歳以上の成人に対する23価肺炎球菌ワクチン (PPSV23) の定期接種 (B類) が開始された。2013年4月から2015年12月における成人IPD患者の臨床像、原因菌血清型分布に関して記述した。

## B. 研究方法

2013年4月-2015年12月に成人重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班における10道県のネットワークに登録された433例のうち菌株と質問票の両方を収集できた414例 (96%) を解析対象とした。質問票から基本属性及び臨床情報、収集された菌株から莢膜血清型に関する情報を得た。生存例及び死亡例における臨床像と原因菌血清型を比較しリスク因子を推定した。

## C. 研究結果

414例の年齢平均値は69歳 (標準偏差 (SD): ±16) で64%を65歳以上の高齢者が占めていた。男性が64% (264/414) であった。病型の割合は菌血症が15% (62/414)、髄膜炎が18% (76/414)、菌血症を伴う肺炎が58% (241/414)、その他が8% (35/414) であった。質問票収集時点で死亡の記載のあった症例は18% (73/414) であった (表1)。Body Mass Index (BMI) の平均値は21 (SD: ±4.2)、インフルエンザの先行感染があった患者は4% (12/275)、5年以内のPPSV23接種歴がある患者は8% (27/323) であった。基礎疾患のある患者は75% (298/399)、免疫不全を伴う患者は38% (150/392) であった。無脾、脾臓低形成の患者は6% (24/379) であった。原因菌 (n=414) の血清型の割合は3型 (17%) が一番高く、次いで19A (13%)、22F (9%) の順に高かった。PCV13含有血清型の割合は46%、PPSV23含有血清型の割合は67%であった (図1)。死亡群の平均年齢は76歳 (SD: ±13) に対し生存群では

表1. 10道県におけるIPD患者の特徴 (n=414)  
2013年4月~2015年12月

	n (%) or mean (SD)
Age group	
15-64y	148 (36)
≥65y	266 (64)
Clinical presentation	
Bacteremia without any focus	62 (15)
Meningitis	76 (18)
Bacteremic pneumonia	241 (58)
Others	35 (8)
Outcome	
Nonfatal	341 (82)
fatal	73 (18)

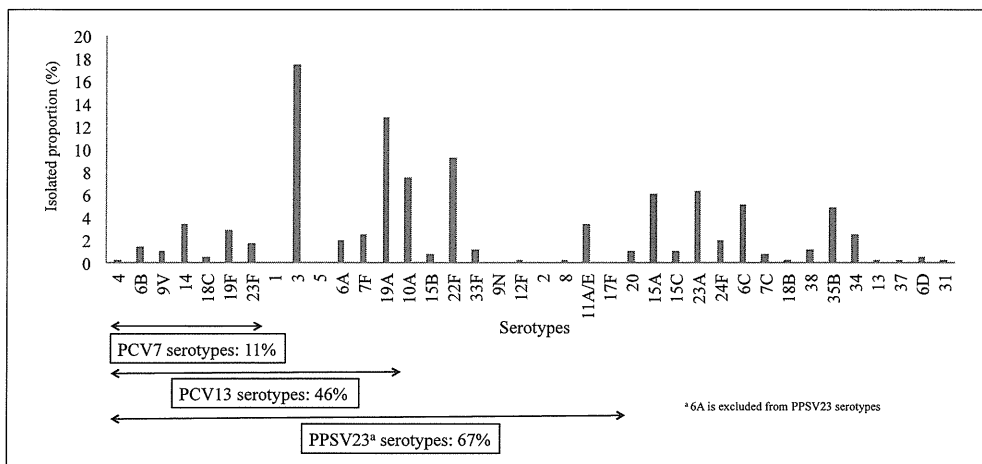


図1. 10道県におけるIPD患者の原因菌血清型分布 (n=414)  
2013年4月~2015年12月

表2. 10道県におけるIPD患者における死亡例と生存例の比較 (n=414)  
2013年4月~2015年12月

Variable	Total n/N <sup>a</sup> (%) or mean (SD)	Outcome		p value <sup>b</sup>
		Fatal n/N <sup>a</sup> (%) or mean (SD)	Nonfatal n/N <sup>a</sup> (%) or mean (SD)	
Sex				
Female	150/414 (36)	35/73 (48)	115/341 (34)	0.06
Male	264/414 (64)	38/73 (52)	226/341 (66)	
Age	69 (16)	76 (13)	67 (16)	<0.002
BMI	21 (4.2)	20 (4.6)	22 (4.1)	0.041
Smoking history	185/372 (50)	26/59 (44)	159/313 (51)	0.34
Alcohol abuse	63/374 (17)	13/66 (20)	50/308 (16)	0.5
Preceding infection of influenza	12/275 (4)	3/47 (6)	9/228 (4)	0.44
Vaccination history of PPSV23	27/323 (8)	6/47 (13)	21/276 (8)	0.24
Comorbidities	298/399 (75)	55/70 (79)	243/329 (74)	0.41
Chronic pulmonary disease	37/399 (9)	9/70 (13)	28/329 (9)	0.26
Chronic heart disease	23/399 (6)	7/70 (10)	16/329 (5)	0.09
Chronic liver disease	26/399 (7)	5/70 (7)	21/329 (6)	0.79
Chronic kidney disease	21/399 (5)	5/70 (7)	16/329 (5)	0.39
Diabetes mellitus	57/399 (14)	7/70 (10)	50/329 (15)	0.26
Immunocompromised status	150/392 (38)	34/68 (50)	116/324 (36)	0.029
Hypoplasenia/Asplenia	24/379 (6)	2/65 (3)	22/314 (7)	0.4
Autoimmune disease	38/392 (10)	8/68 (12)	30/324 (9)	0.53
Chronic corticosteroid therapy	34/392 (9)	6/68 (9)	28/324 (9)	0.96
Malignancy	84/392 (21)	19/68 (28)	65/324 (20)	0.15
Solid cancer	50/392 (13)	11/68 (16)	39/324 (12)	0.35
Hematologic cancer	7/392 (10)	7/38 (10)	25/324 (8)	0.48
Anti-cancer agent	35/392 (9)	6/68 (9)	29/324 (9)	0.97
Clinical presentation				
Nonmeningitis	338/414 (82)	66/73 (90)	272/341 (80)	0.03
Meningitis	76/414 (18)	7/73 (10)	69/341 (20)	
Serotype				
PCV13 type	189/414 (46)	37/73 (51)	152/341 (45)	0.34
PPSV23 type	278/414 (67)	50/73 (68)	228/341 (67)	0.79

<sup>a</sup>P値はBonferroni法で補正  
<sup>b</sup>回答があった数  
<sup>c</sup>年齢、BMIに関してはStudent's  
その他は $\chi^2$  test (Fisher's exact test)

67歳 (SD:  $\pm 16$ ) ( $p < 0.002$ ) であった。死亡群のBMI平均値は20 (SD:  $\pm 4.6$ ) で生存群では22 (SD:  $\pm 4.1$ ) ( $p = 0.041$ ) であった。非髄膜炎患者、免疫不全者の割合はそれぞれ死亡群で90% (66/73)、50% (34/68) に対し生存群では80% (272/341) ( $p = 0.03$ )、36% (116/324) ( $p = 0.029$ ) であった。原因菌におけるワクチン含有血清型の割合については死亡例と生存例で違いはなかった (表2)。菌血症を伴う肺炎患者の原因

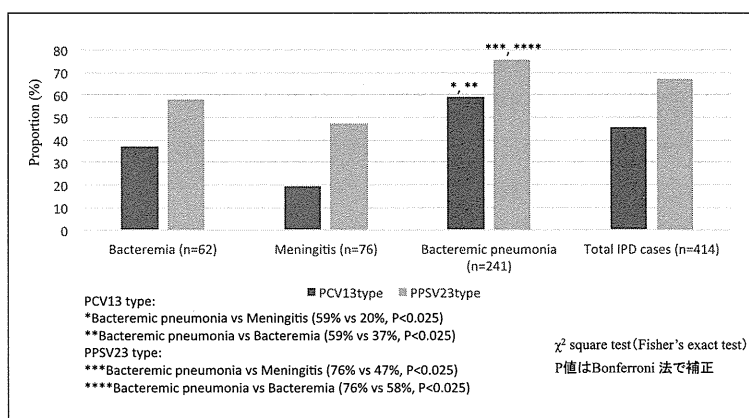


図2. 病型によるIPD原因菌のワクチン含有血清型の割合

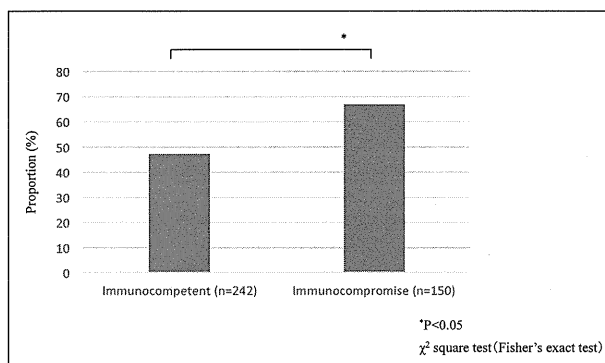


図3. 免疫不全の有無によるIPD原因菌におけるPCV13非含有血清型の割合

菌におけるワクチン含有血清型の割合は髄膜炎患者及び菌血症患者の原因菌におけるワクチン含有血清型の割合よりも、それぞれ高かった(PCV13含有血清型: 59% vs 20%,  $p < 0.025$ , 59% vs 37%,  $p < 0.025$  PPSV23含有血清型: 76% vs 47%,  $p < 0.025$ , 76% vs 58%,  $p < 0.025$ ) (図2)。免疫不全のない患者における原因菌のPCV13非含有原因菌の割合は47% (114/242)、免疫不全者では67% (100/150) であった ( $p < 0.05$ ) (図3)。

注:  $p < 0.05$ を統計学的に有意差ありとし、多重比較を行った場合はBonferroni法でp値を調整した。

#### D. 考察

10道県における成人重症肺炎サーベイランス構築に関する研究班に登録された成人IPD患者について検討した。本研究において、2006年～2007年に実施された国内の成人IPD患者の原因菌血清型分布に関する調査<sup>2)</sup>と比較してPCV13含有血清型の割合は61%から46%に、PPSV23含有血清型の割合は85%から67%に低下しており、2010年4月～2013年3月に実施された最近の調査(PCV13含有血清型: 63%、PPSV23含有血清型の割合: 78%)<sup>3)</sup>と比較しても、さらに血清型置換が進んでいることが示唆された。

高齢は成人IPD患者における死亡のリスク因子であり、先行文献と一致していた<sup>4, 5)</sup>。本研究におけるPPSV23の接種割合は8%で、選択バイアスを考慮しても、日本における65歳以上のPPSV23接種割合(推定30%)と比較して非常に低かった。今後さらにワクチン未接種の高齢者に

対しては、定期接種となったPPSV23の接種を進めてくことが重要である。今回、免疫不全、BMI低値、非髄膜炎についても死亡リスクである可能性があるが有意ではなかった。

菌血症、髄膜炎と比較して、菌血症を伴う肺炎ではPPSV23、PCV13ともにワクチン含有血清型の割合が高く、この傾向も最近の日本からの報告と一致していた<sup>3)</sup>。

免疫不全者では、IPD原因菌としてPCV13非含有血清型の割合が高かった。免疫不全を有するIPD患者においてPCV13非含有血清型が検出される頻度が高く、免疫不全では本来IPDをおこしにくい血清型が原因菌となっている点が指摘されており<sup>6)</sup>本研究結果と矛盾しない。

制約として、登録された症例数は同時期の感染症発生動向調査における10道県の届出数と比較し少なく、また県ごとに偏りがあった。また症例によって、質問票で回答が得られなかった項目があり、これらの影響が結果に反映されている可能性がある。

#### E. 結論

成人IPDの原因菌のPCV13含有血清型の減少は、小児PCV導入に伴う集団免疫効果に起因する血清型置換と考えられた。高齢は成人IPD患者における死亡のリスク因子であり、免疫不全、BMI低値、非髄膜炎についても同様の傾向があった。菌血症を伴う肺炎の原因菌は菌血症、髄膜炎と比較してワクチン含有血清型の割合が高かった。免疫不全者では原因菌としてPCV13非含有血清型の割合が高かった。血清型分布を含めた成人におけるIPDの発生状況を把握し、成人及び小児に導入された肺炎球菌ワクチンの効果を評価するため、引き続き成人IPDサーベイランスの継続と強化が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 福住宗久 他. 成人の侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)の臨床像と原因菌血清型分布に関する疫学(2013～2014年). 第64回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第62回日本化学療法学会東日本支部総会, 北海道, 2015

- 2) 福住宗久 他. 成人の侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) の臨床像と原因菌血清型分布に関する疫学 (2013年-2014年). 第19回日本ワクチン学会学術集会, 愛知, 2015

## G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

## 参考文献

- 1) IASR 35: 179-181, 2014
- 2) Chiba N, Morozumi M, Sunaoshi K, Takahashi S, Takano M, Komori T, et al. Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal diseases in Japan. *Epidemiol Infect.* 2010; 138: 61-8.
- 3) Ubukata K, Chiba N, Hanada S, Morozumi M, Wajima T, Shouji M, et al. Serotype changes and drug resistance in invasive pneumococcal diseases in adults after vaccinations in children, Japan, 2010-2013. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 1956-65.
- 4) Navarro-Torné A, Dias JG, Hrubá F, Lopalco PL, Pastore-Celentano L, Gauci AJ. Risk factors for death from invasive pneumococcal disease, Europe, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21: 417-25.
- 5) Simell B, Lahdenkari M, Reunanen A, Käyhty H, Väkeväinen M. Effects of ageing and gender on naturally acquired antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides and virulence-associated proteins. *Clin Vaccine Immunol.* 2008; 15: 1391-7.
- 6) Luján M, et al, Effects of immunocompromise and comorbidities on pneumococcal serotypes causing invasive respiratory infection in adults: implications for vaccine strategies, *Clin Infect Dis.* 2013; 57: 1722-30.

## 地方衛生研究所への肺炎球菌およびインフルエンザ菌検査の導入と 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症の臨床像と細菌学的解析

- 研究分担者：村上 光一（国立感染症研究所感染症疫学センター）  
研究協力者：石岡 大成（高崎市保健医療部高崎市保健所）  
鈴木 裕（山形県衛生研究所）  
細谷 美佐子（新潟県保健環境科学研究所）  
金谷 瑠美（新潟市衛生研究所）  
松井 重憲（群馬県衛生環境研究所）  
増田 千恵子（富山県衛生研究所）  
永井 佑樹（三重県保健環境研究所）  
田遺 純子（奈良県保健環境研究センター）  
金山 知代（高知県衛生研究所）  
岡元 冬樹（福岡県保健環境研究所）  
穂積 和佳（鹿児島県環境保健センター）  
岡野 祥（沖縄県衛生環境研究所）  
新垣 絵里（沖縄県衛生環境研究所）  
倉井 大輔（杏林大学医学部附属病院呼吸器内科）  
皿谷 健（杏林大学医学部附属病院呼吸器内科）  
石井 晴之（杏林大学医学部附属病院呼吸器内科）  
野田 雅博（国立感染症研究所感染症疫学センター）  
木村 博一（国立感染症研究所感染症疫学センター）  
常 彬（国立感染症研究所細菌第一部）  
蜂巢 友嗣（国立感染症研究所FETP）

**研究要旨** 10道県における成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症について、2013年度は4例、2014年度は21例、2015年度（11月まで）は18例、計43例が報告された。患者年齢は24～95歳と幅広く分布し、平均値が73.2歳、中央値が79歳であった。これらの患者のうち「菌血症を伴う肺炎」を呈した患者が、送付菌株数の半数以上を占めた（23/43、53%）。基礎疾患の比較では「慢性肺疾患」を有する患者が、侵襲性インフルエンザ菌感染により「菌血症を伴う肺炎」を発症する場合が比較的多数認められた。43症例からの分離菌株について精査したところ、莢膜型別用免疫血清によるスライド凝集法およびPCR法により、42分離菌株が non-typable *Haemophilus influenzae* であり、1株のみがe型であった。また、生化学性状検査により生物型は、I、II、III、VおよびVIに分類され、分離菌株の多くはII型およびIII型であった。薬剤感受性については、分離菌株の過半数がアンピシリンに耐性を示した。これらのことから、今後とも成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症由来株の継続的な解析が必要であるとともに、各自治体レベルで本感染症の流行を監視していくことが必要であることが示唆された。



## A. 研究目的

平成25年4月から、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律の一部が改正され、「侵襲性肺炎球菌感染症」および「インフルエンザ、菌感染症」が5類感染症に追加された。これにより、地方自治体はそれぞれの疾病の発生状況を各自自治体レベルで把握することが可能になった。一方、侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症の予防のため、平成25年度から小児を対象としたPCV7またはCV13、Hib ワクチンが、また、平成26年10月から高齢者を対象としてPPV23が公費助成の対象となったことから、本疾病の患者から分離される菌株の血清型に強い関心が寄せられている<sup>1-3)</sup>。また、インフルエンザ菌も成人の市中肺炎の原因菌であるが、本邦における成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症に関する詳細はよくわかっていない。そこで本分担研究では、成人における侵襲性インフルエンザ菌感染症の地方衛生研究所（以下、地衛研）への検査導入および地衛研から国立感染症研究所（以下、感染研）に送付された患者由来菌株について細菌学的検査を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 菌株搬入対象地衛研

2013年度から継続して参加している9地衛研および2014年度新規に協力が得られた3地衛研を菌株搬入の対象とした。

### 2. 菌株の収集

2013年度に確立した各自自治体に応じた収集方法により菌株を収集し、地衛研を経由して感染研に送付するように調整した。

### 3. 侵襲性細菌感染症実技研修

2013年度および2014年度、希望する地衛研を対象に侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症に関する実技研修を実施した。研修は、特に肺炎球菌に関する multiplex serotyping PCR 法の導入<sup>4, 5)</sup>を主として実施した。

### 4. 侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株の細菌学的精査

地衛研経由で感染研に送付された侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株について、それらの患者情報、血清型、生物型、薬剤感受性について

精査した。薬剤感受性試験については、アンピシリン (ABPC)、アンピシリン/スルバクタム (ABPC/BT)、ピペラシリン (PIPC)、メロペネム (MEPM)、セフトキシム (CTX)、セフトリアキソン (CTRX) の6薬剤について Etest (バイオメリュー) およびヘモフィリステスト寒天培地 (BD) を用いて実施した。

## C. 研究結果

### 1. 侵襲性細菌感染症研修の実施

2013年度は、以下の8自治体から研修の希望があった。すなわち、山形県、新潟県、三重県、奈良県、高知県、福岡県、鹿児島県、および沖縄県であった。一方、2014年度については希望を募ったところ、北海道立衛生研究所、札幌市衛生研究所から要望があったため、2014年8月7～8日に感染研戸山庁舎で上記地衛研の職員3名を対象に研修を実施した。また、その後群馬県衛生環境研究所からも要望があったため、2015年1月19～29日に感染研村山庁舎で1名を対象に研修を実施した。主たる研修内容は、肺炎球菌の血清型スクリーニング検査として multiplex serotyping PCR 法を実施した。肺炎球菌の血清型は、必ずしもPCR法のみでは確定できないため、SSIなどの抗血清を用いた莢膜膨潤化法により確定した。ただし、コスト面などから地衛研に導入する検査法として膨潤化法は現実的ではないため、感染研に菌株を送付して実施している(図1)。一方、インフルエンザ菌については、市販莢膜型別用免疫血清(デンカ生研)によるスライド凝集反応および

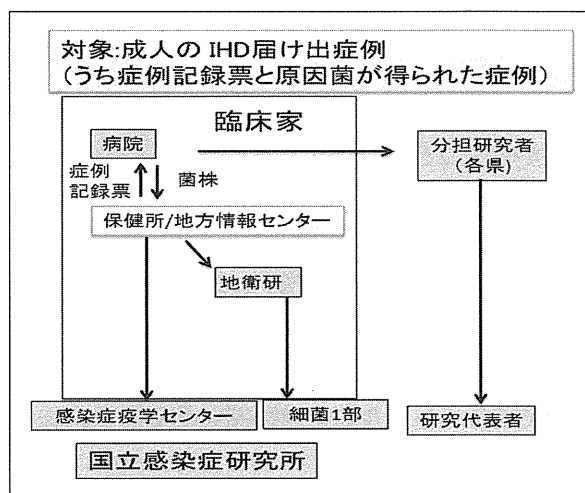


図1. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症患者情報と分離菌株の搬送・搬入

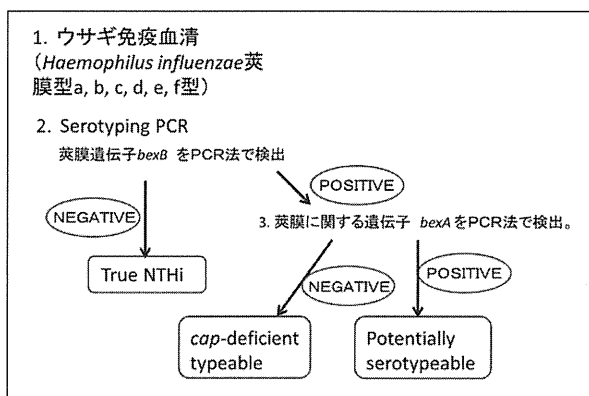


図 2. 菌株の血清型決定方法

PCR 法<sup>8, 7)</sup>により血清型別の実習を実施した。また、両菌種とも一般的な培養法による同定方法について研修を実施した。すなわち、各種培地における発育状況の観察、ヘモフィルス鑑別用培地（極東）における各区画における発育状況差異および性状を確認した。なお、インフルエンザ菌の血清型別において、抗血清のすべてに凝集が認められなかった場合は、莢膜形成に関わる特異遺伝子をターゲットとした PCR 法<sup>6-8)</sup>の結果から血清型を決定した。なお、multiplex serotyping PCR 法については、研修実施回により泳動バッファや電気泳動条件を変化させて検討した。その結果、TAE と TBE バッファとで泳動像に明確な違いは認められなかった。また、泳動条件についても、50V、1.5時間と 100V、30分とで大きな差異は認められなかった。さらには、multiplex serotyping PCR において複数のバンドが観察された場合は、対象となる血清型のプライマーを用いて single PCR を実施して血清型を決定した。

なお、供試した菌株は、本年度実際に研修に参加した地衛研から感染研に送付された菌株を用いた。これらの検査法は地方衛生研究所においても対応できることが示唆された。

## 2. 侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来株の収集状況

侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株は、2013～2015年度（2015年12月まで）で計43株送付された。

## 3. 侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来株の年齢分布および所見

送付された菌株の患者調査票に基づいて、患者の年齢、性別、診断所見および基礎疾患等につい

表 1. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症患者情報等

Age average (SD) n=43	73 (19)
	n/N <sup>a</sup> (%) or mean (SD)
Age group	
≤64y	10/43(23)
≥65y	33/43(77)
male	19/43(44)
BMI <sup>b</sup>	20(5)
Smoking history	13/37(35)
Alcohol abuse	4/40(10)
Preceding infection of influenza	1/34(3)
Vaccination of influenza virus	11/29(38)
Comorbid diseases	33/42(79)
Chronic pulmonary disease	7/42(17)
Chronic heart disease	5/42(12)
Cardiovascular disease	3/42(7)
Cerebrovascular disease	1/42(2)
Chronic liver disease	5/42(12)
Chronic kidney disease	4/42(10)
Diabetes mellitus	2/42(5)
Psychological disease	2/42(5)
Other diseases	14/42(33)
Immunocompromised condition	13/42(31)
Malignancy (再掲)	9/42(21)
Clinical presentation	
Bacteremia without any focus	15/43(35)
Meningitis	1/43(2)
Bacteremic pneumonia	23/43(53)
Others	4/43(9)
Outcome	
Nonfatal	33/39(75)
Fatal	6/39(15)

て表 1 に示す。男女比は、男性：女性 = 1：1.26 であった。患者年齢は 24～95歳と幅広く分布し、平均値が 73.2歳、中央値が 79歳であった。これらの患者のうち「菌血症を伴う肺炎」を呈した患者は、送付菌株数の半数以上（23/43、53%）を占めた。続いて「原発巣不明の菌血症」を呈した患者が、35%（15/43）を占めた。また、多くの患者は、慢性呼吸器疾患（COPD、気管支喘息など）、糖尿病、慢肝疾患、悪性腫瘍、脳梗塞後遺症、関節リウマチ、自己免疫疾患など、何らかの基礎疾患を有することが認められた。

基礎疾患と臨床診断の関係では「慢性肺疾患」を有する患者が、侵襲性インフルエンザ菌感染により「菌血症を伴う肺炎」を発症する場合は比較的多数認められた（表 2）。同様に、「悪性腫瘍」を有する患者が、侵襲性インフルエンザ菌感染により「原発巣不明の菌血症」を発症する場合は比較的多数認められた（表 2）。

## 4. 侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株の血清型

これら 43 菌株のうち、41 株が莢膜型別用免疫

血清で特異的凝集を示さず、また、PCR法<sup>6,7)</sup>によっても特異的バンドは認められなかった。また、1株がa～fすべての免疫血清および生理食塩水で凝集を示したが、PCR法で**exB**遺伝子のバンドが確認されなかったため、今回送付された43株のうち42株をnon-typable *Haemophilus influenzae* (NTHi)と判定した。残る1株はe型であった。

### 5. 侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株の生物型

2013年、2014年度の17株に関して生物型を検討

した。インフルエンザ菌は、インドール産生能、ウレアーゼおよびオルニチンデカルボキシラーゼ活性などの生化学性状により、I～VI型に分類される。今回送付された分離菌株について簡易同定キット(ApiNH、デオメリュー)を用いて菌同定および生物型別を実施したところ、これら17株は*H. influenzae*であり、生物型は、I型が3株、II型が8株、III型が4株、V型が1株およびVI型が1株であった。17株の生物型は、多くの無莢膜型が属するII型およびIII型が多く、自然凝集

表2. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症患者の基礎疾患と臨床診断の関係

	Clinical manifestation				Outcome	
	Bacteremia without any focus	Meningitis	Bacteremic pneumonia	Others	Fatal	Non-fatal
<b>Comorbid diseases</b>						
Chronic pulmonary disease (n=7)	1	1	5		1	6
Chronic heart disease (n=5)	1		3	1	1	4
Cardiovascular disease (n=3)	2		1			3
Cerebrovascular disease (n=1)			1			1
Chronic liver disease (n=5)	4			1		5
Chronic kidney disease (n=4)	1		2	1		4
Diabetes mellitus (n=2)	1		1			2
Psychological disease (n=2)	1		1			2
<b>Immunocompromise</b>						
Malignancy (n=9)	5	1	3		2	7
Autoimmune disorder (n=5)	2		2	1	1	4
<b>No comorbid disease (n=9)</b>	<b>4</b>		<b>4</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>

表3. 成人の侵襲性インフルエンザ菌感染症患者分離株の薬剤感受性試験結果

Antimicrobials	Range	Break Point	No. (%) of susceptible strains
ABPC	0.19->256	1	20/43(47)
ABPC/SBT	0.19-32	2	26/43(60)
PIPC	<0.016->256	1	39/43(91)
CTX	0.012-2	1	27/43(63)
CTR	0.003-0.75	1	43/43(100)
			No. <sup>a</sup> (%) of strains
β-lactamase positive			2/24(8)
BLNAS <sup>b</sup>			13/24(54)
BLNAI <sup>c</sup>			4/24(17)
BLNAR <sup>d</sup>			5/24(21)

<sup>a</sup> Available for 24 answers

<sup>b</sup> BLNAS: β-lactamase non-producing ABPC sensitive strain (ABPC MIC ≤1)

<sup>c</sup> BLNAI: β-lactamase non-producing ABPC intermediately resistant strain (1<ABPC MIC<4)

<sup>d</sup> BLNAR: β-lactamase non-producing ABPC resistant strain (4≤ABPC MIC) (cefinase method)

MIC; tested by E-test

Break Pointは日本化学療法学会の敗血症のBPを参考

を示した菌株はI型であった(表4)。

## 6. 薬剤感受性試験

ABPC、ABPC/SBT、PIPC、MEPM、CTX、CTRXの6薬剤についてEtest(バイオメリュー)を用いて薬剤感受性試験を実施したところ、ABPC、ABPC/SBTに耐性および中間を示す株がそれぞれ23株および17株認められた。その他、CTXに16株が耐性および中間を示した。CTRXに関してはすべてが感性を示した。また、セフィナーゼ試験により $\beta$ -lactamase産生菌が2株認められ、それらの菌株は同一地方から送付された菌株であった。なお、本結果について解析するにあたり、日本化学療法学会が示す臨床的ブレイクポイントを採用した(表3)。

## D. 考察

平成25年度から侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症が五類感染症として位置づけられたことや、肺炎球菌に関しては、ワクチン接種に関する公的助成が実施されたことなどから、地方自治体においてこれら疾患の情報収集および分離菌株の性状を把握することは重要である。特に、平成26年10月からは高齢者を対象としたPPV23が公費助成の対象となったことから、成人の侵襲性肺炎球菌感染症のサーベイランスは重要である<sup>9, 10)</sup>。一方、侵襲性インフルエンザ菌感染症に関しては、インフルエンザ菌b型(Hib)を原因菌とする小児の敗血症、細菌性髄膜炎のほとんどが、Hibワクチンの導入により世界的レベルで激減している<sup>11)</sup>。その一方で、Hibの減少に呼応してNTHiによる侵襲性インフルエンザ菌感染症が報告されるようになった<sup>12)</sup>。

侵襲性インフルエンザ菌感染症に関しては、小児領域においては多くの研究報告がなされているが、成人の侵襲性インフルエンザ菌に関する報告は少ない。今回の結果から、本疾患は特に基礎疾患を有する高齢者に好発し、そのほとんどがNTHiであることが判明した。NTHiは、莢膜を有する菌株と比較して、莢膜多糖生合成遺伝子が欠損し莢膜型とは遺伝子レベルで同系列でないことが報告されている<sup>13)</sup>。このことから、NTHiは単純に莢膜を欠損したインフルエンザ菌であるとみなすことはできないと考えられる。これらのこと

から、今後菌株側と生体側との相関関係についての解析が必要であると思われる。なお、分離菌株の莢膜血清型がすべてNTHiであったことから、今後血清型タイピングに変わる指標も必要であることが示唆された。今回生物型について検討したところ、I型、II型、III型、V型およびVI型の5型に分類された今回の分離株のほとんどが、莢膜欠損株が属するII及III型に分類されたものの、同じNTHi株でも生物型が多岐にわたることから、今後分離菌株のさらなる精査が必要であると考えられた。

ABPC、ABPC/SBTに耐性および中間を示す株がそれぞれ23株および17株認められた。その他、CTXに16株が耐性および中間を示した。CTRXに関してはすべてが感性を示した。小児での調査ではあるが、本邦をはじめとして世界的にも $\beta$ -lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) および $\beta$ -lactamase producing ampicillin resistant (BLPAR)の検出事例が多くなっていることから<sup>14, 15)</sup>、成人においても監視体制を強化する必要があると思われる。

本研究において、地方衛生研究所が積極的に侵襲性細菌感染症技術研修に参加し、自施設において、これらの病原体に関する細菌検査を導入するに至ったのは、自治体における侵襲性細菌感染症に関するサーベイランス構築に大きな前進であると考えられる。

## E. 結論

地衛研から侵襲性肺炎球菌感染症および侵襲性インフルエンザ菌感染症患者由来菌株が順調に送付されつつある。これらの疾病の血清型などの菌株情報を把握することは今後のワクチン開発、公衆衛生行政における重要な要素であることから、今後も継続していくことが必要であることが示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし