

図 2 好中球に対する mucoid 株の殺傷能

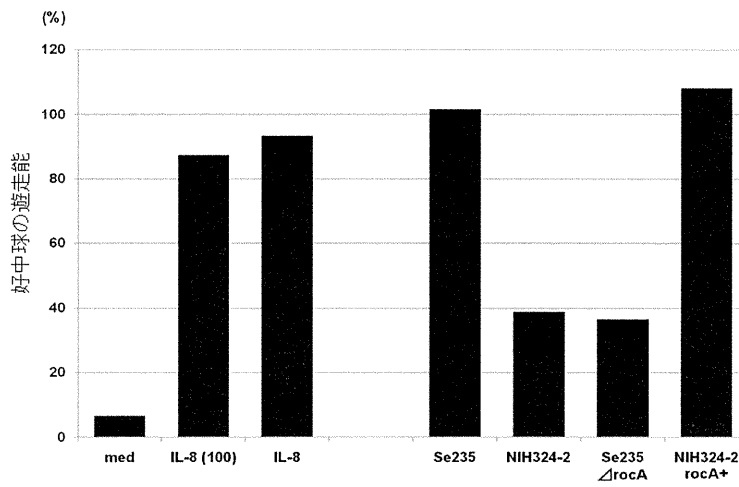


図 3 *rocA* 変異株における好中球の遊走能阻害

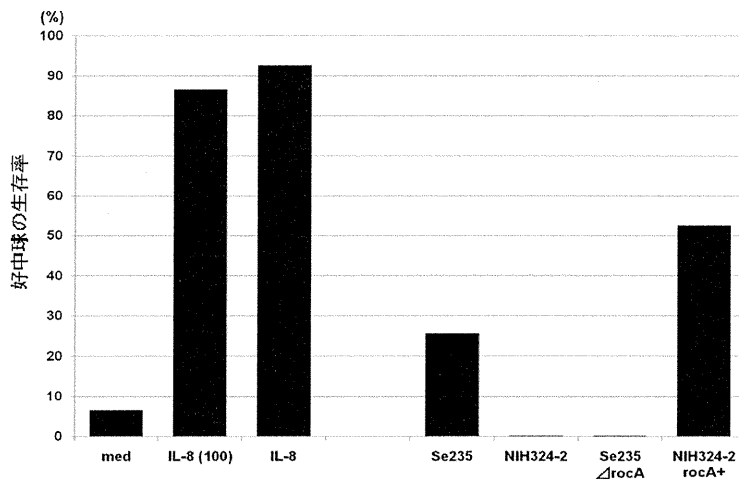


図 4 好中球に対する *rocA* 変異株の殺傷能

分担研究報告書

SDSE レンサ球菌劇症型感染モデルと分子基盤の構築

研究分担者 秋山 徹 (独)国立国際医療研究センター研究所

感染症制御研究部感染症免疫遺伝研究室 室長

研究要旨 新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と、診断・治療に関する研究を行うため、起因菌である *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う。同菌感染症の疫学調査結果から、発症者には悪性新生物や糖尿病などの基礎疾患が高頻度に存在することが明らかとなっている。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 感染糖尿病マウスモデルにて、SDSE 感染前に同抗体を事前投与したところ、SDSE のマウス病原性が著明に抑制された。これらの結果は、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る。

A. 研究目的

劇症型レンサ球菌感染症 (STSS) は致死率が50%にも及ぶ感染症であり、最近の調査ではA群レンサ球菌 (GAS) 以外にG群レンサ球菌およびC群レンサ球菌、特に *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) による症例が増加している。SDSE の劇症型感染症は GAS 劇症型感染症とは異なり、高齢者および糖尿病などの基礎疾患保有患者で著明に高頻度であり、今後の日本社会状況を考える場合、その対策は重要である。しかしながら GAS の場合と異なり SDSE の研究は進んでいない。筆者等はすでに GAS をマウスに腹腔投与するモデルが、GAS による STSS 症例の疫学データと一致するという結果を報告している。本研究では昨年度までに STSS 症例および動物由来の SDSE 分離株 16 株の病原性

をマウスモデルで比較し、SDSE 研究のための菌株選定を行い、さらに1型および2型糖尿病のマウスでは、非糖尿病マウスと比較してSDSE感染への感受性が有意に増加していることを明らかにした。また全ゲノム情報が利用可能でなかったSDSE GGS_124株の全ゲノム配列を世界に先駆けて明らかにした。さらに、日本人に頻発する2型糖尿病のマウスモデルを用いて、選定されたSDSE株を感染させた場合のマウス遺伝子の発現変化の網羅解析を実施することで、宿主側のSDSE感染劇症化に影響する因子の探索を試み、糖尿病マウスに特異的で、且つSDSE感染に特異的な炎症反応が発生することを明らかにした。同現象は血清中サイトカインの網羅的解析でも確認でき、糖尿病マウスでSDSE感染時に産生が高進しているサイトカ

インのうち特に産生量が高かったものの一つはIL-6であった。IL-6は代表的な炎症性サイトカインであり、また関節リウマチなどの疾患に関与している。以上の知見を鑑み、本年度は、SDSE感染糖尿病マウスモデルにおいて、IL-6の効果を抑制することで、SDSEのマウス病原性を抑制できるかどうかを検討した。

B. 研究方法

1. 共試菌株

SDSE菌株は東京女子医科大学微生物学免疫学教室および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より分与を受けた。増菌は、凍結保存されているレンサ球菌をブレイン・ハートインフュージョン培地に植菌し、CO₂インキュベーター内で37°C、5%で一晩培養することで行った。マウス感染実験時の対照菌株として *Staphylococcus aureus* N315株と *Streptococcus pyogenes* 476株を使用した。

2. SDSE のマウス感染実験

菌を一晩培養後、3100 rpm, 10 min遠心、培地を除き1×PBS(-)5mLに懸濁した後、ボルテックス処理を30秒間行った。ボルテックス後の菌液を1×PBS(-)で0.5mL投与時にLD50の5倍となるように希釈し、マウスに腹腔内投与した。2型糖尿病モデルとして糖尿病自然発症型マウスであるdb/dbマウスを使用し、対照として糖尿病非発症型であるdb/m+マウスを使用した。

3. 抗 IL-6 受容体抗体の調製

マウスcDNAより抗IL-6受容体遺伝子を発現ベクター内にクローニングし、大腸菌でHis-Tag蛋白質として発現させて、タグを利用したアフィニティー精製により精製した。得られた精製蛋白質をウサギに免疫し、得られた血清から抗体をプロテインGアフィ

ニティー精製により精製した。

4. SDSE感染糖尿病マウスでの抗IL-6受容体抗体の効果の評価

精製抗IL-6受容体抗体または対照抗体を直前に投与したマウスに、SDSEを投与し、両者の効果を比較した。

(倫理面への配慮)

動物実験については(独)国立国際医療研究センター研究所動物実験委員会にて計画の審査・承認を受けて実施した。本計画で使用した菌株は感染症法の対象となる病原体ではないが、所内バイオセーフティ委員会による使用の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

昨年度までの研究結果から、2型糖尿病マウスであるdb/dbマウスとその対照非糖尿病マウスであるdb/m+マウスとの比較では、SDSEを投与した糖尿病マウス血清中には、非糖尿病マウスまたは黄色ブドウ球菌投与糖尿病マウスと比較して、炎症性サイトカインのうち、G-CSF、IFN- γ 、IL-13、IL-1 α 、IL-6、CXCL10、CXCL1、MCP-1、RANTES、MDCおよびTIMP-1が高レベルであることが明らかとなっている。そこで、これらの中から、特に産生レベルの高かったIL-6に着目し、その効果を抑制した場合のSDSEのマウス病原性への影響を検討した。組換え蛋白質の免疫で調製した抗IL-6受容体抗体を投与したマウスでは、SDSEの病原性が低下した(図参照)。この効果はSDSE感受性が上昇している糖尿病マウスに加えて、野生型マウスでも認められた。この結果は、SDSEの病原性の基盤は炎症性サイトカインの過剰産生によるものであり、その効果が糖尿病マウスで増幅されていることを示唆するものだった。一方、SDSEではなく、GASを投与したマウスでは抗IL-6受容体抗体投与ではGAS病

原性を抑制できなかった。

D. 考察

これまでに実施した2型糖尿病マウスモデルへのSDSE投与時の宿主遺伝子発現の網羅解析の結果、および本年度実施した2型糖尿病マウスモデルを用いたSDSEの感染時の宿主側因子の網羅的液性因子産生測定に黄色ブドウ球菌の投与実験の結果から、SDSE感染時に特異的に発生する宿主側応答の様相が明らかとなった。即ち糖尿病マウスでは、非糖尿病マウスと比較して、SDSE投与により非常に強い炎症反応が発生し、正常な免疫応答がほとんど起きないことが示された。さらに、SDSE感染糖尿病マウスでは炎症性サイトカインとして知られるTNF α がほとんど産生されず、IL-6が大量に産生されるという、特徴的な炎症性サイトカイン産生パターンを示すことを明らかにしている。本年度の研究で、抗IL-6受容体抗体を用いた実験から、大量に産生されているIL-6がマウスにおけるSDSEの病原性に大きな役割を果たしていることが強く示唆された。一方、GASにおいては、IL-6の産生量は相対的に少なく、そのマウス病原性への寄与も限定的であり、SDSEとGASは共有する病原因子が多数存在するにもかかわらず、病原性機構の根幹には明白な違いがあることが示唆された。抗ヒトIL-6R抗体はトシリズマブとして関節リウマチなどへの適用がある承認済みの薬剤であることを考えると、SDSEによる劇症型感染症にはトシリズマブの奏功する可能性があると考えられる。そのためにはSDSE感染症とGAS感染症の鑑別診断法の開

発が必要と思われる。

今回、IL-6がSDSEの病原性に重要な役割を果たすことが示唆されたことから、現在パルスウェイ解析等により、増悪機構の分子基盤を検討中である。

E. 結論

SDSEの糖尿病マウスへの投与モデルを利用した宿主側液性因子の産生の網羅的解析で、SDSEによる劇症型感染症の重症化の機構に、糖尿病背景での炎症反応、特にIL-6の産生の増加がSDSE感染症の増悪に関与することが強く示唆された。

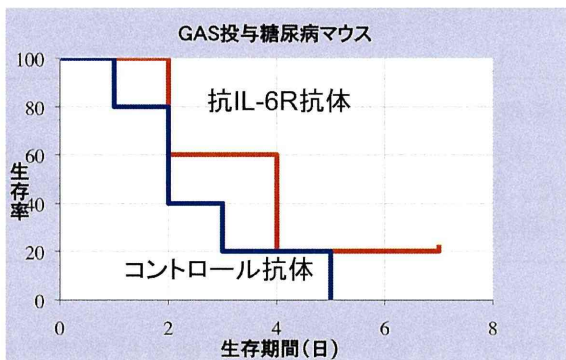
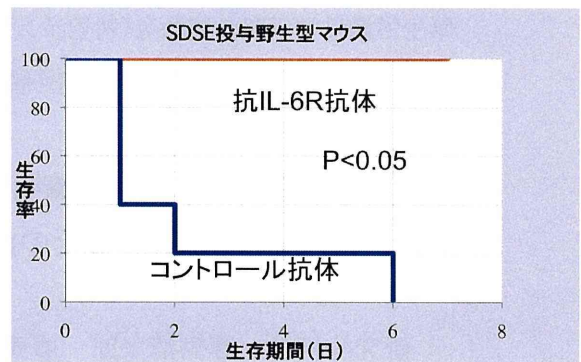
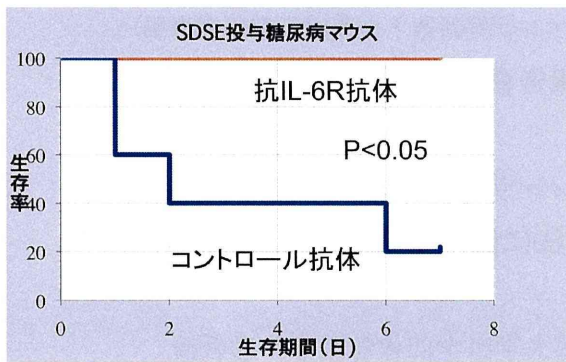
F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) K. Okumura, R. Arai, M. Okura, T. Kirikae, D. Takamatsu, M. Osaki, **T. Miyoshi-Akiyama**. Complete Genome Sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. 111th General Meeting of American Society for Microbiology (New Orleans, Louisiana, USA), 2011.5.21-24
- 2) K. Okumura, R. Arai, M. Okura, T. Kirikae, D. Takamatsu, M. Osaki, **T. Miyoshi-Akiyama**. Complete Genome Sequence of European foulbrood pathogen *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (Sapporo, Japan), 2011.9.6-11

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



抗ヒト IL-6R 抗体はトシリズマブとして関節リウマチなどへの適用がある承認済みの薬剤である。

SDSE 感染マウスの抗 IL-6R 抗体の治療効果

分担研究報告書

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

研究分担者 藤島清太郎 慶應義塾大学医学部救急医学 准教授

研究協力者 一二三 亨 国立病院機構災害医療センター 医師

研究要旨 重症肺炎球菌・レンサ球菌感染症の病態解析と治療法開発を目的に、本年度は 1) 日本救急医学会 UMIN 敗血症登録システムを用いて重症敗血症例集積と実態解析を行い、救急専門施設における死亡率が 30%と低いことが判った。2) 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い、死亡例で特に凝固異常の合併が多い傾向を認めた。

A. 研究目的

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研究の目的とした。

B. 研究方法

- (1) 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。
- (2) 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。両研究とも、倫理委員会申請済みである。

C. 研究結果

- (1) 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。
- (2) 2006年1月～2010年12月に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。また前向き研究も開始している。

D. 考察

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、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。

E. 結論

重症敗血症の中でも、肺炎球菌感染症の死亡率は未だ高く、その予防、早期診断および治療法の早急な確立が必要と思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamata H, **Fujishima S**, et al. Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice. *Exp Biol Med* Maywood. 2011; 236(3): 315-24.
- 2) Hayashida K, **Fujishima S**, et al. Early administration of sivelestat, the neutrophil elastase inhibitor, in adults for acute lung injury following gastric aspiration. *Shock*. 2011; 36(3): 223-7.
- 3) **Fujishima S**. Epithelial cell restoration and regeneration in inflammatory lung diseases. *Inflammation and Regeneration*. 2011; 31(3): 290-5.

4) 藤島清太郎. Sepsis 診断におけるプロカルシトニンの意義. 化学療法の領域. 2011; 27(1): 134-141.

2. 学会発表

1) 藤島清太郎, 他. 日本救急医学会 Sepsis Registry Basic 版によるデータ収集と診療の質の評価. 第 39 回日本救急医学会総会シ

ンポジウム(東京), 2011.10.20

2) 一二三亭, 藤島清太郎, 他. 侵襲性肺炎球菌感染症の臨床病態に関する後ろ向き検討. 第 39 回日本救急医学会総会(東京), 2011.10.19

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

ホームページ作成報告書

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

本研究事業では、啓発活動を目的として、初年度(H22年(2010年)9月末日)に Web サイトを構築、公開した。

H23年11月、研究解析データの大幅な更新を行なった(別紙1)。アクセス用アドレスは <http://strep.umin.jp/> である。Web サイトの掲載内容は、附とした書籍のとおりである。

また、H23年には、初夏からマクロライド系薬高度耐性のマイコプラズマ・ニューモニエ感染症が学童を中心に大流行した。本菌の分子疫学研究を実施している施設は当研究室以外にはない。このためマイコプラズマ菌に関する最新の分子疫学情報も書籍に[附]として掲載し、情報提供した。

本 Web サイトへのアクセス数は2012年3月現在、別紙2の通りである。

訪問者数：18,902名

閲覧状況：別紙3に見られるように、googleあるいはyahooからのアクセスも多く、医療関係者のみならず、一般の方も非常に多くアクセスしている。

医療関係者でのアクセスが多かったのは、参照元サイトからの訪問回数で判るが、i)日本感染症学会のHP(kansensho.or.jp)、ii)日本臨床微生物学会のHP(jscm.org)、iii)国立感染症研究所のHP(nih.go.jp)からが突出して多かった。

Webサイトを更新した2011年11月、マイコプラズマの流行と重なり、閲覧者が大幅に増加した。一般の方の閲覧が最も多かったのは、小児用7価結合型肺炎球菌ワクチン(PCV7)とマイコプラズマ感染症であった。

それに比し、医療関係はβ溶血性レンサ球菌も含めて閲覧していることが明らかにされた。

(別紙1)

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

HOME

総論

収集菌株と協力医療機関

肺炎球菌

β溶血性レンサ球菌

参加施設・分掘者・参考文献

附：マイコプラズマ

このホームページに関するお問合せ

〒108-8641
東京都港区白金5-9-1
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
FAX: 03-5791-6386
e-mail: shinko13@lisci.kitasato-u.ac.jp
u.ac.jp

ご挨拶

21世紀の到来とともに、再び肺炎球菌やβ溶血性レンサ球菌といった細菌による重症型の優位性感染症が増加しています。この背景には、急速に変貌しつつある我が国特有の社会的背景が存在しています。すなわち、急速な少子・高齢化社会の到来と、生活習慣病等の基礎疾患を有する方達の著しい増加です。平成23年9月の総務省統計局の報告によれば、総人口（1億2770万人）に占める65歳以上の割合は23.2%に達しています。

私達の研究事業「研究課題：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」は、このような市中型細菌感染症の社会的重要性に着目し、基礎系研究者と臨床系研究者とが連携して、原因菌の中でも症例数の最も多い肺炎球菌とβ溶血性レンサ球菌とに焦点を当てています。

主たる研究目標は、我が国における i) 発症例の背景因子の解析, ii) 分離菌の分子疫学解析, iii) 迅速診断法の確立, iv) 最適な治療法の確立、そして v) 菌の病原性について明らかにすることです。また、医療関係者あるいは一般の方々への啓発活動も事業目標のひとつに加えられています。

この度、平成22年度に実施された大規模疫学研究の成績を踏まえ、Webサイトを大幅に更新致しました。

このWebサイトが小児科・内科系診療科のみならず、救命救急や整形外科領域の先生方、あるいは薬剤師や臨床検査技師を含むコメディカルの方々にもお役に立てば幸いです。

今後、皆様方のご意見をもとに、より一層充実したものへとバージョンアップして行きたいと考えております。

平成23年10月

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）」

- 研究代表 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 特任教授)

このWebサイトに関するご意見・お問合せ先

〒108-8641 東京都港区白金5-9-1
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
FAX: 03-5791-6386 e-mail: Shinko13@lisci.kitasato-u.ac.jp

お知らせ

(別紙2)

ユーザー サマリー

アドバンス セグメント メール ページ エクスポート マイレポートに追加

訪問数全体の 100.00%

サマリー

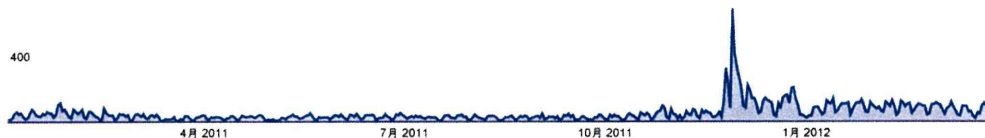
訪問数 対 指標を選択

時間別 日 週 月

● 訪問数

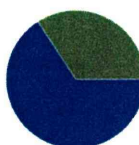
800

400



このサイトのユーザー数 14,543

- 21,390 訪問数
- 14,543 ユーザー数
- 54,126 ページビュー数
- 2.53 訪問別ページビュー
- 00:02:21 訪問の平均滞在時間
- 65.33% 直帰率
- 65.71% 新規訪問の割合



■ 65.82% New Visitor
14,079 訪問数

■ 34.18% Returning Visitor
7,311 訪問数

ユーザー層	言語	訪問数	訪問数 (%)
言語	1. ja	18,405	86.04%
国/地域	2. ja-jp	2,048	9.57%
市区町村	3. en	485	2.27%
システム	4. en-us	191	0.89%
ブラウザ	5. ja-jp-mac	154	0.72%
オペレーティング システム	6. zh-tw	16	0.07%
サービス プロバイダ	7. zh-cn	10	0.05%
モバイル	8. pt-br	9	0.04%
オペレーティング システム	9. de	8	0.04%
サービス プロバイダ	10. es_ES	6	0.03%

画面の解像度

レポート全体を見る

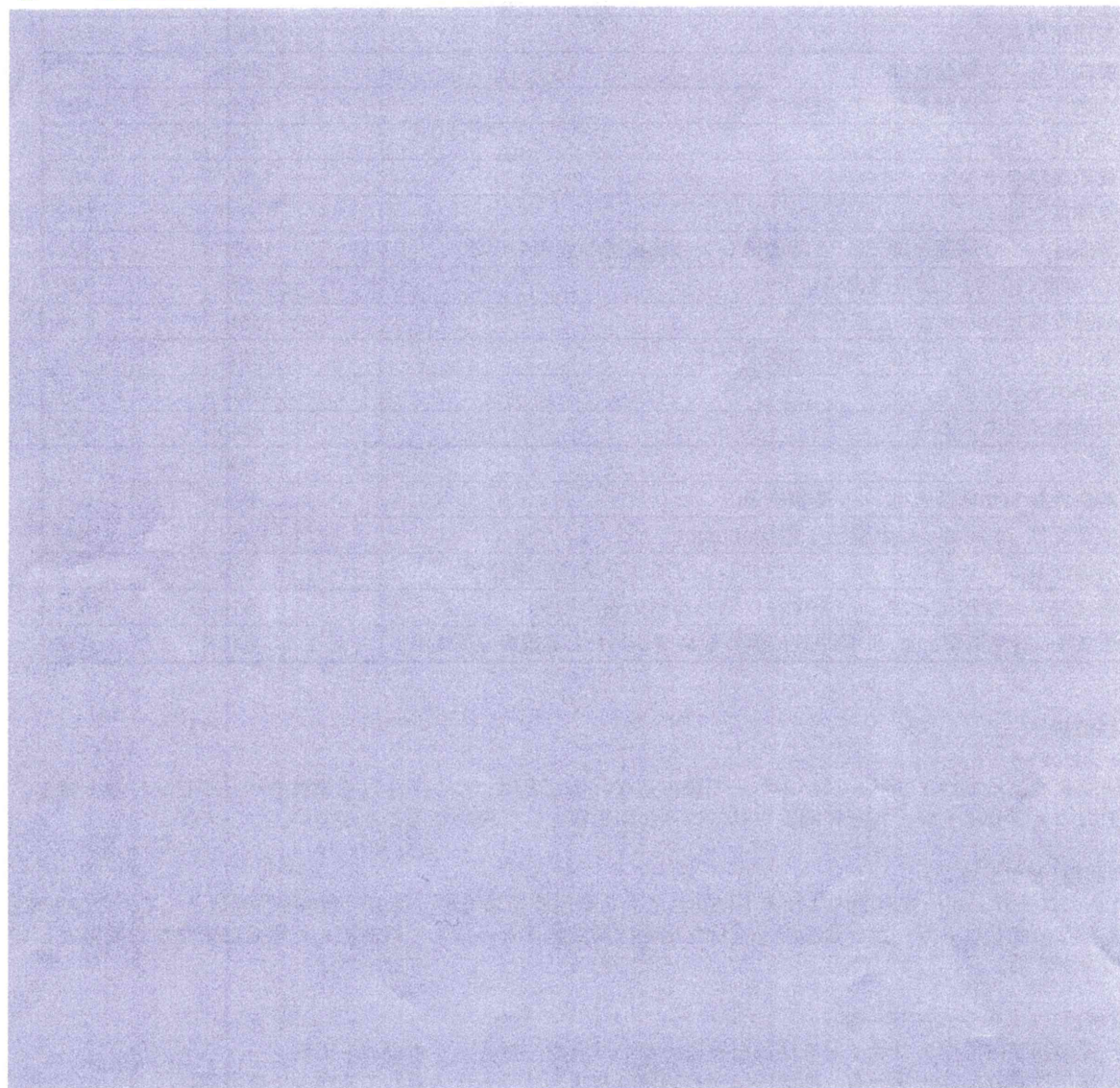
このレポートは 12/03/26 11:34 に作成されました - レポートを要

訪問数 21,390 <small>全体に対する割合 100.00% (21,390)</small>	訪問別ページビュー 2.53 <small>サイトの平均 2.53 (0.00%)</small>	訪問の平均滞在時間 00:02:21 <small>サイトの平均 00:02:21 (0.00%)</small>	新規訪問の割合 65.71% <small>サイトの平均 65.71% (0.00%)</small>	直帰率 65.33% <small>サイトの平均 65.33% (0.00%)</small>
--	--	--	--	--

プライマリ ディメンション: [参照元メディア](#) [参照元](#) [メディア](#) [その他](#)

行を表示 セカンダリ ディメンション 並び替えの種類: デフォルト

参照元メディア	訪問数	訪問別ページビュー	訪問の平均滞在時間	新規訪問の割合	直帰率
1. google / organic	7,068	2.41	00:02:14	64.09%	69.62%
2. yahoo / organic	5,184	2.21	00:01:50	74.65%	73.19%
3. (direct) / (none)	4,418	2.65	00:02:42	59.30%	57.40%
4. kansensho.or.jp / referral	917	4.23	00:04:18	62.16%	41.55%
5. jscm.org / referral	802	4.23	00:03:23	49.13%	42.64%
6. nih.go.jp / referral	511	2.05	00:02:59	68.88%	69.08%
7. bing / organic	397	1.95	00:01:41	82.12%	71.54%
8. kitasato-u.ac.jp / referral	221	3.02	00:01:57	79.64%	52.94%
9. search / organic	183	1.75	00:00:57	78.14%	79.23%
10. 192.168.1.3 / referral	123	2.28	00:01:33	78.86%	47.15%



Web サイト : strep.umin.jp サイト アクセス状況レポート

期間 : 2011.0101 ~ 2012.03.26 (延べ 451 日)

主要な指標	
ページビュー数	54,247
訪問者数(ユニークユーザ数)	18,902
訪問回数(セッション)	2,582
ページビュー/訪問者数=1人が見たページ数	2.87
日別訪問者数	42

閲覧ページ		
閲覧ページ	ページビュー数	訪問者数
附 : マイコプラズマ : 小児におけるマクロライド系薬耐性 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> の大流行	7,418	5,418
トップページ	6,679	4,122
肺炎球菌ワクチン :	2,560	1,893
β 溶血性レンサ球菌とは :	1,953	1,374
β 溶血性レンサ球菌とは ; 7. 細菌検査 :	1,645	1,166
薬剤耐性メカニズム :	1,639	1,184
肺炎球菌ワクチン :	1,607	1,187
肺炎球菌とは :	1,598	1,062
β 溶血性レンサ球菌とは ; 2. β 溶血性レンサ球菌感染症例の疫学 :	1,320	828
2010 年度 (10 月) ・肺炎球菌疫学情報 :	1,263	733
薬剤感受性 (phenotype) と遺伝子型 :	1,245	845
β 溶血性レンサ球菌とは ; 6. 抗菌薬感受性 :	1,203	840
発症例の背景解析 :	1,113	751
薬剤耐性メカニズム :	945	723
検査 :	888	591
β 溶血性レンサ球菌とは ; 3. 症例提示 :	870	601
薬剤感受性 (phenotype) と遺伝子型 (genotype) :	853	646
β 溶血性レンサ球菌とは ; 2. β 溶血性レンサ球菌感染症例の疫学 :	820	572
β 溶血性レンサ球菌とは ; 4. 病原性に関わる菌の表層物質 :	815	501
β 溶血性レンサ球菌とは ; 5. 病原性に関わる M タンパクと莢膜の分子疫学 :	810	512

【用語解説】

ページビュー

訪問者によってウェブページが 1 ページ読み込まれるごとにカウントされる単位をページビュー数と呼ぶ。そのウェブサイトがどれだけ閲覧されているかの指標として使われることが多い。

訪問回数(セッション)

1 人のユーザーが一定時間内にサイトに訪れてから離脱するまでの一連の行動を 1 訪問数としてカウントする。ただし、同じユーザーが一定間隔を空けた場合は訪問終了とみなし、再訪問した場合は新たな訪問数としてカウントする。

訪問者数(ユニークユーザー数)

一定の期間内にウェブサイトを訪れた重複のないユーザー数を示すカウント方法。一度だけ訪れたユーザーも、期間内に複数回訪れたユーザーも 1 人としてカウントされる。

上位リンク先ページ(閲覧開始ページ)

閲覧開始ページ			
順位	閲覧開始ページ名	閲覧開始数	直帰率 (%)
1	トップページ	6,313	43.0%
2	附：マイコプラズマ：小児におけるマクロライド系薬耐性 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> の大流行	3,992	79.2%
3	肺炎球菌ワクチン：	2,213	76.5%
4	β 溶血性レンサ球菌とは：	1,553	71.2%
5	薬剤耐性メカニズム：	1,166	77.1%
6	β 溶血性レンサ球菌とは；7. 抗菌薬感受性：	1,037	72.5%
7	薬剤感受性 (phenotype) と遺伝子型 (genotype)：	742	78.0%
8	β 溶血性レンサ球菌とは；2. β 溶血性レンサ球菌感染症例の疫学：	497	78.9%
9	β 溶血性レンサ球菌とは；6. 米国株との比較	488	73.2%
10	肺炎球菌とは：	461	70.1%
11	β 溶血性レンサ球菌とは；3. 劇症型レンサ球菌感染症例	437	70.0%
12	発症例の背景解析：	324	79.9%
13	検査：	274	69.3%
14	β 溶血性レンサ球菌とは；5. M タンパクと莢膜の分子疫学：	238	67.2%
15	参加施設一覧	225	87.6%
16	β 溶血性レンサ球菌とは；4. 病原性に関わる菌の表層物質：	222	59.0%
17	β 溶血性レンサ球菌とは；8. 細菌検査：	210	77.1%
18	2010 年度 (10 月) ・肺炎球菌疫学情報：	195	42.6%
19	本研究事業で対象とする細菌に関連する参考文献	192	60.9%
20	分担者	169	53.8%

検索キーワード TOP20		
順位	キーワード	検索数
1	肺炎球菌ワクチン	214
2	生方公子 厚生労働省 肺炎球菌	180
3	厚労省 肺炎球菌	169
4	厚生労働省 生方公子 肺炎球菌	109
5	sdse	108
6	感染症学会 ppv23 再接種	87
7	肺炎球菌ワクチン サーベイランス	87
8	レンサ球菌	84
9	肺炎球菌	79
10	http://strep.umin.jp/	77
11	マイコプラズマ 薬	76
12	ニューモバックス	74
13	(not provided)	73
14	薬剤耐性 メカニズム	66
15	β 溶血性レンサ球菌	65
16	β 溶血性連鎖球菌	64
17	薬剤耐性メカニズム	56
18	肺炎球菌とは	48
19	マイコプラズマ	43
20	肺炎球菌 補助金	43
21	肺炎球菌ワクチン 補助金	42
22	β 溶血	39

参照元サイトからのセッション数 (訪問回数)			
順位	参照元	セッション	セッションあたりの閲覧ページ数
1	kansensho.or.jp	919	4.2
2	jscm.org	804	4.2
3	nih.go.jp	511	2.1
4	kitasato-u.ac.jp	224	3.0
5	192.168.1.3	123	2.3
6	192.168.1.10	94	2.0
7	google.co.jp	70	1.9
8	ja.wikipedia.org	69	1.8
9	detail.chiebukuro.yahoo.co.jp	64	3.0
10	search.goo.ne.jp	64	3.2
11	chemotherapy.or.jp	63	3.7
12	hcsquare.blog.so-net.ne.jp	51	2.9
13	websearch.rakuten.co.jp	40	1.7
14	jp.mg5.mail.yahoo.co.jp	37	2.0
15	jp.mc1003.mail.yahoo.co.jp	31	1.7

研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
高橋 孝	溶血性レンサ球菌感染症(含む TSL)	感染症事典 編集委員会	感染症事典	オーム社	東京	2012	204-209

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Rakov AV, Ubukata K. , Ashley Robinson D.	Population structure of hyperinvasive serotype 12F, clonal complex 218 <i>Streptococcus pneumoniae</i> revealed by multilocus boxB sequence typing.	Infect Genet. Evol.	11	1929-1939	2011
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 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS).	BMC Genomics	12	17	2011
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.	Microb Drug Resist.			2011
Ubukata K. , Sunaoshi K, Kobayashi R, Okuzumi K.	Large scale questionnaire surveillance concerning invasive infections group C and G <i>Streptococci</i> .	Kansenshogaku Zasshi	84 (5 Suppl 1)	7-14	2010
<u>生方公子</u>	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炭膜型の関係 -	小児科臨床	64	2459-2466	2012
<u>生方公子</u>	侵襲性・重症レンサ球菌感染症	化学療法の領域	28	66-73	2012
千葉菜穂子, <u>生方公子</u>	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)	59	561-572	2011
千葉菜穂子, <u>生方公子</u>	耐性肺炎球菌感染症	呼吸器内科	20	480-485	2011
<u>生方公子</u>	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	23	257-263	2011
Sakata H.	Invasive <i>Streptococcus pneumoniae</i> infections in children in Kamikawa and Soya subprefecture, Hokkaido, Japan, 2000-2010, before the introduction of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine.	J Infect Chemother.	17	799-802	2011
坂田 宏, 砂川慶介, 野々山勝人, 佐藤吉壮, 春田恒和, 尾内一信, 山口 覚	成人の細菌性髄膜炎における抗菌薬治療と予後.	日本化学療法学会雑誌	59	158-162	2011
坂田 宏, 砂川慶介, 野々山勝人, 佐藤吉壮, 春田恒和, 尾内一信, 山口 覚	小児の細菌性髄膜炎における抗菌薬治療と予後.	日本感染症学会雑誌	85	150-154	2011
坂田 宏, 砂川慶介, 野々山勝人, 佐藤吉壮, 春田恒和, 尾内一信, 山口 覚	小児の細菌性髄膜炎における初期症状と検査所見.	日本小児救急医学会雑誌	10	47-53	2011
Matsumura T, Ato M, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K.	Interferon- γ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A <i>Streptococcus</i> infections.	Nature Communications	3	678	2012
Yoshida H, Ubukata K, Takahashi T, et al.	A CD46 transgenic mouse model for studying the histopathology of arthritis caused by subcutaneous infection with <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i> (SDSE).	J Med Microbiol.	60 (Pt 12)	1860-1868	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakai F, Ubukata K , Takahashi T , et al.	Molecular epidemiologic characteristics of <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009.	J Infect Chemother.	17(3)	334-340	2011
Matsui H, Ubukata K , Takahashi T , et al.	Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with <i>Streptococcus pyogenes</i> in mice.	J Med Microbiol.	60(Pt 1)	128-134	2011
Takahashi T , Ubukata K , et al.	Invasive infection caused by <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> : characteristics of strains and clinical features.	J Infect Chemother.	17(1)	1-10	2011
Takei T, Ubukata K, Takahashi T , et al.	Late onset invasive group B streptococcal infection with serotype VIII in a neonate having congenital biliary atresia.	Pediatr Neonatol.	54(1)	(in press)	2013
高橋 孝, 生方公子	B群溶血性レンサ球菌. 多剤耐性菌の現状と対策.	日本臨牀	70(2)	226-230	2012
Piao Z, Oma K, Ezoe H, Akeda Y, Tomono K, Oishi K	Comparative effects of toll-like receptor agonists on a low dose PspA intranasal vaccine against fatal pneumococcal pneumonia in mice.	J Vaccines Vaccin.	2	1	2011
Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K, Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y, Gottschalk M, Sawanpanyalert P, Oishi K .	Genotypic profile of <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand.	Emerg Infect Dis.	17	835-842	2011
Kamata H, Fujishima S , et al.	Carbon black nanoparticles enhance bleomycin-induced lung inflammatory and fibrotic changes in mice.	Exp Biol Med Maywood	236(3)	315-324	2011
Hayashida K, Fujishima S , et al.	Early administration of sivelestat, the neutrophil elastase inhibitor, in adults for acute lung injury following gastric aspiration.	Shock	36(3)	223-227	2011
Fujishima S .	Epithelial cell restoration and regeneration in inflammatory lung diseases.	Inflammation and Regeneration	31(3)	290-295	2011
藤島清太郎	Sepsis 診断におけるプロカルシトニンの意義	化学療法領域	27(1)	134-141	2011

Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009

Fuminori Sakai · Naoko Chiba · Akiko Ono ·
Somay Yamagata Murayama · Kimiko Ubukata ·
Keisuke Sunakawa · Takashi Takahashi

Received: 10 September 2010 / Accepted: 20 October 2010 / Published online: 15 December 2010
© Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2010

Abstract We examined associations of serotypes with multilocus sequence typing (MLST) data for 7 house-keeping genes and the genotype concerning penicillin resistance based on penicillin-binding protein (PBP) alterations in *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis. From throughout Japan, we collected 115 pneumococcal isolates from the cerebrospinal fluid of patients 15 years old or younger from January 2007 to December 2009. We then carried out serotyping, MLST, and genotypic classification. Isolates included 24 serotypes and 52 sequence types (STs) according to MLST, of which 18 were novel. The 4 predominant serotypes included a variety of STs: 14 STs in serotype 6B ($n = 24$), 2 STs in 19F ($n = 17$), 6 STs in 23F ($n = 14$), and 5 STs in 14 ($n = 11$). Resistance genotypes included 6 types: 44.3% for gPRSP ($pbp1a + 2x + 2b$), 13.9% for gPISP ($pbp1a + 2x$), 9.6% for gPISP ($pbp2x + 2b$), 19.1% for

gPISP ($pbp2x$), 3.5% for gPISP ($pbp2b$), and 9.6% for gPSSP. Interestingly, the most prevalent serotype of 6B included 7 newly identified STs and a variety of genotypes for resistance. STs in serotypes 23F and 14 were highly diverse, but not in 19F. These results suggest that various genetic elements in *S. pneumoniae* might be intrinsically susceptible to genetic mutations and recombination, with acceleration of emergence reflecting selection pressures such as antibiotic overuse.

Keywords *Streptococcus pneumoniae* · Meningitis · Child · Serotype · Multilocus sequence typing · Genotypic resistance · Penicillin-binding protein

Introduction

Streptococcus pneumoniae is a major pathogen causing community-acquired infection, including respiratory tract infections, acute otitis media, septicemia, and meningitis. This agent remains a leading cause of morbidity and mortality worldwide, especially among children and the elderly [1, 2].

In particular, penicillin (PEN)-resistant *S. pneumoniae* (PRSP) emerged in the 1980s and spread rapidly to many countries, posing several difficult clinical problems.

In Japan, meningitis caused by this PRSP in children was first reported by Arimasu et al. [3] in 1988. According to an active Nationwide Surveillance for Bacterial Meningitis (NSBM) program organized by Sunakawa and Ubukata et al. [4], which has been operating since 1999, the prevalence of PEN-intermediate resistant *S. pneumoniae* (PISP) and PRSP is frequent, accounting for 43.1 and 39.7% of *S. pneumoniae* isolates from meningitis patients, respectively.

F. Sakai · T. Takahashi (✉)
Laboratories of Infectious Diseases, Graduate School
of Infection Control Sciences, Kitasato University,
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan
e-mail: taka2si@lisci.kitasato-u.ac.jp

S. Yamagata Murayama · K. Ubukata (✉)
Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents,
Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato
University, 5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan
e-mail: ubukatak@lisci.kitasato-u.ac.jp

N. Chiba · A. Ono
Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha,
760 Morooka, Kohoku-ku, Yokohama,
Kanagawa 222-8567, Japan

K. Sunakawa
Department of Research Project Studies,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University,
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

Resistance to β -lactam antibiotics in PISP and PRSP is mediated mainly by abnormalities in 3 *pbp* genes encoding the PEN-binding proteins (PBP) 1A [5], PBP2X [6], and PBP2B [7], which are enzymes involved in peptidoglycan synthesis. PCR-based genotypic identification to demonstrate the presence or absence of abnormalities in the 3 *pbp* genes was designed by Ubukata et al. [8] in order to rapidly and accurately identify these sites of resistance in *S. pneumoniae* isolates. PCR results, designated by expressions such as gPRSP (*pbp1a* + 2*x* + 2*b*) and gPISP (*pbp2x*), correspond well to the susceptibilities determined by bioassay [9].

Serotyping using antiserum raised against polysaccharide capsule, a virulence factor of *S. pneumoniae*, has received emphasis in worldwide epidemiologic studies concerning this agent [10, 11]. Heptavalent pneumococcal conjugate vaccine (7-PCV) or 13-valent PCV (13-PCV) has been developed based on a great abundance of capsule-type data collected worldwide [12, 13]. However, information about pneumococcal serotypes is less than fully informative concerning individual clones causing invasive illnesses, because a given serotype includes some clones representing horizontal transfer of capsular genes into newly identified lineages [14].

To clarify the clonality of *S. pneumoniae* strains showing the same capsule type that were isolated in different areas and countries in recent years, multilocus sequence typing (MLST) that determines 7 allelic genes was developed [15]. In Japan, Imai et al. [16] first described MLST data relating to pneumococcal isolates from adults with community-acquired pneumonia. However, similar data for isolates from pediatric-age invasive pneumococcal infections have been lacking in Japan.

We therefore applied MLST analytic approaches to *S. pneumoniae* isolates from children with meningitis from 2007 through 2009 to identify linkages between serotypes, genotypic resistance types, and MLST data.

Materials and methods

Strains and serotyping

The active program for NSBM (research representative: Prof. K. Sunakawa, Kitasato University) has been carried out by participating pediatricians since 2000.

Bacterial strains first isolated from cerebrospinal fluid (CSF) were sent to the Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents (Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University), together with anonymous information concerning patient characteristics provided by attending pediatricians.

Pneumococcal strains ($n = 115$) isolated from the CSF of patients 15 years old or younger at 70 participating hospitals

from January 2007 through December 2009 were included in this study. These hospitals were located in 6 areas of Hokkaido-Tohoku, Kanto, Chubu, Kinki, Chugoku-Shikoku, and Kyushu. Strains were immediately grown on sheep blood agar (Nippon Becton–Dickinson, Tokyo, Japan) at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂. After single-colony purification and recultivation, isolates were stored in 10% skim milk (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at –80°C until use. The pneumococcal species from all subjects were confirmed by PCR as described previously, based on amplification of the *lytA* gene encoding the autolysin enzyme specific to *S. pneumoniae* [17].

After speciation, we determined serotypes of *S. pneumoniae* strains with the Quellung reaction, using antiserum purchased from the Statens Serum Institute (Copenhagen, Denmark).

Identification of genotypic classes based on PBP alterations

A single colony of *S. pneumoniae* grown on a sheep blood agar plate was suspended in a microcentrifuge tube (0.5 ml) containing 30 μ l of lysis solution [18]. To prepare template DNA solution, the tube was placed in a thermal cycler (Gene Amp PCR System 9600 R; PerkinElmer Cetus, Waltham, MA, USA), heat-treated for 10 min at 60°C, and then for 5 min at 94°C. Each primer set for the detection of the 3 targeted PBP genes was designed to amplify normal *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* that existed among PEN-susceptible strains [4, 17].

Next, we added the 2 μ l template DNA to each of 4 tubes containing 30 μ l of PCR reaction mixture. Each reaction tube for real-time PCR contained a specific molecular beacon probe and primer set to detect each of the genes *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* (abstr. no. 2074, Chiba et al.; 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston, USA, 2010).

Cycling conditions for real-time PCR consisted of 40 cycles at 95°C for 15 s, 50°C for 20 s, and 75°C for 15 s using Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA). Based on the presence of all 3 DNA fragments corresponding to *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b*, the genotype was assigned to the PEN-susceptible class. When any of the targeted DNA fragments were absent, we assigned the strain to a PEN-nonsusceptible class, since it had sequence(s) at variance with those in PSSP. Six genotypic classes were indicated by adding “g” to the designation as follows: gPSSP, gPISP (*pbp2x*), gPISP (*pbp2b*), gPISP (*pbp1a* + 2*x*), gPISP (*pbp2x* + 2*b*), and gPRSP (*pbp1a* + 2*x* + 2*b*) [19].

MLST and analysis of clonal complexes (CCs) using the eBURST database

MLST of all strains was performed using methods described by Enright et al. [20]. The same template DNA used

for the genotypic identification of PEN resistance was subjected to MLST.

Internal fragments of 7 housekeeping genes were analyzed: *aroE* (shikimate dehydrogenase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *gki* (glucose kinase), *recP* (transketolase), *spi* (signal peptidase I), *xpt* (xanthine phosphoribosyltransferase), and *ddl* (D-alanine-D-alanine ligase). The corresponding 7 primer sets found on the MLST website and the CDC homepage (<http://spneumoniae.mlst.net/misc/info.asp>, <http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/alt-MLST-primers.htm>) were used. A *ddl* forward primer (5'-AGGATTCTTGAAGTTTTGAAAATG-3') was newly constructed for this study.

PCR was performed using Thermal Cycler Dice 600 (Takara, Kyoto, Japan) with cycling conditions that included an initial DNA denaturation step at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 50°C for 40 s, and 72°C for 1 min.

Amplified DNA fragments were purified using a QIAquick® 96 PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and sequenced using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and an Applied Biosystems 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Sequences obtained at each of the 7 loci then were compared with those of all known alleles at those loci using the database at the pneumococcal MLST website (<http://spneumoniae.mlst.net>). A sequence identical to a known sequence was assigned the corresponding allele number, and sequences that were not identical to any known allele sequence were assigned new allele numbers through the MLST website. The allelic profile of each strain as well as its ST designation was determined through the 7 constitutive numbers.

We also used eBURST to analyze the clonal association of strains with strains of identical serotype on the website (<http://spneumoniae.mlst.net/eburst/>). CCs were established by the eBURST sets, in which 6 of 7 identical allele numbers showed commonality with the 1 different number.

Results

Age distributions among children with pneumococcal meningitis

We analyzed 115 pneumococcal isolates in the CSF of Japanese children ranging in age from newborns to adolescents. CSF sampling dates ranged from January 2007 to December 2009. Boys accounted for 67 isolates (58.3%), while 39 isolates were from girls. The genders of the remaining patients were unspecified.

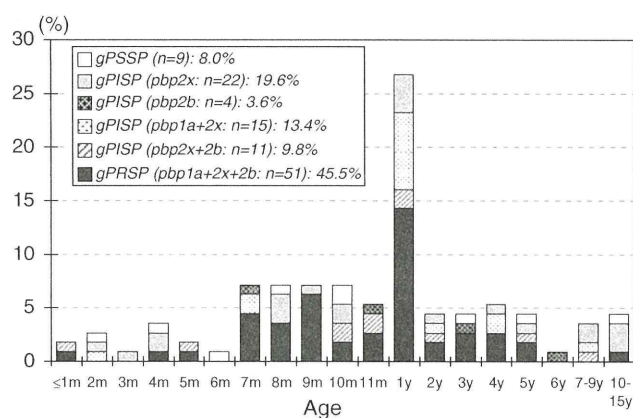


Fig. 1 Age distributions among children ($n = 112$) with pneumococcal meningitis and genotypic resistance classes among pneumococcal isolates. m month, y years

Figure 1 shows age distributions for the various genotypic resistance types among 112 children with meningitis, except for 3 patients whose ages were unclear. A number of patients were 6 months old or younger (11.6%). Isolation rates were high among infants from 7 to 11 months old (33.9%), and showed a peak (26.8%) among 1-year-old infants, with 72.3% of isolations occurring in infancy (1 year old or younger).

Genotypically resistant strains were predominantly gPRSP (*pbp1a + 2x + 2b*) (45.5% of all strains), followed by gPISP (*pbp2x*) (19.6%), gPISP (*pbp1a + 2x*) (13.4%), gPISP (*pbp2x + 2b*) (9.8%), and gPISP (*pbp2b*) (3.6%). Isolates of gPSSP with the 3 normal PBP genes accounted for only 8.0%. Importantly, gPRSP (*pbp1a + 2x + 2b*) strains were especially prevalent among patients 7 months old or older.

This chronology might reflect a decrease in immunoglobulins transferred from the mother to the newborn.

Serotype distributions and genotypic resistance classes

Figure 2 shows serotype prevalences for all *S. pneumoniae* isolates ($n = 115$) in decreasing order. Types represented numbered 24. Serotype 6B (20.9%, $n = 24$) was most prevalent, followed by 19F (14.8%, $n = 17$), 23F (12.2%, $n = 14$), and 14 (9.6%, $n = 11$). Serotypes 6A ($n = 5$) and 6C ($n = 6$) also were observed in our study. Coverage rates of 7-PCV and 13-PCV by age group were: 70.6 and 82.4% in infants (younger than 1 year old); 72.5 and 80.4% in preschool children (1–5 years old); and 20.0 and 30.0% in school children (older than 5 years old). Except for 6 strains (serotypes 6A, 23A and 35), we found that 88.2% of gPRSP was distributed among the 4 serotypes above, especially 19F, 6B, and 23F. Infrequent serotypes tended to be gPSSP, gPISP (*pbp2x*), or gPISP (*pbp1a + 2x*).

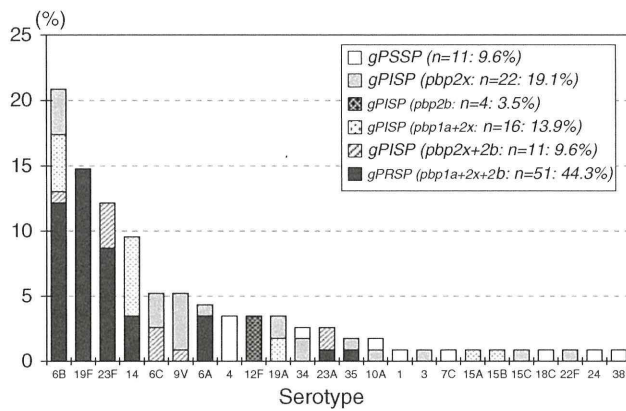


Fig. 2 Serotype distributions ($n = 115$) and genotypic resistance classes among pneumococcal strains

Association of serotype with sequence types (STs) and genotypes

Table 1 shows 52 STs identified by MLST performed on 115 pneumococcal strains, together with information concerning reference strains. We identified 8 novel allele sequences (*recP148*, *recP149*, *xpt336*, *xpt337*, *ddl382*, *ddl383*, *ddl384*, and *ddl385*). Thirty-four of the STs had already been assigned according to the MLST website, and the remaining ones were found to represent 18 new STs identified in our study. Eight ST profiles (STs 5231, 5238, 5239, 5242, 5230, 5234, 5241, and 5244) contained the new allele sequences, and others included novel allelic profiles (STs 5232, 5233, 5235, 5236, 5237, 5240, 5243, 5245, 5246, and 5247) consisting of known allele sequences.

Associations of isolation areas with serotypes and STs are indicated in Table 2. We confirmed that there are no significant distributions of serotypes and STs in Japan.

A correlation was evident between serotypes and STs, except for the 6 STs (STs 63, 199, 236, 338, 2923, and 2924) corresponding to the multiple serotypes in our observations (Tables 1, 2).

Additional eBURST analysis showed the presence of 29 CCs and 7 singletons. Relationships between STs and CCs for the main serotypes were as follows: 14 STs and 9 CCs in serotype 6B, 2 STs and 2 CCs in 19F, 6 STs and 4 CCs in serotype 23F, and 5 STs and 4 CCs in serotype 14 (Table 1).

The serotypes 6B, 6C, and 6A included 10 newly identified STs and a variety of both CCs and genotypic resistance types, suggesting that the 6B, 6C, and 6A serotypes might be susceptible to genetic alterations.

Discussion

Pneumococcal meningitis among young children and the elderly remains an important cause of morbidity and

mortality in Japan [21]. Treatment of bacterial meningitis consists primarily of antimicrobial chemotherapy as recommended in the guidelines edited by the Japanese Society of Neurological Therapeutics, the Japanese Society for Neuroinfectious Diseases, and the Japanese Society of Neurology 2007 [22]. Recommended first-line antibiotics include a combination of third-generation cephalosporins and carbapenems for patients older than 4 months.

The aim of this work was an improved understanding of features such as serotypes, resistance genotypes, and STs among the pneumococcal strains most often isolated from children with meningitis. Although 93 serotypes exist among the strains, serotype 6B is most frequent, since strains of this serotype do not bear antigens corresponding to maternal antibodies transferred placentally to newborns.

In this study, we found that the serotypes 6B, 6C, and 6A included 10 newly identified STs and a variety of resistance genotypes and CCs compared with those associated with other serotypes. Our data suggest that strains with serotypes 6B, 6C, and 6A might be intrinsically susceptible to mutations and genetic recombination, considering that infant carriers with the serotypes 6B, 6C, and 6A seemed prevalent in the community. These genetic changes might be accelerated by selection pressures such as overuse of antibiotics and increased human mobility, reflecting progress in transportation.

In our surveillance study, all isolates recovered from cerebrospinal fluid were collected through the cooperation of pediatricians at collaborating medical institutions nationwide. Strains obtained and patient information would appear to be unbiased in terms of the specifics of *S. pneumoniae* and meningitis. We confirmed that serotypes 6B, 19F, 23F, and 14 were prevalent as causes of meningitis in Japanese children.

The Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN) characterized 26 multidrug-resistant clones of *S. pneumoniae*, which were identified worldwide using MLST analysis (<http://www.sph.emory.edu/PMEN/>) [23]. All STs with allele profiles that were either similar or single- or double-locus variants within the PMEN clones represented the same serotypes, except for ST5241. Associations of serotypes with STs were also evident, except for the 6 STs (STs 63, 199, 236, 338, 2923, and 2924) corresponding to multiple serotypes in our study. In addition, multiple STs were included among the same serotypes (i.e., 6B, 23F, 14, 6A, 6C, and 19A), indicating the diversity of the genetic elements in the *S. pneumoniae* strains.

Comparison with the MLST database showed that most of the clones observed in our study possess allele profiles similar to reference clones obtained worldwide, especially in Asian and European countries. Figure 3 shows the worldwide distribution of ST90/ST2224/ST902 in the commonly seen serotype 6B, ST343 in serotype 14, ST236