

201123028A

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

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 生方 公子

平成 24(2012) 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と薬剤耐性化状況	13
生方 公子, 坂田 宏, 岩田 敏, 他	
2. 肺炎球菌の莢膜型および薬剤耐性型と Multilocus sequence typing(MLST) との関連： 世界の分離菌との日本株の比較	26
生方 公子, 他	
3. 細菌性髄膜炎患者の発生動向把握： real-time PCR 法を用いた原因不明例の解析	32
生方 公子, 岩田 敏, 高橋 孝, 他	
4. 早発型 B 群溶連菌感染症防止のための分娩時の静注抗菌薬投与の効果の検討	36
坂田 宏	
5. 侵襲性感染症に由来する B 群溶血性レンサ球菌における分子疫学データと 抗菌薬耐性	41
高橋 孝, 他	
6. 北タイにおけるヒト <i>Streptococcus suis</i> 感染症の臨床細菌学的研究	47
大石 和徳, 他	
7. A 群溶血性レンサ球菌(GAS)および G, C 群溶血性レンサ球菌(SDSE)感染症： 一発症例の背景と菌の疫学的特徴	52
岩田 敏, 坂田 宏, 他	
8. <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (SDSE)の全ゲノム解析	61
生方 公子, 他	
9. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症発症における宿主要因の解析	70
阿戸 学, 池辺 忠義, 他	
10. 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	75
池辺 忠義, 阿戸 学, 他	

11. SDSE レンサ球菌劇症型感染モデルと分子基盤の構築	80
秋山 徹	
12. 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	84
藤島清太郎, 他	
13. ホームページ作成報告書	86
生方 公子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	93

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ヵ年計画の2年目であるH23年度は、1年目に構築したサーベイランスシステム(参加医療機関341)を通じ、肺炎球菌(633株)と溶血性レンサ球菌(662株)、合計1,295株を収集し、菌側と発症例の因子解析を行なった。肺炎球菌は「ワクチン接種緊急促進事業」の実行に伴い、小児用7価結合型ワクチン(PCV7)でカバーできる割合は71.8%、成人用の23価ワクチンでは82.7%であることを明らかにした。また、耐性肺炎球菌(PRSP)は小児で55%、成人では32%へと明らかに増加していた。ワクチンでカバーできない莢膜型の肺炎球菌が急速に国外から持ち込まれ増加していることを明らかにした。

レンサ球菌のうちGASとSDSEは、病原性に関わるMタンパクを遺伝子レベルで解析、GASでは*emm1*型が欧米と同様に優位であること、しかしSDSEでは諸外国にみられない*stG6792*型が優位であることを明らかにした。GBSの莢膜型は新生児と高齢者では明らかに異なり、また抗菌薬に対する耐性化が後者で進行していることを明らかにした。さらに追加措置がとられた原因菌不明の化膿性髄膜炎由来検体に対して、新たに構築した網羅的real-time PCRを実行し、高い精度で原因菌を明らかにできることを証明した。

本年度は啓発活動のためのWebサイトを大幅に更新、アクセス者は2万人に達した。

分担研究者は、各研究テーマについて協力者とともに、肺炎球菌、GBS、SDSE、*S. suis*感染症について菌と宿主の面から病態解析を行った。

菌のビルレンス解析と動物モデルの構築は、劇症型GAS感染症由来株における*rocA*変異の同定を行い、*rocA*変異株は好中球の遊走能を阻害するとともに好中球を殺傷することを明らかにした。また、劇症型感染マウスモデルではインターフェロン- γ (IFN- γ)産生が亢進しており、病態あるいは予後に関わる可能性が示唆された。この早期の産生は、新規に見いだされた骨髄系細胞から生じ、その細胞群は劇症型感染に対して防御的に働くことが判明した。

糖尿病マウスを用いたSDSE感染では、炎症性サイトカイン、特にIL-6の産生が劇的に増加することを明らかにした。この知見を元に、抗IL-6受容体抗体投与により治療効果を検討し、SDSEのマウス致死効果が有意に抑制されることを明らかにした。

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、等と病原性遺伝子の比較を行い、多くの遺伝子がGASと共通していることを証明した。

研究分担者：所属機関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) 岩田 敏 慶應義塾大学医学部 感染制御センター 教授
- 3) 藤島清太郎 慶應義塾大学医学部救急医学 准教授
- 4) 高橋 孝 北里大学大学院感染制御科学府感染症学 教授
- 5) 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
- 6) 阿戸 学 国立感染症研究所 免疫部 第二室長
- 7) 池辺忠義 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官
- 8) 秋山 徹 国立国際医療研究センター・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における敗血症等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、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ている。

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、解析データを元に 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)接種の効果を推定する基礎データとして、さらには成人に対する23価ポリサッカライドワクチン(PPV23)の基礎データとなり、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年目から2年目にかけて日本臨床微生物学会に所属する学会員の協力を得、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341医療機関に所属する微生物担当の検査技師の協力を得た。

H22年6月からH23年12月までの間に、i) 肺炎球菌：633株、ii) GAS：131株、iii) GBS：232株、iv) SDSE：271株、v) その他の溶血性レンサ球菌：28株、合計1,295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・解析した。

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* 遺伝子と、Multilocus Sequence typing (MLST) を実施した。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解析した。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 MLST 解析を実施した。

4. 菌の病原因子の解析

主に GAS ならびに SDSE について、各種産生物の産生状況や病原性の強さが解析された。

5. 動物モデルによる解析

糖尿病モデルマウスで IL-6 抗体の有無による菌の病原性の違いが調べられた。

6. 啓発活動

H22 年に構築した Web サイト (<http://strep.umin.jp/>) を H23 年 11 月に大幅に更新した。感染症の関連学会である日本感染症学会、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。仮に個人情報が入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。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。情報管理は、特定の研究者のみ閲覧できるように設定し、情報の流出には万全を期した。

C. 研究結果 および D. 各研究の結論

I. 肺炎球菌の分子疫学解析 (生方, 岩田, 坂田)

上記の期間に収集された 633 株の肺炎球菌の内訳は、小児由来が 333 株、成人由来が 300 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% から 55% へと増加、gPSSP はそれとは逆に 15% から 8% 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% から 32%、gPISP (*pbp2x* 変異) も 35% へと増加していた。対照的に gPISP (*pbp2b* 変異) は 12.0% から 2% へ、gPSSP は 25% から 13% 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 (28%) 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 71.8% であった。ワクチンに含まれず gPRSP が検出され始めた 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, 14, 23F, 19A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, 10A, 6C, 6A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82.7%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の接種化でどのように莢膜型が変化していくのか、正確な全国規模でのサーベイランスが引き続き必要であると結論された。

II. 肺炎球菌のMLST解析(生方)

侵襲性感染症由来肺炎球菌の中から470株を無作為に抽出し、世界の菌株との関連性を明らかにするために、**Multilocus Sequence Typing (MLST)**を行なった。MLST解析は、菌の本質的な7つの遺伝子を解析し、米国疾病センター(CDC)のWebサイトで既に解析・登録された菌株と比較する方法である。肺炎球菌は極めて変異しやすく、sequence type(ST)型は123, clonal complex(CC)は34も認められ、極めて複雑化であることが明らかにされた。特に分離株数の多い莢膜6型と14型において、STやCCの多様化が認められ、それだけ抗菌薬に暴露される機会が多かったことが明らかとなった。

また、莢膜遺伝子をコードしているlocusが遺伝子組換えを起すことが、遺伝子解析結果から明らかにされた。このことは、莢膜型が93種と多岐にわたる本菌においては、莢膜をワクチンの標的としている限り、常にその変化に注意を払う必要があり、加えてワクチン接種による予防効果が80%程度というジレンマを抱えていくことになる。将来的には莢膜ではない共通抗原を見出し、それを標的とするワクチン開発がどうしても必要で

あると結論される。

III. 原因不明の化膿性髄膜炎：real-time PCR法を用いた解析(生方)

「平成22年度子宮頸がんワクチン接種緊急促進臨時特例交付金(H22年11月26日発健1126第13号)」の執行に伴い、ヒトパピローマウイルスワクチン、Hibワクチン、および小児用肺炎球菌ワクチンを対象とした接種促進事業が実施されることとなった。

これに関連し、ワクチンによる感染予防が最も期待されているのが細菌性髄膜炎である。細菌性髄膜炎は5類感染症として届出が義務付けられているが、ワクチン効果を正確に把握するためには、“**細菌性髄膜炎患者等の発生動向**”をできる限り明らかにする必要が生じた。このため、発生動向把握に寄与するため、私達が構築したreal-time PCR法を応用し、原因菌を検索することになった。

対象期間中に68検体の送付を受けた。その結果はHibワクチンの対象となるインフルエンザ菌が最も多く、次いで肺炎球菌であった。その他にはさまざまな菌種が認められた。その他に、ウイルスを証明できた例もあった。ウイルスはエンテロウイルスが最も多かった。感度の高いPCR法によって、ワクチン導入後にインフルエンザ菌や肺炎球菌による化膿性髄膜炎が減少するの否か、引き続き検討が必要と結論された。

IV. β 溶血性レンサ球菌(GASとSDSE)の疫学解析(岩田, 生方)

H23年(2011年)にサーベイランス参加医療機関から送付を受けた侵襲性感染症由来のGAS株は131株、SDSEは271株で、これらについて患者背景、分子疫学解析、MLST解析、薬剤感受性の動向を精査した。また、それらの疫学成績について、米国のそれと比較した。

GAS の *emm* 型は世界で 150 以上登録されているが、侵襲性感染症由来株ではその 48% が *emm1.0* 型であった。しかも、死亡や後遺症を残した例が有意に多く、この型は特別に重要であることを明らかにした。その他にはさまざまな型が分離されていたが、咽頭炎・扁桃炎からの分離率が高い *emm12* や 28 型の分離頻度は極めて低かった。

日米との比較では、*emm1.0* 型が共通して優位に分離されているが、日本の方が圧倒的に高い割合を示し、米国の方が多彩であった。この背景には、人種が多様な国か否か、生活習慣や食習慣の違いなどが反映されていると推定された。

一方、SDSE においても依然として *stG6792* 型が 26% 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 *stG485* 型の増加傾向が認められた。米国との比較では、日本に多い *stG6792* 型は米国では極めて少なく、優位に分離される型が異なっていることが明らかにされた。

発症年齢は GAS が平均 57 歳、SDSE は 74 歳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 とも約半数をこれらの疾患が占めていた。基礎疾患保有率も高く、そのような状態が重症化要因の誘引になっていると思われた。抗菌薬に対する感受性動向では、これらの菌には β -ラクタム系薬耐性菌は認められなかった。

超高齢化社会を迎えた我が国では、今後益々このような溶血性レンサ球菌感染症が重要な問題になるであろうと結論された。

V. β 溶血性レンサ球菌 (GBS) の疫学解析 (坂田, 高橋)

1. 新生児における GBS 発症率 (坂田)

2009 年から 2011 年の 3 年間で、妊娠 33

週から 37 週の検体から GBS が検出された妊婦の分娩は 169 件あり、175 名の児が出生した。分娩様式は帝王切開が 42 件で、45 名が出生、経膈分娩が 127 件で、130 名が出生した。経膈分娩の 7 名の児から GBS が検出された。経膈分娩で出生した児の GBS 陽性率は、GBS 陽性妊婦の 5.5% であった。

GBS が陽性であった 7 名の児のうち、在胎 39 週、経膈分娩で出生した 1 名が仮死、呼吸障害などの感染徴候を認め、血液培養から GBS が検出され、GBS 敗血症と診断された。3 年間に当院で出生した 2499 名の新生児の中で 1 名に早発型 GBS 感染症の発症を認めたことになり、早発型 GBS 感染症発症率は出生 1000 人あたり 0.40 と算出された。妊婦の GBS スクリーニング検査を行っていなかった 1997 年から 2001 年の早発型 GBS 感染症発症率は出生 1000 人あたり 0.46 であり、スクリーニングを実施している現在と大きな差はなかった。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。

2. 小児・成人における GBS 感染症の疫学解析 (高橋)

2010 年～2011 年 (2010 年) に GBS が分離された症例の年齢分布は、小児では early-onset disease (生後 6 日以内) は少なく、late-onset disease (生後 7 日～3 か月) が多数を占めた。成人では 50 歳～70 歳が大半を占め、平均発症年齢は 70 歳であった。これらの患者年齢分布は、2006 年に得られた結果と同様な傾向を提示した。小児では化膿性髄膜炎と敗血症が 77% を占めた。これに対し、成人では敗血症が半数を占め、その他に髄膜炎や感染性心内膜炎等、多彩な感染症が認められた。成人例の 90% は何らかの基礎疾患を有していた。

2010 年の小児由来株の莢膜型は III 型 (51.3%) が最も多く、次いで Ia (28.9%)、Ib

型(13.2%)であったのに対し、成人由来株での III 型の割合は 11.7%と低く、次いで Ib 型と続いた。

莢膜型と MLST 結果との関連性では、Ib 型は ST10 のみであったが、Ia 型では ST23 が最も多く、III 型では ST19 と ST17 が優位であった。特に、ST17 はそのすべてが III 型であった 2006 年に解析された III 型株では ST19 が大半であったが、今回の株では約半数が ST335 へ変化していた。VI, VII, VIII 型はすべて原型の ST1 であった。

Ib 型株の大部分はニューキノロン系薬のレボフロキサシン(LVFX)に高度耐性化し、耐性率が上昇していた。これらの菌株では、薬剤標的部位である GyrA・ParC 領域におけるアミノ酸置換(Ser81Leu・Ser79Phe)を確認した。分子疫学的にみると起源を同じくする LVFX 耐性の ST10 型の莢膜 Ib 型株が成人を中心に全国へと拡散したことが示された。

将来増加が懸念されているペニシリン軽度耐性株は成人由来株に数株認められた。

VI. *Streptococcus suis* 感染症(大石)

人獣共通感染菌の *Streptococcus suis* はブタの上気道に常在し、本菌に汚染された生ブタ製品を摂食したヒトにおいて、髄膜炎や敗血症を含む侵襲性感染症を惹起する。近年、東南アジア諸国における報告数が増加している。本研究は、1)タイ国内の *S. suis* の後方視的調査から本症の臨床・細菌学的実態を明らかにし、2)同パヤオ県における前向き臨床疫学調査から、一般住民あたりの本症の罹患率とリスク行動を明らかにし、日本における同感染症の解析に資することにある。

収集された 179 株中、主たる血清型は 2 型(92.2%)で、次いで 14(6.7%)型であった。主要血清型 2 株における ST は、プロトタイプである ST1(62.4%)とタイ特有の ST104(25.5%)であった。14 型は ST105 であった。ヒトにおける 2 型菌感染症 158 症例の

平均年齢は 56.6 歳、小児例は 1 例もなかった。致命率は 9.5%であり、髄膜炎カテゴリーは 58.9%、非髄膜炎カテゴリーは 41.1%であった。今回、世界で初めて 5 型、24 株をヒト症例から分離したが、非代償性の肝硬変症例に発生した spontaneous bacterial peritonitis (SBP) と敗血症であった。血清型 5 型、24 株はいずれも病原遺伝子の *epf*, *sly*, *mrp* を欠き、ST はそれぞれ新規の ST181, ST221 であった。

2010 年に登録されたヒト *S. suis* 症例は 31 例、男性 20 例(64.5%)、年齢の中央値は 53 歳であった。致命率は 16.1%と比較的高率であった。リスク行動としての発症直前のブタ生製品の摂食が 21 例(71.0%)に認められ、摂食から発病までの期間は 2 日であった。発症時期、地域として 4~6 月に発症のピークを認めた。

VII. 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)

重症肺炎球菌・レンサ球菌感染症の臨床像を明らかにすることを目的に次のことを実施した。i) 日本救急医学会 UMIN 敗血症登録システムを完成し、データ集積を行った。ii) 災害医療センターと共同で、侵襲性肺炎球菌感染症の後ろ向き調査を行った。

2010 年 8 月時点で 953 例の重症敗血症が集積され、死亡率は 30%であった。分離菌判明 631 人中 13 人が肺炎球菌、31 人がレンサ球菌感染症であった。2006 年 1 月~2010 年 12 月には 38 例の侵襲性肺炎球菌感染症を認めた。死亡率は 50%で、SOFA スコアの総値、および呼吸器、心血管、凝固系の各値が死亡群で高かった。

救急専門施設における 重症敗血症死亡率は欧米より低いが、侵襲性肺炎球菌感染症に関しては未だ高いことが推察された。今後、その予防、早期診断および治療法の早急な確立が必要と結論される。

VIII. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症発症における宿主要因の解析(阿戸)

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および、劇症型感染マウスモデルの血清においてインターフェロン- γ (IFN- γ) 産生が高い濃度で認められ、このサイトカインが病態あるいは予後に関わる可能性がある可能性が示唆された。本年度の研究で、劇症型感染動物モデルにおいて認められるこの早期の IFN- γ 産生が、従来考えられてきたレンサ球菌スーパー抗原で活性化された T 細胞から産生されるのではなく、新規に見いだされた骨髓系細胞から生じることが明らかとなった。さらに、この細胞群は劇症型感染に対して防御的に働くことが判明した。

以上の成績から、重篤な劇症型レンサ球菌感染で産生される宿主防御に係るサイトカインとその産生細胞が明らかとなり、今後、その詳細な機序を解析することにより、診断および治療に対する応用が期待される。

IX. 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(池辺)

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の高いことで知られる。劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来の分離株において、*csrR/csrS* 遺伝子以外に、*rgg* 遺伝子のような毒素遺伝子の発現を負に制御する制御因子に変異が起きており、この変異は、劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の約 45%に認められた。

一方、咽頭炎などの非侵襲性感染症由来株は、1.7%しかこれら遺伝子の変異を有していなかった。劇症型感染症患者分離株のうち、ムコイド型のコロニーを形成するものがあ

るが、その多くで *csrS/csrR* 遺伝子に変異が見られる。しかしながら、一部の株において、*csrS/csrR* 遺伝子に変異はないが、ムコイド型のコロニーを形成するものが存在する。このうち、1 株において転写制御因子である *rocA* 遺伝子に変異があるものを見いだした。この変異株は、好中球の遊走能を阻害し、また、好中球殺傷能を増大することを明らかにした。

X. SDSE レンサ球菌劇症型感染モデルと分子基盤の構築(秋山)

新規に発生しているレンサ球菌のうち、新たな原因菌として注目されている *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (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既に明らかとなっている。本研究では、これまでに、1) 糖尿病マウスモデルの感染実験で SDSE 感受性が増加していること、2) その際の宿主側因子網羅的発現解析で、SDSE 特異的な炎症関連遺伝子発現が高進していること、3) SDSE 感染糖尿病マウス血清中には G-CSF, IFN- γ , IL-13, IL-1 α , IL-6, CXCL10, CXCL1, MCP-1, RANTES, MDC および TIMP-1 が大量に放出されていることを明らかにしている。本年度は、これらのサイトカインのうち、特に産生量の高い IL-6 に注目して解析を行った。即ち、IL-6 の作用を抑制するため、その受容体に対する抗体を調製し、SDSE を感染させた糖尿病マウスモデルにて、SDSE 感染前に IL-6 抗体を事前投与したところ、SDSE のマウスに対する病原性が著明に抑制された。これらの結果は、糖尿病時における SDSE 感染の劇症化に至る宿主側の分子基盤を明らかにし、治療法確立への方策を提供するものと考えられた。

XI. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) の全ゲノム解析 (村山, 生方)

β 溶血性レンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) のヒト劇症型感染症由来の RE378 株および GGS_124 株と、ブタのリンパ節炎由来の L1 株について、A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) 等の病原性レンサ球菌と、全ゲノム間での詳細な比較を行った。

SDSE は GAS が保持する多くの病原遺伝子を保持しているのみでなく、全ゲノム塩基配列から得られたオルソログ遺伝子の相同性でも 72~81% と GAS ときわめて相同性が高かった。また全 CDS のアミノ酸配列を並べた解析でも、L1 株は GAS と SDSE の共通祖先にヒト由来 SDSE よりも近かった。

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPAR) の解析から、ヒト由来株はブタ由来株よりファージなどの外来遺伝子の獲得が多かったと推測された。本来動物に由来する SDSE は、ヒト生体内に侵入後、GAS やその他のレンサ球菌との間にファージを介して遺伝子の水平伝播が生じ、今日の GAS に近い SDSE が形成されたという私達の推定を確認する結果が得られた。

E. 総括的結論と考察

3 ヶ年計画の 1, 2 年目の間に、全国 341 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 1,295 株を収集し、菌側の疫学解析として肺炎球菌と GBS は莢膜型別、GAS と SDSE は *emm* 型別を行い、2006 年の分離株と比較すると同時に、米国の分離株とも比較した。また、薬剤耐性遺伝子解析も行った。さらに、2 年目には、肺炎球菌、GBS および SDSE について世界の株と分子レベルで比較するために、それぞれの菌株について 7 つの housekeeping

遺伝子を解析する MLST 解析を実行した。

最も注目すべきは肺炎球菌である。H22 年度の「ワクチン接種緊急促進事業」による小児用 PCV7 の接種率上昇に伴い、著しい原因菌の変化が生じていることが H23 年度のサーベイランスで明らかにされた。ワクチン接種が普及するにつれ、今後、益々肺炎球菌の変化が起こることが予測される。ワクチンの有効率を推測する上でも「全国的な菌のサーベイランス」が重要である。

臨床サイドの解析としては、菌株とともに送られてきたアンケート用紙に記載された患者背景因子について、膨大な情報の統計解析を行なった。それらの成績からは、我が国において発生している侵襲性感染症の臨床上の実態を明らかにすることができた。すなわち、肺炎球菌と GBS 感染症は乳幼児と高齢者の 2 峰性分布、GAS 感染症は若年層から高齢者と幅広いこと、SDSE 感染症は高齢者がほとんどを占めていたことである。また、壮年期以上の発症例では基礎疾患を有する例が極めて多いことが浮き彫りにされた。

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。

一方、発症と重症化に至る過程を明らかにするため、基礎実験や動物モデルを用いた実験により得られている成果は、上述した臨床的特徴を裏付けつつあると考える。

当該事業の柱のひとつとして、急速に変貌している市中型感染症に対する医療関係者の啓発活動のため、1 年目に立ち上げた Web サイトを速やかに新たなデータに更新していくことを目標としたが、H23 年 11 月に大幅に更新、アクセス数が驚異的に増加した。今後もさらに充実していきたい。

最終年度にあたる H24 年度は、それぞれの研究分担者が今までの成果を論文として公表すると同時に、重症化の要因をさらに探

るとともに、予後不良例を減らすにはどのような臨床的処置(手段)が必要であるのかを検討していきたい。

F. 健康危険情報

報告なし

G. 研究発表(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) Chiba N, Morozumi M, **Ubukata K**. Application of the Real-Time PCR Method for Genotypic Identification of b-Lactam Resistance in Isolates from Invasive Pneumococcal Diseases. *Microbial Drug Resistance*. DOI: 10.1089/mdr. **2011**.0102
- 2) Rakov AV, **Ubukata K**, Ashley Robinson D. Population structure of hyperinvasive serotype 12F, clonal complex 218 *Streptococcus pneumoniae* revealed by multilocus boxB sequence typing. *Infect Genet. Evol.* **2011**; 11:1929-1939.
- 3) 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**; 60:128-34.
- 4) 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.* **2011**; 17:334-340.
- 5) 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**; 12:17.

- 6) Takahashi T, **Ubukata K**, Watanabe H. Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features. *J Infect Chemother.* **2011**; 17:1-10.
- 7) 千葉菜穂子, **生方公子**: わが国における侵襲性肺炎球菌感染症の実態とその予防としての肺炎球菌ワクチン. *日化療会誌(総説)*. **2011**; 59: 561-572.
- 8) 千葉菜穂子, **生方公子**: 耐性肺炎球菌感染症. *呼吸器内科*. **2011**; 20: 480-485.
- 9) **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—. *小児感染免疫*, **2011**; 23: 257-263.
- 10) **生方公子**: ペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)—薬剤耐性化とワクチンに関わる莢膜型の関係—. *小児科臨床*. **2012**; 64: 2459-2466.
- 11) **生方公子**: 侵襲性・重症レンサ球菌感染症. *化学療法の領域*. **2012**; 28: 66-73.

2. 学会発表

- 1) **生方公子**: 急速な高齢化社会の到来. 変貌する市中型呼吸器系感染症. 第51回日本呼吸器学会(東京), 2011.04.22 (ランチョンセミナー)
- 2) 桑田祐輔, 千葉菜穂子, 岸井こずゑ, 諸角美由紀, 村山琮明, **生方公子**: 侵襲性感染症由来 *Streptococcus agalactiae* (GBS)の分子疫学解析: 莢膜型と MLST 解析からみる菌の多様化. 第85回日本感染症学会総会(東京), 2011.04.22

- 3) 千葉菜穂子, 砂押克彦, 桑田祐輔, 莊司路, 高橋 孝, 生方公子: 侵襲性感染症由来肺炎球菌の分子疫学解析. 第 85 回日本感染症学会総会(東京), 2011.04.22
- 4) 松井英則, 吉田春乃, 村山琮明, 高橋 孝, 生方公子: 劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症に及ぼす肥満細胞の役割. 第 85 回日本感染症学会総会(東京), 2011.04.22
- 5) 吉田春乃, 松井英則, 村山琮明, 生方公子, 高橋 孝: 劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症における骨壊死発症機構の解析. 第 85 回日本感染症学会総会(東京), 2011.04.22
- 6) 生方公子: 侵襲性重症肺炎球菌感染症. 分子疫学解析からみる菌の変化. 第 59 回日本化学療法学会総会(札幌), 2011.06.24 (教育セミナー1-1)
- 7) 桑田祐輔, 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 生方公子, 高橋 孝: 侵襲性感染症由来 *Streptococcus agalactiae* (GBS) の各種抗菌薬に対する耐性化: 2010 年度全国収集株の成績. 第 59 回日本化学療法学会総会(札幌), 2011.06.24 (P-G-117)
- 8) **K. Ubukata**, Y. Kuwata, M. Morozumi, N. Chiba, H. Sakata, S. Iwata, and T. Takahashi: Relationship between Multilocus Sequence Typing and Capsule Type of *Streptococcus agalactiae* (GBS) Isolates from Patients with Invasive Infections. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.19 (C2-1254)
- 9) **K. Ubukata**, K. Sunaoshi, K. Sugita, M. Morozumi, N. Chiba, S. Fujishima, and T. Takahashi: Molecular *emm* Genotype and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (SDSE) Isolated from Patients with Invasive Infections in Japan. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.19 (C2-1255)
- 10) N. Chiba, M. Morozumi, M. Shoji, and **K. Ubukata**: Change in the capsular type and genotype of β -lactam-resistant isolates from patients with invasive pneumococcal disease (IPD): Active Nationwide Surveillance. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.19 (C2-1270)
- 11) M. Morozumi, T. Okada, M. Hasegawa, T. Takei, N. Chiba, S. Iwata, and **K. Ubukata**: Yearly Increase in Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Pediatric Patients with Community-Acquired Pneumonia from 2002 to 2010. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.20 (C2-1806)
- 12) 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 生方公子: カルバペネム系薬にも耐性化した多剤耐性肺炎球菌の遺伝子解析. 第 94 回日本細菌学会地方会(東京), 2011.10.06
- 13) 桑田祐輔, 諸角美由紀, 千葉菜穂子, 生方公子, 高橋 孝: 侵襲性感染症由来 *Streptococcus agalactiae*(GBS) の分子疫学解析. 第 94 回日本細菌学会地方会(東京), 2011.10.06
- 14) 池上千晶, 岡田隆文, 松原啓太, 込山 修, 岩田 敏, 生方公子: 血液培養から肺炎球菌が分離された症例の臨床疫学的検討. 第 43 回日本小児感染症学会(岡山), 2011.10.28
- 15) 成相昭吉, 千葉菜穂子, 生方公子, 和田昭仁: 15A による敗血症・肺炎を繰り返した重症心身障害女児と 11A/E による新生児仮死を生じた新生児から考える肺炎球菌血清型特定と PPSV による予防戦略考慮の必要性. 第 15 回日本ワクチン学会(東京), 2011.12.11 (1-2-03)
- 16) 藤野元子, 長井 香, 千葉菜穂子, 生方公子, 中山哲夫: 閉鎖集団における PCV7・Hib ワクチン導入効果. 第 15 回日本ワクチン学会(東京), 2011.12.11 (1-2-05)

- 17) 生方公子, 千葉菜穂子, 諸角美由紀: 侵襲性感染症由来肺炎球菌の莢膜型の変化. 第15回日本ワクチン学会(東京), 2011.12.11 (1-2-06)
- 18) 村上いつか, 西山秀樹, 浅見さをり, 千葉菜穂子, 生方公子: 血液培養から分離された肺炎球菌と β 溶血性レンサ球菌の臨床細菌学的検討. 第23回日本臨床微生物学会総会(横浜), 2012.01.21
- 19) 千葉菜穂子, 生方公子: 侵襲性肺炎球菌感染症の実態と分離株の分子疫学. 第23回日本臨床微生物学会総会(横浜), 2012.01.21(サテライトセミナー)
- 20) 荘司路, 生方公子: 肺炎球菌の莢膜型および薬剤耐性型と multilocus sequence typing(MLST)との関連. 第23回日本臨床微生物学会総会(横浜), 2012.01.21(サテライトセミナー)
- 21) 村山琮明, 生方公子: ゲノム解析に基づく溶血性レンサ球菌の病原性 -SDSEを中心に-. 第23回日本臨床微生物学会総会(横浜), 2012.01.21(サテライトセミナー)
- 22) 砂押克彦, 生方公子: B群溶血性レンサ球菌(GBS)感染症: 発症例の背景と菌の疫学的特徴. 第23回日本臨床微生物学会総会(横浜), 2012.01.21(サテライトセミナー)
- 23) 杉田香代子, 生方公子: A群溶血性レンサ球菌(GAS)およびG, C群溶血性レンサ球菌(SDSE)感染症: -発症例の背景と菌の疫学的特徴-. 第23回日本臨床微生物学会総会(横浜), 2012.01.21(サテライトセミナー)

H. 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

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と薬剤耐性化状況

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 坂田 宏 旭川厚生病院小児科 主任部長
分担研究者 岩田 敏 慶應義塾大学病院 感染制御センター 教授
分担協力者 千葉菜穂子 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 研究員
分担研究者 諸角美由紀 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 研究員

研究要旨

1. 2010年4月から2011年3月にかけて、全国341医療機関の協力により、市中発症の侵襲性感染症由来・肺炎球菌が633株収集された。小児由来が333株、成人由来が300株であった。
2. 病原性に関わる菌の莢膜型のうち、小児用PCV7でカバーできる割合は71.8%であった。ワクチンに含まれない19Aや6Aが増加していることが注目された。
3. 成人由来株ではムコイドの3型が最も多く、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。小児と同様に19A、6A、23Aの明らかな増加が認められた。ちなみにPPV23のカバー率は82.7%であった
4. β -ラクタム系薬に対する耐性化は、小児ではgPRSPが55%と依然として多く、gPSSPは8%であった。成人においては耐性化が著しく、gPRSPが32%へと増加、gPSSPは24.6%から16.3%へと激減していた。
5. 成人における感染症例の多くは基礎疾患を抱えており、また小児に較べて死亡を含む予後不良例が31%と多く認められた。これらの症例は時間外受診例が多かった。
6. 以上のことから、小児・成人ともに肺炎球菌感染症予防のためのワクチン接種が強く望まれ、またワクチン接種によってどのように莢膜型が変化していくのか、全国規模のサーベイランスが必要であると結論された。

A. 目的

本邦においては1990年代の半ばから、呼吸器感染症や急性中耳炎、化膿性髄膜炎の原因菌として最も重要な肺炎球菌において、治療の第一選択薬である β -ラクタム系薬耐性菌が出現した。特に、免疫学的に未成熟な小児における侵襲性重症感染症は治療の上で深

刻な問題を提起してきた。

一方、急速な高齢化社会の到来とともに、近年50代以上の壮年層における同様の重症感染症例が増加している。

本研究事業1年目(H22)から、我が国における侵襲性感染症由来の肺炎球菌を全国から継続して収集し、発症例(宿主)の背景と予

後について解析,さらにはワクチン接種の基盤となる菌側の莢膜型と薬剤耐性化状況,ならびにMLST解析による世界の分離株との比較を行なうこととした。

ここでは宿主側の因子解析,莢膜型,薬剤耐性解析結果について報告する。

B. 研究方法

1) 収集菌株

解析対象期間は,2010年4月から2011年3月までの期間である。全国343医療機関に所属する細菌検査室から計633株の送付を受けた。小児由来が333株,成人由来が300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侵襲性肺炎球菌感染症(**Invasive Pneumococcal Disease : 略してIPD**)菌株である。

2) 菌株の解析項目 :

- i) 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,あらかじめ連結不可能匿名化を行って菌株とアンケート用紙の回収を行なった。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) 収集菌株の年齢分布と感染症の内訳

図-1には,発症の年齢分布を示す。比較のために2006年の同様の成績も併せて示すが,2010年の成績では小児のうち1歳児が最も多く,次いで1歳未満と2歳児であった。つまり,1歳以下の発症例が70%を占めていることになり,この成績は肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)の接種時期を考える際,極めて重要である。

一方,成人では30代から症例がみられたが,60-70代に発症のピークがみられた。全人口の約4人に1人が65歳以上の高齢者となり,しかも基礎疾患を有する人口が増加している現状において,IPDは乳幼児のみならず,高齢者で再び重要な感染症となっていることが明らかとなった。

IPDの疾患の内訳は,小児と成人とに分けて図-2に示す。小児では敗血症・菌血症が46%と最も多く,次いで化膿性髄膜炎,肺炎(血液培養から菌が分離された例のみ)の順であった。その他には蜂窩織炎,化膿性関節炎等の例も認められた。

一方,成人では肺炎が47%と最も多く,次いで敗血症,化膿性髄膜炎の順であった。小児ではみられなかった疾患として,莢膜3型菌による膿胸や胸膜炎なども6%ほど認められた。

全体としては,化膿性髄膜炎,肺炎,敗血症がIPDの3大疾患であった。

2) 受診科と予後,基礎疾患の関係

図-3には,成人の該当症例が発症時に受診した診療科を示す。成人では肺炎例が多かったことから,内科系診療科が多いのは当然であるが,注目されたのは,救急受診例(時間外受診含む)が40%も占めていることであった。このことは「肺炎球菌感染症は,ひとたび発症すると病態が急速に進行する感染症である」ことを示している。

問題は発症例の予後であるが、小児と成人とに分けた成績を図-4に示す。

左に示す小児での死亡例は1.4%、後遺症を残した例は2.8%であった。右の成人では死亡が22.1%、後遺症を残した例が8.7%、合計で30.8%と「予後不良例」の割合が極めて高かった。

乳幼児の場合には、急な発熱や全身状態の悪化に周囲が気づき、タイムリーに受診していることが大きく寄与していると思われるが、高齢者では自己判断で受診のタイミングを失する例が多いと推察された。

図には示さなかったが、小児と成人に分けた発症例の予後と基礎疾患の有無との関係を調べると、成人では基礎疾患“あり”群で予後不良例が統計学的に「有意に多い」ことが示された。

3) 遺伝子学的に解析した耐性菌の割合

β-ラクタム系薬感受性の低下したペニシリン耐性肺炎球菌では、薬剤の標的である細胞壁合成酵素のPBPをコードする遺伝子変異によって耐性化することが既に明らかにされている。PBP1AとPBP2Bをそれぞれコードする*pbp1a*と*pbp2b*遺伝子変異はペニシリンとカルバペネム系薬の感受性低下、PBP2X(まれにPBP2Aも)をコードする*pbp2x*はセフェム系薬剤の感受性低下に関与している。

マクロライド系薬では*mefA*遺伝子保持による軽度耐性、*ermB*遺伝子保持による高度耐性、ニューキノロン系薬の耐性ではDNA合成酵素のGyrA, GyrB, ParC, ParEをそれぞれコードする遺伝子変異が問題となる。

本サーベイランスでは、各医療施設から検体が届くと、図-5に示す手順で遺伝子解析を行い、翌日には結果を報告するシステムを構築した。報告までの所要時間は1.5時間以内で、緊急を要する依頼には即日結果を報告した。

図-6には、小児由来株(n=333)の成績を示す。genotypeを表す“g”をつけて生物学的結果と区別している。gPRSPの割合が2006年の46%から55%へと増加していた。これとは対照的に、gPSSPが15%からさらに8%へと減少していた。

耐性菌が減少したとする報告もあるが、米国CLSIのブレイクポイント(BP)変更の影響と思われる、現実的には感性菌が増えているわけではない。

一方、図-7には成人由来株(n=300)の成績を示す。gPRSPの増加が著しく、17%から32%へとほぼ倍増していた。また、ムコイド型株がほとんどを占めるgPISP(*pbp2x*)変異株も29%から35%へと増加していた。これに対し、2006年に12%と多かった*pbp2b*変異株が2%へと激減していた。これは、後述する莢膜型12Fの減少と関連している。

4) 莢膜型

小児由来株の莢膜型と遺伝子学的にみた薬剤耐性との関係、そしてワクチンカバー率を図-8に示す。図は左からPCV7に含まれる莢膜型を分離頻度の高い順に、次いで欧米ではPCV7から切り替わった13価ワクチン(PCV13)に含まれる型、そしてワクチンに含まれない型と並べている。

6B型が27.6%と圧倒的に多く、次いで23F, 19F, 14型の順で、これらの型にはgPRSPの多いことが判らかである。欧米で比較的多いとされる9Vや4型等の分離は、日本ではそれほど多くない。このためPCV7のカバー率は71.8%となった。

成績のなかで、欧米でPCV7導入後に増加が問題となった莢膜19Aと6A型が既になりの頻度で分離されていることが注目された。これらにはgPRSPが認められ、PCV13接種でないとカバーできない。その他にも6C, 23A型やさまざまな型が増えてきていた。このため、PCV7のカバー率は2006年の

75.4%から71.8%へと低下していた。

図-9には、成人由来株の23価ワクチン(PPV23)のカバー率と薬剤耐性型との関係を示す。左からPPV23に含まれる莢膜型を分離頻度の高い順に並べた。今回の成績ではムコイド型コロニーを形成する3型と、6B型が突出して多く、次いで14, 23F, 19A, 4, 22F, 19Fの順であった。現在のワクチンカバー率は82.7%と算出された。

3, 4, 22F型は成人に比較的多いが、小児では非常に少なく、成人と小児由来株の莢膜型は明らかに異なるという結果であった。

このような莢膜型の違いは、耐性菌の割合が小児と成人で有意に異なることと密接に関連していた。

なお、2006年の同様のサーベイランス成績と比較すると、最も分離頻度の高かった12F型が激減し、PPV23でカバーできない6C, 35, 15A型が増加し、多様な莢膜型株が認められるように変化していた。このことを反映し、ワクチンカバー率は2006年の85.4%から今回は82.7%へと低下していた。

5) 抗菌薬感受性

図-10には、標準薬のPenicillinG(PCG)感受性(Minimum Inhibitory Concentration:MIC)と、耐性遺伝子結果を重ねた成績を示す。MIC分布は曖昧な2峰性であるが、遺伝子変異別にほとんどが3段階以内にほぼ収まっていた。例えば、*pbp1a+2x*変異のgPISPは0.125-0.25 μ g/mL、赤のgPRSPは0.5-2 μ g/mLのMICを示している。つまり、遺伝子変異の結果からMICを推定することが可能で、データを蓄積しておけば、PCR法によって遺伝子変異を迅速に調べることにより、治療抗菌薬が即確実に選択できることになる。臨床的耐性/感受性の識別は、経口抗菌薬と注射用抗菌薬では異なり、さらに疾患によって異なるので、再現性の高い遺伝子解析が必要と考えられた。

次に、入院例に使用される機会の多い

Cefotaxime(CTX)の同様の成績を図-11に示す。MICが1 μ g/mL以上の菌は遺伝子学的にgPRSPであるが、米国ではこの薬剤にも“髄膜炎”と“非髄膜炎”に分けてブレイクポイントが設定されている。髄膜炎の“S”が0.5 μ g/mL以下、非髄膜炎が1 μ g/mL以下とほとんど同じ濃度に設定されており、髄膜炎では辛うじてgPRSPが排除されるといったことが判る。非髄膜炎では“R”は4 μ g/mL以上とされているが、日本化学療法学会が肺炎にリコメンドした感性菌の臨床的ブレイクポイントは2 μ g/mLである。

図-12には、重症例に対し高頻度に使用されているMeropenem(MEPM)の成績を示す。CLSIではMEPMに対し髄膜炎と非髄膜炎に分けたブレイクポイントが設定されていない。先のCTXは非髄膜炎に4 μ g/mL以上が“R”であったが、MEPMでは“R”が1 μ g/mLと逆転している。また、日本化学療法学会のブレイクポイントとも乖離していた。

成人に対し、経口抗菌薬として多く処方されているのはマクロライド系薬とニューキノロン系薬である。このうち、ニューキノロン系薬耐性は数%であるが、マクロライド系薬の耐性菌の割合は極めて高い。その成績はここには示さないが、クラリスロマイシンに限らずその他のマクロライド系薬も同様の結果であった。すなわち、全体の62%が*ermB*遺伝子保持の高度耐性株、29%が*mefA*遺伝子保持の軽度耐性株であり、全体の90%以上が耐性菌であった。

D. 考察

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、肺炎球菌の収集菌株数は増加しており、侵襲性重症感染症は依然として多く経験されている。そして、本菌の耐性化は小児あるいは成人由来株ともにさらに進行している。発症例の予後を見ると、高齢者においては基

礎疾患を有していること自体がリスクファクターとなっており、受診のタイミングを失すると極めて高い割合で死亡と後遺症を残すことに繋がっていた。

これらの重症化を防止するためにもワクチン接種が必要であるが、収集株の中にワクチンでカバーできない莢膜型株が次第に増加し、小児のPCV7および成人のPPV23のカバー率が経年的に低下してきていることが懸念される。ヒト流入とともに、欧米あるいはアジアにおいて顕彰化している莢膜型株が持ち込まれ、ワクチンでカバー率が低下していることは問題であり、小児においてはできるだけ早い時期にPCV13への切り替えが必要であろう。また、莢膜でないワクチン抗原の検索が強く望まれる。

E. 結論

侵襲性重症感染症由来の肺炎球菌を全国規模で633株収集し、ワクチン接種の基礎となる莢膜型と遺伝子解析による薬剤耐性化状況を調べた。また菌株とともに送付を受けた症例の背景因子について、主に予後との関係から解析した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chiba N, Morozumi M, **Ubukata K**. Application of the Real-Time PCR Method for Genotypic Identification of β -Lactam Resistance in Isolates from Invasive Pneumococcal Diseases. Microbial Drug Resistance. DOI: 10.1089/mdr. 2011.0102
- 2) Rakov AV, **Ubukata K**, Ashley Robinson D. Population structure of hyperinvasive serotype 12F, clonal complex 218 *Streptococcus pneumoniae* revealed by multilocus boxB sequence typing. Infect Genet. Evol. 2011; 11:1929-1939.
- 3) 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; 60:128-34.
- 4) 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. 2011; 17:334-340.
- 5) 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; 12:17.
- 6) Takahashi T, **Ubukata K**, Watanabe H. Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features. J Infect Chemother. 2011; 17:1-10.
- 7) 千葉菜穂子, **生方公子**: わが国における侵襲性肺炎球菌感染症の実態とその予防としての肺炎球菌ワクチン. 日化療会誌(総説). 2011; 59 : 561-572.
- 8) 千葉菜穂子, **生方公子**: 耐性肺炎球菌感染症. 呼吸器内科. 2011; 20 : 480-485.
- 9) **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—. 小児感染免疫, 2011; 23 : 257-263.

- 10) 生方公子：ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP)－薬剤耐性化とワクチンに関わる莢膜型の関係－. 小児科臨床. **2012**; 64: 2459–2466.
- 11) 生方公子：侵襲性・重症レンサ球菌感染症. 化学療法の領域. **2012**; 28: 66–73.
- ## 2. 学会発表
- 1) 生方公子：急速な高齢化社会の到来. 変貌する市中型呼吸器系感染症. 第 51 回日本呼吸器学会 (東京), 2011.04.22 (ランチョンセミナー)
- 2) 桑田祐輔, 千葉菜穂子, 岸井こずゑ, 諸角美由紀, 村山琮明, 生方公子：侵襲性感染症由来 *Streptococcus agalactiae* (GBS) の分子疫学解析：莢膜型と MLST 解析からみる菌の多様化. 第 85 回日本感染症学会総会 (東京), 2011.04.22
- 3) 千葉菜穂子, 砂押克彦, 桑田祐輔, 荘司路, 高橋 孝, 生方公子：侵襲性感染症由来肺炎球菌の分子疫学解析. 第 85 回日本感染症学会総会 (東京), 2011.04.22
- 4) 松井英則, 吉田春乃, 村山琮明, 高橋 孝, 生方公子：劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症に及ぼす肥満細胞の役割. 第 85 回日本感染症学会総会 (東京), 2011.04.22
- 5) 吉田春乃, 松井英則, 村山琮明, 生方公子, 高橋 孝：劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症における骨壊死発症機構の解析. 第 85 回日本感染症学会総会 (東京), 2011.04.22
- 6) 生方公子：侵襲性重症肺炎球菌感染症. 分子疫学解析からみる菌の変化. 第 59 回日本化学療法学会総会 (札幌), 2011.06.24 (教育セミナー1-1)
- 7) 桑田祐輔, 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 生方公子, 高橋 孝：侵襲性感染症由来 *Streptococcus agalactiae* (GBS) の各種抗菌薬に対する耐性化：2010 年度全国収集株の成績. 第 59 回日本化学療法学会総会 (札幌), 2011.06.24 (P-G-117)
- 8) K. Ubukata, Y. Kuwata, M. Morozumi, N. Chiba, H. Sakata, S. Iwata, and T. Takahashi: Relationship between Multilocus Sequence Typing and Capsule Type of *Streptococcus agalactiae* (GBS) Isolates from Patients with Invasive Infections. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.19 (C2-1254)
- 9) K. Ubukata, K. Sunaoshi, K. Sugita, M. Morozumi, N. Chiba, S. Fujishima, and T. Takahashi: Molecular *emm* Genotype and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (SDSE) Isolated from Patients with Invasive Infections in Japan. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.19 (C2-1255)
- 10) N. Chiba, M. Morozumi, M. Shoji, and K. Ubukata: Change in the capsular type and genotype of β -lactam-resistant isolates from patients with invasive pneumococcal disease (IPD): Active Nationwide Surveillance. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.19 (C2-1270)
- 11) M. Morozumi, T. Okada, M. Hasegawa, T. Takei, N. Chiba, S. Iwata, and K. Ubukata: Yearly Increase in Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Pediatric Patients with Community-Acquired Pneumonia from 2002 to 2010. 51st ICAAC, Chicago, 2011.09.20 (C2-1806)
- 12) 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 生方公子：カルバペネム系薬にも耐性化した多剤耐性肺炎球菌の遺伝子解析. 第 94 回日本細菌学会地方会 (東京), 2011.10.06
- 13) 桑田祐輔, 諸角美由紀, 千葉菜穂子, 生方公子, 高橋 孝：侵襲性感染症由来 *Streptococcus agalactiae* (GBS) の分子疫学解析. 第 94 回日本細菌学会地方会 (東京), 2011.10.06