

厚生労働科学研究費補助金

国際医学協力研究事業

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、
感染予防・制御に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 宏

平成18(2006)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究	
鈴木 宏	----- 1
II. 分担研究者	
1. マイコプラズマとマクロライド耐性に関する検討	
荒川 宜親	----- 15
2. アジアで流行する高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスの遺伝解析	
河岡 義裕	----- 19
3. 小児急性中耳炎の難治化のメカニズムと感染予防・制御に関する研究	
山中 昇	----- 21
4. パラミクソウイルス持続感染成立の多様性に関する研究	
伊藤 康彦	----- 25
5. インフルエンザ菌の菌株特異的な肺感染防御能に関する研究	
大石 和徳	----- 29
6. H5N1鳥インフルエンザプロトタイプワクチンの開発とその評価に関する研究	
小田切 孝人	----- 33
7. Programme of Excellence in Influenza - Phase II (2006-2010)	
喜田 宏	----- 39
8. 外来性蛋白を発現する組み換え麻疹AIK-C株の確立	
中山 哲夫	----- 41
9. <i>Rhodococcus equi</i> の増殖過程における形態観察とPBPsとの関連性	
西野 武志	----- 45
11. インフルエンザ関連脳症における前駆症状の特徴と全国調査から 判明した治療法	
横田 俊平	----- 47
12. 急増する呼吸器感染原因菌の薬剤耐性 - β -ラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性 (BLNAR) インフルエンザ菌について	
黒崎 知道	----- 51
13. A型・B型インフルエンザに対するオセルタミビル投与時の臨床経過	
齋藤 玲子	----- 53
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 59
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 65

I. 総括研究報告

急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究

主任研究者 鈴木 宏

新潟大学教育研究院医歯学系教授

研究要旨

2005年7月末のモンゴルのエルケル湖で大量に斃死した野生水禽からのH5N1インフルエンザウイルスと5月に中国の青海湖で大量に斃死した野生水禽から分離されたウイルスと極めて近縁であることが判明した。高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析より、ベトナムの家禽は何度も異なるH5N1ウイルスによる侵襲を受けたことがわかった。

16のHA亜型と9のNA亜型の組み合わせ144中126通りがワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存された。ベトナムのヒトから分離された鳥由来のH5N1ウイルスをリバースジェネティクス法で弱毒化し、アルミニウムアジュバントを添加したプロトタイプワクチンは免疫原性が低く、2003年版のワクチンと比較し、少なくとも10倍以上のワクチン抗原量が必要であることが示された。

インフルエンザ関連脳症の治療方法として発症早期にステロイド・パルス療法を用いることが予後の改善に効果的であることが明らかになった。オセルタミビルはA型とB型インフルエンザ治療に有効であり解熱期間を短縮させる効果があったが、両者を比較し、A型がB型よりその効果は強く見られた。

パラミキソウイルスの持続感染成立過程は多様性を示し、センドライウイルスによる持続感染成立に貢献していないと思われていたFとM蛋白も共にpositiveに関与し、HN蛋白はnegativeな役割を果たしていることも明らかになった。

麻疹ワクチンAIK-C株を生ワクチンウイルスベクターとして利用する基礎研究を行った。ムンプスウイルスのHemagglutinin-neuraminidase (HN) 遺伝子を挿入した組換え麻疹ウイルスからムンプスウイルスHN蛋白が発現され、他のウイルス感染症の応用への足がかりとなった。

2000年以降マクロライドに耐性を獲得したマイコプラズマが全国各地で分離され、周囲への伝播が起きやすくなっている事が懸念された。また、エリスロマイシン耐性マイコプラズマは、ケトライド系新薬であるテリスロマシシンにも高度耐性を示し、その分離・流行の監視強化が必要と思われた。

小児の急性や遷延性中耳炎起炎菌の薬剤耐性化と薬剤耐性遺伝子を検討し、高率に肺炎球菌とインフルエンザ菌の薬剤耐性化が進行している事が判明した。

呼吸器病原菌として重要なインフルエンザ菌のBLNARの急増が明らかになったが、臨床効果の検討ではペニシリン系薬剤で対応しても問題は無かった。

マウスモデルを用いてインフルエンザ菌(Non-typable *Haemophilus influenzae*: NTHi) による菌特異的な肺感染防御獲得機構について検討した。同一のNTHi株

の気管内反復接種により菌株特異的な肺感染防御能が認められ、NTHiの菌株によっては、その反復気管内接種により異なるNTHi菌株に対する交叉肺感染防御能を誘導し、異なるNTHi株の単回気管内接種ではいずれのNTHi株に対する肺感染防御能は得られなかった。

*Rhodococcus equi*の増殖過程の形態観察と関与するペニシリン結合蛋白質(PBPs)との関連性を検討し、*R. equi*は常にあらゆるPBPsを発現することにより独特な形態変化を伴った分裂をもたらし、このことが*R. equi*の全般的な β -lactam系抗菌薬に対する低感受性をもたらす要因ではないかと推測された。

研究組織

主任研究者

鈴木 宏 新潟大学教育研究院医歯学系教授

分担研究者

荒川 宜親 国立感染症研究所
細菌第2部長

河岡 義裕 東京大学医科学研究科教授

田代 真人 国立感染症研究所
ウイルス第3部長

山中 昇 和歌山県立医科大学教授

伊藤 康彦 三重大学医学部教授

大石 和徳 大阪大学医学部教授

小田切孝人 国立感染症研究所
ウイルス第3部室長

喜田 宏 北海道大学大学院
獣医学研究科教授

中山 哲夫 北里生命科学研究科教授

西野 武志 京都薬科大学学長

森島 恒雄 岡山大学大学院医歯薬学
総合研究科教授

横田 俊平 横浜市立大学大学院医学研究科
教授

黒崎 知道 千葉市立海浜病院診療局長

齋藤 玲子 新潟大学教育研究院医歯学系
助手

A 研究目的

急性呼吸器感染症(acute respiratory infection; ARI)はウイルスが主ではあるが、細菌、マイコプラズマ、クラミジアなど多種類の病原微生物が関与する。本研究は日米医学協力研究会のARI部会の活動として東南アジアにおけるARI関連疾患の予防・制御を目的として、本領域の医学部と獣医学部との学際的分担者により広い視野に立って基礎と臨床面それぞれから検討する。

現在、国際的に最大の関心事となっている高病原性トリ型インフルエンザA/H5N1によるパンデミックへの対応を行うべく、発生地域となっているベトナム、ロシアなどの関連研究機関との連携により、ヒト、ニワトリ、カモ、七面鳥、馬、豚、ミンクなどにおけるサーベイランスと疫学研究を行う。特にヒトにおいては、抗ウイルス剤治療と耐性株発生の検討、更には有効、安全なA/H5N1ワクチンの緊急開発法の確立を行う。

例年発生するインフルエンザについては、毎年インフルエンザ疫学、ワクチン効果、抗ウイルス剤耐性株発生状況と臨床への影響を検討する。また、インフルエンザ脳炎については、疫学、発生機序、予防治療法の確立を検討し、患者発生予防と早期の有効な治療を検討する。

ARI起因菌検出頻度と抗菌薬感受性を検討する。特に呼吸器病原性肺炎球菌やインフルエンザ桿菌の薬剤感受性の推移、血清型の分

布、薬剤耐性株の遺伝子変異パターンの検討を行う。また、肺炎球菌やインフルエンザ桿菌に対するワクチン導入と成人での有効性の検討を行う。特に、小児の中耳炎の起因細菌のみならずウイルス疾患との関与、各種細菌への免疫応答を明らかにし、予防・治療への足がかりを掴む。

B 研究方法

ARI の病因としてのウイルスと細菌について、罹患している患者、動物からの材料を用い病原ウイルス、細菌の分離による疫学的検討を行う。更には、分離同定されたウイルス株、細菌株の抗原性、遺伝子性状、病原性より、分子疫学的検討、耐性株の動向についての研究を行った。また、持続感染細胞、リバーズジェネティック方により作成されたウイルス株、細菌感染のマウスモデル、細菌感染後の形態学的変化などを検討した。

研究課題により人権及び利益の保護に関して倫理面での配慮が必要になった際には、基本的には各担当大学や施設における医学部倫理委員会に於いて審議を受け、許可後に研究を行った。

C 結果・考察

ウイルス性と細菌性の急性呼吸器感染症について医学部と獣医学部との学際的分担者により広い視野に立って基礎と臨床面から検討した。このことから、ここでは個別な仕事を尊重してそれぞれについての結果を記述した。

(I) ウイルス性急性呼吸器感染症

1. 急性呼吸器感染症の感染メカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究；

2005 年 7 月末にモンゴルのエルケル湖で野生水禽が大量に斃死し、インドガンの脳ならびにオオハクチョウの脳および気管と総排泄腔の拭い液から 4 株の H5N1 インフルエンザウイルスが分離された。ウイルス遺伝子

および生物性状の解析結果から、5 月に中国の青海湖で大量に斃死した野生水禽から分離されたウイルスと極めて近縁であることが判明した。

2005 年の 9 月から 11 月にかけて、北海道およびモンゴルで採集した野生水禽の糞便からウイルス分離を試みた。モンゴルの渡りガモの糞便 476 検体からは、H3N2、H3N6、H3N8、H4N6、H8N4、H10N3、H10N7 ウイルス計 32 株が分離された。北海道の 4 地点で採集した 1,248 の野生水禽の糞便検体からは、H2N5、H3N2、H3N8、H4N2、H4N6、H6N1、H6N2、H8N4、H9N4、H12N2 ウイルスが計 26 株分離された。これらのウイルスの性状を解析し、インフルエンザウイルス株ライブラリーに加えた。

以上、動物インフルエンザの継続的なグローバルサーベイランスは、動物とヒトのインフルエンザ対策に有益な情報と、16 の HA 亜型と 9 の NA 亜型の組み合わせ 144 中 126 通りがワクチンおよび診断に利用できるウイルス株として系統保存された。なお、後者については WHO との協力した Program of Excellence in Influenza - Phase II (2006-2010) と関連したグローバルな活動でもある。

2. アジアで流行する高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析；

2004 年 1 月から 2005 年 8 月までに、ベトナム各地域のニワトリやアヒルから分離された高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス 9 株の遺伝子 RNA を抽出し、HA と NA 遺伝子をベクタープラスミドにクローニング後、遺伝子配列を決定した。HA 遺伝子配列では、開裂部位の塩基配列は強毒型を示し、レセプター結合部位の配列はトリ型であった。HA と NA 遺伝子系統解析で 9 株のウイルスは、ベトナム、タイ、ラオス、カンボジアのグループ、中国、日本、韓国、インドネシアのグループ、そしてそのどちらにも含まれないマ

イナーなグループ 3 つに分類された。以上、ベトナムの家禽は何度も異なる H5N1 ウイルスによる侵襲を受けたことがわかった。

3. H5N1 鳥インフルエンザプロトタイプワクチンの開発とその評価に関する研究；

2004 年にベトナムのヒトから分離された鳥由来の H5 ウイルスをリバースジェネティクス(RG)法で弱毒化し、それを用いた不活化全粒子プロトタイプワクチンを開発した。H5 亜型鳥インフルエンザウイルスはヒトに対して極めて免疫原性が弱いことから、アルミニウムアジュバントを添加したアジュバントワクチンとし、この免疫原性、感染防御効果をマウスにおいて評価した。また、対照として 2003 年にヒトから分離された H5N1 株を用いたアジュバントワクチンと比較した。その結果、今回のプロトタイプワクチンは免疫原性が低く、2003 年版のワクチンより少なくとも 10 倍以上のワクチン抗原量が必要であることが示された。

4. A 型・B 型インフルエンザに対するオセルタミビル投与時の臨床経過；

2001/02～2004/5 年の 4 冬季インフルエンザ・シーズンに新潟市内 1 小児科を受診した小児にオセルタミビル（タミフル）を 3-5 日間投与し、A 型 B 型インフルエンザにおける解熱を投与群・非投与群間で比較した。4 シーズンを通じ、A 型インフルエンザ投与群は 301 名、B 型インフルエンザ投与群は 209 名、非投与 A 型群 30 名、非投与 B 型群は 66 名であった。単変量解析、多変量解析とも A 型、B 型治療群ではそれぞれの型の非治療群に比して有意な解熱効果をもとめ、平均病日（37.2℃以上の期間）の短縮がみられた。しかし、B 型投与群では A 型投与群に比して経過が遷延していた。有熱期間に影響する因子を線形分析で解析したところ、A 型感染、オセルタミビル治療、年齢が高いことは有意に病期を短縮させ、一方 1 病日の熱が高いこと

は病期を延長させた。性、ワクチン歴、シーズン、受診までの日数は有意差を持った影響はなかった。これらの結果より、オセルタミビルは A 型、B 型治療ともに有効であり、解熱期間を短縮させる効果があったが、A 型が B 型よりその効果は強く見られた。

5. インフルエンザ関連脳症における前駆症状の特徴と全国調査から判明した治療法；

インフルエンザ関連脳症の特徴として、第 1 点は特異な前駆症状、第 2 点には局所的（脳内）および全身性の cytokine storm がある。小児科医の常駐する全国約 3,500 施設における患者調査を基に、治療方法として頻用されている大量 γ -グロブリン療法とステロイド・パルス療法について統計的解析を行い、発症早期にステロイド・パルス療法を適用することが予後の改善に効果的であることが明らかになった。

6. パラミクソウイルス持続感染成立の多様性に関する研究；

パラミキソウイルスは自然宿主において持続感染することが多い。多数のルブラウイルス持続感染細胞形を用いて、その成立過程を解析した。持続感染成立過程は多様性を示し、少なくとも 5 つに分類することができた。センドイウイルスによる持続感染成立に貢献していないと思われていた F 蛋白も、M 蛋白も共に positive に関与していることが明らかになった。意外なことに HN 蛋白は Negative な役割を果たしていることも明らかになった。

7. 外来性蛋白を発現する組み換え麻疹 AIK-C 株の確立；

2000 万ドース以上がヒトに接種されその有効性と安全性は担保されている麻疹ワクチン AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして利用するための基礎研究を行った。

AIK-C 株の性状を分子生物学的に解明し、Fusion (F) 蛋白 278 位の Leu が Vero 細胞に small plaque を誘導し、39-40 度で増殖しない temperature sensitivity (ts) の性状は Phospho (P) 蛋白 439 位の Pro が担っていることがあきらかとなった。こうした弱毒のマーカーを保持し外来性蛋白を発現するウイルスベクターとして N/P, P/M, H/L junction に Asc I 制限酵素を導入し約 3000 塩基を挿入できる生ワクチンウイルスベクターを作製した。Reverse genetic の手法で感染性ウイルスを回収し P/M junction に導入したウイルスの回収率が高かった。ムンプスウイルスの Hemagglutinin-neuraminidase (HN) 遺伝子を挿入しムンプスウイルス HN 蛋白を発現する組換え麻疹ウイルスを回収した。

(I I) 細菌性急性呼吸器感染症

1. マイコプラズマとマクロライド耐性に関する検討；

我が国では、2000 年以降、エリスロマイシンやクラリスロマイシンなどのマクロライドに耐性を獲得したマイコプラズマが全国各地で分離されるようになった。マクロライド耐性マイコプラズマによる肺炎の患者では有熱期間が有意に延長する事が確認されたため、同感染症の患者からの菌の放出期間も延長している事が示唆され、マイコプラズマの周囲への伝播、拡散、感染が起きやすくなっている事が懸念される。さらに、エリスロマイシン耐性マイコプラズマは、最近認可されたケトライド系新薬であるテリスロマシシンにも高度耐性を示す。このことより、今後、マクロライド耐性マイコプラズマの分離状況、流行状況について監視を継続・強化する必要がある。

2. 小児急性中耳炎の難治化のメカニズムと感染予防・制御に関する研究；

小児急性中耳炎、遷延性中耳炎の起炎菌に

おける薬剤耐性化および薬剤耐性遺伝子を検討した。肺炎球菌において、ペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp1a、pbp2x、pbp2b)の変異およびマクロライド耐性遺伝子(emAM、mefE)の発現を、インフルエンザ菌における薬剤耐性化についてはβ-ラクタマーゼ産生およびペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp3)の変異について PCR 法により検討した。

1) ペニシリン耐性肺炎球菌およびマクロライド耐性肺炎球菌： 小児急性中耳炎患児の鼻咽腔から採取した肺炎球菌866株についてペニシリン結合蛋白遺伝子(pbp)の変異を検討し、245株(28.3%)は遺伝子変異を認めなかったが、333株(38.5%)でpbp1a、pbp2b、pbp2xの3遺伝子、78株(9%)に2遺伝子変異、245株(28.3%)において1遺伝子変異が認められた。さらに注目すべき成績とし、全体の94.5%に当たる656株において、セフェム系抗菌薬に対する低感受性を示すpbp2x変異株が検出された。一方、マクロライド耐性肺炎球菌のmefEおよびermB遺伝子の発現を検討し、30%が両方の耐性遺伝子を発現せず、32.5%がmefE、34%がermB、3.4% (28株)に両方の遺伝子発現が認められた。

2) インフルエンザ菌における遺伝子変異： 小児急性中耳炎患児の鼻咽腔から検出されたインフルエンザ菌について薬剤感受性に関係する遺伝子を検討し、bla遺伝子は4.7%に、ftsI遺伝子(gBLNAR)は23.3%に発現していた。

以上、小児急性中耳炎の起炎菌である肺炎球菌およびインフルエンザ菌において高率に薬剤耐性化が進行していることが判明した。

3. 急増する呼吸器感染原因菌の薬剤耐性—β-ラクタマーゼ陰性アンピシリン耐性(BLNAR)インフルエンザ菌—；

2001/02~200 呼吸器病原菌として重要なインフルエンザ菌の BLNAR の急増が明らかになった。しかし、臨床効果の検討ではペニシリン系薬剤での対応で大過なく、全身感染症治療の第一選択薬は局所感染症としての気管

支肺感染症では保持すべきと考える。

4. インフルエンザ菌の菌株特異的な肺感染防御能に関する研究；

インフルエンザ菌は肺炎球菌にならんで重要な呼吸器病原性菌であり、とりわけ成人では慢性閉塞性肺疾患（COPD）の急性増悪の主要な原因菌である。COPD 患者ではしばしばインフルエンザ菌(Non-typable *Haemophilus influenzae*: NTHi) の反復感染が認められるが、NTHi 感染による感染防御抗体の獲得機構に関する検討は少ない。我々はマウスモデルを用いて NTHi による菌特異的な肺感染防御獲得機構について検討した。

- 1) 同一の NTHi 株の気管内反復接種により菌株特異的な肺感染防御能が認められた。
- 2) NTHi の菌株によっては、その反復気管内接種により異なる NTHi 菌株に対する交叉肺感染防御能を誘導する場合がある。
- 3) 異なる NTHi 株の単回気管内接種ではいずれの NTHi 株に対する肺感染防御能は得られない。

5. *Rhodococcus equi* の増殖過程における形態観察と PBP_s との関連性；

今回私どもは *R. equi* の増殖時における形態変化、またこれらの形態変化と細胞の成長・分裂・形態変化に関与するペニシリン結合蛋白質（PBP_s）との関連性について検討した。まず、*R. equi* の増殖時の形態変化を観察したところ、観察開始時は球状であった *R. equi* は 5 時間目付近までに伸長化、その後 24 時間目まで分裂、そして 24 時間目以降は再び球状になるという形態変化が観察された。次いで、透過型電子顕微鏡を用いて増殖時の形態変化の様子を観察したところ、本菌の隔壁形成が終了し分裂する際、菌体内でまず splitting system が作用した後 cutting

system が作用していると思われる像が観察された。また、増殖時の形態に特徴をもつ時点の *R. equi* PBP_s プロフィールを検討したところ、どの時点の PBP_s も大差は見られなかった。

D 結論

1) 2005 年 7 月のモンゴルと 5 月に中国の青海湖の斃死野生水禽から分離された H5N1 インフルエンザウイルスは極めて近縁であることが判明し、高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析より、ベトナムの家禽は何度も異なる H5N1 ウイルスによる侵襲を受けたことがわかった。

2) 16 の HA 亜型と 9 の NA 亜型の組み合わせ 144 中 126 通りがワクチンと診断に利用できるウイルス株として系統保存された。ベトナムのヒトから分離された鳥由来の H5N1 ウイルスをリバースジェネティクス法で弱毒化し、アジュバント添加プロトタイプワクチンは免疫原性が低く、多くのワクチン抗原量が必要であることが示された。

3) インフルエンザ関連脳症の発症早期にステロイド・パルス療法を用いることが予後の改善に効果的であることが明らかになった。オセルタミビルは A 型と B 型インフルエンザ治療に有効であり解熱期間を短縮させる効果があったが、両者を比較し、A 型が B 型よりその効果は強く見られた。

4) パラミキソウイルスの持続感染成立過程は多様性を示し、センダイウイルスによる持続感染成立に F と M 蛋白も共に positive に関与し、HN 蛋白は negative な役割を果たしていることも明らかになった。

5) ムンプスウイルスの Hemagglutinin-neuraminidase (HN) 遺伝子を挿入した組換え麻疹ウイルス AIK-C 株からムンプスウイルス HN 蛋白が発現され、他のウイルス感染症の応用への足がかりとなった。

6) 2000 年以降マクロライドに耐性を獲得し

たマイコプラズマが全国各地で分離され、伝播し易くなっている事が懸念された。また、小児の急性や遷延性中耳炎起炎菌の薬剤耐性化と薬剤耐性遺伝子を検討し、肺炎球菌とインフルエンザ菌の薬剤耐性化が高率に進行している事が判明した。一方、インフルエンザ菌のBLNARの急増が見られたが、ペニシリン系薬剤で臨床的に対応しても問題はなかった。

7) マウスモデルにおいて、同一のインフルエンザ菌 (Non-typable *Haemophilus influenzae*: NTHi) 株の気管内反復接種により菌株特異的な肺感染防御能が認められ、NTHiの菌株によっては、その反復気管内接種により異なるNTHi菌株に対する交叉肺感染防御能を誘導し、異なるNTHi株の単回気管内接種ではいずれのNTHi株に対する肺感染防御能は得られなかった。

E 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kishida N, Sakoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunaga Y, Umemura T, Kida H (2005) Pathogenicity of H5 influenza viruses for ducks. *Arch Virol*, 150: 1383-1392
- 2) Matsuda K, Shibata T, Sakoda Y, Kida H, Kimura T, Ochiai K, Umemura T (2005) In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol* 86: 1131-1139
- 3) Takeda S, Sbagyo A, Sakoda Y, Ishii A, Sawamura M, Sueoka K, Kida H, Mukasa K, Matsumoto K (2005) Application of carbon nanotubes for detecting anti-hemagglutinins based on antigen-antibody interaction. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 201-205
- 4) Bai G, Sakoda Y, Mweene AS, Yamada T, Minakawa H, Kida H (2005) Evaluation of the ESPLINE INFLUENZA A&B-N kit for the diagnosis of avian and swine influenza. *Microbiol Immunol*, 49, 1063-1067
- 5) Bai G, Sakoda Y., Mweene AS, Fujii N,

Minakawa H and Kida H (2006) Improvement of a rapid diagnosis kit to detect either Influenza A or B Virus infections. *J Vet Med Sci*, 68, 35-40

- 6) Muramoto Y, Ozaki H, Takada A, Park C-H, Sunden Y, Umemura T, Kawaoka Y, Matsuda H, Kida H (2006) Highly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens. *Microbiol Immunol*, 50: 73-81.
- 7) Isoda N, Sakoda Y, Kishida N, Bai GR, Matsuda K, Umemura T, Kida H (2006) Pathogenicity of a highly pathogenic avian influenza virus, A/chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) in different species of birds and mammals. *Arch Virol*, in press
- 8) Yukiko Muramoto, Thi Quynh Mai Le, Lien Song Phuong, Tung Nguyen, Thu Ha guyen, Yuko Sakai-Tagawa, Kiyoko Iwatsuki-Horimoto, Taisuke Horimoto, Hiroshi Kida, and Yoshihiro Kawaoka. Molecular characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 influenza A viruses isolated from poultry in Vietnam from 2004 to 2005. *Journal of Veterinary Medical Science*, in press.
- 9) R. O. Donis, Jean-Thierry Aubin, Saliha Azebi, Amanda Balish, Jill Banks, Niranjan Bhat, Rick A. Bright, Ian Brown, Philippe Buchy, Ana-Maria Burguiere, Hua-lan Chen, Peter Cheng, Nancy J. Cox, Aaron Curns, Frédérique Cuvelier, Guohua Deng, Julia Desheva, Stéphanie Desvaux, Nguyen Hong Diep, Alan Douglas, Scott F. Dowell, Nguyen Tien Dung, Lindsay Edwards, Keiji Fukuda, Victoria Gregory, Elena Govorkova, Alan Hampson, Nguyen Thi Hong Hanh, Scott Harper, Alan Hay, Erich Hoffmann, Diane Hulse, Masaki Imai, Shigeyuki Itamura, Samadhan Jadhao, Patricia Jeannin, Chun Kang, Jackie Katz, Jae-Hong Kim, Alexander Klimov, Yong-kuk Kwon, Chang-Won Lee n, Phuong Song Lien, Yi Pu Lin, Yanbing Li, Wilina Lim, Stephen Lindstrom, LaMorris Loftin, Jan Mabry, Taronna Maines, Jean-Claude Manuguerra,

- Masaji Mase, Yumi Matsuoka, Margaret McCarron, Marie-Jo Medina, Doan Nguyen, Ai Ninomiya, Masatsugu Obuchi, Takato Odagiri, Malik Peiris, Jean-Marc Reynes, James Robertson, Claudine Rousseaux, Takehiko Saito, Somchai Sangkitporn, Jean-Louis Sarthou, Michael Shaw, James M. Simmerman, M. Slomka, Catherine Smith, San Sorn, Erica Spackman, Klaus Stöhr, David L. Suarez, Haan Woo Sung, David E Swayne, Maryse Tardy-Panit, Masato Tashiro, Pranee Thawatsupha, Terrence Tumphey, Timothy Uyeki, Phan Van Tu, Sylvie Van der Werf, Robert Webster, John Wood Richard Webby, Xiyan Xu, Guan Yi Evolution of H5N1 avian influenza viruses in Asia *Emerging Infectious Diseases* 11, 1515-1521, 2005
- 10) Subash C. B. Gopinath, Tomoko S. Misono, Kazunori Kawasaki, Takafumi Mizuno, Masaki Imai, Takato Odagiri and Penmetcha K. R. Kumar An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J. Gen. Virol.* (in press)
 - 11) Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Masato Tashiro and Takato Odagiri Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine* (in press)
 - 12) Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri. Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses *Vaccine* (in press)
 - 13) 小田切孝人 インフルエンザウイルス流行の予測は毎年どのようにして行うのか *日医雑誌* 134, 1907-1910, 2006.
 - 14) 齋藤玲子, 鈴木宏. ヒトの鳥型インフルエンザの治療. *インフルエンザ*. 6:139-145, 2005.
 - 15) 齋藤玲子, 鈴木宏. 特集 1 抗インフルエンザウイルス薬の効果と問題点. 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの疫学. *化学療法の領域*. 21:1729-1734, 2005.
 - 16) 長谷川剛, 内藤眞, 江部祐輔, ヤデナー・キャウ, 齋藤玲子, 鈴木宏. ヤンゴン (ミャンマー) におけるインフルエンザの発生状況 (2003.9-2004.10). *新潟医学会雑誌*. 119: 257-262, 2005.
 - 17) 鈴木宏, 坂井貴胤, 齋藤玲子, 菖蒲川由郷, 齋藤君枝. 特集インフルエンザ. 4. インフルエンザ伝播の特性~GISを用いた空間解析~. *医薬ジャーナル*. 41:99-103, 2005.
 - 18) 鈴木宏. インフルエンザと国際保健. *インフルエンザ*. 6:5-6, 2005.
 - 19) Sato M, Saito R, Sakai T, et al.: Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol*. 43:36-40, 2005.
 - 20) Sasaki A, Suzuki H, Saito R, et al.: Prevalence of human metapneumovirus and influenza virus infections among Japanese children during two successive winters. *Pediatr Infect Dis J*. 24: 905-908, 2005.
 - 21) Saito R, Paget J, Hitaka S, et al.: Geographic mapping method shows potential for mapping influenza activity in Europe. *Eurosurveillance Weekly*. 10:<http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/051027.asp#051026>, 2005.
 - 22) Nishio M, Tsurudome M, Ito M, Garcin D, Kalokafsky D, Ito Y. Identification of paramyxovirus V protein residues essential for STAT protein degradation and promotion of virus replication. *Virology* 79: 8591-8601, 2005.
 - 23) Nishio M, Tsurudome M, Ito M, Ito Y. Human parainfluenza virus type 4 incapable of evading the interferon -induced antiviral effect. *Virology* 79: 14756-14768, 2005.

- 24) Nishino M, Tsurudome M, Ito M, Ito Y. Identification of RNA-binding regions on the P and V proteins of human parainfluenza virus type 21. *Medical Microbiology Immunology* (in press).
- 25) Tsurudome M, Ito M, Nishio M, Kawano M, Komada H, Ito Y. A mutant fusion (F) protein of simian virus 5 induces hemagglutinin-neuraminidase-independent syncytium formation despite the internalization of the F protein. *Virology* (in press).
- 26) Komada H, Imai A, Hattori E, Ito M, Tsumura H, Kawano M, Nishio M, Onoda M, Kuramochi M, Tani M, Yamamoto K, Yamane M, Kozuka Y, Yamashita Y, Yuasa K, Morita J, O'Brien M, Okumura M, Uematsu U, Tsurudome M, Ito Y. Regulation of lymphocyte activation through CP98 is independent of IL-2/IL-2R system. *Biomedical Research* (in press).
- 27) Nishio M, Nagata A, Yamamoto A, Tsurudome M, Ito M, Kawano M, Komada H, Ito Y. The properties of recombinant Sendai virus having the P gene of Sendai virus pi strain derived from HBK cells persistently infected with Sendai virus. *Medical Microbiology and Immunology* (in press).
- 28) Okafuji T, Yoshida N, Fujino M, Motegi Y, Ihara T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Rapid diagnostic methods for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 43; 1625-1631, 2005.
- 29) Kuroiwa Y, Nagai K, Okita L, Yui I, Kase T, Nakayama T, Tsutsumi H. A phylogenetic study of human respiratory syncytial viruses group A and B strains isolated in two cities in Japan from 1980-2002. *J. Med. Virol.* 76; 241-247, 2005
- 30) Fujino M, Yoshida N, Yamaguchi S, Hosaka N, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. A simple method for the detection of measles virus genome by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Med. Virol.* 76; 406-413, 2005
- 31) Jin L, Rima B, Brown D, Orvell C, Tecle T, Afzal M, Uchida K, Nakayama T, Song J-W, Kang C, Rota
- 32) PA, Xu W, Featherstone D. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch. Virol.*(in press)
- 33) Ushio M, Yui I, Yoshida N, Fujino M, Yonekawa T, Ota Y, Notomi T, Nakayama T. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Med. Virol.* 77;121-127, 2005.
- 34) Komase K, Nakayama T, Iijima M, Miki K, Kawanishi R, Uejima H. The phosphoprotein of attenuated measles AIK-C vaccine strain contributes to its temperature-sensitive phenotype. *Vaccine* (in press)
- 35) Uejima H, Nakayama T, Komase K. Passage in Vero cells alters the characteristics of measles AIK-C vaccine strain. *Vaccine* (in press)
- 36) Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, Yamanaka N. High Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* with Mutations in pbp1a, pbp2x, and pbp2b Genes of Penicillin-Binding Proteins in the Nasopharynx in Children in Japan. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006 Feb 3;68(3):139-145.
- 37) Billal DS, Hotomi M, Tasnim S, Fujihara K, Yamanaka N. Evaluation of serotypes of

- Streptococcus pneumoniae* isolated from otitis media patients by multiplex polymerase chain reaction. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2006 Jan 30;68(3):135-138.
- 38) Hotomi M, Sakai KF, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamanaka N. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx among Japanese children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol.* 2006 Feb;126(2):130-7.
- 39) Sakai A, Hotomi M, Billal DS, Yamauchi K, Shimada J, Tamura S, Fujihara K, Yamanaka N. Evaluation of mutations in penicillin binding protein-3 gene of non-typeable *Haemophilus influenzae* isolated from the nasopharynx of children with acute otitis media. *Acta Otolaryngol.* 2005 Feb;125(2):180-3.
- 40) Hotomi M, Billal DS, Shimada J, Suzumoto M, Yamauchi K, Fujihara K, Yamanaka N. Increase of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*-expressing *mefE* or *ermB* gene in the nasopharynx among children with otitis media. *Laryngoscope.* 2005 Feb;115(2):317-20.
- 41) Motomura K, Masaki H, Terada M, Onizuka T, Furumoto A, Asoh N, Oishi K, Nagatake T. Usefulness of the Japanese Respiratory Society guidelines for community pneumonia: a retrospective analysis of community-acquired pneumonia between 2000 and 2002 in a general hospital. *Respirology.* 10:208-214, 2005.
- 42) Watanabe H, Kaji C, Anh DD, Huong PLH, Anh NTH, Huong VT, Phuong HVM, Thi PT, Suu PT, Nguyet NTT, Rusizoka OS, Watanabe K, Nagatake T, Oishi K. A comparative molecular analysis of *Haemophilus influenzae* among children less than 5 years of age with acute lower respiratory tract infections and meningitis in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 43:2474-2476, 2005.
- 43) Watanabe H, Hoshino K, Sugita R, Asoh N, Guio H, Qin L, Kaji C, Watanabe K, Oishi K, and Nagatake T. Molecular analysis of intrafamilial transmission in *Moraxella catarrhalis*. *Int J Med Microbiol.* 295: 187-191, 2005.
- 44) Oishi K, Yoshimine H, Watanabe H, Watanabe K, Tanimura S, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kudoh S, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T. Drug-resistant genes and serotypes of pneumococcal strains of community-acquired pneumonia among adults in Japan. *Respirology.* 2006 (in press).
- 45) Qin L, Watanabe H, Yoshimine H, Guio H, Watanabe K, Kawakami K, Iwagaki A, Nagai H, Goto H, Kuriyama T, Fukuchi Y, Matsushima T, Kudoh S, Shimada K, Matsumoto K, Nagatake T, Oishi K. Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with community-acquired pneumonia and molecular analysis of multidrug-resistant serotype 19F and 23F strains in Japan. *Epidemiol. Infect.* 2006 (in press)
- 46) 大石和徳. 肺炎球菌ワクチン—5年後の再接種の是非—. *呼吸器科.* 8(1): 68-72, 2005.
- 47) 大石和徳. 細菌性肺炎 (肺炎球菌性肺炎を中心に). *日本内科学会雑誌.* 94(11): 2256-2260, 2005.
- 48) 大石和徳. 肺炎球菌性肺炎とその対策. *臨床と研究.* 82(12):1983-1986, 2005.

2. 学会発表

- 1) US/Japan Cooperative Medical Science Program ARI Panel. 10th Annual Meeting, Galveston, USA, January 24-25, 2006.
- 2) Kida H. Genetic and pathobiological analysis of H5N1 viruses isolated from dead water birds in Mongolia in summer 2005 and the present status of influenza A virus library.
- 3) Odagiri T. Development of H5N1 vaccine in Japan.
- 4) Saito R. Treatment of influenza by oseltamivir: A clinical comparative study in flu A and B.
- 5) Morishima T, Yokoka S. Premonitory symptoms and disease course of influenza encephalopathy.
- 6) Yamanaka N. Genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* isolated from the upper respiratory tract in Japan and influence of treatment policy.
- 7) Arakawa Y. Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* and its clinical significance.
- 8) Oishi K, Koyama J, Watanabe H. Role of strain-specific surface antigen in pulmonary defense against *Haemophilus influenzae* in a murine model.
- 9) Watanabe H. Prevalence and transmission of acute respiratory tract infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among the internally displaced persons in tsunami disaster evacuation camps of Sri Lanka.
- 10) Nakayama T. Recombinant measles vaccine strain expressing heterologous proteins.
- 11) Takato Odagiri. Strain evolution of H5N1 avian influenza from Hong Kong 1997 to Vietnam/Thailand 2004/2005. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.
- 12) Takato Odagiri. Selection of vaccine strain for H5N1 influenza pandemic. Taiwan Influenza Study Group Symposium on Influenza Pandemic. Taiwan, August, 2005.
- 13) Takato Odagiri, Masaki Imai, Ai Ninomiya, Harumi Minekawa, Tsugunori Notomi, Toru Ishizaki, Phan Van Tu, Masato Tashiro. Development of H5-RT-LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. The Second European Influenza Conference, Malta, September, 2005.
- 14) Ai Ninomiya, Masaki Imai, Masato Tashiro and Takato Odagiri. Inactivated influenza H5N1 whole-virus vaccine with aluminium adjuvant induces cross-protective immunity against lethal challenge with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. Vaccine The Second European Influenza Conference, Malta, September, 2005.
- 15) 大石和徳：肺炎球菌ワクチン：成人、小児領域における今後の展望。第37回日本小児感染症学会教育セミナー，三重，2005年11月11日。

F 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし

II. 分担研究報告

マイコプラズマとマクロライド耐性に関する検討

分担研究者 荒川宜親 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

2000 年以降、マイコプラズマ肺炎の治療に用いられるエリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質に耐性を獲得したマイコプラズマが、我が国の臨床症例から、しばしば分離されるようになったため、その背景や現状、その臨床的意義についての研究報告などを総合的に検討し、今後のマクロライド耐性マイコプラズマ対策に必要な課題等を考察した。

A. 研究目的

ヒトの肺炎の原因となる肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) は、細菌であるにもかかわらず、細胞壁を持たないため、細胞壁の生合成を阻害する、ペニシリン系やセファロスポリン系の β -ラクタム薬、ホスホマイシン、サイクロセリン、バンコマイシンが無効である。そこで、マイコプラズマによる感染症には、マクロライドやテトラサイクリン系の抗生物質が用いられている。数年前より、マクロライドに耐性を獲得したマイコプラズマの分離が報告されるようになったが、当初は、その出現を疑問視する傾向も見られた。しかし、我が国では、2000 年以降、少なからずマクロライド耐性マイコプラズマの分離が持続しているため、細菌性の急性呼吸器感染症(ARI)の重要な起原菌の一つとして、それらに対する今後の検討課題について考察を行った。

B. 研究方法

国内外の肺炎マイコプラズマとマクロライド系抗菌薬との関連性に関して報告が行われた文献を収集し、マクロライド耐性を獲得したマイコプラズマの重要性について整理分析を行った。

C. 研究結果

文献的には、1974 年に Kubota, H.らにより試験管内での実験で、人為的にエリスロマイシンなどのマクロライドに耐性を獲得した肺炎マイコプラズマが作成され報告されている(Antimicrob. Agents Chemother. 5:513-519, 1974)。その際作成された耐性株は、エリスロマイシンの濃度が $200 \mu\text{g/ml}$ の培地に生育した

と報告されており、野性型のマイコプラズマがエリスロマイシンの濃度が $0.01 \mu\text{g/ml}$ では生育できない事を考慮すると、この耐性株は、「高度耐性」を獲得した事になる。この株は、エリスロマイシンとともにロイコマイシン、ジョサマイシン、スピラマイシン、オレアンドマイシンとリンコマイシンに耐性を獲得したと報告されており、当時では遺伝子の解析はできなかったが、おそらくマクロライドやリンコサマイシンの標的分子である 30S rRNA の構成分子である 23S rRNA に変異を獲得した株であったと推察される。

その後の研究でも、マイコプラズマを様々なマクロライドを含んだ培地に摂取して培養すると 10^{-5} ~ 10^{-6} 程度の一定の頻度で、耐性株が出現する事が Suzaki K により報告(Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ [Med] 26:71-91, 1979) されており、マイコプラズマに対して抗菌活性を測定する際には、そのような、人為的耐性株の出現を真の耐性株の出現と見誤らないように注意する必要がある。

その後、マクロライドに耐性を獲得したマイコプラズマの臨床分離報告は見られず、エリスロマイシンが私用開始され 30 年が経過した時点においても、マイコプラズマにおいてはエリスロマイシン耐性株は 1985 年の時点では確認されていなかった(Mayo Clin. Proc. 60:189-203, 1985)。

我が国における調査でも、1988 年の Fujii, R.らによる報告(Jpn. J. Asntibiot, 41:841-853) では、マクロライドはマイコプラズマに良好な感受性を示していた。

1989 年の Cassell, G.H.らの報告(Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 12:433-435, 1989) でも、マイコプラズマ

においてはマクロライド耐性株は確認されず、エリスロマイシンはフルオロキノロンよりマイコプラズマに対して強い抗菌力を示していた。

1995年のLucier, T.S.らにより人為的にエリスロマイシン耐性の肺炎マイコプラズマが作成され、その耐性機序が解析された結果、他の菌種で既に確認されている23S rRNAのドメインVの2063番目と2064番目の塩基が、AからGへ変異している事が確認された。

2001年に我が国の神奈川県で、エリスロマイシンに耐性を獲得したマイコプラズマが患者から臨床分離され、解析の結果、既に人為的に作成されたエリスロマイシン耐性株と同様に23S rRNAのドメインVの2063番目と2064番目にAからGへの変異が確認された(Microbil. Immuno. 45:617-620, 2001)。当初は、エリスロマイシンを含んだ培地を用いる薬剤感受性試験の過程で出現した人為的な耐性変異株ではないかとの憶測もあり、海外の専門家からは、懐疑的な目で受け止められた部分もあった。

2004年にPereyre, S.らにより人為的にマクロライド耐性を付与されたマイコプラズマについて解析が行われ、23S rRNAのドメインIIとVの変異に加え、L4, L12とよばれるリボソーム蛋白のアミノ酸変異や欠失が、マクロライド耐性に関与する事が示唆された。

我が国におけるマイコプラズマのマクロライド耐性株の継続的な監視の結果、2000年以降、国内各地からマクロライド耐性のマイコプラズマが継続的に臨床分離されている事が確認され、それらについて解析が行われた結果、これまで、*in vitro*で人為的に作出されたマクロライド耐性株と同様なAからGへの変異が、2063または2064番目に起きている事がMatsuoka, M.らにより確認された(Antimicrob. Agents Chemother. 48:4624-4630, 2004)。その後、同様に、Morozumi, M.らによっても同様の結果が報告されている(Antimicrob. Agents Chemother. 49:2302-2306, 2005)。

マクロライドに耐性を獲得したマイコプラズマの臨床的意義については、評価が分かれる傾向があったため、Suzuki, S.らは、マクロライド耐性のマイコプラ

ズマが分離された患児と通常のマイコプラズマが分離された患児について、症例対象研究を行った。その結果、マクロライド耐性のマイコプラズマが分離された患児については、全有熱期間が有意に延長し、特に、マクロライド投与後の有熱期間の延長や抗菌薬の変更についても有意な差が認められる事が判明した(Antimicrob. Agents Chemother. 50:709-712, 2006)。

D. 考察

マイコプラズマを人為的にエリスロマイシンに晒すことにより、試験管レベルでエリスロマイシン耐性株を作成する事が容易である事は、1970年代から知られていたが、実際に患者よりマクロライド耐性マイコプラズマが分離されるようになったのは、2000年に入ってからである。リボゾームは蛋白合成を担う重要な装置であり、その構成要素である23S rRNAの変異は、マイコプラズマの蛋白合成能力を低下させる等の負の影響を菌に及ぼすなどの理由から、そのような耐性株は、エリスロマイシンの無い環境では、安定的に存在する事が難しく、万一、耐性株が患者の体内で出現しても、野性株との競合に負け速やかに消失するため、これまでは、マクロライド耐性株が市中に広く伝播拡散する事は無かったと考えられている。しかし、2000年代に入り、我が国の各地で、エリスロマイシン耐性マイコプラズマが臨床分離されるようになった背景には、23S rRNAの変異以外に、我々の認知していない、新たな変異をそれらの菌が獲得し、マクロライド感性の野性型株と同等の *viability* を獲得した株が出現した可能性が示唆される為、それらの耐性株における詳しい分子機構の解析を継続する必要がある。

マクロライド耐性を獲得したマイコプラズマ感染症の患者では、有熱期間、特にマクロライドを投与してから、熱が消失するまでの期間が有意に延長する事が確認された。この事実は、マクロライド耐性を獲得したマイコプラズマ感染症の患者からの菌の放出期間も延長している事が示唆され、その結果、マクロライド耐性株による感染症では、マイコプラズマの周囲への伝播、拡散、感染が起きやすくなっている事が

懸念される。したがって、今後も引き続き、マイコプラズマ肺炎の患者から分離されたマイコプラズマにおけるマクロライド耐性の獲得状況に注意を注ぐとともに、それらによる地域的、全国的な流行状況を積極的に調査継続する事が行政的にも必要と考えられる。

23S rRNA のドメイン V に変異を獲得したマクロライド耐性の肺炎球菌等に対しては、テリスロマイシンが有効とされている。事実、テリスロマイシンは、23S rRNA のドメイン V と II の二箇所相结合する為、ドメイン V の変異のみでは、ドメイン II に結合可能なテリスロマイシンが有効となる。しかし、マイコプラズマでは、生来ドメイン II の構造がテリスロマイシンが結合し難い構造となつており、ドメイン V に変異を獲得しエリスロマイシン耐性を獲得したマイコプラズマは、事実、テリスロマイシンにも高度耐性を示すため、その点においても、マクロライド耐性マイコプラズマの動向には十分な注意を払い、監視を強化する必要がある。

E. 結論

1970 年代よりマクロライド耐性を人為的に獲得させたマイコプラズマを分離できる事は知られていたが、それらが臨床材料から実際に分離される事は、1999 年以前では確認されなかった。しかし、2000 年に入ると我が国の各地から、エリスロマイシンに耐性を獲得したマイコプラズマが分離されるようになり、さらにそれらによる肺炎などの患児では、有熱期間が有意に延長する事も確認され報告されている。また、エリスロマイシン耐性を獲得したマイコプラズマは、新薬であるテリスロマイシンにも高度耐性を示す。そこで、公衆衛生的には、今後、マクロライド耐性マイコプラズマの分離状況、流行状況について監視を継続・強化する必要がある。

F. 健康危険情報

我が国では、2000 年以降、エリスロマイシンやクラリスロマイシンなどのマクロライドに耐性を獲得したマイコプラズマが全国各地で分離されるようになった。マクロライド耐性マイコプラズマによる肺炎の患者で

は有熱期間が有意に延長する事が確認されたため、それがマイコプラズマ感染症の蔓延を増強する危険因子となりうる。さらに、エリスロマイシン耐性マイコプラズマは、最近認可されたケトライド系新薬であるテリスロマイシンにも高度耐性を示す為、行政的にも、マクロライド耐性マイコプラズマの動向について監視を強化する必要がある。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. Satowa Suzuki, Tsuyoshi Kenri, Tsuguo Sasaki, and Yoshichika Arakawa, Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* and its clinical significance, US/Japan Cooperative Medical Science Program, ARI Panel Meeting, January 24-25, 2006, at Galveston, Texas

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、その他

なし

【参考文献】

1. Nitu Y, Hasegawa S, Kubota H. In vitro development of resistance to erythromycin, other macrolide antibiotics, and lincomycin in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974 May; 5(5):513-9.
2. Suzaki K. Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolide and analogous antibiotics. *Sci Rep Res Inst Tohoku Univ [Med].* 1979 Dec; 26(3-4):71-91.
3. Washington JA 2nd, Wilson WR. Erythromycin: a microbial and clinical perspective after 30 years of clinical use (1). *Mayo Clin Proc.* 1985 Mar; 60(3):189-203.
4. Fujii R, Shinozaki T, Meguro H, Arimasu O, Yoshioka H, Fujita K, Sakata H, Maruyama S, Wagatsuma Y, Fukushima N, et al., Studies on susceptibility of isolated organisms from pediatric infections against various

antimicrobial agents, *Jpn J Antibiot.* 1988 Jul; 41(7):841-53.

5. Cassell GH, Waites KB, Pate MS, Canupp KC, Duffy LB. Comparative susceptibility of *Mycoplasma pneumoniae* to erythromycin, ciprofloxacin, and lomefloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1989 Sep-Oct; 12(5):433-5.

6. Loza E, Martinez Beltran J, Baquero F, Leon A, Canton R, Garijo B. Comparative in vitro activity of clarithromycin. Spanish Collaborative Group. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1992 Sep; 11(9):856-66.

7. Lucier TS, Heitzman K, Liu SK, Hu PC. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Dec; 39(12):2770-3.

8. Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, Sasaki Y, Arakawa Y, Sasaki T. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol Immunol.* 2001; 45(8):617-20.

9. Pereyre S, Guyot C, Renaudin H, Charron A, Bebear C, Bebear CM. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Feb; 48(2):460-5.

10. 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 Y, Sasaki T. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Dec; 48(12):4624-30.

11. Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, Inoue N, Iwata S, Kuroki H, Kawamura N, Nakayama E, Tajima T, Shimizu K, Ubukata K. Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jun; 49(6):2302-6.

12. Suzuki S, Yamazaki T, Narita M, Okazaki N, Suzuki I, Andoh T, Matsuoka M, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Feb; 50(2):709-12.

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

（分担） 研究報告書

アジアで流行する高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスの遺伝子解析

（分担） 研究者 河岡 義裕 東京大学医科学研究所・教授

研究要旨

2004年1月から2005年8月までに、ベトナム各地域のニワトリやアヒルから分離された高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルス 9 株の遺伝子 RNA を抽出し、HA 遺伝子と NA 遺伝子をベクタープラスミドにクローニング後、遺伝子配列を決定した。HA 遺伝子配列では、開裂部位の塩基配列は強毒型を示し、レセプター結合部位の配列はトリ型であった。HA と NA 遺伝子系統解析で 9 株のウイルスは、ベトナム、タイ、ラオス、カンボジアのグループ、中国、日本、韓国、インドネシアのグループ、そしてそのどちらにも含まれないマイナーなグループの三つに分類された。以上、ベトナムの家禽は何度も異なる H5N1 ウイルスによる侵襲を受けたことがわかった。

A. 研究目的

2003年以降、アジアでは高病原性鳥インフルエンザが流行している。ウイルスはヒトにも感染し、これまでに多くの犠牲者を出している。なかでもベトナムはヒトの感染報告が最も多い国である。現在ベトナムで流行している H5N1 インフルエンザウイルスの遺伝子を解析し、ウイルスの特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2004年1月から2005年8月までに、ベトナム各地域のニワトリやアヒルから分離された H5N1 ウイルス 9 株の遺伝子 RNA を抽出し、HA 遺伝子と NA 遺伝子をベクタープラスミドにクローニング後、遺伝子配列を決定した。2003年以降に報告された H5N1 ウイルスの HA あるいは NA 遺伝子配列をもとに、それらの遺伝子系統樹を作製した。以上の研究に倫理面での問題はない。

C. 研究結果

HA 遺伝子配列を解析したところ、開裂部位の塩基配列は強毒型を示した。レセプター結合部位の配列はトリ型であった。HA 遺伝子の系統解析をしたところ、これら 9 株のウイルスは、3つのグループに分かれた。

そのひとつは、ベトナムで分離されたウイルスやタイ、ラオス、カンボジアで分離されたウイルスが集まるグループ、もうひとつは、中国、日本、韓国、インドネシアで分離されたウイルスが集まるグループ、最後のひとつは、そのどちらにも含まれないマイナーなグループだった。NA 遺伝子も同様の結果を示した。

D. 考察

どのようなルートで、さまざまなグループに属する H5N1 インフルエンザウイルスがベトナムへ侵入したかが防疫対策上重要である。

E. 結論

ベトナムの家禽は何度も異なる H5N1 ウイルスによる侵襲を受けたことがわかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yukiko Muramoto, Thi Quynh Mai Le, Lien Song Phuong, Tung Nguyen, Thu Ha Nguyen, Yuko Sakai-Tagawa, Kiyoko