

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

R7（2025）年度国内で分離された髄膜炎菌の
血清学的及び分子疫学的解析、薬剤感受性試験

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 (IMD) 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 IMD のサーベイランスネットワークの拡大を図り、IMD の起炎菌 (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。

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、今年度はほぼコロナ禍前と同じ水準に達した。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。

そこで、本研究においては国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 応用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 IMD 株の収集を実施し、IMD 株の血清学的及び分子疫学的解析を実施した。

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℃、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	} 表 1 参照
10 x ExTaq buffer	2.5 μl	
2.5mM dNTPs	2 μl	
primers-1 (100μM)	0.25 μl	
primers-2 (100μM)	0.25 μl	
ExTaq polymerase	0.25 μl	
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.	}

55°C×30sec.35 cycles

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 (~0.001% RedSafe を含む)で 130 V で 20 分電気泳動し、短波長 LED 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

- 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	} 表 2 参照
10 X ExTaq buffer	2.5 μl	
2.5mM dNTPs	2 μl	
primers-1 (100 μM)	0.25μl	
primers-2 (100 μM)	0.25 μl	
ExTaq polymerase	0.25 μl	
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。

ア) abcZ, adk, fumC, gdh

94°C×4 分

94°C×30 秒	5 サイクル	94°C×4 分
60°C×1 分		
72°C×1 分		
94°C×30 秒	5 サイクル	94°C×20 秒
58°C×1 分		
72°C×1 分		
94°C×30 秒	20 サイクル	50°C×30 秒
56°C×1 分		
72°C×1 分		
4°C		60°C×4 分
イ) <u>aroE</u> , <u>pdhE</u> , <u>pgm</u>		
94°C×4 分		
94°C×30 秒	5 サイクル	94°C×4 分
70°C×1 分		
72°C×1 分		
94°C×30 秒	5 サイクル	94°C×20 秒
68°C×1 分		
72°C×1 分		
94°C×30 秒	20 サイクル	50°C×30 秒
66°C×1 分		
72°C×1 分		
4°C		60°C×4 分

c) PCR 産物の精製

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。

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 をと混和し、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。

C. 研究結果

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、本年度は昨年度とほぼ同数の64症例の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、次いで埼玉、東京であった(図2)。

それらのIMD株の血清学的及び分子疫学的解析を実施した。血清学的解析の結果はY; 47株(73%)、B; 13株(21%)、W; 3株(5%)、NG(Non-groupable[莢膜多糖体非産生株]; 1株(1%)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7株、ST-9293、ST-19066、ST-19067、ST-19078が一株ずつであった(図4、表4)。一方、血清群YはST-1655(ST-23 complex)が29株、ST-1466が9株、ST-23及びST-3857株が2株、ST-19068、ST-19229、ST-19274が1株であった(図4、表4)。また、血清群WがST-11の3株、NGの1株は日本固有株であるST-11026であった(図4、表4)。本年度のIMD症例の起炎菌株の解析数は64株となった(図3、表4)。

D. 考察

本年度もIMD株の収集を積極的に遂行し、それらの血清学的及び分子疫学的解析を実施した。

COVID-19パンデミックの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、そして昨年度は61株と大幅に増加し、本年度も昨年度とほぼ同数の64株を回収できた(図1)。一方で、2025年は大阪・関西万博が開催され、海外

からの人口流入数は2024年度より増加しているにも関わらず、IMD症例の大きな増加は認められなかった(IMD株数はIMD症例に正比例するが、詳細は共同研究者の福住宗久博士の報告書を参照)。COVID-19パンデミック収束後、IMD症例が再び増加に転じるまでに1年程のラグが発生した事実を考慮すると、2026年度以降に大阪・関西万博開催の影響が日本国内で認められる可能性もあるため、来年度以降も注視していく必要があると考えられた。

日本国内のIMDの起炎菌の内訳は、IMD報告数の激増にも関わらず、昨年度同様に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。この結果は大阪・関西万博によるインバンド増加が日本国内のIMD報告数の増加に繋がらなかったことと合致すると考えられた。一方で、COVID-19収束後に国内で増加傾向にあるST-1466株は昨年度同様、本年度もST-1655株に次いで日本で多く検出された血清群Yの髄膜炎菌株となった。また、ST-1466株は尿道炎起炎菌株としても日本で最も分離される株となってきた(結果未掲載データ)。アメリカやオーストラリアではIMD起炎菌株及び性感染症起炎菌株として分離数が増加していることが報告されており、世界的な傾向が日本国内でも反映されている可能性が考えられた。

新規遺伝子型としては以下の株が国内で検出された。B群ST-19066株及びST-19078株はST-2057株の一塩基多型、そしてY群ST-19027はST-1655の一塩基多型、ST-19068はST-4821株の一塩基多型、そしてST-19229及びST-19274はST-1466の一塩基多型であった。ST-4821はこれまで国内のIMD症例の起炎菌とし

ては極めて少なかったが、中国では主要な IMD 起炎菌として分離されており、パンデミック後の中国からのインバウンド増加に伴い、ST-4821 株及びその類縁株の増加の可能性も考えられる。また、ST-1466 株の一塩基多型が国内で分離されてきている事実は ST-1466 株が本研究により把握できている以上に日本国内に定着・潜在し、広がっている可能性が考えられた。殊に尿道性髄膜炎菌株としても最も分離されるようになってきた事実は日本人の保菌状況が COVID-19 パンデミック前後で大きく変化している可能性を強く示唆していると考えられる。今後も国内の ST-1466 株及びその類縁株の伝播状況も注視する必要があると考えられた。

E. 結論

2025 年度の国内分離 IMD 株は 2024 年度とほぼ同じ内訳で、2025 年度も国内由来株による症例に起因す推測された。一方で、大阪関西万博開始による外国人の流入に伴う海外からの髄膜炎菌株の流入の影響はほとんどなかったと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hideyuki Takahashi, Hiroko Kato, Yuki Ohama, Ken, Shimuta, Tatsuo Yanagisawa, Yukihiro Akeda. Genetic analyses of the single-pass transmembrane protein TspA in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Lett* 2026 7:373:fnag022. doi: 10.1093/femsle/fnag022.

Miho Matsuba, Samiratu Mahazu, Ken Shimuta, Anthony Ablordey, Hideyuki Takahashi, Ryoichi Saito. Development of a rapid, simple multiplex PCR-dipstick assay for the detection of *Neisseria meningitidis* serogroups in clinical isolates. *Front Cell Infect Microbiol* 2026 22:15:1745660. doi: 10.3389/fcimb.2025.1745660.doi:10.3389/fcimb.2025.1745660.

Ken Shimuta, Yuki Ohama, Ai Yoshida, Shu-Ichi Nakayama, Makoto Ohnishi, Takuya Kawahata, Hideyuki Takahashi, Yukihiro Akeda. Emergence of a ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain harbouring penA-60.001 in a novel genetic background (MLST 9903) in Japan, 2018-2024. *Sex Transm Infect.* 2025 20:2025-056694. doi: 10.1136/sextrans-2025-056694.

Yu Matsuo, Yu Monden, Hiroshi Watanabe, Hideyuki Takahashi, Yukihiro Akeda, Hodaka Akune, Kensuke Sasaki, Daiki Ishio, Kohei Yamazaki, Naotaka Tashiro, Shigeo Yoshida. A case of primary meningococcal conjunctivitis in an older patient. *J Infect Chemother.* 2025. 31:102702. doi: 10.1016/j.jiac.2025.102702.

Hideyuki Takahashi, Yuki Ohama, Kazuhiro Horiba, Munehisa Fukusumi, Tomimasa Sunagawa, Tsukasa Ariyoshi, Mayako Koide, Ken Shimuta, Ryoichi Saito, Yukihiro Akeda. Emergence of high-level penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* harboring ROB-1-type β -lactamase gene in Japan *J Infect Chemother.* 2025.31:102679. doi: 10.1016/j.jiac.2025.102679.

Ken Shimuta, Yuki Ohama, Shin Ito, Shinji Hoshina,
Hideyuki Takahashi, Gene Igawa, Misato Dorin
Yamamoto, Yukihiro Akeda, Makoto Ohnishi.
Emergence of Ceftriaxone-Resistant *Neisseria*
gonorrhoeae Through Horizontal Gene Transfer
Among *Neisseria* Species. *J Infect Dis.* 2025.
30;232:152-161. doi: 10.1093/infdis/jiaf008.
PMID: 39776180 DOI: 10.1093/infdis/jiaf008

2. 学会発表

高橋英之、森田昌知、安田満、大濱侑季、志牟
田健、明田幸宏、大西真、Emergence of new
subtypes of US *Neisseria meningitidis* urethritis
clade isolates in Japan、第 98 回細菌学会総会、金
沢、2025 年 5 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	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'-CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA -3'	27mer
血清群 W	siaD(W)-1	5' - CAGAAAGTGAGGGATTTCATA- 3'	22mer
	siaD(W)-2	5'- CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT- 3'	27mer

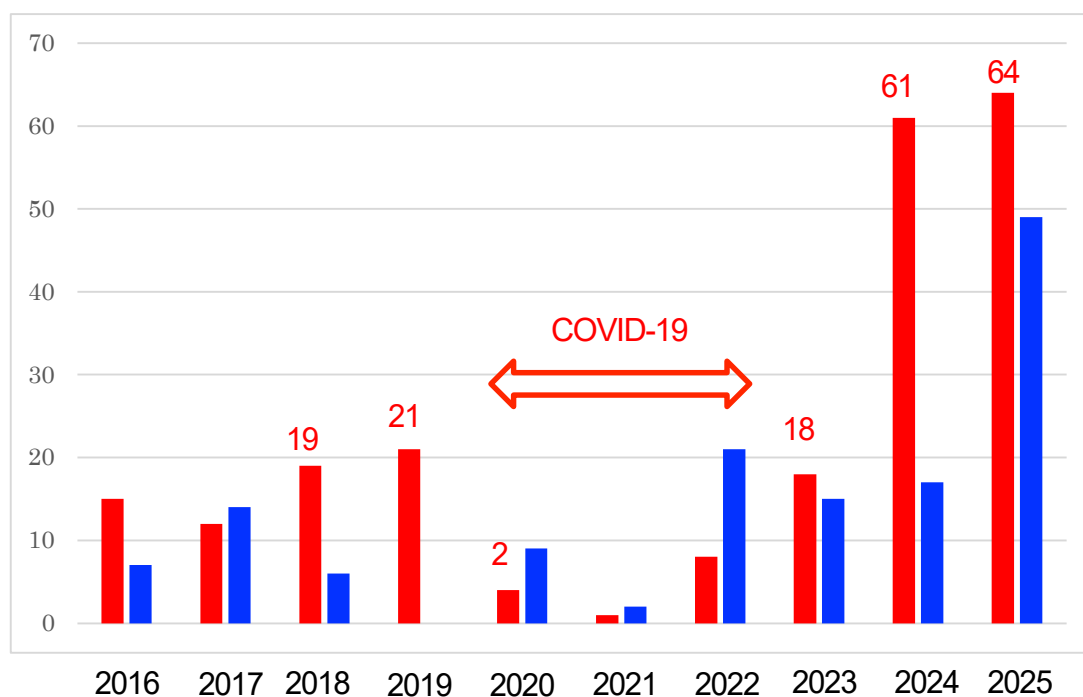
表2 遺伝子型別用の鋳型調製PCRプライマー

<i>abcZ</i>	P1 - ATTCGTTTATGTACCGCAGG
	P2 - GTTGATTCTCTGCCTGTTCCG
<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

表3 遺伝子型別用のシーケンスPCRプライマー

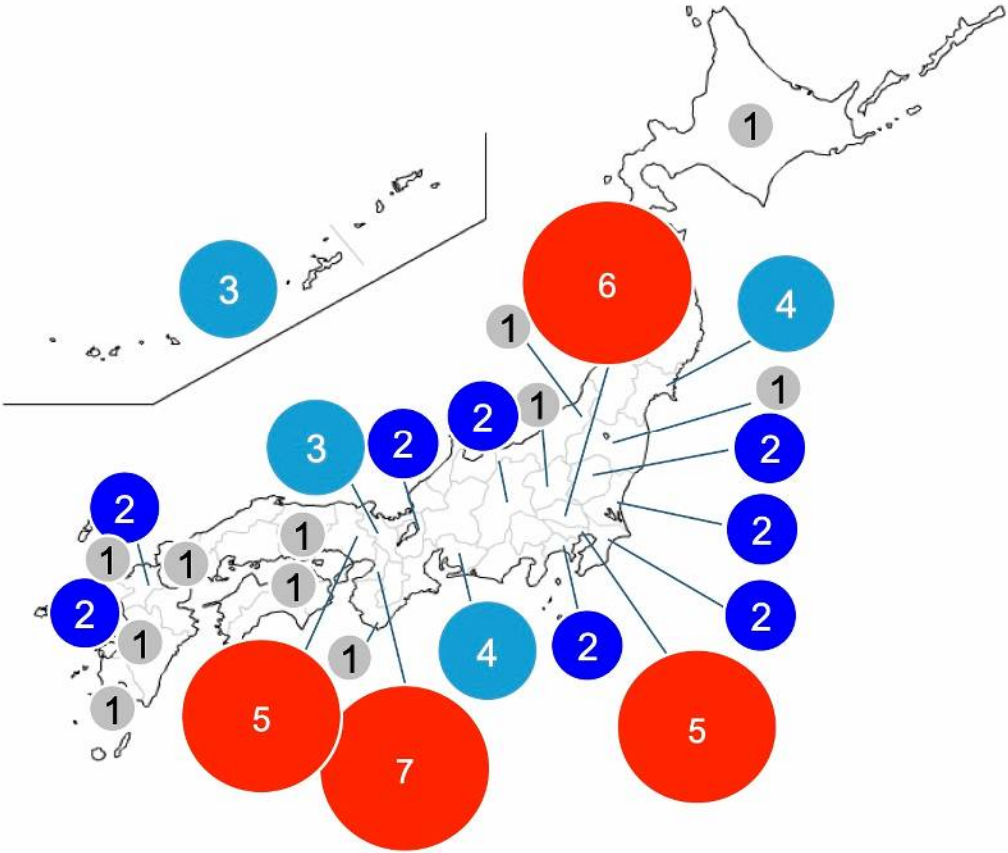
<i>abcZ</i>	P1-ATTCGTTTATGTACCGCAGG
	S2-GAGAACGAGCCGGGATAGGA
<i>adk</i>	S1-AGGCTGGCACGCCCTTGG
	S2;CAATACTTCGGCTTTCACGG
<i>aroE</i>	S1-GCGGTCAACTACGCTGATT
	S2-ATGATGTTGCCGTACACATA
<i>fumC</i>	S1-TCCGGCTTGCCGTTTGTGTCAG
	S2-TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC
<i>gdh</i>	S1-GTGGCGCGTTATTTCAAAGA
	S2-CTGCCTTCAAAAATATGGCT
<i>pdhC</i>	S1-TCTACTACATCACCCCTGATG
	P2-ATCGGCTTTGATGCCGTATTT
<i>pgm</i>	S1-CGGCGATGCCGACCGCTTGG
	S2-GGTGATGATTTTCGGTTGCGCC

図1 2016～2025年度のIMDの回収（解析）数



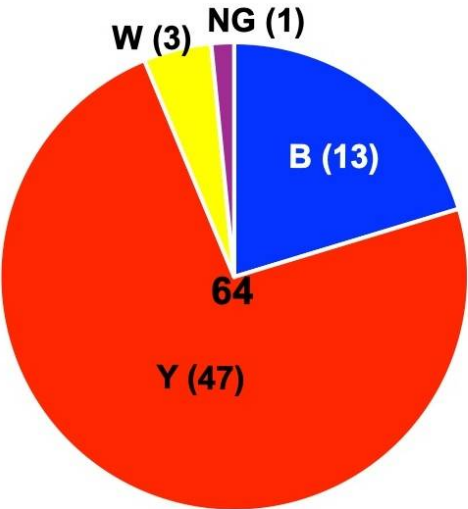
赤が IMD 株の数を示す。青は IMD 症例の患者以外（尿道炎、保菌者等：本報告書内での解析結果は省略）由来株の数を示す。

図2 2025 年度国内分離 IMD 株の地方自治体別の内訳



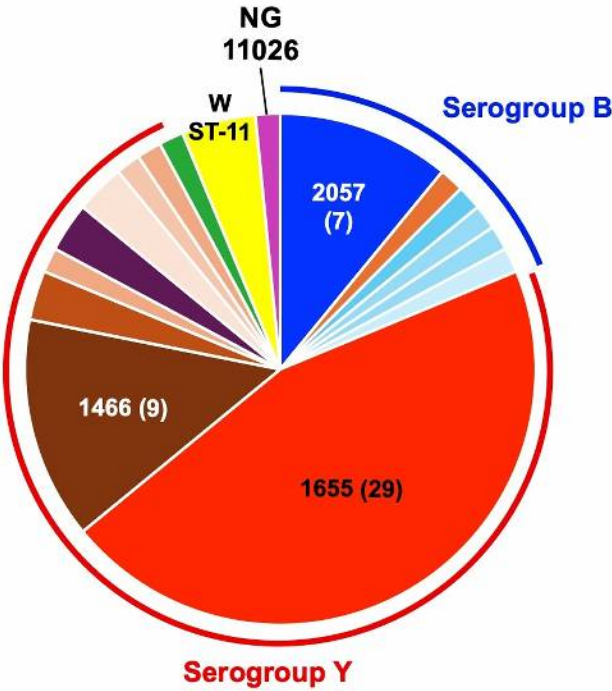
数字はその株数を示す。

図3 2025 年度国内分離 IMD 株の血清群



カッコ内の数字はその株数を示す。

図 4 2025 年度国内分離 IMD 株の遺伝子型の内訳



数字は遺伝子型、カッコ内の数字はその株数を示す。

表 4 2025 年度国内分離 IMD 株の遺伝子型の内訳とその血清群

遺伝子型	株数	血清群
2057	7	B
9293	1	
13675	1	
19066	1	
19067	1	
19078	1	
1655	29	Y
1466	9	
23	2	
1389	1	
3587	2	
19027	2	
19068	1	
19229	1	
19274	1	
11	3	W
11026	1	NG