

200829017A

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20年度 総括研究報告書

主任研究者 砂川 慶介

平成 21(2009)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. 侵襲性 B 群溶血性レンサ球菌感染症の実態と PCR による迅速診断法の確立 . . . . . 8  
生方 公子, 坂田 宏, 岩田 敏
2. 侵襲性感染症例から分離された肺炎球菌の分子疫学解析 . . . . . 19  
生方 公子
3. 劇症型感染症由来 G 群レンサ球菌のゲノム解析 . . . . . 27  
生方 公子, 秋山 徹, 村山 琮明, 砂川 慶介
4.  $\beta$ 溶血性連鎖球菌菌血症に関する臨床的検討 . . . . . 32  
岩田 敏
5. 小児の髄膜炎・敗血症から分離された B 群溶連菌の最小発育阻止濃度と  
最小殺菌濃度 . . . . . 35  
坂田 宏
6. 救急救命, 外科領域における劇症型感染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 . . . . . 38  
藤島 清太郎
7. B 群連鎖球菌および *S. milleri* group 感染症の臨床疫学的特徴と薬剤耐性 . . . . . 40  
吉田 敦
8. *Streptococcus suis* 感染症の病態とその診断・治療法に関する研究 . . . . . 49  
大石 和徳
9. 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) . . . . . 55  
渡辺 治雄, 泉福 英信, 池辺 忠義, 河原井武人
10. 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) . . . . . 61  
渡辺 治雄, 池辺 忠義

11. 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 (3) . . . . . 65

渡邊 治雄, 阿戸 学

12. 動物実験モデルによるレンサ球菌感染症発症のメカニズムの解明と

治療に係る基礎的研究 . . . . . 69

松井 英則

13. 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 . . . . . 77

秋山 徹

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 83

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  
総括研究報告書

研究代表者 砂川慶介 北里大学大学院感染制御科学府&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劇症型例を含む侵襲性重症感染症が多い「レンサ球菌感染症(肺炎レンサ球菌含む)」について、研究初年度に全国規模で収集し、患者背景因子や菌の分子疫学解析、動物モデルの構築など行なった。それらの成績を土台に研究を発展させ、研究 2 年度は以下の結果を明らかにしたことを総括する。

- 1) GBS の迅速診断を目的として、周産期医療を行っている医療機関と協力し、検査材料採取から 2.5 時間で菌の存在が証明できる real-time PCR 法を構築し、検査室で十分に使用できることを明らかにした。(生方, 坂田, 岩田共同研究)
- 2) 肺炎球菌について、死亡や後遺症残存例との関係を明らかにすることを目的に、宿主のリスクファクターが予後に大きく影響していること、入院時の血液検査で WBC や PLT が低値であると予後が非常に悪いことを明らかにした。(生方他共同研究)
- 3) 劇症型由来の GGS:RE378 株の全ゲノム解析を行い、GAS と 60-63%と高い DNA 相同性を有すること、病原遺伝子も多くが共通していることを明らかにした。(生方, 秋山)
- 4) 血液から  $\beta$  溶血性レンサ球菌が分離された例では、GAS と GGS は軟部組織感染症、GBS ではフォーカス不明例が多かった。死亡例は GBS と GGS 例であった(13%)。(岩田)
- 5) 新生児 GBS 感染症由来株を用いて治療抗菌薬の殺菌性について検討し、殺菌性の低下した tolerance 株が多いことを明らかにした。(坂田)
- 6) 救命救急受診例におけるレンサ球菌性感染症を解析し、基礎疾患と高齢者で重要であることから、敗血症例登録システムの開発を行い、そのプロトタイプを作成した。(藤島)
- 7) GBS と *S. milleri* group のレンサ球菌について臨床疫学的解析を行い、高齢者における重要性を明らかにした。(吉田)
- 8) 我が国においてもその感染症が危惧されるブタレンサ球菌(*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)
- 9) 渡邊らは GAS について次の項目を解析した。i) GAS におけるセンサータンパク制御のバイオフィーム形成能への影響、ii) 菌の産生物である SLO の好中球ネクロシスとの関係、iii) *csrS* 遺伝子変異が特定の *emm* 型のみに見られるか否か、の解析である。(渡邊, 池辺, 阿戸, 常, 泉福, 河原井)。
- 10) 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 感染の発症病態を解析した。CD46(+)マウスではヒトにみられる DIC, MOF, sepsis が惹起され、1 週間以内にほぼ全匹が死亡した。病態解析、あるいは治療法の開発に有用であることを明らかにした。(松井)
- 11) GGS 感染症の病態解析のために糖尿病モデルマウス系を構築し、本系では GGS 感受性が明らかに上昇していることを見いだした。また、侵襲性感染症由来の GGS 株について全ゲノム解析を行い、GAS と高い DNA 相同性を有していることを明らかにした。(秋山)

## 研究分担者氏名：所属機関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准教授
- 6) 大石和徳 大阪大学微生物病研究所 特任教授
- 7) 渡邊治雄 国立感染症研究所副所長 細菌第一部部長
- 8) 池辺忠義 同上細菌第一部主任研究官
- 9) 阿戸 学 同上 免疫部第二室長
- 10) 松井英則 北里大学大学院感染制御科学府 講師
- 11) 秋山 徹 国立国際医療センター 研究室長

### A. 研究目的

本研究班が組織された背景には、急速な少子・高齢化社会を迎えた我が国において、市中で発生する重症細菌感染症も変貌しつつあり、中でも呼吸器系感染症の主要な細菌であるβ溶血レンサ球菌、あるいは肺炎レンサ球菌(肺炎球菌)等による劇症型侵襲性感染症が増加しつつあることが示唆されていることにある。

本研究班は当該感染症の社会的重要性に着目、基礎と臨床系研究者とが連携して次の**6項目を3ヶ年計画で研究**し、その結果を医療行政へ反映させたいと企画されている。

1. 侵襲性感染症由来の上記記載菌株を全国規模で収集し、分子疫学解析を行うと

同時に、宿主側のリスクファクターを統計解析によって明らかにする。

2. 動物モデルの構築による病態と重症化メカニズムの解明を行う。
3. レンサ球菌の中で発症例が急速に増加している G 群レンサ球菌(正式菌種名: *Streptococcus dygalactiae* subsp. *equisimilis*, GGS)の全ゲノム解析を行い、*S. pyogenes*(GAS)の病原遺伝子との比較を行なう。
4. 臨床現場で使用可能な原因菌の迅速診断法を構築し、それによる発症予防対策を確立する。
5. 補助療法も含め、発症例に対する適切な抗菌薬療法を確立する。
6. 最終目標は、ガイドライン作成と医療関係者への啓発活動を通じ、医療行政へ貢献する。

### B. 方法

#### 1) 対象菌株と解析法

事業年度1年目において、全国186医療機関から侵襲性感染症由来株として収集された987株が対象とされた。肺炎球菌がほぼ半数、レンサ球菌はGGSが最も多く、次いで*S. agalactiae*(GBS)、GASとなっている。これらの菌が分離された症例のリスクファクターは統計学的解析を行った。

同時に、重篤な後遺症を残しやすい新生児GBS感染症に対する抗菌薬の殺菌性についても検討した。成人例においては、救命救急での予後を含めた実態把握が最も重要であるため、自動的に症例把握が可能となるWebsiteの構築をめざした。

#### 2) GGSのゲノム解析

GGSの病原遺伝子を明確にするため、本菌の全ゲノム解析を行い、その病原性遺伝子の有無をGASのゲノム解析データと比較することとした。

### 3) GASと GGS の動物モデルの構築

GAS ではヒト CD46 レセプターを持つ transgenic マウスを用いた病態解析, GGS では糖尿病誘発マウスモデルを用いて病態解析を行った。

#### (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、患者情報はすべて記号化され、配慮がなされている。

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、疫学研究成果の公表にあたっては、個人情報が含まれることはない。

なお、動物実験を実施する場合には、「動物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た研究がなされた。

### C. 研究結果

平成 20 年度の研究結果についての詳細は研究分担者のそれぞれの報告にあるが、その概要は以下の通りである。

1) GBS: 侵襲性感染症由来の *Streptococcus agalactiae* (GBS) 株に対し、PCR による莢膜型解析、抗菌薬感受性、および耐性遺伝子解析が行われた。小児では III 型が多かったのに対し、成人では Ib 型と V 型が多かった。ニューキノロン系薬高度耐性の 45 株は、ほとんどが Ib 型で、すべての株が *gyrA* と *parC* 遺伝子上にアミノ酸置換を有し、同一の PFGE パターンを示した。ひとつのクローン株が急速に全国へと拡散したことが示唆された。

これら GBS の存在を迅速に証明するには、産道感染としての GBS 感染症予防が最も肝要である。この解決策として、迅速診断法の構築を、周産期医療に関わる臨床医と共同で行った。

用いたサンプルは妊娠 37-39 週の妊婦由来の検査材料である。GBS そのものと病原性に関わる莢膜型を 2 時間で明らかにできる real-time PCR 法が新規に構築された。これは世界で初めてと思われる。

2) 肺炎球菌: 全国約 200 医療機関の協力にて市中で発生した侵襲性感染症由来の肺炎球菌を 684 株収集した。それら症例の予後(転帰と後遺症の有無)と基礎疾患の有無、あるいは入院時血液検査所見との関係について統計学的解析を行った。小児では死亡例は 1.4%であったのに対し、成人では死亡が 22.1%と多く、重篤な後遺症を残した例も 8.7%認められた。小児では従来報告されている莢膜型の株が多く、7 価コンジュゲートワクチンのカバー率は 75.4%であった。これに対し、成人では新たな莢膜型の 12F 型が最も多く、次いで 3 型と 14 型が優位であり、小児とは明らかに異なっていた。菌の相同性を比較する PFGE 解析では、成人の 12F, 3, 14 型は耐性遺伝子型が同一であるとほとんどが同一のパターンを示し、由来が同じであることが示された。

これらの成績は、国外から持ち込まれた新規の莢膜型の菌株がヒトを介して急速に全国へと拡散しており、高齢者や基礎疾患を有するリスクファクターの高い成人において、重篤な侵襲性肺炎球菌感染症を惹起していることを示唆する成績であった。このような感染症を減らすためには、それらのリスクファクターの高いヒトに対するワクチン接種が必要であると結論される。

3) GGS: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (GGS) 株について、その病原性を A 群レンサ球菌(GAS)等と比較するため、まず、劇症型感染症例から分離された RE378 株(*emm* 型: *stG6792*)の全ゲノム解析を行った。これは世界で初めての解析である。

本菌のゲノムは、DNA レベルで GAS と 60-63%と高い相同性を有していた。これに対し、GBS や肺炎球菌、ブタレンサ球菌とは 9-29%と低い相同性であった。

特に、GAS で病原性発揮に関わるとされている多くの遺伝子が、GBS にも認められた。この事実は、GBS は GAS と同レベルの病原性を発揮するであろうことを意味し、臨床的にも極めて重篤な侵襲性感染症を惹起することが示唆された。

GBS の侵襲性感染症が急速に増加しつつある今日、臨床現場への早急な啓蒙活動が必要である。

#### 4) GBS と GGS

2003 年 1 月から 2008 年 8 月の間に、(独)国立病院機構東京医療センターにおいて、血液から  $\beta$  溶血性レンサ球菌が分離された 61 例について、その臨床的背景を後方視的に検討した。

菌としては、GAS、GBS、GGS の 3 種類が分離されたが、GAS と GGS では皮膚軟部組織に感染巣が認められる場合が多いのに対し、GGS では皮膚軟部組織病巣の明らかでない症例が多かった。死亡例は 8 例認められ、いずれも GBS か GGS が分離された症例であった。

5) GBS に対する抗菌薬の殺菌効果:今までに重篤な GBS 感染症を発症した児から分離された 20 株の GBS 株について、どのような薬剤が治療に最も適しているのか、基礎的検討を行なった。ampicillin (ABPC), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CTRX), panipenem (PAPM), meropenem (MEPM) の 5 薬剤の MIC と MBC とを測定した。それぞれの薬剤の MIC<sub>90</sub> は、0.015 $\mu$ g/ml ~ 0.12 $\mu$ g/ml であった。CTX や CTRX の抗菌力は 0.06 $\mu$ g/ml, MEPM が 0.03 $\mu$ g/ml, PAPM が 0.015 $\mu$ g/ml であり、カルバペネムの殺菌性は有意に優れていた。

MBC では抗菌薬濃度が 2 $\mu$ g/ml 以上で生育する、いわゆる tolerance を示す GBS が ABPC では 6 株, CTX では 5 株, CTRX では 4 株, PAPM では 5 株, MEPM では 6 株認められた。tolerance 株では、MIC より高い薬剤濃度で菌を処理しても、経時的な生菌数の減少は抑制されていた。

重症感染症においては、tolerance 株か否かを調べるのが治療上必要である。

6) 敗血症例登録システムの構築: レンサ球菌性劇症型感染症の病態を明らかにするため、当大学症例の後ろ向き調査と当部入院症例の前向き調査を行い、基礎疾患保有または高齢者における GGS 性敗血症の重要性が明らかになった。

それを受け、敗血症症例登録システムの開発も進捗した。

#### 7) GBS と *S. milleri* による侵襲性感染症

獨協医科大学病院において、ヒト由来の GBS と *S. milleri* group (SMG) 株を収集し、侵襲性感染症例と保菌例について臨床的特徴と微生物学的特徴を解析した。小児の早発型 GBS 感染症例では莢膜型 Ib, III, VI, 中年の敗血症例では莢膜型 Ib, III が優位であった。またマクロライド耐性株が徐々に増加しており、莢膜型 Ia と有意に相関していた。

ニューキノロン系薬(FQ)耐性 GBS 検出のリスクファクターは、高齢者の泌尿器系検体と有意に相関していた。慢性疾患を有する高齢者への FQ 投与が、FQ 耐性 GBS の拡散を招いた可能性が示唆される。

SMG は全体としては呼吸器系検体から多く分離されたが、敗血症例は SMG の中でも *S. constellatus* によることが多く、胆道感染や腹腔内感染由来が半数を占めた。マクロライド耐性遺伝子 *erm B* と *mef A* を有していた。

これら GBS、SMG に関する経年的な疫学成

績は、本邦独自のワクチン開発に役立つと思われる。

#### 8) プタレンサ球菌

2006-8年にかけて、タイ国内でヒト血液および髄液由来の *Streptococcus suis* (SS)180株を分離同定し、そのうち165株(91.7%)がSS serotype 2 (SS2)、15株(8.3%)はSS serotype14(SS14)であることを明らかにした。

この結果から、北タイを中心としてタイ国内で少なくとも年間数十例のヒトSS感染症が、主に散発例として発生していることを明らかにした。流行の主体を占めるSS2の中では、sequence type (ST)1, ST104が増加しており、SS14ではST122が新興株として検出された。

今後、タイ国民に向けた生ブタ肉、血液の摂食のリスクを含めたSS感染症に関する教育を徹底することが肝要と結論された。

また、今回作成したSS2 CPS 特異的マウスMabを用いたタイ現地で利用可能な迅速抗原検出系の開発が期待される。

本邦においても、ヒトSS感染症が少数例ながら発生していることが報告されており、今後SS感染症に対する啓蒙活動が必要と考える。

9) GASにおけるバイオフィルム形成と病原性：劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症に関わるGASのバイオフィルム形成能および形成に関わる分子および遺伝子はあまり明らかになっていない。本研究ではGASの臨床分離株を用いて、バイオフィルム形成能について検討を行い、莢膜産生や毒素因子発現を制御しているCsrSR 2成分制御系のセンサーキナーゼのバイオフィルム形成への影響について検討を行った。平成19年度に行った研究成果では、膿由来株1566株を用いて*csrRS*による莢膜の制御が、GASのバイオフィルム形成に関与している可能性を示した。

本年度は、膿由来株である1566株とは特徴

が異なるK33株(咽頭炎由来)の*csrRS*の変異株を作製して、CsrRSがどのようにバイオフィルム形成に影響するか検討を行った。K33株は1566株と異なり、type 1 collagenへの結合を介してバイオフィルムを形成する。

K33株の*csrS*と*csrR*の欠損株を作製して、96穴プレートを用いたバイオフィルム形成実験を行った。K33Δ*csrS*株は、wild株よりもバイオフィルム形成が低下した。K33Δ*csrR*株は、K33Δ*csrS*株よりも顕著にバイオフィルム形成が低下した。しかし、血清を加えた培地では、K33Δ*csrR*株の著しいバイオフィルム形成の低下が認められるものの、若干のバイオフィルム形成が認められた。

CsrRSによる莢膜の制御は、type 1 collagenなどの結合蛋白質を介するバイオフィルム形成に関与している可能性が考えられた

10) GASにおける*csrS*遺伝子の解析：昨年度の研究において、*emm49*型のGASによる劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株には特異的に*csrS*遺伝子変異がみられ、この変異により、病原性因子の発現が上昇し、劇症型感染症を引き起こすことが示唆された。

本年度は、この*csrS*遺伝子の変異が*emm49*型にのみ特異的なのか、それとも、他の*emm*型でも見られることなのか調べるため、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株における当該遺伝子の変異を調べた。

その結果、劇症型感染症患者分離株においては、*emm*遺伝子の違いに関係なく、様々な*emm*型で*csrS*遺伝子に変異の見られることが明らかになった。

11) GASのストレプトリジンOとネクロシスとの関係：劇症型溶血性レンサ球菌感染症において、起因菌であるGASが宿主生体防御を傷害する機構を解析する目的で、劇症感染患者分離株および非劇症感染患者分離株を収集し、



それらに対する好中球の防御能を解析した。

その結果、劇症型分離株において高発現している分泌型溶血毒であ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判明した。さらに、この好中球ネクロシスは、劇症型 GAS と好中球の接触依存性であり、その機序として、好中球上の接着分子であるβ-インテグリンと GAS の膜表面コラーゲン様蛋白がカルシウム依存的に結合することによって、ストレプトリシン O がより効果的に好中球膜孔形成を誘導することが示唆された。

以上の成績から、GAS が劇症型感染を惹起する要因となる好中球傷害の分子機構が明らかとなり、今後の診断および治療に対する応用が期待される。

**12)CD46 発現トランスジェニックマウスを用いた GAS の病態解析:** ヒト CD46 発現トランスジェニック (hCD46Tg) マウスを用いて、GAS の感染モデルを構築した。劇症型患者の血液から分離された GAS472 株を hCD46Tg マウスの後肢足蹠部 (footpad) へ  $1 \times 10^7$  CFU 投与すると、感染部位に壊死性筋膜炎 (necrotizing fasciitis, NF) が誘発された。同時に播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC)、多臓器不全 (multi organ failure, MOF)、敗血症 (sepsis) が惹起され、投与後 7 日以内に死亡した。対照マウスにおいても同じ投与量で、下肢の壊死が誘発されたが生存した。従って、本菌の footpad への感染後に誘発される NF は、致死性には直接関与しないと考えられる。組織の損傷は皮下組織及び真皮から表皮に進行した。

一方、感染局所の真皮の肥満細胞は致死性には関与していなかった。本感染モデルは、組織壊死やショックを伴う劇症型 GAS 感染症 (streptococcal toxic shock syndrome: STSS) に非常に類似した症状を示すため、レンサ球菌による劇症型感染症の細菌学的解析と診断・治

療法の開発に有益であると結論された。

**13) マウスにおける GGS 感染症モデルの構築:** 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・治療に関する研究を行うため、起因菌である GGS, GCS (ここでは GGS とする) のうち、昨年度選定した高病原性株を用いて同菌感染症のマウスモデルの構築を行った。

同菌による感染症の疫学調査結果から、発症者には悪性新生物や糖尿病などの基礎疾患が高頻度に存在することが明らかとなっている。そこで、糖尿病マウスモデルで同菌の感受性を比較したところ、1 型糖尿病モデル、2 型糖尿病モデルとも糖尿病非発症の対照マウスと比較して、GGS 感受性が増加していることが明らかとなった。

また、主任研究者等と共同して、ゲノム情報が明らかになっていなかった GGS の全ゲノム配列を決定した。

## E. 考察・結論

日本各地から収集された市中で発生した侵襲性重症感染症由来のβ溶血性レンサ球菌と肺炎球菌について、宿主側と菌側からの解析を 2 年間継続して行ったことにより、我が国において急速に変貌しつつある侵襲性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の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、複合的に関与していることが明らかにできたと考える。

また、種々の基礎実験や構築された動物モデルは、そのことを裏付けたものと考えられる。

3 年度は、今までの成績を論文化するとともに、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、どのような治療抗菌薬と処置が必要であるのかを明確にし、「抗菌薬の適正使用ガイドライン」へ反映されるよう考えたい。

また、本研究によって確立した real-time PCR 法の臨床への応用を検証する。

最終年度においては、関連学会でシンポジウムを開催し、さらに「迅速診断から治療の提言までを網羅した冊子」を作成し、啓発活動を通じて医療行政へ寄与したいと考えている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

(各研究分担者については、それぞれの報告書に記載)

- 1) 砂川慶介:薬物療法—抗菌薬投与の基本. 小児科学 第3版(総監修 大関武彦, 近藤直美). 医学書院, 2008, p90-97.
- 2) 尾内一信, 石和田稔彦, 岩田 敏, 岡田賢司, 黒崎知道, 坂田 宏, 鈴木 宏, 砂川慶介, 堤 裕幸, 春田恒和, 満田年宏, 山崎勉:小児呼吸器感染症治療の現状把握に関する検討(第1報) 小児呼吸器感染症治療ガイドライン 2004 について. 日本小児学会雑誌, 2008, 112: p729-735.
- 3) 尾内一信, 石和田稔彦, 岩田 敏, 岡田賢司, 黒崎知道, 坂田 宏, 鈴木 宏, 砂川慶介, 堤 裕幸, 春田恒和, 満田年宏, 山崎勉:児呼吸器感染症治療の現状把握に関する検討(第2報)小児呼吸器感染症における抗菌薬使用実態. 日本小児学会雑誌, 2008, 112: p736-742.
- 4) 砂川慶介, 生方公子, 千葉菜穂子, 長谷川恵子, 野々山勝人, 岩田 敏, 秋田博伸, 佐藤吉壮: 本邦における小児細菌性髄膜炎の動向(2005~2006). 感染症学雑誌, 2008, 82: p187-197.
- 5) 佐藤吉壮, 豊永義清, 砂川慶介:アンケート調査による小児感染症への注射用抗菌薬の治療実態と今後への期待. 小児感染免疫, 2008, 20: p115-122.
- 6) Wajima, T., Murayama Y S., Sunaoshi K., Nakayama E., Sunakawa K., and Ubukata K.:Distribution of *emm* type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and noninvasive disease. Journal of Medical Microbiology, 2008. 57: p1383-1388.
- 7) 砂川慶介:起因菌別に考えること—レンサ球菌. 化学療法の領域, 2008. 24: p86-93.
- 8) Chiba N., Murayama S. Y., Morozumi M., Nakayama E., Okada T., Iwata S., Sunakawa K., and Ubukata K: Rapid detection of causative eight pathogens for diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. J Infect Chemother., (印刷中) 2009
- 9) Murayama S. Y., Seki C., Sakata H., Sunaoshi K., Nakayama E., Iwata S., Sunakawa K., Ubukata K. and the invasive Streptococcal Disease working group: Capsular type and antibiotic resistance of Streptococcus agalactiae isolates from patients with invasive infections, ranging from newborn to the elderly. Antimicrob Agents Chemother., (印刷中) 2009
- 10) Chiba N., Morozumi M., Sunaoshi K., Takahashi S., Takano M., Komori T., Sunakawa K., Ubukata K., and IPD surveillance study group: Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan. Epidemiol. and Infect., (印刷中), 2009

## 侵襲性 B 群溶血性レンサ球菌感染症の実態と PCR による迅速診断法の確立

研究分担者 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

研究分担者 坂田 宏 旭川厚生病院小児科 主任部長

研究分担者 岩田 敏 (独)国立病院機構 東京医療センター 統括診療部長

### 研究要旨

侵襲性感染症由来の *Streptococcus agalactiae* (GBS) 株に対し、PCR による荚膜型解析、抗菌薬感受性、および耐性遺伝子解析が行われた。小児では III 型が多かったのに対し、成人では Ib 型と V 型が多かった。ニューキノロン系薬高度耐性の 45 株はほとんどが Ib 型で、すべての株が *gyrA* と *parC* 遺伝子上にアミノ酸置換を有し、同一の PFGE パターンを示していた。ひとつのクローン株が全国へと拡散したことが示唆された。

これら GBS の存在を迅速に証明するため、産道感染としての GBS 感染症予防が最も必要である。そのため、迅速診断法の構築のために、周産期医療に関わる臨床医と共同で、妊娠 37-39 週の妊婦由来の検査材料を用いて GBS そのものと病原性に関わる荚膜型を 2 時間で明らかにできる real-time PCR 法を新規に構築した。

### 研究協力者

- ・村山琮明(北里大学大学講師)
- ・関 千鶴子(北里大学大学院 修士 2 年)
- ・砂押克彦(北里大学大学院博士課程 2 年)
- ・中山栄一(がん感染症都立駒込病院小児科)
- ・三橋直樹(順天堂大学医学部静岡病院周産期医療センター教授)
- ・島貫洋太(順天堂大学医学部静岡病院周産期医療センター)
- ・高橋 孝(東京都老人医療センター呼吸器内科)

### A. 研究目的

*Streptococcus agalactiae* (GBS) は乳幼児における髄膜炎、敗血症、そして成人の敗血

症等の重症感染症を惹起する主要な病原菌である。

乳幼児 GBS 感染症は、生直後の 6 日以内の early-onset と、7 日から 3 ヶ月の間に生ずる late-onset に分けられ、それ以上の年齢での発症は極めて稀である。

1996 年、米国では産婦人科学会、CDC、および小児科学会の三者によって周産期 GBS 感染症予防に関する提言がなされ、予防対策が行われてきた。その結果、early-onset は実質的に減少したとされる。

2002 年には、出生前の細菌培養を元に、ガイドラインが改定されている。

日本においても産婦人科学会によって同様のガイドラインが公表されているが、その

基礎となるデータは乏しい。

最近、7年間にわたる全米規模の侵襲性 GBS 感染症の疫学データが発表されたが、early-onset の GBS 感染症は減少しているが、65歳以上の成人の GBS 感染症が増加していると述べられていることが注目される。

このような背景から、GBS 感染を短時間で診断できる real-time PCR 法を構築することが必要と考えた。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、個人が特定されるような情報は原則として含まないが、取り扱う情報の中に個人が特定されるような情報が含まれていたとしても、それを研究の結果として含むようなことはない。

従って、研究成果の公表にあたっては、個人情報が含まれることはない。万が一個人情報が含まれていた場合には、それに関する機密保護に万全を期するものである。

## B. 研究方法

### 1) 対象

主な対象は、順天堂大学周産期医療センターを受診する妊娠 37-39 週の妊婦に対し、通常行われている出産前 GBS 検査とともに、real-time PCR 法による細菌検索を行い、さらに菌陽性の場合には病原性に関わる莢膜型をも PCR によって検索できる新たな方法を開発した。対象症例は 273 例であり、その他に、新生児化膿性髄膜炎疑いの髄液や高齢者由来の血液検査材料なども対象とした。

### 2) 莢膜型同定の real-time PCR 法

GBS を検索するための本菌に特徴的な *dlts* 遺伝子検索用 primer と、莢膜型の Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 型をそれぞれ同定できる 9 セットの primer を用い、real-

time PCR によって GBS を確定した。

検査材料(臍拭い液、髄液、血液、喀痰など)に対する real-time PCR 法の概略は図 1 に示す。プロスに混釈した材料からトナーの DNA 抽出キットを用いて 15 分で DNA サンプルを得る。それらをあらかじめ分注して -20°C にストックしておいた PCR 用試薬(50µl)へ 2µl 加え、PCR を実行した。

検体処理から結果判明までの所用時間は 2 時間である。

なお、GBS の検索感度を上げるために、サンプルはあらかじめ 1 unit の mutanolysin を加えて 60°C で 10-20 分処理した。

型別に際しては、tube A に Ia と Ib, tube B に II と III, tube C に IV と *dlts*, tube D に V と VII, そして tube E に VI と VIII 検索用 primer を加えた。

PCR 反応液(50µl)の組成は、i) 20 pM の各 primer, ii) 0.625Unit の Ampli Taq Gold polymerase (Applied Biosystems), iii) 10×PCR Gold buffer, iv) 25 mM MgCl<sub>2</sub>, v) dNTP mixture, vi) DW, である。

DNA の増幅反応は、95°C:10 秒, 50°C:30 秒, 72°C:30 秒の条件で 45 cycle 実行した。

### 3) 薬剤耐性遺伝子検索用 PCR 法

マクロライド(ML)薬剤耐性遺伝子は、3 種類の primer セットを用いて検索した。すなわち、i) 誘導型 ML 耐性(iMLSb)をコードする *erm(A)* 遺伝子, ii) 構成型の ML 耐性(cMLSb)をコードする *erm(B)* 遺伝子, および iii) 14 員環と 15 員環 ML の中等度の耐性化(M type)に関わる *mef(A)* 遺伝子である。

フルオロキノロン(FQ)耐性は、*gyrA*, *gyrB*, *parC*, および *parE* 遺伝子について検索した。反応液(50 µl)の組成は、i) 20pM の各 primer, ii) 0.625Unit の TaKaRa Ex Taq polymerase, iii) 10×Ex Taq buffer, iv) dNTP mixture, v)

DNase- RNase-free DW である。増幅精製後の DNA サンプルは、BigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて塩基配列解析を行った。細胞壁合成酵素 PBP2X をコードする *pbp2x* 遺伝子の塩基配列の決定は、国立感染症研究所の木村らが報告した primer を用いた。

PFGE による疫学解析は、FQ 耐性の変異を有することが確認された GBS 45 株について実施した。

## C. 研究成果

### 1) 侵襲性感染症例の年齢と疾患、菌の莢膜型との関係

図-2と図-3にはGBS感染症の疾患と年齢との関係、疾患と莢膜型について、17歳以下の小児(n=65)と18歳以上の成人(n=124)とに分けて示す。疾患は、髄膜炎、敗血症、その他の感染症の3つのグループに分けた。小児ではearly-onsetの新生児が10.8%、late-onsetの児が70.8%の割合であった。GBSの莢膜型はIII型が67.7%と圧倒的に多く、その他の型が少数認められた。

成人では、50歳以上が83.1%を占め、莢膜型はIb型が31.5%と最も多く、次いでV型(18.5%)、II型(12.1%)、III型(12.1%)の順であった。敗血症(75%)に加え、蜂窩織炎、化膿性関節炎、壊死性筋膜炎、化膿性髄膜炎、そして亜急性心内膜炎のような様々な重症疾患が認められた。

成人例の88.7%は、糖尿病、肝機能低下、免疫機能低下等の基礎疾患を有していたことが注目された。また、死亡例と後遺症を残した予後不良例は、小児ではそれぞれ各1例ずつ、成人では死亡8例(6.4%)、後遺症残存が2例(1.6%)認められた。

### 2) 莢膜型と薬剤耐性との関係

表1には、ML耐性とFQ耐性、および莢膜型との関係について、小児と成人に分けて示す。ML耐性23株(12.2%)のうち、*erm(A)*遺伝子保持株は3株、*erm(B)*遺伝子保持株は20株であった。M typeは認められなかった。小児と成人から検出されたML耐性株はいずれもIII型が多かったが、その他いくつかの莢膜型にもML耐性株が少数認められた。

LVXに高度耐性を示した45株(23.8%)は、*gyrA*遺伝子上のSer<sub>81</sub>からLeuへと*parC*遺伝子上のSer<sub>79</sub>からPheへのアミノ酸置換の両方を有していた。これらの株の莢膜型は、Ib型が圧倒的に多かったが、その他の型(II, III, VI)も少数認められた。

図4には、FQ耐性45株のPFGEパターンを示す。これらの株はIb型が40株、その他の型が5株であった。Ib型のすべての株は極めて近似のDNA切断パターンを示し、II型やIII型株のそれとは明らかに異なっていた。

### 3) GBSに対するreal-time PCR法の構築

GBSに対するreal-time PCR法の精度と感度を高めるには、検査材料からいかに効率よくDNAサンプルを抽出できるかに依存する。GBSは特異的なmutanolysinと呼ばれる酵素を使用すると、溶菌が容易になることから、サンプルにmutanolysinを1ユニットを加え、60℃で10-15分処理したところ、図5に示すように感度が10倍高まることが明らかにされた。つまり、サンプルあたり10個の菌に相当するDNAが存在すれば、陽性と判定される感度となっており、培養よりも10倍感度が優れている計算となった。

以後、当該酵素を用いて処理した後、DNAを抽出してPCRを行なうこととしたが、検査材料の処理から結果を得るまでの所要時

間は約2時間である。

図6にはGBSの菌量とreal-time PCRで陽性反応を示すサイクル数との関係を示したが、相関係数 $\gamma=0.990$ と高い成績を示した。

#### 4) 臨床検査材料に対するreal-time PCR法の有用性

3)項に示した迅速検索法を用い、妊娠37-39週の妊婦に対して検査を行った成績を図8に示す。合計273例の検査材料が解析されたが、そのうちPCR陽性例は19.5%、培養陽性例は半数の9.2%であった。すなわち、PCRを施行することにより、培養での見落としが少なくなることが明らかにされた。

分離されたGBSの莢膜型の成績は図9に示す。新生児感染症例で重要な型のIa、Ib、そしてIIIは合計56%であった。

つまり、GBS陽性という判断だけでなく、菌の型まで明らかにすることにより、出産時のリスクを明確にできると判断された。

その他に、生直後にGBS化膿性髄膜炎が疑われた児の髄液検査および血液培養についてもPCR法を実施したが、菌の存在を証明することができた。

#### D. 考察と結論

我が国においては、基礎疾患を有する高齢者人口の割合が急速に高まってきている。その結果、GBSのみならず、*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* や *S. pneumoniae* などの侵襲性重症感染症が次第に増え、深刻な問題を提起し始めている。

新生児の敗血症や髄膜炎由来株の莢膜型はIII型が最も多く、従来の成績と同様であった。しかし、50歳以上の成人例においては、Ib型が最も多く、次いでV型であった。これらの結果は、米国の疫学データとは明

らかに異なるが、その理由は今のところ明らかにできていない。

ML耐性の割合は小児で13.8%、成人では11.3%と、諸外国と比較して必ずしも高い割合ではなかった。しかし、セフェム系抗菌薬の主たる作用標的であるPBP2Xをコードする*pbp2x* 遺伝子上の変異により、ペニシリンGの感受性が低下したGBSの出現が非常に注目されている。

私達の収集菌株の中にも、*pbp2x* 遺伝子上に変異を有し、さらにMLとFQに多剤耐性でIII型であった株を1株認めている。FQ耐性株は既に報告されているが、その割合は極めて少なかった。しかし、私達の結果では、FQ単独耐性株は23.8%を占め、その大部分はIb型株であった。しかもFQ薬が使われていない新生児由来のFQ耐性GBSが成人由来のIb型菌と近似のPFGEパターンを示していた。このことは、ひとつのクローン株が急速に日本各地へと拡散したことを示唆している。

日本においては、小児に対する第一選択薬として経口セフェム系薬が多く処方されているが、成人に対しては経口FQやML、そしてセフェム系薬が多く処方されている。しかし、日本では1回あたりの抗菌薬投与量が他国に較べて全般的に少ない。これらの実態が、GBSを含む多くの原因菌に対するmutant selection windowsを大きくし、結果として耐性菌増加の引き金になっているかも知れない。

耐性菌出現のコントロールのためには、原因菌の分子疫学解析を持続的に行うことと、臨床医に対する啓蒙活動が必要である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ubukata, K.: Simultaneous and rapid detection of causative pathogens in community-

acquired pneumonia by real-time PCR. Japan Medical Association Journal, 51: 46-50, 2008

2) Hamano-Hasegawa K., Morozumi M., Nakayama E., Chiba N., Murayama S. Y., Takayanagi R., Iwata S., Sunakawa K., **Ubukata K.**, and ARD study group: Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia.

J Infect Chemother., 14: p424-432, 2008

3) Wajima T., Murayama S. Y., Sunaoshi K., Nakayama E., Sunakawa K., and **Ubukata K.**: Distribution of *emm* type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and noninvasive diseases.

J Med Microbiol., 57: 1383-1388, 2008

4) Billal DS, Hotomi M., Shimda J., Fujihara K., **Ubukata K.**, Yamanaka N.: Prevalence of Streptococcal invasive locus (*sil*) and its relationship with macrolide resistance among Group A *Streptococcus*.

J Clin Microbiol., 46: 1563-1564, 2008

5) Chiba N., Murayama S. Y., Morozumi M., Nakayama E., Okada T., Iwata S., Sunakawa K., and **Ubukata K.**: Rapid detection of causative eight pathogens for diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR.

J Infect Chemother., (印刷中) 2009

6) Murayama S. Y., Seki C., Sakata H., Sunaoshi K., Nakayama E., Iwata S., Sunakawa K., **Ubukata K.** and the invasive Streptococcal Disease working group: Capsular type and antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolates from patients with invasive infections, ranging from newborn to the elderly.

Antimicrob Agents Chemother., (印刷中) 2009

7) Chiba N., Morozumi M., Sunaoshi K.,

Takahashi S., Takano M., Komori T., Sunakawa K., **Ubukata K.**, and IPD surveillance study group: Serotype and antibiotic resistance of isolates from patients with invasive pneumococcal disease in Japan.

Epidemiol. and Infect., (印刷中), 2009

## 2. 学会発表

1) 岡田隆文, 朝貝省史, 松島崇浩, 松原啓太, 込山修, 岩田敏, 千葉 菜穂子, 長谷川 恵子, 諸角 美由紀, **生方 公子**, 砂川 慶介: 小児気管支喘息発作と呼吸器感染症およびその病原微生物の関連性についての検討. 第 82 回日本感染症学会総会, 2008.04.18

2) 坂田宏, 輪島丈明, **生方 公子**: 反復性の A 群溶連菌感染症の小児から検出された A 群溶連菌の性状. 第 82 回日本感染症学会総会, 2008.04.18

3) 関千鶴子, 輪島丈明, 村山 琮明, **生方 公子**: 侵襲性感染症由来 B 群溶血性レンサ球菌の分子疫学. 日本化学療法学会総会, 2008.06.06

4) 輪島 丈明, 砂押 克彦, 関 千鶴子, 村山 琮明, **生方 公子**, 砂川 慶介: 侵襲性感染症由来 *Streptococcus pyogenes* の分子疫学解析. 日本化学療法学会, 2008.06.06

5) 吉野 美保, 村山 琮明, 黒木 春郎, 酒井 律子, 板橋 孝壽, **生方 公子**: 臨床分離の非溶血性 A 群レンサ球菌にみいだされたストレプトリジン S 遺伝子領域の大きな欠失について.

レンサ球菌研究会, 2008.06.21

6) 関 千鶴子, 村山 琮明, 坂田 宏, 岩田敏, **生方 公子**: 侵襲性感染症由来 B 群溶血性レンサ球菌の PCR 法による莢膜型別 - 小児と成人由来株での違い -. レンサ球菌研究会, 2008.06.21

7) Miyoshi-Akiyama, T., Y. Shimomura, S.

Murayama, **K. Ubukata**, J. Yagi, T. Kirikae. Whole genome analysis of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS-124. American Society for Microbiology, 108th General Meeting 2008.06.01-05, Boston MA, USA

8) N. Chiba, M. Morozumi, T. Komori, S. Takahashi, M. Takano, K. unakawa, **K. Ubukata**. : Serotype Distribution and Antimicrobial Resistance in Invasive Pneumococcal Disease (IPD) in Japan.

48<sup>th</sup> ICAAC/IDSA, Washington DC, 2008.10.25

9) E. Nakayama, C. Seki, K. Sunaoshi, S. Y. Murayama, H. Sakata, S. Iwata, K. Sunakawa, **K. Ubukata**.: Capsule-Type Distribution and Antimicrobial Resistance of *Streptococcus agalactiae* (GBS) Isolated from Patients with Invasive Infection.

48<sup>th</sup> ICAAC/IDSA, Washington DC,

2008.10.27

10) M. Yoshino, S. Y. Murayama, T. Wajima, K. Itahashi, E. Nakayama, **K. Ubukata**. : Nonhemolytic Group A Streptococci (GAS) in Clinical Isolates that Lack Large DNA Regions Encoding Streptolysin S (SLS).

48<sup>th</sup> ICAAC/IDSA, Washington DC, 2008.10.25

11) 砂押克彦, 関 千鶴子, 村山 琮明, 砂川 慶介, 生方 公子: 侵襲性感染症由来 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の分子疫学, *emm* 型別と患者背景因子の解析. 日本感染症学会東日本地方会.

2008.10.24

## 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. GBS検索のためのReal-time PCR法: プロトコール

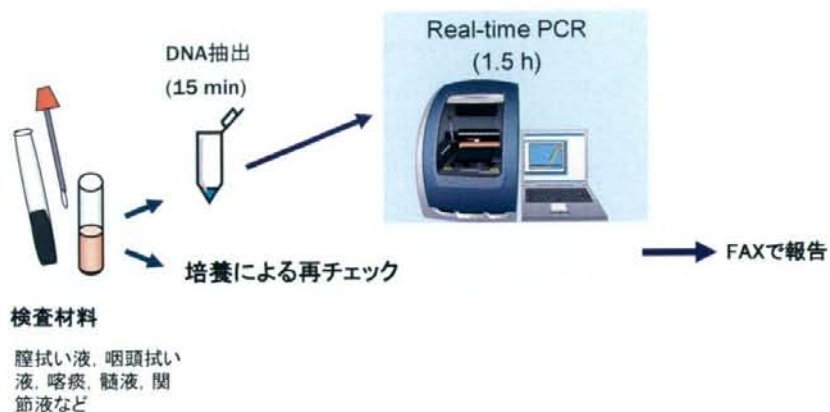


図 2. GBS症例の年齢分布と疾患名

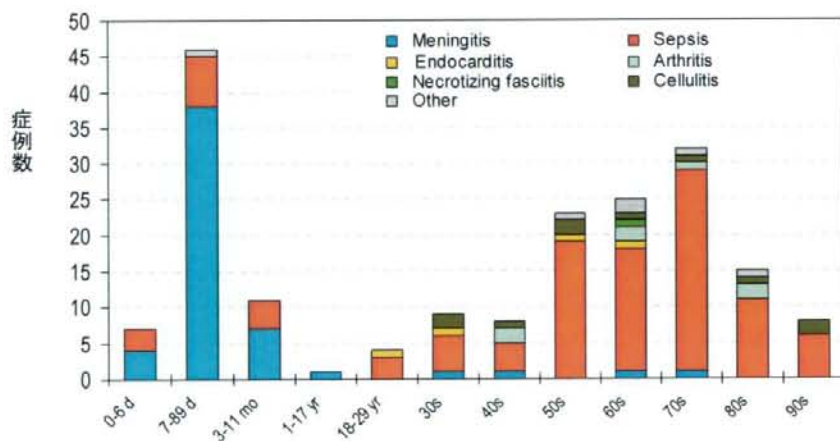


図 3. 小児と成人由来のGBSの荚膜型の違い

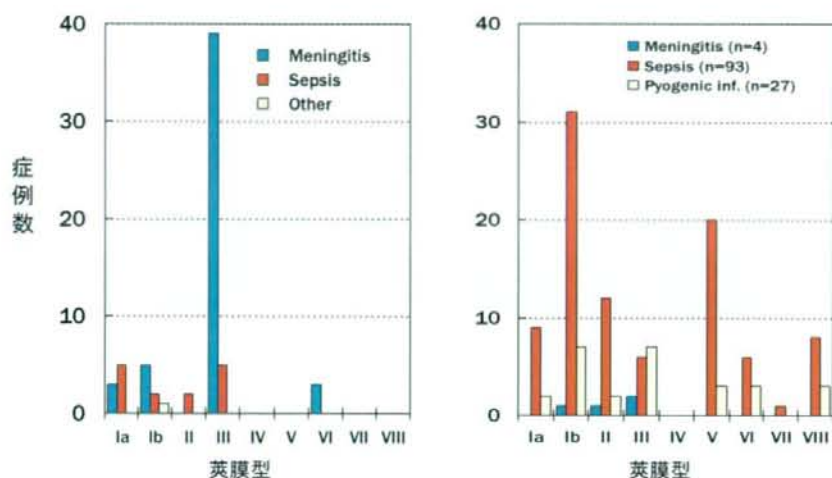


表 1. GBS株の荚膜型と薬剤耐性との関係

Resistance pattern	Serotype									Total
	Ia	Ib	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
<b>Children</b>										
QNL <sup>†</sup>		6								6 (9.2)
ML <sup>†</sup> [erm (A)]				2						2 (3.1)
ML <sup>†</sup> [erm (B)]	1			6			3			7 (10.8)
Susceptible	7	2	2	36						50 (76.9)
Subtotal	8	8	2	44	0	0	3	0	0	65
<b>Adults</b>										
QNL <sup>†</sup>		32	1	1			1			35 (28.2)
QNL <sup>†</sup> and ML <sup>†</sup> [erm (A)]				1						1 (0.8)
QNL <sup>†</sup> and ML <sup>†</sup> [erm (B)]		2		1 <sup>††</sup>						3 (2.4)
ML <sup>†</sup> [erm (B)]			1	4		4		1		10 (8.1)
Susceptible	11	5	13	8		19	8	0	11	75 (60.4)
Subtotal	11	39	15	15	0	23	9	1	11	124

<sup>††</sup> This strain showed three amino acid substitutions in PBP2X.  
 MICs of ampicillin and cefotiam for the strain were 0.25 µg/ml and 2.0 µg/ml, respectively.

図 4. ニューキノロン系薬耐性 GBS の PFGE パターン



図 5. Real-time PCR によるGBS検出の感度

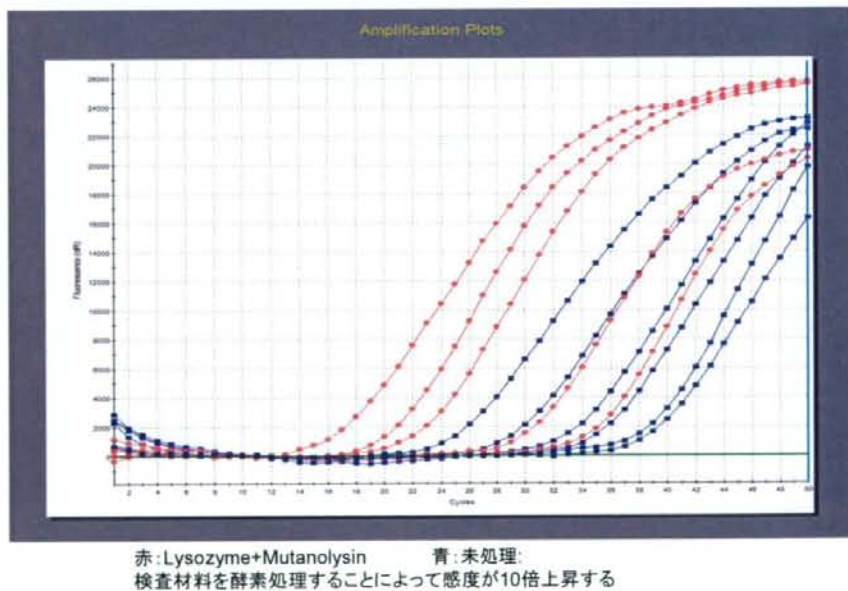


図 6. GBSに対する Real-time PCRのCt値と菌量との関係

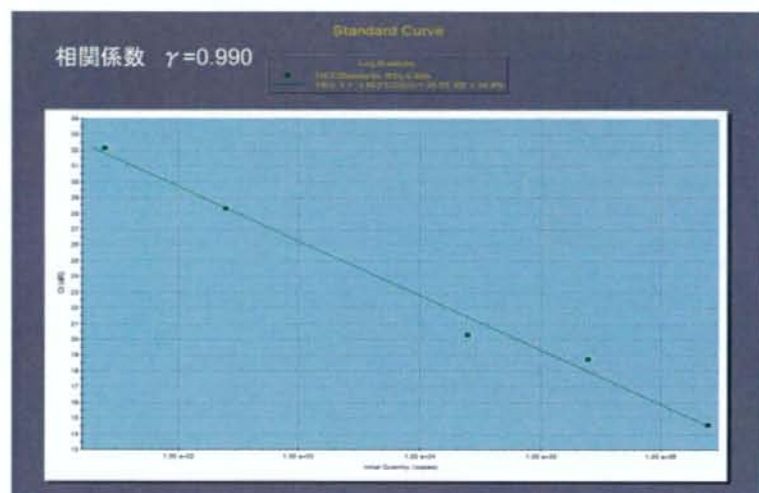


図 7. 検査材料でのreal-time PCR陽性例

Amplification Plots

GBS 0223.mxp

RE535 lb

