

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 肺炎球菌は日本人の主な死因である肺炎の起炎菌として最も頻度が高く、菌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。そのため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、2017年に成人侵襲性肺炎球菌感染症例から分離された412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。Clade の内訳は、clade 1が39.6%で最も多く、clade 3が27.2%、clade 2が17.9%、clade 4が14.1%、clade 5が1.0%、clade 6が0.2%であった。PspA は新しい肺炎球菌ワクチン抗原として有望である。今回の解析で、Clade 1-4で98.8%を占めることが明らかになった。今後、PspA clade 1-4をカバーするワクチンを開発することで、幅広い感染防御効果をもたらすことが期待される。

A. 研究目的

肺炎は日本人の主な死因となっている疾患である。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、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

2017年1月から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412株の肺炎球菌株を用いた。

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% 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°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	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。

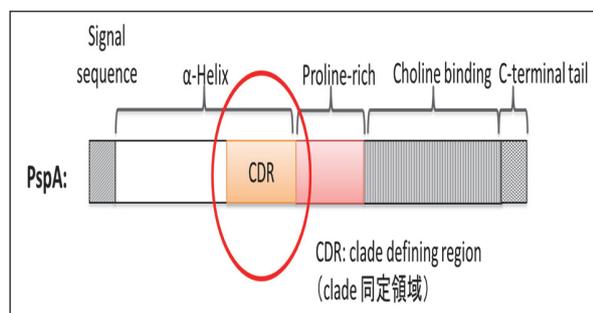


図 1. PspA 蛋白の模式図

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

成人 IPD 症例から分離した 412 株の PspA 蛋白の clade 解析を行った。PspA Family の割合は、family 1 が 57.5%、family 2 が 42.3%、family 3 が 0.2% であった (表 2)。Family の割合は、以前と比較して大きな違いはなかった。

表 2. 成人 IPD 由来菌株の PspA Family の内訳

PspA family	1	2	3	合計
菌株数	237	174	1	412
Family 毎の割合 (%)	57.5	42.3	0.2	100

PspA clade 毎の割合は、clade 1 が 39.6% で最も多く、clade 3 が 27.2%、clade 2 が 17.9%、clade 4 が 14.1%、clade 5 が 1.0%、clade 6 が 0.2% であった (表 3)。先行研究及び私達のこれまでの PspA

表 3. 成人 IPD 由来菌株の PspA clade の内訳

PspA family	1		2			3	合計
PspA clade	1	2	3	4	5	6	
菌株数	163	74	112	58	4	1	412
Clade 毎の割合 (%)	39.6	17.9	27.2	14.1	1	0.2	100

clade 分布の解析において、clade 1 が最も多いことが報告されていたが、2015 年またはそれ以前の菌株の解析結果と比較して、clade 1 の割合が低下していた。

また、PspA clade 1-4 の合計は 98.8% であり (表 4)、成人 IPD 由来菌株のほとんどが clade 1-4 に分類されるという特徴があることが明らかになった。

表 4. 成人 IPD 由来菌株の PspA clade 分布の特徴

PspA family	1		2			3	合計
PspA clade	1	2	3	4	5	6	
菌株数	163	74	112	58	4	1	412
Clade 毎の割合 (%)	39.6	17.9	27.2	14.1	1	0.2	100
Clade 1-4 とその他の割合 (%)	98.8				1	0.2	100

D. 考察

今年度は、2017 年 1 月から 12 月に成人 IPD 症例から分離された 412 株の PspA 蛋白の clade 解析を行った。その結果、family 1 が 57.5%、family 2 が 42.3%、family 3 が 0.2% であった (表 2)。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も、Family 1 が Family 2 よりも少し多いという結果であり、大きな変化を認めなかった。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 の占める割合が低下していた。

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血清型が割合の増加を認め、血清型置換が起きている。今回の解析にて、血清型のみならず、PspA clade分布も変化が起きていることが示唆された。

PspAは新規ワクチンの抗原として有望である。本研究にて、PspAの6つのcladeの中で、clade 1-4が98.8%を占めることが明らかになった。この結果は、PspAワクチンの開発において、clade 1-4をカバーすることで、大部分の肺炎球菌に有効なワクチンになることが期待されることを示唆している。そのため、将来のワクチン行政に有用な資料となるものと考えられる。

E. 結論

本研究では、2017年に成人IPD症例から分離された412株を用いて、PspA蛋白のclade解析を行った。PspA clade毎の割合は、clade 1が39.6%で最も多く、clade 3が27.2%、clade 2が17.9%、clade 4が14.1%、clade 5が1.0%、clade 6が0.2%であった。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。小児での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にも大きな変化が起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

ある。本研究にて、PspAの6つのcladeの中で、clade 1-4が98.8%を占めていることが明らかになった。この結果は、PspAワクチンの開発において、clade 1-4をカバーすることで、大部分の肺炎球菌に有効なワクチンになることが期待されることを示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) [Kinjo Y](#), Takatsuka S, Kitano N, Kawakubo S, Abe M, Ueno K, Miyazaki Y. Functions of CD1d-restricted invariant natural killer T cells in antimicrobial immunity and potential applications for infection control. *Front Immunol*, 9: 1266, 2018.
- 2) Ueno K, Urai M, Izawa K, Otani Y, Yanagihara N, Kataoka M, Takatsuka S, Abe M, Hasegawa H, Shimizu K, Kitamura T, Kitaura J, Miyazaki Y, [Kinjo Y](#). Mouse LIMR3/CD300f is a negative regulator of the antimicrobial activity of neutrophils. *Sci Rep*, 8: 17406, 2018.

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