

表2. *B. pertussis* 検出におけるnPCR, LAMP-IS481, LAMP-PTXの特性比較

Method	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV* (%)	NPV** (%)
nPCR	98.3	79.7	53.2	99.5
LAMP-IS481	98.3	48.7	36.7	99.3
LAMP-PTX	89.8	92.4	73.6	97.5

\*PPV: positive predictive value

\*\*NPV: negative predictive value

表3. *B. pertussis* 検出におけるnPCR, LAMP-IS481, LAMP-PTXと培養法の結果比較

Culture	nPCR		LAMP-IS481		LAMP-PTX		Total
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	
Positive	58	1	58	1	53	6	59
Negative	51	200	100	151	19	232	251
Total	109	201	158	152	72	238	310

表4. 各LAMP法の特異性

Strains	Reaction of each LAMP method		
	PTX	IS481	IS1001
<i>B. avium</i> CCUG 13726 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>B. bronchiseptica</i> CCUG 219 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>B. hinzii</i> CCUG 22847 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>B. holmesii</i> CCUG 34073 <sup>T</sup>	-	+	+
<i>B. holmesii</i> CCUG 34074	-	+	+
<i>B. holmesii</i> CCUG 33848	-	+	+
<i>B. holmesii</i> CCUG 47500	-	+	+
<i>B. pertussis</i> CCUG 30873 <sup>T</sup>	+	+	-
<i>B. pertussis</i> ATCC 8467	+	+	-
<i>B. pertussis</i> Tohama	+	+	-
<i>B. pertussis</i> TWCC 40218	+	+	-
<i>B. pertussis</i> TWCC 40260	+	+	-
<i>B. parapertussis</i> CCUG 413 <sup>T</sup>	-	-	+
<i>B. petrii</i> CCUG 43448 <sup>T</sup>	-	-	-
<i>B. trematum</i> CCUG 32381 <sup>T</sup>	-	-	-

厚生労働科学研究費補助金  
(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

ジフテリア

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

協力研究者

岩城正昭、小宮貴子、福田 靖  
国立感染症研究所 細菌第二部第三室

研究要旨: (1)1960年代から90年代にかけてのジフテリア菌国内臨床分離菌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った。(2)ジフテリアの実験室内検査法の早期診断法の確立をめざし、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DNA10コピーから*tox*遺伝子を検出できる系を構築することができた。また、血液寒天上コロニーの菌体の懸濁液(OD1)、BHI液体培地で培養した菌体の懸濁液(OD0.001)からの検出が可能であった。ジフテリア菌の簡易・迅速な検出への応用が期待される。

A. 研究目的

日本ではワクチン接種の普及に伴いジフテリア患者の報告は激減し、過去10年間にわずか数例の発生が報告されるのみであるが、「ジフテリア疑い」で感染症研究所に検査が依頼される例が依然として毎年みられる。ジフテリアは、1990年代の大流行のみならず、欧州および国内で毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* の分離報告例が増加していることからもうかがえるように、サーベイランスとワクチン接種の重要性が再認識されてい

る。そこで、過去の国内臨床分離菌株のPFGEによる解析を行ない、今後のサーベイランス活動のための基礎データ集積を試みた。

さらに、実験室内診断法の改良も試みた。ジフテリアの実験室内診断は基本的に分離菌のジフテリア毒素産生性の証明をクライテリアとしており、スワブ等の臨床検体からジフテリア菌 *Corynebacterium diphtheriae* が分離されることが前提である。そのため、菌分離が不能で診断そのものが成り立たず「ジフテリア疑い」で終わっ

てしまうことも多く、また運良く菌が分離されても菌の同定と毒素産生性の証明を経て診断が確定するまでに1週間近くの期間が必要である。ジフテリアは2類感染症であり、公衆衛生的見地から実験室診断（臨床検査）の迅速化が求められている。

臨床検体から直接のPCR法が、補助的な迅速法として使われつつあるが、サーマルサイクラー等の特殊な機器を必要とすることが難点であり、より簡便で一般の実験室でも遂行可能な方法の開発が望まれている。LAMP法は特別な機器を必要とせず肉眼で結果が判定できる点が有利である。本年度は、前年度の研究結果で通常のPCR法よりも高い感度が得られなかったLAMP法の改良により迅速・抗感度な検出系の構築をめざした。

## B. 研究方法

### 1. PFGEによるジフテリア菌臨床分離株の解析

#### (1) ジフテリア菌株

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)を用いた。

#### (2) PFGEによる解析

Murrayらの方法(J. Clin. Microbiol.,

1990, 28: 2059-2063)に従った。

寒天平板培地上のコロニーより採取した1白金耳のジフテリア菌体を1% Low melt アガロースゲル内に分散してブロックを作成し、1 mg/ml Lysozyme 処理(37°C、24時間)、0.1 mg/ml Proteinase K 処理(50°C、48時間)により溶菌を行なった。ブロックは溶菌後 TE Buffer (pH 7.6)で37°C、24時間洗浄したのち、ブロック内のDNAを制限酵素 *Sfi*I で50°C、24時間消化した。

ブロックを1.5%アガロースゲルに埋め込み、CHEF DR II (Bio-Rad)型パルスフィールド電気泳動装置で、14°C、6 V/cm、パルスタイム5-20秒18時間、1-5秒14時間の条件で泳動したのち、臭化エチジウム染色したゲルを撮影しDNA断片の泳動パターンを得た。パターンをUPGAMA法で解析し、Similarity 60%以上を同一株として分類した。

### 2. LAMP法による *tox* 遺伝子検出系の改良

#### (1) 高度精製ジフテリア菌DNAの調製 *C. diphtheriae* ATCC700971

(NCTC13129)をBHI液体培地中で37°C一晩培養し、翌日1 µg/mlになるようにPenicillin Gを加えてさらに2時間培養を続けたのちに遠心集菌し、30mg/mlのリゾチームを含むQiagen Genomic DNA Buffer SetB1液、および同B2液を用いて溶菌し、塩化セシウム-臭化エチジウム平衡密度勾配調遠心でDNAを精製した。また、ヒツジ血

液寒天平板培地で 37°C 一晚培養した菌体からの DNA 調製は、Qiagen Genomic Tip 100 と Qiagen Genomic DNA Buffer Set キットを用いて使用説明書に従って行なった。ジフテリア菌のゲノムサイズから、1  $\mu$ g の DNA には  $3.6 \times 10^8$  コピーのゲノム DNA が含まれると計算されるので、これを根拠に 1 反応に用いる 2  $\mu$ l のテンプレート DNA 溶液あたり 10 - 10000 コピーのゲノム DNA をを含むように希釈して用いた。

#### (2) 菌体からの簡易 DNA 調製

*C. diphtheriae* ATCC700971 (NCTC13129) を BHI 液体培地またはヒツジ血液寒天平板培地で 37°C 一晚培養し、菌体を  $OD_{600} = 0.001 - 1$  になるように 10 倍間隔で段階的に懸濁したのち 100°C で 30 分間加熱した。加熱した菌懸濁液を遠心して菌残渣を除き、上清 2  $\mu$ l を LAMP 反応に用いた。

#### (4) LAMP 法による DNA 増幅

プライマーは栄研化学 web サイトで無料運用中のプライマー設計ソフトウェア Primer Explorer version3 を用いて、9 種類の異なるプライマーセット (Loop Primer をセット中に含む) を設計した。

増幅には栄研化学製 LoopAmp DNA 増幅試薬キットを用い、説明書に従って試薬を混合し、25 で反応を行なった。反応溶液 25  $\mu$ l あたり 2  $\mu$ l の鋳型 DNA 溶液を用い、栄研化学リアルタイム濁度測定装置 LA-320C で濁度の増加を

モニタリングしながら 64°C 1 時間、反応を行なった。

(倫理面への配慮) 本年度はヒト検体を用いた実験、動物実験のいずれも行なわなかった。

### C. 研究結果

#### 1. PFGE によるジフテリア菌臨床分離株の解析

UPGAMA 法による解析の結果、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。

#### 2. LAMP 法による *tox* 遺伝子検出系の改良

##### (1) プライマーの設計

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。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のは 1 種類のみであったので、このプライマーセット (Cd#16) を以後の実験に用いた。

##### (2) 感度

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 を 1 反応あたり 10000 コピー、1000 コピー、100 コピー、10 コピーになるように希釈し、*tox* 遺伝子の増幅を試みたところ、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、増幅可能な下限は 10 コピーであった (表 1)。

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簡易調製した DNA からの増幅も試みた。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 (表 1)。

### (3) 特異性

*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。*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 (表 2)。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。

## D. 考察および今後の方針

### 1. PFGE によるジフテリア菌臨床分離株の解析

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 株のみを解析することができた。この情報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。

### 2. LAMP 法による *tox* 遺伝子検出系の改良

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。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

(ア) 論文発表

なし

(イ) 学会発表

岩城正昭、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀. ジフテリア菌 20kDa antigen の菌体内局在性。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京。

(81) 小宮貴子、瀬戸幸路、岩城正昭、福田靖、小崎俊司、高橋元秀. 国内で分離された *Corynebacterium ulcerans* の産

生する毒素について。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京。

福田 靖、岩城 正昭、小宮 貴子、高橋 元秀. 破傷風毒素構造遺伝子の塩基配列の比較。第 78 回日本細菌学会総会、2005 年 4 月、東京。

Iwaki, M., Nagata, N., Saegusa, T., Inomata, Y., Komiya, T. and Takahashi, M. Intradermal infection model for nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. 12th European Meeting on Bacterial Protein Toxins, June 2005, Canterbury (United Kingdom).

Iwaki, M., Nagata, N., Saegusa, T., Inomata, Y., Komiya, T., Arakawa, Y. and Takahashi, M. A mouse intradermal model for *Corynebacterium diphtheriae* infection. 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 2005, Hyogo (Japan).

岩城正昭、堀内善信、小宮貴子、福田靖、荒川宜親、高橋元秀. レーザー粒径測定型血小板凝集計を用いたフロキュレーションアッセイ系の構築。第 9 回日本ワクチン学会学術集会、2005 年 10 月、



大阪。

福田 靖、岩城 正昭、小宮 貴子、  
荒川 宜親、高橋 元秀. ヘモフィ  
ルスインフルエンザB型菌ワクチ  
ンに含まれる破傷風トキソイド  
の免疫原性の検討。第9回日本ワ  
クチン学会学術集会、2005年10  
月、大阪。

特願 2006- 54058 「LAMP法を  
用いたジフテリア毒素遺伝子検出  
方法およびこの方法に用いるプラ  
イマーセット」出願中

実用新案登録  
なし

その他  
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定  
を含む）  
特許取得

表1. DNA調製法とLAMP法の感度

菌の培養法	血液寒天平板	BHI 液体培地	血液寒天平板	BHI 液体培地
DNA 調製の方 法	市販カラムキ ット	CsCl 密度勾配 超遠心	菌を 100°C加熱	菌を 100°C加熱
1 反応あたり の感度	ゲノム DNA 10000 コピー	ゲノム DNA 10 コピー	1 OD (1 x 10 <sup>5</sup> cfu)	0.001 OD (100 cfu)

表2. LAMP法の特異性

菌株	LAMP 法での検 出	PCR 法での検 出
<i>C. diphtheriae</i> TM1	×	×
<i>C. diphtheriae</i> TM2	×	×
<i>C. diphtheriae</i> TM3	×	×
<i>C. diphtheriae</i> TM4	○	○
<i>C. diphtheriae</i> TM5	○	○
<i>C. diphtheriae</i> TM6	○	○
<i>C. diphtheriae</i> TM7	○	○
<i>C. diphtheriae</i> TM8	○	○
<i>C. diphtheriae</i> TM9	○	○

<i>C. diphtheriae</i> TM10	○	○
<i>C. diphtheriae</i> ATCC11951	×	×
<i>C. diphtheriae</i> ATCC27010	×	×
<i>C. diphtheriae</i> PW8	○	○
<i>C. ulcerans</i> 0102	○	○
<i>C. ulcerans</i> 0211	○	○
<i>E. coli</i> XL1 blue	×	×

## 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

分担研究者

東京都健康安全研究センター微生物部 諸角聖

研究協力者

東京都健康安全研究センター微生物部

遠藤美代子、畠山 薫、奥野ルミ、向川 純、伊瀬 郁、柳川義勢

はじめに : 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の常在地ではジフテリアの患者発生が報告されている。また、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。

また、近年、日本において人獣共通感染症であり、ジフテリア毒素を産生する *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*) によりジフテリア症状を呈した患者の症例報告<sup>1)</sup> が散見されており、厚生労働省から、*C. ulcerans* による感染症発生時には、診察した医師は、患者の同意を得た後、保健所を通じて厚生労働省へ報告するよう通知された。

一方、百日咳は、小児科定点病院からの患者報告からみて、我が国ではワクチン未接種者を中心に毎年約 1 万人が感染していると推測されている。

### A. 研究目的

我が国では、ジフテリア菌 *Corynebacterium diphtheriae* (*C. diphtheriae*) および *C. ulcerans* の保菌調査は実施されていない。我々は、小児科を受診した患者の咽頭・鼻腔の擦過物を対象に、小児のジフテリア菌 (*C. diphtheriae*)、ジフテリア毒素産生する *C. ulcerans* の保菌状況を調査するとともに、百日咳菌の遺伝子保有調査も同時に実施した。また小児科定点病院で百日咳と診断された患者から、百日咳菌 *Bordetella pertussis* (*B.*

*pertussis*) の分離を行うとともに、百日咳菌遺伝子の検出を試みた。また都内の 2 人のジフテリア疑い患者から、*C. diphtheriae* の分離同定試験を行なう機会を得たので症例とともに報告する。

### B. 検体および方法

#### B-1. 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

都内の小児科を受診した溶レン菌感染症疑いの患者 323 人から採取した試料を対象に実施した。患者の咽頭を 2 本の綿棒で擦過し、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。遺伝子検査用綿棒からQIA amp DNA Mini KitによりDNAを抽出し、細菌の保有する16S rRNAの高度可変領域の一部の領域、10F

(5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3')/800R

(5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')のプライマーセットを用いてPCRを行い、16S rRNAの高度可変領域の遺伝子を保有し、なおかつ、*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。咽頭ぬぐい液を、馬血液加トリプトソイ寒天培地、チンスダール培地 (OXOID) に塗抹して、35°C24時間培養し、コロニーを観察した。チンスダール培地に発育したコロニーのうち *C. diphtheriae* (図1) または *C. ulcerans* (図4)、暗褐色のハローを伴い、隆起し光沢のある小さな黒色集落を釣菌し、染色を行いグラム陽性の桿菌 (図3、図5) であることを確認した後、Api coryne (bio mérieu製) により菌の同定を行った。

百日咳菌の遺伝子検査は、16S rRNA用に調整したDNAを用いてIS481: Per1/Per2/Per3のhemi-nested法で実施した。

#### B-2. 百日咳と診断された患者からの菌分離

鼻腔又は鼻汁拭い液を用いて行った。

拭い液を百日咳菌分離用ボルデテラCFDN寒天培地 (日研生物) に塗抹し、保湿状態を保ちながら37°Cで7日間培養を行った。培地上に発育し

た真珠様の光沢ある集落を選択し、グラム染色、オキシダーゼ試験、尿素分解試験、百日咳血清との凝集反応により、同定した。

また、分離菌株はPCRによりIS481: Per1/Per2/Per3のhemi-nested法で遺伝子の確認を行い同定の補助とした。

#### B-3. ジフテリア疑いの患者から、*C. diphtheriae* の分離同定

検体を培地に塗抹して、35°C24時間培養し、コロニーを観察した。チンスダール培地に発育したコロニーのうち *C. diphtheriae* 様の菌について同定を行った。またジフテリアの検査診断マニュアルに準拠し、PCR法で検体から直接ジフテリア毒素遺伝子検出を行なった。

#### C. 結果

##### C-1. 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、患者323人の咽頭ぬぐい液が搬入された。8月は13人、9月は37人、10月は57人、11月は121人、12月は95人 (図6) であった。そのうち、細菌用16S rRNAの高度可変領域遺伝子が検出された人は236人であった。内訳は男103人、女126人、不明7人であった。年齢別では、0～3才は32人、4～7才は124人、8～11才は59人、12才以上は11人、不明10人であった。このうち発熱温度が35～35.9°Cであったのは1人、36～36.9°Cは8人、37～37.9°Cは45人、38～38.9°Cは58人、39～39.9°Cは25人で、不明は99人 (図7) 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(図8)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。

前述の、細菌用16SrRNAの高度可変領域遺伝子陽性となった236人の咽頭拭い液(図8)から百日咳菌の遺伝子検出を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

### C-2. 百日咳と診断された患者の検査結果

百日咳菌の分離調査を実施した3年間に、小児科定点病院で百日咳と診断された患者は5名であった。

患者発生は、4月に1人、7月に2人、8月に1人、12月に1人であった。年齢は1ヶ月~7ヶ月で、男児4人、女児1人であった。DPT(3種混合ワクチン)接種歴があるもの1名、未接種1名、3名については記載がなかった。8月に発症した4ヶ月の女児では、whoopが観察され、患者の鼻汁からは、百日咳菌の遺伝子が検出され、百日咳菌が純培養状に発育した。なお、患者のDPTの接種歴は不明であったが、ワクチン接種は3ヶ月~12ヶ月に接種するよう推奨されており、今回の患児は、生後4ヶ月で発症したことから、ワクチンは未接種の可能性が高いと推測された。

### C-3. ジフテリア疑い患者の検査結果

3年間に、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ヶ月の女児、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 cor y ne 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才の女児で、発熱(38℃)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℃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。

### D. 考察

今回、百日咳患者1人の鼻汁から百日咳菌が分離された。しかし、これ以外の試料からジフテリア菌および*C. ulcerans*は分離されず、百日咳菌の遺伝子も検出されなかった。

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。

#### E.結論

今回の調査では小児科を受診した患者から *C. diphtheriae* および *C. ulcerans* は分離できなかった。百日咳菌は患者と診断された5人のうち1人から分離することができた。我が国では予防接種により抗体保有率が高

く維持されており、これらの菌による国内での感染は少ないと考えられた。しかし、百日咳菌は、我が国に常在していることから、ワクチン未接種者の感染に注意を払う必要のあることが示唆された。

#### E.健康危険情報

海外では、菌の常在地も存在することから、検査体制を維持し、サーベイランスによる患者情報の把握を継続していく必要がある。

#### G.学会発表

遠藤美代子、諸角聖、柳川義勢、他7名：わが国の小児科担当医療従事者を対象とした百日咳・ジフテリア菌の感染リスク評価  
第80回日本感染症学会総会で発表予定（平成18年度）

#### H.知的財産の出願・登録状況

なし

図 1. *C.diphtheriae*

図 1. *C.diphtheriae*

チンスダール寒天培地

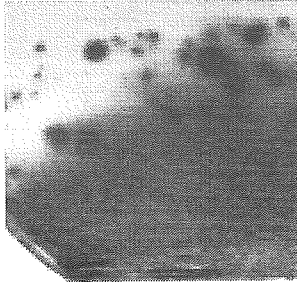


図 2. *C.diphtheriae*

図 2. *C.diphtheriae*

馬血液加寒天培地



図 3. *C.diphtheriae*

図 3. *C.diphtheriae*

グラム染色

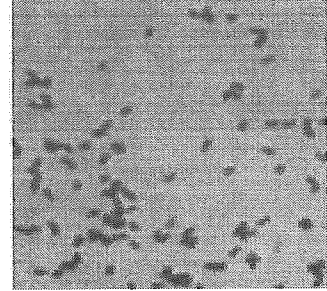


図 4. *C.ulcerans*

チンスダール寒天培地

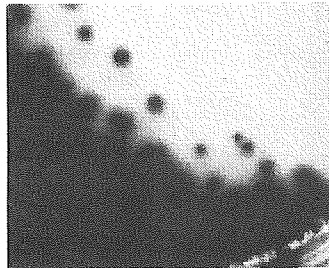


図 5. *C.ulcerans*

グラム染色

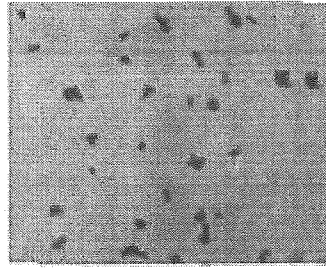


図 6. 小児科由来検体数月別変動

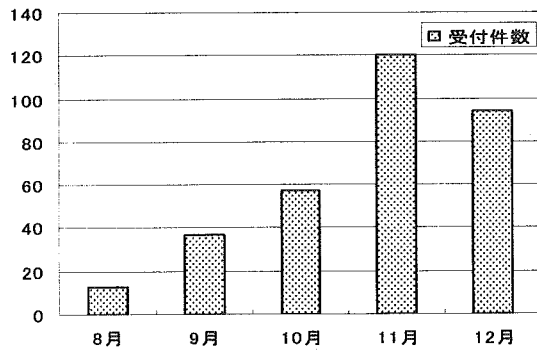


図 7. 年齢別にみた試料採取者の発熱温度と年齢分布

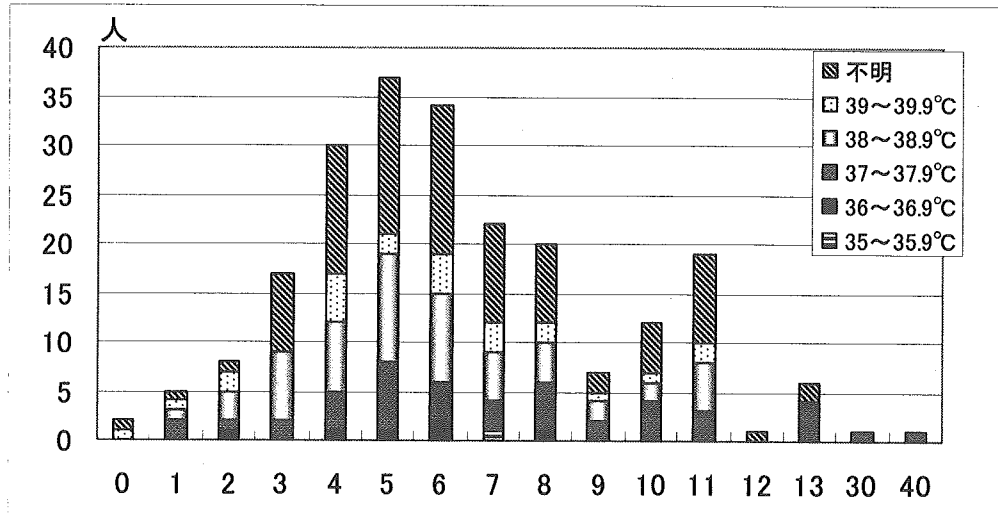
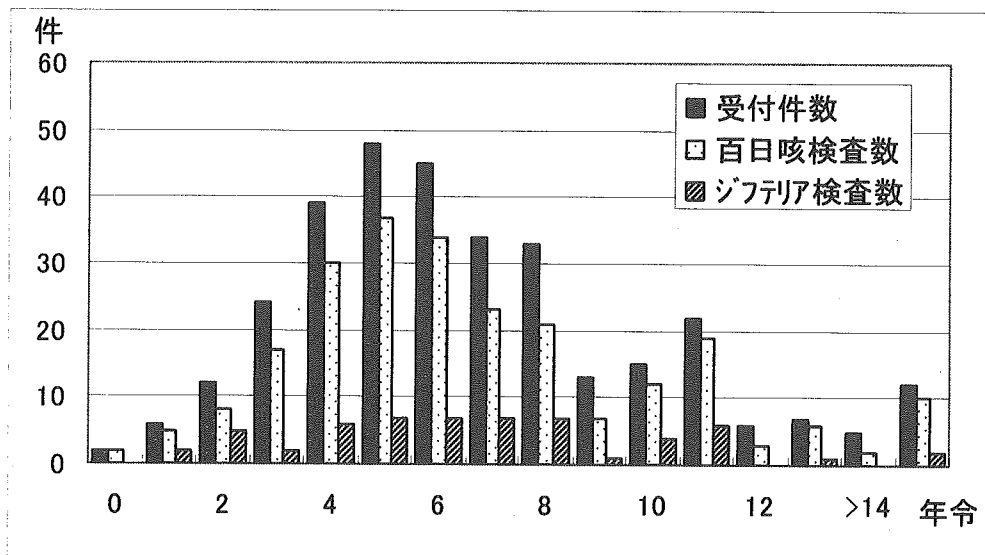


図 8. 検査件数の年齢別内訳





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

鈴木里和 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨:

日本における、*Mycoplasma pneumoniae* の I 型と II 型菌の出現動向を追跡するために、臨床株の型別調査を行った。2004 年と 2005 年に分離、検出された *M. pneumoniae* は I 型菌が優勢で、II 型菌は全く検出されなかった。2000 年以降、日本の臨床現場に出現する *M. pneumoniae* は II 型から I 型菌へと変化したが、その状況が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。今後は II 型亜種菌の出現動向を観察する必要がある。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。この方法は従来法よりも *M. pneumoniae* の検出感度が高く、*M. pneumoniae* 感染症の検出診断法としても有用である。

A. 研究目的

マイコプラズマ肺炎の原因菌 *Mycoplasma pneumoniae* には2つの菌型(I 型と II 型)が存在し、病原性にかかわる接着タンパク質 P1 の遺伝子配列が異なっている。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ことが観察されている。日本における *M. pneumoniae* の I 型菌と II 型菌の出現動向を追跡するため、今年度も臨床菌株の収集および P1 遺伝子 DNA の検出、型別分析

を行った。

B. 研究方法

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(図1、表1)。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。

### C. 研究結果

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(図1、表1)。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。これらの新しいデータを加えた、日本における I 型菌と II 型菌の出現状況を図2 に示した。

### D. 考察

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(図2)。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で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違いが見られ、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違いが見られるが 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 か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す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(図 1)。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。

#### E. 結論

日本において *M. pneumoniae* の臨床株の多くは、現在 I 型菌が占めていることが明らかになった。しかし、II 型亜種菌も以前より多く見られるようになってきている。今回、II 型亜種も検出型別できる nested PCR 法をデザインしたが、この方法は従来の *M. pneumoniae* の検出法よりも感度が高かった。これは *M. pneumoniae* の早期診断法としても利用価値が高いと考える。

#### F. 健康危険情報

なし

## G.研究発表

### 1. 論文発表

見理 剛

ワンポイント臨床細菌学「マイコプラズマ属」、感染と抗菌薬, 8, 334-336, 2005.

### 2. 学会発表

見理 剛、岡崎則男、成田光生、  
佐々木次雄

マイコプラズマ肺炎患者の血清  
に見られる菌型特異的な血球吸  
着阻害活性

(日本マイコプラズマ学会、久留  
米市、2005年4月)

## H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)