

ファイザーKK・社内勉強会

肺炎球菌ワクチンと マクロライド耐性マイコプラズマ

肺炎球菌はどのように進化していくのか？

アジスロマイシンはマイコプラズマ耐性に関与しているのか？

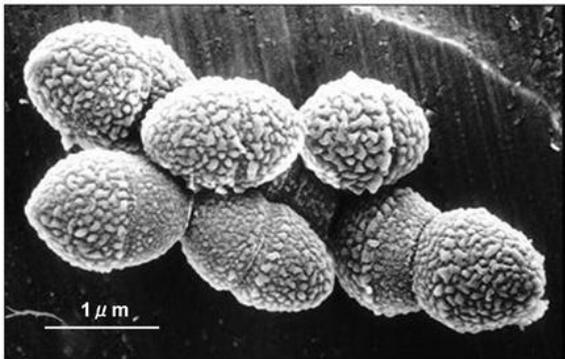


東栄病院 小児科 菊田英明

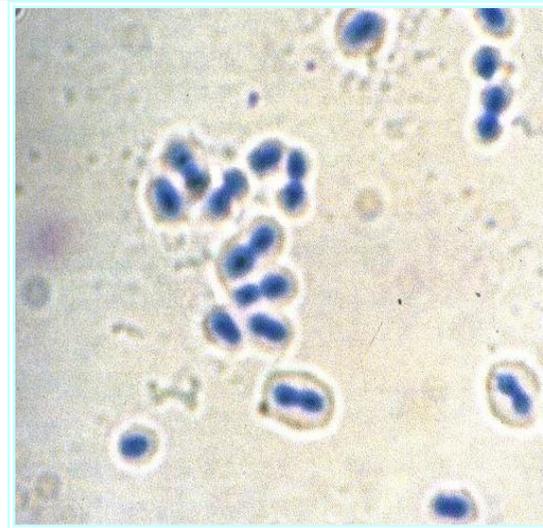
平成28年9月8日

肺炎球菌: *Streptococcus pneumoniae*

図-3. 肺炎球菌の電子顕微鏡写真

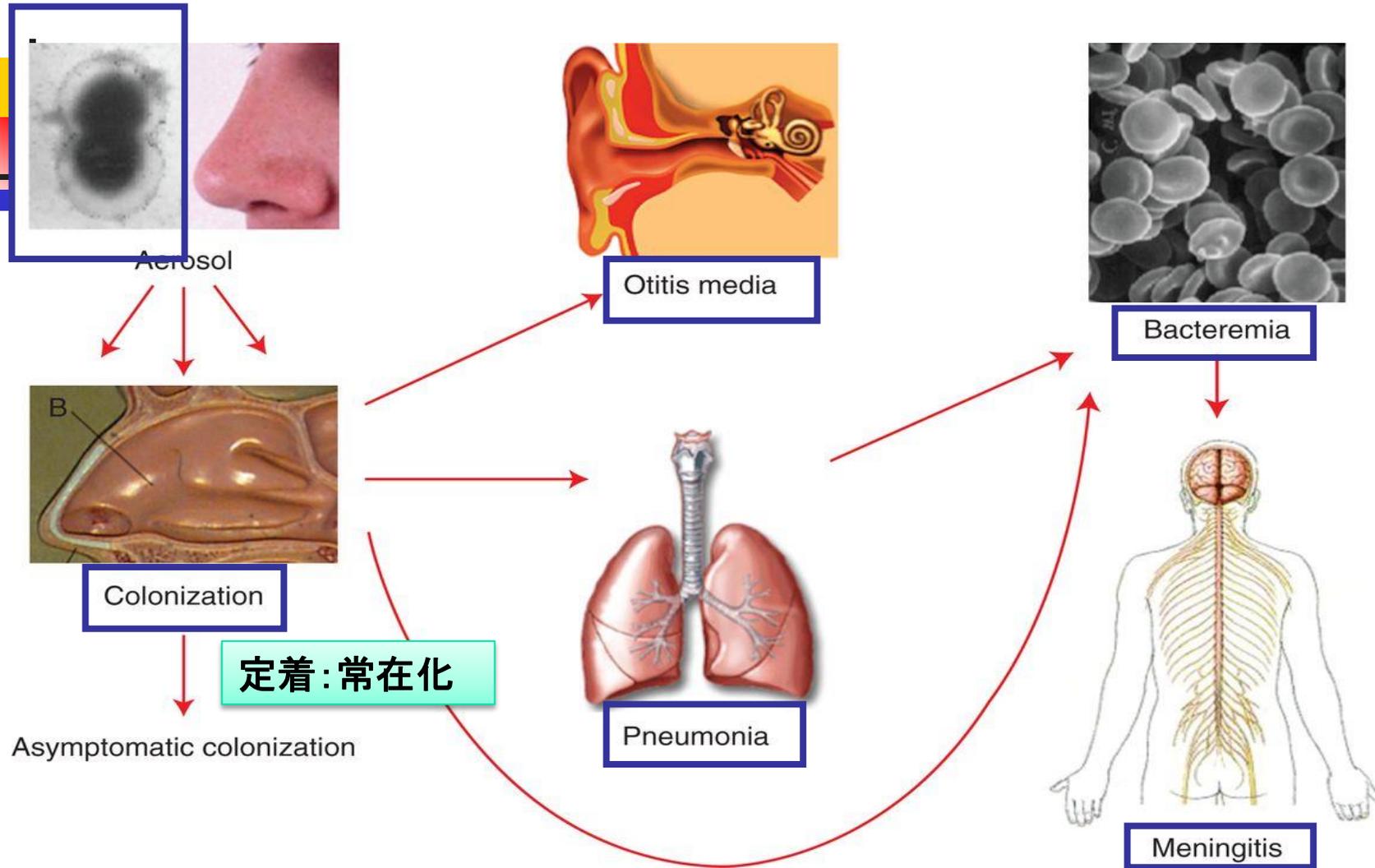


©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興-一般-013).



肺炎球菌: グラム陽性
(2個の細胞: 双球菌)

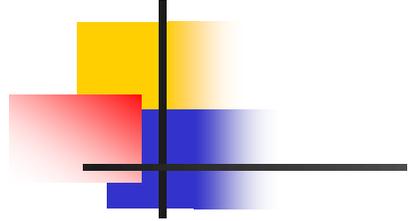
肺炎球菌の感染



Birgitt
Harb F

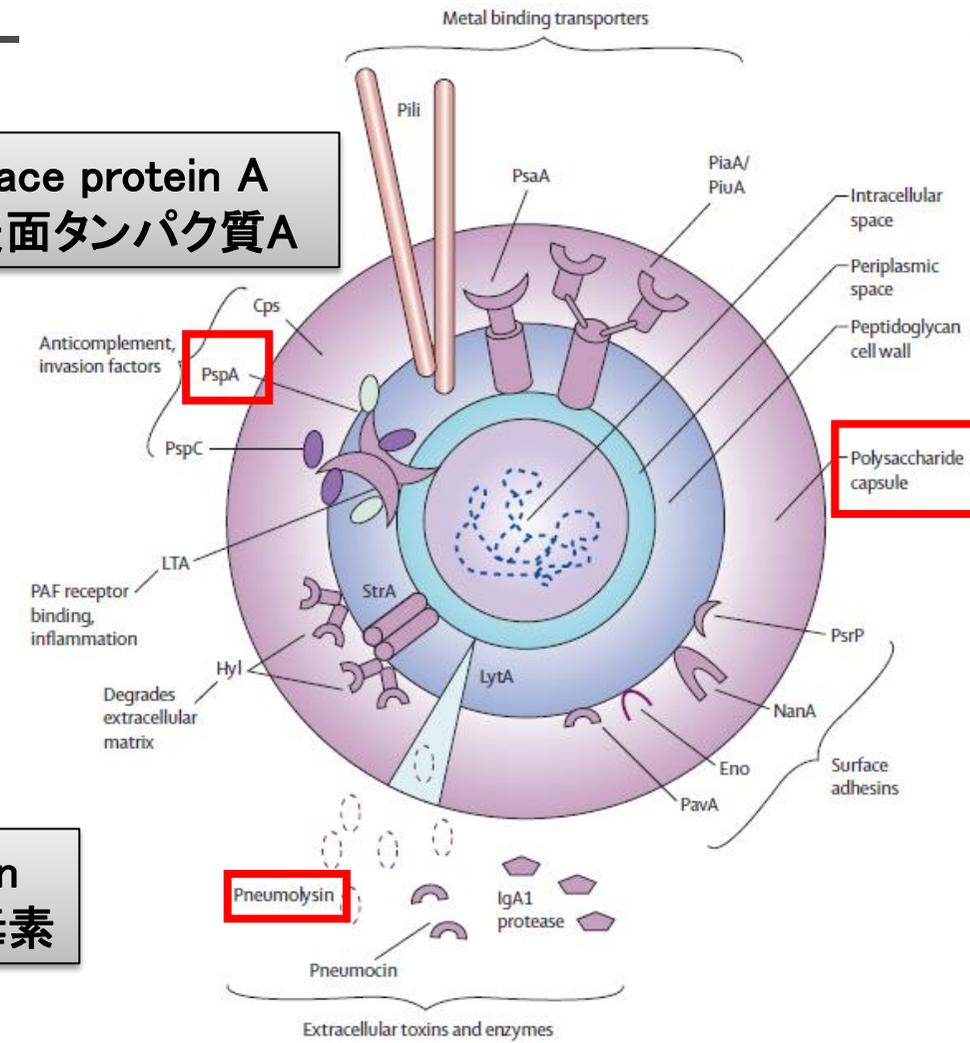
侵襲性肺炎球菌感染症 (invasive pneumococcal disease; IPD)
= 髄膜炎、菌血症、血液培養陽性の肺炎

肺炎球菌の病原因子 (Virulence factors)



肺から血中に入るには、
PspAとpneumolysin
が必要

Pneumococcal surface protein A
(PspA)肺炎球菌表面タンパク質A



莢膜

病原性を1番反映

Pneumolysin
膜孔形成毒素

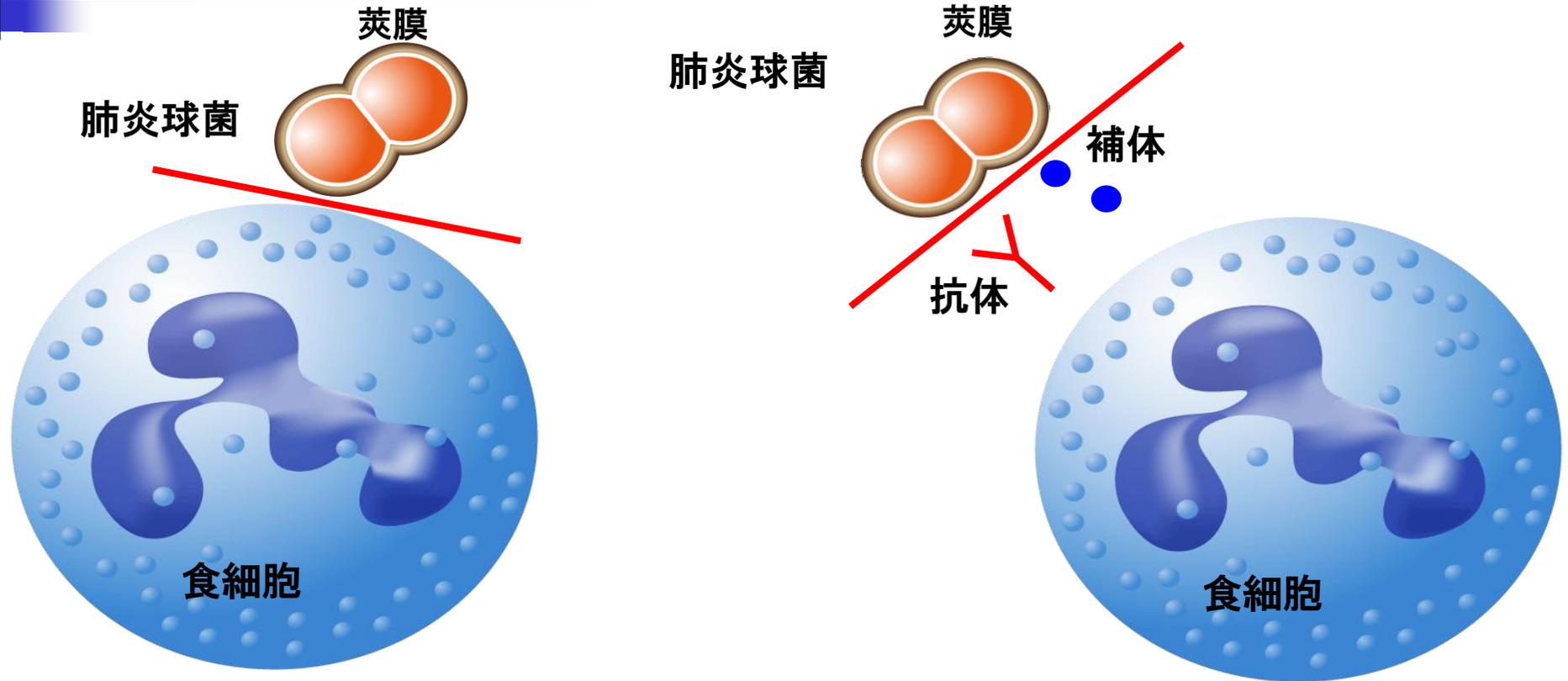
Pneumolysin
IgA1 protease
Pneumocin
Extracellular toxins and enzymes

莢膜 Capsule

- 莢膜多糖体抗原(莢膜型抗原):
97種類。
- 食細胞による貪食を抑制する。
- 莢膜多糖体抗原の違い→**補体結合性**の違い (Inf Immune 2010;
78: 5262-5270)→病原性に差



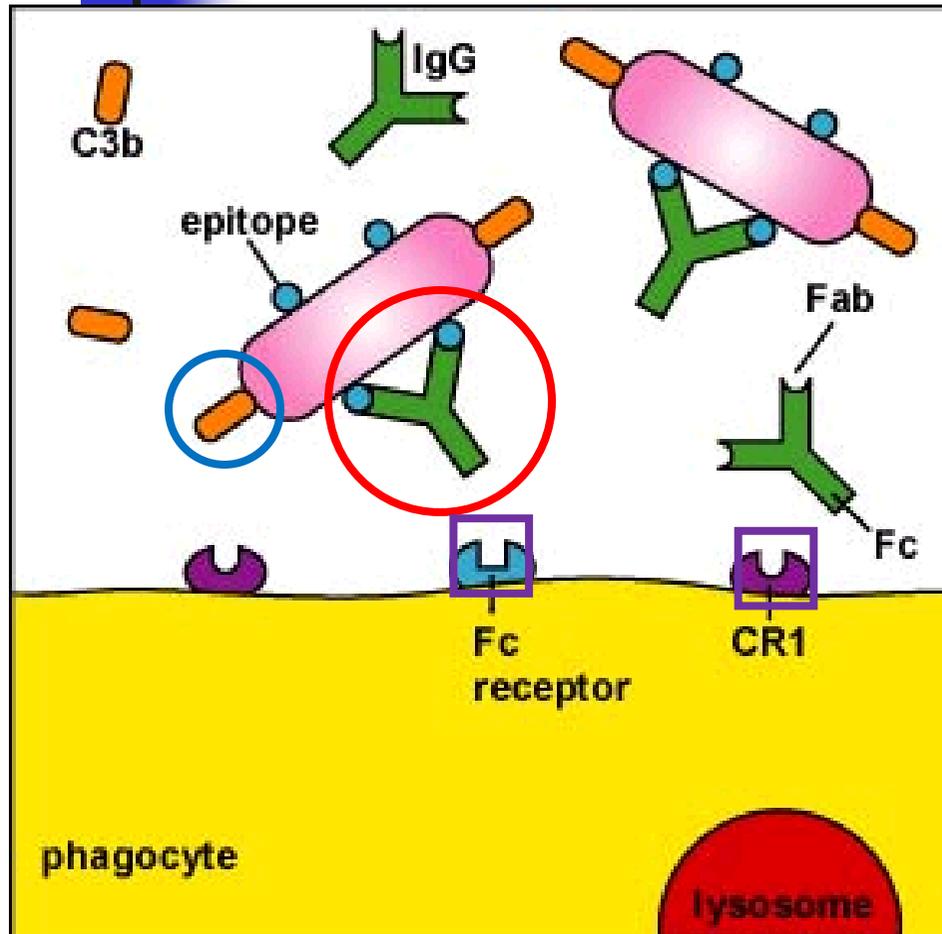
莢膜による免疫機構の回避



莢膜を構成する高分子が親水性であること、表面が負の電荷を帯びていることで、食細胞から認識されにくくなる。

菌体表面蛋白への補体や抗体の結合を抑制しオプソニン化を防ぐ。

オプソニン化



- 2つのオプソニン化の経路

1. Immunoglobulin G (IgG)

2. Complement: C3b

- 莢膜多糖体抗原の違い

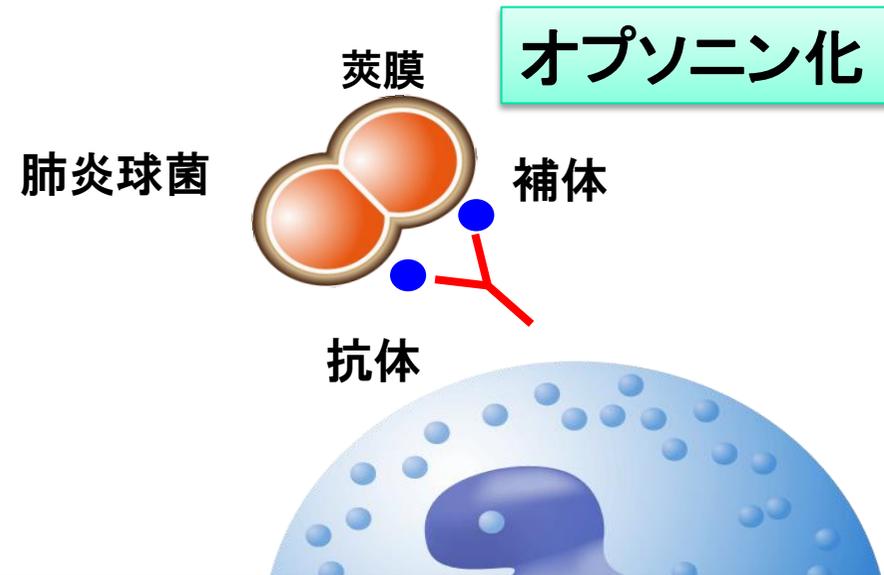
→補体結合性の違い

→オプソニン化に差

→病原性に差

肺炎球菌の貪食には 莢膜に対する抗体が必要

- 莢膜多糖体は**T細胞非依存性**抗原で、膜型免疫グロブリン(B細胞レセプター)と直接結合しB細胞を直接刺激する。
- しかし乳児のB細胞は未熟で、多糖体抗原の刺激に対する免疫応答が十分ではなく、莢膜多糖体に対する抗体が作られにくい。
- **キャリア蛋白(ジフテリアCRM₁₉₇)結合型肺炎球菌ワクチン**の莢膜多糖体は**T細胞依存性**抗原に変換され、乳児に接種しても莢膜多糖体に対する抗体が産生される。



肺炎球菌の多糖体、大腸菌リポ多糖体、ポリビニルピロリジン等で、直鎖状に繰り返し配列された抗原性決定基をもつ高分子であり、体内の酵素による分解に対して高度に抵抗性である。T非依存性抗原は、一義的にIgM応答を引き起こす。

多糖体(ポリサッカライド)23価ワクチンと 小児用結合型ワクチン(PCV7、PCV13)の相違

23価

7価, 13価

多糖体ワクチン

ポリサッカライド

B細胞

肺炎球菌

莢膜

基礎免疫

抗原提示細胞

ヘルパーT細胞

キャリアタンパク

ポリサッカライド

キャリアタンパク結合型ワクチン
プレベナー

追加免疫

抗原提示細胞

ヘルパーT細胞

サイトカインなど

免疫学的記憶が残るためには、樹状細胞によるヘルパーT細胞の刺激が必要

IgG抗体価

多糖体ワクチンによる免疫応答
(免疫記憶なし)

基礎免疫 追加免疫

サイトカインなど

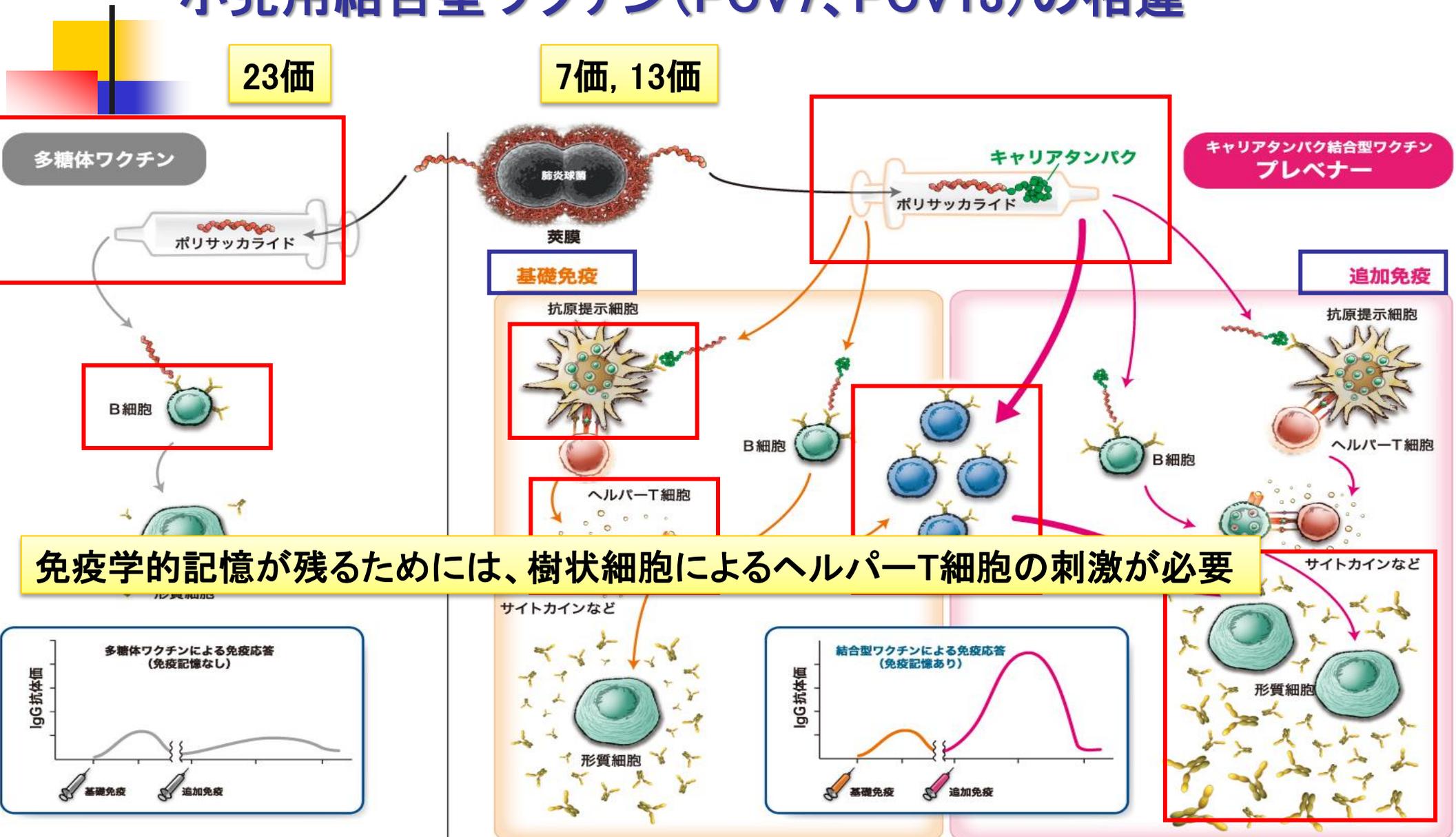
形質細胞

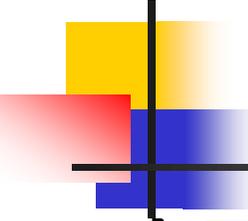
IgG抗体価

結合型ワクチンによる免疫応答
(免疫記憶あり)

基礎免疫 追加免疫

形質細胞



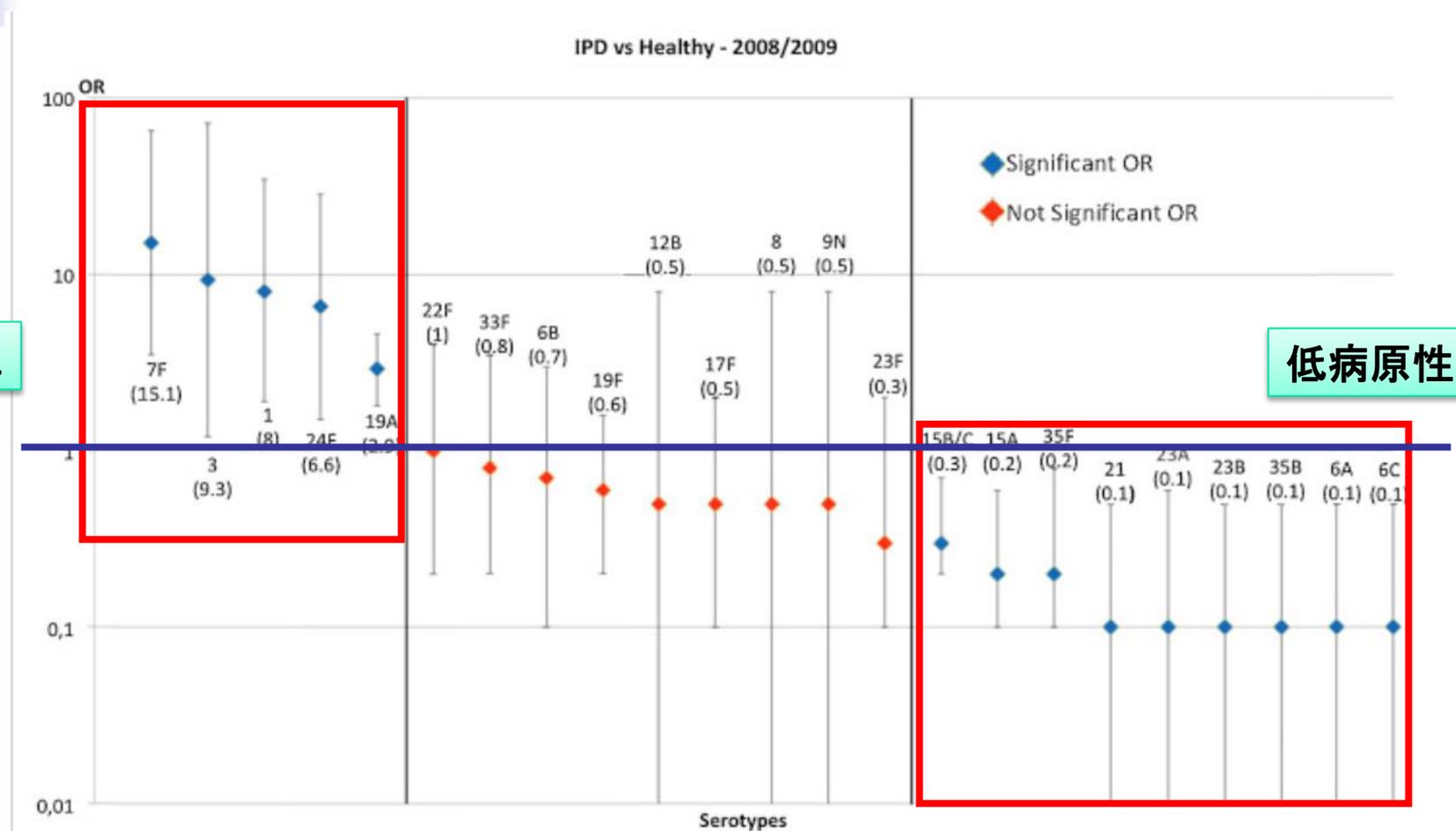


病原性の強い肺炎球菌とは？

- 病原性の強い肺炎球菌
 - （真に病原性があるのは20-30個？）
- = 侵襲性の強い肺炎球菌（IPDを起こしやすい莢膜型）
- = 健康保菌者が保有する莢膜型の頻度より、IPDを起こす頻度が高い莢膜型の肺炎球菌
 - $OR > 1$: IPDとの関連性が強い
 - $OR < 1$: IPDとの関連性が弱い

→PCV-7、13の莢膜型を決定（国による違い）

PCV-7後、IPD-13前 (2008/2009) の肺炎球菌の病原性



Vaccine 2015, 33, 6178-6185

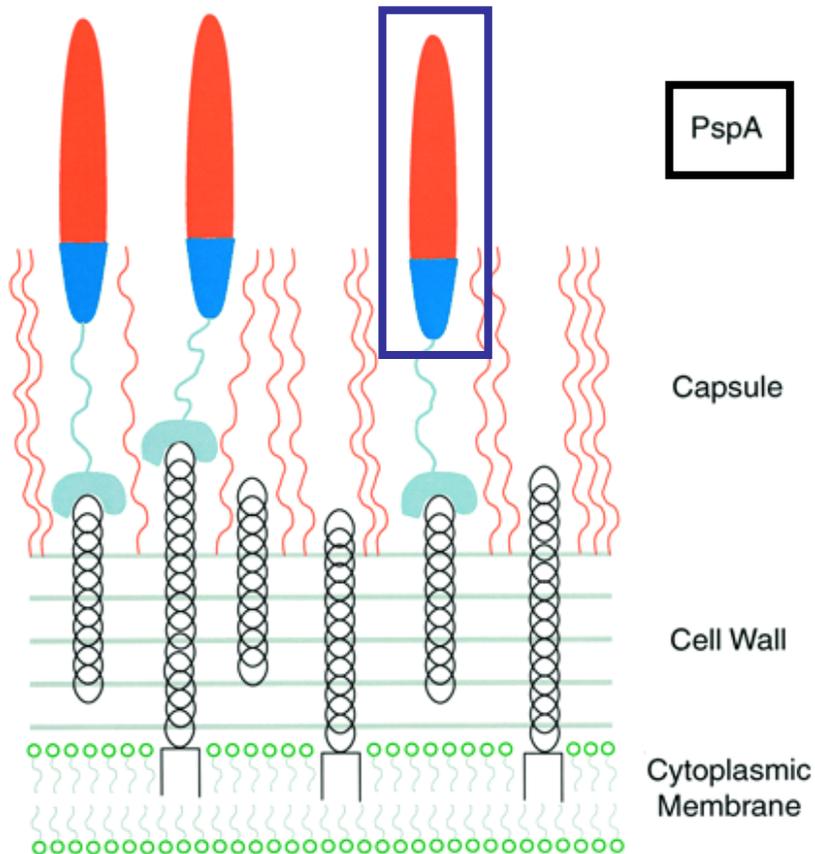
病原性の報告

Reference	High Virulence	Low Virulence
Chang Gung Med J 2008;31:117-24	1, 3	
CID 2010: 51;692-699	3, 6A, 6B, 9N, and 19F	
CHEST 2012; 142: 482 - 491	3, 6A, 6B, 9N, 19F	1, 7F, 8
Vaccine 2015, 33, 6178-6185	24F, 12F	11A, 23B

確かに病原性が強い型は存在するが、年代、報告(国)による違いも見られる。
インフルエンザ菌のタイプbのように、病原性に大きな差はない。

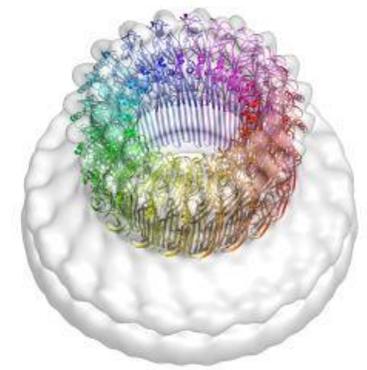
Pneumococcal surface protein A (PspA)

肺炎球菌表面タンパク質A



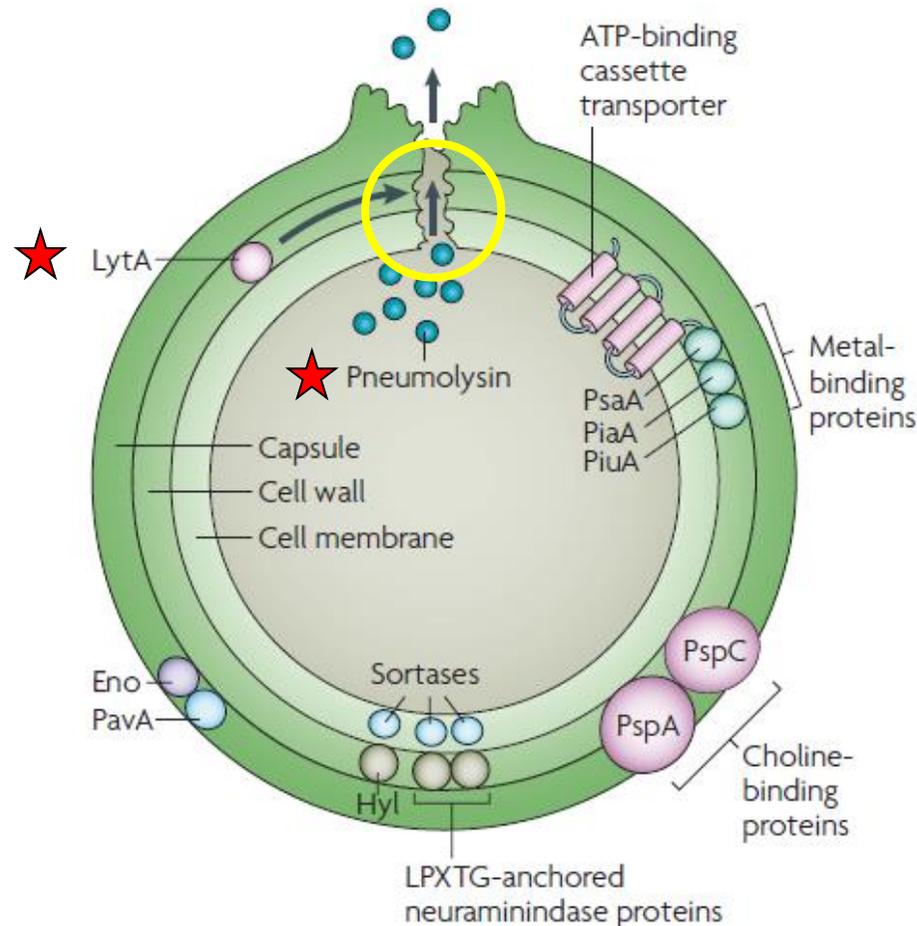
- 細胞との接着に関与
- 全ての血清型の肺炎球菌に**共通する抗原**で、肺炎球菌に対するワクチン候補。但し、ワクチンはできていない。
- **補体の菌への付着と活性化を抑制**、敗血症に重要な働きをする重要な病原因子。

Autolysin & Pneumolysin



LytA (Autolysin) 自己融解酵素

- ペプチドグリカン加水分解酵素。
- 細菌の定常状態で自己融解を起こす。→培養は早く行う必要がある。
- 菌の伸張・分裂する際に必要。



Pneumolysin 膜孔形成毒素

- コレステロール結合蛋白：コレステロールを含む細胞膜を融解し、宿主細胞を障害。
- 肺炎や菌血症の発症および進展において重要な役割。

PCV7、Hibワクチン前

小児細菌感染症の原因菌

重症度

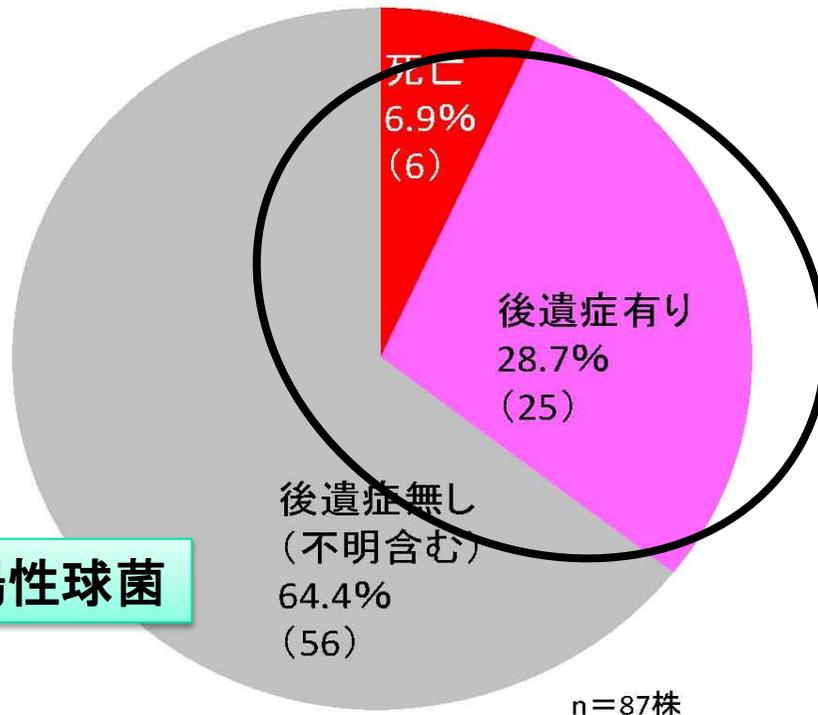


頻度

PCV7、Hibワクチン前

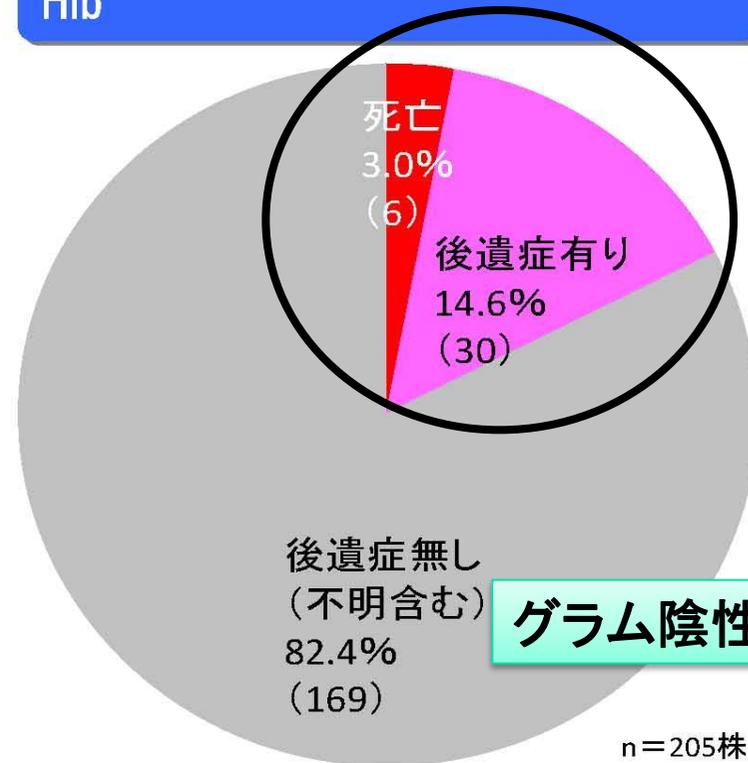
細菌性髄膜炎の予後(起炎菌別)

肺炎球菌



グラム陽性球菌

Hib



グラム陰性桿菌

肺炎球菌の細菌性髄膜炎はインフルエンザ菌より後遺症が多い

1)より作図

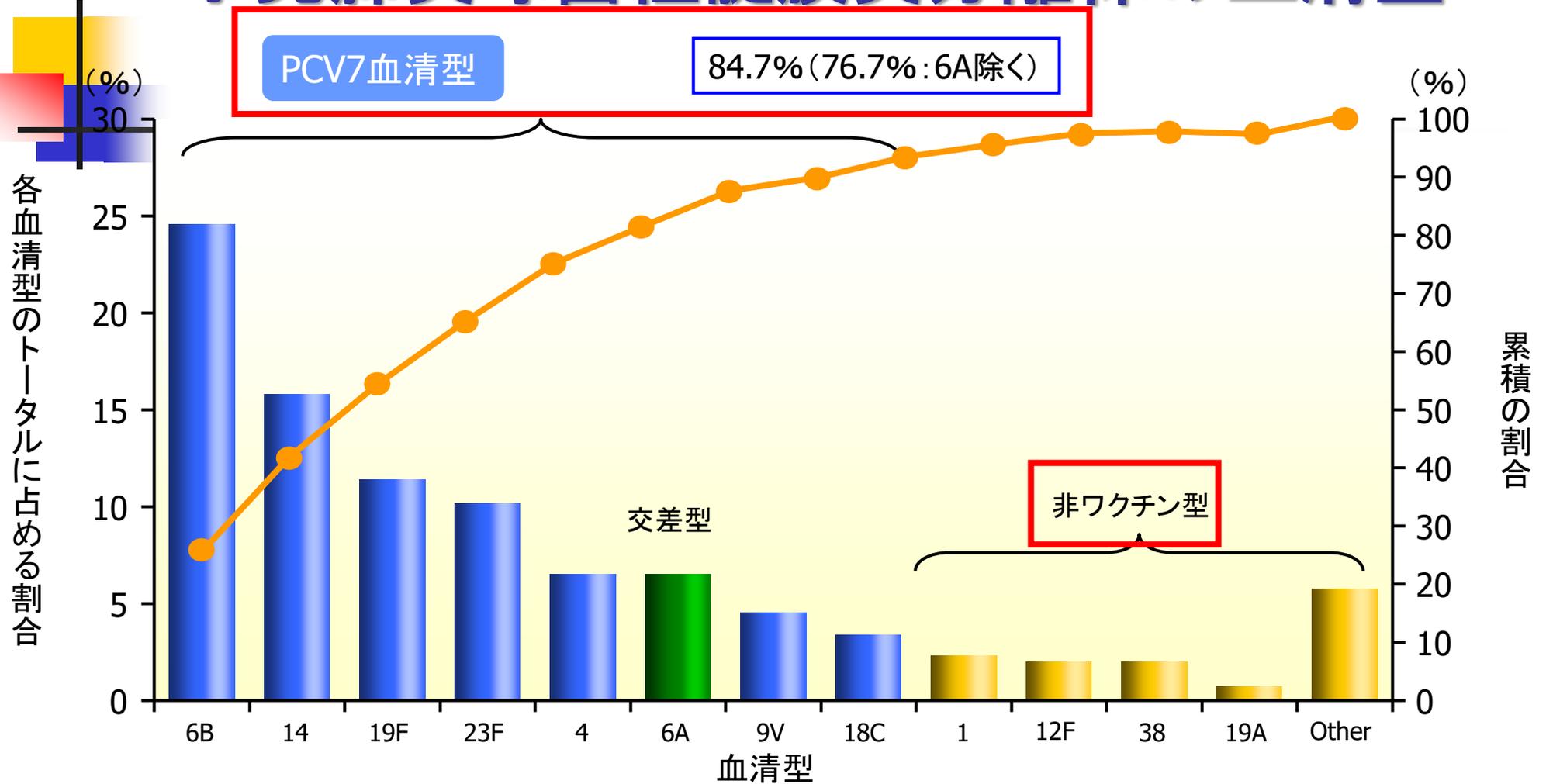
細菌性髄膜炎の主な後遺症²⁾:

水頭症、小頭症、発達遅延、てんかん、硬膜下水腫、膿瘍血腫、聴力障害、脳波異常、痙攣

1)IASR vol.23: 33

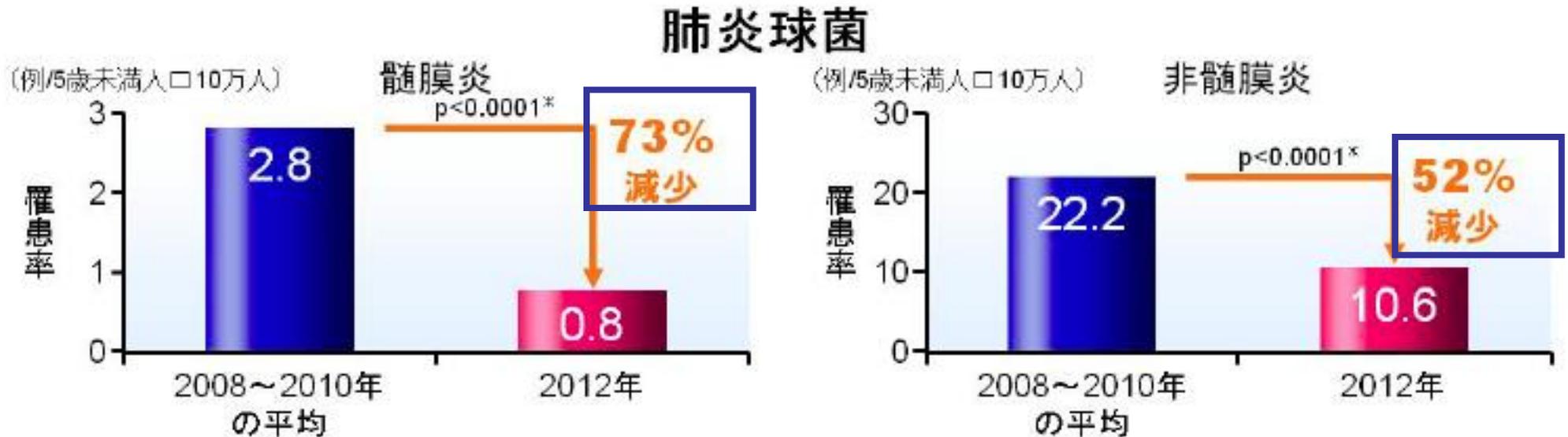
2)加藤達夫, 他: 小児感染免疫, 10(3): 209 (1998)

小児肺炎球菌性髄膜炎分離株の血清型



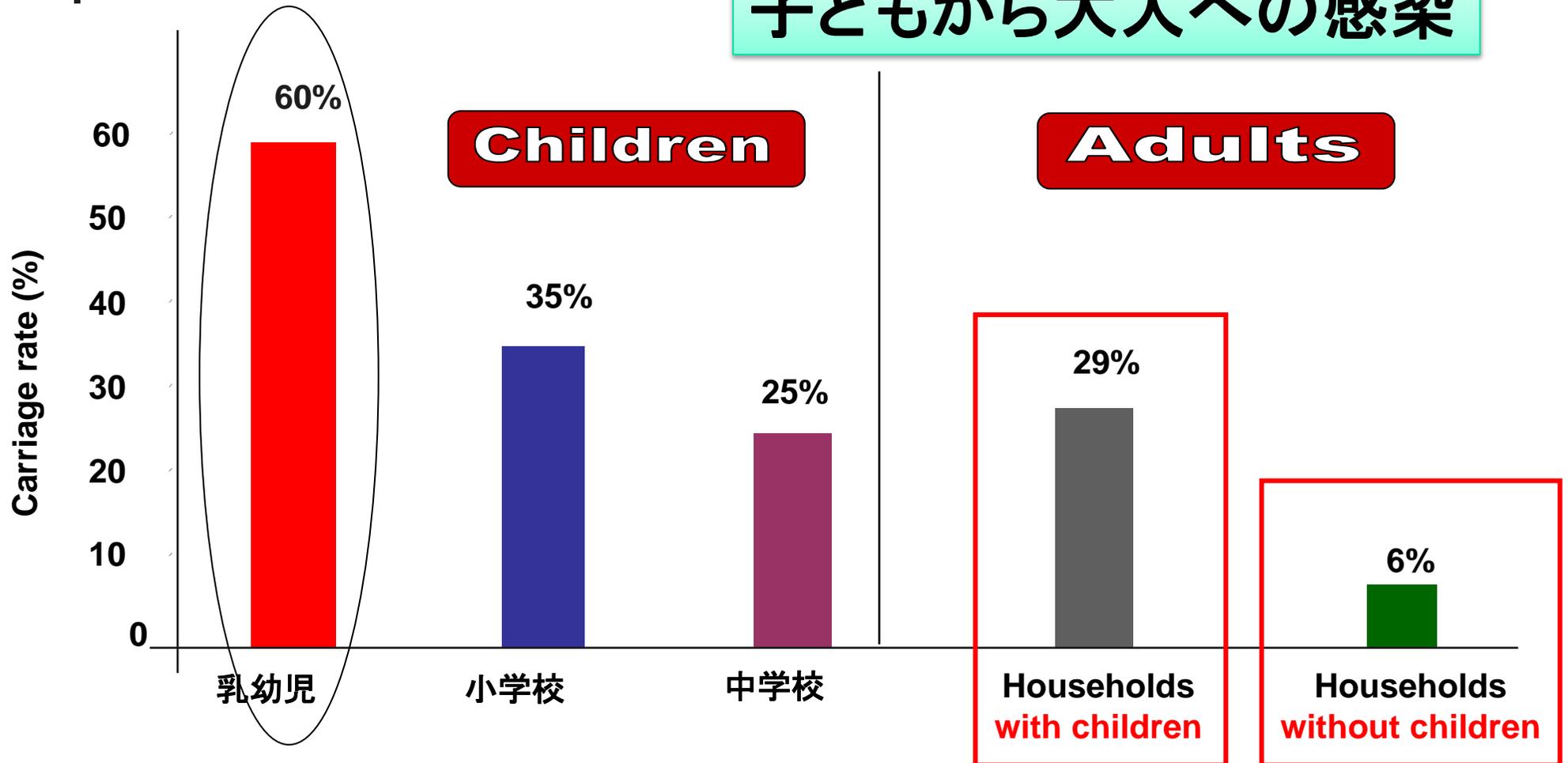
対象: 2007年7月から2008年12月まで8県から送付された小児IPD症例由来の肺炎球菌85症例(97株)

日本 ワクチン接種による侵襲性肺炎球菌感染症



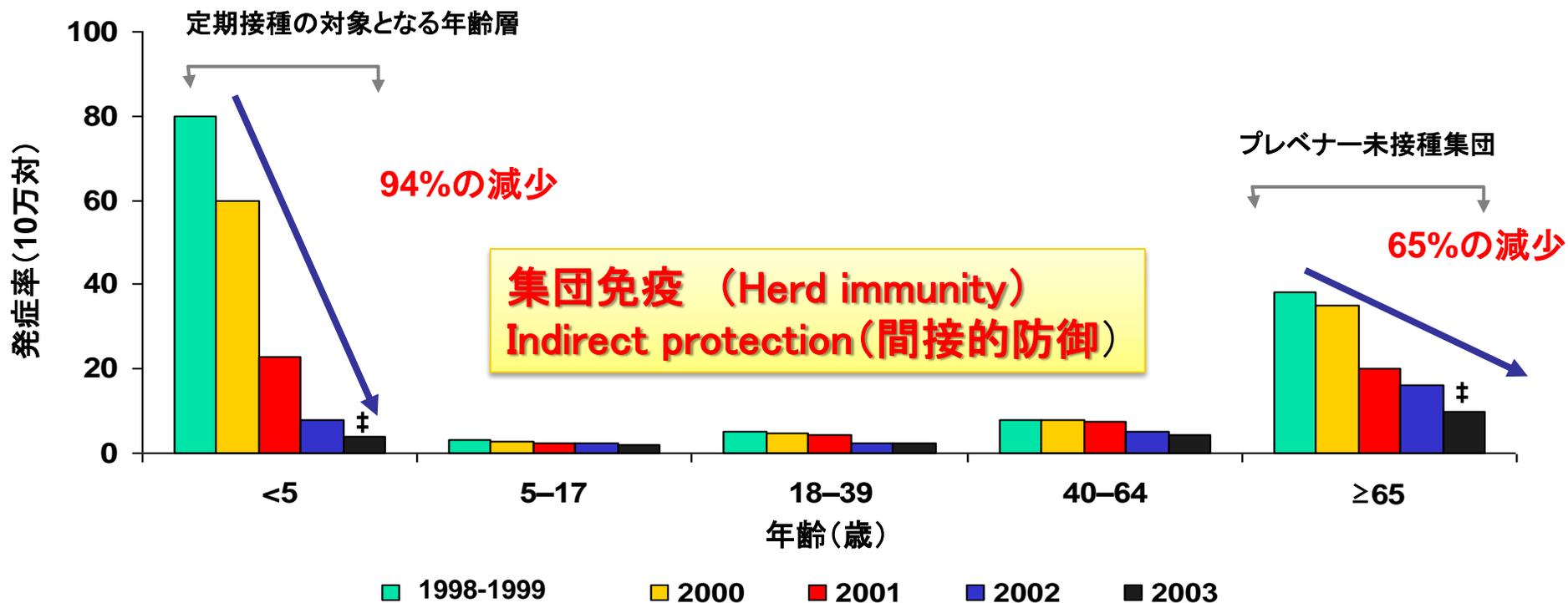
肺炎球菌の鼻咽腔の保菌

子どもから大人への感染



高齢者の感染症予防にもつながったPCV7接種(7価)の間接効果(米国)

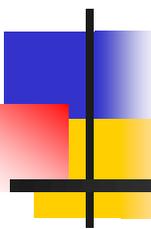
PCV7導入前後での年齢・年次ごとのワクチン血清型株のIPD発症率[†]



[†]Active Bacterial Core調査, 米国, 1998年-2003年

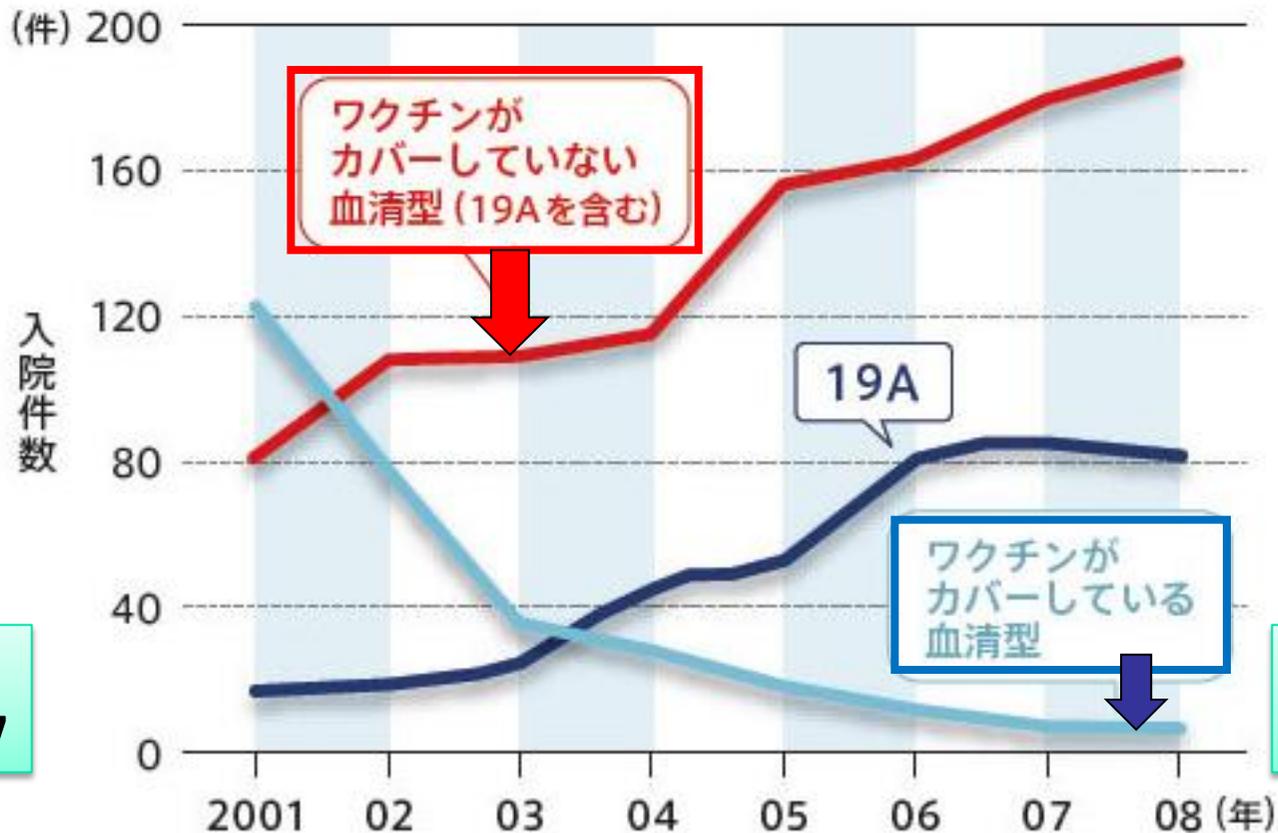
[‡] $p < 0.05$, 2003年対 1998-1999年

**その後、7価の肺炎球菌ワクチンの効果
はどうなったか？**



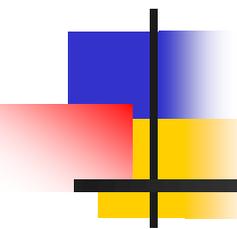
カバーされていない血清型による侵襲性感染症が増加 特に19Aの血清型による件数が増加。(米国)

日本でも予想されていたこと
何故、日本でPCV-13で開始しなかったか？



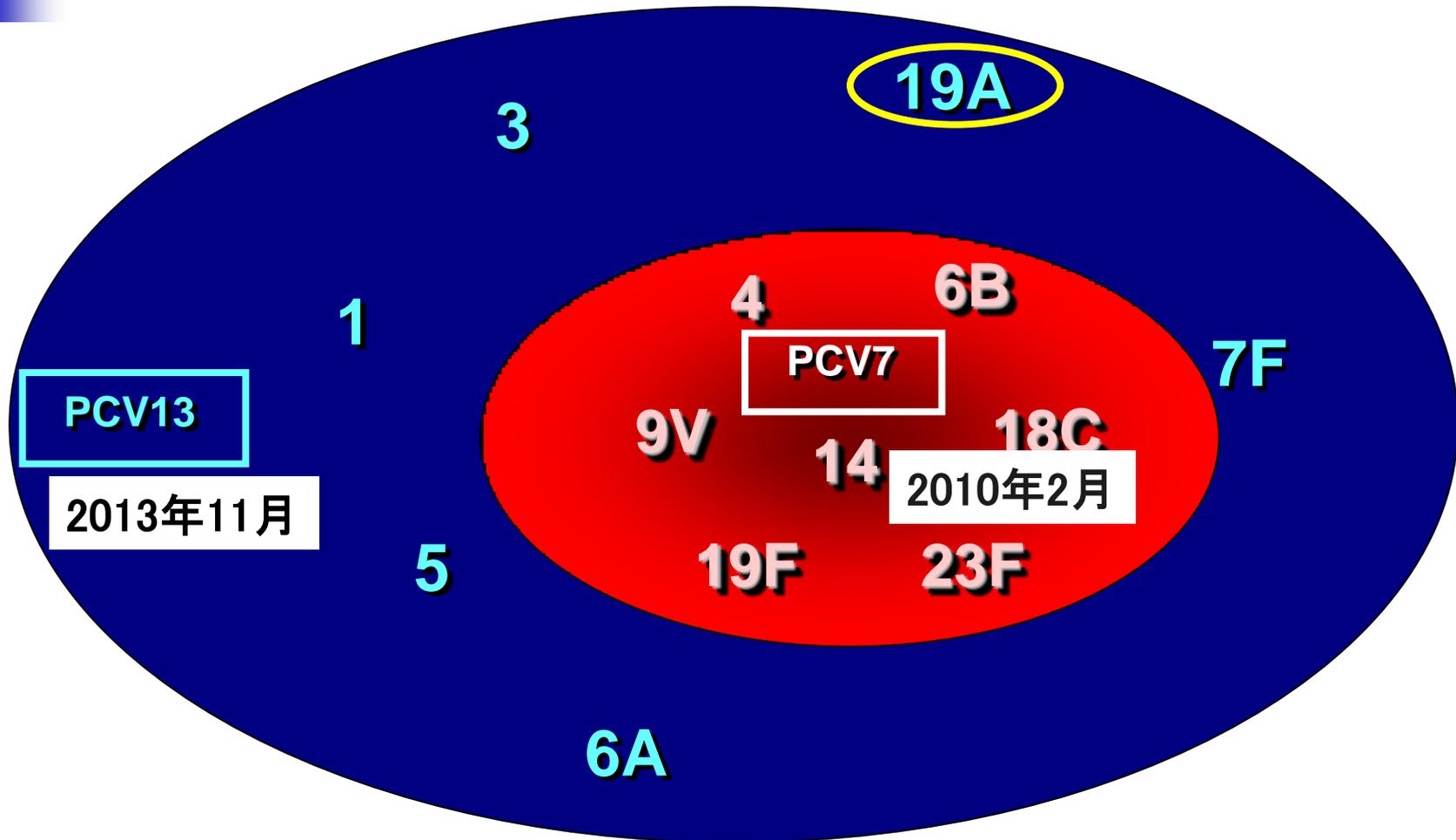
米国
2000年:PCV7

米国
2010年:PCV13



現在の状況

肺炎球菌結合型ワクチンの血清型 Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV)



公費助成前後での小児期侵襲性細菌感染症の罹患率 (5歳未満人口10万人当たり)

	2008～ 2010年	2011年	減少率*2 (%)	2012年	減少率*2 (%)	2013年	減少率*2 (%)
ヒブ髄膜炎	7.71	3.34	57	0.59	92	0.17	98
ヒブ非髄膜炎	5.15	3.00	42	0.91	82	0.10	98
肺炎球菌髄膜炎	2.81	2.09	26	0.76	73	1.10	61
肺炎球菌非髄膜炎	22.18	18.12	18	10.62	52	9.71	56
GBS*3 髄膜炎	1.29	1.25	3	1.52	-17	0.93	28
GBS*3 非髄膜炎	1.15	1.10	4	1.21	-5	2.33	-102

Hibは減少、肺炎球菌は頭打ち

理由はHibの保菌率は数%であり、病原性が他のインフルエンザ菌より明らかに高い

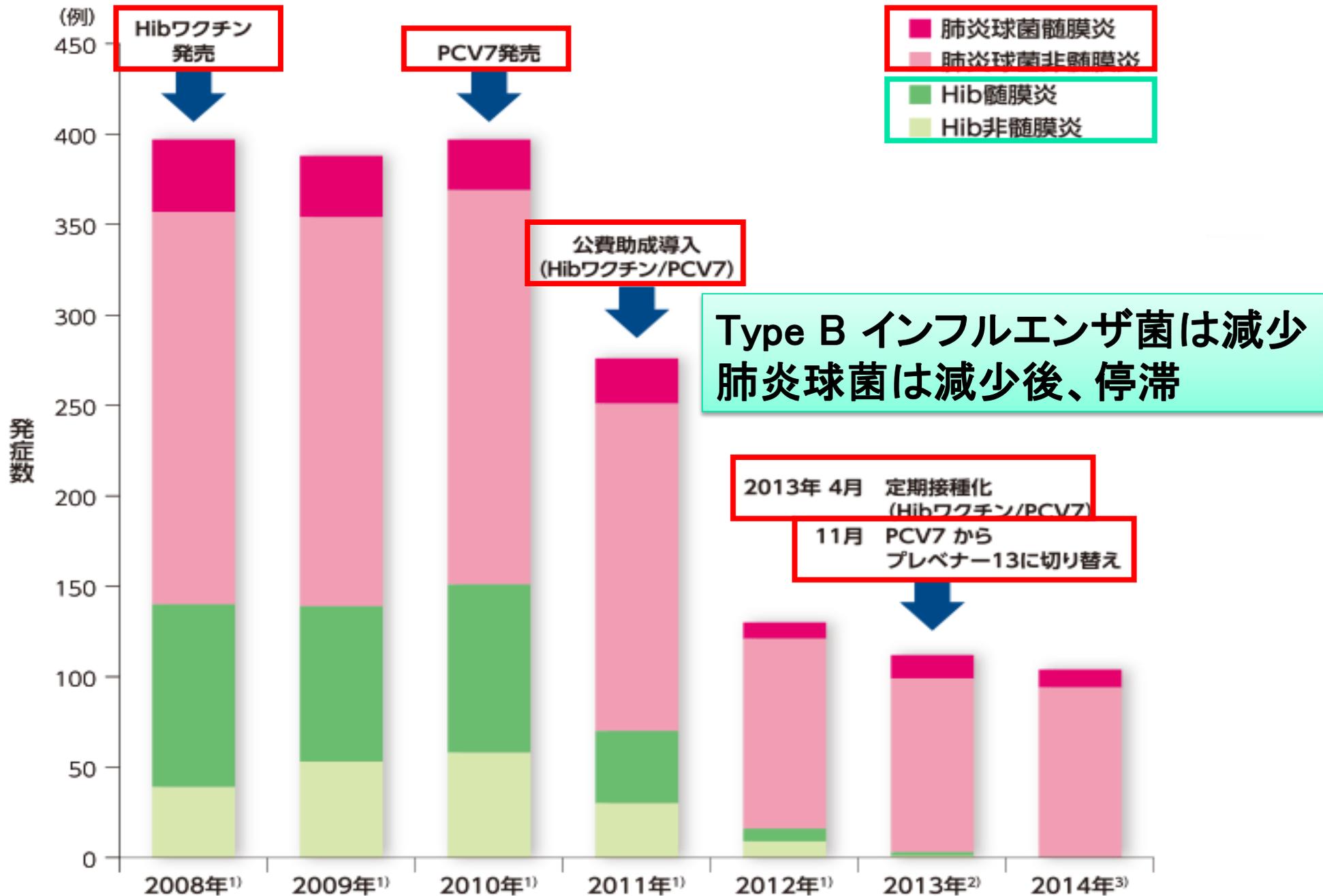
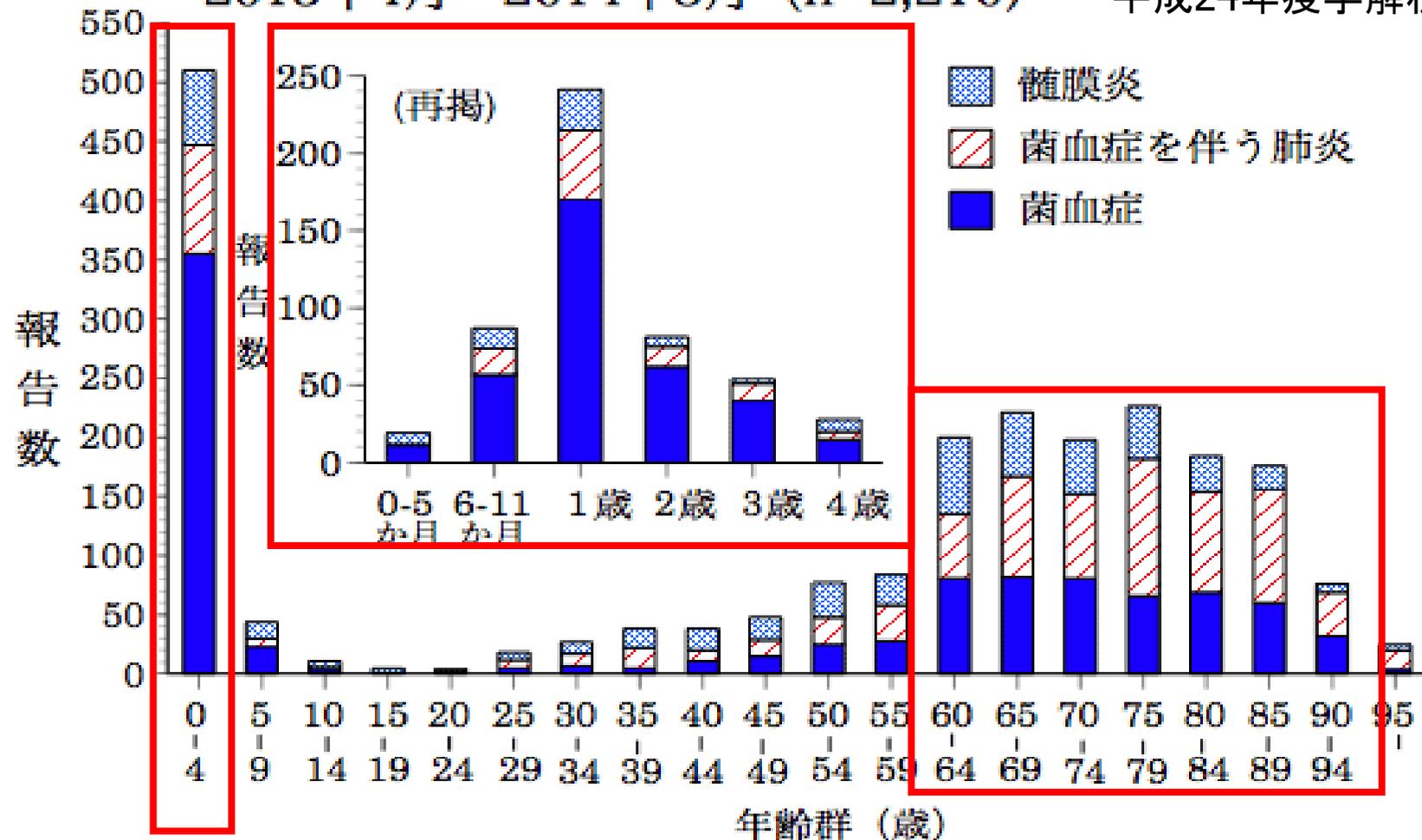
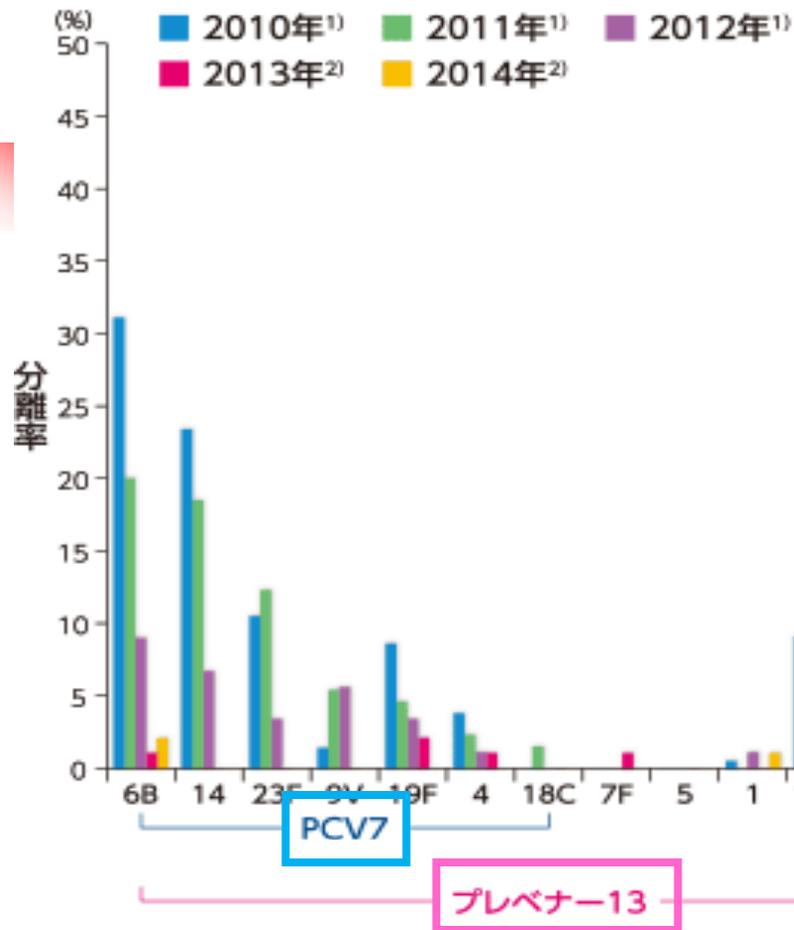


図3. 侵襲性肺炎球菌感染症患者の年齢分布,
2013年4月～2014年8月 (n=2,210) 平成24年疫学解析



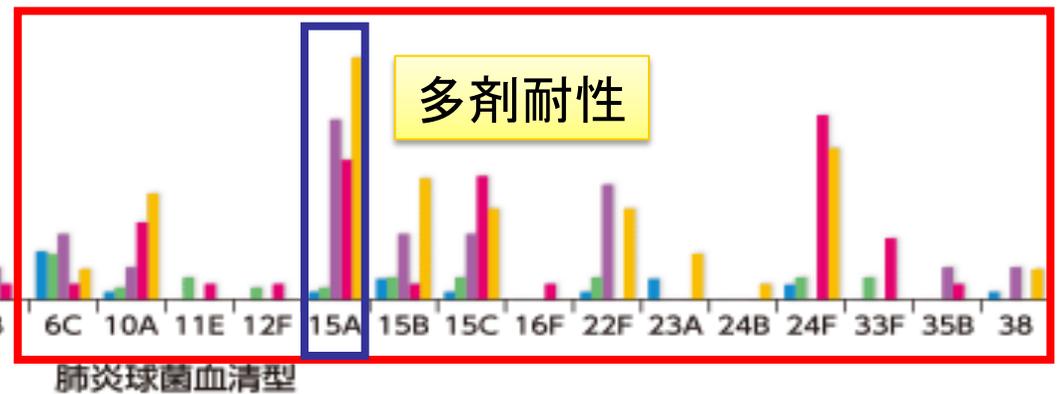
(感染症発生動向調査：2014年8月20日現在報告数)

1歳をピークとする乳幼児と高齢者に多い



ワクチンの血清型カバー率			
	PCV7		プレベナー13
2010年 (209例)	78.9%	↓	90.4%
2011年 (130例)	64.6%		85.4%
2012年 (89例)	29.2%		59.6%
2013年 (94例)	4.3%		53.2%
2014年 (96例)	2.1%		36.5%

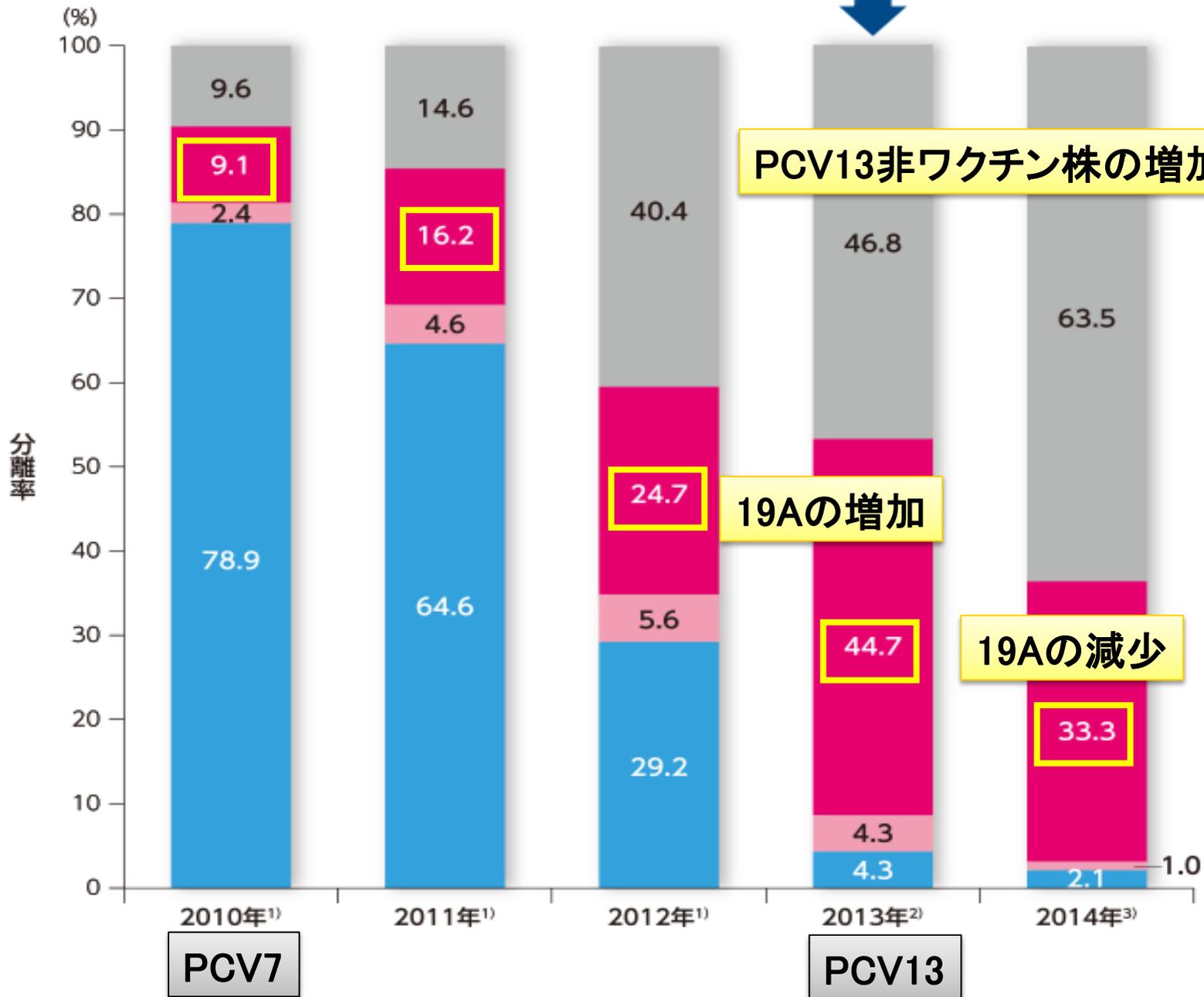
※2013年11月 プレベナー13定期接種化



ワクチンのカバー率が低下→非ワクチン株の増加

■ PCV7血清型 ■ 19A以外のプレベナー13追加血清型 ■ 19A ■ その他

2013年11月 プレベナー13定期接種化



Population by pathology, period and age

	Carriers <i>n</i> = 355	IPD (total) <i>n</i> = 569	Meningitis <i>n</i> = 166	Pneumonia <i>n</i> = 114	Other IPDs <i>n</i> = 289	<i>p</i> *	<i>p</i> **
Overall, <i>n</i> = 924							
Period 1 (2008/2009), <i>n</i> = 581	193 (33.2)	388 (66.8)	102 (17.6)	85 (14.6)	201 (34.6)		
Age (months), mean ± SD (median)	13.2 ± 5.4 (12.3)	13.4 ± 5.2 (12.2)	11.7 ± 5.2 (10.0)	13.7 ± 4.9 (13.7)	14.1 ± 5.1 (13.4)	0.7	0.002
Period 2 (2012/2013), <i>n</i> = 343	162 (47.2)	181 (52.8)	64 (18.7)	29 (8.5)	88 (25.7)		
Age (months), mean ± SD (median)	13.9 ± 5.5 (12.9)	13.1 ± 5.0 (12.3)	11.6 ± 4.7 (10.5)	14.7 ± 5.3 (14.2)	13.7 ± 4.9 (13.6)	0.18	0.012

Data are no. (%) unless indicated. IPD, invasive pneumococcal disease. Other IPD: bacteremia without source, osteo-articular infection, pericarditis, peritonitis, cellulitis.

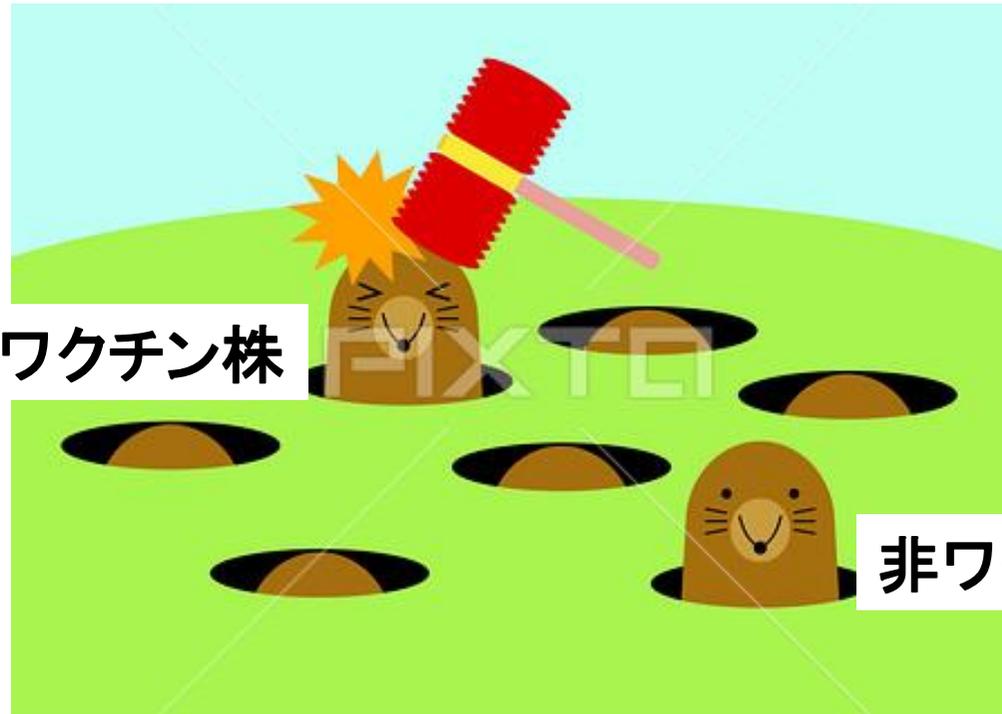
保菌率に変化は見られない→肺炎球菌によるIPDは無くならない？

** ANOVA *p*-value for age comparing carriers vs meningitis vs pneumonia and vs other IPD.

IPD7後
IPD13前

IPD13後

モグラ たたき



ワクチン株

非ワクチン株

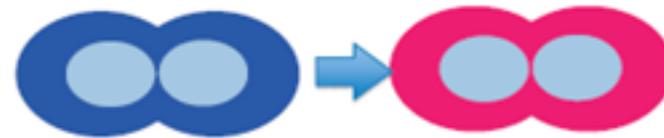
pixta.jp - 4206533

インフルエンザ菌のように型による大きな病原性の違いはない
→ワクチン株は減少し、非ワクチン株の耐性菌が増加

Vaccine pressure

→ Serotype replacement (血清型置換)の機序

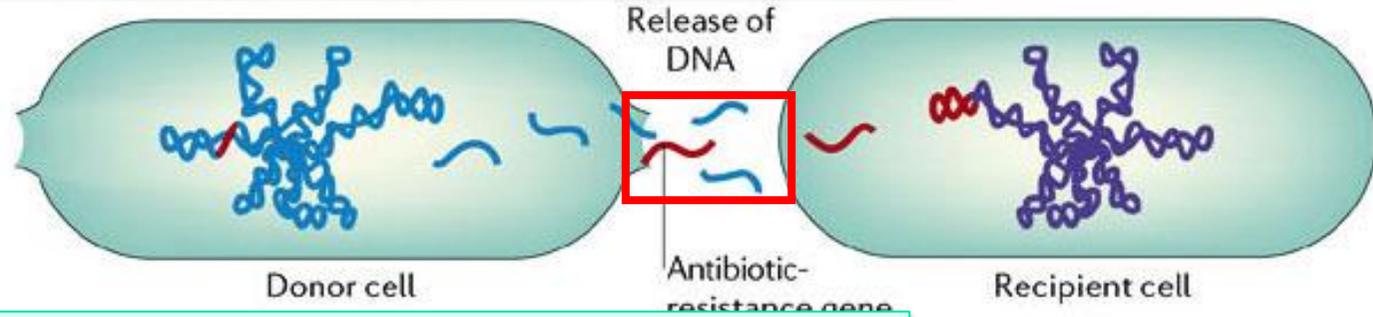
- 非ワクチンタイプの選択(免疫学的圧力)
- ワクチンタイプの莢膜型変化 **Capsular switching**
(非ワクチンタイプの **transformation** による **莢膜遺伝子 capsule polysaccharide synthesis (*cps*) locus の recombination**)



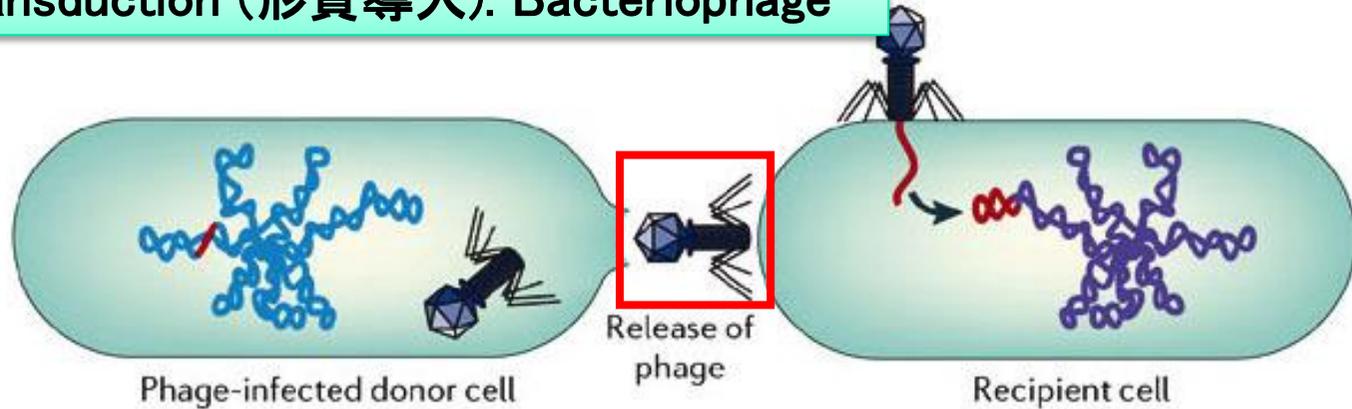
莢膜のみ変化

病原遺伝子の獲得 II 遺伝子導入

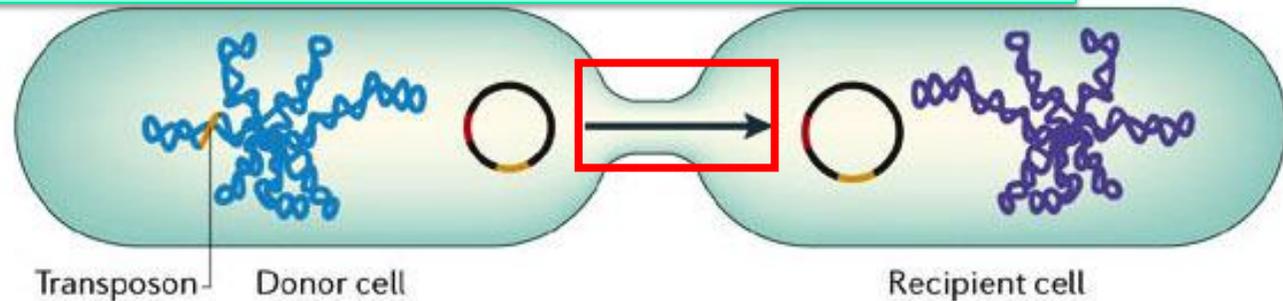
Transformation (形質変換): DNA fragment



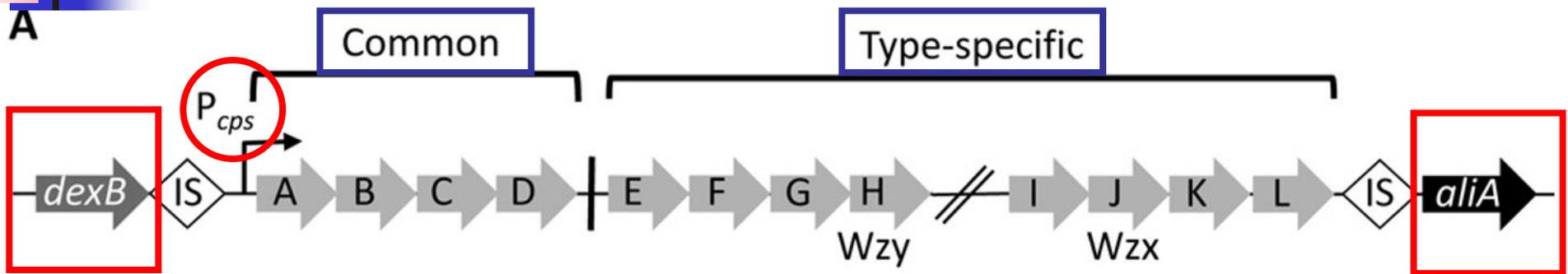
Transduction (形質導入): Bacteriophage



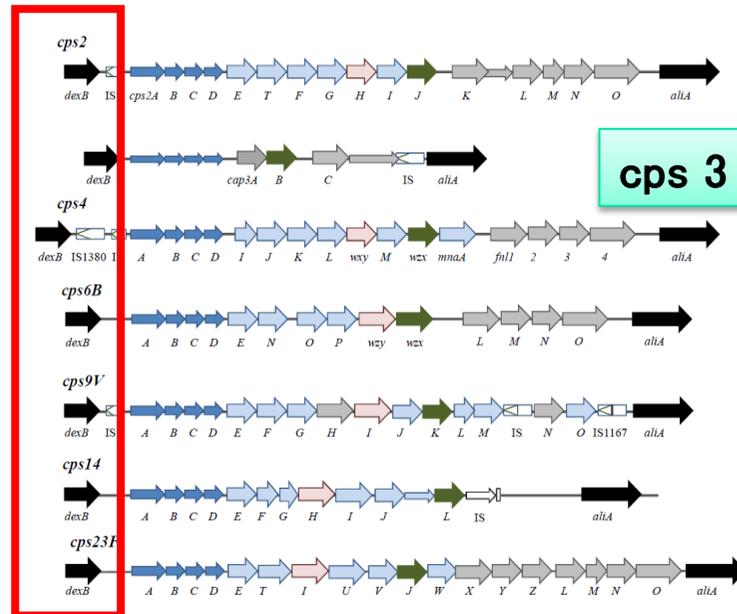
Conjunction (接合): plasmid: Cell to cell contact



cps loci from *S. pneumoniae* serotypes



***cps*のプローター:
莢膜の発現を促進**

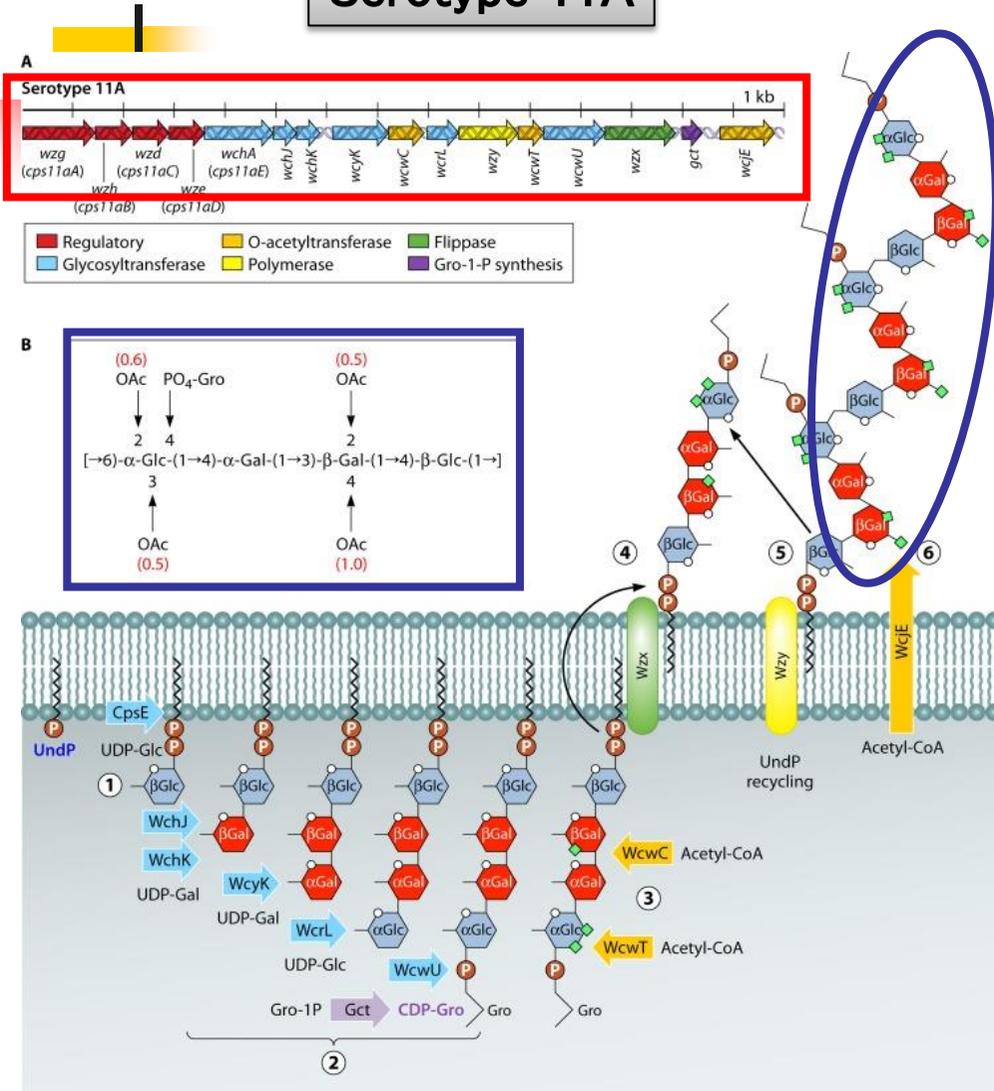


***cps* 3 (Serotype 3)は例外**

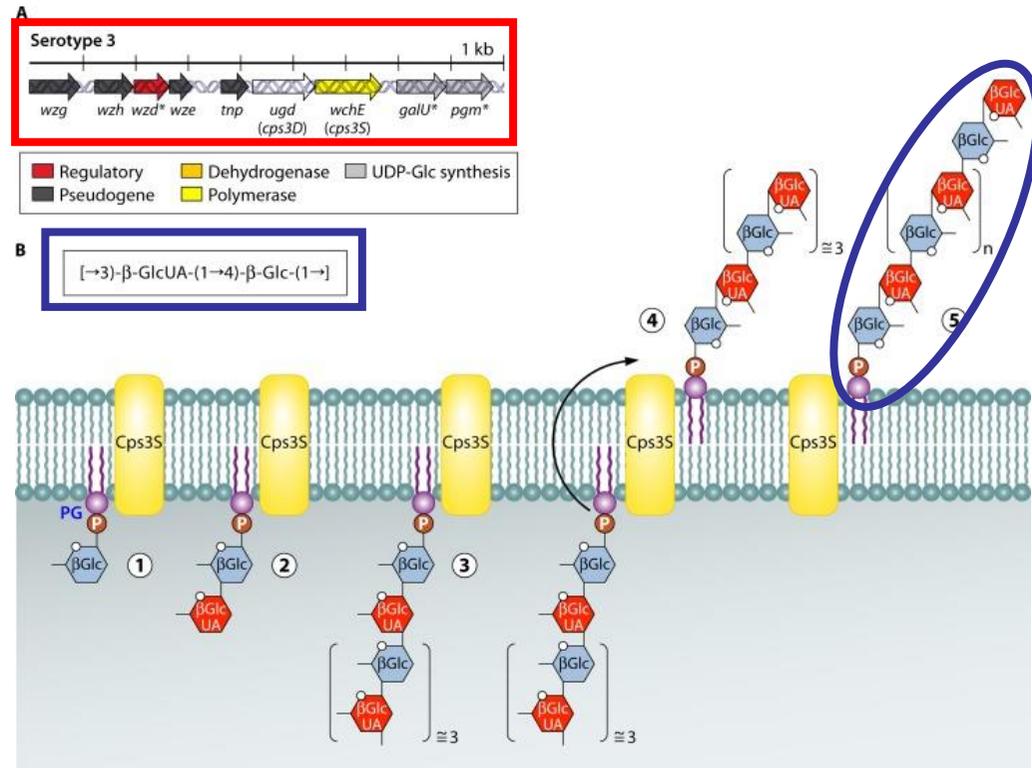
***cps* 33F, 37も例外**

Type specific

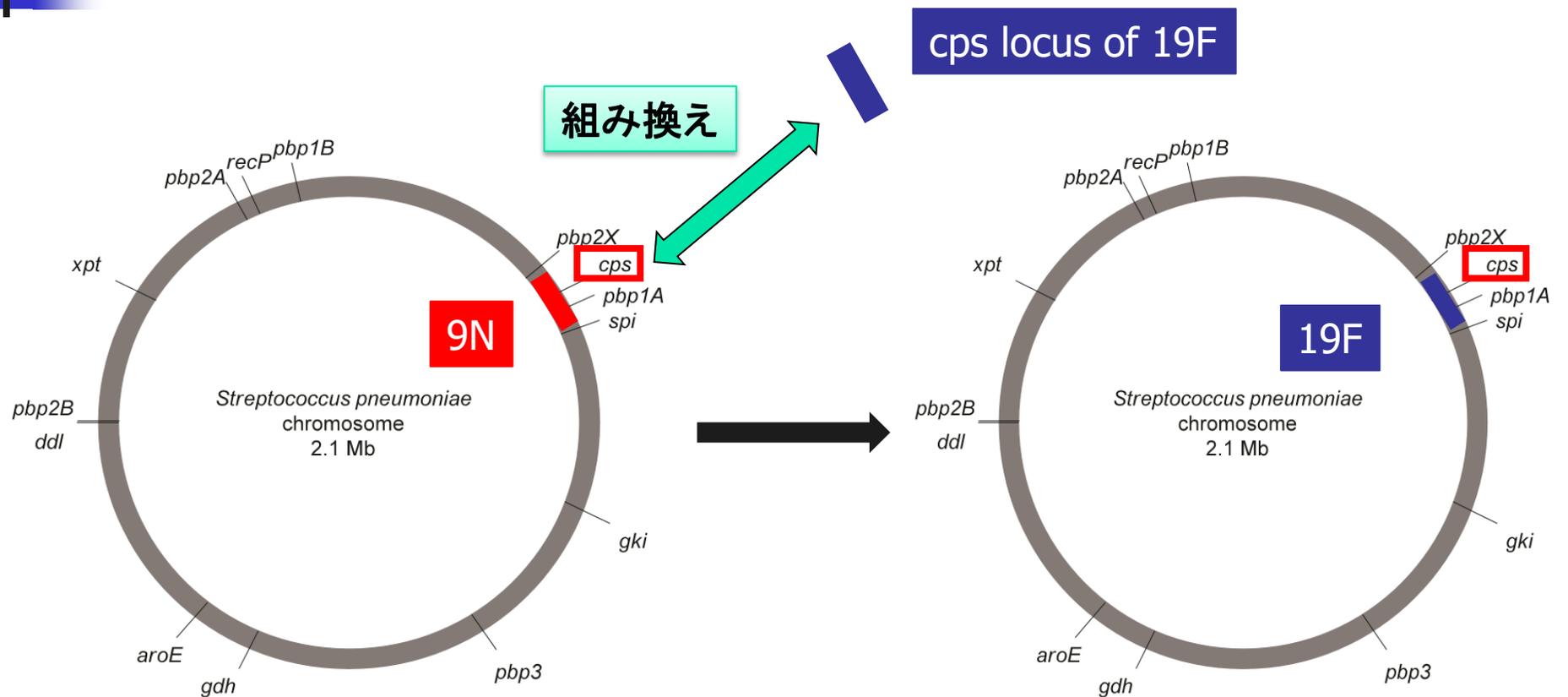
Serotype 11A



Serotype 3



Recombination (組み換え) of *cps* locus



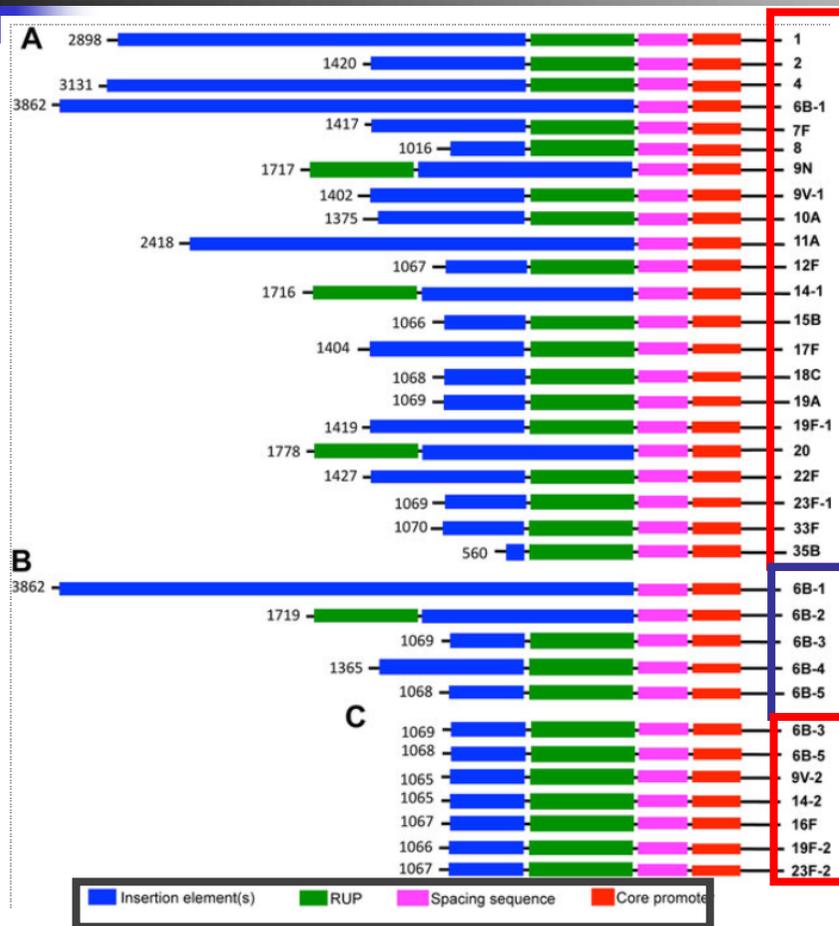
cpsは19Fで、莢膜以外は9N

IPDから分離した肺炎球菌のcps プロモーター領域の遺伝子配列

Sci Rep 2016; 6

莢膜は一番の病原因子
=発現量が多いと病原性が強い

莢膜の発現量を調節しているのは
cpsプロモーター



(A) 血清型により、プロモーター領域の遺伝子配列が異なる。

(B) 同じ血清型6Bでも、プロモーター領域の遺伝子配列が異なるものがある。

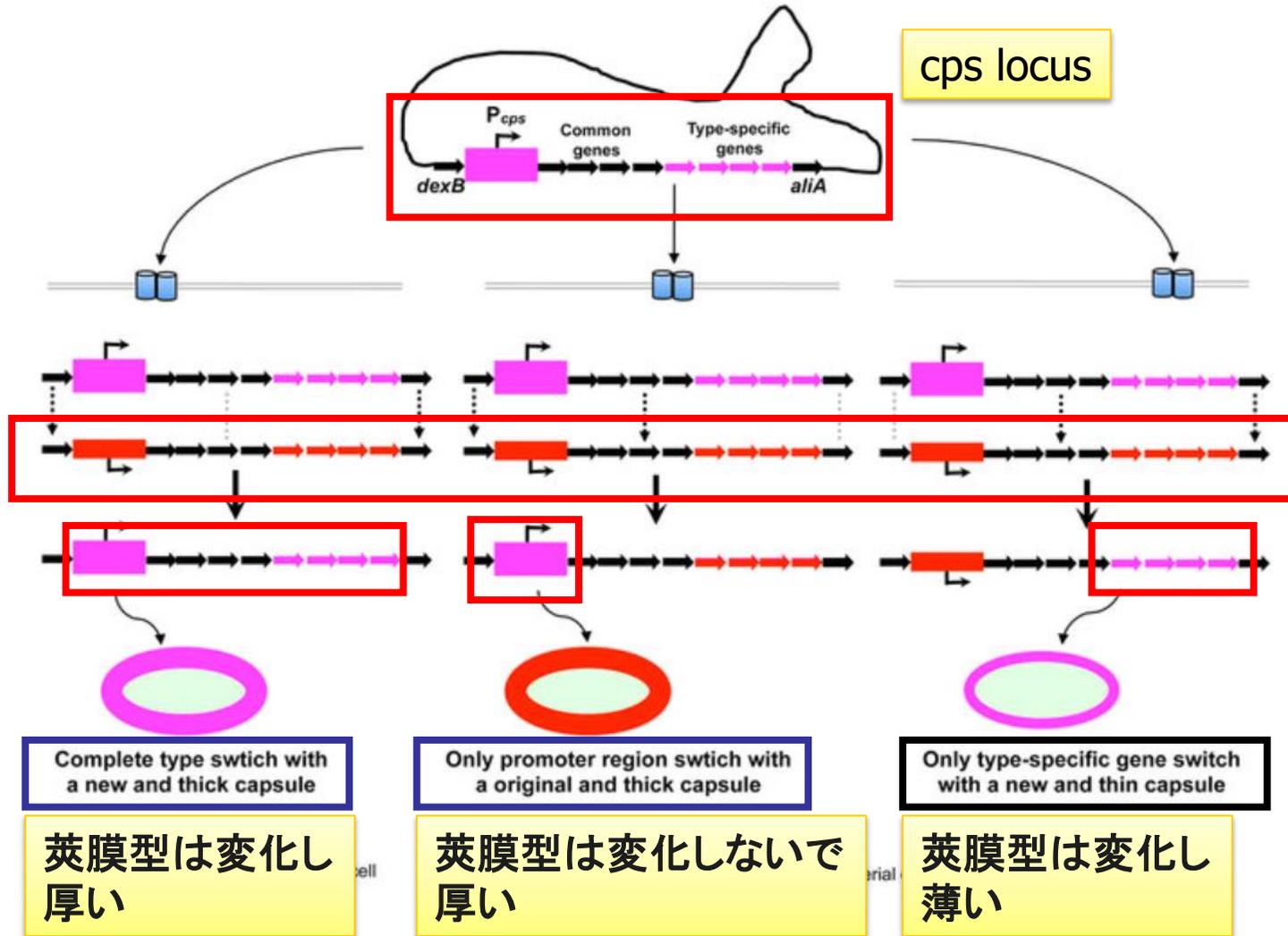
(C) 血清型が異なっても、プロモーター領域の遺伝子配列が同じものがある。

莢膜の血清型だけで、病原性が言えない可能性

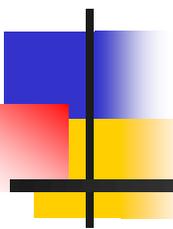
何故、cpsプロモーターのこのような多様性があるのか？

Sci Rep 2016; 6

Transformation: 形質変換



遺伝子組み換え



肺炎球菌は1つの血清型しか検出できないのか？

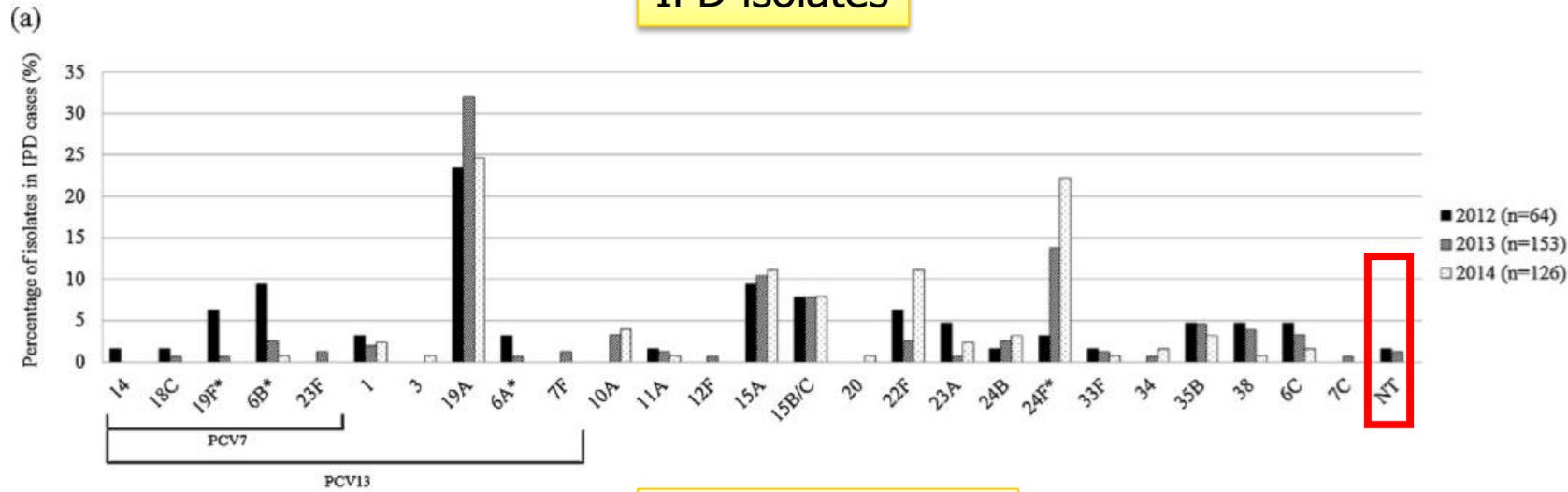
組み換えの起きる可能性？

健康小児・鼻咽頭からの肺炎球菌の 型別の検出率 (従来の方法+PCR)

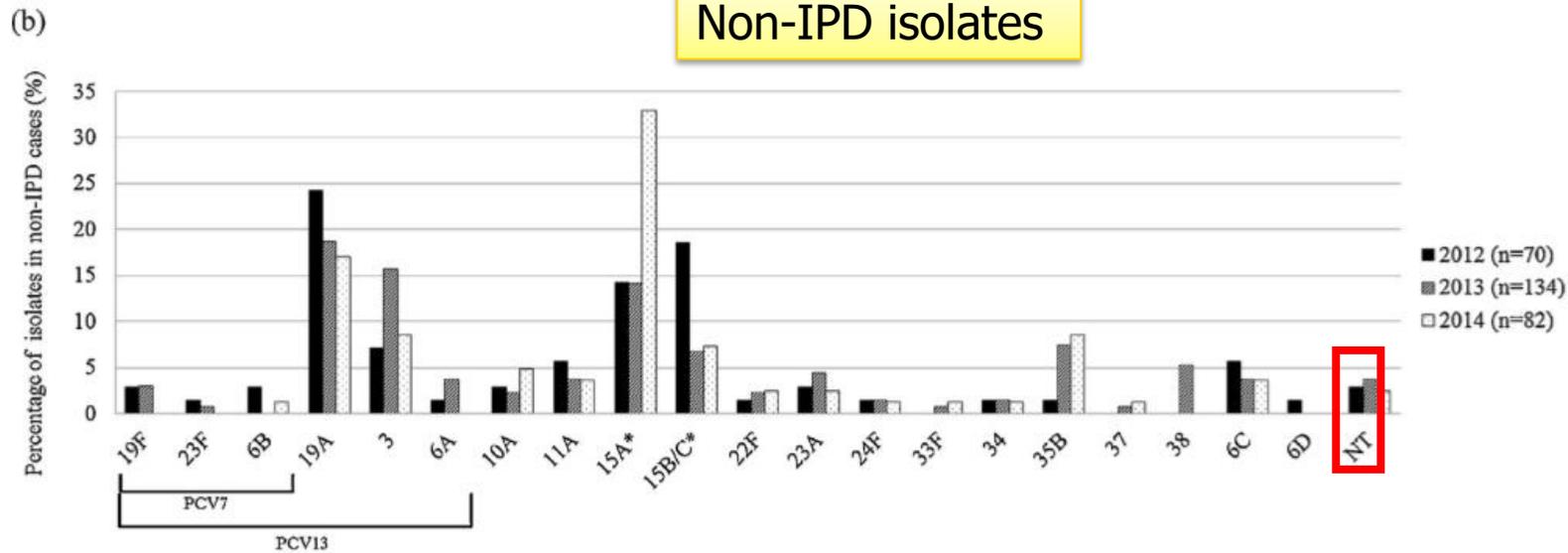
	保菌率	単一の型	複数の型
Pediatr Infect Dis J 2016;35:477-480	389/514 (75.7%)	297/514 (57.8%)	92/514 (17.9%)
BMC Infectious Diseases 2012; 12: 69	94/105 (89.5%)	53/105 (50.4%)	41/105 (39.1%)

健康保菌者は複数の莢膜型の肺炎球菌を保菌している。
→組み換えの起こる環境がある。

IPD isolates



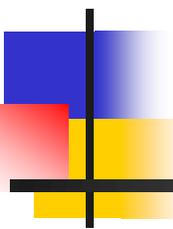
Non-IPD isolates



NT?

Non-typable (NT) Streptococcus pneumoniae

- NT はキャリアー、結膜炎患者、non IPVからの分離が多い。IPDでは稀(1%以下)。
- NT という名称は不適切
 - 莢膜は存在するが、今まで発見されなかった莢膜の可能性(98, 99,100・・・)
 - 別のStreptococcus: Streptococcus pseudopneumoniae, Streptococcus mitis
 - 真に莢膜が存在しない=真のNT
 - *cps*領域の完全または部分欠損:一番多い。(Group I) :IPDからの検体に多い
 - 別の表面蛋白を持つ。(Group II) : *cps* lociが他の遺伝子に置き換わり、莢膜に非依存性に生存。
 - NCC1: *pspK* gene (pneumococcal surface protein Korea, also referred to as *nspA*, non-typeable pneumococcal surface protein A)
 - NCC2: *aliC* (*aliB*-like ORF1)と*aliD* (*aliB*-like ORF2) genes
- 特徴
 - 上皮細胞への接着の上昇
 - バイオフィルム形成能の上昇
 - 形質変換による遺伝子導入の亢進
- 形質変換による遺伝子導入が亢進しているNT はrecombinant DNA の受け渡しの主な貯蔵場所となっている。



どのようにして組み換えが分かるのか？

MLST (Multi Locus Sequence Typing)解析

DATA ANALYSIS

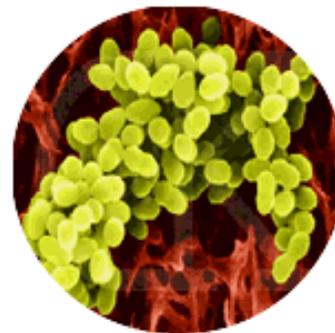
DATABASES

- B.burgdorferi*
- B.cereus*
- B.henselae*
- B.pseudomallei*
- C.albicans*
- C.glabrata*
- C.krusei*
- C.tropicalis*
- C.jejuni*
- C.neoformans var grubii*
- E.coli*
- E.faecalis*
- E.faecium*
- H.influenzae*
- H.pylori*
- Leptospira spp.*
- M.catarrhalis*
- N.meningitidis*
- S.agalactiae*
- S.aureus***
- S.dysgalactiae*
- S.enterica*
- S.epidermidis*
- S.pneumoniae*
- S.pyogenes*
- S.suis*
- V.vulnificus*

NEW - We are launching a BETA version of the *S. aureus* MLST site - [Click here](#)

Staphylococcus aureus

- Organism Specific Information**
- Concatenate Sequences**
- Download Alleles**
- Download ST's**
- Compare profile to reset**
- Draw tree using own MLST data**
- download as MS Excel
- download as MS Access
- eBURST V3
- MLST-Maps
- Contact Curator**



Profile Query

Please choose--- ▾

Locus Query

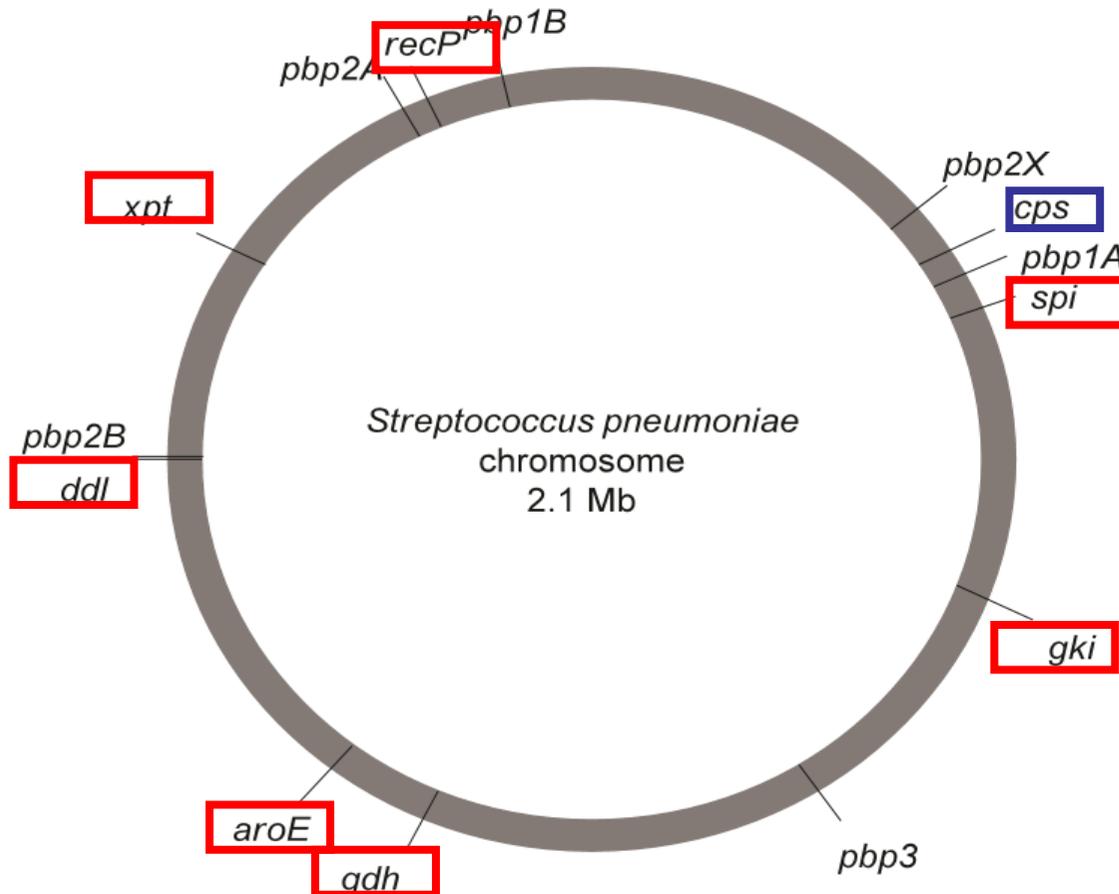
Please choose--- ▾

Batch Query

Please choose--- ▾

Please Note: The downstream trimming position used to define *gmk* alleles has changed slightly. [Click here](#) for further details

MLST (7種の遺伝子の塩基配列)



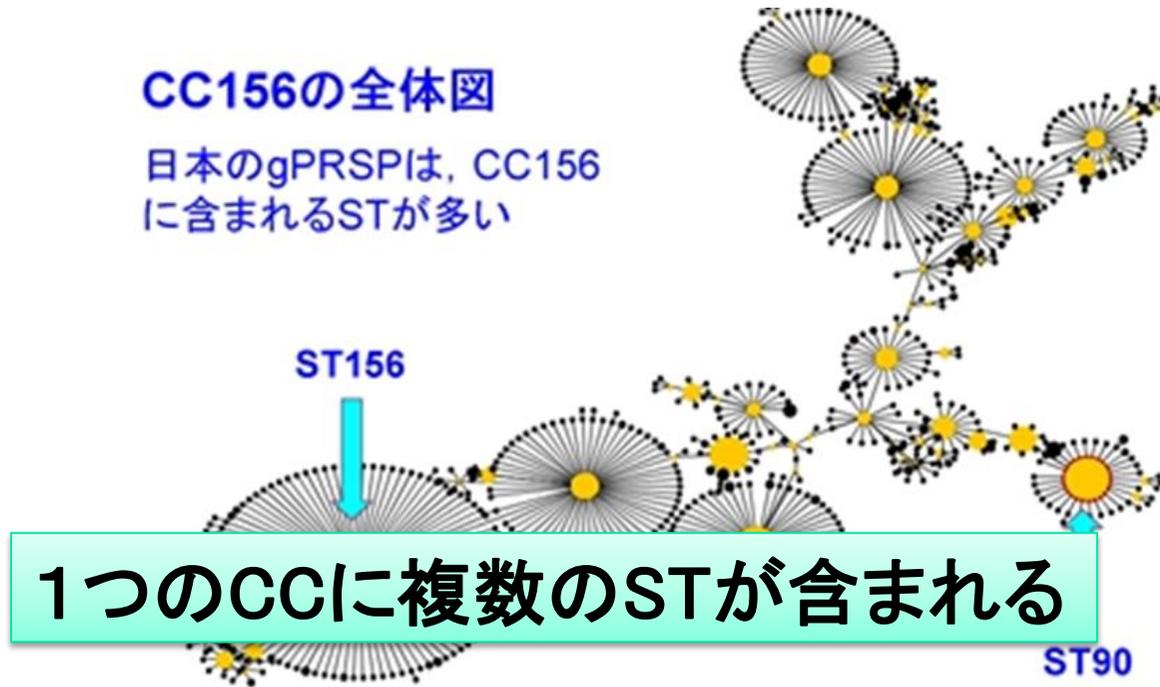
7種のHousekeeping gene

- *aroE* (shikimate dehydrogenase)
- *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase)
- *gki* (glucose kinase)
- *recP* (transketolase)
- *spi* (signal peptidase I)
- *xpt* (xanthine phosphoribosyltransferase)
- *ddl* (D-alanine-D-alanine ligase)

Sequence type (ST)とClonal complexe (CC)の関連

CC156の全体図

日本のgPRSPは、CC156
に含まれるSTが多い

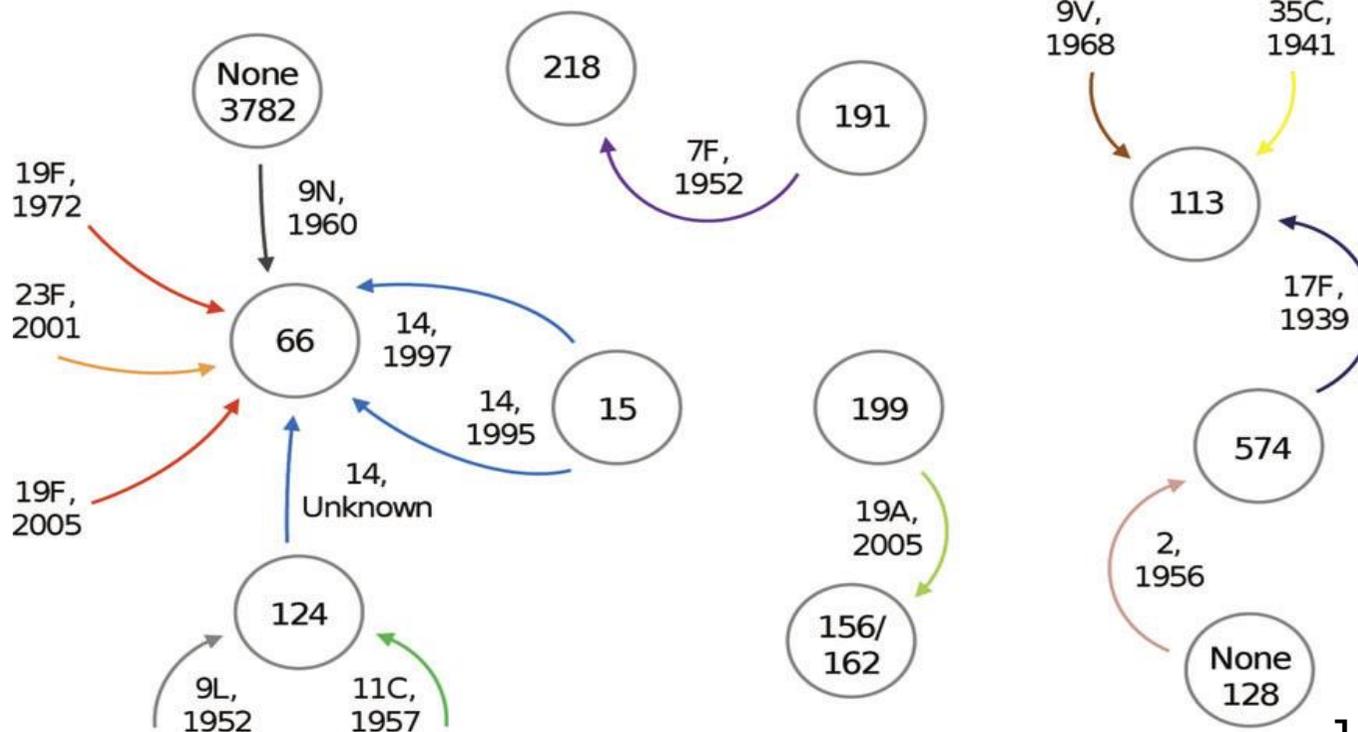


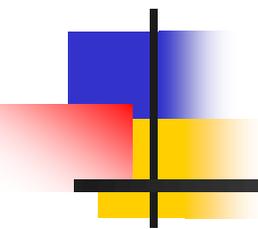
- ST (Sequence type) が同じなら、7個の遺伝子の塩基配列はすべて同じ。同一の菌。
- CC (Clonal complex) : 7個の遺伝子のうち5個が完全に同じ塩基配列である場合、近い関係にあると考えると同じクローン集団に属しているとされる。

Capsular switching

今後、増加していく可能性がある

- Circles: Clonal complex の番号
- Arrows: 同じClonal complexの中での cps loci の移動を表している



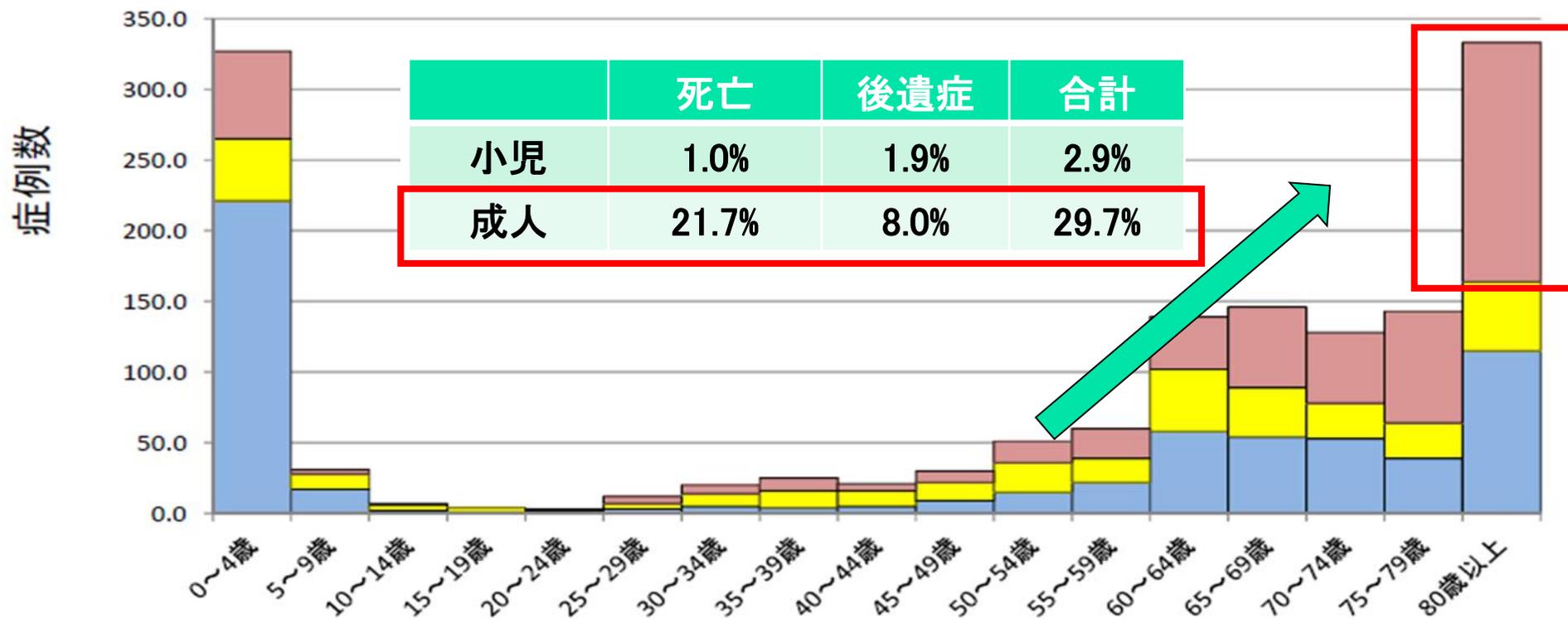


成人のIPD

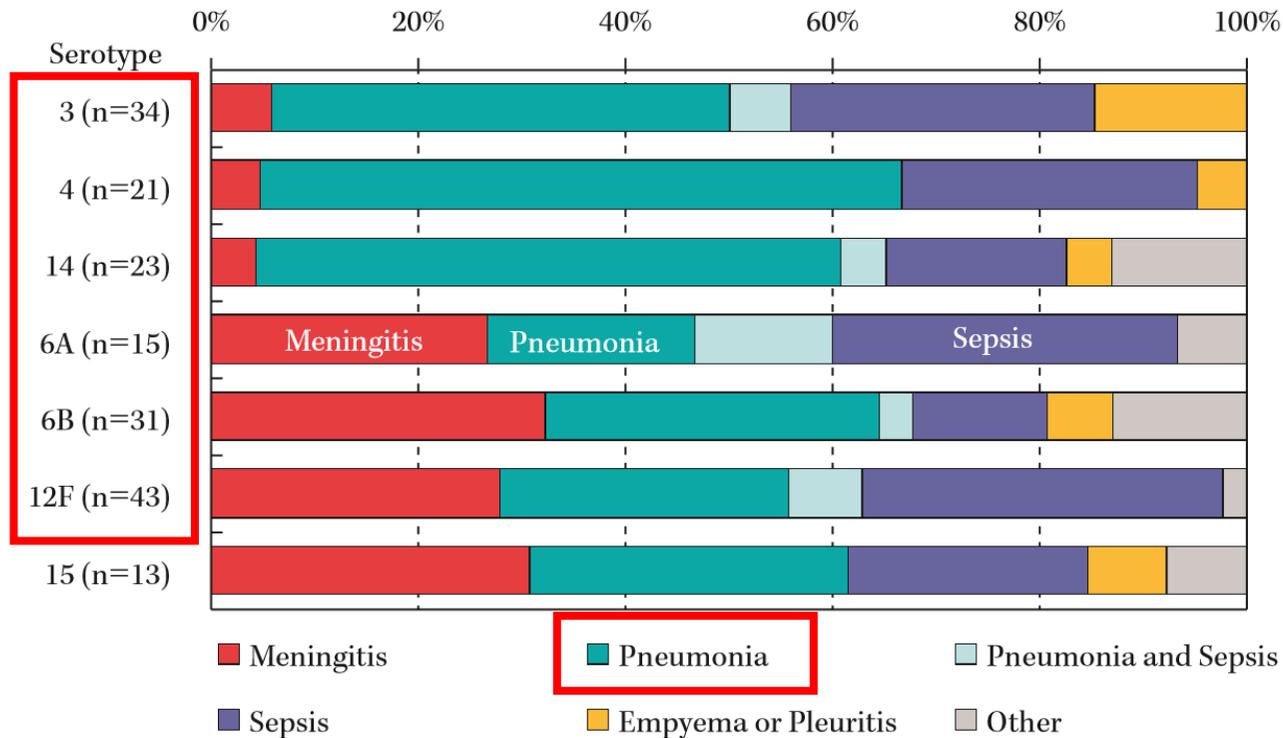
IPD発生状況(2013年4月～2014年3月)

病型別の症例数
(年齢階級別)

■ 菌血症 ■ 髄膜炎 ■ 肺炎



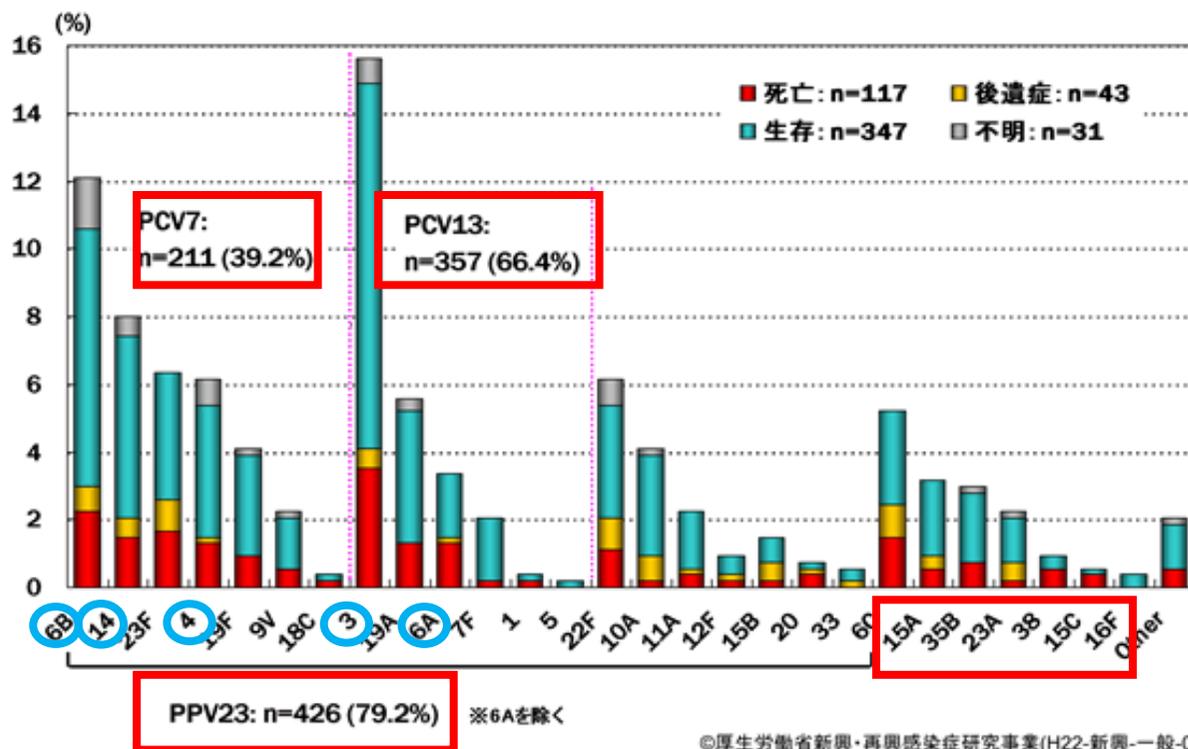
Relationship between pneumococcal capsular types and the diseases in adults



23価肺炎球菌ワクチンに含まれているが、免疫が十分でない。
→ PCV-13の必要性。

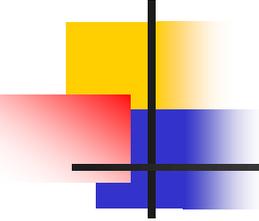
成人：ワクチンカバー率と莢膜型の関係

図-13. 莢膜型と症例の転帰の関係 (n=538)



- PPV23のカバー率は現在**79.2%**。
- PPV23に含まれない15A, 35B, 23A, 16F型の中に**gPRSP**が既に出現。
- PCV7のカバー率は**39.2%**, PCV13でも**66.4%**のカバー率。

成人のIPDに多いserotype 3, 4, 6A, 6B, 14はPCV13に含まれている



23価肺炎球菌ワクチンの臨床効果

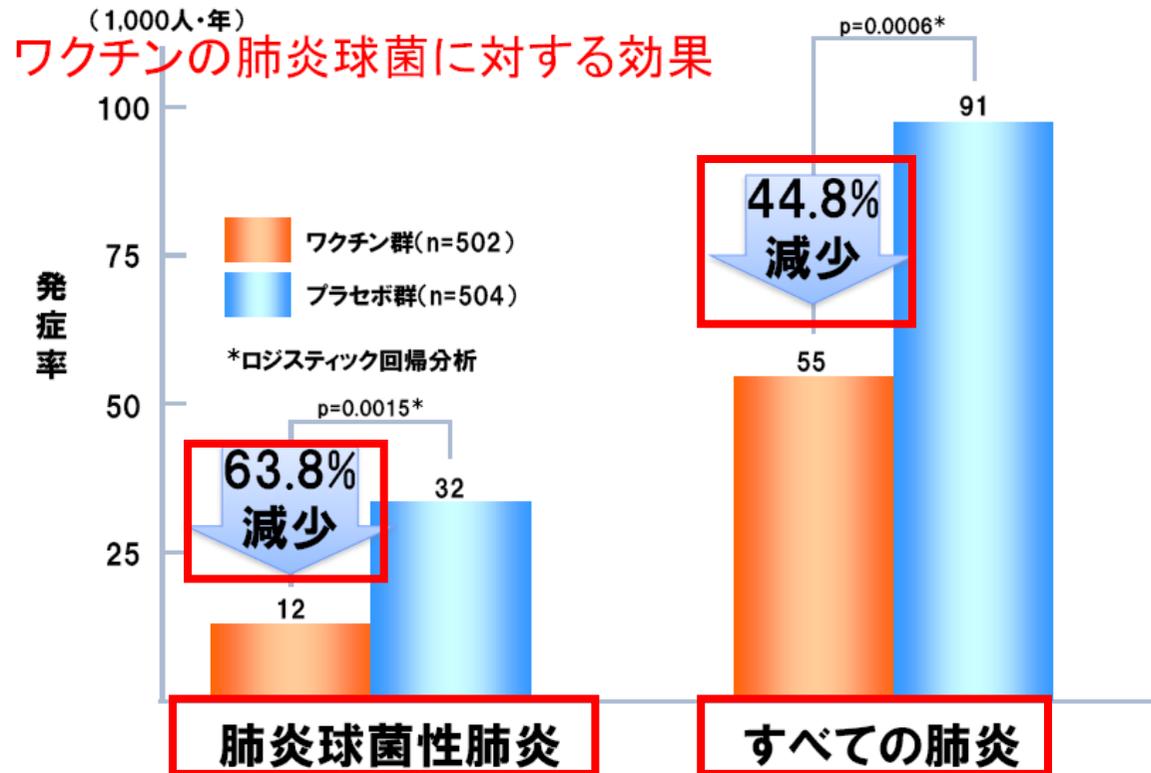
■ 肯定的

- Largest case-control study: 免疫不全のない高齢者においてワクチン血清型のIPDを予防する(Shapiro ED, et al. NEJM, 1991, Wkly Epidemiol Rec 83 : 373, 2008)
- 市中肺炎患者の重症度と死亡のリスクを軽減する。(Fisman DN, et al. CID,2006, Jhonstone J, et al. Arch Int Med,2007)
- わが国において、高齢者に対する23価肺炎球菌ワクチンの肺炎予防効果、医療費削減効果が明らかになった(Maruyama T et al. BMJ. 2010; 340: c1004, Kawakami K et al. Vaccine 2010 28:7063)

■ 否定的

- 成人における全ての肺炎に対する効果が5つの無作為比較試験で検討されたが、いずれの試験でも有意な肺炎リスクの低下はみられていない。(Jackson LA, et al. CID, 2008)

高齢者施設の入所者に対する23価肺炎球菌ワクチンの効果 ～わが国におけるエビデンス～



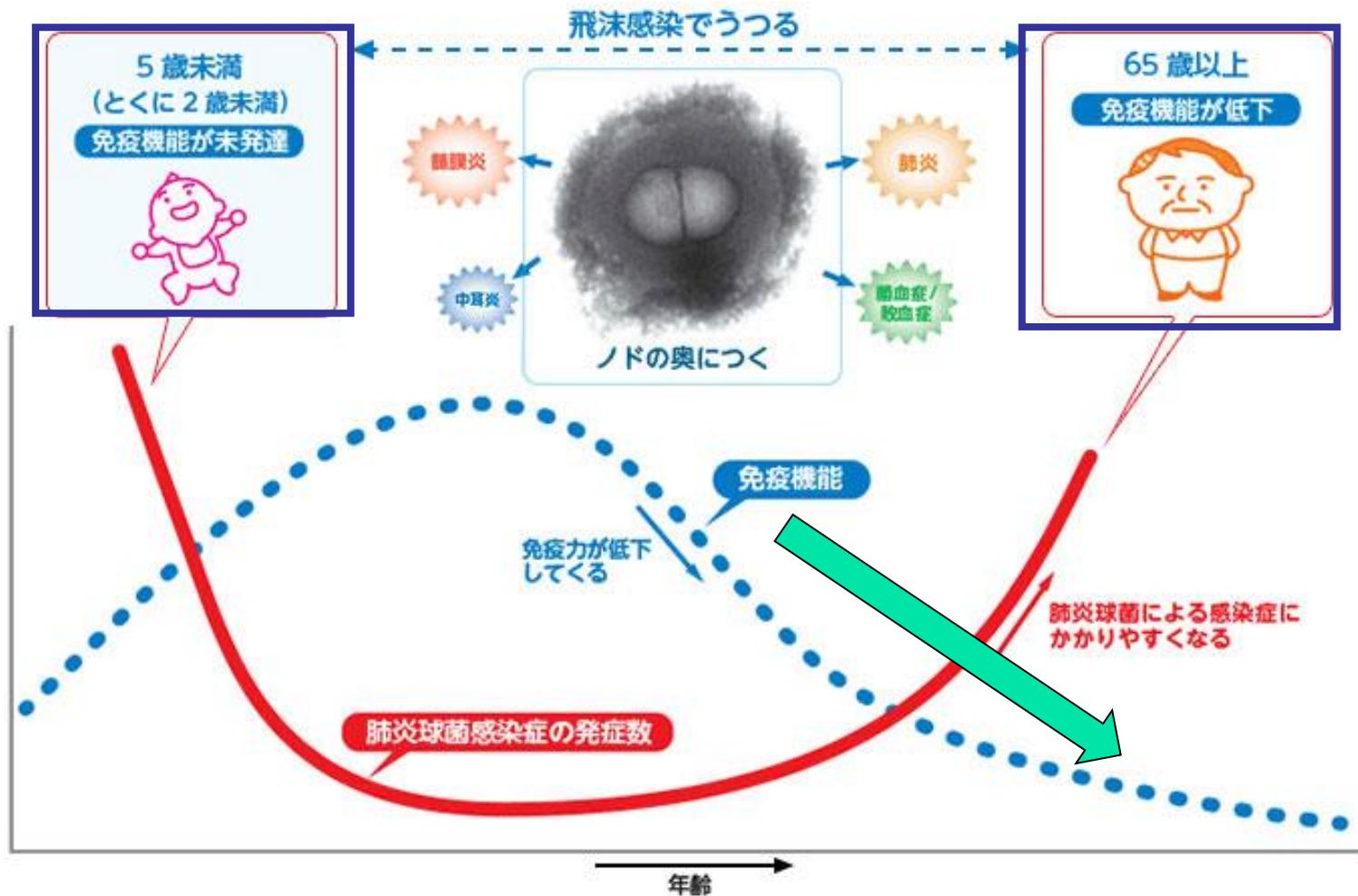
【試験デザイン】多施設二重盲検無作為化プラセボ対照試験

【対象】国内高齢者施設に入所中の高齢者 1,006人 / 試験期間:2006年3月～2009年3月

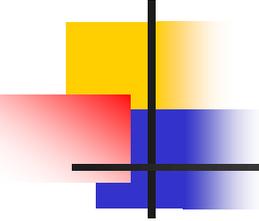
【方法】23価肺炎球菌多糖体ワクチンまたはプラセボを接種後、肺炎球菌性肺炎の発症、すべての肺炎の発症、肺炎球菌性肺炎による死亡率などについて検討

Maruyama T et al. *BMJ*. 2010; 340: c1004.

65歳以上での免疫力低下



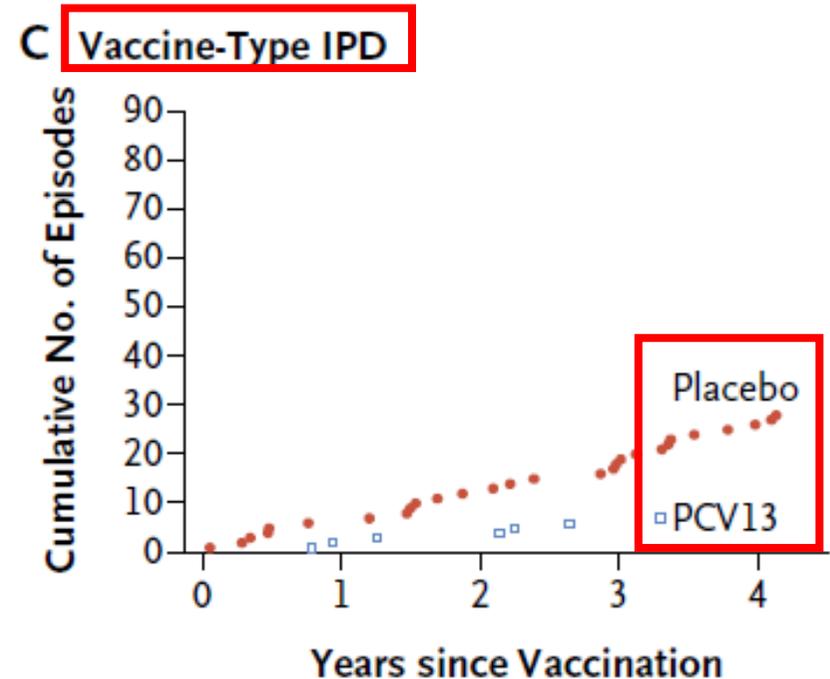
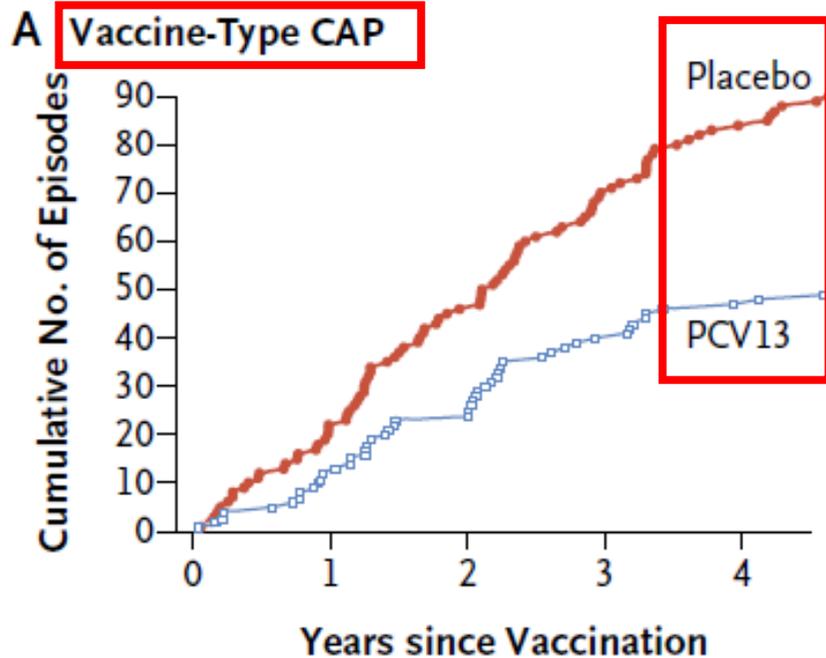
(イメージ図)



プレベナー13®の各国における位置づけ

- CDCの予防接種の実施に関する諮問委員会(ACIP)は、2012年に**免疫不全状態にある19歳以上の成人**に対して、PCV13とPPV23の両方の接種を推奨した。(MMWR 2012; 61: 816-9)
- ACIPは、2014年に、**65歳以上の高齢者**に対してPPV23とPCV13、両方のワクチンを接種することを推奨した。(MMWR 2014; 63: 822-5)
- オランダで2008年から2013年にかけて行われた**CAPiTA trial**では、65歳以上の85000人の免疫正常な**65歳以上の成人**を対象にPCV13を接種し、ワクチン血清型において**46%のEfficacy**を認めたと報告されている。(Community acquired pneumonia immunization trial in adults (CAPiTA). Pneumonia 2014; 3:95)

Polysaccharide Conjugate Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults (65 years of age or older)

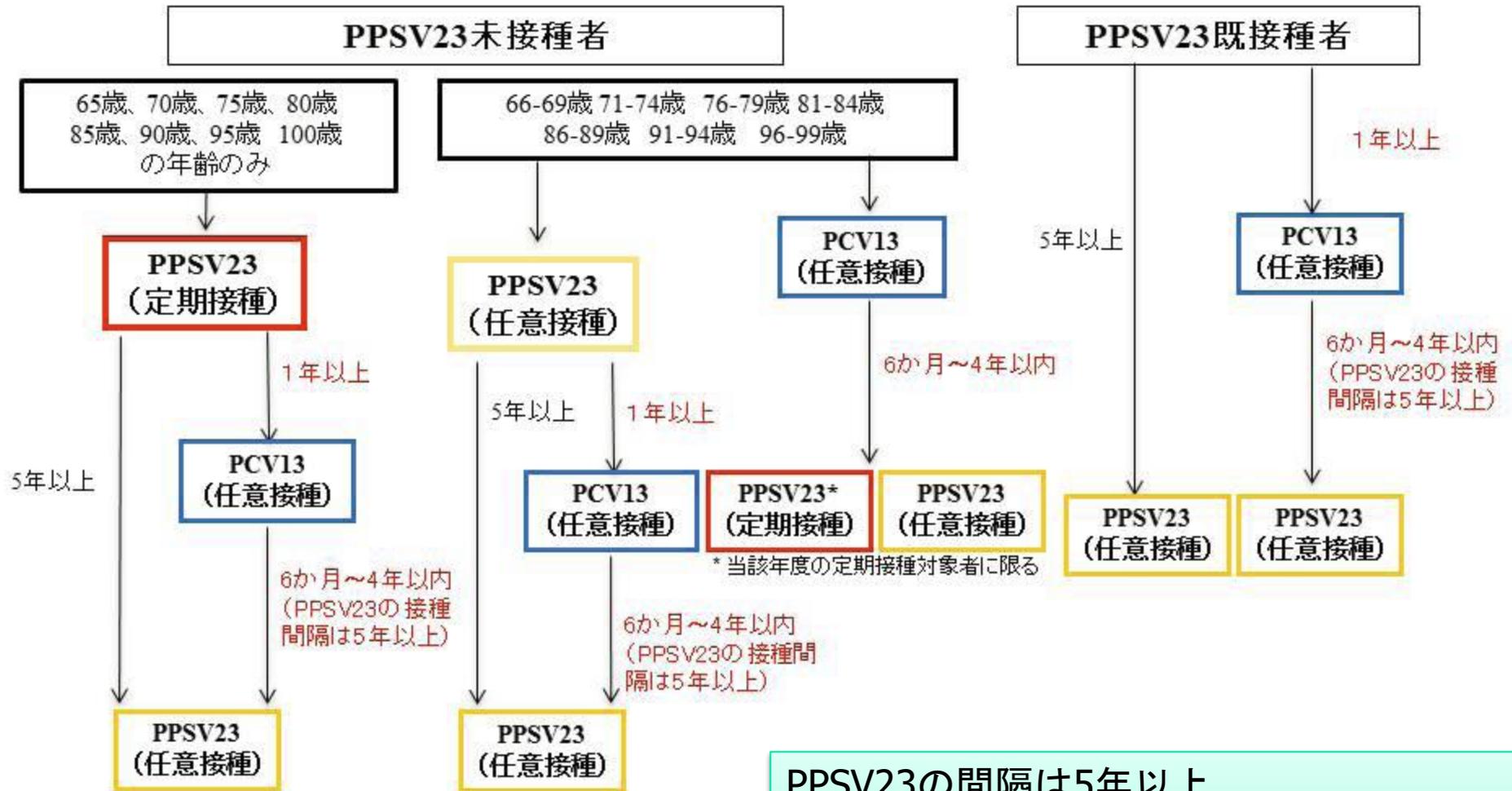


- (Funded by Pfizer; CAPITA Clinical Trials.gov number NCT00744263.)
- **PCV13 Group: (N = 42,237)**
- **Placebo Group: (N = 42,255)**

成人における肺炎球菌ワクチン接種 (主要先進国における推奨)

国・機関	推奨対象	推奨ワクチン
アメリカ合衆国 ACIP(2012) ACIP(2014)	65歳以上の全ての者	PCV13 + PPV23
	慢性疾患を持つ者	PPV23
	免疫不全状態にある者	PCV13 + PPV23
イギリス JCVI(2013)	65歳以上の全ての者	PPV23
	慢性疾患を持つ成人	PPV23
	免疫不全状態にある者	PCV13 + PPV23
ドイツ STIKO(2013)	60歳以上の全ての者	PPV23
オーストラリア ATAGI(2013)	先住民以外の成人(65歳以上) 先住民である成人(50歳以上)	PPV23 PPV23
	慢性疾患を持つ者	PPV23
	免疫不全状態にある者	PCV13 + PPV23
カナダ NACI(2013)	65歳以上の全ての者	PPV23
	慢性疾患を持つ者	PPV23
	免疫不全状態にある者	PCV13 + PPV23

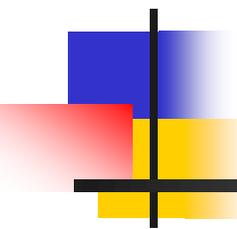
図2. 平成27～30年度の接種について



注意

- #1. 今回の考え方はPPSV23の定期接種措置と米国ACIPの推奨を参考に作成された。
- #2. 定期接種対象者が、定期接種によるPPSV23の接種を受けられるように接種スケジュールを調整する。
- #3. PPSV23未接種者に対して両ワクチンを接種する場合には、上記#2を勘案しつつ、接種スケジュールを調整する。
- #4. PCV13とPPSV23の連続接種については海外のデータに基づいており、日本人を対象とした有効性、安全性の検討はなされていない。
- #5. 定期接種は平成26年10月～平成31年3月までの経過措置に準ずる。
- #6. 今回の考え方は3年以内に見直しをする。

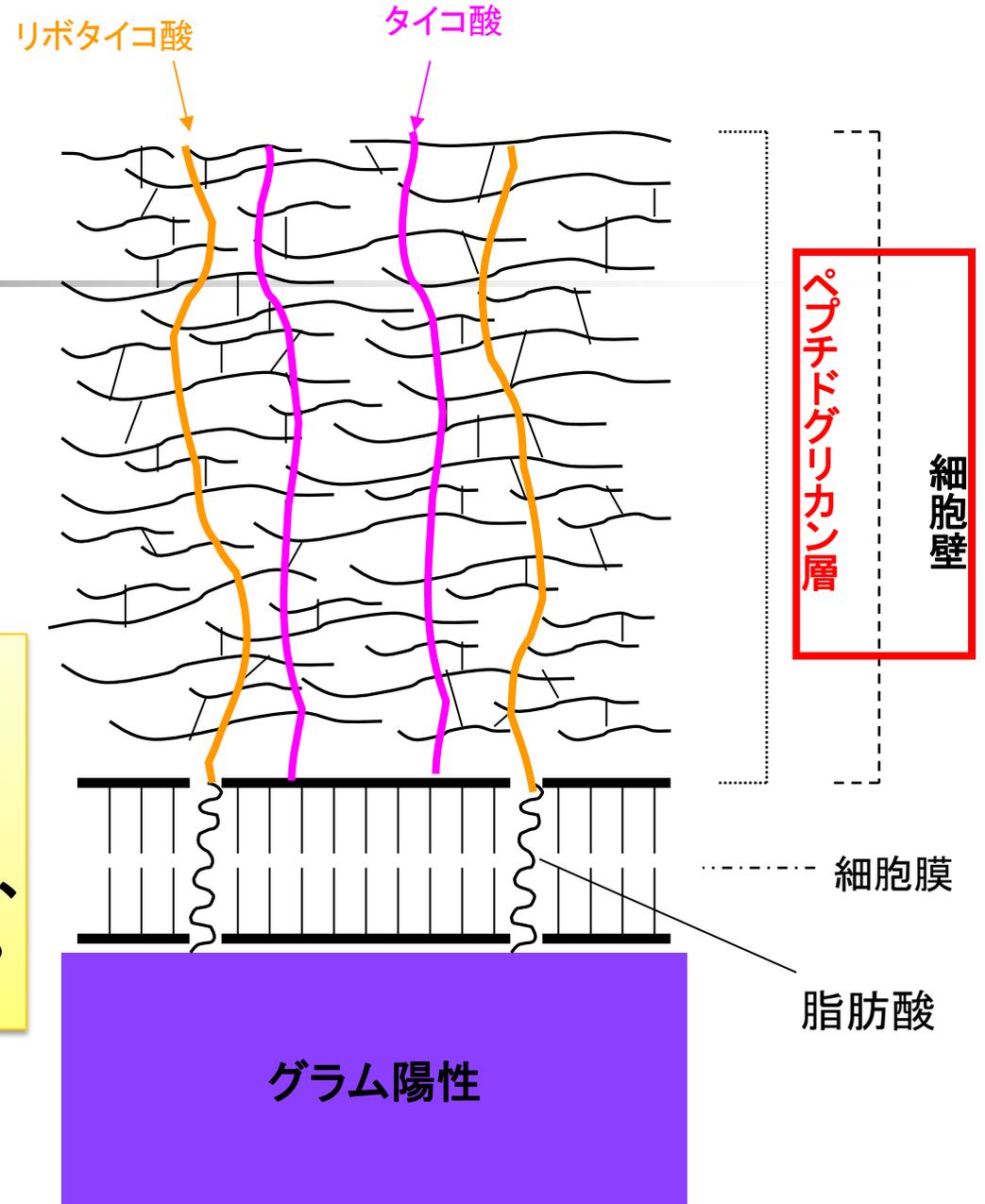
PPSV23の間隔は5年以上
 PPSV23とPCV13の間隔は1年以上
 PCV13とPPSV23の間隔は6か月～4年
 PCV13の接種がPPSV23接種より早い方がよい



藥劑耐性

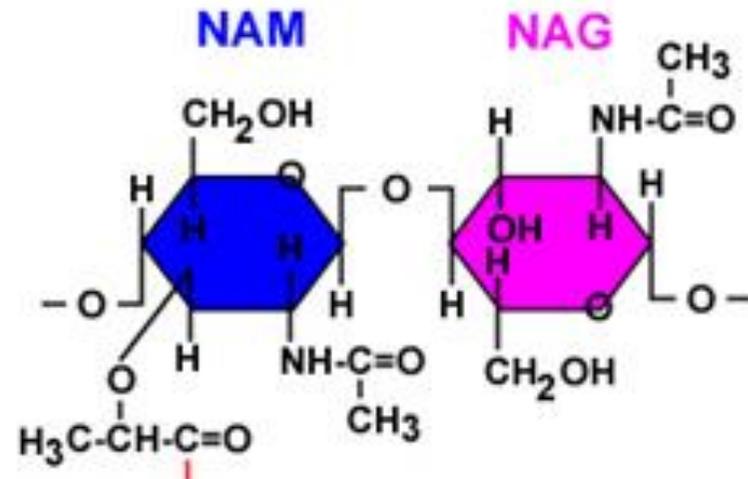
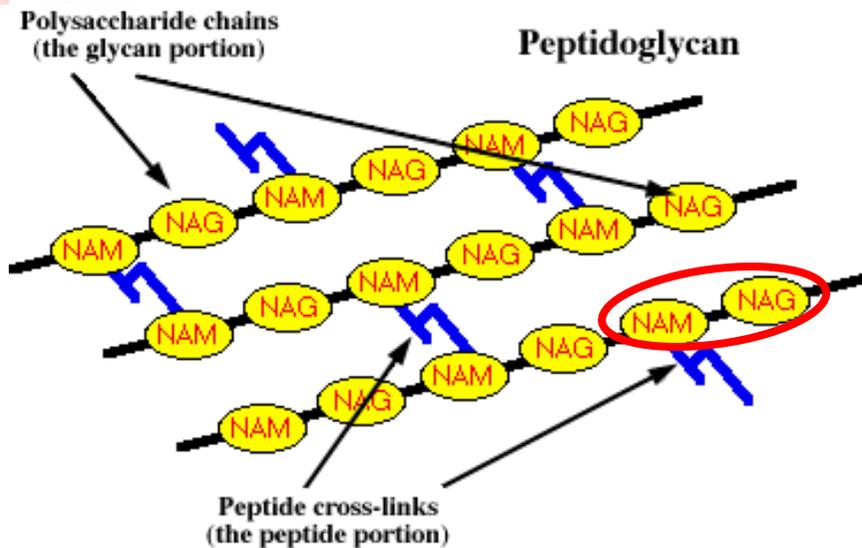
肺炎球菌

- グラム陽性菌の細胞壁は、厚いペプチドグリカン層から構成されているので、アセトンなどで処理でも、細胞質内部の色素の漏出が少なく、脱色されないまま紫の色素が残る。



ペプチドグリカンの構造-1

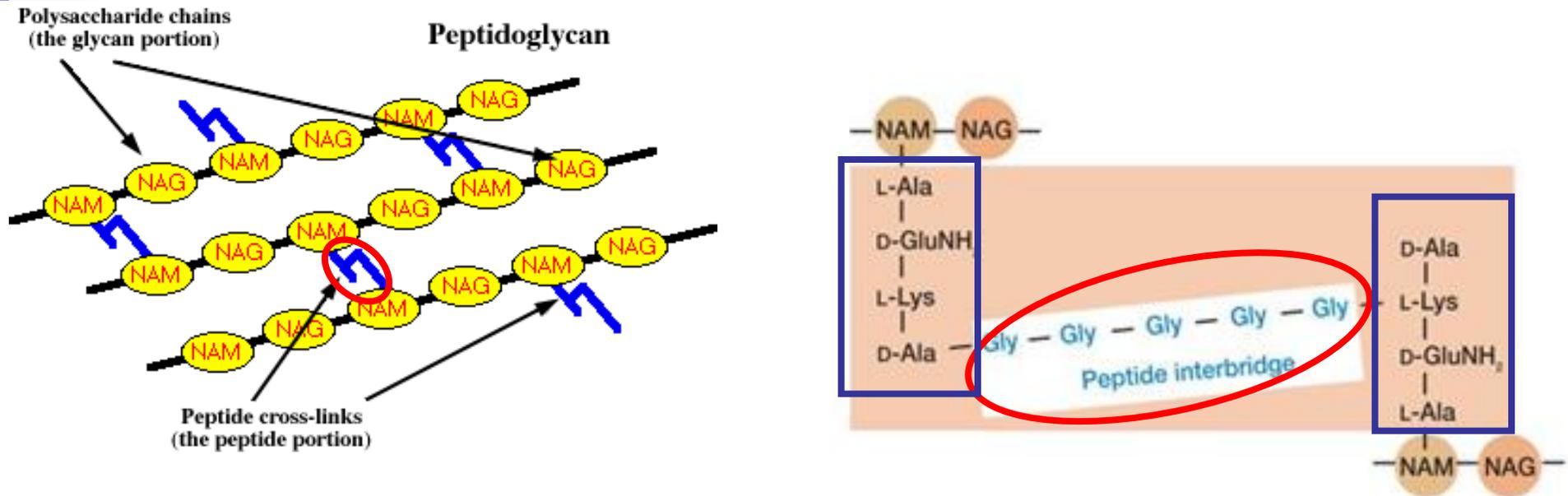
多糖グリカン鎖



- ペプチドグリカンには**多糖グリカン鎖**を縦糸に、**ペプチド**の側鎖を横糸にして、格子状に織り上げた布のような三次元的な網目構造をしている。
- **多糖グリカン鎖**
 - N-acetylmuramic acid (NAM)
 - N-acetylglucosamine (NAG)
 - NAMとNAGがβ-1-4結合した交互ポリマー

ペプチドグリカンの構造-2

ペプチド



- ペプチド
 - 4コのテトラペプチド
 - 5コのグリシン: ペンタグリシン

ペプチドグリカンの合成

L-アラニン(Ala)- D-グルタミン酸(Glu)-L-リシン(Lys)- D-Ala

テトラペプチド

ペンタグリシン

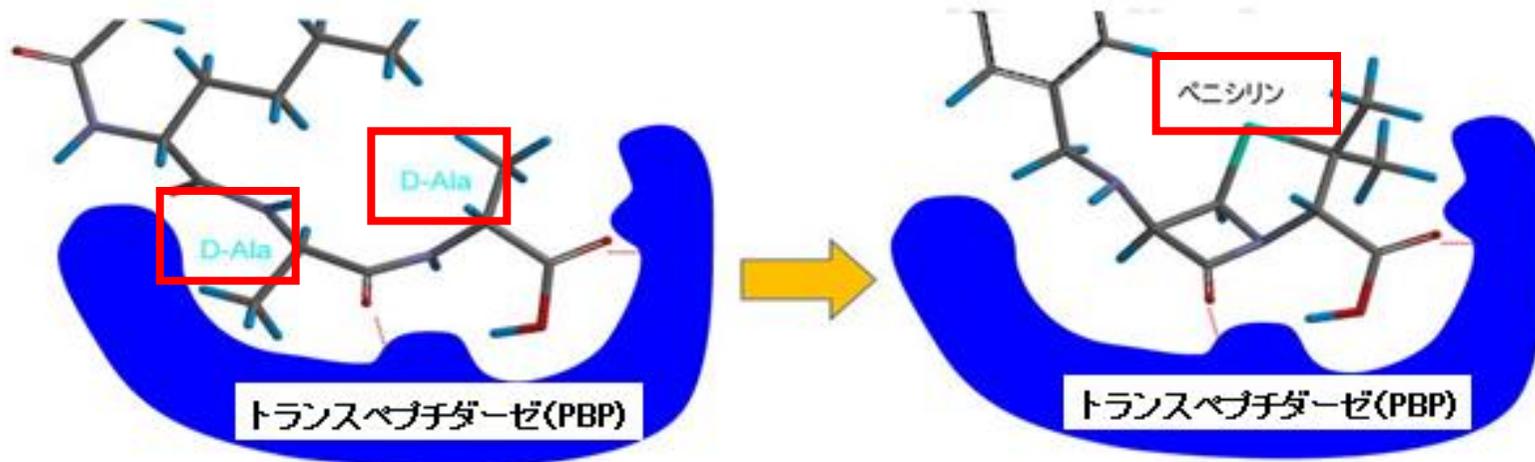
- ①の反応: アミノ酸を結合する酵素が、**トランスペプチダーゼ**
- ②の反応: 末端のD-Alaを切り離す酵素が**Dアラニン・カルボキシペプチダーゼ**
- ③の反応: NAGとNAMの糖の結合をする酵素が**トランスグリコシラーゼ**
- Penicillinは、① ②の両酵素を阻害するが、①の酵素阻害が、抗菌作用に重要である。

細胞壁合成酵素(ペプチドグリカン架橋酵素)

=ペニシリン結合タンパク質 Penicillin-Binding Protein (PBP)

ペニシリン結合タンパク質 Penicillin-Binding Protein (PBP) = 細胞壁合成酵素(ペプチドグリカン架橋酵素)

- 細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンの合成酵素群。
- β ラクタム系抗菌薬と結合すると酵素機能が阻害される。



- ペニシリンの構造はペントペプチド末端のD-Ala-D-Alaという部分構造に類似
- トランスペプチダーゼ(PBP)はペニシリンを間違えて取り込みペプチドグリカンの合成を抑制

ペニシリン耐性肺炎球菌 2013-感染症Today

分離年別耐性菌の割合 (%)



- PSSP: ペニシリン感受性肺炎球菌 (Penicillin susceptible Streptococcus pneumoniae)

- ペニシリンGに対する菌の最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration)

MIC \leq 0.06 μ g/mL

- PISP: ペニシリン中等度耐性肺炎球菌 (Penicillin intermediate resistant Streptococcus pneumoniae)

- MIC 0.12 ~ 1 μ g/mL

- PRSP: ペニシリン耐性肺炎球菌 (Penicillin resistant Streptococcus pneumoniae)

- MIC \geq 2 μ g/mL

PRSP減少傾向

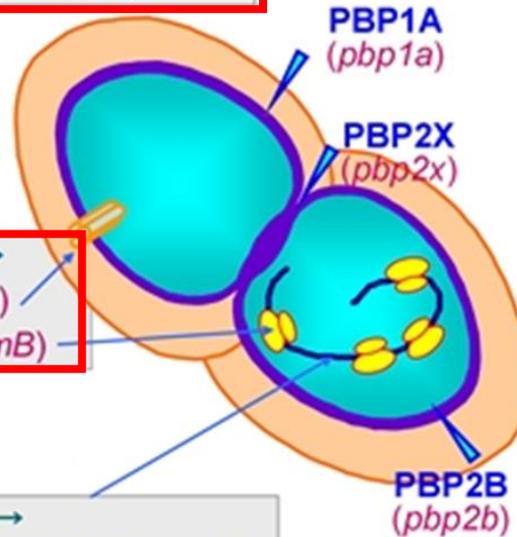
- 耐性に関わる主な PBP はPBP1A、PBP2X、PBP2Bの3種類。

肺炎球菌の主な薬剤に対する耐性化

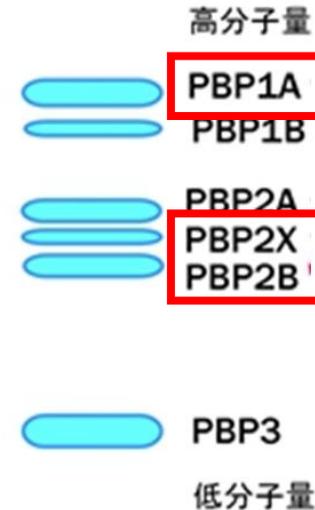
β-ラクタム薬耐性 → 細胞壁合酵素 (PBP) をコードする遺伝子の変異

マクロライド高度耐性 →
薬剤排出タンパク (*mefA*)
リボソーム修飾酵素 (*ermB*)

ニューキノロン薬耐性 →
DNA合成酵素をコードする遺伝子の変異



PBPの電気泳動



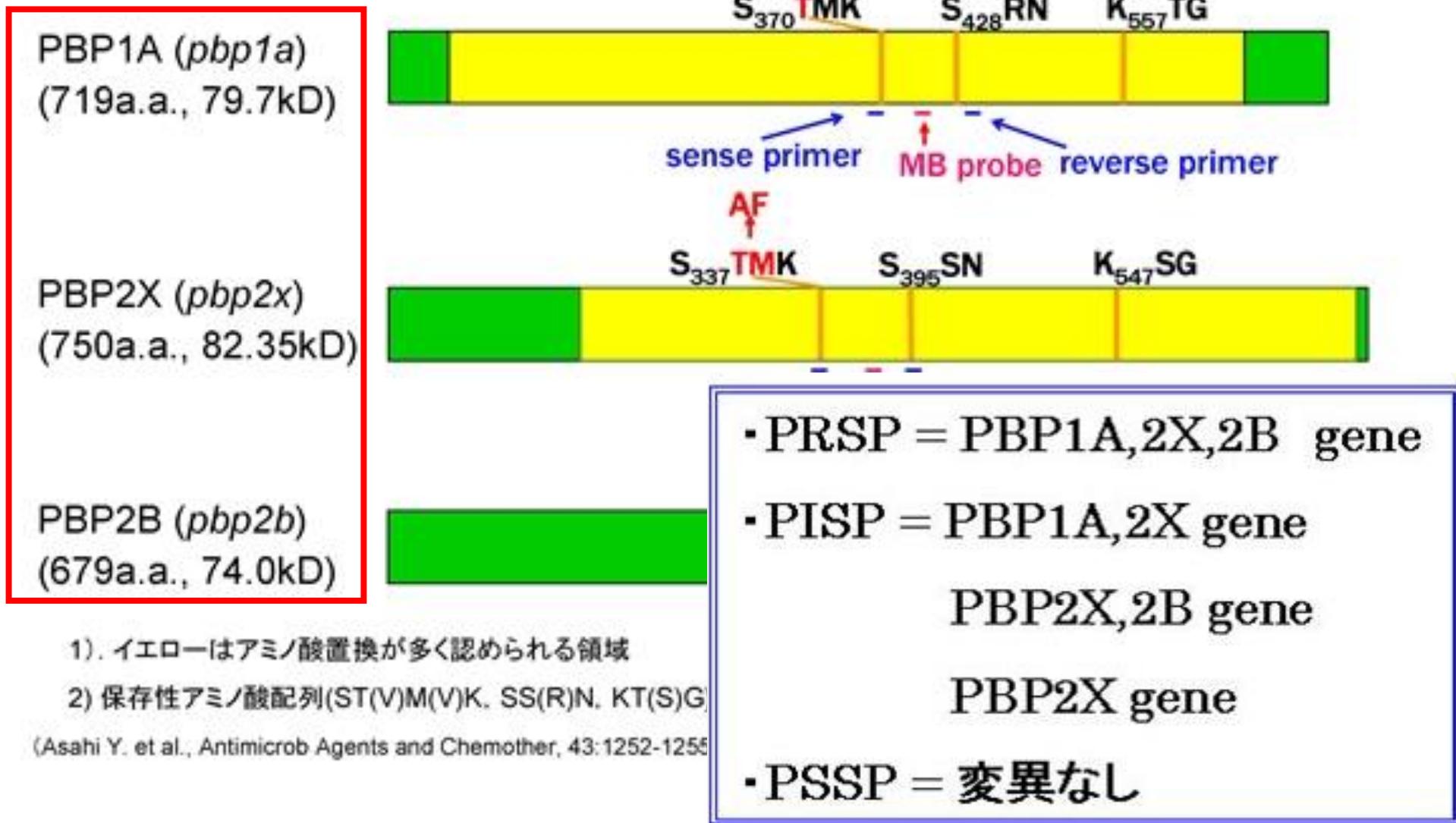
注: 赤の()内はコードする遺伝子を表す

©厚生労働省新興・再興感染症研究事業(H22-新興-一般-013).

95%はマクロライド耐性
マクロライドの併用: バイオフィルム抑制

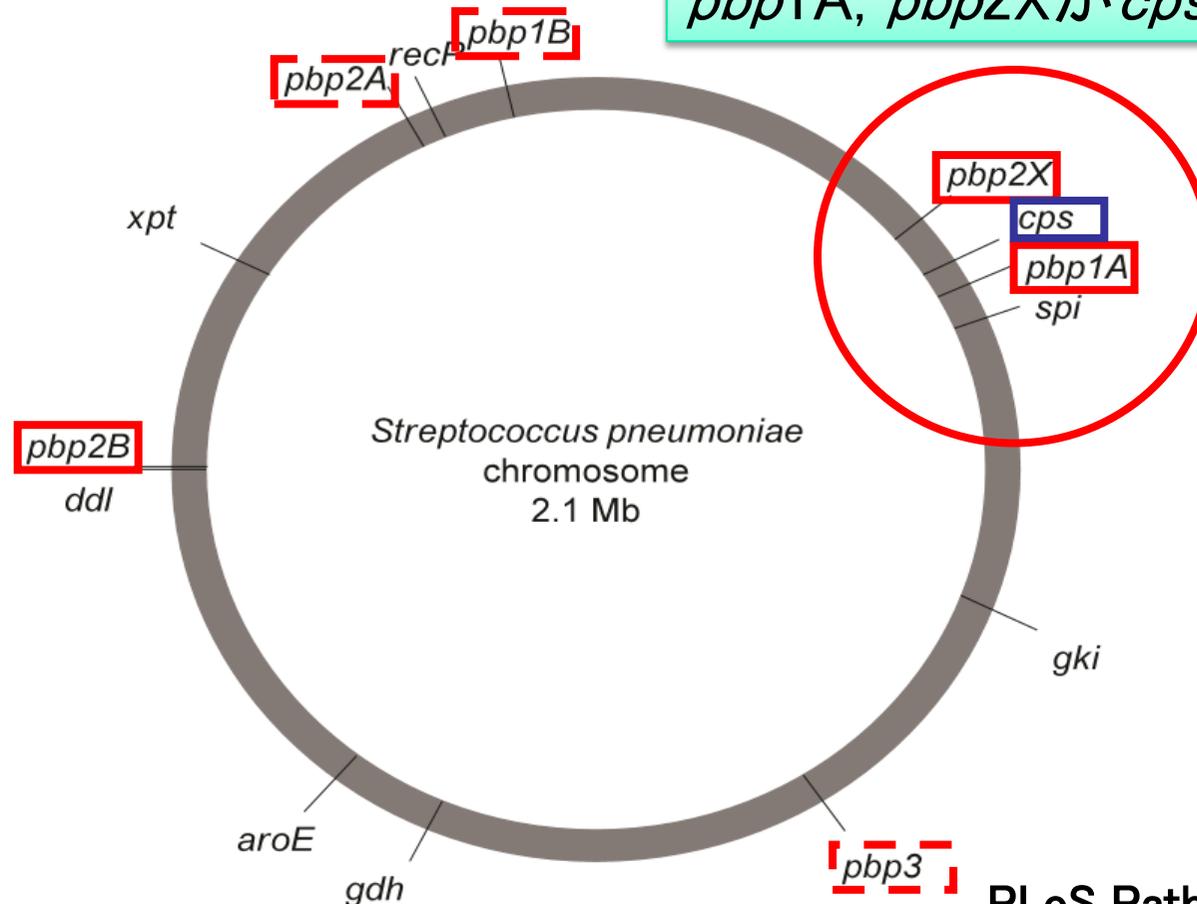
肺炎球菌: βラクタマーゼ(-)、PBPの変異で耐性化
インフルエンザ菌: βラクタマーゼ数%(+)
(BLPAR、BLPACR)

図-19. ペニシリン耐性肺炎球菌の細胞壁合成酵素(PBP)にみられるアミノ酸置換の多様性

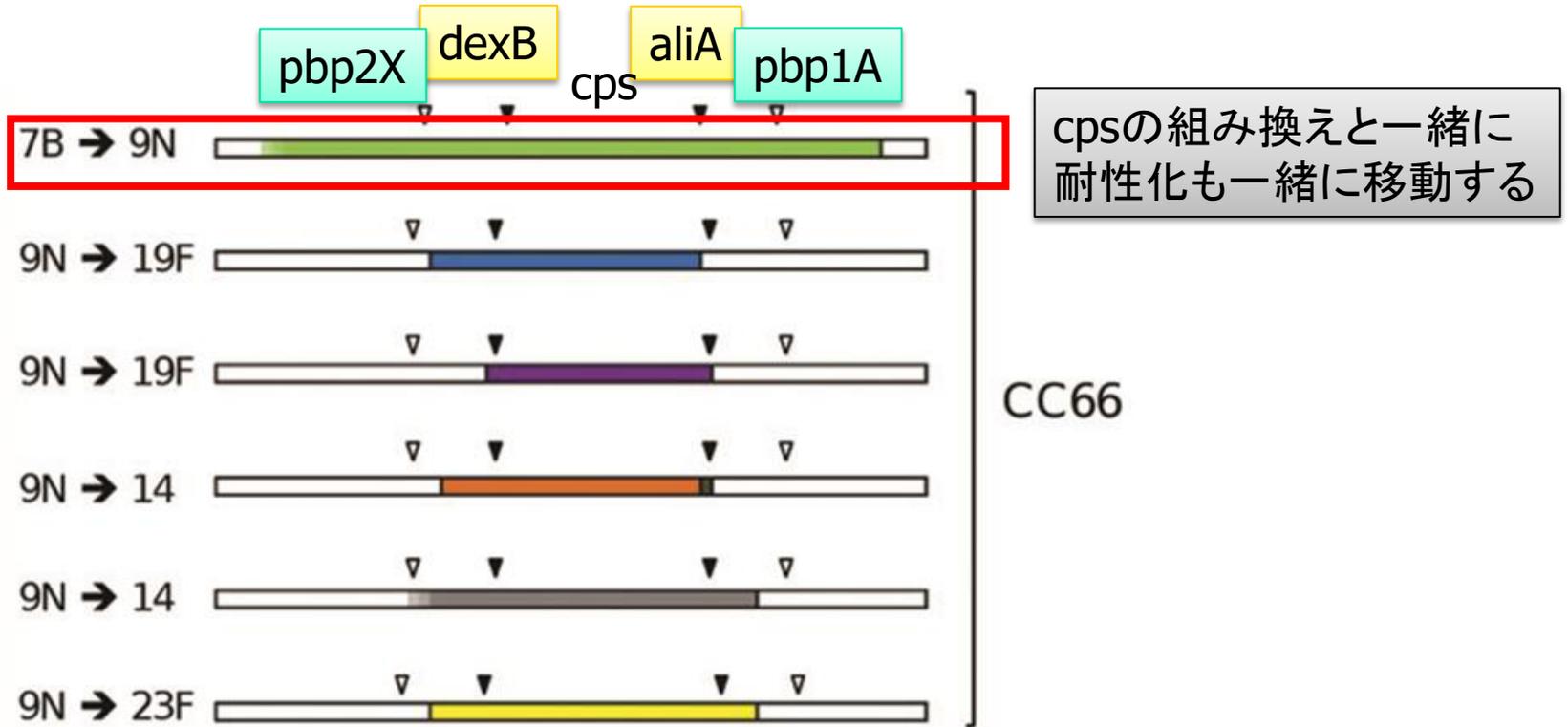


Penicillin binding protein gene (*pbp*)

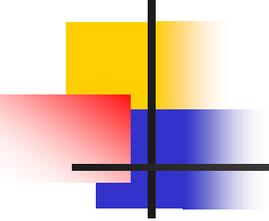
pbp1A, *pbp2X*が*cps*の近くに存在



Genetic changes leading to capsular switching within clonal complex (CC) 66



coloring: 組み換えの遺伝子.



PCV-7, -13の効果のまとめ

- 健康保菌者
 - ワクチン株が減少し、一時的に保菌率は減少。
 - 非ワクチン株が増加し、保菌率は元にもどった。
- IPD
 - ワクチン株によるIPDは減少。
 - 非ワクチン株によるIPDが増加し、IPDの減少は頭打ち。
 - ワクチン株は、非ワクチン株の薬剤耐性より高かったため、薬剤耐性率は減少。
(但し、一時的かも? : 非ワクチン株の耐性化率が上昇してきている)
- 肺炎
 - 肺炎による入院は減少。
 - この減少は、ワクチンというよりオラペネム、オゼックスによる。
- 中耳炎
 - 重症(鼓膜切開、チューブ留置)は減少

肺炎球菌の生き残り戦略

Drug pressure

Immunological (vaccine) pressure

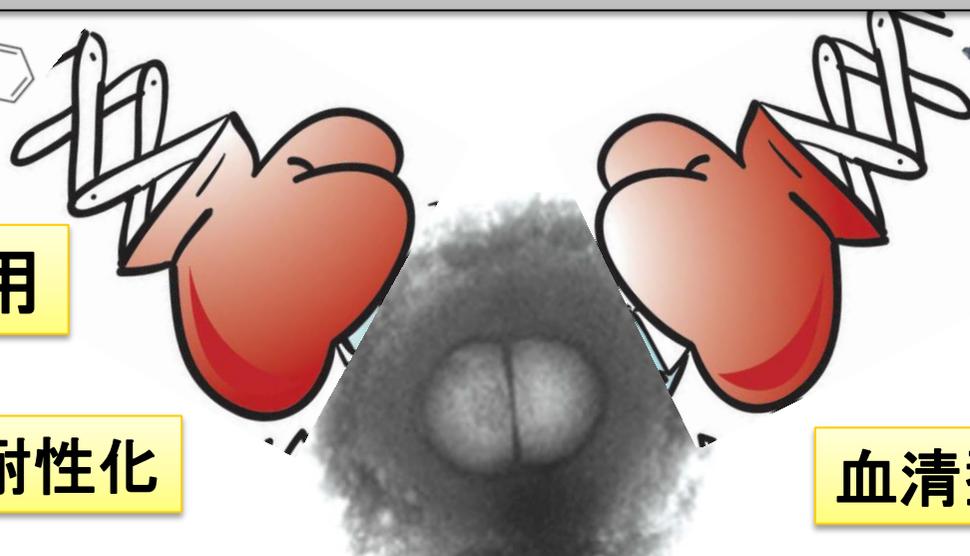
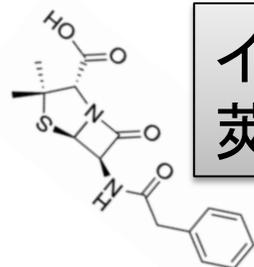
インフルエンザワクチンのように
莢膜株の追加と地域、年による選択？

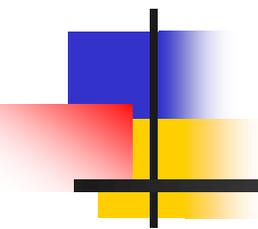
抗菌薬の適正使用

耐性化

血清型置換

薬剤耐性の非ワクチン株が生き残る





マイコプラズマ肺炎

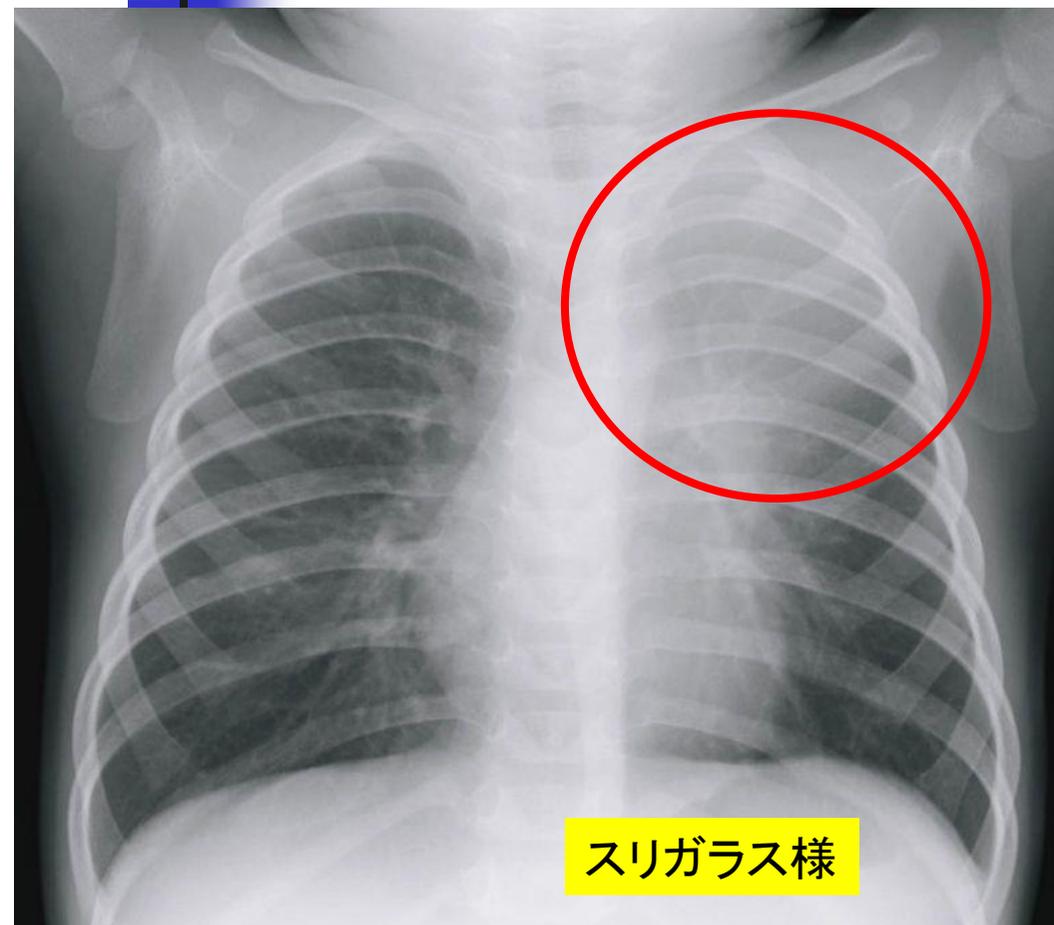
マイコプラズマ感染症

上気道炎

気管支炎

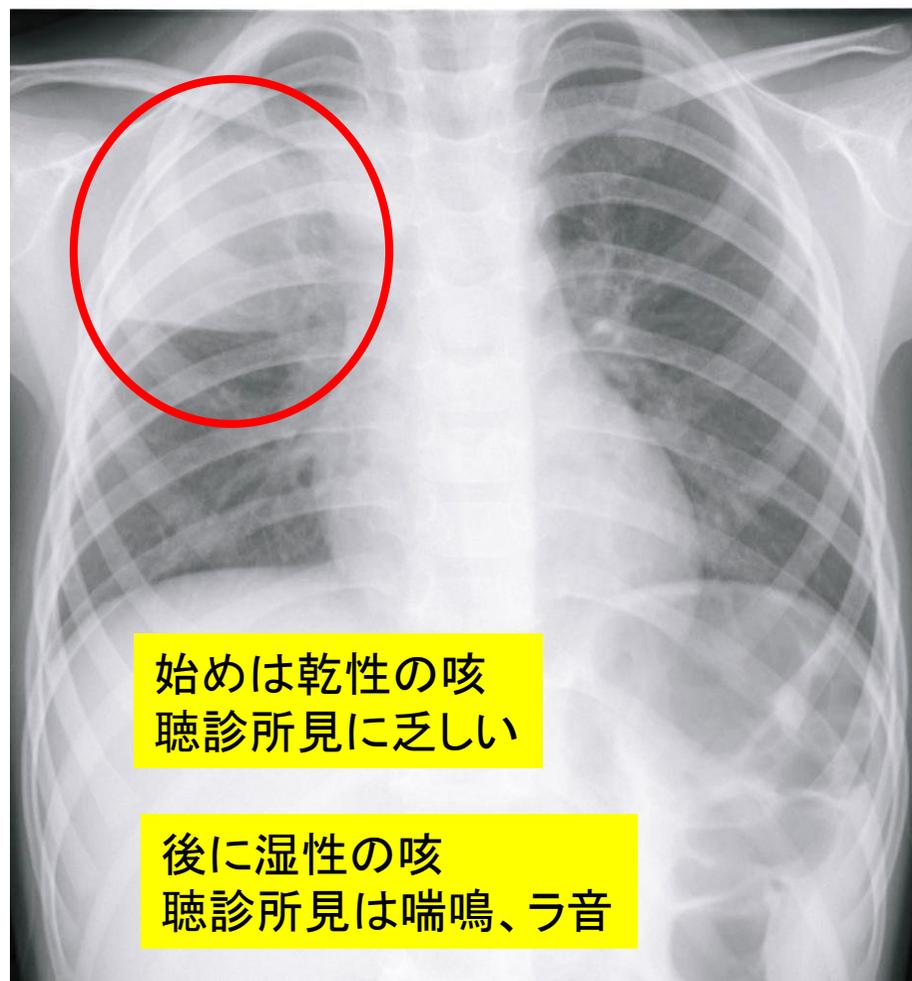
肺炎

マイコプラズマ肺炎



スリガラス様

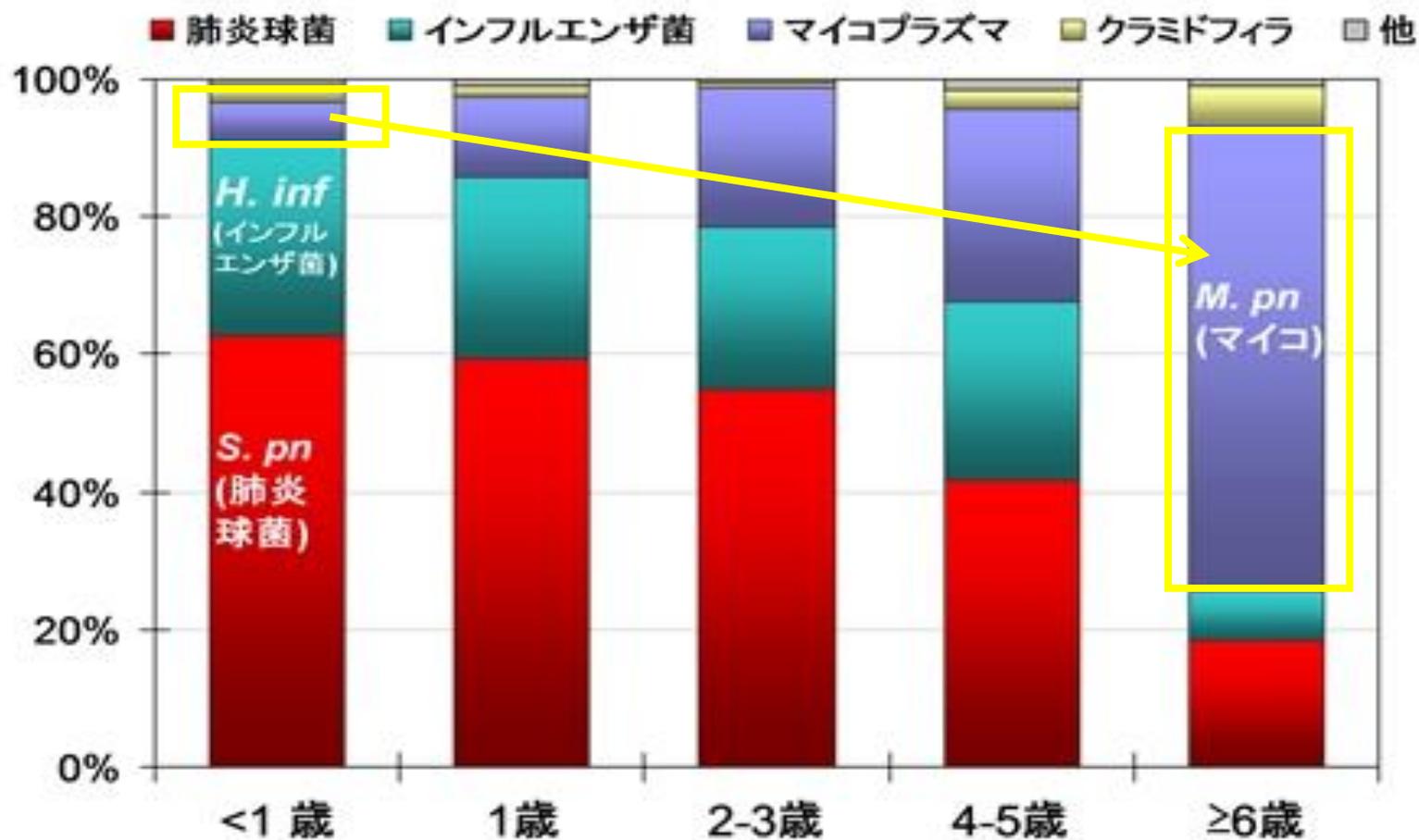
血液所見は強い炎症反応を示さない



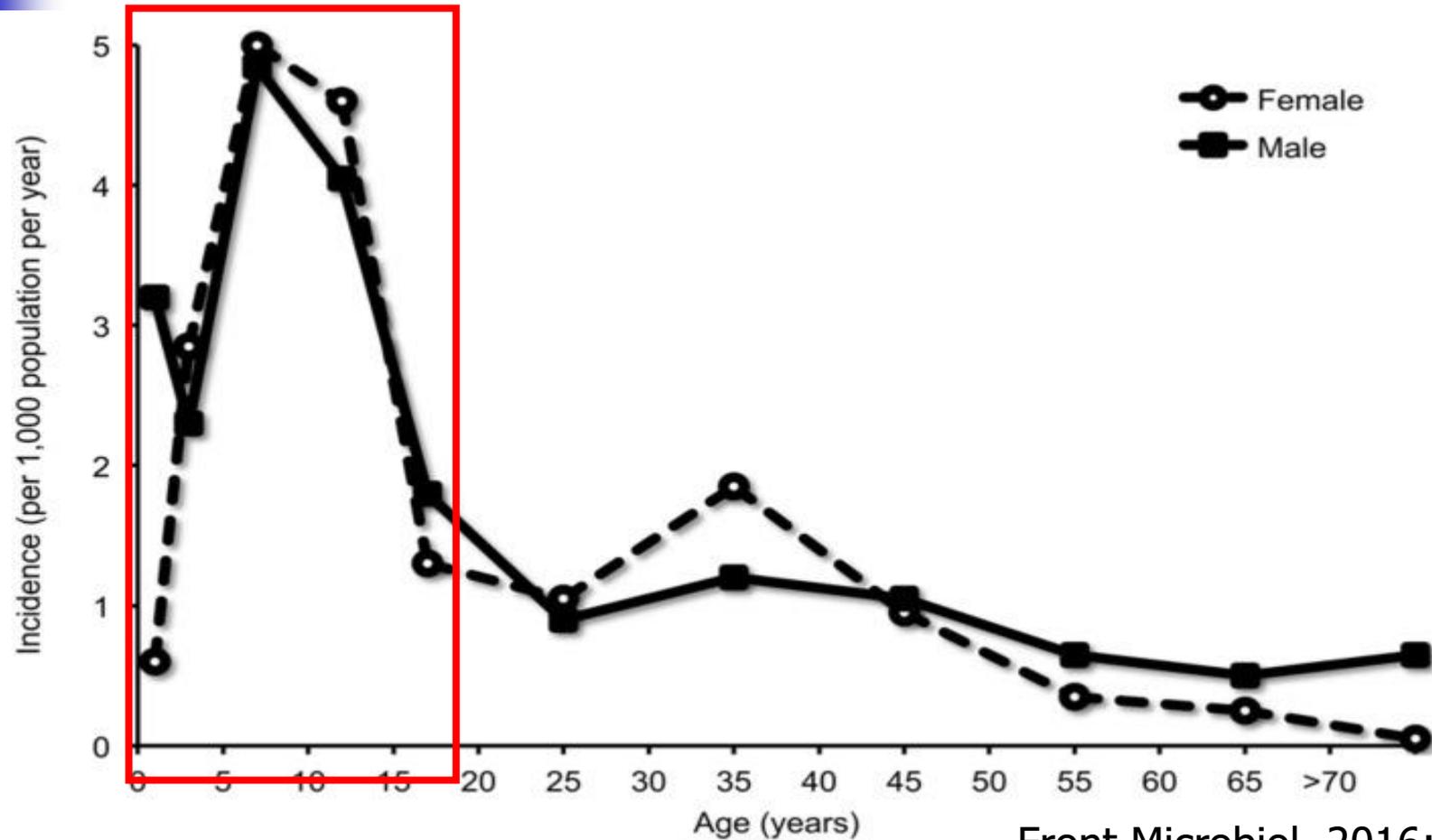
始めは乾性の咳
聴診所見に乏しい

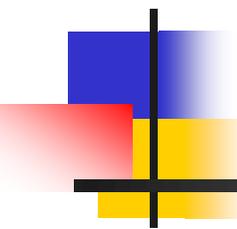
後に湿性の咳
聴診所見は喘鳴、ラ音

図-4. 小児肺炎(CAP)例の年齢別にみた原因細菌の内訳



Detection of *M. pneumoniae* in community-acquired pneumonia (CAP) according to age group.





治療

小児マイコプラズマ肺炎の診断と治療に関する考え方のポイント

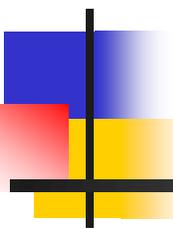
日本小児科学会治療指針 日本マイコプラズマ学会治療指針

- **第一選択薬：マクロライド系薬**
 - 効果は、投与後 2～3 日以内の解熱で概ね評価できる。
 - 最小発育阻止濃度(MIC)は極めて低値であり、治療終了時には気道から除菌される。
 - マクロライド系薬の前投薬与がないときの耐性率は50%以下である。マクロライド系薬の前投薬与がなければ、マクロライド系薬が推奨される。
- **マクロライド系薬が無効の肺炎**
 - トスフロキサシン
 - テトラサイクリン系薬：8歳未満には、原則禁忌
 - トスフロキサシン、テトラサイクリン系薬の最小発育阻止濃度(MIC)は比較的高く、治療終了時には一部の症例で気道に菌が残り感染を広げる可能性がある。
- 投与期間は、それぞれの薬剤で推奨されている期間を遵守する。
- 重篤な肺炎症例には、ステロイドの全身投与が考慮される。

マイコプラズマ肺炎の治療に使用するおもな抗菌薬の用法、用量、投与期間 日本小児科学会治療指針

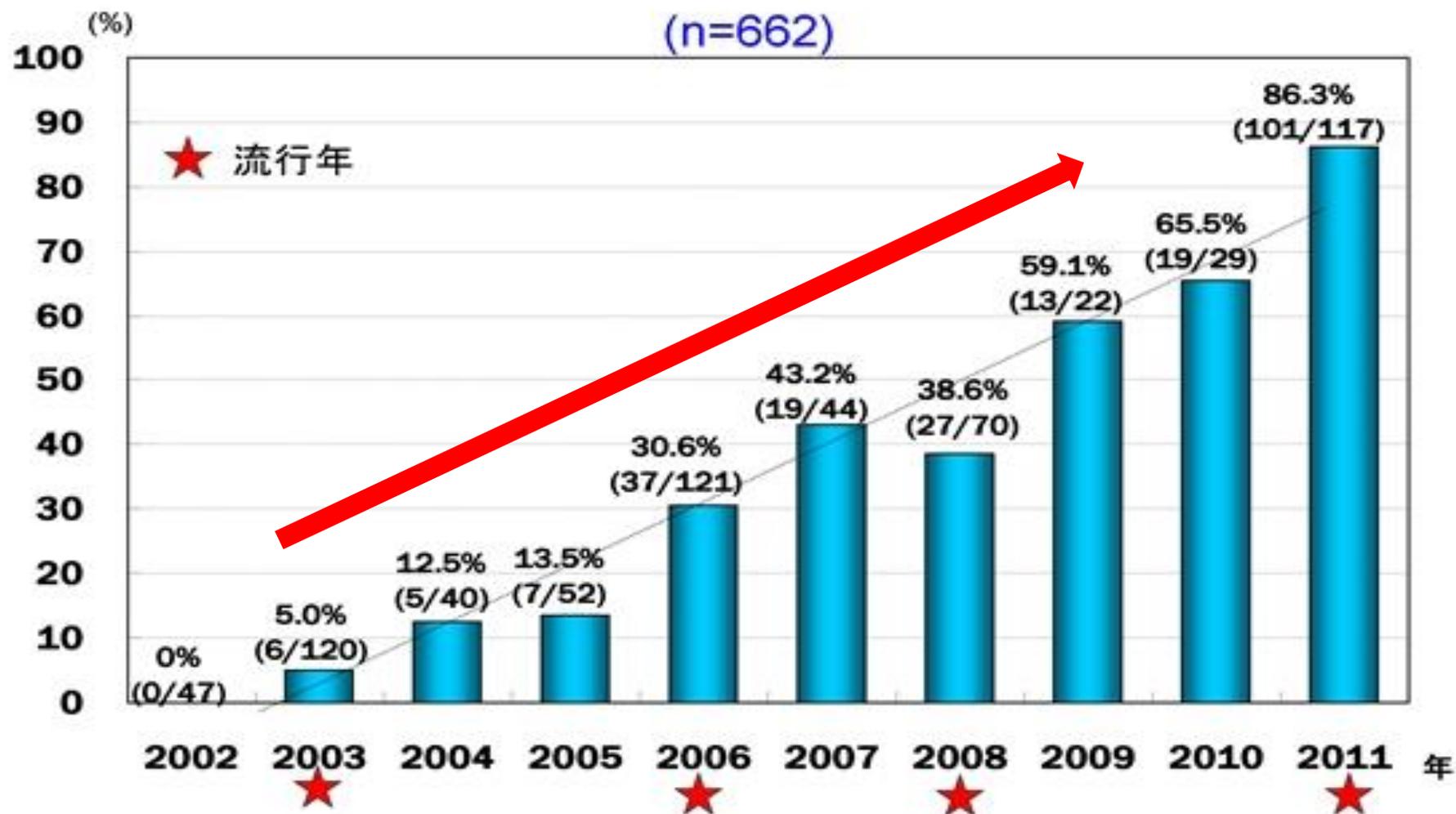
抗菌薬	用法、用量	投与方法	投与期間
エリスロマイシンエチルコハク酸エステル	25-50mg/kg/日、分4-6	経口	14日
クラリスロマイシン	10-15mg/kg/日、分2-3	経口	10日
アジスロマイシン	10 mg/kg/日、分1	経口	3日
トスフロキサシントシル酸塩水和物	12 mg/kg/日、分2	経口	7~14日
ミノサイクリン	2-4 mg/kg/日、分2	経口、点滴静注	7~14日

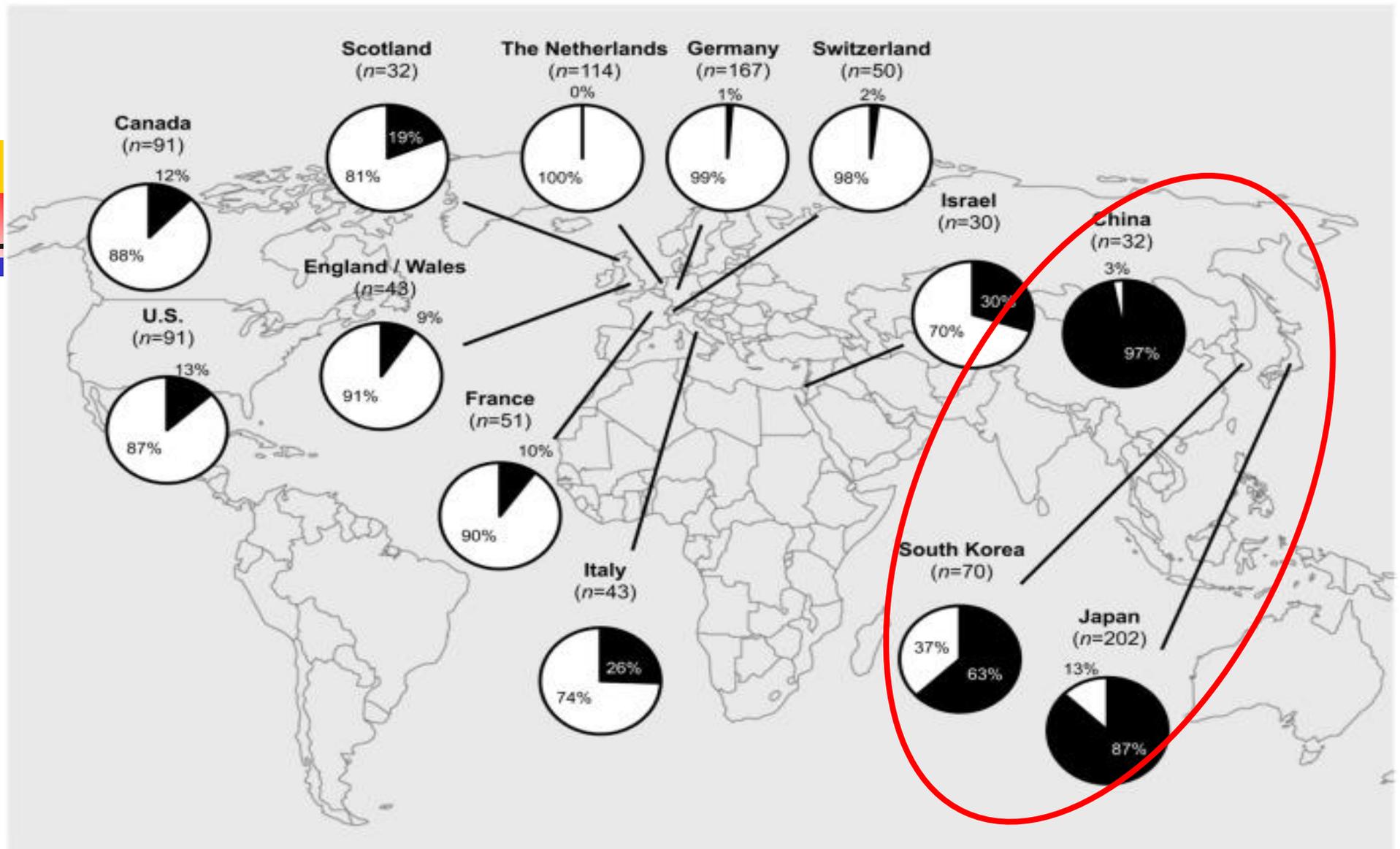
トスフロキサシン肺炎で保険適応。長くても7日が良い。
MINOの使用期間は通常3日、長くても5日以内とし、その後は自然治癒力に期待した方がよい？

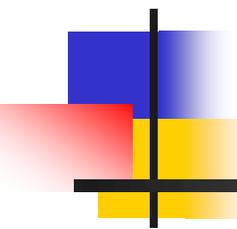


耐性マイコプラズマの疫学

図-1. マクロライド系薬(MLs)耐性マイコプラズマの経年的推移



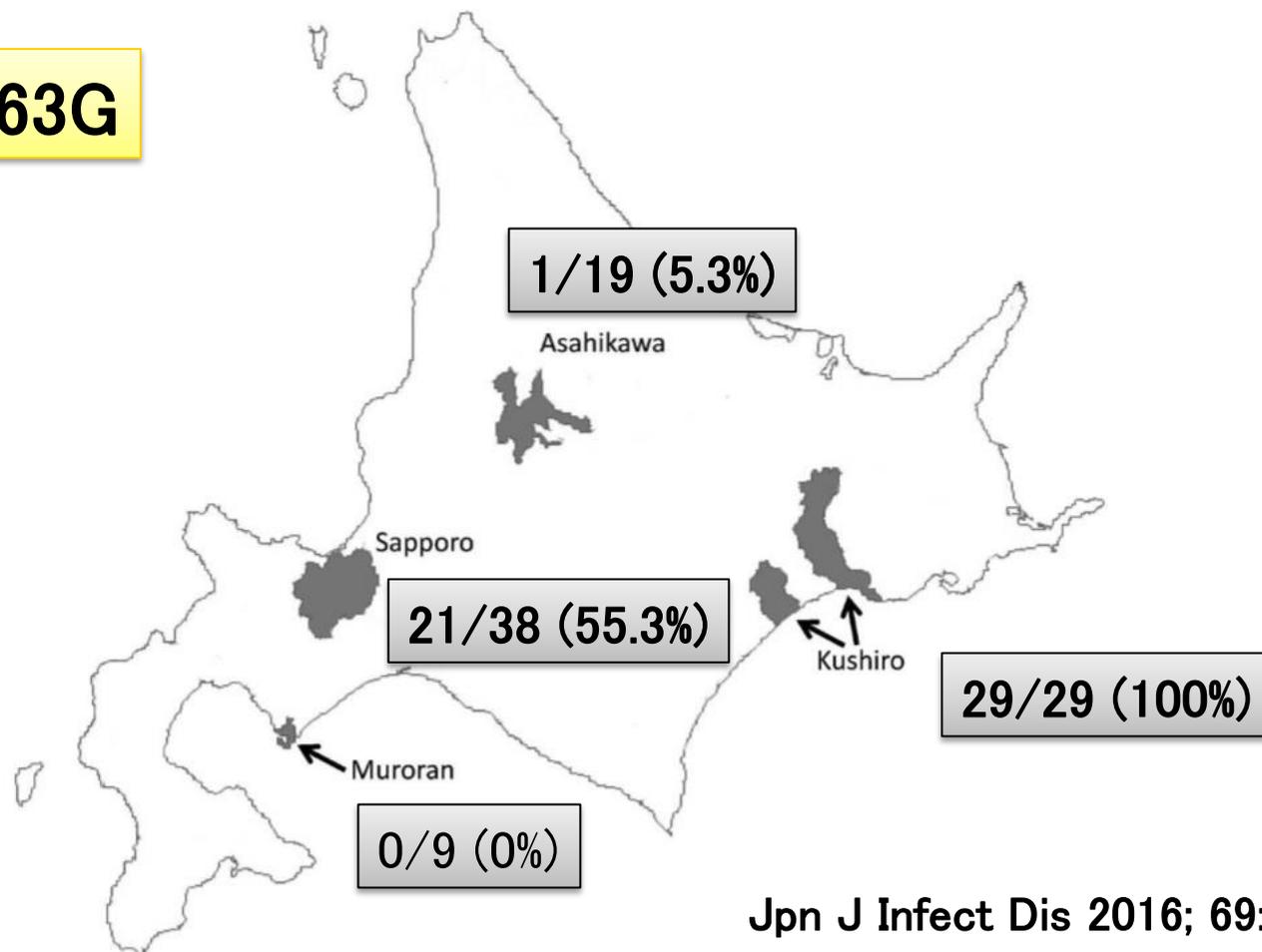




北海道のマイコプラズマ

北海道の4市（2009年11月～2011年8月） のマクロライド耐性マイコプラズマ

耐性：A2063G



病院と診療所、外来患者と入院患者の マクロライド耐性マイコプラズマの頻度

Case	Total No.	Macrolide		<i>P</i> value ¹⁾
		Sensitive (%)	Resistant (%)	
Hospitals	62	14 (22.6)	48 (77.4)	<0.0001*
Clinics	33	30 (90.9)	3 (9.1)	
Outpatients	70	39 (55.7)	31 (44.3)	0.0024*
Inpatients	25	5 (20.0)	20 (80.0)	

¹⁾: *P* value by Fisher's exact test. *, statistically significant.

病院は診療所より耐性が多い

入院患者は外来患者より耐性が多い

Prevalence of macrolide-resistant *M. pneumoniae* in patients pre-administered macrolide

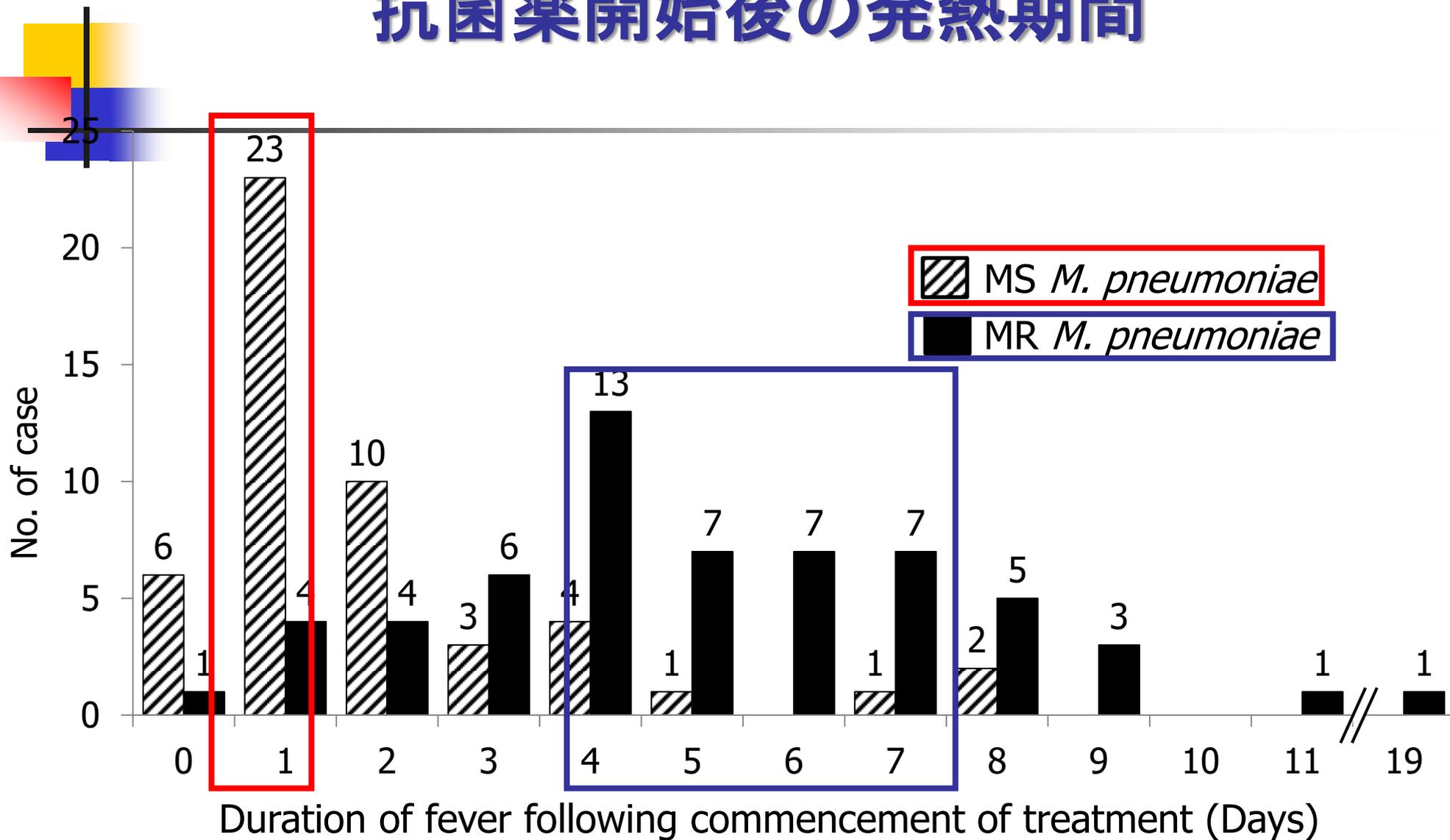
Pre-administration	Total No.	Macrolide		<i>P</i> value ¹⁾
		Sensitive (%)	Resistant (%)	
Yes	25	2 (8.0)	23 (92.0)	<0.0001*
No	70	42 (60.0)	28 (40.0)	

¹⁾: *P* value by Fisher's exact test. *, statistically significant.

前投薬があれば、耐性率が高い。

前投薬で耐性になったというより、耐性株に感染したことを意味する。

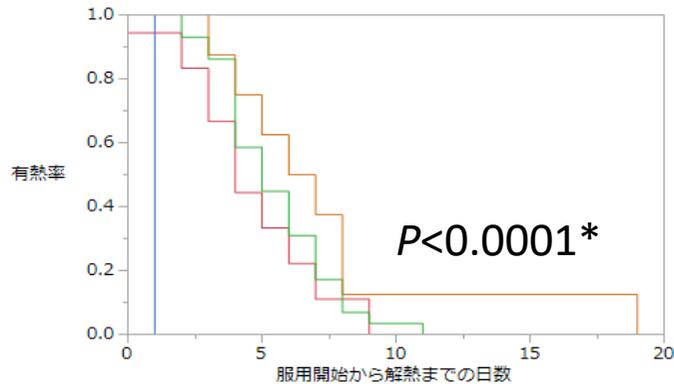
抗菌薬開始後の発熱期間



抗菌薬開始後の発熱期間

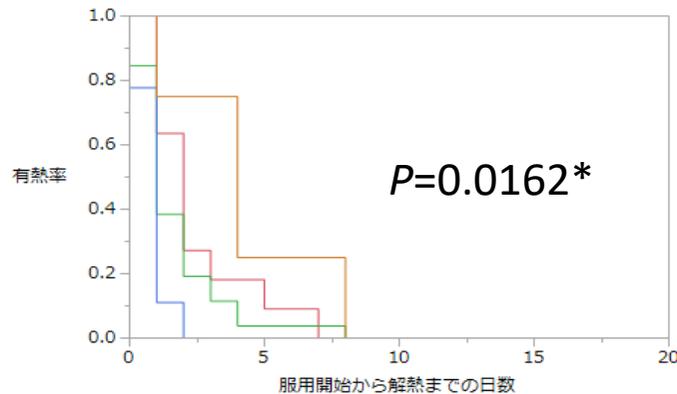
*log-rank test

耐性



抗菌薬	n	平均	SE
AZM	18	4.6	0.6
CAM	29	5.5	0.4
MINO	4	1.0	0.0
TFLX	8	7.5	1.8
合計	59	5.2	0.4

感受性



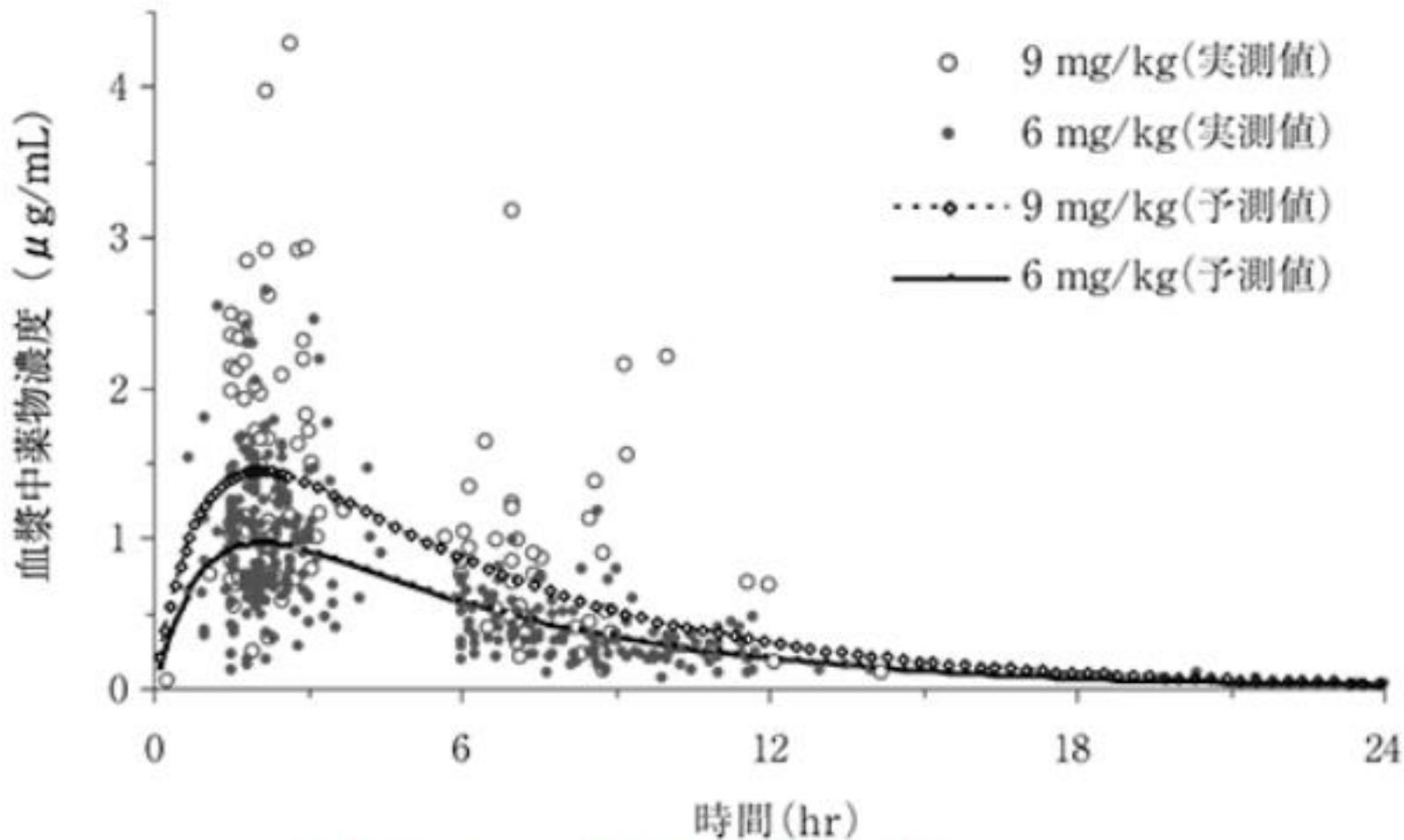
抗菌薬	n	平均	SE
AZM	11	2.5	0.6
CAM	26	1.7	0.3
MINO	9	0.9	0.2
TFLX	4	4.3	1.4
合計	50	1.9	0.3

抗菌薬のMIC

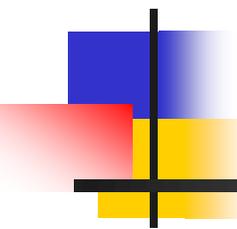
Antimicrobial agent	MIC (μ g/ml) for MR <i>M. pneumoniae</i> (n=27)			MIC (μ g/ml) for MS <i>M. pneumoniae</i> (n=23)		
	Range	50%	90%	Range	50%	90%
Erythromycin	128 - >256	256	>256	0.002 - 0.0078	0.0039	0.0039
Clarithromycin	64 - >256	256	256	0.0005 - 0.0039	0.001	0.001
Azithromycin	16 - 128	32	64	<0.000125 - 0.00025	<0.000125	<0.000125
Tosufloxacin	0.13 - 0.25	0.25	0.25	0.13 - 0.5	0.25	0.5
Minocycline	0.13 - 1	0.5	1	0.13 - 2	0.5	1

Tosufloxacin: (小児) 最高血中濃度: 2時間後、 $0.96 \pm 0.30 \mu\text{g/ml}$
 Minocycline: (大人) 最高血中濃度: 4時間後、 $1.96 \mu\text{g/m}$

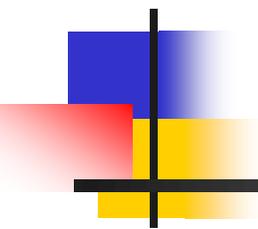
トスフロキサシン、ミノサイクリンの最小発育阻止濃度(MIC)は高く、最高血中濃度に近い



血漿中トスフロキサシン濃度予測推移



マクロライド耐性マイコプラズマ



リボソームと抗菌薬

リボソーム

真核生物

原核生物

60S (分子量 2800kDa)

構成成分

- ・ 28S rRNA (4718 nt)
- ・ 5.8S rRNA (160 nt)
- ・ 5S rRNA (120 nt)
- ・ 49 個のタンパク質

50S (分子量 1600kDa)

構成成分

- ・ 23S rRNA (2904 nt)
- ・ 5S rRNA (120 nt)
- ・ ~ 34 個のタンパク質

40S (分子量 1400kDa)

構成成分

- ・ 18S rRNA (1874 nt)
- ・ ~ 33 個のタンパク質

30S (分子量 900kDa)

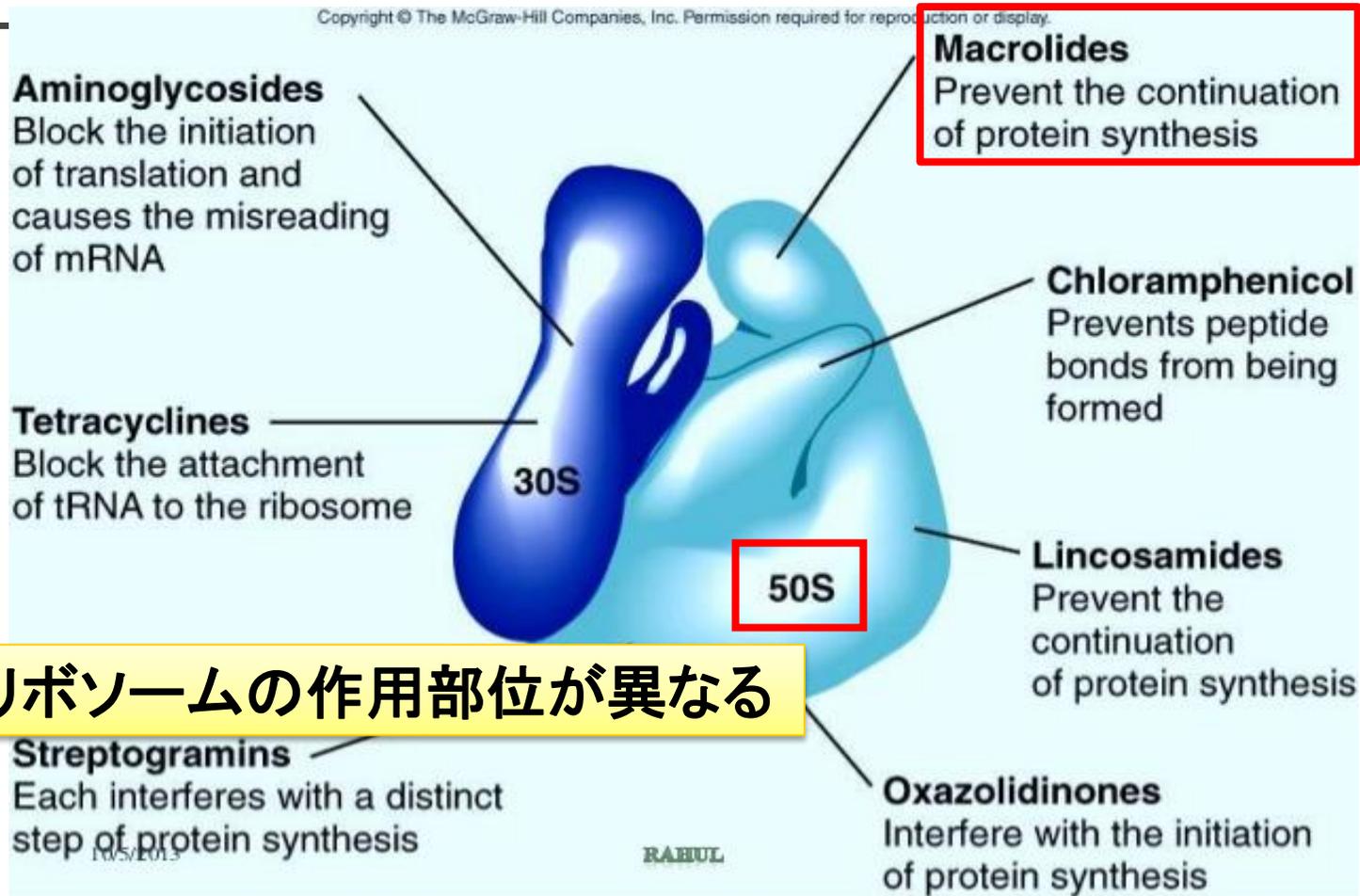
構成成分

- ・ 16S rRNA (1542 nt)
- ・ 21 個のタンパク質

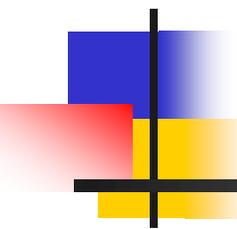
大サブユニット

小サブユニット

各種抗菌薬のリボソームに作用する部位の違い



薬剤によりリボソームの作用部位が異なる

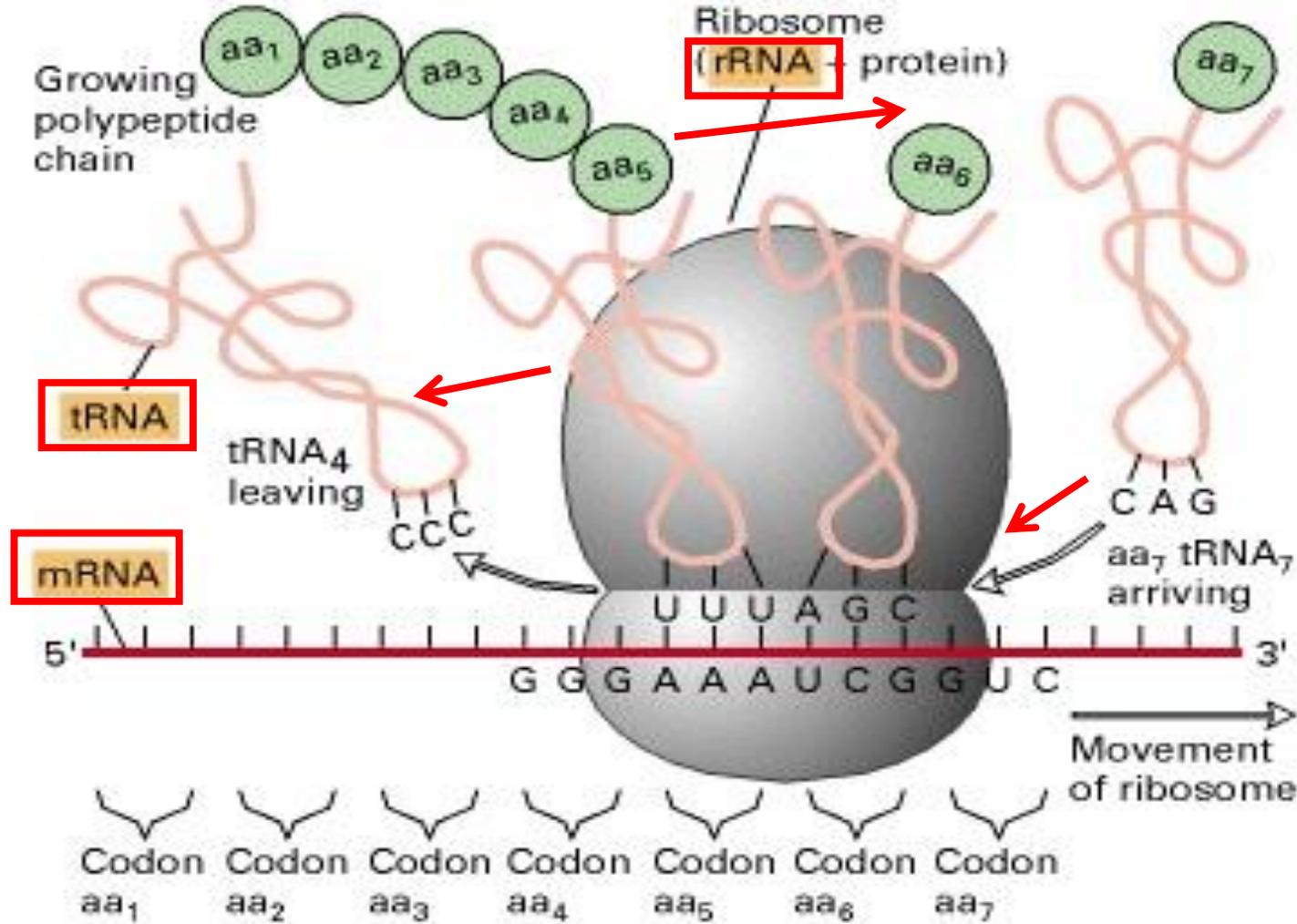


マクロライドの作用機序

タンパク合成のための3個のRNAの働き

Molecular Cell Biology, 4th edition. Section 4.4 The Three Roles of RNA in Protein Synthesis.

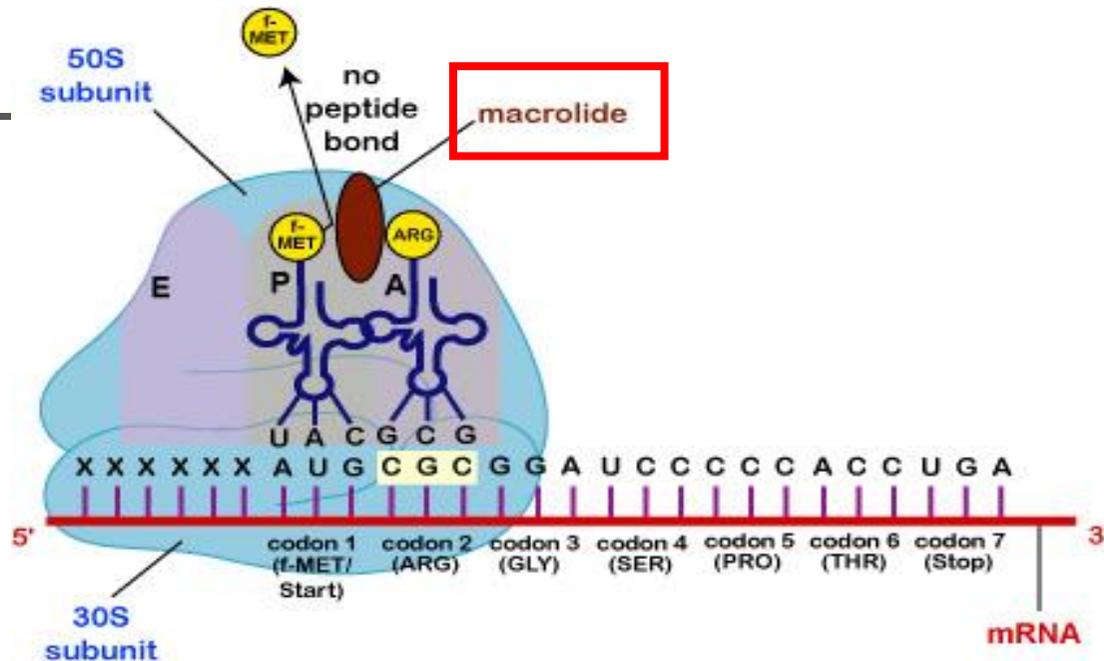
蛋白合成の場 (ribozyme: RNA酵素)



運搬

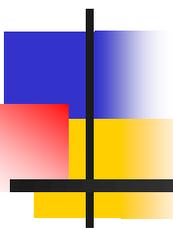
遺伝情報
(設計図)

マクロライドの作用部位

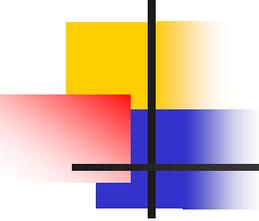


- マクロライドの作用機序: マクロライドは細菌の50Sリボソームの構成要素である23s rRNAに結合することにより、**Peptidyltransferase** 機能[**transpeptidation** (ペプチド転移)と**translocation** (移動)]を抑制し、細菌のタンパク質合成を阻害し増殖を抑える。

リボゾームの23s rRNAが変異することにより、マクロライドが結合できなくなり、マクロライドに対して耐性となる



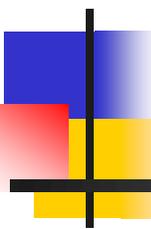
マクロライド耐性機序



細菌のマクロライド耐性機序

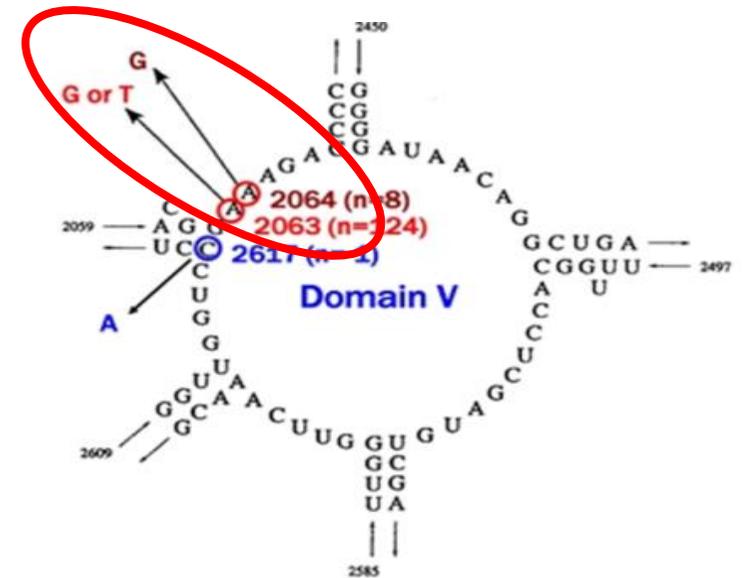
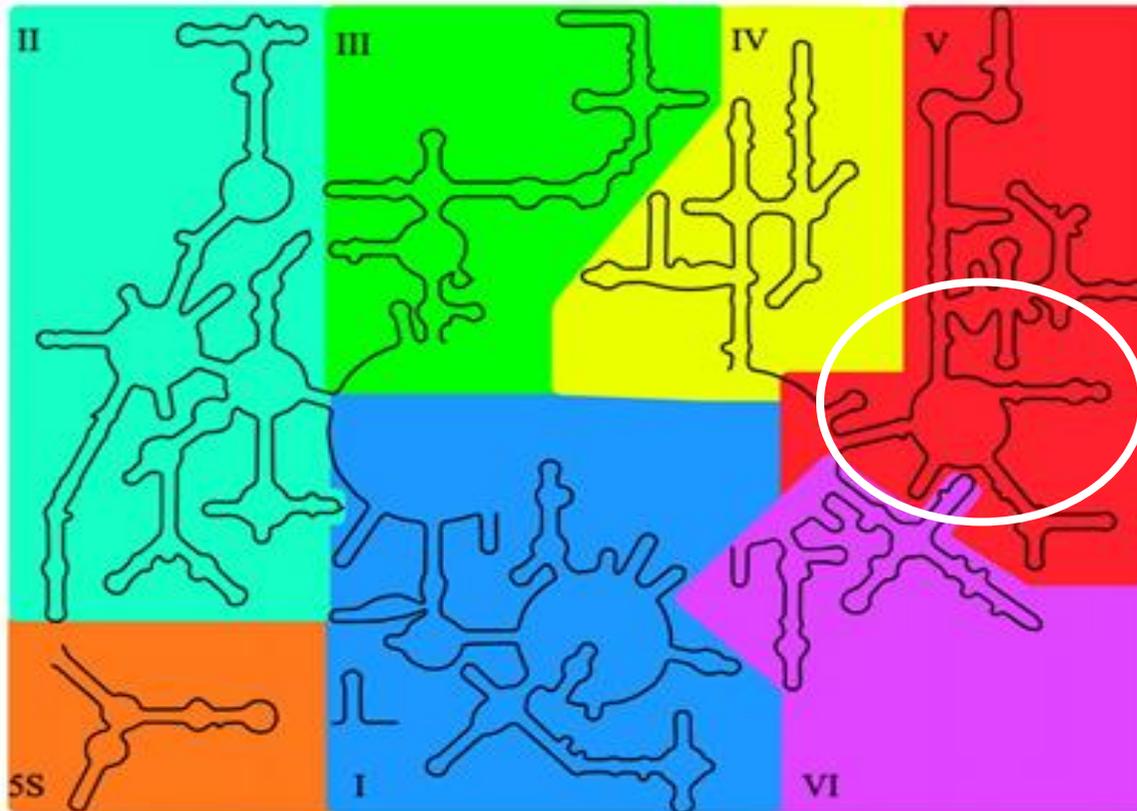
- 外来から耐性遺伝子を獲得：**短期間**のDrug-selective pressureで耐性となる。
 - *erm(A)*, *erm(B)*: リボソームRNA の転写後修飾
メチル化酵素による23S rRNA の特定アデニン塩基のメチル化
(plasmids, transposons, integrative and conjugative elements (ICEs))
 - *mef(A)*: 排出型タンパク質 (*mefA* 遺伝子保有) による薬剤の汲み出し。
(bacteriophages)
- 遺伝子 (DNA) の変異：**長期間**のDrug-selective pressureが耐性に必要。
 - rDNA (リボソームDNA) の変異 → 23S rRNA の点突然変異
(**マイコプラズマ**)
 - 50S リボソームタンパクの変異

マクロライド耐性マイコプラズマに
見られる遺伝子変異は？

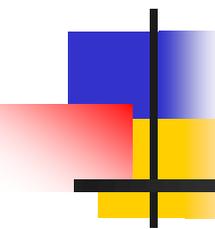


Structures of the 23s rRNA

23SリボソームRNAドメインV



2063番目のアデニン(A)がグアニン(G)に置換(A2063G)が多い。
2064番目のAがGへ置換(A2064G)

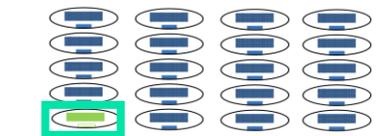


変異により、マイコプラズマの複製(増殖)はどうか？

マクロライド耐性マイコプラズマが1個出現した後、どうなるか？

耐性株の
Growth advantage

マクロライド
の使用



耐性株

2000年以前に存在しなかったことより、否定的



+

-



早期に全て耐性株



耐性株の割合は増加

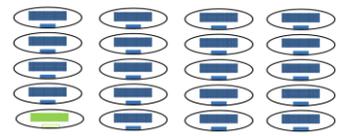


耐性株のみ普通に増加

耐性株の割合は変わらない



減少or消失
耐性株は増えられない



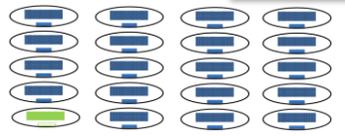
A2063G変異



+

-

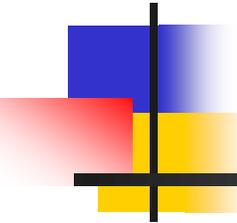
耐性株が増加するためにはマクロライドが必要



A2064G変異など

+

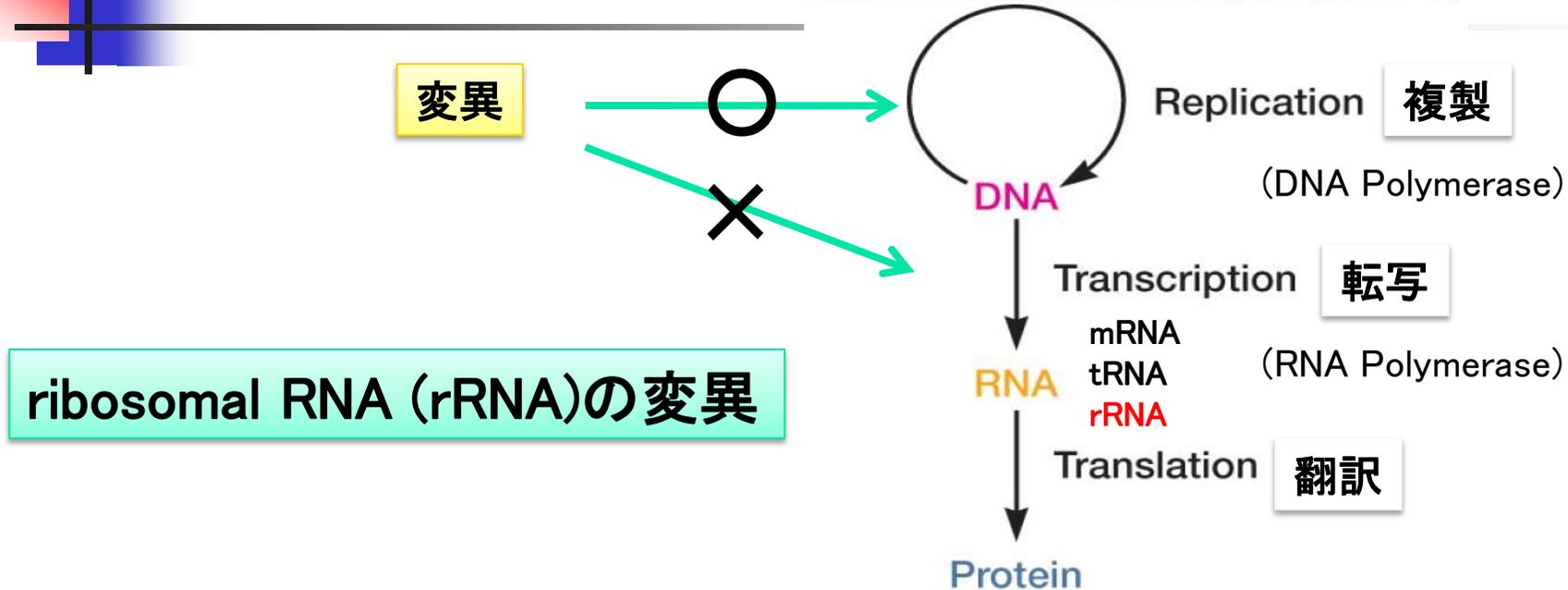
-



Ribosomal RNAの変異は何故起きるのか？

変異の本質はribosomal DNAの変異

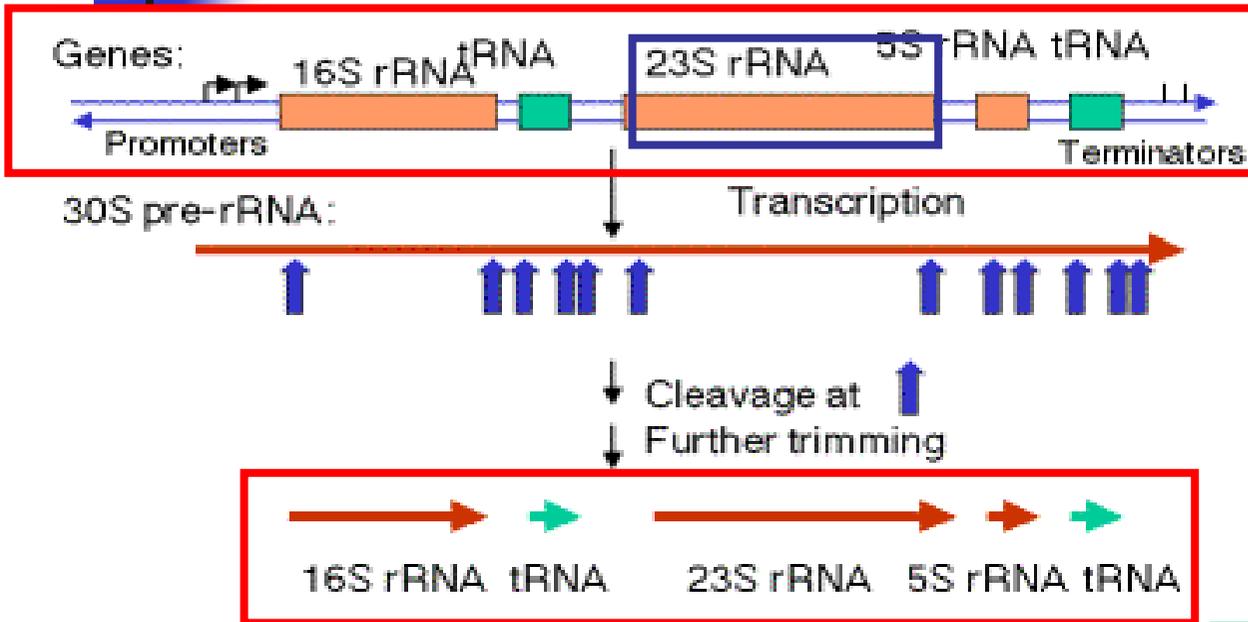
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



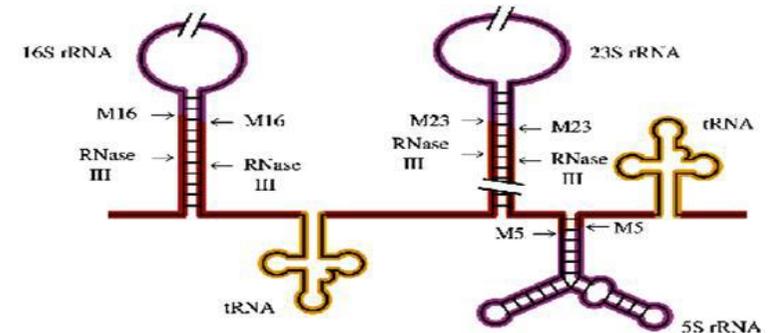
マイコプラズマの複製時にribosomal DNA (rDNA)に変異を起こし生じる。

rDNAからの転写時にrRNAに変異を起こし生じたものではない。

rRNA Operon (rDNA)



ribosomal DNA; rDNA



Biophysic property	<i>M. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
number of ribosomes	300	6,800 – 72,000
number of rRNA operons	1	7

- rRNA Operonは1個のため、rDNAの変異は決定的。
→他の細菌より変異が起きると、rRNAに反映しやすい。

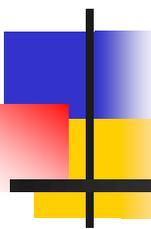
1回の細胞分裂(複製)での変異の数

- RNA
 - $10^4 \sim 10^6$ 塩基に1塩基の変異
- DNA
 - $10^7 \sim 10^{11}$ 塩基に1塩基の変異

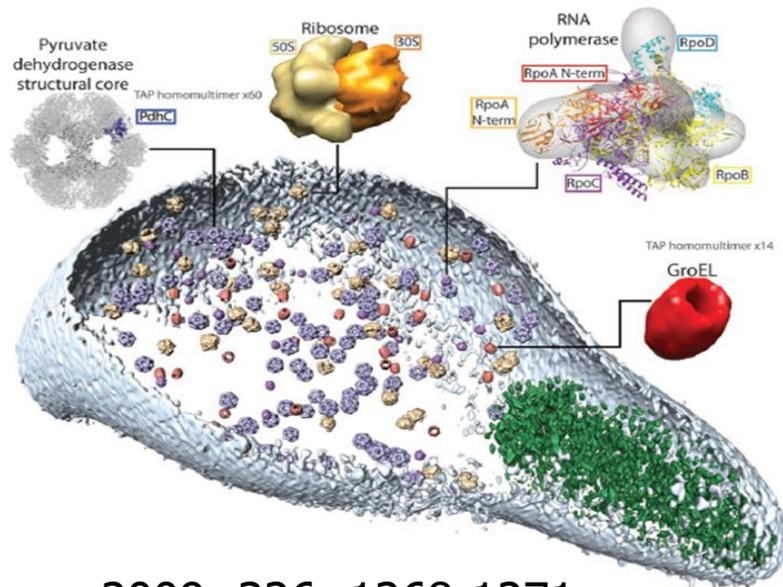
Biophysic property	M. pneumoniae	E. coli
total number of DNA bases	1,632,788	9,279,350
doubling time (hours)	8	0.33

- 変異はat randomに起き、抗菌薬、抗ウイルス薬の違いで起きるものではない。
- DNA 塩基数が少なく、Doubling timeも8 hrsと
→マイコプラズマはウイルスや他の細菌と比べDNAの変異は起こりにくい。

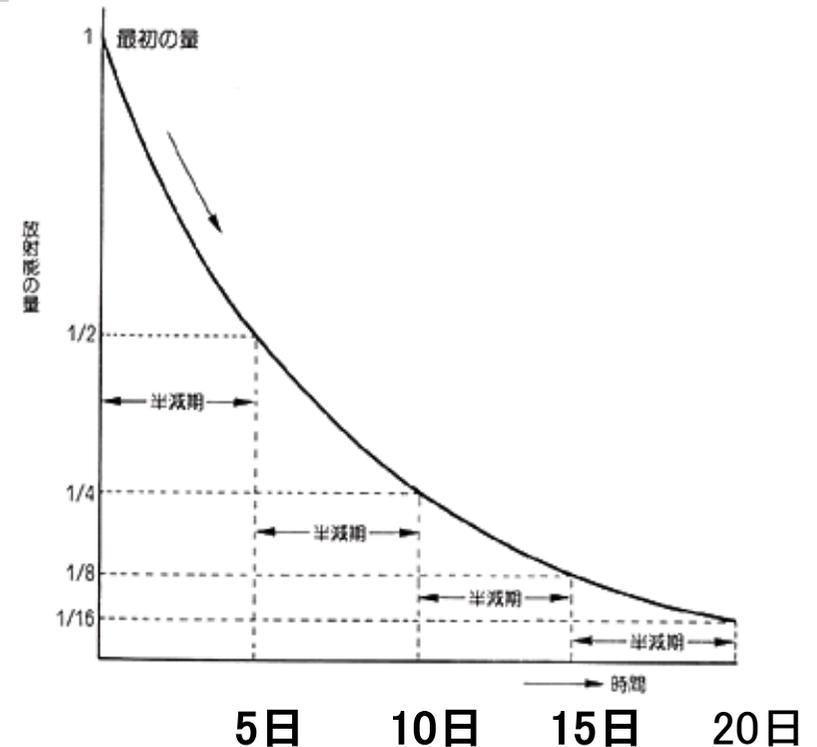
rDNAの変異からrRNAの変化にどのくらい時間がかかるか？



rDNAの変異→rRNAの変異



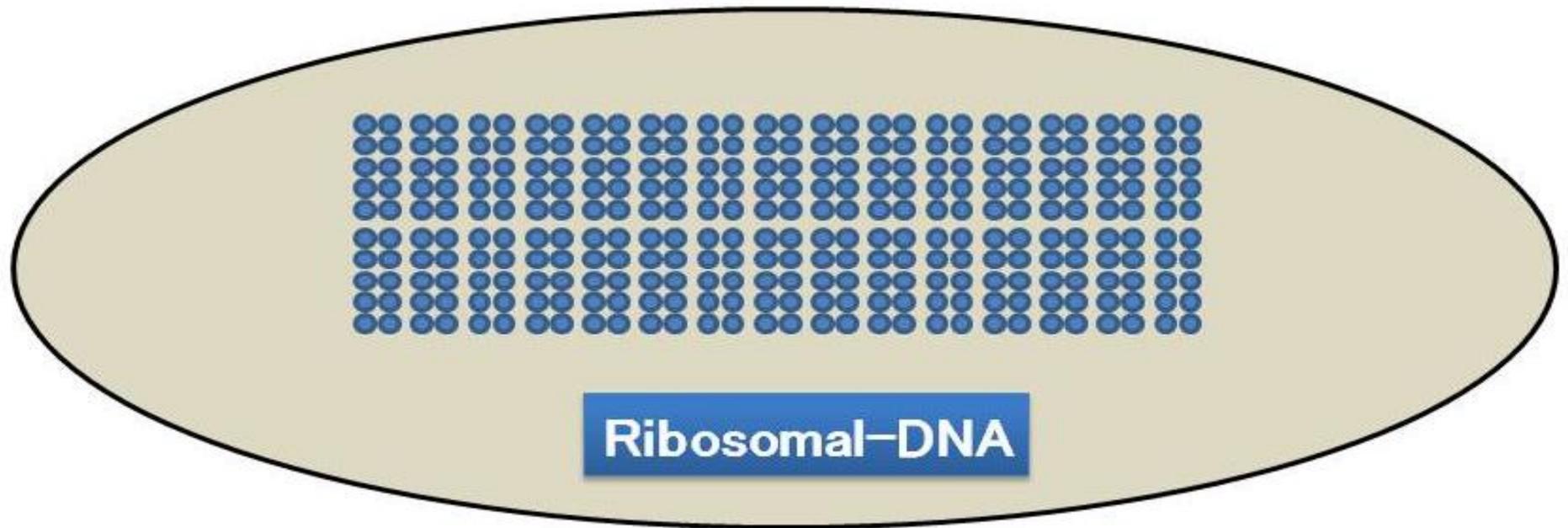
Science 2009; 326; 1268-1271

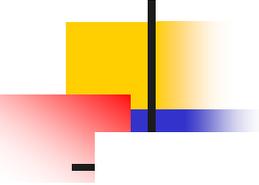


Biophysic property	<i>M. pneumoniae</i>
number of ribosomes	300
Half-life of rRNA	3-7.5 days

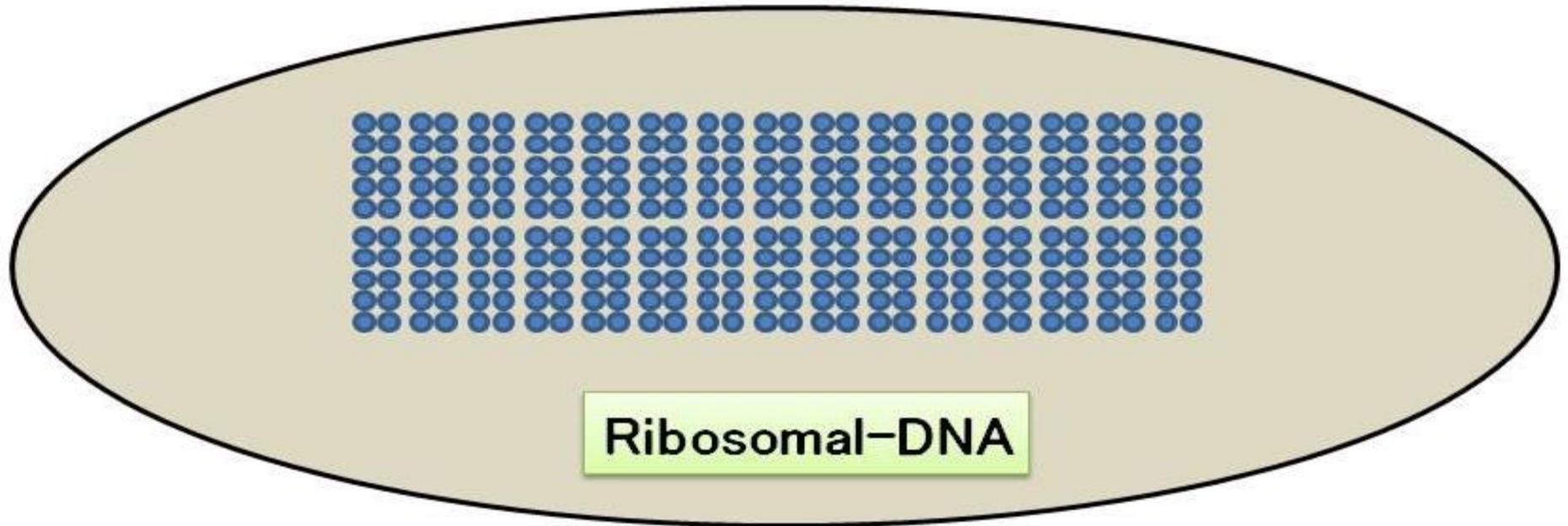
- rDNAの変異が起こった後に、すべてのrRNAが変異を獲得するのに時間がかかる。

300個のribosomal RNA

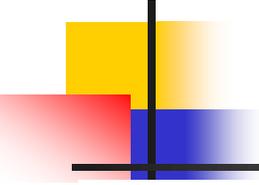




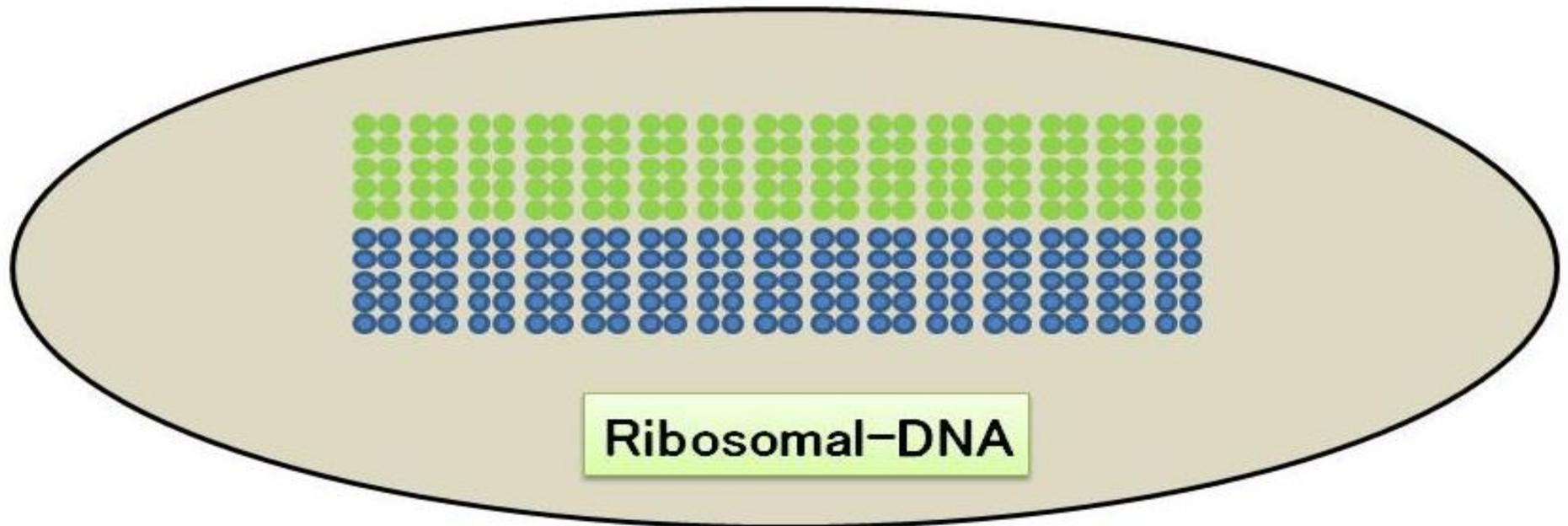
300個 of ribosomal RNA



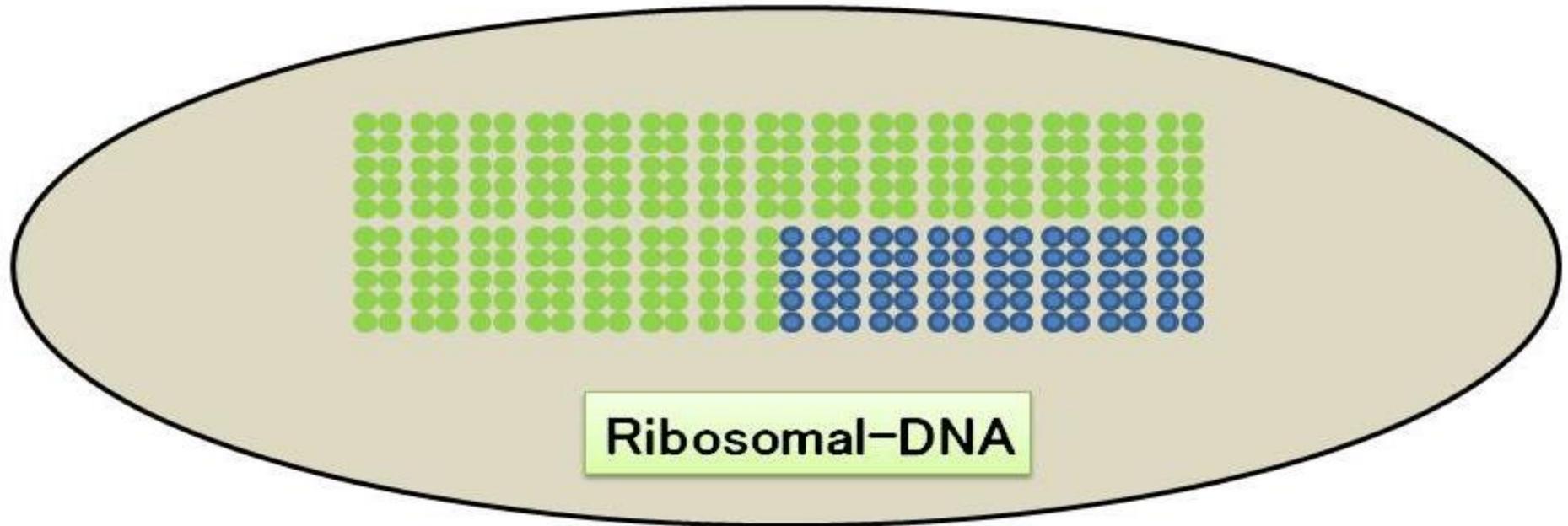
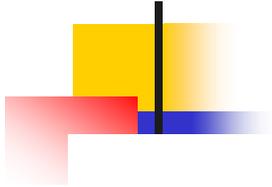
始めにマイコプラズマの複製の過程でrDNAが変異
rRNAは変異を起こしていない



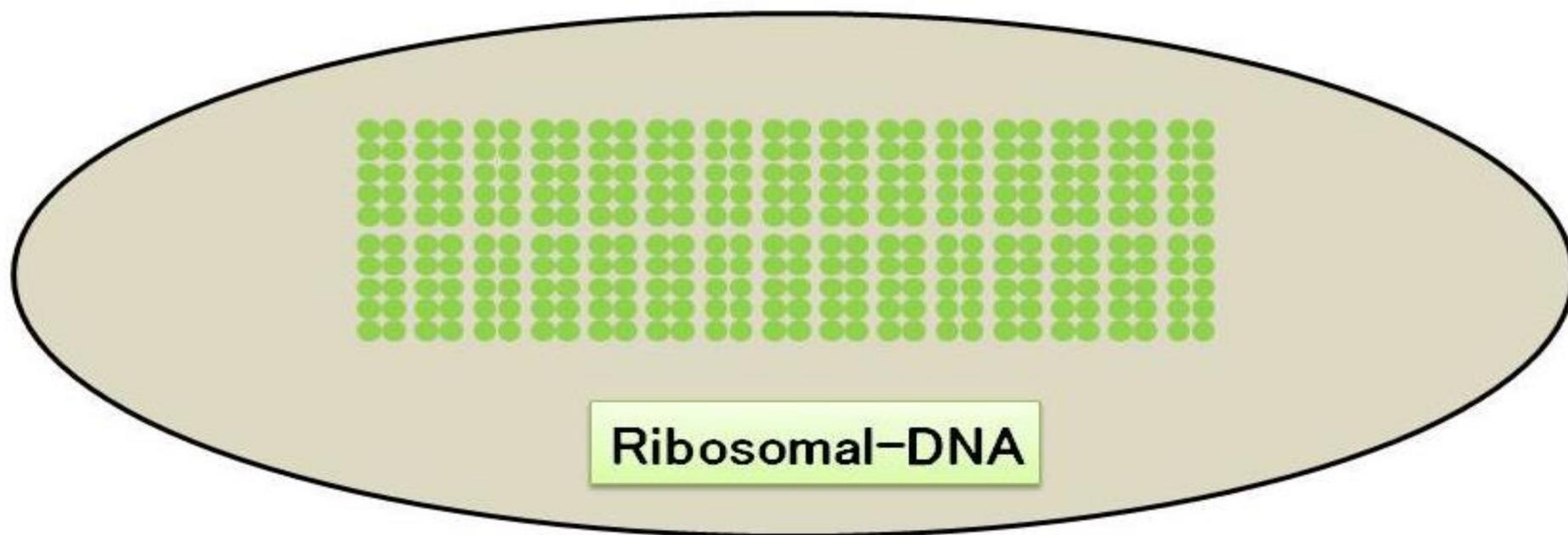
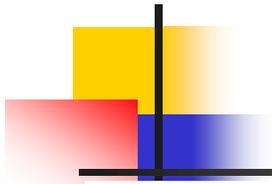
rRNAの半減期: 3-7.5 日



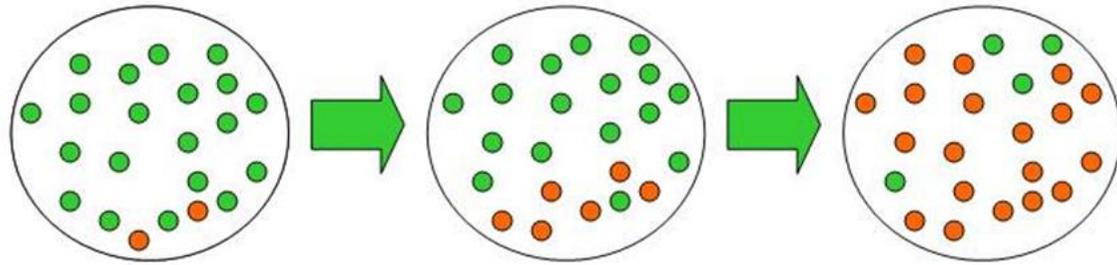
Ribosomal DNA + Ribosomal RNAの変異



300個のrRNA中で何個のrRNAが変異したら、耐性になるかは不明



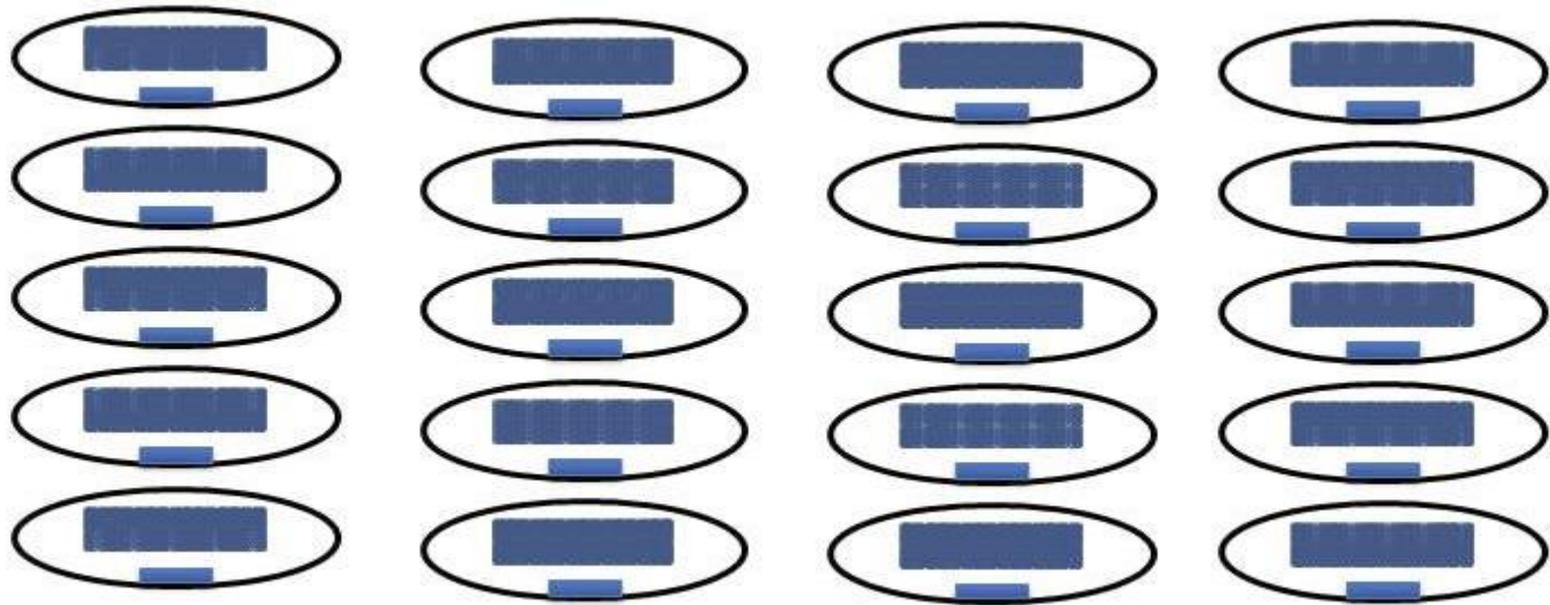
300個の全てのrRNAが変異し耐性が完成



Quasispecies (多種性)

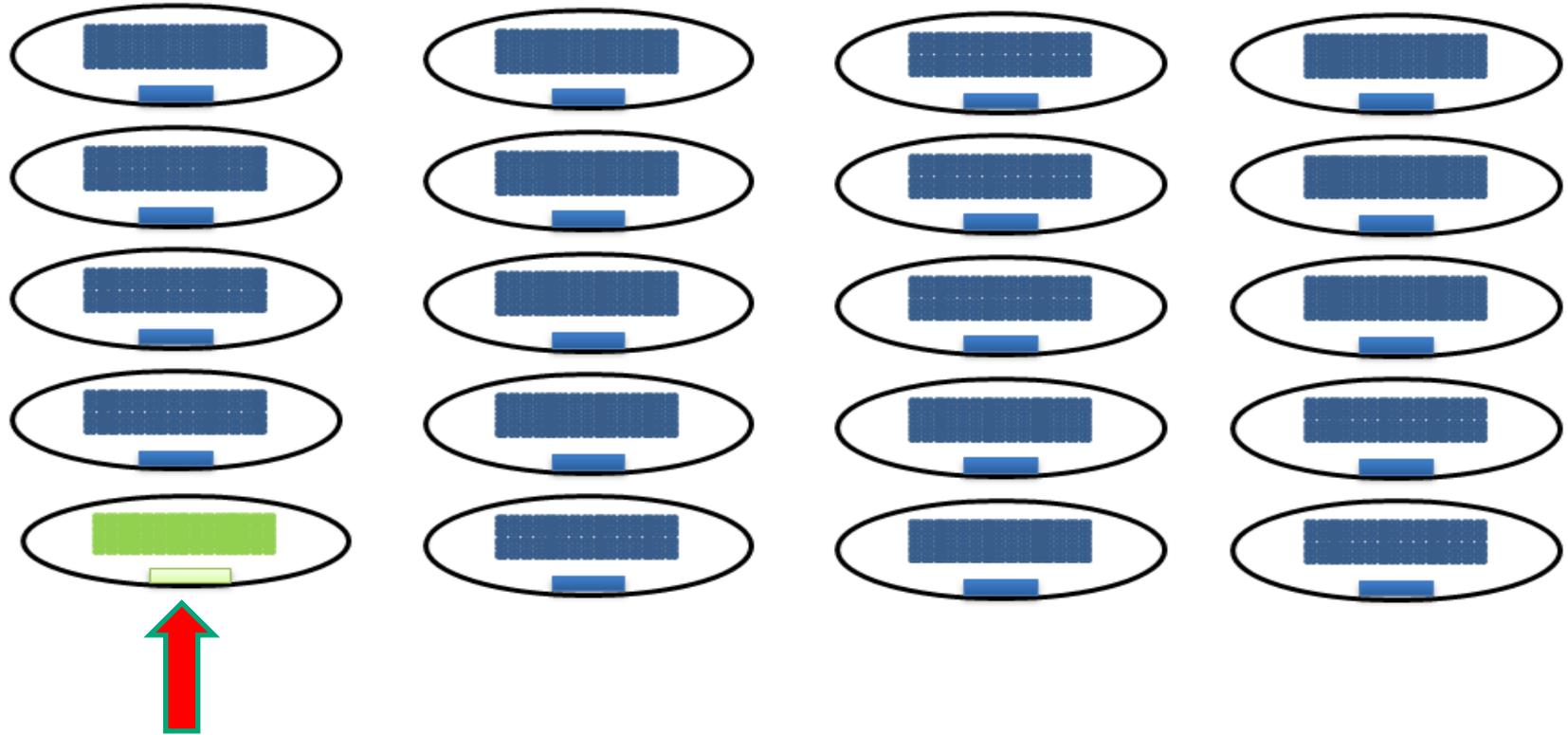
「類似した(=Quasi) + 種(=species)」
ゲノムに変異が入り同じ環境下で増殖しても、異なる特徴を示す集団が存在するようになる。

Quasispecies



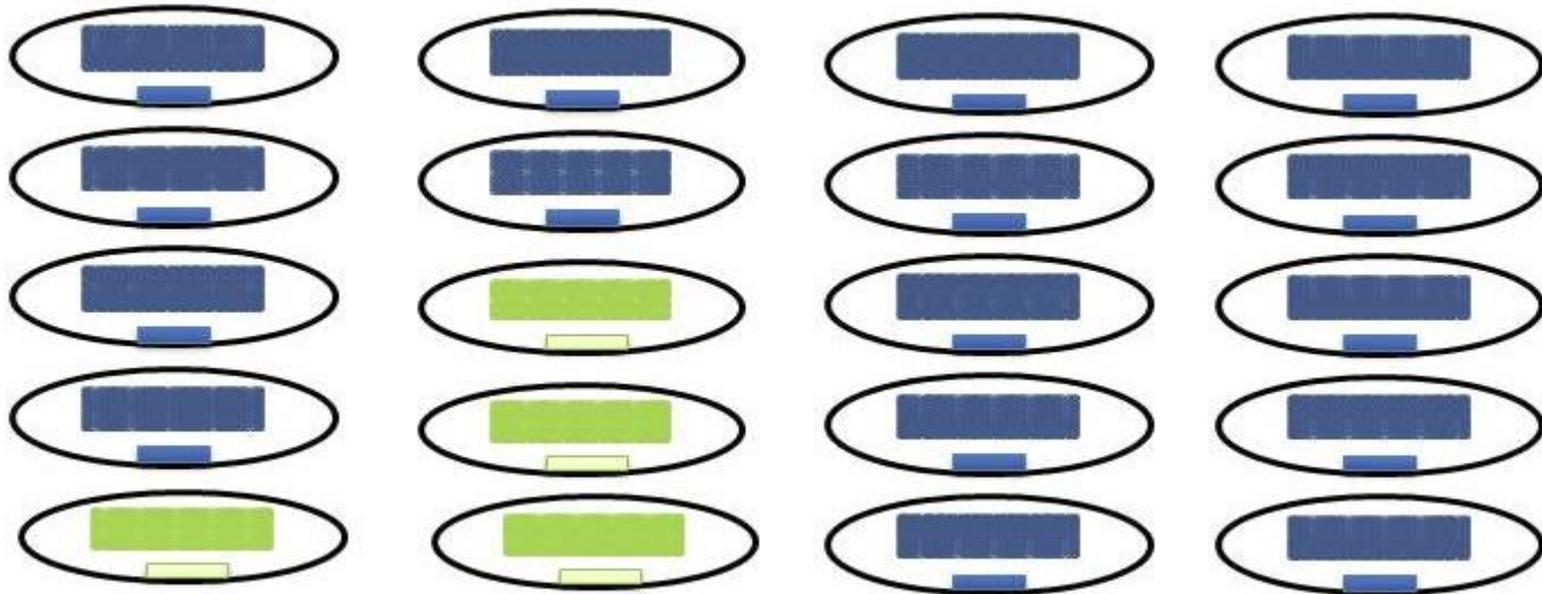
マイコプラズマの複製の過程でrDNAが変異

Quasispecies



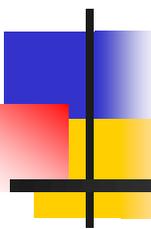
1個のマイコプラズマが完全な耐性になる

Quasispecies



耐性株が存在していても、感受性株より増えるためには、マクロライドが必要。

マイコプラズマ感染で Quasispeciesはあるのか？

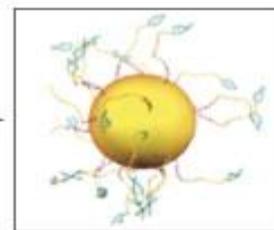
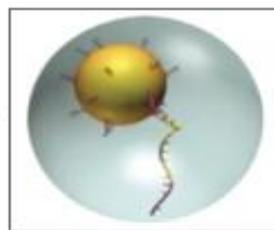
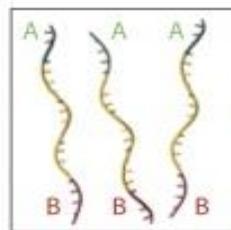
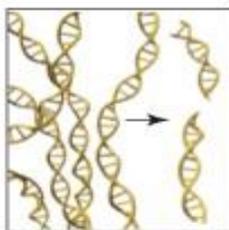


感度よくQuasispeciesを検出する方法

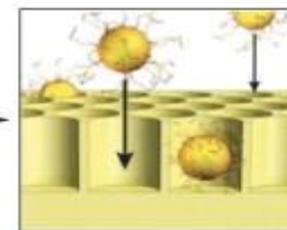
→ Pyrosequencing

Roche (454) GSFLX Workflow:

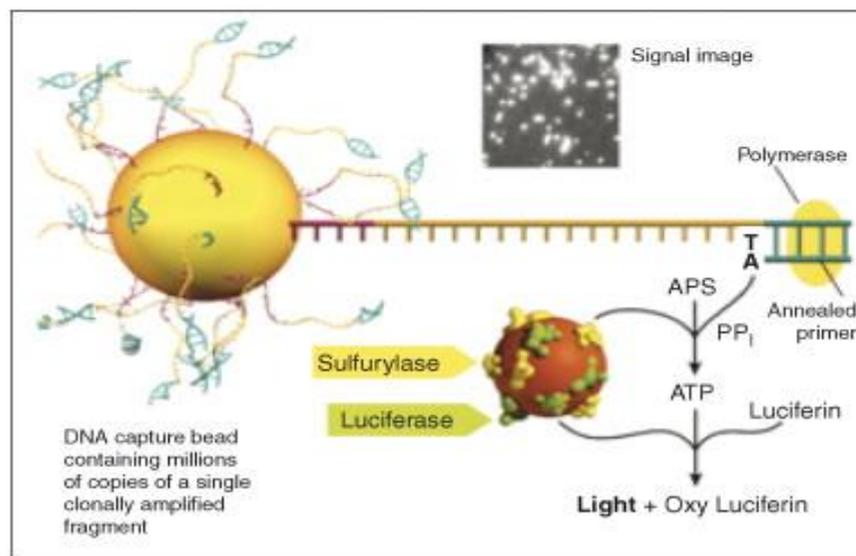
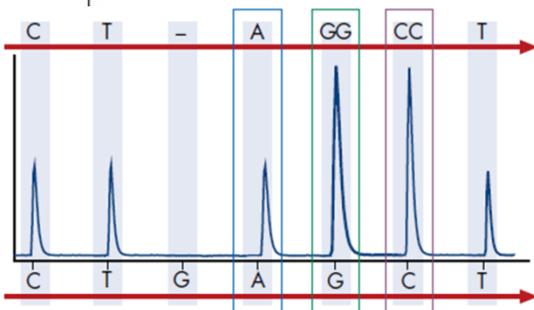
Library construction



PTP loading



Pyrogram

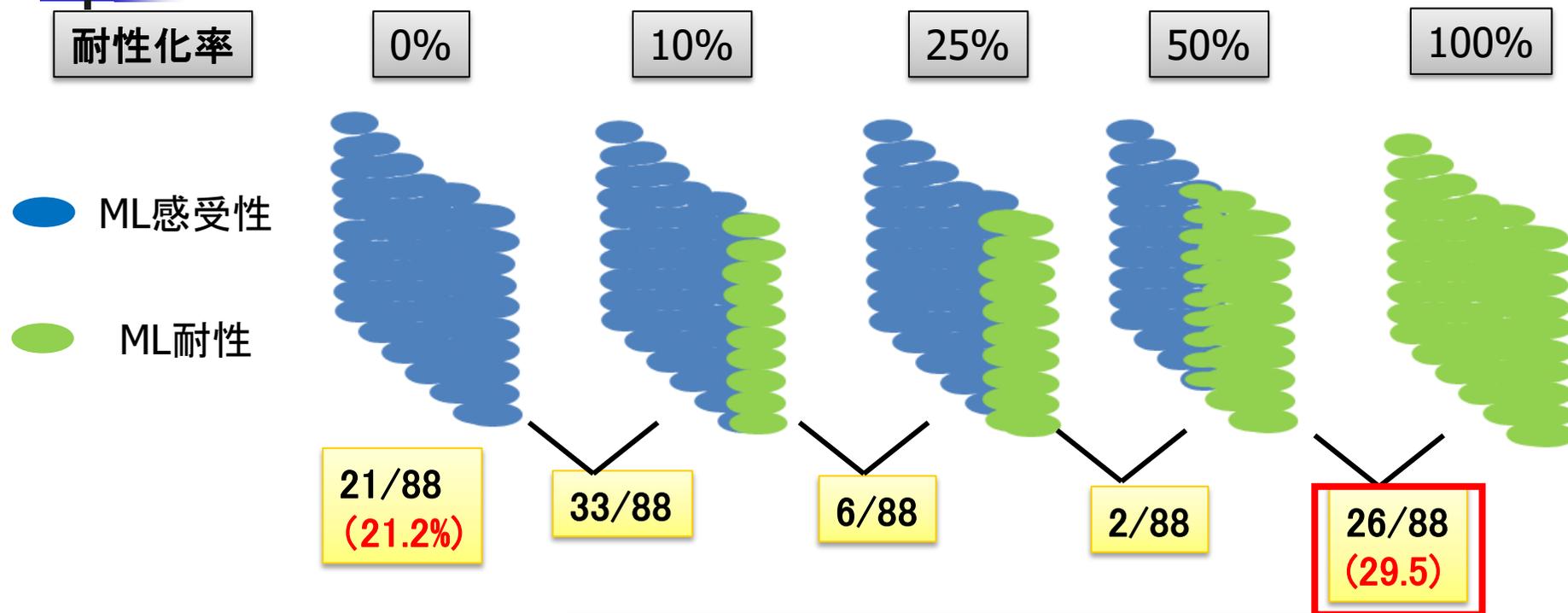


Pyrosequencing reaction

マイコプラズマ肺炎患者

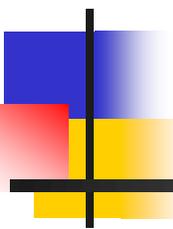
-Pyrosequencing法によるマイコプラズマ耐性遺伝子変異の Quasispeciesの検出-

Quasispeciesが多数存在



Pyrosequencing法で78.8%にQuasispeciesを検出

従来の Sanger sequencing法または Simple Probe PCR法では29.5%しか変異を検出できなかった。



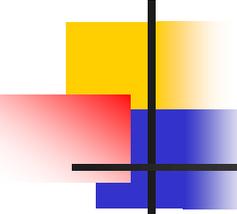
耐性マイコプラズマが生まれる場所は？

長年、マイコプラズマ肺炎の治療では、耐性は起きてこなかったのはなぜか？
では、どこで生まれたか？

耐性マイコプラズマが生まれる場所は？ →小児のreservoir

- 多くが小児が感染を受けている
 - 流行期には健康人の13.5%から検出 (Scan J Infect Dis 1992; 24: 161-4)
 - 家族の15%からM. pneumoniaeを検出 (家族の75%は15歳以下) (J Infect Dis 2001; 183: 675-678)
- 小児は無症状が多い (J Infect Dis 2001; 183: 675-678; PLOS Medicine 2013; 10: e1001444)
 - 検出された約50%は無症状
- 長期間、保有している
 - 平均7週間 (2日~7 か月) (Scan J Infect Dis 2014; 46: 315-9)

小児のreservoirに対する、長期間のマクロライド投与で、耐性は生じる。



小児マイコプラズマ肺炎の診断と治療に関する考え方のポイント 日本小児科学会治療指針 日本マイコプラズマ学会治療指針

■ 第一選択薬：マクロライド系薬

- 効果は、投与後 2～3 日以内の解熱で概ね評価できる。
- 「投与後 2～3 日以内の解熱しないのは、耐性株と判断する。」ことを意味している。
- 投与後 2～3 日の短時間でマイコプラズマは耐性を獲得できない。
- 「はじめから、耐性株に感染してマイコプラズマ肺炎になった。」と判断できる。
- マイコプラズマ肺炎にマクロライド投与して耐性になる可能性は非常に低い。

1回のマクロライド治療では、生じないのでは？

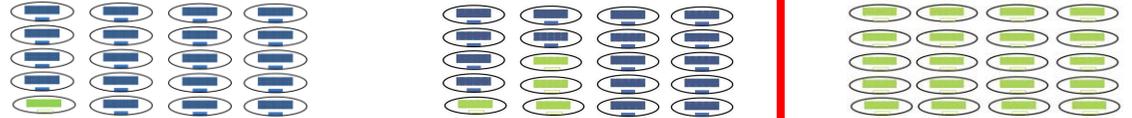
rRNAのhalf-lifeは3-7.5日と長い。

300個のrRNAが変化するのに時間がかかる



rDNAの変異

rRNAの変異



Quasispeciesの時期がある

1回の細胞分裂で
10⁷~10¹¹塩基に1塩基の変異

Doubling timeは8 時間

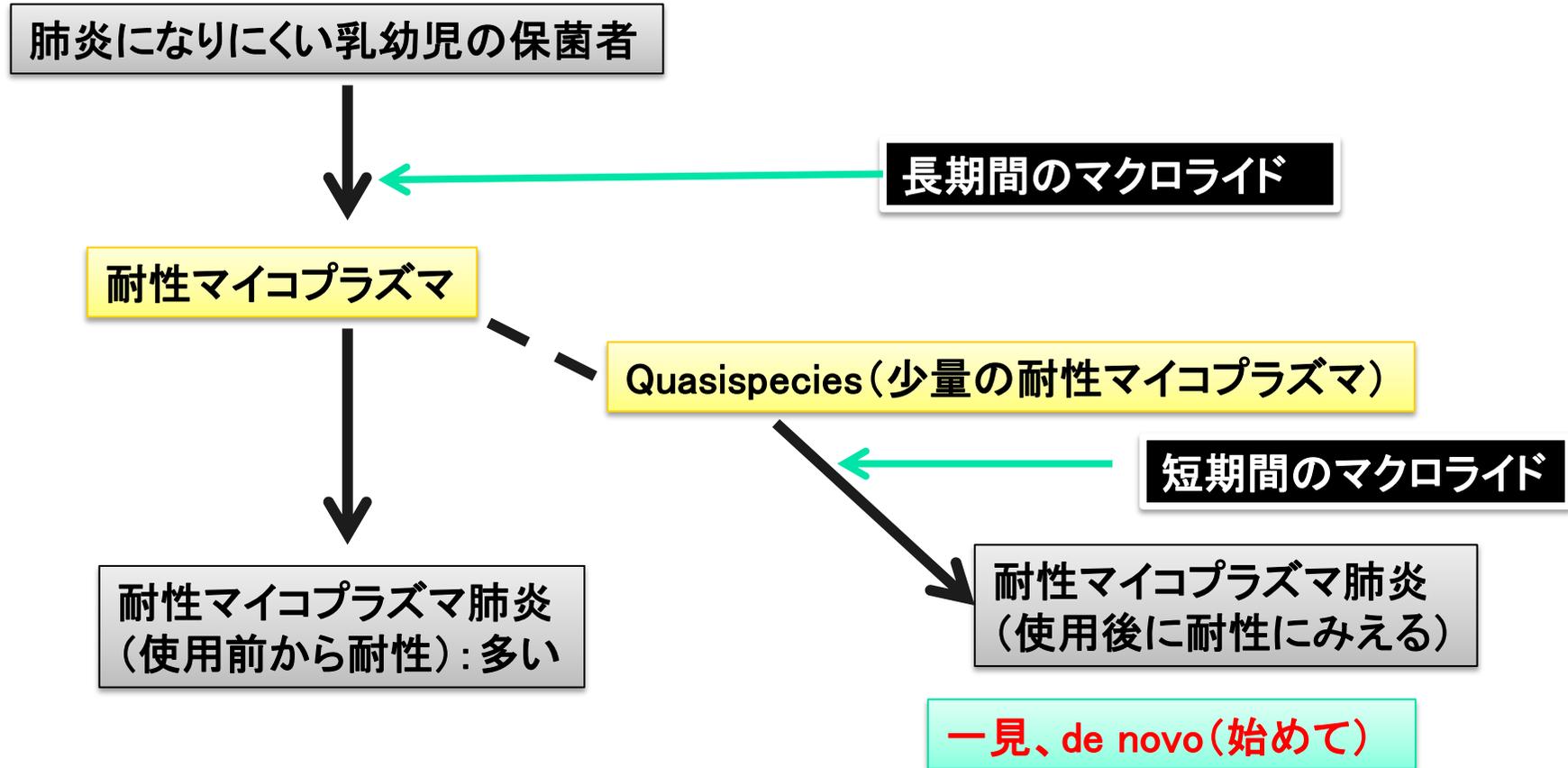
マクロライドがない限り、Quasispeciesの比率は変わらない。

rDNAの変異は起こりにくい

耐性株が増えていくためには、長期間のマクロライド使用が必要。
一人のマイコプラズマ肺炎からは発症できない。

Quasispeciesの感染を受ければ、一人の患者で発症できる。

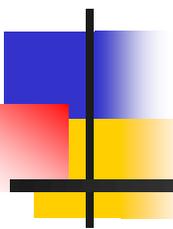
1回のマクロライド治療では、生じないのでは？



マクロライド耐性が生じた原因？

- マクロライドが長い間使用されてきたが、何故、2000年まで発症してこなかったか？
 - エリスロマイシン錠剤：1955年発売
 - エリスロマイシン・ドライシロップ：1966年発売
- 耐性株が最初に発見されたのがAZM市場販売開始の2000年と一致
 - マイコプラズマ肺炎に対する短時間の使用で、耐性マイコプラズマは発生しない。
- 1991年DPBに合併していない慢性副鼻腔炎に対するマクロライド療法の有用性が報告（1990年くらいから使用増加）
 - マイコプラズマ肺炎以外の小児の保菌者に対して、マクロライドの長期少量療法が行われるようになってから発生した可能性が高い。

アジスロマイシン： Not Guilty



「小児科の話題」に戻る

<https://doctor.99soudan.net/index5.htm>