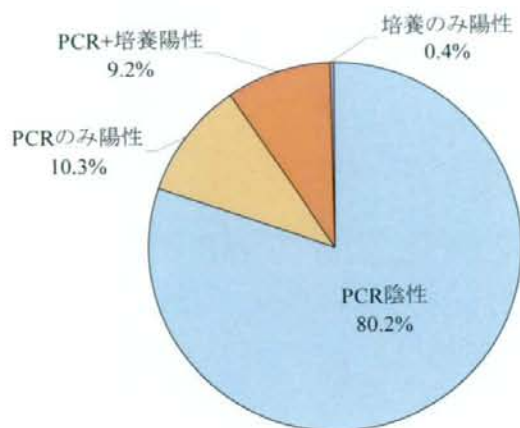
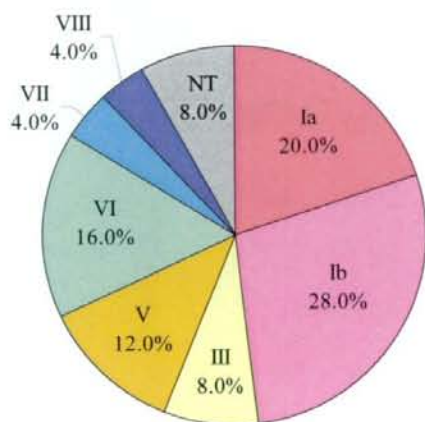


図 8. 妊娠37-39週の妊婦におけるGBS陽性率 (n=273)



	例数
PCR陰性	219
PCRのみ陽性	28
PCR+培養陽性	25
培養のみ陽性	1

図 9. 分離されたGBSの荚膜型 (n=25)



荚膜型	例数
I a	5
I b	7
III	2
V	3
VI	4
VII	1
VIII	1
NT	2

} 56%

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

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

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

研究要旨

2006年から2008年にかけて、全国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荚膜型の株が多く、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、成人では新たな荚膜型の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荚膜型を有する菌株がヒトを介して急速に全国へと拡散し、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が示唆された。このような感染症を減らすためには、それらのヒトに対するワクチン接種と、医療関係者への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 准教授
- ・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

研究年度1年目においては、日本臨床微生物学会の会員である細菌検査部の方々の協力

を得て、市中で発症した侵襲性肺炎球菌感染症由来の肺炎球菌を全国規模で収集し、その患者背景因子などを解析した。

研究年度2年目(H20)の本年においては、それらとさらに全国から収集された菌株を加え、それらがどのように全国へ拡散していったのかをPFGEを含めて解析することを主な目的とした。

B. 研究方法

1) 収集菌株:

2006年から2008年3月までに収集された肺炎球菌とした。全国の約200医療機関から、市中で発生した侵襲性肺炎球菌感染症由来株として送付を受けた *Streptococcus pneumoniae*(肺炎レンサ球菌)は684株であった。

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、鼓膜切開液などから分離された菌株である。

2) 解析項目:

- i) 病原性に関わる荚膜型の解析
- ii) PCR による薬剤耐性遺伝子の解析
- iii) パルスフィールドゲル電気泳動による DNA パターンの解析

(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。

C. 研究成果

1) 症例の入院時背景

Table 1 には収集菌株を小児と成人とにわけ、基礎疾患の有無と予後、すなわち死亡、後遺症の有無について集計した成績を示す。

小児では 20 例(14.5%)が基礎疾患を有しており、ほとんどは先天性疾患を有していた。小児の転帰は死亡 2 例(1.4%)と神経学的後遺症 4 例(2.9%)であった。

成人では 135 例(69.2%)が基礎疾患を有していた。主な基礎疾患は、腫瘍術後(n=38)、糖尿病(n=30)、心疾患(n=18)、肝疾患(n=16)、腎疾患(n=9)、免疫不全(n=3)、脾臓摘出(n=2)などであった。死亡例は多数みられた(43 例, 22.1%)が、そのうち 37 例(86.0%)は基礎疾患を有していた。成人死亡例における入院日数は平均 2 日と短かった。基礎疾患 13 例を含む 17 例が重度の神経学的後遺症を残した。基礎疾患を有した症例(基礎疾患(+))と基礎疾患無しの症例

(基礎疾患(-))における転帰を小児と成人とに分けて比較したが、死亡率と後遺症の割合は小児と成人共に基礎疾患を有した症例において統計学的に有意に高かった(Fisher's test: 小児; p=0.0395, 成人; p=0.0043)。

2) 入院時血液検査値と予後との関係

Table 2 には、成人例を死亡群と救命群とに分け、入院時の WBC, CRP, PLT 値を比較した成績を示す。解析は nonparametric Kruskal-Wallis test を用いている。死亡群と救命群における WBC の中央値は、それぞれ 5.1×10^9 cells/L と 13.2×10^9 cells/L であった。WBC が $< 5.0 \times 10^9$ cells/L とそれ以上の例における Odds 比は 7.64 と算出され、WBC が低値例では予後が 7 倍以上悪いことが示された。PLT 値においても、 $< 13.0 \times 10^9$ cells/L とそれ以上の例における死亡率は、Odds 比は 4.15 の差が認められた。しかし、死亡群と救命群の CRP における有意な差は認められなかった。

また、死亡群と救命群間において、菌の耐性型、あるいは荚膜型がそれらにどの程度影響しているのかを調べたが、有意な差は認められなかった(p=0.1200, p=0.9891)。

3) 分離菌の荚膜型

肺炎球菌の荚膜型は、現在 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-1 には小児由来株の分離頻度の高い荚膜型と、7 価コンジュゲートワクチン(PCV7)との関係を示す。6B 型が最も多く、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が gPRSP や gPISP であった。

欧米で既に実施されている PCV7 のカバー率は約 75.4%であった。将来導入の可能性がある PCV13 のそれは 93.7%であった。

他方、成人由来株の荚膜型に関する成績は図-2 示すが、小児由来株とは統計学的に著しく

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 型などさまざまな荚膜型の肺炎球菌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。

4) PFGE パターンからみた菌の拡散状況

図-3 には、菌株数の最も多かった荚膜型 12F 株についての PFGE パターンを示す。その内訳は *gPSSP*: 5 株, *gPISP(pbp2x+2b)*: 2 株, *gPRSP*: 1 株, *gPISP(pbp2b)*: 38 株の中から無作為に選んだ 19 株である。これらの株は日本各地で分離されたものである。これらの株の染色体 DNA は, *Apal* 制限酵素で消化しているが、同一の耐性遺伝子型の株の DNA 切断パターンは高い近似性を示していることが注目された。

図-4 には、次に多かったムコイドコロニーを形成する荚膜 3 型株の PFGE パターンを示す。これらはすべて *gPISP(pbp2x, erm(B))* 保持のマクロライド系薬耐性株)であるが、完全に DNA パターンは同一であることが示された。

ここには示していないが、肺炎を惹起する頻度が高いことで知られる荚膜 14 型においても *gPISP(pbp1a+2x, erm(B))* 保持の DNA パターンはほぼ同じであった。ごくわずかな *gPRSP* 株は明らかに異なった DNA パターンを示した。

D. 考察と結論

抗菌薬が比較的潤沢に使える環境の我が国においては、国民皆保険制度のお陰で、欧米にみられる急激な転帰をとる市中型劇症感染症はほとんど経験されなくなっていた。

しかし、世界でも類をみないスピードで高齢化社会が到来し、さらには成熟化した社会環境と相俟って、若年層にも急速に生活習慣病が

広がっている状況、重ねて菌の耐性化が新興したことにより、市中型感染症が急速に変貌している。

その典型がここに述べた成人の肺炎球菌性侵襲性感染症である。10 年前には小児のみで問題視され、成人ではほとんど問題とならなるとされていたが、2005 年以降、むしろ成人例が多く、しかも予後が極めて不良であることが明らかにされた。

しかも、PFGE の成績にみられるように、起源を同じくする菌が急速に全国へ拡散したことが示されている。しかも、10 年前には確認できていない荚膜型であること、罹患した成人は予後が極めて悪いことは該当株に対する抗体を有していない可能性が高いことが示唆された。恐らく、ヒトの移動とともに新たな菌が国外から国内へ持ち込まれ、急速にヒトからヒトへと伝播・拡散したのであろうと推測される。

我が国のこのような成人感染症の実情をみると、特に基礎疾患を有するヒトにおいては、ワクチン接種が必要であり、感染防止対策の上で国民や医療関係者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) **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 法による荚膜型別 — 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.

48th 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.

48th 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).

48th 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

Table 1. Outcome based on presence or absence of underlying disease^a

Outcome	Children			Adults		
	Underlying disease		Subtotal	Underlying disease		Subtotal
	(+)	(-)		(+)	(-)	
Fatality	2	0	2 (1.4)	37	6	43 (22.1)
Sequela (+)	1	3	4 (2.9)	13	4	17 (8.7)
Sequela (-)	17	115	132 (95.7)	85	50	135 (69.2)
Total	20	118	138 (100.0)	135	60	195 (100.0)

^a Patients with unknown status concerning underlying disease and outcome were excluded from analysis.

Table 2. Clinical laboratory findings associated with fatal outcome in adults with invasive pneumococcal disease

median or % (25/75 percentiles) and (no./total)	Non-survivors (n=43)	Survivors (n=147)	Univariate analysis OR ^a	P value
WBC (10^9 cells/L) ^b	5.1 (2.3 - 8.8) (37/43)	13.2 (8.2 - 19.1) (136/147)		
< 5.0×10^9 cells/L	48.6% (18/37)	11.0% (15/136)	7.64 (3.30 - 17.68)	<i>P</i> < 0.0001
C-reactive protein (mg/dL)	24.8 (16.3 - 31.7) (36/43)	20.6 (8.9 - 33.6) (131/147)		
≥ 15 mg/dL	77.8% (28/36)	65.6% (86/131)	1.83 (0.77 - 4.35)	<i>P</i> = 0.1661
PLT (10^9 cells/L) ^b	119 (69 - 171) (36/43)	197 (130 - 262) (134/147)		
< 130×10^9 /L	55.6% (20/36)	23.1% (31/134)	4.15 (1.92 - 8.97)	<i>P</i> = 0.0002

^a Data are odds ratio values (95% confidence interval).

^b WBC, white blood cell count; PLT, platelet count.

FIG. 1. 小児侵襲性感染症由来肺炎球菌の荚膜型と耐性型との関係

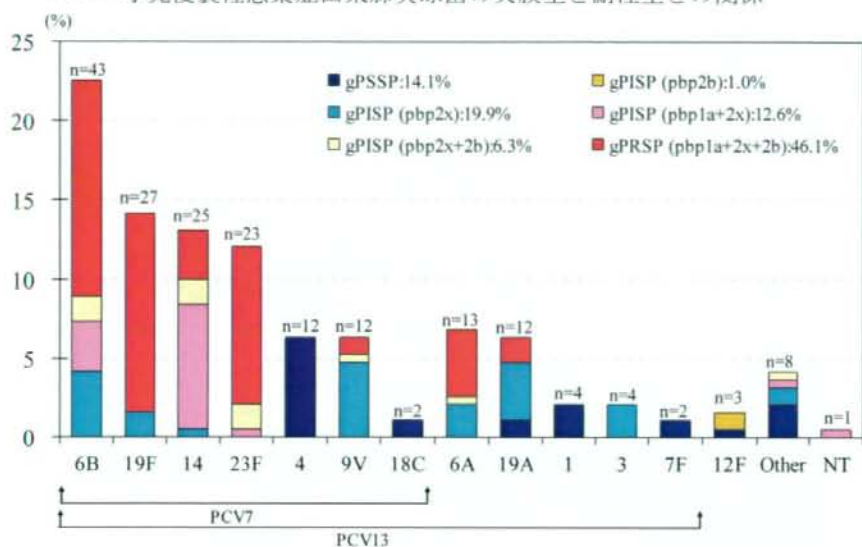


FIG. 2. 成人侵襲性感染症由来肺炎球菌の荚膜型と耐性型との関係

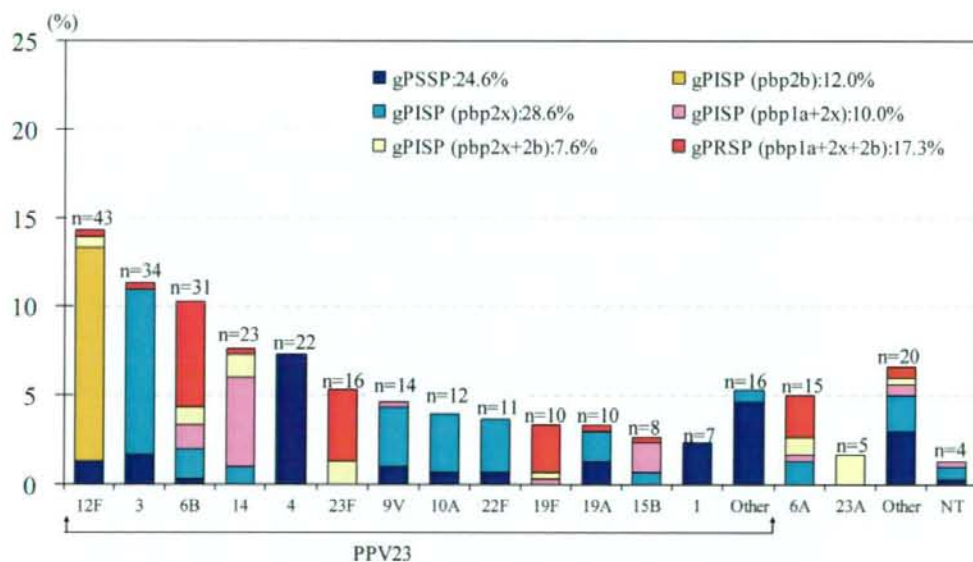


FIG.3. 莢膜 12F 型肺炎球菌の PFGE パターン

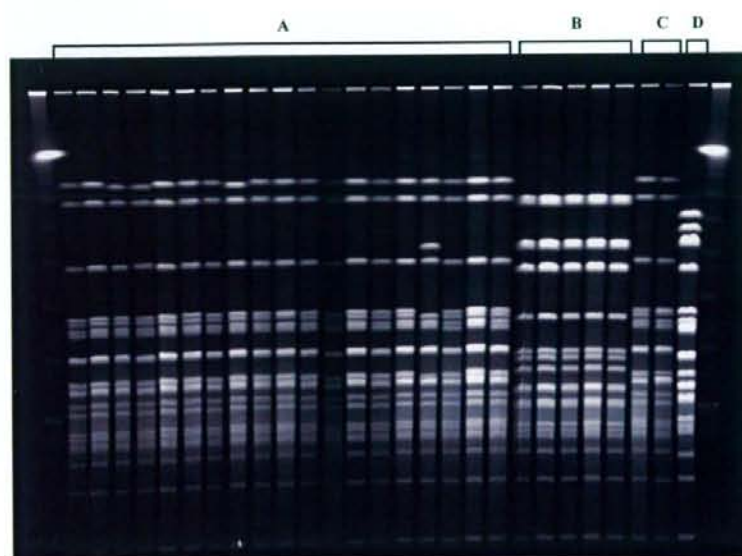
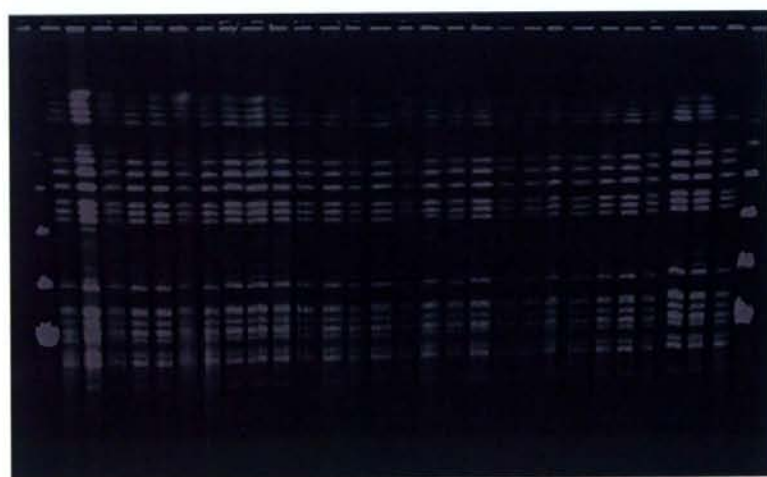


FIG.4. 莢膜 3 型肺炎球菌(*pbp2x* 変異株)の PFGE パターン



劇症型感染症由来 G 群レンサ球菌のゲノム解析

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 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

研究協力者 村山 琮明 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 講師

研究協力者 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 教授

研究要旨

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、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 GAS と 60-63%の相同性を有していた。B 群レンサ球菌や肺炎球菌、ブタレンサ球菌とは 9-29%と低い相同性であった。また、GAS で病原性発揮に関わるとされている多くの遺伝子が GGS にも認められた。この事実は、GGS は GAS と同レベルの病原性を発揮することを意味し、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。GGS 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と結論された。

研究協力者

- ・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)
- ・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 dysgalactiae subsp. *equisimilis* (GGS)は、壮年期以降から高齢者に対し、特に様々な基礎疾患を有しているヒトにおいて、重篤な侵襲性感染症を引き起こしている菌種であり、症例数が急速に増加している。

本菌は1996年に新たな菌名として報告されたものであるが、従来は GGS あるいは C 群レンサ球菌(GCS)として、病原性に乏しい菌として報告されていたものである。

私どもは、研究年度1年目において、あきらかな全身感染症症状を呈した症例の無菌性検査材料、すなわち血液、髄液、組織等から分離された本菌を全国規模で収集し、溶血性レンサ球菌の中では最も症例数が多いことを明らかにした。

本年度(2年目)においては、この菌の病原性因子の解析を行うため、劇症型由来の GGS について、全ゲノム解析を行い、その

病原性遺伝子が A 群レンサ球菌(GAS)や B 群レンサ球菌,あるいは肺炎球菌などどの程度共通であるのかを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象菌株

ゲノム解析した GGS 株は劇症型侵襲性感染症を呈し,短時間で死亡された方の血液より分離された RE378 株(*emm* 型: stG6792)である。

ゲノム解析後のアノテーション, 遺伝子解析は当研究室にて行った。

C. 研究成果

1) ゲノム解析マップ

全ゲノムが解析されたゲノムマップは, 図-1 に示す。全体のゲノムサイズは 2,151,145 bp であった。

この GGS ゲノムと既に解析されている GAS, GBS, 肺炎レンサ球菌(肺炎球菌), *S. suis* (ブタレンサ球菌), *S. sanguis*, 動物に感染症を起こす *S. equi* subsp. *zooepidemicus* などとの相同性を比較した成績を表-1 に示す。

表からも明らかなように, GAS と GGS は他の菌種に比べ飛びぬけて高い 61-63% のホモロジーを示していた。

次の *S. equi* subsp. *Zooepidemicus* でも 29% であった。GBS は 15%, 肺炎球菌とブタレンサ球菌は 9% 程度と低かった。

2) 病原遺伝子を含む遺伝子の相同性

図-2 には, 解析された GGS(RE378)株と, ゲノム解析されてその成績が公表されている GAS, GBS, そして肺炎球菌との遺伝子の相同性について比較した成績である。

その他に, 秋山らが解析中の GGS #124 株 (*emm* 型: stG485)と比較した。

赤は 90%以上の相同性を示す遺伝子, ピンクが 45%以上, グリーンからブルーがそれ以下の相同性を示している。

先のゲノム相同性の高さから推定されるように, GGS と GAS とは相同性の高い遺伝子を多数保持していることが明らかにされた。GBS や肺炎球菌では 90%以上の相同性を示す遺伝子は少なかった。

同じ GGS 同士の遺伝子を見ると, ゲノム全体の 90%は同一であろうと推定されたが, 4ヶ所ほど空白部分が存在するのはファージの DNA 配列と推定されている。

表-2 には GGSRE378 株が保有する GAS と共通する病原性遺伝子の一覧を示す。

菌がヒトの免疫機構を回避し, 上皮細胞へ接着するのを助ける遺伝子, すなわち M タンパクを高度する *emm* 遺伝子, C5a ペプチダーゼをコードする *scpA* 遺伝子, ストレプトキナーゼをコードする *ska* 遺伝子などが共通していた。

毒素では溶血性に関わるストレプトリジン O と S, ヘモリジンが共通していた。

菌が産生する種々の物質を制御する主要な遺伝子, *mga*, *covR*, *covS*, *rofA* も共通していることが明らかにされた。

D. 考察と結論

GGS の正式名は *S. dysgalactiae* subsp. *Equisimilis* であるが, 従来病原性が低いとされ, 臨床においてはほとんど注目されてこなかった細菌である。

しかし前述したように, 2000 年以降本菌による明らかな侵襲性感染症が増加していることが疫学解析から示唆された。

GAS 感染症に比べると, GGS 感染症例の年齢はやや高いが, 死亡例の平均在院日数は 4 日とほとんどが急速な転帰をとっており, 両者の病原性はほぼ同一であること

が強く示唆された。

世界的にゲノム解析されたレンサ球菌を調べると、本菌のみが明らかにされていなかったことから、私達はこの菌種のゲノム解析を行うことにしたものである。

結果の項に示したように、GGS は GAS と極めて高い相同性を有していることが明らかにされた。特にレンサ球菌が病原性を発揮する上で重要とされる遺伝子の多くが共通していると示唆されることが注目された。

研究最終年度においては、これらの成績を論文化すると同時に、いくつかの企画されているシンポジウムにおいて、啓蒙活動を行っていく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) 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

2) 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

2. 学会発表

1) 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

2) 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, USA

3) 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

4) 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

5) 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. 48th ICAAC/IDSA, Washington DC, 2008.10.27

6) 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).

48th ICAAC/IDSA, Washington DC, 2008.10.25

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

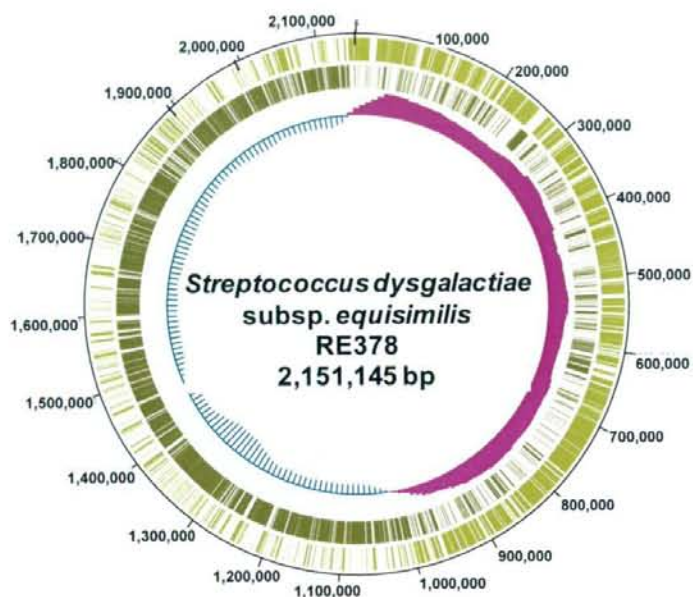


図-1. GGS RE378 株 (劇症型感染症由来) のゲノム地図

外側から, circle 1, ゲノムサイズ (bp); circle 2, 推定 CDSs (右回り); circle 3, 推定 CDSs (左回り); circle 4, GC skew を表す。

表-1. GGS (RE378 株) ゲノムと, 類縁レンサ球菌種ゲノムとの相同性

Species	Coverage (%)
<i>S. pyogenes</i> (GAS)	61- 63
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	29
<i>S. agalactiae</i> (GBS)	15
<i>S. thermophilus</i>	10
<i>S. pneumoniae</i> (肺炎レンサ球菌)	9
<i>S. suis</i> (ブタレンサ球菌)	9
<i>S. sanguis</i>	6

Coverage (%) は, 全長中でカットオフ以上のホモロジーがある部分の割合を示す。

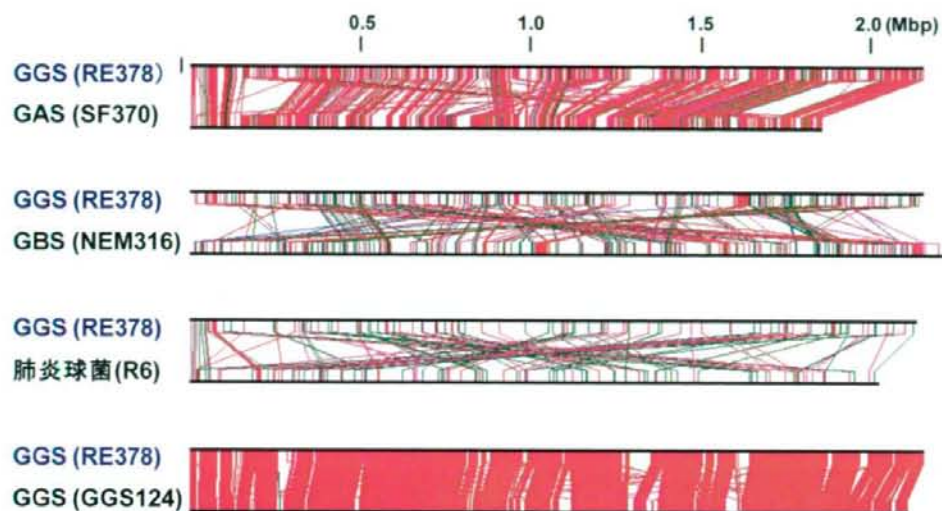


図-2. GGS (RE378)株と他のレンサ球菌とのゲノム再配置マップ

各色は Blast で解析した相同性の割合を示す。■, ≥90 %; ■, ≥45 %; ■, ≥40 %; ■, ≥30 %; ■, ≥25 %; ■, ≥20 %。

表-2. GGS RE378 株が保有する GAS の病原性因子

機能別病原性クラス	病原性因子	遺伝子
接着因子 免疫回避	Fibronectin binding protein	<i>fbp</i>
	Collagen binding protein	
	Laminin binding protein	<i>lmb</i>
	M protein	<i>emm</i>
	Myosin-cross reactive streptococcal antigen	
	Streptococcal C5a peptidase	<i>scpA</i>
	C3-degrading proteinase	
	Streptokinase A	<i>ska</i>
毒素 プロテアーゼ	Streptolysin O	<i>slo</i>
	Streptolysin S	<i>sagA</i>
	Hemolysin	<i>hlyIII, helA1</i>
調節因子	M protein transacting positive regulation	<i>mga</i>
	CovR	<i>covR</i>
	CovS	<i>covS</i>
	Regulatory component of protein F	<i>rofA</i>

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

β 溶血性連鎖球菌菌血症に関する臨床的検討

研究分担者 岩田 敏 独立行政法人国立病院機構東京医療センター 統括診療部長

研究要旨

2003年1月から2008年8月の間に独立行政法人国立病院機構東京医療センターで血液からβ溶血性連鎖球菌が分離された61例について、その臨床的背景について後方視的に検討した。β溶血性連鎖球菌としては *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus equisimitis* の3種類が分離されたが、*S.pyogenes*, *S.equisimitis* 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、*S.agalactiae* 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 *S.agalactiae* もしくは *S.equisimitis* が分離された症例であった。

A. 研究目的

β溶血性連鎖球菌は敗血症、壊死性筋膜炎等の侵襲性感染症の原因菌として重要である。そこで、血液培養からβ溶血性連鎖球菌が検出された症例について、年齢、性別、基礎疾患等の患者背景および治療抗菌薬について検討した。

B. 研究方法

2003年1月から2008年8月の間に独立行政法人国立病院機構東京医療センターで血液からβ溶血性連鎖球菌が分離された61例を対象として、後方視的な検討を行った。

血液培養には BACTEC 9240 および BACTEC 9120 を用い、菌株の同定はアピスト

レップ 20 およびストレプトテックスを用いて行った。

(倫理面への配慮)

今回の研究は、菌株が分離された患者の解析が中心であるが、個々の患者情報に関しては、匿名化に配慮し、患者に不利益を与えたり、患者個人の情報が公開されることのないように配慮した。

C. 研究の結果

血液からβ溶血性連鎖球菌が分離された61例の内訳は、それぞれ *S.pyogenes* が8例、*S.agalactiae* が26例、*S.equisimitis* が27例で、性別は男性33名、女性28名、年齢は20歳代から90歳代で、ピークは *S.pyogenes* と *S.*

agalactiae が 70 歳代, *S. equisimitis* が 80 歳代と、いずれも高齢者に多くみられた。悪性腫瘍、糖尿病、心疾患、肝疾患などの基礎疾患を有する症例が多く、病態としては表1に示したように、壊死性筋膜炎、蜂窩織炎などの皮膚軟部組織感染症のかたちをとる場合が 31 例と過半数を占めていたが、*S. agalactiae* の場合は、腹腔内膿瘍、脊椎症、肺炎などの皮膚軟部組織感染症以外の病巣を有する症例や感染病巣が不明の症例が多く認められた。

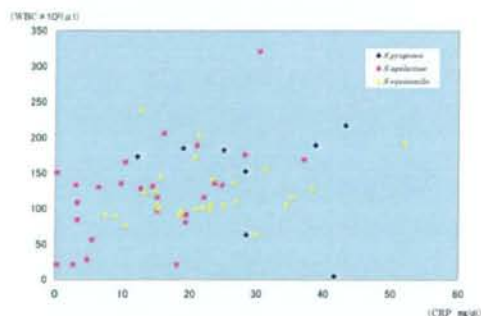
表1 病態の内訳

	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. equisimitis</i>
壊死性筋膜炎	3	2	1
蜂窩織炎	3	5	17
関節炎	1		1
咽頭炎	1		
脊椎症		3	
心内膜炎		1	1
腹腔内膿瘍		4	3
肺炎		2	1
髄膜炎			1
その他		9	2

- 61症例の内壊死性筋膜炎が6症例、蜂窩織炎が25症例と大半を占めた。
- *S. agalactiae*については、focusが不明な症例が多かった。

検査所見では、白血球増多、CRP 強陽性を示す症例が多く、特に *S. pyogenes* が分離された症例で、炎症反応が高値を示す傾向が強かった(図1)。

図1 炎症反応 (WBC・CRP)



治療にはパニペネム/ベタミブロンなどのカルバペネム系薬、セファゾリン、アンピシリン、クリンダマイシンなどが使用されていたが、死亡例が 8 例 (13.1%) 認められた(表 2)。いずれも *S. agalactiae* もしくは *S. equisimitis* が分離された症例で、7 例は 65 歳以上の高齢者であり、4 例はショック状態であった。

表2 死亡した8症例の背景

群	症例	年齢・性別	基礎疾患	WBC (x10 ⁴ /μL)	PLT (x10 ³ /μL)	CRP (mg/dL)	治療薬	備考
I 群	1 症例	81 年	心不全	160	16.8	21.0	PAβA/βP	シタロフ、腎臓病治療
	2 症例	89 年	本病	22	6.1	18.8	PAβA/βP	シタロフ、DIC、腎臓病治療
	3 症例	91 年	糖尿病 心不全	131	16.8	14.4	OE2→4βPC	腎不全、Fusum 手術療法
	4 症例	74 年	糖尿病	129	13.2	2.2	SPN/CG	Staph 手術療法 薬物療法により死亡
	5 症例	80 年	糖尿病	118	24.2	10.1	VOM	腎臓病治療 薬物療法により死亡
II 群	6 症例	83 年	糖尿病 心不全	77	13.4	10.4	CFM ABPC	シタロフ
	7 症例	89 年	上肢障害	204	20.2	21.4	OE2→βPC	腎臓病治療、下肢静脈血栓 薬物療法により死亡
	8 症例	87 年	腎臓病 腎臓病	197	7.7	15.7	FM2A GTx	シタロフ/DIC、心臓病治療

5 症例で再発が認められたが、内 1 例では遺伝子学的に同一の菌株であった(表 3)。

表3 再発した5症例の背景

群	症例	年齢・性別	基礎疾患	病巣	抗菌薬使用期間	再発までの期間
A 群	1 症例	84 年	糖尿病	左足壊死性筋膜炎 (28 歳) 左足関節炎 (14 歳)	β-ラクタム系薬 (41 日間) β-ラクタム系薬 (14 日間)	1 年 3 ヶ月
	2 症例	87 年	子宮癌	右膝下膿瘍	β-ラクタム系薬 (10 日間) β-ラクタム系薬 (14 日間)	6 ヶ月
B 群	3 症例	73 年	糖尿病	右下肢壊死性筋膜炎	β-ラクタム系薬 (23 日間)	2 年 7 ヶ月
	4 症例	86 年	糖尿病 関節症	膝関節膿瘍	β-ラクタム系薬 (36 日間)	6 ヶ月
D 群	5 症例	78 年	子宮癌	右下肢壊死性筋膜炎	β-ラクタム系薬 (1 日間)	2 年 3 ヶ月

- *S. equisimitis* の B 症例は、蜂窩織炎を数年おきに 3 度繰り返し発症している。いずれも β-ラクタム系薬にて治療を行った。また、その菌株については、遺伝子学的にも同一株であることが確認されている。

D. 考察

β 溶血性連鎖球菌は敗血症、壊死性筋膜炎等の侵襲性感染症の原因菌として重要である。今回の検討から、血液から分離される β 溶血性連鎖球菌は *S. agalactiae* と *S. equisimitis* が多く、

分離された症例は高齢者で悪性腫瘍、糖尿病、心疾患、肝疾患などの基礎疾患を有する症例が多くを占め、死亡率は13.1%と高いことが明らかとなった。また皮膚軟部組織感染症をはじめとして様々な病態を示すが、中には明らかな感染病巣の認められない症例もあることから、確定診断には血液培養からの菌の検出及び同定が有用であり、血液培養の重要性が改めて認識された。治療には重症例が多いこと、皮膚軟部組織に病巣があり嫌気性菌の混合感染が疑われる症例が多いことなどから、カルバペネム系薬やクリンダマイシンの使用される割合が高かったが、当然ペニシリン系薬やセフェム系薬も有用であると考えられる。また、*S. agalactiae*、*S. equisimilis* 感染例では繰り返し感染を起こす場合もあることから、病巣からの菌消失後も数回にわたる血液培養が必要と思われた。

E. 結論

- 1) 血液由来 β 溶血性連鎖球菌としては、*S. pyogenes*、*S. agalactiae*、*S. equisimilis* が認められる。
- 2) 血液から β 溶血性連鎖球菌が分離された症例は高齢者で、基礎疾患を有する場合が多く、死亡率は13.1%と高い。
- 3) 病態としては皮膚軟部組織に感染病巣を有する症例が多い。
- 4) 治療には β-ラクタム系薬が有効である。
- 5) 確定診断には血液培養が重要である。肺炎球菌のペニシリン耐性は最近減少する傾向にあるが、キノロン耐性は増加傾向にある。

F. 研究発表

学会発表

庄司 路, 青木泰子, 松原啓太, 保阪由美子, 小川裕子, 樋口晶子, 山本優美子, 岩田敏: 当院における5年間のβ溶血性連鎖球菌菌血症. 第20回日本臨床微生物学会総会, 仙台国際センター(仙台), 2009年1月31~2月1日

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

研究分担者 坂田宏 旭川厚生病院小児科 主任部長

研究要旨

1998年から2008年までの間に、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、どのような薬剤が最も治療に適しているのかを基礎的に検討することを目的とした。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MIC₉₀は、ABPCが0.12μg/ml、CTXが0.06μg/ml、CTRXが0.06μg/ml、MEPMが0.03μg/ml、PAPMが0.015μg/mlであった。MBCでは抗菌薬の濃度が2μg/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より高い抗菌薬濃度に菌を接種して経時的に生菌数を測定すると、他の株よりも生菌数の減少が抑制されていた。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。

A. 研究目的

B群溶連菌(GBS)は新生児の敗血症や髄膜炎の重要な原因菌である。早発型GBS感染症を防止するために、母体の分娩時にpenicillin系薬を静注することも行われている。その予防や治療に用いる抗菌薬の有用性を検討するために、MICとMBCを測定した。

B. 研究方法

1998年から2008年までにGBS感染症の児から分離されたGBS20株について、ampicillin(ABPC)、cefotaxime(CTX)、ceftriaxone(CTRX)、panipenem(PAPM)、

meropenem(MEPM)の5剤のMICとMBCを測定した。MICは微量液体希釈法で測定した。MBCはMICを測定した各ウエルから一定量を採取し、抗菌薬の濃度を調整した寒天培地に塗抹して、24時間後に菌が生育するかで判定した。さらに、一部の株では培地に含まれる抗菌薬の濃度をMICの1倍、4倍、16倍、32倍に設定して菌を接種し2、4、6時間後に生菌数を測定し、培地のみで培養したものと比較した。

(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。

C. 研究結果

それぞれの薬剤の MIC₉₀ は ABPC が 0.12μg/ml, CTX が 0.06μg/ml, CTRX が 0.06μg/ml, MEPM が 0.03μg/ml, PAMP が 0.015μg/ml であった。MBC を測定したところ、抗菌薬の濃度が 2μg/ml 以上で生育する GBS が ABPC では 6 株, CTX では 5 株, CTRX では 4 株, PAMP では 5 株, MEPM では 6 株認められた。高濃度で生育した株以外の他の株の MBC₉₀ は ABPC が 0.12μg/ml, CTX が 0.06μg/ml, CTRX が 0.12μg/ml, MEPM が 0.06μg/ml, PAMP が 0.03μg/ml であった。

tolerance 株と control 株について Table 1 に ABPC, Table 2 に CTX における経時的な変化を示した。tolerance 株は control 株に比較して、生菌数の減少の程度が緩やかであった。

D. 考察

MIC より高い濃度でも菌が生育するという tolerance 現象が認める株が抗菌薬によるが 20 株中 4-6 株存在した。しかし、他の株は MIC と MBC がほぼ一致していたことから、新生児・乳児の B 群溶連菌による感染症には、ABPC, CTX, CTRX, PAMP, MEPM はすべて有効性が期待できると考えられた。ただし、より髄液移行性が良好で、MBC が低い薬剤が求められる

髄膜炎の治療に関しては、MIC₉₀ が 0.12μg/ml である ABPC より 0.03μg/ml である PAMP/BP の方が有効であると考えられた。新生児 GBS 感染症を予防するために、GBS を保菌する妊婦が分娩するさいには、分娩時に penicillin 系抗菌薬を静注投与することが推奨されている。しかし、tolerance 株であった場合には分娩時に 1 回だけの抗菌薬投与では除菌できない可能性があると思われた。実際に、適切な GBS 垂直感染防止対策を行った妊婦から出産した児が GBS 感染症を発症することもある。今後、tolerance 株を考慮する必要がある。

GBS の tolerance の機序は不明であり、今後検討していく課題と思われる。

E. 結論

MBC から有用性を検討すると、GBS 感染症に最も効果的と思われるのは PAMP/BP であった。GBS 保菌妊婦からの分娩時の penicillin 系薬による児への感染予防は、tolerance 株では効果が低下する可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

坂田 宏. 小児における B 群溶連菌感染症の臨床的検討. 日本感染症学会雑誌 2008; 82:633-637.

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

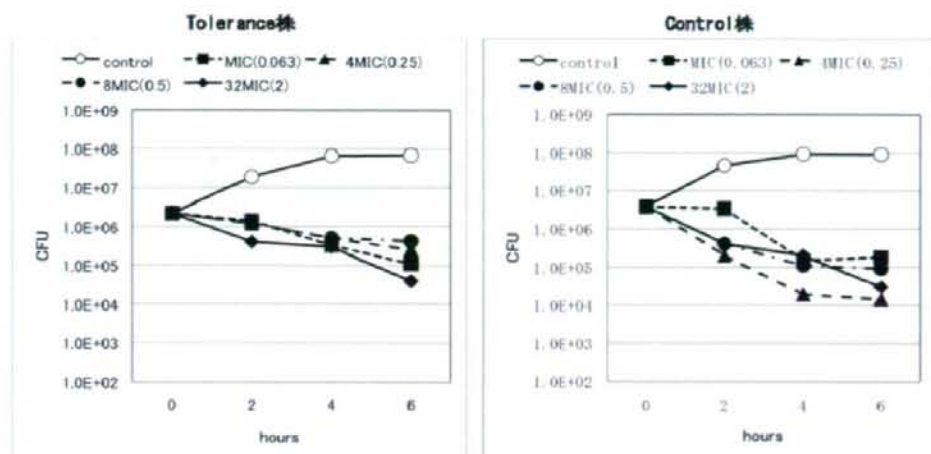


Fig 1 B群溶連菌のampicillinの濃度による生菌数の経時的変動

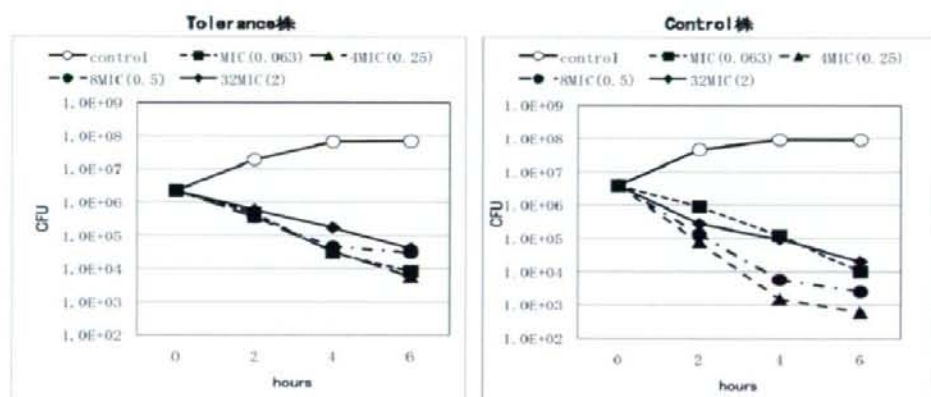


Fig 2 B群溶連菌のcefotaximeの濃度による生菌数の経時的変動

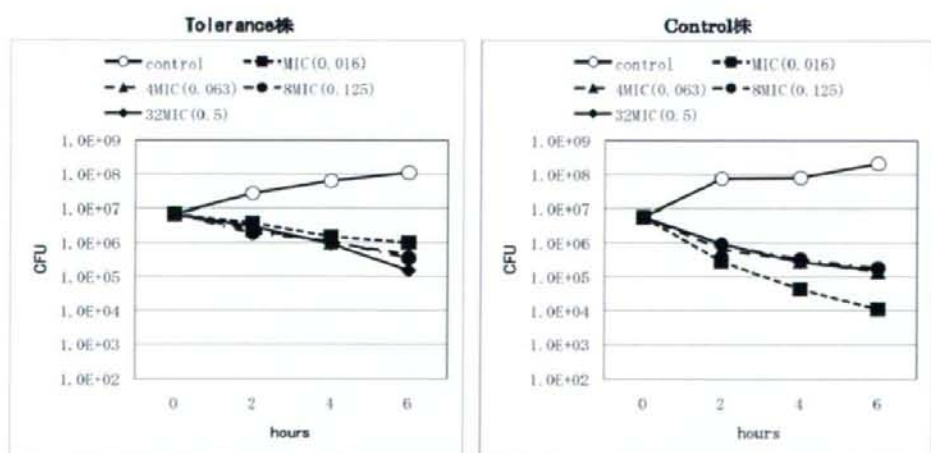


Fig 3 B群溶連菌のpanipenemの濃度による生菌数の経時的変動