

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 肺炎球菌は中耳炎、副鼻腔炎や肺炎などの非侵襲性感染症をおこす。肺炎は日本人の主な死因の一つであるが、肺炎球菌は市中肺炎や医療介護関連肺炎の起炎菌として最も頻度が高い。また、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) 蛋白に着目した。2014年から2017年に成人侵襲性肺炎球菌感染症例から分離された1,126株のPspA蛋白のclade解析を行い、clade分布の推移を調べた。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年分離株と比較して、2017年に分離された菌株では、clade 1及びclade 4の減少、clade 2及びclade 3の増加を認めた。本研究にて、肺炎球菌は血清型のみならず、PspA clade分布も変化していることが明らかになった。今後もPspA clade分布の推移を把握する必要がある。また、本研究にて、ほとんどの肺炎球菌のPspAはclade 1-4であ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が得られる可能性が示唆された。

A. 研究目的

肺炎は日本人の主な死因の一つである。肺炎球菌は市中肺炎及び医療介護関連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）を引きおこす。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、菌への補体の結合を阻害する働きを持っていることから、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に対する対策を検討するうえで、原因菌の血清型やPspAの分布などの細菌学的特徴を解析することは重要である。本分担研究では、成人IPD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

2014年1月から2017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1,126株の肺炎球菌株を用いた。各年の内訳は、2014年が203株、2015年が221株、2016年が290株、2017年が412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%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 CCACATACCGTTTTCTGTTTCCAGCC

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。

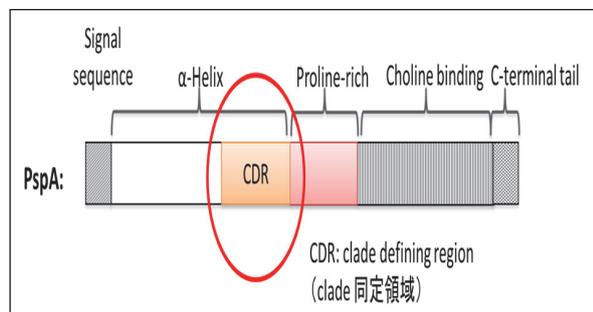


図 1. PspA 蛋白の模式図

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)

2014年分離株と比較して、2017年に成人IPD症例より分離された菌株は、clade 1及びclade 4の減少、clade 2及びclade 3の増加を認めた（図2）。

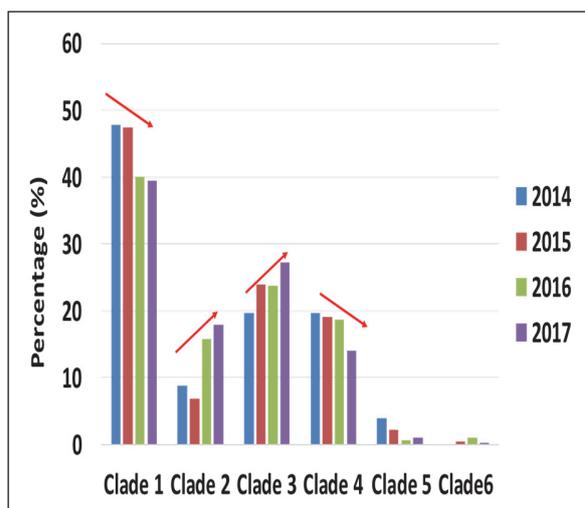


図 2. 成人IPD由来菌株 (全体) のPspA cladeの年次推移

2014年から2017年に成人IPD症例から分離された菌株のPspA cladeの割合を示した。

2) 成人IPD症例由来菌株 (PCV13血清型及び非PCV13血清型) のPspA clade分布の推移

小児での結合型肺炎球菌ワクチン (pneumococcal conjugate vaccine: PCV) 導入の影響で、成人IPD症例においても血清型置換を認めている。そこで、13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) 血清型の菌株と非PCV13血清型の菌株に分けて、PspA clade分布の推移を解析した。その結果、PCV13血清型の菌株では、2014年から2017年にかけて、clade 1の減少及びclade 3の増加を認めた（図3）。一方で、非PCV13血清型の菌株では、2014年から2017年にかけて、clade 2の増加及びclade 3の減少を認めた。また、clade 1は微減していた（図4）。

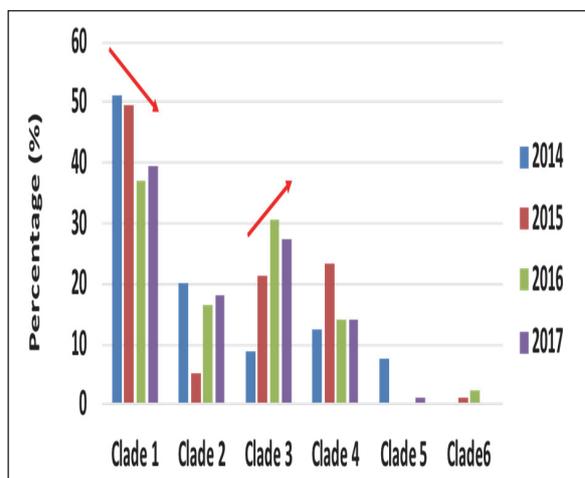


図 3. 成人IPD由来菌株 (PCV13血清型) のPspA cladeの年次推移

2014年から2017年に成人IPD症例から分離された菌株のうち、PCV13血清型菌株のPspA cladeの割合を示した。

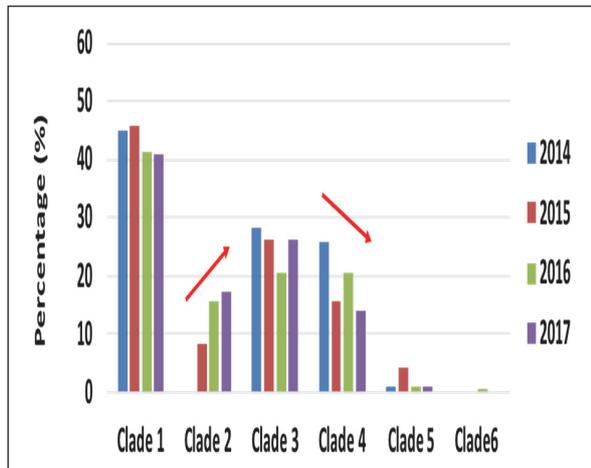


図 4. 成人IPD由来菌株（非PCV13血清型）のPspA cladeの年次推移

2014年から2017年に成人IPD症例から分離された菌株のうち、非PCV13血清型菌株のPspA cladeの割合を示した。

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

次に、23価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン（PPSV23）血清型と非PPSV23血清型に分けて、PspA clade分布の推移を解析した。その結果、PPSV23血清型の菌株では、clade 1の減少、clade 2及びclade 3の増加を認めた。また、clade 4は微減していた（図5）。また、非PPSV23血清型の菌株では、clade 2及びclade 3の増加、clade 4の減少を認めた。clade 1は微減していた（図6）。

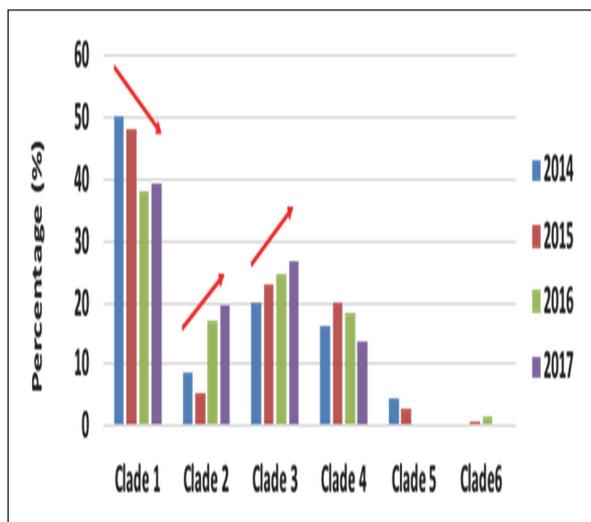


図 5. 成人IPD由来菌株（PPSV23血清型）のPspA cladeの年次推移

2014年から2017年に成人IPD症例から分離された菌株のうち、PPSV23血清型菌株のPspA cladeの割合を示した。

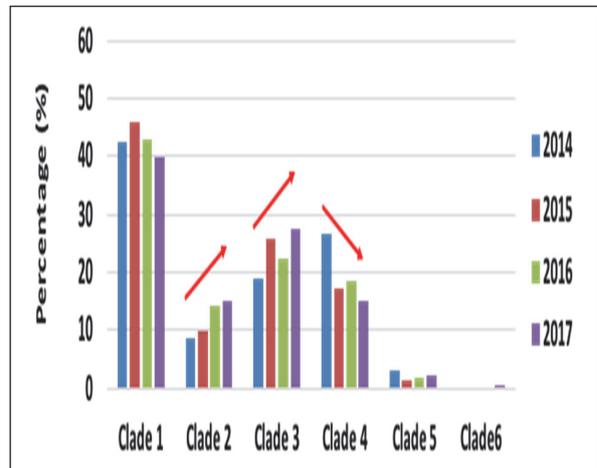


図 6. 成人IPD由来菌株（非PPSV23血清型）のPspA cladeの年次推移

2014年から2017年に成人IPD症例から分離された菌株のうち、非PPSV23血清型菌株のPspA cladeの割合を示した。

4) 主な血清型の菌株のPspA clade分布

主な血清型の菌株について、血清型とPspA clade分布の関係を解析した。血清型3、10A、11A/E、15A、19A、22Fなどでは、特定のcladeに偏りを認めた。一方で、近年顕著な増加を認める血清型12FのPspAは、clade 2と3の二つに分かれた（表2）。

表 2. 成人IPD由来菌株の主な血清型におけるPspA cladeの内訳

Serotype	PspA clade						Total
	1	2	3	4	5	6	
3	139	2	7	1	0	0	149
6C	0	50	10	1	0	0	61
10A	80	0	0	1	0	0	81
11A/E	0	1	1	42	0	0	44
12F	0	42	68	0	0	0	110
15A	0	0	0	56	1	0	57
19A	0	0	109	1	0	0	110
22F	77	0	1	0	0	0	78
23A	54	18	1	0	1	0	74
35B	1	1	5	45	0	0	52

5) 成人IPD由来菌2017年分離株のPspA clade 分布

成人IPD由来菌株のPspA clade分布の現状を把握するため、2017年分離株のPspA clade分布に着目した。その結果、clade 1-4の合計は98.8%であり（表3）、成人IPD由来菌株のほとんどがclade 1-4に分類されることが明らかになった。

表3. 2017年に分離された成人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 1-4とその他の割合(%)	98.8				1	0.2	100

D. 考察

本研究では、2014年から2017年に成人侵襲性肺炎球菌感染症例から分離された1,126株のPspA蛋白のclade解析を行った。2014年分離株と比較して、2017年に分離された菌株では、clade 1及びclade 4の減少、clade 2及びclade 3の増加を認めた。小児でのPCV導入の影響で、成人IPD症例においても血清型置換を認めているが、本研究にて、PspA clade分布も変化していることが明らかになった。

PCV13血清型の菌株と非PCV13血清型の菌株に分けて、PspA clade分布の推移を解析した結果、PCV13血清型の菌株では2014年から2017年にかけて、clade 1の減少及びclade 3の増加を認めた（図3）。一方で、非PCV13血清型の菌株では、2014年から2017年にかけて、clade 1の微減、clade 2の増加及びclade 3の減少を認めた（図4）。そのことから、全体的なclade 1の減少はPCV13血清型、non-PCV13血清型ともに影響していること、clade 2の増加は非PCV13血清型における増加を反映し、clade 3の増加はPCV13血清型での増加、clade 4の減少は非PCV13血清型での減少を反映していることが示唆された。

また、PPSV23血清型と非PPSV23血清型に分

けて、PspA clade分布の推移を解析した結果、PPSV23血清型の菌株では、clade 1の減少、clade 2及びclade 3の増加、clade 4の微減を認めた（図5）。また、非PPSV23血清型の菌株では、clade 1の微減、clade 2及びclade 3の増加、clade 4の減少を認めた（図6）。そのことより、全体的なclade 1の減少は、PPSV23血清型及び非PPSV23血清型共に影響しているものの、割合の多いPPSV23血清型で顕著であることが大きく影響している可能性が示唆された。また、全体的なclade 2及びclade 3の増加は、PPSV23血清型、非PPSV23血清型に関係なく、全体的に認められることが明らかになった。全体的なclade 4の減少は、PPSV23血清型及び非PPSV23血清型共に影響しているものの、非PPSV23血清型で顕著であることが影響している可能性が示唆された（図5及び図6）。

主な血清型の菌株について、PspA clade分布の関係を解析したところ、血清型3、10A、11A/E、15A、19A、22Fなどでは、特定のcladeに偏りを認めた。一方で、近年顕著な増加を認める血清型12FのPspAは、clade 2と3の二つに分かれることが明らかになった（表2）。

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、将来のワクチン政策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、2014年から2017年に成人IPD症例から分離された1,126株のPspA蛋白のclade解析を行い、clade分布の推移を調べた。2014年分離株と比較して、2017年に分離された菌株では、clade 1及びclade 4の減少、clade 2及びclade 3の増加を認めた。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も血清型置換を認めるが、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%を占めることが明らかになった。PspA clade 1-4をカバーする新規ワクチンを開発することで、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。

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