

January 23 (Tues)

Workshop 3: Diagnosis, bacterial colonization and virus-bacterial interactions

8:30 to 10:00 Session 1. Diagnosis and management

Moderators: Dr. L Bakaletz & Dr. K Kawakami

1. Dr. Sorasak Lochindara (Children Hospital): Assessment and management of children presenting with wheeze and fast breathing.
2. Dr. Thanyanat Bunnag (Children Hospital): Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae* in children with community-acquired pneumonia in Thailand.
3. Yoshichika Arakawa (National Institute of Infectious Diseases): Development and Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Bordetella pertussis* Infections.

10:00-10:30 Coffee break

10:30-12:00 Session 2. Bacterial colonization and virus-bacterial interactions

Moderators: Dr. W Shafer & Dr. H Oshitani

4. Dr. Jeffrey Weiser (University of Pennsylvania): Mechanisms of competition among respiratory tract pathogens.
5. Dr. Lauren Bakaletz (The Ohio States University): Mechanisms of upper respiratory tract viral predisposition to bacterial superinfection of the mammalian airway.
6. Dr. Hisakazu Yano (Sendai Virus Center): Acute otitis media associated with respiratory virus infection.

12:00-13:00 Lunch

13:00-14:30 Session 2. Bacterial colonization and virus-bacterial interactions

Moderators: Dr. L. Lambert & Dr. N Yamanaka

7. Dr. Timothy Murphy (University of Buffalo): Pathogenesis of *Haemophilus influenzae* respiratory tract Infection: the resurrection of IgA protease.
8. Dr. Michael Apicella (University of Iowa): Studies the development of novel antimicrobials for nontypeable *Haemophilus influenzae* infection and biofilm Formation.

9. Dr. Ryuichi Uchida (Osaka University): A hospital-based study on respiratory virus-bacteria-host interaction on the occurrence and outcome of acute lower respiratory tract infections in Thailand.

14:30-14:40 Closing Remarks Dr. L Lambert & Dr. H Suzuki

14:40-15:00 Coffee Break

15:00-17:00 Bacterial Subcommittee Meeting

**Annual Report of the Acute Respiratory Infections (ARI) Panel
US Japan Cooperative Medical Science Program
2006**

U.S. – Japan ARI Panel Objectives:

The Acute Respiratory Infections (ARI) Panel was formed in 1997. Its long-term objectives are to:

- Understand the etiology and long-term health effects of ARIs in US/Japan and Pacific Rim countries
- Stimulate research on ARI pathogens, leading to a better understanding of areas such as pathogenesis, immunogenicity
- Conduct research on development of vaccines and therapeutics against selected ARI pathogens

U.S.-Japan ARI Panel Annual Meeting - 2006

Due to the diversity of pathogens that cause acute respiratory infections, the Acute Respiratory Infections (ARI) Panel, which created in 1997, was designed to have two separate but complimentary subcommittees—one focusing on viral infections, the other on bacterial infections. Formal ARI Panel meetings are integrated with representatives from both the bacterial and viral subcommittee, and meeting participants giving scientific presentations followed by questions and discussion. At the end of the presentations, ARI panel members and interested participants hold separate subcommittee meetings to identify and discuss opportunities for collaboration. Following the subcommittee meetings, panel members and invited participants reconvene and summarize their subcommittee discussions for all of the ARI panel members and interested participants.

Because of the continuing avian and human outbreaks of influenza A/H5N1 many of which are occurring in Southeast Asia, the focus of the US Japan Cooperative Medical Science Program's annual Emerging Infectious Diseases Meeting held in Singapore on November 16-18, 2006 focused on the threat of pandemic influenza. This meeting, and its associated workshops, served as the annual meeting for the ARI panel's viral respiratory infections subcommittee (a brief summary of the meeting areas, the workshops and agenda for the EID meeting is included in Appendix A). During the meeting, members of the ARI viral infections subcommittee met informally to discuss and identify areas for collaboration.

As a result of the Singapore meeting, the eleventh joint annual meeting of the U.S.-Japan Acute Respiratory Infections Panel, which was held in Osaka Japan on January 21-23, 2007 focused in large part on bacterial respiratory infections and the increasing threat of bacterial resistance in Japan and Asia and possible strategies for its control. True to the panel's interest in both bacterial and viral respiratory infections, the 11th annual meeting also contained a session on bacterial-viral or bacterial-bacterial co-infections and a presentation on the emergence and spread of adamantane-resistant influenza virus strains in Asia.

SUMMARY
2007 ARI Panel Meeting
U.S. Cooperative Medical Sciences Program
Singapore, November 16-18, 2006
Osaka Japan, January 21-23, 2007

The main topics highlighted at the meeting included:

1. Assessing the spread and impact of drug resistant bacteria in Japan and other Asian countries;
 - Identifying the factors contributing to these increases and the potential control measures
 - Understanding research activities underway to develop novel antimicrobial agents or new strategies to increase the effectiveness of currently available antibiotics.
2. Assessing the use of pneumococcal vaccines and their impact
3. Assessing the clinical significance of co-infections and identifying pathogenic mechanisms and new antimicrobial targets

Included below is a summary of the presentations during the meeting – both by panel members and invited participants. The meeting agenda is provided in Appendix B.

A series of presentations underscored the dramatic global increases in appearance of bacterial resistance with many of the highest rates being reported in Asian countries. The incidence of many of the drug-resistant pathogens that were highlighted have been steadily increasing in Japan and other Asian countries, including penicillin and macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae*, beta-lactamase negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*, including MRSA, and drug resistant *P. aeruginosa*, and *Mycoplasma pneumoniae*. Several of the presentations by Japanese participants highlighted collaborative studies on the incidence of drug-resistant bacterial infections being undertaken with colleagues from Thailand, Vietnam, Turkey, and Uganda. It was also noted that a significant number of acute respiratory tract infections caused by drug resistant bacterial strains have significant morbidity and mortality in pediatric populations and include such syndromes as pharyngitis, epiglottitis, bronchopulmonary infections, pneumonia, and acute otitis media (AOM). In addition to concerns about the increasing incidence of bacterial resistance, results of a study summarizing the emergence of amantadine resistant influenza A viruses in Japan and Vietnam and its impact on clinical illness was also presented.

A number of factors thought to be contributing to the persistence and increasing incidence of drug resistant bacterial infections in Japan and other Asian countries was discussed. The factors identified included: the ease of access (“over the counter”) availability of many antibiotics, the expectations and attitudes on the part of both

physicians and patients that antibiotics should be given for all respiratory illnesses and the pressure on physicians to prescribe the most expensive antibiotics, the use of low doses of antibiotics, and the agricultural use of antibiotics and other cultural issues.

Efforts underway aimed at controlling spread of these infections, include increasing the public's and physician awareness of the over prescription of antibiotics; increasing awareness of newly revised guidelines for physicians for the treatment of community-acquired pneumonia, the treatment of children AOM, and for the management of atypical pneumonia. Other studies currently under evaluation include using 3rd bronchodilator dose to decrease antibiotic use in children with wheezing and fast breathing and evidence from one study that up to a third of acute otitis media cases which are commonly treated with antibiotics were caused by viruses.

The impact and use of the recently introduced pneumococcal conjugate vaccine and the polysaccharide vaccine was the subject of a second series of presentations and discussions. Reports included: modeling efforts demonstrating that increasing the number of doses of the pneumococcal conjugate vaccine given can decrease the incidence of invasive disease and provide herd immunity across all age populations; a collaborative Japanese-Ugandan clinical study indicating that a single dose of the conjugate vaccine could be an important adjunct to HAART therapy; the vaccination of elderly patients with chronic lung disease with both the polysaccharide vaccine and influenza vaccine resulted in a reduction in the exacerbation of lung disease compared to recipients who only received the influenza vaccine; and efforts to develop more effective vaccines by defining the impact of innate immune responses to the vaccine.

The third main focus of the meeting was to share information about the incidence and impact of respiratory co-infections and ongoing research efforts to understand bacterial colonization and mechanisms of pathogenesis. Reports included: identifying the molecular and immunological mechanisms by which bacterial pathogens "compete" to colonize the respiratory tract; how bacterial-viral co-infections result in cellular dysregulation; research efforts to characterize new virulence factors such bacterial proteases; identifying potential targets for the development of a new class of antimicrobial agents, such as efflux pumps or important pathogenic determinants; and a very promising report describing a new simple diagnostic method (LAMP method) for the detection of *Bordetella pertussis*.

Action items and collaborative topics that were discussed at the bacterial subcommittee meeting, held on January 23, 2007, included:

- Sharing reagents (strains, primers) among Japanese and US scientists to determine if bacterial isolates in one country have similar phenotypes to those in the other;
- Exchanging information aimed at promoting consistency in antibiotic treatment guidelines, including criteria used by both the US and Japan to "classify" bacterial isolates as being sensitive vs. resistant;
- Identifying and utilizing training opportunities – with an emphasis on scientists in developing countries. Possible training areas that were discussed included

- broadening experience with the LAMP diagnostic, clinical research design and implementation, and training in laboratory assays
- Facilitating connections with other scientists and public health personnel, including CDC/FDA re the LAMP diagnostic, providing more information on the latest methods for bacterial strain genotyping
 - Identifying areas of mutual interest to apply for NIH funding, including a collaboration that was identified to evaluate drug resistant *M. pneumoniae*
 - Plan for the 2008 meeting to be held in the U.S.

II. 分担研究報告

日米医学協力研究会 急性呼吸器感染症(ARI)部会 報告書
—百日咳菌の遺伝子型別推移と迅速診断に関する検討—

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

1994年(平成6年)に予防接種法が改正され、生後3カ月の乳児へのDTaPワクチン接種が可能となって以降、我が国では、百日咳患児の報告数は引き続き減少した。しかし、依然として年間、1000～2000人代の患児が、小児科定点施設から百日咳として報告されており、2005年(平成17年)は、3,065の小児科定点より1,358名(1定点あたり0.44名)が報告されている代表的な細菌性の急性呼吸器感染症である。現時点における、百日咳に関する問題点を整理し、新規に開発した簡便なLAMP法による検出法を検討した。

研究協力者

蒲地一成 国立感染症研 細菌第二部

A. 研究目的

小児の細菌性急性呼吸器感染症(ARI)の原因菌としては、肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)とともに、百日咳菌は、主要な細菌である。しかし、百日咳菌の分離培養が難しいなどのため、特徴的な咳症状や末梢血のリンパ球増加などの臨床所見により診断される事が多く、回復期の血中抗体価の上昇を確認する検査などは、特異度や感度に問題があり、最近ではあまりおこなわれていない。しかし、ワクチン接種前の新生児での感染事例の報告などもあり、また、ワクチン未接種児童の死亡事例も数年前に確認されており、百日咳は、依然として細菌性の急性呼吸器感染症の重要な起因菌の一つと認識されるべきであり、それらに関する現状および今後の検討課題について若干の考察を行った。

B. 研究方法

細菌第二部でこれまで実施して来た、国内分離の百日咳菌の遺伝子型別に関する考察とともに、独自に開発したLAMP法による百日咳菌の簡便、迅速検査法について検討を行った。

C. 研究結果

百日咳菌の遺伝型の変遷: 現在、臨床分離される百日咳菌について型別を行う場合、遺伝的な型別

法が一般的に採用されつつある。つまり、百日咳毒素のS1サブユニットの遺伝子では、*ptxS1A*と*ptxS1B*の二種類に分類され、菌の表層蛋白であるパータクチンの遺伝子では、*prn1*、*prn2*、*prn3*の3種類に分けられ、それらの組み合わせから、現在、臨床現場で循環している百日咳菌は、大きく分けて*ptxS1B/per1*と*ptxS1A/per2*との二種類に大別される。PFGE解析では、A、B、Cの3タイプに大まかに分類されるが、*ptxS1B/per1*型はPFGEではAとCタイプを含み、*ptxS1A/per2*型は、PFGEはB型と判定される事が多い。ワクチン株であるTohama株は、*ptxS1B/per1*型でありPFGE型はAに属するが、近年、国内分離株では、*ptxS1A/per2*型のPFGEがB型と判定される株が、徐々に多くなる傾向が認められている(表1)。米国では、近年、百日咳の増加が指摘されており(図2)、その原因については不明であるが、遺伝子型の変化とともに成人の百日咳菌保菌者の存在が指摘されている。

百日咳菌の迅速、簡便検出法: 百日咳菌の培養は、一般的にボルデ・ジャングー(Bordet-Gengou)培地が用いられるが、この培地を常備している細菌検査室は国内では稀であり、現在、百日咳疑いの患児からの百日咳菌の分離は、小児科でも殆ど行われていない。そこで、我々は、百日咳菌の特異的遺伝子を簡便に検出する方法を考案し、臨床現場での実用性の評価を行っている。この方法はLAMP法と呼ばれる基本原理を用い、恒温(60℃代)でDNAを特異的に増幅する方法であり、我が国で開発された画期

的な遺伝子増幅・検出法である。LAMP 法の原理の詳細は省略するが、百日咳が疑われる患児の咽頭拭い液を用いた結果では、培養法より簡便かつ迅速で感度が高く、また、既存の PCR 法と比べても、感度とともに特異度も高い事が確認されている。現在、感染研では、培養法とともに LAMP 法による検査が行われ、成果を上げつつある。また、地方衛生研究所にも、LAMP プライマーを提供し、医療機関からの要請があれば、検査や解析に応じる事ができる体制を整備しつつある。さらに、WHO との共同研究として、発展途上国との共同解析も継続中であり、LAMP 法の有用性が確認されつつある。

D. 考察

百日咳は、国内では重症化する事も少なくまた、予後も比較的良好な急性呼吸器感染症であり、近年、生後3ヵ月でのワクチン接種の普及により、臨床現場で、百日咳に遭遇する事は、1994 年以前と比べ稀となっている。そこで、百日咳は、第一線の臨床家にとっても認知度の低い疾患となりつつある。しかし、ワクチンの普及していない国々や地域では、百日咳は依然として小児の死亡原因として重要な位置を占めており、ワクチンの接種の継続や高いワクチン接種率の維持が我が国でも重要な疾患と考えるべきである。現在の百日咳ワクチンは、主として、百日咳毒素と PHA と呼ばれる血球凝集蛋白を主成分とする、精製ワクチンであるため、流行株の抗原変異により、その有効性が変化する可能性があり、我々は、国内の臨床分離株について、定期的に菌の分離を試み、その遺伝的な変化を監視して来た。現在、PFGE 型別で B 型株が一部の地域で漸増する傾向が見られるが、それらの株は、ワクチン株である Tohama 株 (A 型株)と、遺伝的には若干異なるものの、ワクチンの有効性を左右するような大きな変異は起きておらず、現在のワクチン接種を継続することにより、小児での百日咳の発症を十分に阻止する事ができると考えられる。今や、「希少感染症」的な印象を持たれつつある百日咳ではあるが、引き続き、高いワクチン接種率を維持する事が、本疾患の発症予防のために重要と考えられる。

百日咳の診断は、もっぱら特徴的な咳症状や末梢の血液検査結果に基づいて行われており、病原体の分離や同定は殆ど行われていない。これは、百日咳菌の培養には、専用の培地が必要であり、それらを常備するには経費と手間がかかる為である。また、血清学的な診断キットもその感度や特異度に問題が指摘されており、最近では、販売が見合わせられている。本来であれば、百日咳は臨床症状とともに、百日咳菌かそれに由来する特異的な抗原、DNA などを検出する試験法を用いてより正しく診断が行われる必要がある。そこで、我々は、国内で基本技術が開発された LAMP 法を百日咳菌 DNA の検出に応用する為、特異的な LAMP プライマーを試行錯誤の末設計し、その実用性を検証しつつある。国内での百日咳患児の発生数が少ないため、WHO のプロジェクトにより、カンボジアでの症例についてこの検査法を適用し、その有用性を評価したが、培養法や既存の PCR 法より優れた試験法である事が確認されている。LAMP 法は、PCR 装置や電気泳動装置が不要で、かつ、DNA の増幅結果が肉眼で判定できるため、それらの機材が設置されていない、国内の細菌検査室とともに、発展途上国でも実施できるという大きなメリットを含んでいる。そこで、今後は、LAMP 法による百日咳の診断法の普及により、より正確な罹患率などを把握する事が可能となり、百日咳の低減化に貢献するものと期待される。

E. 結論

百日咳については、遺伝的に異なる亜種が出現し、それらは世界的に徐々に増加傾向にあるが、ワクチン効果に影響を及ぼすような事態とはなっていない。また、我々は、百日咳を菌の分離や血清学的検査をすること無く、簡便に百日咳菌の遺伝子を検出することにより、百日咳を判定、診断できる LAMP 法を開発したが、この方法は、既存の検査法より簡便、迅速であり、しかも特異度、感度も高いため、PCR 装置の設置されていない国内や発展途上国の臨床現場での普及が期待される。

F. 健康危険情報

海外の先進国では、小児の百日咳は一般的に減少傾向にあるが、成人を含めた百日咳の報告件数は、米国でも増加傾向にあり、高いワクチン接種率を維持するとともに、引き続き、その動向を監視する必要がある。

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. Kamachi K and Arakawa Y, Development and Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Bordetella pertussis* Infections. US/Japan Cooperative Medical Science Program, ARI Panel Meeting, January 21-23, 2007, at Osaka, Japan

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. Kodama A, Kamachi K, Horiuchi Y, Konda T, Arakawa Y. Antigenic divergence suggested by correlation between antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates in Japan. J Clin Microbiol. 2004 Dec;42(12):5453-7.

2. Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, Horiuchi Y, Kojima K, Takahashi M, Arakawa Y. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol. 2006 May;44(5):1899-902.

図1. 百日咳患者報告数の推移, 1982年第1週~2004年第53週

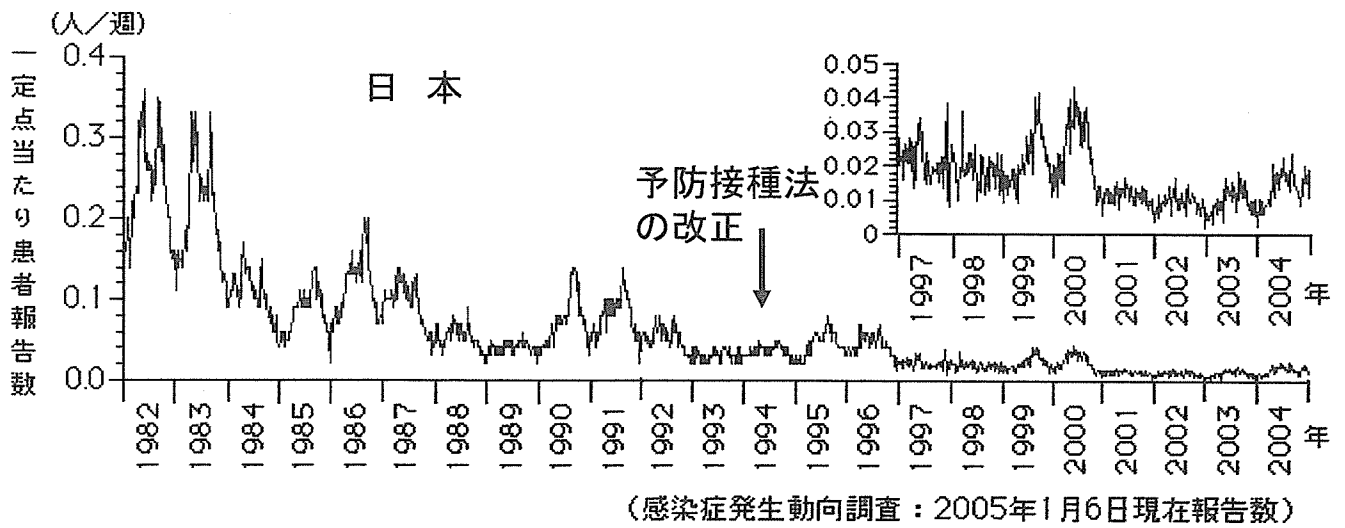


図2. 米国における百日咳の増加

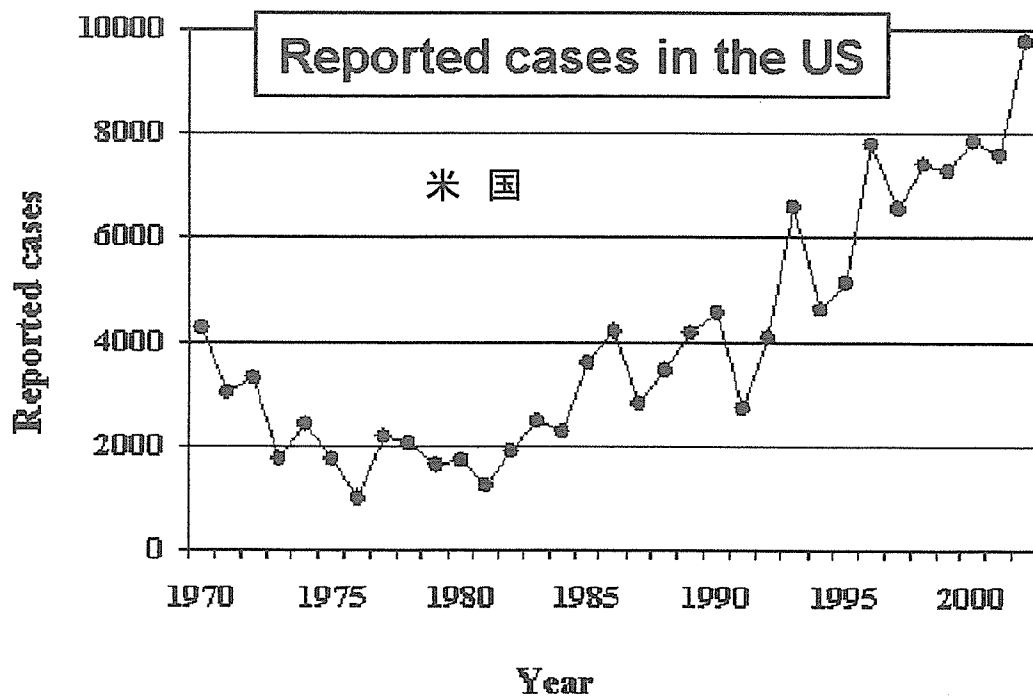


表1 国内で分離された百日咳菌株の年代順のPFGE型の変遷(1988-2001)

年 (分離株数)	PFGE 型 (%)		
	A型	B型	C型
1988 - 92 (35)	100(35)	0	0
93 - 95 (15)	73(11)	27(4)	0
96 - 98 (19)	95(18)	0	5(1)
99 - 2001 (38)	61(23)	39(15)	0
全体 (107)	81(87)	18(19)	1(1)

図3 我が国で分離された百日咳菌の*ptxS1*型と*prn*型

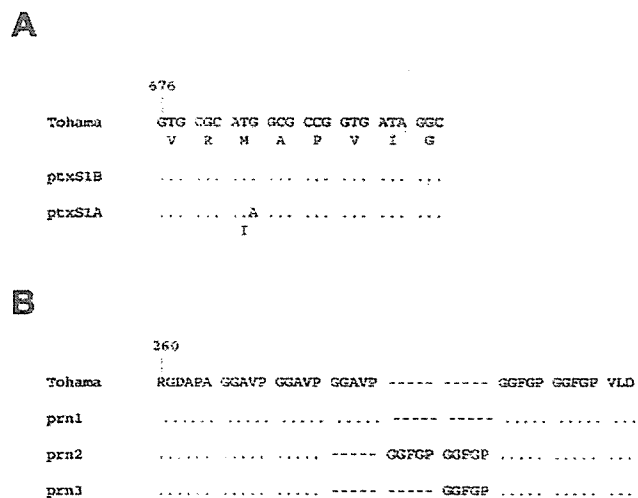


図4 我が国で分離された百日咳菌のPFGEパターンと*ptxS1/prn*型

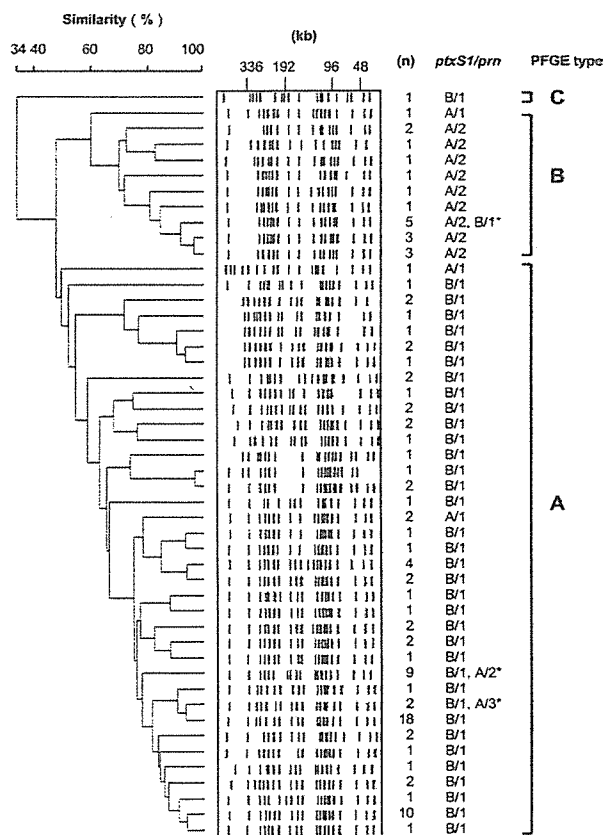


図4 LAMP法による百日咳菌遺伝子検出用LAMPプライマー

Targeting the pertussis toxin promoter region

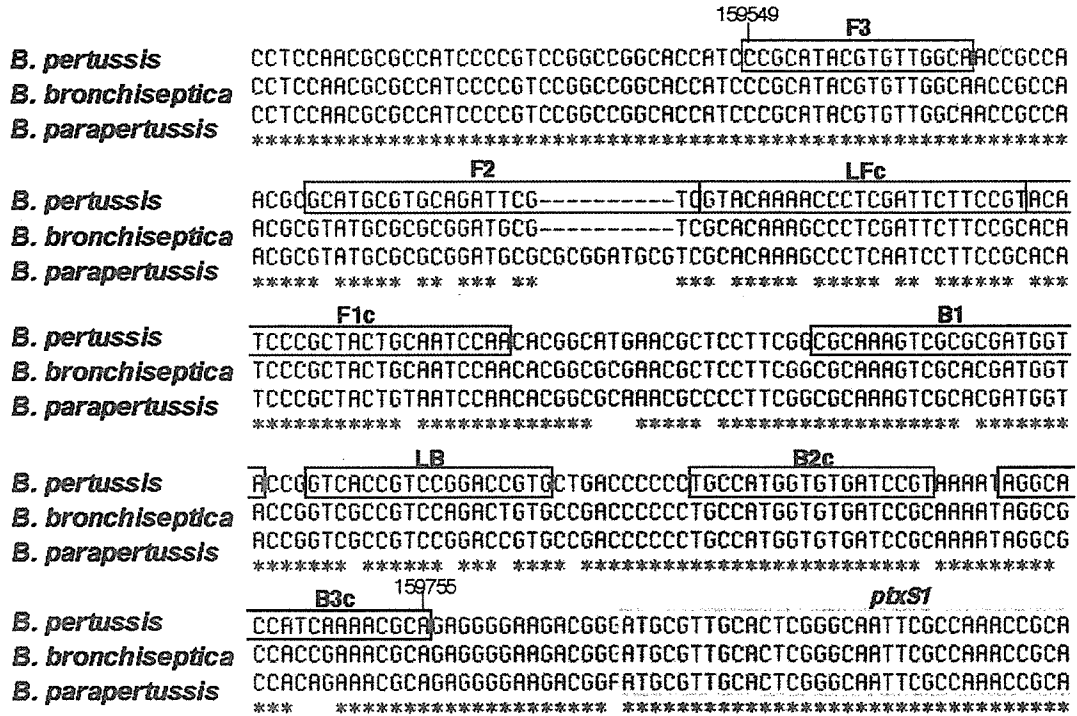


図5 LAMP法による百日咳菌遺伝子の増幅・検出

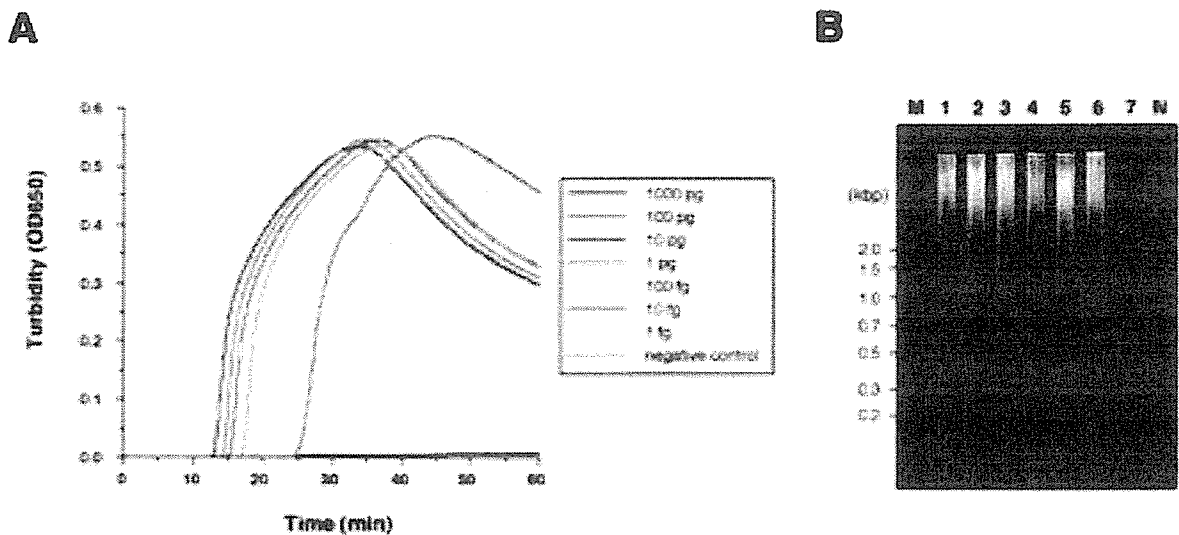


表2 LAMP法とPCR法の特異度の比較結果

Strain	Result by ^b :		
	LAMP ^c	IS481-PCR	PTpI/p2-PCR
<i>B. pertussis</i>			
Tohama	+	+	+
Yamaguchi	+	+	+
BP256 ^d	+	+	+
BP257 ^d	+	+	+
BP258 ^d	+	+	+
BP259 ^d	+	+	+
BP260 ^d	+	+	+
BP289 ^d	+	+	+
BP290 ^d	+	+	+
<i>B. paraptussis</i>			
ATCC 15237	-	-	-
ATCC 15311	-	-	-
BAA-587	-	-	-
BPP01 ^e	-	+	-
<i>B. hinzii</i>			
ATCC 51730	-	-	-
<i>B. holmesii</i>			
ATCC 51541	-	+	-
<i>B. avium</i>			
ATCC 35086	-	-	-
<i>B. bronchiseptica</i>			
R05 ^f	-	-	-

^a For PCR detections, 1 ng of DNA was tested. For LAMP assay, 10 fg DNAs of *B. pertussis* strains and 1 ng DNAs of other *Bordetella* species were tested.

^b +, LAMP or PCR amplification; -, no LAMP or PCR amplification.

^c Turbidity assay with a 60-min reaction.

^d Isolated from Japanese patients in the period 2004 to 2005.

^e Isolated from a Japanese patient in 2002.

^f Isolated from a rabbit in 1995.

表3 LAMP法と各種PCR法と、培養法との比較結果

Culture result	No. of specimens tested by:								
	LAMP ^a			IS481-PCR			PTpI/p2-PCR		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Positive	5	0	5	5	0	5	4	1	5
Negative	19	88	107	19	88	107	2	105	107
Total	24	88	112	24	88	112	6	106	112

^a Fluorescent-dye-mediated naked-eye visualization with a 40-min reaction.

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

「インフルエンザウイルスの感染メカニズムの解析」

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： A型インフルエンザウイルスの RNA ゲノムは、ウイルスポリメラーゼ(PA、PB1、PB2) および NP 蛋白質と共に RNA-核蛋白質複合体 (vRNP) を形成し、核内において転写、複製される。vRNP の最も主要な構成蛋白質である NP 蛋白質は、核移行シグナル (NLS) として働く 2 つのアミノ酸配列を有するが、各 NLS のウイルス増殖に与える影響は不明である。本研究では、これら 2 つの NLS を解析し、一方は NP 蛋白質の核内移行に、他方は核小体移行に重要であることが明らかにした。さらに、核小体移行をつかさどる NLS は、ウイルスの増殖に不可欠であることが示唆された。

A. 研究目的

A 型インフルエンザウイルスは、RNA ウィルスでありながらゲノム RNA が感染細胞の核内に移行する。しかし、この核内移行のメカニズムには、未だ不明な点が多い。そこで、本研究では、核内移行に重要な役割を果たしている NP 蛋白質に着目し、NP 蛋白質に存在する 2 つの核移行シグナル (NLS) のウイルス複製過程における重要性を明らかにすることを目的として解析を行った。

B. 研究方法

NP 蛋白質に存在する、2 つの NLS の両方または一方に変異を導入し、NP 蛋白質の細胞内局在、ウイルス RNA の転写、感染性ウイルス様粒子の形成に与える影響を解析した。さらに、リバーシジェネティクス法を用いて、変異 NP 蛋白質を発現する組換えウイルスを作製し、増殖能を調べた。

C. 研究結果

NP 蛋白質の細胞内局在から、2 つの NLS のうち、一方は NP 蛋白質の核内移行に、他方は核小体移行に重要であることが明らかとなった。核内移行に関与する NLS に変異を入れた場合、ウイルス RNA 転写能やウイルス様粒子形成能に大きな変化は見られなかったが、組換えウイルスの増殖能は低下した。一方、核小体移行に関与する NLS に変異を入れた場合、ウイルス RNA 転写能が著しく低下し、増殖性のある組換えウイルスも作出できなかった。

D. 考察

A 型インフルエンザウイルスが効率よく増殖するためには、NP 蛋白質の持つ 2 つの NLS が協調して働く必要があり、特に核小体移行をつかさどる NLS は、ウイルスの増殖に不可欠であると考えられた。さらに本研究により、イ

ンフルエンザウイルスの増殖には、NP 蛋白質が核小体に移行することが重要であることが示唆された。

E. 結論

インフルエンザウイルスの NP 蛋白質に存在する 2 つの NLS のうち、核小体に移行する NLS が増殖に必須である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. "Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication" *J Virol* 81:30-41, 2007.

2. 学会発表

Ozawa M, Fujii K, Muramoto Y, Yamada S, Yamayoshi S, Takada A, Goto H, Horimoto T, Kawaoka Y. "Contributions of two nuclear localization signals of influenza A virus nucleoprotein to viral replication" The 6th Awaji international forum on infection and immunity, Awaji, Japan, Sept, 2006

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 18 年度日米医学協力計画 A R I 部会研究補助金

研究報告書

「急性呼吸器感染症発症のメカニズムと疫学、感染予防・制御に関する研究」
班

分担研究者：山中 昇

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

-中耳炎起炎菌の薬剤耐性遺伝子変異に対するガイドライン治療の影響について

【背景】

近年、小児において抗生物質による治療にもかかわらず、遷延化、反復する難治性急性中耳炎が急増しており、日常臨床の大きな問題となってきた。その原因として、薬剤耐性菌の急増および乳幼児の鼻咽腔における保有率が高いこと、低年齢保育の普及などの環境の変化などがあげられている。このような状況において、適切な小児上気道感染症対策、治療薬としての抗生物質の適切な選択が今まで以上に重要となってきた。

現在まで薬剤耐性の出現頻度と薬剤使用量は密接に関係していることが多くの論文で指摘されている。Austin は、通常、薬剤使用の休止後や制限後の効果が減弱する時間に比べ、選択圧がかかる状況において耐性が出現する時間は非常に短いこと、耐性を大幅に低下するには、薬剤使用量も同様に大幅に減少する必要があることを指摘した。英国や米国、他の西欧諸国では、抗菌薬の消費量を減少する試みから、診療ガイドラインが作成されており、急性中耳炎のマネジメントに大きな影響を与えている。本邦においても 2006 年に鼓膜と臨床像のスコア化による重症度分類を用いて、新しい急性中耳炎の診療ガイドラインが作成された。このような診療ガイドラインに基づいたマネジメントにより、薬剤耐性に対する抑制効果が現れるのかという点に大きな関心が寄せられている。

【現在までの研究結果（本班研究）】

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についての検討

方法：肺炎球菌において、ペニシリン結合蛋白遺伝子(pbpla、pbp2x、pbp2b)における遺伝子の変異およびマクロライド耐性遺伝子(emAM、mefE)の発現を

PCR 法により検討し、また、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。さらに、これらの薬剤耐性遺伝子の検索と従来から用いられている微量液体希釈法および Disk 法による薬剤感受性検査との比較検討を行った。

研究結果：

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**)の変異を検討した結果、245 株(28.3%)において遺伝子変異は認められなかったが、333 株(38.5%)で **pbp1a**, **pbp2b**, **pbp2x** の 3 遺伝子の変異が認められ、78 株(9%)に 2 遺伝子変異が、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は全体の 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ことである。

一方、マクロライド耐性肺炎球菌に関しては、**mefE** および **ermB** 遺伝子の発現を検討したところ、30%がいずれの耐性遺伝子も発現していなかったが、32.5%が **mefE** を、34%が **ermB** を発現しており、さらに 3.4% (28 株)において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の検討を行ったところ、**bla** 遺伝子の発現は 4.7%に、**ftsI** 遺伝子(**gBLNAR**)は 23.3%に発現していた。

以上の結果から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。

【目的】

起炎菌の遺伝子型、特にペニシリン結合タンパク遺伝子における遺伝子変異、このような耐性菌の子供間の伝播様式、および急性中耳炎症例が再燃あるいは再発したのかを確認する上で、PCR 法やパルスフィールドゲル電気泳動法のような分子生物学的解析が有用であり、薬剤耐性菌感染症に対する新しい治療戦略を構築する上で極めて重要な情報を提供する。本研究では診療ガイドラインに基づいた急性中耳炎管理が起炎菌の薬剤耐性頻度にどのように影響するか、

特に肺炎球菌とインフルエンザ菌のペニシリン結合蛋白 (PBP) における遺伝子変異の出現頻度に対する影響について検討を行った。

【方法】

1) 急性中耳炎のスコアリングシステムと重症度分類 (図 1)

① 臨床症状のスコアリング

耳痛、啼泣／不機嫌、発熱を 3 項目とした評価を行うが、乳幼児で耳痛を訴えない場合には、啼泣／不機嫌を評価し、スコアを 2 倍する。また、発熱については、平熱が 37℃ 以上の場合には、平熱+1℃ 未満、平熱+1℃ 以上の基準で評価を行う。発熱は急性中耳炎の診断に特徴的な症状ではないが急性中耳炎の重症度を決定する上で重要な症状となる。

② 鼓膜所見のスコアリング

鼓膜所見に関しては、膨隆、発赤、光錐減弱を 3 項目と指標化を行う。なかでも、鼓膜の膨隆と、発赤は急性中耳炎の重症度と決める上で重要な所見である。一方光錐減弱は、発赤や膨隆が軽快した後の急性中耳炎の経過を評価する上で、重要な所見となる。

③ 重症度

臨床症状および鼓膜所見のスコアをそれぞれ加算して、図 1 の重症度クロス表から軽症 (Mild), 中等症 (Moderate), 重症 (Severe) に分類する。

図 1

Staging of severity based on scoring system
(Wakayama Study)

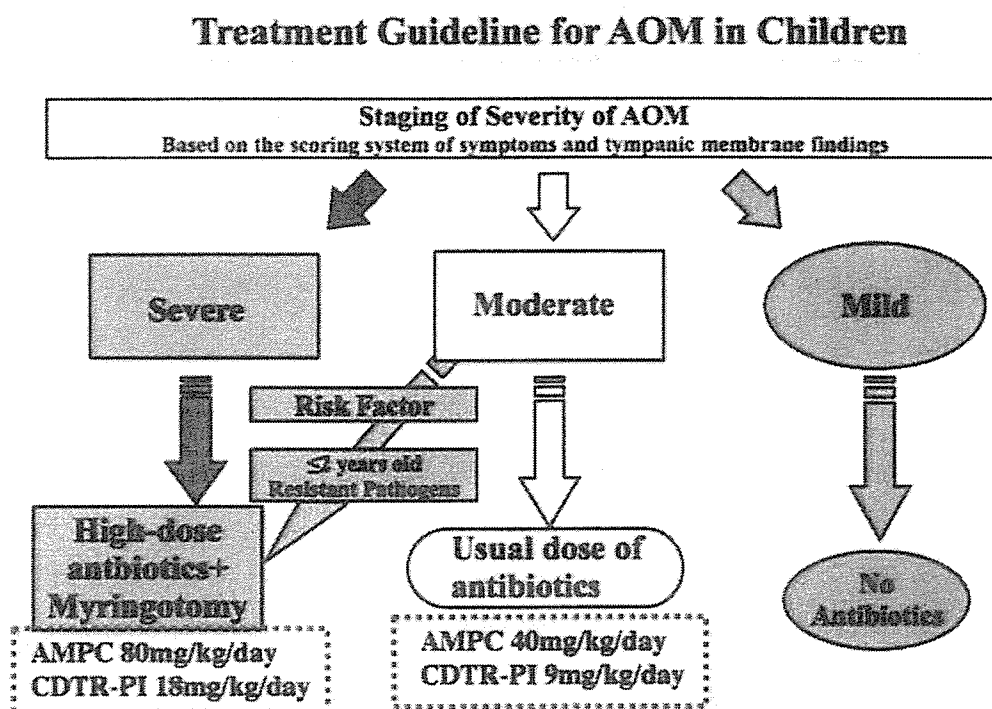
Symptoms				Staging	Symptom score					
	0	1	2		1	2	3	4	5	6
Discharge	0: none	1: mild	2: severe	Tympanic membrane	1	Mild				
Cryopurulent discharge	0: none	1: mild	2: severe							
Fever	0: <37.0°C	1: 37.1~41.0°C	2: >41.0°C		3	Moderate				
					4					
Tympanic membrane					5	Severe				
(1) Without otitis media					6					
Bulging	0: none	1: mid	2: severe							
Erythema	0: none	1: mid	2: severe							
Cloudy	0: none	1: mid	2: severe							
(2) With otitis media										
Characteristics	1: white	2: moderate	3: much purulent							
	1: severe	2: moderate	3: purulent							

Hatomi M. Eur J Pediatr. 164:3 2005
Hatomi M. Ann Otol Rhinol Laryngol. 114:66 2004

2) 重症度にもとづいた治療選択 (図2)

治療選択の基本は、軽症例には抗菌薬を使用しない、中等症にはペニシリンを第一選択薬として常用量による治療を行う、重症例には高用量のペニシリン投与と鼓膜切開による排膿を行う。

図2



3) 治療ガイドラインにもとづいた治療による耐性遺伝子変異に及ぼす影響の検討 (表1)

治療ガイドラインにもとづいた治療選択を行った和歌山地区の急性中耳炎症例と治療ガイドラインを採用していない全国各施設より分離された肺炎球菌およびインフルエンザ菌について、*pbp* 遺伝子変異の頻度を検索し比較検討した。

表1

サーベイランス	肺炎球菌	インフルエンザ菌
全国	296 株	315 株
和歌山	1076 株	711 株

【成績】

1) 全国サーベイランスにおける肺炎球菌およびインフルエンザ菌の遺伝子変異

2003年に行われた耳鼻咽喉科感染症検出菌サーベイランス（日本耳鼻咽喉科感染症研究会）における分離菌について、*pbp* 遺伝子変異を検討した（図3，4）。肺炎球菌では3遺伝子変異を認めた株は30.8%、1または2遺伝子変異は61.8%に認められており、遺伝子変異を認めない株は7.4%に過ぎなかった。またマクロライド耐性遺伝子の検索では、耐性遺伝子を認めなかった株は22%のみで、残りの78%は *mefA*、または *ermB* を認めており、耳鼻咽喉科領域から検出される肺炎球菌が高度にペニシリンおよびマクロライド耐性化をきたしていることが判明した（図3）。

一方、インフルエンザ菌はβ-ラクタマーゼ非産生アンピシリン耐性株は50%となっており、1999年のサーベイランスに比較して著明に増加していることが判明した（図4）。

図3

