

表2 1974～2003年国内分離株のST分布

ST	菌株数	感染有者			計	%
		患者	健康者	不明		
ST-44 complex (Lineage-III)	44	2	1	1		
	2042	1		1		
	2331	1		1		
	2320	1	1			
	2327	1		1		
	2034	3		3		
	2036	1	1			
	687	14	6	8		
	43	1	1			
	2044	1	1			
	41	1	1			
	2134	1	1			
	437	3	2	1		
	2055	1	1			
	2136	1	1			
	2150	1	1			
	180	1	1			
	2182	1	1			
	2045	3		3		
	1475	1	1			
計			21	18	1	40 22%
ST-23 complex (Cluster A3)	23	48	28	15	3	
	2183	1		1		
	2038	1	1			
	2039	1	1			
計			30	18	3	49 27%
ST-2048 complex	2048	19	5	18		
	2325	1		1		
	2330	1		1		
	2033	5		5		
	2332	1	1			
	2340	1	1			
計			6	22	1	28 15%
ST-254 complex	254	4	1	3		
	2041	1	1			
計			2	3	0	5 3%
ST-32 complex (ET-5 complex)	32	5	4	1		
	2358	1	1			
	2145	1	1			
	803	1	1			
	33	2	1	1		
計			7	3	0	10 5%
ST-198 complex	198	8	1	7		
	2146	1	1			
	39	1		1		
計			1	8	1	10 5%
ST-2149 complex	2348	1	1			
	2149	1	1			
計			1	1	0	2 1%
Another groups	37	1		1		
	2135	2	1	1		
	2138	1		1		
	2166	1		1		
	185	3		3		
	2035	1		1		
	175	1		1		
	2037	1		1		
	2341	1	1			
	2032	13	10	2	1	
	11	2	1	1		
	98	1	1			
	2137	1	1			
	2040	1	1			
	2339	1		1		
	2047	1		1		
	2043	1		1		
	1418	2	2			
	2057	1	1			
	2263	1	1			
	2058	1	1			
	1060	1	1			
	269	1	1			
計			23	15	2	40 22%
総計		184	90	88	8	184 100%

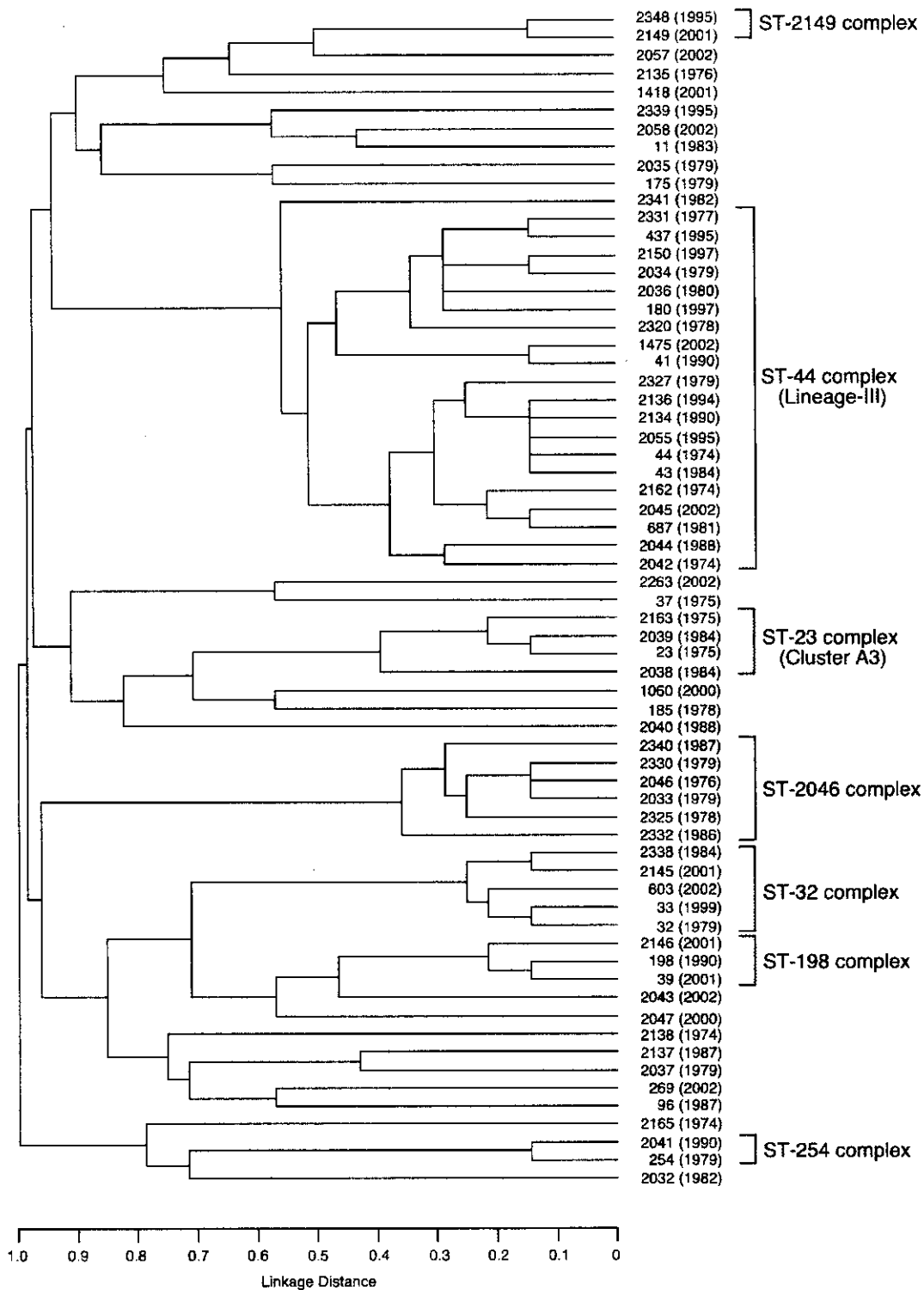


図2 1974年から2003年までの国内分離株のMLST法による分類に基づいた樹状図と単離初年度

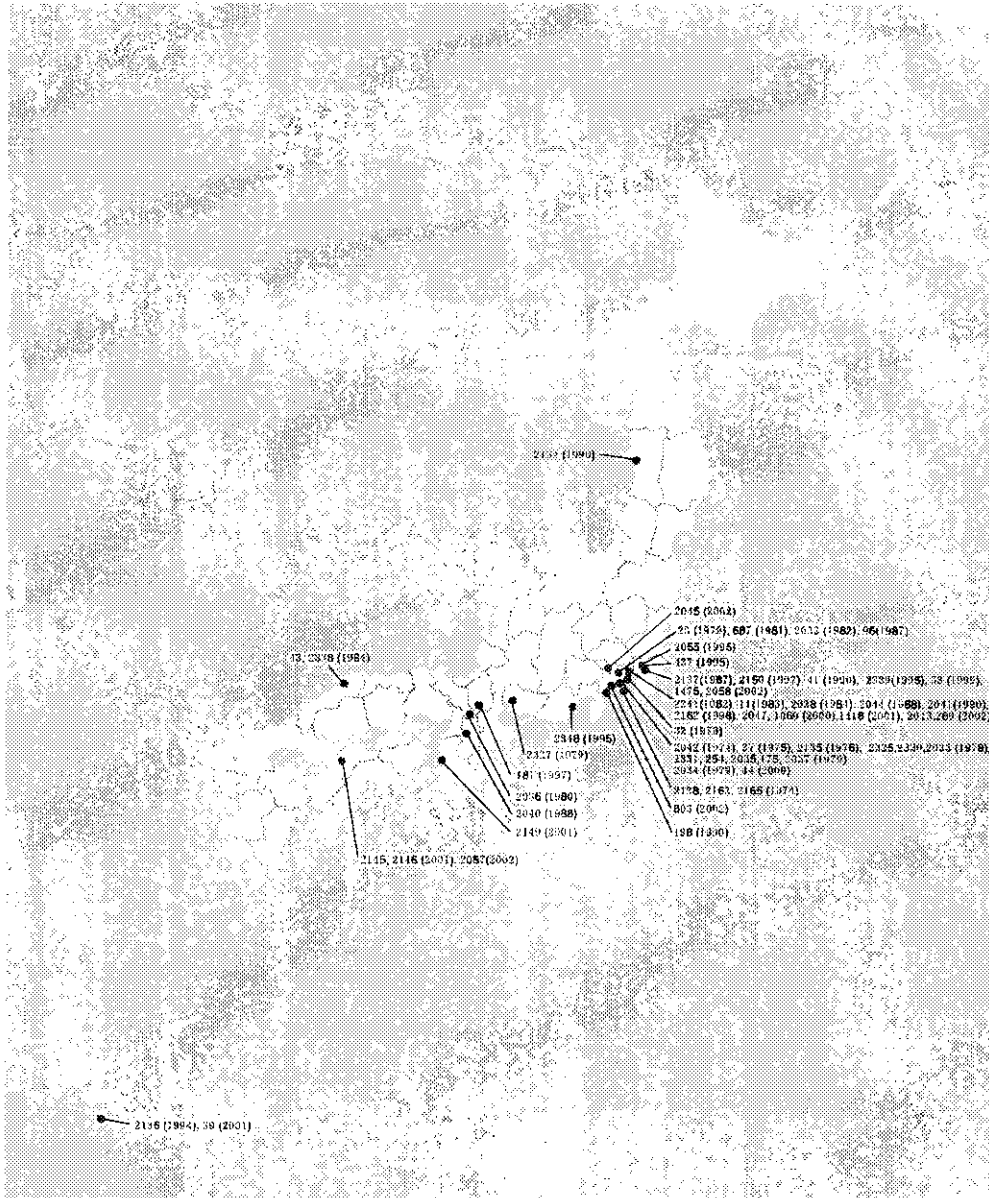


図3 各ST分類株とその単離の初年度及び地域



表 3-1 国内で分離された髄膜炎菌株のプロファイル (続き)

患者No.	MTC No.	年齢	性別	健康状態	ST	serogroup	abc2	ads	afpB	fmC	hly	pDC	psm	complex
212	347	2000.2.12	pat	com	23									9 ST-44 complex/lineage III
213	348	2000.4.10	pat	com	44									9 ST-44 complex/lineage III
214	349	2000.12.4	healthy		2047	unknown	4	4	17	4	30	7	8	ST-198 complex
220	350	2002.12.8	healthy		2043	unknown	5	10	17	4	6	7	12	ST-198 complex
221	351	2001.1.27	healthy		2149	OT	8	3	13	7	0	9	17	ST-23 complex/Cluster A5
222	352	2000.12.8	healthy		687	OT	8	3	9	9	9	8	9	ST-44 complex/lineage III
225	353	2001.2.16	healthy		697	OT	8	3	9	9	9	8	9	ST-44 complex/lineage III
228	354	2001.8.28	pat	com	22									9 ST-44 complex/lineage III
231	361	2001.4.3	healthy		2145	B	4	10	4	4	6	8	8	ST-32 complex/ST-5 complex
234	354	2001.4.10	healthy		198	OT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
235	365	2001.4.10	healthy		2048	OT	35	4	205	188	14	2	12	ST-198 complex
238	368	2001.5.2	healthy		185	Y	12	5	34	17	5	39	17	ST-198 complex
237	367	2001.5.2	healthy		185	Y	12	5	34	17	5	39	17	ST-198 complex
231	363	2001.4.10	healthy		188	B	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
239	369	2001.5.8	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
240	370	2001.5.9	healthy		198	OT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
241	371	2001.5.28	healthy		22	B	4	10	5	4	6	8	8	ST-5 complex
242	372	2001.4.18	healthy		2032	OT	7	16	55	198	3	56	46	ST-44 complex/lineage III
243	373	2001.5.2	healthy		2128		3	3	3	3	3	3	3	ST-44 complex/lineage III
244	374	2001.8.28	pat	com	2092	OT	25	8	225	188	24	2	23	ST-44 complex/lineage III
249	379	2001.11.10	healthy		198	OT	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	unknown	2	3	4	3	8	4	8	ST-11 complex/ST-27 complex
252	382	2002.1.22			437	unknown	8	6	9	17	9	8	8	ST-44 complex/lineage III
258	388	2002.1.22	healthy		687	B	8	3	8	8	8	8	8	ST-44 complex/lineage III
257	387	2002.1.22	healthy		2045	OT	8	3	8	8	13	6	9	ST-44 complex/lineage III
258	388	2002.1.22	healthy		198	OT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
259	389	2002.1.22	healthy		254	OT	2	76	12	11	8	80	7	ST-254 complex
260	390	2002.1.30	healthy		2045	OT	8	3	9	8	13	6	9	ST-44 complex/lineage III
261	391	2002.2.27			2032	OT	7	16	55	198	3	56	46	ST-44 complex/lineage III
262	394	2002.4.2	healthy		587	B	8	3	8	8	8	8	8	ST-44 complex/lineage III
264	395	2002.4.2	healthy		587	B	8	3	8	8	8	8	8	ST-44 complex/lineage III
265	397	2002.4.2	pat	com	23	OT	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
268	398	2002.5.10	pat	com	263		4	10	18	17	6	3	6	ST-44 complex/lineage III
269	399	2002.5.10	pat	com	23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
269	340	2002.2.13	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/Cluster A3
271	392	2002.5.10	pat	com	649		5	5	13	11	8	2	3	ST-44 complex/lineage III
272	393	2002.5.27	pat	com	198	OT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex/Cluster A5
273	404	2002.9.23	pat	com	23	B	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex
274	405	2002.11.23	pat	com	198	OT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
275	406	2002.11.23	pat	com	23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
276	408	2002.12.24	healthy		587	B	8	3	8	8	8	8	8	ST-44 complex/lineage III
277	409	2003.1.22	healthy		2045	OT	8	3	8	8	13	6	9	ST-44 complex/lineage III
278	410	2003.1.21	healthy		587	B	8	3	8	8	8	8	8	ST-44 complex/lineage III
279	411	2003.1.24	healthy		198	OT	5	4	17	15	14	7	12	ST-198 complex
280	412	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
281	413	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
282	414	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
283	415	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
284	416	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
285	417	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
286	418	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
287	419	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
288	420	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
289	421	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
290	422	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
291	423	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
292	424	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
293	425	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
294	426	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
295	427	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
296	428	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
297	429	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
298	430	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
299	431	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
300	432	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
301	433	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
302	434	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
303	435	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
304	436	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
305	437	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
306	438	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
307	439	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
308	440	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
309	441	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
310	442	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
311	443	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
312	444	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
313	445	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
314	446	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
315	447	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
316	448	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
317	449	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
318	450	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
319	451	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
320	452	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
321	453	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
322	454	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
323	455	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
324	456	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
325	457	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
326	458	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
327	459	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
328	460	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
329	461	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
330	462	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
331	463	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
332	464	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
333	465	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
334	466	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
335	467	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
336	468	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
337	469	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III
338	470	2003.1.24	healthy		23	Y	10	5	18	9	11	9	17	ST-23 complex/lineage III

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  
髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究  
分担研究報告書

PCR法による髄液からの髄膜炎菌病原体の遺伝子検出の検討  
PCR gene detection for pathogens of meningitis from cerebrospinal fluid.

分担研究者 中島秀喜 聖マリアンナ医科大学微生物学

#### 研究要旨

PCR法を用いて、髄膜炎患者の髄液から直接的に髄膜炎菌を検出することを試みた。この場合、プライマーとする遺伝子の選定および髄液成分の混入による反応阻止を検討した。

#### 研究協力者

草野秀一 聖マリアンナ医科大学微生物学 助手

#### A. 序文

微生物をPCRにより検出する場合、どの遺伝子を標的にするかにより検出感度や検出対象に違いが生じる。また、直接的に髄液や血液からPCRで遺伝子を検出する場合には、検体中に含まれる反応阻害物質をいかにして除去するかが問題となる。本研究では、遺伝子プライマーの特異性を確認するとともに、反応阻害物質の存在下でもPCR反応が可能とされているアンプダイレクト法を使用して検出感度の違いを検討した。

#### B. 材料と方法

##### 1) 使用菌株

髄膜炎菌検出のために使用した菌株は、聖マリアンナ医科大学・微生物学教室保存の *Neisseria meningitidis* SMUM4255 および、神奈川県衛生研究所より提供された5株の *N. meningitidis* (SMUM4873; serogroup A, SMUM4874; serogroup C, SMUM4875; serogroup W-135, SMUM4876; serogroup Y, SMUM7877; serogroup B)を用いた。

## 2) 使用髄液

聖マリアンナ医科大学・微生物学教室保存の 5 検体 (5 名) の患者髄液を使用した。(髄液 A, B, C, D, E)

## 3) PCR による検出法

McFarland 0.5 の菌液 (*E. coli* =  $1 \times 10^8$  cfu/ml, *N. meningitides* =  $5 \times 10^7$  cfu/ml) を作り、菌液 100  $\mu$ l に対して 5  $\mu$ l の Proteinase K (10mg/ml) を加え 55°C、30 分加熱した。これを -20°C に保存し、使用時に融解して PCR の検体とした。

我々のグループは、髄膜炎菌のリボソーム DNA の塩基配列情報から、菌種特異的なプライマーとして Radstrome らの報告に従って、髄膜炎菌を識別可能な塩基配列を平成 12 年度の本研究において決定した。さらに、血清や髄液中に含まれる反応阻害物質の除去を目的に、アンプダイレクトを使用して、通常の PCR buffer を用いた時との反応の違いを検討した。

PCR 試薬および反応条件は下記の通りである。

### PCR プロトコール

#### Ampdirect™ PCR Method

5× Ampdirect™-A	10	( $\mu$ l)
5× Amp Addition-1	10	
2mM dNTP mixture	2.5	
4 $\mu$ M Primer (forward)	2.5	
4 $\mu$ M Primer (reverse)	2.5	
specimens	5	
pure water	17.5	(up the total volume to 50 $\mu$ l)
(Heat the tube at 95°C for 3 min)		
Taq DNA polymerase (1U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	

(Ampdirect™-human blood, SHIMAZU Co.)

### PCR 反応

10×PCR buffer	5	( $\mu$ l)
2mM dNTP mixture	2.5	
4 $\mu$ M Primer (forward)	2.5	

4  $\mu$  M Primer (reverse)            2.5  
specimens                                5  
pure water                                32.5 (up the total volume to 50  $\mu$ l)  
(Heat the tube at 95°C for 3 min)  
Taq DNA polymerase (1U/ $\mu$ l)    1  $\mu$ l

PCR thermal cycle

94°C; 4min: 1 cycle

94°C; 10sec, 53°C; 30sec, 72°C; 40sec+2sec: 40 cycles

プライマー

Forward primer (Universal primer)

5' AGA GTT TGA TC(A/C) TGG CTC AG (27F)

Reverse primer (Specific primer: *N. meningitides*)

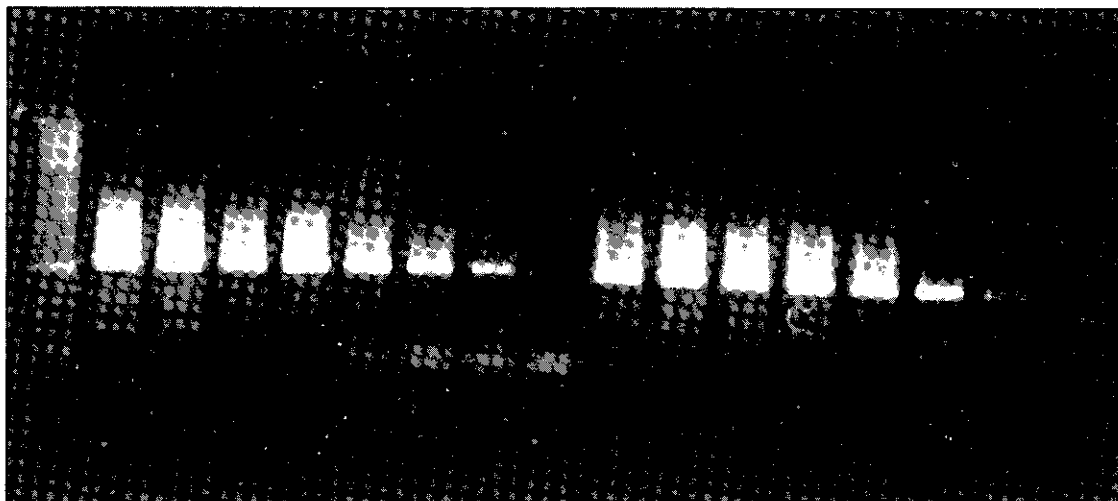
5' CAA TCA GGT TGC CCA ACA (847-831 R)

(Radstrom et al. Journal of Clinical Microbiology. 1994:2738-44)



### C. 結果

1) 精製水を用いて *N. meningitides* を原液から  $10^6$  倍まで希釈したサンプルに対して PCR を行い、DNA が確認できる最小菌数（最大希釈倍数）を求めた。また、PCR buffer に代えて Ampdirect を用いて PCR を行った結果と比較した。

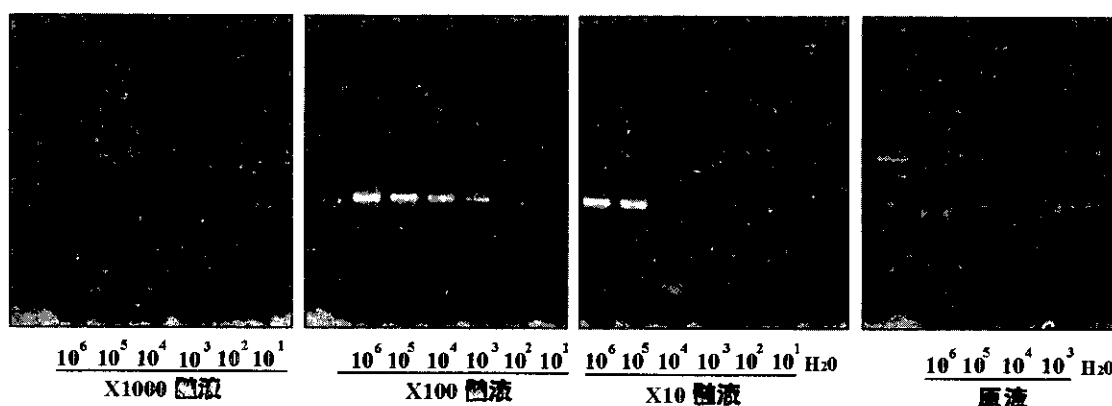


	$\times 10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	H <sub>2</sub> O	$\times 10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	
	Ampdirect								PCR buffer					
								Ampdirect 使用 PCR 法	PCR 法					
原液 : $5 \times 10^7$ cfu/ml								+	+					
$\times 10$ : $5 \times 10^6$ cfu/ml								+	+					
$\times 10^2$ : $5 \times 10^5$ cfu/ml								+	+					
$\times 10^3$ : $5 \times 10^4$ cfu/ml								+	+					
$\times 10^4$ : $5 \times 10^3$ cfu/ml								+	+					
$\times 10^5$ : $5 \times 10^2$ cfu/ml								+	+					
$\times 10^6$ : $5 \times 10^1$ cfu/ml								+	+					
陰性対照 (水)								-	-					

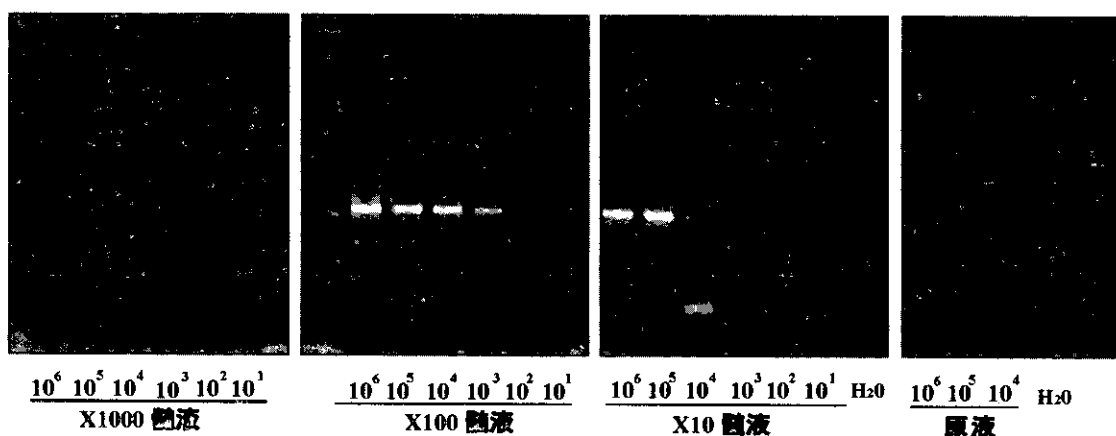
以上の結果から、Ampdirect と PCR buffer との間に差は認められなかった。

2) *N. meningitides* を髄液（髄液 A）で 1 倍から  $10^3$  倍まで希釈し、PCR を用いて DNA が確認できる最小菌数（最大希釈倍数）を求めた。また、PCR buffer に代えて Ampdirect を用いて PCR を行った結果と比較した。

PCR buffer (菌数は  $10^6$  cfu/ml から x10 で階段希釈を行った。)



Ampdirect



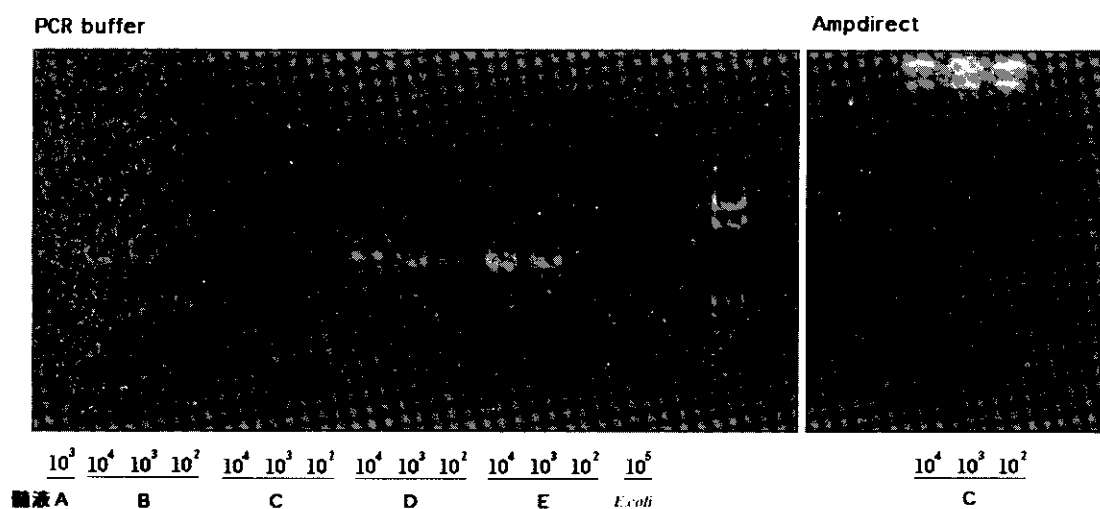
希釈していない髄液では両方とも  $10^6$ cfu/ml でのみ陽性であった。10 倍髄液では PCR buffer は  $10^5$ cfu/ml まで陽性、Ampdirect では  $10^4$ cfu/ml まで陽性で、Ampdirect の方が 10 倍ほど感度が高かった。しかしながら、100 倍、1000 倍希釈髄液ではどちらの方法でも  $10^2$ cfu/ml まで陽性を示し、有意差は認められなかった。

これらの結果から、髄液を 100 倍希釈した場合では、PCR 法による髄膜炎菌の検出は、Ampdirect などの反応阻害物質吸着する試薬を使用せずとも、検出することが可能と考えられた。

1000 倍希釈髄液検出限界	$5 \times 10^2$ cfu/ml	髄液中	$5 \times 10^5$ cfu/ml
100 倍希釈髄液検出限界	$5 \times 10^2$ cfu/ml	髄液中	$5 \times 10^4$ cfu/ml
10 倍希釈髄液検出限界	$5 \times 10^5$ cfu/ml	髄液中	$5 \times 10^6$ cfu/ml
1 倍希釈髄液検出限界	$5 \times 10^6$ cfu/ml	髄液中	$5 \times 10^6$ cfu/ml

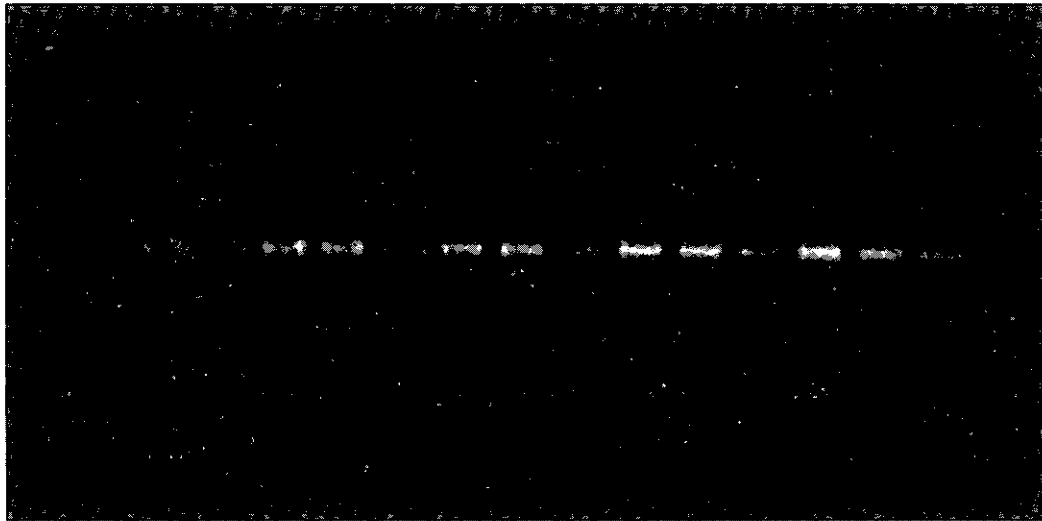
3) *N. meningitides* を髄液 A 以外の髄液 B,C,D,E を用いて髄液による差を比較検討した。

髄液 B,C,D,E を 100 倍希釈し、それぞれに *N. meningitides* を  $10^4$ CFU/ml から  $10^2$ CFU/ml になるように調整し PCR を行った。髄液 B, D,E は髄液 A と同じ結果を得た。髄液 C は混濁の強い検体で、 $10^4$ CFU/ml までしか陽性を示さなかった。この検体に対して Ampdirect を用いて行ったが  $10^4$ CFU/ml でも陰性であった。



4) *N. meningitides* の血清型の違う 5 種類の菌株について検討を行った。髄液 A を 100 倍に希釈し、セルタイプ A,C,W-135,Y,B の *N. meningitides* を  $10^4$ CFU/ml から  $10^2$ CFU/ml になるように調整して PCR を行ったところ、いずれの菌株でも同程度に検出された。

<i>N.m.</i> 179 ; Serogroup A	SMUM 4873
<i>N.m.</i> 184 ; Serogroup C	SMUM 4874
<i>N.m.</i> 185 ; Serogroup W-135	SMUM 4875
<i>N.m.</i> 214 ; Serogroup Y	SMUM 4876
<i>N.m.</i> 245 ; Serogroup B	SMUM 4877



菌数(cfu/ml)  $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^4$   $10^3$   $10^2$   $10^4$   $10^3$   $10^2$   
*N.m.* 179      *N.m.* 184      *N.m.* 185      *N.m.* 214      *N.m.* 245

#### D. 考察

我々のグループは、平成12年度の本研究で、Ampdirect法を用いることで、血液および髄液中に存在する *N. meningitides* を前処理することなしに検出することが可能であることを報告した。しかしながら、今年度の研究成果から、Ampdirectを用いることなしに、十分に髄液が希釈されていれば、通常のPCR法で髄液中の菌の検出は可能であることがわかった。しかしながら、髄液Cでみられたように、混濁が激しく検体の場合は、 $10^4$ CFU/ml までしか陽性を示さなかった。この髄液Cの検体に対しては Ampdirect を用いても  $10^4$ CFU/ml でも陰性であり、髄液が混濁している場合には、その反応阻害物質の存在により、*N. meningitides* をPCR法で検出することは困難であった。

E. 参考文献

Radstrom, P., A. Backman, N. Qian, P. Kragstjerg, C. Pahlson, P. Olcen (1994): Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitides*, *Haemophilus influenzae* and Streptococci using a seminested PCR strategy. Clin. Microbiol., 32: 2738-2744.

池島秀明、池原泰彦、山本啓之、金光敬二、加茂 力、嶋田甚五郎 (2000) : 単純ヘルペスウイルス I 型髄膜炎・脳炎に対するアンプダイレクト法を用いた PCR 法による DNA の検出法の検討、感染症学会総会 #237.

嶋田甚五郎、山本啓之、金光敬二、池島秀明 (2001) : PCR 法による髄液・血液からの髄膜炎病原体の遺伝子検出の検討、髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査および検出方法の研究、厚生科学研究補助金、振興・再興感染症研究事業、平成 12 年度総括・分担研究報告書、105-106.

## 髄膜炎菌性髄膜炎検査法の発生動向調査及び検出方法の研究

### 髄膜炎菌の保菌調査

分担研究者	井上博雄	愛媛県立衛生環境研究所長
共同研究者	大谷勝実	山形県衛生研究所
	長沢正秋	福島県衛生研究所
	黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
	芹川俊彦	石川県保健環境センター
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	砂原千寿子	香川県環境保健研究センター
	田中 博	愛媛県立衛生環境研究所
	帆足喜久雄	大分県衛生環境センター
	久高 潤	沖縄県衛生環境研究所
	高橋英之	国立感染症研究所

**研究要旨** 髄膜炎菌検査法の普及定着とその監視体制の強化を図るため、多くの地研に当研究班への参加を呼びかけ、今年度は9地研の共同で健康保菌者の実態調査を行った。当初より調査、対象者には当研究の趣旨の周知とインフォームド・コンセントを徹底した。

咽頭ぬぐい液での保菌者の検出状況は福島 1.1%、神奈川 0.6%、愛媛 0.8%、沖縄 2.4%、全体で 0.5%であったが、他の6地研で保菌者は見出されていない。また同時に調査したインフルエンザ菌、溶連菌の保菌率はそれぞれ 11.7%、9.8%であった。今年度報告された摘出扁桃剖面の菌分離では高率にヘモフィルス菌が分離されている。なお、今年度は最終年度となるため、3年間の髄膜炎菌分離成績を総括し考察する。

#### A. 研究目的

髄膜炎菌性髄膜炎は感染症法4類全数報告疾患であり、その発生は毎年10例前後である。過去2年間の調査では健康保菌者は青年層で0.3%—1%である。一方、海外での流行の発生状況から、流行株の持ちこみ等による不測の集団発生の可能性を常に秘めている。

このような状況のもと、わが国における髄膜炎菌感染症の現状把握は十分でなく、特に細菌学的監視体制の強化が求められる。

本研究は最終年度を迎え、さらに検査法の普及定着を図るとともに、特に健康保菌者の実態把握を行って、流行予防および監視に資することを目的とする。

## B. 研究方法

今年度は山形県衛生研究所、福島県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、石川県保健環境センター、岡山県環境保健センター、香川県環境保健研究センター、愛媛県立衛生環境研究所、大分県衛生環境センター、沖縄県衛生環境研究所の9地研及び国立感染症研究所細菌第1部が参加し、調査した。調査対象者への趣旨の周知とインフォームド・コンセント並びに検査方法については平成12年度の報告書に記した通りである。各地研での調査対象者及び方法については、表1にまとめる。全て、健常者での調査を行い、対象は大学生等青年集団が大半であるが、社会人、老健入所者での調査も行っている。患者(小児科)並びに患者材料(摘出扁桃)での検査も加わった。摘出扁桃は剖面からの内部の菌分離を行っている。

(倫理面への配慮)

3年度通して趣旨の周知とインフォームド・コンセントの徹底を図った。

## C. 研究結果と考察

### 1. 健常者からの髄膜炎菌分離結果

対象者は表1に示すように学生(大学生、短大生、専門学校生等)が主体の青年集団、社会人(公務員等)や活動的な社会人などである。

表2に今年度の菌分離結果を示すが、全体で0.5%、青年層で0.6%の保菌率を示した。菌が検出された福島で1.1%、神奈川では0.6%、愛媛では0.8%、沖縄では2.4%であった。他の5地研では保菌者は認められなかった。愛媛では4名の保菌者が認められたが、いずれも短・大学生からで、同一大学同一年齢(学年、クラスは不明)で2名保菌者がいた。人との接触も多いと考えられる活動的な社会人も調査したが保菌者はいなかった。

### 2. 健常者からのインフルエンザ菌・溶連菌分離結果

表3にインフルエンザ菌の分離結果を示す。全体で11.7%、岡山の0%から、石川の31.6%と幅広く変動した保菌率を示す。過去3年間を比較しても、全体で12年度から1.2%、5.1%今年11.7% 福島では0%、0.9%、18.1% 神奈川 1.1%、7.9%、4.7% 香川 9.1%、21.3% 今年が10.8%と変動が激しい。これは時間的・空間的なインフルエンザ菌の侵淫状況の変化の激しさを反映しているのかも知れない。

表4に溶連菌分離結果を示す。全体で9.8%地研間では大分の1.4%から香川の18.6%の広がりがあるが多くは10%前後である。12年度、13年度も全体で10.0%、9.2%であり、年度別、地域別に見ても安定している。

### 3. 摘出扁桃腺剖面からの菌分離結果

(愛媛)

愛媛県立中央病院耳鼻咽喉科(中村光士郎部長)の協力を得て、摘出扁桃腺剖面からの菌分離を試みた。表5にその結果を示す。得られた扁桃腺52例、そのうち臨床診断名では慢性扁桃腺等41例、扁桃肥大11例、患者年齢3~10歳20例、11~20歳10例、21歳以上で22例であった。摘出手術当日に扁桃腺を得、無菌的に切断後剖面から培養した。その結果、髄膜炎菌は全て陰性であったがナイセリア・ラクタミカを1例分離した。溶連菌は6例(11.8%)検出された。一方、ヘモフィルス菌は10歳までは95%と高率に分離され、そのうち65%がインフルエンザ菌でパラインフルエンザ菌は0%であった。それに比し21歳以上の成人ではヘモフィルス菌検出率は81%となり、そのうち57%がパラインフルエンザ菌でインフルエンザ菌は10%を占めるのみとなった。摘出扁桃腺内には極め

て高率にヘモフィルス菌が検出され、10歳までの幼小児にはインフルエンザ菌、成人ではパラインフルエンザ菌が多い。

#### 4. 髄膜炎菌健康保菌者調査3年間のまとめ

平成12年秋、ほぼ各ブロック毎の「髄膜炎菌等の検査法に関する研修会」を通じて、検査法の普及定着を図り、健康保菌者調査へのステップとなった。この3年間、コンスタントに保菌者を検出した神奈川と愛媛の調査から総括したい。髄膜炎菌の検査対象集団の調査結果を神奈川の結果は表6に愛媛での結果は表7に示す。また、この調査で得られた菌株の血清型は表8に示している。

##### 1) 何故、神奈川、愛媛のみがコンスタントに保菌者を検出できたのか？

両県での調査ではほぼ全シーズンで菌は分離され、その他の地研の調査も概ね同じ時期で調査され季節性による違いは認められない。調査規模については、確かに両県では群を抜き多く調査しているが、仮に一般集団での保菌率を0.5% (表2) とすると他の菌の分離できていない地研の検査数 (初年度から417、1144、676) で3年間とも菌が分離されない説明がつかない。良い例が今年度の福島1人、沖縄で2人から菌が分離され、恐らく技術的な問題よりも被調査集団の特性つまり、たまたま保菌者が含まれている集団か否かに依存しているであろう。

##### 2) 高リスク集団、低リスク集団とは？

文献や経験から主なターゲットは学生であった。一方、神奈川では幼稚園児、県職員等社会人、愛媛では高齢者、県職員等社会人、職業として活動的で人との接触も多いと考えられる社会人からも菌は分離されていない。乳幼児や高齢者、一般的に公務

員等の社会人としての青壮年者 (21~60歳) は低リスク集団と考えられる。また、学生の中でも比較的小規模で構成が女性の方に偏った表6 A短大、A専門学校、高校生は低リスク集団かも知れない。

一方、大規模な大学である表7 M大学 (学生数6,000名以上) は3年度通して2名ずつの保菌者がいた。M大学の3年間の保菌者率は322名中6で1.9%にも昇る。大規模校で男女の偏りの余りない特に運動の盛んな活動的な大学は高リスクと考えられる。M大学での初年度の調査は21名で19歳女性 (表8. NO. 13) が見出された。同校保健室で本人の健康管理につき話をし、さらに親しい友人、家族の検査をするよう話した結果、ボーイフレンドと母親が了承。その結果ボーイフレンドは陽性 (表8. NO. 14) 母親は陰性であった。つまり、通常の生活では感染しにくい、キスや食べ物、飲み物の共有等親密度の深さによって感染が成立するのかも知れない。

表7、外国人グループは平成13年度報告に記しているが、全12ヶ国からの構成で一般的に高リスクと考えてよい。(偏見、差別が生じないよう配慮を要す)

##### 3) どの血清型が優先型か？

分離された髄膜炎菌の血清型を表8に示す。NO. 1-23が健常者からの分離菌 NO. 24は咳、痰、声がれ、喉の痛みを主症状とする63歳女性患者からの病院での分離株である。血清型分布のまとめを沖縄での分離株、2株 (型別未実施) を加え表9にまとめた。型別不能 (UT) が約半数、次いでB型28%Y型16%であった。表7、M大学では、同一年度では同一型が分離されている。平成13年度はB型であるが、表8. NO. 17はγ-Glutamyl Amino peptidase欠損株である。また、表7、I短大では分離率の低いY型が2年に渡り分離



され、学生数約 350 名の女性優位小規模内で感染循環が維持されている。

#### 4) 男性由来分離率が圧倒的に多い。

表 9 に福島、神奈川、愛媛、沖縄、での分離率（保菌率）を算定し、0.73%であった。さらに男性由来分離率（男性保菌率）1.40%、女性由来分離率（女性保菌率）0.31%であり、この差は 0.1%以下で有意であった。

この差は何に由来するかは不明であるが、STD 的要素が関与しているのかも知れない。なお、全数把握の患者報告でも 1999 年 男 10 名 女 0 名、2000 年 男 11 名 女 4 名、2001 年 男 7 名 女 1 名 計 男 28 名 女 5 名と性差が認められる。

#### 5) 学生集団の男女比は健常保菌率に影響するか？

表 6、表 7 の男性数、女性数は被検者の数で実際の男女構成を表しているか否かは不明であるが、女性を 1 として男女比を算定した。

図 1 に縦軸に片対数で男女比をプロットし、髄膜炎菌分離集団に○、非分離集団に△をプロットした。数字は表 6、表 7 の NO である。特に神奈川のデータでは、男女比の高い集団でよく分離できている。従って、学生集団での高リスク集団は大規模で男女比のバランスがとれていて、学生が運動その他活動性の高い大学等であろう。また、学生で低リスクなのは看護学生等女性に偏った集団であり、多くの地研で 3 年間通して菌分離できなかったのも、このような低リスク集団の選択によるものであろう。

#### D. まとめ

1. 健常者の髄膜炎菌保菌状態を調査し、全体で 0.5%であった。
2. 今年度も神奈川、愛媛から保菌者が見出され、加えて、福島、沖縄でも報告

された。他の地研では過去 2 年間と同様に保菌者は見出されていない。

3. インフルエンザ菌、溶連菌の保菌率はそれぞれ 11.7%、9.8%であった。
4. 摘出扁桃断面からの菌分離を行い、髄膜炎菌は陰性であったが、幼少児ではヘモフィルス菌が極めて高率で特にインフルエンザ菌が多く、成人では特にパラインフルエンザ菌が多い。
5. 福島、神奈川、愛媛、沖縄合わせて保菌率（菌分離率）は 0.73%であり、男性保菌率（男性由来分離率）、女性保菌率（女性由来分離率）はそれぞれ 1.40%、0.31%でこの差は有意であった。
6. 髄膜炎菌の血清型分布では UT が約半数、次いで B 型、Y 型の順であった。
7. 3 年間の結果をまとめ、総括し、髄膜炎菌感染の集団としての高リスク群、低リスク群について考察した。
8. 3 年間を通じ髄膜炎菌検査法が一部地研に定着した。

#### E. 健康危険情報

特になし

#### F. 研究発表

論文発表

・ Isolation from a Healthy Carrier and Characterization of a *Neisseria meningitidis* Strain That is Deficient in  $\gamma$ -Glutamyl Amino peptidase Activity.

Hideyuki Takahashi, Hiroshi Tanaka, Hiroo Inouye, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Shiro Yamai, and Haruo Watanabe

J. Clinical Microbiology : 40, 3035—3037, 2002

#### G. その他

なし

表1 検査対象と検体採取条件

地 研	対 象	検 体	塗布までの時間
山 形	健常者(大学生、社会人)	咽頭ぬぐい液(両側)	30～120分
福 島	〃 (学生)	〃	直 後
神奈川	〃 (短大生、団体)	〃	20分以内及び60分
石 川	〃 (学生)	〃	10～60分
岡 山	〃 (学生)		
香 川	〃 (短大生他)	咽頭ぬぐい液(両側)	10～60分
愛 媛	〃 (短・大学生、 活動的(社会人)	〃	120分以内
	患者 (扁桃腺炎等)	摘 出 扁 桃	〃
大 分	健常者(学生、検査技師)	咽頭ぬぐい液	約60分
	患者 (小児科)	〃	〃
沖 縄	健常者(社会人、老健入所者)	咽 頭 粘 液	1～4時間

表2 健常者からの髄膜炎菌分離結果

平成14年度

地 研	年 齢	男			女			合 計		
		N	分離	%	N	分離	%	N	分離	%
山 形	16-30	29	0	0	96	0	0	125	0	0
	31-60以上	57	0	0	31	0	0	88	0	0
	合 計	86	0	0	127	0	0	213	0	0
福 島	16-30	9	1	11.1	82	0	0	91	1	1.1
	16-60	9	1	11.1	85	0	0	94	1	1.1
神奈川	16-30	126	1	0.8	46	0	0	172	1	0.6
石 川	16-30	26	0	0	149	0	0	175	0	0
	31-50	9	0	0	28	0	0	37	0	0
	合 計	35	0	0	177	0	0	212	0	0
岡 山	21-30	-	-	-	29	0	0	29	0	0
香 川	16-30	-	-	-	70	0	0	70	0	0
	16-60以上	2	0	0	81	0	0	83	0	0
愛 媛	16-20	106	2	1.9	196	1	0.5	302	3	1.0
	21-30	86	0	0	90	1	1.1	176	1	0.6
	16-60	219	2	0.9	287	2	0.7	506	4	0.8
大 分	0-15 <sup>1)</sup>	94	0	0	83	0	0	177	0	0
	16-30	54	0	0	63	0	0	117	0	0
	31-60	15	0	0	7	0	0	22	0	0
	合 計	69	0	0	70	0	0	139	0	0
沖 縄	21-30	4	0	0	8	1	12.5	12	1	8.3
	31-50	13	0	0	5	0	0	18	0	0
	51-60	11	1	9.0	3	0	0	14	1	7.1
	60以上	7	0	0	34	0	0	41	0	0
	合 計	35	1	2.9	50	1	2.0	85	2	2.4
総 計	16-60以上	581	5	0.9	952	3	0.3	1533	8	0.5
	16-30	440	4	0.9	829	3	0.4	1269	7	0.6

1) 小児科患者

平成12年度 1, 253名中5 (0.4%)

平成13年度 2, 623名中12(0.5%)

表3 健常者からのインフルエンザ菌分離結果

平成14年度

地 研	年 齢	男			女			合 計		
		N	分離	%	N	分離	%	N	分離	%
山 形	16-30	29	0	0	96	4	4.2	125	4	3.2
	31-60以上	57	6	10.5	31	2	6.5	88	8	9.1
	合 計	86	6	7.0	127	6	4.7	213	12	5.6
福 島	16-30	9	2	22.2	82	15	18.3	91	17	18.7
	16-60	9	2	22.2	85	15	17.6	94	17	18.1
神奈川	16-30	126	8	6.3	46	0	0	172	8	4.7
石 川	16-30	26	10	38.5	149	46	30.9	175	56	32.0
	16-50	35	13	37.1	177	54	30.5	212	67	31.6
岡 山	21-30	-	-	-	29	0	0	29	0	0
香 川	16-30	-	-	-	70	9	12.9	70	9	12.9
	16-60以上	2	0	0	81	9	11.1	83	9	10.8
大 分	0-15 <sup>1)</sup>	94	13	13.8	83	9	10.8	177	22	12.4
	16-30	54	1	1.9	63	0	0	117	1	0.9
	16-60	69	1	1.4	70	0	0	139	1	0.7
沖 縄	21-30	4	0	0	8	0	0	12	0	0
	21-60以上	35	3	8.6	50	3	6.0	85	6	7.1
総 計	16-60以上	362	33	9.1	665	87	13.1	1027	120	11.7

1) 小児科患者

平成12年度 1,498名中18 (1.2%) (0~9.1%)

平成13年度 1,989名中102(5.1%) (0.9~21.3%)