

表② 体重の二群比較の例

想定：	$\left\{ \begin{array}{l} \text{高齢者 } 50 \text{ kg} \\ \text{中年 } 60 \text{ kg} \end{array} \right\}$	$\rightarrow \delta = 10 \text{ kg}$
	$\left\{ \begin{array}{l} \text{体重の Max } 80 \text{ kg} \\ \text{Min } 35 \text{ kg} \end{array} \right\}$	$\rightarrow \sigma = \frac{\text{Max} - \text{Min}}{4} = 11 \text{ kg}$
ES =	$\frac{\delta}{\sigma} = \frac{10}{11} = 0.9$	
$\rightarrow N =$	$16 \div 0.9^2 = 20$ 例/群	(検出力 80%)

表③ 有効率の二群比較の例

想定：	$\left\{ \begin{array}{l} \text{A 群 } 20\% (=P_1) \\ \text{B 群 } 30\% (=P_2) \end{array} \right\}$	$\rightarrow \delta = 10\% (0.1)$
	$\bar{P} = \frac{P_1 + P_2}{2} = 0.25$	
$\sigma = \sqrt{\bar{P}(1-\bar{P})} =$	$\sqrt{0.25 \times 0.75} = 0.4$	
ES =	$\frac{\delta}{\sigma} = \frac{0.1}{0.4} = 0.25$	
$\rightarrow N =$	$16 \div 0.25^2 = 256$ 例/群	(検出力 80%)

表③は有効率を比較する例である。有効率の差の予想値が δ になる。 σ は二項分布から自動的に $\sqrt{\bar{P}(1-\bar{P})} = 0.4$ と算出される。そこで、エフェクトサイズは0.25となり(検出力80%)、必要サンプルサイズは一群256例と算出された。

5. 危険因子の検出

CVD(心血管死)に関する危険因子を調べる。たとえば、オッズ比(odds ratio:OR) >2.0 の危険因子を検出するには何例必要であろうか。この場合、事前情報としてCVDの通常のリスク(ベースラインリスク)が必要になる。それを年率5%と仮定すると、表④のように、 $P_1=0.05$ 、 $P_2=0.095$ になるから、エフェクトサイズ $=0.174$ 、1群あたり528例必要と算出された。仮にOR >1.5 を検出したいなら1群1,745例も必要となる。

6. 割合の推定

ピロリ菌感染割合を調査する。想定値50%と仮定し、推定精度(95%信頼区間としての)を $\pm 10\%$ とすると、100例調査すればよいと算出される(表⑤)。精度を1%まで高めると(10倍高めると)、必要サイズは100倍の10,000例必要となる。二乗に比例する。すなわち、一群

表④ 危険因子検出の例

想定：	$\left\{ \begin{array}{l} \text{ベースラインリスク } P_1 \\ \text{検出したいリスクの大きさ OR (オッズ比として)} \end{array} \right\}$
	\downarrow
	検出したい危険因子でのリスク $= \frac{P_1 \times \text{OR}}{1 + P_1 (\text{OR} - 1)} = P_2$
例：	$P_1 = 0.05$ (5%/年)
	OR = 2.0 (OR >2 なので最小値を設定する。)
$\rightarrow P_2 =$	$\frac{0.05 \times 2}{1 + 0.05 (2 - 1)} = 0.095$
$\bar{P} = \frac{P_1 + P_2}{2} =$	0.0725 , $\sigma = \sqrt{\bar{P}(1-\bar{P})} = 0.26$
ES =	$\frac{\delta}{\sigma} = \frac{0.095 - 0.05}{0.26} = 0.174$
$\rightarrow N =$	$16 \div 0.174^2 = 528$ 例/群
	(検出力 80%)

表⑤ 割合推定の例

想定：	$\left\{ \begin{array}{l} \text{ピロリ菌感染割合} = P \\ \text{推定精度 (95\%信頼区間)} = X \end{array} \right\}$
$\rightarrow X =$	$1.96 \sqrt{\frac{P(1-P)}{N}} \approx 2 \sqrt{\frac{P(1-P)}{N}}$
$\therefore N =$	$P(1-P) \left(\frac{2}{X}\right)^2$
例：	$P = 0.5$, 精度 $X = 0.1$
$N =$	$0.5 \times 0.5 \times \left(\frac{2}{0.1}\right)^2 = 100$ 例

での割合の推定では、想定する割合値と推定精度が必要となる。

7. 既存データとの比較

これまでピロリ菌感染割合は40%(既存データ値)とされていたのが、今年はいそれより低いという仮説を立証するには、まずどこまで低いかを示す想定値(ここでは30%と想定)が必要となる。そうすれば、エフェクトサイズが0.204となり、304例が必要サイズと算出される。すなわち、既存データ値と想定値が必要となる(表⑥)。

8. その他の事項

二群比較の例では均等割り付け(Equal allocation)を仮定していたが、非均等割り付け(Unequal allocation)の場合は少し変わる。1:1での総サイズをNとすると、1:kでは $N' = N(1+k)^2/4k$ が必要となる。表⑦に示したように、1:4になると1:1の場合の1.56倍に増える。

表⑥ 既存データ値との比較例

想定： { ピロリ菌感染割合 (既存値) = $P_0 = 0.4$ } { 今年の割合 $P_2 = 0.3$ } $\rightarrow \delta = 0.4 - 0.3 = 0.1$ $\sigma = \sqrt{P_0(1-P_0)} = \sqrt{0.4 \times 0.6} = 0.49$ (表④とは異なり、一群のみなので、 σ の推定は H_0 、つまり P_0 を用いる.) $ES = \frac{\delta}{\sigma} = 0.204$ $\rightarrow N = 16 \div 0.204^2 = 384$ 例 (検出力 80%)
--

仮に 1:1 のときの必要サイズが 1,000 例とすると、1:2 だと 1,125 例必要となり、一方は $1,125 \times 1/3$ (375 例)、もう一方は $1,125 \times 2/3$ (750 例) と算出される。すなわち、1:1 割り付けが最も効率的なデザインといえる。

つぎに、脱落を想定する場合である。脱落率を d とすると、必要症例数は $N \div (1-d)$ に変わる。もし $N = 1,000$ 例であり、 $d = 0.1$ (10%) を想定すると、必要症例数は $1,000 \div (1-0.1) = 1,000 \div 0.9 = 1,111$ 例となる。実際に 1,111 例を対象にして 10% 脱落すると、 $1,111 \times 0.9 = 1,000$ 例になる。

おわりに

ここで述べたような平均値あるいは割合の例では、Lehr の公式³⁾を使えば電卓で計算できる。もっと厳密に求めたければ、JMPTMという汎用ソフト (アカデミックの買い取りで約 8 万円) が便利である。それ以外の生存率の場合 (ハザード比、組み入れ期間、追跡期間をもとに) で厳密に算出したい場合は、nQuery AdvisorTMというソフト (アカデミックの買い取りで約 10 万円) をお勧めする。最後に、いくつかの総説論文^{4)~10)}と、定評ある教科書¹¹⁾¹²⁾を挙げるので、必要に応じ参照してもらいたい。

参考文献

- 1) Feinstein AR: *Multivariate analysis: an introduction*, Yale University Press, New Haven, 1996, p226
- 2) Peduzzi P *et al*: A simulation study of the number of events per variable in logistic regression analysis. *J Clin Epidemiol* 9: 1373-1379, 1996
- 3) Lehr R: Sixteen S-squared over D-squared: a relation for

表⑦ 非均等割り付けでのサイズ増大

1:1 でのサイズ N	
$\rightarrow 1:k$ でのサイズ $N' = N \times \frac{(1+k)^2}{4k}$	
少ないほう: $\frac{N'}{1+k}$	
多いほう: $N' - \frac{N'}{1+k}$	
k	全体 N'
2	1.125N
3	1.333N
4	1.56N

- crude sample size estimates. *Stat Med* 11: 1099-1102, 1992
- 4) 折笠秀樹: 仮説の設定と必要症例数. 血圧 10: 1275-1279, 2003
 - 5) 森實敏夫: 生存分析のためのサンプルサイズ計算—ウェブツールを活用する. あいみっく 32: 54-58, 2011
 - 6) 折笠秀樹: 臨床研究デザインの初歩. リハビリテーション医学 49: 177-182, 2012
 - 7) Whitley E *et al*: Statistics review 4: sample size calculations. *Crit Care* 6: 335-341, 2002
 - 8) Schulz KF *et al*: Sample size calculations in randomised trials: mandatory and mystical. *Lancet* 365: 1348-1353, 2005
 - 9) Noordzij M *et al*: Sample size calculations. *Nephron Clin Pract* 118: c319-c323, 2011
 - 10) van der Tweel I *et al*: Standard 4: determining adequate sample sizes. *Pediatrics* 129 (Suppl 3): S138-S145, 2012
 - 11) Machin D *et al* (eds): *Sample Size Tables for Clinical Studies, third edition*. Blackwell Science, Oxford, 2008
 - 12) Chow S-C *et al* (eds): *Sample Size Calculations in Clinical Research*, Marcel Dekker, New York, 2003

おりがさ・ひでき

折笠秀樹 富山大学大学院医学薬学研究部バイオ統計学・臨床疫学教授

1956 年、大阪生まれ。
 1978 年、東京理科大学理学部応用数学科卒業、関東通信病院。
 1983 年、米国ノースキャロライナ大学公衆衛生学部留学。
 1988 年、同博士号取得 (バイオ統計学)。エーザイ株式会社。
 1992 年、自治医科大学附属大宮医療センター助手。1994 年、富山医科薬科大学 (現富山大学) 教授。
 専門は、臨床統計学。研究テーマは、疾病の予測モデリング、QOL 評価など。

総説

東洋医学の臨床研究で必要とされる統計学

折笠 秀樹

富山大学大学院医学薬学研究部バイオ統計学・臨床疫学教室, 富山, 〒930-0194 富山市杉谷2630

Statistics in Clinical Research of Oriental Medicine

Hideki ORIGASA

Division of Biostatistics and Clinical Epidemiology, University of Toyama Graduate School of Medicine, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

日本東洋医学雑誌第61巻第5号別刷

総説

東洋医学の臨床研究で必要とされる統計学

折笠 秀樹

富山大学大学院医学薬学研究部バイオ統計学・臨床疫学教室, 富山, 〒930-0194 富山市杉谷2630

Statistics in Clinical Research of Oriental Medicine

Hideki ORIGASA

Division of Biostatistics and Clinical Epidemiology, University of Toyama Graduate School of Medicine, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan

Abstract

Oriental medicine encompasses various areas including Kampo medicine, and alternative treatments such as acupuncture and massage. Special knowledge of statistics is not necessary to understand in oriental medicine, for which it is sufficient to master general statistics. This review describes statistic fundamentals and important issues for submitting an original article. It describes statistical thinking, data collection, study design, special considerations related to oriental medicine, fundamental statistical methods, multivariate analysis, and statistical software. In particular, it deals with the concept of sample variation, observational and experimental studies, rationale for randomization, sample size determination, t-tests, chi-square tests, paired tests, nonparametric methods, P-values, correlation coefficients, multiple regression, and logistic regression.

Key words : statistics, study designs, univariate analysis, multivariate analysis, statistical software

要旨

東洋医学には漢方薬をはじめとして、鍼・マッサージなどの代替医療と呼ばれるものまで幅広く含まれる。基本的には東洋医学に特有の統計学が必要ということではなく、一般に解説されている統計学を理解しておけば十分である。本総説では統計学の基本を解説しつつ、論文投稿に際して重要な事項を述べる。統計学の考え方、データの取り方、研究デザインの詳細、東洋医学特有の配慮、基本的な統計手法、多変量解析、統計ソフトの7つに分けて概説する。特に、標本変動の概念、観察研究と介入（実験）研究の違い、ランダム化の意義、症例数設計、t検定・カイニ乗検定、対応のある検定、ノンパラ手法、P値、相関係数、重回帰分析、ロジスティック回帰分析を解説する。

キーワード：統計学、研究デザイン、単変量解析、多変量解析、統計ソフト

はじめに

東洋医学には漢方薬をはじめとして、鍼・マッサージなどの代替医療と呼ばれるものまで幅広く含まれる。基本的には東洋医学だから特別の統計学が必要ということではなく、一般に解説されている統計学を理解しておけば十分であろう。今回の総説でも、そのような観点から7項目（統計学の考え方、データの取り方、研究デザインの詳細、東洋医学特有の配慮、基本的な統計手法、多変量解析、統計ソフト）について概説する。

1. 統計学の考え方

表1に示したように、統計学 (Statistics) とは確率で議論するのではなく、数式で議論するのではなく、状態 (Status) について調べるといのが根本

である。状態というのは、個人個人におけるばらつきのことであり、そのばらつきが偶然の範囲か、偶然から逸脱したものかを見極めるのが統計学の目指すところである。また、ばらつきというと個人間の変動（個人ごとのデータの変動）を思い出すだろうが、統計学ではそのほかに標本間のばらつき、つまり標本変動 (Sampling variation) という概念を念頭に置く必要がある。標本とはデータのことなので、データは通常ひとつしかない。しかしながら、標本は母集団からいくつも抽出することは可能である。仮に多くの標本を取ってくると、標本ごとに平均値は異なるだろう。このように、実際には1つのデータしかないのだが、多くのデータ間での違いを念頭におくことが重要である。

表1 統計の語源と基本について

<ul style="list-style-type: none"> • Statistics To stand, Status 状態 (ラテン語, 18c) • 状態について調べる学問 ばらついている • ばらつきの中で真実を見つけるのが統計 • ばらつき (Variation) <ul style="list-style-type: none"> - 個人間のばらつき - 標本間のばらつき (標本は1つだが仮想的に)

表3 変動要因の分類

<ul style="list-style-type: none"> • 1. Chance → できるだけ小さく <ul style="list-style-type: none"> - 偶然、誤差、ではないか？ (測定誤差など) - P値や信頼区間を用いて判断する • 2. Bias → できるだけ避ける <ul style="list-style-type: none"> - 研究に何か問題はないか？ <ul style="list-style-type: none"> ◦ 交絡バイアス (別の原因が絡み合っている) ◦ 情報バイアス (測定法の違いなどが影響している) ◦ 選択バイアス (都合よい症例ではないか) - 研究内容、実施体制についての知識が必要
--

表5 臨床的疑問の種類

<ul style="list-style-type: none"> • 有病率/検査精度/尺度開発 • 関連性 • 因果関係/危険因子 • 予後 <ul style="list-style-type: none"> - 発症率・死亡率・悪化率 • 治療効果・予防効果

表2に標本変動を理解するための例を示した。A治療とC治療でQOLを比較するが、100名ずつ合計200名の標本で調べた結果、A治療の平均値が80点、C治療の平均値は70点であった。このことから、A治療のほうがQOLは高いと結論してよいだろうか。80点のほうが高いのでそれでよいというと、統計をあまりよく理解していないことになる。この結果は1つの標本での結果にすぎないのである。別の標本を取ると、この結果が再現される保証はない。そこで、標本ごとに変動することを考慮しても、なおかつその結論は正しいかどうかを判断しなければならない。そのためには、標本を多数個取ってきて調べないとわからないが、統計学の理論を使うと1つの標本でも、ある程度それがわかるのである。ある程度というのはいかにもアバウトだが、そのアバウトなところが統計学の本質である。ただし、アバ

表2 標本変動を理解するために

<ul style="list-style-type: none"> • A治療とC治療のQOLに関する比較 • A治療 100名 平均80点 • C治療 100名 平均70点 A > B ? • 200名のサンプルについてはYesだが、A・C治療を受ける母集団についてYesかどうかはわからない • Sampling Variation 標本変動が存在する <ul style="list-style-type: none"> - 別のサンプルで、同様の結果が得られるかどうかはわからない • 標本変動(偶然性)を考慮して、真実を判断するのが統計

表4 臨床研究をはじめためのステップ

<ul style="list-style-type: none"> • 仮説(コンセプト)を明らかにする • その仮説の疑問の種類を明らかにする • 研究の型(観察研究・介入研究)を決める • PICO(PECO)を明示する • プロトコルを作る • ケースカードを作る • 同意書、同意説明文書を作る • 倫理審査委員会(IRB)にかける • 研究を事前登録する

表6 臨床研究のPICO (PECO) とは

<ul style="list-style-type: none"> • Participants 対象 • Intervention 介入 → Control 対照 <ul style="list-style-type: none"> - 観察研究ではExposure 曝露 • Confounding 交絡 <ul style="list-style-type: none"> - 別の原因を払拭するために調べておく項目 • Outcome 結果

ウトといってもいい加減ということではなく、0-1ではなく確率で表現されるという意味である。すなわち、完全にそれが正しいかどうかについて統計学は教えてくれないが、95%多分そうだろうということを教えてくれる。95%という意味で「ある程度」といったのである。

データが変動する要因は大きく2つに分けられる(表3)。ひとつは偶然変動と呼ばれているChanceであり、もうひとつは何か理由があって変動するBiasである。したがって、患者さんごとに反応(結果)が異なっているとき、これは偶然に異なっているだけなのか(これをChanceという)、それとも何か体内の変化ゆえに異なっているのか(これをBiasという)を見極める必要がある。

表7 構造化抄録のヘッダー

- Background (背景)
- Objective (目的)
- Design (デザイン)
- Setting (場所)
- Participants (対象)
- Measurements (測定)
- Results (結果)
- Limitation (限界)
- Conclusion (結論)

表8 疫学研究の分類

- 横断研究 (アンケート調査)
Cross-sectional study
 - 症例対照研究 (後ろ向き研究)
Case-control study
 - コホート研究 (前向き研究)
Cohort study
- } 縦断研究

表9 臨床試験の分類

1. 同時比較試験
同時対照群を伴う
ーランダム化比較試験(RCT)
ー非ランダム化比較試験
ークロスオーバー試験
2. 自己対照試験(前後比較試験)
同時対照群はなく、介入の前後で比較する
3. 既存対照試験
同時対照群はなく、既存データと比較する

表10 症例数の計算式

- δ, β, α
 - δ 差の大きさ(検出したい差)
 - σ ばらつき(SD)
 - β 1- β が検出力(Power) 80% or 90%
 - α 有意水準 通常両側5% (時に1%)
- 近似計算式(Power=80%)
 - $N = 16 \div (\text{Standardized difference})^2$
 - 平均値の比較
 - Standardized difference = $\delta/\sigma = \text{Effect size}$
 - 割合の比較
 - Standardized difference = $[P_1 - P_2] / [P(1-P)]^{1/2}$

2. データの取り方

臨床研究をおこなうときには、表4に示したようなステップを踏む必要がある。コンセプトを明示し、疑問の種類(表5)を明らかにし、どのような研究デザインがよいかを考える。研究デザインとはデータの取り方のことであり、いろんな型が存在している¹²⁾。良いデータを取らなければ、いくら適切な解析をしても結論は誤る。

研究デザインは大別し、調査(観察研究、あるいは疫学研究)と実験(介入研究、あるいは臨床試験)がある。調査というのはありのままの状態を調べる研究法であり、実験というのは通常とは異なることをする研究法である。表5の疑問の種類において、治療効果・予防効果では実験と呼ばれる種類の研究でないと結果の信憑度が落ちる。すなわち、治療効果は観察研究では立証しにくいということである。観察研究ではありのままを調べるため、治療は状態の悪い患者へ実施されがちである。したがって、治療を行っている患者ほど結果の悪くなることが多い。治療を行う必要のない人は元々結果がよいからである。これでは真の治療効果を追求できないことになる。すなわち、治療を行う患者も行わない患者も背景因子をそろえないといけない。患者背景をそろえるための効果的な手法はランダム割り付け(Random allocation)という手法である。確率を使って治療を

行う群と行わない群へ振り分けると、両群の背景は類似することが知られている。これは、イギリスの統計学者である Fisher 博士が1925年に提唱したランダム化(Randomization)という実験手法である。

実験か調査かのどちらかを選択したら、次のステップとしてPICO(あるいはPECO)を考えなければならない(表6)。研究の概略を考案するステップである。まず、P(Participants)とは対象のことである。次に、I(Intervention)は介入のことであり、観察研究では介入はないのでE(Exposure)に変える。次に、C(Confounding)は結果に影響すると思われるI(またはE)以外の変数のことである。これは交絡因子と呼ばれ、重要な交絡因子が欠落した研究は致命傷となることもある。最後に、O(Outcome)は結果変数のことであり、臨床試験用語ではエンドポイント(Endpoints)に相当する。

PICO(PECO)だけではプロトコル(研究計画書)の作成は難しいため、次に構造化抄録(structured abstract)を考えるとよいだろう。表7に示したのは構造化抄録のヘッダーである。背景、目的、デザイン、場所、対象、測定、結果、限界、結論から成っている。近年多くの専門誌で採用されている方式なのでご存知の方も多いただろう。臨床研究を計画している段階から、この構造化抄録を完成しておくことよ

表11 臨床研究デザインを見極めるポイント

- ポイント1
- 介入研究か観察研究かを見極めること
- ポイント2
- 縦断研究か横断研究かを見極めること
- ポイント3
- 前向き研究か後ろ向き研究かを見極めること
- ポイント4
- 同時対照群があるかどうかを見極めること

いだろう。結果が分からないから抄録は当然書けないわけだが、この段階では予想する結果を記載すればよい。予想値は大変重要であり、プロトコル作成の際の症例数設計でも必要となる。

構造化抄録を書きあげたら、次にすることは研究計画書³⁾ (プロトコル) を書くことである。そして、データを記載するための症例記録用紙 (ケースカード) を作成する。最後に同意説明文書及び同意書を作成する。この3つをセットにして倫理審査委員会⁴⁾ (IRB) で承認されなければならない。倫理審査委員会はコアとなる施設でまず審査してもらい、その後は必要とされる施設のみで審査を受ければよい。コアの施設での審査結果を流用する場合は、再度の審査は必要ない。

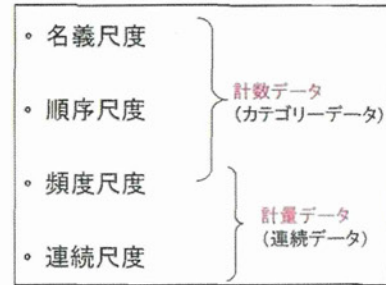
倫理審査を通過し、研究が開始される段になったら、臨床研究の事前登録をしておきたい。事前登録をしていないと出版しない雑誌が増えているので注意されたい。内容としてはプロトコルの骨子程度なので、事前登録は簡単に実施できる。登録サイトとしては、米国 (<http://www.clinicaltrials.gov>) あるいは本邦 (<http://www.umin.ac.jp/ctr>) のサイトがよいだろう。

3. 研究デザインの詳細

臨床研究をはじめるときのステップという観点から先に研究デザインを解説したが、ここでは調査及び実験の詳細な型について、症例数設計の詳細について解説する。

観察研究 (疫学研究) は大きく3つの型に分けられる (表8)。時間経過を伴わない横断研究 (Cross-sectional studies)、時間経過を伴う縦断研究 (Longitudinal studies) にまず分けられる。因果関係を立証する研究では縦断研究でないといけない。さらに、縦断研究は前向き研究 (Prospective studies) と後ろ向き研究 (Retrospective studies) に分けられる。後

表12 データの種類



ろ向きだとデータの信憑性に疑問があったり、必要とされるデータが欠落していたりするため、一般的には前向き研究の方が優れるとされる。後ろ向きの代表的研究デザインは症例対照研究 (Case-control studies) である。前向きの代表的研究デザインはコホート研究 (Cohort studies) といって、追跡調査の類である。

介入研究 (臨床試験) は同時比較試験、自己対照試験、既存対照試験に大別される (表9)。同時対照試験では、介入が2種類以上になっている。その中で対照群 (コントロール) のあることが優れた点である。2つ以上の比較群をどのように割り当てるかはいろんな方法がある。曜日で決めてもよいだろうし、交互に割り当てるという方法もあるが、もっともよいのは確率で決める方式である。その方式をランダム割り付けと呼んでいる。ランダム割り付けの利点としては、比較される群の背景が自然と類似することである。ランダム割り付けを伴う比較試験のことをランダム化比較試験 (Randomized controlled trials, 略してRCT) と呼んでいる。このRCTのチェックリストであるCONSORT声明に目を通してほしい⁵⁾。次の自己対照試験では介入はひとつだけであり、介入の前後で比較する。この研究法では先入観ゆえに良い結果が得られがちである。最後は既存対照試験といい、がんの手術成績のように過去の成績と評価する研究法である。ここでも対照群 (コントロール) は置いていない。

プロトコルには集積予定の症例数を書かないといけない。症例数は必要最小限でないと倫理的に問題になるし、科学的に結果を出せる (つまり統計学的有意な結果になる) 症例数でないといけない。したがって、単に予定症例数を書くだけでなく、症例数設定の根拠も示すことが望まれる。そのことを症例数設計 (Sample size determination) あるいは検出力計

算 (Power calculation) と呼んでいる。症例数設計は複雑なので専門家にお願いするほうがよいが、簡単な場合は表10に示した近似式で算出できる。これは検出力80% (自分の主張が正しければ有意な結果が80%の確率で得られる) での計算式である⁶⁾。連続データの場合が平均値の比較、二値データ (イベントの有無など) の場合が割合の比較を参照されたい。この程度であれば JMP などの簡易統計ソフトでも計算できる。

最後に、臨床研究デザインを見極めるための4つのポイントを示した⁷⁾ (表11)。自分の研究は介入研究か観察研究かを理解することが第一、縦断研究か横断研究かを理解することが第二、前向きか後ろ向きかが第三、同時対照の有無が第四である。前後比較では対照群はないので同時対照は無となり、過去のデータと比較する研究も同時対照は無となる。

4. 東洋医学特有の配慮

東洋医学の臨床研究も西洋医学の臨床研究も、統計学の応用という観点からはほとんど違いはないと述べた。しかしながら、臨床研究デザインを考える上で東洋医学では少し特有な点があるので、その点は配慮すべきである⁸⁾。

第一の配慮は、適格基準の配慮 (証を使う; 専門医でないと参加無理) である。証があるので、新規患者では Run-in 期間を使用し、証に合わない場合は脱落させるような工夫が必要である。第二は、東洋医学は外科手術などと同様に二重盲検が不可能な点が挙げられる。すなわちオープン試験になるわけだが、そこで重要な点はエンドポイント判定を中立に行うことである。オープンゆえに結果を良い方向へ向けないよう、客観的指標をエンドポイントに設定することが大切である。しかしながら、東洋医学のメリットは客観的指標がよくなるというよりは心理的要素が強い。すなわち、不定愁訴がなくなるとか、冷感が減るといったメリットである。このような主観的指標をエンドポイントに設定するときは、PROBE デザインといって、エンドポイントの評価は担当医ではない別の医師などに実施してもらう手法を採用することが肝要となる。また、主観的要素を取り入れた確立した評価指標のないことが多く、そのような評価指標の開発をまず行うというステップが必要となることも多い。

5. 基本的な統計解析

研究デザインの次は統計解析についてである。統計解析の第一歩は、自分が収集しようとする臨床データの尺度をよく理解することである。データの種類は表12のように分類される。名義尺度と順序尺度はカテゴリで評価されるデータである。頻度尺度と連続尺度は数値で評価されるデータである。次に、自分の臨床研究の命題を X と Y で理解することである。X とは説明変数 (原因変数) であり、Y は目的変数 (結果変数) である。

臨床研究の統計解析の第一ステップは患者背景をまとめることである。どの論文でもはじめに患者背景が表として示される。連続量では平均 ± SD であらわすか、中央値 (四分位範囲) であらわす。ほぼ左右対称のデータでは平均 ± SD が一般的だが、そうでない (右側に裾を引っ張ることが多い) 場合には中央値 (四分位範囲) であらわすことが多い。ここで、SD とは標準偏差のことである。中央値とは大きい順に並べてちょうど真ん中の値である。四分位範囲とは下位25%～上位25%のことである。

表13には、主要な結果を示すための基本的統計手法を示した。簡単なケースとして、X 変数が男女のように二値 (二分) の場合を示した。デザイン上で対応の有無によって解析手法は異なるので、その違いをよく理解してほしい。たとえば、処置の前後での変化を見るようなデザインや、観察研究の症例対照研究でケースとコントロールを比較するデザインは Paired design になる。そのうえで、Y 変数の尺度によって手法名が決まる。連続データでは、対応のあるデザインでは Paired t-test (対応のある t 検定) を用いる。これは変化量の平均に関する検定である。対応のないデザインでは Unpaired t-test (対応のない t 検定) を用いる。これは平均値の差に関する検定である。Unpaired t-test の代わりに Student's t-test ということもある。t 検定の仮定として正規性があり、正規性を満たさない右に歪んだデータのような場合 (たとえば QOL 得点など) では、正規性を仮定しないノンパラメトリックな手法を用いる。Paired t-test の代わりに Wilcoxon signed-rank test (符号付き順位検定)、Unpaired t-test の代わりに Wilcoxon rank-sum test (順位和検定) を用いる。データ数が10例未満などと少ないときや、分布の型がよくわからないときも、こうしたノンパラメトリック

表13 基本的な検定手法

Y	X: 二値データの割合	
	対応のある計画 (Paired design)	対応のない計画 (Unpaired design)
連続データ	Paired t-test Wilcoxon signed-rank test	Unpaired t-test Wilcoxon rank-sum test
順序データ	Wilcoxon signed-rank test	Wilcoxon rank-sum test
名義データ	McNemar test Friedman test	Pearson's chi-square test Fisher's exact test

な手法を用いたほうがよい。また、順序データ(QOLの5段階データなど)では分布がよくわからないため、ノンパラメトリックな手法を用いることが多い。また、対応のあるデザインでの名義データではMcNemar testかFriedman test, 対応のないデザインでの名義データではChi-square test(カイ二乗検定)かFisher's exact test(直接確率法)を用いる。

統計的検定を行うとP値が計算される。帰無仮説(「差なし」)が正しいときに、今あるデータより帰無仮説から離れる方向のデータが出る確率がP値である。P値が小さいということは、今あるデータは「差なし」が正しい状況では出る可能性が低いことを意味する。したがって、帰無仮説は誤りに違いないと判断し、このとき統計学的に有意(statistically significant)と呼ぶ。P値がどれくらい小さいと有意かについては、一般的には $P < 0.05$, つまり5%未満だと小さいとみなす。厳しい場合には $P < 0.01$, 1%未満に設定することもある。なお、臨床研究のエンドポイントの評価では $P < 0.05$ という記載はせず、正確なP値を示すことがおおい。P = 0.0331なら、有効数字2桁をとり、P = 0.033と記載する。P = 0.335なら、同じく有効数字2ケタをとり、P = 0.34と記載する。P = 0.000013のように小さいときは $P < 0.0001$ と記載する。有効数字は2ケタ、少数2~4位までが原則であり、あまりに小さいときは $P < 0.0001$ と不等号であらわすのが慣習である。

臨床研究では2つの量の相関を示すこともある。相関は関連性の検討に用いる。直線性の相関ではピアソンの相関係数(Pearson's correlation, r と記載), そうでないか不明のときはスピアマンの相関係数(Spearman's correlation, ρ で記載)を用いる。また、因果関係の検討であれば相関係数ではなく、回帰式と R^2 を記載する。 R^2 は寄与率とか決定係数とよばれる。回帰式($y = a + bx$)により因果関係の式が明らかになり、 R^2 により寄与率(x で y を説明でき

表14 多重比較

<ul style="list-style-type: none"> 多群(k群)の対比較 まず分散分析で多群間の有意差を確認 	
<ul style="list-style-type: none"> 対比較のための多重比較法 <ul style="list-style-type: none"> - Nueman-Keuls test - Tukey's test - Scheffe's test - Dunnett's test - Bonferroni correction 	順序化し、順番に検定 対比較のみ 対以外の様々の比較 Control群との比較 P値を $k(k-1)/2$ 倍する
<ul style="list-style-type: none"> あまり勧められない <ul style="list-style-type: none"> - Duncan's multiple range test - Fisher's LSD (Least Significant Difference) test 	

る割合)がわかる。 R^2 は0.25以上あるとかなりよい因果関係とされる。

6. 多変量解析

最後に、多変量解析について少し解説する。詳細は総説^{9)~12)}をご覧ください。t検定は連続データの2群比較であったが、3群以上の比較になると分散分析(Analysis of variance, ANOVAと略す)を用いる。また、t検定では説明変数Xは1つであったが、説明変数が2つ以上ある場合でも分散分析を用いる。3群以上の比較になると、全体の比較を分散分析で行った後、内部で詳細な比較を行いたいことがある。その際は多重比較(Multiple comparison)という手法を用いる。内部で何回も検定を繰り返すと誤って有意にする危険性が増えるため、このような多重比較を行う。表14に示したように、数多くの多重比較の手法があるので、特徴に見合った手法を選択すべきである。なお、分散分析ではすべての説明変数はカテゴリー変数であるが、説明変数に連続変数も混ざると重回帰分析(Multiple regression)と呼ばれる。

Y変数が連続ではなく、心筋梗塞の有無など二値変数になると、重回帰分析の代わりにロジスティック回帰分析(Logistic regression)を用いる。説明変数はカテゴリーと連続変数が混ざってもよい。ロジスティック回帰分析では指標としてオッズ比(Odds ratio)を用いる。オッズ比とは、説明変数の1単位上昇によりオッズが何倍になるかを示す。心筋梗塞がY変数の場合、オッズとは「心筋梗塞あり：心筋梗塞なし」の割合のことである。オッズが1より大きいと心筋梗塞の進展因子であり、1より小さいと抑制因子である。たとえば年齢の心筋梗塞に対するオッズ比が1.2という、年齢が1歳上がるにつれ1.2倍心筋梗塞のリスクが上昇することを意味す

表15 統計ソフト

<ul style="list-style-type: none"> • プロ用 <ul style="list-style-type: none"> - SAS - S-plus - R • 一般用 <ul style="list-style-type: none"> - JMP - SPSS - Stata - エクセルアドインソフト(エクセル, StatMate, など) - Prism (グラフ作成に優れる) • フリーソフト
--

る。年齢10歳上がるごとにとすれば、1.2の10乗なので、6.2倍がオッズ比となる。説明変数が重症度のような順序尺度であれば、順序が1段階上がるごとのリスクがオッズ比になる。2段階上がるごとのリスクはオッズ比を2乗すればよい。

目的変数 Y がイベントの有無のような二値データでの多変量解析はロジスティック回帰分析であるが、イベント発生までの経過時間までわかっていることがある。心筋梗塞の発症がエンドポイントであっても、その発症日まで分かっている研究も多いだろう。その場合は、有無データとして解析するよりも時間データとして解析したほうが情報のロスが少ない。このように、イベント発症までの時間データ (Time to event) の解析には Cox 回帰 (Cox regression) あるいは比例ハザードモデル (Proportional hazards model) と呼ばれる手法が利用される。ロジスティック回帰も Cox 回帰も、第二次世界大戦後に開発された比較的新しい手法である。

7. 統計ソフト

最後に統計ソフトについて簡単に触れておこう。表15に示したように、統計ソフトは大きく分けて、プロ用の高額 (時にリース契約) な統計ソフト、メニュー方式で素人向けの統計ソフト、そして無料のフリーソフトに分けられるだろう。論文等では使った統計ソフト名を記載しなくてはならないことが多

いため、フリーソフトはあまり勧められない。専門家が近くにいるなら、SAS, S-Plus, R などのソフトで解析してもらおうとよいだろう。そうでなく自分で行うとしたら、JMP, SPSS, Stata, Add-on Excel ソフトが勧められる。また、論文に載せるグラフが容易に作れるソフトとして PRISM が便利である。

引用文献

- 1) 折笠秀樹：臨床研究デザイン—統計入門。真興交易医学出版部，東京，1995
- 2) 折笠秀樹，折笠奈緒美：どう読む？新聞記事の統計数字。ライフサイエンス出版，東京，2007
- 3) 福原俊一：リサーチ・クエスション，健康医療評価研究機構，京都，2008
- 4) 尾藤誠司：いざ，倫理審査委員会へ。健康医療評価研究機構，京都，2008
- 5) Moher D, Schulz KE, Altman D, for the CONSORT Group: The CONSORT statement. JAMA 285: 1987-1991, 2001 [<http://www.consort-statement.org/>]
- 6) Lehr R: Sixteen a squared over d squared: a relation for crude sample size estimates, Statist Med 11: 1099-1102, 1992
- 7) 折笠秀樹，角重喜，熊谷直子：臨床研究からどうエビデンスを評価するのか。内分泌・糖尿病科28(2): 165-170, 2009
- 8) 折笠秀樹：漢方医療のEBM. Geriatric Medicine 40(6): 747-752, 2002
- 9) 折笠秀樹：リハビリテーション医学研究で使われる多変量解析 1. 総論. リハビリテーション医学37(5): 427-431, 2009
- 10) 折笠秀樹：リハビリテーション医学研究で使われる多変量解析 2. 分散分析と重回帰分析. リハビリテーション医学37(6): 531-539, 2009
- 11) 折笠秀樹：リハビリテーション医学研究で使われる多変量解析 3. ロジスティック回帰とCox回帰. リハビリテーション医学37(7): 631-641, 2009
- 12) 折笠秀樹：リハビリテーション医学研究で使われる多変量解析 4. 主成分分析：因子分析・クラスター分析. リハビリテーション医学37(8): 731-740, 2009

**Nanogel-Based PspA Intranasal Vaccine
Prevents Invasive Disease and Nasal
Colonization by *Streptococcus pneumoniae***

Il Gyu Kong, Ayuko Sato, Yoshikazu Yuki, Tomonori Nochi,
Haruko Takahashi, Shinichi Sawada, Mio Mejima, Shiho
Kurokawa, Kazunari Okada, Shintaro Sato, David E. Briles,
Jun Kunisawa, Yusuke Inoue, Masafumi Yamamoto,
Kazunari Akiyoshi and Hiroshi Kiyono
Infect. Immun. 2013, 81(5):1625. DOI: 10.1128/IAI.00240-13.
Published Ahead of Print 4 March 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://iai.asm.org/content/81/5/1625>

	<i>These include:</i>
SUPPLEMENTAL MATERIAL	Supplemental material
REFERENCES	This article cites 52 articles, 27 of which can be accessed free at: http://iai.asm.org/content/81/5/1625#ref-list-1
CONTENT ALERTS	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

Nanogel-Based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by *Streptococcus pneumoniae*

Il Gyu Kong,^{a,b,c} Ayuko Sato,^{a,d} Yoshikazu Yuki,^{a,d} Tomonori Nochi,^e Haruko Takahashi,^f Shinichi Sawada,^f Mio Mejima,^a Shiho Kurokawa,^a Kazunari Okada,^{a,d} Shintaro Sato,^{a,d} David E. Briles,^g Jun Kunisawa,^{a,d,h,i} Yusuke Inoue,^j Masafumi Yamamoto,^k Kazunari Akiyoshi,^f Hiroshi Kiyono^{a,b,d,h}

Division of Mucosal Immunology, Department of Microbiology and Immunology,^a and International Research and Development Center for Mucosal Vaccines,^h The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; Graduate School Medicine and Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan^b; Department of Otorhinolaryngology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, South Korea^c; Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency, Tokyo, Japan^d; Division of Infectious Diseases, Center for AIDS Research, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina, USA^e; Department of Polymer Chemistry, Kyoto University Graduate School of Engineering, Kyoto, Japan^f; Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA^g; Laboratory of Vaccine Materials, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japanⁱ; Department of Diagnostic Radiology, Kitasato University School of Medicine, Kanagawa, Japan^j; Department of Microbiology and Immunology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan^k

To establish a safer and more effective vaccine against pneumococcal respiratory infections, current knowledge regarding the antigens common among pneumococcal strains and improvements to the system for delivering these antigens across the mucosal barrier must be integrated. We developed a pneumococcal vaccine that combines the advantages of pneumococcal surface protein A (PspA) with a nontoxic intranasal vaccine delivery system based on a nanometer-sized hydrogel (nanogel) consisting of a cationic cholesteryl group-bearing pullulan (cCHP). The efficacy of the nanogel-based PspA nasal vaccine (cCHP-PspA) was tested in murine pneumococcal airway infection models. Intranasal vaccination with cCHP-PspA provided protective immunity against lethal challenge with *Streptococcus pneumoniae* Xen10, reduced colonization and invasion by bacteria in the upper and lower respiratory tracts, and induced systemic and nasal mucosal Th17 responses, high levels of PspA-specific serum immunoglobulin G (IgG), and nasal and bronchial IgA antibody responses. Moreover, there was no sign of PspA delivery by nanogel to either the olfactory bulbs or the central nervous system after intranasal administration. These results demonstrate the effectiveness and safety of the nanogel-based PspA nasal vaccine system as a universal mucosal vaccine against pneumococcal respiratory infection.

The use of polysaccharide-based injectable multivalent pneumococcal conjugate vaccines (PCV7, -10, and -13) has diminished the number of fatal infections due to pneumococci expressing the particular polysaccharides present in the vaccine (1–3). However, *Streptococcus pneumoniae* remains a problematic pathogen (4, 5) because of the large number of different capsular polysaccharides associated with virulent disease in humans. In particular, nonvaccine strains are emerging pathogens that result in morbidity and mortality due to pneumococcal diseases, including pneumonia and meningitis (6–8).

Clinical demand to overcome these problems has prompted the preclinical development of universal serotype-independent pneumococcal vaccines that are based on a surface protein common to all strains. Pneumococcal surface protein A (PspA), a pneumococcal virulence factor (9–13), is genetically variable (14) but highly cross-reactive (9, 10). PspA is commonly expressed by all capsular serotypes of *S. pneumoniae* (15) and is classified into 3 families (family 1, clades 1 and 2; family 2, clades 3 through 5; and family 3, clade 6) according to sequence similarities (14). Given that parenteral immunization with PspA induces cross-reactive neutralizing immune responses in mice (16–18) and humans (19), using PspA as a serotype-independent common antigen for the development of pneumococcal vaccines seems to be an ideal strategy.

Pneumococcal infection is generally preceded by colonization of the upper airway (20, 21). Nasal carriage of pneumococci is the primary source for spread of the infection among humans (22,

23). Therefore, an optimal vaccine strategy to prevent and control the spread of pneumococcal disease would induce protective immunity against both colonization and invasive disease. Several studies have confirmed the efficacy of PspA as a nasal vaccine antigen by coadministering PspA with a mucosal adjuvant such as cholera toxin (CT) or cholera toxin subunit B (CTB) to mice (24–26). The mice subsequently mount antigen-specific immune responses in not only the systemic compartment but also the respiratory mucosal compartment (24, 25, 27), where bacterial colonization occurs (20). PspA-specific secretory immunoglobulin A (sIgA) antibodies induced by intranasal immunization with PspA and an adjuvant (i.e., a plasmid expressing Flt3 ligand cDNA) provide protection against pneumococcal colonization (28). In addition, studies in mice have revealed that this protection is mediated by antigen-specific interleukin 17A (IL-17A)-secret-

Received 20 February 2013 Accepted 21 February 2013

Published ahead of print 4 March 2013

Editor: R. P. Morrison

Address correspondence to Hiroshi Kiyono, kiyono@ims.u-tokyo.ac.jp, or Yoshikazu Yuki, yukiy@ims.u-tokyo.ac.jp.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00240-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00240-13

ing CD4⁺ T cells induced by intranasal immunization with pneumococcal whole-cell antigen (29, 30).

Therefore, the intranasal vaccination route is an improved route for preventing colonization of the nasal cavity by pneumococci. A leading obstacle to the practical use of nasal vaccine with a protein-based pneumococcal antigen is the need to coadminister a toxin-based mucosal adjuvant (e.g., CT) for effective induction of antigen-specific immune responses (31, 32). However, the use of such toxin-based adjuvants is undesirable in humans, as it carries the concern that the toxin may reach the central nervous system (CNS) or redirect the vaccine antigen into the CNS through the olfactory nerve in the nasal cavity (33, 34). To bypass these concerns, we recently developed a nasal vaccine delivery system based on a non-toxin-based mucosal antigen carrier, a cationic cholesteryl pullulan (cCHP) nanogel (35).

Here we show the efficacy of a nanogel-based nasal pneumococcal vaccine in which PspA is incorporated into a cCHP nanogel (cCHP-PspA). We also characterized the cCHP-PspA-induced PspA-specific Th17 and antibody responses against *S. pneumoniae*. Mice immunized with nasal cCHP-PspA were protected from lethal challenge with *S. pneumoniae* and had fewer pneumococci on their respiratory mucosae. These results suggest that a nontoxic nasal vaccine comprising nanogel-based PspA offers a practical and effective strategy against pneumococcal infection by preventing both nasal colonization and invasive diseases.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Female BALB/c mice (aged 6 to 7 weeks) were purchased from SLC (Shizuoka, Japan). All of the mice were housed with *ad libitum* food and water on a standard 12-h–12-h light-dark cycle. All experiments were performed in accordance with the guidelines provided by the Animal Care and Use committees of the University of Tokyo and were approved by the Animal Committee of the Institute of Medical Science of the University of Tokyo.

Recombinant PspA. Recombinant PspA of *S. pneumoniae* Rx1, which belongs to PspA family 1, clade 2 (14), was prepared as described previously, with slight modifications (26). Briefly, a plasmid encoding PspA/Rx1 (pUAB055; amino acids 1 through 302) (GenBank accession no. M74122) was used to transform *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. This construct contains amino acids 1 through 302 of the PspA protein from strain Rx1 plus a 6×His tag at the C terminus (26). The sonicated cell supernatant was loaded onto a DEAE-Sepharose column (BD Healthcare, Piscataway, NJ) and a nickel affinity column (Qiagen, Valencia, CA). This was followed by gel filtration on a Sephadex G-100 column (BD Healthcare).

Preparation of cCHP-recombinant PspA complex for intranasal vaccination. A cCHP nanogel (size, ~40 nm) generated from a cationic cholesteryl group-bearing pullulan was used for all experiments. The cCHP-PspA complex for each immunization was prepared by mixing 7.5 μg PspA with cCHP at a 3:1 molecular ratio (volume, 18 μl per mouse) and incubating the mixture for 1 h at 45°C. Before the complex was used in *in vivo* studies, the fluorescence resonance energy transfer (FRET) of fluorescein isothiocyanate (FITC)-PspA and a tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC)-cCHP nanogel was measured with a fluorescence spectrometer (model FP-6500; Jasco, Easton, MD) as described previously (37). FRET analyses confirmed that the cCHP nanogel appropriately formed nanoparticles after the incorporation of PspA (see Fig. S1 in the supplemental material). Dynamic light scattering analysis showed that the cCHP nanogel maintained the same nanoscale size (32.8 ± 0.2 nm) even after the incorporation of PspA. Lipopolysaccharide (LPS) contamination of purified PspA and cCHP (<10 endotoxin units/mg protein) was measured with a *Limulus* test (Wako, Osaka, Japan).

Immunization. Once weekly for 3 consecutive weeks, female BALB/c mice were immunized intranasally with cCHP-PspA, PspA plus CT (1 μg; List Biological Laboratory, Campbell, CA), PspA alone, or phosphate-buffered saline (PBS) only. Some experiments included an irrelevant antigen as a control; in these studies, mice were immunized intranasally with a complex of cCHP nanogel and a recombinant nontoxic receptor-binding fragment of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin subunit antigen Hc (cCHP-BoHc/A) (35). Serum, nasal wash fluid (NW), and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples were harvested 1 week after the last immunization. For NWs, 200 μl sterile PBS was flushed through the posterior choanae (38). BALF was harvested by instilling 1 ml of sterile PBS through a blunt needle placed in the trachea (38).

Bacterial strain. We used the kanamycin-resistant pneumococcal strain *S. pneumoniae* Xen10 (Caliper Life Sciences, MA), derived from the wild-type strain A66.1, which expresses PspA of family 1, clades 1 and 2 (39). *S. pneumoniae* Xen10 carries a stable copy of the modified *Photobacterium luminescens lux* operon at a single integration site on the bacterial chromosome (40). The virulence of *S. pneumoniae* Xen10 is comparable to that of the parent strain (40, 41). For challenge studies, *S. pneumoniae* 3JYP3670, which expresses PspA of family 2, clade 4, was used (10). All of the *S. pneumoniae* strains were grown in brain heart infusion (BHI) broth at 37°C in 5% CO₂.

Pneumococcal infection model. To evaluate the efficacy of intranasal vaccination with cCHP-PspA, mice were challenged 1 week after the last immunization. The cell densities of exponentially growing *S. pneumoniae* Xen10 cultured at 37°C in BHI broth were estimated from the optical density at 600 nm (OD₆₀₀); cells were pelleted and then diluted with PBS. Lethal (2 × 10⁵ CFU) and sublethal (2 × 10⁴ CFU) challenge doses diluted in 50 μl sterile PBS were administered intranasally to isoflurane-anesthetized mice. Mice were restrained vertically for 5 min to ensure inhalation of the organisms into the trachea. In addition, mice were inoculated intranasally with a lethal challenge dose (5 × 10⁴ CFU) of strain 3JYP3670 in the same way as that for strain Xen10. Nasal passages and lung tissues were homogenized in 500 μl sterile PBS for 1 min, and the numbers of bacterial colonies were determined by plating samples on LB agar plates containing kanamycin (200 μl/ml).

***In vivo* imaging of immunized and challenged mice.** Bioluminescence of bacteria was monitored for 1 min 24, 48, and 72 h after lethal challenge by using an Ivis charge-coupled device (CCD) camera (Xenogen, Alameda, CA). Total photon emission from the entire thorax of each mouse was quantified by using the LivingImage software package (Xenogen). The results are provided as numbers of photons/s/cm²/sr.

Antibody titer and subclass analysis. Antibody titers were determined by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described previously, with slight modifications (25). In brief, samples (2-fold serial dilutions) were loaded into individual wells, and the plate was coated with 1 μg/ml recombinant PspA and incubated. Goat anti-mouse IgA, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, and IgM (dilution factor, 1:4,000) conjugated with horseradish peroxidase were used as secondary antibodies. Reactions were visualized by using the TMB microwell peroxidase substrate system (XPL, Gaithersburg, MD). The endpoint titer is expressed as the reciprocal log₂ of the last dilution that gave an OD₄₅₀ that was 0.1 unit greater than that of the negative control.

PspA-specific CD4⁺ T cell responses. By using anti-CD4 microbeads (Miltenyi Biotec, Sunnyvale, CA) according to the manufacturer's instructions, CD4⁺ T cells were isolated from the spleens and cervical lymph nodes (CLNs) of mice intranasally immunized with cCHP-PspA, PspA alone, or PBS only. The purified CD4⁺ T cells were resuspended at 1 × 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 (Cellgro, Mediatech, Washington, DC) supplemented with 10 mM HEPES, 50 μM 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, 100 μl/ml streptomycin, and 10% fetal calf serum and then cocultured with irradiated (2,000 rad) splenic antigen-presenting cells (2 × 10⁶ cells/ml) from naïve BALB/c mice for 5 days at 37°C in 5% CO₂ in the presence of 1 μg/ml PspA. Cytokine levels in CD4⁺ T cell culture supernatants were determined by using cytokine-specific DuoSet ELISA kits

(R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

Radioisotope counting assay. To trace the distribution of PspA after intranasal immunization, PspA was labeled with indium chloride (Nihon Medi-Physics, Tokyo, Japan) anhydride (Dojindo, Kumamoto, Japan) via N-terminal and ϵ -Lys amino groups, using diethylenetriaminepentaacetic acid as described previously (42). ^{111}In -labeled PspA was administered alone or as a complex with cCHP nanogel. The radioisotope counts in the nasal passage, olfactory bulbs, and brain 10 min and 1, 6, 12, 24, and 48 h after instillation were estimated with a γ -counter (Wizard model 1480; PerkinElmer, Waltham, MA). The results are provided as standardized uptake values (SUVs), calculated as radioisotope counts (cpm) per gram of tissue divided by the ratio of the injected dose (1×10^6 cpm) to body weight (in grams).

Flow cytometric analysis. Mice were immunized intranasally with FITC-PspA in cCHP nanogel, FITC-PspA alone, or PBS only; 6 h later, mononuclear cells were prepared from the nasal passages of each group by mechanical dissociation through 70- μm nylon mesh, as described previously (38, 43). Isolated cells were stained with phycoerythrin (PE)-Cy7-conjugated anti-CD11c (BD Bioscience) and analyzed by flow cytometry. The percentage of PspA⁺ cells in the CD11c⁺ fractions was calculated for each experimental group.

Data analysis. Data are expressed as means \pm standard deviations (SD). Statistical analysis for most comparisons among groups was performed with Tukey's *t* test; differences were considered statistically significant when the *P* value was <0.05 . For survival data, the Fisher exact test was used to compare the numbers of alive versus dead mice in the cCHP-PspA, PspA-CT, and PBS-only groups with those in the PspA-only group.

RESULTS

Intranasal vaccination with cCHP-PspA induces protective immunity against lethal challenge with *S. pneumoniae*. To evaluate whether intranasal cCHP-PspA vaccination induces protective immunity against pneumococcal challenge, we vaccinated mice with cCHP-PspA, PspA-CT, PspA alone, or PBS only. One week after the last immunization, we lethally challenged vaccinated mice with the virulent strain *S. pneumoniae* Xen10 (2×10^5 CFU), which is *S. pneumoniae* A66.1 rendered bioluminescent by the integration of a modified *lux* operon into its chromosome (40). The PspA expression level of strain Xen10 was confirmed to be comparable to that of the parent strain (see Fig. S2 in the supplemental material). We then evaluated survival rates after lethal challenge over a 2-week period. The survival rate of the cCHP-PspA-vaccinated group was 100%, as was that for PspA-CT-vaccinated mice (Fig. 1). In contrast, most of the mice intranasally immunized with PspA alone (survival rate, 0%) or with PBS (20% survival) died within 8 days of challenge with *S. pneumoniae* Xen10 (Fig. 1). The survival rates of the groups immunized with cCHP-PspA or PspA-CT were higher and were statistically significant compared to that of the group immunized with PspA alone ($P < 0.01$). The results from the PspA-only and PBS-only groups did not differ ($P > 0.05$). In addition, immunization with the irrelevant antigen BoHc/A incorporated into cCHP (cCHP-BoHc/A) (35) did not protect mice from challenge with *S. pneumoniae* Xen10 (see Fig. S3). Because PspA family 2 (clades 3 through 5) and family 1 (clades 1 and 2) constitute 94 to 99% of clinical isolates of pneumococci (14, 44–49), we also challenged mice with the strain 3JYP3670, which expresses PspA belonging to clade 4 of family 2 (10). Unlike mice inoculated with cCHP-BoHc/A, PspA alone, or PBS only, mice nasally immunized with cCHP-PspA were protected from lethal challenge with 3JYP3670

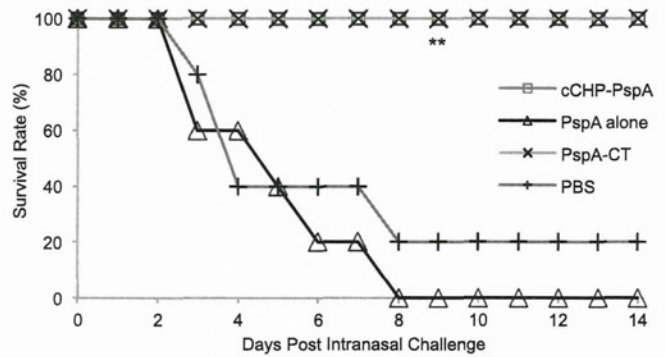


FIG 1 Intranasal vaccination with cCHP-PspA induced protective immunity against pneumococci. One week after the final immunization, mice were challenged with *S. pneumoniae* Xen10 (2×10^5 CFU/mouse), and survival was monitored. Data are representative of three independent experiments, and each group consisted of 5 mice. *P* values were calculated by using the Fisher exact test to compare the numbers of alive versus dead mice in each group with the result obtained for the PspA-only group. **, $P < 0.01$ compared with the group immunized with PspA alone. Abbreviations: cCHP, cationic cholesteryl group-bearing pullulan; CT, cholera toxin; PspA, pneumococcal surface protein A.

(PspA of clade 4) (10), as was the case with Xen10 expressing PspA of clades 1 and 2 (see Fig. S4).

Intranasal vaccination with cCHP-PspA enhances bacterial clearance from BALF and the lung. To assess whether intranasal immunization with cCHP-PspA prevented pulmonary infection with pneumococci, we performed *in vivo* bioluminescence imaging of *S. pneumoniae* Xen10 after lethal challenge (2×10^5 CFU) of mice intranasally vaccinated with cCHP-PspA, PspA alone, or PBS. The lungs of mice immunized with PspA alone or with PBS only (control group) showed high-intensity photon signals in a pattern consistent with that of full-blown lung infection (Fig. 2A). In contrast, the lungs of mice immunized with cCHP-PspA lacked bioluminescence, indicating the absence of pulmonary infection. Forty-eight and 72 h after infection, photon counts of the cCHP-PspA-vaccinated group were significantly lower than those of the other two groups (Fig. 2B).

To investigate whether intranasal immunization with cCHP-PspA hastened bacterial clearance from the lung, we counted the bacteria in the BALF and lung tissues of mice intranasally vaccinated with cCHP-PspA, PspA alone, or PBS and sublethally challenged with *S. pneumoniae* Xen10 (2×10^4 CFU). Three hours after challenge, bacterial numbers in BALF (Fig. 2C) and lung tissue (Fig. 2D) did not differ among the three vaccination groups. However, 24 h after challenge, the bacterial counts in the BALF and lung homogenates from the cCHP-PspA-vaccinated groups were significantly lower (about 100-fold) than those for the mice immunized with PspA alone or PBS only (Fig. 2C and D).

Intranasal vaccination with cCHP-PspA reduces bacterial colonization in the nasal cavity. We next examined whether intranasal cCHP-PspA immunization affected nasal carriage of pneumococci in mice challenged with *S. pneumoniae* Xen10. Three days after challenge, bacterial numbers in NWS (Fig. 3A) and nasal passages (Fig. 3B) of mice immunized with the cCHP-PspA nasal vaccine were decreased significantly (approximately 100-fold) compared to those for the two control groups.

Intranasal vaccination with cCHP-PspA induces strong Th17 and Th2 responses. We then examined the type of immune

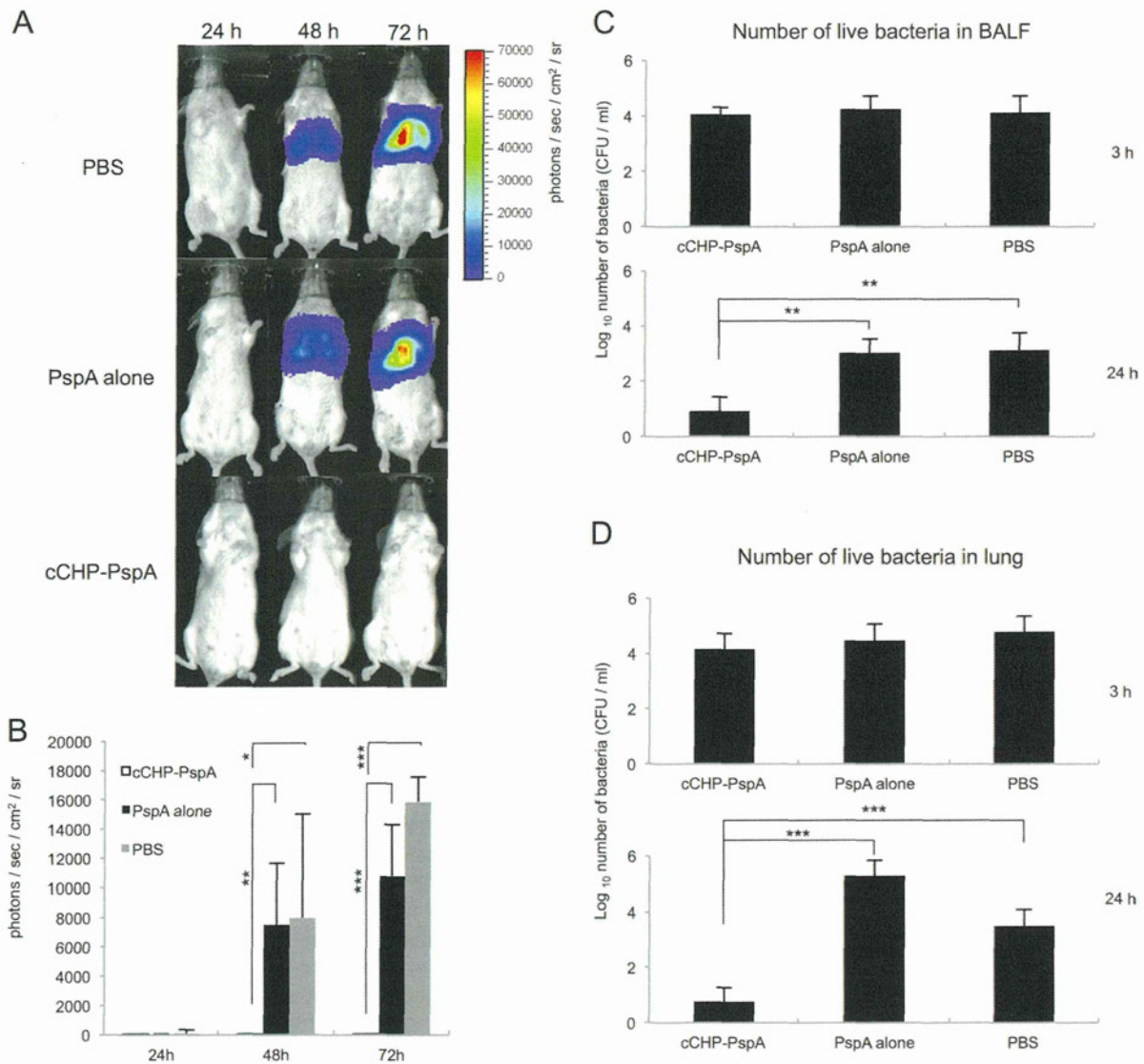


FIG 2 *In vivo* imaging revealed no sign of pneumococcal infection in the lungs of mice immunized intranasally with cCHP-PspA; these mice also showed enhanced bacterial clearance from the BALF and lung. Images (A) and average photon counts (B) show bioluminescence due to *S. pneumoniae* Xen10 in each group of mice infected intranasally with *S. pneumoniae* Xen10 (2×10^5 CFU/mouse) and imaged 24, 48, and 72 h after infection. (C and D) One week after the final immunization, mice were challenged with a sublethal dose (2×10^4 CFU/mouse) of *S. pneumoniae* Xen10. BALF and lung tissues were collected, and the numbers of *S. pneumoniae* Xen10 organisms 3 and 24 h after challenge were determined. Data are representative of three independent experiments, and each group consisted of 5 mice. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Abbreviations: BALF, bronchoalveolar lavage fluid; cCHP, cationic cholesteryl-group-bearing pullulan; PspA, pneumococcal surface protein A.

responses elicited by intranasal cCHP-PspA vaccination. Compared with PspA alone or PBS, cCHP-PspA induced higher levels of IL-17 in CD4⁺ T cells from the spleen, CLNs, and nasal passages (Fig. 4A). The cCHP-PspA-vaccinated group produced high levels of IL-4 and IL-13, the hallmark cytokines of a Th2-type immune response, but only scant amounts of gamma interferon (Fig. 4B to D). These results show the potential of a cCHP-PspA nasal vaccine as an advanced pneumococcal vaccine that can induce a Th17 response together with a Th2-type immune response.

Intranasal vaccination with cCHP-PspA induces high levels of systemic antibodies. To address whether intranasal administration of cCHP-PspA induced PspA-specific antibody responses, we examined the serum titers of PspA-specific antibodies. PspA-specific IgG responses in the systemic compartment were signifi-

cantly higher in mice immunized with intranasal cCHP-PspA than in those given PspA only (Fig. 5A). Unlike the predominant IgG response, IgM and IgA titers in the serum samples were very low (Fig. 5A).

Intranasal immunization with cCHP-PspA induced primarily IgG1 antibodies, followed by IgG2b antibodies (Fig. 5B). This pattern indicated skewing toward a Th2-type response and was consistent with the cytokine profiles of the culture supernatants from antigen-stimulated CD4⁺ T cells prepared from the same mice (Fig. 4B and C).

Intranasal vaccination with cCHP-PspA induces high levels of mucosal antigen-specific sIgA antibodies. We next examined whether vaccinated mice also produced mucosal antigen-specific Ig responses. Intranasal vaccination with cCHP-PspA induced

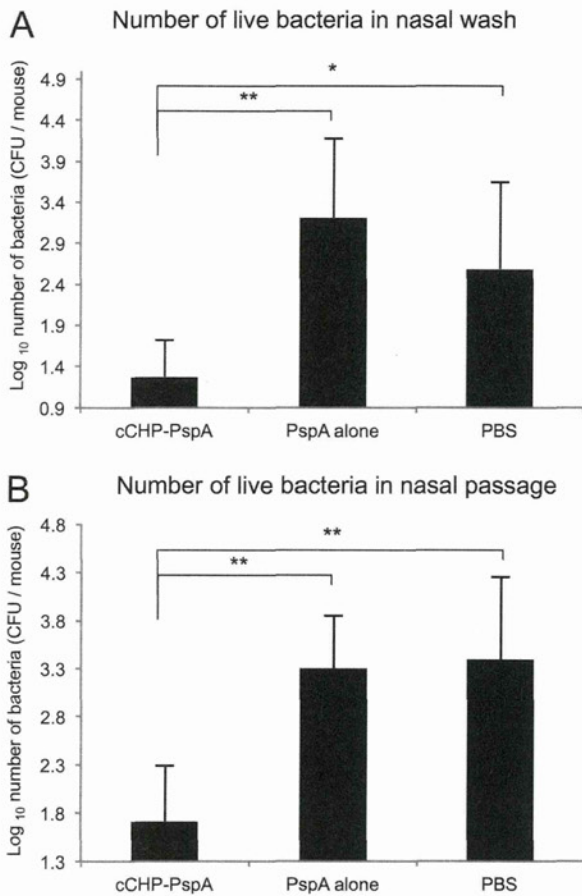


FIG 3 Intranasal vaccination with cCHP-PspA reduced bacterial colonization of the nasal cavity. One week after the final immunization, mice were challenged with a sublethal dose (2×10^4 CFU/mouse) of *Streptococcus pneumoniae* Xen10. Nasal washes and tissues were collected, and the numbers of *S. pneumoniae* Xen10 3 days after infection were determined. Data are representative of three independent experiments, and each group consisted of 5 mice. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Abbreviations: cCHP, cationic cholesteryl group-bearing pullulan; PspA, pneumococcal surface protein A.

PspA-specific mucosal IgA antibodies in the nasal secretions (Fig. 6A). In addition, BALF samples from mice intranasally vaccinated with cCHP-PspA contained PspA-specific IgA antibodies (Fig. 6B), and PspA-specific IgG antibodies were detected at high titers in both the NWs and BALF of mice intranasally immunized with cCHP-PspA (Fig. 6C and D). The nasal and BALF antigen-specific IgGs induced by intranasal immunization with cCHP-PspA were primarily of the IgG1 and IgG2b subclasses (Fig. 6E and F), similar to the Ig responses in the systemic compartment (Fig. 5B). Taken together, these results further support the benefit of cCHP-based nanogel as an effective nasal vaccine delivery vehicle for the induction of PspA-specific systemic and mucosal antibody responses against *S. pneumoniae*.

cCHP delivers PspA to dendritic cells (DCs) without CNS accumulation of PspA. The potential for antigen deposition and accumulation in the CNS through the olfactory fossa is one of the great concerns surrounding the use of nasal vaccines (33, 34, 50). To address this important concern, we instilled ¹¹¹In-labeled PspA alone or in complex with cCHP into the nasal cavities of mice. Beginning 6 h after administration, the nasal passages of mice

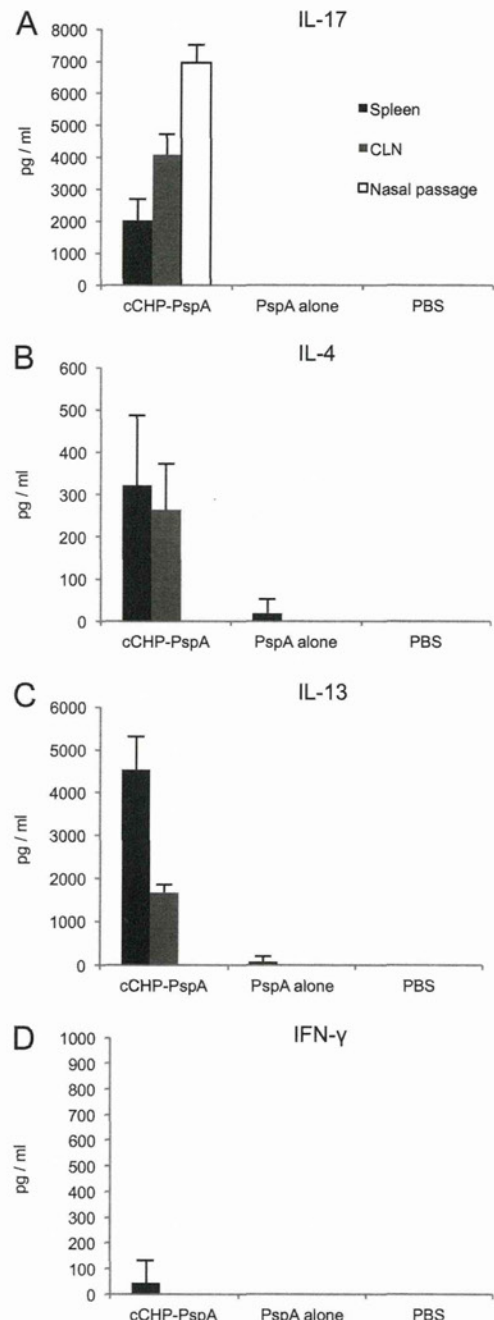


FIG 4 CD4⁺ T cells from cCHP-PspA-immunized mice produce Th17- and Th2-type immune responses. Cytokines produced by CD4⁺ T cells isolated from the spleens, cervical lymph nodes, and nasal passages of mice immunized with cCHP-PspA, PspA alone, or PBS only were analyzed. Data are representative of five independent experiments, and each group consisted of 5 mice. Abbreviations: cCHP, cationic cholesteryl-group-bearing pullulan; CLN, cervical lymph node; IFN-γ, gamma interferon; IL, interleukin; PspA, pneumococcal surface protein A.

treated with ¹¹¹In-labeled cCHP-PspA had higher SUVs than did those of mice treated with ¹¹¹In-labeled PspA alone, but there was no accumulation of ¹¹¹In-labeled PspA in the olfactory bulbs or brain throughout the 48-h observation period (Fig. 7A).

The cCHP vaccine delivery system enabled prolonged antigen exposure at the nasal epithelium, allowing continuous antigen

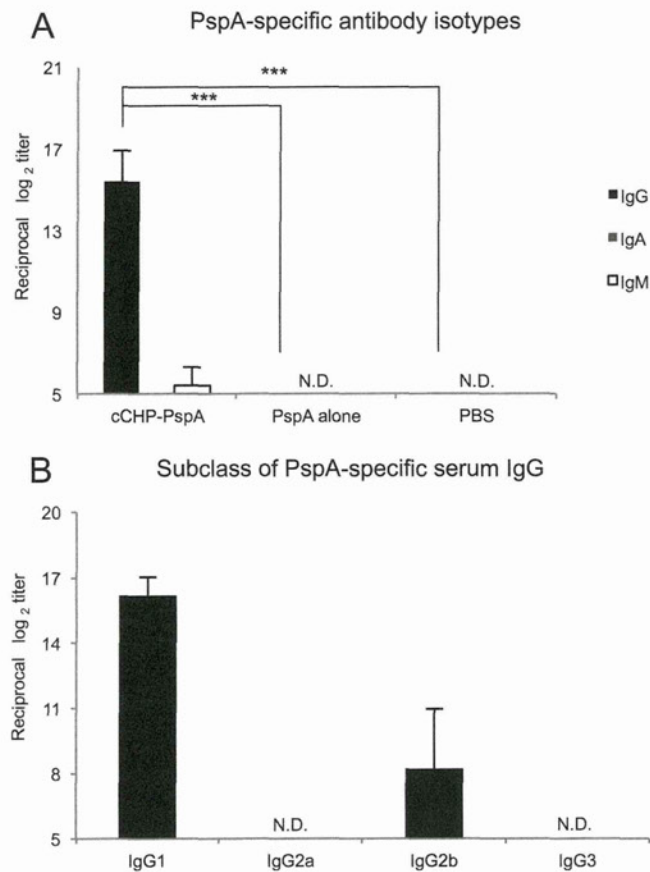


FIG 5 Intranasal vaccination with cCHP-PspA induced high levels of systemic antibodies. The data show the PspA-specific serum IgG level (A) and subclass analysis for IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 (B) for each immunized group (cCHP-PspA, PspA alone, or PBS only). Titers of PspA-specific IgG in sera were measured on day 7 after final immunization. Data are representative of three independent experiments, and each group consisted of 5 mice. N.D., not detected by ELISA with samples diluted 1:32. ***, $P < 0.001$. Abbreviations: cCHP, cationic cholesteryl group-bearing pullulan; Ig, immunoglobulin; PspA, pneumococcal surface protein A.

uptake by nasal DCs located in the epithelial layer and lamina propria of the nasal passages for the initiation of antigen-specific immune responses. Whereas 17.8% of the DCs located in the nasal passages had taken up PspA in the mice intranasally immunized with cCHP-PspA, only 0.7% of nasal DCs contained PspA antigen in mice that had been immunized intranasally with PspA alone (Fig. 7B). These results further support the concept that the cCHP-PspA vaccine formulation is an attractive inhalant delivery vehicle that effectively delivers and sustains antigen at the nasal epithelium for continuous antigen uptake by DCs without antigen deposition in the CNS.

DISCUSSION

We showed that cCHP-PspA-vaccinated mice survived a lethal challenge with *S. pneumoniae* (Fig. 1; see Fig. S4 in the supplemental material), whereas mice vaccinated with cCHP complexed with an irrelevant antigen (BoHc/A) did not (see Fig. S3 and S4). Importantly, compared with those of mice inoculated with control constructs, the respiratory tracts of mice immunized with intranasal cCHP-PspA had less colonization and invasion by pneumo-

coccal organisms (Fig. 2 and 3). Intranasal administration of cCHP-PspA resulted in enhanced PspA-specific Th17 responses (Fig. 4A) and mucosal IgA and systemic IgG antibody responses (Fig. 5 and 6), all of which are involved in establishing protective immunity against pneumococci (10, 28–30). To our knowledge, the current study is the first to show the efficacy of a nasal vaccine not only for inducing protective immune responses but also for preventing nasal colonization by use of a single protein antigen (PspA) without adding any biologically active adjuvant.

The precise mechanisms underlying the efficacy of cCHP-PspA as a nasal vaccine against *S. pneumoniae* lung infection remain to be elucidated. However, we speculate that serum and BALF IgGs, the main isotype of antibody induced by the cCHP-PspA nasal vaccine in the lower respiratory compartment (Fig. 5A and 6D), play key roles in survival against lethal challenge with *S. pneumoniae*, given that antibody titers of PspA-specific IgA in the BALF were low (Fig. 6B) and therefore might contribute only minimally to protection against invasive diseases. This hypothesis is supported by the results of a previous study (28) in which IgA^{-/-} mice immunized with intranasal PspA-adjuvant (i.e., a plasmid expressing Flt3 ligand cDNA) mounted a protective immune response against lethal challenge with *S. pneumoniae*. Our current study shows that the cCHP-PspA nasal vaccine effectively induced antigen-specific sIgA antibodies in the upper airways (Fig. 6A). Immunization of IgA^{-/-} mice with intranasal PspA-adjuvant did not prevent pneumococcal colonization of the nasal cavity (28). In light of the findings of the previous study (28) and our current one, serum antigen-specific IgG antibodies are crucial to preventing invasive disease associated with clinical signs, whereas antigen-specific sIgA antibodies are essential for preventing colonization of the upper respiratory tract by *S. pneumoniae*.

In addition to the essential role of sIgA in protection from nasopharyngeal colonization by pneumococci, IL-17A-producing CD4⁺ T cells play an important role in preventing pneumococcal nasal colonization in mice immunized with intranasal pneumococcal whole-cell antigen (29, 30). Recent studies have found that IL-17 promotes multiple aspects of humoral immunity by enhancing B cell proliferation and isotype switching (51), B cell recruitment to the respiratory mucosa, and expression of the polymeric immunoglobulin receptor on the airway epithelium (52). In the current study, we found that intranasal immunization with cCHP-PspA generated Th17 cells in the nasal passages, draining lymph nodes, and systemic compartment (Fig. 4A). Therefore, our findings suggest that intranasal immunization with cCHP-PspA induces both humoral and cellular immune responses, which are required for protective immunity against pneumococcal colonization and invasive disease. In addition to their essential role in antipneumococcal immunity (29, 30), Th17 responses are a hallmark of autoimmunity (53). Therefore, future studies should carefully examine whether the Th17 responses induced by intranasal immunization with cCHP-PspA are associated with any adverse effects.

As one might expect, the protective immunity induced by nasal cCHP-PspA was not observed when an irrelevant antigen, BoHc/A, was incorporated into cCHP (cCHP-BoHc/A) (35) and used as a nasal vaccine (see Fig. S3 and S4 in the supplemental material). Moreover, mice immunized intranasally with cCHP-PspA (PspA of clades 1 and 2) were protected against challenge with pneumococcal strain 3JYP3670, which expresses PspA of clade 4 (10), whereas mice immunized with cCHP-BoHc/A, PspA

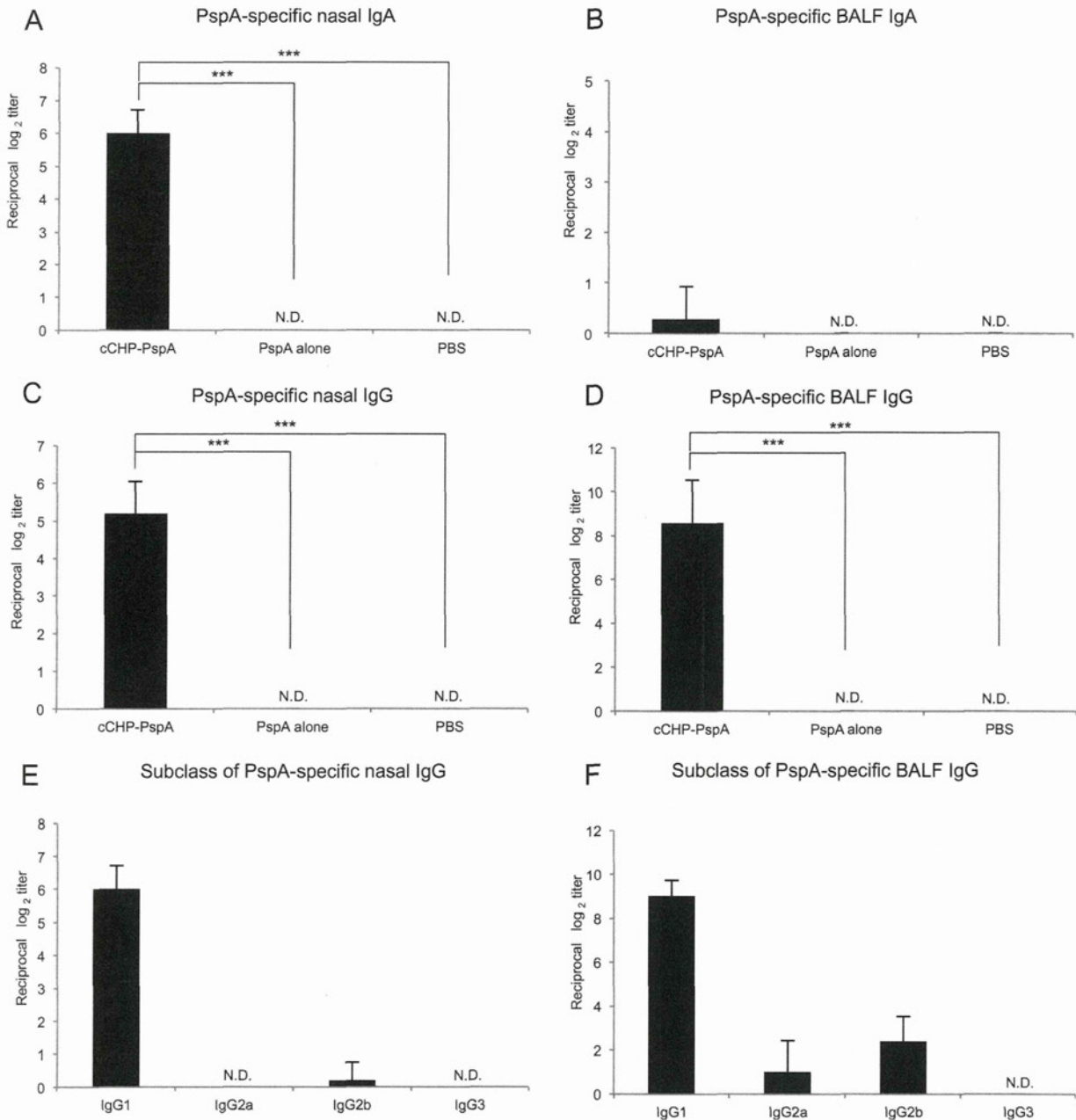


FIG 6 Intranasal vaccination with cCHP-PspA induced strong PspA-specific secretory IgA and IgG responses. Titers of nasal (A and C) and bronchial (B and D) IgA and IgG induced by intranasal immunization with PspA alone or PspA mixed with cCHP are shown. Titers of PspA-specific IgA and IgG in nasal washes and BALFs were measured on day 7 after final immunization. Intranasal cCHP-PspA vaccination induced high levels of IgG1 and IgG2b in mucosal secretions of the upper (E) and lower (F) airways. Data are representative of five independent experiments, and each group consisted of 5 mice. N.D., not detected in undiluted samples. ***, $P < 0.001$. Abbreviations: BALF, bronchoalveolar lavage fluid; cCHP, cationic cholesteryl-group-bearing pullulan; Ig, immunoglobulin; PspA, pneumococcal surface protein A.

alone, or PBS were not (see Fig. S4). These findings highlight the potential advantage of nasal vaccination of cCHP-PspA in inducing antigen-specific protective immunity with subtype cross-reactivity.

Note that cCHP lacks any biologically active adjuvant effect because it cannot activate immune cells by itself (35). The nanogel formulation had no effect on the expression of costimulatory molecules on nasal DCs (see Fig. S5 in the supplemental material), which are supposed to already express high steady-state levels of

costimulatory molecules in the mucosal environment in response to numerous inhaled antigens. Our current and previous studies have shown that antigens are released from the nanogel and are taken up efficiently by DCs in the nasal mucosa (Fig. 7B) (35). These studies suggest that cCHP nanogel is an effective carrier that has strong chaperone-like activity, enabling the delivery of PspA across the nasal mucosal epithelial cell layer for subsequent uptake by DCs and initiation of antigen-specific immune responses.

In summary, this study introduced a promising nanometer-

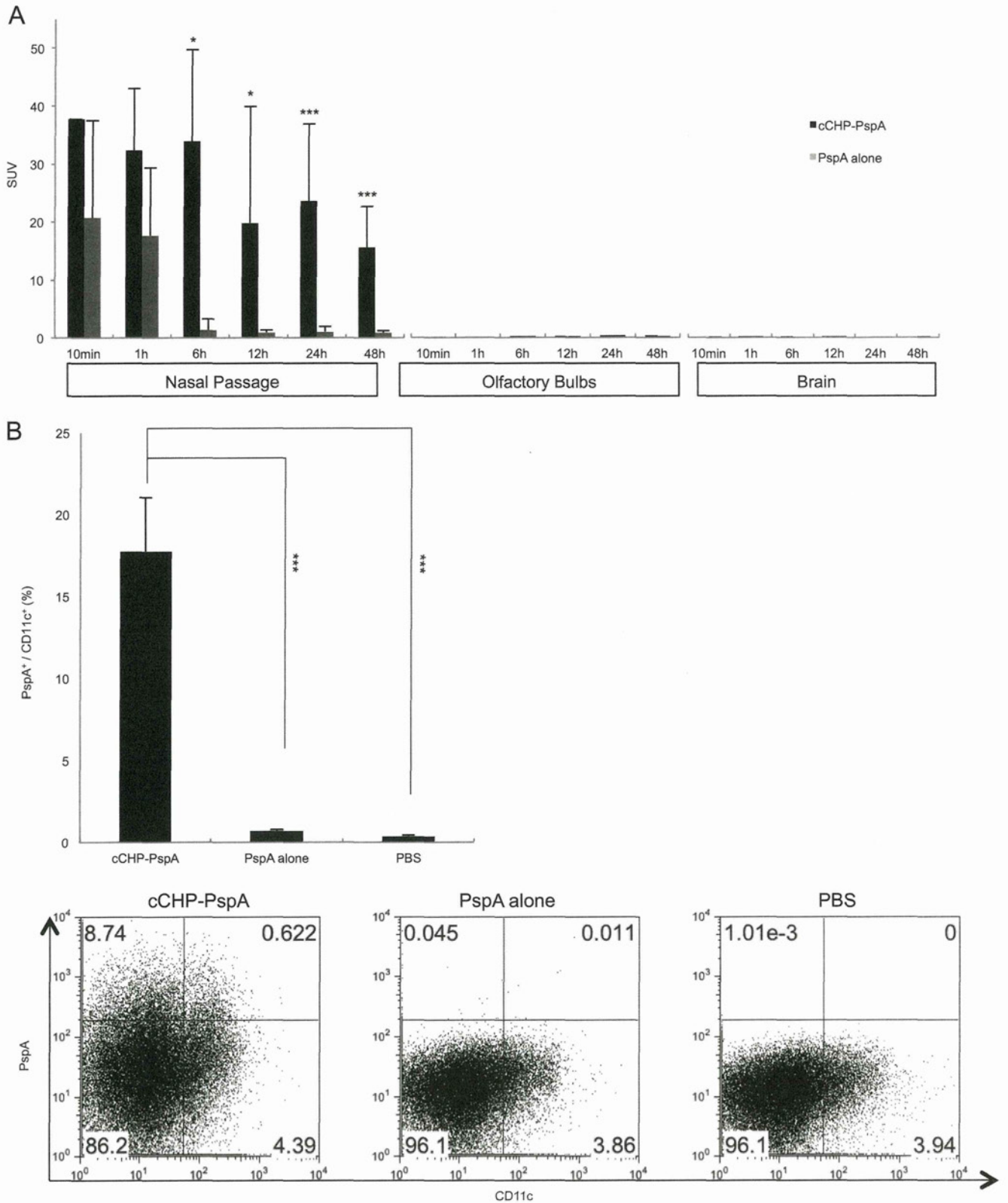


FIG 7 Intranasal vaccination with cCHP-PspA induced no accumulation of PspA in the central nervous system (A) but enhanced the efficiency of uptake of PspA by dendritic cells in the nasal passages (B). (A) ¹¹¹In-labeled PspA was administered intranasally with or without cCHP nanogel, and the radioisotope counts (SUVs) in the nasal passages, olfactory bulbs, and brain were estimated 10 min and 1, 6, 12, 24, and 48 h after instillation. (B) Dendritic cells in the nasal passages of mice immunized intranasally with cCHP-PspA, PspA alone, or PBS were analyzed by flow cytometry 6 h after immunization. Data are representative of three independent experiments, and each group consisted of 5 mice. *, *P* < 0.05; ***, *P* < 0.001. Abbreviations: cCHP, cationic cholesteryl group-bearing pullulan; PspA, pneumococcal surface protein A.

sized carrier-based pneumococcal nasal vaccine that incorporates cCHP nanogel and the pneumococcal serotype-independent protein antigen PspA. The antigen-specific immune responses induced by this vaccine effectively protected mice against the respiratory pathogen *S. pneumoniae*. Our results confirmed that cCHP nanogel is a promising candidate carrier of a protein antigen for a mucosal vaccine that induces humoral and cellular immune responses against PspA to combat colonization and invasion of the airways by respiratory pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant-in-aid from the Research Fellowship of the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) (I.G.K., A.S., and T.N.); by programs of special coordination funds for promoting science and technology, a grant-in-aid for scientific research on priority areas, and a grant-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (J.K. and H.K.); by the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan (J.K., Y.Y., and H.K.); by the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) (Y.Y. and H.K.); by the Young Researcher Overseas Visits Program for Vitalizing Brain Circulation of the Japan Society for the Promotion of Science (J.K., H.K., and Y.Y.); by the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-Oriented Industry (BRAIN) (T.N., S. Sato, and J.K.); by the Yakult Bio-Science Foundation (J.K.); and by the Global Center of Excellence Program "Center of Education and Research for Advanced Genome-Based Medicine—For Personalized Medicine and the Control of Worldwide Infectious Diseases" (H.K.).

We declare that we have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Dinleyici EC, Yargic ZA. 2008. Pneumococcal conjugated vaccines: impact of PCV-7 and new achievements in the postvaccine era. *Expert Rev. Vaccines* 7:1367–1394.
- Rose M, Zielen S. 2009. Impact of infant immunization programs with pneumococcal conjugate vaccine in Europe. *Expert Rev. Vaccines* 8:1351–1364.
- Principi N, Esposito S. 2012. Use of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in infants and young children. *Expert Opin. Biol. Ther.* 12:641–648.
- Huang SS, Johnson KM, Ray GT, Wroe P, Lieu TA, Moore MR, Zell ER, Linder JA, Grijalva CG, Metlay JP, Finkelstein JA. 2011. Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States. *Vaccine* 29:3398–3412.
- Thigpen MC, Whitney CG, Messonnier NE, Zell ER, Lynfield R, Hadler JL, Harrison LH, Farley MM, Reingold A, Bennett NM, Craig AS, Schaffner W, Thomas A, Lewis MM, Scallan E, Schuchat A. 2011. Bacterial meningitis in the United States, 1998–2007. *N. Engl. J. Med.* 364:2016–2025.
- Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. 2011. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet* 378:1962–1973.
- Hsu HE, Shutt KA, Moore MR, Beall BW, Bennett NM, Craig AS, Farley MM, Jorgensen JH, Lexau CA, Petit S, Reingold A, Schaffner W, Thomas A, Whitney CG, Harrison LH. 2009. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* 360:244–256.
- Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL, Zulz T, Hurlburt DA, Butler JC, Rudolph K, Parkinson A. 2007. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA* 297:1784–1792.
- Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A. 2000. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 19(Suppl 1):S87–S95.
- Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, Ferguson LM, Nahm MH, Nabors GS. 2000. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. *J. Infect. Dis.* 182:1694–1701.
- Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, Benjamin Jr, WH. 2003. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 188:339–348.
- Briles DE, Tart RC, Swiatlo E, Dillard JP, Smith P, Benton KA, Ralph BA, Brooks-Walter A, Crain MJ, Hollingshead SK, McDaniel LS. 1998. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* 11:645–657.
- Olafsdottir TA, Lingnau K, Nagy E, Jonsdottir I. 2012. Novel protein-based pneumococcal vaccines administered with the Th1-promoting adjuvant IC31 induce protective immunity against pneumococcal disease in neonatal mice. *Infect. Immun.* 80:461–468.
- Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. 2000. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68:5889–5900.
- Crain MJ, Waltman WD, 2nd, Turner JS, Yother J, Talkington DF, McDaniel LS, Gray BM, Briles DE. 1990. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 58:3293–3299.
- McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect. Immun.* 59:222–228.
- Tart RC, McDaniel LS, Ralph BA, Briles DE. 1996. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. *J. Infect. Dis.* 173:380–386.
- Xin W, Li Y, Mo H, Roland KL, Curtiss R. 2009. PspA family fusion proteins delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium extend and enhance protection against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 77:4518–4528.
- Nabors GS, Braun PA, Herrmann DJ, Heise ML, Pyle DJ, Gravenstein S, Schilling M, Ferguson LM, Hollingshead SK, Briles DE, Becker R. 2000. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine* 18:1743–1754.
- Gray BM, Converse GM, 3rd, Dillon HC, Jr. 1980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J. Infect. Dis.* 142:923–933.
- Faden H, Duffy L, Wasielewski R, Wolf J, Krystofik D, Tung Y. 1997. Relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J. Infect. Dis.* 175:1440–1445.
- Leiberman A, Dagan R, Leibovitz E, Yagupsky P, Fliss DM. 1999. The bacteriology of the nasopharynx in childhood. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 49(Suppl 1):S151–S153.
- Hoge CW, Reichler MR, Dominguez EA, Bremer JC, Mastro TD, Hendricks KA, Musher DM, Elliott JA, Facklam RR, Breiman RF. 1994. An epidemic of pneumococcal disease in an overcrowded, inadequately ventilated jail. *N. Engl. J. Med.* 331:643–648.
- Wu HY, Nahm MH, Guo Y, Russell MW, Briles DE. 1997. Intranasal immunization of mice with PspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 175:839–846.
- Yamamoto M, Briles DE, Yamamoto S, Ohmura M, Kiyono H, McGhee JR. 1998. A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. *J. Immunol.* 161:4115–4121.
- Briles DE, Ades E, Paton JC, Sampson JS, Carlone GM, Huebner RC, Virolainen A, Swiatlo E, Hollingshead SK. 2000. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68:796–800.
- Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, Ishii KJ, Kataoka K, Oishi K. 2009. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. *Vaccine* 27:3181–3188.
- Fukuyama Y, King JD, Kataoka K, Kobayashi R, Gilbert RS, Oishi K, Hollingshead SK, Briles DE, Fujihashi K. 2010. Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol.* 185:1755–1762.
- Lu YJ, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, Kolls JK, Srivastava A, Lundgren A, Forte S, Thompson CM, Harney KF, An-