

侵襲性髄膜炎菌感染症の血清型決定を含む細菌学的検討

研究分担者：高橋 英之（国立感染症研究所細菌第一部 室長）

研究協力者：石原 朋子（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った。また、ワクチン導入の経験もない日本において何故侵襲性髄膜炎菌感染症の症例が少ないのか、そもそも健康保菌者の髄膜炎菌保菌率が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。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引き続き実施した。本研究結果はR1年4月から12月までに感染研に到着した株の解析結果となることを予め申し添えておく。

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% CO₂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A₂₆₀にて濃度測定を行い、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。

鋳型 DNA	0.25 μl	} 表 1 参照
10 x ExTaq buffer	2.5 μl	
2.5mM dNTPs	2 μl	
primers-1 (100 μM)	0.25 μl	
primers-2 (100 μM)	0.25 μl	
ExTaq polymerase	0.25 μl	
H ₂ O	19.5 μl	

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	<i>orf2</i> (A)-1	5'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3'	24mer
	<i>orf2</i> (A)-2	5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	24mer
血清群B	<i>siaD</i> (B)-1	5'-GGATCATTTCAGTGTTTTCCACCA-3'	24mer
	<i>siaD</i> (B)-2	5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'	24mer
血清群C	<i>siaD</i> (C)-1	5'-TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3'	25mer
	<i>siaD</i> (C)-2	5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	23mer
血清群Y	<i>siaD</i> (Y)-1	5'-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3'	22mer
	<i>siaD</i> (Y)-2	5'-CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	27mer

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 μl の40% glycerol-dyeを加えた後、その反応液5 μl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 μl	} 表2 参照
10 x ExTaq buffer	2.5 μl	
2.5mM dNTPs	2 μl	
primers-1 (100 μM)	0.25 μl	
primers-2 (100 μM)	0.25 μl	
ExTaq polymerase	0.25 μl	
H ₂ O	19.5 μl	

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>adk</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

b) PCR反応

GeneAmp 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	} 20サイクル
56°C × 1分	
72°C × 1分	
4°C	

aroE、*pdhE*、*pgm*

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

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 ₂ O	4 μl

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

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℃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。

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-AGGCTGGCACGCCCTTGG
	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

C. 研究結果

本年度はR1年12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34例であり、そのうち分離された髄膜炎菌株18株が回収され、回収率は約53%であった。その臨床分離株の血清学的及び分子疫学的解析を実施した。

回収された菌株は、北海道2株、千葉2株、神奈川4株、東京1株、静岡1株、愛知2株、岐阜2株、和歌山1株、大阪3株、兵庫1株、山口1株、大分1株の計21株であった (図1)。

血清学的解析からは侵襲性髄膜炎菌感染症の原因菌株21株のうち、Y:12株 (57%)、B:8株

(38%)、W：1株（5%）であった（図2）。

分子疫学的解析からは血清群Yの株はST-1655（ST-23 complex）が6株、ST-23（ST-23 complex）が1株、T-14734（ST-14734 complex）が2株、あとはST-3015（ST-23 complex）が1株ずつ同定された（図4）。血清群Bの株はST-2057株が3株、ST-687（ST-41/44 complex）が1株、ST-213（ST-213 complex）が1株、ST-14407（ST-2057 complex）が2株、ST-13675（ST-32 complex）が1株同定された（図4）。血清群Wの株はST-11であった（図4）。

D. 考察

髄膜炎菌に関しては2011年5月に発生した侵襲性髄膜炎菌感染症の集団感染事例を契機に日本の侵襲性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、一昨年度から本研究班で疫学（及び臨床）情報の収集（国立感染症研究所感染症疫学センター

が担当）と同時に菌株収集も積極的に行い、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。

昨年までは血清学的にはYが最も多く、続いてBという傾向が認められたが、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が（図3）、今年は日本国内ではY群とB群がほぼ同じ割合であり、国内の髄膜炎菌分布に変化が起こっている可能性も示唆された。

また、分子疫学的解析からもST-1655及びST-23を含むST-23 complex（注：complexとは7つの遺伝子座の中で5つが一致し、お互いに相互関係があると考えられる集団）に分類される株が全体の70%程度を占めていた（図4）。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-14734（ST-23 complex）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、日本固有株が神奈川と千葉で分離されていることも注目されるべきことであり、ラグビーW杯における国内上における微妙な変



図1. R1年度国内分離髄膜炎菌株の回収地

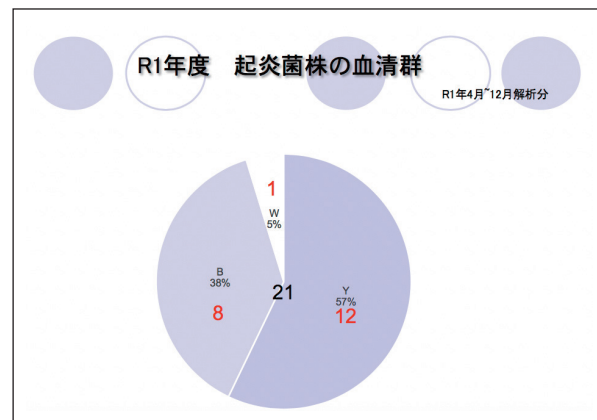


図2. R1年度国内分離髄膜炎菌株の血清学的解析のまとめ

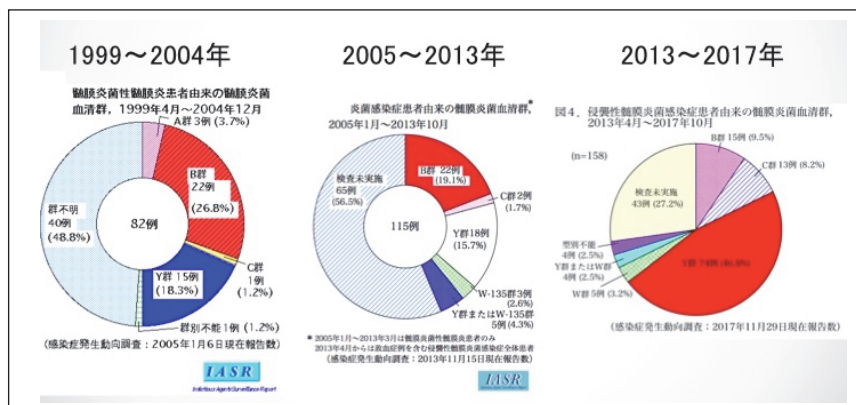


図3. 過去18年間の国内分離髄膜炎菌株の血清群の変遷

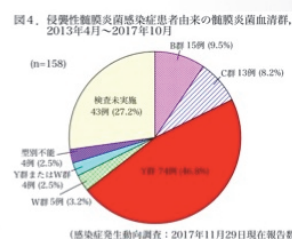


図4. 侵襲性髄膜炎菌感染症由来の髄膜炎菌血清群、2013年4月～2017年10月

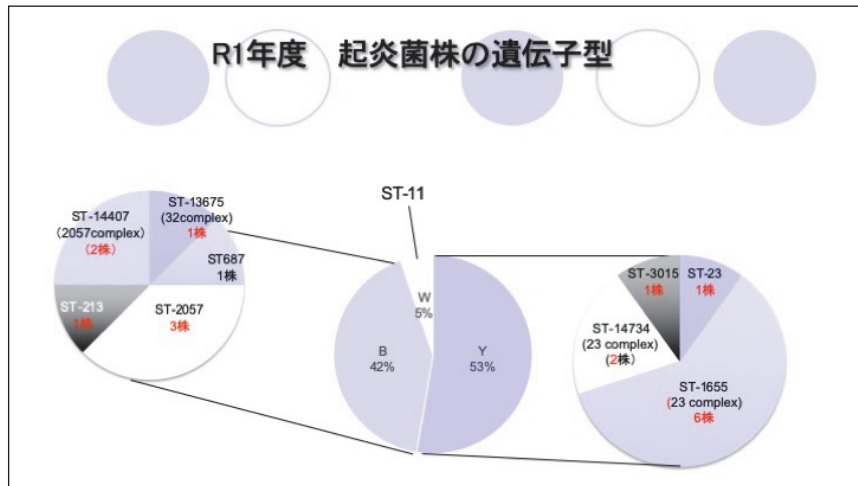


図 4. R1年度国内分離髄膜炎菌株の血清学的解析のまとめ

化とも捉えられる現象と考えられた。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の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、血清群Bの株ではST-2057が近年多く占められるようになってきた。今年度には同定された。これは過去20年間国内分離株を分担研究者が解析してきた中では認められなかった傾向であった。

今年の7月から東京オリンピックが予定されており、インバンドの増加に伴い、徐々に海外株が国内に入り込み始めている予兆を示していると推測された。

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20株の血清学的及び分子疫学的解析を行ない、血清群はY、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

なし

2. 学会発表

なし

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