

肺炎球菌分離株に対するワクチン免疫血清の細菌学的免疫学的検討

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
林崎 浩史 東京慈恵会医科大学細菌学講座 講師

研究要旨

肺炎球菌は肺炎の主な起炎菌であり、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）を引き起こす。肺炎球菌は菌体表層に存在する莢膜のポリサッカライドの違いにより、約 100 種類の血清型に分類される。現行の肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチンはカバーする血清型に対する有効性が高いものの、ワクチンに含まれない血清型による IPD の増加が懸念されている。本研究では、現行肺炎球菌ワクチンの感染防御効果を多角的に解析する目的で、細菌学・免疫学的観点から、23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン（PPSV23）免疫血清を介した補体の沈着活性を解析した。本研究の初年度に、免疫血清を介した補体の沈着活性の解析法を確立し、成人 IPD 由来菌株を用いて解析可能であることを確認した。2-3 年目は成人 IPD 由来菌株を用いて補体の沈着活性を解析した。PPSV23 血清型のうち、成人 IPD 症例から分離された 20 血清型の菌株を用いて解析を行った結果、一部の血清型の菌株を除いて、多くの血清型の菌株にて PPSV23 免疫血清による補体 C3 沈着の増加を認めた。今後も細菌学的・免疫学的観点から、現行肺炎球菌ワクチンの感染防御効果を明らかにしたい。

A. 研究目的

中耳炎や副鼻腔炎の主な起炎菌である肺炎球菌は、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る。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）をおこし、特に 5 歳未満小児と 65 歳以上成人で多い。

肺炎球菌は菌体表層に存在する莢膜

のポリサッカライドの違いにより、約 100 種類の血清型に分類される。現行の肺炎球菌ワクチンはポリサッカライドベースワクチンであり、現在、23 種類の血清型のポリサッカライドを用いた 23 価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPSV23）と 15 または 20 価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV15 または PCV20）が、それぞれ 65 歳成人と小児において定期

接種されている。これらのワクチンの有効性が示されているものの、ワクチンに含まれない血清型（非ワクチン血清型）による IPD 罹患が増加している（血清型置換）。

現行ワクチンの有効性を把握するためには、多角的な解析を行う必要があり、IPD 症例から分離された菌株を用いた細菌学および免疫学的な解析は重要と考えられる。肺炎球菌に対する感染防御において、菌に対する抗体の結合および補体の沈着によるオプソニン化を介した食細胞の貪食殺菌が重要である。そのため、肺炎球菌ワクチン免疫血清による菌への抗体の結合を介した補体沈着活性を解析することにより、ワクチンの感染防御効果を検討する指標となると考えられる。

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を用いて、PPSV23 免疫血清中の抗体を介した補体 C3 沈着活性の解析を行うこととした。

B. 研究方法

1) 肺炎球菌

2013 年から 2024 年の間に成人 IPD 症例の血液、髄液または他の組織から分離された肺炎球菌のうち、PPSV23 に含まれる血清型の菌株を用いた。肺炎球菌株は血液寒天培地にて画線培養し、翌日コロニーを回収、吸光度測定の後、 $OD_{600}=0.1$ = 約 1×10^8 CFU/ml（数種の肺炎球菌株を用い、コロニーカウント法より求めたおよその CFU 濃度の平均値）として各菌株サンプル：約 2×10^7 CFU/菌株サンプルとして用いた。

2) 反応緩衝液

血清反応及び補体反応時の緩衝液として 2 種類作成した。組成・使用試薬は下記の通りである。

1%ウシ血清アルブミン(BSA)/PBS(+):BSA 粉末(WAKO 社)+10xPBS(-)(ナカライ社)+100xD-PBS(+)調製用 Ca, Mg 溶液(ナカライ社)

0.1%ゼラチン/PBS(+):ゼラチン粉末(ナカライ社)+10xPBS(-)(ナカライ社)+100xD-PBS(+)調製用 Ca, Mg 溶液(ナカライ社)

3) 試薬

免疫血清は PPSV23 投与被験者血清 (Human Anti-Pneumococcal capsule Reference Serum (1st International Standard) 007SP; NIBSC) を用い、補体としてはウサギ血清 (Pel-Freez Biologicals 社)、検出抗体は FITC 標識ヤギ抗ウサギ C3 抗体 (MPbio 社) を用いた。

4) 肺炎球菌の蛍光ラベリング

肺炎球菌を Fixable Viability Dye (FVD) (Thermo 社) で染色した。染色手順は血液寒天培地より回収した肺炎球菌ペレットを 1xPBS(-) で再懸濁し、FVD 溶液を 500 倍希釈で加えた後、室温で 30 分間遮光して反応させた。反応後、緩衝液で洗浄・遠心後、補体結合アッセイに用いた。

5) 補体結合アッセイ

菌ペレット（約 2×10^7 CFU）を 10%血清/緩衝液で再懸濁し、37℃、30 分間静置で

反応させた。反応後、1xPBS(-)で洗浄・遠心(15,000rpm, 4℃, 2分間)し、補体/緩衝液で再懸濁し、37℃, 30分間静置で反応させる。1xPBS(-)で洗浄・遠心(15,000rpm, 4℃, 2分間)後、1xPBS(-)で希釈した FITC 標識ヤギ抗ウサギ C3 抗体で 4℃, 20 分間染色、1xPBS(-)で洗浄・遠心後、PI 染色液(終濃度 10 μg/ml)/1xPBS(-)で再懸濁し、フローサイトメトリ CytoFLEX (Beckman Coulter 社)で解析した。フローサイトメトリ解析の結果から、各血清型の肺炎球菌株への補体 C3 の結合率を算出した。

6) 緩衝液・補体濃度の決定

上記の補体結合アッセイのプロトコルに従い、反応時の緩衝液および補体(ウサギ血清)濃度の剪定を行った。緩衝液は 1%BSA/PBS(+), 0.1%ゼラチン/PBS(+) の 2 種で補体濃度は 10%, 5%, 2.5%そして 0%で行った。

C. 研究結果

最初に、安定した実験結果を得る目的で実験系を確立させるために、実験条件の検討を行った。まず、先行研究での報告をもとに、1%BSA/PBS(+)と 0.1%ゼラチン/PBS(+)を用いて、PPSV23 免疫ヒト血清を介する補体 C3 沈着を解析した。その結果、0.1%ゼラチン/PBS(+)を用いた場合に、肺炎球菌株への非特異的な補体沈着が低いと考えられた(図 1)。

そのため、0.1%ゼラチン/PBS(+)を Buffer として用いて、以下の実験を行った。

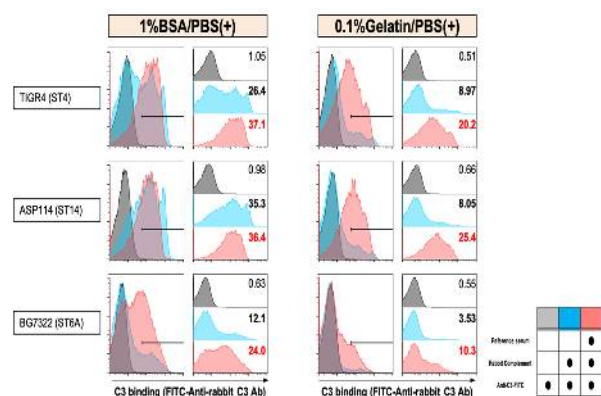


図 1. Buffer の比較検討

3つの肺炎球菌株(血清型 4 の TIGR4 株、血清型 14 の ASP114 株、血清型 6A の BG7322 株)を用いた。数字は補体 C3 沈着の割合を示す。

左: 1%BSA/PBS(+), 右: 0.1%ゼラチン/PBS(+)
 灰色: 補体結合検出抗体のみ、青色: 補体+補体結合検出抗体、赤: PPSV23 免疫血清+補体+補体結合検出抗体

*0.1%ゼラチン/PBS(+)を用いた場合、補体の非特異的結合が少なく(灰色と青色の違い)、PPSV23 を介した補体沈着を認める(青色と赤色の違い)。

次に、補体が含まれるウサギ血清について、最適な濃度を決定するための検討を行った。その結果、10%の濃度を用いた場合に、免疫血清による補体沈着増強効果を明確に確認することが可能であり、かつ、免疫血清非存在下での補体沈着の程度が許容範囲であることが分かった(図 2)

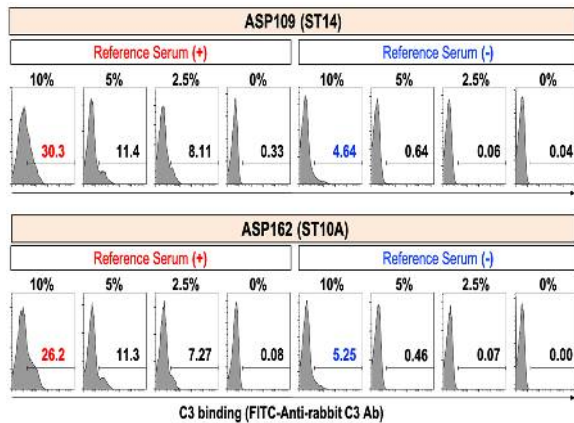


図 2. 補体が含まれるウサギ血清の適正濃度の検討

2つの肺炎球菌株（血清型 14 の ASP109 株、血清型 10A の ASP162 株）を用いた。左：PPSV23 免疫血清存在下、右：PPSV23 免疫血清非存在下、数字は補体 C3 沈着の割合を示す。

以上の解析により決定した Buffer と補体のウサギ血清の条件を用いて、PPSV23 免疫ヒト血清を介する補体 C3 沈着を解析した。ところが、異なる日の解析において、実験結果が安定しないという問題に直面した。原因を検討したところ、用いる菌の僅かな状態の違いにより、解析結果が一定しないことが示唆された。そこで、免疫細胞の解析の際に用いている、状態の悪くなった細胞を除外することが可能な試薬（Fixable Viability Dye）を用いて検討を行ったところ、安定した結果が得られることが分かった。以上により、実験条件を確立することができた。

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株を国立感染症研究所から入手し、本研究にて確立した、菌体への補体 C3 沈着活性の解析法を用いて、解析を行った。PPSV23 に含まれる血清型の菌株を用いて

解析を行った。血清型 1、4、6B、8 の肺炎球菌株の場合、菌株数は限定的ではあるものの、PPSV23 免疫血清の存在下において、菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認めた（図 3）。血清型 3 の菌株については、9 株中 7 株において、PPSV23 免疫血清による菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認めた。しかし、残りの 2 株では、PPSV23 免疫血清の非存在下でも補体 C3 の沈着率が高く、PPSV23 免疫血清による補体沈着の増強効果を認めなかった（図 3、赤枠）。また、血清型 7F の 4 株については、いずれの菌株も補体 C3 の沈着率が高く、PPSV23 免疫血清による補体沈着の増強効果は認められず、むしろ PPSV23 免疫血清の存在下で補体沈着の減少を認めた（図 3）。

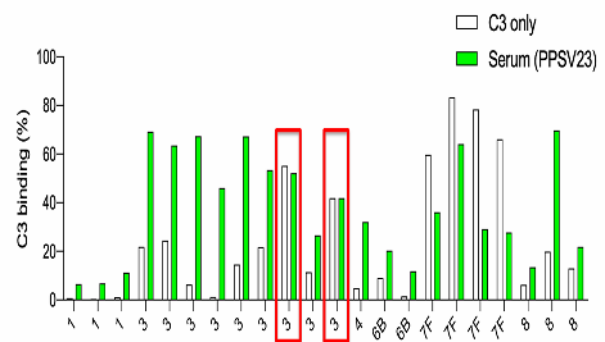


図 3. PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 の沈着活性の解析結果-1

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 1、3、4、6B、7F、8）に対する PPSV23 免疫血清の存在（緑）または非存在下（補体 C3 only、白）での補体 C3 沈着率を示した。

血清型 9N、9V、10A、11A/E、12F、14、15B の肺炎球菌株の場合、菌株数が限定的な血清型もあるものの、PPSV23 免疫血清の存在下において、菌体への補体 C3 の沈

着率の増加を認めた（図 4）。また、一部の菌株では、PPSV23 免疫血清の非存在下でも補体 C3 の沈着率が高かったものの、PPSV23 免疫血清による補体 C3 の沈着率の増加を認めた。

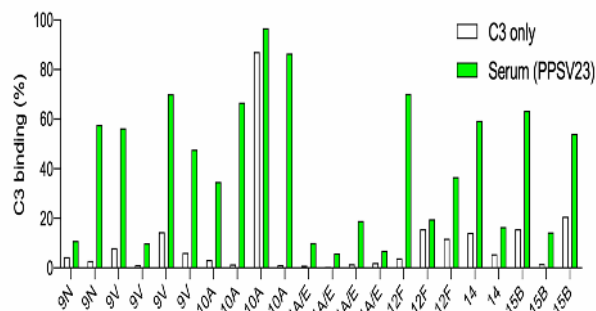


図 4. PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 の沈着活性の解析結果-2

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 9N、9V、10A、11A/E、12F、14、15B）に対する PPSV23 免疫血清の存在（緑）または非存在下（補体 C3 only、白）での補体 C3 沈着率を示した。

血清型 18C、19A、20、22F、33F の肺炎球菌株については、菌株数が限定的な血清型があるものの、PPSV23 免疫血清の存在下において、菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認めた（図 5）。また、一部の菌株では、PPSV23 免疫血清の非存在下でも補体 C3 の沈着率が高かったものの、PPSV23 免疫血清による補体 C3 の沈着率の増加を認めた（図 5）。

血清型 19F の菌株では 4 株中 2 株において、PPSV23 免疫血清による菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認めた。しかし、残りの 2 株では、PPSV23 免疫血清による補体沈着の増強効果は認められず、むしろ

PPSV23 免疫血清の存在下で補体沈着の減少を認めた（図 5、赤枠）。

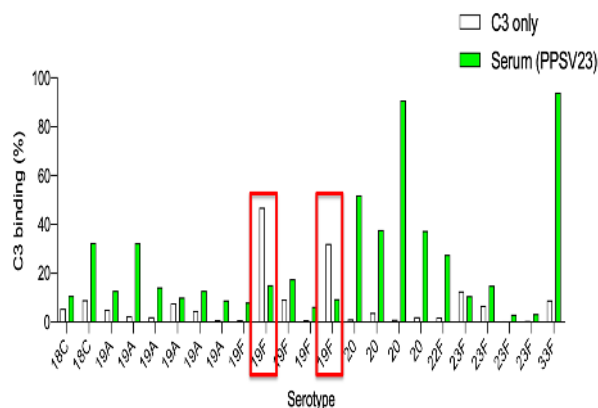


図 5. PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 の沈着活性の解析結果-3

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 18C、19A、19F、20、22F、23F、33F）に対する PPSV23 免疫血清の存在（緑）または非存在下（補体 C3 only、白）での補体 C3 沈着率を示した。

また、血清型 23F の菌株については、複数の菌株で補体沈着活性の低かったため、図 6 に拡大像を示した。解析した血清型 23 の 4 株中 3 株において、PPSV23 免疫血清による菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認めた。しかし、残りの 1 株では、PPSV23 免疫血清による補体沈着の増強効果を認められず、むしろ PPSV23 免疫血清の存在下で補体沈着の減少を認めた（図 6、赤枠）。

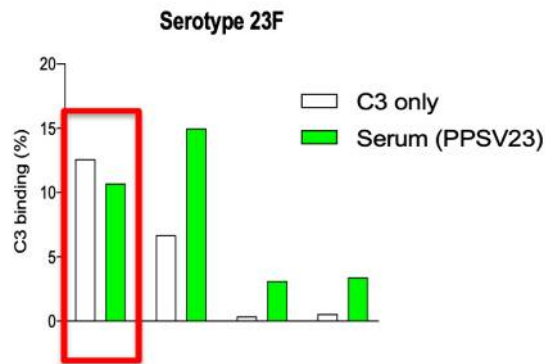


図 6. PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 の沈着活性の解析結果-4

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌（血清型 23F）に対する PPSV23 免疫血清の存在（緑）または非存在下（補体 C3 only、白）での補体 C3 沈着率を示した。

次に、上述の解析にて、PPSV23 免疫血清による補体沈着増強作用を認められなかった菌株について、再解析を行った。血清型 3 の肺炎球菌 2 株の再解析では、PPSV23 免疫血清の存在下において、菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認めた（図 7）。一方で、血清型 7F の 4 株においては、いずれの菌株も PPSV23 免疫血清による補体沈着の増強効果は認められず、むしろ PPSV23 免疫血清の存在下で補体沈着の減少を認めた（図 7）。

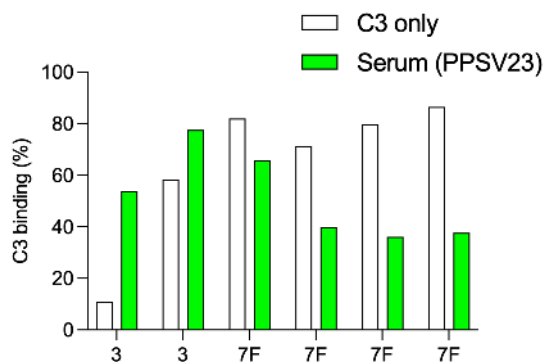


図 7. PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 の沈着活性の解析結果-1

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 3 と 7F）に対する PPSV23 免疫血清の存在（緑）または非存在下（補体 C3 only、白）での補体 C3 沈着率を示した。

PPSV23 免疫血清非存在下における補体 C3 の沈着率が高いことが要因ではないかと考えられた。

血清型 19F の肺炎球菌株については、1 株は PPSV23 免疫血清の存在下において、菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認めたものの、もう 1 株は保体の沈着率の増加を認めなかった（図 8）。また、血清型 23F の菌株では、2 株ともに PPSV23 免疫血清による補体 C3 の沈着率の増加を認めた（図 8）。

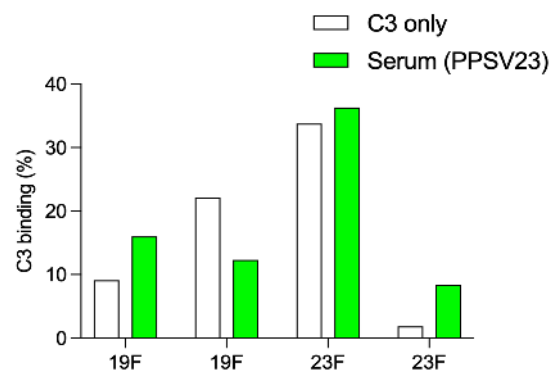


図 8. PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 の沈着活性の解析結果-2

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 19F と 23 F）に対する PPSV23 免疫血清の存在（緑）または非存在下（補体 C3 only、白）での補体 C3 沈着率を示した。

また、血清型 4、6B、19F、22F、23F、33F の肺炎球菌株については、一部の株については再解析を行うと共に、新たに株を追加して、PPSV23 免疫血清による菌体への補体 C3 の沈着の影響を解析した。血清型 4、6B、19F については、PPSV23 免疫血清の存在下において、菌体への補体 C3 の沈着率の増加を認める株と認めない株が混在していた（図 9）。一方で、血清型 22F、23F、33F の菌株では、PPSV23 免疫血清による補体 C3 の沈着率の増加を認めた（図 9）。

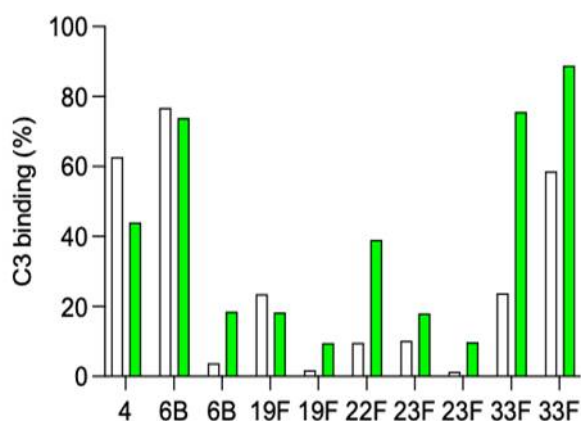


図 9. PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 の沈着活性の解析結果-3

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 4、6B、19F、22F、23F、33F）に対する PPSV23 免疫血清の存在（緑）または非存在下（補体 C3 only、白）での補体 C3 沈着率を示した。

D. 考察

現行の莢膜ポリサッカライドベースの肺炎球菌ワクチンは含有するポリサッカライドの血清型に対する感染防御効果が高い。しかし、肺炎球菌は約 100 種類の血清型が存在し、現行ワクチンに含まれ

ない血清型の増加により幅広い感染防御効果をもたらすことができないことが懸念されている。肺炎球菌のポリサッカライドベースワクチンは、基本的に血清型に依存した感染防御効果をもたらす、すなわち、交差反応性が期待できないためである。本研究では、現行肺炎球菌ワクチンの感染防御効果を多角的に解析する目的で、細菌学・免疫学的観点から、PPSV23 免疫血清を介した補体の沈着活性を解析した。

成人 IPD 由来の PPSV23 血清型の菌株に対する、PPSV23 免疫血清を介する補体沈着活性を解析した。今年度は昨年度、補体沈着活性の増強作用を認めなかった菌株についての再評価を行った。その結果、血清型 3 や 23F などの菌株では、PPSV23 免疫血清を介する補体 C3 沈着の増強効果を認めた。

一方で、血清型 7F の菌株やその他、ごく一部の菌株では、PPSV23 免疫血清を介する補体沈着の増強作用が認められず、PPSV23 免疫血清存在下で、むしろ補体沈着活性が低下した。PPSV23 免疫血清非存在下においても、菌株への補体沈着が高いことが、そのような結果をもたらしたと考えられる。

E. 結論

本研究では、現行の莢膜ポリサッカライドベースの肺炎球菌ワクチンの感染防御効果を多角的に解析する目的で、細菌学・免疫学的観点から、PPSV23 免疫血清を介した補体の沈着活性を解析した。本研究にて確立した解析方法および成人 IPD 由来菌株を用いて解析を行った。まだ菌株数が少ない血清型があるものの、

PPSV23 血清型のうち、成人 IPD 症例から分離された 20 血清型の菌株を用いて解析を行い、血清型 7F および一部の菌株を除いて、多くの血清型の菌株にて、PPSV23 免疫血清による補体 C3 沈着の増加を認めた。今後も細菌学的・免疫学的解析により肺炎球菌ワクチンの感染防御効果を明らかにすることで、今後のワクチン政策において、有用な知見を得られるように解析を続けたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tamura K, Chang B, Shimbashi R, Watanabe H, Tanabe Y, Kuronuma K, Oshima K, Maruyama T, Fujita J, Abe S, Kasahara K, Nishi J, Kubota T, Kinjo Y, Fujikura H, Fukusumi M, Shimada T, Sunagawa T, Suzuki M, Yamamoto Y, Oishi K; Adult IPD Study Group. Dynamic changes in clinical characteristics and serotype distribution of invasive pneumococcal disease among adults in Japan after introduction of the pediatric 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in 2013-2019. *Vaccine*, 40(24): 3338-3344, 2022.

2. 林崎浩史, 金城雄樹. iNKT 細胞による感染防御. *臨床免疫・アレルギー科*. 80 (3):305-310. 2023 年 9 月

3. Kamii Y, Hayashizaki K, Kanno T, Chiba A, Ikegami T, Saito M, Akeda Y, Ohteki T, Kubo M, Yoshida K, Kawakami K, Oishi K, Araya J, Kuwano

K, Kronenberg M, Endo Y, Kinjo Y. IL-27 regulates the differentiation of follicular helper NKT cells via metabolic adaptation of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024; 121 (9):e2313964121.

4. Hayashizaki K, Kamii Y, Kinjo Y. Glycolipid antigen recognition by invariant natural killer T cells and its role in homeostasis and antimicrobial responses. *Front Immunol* 2024; 15: 1402412.

5. Abe M, Kinjo Y, Koshikawa T, Miyazaki Y. Basic Research on *Candida* Species. *Med Mycol J* 2024; 65(3): 67-74.

2. 著書

1. 金城 雄樹. グラム陽性偏性嫌気性球菌. *アクチノミセス属 (放線菌属)*. 敗血症の病態. *標準微生物学 第 15 版* (錫谷 達夫・松本 哲哉 編集) 137-138, 250-253, 586-588. 東京, 医学書院, 2024 年 2 月

3. 学会発表

1. 金城 雄樹、中山 大輝、古泉 ゆか、黒田 英介、常 彬、林崎 浩史、竹河 志郎、明田 幸宏、大石 和徳. 2 価 PspA 融合タンパク質ワクチンによる肺炎球菌感染防御効果の解析. 第 96 回日本細菌学会総会. 2023 年 3 月. 姫路.

2. 林崎浩史, 上井康寛, 菅野俊生, 遠藤裕介, 川上和義, 金城雄樹. 濾胞性ヘルパーNKT 細胞の分化誘導機構の解明.

第34回日本生体防御学会学術総会. 2023年9月, 京都.

3. 金城雄樹. (教育講演) バイオフィルム感染症研究の現状と今後の展開. 第72回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第70回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会 2023年10月, 東京.

4. Koji Hayashizaki, Yasuhiro Kamii, Toshio Kanno, Masato Kubo, Toshiaki Ohteki, Kazuyoshi Kawakami, Yusuke Endo, Yuki Kinjo. The metabolic adaptation is necessary for iNKT cells to differentiate into the follicular subset, which is regulated by Gr-1⁺ cells. 第52回日本免疫学会学術集会. 2024年1月, 千葉.

5. 金城雄樹. (シンポジウム) 肺炎球菌タンパク質・糖脂質ワクチンによる抗体産生誘導機構. 第97回日本細菌学会総会. 2024年8月, 札幌.

6. 金城雄樹. (教育講演) 抗体産生の増強をもたらす免疫機構の解析～新規肺炎球菌ワクチンの開発を目指して～. 第1回免疫衛生学研究会独自集会. 2024年12月, 東京.

7. 林崎浩史, 高塚翔吾, 菅野敏生, 杉本真也, 明田幸宏, 大石和徳, 遠藤裕介, 金城雄樹. (口頭) 糖脂質アジュバントを用いた新規肺炎球菌ワクチンの作用機序の解明. 2024年日本細菌学会関東支部インターラボセミナー. 2024年12月, 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