

原 著

三重県における Multiplex PCR を用いた肺炎球菌の血清型別法

永井佑樹, 常 彬*, 石岡大成**, 赤地重宏, 小林隆司, 西中隆道

Evaluation of multiplex PCR approach for serotype determination of *Streptococcus pneumoniae* isolates from Mie Prefecture

Yuhki NAGAI, Bin CHANG, Taisei ISHIOKA, Shigehiro AKACHI, Takashi KOBAYASHI and Takamichi NISHINAKA

肺炎球菌は成人の市中肺炎の主要な原因菌であるが, まれに血液中に侵入し侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal diseases: IPD) を引き起こす. 本邦では 23 価肺炎球菌ワクチン (PPSV23) および 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (PCV13) が定期接種されているが, ワクチン接種普及による IPD の原因血清型の推移を把握することは極めて重要である. そこで今回, 三重県の成人 IPD 患者から分離された肺炎球菌を対象として, multiplex PCR による serotyping を実施し, ゴールドスタンダードである抗莢膜血清を用いた膨化法との比較を行った. その結果, すべての検体において, multiplex PCR で推定された血清型は膨化法の結果と一致していた. この multiplex PCR 法は標準的な実験室であれば比較的容易に実施が可能であることから, 血清型別のスクリーニング法として有用な方法であると思われた.

キーワード: Multiplex PCR, *Streptococcus pneumoniae*, 血清型別

はじめに

肺炎球菌は成人の市中肺炎の主要な原因菌であり, しばしば重症化する¹⁾. また本菌はまれに血液中に侵入し, 菌血症や膿胸, 化膿性関節炎, あるいは化膿性髄膜炎といった侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal diseases: IPD) を惹起する²⁾.

本邦では 23 種類の精製した莢膜多糖体を含む 23 価肺炎球菌ワクチン (pneumococcal polysaccharide vaccine: PPSV23), 7 価肺炎球菌結合型ワクチン (pneumococcal conjugate vaccine: PCV7) および 13 価肺炎球菌結合型ワクチン (pneumococcal conjugate vaccine: PCV13) が承認されており, 2013 年 11 月には小児用ワクチンとして PCV13 が定期接種化された. それにより小児 IPD の減少が期待されているが, それとともにワクチンに含まれないワクチン非含有血清型 (non-vaccine serotypes: nVT) の増加も懸念されている³⁾. そういったことから肺炎球菌のワクチン接種普及による IPD の原因血清型の推移を把握することは極めて重要である.

肺炎球菌の構成成分である莢膜ポリサッカ

ライド (Capsular Polysaccharide; CPS) は最も重要な病原性因子であり, その血清型を決定する抗原であるが, これまでに 90 以上の血清型が報告されている. 血清型決定には, 抗莢膜血清 (Statens Serum Institute 製) を用いた膨化法による型別がゴールドスタンダードであるが, 試薬が高価であり, 手技に熟練を要する. そのため近年, multiplex PCR を用いた肺炎球菌の血清型別法が報告されているが^{4,9)}, 国内においてはほとんど実施されていない. そこで今回, 三重県で成人 IPD 患者から分離された肺炎球菌を対象として, multiplex PCR による血清型の決定およびその有用性について検討したので報告する.

方 法

1. 被検材料

2014 年 1 月から 5 月にかけて厚生労働科学研究費補助金指定研究: 「成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究」に基づき¹⁰⁾, 三重県内の医療機関から収集された肺炎球菌 13 株を検体として使用した.

* 国立感染症研究所細菌第一部

** 国立感染症研究所感染症疫学センター

Table1 Multiplex PCR reactions 1–8 for serotype determination of *S. pneumoniae* isolates

Multiplex reaction 1	Volume (μ L)	PCR product size (bp)	Multiplex reaction 2	Volume (μ L)	PCR product size (bp)
2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5		2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5	
genome DNA	1.0		genome DNA	1.0	
cpsA-f (25μ M)	0.1	160	cpsA-f (25μ M)	0.1	160
cpsA-r (25μ M)	0.1		cpsA-r (25μ M)	0.1	
6(6A/6B/6C/6D)-f (25μ M)	0.3	250	8-f (25μ M)	0.2	201
6(6A/6B/6C/6D)-r (25μ M)	0.3		8-r (25μ M)	0.2	
3-f (25μ M)	0.3	371	33F/(33A/37)-f (25μ M)	0.3	338
3-r (25μ M)	0.3		33F/(33A/37)-r (25μ M)	0.3	
19-f (25μ M)	0.3	566	15A/15F-f (25μ M)	0.3	434
19-r (25μ M)	0.3		15A/15F-r (25μ M)	0.3	
22F/22A-f (25μ M)	0.5	643	7F/7A-f (25μ M)	0.4	599
22F/22A-r (25μ M)	0.5		7F/7A-r (25μ M)	0.4	
16-f (25μ M)	0.4	717	23A-f (25μ M)	0.5	722
16-r (25μ M)	0.4		23A-r (25μ M)	0.5	
DW	7.7		DW	7.9	
total	25		total	25	

Multiplex reaction 3	Volume (μ L)	PCR product size (bp)	Multiplex reaction 4	Volume (μ L)	PCR product size (bp)
2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5		2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5	
genome DNA	1.0		genome DNA	1.0	
cpsA-f (25μ M)	0.1	160	cpsA-f (25μ M)	0.1	160
cpsA-r (25μ M)	0.1		cpsA-r (25μ M)	0.1	
19F-f (25μ M)	0.5	304	24/(24A/24B/24F)-f (25μ M)	0.2	99
19F-r (25μ M)	0.5		24/(24A/24B/24F)-r (25μ M)	0.2	
12F/(12A/44/46)-f (25μ M)	0.5	376	7C/(7B/40)-f (25μ M)	0.3	260
12F/(12A/44/46)-r (25μ M)	0.5		7C/(7B/40)-r (25μ M)	0.3	
11A/11D-f (25μ M)	0.3	463	4-f (25μ M)	0.3	430
11A/11D-r (25μ M)	0.3		4-r (25μ M)	0.3	
38/25F/25A-f (25μ M)	0.3	574	18/(18A/18B/18C/18F)-f (25μ M)	0.3	573
38/25F/25A-r (25μ M)	0.3		18/(18A/18B/18C/18F)-r (25μ M)	0.3	
35B-f (25μ M)	0.5	677	9V/9A-f (25μ M)	0.5	816
35B-r (25μ M)	0.5		9V/9A-r (25μ M)	0.5	
DW	7.1		DW	8.1	
total	25		total	25	

Multiplex reaction 5	Volume (μ L)	PCR product size (bp)	Multiplex reaction 6	Volume (μ L)	PCR product size (bp)
2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5		2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5	
genome DNA	1.0		genome DNA	1.0	
cpsA-f (25μ M)	0.1	160	cpsA-f (25μ M)	0.1	160
cpsA-r (25μ M)	0.1		cpsA-r (25μ M)	0.1	
14-f (25μ M)	0.3	189	39-f (25μ M)	0.2	98
14-r (25μ M)	0.3		39-r (25μ M)	0.2	
1-f (25μ M)	0.3	280	10F/(10C/33C)-f (25μ M)	0.3	248
1-r (25μ M)	0.3		10F/(10C/33C)-r (25μ M)	0.3	
23F-f (25μ M)	0.5	384	5-f (25μ M)	0.3	362
23F-r (25μ M)	0.5		5-r (25μ M)	0.3	
15B/15C-f (25μ M)	0.3	496	35F/47F-f (25μ M)	0.3	517
15B/15C-r (25μ M)	0.3		35F/47F-r (25μ M)	0.3	
10A-f (25μ M)	0.5	628	17F-f (25μ M)	0.5	693
10A-r (25μ M)	0.5		17F-r (25μ M)	0.5	
DW	7.5		DW	8.1	
total	25		total	25	

Table1 (Continued)

Multiplex reaction 7	Volume (μ L)	PCR product size (bp)	Multiplex reaction 8	Volume (μ L)	PCR product size (bp)
2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5		2 × PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit)	12.5	
genome DNA	1.0		genome DNA	1.0	
cpsA-f (25μ M)	0.1	160	cpsA-f (25μ M)	0.1	160
cpsA-r (25μ M)	0.1		cpsA-r (25μ M)	0.1	
23B-f (25μ M)	0.2	199	21-f (25μ M)	0.2	192
23B-r (25μ M)	0.2		21-r (25μ M)	0.2	
35A/(35C/42)-f (25μ M)	0.3	280	2-f (25μ M)	0.3	290
35A/(35C/42)-r (25μ M)	0.3		2-r (25μ M)	0.3	
34-f (25μ M)	0.3	408	20-f (25μ M)	0.3	514
34-r (25μ M)	0.3		20-r (25μ M)	0.3	
9N/9L-f (25μ M)	0.5	516	13-f (25μ M)	0.4	655
9N/9L-r (25μ M)	0.5		13-r (25μ M)	0.4	
31-f (25μ M)	0.5	701	DW	8.9	
31-r (25μ M)	0.5		total	25	
DW	7.7				
total	25				

血清型決定は抗莢膜血清 (Statens Serum Institute 製) を用いた膨化法により, 国立感染症研究所細菌第一部で実施した¹¹⁾. スライドガラス上にて肺炎球菌, 抗血清, メチレンブルー溶液を混合し莢膜の膨化反応 (Quellung 反応) を光学顕微鏡 (×1,000 倍) で観察した. すなわち肺炎球菌の莢膜抗原と型特異抗体が結合することにより, 莢膜の膨化反応が観察された場合に当該血清型と判定した.

3. Multiplex PCRによる serotyping

1) 肺炎球菌のゲノム DNA 抽出

ヒツジ血液寒天培地にて一晚培養した肺炎球菌から, QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した.

2) PCR 反応

QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いて 8 つの Multiplex PCR 反応 (反応 1: 血清型 6A/B/C, 3, 19A, 22F/A, 16 F, 反応 2: 血清型 8, 33, 15A/F, 7F/A, 2 3A, 反応 3: 血清型 19F, 12F, 11A/D, 3 8/25F, 35B, 反応 4: 血清型 24, 7C, 4, 1 8, 9V, 反応 5: 血清型 14, 1, 23F, 15B, 10A, 反応 6: 血清型 39, 10F, 5, 35F, 1 7F, 反応 7: 血清型 23B, 35A, 34, 9, 31, 反応 8: 血清型 21, 2, 20, 13) を実施した. PCR の条件は 95°C で 15 分加熱した後, 95°C 30 秒, 54°C 90 秒, 72°C 60 秒のサイクルを 35 回繰り返し, 72°C で 10 分加熱した後 4°C とした. またすべての反応系には肺炎球菌の陽性コントロールとして *cpsA* (160bp) の primer を加えた.

各 PCR 反応の組成は Table1 に示し, 血清型特異 primer の配列は米国 CDC ホームページ (<http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html>) を参照した.

3) 電気泳動

3 μ L の PCR 産物に loading buffer を添加し, 0.5 × TBE buffer で作成した 2% Nusieve 3:1 Agarose gel (Takara) で 100V, 1 時間電気泳動を実施した. 泳動後, 0.5 μ g/mL の EtBr 溶液で 30 分染色した. その後ゲル撮影装置で DNA バンドの有無を確認し, 陽性になった増幅産物のサイズに応じて, 血清型を判定した.

結果

1. 膨化法による血清型別

膨化法による血清型別の結果, 血清型 35B, 22F, 3 がそれぞれ 2 株, 15C, 23F, 24F, 14, 6C, 15A および 10A が 1 株ずつ確認された. 今回分離された 13 株のうち 6 株 (血清型 35B, 15C, 24F, 6C, 15A) はワクチンに含まれていない nVT であった.

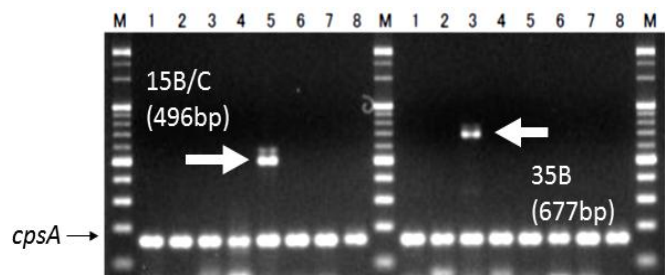


Fig.1 Multiplex PCR for serotyping of *S. pneumoniae*. M; 100bp DNA ladder Marker, 1-8; Multiplex PCR reactions, *cpsA*; inner positive control.

2. Multiplex PCR 法による血清型別

Multiplex PCR による serotyping の結果, すべての検体で PCR による増幅産物が得られ, そのサイズから血清型を推定することができた. Fig.1 に今回実施した Multiplex PCR の電気泳動所見の一例を示した. 左側の菌株では, 反応 5 において 496bp の位置にバンドが確認され, 血清型 15B/C と判定された. また右側の菌株では反応 3 において 677bp の位置にバンドが確認され血清型 35B と判定された. また血清型 14 と推定された菌株 No2013174 に関しては *cpsA* (160bp) と 14 (189bp) の増幅産物のサイズが近く PCR バンドが重なって観察された (Fig.2).

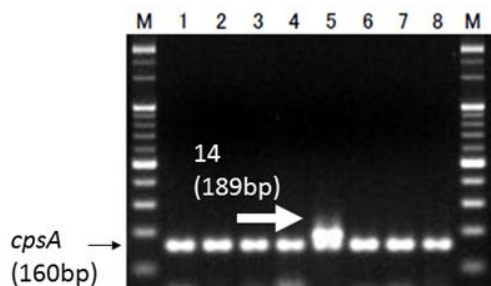


Fig.2 Multiplex PCR for serotyping of strain No2013174. M; 100bp DNA ladder Marker, 1-8; Multiplex PCR reactions, *cpsA*; inner positive control.

3. 膨化法と Multiplex PCR 法との比較

Multiplex PCR の結果, 判定された血清型は膨化法での結果と全て一致していた (Table2).

Table 2. Comparison of the result of actual serotype with the result of predicted serotype by Multiplex PCR

Strain No	Actual serotype	Predicted serogroup and serotype by Multiplex PCR
2013163	15C	15B/C
2013168	35B	35B
2013169	23F	23F
2013170	35B	35B
2013172	24F	24A/24B/24F
2013174	14	14
2013176	22F	22F/22A
2013178	3	3
2013180	22F	22F/22A
2014001	3	3
2014002	6C	6A/6B/6C/6D
2014003	15A	15A/15F
2014004	10A	10A

考 察

肺炎球菌は肺炎や急性中耳炎の主な原因菌であるが, そのほかに菌血症や化膿性髄膜炎といった IPD の原因となる. また本菌はインフルエ

ンザウイルス罹患後の続発感染の原因としても, 最も重要な細菌の一つである¹²⁾.

本邦では 23 種類の精製した莢膜多糖体を含む 23 価肺炎球菌ワクチン PPSV23, 7 価肺炎球菌結合型ワクチン PCV7 および 13 価肺炎球菌結合型ワクチン PCV13 が承認されている. これまでに PPSV23 は免疫不全のない高齢者において, ワクチン血清型による IPD を予防することや, PPSV23 接種による高齢者における肺炎球菌性肺炎の予防, ならびに肺炎に関する医療費の削減に効果があることが報告されている¹³⁻¹⁶⁾. これらのことから 2014 年 10 月から高齢者に対する PPSV23 の定期接種化が予定されている. 一方 PCV7 は 2009 年にわが国で承認され, 2011 年 2 月からは公費助成の対象となり, 2013 年 4 月には定期接種化された. さらに 2013 年 11 月には PCV7 に替わり 13 価の PCV13 が定期接種化されている. これにより小児 IPD の減少はさらに見込まれるが, すでに 15A, 15B, 22F など PCV13 にも含まれていない血清型による IPD も増加している¹⁷⁾. 従って肺炎球菌のワクチン接種普及による IPD の原因血清型の推移を把握することは極めて重要である. また 2013 年 4 月より侵襲性肺炎球菌感染症が, 感染症法上の 5 類全数把握疾患となったことから, 小児だけでなく成人も含めた IPD の血清型解析を実施し, 肺炎球菌の病原体サーベイランスを強化することは重要である.

肺炎球菌はこれまでに 90 以上の血清型が報告されているが, 血清型決定には, 抗莢膜血清 (Statens Serum Institute 製) を用いた膨化法による型別がゴールドスタンダードである. ただ膨化法は試薬が高価であり, 手技に熟練を要するため実施するラボが限定される. そのため近年, multiplex PCR を用いた肺炎球菌の血清型別法が報告されているが^{4,9)}, 国内においてはほとんど実施されていないものと推察される. そこで今回, 三重県の成人 IPD 患者から分離された肺炎球菌を対象として, multiplex PCR による serotyping を実施し, 膨化法による血清型との比較を行いその有用性について検討した. その結果, すべての検体で PCR による増幅産物が得られ, 推定された血清型は膨化法の結果と一致していた. また血清型 14 と推定された菌株 No2013174 に関しては *cpsA* (160bp) と 14 (189bp) の増幅産物のサイズが近く PCR バンドが重なって観察されたことから, 電気泳動の時間を長くするか, あるいは泳動する template の量を少なくする等, 条件設定を工夫する必要があると思われた.

本multiplex PCR法はあらかじめ反応ごとにprimerを混合し保管しておけば、どの施設でも比較的容易に実施が可能であり、コストパフォーマンスの面でも優れた方法である。また本法は新しく導入されたPCV13に含まれる血清型を全てカバーしていることから、PCV13導入による小児IPDの原因血清型の変化を把握するうえでも有用である。

ただ今回実施したmultiplex PCR法で同定できるのは40種の血清型であり、さらに血清型24, 22, 6ならびに15のsubtypeである24A/24B/24F, 22F/22A, 6A/6B/6C/6D, 15A/15Fをそれぞれ個別に識別することは出来ない。またmultiplex PCRでserotypingを実施しても、遺伝子だけでは実際に莢膜が形成されているかどうかは判断できない。以上のことから肺炎球菌の血清型別を実施する上で、multiplex PCRを膨化法の代替法とすることは難しい。しかしながら、multiplex PCRを用いたserotypingを実施することにより今まで以上に迅速な血清型の推定が可能となり、さらに膨化法の試薬および時間の節約にもつながる。また標準的な施設であれば、比較的容易に実施が可能であることから、本法は膨化法を実施する前のスクリーニング法として非常に有用な方法であると考えられた。また今回分離された13株のうちnVTが6株確認されたことから、今後も継続して血清型の流行を監視、把握していくことが重要であると考えられた。

本研究は厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究」の一部として実施した。

文 献

- 1) Dockrell DH, Whyte MK, Mitchell TJ (2012): Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*; **142**: 482-91.
- 2) Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, et al (2001): Epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae infections in the United States, 1995-1998: Opportunities for prevention in the conjugate vaccine era. *JAMA*; **285**: 1729-35.
- 3) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2008): Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction--eight states, 1998-2005. *MMWR*; **57**:144-8.
- 4) CDC PCR Deduction of Pneumococcal Serotypes. <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html> Accessed June, 2014.
- 5) Pai R, Gertz RE, Beall B (2006): Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of Streptococcus pneumoniae isolates. *J Clin Microbiol*; **44**:124-31.
- 6) Morais L, Carvalho Mda G, Roca A, et al (2007): Sequential multiplex PCR for identifying pneumococcal capsular serotypes from South-Saharan African clinical isolates. *J Med Microbiol*; **56**: 1181-4.
- 7) Njanpop Lafourcade BM, Sanou O, van der Linden M, et al (2009): Serotyping pneumococcal meningitis cases in the African meningitis belt by use of multiplex PCR with cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* ; **48**: 612-4.
- 8) Saha SK, Darmstadt GL, Baqui AH, et al (2008): Identification of serotype in culture negative pneumococcal meningitis using sequential multiplex PCR: implication for surveillance and vaccine design. *PLoS One* ; **3** :e3576.
- 9) Campos LC, Carvalho Mda G, Beall BW, et al (2009): Prevalence of Streptococcus pneumoniae serotype 6C among invasive and carriage isolates in metropolitan Salvador, Brazil, from 1996 to 2007. *Diagn Microbiol Infect Dis*; **65**: 112-5.
- 10) 大石和徳 (2014): 成人の重症肺炎サーベイランス構築に関する研究 平成25年度総括・分担研究報告書, 厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業20014, 3.
- 11) 常彬, 大西真, 朴貞玉 他 (2013): 莢膜膨化法と遺伝子増幅法による肺炎球菌の血清型決定. *IASR* ; **34**: 67-68.
- 12) O'Brien KL, Walters MI, Sellman J, et al (2000): Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: the role of preceding influenza infection. *Clin Infect Dis*; **30**:784-9.
- 13) Shapiro ED, Berg AT, Austrian R, et al (1991): The protective efficacy of polyvalent pneumococcal polysaccharide vaccine. *N Engl J Med*; **325**:1453-60.
- 14) Fisman DN, Abrutyn E, Spaude KA, et al (2006):

- Prior pneumococcal vaccination is associated with reduced death, complications, and length of stay among hospitalized adults with community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis*; **42**: 1093-101.
- 15) Maruyama T, Taguchi O, Niederman MS, et al (2010): Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents: double blind, randomised and placebo controlled trial. *BMJ*; **340**:c1004.
- 16) Kawakami K, Ohkusa Y, Kuroki R, et al (2010): Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia and cost analysis for the elderly who receive seasonal influenza vaccine in Japan. *Vaccine*; **28**: 7063-9.
- 17) Ben-Shimol S, Greenberg D, Givon-Lavi N, et al (2014): Early impact of sequential introduction of 7-valent and 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on IPD in Israeli children <5 years: An active prospective nationwide surveillance. *Vaccine*; **32**: 3452-9.

Evaluation of multiplex PCR approach for serotype determination of *Streptococcus pneumoniae* isolates from Mie Prefecture

Yuhki NAGAI, Bin CHANG, Taisei ISHIOKA, Shigehiro AKACHI, Takashi KOBAYASHI
and Takamichi NISHINAKA

Keywords: multiplex PCR, *Streptococcus pneumoniae*, serotype

Streptococcus pneumoniae is the most common cause of pneumonia. Furthermore, in the case of invading the blood stream, *S. pneumoniae* will cause invasive pneumococcal diseases (IPD) such as sepsis, bacteremia with pneumonia, and meningitis. In Japan, two types of pneumococcal vaccines have been approved, i.e., 23-valent capsular polysaccharide vaccine (PPSV23) and 7-valent conjugate vaccine (PCV7). More recently, 13-valent conjugate vaccine (PCV13) was approved by the government in June 2013, later replacing PCV7 as a routine vaccination in November 2013. Therefore, it is important to monitor pneumococcal serotype replacement after the introduction of pneumococcal vaccines. In this study, we determined the serotypes of 13 pneumococcal isolates in Mie prefecture using multiplex PCR and the data were compared with conventional serology method. As the result, 10 different serotypes were detected and the results of multiplex PCR serotyping were identical in the results of conventional method. In conclusion, this applied multiplex PCR method can be suitable and effective tool for the screening of *S. pneumoniae* serotypes.