

10. 薬剤耐性髄膜炎菌の発生・伝播に関する 分子疫学的研究

○陳内 理生 (神奈川県衛生研究所)

河原 隆二 (地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所)

古林 敬一 (そねざき古林診療所)

【研究目的】

我々は2012年2月から2017年2月にかけて、大阪府の性感染症を専門とする診療所であるそねざき古林診療所において、主に性病検診に来院した性労働従事者や性病感染者の咽頭部から髄膜炎菌を分離し、PCRによる血清型別¹⁾ およびE-testによる薬剤感受性試験を実施した²⁾。その結果、アンピシリン(ABPC)中等度耐性株およびニューキノロン系薬剤であるレボフロキサシン(LVFX)耐性株が、2012年までの4年間でそれぞれ8%(5/61)、3%(2/61)であったのが、2015年は54%(15/28)、43%(12/28)、2016年は96%(27/28)、86%(24/28)と急激な増加を示した。これらの結果から2015年までのどこかの時点でこれら保菌者の中に薬剤耐性株が流入または出現したのち、現在それら菌株ないし薬剤耐性関連遺伝子の拡散が起きているのではないかと推測した。そこで本研究では、薬剤耐性髄膜炎菌の発生・伝播機構の解明を目的として、これら菌株に加えて髄膜炎菌症として診断され大阪健康安全基盤研究所に搬入された患者由来の菌株を用い、Multi Locus Sequence Typing (MLST)および一部の薬剤耐性関連遺伝子について解析を実施した。

【研究の必要性】

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)はヒトを唯一の宿主とし、主に咽頭部に感染するため、飛沫感染や濃厚接触により伝播する。無症状や軽い咽頭炎ですむことも多く、日本では0.4%の保菌者が存在する。しかし、感染者の感受性によっては侵襲性髄膜炎菌症(invasive meningococcal disease、以下 IMD)を引き起こす場合がある。IMDは菌血症や髄膜炎を伴う感染症で、髄膜炎となった場合には全身組織の壊死を発症することがあり、治療しなければ致死率は50%となる。また、IMDは集団感染を起こすことでも知られており、世界的には年間50万人の患者が発生し、そのうち約5万人が死亡している。一方で薬剤耐性菌については、日本でもペニシリン中等度耐性株およびニューキノロン系薬剤耐性株の報告はあるものの、その後の継続した調査は行われてこなかった。そこで本研究では潜在的なIMDの感染源となりうる保菌者を含む髄膜炎菌症における薬剤耐性菌の実態を把握し、その発生・伝播機構を解明することを目的とした。

【材料・方法】

1) 菌株

2012年2月から2017年2月にかけてそねざき古林診療所および大阪健康安全基盤研究所において収集された髄膜炎菌株128株のうち、ABPC中等度耐性もしくはLVFX耐性を示した

株を中心に計 33 株を使用した。

2) MLST 解析

InstaGene DNA 精製マトリックス (BioRad) を用いて菌株から DNA を抽出し、供試した。PubMLST (<https://pubmlst.org/>) の方法に従い、ハウスキーピング遺伝子である *abcZ*、*adk*、*aroE*、*fumC*、*gdh*、*pdhC* および *pgm* 遺伝子を標的として、表 1 に示したプライマーを用い、PCR を行った。得られた PCR 産物を用いてシーケンスを行い、塩基配列を決定した。決定した塩基配列を PubMLST データベースに照合し、ST 型を決定した。また、eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) を用いて、海外株を含む既報株との類縁関係を解析した。

3) 薬剤耐性関連遺伝子の解析

LVFX 耐性を示した菌株のうち、3 株 (菌株番号 1304-002、1409-001、1505-017) について DNA ジャイレースのサブユニット A (GyrA) をコードする *gyrA* 遺伝子およびトポイソメラーゼ IV *parC* をコードする *parC* 遺伝子のキノロン耐性決定領域 (quinolone resistance determining region、以下 QRDR) を標的としたプライマー²⁾を用いて PCR を行った (表 1)。得られた PCR 産物を用いてシーケンスを行い、塩基配列を決定した。CLC Genomics Workbench ソフトウェア (QIAGEN) を用いて得られた塩基配列をアミノ酸配列に変換し、*N. meningitidis* MC58 株の各アミノ酸配列と比較することで、変異の有無を調べた。

表 1 プライマー配列

		PCR		シーケンス
MLST	<i>abcZ</i>	Forward	5'-TGTTCCGCTTCGACTGCCAAC-3'	5'-AATCGTTTATGTACCGCAGR-3'
		Reverse	5'-TCCCGTCGTAAAAACAATC-3'	5'-GAGAACGAGCCGGATAGGA-3'
	<i>adk</i>	Forward	5'-CCAAGCGGTGTAATCGTAAACC-3'	5'-AGGCWGGCACGCCCTTG-3'
		Reverse	5'-TGCCCAATGCGCCCAATAC-3'	5'-CAATACTTCGGCTTTCACGG-3'
	<i>aroE</i>	Forward	5'-TTTGAACAGCGGTTGCGG-3'	5'-GCGGTCAAYACGCTGRTK-3'
		Reverse	5'-CAGCGGTATCCAGTGCGAC-3'	5'-ATGATGTTGCCGTACACATA-3'
	<i>fumC</i>	Forward	5'-TCCCGCCGTAAAAAGCCTG-3'	5'-TCCGGCTTGCCGTTTGTCAG-3'
		Reverse	5'-GCCCGCTCAGCAAGCCCAAC-3'	5'-TTGTAGCGGTTTTGCGGAC-3'
	<i>gdh</i>	Forward	5'-CTGCCCGCGGGTTTTCATCT-3'	5'-CCTTGCGAAAGAAAGCCTGC-3'
		Reverse	5'-TGTTGCGCGTTATTTCAAAGAAGG-3'	5'-RCGCACGATTCAATRYGG-3'
	<i>pdh</i>	Forward	5'-CCGGCCGTACGACGCTGAAC-3'	5'-TCTACTACATCACCTGATG-3'
		Reverse	5'-GATGTCGGAATGGGCAACA-3'	5'-ATCGGCTTTGATGCCGTTATT-3'
ニューキノロン 耐性関連遺伝子	<i>pgm</i>	Forward	5'-CTTCAAAGCTACGACATCCG-3'	5'-CGCGCATGCCGACCGCTTG-3'
		Reverse	5'-CGGATTGCTTCGATGACGGC-3'	5'-GGTGATGATTTCGGTYGCRCC-3'
	<i>gyrA</i> ^a	Forward	5'-GTTTCCAGTCACGACGTTGTATGACCGACGCAACCATCCGCCAC	
		Reverse	5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTCAGCTTGGCTTTGTTGACCTGATAG	
	<i>parC</i> ^a	Forward	5'-GTTTCCAGTCACGACGTTGTATGATGAATACGCAAGCGCACGCCCA	
		Reverse	5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTCGGAATTGGCGTTCGGCGGCAGCTC	

^a 下線部はシーケンスのために付与されたアダプター配列

【結果】

1) MLST 解析

本研究により、データベース上に報告のない *fumC* 遺伝子および *pgm* 遺伝子配列がそれぞれ 1 つずつ決定された。また、MLST 解析に供試した全 33 株のうち 2 株 (1405-004、1510-009) が、これら新規の配列を含む 2 つの新規 ST 型であり、3 株 (1205-006、1302-004、1503-008) が既報の配列からなるものの、すべて異なる新規の ST 型であった。これら新規の配列および ST 型を PubMLST データベースに登録した。また、eBURST により、これら新規 ST 型と既

報の ST 型との類縁関係を調べたところ、1405-004 の ST 型は ST-3882 と、1510-009 は ST-11026 と、1205-006 は ST-41/44 complex に属する ST-687 と、1302-004 は ST-3882、1503-008 は ST-11593 と 1 つの遺伝子座が異なるのみであった。

年ごとの ST 型の内訳は、2012 年に ST-198 が 1 株、ST-23 が 2 株、2013 年は、ST-23、ST-11026、新規株がそれぞれ 1 株、2014 年は ST-823 が 2 株、ST-23 および新規株が 1 株、ST-13011 が 2 株、2015 年は新規株 2 株、ST-32 が 1 株、ST-11026 が 4 株、ST-23 が 3 株で、2016 年は ST-11026 が 6 株、ST-5 および ST-9087 が 1 株、2017 年は ST-11026 が 2 株であった (表 2)。

表 2 菌株の血清型、MIC*および ST 型

分離年	菌株 番号	血清型 ^a	ABPC		LVFX		ST type	ST complex
			MIC ^b	判定 ^c	MIC	判定		
2012	1203-001	NG	0.047	S	0.008	S	ST-198	ST-198 complex
	1205-004	NG	0.047	S	0.006	S	ST-23	ST-23 complex
	1205-005	NG	0.032	S	0.006	S	ST-23	ST-23 complex
	1205-006	B	0.75	I	0.006	S	New	ST-41/44 complex
2013	1302-004	NG	0.032	S	0.004	S	New	
	1304-002	NG	0.5	I	0.125	R	ST-11026	ST-32 complex
	1309-001	B	0.047	S	0.004	S	ST-23	ST-23 complex
2014	1404-002	NG	0.25	I	0.006	S	ST-823	ST-198 complex
	1404-004	NG	0.25	I	0.006	S	ST-823	ST-198 complex
	1405-004	NG	0.064	S	0.004	S	New	
	1406-001	Y	0.38	I	0.004	S	ST-23	ST-23 complex
	1407-009	NG	0.023	S	0.094	S	ST-13011	ST-4821 complex
	1409-001	NG	0.032	S	0.125	R	ST-13011	ST-4821 complex
2015	1503-008	NG	0.032	S	0.006	S	New	
	1505-016	B	0.5	I	0.006	S	ST-32	ST-32 complex
	1505-017	NG	0.75	I	0.125	R	ST-11026	ST-32 complex
	1507-004	NG	0.38	I	0.25	R	ST-11026	ST-32 complex
	1507-006	NG	0.5	I	0.19	R	ST-11026	ST-32 complex
	1507-007	NG	0.5	I	0.25	R	ST-11026	ST-32 complex
	1510-005	NG	0.047	S	0.006	S	ST-23	ST-23 complex
	1510-007	NG	1	I	0.008	S	ST-23	ST-23 complex
	1510-009	Y	0.5	I	0.25	R	New	ST-32 complex
	1510-010	NG	0.064	S	0.008	S	ST-23	ST-23 complex
2016	1601-013	Y	0.5	I	0.19	R	ST-11026	ST-32 complex
	1603-004	NG	0.5	I	0.25	R	ST-11026	ST-32 complex
	1603-008	NG	0.5	I	0.38	R	ST-11026	ST-32 complex
	1607-007	NG	1	I	0.008	S	ST-53	ST-53 complex

	1610-004	NG	0.5	I	0.19	R	ST-11026	ST-32 complex
	1610-009	B	0.5	I	0.19	R	ST-11026	ST-32 complex
	1610-010	NG	0.75	I	0.25	R	ST-11026	ST-32 complex
	1611-002	C	0.25	I	0.008	S	ST-9087	ST-11complex
2017	1702-004	NG	0.38	I	0.19	R	ST-11026	ST-32 complex
	1702-005	NG	0.5	I	0.19	R	ST-11026	ST-32 complex

*最小発育阻止濃度 (Minimum inhibitory concentration: MIC)

^a B: B 型、Y: Y 型、C: C 型、NG: 血清型別不能

^b µg/mL

^c S: 感受性、I: 中等度耐性、R: 耐性

2) 薬剤耐性関連遺伝子の解析

1304-002、1409-001、1505-017 の全てにおいて、GyrA の QRDR で 91 番目の Thr-91 が Ile へと変異していたことに加えて、1304-002、1505-017 については 103 番目の Asn-103 が Asp へと変異していた。ParC の QRDR の変異は 3 株すべてにおいて認められなかった。

【考察と今後の課題】

ST-23 は日本では 1974 年に最初に分離されて以降、いくつかの報告がある。今回 MLST 解析した ST-23 の 7 株のうち、5 株は ABPC、LVFX ともに感受性であるものの、2 株は ABPC 中等度耐性であったため、今後 ABPC 中等度耐性の ST-23 が増加するか否か注視する必要があると思われた。

ST-11026 は、2014 年に日本で報告され、その血清型は Y 型であった。本研究においては ST-11026 であった株は血清型別不能株がほとんどで、Y 型は 1 株のみであった。また、ST-11026 は 2013 年には 3 株中 1 株検出され、2014 年の 6 株中には検出されなかったが、その後 2015 年には 10 株中 4 株、2016 年には 8 株中 6 株と増加傾向にあり、さらにその派生 ST 型を持つ 1510-009 が検出されていることから、この ABPC 中等度耐性・LVFX 耐性をもったクローンが、現在国内で広がりつつあることを示唆しており、今後特に注目すべき ST 型であると考えられた。

ST-198 はこれまでも日本で報告されており、日本特有の ST-198 の派生型も報告されている⁴⁾。ST-823 は ST198-complex に属し、ブラジル、カナダ、北米、キューバ、チェコ、ドイツなど広く世界から報告されているものの、データベース上ではこれまで日本からの報告はない。しかし ST-823 は ST-198 と 1 つの遺伝子座が異なる ST 型であり、今回検出された株が海外からの流入か、日本国内で派生した株かについてはさらに解析が必要である。

本研究で得られた株の中にはデータベース上で日本では報告のない ST-53 や ST-9087 が含まれており、いずれも ABPC 中等度耐性を示したことから、現在も薬剤耐性株が海外から流入している可能性が考えられた。

LVFX 耐性株 3 株において ParC については変異が認められなかったものの、GyrA に変異が認められ、これらの変異は Hong E. らおよび Enríquez R. らが報告しているニューキノロン系薬剤耐性を示す変異と一致していた^{3), 5)}。

本研究において、日本に定着した株が拡散、変異している可能性とともに、現在も海外から流入している可能性が考えられた。特に ST-11026 は ABPC 中等度耐性および LVFX 耐性であり、現在進行形で拡散している可能性があることから注意が必要と考えられた。しかし、本研究は大阪で分離された菌株のみを用いており、他の地域での詳細が不明であることから、日本国内の保菌者株を含めた髄膜炎菌のモニタリングが必要と考えられた。また、ニューキノロン耐性関連遺伝子のさらなる解析に加えて、ABPC 中等度耐性株が増加していることから、ペニシリン耐性関連遺伝子の解析を実施する必要もあると考えられた。

【参考文献】

- 1) Désirée E. Bennett¹ and Mary T. Cafferkey Consecutive Use of Two Multiplex PCR-Based Assays for Simultaneous Identification and Determination of Capsular Status of Nine Common *Neisseria meningitidis* Serogroups Associated with Invasive Disease. J Clin Microbiol. 2006 44(3) p.1127-1131.
- 2) 古林敬一、陳内理生 STI クリニックで分離された髄膜炎菌の抗菌薬感受性 日本感染症学会誌 2016 27(1):57-60
- 3) Hong E, Thulin Hedberg S, Abad R, Fazio C, Enríquez R, Deghmane AE, Jolley KA, Stefanelli P, Unemo M, Vazquez JA, Veyrier FJ, Taha MK. Target gene sequencing to define the susceptibility of *Neisseria meningitidis* to ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother. 2013 57(4) p.1961-1964
- 4) 高橋英之 髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* の病原性に関する研究 日本細菌学雑誌 2009 64(2) p.291-301
- 5) Enríquez R, Abad R, Salcedo C, Pérez S, Vázquez JA. Fluoroquinolone resistance in *Neisseria meningitidis* in Spain. J Antimicrob Chemother 2008 61(2) p.286-290.

【経費使途明細】

使 途	金 額
PCR 関連試薬	31,860 円
シーケンス関連試薬	162,540 円
プライマー	273,211 円
菌同定用試薬	18,360 円
チューブその他消耗品	10,659 円
事務費（振り込み手数料）	3,780 円
合 計	500,410 円
大同生命厚生事業団助成金	500,000 円