

## 成人 IPD 症例分離株の PspA clade 分布の解析

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** 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、2014年から2016年に成人侵襲性肺炎球菌感染症例から分離された715株のPspA蛋白のclade解析を行った。

年毎の分離菌株数は、2014年203株、2015年222株、2016年290株であった。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。2014年と2015年ではclade分布に大きな違いを認めなかった。しかし、2014年と比較して、2016年ではclade 1の減少およびclade 2の増加を認めた。小児用ワクチン導入により成人においても血清型置換を認めているが、PspA cladeにも変化を生じていることが明らかになった。PspAは新しい肺炎球菌ワクチン抗原として有望である。今後も解析の継続によりPspA cladeの推移を把握することは厚生労働行政のワクチン政策の上で重要と考えられる。

### 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、しばしば菌血症や髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症（invasive pneumococcal disease; IPD）をおこす。そのため、IPD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、100種類近く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。IPD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、IPD症例から分離した菌株のPspA蛋白のcladeを決定し、clade分布の年次推移を解

析した。

### B. 研究方法

#### 1) 肺炎球菌株

2014年1月から2016年12月の間に、北海道、山形、宮城、新潟、三重、奈良、高知、福岡、鹿児島、沖縄の10道県にて、IPD症例の血液、髄液または他の組織から分離された715株の肺炎球菌株を用いた。年毎の分離菌株数は、2014年203株、2015年222株、2016年290株であった。

#### 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°C、5% CO<sub>2</sub>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 Dye Mixを用いてPCRを行った。PCRは、初回サイクル94°C、2分、その後、94°C、30秒、55°C、30秒、68°C、1分を30サイクル、その後、68°C、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	CCACATACCGTITTTCTTGTTCCAGCC

#### 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。

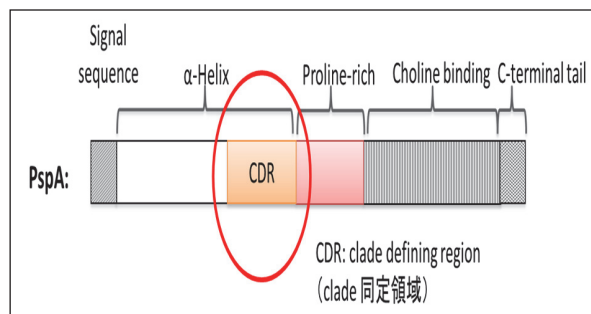


図 1. PspA 蛋白の模式図

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) 成人 IPD 症例由来菌株の PspA clade 分布の推移 (全体)

成人 IPD 症例から分離した 715 株 (2014 年 203 株、2015 年 222 株、2016 年 290 株) の PspA 蛋白の clade 解析を行い、clade 分布の年次推移を調べた (図 2)。PspA clade の中で clade 1 が最も多いことは変わらないものの、2014 年及び 2015 年と比較して、2016 年には clade 1 の減少を認めた。一方で、clade 2 は、2014 年及び 2015 年と比較して、2016 年には増加を認めた。また、clade 3 は、2014 年と比較して、2015 年には微増したが、2015 年と 2016 年はほとんど変化がなかった。また、clade 5 については、2014 年から 2016 年にかけて年々減少傾向を示した。

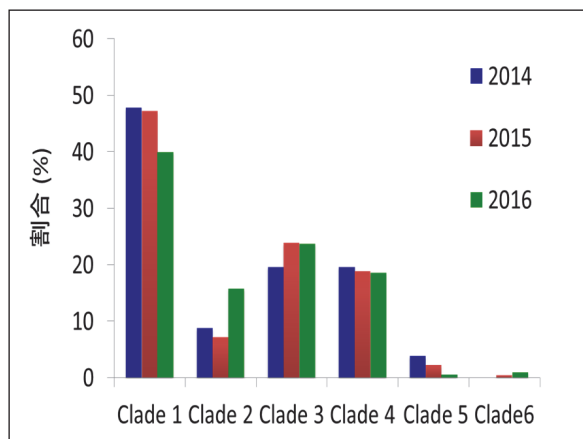


図 2. 成人 IPD 症例由来菌株 (全体) の PspA clade 分布の推移

2014 年から 2016 年にかけての PspA clade 分布の年次推移を示した。

#### 2) 成人 IPD 症例由来菌株の PspA clade 分布の推移 (PPSV23 血清型及び非 PPSV23 血清型):

成人 IPD 症例から分離した 715 株中、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) 血清型の菌株は 469 株であった。年毎の内訳は、2014 年 135 株、2015 年 151 株、2016 年 183 株であった。PPSV23 血清型菌株の PspA clade 分布は、図 2 で示した全体の推移と概ね同様であった (図 3)。Clade 1 は 2014 年及び 2015 年と比較して、2016 年に減少を認め、clade 2 は 2014 年及び 2015 年と比較して、2016 年には増加を認めた。また、clade 3 は、2014 年から 2016 年にかけて微増した。また、clade 5 は、2014 年から 2016 年にかけて年々減少傾向を示した。

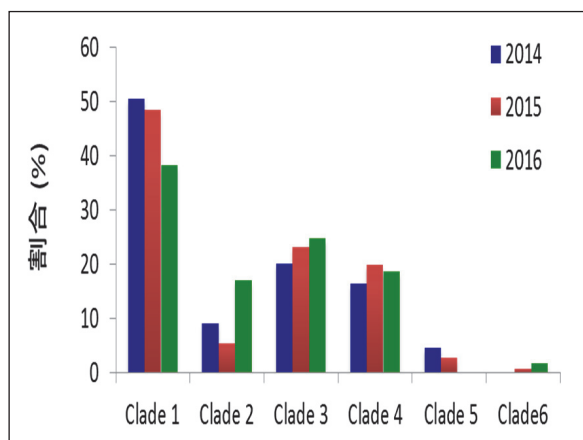


図 3. 成人 IPD 症例由来菌株 (PPSV23 血清型) の PspA clade 分布の推移

2014年から2016年にかけてのPPSV23血清型菌株のPspA clade分布の年次推移を示した。

非PPSV23血清型の菌株は246株であった。年毎の内訳は、2014年68株、2015年71株、2016年107株であった。非PPSV23血清型菌株のPspA clade分布は、全体またはPPSV23血清型菌株の分布と異なり、clade 1は3年間で大きな変化を認めなかった。また、clade 5も大きな変化を認めなかった。しかし、clade 2は2014年から2016年にかけて増加を認めており、全体及びPPSV23血清型菌株の分布の推移と同様の結果であった(図4)。

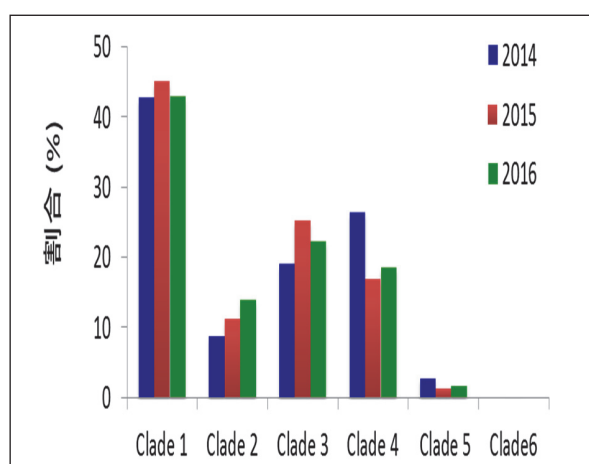


図4. 成人IPD症例由来菌株 (非PPSV23血清型) のPspA clade分布の推移

2014年から2016年にかけての非PPSV23血清型菌株のPspA clade分布の年次推移を示した。

### 3) 成人IPD症例由来菌株のPspA clade分布の推移 (PCV13血清型及び非PCV13血清型):

成人IPD症例から分離した715株中、13価 polysaccharide conjugate vaccine (PCV13: 血清型 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F) 血清型の菌株は281株であった。年毎の内訳は、2014年90株、2015年99株、2016年92株であった。Clade 1については、全体(図2)及びPPSV23血清型(図3)と同様に、2014年及び2015年と比較して2016年に減少を認めた。一方、clade 2は2014年に割合が多かったことから、2015年に一端減少し、2016年に増加したものの、2014年と2016年の間に大きな違いを認めなかった。また、clade 3は、2014年から2016年にかけて増加を認め、clade 5は2014年に検出されたものの、2015年及び2016年には検出されなかった(図5)。

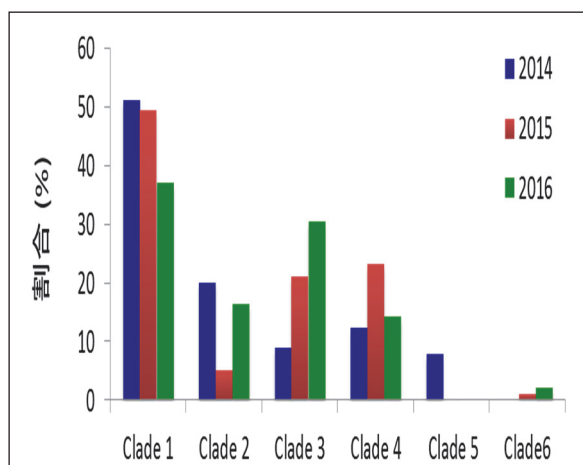


図5. 成人IPD症例由来菌株 (PCV13血清型) のPspA clade分布の推移

2014年から2016年にかけてのPCV13血清型菌株のPspA clade分布の年次推移を示した。

非PCV13血清型の菌株は434株であった。年毎の内訳は、2014年113株、2015年123株、2016年198株であった。非PCV13血清型菌株のPspA clade分布は、全体の菌株の分布と同様に、clade 1の減少及びclade 2の増加を認めた。しかし、全体の分布とは異なり、clade 3及びclade 4の減少傾向を認めた。また、clade 5については、2015年のみで少し多かったものの、2014年と2016年には僅かな数のみ検出された(図6)。

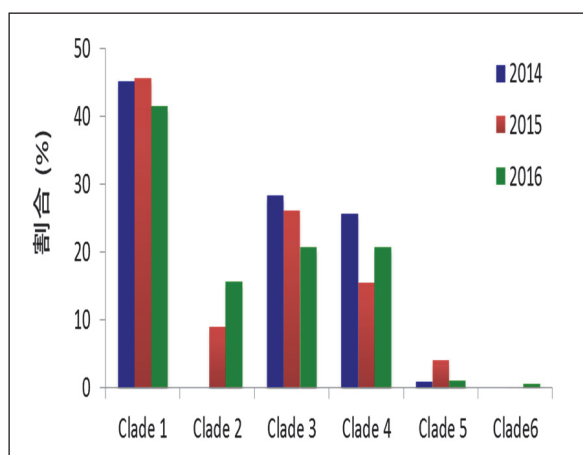


図6. 成人IPD症例由来菌株 (非PCV13血清型) のPspA clade分布の推移

2014年から2016年にかけての非PCV13血清型菌株のPspA clade分布の年次推移を示した。

## D. 考察

2014-2016年に成人IPD症例から分離された715株（2014年203株、2015年222株、2016年290株）のPspA蛋白のclade解析を行い、年毎のclade分布の推移を調べた。これまでの解析にて、ほとんどの肺炎球菌株はPspA clade 1-4であるが、clade 1が最も多く約半数を占めていた。今回の解析の結果、ほとんどの肺炎球菌株はPspA clade 1-4であることは変わらないものの、clade 1が減少傾向であることが明らかになった。また、clade 2は増加傾向を認めていることから、以前と比べてclade 1-4の割合の差が小さくなっていることが分かった。

近年、小児でのPCV13定期接種導入に伴い、成人のIPD症例においてもPCV13に含まれない非PCV13血清型が増加している。PCV13ワクチンでは対応できない非PCV13血清型菌株のPspA clade分布について解析を行ったところ、全体と同様に、clade 1の減少及びclade 2の増加を認めた。一方で、PCV13血清型菌株では、2014年と比較して2016年ではclade 1の減少を認めるものの、clade 2の増加を認めなかった。そのことから、全体的なclade 2の増加は、非ワクチン血清型の増加に伴うclade 2の増加が要因と考えられた。

以上の結果より、PCV定期接種導入に伴い、成人IPD症例において血清型置換のみならず、PspA cladeにも大きな変化が起きていることが示唆された。

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及び今後のワクチン政策において、成人IPD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、2014-2016年に成人IPD症例から分離された715株のPspA蛋白のclade解析を行い、clade分布の年次推移を調べた。今回の解析の結果、clade 1が減少傾向であり、clade 2は増加傾向であることが明らかになった。そのため、以前と比べてclade 1-4の割合の差が小さくなっていた。

非PCV13血清型菌株のPspA clade分布については、全体と同様にclade 1の減少及びclade 2の増加を認めた。そのことから、全体的なclade 2の増加は、非ワクチン血清型の増加に伴うclade 2の増加が要因と考えられた。

本研究の結果にて、PCV定期接種導入に伴い、成人IPD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明らかになった。

PspAは新規肺炎球菌ワクチンの有望な抗原であることから、今後の厚生労働行政のワクチン政策において、成人IPD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と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし