

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591485

研究課題名(和文) B群レンサ球菌による周産期感染症発症予防法確立に向けての試み

研究課題名(英文) Investigation on prevention of perinatal infections caused by group B Streptococcus (GBS)

研究代表者

三鴨 廣繁 (MIKAMO, Hiroshige)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00262775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人女性の膣分泌物から分離されるB群溶血性レンサ球菌(GBS)は、妊婦49例では分離頻度の高い順に、Ⅲ型12株(24.5%)、Ⅴ型7株(24.3%)、Ⅰa型6株(12.2%)、Ⅰ型5株(10.2%)など、非妊婦49例ではⅠa型8株(16.3%)、Ⅰb型7株(14.3%)、Ⅲ型6株(12.2%)、Ⅴ型6株(12.2%)などと血清型が増加していた。また、日本人女性でも膣内から初めてペニシリンG低感受性のGBSが検出された。さらに、日本人で分離頻度が高いGBS血清型Ⅴ型の細胞付着性および細胞侵入性は高く、GBS血清型Ⅲ型とは異なる免疫応答が存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of group B Streptococcus (GBS) isolated from vaginal secretions among 49 Japanese pregnant women has been 24.5% (12 strains), 24.3% (7 strains), 12.2% (6 strains) and 10.2% (5 strains) in serotypes III, V, Ia and I, respectively. Also, GBS isolated from vaginal secretions among 49 Japanese non-pregnant women has been 16.3% (8 strains), 14.3% (7 strains), 12.2% (6 strains) and 12.2% (6 strains) in serotypes Ia, Ib, III and V, respectively. Moreover, we have observed the first isolation of penicillin G-resistant (intermediate) GBS from vaginal secretion in Japanese woman. Continuous surveillance on penicillin G-resistant GBS should be needed in future, since the increase of penicillin G-resistant GBS might lead to the revision of perinatal prevention guideline on GBS. The attachment and invasion of serotype V GBS to A549 was significantly higher than those of serotype III GBS. This means there exists the difference of immunological response among GBS serotypes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：B群溶血性レンサ球菌(GBS) 周産期感染症 早産 絨毛膜羊膜炎 血清型 ペニシリン 耐性菌 予防

## 1. 研究開始当初の背景

B群溶血性レンサ球菌（Group B streptococcus：GBS）は、ヒトの常在菌として呼吸器系、消化器系、尿道系、腔に存在し、新生児から成人（妊婦、非妊婦）に至る幅広い年齢層に、様々な感染症を惹起する重要な原因菌である。特に生後3ヶ月未満の発症が過半数を占め、この年齢層での最も頻度の高い原因菌となっている。症状として早発型（日齢7未満にみられる型）は産道感染が主で、肺炎、敗血症、髄膜炎の順に多く発症し、遅発型（日齢7以降にみられる型）は垂直感染と水平感染があり、髄膜炎、敗血症が多い。いずれも予後不良で、たとえば髄膜炎では早発・遅発型全体で約32%の死亡率または後遺症を残すことが報告されている。これは海外の死亡率に極めて劣る（米国4.7%、欧州10%未満）。

また、GBSは莢膜多糖体の構造により、a、b、  
、  
、  
、  
、  
、  
、  
型の9型の血清が知られており、人種、発症型、病態別に血清学的特異性があることがわかっている（Mikamo H. et al., Rinsho Biseibutu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi. 2001;11:33-7）。

以上のように、GBSは、新生児細菌感染症の原因菌として多いため、母子感染予防について1990年代から検討されている。具体的予防対策については2002年の米国疾病管理センター（CDC）から出された予防対策ガイドライン改訂版が公表されている。日本での早発型・遅発型GBS感染症の臨床症状と予後については、1983年からおよそ5年ごとに4回にわたって実施されてきたアンケート調査が最も重要な結果を示している。一方で、妊婦スクリーニングから始まる予防対策が広く実施されるようになってきたが、ガイドライン作成にはいたっておらず、各施設にその方法が委ねられているのが現状である。日本人女性の腔内に定着しているGBS

は、型が多いが、新生児感染症は型が多いという特徴があり、血清学的な病原性発現の違いが注目されている。我々は、GBSを免疫学的見地から、型では生体はTh1優位に、型では生体はTh2優位に感染防御を発動している可能性があることを明らかにしている（Mikamo H, et al. Infect Immun. 2004; 72: 4716-4722.）。しかし、最近の日本人におけるGBS血清型に関する報告はなく、ガイドライン等の作成にあたって日本人の最新の疫学データが必要とされていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本におけるGBS母子感染対策のガイドライン改訂に向けて、日本人において問題となるGBS血清型別の検討、周産期および新生児におけるGBSの耐性化状況とその治療法の検討を中心に実施した。

さらに、従来から日本人に多いとされてきたGBS血清型型の免疫学的応答に関して、細胞附着性、細胞侵入性に関して基礎的に検討することとした。

## 3. 研究の方法

（1）日本人女性におけるGBSの分離頻度と耐性化

2011年から2013年の期間に日本人女性98名（妊婦49名、非妊婦49名）を対象として、女性腔分泌物を腔円蓋部全周から採取し、GBSを分離するためにTodd-Hewittブイヨン（THB）、gentamicin・nalidixic acid添加THB、羊血液寒天培地の3種類の培地を、混合感染を知る目的で他に8種類の培地を用いて培養した。GBSの群別にはGBS型別用免疫血清（デンカ生研、東京）を用い、最終的には遺伝子学的手法により確認試験を実施した。さらに、分離されたGBSの薬剤感受性について微量液体希釈法を用いて測定し、至適薬剤の選択と耐性化傾向の有無を検討した。

(2) GBS 血清型 型の細胞付着性および侵入性についての検討

5%羊血液寒天培地で培養した GBS 血清型の菌体を 5%ウシ胎児血清加 MEM 培地に懸濁し、単層培養した A549 細胞に添加する。5%炭酸ガス下 37℃、2 時間静置後に phosphate-buffered saline (PBS) を用いて洗浄操作を 3 回繰り返すことによって浮遊菌を除去し、ラバーポリスマンで細胞をかきとった後、細胞破砕して生菌数を測定し、well 当たりの接種菌量に対する付着率を求めた。なお、生菌数の測定は、5%羊血液寒天培地を用い、適宜希釈した菌液を塗抹し、培養後発育したコロニーを測定した。また、細胞内への侵入性は、菌付着細胞にアモキシシリン 100 µg/mL を 2 時間作用させて付着菌を殺菌、洗浄後に細胞破砕して前述したように生菌数を測定し、well 当たりの接種菌量に対する侵入率を求めた。

4. 研究成果

(1) 日本人女性における GBS の分離頻度と耐性化

日本人女性 98 名 (妊婦 49 名、非妊婦 49 名) の膣分泌物から分離される B 群溶血性連鎖球菌 group B *Streptococcus* : GBS は、妊婦では、分離頻度の高い順に、型 12 株 (24.5%)、型 7 株 (24.3%)、Ia 型 6 株 (12.2%)、型 5 株 (10.2%) など、非妊婦では、Ia 型 8 株 (16.3%)、Ib 型 7 株 (14.3%)、型 6 株 (12.2%)、型 6 株 (12.2%) などとこれまでの疫学とは大きく変化していることが明らかになった。参考までに、同時期に愛知医科大学病院で分離された GBS173 株の血清型を検討したところ、女性 (妊婦、非妊婦) 同様に、GBS 血清型 型の検出頻度が従来の報告とは異なり明らかに増加していた (図 1)。

日本人女性から分離される GBS の血清型は、従来型、型が中心であったが、今回の研究結果から、近年は欧米と同様に型

が急増し、主要血清型が型、Ia 型、Ib 型、型となっていることが明らかになり、今後の継続的な監視が必要である。GBS の血清型 Ia, Ib, 型は侵襲型であるとされているが、近年の研究によると型も侵襲性感染症を引き起こすことが明らかにされており、その意味でも継続的な疫学研究が必要である。

さらに、今回の検討で日本では初めて女性膣分泌物からペニシリン耐性 GBS (血清型 Ia) が検出された。その感受性成績を表 1 に示した。

表 1 膣分泌物から検出されたペニシリン耐性 GBS (血清型 Ia) の薬剤感受性

PCG	ABPC	AMPC/CVA	IPM	CTRX	CTX	CFPM	EM	ST	LVSFX
0.5	0.5	1/0.5	0.125	1	1	1	>4	0.25/4.75	>4
I	S	S	S	S	S	S	R	S	R

(単位: µg/mL)

PCG : penicillin G、AMPC/CVA : amoxicillin/clavulanate、IPM : imipenem、CTRX : ceftriaxone、CFPM : cefepime、EM : erythromycin、ST : sulfamethoxazole/trimethoprim、LVFX : levofloxacin。S : susceptible (感性)、I : intermediate (中等度耐性)、R : resistant (耐性)。

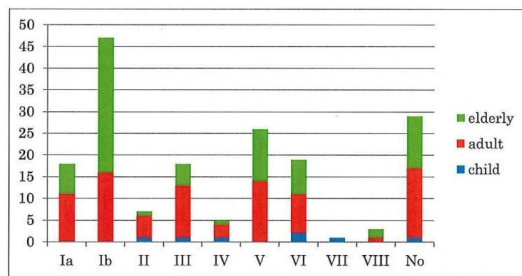


図1 愛知医科大学病院で分離された GBS の血清型分布

(2) GBS 血清型 型の細胞付着性および侵入性についての検討

GBS 血清型 型の細胞接着性および細胞内侵入性について、GBS 血清型 型を対象として A549 を用いて検討したところ、血清型 型では、血清型 型と比較して有意に A549 への接着性(図2)および細胞内侵入性(図3)が高いことが明らかになった。この結果は、従来から日本人に多かった血清型 型のパターンと同様であった。

この結果は、血清型 型の GBS による感染症では、生体は免疫学的には Th1 優位であり、細胞性免疫が主体となって生体が感染防御機構を発動している可能性があり、型 や 型の GBS による感染症では、生体は免疫学的には Th2 優位であり、体液性免疫が主体となって生体が感染防御機構を発動している可能性があることを示唆している。

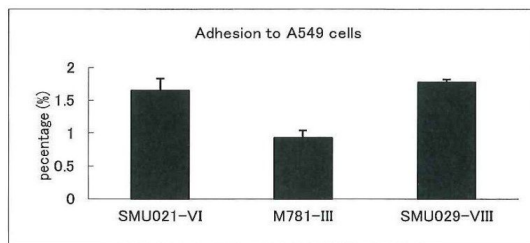


図2 GBS 血清型 型の細胞付着性

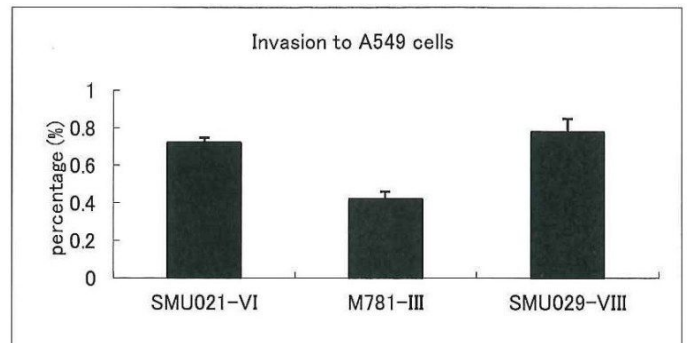


図3 GBS 血清型 型の細胞侵入性

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 計(11)件

Kawakami H, Nakane Y, Inuzuka H, Fukagawa T, Muto T, Mochizuki K, Ohkusu K, Suematsu H, Yamagishi Y, Mikamo H. Late-onset bleb-related endophthalmitis caused by

*Streptococcus pseudopneumoniae*. Int Ophthalmol. 査読有, 34(3), 2014, 643-646

DOI: 10.1007/s10792-013-9835-2

Matsumoto K, Takesue Y, Ohmagari N, Mochizuki T, Mikamo H, Seki M, Takakura S, Tokimatsu I, Takahashi Y, Kasahara K, Okada K, Igarashi M, Kobayashi M, Hamada Y, Kimura M, Nishi Y, Tanigawara Y, Kimura T.

Practice guidelines for therapeutic drug monitoring of vancomycin: a consensus review of the Japanese Society of Chemotherapy and the Japanese Society of Therapeutic Drug Monitoring. J Infect Chemother. 査読有, 19(3), 2013, 365-380

DOI:10.1007/s10156-013-0599-4

Aikawa N, Kusachi S, Mikamo H, Takesue Y, Watanabe S, Tanaka Y, Morita A, Tsumori K, Kato Y, Yoshinari T. Efficacy and safety of

intravenous daptomycin in Japanese patients with skin and soft tissue infections. *J Infect Chemother*. 査読有, 19(3), 2013, 447-455

DOI: 10.1007/s10156-012-0501-9

Yamada K, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Migiyama Y, Nagaoka K, Morinaga Y, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Izumikawa K, Kakeya H, Hasegawa H, Mikamo H, Kohno S.

Azithromycin attenuates lung inflammation in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 査読有, 57(8), 2013, 3883-3888

DOI: 10.1128/AAC.00457-13

三嶋廣繁、山岸由佳 . 女性生殖器感染症 (産婦人科領域感染症) 内性器感染症 (骨盤内炎症性疾患:PID) 子宮内感染 (子宮内膜炎・子宮筋層炎)(解説/特集) . 日本臨床, 査読無, 別冊感染症症候群 (下), 2013, 423-428

Terada M, Mikamo H, et al.

Antimicrobial efficacies of several antibiotics against uterine cervicitis caused by *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Chemother*, 査読有, 18, 2012, 313-317

DOI: 10.1007/s10156-011-0329-8

Yamamoto Y, Mikamo H, et al.

Compliance with oral antibiotic regimens and associated factors in Japan: compliance survey of multiple oral antibiotics (COSMOS). *Scand J Infect Dis*, 査読有, 44, 2012, 93-99

DOI: 10.3109/00365548.2011.619998

Takesue Y, Mikamo H, et al.

Nationwide surveillance of antimicrobial susceptibility patterns of pathogens isolated from surgical site infections (SSI) in Japan. *J Infect Chemother*, 査読有, 18, 2012, 816-826

DOI: 10.1007/s10156-012-0509-1

Hagihara M, Mikamo H, et al.

Pharmacokinetic-pharmacodynamic study of itraconazole in patients with fungal infections in intensive care units. *J Infect Chemother*, 査読有, 17, 2011, 224-230

DOI:10.1007/s10156-010-0102-4

Yamagishi Y, Mikamo H, et al. A case of uterine endometritis caused by *Atopobium vaginae*. *J Infect Chemother*, 査読有, 17, 2011, 119-121

DOI 10.1007/s10156-010-0100-6

Tran CM, Yamagishi Y, Mikamo H, et al. *In vitro* antimicrobial activity of razupenem (SMP-601, PTZ601) against anaerobic bacteria.

*Antimicrob Agents Chemother*, 査読有, 55, 2011, 2398-2402

DOI 10.1128/AAC.01038-10

〔学会発表〕計(2)件

T. Ohno, Mikamo H, et al. Current status of Group B Streptococci (GBS) in Japan -Penicillin-resistant GBS is emerging in Japan? 52th ICAAC, 2012年9月9日~12日, 米国サンフランシスコ

Ohno T, Yamagishi Y, Mikamo H, et al. Current Status of Group B Streptococci (GBS) in Japan -Serotype V Is Emerging Pathogen Also in Japan? 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents

and Chemotherapy(ICAAC), 2011年9  
月19日, 米国シカゴ

〔 図 書 〕 計 ( 2 ) 件

三鴨廣繁、山岸由佳、医科学出版社、  
ーラクタム系抗菌薬の PK-PD 解析ブ  
ック 注射編、2012、73 頁  
三鴨廣繁、山岸由佳 ( 分担執筆 )、金原  
出版、母子感染 妊産婦感染症における  
化学療法薬の使い方、2011、95-102

〔 産業財産権 〕  
出願状況 ( 計 件 )

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 ( 計 件 )

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔 その他 〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

三鴨 廣繁 ( MIKAMO Hiroshige )  
愛知医科大学・医学部・教授  
研究者番号：0 0 2 6 2 7 7 5

### (2) 研究分担者

山岸 由佳 ( YAMAGISHI Yuka )  
愛知医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：6 0 5 1 2 2 4 1

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：