

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09578

研究課題名(和文) A群レンサ球菌性子宮内感染症の病態解明と薬物耐性・分子疫学解析

研究課題名(英文) Analyses of pathological conditions, pathogenic molecular epidemiology, and antimicrobial resistance in uterine infections due to group A streptococcus

研究代表者

高橋 孝 (Takahashi, Takashi)

北里大学・感染制御科学府・教授

研究者番号：00292855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌(A群溶血性レンサ球菌)感染に関する全国規模のデータベース(菌株情報・患者背景)を構築し、膣分泌物由来株・咽頭ぬぐい液由来株・重症感染症由来株が選別された。咽頭ぬぐい液由来株が保有する微生物学的特性との比較により、膣分泌物由来株における有意な微生物学的特徴を見出し、同結果と子宮内感染症由来株における微生物学的特性との類似性を確認し得た。

研究成果の概要(英文)：We selected vaginal discharge-origin isolates of pathogenic group A beta-hemolytic streptococcus, the throat swab-derived strains, and the isolates from severe infectious diseases using the established databases including bacterial information and patient backgrounds, which were collected nationwide. As compared with the microbiological features in the throat-origin isolates, there were significantly characteristic findings in the vagina-derived strains. In addition, we could observe similarities between the microbiological features in the vagina-origin isolates and those in the strains from uterine infections.

研究分野：感染症学、臨床微生物学、感染制御学

キーワード：細菌 子宮内感染症 菌側因子 宿主因子 薬剤耐性 分子疫学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 分娩感染症により、世界的には毎年約75,000人の女性が亡くなっている。この分娩感染症の最も代表的な起因菌がA群レンサ球菌 (*group A streptococcus*, GAS; *S. pyogenes*)である。さらに、妊娠・分娩・産褥といった身体変化との関連性が見られない中高年女性においても、侵襲性レンサ球菌感染症 (invasive streptococcal infection, ISI)あるいは劇症型レンサ球菌感染症 (streptococcal toxic shock syndrome, STSS)を呈するGAS性子宮内感染症が発生し、その生命を脅かしているのが実情である。

そこで、米国立医学図書館のデータベース (PubMed)および科学研究費助成事業データベース (KAKEN)を活用して同情報に関する検索を試みたが、GAS性子宮内感染症に関する基礎研究・臨床研究 (ISI や STSS といった病態の解明/分子疫学解析/薬剤耐性解析を含めて)は極めて乏しいことが判明した。

(2) 研究代表者及び連携研究者は、2012年8月～2013年7月に全国規模でGAS臨床分離株の収集を行い、計2,698株を入手した。予備的研究として、2012年8月に収集した膣分泌物由来株 (外陰部膣炎患者より採取)と咽頭ぬぐい液由来株 (咽頭扁桃炎患者より採取)における *emm* 遺伝子 (菌体表層のMタンパクをコードする)型の分布を比較した。その結果、膣分泌物由来株の特性として病原性を有する *emm1.0* が存在する点・咽頭ぬぐい液由来株では観察されない *emm11.0* の存在を確認した。以上の知見に基づき、膣分泌物由来株は咽頭ぬぐい液由来株とは異なる微生物学的特性を保有するとの仮説を立てた。また、同収集株における薬物感受性結果から、マクロライド系薬物に対する耐性株も認められたため、膣分泌物由来株における薬物耐性解析の必要性も認識した。

以上の理由から、「GAS性子宮内感染症の病態解明と薬物耐性・分子疫学解析」という研究課題を実施する着想に至った。

## 2. 研究の目的

子宮内感染症は膣内にて侵入・増殖した微生物が上行性に子宮内へと伝播することにより発生することが想定される。それ故、本研究では当該研究期間において以下の項目を明らかにすることを目的とする。

### 「GAS性子宮内感染症の病態・疫学・薬物耐性に係る膣分泌物由来株が保有する特性」

本研究では、咽頭ぬぐい液由来株との比較解析や時系列解析を通じて同解明へとアプローチした。

## 3. 研究の方法

当該研究期間において以下の研究方法を展開した。

(1) **データベースの構築**：2012年8月～2013年7月(1年間)において全国規模で収

集したGAS菌株とその患者背景に関するデータベースを構築した。同様に、時系列解析を行うことを目的として、2014年8月～2015年7月(1年間)までに全国レベルで収集した同菌株と患者背景に関するデータベースも構築した。さらに、ISI/STSSを惹起したGAS菌株とその患者背景を入力したデータベースも構築した。なお、要配慮個人情報については匿名加工情報として処理し、同情報漏えいの防止に努めた。

(2) **分子疫学解析**：菌株より抽出したDNAを用いて *emm* 遺伝子型及び multilocus sequence typing により得られる *sequence type (ST)* について両データベース (<http://www2a.cdc.gov/ncidod/biotech/strepblast.asp>) (<https://pubmlst.org/spyogenes/>) を活用して決定した。*emm* 遺伝子型を用いた *emm* clustering も実施した。

(3) **外毒素プロファイル解析**：GASが産生・分泌し得る代表的な5種の外毒素プロファイル (*speA-speB-speC-ssa-smeZ*) に関して核酸増幅法 (PCR) により定性的に確認した。*speB*の増幅をGASとしての内部コントロールに用いた。

(4) **網羅的遺伝子発現解析**：STSSとなる子宮内感染症を惹起した膣分泌物由来株の全塩基配列を決定し、同データに基づいて遺伝子発現カスタムマイクロアレイを構築した。同株を活用してヒト大腸上皮細胞 (Caco-2)間透過前後のRNAサンプルを抽出し、同アレイとのハイブリダイゼーションにより遺伝子発現を網羅的に解析した。同結果の妥当性を確認するため、得られた発現遺伝子を標的とする定量的核酸増幅法 (逆転写リアルタイムPCR)を行った。

(5) **バイオフィーム形成量・細胞内侵入性の評価**：96-well plate を活用して膣分泌物由来株及び咽頭ぬぐい液由来株におけるクリスタルバイオレット染色によるバイオフィーム形成量を吸光度 (545nm) により評価した。また、両株におけるヒト大腸上皮細胞/ヒト皮膚角質細胞 (HaCaT) 内への侵入性をGAS ATCC株による同侵入性との相対値として測定した。

(6) **薬物感受性試験と薬物耐性遺伝子の検出**：微量液体希釈法 (MICroFAST Panel Type 7J for *Streptococcus* spp) により薬物感受性/耐性を評価した。マクロライド系 (ML) 耐性遺伝子3種 [*erm(A)-erm(B)-mef(A)*] 及びテトラサイクリン系 (TET) 耐性遺伝子5種 [*tet(M)-tet(O)-tet(K)-tet(L)-tet(S)*] について核酸増幅法 (PCR) により定性的に検証した。

(7) ***emm* 遺伝子型における clade 解析**：

*emm89*型における新たな clade[ヒアルロン酸合成遺伝子座の全欠損+NAD-glycohydrolase 遺伝子 (*nga*)において *nga* promoter variant 3 及び *nga* allele 1 の配列保有]の発生が報告されている。それ故、2012年8月の膈分泌物由来 *emm89* 型 33 株と同咽頭ぬぐい液由来 *emm89*型 17 株における新たな clade の存在を検証した。さらに、ISI/STSS を呈した子宮内感染症由来 *emm89*型における同 clade の存在も確認した。

#### 4. 研究成果

当該研究期間において以下の研究成果が得られた。

(1) **構築データベースの活用**：2012年8月～2013年7月までに収集し得た 2,698 株に関する菌株情報と患者背景をデータベースへ登録した。同様に、2014年8月～2015年7月までに収集し得た 1,956 株に関する菌株情報と患者背景も登録した。これら構築データベースを活用して、膈分泌物由来株の分離時期を検索した結果、夏季に集中している所見が得られた。それ故、2012年8月(1ヶ月間)に分離した膈分泌物由来 87 株及び咽頭ぬぐい液由来 78 株に関する情報をデータベースより抽出した。さらに、時系列データとして2014年8月(1ヶ月間)に分離した膈分泌物由来 66 株についての情報もデータベースより抽出した。2012年8月に収集した膈分泌物由来株の患者年齢は平均 37.0 歳(2歳～75歳)であり、同菌数 3(+)を示した株が 54.0%を占めた。同時期に収集した咽頭ぬぐい液由来株の患者年齢は平均 31.0 歳(3歳～70歳)で男性 38 名/女性 40 名であり、同菌数 3(+)を示した株が 44.9%を占めた。さらに、2014年8月に収集した膈分泌物由来株の患者年齢は平均 38.0 歳(3歳～68歳)であり、同菌数 3(+)を示した株が 42.4%を占めた。くわえて、ISI/STSS を呈した子宮内感染症(子宮内膿瘍・骨盤内腹膜炎など)由来菌 12 株を登録することができた。

(2) **分子疫学特性の決定**：2012年8月の膈分泌物分離株と咽頭ぬぐい液分離株が有する *emm* 遺伝子型/ST の結果を表1・表2に示す。2014年8月の膈分泌物分離株における *emm* 遺伝子型/ST の結果も表3に提示する。

<i>emm</i> -genotype (sequence type)	<i>emm</i> -cluster	No. of vagina-derived isolates (%)
<i>emm89</i> (ST101, ST142, ST555, ST646)	E4	33 (37.9)
<i>emm28</i> (ST52, ST244, ST458)	E4	10 (11.5)
<i>emm1</i> (ST28, ST313, ST440)	A-C3	9 (10.3)
<i>emm11</i> (ST403, ST640)	E6	8 (9.2)
<i>emm77</i> (ST63, ST399)	E4	7 (8.0)
<i>emm4</i> (ST38, ST39)	E1	6 (6.9)
<i>emm12</i> (ST36, ST201)	A-C4	5 (5.7)
<i>emm58</i> (ST176)	E3	3 (3.4)
<i>emm9</i> (ST75)	E3	2 (2.3)
<i>emm50</i> (ST2)	E2	1 (1.2)
<i>emm75</i> (ST49)	E6	1 (1.2)
<i>emm112</i> (ST194)	E4	1 (1.2)
<i>emm170</i> (ST49)	E5	1 (1.2)
Total No.		87 (100)

表1 2012年8月に分離した膈分泌物由来株の疫学特性

<i>emm</i> -genotype (sequence type)	<i>emm</i> -cluster	No. of throat-derived isolates (%)
<i>emm89</i> (ST101, ST646)	E4	17 (21.8)
<i>emm12</i> (ST36, ST89, ST201, ST465)	A-C4	14 (17.9)
<i>emm28</i> (ST52, ST244)	E4	8 (10.3)
<i>emm1</i> (ST28, ST313)	A-C3	7 (9.0)
<i>emm4</i> (ST38, ST39)	E1	4 (5.1)
<i>emm9</i> (ST73, ST75)	E3	4 (5.1)
<i>emm58</i> (ST19, ST176)	E3	4 (5.1)
<i>emm75</i> (ST49, ST150)	E6	4 (5.1)
<i>emm87</i> (ST62)	E3	4 (5.1)
<i>emm11</i> (ST403)	E6	3 (3.8)
<i>emm73</i> (ST331)	E4	2 (2.6)
<i>emm77</i> (ST63)	E4	2 (2.6)
<i>emm81</i> (ST117)	E6	2 (2.6)
<i>emm27</i> (ST308)	E2	1 (1.3)
<i>emm76</i> (ST50)	E2	1 (1.3)
<i>emm112</i> (ST194)	E4	1 (1.3)
Total No.		78 (100)

表2 2012年8月に分離した咽頭ぬぐい液由来株の疫学特性

<i>emm</i> -genotype (sequence type)	<i>emm</i> -cluster	No. of vagina-derived isolates (%)
<i>emm89</i> (ST101, ST142, ST555, ST646)	E4	22 (33.3)
<i>emm4</i> (ST28, ST38, ST39)	E1	8 (12.1)
<i>emm6</i> (ST37, ST382, ST411)	Single protein <i>emm</i> -cluster clade Y	8 (12.1)
<i>emm1</i> (ST28, ST313, ST440)	A-C3	7 (10.6)
<i>emm12</i> (ST36, ST201)	A-C4	4 (6.1)
<i>emm11</i> (ST403)	E6	3 (4.6)
<i>emm77</i> (ST63, ST399)	E4	3 (4.6)
<i>emm28</i> (ST52)	E4	2 (3.0)
<i>emm58</i> (ST176)	E3	2 (3.0)
<i>emm81</i> (ST117)	E6	2 (3.0)
<i>emm9</i> (ST75)	E3	1 (1.5)
<i>emm75</i> (ST49)	E6	1 (1.5)
<i>emm82</i> (ST36)	E3	1 (1.5)
<i>emm87</i> (ST62)	E3	1 (1.5)
<i>emm97</i> (ST216)	D5	1 (1.5)
Total No.		66 (100)

表3 2014年8月に分離した膈分泌物由来株の疫学特性

これらの結果から、咽頭ぬぐい液分離株における特性と比較して、膈分泌物分離株では *emm89* の頻度が多く、*emm12* の頻度が少ないという知見を認めた。患者年齢を層別化(10歳以下/60歳以上)して解析した結果、同 *emm89* 頻度の特性は10歳以下からの由来株での所見に連動していた。さらに、2014年8月の膈分泌物分離株においては2012年8月の膈分泌物分離株が有する特性と部分的には類似しているものの、新たな遺伝子型として *emm6*(single protein *emm*-cluster clade Y に相当)などを認め、疫学上の多様性・経時的変動性の可能性が示唆された。また、ISI/STSS を呈した子宮内感染症由来菌株においても *emm89* 型(ST101/ST646)が半数を占めることが判明した。以上の結果は、膈分泌物由来株が保有する疫学的特性を示すものと思われる。

(3) **外毒素プロファイルの同定**：2012年8月の咽頭ぬぐい液分離株の所見と比較した膈分泌物分離株が有する特徴として、外毒素 3 種以上のプロファイルの頻度が多く、*speB* 単独プロファイルの頻度が少ない点を認め、膈分泌物分離株が保有する外毒素の多様性が示唆された。また、同膈分泌物由来株では *ssa* 遺伝子保有株が多い点も確認された。同様な所見は、2014年8月の膈分泌物分離株においても見られた。これらの知見も膈分泌

物由来株における毒素上の特徴と推察される。

(4) **網羅的遺伝子発現プロファイルの**

**確認**：ヒト細胞間透過前と比較して同透過後に発現量が増加した遺伝子群として、病原因子群(sic 他)や代謝遺伝子群(collagen-like protein 他)を認めましたが、転写調節因子群ではその変動は見られなかった。同 RNA 検体を用いた逆転写リアルタイム PCR 法においても、透過前と比較した透過後での sic 遺伝子発現量の増加を確認できた。

(5) **バイオフィーム形成量・細胞内侵入性の**

**評価**：2012 年 8 月に収集した *emm89* 型を示す膿分泌物由来 33 株では、同型の咽頭ぬぐい液由来 17 株での結果と比してバイオフィーム形成量が多く、同株による細胞内侵入性が高い所見が得られた。以上の知見は、*emm89* 型膿分泌物由来株における局所定着性を反映しているものと思われた。

(6) **薬物感受性結果と薬物耐性遺伝子の**

**保有**：2012 年 8 月の咽頭ぬぐい液分離株の結果と比較して、同膿分泌物分離株では TET 耐性率が低く、TET 耐性遺伝子の保有率が低値である点を見出した。患者年齢の層別化(10 歳以下/60 歳以上)解析においても、TET/ML 耐性遺伝子の保有率が低い点を確認した。同知見に関しても膿分泌物分離株が有する薬物感受性上の特徴と思われる。

(7) ***emm* 遺伝子型における clade の**

**検証**：2012 年 8 月の膿分泌物由来 *emm89* 型 33 株及び同咽頭ぬぐい液由来 *emm89* 型 17 株における新たな clade として、各々の 31 株及び 16 株が存在する点を見出した。また、ISI/STSS を呈した子宮内感染症由来 *emm89* 型 6 株が全て同 clade に該当することを確認した。この clade は *emm1* 型と同様な高度 NAD 分解活性を保有する可能性が示唆され、感染宿主への病原性を惹起する可能性が想定された。

(8) **今後の展望**：ヒト化マウス(human

CD46-transgenic mice)を活用した子宮内感染症モデルを確立することにより、さらなる同疾患の病態解明を展開する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

Yoshida H, Ishigaki Y, Takizawa A, Moro K, Kishi Y, Takahashi T, Matsui H. Comparative genomics of the mucoid and nonmucoid strains of *Streptococcus pyogenes*, isolated from the same patient with streptococcal meningitis. Genome Announc, 査読有, Vol. 3, No. 2,

2015, pp. e00221-15, DOI: 10.1128/genomeA.00221-15

Takahashi T, Arai K, Lee DH, Koh E, Yoshida H, Yano H, Kaku M, Kim S. Epidemiological study of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* from Korea and Japan by *emm* genotyping and multilocus sequence typing. Ann Lab Med, 査読有, Vol. 36, No. 1, 2015, pp. 9-14, DOI: 10.3343/alm.2016.36.1.9

Matsui H, Nakatani Y, Yoshida H, Takizawa A, Takeuchi O, Øverby A, Takahashi T, Murayama SY, Matsuo K. Flesh-eating *Streptococcus pyogenes* triggers the expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand. Cell Microbiol, 査読有, Vol. 18, No. 10, 2016, pp. 1390-1404, DOI: 10.1111/cmi.12581

Mori N, Hosoo S, Oyamada Y, Sera Y, Yamada Y, Sugawara M, Higuchi A, Aoki Y, Takahashi T. Characteristics of mucoid *Streptococcus pyogenes* isolates from two patients with pneumonia in a local community. IDCases, 査読有, Vol. 6, 2016, pp. 43-46, DOI: 10.1016/j.idcr.2016.09.002

Ohya H, Mori N, Hayashi T, Minami S, Higuchi A, Takahashi T. A case of descending mediastinitis caused by *Streptococcus pyogenes* harboring genotype *emm* 25 and sequence type 660. J Infect Chemother, 査読有, Vol. 23, No. 6, 2017, pp. 403-406, DOI: 10.1016/j.jiac.2016.12.018

Sakai T, Taniyama D, Takahashi S, Nakamura M, Takahashi T. Pleural empyema and streptococcal toxic shock syndrome due to *Streptococcus pyogenes* in a healthy Spanish traveler in Japan. IDCases, 査読有, Vol. 9, 2017, pp. 85-88, DOI: 10.1016/j.idcr.2017.06.006

高橋 孝, 吉田春乃. 化膿レンサ球菌による子宮内感染症. Medical Practice, 査読無, Vol. 32, No. 10, 2015, pp. 1714

[学会発表](計 10 件)

Kim S, Takahashi T, Arai K, Yoshida H. Molecular epidemiological study of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* by *emm* genotyping and multilocus sequence typing in Korea and Japan. 55th Annual Meeting of Interscience Conference of Antimicrobial Agents & Chemotherapy, September 2015. (San Diego, USA) Takahashi T, Arai K, Yoshida H, Goto M,

Iijima K, Ogawa M, Shimojima M. Epidemiological characteristics of *Streptococcus pyogenes* isolated from vaginal discharges as compared with those from throat swabs in Japan. 14th East Asian Conference on Infection Control and Prevention, November 2015. (Fukuoka, Japan)

Takahashi T, Arai K, Ogawa M, Shimojima M. Epidemiological characteristics of *Streptococcus pyogenes* isolated from vaginal discharges in 2014, Japan: differences with respect to those obtained in 2012. 20th General Meeting of Korean Society of Clinical Microbiology, July 2017. (Buyeo, Republic of Korean)

Takahashi T. Exotoxin profiles of *Streptococcus pyogenes* isolates from vaginal discharges as compared to those from throat swabs in Japan. 第 29 回日本臨床微生物学会総会学術集会, 2018 年 2 月. (岐阜市、岐阜)

高橋 孝. 抗菌薬耐性・化膿レンサ球菌の遺伝子タイプの変遷：韓国と日本の比較. 先端医療福祉開発研究会・第 117 回公開定例会, 2015 年 9 月. (板橋区、東京)

新井和明、山本夏男、吉田春乃、仲村 究、大花 昇、金光敬二、高橋 孝. A 群溶血性連鎖球菌産生の蛋白粗分画による Th1 タイプの炎症を惹起する機序の解明. 第 64 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会, 2015 年 10 月. (札幌市、北海道)

山本夏男、新井和明、仲村 究、阿部良伸、吉田春乃、大花 昇、高橋 孝、金光敬二. A 群溶連菌由来 30KDa 蛋白産物が IL-6 及び NALP3 の早期反応系に及ぼす役割. 第 64 回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会, 2015 年 10 月. (札幌市、北海道)

新井和明、山本夏男、仲村 究、大花 昇、金光敬二、高橋 孝. A 群溶血性連鎖球菌を使用した病原性を定量化する検査法の検討. 第 27 回日本臨床微生物学会総会学術集会, 2016 年 1 月. (仙台市、宮城)

大屋寛章、森伸晃、青木泰子、高橋 孝. 化膿レンサ球菌による頸部膿瘍・降下性縦隔炎をきたした 1 例. 第 90 回日本感染症学会学術講演会, 2016 年 4 月. (仙台市、宮城)

高橋 孝、森 伸晃. Genome Profiling (GP)法を用いたムコイド型化膿レンサ球菌流行株の識別. 第 91 回日本感染症学会学術講演会, 2017 年 4 月. (新宿区、東京)

高橋 孝、南江堂、感染症の診断って、こんなちょっとしたことで差がついちゃうんですね、遺伝子検査(分担項目) 2017、116 頁(分担 pp. 102-104)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/life/chart/LSI-lab15.html>

保健産業事報「ホッとひと息ティータム」欄において『化膿レンサ球菌による産科婦人科疾患とその研究』(平成 27 年 12 月 1 日付け)に関する記事を掲載した。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 孝 (TAKAHASHI, Takashi)

北里大学・大学院感染制御科学府・教授  
研究者番号：00292855

### (2) 連携研究者

吉田 春乃 (YOSHIDA, Haruno)

北里大学・大学院感染制御科学府・助手  
研究者番号：70563386

松井 英則 (MATSUI, Hidenori)

北里大学・大学院感染制御科学府・講師  
研究者番号：30219373

新井 和明 (ARAI, Kazuaki)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員  
研究者番号：30547386