

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 15-17 年度 総合研究報告書

主任研究者 佐々木次雄

平成18(2006)年3月

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

平成 15-17 年度 研究組織

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	
上原すゝ子	埼玉医科大学		
田中裕士	札幌医科大学		

## 目 次

頁

I.	総合研究報告書	
	百日咳菌, ジフテリア菌, マイコプラズマ等の臨床分離菌の収集と分子疫学的解析に関する研究	
	主任研究者 佐々木次雄 .....	1
II.	研究成果の刊行に関する一覧表 .....	57
III.	研究成果の刊行物・別刷り .....	63

# I. 総合研究報告書

## 百日咳菌，ジフテリア菌，マイコプラズマ等の臨床分離菌の収集と 分子疫学的解析に関する研究

主任研究者 佐々木次雄（国立感染症研究所・細菌第二部）

### 研究要旨

呼吸器系細菌感染症のうち，特に乳幼児，学童に罹患率の高い百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)，ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)，肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)，インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) の臨床株を収集し，最新の分子生物的手法を駆使してこれら収集菌株の解析と患者情報を解析し，わが国におけるこれら病原体による感染症の現状把握を行った．3年間にわたった研究事業において特記すべき研究成果としては，百日咳菌及びジフテリア菌については，1) PCR や LAMP 法を用い，百日咳菌及びジフテリア菌を迅速にかつ感度よく検出する系を確立した，2) 国内で分離された百日咳菌及びジフテリア菌について，薬剤感受性パターンや諸性状を調べ，更にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による解析を行ない，系統樹を作成した．3) 医療従事者がこれらの病原体のキャリアーになっている可能性があるかどうかの疫学調査を実施した，4) 百日咳菌の定着因子であるパータクチン (Prn) 遺伝子欠損株の分離率が増加傾向にあることより，その原因を究明した．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* 感染に関する疫学調査を実施した，2) マクロライド耐性 *M. pneumoniae* の各種抗菌剤に対する感受性を調べ，薬剤耐性パターンと 23SrRNA 変異パターンを明らかにした，3) マイコプラズマ感染症の実験室診断法としての血清抗体測定法と PCR の感度，特異性を解析した，4) マクロライド耐性 *M. pneumoniae* に感染した患者とマクロライド感受性菌に感染した患者における臨床経過 (有熱期間) を比較した，5) 日本における，*M. pneumoniae* の I 型と II 型菌の出現動向を調べた．インフルエンザ菌については，1) 国内で分離された b 型インフルエンザ菌 (Hib) の薬剤感受性と耐性遺伝子解析，Hib 感染患者における抗 PRP 抗体価，ペニシリン系抗菌薬による治療群とペニシリン以外の抗菌薬による治療群における炎症反応等の比較検討を行った，2) ベトナムで分離された Hib の薬剤感受性，耐性遺伝子解析，PFGE パターン解析を行った，3) インフルエンザ菌と他の呼吸器病原性微生物 (ウイルス，細菌) との混合感染を解析した，4) 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 の遺伝子の変異検出と薬剤感受性について解析を行った．

## 分担研究者

荒川宜親 国立感染症研究所細菌第二部部長  
堀内善信 国立感染症研究所細菌第二部室長  
高橋元秀 国立感染症研究所細菌第二部室長  
見理 剛 国立感染症研究所細菌第二部主任研究官  
菊池 賢 東京女子医科大学感染症科講師  
諸角 聖 東京都健康安全研究センター微生物部部长  
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による感染症の現状把握並びに予防・診断に貢献させることを研究目的としている。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は増加傾向にある。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。そこで、百日咳菌及びジフテリア菌を臨床の場で迅速に検出できる系（PCR や LAMP 法）を確立し、日本では患者数の少ない百日咳及びジフテリア患者を迅速に診断できるようにする。また、収集した百日咳菌及びジフテリア菌臨床分離株を遺伝学的に解析することにより、今後の感染制御に必要な情報を得る。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。また、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。日本にもb型インフルエンザ菌（Hib）ワクチンが導入されようと

しており、その前後で、臨床分離株の血清型や遺伝子型に変化が起こるかどうかを把握するとともに、臨床分離菌の薬剤耐性の獲得状況を把握しつつ、敗血症や髄膜炎などを引き起こした株について病原因子の解析を行う。

## 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得ながら、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、各年度において全体研究班会議を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、それぞれ研究の方向性、進捗状況について議論した。研究に用いた臨床分離菌と解析方法を以下に示す。

百日咳菌：2001年12月より2004年12月までに全国91の医療施設で百日咳疑い患者より得られた鼻咽頭スワブ300検体につき、培養法とnested duplex PCR法による百日咳菌検出を行った。臨床分離した百日咳菌に対する各種薬剤の薬剤感受性（MIC）はEtest（AB Biodisk, Solna, Sweden）を用いて測定した（H16；菊池）。百日咳菌をより高感度に検出する系として *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（H17；菊池）。百日咳菌の定着因子であるパータクチン（Prn）遺伝子欠損株の分離率が増加傾向にあることより、その原因究明のため、1990-2005年にわが国で分離された百日咳臨床分離株（80株）を用いてパータクチン（Prn）遺伝子を調べた。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、抗Prn2抗体を用いたイムノブロット法により、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。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（H16-17；堀内）。

ジフテリア菌：1961～1992年に日本各地で分離された85株を用いて生化学試験、ジフテリア毒素原性試験を行った。また、医療従事者の咽頭拭い液230検体、上気道炎患者／下気道炎患者の咽頭拭い液または鼻腔拭い液87検体からの *C. diphtheria*, *C. ulcerans*, 及び百日咳菌の分離及びDNA検出を行

った(H15; 高橋). 医療従事者が百日咳菌やジフテリア菌のキャリアになっている可能性があるかどうかの疫学調査を行うために, 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に対して, 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 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 (H16; 諸角, 高橋). 東京都健康安全センターにおいて 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 解析並びに LAMP 法による *tox* 遺伝子検出系の改良を行った

(H17; 高橋).

マイコプラズマ: 1983~1998 年に神奈川県で分離された 296 株, 2000~2003 年に北海道, 高知県, 神奈川県で分離された 73 株を用いて, 細胞付着蛋白をコードしている P1 遺伝子による型別, 薬剤感受性試験並びに薬剤耐性機構の解明を行った (H15; 見理, 成田). 咽頭スワブを用いてのマイコプラズマ野生株の分離法, 薬剤感受性試験の方法, 薬剤耐性遺伝子変異の検索方法に加え, PCR 増幅法と制限酵素切断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 解析を用いて, マクロライド耐性遺伝子変異の有無をより簡便に検出する方法を開発し, その有用性を検討した (H16; 成田). 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) の喀痰サンプルからの DNA 抽出物について nested PCR 法によって P1 遺伝子を検出し型別 (I 型, II 型) できる系を確立した. また, 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ようになってきたので, II 型亜種菌も検出, 型別できる nested PCR 法をデザインした (H16-17; 見理). マクロライド耐性 *M. pneumoniae* に感染した患者とマクロライド感受性菌に感染した患者群における臨床経過 (有熱期間) を比較するために, ①マイコプラズマが分離または PCR 法にて咽頭あるいは喀痰に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 PA 法にてマイコプラズマ抗体価が急性期で 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した患者をカルテより抽出し，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 (H17; 成田)。

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

よる治療群 (A 群) とペニシリン以外の抗菌薬による治療群 (B 群) に分類し，各々で炎症反応等の経過を比較した。インフルエンザ菌による髄膜炎に罹患した小児 5 例より，経時的に血清を採取し，抗 polyribosyl ribitol phosphate (PRP) 抗体を測定した。抗 PRP 測定は，BINDAZIME Human anti *Haemophilus influenzae* enzyme immunoassay kit (The Binding Site Ltd.) により行った (H16; 山崎)。ベトナムにおいて髄膜炎患児の髄液より分離された *Haemophilus influenzae* type b (Hib) 79 株を用いて生物型，莢膜血清型，薬剤感受性，PFGE パターンを調べ，我が国で分離される Hib と比較検討した (H16; 荒川)。インフルエンザ菌と他の呼吸器病原性微生物 (ウイルス，細菌) との混合感染を解析するために，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 (H16-17; 山崎). 2002 年までに, 国内において呼吸器材料から分離され, 当部に保存している *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.  $\beta$ -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 (H17; 荒川).

#### (倫理的側面での配慮)

分離菌や採取した臨床材料 (咽頭スワブ, 血清等) に関連する患者情報の管理と取扱いについては, 国立感染症研究所倫理委員会での承認内容に沿って行った.

## C. 研究結果

### 百日咳菌

#### 1) 百日咳菌の迅速検出法確立と疫学調査

2001 年 12 月より 2004 年 12 月までに全国 91 の医療施設で百日咳疑い患者より得られた鼻咽頭スワブ 300 検体につき, 培養法と ndPCR 法を比較したところ, 陽性件数は培養法では 59 件 (19.7%), ndPCR では 112 件 (37.8%) であった. 培養陽性検体 59 検体中 58 件は ndPCR も陽性であったが 1 件は陰性であった. ndPCR の感度, 特異度, 陽性的中率, 陰性的中率はそれぞれ 98.3, 77.6, 51.8, 99.5% であった. 300 検体のうちパラ百日咳菌及び *B. holmesii* は, 培養, ndPCR とともに検出されなかった. 患者は圧倒的に 0 歳が多かった (男性 112 名; 78.3%, 女性 108 名; 72.2%). 20 歳以上のいわゆる成人百日咳の疑われた症例も 16 例あり (男性 5 例, 女性 11 例), 培養陽性が 1 件, ndPCR 陽性が 3 件 (両者とも陽性 1 件) 認められた. 培養か ndPCR で成人百日咳と診断された 3 件のうち 2 名は培養, ndPCR 陽性の百日咳患児 2 名の母親であり, 家族内感染が疑われた. もう 1 件は 37 歳男性で ndPCR のみ陽性であったが, 百日咳抗体上昇から診断された 46 歳女性の成人百日咳患者が感染源と推定され, 小児を介さない成人同士の病院感染が疑われた症例であった. 季節では春から夏にかけて検体数, 陽性例が増加する傾向が認められるが, 2002 年は 1 月にもピークがみられた. 検体は全国から回収さ

れ、関東地区から最も多く提出されていた。百日咳の検出率は28.6-50%であった。培養陽性となった菌52株に対する各種抗菌薬21薬剤のMICを調べた。百日咳の一選択治療薬として広く用いられているmacrolide系薬剤はいずれも良好なMICを示しており、近年報告がみられるerythromycin耐性菌は認められなかった。tetracycline, minocycline, rifampicin, chloramphenicol, clindamycin, trimethoprim/sulfamethoxazoleのMICもすべて1  $\mu$ g/ml未満であった。一方、streptogramin系のquinupristin/dalfopristinのMICは比較的高かった(菊池)。

## 2) 百日咳菌の迅速検出法としてのLAMP法の確立

LAMP-IS481, LAMP-PTXによる*B. pertussis* CCUG 30873<sup>T</sup>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<sup>T</sup>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。2001年12月より2004年12月までに全国91の登録医療施設で百日咳疑い患者より得られた臨床

検体310件に培養法, nPCR, LAMP-IS481, LAMP-PTXを適用したところ、*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、nPCRでは112件が陽性になった。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)。

## 3) 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 株はト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)。

## ジフテリア菌

### 1) 日本で分離されたジフテリア菌の諸性状

1961～1992 年に日本各地で分離された 85 株についてバイオタイプを調べたところ、gravis 型は 56 株、mitis 型は 15 株、その他が 14 株であった。バイオタイプには分離された地域差が大きく影響していた。これらの菌株のジフテリア毒素原性試験を PCR 法、培養細胞法、ウサギ皮内法、Elek 法で調べたところ、感度の面では PCR 法  $\geq$  培養細胞法  $\geq$  ウサギ皮内法  $>$  Elek 法の順に優れていたが、毒素を定量的に

測定する場合には培養細胞法がウサギ皮内法より 4 倍ほど感度が優れていた (高橋)。

### 2) 医療従事者における百日咳・ジフテリア抗体調査

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

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

アンケート調査：被検者は平均年齢 42.7 歳、男性 15 名、女性 34 名、職種は医師 25 名、看護師 24 名であった。調査期間中に百日咳患者と接触した者は 16 名 (33%) で、接触後、百日咳の自覚症状を示した者はいなかった。なお、調査期間外に百日咳患者と接触

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

### 3) 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、検出感度を比較した上で“Cd#16”プライマーセットを以後の実験に用いることにした。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、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懸濁し、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)で、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ず、プライマーセット Cd#16 の LAMP 法による *tox* 遺伝子増幅系特異性が示された (高橋)。

#### 4) ジフテリア疑い患者

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が2名いた。患者は2名とも6月に発症し、ジフテリア疑いと診断された。1例目の患者は、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℃)と咽頭痛、嗄声、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(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

マイコプラズマ肺炎患者から2000-2003年に分離された *M. pneumoniae* 50株の菌型を調べたところ、2000-2001年の分離菌はすべてII型菌だったが、2002年にはI型菌が出現し、2003年にはI型菌が多数を占めるようになっていた。また、同時期に呼吸器疾患患者から採取された喀痰をPCR法で分析し、*M. pneumoniae* の P1 遺伝子が検出された83例について菌型を特定した。この調査でも2000年にはII型の *M. pneumoniae* がほとんどであったのに対して、2001年以降はI型菌が増加し、2002年には多数を占めるようになっていた。日本では2001年から2003年の間に、*M. pneumoniae* の菌型の交代が起こったと考えられる。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) 肺炎マイコプラズマの流行型シフトと型別抗体

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

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

## 3) マクロライド耐性肺炎マイコプラズマの疫学調査と耐性機構について

2000～2003 年に北海道，高知県，神奈川県で分離された 73 株中 13 株がエリスロマイシン（EM）耐性であった．マクロライド耐性には， 23SrRNA 遺伝子のドメイン II 又はドメイン V，又は L4， L22 リボゾーム蛋白が関与していることが多い． 13 株を解析した結果，ドメイン II 変異株はなく，ドメイン V 変異

株 13 株中, A2063G 変異株が 11 株, A2063C 変異株が 1 株, C2617G 変異株が 1 株であった. A2063G 及び A2063C 変異株はマクロライドに高度耐性を示し, C2617G 変異株は低度耐性を示した. L4, L22 リボゾーム蛋白遺伝子にも変異は認められたが, 耐性への貢献度については解明できなかった. PCR-RFLP 解析によるマクロライド耐性遺伝子検出系を確立した. 本法により A2063G, A2063C, A2064G, C2617X (X は C 以外の塩基) の変異を明確に検出し得ることが確認された. 保存菌の薬剤感受性試験並びに喀痰由来 DNA の耐性遺伝子解析結果より 1999 年以前には耐性菌の出現は認められず, 耐性化は 2000 年以後に急速に進んでいることが観察された. 2000 年以後における耐性化率は, 薬剤感受性試験によると 14.9%, PCR-RFLP 解析によると 15.0% で, 両者の結果はほぼ一致していた (成田).

#### 4) 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) 2001~2002 年に埼玉医科大学附属病院で分離されたインフルエンザ菌

インフルエンザ菌は 418 株分離され, その内訳は小児由来が 65% を占め, 分離検体は喀痰 (57%), 咽頭粘液 (32%) など, 気道由来株が 89% を占めた. 小児の気道由来 58 株についてニトロセフィン法により  $\beta$ -ラクタマーゼ産生性, 微量液体希釈法により薬剤感受性を, PCR 法により薬剤耐性遺伝子である *pbp3-1*, *pbp3-2* を検出し, 薬剤感受性試験の結果と比較した. ABPC の MIC が  $0.5\text{--}2.0\ \mu\text{g/ml}$  の感受性株では, *pbp* 遺伝子変異が認められ, MIC が  $0.5\ \mu\text{g/ml}$  の 1 株ならびに MIC が  $1.0\ \mu\text{g/ml}$  の 7 株は, *pbp3-1* あるいは *pbp3-2* のいずれかの変異が存在した. さらに, MIC が  $2\ \mu\text{g/ml}$  の 20 株では, 遺伝子変異数が 2 のものが 15 株, 変異数 1 のものが 5 株を占めた. ABPC 耐性株については, ABPC の MIC が  $4\ \mu\text{g/ml}$  の 9 株では, 遺伝子変異数が 2 のものが 8 株, 変異数 1 のものが 1 株を占めた. また, MIC が  $8\ \mu\text{g/ml}$  以上



の13株では、遺伝子変異数が2のものが3株、変異数1のものが5株を占めたが、*pbp* 遺伝子変異が見られなかったものも5株存在した。なおこの13株は、1株を除いて $\beta$ -lactamase産生性であり、ABPC耐性に関しては $\beta$ -lactamaseが主体的役割を有するものと推察された。しかし、 $\beta$ -lactamaseを産生し、かつ*pbp*遺伝子変異を2個認める株も存在した。薬剤感受性試験でABPC感受性であっても、耐性遺伝子を保有する場合があります。今後インフルエンザ菌の薬剤耐性の動向に留意すべきである(山崎)。

## 2) インフルエンザ菌肺炎の検討

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

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

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

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

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

## 3) インフルエンザ菌と他の呼吸器系病原微生物との混合感染

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)。

4) 日本で分離されたインフルエンザ菌の諸性状

2002年までに、関西地区、関東地区の

医療機関、検査機関において、咽頭拭い液、喀痰などの主に呼吸器材料から分離され *H. influenzae* と同定された臨床分離株634株を用いて生物型、血清型、薬剤感受性、薬剤耐性機構を調べた。生物型は2, 3, 1の順に多く血清型は95%が nontypeable であった。耐性率はアンピシリン14.7%, アンピシリン/スルバクタム7%, セファクロル17%, クロラムフェニコール3.5%, クラリスロマイシン1%であった。 $\beta$ -ラクタマーゼ産生株は61株(9.6%), そのうち58株がTEM-1型, 3株がROB-1型であった。BLNAR株は29株(4.9%)であった(荒川)。

5) ベトナムで分離されたインフルエンザ菌(Hib)の特性

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

6)  $\beta$ -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 μg/ml の株については全株, 2, 1, 0.5, ≤0.25 μg/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 ≥ 4 μg/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 μg/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下の程度が高く, 感性の範疇 (MIC ≤ 2 μg/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) 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。そこで, 百日咳菌特異挿入配列である IS481 の 22-174 領域 (nPCR1), 644-849 領域 (nPCR2) をそれぞれ検出する系を確立した。nPCR2 はパラ百日咳菌 (*B. parapertussis*) 特異挿入配列である IS1001 の 907-1072 領域を同時に検出する nested duplex PCR とした。今回検査を行った 300 検体の培養法陽性は 59 件 (19.7%) であったが ndPCR では 112 件 (37.3%) が陽性を示した。ndPCR は, 感度, 特異度に優れていることが示され, 診断の難しい百日咳の大規模な発生動向調査に有用であると結論づけられた (菊池)。

##### 2) 百日咳菌の迅速検出法としての LAMP 法の確立

更に高感度にかつ簡便に百日咳菌を検出する系として, *Bordetella*

*pertussis* IS481, *pertussis* toxin promoter (PTX), *Bordetella parapertussis* IS1001 のそれぞれ 3 種類の LAMP プライマーを設計した。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る。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。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动向調査に広く適用可能であると期待される(菊池)。

### 3) 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