

- 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  $\beta$  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: 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: 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: 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: 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: 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)

## 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

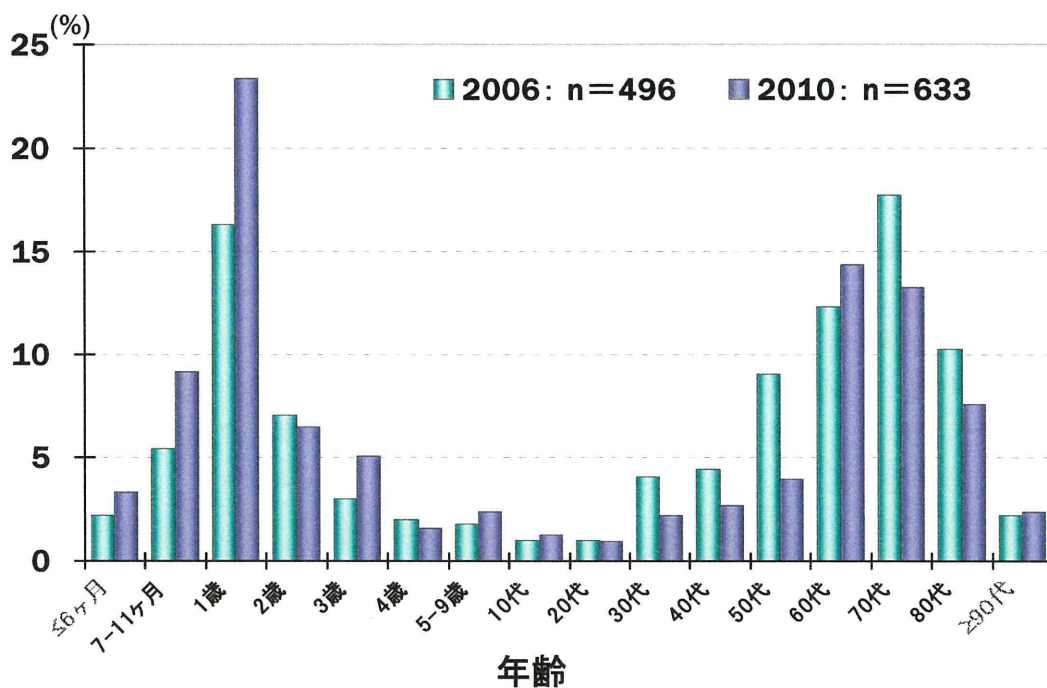
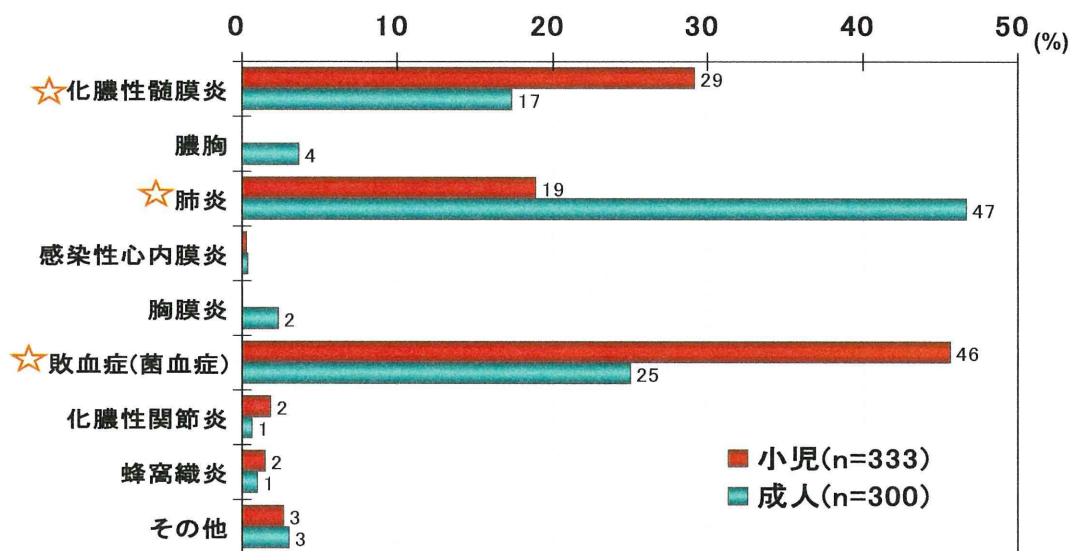


図-1 IPD 例の年齢分布



注: 集計された肺炎は, 肺炎球菌が血液からも分離された例のみ

図-2 IPD 例の疾患の内訳

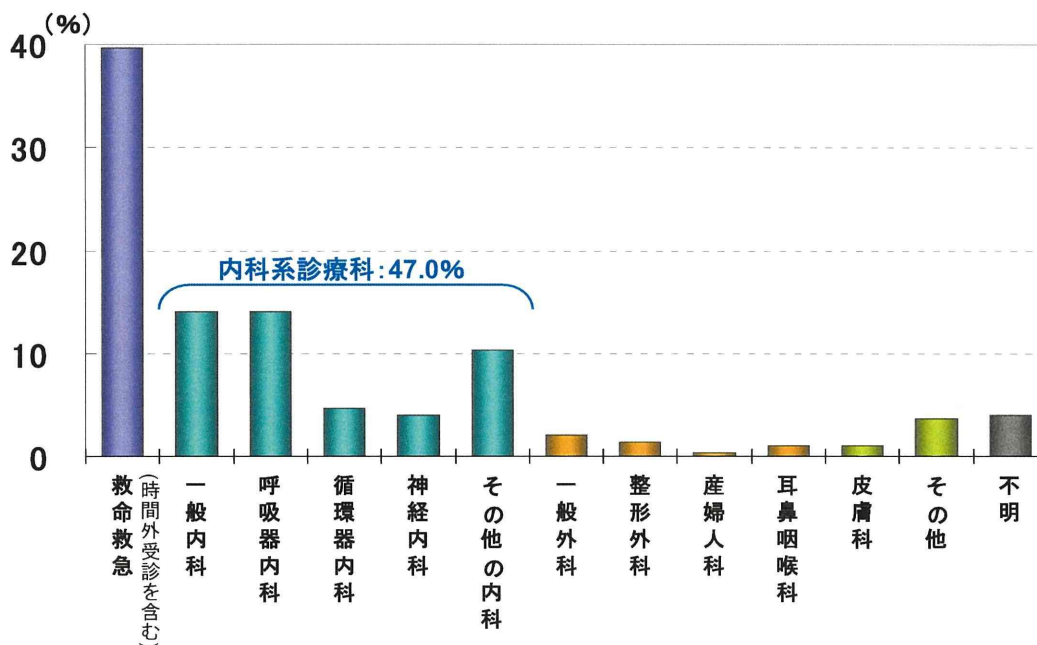
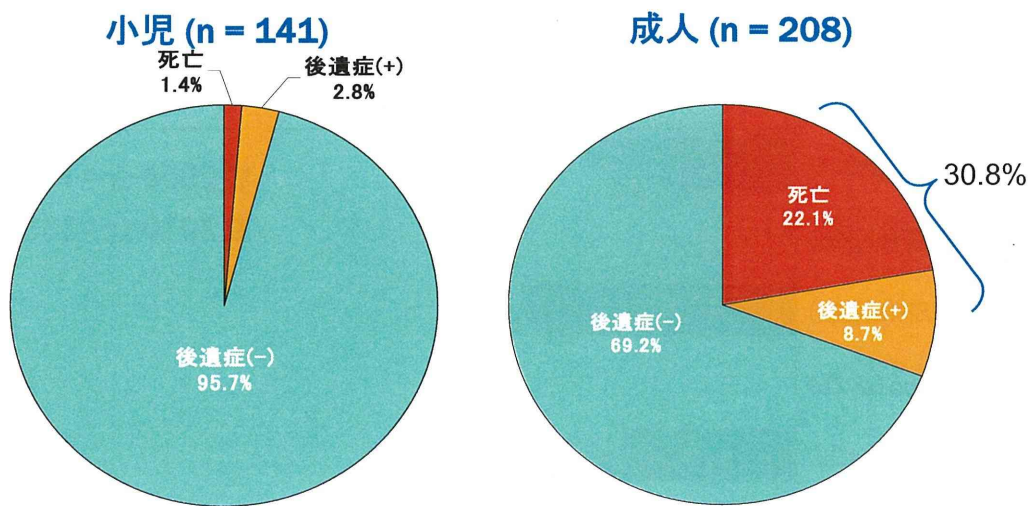


図-3 成人 IPD 例の発症時の受診科



↓ 化膿性髄膜炎の予後不良率は、小児:22.5%, 成人:41.5%  
 ↓ 肺炎球菌感染症は、今でも極めて致死率の高い疾患である

図-4 IPD 例の予後の内訳

検体到着 → 翌日、莢膜型と遺伝子解析データを報告

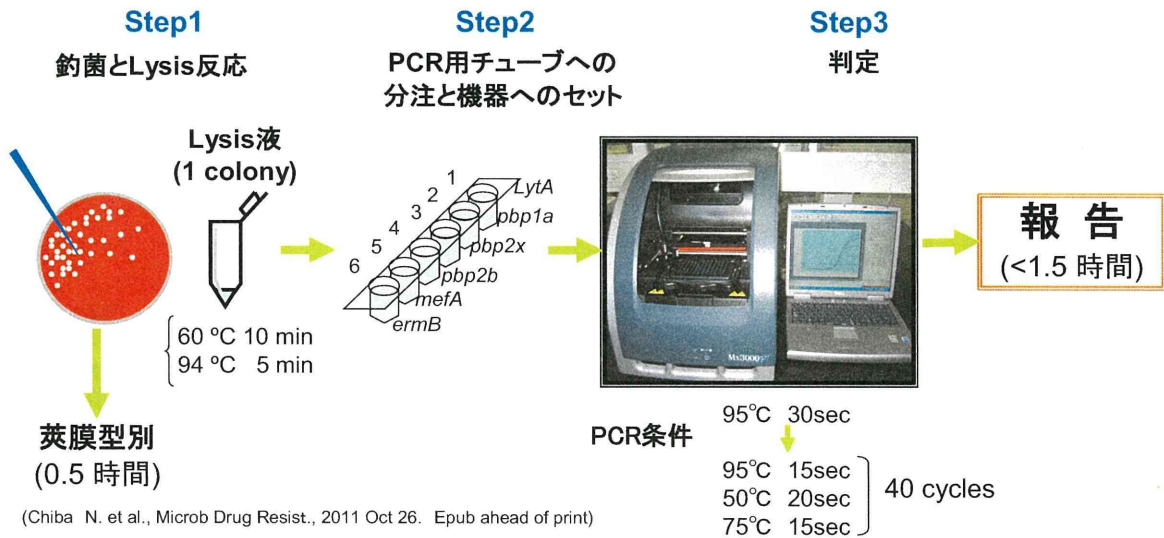


図-5 Real-time PCR 法による耐性遺伝子検索

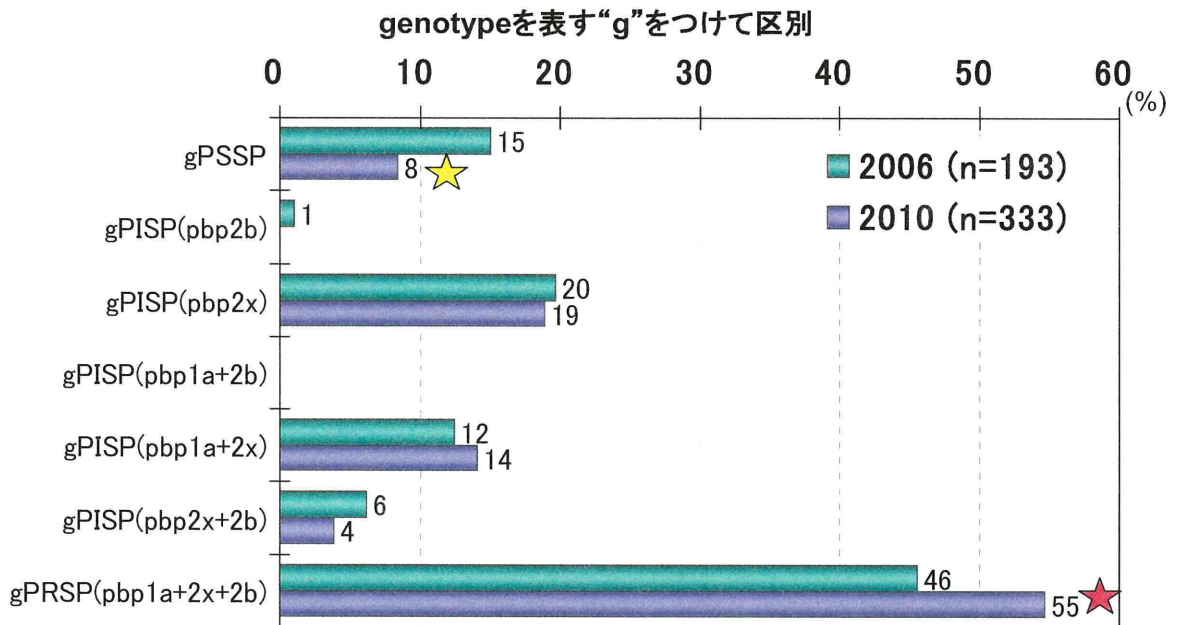


図-6 小児由来株：遺伝子学的に解析した耐性菌の割合



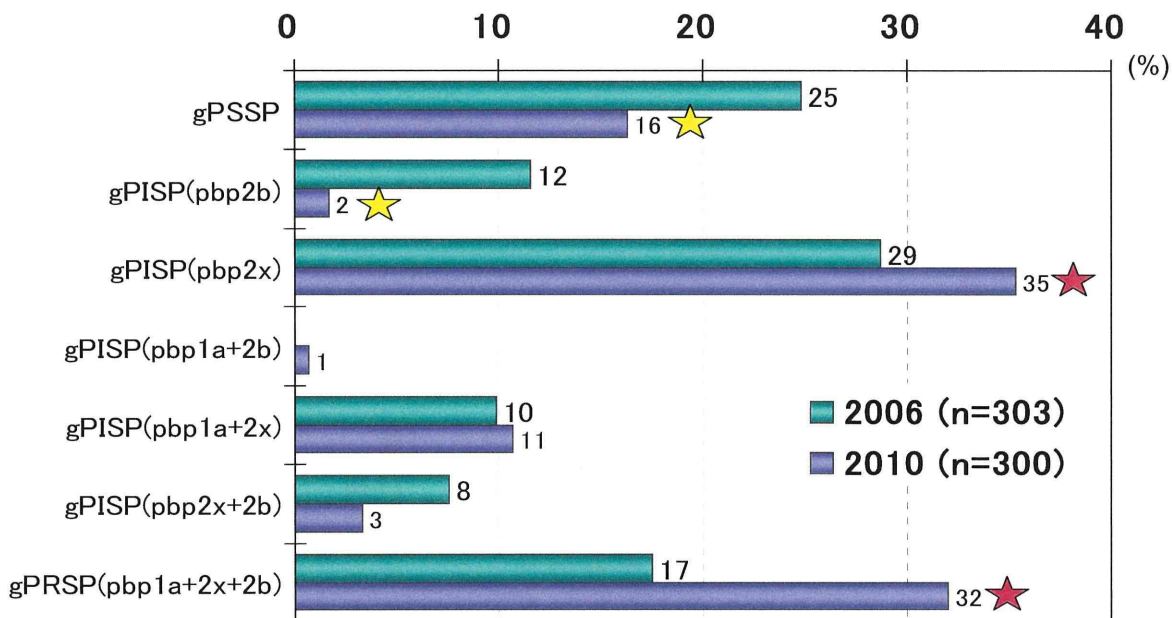


図-7 成人由来株：遺伝子学的に解析した耐性菌の割合

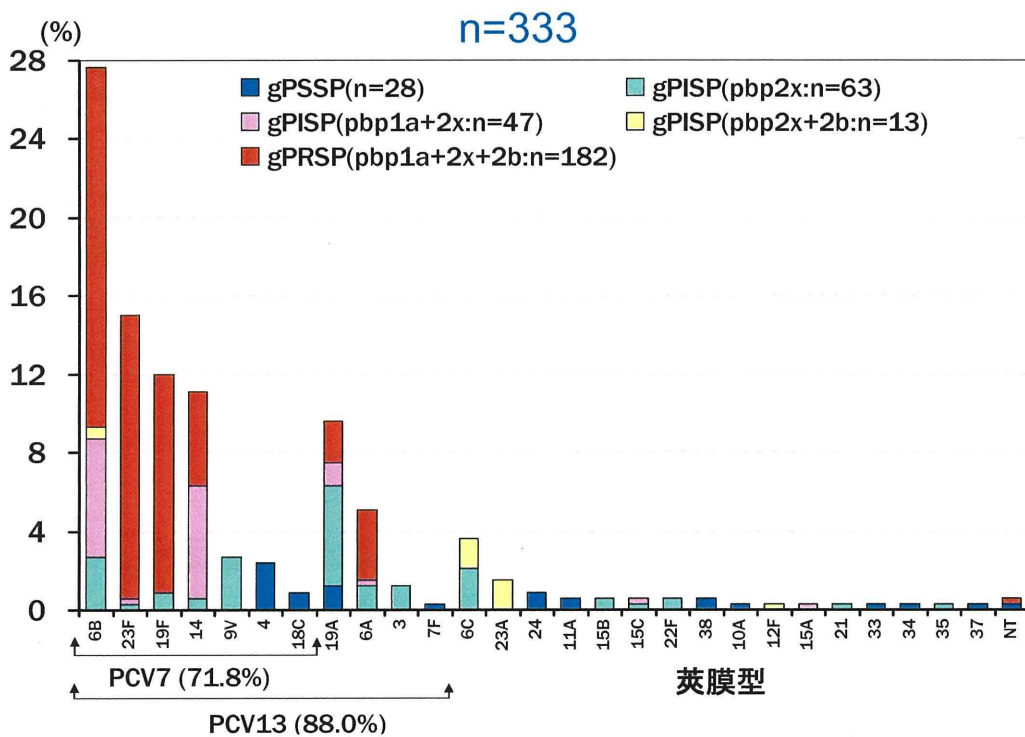


図-8 小児由来株：荚膜型，薬剤耐性型，ワクチンカバー率

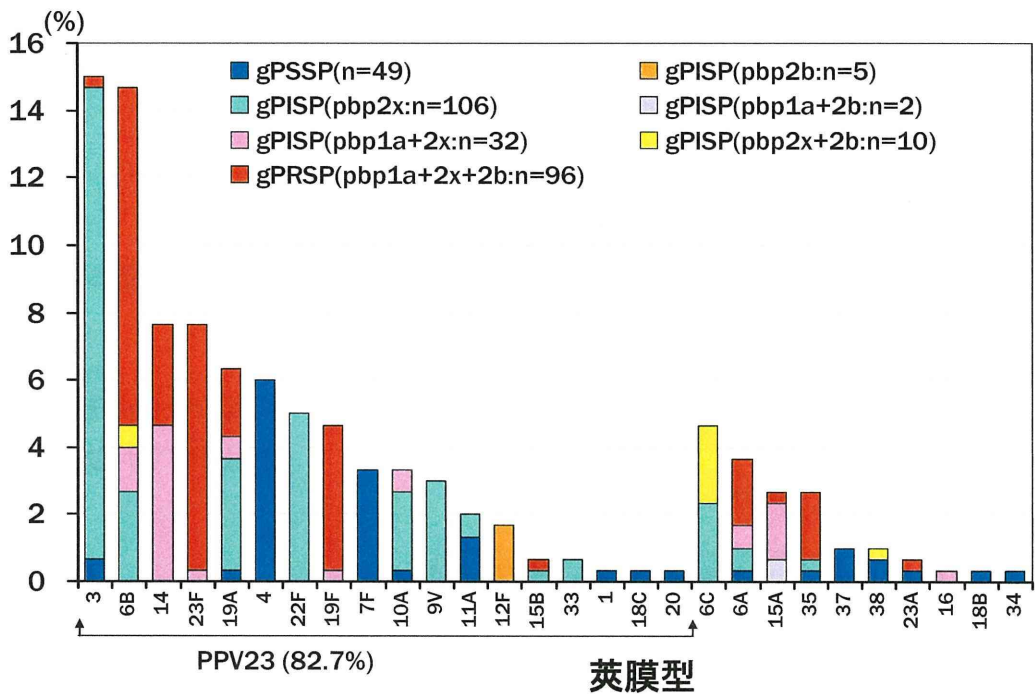


図-9 成人由来株：荚膜型，耐性型，ワクチンカバー率

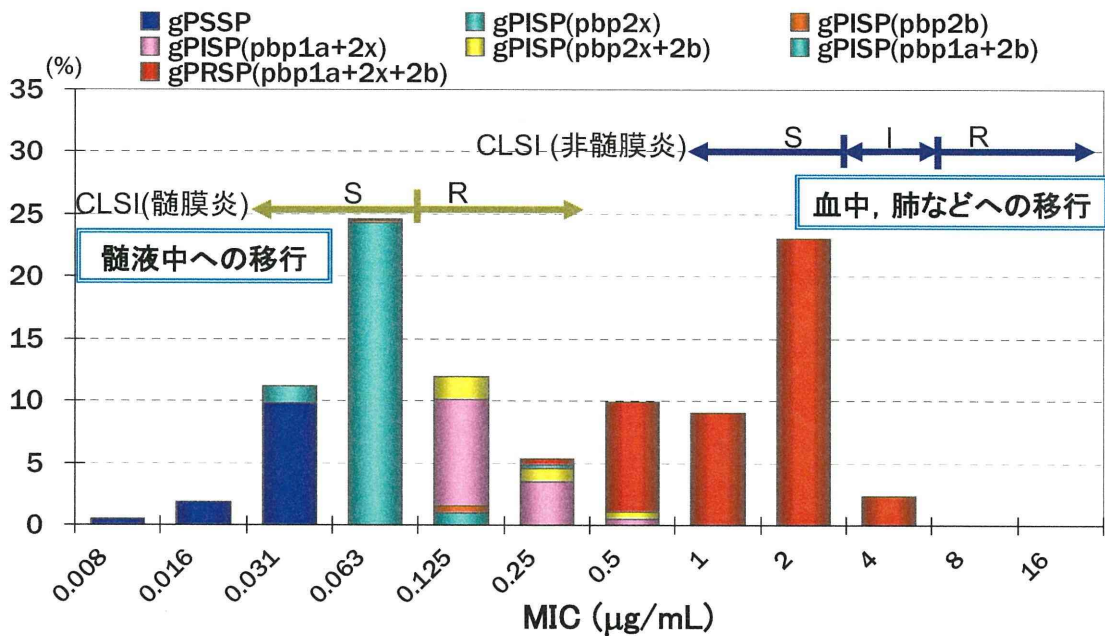


図-10 ペニシリン G 感受性 (n=633)

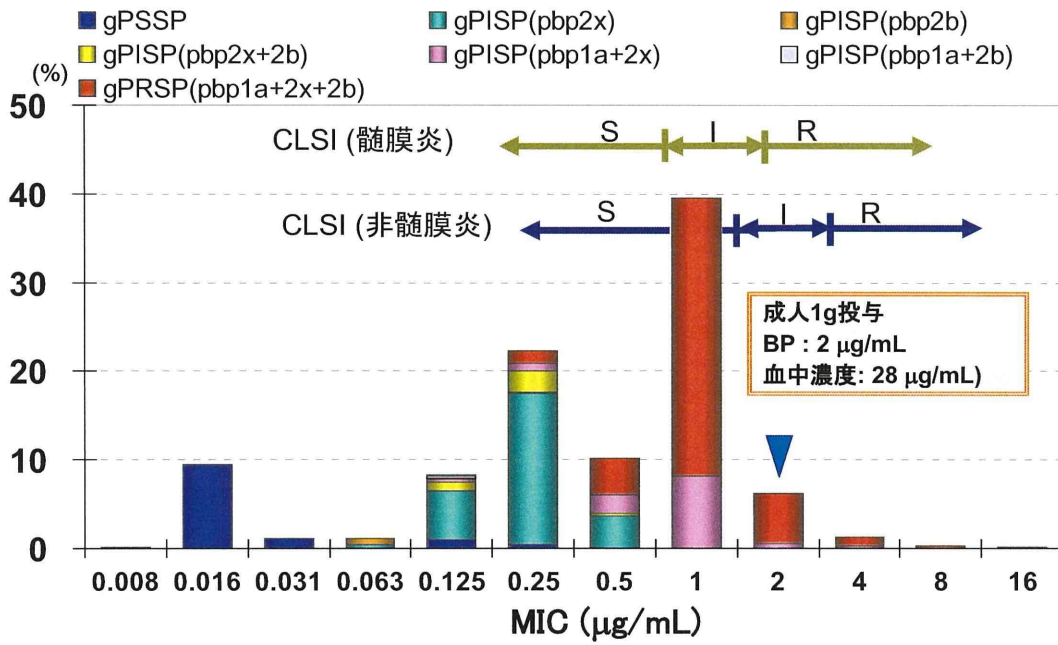


図-11 セフトキシム (CTX) 感受性

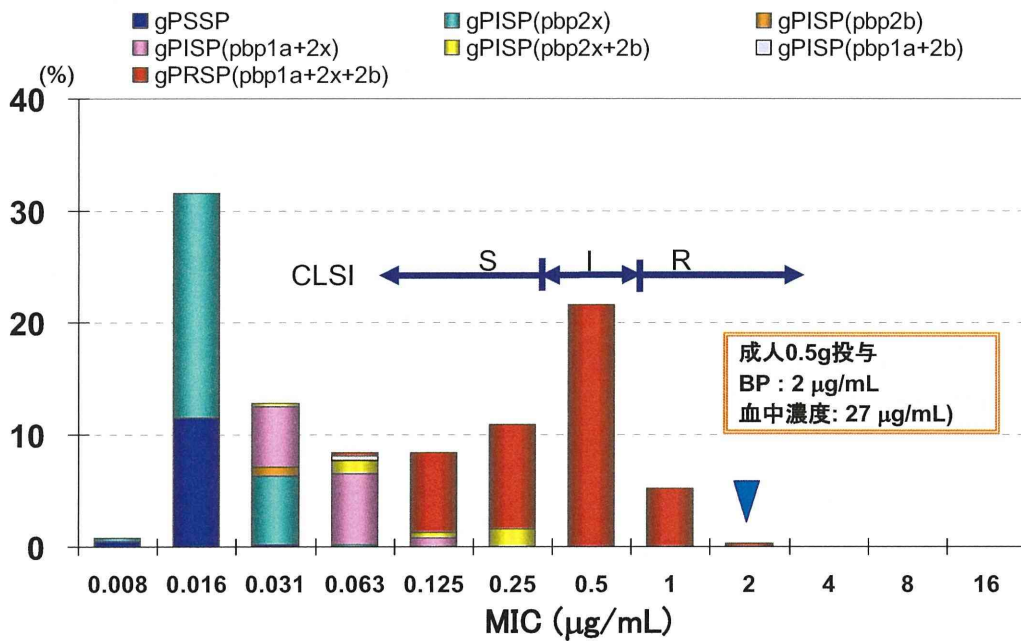


図-12 メロペネム (MEPM) 感受性

## 分担研究報告書

### 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

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  
分担協力者 荘司 路 国立がん研究センター中央病院 病理科・臨床検査科 主任

**研究要旨** 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、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。多様化した sequence type (ST) 型と clonal complex (CC) 型の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による。多彩な莢膜が標的のワクチンではなく、肺炎球菌に共通するワクチン開発が必要である。

#### A. 研究目的

ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) の出現により、欧米では早い段階からその感染症予防として 23 価 polysaccharide vaccine (PPV23)、そして小児用結合型 7 価ワクチン (PCV7) が開発されてきた。PCV7 は既に 100 カ国以上で接種されている。しかし、その普及に伴って菌の莢膜型が変化してきたことが世界的に問題となっている。

他方、我が国では 2011 年に「ヒトパピローマウイルス等ワクチン接種緊急促進事業」によって、小児用 PCV7 と Hib ワクチンが公費助成の対象となった。このため、ワクチンによる予防効果を明らかにすることが急務となっている。肺炎球菌感染症は海外との人々の交流が盛んになるにつれ、さまざまな莢膜型の菌株がヒトとともに流入・流出していることである。

これらの菌株の複雑化を解明するために、Multilocus Sequence Typing (MLST) により世界の中での日本株の状況を遺伝子学的に明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

MLST 解析では、菌が生存のために必須とするタンパクを合成する酵素等をコードする 7 つの遺伝子 (housekeeping gene) を対象とし、定法に従って sequence を行なう。その解析結果を指定された方法に従って、[図-1](#) に示す CDC の Web サイト上の肺炎球菌画面 (<http://spneumoniae.mlst.net/>) で入力する。

必須遺伝子においては、遺伝子変異がゆるやかな時間経過で生じることを利用している。サーベイランス収集株の 7 割に相当する 470 株 (7 遺伝子×470=3290)、再現実験を含め 4000 回以上の sequence を行なった。



送信データはサイトのデータベースと瞬時に照合され、[図-2](#)に示す結果画面が表示される。左側に7遺伝子の名称とその遺伝子番号が表示される。この菌株ごとの7遺伝子番号の組み合わせをアレルプロファイルという。このアレルプロファイルから、その菌株のSequence Type(ST)番号右のように表示される。ここで重要なのは、該当するST番号の菌株一覧が表示されることである。つまり、自分の解析した株が既に登録されている株と同じなのか否かが判る。既報の場合には、i) どの国で分離され、ii) いつ登録され、iii) 莢膜型は何か、iv) そして分離された患者情報まで参照することができる。

現在、肺炎球菌のSTは7,800以上と膨大な数に達しているが、肺炎球菌の遺伝子は極めて変異しやすいことを意味している。これをどのように変化しつつあるのか、アレルプロファイルの似通ったST番号をグループ化したのがClonal Complex(CC)であるが、STでは複雑なため、ここでは主にCCデータを示すことにした。

### (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、あらかじめ連結不可能匿名化を行って菌株解析を行なった。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) MLST 解析

侵襲性感染症由来の肺炎球菌466株の解析により、ST型は総計123、Clonal Complex(CC)では34に区別され、極めて複雑であることが示された。

その中から、日本で分離されるgPRSPに多いCC 156の全体を[図-3](#)に示す。赤字は日本で分離されているST番号を表わし、カッコ内の青字は最初にそれが登録された国名で

ある。

世界的にはPRSPが早い段階から高頻度に分離されたスペイン登録のST156とST90が多いが、わが国の分離株でもこれらのCC株が多い。その他に、コロンビア登録のST338、ベトナム登録のST280も認められる。

解析した株中、菌株数の多い莢膜型とCCとの関係を[図-4](#)に示す。CCの異なるものをさまざまな色に塗り分けているが、菌数が最も多かった莢膜6B型では8種類、さらに6A、6C型でも4種類のCCが認められた。つまり、6型関連で12のCCに属する株が分離されていた。また、莢膜14型でも6種類のCCが認められた。

これに対し、莢膜23F、19F、ムコイドの3および4、9V型等ではCCは比較的均一であった。

この結果は、重症感染症で最も分離頻度の高い6型、肺炎例からの分離が高い14型菌が遺伝子学的に非常に変化してきていることが明らかにされた。

株数の多かった11のST型について、それらが最初に報告された国と日本との関連について[図-5](#)に示す。

莢膜6B型は、スペインのST90とシンガポールから報告されているST902である。莢膜3型のST180は英国から報告されている。一方、PRSPがほとんどを占める莢膜19Fは台湾株として登録されたST236、23F型のST242も台湾株と共通している。肺炎由来株に多い14型はノルウェーから登録されたST343型であった。

注目されるのはPCV7導入後に米国で増加し、わが国でも増加している19A型である。米国株のST3111とチェコから登録されているST2331が同数認められた。

### 2) 莢膜型の変化

MLSTならびに莢膜型の解析から、最近新たな現象が注目されている。それは、莢膜を



コードする遺伝子 (*dexB*) 領域が異なった菌株間で生ずる **Capsular Switching** と呼ばれる現象である。図-6に、遺伝子組換えによる莢膜型の変化を図式化して示す。

ST236で莢膜19F型のPRSPが、ST343型で莢膜14型のPRSP株の遺伝子を取り込み、ST236の莢膜14型株へと変化した。莢膜遺伝子の両端には $\beta$ -ラクタム系薬の耐性に関わる*pbp2x*と*pbp1a*遺伝子があり、それらも同時に組換えを起こすことが明らかにされた。

#### D. 考察

肺炎球菌におけるMLST解析結果と莢膜型の関連性をみると、他の菌種に比して極めて多様化・複雑化していることが明らかにされた。従来、肺炎球菌は遺伝子変異が起りやすいとされているが、MLSTの結果はそのことを裏づけている。

このような肺炎球菌の複雑化は、i) 遺伝子変異への抗菌薬の選択圧、ii) より病原性の強い菌株の選択、iii) そしてワクチン普及による選択圧で、増強されていると推定される。しかし、菌の側からこの現象を眺めると、ヒトの免疫機構を回避して生き延びていくメカニズムでもある。

今後とも、地球上のどこかの国で生じた新たな菌は、地球規模での人々の激しい移動

とともに、国境を越えて容易に拡散することがMLSTの成績から示された。

#### E. 結論

肺炎球菌による侵襲性・重症感染症を防ぐためには、多様化する莢膜を標的としたワクチンではなく、全菌株に共通する高い抗原性のある物質をみだし、ワクチン開発する必要があると結論された。

#### F. 研究発表

論文発表ならびに学会発表は、「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」に記した。

#### 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

# MLSTサイト(<http://spneumoniae.mlst.net/>)

**MLST** Multi Locus Sequence Typing

mlst.net | spneumoniae.mlst.net Tuesday 9th November 2010

**DATA ANALYSIS**

**DATABASES**

- B. burgdorferi
- B. cereus
- B. pseudomallei
- C. albicans
- C. glabrata
- C. krusei
- C. tropicalis
- C. jejuni
- C. neoformans var grubii
- E. coli
- E. faecalis
- E. faecium
- H. influenzae
- H. pylori
- Leptospira spp.
- M. catarrhalis
- N. meningitidis
- S. agalactiae
- S. aureus
- S. enterica
- S. epidermidis
- S. pneumoniae
- S. pyogenes
- S. suis
- V. vulnificus

**SUBMISSIONS**

**NEWS**

**LINKS**

Statistics  
No. STs - 5844  
No. Isolates - 11073  
Last updated - 27/10/2010

Policy Document

**NEW - MLST-maps** - Click here - View global distribution of isolates and STs - NEW

**Streptococcus pneumoniae**

- Organism Specific Information
- Concatenates Sequences
- Is it a pneumo???
- Download Alleles
- Download STs
- Compare profile to refset
- View PMEN Clones
- Draw tree using own MLST data
- download as MS Excel
- download as MS Access
- Contact Curator
- eBURST V3
- Template for submission

**Profile Query** **Locus Query** **Batch Query**

Please choose--- Please choose--- Please choose---

This site is hosted at **Imperial College London** and is funded by the Wellcome Trust. The curation of the *S. pneumoniae* database is in part funded by a charitable donation from Weysh UK.

**DATA ANALYSIS**

**DATABASES**

- B. burgdorferi
- B. cereus
- B. pseudomallei
- C. albicans
- C. glabrata
- C. krusei
- C. tropicalis
- C. jejuni
- C. neoformans var grubii
- E. coli
- E. faecalis
- E. faecium
- H. influenzae
- H. pylori
- Leptospira spp.
- M. catarrhalis
- N. meningitidis
- S. agalactiae
- S. aureus
- S. enterica
- S. epidermidis
- S. pneumoniae
- S. pyogenes
- S. suis
- V. vulnificus

**SUBMISSIONS**

**NEWS**

**LINKS**

Statistics  
No. STs - 5844  
No. Isolates - 11073  
Last updated - 27/10/2010

Policy Document

**aroE**

```

ATGACCTCTTCTAATGAAAGAGCCAAATTTAAATTCGATAATATACAGATGTC
CAAGGATTTTAACTGCTTGGCTCTTTTACAATTTCAAGTAAAGAG
ATGACCTCTTGGTTCAGGCTTGGCCGTAATCAATTTGGCAGC
GCATTTGGATGGCCGACGACGATTTGGCTTTCTGCTCCGTT
CTATGAAAAAAGAACCTTACTACAGAGTTCAGGATCAGACG
GTTTAAAGCTATTTGTC

```

**gdh**

```

CAACTCAGTCAGACAGCTTTTAAAGAAATGGATTCTATTTCGACA
ACCACTTGCACAAATTTTTCAGCATCTATATCCACCAACAGAGCC
TTCTCTTACCGCTAATGGGACGACAGGACGAAAGAAATTAATCTG
GCTCTTAACTACTTATTGGCTACAGATGCTGCACTGCACTGGCTT
CTCCAGACCATACGAGAAATGATTATTGATGCTCAATATAGAAC
CAACTACTTATGGCAGTGGAT

```

**gki**

```

CAGCCAACTCATGCTACTTGGTAAAGAGGCTGCTTCAGACACTT
GCTTCAGGAGAGGATTTGCACTTCACTCTCTGCTATATCCGATGA
TAGCAGGCGATCCAGCTTCAAGGCTTGAATGATAAGGAGACAA
GTAATCTGAAAGCTTTTGTATCTCGAANAAGAGGAGAGACTT
GCTTATGCTTACGCTAATCTCACTTACTTGGCAATGCTGTCTG
CT

```

**recP**

```

AGCTCTCTAGGCGAGGATTTCAAGCTGCTACGGTTTGGCCAGC
AGACCTTCTGGGCGGCAATATAGCCGAGGCTACATATCTTC
GACACATACTTACTTATCTTGGAGAGGAGACTTGAATGGAGCT
CTTCAGAGGAGGACTCTATATGAGGCTTGGCAAACTGATAC
TTGCTTCTTATGATCAATGATATCACTTGGATGCTGAGACAA
AGGATTCCTTACAG

```

**spi**

```

AATGATTAATCTGATCAATGAGAAAGAGGAGGCTTACTCTA
GCACATATAGAGGCTTGAAGATGACAACTCAAGAGCACTAC
TCAGGCAAGGCTTCAAGAAATAGAGACTTCTTAGAGATATC
CTCAAAAAGGCGAGCTTCAAGCTTACTCACTACAGCAACAGC
TTTAGCTTACTTCTCGAAGAGAAATGCTTCTCGAAGAAAGAGC
GCTTGGTTTCGAGCAAGGCGGCACTAGACTCA

```

**xpt**

```

AAAGCTAAGAAATCAACTGAGGAGGACTTCACTCTCAAGTC
TACTTCTTACAGAGGCTGATGATGATGATGATGATGATGATG
TCTCTCAAGAGAGAGGTTTATATGACAGATTTCTCTGTCAM
TGGCAGCTCTAAGGCTTCAATCAATCATCAAGAGCCGCTGCG
CAAGCTGAGGATATGGTATGATGATGATGATGATGATGATG
TCTGATTTCTTCAAAAAGAGGCTACCTGCTGTATGATTTGCTG
CT

```

**ddl**

```

CTTGGGTAAGTACGATGTCAGAGCAGCCTACTCTGAGAAATGTC
AGGACCTGCTCTTACTGACTAGGATCGAAGTATATGATACAGAA
TACTATGATATCTGGCAAAATGATGATGATGATGATGATGATG
GCTCAAAATGACAGAAAGCCTTCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTA
TCTCTTGGGATTTCTTACAGAAAGGAGGAAATTTCTCAAGC
AGGCTC

```

**Profile Query** **Locus Query** **Batch Query**

Please choose--- Please choose--- Please choose---

図-1 MLST の実際(1) : データ送信

## アレルプロファイル(Alelic profile)とSequence Type (ST) 番号の検索

**MLST** Multi Locus Sequence Typing

mlst.net | spneumoniae.mlst.net Tuesday 9th November 2010

**DATA ANALYSIS**

**DATABASES**

- B. burgdorferi
- B. cereus
- B. pseudomallei
- C. albicans
- C. glabrata
- C. krusei
- C. tropicalis
- C. jejuni
- C. neoformans var grubii
- E. coli
- E. faecalis
- E. faecium
- H. influenzae
- H. pylori
- Leptospira spp.
- M. catarrhalis
- N. meningitidis
- S. agalactiae
- S. aureus
- S. enterica
- S. epidermidis
- S. pneumoniae
- S. pyogenes
- S. suis
- V. vulnificus

**SUBMISSIONS**

**NEWS**

**LINKS**

Statistics  
No. STs - 5844  
No. Isolates - 11073  
Last updated - 27/10/2010

Policy Document

**Streptococcus pneumoniae** - Multiple Locus Query

Please enter sequences below - be sure they are the right length and allele

**Locus** **Allele Number**

aroE	5
gdh	6
gki	1
recP	2
spi	6
xpt	3
ddl	4

**gki** 1  
**recP** 2  
**spi** 6  
**xpt** 3  
**ddl** 4

**Your sequence type is ST90**

Strain	ST	Serotype	aroE	gdh	gki	recP	spi	xpt	ddl
SP3026-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
GM17-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
M223-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
M320-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
M337-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
M337-5B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
SP641-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
M810-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
T8-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
GM121-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
NL-950152-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
NL-950861-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
NL960357-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
SP-3352-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
US-1309/92-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
M391-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
670-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
ICF-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
Spain-6B-2	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
TW146-6B	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
995062	90	14	5	6	1	2	6	3	4
985091	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
985221	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
985298	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
985471	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
985472	90	6B	5	6	1	2	6	3	4
985115	90	6B	5	6	1	2	6	3	4

**Profile Query** **Locus Query** **Batch Query**

Please choose--- Please choose--- Please choose---

図-2 MLST の実際(2) : 比較・解析

赤字のSTは日本で分離されている

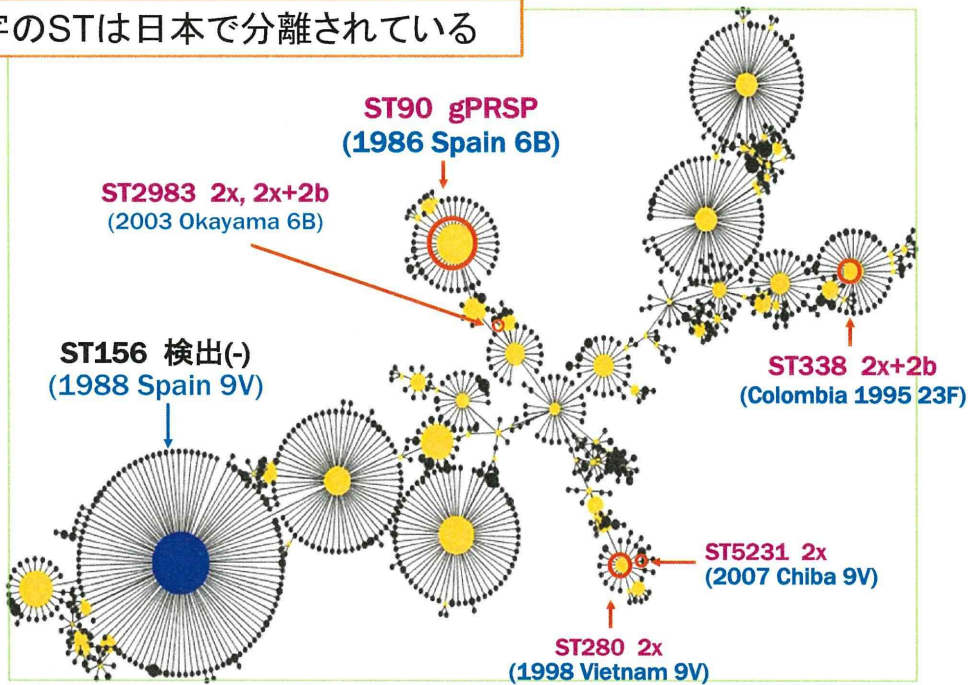
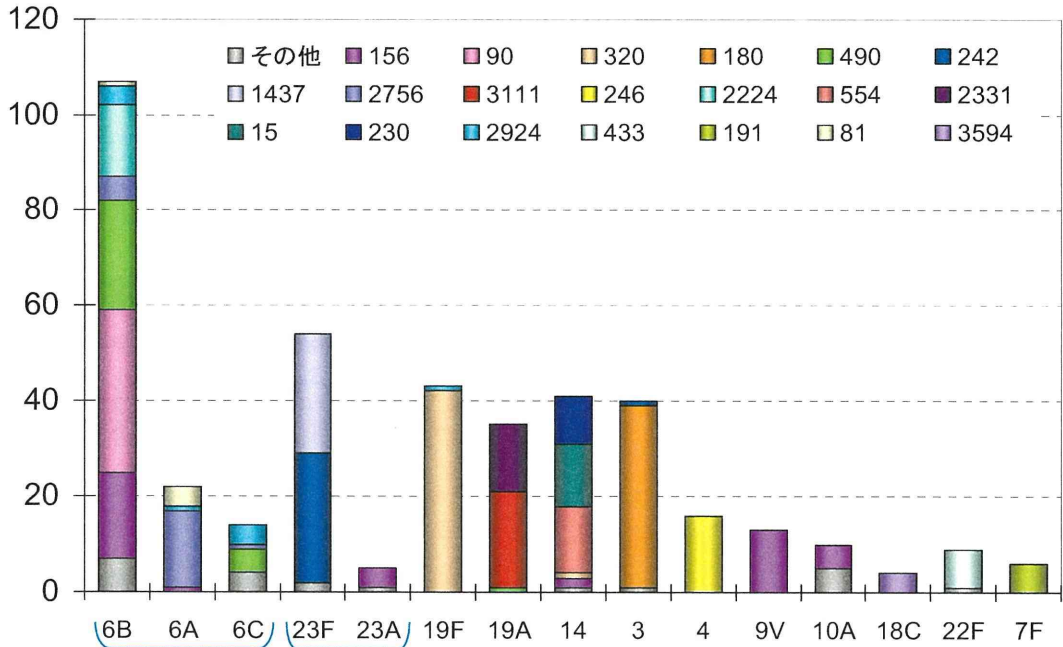


図-3 Clonal Complex : CC 156 の実際



6B, 6A, 6C型と14型は遺伝子が非常に変異している

図-4 莢膜型と Clonal Complex の関係



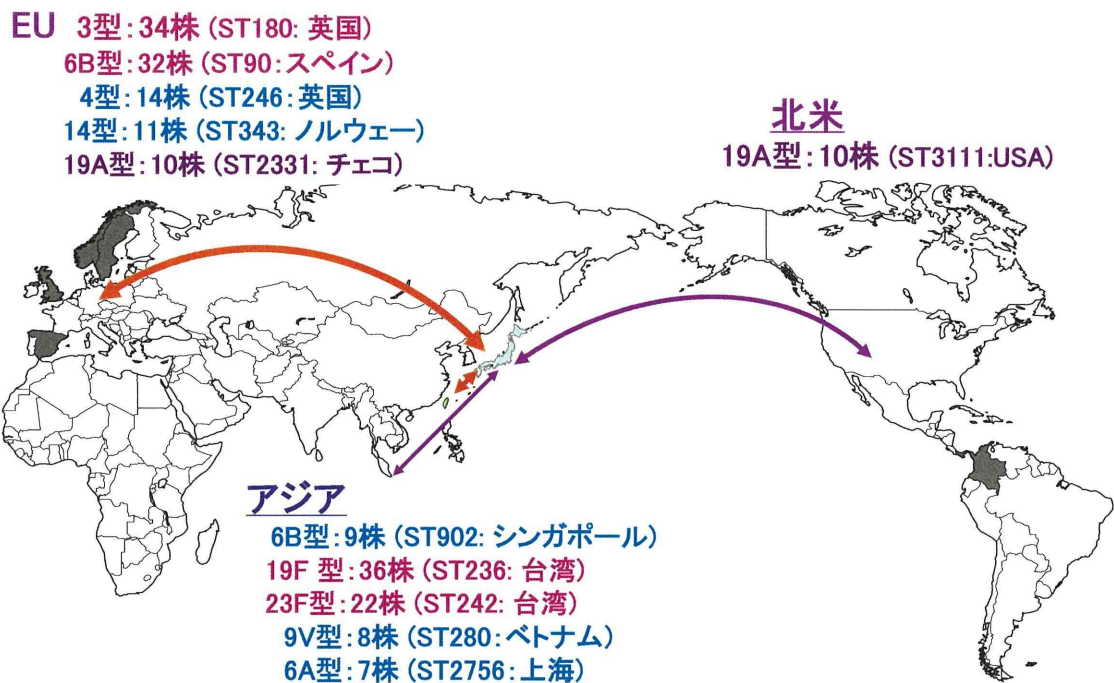


図-5 わが国で多い肺炎球菌分離株と最初の登録国との関係

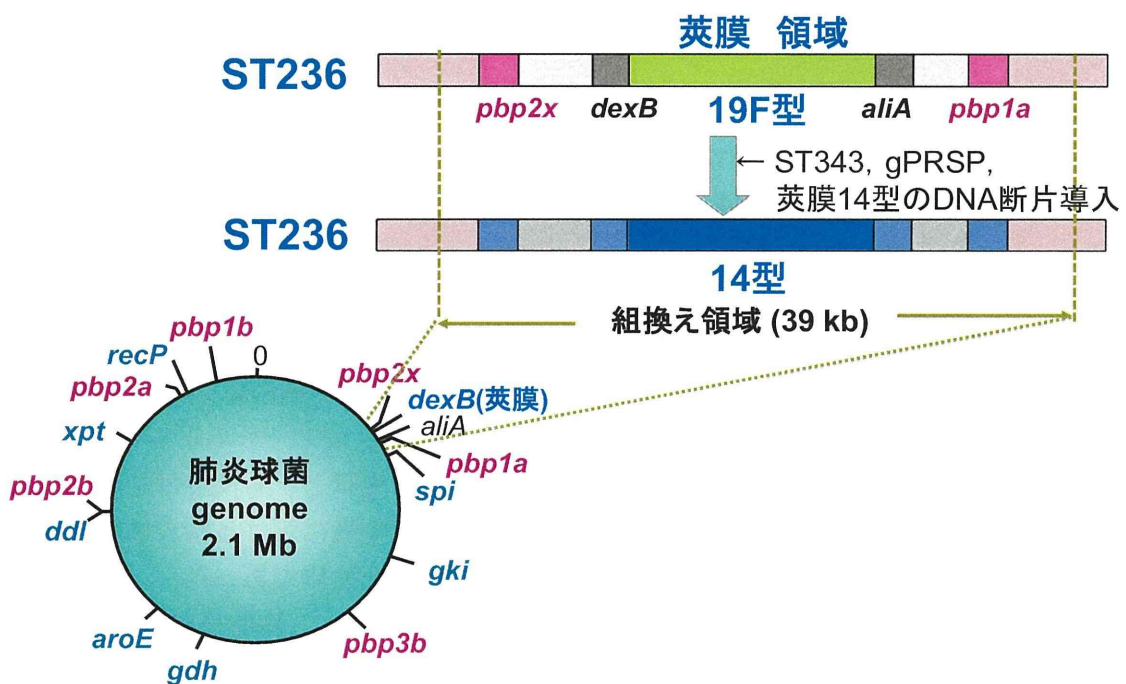


図-6 Capsular switching : 2010年の肺炎球菌分離株

## 分担研究報告書

### 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

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 岩田 敏 慶應義塾大学医学部 感染制御センター 教授

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 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

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

#### 研究要旨

1. H22 年度の「ワクチン接種緊急促進事業」の執行に伴い、小児に対する Hib ワクチンと肺炎球菌結合型 7 価ワクチンの接種が促進されることになったが、この効果を明らかにするために、原因不明の化膿性髄膜炎由来検体について、私達が構築した網羅的 real-time PCR を実施した。
2. その結果は、Hib 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、加えてウイルスを証明できた例もあった。
3. 感度の高い PCR 法によってこれらの菌種の陽性例が減少するのか否か、引き続き検討が必要と結論された。

#### A. 目的

「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」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ある。このため、発生動向把握に 2 つの研究班が関わることになった。

本研究班は、原因菌不明の症例における髄液についてその精査を行なうことを担当(役割分担)した。

#### B. 研究方法

サーベイランスには 343 医療機関が参加しているが、細菌性化膿性髄膜炎が疑われたものの、培養方法によっては原因菌が特定できなかった検体を対象とした。症例の検体の一部を小分けして別のチューブへ移し、-4℃に凍らせた後、依頼用紙、ならびに症例の家族に対するインフォームドコンセントを行なった旨の用紙とともに送付を受けた。

平成 23 年度における精査依頼の検体(髄液)は合計 68 検体であった。

これらについて、到着後直ちに私達によって構築された化膿性髄膜炎の原因細菌検索用 real-time PCR キットとウイルス検索用 real-time PCR キットを実行し、原因微生物の検索を行なった。細菌検索に用いる primer は **Table-1** に示したとおりである。



## (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、あらかじめ連結不可能匿名化を行って、検体、アンケート用紙、インフォームドコンセントを実施した用紙(写し)の3点について回収を行なった。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

期間中、計68検体の送付を受けた。それらに対し定法に従ってDNA/RNAを抽出した。すべてのサンプルについて細菌は8菌種を検索した。すなわち、小児化膿性髄膜炎の原因菌として最も頻度の高い i) インフルエンザ菌, ii) 肺炎球菌, iii) 大腸菌, iv) B 群溶血性レンサ球菌(GBS), v) 髄膜炎菌(*N. meningitis*), vi) リステリア菌(*L. monocytogenes*), vii) 黄色ブドウ球菌(*S. aureus*), viii) マイコプラズマ菌(*M. pneumoniae*)の8菌種である。一方、上記の菌検索で陰性であった場合、ウイルスによる無菌性髄膜炎を疑い、Enterovirus等13種の検索を行なった。

DNA/RNA 抽出から結果判明までの所要時間は2時間弱である。

図-1に示すように、68検体中原因微生物が明らかにできたのは44例であった。その内訳は、インフルエンザ菌が18検体(26.5%)、肺炎球菌が9検体(13.2%)、その他には大腸菌、GBS、リステリア菌、髄膜炎菌、黄色ブドウ球菌が証明できた。その他に、菌が不明であった検体に対し、16S rRNA 遺伝子を増幅させ、直接的に菌種の同定を行い、*Citrobacter koseri* と *Pseudomonas fluorescens* が各1例証明された。

菌が証明されなかった検体に対してはウイルスの網羅的検索を行なったが、Enterovirusが8例、RSV-Bが1例証明できた。

どのような方法を駆使しても原因微生物が証明できなかったのは24例(35.3%)であった。

図-2には解析症例の中から典型的な細菌性化膿性髄膜炎例の4例を示す。GBS(生後3ヶ月)、黄色ブドウ球菌(生後2ヶ月)、髄膜炎菌(7歳)、リステリア菌(5歳)の例である。それぞれにおいて陽性反応を示したのは陽性のシグモイドカーブを描いた菌種のみであり、妥当であると判断された。

## D. 考察

予想以上の検体の送付を受けたが、real-time PCRによる解析結果は菌の培養検査とほぼ同じ割合の菌種となった。すなわち、小児では大多数がHibと推定されるインフルエンザ菌であり、次いで肺炎球菌であった。このほかに新生児に多いGBSや大腸菌、発症年齢が幅広いリステリア菌や髄膜炎菌種が認められたが、これらの菌種を同定するにはPCRが最も効率的であると考えられた。

その他に、ウイルスが証明できた例を13%認めたことは注目すべきことである。

髄膜炎の原因微生物検索においては、細菌のみならずウイルスの検索も必要であることが示された。

## E. 結論

原因菌不明の髄膜炎例に対し、8菌種の網羅的検索とウイルス13種の検索を行ない、65%の例において原因を特定できた。治療薬選択の上でも原因微生物を特定することが有用であると結論された。

## F. 研究発表

論文発表ならびに学会発表は、「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」に記した。

## 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

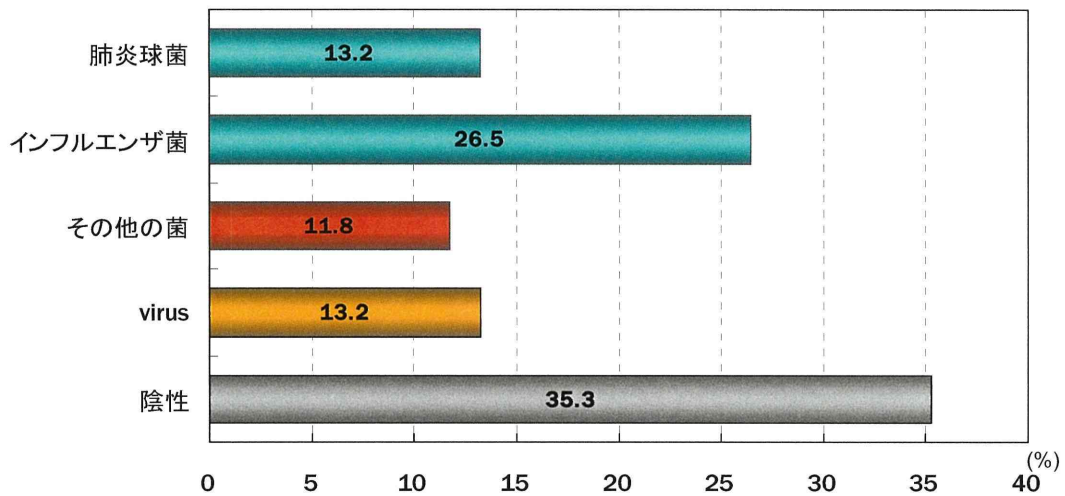
## 3. その他

該当なし

Table 1 primers and probes for real-time PCR

Tube (Paired)	Species, primer, and probe	Primer or probe <sup>a)</sup> sequence	Target gene	Amplicon size (bp)	Reference
A	<i>S. pneumoniae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-CAACCGTACAGAATGAAGCGG-3' 5'-TTATTCGTGCAATACTCGTGGC-3' HEX- <u>CGCGATC</u> AGGTCTCAGCATTCCAACCGCC <u>GATCGCG</u> -BHQ1	<i>lytA</i>	319	23
A	<i>H. influenzae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-TTGACATCCTAAGAAGAGCTC-3' 5'-TCTCCTTTGAGTTCCTCCGACCG-3' FAM- <u>CGCGATC</u> CTGACGACAGCCATGCAGCAC <u>GATCGCG</u> -BHQ1	16S rRNA	167	23
B	<i>E. coli</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-GGGAGTAAAGTTAATACCTTTGC-3' 5'-CTCAAGCTTGCCAGTATCAG-3' HEX- <u>CGCGATC</u> ACTCGTGCAGCAGCCGCG <u>GATCGCG</u> -BHQ1	16S rRNA	204	This study
B	<i>S. agalactiae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-AGGAATACCAGGCGATGAAC-3' 5'-AGGCCCTACGATAAATCGAG-3' FAM- <u>CGCGATC</u> ATTGGCTAGTTATGAAGTCCCTTATGCGAT <u>CGCG</u> -BHQ1	<i>ditS</i>	331	This study
C	<i>N. meningitidis</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-CATATCGGAACGTACCGAGT-3' 5'-GCCGCTGATATTAGCAACAG-3' HEX- <u>CGCGATC</u> TATTGAGCGCCGATATCGAT <u>CGCG</u> -BHQ1	16S rRNA	356	This study
C	<i>L. monocytogenes</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-CGCTTTTGAAGATGGTTTCG-3' 5'-CTTCCAGTTTCCAATGACCC-3' FAM- <u>CGCGATC</u> GCGGCGTTGCTCCGTCAGACTT <u>GATCGCG</u> -BHQ1	16S rRNA	457	This study
D	<i>M. pneumoniae</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-GTAATACTTTAGAGGCGAACG-3' 5'-TACTTCTCAGCATAAGCTACAC-3' HEX- <u>CGCGATC</u> ACCAACTAGCTGATATGGCGCAAT <u>CGCG</u> -BHQ1	16S rRNA	225	23
D	<i>S. aureus</i> Sense primer Reverse primer Probe	5'-TACATGTCGTTAAACCTGGTG-3' 5'-TACAGTTGTACCGATGAATGG-3' FAM- <u>CGCGATC</u> CAAGAACTTGTGTTGATAAGAAGCAACCGAT <u>CGCG</u> -BHQ1	<i>spa</i>	224	This study

a) Stem oligonucleotides are underlined



- 1) その他の菌: *E. coli*, GBS, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *N. meningitidis*, *C. koseri*, *P. fluorescens*
- 2) Virus: Enterovirus (8例), RSV-B (1例)
- 3) 陰性: 細菌性髄膜炎を否定する目的, 抗菌薬が数日投与された例などを含む

図-1 精査を依頼された髄液の real-time PCR 結果 (n=68)

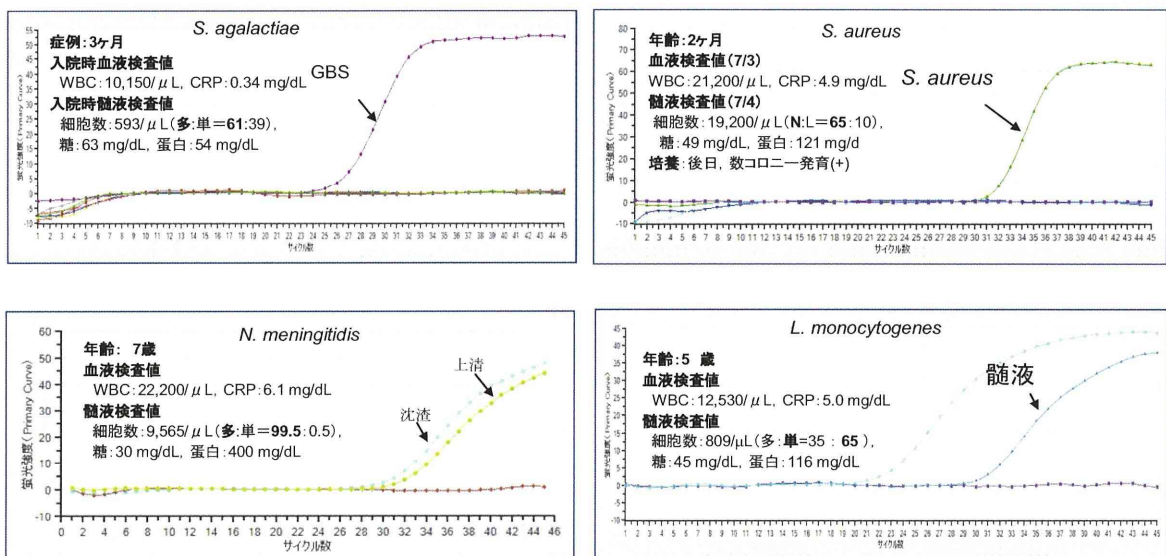


図-2 Real-time PCR による化膿性髄膜炎が疑われる髄液の解析

## 分担研究報告書

### 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

研究分担者 坂田 宏 JA 北海道厚生連旭川厚生病院小児科 主任部長

**研究要旨** 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、経膣分娩が127件で、130名が出生した。経膣分娩の7名の児からGBSが検出された。経膣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、経膣分娩で出生した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2,499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1,000人あたり0.40であった。妊婦のGBSのスクリーニング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1,000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。

#### A. 研究目的

B群溶連菌(GBS)は新生児の敗血症、肺炎、髄膜炎の主要な原因菌である。GBS感染症は生後3日以内に発症する早発型とそれ以降に発症する遅発型があり、早発型の多くは母体産道からの垂直感染による。GBS感染症は発症すると、適切な治療を行っても予後不良となる例が少なくない。そのため、米国のCDCは1996年に新生児のGBS感染症の予防対策のためのガイドライン(以下CDCガイドライン)を公表した。その内容は発熱や遷延する破水などのGBS感染の危険因子がある妊婦の分娩時にペニシリン系抗菌薬を静注で投与することを中心とする対策であった。2002年に、妊婦の膣の培養スクリーニングの成績に基づいて抗菌薬投与の適応を決めるといようにCDCガイドラインの改訂を行った。さらに2010年に、切迫早産時の対応や新生児への対応、抗菌薬の増量などに

ついて改訂が行われた。日本では、日本産婦人科学会と日本産婦人科医会が2008年に「産婦人科診療ガイドライン—産科編2008」を発刊し、CDCが2002年に改訂したガイドラインに準じたガイドライン(以下、日本のガイドライン)を公表した。

しかし、本邦ではGBS感染症防止に関する成績は極めて少ないため、2009年から2011年までの3年間に於ける当院のGBSスクリーニングの成績と新生児GBS感染症の頻度を報告する。

#### B. 研究方法

2009年1月から2011年12月までの3年間に旭川厚生病院で分娩した妊婦と新生児の診療録を後方視的に検討した。

当院におけるGBS感染症防止対策の概要は、日本のガイドラインに従って、妊娠33～37週に膣周辺のスワブを検体として、細菌

培養検査を行い、スクリーニングを実施している。そして、1)スクリーニング陽性者、2)スクリーニング陰性であっても前児がGBS感染症、3)未検査あるいは検査結果不明という3つの条件に該当する妊婦では、分娩時にsulbactam/ampicillin(SBT/ABPC)を1.5g点滴静注し、分娩が遷延するときには担当医の判断で、8~12時間で同量を追加している。ただし、分娩前に複数回のGBSの検査を行っている場合には、直近の成績をもとにして抗菌薬投与を決定している。

GBS保菌者の妊婦から出生した児は、出生時に咽頭、胎脂、便、胃液の細菌培養を行った。呼吸障害、発熱、仮死などの感染徴候を認めた児は血液培養、必要に応じて髄液培養を行った。GBS感染症発症率は出生1,000人あたりの値を算定した。比較のために、母体のGBSスクリーニングをルーチンに行っていなかった1997年から2001年におけるGBS感染症発症率を求めて、比較した。

有意差の検定はStatMate III for Macintosh (アトムス)によりカイ二乗検定を行い、 $p<0.05$ を有意差ありとした。

### C. 研究結果

2009年から2011年の3年間で、当院の分娩数は2,399件、出生した児は2,499名であった。その中で、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。スクリーニングをうけてなくて、分娩直前に検査してGBSが陽性であった例は認めなかった。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。帝王切開で出生した児の中でGBSを検出した例は満期産ではなかったが、在胎26週の1例が認められた。この妊婦は在胎23週の検査でGBSが検出されており、術前からSBT/ABPCを投与された。経膈分娩では正期産の7名の児からGBSが検出された。新生児のGBS陽性率は、33~37週で検査して

GBS陽性であった妊婦の全分娩件数の4.14%、経膈分娩に限ると5.5%であった。

GBSが陽性であった8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。抗菌薬治療を開始し、後遺症なく治癒した。他の7名は、感染徴候を認めず、健常新生児と同様の経過観察を行い、在胎26週の児を除いて5日目に母親とともに退院した。これらの児は全員生後3か月まで追跡したが、GBS感染症の発症を認めなかった。3年間に当院で出生した2,499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1,000人あたり0.40であった。

1997年から2001年の分娩は2097件あり、2,166名が出生した。その中で、1名が早発型GBS感染症を発症していて、早発型GBS感染症発症率は出生1,000人あたり0.46であった。

### D. 考察

1990年代前半の米国の早発型GBS感染症発症率は出生1,000人あたり1.5~1.8であったが、2000年に発症率は出生1,000人あたり約0.5まで低下し、2002年以降は0.34~0.37とほぼ一定している。日本における早発型GBS感染症の発症率に関する報告は極めて少ない。松原らは2000~2004年における主に近畿・中国地方の新生児医療を行っている施設にアンケートを行い、28施設から回答された分娩数、GBS感染症患者数の情報により、出生1,000人あたりの早発型GBS感染症発症率は0.10と算定し、米国に比較して低率であることを報告した。著者の成績は、特に予防対策をとっていなかった時期の発症率は出生1,000人あたり0.46、予防策を実施した最近3年間の発症率は0.40と変動はほとんど認められず、いずれも米国の成績<sup>3)</sup>とほぼ同様であり、松原らの成績より高かった。松原らの



成績は同じ日本でも対象地域は異なること、アンケート調査による多施設、著者らの成績は一施設に限られたものであることから、単純な比較は困難である。

GBS感染症を予防するためのCDCガイドラインの重要な柱の一つはスクリーニングである。全妊婦において妊娠35から37週に膣肛門周囲の培養でGBSスクリーニングを行い、陽性者をひろいあげることである。もう一つはスクリーニングの成績に基づく分娩時の予防的抗菌薬投与である。

GBSは本来膣や直腸の常在菌と考えられているが、一定に存在するのではなく、出現と消失を繰り返すとされる。したがって、スクリーニング時には陰性であったが、分娩時には陽性になっていることがしばしば起こりうる。Linらは在胎32週以上の妊婦5,497名におけるGBS保菌者の動向を検討している。その成績では、妊娠期間中にGBSが陽性になった1,172名のうち分娩直前でも陽性であったのは592名で、ほぼ半数であった。反対に、GBSが陰性であった3524名のうち分娩直前では291名が陽性になっており、このように検査時期によって成績は大きく異なった。培養で陰性であったにもかかわらず、分娩直前で陽性になる妊婦をいかにしてとらえるかがスクリーニングの重要な課題である。したがって、日本のガイドラインでは、スクリーニングの時期が33～37週とCDCガイドラインより早期に開始される。しかし、菌の存在が一定ではないので、早期に行われた場合には2回目の検査を適宜行う必要があると思われる。

また、このような変化が菌の生理的な変動なのか、検体の採取する部位や方法、検体培養方法の感度によるものなのか明らかではない。GBSは常に存在しているが、検査方法の問題で陰性に判定される可能性である。最近、いろいろな検査に応用されているPCRは培養より感度が高く、迅速性に優れ

ていることが確認されている。しかし、検査費用が高額になること、専用の機材が必要なことから日本では広く普及するに至っていないが、PCRの成績によって抗菌薬投与を決定できれば、投与すべき例をより適切に把握することができ、不要な投与も避けられるので、今後期待される。

CDCガイドラインにおける早発型GBS感染症予防のもう一つのポイントは妊婦が分娩する時に予防的に静注抗菌薬を投与することである。CDCではスクリーニング陽性者やGBS感染の危険因子を有する妊婦に対して分娩時にpenicillin G(PCG)またはABPCを投与することを推奨している。日本のガイドラインではCDCガイドラインに準拠するとしているが、PCGに静注用製剤がないことからABPCを第一選択としている。投与量はCDCが初回2g、以後4時間ごとに1gを反復するとしているが、日本のガイドラインでは本邦での医療事情を鑑みて投与量を決めるというあいまいな表現になっている。

Linらは、母親から新生児へのGBS移行率は16.1%としている。分娩中に抗菌薬投与されていない母体からの新生児の38.2%、投与された母体からの児の6.3%と有意差を認めた。詳細をみると、経膣分娩で分娩時のGBS陽性母親507名中34名が分娩中に抗菌薬を投与したにもかかわらず児は陽性であった。分娩中に抗菌薬を投与しなかった217名中121名が陽性となった。実際に敗血症になったのは2名でGBS感染症発症率は出生1,000人あたり0.36であった。1例は35週で陰性であったため分娩時の抗菌薬投与を行わなかったが、分娩直前の培養で陽性であった。もう1例では母親は培養を確認できておらず、分娩中の抗菌薬投与が行われなかった。

抗菌薬を投与してから出生までの必要な時間をCDCガイドラインでは4時間以上としている。Lijoiらの成績では分娩時の抗菌薬投与から4時間以上経過して出生した児では