

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460761

研究課題名(和文) Nanofluidic法を用いた肺炎症例の肺炎球菌血清型サーベイランスの構築

研究課題名(英文) Development of nano-fluidic technology based PCR for epidemiology of pneumococcus serotypes

研究代表者

古本 朗嗣 (FURUMOTO, Akitsugu)

長崎大学・熱帯医学研究所・客員研究員

研究者番号：50380952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺炎球菌は、髄膜炎や肺炎において最も重要な起炎菌の一つである。肺炎球菌は表面抗原によって約100種類に分類(血清型)される。現在国内では肺炎球菌ワクチンは2種類あるが、一部の血清型(約100種類のうち13種類と23種類)のみカバーするため、血清型の疫学は2種類のワクチンの効果を推定するためにも重要である。この研究ではnanofluidicテクノロジーを用いたPCRという技術によって、一度に50検体から50の血清型の遺伝子を検出できる方法を開発し、その有効性を試した。ベトナムの子供の咽頭に定着した肺炎球菌や日本における成人肺炎球菌性肺炎の起炎菌の血清型分布を検討し、非常に有用であった。

研究成果の概要(英文)：Pneumococcus is one of the most important pathogens of pneumonia and meningitis over the world. It has around 100 types of serotype and pneumococcal vaccines covers 10 to 23 serotypes. To know epidemiological distribution of serotypes in carriage among children and pneumonia plays crucial roles in control of diseases by vaccines. We established new method of multiplex real-time PCR for 50 serotypes using nano-fluidic technology. We tested samples of naso-pharyngeal swab taken from children in Vietnam and sputum of adult community-onset pneumonia, and revealed that our new method was very useful for epidemiological research of pneumococcal diseases. We found that some part of healthy children and patients with pneumonia had more than one serotype. This is a novel finding and we will develop our research to investigate the role of these multi-serotypes infection or carriage in pneumococcal diseases.

研究分野：感染症内科学

キーワード：肺炎球菌 血清型 マルチプレックスPCR

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は、小児の髄膜炎をはじめとする侵襲性感染症や成人を含めた肺炎の原因菌としてもっとも重要な細菌の一つである。肺炎球菌の血清型は 90 種類以上存在するが、現在本邦においては、2 種類のワクチンが存在し、それぞれ 13 と 23 の血清型をカバーしているに過ぎない。したがって、肺炎球菌感染症をワクチンによって制御しようとする、市中の感染症においてどのような血清型が原因となっているかを知る必要がある。

従来は主に、抗血清を用いて膨化反応を観察することで血清型を判定してきたが、この方法は非常に手間がかかりまた熟練を要す。疫学研究においては大量の検体を調べる必要があるため、これを精度の高い方法で効率化する必要がある。

また、分離株ではなく喀痰や咽頭ぬぐい液をそのまま PCR で解析して、肺炎球菌の存在とその血清型が判明することは画期的であり、ワクチン行政に参考となる情報をより早く、正確に出すことができる。

2. 研究の目的

我々が開発した nano-fluidic technology を用いて、一度に 50 の検体で 50 の肺炎球菌の血清型を multiplex PCR で検出する方法の疫学研究における有用性を試す。その予想されるメリットは以下の通りである。

- (1) 50 の検体を一度に解析できる
- (2) 50 種類のマルチプレックス PCR を一度に行うことができる
- (3) 咽頭ぬぐい液や喀痰から直接 DNA を検出できる

特に、(1),(2)は、数千という単位で症例を蓄積する研究において、迅速にデータを出すことができるという意味で有用であることが期待できる。

3. 研究の方法

構築した肺炎球菌血清型 nano-fluidic multiplex PCR を用いて、

- (1) ベトナムの小児の咽頭ぬぐい液の肺炎球菌血清型を検討した。

次に

- (2) 本邦における成人肺炎疫学研究において、喀痰 PCR から肺炎球菌血清型分布を明らかにする。この研究では、培養分離株や尿中抗原による血清型の結果とあわせ、この方法の有用性を確認する。

4. 研究成果

- (1) 確認のための研究 (ベトナム小児)

ベトナムで行われている小児肺炎コホート研究の咽頭ぬぐい液サンプル中 (52 検体) の咽頭定着菌を検討した。nano-fluidic multiplex PCR による結果は、培養検査の結果に対して十分整合性があることが明らかであった。この研究でも複数血清型が検出されたが、咽頭定着を観察する研究であり意義は十分わからなかった。また培養検査によるよりもより高い感度で肺炎球菌を検出し、より正確な血清型分布を明らかにすることに成功した。

(2) 日本の成人肺炎における研究

そこで、国内で 2011 年から 2015 年まで行われた成人肺炎の疫学研究 (Adult Pneumonia Study Group-Japan) の喀痰について、同法で解析を行った。この研究では 3740 例の肺炎患者を登録し、この患者から得られた喀痰 2616 検体を対象とした。まず、喀痰から DNA と RNA を集出し、肺炎球菌をニューモリジン遺伝子の PCR を行い、肺炎球菌陽性検体を抽

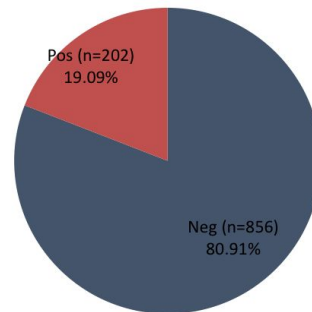
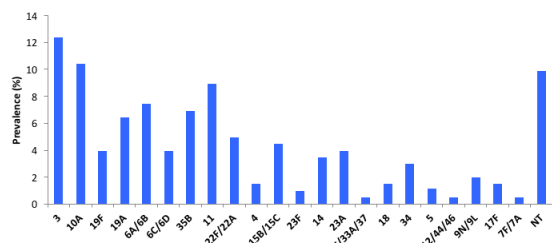


図 1 Screening and serotyping of second year's samples (n=1058)

出した。陽性となったサンプルを nano-fluidic multiplex PCR による、肺炎球菌の血清型解析に用いた。その結果、スクリーニング PCR では 19%程度で肺炎球菌陽性であった(図 1)。培養では約 10%の陽性とどまるので、臨床的な真の起炎菌の判定はここでは検討しなかったが、肺炎球菌性肺炎における PCR 法の疫学研究における有用性が示唆される。

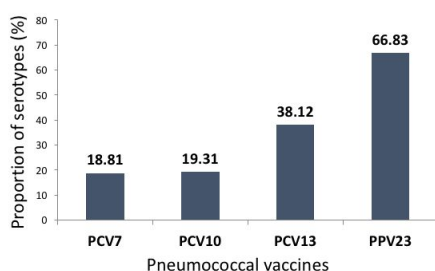
また肺炎球菌の nano-fluidic multiplex PCR を用いて出した血清型分布は図 2 のよう

図 2 Pneumococcal serotype distribution (n= 202)



であった。血清型3がもっとも多いのはこれまでの報告とも合致するものであった。当初の想定どおり、培養ベースよりも多くの陽性サンプル数が検討可能であった。本法によるデータでは、日本で成人に使用できる肺炎球菌ワクチンPPV23とPCV13の血清型カバー率はそれぞれ66.8%と38.1%であった(図3)。この血清型カバー率は90以上の血清型に対してそれぞれ23価と13価のワクチンであるため十分な検体数をもって算出することが肝要であり、本法が非常に有用であったと言える。

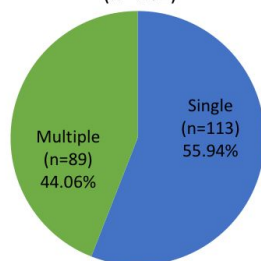
図3 Serotypes covered by pneumococcal vaccines



また、特筆すべきは、肺炎球菌PCR陽性の516検体のうち約40%において複数の血清型が検出された(図4)ことであり、培養によってのみ分離しては決して得られない知見である。複数血清型のコピー数は、1番目の血清型と2番目の血清型で有意差をもって1番目が多かったが、2番目以下は有意差が見られなかった。

今後は複数検出される肺炎球菌血清型が臨床的にどのような意義をもっているのか、臨床情報とあわせて検討しており、まとめて論文として報告する予定である。

図4 Prevalence of multiple serotypes in lytA positive samples (n=202)



また、この研究で有用性を確立したnano-fluidic multiplex PCR法を用いて、日本における肺炎の起炎菌に関する疫学研究やPPV23の肺炎に対するワクチン効果の研究に利用した(発表論文参照)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Suzuki M, Dhoubhadel BG, Morimoto K, Ishifuji T, Yasunami M, Yaegashi M, Asoh N, Ishida M, Hamaguchi S, Aoshima M, Ariyoshi K, and Adult Pneumonia Study Group -Japan (APSG-J). Serotype-specific effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumococcal pneumonia in adults aged 65 years or older: a multicentre, prospective, test-negative design study. *Lancet Infect Dis*. 17:313-321; 2017 査読あり

Morimoto K, Suzuki M, Ishifuji T, Yaegashi M, Asoh N, Hamashige N, Abe M, Aoshima M, Ariyoshi K; on behalf of the Adult Pneumonia Study Group – Japan (APSG-J), The burden and etiology of community-onset pneumonia in the aging Japanese population: A multicenter prospective study. *PLoS One* ;10(3): e0122247; 2015 査読あり

* 研究代表者は Adult Pneumonia Study Group - Japan のメンバーとして記載されている

〔学会発表〕(計2件)

森本浩之輔 「これからの肺炎球菌ワクチン：PCV13の立場から」 第55回日本呼吸器学会学術講演会 シンポジウム 『ワクチンによる肺炎球菌感染症制御～PPSV23 vs. PCV13』、東京国際フォーラム東京都千代田区、2015年4月18日

Morimoto K, Aoshima M, Ariyoshi K, Asoh N, Dhoubhadel BG, Hosokawa N, Ishida M, Ishifuji T, Kaneko N, Otsuka Y, Suzuki M, Sando E, Wakabayashi T, Yaegashi M, Prospective Hospital Based Multicenter Adult Pneumonia Surveillance In Japan, The Most Aged Population; A Mid-Term Progress Report Of APSG-Japan, American Thoracic Society International Conference, San Diego, USA, May 20, 2014,

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古本 朗嗣 (FURUMOTO, Akitsugu)
長崎大学・熱帯医学研究所・客員研究員
研究者番号 : 50380952

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

森本 浩之輔 (MORIMOTO, Konosuke)
長崎大学・熱帯医学研究所・准教授
研究者番号 : 50346970

ビム グッパル ドバデル (DHOUBHADEL, Bhim
Gopal)
長崎大学・グローバルヘルス研究科・助教
研究者番号 : 80761113

鈴木 基 (SUZUKI, Motoi)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号 : 60444874

(4)研究協力者

なし