

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐々木次雄

平成17(2005)年3月

平成16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	佐々木次雄	国立感染症研究所細菌第二部	室 長
分担研究者	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	
	久保田眞由美	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	
	上原すゞ子	埼玉医科大学	
	田中裕士	札幌医科大学	

## 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	百日咳抗原変異株のプロテオーム解析 網羅的発現解析による病原因子の検索日本における百日咳菌の抗 原変異と病原性の解析 -----	17
------	--	----

菊池 賢	国内における百日咳発生動向調査と薬剤感受性分布 -----	23
------	-------------------------------	----

高橋元秀	ジフテリア -----	32
------	-------------	----

諸角 聖	小児科担当医療従事者を対象とした百日咳菌・ジフテリア菌の感 染リスク評価 -----	40
------	---	----

見理 剛	マイコプラズマ肺炎の分子疫学的研究 -----	48
------	-------------------------	----

成田光生	マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの性状と、その臨床における問 題点 -----	55
------	---	----

荒川宜親	ベトナムにおいて髄膜炎患児の髄液より分離された <i>Haemophilus influenzae</i> の型別分布、薬剤感受性分布及び PFGE パターン解析 に関する研究 -----	64
------	---	----

山崎 勉	ヘモフィルス・インフルエンザ感染症と分離菌の解析 -----	71
------	--------------------------------	----

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	77
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別冊 -----	81
-----------------------	----

V. 参考資料、その他 -----	143
-------------------	-----

# I. 総括研究報告書

## (平成16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, 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

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*), ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*), 肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*), インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) の臨床株を収集し, 最新の分子生物的手法を駆使してこれら収集菌株の解析と患者情報を解析した. 本研究事業の第二年度目は, 全体的に研究の進展が認められ, 最終年度に向け, 研究発展が大いに期待できる内容になっている. 第二年度研究として百日咳及びジフテリア菌については, 1) 遺伝学的方法を用いた早期診断法の確立, 2) 医療従事者がこれら病原体のキャリアーになっている可能性があるかどうかの疫学調査, 3) 百日咳菌流行株がワクチン型から抗原変異型への入れ替えが生じていることより, 抗原変異株の蛋白変異の解析, マイコプラズマに関しては, 1) *M. pneumoniae* の流行型 (I型及びII型) が8~10年ごとにシフトすることの原因解明, 2) マクロライド耐性 *M. pneumoniae* の簡易検出法の確立とマクロライド耐性又は感受性 *M. pneumoniae* に感染した患者における臨床経過の比較, インフルエンザ菌においては, 1) 国内で分離されたb型インフルエンザ菌 (Hib) の薬剤感受性と耐性遺伝子解析, Hib感染患者における抗PRP抗体価, ペニシリン系抗菌薬による治療群とペニシリン以外の抗菌薬による治療群における炎症反応等の比較検討, 2) ベトナムで分離されたHibの薬剤感受性, 耐性遺伝子解析, PFGEパターン解析等を行った.

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ジフテリア（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ことを研究目的にしている。1）百日咳及びジフテリアは、世界的にワクチン接種で十分な防御効果を挙げており、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ので、わが国で分離される百日咳菌の抗原遺伝子について解析する。2）1990年以降、旧ソビエト連邦でジフテリアの大流行があり、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世界的に再認識されている。また、ジフテリア毒素産生 *C. ulcerans*、ジ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ジ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ジ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）我が

国において、肺炎マイコプラズマは以前のような4年周期の大流行は起こらなくなったが、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。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。肺炎マイコプラズマ菌は、細胞付着蛋白をコードしている遺伝子を指標にⅠ型菌とⅡ型菌に大別でき、これらは8～10年周期で入れ替わる。この原因について解析する。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。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する。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、今年度は国内及びベトナムで分離されたインフルエンザ菌について型別、薬剤感受性、家族内伝播などについて解析を行った。

## 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、全体研究班会議を1回、病原体ごとの研究班会議（百

日咳・ジフテリア菌グループ、マイコプラズマ・インフルエンザ菌グループ)を各1回開催し、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:** 2001年12月より2004年12月までに全国91の医療施設で百日咳疑似患者より得られた鼻咽頭スワブ300検体につき、培養法とnested duplex PCR法による百日咳菌検出を行った。臨床分離百日咳菌に対する各種薬剤の薬剤感受性(MIC)はEtest(AB Biodisk, Solna, Sweden), Bordet-Gengou培地を用いて測定した。(菊池)。2004年4月に宮城県内の病院で分離された百日咳臨床分離株(BP235, BP233)をプロテオーム解析に供試した(二次元電気泳動, LC-MS/MS)。抗原遺伝子の変異検出は、DNAシーケンス解析を用いた。(堀内)。

**ジフテリア菌:** 秋田県1施設3名、東京都1施設5名、千葉県7施設27名、三重県1施設5名、福岡県2施設9名の合計12施設49名の小児科担当医療従事者を調査対象とした。調査対象者には、2003年11月と2004年2月の2回にわたって採血を行い、百日咳とジフテリアに対する抗体価を測定した。百日咳毒素に対する抗体価は、抗百日咳毒素(抗PT)IgG抗体と抗繊維状赤血球凝集素(抗FHA)IgG抗体をELISA法により測定した。抗体価は標準抗体の検量線から相対力価(ELISA単位/ml)を算出した。百日咳菌の東浜株、山口株に対する凝集素価は2倍の段階希釈法により測定した。一方、ジフテリア

毒素に対する血清中の抗毒素価は培養細胞法により測定した。細胞はVERO細胞を用い、判定は細胞の増殖・死滅により代謝の変化がもたらす培養液中の指示薬の変色を指標とした。血中抗毒素価は標準抗毒素に対する相対力価(国際単位IU/ml)とした(諸角, 高橋)。

**マイコプラズマ:** 埼玉医科大病院に受診した呼吸器疾患患者(呼吸器感染症が疑われる)の喀痰から、nested PCR法によって、*M. pneumoniae*のP1遺伝子を検出し、型別を行った患者の血清を使用した。血清はセロディアマイコII(富士レビオ)によって抗体価(PA抗体価)を測定し、320倍以上の値を示したものの50検体について血球吸着(HA)阻害活性を測定した。HA阻害活性の測定にはI型標準株M129とII型標準株FHを使用し、PPL0寒天培地上で形成させたコロニーに対するヒツジ赤血球の吸着を観察した。患者血清はPBSで5倍および10倍に希釈して*M. pneumoniae*のコロニーと37°Cで30分反応させ、HA阻害活性の有無を判定した。さらに、I型菌とII型菌のP1タンパク質の間でアミノ酸配列が異なっているN領域(I型のP1タンパク質では、218から352アミノ酸残基、II型では218から358に相当)およびI型とII型で共通なD2領域(I型ではアミノ酸残基1,160-1,518に相当)を遺伝子組換えによってHis-tagをつけて大腸菌で発現させた。この組換えタンパク質を精製し、患者血清との反応性をウエスタンブロット法によって分析した(見理, 山崎)。咽頭スワブを用いて

のマイコプラズマ野生株の分離法，薬剤感受性試験の方法，薬剤耐性遺伝子変異の検索方法に加え，PCR 増幅法と制限酵素切断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP）解析を用いて，マクロライド耐性遺伝子変異の有無をより簡便に検出する方法を開発し，その有用性を検討した（成田）。

**インフルエンザ菌**：肺炎・気管支炎にて埼玉医科大学病院を受診した患児より採取された，喀痰 60 検体を用いて，生理食塩水にて喀痰を 3 回洗浄する方法（3 回洗浄法）と 1 回洗浄する方法（簡易法）との比較を行った。肺炎・気管支炎罹患児 501 例において，簡易法により原因菌を同定した。さらに，平成 12 年以降に受診し，インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎 86 例について，薬剤感受性や薬剤耐性遺伝子の保有が，経過に及ぼす影響を検討した。インフルエンザ菌の ABPC 感受性を微量液体希釈法により測定し，最小発育阻止濃度（MIC）により， $4\mu\text{g/ml}$  以上， $2\mu\text{g/ml}$ ， $1\mu\text{g/ml}$  以下に分類した。ニトロセフィン法にて  $\beta$ -lactamase 産生性を検査し，インフルエンザ菌遺伝子検出試薬（湧永製薬）により，耐性遺伝子である *pbp3-1*，*pbp3-2* を検出した。ABPC 感受性および薬剤耐性遺伝子の保有により，経過中の最高白血球値，最高 CRP 値，解熱までに要した日数等について検討した。さらに，治療に用いた抗菌薬により，ペニシリン系抗菌薬による治療群（A 群）とペニシリン以外の抗菌薬による

治療群（B 群）に分類し，各々で炎症反応等の経過を比較した。インフルエンザ菌による髄膜炎に罹患した小児 5 例より，経時的に血清を採取し，抗 polyribosyl ribitol phosphate (PRP) 抗体の測定を施行した。抗 PRP 測定は，BINDAZIME Human anti *Haemophilus influenzae* enzyme immunoassay kit (The Binding Site Ltd.) により施行した（山崎）。ベトナムにおいて髄膜炎患児の髄液より分離された *Haemophilus influenzae* 79 株を用いて生物型，莢膜血清型，薬剤感受性，PFGE パターンを調べ，我が国の場合と比較考察した（荒川）。

#### （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) 百日咳菌の迅速検出法確立と疫学調査

培養法と ndPCR 法を比較したところ，陽性件数は培養法では 59 件（19.7%），ndPCR では 112 件（37.8%）であった。培養陽性検体 59 検体中 58 件は ndPCR も陽性であったが 1 件は陰性であった。ndPCR の感度，特異度，陽性的中率，陰性的中率はそれぞれ 98.3，77.6，51.8，99.5% であった。300 検体のうちパラ百日咳菌，*B. holmesii* は培養，ndPCR と



もに検出されなかった。患者は圧倒的に0歳が多かった(男性112名;78.3%, 女性108名;72.2%)。20歳以上のいわゆる成人百日咳の疑われた症例も16例あり(男性5例, 女性11例), 培養陽性が1件, ndPCR陽性が3件(両者とも陽性1件)認められた。培養か ndPCRで成人百日咳と診断された3件のうち2名は培養, ndPCR陽性の百日咳患児2名の母親であり, 家族内感染が疑われた。もう1件は37歳男性でndPCRのみ陽性であったが, 百日咳抗体上昇から診断された46歳女性の成人百日咳患者が感染源と推定され, 小児を介さない成人同士の病院感染が疑われた症例であった。季節では春から夏にかけて検体数, 陽性例が増加する傾向が認められるが, 2002年は1月にもピークがみられた。検体は全国から回収され, 関東地区から最も多く提出されていた。百日咳の検出率は28.6-50%であった。培養陽性となった菌52株に対する各種抗菌薬21薬剤のMICを調べた。百日咳の一選択治療薬として広く用いられている macrolide 系薬剤はいずれも良好なMICを示しており, 近年報告がみられる erythromycin 耐性菌は認められなかった。tetracycline, minocycline, rifampicin, chloramphenicol, clindamycin, trimethoprim/sulfamethoxazoleのMICもすべて1  $\mu$ g/ml未満であった。一方, streptogramin 系の quinupristin/dalfopristin のMICは比較的高かった。

## 2) 抗原変異百日咳菌の蛋白解析

二次元電気泳動により, 抗原変異株

(BP235) とワクチン型百日咳菌 (BP233) に発現する蛋白質を比較したところ, 両菌株は極めて良く似たタンパクプロファイルを示した。2D-PAGE 用画像解析ソフトを用いて, 抗原変異株に特異的な蛋白スポットを検索したところ, 7個の蛋白スポットに違いを認めた。このうち5個 (SSP1107, 1211, 1702, 5209, 7701) は抗原変異株に特異的な発現スポットであり, 2個 (SSP1204, 3302) はスポット位置の変化であった。質量分析による蛋白質の同定を行ったところ, SSP1107, 5209 は蛋白量が少ないため同定することができなかったが, SSP1204, 1211, 1702, 3302, 7701 については同定可能であった。同定された5種の蛋白質についてシーケンス解析を実施したところ, SSP1702, 7701 に遺伝子変異を確認した。なお, SSP1204, 1211, 3302 に遺伝子の変異は確認されなかった。SSP1702 はワクチン株の hypothetical protein BP0500 と同定され, その変異は終止コドン直下の非翻訳領域に認められた。その変異はワクチン株である東浜株では TGACCG であるのに対し, 抗原変異株である BP235 では TGACAC の配列を示した。二次元電気泳動の解析結果から, BP0500 はワクチン型百日咳菌 (BP233) では発現していない可能性が指摘されたが, この遺伝子変異が BP0500 の蛋白発現に与える影響は現在のところ不明である。

SSP7701 は質量分析から Prn と同定され, その塩基配列は既報の *prn2* に一致するものであった。しかし, 二次元電気泳動における Prn の発現位置をワクチン型 BP233 と比較したところ, BP233 には Prn1

に対応する蛋白スポットが存在しないことが示された。Prn1 は Prn2 と等しい等電点を持ち、Prn2 よりも 0.5 kDa 小さく産生されるが、BP233 のタンパクプロファイル上で Prn1 に相当する蛋白スポットを認めることはできなかった。このことから、Prn1 の発現量は Prn2 よりも著しく低いものと判断した。

### ジフテリア菌

#### 1) 医療従事者における百日咳・ジフテリア抗体調査

ジフテリア抗毒素価：ジフテリア抗毒素価の変動が認められた被験者は 1 名で、抗毒素価 0.652 IU/ml から 5.52 IU/ml に有意に上昇していた。一方、49 名中 8 名は検出限界以下の低値であった。

百日咳抗体価：調査期間中、抗 PT IgG および抗 FHA IgG 抗体価の有意な変動（4 倍以上）を認めた医療従事者はいなかった。一方、凝集価は 47 名中 6 名に変動が認められ、東浜株に対する凝集素価が 320 から 1280（倍）に上昇した被験者が 1 名、160 から 20 以下、80 から 20、40 から 20 以下への減少が各 1 名に認められた。山口株に対する凝集素価が 320 から 1280 に上昇した被験者が 1 名、20 から 80 への上昇が 2 名、320 から 80 下降が 1 名、40 から 20 以下が 2 名であった。なお、東浜株および山口株に対し、320 から 1280 倍への凝集価上昇が認められた被験者は、アンケート調査により調査期間中において百日咳患者との 3 回の接触が判明した。

アンケート調査：被検者は平均年齢 42.7 歳、男性 15 名、女性 34 名、職種

は医師 25 名、看護師 24 名であった。調査期間中に百日咳患者と接触した者は 16 名（33%）で、接触後、百日咳の自覚症状を示した者はいなかった。なお、調査期間外に百日咳患者と接触した者は 26 名（53%）であり、患者から感染の危険性を感じた医療従事者は 7 名（14%）であった。また、医療従事者への百日咳ワクチンの接種を必要と回答した者は 18 名（37%）であった。ジフテリア患者との接触者は調査期間中 0 名であり、調査開始前にジフテリア様患者との接触経験者は 2 名（4%）であった。なお、ジフテリア様患者から感染の危険性を感じた医療従事者は 2 名（4%）であり、医療従事者へのジフテリアワクチンの接種を必要と回答した者は 11 名（22%）であった。百日咳・ジフテリア以外の感染症について患者からの感染の危険性を感じている医療従事者は 38 名（78%）おり、29 名（59%）は実際に感染した経験があると回答した。感染した病名はインフルエンザ 16 名、胃腸炎 12 名、感冒、ロタウイルス感染症各 5 名、上気道炎、溶レン菌感染症各 4 名、風疹 3 名、アデノウイルス感染症、ノロウイルス感染症各 2 名等であった。

#### 2) ジフテリア菌に対する迅速検出法の確立

精製ジフテリア菌 DNA を用いて通常の PCR で検出感度の検討を行なったところ、精製 DNA25 コピーを安定して検出することができた。リアルタイム PCR は通常の PCR よりも高感度であることが期待されたと同時に、定量性が得ら

れることも期待された。Mathershed らによる方法で調べたところ、A サブユニット遺伝子、B サブユニット遺伝子ともに 50 コピーを問題なく検出することができ、 $50-5 \times 10^7$  コピーの間でよい定量性がみられた。今回の実験では、LAMP 法が最も高感度であることが期待されたが、結果はその逆で、最も感度が低かった。プライマーセット 2 で duplicate の片方で 25 コピーの鋳型 DNA を検出できたが、それ以外では感度はそれ以下であった。LAMP 法はプライマー設計の困難さで知られる。今回の実験において検出感度が期待より低かったことから、用いたプライマーが最適のものでなかった可能性が考えられる。

## マイコプラズマ

### 1) 肺炎マイコプラズマの流行型シフトと型別抗体

患者血清 50 検体について、HA 阻害能を測定したところ、22 検体 (44%) で *M. pneumoniae* コロニーへの血球吸着の阻害活性が見られた。22 検体中、片方の菌型のみ阻害活性がみられたのは 12 例だった (7 例が I 型菌、5 例が II 型菌に対して)。他の 10 例は、I 型菌、II 型菌の両方に HA 阻害活性を示したが、これらの例でも、各菌型に対する優先的な阻害活性が見られ、I 型菌に対して優先的なのは 4 例、II 型菌に対して優先的なのは 5 例で、両方の型に同等な活性を示したのは 1 例だけだった。この結果からは、*M. pneumoniae* 感染患者血清の HA 阻害活性は、ほとんどの場合、I 型菌、II 型菌のどちらかに対

して優先的であると考えられた。患者が感染した菌型と血清の HA 阻害活性を比較すると、血清は患者が感染したのと同じ型の *M. pneumoniae* に強く HA 阻害活性を示していることが明らかになった。

患者血清が *M. pneumoniae* に対して菌型特異的な HA 阻害活性をもつのは、血清中に菌型特異的な接着阻害抗体が生産されたためと考えられる。接着を阻害する抗体は抗 P1 抗体である可能性が高いので、菌型特異的な抗 P1 抗体の検出が可能であるか検討した。I 型菌と II 型菌の P1 タンパク質でアミノ酸配列がもっとも異なる N 領域と、両方の菌型で共通な D2 領域に相当する部分を大腸菌で遺伝子組換えによって生産した。これらの組換えタンパク質を抗原として患者血清との反応性をウエスタンブロット法で分析すると、I 型菌と II 型菌でアミノ酸配列が同じな D2 領域では患者血清間で同等な反応性が見られたが、N 領域では患者血清間で反応性が異なっており、ほとんどの血清が、I 型か II 型のどちらかの型に優先的な反応を示した。この N 領域での菌型優先的な反応も、患者に感染した菌型と比較すると、感染した菌と同じ型に強い反応が出た。

### 2) マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの疫学調査

PCR-RFLP 解析によるマクロライド耐性遺伝子検出系を確立した。本法により A2063G, A2063C, A2064G, C2617X (X は C 以外の塩基) の変異を明確に検出し得ることが確認された。培養法にて

は今年度は分離株数そのものが少なく、新たな耐性菌は分離されなかった。培養法、PCR法、ともに1999年以前には耐性菌の出現は認められず、耐性化は2000年以後に急速に進んでいることが観察された。2000年以後における耐性化率は、培養法によると14.9%、PCR法によると15.0%で、両者の結果はほぼ一致していた。また今年度までに本研究班にて収集したマクロライド耐性株全例と、得られた場合にはその株が分離された患者の臨床経過をまとめた。

A2063Gが10株、A2063C、A2064G、C2617Gが各1株の合計13例であった。このう

### インフルエンザ菌

#### 1) わが国で分離されたインフルエンザ菌の特性

洗浄喀痰培養法の検討: 小児の喀痰60検体で、3回洗浄法と簡易法とを比較したところ、各々の結果が一致したものが79%、部分的に一致したもの(3回洗浄法で判定された菌を含む複数菌が、簡易法で起炎菌として判定されたもの)が5%、不一致が16%であった。簡易法による洗浄喀痰培養法により、501検体中でインフルエンザ菌が起炎菌として判定されたものは、37.1%を占めた。

インフルエンザ菌肺炎の検討: インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎86例に関して、ABPCのMICが $4\mu\text{g/ml}$ 以上、 $2\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下のものは、各々12例(13.9%)、21例(24.4%)、53例(61.7%)であった。各群について、経過中の最高白血球数の平均値( $\mu$

ち臨床経過の詳細が得られたのは11例で、そのうち8例ではそれが第1選択か第2選択かは別として、マクロライド剤が臨床的には有効と判断されていた。ただしその発熱期間を具体的に検討すると、同時期に得られた感受性株感染症例26例においてはマクロライド剤を開始したのち解熱までの平均日数が1.3日であったのに対し耐性株感染症例では3.6日であり、耐性株感染症例ではマクロライド剤開始から解熱までの期間が統計学的に有意に延長していた。

/1)/最高CRPの平均値(mg/dl)/解熱までに要した日数の平均値は、各々11, 754/13, 161/12, 365, 1.8/3.3/2.8, 1.9/1.7/1.8であった。ABPCのMICが $2\mu\text{g/ml}$ の場合は、経過中の最高白血球数の平均値および最高CRPの平均値が、他の場合に比べてやや高値であったが、有意差はみられなかった。解熱までに要した日数の平均は、各群で同様であった。

抗菌薬による治療に関して、ABPCのMICが $2\mu\text{g/ml}$ の場合、最高CRP値は、A群がB群より高値であったが、解熱までに要した日数は、両群とも同様であった。一方、ABPCのMICが $4\mu\text{g/ml}$ 以上の場合は、解熱までに要した日数は、A群ではB群に比べて遷延していた。ABPC感受性インフルエンザ菌による肺炎では、*pbp-3* 遺伝子の変異による炎症反応や発熱の遷延等への影響は明らかでなかった。

髄膜炎患児における抗PRP抗体:b型

インフルエンザ菌による髄膜炎患児 5 例より、経時的に採取した血清における、抗 PRP 抗体の推移を示す。初回検査は、第 0-10 病日に施行したが、いずれの検体においても  $1.0 \mu\text{g/ml}$  以上であり、その後も  $1.0 \mu\text{g/ml}$  以下になることはなかった。

## 2) ベトナムで分離されたインフルエンザ菌の特性

生物型は 2, 1 の順に多く、莢膜の血清型はすべて b 型であった。β-ラクタマーゼ陽性率は 57% で、我が国と比べ高かった。薬剤耐性率はアンピシリン 55.7%、クロラムフェニコール 64.6%、クラリスロマイシン 22.8% であった。PFGE パターン解析により家族内の咽頭保菌者と児から分離された株が遺伝的に近似している事が確認され、両者の間で菌が伝達された可能性が示唆された (荒川)。

## D. 考察 百日咳菌

① 培養法は特異性が高く、菌株が得られれば分子疫学的解析、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。ndPCR 法は感度に優れ、検出時間も 4 時間程と短い。検体提出日に結果を報告することができ、臨床現場での有用性は高いと思われる。今回検査を行った 300 検体についても培養法の陽性は 59 件 (19.7%) であったが ndPCR では 112 件 (37.3%) が陽性を示した。ndPCR は今回の検討でも感度、

特異度に優れていることが示され、診断の難しい百日咳の大規模な発生動向調査に大変有用であると結論づけられた。

② 百日咳はワクチンが普及した現在でもしばしば集団発生や院内感染が報告されている。近年ではワクチン株と抗原の異なる菌が急増しており、世界的には患者数が増え続けており、その実態調査と対策が急務とされている。また、最近では成人発症例が散見され、感染源としても注目されるが、我が国での成人百日咳の実態は不明である。今回は百日咳患者の家族内発症者などを中心に成人百日咳疑い 16 例の検査を行い、3 例の陽性を確認できた。感染ルートとしては家族内感染の他、患者からの感染でない職員同士での病院感染例が認められ、成人百日咳の問題は予想以上に大きいことが推察された。今後、慢性咳嗽患者などを対象とし、成人百日咳の動向調査を行う必要があると思われた。薬剤感受性試験では近年、海外で問題になっているエリスロマイシン耐性は検出されず、通常使用される抗菌薬には良好な感受性を示した。小児への適応は限られるがニューキノロン薬の MIC は優れており、今後実態が明らかになれば、ニューキノロン薬は成人百日咳の治療薬としての有用性が期待できるものと思われる。

③ 百日咳菌の抗原変異株の出現を考察するために、抗原変異株のプロテオーム解析を実施した結果、抗原変異株である BP235 とワクチン型 BP233 に

hypothetical protein BP0500 遺伝子の点変異と Prn 発現量の違いを認めた。抗原変異株における BP0500 蛋白質の特異的発現は他の変異株とワクチン型菌株を解析した場合でも同様に認められたことから、BP0500 の特異的発現は抗原変異株に共通したものと考えられた。BP0500 の機能と発現様式は分かっていないが、終止コドン直下の点変異が BP0500 の遺伝子発現に影響する可能性が示唆される。Prn の機能は宿主細胞に対する接着因子であることがすでに明らかにされているが、Prn1 と Prn2 の蛋白発現量が異なる可能性を示した報告例はない。近年増加傾向にある抗原変異株の Prn2 発現量がワクチン型 Prn1 よりも高いことは、宿主細胞への感染を考えると理にかなっていると見える。なお、ワクチン株である東浜株では Prn1 の発現が確認されていることから、ワクチン型菌株においても Prn1 は発現しているものと推察される。

### ジフテリア菌

① 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調査ならびに抗体保有調査は実施されることがないため、現状で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。平成 15 年度に実施した 11 医療機関に属す 47 名の小児科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調査では菌は分離されず、小児科医療従事者が濃厚な保菌者となる可能性は極めて低いものと

考察した。

本年度の抗体保有調査では百日咳菌に対する抗 PT IgG 抗体、抗 FHA IgG 抗体価に有意な変動は認められなかったものの、凝集素価の変動は 6 名で認められた。変動が認められた 6 名中 2 名で患者との接触歴が確認され、1 名（被験者 ID1）は 4 回の接触歴を示したが、その凝集素価は低下していた。また 1 名（被験者 ID44）は同一患児との接触歴が 3 回であったが、その凝集素価は大幅な上昇を示した。一方、調査期間中、百日咳患者と接触した医療従事者は 16 名いたが、そのうち有意な凝集素価の変動を示した医療従事者は 2 名（被験者 ID1, 44）だけであった。なお、百日咳患者と接触したことによって感染の可能性が疑われた医療従事者（被験者 ID44）は、昨年度実施した百日咳菌の保菌調査では百日咳菌は分離されなかった。このことから、小児科担当医療従事者が百日咳菌に感染する可能性はあるものの、その感染は保菌するほどのものではないと言える。また、百日咳患者との接触歴が確認された 16 名の医療従事者のうち感染が疑われた者は 1 名だけであったことから、その感染頻度は極めて低いものと考えられる。

抗毒素価を指標にしたジフテリア菌の感染リスク評価では、ジフテリア抗毒素価の有意な上昇（0.652→5.52 IU/ml）を示した医療従事者が 1 名認められた。この 1 名に対しては追跡調査を実施し、2004 年 6 月に再度抗毒素価を測定した結果、抗毒素価は 0.616

IU/ml に低下した。上記 3 時期の血清は、繰り返し同時実験で測定した結果でも、2002 年 2 月の血中抗毒素価が前後の抗毒素価に比べて高いことを確認している。本人の再聞き取り調査でも、この時期にジフテリア様症状を呈した記憶はなく、また家族および来院者にもジフテリア患者がいないことが確認されている。通常、ジフテリア感染例では、感染後に抗毒素価の上昇が認められた場合には、そのレベルの抗毒素価が 1 年以上は維持されると考えられており、今回の抗毒素価の昇降の原因は不明である。今回の調査では、百日咳同様、医療従事者が患者を通してジフテリア菌に感染する可能性は極めて低いものと考えられた。今回のアンケート調査によると、小児科医療従事者に対して百日咳ワクチンとジフテリアワクチンの接種が必要であると回答した人は、それぞれ 37% と 22% であった。ジフテリアワクチンを必要と回答した 11 名ではすべて百日咳ワクチンが必要と回答していることから、小児科担当医療従事者にワクチンを接種する場合は DPT として接種することが必要であろう。

② 現行の PCR 法はジフテリア菌 DNA 検出系として十分実用に耐えることが明らかになった。一方で LAMP 法は今回のプライマーセットを用いた限りでは実用的でなかった。またリアルタイム PCR は感度、再現性ともに良好で、今後期待できる実験系であると考えられた。今後の方向として、(1)PCR の新規プライマーの開発、(2)生菌を

出発材料とした検出感度の検討、(3)咽頭スワブ等臨床材料を出発材料とした検出感度、信頼性の検討があげられる。

## マイコプラズマ

① I 型又は II 型の *M. pneumoniae* に感染したヒトの免疫応答を知る目的で、患者血清の HA 阻害活性を調べた。患者血清が有する HA 阻害活性は、ほとんどの場合 (22 例中 21 例)、患者に感染した菌型に対して強いことが明らかになった。HA は *M. pneumoniae* コロニーへの赤血球吸着の観察であり、*M. pneumoniae* がヒトの呼吸器上皮細胞へ付着することを観察することは異なっている。しかし、両者はよく相関するとされており、HA を阻害するような活性は *M. pneumoniae* がヒトの呼吸器上皮細胞へ付着、定着することも阻害すると考えられている。*M. pneumoniae* による肺炎の発症には、この菌がヒトの呼吸器上皮細胞へ付着、定着することが必須である。血清中に生じた HA 阻害活性が *M. pneumoniae* の定着を阻害すれば、*M. pneumoniae* に対する防御免疫としてはたらくと考えられている。今回の研究で、患者血清に、感染をうけた *M. pneumoniae* の菌型に対応した HA 活性が生じることがわかったことは、ヒトが *M. pneumoniae* に対して菌型依存的な防御免疫を生じさせようことを示しており、一方の菌型の *M. pneumoniae* に感染した後は同じ型の菌には感染しにくいといった状況が生じると予想される。もしこれがヒ

トの集団で実際に起っていれば、全体として、疫学調査で見られているような I 型菌と II 型菌が交互に出現してくる現象を生じさせるのではないかと考えられる。

② マクロライドが第 1 選択であった場合と、セフェム系など本来マイコプラズマには無効の薬剤あるいは別のマクロライド剤が使われたあとの第 2 選択であった場合も合わせると、マクロライド耐性 *M. pneumoniae* に感染した患者 11 例中 8 例において、マクロライド剤は臨床的に有効であったという印象が持たれた。現在の日本ではマイコプラズマ野生株の少なくとも 15% 前後はマクロライド耐性菌である。しかしながら多くの臨床医は日常診療上、そのような数字は実感していないものと考えられる。おそらく耐性菌感染であっても、臨床的にはマクロライド剤が奏功したと感じられている場合が多いのではないかと想像される。一方で、マクロライド剤投与開始から解熱までの平均日数を統計学的に検討すると、客観的には耐性菌感染症例では明らかにこれが延長していた。

これらの現象を総合すると、マクロライド耐性マイコプラズマ感染による肺炎においては、感受性菌感染と比較して、確かに解熱までの期間に延長は認められるものの、多くの場合それは主治医にとっては明らかに臨床的な問題として感じられるほどの差ではない、という結論が得られる。現在の医学常識においては、マイコプラズ

マ肺炎を疑った場合に有効な抗生剤を投与しないということは倫理的に認められないため、厳密に placebo 投与による自然経過との比較を行なうことは不可能であるが、1960 年代における研究によれば、マイコプラズマ肺炎に placebo を投与して自然経過を観察した場合、解熱までの期間は 8.1 日であったとする報告が有る。この点、単純比較はできないが、マクロライド耐性マイコプラズマ肺炎における平均 3.6 日という解熱日数は確かに感受性菌よりは延長しているものの自然経過よりは明らかに短縮されている、とも考えられる。マクロライド耐性菌感染による肺炎であっても、マクロライド剤投与により臨床的には実際に何らかの薬効が得られている可能性も推測される。

#### インフルエンザ菌

① 今年度の検討において、平成 15 年度に、耐性遺伝子の保有状況を検討した気道由来インフルエンザ菌（無莢膜株）は、実際に小児の肺炎・気管支炎の起炎菌であり、検出頻度が最も高いことが示された。インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎で、ABPC の MIC が  $2.0 \mu\text{g/ml}$  の場合は、ペニシリン系抗菌薬の治療された A 群では、ペニシリン系抗菌薬以外で治療された B 群より、CRP は高値であったが、解熱までに要した日数は同様であった。即ち、ABPC の MIC が  $2.0 \mu\text{g/ml}$  程度の場合は、治療薬としてペニシリン系抗菌薬が推奨される。一方、ABPC の MIC が  $4.0 \mu\text{g/ml}$  以上の場合は、



A群ではB群に比べて解熱までの日数が遷延する傾向にあり、治療にはセフェム系等の抗菌薬が考慮される。ABPC感受性インフルエンザ菌による肺炎では、*pbp-3* 遺伝子の変異数が2つであっても、炎症反応はむしろ軽微で、発熱の遷延等への影響はみられなかった。即ち、ABPC感受性菌における*pbp-3* 遺伝子の変異は、抗菌薬の選択を含めた臨床における意義は少ないものと判断される。これらの結果は、日本小児呼吸器疾患学会ならびに日本小児感染症学会による「小児呼吸器感染症診療ガイドライン2004」が作成される過程において、ガイドライン作成の根拠としても使用された。b型インフルエンザ菌による髄膜炎患児における、血清抗PRP抗体の推移に関して、いずれの検体においても長期の感染防御抗体価とされる $1.0\mu\text{g/ml}$ 以上の値をとっていた。他施設におけるこれまでの報告では、小児のb型インフルエンザ菌髄膜炎症例では $1.0\mu\text{g/ml}$ 以下の値をとっているものが多い。 $\gamma$ -グロブリン療法等が抗体価の経過に影響している可能性もあり、今後さらに検討を重ねたい。b型インフルエンザ菌の予防接種は、わが国では来年度中の導入は難しいとされるが、予防接種導入前の抗PRP抗体を測定することは、疫学的にも意義あるものと考えられる。

② 欧米での報告によれば *H. influenzae* の生物型は分離部位や莢膜血清型と相関があり、b型株では1型が圧倒的に優位であるという。本研究ではベトナムでは欧米とは異なり2

型が優位であることが明らかになった。日本ではb型株の生物型分布に関する最近のデータは少ないが、前年度の本分担研究及びその他の報告により、1型が優位であるが2型も1型の半分程度以上の頻度であり、欧米とベトナムの中間的な分布と見られる。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株は60%に近く、約30%という米国、カナダでの報告よりさらに高い。この差はペニシリン系薬剤の使い方の違いを反映していると思われる。我が国の場合は、前年度の本分担研究によれば例数は少ないが、血液・髄液由来株(10株、すべてb型)の20%(2/10株)が $\beta$ -ラクタマーゼ産生株であった。*H. influenzae* においてもPFGEは識別力が高く、疫学において有用な解析手段である。本研究でも53株が26 genotypesに型別され、詳細な解析が可能になる。PFGEを利用して家族内伝播を調べたところ7家族において患児髄液由来株と家族咽頭スワブ由来b型株とでパターンが一致した。他の1家族では父親からのb型株とは一致しなかった。これらの結果から健常者家族が咽頭に保菌しているb型株が乳幼児の髄膜炎起菌菌となる可能性の高いことが示唆された。

## E. 結論

研究対象病原体が4種類であることより、百日咳・ジフテリア菌グループとマイコプラズマ・インフルエンザ菌グループに分けて、患者材料や患者情報の収集がスムーズに行く体制(国

立感染症研究所—地方衛生研究所—医療機関及び分担研究者—医療機関)を整備しつつ、研究を行った。第二年度の特記すべき研究成果は、百日咳・ジフテリア菌においては、1) 百日咳菌及びジフテリア菌を高感度で検出できる系を確立した、2) 百日咳患者の家族内発症者などを中心に成人百日咳を疑い 16 例を検査したところ、3 例の陽性を確認できた。感染ルートとしては家族内感染の他、職員同士での病院感染例が認められ、成人百日咳の問題は予想以上に大きいことが推察された。3) 11 医療機関に属す 47 名の小児科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調査では菌は分離されなかったが、抗体保有調査では百日咳菌に対する凝集素価の変動が 6 名で認められた。変動が認められた 6 名中 2 名で患者との接触歴が確認され、1 名(被験者 ID1)は 4 回の接触歴を示した。また 1 名(被験者 ID44)は同一患児との接触歴が 3 回で、その凝集素価は大幅な上昇を示した。一方、調査期間中、百日咳患者と接触した医療従事者は 16 名いたが、そのうち有意な凝集素価の変動を示した医療従事者は 2 名(被験者 ID1, 44)だけであった。小児科担当医療従事者が百日咳菌に感染する可能性はあるものの、その感染は保菌するほどのものではないと言える。4) 百日咳菌の抗原変異株の出現を考察するために、抗原変異株のプロテオーム解析を実施した結果、抗原変異株である BP235 とワクチン型 BP233 に

hypothetical protein BP0500 遺伝子の点変異と Prn 発現量の違いが認められた。

マイコプラズマ・インフルエンザ菌においては、1) *M. pneumoniae* の流行型 (I 型と II 型) が 8~10 年周期で入れ替わる原因として、I 型又は II 型の *M. pneumoniae* に感染した患者血清の HA 阻害活性を調べた。その結果、患者血清が有する HA 阻害活性は、ほとんどの場合 (22 例中 21 例)、患者に感染した菌型に対して強いことが明らかになった。今回の研究で、感染を受けた *M. pneumoniae* の菌型に対応した HA 活性が生じることがわかったことは、ヒトが *M. pneumoniae* に対して菌型依存的な防御免疫を生じさせることを示しており、一方の菌型の *M. pneumoniae* に感染した後は同じ型の菌には感染しにくいといった状況が生じうると予想される。もしこれがヒトの集団で実際に起っていれば、全体として、疫学調査で見られているような I 型菌と II 型菌が交互に出現してくる現象を生じさせるのではないかと考えられる。2) マクロライド耐性 *M. pneumoniae* とマクロライド感受性 *M. pneumoniae* で感染した患者の臨床像の解析として、臨床経過の詳細が得られたマクロライド耐性 *M. pneumoniae* 患者 11 例と同時期に得られたマクロライド感受性 *M. pneumoniae* 患者 26 例で発熱期間を比較したところ、マクロライド感受性例においてはマクロライド剤を開始したのち解熱までの平均日数が 1.3 日で

あったのに対し耐性株感染症例では3.6日であり、耐性株感染症例ではマクロライド剤開始から解熱までの期間が統計学的に有意に延長していた。

3) インフルエンザ菌のみが起炎菌として検出された小児肺炎における投与抗菌剤の治療効果について回顧的に解析した。その結果、ABPCのMICが $2.0\mu\text{g/ml}$ の場合は、ペニシリン系抗菌薬の治療されたA群では、ペニシリン系抗菌薬以外で治療されたB群より、CRPは高値であったが、解熱までに要した日数は同様であった。即ち、ABPCのMICが $2.0\mu\text{g/ml}$ 程度の場合は、治療薬としてペニシリン系抗菌薬が推奨される。一方、ABPCのMICが $4.0\mu\text{g/ml}$ 以上の場合は、A群ではB群に比べて解熱までの日数が遷延する傾向にあり、治療にはセフェム系等の抗菌薬が考慮される。ABPC感受性インフルエンザ菌による肺炎では、*pbp-3* 遺伝子の変異数が2つであっても、炎症反応はむしろ軽微で、発熱の遷延等への影響はみられなかった。即ち、ABPC感受性菌における*pbp-3* 遺伝子の変異は、抗菌薬の選択を含めた臨床における意義は少ないものと判断された。ベトナムにおける髄膜炎患児の髄液由来株はいくつかの点で欧米や日本の株とは性状が異なった。薬剤耐性についてはアンピシリン、クラリスロマイシン、クロラムフェニコールに対する耐性化率が日本の株より高かった。PFGE解析により、家族の咽頭保菌株と患児の髄膜炎からの分離株が遺伝的に極めて近縁の関係にある事が確認

され、両者間での菌株の伝達の可能性が強く示唆された。

## F. 健康危機情報

①マクロライド耐性肺炎マイコプラズマが蔓延した場合には患者からの生菌の排出が遷延し、それによりマイコプラズマ感染症の流行が拡大していく可能性が危惧される。肺炎が病像の中心を占める成人におけるマイコプラズマ感染症とは異なり、小児科領域のマイコプラズマ感染症においては、急性脳炎などの肺外発症が決して稀ではない。耐性菌がそのような肺外発症を起こした場合には、重症化する可能性も危惧される。マイコプラズマ感染症を制御する上で、実際に野生に存在する耐性菌の性状を解析しそれに基づいた治療方針を確立することは、やはり今後も重要な課題であると結論される。

②ベトナムでは髄膜炎由来 *H. influenzae* のβ-ラクタマーゼ陽性率が60%に近く、約20%の日本より非常に高い。ベトナムをはじめ東南アジアとの人的交流がさらに盛んになれば伝達性プラスミドに担われたβ-ラクタマーゼ遺伝子が日本にも広がる可能性がある。日本では他にPBP3変異による経口セファロsporin耐性株も増えつつあり、これらにβ-ラクタマーゼ遺伝子が伝達された場合、さらに高度な耐性株が出現する可能性もあり警戒が必要である。

## 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. Matsuoka M. and Sasaki T.: Inactivation of macrolides by producers and pathogens. Current Drug Targets-Infectious Disorders, 2004; 4 (3): 217-240.
2. Matsuoka M., Narita M., Okazaki N., Ohya H., Yamazaki T., Ouchi K., Suzuki I., Andoh T., Kenri T., Sasaki Y., Horino A., Shintani M., Arakawa A. and Sasaki T.: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48 (12): 4624-4630.
3. Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y, Sasaki T. and Miyata M.: Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. J. Bacteriol., 2004; 186 (20): 6944-6955.

## H. 知的所有権の取得状況

該当するものなし