

莢膜膨化法とMultiplex PCR法による肺炎球菌血清型別法の比較検討

内谷 友美^a, 奥野 ルミ^a, 久保田 寛顕^a, 有吉 司^a, 横山 敬子^a, 貞升 健志^b

肺炎球菌は肺炎や中耳炎等の原因菌であり、感染症法における5類全数把握疾患に指定されている侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) の原因菌である。肺炎球菌の主な病原因子は莢膜であり、肺炎球菌感染症の予防として、複数の血清型の莢膜多糖体がワクチンとして導入されている。したがって、肺炎球菌感染症の疫学調査やワクチン効果を把握する上で、肺炎球菌の血清型別は極めて重要である。今回、東京都で収集した肺炎球菌433株を用いて、Multiplex PCRと莢膜膨化法の2種類の血清型別法を実施し、結果を比較した。その結果、莢膜膨化法では34種類に、Multiplex PCRでは30種類に型別された。Multiplex PCRで複数の血清型を含む血清群として型別された型は14種類で、全体の60%を占めた。Multiplex PCRで同一の血清群と判定された菌株に莢膜膨化法を実施したところ、さらに詳細な単一血清型として型別された。同一の血清群でも、ワクチン型と非ワクチン型の両方が含まれる場合があるため、肺炎球菌の血清型別には莢膜膨化法を用い、判定に苦慮する場合はMultiplex PCRを併用することが有効であると考えられた。

キーワード : 肺炎球菌, 血清型, 莢膜膨化法, Multiplex PCR

はじめに

肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) はグラム陽性の双球菌であり、肺炎や髄膜炎、中耳炎等の感染症の原因となる。特に本菌が、血液、髄液またはその他の無菌的部位から分離される症例は侵襲性肺炎球菌感染症 (IPD) と定義され、2013年4月1日より感染症法において5類全数把握疾患に指定されている。肺炎球菌の主な病原因子である莢膜ポリサッカライドは、血清型を決定する抗原であり、本菌には95種類以上の血清型が存在する¹⁾。一方、肺炎球菌感染症には、検出頻度の高い血清型に対する抗体産生誘導を目的に開発されたワクチンが導入されている。現在、日本で使用されているワクチンは主に2種類で、沈降13価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) および23価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン (PPSV23) である。13価ワクチンに先行し、沈降7価ワクチンであるPCV7は2010年に承認され、翌年から一部自治体で公費助成が開始された。ついで、PCV7に代わりPCV13が2013年から小児を対象に定期接種となっており、2014年には成人への適用も開始された。また、PPSV23は同年より65歳以上の高齢者を対象に、年齢を限定して定期接種が実施されている。一方、ワクチンの普及に伴い、ワクチン非含有血清型による感染症の増加が懸念されている^{2,3)}。

肺炎球菌の血清型を調査することは、流行の血清型を把握するだけでなく、ワクチンの効果を評価する上でも極めて重要である。血清型別方法としては莢膜膨化法が標準である一方、莢膜膨化法を実施するには高価な抗血清を多数準備する必要があるため、多くの自治体ではMultiplex PCRを利用した型別が実施されている^{4,5)}。東京都でも、積極的疫学調査および感染症流行予測調査等により、IPD

由来株を中心とした菌株の収集と血清型別試験を実施している。本研究では、東京都で収集した肺炎球菌菌株433株について、莢膜膨化法及びMultiplex PCRの両方法を実施し、結果を比較したので報告する。

実験方法

1. 検査材料

2013年10月より2018年3月までに都内の医療機関等48施設から搬入された肺炎球菌菌株433株を供試した。菌株の由来は血液由来384株、髄液由来29株、血液または髄液由来8株、喀痰由来、関節液由来2株、膿瘍由来2株および鼻腔由来2株である。

2. 方法

1) 莢膜膨化法

新鮮な肺炎球菌を1コロニー鈎菌し、5%馬血液加トリプトソイ寒天培地に塗布後、5%CO₂の存在下で36°C、4~6時間培養を行った。発育した菌を綿棒で鈎菌し、マックファーランド濁度1程度となるように生理食塩液に懸濁し菌浮遊液を調整した。スライドガラス上に、菌浮遊液、メチレンブルー液 (Löffler's methylene blue solution ; MERCK) および抗血清 (PNEUMOCOCCAL ANTISERA ; Statens Serum Institut) を1μLずつ載せ、混合後カバーガラスをかけ、油浸観察用オイルを1滴滴下した。微分干涉顕微鏡の対物レンズ100倍、接眼レンズ10倍で、菌体の周囲に莢膜が明瞭に観察された検体を、陽性とした (図1)。血清型の決定方法は、はじめに検体を14種類のプール血清と反応させ、陽性となったプール血清の組み合わせから、グループ血清または、タイプ血清を選択する。タイプ血清が

^a 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター微生物部

陽性となった場合は、当該血清型（数字のみの血清型）と決定する。グループ血清が陽性となった場合は、該当するグループに含まれるファクター血清を用いて、再び反応を実施し、ファクター血清の反応性のパターンより、血清型（数字及び英字で表される血清型）を決定する。方法の詳細は抗血清の添付文書および、Statens Serum Institut社発行の肺炎球菌テキスト（STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE Textbook in Diagnosis, Serotyping, Virulence Factors and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Pneumococcal Antibodies）⁶⁾ に準拠した。

2) Multiplex PCR

新鮮な肺炎球菌を1コロニー釣菌し、5%馬血液加トリプトソイ寒天培地に塗布した。5%CO₂の存在下で36°C、1晩培養後、発育した菌を1白金耳分かきとりDNA抽出に供した。DNA抽出はQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) のプロトコルに準拠した。PCR反応はMultiplex PCR Kit (QIAGEN) を用い、1反応につき、4または5種類の血清型特異的プライマーセットを含むPCR反応液を1検体につき8セット作成し、Multiplex PCRを実施した。プライマーおよびPCR条件は平成28年度感染症流行予測調査実施要領、別添資料³⁾ に準拠し実施した。PCR産物はアガロースゲル電気泳動で増幅産物の有無とサイズから血清型を判定した。

結 果

1. 莢膜膨化法による血清型別結果

供試菌株433株を莢膜膨化法により血清型別を実施した結果、429株が34種類の血清型に分類され、4株が型別不能であった（表1）。主な血清型は、多い順から12F（54株、12.5%）、24F（46株、10.6%）、3（37株、8.6%）であった。型別不能となった4株はすべてグループ24の血清に陽性反応を示したが、ファクター血清（24c, 24d, 24e）への反応性より、24F, 24A, 24B型のいずれとも判別できず、型別不能となった。

2. Multiplex PCRによる血清型別結果

供試菌株433株をMultiplex PCRにより型別を実施した結果、すべての株が30種類の血清型または血清群に分類された（表1）。主な型は、多い順から24F/A/B（63株、14.5%）、12F/A/44/46（54株、12.5%）、3（37株、8.6%）であった。単一の血清型として決定した型は16種類、計173株（全株の40%）で、うち、ファクター血清が存在しない型が9血清型（1, 3, 4, 8, 13, 14, 20, 31, 34）、計62株で、ファクター血清が決定できた型が7血清型（10A, 19A, 19F, 23A, 23B, 23F, 35B）、計111株であった。複数の血清型を含み、単一血清型として判定することができない血清群は14種類（6A/B, 6C/D, 7C/B/40, 7F/A, 9V/A, 11A/D, 12F/A/44/46, 15A/F, 15B/C, 18A/B/C/F, 22F/A, 24F/A/B, 33F/A/37, 38/25F/A）であり、計260株（全株の60%）存在した。

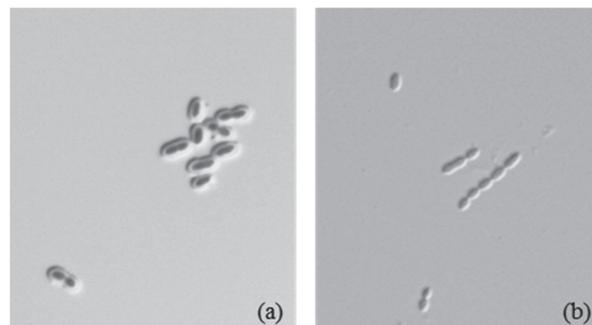


図1. 肺炎球菌の莢膜膨化試験における陽性像 (a) および陰性像(b)

表1. Multiplex PCR及び莢膜膨化法による肺炎球菌の血清型別結果

Multiplex PCR	株数	莢膜膨化法	株数
1	7	1 *	7
3	37	3 *	37
4	1	4 *	1
6A/B	12	6A *	4
		6B *	8
6C/D	9	6C	9
7C/B/40	6	7C	6
7F/A	22	7F *	22
8	1	8 **	1
9V/A	1	9V *	1
10A	26	10A **	26
11A/D	10	11A **	10
12F/A/44/46	54	12F **	54
13	1	13	1
14	3	14 *	3
15A/F	32	15A	32
15B/C	27	15B **	9
		15C	18
18A/B/C/F	2	18C *	2
19A	35	19A *	35
19F	2	19F *	2
20	8	20 **	8
22F/A	10	22F **	10
23A	17	23A	17
23B	4	23B	4
23F	1	23F *	1
24F/A/B	63	24A	1
		24B	12
		24F	46
		型別不能	4
31	1	31	1
33F/A/37	8	33F **	8
34	3	34	3
35B	26	35B	26
38/25F/A	4	38	4

* : PCV13含有血清型

** : PPSV23含有血清型

3. 莢膜膨化法と Multiplex PCR の比較

Multiplex PCR の型別結果と莢膜膨化法の型別結果には矛盾は認められなかった。Multiplex PCR と莢膜膨化法の型別結果が完全に一致した血清型は16種類、Multiplex PCR の各血清群に含まれる血清型と一致した型は14種類であった。莢膜膨化法で型別不能となった4株はMultiplex PCRではすべて24/F/A/B型となった。また、莢膜膨化法のプール血清に対する反応が弱い株が一部存在したが、Multiplex PCRの結果より予想されるファクター血清を選定し、型別を実施することで血清型を決定することができた。

また、両検査法の検査所要時間は、莢膜膨化法は1検体につき、約30分であり、Multiplex PCRはPCR反応時間である約2時間半を含め、約4時間を要した。また、Multiplex PCRは1検体につき8セットの反応系が必要なため、同時に実施できた検体数は最大で3検体であった。手技は莢膜膨化法は判定にある程度の熟練を要するのに対し、Multiplex PCRは通常のPCR等の実験操作が可能であれば、容易に実施可能であった。

考 察

肺炎球菌の血清型を把握することは、流行型の把握やワクチン接種の効果を評価する上で、非常に重要である。本研究では東京都で収集された菌株を用いて、莢膜膨化法およびMultiplex PCRの2種類の血清型別方法を比較検討した。その結果、莢膜膨化法は34種類の血清型に、Multiplex PCRでは30種類の血清型に分類された。この差は、Multiplex PCRでは一部の血清型が区別されず、複数の血清型を含む血清群として決定されることによるものである。両試験方法の結果には矛盾はなく、整合性はとれていた。

両方法の血清型分類能の差はワクチン型であるか否かの判別においては、重要となることが考えられた。Multiplex PCRで型別可能な40種類の血清型のうち、17種類が複数（2～4種類）の血清型を含む血清群である。また、PCV13およびPPSV23の両ワクチン含有血清型のうち、11種類の血清型が、血清群として判定される。今回供試した菌株で、Multiplex PCRによって血清群として判定された型は14種類で全433株中260株（60%）であり、そのうちワクチン型を含む血清群は9種類で計146株（34%）あった。例に挙げるとPPSV23ワクチンに含まれる血清型15Bは Multiplex PCR では15B/C型（15Bまたは15Cの血清群）として判定されたが、莢膜膨化法では、単一血清型として15Bまたは15Cの型別が可能であった。

以上のことから、莢膜膨化法は、Multiplex PCRより詳細な型別が可能であったが、一部の株でプール血清に対する反応が微弱であり、判定に苦慮する場合があった。これらの株はMultiplex PCRを組み合わせることで、最終的に型別が可能であった。また、Multiplex PCRは、本研究に供試した全株で莢膜膨化法の結果と矛盾は認められず、血

清型別方法として有用であることが確認された。一方、複数の血清型から構成される血清群として判定されるため、一部の株でワクチン型か否かの判別が不可能であった。

結論として、肺炎球菌の血清型別方法は、詳細な型別が可能な莢膜膨化法が望ましいが、判定に苦慮する場合は Multiplex PCRを併用することが有効であると考えられた。また、莢膜膨化法で型別不能となった4株はすべて血清型24のファクター不明であった。この原因として現時点では、抗血清のロット差や菌株の継代による影響等の要因も否定できないことから、今後の課題であると考えられた。

文 献

- 1) 常 彬, 森田昌知, 李 謙一, 他 : IASR, **39**, 118-119, 2018.
- 2) Weinberger D.M, Malley R., Lipsitch M.: *Lancet*, **378**, 1962-1973, 2011.
- 3) 河原隆二, 青柳哲史, 高橋弘毅, 他 : IASR, **35**, 179-181, 2014.
- 4) 永井佑樹, 常 彬, 石岡大成, 他 : 三重県保健環境研究所年報, **16**, 42-48, 2014.
- 5) 木村有紀, 猪又明日香, 青木順子, 他 : IASR, **39**, 111-112, 2018.
- 6) Skovsted C. I.: STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, <http://www.oxfordbiosystems.com/Portals/0/PDF/Microbiology/SSI%20Book%20Streptococcus%20pneumonia.pdf> (2018年9月25日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 7) 厚生労働省 : 平成28年度感染症流行予測調査実施要領, <https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/yosoku/AnnReport/2016-99.pdf> (2018年9月25日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

Evaluation of capsular swelling reaction and multiplex PCR for serotyping *Streptococcus pneumoniae* isolates in Tokyo

Yumi UCHITANI^a, Rumi OKUNO^a, Hiroaki KUBOTA^a, Tsukasa ARIYOSHI^a,
Keiko YOKOYAMA^a and Kenji SADAMASU^a

Streptococcus pneumoniae is a leading cause of pneumonia, otitis media, and an invasive pneumococcal disease (designated as a class V infectious disease by Japanese authorities). The capsule is the major virulence factor in *S. pneumoniae* and the target of serotype specific vaccines. Information about serotypes is crucial for controlling *S. pneumoniae* infections. In this study, we compared two serotype typing methods, namely, multiplex PCR and a capsular swelling reaction. We used 433 clinical isolates of *S. pneumoniae* collected from Tokyo (Japan). Subsequently, these isolates were classified into 30 capsular types by multiplex PCR and 34 capsular types by capsular swelling reaction. Sixty percent of the isolates were identified as mixed serogroups by multiplex PCR, and we further classified them into individual types using the capsular swelling reaction. These results indicate that the capsular swelling reaction can effectively identify capsular types, and that multiplex PCR can be used as a supplemental technique.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, serotype, capsular swelling reaction, Neufeld test, multiplex PCR

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan