

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：大西 真（国立感染症研究所 副所長）

研究分担者：常 彬（国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官）

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、ほぼ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、2014-2019年に成人侵襲性肺炎球菌感染症例から分離された1,932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。PspA clade 1-6のいずれとも相同性が低い菌を4株認めた。残りの1,928株のcladeの内訳はclade 1が最も多いものの減少を認め、clade 2は増加を認めた。また、解析機関を通してclade 5と6の割合は低く、clade 1-4が96.1-98.8%と大部分を占めた。さらに、PCV13血清型およびPPSV23血清型の菌株ではclade 1とclade 3が大部分を占めるのに対し、非PCV13血清型および非PPSV23血清型の菌株ではclade 1-4に広く分布を認めた。以上の結果より、成人侵襲性肺炎球菌感染において原因菌株の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明らかになった。そのことから、今後もPspA clade分布の推移の把握が必要である。また、本研究の成果はPspAを抗原として用いる新たなワクチンの開発において有用な知見となるものと考えられる。

A. 研究目的

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、成人の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：

2014年1月から2019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、成人IPD症例の血液、髄液または他の組織から分離された1,939株の肺炎球菌株を用いた。2014年-2019年の各年の分離菌株数はそれぞれ203、220、291、416、391、418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	CCACATACCGTTTCTTGTTCAGCC

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。

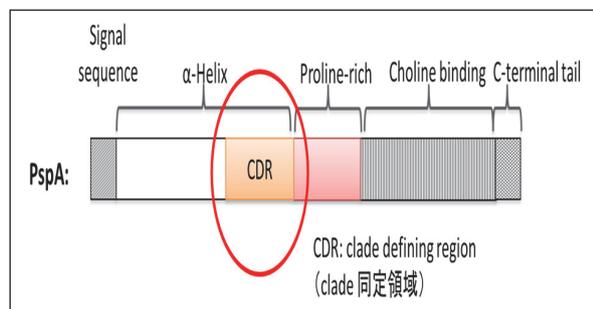


図 1. PspA の模式図

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 症例から分離された1,939株の血清型の分布は図2に示したように、最も多いのが血清型3で、続いて、12F、19A、10A、23Aの順に多かった。

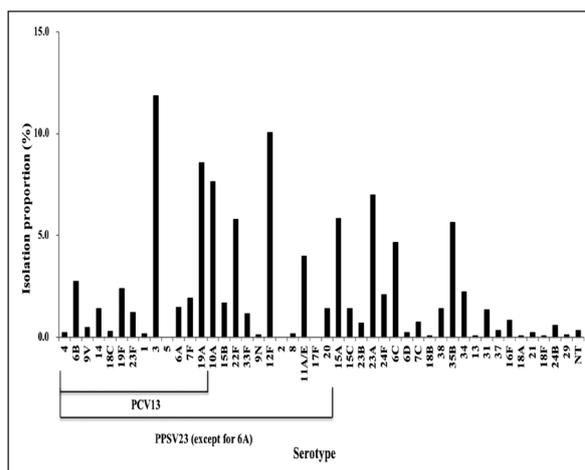


図 2. 成人 IPD 由来菌株の各血清型の割合

2014-2019年に成人 IPD 症例より分離された1,939株の血清型の割合を示した。

また、2014-2019年の血清型分布は図3のように推移し、2019年にはPCV13血清型、PPSV23血清型は27.0、56.2%まで低下した。

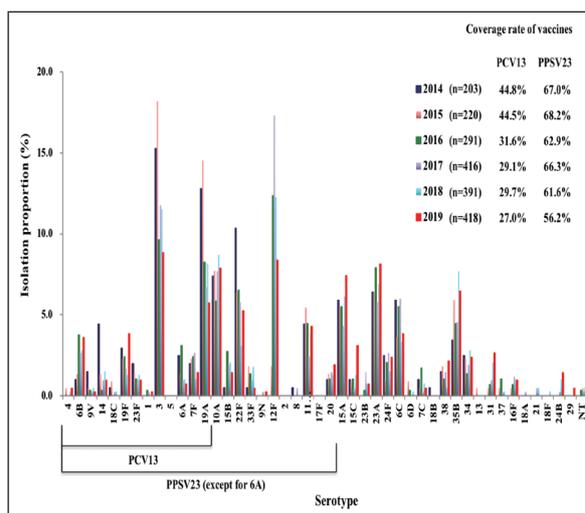


図 3. 成人 IPD 由来菌株の血清型の推移

2014-2019年に成人 IPD 症例より分離された1,939株の血清型の割合の推移を示した。

1,939株の PspA の clade 解析を行った。うち7株は PspA 遺伝子が増幅されなかった。PspA 遺伝子の有無を確認するために、whole genome sequencingを行ったが、PspA 遺伝子と同一性を認める遺伝子は検出されなかった。そのことから、PspA 遺伝子が欠損していると判定した。

その7株を除く1,932株のうち、1,928株は clade 1-6 のいずれかと90%以上の同一性を認めた。最も割合が高いのは clade 1 であったが、2016年から減少を認めた。一方で、clade 2 は2016年から増加を認めた。また、2014-2019年を通じて、

clade 5 と clade 6 の割合は低く、clade 1-4 の割合は96.1-98.8%であり、clade 1-4 が大部分を占めた (図 4)。

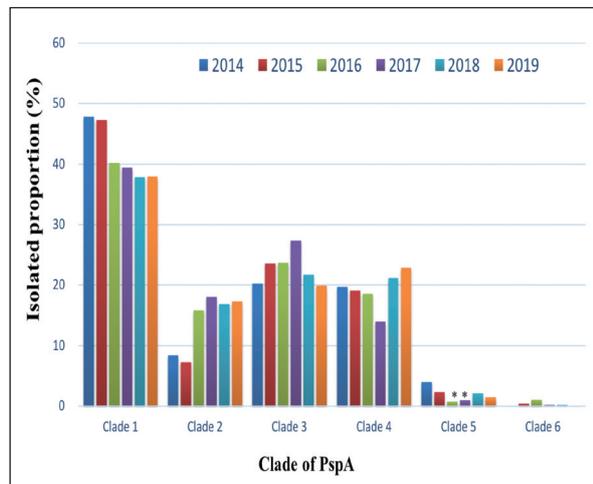


図 4. 成人 IPD 由来菌株の PspA の clade 分布
2014-2019年に成人 IPD 症例より分離された1,928株の PspA の各 clade の割合を示した。

一方で、clade 1-6 のいずれとも相同性の低い (90%未満) の 4 株については、clade 1-6 以外の new PspA clade と判定した (表 2)。

また、13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) に含まれる血清型 (PCV13血清型) と非PCV13血清型で PspA clade 分布の比較を行った。その結果、PCV13血清型では、clade 1 と clade 3 が大部分を占めるのに対し、非PCV13血清型では clade 1-4 に分布することがわかった (図 5)。

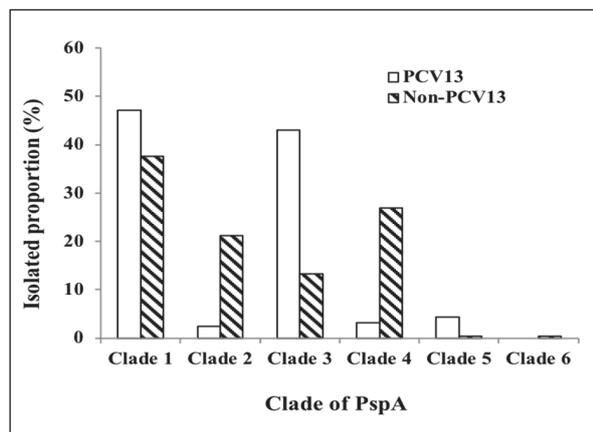


図 5. PCV13血清型と非PCV13血清型の PspA の clade 分布の比較

2014-2019年に成人 IPD 症例より分離された1,928株について、PCV13血清型と非PCV13血清型で PspA clade を比較した。

次に、23価肺炎球菌ワクチン (PPSV23) に含まれる血清型 (PPSV23血清型) と非PPSV23血

表 2. 肺炎球菌血清型および clonal complex 別の PspA clade 分布

Serotype	CC*	Clade 1	Clade 2	Clade 3	Clade 4	Clade 5	Clade 6	New clade	Without pspA sequence
4*	CC695	0	0	3	0	0	0	0	0
	CC5872	0	0	0	1	0	0	0	0
6B*	CC90	21	1	3	0	0	0	0	0
	CC902	8	0	0	2	0	0	0	1
	CC2224	0	0	3	0	0	0	0	0
	CC338	3	0	0	0	0	0	0	0
9V*	CC166	0	0	2	2	0	0	0	0
	CC280	0	1	4	0	0	0	0	0
14*	CC13	18	0	0	0	0	0	0	0
	CC343	3	0	0	0	0	0	0	0
18C*	CC370	0	0	0	2	0	0	0	0
	CC394	3	0	0	0	0	0	0	0
19F*	CC236	0	0	34	2	2	0	0	2
	CC242	0	0	0	0	0	0	0	2
23F*	CC242	0	0	0	0	9	0	0	0
	CC1437	0	0	0	0	9	0	0	0
	CC338	0	2	0	0	2	0	0	0
1*	CC306	3	0	0	0	0	0	0	0
3*	CC180	206	3	8	0	1	0	0	0
6A*	CC3113	11	0	0	0	0	0	0	0
	CC81	0	0	7	0	0	0	0	0
	CC90	2	0	0	0	0	0	0	0
7F*	CC191	0	0	36	0	0	0	0	0
19A*	CC330	0	0	6	0	0	0	0	0
	CC2331	0	0	34	0	0	0	0	0
	CC3111	0	0	124	2	0	0	0	0
10A†	CC1263	40	0	0	0	0	0	0	0
	CC5236	104	0	0	1	0	0	0	0
15B‡	CC199	0	0	0	30	0	0	0	0
22F‡	CC433	105	0	0	0	0	0	0	0
33F‡	CC717	21	0	0	0	0	0	0	0
9N‡	CC66	0	0	2	0	0	0	0	0
12F‡	CC4846	0	0	117	0	0	0	0	0
	CC6945	0	77	0	0	0	0	0	0
g‡	CC2234	0	0	0	0	1	0	0	0
	CC3500	2	0	0	0	0	0	0	0
11A‡§	CC99	0	1	0	71	0	0	0	0
20‡	CC4745	20	0	0	0	0	0	0	0
15A	CC63	0	0	0	108	0	0	0	1
	CC81	0	0	1	0	0	0	0	1
15C	CC199	0	0	0	21	0	0	0	0
23A	CC338	76	39	0	0	0	0	0	0
24F	CC2572	0	36	0	0	0	0	0	0
24B	CC2572	0	0	3	0	0	0	0	0
	CC2754	0	0	8	0	0	0	0	0
6C	CC2924	1	40	0	0	0	0	0	0
	CC2923	0	0	0	11	0	0	0	0
	CC5241	0	31	0	1	0	0	0	0
7C	CC2758	12	0	0	0	0	0	0	0
38	CC6429	26	0	0	0	0	0	0	0
35B	CC156	0	0	8	0	0	0	0	0
	CC2755	0	0	0	42	0	0	0	0
	CC558	0	1	2	53	0	0	2	0
34	CC3116	29	0	0	0	0	0	0	0
	CC7338	14	0	0	0	0	0	0	0
31	CC1184	0	26	0	0	0	0	0	0
37	CC447	0	0	0	0	0	6	0	0
Non-typeable	CC230	0	0	0	0	0	0	1	0
	CC338	0	1	0	0	0	0	0	0
	CC2331	0	0	1	0	0	0	0	0
	CC2572	0	1	0	0	0	0	0	0
	CC3116	1	0	0	0	0	0	0	0
	CC15490	0	0	0	0	0	0	1	0

*: Serotypes belonging to PCV13

†: Serotypes belonging to PPSV23 but not to PCV13

‡: Strains where ≥5 of the 7 alleles in MLST analysis are classified as a CC

清型で PspA clade 分布の比較を行ったところ、PPSV23血清型では、clade 1 と clade 3 が大部分を占めるのに対し、非PPSV23血清型では clade 1-4 に分布しており、PCV13血清型と非PCV13血清型の違いと類似していた (図 6)。

さらに、血清型および clonal complex と PspA clade 間の関連を調べたところ、一部の菌株については、血清型および clonal complex と PspA clade に一定の関係性を認めた (表 2)。

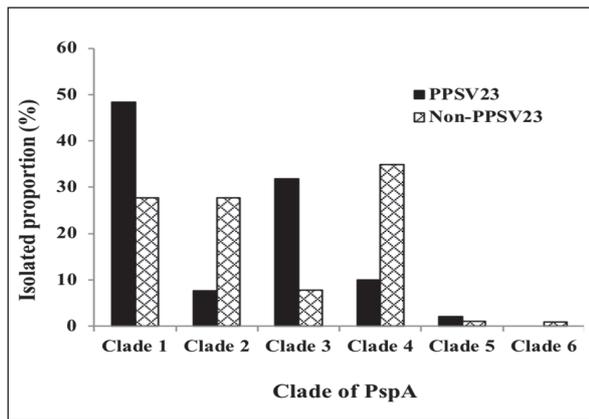


図 6. PPSV23血清型と非PPSV23血清型のPspAのclade分布の比較

2014-2019年に成人IPD症例より分離された1,928株について、PPSV23血清型と非PPSV23血清型でPspA cladeを比較した。

D. 考察

2014-2019年に分離された成人IPD由来菌株のPspA clade解析の結果より、clade 1の減少およびclade 2の増加を認めた。また、PCV13血清型およびPPSV23血清型ではclade 1とclade 3が大部分を占めるのに対し、非PCV13血清型および非PPSV23血清型では、clade 1-4に分布するという違いが明らかになった。2014年にはPCV13血清型とPPSV23血清型の割合は44.8%と67.0%であったのに対し、2019年にはそれぞれ、27.0%と56.2%に低下を認めた。小児におけるPCV定期接種導入により、成人IPDにおいても血清型が進行すると共に、PspA clade分布にも大きな変化を認めた。

また、PspAの6つのcladeの中で、clade 1-4の割合は2014-2019年を通じて96.1-98.8%と非常に高い割合であり、大部分を占め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、2014-2019年にIPD症例から分離された1,932株のPspA cladeを決定した。その内

訳は、clade 1が最も多いものの年々減少しており、対照的にclade 2の増加を認めた。また、PCV13血清型およびPPSV23血清型ではclade 1とclade 3が大部分を占めるのに対し、非PCV13血清型および非PPSV23血清型では、clade 1-4に分布するという違いが明らかになった。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の割合が96.1-98.8%であり、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、有用な知見と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morino S, Kitagami E, Nakayama H, Koizumi Y, Tanaka-Taya K, Kinjo Y, Oishi K. Seroepidemiological analysis of anti-pneumococcal surface protein A (PspA) immunoglobulin G by clades in Japanese population. *Vaccine*, 38 (47): 7479-7484, 2020.
- 2) Chang B, Kinjo Y, Morita M, Tamura K, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Fujita J, Oshima K, Maruyama T, Abe S, Kasahara K, Nishi J, Kubota T, Ohnishi M, Suga S, Oishi K, and the Adult IPD Study Group. Distribution and variation of serotypes and pneumococcal surface protein A clades of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from adult patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Front Cell Infect Microbiol.* (in press).

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