

201028045A

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

重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイ
ランスの構築と病因解析，その診断・治療に関する研究

(H22－新興－一般－013)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 生方 公子

平成 23(2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析,
その診断・治療に関する研究 1
生方 公子

II. 分担研究報告書

1. 全国規模で収集した侵襲性感染症由来・肺炎球菌の分子疫学解析：
ワクチン接種の基盤となる莢膜型の変化 9
生方 公子, 藤島清太郎, 坂田 宏, 高橋 孝, 大石 和徳
2. 全国規模で収集した溶血性レンサ球菌の分子疫学解析 19
生方 公子, 藤島清太郎, 高橋 孝
3. 北海道・道北地域における小児の侵襲性肺炎球菌感染症に関する研究 26
坂田 宏
4. 救急・総合診療分野における劇症型レンサ球菌・肺炎球菌感染症例の病態解析と
その治療法に関する研究 30
藤島清太郎
5. 成人における侵襲性レンサ球菌・肺炎球菌感染症例における病態解析と
最適治療法の確立 33
高橋 孝
6. 北タイにおけるヒト *Streptococcus suis serotype 2* 感染症の臨床細菌学的研究 39
大石 和徳
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
病原因子の解明 43
池辺 忠義, 阿戸 学, 渡邊 治雄, 松村 隆之
8. 劇症型溶連菌感染発症における宿主因子の解析 48
阿戸 学, 池辺 忠義, 渡邊 治雄, 松村 隆之
9. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)を中心としたレンサ球菌
劇症型感染モデルの構築および分子基盤に関する研究 54
秋山 徹
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解明と
治療に係る基礎的研究 58
松井 英則, 生方 公子

11. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (SDSE)の全ゲノム解析.....	65
生方 公子, 村山 琮明, 岡田 圭祐	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	73
IV. 附(ホームページ作成報告書)	77
生方 公子	

総括研究報告書

重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析, その診断・治療に関する研究

研究代表者 生方 公子 北里大学北里生命科学研究所 病原微生物分子疫学研究室 教授

研究要旨

3カ年計画の1年目であるH22年度は、侵襲性感染症解析のためのサーベイランスシステムを構築(参加医療機関232施設)、肺炎球菌と溶血性レンサ球菌をあわせて約1,000株を収集し、主に菌側の因子を解析した。肺炎球菌(n=467)についてはワクチン接種の基礎データとなる莢膜型と薬剤耐性遺伝子を解析、小児用7価結合型ワクチンのカバー率は73%、成人用の23価ワクチンのカバー率は79%であることを明らかにした。耐性肺炎球菌(gPRSP)は小児で55%、成人では34%へと明らかに増加していた。レンサ球菌のうち、GASとSDSEは病原性と関連するMタンパクを遺伝子レベルで解析、GASでは依然としてemml型が欧米と同様に優位であること、しかしSDSEでは諸外国にはみられないstG6792型が優位であることを明らかにした。GBSでは莢膜型とMLST解析を行い、小児では莢膜Ⅲ型と成人ではニューキノロン耐性のIbが多く、両者には明らかな違いを認めた。肺炎球菌とレンサ球菌に対する迅速診断法の臨床応用を行なった。また、啓発活動のためのwebsiteを作成し公開、アクセス数は5,000件に達した(疫学関係)。

病態・疫学を担当する分担研究者は、個々の研究テーマについて協力者とともに肺炎球菌あるいは溶血性レンサ球菌、*Streptococcus suis*感染症について、菌と宿主の面から病態解析を行った(病態・疫学関係)。

菌のビルレンス解析ならびに動物モデルの構築については、発現調節遺伝子*csrS*と*rgg*遺伝子の好中球機能に及ぼす影響と感染モデルマウスにおける病態を解析し、*csrS*遺伝子変異の方が劇症型感染に影響が大きいことを明らかにした。ヒトCD46発現トランスジェニックマウスへのGASおよびSDSEの接種実験により、ヒト類似疾患の病態が惹起されることを明らかにした。さらに糖尿病モデルマウスでは溶血性レンサ球菌に対する感受性が高進しており、強い炎症性応答の発現が関与しているであろうことを明らかにした(病原因子に関する基礎解析)。

今までにゲノム解析が行われていないSDSE株について、ヒト由来とブタ由来株についてゲノム解析を行い、GAS、GBS、肺炎球菌、その他の溶血性レンサ球菌と病原因子をコードする遺伝子の比較を行い、GASとSDSEは極めて遺伝子相同性が高く、病原遺伝子が共通していることを証明した(ゲノム解析)。

研究分担者：

所属期間名および所属機関における職名

1) 坂田 宏

旭川厚生病院小児科 主任部長

2) 藤島清太郎

慶應義塾大学医学部救急医学 准教授

3) 高橋 孝

北里大学大学院感染制御科学府感染症学
教授

4) 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 特任教授

- 5) 渡邊 治雄
国立感染症研究所 所長
- 6) 阿戸 学
国立感染症研究所 免疫部 第二室長
- 7) 池辺 和義
国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官
- 8) 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

A. 研究目的

ヒトに強い病原性を発揮する β 溶血性レンサ球菌には、A群溶血性レンサ球菌(GAS)、B群溶血性レンサ球菌(GBS)などが知られる。中でも、GASは「劇症型レンサ球菌感染症」の原因菌として社会問題化し、現在、本症は感染症法の五類感染症に指定されている。また、GBSは出産時における新生児感染症あるいは高齢者の敗血症の原因菌として知られる。近年、さらに、病原性に乏しいとされてきたC群、G群溶血性レンサ球菌(正確な菌種名：*Streptococcus dysgalactiae subspecies equisimilis* (SDSE))、あるいはブタレンサ球菌(*Streptococcus suis*)による劇症例や侵襲性レンサ球菌感染症例の増加が報告されている。その他に、肺炎の原因菌として最も重要な肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)感染症において耐性化が進行し、中には劇症例も散見される。

本研究班は、初年度(H22年度)においては溶血性レンサ球菌・ならびに肺炎球菌感染症由来の菌株を全国規模で収集し、その分子疫学解析を行うことを第一の目的とした。

また、それぞれの感染症における発症に至る種々の因子について、宿主、菌、および抗菌薬の3方向から総合的に解明することを第二の目的とした。また、基礎的研究として動物感染モデルの構築と感染実験による実証を行うことを第三の目的とした。

それらに加え、過去3年間に解析したデー

タを元に website を立ち上げ、順次新たな解析データを追加することにより、医療関係者ならび一般市民に対しても広く啓発を行なうことも目標のひとつとした。

本研究の成果は、我が国における劇症型、ならびに侵襲性レンサ球菌・肺炎球菌感染症の実態を明らかにすることができ、さらには小児に対する肺炎球菌7価コンジュゲートワクチン(PCV7)接種による莢膜型の変化の基礎データとして、市中における重症感染症の予防対策に貢献できることが期待される。

B. 研究方法

1. 菌株の収集：

本研究は上記の目的を達成するため、3年計画の1年目であるH22年度は、日本臨床微生物学会に所属する学会員の協力を得て、侵襲性レンサ球菌・肺炎球菌感染症由来の菌株を収集した。収集に際してはあらかじめ医療機関の長あるいは所属部門長の許可を得て行なわれ、最終的には全国232医療機関の協力を得た。

H22年6月からH23年3月までの10ヶ月間に、①肺炎球菌:467株、②GAS:102株、③GBS:180株、④SDSE:208株、⑤その他の溶血性レンサ球菌:42株、合計999株が収集された。その他に、研究分担者は自施設において、それぞれが担当する菌種の菌株を収集した。

2. 患者背景因子に関する調査：

菌株の分与を受ける際、当該例の背景因子、入院時の血液検査所見、入院後の治療と予後に関し、アンケート用紙への記入を依頼した。

3. 被験菌株の解析：

肺炎球菌では抗血清を用いた莢膜型別(Stetens Institute Denmark)と薬剤耐性遺伝子解析、レンサ球菌のうちGASとSDSEについては病原因子のひとつで疫学解析に応用されるMタンパクをコードする *emm* 遺伝子

について解析した。また、ペニシリン系薬、セフェム系薬、マクロライド系薬、ニューキノロン系薬等の抗菌薬感受性についても遺伝子レベルで調べた。GBS についてはその病原因子のひとつである莢膜の型別と Multilocus Sequence typing(MLST)を実施した。

4. 菌の病原因子の解析：

主に GAS の 2 成分系遺伝子(*csrS*)と、各種産生物の産生状況の関係を調べ、その病原性の強さを動物実験によって調べた。

5. 動物モデルによる解析：

遺伝子組み替えマウスあるいは糖尿病モデルマウスを用い、動物実験による基礎研究によって菌の病原性の違いと宿主リスクファクターの関係を調べた。

6. 啓発活動：

Website (<http://strep.umin.jp/>)を構築し、日本感染症学会、日本臨床微生物学会、日本化学療法学会会員には直接閲覧できるようにした。

(倫理面への配慮)

本研究で行う発症例に関するアンケート調査と菌株収集にあたっては、依頼時に「個人が特定できるような質問事項は含まない形式」とした。従って、研究成果の公表に際し、個人情報が含まれることはない。仮に個人情報が誤って記載されていたとしても、それに関する機密保持には万全を期した。なお、アンケート調査については、その内容によっては、北里大学に設置された医学研究倫理審査委員会でのクリアランスを得るようにする。基礎研究における動物実験の実施は、「動物の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研究を行った。

C. 研究結果 および D. 各研究の結論

I. 肺炎球菌株の分子疫学解析

上記の期間に収集された 467 株の肺炎球菌の内訳は、小児由来が 252 株、成人由来が 214 株、年齢不明 1 株であった。 β -ラクタム系薬に対する遺伝子レベルでみた耐性化状況は、小児では gPRSP が 3 年前の 46.1% から 54.9% へと増加、gPSSP はそれとは逆に 14.1% から 8.3% へと減少していた。成人においてはさらに耐性化が著明で、gPRSP は 17.3% から 34.1%、gPISP(*pbp2x* 変異)も 37.4% へと増加していた。対照的に gPISP(*pbp2b* 変異)は 12.0% から 0.9%、gPSSP は 24.6% から 13.6% へと激減していた。

菌の耐性化は病原性に関わる莢膜型の変化と密接に関連していた。すなわち、小児では耐性菌が多くを占めるため、PCV7 に含まれ、かつ耐性菌の多い 6B 型の割合(29%)が高く、次いで 23F, 19F, 14 型が優位であった。これら 4 種で全体の 66% を占めていた。最も注目される PCV7 のカバー率は 73.1%であった。ワクチンに含まれない 19A と 6A の増加していることが注目された。

成人由来株ではムコイドの 3 型(gPISP)が最も多く、次いで 6B, 23F, 19A, 14 型の順であった。3 年前の同様の成績に較べて 12F 型が激減し、莢膜型が大きく変化していた。また、小児と同様に 19A, 6A, 23A の明らかな増加傾向が認められた。ちなみに PPV23 のカバー率は 78.5% であった。

欧米でワクチン接種後に増加が指摘されている莢膜型の 19A と 6A 型菌が我が国でも増加していることが明らかにされた。小児に対する公費助成による PCV7 接種化でどのように菌が変化していくのか、全国規模でのサーベイランスを引き続き実施していくことが必要であると結論された。

II. 溶血性レンサ球菌株の疫学解析

1. GAS と SDSE

発症年齢の平均は GAS(n=102)が 60 代、SDSE(n=208)は 80 代と高齢者に多く発症していた。これらの 2 菌種の侵襲性感染症は、蜂窩織炎、壊死性筋膜炎、化膿性関節炎等の化膿性疾患が多く、GAS および SDSE とも 43%を占めていた。

疫学解析としての *emm* 型別では、GAS は *emm1* 型が 36%と圧倒的に多く次いで *emm89* 型の 13%であった。この成績は前回の成績と有意な差は認められなかった。一方、SDSE においても依然として *stG6792* 型が 28%と優位であることに変わりはないが、前回多かった *stG435* 型が減少し、米国で多い *stG245* と *stG653* 型の増加傾向がみられた。

2. GBS

小児由来株は遅発型(生後 1 週間以上 3 ヶ月以内)の GBS 感染症が多く 70%を占めていた。それらの菌株の莢膜型はⅢ型が多く次いで Ia 型であり、その他の型はわずかであった。これに対し成人の平均年齢は 70 代と高齢で、悪性腫瘍の手術後をはじめとし、糖尿病、肝疾患や心疾患など多様な基礎疾患保持例が 80%みられた。莢膜型は Ib 型が多く、その他にさまざまな莢膜型が見られたがⅢ型は 20%程度であった。特に、成人由来の Ib 型の大半はニューキノロン系薬に高度耐性化しており、発症例の増加傾向がみられた。

その他の溶血性レンサ球菌による症例も 42 例認められ、菌そのものの病原性よりも、むしろ宿主側のリスクファクターが大きいと考えられた。

以上の溶血性レンサ球菌に関する疫学成績は、高齢化の進行ならびに基礎疾患を有する人口増により、従来病原性が低いとされてきた SDSE を含むレンサ球菌によって新たな侵襲性感染症が惹起されていることを示している。

III. 小児における侵襲性肺炎球菌感染症の罹患率(坂田)

人口 10 万人あたりの侵襲性感染症の罹患率を算出するには正確な調査が必要であり、人口が比較的一定して把握しやすいことが必要である。2000 年 4 月から 2010 年 3 月までの北海道・上川および宗谷支庁(面積約 13,902km²、人口約 61 万人)における小児の侵襲性肺炎球菌感染症を調査した。

症例は前期 5 年間で 42 例、後期 5 年間で 61 例であった。10 年間における IPD の罹患率は 5 歳未満では人口 10 万人あたり 41.3 であり、前期(2000 年～2004 年)は 32.0、後期(2005 年～2010 年)は 48.8 と増加傾向がみられた。

患者の年齢分布は 1 歳が 51 例(49.5%)と最も多く、ついで 1 歳未満が 23 例(22.9%)であった。疾患は肺炎が 54 例(52.9%)、occult bacteremia が 34 例(33.3%)、髄膜炎が 5 例(4.9%)であった。莢膜型は 77 株が調べられたが、6B 型が最も多く 24 株(31.2%)、ついで 23F が 11 株(14.3%)、19F が 10 株(13.0%)であった。7 価肺炎球菌コンジュゲートワクチン(PCV7)のカバー率は 71.4%、PCV13 のそれは 83.1%であった。

IV. 救急・総合診療分野における感染症例の病態解析とその治療(藤島)

重症型レンサ球菌・肺炎球菌感染症の臨床像を明らかにすることを目的に、i)日本救急医学会による UMIN 敗血症登録システムを完成させた。ii)2011 年 2 月 25 日の時点で、229 例の重症敗血症症例に関する詳細な臨床情報が集積された。iii)レンサ球菌・肺炎球菌感染症の後ろ向きおよび前向き調査を開始した。

また、82 歳の SDSE による髄膜炎例を経験し、適切な抗菌薬療法を施行したにもかかわらず、急速に病態が悪化していた。その他に、国立災害医療センターとの共同研究によ

り、劇症型肺炎球菌感染症の後ろ向きおよび前向き調査を開始しているが、無菌的検体から肺炎球菌が分離された 39 症例に対する後ろ向き解析の結果、死亡例で凝固異常の合併が多い傾向を認めた。

V. 内科系領域における感染症例の病態解析 (高橋)

高齢者急性期病院との共同研究により、侵襲性レンサ球菌感染症に関する予後を含め、その病態解析を行った。先の報告にもみられるように、高齢者の市中発症型重症感染症では SDSE や GBS による奨励が多数を占めていた。その好発年齢は 80 歳代であった。疾患としては肺炎・尿路敗血症・蜂窩織炎が主であった。このような侵襲性感染症を呈する GBS の莢膜型は、その半数が Ib であった。細菌培養と同時に入院時に測定された血小板数の低値や CRP 値の高値が予後不良因子の指標となる可能性が示唆された。

一方、侵襲性肺炎球菌感染症の発症年齢は 60 歳代にピークがあり、その病態は肺炎、肺炎敗血症、敗血症・髄膜炎が多くを占めた。後遺症残存症例から分離された菌株の莢膜型は、現行の PPV23 ワクチンがカバーしていない 23A 型や 15A 型であった。溶血性レンサ球菌と同様に、肺炎球菌感染症においても入院時に測定された白血球数の低値や CRP の高値が予後不良因子の指標となる可能性が示唆された

VI. *Streptococcus suis* 感染症(大石)

我が国における *Streptococcus suis*(*S. suis*) 感染症は、食肉業者等に散見されるレンサ球菌感染症である。タイ国内では当該菌によるヒト発症例が多い地域があるが、それらの地域において後方視的研究を実施した。そのうち 158 例が serotype 2 による侵襲性感染症であった。その病態について調べた。*S. suis* による感染症は成人のみに発症し、致命率

は 9.5%であった。病型の 58.9%は髄膜炎カテゴリー(血液あるいは髄液培養陽性の髄膜炎例)、残り 41.1%は非髄膜炎カテゴリー(敗血症あるいは血液培養陽性の化膿性関節炎等)であった。

被験菌株に対する Multilocus Sequence Typing (MLST)による解析結果では、主要な Sequence typing (ST)の ST1 と ST104 型に属する菌株が敗血症を起こしうるのに対し、ST1 型のみが髄膜炎を惹起していた。

2010 年より実施しているパヤオ県の全住民ベースの前向き研究において、18 症例中 87.4%の患者が発症直前に豚生製品を摂取しており、その後平均 3 日以内に熱性疾患を発症していた。18 例中のうち、10 例が serotype 2、5 例が serotype 14 に起因していた。

これらの調査から、*S. suis*による感染症はブタの腸管内に棲息する菌が生肉等に付着してヒトの体内に侵入し発症することが明らかである。我が国においてもこれらの感染症を防止するために飲食業者を含めた啓発活動が必要であると結論された。

VII. 劇症型レンサ球菌感染症重症化に係る菌側病原因子の解明(池辺, 渡邊)

GAS による劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株に特異的に *csrS/csrR* 遺伝子、あるいは、*rgg* 遺伝子に変異が認められる。これらの変異により、病原性因子の発現が上昇し、劇症型感染症を引き起こすことが示唆された。劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、*csrS/csrR* 遺伝子と *rgg* 遺伝子の変異が病原性にどのような影響を与えているか比較するため、咽頭炎由来株の *csrS* 遺伝子および *rgg* 遺伝子の変異株を作成し、マウスに対する致死性、および、病原性遺伝子の発現について調べた。その結果、*csrS* 遺伝子変異株は、*rgg* 遺伝子変異株より多くの病原性遺伝子の発現を上昇させ、マウスに対する致死性も強いことが明らかにできた。

VII. 劇症型レンサ球菌感染発症における宿主因子の解析(阿戸, 渡邊)

劇症型溶血性レンサ球菌感染症において、GAS がどのように宿主防御を障害するのかその詳細は不明である。H22年度においては、劇症型感染患者分離株のみに認められる、*csrS* 遺伝子変異株とは別の遺伝子発現調節因子をコードする *rgg* 遺伝子の変異が好中球機能に及ぼす影響と、感染マウスモデルにおける病理学的所見を解析した。それらの研究により、*rgg* 遺伝子に変異が認められた劇症型臨床分離株、および非劇症分離株に *rgg* 遺伝子を欠損させた株において好中球傷害は起こるが、遊走は抑制しないことが明らかになった。また、劇症型感染マウスモデルにおいて、*rgg* 変異株の感染組織では、好中球を主とする炎症細胞の浸潤と菌の蓄積が共に認められた。これらの所見は、劇症型レンサ球菌感染症起因菌の遺伝子変化によって、病原因子発現パターンが異なり、感染局所での好中球防御能を様々に障害する結果、感染部位での特異な病態を伴う劇症型感染を惹起する可能性を示唆している。

VIII. SDSE レンサ球菌劇症型感染モデルと分子基盤の構築(秋山)

新たに注目されている SDSE による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析をおこなうため、SDSE 感染時の糖尿病マウスの炎症性応答に関与する液性因子を特定するため、28種類の因子の血清レベルを測定した。その結果、遺伝子発現解析の結果と同様に、SDSE に特異的な液性因子の放出パターンを特定できた。これらの結果より、糖尿病時の SDSE 感染時の劇症化の宿主側における分子基盤が明らかとなり、治療法確立への方策を提供するものと結論された。

IX. 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解明(松井, 生方)

ヒト CD46 発現トランスジェニック (hCD46Tg)マウスを用い、GAS の感染モデルを構築した。劇症型 GAS 感染症(STSS)の患者血液から分離された血清型 M1(*emm1* 型)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。一方、non-Tg マウスは、同様の感染では生存した。hCD46Tg マウスの感染局所では、横紋筋融解症を伴った重篤な壊死性筋膜炎(necrotizing fasciitis, NF)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(osteonecrosis)が観察された。そこで、感染局所の骨と膝下リンパ節から RNA を調製し、リアルタイム RT-PCR 法によって各種サイトカインの発現量の変化を解析した。その結果、RANKL (nuclear factor NF- κ B ligand)の発現と感染局所の骨における破骨細胞の発現に強い相関が認められた。

X. SDSE 株の全ゲノム解析(村山, 生方)

ヒト劇症型感染症由来の SDSE #RE378 株とブタ由来の SDSE #L1 株について、昨年度までに全ゲノム解析を行いアノテーションまで完成させた成績について、本年度は GAS や GBS 等の保持する病原遺伝子やゲノム構造の比較に重点をおいて解析した。また、動物由来の SDSE 株を 11 株収集し、ヒト由来の SDSE 株と比較解析した。その結果、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 SDSE が形成されたという私どもの推定を確認するものであった。動物由来株は同じ SDSE 菌種でありながらヒト由来株と大きく違うと考えられ、おそらく SDSE の起源に

近いと推定される。また動物由来株の中にも少数ながらヒト由来株と同タイプが認められ、ヒトと動物の接点という意味で SDSE は極めて重要であると結論された。

E. 総括的結論と考察

3カ年計画の1年目において、全国232医療機関に所属する細菌検査室の協力を得て、市中で発生するβ溶血性レンサ球菌と肺炎球菌による侵襲性感染症由来株を約1,000株収集し、先ず菌側の解析として莢膜型別、emm型別、耐性遺伝子解析を行った。また、一部のアンケート用紙に記載された患者背景因子についても解析した。これらの成績からは、我が国において発生している侵襲性感染症の実態、すなわち肺炎球菌とGBSにおいては乳幼児と高齢者、GASとSDSEでは高齢者がほとんどを占めること、基礎疾患を有する例が極めて多いことがあらためて明らかにされた。また、疫学的には菌の莢膜型が変化してきていることを明らかにした。これらの成績は、この実態を広く医療関係者に認識させる情報公開が必要であると同時に、今後発症例の詳細な解析が必要であることを示唆している。

また、種々の基礎実験や動物モデルを用いた結果がそのことを裏付けつつあると考えている。

2年目以降においては、1年目の成果を論文として公表すると同時に、さらに、救命救急医学会とも連携し、重症化の要因を探ると共に、予後不良例を減らすにはどのような臨床的処置が必要であるのかを検討したい。さらに、診断法としてのreal-time PCRによる迅速診断法のキット化はほぼ確立したのでその精度検証を行いたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (論文発表のみ)

(各分担研究者については、それぞれの報告書に記載)

1. 論文発表

- 1) Matsui H, Sekiya Y, Takahashi T, Nakamura M, Imanishi K, Yoshida H, Murayama SY, Takahashi T, Tsuchimoto K, Uchiyama T, **Ubukata K**. Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus pyogenes* in mice. J Med Microbiol. 2011 Jan;60(Pt 1):128-34.
- 2) Sakai F, Chiba N, Ono A, Yamagata Murayama S, **Ubukata K**, Sunakawa K, Takahashi T. Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009. J Infect Chemother. 2010 Dec 15. PubMed PMID: 21161561.
- 3) Shimomura Y, Okumura K, Murayama SY, Yagi J, **Ubukata K**, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). BMC Genomics. 2011 Jan 11;12:17.
- 4) Suzuki K, Kurono Y, Kobayashi T, Nishimura T, Baba S, Harabuchi Y, Fujisawa T, Yamanaka N, **Ubukata K**, Ikeda F. [Mutant prevention concentrations of garenoxacin against *Streptococcus pneumoniae* isolates from otorhinolaryngological infections]. Jpn J Antibiot. 2010 Aug;63(4):312-8.
- 5) Yoshino M, Murayama SY, Sunaoshi K, Wajima T, Takahashi M, Masaki J, Kurokawa I, **Ubukata K**. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* isolates that lack large regions of

the sag operon mediating streptolysin S production. J Clin Microbiol. 2010 Feb;48(2):635-8.

- 6) Takahashi T, Asami R, Tanabe K, Hirono Y, Nozawa Y, Chiba N, **Ubukata K**. Clinical aspects of invasive infection with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in elderly patients. J Infect Chemother. 2010 Feb;16(1):68-71.
- 7) Asami R, Okada K, Chiba N, **Ubukata K**, Takahashi T. [Molecular features of beta-hemolytic streptococci isolated from blood in adult invasive infection and the clinical background factors]. Kansenshogaku Zasshi. 2010 May;84(3):285-91.

- 8) Takahashi T, **Ubukata K**, Watanabe H. Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features. J Infect Chemother. 2011 Feb;17(1):1-10.
- 9) Yamaoka S, Ogihara T, Yasui M, Hasegawa M, Hira S, Oue S, **Ubukata K**, Watanabe H, Takahashi T. Neonatal streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Pediatr Infect Dis J. 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担研究報告書

全国規模で収集した侵襲性感染症由来・肺炎球菌の分子疫学解析： ワクチン接種の基盤となる莢膜型の変化

代表研究者 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
分担研究者 藤島清太郎 慶應義塾大学医学部救急医学 准教授
分担研究者 坂田 宏 旭川厚生病院小児科 主任部長
分担研究者 高橋 孝 北里大学大学院感染制御科学府 感染症学 教授
分担研究者 大石 和徳 大阪大学微生物病研究所 特任教授

研究要旨

1. 2010年4月から2011年1月にかけて、全国232医療機関の協力により、市中発症の侵襲性感染症由来・肺炎球菌を467株収集した。その内訳は小児由来が252株、成人由来が214株、年齢不明1株であった。
2. β -ラクタム系薬に対する耐性化状況は、小児においてはgPRSPが3年前の46.1%から54.9%へと増加、それとは逆にgPSSPは14.1%から8.3%へと減少していた。成人においてはさらに耐性化が著明で、gPRSPは17.3%から34.1%へ、gPISP(*pbp2x*変異)も37.4%へと増加していた。対照的にgPISP(*pbp2b*変異)は12.0%から0.9%、gPSSPは24.6%から13.6%へと激減していた。
3. 耐性化状況の変化は、病原性に関わる莢膜型の変化と密接に関連していた。すなわち、小児では耐性菌が多くを占め、かつPCV7に含まれる6B型が29%、次いで23F、19F、14型が優位であった。これら4種で全体の66%を占めていた。PCV7のカバー率は73.1%であった。ワクチンに含まれない19Aと6Aの増加していることが注目された。
4. 成人由来株ではムコイドの3型(gPISP)が最も多く、次いで6B、23F、19A、14型の順であった。3年前の同様の成績に較べて12F型が激減し、莢膜型が大きく変化していた。また、小児と同様に19A、6A、23Aの明らかな増加傾向が認められた。ちなみにPPV23のカバー率は78.5%であった。
5. 欧米でワクチン接種後に増加傾向が指摘されている莢膜型の菌が増加していることが明らかにされた。小児に対するワクチン定期接種化でどのように菌が変化していくのか、全国規模でのサーベイランスを引き続き実施していくことが必要であると結論された。

研究協力者

- ・千葉菜穂子 北里大学北里生命科学研究所
- ・諸角美由紀 北里大学北里生命科学研究所

において耐性菌が出現した。免疫学的に未成熟な小児において、特にそれらによる化膿性髄膜炎を含む重症・侵襲性感染症が治療上深刻な問題を提起してきた。

A. 目的

本邦においては1990年代の半ばより、呼吸器感染症の原因菌として重要な肺炎球菌

一方、急速な高齢化社会の到来とともに、最近では壮年層以上の成人における同様の重症感染症例が増加している。

先の研究事業において、2006年から2007年にかけて「全国規模のサーベイランス」を実施し、500例以上の解析を行ない報告したが、肺炎球菌感染症は小児のみならず、むしろ基礎疾患を有する成人において有意に予後不良であることを報告した。

新規本研究事業においては、我が国の侵襲性感染症から分離される肺炎球菌がどのように変化しつつあるのか、全国規模で再び菌株の収集を行ない、分子疫学的にその変化を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

収集菌株：

解析対象期間は、2010年5月から2011年1月までの9ヶ月間である。全国230医療機関の細菌検査室から、計467株の送付を受けた。小児由来が252株、成人由来が214株、年齢不明が1株であった。こ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、閉鎖性膿汁などから分離された菌株である。

菌株の解析項目：

- i) 病原性に関わる莢膜型は、デンマークの Statens Serum Institute より購入した抗血清を用い、顕微鏡下に莢膜膨化の有無を試験した。
- ii) Real-time PCRによる薬剤耐性遺伝子、すなわち *pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b* 遺伝子、ならびにマクロライド系薬剤耐性に関わる *mefA* と *ermB* 遺伝子の解析
- iii) 各種治療用抗菌薬感受性の測定

(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連結不可能匿名化を行って配慮した。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、研究成果の公表にあたり個人情報が含まれることはない。

C. 研究成果

1. 発症例の年齢分布

図1には発症例の年齢分布を示す。また、その疾患の内訳は図2に示す。

小児例と成人例はほぼ同数であったが、小児では1歳代の発症が最も多く、発症例の大部分が3歳までであった。最も多かったのは敗血症・菌血症例で53%、次いで化膿性髄膜炎の29%、血液から当該菌が分離された肺炎の11.9%であった。その他に化膿性関節炎や感染性心内膜炎例もわずかながら認められた。

成人例における年齢の中心は60代から80代にみられた。疾患としては敗血症が36%、肺炎が34%(血液より菌が分離された例のみ)、化膿性髄膜炎が19%、膿胸・胸膜炎が6%認められた。

図には示さないが、発症例の多くが腫瘍手術後、糖尿病、心疾患、肝胆膵疾患、脳疾患、そして腎疾患など多岐にわたる基礎疾患を有していた

2. 分離菌の遺伝子解析からみた感性/耐性との関係

図3Aと図3Bには、小児由来株の莢膜型と耐性遺伝子の成績を2006年の成績と比較しながら示す。遺伝子学的にみたβ-ラクタム系薬剤耐性菌の内訳は、gPRSPが54.9%と増加しており、次いでgPISP(*pbp2x*)が18.2%、gPISP(*pbp1a+pbp2x*)が13.0%、gPISP(*pbp2x+pbp2b*)が5.5%と多く、gPSSPはわずか8.3%に過ぎなかった。

肺炎球菌の多糖体からなる莢膜は、その病原性と深く関わっていることが知られている。莢膜型は現在21のグループに属する68型と、25の型の計93型に識別することができる。

図に示すように、小児由来株で分離頻度の高い莢膜型は 6B 型であるが、今回は実に 28.5%を占めていた。次いで 23F 型の 14.5%、19F 型の 13%、14 型の 10.5%となっていた。7価結合型ワクチン(PCV7)に含まれる 4 型と 18C は gPSSP であったが、それら以外の PCV7 に含まれる型の菌株はほとんどが gPRSP と gPISP であった。定期接種化が予定されている PCV7 のカバー率は約 73.1%であった。この成績の中で、過去の成績に比べ 19A の割合が 8.5%へと増加していることが注目された。

成人由来株の成績は図 4A と図 4B に示す。今回最も分離頻度の高かった耐性菌は gPISP (*pbp2x*)の 37.4%、次いで gPRSP の 34.1%であった。この 2 タイプは以前の成績に較べ明らかに増加していた。それらに比して、gPISP (*pbp1a+pbp2x*)の割合には 10.3%で変動を認めなかったが、gPSSP、gPISP (*pbp2x+pbp2b*)、および gPISP(*pbp2b*)の割合は著しく減少していた。

耐性菌の割合の変化と連動し、莢膜型も大きく変動していることが注目された。すなわち、12F 型が激減し、ムコイドコロニーを形成する莢膜 3 型、および 6B 型が著しく増加していた。その他に 6A、6C、15A、19A、35 型も増加していた。

ちなみに、成人用 23 価ワクチンである PPV23 のカバー率は 78.5%であった。

3. 各種抗菌薬感受性と遺伝子変異との関係

これらの分離株について、本邦で比較的多く使われている注射用 β -ラクタム系薬、ならびにマクロライド系薬、ニューキノロン系薬、そして VCM に対するの感受性を測定し、耐性遺伝子との関係を検討した。ほとんどの PRSP に対して、カルバペネム系薬のパニペネム(PAPM)、メロペネム(MEPM)の感受性は比較的優れていたが、セフトキシム(CTX)

やセフロリアキソン(CTRX)等の第三世代セフェム系薬のそれは明らかに劣っていた。さらに我が国で開発されたセファゾリンやセフトチアム(CTM)ではさらに劣っていた。

また、成人に多く使用されている経口マクロライド系薬には 80%の株が高度耐性であった。キノロン系薬には耐性菌は少ないものの、感受性は優れたものではなかった。

今後注目されることとして、表 1 に示すように CTX に対する感受性が $16 \mu\text{g/ml}$ 以上の株が出現してきたことである。これらの分離地域はかなり離れた位置関係にあるが、いずれも莢膜型が 19F であったことが注目される。

特に A 病院由来株はマクロライド系薬、ニューキノロン系薬にも耐性遺伝子を保持した多剤耐性株であり、このような株で侵襲性感染症を惹起すると、唯一抗菌力を保持しているのは PAPM のみであり、治療に極めて難渋することが懸念される。

D. 考察と結論

2006 年～2007 年にかけて実施された同様の「大規模サーベイランス」と比較すると、収集された菌株数はほぼ同数であり、依然としてその発生率は変化していないことが推測された。

原因菌である肺炎球菌の耐性化は小児あるいは成人においても依然として進行しており、さらに耐性度の高い菌株が分離されつつあることが懸念される。

耐性化と連動して、小児の PCV7 および成人の PPV23 のカバー率は経年的に低下してきており、欧米においてワクチン定期接種化後に増加が報告されているワクチンでカバーできない 19A や 6A 型などが増加していることは、ワクチン効果を低下させることとして懸念されるが、近年欧米でのワクチン接種の影響により、菌の保持する莢膜をコードする遺伝子の組換えが起こっていること

が報告されている。

つまり、93型にもおよぶ肺炎球菌の莢膜型のバランスは、ワクチン接種によって大きく変動することが予想される。加えて、抗菌薬の影響による耐性化の進行があり、その中で肺炎球菌は本来の病原性を保持しつつ生き延びると思われる(図5)。今後とも注意深い、そして正確な分子疫学サーベイランスが必要であると結論される。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui H, Sekiya Y, Takahashi T, Nakamura M, Imanishi K, Yoshida H, Murayama SY, Takahashi T, Tsuchimoto K, Uchiyama T, **Ubukata K**. Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus pyogenes* in mice. *J Med Microbiol*. 2011 Jan;60(Pt 1):128-34.
- 2) Sakai F, Chiba N, Ono A, Yamagata Murayama S, **Ubukata K**, Sunakawa K, Takahashi T. Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009. *J Infect Chemother*. 2010 Dec 15. PubMed PMID: 21161561.
- 3) Shimomura Y, Okumura K, Murayama SY, Yagi J, **Ubukata K**, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics*. 2011 Jan 11;12:17.
- 4) Suzuki K, Kurono Y, Kobayashi T, Nishimura T, Baba S, Harabuchi Y, Fujisawa T, Yamanaka N, **Ubukata K**, Ikeda F. Mutant prevention concentrations of garenoxacin

against *Streptococcus pneumoniae* isolates from otorhinolaryngological infections. *Jpn J Antibiot*. 2010 Aug;63(4):312-8.

- 5) Yoshino M, Murayama SY, Sunaoshi K, Wajima T, Takahashi M, Masaki J, Kurokawa I, **Ubukata K**. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* isolates that lack large regions of the sag operon mediating streptolysin S production. *J Clin Microbiol*. 2010 Feb;48(2):635-8.
- 6) Takahashi T, Asami R, Tanabe K, Hirono Y, Nozawa Y, Chiba N, **Ubukata K**. Clinical aspects of invasive infection with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in elderly patients. *J Infect Chemother*. 2010 Feb;16(1):68-71.
- 7) Asami R, Okada K, Chiba N, **Ubukata K**, Takahashi T. [Molecular features of beta-hemolytic streptococci isolated from blood in adult invasive infection and the clinical background factors]. *Kansenshogaku Zasshi*. 2010 May;84(3):285-91.
- 8) Takahashi T, **Ubukata K**, Watanabe H. Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features. *J Infect Chemother*. 2011 Feb;17(1):1-10.
- 9) Yamaoka S, Ogihara T, Yasui M, Hasegawa M, Hira S, Oue S, **Ubukata K**, Watanabe H, Takahashi T. Neonatal streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Pediatr Infect Dis J*. 2010

2. 学会発表

- 1) Hasegawa M, Okada T, Sakata H, Inamo Y, Fuchigami T, Hashimoto K, Tajima T, Nakayama E, Iwata S, Morozumi M, **Ubukata K**, and Takahashi T. Clinical aspects of pneumonia associated with

- pandemic (H1N1) 2009 virus infection with or without complications. 50th ICAAC, Boston, USA, (G1-193), 2010.09
- 2) Chiba N, Morozumi M, Kishii K, Ono A, and **Ubukata K.** Genetic identification of β -lactam resistance of isolates from invasive pneumococcal diseases (IPD) by real-time PCR: application to surveillance for pediatrics. 50th ICAAC, Boston, USA, (D-169), 2010.09
 - 3) Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Ono A, and **Ubukata K.** Direct detection of *ftsI* gene mutations affecting MICs of ampicillin in *Haemophilus influenzae* using real-time PCR. 50th ICAAC, Boston, USA, (D-761), 2010.09
 - 4) 生方公子：国際化時代における感染症への対応 第114回日本眼科学会総会 ランチョンセミナー講演(名古屋国際会議場) 2010.04.16
 - 5) 山岡繁夫, 稲富 直, 安井昌子, 長谷川昌史, 平清 吾, 大植慎也, 萩原 亨, 玉井 浩, 生方公子：G群溶連菌の母児垂直感染により劇症型溶連菌感染症を発症した1例。第113回日本小児科学会学術集会(岩手) 2010.4.23-25
 - 6) 生方公子：急性中耳炎におけるウイルスと細菌のかかわり 第111回日本耳鼻咽喉科学会総会 ランチョンセミナー講演 2010.05.21
 - 7) 藤島清太郎, 杉田香代子, 生方公子, 堀進悟： β 溶血性レンサ球菌感染症の臨床像と原因菌の遺伝子解析。第38回日本救急医学会総会(東京), 2010.10.09-11
 - 8) 山口禎夫, 千葉菜穂子, 佐藤吉壮, 岩田敏, 秋田博伸, 生方公子, 砂川慶介：小児の侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)の症例解析。第84回日本感染症学会総会(京都), 2010.04.05
 - 9) 山岡繁夫, 安井昌子, 長谷川昌史, 平清吾, 大植慎也, 萩原 亨, 新田雅彦, 玉井 浩, 生方公子, 高橋 孝：*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) による母子感染の1例。第84回日本感染症学会総会(京都), 2010.04.05
 - 10) 松井英則, 吉田春乃, 岡田圭祐, 村山瑠明, 生方公子：CD46トランスジェニックマウスを用いた*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)感染モデルの構築。第84回日本感染症学会総会(京都), 2010.04.05
 - 11) 岩田 敏, 岡田隆文, 長谷川真紀, 稲毛康司, 坂田 宏, 中山栄一, 田島 剛, 諸角美由紀, 生方公子, 高橋 孝：新型インフルエンザウイルスA(H1N1)による小児肺炎例の多施設解析。第84回日本感染症学会総会(京都), 2010.04.05
 - 12) 岡田隆文, 諸角美由紀, 松原啓太, 松島崇浩, 岸井こずゑ, 千葉菜穂子, 生方公子, 込山 修, 岩田 敏：新型インフルエンザウイルスA流行シーズンを含めた小児気管支喘息発作の原因微生物の経年的な推移についての検討。第84回日本感染症学会総会(京都), 2010.04.05
 - 13) 吉嶺裕之, 五十棲理恵, 斉藤信夫, 原田義高, 諸角美由紀, 生方公子, 有吉紅也：リアルタイムPCR法による成人市中肺炎原因微生物の検索。第84回日本感染症学会総会(京都), 2010.04.05
 - 14) 中山栄一, 岸井こずゑ, 諸角美由紀, 千葉菜穂子, 生方公子：Real-time PCR法によるB群溶血性レンサ球菌 (GBS) の検索と分離菌の莢膜型別：妊娠後期例を対象として。第58回日本化学療法学会総会(長崎), 2010.06.02-04
 - 15) 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 岸井こずゑ, 生方公子, 岩田 敏, 砂川慶介：10年間にわたる肺炎球菌による化膿性髄膜炎の解析：薬剤耐性遺伝子型と莢膜型。第58回日本化学療法学会総会(長崎), 2010.06.02-04

- 16) 岸井こずゑ, 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 生方公子, 岩田 敏, 砂川慶介: 10年間にわたる*Haemophilus influenzae*による化膿性髄膜炎の解析: 予後との関係. 第58回日本化学療法学会総会(長崎), 2010.06.02-04
- 17) 五十嵐優子, 島貫洋太, 鈴木敏史, 藤野一成, 地主 誠, 戸田美帆, 菅沼牧知子, 幡 亮人, 鈴木千賀子, 三橋直樹, 生方公子: Real-time PCR法による妊婦のGBSスクリーニング. 第62回日本産科婦人科学会学術講演会(東京) 2010.04.23-25
- 18) 荘司 路, 青木泰子, 山本優美子, 千葉菜穂子, 生方公子, 高橋 孝: 成人の侵襲性感染症由来・肺炎球菌の分子疫学的解析(2001~2009年). 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会(東京), 2010.10.21-22
- 19) 岡田圭祐, 村山琮明, 切替照雄, 生方公子: ヒトおよびブタ由来のレンサ球菌*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*のゲノム解析とその比較. 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会(東京), 2010.10.21-22
- 20) 野老洋夫, 岸井こずゑ, 鈴木葉子, 生方公子: 成人肺炎例より分離されたニューキノロン系薬耐性を含む多剤耐性インフルエンザ菌の耐性遺伝子解析. 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会(東京), 2010.10.21-22
- 21) 安中めぐみ, 安達桂子, 桑田祐輔, 水野裕之, 柴崎澄枝, 砂押克彦, 奥住捷子, 生方公子, 高橋 孝, 稲松孝思: 高齢者専門医療機関(2005年-2009年)における血液培養由来β溶血性レンサ球菌の疫学的性状と患者背景因子の特徴. 第59回日本感染症学会東日本地方会学術集会(東京), 2010.10.21-22
- 22) 生方公子: 小児・成人に対する肺炎球菌ワクチンの接種とその効果 日本医師会ラジオ日経
- 23) 武井智宏, 藤田尚代, 諸角美由紀, 生方公子: Real-time PCR法を用いた小児呼吸器感染症の原因微生物検索と臨床経過の解析. 日本小児感染症学会(仙台), 2010.11
- 24) 生方公子: 侵襲性ならびに呼吸器系感染症の原因微生物検索 — 網羅的検索法へのパラダイムシフト—日本小児感染症学会(仙台) 教育講演 2010.11.
- 25) 長谷川真紀, 齊藤勝也, 中村綾子, 石川央朗, 橋本光司, 淵上達夫, 稲毛康司, 岡田隆文, 坂田 宏, 田島 剛, 中山栄一, 岩田 敏, 高橋 孝, 生方公子: Pandemic (H1N1) 2009による小児入院肺炎例における呼吸器合併症に基づいた病態解析. 日本小児感染症学会(仙台), 2010.11

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

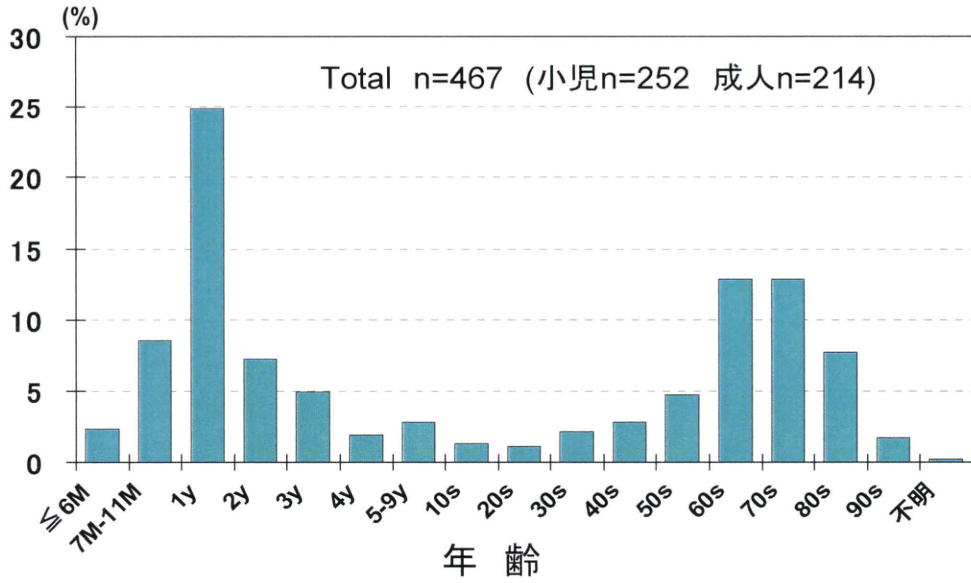


図1 肺炎球菌性・侵襲性感染症(IPD)の年齢分布

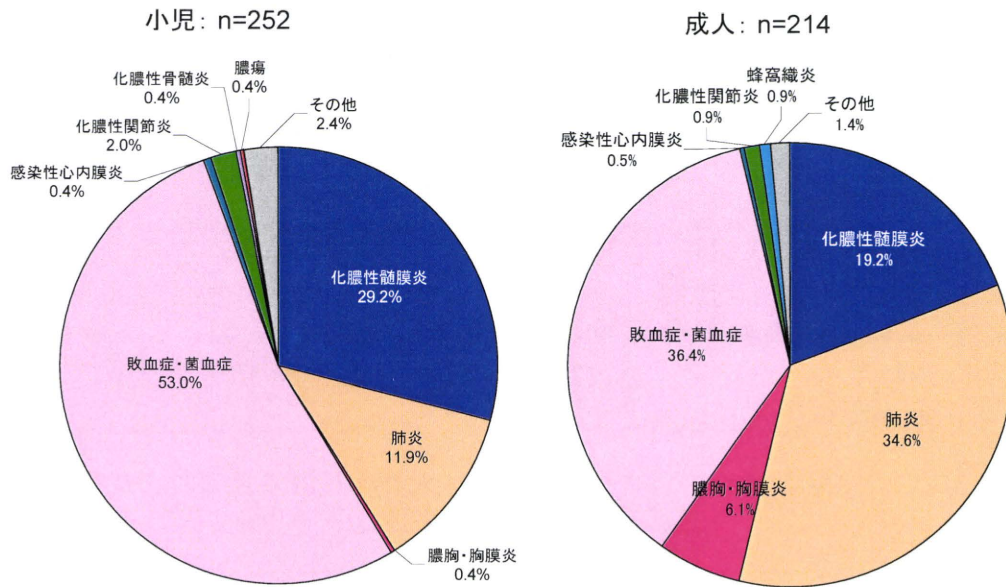


図2 肺炎球菌性侵襲性感染症例における疾患の内訳

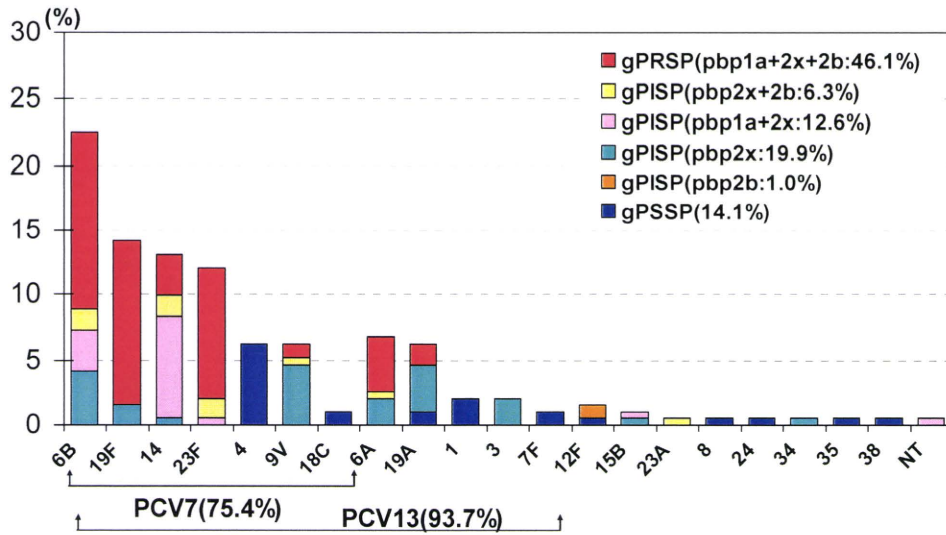


図 3A 2006 年からの 1 年間に収集された小児 IPD 由来株の成績

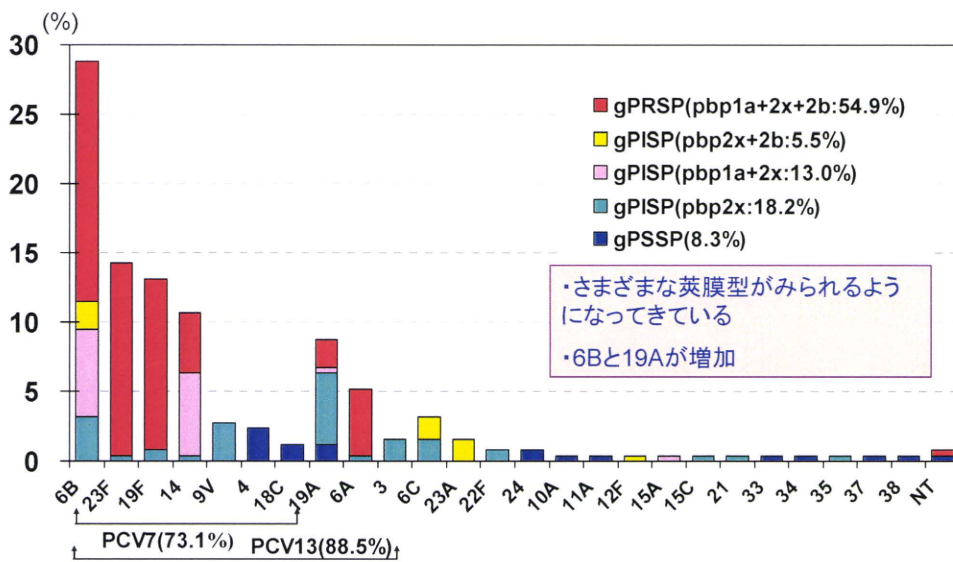


図 3B 2010 年 5 月～2011 年 1 月に収集された小児 IPD 由来株の成績

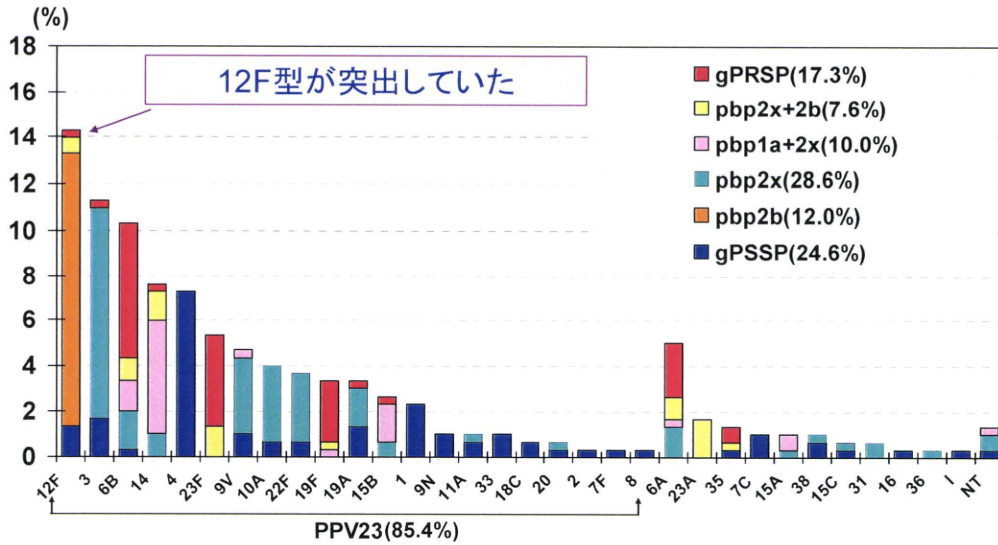


図 4A 2006 年から 1 年間に収集された成人 IPD 分離株 の成績

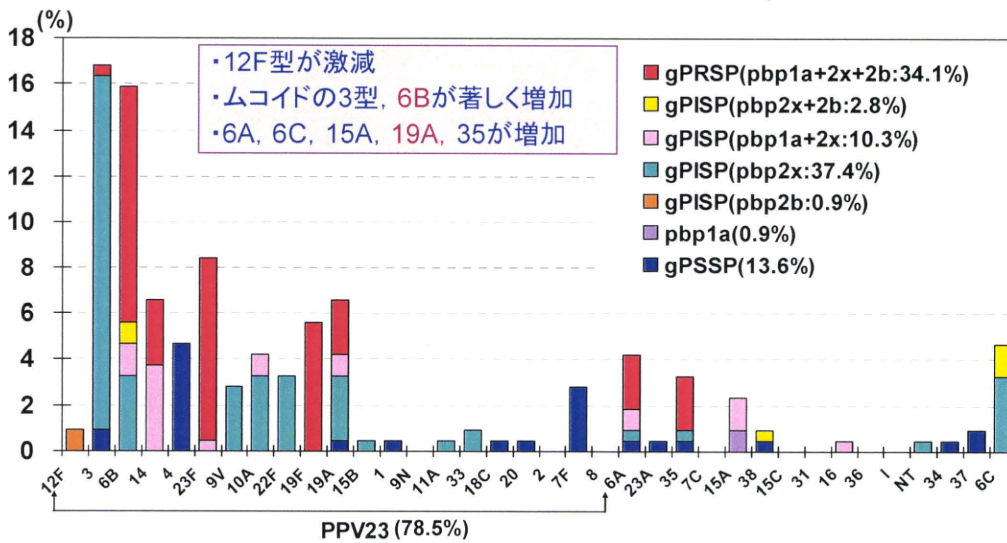


図 4B 2010 年 5 月～2011 年 1 月に収集された成人 IPD 由来株の成績