

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐々木次雄

平成18(2006)年3月

平成17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 | わが国における百日咳流行株の遺伝子変異 ・パータクチン欠損株の解析 ----- | 21 |
|------|--|----|

| | | |
|------|---|----|
| 菊池 賢 | Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法による 百日咳迅速診断方法の開発 ----- | 27 |
|------|---|----|

| | | |
|------|-------------|----|
| 高橋元秀 | ジフテリア ----- | 40 |
|------|-------------|----|

| | | |
|------|---|----|
| 諸角 聖 | 小児科患者からのジフテリア菌の分離および百日咳菌の分離と 遺伝子保有調査 ----- | 47 |
|------|---|----|

| | | |
|------|----------------------------|----|
| 見理 剛 | マイコプラズマ肺炎の分子疫学に関する研究 ----- | 53 |
|------|----------------------------|----|

| | | |
|------|---|----|
| 成田光生 | 肺炎マイコプラズマ菌のマクロライド耐性化が臨床に及ぼす影 響と問題点 ----- | 59 |
|------|---|----|

| | | |
|------|---|----|
| 荒川宜親 | <i>Haemophilus influenzae</i> 臨床分離株のペニシリン結合蛋白 (PBP3)の変異と薬剤感受性の解析 ----- | 66 |
|------|---|----|

| | | |
|------|-----------------------------------|----|
| 山崎 勉 | ヘモフィルス・インフルエンザ感染症の臨床と分離菌の解析 ----- | 74 |
|------|-----------------------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- | 87 |
|---------------------------|----|

| | |
|-----------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別冊 ----- | 93 |
|-----------------------|----|

I. 総括研究報告書

(平成17年度)

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．最終年度は，3年間にわたった研究成果が大いに認められた．特記すべき研究成果として，百日咳菌については，1) 定着因子であるパータクチン (Prn) 遺伝子の発現を1990-2005年に分離された臨床分離株 (80株) を用いて解析したところ，Prn欠損株が18株 (23%) に認められ，その分離率は1997年以降増加傾向にあることを明らかにした．2) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による百日咳の迅速診断法の検出系として，*Bordetella pertussis* IS481, pertussis toxin promotor (PTX), *Bordetella parapertussis* IS1001のそれぞれ3種類を設計し，培養法，IS481-IS1001の nested duplex PCR (nPCR) 法と比較検討したところ，各LAMP法は nested PCR に比べ，10-100倍の検出感度 (0.1-2.5 copies/tube) を示し，特異性にも極めて優れていた．全国88施設の小児科より寄せられた百日咳疑いの臨床検体 (鼻咽頭スワブ) からの検体陽性は培養59 (19%)，nested PCR (IS481) 109件 (35%)，LAMP-IS481 158件 (51%)，LAMP-PTX 72件 (23%)であった．ジフテリア菌については，日本では1945年頃をピークにジフテリアの患者発生報告は激減し，1999年に2名，2000年に1名の患者発生報告以後，発症者は報告されていない．しかし，1994年には旧ソビエト連邦で10万人以上の患者と約4000人の死者が確認される大流行が，アフリカや東南アジアなどでは常時ジフテリアの患者発生が報告されている．WHOの調査でも2004年の患者発生報告件数は9,864件で，2002年には約5,000人が死亡している．このように海外では現在もなお患者発生報告があり，日本への持ち込みが危惧されている．そこで，1) 1960年代から90年代にかけての国内臨床分離菌40菌株について，パルスフィールドゲル電気泳動による解析を行ない，日本で分離されたジフテリア菌の系統樹を作成した．2) ジフテリア菌を実験室内検査法として早期検出をめざし，LAMP法によるジフテリア毒素遺伝子 (*tox*) 検出系の改良を行ない，高度に精製したジフテリア菌DNA 10コピーから *tox* 遺伝子を検出できる系を構築した．肺炎マイコプラズマ菌については，1) マクロライド耐性 *M. pneumoniae* による下気道感染症 (11例) の臨床経過を，マクロライド感受性菌 (26例) によるそれと比較検討した．耐性菌感染においては全有熱期間 (中央値8日)，およびマクロライド剤投与後解熱までの期間 (中央値3日) は感受性菌による感染 (前者が5日，後者が1日) よりいずれも有意に延長していた ($p < 0.05$)．2) 日本における，*M. pneumoniae* のI型とII型菌の出現動向を調べたと

ころ、2000年以降、II型からI型菌へと変化した。その状況は現在も続いていることが明確になった。一方で、以前はまれにしか検出されなかったII型亜種菌が比較的多く検出された。そこで、今後の分子疫学調査を効率よく進めるために、II型亜種菌も検出、型別できるnested PCR法をデザインした。インフルエンザ菌については、1) インフルエンザ菌と他の呼吸器病原性微生物との混合感染を明らかにする目的で、肺炎小児153例由来の喀痰を用いて、洗浄培養法、PCR法、RT-PCR法により、細菌、*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、インフルエンザウイルスA、B、C(以下Flu A、B、C)、respiratory syncytial virus A、B(以下RSA、RSB)、パラインフルエンザウイルス1、2、3、4型(Para 1、2、3、4)、ライノウイルス(Rhino)、コロナウイルス(Corona)、アデノウイルス(Adeno)の検索を行った。好気性培養にて原因菌として細菌が検出されたものは76例(49.7%)で、インフルエンザ菌54(35.3%)、肺炎球菌33(21.6%)、モラクセラ・カタラリス3(2.0%)、A群連鎖球菌1(0.7%)であった。*M. pneumoniae*および*C. pneumoniae*の検出例は、各々45(29.4%)、17(11.1%)であった。呼吸器ウイルスは36例(23.5%)で検出された。2) 国内の呼吸器由来*Haemophilus influenzae*臨床分離株を対象に、ペニシリン結合蛋白PBP3の遺伝子の変異を検出するPCR法による遺伝子型別結果と、薬剤感受性試験による表現型との相関を検討した。その結果、 β -ラクタマーゼ非産生株においてはABPCのMICが $4\mu\text{g/ml}$ までは両者に乖離は殆どみられなかった。しかし、ABPCのMICが $2\mu\text{g/ml}$ (中間型)の株の約30%で、また、ABPC感性であるMIC= $1\mu\text{g/ml}$ の株でも、数%においてpbp3遺伝子がBLNAR型と判定される現象が見られ、その原因については、今後詳しい解析が必要と考えられる。一方、 β -ラクタマーゼ非産生でPBP3が変異した株では、経口セファロsporin系薬のセファクロル、セフカペン、セフポドキシムに対する感受性の低下が顕著であった。第3世代セファロsporinのセフォタキシム、セフトジジムでも感受性低化の程度が高く、まだ頻度は低いものの、感性の範疇(MIC $\leq 2\mu\text{g/ml}$)を越える株も散見されたため、その種の株の動向についても引き続き監視が必要と考えられた。

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としている。

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たが、欧米では百日咳の患者数が増加傾向にある。この原因は不明であるが、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。また百日咳菌を高感度で検出できる系として LAMP を確立し、臨床材料に適用し、その感度、特異性について検討する。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、ジフテリア菌を高感度に検出できる LAMP 法の確立と、これまでに収集した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。2000 年以後の日本においては肺炎マイコプラズマ野生株の約 15%が

マクロライド耐性であることより、臨床経過を詳細に検討し、肺炎マイコプラズマ菌のマクロライド耐性化が臨床に及ぼす影響と問題点を明らかにする。4) 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。5) 気道由来ヘモフィルス・インフルエンザ (インフルエンザ菌) の研究過程で、インフルエンザ菌感染症と判定された症例の中に、他の微生物との混合感染が多いことに気付いた。そこで今年度は、他の気道感染の原因となる微生物についても検討し、インフルエンザ菌との混合感染を明らかにするとともに、薬剤耐性を含めたインフルエンザ菌の臨床的意義について論じる。6) 近年、 β -ラクタマーゼ非産生であるのに ABPC に耐性である *H. influenzae* が報告され、その耐性機構としてペニシリン結合蛋白 (PBP3) の変異が報告されている。そこで国内の呼吸器由来臨床分離株を用いて PBP3 の変異と薬剤感受性について解析を行う。

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：1990-2005年にわが国で分離された百日咳臨床分離株（80株）を供試した。供試した菌株中、*ptxS1B/prn1*の遺伝子を持つワクチン型菌株は55株、抗原変異型（*ptxS1A/prn2*）は17株、変遷型（*ptxS1A/prn1*）は8株であった。Prn発現解析には、菌体より全蛋白質をSDS-lysis bufferを用いて加熱抽出し、蛋白濃度をTCA-Lowry法により測定した。全蛋白質1μgを10% SDS-PAGEで分離後、抗Prn2抗体を用いたイムノブロット法により解析した。なお、検出にはLAS-3000を用いた。また、Prn遺伝子の塩基配列はPCRによる遺伝子増幅後、dye-terminator法により決定した。シークエンス解析にはABI PRISM 3100 Genetic Analyzerを使用し、得られたDNA配列はSEQUENCHER DNA sequencing software (Gene Codes)を用いてアセンブリーを行なった。パルスフィールド電気泳動（PFGE）は常法に従い、制限酵素XbaIを用いてワクチン型菌株（55株）について実施した。系統樹解析にはUPGMA法を用いた（堀内）。百日咳菌検出系として*Bordetella pertussis* IS481, pertussis toxin promotor (PTX), パラ百日咳菌検出系として*Bordetella parapertussis* IS1001の特異領域にそ

れぞれ4本のloop-mediated isothermal amplification (LAMP) primerを、IS481, IS1001には1本、PTXには2本のloop primerをPrimer Explorer

V3(<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>)を用いて設計し、培養法、IS481-IS1001のnested duplex PCR (nPCR)法と比較検討した（菊池）。

ジフテリア菌：東京都健康安全センター（旧称：東京都衛生研究所）において1967-1978年に収集された41菌株、秋田県衛生科学研究所において1992年に秋田県で分離された5菌株、栃木県保健環境センターにおいて1962年と1976年に栃木県で分離された35菌株（合計81菌株）のうち、分離時期、場所の記録が明記されているもの（秋田県と栃木県で分離された菌株40菌株）を用い、PFGE解析、LAMP法による*tox*遺伝子検出系の改良を行った（高橋）。都内の小児科を受診した溶レン菌感染症疑いの患者323人から採取した咽頭スワブ2本中1本を菌培養用に、1本をPCRによる百日咳菌遺伝子検査用に使用した。百日咳菌遺伝子に対するPCR陽性、*Streptococcus pyogenes* 迅速診断用キットの検査結果が陰性であった患者を対象に、ジフテリア菌培養を実施した（諸角）。

マイコプラズマ：埼玉医科大病院に2005年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256サンプルからDNAを抽出し、nested PCR法によってP1遺伝子を

検出し、型別を行った。また、神奈川県衛生研究所で2004年から2005年に分離された *M. pneumoniae* 株49株について型別調査を行った。Nested PCR法による P1 遺伝子の検出、型別は従来通り、P1 遺伝子の RepMP4 領域をターゲットとするプライマーセットを用いたが、新たに RepMP2/3 領域をターゲットとするプライマーセットもデザインして併用した。臨床分離株の型別は PCR-RFLP 法を用いて、RepMP4 領域と RepMP2/3 領域の両方を調べた（見理）。マクロライド耐性および感受性菌感染の臨床経過についての比較は、咳嗽などの呼吸器症状は程度の判断は主治医によって異なり、また有症と治癒の判定も難しいため、マイコプラズマ感染症としての発症時期および治療効果の判定基準としては、38度以上の発熱が1回以上認められた日を有熱日として、有熱期間を比較した。対象とする症例の条件としては、①分離法またはPCR法にて咽頭あるいは喀痰におけるマイコプラズマ菌体の存在が証明され薬剤感受性が特定されたこと、②血液検査にてマイコプラズマ抗体価がPA法にて急性期で640倍以上、またはペア血清で4倍以上の変動が認められ、急性感染であることが証明されたこと、および③治療にマクロライド剤が使用されていたこと、を全て満たすものとした。統計学的解析として、中央値の比較にはウィルコクソンの順位差検定（SPSS ソフト、バージョン 9.05）を用い、 $P < 0.05$ を有意の差と考えた

（成田）。

インフルエンザ菌：埼玉医科大学病院小児科を、肺炎の診断にて受診した153例の患児を対象とした。循環器系、神経系などの基礎疾患を有する児は除外した。平均年齢は3歳3ヶ月（4ヶ月～13歳）、男女比は71例/82例、入院/外来比は100例/53例であった。これらの患児より喀痰を採取し、生理食塩水にて喀痰を洗浄した後に、好気性培養を施行した。喀痰から抽出したDNA及びRNAを用いて、以下の方法で呼吸器病原性微生物の検索を行った。① *M. pneumoniae* および *C. pneumoniae* 検出：抽出されたDNA検体を用いて、既報のPCR法により、*M. pneumoniae* および *C. pneumoniae* を検出した。②呼吸器ウイルス検出：インフルエンザウイルス A, B, C（以下Flu A, B, C）、respiratory syncytial virus A, B（以下RSA, RSB）、パラインフルエンザウイルス 1, 2, 3, 4型（Para 1, 2, 3, 4）、ライノウイルス（Rhino）、コロナウイルス（Corona）については、抽出したRNA検体を用いてRT-PCR法により、アデノウイルス（Adeno）に関しては、抽出したDNAを用いてPCR法により、ウイルス検出を行った。③臨床検査値、発熱期間等の比較：各微生物が検出された症例に関して、混合感染・単独感染の割合を判定した。また各微生物の感染例について、平均年齢、入院症例の比率、経過中の最高白血球数・好中球数値、最高CRP値、有熱日数等について検討した。④統計学的検討：各感染症例にお

ける測定値等の比較は、分散分析法により、 $p < 0.05$ を有意と判定した(山崎). 2002年までに、国内において呼吸器材料から分離され、当部に保存されている *H. influenzae* 臨床分離株 634 株のうち 141 株を用いてペニシリン結合蛋白 (PBP3) の変異と薬剤感受性について解析を行った. 薬剤感受性試験は、微量液体希釈法により行った. β -ラクタマーゼ活性検出は、ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」(日水製薬)に含まれる acidimetry を用いた. *pbp3* 変異の検出は、インフルエンザ菌遺伝子検出試薬 (湧永製薬) を用いた (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) 抗原変異百日咳菌の蛋白解析

イムノプロット法により、抗原変異株とワクチン型百日咳菌における Prn 発現を解析したところ、Prn 欠損株はワクチン型菌株に多く存在することが示された. そこで、臨床分離株 80 株について Prn 発現の有無を調べたところ、Prn 欠損株は抗原変異型および変遷型百日咳菌には認められず、ワクチン型に特異的な現象であることが示された. さらに分離時期と Prn 発現

の関係を調べたところ、Prn 欠損株は 1990-1995 年には認められなかったものの、1997 年以降その分離率が徐々に上昇していることが明らかとなった. この Prn 欠損株は 1997-2000 年には関東地方のみで分離されていたが、2001-2005 年では全国の各地域から分離されていることが判明した. Prn 欠損株 (18 株) の Prn 遺伝子についてシーケンス解析を行なったところ、Prn 欠損は 2 種のメカニズムによって引き起こされていることが判明した. 一つは Prn 蛋白質のシグナル配列の欠失であり、もう一つは挿入配列 IS481 による遺伝子破壊であった. Prn のシグナル配列欠失株は 12 株認められ、そのすべてが同一箇所での欠失 (28 aa) であった. 一方、IS481 の遺伝子挿入は 1598 位の AGG/CAG に認められ、6 株とも同じ位置での挿入であった. しかし、IS481 の挿入方向には違いが認められ、5 株はランポゼースの正方向での挿入、1 株は逆方向での挿入であった. PFGE により Prn 欠損株の遺伝的相同性を解析したところ、シグナル配列欠失株は 1 株を除き全て同じ遺伝子型を示し、これらの菌株は遺伝的に同一な菌株であることが示された. 一方、6 株の IS481 挿入株は 4 種の遺伝子型に分類され、6 株中 4 株は遺伝的に異なることが明らかとなった (堀内).

2) 百日咳菌の迅速検出法確立と疫学調査

LAMP-IS481, LAMP-PTX による *B. pertussis* CCUG 30873^T の検出限界は

0.1 copies/tube で、75 分までに陽性になった。2 段階の PCR が必要な nPCR の検出限界である 10 copies/tube では 60 分以内に陽性となっており、nPCR よりも短い時間で検出可能な系であった。LAMP-IS1001 による *B. parapertussis* CCUG 413^T の検出限界は LAMP-IS481, LAMP-PTX よりも更に低く、0.01 copies/tube で、70 分までに陽性になった。nPCR の検出限界である 10 copies/tube では 50 分で陽性となっており、他の LAMP2 法同様、検体処理を含めて 2 時間以内に検査結果が得られた。臨床検体 310 件に対して培養法、nPCR, LAMP-IS481, LAMP-PTX を適用したところ、今回検討した検体から *B. parapertussis*, *B. holmesii* は培養、nPCR, LAMP-IS1001 いずれの方法でも検出されなかった。*B. pertussis* は培養法では 59 件 (19.7%), nPCR では 112 件 (37.8%) 陽性になった。一方、LAMP-IS481 では 158 件 (51.0%) が陽性となった。培養陽性検体 59 検体中 58 件は nPCR, LAMP-IS481 とともに陽性であったが 1 件は陰性であった。一方、LAMP-PTX で陽性と判定されたものは 72 件 (23.2%) にとどまり、培養陽性 59 件中 6 件は陰性であった (菊池)。

ジフテリア菌

1) PFGE によるジフテリア菌臨床分離株の解析と LAMP 法による *tox* 遺伝子検出系の改良

UPGAMA 法による PFGE 解析結果、秋田県 1992 年分離の 5 菌株は 3 種類、

栃木県 1962 年の 18 菌株は 14 種類。栃木県 1976 年分離の 17 菌株は 11 種類に分類され、国内で分離されたジフテリア菌は遺伝学的に近似性の低いものであった。また秋田県と栃木県 (1962 年と 1976 年) の菌株に同一のタイプはみられなかった。LAMP 法による *tox* 遺伝子検出系の改良のため、9 種類のプライマーセットを作成し、ヒツジ寒天平板培地で培養した菌体から Qiagen 精製した *C. diphtheriae* ATCC700971 ゲノム DNA からの *tox* 遺伝子の増幅を試みたところ、10000 コピー以上のゲノム DNA から、64°C でのインキュベーション中に 20 分以内で増幅が確認されたプライマーセット (Cd#16) を以後の実験に用いた。Cd#16 の検出感度は、ヒツジ寒天平板培地で培養した菌体から Qiagen 精製した *C. diphtheriae* ATCC700971 ゲノム DNA に対しては 10000 コピーでは増幅が認められたがそれ以下では増幅は認められなかった。一方、BHI 液体培地で培養し CsCl 密度勾配超遠心法で精製したゲノム DNA では、10 コピー以上で増幅が認められた。また、実際の臨床検査現場での簡便な使用を考え、培養した菌体を蒸留水に OD600 = 1 から 0.001 まで段階的に希釈懸濁したのちに 100°C で 30 分間加熱することで遊離した DNA に本 LAMP 法を適用したところ、血液寒天培地上のコロニーでは OD600 = 1 (100,000 cfu) の菌懸濁液からの試料では増幅が可能であったが、OD がそれ以下の懸濁液からの試料では増幅が認められなかった。BHI 液

体培地で培養した菌体では、OD600 = 1 (100,000 cfu) から 0.001 (100 cfu) のすべての菌懸濁液由来試料から、*tox* 遺伝子の増幅が認められた。*C. diphtheriae* ATCC700971 由来 DNA で *tox* 遺伝子の増幅が認められたので、それ以外の *C. diphtheriae* 13 菌株と近縁菌 *Corynebacterium ulcerans* 2 菌株から精製したゲノム DNA について、プライマーセット Cd#16 を用いて LAMP 法によるジフテリア毒素遺伝子の増幅を試みたところ、*C. diphtheriae* 14 菌株のうち 10 菌株で増幅がみられ、残り 4 菌株ではみられなかった。*C. ulcerans* 2 菌株についてはいずれからも *tox* 遺伝子が検出された。これら 16 菌株についての検出結果は、従来法である *tox* 遺伝子を対象とした PCR 法による検出結果と完全に一致し、疑陽性、偽陰性を示した検体は認められなかった。このことから、プライマーセット Cd#16 を用いた LAMP 法による *tox* 遺伝子増幅系の高い特異性が示された。

2) ジフテリア菌、ジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* および百日咳菌の保有調査結果

2005 年 8 月から 12 月 15 日までに搬入された咽頭ぬぐい液 323 患者分について 16 SrRNA の高度可変領域遺伝子が検出されたのは 236 人であった。236 人のうち溶レン菌迅速診断陰性者は 77 人であり、そのうち 57 人の咽頭ぬぐい液を塗抹培養に供したが、*C. diphtheriae*、*C. ulcerans*、は分離されなかった。また、百日咳菌の遺伝

子検出も実施したが全ての検体について遺伝子は検出されなかった。本研究事業期間の 3 年間でジフテリア疑いと診断された患者は 2 名であった。患者は、2 名とも 6 月に発症した。患者は、1 才 6 ヶ月の女兒、半年間の間に 3 回のクループ症を繰り返した。乳幼児に見られるクループ症候群と比較し、経過は非典型的だった。医療機関における検査で、鼻汁からグラム陽性桿菌が検出され、菌同定の目的で当センターに菌株が搬入された。Api Coryne による検査の結果 *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* と同定された。この菌のジフテリア毒素遺伝子保有の有無を PCR 法で検討したが、毒素遺伝子は検出されなかった。2 例目の患者は、6 才の女兒で、発熱 (38°C) と咽頭痛、嘔声、扁桃に偽膜形成がみられた。患者にワクチン接種歴はなかった。偽膜ぬぐい液、後鼻腔ぬぐい液を血液寒天培地、チンスダール培地に塗抹して、35°C 24 時間培養し、コロニーを観察した。チンスダール培地に集落は認められず、血液寒天培地に β 溶血を示すコロニーが純培養状に観察された。検査の結果、*Streptococcus pyogenes* と同定された。また、偽膜ぬぐい液、後鼻腔ぬぐい液からジフテリア毒素遺伝子の直接検出を試みたが、遺伝子は検出されなかった。

マイコプラズマ

1) 国内で分離される肺炎マイコプラズマ菌の型別調査

2005年に収集された喀痰 256 個サンプルのうち nested PCR によって P1 遺伝子が検出されたのは 4 例だけだった (1.5%)。この 4 例の型別を行うと、これらはすべて I 型の P1 遺伝子だった。一方、*M. pneumoniae* 分離菌の菌型を PCR-RFLP 法で調べると、2004年の分離菌は 29 株中 22 株が I 型菌 (65%)、7 株が II 型亜種 (35%) だった。2005年の分離株は 20 株中 18 株が I 型菌 (90%)、2 株が II 型亜種 (10%) だった。2004年と 2005年の分離株には II 型菌が存在せず、現在は I 型菌が優勢な状況が続いていることが確認された。しかし、今回の臨床分離株の調査では II 型菌は検出されないものの、II 型亜種の菌がかなり出現していることがわかった (9/49=18%)。これまで我々は臨床サンプルからの P1 遺伝子の検出、型別は、nested PCR によって RepMP4 領域を検出する方法をとっていたが、この方法では II 型菌と II 型亜種の区別ができない。II 型亜種菌が増加している状況を考え、新たに P1 遺伝子の RepMP2/3 領域をターゲットにする、II 型亜種菌も検出可能な nested PCR 法をデザインした。この方法を用いて、従来法で II 型菌と判定されていた 2004年の喀痰検出例 2 例について再検査を行ったところ、これらは II 型亜種と判定された (見理)。

2) マクロライド耐性菌と感受性菌に感染した患者の臨床経過

研究方法に示した基準で選んだ臨

床経過が明らかなマクロライド耐性菌感染症例 (以下、耐性群) 11 例と、対照として、同時期に得られたマクロライド感受性菌感染症例 (以下、感受性群) 26 例を用い、両者の有熱期間を比較した。年齢、性別、マクロライド投与前有熱期間などには両群で差は無かった。マクロライド投与後の有熱期間が感受性群では中央値で 1 日 (平均 1.4 日) であったのに対し、耐性群ではこれが 3 日 (平均 4.3 日) であり、耐性群では統計学的に有意に延長していた。これを反映し、感受性群では全有熱期間が中央値で 5 日 (平均 5.5 日) であったのに対し、耐性群ではこれが 8 日 (平均 9.2 日) であり、やはり耐性群では統計学的に有意に延長していた。なおマクロライド投与後 48 時間以上発熱が持続した患者の割合も、耐性群のほうが有意に高かった (成田)。

インフルエンザ菌

1) 呼吸器病原微生物の検出

好気性培養にて原因菌として細菌が検出されたものは 76 例 (49.7%) で、インフルエンザ菌 54 (35.3%)、肺炎球菌 33 (21.6%)、モラクセラ・カタラリス 3 (2.0%)、A 群連鎖球菌 1 (0.7%) であった。*M. pneumoniae* および *C. pneumoniae* の検出例は、各々 45 (29.4%)、17 (11.1%) であった。呼吸器ウイルスは 36 例 (23.5%) で検出され、Flu A 6 (3.9%)、Flu B 0 (0%)、Flu C 1 (0.7%)、RSA 3 (2.0%)、RSB 3 (2.0%)、Para1 3 (2.0%)、Para2 0 (0%)、

Para3 6 (3.9%), Para4 2 (1.3%), Rhino 12 (7.8%), Corona 0 (0%), Adeno 21 (13.7%)の検出数であった。単独感染あるいは混合感染と判定された症例は、各々61例 (39.9%), 92例 (60.1%)であった。各微生物の年齢別検出状況からインフルエンザ菌は、1~2歳 (51%) および3~5歳 (38%) での検出率が高かった。各微生物の季節別検出状況からインフルエンザ菌は、各季節の症例から検出され、16~42%の検出率であった。

混合感染症例を含めて、各々の微生物による感染症例の平均年齢、入院症例の比率、経過中の最高白血球数・好中球数値、最高CRP値、有熱日数をまとめた。インフルエンザ菌検出例では、肺炎球菌が検出された症例と類似した数値を取った。混合感染例を除外した単独感染症例についてのみ、同様に検討するとインフルエンザ菌による症例は *M. pneumoniae* による症例に比べて、有意に年齢が低く、経過中の最高白血球数は有意に高値であった。検出されたインフルエンザ菌の ABPC 感受性は、耐性 (ABPC の MIC が $4.0 \mu\text{g/ml}$ 以上) が 10%、中等度耐性 (ABPC の MIC が $2.0 \mu\text{g/ml}$) が 18%、感受性が 72%であった (山崎)。

2) β -ラクタマーゼ非産生 *H. influenzae* 臨床分離株の薬剤感受性と耐性機構

国内の呼吸器由来 *Haemophilus influenzae* 臨床分離株を対象に、ペニシリン結合蛋白 PBP3 の遺伝子の変異を検出する PCR 法による遺伝子型別結

果と、薬剤感受性試験による表現型との相関を検討した。 β -ラクタマーゼ非産生株のうち ABPC の MIC が $>8, 8, 4 \mu\text{g/ml}$ の株については全株、2, 1, 0.5, $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ の株については無作為に選んで PBP3 の変異を調べたところ、CSLI の定めるブレイクポイント (MIC $\geq 4 \mu\text{g/ml}$) により ABPC 耐性と判定される β -ラクタマーゼ非産生株の大半は BLNAR 型の変異を持っていた。中間 (MIC = $2 \mu\text{g/ml}$) 株では 1/3 が BLNAR 型で、過半数が Low-BLNAR 型であった。 β -ラクタマーゼ非産生株の PBP3 遺伝子型毎の MIC 分布を調べたところ、薬剤によっては耐性側への分布の偏りが β -ラクタマーゼ産生株の場合よりも明瞭であった。ABPC の上昇した MIC は β -ラクタマーゼ阻害剤によっても下降せず β -ラクタマーゼ産生による耐性とは明瞭に異なっていた。ペニシリン系薬ではピペラシリンへの感受性変化の程度が低かった。注射用セフェム薬ではセフォタキシム、セフトジジムで感受性低化の程度が高く、感性の範疇 (MIC $\leq 2 \mu\text{g/ml}$) を越える株もあった。経口セフェム薬ではセファクロル、セフカペン、セフポドキシムで感受性の低下が顕著で、セファクロルでは BLNAR 型の大半が耐性であった。セフジトレンは感受性低下の程度がやや低かった (荒川)。

D. 考察

百日咳菌

1) 抗原変異百日咳菌の蛋白解析

Prn 欠損株の出現状況を調査した結

果、ワクチン型菌株に Prn 欠損株が多く発生していることが明らかとなった。この Prn 欠損株の分離率は近年増加傾向にあるが、わが国の罹患者数の増減は認められていない。Prn は宿主細胞への定着に關与する重要な蛋白質と考えられており、Prn 欠損株のヒトへの定着には他の因子が關与している可能性が指摘された。今後、Prn 欠損株の定着力について詳細な検討を行ない、百日咳感染における Prn の役割について再考することが必要である。なお、市中における Prn 欠損株の流行を示した報告例は無く、本研究が初めての発見である。今回、Prn の欠損原因として 1) 挿入配列 IS481 による遺伝子破壊、2) シグナル配列の欠失が明らかとなった。シグナル配列を欠失した菌株は単一なクローンであったが、IS481 の挿入株は遺伝的に異なることが示された。このことから、IS481 による遺伝子破壊はワクチン型百日咳菌の間で一定の頻度で生じているものと考えられた。IS481 は百日咳菌のゲノム上に 50-280 コピー程度存在することが知られており、この IS481 はゲノム上を自由に飛び回ることが可能である。IS481 は菌の生育にとって必須な遺伝子 (house keeping gene) にも一定の頻度で挿入されているものと考えられ、これらの遺伝子が破壊された場合、菌は生育することができない。本研究ではワクチン型百日咳菌にのみ IS481 による遺伝子破壊が認められたことから、IS481 はワクチン型に数多く存在している可能性が

強く示唆される。IS481 による遺伝子破壊が近年の抗原シフトに關与する可能性は高く、今後、ワクチン型と抗原変異型菌株における IS481 のコピー数の違いについて詳細な検討が必要である (堀内)。

2) 百日咳菌の迅速検出法確立と疫学調査

百日咳はワクチンによる予防体制が確立しているにもかかわらず、近年、世界各国で発生件数は増加傾向にある。その理由として、ワクチン株と比較して抗原変異のみられる株が増加していること、ワクチンの効果が落ちる思春期以降の青年、成人が罹患する成人百日咳が増えていることが挙げられているが、その実態はまだまだ明らかでないことも多い。アメリカでは昨年度より百日咳ワクチンの追加投与が開始され、思春期以降の成人を対象にした投与の必要性も議論されているが、我が国での実態はほとんど明らかにされていない。成人百日咳を含む百日咳の詳細な疫学調査には、迅速性、感度、特異性を兼ね備えた簡便、安価な検査の確立が欠かせない。今回、開発した LAMP 法 3 法はいずれも従来の nPCR に比較して 100-1000 倍の検出感度と 1/3-1/4 の検出時間を示しており、臨床現場のベッドサイドでも施行可能な迅速検査として、臨床での百日咳診断に威力を発揮するものと期待された。実際、LAMP-IS481 は nPCR と同等の感度を呈し、検出時間も短いことから、現時点では百日咳の迅速診断に最も有用な方法と考えられた。

IS481は *B. pertussis* のみならず、*B. holmesii* にも数 copy 存在することが明らかにされている。このため、IS481 の検出は *B. pertussis* 陽性を必ずしも意味しない。*B. holmesii* には *B. parapertussis* に共通して IS1001 も含まれるため、LAMP-IS1001 と併せて実施することで、この点は解決できると考えている。無論、LAMP-IS481、LAMP-IS1001 両者が陽性になった場合には、*B. holmesii* なのか、*B. pertussis*、*B. parapertussis* 混合感染なのか厳密に否定できないが、今回の臨床検体 310 件の検討でも、このようなケースは認められず、文献的にも実際には非常に稀であると考えられており、現実的には次の LAMP-PTX を併用すれば、あまり問題ないものと考えられる。LAMP-PTX は pertussis toxin promoter region を検出する系で、*B. pertussis* 以外の *Bordetella* 属には含まれず、理論的特異性が極めて高い。今回の基礎検討でも nPCR の 100 倍の検出感度と優れた特異性を示したが、臨床検体からの検出では培養陽性検体から陰性となる偽陰性が 6 件含まれていた。この理由として pertussis toxin promoter region は 1 遺伝子中 1 copy しか存在せず、このことが 200 以上の copy 数を持つ IS481 との検出率の違いに影響しているものと思われた。現在のところ、検出感度を考えると LAMP-IS481 が簡便で、検出率が高く、スクリーニング検査には最も有用ではないかと考えている。我が国での成人百日咳を含む百日咳

の実態はまだ未解明な部分が多く、今後の大規模な疫学調査は必須である。今回新たに開発した LAMP3 法は特別な機器を要せず、簡便、安価、優れた感度から、我が国の百日咳の今後の発生動向調査に広く適用可能であると期待される（菊池）。

ジフテリア菌

1) PFGE によるジフテリア菌臨床分離株の解析と LAMP 法による *tox* 遺伝子検出系の改良

国内では過去において年間 10 万人規模のジフテリア患者が報告されていた。今回、1960 年代から 90 年代にかけての保存菌株を含めて、東京都、秋田県、栃木県の衛生研究所の協力を得て、各機関に保存されていた臨床分離菌株 81 株を収集することができた。このうち分離時期と場所が明記されていた秋田県と栃木県の合計 40 株を解析した結果は今後の国内ジフテリアサーベイランスにおける重要な基礎情報と位置づけることができる。今後も国内各関係機関の協力の下に、ジフテリアおよび *C. ulcerans* 感染症について情報と分離菌株の収集に努めたい。本研究において、高度精製ゲノム DNA10 コピーまたは BHI 液体培養菌体 100 cfu から *tox* 遺伝子を検出可能な LAMP 法遺伝子増幅系を構築することができた。また、血液寒天平板培地上のコロニーから OD = 1 になるように懸濁した菌懸濁液からも *tox* 遺伝子が検出可能であった。臨床検査の現場で OD = 1 の菌懸濁液を調製すること

はさほど困難ではない。LAMP 法は PCR 法のような煩雑な操作特殊な機器を必要しないため、病院などの検査室に導入可能な技術であり、本研究の成果を生かすことにより、簡便かつ迅速なジフテリア診断が臨床現場で可能となる。これにより、2 類感染症であるジフテリアの診断の迅速化を通して、公衆衛生的に迅速な対応が可能になると期待される（高橋）。

2) ジフテリア菌、ジフテリア毒素産生性 *C. ulcerans* および百日咳菌の保有調査結果

東京都では毎年、ジフテリア・百日咳に対する抗体価測定を実施している。ジフテリアの予防接種率は平成 12 年の 98.1% を最高に、毎年低下する傾向にあるものの、平成 16 年度も 93.8% の接種率を維持している。また、ジフテリアの感染を防御可能な抗体値は 1994 年の旧ソビエトでの大流行以後、発症防御抗体値として 0.01IU/ml から 0.1IU/ml と高められた。都民におけるこの基準値以上の抗体保有率は 86. % であり、良好であった。また、2000 年の患者報告以降、患者報告が認められていないことから、ワクチン未接種者であっても、ジフテリア菌との接触機会が極端に少ないため、現在も患者発生は抑えられていると考えられた。一方、百日咳についてみると、ワクチン接種率は平成 13 年度には 96.0%、14 年度は 92.4%、15 年度は 94.6% であり 16 年度は 94.1% であった。東京都内でも、百日咳ワクチンの未接種者が約 6% 認めら

れる。このことは、今回の調査で 4 ヶ月児の発症者から菌が分離されていることからみて、菌は市中に存在すると考えられるため、ワクチン未接種者への感染には注意を払う必要があることを示すものであろう。また患者は、全国で約 1 万人以上と予想されていることから、患者発生時には患者の調査のみならず菌の分離を実施し、実態を明らかにする必要がある（諸角）。

マイコプラズマ

1) 国内で分離される肺炎マイコプラズマ菌の型別調査

今回、2004 年と 2005 年の臨床における、*M. pneumoniae* の出現動向を調べたことによって、2000 年以降、日本では臨床に出現している *M. pneumoniae* の菌型が II 型から I 型に変化した状況がより明確になった。2004 年と 2005 年の臨床検体の中には II 型の *M. pneumoniae* は検出されなかった。しかし、以前はまれにしか検出されなかった、II 型亜種菌が比較的多く検出されるのが認められた。この II 型亜種の出現が増えていることから、将来 II 型亜種が臨床株の多くを占める状況が生じる可能性も考えられる。臨床に出現する *M. pneumoniae* の菌型が変化する現象の要因は、ヒトの免疫と各菌型の *M. pneumoniae* との相互作用によるものと考えられる。昨年度の我々の研究ではマイコプラズマ肺炎の患者血清には、感染した菌と同じ型の菌により強

い血球吸着阻害活性が見られることがわかった。血球吸着阻害活性は *M. pneumoniae* に対する感染防御免疫になると考えられるので、一度感染した菌型には再感染しにくい状況が生じると予想される。ヒトの集団の免疫状態にこの効果が生じる時に、臨床に出現する *M. pneumoniae* の菌型が変化するのはないかと考えられる。I 型菌と II 型菌では P1 接着タンパク質の N 領域と D1 領域に違いが見られる。特に N 領域のアミノ酸配列の違いが大きく、P1 タンパク質の 220 から 370 番目のアミノ酸配列部に変化が見られ、I 型と II 型で相同性は約 58% である。D1 領域は 900 から 1154 番目のアミノ酸配列部に変化が見られるが I 型と II 型の間で違いは小さく、相同性は 90% 程度ある。N 領域と D1 領域に特異的なモノクローナル抗体が *M. pneumoniae* の付着性を阻害するとの報告があるが、患者血清に含まれ菌型特異的な血球吸着阻害活性を示すのは、より変化が大きい N 領域を認識する抗体ではないかと予想される。一方、II 型と II 型亜種の P1 遺伝子の違いは D1 領域の C 末側で D2 領域に近い部分にある。アミノ酸配列では 1212 から 1254 番目に相当し、II 型と II 型亜種でこの部分の相同性は約 57% である。P1 タンパク質の D2 領域には、これまで *M. pneumoniae* の接着性を阻害するモノクローナル抗体のエピトープが 4 カ所同定されているが、これらのエピトープはアミノ酸配列の

1360 から 1475 番目にかけて存在しており、II 型と II 型亜種で異なっている部位とは少し離れている。II 型菌または II 型亜種が感染した場合に、これらの菌型を区別する特異的な血球吸着阻害活性が患者血清中に生じるかは不明である。しかし、出現動向調査では、現在の I 型菌優勢で II 型菌が検出されない状況下でも、II 型亜種の検出が増加していることから、II 型菌と II 型亜種の間にはヒトの防御免疫を回避しうる何らかの差異があると思われる。II 型亜種菌が以前より多く出現している状況をふまえて、今回 II 型亜種菌も検出、型別できる nested PCR 法をデザインした。この方法は上述のように P1 遺伝子の RepMP2/3 領域をターゲットとするが、II 型亜種菌が検出された場合、II 型菌に特異的な 617 bp の PCR 産物に加えて、1008 bp の産物が得られる。また、I 型菌が検出された場合には、394 bp の産物が得られる。この nested PCR 法を従来の RepMP4 領域をターゲットとする nested PCR 法と比較すると、明らかに新しい方法の方が検出感度が良く、特異性にも問題が無かった。この nested PCR 法は今後の II 型亜種の動向も視野に入れた分子疫学調査を行っていく上で有効なツールとなる。また、検査、診断法としても活用できる（見理）。

2) マクロライド耐性菌と感受性菌に感染した患者の臨床経過

マクロライドに対する耐性化率については、分離時期・分離地域によっ

て多少の偏りは認められるものの、平均すると概ね 15%という数字はここ数年変動しておらず、とりあえず増加傾向は無く安定しているものと思われる。ニューキノロン系の合成抗菌剤を用いれば殺菌は可能であるが、一方でさらなる耐性菌を生む可能性も有り、その使用までの必要性が有るものか否か、今後の検討課題である。マクロライド耐性マイコプラズマが分離された症例の経過を感受性菌感染によるそれと比較検討した。その結果、マクロライド剤投与後の有熱期間、全有熱期間、ともに耐性群では感受性群より統計学的に有意に延長していた。現在の日本ではマイコプラズマ野生株の約 15%前後がマクロライド耐性菌であるにもかかわらず、日常診療上、そのような状況は実感されていないものと考えられる。確かに耐性菌感染において有熱期間は延長しているものの、マクロライド剤投与後平均4日程度で解熱するという事は、多くの場合主治医にとって明らかな治癒遷延例として問題が感じられるほどの数字ではないとも言える。また現在まで知り得た範囲では、耐性菌感染により、とりわけ重症化した例も報告されていない。少なくとも個々の症例を見る限り、肺炎マイコプラズマ菌のマクロライド耐性化は、臨床的に大きな影響を及ぼすものではないと考えられる。そもそも肺炎マイコプラズマには、呼吸器粘膜において活性化酸素を過剰に産生させる以外には直接的な組織傷害性は無く、多くの臨床的および

実験室的観察により、マイコプラズマ肺炎の病像は主として宿主の免疫応答により形成されるものと考えられている。このことが、肺炎マイコプラズマ菌自体はマクロライドに耐性化しても、臨床的に肺炎は必ずしも重症化しない主な理由と考えられる。一方で耐性菌感染症例において観察された発熱期間の延長は、同時に菌排出期間の遷延を示唆するものであり、耐性菌の蔓延がマイコプラズマ感染症の流行を拡大していく可能性は考えられる。根拠は無いが、2000年以後マイコプラズマ肺炎が年々増加している理由として、時を同じくしたマクロライド耐性菌の出現が一因となっていることも推測される。耐性菌の動向には今後も注意が必要である(成田)。

インフルエンザ菌

1) 呼吸器病原微生物の検出

今回の検討でも、インフルエンザ菌は肺炎の原因微生物として、最も検出頻度が高いものであった。一方で、他の呼吸器病原性微生物との混合感染も多く、インフルエンザ菌による単独感染の割合は、29.6% (16/54)であった。また、単独で肺炎の原因となる微生物は、*M. pneumoniae*が最も多く(23例)インフルエンザ菌は2番目に多かった(16例)。これは、喀痰よりインフルエンザ菌が有意に検出されて、原因微生物と判定された場合でも、他の病原微生物の混合感染の可能性があり、臨床経過に及ぼす影響を念頭におく必要があることを意味する。単独感

感染症例についてのみ検討すると、インフルエンザ菌による症例は *M. pneumoniae* による症例に比べて、有意に年齢が低かった。一方で、混合感染症例を含めると、インフルエンザ菌は年長児を含めて各年齢群より高頻度で検出されており、小児期を通じて肺炎の病原微生物として重要な役割を果たしているものと考えられる。各月群別の検出状況に関しても、インフルエンザ菌は各群の症例より検出されており、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS ウイルスなどの呼吸器ウイルスのような検出率の季節変動は観察されなかった。細菌性肺炎症例に関して、混合感染症例を含めた場合、インフルエンザ菌および肺炎球菌による感染症例の平均年齢、経過中の最高白血球数・好中球数値、最高 CRP 値、発熱期間は類似していた。これは、細菌性肺炎を診療する際の、臨床現場における一般的な認識とも矛盾しないものと考えられる。一方、単独感染症例については、インフルエンザ菌感染症例の方が、肺炎球菌感染症例より、平均年齢、最高白血球数・好中球数値、CRP 値がやや低い傾向にあったが、統計学的な有意差は得られなかった。さらに、単独感染症例についてのみ検討すると、インフルエンザ菌による症例は *M. pneumoniae* による症例に比べて、経過中の最高白血球数が有意に高値であった。これは、従来より細菌性肺炎と非定型肺炎との鑑別項目として指摘されている項目でもある。今回検出されたインフルエンザ菌

の中で、ABPC 耐性は 10%、中等度耐性は 18% を占め、薬剤耐性状況は今回明らかとなった多種の呼吸器病原性微生物の混合感染とともに、臨床経過に大きな影響を及ぼすものと推察される。今後とも、インフルエンザ菌の薬剤耐性状況ならびに呼吸器病原性微生物の中でのインフルエンザ菌の役割について、経時的に検討していく必要があるものと考えられる（山崎）。

2) β -ラクタマーゼ非産生 *H. influenzae* 臨床分離株の薬剤感受性と耐性機構

β -ラクタマーゼ非産生であるのに ABPC に耐性を示す *H. influenzae* における主たる耐性機構として PBP3 の変異が報告されている。表現型としては β -ラクタマーゼ活性と ABPC を含む薬剤感受性試験を組み合わせれば、日常的な検査室における業務の範囲で判別可能と考えられる。PBP3 の変異に基づいて判定するならば、シーケンス解析によりアミノ酸レベルで詳しく変異を検出しなければならないが日常臨床検査としては困難であるので現在、PCR を利用して *pbp3* の変異を検出する研究用試薬が市販されている。今回はこの方法による遺伝子型と、薬剤感受性試験による表現型との一致状況を比較解析した。ABPC の MIC が 4 $\mu\text{g/ml}$ までは両者に乖離は殆ど見られなかったが、調べた限りの ABPC の MIC が 2 $\mu\text{g/ml}$ (中間) の株では約 30% が BLNAR 型であり、感性である 1 $\mu\text{g/ml}$ の株でも数% が BLNAR 型であった。この事実から、菌の膜の変化と