

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

肺炎球菌は市中肺炎の起炎菌として最も頻度が高く、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、100 種類以上の血清型に分類される。小児に対する肺炎球菌ワクチンは 20 価肺炎球菌結合型ワクチン（pneumococcal conjugate vaccine 20; PCV20）が用いられている。成人に対してはこれまで 23 価肺炎球菌ポリサッカライドワクチン（PPSV23）が用いられていたが、2026 年 4 月から定期接種ワクチンとして導入されることから肺炎球菌感染防御効果が期待される。一方で、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、その効果は血清型に依存することから、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、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・免疫学的観点から解析を行った。マウスへの PCV20 の免疫により、血中に莢膜ポリサッカライドに対する IgG 抗体の産生を認めた。また、PCV20 マウス免疫血清を用いて、成人 IPD 由来菌株に対する IgG 抗体の結合性を解析した。その結果、解析した PCV20 に含まれる血清型の肺炎球菌株に対して IgG 抗体の結合性を認めた。本解析は、PCV20 免疫血清の成人 IPD 由来菌株に対する反応性を評価する一つの方法として有用と考えられることから、引き続き、種々の IPD 由来菌株に対する反応性を解析することで、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

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。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、100 種類以上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 20 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV20) が、65 歳成人と小児において定期接種されている。しかし、2026 年 4 月から成人の定期接種においても PCV20 が使用されることになった。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性を解析することは、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、PCV20 免疫血清中 IgG 抗体の菌への結合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、 $OD_{600}=0.1 \approx 1 \times 10^8 \text{CFU/ml}$ (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 $2 \times 10^7 \text{CFU/菌株サンプル}$ として用いた。

2) マウスの免疫

C57BL/6 マウスに PCV20 (プレベナー20、ファイザー株式会社) を 2 週間ごとに 3 回、腹腔内投与し、最終免疫から 1 週間後に免疫血清を回収した。また、コントロールとして無処置マウスから血清を回収した。

3) 血清中 IgG 抗体価測定

肺炎球菌血清型 3 または 6A の莢膜ポリサッカライドを室温で一晩コートしたウェルを 1%BSA でブロッキング後、PCV20 免疫血清またはコントロール血清の希釈系列を作成して添加し、室温で 1 時間反応させた。反応後、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いて血清中の特異的 IgG 抗体価を検出した。

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 $1 \times \text{PBS}(-)$ で再懸濁し、FVD 溶液を 400 倍希釈で加えた後、 4°C で 30 分間遮光して反応させた。反応後、 $1 \times \text{PBS}(-)$ で洗浄・遠心後 ($12,000\text{rpm}$, 4°C , 2 分間)、IgG 抗体結合性解析に用いた。

5) 肺炎球菌株に対する免疫血清中 IgG 抗体の結合性解析

菌ペレット (約 $1 \times 10^7 \text{CFU}$) に PCV20 免疫血清またはコントロール血清を加え、 4°C で 20 分間遮光して反応させた。反応後、 $1 \times \text{PBS}(-)$ で洗浄・遠心後 ($12,000\text{rpm}$, 4°C , 2 分間)、上清を除き、希釈した

Alexa fluor 647 標識ヤギ抗マウス抗体 (Jackson 社) で 4℃, 20 分間染色、1×PBS(-) で洗浄・遠心後、PI 染色液 (終濃度 10 μ g/ml) / 1×PBS(-) で再懸濁し、フローサイトメトリー CytoFLEX (Beckman Coulter 社) で解析した。FVD ネガティブ・PI ネガティブの集団を生菌として解析した。

C. 研究結果

PCV20 を免疫したマウスから採取した PCV20 免疫血清と無処置 (Naïve) マウスから採取した血清を用いて、血清型 3 と血清型 6A の肺炎球菌莢膜ポリサッカライドに対する血清中 IgG 抗体価を測定した。その結果、無処置 (Naïve) マウスでは抗体産生を認めないものの、PCV20 の免疫マウスでは両方の血清型の莢膜ポリサッカライドに対する IgG 抗体産生を認めた (図 1)。

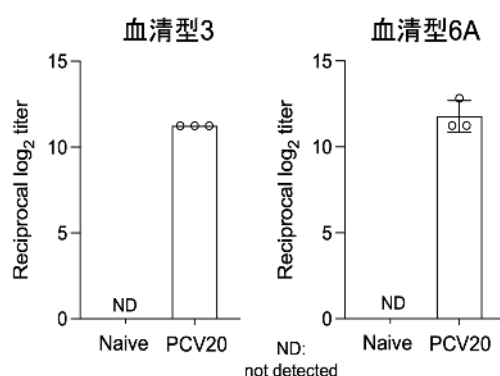


図 1. PCV20 免疫血清中の莢膜ポリサッカライドに対する IgG 抗体価

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株 (血清型 3 と 6A) に対する PCV21 免疫血清中 IgG 抗体価を示した。

肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチ

ンによる感染防御効果は、ワクチン接種によって産生された IgG 抗体が菌の莢膜ポリサッカライドに結合すること (菌のオプソニン化) で、菌の貪食殺菌が促進されることによりもたらされる。実際に、成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株に対して、PCV20 免疫血清中の IgG 抗体が結合するのかどうかフローサイトメトリー解析を行った。まず、血清型 1、3、4、6A および 6B の成人 IPD 由来肺炎球菌株に対する IgG 抗体の結合性を解析したところ、これらの血清型の菌株に対する結合性を認めた (図 2)。

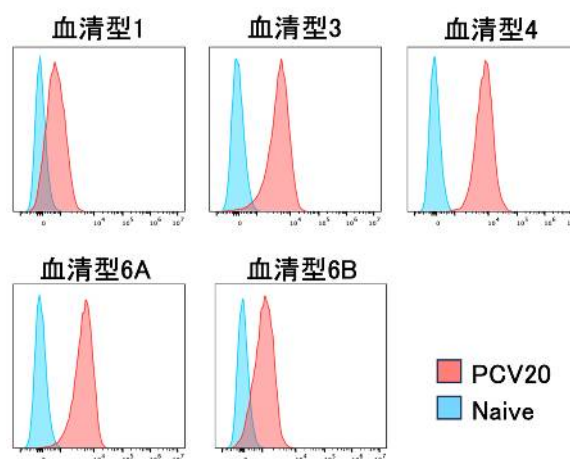


図 2. PCV20 免疫血清中 IgG の肺炎球菌株に対する結合性-1

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株 (血清型 1、3、4、6A、6B) に対する PCV20 免疫血清 (赤) または無処置 (Naïve、青) の IgG 抗体結合性を示した。

続いて、血清型 12F、19A、22F および 33F の成人 IPD 由来肺炎球菌株に対する IgG 抗体の結合性を解析したところ、これらの血清型の菌株に対しても結合性を認めた (図 3)。

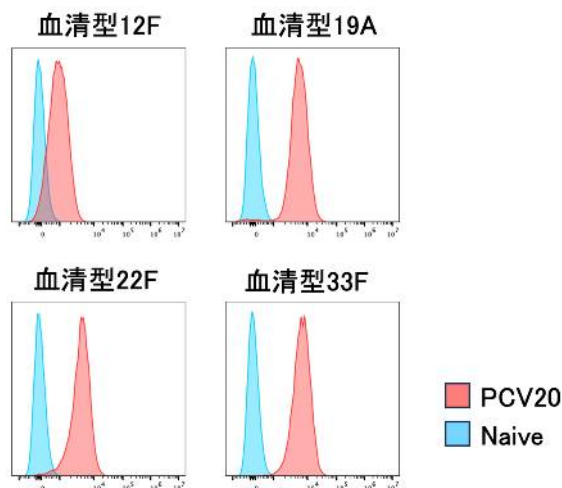


図 3. PCV20 免疫血清中 IgG の肺炎球菌株に対する結合性-2

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 12F、19A、22F、33F）に対する PCV20 免疫血清（赤）または無処置（Naive、青）の IgG 抗体結合性を示した。

同様に、血清型 7F、8 および 9V の肺炎球菌株に対しても、PCV20 免疫血清中の IgG 抗体の結合性を認めた（図 4）。しかし、PCV20 には含まれない莢膜ポリサッカライドをもつ血清型 9N に対しては、IgG 抗体の結合性を認めなかった（図 4）。

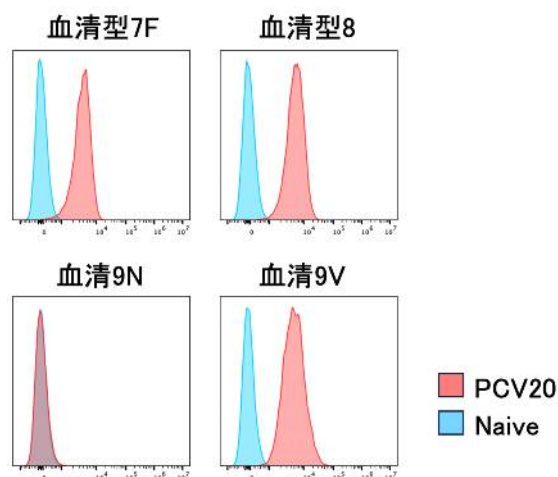


図 4. PCV20 免疫血清中 IgG の肺炎球菌株に対する結合性-3

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 7F、8、9N、9V）に対する PCV20 免疫血清（赤）または無処置（Naive、青）の IgG 抗体結合性を示した。

血清型 10A の菌株に対しても PCV20 免疫血清中の IgG 抗体の結合性を認めたものの、本菌株には無処置（Naive）マウスの血清中の IgG 抗体も一定の結合性を認めた（図 5）。また、血清型 11A/E や 15B の菌株に対しては PCV20 免疫血清中の IgG 抗体の結合性を認めるものの、他の菌株に対する反応性と比べると結合性は弱いものであった（図 5）。さらに、PCV20 には含まれない莢膜ポリサッカライドをもつ血清型 15A に対しては、IgG 抗体の結合性を認めなかった（図 5）。

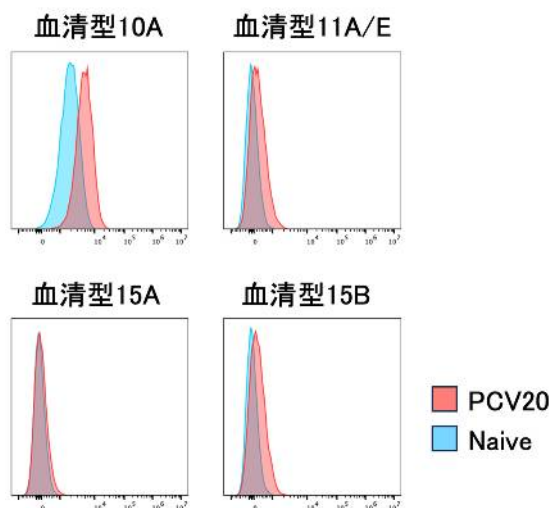


図 5. PCV20 免疫血清中 IgG の肺炎球菌株に対する結合性-4

成人 IPD 症例から分離された肺炎球菌株（血清型 10A、11A/E、15A、15B）に対する PCV20 免疫血清（赤）または無処置（Naive、青）の IgG 抗体結合性を示した。

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 100 種類以上の血清型が存在し、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、PCV20 免疫血清を介した補体の沈着活性を解析した。

マウスへの PCV20 免疫により、血清型 3 と血清型 6A の肺炎球菌莢膜ポリサッカライドに対する IgG 抗体産生を認めた(図 1)。その結果と一致して、PCV20 免疫血清中の IgG 抗体は、血清型 1、3、4、6A、6B、7F、8、9V、12F、19A、22F および 33F などの成人 IPD 由来肺炎球菌株に対する結合性を認めた。PCV20 に含まれる血清型の莢膜ポリサッカライドに対する反応性を確認することができた(図 2-4)。血清型 10A の菌株に対しても PCV20 免疫血清中の IgG 抗体の結合性を認めたものの、本菌株には無処置 (Naive) マウスの血清中の IgG 抗体も一定の結合性を認めたことから(図 5)、解析した菌株の特徴なのか、血清型 10A の特徴なのか今後、調べていきたい。

一方で、PCV20 免疫は血清型 11A/E や 15B の菌株に対して IgG 抗体の結合性を認めるものの、その反応性は他の菌株に対する反応性に比べて弱かった(図 5)。

PCV20 マウス免疫血清中 IgG 抗体の血清型 11A/E や 15B に対する反応性については、他の菌株を用いた解析が必要である。

また、9N と 9V、15A と 15B のように近い血清型であっても、PCV20 には含まれない莢膜ポリサッカライドをもつ血清型 9V や 15A に対しては、IgG 抗体の結合性を認めなかったことから(図 4、5)、血清型依存性の反応性が確認された。

本研究班では、10 年以上に渡る解析にて数千株の成人 IPD 由来菌株を保有する。そのため、PCV20 のワクチン血清型に関して、同じ血清型内で種々の菌株を用いた解析が可能であるという特徴があり、その強みを活かして、肺炎球菌ワクチンの肺炎球菌に対する感染防御効果を解析していきたい。

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、PCV20 マウス免疫血清を用いて成人 IPD 由来菌株に対する IgG 抗体の結合性を解析した。PCV20 免疫血清中の IgG 抗体は、血清型 1、3、4、6A、6B、7F、8、9V、12F、19A、22F および 33F などの成人 IPD 由来肺炎球菌株に対する結合性を認め、PCV20 に含まれる血清型の莢膜ポリサッカライドに対する反応性を確認することができた。一部の血清型の菌株に対しては反応性が弱かったが、その菌だけに対する結果という可能性があることから、同じ血清型の種々の菌株に対する反応性を解析する必要がある。

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

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. Sugimoto S, Terasawa Y, Tani N, Yamanaka K, Kinjo Y. Periplasmic Serine Protease Prc is Responsible for Amyloid Subunit CsgA Degradation and Proteostasis in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. 2025; 437(21):169418.

2. 林崎浩史, 上井康寛, 遠藤裕介, 金城雄樹. ミトコンドリア代謝制御を介した濾胞性ヘルパーNKT 細胞の分化機構. 臨床免疫・アレルギー科 2025; 84(4): 290-297.

2. 学会発表

1. 金城雄樹. 成人の侵襲性肺炎球菌感染症と今後の予防戦略. (ランチョンセミナー) 第 99 回日本感染症学会総会・学術講演会 第 73 回日本化学療法学会総会合同学会. 2025 年 5 月, 横浜.

2. 林崎浩史, 上井康寛, 池上拓, 杉本真也, 明田幸宏, 大石和徳, 金城雄樹. (口頭) 非典型的な免疫応答を基盤とする新規肺炎球菌ワクチンの開発. 第 55 回レンサ球菌研究会. 2025 年 6 月, 東京.

3. Kinjo Y, Hayashizaki K, Takatsuka S, Kamii Y, Ikegami T, Sugimoto S, Kanno T, Kronenberg M, Endo Y. Mechanisms of follicular helper NKT cell-mediated augmentation of

antibody production by a pneumococcal protein and glycolipid vaccine. The 14th International CD1-MR1 Workshop. 2025 年 9 月, Portland, USA.

4. 林崎浩史, 築地信, 池上拓, 杉本真也, 高塚翔吾, 上井康寛, 斎藤充, 明田幸宏, 大石和徳, 金城雄樹. (口頭) B 細胞受容体レパトア解析に基づく NKT 細胞介在ワクチンの特性. 第 36 回日本生体防御学会. 2025 年 9 月, 熊本.

5. 金城雄樹, 林崎浩史, 高塚翔吾, 常彬, 高橋宜聖, 宮崎義継, 明田幸宏, 大石和徳. (シンポジウム 6 細菌感染症に対するワクチン・治療薬の開発戦略) 肺炎球菌タンパク質ワクチンの NKT 細胞活性化を介した抗体産生誘導機構の解析. 第 29 回日本ワクチン学会・第 66 回日本臨床ウイルス学会 合同学術集会. 2025 年 9 月, 札幌.

6. Hayashizaki K, Takatsuka S, Ikegami T, Kanno T, Kubo M, Tsuiji M, Takahashi Y, Kitamura D, Endo Y, Kinjo Y. NKT cells mediate germinal center priming and enhance humoral response induced by a novel pneumococcal vaccine. 第 54 回日本免疫学会学術集会. 2025 年 12 月, 姫路.

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