

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（東京慈恵会医科大学細菌学講座 主任教授）

研究協力者：常 彬（国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官）

大西 真（国立感染症研究所 副所長）

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。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表層蛋白pneumococcal surface protein A (PspA) に着目し、2018年に成人侵襲性肺炎球菌感染症例から分離された387株のPspAのclade解析を行った。PspA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。2018年に分離された菌株のcladeの内訳は、clade 1が38.0%で最も多く、続いてclade 4が21.4%、clade 3が21.2%、clade 2が17.0%、clade 5が2.1%、clade 6が0.3%であった。2018年分離菌株は2014年分離菌株と比較して、clade 1の減少及びclade 2の増加を認めた。参考値ではあるが、PCV導入前と比較し、2018年分離菌株ではclade 1及びclade 3の減少、clade 2及びclade 4の増加を認め、特に非PPSV23タイプ及び非PCV13タイプの菌株でその傾向が認められた。本研究にて血清型分布のみならず、PspA clade分布にも変化がおきていることが示唆されたことから、今後もPspA clade分布の推移の把握が必要と考えられる。

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細菌学的特徴を明らかにするための研究が必要である。

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)があり、菌体表層への補体沈着を阻害する作用を持つことから、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のclade解析を行った。

B. 研究方法

1) 肺炎球菌株

2018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、成人IPD症例の血液、髄液または他の組織から分離された387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 Dye Mixを用いてPCRを

表 1. PspA の PCR で使用したプライマー Primers

LSM12	CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT
SKH2	CCACATACCGTTTTCTTGTTCAGCC

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。

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。

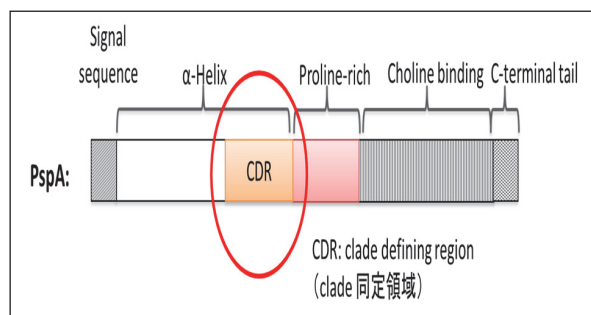


図 1. PspA の模式図

PspA 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387株の PspA の clade 解析を行った。PspA family の内訳は、family 1 が 55.0%、family 2 が44.7%、family 3 が0.3%であった (表 2)。PspA clade 毎の割合は、clade 1 が

表 2. 成人 IPD 由来菌株の PspA family 及び clade の内訳

PspA family	1						2						3	合計
	clade 1	clade 2	clade 3	clade 4	clade 5	clade 6	clade 1	clade 2	clade 3	clade 4	clade 5	clade 6		
菌株数	147	66	82	83	8	1	387							
割合 (%)	38.0	17.0	21.2	21.4	2.1	0.3	100							

38.0% で最も多く、clade 4 が21.4%、clade 3 が 21.2%、clade 2 が17.0%、clade 5 が2.1%、clade 6 が0.3%であった (表 2)。

また、2014年に分離された菌株と比較して、2018年に分離された菌株では、clade 1 の割合が低下し、clade 2 の割合の上昇を認めた (表 3)。

表 3. 成人 IPD 由来菌株の PspA clade 分布の比較 (2014年と2018年)

PspA family	1		2				3
	clade 1	clade 2	clade 3	clade 4	clade 5	clade 6	
2014 (%)	48	8.4	19.8	19.8	4	0	
2018 (%)	38.0	17.0	21.2	21.4	2.1	0.3	

2018年に分離された菌株の血清型分類では、23価肺炎球菌ワクチン (PPSV23) に含まれる血清型 (PPSV23タイプ) の菌株が234株で、全体の60.5%を占めており、PPSV23タイプの菌株の PspA は、clade 1 と clade 3 が多かった (表 4)。非 PPSV23タイプの菌株は153株で全体の39.5%を占めており、PPSV23タイプの菌株と比較して、clade 1 と 3 が少なく、clade 4 と 2 が多かった (表 5)。

表 4. 成人 IPD 由来2018年分離菌株の PPSV23タイプ血清型の PspA clade 内訳

PspA clade	clade 1	clade 2	clade 3	clade 4	clade 5	clade 6	合計
菌株数	111	23	70	23	7	0	234
割合 (%)	47.4	9.8	29.9	9.8	3	0	100

表 5. 成人 IPD 由来2018年分離菌株の非 PPSV23タイプ血清型の PspA clade 内訳

PspA clade	clade 1	clade 2	clade 3	clade 4	clade 5	clade 6	合計
菌株数	36	43	12	60	1	1	153
割合 (%)	23.5	28.1	7.8	39.2	0.7	0.7	100

さらに、13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) に含まれる血清型 (PCV13タイプ) かどうかの分類では、PCV13タイプは113株で、全体の29.2%を占めており、PCV13タイプの菌株の PspA は、

clade 1 と clade 3 が多かった (表 6)。また、非 PCV13 タイプの菌株は 274 株で全体の 70.8% を占めており、PCV13 タイプの菌株と比較して、clade 1 と 3 が少なく、clade 4 と 2 が多かった (表 7)。

表 6. 成人 IPD 由来 2018 年分離菌株の PCV13 タイプ血清型の PspA clade 内訳

PspA clade	clade 1	clade 2	clade 3	clade 4	clade 5	clade 6	合計
菌株数	58	3	42	3	7	0	113
割合 (%)	51.3	2.7	37.2	2.7	6.2	0	100

表 7. 成人 IPD 由来 2018 年分離菌株の非 PCV13 タイプ血清型の PspA clade 内訳

PspA clade	clade 1	clade 2	clade 3	clade 4	clade 5	clade 6	合計
菌株数	89	63	40	80	1	1	274
割合 (%)	32.5	23	14.6	29.2	0.4	0.4	100

D. 考察

今年度の解析結果より、2018 年に IPD 症例より分離された菌株は 2014 年に分離された菌株と比較して、clade 1 の減少及び clade 2 の増加を認め、Piao らは PCV 導入前の成人の IPD 症例由来菌株の PspA clade 分布の解析結果を報告している (Piao et al. Vaccine 2014)。参考値ではあるが、Piao らの PCV 導入前の解析結果と比較し、2018 年分離菌株では clade 1 及び clade 3 の減少、clade 2 及び clade 4 の増加を認め、特に非 PPSV23 タイプ及び非 PCV13 タイプの菌株で顕著であった。そのことから、上述の PspA clade 分布の変化は、非 PPSV23 タイプ及び非 PCV13 タイプの菌株の増加と関連する可能性が示唆された。

また、PspA clade 1-4 の合計は 97.6% であり、2017 年分離菌株での解析結果と同様に、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。PspA は新規肺炎球菌ワクチンの抗原として有望である。本研究での結果は、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

ることを示唆しており、今後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、2018 年に IPD 症例から分離された 387 株の PspA の clade 解析を行った。その内訳は、clade 1 が 38.0% で最も多く、続いて clade 4 が 21.4%、clade 3 が 21.2%、clade 2 が 17.0%、clade 5 が 2.1%、clade 6 が 0.3% であった。2018 年分離菌株は 2014 年分離菌株と比較して、clade 1 の減少及び clade 2 の増加を認めた。参考値ではあるが、PCV 導入前の解析結果と比較し、2018 年分離菌株では clade 1 及び clade 3 の減少、clade 2 及び clade 4 の増加を認め、特に非 PPSV23 タイプ及び非 PCV13 タイプの菌株で顕著であった。本研究にて血清型分布のみならず、PspA clade 分布にも変化がおきていることが示唆されたことから、今後も PspA clade 分布の推移の把握が必要と考えられる。

また、PspA の 6 つの clade の中で、clade 1-4 が大部分を占めていることが明らかになった。この結果は、今後の PspA ワクチンの開発及び将来のワクチン政策において、有用な知見であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 成人侵襲性肺炎球菌症例由来菌株の血清型及び PspA 型解析. 金城雄樹, 常 彬, 大西真, 大石和徳, 成人の侵襲性肺炎球菌感染症サーベイランスの充実化に資する研究班. 第 68 回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第 66 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会. 2019 年 10 月 16-18 日. 宮城.
- 2) 成人侵襲性肺炎球菌症例から分離した菌株の血清型及び Pneumococcal surface protein A (PspA) 型分布解析. 金城雄樹, 常 彬, 丸山貴也, 藤倉裕之, 砂川富正, 西 順一郎, 渡邊 浩, 鈴木 基, 大石和徳. 第 23 回日本ワクチン学会学術集会. 2019 年 11 月 30 日-12 月 1 日. 東京.

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