

## 小児喀痰由来肺炎球菌の細菌学的解析

<sup>1)</sup>福岡市立こども病院検査部, <sup>2)</sup>同 総合診療科, <sup>3)</sup>国立感染症研究所細菌第一部, <sup>4)</sup>福岡市立こども病院小児感染症科  
安部 朋子<sup>1)</sup> 古野 憲司<sup>2)</sup> 常 彬<sup>3)</sup> 青木 知信<sup>2)4)</sup>

(平成 28 年 1 月 29 日受付)

(平成 29 年 1 月 5 日受理)

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, serotype replacement, pneumococcal conjugate vaccine (PCV)

## 要 旨

わが国では 7 価小児肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7) が 2013 年 4 月から定期接種化され, 侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal disease: IPD) の罹患率の低下とともに, 分離される血清型がワクチンに含まれない血清型へ置換される現象 (血清型置換, serotype replacement) が報告されている<sup>1)</sup>。

われわれは, 小児の気管支肺感染症の主要な原因菌である肺炎球菌についても, IPD 同様に血清型置換が発生しているのか検証した。

2014 年 8 月～2015 年 9 月に当院に入院し, 肺炎球菌が起炎菌と判断された気管支肺感染症の小児 66 症例から採取した喀痰を用いて, 肺炎球菌の血清型と薬剤感受性検査を実施するとともに, 小児肺炎球菌結合型ワクチン接種歴を調査した。

小児肺炎球菌結合型ワクチンを 1 回でも接種したことがある患児は 80.3% であった。肺炎球菌の血清型が判明した菌株は全株の 92.4% で, そのうち 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) に含まれる血清型の菌株は 9.8% であった。分離された血清型は多い順に, 15A (21.3%), 35B (19.7%), 6C (13.1%) 型で, いずれも PCV13 非含有型であり, IPD 同様に serotype replacement が起こっていることが示唆された。ペニシリン G に対する薬剤感受性検査については, ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) が 4.5%, ペニシリン中等度耐性肺炎球菌 (PISP) が 47.0%, ペニシリン感受性肺炎球菌 (PSSP) が 48.5% であった。血清型ごとに薬剤感受性を見ると, 15A, 19A, 23A, 35B は非感受性株が占める割合が多く, 血清型によって耐性傾向に差が見られた。

今回の解析で, IPD 同様に気管支肺感染症においても serotype replacement が発生していることが確認でき, また薬剤感受性も異なることから, 喀痰由来肺炎球菌の血清型を特定することは意義が深く, 病原体のサーベイランスの強化が重要であると考えられた。

[感染症誌 91:137~144, 2017]

## 序 文

肺炎球菌は中耳炎, 肺炎, 菌血症, 髄膜炎の原因となるグラム陽性の双球菌である。菌表層の莢膜ポリサッカライドは, もっとも重要な病原因子であり, 莢膜の血清型は現在少なくとも 93 の型が存在している<sup>2)</sup>。

我が国では, 7 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7) の 5 歳未満の小児に対する公費助成が 2010 年に開始された。2013 年 4 月からは, PCV7 が定期接種化され, 2013 年 11 月からは 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) が導入された。肺炎球菌が元来無菌で

ある材料から分離される感染症, 侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal disease: IPD) に及ぼすワクチン導入効果は, 罹患率の減少傾向とともにワクチンに含まれない血清型 (non-vaccine serotypes, nVT) の増加現象として報告されている<sup>3)</sup>。

肺炎球菌による小児の気管支肺感染症は, 髄膜炎や菌血症ほど重症度は高くないが, 小児の重要な入院理由のひとつである。肺炎球菌は, 乳幼児では常在菌として保菌率が高いため<sup>4)</sup>, 上咽頭や後鼻腔からの分離意義は低く, 気管支肺感染症の原因微生物を検索する際には喀痰からの分離が望ましい。

今回われわれは, ワクチン導入後の小児気管支肺感染症を引き起こした肺炎球菌の血清型分布を明らかに

別刷請求先: (〒813-0017) 福岡市東区香椎照葉 5-1-1  
福岡市立こども病院総合診療科 古野 憲司

するために、当院に入院した小児の喀痰から分離された気管支肺感染症の起炎菌と推定される肺炎球菌の解析を行ったので報告する。

### 対象と方法

#### 1. 対象

2014年8月～2015年9月に当院に入院した小児で、肺炎または気管支炎の気管支肺感染症と診断された1,238症例のうち、Geckler分類グループ4以上の良質な喀痰から分離した肺炎球菌66株(66症例)を解析対象とした。喀痰のグラム染色は市中肺炎および医療関連肺炎の起炎菌の推定に有用と言われるが<sup>5)</sup>、乳幼児では喀痰の採取が困難である。66症例から分離された喀痰のうち30症例(45.5%)の喀痰の塗抹検査でグラム陽性球菌の貪食像も確認できた。また、貪食像が認められない症例についても、上記基準の良質な喀痰から肺炎球菌の優位な検出を認めた場合は起炎菌と判断した。

「小児呼吸器感染症診療ガイドライン2011」(日本小児感染症学会 協和企画)に準じて、肺炎の診断基準は、発熱、鼻汁、咽頭痛、咳嗽などの急性呼吸器感染症症状を伴い、胸部X線像やCTなどの画像検査において肺に急性に新たな浸潤影が認められるものとし、急性気管支炎の診断基準は、発熱、咳嗽、喀痰などの気道感染症症状がある患者で、胸部聴診では連続性副雑音(ラ音)を聴取できるが胸部X線像では明確な異常陰影が認められないものとした。

肺炎球菌結合型ワクチンの接種歴は、初診時に保護者が記入する問診表に基づいて調査を行ったが、問診票では接種したワクチンの種類と接種日が不明であった。そのため、病院登録の住所へ調査票を送付し、接種したワクチンの種類と接種回数について回答を依頼した。このワクチン接種歴の調査は当院の倫理審議委員会にて承認を得て行った(承認番号:205番)。

#### 2. 分離方法, 同定方法, 薬剤感受性試験

検査材料の喀痰採取は通常の診療で行うのと同様の、咽頭刺激により誘発し吸引採取する方法を用いた<sup>6)</sup>。痰の膿性部分が少ない場合には滅菌採痰容器に滅菌生理食塩水を入れて吸引し、膿性の部分を検体として用いた。

喀痰をヒツジ血液寒天培地(日水製薬, 東京)に接種し、35℃, 10%CO<sub>2</sub>インキュベーターで一晩培養した。発育してきたα溶血を伴う連鎖球菌を鈎菌し、オプトヒンディスクにより感受性を認められたものを肺炎球菌とした。

薬剤感受性検査は、フローズプレート(栄研化学, 東京)を使用し、微量液体希釈法により実施した。ペニシリンGの最小発育阻止濃度(MIC)が0.06μg/mL以下をペニシリン感受性肺炎球菌(PSSP), 0.12μg/

mL~1μg/mLをペニシリン中等度耐性肺炎球菌(PISP), 2μg/mL以上をペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)とした。エリスロマイシンとレボフロキサシンについてのブレイクポイントは、CLSI M100-S20に基づいて判定した。

また、菌株を国立感染症研究所第一部に送付し、*lytA*遺伝子の検査<sup>7)</sup>により同定検査を実施するとともに、抗莢膜血清(Statens Serum Institut, Denmark)を用いて莢膜膨化法で血清型を決定した。

### 成績

#### 1. 莢膜血清型と肺炎球菌結合型ワクチン接種歴

肺炎球菌66株のうち血清型が判明したのは61株(92.4%)で、16種類認められた(Fig. 1)。15A型13株(21.3%), 35B型12株(19.7%), 6C型8株(13.1%)の分離割合が多く、61株中55株(90.2%)がPCV13非含有型であった。7価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)含有血清型は、23Fが1株(1.6%), 13価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV13)含有PCV7非含有血清型は5株(8.2%)分離され、5株の内訳は6A型1株と19A型4株であった。

調査した66症例のうち、ワクチン接種者は53症例(80.3%), ワクチン未接種者13症例(19.7%)であった。ワクチン未接種者から分離された肺炎球菌は13株すべてPCV13非含有血清型であった。ワクチン接種日と接種ワクチンの種類についての調査票は、66症例中34症例から回答を得た(回収率56%)。PCV13含有血清型が分離されていた6症例は、すべてワクチン接種者であった。PCV13含有血清型が分離された6症例のワクチン接種歴を表に示す(Table 1)。PCV7含有の23F型が分離された症例は、PCV7の2回接種と追加接種1回の合計3回接種でワクチンスケジュールが完了していた。PCV13含有PCV7非含有血清型が分離された5症例(6A型1例, 19A型4例)では、3症例はPCV13の接種歴がなく、2症例はPCV13接種歴があったものの、追加接種が未実施でワクチンスケジュールを完了していなかった。

調査した66症例の年齢構成は、1歳児が20症例と最も多く、5歳以上が3症例と最も少なかった。肺炎球菌結合型ワクチンを1回も接種したことのない13症例のうち、月齢0から月齢2未満が7症例と最も多く、日齢16が最年少であった。次いで多い未接種年齢層は5歳以上の3症例であった。定期接種対象年齢の月齢2から4歳までの各年齢層のワクチン接種率は高く、接種率は80%~100%であった(Table 2)。

#### 2. 莢膜血清型と薬剤感受性

薬剤感受性検査結果は、PSSP 32株(48.5%), PISP 31株(47.0%), PRSP 3株(4.5%)であった(Fig. 2)。各血清型別で3株以上分離された型のうち、23A

Fig. 1 Serotype distribution of the pneumococcal strains and vaccination history of the patients.

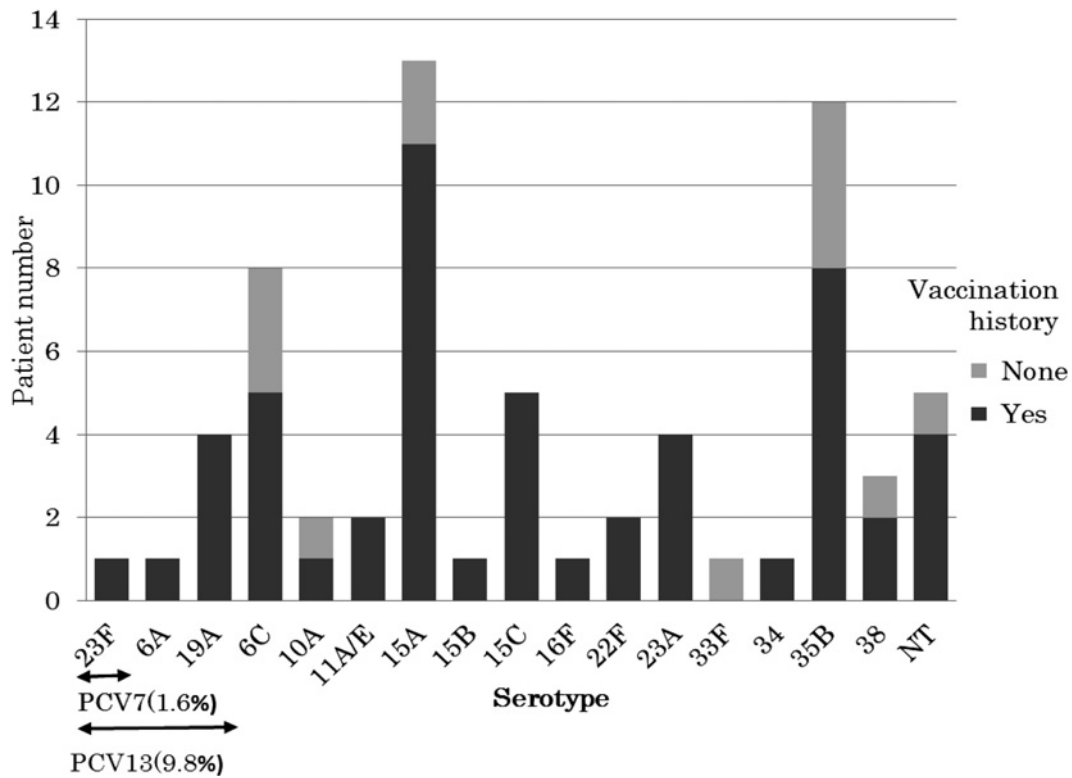


Table 1 Vaccination history of the 6 patients from whom the PCV13 types pneumococcal was isolated.

| Case NO. | Serotype | Age  | Dose                 |                      |                      |              |
|----------|----------|------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------|
|          |          |      | 1 <sup>st</sup> dose | 2 <sup>st</sup> dose | 3 <sup>rd</sup> dose | Booster dose |
| 1        | 23F      | 3y9m | PCV7                 | PCV7                 | N.A                  | PCV7         |
| 2        | 6A       | 9m   | PCV13                | PCV13                | PCV13                | none         |
| 3        | 19A      | 1y3m | PCV13                | PCV13                | PCV13                | none         |
| 4        | 19A      | 1y6m | PCV7                 | PCV7                 | PCV7                 | none         |
| 5        | 19A      | 3y9m | PCV7                 | PCV7                 | PCV7                 | PCV7         |
| 6        | 19A      | 3y2m | PCV7                 | PCV7                 | PCV7                 | PCV7         |

N.A: not applicable

Table 2 Age distribution and pneumococcal conjugate vaccination history of patients with pneumococcal infections.

|                     |      | (patient number)   |                   |        |         |         |         |                         |       |
|---------------------|------|--------------------|-------------------|--------|---------|---------|---------|-------------------------|-------|
|                     |      | 0 month ~ 2 months | 2 months ~ 1 year | 1 year | 2 years | 3 years | 4 years | 5 years of age or older | Total |
| Vaccination history | Yes  | 0                  | 16                | 21     | 4       | 7       | 5       | 0                       | 53    |
|                     | None | 7                  | 1                 | 0      | 1       | 0       | 1       | 3                       | 13    |
| Total               |      | 7                  | 17                | 21     | 5       | 7       | 6       | 3                       | 66    |
| Vaccination rate    |      | 0.0%               | 94.1%             | 100.0% | 80.0%   | 100.0%  | 83.3%   | 0.0%                    | 80.3% |

(100%), 15A (92.3%), 19A (75.0%), 35B (75.0%) 型で, PISP と PRSP が高頻度に分離された. 一方で, 6C (12.5%), 15C (20.0%) 型の非感受性株が占める割合は低く, 38 型については, 分離された 3 株すべてが PSSP であった.

エリスロマイシン感受性株は 4 株 (6.1%) で血清型の偏りはなかった. レボフロキサシン耐性株は分離されず, 全株感受性であった.

考 察

今回われわれは, ワクチン導入後の非侵襲性肺炎球

Fig. 2 Serotype distribution and penicillin-susceptibility of the pneumococcal strains.

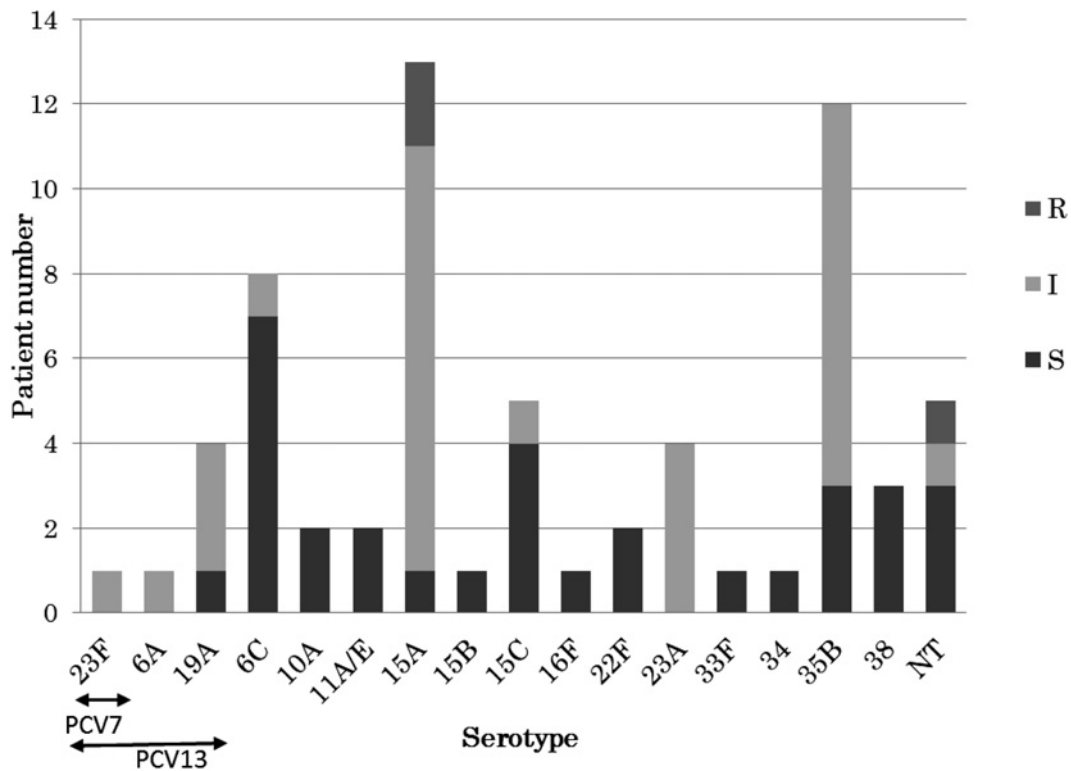


Table 3 Comparison of surveillance studies on pneumococcal infections.

|                            | This article, Fukuoka      | NID <sup>1)</sup> | CDC ABCs <sup>10)</sup> |
|----------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------|
| Target disease             | Bronchopulmonary infection | IPD               | IPD                     |
| Age                        | <12 years of age           | <5 years of age   | <5 years of age         |
| Country                    | Japan                      | Japan             | United States           |
| PCV7 use began in          | 2011                       | 2011              | 2000                    |
| Epidemiologic year         | 2014-2015                  | 2013              | 2006-2007               |
| Cases                      | 61                         | 94                | 427                     |
| PCV7 vaccine serotypes     | 1 (1.6%)                   | 4 (4.3%)          | 14 (3.3%)               |
| Non-PCV7 vaccine serotypes | 90 (98.4%)                 | 90 (95.7%)        | 413 (96.7%)             |

NID: National Institute of Infectious Diseases

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

ABCs: Active Bacterial Core surveillance

菌感染症を引き起こした肺炎球菌の血清型解析を試みた。

2007年から始まった「ワクチン有用性向上のためのエビデンスおよび方策に関する研究」(庵原・神谷班)で、わが国でも肺炎球菌結合型ワクチン導入により小児 IPD 症例が有意に減少したことが明らかになった。分離された肺炎球菌の血清型分布の検討では、PCV7 公費助成前は、PCV7 含有型は 77.2% であったのに対し<sup>8)</sup>、定期接種後の 2013 年には 4.3% に低下していたと報告されている<sup>9)</sup>。2000 年に PCV7 を導入した米国では、PCV13 認可前 (2007 年) の 5 歳未満 IPD 幼児例に関する CDC のデータ (Active Bacterial Core

surveillance : ABCs) によると、PCV7 含有型の検出率は、3.3% となっている<sup>10)</sup>。今回解析した喀痰由来肺炎球菌の血清型分布では、PCV7 含有型の分離割合は 1.6% と少数で、前述の報告を大きく下回っていた (Table 3)。当院では、PCV7 導入前の調査を実施していないため、肺炎球菌結合型ワクチンの導入効果を正確に比較できないが、PCV7 導入前の小児市中肺炎症例から分離された肺炎球菌の PCV7 含有型は喀痰分離株の 67% であったという報告<sup>11)</sup>もあり、今回われわれが調査した喀痰由来肺炎球菌について、IPD 同様に serotype replacement の発生が推定できる。

今回分離率が高かった PCV13 含有型の 19A 型は、

2013年に9県のIPD症例から収集した肺炎球菌94症例のうち41症例(43.6%)と最も多く分離された血清型と一致する<sup>9)</sup>。前述のABCsの分析結果によると、米国でもPCV13認可前(2007年)の5歳未満IPD症例のうち19A型によるものは42%を占め最も多い<sup>10)</sup>。PCV13含有型は、今後成人も含めてPCV13接種の普及と接種率の向上とともに、分離率のさらなる減少や排除が期待される。また、PCV13非含有血清型の6C型は、PCV13含有型の6A型および6B型との交差反応により、血清型特異IgG濃度と血中オプソニン活性(opsonic activity, OPA)が上昇することが報告されている<sup>12)</sup>。今後PCV13接種率の向上とともに、6C型の分離率も低下傾向になることが期待される。一方で、PCV13非含有型の15A, 15C, 23A, 35B型などについては、2015年3月に認可された10価肺炎球菌結合型ワクチンにも含まれておらず、serotype replacementにより今後さらに増加傾向になることが懸念される。

肺炎球菌結合型ワクチンの接種率は、定期接種対象である月齢2から5歳未満では高く、定期接種対象外となる5歳以上の年齢層では接種歴の有る者はいなかった。定期接種対象期間前の月齢0から月齢2未満のワクチン未接種7症例では、肺炎球菌が分離されたもののPCV13含有型の分離は見られなかった。さらに、ワクチン定期接種対象年齢であるにもかかわらず未接種の3症例、および、定期接種対象期間後の5歳以上の3症例についてもワクチン含有株は分離されず、ワクチン非接種群の13症例すべてがPCV13非含有型の分離であった。海外では、PCV7接種開始後、PCV7含有血清型による小児のIPD症例が減少するのと同じくして、65歳以上の高齢者においても間接的にPCV7含有血清型によるIPD症例が減少したという報告がある<sup>3)</sup>。また日本においても、小児のPCV導入による集団免疫効果によって、成人のIPD原因菌のserotype replacementが明らかになりつつあるという<sup>8)</sup>。ワクチン接種対象年齢の接種率の高さから推察すると、小児の集団内においても、ワクチン未接種児とワクチン接種保菌者との接触によって肺炎球菌の伝搬があると考えられる。PCV13導入後の上咽頭に保菌している肺炎球菌の調査では、PCV7含有血清型はほぼ排除されていたとの報告がある<sup>13)</sup>ことから、ワクチン未接種児とワクチン接種保菌者との間で、間接的なワクチン効果が起こっているものと推測される。

今回調査対象とした66症例すべては、PCV13が導入された2013年11月以降の症例である。PCV13導入から2年を経過していない時期の症例のため、年齢と接種日により、PCV7のみの接種者とPCV7と

PCV13の組み合わせ、またはPCV13のみの接種者が混在している。また、PCV7のみの接種でワクチンスケジュールが完了済でも、PCV13の補助的追加接種が未実施であった場合には、血清型のカバー率は低下しワクチン効果は減少する。今回の解析で、肺炎球菌結合型ワクチンを接種しているにもかかわらずワクチン含有型が分離されていた症例は、全部で6症例であった。PCV7含有型の23F型1例とPCV7非含有PCV13含有型の6A型1例と19A型4例である。23F型が分離された症例は、標準的なスケジュールではなかったが、PCV7のみでワクチンの接種は完了しておりvaccine failureである。6A型1症例と19A型4症例中1症例では、PCV13を3回接種していたが、4回目となる追加接種が未実施で、これはbreakthrough infectionと言えるだろう。国内IPD症例のvaccine failureやbreakthrough infectionでは、感染血清型に対する特異的IgG濃度は予防閾値以上であったが、OPAが基準を下回っており、オプソニン化抗体の機能が不十分であったと報告されている<sup>14)</sup>。今回のvaccine failureやbreakthrough infectionの症例も、OPAが十分に誘導されないことが原因のひとつであると考えられるが、原因究明には至っていない。なお、現在までにこれら6名に繰り返す感染のエピソードはない。

19A型4症例中残りの3症例は、PCV13の接種歴がなかった。つまり、PCV7のみでワクチンスケジュールが完了、もしくは、PCV7のみ3回接種で追加接種が未実施の症例である。PCV13を追加で接種していればカバーできていた可能性がある。スケジュール完了の2症例では、PCV13の補助的追加接種は行われていなかった。Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)は、PCV7完全接種例でも慢性疾患を有するハイリスク症例は、さらにPCV13の1回接種を推奨している<sup>15)</sup>。PCV7のみでワクチンスケジュールを完了している5歳未満の幼児には、PCV13補助的追加接種の検討が必要と思われる。

薬剤感受性検査の結果では、血清型別によってペニシリンGに対する耐性傾向に差があることが示唆された。PRSPの血清型としては、6B, 9, 14, 19F, 23F型が世界的に主流となっている<sup>16)17)</sup>。このため、肺炎球菌結合型ワクチンはこれらの血清型と病原性上重要な血清型を中心に開発されている。今回の解析で分離された株のうち、PCV7含有型の23F型もPISPであった。PCV7の接種はPRSP感染症を減少させるというワクチン効果が国内外で確認されているが<sup>17)18)</sup>、その反面、新たな莢膜血清型の株にPRSPが出現し問題になっている。PCV7導入後、米国では、ペニシリン非感受性株の約半数を19A型が占めるとともに、

15A型と6C型にPRSPが出現し、23A型のPISPや35B型のPRSPが増加した報告がある<sup>19)</sup>。国内では、PISPの19A型の分離率が増加し、15B、15C、22F型のPISPと15A、35B型のPRSPの分離率が増加したとの報告がある<sup>20)</sup>。今回分離されたPCV7非含有PCV13含有型の6A型と19A型では、5株のうち4株(80.0%)がPISPであった。6A型は、2008年出生コホート研究調査でペニシリン耐性率が53.3%と高い血清型である<sup>4)</sup>。今回分離した1株もペニシリン非感受性株でPISPであった。また、19A型と35B型は分離株の75%をPISPが占め、15A型、23A型は90%以上がPISPまたはPRSPとなり、国内外の報告とほぼ同様の耐性傾向がみられた。一方で、6C型は8株分離され分離率は高かったものの、非感受性株は1株(12.5%)のみで耐性傾向は見られなかった。5株分離された15C型は、非感受性株が1株(20.0%)で、PCV7公費助成開始後の2011年～2012年に国内IPD症例から分離された15C型の非感受性株の割合27.3%<sup>17)</sup>と同程度の耐性率であった。ペニシリン非感受性株が占める割合に血清型で偏りがあることは、臨床的にも問題となる可能性があるため、今後の検出推移を注視しておく必要がある。

肺炎球菌のペニシリン耐性機構は、ペニシリン結合蛋白：PBP (penicillin-binding protein) の遺伝子変異に起因するといわれている<sup>16)</sup>。6種類のPBPのうち、2つは莢膜遺伝子の近くに存在し、その領域を挟むような場所にある。莢膜遺伝子領域と2種類のPBPが変異を伴いながら組み換えを起こすことによって、血清型の変化やペニシリン耐性化が生じているとの報告がある<sup>21)</sup>。今後ワクチンの普及により、肺炎球菌は選択圧を受けて、遺伝子組み換え現象は持続して発生するであろう。肺炎球菌が自己融解酵素を産生する菌であることは、遺伝子組み換えの発生頻度を高める要因になるものと思われる。血清型の検出状況とペニシリン耐性率の関連については、今後も継続的に調査していく必要がある。

今回われわれの解析では、非侵襲性の肺気管支感染症においてもワクチン効果が得られる一方で、IPD同様に serotype replacement の発生が示唆された。血清型の分布傾向についても、IPDを引き起こす肺炎球菌の血清型の変遷と同様の傾向が見られた。肺炎とIPDについて、同じ研究グループがほぼ同じ時期に同じ対象に行われた研究の報告を見てみると、検出される血清型はその頻度に多少の違いがあるものの同一傾向が見られている<sup>22)23)</sup>。今後ワクチン効果を見極め、肺炎球菌感染症をコントロールするために、IPDに限らず非侵襲性感染症の起炎菌についても血清型を特定することは、意義が深く大変重要である。また、ワクチ

ン接種歴を調査するとともに薬剤耐性傾向を継続してサーベイランスしていくことが、今後の新たなワクチン開発や抗菌薬の適正使用につながるのではないかと考える。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

#### 文 献

- 1) 菅 秀, 庵原俊昭, 浅田和豊, 富樫武弘, 細矢光亮, 陶山和秀, 他: 小児における侵襲性インフルエンザ菌, 肺炎球菌感染症: 2013年. IASR 2014; 35: 233—4.
- 2) Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, *et al.*: Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. Clin Microbiol Rev 2015; 28: 871—99.
- 3) CDC: Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease United States, 1998—2003. MMWR 2005; 54 (36): 893—7.
- 4) Otsuka T, Chang B, Shirai T, Iwaya A, Wada A, Yamanaka N, *et al.*: SADO-study Working Group: Individual risk factors associated with nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: a Japanese birth cohort study. Pediatr Infect Dis J 2013; 32: 709—14.
- 5) Fukuyama H, Yamashiro S, Kinjo K, Tamaki H, Kishaba T: Validation of sputum gram stain for treatment of community-acquired pneumonia and healthcare-associated pneumonia: a prospective observational study. BMC Infect Dis 2014; 14: 534.
- 6) Hoshina T, Kusuhara K, Takimoto T, Saito M, Hara T: Identification of bacterial pathogens in pediatric community-acquired lower respiratory tract infection using a simplified procedure of sputum sampling and examination: comparison between hospitalized children with and without underlying diseases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29: 519—25.
- 7) Llull D, López R, García E: Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. J Clin Microbiol 2006; 44: 1250—6.
- 8) 河原隆二, 青柳哲史, 高橋弘毅, 武田博明, 田邊嘉也, 笠原 敬, 他: 2013年度の侵襲性肺炎球菌感染症の患者発生動向と成人患者由来の原因菌の血清型分布. IASR 2014; 35: 179—81.
- 9) 常 彬, 大西 真, 庵原俊昭: 小児侵襲性肺炎球菌感染症由来菌株の細菌学的解析結果. IASR 2014; 35: 234—6.
- 10) CDC: Invasive pneumococcal disease in young children before licensure of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine — United States, 2007. MMWR 2010; 59: 253—7.

- 11) 石和田稔彦, 田中純子: 小児市中肺炎患者から分離された肺炎球菌の性状. IASR 2013 ; 34 : 58—9.
- 12) Cooper D, Yu X, Sidhu M, Nahm MH, Fernsten P, Jansen KU : The 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) elicits cross-functional opsonophagocytic killing responses in humans to *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6 C and 7A. Vaccine 2011 ; 29 : 7207—11.
- 13) 成相昭吉, 矢内貴憲, 金高太一: PCV13 移行前後における乳幼児上咽頭から検出された肺炎球菌の血清型疫学. 日小児会誌 2016 ; 120 : 744—51.
- 14) Oishi T, Ishiwada N, Matsubara K, Nishi J, Chang B, Tamura K, *et al.* : Low opsonic activity to the infecting serotype in pediatric patients with invasive pneumococcal disease. Vaccine 2013 ; 31 : 845—9.
- 15) CDC : Licensure of a 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV13) and recommendations for use among children — Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR 2010 ; 59 : 258—61.
- 16) 荒川宜親: IDWR : 感染症の話ペニシリン耐性肺炎球菌感染症. 2000 ; 第32週.
- 17) 常 彬, 大西 真, 庵原俊昭: 小児侵襲性感染症由来肺炎球菌の細菌学的解析から見た肺炎球菌結合型ワクチンPCV7の効果. IASR 2013 ; 34 : 64—6.
- 18) Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, *et al.* : Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. N Engl J Med 2003 ; 348 : 1737—46.
- 19) Gertz RE Jr, Li Z, Pimenta FC, Jackson D, Juni BA, Lynfield R, *et al.* : Increased penicillin non-susceptibility of nonvaccine-serotype invasive pneumococci other than serotypes 19A and 6A in post-7-valent conjugate vaccine era. J Infect Dis 2010 ; 201 : 770—5.
- 20) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, Wajima T, Iwata S, Ubukata K, *et al.* : Changes in capsule and drug resistance of pneumococci after introduction of PCV7, Japan, 2010-2013. Emerging Infectious Diseases 2014 ; 20 : 1132—9.
- 21) Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B : Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. PLoS Pathogens 2007 ; 3 : 1628—36.
- 22) Naito S, Tanaka J, Nagashima K, Chang B, Hishiki H, Takahashi Y, *et al.* : The impact of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine on the incidence of childhood community-acquired pneumonia and bacteriologically confirmed pneumococcal pneumonia in Japan. Epidemiol Infect 2016 ; 144 : 494—506.
- 23) Ishiwada N, Hishiki H, Nagasawa K, Naito S, Sato Y, Chang B, *et al.* : The incidence of pediatric invasive *Haemophilus influenzae* and pneumococcal disease in Chiba prefecture, Japan before and after the introduction of conjugate vaccines. Vaccine 2014 ; 32 : 5425—31.

## Bacteriological Analysis of Pneumococcus Detected from the Sputum of Hospitalized Children

Tomoko ABE<sup>1)</sup>, Kenji FURUNO<sup>2)</sup>, Chang BIN<sup>3)</sup> & Tomonobu AOKI<sup>2)4)</sup><sup>1)</sup>Department of Clinical Laboratory and <sup>2)</sup>Department of General Pediatrics & Interdisciplinary Medicine, Fukuoka Children's Hospital, <sup>3)</sup>Department of bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases,<sup>4)</sup>Department of Pediatric Infectious Disease, Fukuoka Children's Hospital

7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) has been included in the routine immunization schedule since April 2013 in Japan. Serotype replacement — a phenomenon by which serotypes are replaced by non-vaccine serotypes after vaccine introduction — has been reported in invasive pneumococcal disease (IPD). Pneumococcus in sputum samples is one of the major causes of bronchopulmonary infection in children.

We tried to verify whether serotype replacement of Pneumococcus occurs in sputum samples in a similar manner as in IPD.

From August 2014 to September 2015, we performed antimicrobial susceptibility testing and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples and investigated the history of PCV from hospitalized children with *S. pneumoniae* bronchopulmonary infection.

From the results of our investigation, 80.3% of children have received PCV at least once. Serotypes of Pneumococcus were determined in 92.4% of tested strains and PCV13 strains accounted for only 9.8%. Major isolated serotypes were 15A (21.3%), 35B (19.7%), and 6C (13.1%). Those were not included in PCV13, i.e. serotype replacement occurs in bronchopulmonary infection just as in IPD. The results of antimicrobial susceptibility testing for Penicillin G indicated that penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) accounted for 4.5%, penicillin-intermediate resistant *S. pneumoniae* (PISP) accounted for 47.0% and penicillin-susceptible *S. pneumoniae* (PSSP) accounted for 48.5%. When examining the drug susceptibility by serotypes, 15A, 19A, 23A and 35B showed a high percentage of non-susceptibility. This means there is a difference in the resistant trend by serotypes.

In our study, it became clear that verifying of the serotypes of Pneumococcus in sputum is meaningful and surveillance of serotypes is important for evaluation of vaccination as IPD.