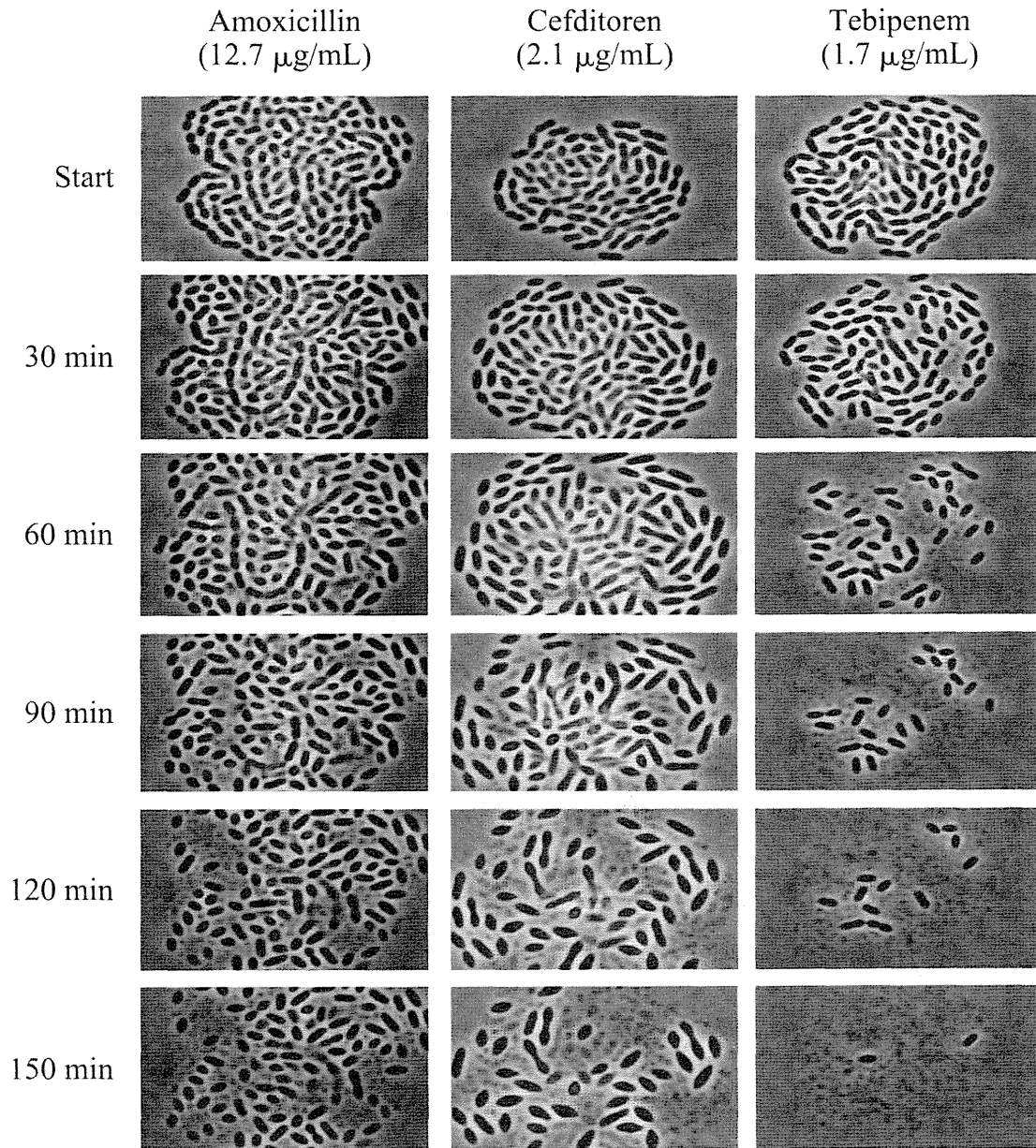


Fig. 1. Time series of morphological changes in *S. pneumoniae* strain ME19 (gPRSP).

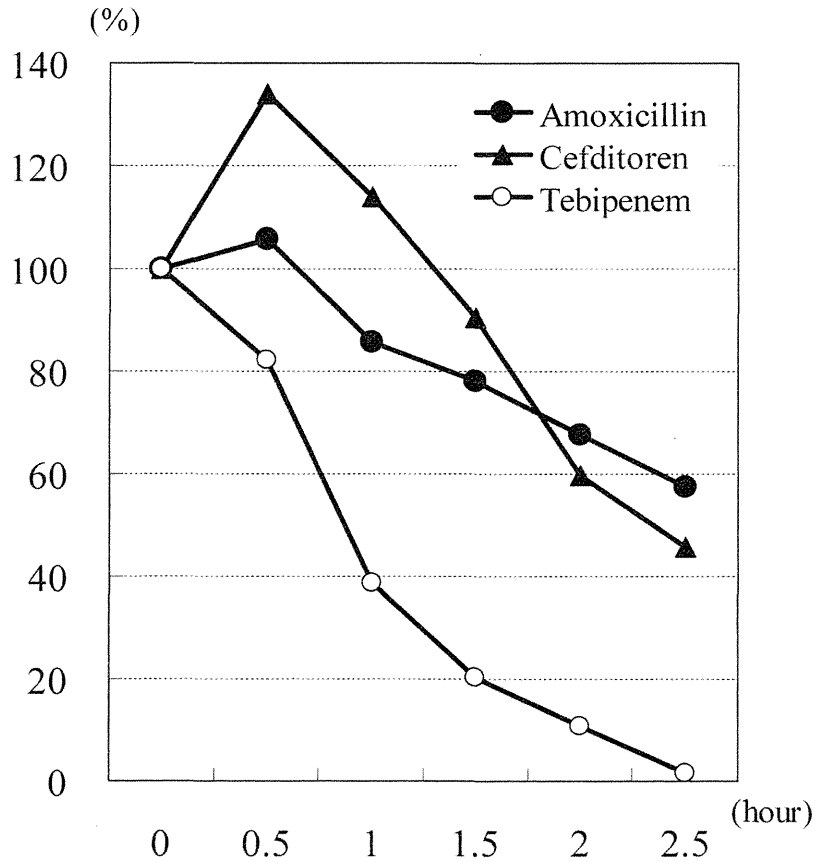
The bacterial cells were exposed to AMPC (12.7  $\mu\text{g/mL}$ ), CDTR (2.1  $\mu\text{g/mL}$ ) and TBPM (1.7  $\mu\text{g/mL}$ ), respectively. Observation was made with a phase-contrast microscope.

うな伸長化した細胞から次第に溶菌像が観察された。90分後にはスタート時の菌数から10%減少していた。減少率は120分後には40%となり、AMPCの溶菌率と逆転した。溶菌像を詳細に観察すると、伸長化した細胞の中央部分、すなわち隔壁形成部位に相当する部位からちぎれるように溶菌した。

することなく薬剤作用20分後から溶菌像が観察され始めた。30分後には全体の18%が溶菌、60分後には61%、90分後には80%、120分後には89%の溶菌像が認められた。観察時間を通じ、TBPMではほぼ通常の大さの細胞のまま、風船が弾けるように溶菌し、AMPCやCDTRに比較して、明らかに短時間殺菌性に優れていた。

Fig. 1の右に示したTBPM作用では、菌は膨化

Fig. 2. The half-hourly rate of lysis was measured defining the number of cells directly after exposure to the three antibacterial agents: AMPC (12.7 $\mu$ g/mL) (●), CDTR (2.1 $\mu$ g/mL) (▲) and TBPM (1.7 $\mu$ g/mL) (○) as 100.



2. インフルエンザ菌の薬剤作用時の形態学的変化

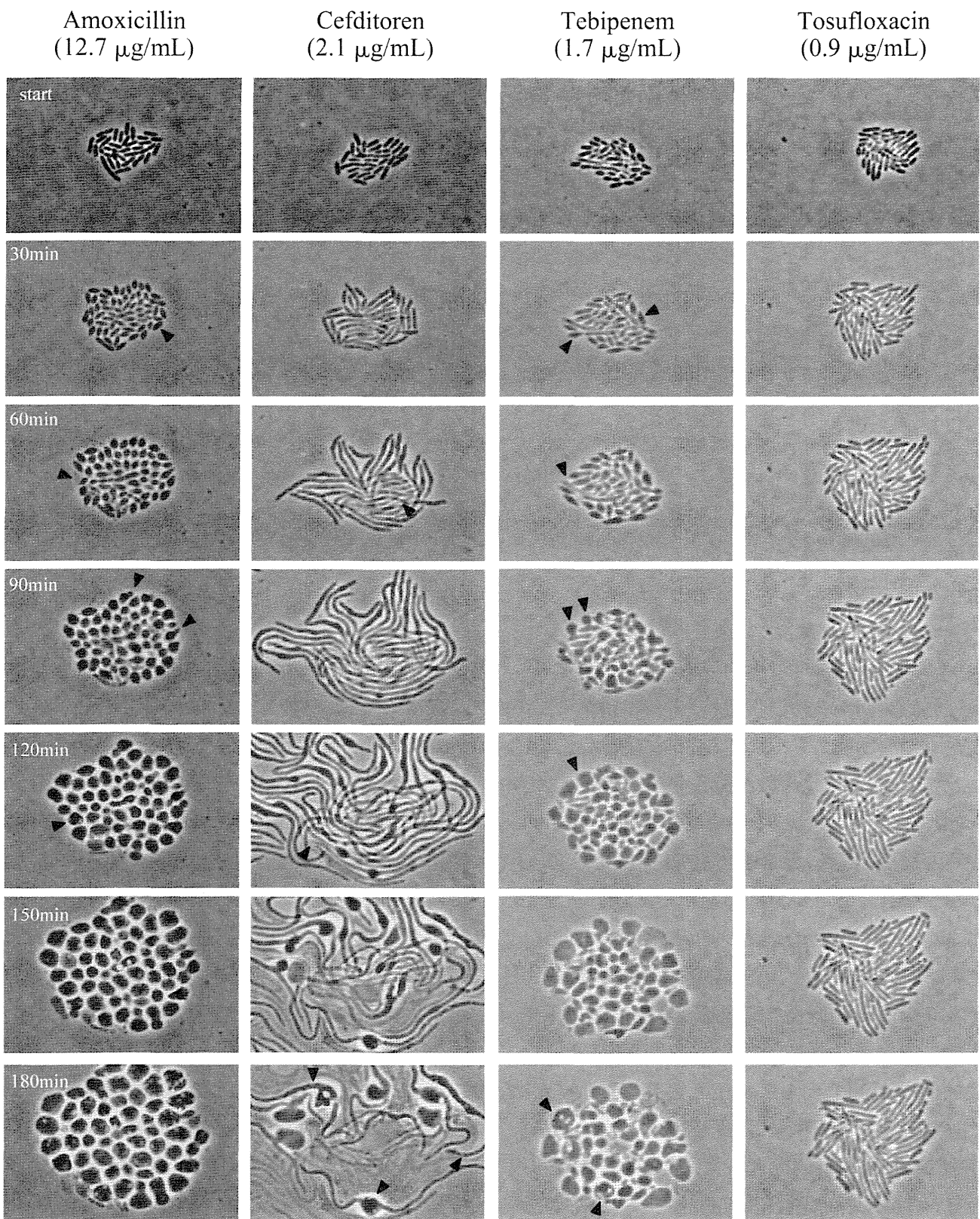
1) 位相差顕微鏡による連続観察

gBLNARのJPH002株に対してAMPC (12.7 $\mu$ g/mL), CDTR (2.1 $\mu$ g/mL), TBPM (1.7 $\mu$ g/mL), およびTFLX (0.9 $\mu$ g/mL) をそれぞれ作用させた後の30分ごとの経時的形態変化をFig. 3に示す。本菌に対する4薬剤の作用濃度とMICの比は, AMPCが作用濃度 (12.7 $\mu$ g/mL)/MIC (4.0 $\mu$ g/mL) で3.2倍, CDTRのそれは作用濃度 (2.1 $\mu$ g/mL)/MIC (0.25 $\mu$ g/mL) で8.4倍, TBPMのそれは作用濃度 (1.7 $\mu$ g/mL)/MIC (0.5 $\mu$ g/mL) で3.4倍, TFLXのそれは作用濃度 (0.9 $\mu$ g/mL)/MIC (0.008 $\mu$ g/mL) で113倍である。

AMPC作用では30分後から細胞の膨化が始まり, スフェロプラスト状を呈した (▲部分)。60

分に達する前には溶菌する細胞も認められた。その後, さらなるスフェロプラスト化と脆弱部位からの膨化が観察された。120分後になるとスフェロプラスト化した細胞内に空胞形成がみられ始めた。180分後, 溶菌はほとんど認められなかったが, すべての細胞に空胞が形成されていた。

CDTRを作用させた細胞は, 作用後すぐに隔壁合成が阻害されフィラメント化が始まった。そして60分後には溶菌像がわずかに観察された (▲部分)。溶菌の際には, 細胞は伸長化により脆弱した部分が膨化し, 破裂崩壊していた。作用90分後, 細胞はさらにフィラメント化しながらわずかに溶菌, 120分後になると細胞が次々と溶菌していく像が観察された。作用180分後には, 大部分のフィラメント化した細胞は溶菌したが, 中には薬剤作用前の小桿菌から分裂する時の隔壁形成部位

Fig. 3. Time series of morphological changes in *H. influenzae* strain JPH002 (gBLNAR).

The bacteria were exposed to each of AMPC (12.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), CDR (2.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), TBPM (1.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and TFLX (0.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

が膨化し、溶菌しないまま残存した細胞もわずかながら観察された。

TBPM作用では30分後、細胞は膨化し始め、その後、AMPCと同様に、徐々に大きなスフェロプラスト細胞が形成された。60分を経過する頃から溶菌像が出現し始め、90分後になると脆弱部位からの膨化が観察された。120分後、細胞はさらに大きく膨化し、細胞内に空胞が観察され始めた。時間を追うごとに膨化しつつ、溶菌する細胞が増加したが、溶菌しない細胞内には空胞が形成されていた。180分後、TBPMを作用させた細胞の95%に空胞が観察された(▲部分)。

一方、TFLXを作用させた細胞は、90分後まで分裂増殖しながら伸長化した。しかし、それ以降での細胞の伸長化は停止、溶菌像も認められなかった。

## 2) 透過型電子顕微鏡による観察

位相差顕微鏡下で観察された薬剤作用後のインフルエンザ菌について菌体内と細胞壁の変化を観察するため、同一条件で作製したサンプルを透過型電子顕微鏡で観察した像をFig. 4に示す。

コントロールの抗菌薬を作用させていないインフルエンザ菌は、長軸が $0.5\mu\text{m}$ 前後の短桿菌である(Fig. 4A)。同菌にAMPCを2時間作用させると、菌体は膨化し、最外層の細胞壁部分が脆弱化し剥離した像が観察された(Fig. 4B)。CDTRを同じ2時間作用させると、細胞はフィラメント状に伸長化し、脆弱化した細胞壁部位から菌体内容物が飛び出してスフェロプラスト状となり破裂した像が観察された(Fig. 4C)。

TBPMを120分間作用させたインフルエンザ菌の低倍率の像はFig. 4Dに示す。AMPCよりもさらに球状化し、一部内容物が飛び出している像が観察された。また、Fig. 4Eにみられるようにスフェロプラストがかなり変形した像も観察された。さらに180分後には細胞内に多数の大きな空胞が観察され、位相差顕微鏡で観察された像と一

致していた(Fig. 4F)。

## 考察

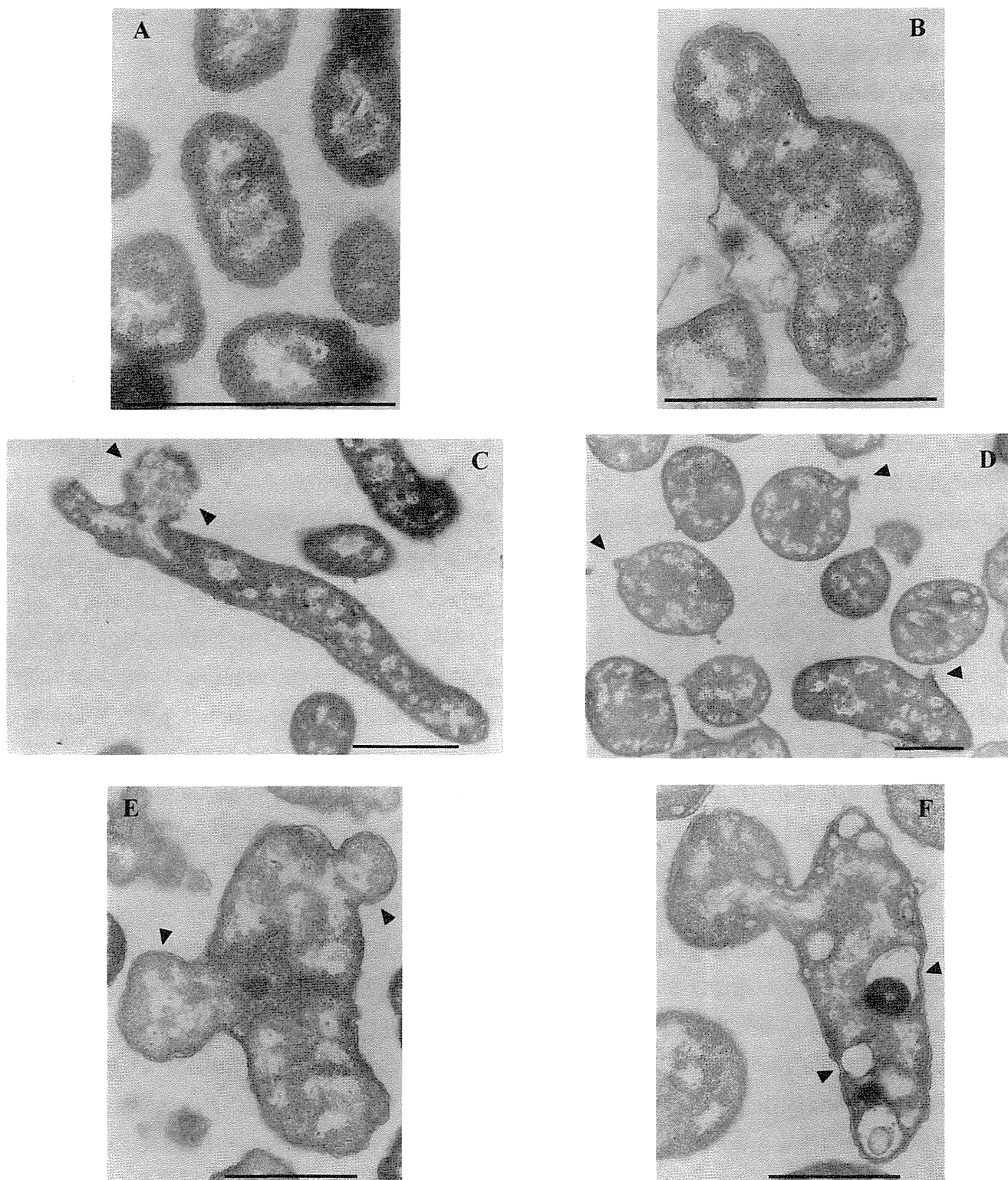
呼吸器感染症における最も主要な病原細菌の肺炎球菌におけるgPRSPの増加は、外来診療における経口抗菌薬の選択の幅を狭めている。特に、小児に対しては、ニューキノロン系薬はほとんど使用不可能なことから、 $\beta$ -ラクタム系薬あるいはマクロライド系薬の中から選択しなければならない。しかし、本邦における小児の肺炎例由来の肺炎球菌は52.3%がgPRSP、マクロライド系薬にも*ermB*を保持する高度耐性菌が48.5%、*mefA*保持の軽度耐性菌が30.6%、*ermB*と*mefA*の両方の保持菌が7.7%と極めて高い割合となっている<sup>18)</sup>。侵襲性感染症由来株でもほぼ同様の耐性率となっている<sup>19)</sup>。

一方、成人における侵襲性感染症由来の肺炎球菌においては、gPRSPの割合は32.0%とやや低いが、経口セフェム系薬に対する感受性を低下させるgPISP(*pbp2x*)の割合が35.3%と高い<sup>19)</sup>。

他方、インフルエンザ菌においても2000年以降、日本においてはgBLNARが急速に増加している。インフルエンザ菌b型(*Haemophilus influenzae* type b: Hib)ワクチンが最近まで導入されなかったことや、呼吸器系感染症のみならず化膿性髄膜炎の原因菌としてその耐性率が45%を上回ることから治療上の問題となってきた<sup>20)</sup>。

インフルエンザ菌の中の病原性の明らかなHibは、2007年1月にHibワクチンが承認されたことにより、Hib侵襲性感染症は減少しつつある<sup>21)</sup>。しかし、急性中耳炎や肺炎を惹起する無莢膜型のインフルエンザ菌(Nontypeable *Haemophilus influenzae*: NTHi)の問題が依然として残っている。NTHiにもBLNARは60%以上認められ、しかもAMPCの抗菌力が劣ることが問題である<sup>22)</sup>。このような背景から、耐性菌による小児の呼吸器

Fig. 4. Morphological changes in *H. influenzae* JPH002 cells.



(A) Control cells, (B) after exposure to AMPC ( $12.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 2 h, (C) after exposure to CDTR ( $2.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 2 h, (D) and (E) after exposure to TBPM ( $1.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 2 h, (F) after exposure to TBPM ( $1.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 3 h, respectively. Cells were observed with a transmission electron microscope (model JEOL JEM-1200 EXS, JEOL Ltd). Each bar indicates  $1 \mu\text{m}$ .

感染症用治療抗菌薬として開発されたのがTBPMである。

TBPMの肺炎球菌およびインフルエンザ菌に対する抗菌活性と経時的殺菌効果は、小林ら<sup>11)</sup>、岸井ら<sup>12)</sup>によって、報告されているが、その特徴は殺菌性が優れていることにある。特徴は臨床にも反映され、特にgPRSPが原因菌であった症例において、投与3日目で菌の消失が認められている<sup>23)</sup>。本薬が優れた殺菌性を発揮するのは、肺炎球菌のPBP1AとPBP2Bに高い親和性を有しているためである<sup>24)</sup>。前者は細胞壁を長軸方向へ合成する酵素、後者は本菌特有の菌体先端のランセット型を形成する酵素である。このため、TBPMでは菌が伸長化しないで溶菌するのに対し、隔壁合成酵素が第一標的のセフェム系薬は伸長化した後、溶菌するといった違いがみられる<sup>11)</sup>。

肺炎球菌に対するセフェム系薬の作用では、菌は隔壁合成が阻害されて著しく伸長化した後、脆弱化した隔壁部分から溶菌するのに対し、TBPMでは作用後分裂が起らず2.5時間で速やかにほぼ完全に溶菌する像が観察された。TBPMのgPRSPに対するMICは0.031–0.063 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるが、4mg/kg投与時の約30分後に得られる最高血中濃度は平均3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、その1時間後の血中濃度は、1.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とされている。投与2時間後の血中濃度も約1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ あるとされ、gPRSPのMICの約10倍の薬剤濃度が保たれていると推測できる。つまり、TBPMで明らかに優れた臨床効果が得られているのは、gPRSPのMICを大きく上回る血中濃度が長く保たれていること、短時間殺菌性に優れていることによると考えられる。

一方、インフルエンザ菌に対するTBPMの殺菌性は、結果に示したように作用後1時間から溶菌像が観察され始めるが、その多くは巨大なスフェロプラストのまま、次第に細胞内に空胞を形成し、死滅していく。そのため、肺炎球菌よりも溶菌に時間を要すると考えられる。しかし、岸井ら<sup>12)</sup>

の殺菌効果の成績によると、ヒト血清を10%の割合で加えた場合、MIC濃度のTBPMを作用させた2時間後に3- $\log_{10}$ の生菌数の減少が認められたと報告しており、臨床での短時間殺菌性を示唆している。

AMPCやTBPMを作用させたインフルエンザ菌は、細胞壁を長軸方向へ新たに伸長化する合成酵素阻害によってスフェロプラスト化し、細胞壁の脆弱部位から破裂崩壊に至る。これらの薬剤はインフルエンザ菌の細胞壁合成酵素のPBP1B、2および4に対して結合親和性を有しているためである<sup>24)</sup>。つまり、セフェム系薬のCDTR等がPBP3に高い親和性を有し、著しく伸長化した後に溶菌するのとは明らかに異なる。

電子顕微鏡によって観察されたように、インフルエンザ菌の細胞壁部分は $\beta$ -ラクタム系薬の作用によりスフェロプラスト化しても、細胞内圧と外圧の差に比較的耐えるような構造をしているため、肺炎球菌に比していずれの薬剤であっても溶菌に時間を要すると考えられた。また、この細胞壁構造により、溶菌するまでは菌は死滅していないと考えられる。生方ら<sup>25)</sup>は、 $\beta$ -ラクタム系薬作用後のスフェロプラスト化した菌を薬剤フリーの環境へ戻すと、再増殖する能力を保持していることをすでに報告している。

一方、DNA合成阻害薬であるTFLXは、一定時間作用させるとDNA合成が阻害され、次いでタンパク合成が二次的に阻害されて溶菌せずに死滅していると考えられる。このため、Fig. 3に示したように基本的に溶菌しないままに死滅していくと推定されるが、今後はアクリジンオレンジ等の生体染色でそのことを確認する必要があると考えている。

最後に、gPRSPやgBLNARによる感染症の治療抗菌薬を選択する際には、使用抗菌薬の特徴をよく把握して選択することが必要不可欠であることを強調しておきたい。

## 謝辞

本研究に際し、画像撮影に御協力いただきましたヨネ・ヨネプロダクションに感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) 紺野昌俊, 生方公子: 改定ペニシリン耐性肺炎球菌。協和企画, 東京, 1999
- 2) 紺野昌俊: インフルエンザとインフルエンザ菌。新日本印刷, 東京, 2010
- 3) UBUKATA, K.: Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. *J. Infect. Chemother.* 9: 285~291, 2003
- 4) 末武光子: 急性中耳炎病態の変貌—変貌する急性中耳炎: ペニシリン耐性肺炎球菌性中耳炎の現状と対策—。山中 昇 (編) 金原出版, 東京, pp. 40~52, 2000
- 5) 山中 昇, 保富宗城: 難治化する急性中耳炎—難治化の要因とその対策—。日本感染症学雑誌 77: 595~605, 2003
- 6) KONNO, M.; S. BABA, H. MIKAWA, *et al.*: Study of upper respiratory tract bacterial flora: first report. Variations in upper respiratory tract bacterial flora in patients with acute upper respiratory tract infection and healthy subjects and variations by subject age. *J. Infect. Chemother.* 12: 83~96, 2006
- 7) UBUKATA, K.; T. MURAKI, A. IGARASHI, *et al.*: Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J. Infect. Chemother.* 3: 190~197, 1997
- 8) UBUKATA, K.; Y. SHIBASAKI, K. YAMAMOTO, *et al.*: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1693~1699, 2001
- 9) HIKIDA, M.; K. ITAHASHI, A. IGARASHI, *et al.*: *In vitro* antibacterial activity of LJC 11,036, an active metabolite of L-084, a new oral carbapenem antibiotic with potent antipneumococcal activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2010~2016, 1999
- 10) 岩田 敏, 岩井直一, 尾内一信, 他: Tosufloxacin 細粒10%の小児細菌性肺炎を対象とした非盲検非対照臨床試験。日本化学療法学会雑誌 58 (S-2): 32~49, 2010
- 11) KOBAYASHI, R.; M. KONOMI, K. HASEGAWA, *et al.*: *In vitro* activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 889~894, 2005
- 12) KISHII, K.; N. CHIBA, M. MOROZUMI, *et al.*: *In vitro* activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54: 3970~3973, 2010
- 13) 生方公子, 千葉菜穂子, 諸角美由紀, 他: Tebipenem pivoxilの小児臨床試験における肺炎球菌のPCR法による耐性遺伝子解析と抗菌薬感受性。日本化学療法学会雑誌 57(S-1): 58~66, 2009
- 14) 杉田麟也, 岩田 敏, 馬場駿吉: 高用量アモキシシリン/クラブラン酸製剤の有用性。新薬と臨牀 54: 1056~1072, 2005
- 15) 藤井良知, 吉岡 一, 奥野晃正, 他: 小児科領域におけるCefditoren pivoxil粒剤の総合評価。Jpn. J. Antibiotics 46: 95~114, 1993
- 16) 砂川慶介, 岩井直一, 岩田 敏, 他: 母集団薬物動態—薬力学的解析に基づくtosufloxacin小児用細粒の臨床推奨用量。日本化学療法学会雑誌 58 (S-2): 69~77, 2010
- 17) 生方公子, 沢井 稔, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae*感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について (第3編)。Chemotherapy 26: 656~665, 1978
- 18) CHIBA, N.; R. KOBAYASHI, K. HASEGAWA, *et al.*: Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes, and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. *J. Antimicrob. Chemother.* 56: 756~760, 2005
- 19) 生方公子: 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)。新日本印刷, 東京, 2012
- 20) HASEGAWA, K.; R. KOBAYASHI, E. TAKADA, *et al.*: High prevalence of type b beta-lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 1077~1082, 2006
- 21) UBUKATA, K.; N. CHIBA, M. MOROZUMI, *et al.*: Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000–2011. *J. Infect. Chemother.* 2012 Jul 18. [Epub ahead of print]
- 22) KISHII, K.; N. CHIBA, M. MOROZUMI, *et al.*: Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *J. Infect. Chemother.* 16: 87~93, 2010
- 23) 馬場俊吉, 鈴木憲二, 戸塚恭一, 他: Tebipenem pivoxil細粒の小児急性中耳炎および急性副鼻腔炎を対象とした非盲検非対照臨床試験 (第III相試験)。日本化学療法学会雑誌57(S-1): 151~166, 2009
- 24) 菅野利恵, 山田恵子, 馬場信吉, 他: Tebipenemの*Streptococcus pneumoniae*および*Haemophilus influenzae*に対する作用機序。日本化学療法学会雑誌57(S-1): 15~29, 2009
- 25) 生方公子, 高橋洋子, 紺野昌俊: *Haemophilus influenzae*感染症治療におけるペニシリン系抗生物質の意義について (第4編)。Chemotherapy 26: 666~675, 1978

## Morphological changes in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* and $\beta$ -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* after exposure to oral antibacterial agents

NAOKO CHIBA, MIYUKI MOROZUMI and KIMIKO UBUKATA

Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents,  
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University,  
5-9-1 Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108-8641, Japan

Morphological changes in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) and  $\beta$ -lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* (BLNAR) after exposure to oral antibacterial agents could be observed over time under a phase-contrast microscope. Morphological changes in BLNAR were also observed using a scanning electron microscope. The organisms used in this study were ME19F strain identified as genotypic(g) gPRSP (serotype: 19F) and JPH002 strain identified as gBLNAR (serotype: b). The antibacterial agents used were amoxicillin (AMPC), cefditoren (CDTR), tebipenem (TBPM), and tosylloxacin (TFLX). The concentration of each antibacterial agent to which the bacteria were exposed was set at the blood level one hour after C<sub>max</sub> when administered to children at the usual dose.

Bacteriolysis of gPRSP cells started after exposure of only 20 minutes to TBPM, and 90% of



the cells were lysed within 2 hours. A high bactericidal action of TBPM on gPRSP was supported by these findings.

When gBLNAR was exposed to AMPC and TBPM, lysis from spheroplasts and cells with vacuoles were sometimes observed. In contrast, after gBLNAR was exposed to CDTR, lysis occurred after marked filamentation in the cells, but after exposure to TFLX, cells deduced to be killed after mild filamentation without lysis.

Time-dependent morphological changes that reflect the differences in bactericidal activity and PBP affinity among  $\beta$ -lactams provide beneficial information to select antibacterial agents.

## 2

## 応用編

## 病原体と遺伝子検査

肺炎球菌,  
インフルエンザ菌

CHIBA NAOKO / UBUKATA KIMIKO

千葉菜穂子/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

**要旨** 肺炎球菌やインフルエンザ菌は、特に乳幼児と基礎疾患を有する高齢者において、ときに致命的ともなりうる重要な細菌である。現在、両菌を含む呼吸器感染症や化膿性髄膜炎等の起炎菌を、real-time PCR法を用いて、迅速に、しかも網羅的に検索することが可能となっている。しかし、両菌種は常在菌としての一面も有している。このため、喀痰や上咽頭などの非無菌的検査材料に応用する場合には、それらが起炎菌か否か、他の細菌や各種ウイルスとの混合感染の有無、血液検査値等と総合的に判断することが非常に重要である。

## はじめに

市中において発症する肺炎等の呼吸器感染症の起炎微生物は、ウイルスから細菌まで多岐にわたる。

近年、肺炎球菌やインフルエンザ菌の培地上でのコロニーを観察すると、抗菌薬の影響等の様々なプレッシャーによるためか、明らかに変化してきている。例えば、肺炎球菌では典型的な艶のある陥没型コロニーを形成せず、他の $\alpha$ 溶血性レンサ球菌と見分けがつかない極小で陥没中にヘソがあるようなコロニー（肺炎例から分離される14型に多い）、あるいは灰白色を帯びたコロニー（耐性菌でみられる）などが見受けられる。インフルエンザ菌でもある程度の大きさの灰白色で透明なコロニーではなく、極小のコロニーや辺縁がラフ状のものが散見される。

このように形態学的に変化している両菌を、無菌検査材料以外の検査材料から効率よく分離するのは意外と難しいことである。特に、成人肺炎例の喀痰では、その処理過程で肺炎球菌は死滅しや

すく、菌数が少なければ培養によって多数の常在菌の中から該当する菌を探し出すことは困難な作業となる。

抗菌薬がすでに投与されている症例では、培養で菌を証明できないことも多く経験する。また、これらの菌は小児感染症の主たる原因菌であるため、検査材料が微量であることも少なくない。

このような状況の中で、急速に発展してきた遺伝子検索による病原微生物の同定は、迅速で正確に起炎菌が特定できること、耐性遺伝子も併せて解析可能であることがメリットである反面、検査材料の質やPCRの実施方法によっては、誤った情報を臨床サイドへ与えかねない。本稿ではそれらのことを念頭におきつつ、筆者らが行っている網羅的real-time PCR法の中から肺炎球菌とインフルエンザ菌について述べる。

## ◆ 1 遺伝子同定による起炎菌検索

図1には筆者らが構築し、実際に使用しているreal-time PCR法のプロトコルを示す<sup>1)</sup>。

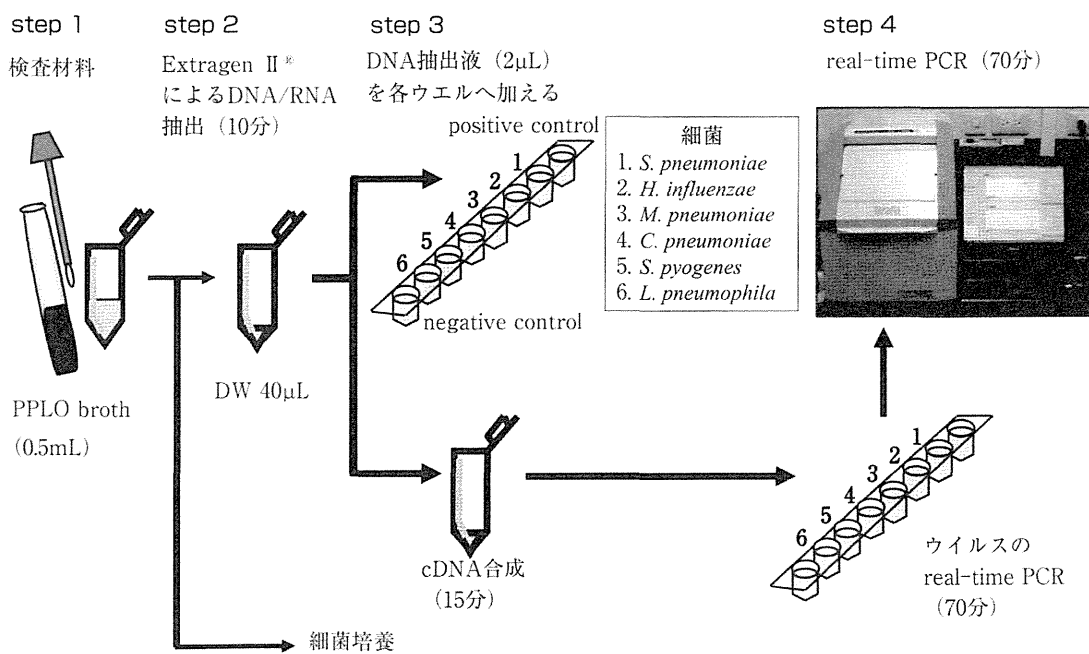


図1 細菌とウイルスの網羅的 real-time PCR のプロトコール

検体からの核酸 (DNA/RNA) 抽出は Extragen II<sup>®</sup>キット (東ソー) を用い、10 分程度で効率よく行う。細菌検索にはこの核酸サンプル 2 μL ずつを、PCR 用試薬があらかじめ 23 μL ずつ分注されたウエルへ加え、直ちに PCR 反応を実行する。

細菌は図中に示した 6 菌種が検索可能である。S. pyogenes (GAS) および L. pneumophila は他のレンサ球菌またはレジオネラ菌と区別するために、1 ウエル/2 遺伝子を検索している。なお、図中にも示したが、原因菌として細菌関与が強く疑われる際には、必ず培養も実施することが必要である。

図2には、real-time PCR に用いられるプローブの設計と蛍光発色の原理を示す。筆者らは molecular beacon (MB) probe, あるいは RNA が挿入された chimera probe (cycling probe) を用いている。6 菌種検出用プローブは、増幅される DNA 断片内の特異性の高い領域に結合するように設計する。プローブの 5' 側には FAM あるいは ROX といった蛍光色素、3' 側には蛍光を消去する BHQ-1 を結合させている。MB probe は

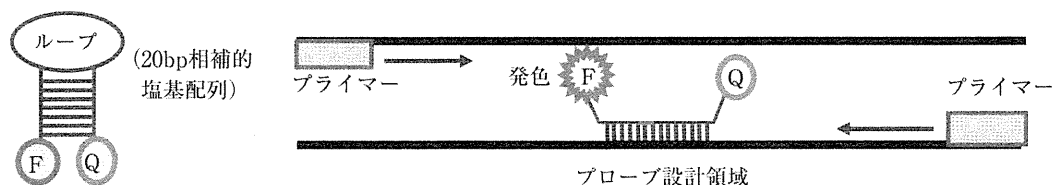
相補的部分へ結合すると蛍光発色するが、cycling probe では RNaseH によって切断され、解離した後に発色する。この蛍光発色量は 1 サイクルごとに測定され、そのデータは接続されたパーソナルコンピュータ (PC) 内に蓄積されていく (図1)。これらのプローブを使う方法は、従来の PCR 法に比して増幅される DNA 断片内にさらにプローブを結合させるので、特異性がきわめて高い。

なお、菌種同定用に選択される遺伝子は、変異の挿入されにくい安定的な塩基配列を有していること、特異性が高いことが条件となる。一般的には 16S rRNA 遺伝子上の菌種特有の領域が選択されるが、菌種によってゲノム当たりのコピー数が異なるので、推定コピー数を算出する際にはそれを考慮しなくてはならない。ちなみに筆者らは、肺炎球菌には自己融解酵素をコードする *lytA* 遺伝子、インフルエンザ菌では 16S rRNA 遺伝子を選択している。

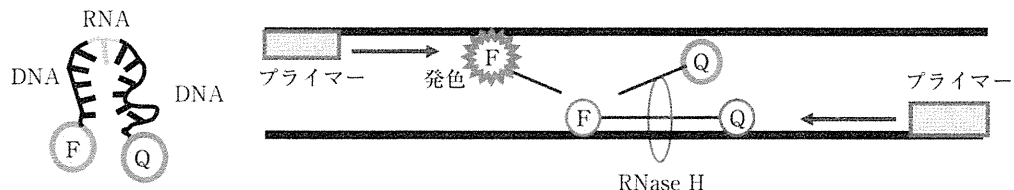
## 2 real-time PCR 法による感度と特異度

PCR による DNA の増幅は、標的遺伝子 1 分

1) molecular beacon probe (30~35bp)



2) cycling probe (12~15bp)



蛍光物質：FAM (6-carboxyfluorescein), ROX (carboxy-X-rhodamine) など  
クエンチャー：BHQ-1 (black hole quencher 1) など

図2 real-time PCR法の原理：プローブの設計と蛍光発色

子からPCRがスタートすると、30サイクル後には理論上、チューブ当たり $10^9$ コピーとなるはずである。

ここにはそのデータは示さないが、菌数とPCRにおける陽性反応を示し始めるサイクル数との関係を見ると、6菌種それぞれは10コピー/ウエルの条件で、陽性反応が33~38サイクルで認められる検出感度となっている<sup>1)</sup>。

今までに多数の検査材料を解析してきた経験では、ほぼ確実に釣菌ができるのは28サイクルまでに陽性反応を示した場合で、以後29~33サイクルでは1サイクルごとに釣菌可能な割合が減少していく。34サイクル以上では釣菌はほぼ不可能である。

つまり、real-time PCRで28サイクルまでに陽性反応が確認できたなら、当該菌の関与を推定してほぼ差し支えないが、それ以上のサイクルでの陽性反応は、電気泳動等の手段で目的遺伝子の増幅であるか否かを確認することが必要である。しばしば、40サイクル以上のシグナルを陽性と判定している成績を見受けるが、理論上はあり得ないことである。

### 3 肺炎例解析の実際

図3には胸部XPによって肺炎と診断された4例の具体例を示す。Aは肺炎球菌とRSVの混合感染、Bは肺炎マイコプラズマ、Cはインフルエンザ菌、Dはレジオネラ菌による肺炎と確定されている。それぞれの症例における①年齢、②発症からの病日、③血液検査値、④前投与抗菌薬の有無と種類をみると、それらがきわめて重要であることが明白である。検索に本来無菌検査材料でない喀痰や上咽頭ぬぐい液を用いた場合、肺炎マイコプラズマ、あるいはウイルスが明らかな陽性反応を示したならば、原因微生物と判定してほぼ間違いはないが、肺炎球菌やインフルエンザ菌は小児では常在化していることも多く、PCRの結果は血液検査値と併せて総合的な判断が必要である。

また、前投与薬の有無やその種類が菌量に大きく影響していることにも留意する。特に、最近ceftriaxone (CTRX)がoutpatient antimicrobial therapy (OPAT)として使用されるようになり、PCRや細菌培養で菌が証明できないといった例が散見される。

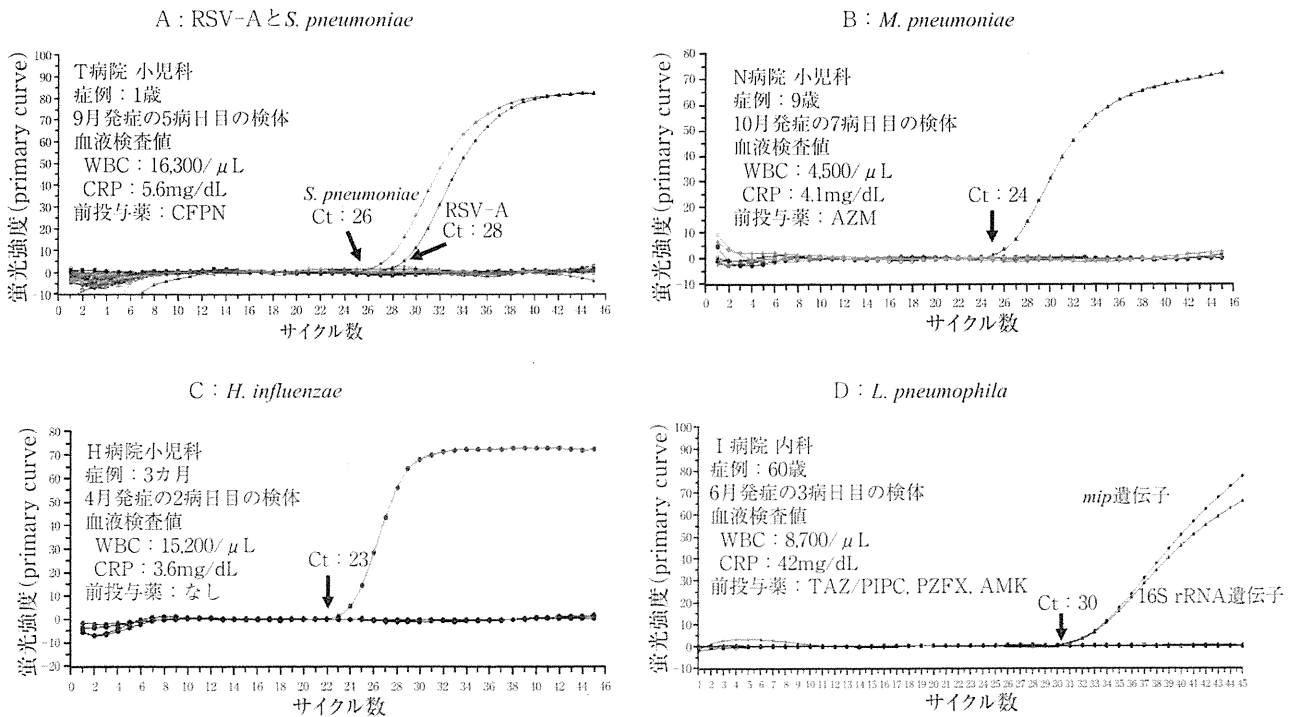


図3 real-time PCR法を用いた網羅的迅速検索での細菌陽性例の実際

#### 4 入院肺炎例に対する多施設解析

筆者らは、多施設参加の「ARD研究会（代表：慶應義塾大学 岩田 敏教授）」を組織し、今までに多数の入院肺炎例を解析してきた<sup>1-3)</sup>。

図4には2008年から2009年にかけて、胸部XPで肺炎と診断された小児入院肺炎例に対する原因微生物の内訳を示す。細菌にはreal-time PCRと同時に培養を実施、血液検査値や抗体価の上昇の有無と併せて最終的に判断されている。注目すべきことに、細菌とウイルスはほぼ同じ割合で、原発感染としてウイルス、続発感染として細菌がかかっていることが明らかである。そして、細菌では肺炎球菌が最も多く、次いで肺炎球菌とインフルエンザ菌の混合感染、インフルエンザ菌、肺炎マイコプラズマ菌の順である。これら3菌種で98%を占めている。

岡田ら<sup>3)</sup>の原因微生物に関する詳細な解析によると、常在細菌の混入する上咽頭ぬぐい液をreal-time PCRに用いた場合、肺炎マイコプラズマ菌、肺炎クラミジア菌、そして各種ウイルスが明らか

に陽性であれば、それらをまず原因微生物として推定し、その後に肺炎球菌やインフルエンザ菌等の関与を判断する2ステップ解釈法を提唱している。それには入院時の血液検査値が重要で、統計学的解析からは、①WBCが13,000cells/ $\mu$ L以上であることと、好中球が7,000cells/ $\mu$ L以上の両方を満たしていること、②あるいはCRPが $\geq 3.0$ mg/dLの場合、細菌関与が推定されるとしている。

#### 5 real-time PCR法を用いた耐性遺伝子解析

肺炎球菌とインフルエンザ菌は、現在real-time PCR法による耐性遺伝子解析が可能である。手法は、前述した方法と同じである。肺炎球菌の耐性遺伝子検索では、 $\beta$ -ラクタム系薬の作用標的である細胞壁合成酵素（penicillin-binding protein：PBP）をコードする遺伝子、すなわち*pbp1a*、*pbp2x*、*pbp2b*遺伝子の変異とマクロライド系薬耐性遺伝子の*mefA*と*ermB*を検出する<sup>4,5)</sup>。

インフルエンザ菌では、 $\beta$ -ラクタマーゼ産生

症例：903例

※これら原因菌の最終的判定は、胸部X線、血液検査値と併せて行われている。

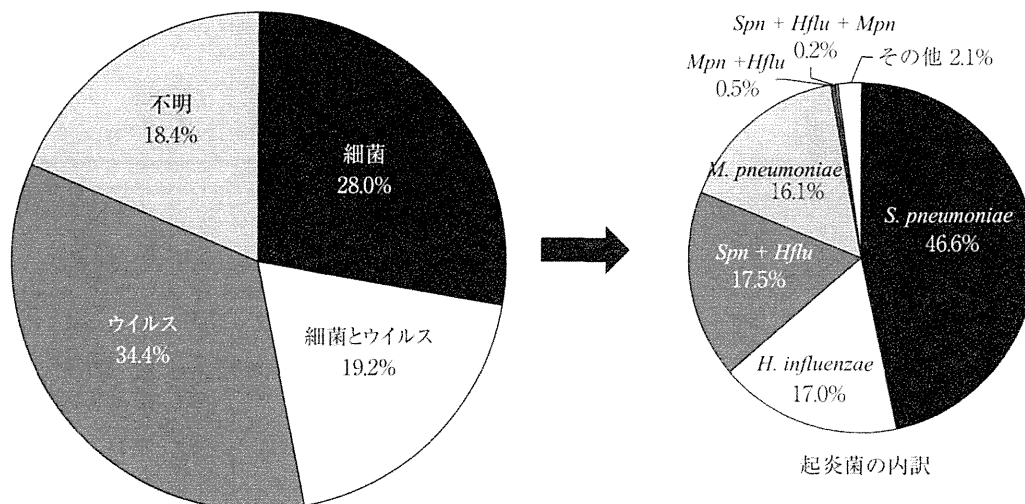


図4 網羅的 real-time PCR によって明らかにされた小児肺炎例の原因微生物の内訳

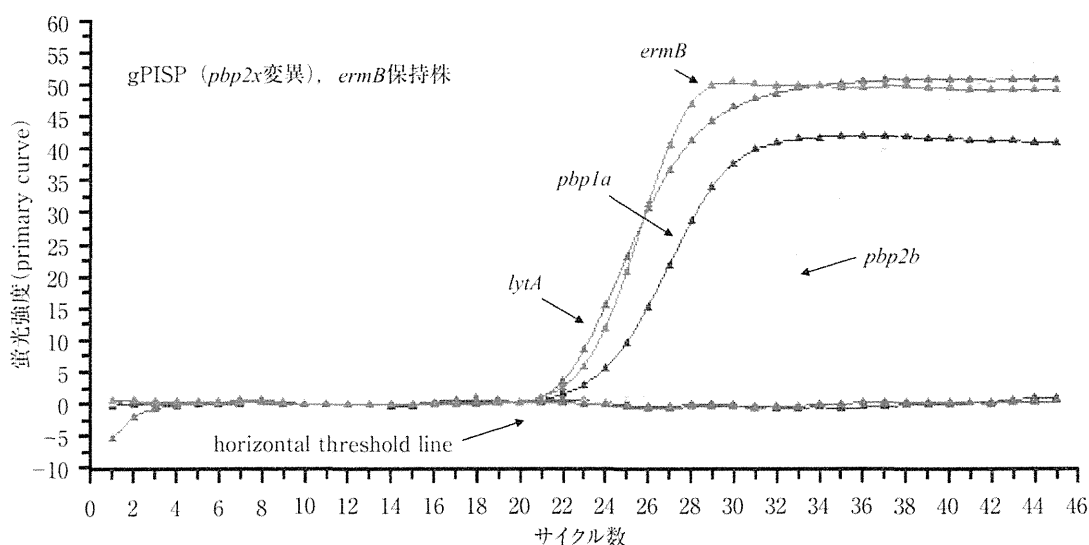


図5 肺炎球菌の real-time PCR 法による薬剤耐性遺伝子解析  
*pbp* 遺伝子のプライマーは遺伝子変異のない感性菌を検出するように設計されている。

遺伝子 (TEM-1 型) と隔壁合成酵素の PBP3 をコードする *ftsI* 遺伝子上の変異, および莢膜の type b をコードする *capB* 遺伝子を検出する<sup>6)</sup>。

肺炎球菌の各遺伝子に対して構築したプライマーとプローブを用いて PCR を行った結果を図5に示す。耐性肺炎球菌の *pbp* 遺伝子は変異が非常に多いことが特徴で, このため耐性化にかかわる

重要なアミノ酸置換に相当する塩基の変異の有無を検索するように設計されている。PCR によって増幅されるのは, 変異のない感性菌の遺伝子である。つまり, 増幅がなければ, 変異があるということになる。

一方, マクロライドは耐性遺伝子を保持する菌で DNA の増幅が起こる。このような解析では,

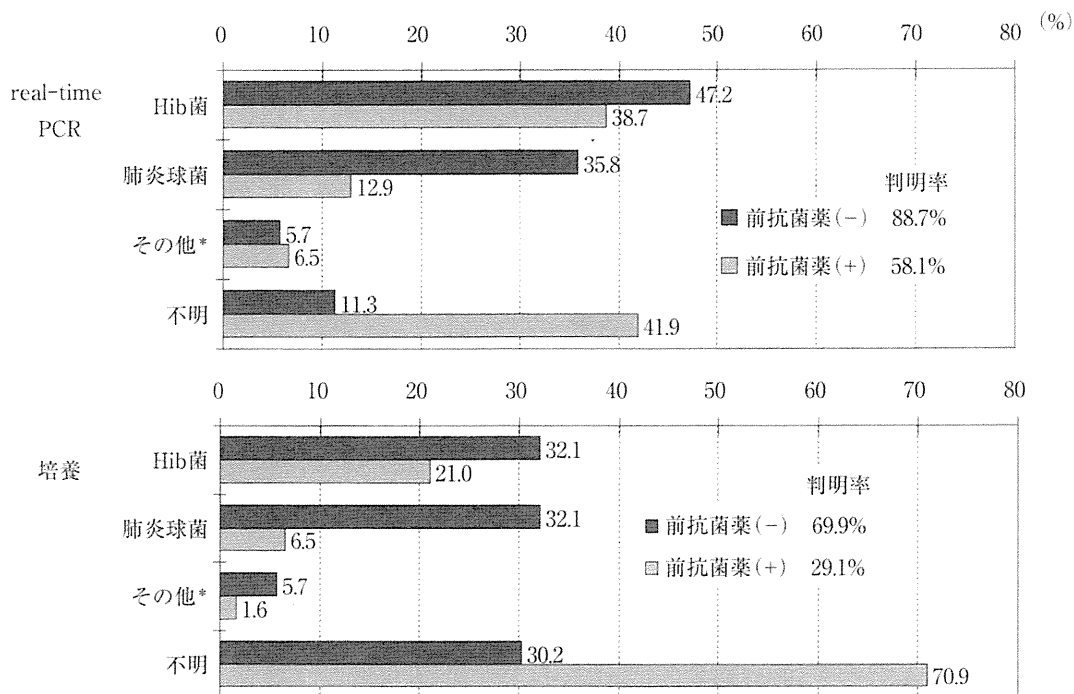


図6 化膿性髄膜炎疑い例に対する real-time PCR による網羅的検索  
\*：その他には GBS, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *M. pneumoniae* が含まれる。

バイオアッセイによる感受性検査時の測定誤差の問題はない。そして何よりも、遺伝子変異と感受性測定による MIC 値の相関を大規模に調べておけば、個々の分離菌の遺伝子変異結果から抗菌薬の MIC が推定できるといった利点がある。

## 6 化膿性髄膜炎疑い例に対する real-time PCR 法の応用

小児と成人を対象とし、結核菌と真菌を除く化膿性髄膜炎例の 90%の原因菌を明らかにしたいと考え、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③大腸菌、④B 群溶血性レンサ球菌 (GBS)、⑤髄膜炎菌 (*N. meningitidis*)、⑥リステリア菌 (*L. monocytogenes*)、⑦黄色ブドウ球菌、⑧マイコプラズマ菌の同時検索法を構築した<sup>7)</sup>。手法は先に述べた肺炎例に対するものと基本的には同じである。肺炎球菌やインフルエンザ菌で陽性反応が早い段階で確認できれば、同一核酸サンプルを用いて耐性遺伝子検索も可能である。

図6には、臨床所見ならびに髄液細胞所見から

細菌性髄膜炎が疑われ、担当医から筆者らの元へ精査依頼のあった髄液の成績を示す。成人例も含めて3年間で168例が解析されている<sup>7)</sup>。

依頼検体全体では、莢膜b型インフルエンザ菌 (Hib) の陽性例が圧倒的に多く、次いで肺炎球菌である。その他に、3カ月未満児の GBS 例が4例、大腸菌が3例、リステリア菌と肺炎マイコプラズマ菌が各1例含まれている。

現実問題として、対象例の約半数に注射薬が投与されていた。それらの例では前投与薬なしの症例に比べ、肺炎球菌の陽性率は明らかに低く、本菌は抗菌薬の影響を受けやすいことが示されている。抗菌薬の前投与がなければ real-time PCR による原因菌判明率は 88.7%であったのに対し、注射用抗菌薬が投与されてしまうと、PCR といえども判明率は 58.1%と有意に低下する。

同一検体に対して実施した培養による原因菌判明率はさらに劣り、抗菌薬の前投与なしでも判明率 69.9%、抗菌薬が使用されていれば 29.1%と、きわめて低い結果となっている。重症例ほど、検

査材料採取のタイミングが重要であることを強調しておきたい。



微生物検査をとりまく課題は山積している。重症化のおそれがある症例や重症例に対する原因微生物の推定には、培養検査だけでなく確実に進歩している分子生物学的手法，すなわち，ここで述べたような網羅的迅速検索法を積極的に採り入れていく必要がある。原因微生物が短時間で明らかにできれば，医師は適切な治療抗菌薬を自信をもって選択できる。結局は患者自身のため，医療経済上の点からも大きなメリットになり得るはずである。

ただし，real-time PCR 法を含む網羅的な検索手法はすでに診断ツールとして応用段階に入っているものの，PCR の理論と得られた結果の判定には基礎的知識の裏づけが必要である。常在菌の混入する検査材料での結果の解釈は，診断に直結するので特に慎重であらねばならない。

なお，近年，世界的レベルで原因菌を遺伝子学的に比較する multilocus sequence typing (MLST) が分子疫学解析の主流となっている。誌面の関係でそれらの成績は省略したが，菌の拡散を地球規模で考察する上で今後，重要な解析手段となるであろう。

謝辞：厚生労働科学研究「新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業（H22-新興-一般-013），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」にご協力いただいている検査技師各位に感謝いたします。

\* \* \*

## 文 献

- 1) Morozumi M, Nakayama E, Iwata S *et al.* : Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol* 44 : 1440-1446, 2006.
- 2) Hamano H K, Morozumi M, Nakayama E *et al.* : Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother* 14 : 424-432, 2008.
- 3) Okada T, Morozumi M, Sakata H *et al.* : A practical approach estimating etiologic agents using real-time PCR in pediatric inpatients with community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother* : 2012 May 9 [Epub ahead of print]
- 4) Chiba N, Morozumi M, Ubukata K : Application of the real-time PCR method for genotypic identification of beta-lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. *Microb Drug Resist* 18 : 149-156, 2012.
- 5) 生方公子（研究代表者）：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。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，平成 22 年度総括研究報告書。
- 6) Kishii K, Morozumi M, Chiba N *et al.* : Direct detection by real-time PCR of ftsI gene mutations affecting MICs of  $\beta$ -lactam agents for *Haemophilus influenzae* isolates from meningitis. *J Infect Chemother* 17 : 671-677, 2011.
- 7) Chiba N, Murayama SY, Morozumi M *et al.* : Rapid detection of eight causative pathogens for diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR. *J Infect Chemother* 15 : 92-98, 2009.



## 病原体と遺伝子検査

 $\beta$  溶血性レンサ球菌

WAJIMA TAKEAKI / SUNAOSHI KATSUHIKO / UBUKATA KIMIKO

輪島丈明\*<sup>1</sup>/砂押克彦\*<sup>1,2</sup>/生方公子\*<sup>1</sup>\*<sup>1</sup>●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\*<sup>2</sup>●埼玉県衛生研究所

**要旨** *Streptococcus pyogenes* (GAS), *S. agalactiae* (GBS), および *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) の3菌種は、市中型侵襲性感染症の主要な起原因菌として注目されている。GASとSDSEはゲノム上相同性が高く、多くの共通する病原因子を保持している。中でも、菌体表層のM蛋白には多様性があるが、その遺伝子を解析する手法が世界的な疫学解析の主流である。GBSの病原因子である莢膜型別も、PCRによる解析へとシフトしている。

## はじめに

$\beta$  溶血性レンサ球菌は常在菌としての側面を持つ一方で、咽頭炎や膿痂疹などの局所感染症から髄膜炎や劇症型感染症などの全身感染症まで、ヒトに対して幅広い病態を引き起こす。急速な少子・高齢化社会を迎えた我が国では、基礎疾患を有する人々の増加とともに、これらの菌による侵襲性感染症が増加しており、しかも重症化しやすく予後不良となりやすい<sup>1)</sup>。 $\beta$  溶血性レンサ球菌の中でも、*Streptococcus pyogenes* (A群溶血性レンサ球菌; GAS), *S. agalactiae* (B群溶血性レンサ球菌; GBS), *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) の3菌種が临床上、特に重要である。

本稿では、この3菌種の病原因子に対する分子疫学的型別手法、および薬剤耐性遺伝子解析について、筆者らが実際に用いている手法と、実際に得られた成績を中心に述べる。

## 1 病原因子

GASとSDSEは、図1に示すように菌体表層に線維状に突出したM蛋白を持ち、これが宿主

細胞への接着に関与している<sup>2)</sup>。さらにM蛋白は抗オプソニン活性を示し、宿主免疫系からの回避にもかかわっている<sup>3)</sup>。次世代シーケンサーの普及に伴い、筆者らのグループを含めいくつかのグループで全ゲノム解析が行われ、GASとSDSEはこれまでそれぞれ13株と2株のゲノム解析が終了し、日本DNAデータバンクのウェブサイト (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) 上で公開されている。その結果、この2菌種の遺伝学的相同性は高く、SDSEの遺伝子71.9%がGASのホモログであることが明らかにされている<sup>4)</sup>。つまり、GASとSDSEにはM蛋白以外にも組織壊死や菌の組織内での拡散を助長する因子、すなわちストレプトリジンOやストレプトキナーゼ、ヒアルロニダーゼ等が共通して存在し、それらが複合的に絡まって特徴的な病態を引き起こすと考えられている<sup>4,5)</sup>。

一方、GBSはGASやSDSEとの相同性は15%程度と低く、遺伝学的に異なっている<sup>4)</sup>。GBSの病原性にかかわる重要な因子としては、菌体表層の多糖体からなる莢膜が広く知られている。莢

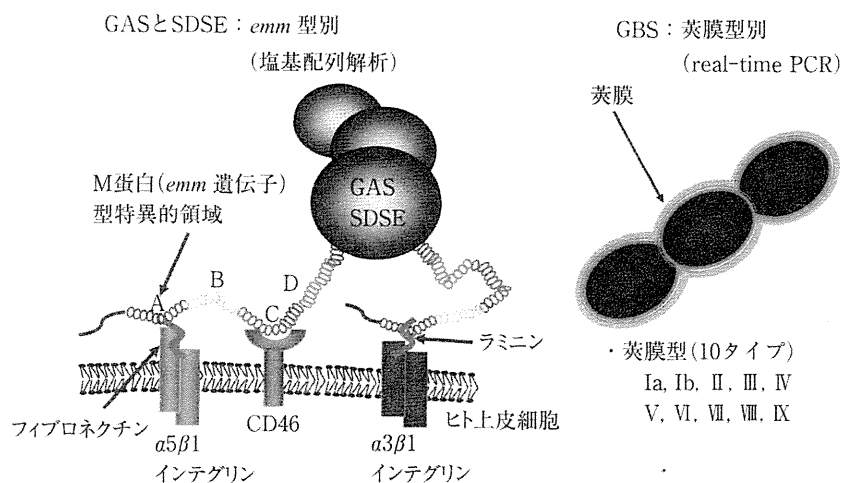


図1 GASとSDSEおよびGBSの菌体表層構造

膜は現在 Ia, Ib, II, III等の10種類が報告されているが、これらは菌の宿主貪食細胞からの回避に参与している<sup>6)</sup>。

## 2 遺伝子解析による型別法

### ●GASとSDSEに対する*emm*型別

これまでGASの疫学解析には、本邦では抗血清を用いたT型別が広く行われてきた。しかし、この手法は病原性に乏しいT蛋白が対象であり、世界的には病原性が明らかなM蛋白をコードする*emm*遺伝子の塩基配列に基づく型別法が主流となっている<sup>7)</sup>。

*emm*遺伝子の先端にはAリピート領域と呼ばれる多様性に富む可変領域(図1)があり、疫学解析はこの領域の塩基配列を調べることからスタートする。米国疾病管理予防センター(CDC)のデータベースには今までのデータが蓄積されており、ウェブサイト上で公開されている(<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>)。解析した塩基配列をウェブサイト上から入力すると、データベース内の配列と相同性の高い*emm*型がE-mailで返信されてくる。

図2には、2006年と2010年に筆者らが収集した侵襲性感染症由来GAS株の*emm*型分布、ならびに比較のために米国の成績とを示す<sup>1,8)</sup>。両国

に共通して*emm1*型が多いが、EU諸国でも同様である<sup>9)</sup>。ただし、米国ではその他とした型が30%も含まれ、我が国よりも原因菌の多様性が伺える。

一方、前述したように、SDSEもM蛋白を保有している。このため同一の反応条件と方法で*emm*遺伝子型別が可能である。2010年に筆者らが解析した侵襲性感染症由来SDSE株の*emm*型分布を図3に示す<sup>1,10)</sup>。最も優位な*emm*型はstG6792型であったが、米国の成績とは明らかに異なっていた。我が国では2012年現在、依然としてstG6792型が優位に分離されているが、なぜ本菌では国によって主要な型が異なるのか、今後明らかにしていく必要がある。

なお、SDSEの大多数はLancefield分類でCあるいはG群と判定される。しかし、stG245とstG485型の中には、A抗原を持つ株が数%存在している。正確な菌種識別のためにはPYR試験を行うことが肝要である。PYR陽性であればGAS、陰性であればA群凝集であってもSDSEとなる。

このように、M蛋白の遺伝子型を調べることは、諸外国との疫学比較ができるだけでなく、派生的に菌種を正確に同定することができ、*emm1*型のような病原性の高い株を確認できる利点があ

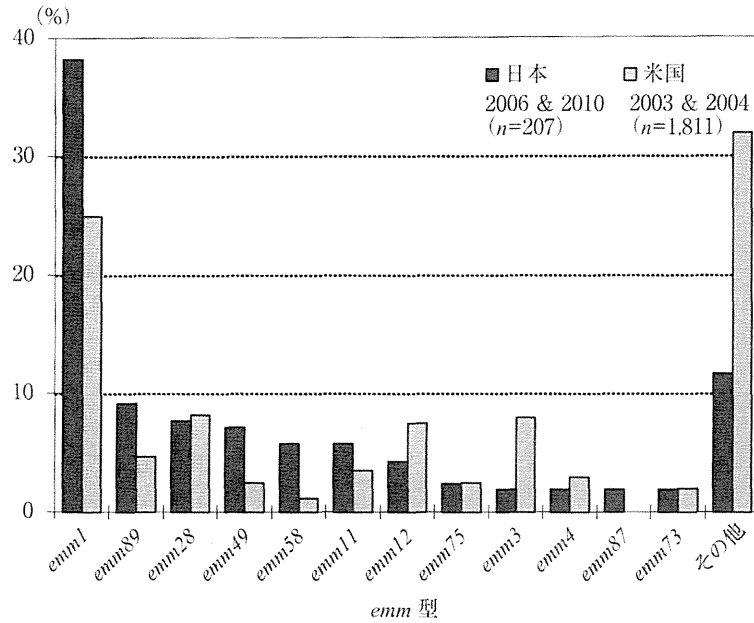


図2 侵襲性感染症由来 GAS の emm 型：日本と米国<sup>8)</sup>との比較

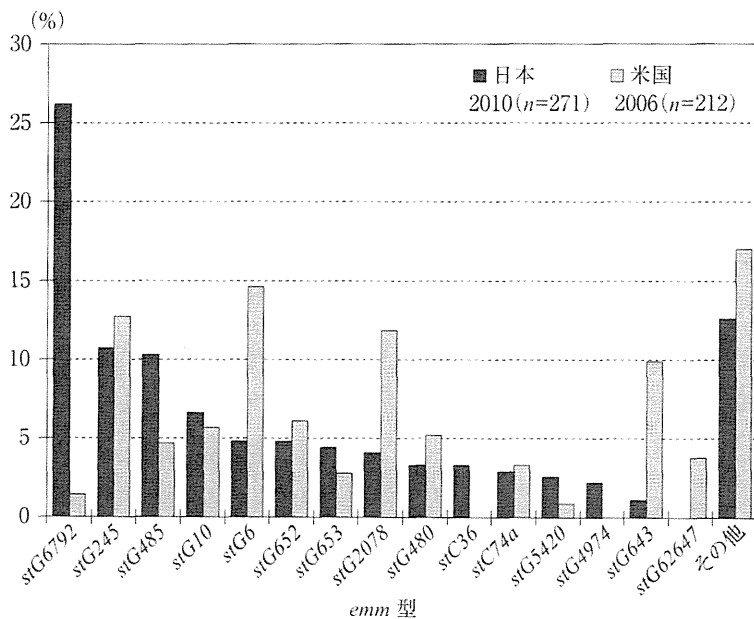


図3 侵襲性感染症由来 SDSE の emm 型：日本と米国<sup>10)</sup>との比較

る。

### ●GBS の莢膜型別

GBS の型別には、前述した莢膜多糖体に対する抗血清を用いた抗原抗体反応による方法が行われてきた。しかし近年、莢膜をコードする遺伝子を PCR で検出する手法が確立され、比較的容易

に型別することが可能となった<sup>11,12)</sup>。筆者らの研究室ではこれらの手法をさらに発展させ、real-time PCR 法により菌種同定と同時に型別を行う手法を確立している（投稿準備中）。

図4には、その PCR 法によって侵襲性感染症由来 GBS の莢膜型を決定した成績を小児と成人とに分けて示す<sup>1)</sup>。成人では I b 型株が多いが、

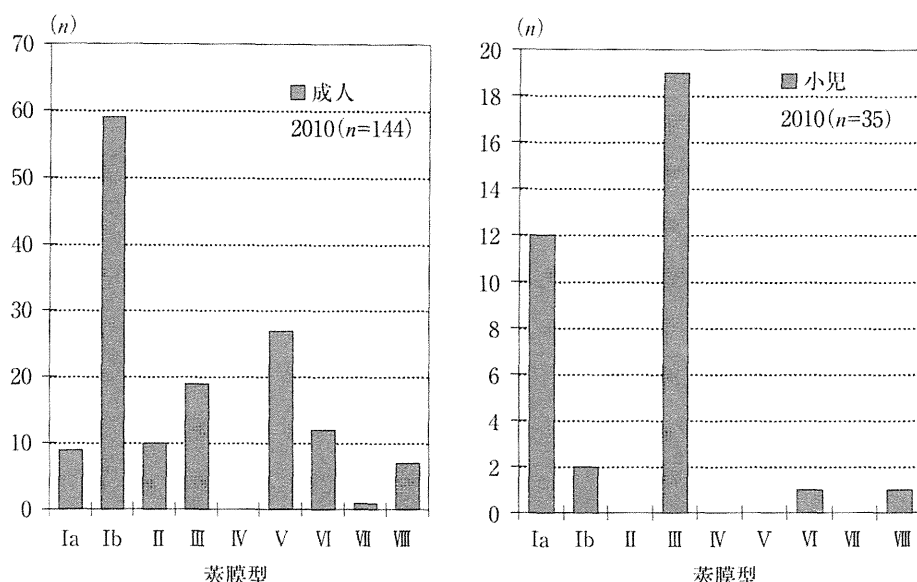


図4 侵襲性感染症由来 GBS の莢膜型：成人と小児由来株の比較

その他の莢膜型株も認められ多様化している。ところが、小児ではⅢ型株が突出して多く、次いで Ia, Ib 型の順で、他の型はほとんど認められない。小児では生後 6 日以内の発症例を早発型といい、敗血症が多いが、それらでは Ia とⅢ型株がかかわっている。7 日以降 3 カ月までの遅発型では髄膜炎例が多いが、そのほとんどはⅢ型の GBS に起因する。

このように、GBS による侵襲性感染症は、成人と小児では疫学的に明らかに異なる菌によって惹起されている。

### ●multilocus sequence typing (MLST)

MLST は、遺伝子解析技術の高速・低コスト化に伴い普及した解析手法であるが、GAS, GBS, SDSE も含めた約 30 種の細菌ですでに解析可能である。いずれも 7 個のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を決定し、*emm* 型別と同様に MLST ウェブサイト (<http://www.mlst.net>) にそのデータを入力することで、それぞれのシーケンスタイプ (ST 型) を決定する仕組みである。

ハウスキーピング遺伝子には菌の生存に必須の酵素をコードする遺伝子が選択されているが、それらは抗菌薬などの菌の周辺環境の影響を受け

くいで、その中に起こる変異は進化の時間を示すという理論である<sup>13)</sup>。つまり、7 個のハウスキーピング遺伝子を解析することで、同一の *emm* 型や莢膜型を示す株の時間依存的な進化を推定できる。また、これを基に系統樹を作成することで遺伝的な差異も示すことが可能である。

## 3 抗菌薬感受性と耐性遺伝子

### ●β-ラクタム系抗菌薬

2010 年に筆者らが収集した侵襲性感染症由来 GAS, SDSE および GBS の抗菌薬感受性を表 1 に示す。GAS および SDSE では、β-ラクタム系抗菌薬に対する耐性株はこれまで報告されていない。しかし、GBS においてはアミノ酸置換を生じた PBP2X を保持する軽度耐性株が報告されている<sup>14)</sup>。筆者らの成績でも、この軽度耐性株が 1% ほど認められたが、すべて成人由来株であった。今後、新生児がこのような株によって髄膜炎を発症すると、髄液への薬剤移行や殺菌性の低下のために、治療に難渋することになるかもしれない。

### ●マクロライド (ML) 系抗菌薬

表 1 に示すように、3 菌種において ML 耐性株が存在し、GAS ではすでに 55%、SDSE で 19%、