

侵襲性髄膜炎菌感染症起炎菌の細菌学的解析

R5（2023）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 細菌第一部 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、性感染症由来株や健康保菌者由来株といった、IMD由来ではない（non-IMD）株の解析も実施した。

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、致命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感染症研究所疫学センターの神谷元博士、実地疫学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、そして薬剤感受性試験を実施した。また、性感染症由来株や健康保菌者由来株といった、IMD由来ではない（non-IMD）株の解析も並行して実施した。

B. 研究方法

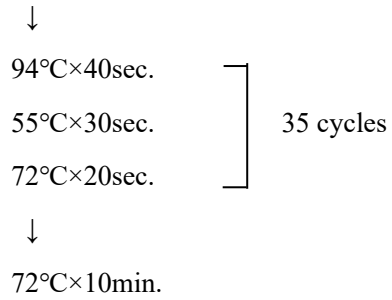
1) 菌株の収集

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°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。

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。

4) 血清群型別

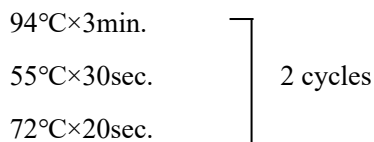
a) PCR 反応液の調製

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	
10 x ExTaq buffer	2.5 μl	
2.5mM dNTPs	2 μl	
primers-1 (100 μM)	0.25 μl	} 表 1 参照
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 Dice TP600 (Takara Bio) を用いて以下のプロトコールに従って PCR 反応を行なった。



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

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。

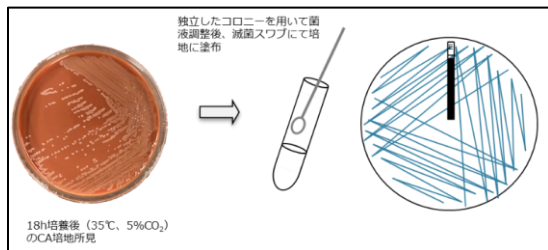
<i>abcZ</i>	433 bp
<i>adk</i>	465 bp
<i>aroE</i>	490 bp
<i>fumC</i>	465 bp
<i>gdh</i>	501 bp
<i>pdhC</i>	480 bp
<i>pgm</i>	450 bp

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 P B S 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。

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 (図 1)、本年度は 18 症例の IMD 起炎菌株 (IMD 株) もしくは臨床検体 (NIID867 及び NIID880 (表 4) を回収し、解析した。近年はピオメリュー社の Filmarray が髄膜炎の起炎微生物を幅広く鋭敏に検出するために臨床検

査の現場で汎用されており、NIID867 及び 880 においても Filmarray による陽性判定で IMD 症例として届出された。しかし、その後の髄液からの培養で起炎菌は培養されず、NIID867 の髄液検体を用いて PCR を用いた解析が遂行できたが、NIID880 は解析不能 (PCR による DNA 断片の増幅が認められなかった)。それ故に、NIID867 は薬剤感受性試験の結果、NIID880 は全ての解析結果を皆無とし、Unknown として以下に示した。

その上で、まず始めに、その 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 ; 8 株 (44%)、B ; 8 株 (44%)、W ; 1 株 (6%)、Unknown ; 1 株 (6%) であった (図 2)。分子疫学的解析の結果、血清群 B は ST-2057 (ST-2057 complex) が 6 株、ST-687 及びその一塩基多型で新規 ST に分類される ST-17517 (共に ST-41/44 complex) が一株ずつであった (表 4)。一方、血清群 Y は全て ST-1655 (ST-23 complex) であった (表 4)。更にそれらの薬剤感受性を解析した結果、ST-17517 株はシプロフロキサシン (CPF) 及びペニシリン G (PCG) に耐性、NIID866 を除く全ての S T-2057 株 (4 株) は CPF 非感性を示した (表 5)。

一方、non-IMD 株 16 株に関しては、血清学的解析の結果は、Y ; 2 株 (12%)、B ; 3 株 (19%)、NG; ; 11 株 (69%) であった (表 6)。分子疫学的解析から血清群 Y は ST-5774 (ST-23 complex) 及び ST-1466 (ST-174 complex)、血清群 B は 3 株全て ST-2057 (ST-2057 complex)、そして NG (Non-groupable ; 莢膜多糖体非産生株) は 11 株全て ST-11026 (ST-32 complex) (表 6) であった。更にそれらの薬剤感受性を解析した結果、CPF 耐性が 9 株 (56%)、CPF 耐

非感性が 3 株 (18%)、PCG 非感性が 12 株 (75%) 存在することが明らかとなった(表 7)。

D. 考察

本年度も IMD 株及び non-IMD 株の収集を積極的に遂行し、それら国内分離株の血清学的及び分子疫学的解析、薬剤感受性試験を実施した。

COVID-19 流行下の 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、そして本年度は 18 株と増加し(図 1)、明らかに COVID-19 収束後の IMD 拡大が確認される結果となったと考えられる。一方で、その内訳は ST-2057 及び ST-1655 という、日本での主要な B 群及び Y 群の髄膜炎菌株であることが明らかとなり、COVID-19 収束後の IMD 拡大はインバウンド増加による海外流入株に起因するのではなく、国内における人の流通量の増加によるものであることが推測された。また、IMD 株に関しては、NIID843 が CPFX 耐性、そして ST-2057 株の多くが CPFX 非感性を示すことから、盲目的に適用されていた IMD 患者の濃厚接触者への CPFX の投与は考慮する余地があると考えられた。2003~2020 年の 17 年間日本で分離された髄膜炎菌株の薬剤感受性を解析した結果、リファンピシン(RFP)は 100% 効果的であった(Takahashi *et al.* AAC, 2023) ことから、従来の IMD 患者の濃厚接触者への予防内服法に関しては再検討を行う必要性が強く示唆された。

一方、non-IMD 株に関しては、昨年度と同様に NG である日本固有株 ST-11026 の分離数が極めて多く認められた。CPFX 耐性、PCG 非感性の性質を持つ ST-11026 髄膜炎菌株の検出

を含め、臨床微生物的検査の問題として、以下のことが憂慮される。

- ① 髄膜炎菌の血清群や遺伝子型までを同定できる臨床検査室は国内では限定されており、髄膜炎菌株が分離された場合には予防内服として CPFX が盲目的に使用される可能性が高く、その予防効果も臨床的に効果が低いと考えられる。
- ② 近年 MALDI-TOF MS による菌種同定が臨床検査室で実施されているが、髄膜炎菌においては正規の同定過程を経ない測定方法による誤同定が認められるようになってきている。
- ③ また、Filmarray による DNA レベルでの迅速診断法も同時に臨床検査分野で普及し始めているが、本年の NIID862 及び NIID880 のように髄膜炎菌が検出された検体から髄膜炎菌が分離できない事例も認められるようになってきている。

以上のことを考慮すると、日本国における IMD の診断方法やその起炎菌株の血清群や薬剤感受性の迅速診断法開発も別途必要であると考えられた。

最後に、今年度 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 増加も予想されたが、2023 年度においてはウズベキスタン渡航歴のある患者の W/ST-11 株(NIID884)以外は国内流通株による散発例の増加に留まっていると考えられた。しかし、2025 年には大阪万博という国際イベントを日本は控えており、防疫対策として海外流入株の検出を含め、今後も IMD 起炎菌株の解析は引き続き遂行する必要があると考えられた。

E. 結論

IMD 株は、国内由来株によるものと推定され、CPFX に耐性、非感性の株も少数認められた。一方で non-IMD 株は CPFX 耐性、PCG 非感性/耐性を示す日本固有株 ST-11026 の分離数が極めて多く分離された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

なし

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'-CGCAATAGGTGTATATATCTTCC-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'-CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA -3'	27mer
血清群 W	<i>siaD</i> (W)-1	5'-CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA-3'	22mer
	<i>siaD</i> (W)-2	5'-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	27mer

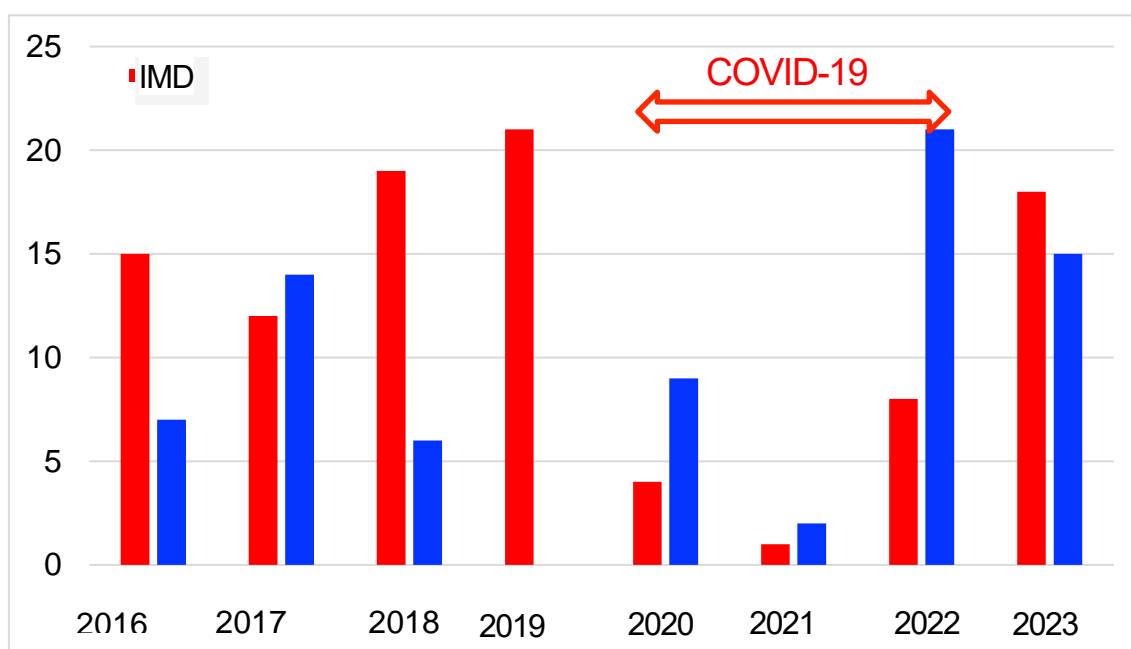
表2 遺伝子型別用の鋳型調製PCRプライマー

<i>abcZ</i>	P1 - ATTCGTTTATGTACCGCAGG
	P2 - GTTGATTTCTGCCTGTTCGG
<i>adk</i>	P1 - ATGGCAGTTTTGTGCAGTTGG
	P2 - GATTTAAACAGCGATTGC
<i>aroE</i>	P1 - ACGCATTTCGCGCGACATC
	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- CGGATTGCTTTTCGATGACGGC

表3 遺伝子型別用のシーケンスPCRプライマー

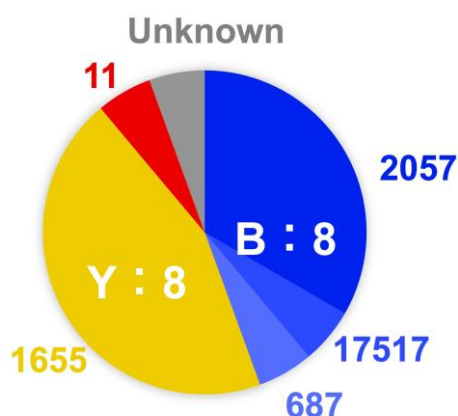
<i>abcZ</i>	P1-ATTCGTTTATGTACCGCAGG
	S2-GAGAACGAGCCGGGATAGGA
<i>ack</i>	S1-AGGCTGGCACGCCCTTGG
	S2;CAATACTTCGGCTTTCACGG
<i>aroE</i>	S1-GCGGTCAACTACGCTGATT
	S2-ATGATGTTGCCGTACACATA
<i>fumC</i>	S1-TCCGGCTTGCCGTTTGTTCAG
	S2-TTGTAGGCGGTTTTGGCGAC
<i>gdh</i>	S1-GTGGCGCGTTATTTCAAAGA
	S2-CTGCCTTCAAAAATATGGCT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

図1 2016～2023年度のIMD及びnon-IMD株の回収(解析)数



赤が IMD、青が non-IMD 株の数を示す。

図2 2023年度国内分離IMD株の血清群、及び遺伝子型の内訳



白字は血清群とその株数を示す。

表4 2023年度に分離されたIMD患者由来株の解析結果

NIID No	日付	血清群	遺伝子型	complex	地域	検体
843	3/30	B	17517	41/44	千葉	血液
855	5/16	Y	1655	23	長野	血液
856	6/9	B	2057	2057	埼玉	血液
857	6/14	B	687	41/44	熊本	髄液
862	7/25	B	2057	2057	東京	髄液
866	7/28	B	2057	2057	兵庫	髄液
867	10/3	B	2057	2057	東京	髄液
869	11/3	B	2057	2057	兵庫	髄液
870	11/29	Y	1655	23	大阪	髄液
878	12/21	B	2057	2057	埼玉	血液
879	12/25	Y	1655	23	長野	血液
880	12/27				兵庫	髄液
881	1/10	Y	1655	23	愛知	血液
882	1/17	Y	1655	23	富山	血液
884	2/1	W	11	11	栃木	血液
886	2/28	Y	1655	23	大阪	髄液
887	3/6	Y	1655	23	岡山	血液
889	3/13	Y	1655	23	広島	髄液

表5 2023年度に分離されたIMD患者由来株の薬剤感受性試験

NIID No	AZM	CP	CPFX	CTRX	MEPM	MINO	PCG	RFP
843	0.25	2	0.125	0.003	0.125	0.094	0.5	0.012
855	0.19	1.5	0.004	<0.002	0.012	0.19	0.023	0.006

856	0.38	0.75	0.094	0.002	0.047	0.064	0.19	0.023
857	0.25	1	0.004	<0.002	0.006	0.094	0.047	0.008
862	0.125	0.75	0.064	<0.002	0.008	0.047	0.064	0.023
866	<0.016	0.002	<0.016	<0.002	<0.002	<0.016	<0.002	<0.002
867								
869	0.25	1.5	0.064	<0.002	0.008	0.064	0.047	0.008
870	0.25	1		0.004	0.008			0.012
878	0.38	1	0.064	<0.002	0.012	0.047	0.064	0.064
879	0.5	1	0.004	0.002	0.012	0.19	0.094	0.004
881	0.25	1.5	0.003	<0.002	0.16	0.19	0.012	0.125
882	0.19	1.5	0.003	<0.002	0.016	0.25	0.008	0.064
884	1	1.5	0.003	0.002	0.016	0.047	0.023	0.094
886	0.19	1		0.004	0.008			0.004
887	0.38	1	0.003	<0.002	0.016	0.125	0.064	0.064
889	0.19	1.5	0.003	0.002	0.023	0.25	0.094	0.008

※NII D867 は菌分離不能検体。

※NII D886 は大阪健康安全基盤研究所による解析結果を転用した為、未検討の薬剤あり。

※赤字は耐性、青字は非感性の判定となることを示す。

表6 2023年度に分離された non-IMD 株の解析結果

NIID No	日付	血清群	遺伝子型	complex	地域	検体
842	3/22	NG	11026	32	北海道	眼脂
845	4/13	B	2057	2057	岡山	喀痰
846	4/21	B	2057	2057	北海道	尿道炎
847	4/22	NG	3506	178	石川	喀痰
854	5/11	B	2057	2057	長崎	喀痰
859	6/29	NG	11026	32	北海道	咽頭スワブ
860	6/29	NG	11026	32	北海道	尿道炎
861	6/29	NG	11026	32	東京	尿道炎
863	7/27	NG	11026	32	東京	尿道炎
868	10/6	NG	11026	32	東京	膣スワブ
871	12/1	NG	11026	32	北海道	尿道炎
872	12/1	Y	5774	23	北海道	尿道炎
874	12/1	Y	1466	174	北海道	尿道炎
876	12/1	NG	11026	32	北海道	咽頭スワブ

877	12/14	NG	11026	32	福岡	咽頭スワブ
885	2/2	NG	11026	32	奈良	喀痰

※血清群 NG は Non-groupable (莢膜多糖体非産生株) を示す。

表7 2023年度に分離された non-IMD 患者由来株の薬剤感受性試験

NIID No	AZM	CP	CPFX	CTRX	MEPM	MINO	PCG	RFP
842	0.5	1.5	0.25	0.002	0.19	0.064	0.25	0.032
845	0.38	1.5	0.094	<0.002	0.064	0.012	0.064	0.094
846	0.75	1.5	0.094	<0.002	0.008	0.094	0.023	0.047
847	0.38	1.5	0.004	<0.002	0.008	0.094	0.064	0.023
854	0.125	0.75	0.064	<0.002	0.006	0.064	0.023	0.032
859	0.5	2	0.125	<0.002	0.032	0.025	0.38	0.125
860	0.38	1.5	0.125	<0.002	0.064	0.094	0.25	0.094
861	0.38	1.5	0.19	<0.002	0.064	0.5	0.38	0.032
863	0.5	1	0.002	<0.002	0.064	0.047	0.19	0.032
868	0.094	0.75	0.125	<0.002	0.064	0.047	0.125	0.032
871	1	1.5	0.125	<0.002	0.064	0.19	0.38	0.047
872	2	1.5	0.003	<0.002	0.012	0.25	0.125	0.125
874	12	1	0.003	<0.002	0.064	0.125	0.38	0.016
876	1	1.5	0.125	<0.002	0.047	0.125	0.25	0.125
877	0.5	1.5	0.25	0.002	0.19	0.064	0.25	0.032
885	0.064	0.75	0.125	<0.002	0.064	<0.002	0.125	0.004

※赤字は耐性、青字は非感性の判定となることを示す。