

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870612

研究課題名(和文)肺炎球菌の変異獲得能をもたらす抗菌薬耐性化メカニズムの解析

研究課題名(英文)The association between antimicrobial resistance and the mutational ability of Streptococcus pneumoniae

研究代表者

輪島 丈明(Wajima, Takeaki)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00516669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肺炎球菌がもつ自然形質転換能および突然変異獲得能を定量し、肺炎球菌の特徴との関連を明らかにすることを目的とした。その結果、臨床分離株中に形質転換能が低い株が一定の割合で存在していることが明らかとなった。このうち、形質転換能が低い株は、ComDに特徴的なアミノ酸置換を有していることが明らかとなった。そこで、このアミノ酸置換を検出する実験系を構築し、臨床分離株のスクリーニングを行った。その結果、肺炎球菌ワクチンに含まれていない血清型の株は、含まれている型と比較し有意に形質転換能が低いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the association between bacterial features and the transformation and mutational ability of Streptococcus pneumoniae strains. Strains with low transformation ability were detected among clinical isolates. These strains had an amino acid substitution in ComD, which is the receptor for the competence stimulating peptide. We developed a detection technique for this particular amino acid substitution using PCR that was subsequently used to screen clinical isolates. Results obtained in this study indicated that non-vaccine serotypes had a significantly lower transformation ability compared with that of vaccine serotypes.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：肺炎球菌 莢膜型 ワクチン 形質転換

1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は小児において髄膜炎、肺炎、敗血症などを引き起こし、世界中で年間 70 から 100 万人が死亡している。そのような、経緯からわが国でも 2013 年 4 月より 7 価の肺炎球菌ワクチン (PCV7) が、また同年 11 月から 13 価のワクチン (PCV13) が定期接種化されている。しかし、申請者らは 2009 年にワクチンが承認されてから急速に非ワクチン型が増加していることを報告した。

肺炎球菌は自然形質転換能を持ち外来遺伝子を獲得しやすいことが知られている。つまり、菌体外の DNA を取り込み菌体内で組み換えを起こすことで適応進化のスピードが速くなっていると考えられている。また、この形質転換能は、口腔内レンサ球菌からのペニシリン結合タンパク遺伝子 (PBP) の取り込みによるペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の出現にも関与している。PRSP の拡散は世界的に問題となっており、さらに多剤耐性化した PRSP の出現と大規模な拡散が韓国などで報告されている。外来遺伝子獲得能と薬剤耐性との関連はペニシリンでは知られているが、その他の薬剤では知られていない。

一方、点変異で耐性化するような抗菌薬に関しては、遺伝子修復能の機能異常などからくる突然変異の起こりやすさなどが関連していると考えられる。そこで、本研究では申請者の所属している研究室が、2002 年より継続的に収集している肺炎球菌の臨床分離株を用い、薬剤耐性と形質転換能、変異修復能、変異獲得能との関連を明らかとすることを目的とし実験を行った。

2. 研究の目的

肺炎球菌は自然形質転換能が高く、現在も外来遺伝子を獲得し、進化をし続けていることが示唆されている。肺炎球菌の形質転換能や変異獲得能、変異修復能の強弱と薬剤耐性の関連を解明できれば、耐性化の潜在能力を持つ肺炎球菌のマーカーが見つかる可能性がある。

本研究の目的は、臨床分離株における上記の能力を定量し、薬剤耐性化との関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 臨床分離株の収集と分子解析

東京都内の単一の大学病院より臨床分離株を収集し、莢膜領域の塩基配列解析による莢膜型の決定および微量液体希釈法による薬剤感受性の測定を行った。

(2) 変異獲得頻度および形質転換能の比較

上述した臨床分離株を用い、リファンピシン、ストレプトマイシン、シプロフロキサシンを添加した培地上に 10^9 CFU の菌を接種し、一晚培養後の耐性株の出現頻度を測定した。形質転換頻度は、キノロン耐性株のゲノム

DNA 1 μ g を用い、コンピテンス刺激因子 (CSP) 存在下で、肺炎球菌と共存させることで、自然形質転換を起こした。その後、レボフロキサシン含有培地に塗抹することで耐性株の出現頻度を測定し定量した。得られた耐性株は、DNA シークエンスにより形質転換が起こったことを確認した。

(3) コンピテンス関連遺伝子群の塩基配列の比較

形質転換能が高い株と低い株を抽出し、コンピテンス関連遺伝子群 (*com* 遺伝子群) の塩基配列を解読し、マルチプルアライメントを作成しそれぞれ比較した。

(4) *comD* 変異検出系の構築

PCR 法を用いた *comD* に認められる変異の簡便な検出系を構築した。臨床分離株をランダムに抽出し、構築した PCR の結果と塩基配列の結果、形質転換能に整合性があることを確認した。

(5) *comD* 変異に関する臨床分離株の調査

収集した臨床分離株について、構築した PCR 法により *comD* 変異の調査を行った。また、変異保有株と非保有株の間の、莢膜型および薬剤感受性試験結果との比較を行った。

4. 研究成果

(1) 臨床分離株を用いた疫学解析

臨床分離株を収集し、2010 年から 2014 年までの間に分離された肺炎球菌 430 株の莢膜血清型および薬剤感受性の測定を行った。莢膜型は、ワクチンが導入された 2011 年以降ワクチンに含まれる血清型 (ワクチン型) が有意に減少しており、一方でワクチンに含まれない型 (非ワクチン型) は有意に増加していた。さらに、莢膜コード領域を持たない株 (無莢膜型株) も認められ、その割合は増加していた (図 1)。すなわち、肺炎球菌の莢膜型の割合は大きく変化していることが明らかとなった。

薬剤感受性測定の結果、年々 β -ラクタム系薬に感受性化している傾向が認められた。

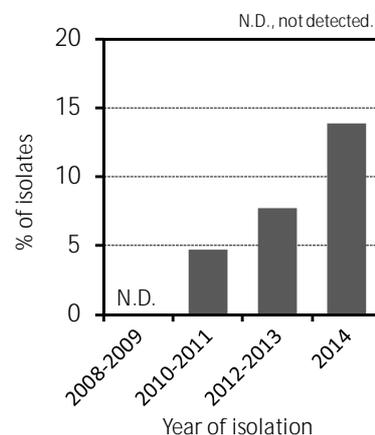


図 1. 無莢膜型株の割合

(2) 変異獲得および形質転換頻度の定量

臨床分離株の変異獲得能を定量したところ、すべての菌で有意な違いを見いだすことはできなかった。一方、キノロン耐性株のゲノム DNA を用いて形質転換能を定量したところ、耐性株の出現頻度には株間で大きな差が認められた(図2)。

形質転換能が高い株は、外来遺伝子を取り込み変化しやすいと考えられる。そのため、この能力が高い株は、低い株と比較し、適応進化しやすい株であると考えられた。

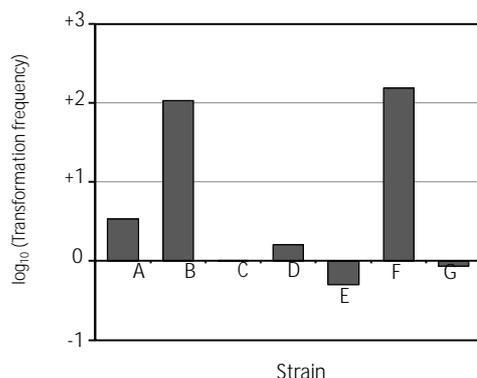


図2. 形質転換頻度

(3) コンピテンス関連遺伝子の塩基配列解析

図2で示した7株の *com* 遺伝子群の塩基配列を解析した。その結果、形質転換現象がほとんど認められない株はすべて、CSPの受容体である ComD にアミノ酸置換を保有していた。すなわちこのアミノ酸置換により CSP の認識能に差が出たことが考えられた。

そこで、このアミノ酸置換を特異的に検出する PCR 系を構築し、臨床分離株で検出を試みたところ、全分離株のうち 10% 程度、アミノ酸置換を保有した株が存在していることが明らかとなった。その株をランダムに選択し、実際に形質転換能を測定したところ、形質転換は起こらなかった。

(4) 形質転換能と莢膜型の関連

臨床分離株において、アミノ酸置換のスクリーニングを行った結果と薬剤感受性および莢膜型との関連を比較した。

当初、目的としていた形質転換能と薬剤感受性に有意な相関は認められなかった。一方で、形質転換能が低い株は、特定の莢膜型に多いことが明らかとなった。そこで、ワクチン導入前(2010年)における臨床分離株をワクチン型、非ワクチン型株に分類し、アミノ酸置換との関連を解析した(表1)。その結果、非ワクチン型株では、ワクチン型株と比較し有意に形質転換能が低い株が多いことが明らかとなった ($P < 0.001$)。

表1. 2010年の臨床分離株におけるアミノ酸置換保有株の割合

Amino acid Substitution	Vaccine type n (%)	Nonvaccine type n (%)	P value
Positive	3 (2.6)	13 (20.6)	< 0.001
Negative	112 (97.4)	50 (79.4)	

しかし、ワクチン導入後である 2014 年の株では、非ワクチン型も変異保有株の割合が低く、有意差は認められなかった。このことは、ワクチン導入とともに、形質転換能が低い株、すなわち適応進化しにくい株が、淘汰された可能性を示唆している。

また、近年ワクチン導入とともに、莢膜型のスイッチング現象が起こった可能性が報告されている。この現象に、肺炎球菌の形質転換能が関与している可能性が示唆された。

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4件)

1. Ubukata K., Chiba N., Hanada S., Morozumi M., Wajima T., Shouji M., Iwata S., the IPD surveillance study group. (2015) Rapid Changes of Serotype and Genetic Drug Resistance in Isolates from Japanese Adults with Invasive Pneumococcal Diseases after PCV7 Introduction in Children, 2010-2013. *Emerg. Infect. Dis.* 21 (11): 1956-1965. (査読あり)
doi: 10.3201/eid2111.142029.

2. Wajima T., Morozumi M., Hanada S., Sunaoshi K., Chiba N., Iwata S., Ubukata K. (2016) Molecular characterization of invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 22 (2): 247-254. (査読あり)
doi: 10.3201/eid2202.141732.

3. Hanada S., Iwata S., Kishi K., Morozumi M., Chiba N., Wajima T., Takata M., Ubukata K. (2016) Host factors and biomarkers associated with poor outcomes in adults with invasive pneumococcal disease. *PLoS One.* 11 (1): e0147877. (査読あり)
doi: 10.1371/journal.pone.0147877.

4. Wajima T., Seyama S., Nakamura Y., Kashima C., Nakaminami H., Ushio M., Fujii T., Noguchi N. (2016) Prevalence of macrolide-nonsusceptible isolates among β -lactamase non-producing *Haemophilus influenzae* (BLNAR) in a tertiary care hospital. *J Glob Antimicrob Resist.* in press. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. **Wajima T**, Nakaminami H., Nakase K., Noguchi N: Rapid Changes in Serotype and Antimicrobial Resistant Profile of Penicillin-nonsusceptible Pneumococci by Introduction of PCV7. ICAR2014 (Madrid, Spain)

2. 長谷部 太相, **輪島 文明**, 中南 秀将, 野口 雅久: 7価肺炎球菌結合型ワクチンの市販後における肺炎球菌の莢膜型の変化と薬剤感受性. 日本薬学会第135年会(神戸)

3. **輪島 文明**, 野口 雅久: 肺炎球菌ワクチン導入以降に分離された無莢膜型肺炎球菌の遺伝学的特徴. 第89回日本細菌学会総会(大阪)

4. 大里 隆二, **輪島 文明**, 野口 雅久: 肺炎球菌結合型ワクチン市販後における莢膜型の変化と新たに出現した無莢膜型株の特徴. 日本薬学会 第136年会(横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

輪島 文明 (WAJIMA, Takeaki)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 00516669