

侵襲性肺炎球菌感染症の原因菌のPspA cladeの分布に関する研究

研究分担者：金城 雄樹（国立感染症研究所真菌部）

研究協力者：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）

研究要旨 日本人の死因で3番目に多いのが肺炎である。肺炎球菌は肺炎の起炎菌として最も頻度が高く、敗血症や髄膜炎などの侵襲性感染症の起炎菌としても重要であることから、侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した菌株の細菌学的解析は重要である。本研究では、全ての肺炎球菌に認められる重要な病原因子の一つである pneumococcal surface protein A (PspA) 蛋白に着目し、侵襲性肺炎球菌感染症例から分離された103株のPspA蛋白のclade解析を行った。PspA蛋白は、Family 1～3に分類され、Family 1にはclade 1と2、Family 2にはclade 3、4と5、Family 3にはclade 6が存在する。今年度の解析の結果、Family 1ではclade 1が40株（38.8%）、clade 2が10株（9.7%）であった。Family 2ではclade 3が28株（27.2%）、clade 4が21株（20.4%）、clade 5が3株（2.9%）であった。Family 3ではclade 6が1株（1.0%）であった。本研究での解析では、小児用ワクチン導入前と比較して、clade 1が最も多いことは違いがないものの、その割合が減少しており、clade 2及びclade 4の割合の増加を認めた。ワクチン導入に伴い、血清型のみならずPspA clade分布にも変化がおきていることが示唆されたことより、今後もPspA clade分布の推移について注視する必要がある。

A. 研究目的

日本人の死因で3番目に多いのが肺炎である。肺炎球菌は成人の市中肺炎の原因菌として最も頻度の高い細菌であり、しばしば重症肺炎、侵襲性肺炎球菌感染症をおこす。そのため、侵襲性肺炎球菌感染症例における原因菌の動向調査を行うことを目的とした細菌学的解析研究が必要である。

肺炎球菌は菌体表層の多糖抗原の違いにより、90種類以上の血清型に分類される。また、菌体表層に存在する蛋白抗原の一つに pneumococcal surface protein A (PspA) という蛋白があり、肺炎球菌の重要な病原因子の一つと考えられている。PspAはFamily 1、2、3に分類されるが、ほとんどの菌株はFamily 1またはFamily 2に分類される。また、Family 1はclade 1とclade 2、Family 2はclade 3、clade 4及びclade 5、Family 3はclade 6に分類される。侵襲性肺炎球菌感染症の症例から分離された菌株の細菌学的特徴を把握するうえで、血清型やPspAの分布を解析すること

は重要である。本分担研究では、侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した菌株のPspA蛋白のclade解析を行った。

B. 研究方法

1) 肺炎球菌株：

2016年1月から2016年3月の間に、侵襲性肺炎球菌感染症例の血液、髄液または他の組織から分離した103株の肺炎球菌を用いた。菌株に関する詳細は、分担研究「成人侵襲性肺炎球菌感染症由来株の細菌学的解析」報告書（研究分担者 常彬）参照。

2) 肺炎球菌ゲノムDNAの精製：

HighPure PCR Product Purification Kitを用いて、血液寒天培地にて37℃、5% CO₂下で一晩培養した肺炎球菌のゲノムDNAを精製した。

3) PspA遺伝子のPCRとシーケンス解析：

PspA遺伝子を増幅させるために、各臨床分離肺炎球菌株のゲノムDNAをテンプレートとして、

LSM12プライマーとSKH2プライマー（表1参照）、Quick Taq™ HS DyeMixを用いてPCRを行った。PCRは、初回サイクル94℃、2分、その後、94℃、30秒、55℃、30秒、68℃、1分を30サイクル、その後、68℃、5分で行った。電気泳動にてPCR産物を確認後、精製し、SKH2プライマーを用いて、PspA遺伝子シーケンス解析を行った。

表1 PspAのPCRで使用したプライマー

Primers	
LSM12	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT
SKH2	CCACATACCGTTTTCTTGTTCAGCC

4) PspA clade判定：

PspA蛋白のプロリンリッチ領域の上流約400bpの塩基配列（clade同定領域、図1参照）をfamily、cladeが同定されている参照株のPspA塩基配列と比較し、同定を行った。

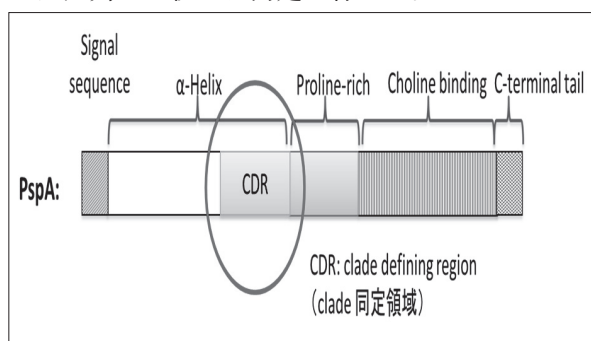


図1 PspA蛋白の模式図

PspA蛋白の構造とclade同定領域の模式図を示した。

（倫理面への配慮）

国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会からの承認を得ている。

C. 研究結果

1) 侵襲性肺炎球菌感染症例より分離した菌株のPspA clade解析結果：

侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した103株のPspA蛋白のclade解析を行った。Family 1では、clade 1が40株（38.8%）、clade 2が10株（9.7%）であった。Family 2では、clade 3が28株（27.2%）、clade 4が21株（20.4%）、clade 5が3株（2.9%）であった。Family 3のclade 6が1株（1.0%）で

あった。

表2 侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した菌株のPspA clade解析結果

Family	1			2			3	total
PspA clade	1	2	3	4	5	6		
数	40	10	28	21	3	1		103
割合(%)	38.8	9.7	27.2	20.4	2.9	1		100
割合(%)	48.5			50.5			1	100

2) 侵襲性肺炎球菌感染症例より分離した非PCV13血清型菌株のPspA clade解析：

13価 polysaccharide conjugate vaccine (PCV13；血清型1、3、4、5、6A、6B、7F、9V、14、18C、19A、19F、23F) に含まれない血清型の菌株におけるPspA cladeの内訳を解析した。その結果、Family 1では、clade 1は全ての血清型と非PCV13血清型では違いを認めなかったのに対し、clade 2は非PCV13血清型では割合の増加を認めた。また、Family 2ではclade 3が全ての血清型の菌株では27.2%を占めるのに対し、非PCV13血清型では11.1%と顕著に減少した。一方で、clade 4は全ての血清型では20.4%を占めるのに対し、非PCV13血清型では31.7%となり、clade 4の占める割合の増加を認めた。

表3 侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した非PCV13血清型菌株のPspA clade解析

Family	1			2			3	total
PspA clade	1	2	3	4	5	6		
数	25	10	7	20	0	1		63
割合(%)	39.7	15.9	11.1	31.7	0	1.6		100
割合(%)	55.6			42.8			1.6	100

3) 侵襲性肺炎球菌感染症例より分離した非PPSV23血清型菌株のPspA clade解析：

23価 pneumococcal polysaccharide vaccine

(PPSV23; 血清型 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) に含まれない血清型の菌株における PspA clade の内訳を解析した。その結果、Family 1 では、clade 1 は全ての血清型では 38.8% を占めるのに対し、非 PPSV23 血清型では 31.4% に減少した。clade 2 は非 PPSV23 血清型では顕著な割合の増加を認めた。また、Family 2 では clade 3 が全ての血清型の菌株では 27.2% を占めるのに対し、非 PCV13 血清型では 11.4% と顕著に減少した。一方で、clade 4 は全ての血清型では 20.4% を占めるのに対し、非 PCV13 血清型では 37.2% となり、clade 4 の占める割合の増加を認めた。

表 4 侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した非 PPSV13 血清型菌株の PspA clade 解析

Family	1		2			3	total
PspA clade	1	2	3	4	5	6	
数	11	6	4	13	0	1	35
割合 (%)	31.4	17.1	11.4	37.2	0	2.9	100
割合 (%)	48.5		48.6			2.9	100

D. 考察

今年度は、侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した 103 菌株の PspA 蛋白の clade 解析を行った。その結果、Family 1 が 48.5%、Family 2 が 50.5% であった。海外の報告では、Family 1 と Family 2 の比率は、半々であるという報告、Family 1 の方が多い、または Family 2 が多いという報告があるが、何れの報告も極端な違いはない。これまでの私達の解析では、Family 1 が Family 2 よりも少し多いという結果であったが、今回ははじめて Family 2 の方が若干多かった。また、clade 1 が最も多いということは、先行研究及びこれまでの解析結果と一致した所見であるが、これまでの結果と比べて、clade 1 の占める割合が低くなっていた。また、Family 2 に関しては先行研究と

は異なり、clade 4 の増加を認めた。

小児での PCV13 定期接種導入に伴い、成人の侵襲性肺炎球菌症例においても PCV13 に含まれない非 PCV13 血清型や PPSV23 に含まれない非 PPSV23 血清型の割合が増加している。PCV13 ワクチンでは対応できない非 PCV13 血清型菌株の PspA clade 分布について、全血清型と比較解析を行った。その結果、全血清型と比べて、非 PCV13 血清型菌株では clade 2 及び clade 4 が多く、clade 3 が少ないことが分かった。同様に、PPSV23 に含まれない非 PPSV23 血清型の PspA clade 分布について、全血清型と比較解析を行った。その結果、clade 1 及び clade 3 の減少を認め、clade 2 及び clade 4 の増加が顕著であった。

以上の結果より、PCV 定期接種導入に伴い、成人の侵襲性肺炎球菌症例において血清型置換のみならず、PspA clade にも大きな変化がおきていることが示唆され、今後も注視する必要がある。

PspA は新規肺炎球菌ワクチンの有望な抗原であり、新規ワクチンの開発においても侵襲性肺炎球菌感染症例から分離される菌株の PspA clade の推移を継続して把握することが重要である。

E. 結論

本研究では、侵襲性肺炎球菌感染症例から分離した菌株を用いて、PspA 蛋白の clade 解析を行った。今年度は 103 株について解析を行い、PspA clade を決定した。これまでの私達の解析では、Family 1 が Family 2 よりも少し多いという結果であったが、今回ははじめて Family 2 が若干多くなった。また、clade 1 が最も多いということは、先行研究及びこれまでの解析結果と一致した所見であるが、これまでの結果と比べて、clade 1 の割合が低くなっていた。また、Family 2 に関しては先行研究とは異なり、clade 4 の頻度の増加を認めた。

また、非 PCV13 血清型菌株及び非 PPSV23 血清型菌株の PspA clade 分布については、全血清型と比較して、clade 2 及び clade 4 が多く、clade 3 が少ないことが分かった。以上の結果より、PCV 定期接種導入に伴い、成人の侵襲性肺炎球菌症例において血清型置換のみならず、PspA clade にも大きな変化がおきていることが

示唆され、今後も推移を注視する必要がある。

PspAは新規肺炎球菌ワクチンの有望な抗原であり、新規ワクチンの開発においても侵襲性肺炎球菌感染症例から分離される菌株のPspA cladeの推移を継続して把握することが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Keigo Ueno, Makoto Urai, Kayo Ohkouchi, Yoshitsugu Miyazaki, Yuki Kinjo. Dendritic cell-based vaccine against fungal infection. Dendritic cell-based vaccine against fungal infection. Vaccine Design, Methods and Protocols: Vol 1: Vaccines for Human Diseases. Edited by Sunil Thomas, Springer Science+ Business Media, New York, 537-549, 2016.

2. 学会発表

なし

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