

## 国内で分離された侵襲性髄膜炎菌感染症の原因株の 血清学的及び分子疫学的解析

研究分担者：高橋 英之（国立感染症研究所細菌第一部）

**研究要旨** 日本における髄膜炎菌による感染症（侵襲性髄膜炎菌感染症）の実態に関しては不明な点が多い。本研究では10道県（北海道、宮城、山形、新潟、三重、奈良、高知、福岡、鹿児島、沖縄）のみならず全国における侵襲性髄膜炎菌感染症のサーベイランスネットワークの拡大を図り、侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌の積極的収集とその血清学的及び分子疫学的解析を試みた。

### A. 研究目的

侵襲性髄膜炎菌感染症は海外においてはヒト-ヒト感染による集団感染事例が多く報告され、常に公衆衛生的注視を余儀なくされている。一方で、日本においては年間40例程度の稀少感染症となっている。しかし、2011年5月に宮崎の高校生の寮で発生した侵襲性髄膜炎菌感染症の集団感染事例は日本においても侵襲性髄膜炎菌感染症は楽観視出来ないということを改めて認識させる事例となり、ワクチン導入の経験もない日本において何故髄膜炎菌性感染症が少ないのか、そもそも健康保菌者の髄膜炎菌保菌率はどのようになっているのかを問われる事例となった。しかし、侵襲性髄膜炎菌感染症の実態はその稀少感染症の実態ゆえに不明な点が多く、そのサーベイランスシステムも構築されてこなかった。

そこで、本研究においては国立感染症研究所・感染症疫学センターの神谷元博士と共同で、感染症法で5類の全数報告となっているNESIDに報告された侵襲性髄膜炎菌感染症の把握と、その原因株の収集、及びその血清学的及び分子疫学的解析を行い、侵襲性髄膜炎菌感染症の疫学情報及びその原因菌の情報を統合させた侵襲性髄膜炎菌感染症のサーベイランスシステムの構築を試みた。研究分担者は主に侵襲性髄膜炎菌感染症の把握と、その原因菌の収集、及びその血清学的及び分子疫学的解析を実施した。

### B. 研究方法

#### 1) 菌株の収集

各10道県に限定せず、全国の同県衛生研究所、保健所の協力を得て菌株を血液寒天培地・常温で国立感染症研究所の方へ輸送する手配を行なった。

#### 2) 菌の生育方法

輸送された髄膜炎菌は直ちにGC寒天培地に塗布後、37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下で一晩培養した。蘇生培養された菌は凍結保存し、一部を解析に用いた。

#### 3) 菌体の処理（DNAサンプルの調製）

プレート上の菌体1μl loop分を100μlのTEに懸濁した。そこからDNAの抽出はDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて添付プロトコール通り行い、200μlのAEで溶出後、精製後A<sub>260</sub>にて濃度測定を行ない、実験に供した。

#### 4) 血清群型別

##### a) PCR反応液の調製

以下の表に従って6本のPCR反応液を調製する。

表1 血清群型別用PCRプライマー

同定因子	プライマー名	塩基配列	長さ
<i>crgA</i> (髄膜炎菌の陽性コントロール)	<i>crgA</i> -1	5'-GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC-3'	25mer
	<i>crgA</i> -2	5'-CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT-3'	24mer
血清群 A	orf2 (A)-1	5'-CGCAATAGGTGTATATATTTCTTCC-3'	24mer
	orf2 (A)-2	5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	24mer
血清群 B	siaD (B)-1	5'-GGATCATTTTCAGTGTTCACCA-3'	24mer
	siaD (B)-2	5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'	24mer
血清群 C	siaD (C)-1	5'-TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3'	25mer
	siaD (C)-2	5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	23mer
血清群 Y	siaD (Y)-1	5'-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3'	22mer
	siaD (Y)-2	5'-CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	27mer

鋳型DNA	0.25 $\mu$ l	} 表1 参照
10 x ExTaq buffer	2.5 $\mu$ l	
2.5mM dNTPs	2 $\mu$ l	
primers-1 (100 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l	
primers-2 (100 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l	
ExTaq polymerase	0.25 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	19.5 $\mu$ l	

b) PCR 反応

GemeAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を用いて以下のプロトコールに従ってPCR反応を行なった。

94°C × 3min.  
55°C × 30sec.  
72°C × 20sec. } 2 cycles

↓

94°C × 40sec.  
55°C × 30sec.  
72°C × 20sec. } 35 cycles

↓

72°C × 10min.

c) 結果の確認

10  $\mu$ l の40% glycerol-dye を加えた後、その反応液 5  $\mu$ l を2% アガロースゲル (~0.1mg/ml のエチジウムブロマイドを含む) で100Vで30分電気泳動し、UV照射条件下で結果を確認した。

5) 髄膜炎菌の遺伝子型同定

検査方法

a) sequence 鋳型DNAの調製

表2 遺伝子型別用の鋳型調製PCRプライマー

<i>abcZ</i>	P1-ATTCGTTTATGTACCGCAGG
	P2-GTTGATTTCTGCCTGTTCGG
<i>adk</i>	P1-ATGGCAGTTTTGTGCAGTTGG
	P2-GATTTAAACAGCGATTGC
<i>aroE</i>	P1-ACGCATTTGCGCCGACATC
	P2-ATCAGGGCTTTTTTCAGTT
<i>fumC</i>	P1-CACCGAACACGACACGATCG
	P2-ACGACCAGTTCGTCAAATC
<i>gdh</i>	P1-ATCAATACCGATGTGGCGCGT
	P2-GGTTTTTCATCTGCGTATAGA
<i>pdhC</i>	P1-GGTTTCCAACGTATCGGCGAC
	P2-ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>pgm</i>	P1-CTTCAAAGCCTACGACATCCG
	P2-CGGATTGCTTTCGATGACGGC

1. 前項「髄膜炎菌の血清型同定 - PCR法 - 鋳型DNAの調製」で調製した染色体DNAを鋳型DNAとして用いて以下の表に従って7本のPCR反応液を調製した。

鋳型DNA	0.25 $\mu$ l	} 表2 参照
10 x ExTaq buffer	2.5 $\mu$ l	
2.5mM dNTPs	2 $\mu$ l	
primers-1 (100 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l	
primers-2 (100 $\mu$ M)	0.25 $\mu$ l	
ExTaq polymerase	0.25 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	19.5 $\mu$ l	

b) PCR 反応

GemeAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を用いて以下のプロトコールに従っ

てPCR反応を行なった。

ア) *abcZ*, *adk*, *fumC*, *gdh*

94°C × 4分	5 サイクル
94°C × 30秒	
60°C × 1分	
72°C × 1分	
94°C × 30秒	
58°C × 1分	5 サイクル
72°C × 1分	
94°C × 30秒	
56°C × 1分	20 サイクル
72°C × 1分	
4 °C	

*aroE*, *pdhE*, *pgm*

94°C × 4分	5 サイクル
94°C × 30秒	
70°C × 1分	
72°C × 1分	
94°C × 30秒	5 サイクル
68°C × 1分	
72°C × 1分	
94°C × 30秒	20 サイクル
66°C × 1分	
72°C × 1分	
4 °C	

c) PCR産物の精製

Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネテックス) を用いて精製し、シーケンス用の鋳型DNA 25 μl を調製した。

d) Sequence reaction

以下の表に従って14本のPCR反応液を調製した。

鋳型DNA	2 μl
primer (4 μM)	1 μl
(表3に示すプライマーに対応)	
BigDye v3.1	4 μl
H <sub>2</sub> O	4 μl

94°C × 4分	30 サイクル
94°C × 20秒	
50°C × 30秒	
60°C × 4分	

表3 遺伝子型別用のシーケンスPCRプライマー

<i>abcZ</i>	P1-ATTTCGTTTATGTACCGCAGG
	S2-GAGAACGAGCCGGGATAGGA
<i>adk</i>	S1-AGGCTGGCAGCCCTTGG
	S2-CAATACTTCGGCTTTCACGG
<i>aroE</i>	S1-GCGGTCAACTACGCTGATT
	S2-ATGATGTTGCCGTACACATA
<i>fumC</i>	S1-TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG
	S2-TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC
<i>gdh</i>	S1-GTGGCGCGTTATTTCAAAGA
	S2-CTGCCTTCAAAAATATGGCT
<i>pdhC</i>	S1-TCTACTACATCACCCCTGATG
	P2-ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>pgm</i>	S1-CGGCGATGCCGACCGCTTGG
	S2-GGTGATGATTTTCGGTTGCGCC

反応物 (~10 μl) はSephadex G50 によって精製し、10 μlのHi-Di (Applied Biosystem) を混和し、100°Cで2分インキュベーション後、すぐに氷冷した。ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem) に供して塩基配列を解読した。

e) Sequenceの解析

得られたDNAの塩基配列をDNA塩基配列ソフト、GENETYX-MAC (ゼネティックス) によって塩基配列を解析し、以下の入力配列領域を用いて最終確認した。

<i>abcZ</i>	433 bp
<i>adk</i>	465 bp
<i>aroE</i>	490 bp
<i>fumC</i>	465 bp
<i>gdh</i>	501 bp
<i>pdhC</i>	480 bp
<i>pgm</i>	450 bp

さらには、Multi locus sequence typing (MLST) を行なうために英国オックスフォード大学のホームページに設置されるサイト、<http://mlst.zoo.ox.ac.uk/> にアクセスし、7つの遺伝子座についてそれぞれのalleleナンバーを同定後、別ページに再度アクセスし、それらのナンバーを入力して遺伝子型 (sequence Type: ST) を同定した。

### C. 研究結果

本年度は国内で分離された髄膜炎菌株22株を収集できた。そのうち、NESIDに登録された侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌として分離された株は15株で、それ以外は喀痰や咽頭ぬぐいといった、非侵襲性の患者（健常者）から分離されたものであった。それらの免疫学的及び分子疫学的解析を実施した。

まず血清学的解析からは22株のうち、Y：14株（63.3%）、B：3株（13.6%）、C：1株（4.5%）、NT（Non-typable：莢膜多糖体非合成株）：4株（18.1%）であった（表4）。

分子疫学的解析からはST-1655（ST-23 complex）が9株、ST-23（ST-23 complex）が3株、4株のNT株のうちの3株がST-11026（ST-32 complex）、あとはST-41（ST-41/44 complex）、ST-9087（ST-11 complex）、ST-1157、ST-2057（ST-2057 complex）、ST-12606（ST-2057 complex）、ST-12182、ST-12416（ST-23 complex）が1株ずつ同定された（表4）。

### D. 考察

髄膜炎菌に関しては2011年5月に発生した髄膜炎菌性感染症の集団感染事例を契機に日本の髄膜炎菌感染症の実態が問われたがその詳細は不明な点が多く、その一因は侵襲性髄膜炎菌感染症の原因株の収集率が悪いために、侵襲性髄膜炎菌感染症の発生動向に対する詳細な細菌学的解析の欠如にあると考えられた。そのため、本年度からは本

研究班で疫学（及び臨床）情報の収集（国立感染症研究所疫学センターが担当）と同時に菌株収集も積極的に行ない、侵襲性髄膜炎菌感染症の原因株の詳細を明らかにすることを試みた。

血清学的にはYが最も多く、続いてB、C、そしてNTが3株あるという結果が得られた。NTは全て非侵襲性の検体から分離されており、髄膜炎菌の莢膜多糖体が補体抵抗性に関与しているという、基礎生物学的結果と合致していると考えられた。また、これは昨年度までに研究分担者が自主的に解析を行ってきた解析結果と矛盾がなく、日本国内ではY群がドミナントである実態が推測された。一方でC群も検出された。患者情報によると輸入感染ではないと推測された。しかし、このことから、日本国内にY及びB群がどの程度潜在しており、それが海外からの輸入感染との区別を明確にするためにも国内での現状の全体像を極力もれなく把握する必要性もあると考えられた。

また、分子疫学的解析からもST-23 complexに分類されるST-23及びST-1655が解析株全体の55%程度を占めていた（表4）。これらも昨年度までの結果と合致しており、来年度以降の国内分離株の解析数を増やした際に同様の結果が得られるかどうかで、日本国内のドミナント株であるかが判断される。一方で、ST-11026（ST-32 complex）、ST-12606（ST-2057 complex）、ST-12182、ST-12416（ST-23 complex）と22株しかない解析株中に4株の新しい遺伝子型が検出され

表4 平成28年度に国内で分離された髄膜炎菌株（非侵襲性患者も含む）の解析結果

Strain No.	NESID(細菌第一部把握分)	発生地域	患者情報	症例	分離検体	解析年月日	Invasive or not	血清群	遺伝子型	疫学センターとのリンク
NIID626		長野県松本市	35歳・男性	健常者	咽頭ぬぐい	2016.4.7	Non-invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	
NIID627		横浜市	66歳・男性	菌血症	血液	2016.4.26	invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	○
NIID628		横浜市	78歳・女性	菌血症	血液	2016.4.26	invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	○
NIID629		福井県				2016.5.23	invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	?
NIID630		さいたま市	25歳・女性	菌血症	血液	2016.5.23	invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	○
NIID631		獨協医科大学病院	CAPD患者		腹水灌流液	2016.7.1	Non-invasive	Y	ST-23 (ST-23 complex)	
NIID632		獨協医科大学病院	2ヶ月・男児		眼脂	2016.7.1	Non-invasive	NT	ST-11026 (ST-32 complex)	
NIID633		東京警察病院		髄膜炎?	血液・髄液	2016.7.15	invasive	B	ST-41 (ST41/44 complex)	○
NIID634		鹿児島市				2015.7.26	invasive	Y	ST-12182	○
NIID635		横浜市	88歳・女性			2016.8.6	invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	○
NIID636		自衛隊阪神病院	23歳・男性	せき	喀痰	2016.9.1	Non-invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	○
NIID637	201632392	京都府				2016.9.7	invasive	Y	ST-23 (ST-23 complex)	△
NIID640		札幌市			血液	2016.9.15	invasive	Y	ST-23 (ST-23 complex)	○
NIID641		愛知県春日井市	92歳・女性	発熱	関節液	2016.9.19	invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	○
NIID642	201636840	京都府				2016.10.1	invasive	Y	ST-12416 (ST-23 complex)	△
NIID643		神戸市	54歳・男性	敗血症	血液	2016.10.3	invasive	B	ST-2057	○
NIID644		山口大学医学部付 属病院	28歳・男性	肺炎	喀痰	2016.11.4	Non-invasive	NT	ST-1157	
NIID645			33歳・男性	咽頭痛	咽頭粘液	2016.11.7	Non-invasive	NT	ST-11026 (ST-32 complex)	
NIID646		九州大学病院	48歳・男性	気管支炎	喀痰	2016.11.29	Non-invasive	NT	ST-11026 (ST-32 complex)	
NIID647		大阪市	66歳・女性	菌血症	血液	2016.11.29	invasive	C	ST-9087 (ST-11 complex)	×
NIID649		自治医科大学(栃 木県)	45歳・男性	菌血症・髄膜炎	血液・髄液	2016.12.9	invasive	Y	ST-1655 (ST-23 complex)	×
NIID650		沖縄県	5歳・男児	菌血症	血液	2017.1.11	invasive	B	ST-12606 (ST-2057 complex)	×

た。新しい遺伝子型ということは世界でも日本で初に検出され、日本以外の国々では検出例がない、日本固有株であるということを意味している。日本は島国であり、髄膜炎菌はヒト-ヒト感染しかしないことから、髄膜炎菌は人の動きに応じた分布をしていると考えられ、また、こうした日本固有株が高頻度で検出されるということは、日本では髄膜炎菌分離株の解析が不十分であるということの裏返しであるという結果であると考えられ、こうした結果からもさらなる国内分離株の解析の必要性が考えられた。

しかし、本年度は初年度ということもあり、疫学センターとのリンクがうまく動かなかったことが主原因でもある(表4)が、侵襲性髄膜炎菌株の収集があまり効率的に実施できなかった。来年度以降は本年度以上に積極的な菌株収集を実施して引き続き国内分離株の実態解明を実施する予定である。

## E. 結論

侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌を含む国内分離株22株の血清学的及分子疫学的解析を行ない、血清群はY続いてB、少数のCが検出され、遺伝子型はST-23 complexに分類される株が多く認められた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Fukusumi M, Kamiya H, Takahashi H, Kanai M, Hachisu Y, Saitoh T, Ohnishi M, Oishi K, Sunagawa T. National surveillance for meningococcal disease in Japan, 1999-2014. *Vaccine* 2016 34 (34): 4068-4071
- 2) Lee DK, Kim EJ, Kilgore P, Takahashi H, Ohnishi M, Tomono J, Miyamoto S, Omagari D, Kim DW and Seki M. A Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Serogroup Identification of

*Neisseria meningitidis* in Cerebrospinal Fluid. *Frontiers in Microbiology* 2016 6: 1548.

- 3) Yanagisawa T, Takahashi H, Suzuki T, Masuda A, Dohmae N, Yokoyama S. *Neisseria meningitidis* Translation Elongation Factor P and Its Active-Site Arginine Residue Are Essential for Cell Viability. *Plos One* 2016 11 (2): e0147907.
- 4) Takahashi H, Haga M, Sunagawa T, Saitoh T, Kitahara T, Matsumoto S, Ohnishi M. Meningococcal carriage rates in healthy individuals in Japan determined using Loop-Mediated Isothermal Amplification and oral throat wash specimens. *J Infect Chemother.* 2016. 22 (7): 501-504.

### 2. 学会発表

- 1) Hideyuki Takahashi, Tatsuo Yanagisawa, Kwang Sik Kim, Shigeyuki Yokoyama and Makoto Ohnishi. Multiple functions of glutamate uptake via meningococcal GltT-GltM L-glutamate ABC transporter for *Neisseria meningitidis* internalization into human brain microvascular endothelial cells. 2016 International Pathogenic *Neisseria* Conference, Manchester UK, Sep 2016.
- 2) 高橋英之, 羽賀将衛, 砂川富正, 齋藤剛仁, 北原武尊, 松本壮吉, 大西 真: 咽頭うがい液を用いた髄膜炎菌の健康者保菌調査の実施. 第90回日本細菌学会総会, 仙台市, 2016年3月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし