

共同開催シンポジウム

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(課題番号: H22-新興-一般-013)
ならびに 第32回日本臨床微生物学会総会

サテライトセミナー講演集

急速な高齢化社会の到来と国際化に伴い変貌する市中型重症感染症
—肺炎球菌と β 溶血性レンサ球菌—

2012年1月21日 [土]
於 パシフィコ横浜

ご挨拶とお願い

先般、パシフィコ横浜において第23回日本臨床微生物学会が盛会裡の内に開催されました。2000名を超える多くの参加者があったとのことで、学会設立当時と較べれば昔日の思いがいたします。

さてその折、厚生労働省所管の研究事業「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（H22-新興一般-013）」に関するサテライトセミナーが開催されました。聴講いただきました多くの方々に心より感謝申し上げます。

当日、分子疫学の研究成果を発表された研究協力者には、平易な言葉でお話いただけるようお願いしましたが、セミナー終了後に何人かの方々から「疫学成績は理解できたが Multilocus Sequence Typing (MLST) の内容は難しく、宇宙語を聞いているようであった」という感想を頂戴いたしました。

既に配布済みの冊子は、感染症を御専門としない医療関係者でも理解できるようにまとめましたので、MLSTについてはほとんど記述いたしませんでした。しかし、世界的には菌種毎に定められた7つの遺伝子の特定領域を解析し、世界の菌株とその類似性を比較する手法、すなわち MLST 解析へと大きくシフトしてきています。菌そのものの分与をしなくても世界中の菌株と正確な比較ができるという理由です。

もちろん、このような解析はそれぞれの施設で行うものではなく、大規模サーベイランスの中で実施すべき事項ですが、MLSTをご理解いただくためにも「サテライトセミナー講演集」を作成し、皆様にお配りしようと考えた次第です。

末尾には、第1回の本学会総会の会長を務められた紺野昌俊先生（帝京大学名誉教授、本学会名誉会員）がセミナーへお寄せ下さった感想とコメントを掲載させていただきました。大変に貴重な、そして重い言葉と受け止めました。

また、本学会20周年記念式典の折、初代理事長の清水喜八郎先生（元東京女子医科大学教授、本学会名誉会員）は、**日本臨床微生物学会の社会的責務 (Science for Society)** についてご講演されました。お二方の言葉は真の疫学研究とはどのようなものなのか、学会としての有り様も問われているように感じます。

世界に通用する精度の高いサーベイランスとは、全国規模のレベルで、しかも同一の手法を用いて継続してこそ意味のあるものと信じます。皆様には今後とも御協力いただけますようお願い申し上げます。

2012年2月8日
生方

サテライトセミナー

テーマ：急速な高齢化社会の到来と国際化に伴い変貌する市中型重症感染症：
—肺炎球菌とβ溶血性レンサ球菌—

開催日時：2012年1月21日（土）14:45～17:15

会場：パシフィコ横浜 第2会場（参加者約700名）

座長：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）
高橋 孝（北里大学大学院感染制御科学府 感染症学研究室）

演者：

1. 侵襲性肺炎球菌感染症の実態と分離株の分子疫学
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）
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
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）
3. 肺炎球菌性重症感染症に対する抗菌薬選択の実際
坂田 宏（旭川厚生病院 小児科）
4. 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—
村山 琮明（日本大学薬学部 分子細胞生物学研究室）
5. 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—
砂押 克彦（埼玉県衛生研究所 臨床微生物担当）
6. 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—
杉田 香代子（慶應義塾大学病院 感染制御センター）
7. 肺炎球菌ならびに *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) による重症感染症の自験例
田島 剛（博慈会記念総合病院 小児科）

サテライトセミナー開催にあたって： 今日的社会的背景



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

◆スライド1

厚生労働科学研究とは厚生労働省所管の研究であり、スライドに示す大きな4分野があります。それぞれの中は、いくつかの研究事業、そしてさらに研究テーマが細かく分けられています。

「新型インフルエンザ等新興・再興感染症」研究事業は、疾病・障害対策研究分野の中に含まれ、現在、57研究テーマが遂行されています。細菌やウイルス、耐性菌等が研究課題ですが、実にこの事業だけで29億近い国家予算が投入されています。
(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkyuuigyyou/hojokin-koubol6/18.html>)

これらの研究の特徴は行政施策へ反映される研究内容であることが要求されており、この点が文部科学省の科学研究とは本質的に異なるところです。

厚生労働科学研究

- 行政政策研究分野..... 5 研究事業:119 テーマ
- 厚生科学基盤研究分野 12 研究事業:266 テーマ
- 健康安全確保総合研究分野...6 研究事業:397 テーマ
- 疾病・障害対策研究分野.....13 研究事業:580 テーマ
- 「新型インフルエンザ等新興・再興感染症」研究事業:57 テーマ
細菌とウイルス, 耐性菌の疫学, 疾患解析など

行政施策へ反映される研究内容であることが要求される

◆スライド2

私どもの研究事業は、2期目となっております。

I期目は186医療機関のご協力で、2006年度・1年間の収集菌株が解析され、その成果は第21回の

本学会においてシンポジウムが開催されています。

今回はII期目ですが、現在341医療機関の方々のご協力を得て進行中です。

実施条件は、平素無菌的な検査材料由来株をtargetとしていること、莢膜型やPCRの結果は速やかにご返却すること、その替わり匿名化された最低限の情報を頂戴すること等です。

参加機関には、多くの労力を割いていただいておりますこと、この場をお借りいたしまして厚く感謝申し上げます。

研究課題とサーベイランスの組織

- ◆ 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
- ◆ 組織 (I期): 研究代表 (砂川慶介先生)
協力: 186医療機関 期間: 2006年度
- ◆ 組織 (II期): 研究代表 (生方)
協力: 341医療機関 期間: 2010年 ~
- ◆ 実施条件
 - ・平素無菌的な検査材料・由来株
 - ・莢膜型やPCR解析結果は速やかに各施設へ返却
 - ・匿名化された最低限の情報 (CDCのABCs様式)
 - ・各医療機関の承認

◆スライド3

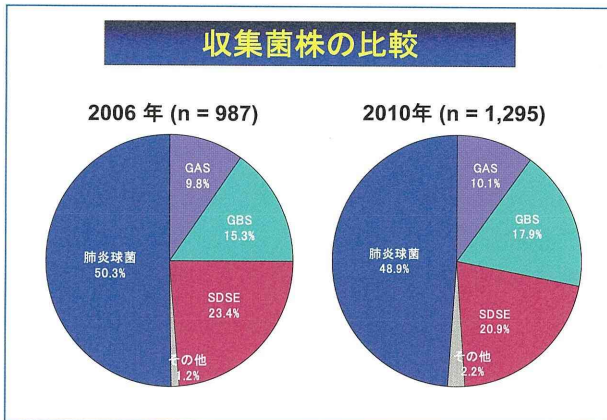
さて、各演者のご発表の中で対象となる菌株ですが、2010年度・収集株の1,295株がmainです。これらを2006年の987株と比較しながら、肺炎球菌は千葉菜穂子さんと荘司路さん、GBSは砂押克彦さん、そしてGASとSDSEについては杉田香代子さんに発表していただきます。

そして、肺炎球菌の症例については旭川厚生病院小児科医長の坂田宏先生、β溶血性レンサ球菌は(財

博慈会記念総合病院小児科医長の田島剛先生にお話をいただきます。

また、世界に先駆けてゲノム解析されたSDSEについて、他の菌種と比較しながら、日本大学薬学部准教授の村山琮明先生にお話をいただきます。

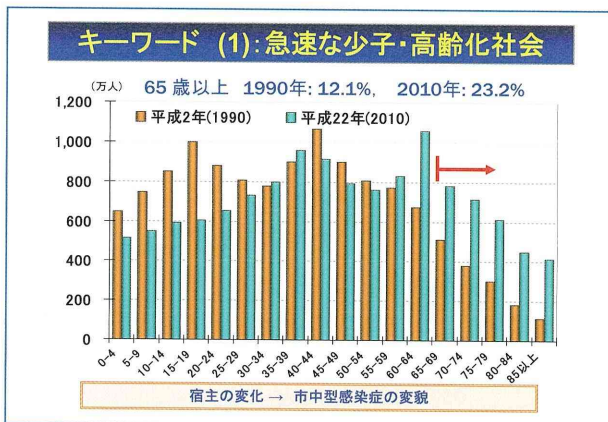
いずれも、将来の本学会を担っていく方々と期待し、研究に御協力いただきました。



◆スライド4

さて、このような市中型重症感染症が問題化している現実を理解するためのキーワードを3つ提示いたします。

ひとつは、急速な少子・高齢化社会の到来です。オレンジで示す約20年前、1990年には65歳以上は12%でした。しかし、2010年には実に23.2%、4人にひとりの割合となっています。背景にはもちろん医療の進歩があるわけですが、このような宿主側の変化が市中型感染症の変貌に繋がっています。

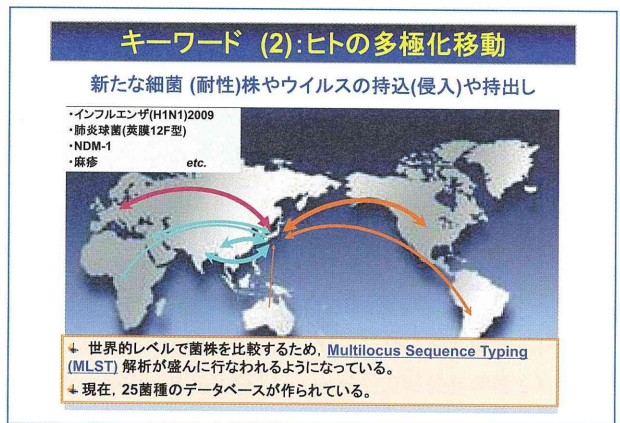


◆スライド5

キーワードの二つ目は、ヒトの多極化移動です。20年前の海外旅行状況を思い浮かべていただくとお判りいただけると思いますが、交通網の発達、経済活動の活発化・国際化に伴い、激しいヒトの移動が生じています。2009年のインフルエンザ(H1N1) 2009の世界的大流行に象徴されるように、呼吸器感染症の原因細菌もヒトの移動とともに、国外から持ち込まれ、また持ち出されています。

そしてひとたび新たな菌が持ち込まれますと、人口密度の高いわが国では瞬く間に全国へと拡散していきます。

このような細菌を世界的レベルで比較するために、近年 PFGE に替り、ゲノム上の7遺伝子 (housekeeping gene) 解析を行ってそのデータを世界の株と比較する新たな手法、すなわち Multilocus Sequence Typing (MLST) が盛んに行なわれるようになりました。この MLST サイトは CDC の管理下にありますが、現在 25 菌種のデータベースが作られています。発表の中でその手法とデータが紹介されます。



◆スライド6

第三のキーワードは、市中型感染症における原因菌の「耐性化と耐性率」に最も影響する外来処方抗菌薬の変化です。

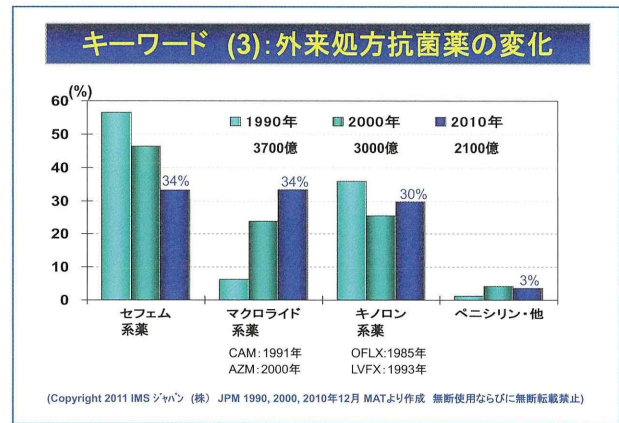
スライドは10年毎の成績ですが、抗菌薬の乱用が叫ばれた結果として、総売上高は3,700億から2,100億と半減しています。

各系統別の割合を見ますと、2010年にはセフェム系薬、マクロライド系薬、そしてキノロン系薬が

おおよそ30%ずつとなっています。ペニシリン系薬はわずかに3%です。 β 溶血性レンサ球菌の演者が話されると思いますが、これらの菌種は依然としてペニシリン系薬に対する耐性菌は存在していません（注：GBSのペニシリン軽度耐性菌は、成人の喀痰からわずかに分離されているのみ、砂押発表を参照）。

ちなみに、2007年の米国における同様の抗菌薬使用状況をみますと、ペニシリン系薬が40%弱、次いでキノロン系薬が30%を占め、マクロライド系薬とセフェム系薬の使用はそれぞれ15%と低いのです。

市中型感染症の原因細菌が、先ず肺炎球菌、インフルエンザ菌、マイコプラズマ、そして β 溶血性レンサ球菌であることを考えれば、米国の処方割合



は比較的妥当であるといえます。

このような社会的背景の変化を念頭におきながら各演者の講演をお聞きください。

侵襲性肺炎球菌感染症の実態と 分離株の分子疫学 —発症例の患者背景も含めて—



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

◆スライド1

解析対象株は、平素無菌的な検査材料からの分離菌，すなわち，侵襲性肺炎球菌感染症 (**Invasive Pneumococcal Disease: 略して IPD**) 由来株です。

先ほど生方教授が話された通り，2期に亘りサーベイランスが実施されています。I期・収集株は496株，II期はそれを上廻る633株と膨大な株数でした。

これらの菌について，スライドの5項目を解析しました。私はそのうちの1) 患者背景因子の解析，2) real-time PCR法による耐性遺伝子解析，3) 生物学的手法による薬剤感受性成績について発表致します。残りの項目は後の演者をご報告します。

解析の対象と項目

解析対象: **侵襲性肺炎球菌感染症由来株**
(**Invasive Pneumococcal Disease: IPD**)

I期: 菌株収集期間

- 2006年～2007年(1年間)
- 協力医療機関: n = 186
- 肺炎球菌: n = 496

II期: 菌株収集期間

- 2010～2011年(1年間)
- 協力医療施設 n = 341
- 肺炎球菌 n = 633

解析項目

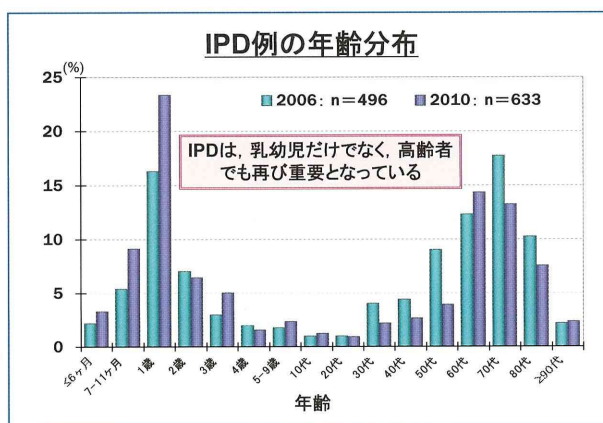
- 1) 患者背景因子の解析
- 2) real-time PCR法による耐性遺伝子解析
- 3) 生物学的手法による薬剤感受性測定
- 4) 荚膜型解析
- 5) **Multilocus Sequence Typing: MLST解析**

◆スライド2

発症年齢分布です。グリーンの2006年とブルーの2010年ともに，2峰性分布を示すことが特徴です。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歳児となっています。つまり，1歳以下の発症例が70%を占めていますが，

これはワクチン接種時期に密接に関連してきます。

一方，成人では30代から次第に症例数が増加し，60-70代にピークがみられます。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方が増加している現状において，IPDは乳幼児だけでなく，高齢者でも再び重要になっていると言えます。

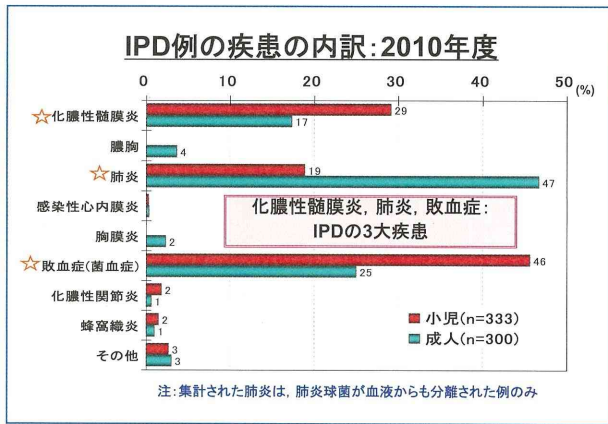


◆スライド3

疾患の内訳を小児と成人とに分けて示します。赤で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）の順です。その他には，蜂窩織炎，化膿性関節炎等もみられます。

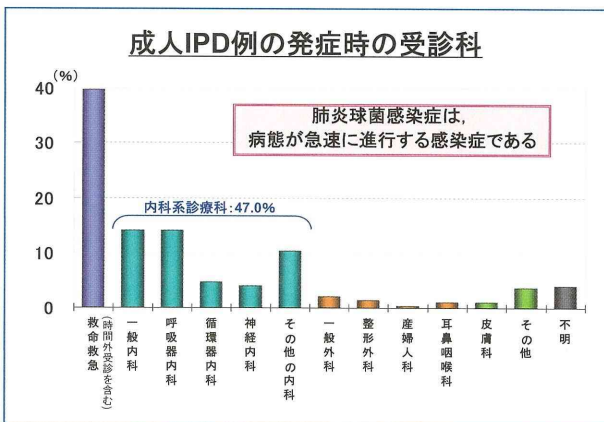
一方，グリーンで示す成人では肺炎が47%と最も多く，次いで敗血症，化膿性髄膜炎の順です。小児ではみられなかった疾患として，莢膜3型菌による膿胸や胸膜炎などがみられています。

全体としては，化膿性髄膜炎，肺炎，敗血症がIPDの3大疾患です。



◆スライド4

次に、このような症例が発症時に受診した診療科をお示しします。成人のみの成績です。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すが、注目されるのは、救急受診例（時間外受診含む）が40%も占めていることです。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」ことを承知し、検査も対応していく必要があります。



◆スライド5

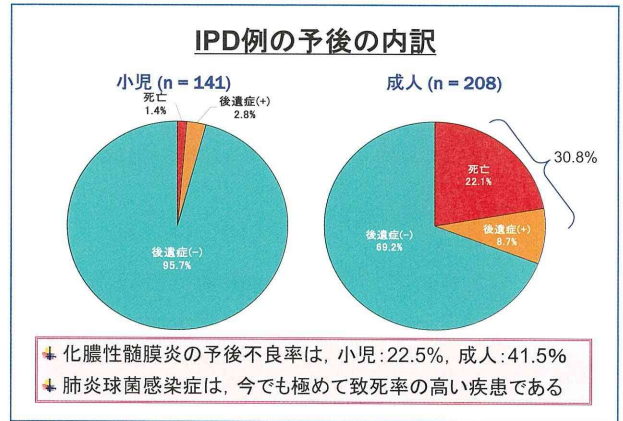
問題は発症例の予後ですが、小児と成人とに分けた成績を示します。

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%でした。右の成人では死亡が22.1%、後遺症を残した例が8.7%、合計30.8%と「予後不良例」の割合が極めて高くなっています。

乳幼児の場合には、急な発熱や全身状態の悪化に家族が気づき、タイムリーに受診していることが大きいと思われませんが、高齢者では自己判断で受診が

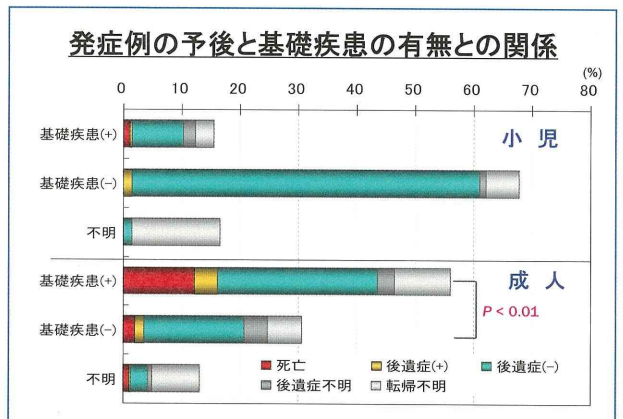
遅れがちとなりやすいと思われます。

ちなみに、化膿性髄膜炎のみに限った予後不良率は、小児で22.5%、成人では41.5%と、さらに高くなっています。肺炎球菌感染症は今でも極めて致死率の高い疾患といえます。



◆スライド6

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です。赤は死亡例、黄色は後遺症を残した症例です。両方を合わせて「予後不良例」とし、基礎疾患“あり”群と“なし”群とを比較しますと、下段の成人では、基礎疾患“あり”群で、予後不良例が「有意に多い」ことが示されています。



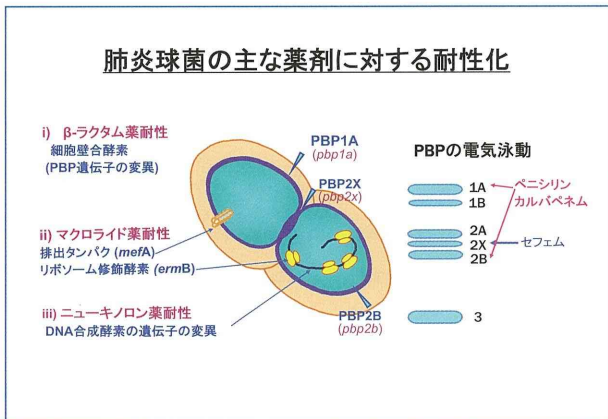
◆スライド7

肺炎球菌がどのような薬剤にどのようなメカニズムで耐性化しているのかを簡単にお示しします。

まず、β-ラクタム系薬に対する感受性の低下したペニシリン耐性肺炎球菌です。これらは細胞壁合成酵素のPBPをコードする遺伝子の変異によって

耐性化します。右に示すように、*pbp1a* と *pbp2b* 遺伝子変異はペニシリンとカルバペネム、*pbp2x* はセフェムの感受性低下に関与しています。

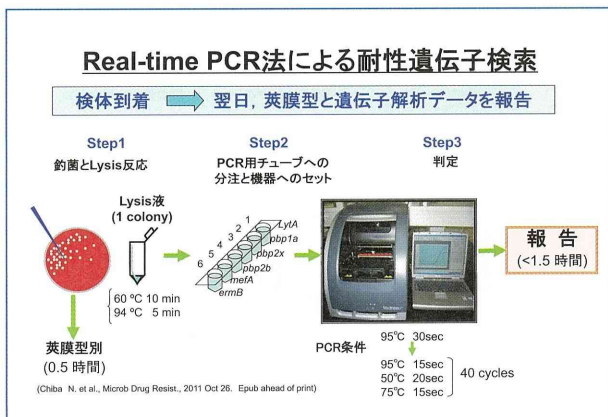
マクロライド系薬では、*mefA* 遺伝子による軽度耐性、*ermB* 遺伝子による高度耐性が問題です。ニューキノロン系薬の耐性では DNA 合成酵素の遺伝子変異が報告されています。



◆スライド 8

本サーベイランスでは、皆様から検体が届きますと、スライドの手順で遺伝子検索を行い、翌日には結果を報告するようにしています。髄膜炎等でお急ぎであれば、即日報告しています。

まず、コンタミがないことを確認するため、菌は羊血液寒天培地に塗布し、一晚 CO₂ 培養後、Lysis 液へ釣菌、溶菌させます。次いで、Lysis 液を PCR 反応液に分注、real-time PCR 機器へセットします。条件はスライドの通りです。結果はパソコン画面上に real-time で映し出されるため 40cycle を待たずに判定することが可能です。報告までの所要時間は

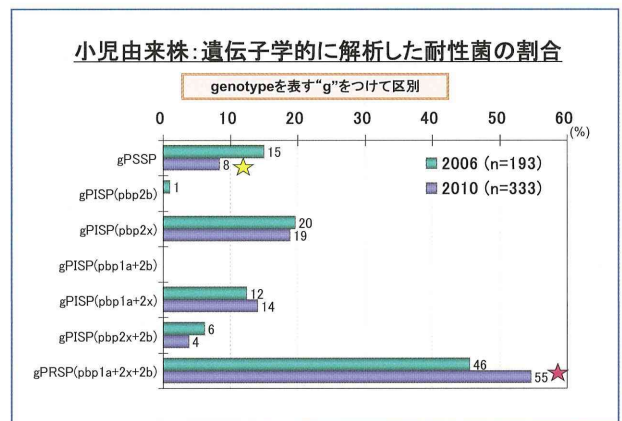


1.5 時間以内です。

◆スライド 9

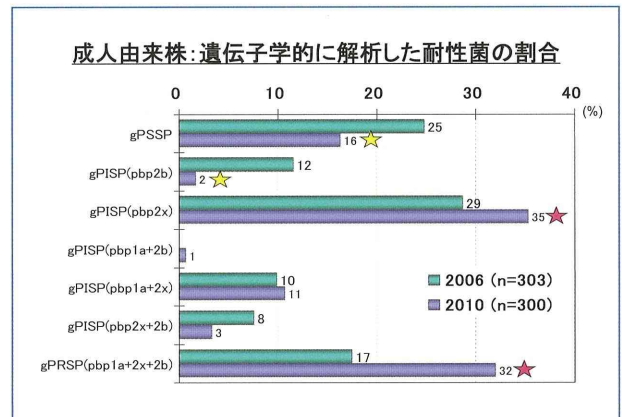
PCR にて解析した小児由来株の成績です。genotype を表す “g” をつけて生物学的結果と区別しています。gPRSP の割合は 2006 年の 46% から 55% へと増加しています。代わって、gPSSP が 15% からさらに 8% へと減少しています。

耐性菌が減少したとする報告もありますが、後述する CLSI のブレイクポイント (BP) 変更の影響と思われる、感性菌が増えているわけではありません。



◆スライド 10

成人由来株です。赤のスターで示した gPRSP の増加が著しく、17% から 32% へとほぼ倍増しています。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% へと増加しています。これに対し、2006 年に 12% と多かった *pbp2b* 変異株が 2% へと激減しています。これは、



後の演者（荘司）が詳しく述べますが、莖膜型 12F の減少が関連しています。

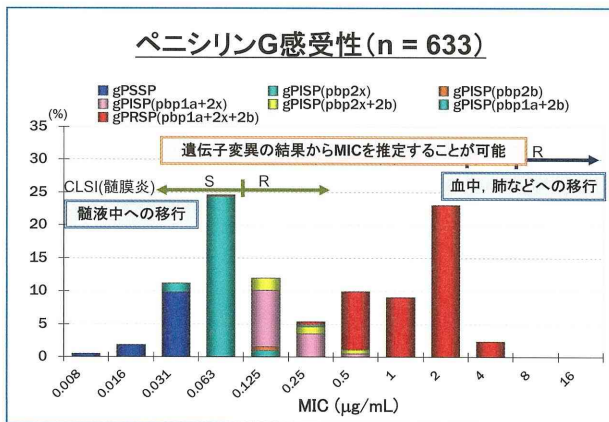
◆スライド 11

寒天平板希釈法で測定された PenicillinG (PCG) 感受性と、耐性遺伝子の成績を重ねたグラフです。

MIC 分布は曖昧な 2 峰性分布です。遺伝子変異はそれぞれカラーを違えて示していますが、それらはほとんどが 3 段階以内にはほぼ収まっていることがわかります。例えば、ピンクの *pbp1a+2x* 変異の gPISP は 0.125-0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、赤の gPRSP は 0.5-2 $\mu\text{g/mL}$ です。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す。

このグラフに CLSI のブレイクポイントを重ねます。CLSI では“髄膜炎”と“肺炎や敗血症などの非髄膜炎”に分けてブレイクポイントが設定されています。

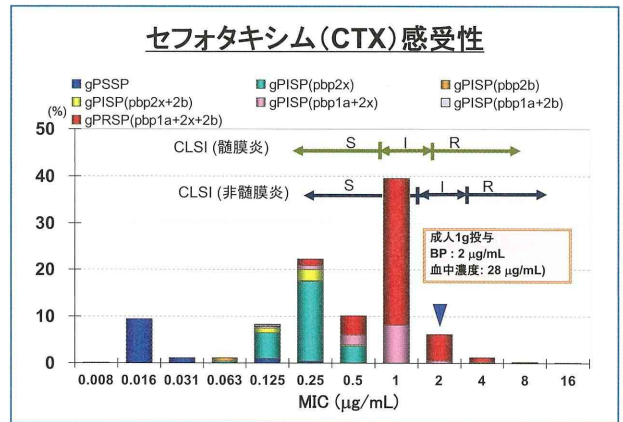
非髄膜炎では PCG が血中や肺などへ高濃度に移行するため、2 $\mu\text{g/mL}$ 以下の菌は“感性”，4 $\mu\text{g/mL}$ は“中間”，8 $\mu\text{g/mL}$ 以上が“耐性”となっています。しかし、化膿性髄膜炎では髄液への薬物移行が血中濃度の 10% 程度のため、MIC が 0.063 $\mu\text{g/mL}$ 以下のみが“感性”，0.125 $\mu\text{g/mL}$ 以上は“耐性”とみなして治療をするようにとリコmendされています。



◆スライド 12

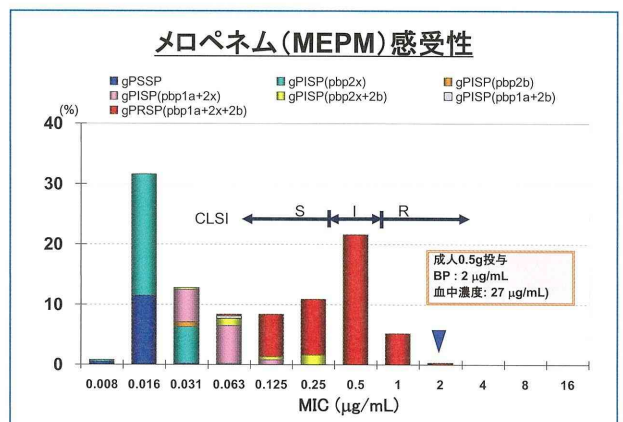
次に、使用される機会の多い Cefotaxime (CTX) の同様の成績を示します。MIC が 1 $\mu\text{g/mL}$ 以上の菌は遺伝子学的には gPRSP です。この薬剤にも“髄膜炎”と“非髄膜炎”に分けてブレイクポイントが

設定されていますが、髄膜炎の“S”が 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、非髄膜炎が 1 $\mu\text{g/mL}$ 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ります。そして、非髄膜炎では“R”は 4 $\mu\text{g/mL}$ 以上です。日本化学療法学会が肺炎にリコmendした感性菌が多かった時でも臨床的ブレイクポイントは 2 $\mu\text{g/mL}$ でした。日本のブレイクポイントは 80% の臨床の有効率が得られると推定される 1 濃度表記となっています。



◆スライド 13

次に重症例に対し、カルバペネム系薬の中で最も多く使用されている Meropenem (MEPM) の成績を示します。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ません。先ほどの CTX は非髄膜炎に 4 $\mu\text{g/mL}$ 以上が“R”でしたが、MEPM では 1 $\mu\text{g/mL}$ と逆転しています。また、日本化学療法学会のブレイクポイントとも乖離があります。ちなみに、成人 0.5g 投与時の最高血中濃度は 27 $\mu\text{g/mL}$ で、髄液中には

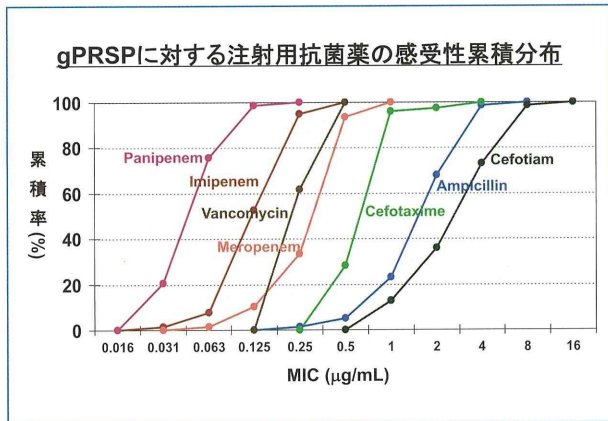


その20%の5.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度とされています。

◆スライド 14

我が国で使用頻度の高い主な注射用抗菌薬のgPRSPに対する感受性累積分布を示します。抗菌力が優れているのはカルバペネム系薬です。中でもPAPMは0.063-0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と最も優れています。それに比してMEPMは8倍劣っています。

第三世代セフェムのCTXは0.5-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ です。CTMに代表される日本で開発されたセフェム薬の抗菌力は、さらに劣っています。これらの中からの抗菌薬の選択に際しては、それぞれの抗菌薬のヒトにおける体内動態 (PK/PD)、薬剤の殺菌性の強弱、病巣の違い、基礎疾患の有無、重症度等に応じた配慮が必要と思われます。

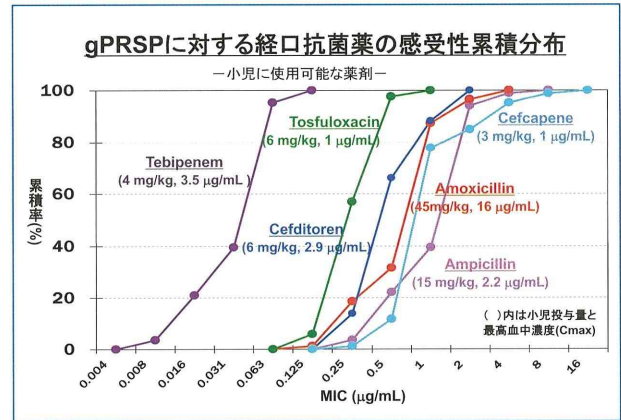


◆スライド 15

肺炎球菌やインフルエンザ菌は呼吸器系に生息し、常在細菌の一面も持つ菌です。このため、耐性菌の増加には経口抗菌薬の影響が大きいのと思います。スライドはgPRSPに対する主な経口薬の感受性累積分布ですが、これらの成績はそれぞれの薬剤を服用した後に得られる血中あるいは病巣中への移行濃度と関連付けて眺める必要があります。

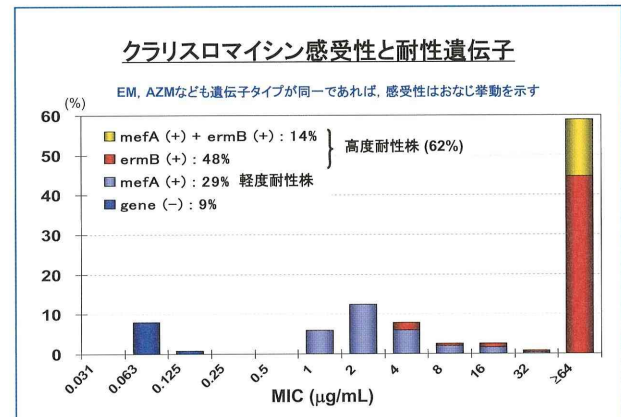
成績は小児ですが、薬剤名に続くカッコ内には、投与量と最高血中濃度を示しています。例えばAmoxicillin (AMPC)は、セフェムに比べ投与量も非常に多いので、高い血中濃度が16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が得られます。つまり、累積曲線がほぼ同じであれば、移行性に優れた薬剤の方が臨床効果は確実に期待できることになります。

近年、小児のPRSPやBLNAR感染症に対して、Tebipenem (TBPM)とTosufloxacin (TFLX)が承認されました。抗菌力に差があることと同時に、血中移行濃度に対する配慮も必要です。



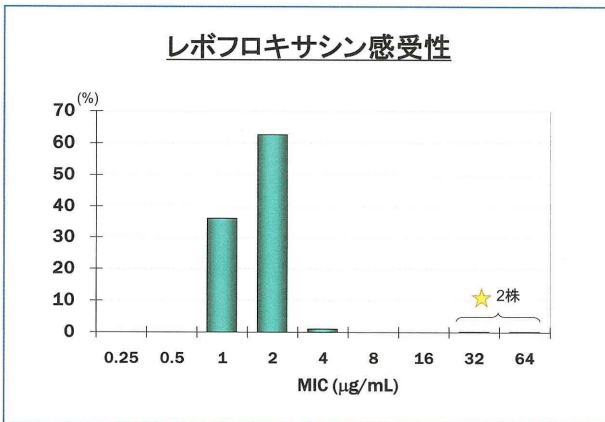
◆スライド 16

マクロライド系薬に対する耐性菌の割合は高い状況が続いています。スライドはCAMの成績ですが、その他のEM、AZMも同様です。全体の62%が赤と黄色で示すermB保持の高度耐性株、29%がmefA保持の軽度耐性株です。実に90%以上が耐性菌です。



◆スライド 17

ニューキノロン系薬の中で最も多く使われているLevofloxacin (LVFX)の成績を示します。遺伝子変異を有するMICが8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の菌は1%未満です。しかし、近隣の香港では10%以上、韓国でも3%分離されたという報告があります。今後の動向に注意すべきだと思います。



◆スライド 18

サマリーです。肺炎球菌は市中型感染症の中で最

も重要な細菌です。今後とも正確な全国的サーベイランスが行なわれることを期待したいと思います。

SUMMARY

- 肺炎球菌感染症(IPD)は、乳幼児のみならず、高齢者(≥65歳)でも問題の疾患である。
- 小児、成人ともに、依然としてgPRSPが増加している。
- 我が国独自のブレイクポイントの設定が必要である。
- 耐性化状況を踏まえ、適応菌種の見直しが必要である。
- 将来、CTX高度耐性(16 μg/mL)、キノロン耐性(≥16 μg/mL)菌の増加が危惧される。



正確な継続的サーベイランスが必要である

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



莊司 路

国立がん研究センター中央病院 病理科・臨床検査科

◆スライド1

ペニシリン耐性肺炎球菌，すなわち PRSP が最初に注目されたのは，ペニシリン系薬が多く使用されてきた南アフリカおよび欧米からです。このため，予防としてのワクチン開発が早い段階から試みられ，23 価 polysaccharide vaccine (23 価ワクチン)，7 価結合型ワクチン (7 価ワクチン) が開発されてきました。小児用 7 価ワクチンは，既に 100 カ国以上で接種化されています。しかし，その普及に伴い，分離菌の莢膜型が変化してきていることが世界的に問題となっています。

他方，我が国では，2010 年「ワクチン接種緊急促進事業」により，i) 小児用 7 価ワクチン，ii) Hib ワクチン，そして iii) ヒトパピローマウイルスワクチンが公費助成の対象となりました。そのため，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ます。

この目的に添い，研究事業によって収集された肺炎球菌の i) 莢膜型別，ii) 薬剤耐性型，iii) MLST 解析について，研究協力者としてお手伝いをいたし

ました。

◆スライド2

私共が実施している莢膜型別法です。一晚血液寒天培地で培養した菌は，MH broth で McFarland 1 に調整し，その 150 μ L をメチレンブルー 300 μ L と混和後，スライドガラス上に 1 滴ずつ落として薄く広げて乾燥させます。乾燥後抗血清を滴下した後カバーガラスを載せ，光学顕微鏡下 ($\times 1,000$ 倍) で莢膜膨化の有無を観察します。右の写真で濃青色に染まっている部分が菌体，その外側にハローを形成している部分が膨化した莢膜です。

莢膜は菌体の一番外側に存在する多糖体物質であり，最も重要な病原因子です。莢膜型は現在 93 種類と多く，このような菌は肺炎球菌のみです。

莢膜型別の方法(変法)と膨化像

菌液 (MH broth) McFarland 1.0
↓ 150 μ L
メチレンブルー 300 μ L
↓
乾燥後，抗血清滴下 → 光学顕微鏡

莢膜型: 93種類

背景と目的

諸外国

- ✦ PRSPの出現 → 予防用ワクチン開発
- ✦ 23価ワクチン(1988年)と7価結合型ワクチン(2000年)
100カ国以上で接種承認
- ✦ ワクチン普及 → 分離菌の莢膜型が変化

日本

- ✦ 「ワクチン促進事業(2010年)」: ① 7価結合型ワクチン，② Hibワクチン，③ パピローマウイルスワクチン
- ✦ 「ワクチン効果」を明らかにすることが急務となる。

①莢膜型別，②薬剤耐性型，③MLST解析

◆スライド3

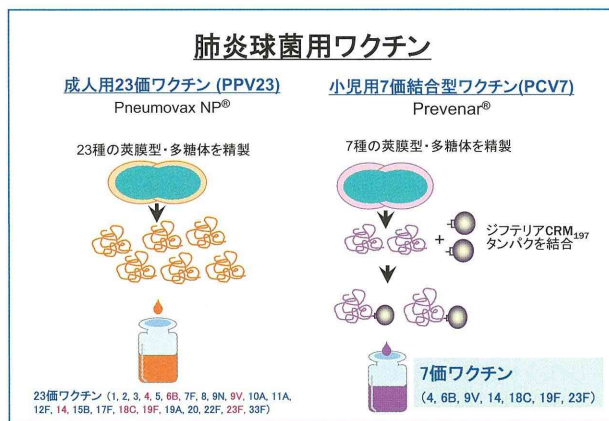
肺炎球菌ワクチンは，そのような莢膜を抗原として作られていますが，莢膜の種類があまりにも多いため，世界レベルの疫学情報に基づいてワクチンが

開発されています。

スライドは、現在日本で使用できる2種類のワクチンです。一つは、米国で早くに開発された23種の精製した莢膜を抗原として含む、23価ワクチンです。接種対象は主に成人です。

もう一つは、2000年に米国で認可された7価ワクチンです。4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23Fのそれぞれの莢膜多糖体を精製し、それに無毒化したジフテリア毒素タンパクを結合させて抗原性を高めたものです。

現在、日本では申請中とのことですが、世界的には次世代型の13価ワクチンが承認され、既に使われ始めています。



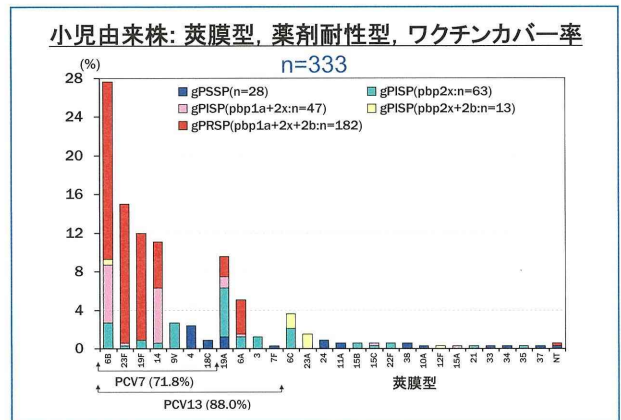
◆スライド4

まず、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示します。スライドは左から7価ワクチンに含まれる莢膜型を分離頻度の高い順に、次いで13価ワクチンに含まれる型、そしてワクチンに含まれない型と並べています。

6B型が27.6%と圧倒的に多く、次いで23F, 19F, 14型の順となっています。またこれらの型には、赤で示したgPRSPの多いことが判ります。欧米で比較的多い9Vや4型等の分離は、日本ではそれほど多くありません。この成績から7価ワクチンのカバー率を算出しますと、71.8%となります。

注目されるのは、欧米で7価ワクチン導入後にその増加が問題となった莢膜型19Aと6Aが既にかなり分離されていることです。しかもgPRSPが認められます。両型とも次の13価ワクチンでない

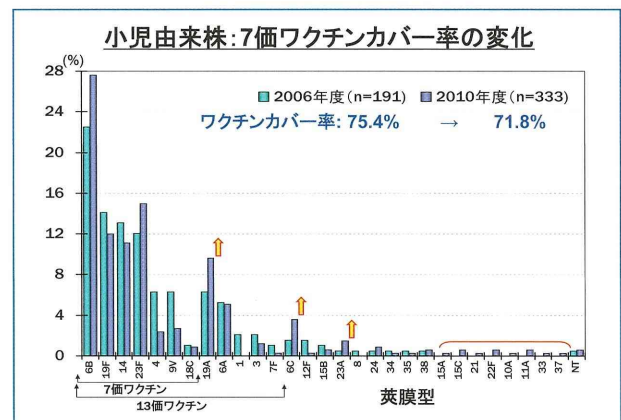
とカバーできません。



◆スライド5

グリーンで示す2006年度に実施された全国サーベイランスの成績と、ブルーで示した今回の成績とを比較したものです。上向きの矢印で示した19A, 6C, 23A型が増えていることが判ります。これらの型は7価ワクチンでカバーできないため、カバー率が2006年の75.4%から71.8%へと低下しています。

また、赤いカッコでくくった莢膜型は以前には分離されておらず、莢膜型は次第に多様化してきていることが判ります。



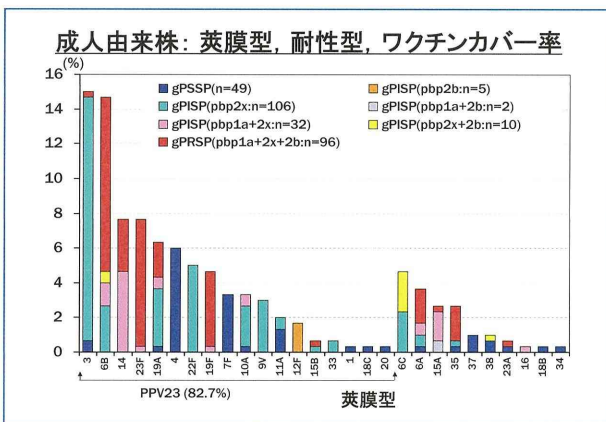
◆スライド6

次に、成人由来株での薬剤耐性型と23価ワクチンのカバー率を示します。スライドは左から23価ワクチンに含まれる莢膜を分離頻度の高い順に並べてあります。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型が突出して多くなっていま

す。次いで14, 23F, 19A, 4, 22F, 19Fの順でした。現在の23価ワクチンカバー率は82.7%となります。

ここに示すように、成人では3, 4, 22Fは比較的多いのですが、先の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、ということになります。

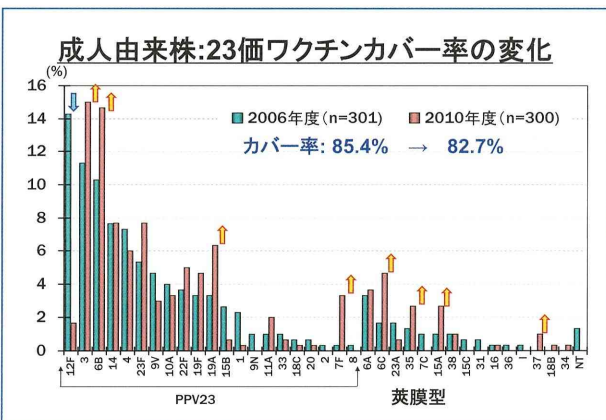
このような莢膜型の違いは、先の演者がお示しした耐性菌の割合が小児と成人で有意に異なることと密接に関連しているのです。



◆スライド7

グリーンで示す前回2006年のサーベイランス成績と、オレンジで示す今回の莢膜型の成績とを比較したものです。

最も注目されるのは、青の矢印で示した12F型です。2006年には成人由来株で最も多く分離されていましたが、今回は激減しています。当時、12F型菌が我が国の成人の間で大流行していたと思われます。



一方、上向きの矢印で示した型は、今回明らかに増加しているタイプです。3, 6B, 19A, 7F, そして23価ワクチンではカバーできない6C, 35, 15A型も増加し、多様化してきています。このことを反映し、ワクチンカバー率は2006年の85.4%から82.7%へと低下しています。

◆スライド8

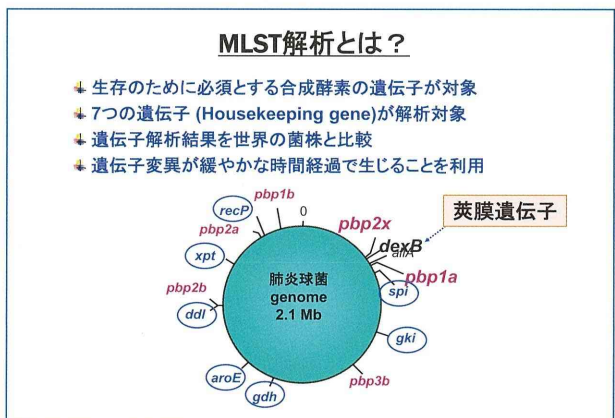
次に Multilocus Sequence Typing, 略して MLST 解析の成績についてお話しします。

近年、菌の疫学情報を世界的に比較共有するため、PFGE解析に替ってMLSTによる遺伝子レベルでの解析が盛んに行なわれるようになってきました。

MLST解析には、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遺伝子が対象となっています。しかも7つ遺伝子 (housekeeping gene) を対象とします。そしてその解析結果を世界の菌株と比較するのです。

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のです。

スライドに青丸印をつけた肺炎球菌の7つの遺伝子は、ゲノム上に散在するように選択されています。また、後で大変重要になりますが、2時の位置にある莢膜遺伝子の *dexB* は、*pbp2x* と *pbp1a* 遺伝子に挟まれて存在しています。

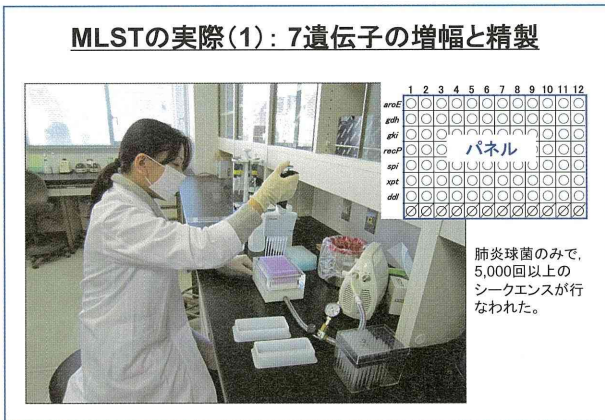


◆スライド9

写真は、実際に7遺伝子をPCRで増幅し、精製しているところです。ひとつのパネルで7遺伝子×12株の解析を効率的に行います。この後、シーク

エンス（塩基解析）を行なっています。最終的には、収集株の7割に相当する470株という膨大な解析を行いました。

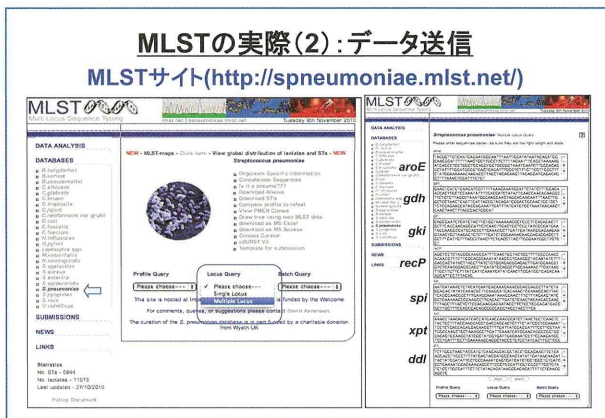
MLSTの実際(1): 7遺伝子の増幅と精製



◆スライド 10

解析されたデータは、インターネット上にある“MLST サイト”の肺炎球菌のデータ入力画面を開き、右のように7遺伝子のデータを貼り付けて送信します。そうしますと、その送信データはサイトのデータベース情報と瞬時に照合され、次のスライド11に示す結果画面が表示されます。

MLSTの実際(2): データ送信 MLSTサイト(<http://spneumoniae.mlst.net/>)



◆スライド 11

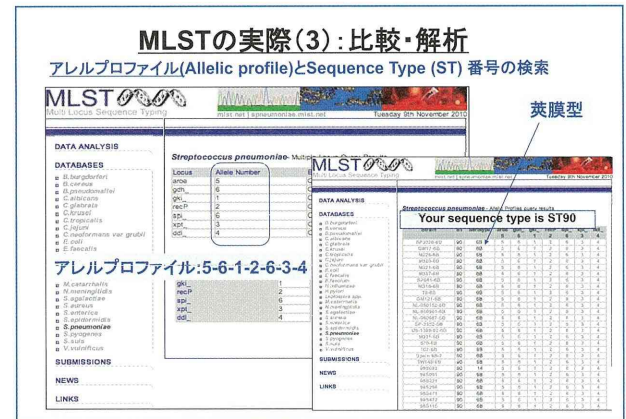
これが結果画面です。左側に7遺伝子の名前とその遺伝子番号が入っています。この菌株ごとの7遺伝子番号の組み合わせをアレルプロファイルといいます。このアレルプロファイルから、その菌株のSequence Type (ST) 番号右のように表示されます。ここで重要なのは、該当するST番号株の一覧が表示されることです。つまり、自分の解析した株

が既に登録されている株と同じなのか否かが判ります。既に報告されている場合には、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事ができるのです。

つまり、世界の菌株と共通性があるのかないのかを明らかにすることができます。

MLSTの実際(3): 比較・解析

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



◆スライド 12

現在、肺炎球菌のSTは7,800以上と膨大な数に達しています。それだけ肺炎球菌の遺伝子は変異しやすいということです。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ます。これをClonal Complex (CC) と呼びます。この解析には、eBURST と呼ばれる解析ソフトを用います。

遺伝子レベルで類似性が高いことは、菌の進化の過程や共通性を推測することができるかとされています。

MLST結果の解析

- ✦ ST番号は7,840以上と増え続けている。
- ✦ アレルプロファイル(遺伝子群)の類似性によってグループ化 → Clonal Complex
- ✦ eBURST (Electronic Based Upon Related Sequence Types)と呼ばれる解析ソフトを使用



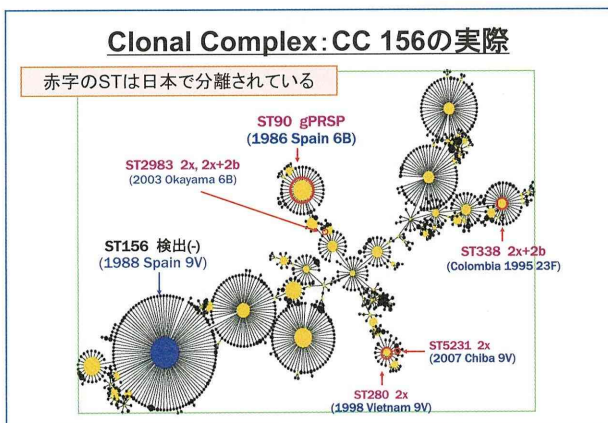
Clonal Complex (CC)

7つの遺伝子の類似性が高いことは、菌の進化の過程や共通性を推測することができる

◆スライド 13

1例として、日本ではgPRSPに多い **Clonal Complex 156** の全体図を示します。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す。

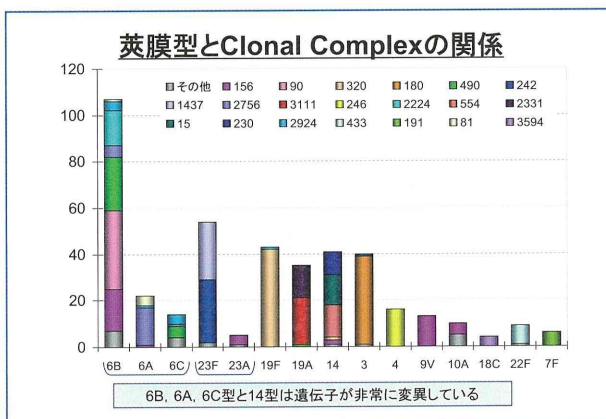
世界的にはスペインから登録されている ST156 が多いのですが、日本で多いのはやはりスペインから登録されている ST90 です。その他に、コロンビア登録の ST338、ベトナム登録の ST280 も認められます。これらの成績をみますと、薬剤耐性型や莢膜型が複雑化しており、肺炎球菌は非常に遺伝子変異が起りやすいことが判ります。



◆スライド 14

解析した中で、株数の多い莢膜型と Clonal Complex の関係について示します。横軸に莢膜を示しています。

Clonal Complex が異なるものを、棒グラフのなかでさまざまな色に塗り分けています。今回、最も菌数が多かった莢膜 6B 型では、8 種類の Clonal



Complex が認められ、さらに 6A, 6C 型でも 4 種類の Clonal Complex が認められました。つまり、6 型関連で 12 の CC に属する株が分離されていることになります。また、莢膜 14 型でも 6 種類の Clonal Complex が認められます。

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 は比較的均一です。

この成績をみますと、重症感染症で最も重要な莢膜 6 型、そして肺炎例からの分離が多い 14 型の菌が遺伝子学的にみると非常に変化してきていることが判ります。

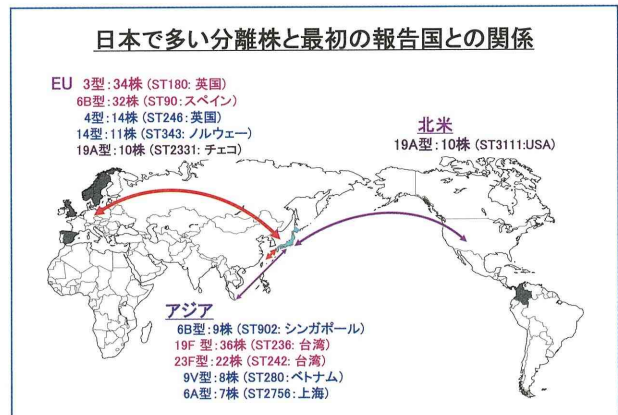
◆スライド 15

日本で分離された肺炎球菌のうち、株数の多い 11 の ST 型について、それらが最初に報告された国はどこなのか、日本との関連性について示します。

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 です。莢膜 3 型 ST180 は英国で報告されています。一方、PRSP がほとんどを占める莢膜 19F は台湾から報告された ST236, 23F 型の ST242 も台湾株と共通しています。14 型はノルウェーから報告されている ST343 と共通していました。

注目されるのは莢膜 19A 型です。7 価ワクチン導入後に米国で増加したと報告されているこの型は、米国株の ST3111 と同じです。その他にチェコから報告されている ST2331 も同数認められます。つまり、両方から日本へ入ってきていることが示唆されます。

結論を申しますと、「地球規模での人々の激しい



移動とともに、菌の拡散も容易に生じている」ことを示しています。

◆スライド 16

MLST 解析と莢膜型の解析から、新たな現象が現在注目されています。

それは、Brueggeman らによって報告された莢膜をコードする遺伝子の組換え、すなわち **Capsular Switching** と呼ばれる現象です。最初に明らかになったのは莢膜 4 型から 19A 型への変化でした。

莢膜遺伝子の組換え: Capsular Switching

莢膜をコードしている領域 (Capsular locus) の DNA 組換えにより莢膜型が変化 = Capsular Switching

↓ Brueggeman *et al* (PLoS Pathog, 2007)

- 1999年: ST695の莢膜4型株 (ワクチンタイプ)
- 2000年: 肺炎球菌7価ワクチンの導入(USA)
- 2003年: ST695の莢膜19A型株が出現

◆スライド 17

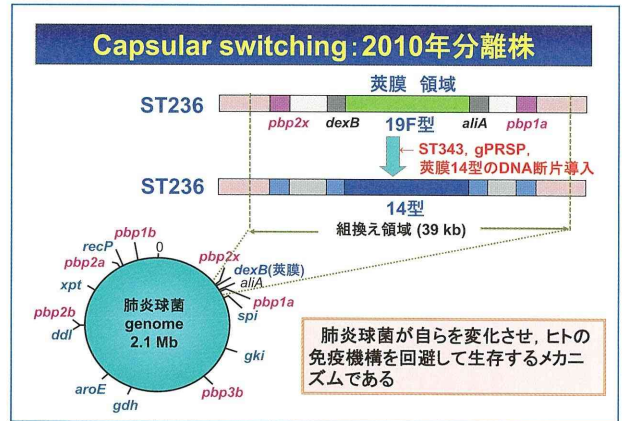
遺伝子組換えによる莢膜型の変化を図式化したスライドです。

ST236 で莢膜 19F 型の肺炎球菌が、ST 型が異なる莢膜 14 の菌株の遺伝子を取り込んで、ST236 の莢膜 14 型株になった、すなわち遺伝子組換えを起こしたということです。

しかも、両端には *pbp2x* と *pbp1a* 遺伝子があり、それらも同時に組換えを起こす場合があります。

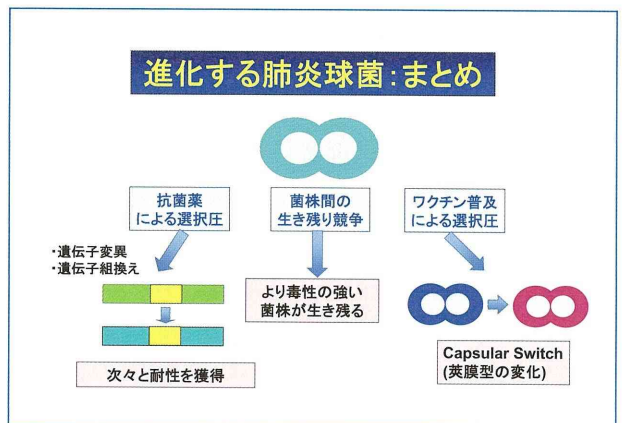
このような莢膜組換え現象は GBS でも生じてい

るようですが、肺炎球菌で最も多くみだされています。**Capsular Switching** は、肺炎球菌が自らを変化させ、ヒトの免疫機構を回避して生存するというメカニズムです。



◆スライド 18

肺炎球菌の進化をまとめた図です。より病原性の高い菌、あるいは抗菌薬の選択圧による耐性化に加え、ワクチン導入後には莢膜型の変化にも注視していく必要があります。



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



砂押 克彦

埼玉県衛生研究所 臨床微生物担当

◆スライド 1

GBS による侵襲性重症感染症は、先ず産道感染に起因する新生児の敗血症と化膿性髄膜炎が問題となります。感染形態は生後6日以内に発症する早発型 (early onset) と、それ以降3ヶ月までの遅発型 (late onset) とに分けられます。新生児 GBS 感染症は予後不良となりやすいことから、日本産科婦人科学会により「感染症予防対策のガイドライン」が作成され、妊娠後期の妊婦に対して保菌検査が実施されるようになりました。

もうひとつは、高齢者における敗血症あるいは化膿性髄膜炎等です。急速な高齢化社会を迎えた我が国では、GBS の分離頻度が高まっているようにみられます。

このような背景から、サーベイランスによって収集された GBS 株について、i) 患者背景、ii) 病原性因子としての荚膜型、iii) MLST 解析、および iv) 薬剤感受性の測定を行い、発症例の背景ならびに重症化要因について明らかにすることを目的としました。

GBS感染症の背景と目的

新生児

- 感染症: 敗血症と化膿性髄膜炎が主体
- 感染形態: 生後6日以内(早発型) / 7日-3ヶ月(遅発型)
- 予防対策: 妊娠後期の検査

高齢者

- 感染症: 敗血症や化膿性髄膜炎など多彩
- 感染形態: Urosepsisも多い
- 分離頻度: 高まっている?
- 喀痰由来株: β -ラクタム系薬耐性菌が出現



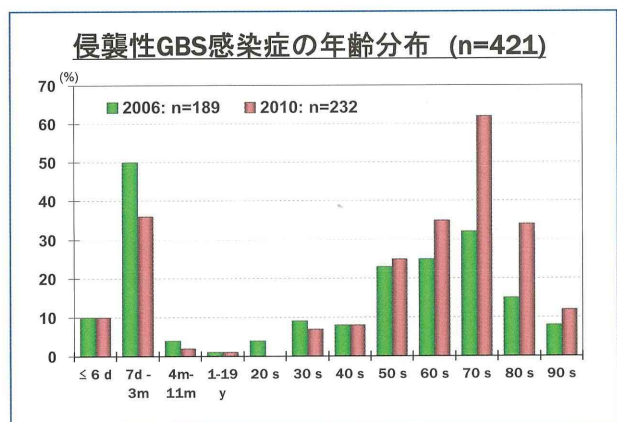
i)患者背景, ii)菌の荚膜型, iii) MLST解析, iv)薬剤感受性

◆スライド 2

侵襲性感染症例の年齢分布です。

2006 年の 189 例と 2010 年の 232 例のそれぞれの年齢分布を示しています。いずれも明らかな 2 峰性で、生直後から 1 歳未満と、50 歳代以降、とくに 70 歳代にピークを有する高齢者に分けられます。

新生児の発症例では、早発型は少なく、生後 7 日以降の遅発型発症例が圧倒的に多いことが注目されます。これに対し、成人高齢者の GBS 感染症は、高齢化社会を反映し、70 歳以上の発症例が次第に増加しているように思います。



◆スライド 3

GBS 感染症の年齢と疾患との関係を見た成績です。

疾患は赤の化膿性髄膜炎、パープルの敗血症、黄色の心内膜炎、ピンクの化膿性関節炎、グリーンの蜂窩織炎、そしてグレーのその他とに区別しています。

新生児ではほとんどが髄膜炎と敗血症でした。一