

表-1 非ワクチンタイプ(NVT)のgPRSPについてのMLST解析

Serotype	Clonal complex	n	ST (n: PMEN clone)	Origin
19A	3111	5	3111(5)	Alaska
	320	1	320(1)	Norway
15A	63	11	63(10: Sweden <sup>15A</sup> -25), <b>8354(1)</b>	Sweden, Japan (in this study)
15C	81	1	83(1)	Taiwan
35B	558	4	558(4)	New York

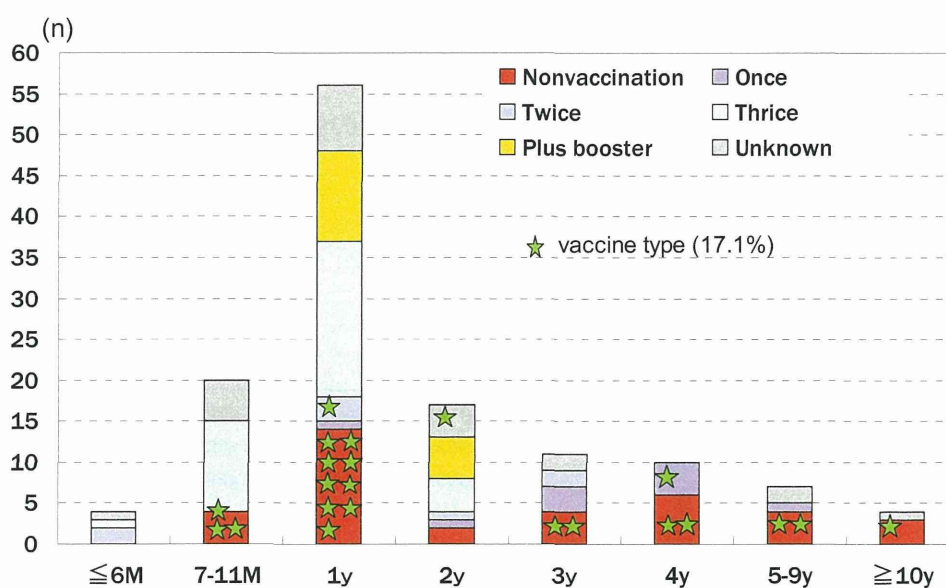


図-5 小児の年齢分布とワクチン接種回数

## 分担研究報告書

### 全国規模で収集した侵襲性感染症由来 A 群および C 群, G 群レンサ球菌の 分子疫学解析：流行菌の細菌学的解析と患者予後予測因子の検討

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 特任教授  
研究協力者 輪島 丈明 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 研究員  
研究協力者 千葉菜穂子 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 研究員  
研究協力者 諸角美由紀 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 研究員

#### 研究要旨

1. 2012年4月から2013年2月末日までに、全国343医療機関の協力により侵襲性感染症由来 A 群レンサ球菌(GAS)および C 群, G 群レンサ球菌(SDSE)がそれぞれ91株と184株収集された。
2. 菌の *emm* 型は昨年度と同様で GAS では *emm1* 型が34.4%と最も多く、SDSE は *stG6792* 型が28.8%と優位であった。一昨年度から増加傾向を示した GAS の *emm89* 型株は本年度も *emm1* 型に次いで多く分離されていた。
3. GAS に  $\beta$  ラクタム系薬耐性株は認められなかったが、マクロライド系薬に対する耐性株は54.4%と以前の成績と比較すると優位に増加していた。特に、*emm1* 型株の92.2%が *mef(A)* を保持しているマクロライド耐性株であった。キノロン系薬に対する耐性株は15.2%で、耐性率に変化はなかった。
4. GAS 症例について臨床検査値と患者背景因子の多変量解析から年齢が65歳以上、疾患名がSTSSまたは壊死性筋膜炎であること、クレアチンキナーゼ・血清クレアチニンの上昇、白血球・血小板数の低下が有意に予後不良に関係していた。多変量解析結果を元に、予後推定のためのスコアリングモデルを作成した。
5. 以上ことから、GAS の型及び抗菌薬感受性は刻々と変化を遂げていることが推定された。今後もこれらの動向を監視するとともにスコアリングモデルの評価を行う必要があると結論された。SDSE については現在同様の解析を行っている。

#### A. 研究目的

A 群溶血性レンサ球菌(GAS)は重篤な侵襲性感染症を引き起こすことが知られている。特に劇症型レンサ球菌感染症は致死率が約40%と高い。GAS による重篤な侵襲性感染症については様々な解析がなされているが、疫学情報に基づいた患者背景や臨床検査値などの詳細な解析はなされていない。

一方、高齢化社会を迎えたわが国では、GAS だけではなくこれまで病原性が低いと

された C 群, G 群レンサ球菌(*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: SDSE)による重篤な侵襲性感染症も増加しており、その病態の解明が急務である。

このような背景から、本研究では対象を GAS および SDSE による侵襲性感染症とし、流行株の細菌学的解析と、同時に収集した患者背景因子や入院時臨床検査値の成績を用いてリスク要因の統計学的解析を行った。

## B. 研究方法

### 1) 収集菌株

前年度に引き続き侵襲性感染症部位より分離された GAS および SDSE を収集した。2012 年 4 月から 2013 年 2 月末現在で収集菌株数は、GAS が 91 株、SDSE が 184 株であった。同時に、匿名化した上で患者年齢や性別、基礎疾患などの背景因子及び入院時臨床検査値をアンケート用紙にて収集した。

### 2) 解析項目

#### i) 収集菌株の型別

*emm* 遺伝子型別は、米国疾病予防管理センターが公表している手法を用いた。また、各菌株の遺伝学的背景は Multilocus sequence typing を用い比較解析した。

#### ii) 各種抗菌薬感受性 (GAS)

抗菌薬感受性は、CLSI の基準に従い寒天平板希釈法で行った。

#### iii) 耐性機構の決定 (GAS)

マクロライド系薬の耐性機構は *mef* (A), *erm* (A), *erm* (B) 遺伝子の検出を PCR 法で行った。フルオロキノロン系薬の耐性機構は、標的タンパクをコードする遺伝子のキノロン耐性決定領域の配列中の変異の有無を検討し決定した。

#### iv) 患者予後規定因子の検討 (GAS)

昨年度までに収集した症例を合わせ、調査により得られた患者背景および臨床検査値の値からロジスティック回帰分析を行い予後に関連した因子の推定を行った。

### (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に、あらかじめ連結不可能匿名化を行って菌株とアンケート用紙の回収を行った。また、各医療機関の長、あるいは検査部の長に対し、疫学調査の内容を開示し、あらかじめ許可を受けた。従って、研究成果の公表にあたり個人

情報が含まれることはない。

## C. 研究結果

### 1) 収集菌株

収集された侵襲性 GAS 感染症例の年齢別疾患分布を図 1a に示す。患者年齢の中央値は 55 歳であり、疾患は皮膚および軟部組織感染症が最も多く (n=28) 次いで敗血症 (n=25) 壊死性筋膜炎 (n=12), 劇症型感染症 (n=7) の順であった。一方、侵襲性 SDSE 感染症では、患者年齢の中央値が 79 歳で GAS とは有意に異なっていた ( $P<0.001$ )。疾患は皮膚および軟部組織感染症が最も多く (n=72) 次いで敗血症 (n=57) と GAS と同様であったが、壊死性筋膜炎などの症例は少なく、変わりに肺炎 (n=14) や関節炎 (n=11) が多く認められた (図 1b)。致死率は、GAS で 25.9%, SDSE で 17.0%であった。

### 2) 分離菌の *emm* 型

図 2a には侵襲性感染症由来 GAS の *emm* 型の結果を示す。*emm1* 型が 34.4% (n=31) と最も多く、次いで *emm89* 型 (n=17, 18.9%), *emm28* 型 (n=9, 10.0%) であり、昨年度と同様の順であった。SDSE に関しても、図 2b に示すように、*stG6792* 型が 28.8% (n=53) と最も多く、次いで *stG485* 型 (n=23, 12.5%), *stG245* 型 (n=20, 10.9%) であり、同様の順であった。

### 3) GAS の薬剤耐性化の現状

$\beta$  ラクタム系薬に対する耐性菌は認められなかった。しかし、マクロライド (ML) 系薬剤に対する耐性菌は 54.4% を占めていた。2006 年にはその割合は 20% であり有意に増加していた。ML 耐性機構は構成型および誘導型 23S リボソーム RNA メチラーゼと ML 排出タンパクによるものであった。特に、*emm1* 型の 92.2% が排出タンパクを保有する ML 耐性株であった。マクロライド (ML) 系薬剤に対する耐性菌が 54% を占め、2006 年

には 20%であったことから有意に増加していた。その耐性機構は構成型および誘導型 23S リボソーム RNA メチラーゼと ML 排出タンパクによるものであった。特に、*emm1* 型の 92.2%が排出タンパクを保有する ML 耐性株であった。フルオロキノロン系薬に対する耐性株は 15.2%と以前の報告と有意な差は認められなかった。

#### 4) 症例の背景因子解析

3 年間に収集した症例の情報を基に、予後不良を目的変数としロジスティック回帰分析を行った(表 1)。GAS では患者側因子として、i) 年齢が高いこと、ii) 劇症型感染症 (STSS) あるいは壊死性筋膜炎に罹患していること、iii) 基礎疾患を有していることがリスクファクターであった。検査値の中では白血球が 4,000/ $\mu$ L 未満、血小板が 12 万/ $\mu$ L 未満、血清中クレアチニンとクレアチンキナーゼ (CK) の上昇のオッズ比が高く、予後不良と有意に関連していることが示された。これらをもとに入院時臨床検査値と患者背景情報を用い予後を推定するスコアリングモデルを作成した(図 3)。多変量解析により得られた各オッズ比をもとに各因子に重み付けを行い実際の症例に当てはめて解析をした。このモデルに対し ROC 解析を行ったところ、曲線下面積が 93%でブレイクポイントが 5 という結果を得た。このことから、患者の予後を予測できる可能性が示唆された。

SDSE については、現在同様の解析を行っている。

#### D. 考察

GAS も SDSE も化膿性疾患が多く類似した病態を示すものもある一方で、SDSE は発症年齢が高齢者に偏っていた。致死率からも SDSE 病原性は GAS と比較して低いことが示唆された。菌の *emm* 型は昨年と同様の結果であったが、GAS では *emm89* 型が増加傾

向にあった。

GAS の ML 系薬に対する耐性菌の割合は高く、特に侵襲性感染症で予後不良と関連が示唆されている *emm1* 型のほとんどが耐性株であった。ML 系薬剤は、侵襲性感染症治療というよりも非侵襲性の市中感染症に使用される薬剤であるが、その薬剤が侵襲性感染症由来株の感受性にも影響を与えていることが示唆された。ML 系薬剤の広範な使用は菌の選択特に *emm1* 型の選択に繋がる可能性を示す結果であった。

臨床検査値についてはクレアチニンキナーゼは筋肉の損傷を示す値であり、この数値の上昇は GAS の持つヒアルロニダーゼ、ストレプトキナーゼやストレプトリジンなどの病原因子の性質を現していると考えられ、この値は患者の予後を推定する上で重要な検査値であることが示唆された。スコアリングについては、今後実際の臨床現場でこの指標の評価を重ね、モデルの精度を上げる必要があると考える。

市中感染症に対する不適切な抗菌薬投与は今後ますます耐性化を進行させることが懸念され、侵襲性感染症起炎菌の型や抗菌薬感受性にも影響を与える。菌や症例の動向を正確に把握することは、すなわちその疾患を正しく理解することにつながる。そのためにも分子疫学解析を定期的実施していくことが国の施策として必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takeaki Wajima, Miyuki Morozumi, Naoko Chiba, Seitaro Fujishima, Haruo Watanabe, **Kimiko Ubukata**. Prognosis-Associated Clinical Findings and Characteristics in Invasive Group A Streptococcal Diseases in Japan. *J. Infect.*, (March 2013 submitted).
- 2) Takeaki Wajima, Miyuki Morozumi,

Naoko Chiba, Michi Shouji, Satoshi Iwata, Hiroshi Sakata, **Kimiko Ubukata**. Associations of Macrolide and Fluoroquinolone Resistance With Molecular Typing in *Streptococcus pyogenes* From Invasive Infections, 2010 to 2012. *Int. J. Antimicrob. Agents*. (March 2013 submitted).

## 2. 学会発表

- 1) T. WAJIMA, M. MOROZUMI, N. CHIBA, **K. UBUKATA**. Change in the Prevalent *emm* Type and Increase in Macrolide Resistance among *Streptococcus pyogenes* Isolated from Invasive Infections (poster Number C2-1991). 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), September 9-12, 2012, San Francisco. 2012
- 2) 輪島丈明, 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 生

方公子. 侵襲性感染症由来 *Streptococcus pyogenes* における流行菌型の変化と薬剤耐性化. 第 61 回日本感染症学会 東日本地方会, 2012, 10.12, 横浜.

- 3) 輪島丈明, 生方公子. *Streptococcus pyogenes* におけるマクロライド系・フルオロキノロン系薬耐性化とその遺伝学的特徴. 第 86 回日本細菌学会, 2013, 03.18, 千葉幕張
- 4) 生方公子. グラム陽性球菌とマイコプラズマにおける耐性化とそのメカニズム. シンポジウム: 始まった市中型感染症原因菌の逆襲. 第 86 回日本細菌学会, 2013, 03.18, 千葉幕張
- 5) 生方公子, 諸角美由紀, 砂押克彦, 諸角美由紀, 千葉菜穂子. 侵襲性 SDSE 感染症. 第 86 回日本感染症学会, 2012, 04.25.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

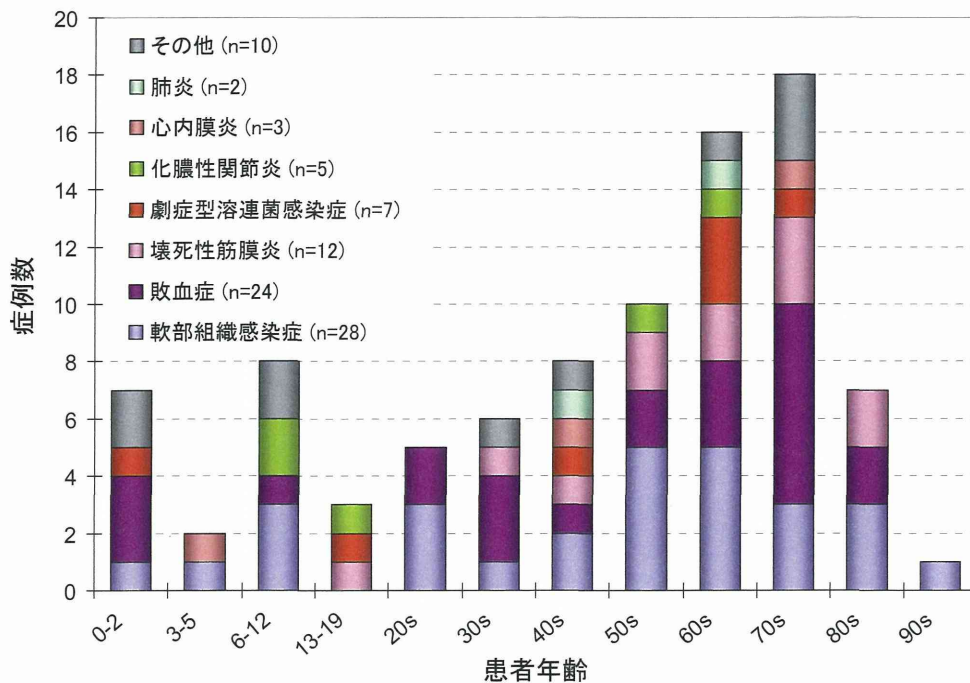


図-1a 侵襲性 GAS 感染症例の年齢分布と疾患の内訳

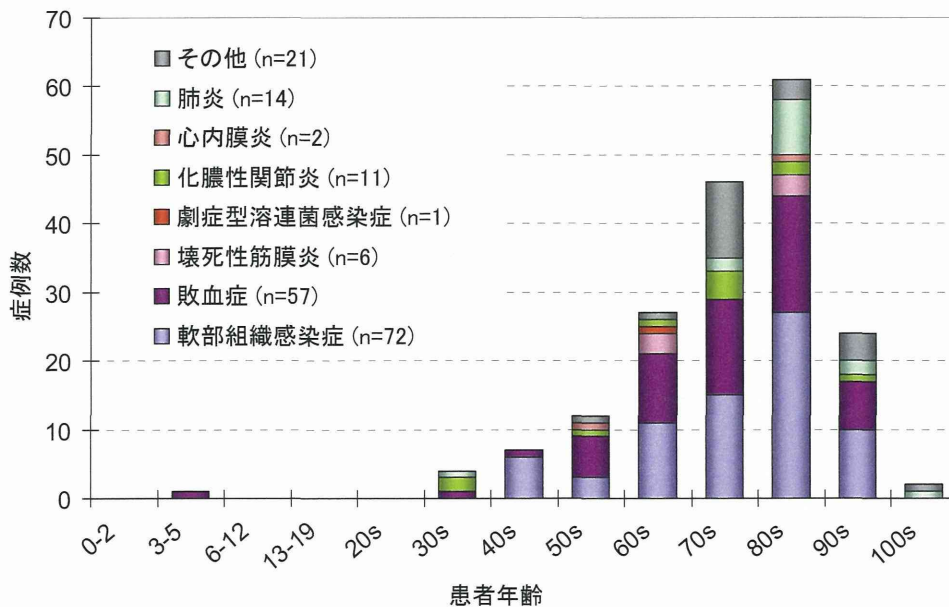


図-1b 侵襲性 SDSE 感染症例の年齢分布と疾患の内訳

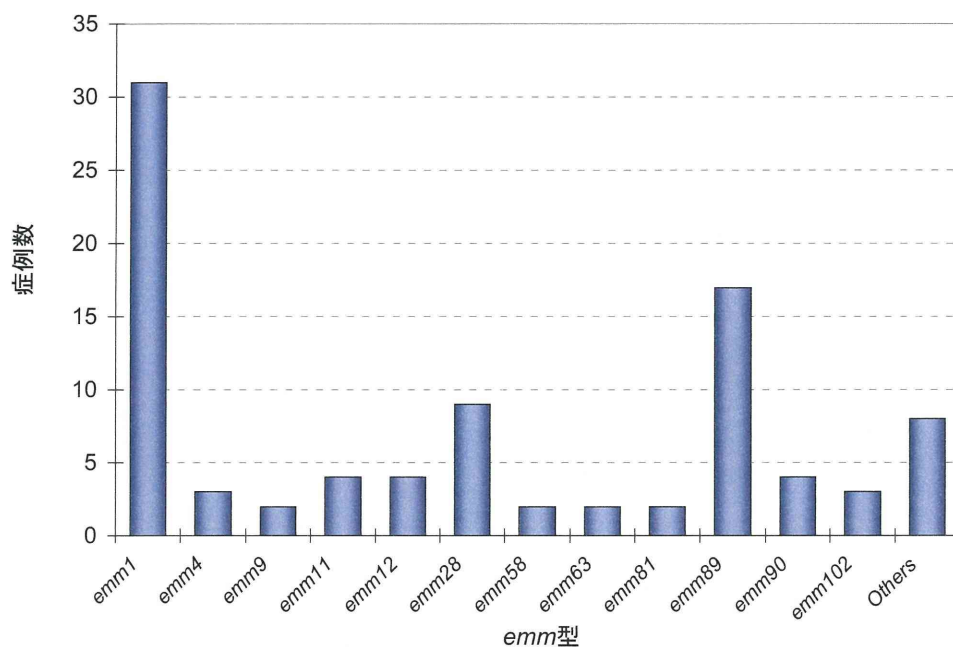


図-2a 侵襲性 GAS 感染症例の emm 型分布

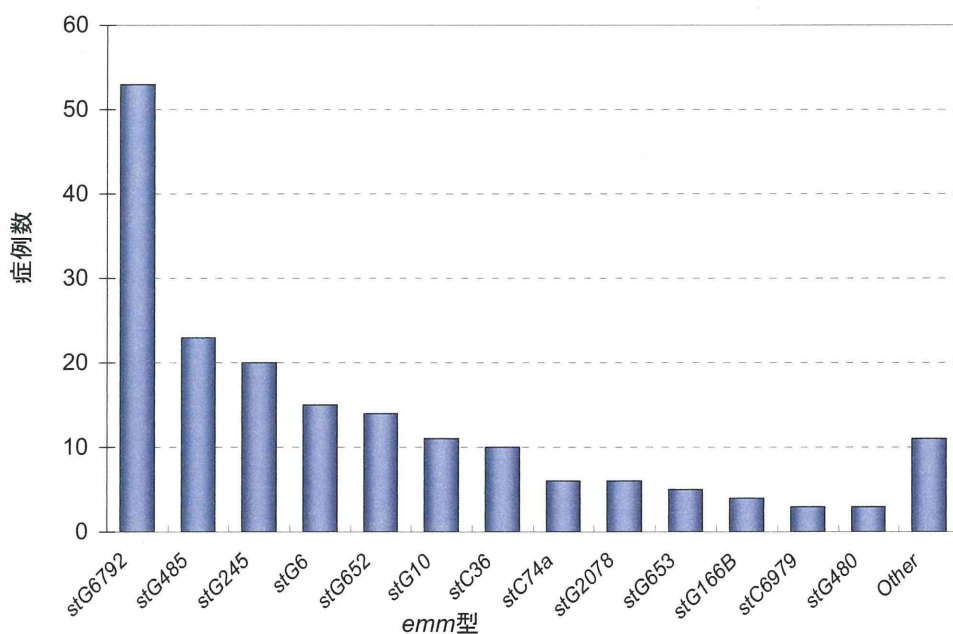


図-2b 侵襲性 SDSE 感染症例の emm 型分布

表 1 侵襲性 GAS 感染症例の予後不良と関連する患者背景および入院時臨床検査値

患者背景および検査値	ブレイクポイント	P 値	オッズ比 (95%信頼区間)
年齢 (y)	≥ 65	0.033	2.9 (1.1-7.8)
診断	STSS or NF	0.048	3.4 (1.0-11.5)
基礎疾患	present	0.088	3.7 (0.8-16.2)
白血球数 (cells/mL)	< 4,000	< 0.001	10.0 (2.6-37.0)
血小板数 ( $\times 10^4$ /mL)	< 12	0.048	2.9 (1.0-8.5)
AST (IU/L)	≥ 50	0.568	1.5 (0.4-5.4)
血清クレアチニン (mg/dL)	≥ 1.5	0.009	5.0 (1.5-16.9)
クレアチンキナーゼ (CK, IU/L)	≥ 198	0.025	5.6 (1.2-25.6)

STSS: streptococcal toxic shock syndrome  
 NF: necrotizing fasciitis

a.

項目 <sup>a</sup>		Odds ratio	Score <sup>b</sup>
Age	≥ 65y	2.9	1
Diagnosis	STSS or NF	3.4	1
Underlying diseases	present	3.6	1
WBC (cells/ $\mu$ L)	< 4,000	10.0	3
PLT ( $\times 10^4$ / $\mu$ L)	< 12	2.9	1
Creatinine (mg/dL)	≥ 1.5	5.0	2
CK (IU/L)	≥ 198	5.6	2

<sup>a</sup> These characteristics have P value below 0.1

<sup>b</sup> Score was based on odds ratio (OR). OR < 5, Score 1; OR 5 - <10, Score 2; OR ≥ 10, Score 3

b.

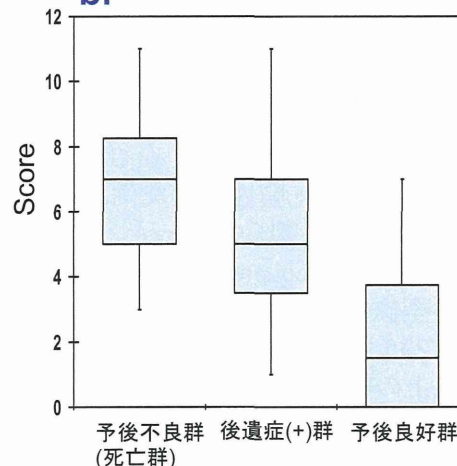


図-3 予後を左右する因子解析に基づくスコアリングモデル  
 — 多変量解析から得られたオッズ比に基づく —



## 分担研究報告書

### 全国規模で収集した侵襲性感染症由来・B 群溶血性レンサ球菌 (GBS) の分子疫学解析 分離株の莢膜型の変化と薬剤耐性化状況

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  
研究協力者 諸角美由紀 北里大学北里生命科学研究所 病原微生物分子疫学研究室 研究員  
研究協力者 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  
研究協力者 輪島 文明 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  
研究協力者 砂押 克彦 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  
研究協力者 杉田香代子 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. 2012年4月から2013年2月にかけて、全国343医療機関の協力により、市中発症の侵襲性感染症 (IPD) 由来の B 群溶血性レンサ球菌 (GBS) が 158 株収集された。小児由来が 48 株、成人由来が 110 株であった。
2. 小児 IPD 例は化膿性髄膜炎 (66.7%) と敗血症 (18.8%) が多く、早発型が減少し遅発型が多くなっていた。莢膜型は III 型 (62.5%) が多かった。
3. 成人 IPD 例では、敗血症、蜂窩織炎が多く、莢膜型は Ib 型の割合が 38% を占めていた。
4. 妊娠後期の妊婦に対する GBS 検索では 16.0% が PCR 陽性、15.0% が培養陽性であった。敗血症例や化膿性髄膜炎例に多くみられる重要な莢膜型、Ia 型と Ib 型と III 型の合計が 66.7% と高い割合であった。
5. Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析より、莢膜 Ia 型株は ST23 が優位で、成人で多い Ib 型株では 90% が ST10 であった。病原性の高い莢膜 III 型株は多様化が進み、ST17, ST19, ST335 がメインでその他に ST10, ST24, ST27 が認められた。
6. 以上の成績から、今後も GBS 感染症の動向を監視するとともに、小児の遅発型感染や高齢者における感染への対策が必要である。

#### A. 研究目的

GBS は、本来ヒトの腸管や膣内の常在菌であるが、高齢者の肺炎や産道感染による新生児の化膿性髄膜炎あるいは敗血症の起炎菌ともなり得る。

新生児の侵襲性 GBS 感染を予防する目的で日本産婦人科学会よりガイドラインが作成され、妊娠 33-37 週の妊婦に対する GBS 保菌検査が実施されている。新生児 GBS 感染症は、生後 6 日以内の早発型感染 (Early-

Onset Disease: EOD) と、7 日以降 89 日までの間に発症する遅発型感染 (Late-Onset Disease: LOD) とに区別されるが、近年の予防検査の普及で早発型は減少してきているが、遅発型は増加してきている。

一方、成人例においても敗血症などの侵襲性感染症が増加して問題となっている。

本研究事業では、我が国における侵襲性感染症由来の GBS を全国から継続して収集し、発症例 (宿主) の背景と予後について解析し、

さらに莢膜型別、薬剤耐性化状況、Multilocus Sequence Typing (MLST) 解析による世界の分離株との比較を行うこととした。

ここでは、莢膜型、薬剤感受性測定結果、ならびに MLST 解析結果について報告する。

## B. 研究方法

### 1) 収集菌株

解析対象期間は、2012 年 4 月から 2013 年 2 月までの期間である。全国 343 医療機関に所属する細菌検査室から計 158 株の送付を受けた。小児由来が 48 株、成人由来が 110 株であった。これらはすべて平素無菌的な検査材料、すなわち髄液、血液、関節液、閉鎖性膿汁などから分離された侵襲性 GBS 感染症の菌株である。

### 2) 菌株の解析項目：

- i) 莢膜型別は、私達が構築した real-time PCR 法によって行った。
- ii) 分離株に対して GBS のゲノム上から選択されている 7 つの housekeeping 遺伝子解析 (MLST 解析) を実施した。
- iii) 各種治療用抗菌薬感受性の測定、ならびにマクロライド系薬の耐性遺伝子の有無の検索を行った。

### (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に、あらかじめ連結不可能匿名化を行って菌株とアンケート用紙の回収を行った。また、各医療機関の長、あるいは検査部の長に対し、疫学調査の内容を開示し、あらかじめ許可を受けた。

従って、研究成果の公表にあたり個人情報が含まれることはない。

## C. 研究結果

### 1) 収集菌株の疾患と年齢分布

図-1 には、小児発症例の年齢分布と疾患の内訳を示す。図からも明らかのように、早発型は少なく遅発型が圧倒的に多くなっている。早発型は生直後 0-1 日の発症が多く、化膿性髄膜炎 (n=5) と敗血症 (n=3) が多くみられたが、遅発型では化膿性髄膜炎 (n=27) が明らかに多かった。

一方、成人由来株の平均年齢は 69.2 歳で、50 歳代から発症例が急速に増加し、60~80 歳代の症例が多数を占めていた。敗血症、蜂窩織炎が多く、その他に肺炎、心内膜炎、関節炎などが認められた。

### 2) 小児由来株と成人由来株の莢膜型

図-2 には小児由来分離株の莢膜型の成績を示す。GBS の莢膜型は現在 10 種が知られている (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX)。EOD 例と LOD 例ともに III 型 (62.5%) が圧倒的に多かった。次いで、Ia 型 (16.7%)、Ib 型 (10.4%) の順となっていた。欧米の同様の成績では莢膜型にややばらつきがみられ、III 型が多いといってもそれほど高い割合では分離されていない。

一方、成人由来株の莢膜型の成績をみると、図-3 に示すように小児の成績とは異なり Ib 型の割合が 38% を占め、次いで V 型であり、その他 Ia 型、II 型、III 型、VI 型、VIII 型など多彩である。

### 3) 妊娠後期における GBS 検索とその莢膜型

図-4 には、順天堂大学医学部附属静岡病院 産婦人科・五十嵐医師との共同研究の成績を示す。妊娠 36-39 週の 200 例の膣から採取された材料を検査しているが、real-time PCR で 16.0% (n=32) が GBS 陽性で、培養陽性であったのは 15.0% (n=30) であった。

分離菌の莢膜型をみると、Ib 型と III 型の

割合が 26.7%と高く、Ia 型と Ib 型と III 型の合計が 66.7%と高い割合であった。これらは敗血症例や化膿性髄膜炎例に多くみられる重要な莢膜型である。GBS 予防検査においては GBS が陽性であるか否かに加え、菌量や莢膜型まで短時間で明らかにできれば、GBS の監視が効率的であると考えられる。

#### 4) 分離株の MLST 解析と Clonal Complex との関係

図-5 には、MLST 解析した ST の成績を莢膜型との関連で示す。III 型では ST17, ST19, ST335 がメインでその他に ST10, ST24, ST27 が認められた。ST17 は病原性が高いと報告されている型で、ST19 とは由来が異なることが知られている。本邦において 2006 年より認められ始めた ST335 は、ST19 と 1 遺伝子のみの違いである。莢膜 Ia 型は ST23 が優位で、成人で多い Ib 型では 90%は ST10 であった。いずれにしても、III 型といっても由来の異なるものが混在していることが示された。

III 型では 6 タイプの ST 型が存在している。莢膜 Ia 型では ST23 を含めて 5 タイプ、II 型でも ST1 を含めて 3 タイプ、V 型では 3 タイプと次第に多様化 (housekeeping gene に変異が挿入され始めていること) しつつあることが明らかにできた。

図-6 には GBS における主要な ST がいずれの Clonal Complex (CC) に属するのかについて示す。特に莢膜 III 型の ST27, ST335 は ST19 と 1 遺伝子のみの違いであることが示されている。注目されるのは CC17 であるが、この CC はウシ由来の CC67 に近い。ゲノム全体としては必ずしもウシ由来の GBS に近いわけではないが、莢膜をコードする遺伝子および 7 つの housekeeping gene は、ヒトとウシ由来で近似しているということになる。莢膜 Ia 型に多い ST23 は CC23 に属するが、この CC は CC19, CC1, CC10, および CC17

とはかなり異なっていた。

#### 5) 小児由来株と成人由来株に対する薬剤感受性

小児由来株と成人由来株に対する薬剤感受性成績をみると、成人由来株にはペニシリン軽度耐性 GBS (PRGBS) が出現しているが、小児由来株には認められていない。小児由来株では、マクロライド (ML) 耐性遺伝子保持株 (*erm* (A), *erm* (B)) は全体の 22%であった。

一方、成人由来株の PRGBS は約 1%程度であるが、現在前投与薬として使用されているマクロライド系薬やニューキノロン系薬に対する耐性化が進行している。ML 耐性遺伝子保持株は 21.6%、キノロン系薬耐性は 44.3%であった。Ib 型の大多数が *gyrA* 変異と *parC* 変異を有するニューキノロン系薬高度耐性菌であることが注目される。さらに、成人由来の莢膜 III 型菌に PRGBS が既に認められていることから、今後十分な監視が必要である。

#### D. 考 察

GBS は本来病原性の高い菌ではなく、ヒトの腸管や膣内の常在菌であるが、高齢者の肺炎や新生児の化膿性髄膜炎や敗血症の起炎菌ともなり得る。現在、新生児 GBS 感染症予防のため、妊娠後期の妊婦に対する GBS 保菌検査が実施され、GBS 陽性例に対しては抗菌薬の予防投与が行われている。出産時にアクシデントがあった場合、あるいは児にリスクがあった場合には、児が少数の菌を飲み込んだだけでも GBS 感染を惹起しやすくなると考えられる。

小児由来株の莢膜型は、病原性の高い III 型が圧倒的に多く、次いで Ia 型、Ib 型であった。これは妊娠後期の妊婦に対して実施した GBS 検索の成績とほぼ同様の成績であった。

このような高い病原性を示す莢膜型株を保持していることが短時間で明らかにでき

れば、出産時のみならず新生児に対する GBS 感染症予防のフォローアップを効率的に行うことが可能となるであろう。このことから、私達が構築した real-time PCR は有用で、我が国における妊婦の保菌率と新生児における GBS 感染症の実態を明らかにできれば、現在進行中の GBS ワクチンの基盤とすることができると考えられる。

一方、成人例でも高齢化社会を反映し、GBS による IPD 例が増加してきている。患者背景因子、臨床検査値と予後との関係から、成人の GBS 感染症を重篤化させないためには、基礎疾患を有し、高齢の男性であること、肺炎や敗血症例で特に腎機能が低下している際には注意が必要である。

MLST 解析より GBS の多様化が進んでおり、今後も、GBS 感染症の動向を監視するとともに、小児の遅発型感染や高齢者における感染への対策が必要である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyuki Morozumi, Takeaki Wajima, Yusuke Kuwata, Naoko Chiba, Katsuhiko Sunaoshi, Kayoko Sugita, Hiroshi Sakata, **Satoshi Iwata**, Kimiko Ubukata.

Associations between Capsular Serotype and Multilocus Sequence Type in Invasive Group B Streptococcal Isolates From Infants in Japan. *Int J Antimicrob Agents*. (March 2013 submitted).

### 2. 学会発表

- 1) Kimiko Ubukata, Miyuki Morozumi, Naoko Chiba, Takeaki Wajima, Hiroshi Sakata, **Satoshi Iwata**. Characteristics of Capsule Types and Multilocus Sequence Types of *Streptococcus agalactiae* (GBS) from Neonatal Invasive Infections in Japan. 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) September 9-12, 2012, San Francisco.
- 2) 生方公子, 砂押克彦, 千葉菜穂子, 諸角美由紀, **岩田 敏**. 侵襲性 B 群溶血レンサ球菌 (GBS) の分子疫学解析 : 2010 年収集株. 第 86 回日本感染症学会, 2012.04.25.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

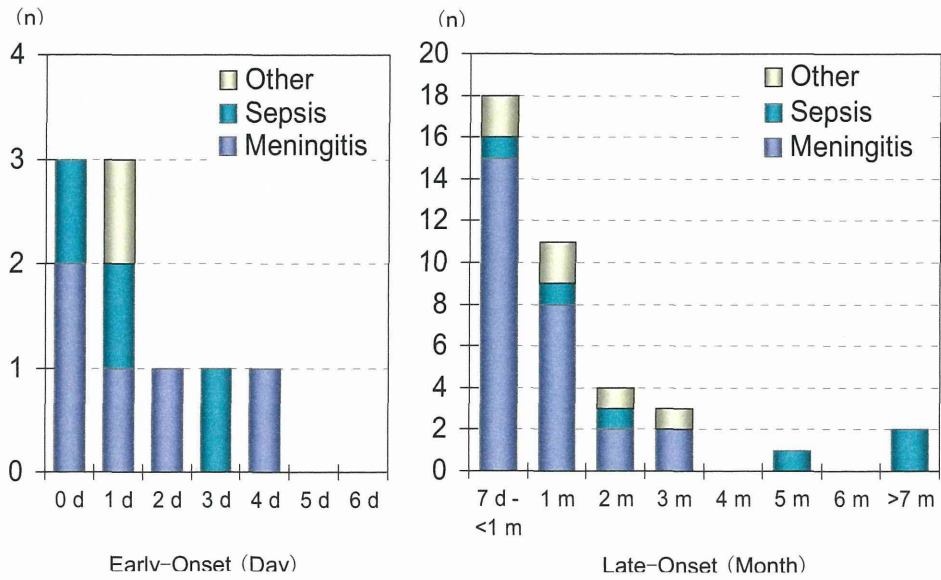


図-1 小児 GBS 侵襲性感染症：EOD と LOD 別，および疾患 (n=48)

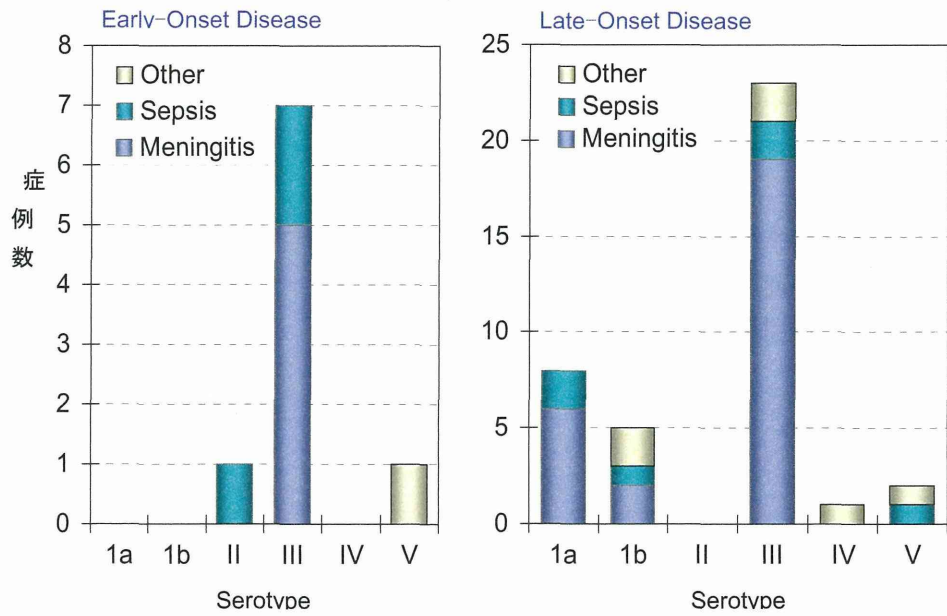


図-2 EOD例とLOD例における莢膜型の違い

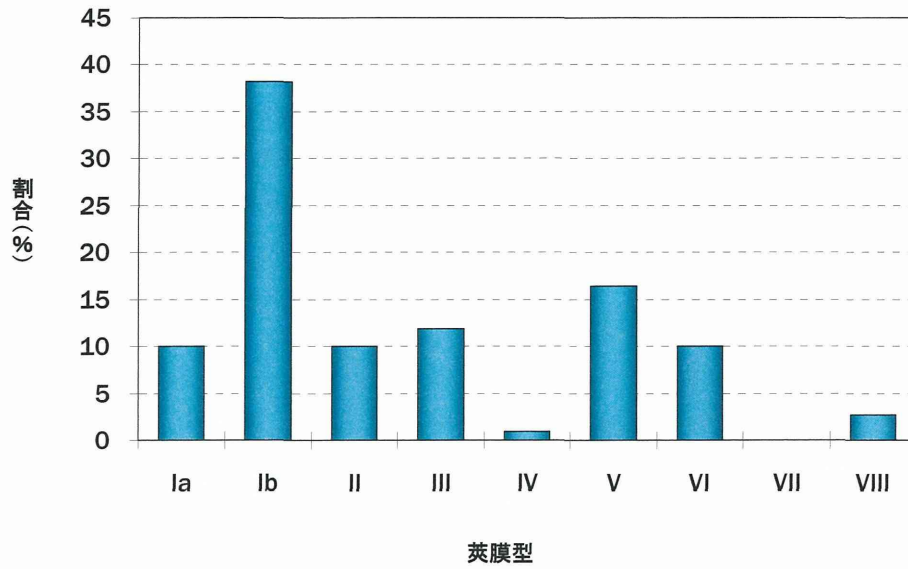


図-3 成人侵襲性 GBS 感染症由来株の莢膜型 (n=110)

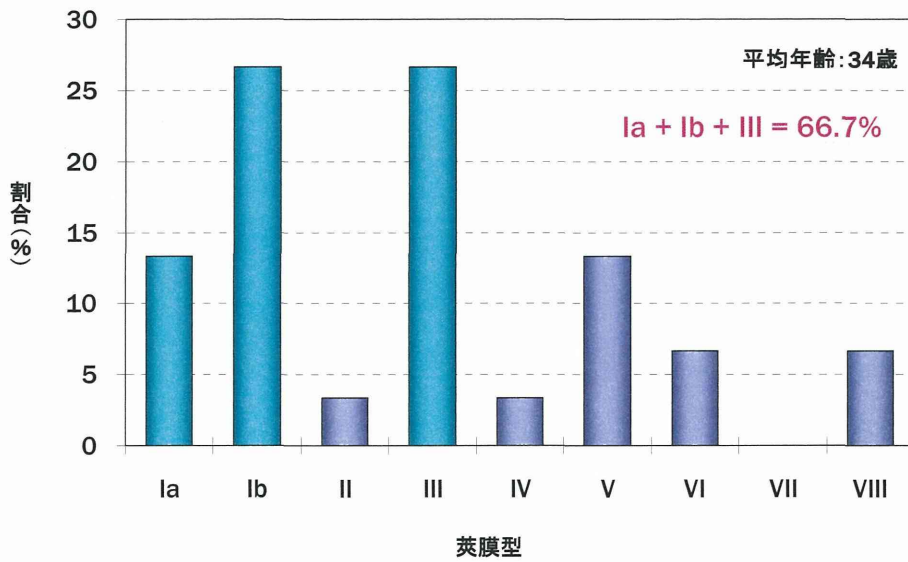


図-4 妊娠後期における GBS 検査で分離された菌株の莢膜型 (n=30)

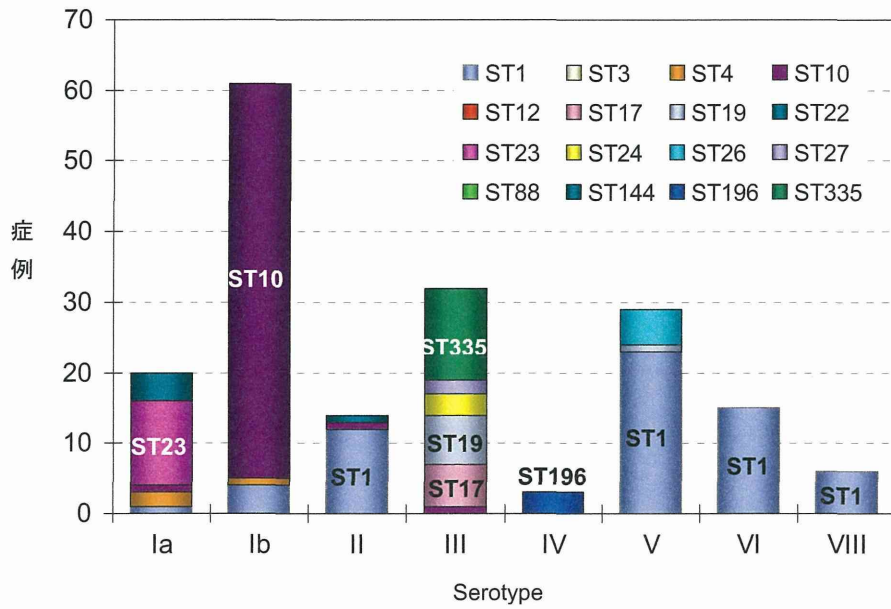


図-5 GBS 株：莢膜型と MLST 解析による ST との関係

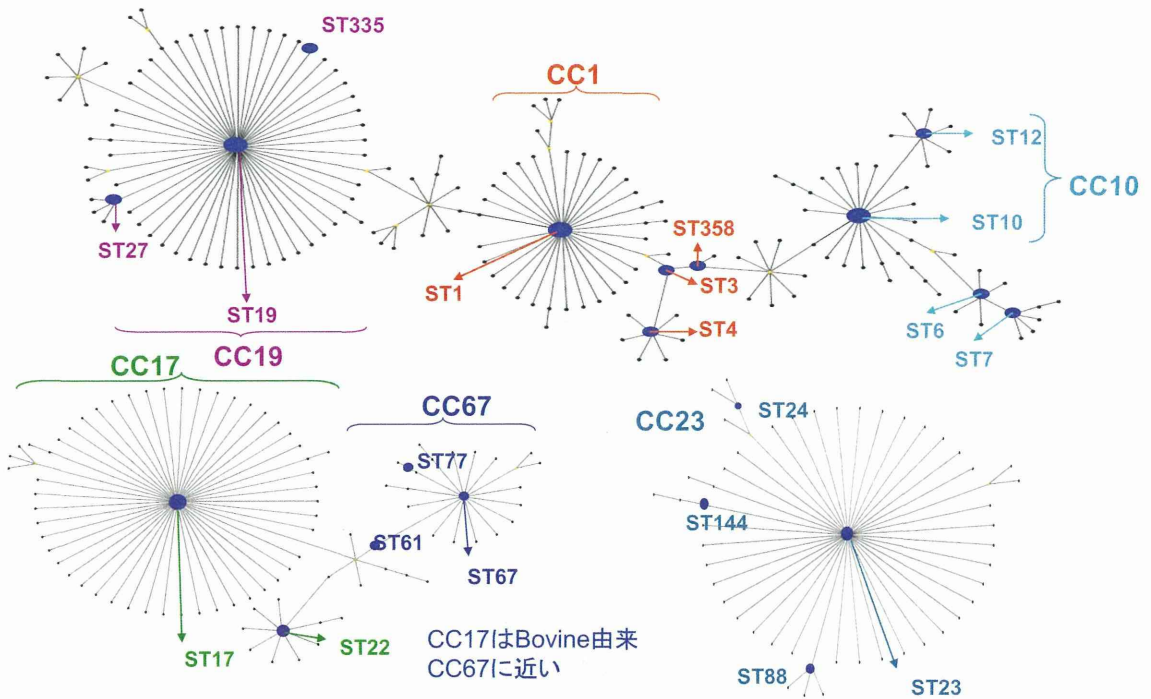


図-6 Clonal Complex (CC) と ST との関係

## 分担研究報告書

### 侵襲性感染症の小児から分離された *Streptococcus pyogenes* の *emm* 型と抗菌薬感受性

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

2003 年から 2012 年までに侵襲性感染症の小児から検出された *Streptococcus pyogenes* 12 株について最小発育阻止濃度 (MIC) と最小殺菌濃度 (MBC) を測定した。患者の年齢は生後 1 日から 15 歳までに分布し、新生児 3 名を含めて 5 歳未満が 6 例と半数を占めていた。疾患は敗血症 4 例、皮膚軟部組織炎 3 例、咽後膿瘍 2 例、肺炎+敗血症 1 例、膿胸 1 例、関節炎 1 例であった。敗血症 1 例が死亡し、他は後遺症なく治癒した。型別では *emm1* が最も多く 6 株、ついで *emm12* が 2 株であった。MIC<sub>90</sub>/MBC<sub>90</sub> は penicillinG 0.015/0.015  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ampicillin 0.03/0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , cefotaxime 0.015/0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ceftriaxone 0.03/0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , panipenem 0.008/0.008  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , meropenem 0.008/0.008  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , doripenem  $\leq 0.004/\leq 0.004$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  で、carbapenem 薬の抗菌力が優れていた。

#### A. 研究目的

*Streptococcus pyogenes* は咽頭炎・扁桃炎の主要な原因菌であるが、まれに髄膜炎、敗血症、壊死性筋膜炎などの侵襲性感染症をきたす。このような感染症では、*S. pyogenes* に対する抗菌力が優れた抗菌薬による治療を速やかに開始しなければならない。penicillin 薬は、溶連菌感染症では第一選択とされる代表的薬剤である。しかし、*S. pyogenes* における抗菌薬感受性に関する報告の多くは、咽頭炎・扁桃炎から分離された株に対するものであり、侵襲性感染症から分離された株に限定した報告は極めて少ない。さらに、それらの報告の中で penicillin 薬と対比される薬剤は経口抗菌薬がほとんどで、侵襲的な感染症に用いられる静注抗菌薬、とくに carbapenem 薬の成績は認められないため、今回の検討を行った。

#### B. 研究方法

2003 年 7 月から 2012 年 6 月までの 10 年間に侵襲性感染症のために当院を含めた北海道内の小児科施設で診療した小児から検出された *S. pyogenes* 12 株を対象とした。概要を表-1 に示した。これらの株は血液、胸水などの閉鎖的部から検出された株、または咽頭や皮膚からの検出であるが担当医が患者の病態から原因菌であると判断した株である。生命の危険を感じさせるほどの重篤な症状を認めた例、排膿やデブリードマンなどの外科的処置を要した例、2 週間以上の入院を要した例を侵襲性とした。

MIC は日本化学療法学会標準法<sup>1)</sup>に準じた微量液体希釈法で penicillinG (PCG), ampicillin (ABPC), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CTRX), panipenem (PAPM), meropenem (MEPM), doripenem (DRPM) の 7 薬剤について測定した。MBC は MIC 測定を行ったプ



レートより MIC 以上の濃度のウェルから培養液 10  $\mu$ L を非選択培地に塗布し、35°C で 20~24 時間好気培養後、コロニー数を計測し、発育菌量を 99.9%以上減少させる濃度とした。

*emm* 型別は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に測定を依頼した。研究室では M 蛋白をコードする遺伝子を PCR で増幅し、その増幅産物の 5'末端側の塩基配列を決定した後、300bp の配列を CDC レファレンスセンターへ送信し、CDC のデータベースとのマッチングにより型別した<sup>2)</sup>。

### C. 研究結果

表-1 に *S. pyogenes* による侵襲性感染症の患者の一覧を示した。年齢は生後 1 日目の新生児から 15 歳まで幅広く分布していた。新生児 3 名を含めて 5 歳未満が 6 例と半数を占めていた。いずれの例も基礎疾患は認めなかった。疾患は敗血症 4 例、皮膚軟部組織炎 3 例、咽後膿瘍 2 例、肺炎+敗血症 1 例、膿胸 1 例、関節炎 1 例であった。Toxic shock 症候群を合併した例は認めなかった。死亡は 1 名で、肺炎+敗血症の 15 歳女児がショックをきたして死亡した。*emm* 型で最も多かったのは *emm1* で 6 株 (50.0%)、ついで *emm12* が 2 株 (16.7%) であった。1 株ずつ認めたのは *emm3*, *emm4*, *emm6*, *emm28* であった。

各薬剤に対する MIC と MBC の分布を図-1 と図-2, MIC90 と MBC90 を表-2 に示した。測定した薬剤の中で抗菌力が最も優れていたのは DRPM で MIC, MBC とともにすべての株が 0.004  $\mu$ g/mL 以下であった。次に PAPM で MIC と MBC が一致して、0.004  $\mu$ g/mL 以下と 0.008  $\mu$ g/mL の株が 6 株ずつであった。MEPM は MIC, MBC とともにすべての株が 0.008  $\mu$ g/mL であった。MIC と MBC の値が乖離する株が PCG で 5 株, ABPC で 3 株, CTX で 5 株, CTRX で 8 株に認められた。

この 4 剤における感受性を比較すると、PCG, CTX, ABPC, CTRX の順であった。

### D. 考 察

侵襲性 A 群溶連菌感染症には敗血症、膿胸、骨・関節感染症、壊死性筋膜炎、streptococcal toxic shock 症候群などがある。先進国における小児の侵襲性 A 群溶連菌感染症発症率は、人口 10 万人あたり 1~3 とする報告が多く、死亡率は 5~20%である<sup>3)</sup>。全年齢では高齢者の発症率が極めて高いが、5 歳未満の発症率も高齢者に続いて高かった<sup>4)</sup>。

小児における侵襲性 A 群溶連菌感染症に関する報告では、米国の Mulla<sup>5)</sup>による 1996 年から 2000 年に診療した生後 3 週から 17 歳までの 25 名についての報告がある。患者の年齢は 1 歳未満が 6 名、1~4 歳が 8 名と、5 歳未満の児が半数以上であった。疾患は 18 名に菌血症を認め、3 名が壊死性筋膜炎であった。死亡率は 4.4%であった。フランスの Henriot からの報告<sup>6)</sup>では、2000 年から 2007 年に 28 名の児を診療し、そのうち 15 名が骨・関節感染症、7 名が軟部組織感染症、3 名が肺炎、3 名が toxic shock 症候群であり、年齢の中央値は 2.9 歳であった。

Wajima ら<sup>2)</sup>は 2003 年から 2006 年までに本邦の施設から収集した侵襲性 A 群溶連菌感染症から分離された *S. pyogenes* の *emm* 型を解析している。集積された 74 株の中で 60~80 歳の患者から多く分離されていて、20 歳未満からは 11 株 (14.9%) にすぎなかった。74 株の中で最も多い型は *emm1* で 29 株 (39.2%)、ついで *emm49* が 8 株 (10.8%)、*emm12* と *emm28* が 5 株 (6.8%) ずつであった。*emm1* が最も多かったことは著者の成績と一致していた。欧米の成績をみると、1998 年から 2009 年におけるスペインでは、小児分離株も含めた 247 株中 *emm1* 型が 60 株 (24.3%) と最も多く、ついで *emm3* が 21 株 (8.5%)、*emm4* が 14 株 (5.7%) であり、*emm1*

が占める割合が増加していた<sup>7)</sup>。ドイツでは586株を検討し、やはり *emm1* が179株(30.5%)とほぼ3分の1を占め、*emm28* が107株(18.3%)、*emm3* が56株(9.6%)であった<sup>8)</sup>。他の報告も同様に *emm1* が多く<sup>6,9)</sup>、侵襲性感染症と *emm1* は極めて関連が高いと考えられた。

薬剤感受性を測定した薬剤の中では、DRPM がすべての株に対し0.004  $\mu\text{g/mL}$  と最も優れていた。PAPM とMEPM のMIC<sub>90</sub> は0.008  $\mu\text{g/mL}$  であり、その他の薬のMIC<sub>90</sub> は0.015~0.03  $\mu\text{g/mL}$  より強い抗菌力を示した。また、carbapenem 薬はMIC とMBC がすべての株で一致していたが、penicillin 薬、cephem 薬では不一致している株が少なくなかった。penicillin 薬に耐性を示す *S. pyogenes* の報告はいまだに認められないが、tolerance の報告<sup>10,11,12)</sup>は散見される。これはMIC とMBC が乖離した状態で、なんらかの機序で通常の株より殺菌に至るまでに時間を要するか殺菌できない株と考えられている。この現象が *S. pyogenes* による咽頭炎・扁桃炎が有効な抗菌薬を投与しても反復したり<sup>13,14)</sup>、侵襲性感染症時に penicillin の効果が低下する<sup>15)</sup>理由の一つとされている。この tolerance について統一された基準はないが、一般的にはMIC とMBC の比が16倍以上<sup>16)</sup>、あるいは32倍以上とされている<sup>14)</sup>。今回の成績ではMIC とMBC の比が最大で2倍であり、tolerance の定義には該当しないが、注意すべき現象と思われた。

侵襲性溶連菌感染症に対する治療の第一選択は penicillin 薬とされ、組織透過性、毒素産生抑制、食食作用促進など特殊な抗菌効果を期待して clindamycin を併用することが推奨されている<sup>3)</sup>。ただ、今回の抗菌力の検討では、carbapenem 薬の有効性が期待される結果が得られた。しかし、*S. pyogenes* に対する感受性を penicillin 薬と carbapenem 薬、cephem 薬を比較した成績は他になく、今後

の基礎的、臨床的な報告がされることを期待される。

## E. 結 論

小児における侵襲性感染症から分離された12株の *S. pyogenes* の *emm* 型を測定し、*emm1* が6株で半数を占めた。抗菌力が最も優れていた薬剤はDRPM でMIC, MBC とともにすべての株が0.004  $\mu\text{g/mL}$  以下であった。ついでPAPM, MEPM, PCG, CTX, ABPC, CTRX の順であった。

## 謝 辞

菌の分与をいただいた旭川医科大学付属病院、札幌徳洲会病院、富良野協会病院、帯広協会病院の各小児科の先生方に感謝いたします。また、*emm* 型別をお引き受けいただいた北里大学北里生命科学研究科病原微生物分子疫学研究室の輪島丈明先生、生方公子先生に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会：微量液体希釈によるMIC測定法(微量液体希釈法)-日本化学療法学会標準法-。Chemotherapy. 1990; 38: 102-105.
- 2) Wajima T, Murayama SY, Sunaoshi K, Nakayama E, Sunakawa K, Ubukata K. Distribution of *emm* type and antibiotic susceptibility of group A streptococci causing invasive and noninvasive disease. J Med Microbiol. 2008; 57: 1383-1388.
- 3) Steer AC, Lamagni T, Curtis N, Carapetis JR. Invasive group a streptococcal disease: epidemiology, pathogenesis and management. Drugs. 2012; 72: 1213-1227.
- 4) Steer AC, Jenney A, Kado J, Good MF, Batzloff M, Waqatakirewa L, Mullholland EK, Carapetis JR. Prospective surveillance

- of invasive group A streptococcal disease, Fiji, 2005–2007. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 216–222.
- 5) Mulla ZD. Clinical and epidemiologic features of invasive group A streptococcal infections in children. *Pediatr Int.* 2007; 49: 355–358.
  - 6) Henriët S, Kaguelidou F, Bidet P, Lorrot M, De Lauzanne A, Dager S, Angoulvant F, Mercier JC, Alberti C, Bingen E, Faye A. Invasive group A streptococcal infection in children: clinical manifestations and molecular characterization in a French pediatric tertiary care center. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 341–346.
  - 7) Montes M, Ardanuy C, Tamayo E, Domènech A, Liñares J, Pérez-Trallero E. Epidemiological and molecular analysis of *Streptococcus pyogenes* isolates causing invasive disease in Spain (1998–2009): comparison with non-invasive isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30: 1295–1302.
  - 8) Imöhl M, Reinert RR, Ocklenburg C, van der Linden M. Epidemiology of invasive *Streptococcus pyogenes* disease in Germany during 2003–2007. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 58: 389–396.
  - 9) Siljander T, Lyytikäinen O, Vähäkuopus S, Snellman M, Jalava J, Vuopio J. Epidemiology, outcome and *emm* types of invasive group A streptococcal infections in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 1229–1235.
  - 10) Krasinski K, Hanna B, LaRussa P, Desiderio D. Penicillin tolerant group A streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1986; 4: 291–297.
  - 11) Van Asselt GJ, Van Boven CP. Guidelines for detection of penicillin tolerance in *Streptococcus pyogenes* by MIC–MBC method. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 418: 451–452.
  - 12) Steininger C, Allerberger F, Gnaiger E. Clinical significance of inhibition kinetics for *Streptococcus pyogenes* in response to penicillin. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50: 517–523.
  - 13) Kim KS, Kaplan EL. Association of penicillin tolerance with failure to eradicate group A streptococci from patients with pharyngitis. *J Pediatr.* 1985; 107(5): 681–684.
  - 14) Dagan R, Ferne M. Association of penicillin-tolerant streptococci with epidemics of streptococcal pharyngitis in closed communities. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989; 8: 629–631.
  - 15) Eagle H. Experimental approach to the problem of treatment failure with penicillin. I. Group A streptococcal infection in mice. *Am J Med.* 1952; 13: 389–399.
  - 16) EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). *Clin Microbiol Infect.* 2000; 6: 503–508.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakata H. Evaluation of intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of early-onset group B streptococcal infection. *J Infect Chemother.* 2012; 18: 853–857.

- 2) 坂田 宏. 2001～2010年までの *Streptococcus pneumoniae* の  $\beta$ -lactam 抗菌薬に対する感受性の変動. 小児感染免疫. 2012; 23: 395-400.
- 3) 坂田 宏. 侵襲性肺炎球菌感染症の小児から分離された *Streptococcus pneumoniae* の抗菌薬感受性. 感染症誌. 2013; 87: 1-5.
- 道における侵襲性肺炎球菌感染症の小児から分離された肺炎球菌の血清型の変動. 第86回日本感染症学会(長崎). 2012.4.
- 3) 坂田 宏. 重症 A 群溶連菌感染症の小児から分離された A 群溶連菌の薬剤感受性. 第59回日本化学療法学会東日本支部総会(東京). 2012.10.
- 4) 坂田 宏. 北海道における小児の重症 A 群溶連菌感染症の調査成績. 第44回日本小児感染症学会(北九州). 2012.11.

## 2. 学会発表

- 1) 坂田 宏. 侵襲性肺炎球菌感染症の小児から分離された肺炎球菌の薬剤感受性. 第60回日本化学療法学会(長崎). 2012.4.
- 2) 坂田 宏, 千葉菜穂子, 生方公子. 北海

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表-1 Characteristics of children with severe streptococcal infection

Case No	age	emm	diagnosis	Isolated	prognosis
1	1 day	6	pyothorax	pleural fluid	cure
2	4 days	1	sepsis	blood	cure
3	7 days	1	sepsis	blood	cure
4	1 year	12	cellulitis	skin swab	cure
5	3 years	12	sepsis	blood	cure
6	3 years	1	sepsis	blood	cure
7	5 years	28	arthritis	synovial fluid	cure
8	5 years	4	retropharyngeal abscess	pharyngeal swab	cure
9	7 years	3	cellulitis	skin	cure
10	11 years	1	erysipelas	pharyngeal swab	cure
11	11 years	1	retropharyngeal abscess	pharyngeal swab	cure
12	15 years	1	sepsis+pneumonia	blood	dead