

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

柏谷 淳より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 541 号

学位申請者 : かしわ 柏 や 谷 きよし 淳

学位審査論文 : Worldwide lineages of clinical pneumococci in a Japanese teaching hospital identified by DiversiLab system

(DiversiLab システムを用いた臨床分離肺炎球菌における世界的流行系統の推定)

著 者 : Kiyoshi Kashiwaya, Tomoo Saga, Yoshikazu Ishii, Ryuji Sakata, Morihiro Iwata, Sadako Yoshizawa, Bin Chang, Makoto Ohnishi, Kazuhiro Tateda

公 表 誌 : Journal of Infection and Chemotherapy

論文内容の要旨 :

【目的】肺炎球菌は、現在 90 種類以上の荚膜型が報告されているグラム陽性双球菌であり、抗菌薬治療が発達した現在でも、化膿性髄膜炎等の侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal diseases : IPD) の原因となり、時に致命的となる。その中でも世界的流行系統である Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) クローンは、世界的に拡散している病原微生物の代表格である。これら PMEN クローンとの比較は肺炎球菌の疫学解析上重要であるが、multilocus sequence typing (MLST) 法は手技の煩雑さと実施コストの高さを伴う。一方、DiversiLab システムは、repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR 法) を原理とする簡便かつ短時間で遺伝子解析を行なう手法として提案されている。しかし DiversiLab システムの PMEN クローン同定能の評価、およびそのための最適な自動分析パラメーターの報告はなかった。今回我々は、日本の教育病院で分離された肺炎球菌を用いて、世界的流行系統を同定するための DiversiLab システムの性能評価と、最適な自動分析パラメーターを検討した。

【材料・方法】東邦大学医療センター大森病院にて 2009 年に連続的に臨床分離された肺炎球菌 245 株を対象とし、薬剤感受性試験、DiversiLab システム、MLST 法による遺伝子解析、および糖化試験による肺炎球菌の荚膜型同定を実施した。MLST 結果から PMEN クローンを推定した。各解析手法の識別能と、各解析手法と最も相関する自動分析パラメーター (Pearson correlation: PC, Kullback-Leibler: KL, extended Jaccard: XJ) とカットオフ値 (similarity index cutoff, SIC) を決定するために、Simpson

係数、adjusted Rand 係数を算出した。

【結果】 莢膜型は 24 種類に分類され、頻度が高い順に 19F (n=51), 6B (n=49), 23F (n=29), 3 (n=17), 19A (n=15) であった。7 価蛋白結合型ワクチン (7-valent pneumococcal conjugate vaccine:PCV7) の接種が始まる前の全年齢層から得られた肺炎球菌 245 株での PCV7 カバー率は 59%、23 価莢膜多糖体ワクチン (23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine:PPV23) カバー率は 82% であった。また、ペニシリン非感性株の割合は、PCV7 で 83.4%、13 価肺炎球菌ワクチン (13-valent pneumococcal conjugate vaccine : PCV13) で 69.5%、PPSV23 で 63.5% であった。

DiversiLab システムでのバンドパターンを目視識別 (visual observation:V0) したところ、73 群に分類された。V0 で分類された 73 群から各 1 株ずつ MLST 解析を行なったところ、51 の sequence type (ST) が同定された。MLST 実施株のうち PMEN に関連する株は 63% (73 株中 46 株) であり、PMEN 関連株 46 株のうち、主要な 5 つの系統は、Taiwan^{19F}-14、Greece^{6B}-22、Colombia^{23F}-26、Taiwan^{23F}-15、および Netherlands³-31 であり、MLST 実施株の 70% (46 株中 32 株) を占めた。これら主要な 5 つの系統のうち、Taiwan^{19F}-14、Taiwan^{23F}-15、Netherlands³-31 は、PMEN クローンに報告されている莢膜型と同一であった。一方、残る 2 つの系統である Greece^{6B}-22、Colombia^{23F}-26 は、元々の PMEN クローンの莢膜型とは異なるものが多く、かつ多様性がみられた。

各自動分析パラメーターとカットオフを比較検討したところ、莢膜型分類と最も高い相関性を示したのは XJ の SIC75% であった (adjusted Rand 係数 0.528)。一方、V0 による分類と最も高い相関性を示したのは、KL の SIC95% であり (adjusted Rand 係数 0.514)、XJ の SIC85% (adjusted Rand 係数 0.468)、PC の SIC97% (adjusted Rand 係数 0.462) がそれに続いた。しかしこれら 3 つの自動分析パラメーターのうち、主要な 5 つの系統に分類された 32 株を、V0 と同様に各系統に区別できたのは、XJ の SIC85% のみであった。

【考察】 本検討では DiversiLab システムを活用することで、PCV7 導入前の国内の連続的な臨床分離菌株には PMEN 関連クローンが存在したことを明らかにすることができた。世界的伝播が推定される主要な PMEN 関連 5 系統のうち、3 系統は PMEN クローンと莢膜型が一致していたのに対し、Greece^{6B}-22、Colombia^{23F}-26 に関連する菌株の莢膜型に多様性がみられた理由は今回特定できなかった。自動解析パラメーターのうち、莢膜型分類に最も高い相関を示した XJ の SIC75% では主要な PMEN 関連 5 系統の識別には分別能が不十分であった。XJ の SIC を 85% に上げることで分別能が V0 に近付き、主要な PMEN 関連 5 系統の識別が可能となったことは、今後 DiversiLab システムで自動解析する際の参考になる有益な情報と考えられる。

【まとめ】 本結果は、肺炎球菌の分子疫学的な分類を行なうための DiversiLab システムの潜在的な有用性を証明した。今回見出された最適自動分析パラメーターを用いて DiversiLab システムでリファレンス株情報と比較を行うことで付加的な分子疫学的情報が得られることが期待される。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 541 号	氏 名	柏 谷 淳
学位審査担当者	主 査	本 間 栄
	副 査	西 脇 祐 司
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	松 瀬 厚 人
	副 査	草 地 信 也
<p>学位審査論文の審査結果の要旨 :</p> <p>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) クロームは、世界的に拡散している肺炎球菌の代表株である。一方、repetitive extragenic palindromic sequence-based polymerase chain reaction (rep-PCR 法) を原理とする DiversiLab システムは、従来より少ない労力かつ短時間で遺伝子解析を行なう手法として提案されている。しかし PMEN のように分子疫学的な分類を行なうために、DiversiLab システムの有用性と、自動分析パラメーターを評価した報告はない。今回 DiversiLab システムの性能評価と、最適な自動分析パラメーターを検討する目的で、東邦大学医療センター大森病院で 2009 年に臨床分離された肺炎球菌 245 株を対象とし、DiversiLab システム、multilocus sequence typing (MLST) 法による遺伝子解析、および膨化試験による肺炎球菌の莢膜型同定を実施した。その結果、莢膜型は 24 種類に分類され、19F, 6B, 23F, 3, 19A が多くみられた。7 価蛋白結合型ワクチン (7-valent pneumococcal conjugate vaccine: PCV7) の接種が始まる前の全年齢層から得られた肺炎球菌 245 株での PCV7 カバー率は 59%、23 価莢膜多糖体ワクチン (23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine: PPV23) カバー率は 82% であった。DiversiLab でのバンドパターンは、目視識別 (visual observation: VO) では 73 群に分類した。VO にて分類した 73 群から各 1 株ずつ MLST 解析を行なったところ、51 の sequence type (ST) に分類された。このうち、PMEN に関連する系統は、63% (73 株中 46 株) であった。自動分析パラメーターの検討では、莢膜型の分類と最も高い相関性を示したのは、extended Jaccard (XJ) で similarity index cutoff (SIC) 75% であった (Rand 係数 0.528)。以上、本検討により肺炎球菌の分子疫学的な分類を行なうための DiversiLab システムの潜在的な有用性を証明できた。DiversiLab システムにて、今回検証された最適な自動分析パラメーターを用いることは、分子疫学的な解析時に有用と思われる。</p> <p>平成 28 年 5 月 24 日の学位審査会では審査担当者全員から多くの質疑があり、主な内容を記す。「情報量が多く、目的と結果が明確に伝わってこない」等の指摘に対し、ノイエンスとして、上記結果に示した「DL システムに搭載されている自動解析パラメーターを評価した」事にあるとの説明がなされた。また、「世界的な流行株である PMEN クロームと同じであることが調べられる MLST 解析に、DL システムは取って代わる事はできるのか」に対しては、「DL システムで全 PMEN クローム株を、今回の解析パラメーターを用いて解析を行ない、各 PMEN クロームを識別することができれば、被験菌が PMEN クロームと同一のグループに識別される事で PMEN クロームと同じである可能性はある。しかし、現時点の解析では MLST にとって代わる可能性を評価するほどのデータを得てはいない」との回答で、結論としては、可能性の域を脱しない。申請者はその他のすべての質問に対し明確かつ的確に回答した。</p> <p>この後、審査員による討議が行われ、本研究は肺炎球菌の疫学的な分類を行なうための DiversiLab システムの潜在的な有用性に関して、その根拠となる知見を分子疫学的に示した極めて価値ある研究であり、審査員全員が学位に値すると判定した。</p>		