

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08828

研究課題名(和文)肺炎球菌定着における type 1 pilus の関与の解明と予防・治療への応用

研究課題名(英文)Contribution of type 1 pilus to the colonization of Streptococcus pneumoniae

研究代表者

宮崎 治子 (Miyazaki, Haruko)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10527948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌血清型35Bにおけるtype 1 pilus (T1P)の定着における機能と薬剤耐性化への寄与の解析および予防・治療への応用を目的として研究を行った。臨床分離35BのうちT1P遺伝子を持つ Sequence type (ST)558の株を用いて、遺伝子相同組み換えによりT1P欠損株を作製し、ヒト肺胞上皮細胞への付着性や薬剤感受性を親株と比較した。(1)細胞付着性：株により程度差があるが、T1Pの宿主細胞付着への関与が示唆された。(2)薬剤感受性に与える影響：親株および欠損株で明らかな差異を認めず、T1Pは薬剤耐性機序への直接的な関与はないと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの検討によって、研究計画で問いとして挙げた1)非ワクチン血清型の中でも血清型35Bの検出が定期接種開始後に増加した原因としてT1Pにより定着しやすいことが関与するのか。2)T1Pは薬剤感受性に影響を与えるのか。に対して考察することができた。これらの情報は肺炎球菌感染症の今後のワクチン開発や治療への参考となると考える。

研究結果は学会で発表予定であり、また、論文を作成して雑誌に投稿中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the function of type 1 pilus (T1P) in the colonization of Streptococcus pneumoniae serotype 35B and its contribution to drug resistance. Among clinical isolates of serotype 35B, clonal complex (CC) 558 strains carrying the T1P gene were used to generate T1P-deficient strains by homologous recombination, and their adherence to human alveolar epithelial cells and drug sensitivity were compared with those of the parental strains.

(1) Adherence to cells: Although the degrees of cell adhesion were strain-dependent, the contribution of T1P to adhesion to host cell was suggested. (2) Effect on antimicrobial susceptibility: No obvious difference in antimicrobial susceptibility was observed between the parental and T1P-deficient strains, suggesting that T1P may not be involved in the drug resistance mechanism.

研究分野：微生物学、感染症学

キーワード：type 1 pilus 肺炎球菌 付着因子 ワクチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は致死的な感染症を引き起こす細菌であるが、100種の血清型を持つことから現行の肺炎球菌ワクチンではすべての血清型を予防できない。定期接種開始後、臨床材料から収集した肺炎球菌株で最も多く分離された非ワクチン血清型 35B は、*r1rA* islet にコードされる繊毛 type 1 pilus (T1P) のサブユニット *RrgC* 遺伝子を高率に保有していた。また、*rrgC* 陽性株はペニシリンの MIC が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の株で高頻度であった。繊毛は上皮付着因子とされているが、肺炎球菌の定着への関与や薬剤に対する影響はまだ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

- (1) 肺炎球菌血清型 35B の宿主への定着における T1P の役割を解明する。
- (2) 肺炎球菌の T1P 保有と薬剤非感受性に関連があるかどうかを検討する。
- (3) T1P を標的とした感染予防および治療の可能性を考察する。

### 3. 研究の方法

- (1) 検討株の選択及び T1P 欠損株の作製：収集保存した 786 株の臨床分離肺炎球菌の血清型を検査し、86 株の血清型 35B のヒト肺胞上皮細胞 A549 への付着性を評価した。付着性が高い 2 株を選択して遺伝子相同組み換えを用いて T1P 欠損株を作製した。
- (2) 肺炎球菌血清型 35B における T1P の付着機能の検討：T1P 欠損株とその親株を用いて、プレートで培養した A549 細胞に菌液を加え、30 分反応後に洗浄、細胞溶解し付着菌数を定量培養して測定した。添加菌数に対する付着菌数を付着率とした。
- (3) T1P と薬剤感受性との関連の検討：T1P 欠損株の各種薬剤に対する感受性を測定し、親株の測定結果と比較した。

### 4. 研究成果

- (1) 臨床分離 35B の遺伝子型 (ST) を multilocus sequence typing により調べたところ、T1P 遺伝子を持つのは clonal complex (CC) 558 の株であり、35B の 77.9% を占めていた。A549 細胞への付着性が高い ST558 の SP212 と SP709 を選択し、*km-pFW13* を用いて遺伝子相同組み換えにより T1P サブユニット *rrgA*、*rrgB*、*rrgC* を欠損させた変異株 SP212 *rrgABC* および SP709 *rrgABC* を得た。
- (2) *rrgABC* 欠損株の A549 付着率を測定すると、株により程度差があるが、欠損株では親株と比較して付着率が低値であった。(Figure)。従って T1P の宿主細胞付着への関与が示唆された。

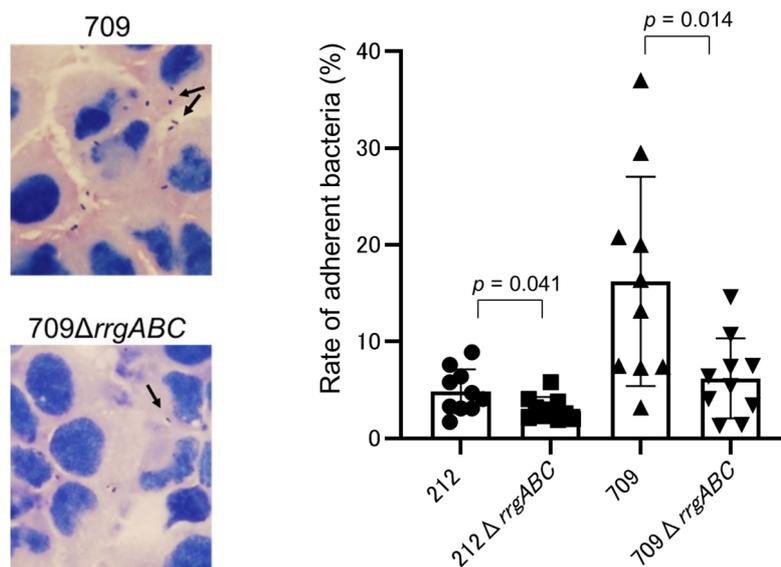


Figure. Type 1 pilus (T1P) 陽性肺炎球菌血清型 35B と T1P 欠損変異株の付着率の比較  
(左) グラム染色顕微鏡像. 矢印: 付着菌. (右) 菌数測定による付着率  
SP212, SP709: T1P 陽性 35B 肺炎球菌; SP212 *rrgABC*, SP709 *rrgABC*: T1P 欠損変異株

(3) SP212、SP212 *rrgABC*、SP709、SP709 *rrgABC* の各種薬剤に対する感受性を MICroFAST Panel Type7J (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて測定した結果、*rrgABC* 欠損株の最小発育阻止濃度 (MIC) は全ての薬剤に対し親株と同様あるいはやや高い感受性 (すべて 1 管) を示した (Table)。従って血清型 35B の T1P は各種薬剤感受性に直接には関与しないと考えられ

た。

Table. Type 1 pilus (T1P) 陽性肺炎球菌血清型 35B と T1P 欠損変異株の薬剤感受性

		212	212ΔrrgABC	709	709ΔrrgABC
ベンジルペニシリン	P C G	0.5	0.5	0.5	1
アンピシリン	ABPC	1	1	1	2
クラバン酸・アモキシシリン	ACV	0.5 / 0.25	0.5 / 0.25	1 / 0.5	1 / 0.5
スルバクタム・アンピシリン	S / A	0.5 / 1	1 / 2	0.5 / 1	1 / 2
セフジニル	C F D N	> 1	> 1	> 1	> 1
セファゾリン	C E Z	2	2	2	2
セフェピム	C F P M	0.5	0.5	1	2
セフォタキシム	C T X	0.25	0.5	1	1
セフトリアキソン	C T R X	0.25	0.25	1	1
イミペネム	I P M	0.12	0.12	0.12	0.12
メロペネム	M E P M	0.25	0.25	0.25	0.5
ミノサイクリン	M I N O	4	> 4	2	2
クリンダマイシン	C L D M	0.25	0.25	> 2	> 2
エリスロマイシン	E M	> 2	> 2	> 2	> 2
アジスロマイシン	A Z M	> 4	> 4	> 4	> 4
クラリスロマイシン	C A M	8	8	> 16	> 16
エリスロマイシン・クリンダマイシン	E M / C L D M	1 / 0.5	1 / 0.5	> 1 / 0.5	> 1 / 0.5
バンコマイシン	V C M	0.5	0.5	0.25	0.25
モキシフロキサシン	M F L X	0.5	0.5	0.5	0.5
レボフロキサシン	L V F X	1	1	1	1
スルファメトキサゾール・トリメトプリム	S T	38 / 2	38 / 2	19 / 1	38 / 2

(4) 以上より、非ワクチン血清型の中でも 35B が多く分離される原因として、T1P による定着性増加が関与している可能性が示唆された。現行の莢膜多糖体を抗原とするワクチンに併用するワクチンの標的抗原として T1P は候補となり得るかも知れない。一方、T1P を保有することは 35B の薬剤低感受性に直接影響しないものの、低感受性であることも定着に有利であると考えられ、35B の広がりに関与していると推測される。今後は肺炎球菌の薬剤耐性化、特に penicillin binding protein の変異と感受性について検討する。また、研究中に、T1P を保有するワクチン血清型と莢膜遺伝子の組換えを起こした血清型 35B/遺伝子型 156 の分離増加が認められた。今後も臨床分離株の分子学的解析を続けて分布を追跡する。

#### 引用文献

- Miyazaki H, Shibuya R, Midorikawa N, Chang B, Ohnishi M, Matsumoto T. Serotype distribution and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Japan after introduction of the routine immunization program. *J Infect Chemother* 23:234-240, 2017
- Miyazaki H, Shibuya R, Chang B, Inukai T, Miyazaki Y, Ubukata K, Nakamura S, Matsumoto T. Genetic characteristics of pilated *Streptococcus pneumoniae* serotype 35B, increased after introduction of pneumococcal vaccines in Japan. *J Infect Chemother* 26:1198-1204, 2020
- Tsuchiya M, Miyazaki H, Takata M, Shibuya R, Chang B, Ubukata K, Matsumoto T, Nakamura S. Comparative characteristics of the background and blood test findings in adults with pneumococcal pneumonia and invasive pneumococcal disease: A retrospective study. *J Infect Chemother* 28(3):420-425, 2022
- Takata M, Ubukata K, Miyazaki H, Iwata S, Nakamura S. Diversity of amino acid substitutions of penicillin-binding proteins in penicillin-non-susceptible and non-vaccine type *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Chemother* 28:1523-1530, 2022

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takata M, Ubukata K, Miyazaki H, Iwata S, Nakamura S.	4. 巻 28
2. 論文標題 Diversity of amino acid substitutions of penicillin-binding proteins in penicillin-non-susceptible and non-vaccine type Streptococcus pneumoniae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 1523-1530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2022.8.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyazaki H, Yamanaka G, Furukawa K, Ichiki M	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect of vaccine program on IgG antibody titers for measles, rubella, varicella, and mumps in young adults in Japan: Survey between 2018 and 2021	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 1410-1414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2022.6.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hatanaka S, Yamaguchi T, Miyazaki H, Matsumoto T, Nakamura S	4. 巻 80
2. 論文標題 Antimicrobial susceptibility profiles of genera Bifidobacterium, Enterococcus, and Lactobacillus probiotic strains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Tokyo Med Univ	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya M, Miyazaki H（責任著者）, Takata M, Shibuya R, Chang B, Ubukata K, Matsumoto T, Nakamura S. Tsuchiya M, Miyazaki H（責任著者）, Takata M, Shibuya R, Chang B, Ubukata K, Matsumoto T, Nakamura S.	4. 巻 28(3)
2. 論文標題 Comparative characteristics of the background and blood test findings in adults with pneumococcal pneumonia and invasive pneumococcal disease: A retrospective study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 420-425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2021.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki H, Shibuya R, Chang B, Inukai T, Miyazaki Y, Ubukata K, Nakamura S, Matsumoto, T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Genetic characteristics of piliated Streptococcus pneumoniae serotype 35B, increased after introduction of pneumococcal vaccines in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 1198-1204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.06.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Miyazaki H, Shibuya R, Nakamura S, Miyazaki Y, Chang B, Akeda Y.
2. 発表標題 Changes in serotype distribution and antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae isolated in Japan
3. 学会等名 33th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Copenhagen, Denmark (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮崎治子
2. 発表標題 教育シンポジウム「肺炎球菌感染症の現状と予防を考える」血清型からみた肺炎球菌感染症の最近の動向
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高田美佐子、宮崎治子、中村茂樹、生方公子
2. 発表標題 侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) 由来株における莢膜型別と遺伝子解析
3. 学会等名 第96回日本感染症学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高田美佐子、宮崎治子、生方公子、中村茂樹、岩田敏
2. 発表標題 非ワクチンタイプ (NVT) の肺炎球菌における -ラクタム薬耐性に関わる pbp1a, pbp2x, pbp2b遺伝子の多様性
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会・第69回日本化学療法学会総会合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maki Tsuchiya, Haruko Miyazaki, Misako Takata, Rie Shibuya, Bin Chang, Kimiko Ubukata, Tetsuya Matsumoto, Shigeki Nakamura.
2. 発表標題 Predictive Role of Blood Test Findings on Diagnosis of Invasive Pneumococcal Disease in Adults; A Retrospective Study
3. 学会等名 第188回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田美佐子、生方公子、宮崎治子、中村茂樹
2. 発表標題 非ワクチンタイプ (NVT) の肺炎球菌における -ラクタム薬耐性に関わる pbp1a, pbp2x, pbp2b遺伝子の多様性
3. 学会等名 第187回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋真希、宮崎治子、高田美佐子、渋谷理恵、常彬、中村造、生方公子、松本哲哉、中村茂樹
2. 発表標題 肺炎球菌性肺炎と侵襲性肺炎球菌感染症の臨床背景、血液所見および血清型の比較
3. 学会等名 第70回日本感染症学会東日本地方会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田美佐子、生方公子、宮崎治子、中村茂樹、岩田敏
2. 発表標題 非ワクチン型 (NVT) 肺炎球菌の薬剤耐性に関わる pbp遺伝子の多様性と細胞壁合成酵素 (PBP) のホモロジーモデリング
3. 学会等名 第70回日本感染症学会東日本地方会学術講演会・第68回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎治子
2. 発表標題 保菌を含めた臨床検体からの肺炎球菌の分離状況
3. 学会等名 第68回日本化学療法学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎治子、常彬、渋谷理恵、犬飼達也、柴田岳彦、高田美佐子、大楠清文、生方公子、松本哲哉、中村茂樹
2. 発表標題 Pilus遺伝子を保有する肺炎球菌血清型35Bの遺伝子型および薬剤感受性の特徴
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会・第67回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 犬飼達也、星野康隆、柴田岳彦、高田美佐子、生方公子、宮崎治子、大楠清文、宮崎義継、中村茂樹
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus B11b破壊株の増殖能に影響を及ぼす血清中の成分の同定
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会・第67回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田岳彦、宮崎治子、大楠清文、犬飼達也、阿戸学、中村茂樹
2. 発表標題 RSウイルス感染が誘導するGas6/Axlシグナルは二次性細菌感染を容易にする
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会・第67回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 犬飼達也、星野康隆、宮崎治子、宮崎義継、中村茂樹
2. 発表標題 Aspergillus fumigatus B11b破壊株の増殖能に影響を及ぼす血清中の成分の精製
3. 学会等名 第64回日本医真菌学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<ul style="list-style-type: none"> <li>・第69回日本感染症学会(2020.10.23, 東京)にてシンポジウム開催 「肺炎球菌ワクチン」座長</li> <li>・「肺炎のおはなし」パンフレット作成2020.10</li> <li>・ホームページ更新「肺炎のおはなし」2020.6 <a href="http://haien-yobo.com">http://haien-yobo.com</a></li> </ul>
--

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

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
---------	---------