

日本化学療法学会 公益目的事業プロジェクト 侵襲性肺炎球菌感染症由来のムコイド型 ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) に 関する研究

研究代表者：岩田 敏

解析者：生方公子, 高田美佐子, 諸角美由紀

分担研究者：迎 寛, 石田 直, 宮入 烈

公益社団法人日本化学療法学会理事長：清田 浩

はじめに

急速な少子高齢化社会を迎えたわが国では、肺炎が死亡原因の第3位に浮上している。肺炎球菌は市中型肺炎 (community-acquired pneumonia : CAP) の原因として最も重要な菌であり、高い致命率で知られる。ヒトに対する本菌の高い病原性の一つは多糖体でできた菌体表面に存在する莢膜構造にあるが、現在97種の抗原性の異なる莢膜型が存在する。この莢膜を抗原として小児用には無毒化されたジフテリアトキソイドタンパクを結合させた7価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV7) が開発され、次いで13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) へと発展してきた。わが国では2010年末にワクチン接種緊急促進事業による公費助成がスタートしたが、導入2年目にはPCV7の接種率は全国平均95%前後ときわめて高い接種率となった。その後PCV13に切り替えられた後も高い接種率が維持されている。

他方、23種の精製した多糖体のみを含む肺炎球菌多糖体ワクチン (PPSV23) はわが国においては1988年に薬事承認されたが、広く認知され普及するにはいたらなかった。しかし、わが国の急速な人口動態の変化は基礎疾患保持者の相対的な増加を伴い、予防にもようやく目が向けられはじめ、その結果65歳以上の成人に対しPPSV23の変則的接種の公費助成が2014年に導入されている。

小児の侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal diseases : IPD) に対するPCV7、およびPCV13ワクチン効果は明白で、加えて成人のIPDにも明らかな間接効果をもたらしている¹⁾。また、これらの結合型ワクチンの普及に伴い、ヒトの鼻腔に保菌される肺炎球菌も大きく変化し、その結果IPDの起炎菌もワクチンに含まれる莢膜型株は激減、ワクチンに含まれない莢膜型株へとシフトしてきている^{1,2)}。

一方、厚い莢膜をもつためムコイド型を呈する莢膜3型株の抗原はPCV13とPPSV23の両方に含まれるが、その予防効果には違いがみられる。すなわち小児に対するPCV13接種以降、急性中耳炎 (AOM) のサーベイランスによると莢膜3型によるAOMは減少し明らかな予防効果がみられている³⁾。しかし、65歳以上ではPPSV23の接種率は50%前後となっているとされるが、莢膜3型の予防効果は乏しいと推定される¹⁾。成人IPD感染症の15~20%は莢膜3型菌に起因し、その死亡率は25%に達する⁴⁾。

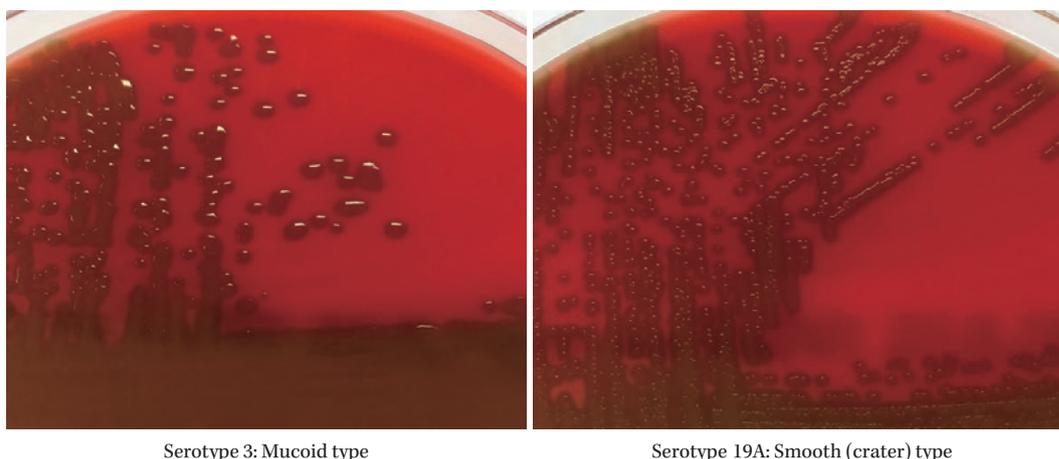


Fig. 1. Characteristics of mucoid-type colonies of *Streptococcus pneumoniae* on Sheep Blood Agar plate (T) (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.).

菌の薬剤耐性化からみると、3型菌はその特徴的な細胞壁構造から菌体内に他のレンサ球菌あるいは肺炎球菌のDNAを取り込みが多く、遺伝子組み換えを生じがたいため薬剤耐性化しにくいことが知られていた。しかし近年、このタイプにペニシリン耐性肺炎球菌（penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* : PRSP）が出現し、注目されている⁹⁾。ムコイド型を呈するPRSPの出現は、わが国においてもまた世界的にも将来きわめて憂慮すべき問題を含んでいる。

このような現状をふまえ、本研究ではIPD由来のムコイド型肺炎球菌を全国規模で収集し、薬剤耐性を含めて分子疫学的に詳細に解析することを第一の目的とした。また、PRSPがみいだされた際には、その出現のメカニズムを明らかにすることを第二の目的とした。これらの解析を通じて今後の肺炎球菌感染症の変化を予測し、臨床へ役立てたいと考えた。

研究方法

本研究は、公益社団法人日本化学療法学会の公益目的事業として、「侵襲性肺炎球菌感染症由来のムコイド型ペニシリン耐性肺炎球菌（PRSP）に関する研究」と題し、IPD由来の肺炎球菌の中でムコイド型を呈する菌株に限定して全国規模で収集した。研究期間は2017年6月9日から2018年3月31日とした。収集株については、i) 莢膜型別、ii) 耐性遺伝子解析、iii) 薬剤感受性、iv) multilocus sequence typing (MLST) 解析、v) PRSPの莢膜型遺伝子組み換え（capsular switching）の詳細を解析した。

1. 対象菌株

対象とした肺炎球菌は、平素無菌的な検査材料、すなわち血液、髄液、胸水、関節液、鼓膜切開液などを血液寒天培地で培養後、Fig. 1に示すムコイド型コロニーを形成した肺炎球菌に限定した。感染症としてはIPD、菌血症を伴う肺炎、focus不明の菌血症、AOM（鼓膜切開例に限る）が主たる疾患として含まれる。肺炎球菌はサーベイランス協力医療機関の細菌検査部門で分離された菌株であるが、送付を受けた菌株中、ムコイド型と同定された菌株は225株であった。

2. 莢膜型別と耐性遺伝子検索

送付された菌株はFig. 2に示すプロトコールに従って解析した。血液寒天培地 [Nippon Becton Dickinson Co., LTD., Sheep Blood Agar (T)] 上に塗布し、37℃、18時間の5%炭酸ガス培養を

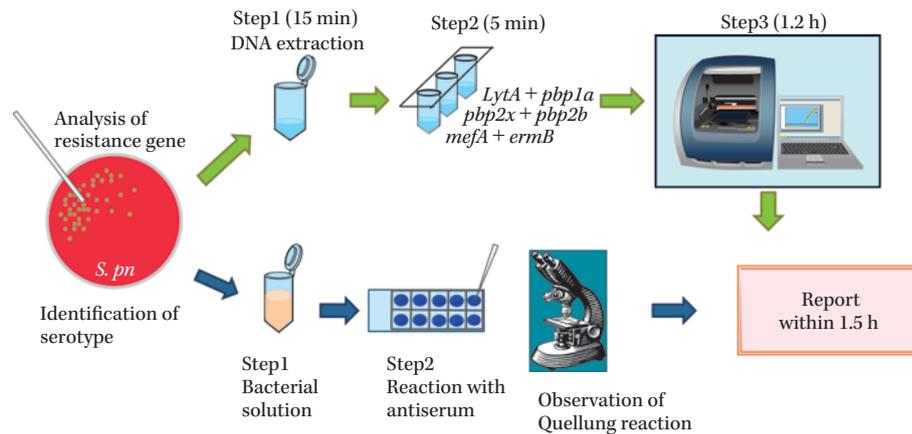


Fig. 2. Protocol for identifications of pneumococcal serotype and resistance genes. Mutations in each *pbp* gene are negative analysis (Ubukata K, et al: J Infect Chemother 1997; Chiba N, et al: Microb Drug Resist 2012).

行った。発育したコロニーは先ず real-time PCR 法による耐性遺伝子検索⁶⁾を行い、耐性遺伝子型 [resistance genotype (g)] を明らかにした。その結果と今までに蓄積された結果^{7,8)}から莢膜型別を効率的に実施した。結果は菌株送付を受けた各医療機関・検査部へ速やかに報告した。

3. 薬剤感受性測定

自己融解酵素を産生する肺炎球菌の薬剤感受性は、液体希釈法では正確に測定できない。このため、菌の前培養時間や感受性測定培地を厳密に規定した後、接種する生菌数が揃うように菌液調整後、寒天平板希釈法で測定した。測定時にはレファレンス株として R6 株と ATCC49619 株 (*pbp2b* 変異株) を用いた。

4. MLST 解析

MLST 解析には <https://pubmlst.org/spneumoniae/> に記載された primer を使用した。得られた塩基解析結果は、eBURST Version 3 (<http://eburst.mlst.net/>) により sequence type (ST) と cluster 解析を行った。

5. gPRSP 株の遺伝子解析

収集株中に認められた gPRSP 株はゲノム上の *pbp1a* 遺伝子と *pbp2x* 遺伝子に挟まれて存在する莢膜遺伝子群 (*cps* locus) をコードする領域の約 41 kb の塩基解析を行い、*S. pneumoniae* R6 株のゲノム情報⁹⁾を参考に遺伝子組み換えが生じた領域を特定した。

6. 倫理委員会の承認

本研究において、菌株の基礎解析を慶應義塾大学医学部感染症学教室において実施することについては、本学倫理委員会の承認を受けた (承認番号: 20160394)。

結果

1. 収集菌株の背景

研究対象期間中に全国各地の細菌検査室を有する医療機関 (n=73) からムコイド株として送付を受けた肺炎球菌のうち、慶應義塾大学医学部感染症学教室における再検査によってムコイド型の肺炎球菌と同定された株は総計 225 株であった。地域別の菌株数の内訳は Fig. 3 に示したとおりである。市立・市民病院クラスが最も多く、肺炎球菌感染症は一般的に community-onset の



Fig. 3. Mucooid-type *Streptococcus pneumoniae* isolates collected throughout our country (n = 225).

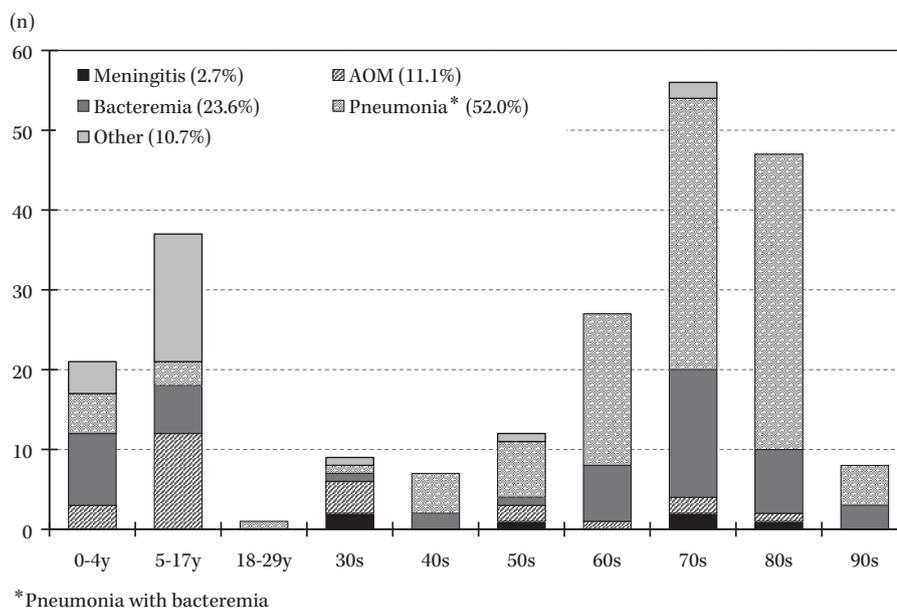


Fig. 4. Distributions of patient age and invasive pneumococcal diseases.

疾患であることが示された。

Fig. 4には、それらの肺炎球菌が分離された症例の年齢と主たる疾患の内訳を示す。0～17歳の小児例は26%、相対的に成人例が多かったが、とりわけ60歳以上が圧倒的多数を占めていた。疾患の内訳では、菌血症を伴う肺炎が52.0%、次いでfocus不明の菌血症が23.6%を占めていた。本菌による化膿性髄膜炎は2.7%と、先に報告したすべての莢膜型を含むIPD^{1,7)}に含まれる18%に比して明らかに少なかった。

一方、受診時の状況を見ると、成人の56%は時間外受診であり、病態が急速に進行して受診していることが注目された。男女比は6:4で男性が多かった。

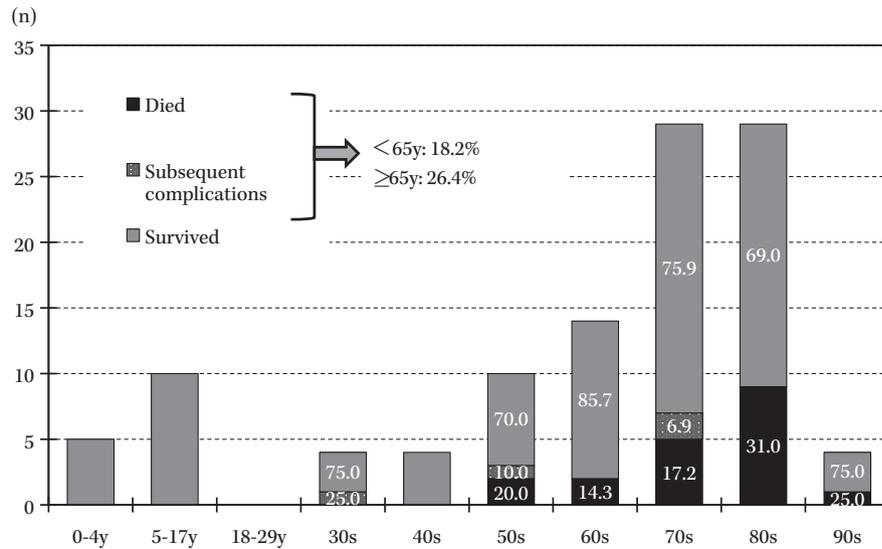


Fig. 5. Association with poor prognosis and patient age (n = 109).

Table 1. Associations with pneumococcal serotypes and penicillin- and macrolide-resistant genotypes

(A)

Genotype of penicillin resistance	Serotype		
	3	8	37
gPSSP	9	1	34
gPISP (<i>pbp2x</i>)	179		
gPISP (<i>pbp2b</i>)	1		
gPRSP (<i>1a + 2x + 2b</i>)	1		
Total	190 (84.4%)	1 (0.4%)	34 (15.1%)

(B)

Macrolide-resistant gene	Serotype		
	3	8	37
Negative	15	1	14
<i>ermB</i>	174		16
<i>mefA</i>	1		4

発症後1カ月以内における予後が明らかにできたのは半数の109例であった。その成績をFig. 5に示す。死亡例と明らかな後遺症を残した症例は70歳以降に急速に増加していた。成人における65歳未満とそれ以上の発症例における予後不良率について統計学的解析を行うと、前者では18.2%であるのに対し、後者での予後不良率は26.4%と有意に高率であった ($p < 0.001$)。

なお、成人発症例はさまざまな基礎疾患を有していた。回答が得られた101例中、基礎疾患なしと記載されていたのは20%にすぎず、糖尿病、慢性肺疾患、悪性疾患、心疾患が多かった。その他に肝疾患、腎疾患、膠原病、脳血管障害、アルコール依存症等もみられた。

Table 2. MIC range, MIC₅₀, and MIC₉₀ of 4 antimicrobial agents against *S. pneumoniae* isolates showing mucoid type by genotype

Antimicrobial agents	Resistant genotype (n)	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)		
		MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC range
Penicillin G	gPSSP (n = 44)	0.016	0.031	0.008-0.031
	gPISP (<i>pbp2x</i>) (n = 180)	0.063	0.063	0.016-0.125
	gPRSP (n = 1)	—	1	—
Ampicillin	gPSSP (n = 44)	0.031	0.031	0.008-0.031
	gPISP (<i>pbp2x</i>) (n = 180)	0.063	0.125	0.016-0.125
	gPRSP (n = 1)	—	2	—
Cefotaxime	gPSSP (n = 44)	0.016	0.063	0.008-0.125
	gPISP (<i>pbp2x</i>) (n = 180)	0.25	0.5	0.016-0.5
	gPRSP (n = 1)	—	2	—
Meropenem	gPSSP (n = 44)	0.016	0.031	0.008-0.063
	gPISP (<i>pbp2x</i>) (n = 180)	0.016	0.063	0.008-0.125
	gPRSP (n = 1)	—	0.5	—

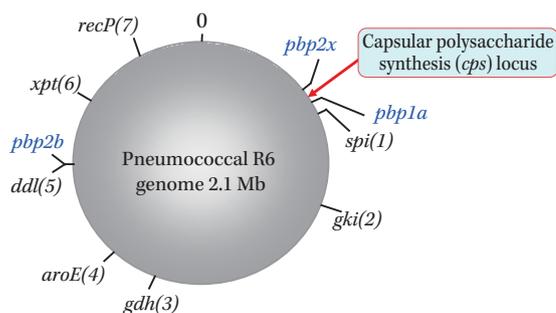


Fig. 6. Seven housekeeping genes on genome of pneumococcal R6 strain. Each gene indicate *spi*, *gki*, *gdh*, *aroE*, *ddl*, *xpt*, and *recP*. Accession No.: NC_003098, Source: Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6 (Hoskins, J, et al: J. Bacteriol 2001; 183: 5709-17).

2. 血清型と遺伝子学的薬剤耐性

Table 1 には収集された 225 株の莢膜型とペニシリン耐性遺伝子保持との関係 (A), およびマクロライド耐性遺伝子保持との関係 (B) を示す。

ムコイド株には従来莢膜 3 型以外はきわめてまれであったが, 3 型は 84.4% であり, その他に 37 型が 15.1%, 8 型が 0.4% 認められた。耐性遺伝子保持との関係では, 最も菌株数が多い 3 型の大多数は gPISP (*pbp2x*) 株であり, その他にわずかに gPSSP 株が認められた。最も注目されたのは, gPISP (*pbp2b*) 株と gPRSP (*pbp1a+2x+2b*) 株が各 1 株同定されたことである。莢膜 8 型と 37 型を示した株はすべて gPSSP 株であった。

他方, マクロライド耐性にかかわる遺伝子保持率はきわめて高く, 莢膜 3 型はその大多数が 14 員環マクロライド系薬の高度耐性化にかかわる *ermB* 遺伝子保持株であった。莢膜 37 型もその半数は *ermB* 遺伝子保持株であった。

3. 薬剤感受性

Table 2 には収集されたムコイド株の PCG, ABPC, CTX, MEPM の感受性について, 耐性遺

Table 3. Serotype, resistance genotype, and sequence type of *S. pneumoniae* isolates formed mucoid colony

Serotype	Sequence type (ST)			
	gPSSP	gPISP (<i>pbp2x</i>)	gPISP (<i>pbp2b</i>)	gPRSP
3	ST180 (n = 9)	ST180 (n = 177) ST5234 (n = 1) ST1119 (n = 1)	ST13574 (n = 1)	ST166 (n = 1)
8	ST11999 (n = 1)	—	—	—
37	ST447 (n = 34)	—	—	—

Alterations in 3 penicillin binding protein genes that mediate β -lactam resistance in *S. pneumoniae* (*pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b*), were identified by real-time PCR as described previously (Chiba N, et al: Microb Drug Resist 2012; 18: 149-56).

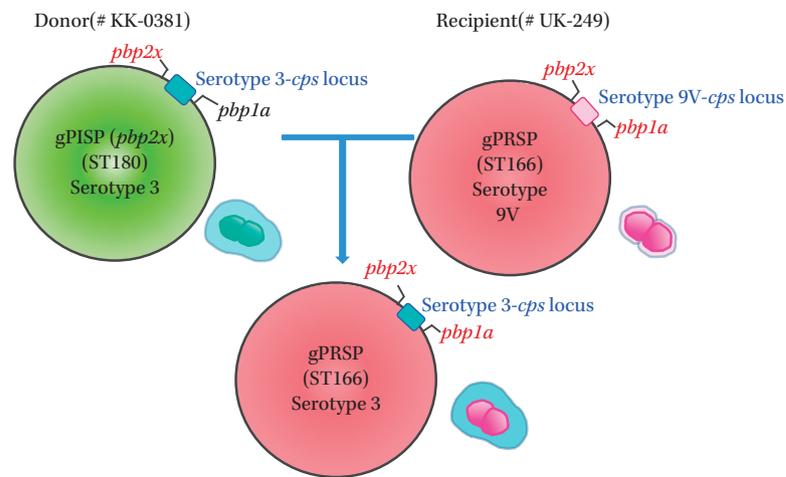


Fig. 7. Evolution of serotype 3 gPRSP (#UK-410) by genetic recombination.

伝子別に示す。

最も菌株数の多い gPISP (*pbp2x*) 株に対する各薬剤の MIC₉₀ は、PCG, ABPC, および MEPM で gPSSP 株に較べて 2~4 倍低下していたが、それに比してセフェム系薬の CTX では 8 倍の低下がみられた。

一方、1 株同定された gPRSP 株の薬剤感受性は、MEPM が 0.5 μ g/mL, PCG, ABPC, CTX は 1~2 μ g/mL と明らかに低下していた。

4. MLST 解析

近年、分離菌を諸外国と比較するには、MLST 解析が主流となっている。27 菌種の解析が可能であるが、その中でも肺炎球菌に関する情報量が飛び抜けて多い。

MLST 解析とは Fig. 6 に示すように、ゲノム上の保存性の高い、すなわち変異しにくい生存に必須の酵素等をコードする 7 種の遺伝子 (housekeeping gene) を塩基解析し、allele 番号を取得して比較する手法である。

7 遺伝子の番号の並びを ST と呼称するが、すでに登録されている ST かあるいは新規であるのかを調べ、新規 ST であれば新たな ST 番号を取得する。さらに、ST が近似のものは集団として扱われ、それらは clonal complex (CC) と呼称される。

現在、世界各地から登録された肺炎球菌の ST は 13,786 に達している。

肺炎球菌のゲノムには他の菌種にはみられない特徴がある。Fig. 6 に併せて示すように、莢膜を合成する *cps* locus が耐性にかかわる *pbp2x* と *pbp1a* 遺伝子に挟まれた位置にあることである。この遺伝子配列の特異性が耐性化と深くかかわっている。

MLST の解析結果は Table 3 に示す。莢膜 3 型の大多数は gPSSP 株あるいは gPISP (*pbp2x*) 株であっても ST180 と判定され、ゲノム全体は相同性の高いことが推測された。しかし、ST5234 や ST1119 のように ST180 から派生した新規の ST 株も認められた。特に注目されたのは、gPRSP 株は ST166 で、gPISP (*pbp2x*) 株の ST180 とは遺伝的背景が明らかに異なっていたことである。

莢膜 37 型はすべて ST447, 8 型は ST11999 で、莢膜 3 型とは異なる遺伝的背景を有していることが示された。

5. 莢膜型の遺伝子組み換え

収集されたムコイド株の中に莢膜 3 型の gPRSP 株が 1 株みいだされたが、当該株の MLST 解析によると CC166 の ST166 であった。この gPRSP 株は重症肺炎例の血液から分離されている。この株とゲノム上の遺伝学的背景が ST166 と近似した株として、慶應義塾大学医学部感染症学教室に保存された IPD 由来株の莢膜 9V 型の gPRSP 株がみいだされた。しかも両株ともマクロライド系薬に高度耐性を付加する *ermB* 遺伝子保持株であった。

上記 2 株と、莢膜 3 型で最も多くを占める ST180 (CC180) の gPISP (*pbp2x*) 株の 3 株について、*pbp2x* 遺伝子領域から *pbp1a* 遺伝子までの 41 kb の塩基解析を行い、3 株におけるそれらの比較を行った。

その詳細は別に報告する予定であるが、Fig. 7 に遺伝子組み換えの概略図を示す。9V 型の 23 kb と長い *cps* locus (*wzg*~*wcjE*) が、3 型の 10 kb とやや短い *cps* locus と遺伝子組み換えを生じたことが明らかにされた。

すなわち、*pbp2x* から *pbp1a* 遺伝子間は、*pbp2x* - *dexB* - *aliB* - *cps* locus - *aliA* - galactosaminidase - *pbp1a* - *recU* と各遺伝子が配列されているが、遺伝子組み換えは莢膜 9V 型 gPRSP 株の *aliB* 遺伝子と *pbp1a* 遺伝子の下流部分の 2 カ所において、莢膜 3 型 gPISP (*pbp2x*) 株の同様の遺伝子との間で遺伝子組み換えが生じ、莢膜 3 型の gPRSP (#UK-410) 株が形成されたと推定された。

まとめ

本研究事業のサーベイランスが対象とした IPD 由来のムコイド型肺炎球菌については、以下のように要約される。

- 1) IPD 由来ムコイド型肺炎球菌の莢膜型は 84% が莢膜 3 型であったが、その他に 37 型や 8 型が出現しつつある。
- 2) 小児への PCV7, PCV13 の定期接種化はそれらワクチンタイプによる IPD を激減させ、加えて成人例においてもワクチンタイプの IPD の割合は減少していた。
- 3) 厚い莢膜を有する莢膜 3 型株による成人の IPD は減少していない。
- 4) 莢膜 3 型株に gPRSP 株が新たに出現した。
- 5) 莢膜 3 型の gPRSP 株は、9V 型 gPRSP 株の莢膜遺伝子領域 (27.5 kb) と 3 型 gPISP (*pbp2x*) 株との間で遺伝子組み換えを生じていた。
- 6) 抗菌薬の選択圧とワクチンの普及とにより、今後さまざまな莢膜型に gPRSP 株が出現することが予測される。
- 7) ムコイド型菌が分離されるのは 65 歳以上の高齢者が多く、その死亡率も高い。臨床での適切

な抗菌薬使用と持続的サーベイランスが必要である。

利益相反自己申告：

岩田 敏は、大日本住友製薬(株)、ファイザー(株)、大正富山医薬品(株)、第一三共(株)、アステラス製薬(株)、MSD(株)より奨学寄付金を受けている。

迎 寛は、MSD(株)、アステラス製薬(株)、大鵬薬品工業(株)、中外製薬(株)、第一三共(株)、日本イーライリリー(株)、富士フィルムファーマ(株)、大日本住友製薬(株)、大正富山医薬品(株)、武田薬品工業(株)、富山化学工業(株)、Meiji Seika ファルマ(株)、ノバルティスファーマ(株)、日本ベーリンガーインゲルハイム(株)、ファイザー(株)より奨学寄付金を受けている。

石田 直は、MSD(株)より講演料を受けている。

清田 浩は、大正富山医薬品(株)、第一三共(株)、アステラス製薬(株)、富山化学工業(株)、サノフィ(株)より奨学寄付金を受けている。

生方公子、高田美佐子、諸角美由紀、ならびに宮入 烈は申告すべきものなし。

文献

- 1) Ubukata K, Takata M, Morozumi M, Chiba N, Wajima T, Hanada S, et al: Effects of pneumococcal conjugate vaccine on genotypic penicillin resistance and serotype changes, Japan, 2010-2017. *Emerg Infect Dis* 2018; 24: 2010-20
- 2) Suga S, Chang B, Asada K, Akeda H, Nishi J, Okada K, et al: Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in Japanese children: Effects of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine* 2015; 33: 6054-60
- 3) Ubukata K, Morozumi M, Sakuma M, Takata M, Mokuno E, Tajima T, et al: Etiology of acute otitis media and characterization of pneumococcal isolates after introduction of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in Japanese children. *Pediatr Infect Dis J* 2018; 37: 598-604
- 4) Hanada S, Iwata S, Kishi K, Morozumi M, Chiba N, Wajima T, et al: Host factors and biomarkers associated with poor outcomes in adults with invasive pneumococcal disease. *PLoS One* 2016; 11: e0147877
- 5) Chiba N, Murayama S Y, Morozumi M, Iwata S, Ubukata K: Genome evolution to penicillin resistance in serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* by capsular switching. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61: e00478-17
- 6) Chiba N, Morozumi M, Ubukata K: Application of the real-time PCR method for genotypic identification of β -lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. *Microb Drug Resist* 2012; 18: 149-56
- 7) Ubukata K, Chiba N, Hanada S, Morozumi M, Wajima T, Shouji M, et al: Serotype changes and drug resistance in invasive pneumococcal diseases in adults after vaccinations in children, Japan, 2010-2013. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 1956-65
- 8) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, Wajima T, Iwata S, Ubukata K, et al: Changes in capsule and drug resistance of pneumococci after introduction of PCV7, Japan, 2010-2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1132-9
- 9) Hoskins J, Alborn W E Jr., Arnold J, Blaszczyk L C, Burgett S, DeHoff B S, et al: Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 2001; 183: 5709-17