

厚生労働省 新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業
成人の侵襲性細菌感染症サーベイランスの強化のための研究

侵襲性髄膜炎菌感染症起炎菌の細菌学的解析

R4~6 (2022~2024) 年度 3 ヶ年間で国内において分離された髄膜炎菌の
血清学的及び分子疫学的解析

2003-2020 年までの 17 年間に国内において分離された髄膜炎菌の
全ゲノム解読による系統学的解析及び薬剤感受性の解析

研究分担者 高橋英之 国立感染症研究所 潜在感染研究部（細菌第一部併任）室長

研究要旨

日本における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 (IMD) のサーベイランスネットワークの拡大を図り、IMD の原因菌 (IMD 株) 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、COVID-19 パンデミックを機に 2003 年から 2020 年までに国内で分離された髄膜炎菌株の全ゲノム解読による解析、及びその薬剤感受性試験とその相関性についても解析を行なった。

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ーヒト感染による集団感染事例が多く報告され、致死率が他の感染症に比べて高いため、危険視されている。一方で日本では、COVID-19 流行前は年間 40 例程度の稀少感染症となっており、COVID-19 流行期においては年間数例にまで激減した。しかし、コロナ禍明けの 2022 年から徐々に増加し、2024 年度は過去最高の IMD 報告数となった。しかし、その増加がインバウンド増加に伴う海外流入株に起因するのか、国内での人の流動増加によるの

かは不明であった。本研究においては国立感染症研実地疫学研究センターの福住宗久博士と共同で、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ない、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 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。

また、COVID-19 パンデミックで IMD 発症数が激減したのを機に 2003 年から 2020 年までに国内で分離された髄膜炎菌株の全ゲノム

解読による解析、及びその薬剤感受性試験とその相関性についても解析を遂行した。

B. 研究方法

1) 菌株の収集

各 10 道県のみなら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°C、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 100 µl 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、200 µl の AE で溶出後、精製後 A₂₆₀ 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。

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

b) PCR 反応

PCR Thermal Cycler Veriti (Applied Biosystems) 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 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 100 V 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	0.25µl	
10 X ExTaq buffer	2.5 µl	
2.5mM dNTPs	2 µl	
primers-1 (100 µM)	0.25µl	} 表 2

primers-2 (100 μM)	0.25 μl	参照
ExTaq polymerase	0.25 μl	
H ₂ O	19.5 μl	

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。

b) PCR 反応

PCR Thermal Cycler Veriti (Applied Biosystems) 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		

イ) *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		
68°C×1 分	}	5 サイクル
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

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 (4μM)	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°C×4 分	}	30 サイクル
94°C×20 秒		
50°C×30 秒		
60°C×4 分		

反応物 (~10 μl) は Sephadex G50 によって精製し、10 μl の Formaldehyde 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。Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer 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 (Genetyx) 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。

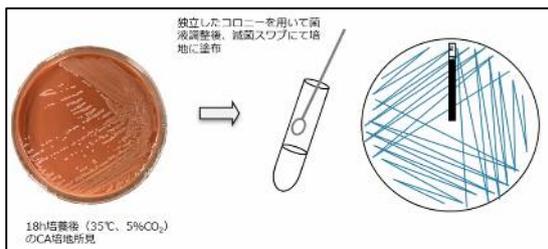
<i>abcZ</i>	433 bp
<i>adk</i>	465 bp
<i>aroE</i>	490 bp
<i>fumC</i>	465 bp

<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。

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 4 mL PBS に懸濁し、OD₆₀₀ が 0.25 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 (ピオメリュー) を置いた。その寒天培地を 37°C、5%CO₂ で約 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。

7) 全ゲノム塩基配列解読及び系統解析

全自動サンプル精製システム KingFisher Duo Prime (ThermoFisher Scientific) により髄膜炎菌ゲノム DNA を抽出した。その後、QIASeq FX DNA Library Kit (キアゲン株式会社) を用いてゲノムライブラリー調整を実施し、MiSeq (Illumina) にて全ゲノム配列解読を実施した。得られたデータは、SPAdes v4.0.0 を用いて de novo Assembly を実施した。系統解析は、オープンリーディングフレーム (ORF) のみを含むコア遺伝子のアラインメントを、Roary v.3.13.0 を用い、SNP-site v2.5.1[23]を用いてコア遺伝子のアラインメントから抽出した一塩基変異 (SNV) を用いて、IQ-TREE v.2.1.2[24]を用いて 1,000 個の超高速ブートストラップ複製で系統樹を再構築し、系統関係を解析した。系統樹は iTOL を用いて作成した。

C. 研究結果

a) 2022-2024 年 3 ヶ年度において国内で分離された髄膜炎菌株の解析

2020 年から COVID-19 の影響により激減していた国内の IMD 症例も 2023 年度は増加傾向にあり、その起炎菌株の回収数も大幅に増加し、2024 年度は 1999 年に感染症法に髄膜炎菌感染症が明記されて以来、最高の 61 症例の IMD 起炎菌株 (IMD 株) を回収し、解析した (図 1)。分離株の自治体別回収数は大阪府が最も多く、次いで東京であった (図 2)。

それらの IMD 株の血清学的解析の結果は Y ; 54 株 (62%)、B ; 27 株 (31%)、W ; 3 株 (3%)、C ; 2 株 (2%) であった (図 3)。分子疫学的解析の結果、血清群 B は ST-2057 (ST-2057 complex) が 17 株、ST-687 及び ST-467 が 2 株ずつ、ST-34, ST-485, ST-1572、ST-

11110、ST-17517 が 1 株ずつであった (図 4)。一方、血清群 Y は ST-1655 (ST-23 complex) が大多数を占めており、42 株、ST-1466 が 8 株、ST-3857 株が 2 株、ST-767 が 1 株であった (図 4)。残りの ST-11 は血清群 C の 3 株、血清群 W の株 2 株の合計 5 株であった (図 4)。

日本国内において過去 30 年間で検出されず、2022~2024 年の 3 ヶ年度において初めて検出された遺伝子型に分類される髄膜炎菌株は合計 21 株であった (表 4)。NIID824 (ST-17048, ST-23 complex)、NIID829 (ST-17239, ST-11 complex) 及び NIID843 (ST-17517, ST-41/44 complex) を除く 18 株は海外では普遍的に分離されている遺伝子型であり、特に 2024 年からこうした遺伝子型に分類される髄膜炎菌による IMD 症例が激増したことが明らかとなった。また、その中で特筆すべき解析結果として、2018 年にフランスで初めて検出され、その後欧米で広く分離報告があるがアジア圏では検出されてこなかった血清群 Y、ST-3587 の NIID927 及び NIID946 が 2024 年に 2 株分離された (表 4)。ST-3587 株はペニシリン G (PCG) に対して 32 μ g/ml の高度耐性を示し、複数種の β -lactam 剤に対しても耐性を示す一方で、第三セフェム系には感受性を示す。海外分離 ST-3587 株と比較ゲノム解析した結果、それら 2 株と同一の海外株は認められず、NIID927 と NIID946 も同一株でないことが明らかとなった (図 5)。

- b) 2003-2020 年 17 年間に国内で分離された髄膜炎菌株 291 株の WGS による系統学的解析

この三カ年中に、COVID-19 パンデミックを機に 2003 年から 2020 年までに国内で分離さ

れた髄膜炎菌株の全ゲノム解読による解析を行なった。その結果、日本国内分離株は MLST 法による遺伝子型を反映した系統樹で分離された (図 6)。その中には日本で最も多く分離される ST-23 complex の株が多くを占め、ST-1655 と ST-23 は近いが分離された系統であることが明らかとなった。また、ST-2057 を代表とする ST-2057 complex 株と莢膜多糖体合成遺伝子欠損株である ST-111026 株は日本固有株であり、他の遺伝子型の株とは異なる系統であるということが明らかとなった。一方で、ST-11106 は ST-32 complex に分類され、海外で多数の分離例がある一方で日本国内では分離頻度は非常に低い血清群 B、ST-32 株と分離された系統であるが他の ST と比較すると近いことが明らかとなった。さらに、海外で IMD 流行の起炎菌株として分離されている ST--11 に分類される髄膜炎菌株が 9 株分離され、それらを海外で分離された ST-11 株とゲノム比較解析を行なった (図 7)。その結果、日本で検出されてくる ST-11 株は中国由来株と近い株と、それ以外は世界各国で分離された海外由来株に分散されることが明らかとなった。

- c) 2003-2020 年 17 年間に国内で分離された髄膜炎菌株 290 株の薬剤感受性解析

2003-2020 年 17 年間に国内で分離された髄膜炎菌株 291 株のうち、生菌として感染研に受領できた株が 290 株あった為、それらの薬剤感受性解析を実施した (表 5)。その結果、クロラムフェニコール、メロペネム、ミノサイクリンに関しては全ての国内分離株に対して試験を実施しなかったが、試験対象

株に対しては 100%感受性を示した。また、セフトリアキソンとリファンピシンに対しては 290 株全てが感受性を示した。一方で、アジスロマイシンに対して耐性を示す株が 2 株存在し、シプロフロキサシン (CIP) と PCG に非感性及び耐性を示す株が多く認められた。さらにゲノム比較系統と CIP 及び PCG の非感性及び耐性の相関性について解析を行なった結果、日本固有株である ST-2057 株及び ST-111026 に CIP 及び PCG の非感性及び耐性株が多いことが明らかとなった (図 8)。また、髄膜炎菌株の薬剤感受性は遺伝子型と非常に相関性が認められることから、薬剤耐性遺伝子の水平遺伝は髄膜炎菌は非常に稀であることが明らかとなった。

D. 考察

a) 2022-2024 年 3 ヶ年度で国内で分離された髄膜炎菌株の解析

COVID-19 パンデミック下の 2020~2021 年度は IMD 株の解析数はわずか 5 株のみであったが、2022 年度は 8 株、2023 年度は 18 株、そして本年度は 61 株と大幅に増加し (図 1)、COVID-19 収束後の IMD 拡大が確認される結果となった。地方自治体別では IMD 報告数は人口に比例して増加する傾向が認められるが、大阪が最も多く、次いで東京という結果となった (図 2)。しかし、IMD 症例の報告数は東京が最も多く、地方自治体の衛研に依存した現行の方法で国内 IMD の全貌をより詳細に解明するには限界があることが明らかとなった。

日本国内の IMD の起炎菌の内訳は、ST-2057 及び ST-1655 という、日本での主要な B 群及び Y 群の髄膜炎菌株が多くを占めることが明

らかとなった。この結果から MD 報告数の激増はインバウンド増加による海外由来株の流入に一義的には起因しない可能性が示唆された。一方で、COVID-19 パンデミック前まで 30 年以上日本国内で検出されてこなかった特に 2024 年度からは表 4 に示した遺伝子型に分類される髄膜炎菌株も検出されたことから、COVID-19 収束後の IMD 拡大は海外流入株も起因することが明らかとなった。特に、ST-1466 株はアメリカ CDC の報告によると、アメリカでも IMD 起炎菌株や性感染症起炎菌株としてその分離数が増加していることが報告されており、ST-1466 株の日本国内での増加は世界的な傾向を反映したものだ と推測された。また、ST-3587 株は染色体上に β -lactamase 遺伝子を保持する β -lactamase 産生株であり、PCG を含む β -lactam 剤に対して高度の耐性を示した (結果未掲載、論文発表 Takahashi *et al*, 2025 参照)。ST-3587 髄膜炎菌株は 2018 年にフランスで初めて検出され、その後欧米で広く分離報告があるがアジア圏では検出されてこなかった。しかし、2024 年に日本国内で 2 例の IMD 起炎菌株として分離されたことから、 β -lactamase 産生 ST-3567 髄膜炎菌株がアジア圏まで広がっていることが示された。また、日本国内では PCG は IMD 治療薬及び予防内服薬の第一選択薬ではないが、髄膜炎菌の薬剤感受性試験が終了した症例に対して治療や退院後の予後における処方例があり、ST-3587 髄膜炎菌株の出現は国内における IMD 対策において依然憂慮すべきであると考えられた。

b) 2003-2020 年 17 年間に国内で分離された髄膜炎菌株 291 株の WGS による系統学的解析

2003-2020 年 17 年間に於いて国内で分離された髄膜炎菌株 291 株の WGS による系統学的解析の結果、MLST 法による遺伝子型を強く反映されることが明らかとなった(図6)。海外で IMD 流行の起炎菌株として分離されている ST-11 に分類される髄膜炎菌株が 9 株を海外で分離された ST-11 株とゲノム比較解析を行なった結果、その由来は世界各国から由来していると推測される結果となった(図7)。一方で、世界では血清群 C に対する髄膜炎菌ワクチンの定期接種が実施されているため、血清群 C の ST-11 株が分離される可能性は日本以外では非常に低いと考えられるが、髄膜炎菌ワクチンの定期接種が実施されていない日本国内においては血清群 C の ST-11 株が依然 IMD 起炎菌株として分離されている(図4)。以上のことから、日本国内で分離される ST-11 株は日本国内で潜在している血清群 C (もしくは W) の ST-11 株と海外から持ち込まれる血清群 W の ST-11 株の 2 種類で構成されると推測された。

c) 2003-2020 年 17 年間に於いて国内で分離された髄膜炎菌株 290 株の薬剤感受性解析

2003-2020 年 17 年間に於いて国内で分離された髄膜炎菌株 290 株の薬剤感受性の解析の結果、日本国内ではクロラムフェニコール、メロペネム、ミノサイクリン、セフトリアキソンとリファンピシンの 5 剤に対しては 100%感受性を示した(表5)。この結果から、日本国内で IMD 治療に使われているクロラムフェニコール、メロペネム、ミノサイクリ

ン、セフトリアキシンの 4 剤は細菌学的見地からも今後も IMD 治療薬として有効であることが明らかになった。特にリファンピシンは化学予防内服薬として欧米でも使用されており、後述の日本国内分離株のシプロフロキサシン (CIP) 非感性・耐性化傾向を考慮すると起炎菌の解析を待たずに処方をする場合にはリファンピシンの選択が望ましいと考えられた。一方で、CIP と PCG に非感性及び耐性を示す株が多く認められた(表5)。この結果から、CIP は一日一回の経口処方薬として IMD 化学予防薬として国内では広く使われてきたが、その一義的な処方薬の選択に対しては一考を要すると考えられた。PCG に関して日本国内では IMD の治療及び予防に対して第一選択薬となることはないが、「髄膜炎菌は薬剤耐性が無いから IMD に対する選択薬は比較的豊富」という臨床での経験的認知に関しては再考を促す結果となったと考えられた。一方で、CIP 及び PCG の非感性・耐性株は日本固有株である ST-2057 complex 株及び ST-111026 株に偏重していることが本研究で明らかとなった(図8)。髄膜炎菌の薬剤耐性遺伝子は水平伝播する可能性は非常に低いことから、起炎菌(分離菌)解析の猶予がある場合には遺伝子型(可能であれば薬剤感受性も)の解析結果を実施してから処方薬を選択する手順を取ることが可能であれば、不適切な抗生物質処方を避けることが可能であると考えられた。また、2024 年に検出された ST-3587 株は β -lactamase 産生株であり、PCG のみならず、アンピシリンやアモキシシリンといった他の β -ラクタム剤に対しても耐性を示す。日本の臨床の現場では経口薬のアモキシシ

リンが処方されるケースもゼロでは無い為、国内分離株の薬剤感受性に関しては引き続きモニタリングしていく必要があると考えられた。

E. 結論

2023年5月に感染症法においてCOVID-19が5類相当に変更され、インバウンド増加に伴うIMD増加も予想された。2023年度のIMD起炎菌株としてはST-2057及びST-1655髄膜炎菌株が大多数であったため、インバウンド増加の影響は少ないと考えられたが、2024年度はST-2057及びST-1655髄膜炎菌株が大多数という2023年度の傾向が認められる一方で、海外流入株が増加している傾向も認められた。日本では2025年4月に大阪関西万博が開催され、更なる海外株の流入の可能性も十分に予想される。今後も引き続き薬剤感受性を含めたIMD起炎菌株の解析を遂行する必要があると考えられた。

G. 研究発表

論文発表

Nishida Y, Yanagisawa S, Morita R, Shigematsu H, Shinzawa-Itoh K, Yuki H, Ogasawara S, Shimuta K, Iwamoto T, Nakabayashi C, Matsumura W, Kato H, Gopalasingam C, Nagao T, Qaqorh T, Takahashi Y, Yamazaki S, Kamiya K, Harada R, Mizuno N, Takahashi H, Akeda Y, Ohnishi M, Ishii Y, Kumasaka T, Murata T, Muramoto K, Tosha T, Shiro Y, Honma T, Shigeta Y, Kubo M, Takashima S, Shintani Y. Identifying antibiotics based on structural differences in the conserved allostery from mitochondrial heme-copper oxidases. *Nat Commun* 2022 13:7591. doi: 10.1038/s41467-022-34771-y.

Soichiro Kado, Koji Kamiya, Takashi Hosaka, Tetsuya Kawamura, Kenichi Komatsu, Eiji Kajii, Hideyuki Takahashi, Mayumi Komine, Mamitaro Ohtsuki. Adult invasive meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* classified as serogroup B and sequence type 15947. *Journal of Dermatology* doi: 10.1111/1346-8138.16664.

Hideyuki Takahashi, Masatomo Morita, Hajime Kamiya, Munehisa Fukusumi, Masatimi Sunagawa, Haruna Nakamura-Miwa, Yukihiro Akeda, Ken Shimuta, Makoto Ohnishi. Genetic characterization of Japanese meningococcal strains isolated over a 17-year period between 2003 and 2020 in Japan. *Vaccine* 2023 1:416-426.

Yusuke Ota, Reina Okada, Hideyuki Takahashi, Ryoichi Saito. Molecular detection of fluoroquinolone-resistant *Neisseria meningitidis* by using mismatched PCR-restriction fragment length polymorphism technique. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 2:12:911911. doi:10.3389/fcimb.2022.911911.eCollection 2022.

Shimuta K, Takahashi H, Akeda Y, Nakayama SI, Ohnishi M. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Identifying *Neisseria gonorrhoeae* Nonmosaic *penA*-Targeting Strains Potentially Eradicable by Cefixime. *Microbiol Spectr.* 2022, 24:e0233522. doi: 10.1128/spectrum.02335-22.

Saito R, Nakajima J, Prah I, Morita M, Mahazu S, Ota Y, Kobayashi A, Tohda S, Kamiya

H, Takahashi H, Ohnishi M. Penicillin- and Ciprofloxacin-Resistant Invasive *Neisseria meningitidis* Isolates from Japan. *Microbiol Spectr.* 2022, 29;10(3):e0062722.doi: 10.1128/spectrum.00627-22.

Takahashi H, Morita M, Kamiya H, Nakamura-Miwa H, Shimuta K, Ohnishi M. Genetic characterization of clonal complex sequence type 2057 (cc2057) serogroup B *Neisseria meningitidis* strains unique to Japan and identification of a capsular-switched serogroup Y isolate cc2057. *J Med Microbiol.* 2022, 71(3).doi: 10.1099/jmm.0.001504.

Takahashi H, Morita M, Kamiya H, Fukusumi M, Sunagawa M, Nakamura-Miwa H, Akeda Y, Shimuta K, Ohnishi M. Genetic characterization of Japanese meningococcal strains isolated over a 17-year period between 2003 and 2020 in Japan. *Vaccine* 1:416-426, 2023.

Takahashi H, Morita M, Yasuda M, Ohama Y, Kobori Y, Kojima M, Shimuta K, Akeda Y, Ohnishi M. Detection of Novel US *Neisseria meningitidis* Urethritis Clade Subtypes in Japan. *Emerg.Infect .Dis.* 29(11):2210-2217, 2023.

Takahashi H, Morita M, Kamiya H, Fukusumi M, Yasuda M, Sunagawa M, Nakamura-Miwa H, Ohama Y, Shimuta K, Ohnishi M, Saito R, Akeda Y. Emergence of ciprofloxacin- and penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* isolates in Japan between 2003 and 2020 and its genetic features. *Antimicrobiol Agents Chemother.* 67(11):e0074423,

2023.

Ota Y, Okada R, Takahashi H, Saito R. A mismatch amplification mutation assay for specific detection of ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis*. *J Infect Chemother.* 29(5):562-564, 2023.

Kado S, Kamiya K, Hosaka T, Kawamura T, Komatsu K, Kajii E, Takahashi H, Komine M, Ohtsuki M. Adult invasive meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* classified as serogroup B and sequence type 15947. *J Dermatol.* 50(4):e129-e130, 2023.

Ishikawa K, Takahashi H, Akeda Y, Mori N. Emerging Meningococcal B Meningitis in Japan: A Case Report of a 50-Year-Old Japanese Man with Diabetes. *American Journal of Case Report.*, e943973. doi: 10.12659/AJCR.943973., 2024.

Takahashi H, Ohama Y, Horiba K, Fukusumi M, Sunagawa T, Ariyoshi T, Koide M, Shimuta K, Saito R, Akeda Y. Emergence of high-level penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* harboring ROB-1-type β -lactamase gene in Japan. *J Infect Chemother.* 102679. doi: 10.1016/j.jiac.2025.102679, 2025.

Shimuta K, Ohama Y, Ito S, Hoshina S, Takahashi H, Igawa G, Dorin Yamamoto M, Akeda Y, Ohnishi M. Emergence of ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* through horizontal gene transfer among *Neisseria* spp. *Journal of Infectious Diseases.* jiaf008. doi: 10.1093/infdis/jiaf008, 2025.

T Kobayashi M, Kamiya H, Fukusumi M, Takahashi H, Akeda Y, Suzuki M, Sunagawa T. Epidemiology of invasive meningococcal disease, Japan, 2013 to 2023. Euro Surveill. 2400136. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.46.2400136., 2025.

学会発表

高橋英之、大西真、志牟田健、横山茂之、柳沢達男、Genetic incorporation of non-canonical amino acid photocrosslinkers in *Neisseria meningitidis* provides insights into the physiological function of the function-unknown protein. 第 95 回細菌学会総会、オンライン開催、2022 年 3 月

高橋英之、森田昌知、神谷元、福住宗久、砂川富正、三輪春奈、明田幸宏、志牟田健、大西真、Genomic characterization of Japanese meningococcal strains isolated over a 17-year period between 2003 and 2020 in Japan、第 96 回細菌学会総会、姫路、2023 年 3 月

高橋英之、森田昌知、神谷元、福住宗久、安田満、大濱侑季、志牟田健、大西真、齋藤良一、明田幸宏、Emergence of ciprofloxacin- and penicillin- resistant meningococcal isolates in Japan and its genetic features、第 97 回細菌学会総会、札幌、2024 年 8 月

H. 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

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	<i>orf2</i> (A)-1	5'-CGCAATAGGTGTATATATTCCTTCC-3'	24mer
	<i>orf2</i> (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

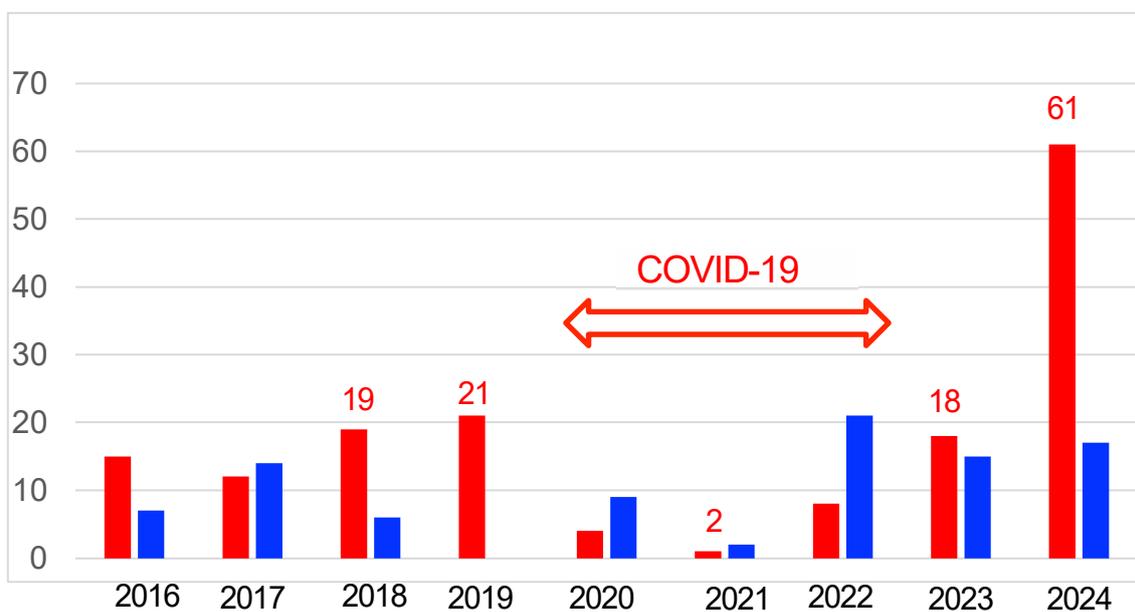
表2 遺伝子型別用の鋳型調製 PCR プライマー

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

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-TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG
	S2-TTGTAGGCGGTTTGGCGAC
<i>gdh</i>	S1-GTGGCGCGTTATTTCAAAGA
	S2-CTGCCTTCAAAAATATGGCT
<i>pdhC</i>	S1-TCTACTACATCACCTGATG
	P2-ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>pgm</i>	S1-CGGCGATGCCGACCCTTGG
	S2-GGTGATGATTTCCGGTTGCGCC

図1 2016～2024年度のIMD及びnon-IMD株の解析数



赤が IMD、IMD non-IMD 株の数を示す。

図3 2022-2024年3ヵ年度に分離された髄膜炎菌株の血清群内訳

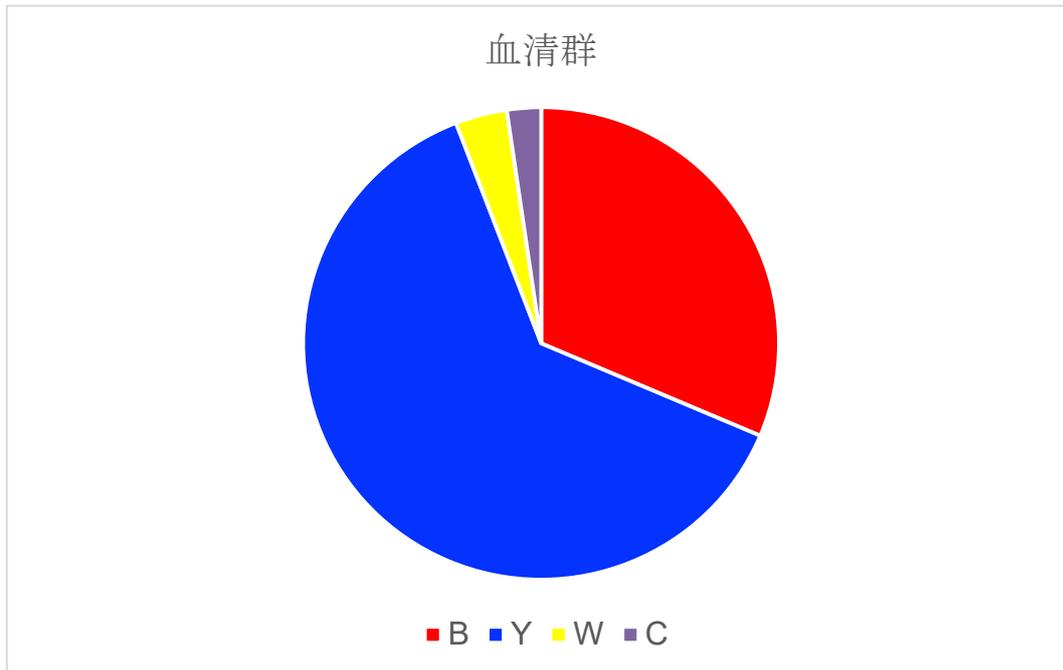


図4 2022-2024年3ヵ年度に分離された髄膜炎菌株の遺伝子型内訳

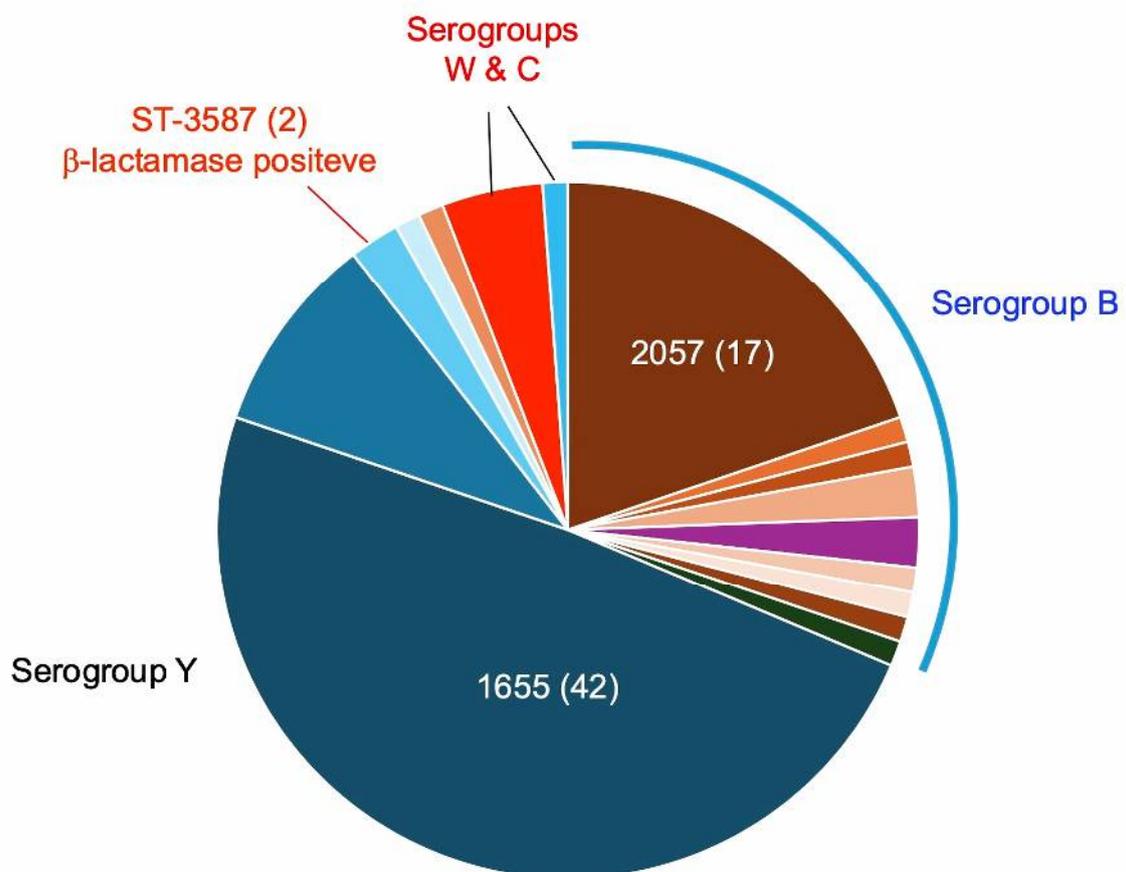
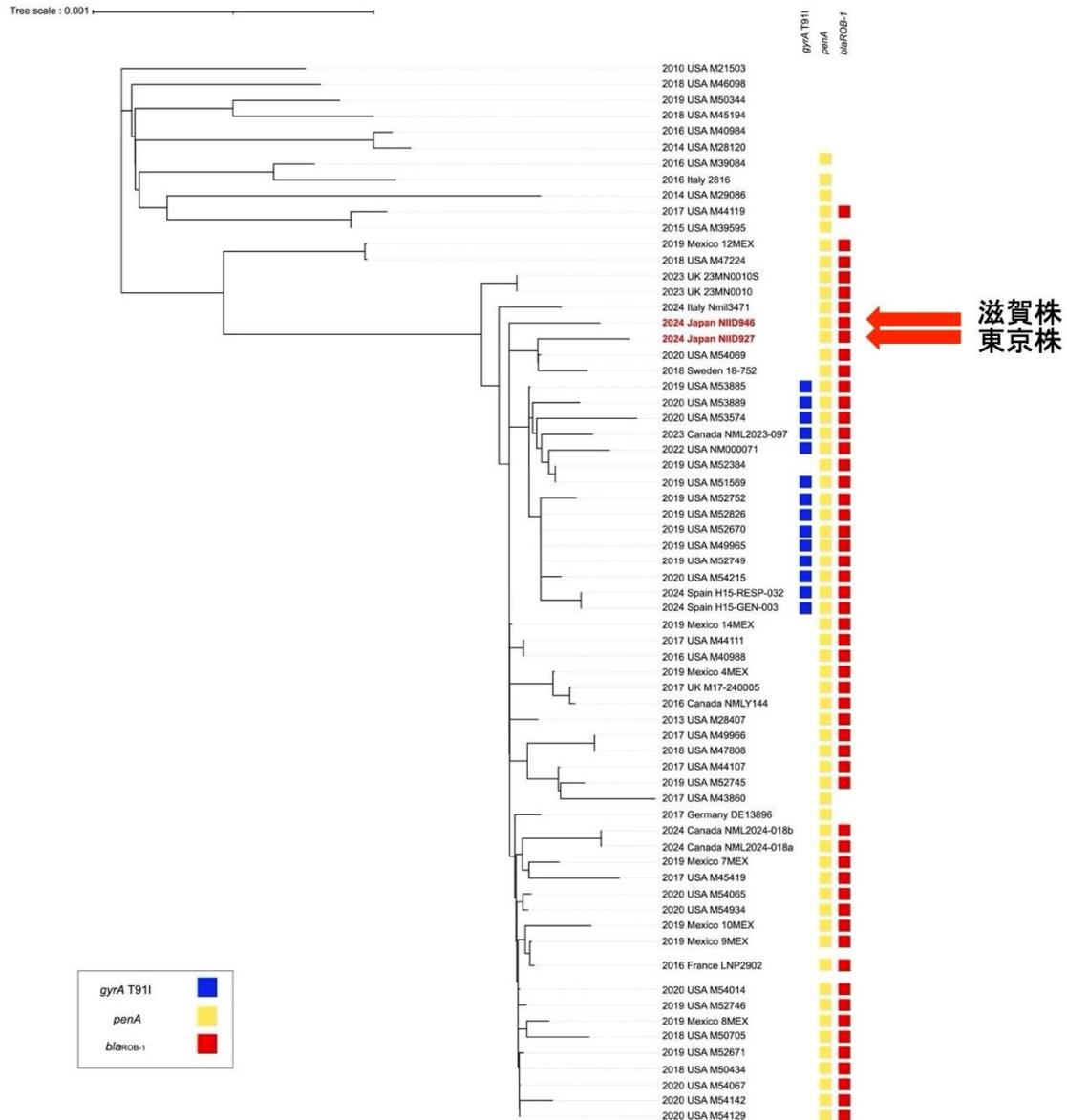


表4 2022-2024年3ヵ年度間で国内において初めて検出された遺伝子型に分類された髄膜炎菌株

NIID No.	Date	都道府県	Serogroup	ST	ST-complex
812	2022/5/18	群馬	B	2032	178
824	2022/12/9	埼玉	Y	17048	23
829	2023/1/29	東京	C	17239	11
840	2023/3/2	大阪	B	467	269
841	2023/3/2	大阪	B	467	269
843	2024/3/30	千葉	B	17517	41/44
892	2024/4/15	東京	B	1572	
907	2024/5/31	埼玉	Y	767	167
913	2024/6/21	千葉	Y	1466	174
917	2024/7/4	茨城	Y	1466	174
918	2024/7/6	神奈川	B	11110	
927	2024/9/23	東京	Y	3587	
933	2024/10/10	栃木	Y	1466	174
934	2024/10/24	兵庫	Y	1466	174
938	2024/11/8	東京	B	34	32
946	2024/12/23	滋賀	Y	3587	
949	2024/12/19	大阪	Y	1466	174
950	2024/12/19	茨城	Y	1466	174
953	2025/1/10	福岡	Y	1466	174
954	2025/1/11	福岡	Y	1466	174
964	2025/1/25	広島	B	485	d
Total No.				21	

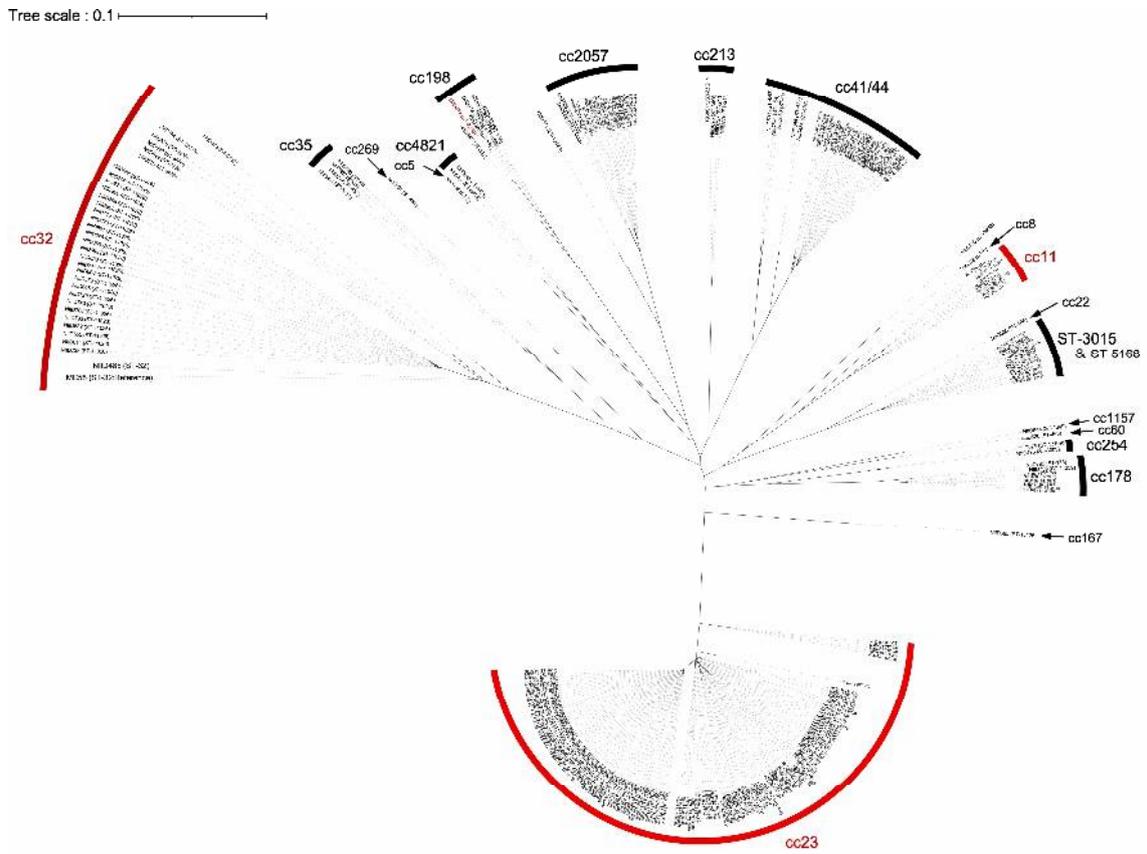
※国内既存株の一塩基多型株であると推測される NIID824 (ST-17048,ST-23 complex)、NIID829 (ST-17239,ST-11 complex) 及びNIID843 (ST-17517,ST-41/44 complex) は灰色で示した。

図5 海外分離ST-3587株と国内ST-3587IMD2株（東京株NIID927、滋賀株NIID946）のWGS比較による分子系統樹解析の解析結果



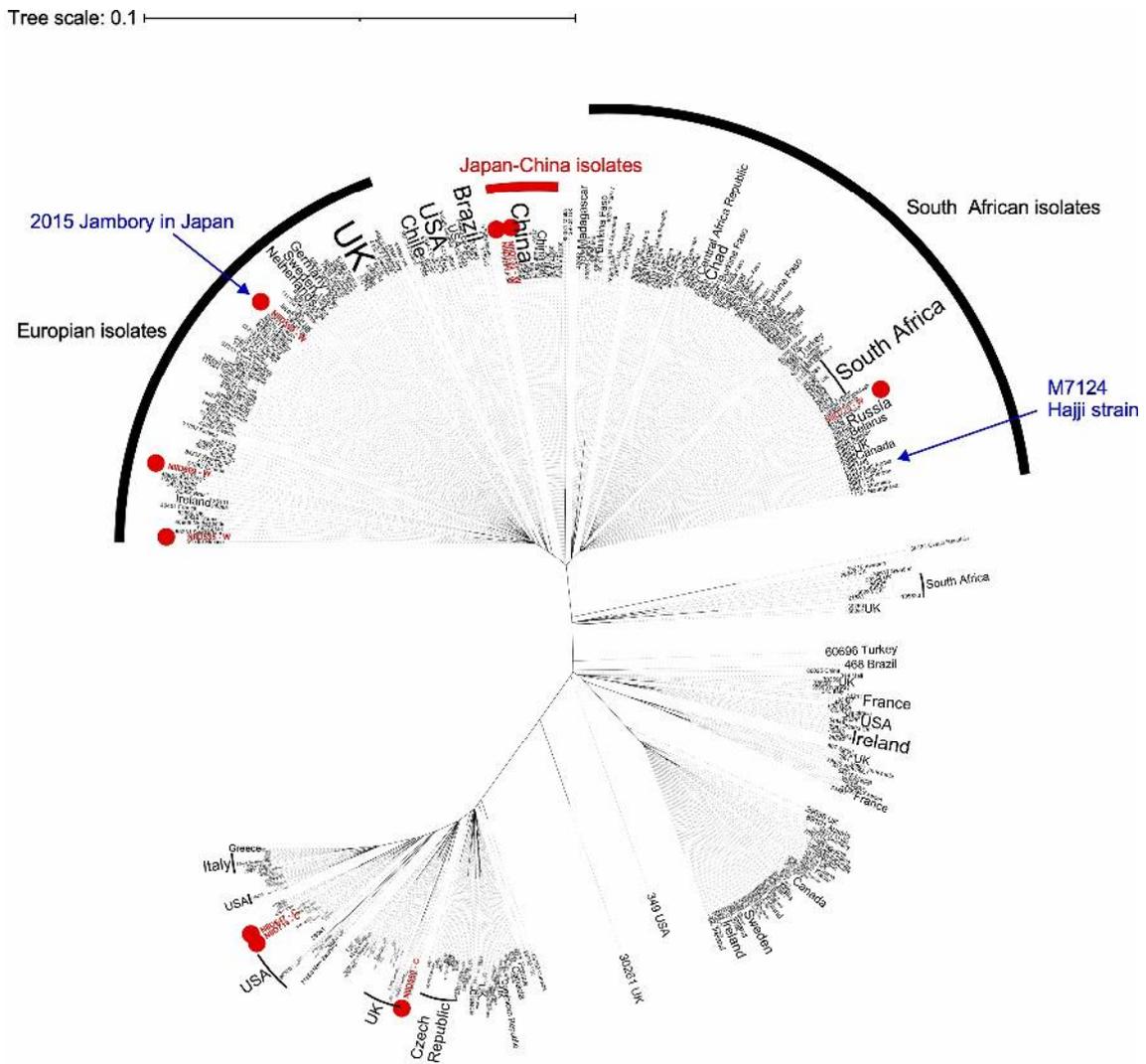
青ボックスは キノロン耐性を示す *gyrA* T91I 変異、黄ボックスはアンピシリン耐性を示す5つの *penA* 変異 (F504L, A510V, I515V, H541N, I566V)、赤ボックスは β -lactamase 遺伝子の有無を示す。

図6 2003年から2020年までの17年間にわたり国内で分離された髄膜炎菌株の全ゲノム解読による系統学的解析



cc は7つの遺伝子座のうち4つが一致する「同族遺伝子型」という意味の clonal complex の略である。

図7 2003年から2020年までの17年間にわたり日本で分離されたST-11株と世界で分離されたST-11株のWGS比較による系統学的解析



日本分離株を赤丸で示す。

表 5 2003 年から 2020 年までに国内で分離された髄膜炎菌株 290 株の薬剤感受性試験の解析結果の

Antibiotic	No.	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Interpretative category#		
					%S	%I	%R
Azithromycin (AZM)	290	0.016 - 4	0.25	1	99.3	*	0.7
Ceftriaxone	290	≦ 0.004-0.016	≦ 0.002	≦ 0.002	100.0	0.0	0.0
Ciprofloxacin (CIP)	290	≦ 0.002 - 0.25	0.003	0.094	81.8	10.3	7.9
Chloramphenicol **	168	0.25-2	1	1.5	100.0	0.0	0.0
Meropenem**	211	0.002 - 0.120	0.008	0.023	100.0	*	0.0
Minocycline**	214	0.009 - 1	0.125	0.25	100.0	*	0.0
Penicillin (PCG)	290	0.018- 0.5	0.064	0.19	70.7	27.9	1.4
Rifampicin (RFP)	290	≦ 0.002 - 0.19	0.008	0.047	100.0	0.0	0.0

S,susceptible; I, intermediate; R, resistant. The category was interpreted by the Clinical and Laboratory Standards Institute guideline

* The criteria for "Intermediate" was not defined by CLSI.

**Susceptibility for chloramphenicol, meropenem, minocycline was not performed for all *N. meningitidis* isoates (shown in grey).

