

侵襲性肺炎球菌感染症 病原体検出マニュアル

目次

I. 肺炎球菌概説	• • • 5
II. 培養同定法	• • • 6
1. 培養	
2. 胆汁酸溶解試験	
3. オプトヒン感受性試験	
4. <i>lytA</i> 遺伝子検査	
III. 肺炎球菌の血清型別	• • • 7
1. 莢膜膨化法による血清型別	• • • 7
1. 1. 型別方法	
2. 凝集法による血清型別	• • • 9
2. 1. IMMULEX™ ANTISERA (SSI)	
2. 2. 肺炎球菌莢膜型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)	
3. Multiplex PCR 法による肺炎球菌の血清型判定法	• • • 11
3. 1. 検査材料	
3. 2. DNA 抽出	
3. 3. PCR 反応	
3. 4. 電気泳動	
3. 5. ゲルの染色	
3. 6. 血清型判定	
IV. 薬剤感受性試験	• • • 18
1. 試験法	• • • 18
1. 1. ディスク拡散法	
1. 2. 濃度勾配ストリップ (Etest)	
1. 3. 微量液体希釈法 (96 穴ドライプレートを用いた方法)	
1. 4. 注意事項	
2. 肺炎球菌の薬剤耐性遺伝子検査	• • • 20

2. 1. PCR 法による変異 *pbp* 遺伝子及びマクロライド耐性遺伝子の検出
2. 2. リアルタイム PCR 法による変異 *pbp* 遺伝子及びマクロライド耐性遺伝子の検出
2. 3. 注意事項

V. 分子疫学解析	・・・24
1. Multilocus Sequence Typing (MLST)	・・・24
1. 1. 解析方法	
1. 2. PCR による増幅	
1. 3. ダイレクトシーケンス	
1. 4. 配列データの確認および編集	
1. 5. 公開データベースを利用した ST (sequence type) 番号の検索	
1. 6. MLST 解析用ソフトウェアを利用した ST 番号の検索	
2. 次世代シーケンス	・・・30
2. 1. Library 作成に用いる DNA 精製 (Nextseq500、Miseq、iseq100 共通)	
2. 2. サンプル DNA 濃度の測定および濃度調整 (Nextseq500、Miseq、iseq100 共通)	
2. 3. Illumina Library の作成 (Nextseq500、Miseq、iseq100 共通)	
2. 3. 1. Tagmentation	
2. 3. 2. Amplify Libraries	
2. 3. 3. Clean up	
2. 3. 4. Normalization	
2. 3. 4. 1 Nextseq500、Miseq を用いる場合	
2. 3. 4. 2 iseq100 を用いる場合	
2. 3. 5. Pool Library	
2. 4. Denature and dilute (Nextseq500)	
2. 4. 1. Nextseq500 を使用する場合	

- 2. 4. 2. Miseq を使用する場合
- 2. 4. 3. iseq100 を使用する場合
- 2. 5. 試薬カートリッジの準備
 - 2. 5. 1. Nextseq500 の場合
 - 2. 5. 2. Miseq の場合
 - 2. 5. 3. iseq100 の場合
- 2. 6. Sample sheet の作成
 - 2. 6. 1. Nextseq500、Miseq の場合
 - 2. 6. 2. iseq100 の場合
- 2. 7. fastq.gz ファイルの取得
- 2. 8. トリミング
- 2. 9. アセンブリー
- 2. 10. Web 上での分子疫学情報取得
- 2. 11. 解析内容について

VI. 参考文献	• • • 49
-----------------	----------

VII. 執筆者一覧	• • • 56
-------------------	----------

I. 肺炎球菌概説

肺炎球菌はグラム陽性菌で、主要な呼吸器病原性菌の一つである。本菌は、ヒトの鼻咽頭の常在菌であるが、小児や高齢者では副鼻腔炎、中耳炎、肺炎などの非侵襲性感染症を引き起こす。成人の市中発症肺炎（市中肺炎と医療ケア関連肺炎）の大半は菌血症を伴わない肺炎であり、その原因菌の約 20%が肺炎球菌である（文献 1、2）。肺炎球菌感染症の治療には一般的にペニシリン系抗菌薬が投与されるが、ペニシリン耐性株（penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: PRSP）の検出状況を把握するため、感染症法に基づく感染症発生動向調査（NESID）として、毎月の基幹定点医療機関（全国約 500 か所の病床数 300 以上の医療機関）からの届出・報告による監視が行われている（届出基準については <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-37-01.html> 参照）。また、本菌はときに菌血症を伴う肺炎や髄膜炎などの侵襲性肺炎球菌感染症（invasive pneumococcal disease: IPD）を引き起こすことが知られている。IPD とは通常無菌的であるべき検体から肺炎球菌が分離された疾患を指し、2013 年 4 月より感染症法に基づく五類全数届出の対象疾患となった。感染症法上の届上の定義は、*Streptococcus pneumoniae* による侵襲性感染症として、本菌が髄液または血液などの無菌部位から検出された感染症とされている（届出基準については <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-09-02.html> 参照）。

肺炎球菌は多くの病原因子を持つことが知られているが、その中でも菌体表層の莢膜ポリサッカライド（capsular polysaccharide: CPS）は最も重要な病原因子である（文献 3、4）。それと同時に、CPS は血清型を決定する抗原でもあり、肺炎球菌の血清型は現在までに 100 種類に分類されることが知られている（文献 5）。肺炎球菌による感染症に対する宿主側の主要な感染防御機構は、血清型特異的抗体によって誘導される補体依存的オプソニン活性である（文献 6、7）。現行の肺炎球菌ワクチンにおいても、ワクチン抗原である CPS により血中に誘導された血清型特異的抗体が補体依存性に菌体をオプソニン化し好中球による貪食殺菌作用を増強させることで感染防御効果を発揮すると考えられてい

る（文献 8）。2020 年現在、日本国内において、小児では 13 価肺炎球菌結合型ワクチン（PCV13）、65 歳以上の成人では 23 価肺炎球菌莢膜ポリサッカライドワクチン（PPSV23）が定期接種ワクチンとなっている。これらのワクチンに含まれる各血清型の CPS により誘導された血清型特異的抗体は同じ血清型の肺炎球菌に対してのみ感染防御効果を発揮することが明らかになっている。

肺炎球菌の同定には、血液寒天培地上での溶血型別試験（ α 溶血）、胆汁酸溶解試験、オプトヒン感受性試験、*lytA* 遺伝子の *Bsa*AI 制限酵素切断試験等が用いられている（文献 9、10）。また、上述したようにワクチンで予防できる肺炎球菌は特定の血清型に限定されるため、ワクチンの予防効果を評価するためには血清型を決定することが重要となる。血清型別法には、各血清型に特異的な抗 CPS 血清を用いた莢膜膨化法・凝集法、および Multiplex PCR 法が使われている（文献 11-13）。さらに、疫学調査に必要な系統解析法には、Multilocus sequence typing (MLST) が主に用いられ（文献 14、15）、近年では全ゲノム解析も普及しつつある（文献 16）。

II. 培養同定法

1. 培養

肺炎球菌はカタラーゼ陰性のグラム陽性球菌である。5%ヒツジ血液寒天培地で、35～37℃、5% CO₂ 下で一晩培養後に、直径 1～2 mm の α 溶血のコロニーを形成する。チョコレート寒天培地にも生育可能である。同定はオプトヒン感受性試験、胆汁酸溶解試験または *lytA* 遺伝子を利用した検査によって行われる。

2. 胆汁酸溶解試験

10%デオキシコール酸ナトリウム（ナカライテスク株式会社 Cat. 10712-54 または同等品）水溶液を菌液に数滴加えると肺炎球菌であれば、通常、数秒から数十秒で菌の溶解による濁度の低下がみられる。

3. オプトヒン感受性試験

純粋培養した肺炎球菌を均一に塗布した5%ヒツジ血液寒天培地にオプトヒンディスク（栄研化学）を置き、大気、35～37℃で一晩培養。肺炎球菌はオプトヒンディスクの周辺に 14 mm 以上の阻止円をつくる。

胆汁酸溶解試験とオプトヒン感受性試験の結果が一致しないときは、前者の結果を優先する。

4. *lytA* 遺伝子検査

参考文献 1 に従い、*lytA* 遺伝子を増幅し、制限酵素 *Bsa*AI で切断後に、その泳動パターンにより、肺炎球菌の同定を行う。

Ⅲ. 肺炎球菌の血清型別

肺炎球菌の血清型別には、莢膜膨化法、スライド凝集法、PCR 法などが用いられる。それぞれの方法には長所と短所があり、実際の状況に応じて解析方法を選択する必要がある。5%ヒツジ血液寒天培地（Columbia 羊血液寒天培地 BD Cat. 251165 または TSA 羊血液寒天培地 BD Cat. 251239）にて 35-37℃、5% CO₂ 下で一晩培養した肺炎球菌を使用する。

1. 莢膜膨化法による血清型別

この方法は特異的抗莢膜血清（SSI Diagnostica 社、以下 SSI）を用いた膨化法による型別である。肺炎球菌を血清型別する方法の中でもっとも伝統的で、標準法とされている。現在、14 個のプール血清（A, B, C, D, E, F, G, H, I および P, Q, R, S, T）、25 個の型血清（1, 2, 3, 4, 5, 8, 13, 14, 20, 21, 27, 29, 31, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 48 型）、21 個のグループ血清（グループ 6, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 25, 28, 32, 33, 35, 41, 47）および 65 個のファクター血清（ファクター 6a, 6b, 6c, 6d, 7b, 7c, 7e, 7f, 7h, 9b, 9d, 9e, 9g, 10b, 10d, 10f, 11b, 11c, 11f, 11g, 12b, 12c, 12e, 15b, 15c, 15e, 15f, 16b, 16c, 17b, 17c, 18c, 18d, 18e, 18f, 19b, 19c, 19f, 20b, 22b, 22c, 23b, 23c, 23d, 24c, 24d, 24e, 15b, 25c, 28b, 28c, 29b, 32a, 32b, 33b, 33e, 33f, 35a, 35b, 35c, 41a, 41b, 42a, 43b, 47a）が販売されている。

表Ⅲ-1. プール血清に含む型およびグループ血清

プール	P	Q	R	S	T	非 PPSV23 型/グループ
A	1	18*	4	5	2	
B	19*	6*	3	8		
C	7*				20	24*, 31, 40
D			9*		11*	16*, 36, 37
E			12*	10*	33*	21, 39
F				17*	22*	27, 32*, 41*
G						29, 34, 35*, 42, 47*
H	14	23*		15*		13, 28*
I						25*, 38, 43, 44, 45, 46, 48

* : グループ血清

1. 1. 型別方法

- ① 5%ヒツジ血液寒天培地で35～37℃、5% CO₂下で一晩培養した肺炎球菌を、PBS にMcFarland 2～3 となるように懸濁した菌液を用いる。
- ② スライドグラス上で、肺炎球菌菌液、特異的抗血清、メチレンブルー溶液をそれぞれ 1 μl ずつ混合し、光学顕微鏡（×1,000 倍）で検鏡する。抗血清はプール血清、型血清およびグループ血清、ファクター血清の順に使用する。
- ③ 肺炎球菌の莢膜抗原と抗血清に反応が起こらなければ、メチレンブルーで染色された菌体のみが見られ（図Ⅲ-1. A）、莢膜抗原と抗血清が反応している場合は、莢膜に型特異抗体が結合することによる莢膜の膨化（Quellung 反応）が見られる（図Ⅲ-1. B）。

膨化法による血清型決定では、現在 91 種類の血清型を同定することが可能である。一検体当たりの検査コストは比較的安価であるが、すべての抗血清を購入するためには高額な費用がかかる。同定する血清型が決まっている場合には、その血清型に応じた抗血清が購入可能である。商品の詳細については、SSI の Web サ

イト (<https://www.ssidiagnostica.com/antisera/pneumococcus-antisera/>)
を参照のこと。

2. 凝集法による血清型別

この方法は抗莢膜血清（SSI またはデンカ生研製）を用いた凝集による型別である。

2. 1. IMMULEX™ ANTISERA (SSI)

SSI ではラテックス凝集法で肺炎球菌を血清型別できる抗血清 IMMULEX™ PNEUMOTEST Kit および IMMULEX™ PNEUMOCOCCUS ANTISERA を販売している。IMMULEX™ PNEUMOTEST Kit には 14 個のプール血清（A, B, C, D, E, F, G, H, I および P, Q, R, S, T）のみ、IMMULEX™ PNEUMOCOCCUS ANTISERA には 14 のプール血清に加えて、7 個の型/グループ血清（1, 3, 4, 5, 14, 38, 25）および 15 個のファクター血清（6b, 6c, 7b, 9g, 15b, 15c, 15e, 15h, 18c, 18f, 19b, 19c, 23b, 25b, 25c）が含まれている。

型別方法

- ① 5%ヒツジ血液寒天培地で35-37℃、5% CO2下で一晩培養した肺炎球菌を、PBSに懸濁し菌液とする。
- ② 白いカード（SSI から購入可能）の上に、同量の抗血清と肺炎球菌の菌液（熟練度合いにより 2～10 μl ずつ）を混合し、5-10 秒で凝集の判定を行う。反応は、プール血清、型血清およびグループ血清、ファクター血清の順に行う。

14 個のプール血清（A-I および P-T）を使用することにより、PPSV23 に含まれる血清型/グループを同定することが可能である（表 III-1）。IMMULEX™ PNEUMOCOCCUS ANTISERA を使用することにより、PCV7、PCV10 および PCV13 に

含まれる血清型を判別できる。商品の詳細について、SSI の Web サイトを参照のこと。

2. 2. 肺炎球菌莢膜型別用免疫血清「生研」(デンカ生研)

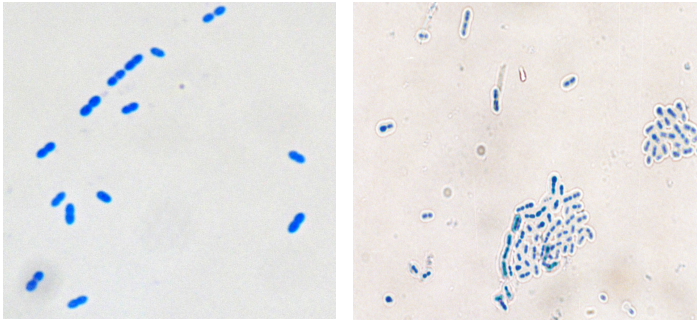
デンカ生研は凝集法で肺炎球菌を血清型別できる抗血清、『肺炎球菌莢膜型別用免疫血清「生研」』を販売している。8 個の混合血清 (混合 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) と 39 個の単味血清 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 46, 47 型/グループ) が含まれている。

型別方法

- ① 5%ヒツジ血液寒天培地で 35~37℃、5% CO₂ 下で一晩培養した肺炎球菌を、生理食塩水に濃厚に懸濁し、菌液とする。型別を行う菌体は、新鮮で溶菌を起こしていないものを用いる。溶菌現象を生じるなど培養が古いものは偽陽性または偽陰性となることがあり、使用してはならない。
- ② 分画スライドガラスの上方に抗血清、下方に菌液をおき、1 分間よく混合し、凝集の有無を判別する。反応は、混合血清、型血清およびグループ血清の順に行う。

肺炎球菌莢膜型別用免疫血清「生研」を使用することにより、試薬キットに含まれる 39 個の血清型/グループを同定することが可能であるが、SSI のファクター血清に相当するものはない。また、6C 型は混合血清・6 型血清ともに凝集しない、ムコイド状の 3 型で凝集が弱いことがあるなどの点に注意を要する。

日本国内のメーカーのため、試薬の入手がしやすく、SSI より安価であるという利点がある。しかし、偽陽性と偽陰性が出るケースがあるため、必ず SSI の抗血清または PCR 法による判別法での確認が必要である。商品の詳細について、添付文書を参照のこと。



図Ⅲ-1. A. 莢膜膨化反応陰性、B. 莢膜膨化反応陽性

3. Multiplex PCR 法による肺炎球菌の血清型判定法

3. 1. 検査材料

5%ヒツジ血液寒天培地 (Columbia 羊血液寒天培地 BD Cat. 251165 または TSA 羊血液寒天培地 BD Cat. 251239) にて 35~37°C、5% CO₂ 下で一晩培養した菌株を用いる。

3. 2. DNA 抽出

上記の菌株を用いて、DNA を抽出する。一例として、High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Cat. 11732668001) を使用した抽出法を下記に示す。

- ① Elution buffer を 80 μ l、10% デオキシコール酸ナトリウム(富士フィルム 和光純薬 Cat. 190-08313) 溶液を 20 μ l、1.5 mL エッペンドルフチューブに入れる。ここに、McFarland 0.5~2.0 となるよう菌体を懸濁する。
- ② 室温にて 10~30 分インキュベートする。
- ③ サンプルの数だけ 2 ml の蓋なしチューブ(未滅菌)を準備し、これに High Pure PCR Product Purification Kit 中のシリカカップをセットする。これとは別に 2 ml の蓋なしチューブをサンプルあたり 2 本用意する。
- ④ ディスペンサーを用いて、500 μ l の Binding Buffer と菌液を混合し、シリカカップにアプライし、シリカカップの蓋をする。
- ⑤ サンプルを安全キャビネットから出し、微量高速遠心機を用い、15,000 rpm で 30 秒遠心する。

- ⑥ サンプルを安全キャビネット内に戻し、シリカカップを新しい2 ml チューブに移す。液の入った2 ml チューブは感染性廃棄物として処理する。
- ⑦ シリカカップの蓋を開け、500 μ l の Washing Buffer を入れる。シリカカップの蓋をする。
- ⑧ サンプルを安全キャビネットから出し、微量高速遠心機を用い、15,000 rpm で30秒遠心する。
- ⑨ サンプルを安全キャビネット内に戻し、シリカカップを新しい2 ml チューブに移す。液の入った2 ml チューブは感染性廃棄物として処理する。
- ⑩ シリカカップの蓋を開け、200 μ l の Washing Buffer を入れる。シリカカップの蓋をする。
- ⑪ サンプルを安全キャビネットから出し、微量高速遠心機を用い、15,000 rpm で30秒遠心する。
- ⑫ サンプルを安全キャビネット内に戻し、シリカカップを新しい1.5 ml エッペンドルフチューブに移す。液の入った2 ml チューブは感染性廃棄物として処理する。
- ⑬ シリカカップの蓋を開け、50 μ l の Elution buffer を入れる。シリカカップの蓋をする。
- ⑭ サンプルを安全キャビネットから出し、70°Cのヒートブロックに載せ、10分間インキュベートする。
- ⑮ サンプルを微量高速遠心機に移してすぐに、15,000 rpm で30秒遠心する。
- ⑯ シリカカップを取り除き、1.5 ml のチューブに菌株の番号をラベルする。抽出したDNA溶液0.5~1.0 μ l をPCRのテンプレートとして用いる。DNA溶液は4°Cまたは冷凍にて保存する。

3. 3. PCR 反応

米国疾病管理予防センター (CDC) ホームページ¹⁾を参考に、QIAGEN Multiplex PCR Kit (キアゲン Cat. 206143) を用いて、8セットの Multiplex PCR を行う。プライマー配列は表III-2、各 PCR 反応セットの組成は表III-3に示す。

なお、PCRキットはQIAGEN Multiplex PCR Plus Kit (キアゲン Cat. 206152) を用いることもできるが、PCRの条件などに違いがあるためメーカーのプロトコールを元に調整が必要である。

Multiplex PCR 条件

95°C	15分	
95°C	30秒	} 35回
54°C	90秒	
72°C	60秒	
72°C	10分	

必要に応じて、DNAの量およびアニーリング温度を調整する。

3. 4. 電気泳動

10 µl の PCR 産物に 2 µl の 6x loading buffer を添加し、1 x TBE で作成した 2 % Nusieve™ 3:1 Agarose gel (ロンザ Cat. 50091) で、50 V、1.5 時間泳動を行う。マーカーとしては 50 bp DNA ladder (ニュー・イングランド・バイオラボ Cat. N3236S) を用いる。

3. 5. ゲルの染色

泳動後、0.5 µg/ml EtBr 液に 30 分染色後、水で 10 分洗い、ゲル撮影装置で撮影する。

3. 6. 血清型判定

陽性になった PCR 産物のサイズに応じて、血清型を判定する。反応 1 の血清型 6 が陽性の場合は、引き続き反応 6CD を行い、6A/6B または 6C/6D を区別する。

表III-2：肺炎球菌血清型判定用プライマー配列

プライマー名	配列	PCR 産物サイズ (bp)
1-f 1-r	CTC TAT AGA ATG GAG TAT ATA AAC TAT GGT TA CCA AAG AAA ATA CTA ACA TTA TCA CAA TAT TGG C	280
2-f 2-r	TAT CCC AGT TCA ATA TTT CTC CAC TAC ACC ACA CAA AAT ATA GGC AGA GAG AGA CTA CT	290
3-f 3-r	ATG GTG TGA TTT CTC CTA GAT TGG AAA GTA G CTT CTC CAA TTG CTT ACC AAG TGC AAT AAC G	371
4-f 4-r	CTG TTA CTT GTT CTG GAC TCT CGA TAA TTG G GCC CAC TCC TGT TAA AAT CCT ACC CGC ATT G	430
5-f 5-r	ATA CCT ACA CAA CTT CTG ATT ATG CCT TTG TG GCT CGA TAA ACA TAA TCA ATA TTT GAA AAA GTA TG	362
6A/6B/6C/6D-f 6A/6B/6C/6D-r	AAT TTG TAT TTT ATT CAT GCC TAT ATC TGG TTA GCG GAG ATA ATT TAA AAT GAT GAC TA	250
6C/6D-f 6C/6D-r	CAT TTT AGT GAA GTT GGC GGT GGA GTT AGC TTC GAA GCC CAT ACT CTT CAA TTA	727
7C/(7B/40)-f 7C/(7B/40)-r	CTA TCT CAG TCA TCT ATT GTT AAA GTT TAC GAC GGG A GAA CAT AGA TGT TGA GAC ATC TTT TGT AAT TTC	260
7F/7A-f 7F/7A-r	TCC AAA CTA TTA CAG TGG GAA TTA CGG ATA GGA ATT GAG ATT GCC AAA GCG AC	599
8-f 8-r	GAA GAA ACG AAA CTG TCA GAG CAT TTA CAT CTA TAG ATA CTA GTA GAG CTG TTC TAG TCT	201
9N/9L-f 9N/9L-r	GAA CTG AAT AAG TCA GAT TTA ATC AGC ACC AAG ATC TGA CGG GCT AAT CAA T	516
9V/9A-f 9V/9A-r	GGG TTC AAA GTC AGA CAG TGA ATC TTA A CCA TGA ATG AAA TCA ACA TTG TCA GTA GC	816
10A-f 10A-r	GGT GTA GAT TTA CCA TTA GTG TCG GCA GAC GAA TTT CTT CTT TAA GAT TCG GAT ATT TCT C	628
10F/(10C/33C)-f 10F/(10C/33C)-r	GGA GTT TAT CGG TAG TGC TCA TTT TAG CA CTA ACA AAT TCG CAA CAC GAG GCA ACA	248
11A/11D-f 11A/11D-r	GGA CAT GTT CAG GTG ATT TCC CAA TAT AGT G GAT TAT GAG TGT AAT TTA TTC CAA CTT CTC CC	463
12F/(12A/44/46)-f 12F/(12A/44/46)-r	GCA ACA AAC GGC GTG AAA GTA GTT G CAA GAT GAA TAT CAC TAC CAA TAA CAA AAC	376
13-f 13-r	TAC TAA GGT AAT CTC TGG AAA TCG AAA GG CTC ATG CAT TTT ATT AAC CGC TTT TTG TTC	655
14-f 14-r	GAA ATG TTA CTT GGC GCA GGT GTC AGA ATT GCC AAT ACT TCT TAG TCT CTC AGA TGA AT	189
15A/15F-f 15A/15F-r	ATT AGT ACA GCT GCT GGA ATA TCT CTT C GAT CTA GTG AAC GTA CTA TTC CAA AC	434
15B/15C-f 15B/15C-r	TTG GAA TTT TTT AAT TAG TGG CTT ACC TA CAT CCG CTT ATT AAT TGA AGT AAT CTG AAC C	496

プライマー名	配列	PCR 産物サイズ (bp)
16F-f	GAA TTT TTC AGG CGT GGG TGT TAA AAG	717
16F-r	CAG CAT ATA GCA CCG CTA AGC AAA TA	
17F-f	TTC GTG ATG ATA ATT CCA ATG ATC AAA CAA GAG	693
17F-r	GAT GTA ACA AAT TTG TAG CGA CTA AGG TCT GC	
18/(18A/18B/18C/18F)-f	CTT AAT AGC TCT CAT TAT TCT TTT TTT AAG CC	573
18/(18A/18B/18C/18F)-r	TTA TCT GTA AAC CAT ATC AGC ATC TGA AAC	
19A-f	GAG AGA TTC ATA ATC TTG CAC TTA GCC A	566
19A-r	CAT AAT AGC TAC AAA TGA CTC ATC GCC	
19F-f	GTT AAG ATT GCT GAT CGA TTA ATT GAT ATC C	304
19F-r	GTA ATA TGT CTT TAG GGC GTT TAT GGC GAT AG	
20-f	GAG CAA GAG TTT TTC ACC TGA CAG CGA GAA G	514
20-r	CTA AAT TCC TGT AAT TTA GCT AAA ACT CTT ATC	
21-f	CTA TGG TTA TTT CAA CTC AAT CGT CAC C	192
21-r	GGC AAA CTC AGA CAT AGT ATA GCA TAG	
22F/22A-f	GAG TAT AGC CAG ATT ATG GCA GTT TTA TTG TC	643
22F/22A-r	CTC CAG CAC TTG CGC TGG AAA CAA CAG ACA AC	
23A-f	TAT TCT AGC AAG TGA CGA AGA TGC G	722
23A-r	CCA ACA TGC TTA AAA ACG CTG CTT TAC	
23B-f	CCA CAA TTA GCG CTA TAT TCA TTC AAT CG	199
23B-r	GTC CAC GCT GAA TAA AAT GAA GCT CCG	
23F-f	GTA ACA GTT GCT GTA GAG GGA ATT GGC TTT TC	384
23F-r	CAC AAC ACC TAA CAC TCG ATG GCT ATA TGA TTC	
24/(24A/24B/24F)-f	GCT CCC TGC TAT TGT AAT CTT TAA AGA G	99
24/(24A/24B/24F)-r	GTG TCT TTT ATT GAC TTT ATC ATA GGT CGG	
31-f	GGA AGT TTT CAA GGA TAT GAT AGT GGT GGT GC	701
31-r	CCG AAT AAT ATA TTC AAT ATA TTC CTA CTC	
33F/(33A/37)-f	GAA GGC AAT CAA TGT GAT TGT GTC GCG	338
33F/(33A/37)-r	CTT CAA AAT GAA GAT TAT AGT ACC CTT CTA C	
34-f	GCT TTT GTA AGA GGA GAT TAT TTT CAC CCA AC	408
34-r	CAA TCC GAC TAA GTC TTC AGT AAA AAA CTT TAC	
35A/(35C/42)-f	ATT ACG ACT CCT TAT GTG ACG CGC ATA	280
35A/(35C/42)-r	CCA ATC CCA AGA TAT ATG CAA CTA GGT T	
35B-f	GAT AAG TCT GTT GTG GAG ACT TAA AAA GAA TG	677
35B-r	CTT TCC AGA TAA TTA CAG GTA TTC CTG AAG CAA G	
35F/47F-f	GAA CAT AGT CGC TAT TGT ATT TTA TTT AAA GCA A	517
35F/47F-r	GAC TAG GAG CAT TAT TCC TAG AGC GAG TAA ACC	
38/25F/25A-f	CGT TCT TTT ATC TCA CTG TAT AGT ATC TTT ATG	574
38/25F/25A-r	ATG TTT GAA TTA AAG CTA ACG TAA CAA TCC	
39-f	TCA TTG TAT TAA CCC TAT GCT TTA TTG GTG	98
39-r	GAG TAT CTC CAT TGT ATT GAA ATC TAC CAA	
<i>cpsA</i> -f	GCA GTA CAG CAG TTT GTT GGA CTG ACC	160
<i>cpsA</i> -r	GAA TAT TTT CAT TAT CAG TCC CAG TC	

cps PCR は陽性コントロールである

表III-3. 各 PCR 反応セットの組成

反応 1	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	6(6A/6B/6C/6D)-f (25 μ M)	0.3 μ L	250
	6(6A/6B/6C/6D)-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	3-f (25 μ M)	0.3 μ L	371
	3-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	19A-f (25 μ M)	0.3 μ L	566
	19A-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	22F/22A-f (25 μ M)	0.5 μ L	643
	22F/22A-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	16-f (25 μ M)	0.4 μ L	717
	16-r (25 μ M)	0.4 μ L	
	PCR 用水	7.7 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 2	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	8-f (25 μ M)	0.2 μ L	201
	8-r (25 μ M)	0.2 μ L	
	33F/(33A/37)-f (25 μ M)	0.3 μ L	338
	33F/(33A/37)-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	15A/15F-f (25 μ M)	0.3 μ L	434
	15A/15F-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	7F/7A-f (25 μ M)	0.4 μ L	599
	7F/7A-r (25 μ M)	0.4 μ L	
	23A-f (25 μ M)	0.5 μ L	722
	23A-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	PCR 用水	7.9 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 6CD	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	6(6A/6B/6C/6D)-f (25 μ M)	0.3 μ L	250
	6(6A/6B/6C/6D)-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	6C/6D-f (25 μ M)	0.5 μ L	727
	6C/6D-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	PCR 用水	9.7 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 3	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	19F-f (25 μ M)	0.5 μ L	304
	19F-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	12F/(12A/44/46)-f (25 μ M)	0.5 μ L	376
	12F/(12A/44/46)-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	11A/11D-f (25 μ M)	0.3 μ L	463
	11A/11D-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	38/25F/25A-f (25 μ M)	0.3 μ L	574
	38/25F/25A-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	35B-f (25 μ M)	0.5 μ L	677
	35B-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	PCR 用水	7.1 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 4	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	24/(24A/24B/24F)-f (25 μ M)	0.2 μ L	99
	24/(24A/24B/24F)-r (25 μ M)	0.2 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	7C/(7B/40)-f (25 μ M)	0.3 μ L	260
	7C/(7B/40)-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	4-f (25 μ M)	0.3 μ L	430
	4-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	18/(18A/18B/18C/18F)-f (25 μ M)	0.3 μ L	573
	18/(18A/18B/18C/18F)-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	9V/9A-f (25 μ M)	0.5 μ L	816
	9V/9A-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	PCR 用水	8.1 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 5	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	14-f (25 μ M)	0.3 μ L	189
	14-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	1-f (25 μ M)	0.3 μ L	280
	1-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	23F-f (25 μ M)	0.5 μ L	384
	23F-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	15B/15C-f (25 μ M)	0.3 μ L	496
	15B/15C-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	10A-f (25 μ M)	0.5 μ L	628
	10A-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	PCR 用水	7.5 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 6	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	39-f (25 μ M)	0.2 μ L	98
	39-r (25 μ M)	0.2 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	10F/(10C/33C)-f (25 μ M)	0.3 μ L	248
	10F/(10C/33C)-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	5-f (25 μ M)	0.3 μ L	362
	5-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	35F/47F-f (25 μ M)	0.3 μ L	517
	35F/47F-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	17F-f (25 μ M)	0.5 μ L	693
	17F-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	PCR 用水	8.1 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 7	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	23B-f (25 μ M)	0.2 μ L	199
	23B-r (25 μ M)	0.2 μ L	
	35A/(35C/42)-f (25 μ M)	0.3 μ L	280
	35A/(35C/42)-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	34-f (25 μ M)	0.3 μ L	408
	34-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	9N/9L-f (25 μ M)	0.5 μ L	516
	9N/9L-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	31-f (25 μ M)	0.5 μ L	701
	31-r (25 μ M)	0.5 μ L	
	PCR 用水	7.7 μ L	
	総量	25 μ L	

反応 8	成分	添加量	PCR 産物 サイズ (bp)
	2X PCR Buffer (QIAGEN Multiplex PCR Kit cat#206143)	12.5 μ L	
	ゲノム DNA	1 μ L	
	<i>cpsA</i> -f (25 μ M)	0.1 μ L	160
	<i>cpsA</i> -r (25 μ M)	0.1 μ L	
	21-f (25 μ M)	0.2 μ L	192
	21-r (25 μ M)	0.2 μ L	
	2-f (25 μ M)	0.3 μ L	290
	2-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	20-f (25 μ M)	0.3 μ L	514
	20-r (25 μ M)	0.3 μ L	
	13-f (25 μ M)	0.4 μ L	655
	13r (25 μ M)	0.4 μ L	
	PCR 用水	8.9 μ L	
	総量	25 μ L	

IV. 薬剤感受性試験

肺炎球菌においては、β-ラクタム系、マクロライド系、フルオロキノロン系等の薬剤に対する耐性が報告されている。分離菌株の薬剤感受性を把握することは临床上重要である。ペニシリン及び一部のセフェム系薬剤に対しては髄液由来と髄液以外由来では異なるブレイクポイントが設定されているため注意が必要である（表IV-1）。

表IV-1. 肺炎球菌におけるペニシリンのブレイクポイント（CLSI M100-ED30:2020）

菌株の由来	カテゴリと MIC ブレイクポイント ($\mu\text{g/mL}$)		
	S	I	R
髄液	≤ 0.06	—	≥ 0.12
髄液以外	≤ 2	4	≥ 8

1. 試験法

1.1. ディスク拡散法（以下はオキサシリン感受性試験について記述しているが、他の薬剤も同様に実施可能）

- ① 薬剤ディスクを室温に戻しておく。
- ② 5%ヒツジ血液寒天培地で35～37℃、5% CO₂下で一晩培養した肺炎球菌を、滅菌生理食塩水またはトリプトソイブイオンに McFarland 0.5 となるように懸濁させ菌液とする。菌液は調製後 15 分以内に使用する。
- ③ 滅菌綿棒を菌液に浸漬する。試験管内壁に軽く押し付けて余剰の菌液を除く。
- ④ 綿棒で菌液を 5% 羊血液加ミュラーヒントン寒天培地に均一に塗抹する。全面に塗抹後シャーレを約 60 度ずつ回転させ、さらに 2 回塗抹する。
- ⑤ 菌液を塗抹した寒天培地は、3～5 分静置し、表面を乾燥させる。
- ⑥ 培地表面に 1 μg オキサシリンディスクを置く。
- ⑦ シャーレを裏返し、35±2℃、5% CO₂ 下で 20～24 時間培養する。
- ⑧ 培養後、ディスク周囲に形成された発育阻止円の直径を計測する。

- ⑨ 阻止円径が 20 mm 以上であれば、ペニシリン感受性肺炎球菌 (PSSP)、19 mm 以下であればペニシリン低感受性または耐性肺炎球菌と判定する。ペニシリン耐性であるかを判断する際には、微量液体希釈法等により得られた MIC を用いるのが望ましい。

1. 2. 濃度勾配ストリップ (Etest)

- ① Etest (ビオメリュー) のストリップは室温に戻しておく。
- ② 5%ヒツジ血液寒天培地で35~37℃、5% CO₂下で一晩培養した肺炎球菌を、BHIブイヨンまたはミュラーヒントンブイヨンに McFarland 0.5になるように懸濁し菌液とする。菌液は調製後 15 分以内に使用する。
- ③ 滅菌綿棒を菌液に浸漬する。試験管内壁に軽く押し付けて余剰の菌液を除く。
- ④ 綿棒で菌液を 5% 羊血液加ミュラーヒントン寒天培地に均一に塗抹する。全面に塗抹後シャーレを約 60 度ずつ回転させ、さらに 2 回塗抹する。
- ⑤ 菌液を塗抹した寒天培地は、3~5 分静置し、表面を乾燥させる。
- ⑥ 菌を塗布した寒天培地にストリップを配置する。
- ⑦ シャーレを裏返し、35±2℃、5% CO₂ 下で 20~24 時間培養する。
- ⑧ 培養後、発育阻止円とストリップの交点の濃度を読み取り、MIC を判定する。

1. 3. 微量液体希釈法 (96 穴ドライプレートを用いた方法)

- ① ストレプト・ヘモサプリメント (栄研化学) のバイアルに滅菌精製水 5.5 ml を加え、溶解させる。
- ② ミュラーヒントンブイヨン 12 ml に①のサプリメント溶解液を 1 ml 加える。
- ③ 血液寒天培地で一晩培養した肺炎球菌を、滅菌生理食塩水にMcFarland 1となるように懸濁し菌液とする。
- ④ ②で作製したサプリメント加ミュラーヒントンブイヨン (全量) に ③ の菌液を 25 µl 加え、よく混和し接種用菌液とする。
- ⑤ 接種用菌液をドライプレート (栄研化学 製品コード: 9DDP44) の各ウェル

に 100 μlずつ分注し、プレート用のふたを被せる。

- ⑥ 35±2°C、好気条件下で 20～24 時間培養する。
- ⑦ 培養後、ドライプレートをリーディングミラー等に乗せ、下方向から菌の発育の有無を観察する。
- ⑧ 被検菌の発育を阻止した最小の薬剤希釈濃度を最小発育阻止濃度（MIC）とする。

1. 4. 注意事項

- ① 以上の作業は BSL2 の施設を備えた細菌検査室で実施する。
- ② 定期的に精度管理株である *S. pneumoniae* ATCC49619 株を用いて阻止円径やMICを測定し、表IV-2に示した基準値内であることを確認する。

表IV-2. 精度管理株（ATCC49619株）の精度管理限界値

薬剤名	ディスク拡散法 (mm)	微量液体希釈法 (μg/ml)
ペニシリン	24-30	0.25-1
オキサシリン	≤12	—
セフトキシム	31-39	0.03-0.12
クラリスロマイシン	25-31	0.03-0.12
レボフロキサシン	20-25	0.5-2
メロペネム	28-35	0.03-0.25
バンコマイシン	20-27	0.12-0.5

(CLSI M100-ED30:2020より抜粋)

2. 肺炎球菌の薬剤耐性遺伝子検査

ペニシリン耐性肺炎球菌 (PRSP) は肺炎球菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンの生合成に関与する 3 種類のペニシリン結合蛋白をコードする遺伝子 (*pbp1a*, *pbp2x*, *pbp2b*) の変異によるものである。耐性度が高い菌株では複数の遺伝子に変異を持つ菌株が多い。一方、*mefA* および *ermB* はマクロライド耐性に関与する遺伝子である。

2. 1. PCR 法による変異*pbp* 遺伝子及びマクロライド耐性遺伝子の検出

市販の DNA 抽出キット等により、菌株から抽出した DNA を Template として用いる（Ⅲ-3. 2. DNA抽出に準拠）。下記の表Ⅲ-3のプライマーを用いて常法に従い PCR を実施する。また、1 本のチューブで 2 領域を同時に検出することが可能である（A：*lytA*+*pbp1a*、B：*pbp2x*+*pbp2b*、C：*mefA*+*ermB*）。反応終了後は 3% アガロースゲルで電気泳動を実施し、増幅産物の有無とサイズを確認する。本方法では *lytA*、*mefA* および *ermB* は当該配列が増幅された場合を陽性とする。また、*pbp1a*、*pbp2x* および *pbp2b* 領域は、耐性遺伝子変異が無い菌株で増幅されるように設計されており、遺伝子変異を有する菌株では増幅しない。結果判定は、図Ⅳ-1および表Ⅳ-4に準じる。

表Ⅳ-3. 耐性遺伝子検出 PCR 用プライマー配列

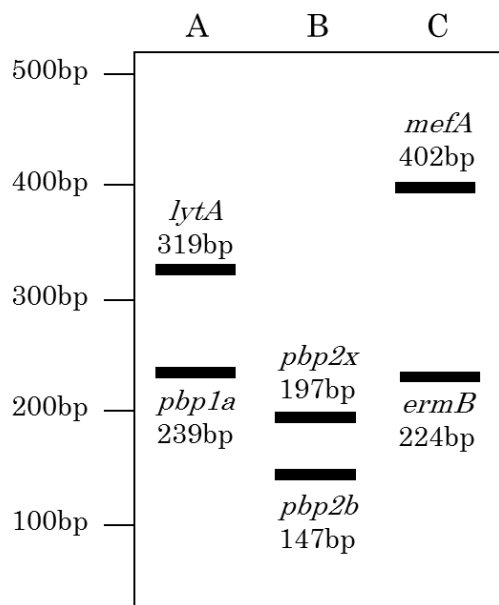
遺伝子	プライマー配列 (5' →3')	増幅 サイズ	標的アミノ 酸変異*	
<i>lytA</i>	Forward	CAACCGTACAGAATGAAGCGG	319 bp	—
	Reverse	TTATTCGTGCAATACTCGTGCG		
<i>pbp1a</i>	Forward	AAACCGCGACTGGGATCAAC	239 bp	371T→ S or A
	Reverse	GGTTGAGTCCGACCTTGTTT		
<i>pbp2x</i>	Forward	CCAGGTTCCACTATGAAAGTG	197 bp	338T→A 339M→F
	Reverse	ATCCCAACGTTACTTGAGTGT		
<i>pbp2b</i>	Forward	CCTATATGGTCCAACAGCCT	147 bp	451T→ A or S
	Reverse	GGTCAATTCTGTGCGAGTA		
<i>mefA</i>	Forward	GGGACCTGCCATTGGTGTGC	402 bp	—
	Reverse	CCCAGCTTAGGTATACGTAC		
<i>ermB</i>	Forward	CGTACCTTGGATATTCACCG	224 bp	—
	Reverse	GTAACAGTTGACGATATTCTCG		

*：リファレンス配列： *S. pneumoniae* R6 株、NC_003098 (PCG 感性株)

PCR プログラムの例 (参考)

94℃ 2分
 94℃ 15秒
 53℃ 15秒
 72℃ 15秒

} 30回



図IV-1. 増幅産物の泳動後模式図

表IV-4. 結果判定

増幅の有無	有 (+)	無 (-)
<i>lytA</i>	陽性	陰性
<i>pbp1a</i>	感受性 (変異なし)	耐性 (変異あり)
<i>pbp2x</i>	感受性 (変異なし)	耐性 (変異あり)
<i>pbp2b</i>	感受性 (変異なし)	耐性 (変異あり)
<i>mefA</i>	陽性	陰性
<i>ermB</i>	陽性	陰性

2. リアルタイム PCR 法による変異 *pbp* 遺伝子及びマクロライド耐性遺伝子の検出

市販のDNA抽出キット等により、菌株から抽出した DNA を Template として用いる (III-3. 2. DNA抽出に準拠)。下記のプライマーおよびプローブ (Molecular Beacon Probe) を用いて常法に従いリアルタイム PCR を実施する。使用する機器に BHQ1 の設定がない場合は、プローブのクエンチャーは”なし”を選択す

る。1 領域につき 1 ウェルを使用する。反応時間内に増幅曲線の立ち上がりが見られたウェルを陽性とする。結果判定は表IV-4 に準じる。

表IV-5. リアルタイム PCR 用プライマー、プローブ配列

遺伝子		プライマー、プローブ配列 (5' →3')	増幅 サイズ
<i>lytA</i>	Forward	CAGAATTAGGTTTTTCTCGC	188 bp
	Reverse	TAAGAGTTCGATATAAAGGCG	
	Probe	FAM- <u>CGCGATCAGGTCTCAGCATTCCAACCGCCGATCGCG</u> -BHQ1	
<i>pbp1a</i>	Forward	AAACCGCGACTGGGGATCAAC	239 bp
	Reverse	GGTTGAGTCCGACCTTGTTT	
	Probe	FAM- <u>CGCGATCACTGGGATAGGGGCTACTTTGGCGATCGCG</u> -BHQ1	
<i>pbp2x</i>	Forward	CCAGGTTCCACTATGAAAGTG	197 bp
	Reverse	ATCCCAACGTTACTTGAGTGT	
	Probe	FAM- <u>CGCGATCAGATGCCACGATTCGAGATTGGGGATCGCG</u> -BHQ1	
<i>pbp2b</i>	Forward	CCTATATGGTCCAAACAGCCT	147 bp
	Reverse	GGTCAATTCCCTGTGCGAGTA	
	Probe	FAM- <u>CGCGATCTCGGCACCAGCAATCTAGAGTCTGATCGCG</u> -BHQ1	
<i>mefA</i>	Forward	GGGACCTGCCATTGGTGTGC	402 bp
	Reverse	CCCAGCTTAGGTATACGTAC	
	Probe	FAM- <u>CGCGATCCCCCAGCACTCAATGCGGTTACACGATCGCG</u> -BHQ1	
<i>ermB</i>	Forward	CGTACCTTGGATATTCACCG	224 bp
	Reverse	GTAAACAGTTGACGATATTCTCG	
	Probe	FAM- <u>CGCGATCCCGCCATACCACAGATGTTCCGATCGCG</u> -BHQ1	

リアルタイム PCR プログラムの例 (参考)

95°C 30 秒
 95°C 15 秒
 50°C 20 秒
 75°C 15 秒

} 40 回

2. 3. 注意事項

- ① 試験時には、必ず陽性対照と陰性対照を置くこととする。
- ② 陽性対照が入手できない場合は、PCR の増幅産物をシーケンス解析し、塩基配列を BLAST 等で検索し確認する。*pbp1a*、*pbp2x*、*pbp2b* の各領域について

ては、PCR用プライマー配列表に示した、標的アミノ酸変異部位周辺のモチーフ配列 (*pbp1a*: 370 STMK、*pbp2x*: 337 STMK、*pbp2b*: 448 SSN) が R6 株 (NC_003098) と一致することを確認する。配列確認後は当該株を陽性対象として利用可能である。陰性対照としては溶出 Buffer や蒸留水を用いる。

- ③ コンタミネーション防止のため、PCR反応液の調整と増幅産物の確認は別の場所で実施することが望ましい。

V. 分子疫学解析

肺炎球菌は飛沫感染により気道に入り気道炎、肺炎を引き起す。また、血中または髄液に侵入することにより菌血症や髄膜炎などを起こす。稀に、病院や軍隊などの集団生活で暮らすヒトには、集団感染を引き起す症例も報告されている (文献 1~3)。肺炎球菌による集団感染が引き起す際、起因菌の関連性を明らかにする必要がある。現在、MLST (Multilocus Sequence Typing) または次世代シーケンスなどの分子疫学解析が広く使われている。

1. Multilocus Sequence Typing (MLST)

MLST とは、7種のハウスキーピング遺伝子の配列を読み、それらの配列データを元に菌株のタイピングを行うものである (文献 4)。配列データはデジタルコードとして扱うことができるため、公開データベース (文献 5) を検索して、対象とする菌株と登録されている世界各地の菌株とを比較・グループ化できることがメリットである。

1. 1. 解析方法

通常は、PCRで増幅した各遺伝子の配列をサンガーシーケンサーで読み、その結果を元に ST (sequence type) 番号を決定する。近年、全ゲノムシーケンサーによる解析が普及しつつあり、菌株のゲノム配列で ST を決定することも可能である。

表 V-1. MLST 解析の標的とするハウスキーピング遺伝子

<i>aroE</i>	shikimate dehydrogenase
<i>gdh</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase
<i>gki</i>	glucose kinase
<i>recP</i>	transketolase
<i>spi</i>	signal peptidase I
<i>xpt</i>	xanthine phosphoribosyltransferase
<i>ddl</i>	D-alanine-D-alanine ligase

1. 2. PCR による増幅

各遺伝子を増幅する PCR のプロトコールは以下の通りである。プライマーは文献 5 および 6 のものを用いる。菌株・遺伝子により増幅しにくいことがあり、文献 7 または 8 の改良版のプライマーで置き換えることで改善する場合がある。

表 V-2. MLST 解析用プライマー

	Forward Primer		Reverse Primer	PCR産物 (bp)
<i>aroE</i> -up	GCCTTTGAGGCGACAGC	<i>aroE</i> -dn	TGCAGTTCARAAACATWTTCTAA	469
<i>gdh</i> -up	ATGGACAAACCAGCNAGYTT	<i>gdh</i> -dn	GCTTGAGGTCCCATRCTNCC	659
<i>gki</i> -up	GGCATTGGAATGGGATCACC	<i>gki</i> -dn	TCTCCCGCAGCTGACAC	626
<i>recP</i> -up	GCCAACCTCAGGCATCCAGG	<i>recP</i> -dn	TGCAACCGTAGCATTGTAAC	571
<i>spi</i> -up	TTATTCCTCCTGATTCTGTC	<i>spi</i> -dn	GTGATTGCCAGAAGCGGAA	560
<i>xpt</i> -up	TTATTAGAAGAGCGCATCCT	<i>xpt</i> -dn	AGATCTGCCTCCTTAAATAC	572
<i>ddl</i> -up	TGCYCAAGTTCCTTATGTGG	<i>ddl</i> -dn	CACTGGGTRAAACCGGCAT	512

① PCR 反応液の調整 (Tks Gflex DNA Polymerase, Takara Bio)

PCR キットは汎用のものが使用可能であるが、キットに合わせて反応条件等の最適化を行うこと。

表 V-3. PCR 反応液の調製

Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/ μ l)	0.5 μ l
2 \times Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	12.5 μ l
Forward Primer (final conc.)	0.2~0.3 μ M
Reverse Primer (final conc.)	0.2~0.3 μ M
DNAテンプレート	1 μ l
滅菌精製水	up to 25 μ l

② PCR 反応条件

95°C 1 分

98°C 10 秒

55°C 15 秒

68°C 30 秒

30 回

必要に応じ、PCR 産物の電気泳動を行い、増幅産物の確認を行う。

1. 3. ダイレクトシーケンス

① PCR 産物の精製

PCR 産物は、市販のカラム精製キット (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit など) や酵素処理により精製を行う。本稿では、酵素処理によるキット (ExoSAP-IT Express, Thermofisher) を用いた方法について記載する。

以下の反応液を PCR チューブに入れ、混和する。

PCR 産物	15 μ l
1/20x ExoSAP-IT Express*	3 μ l

*原液を滅菌水で 20 倍希釈 (要時調製)

サーマルサイクラーで、37°C \times 4 分 \rightarrow 80°C \times 1 分処理する。滅菌水で 3~5 倍に希釈し、シーケンス反応のテンプレートとして用いる。

② シーケンス反応

使用するプライマーは PCR の増幅で用いたものと同じものを希釈して用いる。遺伝子ごとに Forward と Reverse のプライマーを用い、1 株あたり計 14

本のシーケンスリードを取得する。BigDye Terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kit (Thermofisher) を用いたシーケンス反応液のプロトコールは以下の通り。なお、使用するシーケンサーに合わせて、プロトコールの最適化を行うこと。シーケンス反応は、BigDye Terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kit 添付のプロトコールに準じて実施する。

表 V-4. シーケンス反応液の調製

BigDye Terminator Ready Reaction Mix	0.5 μ l
5X Sequencing Buffer	1.75 μ l
滅菌水	4.75 μ l
0.8 μ M プライマー	2 μ l
テンプレート	1 μ l
<hr/>	
	(計 10 μ l)

③ シーケンス反応液の精製

シーケンス反応後の過剰な Dye を除去するため、精製を実施する。各種精製キットが市販されており、それらを使用することで簡易迅速に行うことが可能である。本稿では標準的な方法であるエタノール沈殿による精製法を以下に記載する。

シーケンス反応液 10 μ L に以下の順に試薬を添加する。

+ 125 mM EDTA	2 μ l
+ 3 M 酢酸ナトリウム溶液	2 μ l
+ 滅菌水	6 μ l
+ エタノール	50 μ l

④ よく混和し、 -20°C 以下の冷凍庫で 10 分以上放置する。

⑤ 微量高速遠心機を用いて、13,000~15,000 rpm、 4°C で 30 分間遠心する。

- ⑥ 上清を捨てる。この際、ペレットが目視できないため注意深く行うこと。
70%エタノールによる洗浄は行わなくてもデータにほとんど影響はない。
- ⑦ チューブキャップを開けたまま、室温で10分以上放置し、乾燥させる。
- ⑧ Hi-Di Formamide (Thermofisher) 20 μ l を加え、混和し、シーケンサーにアプライする。

1. 4. 配列データの確認および編集

各リードのデータ (.ab1 ファイル等) は以下のソフトウェアを用いて確認、修正が可能である。これらを使用して、各リードの配列データを書き出した後、Forward と Reverse の配列データをアライメントし結合したものを各遺伝子の配列データとして解析に用いる。

Applied Biosystems Sequence Scanner Software v2.0 (Thermofisher、Windows 用)

4peaks (<https://nucleobytes.com/4peaks/>、Mac 用)

FinchTV (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>、Windows/Mac 用)

MEGA (<https://www.megasoftware.net>、Windows/Mac/Linux 用、アライメントおよび系統解析も実施可能)

市販の遺伝子解析ソフト (CodonCode Aligner、Genetyx、Geneious など) を用いることで、各リードデータを直接結合、修正することが可能である。また、使用環境が Mac および Linux に限定されるが、Phred, Phrap, Consed パッケージ (文献 9 および 10) は Academic user agreement を提出すれば無料で使用でき、MLST の配列データの修正や確認に適している。

確認および修正を行なった 7 つの遺伝子配列データは、菌株ごとにまとめたマルチ fasta 形式 (下記) で保存しておき、以降の解析に用いる。

表 V-5. マルチ fasta 形式の例

```
>aroE_contig_v1.fasta
GAAGCGAGTGACTTGGCAG.....GGAGCAGACAGGCTTTAAAGTGGATTTGTGT
>ddl_contig_v1.fasta
GCTAAAATCGCTGAAGTGG.....AGATAAGGGAGAGATTTTTCTCAACGAGCTC
>gdh_contig_v1.fasta
AGAACACTTTATCCGTGGA.....TAACAAC TCACTA ACTTTAGCCACTGGGAT
.....
.....
.....
>xpt_contig_v1.fasta
GGTGATAACATCCTCAAGG.....GGCAGGCTACCCTGTCCTATCACTTGCTCGT
```

1. 5. 公開データベースを利用した ST (sequence type) 番号の検索

公開データベース (文献 5) を利用する


前項のマルチ fasta 形式のデータファイルをコピーして、配列データ検索画面 (https://pubmlst.org/bigfdb?db=pubmlst_spneumoniae_seqdef&page=sequenceQuery、下図) の入力フィールドにペーストし、「SUBMIT」ボタンを押す。また、菌株の全ゲノムデータを取得している場合は、ここ (○) から該当するデータをアップロードすることで同様に解析が可能である。




結果画面（下図）の例では、ST3117 であることが確認できている。それぞれの遺伝子ごとのアレル番号が表になっており、この結果はテキストまたはエクセルファイルでダウンロードすることが可能である。また、ST:3117 がリンクになっており、これをクリックすることで現在データベースに登録されている菌株の情報にアクセスすることができる（要ユーザー登録）。

Locus	Allele	Length	Contig	Start position	End position	Flags
aroE	1	405	aroE_contig_v1.fasta	1	405	
ddl	14	441	ddl_contig_v1.fasta	1	441	
gdh	42	460	gdh_contig_v1.fasta	1	460	
gki	8	483	gki_contig_v1.fasta	1	483	
recP	16	450	recP_contig_v1.fasta	1	450	
spi	25	474	spi_contig_v1.fasta	1	474	
xpt	104	486	xpt_contig_v1.fasta	1	486	

Only exact matches are shown above. If a locus does not have an exact match, try querying specifically against that locus to find the closest match.



MLST

 Matching profile

ST: [3117](#)

1. 6. MLST 解析用ソフトウェアを利用した ST 番号の検索

菌株が多数になる場合など、使用しているパソコン上に MLST 解析用のツールをインストールしておくると便利である。mlst ソフトウェア（文献 11 および 12）を導入することで、PubMLST データベースに登録されている ST 番号を容易に検索することが可能となり、複数菌株のデータの解析や全ゲノムデータの解析にも対応している。また、肺炎球菌以外のデータベースもビルトインされていることから、他の菌種の MLST 解析にも応用可能である。

2. 次世代シーケンス

2005 年以降の次世代シーケンス技術の発展により、細菌学分野におけるゲノム解析においても革新的な変化が起こった。次世代シーケンス技術は従来のキャピラリーシーケンサーの数倍以上の解読塩基量を誇り、網羅的な遺伝子解析が可能となったのである。その後も新型機種が登場により解読塩基量は年々増加している。次世代シーケンサーには HiSeq シリーズ、Nextseq シリーズ、Miseq シリーズ（Illumina）のシーケンサーに代表されるショートリード型と PacBio RSII（Pacific Bioscience）や MinION（Oxford Nanopore Technologies）など

のロングリード型の2種類がある。ショートリード型は1塩基当たりの同定精度が高い一方で、そのリードの長さ(数十~300塩基)により、繰り返し配列領域のアセンブリーが困難である。ロングリード型は1塩基当たりの同定精度は低い、リードが長い(数キロ~100キロ塩基)ため、繰り返し配列領域のアセンブリーを可能にする。ショートリードシーケンスにおいてはDNA断片の3'、5'末端の両側から配列を読んでいく pair-end sequencing を用いるのが一般的である。

本項では Nextseq500、Miseq、iseq100 システムを用いて肺炎球菌の全ゲノム解析を行うワークフローを示す。

サンプル数の決定

肺炎球菌のゲノムサイズは約2MBであるため、×100のdepthを得るためには1サンプル当たり $2 \times 100 = 200$ MB (0.2GB) の出力を要する。NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5 (300 cycles) を用いる場合、総データ出力量は39 GBである。この場合、×100のdepthが必要であれば、1ラン当たり $39 \div 0.2 = 195$ サンプル程度の解析が可能である。所有しているシーケンスプラットフォームの出力量と必要なdepthから、1ランに載せるサンプル数を逆算する。

一般的な分子疫学解析は×50のdepthで十分に行えるが、1ラン内のすべてのサンプルに均等に出力が分配されるわけではないことに注意が必要である。(上記のNextseq500を用いる際、×100を指標に192サンプルでライブラリーを作成すると、実際に得られる1サンプル当たりのoutputはおおよそ×50~200に分布することが多い。)

2. 1. Library作成に用いるDNA精製 (Nextseq500、Miseq、iseq100 共通)

QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて肺炎球菌のDNAを精製する。

- ① 菌株を血液寒天培地一面に成育させる (37°C、5% CO₂、over night)。
- ② Lysozyme solution (20 mg/ml Lysozyme, 20 mM Tris-HCL [pH 8.0], 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100) を準備する

- ③ 1.5 ml エッペンドルフチューブに 250ml の Lysozyme solution を入れ、McFarland 0.5~2 になるように綿棒を用いて菌体を懸濁する。懸濁後の溶液量が 180 μ l を超えないように注意する。（綿棒に吸収される溶液量を考慮し、エッペンドルフチューブに入れる Lysozyme solution の初期量を調整する。）
- ④ 37°Cで 30 分間インキュベートする。
- ⑤ 20 μ l の Proteinase K と 200 μ l の Buffer AL とを加え、軽くボルテックスする。
- ⑥ 56°Cで 30 分間インキュベートする。
- ⑦ 95°Cで 15 分間インキュベートする。
- ⑧ 軽く遠心して溶液を落とす。
- ⑨ 200 ml の 100%エタノールを加え、15 秒間ボルテックスする。その後軽く遠心する。
- ⑩ 溶液全量を 2ml コレクションチューブ内に装填されたスピнкаラムに移し、8,000 rpm で 1 分間遠心する。スピнкаラムを遠心する際には必ず蓋を閉じる。遠心後溶液がカラムの上部に残る場合には、回転速度を上げ、溶液が完全にコレクションチューブに落ちるまで遠心を追加する。
- ⑪ 遠心後、溶液の入ったコレクションチューブを廃棄し、スピнкаラムを新しいコレクションチューブに装填する。
- ⑫ 500 μ l の Buffer AW1 をスピнкаラムに注ぐ。
- ⑬ 8,000 rpm で 1 分間遠心する。
- ⑭ 遠心後、溶液を含んだコレクションチューブを廃棄し、スピнкаラムを新しいコレクションチューブに装填する。
- ⑮ 500 μ l の Buffer AW2 をスピнкаラムに注ぐ。
- ⑯ 14,000 rpm で 3 分間遠心する。
- ⑰ 遠心後、溶液を含んだコレクションチューブを廃棄し、スピнкаラムを新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブに装填する。
- ⑱ 14,000 rpm 以上で 1 分間遠心する。

- ⑱ 遠心後、溶液を含んだコレクションチューブを廃棄し、スピнкаラムを DNA 溶出用の新しい 1.5ml エッペンドルフチューブに装填する。
- ⑲ 200 μ l の Buffer AE あるいは蒸留水をスピнкаラムに注ぐ。
- ⑳ 室温で 5 分間インキュベートする。
- ㉑ 8,000 rpm で 1 分間遠心する。
- ㉒ 得られた溶液を 4°C または冷凍で保存する。

以上はマニュアルで DNA 抽出を行う行程であるが、QIAcube、QIAamp DNA Mini QIAcube Kit を用いる事により、これらの行程を自動化する事も可能である。

2. 2. サンプル DNA 濃度の測定および濃度調整 (Nextseq500、Miseq、iseq100 共通)

Qubit Fluorometer、Qubit dsDNA HS Assay kit (Thermo Fisher Scientific、#Q32851) を用いて各サンプルの DNA 濃度を測定する。

- ① 保存していた DNA 溶液を解凍し、軽くボルテックスし濃度を均一にする。
- ② n 個のサンプルを測定する場合、 $199 \times (n+2)$ μ l の Qubit Buffer を 15 ml あるいは 50 ml コニカルチューブにとる。(2 個分は standard の計測に用いる)
- ③ $1 \times (n+2)$ μ l の Qubit reagent を②のコニカルチューブに混合し、溶液 (Working solution) が均一になるように転倒混和する。
- ④ 190 μ l の Working solution を測定用の Sample assay tube に移す。これを 2 つ作成し #1、#2 と番号を付ける。
- ⑤ 10 μ l の Standard#1 を #1 に追加する。同様に 10 μ l の Standard#2 を #2 に追加する。
- ⑥ Standard を加えた Sample assay tube を 2~3 秒ボルテックスする。
- ⑦ 2 分間室温でインキュベートする。
- ⑧ Sample assay tube #1 と #2 を順番に Qubit Fluorometer に装填、測定し、検量線を作成する。
- ⑨ n 個の Sample assay tube を準備し、それぞれに 198 μ l の Working solution

を入れる。

- ⑩ 均一になった 2 μ l のサンプル DNA 溶液を Sample assay tube を加える。
- ⑪ 2~3 秒ボルテックスする。
- ⑫ 2 分間室温でインキュベートする。
- ⑬ DNA 濃度を測定する。
- ⑭ 10~50 μ l のサンプル DNA 溶液を 96 well プレート等に移し、最終濃度が 0.2 ng/ μ l になるように、蒸留水あるいは 10 mM Tris HCL (pH 7.5~8.5) で希釈する。サンプル DNA を Buffer AE で溶出している場合は、5 倍以上希釈する。
- ⑮ 濃度調整したサンプル DNA は -15~25°C で保存し、翌日にはライブラリー作製を開始する。

2. 3. Illumina Library の作製 (Nextseq500、Miseq、iseq100 共通)

96 サンプルに対して Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina、FC-131-1096)、Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina、FC-131-2001) を用いて Library を作製する方法を示すサンプル数が 96 サンプルより少ない時には、Index の種類を減らして対応する。96 サンプル以上を 1 ランで解析する際には Nextera XT Index Kit v2 Set A, B, C, D を用いて、index が重複しないようにする。

2. 3. 1. Tagmentation

- ① ATM、TD を氷上で溶かす。NT は室温で溶かし、結晶が見えなくなるまでボルテックスする。
- ② 96 well plate (Bio-Rad、#HSP-9601 など) の各 well に 0.2 ng/ μ l に調整した 5 μ l のサンプル DNA と 10 μ l の TD を入れる。
- ③ 各 well に 5 μ l の ATM を入れ、ピペッティングして混ぜる。
- ④ 280 \times g、20°C で 1 分間遠心する。
- ⑤ サーマルサイクラーで以下のランを行う。

55°C 5分

10°C Hold

- ⑥ ランが終わったら速やかに 5 μ l の NT を各 well に加え、ピペッティングして混ぜる。
- ⑦ 280 \times g、20°Cで1分間遠心する。
- ⑧ 室温で5分間インキュベートする。

2. 3. 2. Amplify Libraries

- ① Index 1 primers (N7XX) および Index 2 primers (S5XX) を室温で溶かし、20分間静置する。NPM は氷上で溶かす。
- ② Index をタッピングし、その後軽く遠心する。
- ③ TruSeq Index Plate Fixture に Index を並べる。Index 1 (オレンジ色のキャップ) をプレートの 1-12 に番号の小さい順に並べる。Index 2 (白色のキャップ) をプレートの A-H に番号の小さい順に並べる。
- ④ Tagmentation が終わった 96 well plate を TruSeq Index Plate Fixture の中央に乗せる。
- ⑤ Index 1 primers (オレンジ色のキャップ) のキャップを全て外して捨てる。
- ⑥ マルチチャンネルピペットを用いて、5 μ l の Index 1 primers を A \rightarrow H に向かって順に加える。(図 V-1 参照)
- ⑦ マルチチャンネルピペットを用いて、5 μ l の Index 2 primers を 1 \rightarrow 12 に向かって順に加える。(図 V-1 参照)
- ⑧ Index 1 primers と Index 2 primers に新しいふたをして、保存する。
- ⑨ 8 連チューブに NPM の必要量を計算して入れる。
- ⑩ マルチチャンネルピペットを用いて 15 μ l の NPM を 8 連チューブから各 well に加え、ピペッティングして混ぜる。
- ⑪ 280 \times g、20°Cで1分間遠心する。
- ⑫ サーマルサイクラーで以下のランを行う。

		N701	N702	N703	N704	N705	N706	N707	N710	N711	N712	N714	N715
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S502	A	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S503	B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S505	C	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S506	D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S507	E	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S508	F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S510	G	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
S511	H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

図V-1 (Nextera XT Index Kit v2 Set A 使用例)

72°C 3分
95°C 30秒
95°C 10秒
55°C 30秒
72°C 30秒 } 12 サイクル
72°C 5分
10°C Hold

ここで一時作業を終える場合には、2~8°Cの冷蔵保存で2日間作業を中断できる。サーマルサイクラー上(10°C Holdの状態)で一晩保存することも可能である。

2. 3. 3. Clean up

以下に AMPure XP Beads を用いたサイズセレクションとクリーンアップの方法を記載する。サンプル数が少ない場合等は、作製したライブラリーをアガロース

ゲル電気泳動し、目的とするライブラリーサイズの領域を切り出して精製することで代用できる。

- ① RSB を室温で溶かす。
- ② AMPure XP Beads (Beckman Coulter、#A63881) を室温に戻し、少なくとも 30 分静置する。
- ③ 80%エタノールを準備する。
- ④ プレートを 280×g、20°C で 1 分間遠心する。
- ⑤ 50 μ l の PCR 産物(前章の⑫の産物)を 0.8 ml midi plate (Fisher Scientific、#AB-0859) に移す。
- ⑥ AMPure XP Beads を十分に転倒混和し、溶液を均一化する。ビーズの塊がなくなるまで転倒混和を繰り返す。
- ⑦ 30 μ l の AMPure XP Beads を各 well に加える。
- ⑧ シェーカーを用いて 1,800 rpm で 2 分間振盪する。
- ⑨ 室温で 5 分間インキュベートする。
- ⑩ Magnetic stand (ThermoFisher SCIENTIFIC、#AM10027) にプレートを乗せ、液体が透明になるまで 2 分ほど静置する。
- ⑪ ビーズに触れないように、各 well の上清のみを捨てる。
- ⑫ 200 μ l の 80% エタノールを各 well に加える。
- ⑬ Magnetic stand 上で 30 秒インキュベートする。
- ⑭ 上清を捨てる。ビーズを吸わないように注意する。
- ⑮ ⑫から⑭をもう一度繰り返す。
- ⑯ 20 μ l のチップを用いて、各 well のエタノールを確実に吸い切る。
- ⑰ Magnetic stand 上で 15 分間、室温でインキュベートする。
- ⑱ Magnetic stand からプレートを外す。
- ⑲ 各 well に 52.5 μ l の RSB を加える。
- ⑳ シェーカーを用いて 1,800 rpm で 2 分間振盪する。
- ㉑ 室温で 2 分間インキュベートする。

- ② Magnetic stand にプレートに乗せ、液体が透明になるまで 2 分ほど静置する
- ③ 上清を 50 μ l 吸い、新しい 96 well plate (Bio-Rad、 #HSP-9601 など) に移す。

ここで一時作業を終える場合には、 $-25\sim 15^{\circ}\text{C}$ の冷凍保存で 7 日間作業を中断できる。

(注) iseq100 を用いる場合には、この後の行程が Nextseq500、Miseq を使用する場合と異なる。

2. 3. 4. Normalization

2. 3. 4. 1 Nextseq500、Miseq を用いる場合

- ① LNA1、LNB1、NNW1、LNS1 を室温に戻す。
- ② LNA1 を十分にボルテックスし、結晶を完全に溶解する。
- ③ LNB1 を容器を転倒混和しながら十分に (少なくとも 1 分) ボルテックスする。ビーズが完全に均一になるまで繰り返す。
- ④ 20 μ l のプレート内サンプルを新しい 0.8 ml midi plate (Fisher Scientific、 #AB-0859) に移す。
- ⑤ 4.4 ml (96 サンプルの場合) の LNA1 を 15 ml のコニカルチューブに入れる。
(サンプル数が 96 より少ない場合には、比例で容量を減らす[例: 24 サンプルの場合、 $4.4 \times (24/96) = 1.1$ ml])
- ⑥ LNB1 を再度ボルテックスし、1000 μ l のチップでピペッティングして溶液を均一にする。
- ⑦ 800 μ l (96 サンプルの場合) の LNB1 を⑤のコニカルチューブに加え、転倒混和する (1,000 μ l のチップを用いる) (サンプル数が 96 より少ない場合には、比例で容量を減らす[例: 24 サンプルの場合、 $800 \times (24/96) = 200$ μ l])
- ⑧ ⑦の溶液を全量リザーバーに移す。
- ⑨ 45 μ l の⑦溶液を各 well に加える。
- ⑩ シェーカーを用いて 1800 rpm で 30 分間振盪する。
- ⑪ Magnetic stand (ThermoFisher SCIENTIFIC、 #AM10027) にプレートに乗せ、

液体が透明になるまで2分ほど静置する。

- ⑫ ビーズに触れないように、各 well の上清のみを捨てる。
- ⑬ 45 μ l の LNW1 を各 well に加える。
- ⑭ シェーカーを用いて 1,800 rpm で 5 分間振盪する。
- ⑮ Magnetic stand にプレートに乗せ、液体が透明になるまで 2 分ほど静置する。
- ⑯ ビーズに触れないように、各 well の上清のみを捨てる。
- ⑰ ⑬から⑯をもう一度繰り返す。
- ⑱ 30 μ l の 0.1N NaOH を各 well に加える。
- ⑲ シェーカーを用いて 1,800 rpm で 5 分間振盪する。
- ⑳ 新しい 96 well plate (Bio-Rad、 #HSP-9601 など) を準備し SGP plate と名前を書く。
- ㉑ 30 μ l の LNS1 を SGP plate の各 well に入れる。
- ㉒ 5 分間振盪した後、midi plate 内の溶液が均一になっているかを確認する。
必要に応じてピペティングして混ぜる。
- ㉓ シェーカーを用いて再度 1,800 rpm で 5 分間振盪する。
- ㉔ Magnetic stand にプレートに乗せ、液体が透明になるまで 2 分ほど静置する。
- ㉕ 上清を全て SGP plate に移す。
- ㉖ SGP plate を 1,000 \times g で 1 分間遠心する。

ここで一時作業を終える場合には、 $-25\sim 15^{\circ}\text{C}$ の冷凍保存で 7 日間作業を中断できる。

2. 3. 4. 2 iseq100 を用いる場合

- ① バイオアナライザー等を用いて、各サンプルのおおよその平均ライブラリーサイズを計測する。あるいは、アガロースゲルから切り出しによるサイズセレクションを実施した場合は、切り出したバンドサイズから平均ライブラリーサイズを推定することもできる。

- ② Qubit dsDNA HS Assay kitあるいはQubit dsDNA BR Assay kitを用いて、各サンプルの2本鎖DNA濃度を測定する。
- ③ Resuspension Buffer (RSB) あるいは10 mM Tris-HCl、pH8.5を用いて、以下の換算表あるいは計算式を参考に、各サンプルを1 nMに希釈する。

平均ライブラリーサイズ	変換係数
250bp	1 ng/μL = 6 nM
500bp	1 ng/μL = 3 nM
1000-1500bp	1 ng/μL = 1.5 nM

濃度 [nM] = (濃度 [ng/μL] × 10⁶) ÷ (660 × 平均ライブラリーサイズ [bp])

2. 3. 5. Pool Library

plateの各well溶液を5 μlずつとり、1つのエッペンドルフチューブに混ぜ合わせる。この際、8連チューブを用いると簡便である。

iseq100を用いる場合にはPool量が20 μl以上になるように混ぜ合わせる。

2. 4. Denature and dilute (Nextseq500)

この行程は、ランを行う直前に行う。

2. 4. 1. Nextseq500を使用する場合

- ① HT1を室温で溶かす。使用直前まで2~8℃で保存する。
- ② インキュベーターを98℃に設定しておく。
- ③ 1.5 ml エッペンドルフチューブに2~5 μlのPool Libraryと998~995 μlのHT1を加え、総量が1mlになるようにする。 (*)
- ④ 軽くボルテックスし、280×gで1分間遠心する。
- ⑤ ③のうち750 μlを新しい1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、これに750 μlのHT1を加える。
- ⑥ 軽くボルテックスし、280×gで1分間遠心する。

⑦ すでに 98°C に温まったインキュベーターにチューブを入れ、2 分間インキュベートする。

⑧ 氷上で 5 分間インキュベートする。

これでランのための Library の準備が終了。ランを行うまで氷上でサンプルを保存する。

(*)③における Pool Library の量によって、run の際の cluster density が決まる。Nextseq の場合、至適 cluster density は 170~220 (K/mm²) である。Pool Library の量が多いほど cluster density は高くなるが、至適範囲を超えすぎると、逆に percent of clusters passing filter (%PF) が低下し、結果として output データ量は減少する。執筆者は通常 12.5 μ l の Pool Library と 987.5 μ l の HT1 を混合している。

2. 4. 2. Miseq を使用する場合

① HT1 を室温で溶かす。使用直前まで 2~8°C で保存する。

② インキュベーターを 98°C に設定しておく。

③ 1.5 ml エッペンドルフチューブに 6~10 μ l の Pool Library と 594~590 μ l の HT1 を加え、総量が 600 μ l になるようにする。(*)

④ 軽くボルテックスし、280×g で 1 分間遠心する。

⑤ すでに 98°C に温まったインキュベーターにチューブを入れ、2 分間インキュベートする。

⑥ 氷上で 5 分間インキュベートする。

これでランのための Library の準備が終了。ランを行うまで氷上でサンプルを保存する。

(*)③における Pool Library の量によって、run の際の cluster density が決まる。MiSeq v3 reagent kit の場合、至適 cluster density は 1200~1400 (K/mm²)、MiSeq v2 reagent kit の場合、1000~1200 (K/mm²) である。Pool Library の量

が多いほど cluster density は高くなるが、至適範囲を超えすぎると、逆に percent of clusters passing filter (%PF) が低下し、結果として output データ量は減少する。

2. 4. 3. iseq100 を使用する場合

iseq100 は自動で denaturing が行われるため、適切な library 希釈のみを行う。Nextera XT を用いた場合、至適ローディングサンプル濃度は 100~200 pM とされているが、初めて iseq を使用する場合は、100 pM 以下の低濃度から検討すると良い。output 量が少ない場合は次回以降、徐々にサンプル濃度を上げて、最適化を行う。Library 希釈の一例として、2. 3. 4. 2. ~2. 3. 5. で作成した 1 nM の Pool Library 10 µl と RSB 90 µl を混ぜ合わせ、100 µl のライブラリーを作製する。希釈後はカートリッジにロードするまで氷上に静置する。

2. 5. 試薬カートリッジの準備

2. 5. 1. Nextseq500 の場合

ラン前日~当日に行う試薬カートリッジの準備方法を示す。

- ① 試薬カートリッジを-20℃の冷凍庫から取り出す。
- ② 試薬カートリッジを十分量の Milli Q 水が入った容器に入れ、カートリッジのベース部分が水に浸った状態にする。カートリッジ上面に水がかからないように注意する。
- ③ 試薬が完全に溶解するまで、水につけて静置する (60~90 分)。
- ④ 試薬カートリッジを水浴から取り出し、机の上に軽くトントンと叩きつけて水気を切る。残った水気はペーパータオルなどでふき取り、カートリッジを乾かす。
- ⑤ 試薬の中身を混ぜるために、溶解後の試薬カートリッジを 5 回転倒攪拌する。
- ⑥ カートリッジを下から眺めて、容量の多い試薬部分 (ポート 29、30、31 および 32) に溶解残りや沈殿が無いことを確認する。

- ⑦ 試薬カートリッジを机の上に軽く叩きつけて、泡抜きをする。
- ⑧ レンズ紙を用いて、10番ポートのホイルシートを拭き、きれいにする。
- ⑨ 新しい1,000 μ l ピペットチップを用いて、10番ポートのホイルシールに穴をあける。

調整済のライブラリー溶液 1.3 ml をピペットチップであけた穴から10番ポートに分注する。ピペットチップがホイルシールに触れないように気を付ける。以上を終えたら、シーケンサーにカートリッジを挿入できる。

2. 5. 2. Miseq の場合

ラン前日～当日に行う試薬カートリッジの準備方法を示す。

- ① 試薬カートリッジを -20°C の冷凍庫から取り出す。
- ② 試薬カートリッジを十分量の Milli Q 水が入った容器に入れ、カートリッジのベース部分が水に浸った状態にする。カートリッジ上面に水がかからないように注意する。
- ③ 試薬が完全に溶解するまで、水につけて静置する（60～90分）。
- ④ 試薬カートリッジを水浴から取り出し、机の上に軽くトントンと叩きつけて水気を切る。残った水気はペーパータオルなどでふき取り、カートリッジを乾かす。
- ⑤ 試薬の中身を混ぜるために、溶解後の試薬カートリッジを5-10回転倒攪拌する。
- ⑥ カートリッジを下から眺めて、ポート1、2、および4の試薬部分に溶け残りや沈殿が無いことを確認する。
- ⑦ 試薬カートリッジを机の上に軽く叩きつけて、泡抜きをする。
- ⑧ レンズ紙を用いて、21番ポート（Load Samples と表記されているポート）のホイルシートを拭き、きれいにする。
- ⑨ 新しい1,000 μ l ピペットチップを用いて、21番ポート（Load Samples と表記されているポート）のホイルシールに穴をあける。

調整済のライブラリー溶液 600 μ l をピペットチップであけた穴から 21 番ポート (Load Samples と表記されているポート) に分注する。ピペットチップがホイルシールに触れないように気を付ける。

以上を終えたら、シーケンサーにカートリッジを挿入できる。

2. 5. 3. iseq100 の場合

ラン前日～当日に行う試薬カートリッジの準備方法を示す。

- ① 試薬カートリッジを -20°C の冷凍庫から取り出す。
- ② カートリッジを袋に入れたまま、ラベルを上向きにして 25°C ウォーターバス (6 時間) や $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷蔵庫 (36 時間)、室温 (9 時間) で試薬を溶解する。
- ③ 使用する 15 分前にフローセルを冷蔵庫から取り出し、室温に戻しておく。
- ④ カートリッジを袋から出し、5 回転倒攪拌する。
- ⑤ ベンチ、または別の堅い表面上でカートリッジ (ラベルは上向き) を軽く 5 回叩き、試薬の吸引が確実に行われるようにする。
- ⑥ 新しいピペットチップを使って、ライブラリーリザーバーに穴をあけ、ホイルを端に押し、穴を大きくする。
- ⑦ 20 μ L の希釈済みライブラリーをリザーバーの底部に加える。この際、ホイルに触れないように気を付ける。
- ⑧ フローセルをパッケージから取り出す。
- ⑨ カートリッジの前面のスロットにフローセルを挿入する (カチッと音がするまで挿入する)。

以上を終えたら、シーケンサーにカートリッジを挿入できる。

2. 6. Sample sheet の作成

2. 6. 1. Nextseq500、Miseq の場合

Illumina Experiment Manager を用いて、SampleSheet.csv を作製する。

Illumina のホームページから Illumina Experiment Manager (IEM) をダウンロードし、インストールする。

- ① ソフトウェアを立ち上げる。
- ② Create Sample Sheet を選ぶ。
- ③ 用いるプラットフォームを選択する (NextSeq/MiniSeq あるいは MiSeq) を選ぶ。
- ④ Next を選ぶ。
- ⑤ Reagent Kit Barcode に任意の ID を入力する。
- ⑥ Library Prep Workflow→Nextera XT を選ぶ。
- ⑦ Index Adapter→使用した Index を選ぶ (Nextera XT v2 Index Kit A など)
- ⑧ Read Type、Cycles Read1、Cycles Read2 に適切な値を入力する。Cycles Read1 および Cycles Read2 には使用するキットのサイクル数 (リード長) に 1 を加えた値を入力する (NextSeq 550 システムの中出力キットを用いて 150bp×2 のリードを得る場合には「151」と入力する。)
- ⑨ Next を選ぶ。
- ⑩ New Plate…を選ぶ。
- ⑪ Plate 名を入力し Next を選ぶ。
- ⑫ Plate タブを選び、各 well にサンプル名を入力する。エクセルからコピー&ペーストすると簡便である。
- ⑬ Apply Default Index Layout を選び、その後 Finish を選ぶ。
- ⑭ Plate file を任意の場所に保存する。
- ⑮ Index が 96 種類以上の場合には上記を繰り返して、各 Index の plate file を作成する。
- ⑯ ②に戻り、⑥までを繰り返す。
- ⑰ ⑦で Nextera XT v2 Index kit を選び Next を選ぶ。
- ⑱ Select Plate…を選び、先ほど作成した Plate file を選択する。
- ⑲ Select all→Add Selected Samples⇒の順に押し、サンプル名を右側に移す。

これを各 Plate file に対して行う。

- ⑩ サンプル名を全て右側に移したら、Finish を押し、SampleSheet.csv という名前で保存する。この名前でない、後の bcl2fastq2 が動かないので注意する。

2. 6. 2. iseq100 の場合

現バージョンの Illumina Experiment Manager では機種選択時に iseq100 が表示されないため、通常、iseq100 に内蔵された Local Run Manager 上で Sample sheet の作成を行う。Miseq 用として Sample sheet.csv を作成したものを流用することは可能であるが、本稿では割愛する。

2. 7. fastq.gz ファイルの取得

bcl2fastq2 を用いて Nextseq500、Miseq システムの output から fastq.gz ファイルを生成する。bcl2fastq2 を事前に解析用パソコンにインストールしておく必要がある。

- ① Illumina Experiment Manager を用いて作成した SampleSheet.csv をメインディレクトリ直下 (Data フォルダがあるディレクトリ) に置く。
- ② メインディレクトリに移動し、
bcl2fastq --runfolder-dir ./ --output-dir ./Output --no-lane-splitting を走らせる。使用する PC スレッド数に合わせて -r、-p、-w オプションを設定すれば、より短時間で output を得られる。
- ③ メインディレクトリの Output フォルダ内に fastq.gz ファイルが生成される。

2. 8. トリミング

bcl2fastq2 から得られた fastq.gz ファイルにはアダプターやインデックスは含まれていないはずであるが、これらの除去やリードクオリティ、リードの長さ等に基づいて、まずリードのトリミングを行ってから後解析に移る必要がある。

トリミングを行うソフトウェアとしては fastp(1)が簡便で使いやすい。リードクオリティに関しては Q20-30 の間でフィルタリングすることが一般的である。また 1 cycle 分の塩基を必ず除去する (-t および-T オプション)。Nextseq を用いた場合には-g オプションを使用し、polyG 配列の除去が必要である。iseq100 を用いた場合も、-g オプションを使用することでクオリティが改善するケースがある。

Command 例 :

```
fastp -h report.html -i input_1.fastq.gz -I input_2.fastq.gz -o
output_paired_1.fastq.gz -O output_paired_2.fastq.gz -q 25 -t 1 -T 1 -l
25 -g
```

(html 形式のリードクオリティ output を出力[-h]。Q25 でフィルタリング[-q]。25 塩基より短いリードを除去[-l]。polyG 配列を除去[-g]。)

2. 9. アセンブリー

トリミング後のリードを用いてアセンブリーを行うことにより、contig を得ることができる。Bacteria のアセンブリーを行うソフトウェアには SPAdes(2)や velvet(3)などがある。アセンブリー後には QUAST(4)を用いてアセンブリーを評価する。以下に SPAdes および QUAST の使用例を示す。

Command 例 :

```
spades.py --careful -o output_spades -1 input_paired_1.fastq.gz -2
input_paired_2.fastq.gz -k 21,55,99,127
```

(careful モードでランを行う[--careful]。k-mer size : 21, 55, 99, 127 でそれぞれランを行う。)

```
quast.py input_contigs.fasta -o output_directory
```

2. 10. Web 上での分子疫学情報取得

以下に Pathogenwatch (<https://pathogen.watch/>) を用いた肺炎球菌の分子疫学解析方法を示す。

- ① Pathogenwatch にログインする。(Google account でログイン可能)
- ② 右上の UPLOAD を選択する。
- ③ Drag and drop files to begin. の画面が出たら、同画面上に fastq. gz ファイル、あるいはアセンブリーで得られた contig ファイルを drag&drop する。
なお、2021 年 3 月時点では fastq. gz ファイルのアップロードは β 版として扱われており、解析できるサンプル数に制限があることに注意が必要である。また fastq. gz ファイルをアップロードした場合 web 上でアセンブリーが行われ、結果を得るのに時間がかかるため、可能であれば contig ファイルを upload することが望ましい。
- ④ 解析が終われば(全ての項目に緑色のチェックがつく)、中央の VIEWGENOMES を押し解析結果を確認することができる。得られる情報は、Serotype、MLST、Global Pneumococcal Sequencing Cluster (GPSC)、PBP types、各種耐性遺伝子の有無、PBP type から予想される感受性予測などである。

2. 11. 解析内容について

① 血清型 (Serotype)

肺炎球菌の莢膜は肺炎球菌の最も重要な病原因子であり、血清型を決定する抗原でもある。莢膜は肺炎球菌多価ワクチンのターゲットになっており、その疫学情報の収集は肺炎球菌の分子疫学解析において必須である。肺炎球菌莢膜は *cps* locus の構成によって規定されているため、全ゲノム解析によって解析菌株の血清型を推定することが可能である。注意点としては、全ゲノム解析により得られた血清型は、PCR 法と同様、あくまで *cps* locus の一部を見ているのみであり、血清型別試験の結果と乖離する可能性があることを念頭に置く必要がある。

② Multi-Locus Sequencing Typing (MLST)

MLSTは複数のハウスキーピング遺伝子（肺炎球菌では7遺伝子）の遺伝子配列を決定し、これをもとにタイピングする手法である。2020年12月時点で、16,325種類のシーケンスタイプ(ST)に型別されているが、この数は徐々に増えている。MLSTは国内、国間において、クローン性を確認する上で重要かつ、簡便な手法である。MLSTは遺伝子配列情報のみを用いた型別であるため、全ゲノム解析を用いて解析を行う事ができる。

③ Global Pneumococcal Sequencing Cluster (GPSC)

GPSCは全ゲノム配列を用いたクラスタリング手法である。GPSCを利用することにより、検査対象菌株が他国のどのクローンと近縁であるかを確認する事ができる(文献5)。GPSCによるクラスタリングは、従来から使用されてきた clonal complex(CC)のように利用する事ができる。CCは現在、goeBURST(<http://www.phyloviz.net/goeburst/>)を用いて決定する事ができるが、inputに含まれるSTの種類によって結果が異なり、結果の解釈に注意が必要である。一方で、GPSCは全ゲノム配列におけるSNP数に基いて算出されており、結果に一貫性があり、解釈も容易である。

④ PBP typing

肺炎球菌はPBPを6つ持ち、主にはこれらの変異でペニシリン、セファロスポリン、カルバペネム系抗菌薬に耐性化する。そのため、*pbp*遺伝子の配列が重要となってくるが、特に*pbp1a*、*pbp2b*、*pbp2x*の変異が、これらの薬剤耐性に関与している。全ゲノム解析を用いて、MLSTのようにPBP配列のタイピングを行う事により、薬剤感受性を予測する事ができる。従来のデータベースはCDCが公開しているが(<https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/mic.html>)、2016年からupdateされていないため注意が必要である。

PBP typingは薬剤感受性を予測する以外に、MLSTのようにクローン性を確認する目的で使用できる(文献6)。例えば、本邦で検出されるメロペネム感受性の莢膜型15A-ST63株は*pbp1a:pbp2b:pbp2x=24:27:28*であり、このタ

イブは英国や米国で検出される 15A-ST63 株においても一般的である。一方で、本邦で検出されるメロペネム耐性の莢膜型 15A-ST63 株は *pbp1a:pbp2b:pbp2x=13:175:43* であり、PBP type が大きく異なる。このことから、この耐性株はメロペネム感受性の 15A-ST63 から近年分岐発生したわけではないことが推定される。

VI. 参考文献

I. 概説

1. Llull D, López R, García E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol.* 2006. 44:1250-1256.
2. Shindo Y, Ito R, Kobayashi D, Ando M, Ichikawa M, Shiraki A, et al. Risk factors for drug-resistant pathogens in community-acquired and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013. 188:985-995.
3. Avery OT, Goebel WF. Chemo-immunologic studies on conjugate carbohydrate-proteins. II Immunological specificity synthetic sugar-protein antigens. *J Exp Med.* 1929. 50:533-550.
4. Magee AD, Yother J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2001. 69:3755-3761.
5. Ganaie F, Saad JS, McGee L, van Tonder AJ, Bentley SD, Lo SW, et al. A new pneumococcal capsule type, 10D, is the 100th serotype and has a large *cps* fragment from an oral *Streptococcus*. *mBio.* 2020. 19:e00937-20. doi: 10.1128/mBio.00937-20.
6. AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev.* 1995. 59:591-603.

7. Musher DM, Watson DA, Baughn RE. Genetic control of the immunologic response to pneumococcal capsular polysaccharides. *Vaccine*. 2000. 19:623-627.
8. 川上 和義：肺炎球菌感染症の発症病態とワクチンの免疫機序. 日本内科学会雑誌. 2015. 11:2307-2313.
9. 児玉 博英, 永瀬 金一郎, 奥山 雄介, 滝沢 金次郎：レンサ球菌. 微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版. 財団法人 日本公衆衛生協会. 1966. F2-F33.
10. Llull D, López R, García E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol*. 2006. 44:1250-1256.
11. Porter BD, Ortika BD, Satzke C. Capsular Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by latex agglutination. *J Vis Exp*. 2014. 25:51747. doi: 10.3791/51747.
12. Satzke C, Turner P, Virolainen-Julkunen A, Adrian PV, Antonio M, Hare KM, et al. Standard method for detecting upper respiratory carriage of *Streptococcus pneumoniae*: updated recommendations from the World Health Organization Pneumococcal Carriage Working Group. *Vaccine*. 2013. 32:165-179.
13. The Centers for Disease Control and Prevention: Multiplex conventional PCR schemes for pneumococcal serotype deduction. <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html>. (2020年11月22日閲覧)
14. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*. 1998. 144:3049-60.

15. *Streptococcus pneumoniae* MLST website [cited 2020 November 22]
<https://pubmlst.org/spneumoniae/>

16. Nakanishi N, Yonezawa T, Tanaka S, Shirouzu Y, Naito Y, Ozaki A, et al. Assessment of the local clonal spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 12F caused invasive pneumococcal diseases among children and adults. J Infect Public Health. 2019. 12:867–872.

II. 培養同定法

1. Llull D, López R, García E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. Journal of Clinical Microbiology. 2006. 44:1250-1256.

III. 肺炎球菌の血清型別

1. The Centers for Disease Control and Prevention: Multiplex Conventional PCR Schemes for Pneumococcal Serotype Deduction. <http://www.cdc.gov/streplab/pcr.html>. (2020年11月22日閲覧)

2. Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. Journal of Clinical Microbiology. 2006. 44:124–131.

3. Carvalho Mda G, Pimenta FC, Jackson D et al. Revisiting pneumococcal carriage by use of broth enrichment and PCR techniques for enhanced detection of carriage and serotypes. Journal of Clinical Microbiology. 2010. 48:1611–1618.

4. Carvalho Mda G, Pimenta FC, Gertz RE Jr, et al. PCR-based quantitation and clonal diversity of the current prevalent invasive serogroup 6 pneumococcal serotype, 6C, in the United States in 1999 and 2006 to 2007. Journal of Clinical Microbiology. 2009. 47:554–559.

5. Dias CA, Teixeira LM, Carvalho Mda G, et al. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *Journal of Medical Microbiology*.2007. 56:1185-1188.
6. Pimenta FC, Gertz RE Jr, Roundtree A, et al. Rarely occurring 19A-like cps locus from a serotype 19F pneumococcal isolate indicates continued need of serology-based quality control for PCR-based serotype determinations. *Journal of Clinical Microbiology*.2009. 47:2353-2354.

IV. 薬剤感受性試験

1. 千葉菜穂子、小林玲子、長谷川恵子、生方公子、紺野昌俊：肺炎球菌に対するカルバペネム系薬の抗菌作用の比較、*日本化学療法学雑誌*. 2002. 50:161-169
2. Yumiko Sanbongi, Takashi Ida, Midori Ishikawa, Yumi Osaki, Hiroshi Kataoka, Takahisa Suzuki, Kumiko Kondo, Fukuichi Ohsawa, Minoru Yonezawa. Complete Sequences of Six Penicillin-Binding Protein Genes from 40 *Streptococcus pneumoniae* Clinical Isolates Collected in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. 48:2244-50.
3. Kimiko Ubukata, Naoko Chiba, Keiko Hasegawa, Reiko Kobayashi, Satoshi Iwata, Keisuke Sunakawa. Antibiotic susceptibility in relation to penicillin-binding protein genes and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains responsible for meningitis in Japan, 1999 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 2004. 48:1488-94
4. Naoko Chiba, Miyuki Morozumi, Kimiko Ubukata. Application of the real-time PCR method for genotypic identification of β -lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. *Microb Drug Resist* 2012. 18:149-56.

5. 生方公子：呼吸器感染症原因微生物の質的变化による薬剤耐性化、日本化学療法学雑誌. 2006. 54: 69-93
6. 小栗豊子：臨床微生物検査ハンドブック第4版、三輪書店
7. CLSI M100-ED30:2020 Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition

V. 分子疫学解析

1. Multilocus Sequence Typing (MLST)

1. Crum NF, Wallace MR, Lamb CR, Conlin AM, Amundson DE, Olson PE, Ryan MA, Robinson TJ, Gray GC, Earhart KC. 2003. Halting a pneumococcal pneumonia outbreak among United States Marine Corps trainees. *Am J Prev Med* 25:107-111.
2. Kuroki T, Ishida M, Suzuki M, Furukawa I, Ohya H, Watanabe Y, Konnai M, Aihara Y, Chang B, Ariyoshi K, Oishi K, Ohnishi M, Morimoto K. 2014. Outbreak of *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 pneumonia in extremely elderly people in a nursing home unit in Kanagawa, Japan, 2013. *J Am Geriatr Soc* 62:1197-1198.
3. Millar MR, Brown NM, Tobin GW, Murphy PJ, Windsor AC, Speller DC. 1994. Outbreak of infection with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a hospital for the elderly. *J Hosp Infect* 27:99-104.
4. 木村凡. “これからの細菌のゲノムタイピングとしてのMLST法”. モダンメディア. 2006 52 巻7号:209
(https://www.eiken.co.jp/uploads/modern_media/literature/MM0607-01.pdf)
5. PubMLST ウェブサイト (<https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-pneumoniae>)

6. Enright MC, Spratt BG. “A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease.” *Microbiology*. 1998. 144:3049-60.
7. M. C. Enright, K. Knox, D. Griffiths, D. W. Crook, and B. G. Spratt, “Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid.,” *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000. 19:627-630
8. CDC:Streptococcus Laboratory ウェブサイト
(<https://www.cdc.gov/streplab/pneumococcus/resources.html>)
9. Phred, Phrap, Consed ウェブサイト
(<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>)
10. Phred, Phrap, Consed 使用方法の解説
(http://cse.fra.affrc.go.jp/ksaitoh/using_consed.html)
11. mlst ソフトウェア (<https://github.com/tseemann/mlst>)
12. mlst ソフトウェア使用方法の解説
<http://kazumaxneo.hatenablog.com/entry/2020/05/30/134738>

2. 次世代シーケンス

1. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018. 34:i884-i90.
2. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012. 19:455-77.
3. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res*. 2008. 18:821-9.
4. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013. 29:1072-5.

5. Gladstone RA, Lo SW, Lees JA, Croucher NJ, van Tonder AJ, Corander J, et al. International genomic definition of pneumococcal lineages, to contextualise disease, antibiotic resistance and vaccine impact. *EBioMedicine*. 2019. 43:338-46.
6. Nakano S, Fujisawa T, Ito Y, Chang B, Matsumura Y, Yamamoto M, et al. Spread of Meropenem-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Serotype 15A-ST63 Clone in Japan, 2012-2014. *Emerg Infect Dis*. 2018. 24:275-83.

VII. 執筆者一覧

内谷 友美	東京都健康安全研究センター	微生物部
金谷 潤一	富山県衛生研究所	細菌部
河原 隆二	大阪健康安全基盤研究所	微生物部
中野 哲志	国立感染症研究所	薬剤耐性研究センター
常 彬	国立感染症研究所	細菌第一部
小川 道永	国立感染症研究所	細菌第一部
明田 幸宏	国立感染症研究所	細菌第一部
大西 真	国立感染症研究所	

令和3年4月 作成