

# 高校生の髄膜炎菌集団感染事例

## “*Neisseria meningitidis* の細菌学的検討”

黒木真理子 吉野修司 河野喜美子 堀田剛<sup>1)</sup> 深江弘恵<sup>2)</sup>  
山田亨 岩切章 大浦裕子 相馬宏敏<sup>3)</sup> 益留真由美<sup>4)</sup> 永野秀子<sup>5)</sup>  
村岡涼子<sup>4)</sup> 藤本茂紘<sup>6)</sup> 高橋英之<sup>7)</sup> 川端寛樹<sup>7)</sup> 大西真<sup>7)</sup>

### Outbreak of meningococcal disease occurred in high school students. “Studies on the bacteriology of *Neisseria meningitidis*.”

Mariko KUROGI, Shuji YOSHINO, Kimiko KAWANO, Takeshi HORITA,  
Hiroe FUKAE, Toru YAMADA, Akira IWAKIRI, Yuko OURA, Hirotoshi SOMA,  
Mayumi MASUDOME, Hideko NAGANO, Ryoko MURAOKA, Shigehiro FUJIMOTO,  
Hideyuki TAKAHASHI, Hiroki KAWABATA, Makoto ONISHI

#### Abstract

*Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), the causative agent of meningococcal meningitis. It only infects humans, which is isolated from neither animals nor the environment. Since it decreased sharply after World War II, in late years, it is an extremely rare disease in Japan.

On May, 2011, an outbreak of *N. meningitidis* infection was occurred at a high school in Miyazaki Prefecture. The pathogen was isolated from three symptomatic patients and four asymptomatic carriers, it was identified as *N. meningitidis* serogroup B by Gram stain, oxidase-test, catalase-test and polymerase chain reaction (PCR). In addition, Pulsed-Field Gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing (MLST) were used for epidemiological analysis. Results suggested that the genetic relationship was very close.

On the other hands, a difference in a symptom, death-to-asymptomatic, was unknown.

Key words: *Neisseria meningitidis*, outbreak, PFGE, MLST

#### はじめに

髄膜炎菌性髄膜炎は、ナイセリア属の髄膜炎菌を起病菌とする疾患である。「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」では5類全数把握疾患に分類されているが、輸入例を含め、我が国では近年稀な疾患であり<sup>1)</sup>、過去30年間髄膜炎菌感染症の集団発生報告はない<sup>2)</sup>。

平成23年5月、宮崎県内の高校で死亡例を含む髄膜炎菌感染症の集団発生が見られた。髄膜炎菌はヒト以外からは分離されず、感染者の多くは発病しないことが知られているが、一部は気道粘膜から血中に移行し、頭痛や発熱、嘔気、嘔吐を生じる。敗血症や髄膜炎を起し、劇症型と呼ばれるショック症状 (Waterhouse-Friderichsen syndrome) や DIC、多臓器不全を呈した場合は、適切な治療が行われても致死率が高いと言われている。なお、保

微生物部 1) 現 高鍋保健所 2) 現 県立宮崎病院 3) 現 都城保健所兼小林保健所  
4) 現 小林保健所 5) 現 健康増進課感染症対策室  
6) 元 小林保健所 7) 国立感染症研究所細菌第一部

菌者は鼻咽頭粘膜に髄膜炎菌が定着し、その割合は流行時に上昇することが知られている<sup>3)</sup>が、国内における保菌率は0.4%と報告<sup>4)</sup>されており、海外の10%以上に比し極めて低い。

今回、髄膜炎症状を呈した3名、保菌者4名(有症者2名、無症状者2名)から分離された髄膜炎菌の細菌学的検討を行い、併せて分子疫学的解析を行ったので報告する。

## 材料と方法

### 1 材料

同じ寮の生徒を中心に、濃厚接触の機会があったと考えられた計33名の咽頭ぬぐい液から分離された4株を用いた。

死亡例を含む3名の入院患者については、血液および喀痰由来の分離株4株を用いた。

### 2 A群溶血性連鎖球菌(溶連菌)感染症検査

病院からの連絡で溶連菌感染症が疑われたため、ラピッドテスト・ストレップA(積水メディカル)を用いて検査を実施した。

### 3 検体からの *Neisseria* 属菌分離

分離には、羊血液寒天培地(日水製薬)、チョコレート寒天培地(関東化学)、Modified-Thayer-Martin medium (MTM : BD-BBL)を用い、37°Cで24時間炭酸ガス培養を行った。

### 4 同定

分離菌の同定は、グラム染色、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験、Cystine-Trypticase agar (CTA) 培地を用いた6種類の糖分解性試験(maltose, mannose, sorbitol, xylose, lactose, mannitol)、培養同定・一般細菌キットのアピNH(シスメックス・ピオメリュー)、ゴノチェックIIキット(コスモ・バイオ)による同定試験、および国立感染症研究所細菌第一部から分与された、 $\gamma$ -glutamylaminopeptidase 遺伝子をターゲットとしたPCR法により行った。

### 5 血清群別試験

分離菌の血清群は、血清群別プライマーを用いたPCR法<sup>5)</sup>により決定した。

### 6 薬剤感受性試験

分離菌の薬剤耐性は、19種類の薬剤を用いてMicroFAST シリーズ ヘモフィルスの

MicroFAST 4J (SIEMENS)により確認した。試験は県立宮崎病院臨床検査科に依頼した。

### 7 分子疫学的解析

#### 1) Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

純培養菌をMacFarland 4~5となるよう滅菌蒸留水に懸濁し、等量の低融解アガロース(Lonza)と混和後、氷上で固化させたものをサンプルプラグとした。プラグをProtenaseK(1mg/ブロック、和光純薬)で50°C、一夜反応後不活化させ、Pefabloc SC(Roche)処理し、TE bufferで洗浄した。整形したブロックを制限酵素 *Nhe* I および *Spe* I (各30U/ブロック、Roche)で37°C一夜反応後、泳動用アガロースゲルに固定して泳動した。泳動はCHEF DR III(Bio-Rad)で(①5V/cm、パルス時間6-13秒、10°C、16時間、②5V/cm、パルス時間13-30秒、10°C、8時間)の条件で行った。泳動後、エチジウムブロマイドで染色した画像を解析ソフト(FPQuest, Bio-Rad)で解析した。

なお、PFGEパターンを比較するために、2001年と2003年に宮崎県で分離された髄膜炎菌も併せて解析を行った。

#### 2) Multilocus Sequence Typing (MLST)

分子疫学手法であるMLSTを用い、今回分離された8株および過去に宮崎県で分離された2株を解析した。解析は、国立感染症研究所細菌第一部に依頼した。

## 結果

### 1 A群溶血性連鎖球菌(溶連菌)感染症検査

溶連菌感染症の検査結果は、いずれの検体においても陰性であった。

### 2 生化学性状試験および血清型別試験

分離株はいずれもグラム陰性双球菌で、オキシダーゼ試験、カタラーゼ試験共に陽性であった。CTA培地による糖分解性試験はマルトースのみ陽性、他は陰性であった。PCRは分離株全て陽性で、アピNH、ゴノチェックIIキットの結果も併せて髄膜炎菌と同定した。

血清群別試験の結果、8株の髄膜炎菌はいずれも *N. meningitidis* B群であった。

### 3 薬剤感受性試験

検査の結果、有症(咳、痰、鼻水)の保菌者2

名を除いて、スルファメトキサゾール・トリメトプリム(ST)合剤に耐性を示した。他の薬剤に対しては、いずれも感受性であった(Table 1)。

#### 4 分子疫学的解析

解析の結果、集団感染で分離された8株については、*Nhe* I, *Spe* I 共に1~2バンド以内の

違いであった。一方、対照として用いた2株は、今回の分離株とは明らかに異なるバンドパターンを示した (Fig.1)。

今回分離・同定された髄膜炎菌8株のMLST法の結果は、いずれもST-687株で血清型B群であった(Table 2)。

**Table 1 Antibiotic susceptibility patterns of *N. meningitidis*.**

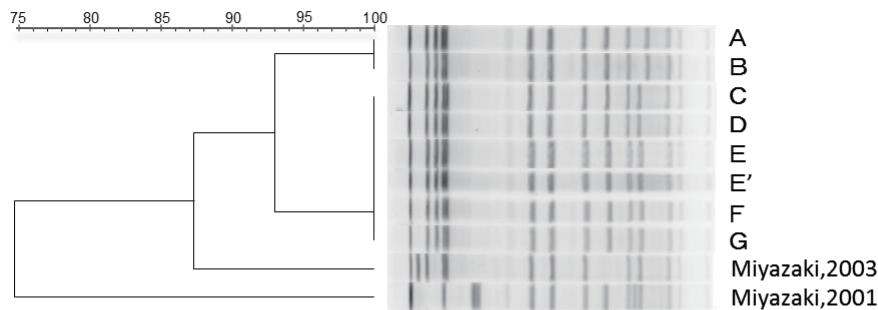
student		A	B	C	D	E	E'	F	G
disease		carriers				patients			
		symptomatic		asymptomatic		sepsis	DIC	meningitis	
antimicrobial	ST	R	R	I	S	R	R	R	R
agent	others	S	S	S	S	S	S	S	S

S : Susceptible      I : Intermediate      R : Resistant

ST : Sulfamethoxazole/ Trimethoprim

Others : Amoxicillin/Clavulanate, Ampicillin, Ampicillin/Sulbactam, Cefaclor, Cefditoren, Cefepime, Cefixime, Cefotaxime, Cefotiam, Cefozopran, Ceftriaxone, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Clarithromycin, Levofloxacin, Meropenem, Rifampicin, Tetracycline

#### *N. meningitidis* – *Nhe* I



#### *N. meningitidis* – *Spe* I

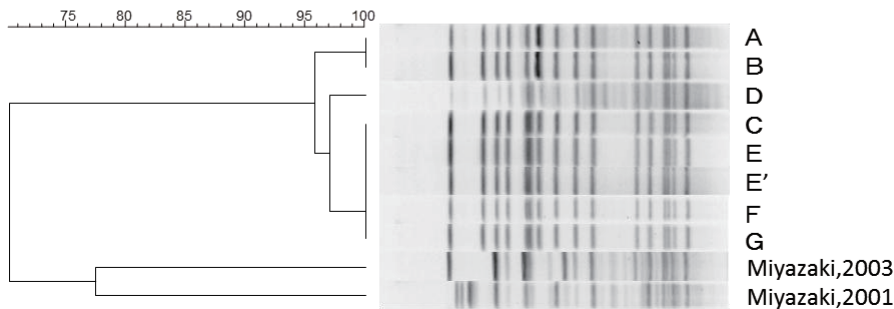


Fig.1 Result of gene analysis by PFGE. The isolates were digested with *Not* I and *Spe* I.

Lane A-B: Asymptomatic carriers, Lane C-D : Symptomatic carriers.

Lane E: Source of blood, Lane E' : Source of sputum. E and E' is identical.

Lane F,G : Symptomatic patients.

These patterns were compared with isolates in 2001 and 2003.

**Table 2 Analysis results by MLST of *N. meningitidis* isolated in Miyazaki.**

student	ST	year	serogroup	disease
A	687	2011	B	carriers
B	687	2011	B	carriers
C	687	2011	B	carriers
D	687	2011	B	carriers
E	687	2011	B	patients
E'	687	2011	B	patients
F	687	2011	B	patients
G	687	2011	B	patients

ST : Sequence Typing

**Table 3 ST-687 which was registered with MLST database from 1981 to 2002.**

ST	year	prefecture	serogroup	disease
687	1981	Tokyo	B	Patient
687	1983	Kumamoto	B	Patient
687	1986	Chiba	B	Carrier
687	1991	Chiba	B	Patient
687	1992	Tochigi	B	Patient
687	2000	Kanagawa	B	Patient
687	2001	Ehime	UT	Carrier
<b>687</b>	2002	Tokyo, Ehime	UT	Carriers
<b>687</b>	2003	Kanagawa, Fukuoka	B	Carrier, Patient
<b>687</b>	2004	Kanagawa, Saitama	B	Patients
<b>687</b>	2005	Tokyo, Hyogo	B	Patients

UT : Untypable

On this table, shown in bold indicate clones that were not registered in the MLST database of July 2012.

### 考察とまとめ

本邦では過去 30 年間髄膜炎菌感染症の集団発生報告はない。海外では寄宿舎等の閉鎖された環境や、濃厚接触の機会が多い場合、髄膜炎発症のリスクが高まるという報告<sup>6)</sup>があるが、本県での事例も同様の環境下で発生したものと考えられる。なお、咽頭ぬぐい液の検査では、陽性率 12.1%(有症: 14 名中 2 名, 14.3% 無症状者: 19 名中 2 名, 10.5%)であり、今回の事例は集団発生と考えられた。

分離された髄膜炎菌はいずれも血清型 B 群であり、生化学性状にほとんど差が見られなかったこと、PFGE 法における解析結果がほぼ一致

したことから、同一感染源と考えられた。また、国内では ST-687 株は 1981 年から分離されており、今回の集団発生の起因菌は海外からの輸入ではなく、国内に潜在する菌に由来すると推測された。

薬剤耐性が多数見られた ST 合剤に含まれるトリメトプリムは、ナイセリア属菌の選択分離培地である MTM に抑制剤として添加されており、髄膜炎菌の大半はトリメトプリムに耐性を示すと考えられるが、今回の結果から起因菌の薬剤耐性化は判断できなかった。

髄膜炎菌の病原性あるいは病原因子については不明な点が多く、菌の糖利用やアミノ酸利用に関する報告<sup>7)</sup>があるが、今回の事例において

無症状保菌例から死亡例まで見られた要因は不明である。

髄膜炎菌は他の細菌に比べ、栄養要求が厳しく溶菌しやすいこと、また、咽頭ぬぐい液には髄膜炎菌と紛らわしい他のナイセリア属の細菌<sup>8)</sup>も存在することから、今後、臨床材料から効率よく菌を分離できる方法を確立するために、液体培地等を利用した分離法や、保菌者の実態調査を検討していきたいと考える。

## 謝辞

本研究にご協力いただいた小林保健所、都城保健所、宮崎県福祉保健部健康増進課、県立宮崎病院ほか関係医療機関、国立感染症研究所、当該高校の皆様に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) 国立感染症研究所: 2003年および1999年4月からの髄膜炎菌性髄膜炎、感染症発生動向調査週報, 5,(50),14-16, (2003)
- 2) 国立感染症研究所: 病原体微生物情報, 32(10), 17-18, (2011)
- 3) Hassan-King MK et al.: Meningococcal carriage, meningococcal disease and vaccination, J Infect 16, 55-59, (1988)
- 4) 田中ら: 我が国の健康者における髄膜炎菌の保菌状況, 感染症誌, 79, 527-533, (2005)
- 5) Taha MK: Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*, JCM, 38, 855-857, (2000)
- 6) Nancy E. Rosenstein: N Engl J Med, 344, 1378-1388, (2001)
- 7) 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, 64(2), 291-301, (2009)
- 8) Xiuping Liu et al: Human Airway Epithelial Cell Responses to *Neisseria lactamica* and Purified Porin via Toll-Like Receptor 2-Dependent Signaling, American Society for Microbiology, 78(12), 5314-5322, (2010)