

令和元年5月28日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09101

研究課題名(和文) 新規ワクチン開発に向けた肺炎球菌の血清型、薬剤耐性および表層抗原の分子疫学的研究

研究課題名(英文) Molecular epidemiological study of pneumococcal serotypes, drug resistance, and surface antigen for novel vaccine development

研究代表者

川口谷 充代 (Kawaguchiya, Mitsuyo)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70733062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：2016年6-11月に、北海道各地の医療機関から収集された非侵襲性肺炎球菌729株(小児由来678株、成人由来51株)を研究対象とし、血清型と薬剤耐性、新規ワクチン候補抗原として考えられている肺炎球菌表層タンパク質A(PspA)の分子疫学的性状を調査した。結果、小児由来株の87.9%がPCV13非含有血清型で、優勢な血清型15A、35B、23Aの81-100%がペニシリン非感受性であった。全菌株の99%がPspA Family 1またはFamily 2に属していたが、Family 3/clade 6が非PCV13非含有血清型37(ST447/ST7970) ムコイド型から検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児に対する肺炎球菌結合型ワクチン導入後、国内外においてワクチンに含まれない血清型の増加とその薬剤耐性傾向が臨床上問題となっている。この現況に対し、肺炎球菌血清型分布とその薬剤耐性の状況、流行株の分子疫学的特徴を明らかにすることで、今後の肺炎球菌感染症対策に寄与する知見を得る。加えて、莢膜型(血清型)に依存しない、次世代肺炎球菌ワクチン抗原の候補である菌表層蛋白PspAの分子疫学的性状を含めた研究を行なう。これらの成果を国内外で発信・報告することは、新規ワクチン開発の早期の実現に結び付く基礎資料として、グローバルな肺炎球菌感染症対策に貢献するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：After the introduction of the pneumococcal conjugate vaccine (PCV) for children, an increase in pneumococcal diseases caused by non-PCV serotypes is a worldwide concern. The prevalence of serotypes, antimicrobial resistance, and its relevance to PspA which is a considered as promising vaccine candidate were investigated for 729 (678 children, 51 adults) non-invasive pneumococcal isolates. Isolates were collected in hospitals and clinics in Hokkaido between June and November 2016. As a results, 87.9% of isolates from children belonged to non-PCV13 serotypes and most isolates (81-100%) of the dominant serotypes 15A, 35B and 23A were non-susceptible to penicillin. While most of the isolates (99%) had PspA belonging to either family 1 or 2, PspA family 3/clade 6 was detected in only non-PCV13 serotype 37 isolates assigned to ST447 and ST7970 showing the mucoid phenotype.

研究分野：衛生学

キーワード：肺炎球菌 蛋白結合型ワクチン 表層蛋白 血清型 非ワクチン血清型 分子疫学 薬剤耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は臨床上最も重要な病原菌の一つであり、特に小児および高齢者における市中肺炎の第一位の起病菌である。肺炎球菌感染症は本菌が鼻咽頭やヒト上気道粘膜定着(保菌)から始まり、保菌状態が長いと侵襲性肺炎球菌(IPD)へのリスクが高まる。肺炎球菌は無莢膜型を除き、莢膜多糖体(capsular polysaccharide: CPS)の抗原性により約100種類の血清型(莢膜型)に分類される。本邦において、5歳未満の小児に対して侵襲性肺炎球菌(IPD)原因となる代表的な七つの血清型(4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F)を含有した7価沈降肺炎球菌結合型ワクチン(7-valent pneumococcal conjugate vaccine: PCV7)が2010年2月に任意接種ワクチンとして導入され、2013年4月にPCV7は定期接種に移行した。さらに同年11月にはPCV7導入後に増加した6つの血清型を加えたPCV13[PCV7含有血清型+血清型1, 3, 5, 6A, 7F, 19A]に置き換わり、現在に至っている。一方、成人用には23価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン(PPSV23)があり、2014年10月に65歳以上の高齢者に対して任意接種から定期接種に移行し、PCV13が同年6月に任意接種として適応拡大されている。現行のPCV13は13種類、PPSV23は23種類のCPSを混合して作られたワクチンであるため、ワクチンに含有された血清型(莢膜型)に対しては予防効果があるが、ワクチンに含まれない血清型による肺炎球菌感染症は予防できない。

本邦を含め、海外諸国におけるPCV7/13導入後の調査において、PCVsに含まれない血清型(PCVs非含有血清型)による本菌感染症の増加及びその薬剤耐性が明らかとなっている。我々が継続的に行っている疫学調査においても、PCV13非含有血清型株検出率が39.7%(2011年)から72.9%(PCV13定期接種導入後の2013年4月~2014年11月)へと急激に増加したことを明らかにした(Kawaguchiya et al., *New microbe and New infect*, 2015)。国内外において、PCV13非含有血清型株および薬剤耐性株の増加とその拡がり本菌感染症の治療を難しくしている現状から、血清型特異的な現行のワクチンに代わる、全ての肺炎球菌に有効な新規肺炎球菌ワクチンの開発が望まれている。

近年、次世代肺炎球菌ワクチンに向けた数々の研究が国内外で報告されている。中でも、全ての肺炎球菌が保有するとされる病原因子である、肺炎球菌表面タンパク質A(Pneumococcal surface protein A: PspA)が新規ワクチンの抗原として注目されており、PspAに対する特異的免疫応答は肺炎および全身性感染症を抑制することがわかっている。PspA上に存在する抗体が認識する抗原エピトープという領域はCDR(Clade-defining region)と呼ばれ、遺伝子配列の違いによってFamily1(clade1, 2)、Family2(clade3, 4, 5)、Family3(clade6)に分類される。非侵襲性肺炎球菌を対象に、各血清型における薬剤耐性の状況を明らかにするとともに、次世代肺炎球菌ワクチンの抗原として期待されているPspAの遺伝学的多様性を調査・解析し、その成果を国内外に発信・報告することは、新規肺炎球菌ワクチンの早期の実現において重要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、第一に、多数の菌株の血清型をより迅速に確実に決定できる、新規血清型判別法の改良である。肺炎球菌の血清型は近年さらに莢膜遺伝子の変異によって、現在約100種類知られ、既報の連続多重PCR法では、いくつかの重要な血清型(亜型)の同定または鑑別ができない。我々は改良を加えつつ、新規血清型鑑別法を報告してきたが、血清型の変化に対応した更なる解析法の開発が本研究のために必要である。

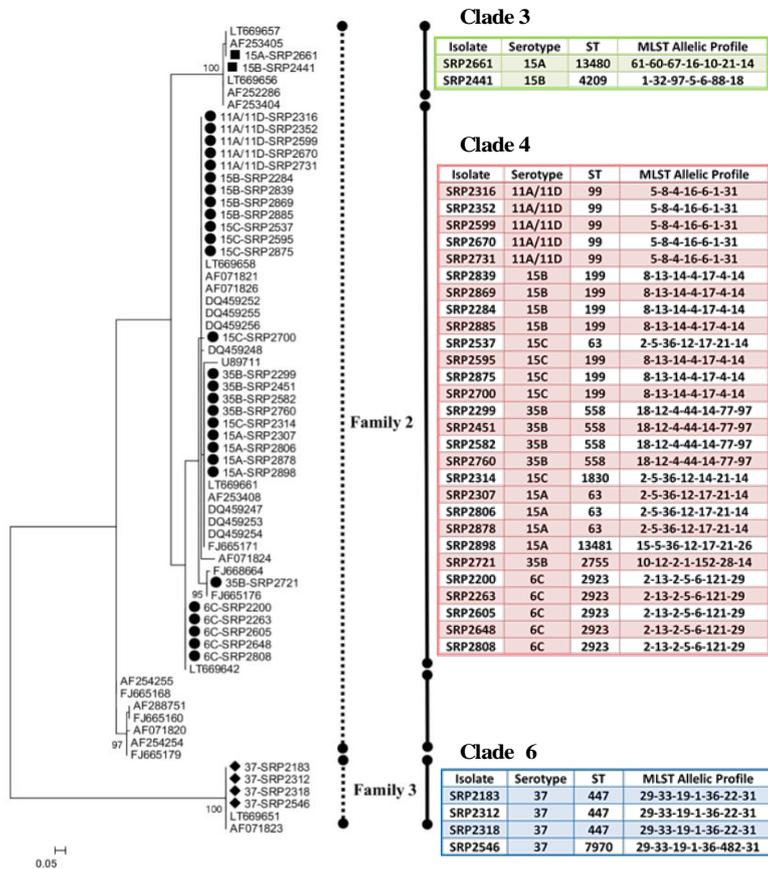
第二に、わが国で流行している肺炎球菌の血清型、薬剤耐性状況およびPspA遺伝子の分子疫学的性状を明らかにすることである。我々の調査における、PCV13定期接種導入後(2013年4月~2014年11月)のPCV13非含有血清型株検出率は、72.9%(全960株)と非常に高く、現在さらに増加していると想定される。加えて、増加したPCV13非含有血清型中における薬剤耐性も懸念されていることから、本研究では各種薬剤に対する感受性を血清型ごとに評価し、薬剤耐性遺伝子およびペニシリン変異遺伝子の分布も調査する。さらにPspAのFamily型別、cladeの分類等の分子疫学的解析を加えて総合的な統計解析を行い、日本における流行菌株の特徴を明らかにし、今後の肺炎球菌感染症対策に寄与する知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

2016年6月-11月に、北海道内各地の医療機関における外来患者から分離され、札幌臨床検査センターで同定された非侵襲性肺炎球菌729株(小児由来678株、成人由来51株)を研究対象とした。全被検菌株に対して連続多重PCR法[Pai et al., *J Clin Microbiol*, 2006; CDC (<http://www.cdc.gov/stemplab/pcr.htm>)]とPCR-RFLP法(Kawaguchiya, et al. *Microb Drug Resist*, 2011)で血清型を判別したのち、この方法で判別できない血清型(亜型)に対する新規血清型鑑別法を考案した。PCR法でPspA Family型別をおこない、マクロライド耐性遺伝子[*erm(B)*, *mef(A/E)*]と3種のペニシリン結合蛋白(penicillin-binding protein: PBP)遺伝子(*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b*)変異の検出には多重PCR法を用いた。16種(成人は10種)の抗菌薬[penicillin (PEN), macrolides [erythromycin (ERY), clarithromycin (CLR), azithromycin (AZM)], clindamycin (CLI), cephalosporins [cefepime (FEP), cefuroxime (CXM), ceftriaxone (CRO)], carbapenems [imipenem (IPM), meropenem (MEM)], quinolones [levofloxacin (LVX), moxifloxacin (MXF), gatifloxacin (GAT)], vancomycin (VAN), tetracycline (TET) and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT)]に対する感受性検査は、微量液体希釈法(ドライプレート, 栄研)を用いて最小発育阻止濃度(MIC)を測定するとともに、MIC測定でLVF非感受性を示した株に対しては、*gyrA*, *gyrB* 遺伝子(DNA ジャイレーズ)と



図 2. CDR の遺伝子配列に基づく系統樹 (Family 2 と Family 3)

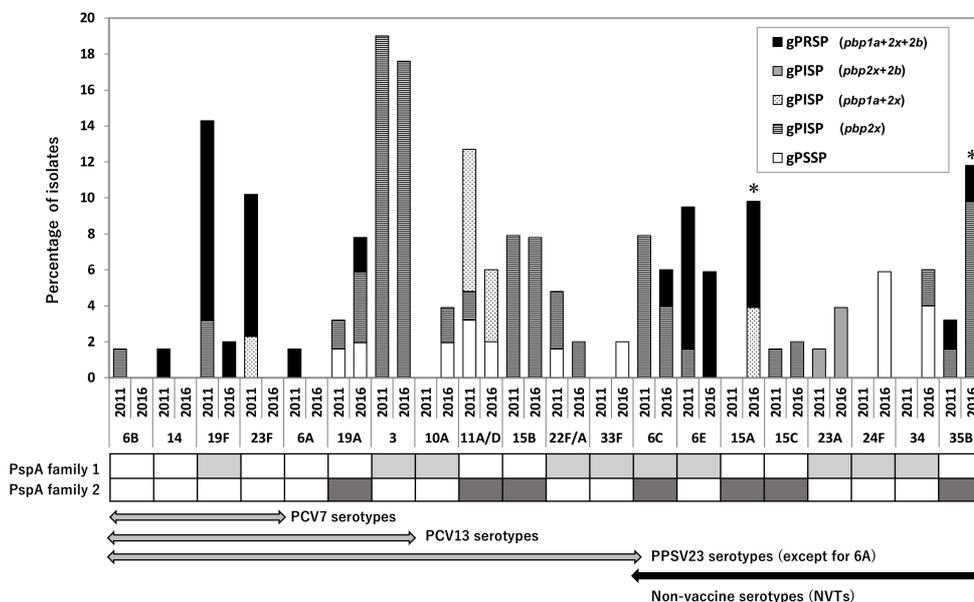


得られた CDR 領域の塩基配列は BLAST を使用してアラインし、代表的な参考株を加えて系統樹を作成した (図 1、2)。その結果、同一 Family 内では 80-100%、同一 Clade 内では 90% 以上の一致率を示し、一方異なる Family 間においては 53-69% の一致率を示した。本研究で検出された PspA family 3/clade 6 株が GenBank に登録されている株すべてと 100% の一致率を示したことから、現段階において分布頻度が少ないものの Family 3/Clade 6 の塩基配列の保存性は極めて高いことがわかった。

(3) 成人由来株の解析  
全 51 株中、ムコイド型血清型 3/ST180 が 17.6% と最も多く、次いでワクチン非含血清型 35B (ST2755/ST558)、15A (ST63/ST7874/ST13785) 等が分布していることが分かり、この 3 つの血清型で全体の 39% を占めていた。ワクチンカバー率は PCV13 が

27.5% で PPSV23 が 49% であった。薬剤耐性関連の解析においては、非ワクチン含有血清型 6E、15A、23A は全てペニシリンに対して非感受性で、全菌株の 84.3% が多剤耐性であった。さらに血清型 15A/ST13785 (ST242 の SLV) はキノロン系抗菌薬 (LVF と ciprofloxacin) に耐性を示し、この耐性に関与する *gyrA* (Ser81Phe) と *parC* (Asp83Try) 遺伝子に変異が認められた。図 3 は成人由来株における 3 種のペニシリン結合蛋白 PBP 遺伝子 (*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b*) の変異 (PBP genotype) と血清型 (2011 年と 2016 年の比較) PspA Family 型別 (2016 年) の関係を示している。2011 年と 2016 年を比較すると、血清型 15A と 35B が有意に増加しており、PEN 耐性に関与する 3 種の PBP 遺伝子に変異が認められる gPRSP 遺伝子型 (genotype PRSP) の分布がワクチン非含有血清型 6E、15A と 35B 株において確認された。全菌株が PspA 遺伝子 [Family 1 (51%)、Family 2 (49%)] を持ち、血清型 3 は Family 1 に、血清型 35B と 15A は Family 2 といったように各血清型はいずれかのタイプの Family に属していた。

図 3. PBP 遺伝子型と血清型の分布 (2011 年と 2016 年) と PspA Family 型 (2016 年)



#### (4) 成果のまとめ

小児由来株において、現行の肺炎球菌ワクチンに含まれない血清型が約90%を占め、優勢な血清型15A、35B、23Aの大半がペニシリン非感受性を示した。これら血清型の更なる拡大が懸念されることから、今後も血清型分布と薬剤耐性状況を含む継続したサーベイランスが不可欠である。PspAの分子疫学的解析では、PCV13非含有血清型37μコイド型に属するFamily 3/Clade 6が北海道で僅かながら分布していることが判明した。異なるFamily、Clade間では免疫交差反応性が認められていないことから、融合型PspA抗原のワクチンの開発が望まれている。これまでFamily 1と2に関する研究報告から、Family 1と2に分類されるClade 1-5を含有するPspA融合ワクチンの開発が今後必要であると考えられているが、ワクチンに含まれない血清型の増加に伴うFamily 3/Clade 6の拡がり懸念されることから、より広範な肺炎球菌感染症の防御を可能とするワクチンの開発も検討する余地があると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 6件)

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Habadera S, Ito M, Kudo K, Kobayashi N. Association between pneumococcal surface protein A (PspA) family and genetic/antimicrobial resistance traits of non-invasive pneumococcal isolates from adults in northern Japan. *Microbial Drug Resistance*, 2019, in press. DOI: 10.1089/mdr.2018.0267 査読有り

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Morimoto S, Ito M, Kudo K, Kobayashi N. Genetic diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) in pediatric isolates of non-conjugate vaccine serotypes in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, 2018, 67:1130-1138. DOI: 10.1099/jmm.0.000775 査読有り

川口谷充代. 平成29年度北海道公衆衛生協会賞表彰論文「北海道における非侵襲性感染症由来肺炎球菌の血清型と薬剤耐性に関する分子疫学的研究」北海道公衆衛生学雑誌、2017年第31巻第2号22-24頁.

Takamatsu A, Kawaguchiya M, Chang B, Ito M, Hirano Y, Katsuta S, Matsuzaka S, Serizawa Y, Kobayashi N. First report of serotype 23B *Streptococcus pneumoniae* isolated from an adult patient with invasive infection in Japan. *New Microbes New Infect*, 2017, 17:96-97. DOI: 10.1016/j.nmni.2017.02.008 査読有り

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Shinagawa M, Takahashi S, Kobayashi N. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and prevalence of pilus islets in pneumococci following the use of conjugate vaccines. *Journal of Medical Microbiology*, 2017, 66:643-650. DOI: 10.1099/jmm.0.000479 査読有り

Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N. Multidrug Resistance in Non-PCV13 Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in Northern Japan. *Microbial Drug Resistance*, 2017, 23:206-214. DOI: 10.1089/mdr.2016.0054 査読有り

##### [学会発表](計 12件)

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Masahiko Ito, Kenji Kudo, Nobumichi Kobayashi. Genetic diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) in non-invasive pneumococcal isolates. 第92回日本細菌学会総会, 2019, 札幌.

川口谷充代, 小林宣道. 小児非侵襲性感染症由来肺炎球菌の莢膜血清型と表層タンパク質A (PspA) 遺伝子の分布. 第67回日本感染症学会東日本地方会学術集会 第65回日本化学療法学会東日本支部総会 合同学会, 2018, 東京.

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Kobayashi N. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from adult patients in Hokkaido, northern main island of Japan. 17th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection cum 8th International Infection Control Conference 2018 (APCCMI-IICC 2018), Hong Kong.

川口谷充代, 小林宣道. Epidemiological studies on the distribution of serotype and pneumococcal surface protein isolated from pediatric outpatient. 第88回日本衛生学会学術総会, 2018, 東京.

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Morimoto S, Ito M, Kudo K, Kobayashi N. Replacement with antibiotic-resistant serotypes of non-invasive *Streptococcus pneumoniae* in Hokkaido, Japan. The 30th International Congress of Chemotherapy and Infection 2017 (ICC 2017), Taiwan.

川口谷充代, 小林宣道. 2016年に分離された小児非侵襲性肺炎球菌の莢膜血清型と薬剤耐性遺伝子の分布状況. 第76回日本公衆衛生学会総会, 2017, 鹿児島.

Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung MS, Kobayashi N. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and prevalence of pilus islets of *Streptococcus pneumoniae* in Hokkaido, Japan. International Union of Microbiological Societies Congresses 2017 (IUMS2017), Singapore.

川口谷充代, 漆原範子, 森本茂雄, 伊藤政彦, 工藤兼司, 鷲見紋子, 小林宣道. 北海道で分離された小児非侵襲性肺炎球菌の血清型分布の経時的変化. 第69回北海道公衆衛生学会, 2017, 札幌.

川口谷充代、漆原範子、小林宣道. Invasive and non-invasive pneumococcal serotypes and antimicrobial resistance following the introduction of conjugate vaccines. 第 87 回日本衛生学会 学術総会, 2017, 宮崎.

伊藤政彦、男澤千啓、勝田聡、平野陽子、松友淳、川口谷充代、小林宣道. 侵襲性肺炎球菌感染症の分子疫学的検討. 第 90 回 北海道医学検査学会, 2016, 室蘭.

Kawaguchiya M, Urushibara N, Shinagawa M, Kobayashi N. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from a university hospital in Japan. The 48th Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health Conference (APACPH) 2016, Tokyo, Japan.

川口谷充代、漆原範子、小林宣道. 13 価肺炎球菌ワクチン (PCV13) 非含有の血清型株における薬剤感受性とペニシリン耐性株の分子疫学的解析. 第 90 回日本感染症学会総会・学術講演会, 2016, 仙台.

〔図書〕(計 1 件)

小林宣道、川口谷充代、漆原範子、メイジ ソウアウン

グローバル感染症と薬剤耐性菌対策の動向～最近の MRSA、薬剤耐性肺炎球菌の特徴について～. 公益社団法人産業医学振興財団、産業医学ジャーナル、2017 年 5 月第 40 巻・第 3 号.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：小林 宣道

ローマ字氏名：KOBAYASHI Nobumichi

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：80186759

研究分担者氏名：漆原 範子

ローマ字氏名：URUSHIBARA Noriko

所属研究機関名：札幌医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：80396308

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 政彦

ローマ字氏名：ITO Masahiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。