

2. Hideyuki Takahashi, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Shiro Yamai and Haruo Watanabe: Identification of tet(B), encoding high-level tetracycline resistance, in *Neisseria meningitidis*. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 4045-4046, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 14 年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

髄膜炎菌性髄膜炎菌発生動向調査及び検出方法の研究

2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の

MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究

主任研究者(平成 12-13 年度) 山井志朗 神奈川県衛生研究所 細菌病理部 部長

主任研究者(平成 14 年度) 益川邦彦 神奈川県衛生研究所 所長

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌第一部 部長

分担研究者 井上博雄 愛媛県立環境衛生研究所 所長

協力研究者 黒木俊郎 神奈川県衛生研究所 臨床血清科 主任研究員

協力研究者 渡辺祐子 神奈川県衛生研究所 臨床血清科 主任研究員

協力研究者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌第一部 研究員

協力研究者 田中 博 愛媛県立環境衛生研究所 微生物部 細菌科長

## 研究要旨

髄膜炎菌性髄膜炎菌の分子疫学的手法、Multi locus sequence typing (MLST) 法<sup>3)</sup>を用いて本研究班の活動により分離された髄膜炎菌 49 株を解析し、近年日本国内に潜在している髄膜炎菌株の実態の解明を試みた。その結果、海外で流行を起こした株の sequence type (ST) が同一の ST がいくつか見出された。またそれ以外の海外の流行株が既に日本に流入していることが明らかとなった。

### 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日本で分類されている株と世界において分離された株がどういう疫学的関連、即ち国内で発生している髄膜炎菌性髄膜炎菌が外国由来の輸入感染症として捉えるべきなのか、国内固有の髄膜炎菌による感染症であるかは全く不明である。そこで本年度では昨年度本研究班の研究によってその導入が確立された、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である Multi locus sequence typing (MLST) 法を用いて過去に国内で分離され、保存されていた株 192 株を網羅的に解析し、その分子疫学的分類を試みた。そのことにより過去から現在における国内での髄膜炎菌の分類と世界的レベルでの疫学的情報の照合が可能となり、世界的に髄膜炎菌性髄膜炎の流行を発生させている起炎菌の発見とその公

衆衛生学的な警告や対応が可能となる。

58°C×1分  
72°C×1分  
— } 5 サイクル

## B. 研究方法

### 菌の生育方法

神奈川県衛生研究所に保管されているすべての髄膜炎菌株をゼラチンディスクの保存状態から蘇生させ、Kellog 培地で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在かで 18 時間培養した。

4°C×30秒  
56°C×1分  
72°C×1分  
— } 20 サイクル  
4°C

1) *aroE*, *pdhC*, *pgm*

### 染色体 DNA の精製

培養した髄膜炎菌を一白金耳とり、TE (10 mM Tris-HCl {pH8.0}, 1mM EDTA) 100 μl に懸濁し、10 分間煮沸した。その後 15,000rpm で 5 分間遠心し、その上清を Wizard Plus Minipreps DNA Purification Systems (Promega) を添付されるマニュアルに従って処理し、最終的に 100μl の TE で溶出し、精製染色体 DNA とした。

94°C×4分  
94°C×30秒  
70°C×1分  
72°C×1分  
— } 5 サイクル  
94°C×30秒  
68°C×1分  
72°C×1分  
— } 5 サイクル  
94°C×30秒  
66°C×1分  
72°C×1分  
— } 20 サイクル  
4°C

### PCR によるシーケンス用鋳型の作成

シーケンスの鋳型 DNA は前項において精製した染色体 DNA を元に昨年度の本研究室の研究により設定されてプロトコールに従って PCR を行ない、調製した<sup>2)</sup>。

PCR 産物は High Pure PCR Products Purification Kit (Roche) により精製し、最終的に……100μl の Milli-Q で溶出した。

### 塩基配列の解析

1) *abcZ*, *adk*, *fumC*, *gdh*

94°C×4分  
94°C×30秒  
60°C×1分  
72°C×1分  
— } 5 サイクル  
94°C×30秒 —

ABI PRISM Big Dye Terminator cycle Sequencing ready Reaction Kit v.2.0 (Applied Biosystem) を用いて作成した鋳型 DNA 50ng とシーケンス用のプライマー 4 pmol を添加して sequence 反応を行った。反応物は SigmaSpin Post-Reaction

Clean-Up Column (Sigma)によって精製し、乾燥後、1・5μl の TSR (Applied Biosystem) に溶解して ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)により DNA 配列を解読した。塩基配列は DNASIS (HITACHI) を用いて解析した。解析された遺伝子配列は MLST の ホーム ページ (<http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>) に参照して各遺伝子座と Sequence Type (ST) の同定を行なった。

#### MLSTの統計解析

前述の解析によって得られた単離株の MLST 法による解析結果の樹状図は START (<http://outbreak.ceid.ox.ac.uk/software.shtml>) による UPGMA 法により解析し、2) 出現頻度は BURST ([http://www.mlst.net/new/data\\_analysis/burst/burst.htm](http://www.mlst.net/new/data_analysis/burst/burst.htm)) を用いて解析した。その際、全体のサンプル数が少ないために本研究においてはグループ化の閾値を通常の 5 遺伝子座ではなく 4 遺伝子座の合致とした。

#### C. 結果

本年度においては本研究班が発足し活動を行なった 3 年間に収集された国内髄膜炎菌分離株の MLST による分子タイピングを行ない、近年の髄膜炎菌の分布の概略と傾向の解明を試みた。

2000 年から 2003 年 3 月までに収集された株は 51 株であった。主に神奈川県及び愛媛県の健常者の保菌率調査における単離株で

あるが、その他感染症新法に基づいて感染症研究所に報告され且つその分与が可能であった髄膜炎菌株、もしくは個人的な医療機関とのネットワークによって分与された髄膜炎菌株が主な由来である。その内訳は健常者から 28 株 (55%)、患者からは 18 株 (35%)、その他不明が 5 株 (10%) であった (表 1)。それら国内分離株すべての 7 つの遺伝子座の遺伝子配列を解析し、MLST による分子タイピングを実施した (表 2)。その結果、4 つの sequence type (ST) 群とどれにも属さない ST 群の計 5 群に大別された (表 2、図 1)。

ST-44 complex は本研究の単離株中において最も多く分類された ST のグループ (Group4、図 2) であり、全体の 27% を占めた。この ST グループは世界的にはアフリカの髄膜炎ベルト地帯を中心として大規模な髄膜炎の流行を引き起こした、いわゆる病原性の強い株として知られているが、本研究における ST-44 株の患者はグループ中のわずか 27% に留まっていた (表 3)。

次に多いのは ST-198 complex であり、全体の 18% であった (表 2)。ST-198 complex に属する髄膜炎菌株のプロファイルをデータベースで一覧するとすべて健常者から単離された株であり、疫学的に解釈すれば ST-198 complex は非病原性タイプであると推定される。その観点において本研究結果を観察すると、本研究においても ST-198 complex に属する髄膜炎菌株は健常者からの分離率は 100% で患者からは単離されていない (表 3) ことから、世界的な疫学が

日本国内の本研究結果にも反映されていることが示唆される。

次いでST-32complex(ET-5 complex)が3株(18%)単離された。ET-5 complexは1970年代後半ノルウェー、アイスランド、デンマークといった北欧を中心に大規模なB群髄膜炎菌による流行の起炎菌であり、現在においても世界各地で小規模の流行の起炎菌で危険株のタイプとして認識されている。本研究班ではいずれも20代の成人から単離されているが、髄膜炎を発症した患者からの単離は一例のみ(33%)で他の二例はいずれも健常者からの単離であった(表3)。

ST-11 complex(ET-37 complex)は二株(4%)単離された(表2、図1)。このタイプは2000年のイスラム教徒の巡礼者のメッカにおける集団感染から各巡礼者が帰国後に二次感染によるその近親者への小流行の起炎菌として広く知られる。その血清群はW-135であり、本研究班により分離・解析された二株は不明及びY群であり、また単離された年がメッカでの小流行発生年と離れていることからメッカの集団感染の起炎株とは異なっていると推測される(表4)。しかし、二株ながらもその一株であるST-2058はDICを発症した患者から単離されており(表3)、海外の疫学と合わせてもその病原菌の危険性に関しては憂慮する必要があると推測される。

上記4グループ以外のSTに関してはMLST法によっては共通性を見出せないSTとして同定された。その中で注目されるのはの

分離株全体の約18%の9株も単離されたST-23 complexである(表2、4)。ST-23は次章の「1974年から2003年までに日本国内で分離・保存された髄膜炎菌株の

MLST法を用いた分子疫学的分類に関する研究」で報告する過去のすべての国内髄膜炎菌単離株のMLST法の解析の結果、ST-23は日本国内において最も多く分類される株であることが明らかとなっており、この株は流行の起炎株としては知られていないが、単発的な髄膜炎菌性感染症の患者から単離されることがある。その一方で健常者の咽頭からも頻度よく単離される株である。本研究においても9株のST-23のうち3株(33%)は患者から残りの6株(67%)は健常者から単離されており、一般的な疫学傾向と合致すると考えられる。また健常者と患者の割合がほぼ同等であるという解析結果からその病原性に関しては流行を引き起こすほど強くはないが、保菌した場合には警戒が必要なレベルであると考察される。

また、注目すべきことは日本国内独自の株も多く見出されるということである。ST-2032、2043、2045、2046、2047、2057、2058、2145、2263はデータベースには登録されていないことから、現時点においては日本に特異的なSTと推測される。その日本独自の株は11株であり、全体の約22%を占めた(表4)。ST-2046、2058、2145、2146に関しては同定された4つのSTグループのいずれかに属しているため、海外の流入株が派生した株であることが推測される。しかし、ST-2035、2046、2047、2057、2263

は海外の単離株とは全く異なるタイプであるため、本来海外の流入株とは独立した国内独自の ST 株であり、従来より日本国内に潜在していた可能性が推測される。

最後に全 51 株の ST に関して UPGMA 法により求められた相関関係を樹状図の形式で表した (図 2)。前述のように空間的・時間的に統一されたサーベイが困難であったため、単離株の相関性も薄く、比較的多様性に富んでいることを示していると考えられる。

#### D. 研究考察

MLST 法によるタイピングにより、本年度を最終年度とする 3 カ年において単離された髄膜炎菌株中において過去に海外の流行の起炎菌となった ST-44 complex (Lineage-III)、ST-32 Complex (ET-5)、及び ST-11 complex (ET-37) の 3 タイプの株が見いだされた。本研究班の活動は神奈川県周域及び愛媛県周域のある特定の年齢層に限定された上でのサンプリングであった。しかし、その条件下においても海外の流行の起炎菌株と同タイプの髄膜炎菌株が単離されたという調査結果は日本全国には既に海外の流行株が潜在的に侵入している可能性を示唆していると考えられる。

一方で、海外の流行株が多く認められる中で日本国内の株も全単離株の約四分の一認められた。このことは日本国内においては海外からの流行株が侵入している一方で日本独自の株も存在していることを示唆するものと考えられる。特に 4 つの ST-group

に属さない ST-2035、2046、2047、2057、2263 は海外の分離株とは全く異なる日本古来の株であることが推測されるが、日本古来であるかどうかを明確にするには過去の分離株との更なる照合解析をする必要があるであろう。

また、海外の流行起炎株と同タイプの髄膜炎菌株が健常者から頻繁に分離されていることも注目すべき点であると考えられる。分子疫学的観点からも MLST のタイピング法が必ずしも病原性を反映するものではないが、海外流行株を多数の日本の健常者が不顕性感染している現象自体が日本国内における髄膜炎菌の保菌率の低さや、ひいては髄膜炎菌性髄膜炎の発症率の低下を導いている可能性を示唆しているとも考えられる。いずれにしても今後も国内に潜在する髄膜炎菌のサーベイランスを継続し、海外からの輸入感染による国内の流行の発生の危険性を察知するためのさらなる髄膜炎菌の動向調査を実施する必要があるであろう。また、歴史とともに変遷する髄膜炎菌のタイプを明確にし、海外の流入株の動向が推測するために過去に日本国内で分離された髄膜炎菌株の MLST 法による解析も行なう必要があるであろう。

#### E. 参考文献

1. 髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究、平成 12 年度 総括・分担研究報告 p. 107-123
2. 髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究、平成 13 年度 総括・分

担研究報告 p. 47-51

3. 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

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

1. H. Takahashi, H. Tanaka, H. Inouye, T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H. Watanabe: Isolation and characterization of a *Neisseria meningitidis* strain from healthy carrier that is deficient in  $\gamma$ -glutamyl aminopeptidase activity. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3035-3037, 2002
2. H. Takahashi, T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H. Watanabe: Identification of *tet(B)*, Encoding High-Level Tetracycline Resistance, in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 4045-4046, 2002

#### H. 知的財産権の出願

特になし

表1 2000～2003年国内分離株の菌保有者の内訳

菌保有者	症状	単離株数	%
患者	髄膜炎	7 (38%)	
	敗血症	2 (11%)	
	その他	9 (51%)	
	計	18	35%
健常者		28	55%
不明		5	10%
合計		51	100%

患者欄の症状における割合は患者総数に対する各症状の割合を表す。

表2 2000～2003年国内分離株のSTの内訳

	ST	頻度	単離数	%
ST-44 complex	687	9		
(Lineage-III)	44	1		
	437	1		
	2045	3		
	1475	1	15	29%
ST-32 complex	32	1		
(ET-5 complex)	803	1		
	2145	1	3	6%
ST-198 complex	198	5		
	2146	1		
	39	1		
	2043	1	8	16%
ST-11 complex	11	1		
(ET-37 complex)	2058	1	2	4%
Another groups	23	9		
	1060	1		
	2047	1		
	2149	1		
	2046	2		
	2032	2		
	185	1		
	1418	2		
	254	1		
	2057	1		
	269	1		
	2263	1	23	45%
計		51	51	100%



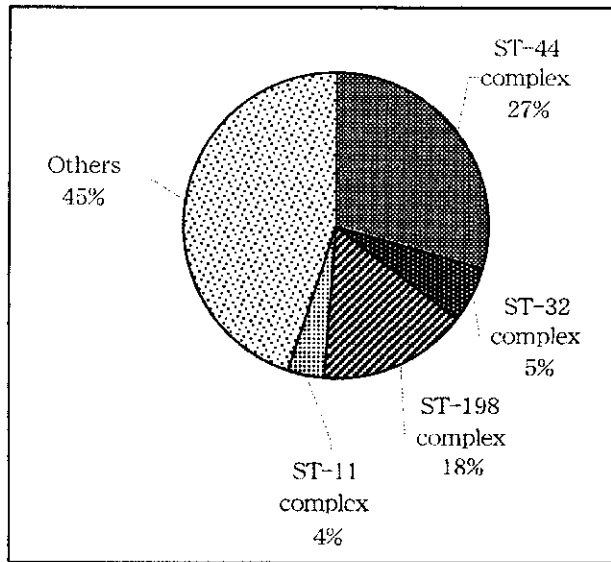


図1 2000-2003年単離株のMLST法によるタイプの割合

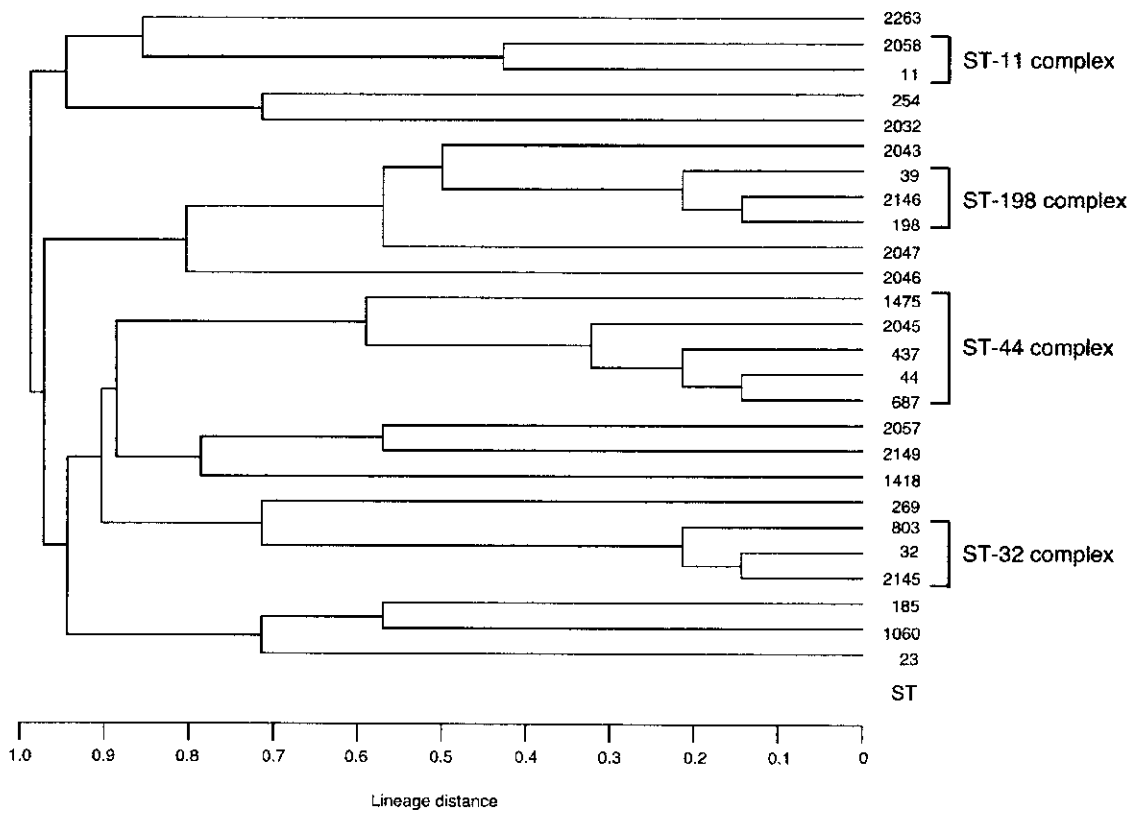


図2 2000-2003年単離株のMLST法による分類に基づいた樹状図

表3 単離株のプロファイル

	ST	単離数	菌保有者情報	Place	Date	菌保有者	備考
ST-44 complex (Lineage-III)	687	9		横浜	2000.2.	P	髄膜炎
			19Y、女	愛媛		H	
			19Y、男	愛媛	2001.2.	H	
				東京		H	
			19Y、男	愛媛	2002.4.	H	
			20Y、男	愛媛	2002.4.	H	
				広島		P	
				広島		H	
				横浜		H	
	44	1	62Y、男	横浜		P	
	437	1		船橋市			
	2045	3	23Y、女	東京		H	
				石川			
				愛媛	2003.1.	H	
	1475	1	69Y、男	千葉		P	髄膜炎
ST-32 complex (BT-5 complex)	32	1	22Y、男	東京		H	
	803	1		藤沢市	2002.4.	P	髄膜炎
	2145	1	28Y、男	愛媛		H	
ST-198 complex	198	5	19Y、男	愛媛	2001.4.	H	
			19Y、女	川崎市	2001.4.	H	
			21Y、男	川崎市		H	
			26Y、女	札幌		H	
				東京	2002.1.	H	
	2146	1		愛媛	2001.8.		
	39	1		札幌			
	2043	1	25Y、女	東京		H	
ST-11 complex (BT-37 complex)	11	1		東京	2002.1.		
	2055	1	26Y、男	千葉		P	DIC
Another groups	23	9	14Y、男	千葉		P	
				横浜	2000.11.	H	
			10Y、女	千葉		P	髄膜炎
			19Y、男	川崎市	2001.5.	H	
				北九州市			
				静岡			
			21Y、女	愛媛		H	
			2W				
			40Y、男	平塚市		P	髄膜炎
	1060	1	23Y、男	東京	2000.9.	P	敗血症
	2047	1	22Y、男	東京	2000.12.	H	
	2149	1	21Y、男	和歌山	2001.1.	H	
	2046	2	40Y、男	神戸	2001.3.		
			20Y、男	川崎市	2001.4.	H	
	2032	2	18Y、女	愛媛	2001.4.	H	
			77Y、男	沖縄	2002.2.		
	185	1	26Y、男	愛媛	2001.4.	H	
	1418	2	38Y、男	東京	2001.7.	P	
			1M、男	小田原	2003.1.	P	髄膜炎
	254	1	21Y、男	東京	2002.1.		
	2057	1	63Y、女	愛媛	2002.7.		
	269	1		東京	2002.7.	P	髄膜炎
	2263	1			2002.11.	P	肺炎
		51					

注1) Carrier: H:Healthy (健康者) P:Patient (患者)

注2) 患者の欄は影をつけて示した。

表4 2000-2003年髄膜炎菌分離株のプロファイルとMLST法により分類された各遺伝子座のタイピング結果

神奈川県no.	NIID No.	単離日	菌保有者	ST	血清群	abcZ	adk	aroE	fumC	gdh	pdhC	pgm	complex
213	343	2000.2.12	patient	23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
216	345	2000.2.19	patient	687	B	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
	93	2000.5.18	patient	1060	W-135	6	5	34	13	73	24	17	
217	347	2000.9.16	patient	44	B	9	6	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
218	348	2000.11.7	healthy	23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
219	349	2000.12.4	healthy	2047		4	4	17	4	30	7	8	
222	352	2000.12.6	healthy	687	UT	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage-III
221	351	2001.1.27	healthy	2149		8	3	13	7	6	9	17	
225	355	2001.2.16	healthy	687	UT	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
228	358	2001.2.19	patient	23		10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
246	376	2001.3.29	patient	2046	UT	35	4	205	199	14	2	12	
231	361	2001.4.3	healthy	2145	B	4	10	4	4	6	3	8	
238	368	2001.4.3	healthy	198	B	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
234	364	2001.4.10	healthy	198	UT	5	4	17	15	14	7	12	
235	365	2001.4.10	healthy	2046	UT	35	4	205	199	14	2	12	
242	372	2001.4.18	healthy	2032	UT	7	16	55	198	3	56	46	
236	366	2001.5.2	healthy	185	Y	12	5	34	17	6	38	17	
239	369	2001.5.9	healthy	23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
240	370	2001.5.9	healthy	198	B	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
241	371	2001.5.29	healthy	32	UT	4	10	5	4	6	3	8	ET-5 complex
245	375	2001.7.6	patient	1418	B	8	3	6	17	29	18	9	
247	377	2001.8.14	healthy	2146	UT	5	4	17	17	14	7	12	
249	379	2001.11.10	healthy	198	UT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
250	380	2001.12.22		39	B	5	4	17	15	14	7	16	ST-198 complex
251	381	2002.1.11		11		2	3	4	3	8	4	6	ST-11 complex/ET-37 complex
252	382	2002.1.22		437		9	6	9	17	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
256	386	2002.1.29	healthy	687	B	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
257	387	2002.1.29	healthy	2045	UT	9	3	9	9	13	6	9	
258	388	2002.1.29	healthy	198	UT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
259	389	2002.1.29	healthy	254	UT	2	16	12	11	3	60	7	ST-254 complex
260	390	2002.1.30	healthy	2045	UT	9	3	9	9	13	6	9	ST-44 complex/Lineage III
269	340	2002.2.13	healthy	23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
261	391	2002.2.27		2032	B	7	16	55	198	3	56	46	
265	397	2002.4.2	patient	23	UT	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
264	396	2002.4.2	healthy	687	UT	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
262	394	2002.4.2	healthy	687	B	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
267	398	2002.4.8	patient	803	B	4	10	5	17	6	3	8	ST-32 complex/ET-5 complex
268	399	2002.5.10		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
	392	2002.6.7	patient	2058	Y	10	3	4	142	3	4	6	
271	402	2002.7.8	patient	2057	B	8	5	13	11	6	2	2	
	393	2002.8.10	patient	269	B	4	10	15	9	8	11	9	ST-269 complex
273	403	2002.8.23	patient	23	B	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
	405	2002.11.21	patient	1475	B	3	6	108	5	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
220	350	2002.12.6	healthy	2043		5	10	17	4	6	7	12	ST-198 complex
274	406	2002.12.24	patient	2263	B	12	2	4	219	13	8	16	ST-231 complex
275	407	2002.12.24	patient	687	B	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
276	408	2002.12.24	healthy	687	B	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
278	410	2003.1.21	healthy	687	B	9	3	9	9	9	6	9	ST-44 complex/Lineage III
277	409	2003.1.22	healthy	2045	UT	9	3	9	9	13	6	9	ST-44 complex/Lineage III
279	411	2003.1.28	patient	1418	B	8	3	6	17	29	18	9	
280	412	2003.1.28	patient	23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3

平成 14 年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

髄膜炎菌性髄膜炎菌発生動向調査及び検出方法の研究

1974 年から 2003 年までに日本国内で分離・保存された髄膜炎菌株の

MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究

主任研究者(平成 12-13 年度) 山井志朗 神奈川衛生研究所 細菌病理部 部長

主任研究者(平成 14 年度) 益川邦彦 神奈川衛生研究所 所長

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌第一部 部長

協力研究者 黒木俊郎 神奈川衛生研究所 臨床血清科 主任研究員

協力研究者 渡辺祐子 神奈川衛生研究所 臨床血清科 主任研究員

協力研究者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌第一部 研究員

#### 研究要旨

前章の「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究」において近年の国内髄膜炎菌分離株中に海外において流行を引き起こした起炎菌と同タイプの髄膜炎菌株が認められたことから日本国内に既に海外の流行株が存在していることが明らかとなった。本章においてはさらに歴史的な海外流行株の流入を明確にする目的で MLST 法を用いて 1974 年から日本国内で分離されてきた過去の髄膜炎菌単離株を MLST 法により解析した。その結果、7 つの ST グループとグループに属さない ST に大別され、特に ST-44 complex はかなり大きなクラスターを形成していることが明らかとなった。また分離された年のフォローアップと ST を対比させた結果、過去の早い時期に分離された株と近年単離された株が MLST の分類でお互いに近位にある傾向が認められ、現在の日本国内においては過去 30 年間前から存在する国内古来の株と海外での流行株が混在する状況であることが推測された。

#### 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日本で分類されている株と世界において分離された株がどういう疫学的関連、即ち国内で発生している髄膜炎菌性髄膜炎菌が外国由来の輸入感染症とし

て捉えるべきなのか、国内固有の髄膜炎菌による感染症であるかは全く不明である。前章の「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究」において本研究班の活動期間中

に国内で単離された髄膜炎菌株中には世界中で猛威を奮った髄膜炎菌株と MLST による分類において同タイプの髄膜炎菌株が見出され、海外の流行株が日本国内にも存在しているが明らかとなった。本章においては 1974 年から現在に至るまで関東地方を中心に単離された過去の髄膜炎菌株 184 株すべてに関して MLST 法による分子疫学的分類を行い、過去 30 年間に遡って日本国内の髄膜炎菌単離株の疫学的考察を行なった。

## B. 研究方法

### 菌の単離

神奈川衛生研究所において 1974 年より神奈川県を中心として国内髄膜炎菌の分離が実施された。保菌者は神奈川県を中心とした地域の健常者の咽頭から単離された。患者からの髄膜炎菌株は神奈川県衛生研究所の尽力により全国の病院より収集された。そのうちの数株に関しては国立感染症研究所感染症情報センターへ感染症新法に基づいて報告が上がり、菌の分与が可能であったものも含まれる。

### 菌の保存

菌の保存はすべてゼラチンディスク法により、 $-80^{\circ}\text{C}$ のフリーザーで保存した<sup>1)</sup>。

### 菌の生育方法

神奈川衛生研究所に保管されているすべての髄膜炎菌株をゼラチンディスクの保存状態から蘇生させ、Kellog 培地で  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  存在かで 18 時間培養した。

### 染色体 DNA の精製

培養した髄膜炎菌を一白金耳とり、TE ( $10 \text{ mM Tris-HCl}$  {pH8.0},  $1 \text{ mM EDTA}$ )  $100 \mu\text{l}$  に懸濁し、10 分間煮沸した。その後  $15,000 \text{ rpm}$  で 5 分間遠心し、その上清を精製染色体 DNA とした。

### PCR によるシーケンス用鋳型の作成及び塩基配列の解読

1974 年から 2000 年までの国内分離株に関しては前年度の報告書に記載した通りすべての株の PCR による鋳型 DNA の作成及びその塩基配列の解読は Dragongenomics 社に依頼した。

次項で記述するように Dragongenomics 社から提出された結果が解読不可能であった場合には国立感染症研究所細菌第一部において PCR 及び遺伝子配列の再解読を実施した。その際は前章「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究」の B. 研究方法、PCR によるシーケンス用鋳型の作成及び塩基配列の解析の項に記載してある方法と同様の方法を用いて解析を行なった<sup>2) 3)</sup>。

### 塩基配列の解析

DNA 配列を解読した。塩基配列は DNASIS (HITACHI) を用いて解析した。解析された遺伝子配列は MLST のホームページ (<http://neisseria.org/nm/typing/mlst/>) に参照して各遺伝子座と Sequence Type

(ST) の同定を行なった。

#### MLST の統計解析

前述の解析によって得られた単離株の MLST 法による解析結果の樹状図は START (<http://outbreak.ceid.ox.ac.uk/software.shtml>) による UPGMA 法により解析し、2) 出現頻度は BURST ([http://www.mlst.net/new/data\\_analysis/burst/burst.htm](http://www.mlst.net/new/data_analysis/burst/burst.htm)) を用いて解析した。本研究においてはグループ化の閾値を通常の 5 遺伝子座の合致と定義して解析を行なった。

#### C. 結果

本年度においては神奈川県衛生研究所が中心となって収集された 1974 年より収集された国内髄膜炎菌分離株の MLST による分子タイピングを行ない、国内における髄膜炎菌の歴史的変遷とその分布に関する解析を試みた。

1974 年から 2003 年 3 月までに収集された株は 184 株であった。主に神奈川県の健常者の保菌率調査における健常者の咽頭からの単離株であるが、その他感染症新法に基づいて感染症研究所に報告され且つその分与が可能であった髄膜炎菌株、もしくは個人的な医療機関とのネットワークによって分与された髄膜炎菌株が主な由来である。その菌保有者の内訳は健常者から 86 株 (46%)、患者からは 90 株 (49%)、その他不明が 8 株 (4%) であった (表 1)。この分類における患者とは髄膜炎菌感染症にお

ける典型症状である敗血症や報告義務が伴う髄膜炎菌性髄膜炎以外に肺炎や気管支喘息といった症状も含めた。その患者のうち髄膜炎患者からは 27 株 (患者総数の 30%)、敗血症患者からは 5 株 (患者総数の 6%)、数例の疾患不明を含めたその他の疾患患者からは 59 株 (患者総数の 64%) 単離された (表 1)。

それら国内分離株すべての 7 つの遺伝子座の遺伝子配列を解析し、MLST による分子タイピングを実施した (表 2)。その結果、7 つの sequence type (ST) 群とどれにも属さない ST 群の計 8 群に大別された (表 2、図 1)。その MLST 法によりタイピングされた結果を UPGMA 法により系統的に解析した結果が図 2 である。

最も多くの株が分離されたのは ST-23 complex であり、全体の約 27% (表 2、図 1)。ST-23 は ST-23 complex の約 94% を占め、ST-23 complex は比較的バリエーションが少ない (表 2、図 1)。この株は海外では流行の起炎株としては知られていないが、単発的な髄膜炎菌性感染症の患者から単離されることがある。本研究においては 46 株の ST-23 complex のうち 3 株 (61%) は患者から残りの 16 株 (33%) は健常者から単離されており (表 2)、比較的 ST-23 complex 株の菌保有者は患者の割合の方が高い結果となった (表 2)。この解析結果は実際に MLST のデータベースに登録された情報においては健常者と患者から同数程度単離されている事実と若干相反する部分もあるが、本研究においては前述のように髄膜炎菌性感

感染症の典型症例の髄膜炎、敗血症以外の疾患患者も患者として扱ったために多少の矛盾が生じた可能性が考えられる。ST-23 complex 株の保菌者の約 60%が患者である一方で約 35%が健常者であるという解析結果は ST-23 complex に属する菌の病原性に関しては、大流行は起こさない可能性が高く、保菌した場合にはその後の対処に関して十分警戒する必要のあると考察される。

次に多いのは ST-44 complex であり、21 株 (22%) 単離された。この結果は前章の「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究」の解析結果を反映しているものと考えられる (図 2)。しかし、バリエーションの数は全グループの中で最多であり、この ST-44 complex には非常に多くのバリエーションが存在していた (図 2)。この ST-44 complex のオリジナル株と考えられる ST-44 は lineage-III と呼ばれ、世界的にはアフリカの髄膜炎ベルト地帯を中心として大規模な髄膜炎の流行を引き起こした、いわゆるビルレンス株として知られている。その ST-44 は既に収集株中で最も古い 1974 年に日本国内において単離されていた。MLST のデータベースに登録された ST-44 株において最古のものは 1975 年であることから ST-44 は 1974 年には既に日本国内に侵入していたか、もしくは日本の固有タイプとして既に存在していた可能性が考えられた。しかし、ST-44 と同じグループに属するバリエーション、ST-2162 と ST-2042 も既に

1974 年には単離されており、ST-44 とは比較的遠位にはある (図 2) が、前述の 3 つの ST は 1974 年以前に派生した可能性が推測される。また ST-44 complex が図 2 に示してあるような非常に大きなグループを形成し、バリエーションに富んでいるという解析結果は ST-44 を元にした日本国内における派生が歴史的にかなり古くから起こっていたと考察した方が妥当だと考えられる。以上の二つの考察を前提にすると ST-44 及びそのバリエーションを含む ST-44 complex は日本古来より既に存在していた可能性が高いと考えられる。

次に多いのは ST-2046 complex であり、全体の 15%にあたる 28 株が単離された (表 2)。この ST-2046 は世界中で初めて単離された株であり、現在までに他国で単離され、データベースに登録された髄膜炎菌株は存在しないため、日本固有の髄膜炎菌株であることが推測される。また ST-2046 が 19 株 (国内全分離株の約 10%) も単離されている事実も ST-2046 が日本固有に既に定着している可能性を肯定するものと考えられる。さらに ST-2046 以外のバリエーションである ST-2325、2330、2033、2332、2340 についても同様に MLST データベースへの他国単離株の登録はなく、ST-2046 同様、日本の固有株であると推測される。以上の結果から ST-2046 complex はおそらく日本古来より存在していた株であり、海外外来の髄膜炎菌株とは一線を画していることが推測された。この ST-2046 complex は保菌者の約 80%が健常者であることから MLST の分類

においては病原性の低いタイプであると推測される（表 2）。

ST-32 complex は ET-5 complex と呼ばれ、10 株（5%）単離された（表 2、図 1）。ET-5 complex は 1970 年代後半ノルウェー、アイスランド、デンマークといった北欧を中心に大規模な B 群髄膜炎菌による流行の起炎菌であり、現在においても世界各地で小規模の流行の起炎菌で危険株のタイプであり、その病原性も高いと考えられている。本研究においては 10 株中 7 株（70%）が患者から単離されているが、明らかな髄膜炎菌性髄膜炎症状を呈した患者から単離されたのは 3 株（ST-32、803、33 一例ずつ；ST-32 complex において約 30%）であり、海外での流行を引き起こす病原性の高い株と同タイプにもかかわらず髄膜炎症状との相関性が薄い傾向であるように思われた。

ST-198 は ST-32 complex と同様で 10 株（5%）単離された（表 2、図 1）。10 株のうち 8 株は本研究班が活動した 3 年間で分離された株であり、前章の「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究」において発表された株である。残りの 2 株も 1990 年と 1995 年に分離されており、MLST のデータベースによれば ST-198 complex が報告され始めたのは 1990 年代であるため、ST-198 complex 自体が世界的にも近年に広まった株であり、日本国内へも近年に侵入してきた可能性が示唆された。前章の「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患

者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究」においても示したように ST-198 complex 株は MLST のデータベースを元にするとは非病原性タイプであると推定される。本研究は患者からの ST-198 complex 分離株が 1 株あるが、その患者の疾患は不明であり、さらに検体も眼脂である（データ未掲載、表 3）ため、髄膜炎菌の主たる疾患と相関があるかは不明確な部分があると思われる。以上のことを考慮すると ST-198 株の病原性が低いという点においては前章に示した結果及び考察と矛盾がないと考えられる。

ST-254 complex は 5 株（3%）され、その内の 4 株が ST-254 であった（表 2、図 1）。現時点では ST-254 complex の特筆すべき具体的な疫学情報はないが、本研究においては明らかな髄膜炎菌性髄膜炎の症状を呈した患者から ST-254 株が 1 株単離されており（データ未掲載、表 3）、完全な非病原性タイプであると断定するのは困難であると考えられる。

ST-2348 及び 2149 は一遺伝子座の相違で近位にある株であり、一株ずつ単離された（表 2）。ST-2348 は髄膜炎菌性髄膜炎の症状を呈した患者から単離されている（データ未掲載、表 3）。注目すべきことはこれらの株は ST-2046 complex 株と同様に現時点では日本株しか登録がないということである。また、図 2 の樹状図に認められるように ST-2348 と 2149 はすべての国内分離株に対して比較的独立して存在し、系統的に遠位にある。以上の点から、単離数が少ない



ために詳細は不明だが、ST-2348 と 2149 は ST-2046 complex 株と独立して従来から国内に存在した日本固有株である可能性が推測される。

その他、グループを形成しなかった ST は全体の 22%にあたる 40 株単離された(表 2、図 1)。注意すべき ST と考えられるのは第一に ST-2032 株である。この株は全国内株の 7%にあたる 13 株単離され、クラスターを形成しない ST 中では最も多く単離されている。また ST-2032 株の単離初年度が 1982 年であり(表 3、図 3)、本研究班の活動期間の 2002 年においても単離されている(表 3)。さらに ST-2348 と 2149 の同様に ST-2032 株もまた図 2 の樹状図に認められるようにすべての国内分離株に対して比較的独立して存在し、系統的に遠位にある。以上のことから、単離数が少ないために詳細は不明だが、以上の解析結果から ST-2032 は ST-2046 complex 株、T-2348、T-2149 同様、従来から国内に存在した日本固有株であり、従来から広く日本国内に存在している可能性が推測される。また、ST-11 complex (ET-37 complex) も 2000 年のイスラム教徒の巡礼者のメッカにおける集団感染から各巡礼者が帰国後に二次感染によるその近親者への小流行の起炎菌として広く知られているが、その詳細は前章の「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分類に関する研究」での結果を参照されたい。さらにグループを形成しない ST 群中、ST-2137、2040、2043、

2263、2058 は ST-2046 complex 株、T-2348、T-2149 及び ST-2032 同様に現時点において日本でのみの報告で他国ではまだ分離されていないものと推定されるため日本独特の ST 株である可能性が推測される。

最後に、全 184 株の MLST 法によるタイピングにより同定された ST の内、現時点において日本でのみの報告がなされている ST は 28 にのぼり、全 ST の 43% (28/65) と約半数を占める結果となった(表 2)。この結果から日本国内の分離株は海外から流入した株とそれが日本国内で独自に派生した株もしくは国内固有に存在していた株が混在していることが示唆された。

#### D. 研究考察

1974 年から神奈川県衛生研究所により収集され、保存されていた髄膜炎菌株 184 株の MLST 法による分子タイピングの結果、過去に海外の流行の起炎菌となった ST-44 complex (Lineage-III)、ST-32 complex (ET-5complex)、ST-11 (ET-37 complex) に属する菌株が見いだされた(表 2、図 2)。さらに ST-44 complex 及び ST-32 complex の国内での単離初年度は 1974 年、1979 年であり(図 2、表 3)、1970 年代には既に日本国内に存在していたことが明らかとなった。神奈川県衛生研究所による髄膜炎菌収集は主に神奈川県周辺を中心とした地域の特定年齢層を対象としており、その他の分離株に関しても神奈川県衛生研究所の尽力により全国各地の病院からも収集されているが、やはりある程度対象場所及び年齢層

が限定されたサンプリングにならざるをえなかったと考えられる。しかし、その条件下においても海外の流行の起炎菌株と同タイプの髄膜炎菌株が単離され、それが単離開始年に近い 1970 年代に既に単離されていたという結果は 1970 年代には日本全国に既に海外の流行株が存在していたことを示唆していると考えられる。さらに現時点において世界中で日本の単離株のみが属する ST も日本国内の全髄膜炎菌株 ST の約 50% を占めた。そのうち海外の流行株と同じ ST complex を形成するものは海外の流行株が日本国内の流入した後に日本国内独自で派生した ST 株であると推測される。その一方で ST-2046 complex 株の様に海外では全く認められないが、国内では頻度よく単離されている株も見出された。これらの株は海外で知られる ST 株とは異なったクラスターを形成している (図 2) ことから、前述の海外由来株の国内派生とはまた異なり、元来日本国内に存在し、国内で派生していった日本の固有株である可能性が高いと考えられた。このように全点把握対象が不可能な条件下でのサンプリングによる解析によっても 1) 海外由来株、2) 海外由来国内派生株、3) 日本固有株とその派生株の 3 種類の存在が伺えることから現時点において日本国内に潜在している髄膜炎菌は前述 3 タイプがモザイク状に存在していることが推測される。

一方で前章の「2000 年から 2003 年までに日本国内の健常者及び患者から単離された髄膜炎菌の MLST 法を用いた分子疫学的分

類に関する研究」でも考察されたように海外のビルレンス株と同じ ST 株が健常者から頻繁に分離されている。MLST のタイピング法と髄膜炎菌の病原性は必ずしも一致しないために詳細は不明であるが、多数の日本の健常者が海外流行株を不顕性感染している現象は日本国内における髄膜炎菌の保菌率の低さや髄膜炎菌性髄膜炎の発症率の低下と何らかの相関関係がある可能性を示唆しているとも考えられる。

また、本研究においては髄膜炎菌性感染症のうち髄膜炎症状の患者からの分離株はわずか 30% であり、残りの 70% は敗血症、肺炎、管支喘息といった髄膜炎症状以外の患者から分離されている。この結果は現在の感染症新法での髄膜炎菌性髄膜炎の全数把握が髄膜炎症状に限っている場合には髄膜炎菌性感染症の約 70% を見落とす可能性を示唆しているものと考えられる。髄膜炎症状以外の患者から伝播した髄膜炎菌が他の患者に対して髄膜炎症状を発症させる疫学情報が存在しないため詳細は不明であるが、髄膜炎症状以外の患者が日本国内の髄膜炎菌性髄膜炎の潜在的なリザーバーとなり、髄膜炎流行の伝播源となりうる危険性も推測される。それ故、今後の髄膜炎菌性髄膜炎疾患の全数把握ではなく、髄膜炎菌性感染症として髄膜炎菌性の動向調査を行なうことが潜在化している日本国内の髄膜炎菌の実態をより具体的に把握できるものと期待される。

いずれにしても今後も国内に潜在する髄膜炎菌のサーベイランスを継続し、海外か

らの輸入感染による国内の流行の発生の危険性を察知するためのさらなる髄膜炎菌の動向調査を実施する必要があるであろう。

#### E. 参考文献

1. Yamai, S., Obara, Y., Nikkawa, T., Shimoda, Y. and Miyamoto, Y. (1979) Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* by the gelatin-disc method. Br. J. Vener. Dis. 55, 90-93.
2. 髄膜炎菌性髄膜炎の発生动向調査及び検出方法の研究、平成12年度 総括・分担研究報告 p.107-123
3. 髄膜炎菌性髄膜炎の発生动向調査及び検出方法の研究、平成13年度 総括・分担研究報告 p.47-51
4. 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

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

1. H. Takahashi, H. Tanaka, H. Inouye, T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H.

Watanabe: Isolation and characterization of a *Neisseria meningitidis* strain from healthy carrier that is deficient in  $\gamma$ -glutamyl aminopeptidase activity. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3035-3037, 2002

2. H. Takahashi, T. Kuroki, Y. Watanabe, S. Yamai and H. Watanabe: Identification of *tet(B)*, Encoding High-Level Tetracycline Resistance, in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 4045-4046, 2002

#### H. 知的財産権の出願

特になし

表1 1974～2003年国内分離株の菌保有者の内訳

菌保有者	症状	単離株数	%
健常者		85	46%
患者	髄膜炎	27 (30%)	
	敗血症	5 (6%)	
	その他	59 (64%)	
	計	91	49%
不明		8	4%
合計		184	100%

患者欄の症状における割合は患者総数に対する各症状の割合を表す。

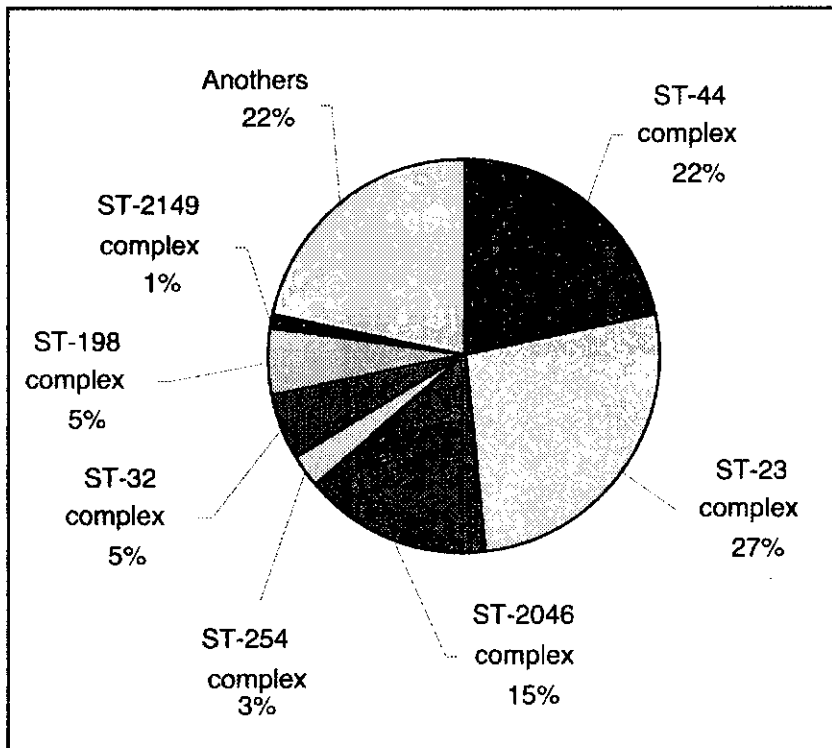


図1 1997年から2003年までの国内髄膜炎菌単離株のMLST法に基づいた分類の内訳