



Master's Lectures – 17

基礎と臨床とをつなぐ研究(インターサイエンス)を目指した50年：研究生活を振り返って思うこと(1)

慶應義塾大学医学部総合診療教育センター 共同研究員
東京医科大学微生物学分野 客員研究員

うぶ かた きみ こ
生 方 公 子
Kimiko UBUKATA

はじめに

2年ほど前、本誌編集部から寄稿を依頼されたのであるが、ライフワークとしてきた呼吸器感染症原因菌に関する研究が一段落しておらず、今日に至ってしまったことを先ずお詫びしたい。本年、改めて今までの研究生活についてその来し方を振り返る機会があった。研究生活をここまで続けてこられた陰には、何人かのターニングポイントとなる先生方とのめぐり逢い、臨床科の研究室の中において当時は雑務としか思えなかった多岐にわたる研究の中から会得したことが基礎になっていることをあらためて実感している。Medical staffでもなく、薬剤師や医師の資格も持たない医療の場では異端者であった私が、どのような視点で研究テーマの芽を見いだし研究を続けることができたのか、過去を振り返りつつ「研究とはどうあるべきか」について、実体験に基づく私の持論を記しておきたいと考えた次第である。

I. 研究への道

私は終戦の翌年、まさに激動の時代であった昭和21年(1946年)の元旦に群馬県で生まれた。昭和39年(1964年)4月、通称「目白の女子大」と呼ばれていた日本女子大学に入学している。女子大学を選んだのは、地方からの入学者は全員が、護国寺へ通じる道路を隔てた場所にあった学生寮に入寮することを義務付けられていたことによる。寮には寮監が

おられ、しかも学部や学科の異なる先輩、後輩が一つ屋根の下に生活する環境は、後々の生き方に学問とは違った点で大きな影響を与えられたように思う。

当時は大学4年になると、研究テーマを決めて卒業論文を書くことが必須であったが、実験がメインの理系学部は今の修士課程と同じくらい大変であった。研究テーマの指導教授は、講師になられたばかりでとても active で面倒見のよい大隅正子先生(現名誉教授)であり、大隈先生のもとで「酵母の研究」を選択したのであった。この研究テーマによって、酵母を包埋してガラスナイフで超薄切片を作製、酢酸ウランで染色して観察するという「電子顕微鏡による細菌の観察技術」を習得させていただいた(図1-A)。これは当時登場したばかりのタンパク合成阻害剤のクロラムフェニコールを作用させたのち、細胞内のミトコンドリアがどのように変化するのかを観察するためであった。また、形態変化とともにタンパク合成阻害を測定するための機器を拝借するため、大隅先生のご紹介で築地の国立がんセンター研究所の杉村 隆・生化学部長(当時)の研究室への出入りが許可された。同時に研究室で週1回夜間に行われていた抄読会への参加も許された。抄読会では発行されたばかりのノーベル賞受賞者 Watson 博士による「Molecular Biology of the Gene」初版の海賊版を用い、先生自らが時々 chapter ごとに質問を含めた lecture をしてくださった(図1-B)。大変厳しい先生で大学2年分位の本を読み漁ったが、「研究者とはどうあるべきか」を強烈に意識させられたことを今でも鮮明に覚えている。

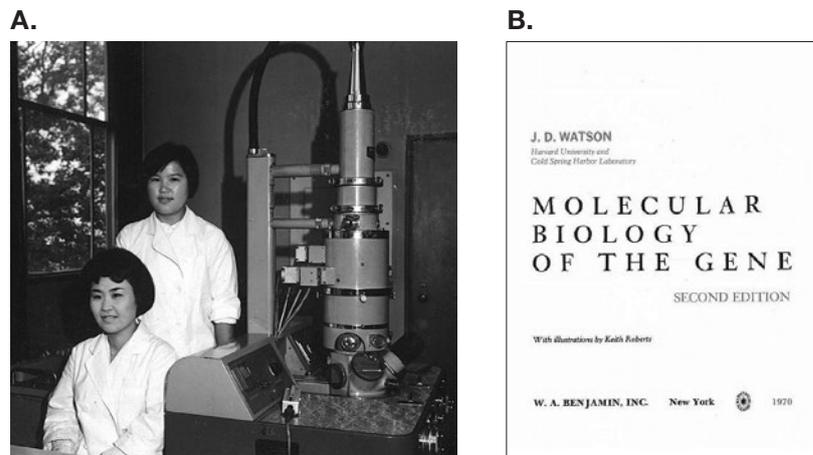


図1 研究者への道

大隅正子先生(左)と筆者(A)、Watson博士の著書(B)

学生時代に当時先端的な分野であった電子顕微鏡技術の習得とDNAの合成・転写に関する基礎知識を垣間見た(習得とはとてもいえない)ことが私の研究の礎となっている。そして、「Scienceの分野に進むのも面白いかも?」と考えるに至ったきっかけでもある。これらの出会いと経験がなければ、例えば研究者の道に進んだとしても、その後急速に進歩したDNAレベルの研究に対応できていなかったかもしれない。学生時代はすべての時間は自分自身のもの、生かすも殺すも自分次第である。

II. 黄色ブドウ球菌(MRSA)の研究

1. 耐性ブドウ球菌研究会

さて、卒業後は先輩の紹介で当時の「東京大学医学部附属病院分院小児科細菌研究室」で研究のお手伝いをするようになった。最初の仕事は、当時御高名な錚々たる先生方で組織された「耐性ブドウ球菌研究会(代表 市川篤二先生)」によって収集された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性測定やファージ型別であった。

黄色ブドウ球菌の研究はこの時が初めてであり、「グラム染色」もできずにあきれられつつ、日常では恩師の紺野昌俊先生が外来診療で採取された検体を白衣のポケットからおもむろに取り出し、その培養を指示されていたのである。それらの検体が小児

の膿胸などと結びついており、治療としての抗菌薬の基礎研究は私の目には極めて新鮮に映った。ちなみに当時の新生児での新規抗菌薬の血中濃度測定は非常に大変で、毛細管現象を利用してわずか100 μ L程度の血液を採血し血清部分を分離して測定するというもので、失敗は決して許されなかった。このような実体験が、基礎研究と臨床とを結びつけるいわば「インターサイエンス」と呼ばれる研究分野を目指した私の原点である。

黄色ブドウ球菌は溶原化したファージを染色体上に組み込んでいる。肺炎球菌やA群溶血性レンサ球菌も然りである。これらの菌は紫外線照射あるいはマイトマイシンCを作用させて数時間培養すると、溶原化ファージは染色体から外れて増殖し、細胞を壊して飛び出してくる(図2-A, B)。薬剤耐性型や感染症の種類によって特有のファージ型(52/52A/80/81など)が認められ、ファージ型別として疫学解析に応用されていた。近年ではMultilocus Sequence Typing (MLST) 解析などDNAレベルでの疫学解析にすっかり切り替わっているが、急速な手法の進歩はDNA合成技術や解析機器の発展のお陰である。

その時々注目されるScienceの陰にはそれを進歩・発展させる画期的な機器の発明がみられる。微生物関係では、光学顕微鏡から電子顕微鏡、蛍光顕微鏡や位相差顕微鏡への進化、超遠心機やPCR機器、質量分析機器などの登場がその典型であろう。

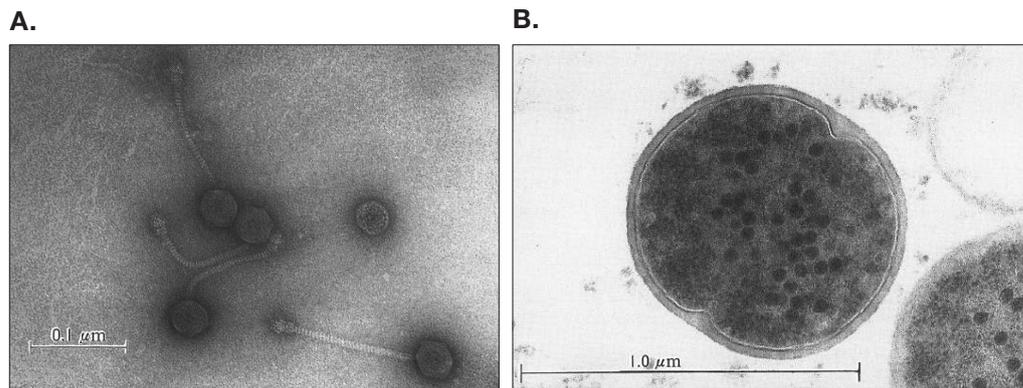


図2 黄色ブドウ球菌のファージ・電子顕微鏡写真

黄色ブドウ球菌のファージ(A)は正6面体のファージと長いファージがみられ、プラスミドや染色体の一部を取り込んで他の黄色ブドウ球菌へと伝播していく。マイトマイシンや紫外線照射後2-3時間経過すると細胞内に増殖したファージが観察される(B)。

2. 誘導型 MRSA と *mecA* 遺伝子

昭和46年(1971年)、恩師である藤井良知先生が帝京大学医学部小児科学の教授となられた異動に伴い、同科に所属する約半数の人達が一緒に異動し細菌とウイルスの研究室がそれぞれ立ち上げられた。細菌研究室では当初の数年、化膿性髄膜炎を含む小児呼吸器感染症を惹起するさまざまな細菌(肺炎球菌、インフルエンザ菌、A群溶血性レンサ球菌など)の検体からの分離をはじめ、今では経験できない破傷風菌などの分離も経験した。加えて、細菌感染症治療のための新規抗菌薬開発の基礎研究として、薬剤作用後の形態変化や標的PBPに対するβ-ラクタム系薬の結合親和性など、さまざまな手法を用いて多面的に検討した。当時は、それらの研究が将来どのように臨床研究に結びつくのか明確に理解できず、記述した論文がほとんど邦文であったことは、今にして思うと極めて残念である。昨今、薬剤感受性(MIC)の優劣や血中濃度、あるいは欧米で云々という理由で抗菌薬が選択されていることにはかなり違和感を覚えるのである。

帝京大学へ異動して8年近く経ったある日、細菌検査室(当時の主任:川上小夜子さん)の面倒もみておられた紺野先生が、感受性検査を行った黄色ブドウ球菌のシャーレを「珍しい現象がみられる」とおっしゃって研究室へ持参された。当時、ディスク法による測定であったが、β-ラクタム系薬の中でも

第三世代に属するセフェム系薬含有ディスクの近い位置、すなわち抗菌薬濃度が高い部位で菌が発育し、薬剤濃度の低い遠い部位で菌の発育が阻止されたいわゆる「2重リング現象」であった。シャーレを見た瞬間、何らかの酵素産生に誘導が生じていると直感した。当時すでにマクロライド系薬耐性が問題となっており、マクロライド系薬による誘導耐性が明らかにされていたからである。そして、この現象には細胞壁合成に関わる何らかの酵素がβ-ラクタム系薬によって誘導産生されているのではないかと仮説を立てた。昭和59年(1984年)当時のことである。

この耐性メカニズム、すなわちPBP2'が誘導産生されるMRSAについては論文¹⁻³⁾や書籍⁴⁾にもまとめているのでここではその詳細は省略するが、PBP2'をコードする*mecA*遺伝子に関する研究を通じて明らかにできたことは、初期の誘導耐性に関わる*mecA*遺伝子はペニシリナーゼ遺伝子と細胞壁合成酵素、いわゆるペニシリン結合タンパク(PBP)遺伝子のハイブリッドによって形成された遺伝子であったことである。その後、誘導に関わる遺伝子領域が構成型へと変異し、高度耐性化したMRSAへと進化している。ヒトとともにある細菌がその棲息環境に応じて巧みに進化・生存することを認識した最初の発見であった。

当時、私どもは米国で毎年秋に開催されていた Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)に参加してこの耐性について

て発表したがあまり注目されなかった。反応の多くはなぜバンコマイシン (VCM) を治療に用いないのか、自分たちは VCM を用いているから問題ないという意見であった。日本では VCM が簡単に使用できなかった時期である。その後、医療制度の異なる米国などからは、VCM 耐性腸球菌や cMRSA が先に問題化してきたことは皮肉なことである。特定の抗菌薬を集中使用すれば、いつかは必ず耐性化した菌が出現するということを如実に示している。

一方、私が院内感染菌としての MRSA の研究を通じて感じていたことは、医療の高度化に伴い易感染

状態にある入院患者の感染増加と耐性菌の拡散の問題である。血液培養から MRSA が検出される入院例の基礎疾患 (併存疾患) と年齢をみると、MRSA の問題はまさに今日的高齢化社会の入り口なのであった (図 3)。戦後 30 年を経て、高度経済成長に伴う食の欧米化、国民皆保険制度による医療の充実、そして人口動態の著しい変動が始まった時代を反映している。1990 年と 2019 年の全人口に占める 65 歳以上の割合は 12.1% から 28.4% に達し、今後さらに超高齢化社会を迎えると予測されている (図 4)。人口動態の推移は経済面だけでなく医療においても将来

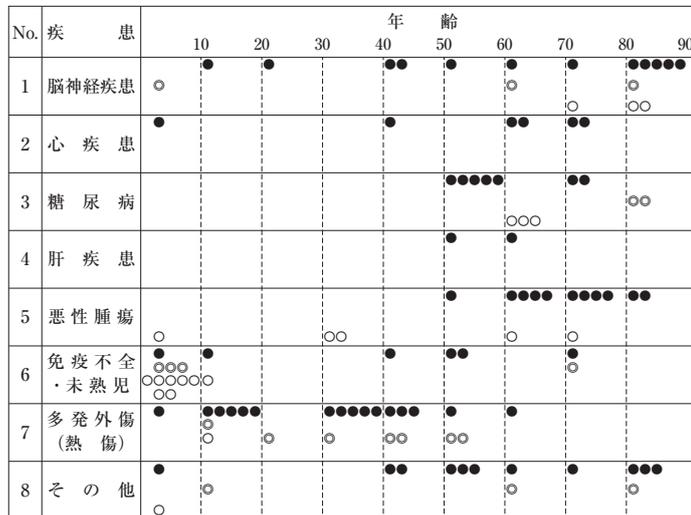
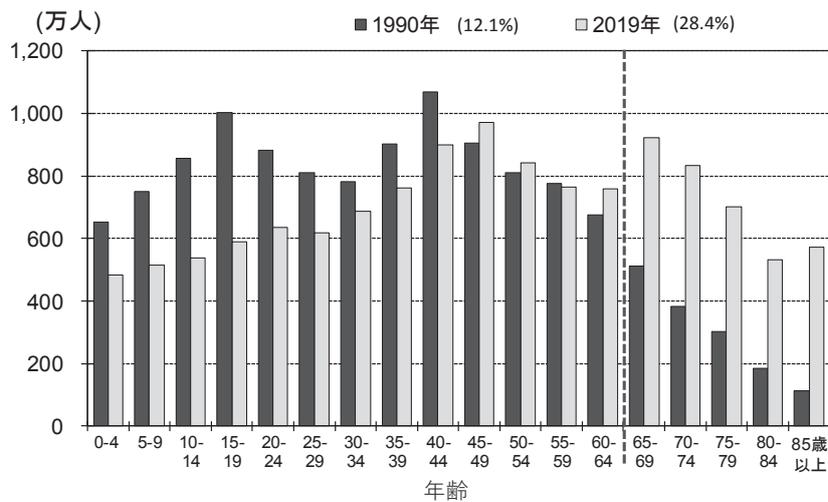


図 3 血液から MRSA が分離された例の基礎疾患 (併存疾患) と年齢分布



わが国における人口動態。総務省統計局データ2020年10月1日現在確定値：総人口1億2616万7千人。65歳以上の割合は、1990年：12.1%、2019年：28.4%。 出典「人口推計」(総務省統計局)

図 4 わが国における人口動態：急速な少子高齢化社会

医療の面ではさまざまな基礎疾患 / 並存疾患保持例が増加することを意味している。

どのような疾患が問題になるのかを推測する上で欠かせない。感染症領域においてもこの点を踏まえて冷静な準備と対策が必要であることは言うまでもない。

そもそも加齢とは、個々人における長い間の生活習慣をベースにした併存疾患の有無と本質的な免疫学的老化 (Immunosenescence) とが複合的に絡まっている。加齢は誰しものが避けて通れない宿命である。

Ⅲ. 肺炎球菌 (PRSP) の研究

1. 研究のはじまり

MRSA の研究が一段落したら、研究を速やかに肺炎球菌にシフトしたいと考えていた。その理由はすでに拙著⁵⁾にも書いたとおりであるが、1987年にペニシリン系薬に非感受性の肺炎球菌による小児化膿性髄膜炎を経験し、治療に難渋したことにある。小児気道感染症の検体を幼弱マウスの腹腔に接種すると、肺炎球菌が存在すれば翌朝マウスは斃死しているか衰弱している。解剖してその心血を培養すると純培養状態で肺炎球菌を分離でき、最も早く正確に肺炎球菌を証明できる。臨床症状から細菌感染を推測して採取された検体では、この手法で25%に肺炎球菌を証明できた。しかも分離された菌はすべて莢膜を有し、莢膜を脱落した菌ではマウスは元気に生存している。肺炎球菌による侵襲性感染症の成立には、いかに莢膜が重要であることを理解する体験であった。

一方、1970年代にはすでに南アフリカに端を発したペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) は欧米にも拡散し始め、臨床上問題となり始めていた。彼らはかつてスペイン風邪の大流行時に、続発感染の原因菌として肺炎球菌が重要であることを認識していたからである。主要国では国家規模での大規模疫学サーベイランスが開始され、それらの莢膜型についての疫学データがワクチン開発の基礎になっている。

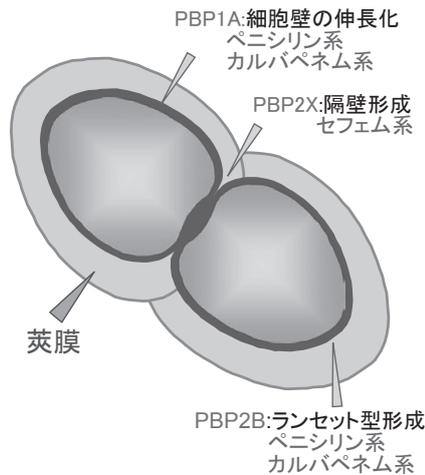
その当時、わが国では注射用セフェム系薬のみならず経口用セフェム系薬の開発も盛んで、PRSPは問題視されていなかった。しかし冷静に考えれば、経口吸収性の劣るセフェム系薬に側鎖としてピボキシル体を結合し吸収効率を高めても、その多くの血

中濃度は1 μ g/mL程度であった。しかもこれら薬剤の作用標的は細菌に複数以上ある隔壁合成酵素 (Penicillin-Binding Protein ; PBP) のPBP2Xへの結合が主であり、薬剤を作用させると隔壁形成が阻害され伸長化 (フィラメント化) した細菌細胞が観察されるのであった。コントロール細胞の大きさに比して100倍以上に伸長化しても溶菌せず、殺菌性が劣っていたのである。他方、ペニシリン系薬やカルバペネム系薬は細胞壁の合成に関わるPBP1A、あるいはPBP2Bに親和性が高く、セフェム系薬に比して菌の溶菌・殺菌が短時間で発現するといった薬剤の本質的な違いがあった。

さて、私たちが肺炎球菌の耐性メカニズムについて研究をスタートしたのは1987年頃である。まず、ペニシリン系薬、セフェム系薬、そしてカルバペネム系薬と系統の異なる β -ラクタム系薬を肺炎球菌に作用させて形態変化を観察したが、薬剤によって生じる形態変化は著しく異なり、さらにC¹⁴標識されたペニシリンとそれぞれの抗菌薬の競合実験を行ってPBPに対する結合親和性を解析すると、PBP1A、PBP2X、そしてPBP2Bが重要で、それらに対する各薬剤の親和性が明らかに異なっていること、そして耐性化にはそれらのPBPをコードする*pbp*遺伝子に変異のあることを明らかにした⁵⁾ (図5)。

それらをもとに、当時東京大学医学部附属病院細菌検査室に在職された奥住捷子先生と愛媛大学医学部検査部におられた村瀬光春先生にお願いし、保存されていた貴重な肺炎球菌の分与を受け*pbp*遺伝子解析を行った。そして、1980年の分離株には遺伝子変異株を認めなかったのであるが、1987年の分離株中に本来ペニシリン感受性が0.016 μ g/mL前後であるはずが、0.125 μ g/mLへと低下した株を認めた。それらの株には*pbp2x*遺伝子に感受性低下に影響する変異のあることを見いだした。つまり、日本では肺炎球菌の耐性化は1987年頃にはすでに始まっていたことが明らかにできたのである。

分離時には判然としない菌であっても、無菌検査材料から分離され重要と思われる菌は、正確なメモとともに保存しておくことが後々役立つことの教訓である。



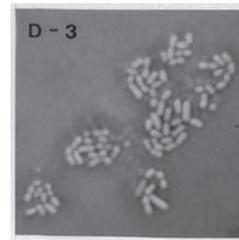
Ubukata K, et al., *J Infect Chemother.* 1996 ; 2 : 213-221.
Ubukata K, et al., *J Infect Chemother.* 1997 ; 3 : 190-197.
紺野昌俊, 生方公子共著。(改)ペニシリン耐性肺炎球菌。(株)協和企画通信。1999年

図5 肺炎球菌における β -ラクタム系薬とその標的であるPBPs機能との関係
それぞれのPBPをコードする遺伝子に変異が生じると、特徴的な感受性低下と形態変化を生ずる。

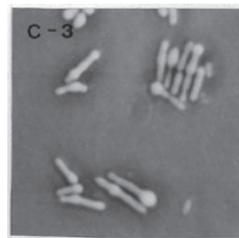
(図5は巻末にカラーで掲載しています)

2. 「ペニシリン耐性肺炎球菌研究会」の立ち上げ

「肺炎球菌についての全国規模の疫学研究を実施して耐性化の実態と肺炎球菌感染症の臨床像を把握したい」というかねてからの目標を、「ペニシリン耐性肺炎球菌研究会」という形でようやくして組織化することができたのは1993年のことである。この研究会には48医療機関に所属する検査技師の方々に賛同をいただき、5年間で4,255株の菌株が収集され、疫学情報として重要な莢膜型別、耐性遺伝子解析、そして正確な感受性測定、臨床との関連について解析できた。その結果は論文⁶⁻¹⁰⁾のみならず、書籍⁵⁾としてまとめることのできたのである。この疫学研究はわが国における肺炎球菌研究のスタートとなったと自負している。その繋がりから1998年より5年間、Meiji Seika ファルマ(株)の百合ヶ丘研修センターをお借りし、「実技と講義のPCR研修会」を開き、総計200名近い検査技師の方々が参加した。寝食を共にして信頼関係を築くことができたのは、その後において何にも代えがたい私の財産となった。しかし、PCRの手法を臨床検査の場へ応用したいという目標は参加者が職場へ戻るとなかなか理解されず、普及に至らなかったことは残念でならない。もしこの時期から各地区のメインの医療



・PBP1Aと PBP2Bに
親和性の高い抗菌薬
Panipenem
(MIC : 0.004 μ g/mL)



・PBP2Xに親和性の
高い抗菌薬
Cefotaxime
(MIC : 0.016 μ g/mL)

機関にPCRが普及していたなら、現在流行しているCOVID-19にももう少し迅速に対応できたかもしれないと思うのである。この研修を通じてもうひとつ感じたことは、県単位で検査センターを設け、重要度の高い検体については精度の高い検査を行う必要性を痛感した。そのようなシステムが構築されない限り、わが国における人口10万単位の正確な疫学情報は得られないであろうと考える。物流システムやIT技術が急速に進歩した今日、不可能なことではないはずである。

さて、その間1994年、プラハで開催された第6回国際感染症学会(図6)に参加する機会があった。肺炎球菌に関するシンポジウムの会場は満員で、その熱気に驚くと同時に、欧米とわが国の本菌に対する認識の乖離に愕然とした。帰国後、ある機会に内科の某教授にこのお話をしたところ、「生方さん、日本では優れた β -ラクタム系薬があるから耐性菌は成人では問題にならないよ」と一笑に伏されたのである。このレスポンスが当時の一般的な考えで、高額な医療費を要する国と、皆保険制度に守られたわが国の「予防に対する認識の差」こそが、その後の肺炎球菌結合型ワクチン(Pneumococcal Conjugate Vaccine; PCV)導入に至るいわゆるワクチンギャップになっていることは残念でならない。

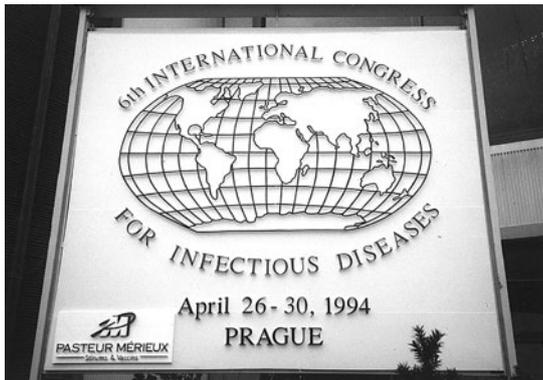


図6 感染症を考える上でのevidenceとしての
大規模疫学の必要性

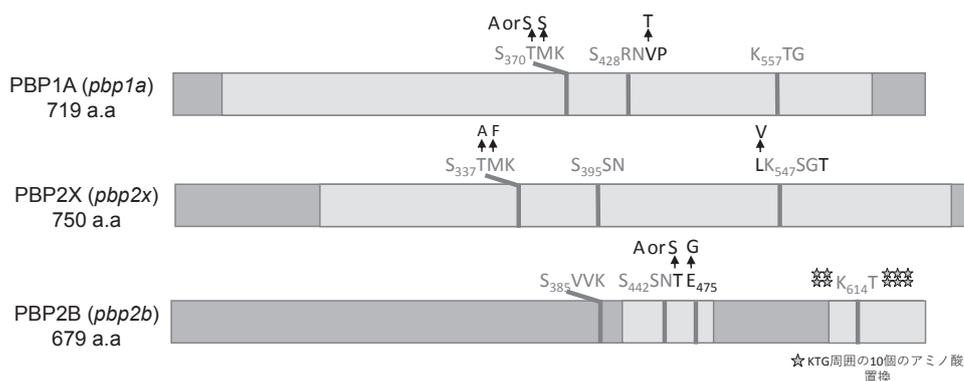
1994年、プラハで開催された第6回国際感染症学会において、大規模な「肺炎球菌シンポジウム」が開催された。日本でこの重要な細菌に対する研究が遅れていることを痛感した忘れがたい学会である。

3. PCR法によるPRSPの迅速検索

私がPCR法の臨床への応用を目指したのは、1985年MRSAの*mecA*遺伝子の迅速検索が始まりである。しかしこのPCR法は開発側と利用者側にギャップがあり過ぎ、加えて保険収載などさまざまなハードルがあって研究目的の使用から抜け出すことはできなかった。その後、耐性インフルエンザ菌や耐性肺炎球菌についても試みたが、残念ながら研究使用

の域をでていない。皆保険制度の下ですべてが点数化されコントロールされる限り、設備投資に見合う長期的収益に確信が持てなければ、企業が開発にヘジテートするのは至極当然の成り行きである。これに限らず、日本はすべての領域において外圧に弱い風土であるとおつくづく感じる。

さて、基礎研究者の間では昔から肺炎球菌は自己融解しやすい菌で遺伝子変異を生じやすく、病原性としては莢膜が重要であるというのは常識であった。マウスの実験でも先に記したとおりである。このような特徴的性状のため、薬剤感受性測定は難しく、前培養に用いる培地や培養時間を一定にしないと接種菌量が一定化せず結果が非常にブレる。ところが本菌は化膿性髄膜炎をはじめとする重篤な侵襲性肺炎球菌感染症 (Invasive Pneumococcal Disease; IPD) を惹起し、発症者は短時間で死に至ることがあり、救命し得ても重篤な後遺症を残す割合の高い菌である。このような菌の耐性の有無を短時間で識別するにはPCR検索が最良であろうと考えた。しかし、肺炎球菌のβ-ラクタム系薬耐性化には*pbp1a*、*pbp2x*、*pbp2b* 遺伝子変異が関わっている (図7)。しかも耐性化には各遺伝子上におびただしく認められる変異のうち、保存性アミノ酸配列あるいはその近



S, Serine; T, Threonine; M, Methionine; K, Lysine; R, Arginine; N, Asparagine; G, Glycine; E, Glutamic acid; A, Alanine; F, Phenylalanine; D, Aspartic acid; V, Valine

Asahi Y. et al. Antimicrob Agents Chemmother. 1998;42:2267-2273.
Asahi Y. et al. Antimicrob Agents Chemmother. 1999;43:1252-1255.
Yamane A. et al. Antimicrob Agents Chemmother. 1996;40:1257-1259.

図7 β-ラクタム系薬耐性化に関わるPBPのアミノ酸置換

β-ラクタム系薬が各PBPに結合するためには保存性アミノ酸配列 (STMK、SS (R) N、KT (S) G) が重要な役割を担っている。特にSTMKのS (serine) はβ-ラクタム環の結合アミノ酸である。保存性アミノ酸配列あるいはその近位アミノ酸が他のアミノ酸へと置換することが耐性化にとって重要である。

(図7は巻末にカラーで掲載しています)

位アミノ酸が異なるアミノ酸へ置換することが重要である。このことから、「変異のない感性菌側の遺伝子を識別する方が解析結果は安定するのではないか」という逆転の発想による PCR 法を思いついた。しかもできるだけ重要な DNA 領域のみを標的とする短い DNA 増幅であることが望ましいとも考えたのである。

初期の PCR 解析⁷⁾では、PCR の増幅産物をゲル電気泳動で解析していたが、2007 年以降は蛍光色素を付けたプローブを用いる real-time PCR 法¹¹⁾へと変更し省力化と時間短縮に結びつけている(図 8)。遺伝子変異の有無による耐性/感性は、遺伝子型(Genotype : g)としてバイオアッセイによる感受性とは標記法を明確に区別している。先述したように、遺伝子解析の方が微妙な耐性の違いを明確に区別できる¹¹⁾(図 9)。特に、セフェム系薬が汎用されてきた日本では、ペニシリン系薬が第一選択薬である欧米に比べ、セフェム系薬の感受性を低下させる *pbp2x* 遺伝子変異株が非常に多く、それらの株ではセフェム系薬の感受性が劣るのである。ところが、欧米では汎用されているペニシリン系薬の感受性に影響する *pbp2b* 遺伝子変異株が明らかに多いのである。

新たな耐性菌の出現はそれぞれの国における抗菌

薬の使用状況や病院環境を映す鏡であり、何らかの警告のシグナルなのである。

4. 肺炎球菌結合型ワクチンの導入と菌の変化

2010 年の暮、わが国ではようやくして沈降 7 価肺炎球菌結合型ワクチン(PCV7)とインフルエンザ菌莢膜 b 型菌(Hib)に対する結合型ワクチン(Hib ワクチン)とが「ワクチン接種緊急促進事業」として導入された。Hib ワクチンは米国に 20 年以上遅れ、PCV7 は米国で PCV7 から PCV13 に切り替わった年に導入されている。関連学会等においても熱心に厚労省へ要望書を提出していたとのことであるが、それでもなぜこのようなワクチンギャップが生じたのであろうか？

個人的見解であるが、厚労省の担当部課を説得させるだけの全国規模の正確な疫学データとそれに基づくワクチン導入効果のコストパフォーマンスを示せなかった製薬企業や私どもの側にも責任の一端があると感じている。この件に限らず、自国のエビデンスは自分たちで努力して集めていくことが私たちの責務でもあると思っている。

一例であるが私が中心となって行ってきた全国規模の IPD サーベイランスの分離株における莢膜型

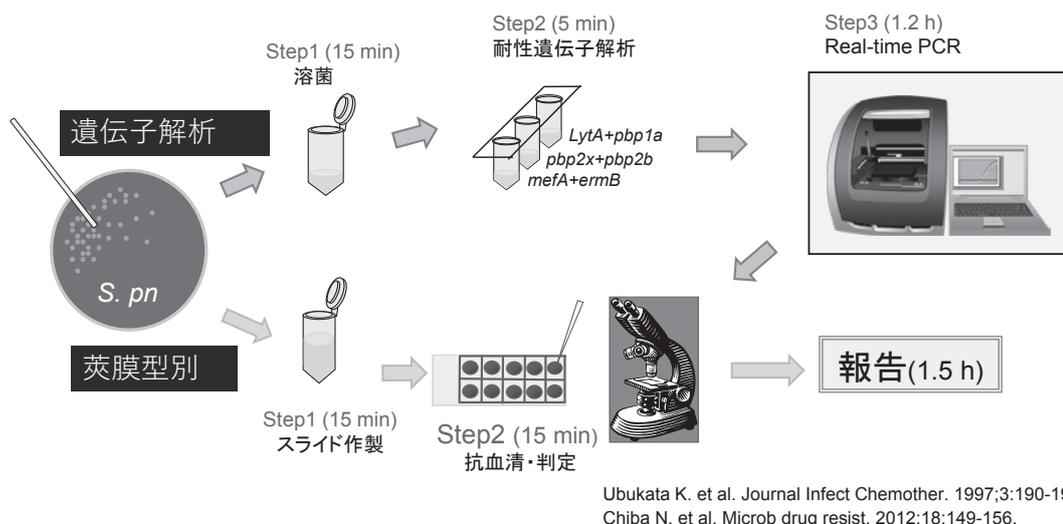


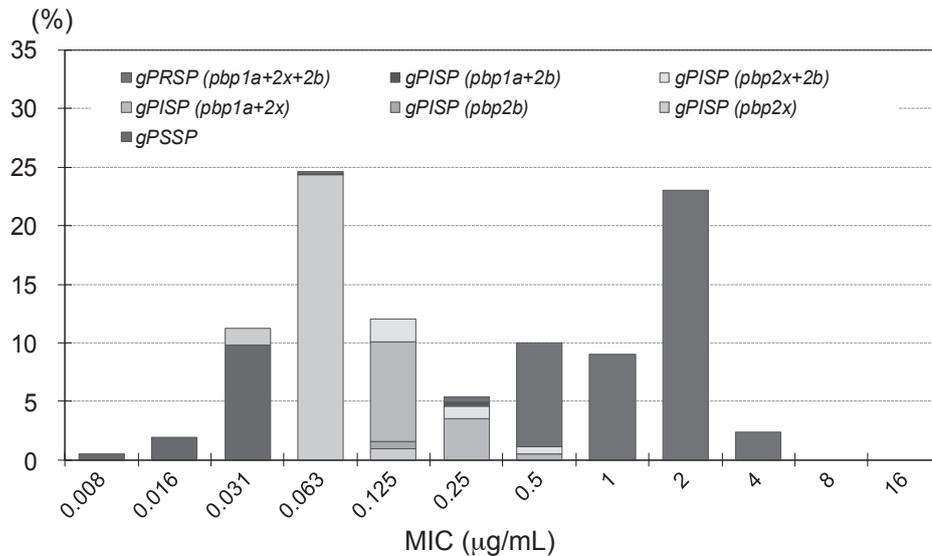
図 8 耐性遺伝子と莢膜型別の解析プロトコール

PBPs をコードするそれぞれの遺伝子検索は、多様化する変異に対応するため、耐性化に重要な保存性アミノ酸配列(近位)に変異があるか否かを検出できるよう変異のない遺伝子が識別できるように設計している。すなわち、PCR で DNA の増幅が起これば変異がなく、増幅がみられなければ変異があり、耐性に影響するアミノ酸置換があると判断する。

(図 8 は巻末にカラーで掲載しています)

の変化を小児 (A) と成人 (B) に分けて図 10 に示す。PCV7 の導入によりワクチンに含まれる莢膜型株による小児 IPD は激減、PCV13 へ切替後にはそれらに含まれるタイプの IPD も減少している。同時に成人でも PCV7 タイプの IPD は激減している¹²⁻¹⁴⁾。このような現象は集団免疫効果 (Herd Immunity) と

呼ばれるが、これでも私にとっては満足できる疫学データではないのである。このような成績では通常 10 万人あたりの発症率 (罹患率) の推移として米国 ABC サーベイランスのように正確な罹患率を算出することが望まれるが、わが国ではそれはほとんど不可能に近い。それでも詳細に解析すれば、図 11

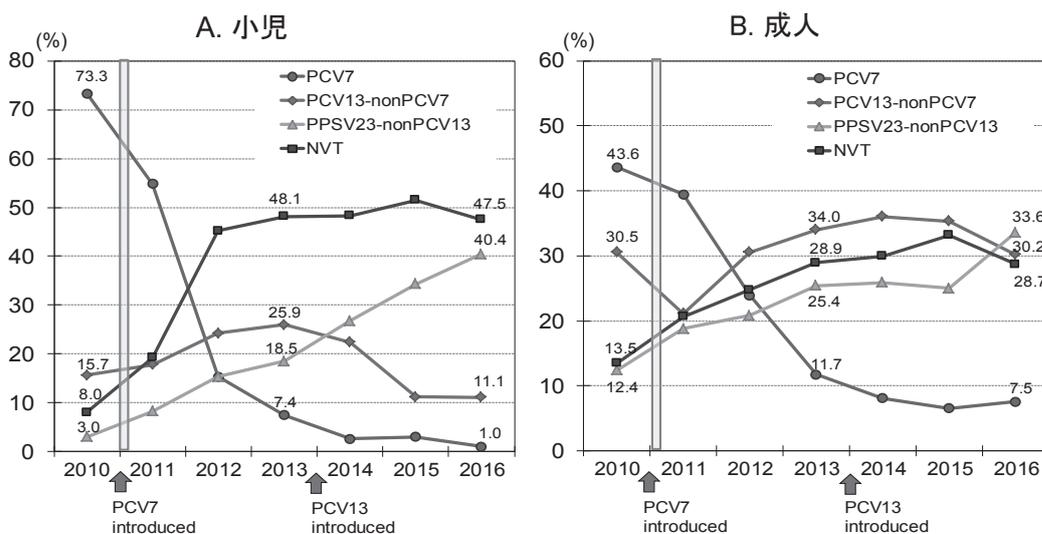


Chiba N, et al. Emerg Infect Dis. 2014;20:1132-1139.

図 9 耐性遺伝子とペニシリンG感受性との関係 (n = 633)

セフェム系薬では gPISP (pbp2x) の MIC は 0.125-0.25 μg/mL、gPISP (pbp2b) のそれは 0.063 μg/mL と逆転する。

(図 9 は巻末にカラーで掲載しています)



Ubukata K, et al. Emerg Infect Dis. 2018;24:2010-2020.

図 10 小児への肺炎球菌結合型ワクチン導入後のIPD由来株の莢膜型の変化

(図 10 は巻末にカラーで掲載しています)

のようにPCVsの導入前には多くを占めたgPRSPがワクチン導入によって小児・成人ともに激減していることが示されている。ただし小児に比べ成人ではgPISP(*pbp2x*)変異株が多数を占めていることが明らかである。

ムコイド型と呼ばれる莢膜3型によるIPD¹⁵⁾が多いため、このデータは高齢者や壮年期の成人に対してPCV13とPPSV23をどのように接種したなら効果的なのか正確なエビデンスを把握することが喫緊の課題であることを示唆している。

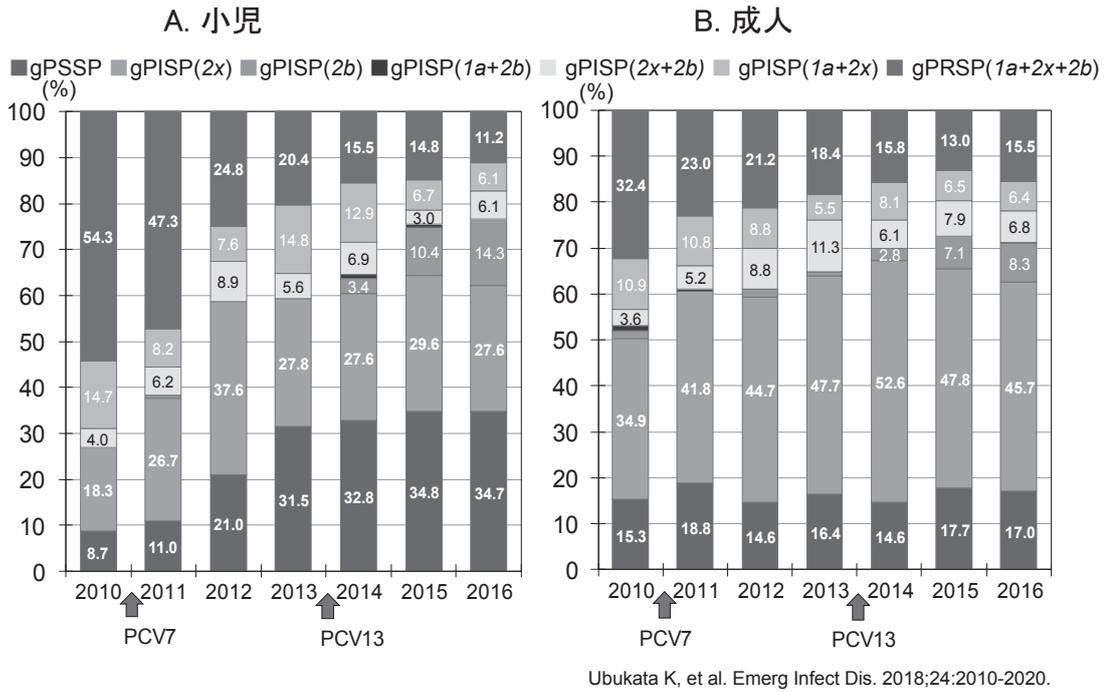


図 11 小児への肺炎球菌結合型ワクチン導入後のIPD由来株における耐性菌の割合の変化

(図 11 は巻末にカラーで掲載しています)



図 12 北里大学大学院感染制御科学府・病原微生物分子疫学研究室
(Laboratory of Molecular Epidemiology for Infectious Agents,
Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University)

(故)井上松久先生(当時副学長)を囲んで平成20年(2008年)撮影

おわりに

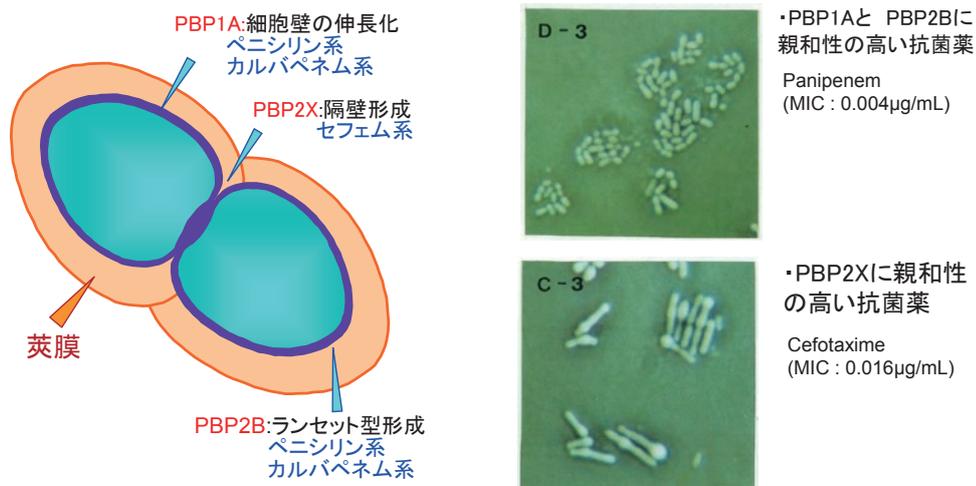
図 12 は 2008 年当時の北里大学大学院感染制御科学府・病原微生物分子疫学研究室に所属した関係者一同である。正規のスタッフは私と村山琮明講師（現日本大学薬学部教授）のみで、ほとんどは社会人枠の博士課程や修士課程在籍者である。北里大学大学院時代の研究成果は、私の意図したことを理解し日々たゆまざる努力をしてくださったこの方々の賜物である。現在、盛んに「Sustainable Development Goals: SDGs」などと叫ばれているが、そもそも研究とは失敗の連続であり、いかにめげずに努力を重ねるか、持続力（Sustainability）にかかっていると思うのである。ただし、focus がずれてはダメなのである。

研究者をはじめとして医療にかかわる者は、上司から命令されたことのみを行うのではなく、自らの仕事の中で閃いたことを工夫して行う資質（Serendipity）も求められる。その最たるものがペニシリンの発見である。日常のルーチン業務に埋もれてはダメなのである。

最後に、「日本細菌学の父」と呼ばれる北里柴三郎先生の印象深い言葉を記しておきたい。「医師の使命は病気を予防することにある。研究だけではダメだ。どうやって世の中に役立てるか考えよ」と書かれている。医療にかかわるコメディカルにも通じるところがあり、深く同感するのである。そして、「基礎と臨床をつなぐインターサイエンス」とはそのような研究分野なのである。

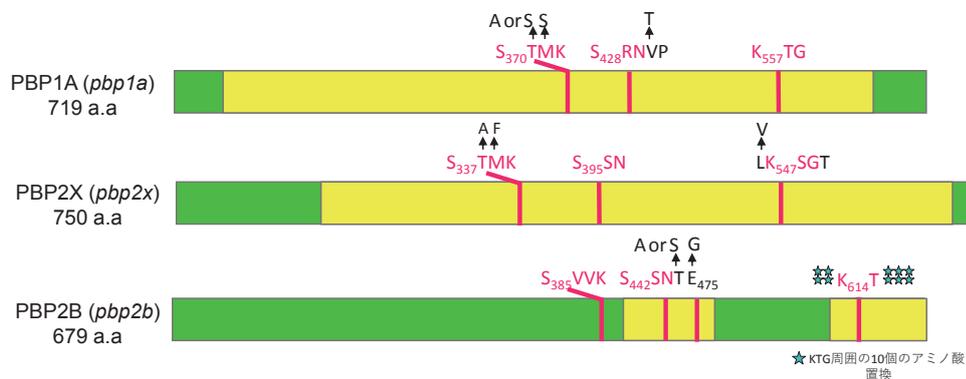
文 献

- 1) Ubukata K, Yamashita N, Konno M. Occurrence of a β -lactam-inducible penicillin binding protein in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; **27**: 851-857.
- 2) Matsuhashi M, Song MD, Ishino F, et al. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1986; **167**: 975-980.
- 3) Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M, et al. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol.* 1989; **171**: 2882-2885.
- 4) 紺野昌俊編. MRSA感染症のすべて(改). 大阪, (株)医薬ジャーナル社; 1993年.
- 5) 紺野昌俊、生方公子共著. (改)ペニシリン耐性肺炎球菌. 東京, (株)協和企画通信; 1999年.
- 6) Ubukata K, Asahi Y, Okuzumi K, et al. Incidence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan, 1993-1995. *J Infect Chemother.* 1996; **1**: 177-184
- 7) Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, et al. Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Infect Chemother.* 1997; **3**: 190-197.
- 8) Asahi Y, Ubukata K. Association of a Thr-371 substitution in a conserved amino acid motif of penicillin-binding protein 1A with penicillin resistance of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; **42**: 2267-2273.
- 9) Asahi Y, Takeuchi Y, Ubukata K. Diversity of substitutions within or adjacent to conserved amino acid motifs of penicillin-binding protein 2X in cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; **43**: 1252-1255.
- 10) Yamane A, Nakano H, Asahi Y, et al. Directly repeated insertion of 9-nucleotide sequence detected in penicillin-binding protein 2B gene of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; **40**: 1257-1259.
- 11) Chiba N, Morozumi M, Ubukata K. Application of the real-time PCR method for genotypic identification of β -lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. *Microb Drug Resist.* 2012; **18**: 149-156.
- 12) Chiba N, Morozumi M, Shouji M, et al. Changes in capsule and drug resistance of pneumococci after introduction of PCV7, Japan, 2010-2013. *Emerg Infect Dis.* 2014. **20**:1132-1139.
- 13) Ubukata K, Chiba N, Hanada S, et al. Serotype changes and drug resistance in invasive pneumococcal diseases in adults after vaccinations in children, Japan, 2010-2013. *Emerg Infect Dis.* 2015; **21**: 1956-1965.
- 14) Ubukata K, Takata M, Morozumi M, et al. Effects of pneumococcal conjugate vaccine on genotypic penicillin resistance and serotype changes, Japan, 2010-2017. *Emerg Infect Dis.* 2018; **24**: 2010-2020.
- 15) Hanada S, Iwata S, Kishi K, et al. Host factors and biomarkers associated with poor outcomes in adults with invasive pneumococcal disease. *PLoS One.* 2016; **11**: e0147877. **24**: 2010-2020.



Ubukata K, et al., *J Infect Chemother.* 1996 ; 2 : 213-221.
 Ubukata K, et al., *J Infect Chemother.* 1997 ; 3 : 190-197.
 紺野昌俊, 生方公子共著。(改)ペニシリン耐性肺炎球菌。(株)協和企画通信。1999年

図5 肺炎球菌におけるβ-ラクタム系薬とその標的であるPBPs機能との関係
 それぞれのPBPをコードする遺伝子に変異が生じると、特徴的な感受性低下と形態変化を生ずる。

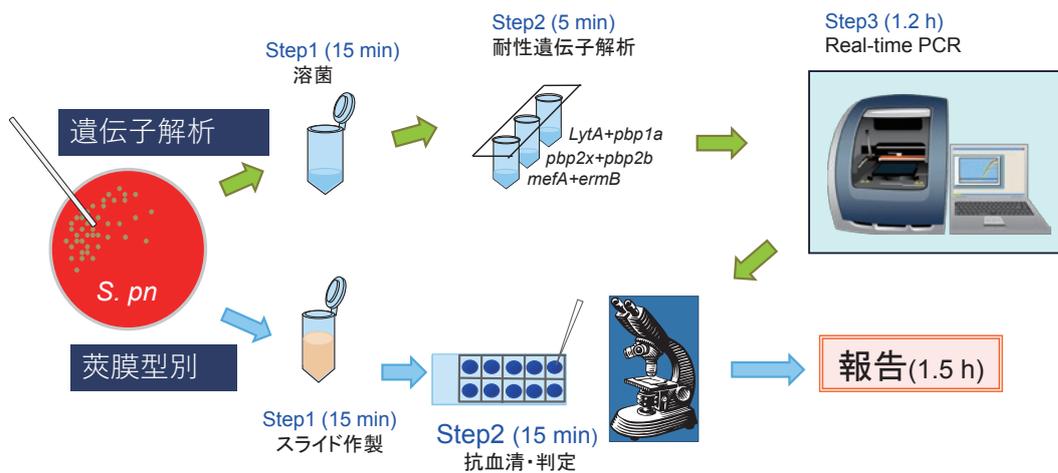


S, Serine; T, Threonine; M, Methionine; K, Lysine; R, Arginine; N, Asparagine; G, Glycine; E, Glutamic acid;
 A, Alanine; F, Phenylalanine; D, Aspartic acid; V, Valine

Asahi Y. et al. *Antimicrob Agents Chemmother.* 1998;42:2267-2273.
 Asahi Y. et al. *Antimicrob Agents Chemmother.* 1999;43:1252-1255.
 Yamane A. et al. *Antimicrob Agents Chemmother.* 1996;40:1257-1259.

図7 β-ラクタム系薬耐性化に関わるPBPsのアミノ酸置換

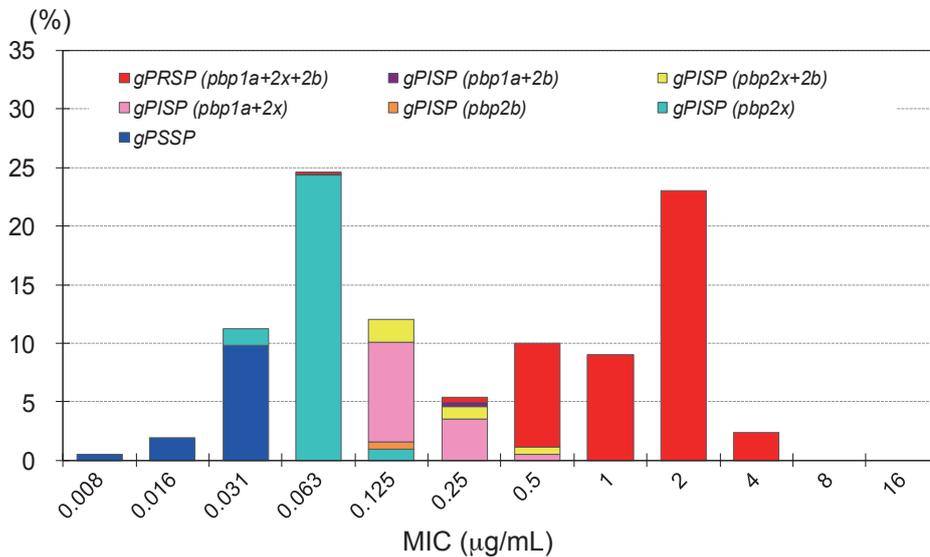
β-ラクタム系薬が各PBPに結合するためには保存性アミノ酸配列(STMK、SS(R)N、KT(S)G)が重要な役割を担っている。特にSTMKのS(serine)はβ-ラクタム環の結合アミノ酸である。保存性アミノ酸配列あるいはその近位アミノ酸が他のアミノ酸へと置換することが耐性化にとって重要である。



Ubukata K. et al. Journal Infect Chemother. 1997;3:190-197.
 Chiba N. et al. Microb drug resist. 2012;18:149-156.

図8 耐性遺伝子と莢膜型別の解析プロトコール

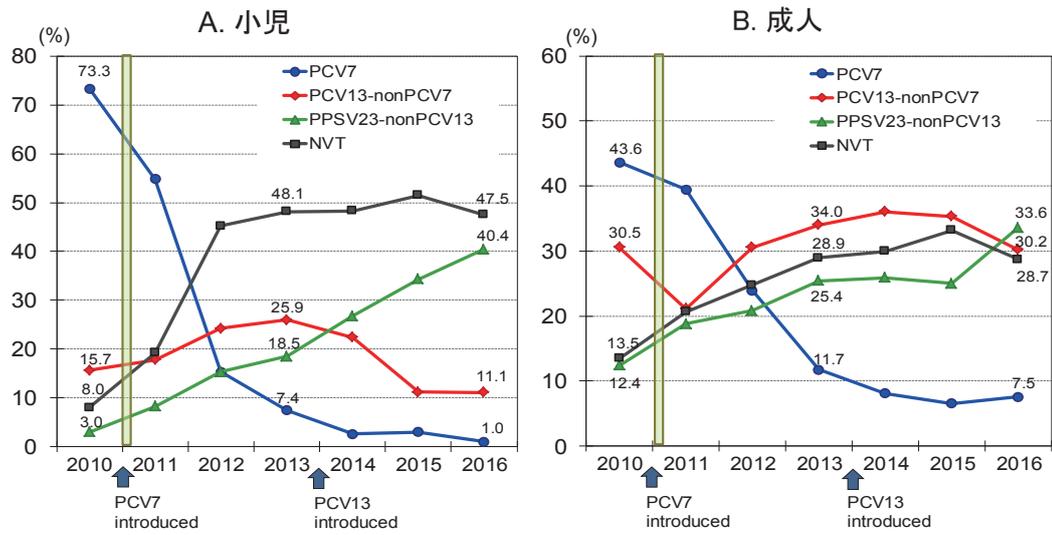
PBPsをコードするそれぞれの遺伝子検索は、多様化する変異に対応するため、耐性化に重要な保存性アミノ酸配列(近位)に変異があるか否かを検出できるように変異のない遺伝子が識別できるように設計している。すなわち、PCRでDNAの増幅が起これば変異がなく、増幅がみられなければ変異があり、耐性に影響するアミノ酸置換があると判断する。



Chiba N, et al. Emerg Infect Dis. 2014;20:1132-1139.

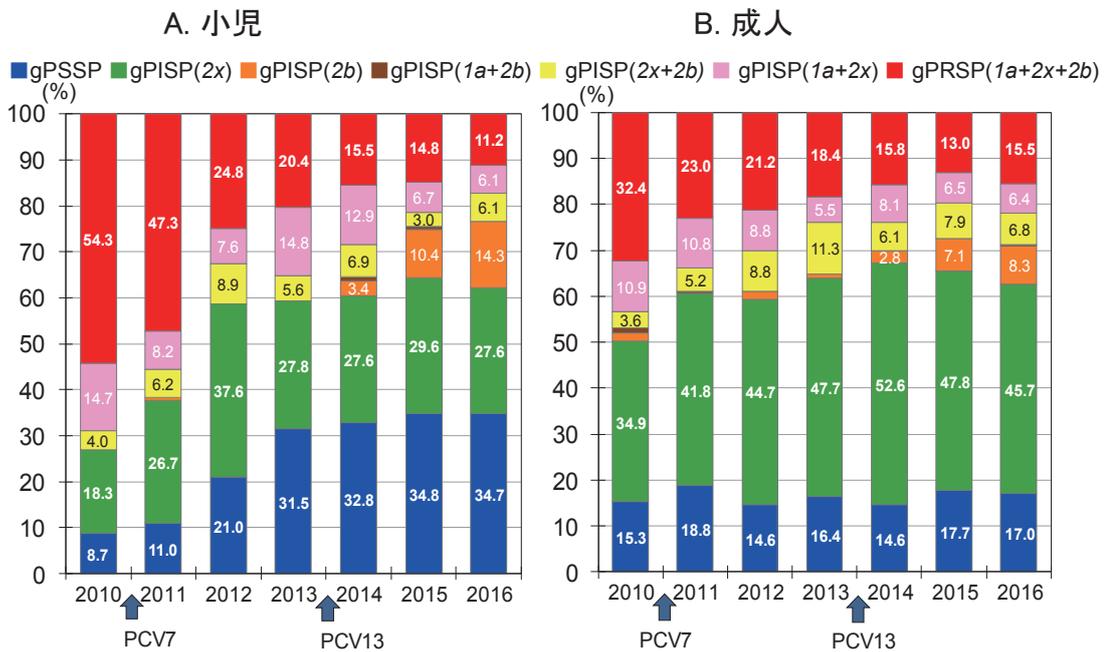
図9 耐性遺伝子とペニシリンG感受性との関係 (n = 633)

セフェム系薬では gPISP (pbp2x) の MIC は 0.125-0.25 μg/mL、gPISP (pbp2b) のそれは 0.063 μg/mL と逆転する。



Ubukata K, et al. Emerg Infect Dis. 2018;24:2010-2020.

図 10 小児への肺炎球菌結合型ワクチン導入後のIPD由来株の莢膜型の変化



Ubukata K, et al. Emerg Infect Dis. 2018;24:2010-2020.

図 11 小児への肺炎球菌結合型ワクチン導入後のIPD由来株における耐性菌の割合の変化