

3. 秋田県における A 群溶血性レンサ球菌 M1_{UK} 株の浸淫状況の解明

○関谷 優晟（秋田県健康環境センター）

【研究目的】

今般、日本国内において A 群溶血性レンサ球菌を原因とする感染症例が増加傾向にある。これは 2010 年代より欧州で流行している病原性及び伝播性が高い M1_{UK} 株の集積が原因である可能性があるが、現時点での関連性は不明である。本研究では、秋田県内における M1_{UK} 株の浸淫状況及びその疫学的特徴を解析することにより、当該感染症に対する注意喚起、普及啓発への一助とともに、検査体制の充実を図ることを目的とする。

【研究の必要性】

A 群溶血性レンサ球菌（group A streptococcus、以下 GAS）は、多種多様な感染症に関与する細菌であり、その侵入部位によって咽頭炎、皮膚軟部組織感染症、菌血症など様々な臨床症状を引き起こす。このうち A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎は、小児への感染が最も多く、発熱や倦怠感、咽頭痛等の症状を呈する。感染症法に基づく感染症発生動向調査においては、小児科定点把握の 5 類感染症とされている。また、GAS はまれに劇症型溶血性レンサ球菌感染症（以下 STSS）を引き起こす。STSS は、突然的に発症し、急速に多臓器不全に進行する致死率の高い感染症であり、子供から大人まで広範囲の年齢層に発症する。感染症発生動向調査においては、5 類全数把握疾患と定められている。

今般、日本国内において GAS による STSS 症例及び A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎症例が増加している¹⁾。これには、2010 年代に英国で流行した病原性および伝播性が高いとされる M1_{UK} 株の日本国内への集積が関与している可能性がある。M1_{UK} 株は、M タンパク型別で M1 型に分類される GAS のうち、特徴的な 27 力所の単塩基置換を有する系統であり、*ssrA* 遺伝子上流に単塩基置換が存在することにより、従来の M1 型株と比較して病原遺伝子 *speA* の発現量が多いことが報告されている²⁾。また、上記の 27 力所の単塩基置換のうち一部のみを有する中間系統（M1_{13SNPs} 株、M1_{23SNPs} 株）も存在し、このうち M1_{23SNPs} 株のみが *ssrA* 上流の単塩基置換を有している²⁾。現時点では、M1_{UK} 株等と STSS 症例及び A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎症例の増加の関連性は不明であり、現状を明らかにするためには、その浸淫状況及び疫学的特徴を詳細に把握する必要がある。

【研究計画】

1. 2024.9～2025.4 M1_{UK} 株等の浸淫状況調査

秋田県内の医療機関から受領した M1 型 GAS 菌株について、3 種の遺伝子（*rofA*、*gldA*、*pstB*）の単塩基置換の有無を確認し、従来型（M1_{global} 株）、中間系統（M1_{13SNPs} 株、M1_{23SNPs} 株）及び M1_{UK} 株に判別する。M1_{UK} 株については、*ssrA* 遺伝子上流の単塩基置換の有無を確認する。

2. 2025.5～2025.6 *speA* 発現量の比較

逆転写PCRにより、M1_{UK}株とそれ以外の系統の *speA* mRNA の発現量を比較する。

3. 2025.7～2025.8 分離株の疫学的特徴の解析

speA 及びその他の病原遺伝子 (*speC*、*spdI*、*sic*) の保有状況を調査する。*sic* 遺伝子型別及び Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法による疫学解析を実施し、他の地域の菌株と比較し、病原遺伝子の保有状況も含めてそれらの総合的な関連性について考察する。

【実施内容・結果】

1. M1_{UK} 株等の侵淫状況調査

2017 年 9 月～2025 年 3 月に秋田県内の医療機関から受領した GAS 菌株のうち、T1 型 (M1 型) と判定された 75 株を供試した。国立感染症研究所の検査マニュアル³⁾に従い、3 種の遺伝子 (*rofA*、*gldA*、*pstB*) の単塩基置換の有無を確認し、従来型 (M1_{global} 株)、中間系統 (M1_{13SNPs} 株、M1_{23SNPs} 株) 及び M1_{UK} 株に判別した。M1_{UK} 株については、プライマーとして *ssrA*-Fw:CAACTGTCGTAGGCCTCCA 及び *ssrA*-Rv:TCAAGCCATTAGTTGCGAGTC を使用した PCR により *ssrA* 周辺の領域を増幅し、PCR 産物を精製後、外部の検査機関 (ファスマック) に依頼してシークエンス解析を実施し、*ssrA* 上流の特徴的な単塩基置換の有無を確認した。

解析の結果、M1_{global} 株が 9 株、M1_{13SNPs} 株が 57 株、M1_{UK} 株が 9 株検出され、M1_{23SNPs} 株は検出されなかった (表 1)。M1_{global} 株は全て 2019 年度以前に分離されており、2020 年度以降に分離された菌株は全て M1_{13SNPs} 株又は M1_{UK} 株であった。シークエンス解析の結果、M1_{UK} 株 9 株は全て *ssrA* 上流の特徴的な単塩基置換を有していた。

表 1 M1_{UK} 株等の検出

年度	2017	2018	2019	2020	2021～2023	2024	計
M1 _{global} 株	4	4	1	0	—	0	9
M1 _{13SNPs} 株	0	0	1	4	—	52	57
M1 _{23SNPs} 株	0	0	0	0	—	0	0
M1 _{UK} 株	0	0	0	0	—	9	9
計	4	4	2	4	—	61	75

2. *speA* 発現量の比較

M1_{global} 株 3 株、M1_{13SNPs} 株 6 株、M1_{UK} 株 9 株の計 18 株を供試した。菌株を Todd-Hewitt 培地にて 37°C で一晩培養した後、total RNA 抽出及び cDNA 合成を実施した。n=2 でインターラーザー法のリアルタイム PCR を行い、*speA* 及びレファレンス遺伝子 *proS* を増幅した⁴⁾。測定した Ct 値をもとに $\Delta\Delta Ct$ 法による相対定量を行い、M1_{UK} 株とそれ以外の系統 (M1_{global} 株及び M1_{13SNPs} 株) の *speA* mRNA 発現量を比較した。培養からリアルタイム PCR までの一連の解析は 2 回実施した。

解析の結果、M1_{UK} 株はそれ以外の系統の平均値と比較して *speA* mRNA 発現量が平均で約 3.4 倍、最大で約 5.7 倍多いことが判明した。

3. 分離株の疫学的特徴の解析

計 75 株の M1 型 GAS について、スーパー抗原 *speA*、*speC*、DNA 分解酵素 *spdI*、補体阻害因子 *sic* をそれぞれ標的とした PCR を実施した^{3,5,6)}。*sic* 遺伝子の保有が確認された菌株については、シークエンス解析を行ったのち、ウェブサイト (<https://www.uniprot.org/>) の登録情報を参考に *sic* 遺伝子型を決定した。

M1_{global} 株 6 株、M1_{13SNPs} 株 9 株、M1_{UK} 株 9 株の計 24 株について、PCR により 7 種のハウスキーピング遺伝子 (*gki*、*gtr*、*murl*、*mutS*、*recP*、*xpt*、*yqiL*) を増幅し⁷⁾、PCR 産物を精製後、シークエンス解析を実施した。ウェブサイト (<https://pubmlst.org/>) の登録情報を参考に各遺伝子の allele number および MLST 型を決定した。

病原遺伝子の保有状況を表 2 に示した。*speA* はほぼ全ての菌株が、*sic* は全ての菌株がそれぞれ保有しており、*speC* と *spdI* に関しては M1_{13SNPs} 株の保有率が特異的に高かった。

sic 遺伝子型解析の結果、*sic1.02*、*sic1.34* 及び *sic1.88* と 1 塩基又は 2 塩基違いの近縁な遺伝子型 (*sic1.88-like*) が主要な遺伝子型として確認された（表 3）。*sic1.02* 及び *sic1.34* は M1_{global} 株と M1_{UK} 株から共通して確認された一方で、*sic1.88-like* は M1_{13SNPs} 株からのみ確認された。

MLST による解析の結果、供試した 24 株のうち 20 株が ST28 で、4 株が ST28 と 1 塩基違いの近縁な遺伝子型 (ST28-like) であった（表 4）。

表 2 病原遺伝子保有状況

	解析数	<i>speA</i>	<i>speC</i>	<i>spdI</i>	<i>sic</i>
M1 _{global} 株	9	8	1	1	9
M1 _{13SNPs} 株	57	56	55	55	57
M1 _{UK} 株	9	9	0	0	9
計	75	73	56	56	75

表 3 *sic* 遺伝子型別結果

	<i>sic1.02</i>	<i>sic1.34</i>	<i>sic1.88-like</i>	その他	計
M1 _{global} 株	1	4	0	4	9
M1 _{13SNPs} 株	0	0	51	6	57
M1 _{UK} 株	7	2	0	0	9
計	8	6	51	10	75

表 4 MLST 解析結果

allele number							MLST 型	M1 _{global} 株	M1 _{13SNPs} 株	M1 _{UK} 株	計
<i>gki</i>	<i>gtr</i>	<i>murl</i>	<i>mutS</i>	<i>recP</i>	<i>xpt</i>	<i>yqiL</i>					
4	3	4	4	4	2	4	ST28	6	8	6	20
4	3	4	4	4	2	4	ST28-like	0	1	3	4

【考察と今後の課題】

秋田県内では、近年 M1 型 GAS の分離頻度が増加しており、2024 年度においては GAS 全体の半数以上を占めていた。M1 型 GAS の系統解析の結果、県内では 2019 年度以前に M1_{global} 株が流行し、2020 年度以降は M1_{13SNPs} 株及び M1_{UK} 株への置き換わりが進んでいたことが判明した。

M1_{UK} 株では、*ssrA* 上流に特徴的な单塩基置換が存在し、ターミネーターとの相互作用により *ssrA* の転写終結が阻害され、下流の *speA* の mRNA 発現量が増加する²⁾。解析の結果、秋田県内で分離された M1_{UK} 株は全て上記の单塩基置換を有していることが確認された。リアルタイム PCR の結果、M1_{UK} 株

は他の系統（M1_{global} 株及び M1_{13SNPs} 株）の平均値と比較して *speA* mRNA 発現量が平均で約 3.4 倍、最大で約 5.7 倍多いことが明らかになり、高病原性であることが推察された。なお、M1_{UK} 株は他の系統と比較して菌株間で測定値のばらつきが大きかったが、これは海外の報告⁴⁾でも同様であった。

speC と *spdI* は、M1_{13SNPs} 株において保有率が特異的に高かった。これらは 2010 年代に北東アジア等で猩紅熱が流行した際に M12 型 GAS が高頻度で保有しており、相乗的に作用して宿主の鼻咽頭への定着性を増大させていたとの報告⁸⁾があり、秋田県内の分離株においてもその感染力を強めていた可能性がある。

sic は、GAS のうち M1 型のみが保有する病原遺伝子で、200 種類以上の遺伝子型が存在し、配列を比較することで他の手法よりも菌株間の疫学的関連性を詳細に調べることができる。解析の結果、*sic1.02* 及び *sic1.34* が M1_{global} 株と M1_{UK} 株から共通して確認されたのに対し、*sic1.88-like* は M1_{13SNPs} 株からのみ確認された。このことから、秋田県で分離された M1 型 GAS は、*sic* 遺伝子型別により M1_{13SNPs} 株とそれ以外の系統に大別できることが判明した。これは *speC* 及び *spdI* の保有パターンとも合致しており、秋田県内で流行した M1_{13SNPs} 株と M1_{UK} 株は由来が異なる可能性が示唆された。

MLST 解析の結果、供試した 24 株は全て ST28 あるいは ST28 と 1 塩基違いの遺伝子型であった。ST28 の M1 型 GAS は、日本的小児の咽頭扁桃炎やスペインの成人肺炎からの分離株で最も多くの割合を占め、重症例が多く、伝搬性及び病原性が高い遺伝子型であることが報告されている^{9,10)}。

以上の解析結果から、近年秋田県内では、*speA* の発現量が多い M1_{UK} 株と、*speC* と *spdI* を保有する M1_{13SNPs} 株といった、特徴や由来が異なる 2 つの高病原性の系統が伝播しており、これらが GAS を原因とする感染症流行の要因となった可能性が考えられた。

国立感染症研究所の解析では、2024 年上半期に国内の STSS 患者から分離された M1 型 GAS のうち、約 88% が M1_{UK} 株又は中間系統であったことが明らかになっている¹⁾。本研究で解析した菌株は、鼻咽頭や皮膚等から分離された菌株が大部分（96%）を占めており、STSS 以外の一般的な疾患由来の菌株においても上記の系統が流行していることが明らかとなった。

海外においては、秋田県内では検出されなかった *speC* および *spdI* を保有する M1_{UK} 株の分離報告があり²⁾、インバウンドの増加に伴いこれらが国内に流入する可能性がある。また、GAS が保有する病原遺伝子の多くはプロファージ由来であり、水平伝達により獲得し得るため、今後更に病原性が高い菌株が流行する可能性も否定できない。GAS の病原性や流行状況を把握するためにも、今後も継続して菌株の解析を実施していきたい。

【参考文献】

- 1) 国内における劇症型溶血性レンサ球菌感染症の増加について（2024 年 6 月時点），URL.<https://www.niid.go.jp/niid/ja/tsls-m/2655-cepr/12718-stss-2024-06.html>.
- 2) Davies, MR., et. al.: Detection of *streptococcus pyogenes* M1_{UK} in Australia and characterization of the mutation driving enhanced expression of superantigen SpeA, Nat. Commun., 14, 1, 1051 (2023).
- 3) A 群溶血レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 検査マニュアル（劇症型溶血性レンサ球菌感染症起

因 菌 を 含 む) 2024 年 1 月

版, URL: <https://id-info.jihs.go.jp/diseases/alphabet/agun/010/streptococcusA20240112.pdf>

- 4) Li, HK., et al.: Characterization of emergent toxigenic M1_{UK} *Streptococcus pyogenes* and associated sublineages, *Microb. Genom.*, 9, 000994, (2023).
- 5) Green, NM., et. al.: Genetic Diversity among Type emm28 Group A Streptococcus Strains causing invasive infections and pharyngitis, *J. Clin. Microbiol.*, 43, 4083-4091 (2005).
- 6) Mylvaganam, H., B., et. al.: Polymorphism of the virulence regulon and allelic variations of the *sic* gene among the *emm1* isolates of group A Streptococcus from western Norway, *Microb. Pathog.*, 30, 71-79 (2001).
- 7) Enright, MC., et. al.: Multilocus Sequence Typing of *Streptococcus pyogenes* and the Relationships between *emm* Type and Clone, *Infect. Immun.*, 69, 2416-2427 (2001).
- 8) Brouwer, S., et. al.: Prophage exotoxins enhance colonization fitness in epidemic scarlet fever-causing *Streptococcus pyogenes*, *Nat. Commun.*, 11, 5018 (2020).
- 9) Tamayo, E., et. al.: *Streptococcus pyogenes* pneumonia in adults: clinical presentation and molecular characterization of isolates 2006-2015. *PLoS One.*, 11, e0152640 (2016).
- 10) Tanaka, Y., et. al.: Molecular epidemiology, antimicrobial susceptibility, and characterization of macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* in Japan. *J. Infect. Chemother.*, 22, 727-732 (2016).

【経費使途明細】

使 途	金 額
【共通】	
① DNA シークエンス解析費	73,920 円
② 試薬（合成 DNA、DNA ポリメラーゼ、DNA 精製キット）	129,190 円
【 <i>speA</i> 発現量の比較】	
③ 試薬（逆転写 PCR 試薬、RNA 抽出キット）	96,140 円
事務費（振込手数料）	1,540 円
合 計	30,0790 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円