

## 国内で分離された侵襲性髄膜炎菌感染症の起炎症株の血清学的及び分子疫学的解析 H28-R2年の5年間に国内で分離された髄膜炎菌の薬剤感受性解析

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。また、本年度はIMD由来株が極端に少なかった為、過去5年間に分離された髄膜炎菌株のペニシリンG、セフトリアクソン、シプロフロキサシン、リファンピシンの薬剤感受性の解析を併せて実施した。

### A. 研究目的

侵襲性髄膜炎菌感染症（Invasive meningococcal Diseases : IMD）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IMDの集団感染事例は日本においてもIMD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IMD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、IMD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IMD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、IMDの疫学情報及びその原因菌の情報を統合させたIMD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IMD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。

さらに今年度はIMD由来株が極端に少なかった為、過去5年間に分離された髄膜炎菌株のペニシリンG（PCG）、セフトリアクソン（CTRX）、シプロフロキサシン（CPFX）、リファンピシン（REP）の薬剤感受性の解析を合わせて実施した。

### 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 $\mu$ l
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

表 1  
参照

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 $\mu$ 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 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
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

表 2  
参照

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-GTTGATTTCTGCCTGTTCCGG
<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-ATCGGCTTTGATGCCGATTT
<i>pgm</i>	P1-CTTCAAAGCCTACGACATCCG
	P2-CGGATTGCTTTCGATGACGGC

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 反応を行った。

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> (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	<i>siaD</i> (B)-1	5'-GGATCATTTTCAGTGTTTTCCACCA-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
血清群 W	<i>siaD</i> (W)-1	5'-CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA-3'	22mer
	<i>siaD</i> (W)-2	5'-CACAAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	27mer

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*, *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		
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-GTGGCGGTTATTTCAAAGA
	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

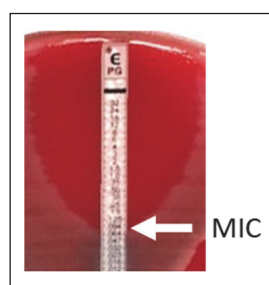
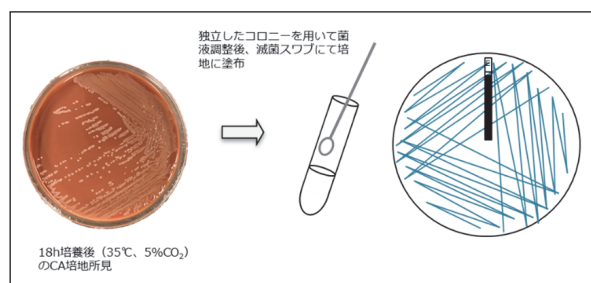
得られたDNAの塩基配列をDNA塩基配列ソフト、GENETYX-MAC (ゼネティクス) によって塩基配列を解析し、以下の入力配列領域を用いて最終確認した。

<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。

## 6) 薬剤感受性試験

GC寒天培地で一晚培養した新鮮培養菌を3 mLのPBSに懸濁し、OD<sub>600</sub>が0.15になるように調製した。その菌懸濁液に滅菌スワブを浸し、過剰な水分は内壁に押し付けて除去した後に、血液加ミューラーヒントン寒天培地（日本BD）の表面全体にシャーレを60度ずつ回転させながらムラなく3回塗布し（下図を参照）、培地表面が乾いたのを確認してE-testストリップ（バイオメリュー）を置いた。その寒天培地を37℃、5% CO<sub>2</sub>で24h培養後、阻止帯からMIC値を読み取った。各抗菌薬MIC値は、European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) のclinical breakpointsを基に感性・耐性を判定した。



## C. 研究結果

本年度はR2年12月までにNESIDに登録された国内でのIMD症例数は新型コロナウイルス感染症の影響により6例のみであり、そのうち回収された髄膜炎菌株は4株のみで、回収率は67%であった（表4）。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。愛知、静岡、東京、

宮城の各都県から1株ずつの分離報告があった（表4）。それらの血清学的解析の結果はB;2株（50%）、Y;1株（25%）莢膜多糖体非産生株（Non-Typable: NT）;1株（25%）であった（表4）。分子疫学的解析からは血清群B株は2株ともST-2057、血清群Y株はST-1655（ST-23 complex）、NT株は新規遺伝子型 ST-15484（ST-32 complex）であった（表4）。

さらに本研究班に分担研究者が参画してからの5年間日本国内で分離された153の髄膜炎菌株の薬剤感受性に関して東京医科歯科大学齋藤教授の調査（未発表）に基づいて侵襲性髄膜炎菌感染症治療に使用されるPCG及び予防内服の第一選択薬であるCPFの非感受性及び耐性菌の出現の可能性が指摘された為、PCG、CPF、そしてCTR、予防内服第二選択薬RFPに関して薬剤感受性試験を行った。その結果、PCGは30%（46株）が非感受性（MIC; 0.094-0.25 µg/mL）、2%（3株）が耐性（MIC; 0.094-0.25 µg/mL）であることが明らかとなった（図1）。一方で、侵襲性細菌感染症の治療薬として広く使用されているCTRは約98%の株が感受性で、2%（3株）が軽微な非感受性（MIC; 0.016-0.032 µg/mL）を示すことが明らかとなった。

また、予防内服薬として使用される薬剤においてはCPFは25.5%（39株）が非感受性（MIC; 0.004-0.064 µg/mL）、20.3%（31株）が耐性（MIC; 0.094-0.19 µg/mL）と全体の54.2%（83株）のみが感受性を示すことが明らかとなった。一方でRFPに関しては全てがMIC 0.19 µg/mL以下であり、CLSIが示す感受性の域値（MIC<0.5 µg/mL）を大きく下回り、全て（100%）感受性を示すことが明らかとなった（図1）。

さらに、PCG及びCPFの非感受性及び耐性の年毎の出現率を解析した。その結果、PCG及びCPFに関しては年毎に変動しているという大

表4. R2年度に分離されたIMD患者由来株の解析結果

strain	Year / month	Serogroup	ST	ST-complex	地域	分離検体	症状	性別	年齢	特記事項
NIID790	May-20	NT	15484	32	愛知	血液	菌血症	女	42	妊婦
NIID797	Sep-20	Y	1655	23	静岡	血液	菌血症	女	86	
NIID798	Sep-20	B	2057	2057	東京	血液	髄膜炎	女	30	
NIID799	Sep-20	B	2057	2057	宮城	髄液	髄膜炎	男	20	

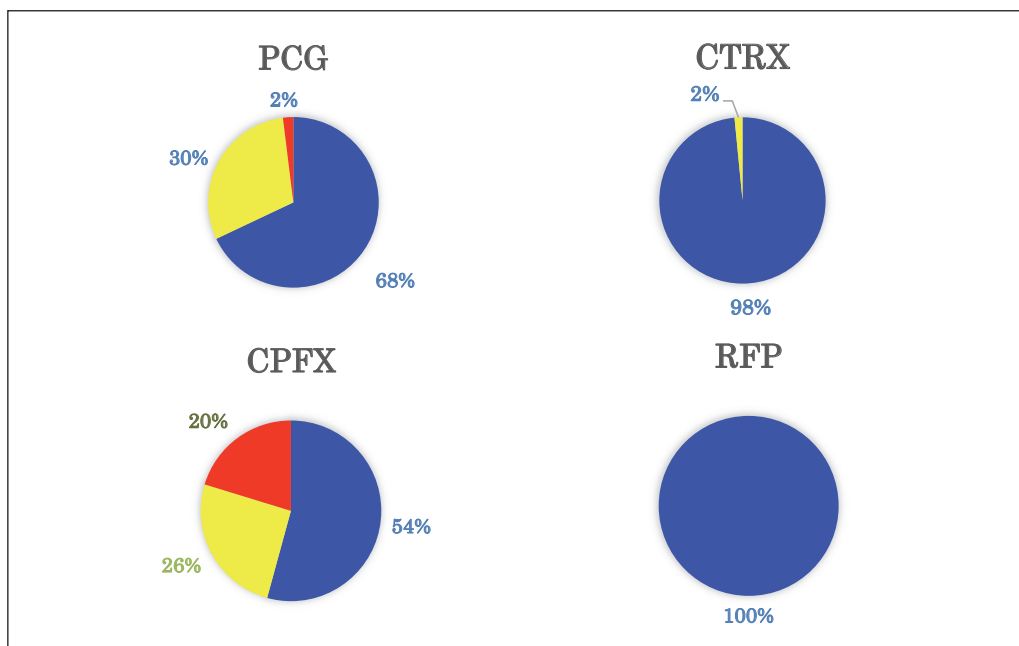


図 1. H28～R2年度に国内で分離された153株の薬剤感受性試験の解析結果  
ペニシリンG (PCG)、セフトリアクソン (CTRX)、シプロフロキサシン (CPFX)、リファンピシン (RFP) の薬剤感受性の割合を示した。青は感受性、黄色は非感受性、赤は耐性の株の割合を示す。

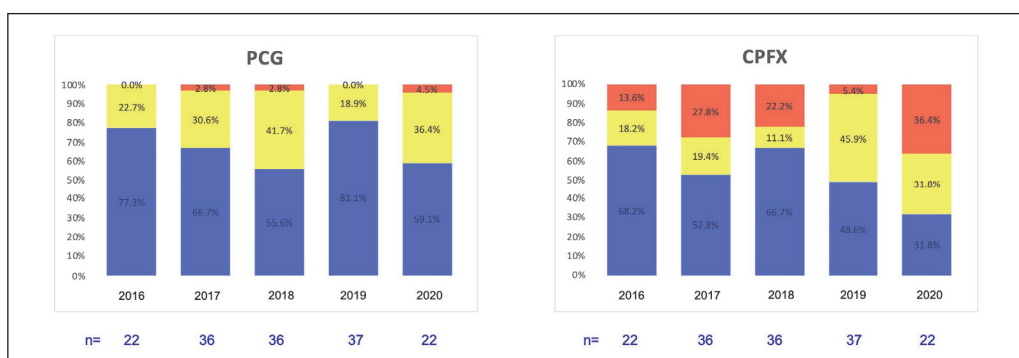


図 2. H28～R2年度に国内で分離された153株の薬剤感受性試験の年別割合  
ペニシリンG (PCG) 及びシプロフロキサシン (CPFX) の薬剤感受性の割合を示した。青は感受性、黄色は非感受性、赤は耐性の株の割合を示す。

きな変化は認められないことが明らかとなった (図 2)。

#### D. 考察

本年度も本研究班で疫学 (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) との協力研究体制の下に起炎菌株の収集も積極的に行い、IMD原因株の血清学的及び分子疫学的解析を試みた。

本年度は新型コロナウイルス感染症を経験する中でのIMD調査を初めて経験することとなり、結果として例年以上にIMD症例が激減し、IMDが6例しか無い中で回収出来た起炎菌株は4株に留まった (表 4)。この少数では例年と比較す

ることは非常に困難であるが、例年通りB/ST-2057、Y/ST-1655が検出されていることから、ドメスティックに散発するIMD症例が検出されたと考えられた。

本年度はさらに過去5年間に国内で分離された髄膜炎菌株の薬剤耐性に関して解析を実施した。IMD治療の第一選択薬として使用されるPCGの非感受性及び耐性株が約30%存在することが明らかとなった。一方で侵襲性細菌感染症治療薬として広く使用されているCTRXに対してはほぼ感受性 (非感受性株も域値の近値で実質は感受性と判断される) であり、IMD治療としては起炎菌株のPCG感受性試験を実施する時間的猶予が無い症例においてはCTRXを用いた方が

良いことが明らかとなった。

また髄膜炎菌ワクチンが一般的に使用されていない日本においては濃厚接触者に対しては抗生物質の予防内服が推奨されており、処方しやすいCPFVが最も使用されている。しかし、本研究の結果により直近5年間の日本国内の髄膜炎菌株の約5割はCPFV非感受性、もしくは耐性であり、CPFVの処方効果が低い可能性を示唆するものであると考えられた。一方で予防内服の第二選択薬として使用されるRFPに対しては100%感受性であった。これらの結果からIMD予防内服薬としては起炎菌株のCFRX感受性試験を実施する時間的猶予が無い症例においてはRFP用いた方が良いことが明らかとなった。

PCG及びCPFVの感受性の変化は年別で大きく変化している傾向は認められなかったため、治療もしくは予防における薬剤処方による耐性菌の蔓延の可能性は否定できると考えられた。

現在の保険制度においてはRFPの保険適用がない故に、処方段階で問題があると考えられるが、本研究の解析結果を元にして医療制度のあり方の変化が必要なことも厚生労働省の本省でご検討頂ける機会の参考資料となる、有用な解析結果が得られたと考えられた。

最後に、今年度の開催が予定されていた東京オリンピックによるインバウンドの増加に伴うIMD症例の増加も、新型コロナウイルス感染症により東京オリンピックは延期になると共に国内におけるヒト-ヒト交流の機会自体が激減した為に例年になくIMD症例が激減した。これはIMD症例は人の動きを制限すれば減少するということを意味していると考えられた。2021年に東京オリンピックが開催されるかは2021年2月の時点で依然不透明であるが、開催される場合には今年度の裏返しの現象としてインバウンド増加に伴うIMD増加は容易に推測される。東京オリンピックの開催動向を確認しながら引き続き国内におけるIMD症例とその起炎菌の解明を実施する必要があると考えられた。

## E. 結論

IMD原因菌を含む国内分離株4株の血清学的及分子疫学的解析を行ない、血清群はY、B、NT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。また、日本国内においては3割程度の株がPCG非感受性もしくは耐性、5割弱の株がCPFV非感受性もしくは耐性になっていると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) [Takahashi H](#), Dohmae N, Kwang Sik Kim, Shimuta K, Ohnishi M, Yokoyama S, and Yanagisawa T. Genetic incorporation of non-canonical amino acid photocrosslinkers in *Neisseria meningitidis*: New method provides insights into the physiological function of the function-unknown NMB1345 protein. PLoS One 15 (8) : e02378832, 2020.
- 2) Shimuta K, Lee K, Yasuda M, Furubayashi K, Uchida C, Nakayama S, [Takahashi H](#), and Ohnishi M. Characterization of two *Neisseria gonorrhoeae* strains with high-level azithromycin-resistance isolated in Japan. Sex Trans Dis, *in press*
- 3) 小林亜由香, 中島 淳, 大塚 武, 飯草正実, 酒井雄一郎, 佐多 章, 大城健哉, 菊池孝司, 菊池 俊, 松本裕子, 宮原聖奈, 宮平勝人, [高橋英之](#), 東田修二, 齋藤良一. 市販輸送培地における *Neisseria meningitidis* 生菌数の経時的変動. 臨床微生物学会誌, *in press*

### 2. 学会発表

- 1) [高橋英之](#), 侵襲性髄膜炎菌感染症, 第94回感染症学会総会, 東京, 2020年8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