

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**12<sup>TH</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim**  
***Antimicrobial Resistance (AMR) in Respiratory Infections***  
4-6 December 2007  
Sheraton Haikou Resort  
Haikou, Hainan, China

---

**DAY 2                    WEDNESDAY, 5 DECEMBER 2007**

**8:00                    INTRODUCTION AND OPENING REMARKS**  
**Michael APICELLA**

**SESSION I: Global problems/issues associated with AMR**  
**Moderators: Jaime MONTOYA and Michael APICELLA**

**8:10                    Dr. Kazunori OISHI (Osaka University)**  
*Antibiotic resistance of pneumococi and other respiratory bacteria in Asian countries*

**8:30                    Dr. Satoshi MITARAI (Research Institute of TB)**  
*Drug resistant Mycobacterium tuberculosis in Japan: A nationwide survey, 2002*

**8:50                    Dr. Kai Man KAM (Department of Health, Hong Kong)**  
*MDR TB: Asian Overview*

**9:10                    COFFEE/TEA BREAK**

**SESSION II: Clonal spread, fitness, and modeling studies**  
**Moderators: Hiroshi SUZUKI and Bruce LEVIN**

**9:30                    Dr. James GALAGAN (Broad Institute)**  
*Genomic epidemiology of drug resistant TB*

**9:50                    Dr. Sebastien GAGNEUX (MRC, UK)**  
*Impact of bacterial genetics on the fitness of drug-resistant M. tuberculosis*

**10:10                  Dr. Noboru YAMANAKA (Wakayama Medical University)**  
*Clonal spread of drug-resistant S. pneumoniae and H. influenzae and disease burden for children in Japan*

**10:30                  Dr. Bruce R. LEVIN (Emory University)**  
*The fitness costs of resistance and their effects on the epidemiology and future of antibiotic resistant respiratory pathogens*

**10:50                  COFFEE/TEA BREAK**

**11:00                  Dr. Reiko SAITO (Niigata University)**  
*Prevalence of Amantadine resistant influenza A in Japan and Asian countries*

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**12<sup>TH</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim**  
***Antimicrobial Resistance (AMR) in Respiratory Infections***  
4-6 December 2007  
Sheraton Haikou Resort  
Haikou, Hainan, China

- 11:20**            **Dr. Shuji HATAKEYAMA** (University of Tokyo)  
*Neuraminidase inhibitor- resistant influenza viruses: Current situation and perspectives*
- 11:40**            **Dr. William M. SHAFER** (Emory University)  
*Use of an experimental infection model to study genetic control of multidrug resistance and bacterial fitness in vivo: importance of an efflux pump*
- 12:00**            **Dr. Kayo INABA** (Kyoto University)  
*Role of SIGNR1, a C-type lectin, in anti-microbial responses*
- 12:20**            **NETWORKING LUNCH WITH “TOPIC TABLES”**: *select a table based on your scientific interests* (Jade Restaurant)

**SESSION III: Mechanisms for emergence of AMR**  
**Moderators: Isamu SUGAWARA and David STEPHENS**

- 14:00**            **Dr. Teruo KIRIKAE** (International Medical Center of Japan)  
*TB genetic mechanism of drug resistance in M. tuberculosis and novel testing techniques*
- 14:20**            **Dr. Ruiru SHI** (Henan TB Center, China)  
*Analysis of drug-resistant gene mutations in M. Tuberculosis clinical isolates by denaturing HPLC*
- 14:40**            **Dr. David S. STEPHENS** (Emory University)  
*The genetic basis and emergence of macrolide resistance in pneumococci*
- 15:00**            **Dr. Kathryn M. EDWARDS** (Vanderbilt University)  
*Have antibiotic resistant Streptococcus pneumoniae been reduced by conjugate pneumococcal vaccine (PCV)?*
- 15:20**            **Dr. Randall S. SINGER** (University of Minnesota)  
*Potential impacts of antibiotic use in poultry production*
- 15:40**            **Dr. Lawrence J. GEITER** (Otsuka Pharmaceutical)  
*Clinical trials of OPC-67683: a potential new drug for the treatment of tuberculosis*
- 16:00**            **COFFEE/TEA BREAK**

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**12<sup>TH</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim**  
***Antimicrobial Resistance (AMR) in Respiratory Infections***  
4-6 December 2007  
Sheraton Haikou Resort  
Haikou, Hainan, China

**SESSION IV: Strategies for optimizing use of available drugs and those in the pipeline**  
**Moderators: Kazunori OISHI and Clifton BARRY**

- 16:20**            **Dr. Clifton E. BARRY, III** (NIAID, NIH)  
*Molecular imaging as a surrogate endpoint in clinical trials of new anti-tuberculars*
- 16:40**            **Dr. Norio DOI** (Research Institute of TB, Japan Anti-Tuberculosis Association)  
*Novel Drug Delivery System: Possibility of Inhalation Drugs for TB/HIV*
- 17:00**            **Dr. Seung-Kyu PARK** (International TB Research Center, Korea)  
*Clinical perspective of MDR-TB treatment strategies*
- 17:30-19:00**    **POSTER VIEWING (Remove posters at end of this session)**
- DINNER – On Your Own**
-

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**12<sup>TH</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim**  
***Antimicrobial Resistance (AMR) in Respiratory Infections***  
4-6 December 2007  
Sheraton Haikou Resort  
Haikou, Hainan, China

---

**DAY 3                    THURSDAY, 6 DECEMBER 2007**

**SESSION V: Future directions and next steps: new technologies**

**Moderators: Yichen LU and David MCMURRAY**

- 8:00**                    **Dr. Daniel P. CHIN** (Bill & Melinda Gates Foundation)  
*Moving new TB diagnostics and drugs into use to tackle the problem of MDR/XDR-TB*
- 8:20**                    **Dr. Thelma E. TUPASI** (Tropical Disease Foundation, Philippines)  
*DOTS-Plus for MDR-TB management: Experience in the Philippines*
- 8:40**                    **Dr. Tomotada IWAMOTO** (Kobe Institute of Health)  
*Rapid and simple detection of M. Tuberculosis complex from sputum samples using Loop-Mediated Amplification (LAMP) with simplified manual DNA extraction*
- 9:00**                    **Dr. Yasuhiko SUZUKI** (Hokkaido University)  
*Perspectives to wider applications: Molecular diagnostic tools for tuberculosis*
- 9:20**                    **Dr. Richard M. KRAUSE** (NIAID)  
*Enzybiotics: A novel new alternative to antibiotic therapy*

**MEETING SUMMARY AND CLOSING PRESENTATIONS**

**Moderators: Toru MORI and Patrick BRENNAN**

- 9:30**                    **MEETING SUMMARY**
- Dr. Gail CASSELL** (Eli Lilly and Company)
- Dr. Toru MORI** (National Institute of Infectious Diseases, Japan)
- 10:00**                    **CLOSING REMARKS**
- US Delegation: Dr. Ashley HAASE**
- Japanese Delegation: Dr. Takehiko SASAZUKI**
- Local Committee: Mr. Ci CHEN**, Secretary of Haikou Municipal Committee
- 10:20**                    **COFFEE/TEA BREAK**
-

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**  
**12<sup>TH</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim**  
***Antimicrobial Resistance (AMR) in Respiratory Infections***  
*4-6 December 2007*  
*Sheraton Haikou Resort*  
*Haikou, Hainan, China*

- 
- 10:30 – 13:00**    **WORKSHOPS SESSION 1**
- 13:00 – 14:00**    **LUNCH** (Breeze Restaurant)
- 14:00 – 16:30**    **WORKSHOPS SESSION 2** (Each workshop will be conducted 2 times – once in the morning and once in the afternoon; participants can choose one morning and one afternoon workshop)
- 16:30 – 19:30**    **BEACH PARTY HOSTED BY VTI** (Sheraton Resort)
-

**US-JAPAN COOPERATIVE MEDICAL SCIENCE PROGRAM**

**12<sup>TH</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim  
Antimicrobial Resistance (AMR) in Respiratory Infections**

4-6 December 2007

Sheraton Haikou Resort

Haikou, Hainan, China

**WORKSHOP TOPICS**

**WORKSHOP I: Safe Laboratory Practices - Respiratory Pathogens:**

Laboratory work with respiratory pathogens, especially potentially drug-resistant strains, requires safe handling to protect personnel. Strategies for implementation of good laboratory and clinical practices from initial collection of field samples through clinical and research laboratory testing.

[Format: approx. 30 min talks each on biosafety, laboratory procedures, and laboratory standards, followed by discussion]

*Leads: Polly Sager NIH; Janet Robinson FHI*

**WORKSHOP II: Sequencing, Bioinformatics:** Publicly available genomic, proteomic and bioinformatics resources for *Mycobacterium tuberculosis* and other respiratory pathogens supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH for the scientific community will be discussed and include hands on bioinformatics demonstrations.

[Format: approx. 30 min overviews on each of the following:

Sequencing/Comparative Genomics, Functional Genomics, Structural Genomics & Bioinformatics databases]

*Leads: Maria Giovanni, NIH; Valentina Francesco, NIH*

**WORKSHOP III: Protecting those in the field:** Strategies to protect those collecting and handling specimens; protect sample integrity during transport, and update on portable assays – relevant to antimicrobial resistance detection/diagnosis.

[Format: 1.5 hr comprehensive overview, followed by three (15min) talks]

*Leads: Farukh Khambaty, NIH; Douglas Abbott, USDA*

**WORKSHOP IV: Introduction to building and operating a biocontainment laboratory in developing countries:** Topics covered include descriptions of BSL2, 3/3e labs; resources available when planning to set-up new or renovate existing labs to the desired biosafety level; and information on portable laboratory facilities that can be customized and deployed in emergency situations where a significant amount of specialized field testing is needed.

[Format: 1.5 hr comprehensive overview followed by three (15min) talks]

*Leads: Farukh Khambaty, NIH; Chris Peter, San Diego County Health & Human Services Agency*

**US JAPAN ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS PANEL MEETING  
FEBRUARY 25-26, 2008  
BETHESDA, MARYLAND**

**MEETING LOCATION:**

**DOUBLETREE HOTEL AND EXECUTIVE MEETING CENTER  
GRAND BALLROOM B (second floor)  
8120 WISCONSIN AVENUE  
BETHESDA, MD 20814  
Phone: 301-652-2000**

**Monday, February 25, 2008**

**8:00 Introductions (Dr. H. Suzuki, Dr. M. Apicella, Dr. L. Lambert)**

**Session 1: (Moderators: Dr. M. Apicella and Dr. H. Suzuki)**

- 8:15 Dr. K. Edwards The impact of pneumococcal conjugate vaccine on antimicrobial resistance
- 8:45 Dr. N. Yamanaka Clonal spread of drug-resistant *S. pneumoniae* and *H. influenzae*
- 9:15 Dr. M. Nahm A new pneumococcal serotype, 6C. Its implication to pneumococcal vaccines

**9:45 BREAK**

**Session 2: (Moderators: Dr. N. Yamanaka and Dr. D. Stephens)**

- 10:00 Dr. K. Oishi Nasal immunization with recombinant pneumococcal surface protein A with mucosal adjuvant provides protective immunity against pneumococcal pneumonia in mice
- 10:30 Dr. J. Weiser Targeting bacterial colonization
- 11:00 Dr. H. Watanabe Analysis of the effectiveness of different classes of antibiotics for the treatment of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms
- 11:30 Dr. T. Murphy Mining the *Moraxella catarrhalis* genome: Identification of potential vaccine antigens expressed during human infection

**12:00 LUNCH**

**Session 3: (Moderators: Dr. M. Tashiro and Dr. J. Katz)**

- 1:00 Dr. J. Katz Assessing the pandemic risk of avian influenza viruses

- 1:30 Dr. M. Tashiro Development of a nasal influenza vaccine inducing broad-spectrum cross-protective immunity
- 2:00 Dr. F. Cassels While the lion sleeps: Current SARS research and development
- 2:30 Dr. R. Saito Circulation of amantadine resistance influenza A in Japan
- 3:00 **BREAK**

**Session 4: (Moderators: Dr. L. Bakaletz and Dr. R. Saito)**

- 3:30 Dr. J. Taubenberger Evolutionary dynamics of human and avian influenza A viruses
- 4:00 Dr. C. Russell Regulation of the acid stability of the H5N1 hemagglutinin (HA) protein
- 4:30 Dr. K. Subbarao Active and passive immunization against avian influenza viruses
- 5:00 Dr. T. Odagiri Updated laboratory diagnostic system for the detection of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses

**Tuesday, February 26, 2008**

**Session 5: (Moderators: Dr. H. Watanabe and Dr. M. Nahm)**

- 8:30 Dr. N. Ishiwada Diagnosis and prevention of RSV bronchopulmonary infection associated with secondary bacterial infection
- 9:00 Dr. D. Stephens The genetic basis and emergence of macrolide resistance in pneumococci
- 9:30 Dr. T. Nakayama Recombinant live measles vaccine expressing respiratory syncytial virus G/F protein

**10:00 BREAK**

**Session 6: (Moderators: Dr. J. Weiser and Dr. T. Murphy)**

- 10:15 Dr. W. Shafer Fitness costs and benefits of antibiotic resistance in a human bacterial pathogen
- 10:45 Dr. T. Morishima Etiology and clinical features of acute encephalitis/encephalopathy in Japan
- 11:15 Dr. L. Bakaletz The role of the type IV pilus of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the pathogenesis of otitis media and protective efficacy of novel PilA-derived immunogens
- 11:45 Dr. M. Apicella Quorum sensing and nontypeable *H. influenzae* biofilms



**12:15 LUNCH**

**1:15 Subcommittee Meetings**

**2:45 Re-Convene; Closing Comments (Dr. L. Lambert and Dr. H. Suzuki)**

**Conference on Novel Antimicrobials in Respiratory Infections  
February 27 - 28, 2008**

**Wednesday: February 27, 2007**

8:15 am                    Introductions: NIAID Staff, Mike Apicella

**Scope of the problem (Moderator: Keith Klugman)**

8:30 am                    Robert Moellering, Beth Israel Deaconess Med Ctr, Boston, MA  
New and emerging problems with resistance in MRSA

9:00                        Keith Klugman, Emory University, Atlanta, GA  
Risk factors for antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*

9:30                        John Quinn, Rush Univ. Med Ctr., Chicago, IL  
Status of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

10:00                      **Break**

**Mechanisms of antimicrobial resistance (Moderator: Herman Goosens)**

10:30                      Herman Goosens, University of Antwerp, Antwerp, Belgium  
Protein synthesis inhibitors: mechanisms of action and challenges  
of resistance

11:00                      Fernando Baquero Mochales, Ramon y Cajal Hosp., Madrid, Spain  
Mechanisms of biofilm-mediated antimicrobial resistance

11:30                      Karen Carroll, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, MD  
Molecular diagnosis of bacterial respiratory pathogens

12:00                      **Working Lunch**

**Novel Approaches (Moderators: James Sacchetti/ Vince Fischetti)**

1:00 pm                    William Craig, VA, Hospital, Madison, WI  
Newer drugs for respiratory tract infections: major advances or  
only marginal improvements?

1:30                        Rino Rappuoli, Novartis Vaccines, Siena, Italy  
Genomics for vaccines and antimicrobials

2:00                        James Sacchetti, Texas A & M University, College Station, TX  
TB structural genomics and drug discovery, emphasizing microbial  
persistence and drug resistance

- 2:30                    **Break**
- 2:45                    Joseph Zabner, University of Iowa, Iowa City, Iowa  
Safety of two-week aerosolized xylitol in two animal models
- 3:15                    Kazuhiro Tateda, Toho University School of Medicine  
Potential of macrolide antibiotics as quorum-sensing inhibitor  
against *Pseudomonas*
- 3:45                    Pradeep Singh, University of Washington, Seattle, WA  
A Trojan horse strategy to fight drug-resistant bacteria and biofilm  
infections
- 4:15                    Angela Wilks, University of Maryland, Baltimore, MD  
Heme utilization in bacterial pathogens: A new paradigm in  
antimicrobial drug development
- 5:00                    **Adjourn for the day**

**Thursday, February 28, 2008**

- 8:30 am                William Love, Destiny Pharma, Falmer, Brighton, UK  
Photo-dynamic therapy: creating new approaches to overcome  
bacterial resistance
- 9:00                    Richard Koepsel, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA  
Antimicrobial polydiacetylene nanotubes
- 9:30                    Vince Fischetti, Rockefeller University, New York  
Phage lytic enzymes: novel antimicrobials to control gram-positive  
bacteria
- 10:00                   **Break**
- 10:30 - 1:00           **Recommendations for future research and identification of gap  
areas (Moderator: Chris Taylor)**  
Short presentations by each of the moderators will be followed by  
general discussions\

## II. 分担研究報告

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

自己凝集能を持つ百日咳流行株の細菌学的解析

分担研究者 荒川 宜親 国立感染症研究所 細菌第二部長

**研究要旨** 近年、わが国の臨床現場からは自己凝集能を持つ百日咳菌が分離されている。現在まで自己凝集株の報告例はなく、その病原性などは不明である。本研究では自己凝集株の細菌学的知見を得ることを目的に、遺伝子型解析と自己凝集に関連するタンパク質の検索を行った。その結果、自己凝集株 ( $n=4$ ) は高い遺伝的相同性 (96~100%) を示し、特定の multilocus sequence type (MLST-4) に属することが判明した。さらに、自己凝集関連タンパク質として2種類のタンパク質 (170 kDa protein, 40 kDa protein) が同定された。

**研究協力者**

蒲地一成(国立感染症研究所 細菌第二部)

韓 賢子(国立感染症研究所 細菌第二部)

豊泉裕美(国立感染症研究所 細菌第二部)

**A. 研究目的**

百日咳は *Bordetella pertussis* の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、分離菌の同定は主に免疫血清を用いたスライド凝集反応が用いられている。近年、わが国の臨床現場からは自己凝集能を持つ百日咳菌が分離されており、これら分離菌は自然凝集を示すため菌同定が困難となっている。自己凝集株の菌同定には遺伝子的な同定を必要とするが、一般の病院検査室で実施することは難しい状況にある。なお、百日咳菌は cyclodextrin (CD) の非存在下で自然凝集を生じるが、現在までに自己凝集能を持つ百日咳菌の報告例はない。

食中毒の起因为菌であるエルシニア属菌 (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) の病原株は、自己凝集能を持つことが知られている。これら自己凝集株の病原性は巨大プラスミドに支配されており、プラスミド依存性のタンパク質を発現する。百日咳菌の自己凝集株がプラスミドを保有するか否かは不明であるが、自己凝集株が新たな病原性を獲得した可能性は否定できない。そこで本研究では自己凝集株の細菌学的知見を得ることを目的に、自己凝集株の遺伝子型解析と自己凝集関連タンパク質の検索を行った。

**B. 研究方法**

菌株: スライド凝集試験において、自然凝集により判定不能となった自己凝集株 4 株を解析に供試した(表1)。比較対象には、2005~2007年に分離された非凝集株 20 株を用いた。なお、スライド凝集試験は百日せきI相菌免疫血

清「生研」により実施した。

自己凝集性試験：菌株をボルデテラ CFDN 寒天培地（日研生物）で培養後、生理食塩水に懸濁し、30 分間静置した。凝集の有無は肉眼により判定した（図1）。

パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）：常法に従ってプラグを作製した後、DNA を制限酵素 *XbaI* により切断し、1%アガロースゲルにより分離した。系統樹解析は Fingerprinting II software (Bio-Rad) を使用し、UPGMA 法により行った。

MLST 解析：多様性が認められる3種類の病原遺伝子 (*ptxS1*, *prn*, *fim3*) をシーケンス解析し、その allele タイプの組み合わせから MLST を決定した。

SDS-PAGE：菌株を寒天平板培地（BG 培地、CFDN 培地）で培養後、全タンパク質を SDS-lysis buffer を用いて抽出した。全タンパク質を 14% SDS-PAGE に展開し、その蛋白プロファイル解析した。

（倫理面への配慮）

本研究は臨床分離株についての解析であり、倫理上特段の問題点は発生しない。

### C. 結果

自己凝集能を持つ百日咳菌 4 株の遺伝子型を解析した結果、これら菌株は極めて似た PFGE パターンを示し、系統樹解析により菌株間の遺伝的相同性は 96~100% と算出された（図2）。また、非凝集株（20 株）とその遺伝子型を比較したところ、自己凝集株は特定の PFGE タイプを持つことが判明した。また、MLST 解析により、自己凝集株はすべて MLST-4 に分類されることが明らかとなった

（表1）。なお、わが国では MLST-4 の出現は 2005 年以降に認められており、自己凝集株の分離年と一致した（1991~2007 年における MLST-4 の分離率は 6.6%）。

次に培養条件が自己凝集能に与える影響を検討したところ、BG 培地で培養した自己凝集株ではその凝集能が消失することが判明した（図 3）。そこで、自己凝集に関連するタンパク質を検索するため、CFDN 培地と BG 培地で培養した菌体から全タンパク質を抽出し、その蛋白プロファイルを比較解析した。その結果、自己凝集関連タンパク質として、2種類のタンパク質（170 kDa protein, 40 kDa protein）が同定された（図 4）。

### D. 考察

本研究では、自己凝集能を持つ百日咳菌の細菌学的知見を得ることを目的に、遺伝子型解析と自己凝集関連タンパク質の検索を行った。その結果、自己凝集株 4 株は極めて似た遺伝的背景を示し、自己凝集能は特定の百日咳菌が獲得した表現型であると考えられた。百日咳菌は培養条件（CD 非存在下）により自己凝集を示すが、この凝集反応は CD 添加により阻害されることが知られている。CD は菌体表面上の繊維状赤血球凝集素（FHA）と結合することにより凝集を阻害するが、自己凝集株に CD 添加による凝集阻害は認められなかった。このことから、自己凝集株の凝集形成に FHA が関与する可能性は低く、新たな凝集メカニズムの存在が強く示唆された。

病原細菌の自己凝集と病原性の関係は古くから研究され、エルシニア属菌や大腸菌の病原株は自己凝集能を持つことが知られている。多くの場合、自己凝集には巨大プラスミド

が関与し、凝集型接着線毛などの発現が認められる。例えば、腸管病原性大腸菌では、EPEC adherence factor プラスミドがコードするBEP線毛が菌の自己凝集を引き起こす。百日咳菌ではプラスミド保有株は極めて稀であるが、自己凝集株にプラスミドが関与する可能性は否定できない。今後、プラスミドの存在について検討を加えるとともに、病原性に関する検討が必要である。また、本研究では自己凝集関連タンパク質として2種類のタンパク質が同定された。本タンパク質は培地条件によりその発現量の変動することから、自己凝集に関与する可能性が強く示唆される。今後プロテオーム解析により、遺伝子の特定が必要である。

## E. 結論

わが国の百日咳流行株に自己凝集能を持つ株の存在を認めた。細菌学的解析により、自己凝集株は特定の遺伝子型を有し、2005年以降の流行株に特徴的に認められることが判明した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Han HJ, Kamachi K, Okada K, Toyozumi-Ajisaka H, Sasaki Y, Arakawa Y. Antigenic variation in *Bordetella pertussis* isolates recovered from adults and children in Japan. *Vaccine* 26:1530-4 (2008).

### 2. 学会発表

1) 韓賢子, 蒲地一成, 桑江朝臣, 阿部章夫, 荒川宜親. 百日咳流行株におけるタイプ III エフェクターBopCの発現差異について. 第81回日本細菌学会総会, 平成20年3月, 京都(発表予定)

2) 蒲地一成, 荒川宜親. スライド凝集反応における *Bordetella pertussis* の自然凝集と菌型の関係について. 第19回日本臨床微生物学会総会, 平成20年1月, 東京

3) 蒲地一成, 岡田賢司, 豊泉裕美, 佐々木裕子, 荒川宜親. 成人層から分離された百日咳菌の分子疫学的解析. 第11回日本ワクチン学会学術総会, 平成19年12月, 横浜

## 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

なし

### 3. その他

なし

Table 1. 自己凝集能を持つ百日咳臨床分離株

菌株コード	分離年月	分離場所	Allele type			MLST
			<i>ptxS1</i>	<i>pm</i>	<i>fim3</i>	
BP298	2005年9月	近畿	A	2	B	MLST-4
BP300	2005年10月	九州	A	2	B	MLST-4
BP301	2005年10月	九州	A	2	B	MLST-4
BP306	2006年3月	中部	A	2	B	MLST-4



1. 非凝集株  
2. 自己凝集株

Fig. 1 自己凝集株の自己凝集性試験

CFDN 寒天培地で培養した菌体を生理食塩水に懸濁し、30 分間静置した

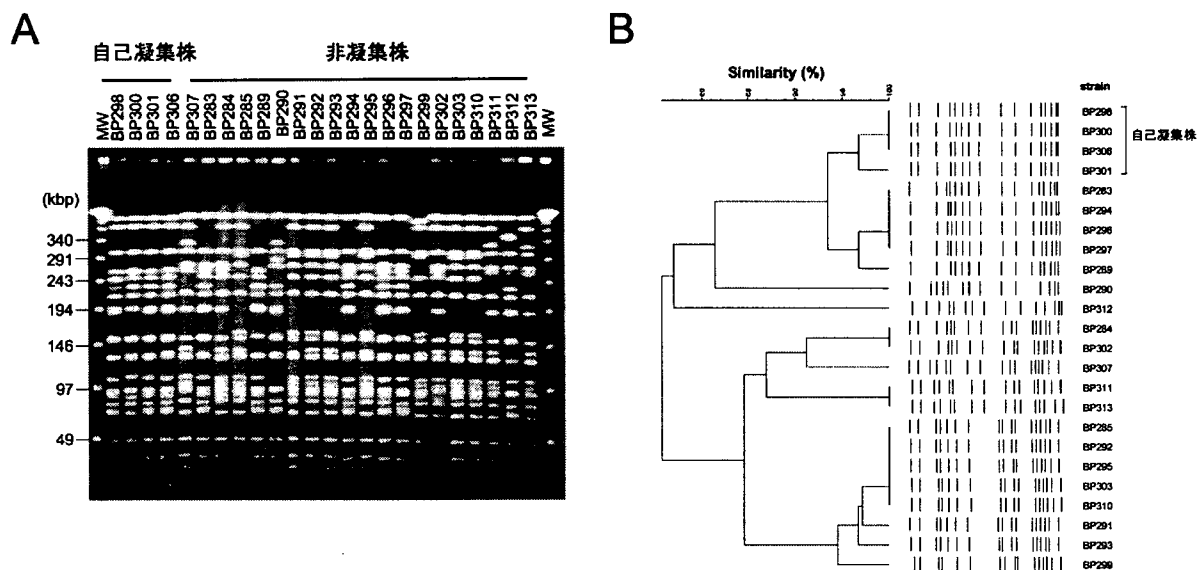
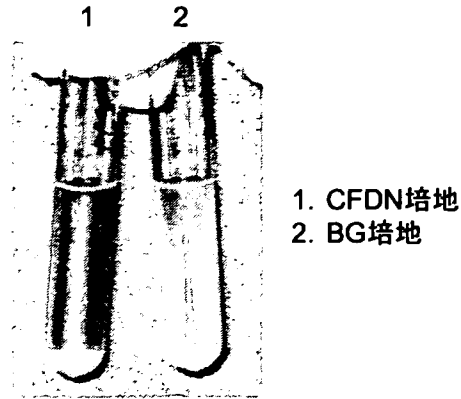


Fig. 2 自己凝集株のパルスフィールドゲル電気泳動パターン(A)と系統樹解析(B)

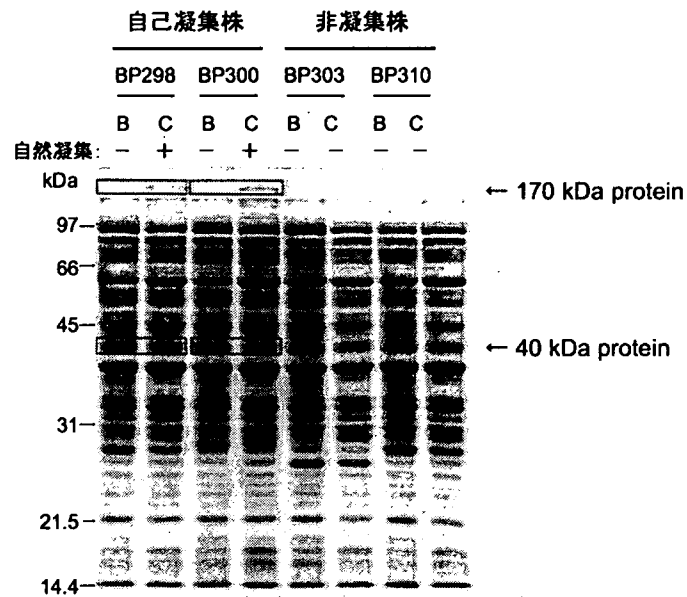
自己凝集株 (BP298, BP300, BP301, BP306) と非凝集株 (20 株) を比較解析した。系統樹解析は UPGMA により行った





**Fig. 3** 培養条件が自己凝集能に与える影響(自己凝集性試験)

自己凝集株をそれぞれ CFDN 寒天培地と Bordet-Gengou 寒天培地で培養した。各菌体を生理食塩水に懸濁し、30 分間静置した



**Fig. 4** 自己凝集株と非凝集株の蛋白プロファイル

自己凝集株を CFDN 寒天培地と BG 寒天培地で培養後、各菌体の全タンパク質を抽出した。全タンパク質を 14% SDS-PAGE に展開後、CBB 染色を行った。B、BG 培地;C、CFDN 培地

## 平成19年度分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

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

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ゲノム転写・複製の基本単位であるRNA-核蛋白質複合体(vRNP)の各構成要素をレトロウイルスベクターにより培養細胞に導入し、vRNPを安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いることで、ゲノム転写・複製を標的とする新規抗ウイルス薬の大規模スクリーニングを行うことができる。

### A. 研究目的

現在認可されているインフルエンザ治療薬は、その作用機序により2種類に大別されるが、現在問題となっているH5N1亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスの中には、すでにこれらの抗ウイルス薬に対する耐性を示すウイルスが現れており、作用機序の異なる新規抗ウイルス薬の開発が求められている。ウイルスゲノムの転写・複製過程は、古くから抗インフルエンザ薬の標的候補と考えられていたが、この過程の阻害物質を効率的に探索する手法はこれまで存在しなかった。本研究は、ゲノム転写・複製阻害物質の大規模スクリーニングを可能とするvRNP安定発現細胞株の樹立を目的とした。

### B. 研究方法

vRNPは、4つのウイルス蛋白質(PA、PB1、PB2およびNP)とウイルスRNA(vRNA)から構成されている。各構成要素を、レトロウイルスベクターを用いて培養細胞内に強制発現させた。vRNAの翻訳領域に薬剤耐性遺伝子をコードさせることで、vRNAが安定的に転写・複製されている(=vRNPを安定的に発現している)細胞株の樹立を試みた。

### C. 研究結果

選択薬剤存在下で生存した細胞をクローニングし、細胞内での各vRNP構成要素の発現をRNAレベルで確認した。また、蛍光蛋白質をコードしたレポーターvRNAの導入により、各ウイルス蛋白質の機能的な発現を確認した。さらに、vRNA転写・複製阻害物質として知られる化合物は、選択薬剤存在下の本細胞株に対して、濃度依存性の細胞障害を引き起こした。

### D. 考察

樹立した細胞株は、細胞内で安定的に行われているvRNAの転写・複製を介して薬剤耐性を示すことから、選択薬剤存在下の本細胞株に対する細胞障害性を指標としたvRNA転写・複製阻害物質の効率的なスクリーニングが可能である。

### E. 結論

本研究で樹立したvRNP安定発現細胞株は、ゲノム転写・複製を標的とする新規抗ウイルス薬の大規模スクリーニングを可能とする。

### G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

3. その他

平成19年度厚生労働科学研究費補助金（社会保障国際協力推進研究事業）

「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」

分担研究者：山中 昇（和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

#### 研究要旨

全国中耳炎サーベイランス(ATOMS)により収集された肺炎球菌およびインフルエンザ菌について、血清型、薬剤感受性、遺伝子検索およびPFGEによるクローン解析を行い、薬剤耐性化の状況およびその伝播様式について検討を行った。小児急性中耳炎症例の検出菌の感受性検査では肺炎球菌の64%およびインフルエンザ菌の70%が薬剤耐性化を示した。さらに遺伝子検索では肺炎球菌の約60%に3遺伝子変異が認められ、インフルエンザ菌の約80%になんらかの遺伝子変異が認められた。さらにクローン解析では肺炎球菌19F株で高頻度にクローン伝播が認められ、さらにインフルエンザ菌では全国で主要な3クローンの伝播が認められ、アンピシリンに対するMICの上昇に伴ってクローンの頻度が増加することを見出した。

#### 研究協力者

保富宗城（和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

Dewan S. Billal（和歌山県立医科大学耳鼻咽喉科感染免疫リサーチセンター）

#### A. 研究目的

近年の薬剤耐性菌の急増により、小児急性中耳炎や鼻副鼻腔炎などの上気道感染症が難治化しており日常臨床において大きな問題となってきた。このような小児感染症の臨床像の変貌の原因として、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。本研究は小児中耳炎の検出菌の薬剤耐性化、感受性に関係する遺伝子変異に関する検索、およびペニシリン耐性肺炎球菌(PRSP)および耐性インフルエンザ菌(BLNAR)の伝播様式を遺伝子学的に

検索し、耐性菌増加および伝播を抑制するアプローチを探索するものである。

## B. 研究方法

2006年から開始した全国的中耳炎サーベイランス(ATOMS)より収集した中耳炎起炎菌を対象とした。肺炎球菌 183 株、インフルエンザ菌 208 株について、薬剤感受性および感受性に関与する遺伝子検索(PCR)および Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)によるクローン解析を行った。

## C. 研究結果

### 1) 薬剤感受性 (図 1, 2)

肺炎球菌(183 検体)では PSSP;65(35.5%), PISP;68(37.2%), PRSP;50(27.3%)と約 65%の検出菌がペニシリン耐性となっており、インフルエンザ菌(209 検体)では ampicillin に対する MIC が 1ug/ml 以下のものを感受性、2ug/ml 以上の株を耐性菌とすると、感受性 BLNAS;63(29.8%), 耐性 BLNAR;144(69.3%), BLPAR;2(0.9%)と 70%の検出菌が耐性となっていた。

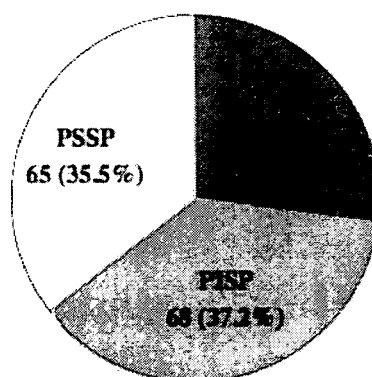
### Antimicrobial sensitivity of *S.pneumoniae* isolated from AOM children

#### CLSI classification by MIC of Penicillin G

penicillin-sensitive *S.pneumoniae* (PSSP)  $\leq 0.06 \mu\text{g/mL}$

penicillin-intermediately resistant *S.pneumoniae* (PISP)  $0.125\sim 1.0 \mu\text{g/mL}$

penicillin resistant *S.pneumoniae*  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$



Middle ear isolates from AOM patients (n=183) (ATOMS surveillance 2006-2007)

図 1