

劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の細菌学的検討

研究分担者：池辺 忠義（国立感染症研究所細菌第一部 主任研究官）

研究要旨 劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の高いことが知られている。その主な原因菌は、 β 溶血性レンサ球菌である。本研究では、10道県における劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の*emm*型を行った。10道県で82症例の劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こした溶血性レンサ球菌が収集された。内訳は、A群23株、B群15株、C群1株、F群1株、G群41株、群別不能1株であり、G群が最も多かった。A群は*emm89*型、G群は*stG6792*型が最も多かった。B群は、血清型Ibが最も多かった。

A. 研究目的

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の高いことが知られている。その主な原因菌は、 β 溶血性レンサ球菌であり、小児に咽頭炎などを引き起こすありふれた病原体である。近年、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の報告数が増加している。しかしながら、どのような菌種でどのような型が流行しているか明らかでない。そこで、本研究では、10道県における劇症型溶血性レンサ球菌感染症に注目し、劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株の*emm*遺伝子型を決定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 生物材料と培養方法

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株は、10道県より集められた。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の診断基準は、Working Group on Severe Streptococcal Infections (1993) Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. JAMA 269: 390-391.に基づいて定められた感染症法の診断基準に従った。G群レンサ球菌の生育には、固形培地としてコロンビア5%羊血液寒天培地（Becton Dickinson）を使用した。薬剤感受性試験に用いる液体培地として、ヘモサプリメント（栄研化学）を含むミュラーヒントンプイオン液体培地（栄研化学）を使用した。

2. ゲノムDNAの調製

血液寒天培地に塗末した菌を90 μ LのTE（pH8.0）に懸たく後、mutanolysin（Sigma）を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間処理した後、DNA精製キットを用いて精製した。

3. 塩基配列の決定

Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer、あるいは、ABI 3500 Genetic Analyzerを用いて、塩基配列を決定した。

4. *emm* 遺伝子型別

アメリカCDCのホームページの方法に従い、primer 1（TATT（C/G）GCTTAGAAAATTA A）、primer 2（GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT）を用いて、PCRにより*emm*遺伝子を増幅する。得られたPCR産物をHigh Pure PCR Product purification kit（Roche）を用いて精製し、*emm* seq2（TATTCGCTTAGAAAATTAACAGG）プライマーを用いてシーケンス反応を行い、sephadex G-50を用いて精製後、塩基配列を決定した。決定した塩基配列をBlast-*emm*検索サイト（<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>）に必要事項を入力後送信し、*emm*遺伝子型を決定した。

（倫理面への配慮）

Helsinki宣言に法り、患者の尊厳を守り、症例記録票では患者氏名は連結可能匿名化するため、プライバシーは保護される。患者情報については診療録から匿名化して情報を抽出し、解析および

発表において個々の患者が同定されることはないため、患者に対する不利益は無い。また、インフォームドコンセントの必要性は該当しない。

C. 研究結果

1. 10道県から分離された劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の群別

10道県から劇症型溶血性レンサ球菌感染症の患者由来株82株を収集した。道県別では、北海道10株、山形県13株、宮城県3株、新潟県13株、三重県6株、奈良県5株、高知県2株、福岡県22株、鹿児島県7株、沖縄県0株であった。そのうちA群レンサ球菌によるものが23株、G群レンサ球菌によるものが41株、B群レンサ球菌によるものが15株、C群レンサ球菌によるものが1株、F群によるものが1株、群別不能が1株であった(表1)。

2. A群レンサ球菌のemm型

A群レンサ球菌のemm型を決定した。その結果、emm89が6株、emm1が4株、emm81が3株であった(図1)。

3. G群レンサ球菌のemm型

G群レンサ球菌のemm型を決定した。その結果、stG6792が16株、stG10、stG245、stG485が5株ずつであった(図2)。

4. B群レンサ球菌の血清型

B群レンサ球菌の血清型を決定した。その結果、Ib型が11株、III型が2株であった(図3)。

D. 考察

劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来のA群レンサ球菌は、emm89型が6株と最も多かった。また、G群レンサ球菌はstG6792型が最も多かった。それぞれのemm型について道県別にみると、特定の道県で分離されておらず(図1)、特定の遺伝子型が特定の県で増えていなかった。

E. 結論

- ・10道県で82症例の劇症型溶血性レンサ球菌感染症由来株を収集した。
- ・特定の遺伝子型が特定の県で増えている傾向はみられなかった。

表1. 2020年に10道県で分離された劇症型レンサ球菌感染症患者分離株

	A群	B群	C群	F群	G群	計
北海道	1	2	0	0	7	10
山形県	3	2	0	0	8	13
宮城県	2	1	0	0	0	3
新潟県	3	2	0	1	7	13
三重県	2	1	0	0	3	6
奈良県	3	2	0	0	0	5
高知県	0	1	0	0	1	2
福岡県	9	2	1	0	10	22
鹿児島県	0	2	0	0	5	7
沖縄県	0	0	0	0	0	0
計	23	15	1	1	41	81

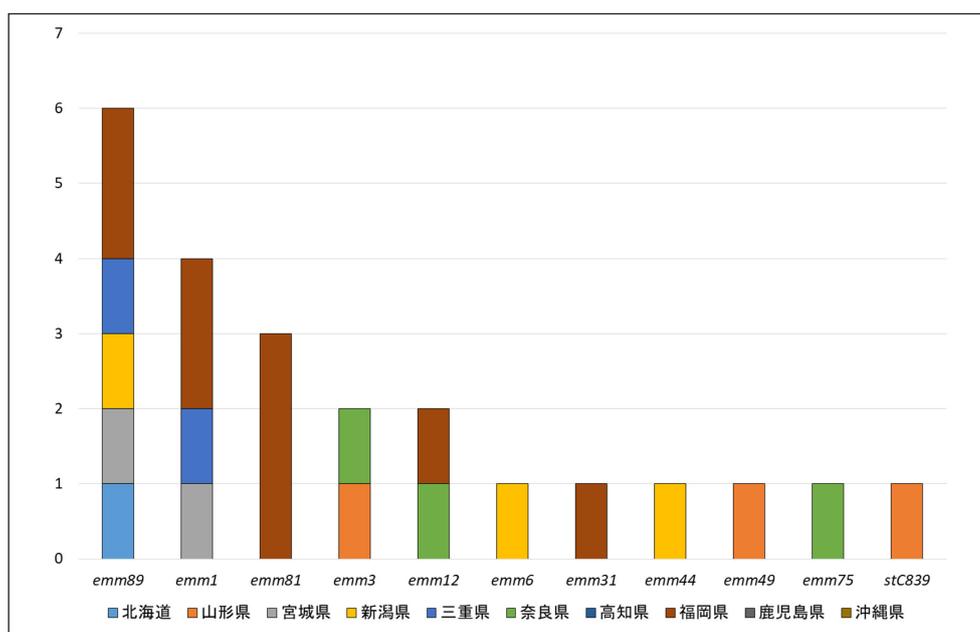


図1. 2020年に10道県で分離された劇症型A群レンサ球菌感染症患者分離株23株のemm型

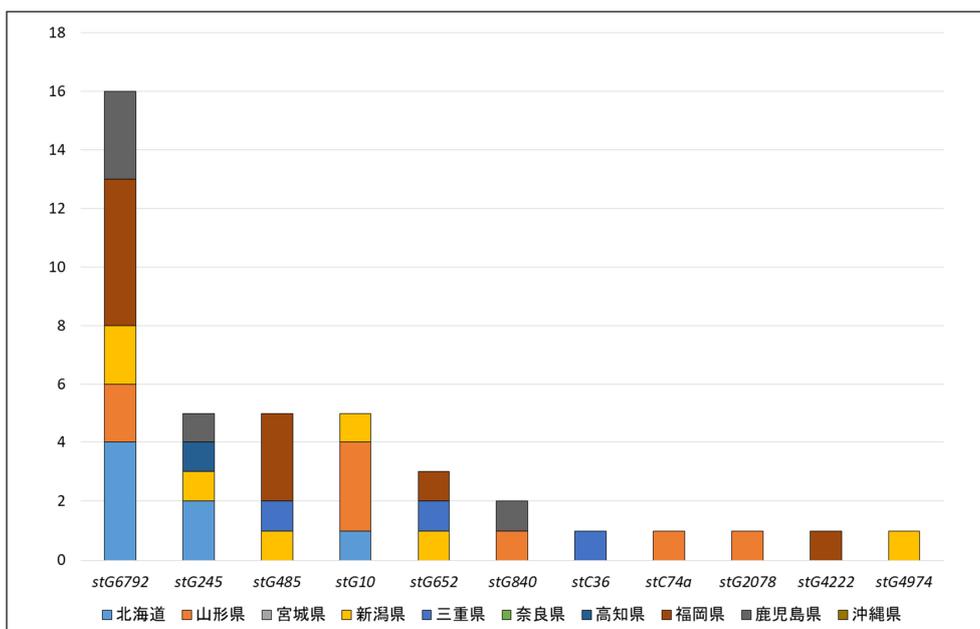


図 2. 2020年に10道県で分離された劇症型G群レンサ球菌感染症患者分離株41株のemm型

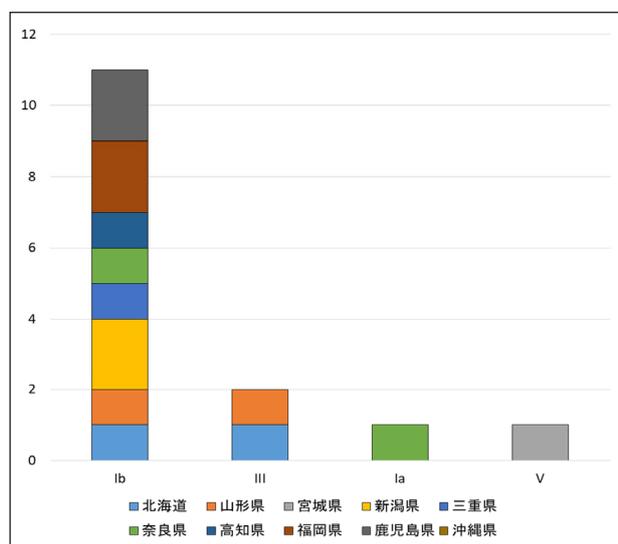


図 3. 2020年に10道県で分離された劇症型B群レンサ球菌感染症患者分離株15株の血清型

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsumura T, Nishiyama A, Aiko M, Ainai A, Ikebe T, Chiba J, Ato M, Takahashi Y. An anti-perfringolysin O monoclonal antibody cross-reactive with streptolysin O protects against streptococcal toxic shock syndrome. BMC Res Notes. 2020 Sep 5; 13 (1) : 419. doi: 10.1186/s13104-020-05264-2.
- 2) Murase K, Nozawa T, Aikawa C, Nagao M, Ikebe T, Yoshida A, Kikuchi T, Nakagawa I. Complete Genome Sequences of *Streptococcus*

pyogenes Serotype M3, M28, and M89 Strains Isolated from Human Patients in Japan, 1994 to 2009. Microbiol Resour Announc. 2020 Oct 15; 9 (42) : e01047-20. doi: 10.1128/MRA.01047-20.

- 3) Shinoda Y, Hori T, Sasai H, Ikebe T, Ohnishi H. Neonatal bacteremia caused by *emm* type 80 group A *Streptococcus*: A case report. Pediatr Int. 2020 Nov; 62 (11) : 1305–1306. doi: 10.1111/ped.14349.
- 4) Hirose Y, Yamaguchi M, Takemoto N, Miyoshi-Akiyama T, Sumitomo T, Nakata M, Ikebe T, Hanada T, Yamaguchi T, Kawahara R, Okuno R, Otsuka H, Matsumoto Y, Terashima Y, Kazawa Y, Nakanishi N, Uchida K, Akiyama Y, Iwabuchi K, Nakagawa C, Yamamoto K, Nizet V, Kawabata S. Genetic characterization of *Streptococcus pyogenes emm89* strains isolated in Japan from 2011 to 2019. Infect Microbe Dis. 2020 December; 2 (4) : 160–166. doi: 10.1097/IM9.0000000000000038.
- 5) Shizukuishi S, Ogawa M, Matsunaga S, Tomokiyo M, Ikebe T, Fushinobu S, Ryo A, Ohnishi M. *Streptococcus pneumoniae* highjacks host autophagy by deploying CbpC as a decoy for Atg14L depletion. EMBO Rep. 2020 May 6; 21 (5) : e49232. doi: 10.15252/

embr.201949232.

2. 学会発表

- 1) 池辺忠義. 劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症由来株の細菌学的特徴 (シンポジウム: 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の謎に迫る). 第 94 回日本感染症学会学術講演会, 東京, 2020 年 8 月 19-21 日.

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