

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

百日咳菌、ジフテリア菌、マイコプラズマ
等の臨床分離菌の収集と分子疫学的
解析に関する研究

(H15-新興-24)

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐々木次雄

平成16(2004)年3月

平成15年度 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

百日咳菌、ジフテリア菌、マイコプラズマ等の臨床分離菌の収集と分子疫学的解析に
関する研究班 名簿

| 区 分 | 氏 名 | 所 属 | 職 名 |
|----------------|--------|-------------------|-------|
| 主任研究者 分担研究者 | 佐々木次雄 | 国立感染症研究所細菌第二部 | 室 長 |
| | 堀内善信 | 国立感染症研究所細菌第二部 | 室 長 |
| | 高橋元秀 | 国立感染症研究所細菌第二部 | 室 長 |
| | 見理 剛 | 国立感染症研究所細菌第二部 | 主任研究官 |
| | 荒川宜親 | 国立感染症研究所細菌第二部 | 部 長 |
| | 菊池 賢 | 東京女子医科大学感染症科 | 講 師 |
| | 諸角 聖 | 東京都健康安全研究センター微生物部 | 部 長 |
| | 成田光生 | 札幌鉄道病院小児科 | 医 長 |
| | 山崎 勉 | 埼玉医科大学感染症科(小児科) | 講 師 |
| 研究協力者 | 新谷三春 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 蒲池一成 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 岩城正昭 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 山本明彦 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 落合雅樹 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 小宮貴子 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 久保田真由美 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 鈴木里和 | 国立感染症研究所細菌第二部 | |
| | 遠藤美代子 | 東京都健康安全研究センター微生物部 | |
| | 内村真佐子 | 千葉県衛生研究所 | |
| | 八柳 潤 | 秋田県衛生科学研究所 | |
| | 堀川和美 | 福岡県保健環境研究所 | |
| | 杉山 明 | 三重県科学技術振興センター | |
| | 岡崎則男 | 神奈川県衛生研究所 | |
| | 大屋日登美 | 神奈川県衛生研究所 | |
| | 大塚正之 | 江東微生物研究所 | |
| | 上原すゝ子 | 埼玉医科大学 | |

目次

| | | |
|--------------------------|---|----|
| I 総括研究報告書 | | |
| 佐々木次雄 | 百日咳菌、ジフテリア菌、マイコプラズマ等の臨床分離菌 の収集と分子疫学的解析に関する研究 ----- | 1 |
| II 分担研究報告書 | | |
| 堀内善信 | 日本における百日咳菌の抗原変異と病原性の解析 ----- | 9 |
| 菊池 賢 | 国内における百日咳発生動向調査のための迅速診断法 の検討 ----- | 16 |
| 高橋元秀 | ジフテリア ----- | 22 |
| 諸角 聖 | 我が国の医療従事者に対する、百日咳菌・ジフテリア菌の 保菌状況調査 ----- | 30 |
| 見理 剛 | マイコプラズマ肺炎の分子疫学的研究 ----- | 35 |
| 成田光生 | マクロライド耐性マイコプラズマ野生株の 性状解析と、その臨床医学に関わる問題点 ----- | 41 |
| 荒川宜親 | <i>Haemophilus influenzae</i> 臨床分離株の型別分布及び 薬剤感受性分布に関する研究 ----- | 49 |
| 山崎 勉 | ヘモフィルス インフルエンザ感染症と分離菌解析 ----- | 57 |
| III 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | | 63 |
| IV 研究成果の刊行物・別冊 ----- | | 65 |
| V 参考資料、その他 | | |

I. 総括研究報告書

(平成15年度)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

百日咳菌、シフテリア菌、マイコプラズマ等の臨床分離菌の収集と分子疫学的解析に関する研究

主任研究者 佐々木次雄（国立感染症研究所・細菌第二部）

研究要旨

呼吸器系細菌感染症のうち、特に乳幼児、学童に罹患率の高い百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)、シフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、インフルエンサ菌 (*Haemophilus influenzae*) の臨床株を過去及び現在にわたって広く収集し、最新の分子生物的手法を駆使してこれらの収集菌株を解析した。百日咳菌及びマイコプラズマの分担研究班では興味ある新知見が得られ、論文作成中である。シフテリア患者報告数は年 0～数例と少なく、新たなシフテリア菌分離は難しい。しかし、シフテリア毒素産生 *C. ulcerans* やシフテリア毒素非産生 *C. diphtheria* が分離されることかあるため、医療従事者をキャリア候補と考え、医療従事者からこれらの菌及び菌の遺伝子検出を試みたが、初年度は菌分離も遺伝子検出もできなかった。インフルエンサ菌について生物型、血清型、薬剤感受性、薬剤耐性機構を調べたところ、生物型は 2, 3, 1 の順に多く血清型は 95%が nontypeable であった。従来、 β -lactamase 産生菌におけるアンピシリン (ABPC) をはしめとする β -lactam 薬に対する耐性が問題とされてきたが、 β -lactamase 陰性で ABPC 耐性を示すインフルエンサ菌も検出された。調べた 418 株中、 β -ラクタマーゼ産生株 61 株 (9.6%) 中、58 株が TEM-1 型、3 株が ROB-1 型であった。

分担研究者

荒川宜親 国立感染症研究所細菌第二部部長
堀内善信 国立感染症研究所細菌第二部室長
高橋元秀 国立感染症研究所細菌第二部室長
見理 剛 国立感染症研究所細菌第二部主任研究官
菊池 賢 東京女子医科大学感染症科講師
諸角 聖 東京都健康安全研究センター微生物部部長
成田光生 札幌鉄道病院小児科医長
山崎 勉 埼玉医科大学感染症科（小児科）講師

A 研究目的

「感染症法」指定呼吸器系細菌感染症の病原体として、国立感染症研究所細菌第二部が担当しているシフテリア（第2類）、百日咳（新5類）、マイコプラズマ肺炎（新5類）並びに細菌性髄膜炎（新5類）起因菌の臨床分離株を収集し、薬剤耐性を含むそれら臨床分離株の遺伝学的特性を最新の分子生物的手法を駆使して解析し、その結果を我が国におけるこれら病原体の流行把握並びに感染症予防に貢献させる。1）百日咳及びシフテリアは、世界的にワクチン接種で十分な防御効果を挙げている、我が国でも患者発生は激減している。しかし、欧米ではワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ百日咳菌の分離率が増加傾向にあることが報告されている。そこで、我が国で分離された百日咳菌の抗原遺伝子について解析する。2）1990年以降、旧ソビエト連邦でシフテリアの大流行があり、シフテリアのサーヘイランスとワクチン接種の重要性が世界的に再認識されている。また、シフテリア毒素産生 *C. ulcerans*、シフテリア毒素非産生 *C. diphtheria* が分離されることもあり、これらの病原体のキャリアに医療従事者が関与するという作業仮説を立て、医療従事者を中心にこれらのシフテリア菌の分離並びに抗体測定解析を行う。収集した百日咳菌及びシフテリア菌臨床分離株を遺伝学的に解析することにより、今後の感染制御に必要な情報を得る。3）肺炎マイコプラズマは、我が国において

は以前のような4年周期の大流行は起こらなくなったか、今でも地域的に小流行も引き起こしており、中には劇症化するケースもある。また、マクロライド耐性菌が分離されるようになってきたこともあり、その動向を調べ有効な化学療法につなげる。肺炎マイコプラズマ菌の病原因子と肺炎の発症機構はいまだ十分に解明されていない。マイコプラズマ肺炎は多様な合併症を併発して重症化することもあり、臨床分離菌に遺伝学的な特徴を見出せば、肺炎マイコプラズマ菌の病原性を考察する上で有用な情報となりうる可能性はある。4）日本にもb型インフルエンザ菌（Hib）ワクチンが導入されようとしており、その前後で、臨床分離株の血清型や遺伝子型に変化が起こるかどうかを把握するとともに、臨床分離菌の薬剤耐性の獲得状況を把握しつつ、敗血症や髄膜炎などを引き起こした株について病原因子の解析を行うことは、小児や高齢者における肺炎や敗血症等の感染症対策を講じる上で重要な情報となりえることが期待される。インフルエンザ菌における薬剤耐性の獲得状況は国内外で異なっており、国内分離菌のデータを蓄積することは重要である。また、敗血症などの侵襲的感染症を引き起こす病原機構には不明な点も多いので、その因子解明につなげる研究成果が得られれば新しいワクチン開発の可能性も期待できる。

B 研究方法

臨床分離株及び臨床材料（咽頭スワブ、血清等）の収集には、地方衛生研究所並びに医療機関の協力を仰ぎながら、国立感染症研究所倫理委員会規定並びに関連機関の諸規定に沿って行った。研究を実施するにあたり、全体研究班を2回開催した。第1回班会議では本研究班の活動目的と活動方針を確認し、第2回班会議では各分担研究者の研究報告を行った。また、「百日咳・シフテリア菌」グループと「マイコプラズマ」グループは別途、班会議を開催し、それぞれ専門的な面から研究内容について議論した。本年度、研究に用いた臨床分離菌と解析内容を以下に示す。

百日咳菌 1988～2001年に我が国で分離された107株を用いてワクチン株と異なる抗原遺伝子出現状況をパルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）およびシーケンスにより解析した。また、二段階PCRによる感度の高い検出系を確立し、百日咳か疑われる鼻咽頭スワブ100検体に適用し、培養法と比較した。

シフテリア菌 1961～1992年に日本各地で分離された85株を用いて生化学試験、シフテリア毒素原性試験を行った。また、医療従事者の咽頭拭い液230検体、上気道炎患者／下気道炎患者の咽頭拭い液または鼻腔拭い液87検体からの*C. diphtheria*、*C. ulcerans*、及び百日咳菌の分離及びDNA検出を行った。

マイコプラズマ 1983～1998年に神奈川県で分離された296株、2000～2003

年に北海道、高知県、神奈川県で分離された73株を用いて、細胞付着蛋白をコートしているP1遺伝子による型別、薬剤感受性試験並びに薬剤耐性機構の解明を行った。

インフルエンザ菌 分担研究者、山崎は2001～2002年に埼玉医科大学附属病院で分離された418株についてβ-ラクタマーゼ産生性、薬剤感受性を調査した。分担研究者、荒川は2002年までに収集した634株について生物型、血清型、薬剤感受性、薬剤耐性機構を調べた。

（倫理的側面での配慮）

分離菌や採取した臨床材料（咽頭スワブ、血清等）に関連する患者情報の管理と取扱いについては、国立感染症研究所倫理委員会での承認内容に沿って行った。

C 研究結果

百日咳菌

1) 1988～2001年に我が国で分離された107株についてPFGE解析を行ったところ、系統樹解析により大きく3タイプ（Type-A, Type-B, Type-C）に大別された。その占有率はType-Aが81%（87株）、Type-Bが18%（19株）、Type-Cが1%（1株）であり、Type-Cはワクチン株である東浜株と同じPFGEパターンを示した。PFGE解析に供試した菌株から91株を選択し、百日咳毒素S1遺伝子（*ptxS1*）およびパータクチン遺伝子（*prn*）を解析したところ、*ptxS1*は2種類（*ptxS1A*、*ptxS1B*）、*prn*

は3種類 (*prn1*, *prn2*, *prn3*) の抗原多型を示した。なお、ワクチン株である東浜株は *ptxS1B* および *prn1* を有していた。

2) 百日咳菌特異挿入配列である IS481 をターゲットとした2種類の nested PCR 系を構築し、百日咳の発生動向調査に欠かせない臨床検体からの百日咳菌の検出を試みた。nested PCR は IS481 の 22-174 領域 (nPCR1) と 644-849 領域 (nPCR2) をそれぞれ検出する系で、検出感度は共に 5 CFU/tube であった。百日咳が疑われる鼻咽頭スワブ 100 検体について、培養法を対照に PCR を行った。PCR1 の感度、特異性、positive predictive value, negative predictive value は 88.9%, 68.3%, 38.0%, 96.5%, PCR2 では 100%, 87.5%, 60.0%, 100% であった。測定に要する時間はいずれも約4時間であった。nPCR1 では培養陽性18件のうち2件が陰性となったか、nPCR2 では培養陽性検体はすべて陽性となった。

ジフテリア菌

1) 1961~1992年に日本各地で分離された85株についてハイオタイプを調べたところ、*gravis* 型は56株、*mitis* 型は15株、その他が14株であった。ハイオタイプには分離された地域差が大きく影響していた。これらの菌株のジフテリア毒素原性試験をPCR法、培養細胞法、ウサキ皮内法、Elek法で調べたところ、感度の面ではPCR法 ≧ 培養細胞法 ≧ ウサキ皮内法 > Elek法の順に優れていたか、毒素を定量的

に測定する場合には培養細胞法かウサキ皮内法より4倍ほど感度が優れていた。

2) 医療従事者の咽頭拭い液230検体、上気道炎患者/下気道炎患者の咽頭拭い液または鼻腔拭い液87検体からは、*C diphtheria*、*C ulcerans*、及び百日咳菌は分離されず、DNAも検出できなかった。

マイコプラズマ

1) マイコプラズマ肺炎患者から2000-2003年に分離された *M pneumoniae* 50株の菌型を調べたところ、2000-2001年の分離菌はすべてII型菌だったか、2002年にはI型菌が出現し、2003年にはI型菌が多数を占めるようになっていた。また、同時期に呼吸器疾患患者から採取された喀痰をPCR法で分析し、*M pneumoniae* のP1遺伝子が検出された83例について菌型を特定した。この調査でも2000年にはII型の *M pneumoniae* がほとんどであったのに対して、2001年以降はI型菌が増加し、2002年には多数を占めるようになっていた。日本では2001年から2003年の間に、*M pneumoniae* の菌型の交代が起こったと考えられる。マイコプラズマ肺炎の発生動向は2001年以降増加傾向にあるか、菌型の変化との関連が疑われる。

2) 2000~2003年に北海道、高知県、神奈川県で分離された73株中13株がエリスロマイシン (EM) 耐性であった。マクロライド耐性には、23SrRNA 遺伝子のトメインII又はトメインV、

又は L4、L22 リボソーム蛋白が関与していることか多い。13 株を解析した結果、トメイン II 変異株はなく、トメイン V 変異株 13 株中、A2063G 変異株か 11 株、A2063C 変異株か 1 株、C2617G 変異株か 1 株であった。A2063G 及び A2063C 変異株はマクロライドに高度耐性を示し、C2617G 変異株は低度耐性を示した。L4、L22 リボソーム蛋白遺伝子にも変異は認められたか、耐性への貢献度については解明できなかった。

インフルエンザ菌

1) 2001～2002 年に埼玉医科大学附属病院で分離されたインフルエンザ菌 418 株は、小児由来か 65%を占め、インフルエンザ菌か分離された検体は、喀痰 (57%)、咽頭粘液 (32%) など、気道由来株か 89%を占めた。小児の気道由来 58 株についてニトロセフィン法により β -ラクタマーセ産生性、微量液体希釈法により薬剤感受性を、PCR 法により薬剤耐性遺伝子である *pbp3-1*、*pbp3-2* を検出し、薬剤感受性試験の結果と比較した。ABPC の MIC か $0.5\text{--}20\ \mu\text{g/ml}$ の感受性株では、*pbp* 遺伝子変異か認められ、MIC か $0.5\ \mu\text{g/ml}$ の 1 株ならびに MIC か $10\ \mu\text{g/ml}$ の 7 株は、*pbp3-1* あるいは *pbp3-2* のいずれかの変異か存在した。さらに、MIC か $2\ \mu\text{g/ml}$ の 20 株では、遺伝子変異数か 2 のものか 15 株、変異数 1 のものか 5 株を占めた。ABPC 耐性株については、ABPC の MIC か $4\ \mu\text{g/ml}$ の 9 株では、遺伝子変異数か 2 のものか 8 株、変異数 1 のものか 1 株を占め

た。また、MIC か $8\ \mu\text{g/ml}$ 以上の 13 株では、遺伝子変異数か 2 のものか 3 株、変異数 1 のものか 5 株を占めたか、*pbp* 遺伝子変異か見られなかったものも 5 株存在した。なおこの 13 株は、1 株を除いて β -lactamase 産生性であり、ABPC 耐性に関しては β -lactamase か主体的役割を有するものと推察された。しかし、 β -lactamase を産生し、かつ *pbp* 遺伝子変異を 2 個認める株も存在した。薬剤感受性試験で ABPC 感受性であっても、耐性遺伝子を保有する場合かあり、今後もインフルエンザ菌の薬剤耐性の動向に留意すべきである。

2) 主に呼吸器材料より分離された *Haemophilus influenzae* 634 株を用いて生物型、血清型、薬剤感受性、薬剤耐性機構を調べた。生物型は 2, 3, 1 の順に多く血清型は 95%か nontypeable であった。耐性率はアンピシリン 14.7%、アンピシリン/スルハクタム 7%、セファクロル 17%、クロラムフェニコール 3.5%、クラリスロマイシン 1%であった。 β -ラクタマーセ産生株は 61 株 (9.6%)、そのうち 58 株か TEM-1 型、3 株か ROB-1 型であった。BLNAR 株は 29 株 (4.9%) であった。

D 考察

百日咳及びシフテリアはワクチン接種で十分な防御効果を挙げており、我が国での患者発生は激減している。そのため、新たに臨床分離株を集めることは非常に難しい。しかし、シフテリア患者からシフテリア毒素産生 C

ulcerans やシフテリア毒素非産生 *C diphtheria* が分離されることかある。このように稀てはあるか患者発生かあるということはこれらの病原菌のキャリアか存在することを示唆している。研究班では医療従事者をキャリア候補と考え、医療従事者の咽頭又は鼻腔からこれら病原体の分離と遺伝子検出を行い、医療従事者かキャリアになりえる可能性について調べたか、現在までのところ、病原体の分離も遺伝子も検出てきていない。患者発生率に比較し検査した医療従事者の数が少ないこともあり、医療従事者かキャリアになりえる可能性はまた否定できない。来年度は検査対象医療従事者数を増やし、医療従事者と非従事者群におけるこれら病原体に対する抗体価比較を行うなど、更なる調査を行う。

百日咳菌 我か国における抗原変異株の出現動向を把握するために、収集百日咳菌 107 株について PFGE 解析および抗原遺伝子のシーケンス解析を行った結果、1994-1995 年からワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株 (Type-B) が出現していることか明らかになった。ワクチン株と異なる抗原変異株の出現は欧米諸国ではすでに報告されており、近年分離される菌株の多くは抗原変異株であることか知られている。事実、1995-1996 年には、高いワクチン接種率を維持するオランダにおいて百日咳の大規模なアウトブレイクか発生し、その際分離された菌株の多くは抗原変異株であった。また、米国・ポーランドでは

百日咳患者数は増加傾向にあり、分離される菌株の多くは抗原変異株であることか報告されている。このことから、欧米諸国ではこの抗原変異株はワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性かあると考察されている。本研究により、我か国でも抗原変異株か出現していることか明らかとなったか、日本では百日咳報告患者数は減少していることから、Type-B 株は現行ワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性は低く、国外から持ち込まれた可能性か高いことか示唆された。しかし今後、我か国で分離される Type-B 株の出現動向に注目する必要がある。

マイコプラズマ *M pneumoniae* は細胞付着蛋白遺伝子の違いにより、二つの型 (I 型、II 型) に分類することかできる。我か国では 8~10 年周期の非常にきれいなパターンでこれらの型か入れ替わっていることを突き止めた。型の入れ替えは、宿主側の免疫学的要因によると考えられるか、また決定的な証拠は得られていない。今後、各型 *M pneumoniae* で感染した患者血清を用いて各型 *M pneumoniae* に対する中和抗体価や血球付着阻止活性能の違いを調べ、*M pneumoniae* の型か入れ替わる要因究明にあたりたい。我か国では、以前、マクロライト耐性 *M pneumoniae* が患者から検出されることはなかった。しかし、2000-2003 年に分離された 73 株並びに患者材料 (咽頭スワブや喀痰) を直接用いた検査ではマクロライト耐性 *M pneumoniae* が

15%程度検出された。これまでは *M pneumoniae* を分離しなければ薬剤耐性検査を行えなかったか、本研究班では患者咽頭スワブ又は喀痰検体に直接 PCR を適用し、得られた PCR 産物を制限酵素で切断する方法で簡単に薬剤耐性 *M pneumoniae* かどうかを調べる方法を確立した。本成果は、マクロライド耐性 *M pneumoniae* 感染患者の早期スクリーニング並ひに適切な薬剤投与にもつなかるものである。

インフルエンザ菌 インフルエンザ菌の薬剤耐性について、従来は β -lactamase 産生菌における ABPC をはしめとする β -lactam 薬に対する耐性か問題とされてきた。最近、 β -lactamase を産生せず ABPC 耐性を示すインフルエンザ菌の存在か、特にわが国において注目されている。インフルエンザ菌は、呼吸器感染症以外にも髄膜炎や敗血症の原因ともなり、これらの耐性株の出現は、臨床上の脅威である。米国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)の基準では、ABPC の MIC が $4 \mu\text{g/ml}$ 以上のものを ABPC 耐性と定義している。この判定基準を適用すると、今回の検討からは ABPC 感受性菌であっても耐性遺伝子を持つ場合があった。ABPC に対する MIC が $0.5\text{--}2.0 \mu\text{g/ml}$ のものでは、いずれも *pbp* 遺伝子変異を有し、全身感染症の際の抗菌薬選択に、今後留意する必要がある。一方、ABPC に対する MIC が $8 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性株では、*pbp* 遺伝子変異のない株もあり、この群における ABPC 耐性は、従来よ

り報告されている β -lactamase が主体的役割を有するものと推察された。しかし、 β -lactamase を産生し、かつ *pbp* 遺伝子変異を2個認める株も存在した。インフルエンザ菌における、これらの耐性株の検出状況を、今後も注意深く調査する必要がある。 β -ラクタマーセ産生株は約10%であり、我が国の最近の報告と大差はなく、約30%という米国、カナダでの報告より低い。この差はペニシリン系薬の使い方の違いを反映していると思われる。逆に我が国では米国に比へ BLNAR の頻度が高いとされるか、我が国では経口セフェム系薬の使用頻度が高く、これらの薬剤は β -ラクタマーセ産生菌には有効たか BLNAR には効果の低いものかあり、これは臨床現場で BLNAR が選択され易い結果であろう。BLNAR の判定基準を「 β -ラクタマーセ非産生アンピシリンの MIC が $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ 」とすると、本研究では49%が BLNAR であった。この値は我が国の1997～1999年の小児科領域における報告(30%)よりも増加している。

E 結論

研究対象病原体が4種類であることより、第一年度は各病原体における研究課題の明確化と研究組織の充実化に努めた。各病原体に2名の分担研究者(1名は国立感染症研究所職員)をあてた。病原菌を対象とする疫学調査は、長期間にわたって継続しなければ意味がない。本研究事業期間中は、研究課題に沿って実績を上げることは

当然であるか、研究事業終了後も国立感染症研究所を中心に更なる研究を持続できるシステム作りも大切であると考えた。そのため、患者数の少ない百日咳菌、シフテリア菌、マイコプラズマの収集に関しては、国立感染症研究所—地方衛生研究所—医療機関からなる研究ネットワークを構築した。第一年度の特記すべき研究成果は、1) 1988～2001年に我が国で分離された百日咳菌107株を用いてワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株が存在するかどうかを調べたことである。その結果、我が国における抗原変異株の出現は欧米で言われているように、現行ワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性が低いことを明らかにした。2) *M pneumoniae*には2つの型(I型、II型)があり、8～10年周期で型が入れ替わっており、現在(2003年)はII型からI型への入れ替わり時期にあることを明らかにした。また、マクロライド耐性 *M pneumoniae* が急速に蔓延しつつあることを明らかにし、その耐性機構並びに耐性 *M pneumoniae* の簡易検出法を確立した。

F 健康危機情報

平成12年(2000年)以前には報告例のないマクロライド耐性 *M pneumoniae* が全 *M pneumoniae* 感染患者の約15%から分離されていることが判明した。*M pneumoniae* 感染症は、一般に小児や学童が罹患しやすく、その治療にはマクロライド系(主に第14

員環のエリスロマイシンやクラリスロマイシン) 抗生物質が投与される。最近、小児領域では「マクロライドが効かないマイコプラズマ肺炎患者に遭遇することがある」と言われていたか、その原因はマクロライド耐性 *M pneumoniae* 感染菌の蔓延にあった。本情報は、国立感染症研究所が発行する病原微生物検出情報(IASR, Vol 25, No 2, 2004年)に「マクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* 増加の兆し」という記事で報告を行った。

G 研究発表

(分担研究者については各々の報告書に記載)

1) 佐々木次雄、マイコプラズマ肺炎の細菌学的診断法、日本臨床微生物雑誌、13(2) 101-106, 2003

2) 佐々木次雄、成田光生、岡崎則男、安岡富久、荒川宜親、マクロライド耐性 *Mycoplasma pneumoniae* 増加の兆し、病原微生物検出情報、25(2) 43-44, 2003

3) Horino A, Sasaki Y, Sasaki T, Kenri T Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans* J Bacteriol 2003, 185(1) 231-42

H 知的所有権の取得状況

該当するものなし

II. 分 担 研 究 報 告 書

日本における百日咳菌の抗原変異と病原性の解析

分担研究者 堀内 善信 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

1988年から2001年に我が国で分離された百日咳臨床分離株107株を収集し、ワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株の出現状況を調査した。解析菌株はパルスフィールドゲル電気泳動により3タイプ（Type-A 87株、Type-B 19株、Type-C 1株）に大別され、1994-1995年からType-B株の分離率が上昇していることが判明した。分離菌株の百日咳毒素S1遺伝子（*ptxS1*）とパータクチン遺伝子（*prn*）を解析したところ、Type-B株は主にワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株であることが示され、我が国でも欧米諸国と同様に抗原変異株が出現していることが明らかとなった。日本では1991年以降、百日咳報告患者数は減少傾向にあることから、Type-B株は現行ワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性は低く、ワクチンの有効性とは無関係な出現であると考察された。

研究協力者

児玉温子（国立感染症研究所 細菌第二部）

蒲地一成（国立感染症研究所 細菌第二部）

A 研究目的

百日咳は百日咳菌（*Bordetella pertussis*）の気道感染によって引き起こされる小児の急性呼吸器感染症であり、本疾病対策にはワクチン接種による防御が最も有効である。近年、高いワクチン接種率を維持する欧米諸国において百日咳患者数の増加が認められ、臨床より分離される百日咳菌の多くはワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つことが報告されている。この抗原変異株は百日咳菌の主要な病原因子である百日咳毒素

S1遺伝子（*ptxS1*）と接着因子であるパータクチン遺伝子（*prn*）がワクチン株と異なるため、欧米諸国ではこの抗原変異株は現行ワクチンによる免疫を回避するために出現したものと考察されている。

我が国では百日咳患者数の増加は認められていないか、いまだワクチン未接種の乳幼児を中心に散発的な小流行が認められている。現在まで、我が国では百日咳菌の分子疫学的解析が実施されたことがないため、どのような性質を持った百日咳菌が市中を循環しているのかは不明のままである。また、抗原変異株の出現状況を調査した例は無く、日本での抗原変異株の出現状況に関する知見は得られていない。以上の背景を踏まえ、本研究では我が国における抗原変異株の出現状況を把握することを目的に、

日本各地域で分離された百日咳臨床分離株を収集し、その分子疫学的解析を実施した。

B 研究方法

菌株 1988年から2001年の間に我が国で分離された百日咳臨床分離株(107株)を収集し、解析に供試した。なお、収集菌株は百日咳毒素遺伝子を標的にしたPCR法により再度同定を行い、すべての菌株が百日咳菌であることを確認した。

パルスフィールド電気泳動 パルスフィールド電気泳動(PFGE)は常法に従って行った。百日咳菌をBordet-Gengou培地で培養した後、菌体を回収し、プラクを作製した。プラクはproteinase K処理を行った後、DNAを制限酵素XbaIにより切断し、1%アカロースゲルにより分離した。泳動装置にはCHEF DR II (Bio-Rad)を用いた。

系統樹解析 系統樹解析はPFGE分析の泳動像をもとに、Diversity Databaseソフトウェア(PDI)を用いてUPGAMA法により行った。

DNA解析 百日咳毒素S1遺伝子(*ptxS1*)およびパータクチン遺伝子(*prn*)の多型領域1の塩基配列をdye-terminator法により解析した。シーケンス解析にはABI PRISM 3100 Genetic Analyzerを使用した。

変異百日咳毒素の生物活性 抗原変異株が産生する変異百日咳毒素(PT-194I)とワクチン株が産生する百日咳毒素(PT-194M)をAffi-gel blueカラムとfetuin-Sepharoseカラムを用いて精製した。毒素の生物活性はCHO cell-clustering testにより評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は分離菌株についての解析であり、ヒト由来の臨床材料を使用しないため、倫

理上特段の問題点は発生しないと判断された。

C 結果

PFGE解析の結果、解析菌株は48のPFGEパターンを示し、系統樹解析により大きく3タイプ(Type-A, Type-B, Type-C)に大別された(図1)。その占有率はType-Aが81%(87株)、Type-Bが18%(19株)、Type-Cが1%(1株)であり、Type-Cはワクチン株である東浜株と同じPFGEパターンを持つことが示された。PFGE解析に供試した菌株から91株を選択し、*ptxS1*および*prn*を解析したところ、*ptxS1*は2種類(*ptxS1A*, *ptxS1B*)、*prn*は3種類(*prn1*, *prn2*, *prn3*)の抗原多型を示した(図2)。なお、ワクチン株である東浜株は*ptxS1B*および*prn1*を有していた。

PFGEタイプと抗原多型の関係について解析を加えたところ、Type-B株は19株中17株(90%)がワクチン株と異なる抗原遺伝子の組み合わせ(*ptxS1A/prn2*)を持つことが示された(表1)。一方、Type-A株は71株中67株(94%)がワクチン株と同じ*ptxS1B/prn1*を有し、同様にType-C株も*ptxS1B/prn1*を持つことが示された。このことから、1)日本で分離された百日咳菌はそのPFGEタイプと抗原多型の間に強い相関があること、2)Type-B株の多くは抗原変異株であることが明らかとなった。

Type-B株の分離地域を解析したところ、Type-B株は1994-1995年に中国地方および北海道で初めて分離され、その後、近畿、関東、東北地方で分離されていることが示された(図3)。このことからType-B株は特定地域に限局した分離ではなく、全国レベルで分離されていることが明らかとなった。さらに、Type-B株の分離時期について

解析を行ったところ、Type-B 株は 1994-1995 年から周期的に出現し、近年、その分離率を徐々に上昇させていることが判明した (図 4 B)。また、ワクチン株と異なる抗原遺伝子 (*ptxS1A/prn2*) を持つ Type-B 株の分離率は 1994-1995 年に 20%であったか、1998-1999 年、2000-2001 年ではそれぞれ 42%、33%であり、Type-B 株の出現パターンと同様な傾向を示していた。一方、我が国における百日咳報告患者数 (百日咳患者、百日咳様患者) は 1991 年から徐々に減少しており、type-B 株出現による報告患者数の増加は認められなかった (図 4 A, B)。

抗原変異株が産生する PT-194I の生物活性をワクチン株が産生する PT-194M と比較したところ、活性発現に必要な PT-194I と PT-194M の最少濃度はそれぞれ 44 pg/ml、68 pg/ml であり、変異型毒素の毒力に有意な差は認められなかった。

D 考察

本研究では、我が国における抗原変異株の出現動向を把握するために、PFGE 解析および抗原遺伝子のシーケンス解析を行った。その結果、1994-1995 年からワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株 (Type-B) が出現していることが明らかとなった。ワクチン株と異なる抗原変異株の出現は欧米諸国ではすでに報告されており、近年分離される菌株の多くは抗原変異株であることが知られている。事実、1995-1996 年には、高いワクチン接種率を維持するオランダにおいて百日咳の大規模なアウトブレイクが発生し、その際分離された菌株の多くは抗原変異株であった。また、米国・ポーランドでは百日咳患者数は増加傾向にあり、分離される菌株の多くは抗原変異株

であることが報告されている。このことから、欧米諸国ではこの抗原変異株はワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性があると考察されている。本研究により、我が国でも抗原変異株が出現していることが明らかとなったか、日本では百日咳報告患者数は減少していることから、Type-B 株は現行ワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性は低く、その他の要因によるものと考察された。他の要因の一つとして抗原変異株が強い毒力を持つ百日咳毒素を産生している可能性が指摘されたか、変異型毒素の毒力に変化は認められなかった。

日本で分離された菌株は、その PFGE タイプと抗原多型の間に強い相関があることが示された。欧米諸国で分離された菌株にはこのような相関は認められておらず、この相関は日本の百日咳菌固有のものと考えられた。一般に、ワクチン株と同じ抗原遺伝子 (*ptxS1B*、*prn1*) は旧型、ワクチン株と異なる抗原遺伝子 (*ptxS1A*、*prn2*、*prn3*) は新型と呼ばれており、旧型と新型の組み合わせを持つ菌株は変遷型 (transitional) と称されている。米国およびカナダでは変遷型が全菌株の約 2 割を占めており、百日咳菌は旧型から変遷型、変遷型から新型というように段階的に進化しているものと考察されている。しかし、日本では、変遷型は解析菌株の 3%を占めるに過ぎず、Type-A、Type-B、Type-C 株の間には遺伝的関連性は無いものと考えられた。すなわち、Type-B 株は固有の進化を遂げた菌株であり、その出現理由の一つとして国外から持ち込まれた可能性が考えられた。

現在のところ、我が国では百日咳報告患者数は減少傾向にあるため、Type-B 株の出現が現行ワクチンの有効性に直接影響する

可能性は極めて低いと考えられる。しかし、我が国で Type-B 株かその分離率を上昇させている理由は依然不明のため、今後、Type-B 株の病原性などについて詳細な検討を行っていく必要がある。

E 結論

欧米諸国同様に、我が国でもワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株 (Type-B) が出現していることが判明した。この抗原変異株は強い毒力を持つ百日咳毒素を産生している可能性が疑われたか、その毒力に変化は認められなかった。また、我が国における抗原変異株の出現理由の一つとして、国外から持ち込まれた可能性が考えられた。

F 健康危険情報

我が国の百日咳報告患者数は減少傾向にあるため、抗原変異株の出現が直接我が国の公衆衛生に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。しかし、抗原変異株の出現理由は依然不明のため、今後も抗原変異株の発生動向を継続的に監視していく必

要がある。

G 研究発表 (予定)

1 論文発表

Kodama A, K Kamachi, Y Horiuchi, T Konda, M Fukui, and Y Arakawa Antigenic divergence of *Bordetella pertussis* isolated in Japan correlation with antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profile in the isolates (投稿準備中)

2 学会発表

児王温子、蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親、近年増加傾向にある百日咳菌が有する主要抗原遺伝子について、第 77 回日本細菌学会総会、平成 16 年 4 月、大阪

H 知的所有権の出願・登録状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

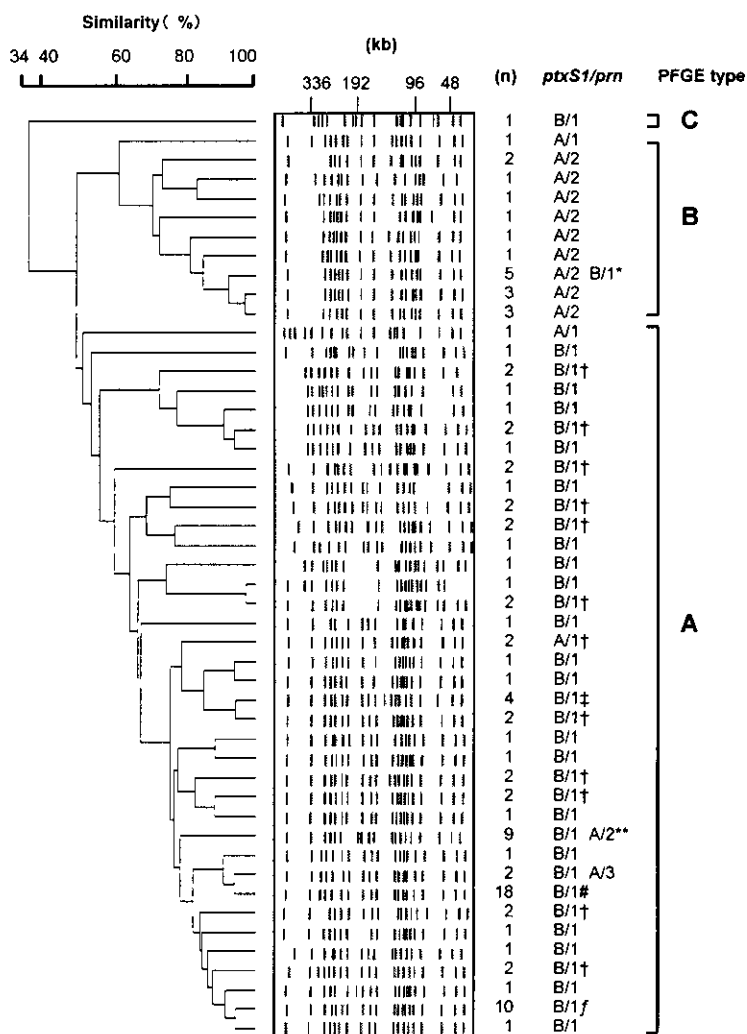


FIG 1 Dendrogram of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of 107 Japanese *Bordetella pertussis* strains, 1988-2001. The dendrogram was calculated by UPGMA method. Regions encoding *ptxS1* and the repeats of the *prn* were sequenced for 91 strains selected from the 107 strains. The combination of *ptxS1* and *prn* alleles shown as *ptxS1/prn*, e.g., B/1 indicated a *ptxS1B/prn1*. *, one of 5 strains had *ptxS1B/prn1*, **, one of 9 strains had *ptxS1A/prn2*. The symbols indicated number of sequenced strains: †, one strain; ‡, three strains; #, 17 strains; f, eight strains.

A

```

          676
          |
Tohama   GTG CGC ATG GCG CCG GTG ATA GGC
          V  R  M  A  P  V  I  G

ptxS1B

ptxS1A           A
                  I
  
```

B

```

          260
          |
Tohama   RGDAPA GGAVP GGAVP GGAVP ----- GGFGP GGFGP VLD
ptn1     -----
ptn2     ----- GGFGP GGFGP
ptn3     ----- GGFGP
  
```

FIG 2 Variants of pertussis toxin S1 subunit and pertactin observed in Japanese *Bordetella pertussis* strains (A) Primary structure of pertussis toxin S1 subunit gene showing regions of polymorphism (B) Deduced amino acid sequence of region 1 of pertactin Dots indicate sequence identity with Japanese vaccine strain, *B. pertussis* Tohama Dashed indicate gaps The vaccine strain has a combination of *ptxS1B/prn1* alleles The variants were found in 91 strains

TABLE 1 Correlation between PFGE-type and *ptxS1/prn* alleles in *Bordetella pertussis* strains isolated during 1988-2001 in Japan

| PFGE type | No. of isolates | No. (%) of <i>ptxS1/prn</i> alleles | | | |
|-----------|-----------------|-------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | "old" | "transitional" | "new" | |
| | | <i>ptxS1B/prn1</i> | <i>ptxS1A/prn1</i> | <i>ptxS1A/prn2</i> | <i>ptxS1A/prn3</i> |
| type-A | 71 | 67 (94) | 2 (3) | 1 (1.5) | 1 (1.5) |
| type-B | 19 | 1 (5) | 1 (5) | 17 (90) | |
| type-C | 1 | 1 | | | |
| Total | 91 | 69 (76) | 3 (3) | 18 (20) | 1 (1) |

Seventy-one of 87 type-A strains were examined

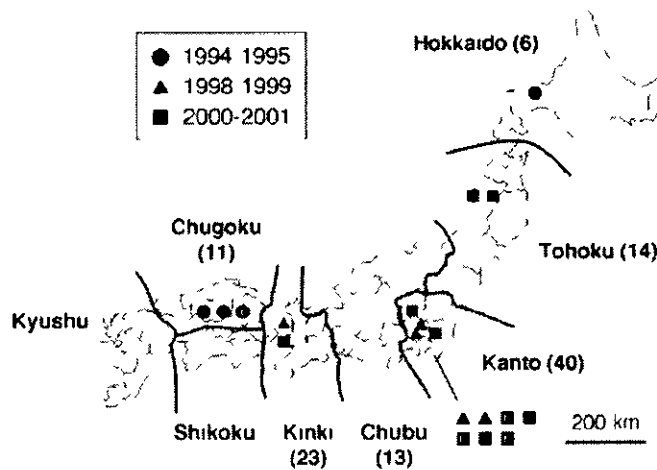


FIG 3 Geographic distribution of type-B strains in Japan Type-B strains were collected from each prefecture in the period 1994-1995 (●), 1998-1999 (▲), and 2000-2001 (■) Numbers of the symbols indicate numbers of type-B strain Numbers of total isolates collected in each district are indicated in parentheses

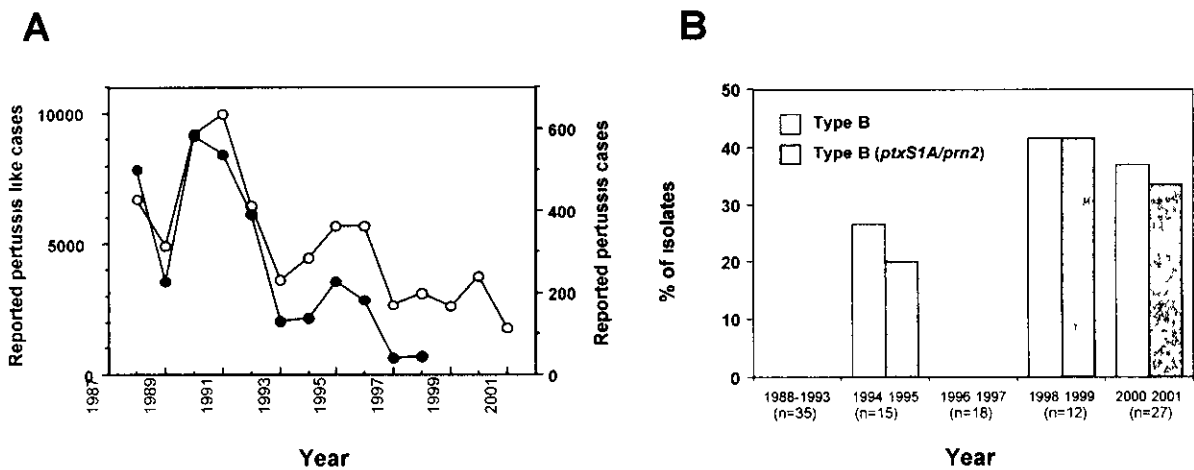


FIG 4 Temporal trend in isolation of type-B strains and reported pertussis cases in Japan (A) Reported pertussis-like cases (○) and pertussis cases (●) by sentinel clinics and hospitals in Japan, 1988-2001 The data were obtained from Infectious Disease Surveillance data of Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan The report of pertussis cases discontinued from 1999 (B) Changes in the frequency of type-B strain and those harboring *ptxS1A/prn2* alleles