

200726031A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の
臨床的・細菌学的解析と診断・治療法に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 砂川 慶介

平成 20(2008) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と
診断・治療法に関する研究 1
砂川 慶介

II. 分担研究報告書

1. 我が国における侵襲性感染症例の患者背景の解析と分離されたβ溶血性レンサ球菌と肺炎球菌の分子疫学解析 8
生方 公子, 砂川 慶介, 岩田 敏, 坂田 宏, 藤島 清太郎,
吉田 敦, 大石 和徳
2. キノロン耐性を含む肺炎球菌の薬剤耐性の変化に関する臨床的・分子疫学的検討 . . . 23
岩田 敏
3. 救命救急, 外科領域における劇症型重症レンサ球菌感染症例の病態解析とその治療法に
関する研究 27
藤島 清太郎
4. B群レンサ球菌感染症の症例解析と分離株の血清型と薬剤感受性 31
坂田 宏
5. B群レンサ球菌感染症の臨床的・疫学的解析と抗菌薬の耐性機序に関する研究 35
吉田 敦
6. 肺炎球菌と *Streptococcus suis* による感染症の病態と診断に関する研究 41
大石 和徳
7. 劇症型レンサ球菌感染症の細菌学的解析および重症化に係る宿主要因の解明に
ついての研究 (1) 46
渡辺 治雄, 池辺 忠義
8. 劇症型レンサ球菌感染症の細菌学的解析および重症化に係る宿主要因の解明に
ついての研究 (2) 49
渡邊 治雄, 阿戸 学
9. 患者由来 *Streptococcus suis* の細菌学的研究 53
渡邊 治雄, 常 彬

10. <i>S. pyogenes</i> におけるバイオフィーム形成の検討	55
渡邊 治雄, 泉福 英信, 池辺 忠義, 河原井 武人	
11. 動物実験モデルによるレンサ球菌感染症メカニズムの解明と治療に関わる基礎的研究	61
松井 英則	
12. G 群レンサ球菌による劇症型感染症のモデル構築および分子基盤に関する研究	68
秋山 徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	76
IV. 啓蒙書	
新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と診断・治療法に関する研究	81

新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と
診断・治療法に関する研究

研究代表者 砂川 慶介 北里大学北里生命科学研究所 感染症学 教授

研究要旨 市中感染症の中でも予後不良例の多い「レンサ球菌感染症(肺炎レンサ球菌含む)」について、侵襲性感染症由来株を全国規模で収集し、患者背景因子、菌の病原因子、薬剤感受性の動向を含めた分子疫学解析および動物を用いた病態解析等の基礎的検討を行った。

- 1) 市中型侵襲性感染症由来のレンサ球菌(GAS, GBS, GGS 等)と肺炎球菌、各々約 500 株ずつが収集された。宿主背景因子としては、受診科、血液検査値、予後、基礎疾患、治療抗菌薬等が解析された。菌側因子としては、病原性遺伝子や薬剤耐性について分子疫学解析が実施された。(生方他共同研究)
- 2) 肺炎球菌とレンサ球菌の劇症型感染症の病態を明らかにするため、該当症例の後ろ向き調査を行い、DIC と重症化との関連を明らかにした。(藤島)
- 3) 小児と成人における肺炎球菌感染症について、主に抗菌薬感受性、その中のキノロン系薬耐性肺炎球菌による院内感染の可能性について言及した。(岩田)
- 4) 主に新生児と婦人科疾患で問題となる **GBS** について、侵襲性感染症と菌の型との関連性を明らかにした。特に、本菌のみに急速にキノロン系薬耐性化が進行し、しかも疫学的に同一クローンであることを明らかにした(吉田)。
- 5) 小児における **GBS** の病態について、早発型と遅発型の違い、および原因菌の違いを明らかにし、治療抗菌薬についても言及した。(坂田)
- 6) 我が国においてもその感染症が危惧される **S. suis** 感染症について、疾患の多いベトナムでの実態と疫学情報収集を行なった。(大石)
- 7) 渡邊らは次の 4 項目を解析した。i)病原性に関わる菌の産生物の量的変動と 2 成分制御系遺伝子 (*csrS*)の変異との関連について調べ、変異が病原性増強に与える影響を明らかにした。ii)菌の産生物と宿主防御機能との関係について、劇症型株は好中球の殺菌に抵抗性を示すことを明らかにした。その機序は *csrS* 変異によるいくつかの産生物の発現が増強され、感染局所への好中球走化抑制と好中球障害によって惹起されることを示唆した。iii)日本で分離された **S. suis** 株を用いて病原性に関わる毒素の保有状況を調べた。iv)GAS 株のバイオフィーム形成能と病原性との関わりを検討した。(渡邊, 池辺, 阿戸, 常, 泉福, 河原井)。
- 8) ヒト上皮細胞に存在し、菌のレセプターである CD46 の組換えマウスを用い、**GAS** 感染の発症病態が解析された。CD46(+)マウスではヒトにみられるネクロシスが再現された。(松井)
- 9) 糖尿病モデルマウスを用い、GGS 感染を惹起させると正常マウスに較べて病原性が増していることを明らかにした。GGS 菌株間では現在のところ病原性に差を認めなかった。(秋山)

分担研究者氏名：所属期間名および所属機関における職名

- 1) 生方 公子 北里大学大学院感染制御科学府 教授
- 2) 岩田 敏 (独)国立病院機構東京医療センター 統括診療部長
- 3) 藤島清太郎 慶應義塾大学医学部救急医学・講師
- 4) 坂田 宏 旭川厚生病院小児科主任部長
- 5) 吉田 敦 獨協医科大学病院感染総合対策部臨床検査医学講座 講師
- 6) 渡邊 治雄 国立感染症研究所副所長細菌第一部部長
- 7) 松井 英則 北里大学大学院感染制御科学府 講師
- 8) 秋山 徹 国立国際医療センター・研究所感染症制御研究部室長

A. 研究目的

ヒトに病原性を有するβ溶血性レンサ球菌には、A群レンサ球菌(GAS)、B群レンサ球菌(GBS)などが知られている。中でも、GASは「劇症型レンサ球菌感染症」の原因菌として社会問題化し、現在、本症は感染症法の五類感染症に指定されている。近年、さらに、GBS、病原性に乏しいとされてきたC群、G群レンサ球菌(GCS、GGS)、あるいはブタレンサ球菌(*S. suis*)による劇症例や侵襲性レンサ球菌感染症例の増加が報告されている。その他に、肺炎の原因菌である肺炎球菌(肺炎レンサ球菌とも呼ばれる)劇症例も散見される。

初年度においてはこのような状況から、本研究班はそれらのレンサ球菌感染症について、全国規模で発症例の疫学調査を実施し、併せてその菌株をも収集して分子疫学的な解析を行うことを目的とした。

また、発症に至る種々の因子について、宿主、

菌、抗菌薬の3方向から総合的に解明することを目的とした。基礎的研究として、動物感染モデルの構築と感染実験も行うこととした。

それらの研究成績を元に、2年度以降は本疾患の早期迅速診断と適切な治療法の確立を目標としているが、逐次得られる成果は、我が国における劇症型、ならびに侵襲性レンサ球菌感染症の実態を明らかにすることができ、市中における重症感染症予防対策に貢献できることを最終目的とする。

B. 研究方法

収集菌株：3年計画の1年目(H19年度)には、日本臨床微生物学会会員の協力を得て、劇症型、あるいは侵襲性レンサ球菌感染症由来の菌株を収集した。研究協力医療機関は全国の細菌検査室を有する186施設であった。1年間にGASが97株、GBSが151株、GGSが231株、肺炎球菌が496株収集された。その他に各自の施設において、それぞれが担当する菌種の菌株が収集された。

患者背景因子の解析：臨床領域の分担研究者は当該例を担当した医師に対し、発症に至った患者背景因子、入院時の検査所見、入院後の治療と予後についてアンケート調査を行ない、収集されたデータの統計学的解析を行った。

被験株の解析：肺炎球菌では抗血清を用いて莢膜型、レンサ球菌ではGASとGGSについては病原因子であるMタンパク型(*emm* 遺伝子)について解析した。また、抗菌薬感受性についても遺伝子レベルで調べた。

菌の病原因子の解析：主にGASの2成分系遺伝子(*csrS*)と、各種産生物の産生状況の関係を調べ、劇症型に及ぼす影響を調べた。

動物モデルによる解析：遺伝子組み替えマウスあるいは糖尿病モデルマウスを用い、動物実験による基礎研究によって菌の病原性の違いと宿主リスクファクターの関係を調べた。

疫学解析の結果は、啓蒙活動の一環として印刷物として医療機関(関係者)に配布した。

(倫理面への配慮)

本研究で行う発症例に対する担当医師へのアンケート調査、ならびに菌株の収集にあたっては、依頼時に「個人が特定できるような質問事項は含まない形式」とする。従って、研究成果の公表に際し、個人情報が含まれることはない。仮に個人情報が誤って記載されていたとしても、それに関する機密保持には万全を期する。なお、アンケート調査については、その内容によっては、北里大学医学部に設置された医学研究倫理審査委員会でのクリアランスを得るようにする。基礎研究における動物実験の実施は、「動物の愛護および管理に関する法律」「実験動物の使用および保管等に関する基準」に基づき、各施設の動物実験指針に基づいて研究を行う。

C. 研究成果

1) 研究代表者ならびに研究分担者は、日本臨床微生物学会会員と共同して、全国規模で侵襲性感染症由来の β 溶血性レンサ球菌と肺炎球菌(肺炎レンサ球菌)を1年間にわたって収集した。 β 溶血性レンサ球菌は GAS が 97 株, GBS が 151 株, GGS が 231 株であった。この中では GAS において予後不良例が 26%と最も多かったが、次いで GGS が 17.3%, GBS が 12.9%であった。肺炎球菌例は 491 例であったが、成人例において予後不良例が 27.7%を占めていた。疾患としては敗血症や肺炎、化膿性髄膜炎が多かったが、時間単位で急速に病態が悪化する例が散見され、劇症型例が少なからず認められた。ただし、そのような症例は基礎疾患を抱えている例が多く、宿主側のリスクファクターが病態に強く影響していることが示唆された。また、入院時の、血液検査値と予後不良例との関係を統計学的に明らかにした。

菌側の病原性については肺炎球菌では莢膜型、 β 溶血性レンサ球菌では M タンパクをコードする *emm* 遺伝子の解析を実施し、重症例が多い型を明らかにした。(生方, 砂川, 岩田, 坂田, 藤島, 大石, 吉田)

2) 2003-2004 年および 2006-2007 年に、(独)国立病院機構東京医療センターで分離された肺炎球菌の各種抗菌薬感受性を検討した。ペニシリン耐性株(PRSP)の割合は、小児、成人共に減少傾向が認められた。2006-2007 年に分離された成人由来株の中に、キノロン系薬(トスフロキサシン)耐性株が認められたが、これらのうちの一部は同一病棟の入院患者より分離されており、PFGE パターンも一致しており、院内における水平感染によって伝播したものと推定された。免疫学的低下症例を収容する施設においては、今後肺炎球菌による院内感染に対する対策が必要であると結論された。(岩田)

3) Pilot study としてレンサ球菌、あるいは肺炎球菌による劇症型侵襲性感染症の病態を明らかにするため、初年度は慶應義塾大学病院救命救急センターで経験した症例について後ろ向きに調査し、DIC と病態重症化との関連性を示唆する知見を得た。さらに、各地の救命救急センター、救命救急医学会と連携して、症例のデータベース化の検討が開始された。(藤島)

4) 1998 年から 2007 年までに経験した新生児・乳児の GBS 感染症は 12 名、そのうちの 4 名が髄膜炎、他は敗血症であった。3 名が早発型、9 名が遅発型であった。3 名で神経学的後遺症を認めた。分離菌の血清型は III 型が多く、次いで Ia と Ib であった。抗菌薬感受性ではパニペネムがすべての株に対して 0.015 μ g/ml と最も優れていた。(坂田)

5) 1999年から2007年までの期間に、臨床検体から4,339株のGBSが分離されたが、そのうち敗血症を生じたのは新生児で4名、成人で14名であった。2005年以降に収集された109株の血清型はIb型が27%、VI型が19%、V型が14%を占め、以前の報告に比べて血清型Ib型が著しく増加していることが明らかにされた。そのうち22%がキノロン薬耐性、血清型はIbであった。これらIb型の耐性株は同一の遺伝子変異を有し、侵襲性感染症を生じる病原性の高い新たなクローンが市中に広まっている可能性が示唆された。全国的なサーベイランスシステムの確立と、ワクチン開発が必要であると結論づけられた。(吉田)

5) 中国やタイにおいて集団で劇症型感染が発生して問題となった*S. suis*について、日本での流行の可能性を予測するため、タイのパヤオ県Public Health Office、パヤオ県立病院、チェンカム病院を中心に、population-based studyの体制を構築し、実態調査を行なった。また、本菌の病原性に関わる多糖体解析と、その成績に基づく迅速診断キットの構築を開始した。(大石)

6) 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において*emm49*型が2000年から増加し始めている。これらの株、ストレプトキナーゼ遺伝子の発現量が増加しており、その原因は二成分制御系のセンサー蛋白をコードする*csrS*遺伝子に変異が生じていることが判明した。病原性遺伝子の発現を調べた結果、この変異により、様々な病原性遺伝子の発現が増強していた。*in vivo*での*csrS*変異による病原性の変化を、マウスの致死性、血中の菌数、臓器障害を指標として調べた結果、*csrS*の変異により*S. pyogenes*の病原性が上昇していることが確認された。以上の結果から、*csrS*が*S. pyogenes*の病原性に強く関与していること、また*csrS*変異はSTSS患

者分離株でのみ見出されることから、本因子が*S. pyogenes*の劇症型化に関与している可能性が強く考えられた。(渡辺、池辺忠義)

7) GASが宿主生体防御を障害する機構を解析する目的で、劇症例および非劇症例からの分離株を収集し、それらの好中球機能に与える影響について解析した。非劇症株に比べ、劇症株は好中球の殺菌に抵抗性を示した。その機序として、高発現しているストレプトリシンOが好中球にネクロシスを誘導することが原因と考えられた。また、好中球の直接障害に加え、劇症株では好中球の走化因子(IL8)を分解するScpCの発現が増強しており、好中球遊走を抑制することも判明した。これらの病原因子発現増強は、発現調節遺伝子*csrS*の変異によって生じており、そのことが感染部位に好中球浸潤を伴わない特異な病態による宿主防御機構の破綻を招来し、劇症型感染を惹起する可能性を示唆した。(渡邊、阿戸)

8) *S. suis*は本来ブタに肺炎、敗血症を起す菌であるが、まれにヒトに髄膜炎や敗血症など全身感染を引き起こすことが知られている。本研究は日本での患者から分離された*S. suis*のPFGE型別とST解析を行い、他の疫学情報とも併せて総合的に分析し、日本国内でヒトへの感染を防ぐ方策について考察した。また、分離株の病原性因子や毒力などについても調べた。国内例由来株の解析では2つのグループに分けられることが明らかにされた。病原性マーカーのSuilysin(溶血毒素)の保有状況にも違いがみられた。(渡邊、常)

9) 臨床分離のGAS株と、*csrS*遺伝子を変異させた株を用い、バイオフィーム形成と付着実験を行った。その結果、バイオフィーム形成能が高い株と低い株のあることが明らかにされた。

基礎実験より、疾患状態の違いでバイオフィルム形成能および相互作用する蛋白質に違いのあることが明らかとなった。また血清は GAS の蛋白質を介するバイオフィルム形成能を活性化させることも明らかにされた。CsrRS による莢膜の制御は、GAS のバイオフィルム形成に関与している可能性が考えられ、これらの作用は、GAS の病原性に関与している可能性が考えられた。(渡辺, 泉福, 池辺, 河原井)

10) 補体系の活性化を制御する因子である Membrane cofactor protein (MCP,CD46)は、全ての有核細胞で発現している。一方、ヒト CD46 は GAS の M 蛋白質の受容体となることが知られている。そこで、ヒト CD46 発現トランスジェニック (hCD46Tg) マウスを用いた GAS による劇症型感染症の感染モデルの構築を目指した。野生型(WT)マウス及び hCD46Tg マウスへ劇症型の GAS472 株を後肢足蹠部 (footpad) へ (10^6 あるいは 10^7 CFU) 投与すると、hCD46Tg マウスは投与後 10 日以内に死亡するが、WT マウスは生存した。hCD46Tg マウスの感染部位は出血傾向を示し、軟部組織の変性・壊死が認められ、播種性血管内凝固症候群(DIC)を示唆する所見が得られた。(松井)

11) GGS の病原性を、マウスモデルを用いて解析した。今回の解析では、GGS 遺伝子型とマウス病原性の間に明瞭な相関を認めなかった。GGS による劇症型感染症は GAS のそれと異なり、糖尿病などの基礎疾患保有患者で明瞭に高頻度であることを考えると、本結果は、GGS 劇症型感染症が特定菌株により誘発されるのではなく、宿主側要因により発症することが示唆された。実際の病態に近い GGS 劇症型感染症の動物モデルを構築するため、マウスにストレプトゾトシン投与で糖尿病を誘発し、動物実験により GGS 病原性への影響を検討した。糖尿

病誘発マウスでは、GGS の病原性が増加していることが明らかにされた。(秋山)

D. 考察

1 年間にわたって、日本各地の細菌検査室を有する中規模以上の医療機関の協力を得て、市中で発生する β 溶血性レンサ球菌と肺炎球菌による侵襲性感染症(敗血症, 肺炎, 化膿性髄膜炎等)由来株を収集して、宿主側と菌側からさまざまな解析を行ったことにより、我が国において発生している侵襲性感染症の実態と、その中に占める劇症型感染症の実態が明らかにできたと考える。

特に、小児に比して成人例において劇症型、あるいは劇症型例に近い病態で死亡例が多いことは、菌の病原性の強さも影響しているが、宿主側の基礎疾患による免疫能の低下、あるいは抗体獲得の有無、受診のタイミング、初期治療薬の問題などが、複合的に重症化と劇症化に関与していることが明らかにできたと考えている。

また、種々の基礎実験や動物モデルを用いた結果がそのことを裏付けていると考えられた。

2 年度以降においては、1 年目の成果を踏まえ、それぞれがその成果を論文として公表する。さらに、救命救急医学会とも連携し、さらに重症化の要因を探ると共に、予後不良例を減らすには、どのような臨床的処置が必要であるのかを検討することが必要である。さらに、迅速診断法を確立することも必要である。

基礎研究においては、さらに宿主側因子を踏まえた動物実験を試みる。

E. 結論

1. 劇症型を含む侵襲性重症感染症例由来の β 溶血性レンサ球菌と肺炎球菌を全国規模で収集し、宿主側背景因子の解析と菌の分子疫学解析を行った。

2. その他に、研究分担者は各自の分担テーマに従って対象菌種と宿主との関係、耐性化状況を検討した。
3. 基礎研究にあつては、被験菌の遺伝子変異と病原性に関わる菌の産生物の量との関係を検討した。
4. 動物を用いた実験においては、ヒトの感染症を踏まえたモデルを作成し、感染実験を行った。

謝辞

菌株の送付、ならびに患者背景因子のアンケート調査にご協力いただきました日本臨床微生物学会会員の検査技師の皆様に感謝申し上げます。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(論文発表)

1. 砂川慶介:□ 治療 2.小児 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン (監修 日本神経治療学会, 日本神経学会, 日本神経感染症学会 編集 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン作成委員会)。P52-65。医学書院。東京。2007年4月
2. 砂川慶介:□ 中枢神経感染症。スタンダード微生物学-第2版- (土肥義胤, 山本容正, 宇賀昭二編集)。P225-228。文光堂。東京。2008年2月
3. 砂川慶介編集:これだけは知っておきたい日常診療ガイドライン MRSA—診断・治療・対策— 医薬ジャーナル社 東京 平成19年11月
4. K Barada, H Hanaki, S Ikeda, Y Yamaguchi, H Akama, T Nakae, T Inamatsu and **K Sunakawa**: Trends in the gentamicin and arbekacin susceptibility of methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* and the genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. J Infect Chemother, 13:74-78, 2007

5. Y Hososaka, H Hanaki, H Endo, Y Suzuki, Z Nagasawa, Y Otsuka, T Nakae and **K Sunakawa**: Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* : a new type of MRSA. J Infect. Chemother. 13: 79-86, 2007
6. H Hanaki, Y Hososaka, C Yanagisawa, Y Otsuka, Z Nagasawa, T Nakae and **K Sunakawa**: Occurrence of vancomycin-intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Infect. Chemother. 13: 118-121, 2007
7. 二本柳伸, 小幡進, 中崎信彦, 平井誠, 平田泰良, 高山陽子, 大谷慎一, 狩野有作, 赤星透, 砂川慶介, 井上松久:A 群連鎖球菌集団感染における迅速検出用キットの有用性評価。感染症誌。81: 441-448, 2007
8. 大石智洋, 砂川慶介: 全国小児科外来初診の呼吸器感染症患児より分離された *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* の検討 (2002~2003年) —抗菌薬前投与のない児の鼻咽頭培養についての検討—。感染症誌。81: 449-455. 2007
9. **K Sunakawa** and D J Farrell: Mechanisms, Molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 6: 112-119, 2007
10. M Konno, S Baba, H Mikawa, K Hara, F Matsumoto, K Kaga, T Nishimura, T Kobayashi, N Furuya, H Moriyama, Y Okamoto, M Furukawa, N Yamanaka, T Matsushima, Y Yoshizawa, S Kohno, K

Kobayashi, A Morikawa, S Koizumi, K Sunakawa, M Inoue and K Ubukata; Study of nasopharyngeal bacterial flora. Variations in nasopharyngeal bacterial flora in schoolchildren and adults when administered antimicrobial agents. *Journal of Infection and Chemotherapy* 13: 235-254, 2007

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

11. 伊藤尚志, 野々山勝人, 渡邊智子, 佐伯敏亮, 砂川慶介, 石井正浩: ESBL 産生大腸菌による尿路感染症の乳児例。小児感染免疫 19: 235-238, 2007
12. 岩田敏, 公文裕己, 二木芳人, 青木信樹, 賀来満夫, 和田光一, 河野茂, 砂川慶介, 三嶋廣繁, 竹末芳生, 後藤直正, 門田晃一: 小児細菌感染症に対する ceftriaxon 1 日 1 回投与に関するアンケート調査。日化療会誌。55: 463-472, 2007
13. 小林寅詰, 中川直子, 卜部恵理子, 松崎薫, 佐藤弓枝, 砂川慶介: ファロペネムおよび経口抗菌薬の各種分離菌株に対する抗菌活性の比較。化学療法の領域。23: 75-88, 2007
14. M Morozumi, S Iwata, K Hasegawa, N Chiba, R Takayanagi, K Matsubara, E Nakayama, K Sunakawa and K Ubukata; Increased Macrolide Resistance of *Mycoplasma pneumonia* in pediatric patients with community-acquired pneumonniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008.52: 348-350, 2008
15. 砂川慶介, 月本一郎, 豊永義清, 恒松由記子, 岩井直一, 谷川原祐介: 小児深在性真菌症患者における micafungin の有効性, 安全性および薬物動態。日化療会誌。2008. 56: 190-201, 2008

新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と
診断・治療法に関する研究

我が国における侵襲性感染症例の患者背景の解析と分離されたβ溶血性レンサ球菌と
肺炎球菌の分子疫学解析

分担研究者 生方 公子 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 教授

研究要旨

1. 2006年から2007年にかけて、全国186医療機関の協力で、市中で発生した侵襲性感染症由来のβ溶血性レンサ球菌と肺炎球菌を約1,000株収集した。
2. それら症例における発症時の宿主側背景因子として、年齢、疾患名、基礎疾患の有無とその詳細、転帰、後遺症の有無と詳細、入院時血液検査所見、初期治療薬等について調べ、予後不良群(死亡+後遺症(+))と予後良好群間の統計学的解析を行い、その違いを明らかにした。
3. 分離菌株については、β溶血性レンサ球菌のうちGASとGGSについては病原性を有するMタンパクをコードする*emm* 遺伝子解析、GBSと肺炎球菌については莢膜型を抗血清あるいは遺伝子レベルで疫学解析を行った。GASにおいては*emm1*型、GGSではstG6792型で有意に死亡例が多く、これらの型は病原性の高いことが示唆された。GBSでは、小児ではIII型、成人ではIb型であった。肺炎球菌では、小児では耐性菌の多い6, 14, 19, 23Fの分離率が高かったが、成人では12型、3型が優位で、明らかに原因菌が異なっていた。
4. 基礎疾患として悪性腫瘍の手術後、糖尿病、肝疾患や心疾患を有する成人において、β溶血性レンサ球菌や肺炎球菌の侵襲性感染症に罹患した場合、受診のタイミングを失すると劇症型の急速な臨床経過を辿り、予後不良となることが明らかにされた。
5. 以上の成績から、医療関係者のみならず、医療関係者に対する啓蒙活動が必要であると結論された。

研究協力者

- ・ 岩田 敏 (独)国立病院機構東京医療センター 統括診療部長
- ・ 藤島 清太郎 慶應義塾大学医学部救急医学 講師
- ・ 坂田 宏 旭川厚生病院小児科主任部長
- ・ 吉田 敦 獨協医科大学病院感染総合対策部 講師
- ・ 砂川 慶介 北里大学大学院感染制御科学府 教授
- ・ 日本臨床微生物学会

A. 目的

本邦においては、市中で発症する細菌感染症の多くが致命的な疾患ではなくなったと考えられた時期もあったが、1990年代の半ば頃より、呼吸器感染症の原因菌として重要な肺炎球菌等の耐性化が始まり、特に免疫学的に未熟な小児において、それらによる重症感染症が治療上極めて深刻な問題を提起してきた。

しかし、高齢化社会の到来と共に、最近では免疫能が再び低下してくる成人の発症例が増加しているといわれる。このような症例では、

的確な初期診断と治療が予後の良否に強く影響することはいうまでもない。

このようなことから、先ず初年度においては市中において発生するβ溶血性レンサ球菌と肺炎球菌の侵襲性重症感染症にフォーカスをあて、患者背景因子の解析、原因菌の病原因子や薬剤感受性について全国規模で疫学調査を行ない、その実態を把握することを目的とした。

B. 研究方法

収集菌株：

期間は2006年8月から2007年7月までの1年間とした。全国の186医療機関から、市中で発生した侵襲性感染症由来株として送付された目的菌は、*Streptococcus pyogenes* (GAS)が97株、*Streptococcus agalactiae*(GBS)が151株、*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* が(GGSとGCS)が231株、その他の*Streptococcus anginosus* groupに分類されたレンサ球菌が12株、*Streptococcus pneumoniae*(肺炎レンサ球菌)が496株(42.1%)であった。

それらは、すべて平素無菌的な検査材料、すなわち髄液、血液、胸水、関節液、閉鎖性膿汁などから分離された菌株である。

菌株の解析項目：

- i) 病原性に関わるβ溶血性レンサ球菌のMタンパクをコードする *emm* 遺伝子解析とその他の遺伝子解析。GBSと肺炎球菌では莢膜血清型別
- ii) PCRによる薬剤耐性遺伝子の解析
- iii) 各種治療用抗菌薬感受性の測定

宿主側の背景因子解析項目：

- i) 年齢
- ii) 疾患名
- iii) 入院時の血液検査値(WBC, CRP, PLT)
- iv) 基礎疾患の有無とその内訳
- v) 転帰(死亡例の場合には入院からの日数、後遺症残存例ではその詳細)

vi) 初期治療抗菌薬

(倫理面への配慮)

本研究においては、取り扱う情報の中に個人が特定される情報が含まれないように配慮した。

また、各医療機関の長、あるいは検査部の長に対し、疫学調査の内容を開示し、あらかじめ許可を受けた。

従って、研究成果の公表にあたって、個人情報が含まれることはない。

C. 研究成果

1. β溶血性レンサ球菌

図-1には、レンサ球菌3菌種によって侵襲性感染症を惹起した症例の年齢分布を示す。重症感染症例の多くが、GBS染症を除き、50代以降の壮年期に多く発症していることが明らかにされた。しかし、その年齢的には微妙な違いがあり、GASは60代にピークがあり、30～80代に発症例がみられるのに対し、GGSでは50代から急速に発症例が増加し、70～80代が多数を占めていた。このことは、基礎疾患を有する割合と密に関連していた。GBS例のピークは70代にあったが、50～60代も多かった。これらの発症年齢は菌種によって異なることが統計学的にも示された。

それぞれの疾患の比較は図-2に示す。それぞれの菌種で敗血症例が多かったが、GASとGGSでSTSS、壊死性筋膜炎、蜂窩織炎が多く認められた。菌種によって惹起される疾患には違いがみられることが明らかにされた。

それぞれの発症例の受診科を調べると、GAS例の約4人に1人が時間外の救急診療を受けていた。しかし、同じような疾患が多いGGS例では救急よりも内科受診例の割合がやや高かった。GBSではさらに内科系受診例が多く、病態の進行を反映していると考えられた。

図-3には、発症後の予後に関する成績を示す。「死亡+予後不良例」の割合はGASで22.1%と

高く、GGS で 17.3%，GBS で 12.9%であった。

2. A 群溶血性レンサ球菌(GAS)

図-4 には GAS 検出例の年齢分布と入院時の診断名および予後との関係を示す。小児での発症例は 19.6%と少なく、成人例が圧倒的に多かった。20 歳未満では化膿性疾患が多かったのに対し、成人では敗血症が 32.1%と最も多く、次いで化膿性疾患が 20.5%，蜂窩織炎が 16.7%という割合であった。その他に、最も特異的で極めて重症と考えられる STSS が 3 例と、壊死性筋膜炎 5 例が認められた。図中に星印で示した死亡例や後遺症残存例は、すべて 30 歳以上の成人における全身性疾患であった。

発症例の受診科と予後との関係を調べると、救急を受診した例において「死亡+予後不良例」が著しく多い点が特徴であった。

「死亡+予後不良例」はすべて成人例であったが、その 56.4%は基礎疾患(+)で、糖尿病や悪性腫瘍であった。しかし、GGS に較べるとその割合は低く、基礎疾患(-)でも発症している点が注目された。

図-5 には GAS 株の *emm* 型と予後との関係を示す。*emm* 遺伝子は病原性に関わる M タンパクをコードする遺伝子で、先端(N 末端側)の塩基配列が非常に異なる”超可変領域”と呼ばれる部分を有しているため、疫学調査に用いられる。“超可変領域”の塩基配列を解析し、米国の CDC レファレンスセンターへ送信して、解析データの返信を受ける。*emm* 型は 118 タイプ、st 番号で表現されるタイプが 58 と極めて多岐にわたるが、日本で多く分離されるのはその中の 20 タイプ程である。

侵襲性感染症由来株で最も多いのは *emm1* 型で全体の 33%を占め、しかもこの型に「死亡+予後不良例」が圧倒的に多いことが明らかにされた。*emm1* 型の予後は他の型に比して明らかに悪かった。

発症例の入院直後における血液検査所見と予後との関係は表-1 に示す。WBC では $<5,000/\mu\text{l}$

に該当する症例中に占める「死亡+予後不良例」の割合は 58.3%，Odds 比では $\geq 5,000/\mu\text{l}$ であった群に較べ、「予後不良の発生率」が 4.5 倍高いことが有意であるという結果であった。PLT では $<13\times 10^4/\mu\text{l}$ の群における「死亡+予後不良例」の割合は 61.1%と高く、Odds 比でも $\geq 13\times 10^4/\mu\text{l}$ の群に較べ、その発生率は 7.4 倍と有意差が認められた。CRP は発症例ですべて高く、群間に有意差はなかった。

つまり、GAS 感染においては、“初期診断時に WBC が $<5,000/\mu\text{l}$ 、あるいは PLT が $<13\times 10^4/\mu\text{l}$ では予後が非常に悪い”ということが明らかにされた。

3. C, G 群溶血性レンサ球菌(GGS)

GCS と GGS の正式な菌種名は *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* である。本菌による侵襲性重症感染症は 2000 年以降増加傾向にあることが指摘されている。

図-6 には GGS 例の年齢分布、入院時診断名、および予後との関係を示す。本菌の感染症は成人例が圧倒的に多く、しかも 70-80 代が多いことが特徴であった。

疾患としては、GAS でみられる壊死性筋膜炎や STSS、化膿性髄膜炎、感染性心内膜炎が認められている。発症年齢が GAS に比して高いこともあってか基礎疾患(+)の割合が高く、それらは悪性腫瘍や糖尿病、脳血管系障害であった。

GGS の *emm* 型と予後との関係は図-7 に示す。これらの型別は、GAS の M タンパクに類似の病原性に関連する *emm* 遺伝子を解析している。最も多かった型は *stG6792* (24.2%)で、しかも有意に死亡例が多かったが、宿主側の要因も大きいことが示唆された。

表-2 には、発症例の入院直後に施行された血液検査所見と予後との関係を示す。

WBC では、 $<5,000/\mu\text{l}$ に該当する症例群中に占める「死亡+予後不良例」の割合は 33.3%で、 $\geq 5,000/\mu\text{l}$ であった群に較べて予後不良例の発生率は 3 倍高かった。PLT では、 $<13\times 10^4/\mu\text{l}$ の

症例群における「死亡+予後不良例」の割合は29.5%、 $\geq 13 \times 10^4/\mu\text{l}$ の症例群の割合が9.2%で、Odds比では予後不良例の発生率は4倍高いという結果であった。

4. B群溶血性レンサ球菌(GBS)

図-8には、GBSによる151症例の疾患名、年齢分布、およびその予後の成績を示す。本菌による感染症の罹患年齢は、生後1-4ヶ月までの小児重症感染症($n=28$)と、成人感染症($n=123$)の2群に分けられる。

疾患の内訳は、小児では化膿性髄膜炎と敗血症が大半であったのに対し、成人では敗血症が62.6%と最も多く、次いで蜂窩織炎、肺炎、化膿性関節炎等がみられた。その他に尿路性敗血症と感染性心内膜炎も認められたことが注目された。

図-9に示したように、GBSによる重症感染症で死亡した症例の入院日数は平均16日、GASやGGSによる重症感染症の死亡例の平均入院日数約4-5日とは明らかに異なっていた。この相違は、これらレンサ球菌3菌種の病原性に関わる産生物の違いが大きく関与していると考えられたが、その解析は今後の検討課題である。

GBSによる成人例ではその87.4%が1つ以上の基礎疾患を有しており、自家感染という意味で、GAS等による感染症とはやや異なると考えられた。基礎疾患の内訳は、悪性腫瘍や糖尿病が51.5%と約半数を占めていた。

一方、本菌の型別は細胞表層に存在する多糖体物質の相違から、9種の型に分類される。型特異的部分に相当する遺伝子をPCRで検索すると、小児と成人由来株では明らかに型が異なっていた。新生児から乳児ではIII型が圧倒的に多かったのに対し、成人ではIb型が最も多かった。このIb型においてキノロン薬耐性株が高頻度に認められた。

GBSによる発症直後に施行された血液検査所見と予後との関係では、WBC、PLT、CRPとも予後との相関は認められなかった。

5. 肺炎球菌

1) 症例の入院時背景

図-10には、発症例の初期診断名と予後との関係を示す。

小児例($n=193$)よりも成人例($n=303$)が多くを占めていたことが注目された。また、小児の死亡例は2例であったのに対し、成人では化膿性髄膜炎、肺炎、膿胸、敗血症などの疾患において死亡例が46例、後遺症残存例が18例も認められ、統計学的にも成人において予後不良例の多いことが示された。そのうち60代までの予後不良例が26例含まれ、しかも化膿性髄膜炎例が11例含まれていた。また、その多くが発症3日以内に死亡していた(図-9)。70代以上の38例の予後不良例では、大半が敗血症や肺炎例で、化膿性髄膜炎例は4例のみであった。

図-11には、発症例の基礎疾患の有無と予後との関係について示す。小児では基礎疾患(+)は15.5%であったのに対し、成人では基礎疾患(+)が56.1%に認められ、しかもそれらの例で死亡と後遺症残存例が有意に多いことが示された($\chi^2=25.1959$, $p=0.0000(**)$)。

基礎疾患としては、腫瘍手術後が最も多く、次いで糖尿病、心疾患、肝胆膵疾患、脳疾患、そして腎疾患など多岐にわたっていた。

各症例が発症直後に受診した診療科をみると、呼吸器内科ではなく一般内科と救命救急を含む救急受診例が全体の28%を占めていたことが注目された。つまり、肺炎球菌感染症は、極めて進行の早い急性感染症であることを窺わせた。

2) 入院時血液検査値と予後との関係

表-3には、成人例の入院時に測定されたWBC、CRP、およびPLTの検査値と予後との関係について示す。その成績は「予後不良群(死亡+後遺症あり)」と「予後良好群(後遺症なし)」とに層別して比較した。

層別した各検査値についてみると、WBCとPLTにおいて明らかな有意差が認められた。こ

の成績から、WBC が低値である際の予後不良率の発生率を計算すると、5,000/ μ l 以下の場合には 61.1%、>5,000/ μ l では 21.6%となり、その Odds 比は 5.7 で有意となっている。

また、PLT でも <13 \times 10⁴/ μ l とそれ以上とに層別して予後不良の割合を計算すると、<13 \times 10⁴/ μ l の場合には 50.0%、それ以上では 20.3%となり、その場合の Odds 比は 3.9 で有意差が認められている。

CRP 値は 3 群とも高値であり有意差は認められなかった。

3) 症例の年齢と分離菌の遺伝子解析からみた感性/耐性との関係

図-12 には、収集菌株の β -ラクタム系薬耐性に関わる PBP 遺伝子変異の内訳と症例の年齢との関係を示す。小児(\square 19 歳)では 1 歳児が 41% を占め、次いで 1 歳未満と 2 歳児であったが、発症は 4 歳児までに集中していた。それに対し、成人(\square 20 歳)では 30 歳から加齢とともに症例数が増加し、70 歳にピークがみられた。

分離菌の耐性型の内訳は、小児と成人とに分けて比較すると、両者での耐性菌の割合は有意に異なっていた($\chi^2=61.4465$, $p=0.0000(**)$)。

小児では gPRSP が 45.6%、gPISP(*pbp2x*)が 19.7%、gPISP(*pbp1a+pbp2x*)が 12.4%と多く、gPSSP は 14.0%に過ぎなかった。成人で最も分離頻度の高かったのは gPISP(*pbp2x*)の 28.7%、次いで gPSSP の 24.4%、gPRSP は 17.5%であった。この成績は菌の莢膜型と密接に関連しており、小児由来株では少ない gPISP (*pbp2b*) が成人では 11.6%も認められたのが特徴であった。

4) 分離菌の莢膜型

肺炎球菌が保持する莢膜は、その病原性と深く関わっていることが知られている。莢膜型は 21 のグループに属する 65 型と、25 の型の計 90 型に識別される。

図-13 に示すように、小児由来株で分離頻度の高い莢膜型は 6B 型、次いで 19F、14、23F

型であった。続いて 6A、9、19A、4 型であった。4 型を除くほとんどの株は gPRSP や gPISP であった。

つまり、肺炎球菌による小児侵襲性感染症は耐性菌によるものとみなして抗菌薬を選択した方がよいということであった。

欧米で既に実施されている 7 価コンジュゲートワクチン(7PCV)のカバー率は約 73.8%であった。

他方、成人由来株の莢膜型に関する成績は図-14 に示したが、小児由来株とは著しく異なっていた($\chi^2=99.0099$, $p=0.0000(**)$)。最も多かったのは 14.2%を占めた 12 型で、その大半が gPISP(*pbp2b*)であった。次いで gPISP(*pbp2x*)でムコイドタイプの 3、6B、14 型であった。その他に 10、15、22 型などさまざまな型によって発症していることが特徴であった。

ここにはデータは示していないが、予後不良例はさまざまな型に認められた。

5) 各種抗菌薬感受性と遺伝子変異との関係

本邦で比較的多く使われている経口、注射用 β -ラクタム系薬、マクロライド系薬、ニューキノロン系薬、そして VCM の感受性と耐性遺伝子との関係を検討した。PRSP に対するカルバペネム系薬の感受性は比較的優れていたが、セフェム系薬のそれは明らかに低下していた。

また、マクロライド系薬には 80%の株が高度耐性であった。キノロン薬には耐性菌は少ないものの、感受性は優れたものではなかった。

6) 治療抗菌薬の現状

侵襲性肺炎球菌感染症に対し、どのような抗菌薬が初期治療薬として選択されていたのかを調べると、小児と成人では使用薬が明らかに異なっていた。

成人では小児に比して殺菌性に優れるカルバペネム系薬が比較的多く使用され、しかも CTRX などと併用されていたにも関わらず、予後不良例が多かった。この点が成人と小児にお

ける臨床経過の違いであり、特に、基礎疾患を有する成人が病原性の高い莢膜型の肺炎球菌によって全身感染症を惹起した場合には、抗菌薬療法のみでは限界のあることが示唆された。また、受診の遅れがその予後に強く影響していることが示唆された。

D. 考察と結論

我が国において、市中で発生する侵襲性感染症の宿主側因子と菌の側からこのような大規模サーベイランスが実施されたのは、恐らく始めてのことである。

急速に高齢化社会を迎え、さらに若年層にも生活習慣病が広がっている現状を考えると、そのような基礎疾患を有する例において、ひとたびβ溶血性レンサ球菌や肺炎球菌に罹患し、さらに受診のタイミングを失するということが重なると、急激な転帰をとることが示された。

このような感染症例の防止対策には、医療関係者や国民に対する積極的な啓蒙活動が必要である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 生方公子, 中山栄一, 長谷川恵子, 諸角美由紀: 呼吸器感染症原因微生物ーリアルタイム PCR による迅速検索ー。小児科診療 71: 111-116, 2008
- 2) 生方公子, 千葉菜穂子, 岩田敏, 砂川慶介: 肺炎球菌の耐性化とワクチン, 小児科, 49:301-307, 2007
- 3) Nakayama, E., Hasegawa, M. Morozumi, R. Kobayashi, N. Chiba, T. Iitsuka, T. Tajima, K. Sunakawa, **K. Ubukata**.: Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community-acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture. J Infect Chemther., 13:305-313, 2007
- 4) Morozumi, M., S. Iwata, K. Hasegawa, N. Chiba, R. Takayanagi, K. Matsubara, E. Nakayama, K. Sunakawa, **K. Ubukata**, and the Acute Respiratory

Diseases Study Group.: Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. Antimicrob. Agents Chemother. 52:348-350, 2008

2. 学会発表

- 1) 輪島文明, 砂押 克彦, 小林 玲子, 中山 栄一, 生方 公子, 砂川 慶介: A 群溶血性レンサ球菌のマクロライド系薬およびレボフロキサシン耐性化機構についての解析。第 55 回日本化学療法学会総会(仙台), 2007 年 6 月
- 2) 生方公子: β 溶血レンサ球菌感染症例増加の背景とその分子疫学および病原性について。ー *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* と *S. pyogenes* を中心に ー。第 40 回レンサ球菌感染症研究会(東京), 特別講演, 2007 年 6 月
- 3) T. Wajima, K. Sunaoshi, E. Nakayama, N. Chiba, K. Sunakawa, **K. Ubukata**: Prevalence of macrolide and levofloxacin resistance characterized genetically and *emm* typing in *Streptococcus pyogenes*. 47th ICAAC, Chicago, 2007 年 9 月
- 4) 関千鶴子, 千葉菜穂子, 輪島文明, 砂押克彦, 砂川慶介, 生方 公子: 侵襲性感染症由来 B 群溶血レンサ球菌の莢膜型と薬剤耐性化の動向。第 56 回日本感染症学会東日本地方総会(東京), 2007 年 10 月

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図-1. β 溶血性レンサ球菌の発症年齢の比較

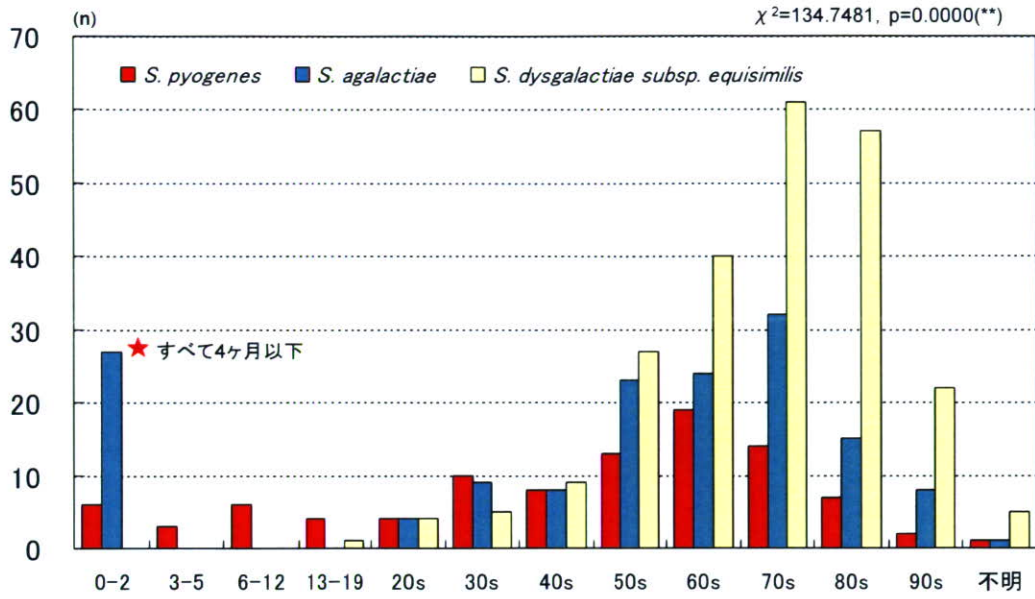


図-2. 侵襲性 β 溶血性レンサ球菌の菌種による疾患の比較

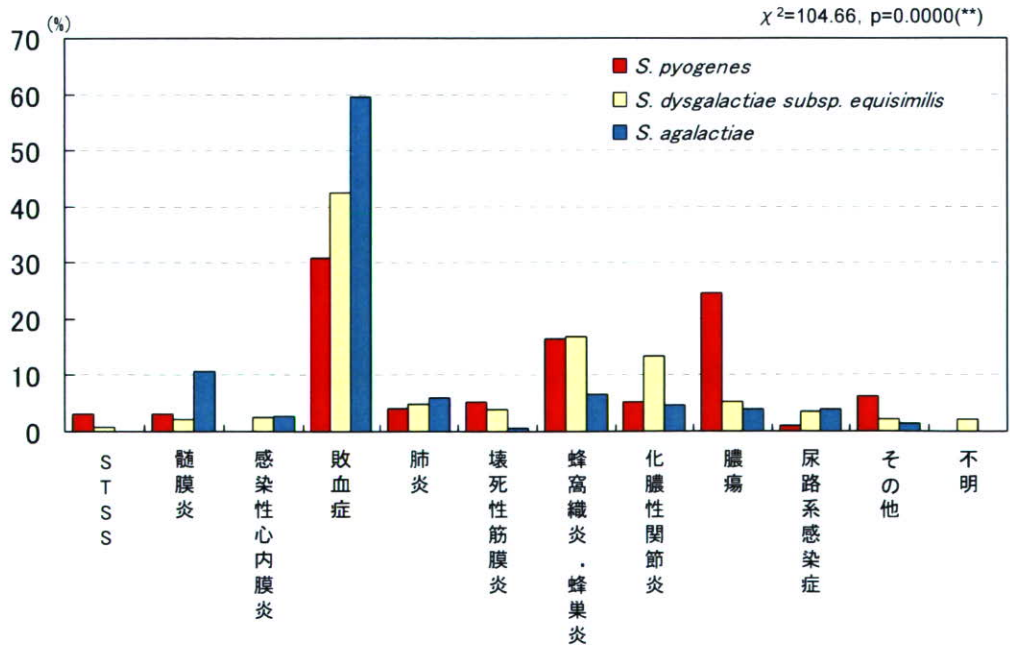


図-3. β 溶血性レンサ球菌の菌種別にみた発症例の予後の比較

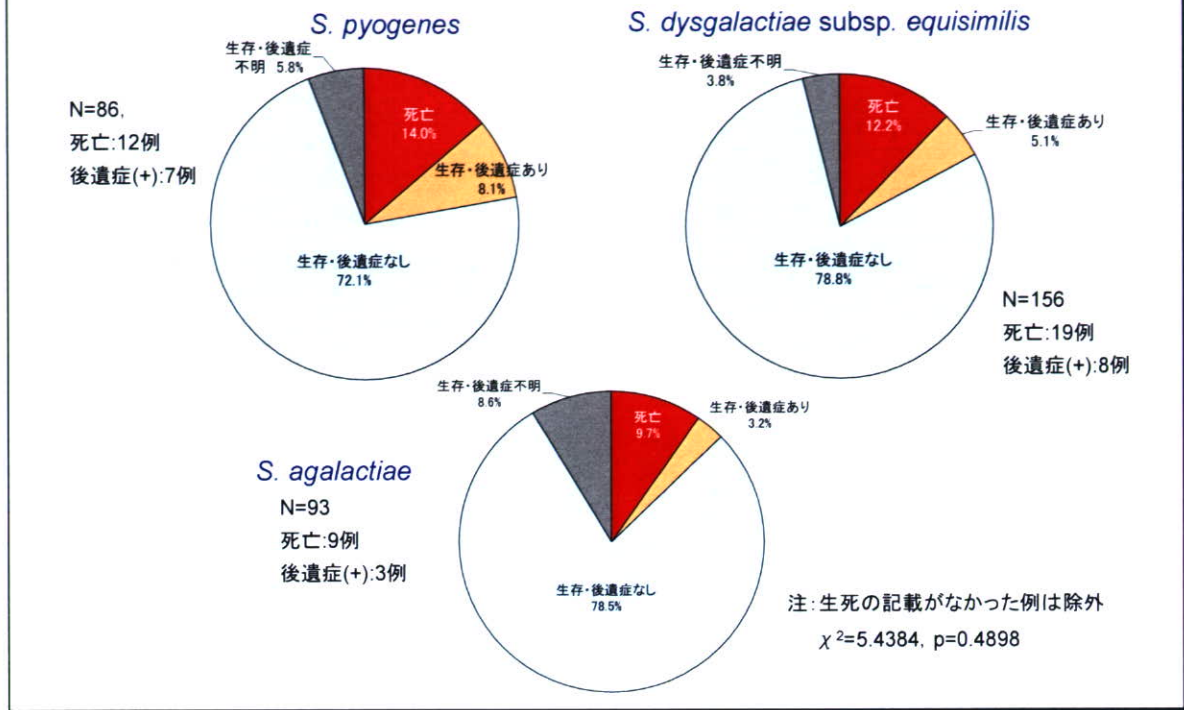


図-4. *S. pyogenes*による疾患名と症例の年齢分布, およびその予後 (n=97)

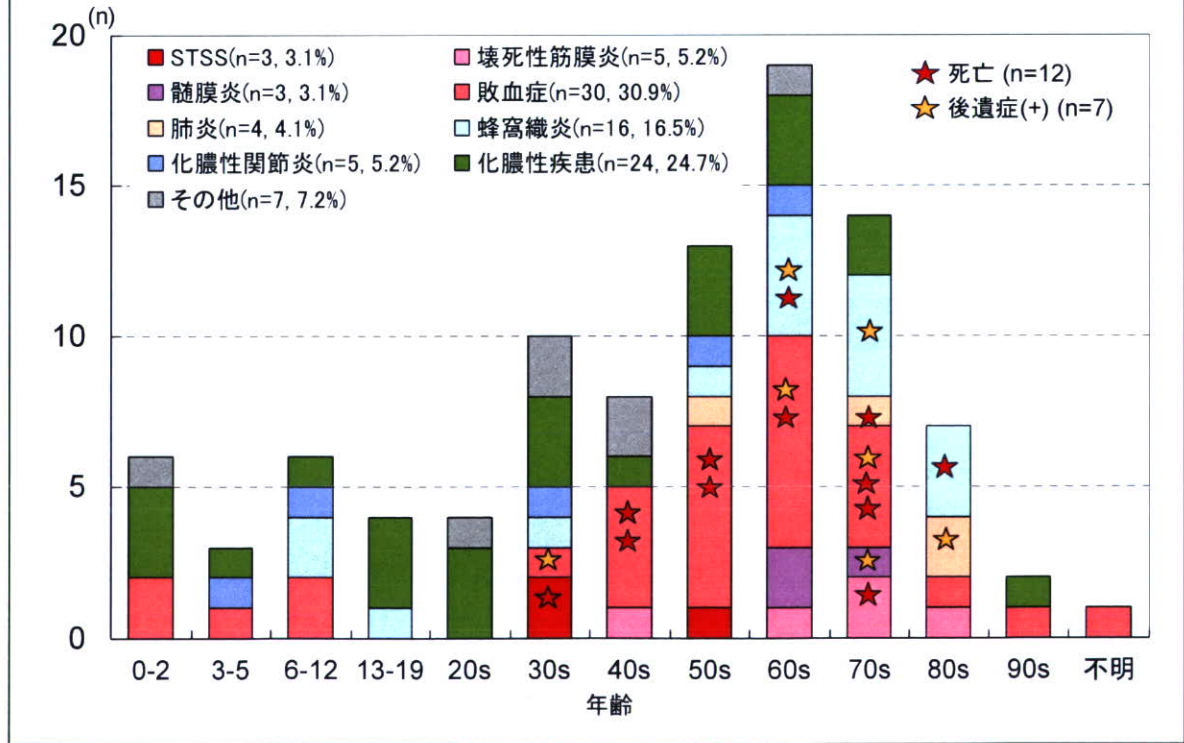


図-5. *S. pyogenes*のemm型と予後との関係 (n=97)

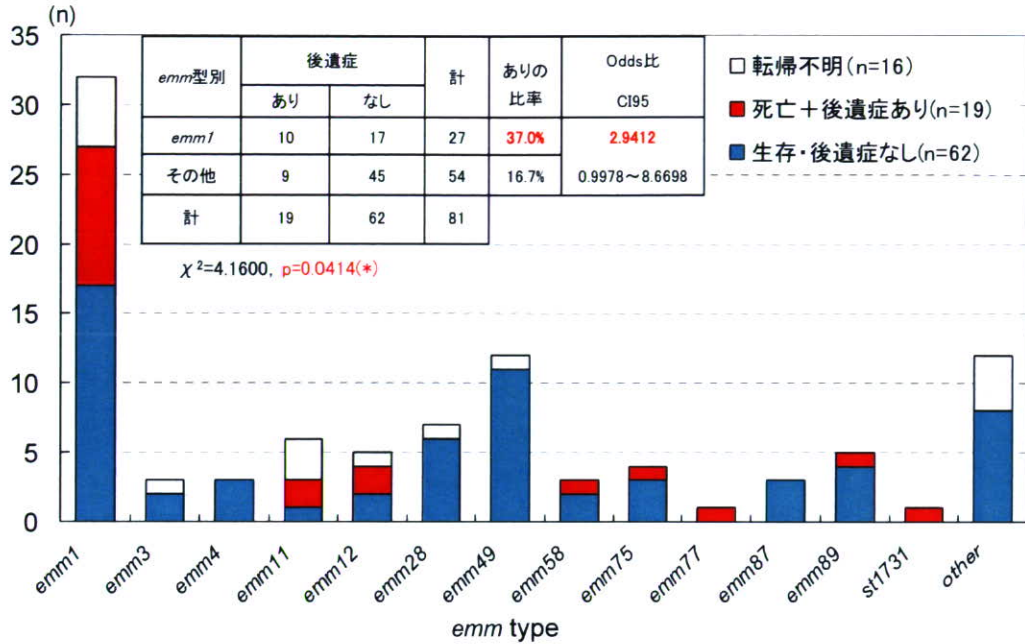


表-1. 成人の*S. pyogenes*感染症例の入院時血液検査値と予後との関係

WBC (/μl)	後遺症+死亡	
	あり	なし
<5,000	7	5
5,000-10,000	3	14
10,001-20,000	3	15
>20,000	5	6
計	18	40

$\chi^2=8.4066, N=3, P=0.0383(*)$

WBCが低値である場合の後遺症発生率

WBC (/μl)	後遺症+死亡		計	ありの比率	Odds比 CI95
	あり	なし			
<5,000	7	5	12	58.3%	4.4545
≥5,000	11	35	46	23.9%	1.1434~17.3542
計	18	40	58		

PLT (×10 ⁴ /μl)	後遺症+死亡	
	あり	なし
<13	11	7
13-37	6	29
>37	1	4
計	18	40

$\chi^2=11.047875, N=2, P=0.0048(**)$

PLTが低値である場合の後遺症発生率

PLT (×10 ⁴ /μl)	後遺症+死亡		計	ありの比率	Odds比 CI95
	あり	なし			
<13	11	7	18	61.1%	7.4082
≥13	7	33	40	17.5%	2.0684~26.5332
計	18	40	58		

CRP (mg/dl)	後遺症+死亡	
	あり	なし
<1	1	3
1-10	2	11
>10	14	25
計	17	39

$\chi^2=1.9990, N=2, P=0.3681$

CRPの値が1mg/dl未満である場合の後遺症発生率

CRP (mg/dl)	後遺症+死亡		計	ありの比率	Odds比 CI95
	あり	なし			
<1	1	3	4	25.0%	0.7500
≥1	16	36	52	30.8%	0.0690~8.1549
計	17	39	56		

図-6. *S. equisimilis*による疾患名と症例の年齢分布, およびその予後 (n=231)

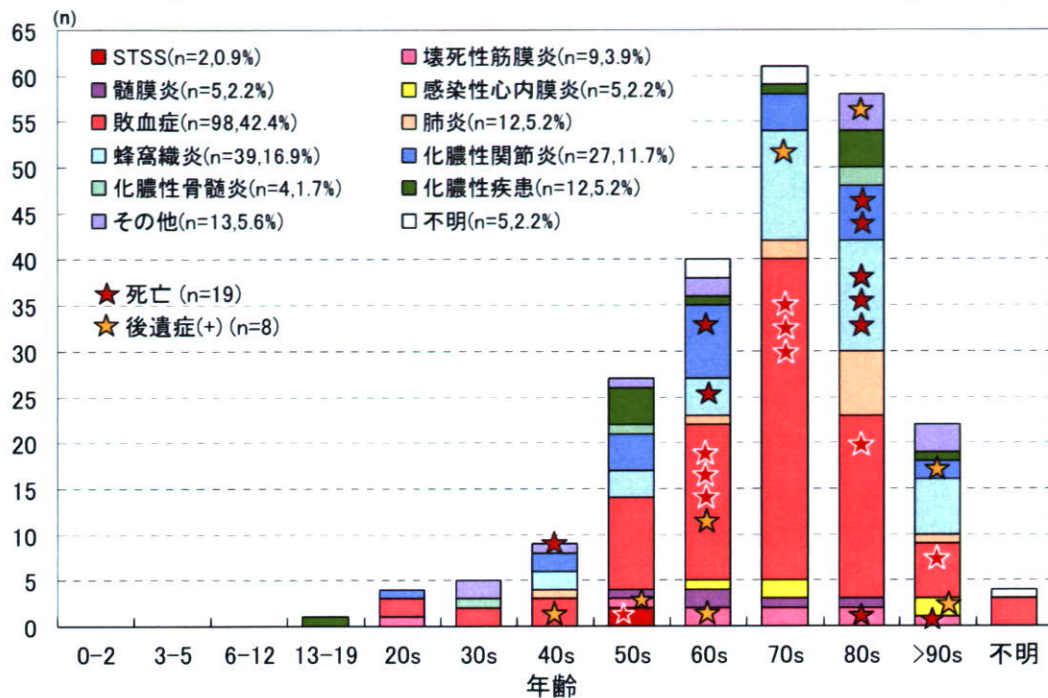


図-7. *S. equisimilis*のemm 型と症例の予後との関係 (n=231)

