

200931002A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 砂川 慶介

平成 22(2010) 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. Real-time PCR による化膿性髄膜炎を含む無菌検査材料の原因菌の
迅速検索 9
生方 公子, 坂田 宏, 岩田 敏
2. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*(SDSE)の全ゲノム解析 17
生方 公子, 秋山 徹, 村山 琮明, 砂川 慶介
3. 小児の血液・髄液から分離された *Streptococcus pneumoniae* の血清型,
薬剤感受性および耐性遺伝子に関する研究 24
坂田 宏
4. 新型インフルエンザウイルス A(H1N1)感染後の肺炎球菌, レンサ球菌による
続発感染に関する臨床的検討 27
岩田 敏
5. 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
その診断・治療法に関する研究 35
藤島清太郎
6. B 群レンサ球菌を含む β 溶血性レンサ球菌による重症感染症の難治性因子の
解析と適切な診断・治療を目指したマネジメント向上に関する研究 38
吉田 敦
7. *Streptococcus suis* 感染症の病態とその診断・治療法に関する研究 47
大石 和徳
8. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の細菌学的解析および重症化に係る
病原因子に関する研究 51
渡辺 治雄, 池辺 忠義

9. 劇症型溶連菌感染発症における宿主因子の解析	55
阿戸 学, 池辺 忠義, 松村 隆之	
10. 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	59
松井 英則	
11. 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	69
秋山 徹	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	73

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 「侵襲性重症感染症の中のレンサ球菌感染症(肺炎レンサ球菌含む)」について、H21 年度は過去 2 年間に行なった研究事業の総まとめとして、菌の分子疫学と宿主因子の解析成果、ならびに動物実験を含む成果等について論文文化し公表した。さらにそれらの成果のうち、 β 溶血性レンサ球菌感染症および肺炎球菌感染症の実態について関連学会との共催セミナーを開催し、医療関係者に対して幅広い啓発活動を行なった。

それぞれの研究分担者が担当した研究事業の成果は以下のとおりである。

- 1) 侵襲性感染症の迅速診断を目的として、多くの医療機関と協力し、検査材料採取から 2 時間以内に菌種が推定できる real-time PCR 法を構築した (生方, 坂田, 岩田共同研究)。
- 2) ヒト劇症型由来の SDSE 株(RE378 株)とブタ由来株(L1 株)の全ゲノム解析を行った。さらにそれらと GAS, GBS などのレンサ球菌の病原遺伝子との違いを明らかにした (生方, 秋山)。
- 3) 小児侵襲性感染症(敗血症と化膿性髄膜炎)由来の *Streptococcus pneumoniae* について、ワクチン接種の基盤となる莢膜型や薬剤耐性遺伝子について検討した(坂田)。
- 4) 新型インフルエンザウイルスに罹患し、入院となった小児について、ウイルスと細菌を網羅的に検索し、続発感染としての肺炎球菌の重要性と抗菌薬使用状況を明らかにした (岩田)。
- 5) 救命救急受診例におけるレンサ球菌感染症を解析し、その病態的特徴を明らかにした (藤島)。
- 6) 自施設における重篤な β 溶血性レンサ球菌感染症例の解析から、診断と治療のマネジメント向上を目指す指針案を作成した(吉田)。
- 7) 本邦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、疾患の多いタイでの実態と疫学情報収集を行なった(大石)。
- 8) GAS の病原性発揮に関わる *rgg* 遺伝子を新たに見いだし、この変異が劇症型レンサ球菌感染症患者分離株において、どの程度の頻度で存在するのか解析した(渡邊, 池辺)。
- 9) GAS 劇症型感染時においては、血清中サイトカイン濃度のうち、死亡例ではインターフェロン γ とインターロイキン 6 が高濃度になっていることを明らかにした(阿戸)。
- 10) ヒト上皮細胞に存在する菌レセプターの 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。病態解析等に有用であることを明らかにした (松井)。
- 11) SDSE 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た。この系においては SDSE に対する感受性が明らかに上昇しており、解析モデルとして有用であ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) 坂田 宏 旭川厚生病院小児科 主任部長
- 3) 岩田 敏 (独)国立病院機構東京医療センター 統括診療部長
- 4) 藤島清太郎 慶應義塾大学医学部救急医学 准教授
- 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 所長
- 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

我が国では、急速な少子・高齢化社会を迎え、市中で発生する重症細菌感染症も変貌しつつある。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、すなわちA群溶血性レンサ球菌(GAS)、B群溶血性レンサ球菌(GBS)、C、G群溶血性レンサ球菌(SDSE)、そして肺炎レンサ球菌(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。本研究班は当該感染症の社会的重要性に着目し、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、その成果を医療行政へ反映させることを目的に企画・組織されたものである。

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C、G群レンサ球菌(正式菌種名: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, SDSE)の全ゲノム解析を行い、GASやGBSの病原遺伝子との違いを明らかにする。
4. 臨床で使用可能な原因菌の迅速診断法を構築し、発症予防対策と迅速診断に役立つ。
5. 補助療法も含めた発症例に対する適切な抗菌薬療法を確立する。
6. 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. 研究方法

- ・ 上記研究事業遂行のため、本研究班は基礎系研究者5名、疫学系研究者2名、臨床系研究者4名、合計12名(研究代表者1名と研究分担者11名)を中心に、多くの研究者の協力を得て実行された。
- ・ 基礎研究においては、ヒト劇症型由来のSDSEの全ゲノム解析を行うと同時に、ブタ由来のSDSEのゲノム解析も行い、それらの病原遺伝子をヒト由来のGAS、GBS等のデータと詳細に比較、ヒト由来株の病原遺伝子を世界に先駆けて明らかにすることとした。
- ・ GASとSDSEの動物モデルの構築については、ヒトCD46レセプターを持つtransgenicマウスを用いた病態解析、SDSEでは糖尿病誘発マウスモデルを用いて病態解析を行うこととした。
- ・ GASによる劇症型感染症の病態を明らかにするため、当該患者の血清中各種サイトカイン濃度を測定し、予後との関連を明らかにすることにした。

(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、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ている。

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. 研究結果と D.各研究の結論

平成 21 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、その概要は以下のとおりである。

1. 疫学 (肺炎球菌)

2005 年 11 月から 2009 年 10 月までの 4 年間に、北海道内の協力施設で診療した小児の血液または髄液から分離された 42 株について、血清型、耐性遺伝子、主な注射用抗菌薬に対する最小発育阻止濃度(MIC)と最小殺菌濃度(MBC)を検討した。血清型は 6B, 19F, 23F が主流であった。肺炎球菌の 7 価コンジュゲートワクチン(PCV7)に含まれる株は 75.6%であった。遺伝子変異からみた耐性菌の割合は、gPRSP が 52.4%と多く、次いで、gPISP が 36.7%, gPSSP は 11.9%に過ぎなかった。抗菌力は panipenem(PAPM)が最も優れ、かつ殺菌性も優れていた。次いで、meropenem (MEPM), vancomycin(VCM), ceftriaxone (CTRX), cefotaxime(CTX), ampicillin(ABPC)の順であった。

岩田らは、2009 年 7 月から 2010 年 1 月の間に新型インフルエンザウイルス A (H1N1) (pdmV)に罹患し、独立行政法人国立病院機

構東京医療センター小児科に入院となった 46 例について後方視的に解析を行った。pdmV 感染の診断は、上咽頭拭い液を用いた real-time PCR で行なわれた。入院数は 2009 年 10 月にピークとなり、それ以降急速に減少した。男児(73.9%)が女児(26.1%)に比べて多かった。6 歳以上の学童が大半を占め、年齢の中央値は 7 歳であった。最終診断名は、肺炎が 42 例 (91.3%), 気管支炎が 3 例 (6.5%), 上気道炎が 1 例 (2.2%)であった。入院までの病日は 3 日であった。気管支喘息の既往歴のある児が 14 例 (30.4%)と多かった。初診時の臨床症状は、発熱 97.8%, (咳, 鼻汁などの)上気道症状 87.0%, (腹痛, 下痢, 嘔吐などの)消化器症状を 13.0%に認めた。血液検査所見では、いずれの年齢層でもリンパ球数は明らかに低かった。抗インフルエンザ薬はその大半(95.6%)に発症から 48 時間以内に投与されていた。重症群と軽症・中等症群を比較すると、前者では後者に比して次の項目で差が認められた: i)年齢が低かった, ii)気管支喘息の既往例が多かった, iii)白血球数, 好中球数, および LDH 値が高かった, iv)解熱までの期間と入院期間が長かった, 等である。

細菌学的には重症群に肺炎球菌保菌例を有意に多く認めた。しかし、抗菌薬が入院時から使用され、そのため細菌による続発感染は 1 例も認めなかった。

2. 疫学 (β 溶血レンサ球菌)

藤島らは、主要な β 溶血レンサ球菌感染症の臨床像を明らかにするために 2 つの後ろ向き調査を行った。まず、レンサ球菌属の分離頻度を明らかにするため、2007 年から 2 年間の調査を行ったところ、血液培養実施患者 605 人中 13.4%が陽性で、グラム陽性球菌を 4.6%, レンサ球菌属を 3.3%から検出していた。

続く GAS, GBS, SDSE に限定した 12 年間の調査では、GAS 19 人, GBS 9 人, SDSE 27 人を見だし、基礎疾患保有率は GAS と SDSE

が各々 84%, 96%と高かった。感染巣としては骨・軟部組織が大多数を占め、STSS発症は GASとSDSEがともに11%であり、STSSの臓器症状としてはGAS, SDSEとも凝固障害を最も高率に認めた。SDSEについては、STSS発症のリスクが余り認識されておらず、今後社会への啓蒙が必要と考えられた。また、菌の病原性に関わるMタンパクをコードする*emm* 遺伝子型と臨床症状、予後が関連していることも疑われ、今後さらに疫学的ならびに病態学的な検討を進めるべきと結論された。

吉田らは、1999年9月から2009年9月までのおよそ10年間に経験したβ溶血性レンサ球菌菌血症・敗血症例 {B群レンサ球菌 (GBS) 27例, A群レンサ球菌 (GAS) 6例, C, G群レンサ球菌 (SDSE) 29例} の臨床的特徴、施行された治療、ならびに予後、その菌株の分子疫学的指標を縦断的に解析した。

GBSによる菌血症・敗血症例は、成人で2007年以降、SDSEのそれは2005年以降に増加がみられた。近年のGBS株では感染性心内膜炎や縦隔炎、髄膜炎、腸腰筋・陰嚢・肛門周囲膿瘍など、合併病変が重症である例が増加するとともに、莢膜型III, V, VIである場合が目立った。また症状が非特異的であることや、侵入門戸によって症状が多彩であることが診断を難しくし、治療開始を遅らせる大きな要因であることを明らかにした。GBS, GAS, SDSEによる臨床像はそれぞれ異なっており、あらかじめそれらの特徴を把握しておくことが、的確な診断と治療を容易にする有力な手段であると結論された。加えて、感染症専門医が早い段階でアドバイスできるシステムの構築が、マネジメントの質を向上させると結論された。

2. 疫学 (ブタレンサ球菌 : *S. suis*)

大石らは、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) 177株を分離同定し、そのうち165株

(91.7%)が SS serotype 2 (SS2), 12株(8.3%)は SS serotype 14(SS14)であった。これらの原因菌培養陽性症例の調査から、その臨床像、予後、および原因菌のゲノタイプとの関連について検討を加えた。SS2 165株の ST では、ST1 (n=103), ST104(n=42)の順に多く分布し、発症のピークは6月-8月の雨期にあった。SS2 感染症 158症例の平均年齢は55歳、男性が72.8%であった。致命率は9.5%と高率であった。臨床像の大半(59.8%)が髄膜炎であり、34.8%が局所所見を欠く菌血症であった。生豚肉の摂食は32.9%、併存症としてアルコール多飲者が20.9%と多かった。また、SS2株の sequence typing (ST), 病原性遺伝子プロファイル, 89K pathogenicity island (PAI)の有無も、有意な死亡のリスク因子ではなかった。一方、SS14感染症は、全体の6.8%を占め、その臨床像はSS2のそれと同等であり、致命例は認められなかった。

3. ゲノム解析

生方と秋山らは、ヒト劇症型感染症由来のβ溶血性レンサ球菌の1種である *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) RE378株とブタ由来L1株について全ゲノム解析を行い、GASやGBS等の保持する病原遺伝子との比較を行なった。SDSEはGASが保持する多くの病原遺伝子を保持していた。しかし、スーパー抗原に関わる一部の遺伝子は保持していなかった。GBSの一部の病原遺伝子はSDSEと共通であったが、菌全体で比較した遺伝子の相同性は低かった。解析の結果は、本来動物に由来するSDSEが、ヒト生体内においてGASやその他のレンサ球菌との間に遺伝子の水平伝播を生じ、今日のGASに近いヒトに特有のSDSE株が形成されたものと推定された。このため、SDSEはGASよりは病原性は低いものの、病原性に関わるGAS特有の多くの遺伝子を保持することが、ヒトにおいて

SDSE が GAS 感染症に近い病態を示すことに繋がっていると推察された。

4. 病原性発揮に関わる GAS の遺伝子解析

池辺らは、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 *csrS/csrR* 遺伝子特異的な変異があり、この変異によって病原性因子の発現が上昇し、劇症型感染症を引き起こされるのではないかとすることを前年度の研究において示唆した。本年度は、この *csrS/csrR* 遺伝子とは別に見出された *rgg* 遺伝子の変異が、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、各 *emm* 型の GAS 株でどの程度の割合で存在するのかを調べるため、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株および咽頭炎等の非劇症型感染症由来株の *csrS/csrR* 遺伝子および *rgg* 遺伝子の各 *emm* 遺伝子型の変異の割合を調べた。その結果、各 *emm* 遺伝子型でそれぞれの変異がみられ、全ての *emm* 遺伝子型で変異がみられることが明らかにされた。

5. 宿主側要因解析

阿戸らは、劇症型溶血性レンサ球菌感染症において、病態における宿主因子の役割を探索する目的で、劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者血清のサイトカイン濃度を解析した。その結果、死亡例で生存例に較べてインターフェロン γ とインターロイキン 6 がより高い濃度で認められた。また、主要な起因菌である GAS 劇症感染患者分離株を用いた劇症型感染動物モデルにおいても、同様のサイトカイン産生パターンが、劇症型分離株の致死的感染群に認められた。重篤な劇症型 GAS 感染で発現されるサイトカインが明らかとなり、今後、その役割を評価することにより、診断および治療に対する応用が期待される。

6. 動物モデルによる GAS の病態モデル解析

松井らは、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 GAS 感染症 (STSS) の血液から分離された血清型 M1 の GAS472 株を hCD46Tg マウスの後肢足蹠部 (footpad) へ 1×10^7 CFU 投与すると、敗血症 (sepsis) を生じ、播種性血管内凝固症候群 (DIC) 及び多臓器不全 (MOF) により投与後 7 日以内に全ての hCD46Tg マウスは死亡した。感染局所では、横紋筋融解症を伴った重篤な壊死性筋膜炎の発症が認められた。さらには皮膚及び軟部組織壊死のみならず大腿骨の壊死が観察された。また、感染初期に肥満細胞の脱顆粒現象およびマクロファージによる壊死細胞の貪食が観察された。そこで、肥満細胞の感染防御作用を解析するため、肥満細胞欠損マウスとその対象マウスの footpad へ GAS472 を投与し、病態を比較した。肥満細胞欠損マウスは対象マウスに比較して、感染 72 時間後において感染局所の重症化が観察された。さらに、膝下リンパ節脾臓、肝臓における感染菌数が有意に多く検出された。次に、hCD46Tg マウスの肥満細胞を移入した肥満細胞欠損マウスと non-Tg マウスの肥満細胞を移入した肥満細胞欠損マウスの footpad へ GAS472 を投与し、致死性を比較したが、両マウスにおける生存曲線に顕著な差は認められなかった。従って、ヒト CD46 は、肥満細胞の感染防御に関与しないと考えられた。一方、GAS472 は、各種遺伝子の発現調節因子である *csrRS* 遺伝子の変異が無いにもかかわらず、hCD46 依存的にストレプトリジン S の高発現が認められた。従って、hCD46Tg マウスにおける劇症型レンサ球菌感染症の発症には菌の溶血活性が関与していることが推定できた。

7. 動物モデルによる GAS の病態モデル解析

秋山らは、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 SDSE の感染症のマウスモデルを用いた分子レベルでの研究を行った。同菌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たので、昨年度までに、1型および2型の糖尿病マウスと非糖尿病対照マウスで同菌に対する感受性を比較し、両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、SDSE 感受性が増加していることが明らかにしている。本年度はこれらのマウスを利用して、SDSE 感染時の糖尿病マウスでの宿主側因子発現変化の網羅解析を行った。その結果、糖尿病マウスは SDSE 感染時に、対照非糖尿病マウスと比較して、また対照菌である黄色ブドウ球菌を投与した場合と比較して、強い炎症性応答が惹起され、逆に自然免疫応答や獲得免疫応答性が低いことが明らかとなった。以上の結果は糖尿病時の SDSE 感染劇症化の宿主側分子基盤を反映すると考えられる。

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。

8. 啓発活動

再び急速に増加している侵襲性感染症のβ溶血レンサ球菌感染症と肺炎球菌感染症についての啓発活動のため、関連学会と下記の共催シンポジウムを開催した。

I. 日本感染症学会東日本地方会・日本化学療法学会東日本支部総会

タイトル：

再び問題化しつつある侵襲性レンサ球菌感染症 —その社会的背景、基礎、および臨床像—

開催日：2009年10月30日(金)

東京(東京ドームホテル)

座長：砂川 慶介

(北里大学北里生命科学研究所)

渡邊 治雄(国立感染症研究所)

1. β溶血性レンサ球菌の分子疫学(15分)

生方 公子

(北里大学北里生命科学研究所)

2. ゲノム解析からみた *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の病原性(15分)

秋山 徹

(国立国際医療センター感染制御研究部)

3. 劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる宿主要因の解明(15分)

阿戸 学

(国立感染症研究所免疫部)

4. 小児における侵襲性β溶血性レンサ球菌感染症(15分)

坂田 宏

(JA 北海道厚生連旭川厚生病院小児科)

5. 内科領域で経験するβ溶血性レンサ球菌感染症とその治療法(15分)

吉田 敦

(獨協医科大学病院感染総合対策部)

6. ブタレンサ球菌感染症の病態(15分)

大石 和徳

(大阪大学微生物病研究所感染症国際研究センター)

発表後30分の討論を行なった。

II. 第21回日本臨床微生物学会総会

タイトル：

世界的にクローズアップされつつある侵襲性レンサ球菌感染症

—その社会的背景から基礎、および臨床まで—

開催日：2010年1月30日(土)

東京(東京ドームホテル)

座長：砂川 慶介

(北里大学北里生命科学研究所)

藤島清太郎

(慶應義塾大学病院救急医学)

1. β 溶血性レンサ球菌の分子疫学(15分)

生方 公子

(北里大学北里生命科学研究所)

2. ゲノム解析からみた *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の病原性(15分)

村山 琮明

(北里大学北里生命科学研究所)

3. 劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる病原因子の解明(15分)

池辺 忠義

(国立感染症研究所 細菌第一部)

4. 小児における GBS 感染症の迅速診断法と最適な治療法の確立(15分)

佐藤 吉壮

(富士重工業総合太田病院小児科)

5. 救急部で経験する成人の β 溶血性レンサ球菌感染症(15分)

藤島清太郎

(慶應義塾大学病院救急医学)

6. β 溶血性レンサ球菌感染症に対する検査室の対応(10分)

矢越美智子

(日大医学部附属板橋病院臨床検査部)

発表後、35分の討論を行なった。

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疫学解析を3年間継続して行い、最終年度にそれらの成績を学会との共催セミナーを開催して広く啓発活動を行なったことは、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を医療関係者に理解していただけたと考える。

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重篤な病態の死亡例が多いことは、菌の病原性の強さも反映

するものの、宿主側の高齢化に伴う免疫能の低下や基礎疾患保有率の上昇が根底にあり、加えて発症後の受診のタイミングや臨床側にも急速に進行するこれら感染症の認識がなく、初期に適切な治療薬が選択されていないなどといった問題が、極めて複合的に関与していることが明らかにできたと考える。

その他に重症感染症例の平素無菌的な検査材料、すなわち髄液、血液、あるいは胸水、関節液などから、2時間で原因細菌を網羅的に検索できる real-time PCR 法を確立したことは、今後医療の現場に大きく貢献できると考える。

また、あらたな菌種である SDSE(劇症例由来)の全ゲノムを2株解析できたことは、その病原遺伝子を GAS や GBS あるいは動物のそれと比較することによって、ヒトにおける感染症の病態を理解するのに大いに役立つと結論された。

さらにはその他の基礎実験やあらたに構築されたマウス動物モデルは、菌側の病原性の強弱や宿主側の防御メカニズムを明らかにしたものと考える。

米国 CDC の研究グループによっても、本研究事業と同時期に β 溶血性レンサ球菌、特に SDSE の大規模疫学調査が行なわれており、世界的に市中感染症の原因菌が β 溶血レンサ球菌や肺炎球菌へとシフトしてきていることは事実である。

これらの現状を広く公表し、関連学会の協力を得て、今後「診断と治療に関するガイドライン」を作成し、医療行政へ貢献したいと考える。

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. 論文発表

- 1) 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.*, 2009; 15: 92-98.
- 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.*, 2009; 53: 2650-2653.
- 3) 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.*, 2010;138:61-68.
- 4) **Matsui H**, Sekiya Y, Nakamura M, Murayama SY, Yoshida H, Takahashi T, Imanishi K, Tsuchimoto K, Uchiyama T, **Sunakawa K.** and Ubukata K. CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection. *Infect Immun.*, 2009; 11: 4806-4814.
- 5) 村山琮明, 関 千鶴子, 坂田 宏, 岩田 敏, **砂川慶介**, 生方公子: Real-time PCR 法による *Streptococcus agalactiae* の迅速診断法の確立. 日本感染症学会総会, 2009 年 4 月 23 日
- 6) 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 岸井こずゑ, 砂押克彦, **砂川慶介**, 生方公子: 小児および成人の侵襲性感染症例由来肺炎球菌の莢膜型と薬剤感受性. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月 23 日
- 7) 松井英則, 高橋哲史, 村山琮明, **砂川慶介**, 生方 公子: ヒト CD46 発現マウスを用いた実験的劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症の解析. 日本感染症学会総会, 2009 年 4 月 24 日
- 8) 山口貞夫, 花木秀明, 佐藤吉壮, 生方公子, **砂川慶介**: メロペネムおよびセフトリアキソンの併用が奏効した咽後膿瘍の小児例. 第 83 回日本感染症学会総会, 2009 年 4 月 24 日
- 9) Murayama S.Y., K. Sunaoshi, T. Miyoshi-Akiyama, Y. Shimomura, T. Kirikae, K. Ubukata, **K. Sunakawa**: Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain RE378 isolated from patient with invasive infection. American Society for Microbiology, 109th General Meeting, Philadelphia, USA, 2009.05.17-21
- 10) Ubukata K, Takahashi T, Sunaoshi K, Fujishima S, Watanabe H, **Sunakawa K.** and the Invasive Streptococcal Disease Working Group. Clinical aspects of invasive infections caused by *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (Group G Streptococci) in Japan. 49th ICAAC, San Francisco, 2009 (L1-1681)

2. 学会発表

- 1) 岡田隆文, 諸角美由紀, 松原啓太, 岩田敏, 千葉菜穂子, 岸井こずゑ, **砂川慶介**, 生方公子, ARD 研究会: 小児市中肺炎に対する Real-time PCR 法を用いた細菌とウイルスの網羅的検索. 第 83 回日本感染症学

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

Real-time PCRによる化膿性髄膜炎を含む無菌検査材料の原因菌の迅速検索

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

研究協力者 千葉菜穂子 北里大学大学院感染制御科学府 博士課程3年

研究要旨 細菌性髄膜炎を含む市中型重症感染症では、その診断がいかに迅速で正確になされ、その結果として推定原因菌に対する有効な抗菌薬が *timely* に使用されるかが重要である。本研究では、肺炎球菌、インフルエンザ菌(Hib)、および髄膜炎菌に加え、新生児の化膿性髄膜炎の原因菌として多い *E. coli* や *S. agalactiae*(GBS)、その他に黄色ブドウ球菌、リステリア菌、マイコプラズマも同時に検索できる *real-time PCR* 法を構築した。新規に構築された5菌種の *primer* と *probe* の目的遺伝子は、リステリア菌、*E. coli* と髄膜炎菌が 16S rRNA、GBS が *dltS*、黄色ブドウ球菌は *spa* とした。目的菌の反応チューブあたりの検出限界(感度)は、 1.3×10^0 CFU- 6.5×10^1 CFUであった。また、非特異の陽性反応は認められなかった。原因菌の確定率は、培養では全体の48.2%($n=81$)であったのに比べ、*real-time PCR* では72.0%($n=121$)で原因菌を推定することができた。*Real-time PCR* による原因菌の推定率は、抗菌薬の前投与があった場合($\chi^2=10.629$, $P<0.01$)、あるいは抗菌薬の投与がなかった場合($\chi^2=5.736$, $P<0.05$)のいずれにおいても培養に比べ有意に優れていた。化膿性髄膜炎のみならず、侵襲性重症感染症に対しても、ここで述べた *real-time PCR* による診断が期待される。

A. 研究目的

細菌性髄膜炎を含む侵襲性感染症は、幼児期や成人における重篤で時に致命的な感染症である。その主たる主な病原菌は、肺炎球菌、インフルエンザ菌(Hib)、および髄膜炎菌であるが、その発生頻度や菌種は、社会的背景の違いによりそれぞれの国によって様々である。すなわち、ワクチン接種の有無や医療保険制度、あるいは衛生事情が色濃く反映される。

欧米先進国では、1987年のHib vaccineの導入に加え、200-2001年に肺炎球菌に対する7価コンジュゲートワクチン(7PCV)の接種開始によって、髄膜炎例は劇的に減少し、侵

襲性肺炎球菌感染症例も減少していると報告されている。

一方、日本においては、これらのワクチンが任意接種で認可されたばかりであり、そのため、重症感染症は依然として減少してはいない。しかも、これら細菌では抗菌薬に対する耐性菌が増加し治療上の問題となっている。このような状況から、適切な抗菌薬の選択のためには、病原菌の迅速検索法の確立が急務である。

このような背景から、本研究事業においては、新生児・乳児の髄膜炎や敗血症、あるいは肺炎の起炎菌となる得る *E. coli* や *S. agalactiae*(GBS)、あるいは *Staphylococcus*

aureus を同時に検索できる real-time PCR 法を構築することを目的とした。また、高齢者由来の検査材料にも応用できることを考慮した。

B. 材料と方法

1. 臨床検査材料

臨床症状、CSF 検査結果、血液検査結果を元に髄膜炎が疑われた症例から採取され、担当医より検査の依頼を受けた CSF サンプルは総計 168 であった。当方への検査依頼時には、担当医によって患者の両親あるいは家族にインフォームドコンセントがなされている旨の依頼状が検体に同封されてきた。

2. DNA 抽出と細菌培養

サンプルは、融解後にただちに 4°C, 10,000 rpm, 10 分間の遠心を行い、上清は別の滅菌チューブへ移し、沈渣を 150 μ l とした。沈渣 10 μ l ずつは血液寒天培地などに塗布し培養した。残りの沈渣 100 μ l から、直ちに Extragen II kit を用いて DNA を抽出した。DNA 抽出に要する時間は 15 分である。

3. 細菌検索用 Real-time PCR

real-time PCR の対象とした菌種は、*E. coli*, リステリア菌, 髄膜炎菌, GBS, 黄色ブドウ球菌, 肺炎球菌, インフルエンザ菌, およびマイコプラズマである。

上記 8 菌種の検索には primer と MB probe を設計して使用した。8 菌種は 2 菌種ずつに組み合わせられ、4 チューブで同時に検索した。それらの組み合わせは、A チューブが肺炎球菌(a)とインフルエンザ菌 (b), B チューブは *E. coli* (a) と GBS (b), C チューブは髄膜炎菌 (a) とリステリア菌(b), D チューブは黄色ブドウ球菌(a) とマイコプラズマ (b)である。(a) とした菌種検索用の MB probe は 5' 末端に蛍光色素の 6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachloro fluorescein (HEX), (b)とした菌種のそれに

は 6-carboxyfluorecein (FAM) を結合させた。すべての MB probe は 3' 末端に black hole quencher 1 (BHQ-1) を結合させた。

PCR 反応液は、調整後ウェルに分注し、用事まで-30°Cに保存した。凍結された PCR 試薬は使用時に氷上で融解し、サンプルから抽出した DNA を各 2 μ l ずつそれぞれのウェルへ加えた。

real-time PCR はただちに Stratagene Mx3000P™を使用して実行した。反応条件は下記のとおりである。すなわち、最初の DNA denaturation step は 95°C, 30s, 続いて 95°C ; 15s, 50°C ; 30s, 75°C ; 20s の 40cycle, 最後に 75°C ; 30s である。DNA 抽出から real-time PCR 終了までの全行程は図 1 に示したが、所要時間は 1.5 時間である。

4. Real-time PCR の感度と特異度

各菌種についてそれぞれの 3 株ずつを用い、 $10^8 \sim 10^0$ /ml まで 10 倍希釈した菌液で感度・特異度を測定した。それぞれの MB probe と primer の特異度は、対象の 8 菌種に加え、*Streptococcus* : 10 菌種, *Enterococcus* : 3 菌種, *Staphylococcus* : 3 菌種, *Neisseria* : 3 菌種, *Enterobacteriaceae* : 5 菌種, *Pseudomonas* : 2 菌種, other : 6 菌種, 計 40 菌種について検討した。

C. 研究成果

1. Real-time PCR の感度と特異度

Real-time PCR の対象とした 5 菌種の反応チューブあたりの検出限界(感度)は、*E. coli* が 1.3×10^0 CFU, リステリア菌が 6.5×10^1 CFU, 髄膜炎菌が 1.3×10^0 CFU, GBS が 5.5×10^1 CFU, 黄色ブドウ球菌が 5.5×10^1 CFU であった。なお、肺炎球菌, インフルエンザ菌およびマイコプラズマの感度は、 2×10^0 CFU, 1.7×10^0 CFU, および 5×10^0 CFU であることが既に明らかにされている。10 倍希釈された 8 菌種の CFU と、Ct 値との間

には、いずれも $\gamma = 0.9709 \sim \gamma = 0.9989$ と高い相関が認められた。

それぞれの primer と MB probe の特異度は、8 菌種同士の他に、32 菌種について検討された。それらの菌から抽出された DNA サンプルを用いた real-time PCR では、非特異の陽性反応は認められなかった。

2. Real-time PCR と培養での陽性細菌の比較

依頼を受けた 168 サンプルに対して行なった real-time PCR と培養結果によって確認された起炎菌の内訳は図 2 に示す。

real-time PCR で陽性を示した菌の内訳は、インフルエンザ菌が 76 例 (45.2%) と最も多く、次いで肺炎球菌の 36 例 (21.4%) であった。その他に、GBS が 4 例 (2.4%)、*E. coli* が 3 例 (1.8%)、リステリア菌が 1 例 (0.6%)、マイコプラズマが 1 例 (0.6%) 陽性であった。髄膜炎菌と黄色ブドウ球菌陽性例は認められなかった。

一方、培養ではインフルエンザ菌 48 例 (28.6%)、肺炎球菌 27 例 (16.1%)、GBS 2 例 (1.2%)、*E. coli* 3 例 (1.8%)、リステリア菌 1 例 (0.6%) が分離できた。培養結果の菌種と real-time PCR での推定菌種はすべて一致していた。

原因菌の確定率は、培養では全体の 48.2% であったのに比べ、real-time PCR 法では 72.0% で原因菌を推定することができた。

3. Real-time PCR による陽性例と症例の年齢との関係

Real-time PCR によって推定された原因菌と症例の年齢との関係は表 1 に示す。17 歳までの 150 例の小児のうち、real-time PCR で菌が推定できたのは 69 例 (72.6%) であった。*E. coli* と GBS が原因菌と推定された 6 症例のうち 5 例は、3 ヶ月以下の症例であった。4 ヶ月-17 歳ではインフルエンザ菌と肺炎球菌が多くを占めた。

一方、18 歳以上の成人髄膜炎 18 例のうち、real-time PCR 陽性例は 15 例 (83.3%) 認められ、そのほとんどが肺炎球菌であった。

4. 抗菌薬前投与の影響

髄液採取前における抗菌薬投与の有無と、real-time PCR、あるいは培養による原因菌陽性率との関係は、投与の有無が確認できた 115 症例について解析した。その成績は図 3 に示す。

既に、62 例 (53.9%) に対し入院前に抗菌薬が投与されていた。注射薬の投与が 15 例、経口薬剤の投与が 47 例であった。62 例のうち培養で原因菌が明らかにできたのは 18 例 (29.0%) であったのに対し、real-time PCR では 36 例 (58.1%) で推定できた。

一方、抗菌薬の投与がなかった 53 例では、培養で 37 例 (69.8%)、real-time PCR で 47 例 (88.7%) が原因菌を推定できた。Real-time PCR による原因菌の推定率は、抗菌薬の前投与があった場合 ($\chi^2 = 10.628$, $P < 0.01$)、あるいは抗菌薬の投与がなかった場合 ($\chi^2 = 5.736$, $P < 0.05$) のいずれにおいても培養に比べ有意に優れていた。

なお、培養および real-time PCR のいずれの方法によっても原因菌を推定することができなかった 32 例は、既に 26 症例 (81.3%) に抗菌薬が投与されていた。

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、溶血レンサ球菌や肺炎球菌などの侵襲性重症感染症が次第に増加し、深刻な問題を提起し始めている。特に、糖尿病や肝炎、あるいは心疾患等の基礎疾患を抱える壮年期以上の症例では、死亡率も高く、また救命し得ても致命的な後遺症を残すことが多い。特に溶血レンサ球菌ではその 15-20% が予後不良であり、肺炎球菌に

いたっては約半数が死亡を含む後遺症を残している。

これらの症例を、後遺症を残すことなく救命するには、救急搬送時に迅速に原因菌が特定され、補助療法とともに最適な抗菌薬が選択されることが必要である。数日を要する培養検査はほとんど役に立たないのが現実である。

このような背景から、急速に進歩している real-time PCR 法を応用し、細菌の網羅的な迅速検索法を確立したものである。検体採取から 2 時間で高い感度と精度で起炎微生物が推定できることは、適切な治療薬選択に役立つと考える。また、この方法が広く普及することにより、抗菌薬の適正使用に繋がり、耐性菌の制御が可能になると確信する。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.*, 2009; 15: 92-98.
- 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.*, 2009; 53: 2650-2653.
- 3) 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.*, 2010;138:61-68.
- 4) Matsui H, Sekiya Y, Nakamura M, Murayama SY, Yoshida H, Takahashi T, Imanishi K, Tsuchimoto K, Uchiyama T, Sunakawa K, and **Ubukata K.** CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection. *Infect Immun.*, 2009; 11: 4806-4814.
- 5) Takahashi T, Morozumi M, Chiba N, Asami R, Kishii K, Murayama SY, and **Ubukata K.** Co-infection with respiratory syncytial virus subgroup A and *Streptococcus pneumoniae* detected by a comprehensive real-time polymerase chain reaction assay in an elderly patient with community-acquired pneumonia. *Journal of American Geriatrics Society.* 2009; 9: 1711-3.
- 6) Oikawa J, Ogita J, Ishiwada N, Okada T, Endo R, Ishiguro N, **Ubukata K.** and Kohno Y. Human bocavirus DNA detected in a boy with plastic bronchitis. *Pediatric Infection Journal.* 2009; 28: 1035-6.
- 7) Baba S, Yamanaka N, Suzuki K, Furukawa M, Furuya N, **Ubukata K.** and Totsuka K. Clinical efficacy, safety and PK-PD analysis of tebipenem pivoxil on a phase II clinical trial in otolaryngological infections. *Jpn J Antibiot.* 2009, 62: 155-77.
- 8) Isozumi R, Yoshimine H, Morozumi M, **Ubukata K.** and Ariyoshi K. Adult community-acquired pneumonia caused by macrolide resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Respirology.* 2009; 8: 1206-8.
- 9) Takahashi T, Sunaoshi K, Sunakawa K, Fujishima S, Watanabe H, and **Ubukata K.** Clinical aspects of invasive infections with *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis*

- in Japan: differences with respect to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*. Clin Microbiol Infect. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03047.x
- 10) Peuchant O, Ménard A, Renaudin H, Morozumi M, **Ubukata K**, Bébéar CM, and Pereyre S. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. J Antimicrob Chemother. 2009; 64: 52-8.
 - 11) Takahashi T, Morozumi M, Okada T, Chiba N, Asami R, Murayama SY, and Ubukata K. Prolonged *Mycoplasma pneumoniae* infection in an elderly patient with community-acquired pneumonia. J Infect Chemother. 2009; 15: 243-7.
 - 12) Sunaoshi K, Murayama SY, Adachi K, Yagoshi M, Okuzumi K, Chiba N, Morozumi M, and **Ubukata K**. Molecular *emm* genotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from invasive and noninvasive infections. J Med Microbiol. 2010; 59: 82-8.
 - 13) Hasegawa M, Hashimoto K, Morozumi M, **Ubukata K**, Takahashi T, and Inamo Y. Spontaneous pneumomediastinum complicated by pneumonia in children infected with 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus. Clinical Microbiology and Infection. 2010; 16: 195-9.
 - 14) Hasegawa M, Inamo Y, Fuchigami T, Hashimoto K, Morozumi M, Takahashi T, Watanabe H, and **Ubukata K**. Bronchial Casts due to 2009 Pandemic Influenza A(H1N1). Emerging Infectious Diseases. 2010; 16: 344-6.
 - 15) Yoshino M, Murayama SY, Sunaoshi K, Wajima T, Takahashi M, Masaki J, Kurokawa I, and **Ubukata K**. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* isolates that lack large regions of the sag operon mediating streptolysin S production. J Clin Microbiol. 2010; 48: 635-8.
 - 16) Takahashi T, Asami R, Tanabe K, Hirono Y, Nozawa Y, Chiba N, and **Ubukata K**. Clinical aspects of invasive infection with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in elderly patients. J Infect Chemother. 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]
 - 17) Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hamano-Hasegawa K, Kurokawa I, Masaki J, and **Ubukata K**. Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. J Infect Chemother. 2010 Jan 21. [Epub ahead of print]
 - 18) Morozumi M, Takahashi T, **Ubukata K**. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia. J Infect Chemother. 2010 Jan 22. [Epub ahead of print]
 - 19) 生方公子:我が国における細菌性髄膜炎の現況とその迅速診断の必要性。神経内科学会誌, 2009; 14:1-8.
 - 20) 黒川いく, 真崎純子, 千葉菜穂子, 生方公子:急性中耳炎例の中耳貯留液から分離された肺炎球菌の莢膜型と薬剤耐性遺伝子解析。日本臨床微生物学雑誌, 2009
 - 21) 生方公子:感染症の原因微生物別に小児感染症を考える。β 溶血性レンサ球菌。化学療法の領域, 2009; 25: 142-148.
 - 22) 生方公子:世界標準にはるかに及ばない我が国の予防接種体制。肺炎球菌ワクチン。日本医師会雑誌, 2009; 4: 715-718.

- 23) 諸角美由紀, 生方公子: マルチプレックス呼吸器ウイルスゲノム・リアルタイム検査。臨床と微生物 2009; 36: 61-6.
- 24) 岸井こずゑ, 生方公子: PRSP と BLNAR。臨床と微生物 2009; 36: 95-101.
- 25) 諸角美由紀, 生方公子: Real-time PCR法を活用した細菌学的検索。臨床と微生物 2010; 37: 9-15.
- 26) 生方公子: 肺炎球菌とインフルエンザ菌に対する tebipenem の抗菌力と殺菌力。臨床と微生物 2010; 37: 17-23.
2. 学会発表(国外)
- 1) Murayama S.Y., K. Sunaoshi, T. Miyoshi-Akiyama, Y. Shimomura, T. Kirikae, **K. Ubukata**, K. Sunakawa: Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain RE378 isolated from patient with invasive infection. American Society for Microbiology, 109th General Meeting, Philadelphia, USA, 2009.05.17-21
- 2) Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Shimomura Y, Murayama SY, **Ubukata K**, Kirikae T: Origin of Streptococcal superantigens based on mass genome comparison among *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. American Society for Microbiology, 109th General Meeting, Philadelphia, USA, 2009.05.17-21
- 3) **Ubukata K**, Takahashi T, Sunaoshi K, Fujishima S, Watanabe H, Sunakawa K, and the Invasive Streptococcal Disease Working Group. Clinical aspects of invasive infections caused by *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (Group G Streptococci) in Japan. 49th ICAAC, San Francisco, 2009 (L1-1681)
- 4) Nakayama E, Mitsuhashi N, Morozumi M, Chiba N, Kishii K, Murayama S Y, and **Ubukata K**. Application of real-time PCR assay for the prevention of perinatal *Streptococcus agalactiae* infection. 49th ICAAC, San Francisco, 2009 (D-776)
- 5) Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Ono A, and **Ubukata K**. New amino acid substitutions of Val329Ala and Val511Ala in PBP3 of β -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant (BLNAR) *Haemophilus influenzae*. 49th ICAAC, San Francisco, 2009 (C2-1407)
- 6) Okada T, Morozumi M, Kishii K, Chiba N, Matsubara K, Iwata S, **Ubukata K**, and The Acute Respiratory Diseases (ARD) Study Group. Clinical use of simultaneous real-time PCR identification of twelve viruses and six bacteria in pediatric patients with community-acquired pneumonia. 49th ICAAC, San Francisco, 2009 (G1-1550)
- F. 健康危険情報
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

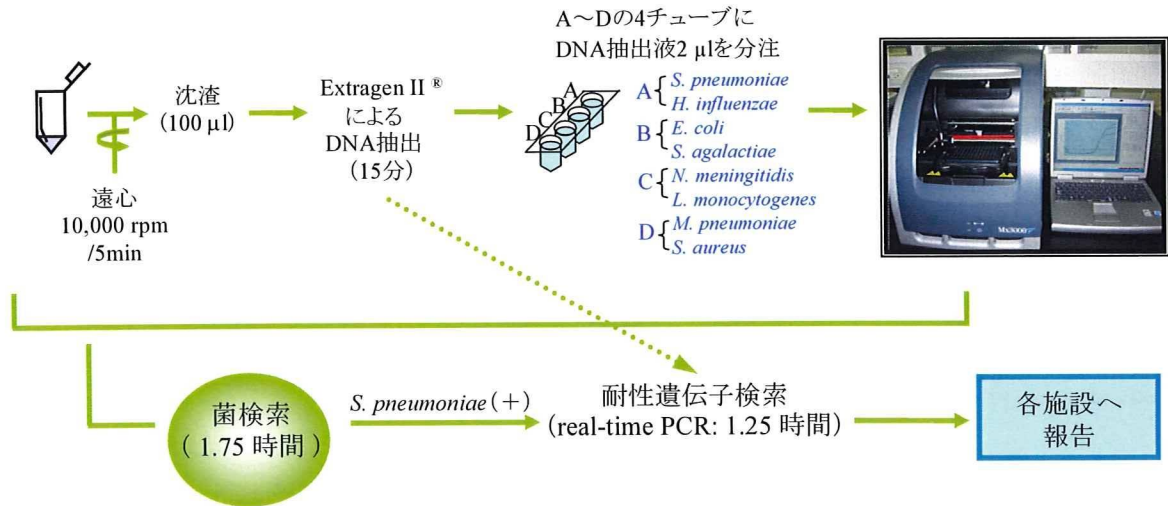


図1 無菌的検査材料用 real-time PCR 法のプロトコール

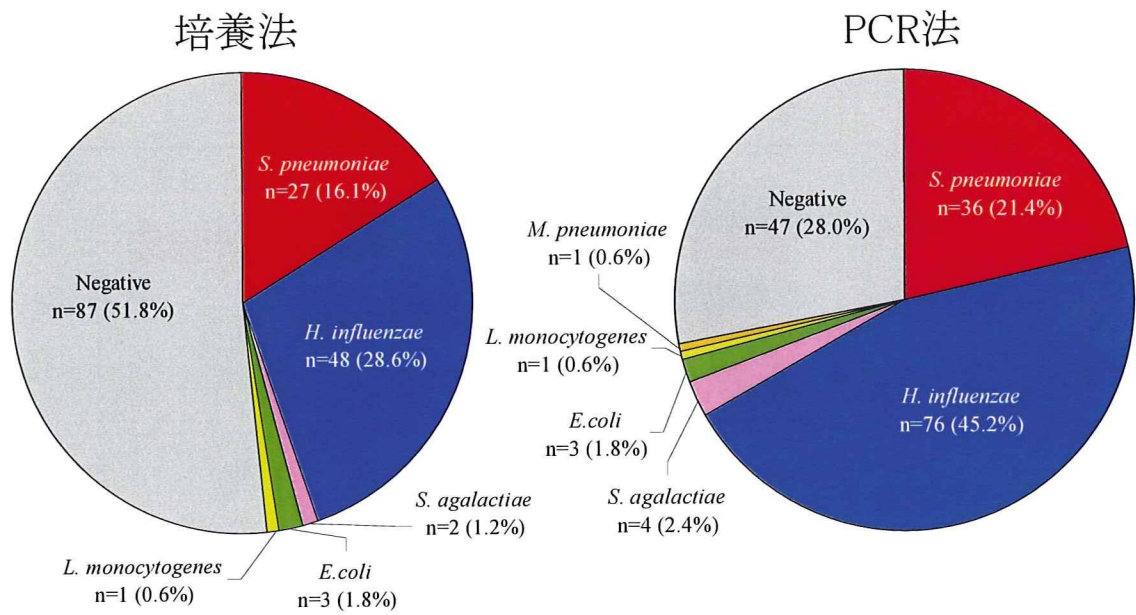


図2 Real-time PCR 法と培養法での陽性率の比較

表 1 Real-time PCR 法での陽性例の年齢分布と推定原因菌との関係

Causative pathogen	n ^{a)}	Pediatrics (n=106)							Subtotal	Adults (n=15)				Subtotal
		≤ 3 m	4-11 m	1 y	2 y	3 y	4 y	5-17 y		18-34 y	35-49 y	50-64 y	> 65 y	
positive case														
<i>S. pneumoniae</i>	36	2	6	3	2	3	1	5	22	1	3	6	4	14
<i>H. influenzae</i>	76	3	34	14	7	9	4	5	76					
<i>S. agalactiae</i>	4	3							3		1			1
<i>E. coli</i>	3	2	1						3					
<i>L. monocytogenes</i>	1							1	1					
<i>M. pneumoniae</i>	1			1					1					
Subtotal	121	10	41	18	9	12	5	11	106	1	4	6	4	15
negative case														
	47	11	13	2	1	1	1	15	44	1		1	1	3

a) Number of real-time PCR positive case

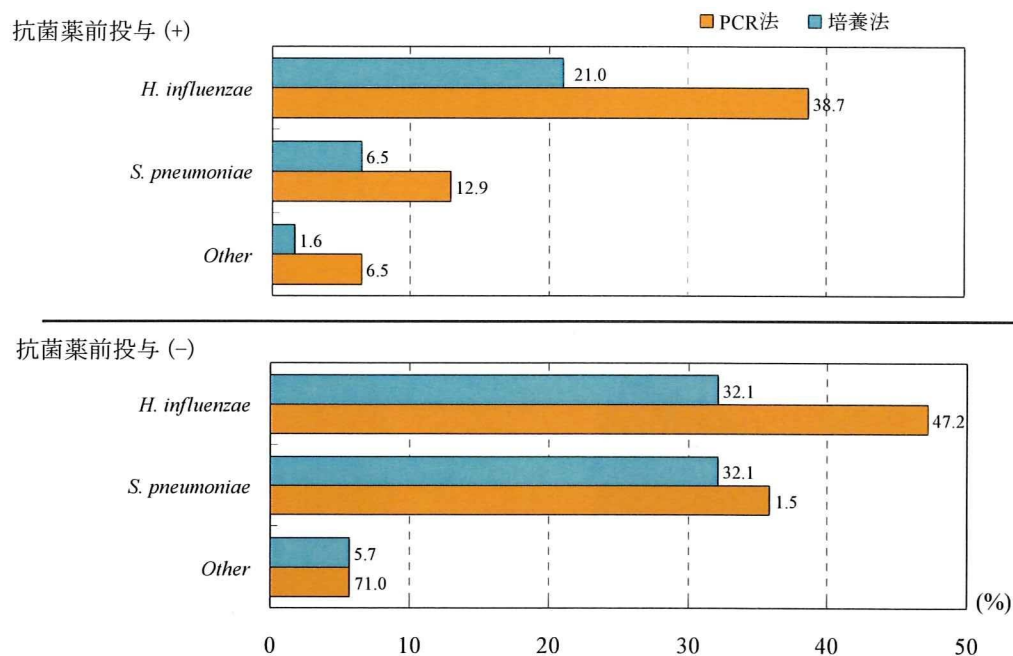


図3 抗菌薬投与の有無と real-time PCR法または培養法による原因菌陽性率との関係

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* (SDSE)の全ゲノム解析

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 岡田 圭祐 北里大学大学院感染制御科学府 修士1年
研究協力者 砂押 克彦 北里大学大学院感染制御科学府 博士3年
研究協力者 高橋 孝 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 ヒト劇症型感染症由来の溶血レンサ球菌の1種である *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) RE378 株とブタ由来 L1 株について全ゲノム解析を行い、A 群溶血性レンサ球菌(GAS)やB 群溶血性レンサ球菌(GBS)等の保持する病原遺伝子との比較を行なった。SDSE は GAS が保持する多くの病原遺伝子を保持していた。しかし、スーパー抗原に関わる一部の遺伝子は保持していなかった。GBS の一部の病原遺伝子は SDSE と共通であったが、菌全体でみた遺伝子の相同性は低かった。解析の結果は、本来動物に由来する SDSE が、ヒト生体内において GAS やその他のレンサ球菌との間に遺伝子の水平伝播が生じ、今日の GAS に近い SDSE が形成されたものと推定される。このため、GAS よりは病原性は低いものの、病原性発揮に関わる多くの遺伝子を保持することが、ヒトにおける GAS 感染症に近い病態を示すことに繋がっていると考えられた。

A. 研究目的

Streptococcus dysgalactiae subsp. *equisimilis* (SDSE) は、従来グループ G、あるいはグループ C レンサ球菌 (GGS, GCS) と呼称され、人獣に共通にみられるレンサ球菌のひとつである。ヒトにおいてはその病原性は低いとされてきた。しかし、近年 A 群溶血性レンサ球菌(*S. pyogenes*: GAS)と同様の敗血症性ショック病態を始めとする重篤な侵襲性感染症を引き起こし、また症例数も GAS と同等以上に急速に増加してきている。症例は基礎疾患を有する壮年期から高齢者に多いのが特徴である。

一方、GAS や B 群溶血性レンサ球菌(*S. agalactiae*:GBS)については病原因子解析の

ために数株ずつのゲノム解析がなされているが、SDSE についてはゲノム解析が行われていない。私達は、病原性解析などのための第一歩として、そのゲノム解析に着手した。研究年度2年度までに、ヒト侵襲性感染症由来 SDSE の2株、すなわち、GGS_124 (*emm*型: *stG480.0*) と RE378 (*emm*型: *stG6792.3*) について全ゲノム解析を行い、アノテーションまで終了させた。

本年度は、ヒト由来の SDSE 株がどのような過程で病原性を獲得してきたのかを知るため、ブタのリンパ節炎由来の L1 株について全ゲノム塩基配列を決定し、ヒト由来株とブタ由来株の遺伝子比較を行い、両 SDSE 株が病原性因子としてどのような遺伝子を保