

厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究
分担研究報告書

髄膜炎菌の分子疫学的マーカーを用いた解析方法の導入と確立に関する研究

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部 部長
協力研究者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌部 研究員

研究要旨

髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)は世界中で猛威を奮っているが、日本国内においては現在では稀な感染症であると認識されている。そのため国内で発生した髄膜炎菌性髄膜炎菌の疫学調査の方法が確立されておらず、日本の髄膜炎菌の潜在状況が明らかにされていない。そこで、我が国における髄膜炎菌の特徴を解析する手段として本年度は髄膜炎菌のハウスキーピング遺伝子の多様性という分子疫学マーカーを用いた分子型別、Multilocus sequence typing (MLST) 法の日本国内への導入と確立を試みた。

A. 研究目的

世界各国で髄膜炎菌性髄膜炎が流行している現状においても日本国内では年間 10 例ほどの症例しか報告されていない。また分子疫学的手法が導入されていないため日本で分類されている株が日本固有の髄膜炎菌株による発症例なのか、海外由来の髄膜炎菌株による輸入感染例なのかが不明である。一方、海外では多発する髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌の疫学調査を可能にするため MLEE (multi locus enzyme typing) という、菌抽出液をデンブングルで分離後、基質染色によって

そのアイソザイムパターンを同定する方法が開発されてきている。近年では遺伝子配列解析法の進展に伴い、MLEEに代わって遺伝子配列の多様性を直接解析する方法、Multi locus sequence typing (MLST) 法が導入されている(参考文献 1)。そこで本年度の研究対象として海外で確立され、既に実用化されている MLST を用いて髄膜炎菌株を分子疫学的に解析する方法を導入し、そのシステムを確立し、国内分離株を解析できるようにすることを目的とした。そのことにより 1) 国内で収集された病原菌が諸外国の流

行株と同一であるか否か、さらにはどの molecular typing に属するかの判定、2) 今までに海外から国内への輸入感染例が存在するのか、3) 新たに今後発生する髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌の海外由来株との同一性等の解明が容易になり、公衆衛生学的な対応に結びつけられるようになる。

B. 研究方法

sequence template の作成

Norway の National Institute of Public Health より、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) の基準株、H44/76 (ET-5) と H114/90 (LineageIII) の二株が分与された。また神奈川衛生研究所から過去に健康保菌者から単離された株、NIID57 を一株分与された。各菌株を 1% の IsoVital X enrichment (Becton-Dickinson) を添加した GC 寒天培地 (Becton-Dickinson) に塗布して 37℃、5% CO₂ 条件下で 18 時間培養し

た。その菌をコンラージ棒でかき取り、1ml の TE buffer に懸濁した。さらに 1ml の TEN buffer、0.2ml の 10% Sarkocyl、20μl の Protease K (10mg/ml) を加えて 55℃ で 1 時間静置した。その溶液をフェノール、フェノール+クロロフォルム、クロロフォルムで各一回処理を施し、抽出溶液をさらに RNase A 処理し、再度フェノール、フェノール+クロロフォルム、クロロフォルムで各一回処理を施した後に TE buffer にて一晚透析をして得られた溶液を染色体 DNA 溶液とした。

その DNA 100ng と以下のプライマーの 7 つの遺伝子座を Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystem) を用いて 95℃ × 5 分 → (94℃ × 0.5 分 → 55℃ × 0.5 分 → 72℃ × 2 分) × 30 サイクルのプログラムで PCR 法にて増幅した。その DNA を High Pure™ PCR Products Purification Kit (Roche) によって精製し、鋳型 DNA を調製した。

abcZ : P1;ATTCGTTTATGTACCGCAGG, P2;GTTGATTTCTGCCTGTTCCGG
adk : P1;ATGGCAGTTTTGTGCAGTTGG, P2;GATTTAAACAGCGATTGC
aroE : P1;ACGCAATTTGCGCCGACATC, P2;ATCAGGGCTTTTTTCAGGTT
fumC : P1;CACCGAACACGACACGATCG, P2;ACGACCAGTTCGTCAAATC
gdh : P1;ATCAATACCGATGTGGCGCGT, P2;GGTTTTTCATCTGCGTATAGA
pdhC : P1;GGTTTCCAACGTATCGGCGAC, P2;ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
pgm : P1;CTTCAAAGCCTACGACATCCG, P2;CGGATTGCTTTTCGATGACGGC

Sequence reaction 及び解析

ABI PRISM Big Dye Terminator cycle Sequencing ready Reaction Kit (Applied Biosystem) を用いて作成した鋳型 DNA 50ng と以下のプライマーを用いて sequence 反応を行なった。

反応物は CENTRI-SEP COLUMNS (Applied Biosystem) によって精製し、乾燥後、10µl の TSR に溶解して ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) に供して DNA 配列を解読した (図 1)。

abcZ : P1;ATTCGTTTATGTACCGCAGG, S2;GAGAACGAGCCGGGATAGGA
adk : S1;AGGCTGGCACGCCCTTGG, S2;CAATACTTCGGCTTTCACGG
aroE : S1;GCGGTCAACTACGCTGATT, S2;ATGATGTTGCCGTACACATA
fumC : S1;TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG, S2;TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC
gdh : S1;GTGGCGCGTTATTTCAAAGA, S2;CTGCCTTCAAAAATATGGCT
pdhC : S1;TCTACTACATCACCTGATG, P2;ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
pgm : S1;CGGCGATGCCGACCGCTTGG, S2;GGTGATGATTTTCGGTTGCGCC

Sequence の解析

得られた DNA の塩基配列を DNA 塩基配列ソフト、DNASIS (HITACHI) によって塩基配列を解析し、以下の入力配列領域を最終確認した (図 2)。

abcZ : 433 bp
adk : 465 bp
aroE : 490 bp
fumC : 465 bp
gdh : 501 bp
pdhC : 480 bp
pgm : 450 bp

MLST

Multi locus sequence typing (MLST) を行なうために英国オックスフォード大学のホームページに設置されるサイト、<http://mlst.zoo.ox.ac.uk/> にアクセスし、最終確認した塩基配列を入力してアイソザイムナンバーを決定した (図 3、4、5)。

7 つの遺伝子座についてそれぞれのアイソザイムのナンバーを同定後、別のページに再度アクセスし、それらのナンバーを入力してエンザイムタイプを同定した (図 6、7)。

C. 研究結果

ノルウェーより分与された既に MLST の型が同定済の基準株二つについて得られている結果と同様の結果が得られるかを解析した。

その際に論文、ホームページに記載されている手順の簡略化を図った。各遺伝子座の増幅は原法では遺伝子座ごとに PCR の設定温度、時間が異なっていたが、すべての遺伝子座の増幅を同一条件で出来る条件を見出し、時間を短縮させることが出来た。さらに PCR 産物の精製法に関しても市販のキットを導入することにより、作業の効率化を図ることに成功した。

上記の改良点を導入して MLST を実施した。

H44/76 株においては研究方法に従って解析を行った結果、データベース上でエンザイムタイプ:ET-5 と同定され、既知の結果と一致した (図 7)。

H114/90 株も同様の解析を行なった結果、エンザイムタイプ:Lineage III と同定され、既知の結果と一致した (図 8)。

一方、未同定の健康保菌者からの分離株、NIID57 は既知のタイプに属さない、新しいエンザイムタイプであることが明らかとなった (図 9)。

D. 研究考察

本年度の研究成果により我が国において MLST が導入され、諸外国と共通の場での解析とその結果の比較が可能となった。

また、MLST 解析結果から健康保菌者からの分離株、NIID57 はどのエンザイムタイプにも属さない新規のエンザイムタイプであることが明らかとなった。このことは日本に潜在する髄膜炎菌は海外の髄膜炎菌株とは異なる可能性あるいは、健康保菌者から分離された株は発病した患者から単離される病原株とは異なるクローンである可能性を示唆しているのかもしれない。

E. 展望

今後は、1) 他の分担研究者によりすすめられている健康保菌者からの分離株について MLST を用いて分子疫学解析を行ない、日本に存在する髄膜炎菌株のルーツ、及び分布を明らかにしていく 2) 本研究班主任研究者のグループにより独自に収集された菌株について MLST 解析を行ない、過去に分離された株の特徴に関する解析を進めていく方針である。

F. 参考文献

Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., and

Spratt, B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 3140-3145, 1998

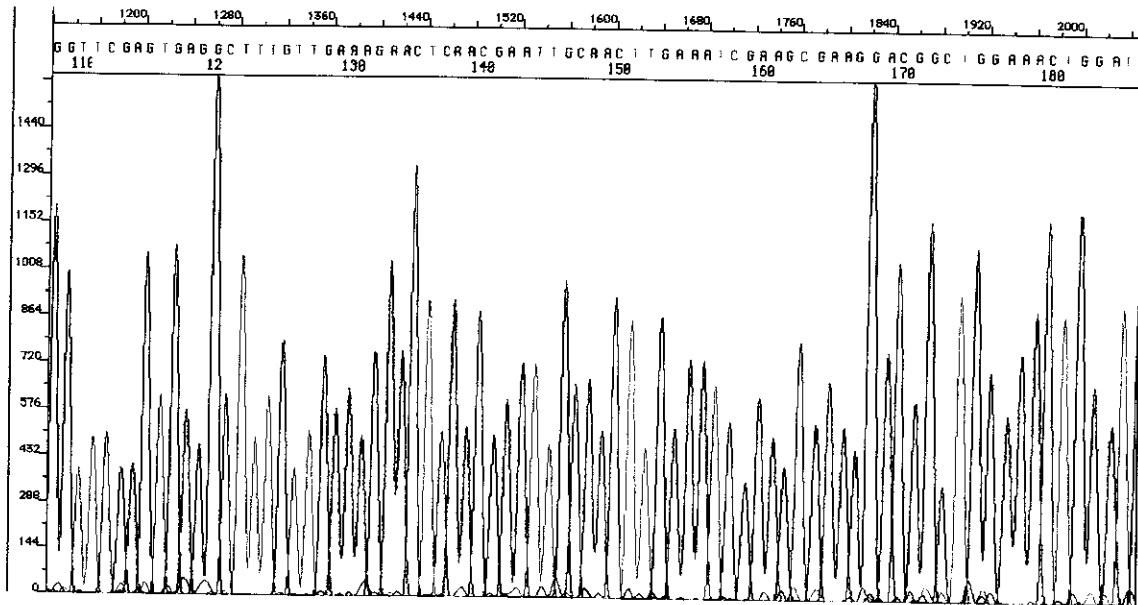


図1 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)によって解読された塩基配列の一例 (DNA 鋳型 : H44/76、プライマー : *abcZ*-S1)

abcZ-forward						
Size 624 bp, Select 27 - 460						
10	20	30	40	50	60	
TCCTTACTG	NAAGGACGCA	ACCGTATTTG	ATACCGTTGC	CGAGGTTTG	GGCGAATTC	
70	80	90	100	110	120	
GTGATTTATT	GCGCCGTTAT	CATCATGTCA	GCCATGAGTT	GGAAAATGGT	TCGAGTGAGG	
130	140	150	160	170	180	
CTTTGTTGAA	AGAACTCACC	GAATTGCACC	TTGAATCGA	AGCGAAGGAC	GGCTGGAAAC	
190	200	210	220	230	240	
TGGATGCGGC	AGTCAAGCAG	ACTTTGGGGG	AACTCGGTTT	GCCGGAAAT	GAAAAATCG	
250	260	270	280	290	300	
GCAACCTTTC	CGGCGGTCAG	AAAAAGCGCG	TCGCCTTGGC	TCAGGCTTGG	GTGCAAAAGC	
310	320	330	340	350	360	
CCGACGTATT	GCTGCTGGAC	GAGCCGACCA	ACCATTTGGA	TATCGACGCG	ATTATTTGGC	
370	380	390	400	410	420	
TGGAAATCT	GCTCAAGCG	TTTGAGGGCA	GCTTGGTTGT	GATTACCCAC	GACCGCCGTT	
430	440	450	460	470	480	
TTTTGGACAA	TATCGCCACG	CGGATTGTCC	AACTCGATCG	CGGTATTTTG	CGTTCCTATC	
490	500	510	520	530	540	
CCGGCTCGTT	CTCTAATAC	AGCGAGAAAA	AAGCGCAAGA	GTTGGCAAGT	CCGAGCCGGA	
550	560	570	580	590	600	
ACACACCCCG	CCTCTTTTGA	CARATTCCAC	GCCACAGGAA	AGAGCATGG	ATACCCAAAG	
610	620	630	640	650	660	
GGCATTGAA	ACCGCCGCC	GTAC.....	
670	680	690	700	710	720	

図2 遺伝子配列解析ソフトDNASIS (HITACHI) によるH44/76 *abc* 遺伝子の塩基配列の解析

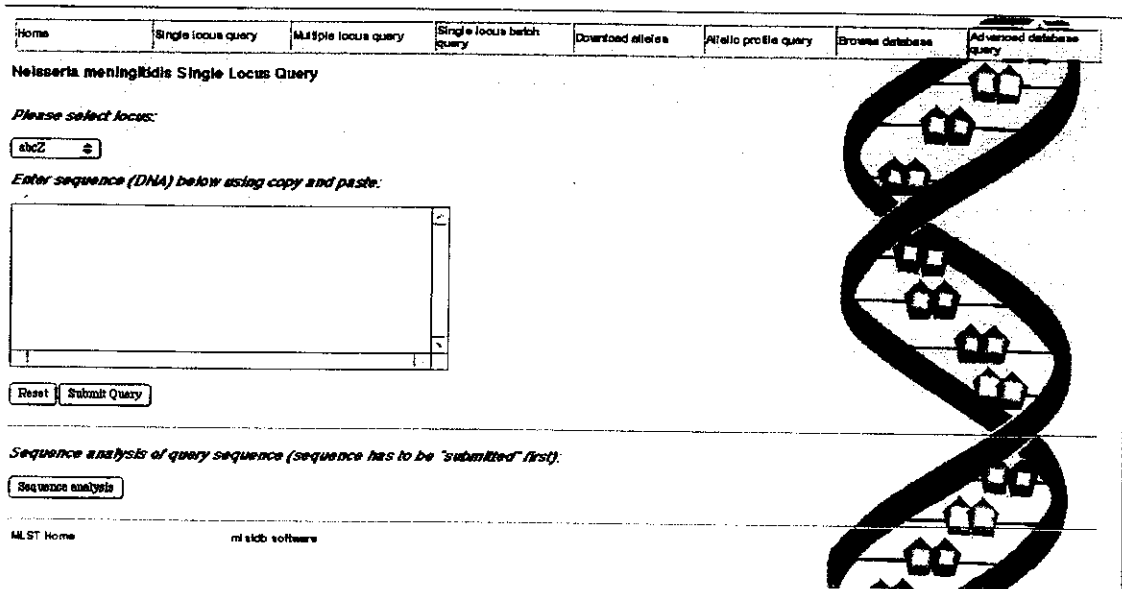


図 3 英国オックスフォード大学のホームページサイト (<http://mlst.zoo.ox.ac.uk/>) における *Neisseria meningitidis* の *abcZ* 遺伝子座における入力画面

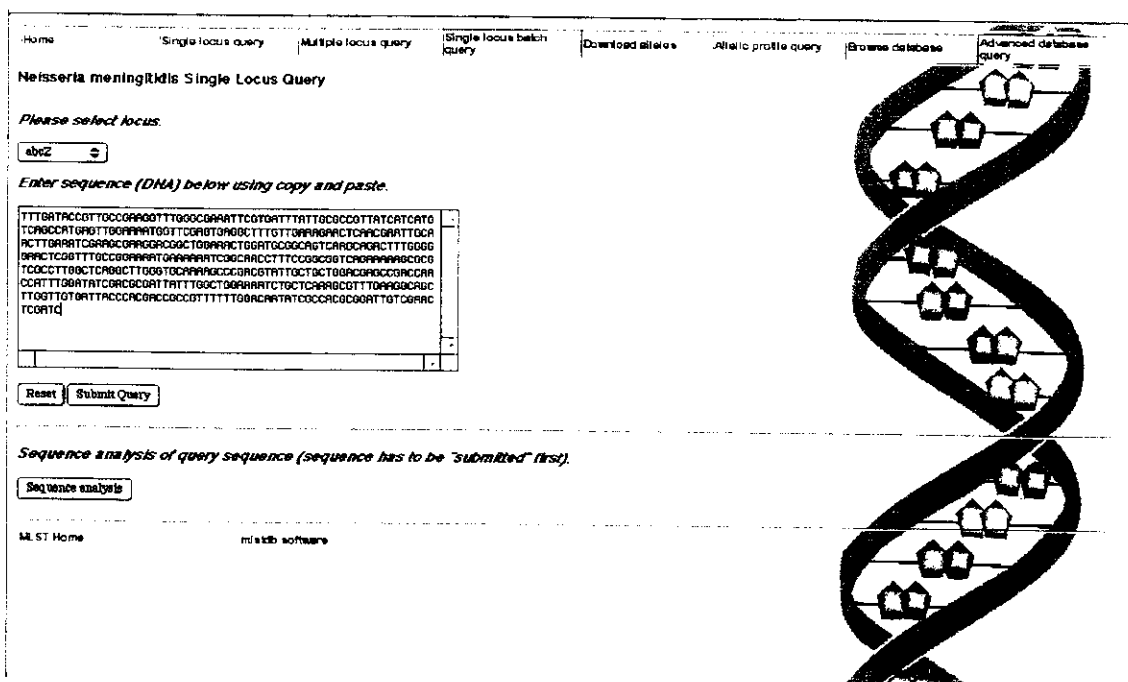


図 4 髄膜炎菌基準株 H44/76 の *abcZ* 遺伝子座の塩基配列入力画面

Home Single locus query Multiple locus query Single locus batch query Download alleles Allelic profile query Browse database Advanced database query

Neisseria meningitidis Single Locus Query

Please select locus:

Enter sequence (DNA) below using copy and paste:

```
TTTGTATCCGTTGCCGAGGTTTGGCCAAATTCGTGATTTATTCGCCCTTATGATCATG
TCAGCCATGATTTGAAATGATTCGAGTGAAGCTTTGTTGAAAGACTCAGCAGATTGGA
ACTTGGATTCGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
AGACTGAGTTTCCCGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAA
TCGCCTTGCTCAGGTTGGTGCAGAGCCGAGCTATTGCTGCTGAGCAGCCAGCCAG
TCGATTTGATTCAGCAGCAGTATTTGCTGAGAGATCTGCTGAGAGCCTTGAAGCAGC
TTGATTTGATTTACCCAGCCAGCCAGCTTTTGTGACATATTCGCCAGCCAGTATGTCAGC
TCGATG
```

Sequence analysis of query sequence (sequence has to be "submitted" first).

MLST Home ml stdb software




図5 髄膜炎菌基準株 H44/76 の *abcZ* 遺伝子座のアイソザイムタイプナンバー決定結果の画面

Home Single locus query Multiple locus query Single locus batch query Download alleles Allelic profile query Browse database Advanced database query

MLST Allelic Profile Query

Neisseria meningitidis

Enter your allelic profile below:

abcZ <input type="text" value="1"/>	adk_ <input type="text" value="1"/>	aroE <input type="text" value="1"/>
fumC <input type="text" value="1"/>	gdh_ <input type="text" value="1"/>	pdhC <input type="text" value="1"/>
pgm_ <input type="text" value="1"/>	Type of search <input type="text" value="Exact or nearest match"/>	

MLST Home ml stdb software




図6 髄膜炎菌基準株 H44/76 の *abcZ* 遺伝子座のエンザイムタイプ決定の入力画面

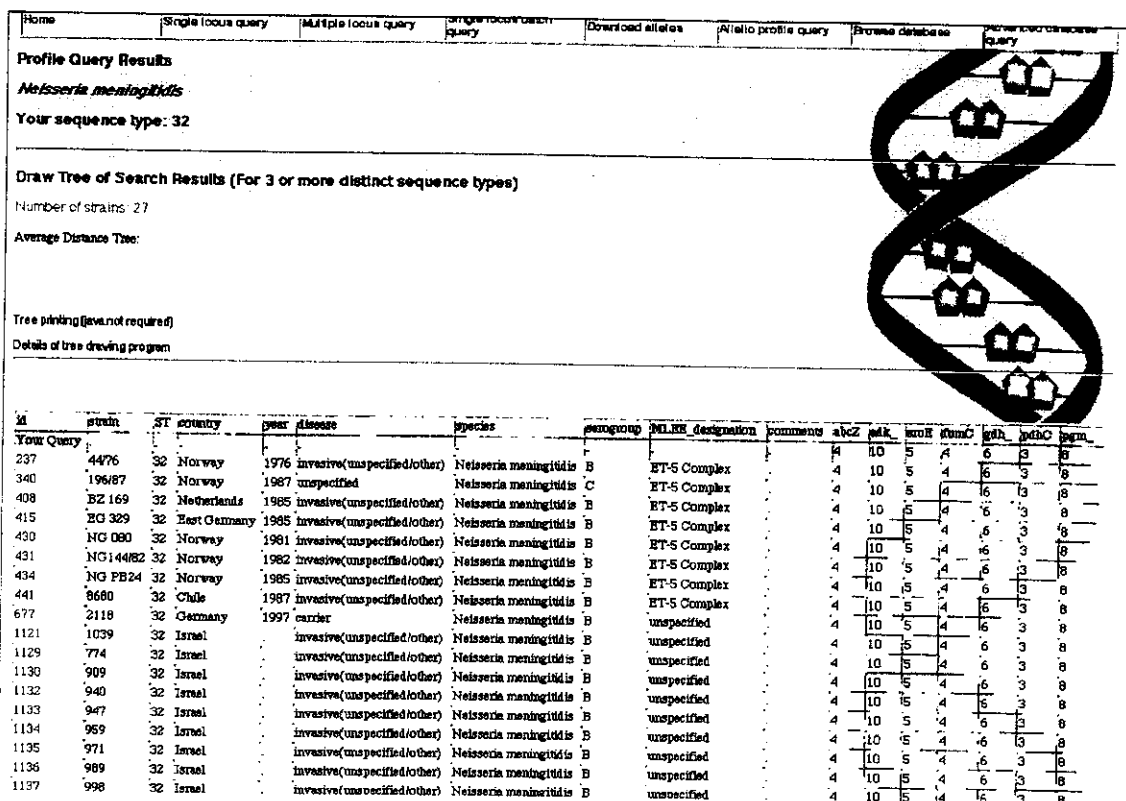


図 7 髄膜炎菌基準株 H44/76 のエンザイムタイプ決定

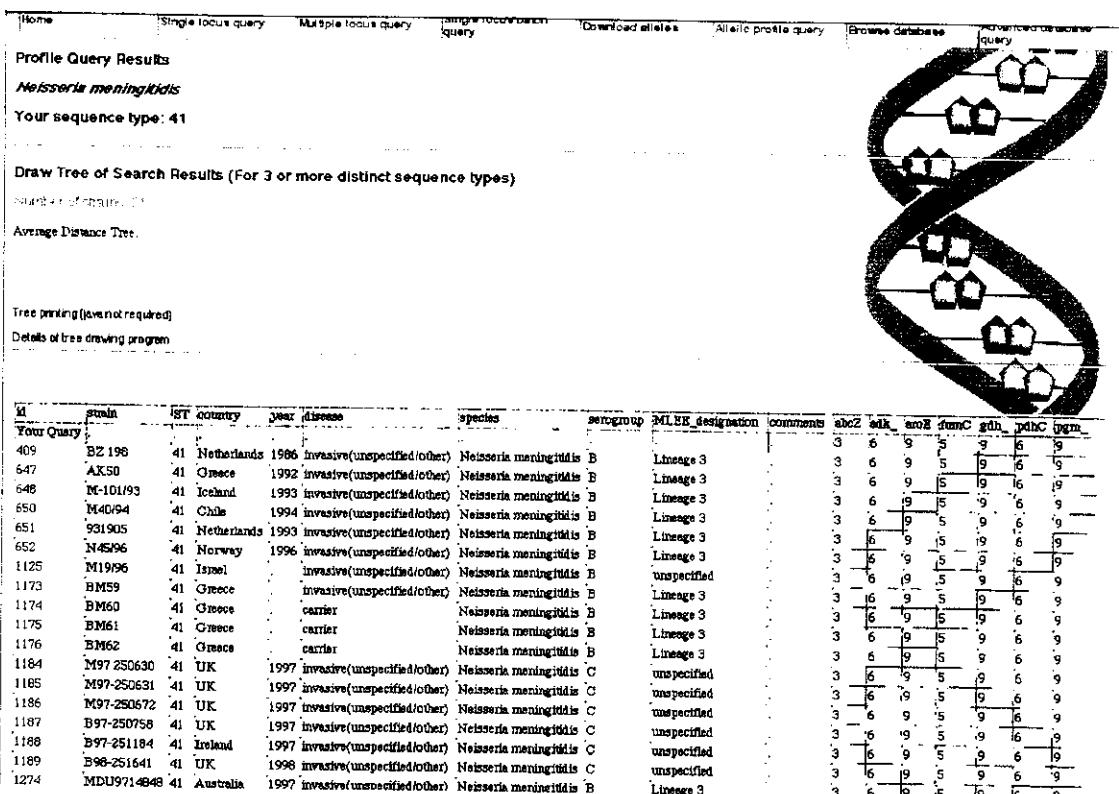


図 8 髄膜炎菌基準株 H114/90 のエンザイムタイプ決定

Home | Single locus query | Multiple locus query | Single nucleotide query | Download alleles | Allelic profile query | Browse database | Multiple locus query

Profile Query Results
Neisseria meningitidis
 Closest match: 4 matches

Draw Tree of Search Results (For 3 or more distinct sequence types)
 Number of strains: 9
 Average Distance Tree:
 Tree printing (java not required)
 Details of tree drawing program

id	strain	ST	country	year	disease	species	serogroup	MLER designation	comments	hbsZ	hsk	hcnH	hcnO	hcnI	hcnJ	hcnK
Your Query																
1101	5873	198	Gambia		carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	Non-groupable	unspecified		95	4	18	15	14	2	12
1102	6053	198	Gambia		carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	unspecified	unspecified		5	4	17	15	14	7	12
1103	6133	198	Gambia		carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	Non-groupable	unspecified		5	4	17	15	14	7	12
1104	6241	198	Gambia		carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	B	unspecified		5	4	17	15	14	7	12
1105	6323	198	Gambia		carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	Non-groupable	unspecified		5	4	17	15	14	7	12
1109	3113	201	Gambia		carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	Non-groupable	unspecified		5	4	17	15	14	7	12
2038	88	822	Germany	1999	carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	unspecified	unspecified	Bavarian Carriage Study	5	4	17	15	14	7	12
2186	732	968	Germany	2000	carrier	<i>Neisseria meningitidis</i>	unspecified	unspecified	Bavarian Carriage Study	103	14	17	15	14	7	12

図9 健康保菌者分離髄膜炎菌株 NIID57 のエンザイムタイプ決定

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究
分担研究報告書

髄膜炎菌の血清型の分布に関する研究

主任研究者 山井志朗 神奈川県衛生研究所細菌病理部長

研究要旨

わが国で分離される菌株を国際的に標準的な型別法で型別することで流行発生の比較が国際間で可能となるようにするために、欧米を中心に広く用いられている血清型別法（serotyping および serosubtyping）の導入を試みた。収集株（臨床分離株および健康保菌者分離株）48 株における血清型の分布を調査したところ、27 パターンが得られた。得られたパターンの中には海外で流行型として注目されている ET-5 complex に属する株でみられるパターンがあり、MLEE により ET-5 complex であることが確認された。

研究協力者

浅井良夫 神奈川県衛生研究所臨床血清科長
渡辺祐子 神奈川県衛生研究所臨床血清科
主任研究員
黒木俊郎 神奈川県衛生研究所臨床血清科
主任研究員

54 年（1979 年）から平成 10 年（1998 年）までに分離された臨床分離株 35 株、健康保菌者から分離された株 13 株の合わせて 48 株を用いた。臨床分離株には全国各地の医療機関、地方衛生研究所等から分与された株あるいは血清群別等の検査依頼を受けた株が含まれていた。

分離・収集された株はゼラチン・ディスク法を用いて-80℃で凍結保存し、要に応じて培養して調査に供した。

A. 研究目的

髄膜炎菌の疫学調査等では、疫学マーカーとして群別法（serogrouping）が凝集法等の簡単な方法で実施できることから非常に普及している。この他に PorA や PorB の抗原性に基づく血清型別（serotyping および serosubtyping）が開発され、欧米を始めとする多くの国々で流行の解析等に広く活用されている。しかし、わが国ではこれまで血清型別は行われていなかった。そこで本研究では、血清型別法を実施できる体制を確立することを目的としてその導入を行い、収集株における血清型の分布や流行株等の検出状況を探った。

2) 血清型別用モノクロナール抗体

血清型別用モノクロナール抗体は、National Institute of Public Health, Norway および WHO International Laboratory for Biological Standards, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom 等より分与を受けた。

型別用モノクロナール抗体は、serotype 用と serosubtype 用があり、各抗体液は-80℃で保存した。抗体の力価により、所定の割合になるように PBS で希釈し、使用するまで冷蔵保存した。

B. 研究方法

1) 調査の対象とした髄膜炎菌株

神奈川県衛生研究所で分離・収集した髄膜炎菌株のうち、凝集法により B 群とされた、昭和

3) 血清型別の実施方法

血清型別（serotyping および serosubtyping）はドットプロット法を用いて行った¹⁾。菌株抗原液をニトロセルロース膜製ストリップ

にスポット状に滴下して乾燥させた。抗体希釈液に抗原を接種したストリップを浸して室温で一晩振盪して抗原抗体反応を起こさせた。洗浄後、Horseradish peroxidase 感作抗マウスウサギ抗体を加えて室温で2時間振盪した。さらに洗浄後、基質と過酸化水素水を加えて抗原液をスポット状に接種した部分が発色するまで室温で10~15分程度振盪した。抗原液のスポットが発色したものを陽性として、タイプを決定した。

C. 研究結果

収集株48株について調べたところ、表1に示したように serotype が8パターン、serosubtype が17パターンあり、群別結果との組み合わせで27パターンが得られた。

各パターンにおける株数は1~7株であった。最も株数が多かったのは7株のNG:NT:P1.15、次いで4株のNG:15:P1.6であり、これに3株のB:NT:とB:NT:P1.5,2が続いた。

最も多くの株が表現型として示したNG:NT:P1.15と同一クローンに由来すると考えられるB:NT:P1.15の合わせて8株は1982年から1990年の期間に7人から分離された。このうち6人は患者(男2人、女4人)で、年齢は38-70才、2名は年齢が不明であるが、泌尿器科を受診して膣、子宮口から検出されているので成人と考えられる。髄液から検出されたのは1株のみで、他は喀痰から2株(1株は肺気腫患者から分離)、膣、子宮口から3株から分離された。残りの1人は患者の家族で、咽頭から当該菌が検出された。

解析の対象とした株のうち、MLEEによる型別でET-5 complexに属する株が示すタイプが見いだされたため、National Institute of Public Health, Norway にB:15:P1.7、B:15:P1.7,16およびB:NT:P1.7を示した4株を送付してMLEEによる型別を依頼した。その結果、これら4株はET-5 complexであることが明らかとなった。

D. 考察

収集株(臨床分離株、患者接触者由来株およ

び健康保菌者由来株)のphenotypeを調べたところ、27パターンが見いだされ、多くのパターンではそれに属する株数は1~2株であり、特定のパターンを示すクローンが特に優勢に分離されるという状況は見られなかった。しかし、同一あるいは同じパターンに由来すると考えられるパターンを示した株の数が3株、4株あるいは7株となった。これはわが国において比較的規模の大きい流行が発生している可能性が低いことを示唆しているものと推測されるが、散発性の流行である可能性もあり、この点についてさらに詳細に解析する必要がある。

菌株数が7株と最も多かったNG:NT:P1.15と次の4株が示したNG:15:P1.6、さらに3株のB:NT:とB:NT:P1.5,2のパターンを有する株は、患者と保菌者(患者家族を含む)から分離されている。分離された年は、NG:NT:P1.15では1982年から1990年に、NG:15:P1.6では1986年から1990年に、B:NT:も1982年から1990年に、B:NT:P1.5,2では1982年から1988年に渡っていた。これは、これらのパターンを有する株がわが国において定着し、広く広がっていることが示唆している。

今回の解析の中で、特定のクローンによる地域的な流行あるいは定着と考えられる状態が示された。前述のNG:NT:P1.15とB:NT:P1.15の合わせて8株が分離されたのは、都内の総合病院の泌尿器科、都下の総合病院および千葉県内の総合病院の3医療機関に限られていた。分離された時期は1982年から1990年と比較的長期間であったが、地理的には狭い範囲の場所での患者の発生であった。

さらにB:15:P1.7、B:15:P1.7,16およびB:NT:P1.7のパターンを示し、ET-5 complexであることが明らかとなった4株は、1株が1979年に岡山県で、3株が1983年と1984年に島根県で分離された。解析した株数は少ないが、このクローンが中国地方で流行していた、あるいは限られた地域内で感染が広がっていたものと推察される。

米国の研究グループは、外膜蛋白によるワクチン製造のための基礎的データ収集のために、外膜蛋白の抗原性に基づいているserosubtypingおよびserotypingの分布調査をおこなった。米国においては244株のうち上述

の P1.7,16 を示す株が 14.3% で最も高い頻度で検出され、次いで P1.19,15 (9.8%)、P1.7,1 (8.6%)、P1.5,2 (7.8%)、P1.22a,14 (7.8%)、P1.14 (5.3%) が検出される頻度が高いと報告している²⁾。また、serotyping では 4,7 (27.5%)、15 (16.0%)、14 (8.6%)、10 (6.1%)、1 (4.9%) および 2a (3.7%) の検出頻度が高いとしている。これに対して、今回解析した収集株における分布は serosubtype で検出頻度が高いのは、P1.15 (18.8%)、P1.5,2 (10.4%)、P1.5 (8.3%)、P1.6 (8.3%)、P1.7 (6.3%) の順であり、serotype では 15 (25.0%) 4 (12.5%) 14 (8.3%) の順であった。この結果から、わが国での serotype と serosubtype の分布が米国のそれとはやや異なっていると考えられる。

E. 文献

1. Wedege, E., Hoiby, E.A., Rosenqvist, E. and Froholm, L.O. : Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by co-agglutination, dot-blotting and ELISA. *J. Med. Microbiol.* 31:195-201;1990.
2. Tondella, M.L., Popovic, T., Rosenstein, N.E. et al : Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 38:3323-3328;2000.

表1 髄膜炎菌収集株48株の血清型のパターン

Serogroup	Serotype/ serosubtype	No. of strains	Source	
C?	1:-	2	Patient	
NG	2c:P1. 5, 2	2	Patient	
B	4:P1. 3, 6, 15	1	Patient	
NG	4:P1. 5	1	Patient	
B	4:P1. 14	1	Patient	
NG	4:P1. 5	2	Patient	
B	4:-	1	Patient	
B	14:P1. 10	2	Patient, Family	
NG	14:P1. 15	1	Patient	
NG	14, 19:P1. 22, 6	1	Patient	
B	15:P1. 5	1	Patient	
NG	15:P1. 6	4	Patient, Carrier	
NG	15:P1. 19, 6	1	Carrier	
B	15:P1. 7	2	Patient	ET-5 complex
B	15:P1. 7, 16	1	Patient	ET-5 complex
NG	15:P1. 22, 5	1	Patient	
NG	15:-	2	Patient, Carrier	
B	17:P1. 22, 14	1	Patient	
B	19, 22/23:P1. 2	1	Patient	
NG	19, 22/23:P1. 15	1	Patient	
B	NT:-	3	Patient, Carrier	
B	NT:P1. 2	1	Family	
B	NT:P1. 5, 2	3	Patient, Carrier	
NG	NT:P1. 5, 2, 6	1	Patient	
B	NT:P1. 7	1	Patient	ET-5 complex
NG	NT:P1. 15	7	Patient, Carrier	
NG	NT:P1. 19, 15	2	Patient, Family	

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究
分担研究報告書

髄膜炎菌の薬剤感受性の測定と耐性菌の出現に関する研究

主任研究者 山井志朗 神奈川県衛生研究所細菌病理部長

研究要旨

髄膜炎菌感染症において、特に原因菌への効果を期待する治療は、患者に対する抗生物質の投与である。近年、髄膜炎菌が種々の抗生物質に対して感受性の低下を示し、あるいは耐性を獲得していることが報告されている。そこで感受性の低下や耐性の獲得を調べるために、収集株（臨床分離株および保菌者由来分離株）166株の、髄膜炎菌感染症の治療上重要な種々の薬剤に対する感受性値を測定した。サルファ剤に対しては約70%の株が耐性を示し、テトラサイクリン耐性株が7株見いだされ、そのうち3株はMIC値が32 μ g/mlであった。ペニシリン系薬剤および第1世代セフェム系薬剤に対しては感受性が低下していた。

研究協力者

浅井良夫 神奈川県衛生研究所臨床血清科長
渡辺祐子 神奈川県衛生研究所臨床血清科
主任研究員
黒木俊郎 神奈川県衛生研究所臨床血清科
主任研究員

公衆衛生上の問題も引き起こす。したがって、髄膜炎菌の耐性の獲得や感受性の低下を調べることは、治療方針の決定や抗生物質の開発に重要な情報を提供することのみならず、患者の生命を守り、さらに迅速な治療を可能とすることで2次感染を防ぐこと等により感染の拡大の防止につなげることができる。

本研究は、収集株の各種抗生物質に対する感受性値を測定し、耐性菌の存在や感受性の低下の動向を調べ、髄膜炎菌感染症の治療が確実に行われるための情報の収集を目的とした。

A. 研究目的

細菌性感染症の治療は、抗生物質の投与が主流である。髄膜炎を始めとする髄膜炎菌感染症においても、サルファ剤、ST合剤、ペニシリン系薬剤、セフェム系薬剤、ニューキノロン系薬剤が選択され、患者に投与されている。こうした薬物治療に対して、多くの細菌性病原体は抗生物質に対する耐性を獲得して薬物に対抗し、生存しようとする。髄膜炎菌も他の病原細菌と同様にサルファ剤やペニシリン系薬剤等の抗生物質に対して耐性を獲得し、あるいは感受性が低下していることが報告されている。こうした耐性や感受性の低下は髄膜炎菌性感染症の治療に対して、抗生物質の効果が低下する、あるいは効果を失うという重大な影響をもたらす、患者の生命を脅かすのみならず、感染が拡大するといった

B. 研究方法

1) 対象菌株

薬剤感受性の測定には、神奈川県衛生研究所細菌病理部においてこれまでに収集・保存した国内の臨床分離株および健康保菌者からの分離株166株を用いた。

菌株はゼラチン・ディスク法により-80℃で凍結保存した。要に応じて培養し、測定に供した。

2) 測定の対象とした薬剤

髄膜炎菌の感受性値測定の対象とした薬剤は Benzylpenicillin (PCG: 明治製菓)、Ampicillin (ABPC: 明治製菓)、Cefazolin (CEZ: 藤沢薬品)、Cefuroxime (CXM:), Cefotaxime (CTX: ヘキストマリオンセル)、Nalidixic acid (NA: 第一製薬)、Norfloxacin (NFLX: 杏林製薬)、Tetracycline (TC: ファイザー製薬)、Erythromycin (EM: 塩野義製薬)、Chloramphenicol (CP: 三共製薬)、Rifampicin (RFP: 第一製薬)、Sulfamethoxazole (SMX: 塩野義製薬)、Sulfamethoxazole/ Trimethoprim (ST: 塩野義製薬) とした。

3) 薬剤感受性測定法

薬剤感受性値は、寒天平板希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC 値) の測定により行い、その測定方法は National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) が定める方法に準じた¹⁾。すなわち、10%ウマ血液加ミューラーヒントン培地 (Difco, Detroit, USA) に所定の濃度の薬剤を添加した寒天平板培地を作製し、各菌株の 10^4 CFU を接種機 (マイクロプランター、佐久間製作所、東京) を用いて接種した。菌を接種した寒天平板培地は 35℃ で 24 時間ロウソク培養した。培養後、各寒天平板培地上の集落の有無を観察・記録し、MIC 値を決定した。

4) 結果の判定

髄膜炎菌の各薬剤 (PCG、ABPC、CEZ、CXM、CEZ、NA、NFLX、TC、EM、CP、RFP、SMX、ST) に対する感受性の判定に用いる break point は NCCLS が定める淋菌のそれを利用した¹⁾。その他の薬剤 (RFP、SMX) については、文献の方法を参照して行った^{2,3)}。

C. 研究結果

対象とした髄膜炎菌の MIC 値の分布を表 1 と図 1~10 に示した。

PCG、ABPC および CEZ では感受性が低下した株が見られ、PCG に対して 51 株

(30.7%) が中等度耐性 (intermediate; MIC 値: $<1 \mu\text{g/ml}$, $\geq 0.125 \mu\text{g/ml}$) と判定された。それぞれの薬剤の MIC₉₀ は $0.125 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.125 \mu\text{g/ml}$ および $0.5 \mu\text{g/ml}$ であった。EM に対して 8 株が中等度耐性と判定された。CXM、CTX、NFLX、CP、RFP に対してはいずれの株も感受性であった。

調査した 166 株のうち 7 株 (4.2%) が TC に対して耐性であった。このうち 3 株 (1.8%) は MIC 値が $32 \mu\text{g/ml}$ を示す高度耐性株であった。この株は 19 年に患者の両親と姉から分離された。この事例では患者からは髄膜炎菌は分離されなかった。残りの 4 株の MIC 値は $2 \mu\text{g/ml}$ であった。

SMX の MIC₉₀ は $256 \mu\text{g/ml}$ で、およそ 70% の株が耐性化していた。感受性値の分布は 2 峰性で、 $2 \mu\text{g/ml}$ と $64\text{--}128 \mu\text{g/ml}$ にピークが見られた。菌株の由来 (患者と保菌者) の間で、耐性株の出現の割合や感受性値の分布にはほとんど違いは見られなかった。

D. 考察

収集株 166 株について、治療薬として使用される抗生物質を中心に感受性値の測定を行ったところ、ペニシリン系薬剤やテトラサイクリン系薬剤、サルファ剤で中等度耐性あるいは耐性を示す株が見いだされた。これらの薬剤を治療に使用する場合は耐性菌に対する十分な配慮が必要である。

髄膜炎菌の耐性は、諸外国においてこれまでにサルファ剤耐性、ペニシリンに対する感受性の低下あるいは耐性、クロラムフェニコール耐性、テトラサイクリン耐性、キノロン剤に対する感受性の低下等が報告されている。今回の調査の対象にした収集株の中にはクロラムフェニコール耐性あるいはキノロン耐性は見いだされなかった。今後これらの薬剤に対する耐性菌が出現する可能性は否定できないため、分離株を積極的に収集して感受性値の動向や耐性菌の出現を監視するが強く望まれる。

ペニシリン系薬剤に対する感受性の低下や中等度耐性を示す株が検出されていることが諸外国から報告されている。すなわち、米国

の調査では 28%、スペインでは約 50~70%、オーストラリアでは 75%、スイスでは 12%であった²⁻⁵⁾。

感受性値を調べた 166 株から PCG あるいは ABPC 等のペニシリン系薬剤に対する感受性が低下し、中等度耐性と判定された株が 51 株 (30%) 見いだされた。PCG 等は侵入性髄膜炎菌感染症の治療薬として推奨されているが、中等度耐性菌に対しては治療効果が低い可能性があり、治療薬の選択に注意を要する。

今回の調査では、RFP、NFLX および CP に対する耐性菌は無かったが、海外ではこれらの薬剤に対する耐性菌が報告されている^{4, 6)}。オーストラリアの 1998 年の調査では、患者から分離された髄膜炎菌株 323 株のうち、75%はペニシリン系薬剤に対して中等度の耐性を示した。また、4 株は RFP に対して、1 株は ciprofloxacin、1 株は CP に対して感受性が低下していた。Ciprofloxacin 耐性菌の MIC 値は 0.25 μ g/ml で、キノロン剤の作用点である DNA ジャイレースに関与する遺伝子 *gyrA* の変異が報告されている⁷⁾。キノロン剤に対する耐性機構は染色体上にある *gyrA* 等の遺伝子の突然変異による。したがって、キノロン剤を複数回あるいは長い期間投与することにより髄膜炎菌が耐性を獲得する可能性がある。キノロン剤を使用する場合には、耐性菌を出現させないに注意が不可欠である。

調査した髄膜炎菌収集株の中に TC 耐性株が 7 株含まれていた。このうちの 3 株は MIC 値が 32 μ g/ml と非常に高い値を示した。この 3 株は 1995 年に患者の家族 (両親と姉) の咽頭検体から分離された株であり、同一クローンであると考えられる。この事例では患者からは髄膜炎菌は分離されなかった。この株の耐性機構について、早急に解析しなければならないが、髄膜炎菌を始めとする *Neisseria* 属菌の TC 耐性は *tetM* 遺伝子が関与していることが報告されている⁸⁾。髄膜炎菌とその類縁菌である淋菌ではプラスミド性 (25.2MD 接合プラスミド) に当該遺伝子を有し、TC 耐性を獲得している⁹⁾。淋菌でも国内で分離された分離菌の中にテトラサイク

リン高度耐性淋菌が存在することが確認されており、*tetM* を保有していることが遺伝子の解析で明らかにされている¹⁰⁾。今後、*tetM* 遺伝子の保有を確認しなければならないが、テトラサイクリン高度耐性髄膜炎菌が既にわが国に存在していたことが本研究で初めて確認された。

髄膜炎菌株の多くはサルファ剤耐性となっている。今回調べた 166 株でも 70%が耐性となっていた。サルファ剤は以前は治療薬として盛んに用いられていたが、耐性菌が世界的に非常に頻りに検出されるようになり、現在では治療に使用することができない。サルファ剤耐性はむしろ疫学マーカーとして利用されている。Caugant らは髄膜炎菌の酵素型 (ET) によりサルファ剤耐性の割合が異なり、流行株が属する ET-5 complex 株では 99.5%が耐性である一方、その他の酵素型の株では耐性株が占める割合は 20%であったと報告している¹¹⁾。今回の薬剤感受性調査では、患者由来株と保菌者由来株の間で MIC 値の分布に差はほとんど認められなかった。今後国内での収集株について、型別の解析を進めながら、耐性株の分布をさらに検討する必要がある。

今回の薬剤感受性測定調査において抗生物質の分与をいただいた製薬会社各社に深謝いたします。

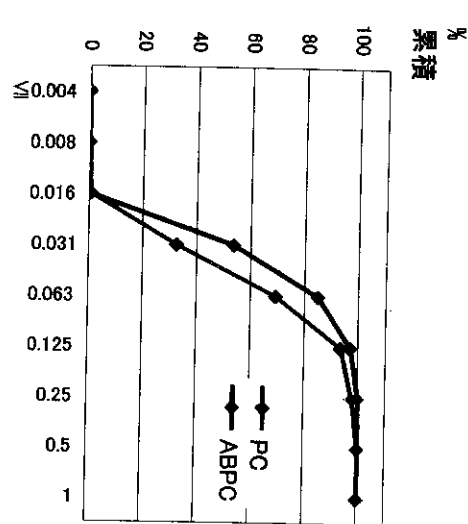
E. 健康危険情報

ペニシリン系薬剤 (PCG、ABPC) に対して調査した 166 株中 51 株 (30.7%) が中等度耐性を示した。ペニシリン系薬剤による治療の効果が低下することが懸念される。テトラサイクリン系薬剤 (TC) に対して 7 株は耐性であり、うち 3 株 (1995 年分離) は高度耐性 (MIC 値=32 μ g/ml) であった。テトラサイクリン系薬剤による治療の効果が期待できない髄膜炎菌株が既に国内に存在していた。また、エリスロマイシンに対して感受性が低下した菌株があった。

F. 文献

- 1 . NCCLS: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Ninth informational supplement. Vol.19 pp104, 1999.
- 2 . Arreaza, L., De la Fuente, L. and Vazquez, J.A. : Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. Antimicrobiol. Agents Chemotherapy. 44:1705-1707;2000.
- 3 . Winterscheid, K. K., Whittington, W.L., Roberts, M.C., Schwebke, J.R. and Holmes, K.K.: Decreased susceptibility to penicillin G and *tetM* plasmids in genital and anorectal isolates of *Neisseria meningitidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 38:1661-1663;1994.
- 4 . Annual report of the Australian meningococcal surveillance programme, 1998. The Australian meningococcal surveillance programme. Commun. Dis. Intell. 23:317-323;1999.
- 5 . Liassine, N., Gervaix, A., Heri, R., Strautman, G., Suter, S. and Auckenthaler, R. : Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens in the oropharynx of healthy children. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 18:217-220;1999.
- 6 . Galimond, M., Gerbaud, G., Guibourdenche, M., Riou, J.Y. and Courvalin, P.: High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. N.Engl. J. Med. 339:868-874;1998.
- 7 . Shultz, T.R., Tapsall, J.W. and White, P.A. : An invasive isolate of *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to quinolones. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1116;2000.
- 8 . Knapp, J.S., Johnson, S.R., Zenilman, J.M., Roberts, M.C. and Morse S.A.: High-level tetracycline resistance resulting from *tetM* in strains of *Neisseria* spp., *Kingella defnicens*, and *Eikenella corrodens*. Antimicrobiol. Agents Chemother. 32:765-767;1988.
- 9 . Roberts, M. and Knapp, J. S.: Transfer of β -lactamase plasmids from *Neisseria gonorrhoeae* to *Neisseria meningitidis* and commensal *Neisseria* species by the 25.2-megadalton conjugative plasmid. Antimicrob. Agents Chemother. 32:1430-1432;1988.
- 10 . Kuroki, T., Murase, T., Watanabe, Y. et al: Characterisation of high level tetracycline resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolates. Genit. Med. 73:421-422;1997.
- 11 . Caugant, D.A., Froholm, L.D., Selander, R.K. and Bovre K.: Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* isolates of clones of the ET-5 complex. APMIS 97:425-428;1989.

髄膜炎菌のMIC (ペニシリン系薬剤) n=166



(セフェム系薬剤) n=166

