

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

東京女子医科大学 感染症科 菊池 賢

研究要旨

我々は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 系を作成し、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 (*Bordetella pertussis*) 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。百日咳か疑われる鼻咽頭スワブ 100 検体について、培養を対照に PCR を行った。培養で百日咳菌は 18 件検出された。感度、特異性、positive predictive value, negative predictive value は PCR1 で 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 件が陰性となったが、nPCR2 では培養陽性検体はすべて陽性となった。今回、我々が作成した nested PCR の系は臨床検体から直接、短時間で百日咳菌を検出てき、臨床現場での百日咳の迅速診断に有用であり、我が国における百日咳の発生動向調査に適用しうるものと考えられた。

A. 研究目的

国内での百日咳発生動向を調査する上で欠かせない百日咳の迅速診断法として nested PCR 法を検討した。

B. 研究方法

百日咳疑い患者より得られた鼻咽頭スワブ 100 検体につき、培養検査と nested PCR 法の比較検討を行った。検体は cyclodextrin broth 300 μ l に resuspend し（鼻咽頭スワブ液）、cefalexin 40 mg/L 添加 Bordet-Gengou 培地、cefalexin 5 mg/L 添加 cyclodextrin 培地、Bordetella-CFDN 培地に塗布後、37°C、7 日間の好気湿潤培養を行った。百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の菌

種同定はグラム染色、オキニターゼ試験、血清によるスライト凝集反応によった。いずれかの培地で *B. pertussis* が確認できたものを培養陽性と判断した。鼻咽頭スワブ液 50 μ l は 100°C、20 分間煮沸し、18,500 \times g、10 分間遠心し、上清を PCR 用のサンプルとした。nested PCR は百日咳菌特異挿入配列である IS481 の 22-174 領域 (nPCR1)、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。使用したプライマーを表 1 に示す。nPCR2 はパラ百日咳菌 (*B. parapertussis*) 特異挿入配列である IS1001 の 907-1072 領域を同時に検出する nested duplex PCR とした。

PCR 産物は 1×TAE buffer、2% agarose で電気泳動を行い、特異バンドの確認を行った。

(倫理面への配慮) 倫理規定に沿った。

C. 研究結果

PCR 検出感度、特異性 図1に nPCR1, *B pertussis*, *B parapertussis*, *B bronchiseptica* の検出結果を示す。nPCR1 の一次 PCR の検出感度は 5×10^6 CFU/tube で *B parapertussis*, *B bronchiseptica* では増幅産物はみられなかった。nested PCR での検出感度は $5 \times$ CFU/tube に上昇した。*B parapertussis*, *B bronchiseptica* では nested PCR でも増幅産物はみられなかった。

図 2 に nPCR2 の *B pertussis*, *B parapertussis*, *B bronchiseptica* の検出結果を示す。nPCR2 の一次 PCR の検出感度は *B pertussis*, *B parapertussis* ともに 5×10^6 CFU/tube であった。nested PCR での検出感度は共に $5 \times$ CFU/tube まで上昇した。*B bronchiseptica* ても 5×10^4 CFU/tube までは非特異バンドの増幅がみられたか、増幅産物のサイズの違いから、区別可能であった。

臨床検体からの *B pertussis* 検出

図 3, 4 に nPCR1, nPCR2 による臨床検体からの *B pertussis* 検出例を示す。いずれも陽性例では明瞭な特異バンドが検出されていた。

培養法と nPCR1, nPCR2 の比較 表 2 に培養法と nPCR1, nPCR2 の比較成績を示した。nPCR1 では陽性件数が 100 検体中 42 件と高かったか、培養で陽性になった 18 検体のうち、2 検体では陰性と判定された。nPCR2 での陽性件数は 30 件であったか、培養陽性検体はすべて陽性であった。培養成績を gold standard とした時の nPCR1, nPCR2 の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を表 3 に示した。感度、特異度でも nPCR2 が優れていた。

尚、試験した 100 検体のうち、*B parapertussis* は培養、nPCR2 でも検出されなかった。

D. 考察

百日咳の診断方法としては、培養、直接蛍光抗体法 (DFA 法 direct fluorescent antibody method)、血清抗体価、PCR などの遺伝子診断が用いられている。

培養法は特異性が高く、gold standard と考えられている。菌株が得られれば分子疫学的解析、近年、散発的に報告されているエリスロマイシン耐性菌などの検出のための薬剤感受性試験も実施可能であり、発生動向調査には不可欠である。その一方で、感度が低く、検出までに時間がかかる欠点がある。DFA 法は迅速に結果が得られるか、特異性、感度に難があり、検査試薬や手技習熟度に影響される。血清抗体価は陽転化するまでに 1 週間程かかり、スライト凝集反応は特異性に乏しい。

一方、PCR 法は迅速で特異性に優れているか、通常の PCR は感度の面で問題があり、臨床検体から直接検出することは難しかった。今回、我々が検討した nested PCR 法は感度を 10^6 倍まで上げることに成功し、臨床検体からの *B. pertussis* の直接検出が可能となった。検出時間も 4 時間程なので、検体提出日に結果を報告することかでき、臨床現場での有用性は高いと思われる。取分け、nPCR2 は感度、特異性で nPCR1 に優れており、今回の検体から検出はされなかったか、我が国での実態かほとんど明らかにされていない百日咳類似呼吸器疾患を起こすとされる *B. parapertussis* も同時に検出することか出来ることから、有用性が高いものと考えられた。

百日咳はワクチンが普及した現在でもしはしは集団発生や院内感染が報告され、国によっては患者数も増え続けている。また、最近は成人での抗体価の低下により慢性咳嗽の原因となることか明らかになっているか、我が国での成人百日咳の実態は不明である。今回検討した nested PCR 系は我

か国の百日咳の今後の発生動向調査に適用可能であると思われた。

E. 結論

nested PCR による *B. pertussis* の検出系は臨床現場での百日咳診断に有用であり、我が国の百日咳発生動向調査に適用されうるものと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

平成 16 年日本化学療法学会総会で発表予定

H. 知的財産権の出願・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

表1 *B. pertussis*, *B. parapertussis* 検出のためのプライマー

PCR	Organism	Target		Oligonucleotide			Product size (kb)			
		Gene	Gene Bank No	Name of primer	Position	Sequence				
nPCR1	<i>B. pertussis</i>	IS481	M28220	BP1 (Forward)	22-46	5'-GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT-3'	181			
1st PCR				BP2 (Reverse)	202-178	5'-TTCAGGCACACAACTTGATGGGCG-3'				
2nd PCR				BP1 (Forward)	22-46	5'-GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT-3'	153			
				BP2 (Reverse)	174-149	5'-AATTGCTGGACCATTCGAGTCGACG-3'				
nPCR2	<i>B. pertussis</i>	IS481	M28220	BPIS4801 (Forward)	611-630	5'-GACTTCGTCTTCGTGGCCAT-3'	400			
1st PCR				BPIS4802 (Reverse)	1010-991	5'-GTACAGCGCGCCCGATGCCT-3'				
2nd PCR				BPNEST1 (Forward)	644-663	5'-CGCGTGGCCTTACCAGACAT-3'	205			
				BPNEST2 (Reverse)	649-630	5'-GGGCGGTAAGGTCGGGTAAA-3'				
1st PCR				<i>B. parapertussis</i>	IS1001	X66858	BPPA (Forward)	733-753	5'-CGCCGCTTGATGACCTTGATA-3'	498
							BPPZ (Reverse)	1230-1210	5'-CACCGCCTACGAGTTGGAGAT-3'	
2nd PCR				PARAN1 (Forward)	902-921	5'-CGCTGGCTGCTGCTGCACAA-3'	171			
				PARAN2 (Reverse)	1195-1176	5'-GTGGTCCAGGCTTGCTTTG-3'				

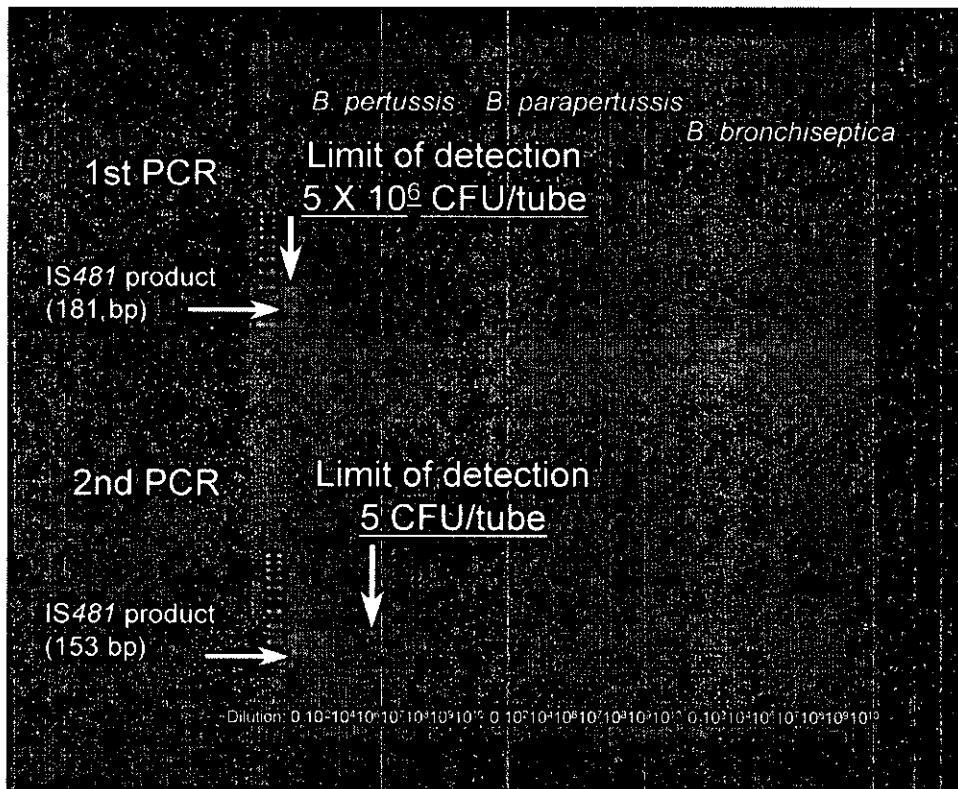


図1 nPCR1による *B. pertussis* 検出

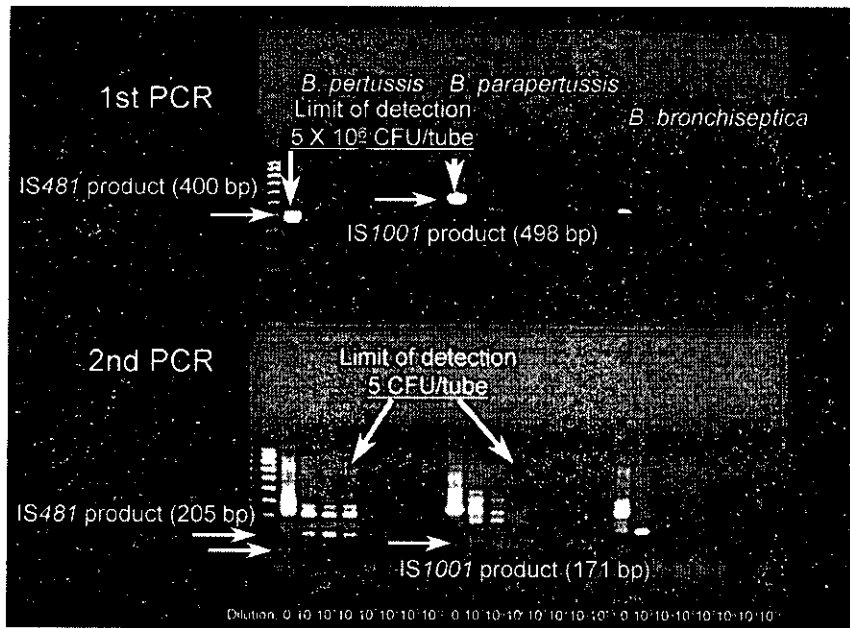


図 2 nPCR2 による *B. pertussis*, *B. parapertussis* 検出

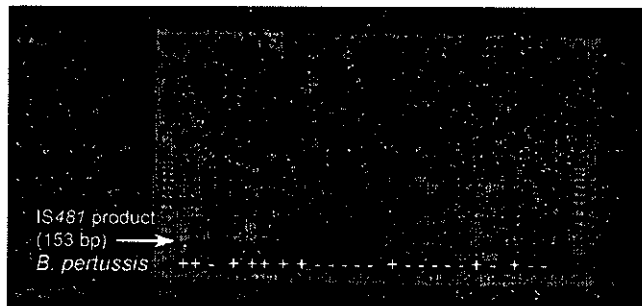


図 3 nPCR1 による鼻咽頭スワブからの *B. pertussis* 検出



図 4 nPCR2 による鼻咽頭スワブからの *B. pertussis* 検出

表2 *B pertussis* 検出における nPCR1, nPCR2と培養法の結果比較

Culture results	nPCR1		nPCR2		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	16	2	18	0	18
Negative	26	56	12	70	82
Total	42	58	30	70	100

表3 *B pertussis* 検出における nPCR1, nPCR2の特性

	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV* (%)	NPV** (%)
nPCR1	88.9	68.3	38.0	96.5
nPCR2	100.0	87.5	60.0	100.0

*PPV positive predictive value

**NPV negative predictive value

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

ジフテリア

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

協力研究者

岩城正昭、小宮貴子、福田 靖

国立感染症研究所 細菌第二部第三室

東京都、栃木県、秋田県衛生研究所 細菌課担当者

研究要旨 地方衛生研究所で保存されていたジフテリア菌について生化学的および分子生物学的検査をおこない、ジフテリアの標準検査法としての各検査法の手技の容易さ、感度等について比較検討した。標準的な手順としては、チンスタール培地で増殖した菌を、グラム染色による陽性と菌形を確認する。異染小体染色は判定が困難な場合が多いこと、大半の *Coryne* 属菌が陽性となるために、必ずしも実施する必要性は低いと思われた。Api コリネキットによる生化学的検査とハイオタイプの確認は、菌の性状を確認する上で有意義である。ジフテリア毒素原性試験の感度の比較では、PCR 法 \geq 培養細胞法 \geq ウサキ皮内法 $>$ Elek 法の順であった。また、毒素を定量的に測定した場合、培養細胞法はウサキ皮内法より4倍程度感度が優ることが確認された。

A 研究目的

ジフテリアは、日本ではワクチン接種の普及に伴い患者の報告は激減し、過去10年間に数例の発生が見られるだけで、報告のない年もある。しかし1990年代には、旧ソビエト連邦では大流行があり、ジフテリアのサーベイランスとワクチン接種の重要性が再認識されている。また、欧州ではジフテリア様患者から毒素産生性 *C. ulcerans* の分離報告があったが、日本国内でも2001と2002年に2名のジフ

テリア様患者から本菌が分離・確認された。さらに、ジフテリア患者から毒素非産生性の *C. diphtheria* が分離されている事例報告も海外ではあり、国内での疫学調査が必要である。

B 研究方法

過去国内で発生したジフテリア患者について臨床的診断法だけでなく、細菌学的調査を実施した地方衛生研究所で分離・保管されていたジフテリア菌株を収集した。収集した菌株の起

源、株数、由来等の記録があるものについては、(表1)に示した。現在、シフテリアのリファレンスセンターとしてシフテリアの細菌学的診断に用いる毒素、標準株および抗毒素の分与や標準検査法についてとりまとめを実施している感染症研究所 細菌第2部 第三室において、以下の検査を実施した(図1)。

培養した菌は、細菌学的検査法の定法に従いグラム染色、異染小体染色をおこなった。毒素原性試験として、Elek試験、培養細胞試験法、ウサキ皮内試験法、PCR法で検査した。培養、染色試験の判定は、シフテリア菌の特徴である好気性の細長いグラム陽性桿菌(10~80×0.3~0.8μm)であること、形状はやや多形性、棍棒状、まっすくなものや湾曲しているものなどか混在し、柵状や松葉状に重なりあっている短桿菌か観察されるか、異染小体染色により菌体の末端に異染小体か観察されるか等、複数点をチェックした。

生化学性状試験は、市販品のアピコリネキット(日本ヒオメリュー)で実施した。培養した菌にサプリメントを添加後、生じた反応パターンをコート別に判定した。シフテリア菌のハイオタイプは *gravis*、*mitis* は分類可能であるか、*intermedius* は陽性対照とした PW8 株の反応に対応するかで判断した。ハイオタイプは、本来コロニーの形態、糖の分解能および溶血性等の違いで判定し *belfanti* を加えた4種類の分類方法もあるか、今回は3種に分けた。

Elek試験は、平板寒天培地の中央の

穴に 500 U/ml のシフテリア抗毒素を 9 μl 入れ、更に蒸留水を入れて穴を満たした。37℃ で 24 時間培養後、穴と菌穿刺部位に白色の沈降線か出現すれば、シフテリア毒素産生株として判定した。

ウサキの皮内試験法は、ウサキの背毛を除去した後、約 2 cm 角のマスを書き、菌が増殖したレフレル培地凝固水(除菌)を2段階希釈し 0.1 ml 皮内注射した。注射 48 時間後に約 10mm の発赤か生じた場合を陽性とした。培養液に約 1 U/ml のシフテリア抗毒素を添加した場合は、毒素は中和され発赤は観察されないことを確認した。

Vero 細胞を用いた培養細胞法は、菌が増殖したレフレル培地凝固水(除菌)をマイクロプレート上で2段階希釈した後、Vero 細胞浮遊液を加え、37℃で4日間培養し、シフテリア毒素により細胞死か観察される希釈倍数を求めた。シフテリア抗毒素を添加した場合は、毒素は特異的に中和され、Vero 細胞は増殖することを確認した。

PCR 試験法は、シフテリア菌の DNA を Qiagen 社の QIA amp blood キットを用いて単離後、毒素遺伝子の一部を増幅した。使用したプライマーは、シフテリア毒素の A サブユニットの N 末端の部分に対応する DNA の 248 塩基対を増幅するように設計した。この方法では 50 cfu の菌を検出可能であることを予備試験で確認した。

(倫理面への配慮)本年度はヒト検体は扱わない。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和48年法律第105号)及び「実験動物の飼育

及び管理に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号)の法律基準のほか、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情大 141 号)の通知を踏まえつつ、使用する実験動物が有効かつ適切に行われるように配慮する。また、国立感染症研究所内の動物実験指針に基づき、年度ごとに実験計画書を提出・審査を受け、用いる動物数は最小限とし、採血時には動物愛護の精神を基に実験を行っている。

C 研究結果

(1) 染色試験の結果、東京都 45 株、栃木県 35 株および秋田県 5 株のすべて、グラム染色陽性の短桿菌が確認され、ナイセル染色(異染小体)の陽性率は、それぞれ 62%、97%及び 40%であった。

(2) Ap1 コリネの結果は、東京都 45 株のうち、ハイオタイプ *gravis* 型は 21 株、*mitis* 型は 15 株、その他 9 株であり、栃木県の 35 株は、すべてが *gravis* 型、秋田県は 5 株はすべてがその他であった。

(3) 毒素原性試験の Elek 試験の結果は、東京都は 18 株(40%)、栃木県は 9 株(26%)及び秋田県は 4 株(80%)が陽性となった。

(4) 毒素原性試験のウサキ皮内試験の結果は、東京都 22 株(49%)、栃木県は 5 株(14%)及び秋田県は 4 株(80%)が陽性となった。

(5) 毒素原性試験の Vero 細胞による培養細胞法の試験結果は、東京都の 22 株が陽性で、そのうち 25 μ L 試験系

で $<10CD_{50}$ 以下(弱毒性)は 15 株、10 ~ 100 CD_{50} (中毒性)は、3 株及び 100 CD_{50} (強毒性)は 4 株であった。栃木県の 13 株はすべて弱毒性であり、秋田県の 5 株は、4 株が陽性でそのうち 3 株が弱毒性、1 株が中毒性であった。

(6) 毒素原性試験の PCR 法による試験結果は、東京都 31 株(69%)、栃木県は 35 株(94%)及び秋田県は 5 株(100%)が陽性となった。

D 考察

標準的なシフテリアの検査手順として現在第三室で行っている方法は、PCR 法によるスクリーニングの後、培養細胞法により毒素を定量測定することで、シフテリアの毒素原性を確認している。今回の試験結果を見ても、PCR だけで確定診断ということは不十分であるか、感度は優れたものであり、分離菌または患者検体の一次培養で出現した数種のコロニーの毒素遺伝子を検出する試験法としては、良い道具と考える。また、細胞培養法によるシフテリア抗毒素を用いた中和試験系によるシフテリア毒素に対する特異的試験法での毒素原性の確認は必須であり、上記 2 法で細菌学的な検査手順は十分と考える。培養細胞法、PCR 法が常時実施されていない機関では、古典的ではあるか、確実な試験法である Elek 試験、ウサキ皮内試験による毒素原性の確認は必要である。

今回試験した国内で分離保存されていたシフテリア菌の中で、東京都の保存株は、1967~1981 年間に収集され

た菌で、由来と保存条件等が異なっており、3種のハイオタイプに分類された。PCRで毒素遺伝子が証明されても他の方法で毒素産生性が証明されない株もある。栃木県の保存株は、由来がほぼ同しうてあるため、ハイオタイプと異染小体染色およびPCRの結果は、ほぼ一致している。秋田県の保存株は、1992年の事例（5患者）から分離された5株であり、すべてPCR陽性、他の方法で毒素が4株より証明された。

E 結論

シフテリアの標準検査法は、チンスタールまたは血液寒天平板培地で増殖した菌を、グラム染色により陽性と菌形（単桿菌等）を確認する。異染小体染色は、必ずしも実施する必要はないと思われる。Ap1 コリネキントによる生化学的検査とハイオタイプの確認のあと、シフテリア毒素原性試験を実施する。感度の面では、PCR法 \geq 培養細胞法 \geq ウサキ皮内法 $>$ Elek法の順に優れており、毒素を定量的に測定する場合は、培養細胞法はウサキ皮内法より4倍程度感度が優れていることを念頭に検査に用いることが望ましい。

F 健康機器情報

なし

G 研究発表

(ア) 論文発表

Akiyo Hatanaka, Takako Komiya,
Motohide Takahashi, et al

Corynebacterium ulcerans

Diphtheria in Japan Emerging

Infectious Diseases Journal

Vol 9, No 6, 752-753, 2003

(イ) 学会発表

- ① 角田篤信、畑中章生、中村 朗、大江健二、高橋元秀、小宮貴子
Corynebacterium ulcerans によりシフテリア様症状を呈した2例、第77回日本感染症学会総会平成15年4月
- ② 高橋元秀、小宮貴子、岩城正昭、福田靖、荒川宜親 国内で発生した2例のシフテリア症から分離された *Corynebacterium ulcerans* の細菌学的性状 第76回日本細菌学会総会 平成15年4月
- ③ 小宮貴子、岩城正昭、福田靖、堀川和美、村上光一、高田智、帆足喜久雄、緒方喜久代、八柳潤、斉藤志保子、内村眞佐子、小岩井健司、松井義彦、加瀬宏夫、西阪光広、荒川宜親、高橋元秀 ウシ、ネコ、イヌを対称とした *Corynebacterium ulcerans* の予備的疫学調査、平成15年4月

H 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

表1. 地方衛生研究所で保存され当室に 分与を受けたジフテリア菌の解析

- 1 東京都衛生研究所
1967年～1981年収集 東京、北海道、広島など45株
菌株の由来等は大半が不明
- 2 秋田県衛生科学研究所
1992年 秋田 5株
県内発生事例から分離
- 3 栃木県保健環境センター
1961年～1976年 栃木県内発生分離 35株
菌株の由来等は大半が不明

検体 咽頭拭い液(綿棒)

塗抹鏡検	分離培養	PCR
単染色	チンスダール培地	毒素遺伝子
グラム染色	レフレル培地	の検出
異染小林染色	血液凍天培地	

確認(同定)培養
チンスダール培地
レフレル培地
血液凍天培地

染色試験	生化学的検査	生物学的検査(毒素産生性)
単染色	API Coryne	動物試験法(ウサギ、モルモット)
グラム染色	DSS培地	培養細胞法(VERO細胞)
異染小林染色		Elek試験法
		PCR法

図1. ジフテリア菌の分離・同定法

表2. 染色試験の結果

		グラム染色		ナイセル染色	
		陽性	短桿菌	陽性	異染小体
東京都	45株	45株	100%	28株	62%
栃木県	35株	35株	100%	34株	97%
秋田県	5株	5株	100%	2株	40%

表3. Api coryneの結果

		<i>Corynebacterium diphtheriae</i>		
		gravis	mitis	その他
東京都	45株	21	15	9
栃木県	35株	35	0	0
秋田県	5株	0	0	5

表4. Elek試験の結果

陽性(沈降線確認)			
東京都	45株	18株	40%
栃木県	35株	9株	26%
秋田県	5株	4株	80%

表5. ウサギ皮内試験の結果

陽性(発赤・壊死確認)			
東京都	45株	22株	49%
栃木県	35株	5株	14%
秋田県	5株	4株	80%

表6. 培養細胞法の結果

	陽性	CD ₅₀ / 25 μL			
		<10	10~100	100<	
東京都	45株	22株	15	3	4
栃木県	35株	13株	13	0	0
秋田県	5株	4株	3	1	0

表7. PCRの結果

		陽性 (248 bp)	
東京都	45株	31株	69%
栃木県	35株	33株	94%
秋田県	5株	5株	100%

我が国の医療従事者に対する百日咳菌・シフテリア菌の保菌状況調査

分担研究者 諸角 聖 東京都健康安全研究センター

研究要旨

医療従事者から乳幼児への百日咳菌およびシフテリア菌の感染リスクを評価するため、我が国の小児科担当医療従事者に対し両菌の保菌状況を調査した。調査は 11 医療機関に属す医師および看護師（計 47 名）を対象とし、定期的に月一回の菌培養検査を実施した。調査は 2003 年 10 月から 2004 年 2 月までの 5 ヶ月間実施し、その間、いずれの調査対象者からも両菌は検出されなかった。このことから、検査数は少なかつたか、健常な医療従事者が両菌を濃厚に保菌している可能性は低いと推定され、今後、患者の治療歴のある医療従事者を調査する時の比較成績となることか期待される。現在、上記の医療従事者から採取した血清を用いて、血清学的にも感染履歴がないことを確認 検証中である。

研究協力者		大濱洋一	（（医）社団博洋会大濱医院）
遠藤美代子	（東京都健康安全研究センター）	原木真名	（まなこともクリニック）
島山 薫	（同上）	岩田裕子	（（医）社団屯翔会岩田こともクリニック）
奥野ルミ	（同上）		
向川 純	（同上）	細山公子	（（医）社団千葉県勤労者医療協会稲毛診療所）
吉田靖子	（同上）		
長谷川道弥	（同上）	佐藤好範	（さとう小児科医院）
田部井由紀子	（同上）	杉山 明	（三重県科学技術振興センター）
長島真美	（同上）	山内昭則	（同上）
柳川義勢	（同上）	岩出義人	（同上）
保科 清	（東京通信病院）	神谷 齊	（国立療養所三重病院）
八柳 潤	（秋田県衛生科学研究所）	中野貴司	（同上）
齋藤志保子	（同上）	鈴木幹啓	（同上）
齋藤淳子	（同上）	伊藤馨子	（同上）
高橋義博	（大館市立総合病院）	米川貴博	（同上）
小沼俊一	（同上）	石黒靖尚	（福岡県保健環境研究所）
藤森由加里	（同上）	堀川和美	（同上）
内村眞佐子	（千葉県衛生研究所）	村上光一	（同上）
江下倉重	（同上）	岡田賢司	（国立療養南福岡病院）
太田又夫	（おおた小児科循環器科）	青木知信	（福岡市立ことも病院・感染症センター）
伊藤ルミ	（（医）社団四輝会伊藤小児科）		

A 研究目的

我が国において百日咳感染症はワクチン未接種の乳幼児を中心にまた散発的な小流行が認められている。この感染経路等については不明であるか、近年、乳幼児に直接接触する機会を有する小児科医療従事者が感染源となる可能性が指摘されている。事実、ドイツ、米国 CDC では小児科医療従事者に対する百日咳ワクチンの接種が勧告されている。一方、ジフテリアにおいては、ジフテリア菌の近縁菌であり、ジフテリア毒素産生能を有する *Corynebacterium ulcerans* のヒト感染例が最近報告された。我が国の毒素非産生ジフテリア菌、*C. ulcerans* の分布調査報告はなく、百日咳同様、小児科医療従事者がジフテリア菌に感染・保菌した場合、接触した乳幼児は感染の危険性が極めて高いと考えられる。

我が国では小児科担当医療従事者に対する百日咳菌およびジフテリア菌の保菌状況を調査した例は無く、医療現場が乳幼児への感染の場となっているのかは不明のままである。そこで本調査研究では、小児科医療従事者の百日咳菌およびジフテリア菌の保菌状況を調査し、乳幼児に対する両菌の感染リスクを評価することを目的に実施した。また、併せて感染症発生動向調査の目的で東京都健康安全研究センターに搬入された上気道および下気道炎の患者検体について百日咳菌の遺伝子検査を実施した。

B 調査方法

調査対象者 5 都道府県の 11 医療機関に属す小児科担当医療従事者 (47 名) を調査対象者とした。その内訳は秋田県 (A 病院 3 名)、千葉県 (B 病院 3 名、C 病院 4 名、D 病院 6 名、E 病院 5 名、F 病院 3 名、G 病院 4 名)、東京都 (H 病院 5 名)、三重県 (I 病院 5 名)、福岡県 (J 病院 6 名、K 病院 2 名) であった。調査対象者の年齢構成を図 1 に示した。

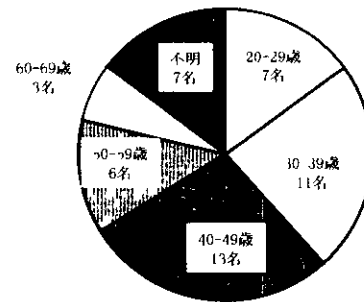


図 1 小児科担当医療従事者の年齢構成

検体採取 検体 (咽頭および鼻腔スワブ) は被験者から医師が採取し、菌培養検査は医療機関が所在する地方衛生研究所において実施した。検体は 2003 年 10 月から 2004 年 2 月までの間に毎月 1 回採取し、計 230 検体について菌培養検査を行った。なお、*C. diphtheria* と *C. ulcerans* の分離培養は被験者の咽頭スワブ、百日咳菌の分離および百日咳菌の遺伝子検査は鼻腔スワブについて実施した。

***C. diphtheria*、*C. ulcerans* の培養検査** 咽頭スワブを採取した綿棒を羊血液寒天培地とチンスタール培地各 1 枚に塗抹し、37°C で 24 時間培養した。出現したコロニーのうち両菌の特徴を示した集落について染色を行い、グラム陽性の桿菌についてはさらに Api coryne (bioMérieux) を用いてその生化学性状を調べた。

百日咳菌の培養検査 採取した鼻腔スワブは、採取後速やかに百日咳菌分離用ホルデテラ CFDN 寒天培地 (日研生物) に塗抹した。保湿状態を保ちながら 37°C で 7 日間培養を行い、培地上に真珠様の光沢ある集落を選択しグラム染色・オキニターセ試験・尿素分解試験 抗百日咳菌血清との凝集反応により菌を同定した。

PCR 検査 百日咳菌の PCR 検査は以下の方法で実施した。綿棒に付着した分泌液を 1 ml の蒸留水に懸濁し、遠心操作により沈殿物を回収した。沈殿物から ISOPLANT キットを用いて DNA を抽出後、PTp1/PTp2 primer を用いて PCR 検査を実施し

た。

上・下気道炎患者の百日咳菌検査 東京都健康安全研究センターに搬入された上気道炎および下気道炎患者検体を対象に百日咳菌PCR検査を実施した。咽頭スワブまたは鼻腔スワブ検体は、都内7病院からウイルス感染症検査のために搬入されたもののうち、いずれのウイルスも分離されなかった87検体である。検体はIS481(Per1/Per2/Per3)のhemi-nested法を用いたPCR検査により実施した。なお、年齢別検体数と月別検体数を図2に示した。

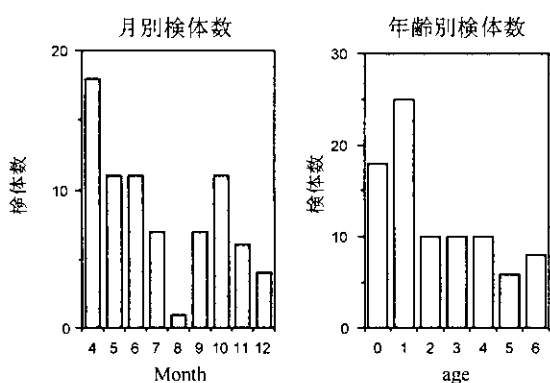


図2 東京都健康安全研究センターに搬入された上気道 下気道炎患者検体の月別および年齢別検体数

(倫理面への配慮)

本調査は国立感染症研究所の倫理審査を受け、その倫理規定に従って実施した。

C 結果

調査対象者47名について、2003年10月46名、11月45名、12月47名、2004年1月45名、2月47名の菌培養検査を実施した(表1)。培養検査の結果、咽頭スワブ230検体から*C. diphtheria*、*C. ulcerans*はいずれも分離されなかった。同様に、鼻腔スワブ230検体からも百日咳菌は分離されなかった。

培養法の他にPCRによる遺伝子検査を一部の検体について実施した。百日咳についてはA, I, J, K病院の医療従事者に、ンフテリアについてはA,

H, I, J, K病院の医療従事者に対して実施した。PCR検査の結果、ンフテリア毒素遺伝子、百日咳菌遺伝子は検出されず、いずれの検体も陰性であった。

東京都健康安全研究センターに搬入された上・下気道炎患者の87検体について百日咳菌のPCR検査を実施したところ、百日咳菌のIS481遺伝子は検出されず、いずれの検体も陰性であった。

D 考察

百日咳およびンフテリアはワクチン接種により高度に制圧されている感染症であるか、これらのワクチンが乳幼児および小児を接種対象としているため、年齢の上昇とともに免疫が低下する可能性が指摘されている。事実、医療従事者が百日咳菌を保菌したことにより、乳幼児への感染源となった事例が報告されている。このような事例が散発したことにより、ドイツ・米国では小児科担当医療従事者への百日咳ワクチンの接種が勧告されている。一方、我が国では小児科担当医療従事者に対する百日咳菌およびンフテリア菌の保菌調査は実施されたことかないため、我が国の小児科医療従事者にワクチン接種が必要であるか否かは不明のままである。そこで、我が国の小児科医療従事者に対し両菌の保菌状況の調査を実施したところ、11医療機関に属す47名の被験者から両菌は分離されず、小児科医療従事者が濃厚な保菌者となっている可能性は極めて低いものと考察された。

調査期間中、全国約3,000の小児科定点から報告された百日咳様患者数は一週当たり20-30名であり、調査期間中の月当たりの報告数は約100名程度であった(図3)。この報告数を検査対象の医療機関が所在する都道府県別で見ると、調査期間中の報告数は秋田県5名、千葉県17名、東京都19名、三重県1名、福岡県39名であった(表2)。このことから、秋田県のA病院および三重県のI病院では医療従事者が百日咳患者と接触す

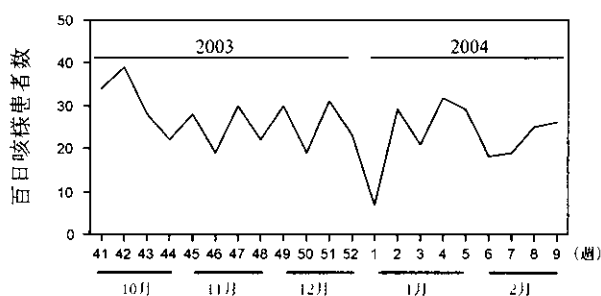


図3 調査期間中における百日咳様報告患者数
(小児科定戸当りの全数)

る機会が低く、逆に福岡県に所在する J, K 病院では患者と接触する機会が高かったと考えられた。J, K 病院の被験者において百日咳菌が分離されなかったことから、我が国の小児科担当医療従事者が百日咳菌の保菌者となる可能性は低いものと強く示唆された。一方、調査期間中、シフテリア菌および *C. ulcerans* の患者報告例は一例も無かった。シフテリアは感受性指数 10% 程度の典型的な保菌者流行の感染症と言われており、日本では保菌者、特に毒素非産生株保菌者はかなりいるものと推察されている。しかし、本調査ではシフテリア菌、*C. ulcerans* および毒素非産生の両株も検出されなかったことから、医療従事者がこれらの菌を保菌している可能性は百日咳同様極めて低いものと考えられた。

今回の調査結果により、医療従事者からの乳幼児への百日咳感染の可能性をすべて排除することは不可能であるか、少なくとも我が国の医療従事者が菌培養検査で陽性になるほどの濃厚な保菌者とはなっていないことは確かである。国内の患者はワクチン接種により制圧されているか、ワクチン接種率が低いまたは何らかの理由で低下した地域における流行時では、感染の拡散は増大するために、多くの患者と直接接触する機会を有する小児科医療従事者が感染源となる可能性は否定できない。1990 年代にシフテリアの大流行のあったロシア周辺国では、健康な成人、軍人の移動が病気を拡散したとの考察がある。

本調査では菌培養法による評価を実施したか、両菌の感染評価には血清学的な手段も有効である。百日咳患者からの菌分離率は 10-20% 程度であることから、臨床では主に臨床症状または血清診断が頻用されている。またこのような菌分離の難しさはシフテリア菌にも同じことか言え、現在、被験者である医療従事者を対象に血清学的診断を実施し、血清学的にも感染履歴がないことを確認・検証中である。また今後は、実際に百日咳またはシフテリア患者と接触した医療従事者に対し、同様な調査を実施し、患者から医療従事者への感染リスクを評価していくことが重要であると考えられた。

E 結論

本調査では小児科担当医療従事者から乳幼児への百日咳菌およびシフテリア菌の感染リスクを評価するため、11 医療施設の小児科担当医療従事者 47 名に対し両菌の保菌状況を調査した。その結果、調査期間中にはいずれの被験者からも両菌は分離されなかった。今回、検査した少数の医療従事者は両菌の保菌者となっていないことか確認されたか、特に百日咳様患者の年間報告数は約 3000 名であり、これらの患者を多く診察する医療関係者の保菌状況調査も興味のあるところである。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

なし

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

表1 1.1 医療施設における調査対象者数と月別陽性件数

医療施設	所在地	調査対象者数	月別調査数と陽性件数()				
			2003年			2004年	
			10月	11月	12月	1月	2月
A	秋田県	3	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)
B	千葉県	3	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)
C	"	4	4(0)	4(0)	4(0)	4(0)	4(0)
D	'	6	6(0)	6(0)	6(0)	5(0)	6(0)
E	"	5	5(0)	5(0)	5(0)	4(0)	5(0)
F	"	3	3(0)	2(0)	3(0)	3(0)	3(0)
G	"	4	4(0)	4(0)	4(0)	4(0)	4(0)
H	東京都	5	4(0)	4(0)	5(0)	5(0)	5(0)
I	三重県	5	5(0)	5(0)	5(0)	5(0)	5(0)
J	福岡県	6	6(0)	6(0)	6(0)	6(0)	6(0)
K	"	3	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)	3(0)
計		47	46(0)	45(0)	47(0)	45(0)	47(0)

表2 小児科定床当たりの百日咳様報告患者数 (2003.10-2004.2)

都道府県	2003年10月				11月				12月				2004年1月					2月			
	41W	42W	43W	44W	45W	46W	47W	48W	49W	50W	51W	52W	1W	2W	3W	4W	5W	6W	7W	8W	9W
秋田県	-	-	1	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
千葉県	2	1	2	1	1	-	1	-	-	2	-	2	-	-	2	-	3	-	-	-	-
東京都	4	3	1	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	3	1	-	3	-	1	-
三重県	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
福岡県	5	2	2	2	1	3	3	2	1	3	2	1	-	-	2	5	-	1	-	3	1
全国総数	34	39	26	22	28	19	30	22	30	19	31	23	7	29	21	32	29	18	19	25	26

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

マイコプラズマ肺炎の分子疫学的研究

分担研究者 見理 剛、国立感染症研究所 細菌第二部、主任研究官
研究協力 岡崎則男 神奈川県衛生研究所 呼吸器系細菌
山崎 勉 埼玉医科大学 感染症科
成田光生 札幌鉄道病院 小児科

研究要旨 マイコプラズマ肺炎患者から 2000-2003 年に分離された *Mycoplasma 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 年に存在しているのは 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、I 型菌が出現してきたこととの関連が疑われる。

A. 研究目的

日本における、マイコプラズマ肺炎の動向を把握するために *M. pneumoniae* の臨床株を収集し、分子疫学的な調査を行う。*M. pneumoniae* は P1 接着タンパク質遺伝子を指標にして I 型と II 型の 2 つの型に分類することかてきるので、収集した菌株を型別して、I 型と II 型菌が占める割合を調べる。また、I 型、II 型菌の出現状況の変化とマイコプラズマ肺炎発生数との間に関連がないかを調べる。

B 研究方法

神奈川県衛生研究所、高知県衛生研究所、札幌鉄道病院でマイコプラズマ肺炎患者より分離された *M. pneumoniae* 株を、P1 接着タンパク質遺伝子に特異的な PCR-RFLP 法によって型別分析した。PCR-RFLP 法にはプライマー対として、ADH1/ADH2 または、ADH3/ADH4 を使用した（表 1）。PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で処理後、アガロースゲル電気泳動によって DNA の切断パターンを比較して、I 型、II 型および II' 型（II 型亜種）に型別した。

また、埼玉医科大病院に受診の呼吸器疾患患者（感染症が疑われる）