

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)分担研究報告書

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

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

研究分担者 藤島清太郎 慶應義塾大学医学部救急医学 講師

### 研究要旨

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 G 群レンサ球菌敗血症の重要性が示された。また敗血症症例登録システムの開発も進捗した。

### A. 研究目的

重感染症で来院する救急患者の病態を、臨床的及び基礎的に解明すること。

### B. 研究方法

- (1) 平成 19 年 9 月～20 年 8 月に当院で G 群レンサ球菌血液培養陽性患者の後ろ向き疫学調査, 菌 DNA 解析を行った。
- (2) レンサ球菌が血液培養陽性であった当部入院症例を詳細に前向き調査した。
- (3) 敗血症疫学研究推進のため、日本救急医学会症例登録システム開発を行った。

### (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。

### C. 研究結果

- (1) 血液培養で G 群レンサ球菌を 5 人より検出, 全例基礎疾患を有していた(担癌 4 人, 肝硬変 1 人)。死亡率 60%だが, 本菌による死亡例(-)。血小板 < 10 万/ $\mu$ l を 60%で認めたが, DIC 合併(-)。
- (2) 81 歳女性患者 1 人の血液から G 群レンサ球菌が分離され, *S. dysgalactiae subspecies equisimilis* と同定した。本患者は基礎疾患を有さず, 来院時 SIRS 4 項目を満たしたが, 合併症なく, 6 日間の抗菌

化学療法にて軽快退院した。なお、諸検査にもかかわらず、感染巣、感染経路は不明であった。

- (3) 敗血症患者の全国集計を行うために、UMINと共同で Web 登録システムの開発に着手し、プロトタイプが完成した。

#### D. 考察

G 群レンサ球菌のうち *S. equisimilis* は基礎疾患がなくても感染するが、他は基礎疾患保有患者の敗血症原因菌として重要と思われた。今後、検討継続の予定である。

#### E. 結論

G 群レンサ球菌敗血症は基礎疾患保有または高齢患者において重要と思われた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Fujishima S., et al. Neutrophil elastase and systemic inflammatory response syndrome in the initiation and development of acute lung injury among critically ill patients. Biomed Pharmacother 2008;62(5):333-8.
- (2) 藤島清太郎. *S. equisimilis* 感染症が今後の焦点に:溶血連鎖球菌による侵襲性感染症の新たな動向. Medical Tribune 2008 年 11 月 20 日号 p.64-5

##### 2. 学会発表

- (1) 藤島清太郎, 他. レンサ球菌, 肺炎球菌

Sepsis における病態重症化因子の解明:  
劇症型感染症の救命率向上に向けて 第  
36 回日本救急医学会総会・学術総会  
2008 年 10 月 13 日 札幌

#### G. 健康危害状況

該当なし

#### H. 知的所有権の出願・登録状況

該当なし

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

## 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

研究分担者 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 准教授

### 研究要旨

2007年から2008年にかけて、獨協医科大学病院においてB群連鎖球菌(GBS)と*S. milleri* group (SMG)の臨床分離株を収集し、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、1999年-2006年のものと比較した

1. GBSによる小児の早発型感染症例では莢膜型 Ib, III, VI が、中高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。
2. FQ 耐性 GBS 検出のリスクファクターとして、高齢者、泌尿器系検体が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、新生児とその母親をも含めた FQ 耐性 GBS の蔓延を招いた可能性がある。
3. 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。さらにマクロライド耐性遺伝子として *erm B* と *mef A* を有した。
4. これら GBS, SMG に関する経時的な臨床疫学的データは、今後の基礎研究・臨床研究に応用可能である。特に GBS では本邦独自のワクチン開発に役立つと思われる。

### 研究協力者

- ・岡本友紀 獨協医科大学病院臨床検査部
- ・樽川友美 同上
- ・三澤慶樹 東京大学医学部附属病院
- ・吉田穂波 ウィメンズ・ウェルネス銀座クリニック

### A. 研究背景・目的

B群連鎖球菌(Group B *Streptococcus*; GBS)と*Streptococcus milleri* group(SMG)はともに莢膜を持つ連鎖球菌でヒトへの病原性が高く、しばしば敗血症などの侵襲性感染症を生じる。近年マクロライド系(ML)やフルオロキノロ

ン系(FQ)抗菌薬への耐性が指摘され、治療上の選択肢がより制限される状況になっている。

しかしながら両菌に関する本邦での疫学データは非常に少なく、経時的に集積した情報もない。米国では既に豊富な疫学情報に基づき、GBSの莢膜多糖体に対するワクチンが開発され、臨床応用を待つばかりになっている。

我々は感染症発症例のみならず保菌例をも含めた10年間のサーベイランスを行い、臨床・疫学情報、薬剤耐性機構を解析した。それにより発症メカニズムや病原因子に関わる研究の向上、公衆衛生的見地からの予防対策の推進、さらにワクチン開発・導入に資することを目的とした。

## B. 研究方法

獨協医科大学病院で臨床検体から分離されたGBSとSMGを対象とした。分離例の基礎情報(患者年齢、性別、検体、診療科など)に加え、必要に応じて病歴から感染症の臨床的特徴(診断名、治療、予後)に関する情報を得た。菌株については微量液体希釈法により薬剤感受性を判定した。

GBSではさらに型別用抗血清(デンカ生検)を用いるか、型特異的PCR反応を行って莢膜型を決定した。MLまたはFQに耐性であった場合には、耐性遺伝子の検出と塩基配列の決定を行った。

SMGについては同定キットを用いて菌名を決定した。薬剤耐性遺伝子の解析はGBSと同様に行った。

侵襲性感染症例と保菌例に分けて以上のよ

うな臨床的・疫学的・細菌学的な特徴に差がどうか検討した。なお2007-8年とそれ以前(1999-2006年)との比較も行った。一方で耐性のリスクファクターについても解析し、どの集団が耐性出現に最も寄与しているか明らかにした。

## (倫理面への配慮)

臨床検体はあくまで日常診療において感染症診断ないしは妊娠中のスクリーニング検査のために採取されたものであり、各担当医から患者に理解を得た上で実施している。結果についても微生物検査結果として、患者家族に説明される。莢膜型や薬剤耐性遺伝子など菌株の解析に際しては、症例の個人情報に配慮するとともに、データ保管には十分な配慮を払った。臨床情報についても、患者の特定を避ける配慮を行った。

## C. 研究結果

### 1. GBS感染症と莢膜型

2007年は598株、2008年は553株が分離され、1999年9月からの合計では4980株となった。1572株の薬剤感受性試験と166株の莢膜型の結果が得られた。

小児の侵襲性感染症例での莢膜型をみると、生後1週間以内の早発型ではIb、III、VIが優位であり、保菌例に対する発症例の割合には、III>Ib>VIという関係があった(n=9)。一方遅発型ではIa型のみみられた(n=1)(表1)。

成人の侵襲性感染症例(n=11)については、Ibが6例、IIIが3例、VI型1例、nontypable I例であり、IbとIII型が優位であった。

保菌例を含む年齢別の莢膜型の分布をみると、生後1~3か月ではIaが、60歳以降の成人ではIbが多かった(表2)。III型はIa、Ibとは異なり、保菌は少なく、小児・成人の両方で侵襲性感染症を生じていた。

## 2. マクロライド耐性と莢膜型

2007-8年においてErythromycin(EM)耐性が11.7%、Clindamycin(CLDM)耐性が8.3%にみられ、両者とも2000年の3%から漸増していた(図1)。莢膜型をみるとIaとの相関が有意に高かった( $p=0.011$ , 図2)。一方でVI、VIIIでは耐性株はみられず、Iaが呼吸器系検体に多く、VIIIが産婦人科検体に多いというこれまでの結果に合致していた。

## 3. フルオロキノロン(FQ)耐性GBSの出現、増加に関するリスク因子

血清型Ibに属するFQ耐性GBSが急速に増加しているが、増加の背景を探るためにリスク因子の解析を行った。性別、年齢、提出された検体の種類について、 $\chi^2$ 検定とlogistic regression analysisを用いてcross-sectional studyを行ったところ、男性、60歳以上の中高年が有意に相関し(性別よりも年齢の方が影響が大きい)、さらに産婦人科検体より尿検体での増加が大きく寄与していた。一方で新生児や妊娠可能年齢の女性との相関は低かった。さらに院内検出、外来検出に分けて耐性株の分離頻度を比較したが、それには差はなかった(表3)。

この結果は、脳梗塞や前立腺肥大など尿流障害を持つ高齢者にFQがしばしば投与され、

尿路でFQ耐性GBSが選択されたことと合致する。一方で妊娠可能年齢の女性がFQ耐性GBSを保有し、それが児に感染することも分かっている。経時的にFQ耐性GBSの分離推移をみると高齢者で増加が早く始まっており、高齢者から妊娠可能年齢の女性へ伝播が生じた可能性を考える。その経路としては家族内感染や、若い男性を介した性行為が疑われる。

## 4. SMG感染症の臨床像の解析

2000年以降218株のSMGが分離されたが、うち敗血症由来が21例(22株)あった(うち11例が*S. constellatus*, 8例が*S. anginosus*, 2例が*S. intermedius*)。2004年以降の15例について臨床背景を解析したところ、男性に多く(80%)、基礎に胆道疾患や消化管疾患を有し(47%)、胆管炎・肝膿瘍(33%)や腹膜炎など消化管感染症(20%)に続発(ないし併発)した例が多かった(表4)。SMGは従来呼吸器感染症の病原体として認識されてきたところが大きいですが、実際は敗血症においては胆道感染や腹腔内感染症によるものが半数にのぼることが判明した。この背景として、胆道狭窄・閉塞に伴う胆汁排泄の低下が腸内のSMGの増殖を促したり、化学療法や腹水貯留を契機として腸内のSMGがbacterial translocationを生じ、菌血症をおこすのではないかと推測した。

## 5. SMGの薬剤耐性(マクロライド耐性)

SMGではペニシリン系が第一選択薬となるが、ペニシリン系への低感受性株が増加するとともに、第2世代セフェム系やML系といったその

他の抗菌薬にも耐性が指摘されている。我々はまず ML 耐性について検討した。

2007-8 年の全検体において EM 耐性は 18%、CLDM 耐性は 13%にみられた。2006 年以前に比べ明らかに増加しているわけではなかったが、血液培養由来株では耐性はより高頻度に認められた (EM 耐性 33.3%、CLDM 耐性 13.3%)。同時にマクロライド耐性遺伝子である *ermB* は 13.3%に、*mefA* は 20%に検出された (図 7)。侵襲性感染症例と呼吸器検体で耐性率は高く、呼吸器～腸管に常在する SMG が ML 系に曝露され耐性化し (または耐性株が選択され)、その後侵襲性感染症を生じたものと推測する。現在 ML 投与 (特に長期少量投与) との関係を解析中である。

なお本検討では A 群連鎖球菌と GBS を対象とした EM 耐性遺伝子の PCR 法 (図 7 下左・中) と、肺炎球菌を対象とした EM 耐性遺伝子の PCR 法 (図 7 下右) とを用いたが、どちらの方法もすべての株について検出できるわけではなかった。SMG の EM 耐性遺伝子はこれらの菌のものとは異なっている可能性があり、現在耐性遺伝子の塩基配列を解析中である。これにより耐性遺伝子がどのように SMG に伝播してきたのか有用な情報が得られる見込みである。

## D. 考察

### ・GBS について

本検討により、GBS の侵襲性感染症のみならず保菌例での疫学情報が得られつつある。薬剤耐性も含めると短期間で GBS の疫学的特徴はかなり変化しているといえる。

米国で既に開発されたワクチンは荚膜型 Ia, Ib, II, III, V を含むもので、母体に接種することで児の GBS 感染を防ぐことを目的としている。

しかしながらこれをそのまま日本で導入するについては、日本と米国で荚膜型の特徴が異なることや (日本では侵襲性感染例で VI や VIII も認められる)、中高年での侵襲性感染症が多いことから、現時点ではあまり現実的ではないように思われる。それよりも日本独自の状況に応じたワクチン開発を急ぐべきである。

さらに荚膜多糖体の種類に左右されることのないワクチンについても開発可能とされており、これについても検討の価値が大きいと考える。

### ・SMG について

SMG においては疫学的特徴や薬剤耐性のみならず、荚膜多糖体など病原因子についても不明の部分が多い。GBS や肺炎球菌など、荚膜を形成するその他の細菌でのこれまでの研究成果を応用しつつ、SMG に関する解明を進める必要があり、それが将来の予防や連鎖球菌全体の包括的理解につながっていくものと考えている。

## E. 結論

1. GBS, SMG ともに薬剤耐性を含むその疫学的特徴は短期間で変化している。それらを継続的に追跡できる全国的なサーベイランスシステムが早期に構築されるべきである。
2. 本邦での疫学調査結果に基づいた GBS ワクチンが早期に開発されるべきである。

3. SMG については疫学情報の集積と病英膜多糖体・病原因子の解析を平行して進める必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshida A, Okamoto Y, Tarukawa T, Koike S, Wakimoto H, Yoshida H, Hishinuma A, Okuzumi K, Ieiri T. Emerging fluoroquinolone-resistant type Ib *Streptococcus agalactiae*. (投稿中)
- 2) 岡本友紀, 鈴木弘倫, 樽川友美, 山本芳尚, 大内友二, 及川信次, 奥住捷子, 吉田敦, 小池幸子, 菱沼昭, 家入蒼生夫. キノロン耐性 B 群連鎖球菌の臨床的・疫学的特徴と耐性機序の解析. 臨床検査栃木 2008;3(2):54-57.
- 3) 樽川友美, 鈴木弘倫, 岡本友紀, 山本芳尚, 大内友二, 及川信次, 吉田敦, 奥住捷子, 家入蒼生夫. 血液培養から分離された肺炎球菌の莢膜血清型と薬剤感受性および臨床背景の検討. 臨床検査栃木 2008;3(2):50-53.
- 4) 吉田敦, 山本芳尚, 奥住捷子. ICU における感染のトピックス 血液培養の落とし穴. ICUとCCU 2008;32(3):181-190.
- 5) 吉田敦. *Streptococcus suis*, *Streptococcus dysgalactiae*. 臨床と微生物 2009;36(1)

### 2. 学会発表

- ・ 吉田敦, 岡本友紀, 樽川友美, 山本芳尚, 奥住捷子, 小池幸子, 菱沼昭, 家入蒼生夫. 変わりゆく連鎖球菌感染症 B 群連鎖球菌・G 群連鎖球菌感染症を中心に. 第 82 回日本感染症学会総会 ミニ特別講演, 松江, 2008 年 4 月
- ・ Yoshida A, Okamoto Y, Tarukawa T, Koike S, Misawa Y, Wakimoto H, Yoshida H,

Hishinuma A, Okuzumi K, Ieiri T. Epidemiological analysis of fluoroquinolone-resistant group B streptococci. 18th ECCMID, P-1238, Barcelona, Spain, 2008.

- ・ 脇本寛子, 脇本幸夫, 矢野久子, 吉田敦, 奥住捷子, 佐藤洋子, 澤田恭子, 土井まつ子, 宮川創平, 溝上雅史. 新生児 GBS 敗血症/髄膜炎発症株と非発症株における血清型別と薬剤感受性試験の比較検討. 第 82 回日本感染症学会総会. 2008 年 4 月
- ・ 樽川友美, 岡本友紀, 山本芳尚, 奥住捷子, 吉田敦, 家入蒼生夫, 菱沼昭, 小池幸子. *S. milleri* group の薬剤感受性およびマクロライド系薬耐性遺伝子の解析. 第 41 回レンサ球菌感染症研究会. 2008 年 6 月
- ・ 脇本寛子, 脇本幸夫, 溝上雅史, 矢野久子, 三澤慶樹, 吉田敦, 奥住捷子, 鈴木悟, 戸新創, 相澤まどか, 佐藤洋子, 澤田恭子, 土井まつ子, 宮川創平. 新生児 GBS 敗血症/髄膜炎発症株と非発症株における分子遺伝学的手法を用いた型別法と薬剤感受性試験の検討. 第 41 回レンサ球菌感染症研究会. 2008 年 6 月
- ・ 樽川友美, 鈴木弘倫, 岡本友紀, 山本芳尚, 三澤慶樹, 奥住捷子, 吉田敦, 小池幸子, 菱沼昭, 家入蒼生夫. 血液培養から検出された *S. milleri* group の薬剤感受性成績とマクロライド耐性遺伝子および臨床背景の検討. 第 20 回日本臨床微生物学会総会, 2009 年 1 月

## G. 知的所有権の取得状況

該当なし

表 1

### 新生児GBS感染症と莢膜型、薬剤感受性

性別	年齢	検体種別	感受性(LVFX)	感受性(EM)	莢膜型	感染症
男	1day	鼻腔粘液	S	S	II	有
男	1day	咽頭粘液	R: MIC >8	R: MIC >4	I b	有
女	1day	鼻腔粘液	R: MIC >8	S	I b	有
女	1day	鼻腔粘液	S	S	V	有
男	1day	胃液	S	S	III	有
男	1day	血液	S	S	VI	有
女	1day	耳分泌物	S	S	VI	なし
女	1day	咽頭粘液	S	S	VI	なし
女	1day	鼻腔粘液	S	S	I b	なし
男	1day	耳分泌物	S	S	IX	確認中
男	1day	耳分泌物	S	S	IX	確認中
女	1day	咽頭粘液	S	S	I a	確認中
女	1day	鼻腔	S	S	(-)	確認中
女	1ヵ月	鼻腔粘液	S	R: MIC 2	I a	なし
男	1ヵ月	鼻腔粘液	S	R: MIC 1	I a	有
女	1ヵ月	鼻腔粘液	S	S	V	確認中
女	2ヵ月	鼻腔粘液	S	R: MIC 1	I a	確認中
男	2ヵ月	随時尿	S	S	I a	確認中
男	3ヵ月	気管内	S	S	I a	確認中

感染症発症、頻度、抗菌薬耐性からみると、III, Ib, Ia, Vが重要

表 2

### 年齢別莢膜型

n=166, 感染・保菌を問わない,  
( )はFQ耐性株の内訳

	I a	I b	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	I b+VI	nontypable
0ヵ月	1	3 (2)	1	1		1	3		2		1
1ヵ月	2					1					
2ヵ月	2										
3ヵ月	1										
4ヵ月							1				
8ヵ月	1										
1~10歳							1		1		
~20	1		1				1				1
~30	3	7 (6)	1	2	1	4	7		4		1
~40	4	7 (4)	1	6		8	10	1	9		4
~50	1	5 (4)							2		2
~60		5 (2)				1	2		1		1
~70	1	3 (3)		1		2	2	1			
~80歳		8 (6)		3 (1)		3	1		1		
81歳~	1 (1)	4 (4)				4	3 (1)			1	
計(株)	18 (1)	42 (31)	4	13 (1)	1	24	31 (1)	2	20	1	10



図 1

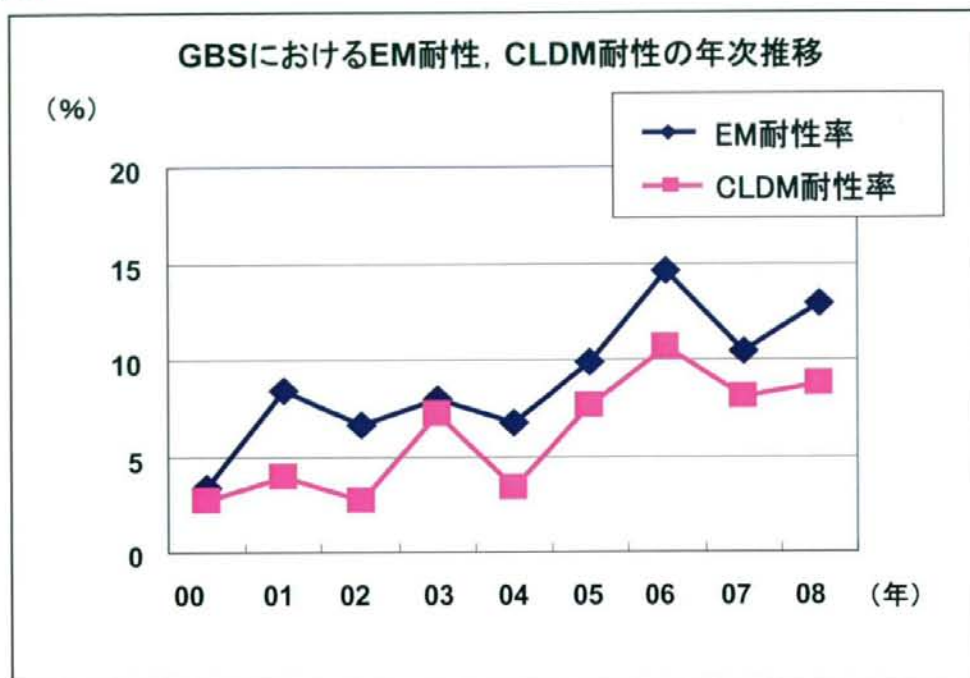


図 2

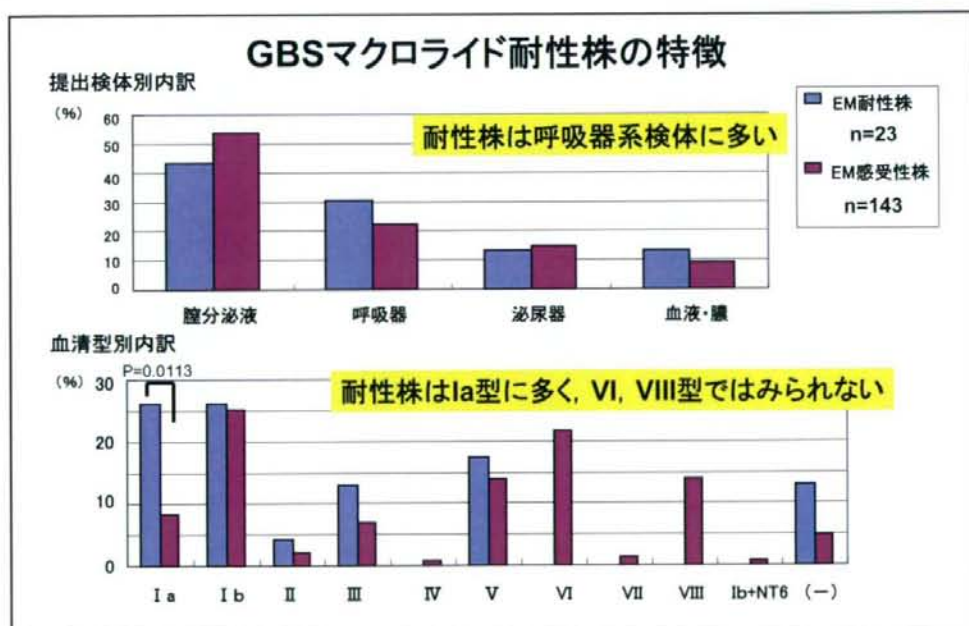


表 3

FQ耐性GBSのリスク		
リスク因子	Odds比(95%CI)	P value
男性	1.07(0.80-1.32)	p < 0.0001
年齢(60歳以上)	1.58(1.33-1.84)	p < 0.0001
尿検体	1.97(1.49-2.60)	p < 0.0001
産婦人科検体 (膣分泌物など)	0.39(0.26-0.58)	p < 0.0001
院内例	1.26(0.95-1.68)	p = 0.106
莢膜型Ib	45.76(11.4-183.1)	p < 0.0001

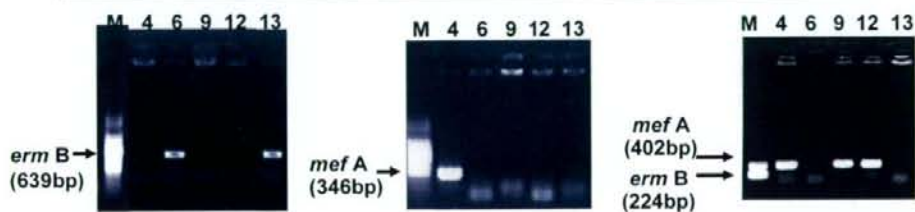
表 4

SMG敗血症例の臨床的特徴					
症例	年齢	基礎疾患	感染症(原発巣)・侵入門戸	菌名	予後
1	65M	胃癌・DM	不明熱・腸管?	<i>S.constellatus</i>	死亡
2	67F	DM	肺炎・肺化膿症	<i>S.constellatus</i>	軽快
3	3M	骨髄異型性症候群	FN・口腔内	<i>S.constellatus</i>	敗血症改善
4	78M	肝内胆管癌・心不全	胆管炎	<i>S.constellatus</i>	軽快
5	91M	脳梗塞	誤嚥性肺炎?	<i>S.constellatus</i>	軽快
6	40M	肝内結石症	胆管炎	<i>S.constellatus</i>	軽快
7	63M	肺小細胞癌・DM	腹腔内感染症	<i>S.constellatus</i>	死亡
8	62M	肝硬変・総胆管結石	胆道感染, 肝嚢胞内感染	<i>S.anginosus</i>	死亡
9	49F	肺癌	肝膿瘍	<i>S.anginosus</i>	死亡
10	62M	肺癌・副腎転移	肺炎・膿胸	<i>S.anginosus</i>	死亡
11	77M	S状結腸癌	肝膿瘍	<i>S.anginosus</i>	軽快
12	80M	イレウス・回腸壊死	腹膜炎	<i>S.anginosus</i>	軽快
13	58M	胸部食道癌・DM	食道癌部?	<i>S.anginosus</i>	軽快
14	55M	うっ血性心不全	肺炎	<i>S.intermedius</i>	軽快
15	49F	肺癌	肺癌部? 口腔内?	<i>S.intermedius</i>	軽快

図 3

### マクロライド耐性遺伝子とMIC

No.	耐性遺伝子	EM MIC( $\mu$ g/ml)		CLDM MIC( $\mu$ g/ml)	
4	<i>mef A</i> (+)	2	(R)	0.06	(S)
6	<i>erm B</i> (+)	>4	(R)	1	(R)
9	<i>mef A</i> (+)	>4	(R)	0.125	(S)
12	<i>mef A</i> (+)	0.5	(I)	0.125	(S)
13	<i>erm B</i> (+)	>4	(R)	>4	(R)



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

*Streptococcus suis* 感染症の病態とその診断・治療法に関する研究

研究分担者 大石和徳 大阪大学微生物病研究所 特任教授

研究要旨

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)であった。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、主に散发例として発生していることが明らかになった。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考えられる。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。我が国においてもヒト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、今後我が国でも国民に向けてSS感染症に対する注意を喚起することが必要と考える。

A. 研究目的

1) *Streptococcus suis* (SS)はブタの上気道に常在し、ブタのみならずヒトに髄膜炎、敗血症を含む侵襲性感染症を惹起する。全世界では未だ500症例程度のヒト症例が報告されているに過ぎない。また、ヒトにおける病原性株の主要な血清型はserotype 2とされる。2005年の中国、四川省におけるアウトブレイク、2007年5月の北タイ、パヤオ県での死亡3例を含む33症例のアウトブレイク事例以来、本症のタイ国内で

の新興・人獣共通感染症としての認識が高まっている。とりわけ、パヤオ県のアウトブレイクの感染源は、葬儀で振る舞われたブタの血液や生肉であったとされている。このような北タイ地域に特有な食習慣が本症のリスク因子となっていることが指摘されている。

本研究の目的は、

1) タイ国内の医療機関から収集されたヒト由来の *Streptococcus suis* 株の分子疫学的特徴を明らかにすること、

2) タイの臨床現場で使用可能な本症の迅速診断系の開発, の2項目である。

## B. 研究方法

### 1) 菌収集・同定と分子疫学的手法

#### 1. 菌株収集と同定

2006年1月から2008年9月までにタイ NIH にタイ国内 60 医療施設(北部, 北東部, 中央部, 東部, 南部地域の 48 県)からヒトの血液および髄液由来の連鎖球菌 1,157 株が収集された。これらの連鎖球菌株から, 生化学的方法と 294 bp の PCR 産物を検出する *S. suis* 特異的 PCR 法により 180 株の *S. suis* 株(1 症例あたり 1 菌株)が同定された。これらの菌株は 25 県の 34 医療施設(北部, 北東部, 中央部, 東部)から分離された。さらに, その血清型を, 血清型 1 または 14 型, 2 または 1/2 に対する duplex PCR と抗血清による凝集試験により決定した。

#### 2. 菌株の分子疫学的検討

##### a) MLST 解析

既報(King SJ, et al. J Clin Microbiol 2002)に従い, 7 つの house keeping gene (*aroA*, *cpn60*, *dpr*, *gki*, *mutS*, *recA*, *thrA*)の配列から, それぞれの菌株のシーケンスタイプ(ST)を決定した。

##### b) Virulence-associated gene(VAG)プロフィール

既報(Silva LMG, et al. Vet Microbiol, 2006)に従い extracellular factor (*epf*), suilysin gene (*sly*), muraminidase-related gene (*mpr*)について multiplex PCR で解析した。

##### c) 89K pathogenicity island (PAI)

89K PAI は 2005 年の中国, 四川省でみられたアウトブレイク株(SS2,ST 7)に検出された PAI であり, 既報 (Chen C, et al. PLoS one, 2007)に従い PCR 法で解析した。

##### d) Pulse-fielded gel electrophoresis (PFGE)とその解析

PFGE は *Sma I* を用いて通常の方法で実施し, その dendrogram 解析で 70%以上の相同性を示すクラスターについて pulsotype を決定した。

### 2) 迅速診断系の開発

#### 1. *S. suis* serotype 2 特異的マウス単抗体 (MAb)の作成

*S. suis* serotype 2 31533 由来の capsular polysaccharide(CPS)を精製した。この他にも serotype 2 である 90-1330 株, P1/7 株, serotype 1, 14, 16 株の CPS を分離精製した。同株の加熱処理死菌で BALB/c マウスを免疫し, 得られた脾細胞とマウス骨髄腫細胞を通常の方法で細胞融合させ, serotype 2 CPS に特異的 MAb を選択し, 得られた MAb の特異性について検討した。

## C. 研究結果

### 1) 菌の分子疫学的検討

得られた *S. suis* の 180 菌株中, serotype 2 (SS2)は 165 株, 残りの 15 株は serotype 14(SS14)と判定した。この血清型は, International Reference labo (Dr. M. Gottschalk) でも確認された。これらの菌株の分離された地域は, 149 株 (93.1%)が北部, 21 株が中央部, 7 株が北東部, 3 株が東部であり, 北タイにおける菌分離が圧倒

的に多かった。SS2 165株の検討において、STではST 1 103株(62.4%)、ST 104 42株(25.5%)、ST 25 11株(6.7%)、ST 28、ST 103、ST 126(新ST)がそれぞれ3株(1.8%)であった。全体の60%以上を占めたST1のすべてがVAGではepf+/sly+/mrp+パターンを示し、ST104はVAGでepf-/sly+/mrp-パターンを示した。また、ST1は81株(78.6%)が89PAIを保有するのにに対し、ST104はそのうち38株(92.7%)が89K PAIを欠損していた。

一方、SS14 15株については、その11株が血液由来、4株が髄液由来株であった。STは14株がST122、他1株がST127であり、いずれの菌株も新STであった。また、15株中11株は、異なる時期に異なる地域から分離され、散発例と考えられたのに対し、残りの4株は同時期にTak県の症例からの血液分離株であり、SS14の小クラスターが発生していたと推察された。ST122の14株はすべてVAGでepf+/sly+/mrp+を示したが、89K PAIは欠損していた。ST127の1株はepf+/sly+/mrp+を示したが、89K PAIは保有していた。これらのSS14のうち12株(Tak県の小クラスター由来の4株を含む)は同一のpulsotypeを示し、残りの3株も近縁のpulsotypeと判定した。

## 2) 迅速診断系の開発

SS2 CPSに反応するマウスMAbを2クローン選択し、このうち反応性の高いIgG 2aのクローンを選択した。その特異性をinhibition ELISAで判定したところ、serotype 1, 14, 16 CPSとは反応性が認められず、serotype 2 CPSにのみ反応した。さらに、SS 2 31533株加熱死菌でウ

サギを免疫して得たポリクローナル抗体とIgG 2a MAbを用いてサンドイッチELISAを構築し、その感度はSS2 CPSに対し、10 mg/ml程度であった。

## D. 考察

今年度の研究から、北タイを中心として、タイ国内ではヒトSS感染症が、年間に少なくとも数十例程度が発生していることが明らかになった。ヒト症例の臨床診断はSS株の分離部位から、敗血症もしくは髄膜炎が考えられたが、今後は細菌学的検討のみならず、ヒトSS症例の臨床症状を含めた前向き研究が必要と考えられる。

従来報告どおりに、SS2はヒトSS感染症全体の90%以上を占めていた。SS2のSTタイプではST1が62.4%、ST104が25.5%とその主体を占めており、これまでのタイ分離株の報告と異なり(Takamatsu D, et al. EID, 2008)、近年はST1とST104が主要な原因菌として増加していることが示唆された。また、これまで世界で6症例しか報告のないヒトSS14感染症が、この約3年間で15例も発生していることは注目に値する。しかもSS14株はPFGEで同一あるいは近縁のDNAパターンを示したことから、SS14の北タイを中心としたクローナルな菌伝播が示された。さらに、2005年の中国、四川省のアウトブレイク流行株で同定された89K PAIは、タイのSS2のST104の92.7%の株とSS14のST122のすべての株には欠損しており、これらの菌株には89K PAI以外のPAIを保有することが示唆される。北タイバヤオ県のアウトブレイクでは汚染したブタ生血、生肉の摂取による経口感染であった

ことが報告されているものの、SS14 症例の解析からもタイにおけるヒト症例の多くは散発例と考えられる。しかしながら、これらの散発例の SS 菌による感染経路は未だ不明であり、今後の解明が必要である。また、タイ国民に向けた生ブタ肉、血液の摂食のリスクについての教育を徹底することが、今後のヒト SS 感染症の増加防止のために重要と考える。

我が国においてもヒト 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、今後我が国でも国民に向けて SS 感染症に対する注意を喚起することが必要と考える。

また、SS2 CPS に特異的なマウス IgG 2a MAb を用いたサンドイッチ ELISA 法による抗原検出系を作成した。今後、タイで利用可能な、より感度の高い、簡便な迅速診断系に近づける必要がある。

## E. 結論

2006-8 年にかけてタイ国内でヒト血液および髄液由来の SS180 株を分離同定し、このうち 165 株(91.7%)が SS2、15 株(8.3%)は SS14 であった。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が明らかになった。また、SS2 の中では ST1、ST104 が増加しており、SS14 では ST122 が新興株として注目される。また、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。(共同研究者:タイ NIH, Mr. Anusak Kerdsin, Mrs Surang Desililert)

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Furumoto A, Ohkusa Y, Chen M, Kawakami K, Masaki H, Sueyasu Y, Iwanaga T, Aizawa H, Nagatake T, **Oishi K**. Additive effect of pneumococcal vaccine and influenza vaccine on acute exacerbation in patients with chronic lung disease. *Vaccine* 26:4284-4289, 2008
- 2) Chen M, Ssali F, Mulungi M, Awio P, Yoshimine H, Kuroki R, Furumoto A, Tanimura S, Kityo C, Nagatake T, Mugenyi P, **Oishi K**. Induction of opsonophagocytic killing activity with pneumococcal conjugate vaccine in human immunodeficiency virus-infected Ugandan adults. *Vaccine* 26:4962-4968, 2008
- 3) Watanabe H, Asoh N, Kobayashi S, Watanabe K, **Oishi K**, Kositsakulchai W, Sanchai T, Khantawa B, Tharavichitkul P, Sirisanthana T, Nagatake T. Clinical and microbiological characteristics of community-acquired pneumonia among HIV-infected patients in northern Thailand. *J Infect Chemother*. 14: 105-109, 2008
- 4) Gotoh K, Qin L, Watanabe K, Anh DD,

Huong PLT, Anh NTH, Cat NDL, Ha LL, Ai LTT, Tien NM, Minh TT, Oishi K, Watanabe H. Prevalence of *Haemophilus influenzae* with resistant genes isolated from young children with acute lower respiratory tract infections in Nha Trang, Vietnam. J Infect Chemother. 14:349-353, 2008

5) 大石和徳. 医学と医療の最前線 肺炎球菌ワクチン—5年後の再接種の是非—. 日本内科学会雑誌. 97:836-841, 2008

6) 大石和徳. 細菌ワクチンの現状. Medical Science Digest.34: 444-447,2008

## 2. 学会発表

1) 大間敬太, 大石和徳:Flt3 プラスミドを用いた PspA 経鼻粘膜免疫の肺炎予防効果. 第 82 回日本感染症学会総会, 島根, 2008 年 4 月 17-18 日.

2) 内田隆一, Kerdsin Anusak, 川上和義, 大石和徳:SYBER Green Triplex Real Time PCR による呼吸器マイコプラズマ, クラミジア, レジオネラ感染の診断. 第 82 回日本感染症学会総会, 島根, 2008 年 4 月 17-18 日.

3) 大石和徳. :日本とアジアにおける新興感染症の状況と対策. 第 82 回日本感染症学会総会, 島根, 2008 年 4 月 17-18 日.

4) 坂東園子, 大石和徳. ;ウガンダ成人にお

ける肺炎球菌コンジュゲートワクチンの免疫原性:血清特異的 IgG のオプソニン活性の意義. 日本ワクチン学会,熊本, 2008 年 11 月 8-9 日.

5) 川上健司, 大日康史, 大石和徳. :65 歳以上の成人における肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの併用効果に関する検討. 日本ワクチン学会,熊本, 2008 年 11 月 8-9 日.

6) 大間敬太, 趙 吉子, 大石和徳. :PspA に対する TLR ligand の粘膜アジュバント効果の比較. 日本化学療法学会西日本支部総会,広島,2008 年 12 月 6-7 日.

7) 趙 吉子, 大石和徳. タイにおけるヒト由来ブタ連鎖球菌(*Streptococcus suis*)の分子疫学的検討, 日本臨床微生物学会総会,仙台,2009 年 1 月.

8) Oma K, Zhao J, Oishi K. Comparative analysis on mucosal adjuvancity of TLR ligands against PspA. 108 th General Meeting, American Society for Microbiology. June, 2008, Boston, USA.

9) Uchida R, Oishi K, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Tanaka Y, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Clinical and microbiological studies on pediatric pneumonia in Bangkok. Forum of the Network of Research Centers on Infectious Diseases, Hanoi, Vietnam.



Oct 6, 2008

10) Uchida R, **Oishi K**, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Tanaka Y, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Evaluation of correlation among bacterial carriage in nasopharynx, socioeconomics, and pediatric pneumonia: an interim report of case control study in Bangkok. The 13th Congress of Asia Pacific Society of Respiriology, Bangkok, Thailand. Nov 21, 2008

11) Uchida R, **Oishi K**, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Verathamjamras C, Puangpatra P, Kawakami K, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Dejsirilert S. Evaluation of nasopharyngeal Pneumococcus for etiology of pediatric pneumonia. the 1st National Pneumococcus Symposium, Bangkok, Thailand. Nov 26, 2008

12) Puangpatra P, Uchida R, **Oishi K**, Tanaka Y, Puntanakul P, Lochindarat S, Bunnag T, Kawakami K, Verathamjamras C, Kerdsin A, Sawanpanyalert P, Surang Dejsirilert. Risk factors for nasopharyngeal Pneumococcal colonization and pneumonia in children. the 1st National Pneumococcus Symposium, Bangkok, Thailand. Nov 26, 2008

13) Surang D, Kerdsin A, Sripakdee S,

Polwichai P, Nakamura S, Uchida R, Sawanpanyalert P, **Oishi K**. Characterization of *Streptococcus suis* strains isolated from clinical specimens in Thailand. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections, Sapporo, Japan. Dec 15-16, 2008.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他: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

研究分担課題名: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

### *S. pyogenes* におけるバイオフィーム形成の検討

研究分担者:渡邊治雄 国立感染症研究所 副所長  
研究協力者:泉福英信 国立感染症研究所細菌第一部・室長  
研究協力者:池辺忠義 国立感染症研究所細菌第一部・主任研究官  
研究協力者:河原井武人 国立感染症研究所細菌第一部・協力研究員

#### 研究要旨

劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症に関わる *Streptococcus pyogenes* のバイオフィー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。そこで本研究では、*S. pyogenes* の臨床分離株を用いて、バイオフィー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ー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、*S. pyogenes* のバイオフィー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ー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ームを形成する。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ーム形成実験を行った。K33 $\Delta$ *csrS* 株は、wild 株よりもバイオフィーム形成が低下した。K33 $\Delta$ *csrR* 株は、K33 $\Delta$ *csrS* 株よりも顕著にバイオフィーム形成が低下した。しかし、血清を加えた培地では、K33 $\Delta$ *csrR* 株の著しいバイオフィーム形成の低下が認められるものの、若干のバイオフィー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ーム形成に関与している可能性が考えられた。これらの作用は、培地の違いや serum 添加など、栄養分の違いに影響を受けることも考えられた。

#### A. 研究目的

一般的に劇症型溶血性レンサ球菌感染症は A 群に分類される *Streptococcus*

*pyogenes* によって発症することが多く、本菌により咽頭炎、敗血症、壊死性筋膜炎、播種性血管内凝固症候群(DIC)、ショック、多

臓器不全などの全身感染症が励起され、症状は急速に進行し、死亡に至ることも多々ある。

この *S. pyogenes* 感染症におけるバイオフィルム形成の意義および形成に関わる分子および遺伝子等は、近年注目され研究されているが明確になっていない。以前に CsrRS 2 成分制御系のセンサーキナーゼの欠損変異体を作成するとバイオフィルム形成が低下することが報告された(Heath et al., Infect Immun 67: 5298-5305, 1999)。その変異体は、病原性に関わる莢膜やタンパク質分解酵素などが過剰に産生されるなど劇症型 A 群レンサ球菌の特徴が見られるが、その一方でバイオフィルム形成に関わる adhesin も過剰産生される。Adhesin の一つである M たんぱく質は、この変異体で過剰に産生されないという報告もあるが他の adhesin とバイオフィルム形成への関わりは明らかになっていない。もしも、莢膜と同時に Adhesin も過剰産生されれば、バイオフィルム形成の莢膜による阻害に何か影響を与えるかもしれない。そこで、*S. pyogenes* の中で fibronectin や collagen と結合する adhesin を有する株を用いて CsrRS 2 成分制御系のセンサーキナーゼの変異体を作製し、fibronectin や collagen との結合を介する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 年度に行った研究では、

fibronectin への結合を介してバイオフィルムを形成する膿由来株である 1566 株の *csrS* 変異株が wild 株と比較し、バイオフィルム形成の低下することが明らかとなった。これは、*csrRS* による莢膜の制御が、*S. pyogenes* のバイオフィルム形成に関与している可能性を示している。

そこで本年度は、1566 株とは特徴が異なる K33 株(咽頭炎由来、type 1 collagen への結合を介してバイオフィルムを形成する)の *csrRS* の変異株を作製して、CsrRS 2 成分制御系のセンサーキナーゼ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。

研究期間:平成 20 年 4 月 1 日から平成 21 年 3 月 31 日まで

## B. 研究方法

### 1) 使用菌株

*S. pyogenes* K33 (1994 年臨床分離株:咽頭炎由来、ファージ保持)

*S. pyogenes* K33Δ*csrS* (Spc<sup>r</sup>, K33 の *csrS* 変異株)

*S. pyogenes* K33Δ*csrR* (インフレーション欠損、K33 の *csrR* 変異株)

*csrS*, *csrR*:CsrRS 二成分制御系のセンサーキナーゼをコードする。本システムは、莢膜産生や毒性因子発現を制御している。本

遺伝子の欠損株は莢膜や毒性因子生産が増加する(Heath A, *et al.*, (1999) *Infect. Immun.*, 67:5298-5305)。

## 2) *S. pyogenes* のバイオフィーム形成実験

96穴マイクロタイタープレートにフィルター滅菌した type 1 collagen 50 µg/ml を 50µl 入れる。37°C, 30 分間処理し PBS にて2回洗浄する。菌株を BHI broth, 37°C, 一晚, 前培養を行い, PBS にて洗浄後, 菌液を PBS にて  $A_{550}=0.5$  に調整する。180µl の BHI, TSB without dextrose, TSB without dextrose with 0.25% sucrose か TSB without dextrose with 0.25% sucrose and 1% sucrose にそれぞれ 20 µl の菌液を 96 穴プレート入れ, 37度 5%CO<sub>2</sub> 下で培養する。37°C, 16 時間培養し, 菌浮遊液を捨てる。PBS にて2回洗浄後, 乾燥, 0.25%サフラニンで染色する。DW にて洗浄, 乾燥後, 492 nm の吸光値を測定することでバイオフィーム形成量を評価する。

## C. 研究結果

1) *S. pyogenes* K33 株, K33Δ*csrS* 株および K33Δ*csrR* 株のバイオフィーム形成に及ぼす培地および type 1 collagen コートの影響(Fig. 1)

・BHI 培地を用いて培養すると, なにもコートしていない場合, K33 株は OD=0.2 程度の

弱いバイオフィーム形成を示した。一方, K33Δ*csrS* のバイオフィーム形成は, K33 株よりも若干の低下が認められた。K33Δ*csrR* 株は, さらにバイオフィーム形成が wild 株よりも有意に低下し, 菌を接種していない negative control と同程度のバイオフィーム形成量であった。Type 1 collagen をコートしてもその傾向は大きく変化しなかった。しかし TSB without dextrose 培地で培養すると, type 1 collagen をコートした場合, K33 のバイオフィーム形成が OD=0.5 程度にまで著しく上昇した。K33Δ*csrS* 株のバイオフィーム形成は, wild 株の半分程度まで低下した。K33Δ*csrR* 株は, さらにバイオフィーム形成が wild 株や K33Δ*csrS* 株よりも有意に低下し negative control のバイオフィーム形成量に近づいた。

2) *S. pyogenes* K33 株, K33Δ*csrS* 株および K33Δ*csrR* 株のバイオフィーム形成に及ぼす培地への sucrose および serum 添加の影響(Fig. 2)

・TSB without dextrose に 0.125% sucrose を加えた培地を用いてバイオフィーム形成実験を行うと, なにもコートしていない場合において, K33 株は BHI 培地で培養した時と同様に OD=0.2 程度のバイオフィームを形成した。K33Δ*csrS* のバイオフィーム形成