

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08449

研究課題名(和文) 劇症型感染における起因菌および外毒素の新規迅速分析法の確立

研究課題名(英文) Identification of virulence genes of *Streptococcus pneumoniae* in fulminant cases.

研究代表者

上田 たかね (Kikuchi-Ueda, Takane)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：80459312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚・筋肉壊死の進行が速い急性感染性電撃紫斑病(Acute Infectious Purpura Fulminans; AIPF)は、致死率が高く救命できても患者のQOLは極めて低下する。起因菌の1つであり2例のAIPF患者より分離した肺炎球菌株2株と6例の敗血症患者の6株、肺炎患者の3株について全ゲノム解析を行なった。11株のゲノム解析の結果いずれの株も全長約2Mbであった。これらをDDBJへ登録した。莢膜型はPF株で6(6A/6B/6C/6D)と35Bであり、Core geneの全ゲノム系統樹で最も離れていた。PF株は他株に見られない配列部位がNan Aにあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の学術的意義は、起因菌が髄膜炎菌(主に米国)、肺炎球菌、溶血性連鎖球菌など複数種のため、短時間に播種生血管内凝固と抹消の紫斑を形成し、皮膚・筋肉の壊死が進み致死率が高い急性感染性電撃紫斑病(Acute Infectious Purpura Fulminans; AIPF)の病原因子の同定を試み、候補分子を明らかにしたことである。肺炎球菌と同定された2例のAIPF患者から分離したPF株に他の株に見られない配列部位を持つ遺伝子Nan Aを明らかにした。

社会的意義は、Nan Aという病原因子候補を同定したことは本因子を標的としたPCRや抗体による検出系が創成と早期診断の可能性の貢献した。

研究成果の概要(英文)：Acute Infectious Purpura Fulminans (AIPF), with its rapid progression of skin and muscle necrosis, has a high mortality rate, and even if the patient is saved, the QOL of the patient is extremely low due to excision of ischemic and necrotic areas. Although there are several known strains of AIPF, we performed whole genome analysis of two PF strains isolated from two patients with purpura pneumoniae, two Sepsis strains isolated from six patients with sepsis, and three strains from patients with pneumonia using Nanopore and Illumina MiSeq. The genome analysis of 11 strains was completed. All strains were approximately 2 Mb in length. Registration of these 11 strains to DDBJ was completed. The capsular types of PF strains were 6(6A/6B/6C/6D) and 35B, which were the most distant in the genome-wide phylogenetic tree of the core gene.

研究分野：感染症

キーワード：細菌感染 炎症 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

申請者らは本学附属病院 ER にて 2011 年 4 月と 2009 年 11 月下旬に敗血症、多臓器不全、disseminated intravascular coagulation (DIC) を疑われ、ICU での救命処置がなされたが急速な虚血性変化と紫斑、水疱形成、皮膚と筋肉の壊死の進行による死亡例を経験した。血液培養にて肺炎球菌が検出され急性感染性電撃性紫斑病 (Acute Infectious Purpura Fulminans : AIPF) と診断し、2 例の患者から分離された肺炎球菌株 (PF1 と PF2) は中央検査部にて保存されていた。感染性電撃紫斑病は病態としてあまりにも劇的で、救命できた場合でも虚血壊死部の切除により患者の QOL は著しく低下するが、原因が何であるかは不明である。起病菌は、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*, 主に米国)、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、溶血性連鎖球菌 (*S. pyogenes*) などがある。感染においてスーパー抗原の免疫系に与える影響の報告は多いが、複数種の菌により本疾患の明確な病原因子はまだ不明である。電撃紫斑病についての報告は多くが症例報告であり、原因菌の特定も記載のみに留まっている。また電撃紫斑病発症時には、複数の抗菌薬投与がなされるため、発症時の血液培養からの菌体検出はほぼ無いために患者からの原因菌の分離は極めて少ない。

2. 研究の目的

劇症型の急性感染性電撃紫斑病の原因菌である肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の本病態に関わる病原因子を全ゲノム解析により同定する。

病原因子を特定できれば、他の肺炎球菌株における病原因子の有無を検出するための迅速検査法や中和抗体を作製し、新規の検査法や治療法につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

電撃性紫斑病 (Purpura Fulminans) と診断された患者から分離された肺炎球菌株 PF1 と PF2 の 2 株、本学附属病院で敗血症 (Sepsis) と診断された患者からの臨床分離 (Sepsis) 6 株、軽症である肺炎 (Pneumoniae) の 3 株の計 11 株の臨床分離株を血液寒天培地及び Todd-Hewitt Broth で 37°C、8 時間培養後、集菌し Genomic-tip (Qiagen) を用いて Genomic DNA を抽出した。この Genomic DNA を Oxford Nanopore と Illumina MiSeq で行なった。各肺炎球菌の荚膜型の決定には荚膜型解析に用いられるプライマーで PCR を行い同定した。

4. 研究成果

全ゲノム解析を Nanopore と Illumina MiSeq で行なった。11 株のゲノム解析を完了した。Sepsis 株の一部にはファージによる挿入や欠失が見られたが、いずれの株も全長約 2 Mb であった (図 1)。

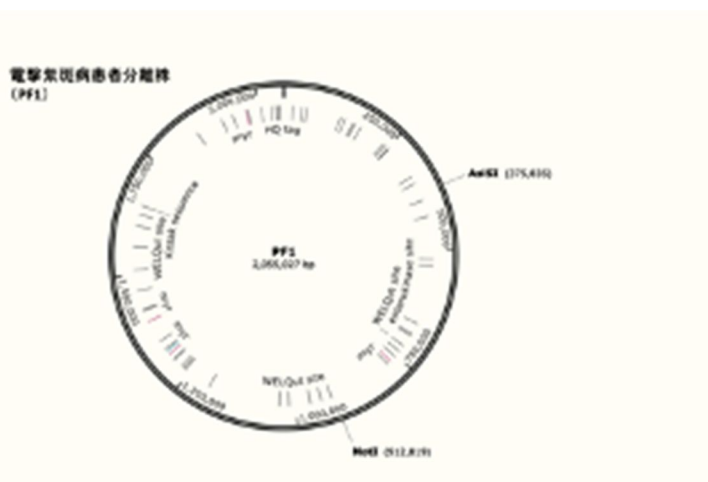


図 1

これら肺炎球菌 11 株について D D B J への登録を完了した (Accession

No: DRA016284) (投稿準備中)。莢膜型は PF 株で 6 (6A/6B/6C/6D) と 35B であった。他の分離株の莢膜型は以下の通りであった(表 1)、Core gene の全ゲノム系統樹でも、PF1 と P2 は最も離れていた(図 2)。

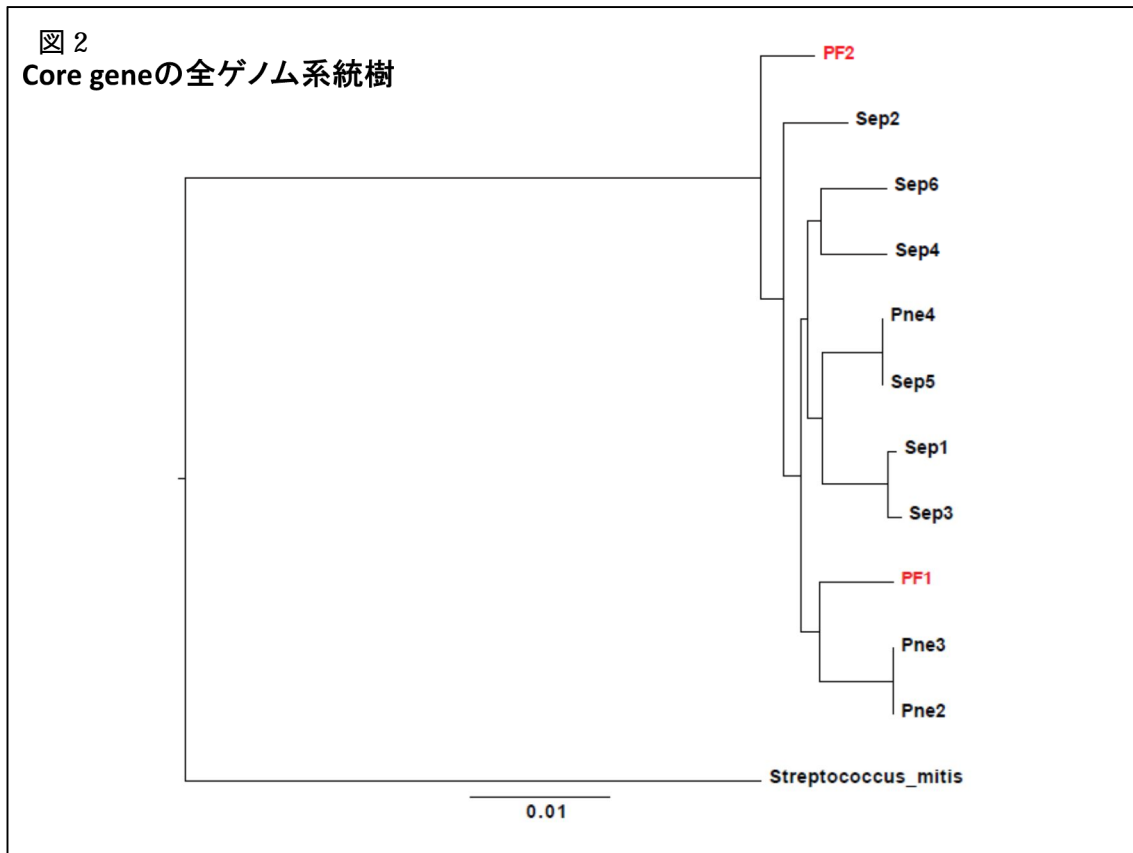


表 1 解析した肺炎球菌臨床分離株の莢膜型

Strain ID	Type of cps	Source
PF 1	6A/6B/6C/6D	Purpura Fulminans, blood
PF 2	35B	Purpura Fulminans, blood
Pne 2	23A	Pneumoniae, sputum
Pne 3	23A	Pneumoniae, sputum
Pne 4	22F/22A	Pneumoniae, sputum
Sepsis 1	7F/7A	Sepsis, blood
Sepsis 2	14	Sepsis, blood
Sepsis 3	7F/7A	Sepsis, blood
Sepsis 4	22F/22A	Sepsis, blood
Sepsis 5	22F/22A	Sepsis, blood
Sepsis 6	4	Sepsis, blood
GTC00261	1	NCTC

細菌の莢膜は白血球細胞の貪食を阻害するため、当初、莢膜型が病原性に関与するのではないかと想定していたが、PF 株同士であまりにも異なること、軽症の肺炎株と重傷に分類される Sepsis 株とにおいて同じ莢膜型(22F/22A)が示されたため、肺炎球菌の莢膜型が PF を発症する因子になる可能性は低いと考えられた。

PF 株が 2 株しかないため、統計学的解析が困難であったが、全ゲノム解析の結果、PF 株には *Nan A* に他の株には見られない配列部位が見られた。*Nan A* と同定された本因子の配列の差が炎症反応の重症性に関与が示唆された。*Nan A* とい

う病原因子候補を同定したことは、今後の本因子を標的とした PCR や抗体による検出系の創成と早期診断の可能性に繋がる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上田たかね、藤崎竜一、祖母井庸之、西田智、永川茂、佐藤義則、斧康雄
2. 発表標題 Draft genome sequences of Two strains of Streptococcus pneumoniae from AIPF patients
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上田たかね、藤崎竜一、祖母井庸之、西田智、永川茂、佐藤義則、斧康雄
2. 発表標題 Draft genome sequences of Two strains of Streptococcus pneumoniae from AIPF patients
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	斧 康雄 (Ono Yasuo) (10177272)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	
研究分担者	西田 智 (Nishida Satoshi) (10409386)	帝京大学・医学部・講師 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	藤崎 竜一 (Fujisaki Ryuichi) (00527442)	帝京大学・医療技術学部・准教授 (32643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関