

200931002B

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19年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 砂川 慶介

平成 22(2010) 年 4 月

目 次

I. 総合研究報告

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	
資料-1. Real-time PCR法によるB群溶血性レンサ球菌の迅速検索法の確立	18
生方 公子, 坂田 宏, 岩田 敏	
資料-2. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (SDSE) の全ゲノム解析	22
生方 公子, 秋山 徹	
資料-3. 小児の血液・髄液から分離された <i>Streptococcus pneumoniae</i> の血清型, 薬剤感受性および耐性遺伝子に関する研究	27
坂田 宏	
資料-4. 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	
資料-5. 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	43
吉田 敦	
資料-6. <i>Streptococcus suis</i> 感染症の病態とその診断・治療法に関する研究	52
大石 和徳	
資料-7. 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	58
渡邊 治雄, 池辺 忠義	
資料-8. 劇症型溶連菌感染発症における宿主因子の解析	65
阿戸 学, 池辺 忠義, 松村 隆之	
資料-9. 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	72
松井 英則	
資料-10. 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	80
秋山 徹	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	89
III. 研究成果の刊行物・別刷	99

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

研究代表者 砂川慶介 北里大学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 急速な少子・高齢化社会を迎えた我が国においては、市中で発生する重症細菌感染症が変貌しつつあり、特に呼吸器系感染症の原因菌として重要なβ溶血レンサ球菌(A群：GAS, B群：GBS, およびC群とG群：SDSE)と肺炎レンサ球菌(肺炎球菌)等による劇症型侵襲性感染症が再び増加している。本研究班はこれらの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3ヶ年計画で研究を行い、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、次の記した成果を得た。

- (1) 本研究事業の代表者(砂川)は、基礎と臨床の研究成果を統括するとともに、日本感染症学会東日本支部総会・日本化学療法学会東日本支部総会の合同学会、および日本臨床微生物学会との共催シンポジウムを企画・開催し、多数の医療関係者に対する啓発活動を行った。
- (2) 研究分担者の生方、岩田、坂田らは、H19年度に全国規模で侵襲性感染症由来のレンサ球菌と肺炎球菌を1,000株収集し、発症症例の予後、リスクファクター等の統計学的解析、さらには菌の分子疫学解析、治療抗菌薬に対する耐性化状況を明らかにした。
- (3) さらに、菌の分子疫学解析データについて欧米の成績との比較を行い、成人では欧米で極めてまれな12F型の肺炎球菌が突出して多いこと、SDSE感染症例でもGASやGBS例をはるかに上回ると同時に、stG6792型という特殊な型が多いことを明らかにした。
- (4) 研究分担者の生方、岩田、坂田らは、さらに新生児に置ける重篤なGBS感染症の感染制御としての妊婦のreal-time PCR法による迅速検査法、さらには化膿性髄膜炎や敗血症などの診断法として、2時間で判定できる網羅的real-time PCRを構築した。
- (5) 研究分担者の藤島と吉田は、GAS、GBS、SDSE菌による侵襲性感染症例はSIRS基準の白血球異常を100%満たしていた。SDSE例ではPLTの異常低値例が多く認められた。また、GBS菌で遺伝子変異を持ったニューキノロン薬耐性菌が急速に増加していることを明らかにした。
- (6) 研究分担者の渡邊、池辺、阿戸らは、GASでは特定のemm遺伝子保持株で、病原遺伝子を制御する新たな遺伝子 rgg 遺伝子に変異の認められる株が劇症型発症に関与していることが示唆された。加えて、劇症型レンサ球菌例における好中球障害機構の解析、炎症性サイトカインの役割を明らかにした。
- (7) 研究分担者の秋山と生方らのグループは、SDSEによる劇症型感染を菌の保持する病原因子から解析するため、ヒト由来2株の全ゲノム解析を行い、GASの病原性遺伝子との比較を行った。また、SDSEは人獣共通感染症の一面ももつことから、ブタ由来SDSEのゲノム解析も行い、病原因子の保有状況についての詳細を世界に先駆けて明らかにした。
- (8) 研究分担者の松井らは、細菌のレセプターであるヒトCD46発現トランスジェニックマウスを用い、GASによる劇症型感染を惹起させその病態を明らかにした。同様にSDSEについても化膿性関節炎のモデルを構築した。
- (9) 研究分担者の秋山は、自然発生型の糖尿病モデルマウス、II型糖尿病モデルマウスを構築し、基礎疾患を有すると致死率が異常に高いことを明らかにした。
- (10) 研究分担者の大石は、国内におけるブタレンサ球菌感染症予防対応策として、タイ・ベトナム国における当該菌の遺伝子レベルでの解析と発症者の疾患、致死率を解析し、国内症例のそれと比較した。

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
(現 慶應義塾大学医学部感染症対策センター 教授)
- 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。

しかし、i)それら重症感染症の実態が把握されていないこと ii)全国規模での原因菌の正確な分子疫学解析がなされていないこと、iii)予後不良例における宿主側因子の解析がなされていないこと、iv)近年症例が増加している SDSE の病態と菌の病原性が明らかになっていないこと、v)欧米の成績との比較が

なされていないことが問題であった。

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とした。

1. 侵襲性感染症由来の GAS, GBS, SDSE 株、および肺炎球菌の4菌種を全国規模で収集し、菌の分子疫学解析を行う。また、治療に関わる抗菌薬の耐性化状況も解析した。加えて、発症例における宿主リスクファクターや予後についてもアンケート調査を行い、統計解析によってそれらを明らかにする。
2. ヒトに近い動物モデルの構築によって、病態と重症化メカニズムの解明を行う。
3. 発症例が急速に増加しているヒト由来の SDSE 株 (正式菌種名: *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*)、ブタ由来 SDSE 株の全ゲノム解析を行い、GAS や GBS の病原因子との相同性やその違いを明らかにする。
4. 臨床現場で使用できる重症感染症の原因菌を迅速に確定する PCR 法を構築する。また、新生児の GBS 感染症の発症予防対策としての GBS 迅速診断法も構築する。
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

1) 組織:

上記研究事業を遂行するため、本研究班は研究代表者1名と研究分担者11名(基礎系研究者5名、細菌の分子疫学研究を主とする研究者2名、臨床系研究者4名)の合計12名を中心に、全国各地の細菌検査室を有する医療機関に所属する細菌検査技師、症例の担当医等、多くの方々の協力を得て実行された。

2) 菌株収集：

平成 19 年度の 1 年間に侵襲性感染症例の血液、髄液、胸水、あるいは関節液など本来無菌的な検査材料から分離された GAS, GBS, SDSE, 肺炎球菌を対象とした。合計で 1,000 株近い菌株が収集された。

3) 疫学解析：

これらの菌株は菌種の再同定を行った後、すべて DNA を抽出した。GAS と SDSE については、疫学解析の世界標準となっている菌体表層に存在する病原因子のひとつである M タンパクをコードする *emm* 遺伝子解析を行い、CDC レファレンスセンターの成績とマッチングして *emm* 型を明らかにした。GBS については多糖体の莢膜の型を real-time PCR で解析した。肺炎球菌については抗血清を用いて膨化試験で莢膜型を確定した。薬剤感受性と耐性遺伝子については、CLSI に準じて実施された。

4) 宿主リスクファクター解析：

発症例の背景については、担当医に対するアンケート調査を匿名貸して実施し、それを入力・統計解析した。

5) SDSE のゲノム解析：

ヒト劇症型由来の SDSE(2 株)の全ゲノム解析を完了した。さらに、比較のためにブタ(リンパ節炎)由来の SDSE(1 株)のゲノム解析も行った。それらのデータの中でも特に病原遺伝子に注目、ヒト由来の GAS, GBS 等のデータと詳細に比較した。

6) 病原遺伝子の制御機構解析：

既に知られている制御遺伝子のほかに新たな制御遺伝子の有無を解析した。また *emm* 型との関連性を検討した。

7) 宿主好中球とサイトカイン解析：

GAS による劇症型感染症の病態を明らかにするため、in vivo での好中球機能の解析、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。

8) 動物モデルの構築とその解析：

GAS と SDSE の動物モデルの構築については、i) ヒト CD46 レセプターを持つ transgenic マウスを用いた病態解析、ii) 糖尿病誘発マウスモデルを用いての病態解析を行った。

9) 啓発活動：

関連学会と共催セミナーを 2 回開催した。

(倫理面への配慮)

本研究においては、取り扱う情報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、細心の配慮がなされた。データ管理は関係する研究者のみが行った。また、菌株の収集、情報提供に際しては、各医療機関の長、あるいは検査部長に対し、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。

基礎の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て、それぞれの研究は適切に行われた。

C. 研究結果

3 カ年に得られた研究成果は以下のとおりである。

1. 菌の疫学解析と宿主リスクファクター解析(図 1, 表 1, 表 2)

1) GAS 感染症：

侵襲性 GAS 感染症(n=120)例は、症例数は最も少なかったが、発症例の年齢は最も若く、30-80 代が発症し、年齢平均は 60 代であった。基礎疾患の保有率は 65%であった。疾患は蜂窩織炎を含む化膿性疾患や重篤な STSS も認められているが、その多くが救命救急を受診している。予後不良率(死亡+後遺症(+))は 22%であった。これらの菌株に対し M タンパクをコードする *emm* 遺伝子の塩基解析が

行われ、遺伝子レベルでの型別が実施された。最も多かったのは *emm1* 型で、予後不良例もこの型に有意に多かった。 β -ラクタム系薬耐性株は存在しなかったが、マクロライド系薬やニューキノロン系薬耐性菌が認められた。

2) GBS 感染症：

侵襲性 GBS 感染症($n=200$)は小児と 50 代以上の症例(50-80 歳, 平均 70 歳)の 2 峰性分布であった。成人の疾患は敗血症が最も多く、症例は肝機能や腎機能の低下、悪性腫瘍 *ope* 後など基礎疾患を有する例が 90%に達していた。予後不良率(死亡+後遺症(+))は、13%であった。これらの 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。小児由来株では III 型が圧倒的に多かったのに対し、成人では I b 型と V 型が多かった。ニューキノロン系薬(レボフロキサシン)高度耐性が 30%認められたがほとんどが I b 型であり、すべての株がニューキノロン薬耐性に関わる *gyrA* 遺伝子と *parC* 遺伝子上にアミノ酸置換を有していた。また、全国から収集されているにも関わらず、同一の PFGE パターンを示し、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。そのほかにペニシリン軽度耐性株が数株確認された。ただし、GBS では一見感受性が優れていても、殺菌性が劣る株が認められた。

3) SDSE 感染症：

侵襲性 SDSE 感染症($n=300$)はすべてが成人例(50-90 歳, 平均 70 歳)であった。成人における疾患は GAS に近似し、救命救急受診例が多く、蜂窩織炎などの化膿性疾患が多かった。特に整形外科における化膿性関節炎の割合の高いことが注目された。発症例で最も多かった基礎疾患は悪性腫瘍 *ope* 後、次いで糖尿病であった。基礎疾患を有する例が 85%に達していた。予後不良率(死亡+後遺症(+))は 17%と高かった。これらの株の疫学研究は、

表層タンパクである M タンパクをコードする *emm* 遺伝子の塩基解析で行われた。最も多かったのは stG9792 型であった。その他にさまざまな型が 20 種ほど認められた。全国から収集された stG6792 型は、同一の PFGE パターンを示し、国外から持ち込まれた 1 クローンが急速に全国へと拡散したことが示唆された。 β -ラクタム系薬耐性は認められなかったが、マクロライド薬耐性が 20%、ニューキノロン薬耐性が 1%認められた。これらは耐性に関わる遺伝子を保持していた。

4) 肺炎球菌：

対象期間内に、市中で発生した侵襲性感染症由来の肺炎球菌($n=684$)を最も多く収集した。それら症例の予後を解析すると、小児の死亡例は 1.4%であったのに対し、成人では 22.1%と多く、重篤な後遺症残存例も 8.7%、すなわち予後不良例は 30%に達していた。小児由来株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(7PCV)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。23 価ポリサッカライドワクチン(23PPV)の成人分離株のカバー率は 85%であった。日本においては今までに認められなかっ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いることが示唆された。高齢者や基礎疾患を有するリスクファクター保持例において肺炎球菌感染症を惹起すると予後不良となりやすいことが示唆された。

5) ブタレンサ球菌(*S. suis*)：

大石らは、2006-8 年にかけてタイ・ベトナムで発生した *Streptococcus suis* による侵襲性感染症例(敗血症例と化膿性髄膜炎例)と分離されたブタレンサ球菌を詳細に解析、どのようなタイプが分離され、病原性が高いの

かを明らかにした。91.7%が serotype 2, 8.3%が serotype14 であった。これら症例の調査から、その臨床像、予後、および原因菌のゲノタイプとの相関について検討を加えた。serotype2 の株の 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。発症例の平均年齢は55歳、男性が72.8%、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。発症の背景因子として、生豚肉の摂食が32.9%、併存症としてアルコール多飲者が20.9%と多かった。一方、serotype14による感染症の臨床像は、serotype2のそれと同じであった。

2. レンサ球菌と肺炎球菌などの迅速診断法の構築(図2, 図3)

1) 無菌検査材料に対する細菌の迅速検索:

市中型重症感染症では、いかに迅速にしかも正確に原因菌が推定でき、適切な抗菌薬が timely に投与されるかが重要である。化膿性髄膜炎の原因菌として頻度の高い肺炎球菌、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 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。検出感度は、 1.3×10^0 - 6.5×10^1 CFU である。原因菌の確定率は、培養が48.2%であったのに比べ、PCR 法では72.0%であった。特に、抗菌薬の前投与があった場合に、real-time PCR 法は有意に優れていた。

2) GBS の保菌検索:

発症例の約半数が死亡あるいは重篤な後遺症を残す産道感染症としての GBS 感染症は、予防対策が必須である。そのためには、妊娠後期における妊婦が GBS を保菌しているか否かを高い感度と精度で迅速に証明す

ることが最も重要である。この解決方法として、生方、岩田、坂田らは、三橋ら(順天堂大学医学部静岡病院周産期来医療センター)と共同で、迅速診断法の構築を行った。使用したサンプルは妊娠37-39週の妊婦由来の検査材料で、インフォームドコンセント後に採取され、その結果は24時間以内に報告された。新規に構築された real-time PCR 法は、GBSの有無が培養の10倍の感度、さらに新生児感染症で重要な莢膜型のIII, Ib, Iaまでを2時間で明らかにできる方法である。

3. SDSE のゲノム解析(表3, 図4)

GAS や GBS の全ゲノム解析は既に世界的レベルで行われていたが、ヒトの SDSE 株については解析がなされていなかった。本研究班ではその病原性を明確にするため、GAS や GBS 等と比較することを目的に、秋山と生方らのグループは、劇症型感染症由来の RE378 株(*emm* 型: *stG6792*)と GGS-124 株の全ゲノム解析を行った。世界で初めての解析であった。また、ブタのリンパ節炎由来の L1 株も比較のためにゲノム解析を行った。

ヒト由来のゲノムは、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。しかし、GBS から SDSE に水平伝播したと思われる DNA 領域も認められた。

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 SDSE にも認められた。この事実は、SDSE は GAS に近いレベルの病原性を発揮するであろうことを意味していると考えられる。

また、ゲノム解析の結果、ヒトから分離される SDSE には、GAS あるいは GBS に見出される病原遺伝子が多くみいだされ、ブタ由来株には認められないものが存在した。このことは、人獣共通の SDSE がヒト生体内に適応する過程において、GAS や GBS の病原因

子を水平伝播によって獲得してきたことが示唆された。

4. 病原遺伝子の制御機構の解析

渡邊, 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* 遺伝子に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証明するため, i)病原性に関わる菌の産生物の量的変動と 2 成分制御系遺伝子(*csrS*)の変異との関連について調べ, 変異が病原性増強に与える影響を明らかにした。ii)菌の産生物と宿主防御機能との関係について, 劇症型株は好中球の殺菌に抵抗性を示すことを明らかにした。その機序は *csrS* 変異によるいくつかの産生物の発現が増強され, 感染局所への好中球走化抑制と好中球障害によって惹起されることを示唆した。iii)日本で分離された *S. suis* 株を用いて病原性に関わる毒素の保有状況を調べた。さらに, iv)GAS 株のバイオフィーム形成能と病原性との関わりを検討した。

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. 動物モデルの構築とその解析

1) トランスジェニックマウスを用いた GAS 感染モデル(図 5, 図 6) :

松井らはヒト CD46 トランスジェニック (hCD46Tg) マウスを用いて, GAS および SDSE 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。

2) 糖尿病動物モデルによる GAS の病態モデル解析(図 7, 図 8) :

秋山らは, 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疫学解析から明らかにされたが, この事実を受け, 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た。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, SDSE に対する感受性が増加していることが明らかにされた。また比較の黄色ブドウ球菌に較べて SDSE では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。

7. 啓発活動(表 4)

臨床的に問題化した β 溶血レンサ球菌感

感染症と肺炎球菌感染症による侵襲性感染症についての啓発活動のため、関連学会と共催シンポジウムを2回開催した。

I. 共催シンポジウム-1

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—

学会:

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

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)

II. 共催シンポジウム-2

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—

学会:

第21回日本臨床微生物学会総会

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)

D. 考察

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、さらに菌の病原性やゲノム解析を3年間継続して行い、最終年度には学会との共催セミナーを開催し、それらの成績を公表

して啓発活動を広く行なうことができた。

このように、菌の病原性と宿主の防御メカニズムについての基礎的研究と全国規模で侵襲性感染症由来の菌株を1箇所を集めて分子レベルで解析された疫学データは欧米にひけをとらない。同時期に米国のCDCからも同様の研究成果が発表されたことがその重要性を物語っている。特に、菌の疫学のみならず、担当医から症例の入院の状況やその予後についてアンケートで回答いただけたことは、これらの細菌による侵襲性感染症の臨床像を明確にするのに十分であったと考える。

中でも特筆すべきことは、2000年以降、これらの細菌による重症例は小児から成人へと急速にシフトしてきている点である。劇症型、あるいは劇症型例に近い重篤な病態の死亡例が成人で小児に比して有意に多かったことは、菌の病原性の強さも反映はしているものの、宿主側の高齢化に伴う免疫能の低下、そして急速な基礎疾患保有率の上昇が根底にあることが明確になったことである。加えて、小児比して、発症後からの受診のタイミングの遅れ、あるいは臨床サイドにも急速に進行するこれらの感染症の認識が低く、救急搬送時に適切な治療抗菌薬が速やかに選択されていない、などといった問題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。

この解決のためには、さらなる救命救急センターや整形外科領域への啓発活動、そして原因細菌を網羅的に検索できる本事業で確立したreal-time PCR法を広く臨床サイドへ普及することが今後必要である。

さらには、症例が急速に増加しているSDSE株(劇症例由来)の全ゲノムを2株解析でき、その病原遺伝子の多くが病原性の明らかかなGASと多く共通していたこと、あるいはGBSとも一部共通していたことを明らかにしたことは、今後SDSE感染症の病態を理

解するのに大いに役立つであろう。

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であるヒト側の防御メカニズムを明らかにするために大いに寄与すると考える。

初期の目標のひとつであった「診断と治療に関するガイドライン」の作成が未完であったが、当該感染症の本質を知るほど、そのコントロールには生活習慣病などのコントロールや基礎疾患を抱えるヒトの啓発活動も重要であり、それらを踏まえたガイドラインの作成を関連学会の協力を得て完成し、医療行政へ貢献したいと考える。

E. 結論

- 1) 3 ヶ年計画の研究目標として当初考えた目的はほぼ達成できた。
- 2) すなわち、溶血性レンサ球菌の 3 菌種 (GAS, GBS, SDSE) と肺炎球菌による侵襲性感染症の宿主側の発症に至る背景、およびその予後についてであるが、予想以上に当該疾患が多いこと、致命率も高いことが明らかにできた。
- 3) これらは動物モデル実験によっても明らかにできた。
- 4) SDSE の病原性は GAS のそれに匹敵することを SDSE の全ゲノム解析から明らかにできた。
- 5) 以上の結果は、壮年期以上に増加しているリスクファクター保持例をいかに減らすかにかかっていると結論される。
- 6) そのためには、今までの研究成果をホームページなどを通じて広く公開すること、引き続き公開シンポジウムを開催すること、そしてガイドラインの作成が必要であると結論された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 砂川慶介：IV治療 2.小児 細菌性髄膜炎

炎の診療ガイドライン (監修 日本神経治療学会, 日本神経学会, 日本神経感染症学会 編集 細菌性髄膜炎の診療ガイドライン作成委員会). p52-65, 医学書院, 東京, 2007年4月

- 2) 二本柳伸, 小幡 進, 中崎信彦, 平井誠, 平田泰良, 高山陽子, 大谷慎一, 狩野有作, 赤星 透, 砂川慶介, 井上松久: A 群連鎖球菌集団感染における迅速検出用キットの有用性評価. 感染症学雑誌. 81 : 441-448, 2007
- 3) 大石智洋, 砂川慶介: 全国小児科外来初診の呼吸器感染症患児より分離された *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* の検討 (2002~2003 年) —抗菌薬前投与のない児の鼻咽頭培養についての検討—. 日本感染症学雑誌, 81 : 449-455, 2007
- 4) K Sunakawa and D J Farrell: Mechanisms, Molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 6: 112-119, 2007
- 5) M Konno, S Baba, H Mikawa, K Hara, F Matsumoto, K Kaga, T Nishimura, T Kobayashi, N Furuya, H Moriyama, Y Okamoto, M Furukawa, N Yamanaka, T Matsushima, Y Yoshizawa, S Kohno, K Kobayashi, A Morikawa, S Koizumi, K Sunakawa, M Inoue and K Ubukata; Study of nasopharyngeal bacterial flora. Variations in nasopharyngeal bacterial flora in schoolchildren and adults when administered antimicrobial agents. Journal of Infection and Chemotherapy, 13 : 235-254, 2007
- 6) 砂川慶介: 侵襲性感染症とその検査に関する精度の検証. (研究班報告書), P1-56, 新日本印刷株, 東京, 2008年2月

- 7) 砂川慶介 : IV 中枢神経感染症。スタンダード微生物学-第 2 版- (土肥義胤, 山本容正, 宇賀昭二編集). P225-228, 文光堂, 東京, 2008 年 2 月
- 8) 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, P90-97, 2008
- 9) 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, 112 : P729-735, 2008
- 10) 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 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, 112 : P736-742, 2008
- 11) 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, 82:P187-197, 2008
- 12) 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, 20 : P115-122, 2008
- 13) Hamano-Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Chiba N, Murayama SY, 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 : 424-432, 2008
- 14) 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, 57 : P1383-1388, 2008
- 15) 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, 24 : P86-93, 2008
- 16) 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.,15 : 92-98, 2009
- 17) 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., 53 : 2650-2653, 2009
- 18) 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., 138 : 61-68, 2009
- 19) Matsui H, Sekiya Y, Nakamura M, Murayama SY, Yoshida H, Takahashi T, Imanishi K, Tsuchimoto K, Uchiyama T, Sunakawa K, Ubukata K.: CD46 Transgenic Mouse Model of Necrotizing Fasciitis Caused by *Streptococcus pyogenes* Infection. Infect Immun 11 : 4806-4814, 2009

- 20) Takahashi T, Sunaoshi K, **Sunakawa K**, Fujishima S, Watanabe H, and Ubukata K.: Clinical aspects of invasive infections with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Japan: differences with respect to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*. Clin Microbiol Infect DOI: 10. 1111/j.1469-0691. 2009.03047.x, **2009**
2. 学会発表
- 1) 輪島丈明, 砂押克彦, 小林玲子, 中山栄一, **生方公子**, 砂川慶介: A 群溶血性レンサ球菌のマクロライド系薬およびレボフロキサシン耐性化機構についての解析。第 55 回日本化学療法学会総会(仙台), **2007 年 6 月**
 - 2) T. Wajima, K. Sunaoshi, E. Nakayama, N. Chiba, K. Sunakawa, **K. Ubukata**: Prevalence of macrolide and levofloxacin resistance characterized genetically and *emm* typing in *Streptococcus pyogenes*. 47th ICAAC, Chicago, **2007 年 9 月**
 - 3) 関 千鶴子, 千葉菜穂子, 輪島丈明, 砂押克彦, 砂川慶介, **生方公子**: 侵襲性感染症由来 B 群溶血レンサ球菌の莢膜型と薬剤耐性化の動向。第 56 回日本感染症学会東日本地方総会 (東京), **2007 年 10 月**
 - 4) 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 年 4 月**
 - 5) 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 年 6 月**
 - 6) N. Chiba, M. Morozumi, T. Komori, S. Takahashi, M. Takano, **K. Sunakawa**, K. Ubukata. : Serotype Distribution and Antimicrobial Resistance in Invasive Pneumococcal Disease (IPD) in Japan. 48th ICAAC/IDSA, Washington DC, **2008 年 10 月**
 - 7) 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 年 10 月**
 - 8) 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 年 10 月**
 - 9) 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 回日本感染症学会総会, **2009 年 4 月**
 - 10) 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**
 - 11) 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**
 - 12) 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
- 13) 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
- 14) 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年5月
- 15) 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年5月
- 16) 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年9月
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

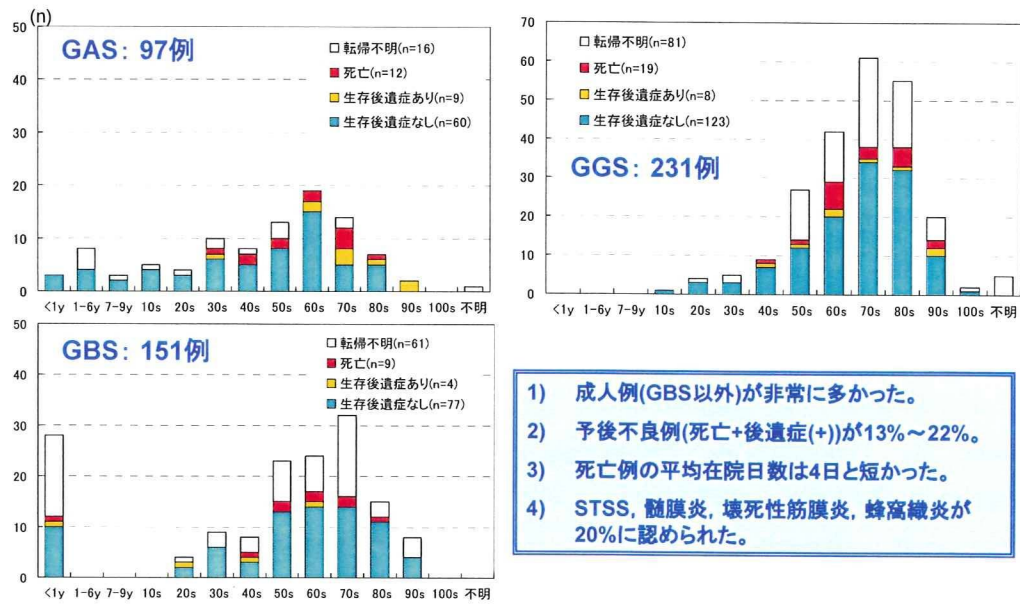


図1 β溶血レンサ球菌(GAS, GBS, SDSE)感染症の発症年齢と予後

表1 成人発症例の基礎疾患保有率と血液検査値

解析項目	GAS	GGS	GBS	肺炎球菌
予後不良率(%)	22.1%	17.3%	12.9%	27.7%
基礎疾患(+) ^{a)}	56.4%	75.0%	87.4%	56.1%
WBC (< 5,000 /μl)	4.5 ^{b)}	3.0	1.3	5.7
PLT (< 13×10 ⁴ /μl)	7.4	4.1	4.2	3.9
CRP (< 1 mg/dl)	0.8	0.2	1.1	0.3

a) 基礎疾患は糖尿病や悪性腫瘍術後が多く、次いで心、肝、腎疾患例が多く認められた。

b) WBC, PLT, CRPのカラム中、予後不良(死亡例+後遺症(+))群と、予後良好群間の検査値に有意差がみられた場合のOdds比を赤字で示した。

表2 溶血性レンサ球菌と肺炎球菌に対する耐性化状況

抗菌薬	耐性率(%)			
	GAS	SDSE	GBS	肺炎球菌
P C系	—	—	< 1%	45% 18%
β-ラクタム CEP系	—	—	< 1%	57% 30%
CBP系	—	—	—	< 1% < 1%
マクロライド系薬	23.7%	9.9%	15%	80%
ニューキノロン系薬	< 1%	1%	27%	< 1%

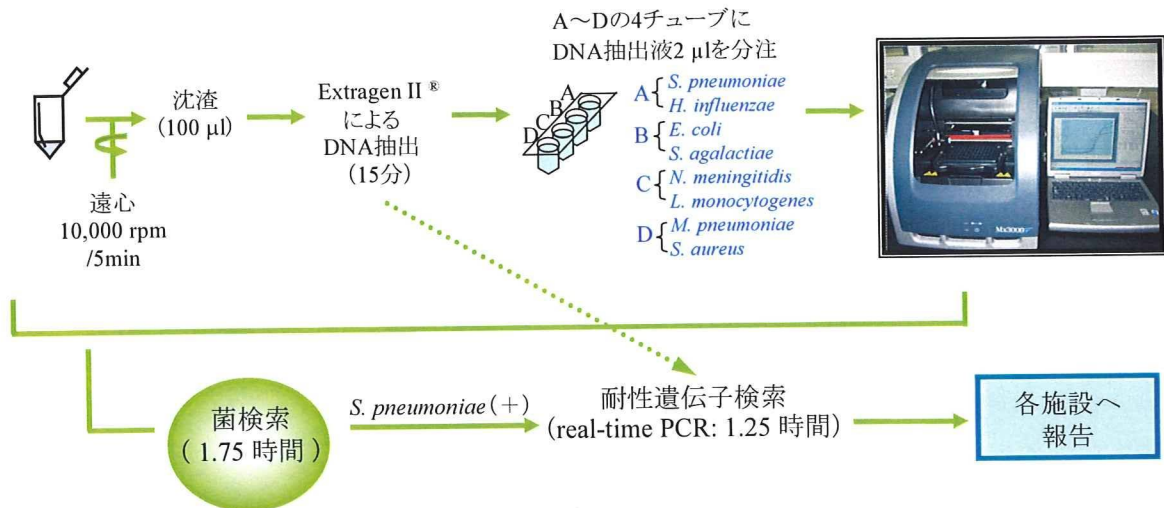


図2 無菌的検査材料用 real-time PCR 法のプロトコール

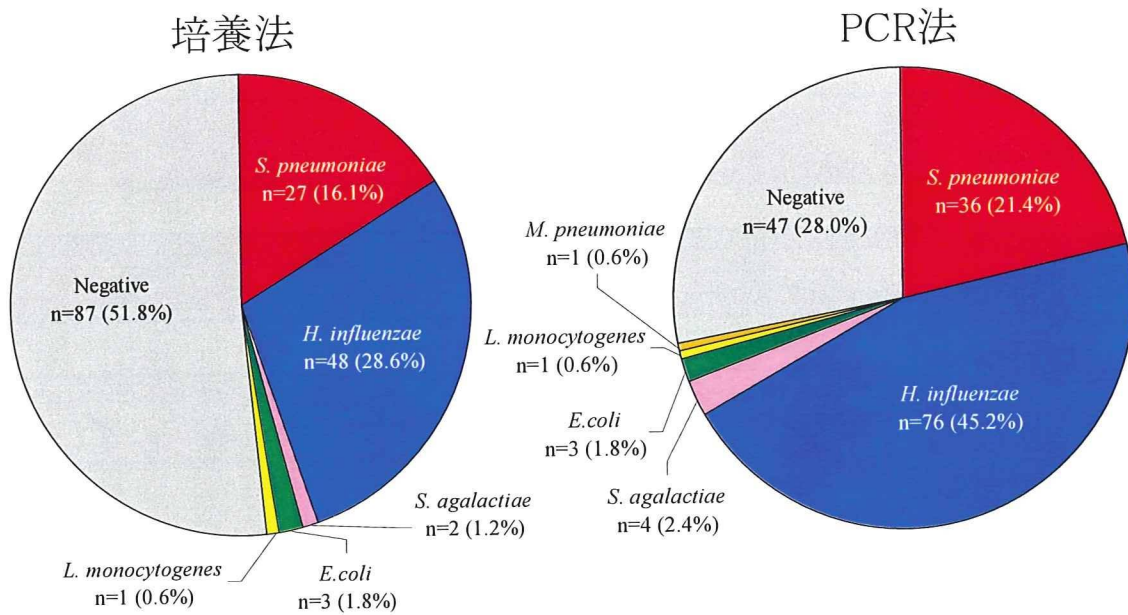


図3 Real-time PCR 法と培養法での陽性率の比較 (化膿性髄膜炎由来髄液)

表3 SDSE の RE378 株と他の *Streptococcus* 属菌種ゲノムとの比較

菌種	解析された ゲノム数	ゲノムサイズ (Mbp)	GC%	Cover* (%)
SDSE	3	2.11 - 2.21	39	—
<i>S. pyogenes</i> (GAS)	13	1.82 - 1.94	38	61- 63
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	2	2.15 - 2.03	41	29
<i>S. agalactiae</i> (GBS)	3	2.13 - 2.21	35	15
<i>S. thermophilus</i>	3	1.80 - 1.86	39	10
<i>S. pneumoniae</i> (肺炎球菌)	11	2.04 - 2.25	39	9
<i>S. suis</i>	5	2.01 - 2.05	41	9
<i>S. sanguinis</i>	1	2.39	43	6

*mega BLAST による cover 率

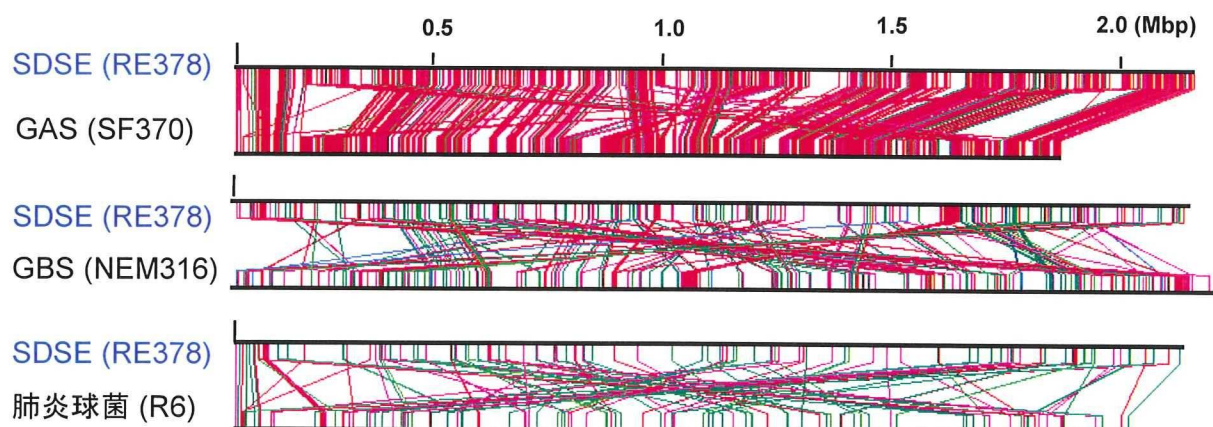


図4 SDSE(劇症型由来 RE378 株)と GAS, GBS あるいは肺炎球菌ゲノムとの比較
赤のラインが最も相同性が高いことを示す。次いで、ピンク、グリーン、ブルーとなっている。SDSE は GAS と相同性が高いことがしめされている。GBS や肺炎球菌とは相同性は低い、一部相同性の高い遺伝子があり、それらの菌種間で遺伝子の水平伝播が生じていることが推定された。

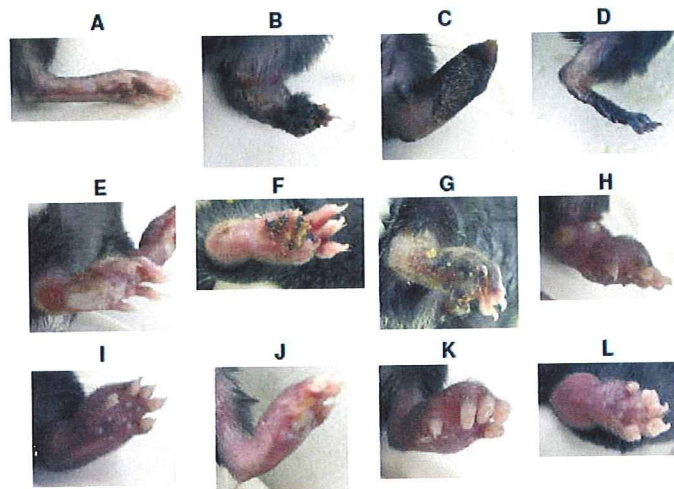
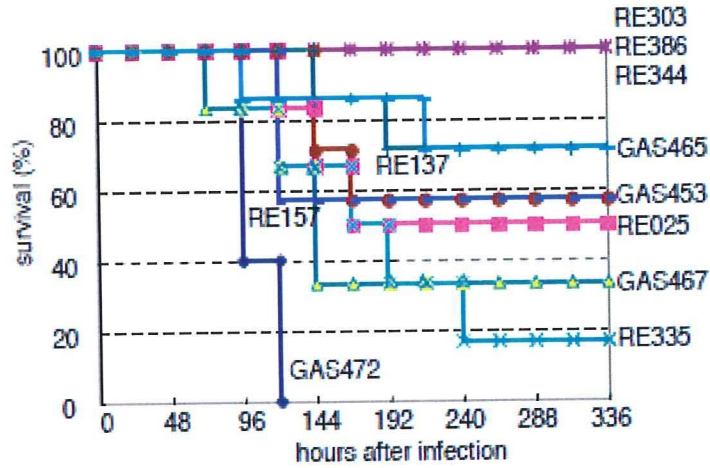


図5 1×10^7 CFU の菌数を hCD46Tg マウスの footpad へ投与した時の生存曲線と投与 72 時間後の足の状態。

被験菌は侵襲性感染症由来の GAS と SDSE。A, 非感染; B, GAS472; C, GAS467, D, RE025; E, RE335; F, GAS465; G, GAS453; H, RE303; I, RE386; J, RE137; K, RE157; RE344.

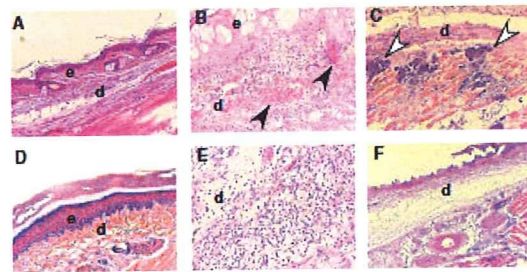


図6 GAS472(1×10^7 CFU)の菌数を hCD46Tg あるいは non-Tg マウスの footpad へ投与した時皮膚組織の変化

(H&E 染色, A,B,C, hCD46Tg マウス ; D,E,F, non-Tg マウス ; A,D, 非感染 $\times 100$; B,E, 感染後 24 時間 $\times 200$; C,F, 感染後 48 時間 $\times 100$). The closed arrowheads indicate hemorrhaging in the dermis. The open arrowheads indicate the necrotic striated muscle layers. E, epidermis; d, dermis.

GGSによる劇症型感染症では発症者において糖尿病や悪性腫瘍などの基礎疾患が高頻度に存在する。そこで糖尿病マウスで同菌感受性が上昇しているかどうかを、菌投与後の生死観察で検証した。

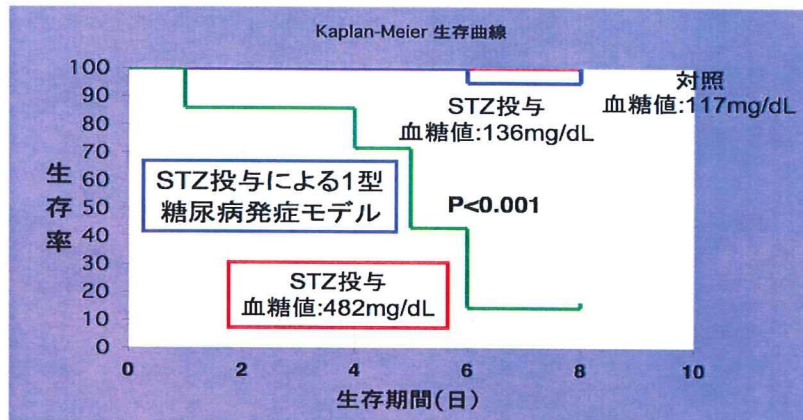


図7 SDSE(G群レンサ球菌)による劇症型感染症のモデル構築 (2型糖尿病マウスモデル)

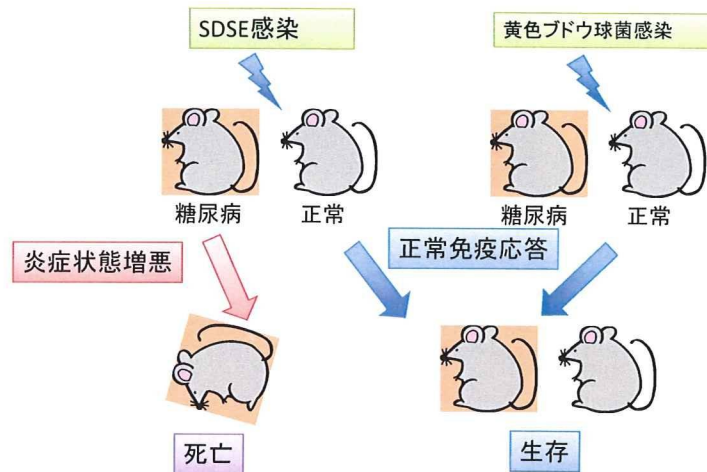


図8 SDSE感染症の糖尿病状態での劇症化機構

表 4. 関連学会と共同開催したシンポジウム

I. 共催シンポジウム-1

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—

学 会: 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

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

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

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

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

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

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

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)

II. 共催シンポジウム-2

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—

学 会: 第 21 回日本臨床微生物学会総会

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

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

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

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

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

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

矢越美智子 (日大医学部附属板橋病院臨床検査部)

Real-time PCR 法による B 群溶血性レンサ球菌の迅速検索法の確立

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

研究協力者 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

研究協力者 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 医師

研究協力者 五十嵐優子 順天堂大学医学部静岡病院周産期医療センター 医師

研究要旨 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を行った。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。

GBS では新生児感染症が最も問題である。このため産道感染症の予防を目的として、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、GBS 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 法を新規に構築した。

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、予防対策が行なわれてきた。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。

日本においても日本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ものの、65 歳以上の成人における GBS 感染症が増加していると述べられている。

このような背景から、GBS による感染の有無を短時間で診断できる real-time PCR 法を新たに構築することが必要と考え、その構築を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究では、症例由来の検査材料を扱うが、個人が特定されるような情報は原則として含まない。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