

スツール研(PI)、南部はホーチミンのPIが衛生行政の機関として独立している。訪問したNIHEの検査室の設備は不足しており、ジフテリア担当者はジフテリア菌を取り扱った経験もなく技術は未知数である。2003年度には、ホーチミン市近隣(TPHCM)でDPTの接種率低下によることが原因と説明があり、約80名のジフテリアが発生した。本事例の疫学詳細は、上述のホーチミン市PIの所轄であり、NIHEでは情報が得られなかった。なお、2003年度のジフテリア患者報告数は105名、うち死者7名であった(別紙1)。なお、2004年度にNIHEの所轄地域でジフテリア感染報告があり、患者から分離されたジフテリア菌の生物化学的検査の情報と菌の分与を交渉中である。

なお、CENCOBIにおける担当者の打ち合わせで、ベトナム国内のワクチンおよび診断薬の供給状況の資料を入手した(別紙2)。EPI関連ワクチンだけでなく、大半のワクチンが海外から輸入されているのが現状のようである。

D. 考察および今後の方針

1. 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い。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る。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(を模したものを)を出発材料とした検出感度、信頼性

の検討があげられる。

2. 今後、2003年および2004年に患者から分離されたジフテリア菌を入手し、日本国内分離株との遺伝子型と毒素原性の比較検討を実施する。また、NIHEのジフテリア検査室への技術支援も検討したい。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

(ア) 論文発表

Tadashi Fukuda, Masaaki Iwaki, Takako Komiya, Yoshichika Arakawa and motohide Takahashi. Attempt to curtail the observation periods of mice in the tetanus vaccine potency tests. Japan Journal of Infectious Diseases 57, 257-259, 2004

M. Isaka, T. Komiya, M. Takahashi, Y. Yasuda, T. Taniguchi, Y. Zhao, K. Matano, H. Matsui, J. Maeyama, K. Morokuma, K. Ohkuma, N. Goto and K. Tochikubo

Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. Vaccine 22, 3061-3068, 2004

Nilay Coplu, Berrin Esen, Aysegul Gozalan, Kikuko Miyamura, Iwao Yoshida, Demet Kurtoglu, Nuvide Ozturk Dogan, Gokhan Afacan, Ahmet Unal, Setsuji Ishida and Motohide Takahashi: Tetanus : Antibody Assay Combining In-House ELISA and Particle Agglutination Test and Its Serosurvey Application in a Province in Turkey. Japanese Journal of Infectious Diseases Vol. 57 No. 3, 2004

ロブリン製剤の現状、第8回日本ワクチン学会 平成16年10月 札幌市

福田靖、小宮貴子、岩城正昭、益見厚子、末原章宏、多田善一、長井正昭、坂口孝廣、小幡朗、荒川宜親、高橋元秀：ジフテリア及び破傷風トキソイドにおけるトキソイド抗原とたん白含量の測定に関する感染研と国内製造所による比較検討について、第8回日本ワクチン学会 平成16年10月 札幌市

(イ) 学会発表

高橋元秀、岩城正昭、福田靖、小宮貴子、新谷三春、荒川宜親、佐々木次：Hib ワクチンにキャリアーとして含まれる破傷風トキソイドの免疫原性、第77回日本細菌学会総会 平成16年4月 大阪

片岡紀代、山本明彦、永田典代、後藤紀久、加藤博史、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、高橋元秀、荒川宜親、倉田毅、堀内善信：国内外沈降精製 DPT ワクチンの比較と検討 第77回日本細菌学会総会 平成16年4月 大阪

岩城正昭、三枝智美、高橋元秀：マウスを用いたジフテリア菌感染実験系の検討 第77回日本細菌学会総会 平成16年4月 大阪

岩城正昭、福田靖、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀：抗破傷風人免疫グ

G. 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

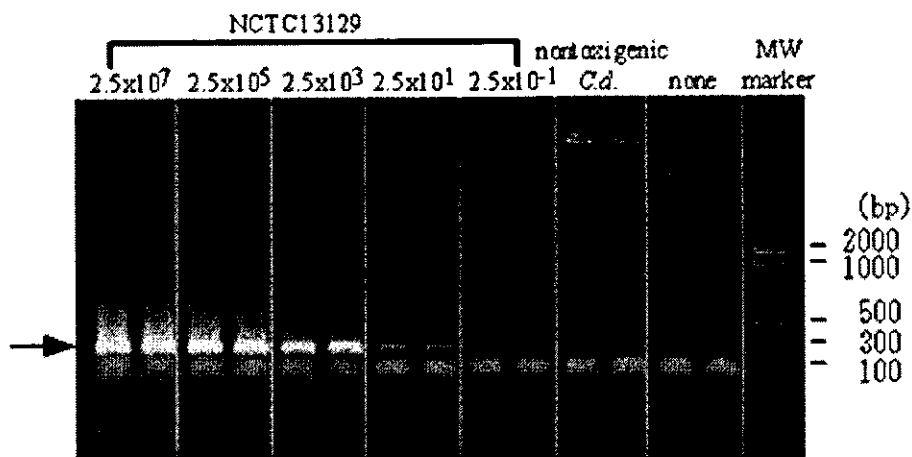


図1. 通常のPCR

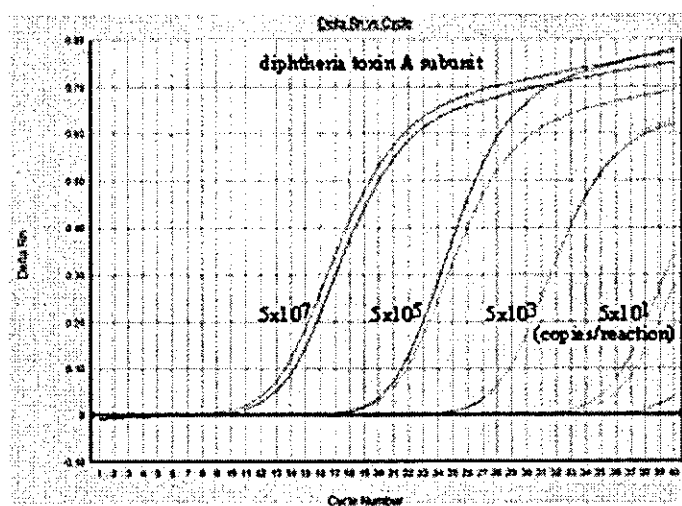


図2 リアルタイムPCR ジフテリア毒素 Aサブユニット遺伝子

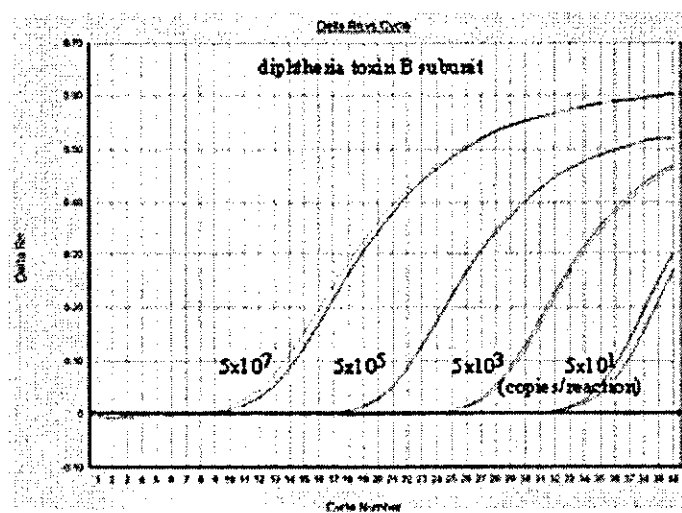


図3 リアルタイムPCR ジフテリア毒素 Bサブユニット遺伝子

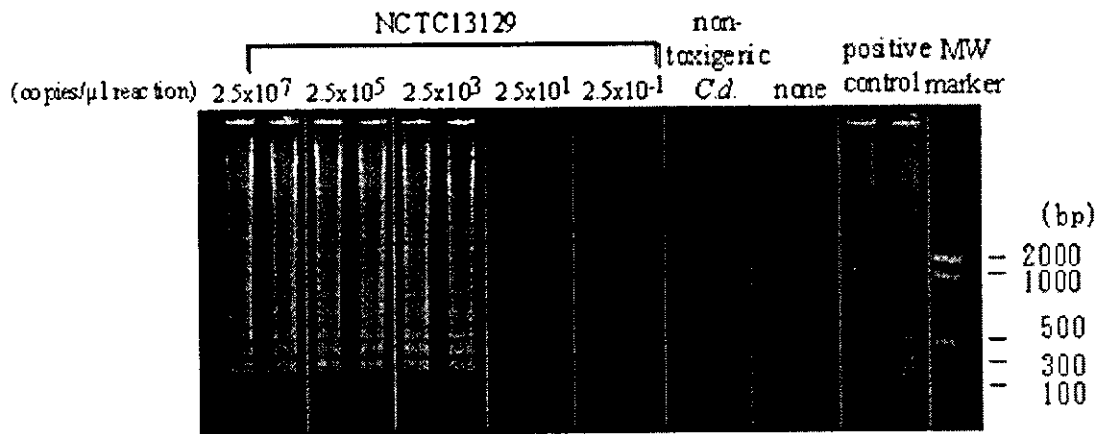


図4. LAMP法 (プライマーセット1)

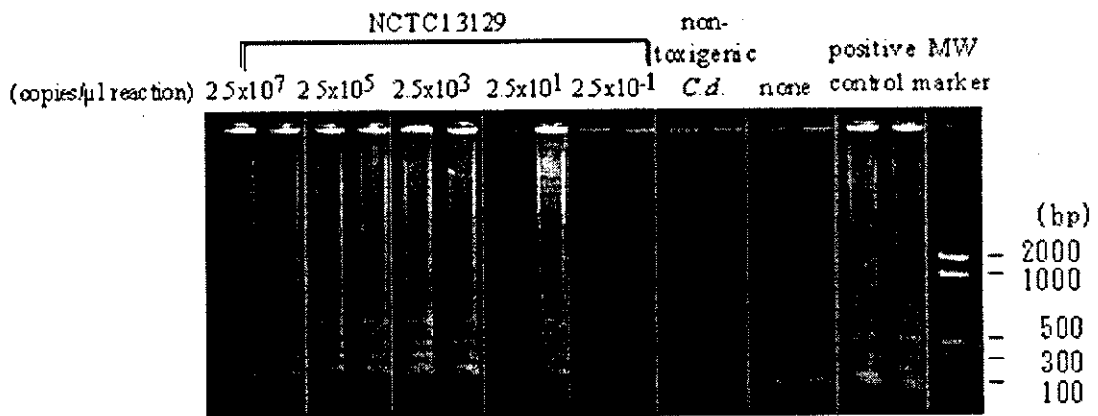


図5. LAMP法 (プライマーセット2)

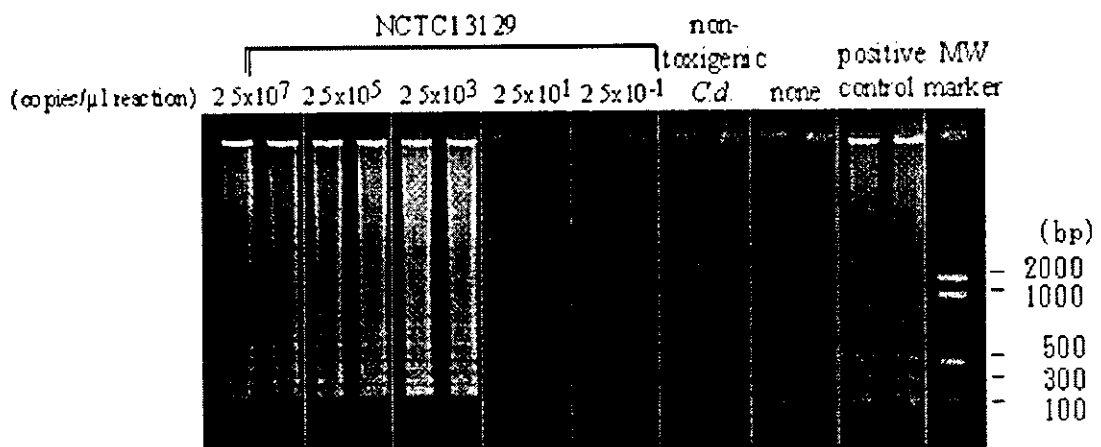


図6. LAMP法 (プライマーセット3)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

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

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

百日咳はワクチン未接種の乳幼児を中心にいまだ散発的な小流行が認められている。ドイツ・アメリカでは医療従事者が感染源となっているとの報告もあり、小児科担当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。そこで小児科担当医療従事者の百日咳抗体とジフテリア抗体を調査し、併せてアンケート調査を実施することにより、医療従事者からワクチン未接種小児への百日咳・ジフテリア菌感染の可能性及び患者から医療従事者への感染リスクを評価した。調査期間中、百日咳患者と接触した医療従事者1名に感染の可能性が認められたが、百日咳菌は分離されなかった。今回の調査結果から、小児科医療従事者が百日咳菌またはジフテリア菌の保菌者となり乳幼児への感染源となる可能性は低いものと考察された。

研究協力者

遠藤美代子（東京都健康安全研究センター）

島山 薫（同上）

奥野ルミ（同上）

向川 純（同上）

柳川義勢（同上）

保科 清（東京逓信病院）

八柳 潤（秋田県衛生科学研究所）

齋藤志保子（同上）

齋藤淳子（同上）

高橋義博（大館市立総合病院）

小沼俊一（同上）

藤森由加里（同上）

内村眞佐子（千葉県衛生研究所）

江下倉重（同上）

太田文夫（おおた小児科循環器科）

伊藤ルミ（（医）社団四輝会伊藤小児科）

大濱洋一（（医）社団博洋会大濱医院）

原木真名（まなこどもクリニック）

岩田裕子（（医）社団恵翔会岩田こどもクリニック）

細山公子（（医）社団千葉県勤労者医療協会稲毛診療所）

佐藤好範（さとう小児科医院）

杉山 明（三重県科学技術振興センター）

山内昭則（同上）

岩出義人（同上）

神谷 齊（国立病院機構三重病院）

中野貴司（同上）

鈴木幹啓（同上）

伊藤馨子（同上）

米川貴博（同上）

石黒靖尚（福岡県保健環境研究所）

堀川和美（同上）

村上光一（同上）

岡田賢司（国立病院機構福岡病院）
青木知信（福岡市立こども病院・感染症センター）

A. 研究目的

百日咳は我が国においてワクチン未接種の乳幼児を中心にいまだ散発的な小流行が認められている。今回はその原因究明を目的として、小児科担当医療従事者を対象に百日咳及びジフテリア抗体ならびにアンケート調査を実施し、患者との接触頻度や医療従事者の抗体保有状況から小児への百日咳・ジフテリア感染の可能性を考察した。

B. 調査方法

抗体調査：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。

判定：百日咳菌抗体価とジフテリア抗毒素価ともに、ペア血清で4倍以上の変動を示

したものを有意とした。

協力医療従事者への百日咳患者及びジフテリア患者との接触に関するアンケート調査：被験者に対し書面により、職種、患者との接触状況等についてアンケート調査を実施し、回答について集計した。

（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

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（図1）。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（図2、表1）。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。

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（図3）。

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（図4）。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(図5)。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(図6)。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(図6)。

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。

D. 考察

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。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と抗体保有調査を実施した。平成15年度に実施した菌の保有調査では、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。

現在、百日咳およびジフテリアはワクチン接種により制圧されているが、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では患者が発生すると蔓延する可能性が高く、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り、流行を拡大させる要因となる可能性は否定できない。しかし、今回の小児科担当医療従事者に対する百日咳ワクチンの必要性に対し「わからない・無回答」とした医療従事者も半数以上に上ることから、今後も同様な調査を継続し、百日咳患者から医療従事者への感染率と保菌率を正確に把握

していくことが必要となる。

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ジ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名に対し抗体保有状況およびアンケート調査を実施した。その結果、調査期間中に百日咳患者と接触した医療従事者は16名であり、患者からの感染が疑われた医療従事者が1名存在した。

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
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

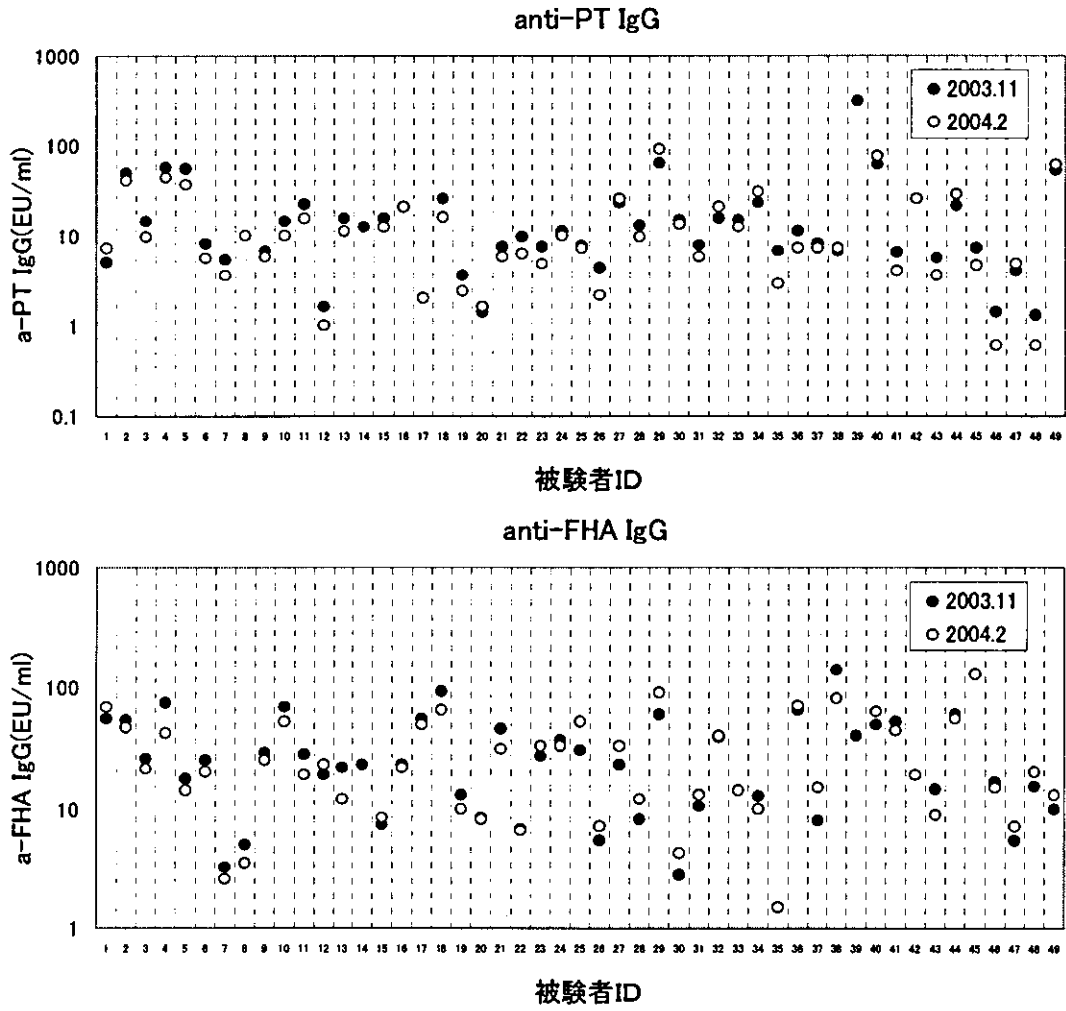


図1 anti-PT IgG と anti-FHA IgG の変動 (ペア血清)

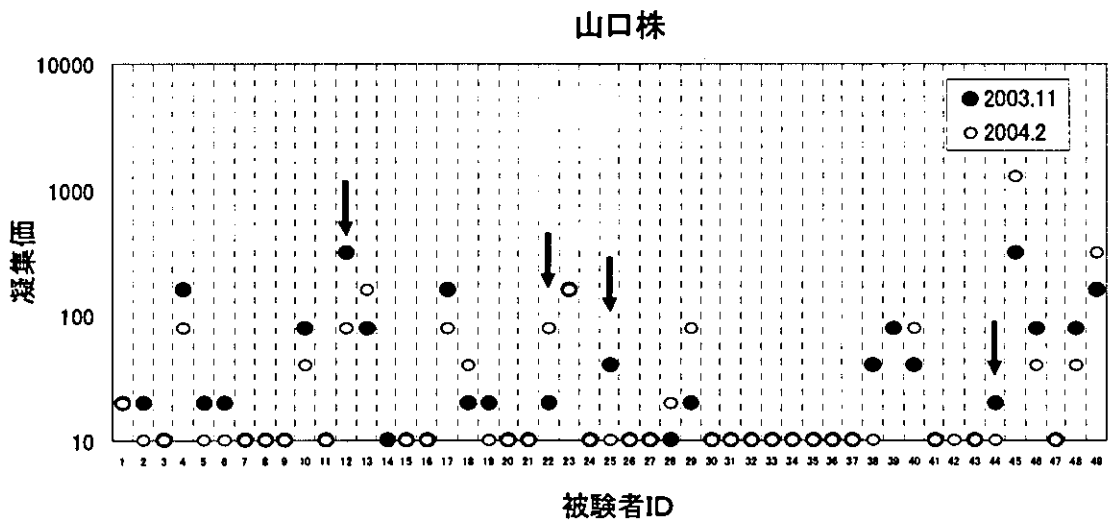
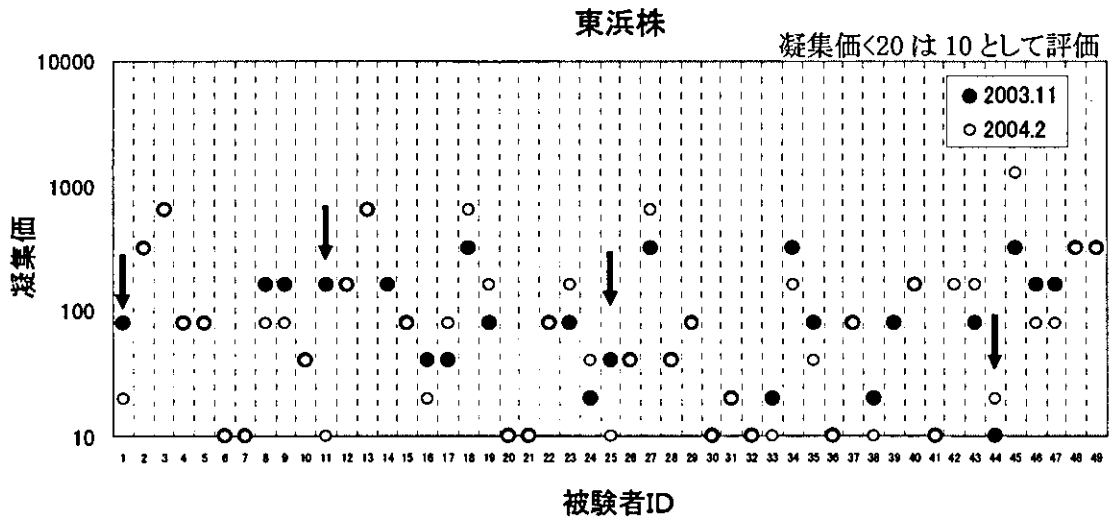


図2 凝集価の変動(ペア血清)

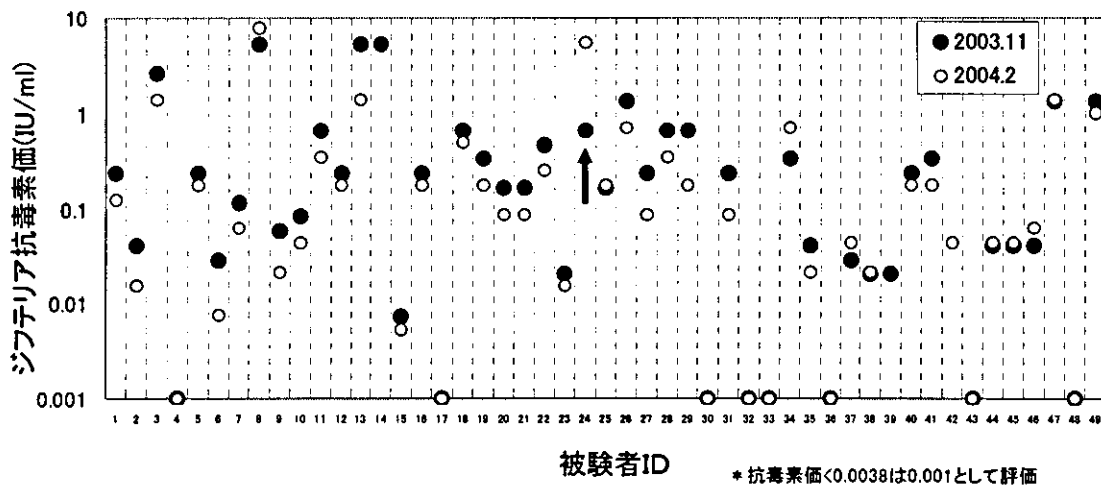


図3 ジフテリア抗毒素価の変動

被験者ID	東浜株		山口株	
	2003年 11月	2004年 2月	2003年 11月	2004年 2月
1	80	20	20	20
11	160	<20	<20	<20
12	160	160	320	80
22	80	80	20	80
25	40	<20	40	<20
44	320	1280	320	1280

表1 百日咳凝集価の変動が認められた医療従事者

被験者ID	2003年11月	2004年2月	2004年6月
24	0.616	5.52	0.616

*有意な変動を認めたので、3回測定を行った

表2 ジフテリア抗毒素価の変動が認められた医療従事者

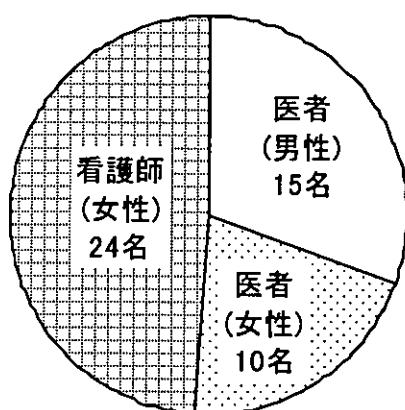


図4 アンケート調査 被験者の構成

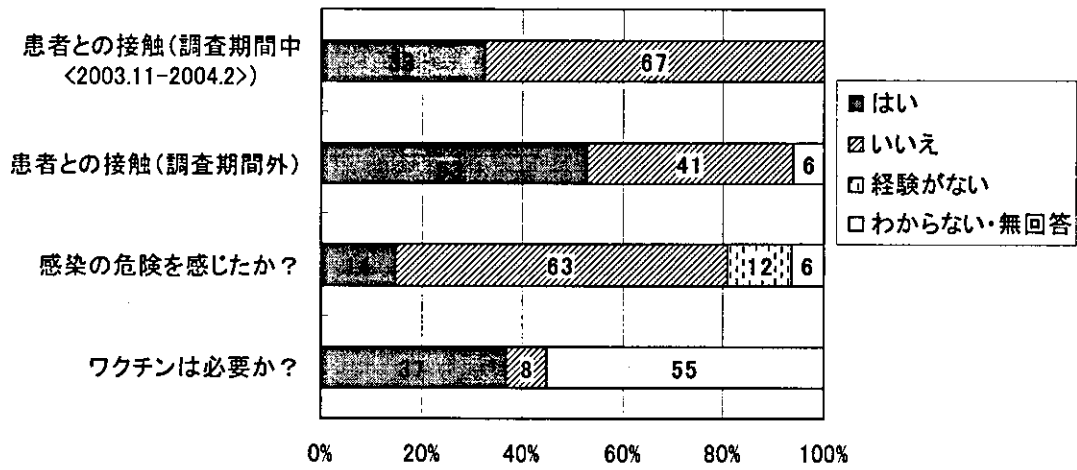


図5 百日咳・百日咳ワクチンについて

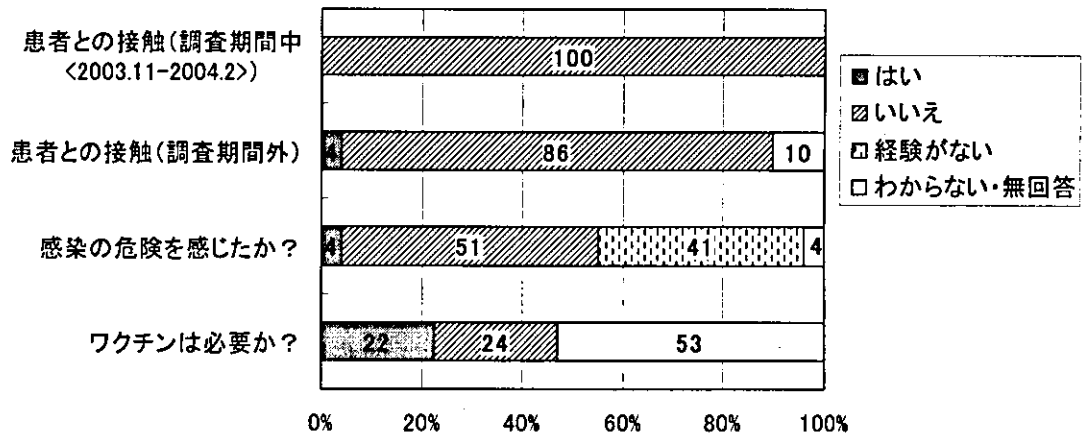


図6 ジフテリア・ジフテリアワクチンについて

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に関する研究

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

協力研究者 山崎 勉 埼玉医科大学 感染症科

岡崎則男 神奈川県衛生研究所 呼吸器系細菌

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血清の *M. pneumoniae* に対する血球吸着(HA) 阻害活性を調べると、HA 阻害活性を有する血清のほとんどは、I 型か II 型のどちらかの *M. pneumoniae* に対して優先的な阻害を示した。この菌型優先的な HA 阻害活性は、患者に感染した *M. pneumoniae* の菌型に対応していた。*M. pneumoniae* の感染時には、血清中に菌型特異的な接着阻害抗体が産生されると考えられる。I 型菌と II 型菌の間で異なっている P1 接着タンパク質の断片を作製し、患者血清との反応性を調べると、患者血清中には菌型特異的な P1 抗体が存在していることが示された。これが菌型特異的な接着阻害抗体である可能性が高いと考えられた。*M. pneumoniae* 感染時に菌型特異的な接着阻害抗体が産生されることは、臨床において I 型菌と II 型菌が交互に出現する現象の主な要因になりうると考えられる。

A. 研究目的

マイコプラズマ肺炎の原因菌 *M. pneumoniae* には2つの菌型(I 型と II 型)が存在し、疫学調査からはこれらの菌が8年から10年程度の周期で交互に臨床に出現する傾向が観察されている。*M. pneumoniae* の菌型交代現象は、ヒトの免疫と *M. pneumoniae* の相互作用によって起きていると考えられ、過去のマイコプラズマ肺炎の周期的な流行にも関連していると思われる。しかし、その詳細は不明であり、今回、*M. pneumoniae* の2つの菌型に対するヒトの免疫応答を知る

ために、血清学的な見地から検討を行った。

B. 研究方法

昨年度の研究計画で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。今年度は、同患者の血清を研究に使用した。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、PPLO 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。判定は図1のようにコロニーへの血球吸着の阻害度から、完全阻害(+)、部分的、弱阻害(±)、阻害なし(-)の3段階で行った。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。

C. 研究結果

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。この 22 検体の個々の分析結果を表 1 に示す。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。今回の研究に用いた血清は、喀痰の PCR 検査から、患者に感染した *M. pneumoniae* の型が判明している(表 2)。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(表2)。

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つとも異なる 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(図 2)。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(図 3 (表 2 の患者血清の分析結果の一部を示した))。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

出ていることがわかった(表2)。

D. 考察

本研究では I 型と II 型の *M. pneumoniae* に対するヒトの免疫応答を知る目的で、*M. pneumoniae* に感染した患者の血清の分析を行った。今回使用した血清はすべて、患者に感染した菌の型がわかっていたため、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う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。

各菌型に優先的な HA 阻害活性に関わるのは、接着タンパク質である P1 に対する抗体であろうと考えられる。I 型と II 型の *M. pneumoniae* の間で、構造に違いが見られるおもなタンパク質は P1、ORF6、P65 の3つであることがわかっているが、この中で接着性に直接関与するのは P1 である。ORF6 も接着性に必須ではあるが、直接の接着分子ではない。さらに、これまで、この3つのタンパク質に対する抗体のうち、接着性を阻害するとの報告があるのは抗 P1 抗体だけである。今回 P1 タンパク質断片を用いた実験で、患者血清に型特異的な P1 抗体が存在していることが検出できたので、このような抗 P1 抗体の一部が型特異的な接着阻害活性を有するものと思われる。P1 の N 領域に対するモノクローナル抗体が接着阻害活性を有するという報告もあり、この考えを支持している。今回作製した P1 タンパク質断片は、患者が感染した菌型を血清学的に判定する目的でも使用できると考えられる。

E. 結論

M. pneumoniae に感染した患者の血清中には、感染した菌と同型の菌に対してより強くはたらく HA 阻害活性が生じることが明らかになった。これは型特異的な抗 P1 接着阻害抗体が生産されるためと考えられる。型特異的な抗 P1 接着阻害抗体は防御免疫として働くと考えられ、臨床における *M.*

pneumoniae の菌型変化の主な要因になりうると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kenri, T., Seto, S., Horino, A., Sasaki, Y., Sasaki, T., 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, 6944-55.

Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T., Miyata, M. Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as

revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions.

J. Bacteriol. 2005, 187, 1875-7.

2. 学会発表

見理 剛、岡崎則男、成田光生、佐々木次雄

Type shift of clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae* in Japan. 15th Congress of International organization of Mycoplasmaology, Athens, Georgia, USA. July 11-16, 2004

(第15回国際マイコプラズマ学会、米国 ジョージア州 アセンス、2004年7月11-16日)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

表 1. HA 阻害活性を示した患者血清の性状

血清			抗体価	血球吸着阻害 (HA阻害)				判定	Wb	喀痰 PCR 分析	
検体番号	採血日	PA法		M129 (I)		FH (II)				P1型	耐性
117-1	18	11/21/00	>2560	±	-	+	±	I<II	II	II	A2063G
117-2	32	11/27/00	1280	±	-	+	±	I<II	II	II	A2063G
772-1	94	08/10/02	>2560	+	+	+	±	I>II	I	I	
772-2	13	08/16/02	1280	+	+	+	±	I>II	I	I	
764-2	4	08/14/02	1280	+	±	-	-	I	I	I	
819-2	5	10/28/02	2560	+	±	±	-	I>II	I	I	
269	16	05/11/01	>2560	+	+	-	-	I	I	I	
118	21	11/22/00	>2560	±	-	+	±	I<II	II	II	
756-2	28	07/26/02	1280	±	-	±	-	I+II	I	II	
275	31	05/14/01	>2560	+	+	-	-	I	I	I	
598-2	47	03/25/02	1280	+	+	-	-	I	I	I	
387-2	53	08/17/01	>2560	+	-	-	-	I	I	I	
771-2	57	08/16/02	>2560	±	-	-	-	I	I	I	
723-2	64	07/17/02	>2560	-	-	±	-	II	II	II	
83-2	71	10/13/00	>2560	±	-	+	-	I<II	II	II	
239-2	73	04/19/01	>2560	-	-	±	-	II	I	I	
709	86	05/29/02	>2560	+	±	-	-	I	I	I	
406	88	09/28/01	>2560	-	-	±	±	II	I+II	II	
415	93	10/01/01	640	-	-	±	±	II	II	II	
86-2	96	10/28/00	>2560	-	-	±	±	II	II	II	
898-2	106	01/22/03	320	+	-	±	±	I>II	I+II	I	
930-2	108	04/25/03	320	±	-	+	+	I<II	II	II	

HA 阻害の判定(+、±、-)は図1を参照。Wb は組換え P1 タンパク質断片に対するウエスタンブロット分析の結果(図2を参照)。検体番号 117-1 と 117-2 および 772-1 と 772-2 はそれぞれ同一患者からのペア血清。117-1、117-2 の患者に感染したのは喀痰 PCR マクロライド耐性菌(23S rRNA 遺伝子に A2063G の変異)であったことが判明している。

図 1. 血球吸着阻害活性の判定基準

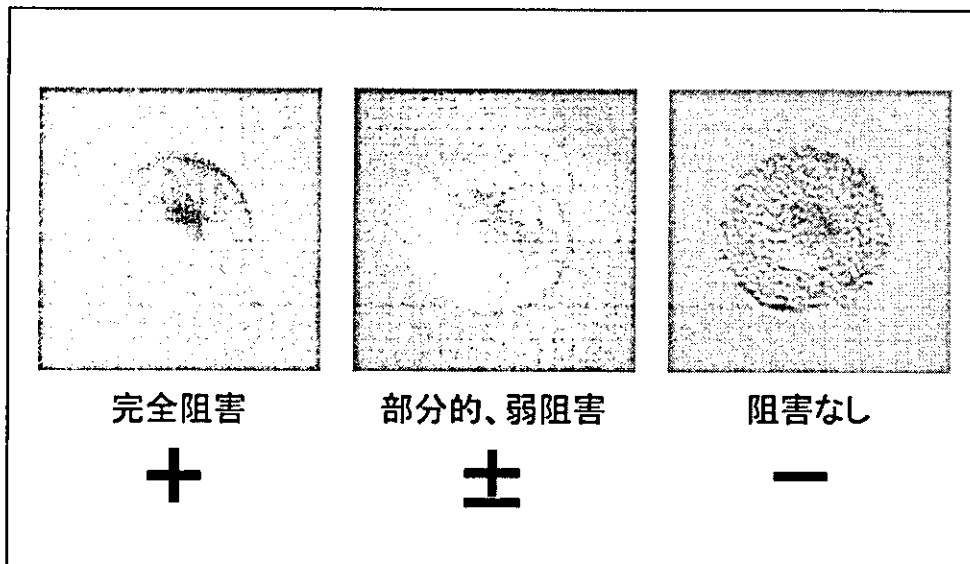
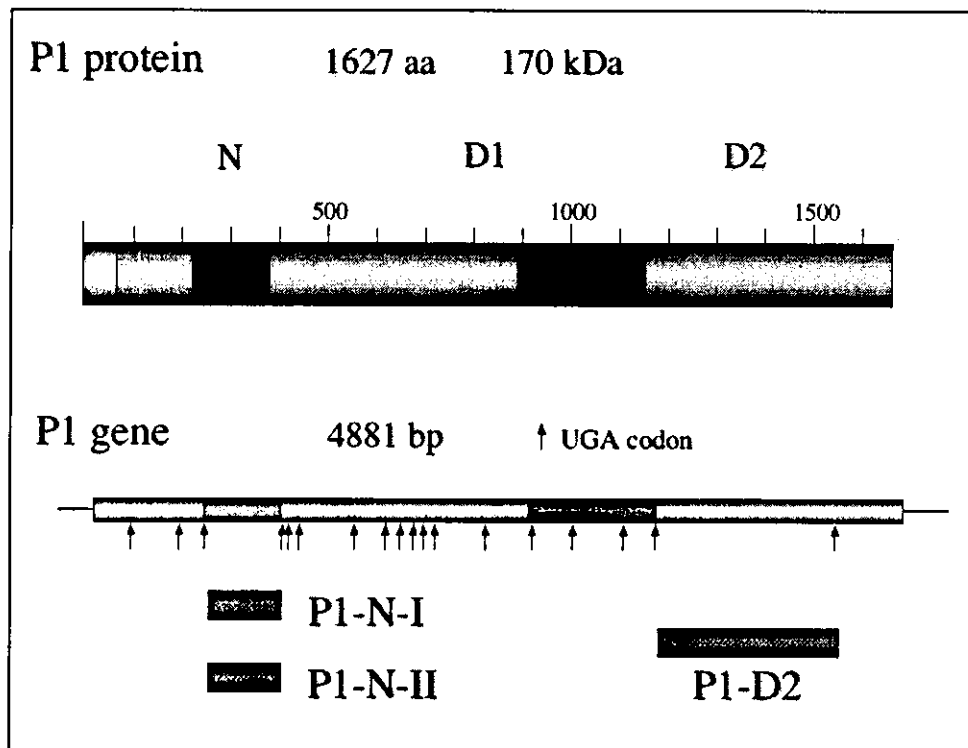
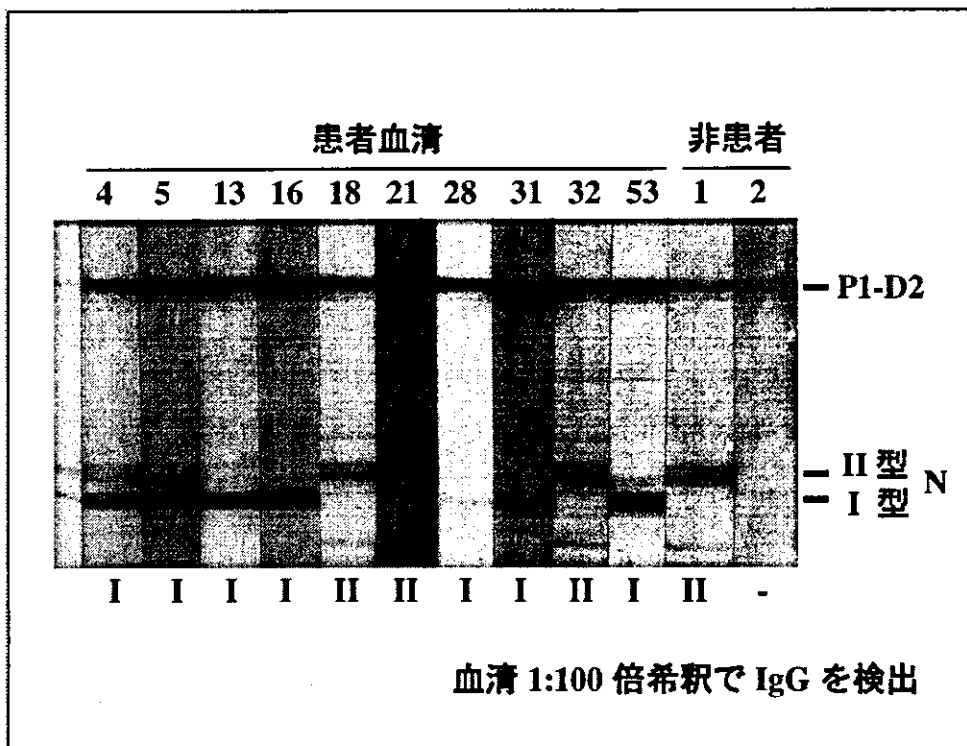


図 2. P1 タンパク質断片の作製



図中、上の Bar が P1 タンパク質、下が P1 遺伝子の構造を示している。P1 タンパク質には、N、D1、D2 の 3 つのドメインがある。色が濃くなっている 2 つの領域が I 型菌と II 型菌で配列が異なっている部分を示している。*M. pneumoniae* の遺伝子では UGA コドンはトリプトファンに翻訳される。I 型と II 型の N 領域と D2 領域を大腸菌に組み込んで発現させた。

図 3. P1 タンパク質断片と患者血清の反応



厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）分担研究報告書

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

分担研究者 成田光生 札幌鉄道病院・小児科

研究協力者：岡崎則男，大屋日登美；神奈川県衛生研究所・微生物部・呼吸器系細菌

見理 剛，久保田眞由美，鈴木里和；国立感染症研究所・細菌第二部

山崎 努；埼玉医科大学・感染症科・感染制御科

田中裕士；札幌医科大学・第三内科

研究要旨

前年度に引き続き、マイコプラズマ野生株を分離・収集し、薬剤感受性試験および23SリボソームRNAドメインVにおける遺伝子変異の有無を検討した。また喀痰抽出DNAを用いた直接PCR法にてもマイコプラズマ菌体の存在および薬剤耐性遺伝子変異の有無を検討した。その結果マイコプラズマ野生株の15%がマクロライド耐性であった。一方でこれら耐性菌感染においては感受性菌感染と比較して、マクロライド剤投与後の発熱持続日数に有意の延長が認められたものの、耐性菌感染症例がとりわけ重症化する傾向は認められなかった。マクロライド耐性肺炎マイコプラズマは少なからず野生に存在するが、肺炎に関しては臨床的問題は大きくないものと考えられた。ただし疫学的な面からは耐性菌蔓延によりマイコプラズマ肺炎の流行が拡大する危惧が有り、また耐性菌による肺外発症の危険性なども無視できない問題であり、耐性菌対策は継続すべき課題である。

A. 研究目的

本研究者らによる昨年度までの研究結果によると、現在の日本において流行している肺炎マイコプラズマ（*Mycoplasma pneumoniae*）野生株の約17%がマクロライド耐性であった。しかしながら個々の症例においては、マクロライド耐性菌感染においても臨床的にはマクロライド剤が奏功しているかに感じられる場合が少なからず存在した。

この点を明らかにするため、引き続きマイコプラズマ野生株を収集しその性状解析を行なうとともに、それらの株が分離された症例の臨床情報も積極的に収集し、*in vitro*における菌の性状と*in vivo*におけるマクロライ

ドの臨床効果には実際に乖離が存在するの否かにつき、臨床医学的及び微生物学的観点からより精密に検討することを目的とした。

B. 研究方法

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などについては昨年度の本研究班報告書に記載したので省略する。

今年度はこれに加えて、煩雑な塩基配列決定の段階を省くために、polymerase chain reaction (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