

図-25 *S. pyogenes* (GAS) のクラリスロマイシン感受性

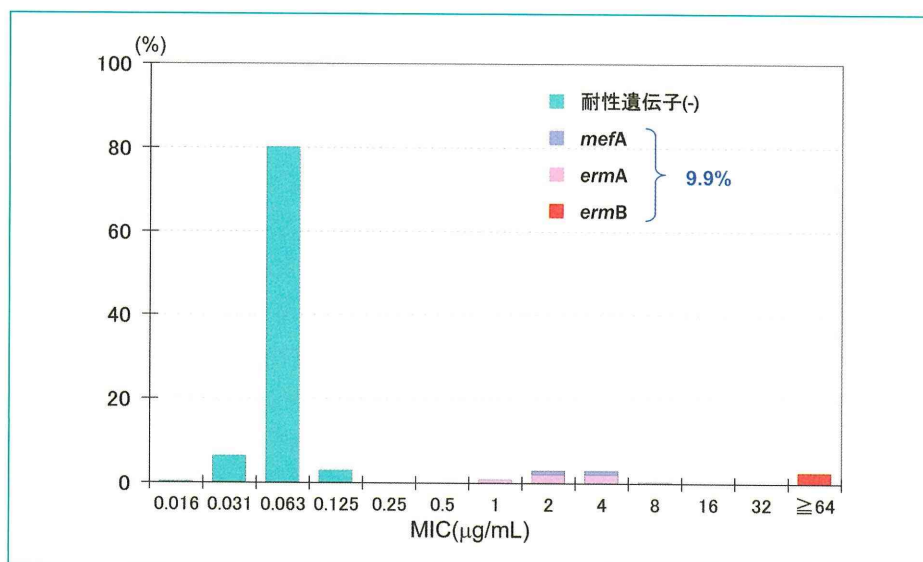


図-26 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) のクラリスロマイシン感受性

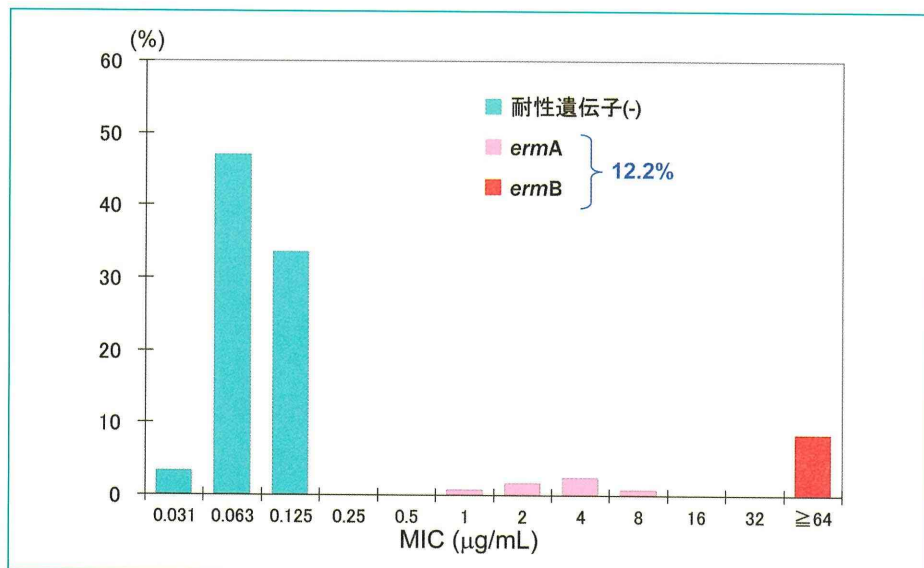


図-27 *S. agalactiae* (GBS) のクラリスロマイシン感受性

薬耐性菌は増加傾向にあります。

なお、レンサ球菌による重症感染症に対し、 β -ラクタム系薬とクリンダマイシン (CLDM) の併用が推奨されていますが、クリンダマイシンは *mefA* 保持株には感性ですが、*ermB* 遺伝子保持株には耐性です。マクロライド耐性菌による重篤な全身性感染症に遭遇した場合、果たしてクリンダマイシンの併用が有効なのか否か、今後の検証が必要と思われます。



ニューキノロン系薬に耐性の GAS が分離され始めたと聞きますが？

A まず、ニューキノロン系薬耐性化のメカニズムを図-28 に模式図で示します。

既にさまざまな菌種においてニューキノロン系薬耐性菌が報告され、問題となっています。いずれも、薬剤の作用標的である i) DNA ジャイレース (GyrA と GyrB の 4 量体) をコードする *gyrA* と *gyrB* 遺伝子、あるいは ii) トポイソメラーゼ IV (ParC と ParE の 4 量体) をコードする *parC* と *parE* 遺伝子の quinolone resistance-determining region (QRDR) に生じた変異です。特に、*gyrA* 遺伝子上に変異が生ずると、高度耐性化することが知られています。

ここでは、ニューキノロン系薬の中で最も使用頻度の高いレボフロキサシン (LVFX) の成績を中心に記述します。

『GAS』に対するレボフロキサシンの感受性分布は図-29 (左) に示しますが、遺伝子変異を持たない株でもその MIC は $0.25\text{--}2\mu\text{g/mL}$ です。MIC が正規分布ではなく耐性側にやや偏っていることに気付かれると思いますが、耐性側に位置する $2\text{--}4\mu\text{g/mL}$ の MIC を示す菌株の遺伝子を解析しますと、既に変異が生じており、結果として ParC の 79 番目のアミノ酸であるセリン (Ser) がフェニルアラニン (Phe) 等へ置換しています。

『SDSE』に対するレボフロキサシンの感受性分布も図-29 (右) に示しました。ごくわずかですが、 $32\mu\text{g/mL}$ 以上の高度耐性株が出現しています。遺伝子変異によるアミノ酸置換は、GyrA の 81 番目のセリンのフェニルアラニン

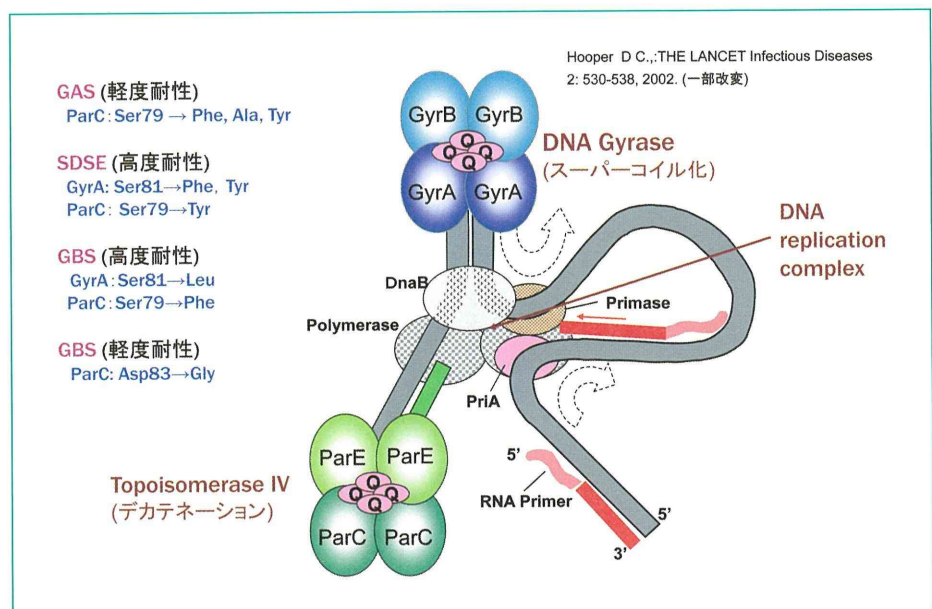


図-28 β 溶血性レンサ球菌におけるニューキノロン系薬耐性メカニズム

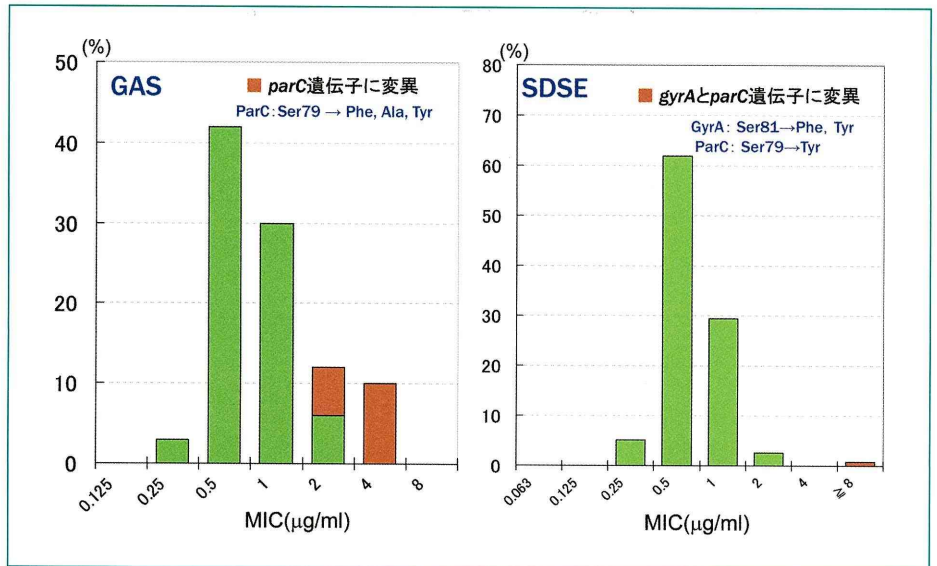


図-29 S. pyogenes (GAS) と S. dysgalactiae subsp. equisimilis (SDSE) のレボフロキサシン感受性

あるいはチロシンへの置換と、ParCの79番目のセリンのチロシンへの置換が同時に生じています。

今後、GASやSDSEにおける耐性化の動向には監視が必要であろうと考えます。

Q >>

GBSではさらにニューキノロン系薬耐性菌の頻度が高いとも聞きますが？

A

その通りです。

『GBS』の成績は図-30に示しますが、成人の侵襲性感染症由来株の約30%が既にニューキノロン系薬に高度耐性です。これらの株では、やはりGyrAの81番目のセリンがロイシン(Leu)へ、ParCの79番目のセリンもフェニルアラニンへ置換しています。

しかも、同図にみられるように、耐性株はそのほとんどが莢膜Ib型なのです。

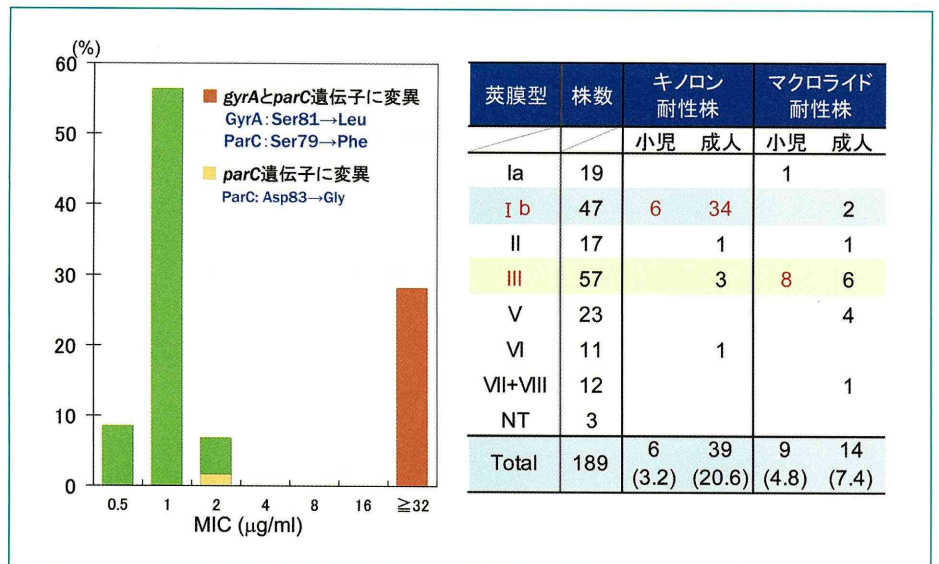


図-30 S. agalactiae (GBS) のレボフロキサシン感受性

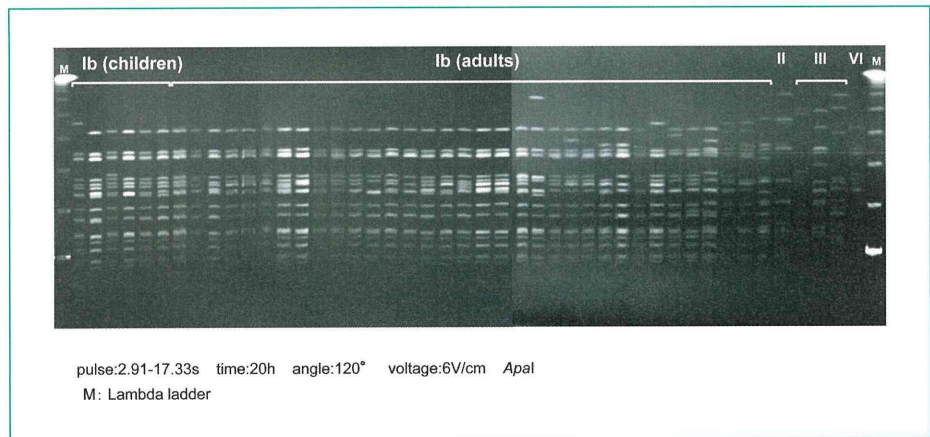


図-31 ニューキノロン系薬耐性株のパルスフィールドゲル電気泳動パターンの比較

図-31 に示すパルスフィールド・ゲル電気泳動による DNA プロファイルでも、Ib 型はほとんどが同一です。これらの成績をみますと、ニューキノロン系薬に耐性化した莢膜 Ib 型のクローンが全国へ拡散したのか、あるいは Ib 型の GBS が耐性を獲得しやすいのか、そのいずれかであろうと思われます。

【基礎研究者からのコメント】

本来、ニューキノロン系薬はグラム陰性桿菌に優れた抗菌力を有する薬剤です。近年開発されているレスピラトリーキノロン系薬は、側鎖の化学構造に新規性を持たせ、グラム陽性球菌である肺炎球菌やレンサ球菌に対する抗菌力を増強しています。セフェム系薬の開発経緯と同様に、みかけの感受性 (MIC) は良くなりましたが、殺菌性まで改良されたわけではないように思われます。

成人の呼吸器系感染症に対して本系統の薬剤が繁用されていますが、外来受診例でグラム陽性球菌感染症が強く疑われる症例やハイリスク症例に対しては、抗菌薬の慎重な選択が望まれます。

▶ 8. 細菌検査



β 溶血性レンサ球菌の検査はどのように実施されますか？



表-7 には、ヒトに病原性を示し β 溶血性を示すレンサ球菌について、鑑別のキーポイントとなる主な性状のみを示します。

1) 最も重要なのは血液寒天培地上の β 溶血性の強弱です。図-32 に典型的な GAS, SDSE, GBS, *S. anginosus* group の *Streptococcus constellatus* を示します。溶血性の強弱と溶血環の大きさ、コロニーの大きさは一般的には写真の通りです。同じ培養条件下では、SDSE がコロニーも大きく溶血環がクリアなのに対し、GAS はややコロニーが小さく溶血環もやや小さい特徴がみられます。GBS の溶血はさらに弱く、培地の底部まで溶血反応がみられることはまずありません。

2) 次に、重要なのは Lancefield の凝集試験です。

3) その他に、バシトラシン感受性試験と pyrrolidonyl arylamidase (PYR) 試験があります。これらの試験では GAS のみが陽性で、GBS や SDSE は陰性です。

4) さらにいろいろな生化学的性状を調べるには、API strep® や自動化機

器が用いられますが、表の基本性状を踏まえた上での判断が必要です。

菌名	略名	溶血性	コロニー	Lancefieldの分類	宿主	Bacitracin	PYR	VP	β-GUR	β-GAR
<i>S. pyogenes</i>	GAS	β	大	A	ヒト	+	+	-	-	(+)
<i>S. agalactiae</i>	GBS	β	大	B	ヒト 牛	-	-	+ ^{a)}	(+)	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	SDSE	β	大	A, C, G	ヒト 動物	-	-	-	+	-
<i>S. anginosus</i> group	-	β, α, γ	小	A, C, G, F, 非凝集	ヒト	-	-	+	-	-
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	SDSD	非溶血	大	C, L	動物	-	-	-	+	-

PYR: ピロリドニルアリアルアミダーゼ
β-GUR: β-D-グルクロニダーゼ
β-GAR: β-ガラクトシダーゼ
a): API strepでは陽性となる

•これらの性状はManual of Clinical Microbiologyのレンサ球菌の項を要約。
•SDSEは1996年、Vandammeによって提唱された。

表-7 ヒトに病原性を示すβ溶血性レンサ球菌の主な性状

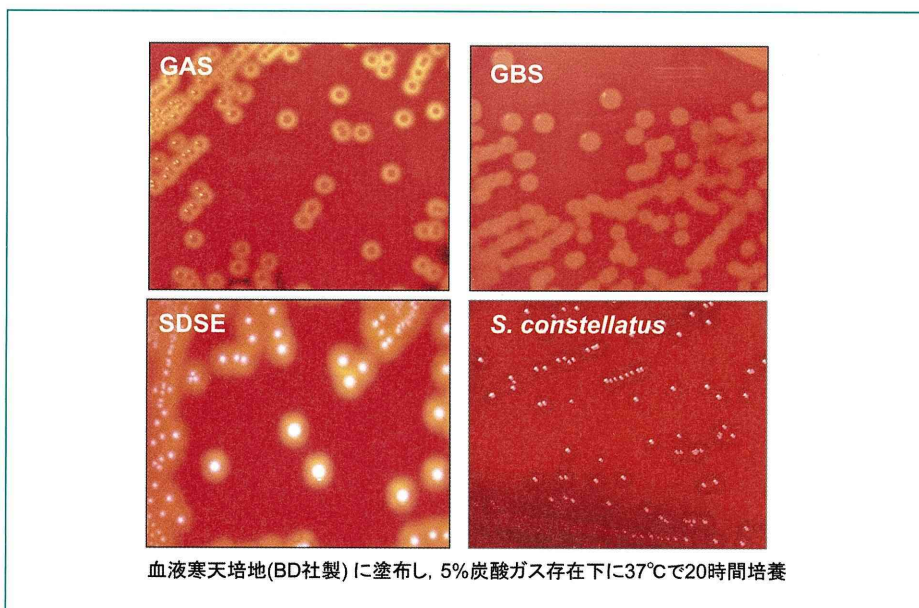


図-32 血液寒天培地上に発育した各β溶血性レンサ球菌の比較

Q >>

Lancefieldの凝集試験とはどのようなものですか？

A Lancefieldの凝集試験とは本法を確立した研究者の名前をつけてこのように呼ばれ、今でも世界的に通用する方法です。Lancefieldはレンサ球菌の細胞壁に群特異的な多糖体(C-polysaccharide: C多糖体)があるのを見だし、それを抗原として精製、ウサギに接種して抗体を作らせ抗血清としています。群特異的な多糖体抗原は20種類が知られていますが、これらの抗血清と検査するレンサ球菌の抽出液とを混合しますと、図-33のように対応する抗血清との間に数分で凝集反応がみられます。

ヒトの感染症と関わりのあるのはA群、B群、C群、G群、F群、D群(腸球菌は現在Enterococcus属として別に分類されています)などで、従来はこの方法でA群に凝集すれば菌種として*S. pyogenes*、B群であれば*S. agalactiae*と

してもほとんど間違いはありませんでした。

しかし、SDSE や *S. anginosus* group が注目されるに従い、凝集法が確立された頃にはみられなかった問題がでてきました。16S rRNA 解析や生化学的性状に基づいてレンサ球菌の分類を行いますと、SDSE や *S. anginosus* group に属する菌には、いくつかの群が含まれることが明らかになってきたからです。

例えば、SDSE の90%はG群、9%はC群、まれにA群 (<1%) に凝集する株もあります。

凝集試験は極めて優れた方法ですが、Lancefield の群別のみでは正確な菌種名は付けられないことになります。

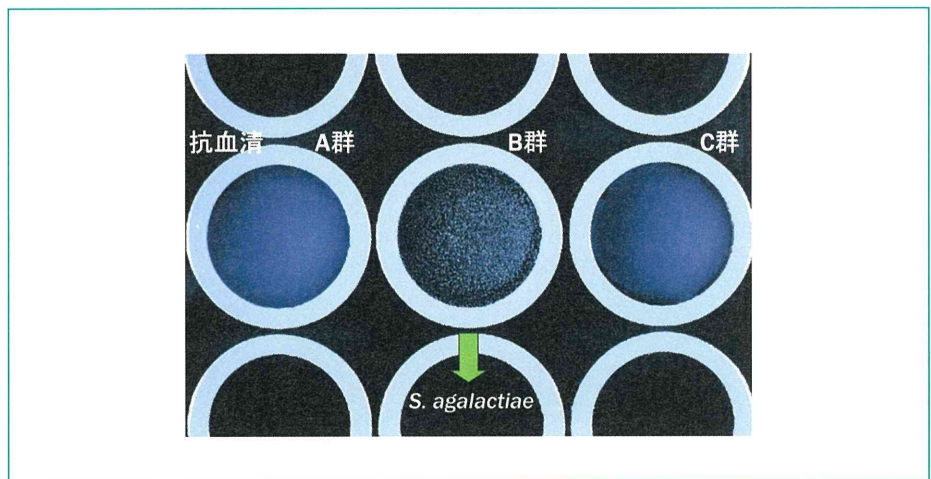


図-33 Lancefield の凝集試験



高価なキットを使わずに GAS と SDSE を鑑別できないのでしょうか？



PYR 試験を実施するのが最も安価であると思います。

図-34 に Lancefield の凝集試験で A 群に凝集した β 溶血性レンサ球菌 2 株の PYR 試験の結果を示します。PYR 陽性、すなわちアシルアミダーゼ活性を保持するのが *S. pyogenes*、PYR 陰性は *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* となります。

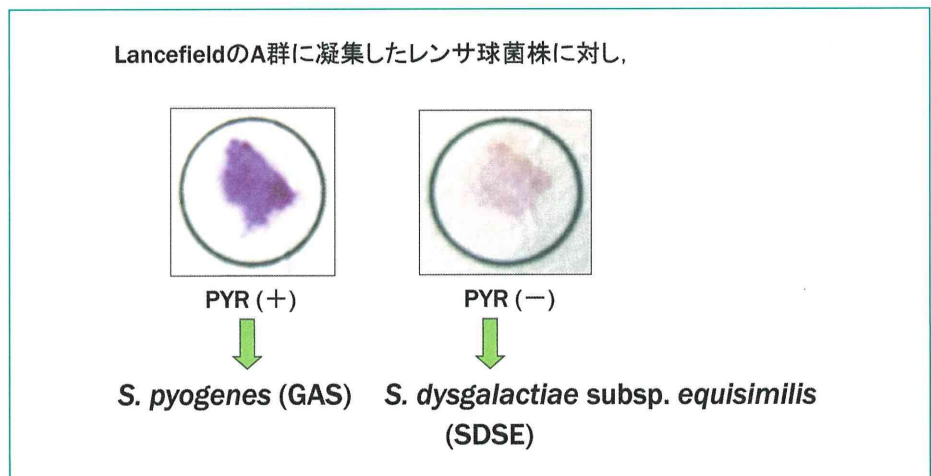


図-34 PYR 凝集試験

Q >>

臨床現場でβ溶血性レンサ球菌の有無を判定できるキットはあるのですか？

A

GAS の検査のみ、外来診療で使用できるキットが市販されています。ただし、咽頭/扁桃炎等に限られており、また、それほど検出感度に優れているわけではありません。

問題は、キットで検査をしてしまいますと、保険診療上培養検査はできない仕組みになっています。このため、臨床症状から GAS 感染が強く疑われても、それ以上の検査は出来ないのが現状です。

Q >>

PCR による迅速検査は可能なのですか？

A

各種検査材料に含まれる *S. pyogenes*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. agalactiae* の有無は、本研究事業によって既に real-time PCR 法による迅速診断が確立されています。

基本的には 16S rRNA の検索と、菌種特異的な遺伝子として GAS と SDSE 用に streptolysin O (*slo*), GBS 用にヒスチジンキナーゼをコードする *dltS* 遺伝子検索を組み合わせています。重症感染症由来の髄液、胸水、関節液などの検索が、高い感度と精度で 2 時間以内に検索可能です (図-35)。

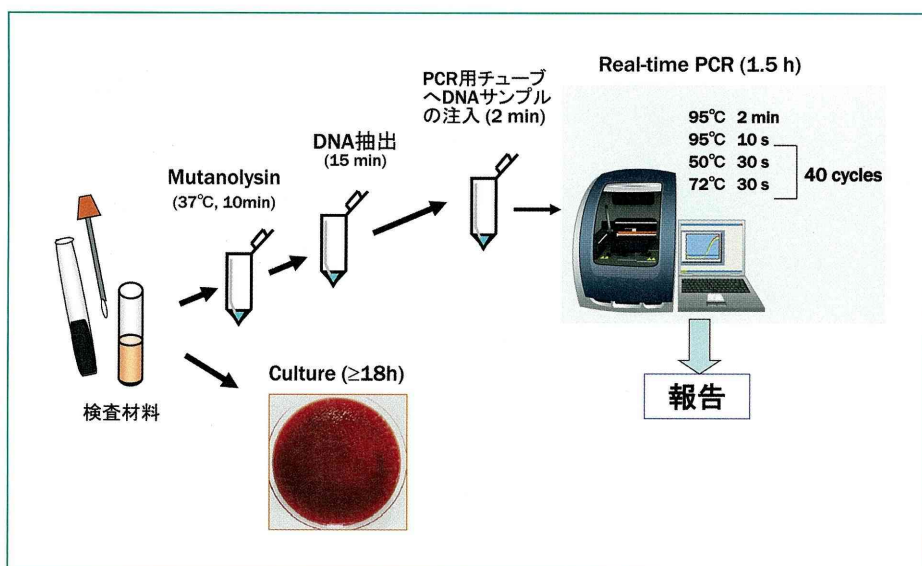


図-35 Real-time PCR 法による検査材料からのレンサ球菌、肺炎球菌検索

Q >>

非溶血性の GAS がまれにあるということですが？

A

恐らく過去にもそのような菌株は存在したのですが、近年そのような非溶血性の株が GAS, SDSE, GBS のいずれにおいても散見されるようになってきました。

吉野ら (Antimicrob Agents Chemother 48: 635-638, 2010) は GAS の溶血性に関わる streptolysin S をコードする *sag* オペロン (*sagA* から *sagI* 領域) の遺伝子解析を行い、非溶血株では *sagA* を含む領域が大きく欠失していることを報告しています。

釣菌の指標であった溶血性でレンサ球菌が推定できなくなりますと、非無菌検査材料の咽頭ぬぐい液や喀痰などからの釣菌はかなり難しくなります。

なお、一部には溶血性を失ったのであるから、病原性は低下しているのではとの見解もありますが、そのようなことはありません。

▶ 9. ゲノム解析

この項で述べたβ溶血性レンサ球菌のうち、*S. pyogenes* (GAS) と *S. agalactiae* (GBS) の病原因子については既に多くの先駆者によって膨大な研究がなされています。

また、遺伝子解析が容易に行えるようになった現在、肺炎球菌、GAS、GBSについては各々かなりの菌株数の全ゲノム解析が終了し、その遺伝子情報が公開されています。

S. dysgalactiae subsp. *equisimilis* (SDSE) については、ゲノム解析情報はありませんでした。

下村および秋山ら（国立国際医療センター研究所，感染症制御研究部）はその点に着目し、劇症型由来のSDSE株（STSS例由来，菌株番号：GG5_124，*emm*型：*stG480*）について全ゲノム解析を行い、その情報を公開（GeneBank Accession No.: AP010935）すると同時に論文として発表しました（BMC Genomics 12: 17-, 2011）。その後、村山，秋山，および岡田（大学院生）らは、我が国で最も分離頻度の高いタイプのSDSE株（STSS例由来，菌株番号：RE378，*emm*型：*stG6792.3*）と、リンパ節炎を起こしたブタ由来のSDSE株（リンパ節炎由来，菌株番号：L1株，*emm*型：*stL2764*（酪農学園大学 菊池先生，高橋先生より分与を受ける））について全ゲノム解析を行っています（未発表データ）。

ここではそれらのデータの中から、レンサ球菌感染症を理解する上で知っておきたい病原性に関する情報を記述します。

1) 全ゲノム解析からみたSDSEと他のレンサ球菌との関係

図-36には村山および秋山らが解析したRE378株の環状ゲノム図を示します。外側からi) ゲノムサイズ，ii) forward CDS (coding sequence, 遺伝子をコードしているDNA配列)，iii) reverse CDS, iv) GC skew (一本鎖DNA分子におけるG含量とC含量のバイアスを表す指標で、 $(C-G)/(C+G)$ の式で表すもの)，およびv) 5ヶ所のrRNA遺伝子位置が示してあります。ゲノムサイズはGASに比してやや大きく2.15 Mbp, GC含量は39.5%です。

その後解析された株も含めたSDSEの4株とその他のレンサ球菌のゲノムサイズ，GC含量，および全CDSのオルソローガス遺伝子（異なる種において同じ遺伝子座（染色体上の位置）を占める遺伝子）の相同性を比較した成績は表-8に示します。レンサ球菌のゲノムサイズは通常2 Mbp以上ですが，GASのみやや小さいことが判ります。GC含量はGBSが35.6%と最も低く，次いでGAS，肺炎球菌の順で，次がSDSEとなっています。

問題は，SDSEとその他の菌種との相同性ですが，オルソローガス遺伝子の相同性はGASとのそれは71-

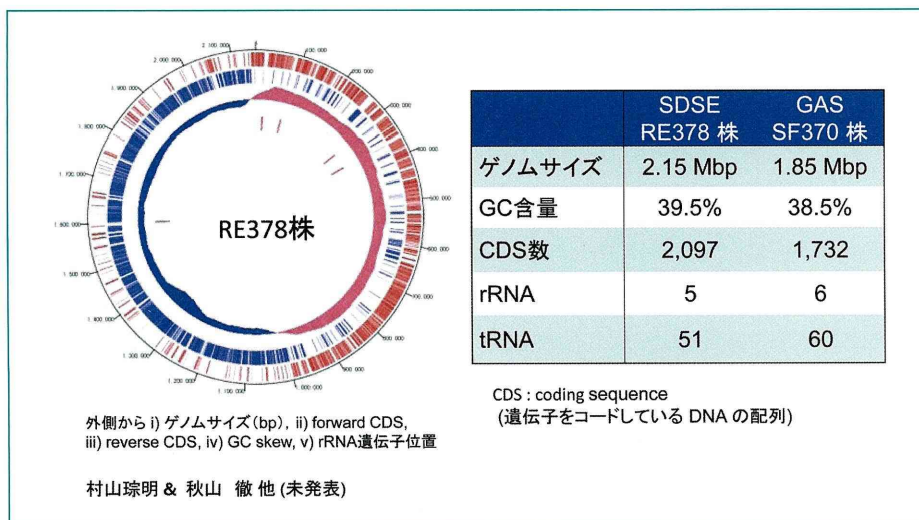


図-36 ヒト由来SDSE株におけるゲノムの一般的性状

菌種	解析されたゲノム数*	ゲノムサイズ (Mbp)	GC%	Identity (%)**
<i>S. dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> (SDSE)	4	2.14 - 2.21	39	81-87
<i>S. pyogenes</i> (GAS)	14	1.82 - 1.94	38	71-81
<i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	3	2.02 - 2.17	41	61-73
<i>S. agalactiae</i> (GBS)	3	2.13 - 2.21	35	57-64
<i>S. pneumoniae</i>	23	2.02 - 2.25	39	51-59
<i>S. mitis</i>	1	2.15	40	42-54
<i>S. suis</i>	13	2.01 - 2.18	41	49-60
<i>S. sanguis</i>	1	2.39	43	51-58

* ゲノム解析された菌株数

** 全CDSのオルソログな遺伝子(異なる種において同じ遺伝子座(染色体上の位置)を占める遺伝子)の相同性の平均値

表-8 SDSE 株と他の *Streptococcus* 属・菌種ゲノムとの比較

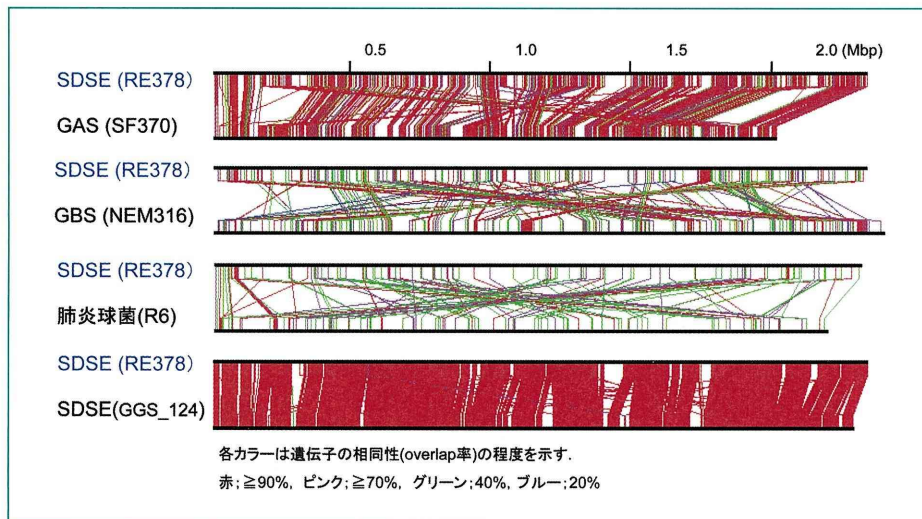


図-37 SDSE 株と他の菌種とのゲノムの再配置マップ

81%と高いのに対し、GBS とは 57-64%，肺炎球菌とはわずかに 50-60%です。

この相同性を判りやすいようにゲノム再配置マップとして図-37 に示します。赤は遺伝子の相同性が 90%以上と高い場合、ピンクは 70%，グリーンは 40%，ブルーは 20%を表しています。

SDSE と GAS, GBS, あるいは肺炎球菌, SDSE 同士のそれぞれを比較しますと、SDSE は GAS 遺伝子と相同性の高い遺伝子をいかに多く保持しているかが判ります。つまり病原遺伝子も共通するものが多いのであろうということが推測できるわけです。

SDSE と GBS では、全般的に相同性の高い遺伝子は非常に少ないのですが、1ヶ所集中して相同性の高い部分があります。このような領域は SDSE から GBS へ遺伝子が水平伝播したのかあるいはその逆に GBS から SDSE へ伝播したのかは定かではありませんが、いずれにしても両菌種間において過去に遺伝子組換えが生じていたことが示唆されるのです。

SDSE と肺炎球菌の比較では、多少相同性の高い遺伝子の存在も認められますが、遺伝学的にみまると相同性は明らかに低いことが示されています。

SDSE 株同士では当然のことながら高い相同性を認めますが、それでも遺伝子配列の異なる部分が5ヶ所ほど認められます。

2) GAS と SDSE にみいだされる主な病原遺伝子の比較

まず、GAS の主な病原性遺伝子とそれにコードされたタンパク、およびその機能を表-9 に示し、それらの遺伝子が SDSE にも存在するの否かを表-10 に示します。

菌の病原性因子は、i) 宿主細胞への付着と侵入に関わるもの、ii) 宿主免疫系からの回避に関わるもの、iii) そして侵入後における組織への拡散や傷害作用に関わるものと、大きく3つに分けることができます。

i) に区分される M タンパクは ii) の機能も有していることは M タンパクの図で説明したとおりです。その他にフィブロネクチン結合タンパク (*fbp*)、オパシティーファクター (*sof*)、コラーゲン様タンパク (*sclA*) などがあります。ii) には、M タンパクやフィブロネクチン結合タンパクの他に、補体成分 C5a を不活化するペプチダーゼ (*scpA*)、補体の膜傷害性複合体 (MAC) 形成インヒビター (*sic*) などがあります。

一方、iii) には組織間への菌の拡散を助長するストレプトキナーゼ (*ska*) やヒアルロニダーゼ (*hylA*, *hylP*、

病原遺伝子	タンパク	機能
<i>emm</i>	Mタンパク	抗オプソニン活性、菌体の付着、侵入に関与
<i>fbp</i>	フィブロネクチン結合タンパク	フィブロネクチンに結合すると同時に、H因子とも結合し、抗オプソニン活性を示す
<i>sof</i> *	血清混濁物質 (オパシティーファクター)	アポプロテアーゼとして働く。また、ヒトの細胞外マトリックス (ECM) と結合し相互作用する
<i>sclA</i>	コラーゲン様タンパク	ヒト血清 LDL を吸収し、宿主細胞の $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンに結合。細胞侵入を助長する
<i>scpA</i>	C5a ペプチダーゼ	補体成分 C5a を分解し、好中球などの遊走を阻害する
<i>sic</i>	補体阻害物質	補体成分と結合し膜傷害性複合体 (MAC) 形成を阻害 また、lysozyme や difencin などの活性も阻害する
<i>speB</i>	システインプロテアーゼ	Dick 毒素の1種。抗体の排除に関与
<i>slo</i>	ストレプトリジン O	赤血球のコレステロールに結合し、溶血活性を示す。細胞傷害作用
<i>sagA</i>	ストレプトリジン S	リン脂質に作用し、さまざまな細胞に対し傷害作用を示す
<i>ska</i>	ストレプトキナーゼ	プラスミノゲンアクティベーター。結果的にフィブリンを分解し、菌の拡散を助長
<i>hylA</i> , <i>hyl</i> , <i>hylP</i>	ヒアルロニダーゼ	ヒアルロン酸を分解し、菌の組織への拡散を助長する
<i>sda</i>	ストレプトドルナーゼ	DNA 分解酵素。病原性における役割は不明な点が多い

*: 一部の GAS では保持していない。

表-9 GAS にみいだされる主な病原遺伝子とコードされたタンパクの機能

機能	産生物	遺伝子	GAS	SDSE (RE378)	SDSE (L1)
付着因子、免疫回避、 組織侵襲性	フィブロネクチン結合タンパク	<i>fbp</i>	+	+	+
	ラミニン結合タンパク	<i>lmb</i>	+	+	+
	Mタンパク	<i>emm</i>	+	+	+
	C5a ペプチダーゼ A	<i>scpA</i>	+	+	-
	ヒアルロニダーゼ	<i>hyl</i>	+	+	+
	ストレプトキナーゼ	<i>ska</i>	+	+	-
毒素	ストレプトリジン O	<i>slo</i>	+	+	-
	ストレプトリジン S	<i>sag</i>	+	+	+
調節因子	M タンパク転写調節	<i>mga(e)</i>	+	+	+
	2成分制御因子センサータンパク	<i>covR/S</i>	+	+	+
付着因子、免疫回避、 組織侵襲性	ヒアルロン酸合成酵素	<i>hasA, B</i>	+	-	-
	ヒアルロニダーゼ	<i>hylA, hylP</i>	+	-	-
	エリスロジェニックキシンB (システインプロテアーゼ)	<i>speB</i>	+	-	-
	コラーゲン様タンパク	<i>sclA</i>	+	-	-
	補体性溶菌インヒビター (<i>emm1</i> のみ)	<i>sic</i>	+	-	-
スーパー抗原	発熱性外毒素 A, C, G, H, I, J	<i>spe</i>	+	-	-
	マイトジェニック因子 MF1-3	<i>mf, mf2, mf3</i>	+	-	-
	マイトジェニック・外毒素 Z	<i>smeZ</i>	+	-	-
調節因子	SpeBプロテアーゼ転写調節	<i>ropB</i>	+	-	-

RE378株: ヒト由来, L1: プタ由来
似通った遺伝子が認められても、機能しているか否かが不明の場合は(-)と表記。

表-10 GAS と SDSE における病原性因子の比較

hyl), 組織壊死に関わるとされるストレプトリジン O (*slo*) やストレプトリジン S (*sag*), システインプロテアーゼ (*speB*) などがあります。

表-10 をみますと, SDSE は菌の付着や侵入に関わる産物, あるいは侵入後の菌の拡散に関わる産物, その転写調節に関わる遺伝子の *mga* (*g*) や *covR/S* など多くを保持していますが, 表の下方に示す *speB*, *sic*, *speG* 等は完全な遺伝子としては保持していないようです。

いずれにしても, この成績から SDSE が GAS の保有する多くの病原性因子を保持し, 同様の疾患を起こすことが理解できると思います。

3) 病原性に関わる遺伝子からの産物の制御

GAS における病原性発揮に関わる主な遺伝子のゲノム上の位置を図-38 に示します。同図に示す SDSE にもみいだされる多くの産物は, 発現調節遺伝子である *mga* 遺伝子 (multiple gene activator) の正の制御, あるいは *covR/covS* の 2 成分系調節遺伝子の制御を受けています。

図-39 には GAS と SDSE における *mga* 遺伝子による調節領域部分を比較しながら示します。GAS では,

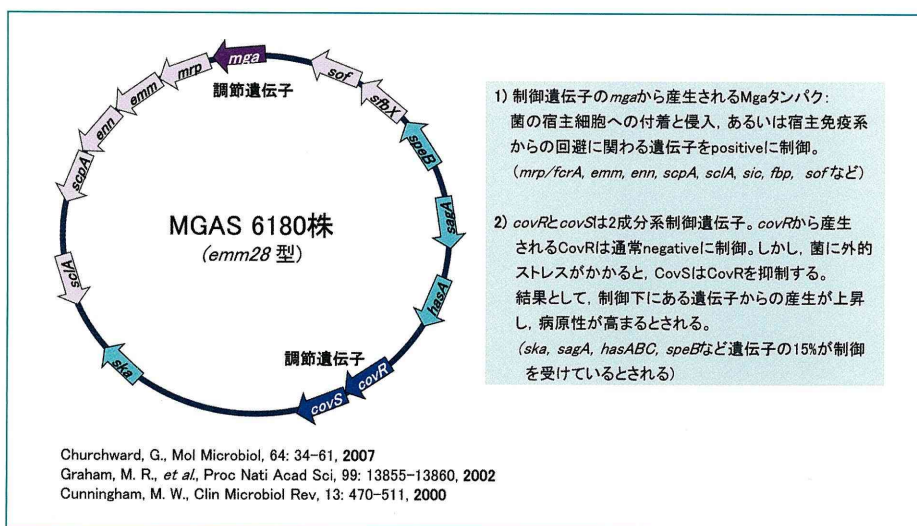


図-38 GAS のゲノム上にみいだされる主な病原遺伝子からの発現調節機構

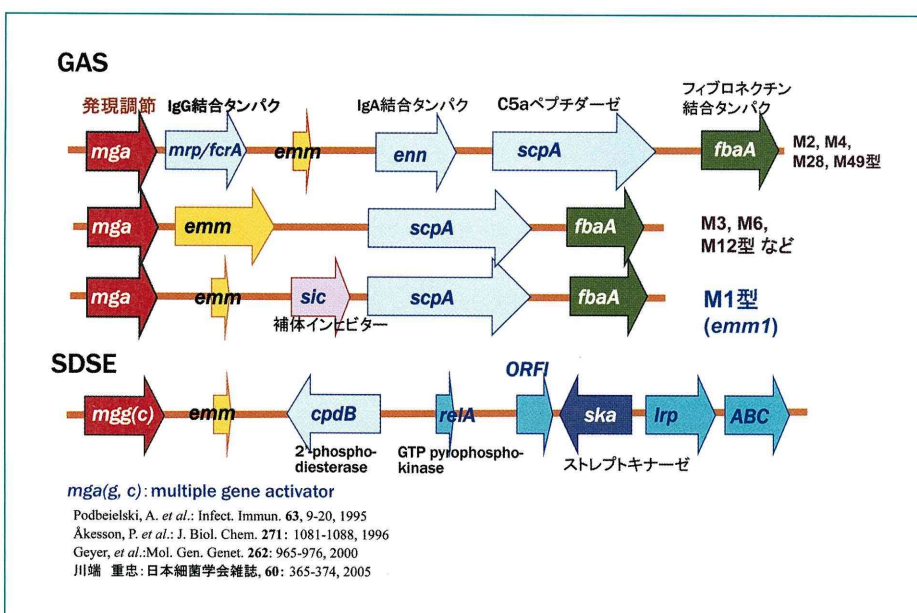


図-39 Mga (g) レギュロンとその近位の遺伝子マップ

IgG 結合タンパクの *mrp/fcrA* 遺伝子, M タンパクの *emm* 遺伝子, IgA 結合タンパクの *enn* 遺伝子, C5a ペプチダーゼの *scpA* 遺伝子, 補体インヒビターの *sic* 遺伝子などが調節されています。*mga* 遺伝子に支配される Mga タンパクの産生は, 菌の対数増殖後期や培養時の炭酸ガス濃度の上昇 (O_2 濃度の低下かも知れない) で高まりますが, その下流域に存在する遺伝子群のそれぞれのプロモーター領域部分に結合すると, それらの転写活性が一挙に高まります。やや離れた位置にある遺伝子 (*sclA*, *sof*: 図-38 参照) でも転写活性が高まっていることが証明されています。

近年明らかにされたのは *covS/covR* 遺伝子による 2 成分系制御機構です。*covR* にコードされた CovR はストレプトキナーゼ (*ska*), ストレプトリジン (*sagA*), システインプロテアーゼ (erythrogenic toxin B: *speB*), ヒアルロン酸合成酵素 (*hasA, B*) を制御しているとされます。これらは通常 CovR によって産生が抑制 (負の制御) されていますが, 菌に外的ストレスがかかると CovS が CovR を抑制するため, 各遺伝子に対する抑制が解除され, それぞれの産生が高まります。つまり, 結果的には病原性が高まることになります (図-38 も参照)。

4) 線溶系の活性化

GAS および SDSE の感染による「予後不良例」では, 血液検査値の PLT 値が有意に低値を示すことを述べました (β 溶血性レンサ球菌の項, 表-2 参照)。

この現象には菌が産生するストレプトキナーゼによる線溶系の活性化が大きく影響していると考えられます。図-40 に示すように, ストレプトキナーゼはプラスミノゲンをプラスミンに変換しますが, 産生量が著しく増加したプラスミンは次々とフィブリンを加水分解し, フィブリン分解産物 (FDP) を増大させます。つまり, 線溶系が活性化されるため, 血小板の著しい消費が生じていると推定されます。酸素濃度の低い条件下でストレプトキナーゼ産生能が高まる菌によって, 病態が進行した際のひとつの特徴ではないかと考えます。

『しかし, GAS, SDSE, そして GBS によってヒトに侵襲性感染症が惹起された場合には, 病原性は i) さまざまな菌側の因子, および ii) 宿主側のリスクファクターによって左右されることを常に念頭におく必要があります』

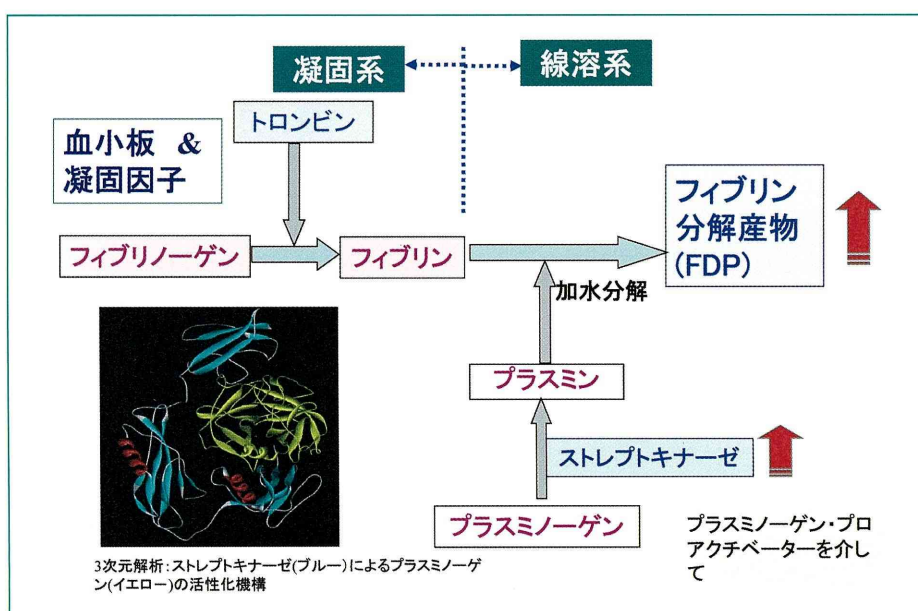


図-40 ストレプトキナーゼによる線溶系の活性化

5) ゲノム解析からみえるレンサ球菌の進化

この項では病原性に乏しいとされてきた SDSE が、なぜ GAS と同じような疾患を引き起こすのか、ゲノム解析からみえる成績を中心に記しましたが、そのまとめとして、現在の GAS あるいは SDSE の進化を推定図として図-41 に示しました。

はるか遠い昔、レンサ球菌は共通の祖先から出発し、環境（宿主がヒトかあるいは動物か等）に適応しながら進化してきたと想像されます。その過程において、GAS と SDSE は長い間祖先は共通であったと推定されます。しかし、進化の過程で恐らく図-42 に示す染色体上の溶原化ファージから何らかの刺激でファージ粒子が形成されるとき、染色体 DNA もファージ粒子内に取り込まれ、他のレンサ球菌へと水平伝播したと推定されるのです。伝達された DNA は、新たな菌の中でさらに DNA の欠失や組換えが生じています。

ファージによる遺伝子伝達は、肺炎球菌や黄色ブドウ球菌などのグラム陽性球菌では古くから知られたこと

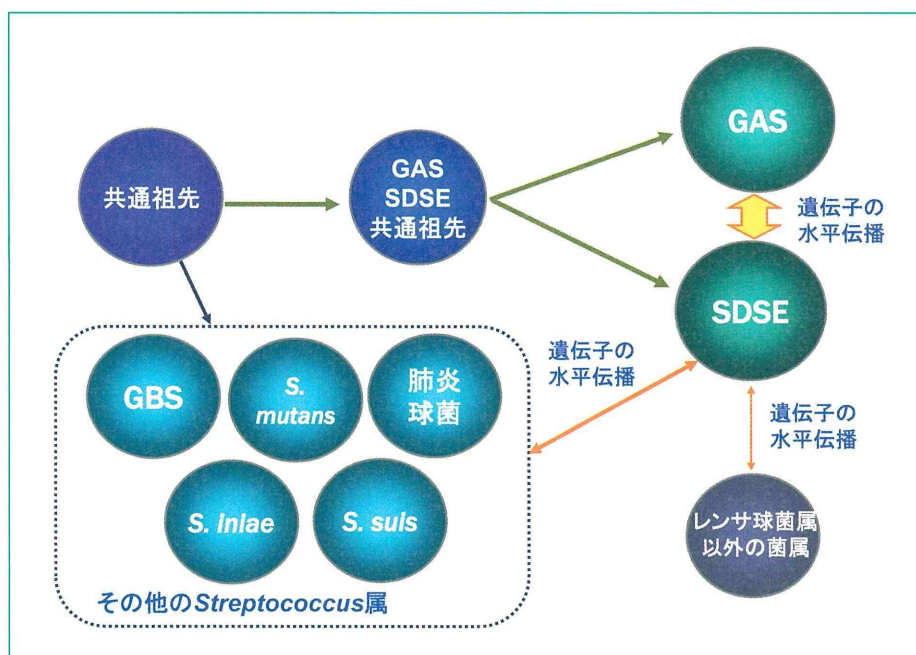
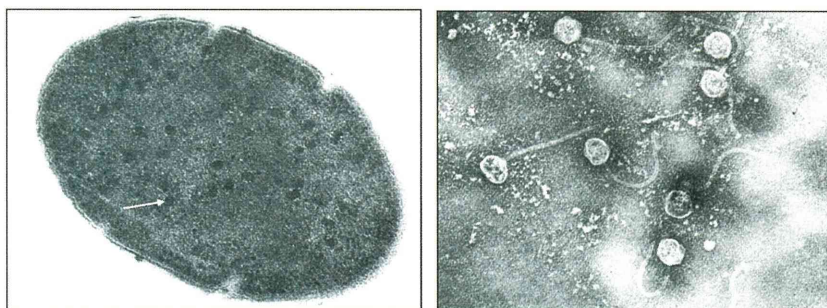


図-41 SDSE, 他の Streptococcus 属菌種の進化 (推定)

レンサ球菌は染色体上に溶原化ファージを組み込んでおり、マクロライド系薬耐性遺伝子等はファージによって伝達される。



Mitomycin C を1時間作用させると
ファージ粒子が形成され始める

(Ubukata et al, J. Antibiotics, 28:681-, 1975)

図-42 遺伝子伝達に関わる GAS のファージ

ですが、このようにしてこれからも多くの細菌は進化していくことでしょう。

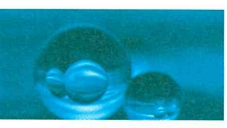
6) まとめ

この10年来、わが国でのレンサ球菌に関する研究は、少数の研究者によって続けられてきましたが、欧米ではレンサ球菌感染症には常に高い関心が払われています。

例えば、CDCでは肺炎球菌、GAS、GBS、インフルエンザ菌、髄膜炎菌、MRSA（2005年～）の6菌種について、Active Bacterial Core Surveillanceによって1997年から大規模疫学研究が継続して行われているのです。そのような基礎研究から、肺炎球菌ワクチン同様にGBSの莢膜に対するワクチンが開発され、南アフリカで既に治験が開始されています

翻って、我が国の急速な少子高齢化社会に伴う市中型重症感染症に対応するためには、予防に重点をおいた施策が必要であろうと結論されます。

附 髄膜炎が強く疑われた症例の髄液に対する PCR 成績（精査依頼検体）



「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ようになりました。

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ますが、ワクチン効果を正確に把握するため、“細菌性髄膜炎患者等の発生動向把握について”として、2 つの研究事業【i) 国立感染症研究所 研究代表部信彦 (<http://idsc.nih.go.jp.disease/hib/hib-db.html>) と ii) 北里大学北里生命科学研究所分】へのご協力のお願いが厚生労働省健康局結核感染症課から都道府県等の衛生主管部（局）へ連絡（H23 年 2 月 14 日）されているところです。

その後、多くの医療機関から標記の検査材料が送られてきましたが、その結果について【附】として記載いたします。これらの成績は、依頼された検体を「肺炎球菌の検査：図-9」に従って real-time PCR 法にて解析したものです。特に、症例に対し注射用抗菌薬があらかじめ投与されてしまいますと、多くの場合培養では原因菌は特定しがたく、PCR でようやく原因菌が推定できることになります。なお、無菌性髄膜炎が疑われる症例の髄液に対する網羅的ウイルス検索も同様に可能です。

髄液検査時の留意事項

髄液の細菌培養検査では、原因菌は恐らく約半数の症例程度しか分離できていないと思われます。これに備え、まず培養をなされる前に 100 μ L 程度の髄液をあらかじめ小分けし、 -80°C に凍結保存しておかれることをお勧めします。その際、厳密な無菌操作（グローブ使用）で無菌容器（特にチューブのふた部分の操作で汚染が生じています）に小分けしてください。1 個の DNA 汚染でも 30 サイクル増幅させると 10 億コピーとなり、結果の解釈が極めて難しくなります。

相談先 mail : sinko13@lisci.kitasato-u.ac.jp, TEL : 03-5791-6385

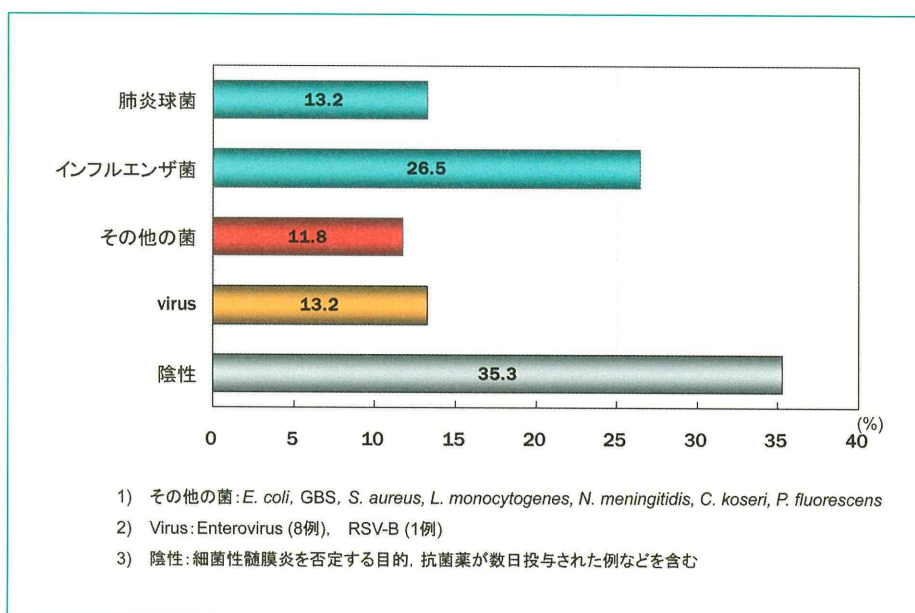


図-1 精査を依頼された髄液の real-time PCR 結果 (n = 68)

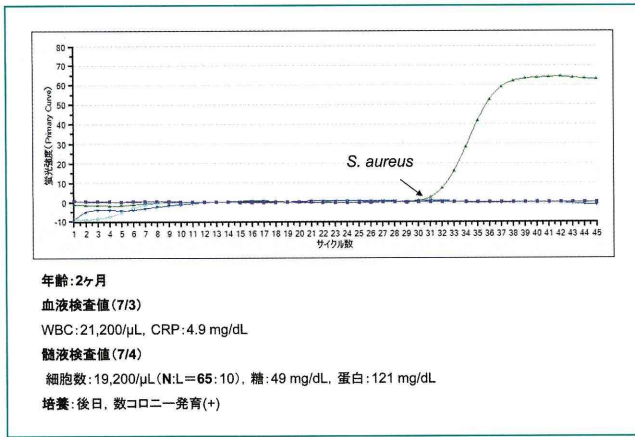


図-2 依頼番号: JPO442 (黄色ブドウ球菌による化膿性髄膜炎)

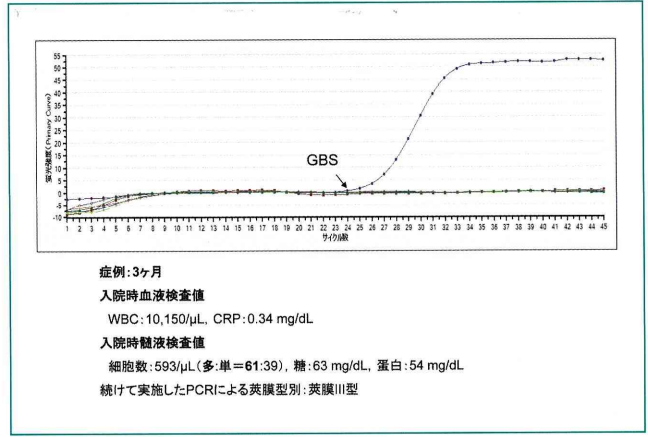


図-3 依頼番号: JPO433 (GBS による化膿性髄膜炎)

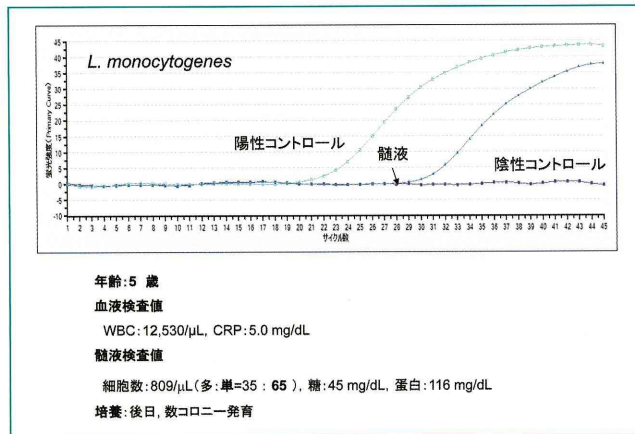


図-4 依頼番号: JPO445 (リステリア菌による化膿性髄膜炎)

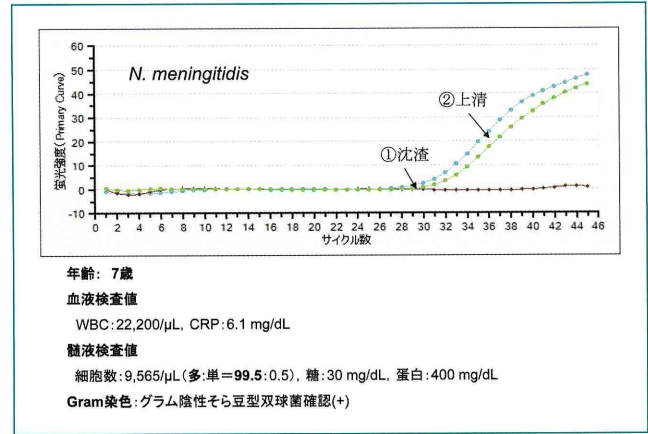


図-5 依頼番号: JPO449 (髄膜炎菌による化膿性髄膜炎)

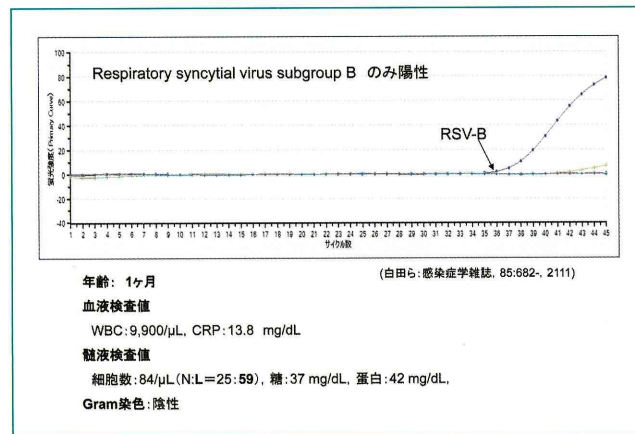


図-6 依頼番号: JPO412 (RSV による無菌性髄膜炎と推定)

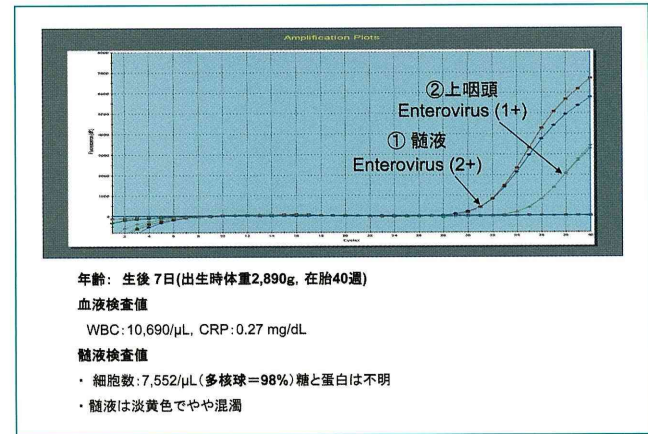
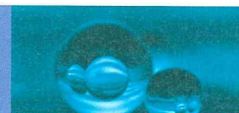


図-7 依頼番号: JPO405 (Enterovirus による無菌性髄膜炎)



▶ 小児におけるマクロライド系薬耐性 *Mycoplasma pneumoniae* の大流行

本年（2011年）初夏から、学童を中心に *Mycoplasma pneumoniae*（マイコプラズマ）による感染症が流行しています（図-1）。しかも、今流行しているマイコプラズマは、優れた感受性を有し治療の第一選択薬であった抗生物質のマクロライド系薬（MLs）に高度耐性化しています。このため、MLsを投与しても臨床症状がなかなか改善せず、遷延化する例あるいは入院する例も増えてきています^{1,2)}。本症は強い咳嗽を主訴とするため、学童間に容易に広がりやすいことも流行を助長する一因となっているように思われます。

このようなマイコプラズマにどのような抗菌薬が適正であるかということ調べるには、培養検査を行い、菌そのものを分離して抗菌薬に対する感受性を調べる必要があります。しかし、培養には特殊な培地が必要であるのみならず、菌が発育してくるまでには1週間以上の時間がかかり臨床での治療には間に合わないことから、培養はほとんど行われていないのが実情です。

私どもの研究室は約10年前よりマイコプラズマに限らず、小児の市中肺炎（community-acquired pneumonia：CAP）に関係する肺炎球菌やインフルエンザ菌が抗菌薬に急速に耐性化してきている現状に鑑み、小児のCAPの誘因ともなる種々のウイルスをも含めて、これらの病原微生物を網羅的に検索できる real-time PCR法を確立しました^{3,4)}。そして、このようなことに関心をお持ちの小児科の先生方との共同研究として、小児のCAPに関与する病原微生物の検索と、検出された微生物の抗菌薬に対する耐性菌の出現状況、およびその耐性機構について研究を行ってきました。

小児における本年のマイコプラズマ感染症の流行に対し、多くの方々に関心を持っていただきたいと考え、共同で研究している小児科の先生方とも相談し、「附：マイコプラズマ」として本邦におけるMLs耐性マイコプラズマの現状について、今までに調べてきた研究結果を公開することにいたしました。

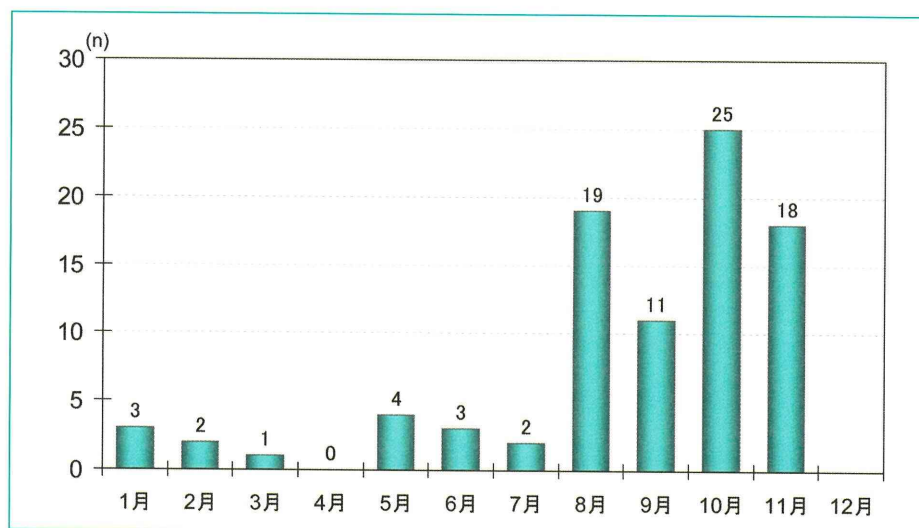


図-1 (財) 博慈会記念総合病院小児科におけるマイコプラズマ肺炎例の入院状況（2011年1月～11月22日）（小児科田島 剛先生の提供）

1. MLs耐性マイコプラズマの出現とその年次的変化は？

マイコプラズマ感染症の症例からMLs耐性マイコプラズマを分離し、世界で最初に報告されたのは神奈川県衛生研究所の岡崎ら⁵⁾です。私どもの研究室でMLs耐性マイコプラズマを分離し始めたのは2003年からで、その年は6株（5.0%）が分離されています^{6,7)}。

図-2には、私どもの研究室における2002年から本年10月までの間におけるMLs耐性マイコプラズマの経年的推移を示します。MLs耐性マイコプラズマの分離率が年次的に急速に上昇してきています。

特に、本年はマイコプラズマの流行年にあたり、80%以上のマイコプラズマがMLs耐性となっています。

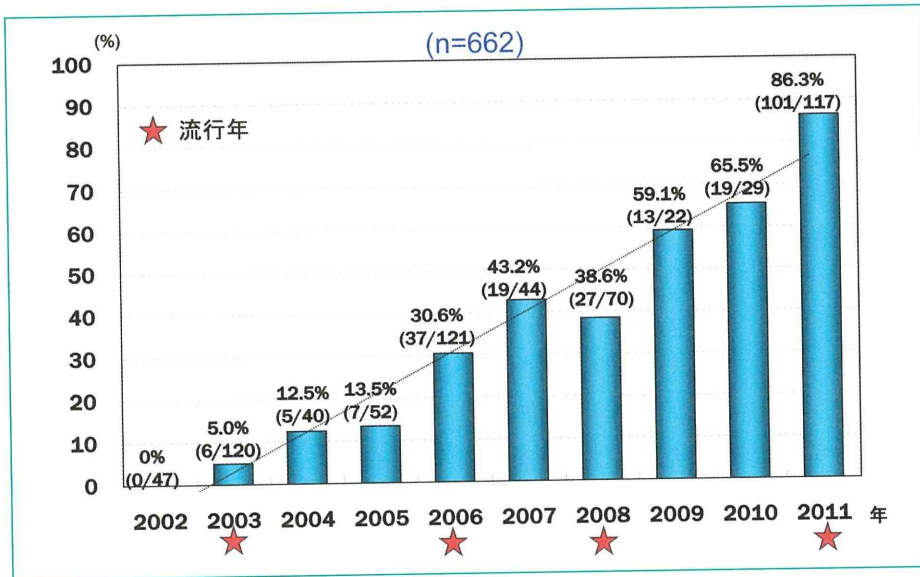


図-2 マクロライド系薬（MLs）耐性マイコプラズマの経年的推移

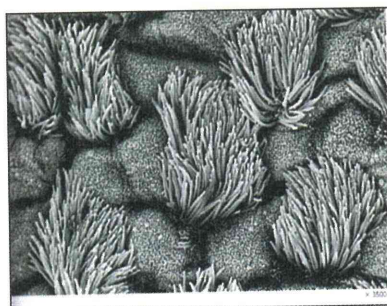
2. マイコプラズマとはどのような菌か？

マイコプラズマは一般の細菌（大腸菌やブドウ球菌など）とは異なり、細菌の特徴である細胞壁を持たず、細胞質膜のみで形態を保っている特殊な菌です。

そして、図-3に示すように、培地上に発育することができる最小の細菌として知られています。その培養にはPPLO培地という特殊な培地が必要で、しかも培養には1週間から1ヶ月程度を必要とします。

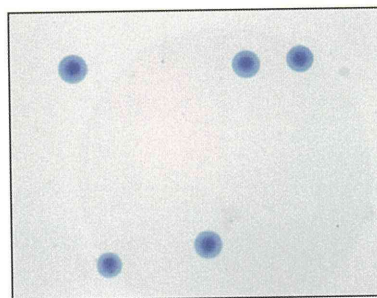
また、細胞壁を持たないため、細胞壁を作用標的とするβ-ラクタム系薬は全く無効とされています。既存

- ✚ 細菌特有の細胞壁を有していない。
- ✚ β-ラクタム系薬は無効である
- ✚ 培養には特殊培地(PPLO)が必要である。
- ✚ 培養に1週間～1ヶ月以上を要する。



咽頭から気管にかけての線毛上皮細胞の繊毛の付け根に付着し増殖する。細胞は損傷を受け剥離する。

「武田編、気道感染その1。(株)アイカム、東京、2000年より引用」



11日間培養したマイコプラズマのコロニー。PPLO培地に食い込んだ菌が濃く染まり、目玉焼状を呈する。(×40にて光学顕微鏡撮影)

図-3 *Mycoplasma pneumoniae* (マイコプラズマ) とは？

の抗菌薬の中で最も感受性が優れ、臨床的にも有効とされてきたのが MLs でした。

3. マイコプラズマ感染の成立と症状の特徴は？

マイコプラズマ感染は、菌がヒトの上気道へ侵入することから始まります。侵入した菌は、菌体のとがった先端部の細胞吸着器官（PI タンパク群）で気道表面の線毛上皮細胞の線毛付け根部分に接着して増殖し、細胞に直接的な損傷を与えることにより感染が成立します（**直接障害**）。この PI タンパクをコードする遺伝子配列には 2 タイプあることが知られ、I 型と II 型が交互に流行を繰り返すといわれています⁸⁾。

感染が成立し遷延化してきますと、マクロファージを介した各種炎症性サイトカイン（IL-8, IL-18 等）の産生が誘導され、間接的な炎症反応が強くなります（**間接障害**）。マイコプラズマは全ゲノム解析が行われており^{9,10)}、感染成立の機序については遺伝子レベルで明らかにされてきています¹¹⁾。

マイコプラズマ感染症は急性気管支炎や肺炎が主ですが、その他に咽頭炎や急性中耳炎、まれに髄膜炎の原因となることもあり多彩です。臨床症状としては 38℃ 台の高熱が 5 日間ほど続くことと、咳嗽もまた長く続くことが特徴とされてきました。菌が増えるのに時間がかかるため、マイコプラズマが侵入してから発症までの潜伏期間は 1～4 週（主に 2～3 週）といわれています。

また、マイコプラズマ肺炎はその肺炎像から異型肺炎と呼ばれていましたが、近年 PCR 等の迅速診断技術の進歩により、起炎微生物を網羅的に検索すれば速やかに確定診断が可能ですので、マイコプラズマ肺炎やクラミジア肺炎などのように、病原体の名称を付けて呼ばれることが多くなっています。

4. 小児の CAP におけるマイコプラズマの割合は？

図-4 は、私どもの研究室と 10 医療施設の小児科の先生方との共同研究によって、前述したウイルスと細菌とを網羅的に検索できる real-time PCR 法で調べた小児 CAP (n=1,700) の原因微生物の成績です。なお、抗体価が調べられる病原微生物については、ペアー血清による抗体価の上昇の有無も調べられています。また、細菌陽性例については、胸部 X 線像はもとより、発症当初の末梢白血球数と核左方移動の有無の他に、CRP や血沈についても調べ、さらにその後の臨床経過についても調べて、細菌感染の有無を推定しています。

結果をみますと、ウイルスあるいは細菌と推定された例がほぼ半数ずつとなっています。その内訳を図-4 の右側に示しましたが、細菌では肺炎球菌の割合が高く、次いで**マイコプラズマ**であり、インフルエンザ菌の関与は 3 番目となっています。ウイルスでは抗体の有意上昇が測定できない Rhinovirus の陽性率が最も高い

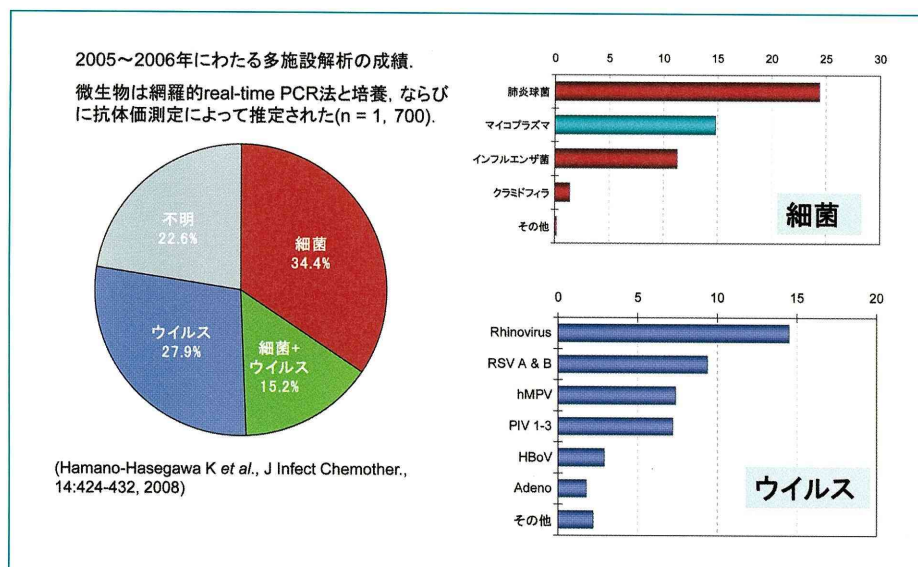


図-4 小児肺炎 (CAP) 例における推定原因微生物

のですが、それを除くとRSV (respiratory syncytial virus subgroup A & B) の関与が高く、次いでhMPV (human metapneumovirus), PIV (parainfluenzavirus 1-3) の順となっています。つまり、パラミクソウイルス科に属して肺細胞に対する親和性が高いとされるウイルスの陽性率が高いことが示されています。

5. マイコプラズマ感染症の好発年齢は？

マイコプラズマ感染症は学童期の代表的な感染症といわれています。図-5に前述した小児のCAP例における年齢別の推定原因細菌の内訳を示しました。1歳以下では肺炎球菌とインフルエンザ菌の関与する割合が高く、マイコプラズマによる肺炎は減多にみられていません。2歳以上になりますと次第にマイコプラズマによるCAPが増えてくることが示され、6歳以上(学童期)ではマイコプラズマ肺炎の占める割合が極めて高くなっているところに特徴があります。

なお、マイコプラズマ感染症には自然治癒例があることもよく知られていることで、またCAPを発症したとしても、一般には軽症から中等症であることが多いことから、“歩く肺炎”ともいわれています。しかし、中には重症化する例があることも事実です。

『私どもの小児マイコプラズマ肺炎例における検査値データの集計によりますと、年齢によって多少の相違はありますが、一般的には、i) WBCは正常値よりやや高い程度で平均値は6,600 cells/ μ L (2,300-19,800) であること、ii) 好中球優位であること、iii) CRPの平均値は1.8 mg/dL (0.1-13.4) 程度であること、iv) 血沈が亢進している場合が多いことなどが明らかにされています。』

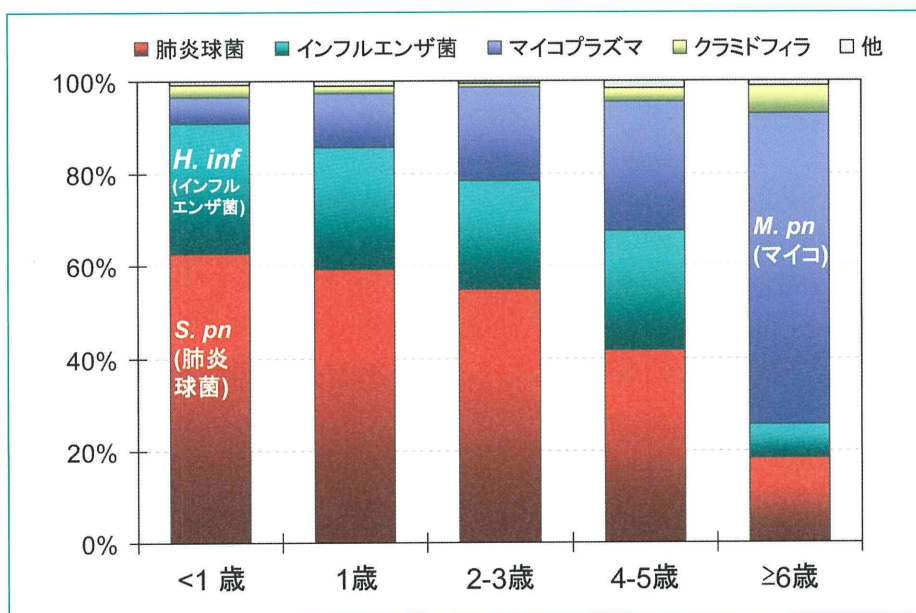


図-5 小児肺炎 (CAP) 例の年齢別にみた原因細菌の内訳

6. マイコプラズマ感染症の診断¹²⁾は？

マイコプラズマ感染症の診断には次の4つの方法があります。

1つは、今でも主として行なわれている免疫血清学的診断です。寒冷凝集反応 (CHA), 酵素免疫測定法 (ELISA 法), 微粒子凝集反応 (PA 法, HDPA 法), 補体結合反応 (CF) があります。通常、急性期と2-3週後の回復期のペア血清で診断が行われます。PA法は特異的IgM抗体を測定するので診断上優れていますが、入院時の単一血清のみでは診断できない場合が往々にして認められることが難点です。

2つ目はマイコプラズマを分離する培養法です。確実ではありますが、先に述べたようにPPLO培地を用いなければならない、また培養に日数を要することが難点です。