

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関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)。

ジフテリア菌

1) 医療従事者における百日咳・ジフテリア抗体調査

我が国では小児科担当医療従事者に対する百日咳菌およびジフテリア菌の保菌調査ならびに抗体保有調査

は実施されることがないため、現状で我が国の小児科医療従事者にワクチン接種が必要であるか否かは不明のままである。平成15年度に実施した11医療機関に属す47名の小児科医療従事者に対する百日咳菌およびジフテリア菌の保菌調査では菌は分離されず、小児科医療従事者が濃厚な保菌者となる可能性は極めて低いものと考察した。抗体保有調査では百日咳菌に対する抗PT IgG抗体、抗FHA IgG抗体価に有意な変動は認められなかったものの、凝集素価の変動は6名で認められた。変動が認められた6名中2名で患者との接触歴が確認され、1名(被験者ID1)は4回の接触歴を示したが、その凝集素価は低下していた。また1名(被験者ID44)は同一患児との接触歴が3回であったが、その凝集素価は大幅な上昇を示した。一方、調査期間中、百日咳患者と接触した医療従事者は16名いたが、そのうち有意な凝集素価の変動を示した医療従事者は2名(被験者ID1, 44)だけであった。なお、百日咳患者と接触したことによって感染の可能性が疑われた医療従事者(被験者ID44)は、昨年度実施した百日咳菌の保菌調査では百日咳菌は分離されなかった。このことから、小児科担当医療従事者が百日咳菌に感染する可能性はあるものの、その感染は保菌するほどのものではないと言える。また、百日咳患者との接触歴が確認された16名の医療従事者のうち感染が疑われた者は1名だけであったことから、その感染頻度は極め

て低いものと考えられる。抗毒素価を指標にしたジフテリア菌の感染リスク評価では、ジフテリア抗毒素価の有意な上昇（0.652→5.52 IU/ml）を示した医療従事者が1名認められた。この1名に対しては追跡調査を実施し、2004年6月に再度抗毒素価を測定した結果、抗毒素価は0.616 IU/mlに低下した。上記3時期の血清は、繰り返し同時実験で測定した結果でも、2002年2月の血中抗毒素価が前後の抗毒素価に比べて高いことを確認している。本人の再聞き取り調査でも、この時期にジフテリア様症状を呈した記憶はなく、また家族および来院者にもジフテリア患者がいなかったことが確認されている。通常、ジフテリア感染例では、感染後に抗毒素価の上昇が認められた場合には、そのレベルの抗毒素価が1年以上は維持されると考えられており、今回の抗毒素価の昇降の原因は不明である。今回の調査では、百日咳同様、医療従事者が患者を通してジフテリア菌に感染する可能性は極めて低いものと考えられた。今回のアンケート調査によると、小児科医療従事者に対して百日咳ワクチンとジフテリアワクチンの接種が必要であると回答した人は、それぞれ37%と22%であった。ジフテリアワクチンを必要と回答した11名ではすべて百日咳ワクチンが必要と回答していることから、小児科担当医療従事者にワクチンを接種する場合はDPTとして接種することが必要であろう（諸角，高橋）。

2) 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）。

3) 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) 肺炎マイコプラズマの流行型シフトと型別抗体

I 型又は II 型の *M. pneumoniae* に感染したヒトの免疫応答を知る目的で、患者血清の HA 阻害活性を調べた。患者血清が有する HA 阻害活性は、ほとんどの場合 (22 例中 21 例)、患者に感染した菌型に対して強いことが明らかになった。HA は *M. pneumoniae* コロニーへの赤血球吸着の観察であり、*M. pneumoniae* がヒトの呼吸器上皮細胞へ付着することを観察することは異なっている。しかし、両者はよく関連するとされており、HA を阻害するよ

うな活性は *M. pneumoniae* がヒトの呼吸器上皮細胞へ付着，定着することも阻害すると考えられている。*M. pneumoniae* による肺炎の発症には，この菌がヒトの呼吸器上皮細胞へ付着，定着することが必須である。血清中に生じた HA 阻害活性が *M. pneumoniae* の定着を阻害すれば，*M. pneumoniae* に対する防御免疫としてはたらくと考えられている。今回の研究で，患者血清に，感染をうけた *M. pneumoniae* の菌型に対応した HA 活性が生じることがわかったことは，ヒトが *M. pneumoniae* に対して菌型依存的な防御免疫を生じさせることを示しており，一方の菌型の *M. pneumoniae* に感染した後は同じ型の菌には感染しにくいといった状況が生じると予想される。もしこれがヒトの集団で実際に起っていれば，全体として，疫学調査で見られているような I 型菌と II 型菌が交互に出現してくる現象を生じさせるのではないかと考えられる（見理）。

3) 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ことは，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) 日本で分離されるジフテリア菌の諸性状

インフルエンザ菌の薬剤耐性について、従来は β -lactamase産生菌におけるABPCをはじめとする β -lactam薬に対する耐性が問題とされてきた。最近では、 β -lactamaseを産生せずABPC耐性を示すインフルエンザ菌の存在が、特にわが国において注目されている。インフルエンザ菌は、呼吸器感染症以外にも髄膜炎や敗血症の原因ともなり、これらの耐性株の出現は、臨床上的脅威である。米国 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)の基準では、ABPCのMICが $4\mu\text{g/ml}$ 以上のものをABPC耐性と定義している。この判定基準を適用すると、今回の検討からはABPC感受性菌であっても耐性遺伝子を持つ場合があった。ABPCに対するMICが $0.5\sim 2.0\mu\text{g/ml}$ のものでは、いずれも*pbp*遺伝子変異を有し、全身感染症の際の抗菌薬選択に、今後留意する必要がある。一方、ABPCに対するMIC

が $8\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性株では、*pbp*遺伝子変異のない株もあり、この群におけるABPC耐性は、従来より報告されている β -lactamaseが主体的役割を有するものと推察された。しかし、 β -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。インフルエンザ菌における、これらの耐性株の検出状況を、今後も注意深く調査する必要がある。 β -ラクタマーゼ産生株は約10%であり、我が国の最近の報告と大差はなく、約30%という米国、カナダでの報告より低い。この差はペニシリン系薬の使い方の違いを反映していると思われる。逆に我が国では米国に比べBLNARの頻度が高いとされるが、我が国では経口セフェム系薬の使用頻度が高く、これらの薬剤は β -ラクタマーゼ産生菌には有効だがBLNARには効果の低いものがあり、これは臨床現場でBLNARが選択され易い結果であろう。BLNARの判定基準を「 β -ラクタマーゼ非産生でアンピシリンのMICが $\geq 4\mu\text{g/ml}$ 」とすると、本研究では4.9%がBLNARであった。この値は我が国の1997～1999年の小児科領域における報告(3.0%)よりも増加している（山崎）。

2) 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）。

3) ベトナムで分離されたインフルエンザ菌 (Hib) の特性

欧米での報告によれば *H. influenzae* の生物型は分離部位や莢膜血清型と相関があり、b型株では1型が圧倒的に優位であるという。本研究ではベトナムでは欧米とは異なり2型が優位であることが明らかになった。日本ではb型株の生物型分布に関する最近のデータは少ないが、前年度の本分担研究及びその他の報告により、1型が優位であるが2型も1型の半分程度以上の頻度であり、欧米とベトナムの中間的な分布と見られる。β-ラクタマーゼ産生株は60%に近く、約30%という米国、カナダでの報告よりさらに高い。この差はペニシリン系薬剤の使い方の違いを反映していると思われる。我

が国の場合は、前年度の本分担研究によれば例数は少ないが、血液・髄液由来株(10株,すべてb型)の20%(2/10株)が β -ラクタマーゼ産生株であった。*H. influenzae*においてもPFGEは識別力が高く、疫学において有用な解析手段である。本研究でも53株が26 genotypesに型別され、詳細な解析が可能になる。PFGEを利用して家族内伝播を調べたところ7家族において患児髄液由来株と家族咽頭スワブ由来b型株とでパターンが一致した。他の1家族では父親からのb型株とは一致しなかった。これらの結果から健常者家族が咽頭に保菌しているb型株が乳幼児の髄膜炎起因菌となる可能性の高いことが示唆された(荒川)。

4) 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、シークエ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 μ 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 μ g/ml(中間)の株では約30%がBLNAR型であり、感性である1 μ g/mlの株でも数%がBLNAR型であった。この事実から、菌の膜の変化とともにPBP3遺伝子のPCRプライマーとアニールする領域に、アミノ酸変異を引き起こさない、サイレントな変異が入る等の可能性も示唆されたため、その理由について引き続き詳しい解析が必要である。一方ペニシリン系薬の小児*H. influenzae*肺炎に対する臨床効果から見ると、起炎菌に対するABPCのMICが2 μ g/mlの場合ペニシリン系以外の抗菌薬に比べて治療効果は劣らないという報告があり、治療薬選択という目的のためならば、日常的な細菌検査の現場における遺伝子学的方法を用いての*pbp3*変異型判定の実用性は低いかも知れない。今回用いた試薬は、Wild株としてRd KW20株、BLNAR株としてME870株の、*ftsI*の大部分重なる領域を標的配列として、変異塩基を3'末端としてプライマーを設計し、3'末端の塩基の mismatchによる増幅効率の差を利用して野生型と変異型とを区別することを意図している。しかしながら今回の実験ではRd KW20型配列にアニールするプライマーとME870型配列にアニールするプライマーの両方で増幅するものが数株あり、この原因については、細菌の膜の変化やプライマー領域のサイレントな変異など複数の因子が

関与している可能性を考慮し、今後も引き続き検討課題としたい。PBP3は、セファロスポリン系薬の主たる標的分子であるため、PBP3変異株はセファロスポリン系薬に対する感受性に、より強く影響を受けると言われてきた。我が国では、これまで経口セファロスポリン系薬が、外来施設で多用されてきたのも事実である。その結果、ペニシリン系薬よりもセファロスポリン系薬に対してより抵抗性を示すPBP3変異株が選択されて来たとも指摘されている。最近、ファロペネムなどの新しい系統の経口薬も認可され、外来診療現場において利用されるようになり、インフルエンザ菌を含む市井感染症、急性呼吸器感染症、耳鼻咽喉科領域感染症の起因菌における薬剤感受性の動向を引き続き監視を継続する必要がある（荒川）。

E. 結 論

研究対象病原体が4種類であることより、百日咳・ジフテリア菌グループとマイコプラズマ・インフルエンザ菌グループに分けて、患者材料や患者情報の収集がスムーズにいく体制（国立感染症研究所—地方衛生研究所—医療機関及び分担研究者—医療機関）を整備しつつ研究を行った。本研究事業3年間において得られた研究成果の主な結論を以下に述べる。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高感度に検出できる系を確立したことより、実験室

レベルでこれら病原体の迅速検出が可能になった。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)解析により系統樹を作成したことより、今後の疫学研究の基礎データになりえる。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が、対象被験者が少なかったこともあり、仮説を立証することはできなかったが、ジフテリア抗毒素価の有意な上昇(0.652→5.52 IU/ml)を示した被験者もいたため、仮説の可能性は否定できないので今後とも注目する必要がある。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。本研究は現在使われているワクチンの改良(組成変更)にもつながる可能性があり、今後とも研究を継続する必要がある。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ところ、約15%のマイコプラズマ感染患者はマクロライド耐性 *M. pneumoniae* による感染であった。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変異パターンを解明したところ、23SrRNAのドメインVの点変異(特に、A2063XとA2064X)によって高度耐性を獲得することを明らかにした。これ以外の点変異は、

マクロライド耐性に関与していないか、関与しても極めて低耐性であった。

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、特異性を解析したところ、PCRが急性期を含め最も高感度に *M. pneumoniae* DNA を検出（診断）でき、血清診断法は急性期においては信頼性の低いものであった。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）を比較したところ、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、耐性群では統計学的に有意に延長していたことを明らかにしたことより、今後のマイコプラズマ感染患者に対する抗菌剤使用においては注意すべき事項である。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ところ、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 型菌は検出されなかったが、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%）ことより、今後は II 型亜種の動向にも注意が必要である。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）の薬剤耐性について、小児の気道由来 58 株について検討したところ、ABPC の MIC が 0.5–2.0 μ g/ml の感受性株では、pbp 遺伝子変異が認められ、MIC が 0.5 μ g/ml の 1 株ならびに MIC が 1.0 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 β -lactamase 産生性であり、ABPC 耐性に関しては β -lactamase が主体的役割を有するものと推察された。しかし、 β -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。今後も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。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結果, 生物型については2型が最も多く(68.3%), 次いで1型(22.8%), 3型(2.5%)の順であった. また β -ラクタマーゼ活性陽性株は45株(57.0%), 陰性は34株(43.0%)であった. β -ラクタマーゼの遺伝子型は陽性株のうち44株がTEM-1型, 1株がROB-1型であった. 日本のようにBLNARは存在せず全てBLPARであった.

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ところ, インフルエンザ菌は, 小児肺炎の原因微生物として最も多く35.5%で検出されたが, 他の微生物との混合感染例も多く, 単独で原因微生物と判定されたものは, 16例(10.3%)であった. 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, 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. インフルエンザ菌と他の病原体との呼吸器系混合感染における貴重な情報が得られた.

4) 呼吸器由来 *H. influenzae* 臨床分離株の β -ラクタマーゼ産生株及び β -ラクタマーゼ非産生株を *pbp3* 遺伝子変異の型により群別し, 各種 β -ラクタム薬に対する感受性を群間で比較した結果, β -ラクタマーゼ非産生株の方がWild型株とBLNAR型株の感受性の差が大きくなる事が確認された. しかし, Low-BLNAR型株は, β -ラクタマーゼ産生株及び β -ラクタマーゼ非産生株ともにWild型株との感受性の差は大き

くはなかった. BLNAR型変異株の大部分はABPCのMICが $4\mu\text{g/ml}$ 以上でありその鑑別は β -ラクタマーゼ活性とABPCのMICを測定すればほぼ可能であると考えられる. しかし, その際にはABPCのMICが $2\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ の株の中にはBLNAR型株も存在することに留意する必要がある. BLNAR型変異株ではセファクロル, セフカペン, セフポドキシムで感受性が低下し, また低頻度ながらセフォタキシム, セフトジジムに非感受性の株も見られたため, それらの動向について引き続き監視と解析が必要である.

F. 研究発表

1. 論文発表

各分担研究者, 日本細菌学会, 日本感染症学会, その他で多く発表したが, その詳細は割愛.

2. 学会発表

本報告書, II. 研究成果の刊行に関する一覧表を参照.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

百日咳菌

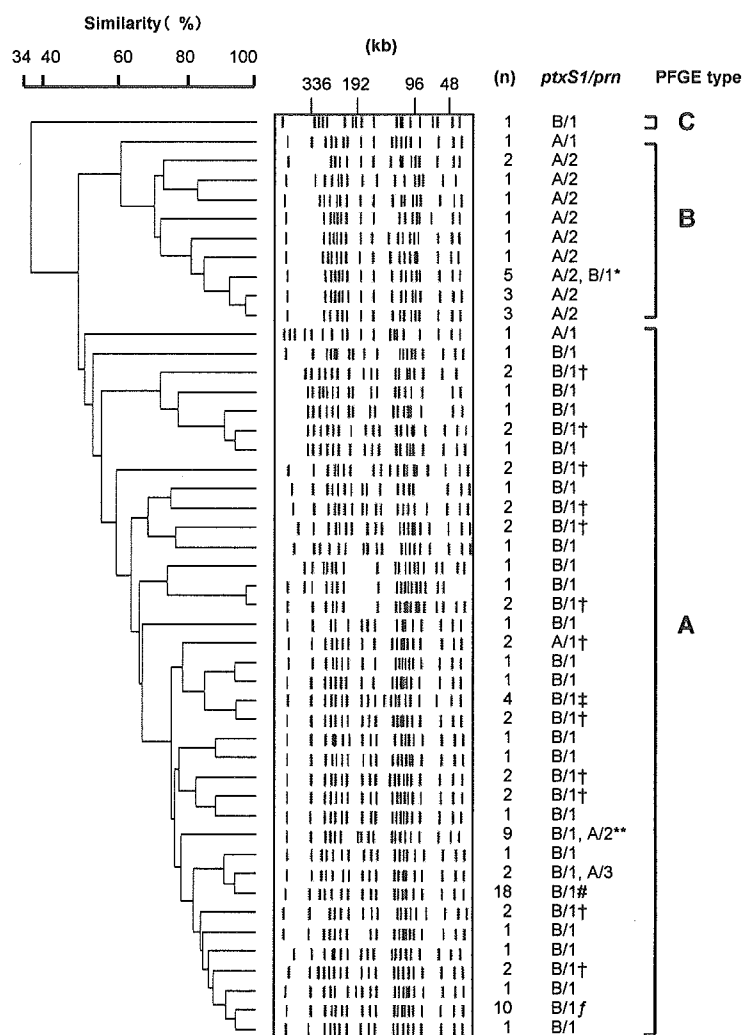


図 1. Dendrogram of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles of 107 Japanese *Bordetella pertussis* strains, 1988-2001. The dendrogram was calculated by UPGMA method. Regions encoding *ptxS1* and the repeats of the *prn* were sequenced for 91 strains selected from the 107 strains. The combination of *ptxS1* and *prn* alleles shown as *ptxS1/prn*, e.g., B/1 indicated a *ptxS1B/prn1*. *, one of 5 strains had *ptxS1B/prn1*; **, one of 9 strains had *ptxS1A/prn2*. The symbols indicated number of sequenced strains: †, one strain; ‡, three strains; #, 17 strains; f, eight strains.

表1. 百日咳菌 52 株に対する各種抗菌薬の MIC 分布

Antimicrobial agent	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Amoxicillin/clavulanic acid	$\leq 0.016-0.25$	0.25	0.25
Piperacillin	≤ 0.016	≤ 0.016	≤ 0.016
Cephalexin	64->256	256	>256
Cefaclor	16->256	32	>256
Cefdinir	16->256	32	64
Ceftidoren	0.125-0.25	0.125	0.25
Cefoperazone	≤ 0.016	≤ 0.016	≤ 0.016
Erythromycin	0.03-0.06	0.03	0.06
Azthreomycin	0.016-0.06	0.03	0.06
Clarithromycin	0.016-0.06	0.03	0.06
Clindamycin	0.25-0.5	0.25	0.5
Quinupristin/dalfopristin	0.5-8	2	8
Tetracycline	0.06-0.25	0.125	0.125
Minocycline	0.06-0.25	0.06	0.125
Ciprofloxacin	0.008-0.125	0.03	0.03
Sparfloxacin	0.004-0.125	0.008	0.008
Levofloxacin	0.008-0.06	0.016	0.016
Gatifloxacin	0.004-0.03	0.008	0.016
Chloramphenicol	0.25-0.5	0.5	0.5
Trimethoprim/sulfamethoxazole	0.016-0.25	0.06	0.125
Rifampicin	0.125-0.25	0.125	0.25

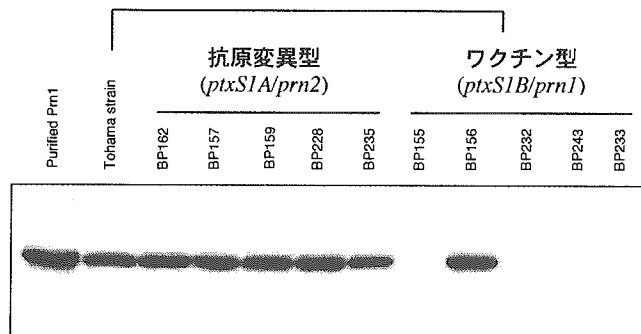


図2. ワクチン型と抗原変異型百日咳菌における Prn の発現全蛋白質 (1 μ g) をイムノブロット解析に供試

表1 パータクチン発現と菌型との関係

菌型 (<i>ptxS1/prn</i> alleles)	分離年	菌株数 (n)	Prn 発現の有無 (%) ^a	
			(+)	(-)
ワクチン型 (<i>ptxS1B/prn1</i>)	1990-1995	15	15 (100)	0 (0)
	1996-2000	20	15 (75)	5 (25)
	2001-2005	20	7 (35)	13 (65)
抗原変異型 (<i>ptxS1A/prn2</i>)	1994-2005	17	17 (100)	0 (0)
変遷型 (<i>ptxS1A/prn1</i>)	1990-2003	8	8 (100)	0 (0)

^aイムノブロット解析

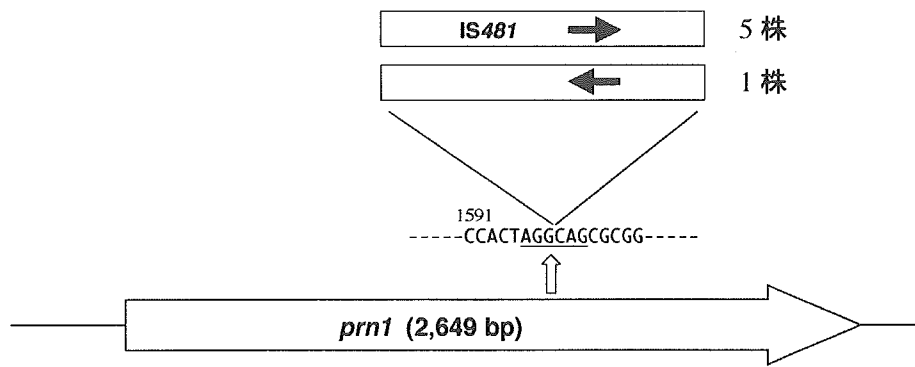


図5. Prn 欠損株 (6株) における IS481 の挿入位置
IS481 遺伝子の矢印はトランスポゼースの転写方向を示した

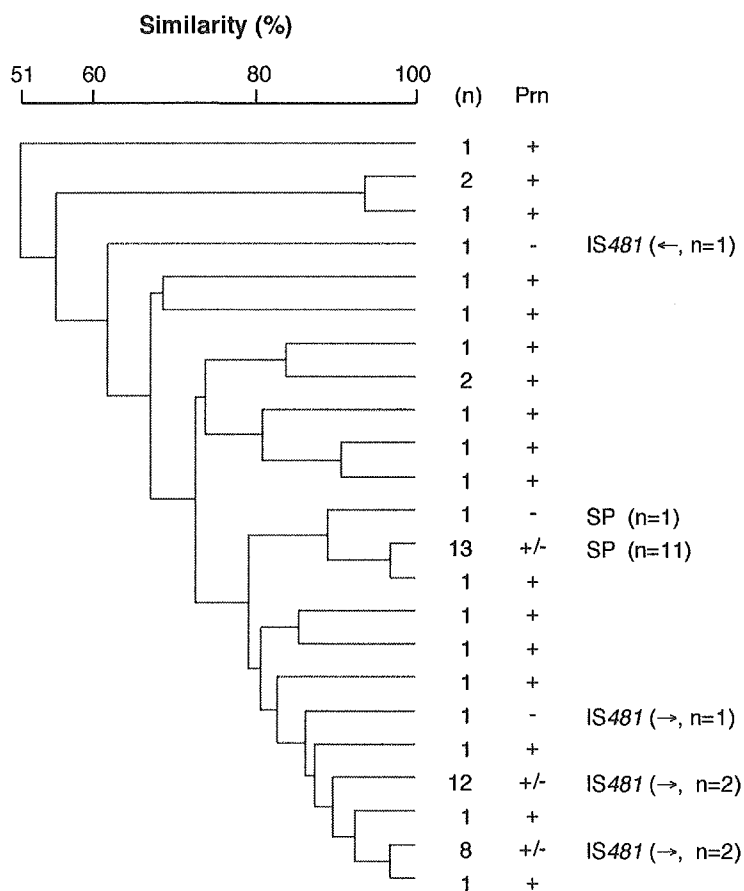


図6. ワクチン型菌株における Prn 欠損株の遺伝子型
矢印 (→) は IS481 の挿入方向を、SP は Prn のシグナル配列欠失株を示した

表3. LAMP法プライマー

LAMP	Organism		Target		Oligonucleotide	
	Gene	Gene Bank No.	Name of primer	Sequence	Sequence	Sequence
LAMP-IS481	IS481	M28220	<i>B. pertussis</i>	IS481-FIP2	5'-GCTTGATGCCCAAGCTCATGGCAACAATGGCTCGGCCTTTTCG-3'	5'-GCTTGATGCCCAAGCTCATGGCAACAATGGCTCGGCCTTTTCG-3'
				IS481-BIP1	5'-AGACCAATGGCAAGGCCGAATTGGGAGTTCTGGTAGGTGT-3'	5'-AGACCAATGGCAAGGCCGAATTGGGAGTTCTGGTAGGTGT-3'
				IS481-F3-1	5'-ATCCAGCGCTTGCTCAC-3'	5'-ATCCAGCGCTTGCTCAC-3'
				IS481-B3-1	5'-TTTCATGGCATCGGCTCG-3'	5'-TTTCATGGCATCGGCTCG-3'
				IS481-Loop B	5'-CATCCAGTCGGCCTTGCGTG-3'	5'-CATCCAGTCGGCCTTGCGTG-3'
LAMP-PTX	PTX	X16347	<i>B. pertussis</i>	PTX-FIP1	5'-TTACGGATCACACCATGGCAGGCTCCTTGGCGCAAAGT-3'	5'-TTACGGATCACACCATGGCAGGCTCCTTGGCGCAAAGT-3'
				PTX-BIP1	5'-AGGCACCATAACGCAGAGGGCCTGTTCTTGGCGTTTGG-3'	5'-AGGCACCATAACGCAGAGGGCCTGTTCTTGGCGTTTGG-3'
				PTX-F3-1	5'-TCCAACACAGGGCATGAACG-3'	5'-TCCAACACAGGGCATGAACG-3'
				PTX-B3-1	5'-AGAAATGCCAGCCACCGT-3'	5'-AGAAATGCCAGCCACCGT-3'
				PTX-Loop F	5'-ACGGTGACCCGGTACCATCG-3'	5'-ACGGTGACCCGGTACCATCG-3'
				PTX-Loop B	5'-GTTGCACTCGGGCAATTCCG-3'	5'-GTTGCACTCGGGCAATTCCG-3'
LAMP-IS1001	IS1001	X66858	<i>B. paraptussis</i>	IS1001-FIP1	5'-TTGATTGGCCTGATCCACGGCCCATGTCGTGGCCAAAGTATGG-3'	5'-TTGATTGGCCTGATCCACGGCCCATGTCGTGGCCAAAGTATGG-3'
				IS1001-BIP1	5'-CGCAACCGTGACAACACCTGGAGGCTGCAGCAATTCCGTCG-3'	5'-CGCAACCGTGACAACACCTGGAGGCTGCAGCAATTCCGTCG-3'
				IS1001-F3-1	5'-GGCGGAGATCGTCTATGACT-3'	5'-GGCGGAGATCGTCTATGACT-3'
				IS1001-B3-1	5'-ACATAGACCGTCAGCAGCG-3'	5'-ACATAGACCGTCAGCAGCG-3'
				IS1001-Loop F	5'-ACCCGATCAATGACCTCTCGT-3'	5'-ACCCGATCAATGACCTCTCGT-3'

表4. 各LAMP法の特異性

Strains	Reaction of each LAMP method		
	PTX	IS481	IS1001
<i>B. avium</i> CCUG 13726 ^T	-	-	-
<i>B. bronchiseptica</i> CCUG 219 ^T	-	-	-
<i>B. hinzii</i> CCUG 22847 ^T	-	-	-
<i>B. holmesii</i> CCUG 34073 ^T	-	+	+
<i>B. holmesii</i> CCUG 34074	-	+	+
<i>B. holmesii</i> CCUG 33848	-	+	+
<i>B. holmesii</i> CCUG 47500	-	+	+
<i>B. pertussis</i> CCUG 30873 ^T	+	+	-
<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 ^T	-	-	+
<i>B. petrii</i> CCUG 43448 ^T	-	-	-
<i>B. trematum</i> CCUG 32381 ^T	-	-	-

表5. *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6. *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