

## 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 主任研究官）

**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し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ない、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。分担研究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昨年度に引き続き実施した。

### 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'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3'	24mer
	orf2 (A)-2	5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	24mer
血清群B	siaD (B)-1	5'-GGATCATTTTCAGTGTTTTCCACCA-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'-CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTAA-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

PCR Thermal Cycler Dice TP600 (Takara Bio) 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.	} 2 cycles
55°C × 30sec.	
72°C × 20sec.	
↓	
94°C × 40sec.	} 35 cycles
55°C × 30sec.	
72°C × 20sec.	
↓	
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 (~0.1 mg/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

1. 前項「髄膜炎菌の血清型同定-PCR法-鋳型

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-GTTGATTTCTGCCTGTTTCGG
<i>adh</i>	P1-ATGGCAGTTTTGTGCAGTTGG
	P2-GATTTAAACAGCGATTGC
<i>aroE</i>	P1-ACGCATTTGCGCCGACATC
	P2-ATCAGGGCTTTTTTCAGGTT
<i>fumC</i>	P1-CACCGAACACGACACGATCG
	P2-ACGACCAGTTCGTCAAACCTC
<i>gdh</i>	P1-ATCAATACCGATGTGGCGCGT
	P2-GGTTTTTCATCTGCGTATAGA
<i>pdhC</i>	P1-GGTTTCCAACGTATCGGCGAC
	P2-ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>pgm</i>	P1-CTTCAAAGCCTACGACATCCG
	P2-CGGATTGCTTTCGATGACGGC

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

*aroE*, *pdhC*, *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		
66°C × 1分	}	20 サイクル
72°C × 1分		
4 °C		

c) PCR産物の精製

Fast Gene Gel / PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) 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-ATTCGTTTATGTACCGCAGG
	S2-GAGAACGAGCCGGGATAGGA
<i>adk</i>	S1-AGGCTGGCAGCCCTTGG
	S2-CAATACTTCGGCTTTCACGG
<i>aroE</i>	S1-GCGGTCAACTACGCTGATT
	S2-ATGATGTTGCCGTACACATA
<i>fumC</i>	S1-TCCGGCTTGCCGTTTGTCAG
	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H30年1月までに、NESIDに登録された国内での侵襲性髄膜炎菌感染症の症例数は21であり、そのうち分離された髄膜炎菌株15株が回収され、回収率は約71%であった。また、それ以外の喀痰や咽頭ぬぐいといった、非侵襲性の患者（健常者）から分離された株も合わせて血清学的及び分子疫学的解析を実施した（表4～6）。

まず血清学的解析からは侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌株15株のうち、Y：10株（67%）、B：4株（27%）、C：1株（6%）であった（図1）。

分子疫学的解析からはST-1655（ST-23 complex）が5株、ST-23（ST-23 complex）が4株、あとはST-13126（ST-167 complex）、ST-2057（ST-2057 complex）、ST-13100（ST-2057 complex）、ST-467、ST-3496、ST-11が1株ずつ同定された（表4～6、図1）。

一方、非侵襲性由来の髄膜炎菌株に関しては、

血清群Y（ST-1655）1株、血清群B（ST-2057）1株、血清群Y（ST-23）6株（防衛大学における集団感染事例関連、考察の項参照）、血清型別不能（NT）（ST-11026）1株、NT・ST-13109（ST-254 complex）1株、NT・ST-13129（ST-254 complex）1株であった（表4～6）。

### 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、昨年度から本研究班で疫学（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

表4. 平成29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-1

No.	西暦	報告年月日	病院・診療所	感染地域	病態（検体）	性別	生年月日	年齢	当該者職業	血清群	遺伝子型
1	2017	20170424	国分生協病院	鹿児島県	肺炎（血液）	男	19970613	19	自衛官	Y	1655
2	2017	20170426	茨城県立こども病院	茨城県	髄膜炎（髄液 / nested PCRで同定）	女	20160728	0	無	unknown	unknown
3	2017	20170430	成田赤十字病院	千葉県	菌血症・髄膜炎（血液・髄液）	男	19940105	23	解休業	Y	1655
4	2017	20170517	関西メディカル病院	大阪府	感染症死亡	女	19690621	47	主婦	Y	23
5	2017	20170605	東京警察病院	東京都	肺炎（喀痰）	男		22	学生	Y	1655
6	2017	20170609	長崎大学病院	長崎県	肺炎（喀痰）	男		17	学生	B	2057
7	2017	20170607	東京医療センター	東京都	菌血症・髄膜炎（血液・髄液）	女		27	翻訳業	W	11
8	2017	20170629	佐賀大学付属病院	佐賀県	肺炎（喀痰）	男		86		NT	11026
9	2017	20170706	鹿児島大学	鹿児島県	肺炎（喀痰）	男		67		NT	11026
10	2017	20170713	平塚共生病院	神奈川県	髄膜炎（髄液）	女		60		B	2057
11	2017	201726308	和歌山医療センター	和歌山県	菌血症（血液）・多臓器不全死亡	女		84		Y	23
12	2017	201727254	関西メディカル病院	大阪府	菌血症・髄膜炎（血液・髄液）	女		28	エステシャン	B	13100 (ST-2057 complex)

侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌は赤、非侵襲性の分離株は黒で示してある。

表5. 平成29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-2

No.	西暦	報告年月日	病院・診療所	感染地域	病態（検体）	性別	生年月日	年齢	当該者職業	血清群	遺伝子型
13	2017	20170724	横須賀市立うわまち病院	神奈川県	敗血症（血液）・死亡	男		19	防衛大学学生	Y	23
14	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	Y	23
15	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	Y	23
16	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	NT	13109 (ST-254 complex)
17	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	NT	198
18	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	Y	23
19	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	Y	23
20	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	Y	23
21	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	NT	198
22	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	NT	13129 (ST-198 complex)
23	2017			神奈川県	健康保菌者（咽頭スワブ）	男			防衛大学学生	Y	23
24	2017	20170831	国保旭中央病院	千葉県	菌血症（血液）	女		44	売店店員	Y	13126 (ST-167 complex)
25	2017	20170828	紀南病院	和歌山県	菌血症（血液）	女		59	居酒屋経営	Y	23
26	2017	20170902	聖マリアンナ医科大学病院	神奈川県	菌血症（血液）	男		52	介護士	Y	1655
27	2017	20170905	獨協医科大学越谷病院	埼玉県	菌血症・髄膜炎（血液・髄液）	男		35		B	467 (ST-267 complex)

侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌は赤、非侵襲性の分離株は黒で示してある。

青色の欄で示してある分離株は防衛大学校関連で分離された髄膜炎菌株である。

表 6. 平成29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-3

No.	西暦	報告年月日	都道府県名	性別	年齢	職業	病態（検体）	血清群	MLST
28	2017	20170905	埼玉県	男	35	会社員	血液・髄液	Y	1655 (ST-23 complex)
		20170902	神奈川県	男	52	介護職	血液		
		20171010	埼玉県	女	79	無職	血液		
		20171011	東京都	男	69	大工	血液	Y	
		20171011	大阪府	女	63	事務職	血液	Y	
29	2017	20171226	千葉県	男	71	無職	血液	B	3496 (ST-213 complex)
		20180104	京都府	女	0	なし	血液・髄液		
		20171225	愛知県	女	24	ドラッグストア	血液		
30	2018	20180105	千葉県	女	52	主婦	血液	Y	1655 (ST-23 complex)

侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌は赤、非侵襲性の分離株は黒で示してある。灰色の欄で示した項目はNESIDで登録され、菌株分与の依頼をしたが菌株入手が叶わなかった症例を示す（後日、京都府に関しては死菌体を入手した）。

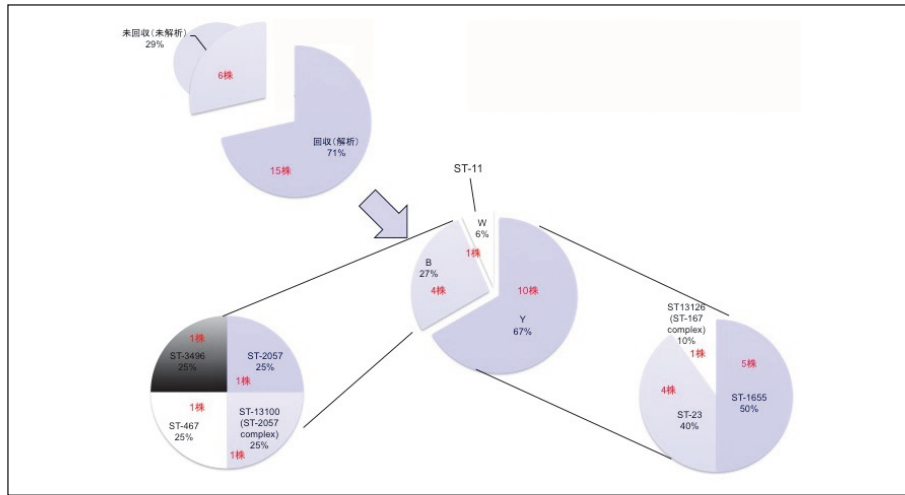


図 1. 平成29年度国内分離髄膜炎菌株の血清学的及び分子疫学的解析のまとめ

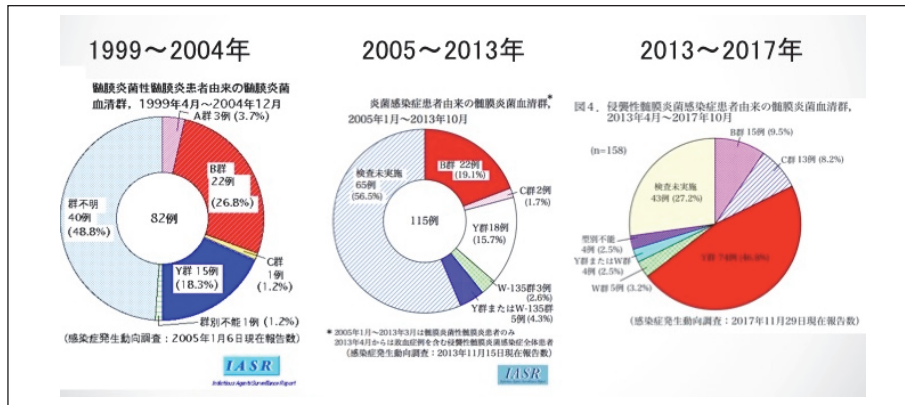


図 2. 過去18年間の国内分離髄膜炎菌株の血清群の変遷

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そしてWが1株あるという結果が得られた。これは昨年度までの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。しかし、過去18年間の自主的解析結果からは過去にはB群が優勢であった傾向も認められ（図2）、国内の髄膜炎菌分布事情も変化している可能性も考えられる。

さらに、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60%程度を占めていた（図1）。これらも昨年度までの結果と合致しており、ST-23 complexに分類される株が日本国内のドミナント株であることが示唆された。一方で、ST-13126 (ST-167 complex)、ST-13100 (ST-2057 complex)、ST-467、ST-3496と15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た。新しい遺伝子型と

いうことは世界でも日本でも初めて検出され、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。

また、表5で示してある防衛大学校での死亡例に伴う近接者（学校寮の同室者等）の保菌調査の結果、保菌者から分離株の多くが死亡例の原因菌と同一の血清群及び遺伝子型を示した。また、NT・ST-13109（ST-254 complex）及びNT・ST-13129（ST-254 complex）も1株ずつ分離されていた。この結果から、防衛大学校では、Y・ST-23株とNT・ST-13109（ST-254 complex）、NT・ST-13129（ST-254 complex）が混在した形で保菌状態が維持され、その保菌者の一人が発症して残念ながら死に至ったと考えられた。

来年度以降も引き続き積極的な菌株収集を実施し、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15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W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) Kanai M, Kamiya H, Smith-Palmer A, Takahashi H, Hachisu Y, Fukusumi M, et al. Meningococcal disease outbreak related to the World Scout Jamboree in Japan, 2015. *Western pacific Surveillance and Response*. 2016. 7. 3. 007, 2017.
- 2) Ma K, Unemo M, Jeverica S, Kirkcaldy B, Takahashi H, Ohnishi M, Grad Y. Genomic

characterization of urethritis-associated *Neisseria meningitidis* shows that a wide range of *N. meningitidis* strains can cause urethritis. *Journal of Clinical Microbiology* 55 (12) : 3374-3383, 2017.

- 3) Sengoku T, Suzuki T, Dohmae N, Watanabe C, Honma T, Hikida Y, Yamaguchi Y, Takahashi H, Yokoyama S, Yanagisawa T. Structural mechanism of protein arginine rhamnosylation by glycosyltransferase EarP. *Nature Chemical Biology in press*.
- 4) Kawasaki Y, Matsubara K, Takahashi H, Morita M, Ohnishi M, Hori M, Isome K, Iwata A, Nigami H, Yamamoto G, Ohkusu K. Invasive meningococcal disease due to ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis* sequence type 4821: the first case in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy, in press*.
- 5) Mori N, Hayashi T, Nakamura H, Takahashi H. Meningococcal meningitis with neurological complications and meningococemia due to serogroup W sequence type 11 complex. *Journal of Infection and Chemotherapy, in press*.

### 2. 学会発表

- 1) 仙石 徹, 鈴木健裕, 堂前 直, 渡邊千鶴, 本間光貴, 疋田泰士, 山口芳樹, 高橋英之, 横山茂之, 柳沢達男: 髄膜炎菌由来の翻訳因子EF-Pのラムノース修飾による活性化の構造的基盤. ComBio2017, 神戸市, 2017年12月
- 2) 仙石 徹, 鈴木健裕, 堂前 直, 渡邊千鶴, 本間光貴, 疋田泰士, 山口芳樹, 高橋英之, 柳沢達男, 横山茂之: 反転型糖鎖転移酵素によるタンパク質アルギニン・ラムノシル化の構造的基盤. ComBio2017, 神戸市, 2017年12月
- 3) 高橋英之, 横山茂之, 柳沢達男: 臨床分離株の宿主細胞への侵襲能と細胞外因子の発現量の相互比較による髄膜炎菌の病原性因子の探索及び解析. 第91回日本細菌学会総会, 福岡市, 2018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