

が死亡例として分離報告された。

## 2. ウイルス分離株の抗原解析。

抗 A/California/7/2009 ウサギ血清を用いた HI 試験では、210 株中 202 株 (96%) の HI 価はホモ価に比べて 4 倍以内の減少におさまった。残り 8 株の HI 価は、ホモ価から 8 倍以上減少した (下気道炎患者由来 7 株、脳症患者由来 1 株)。したがって、これら分離株のほとんどは、A/H1N1pdm ワクチン株 A/California/7/2009 と類似の抗原性であることが示された。一方、これらは 2009/10 シーズン季節性インフルエンザ ワクチン株 A/Brisbane/59/2007 に対する抗血清とは全く反応しないことから、季節性 A/H1N1 ウイルスとは抗原性が大きく異なることが明らかになった。

## 3. ウイルス分離株の遺伝子解析。

下気道炎患者由来の 4 株 (死亡 2 株を含む)、脳症患者由来の 2 株および下気道炎、脳症以外の症状で死亡した患者由来の 1 株について、HA および NA 遺伝子の解析を行った。その結果、HA1 領域にコンセンサ配列とは異なるアミノ酸が 7 つみられた (V19I、A186T、D222E、N260D、A261V、P297S および I324V)。これらの部位は、A186T を除いていずれも抗原部位ではなく、全ての分離株に共通しているわけでもなかった。一方、NA においては 17 ヶ所のアミノ酸置換が認められた (N21K、I34D、S35C、N42M、S82P、S95N、T148A、K150R、D199Y、M269I、H275Y、W375C、T381N、N434K、T435A、I443V および F465L)。2 株にオセルタミビル耐性マーカーの置換 (H275Y) がみられたが、他のアミノ酸置換はいずれも 1 株のみであった。

## D. 考察

今回の調査では、重症患者から分離したウイルスに共通した抗原性の変化および HA、NA 遺伝子の変異は見られなかった。ま

た、NA の H275Y のアミノ酸置換が確認された 2 株は、いずれもオセルタミビルの治療投与により出現したものであると考えられたが、ヒトからヒトへ伝搬した様子はなかった。したがって、A/H1N1pdm ウイルスによる重症化の予防として、ワクチンの接種や抗インフルエンザ薬 (オセルタミビル、ザナミビル) の投与が有効であることが示唆された。

一方で、現在流行している A/H1N1pdm ウイルスでは、ウイルス RNA 複製酵素を構成する PB2 蛋白の 627 番目のアミノ酸が強毒性鳥インフルエンザウイルスに共通のグルタミン酸である。このトリ型 PB2 遺伝子を持つウイルスは、下気道で増殖しやすいことが動物実験等で報告されている。また、ヒト型に変化することにより、伝搬力が高まることが危惧される。さらに、季節性 A 型インフルエンザウイルスとの遺伝子再集合によるウイルスの出現の可能性も否定できない。したがって、A/H1N1pdm ウイルスが季節性インフルエンザとして定着するまでの間、重症死亡例から分離したウイルスについて、継続的に性状変化を調査する必要がある。

## E. 結論

重症患者から分離した A/H1N1pdm ウイルスには、重症化に関わるようなウイルスの性状変化は認められなかった。しかし、今後も重症死亡例について継続的にウイルス株サーベイランスを行う必要がある。

## F. 健康危機情報

特になし

## G. 研究発表

小淵正次、氏家誠、岸田典子、徐紅、高下恵美、伊藤玲子、松浦純子、菅原裕美、安楽茜、江島美穂、田代真人、小田切孝人. 2008/09 シーズンの季節性インフルエンザウイルス流行株と平成 21 年度のワクチン株. 第 57 回日本

ウイルス学会学術集会、東京、10月（2009）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. その他 なし

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症事業)  
研究報告書

「国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能およびわが国の感染症サーベイランス  
システムの改善・強化に関する研究」

分担研究項目：感染症サーベイランスにおけるサンプリング戦略

「アデノウイルス分離培養に適した細胞および凍結融解回数のウイルス分離への影  
響」

研究分担者：藤本嗣人 国立感染症研究所感染症情報センター 第 4 室長

研究協力者：

榎本美貴	国立感染症研究所感染症情報センター	協力研究員
小長谷昌未	国立感染症研究所感染症情報センター	協力研究員
宗村徹也	国立感染症研究所感染症情報センター	協力研究員
岡部信彦	国立感染症研究所感染症情報センター	センター長
谷口清州	国立感染症研究所感染症情報センター	第 1 室長

**研究要旨：**全国の地方衛生研究所 77 ケ所がアデノウイルス分離に用いている細胞は 2006 年のアンケートで主に 5 種類で、使用施設が多い順に RD(n=33)、HEp-2(n=32)、Vero(n=26)、HeLa (n=16) および FL (n=10) であった(2006 年レファレンス)。A549 細胞は使用施設がほとんどなかった。そこで、我々は多用されていた RD および HEp-2 細胞のアデノウイルスに対する感受性を A549 細胞と継時・定量的に比較・観察した。その結果、アデノウイルス 2 型に対する細胞感受性を TCID<sub>50</sub>/mL で評価したところ常に A549 の感受性が最も高く、感受性(TCID<sub>50</sub>/μL)は A549、HEp-2、RD 細胞の順であった。アデノウイルスが遺伝子検査で陽性の臨床検体(n=34)を用いて A549、HeLa、RD および Vero 細胞を用いて分離率を比較したところ分離率はそれぞれ 94%(32/34)、85%(29/34)、35%(12/34)および 27%(9/34)であり A549 細胞がアデノウイルスの病原体サーベイランスに適していると思われた。

また、これまでアデノウイルスの継代において 5 回以上の凍結融解が必要であることが経験的な事実として伝えられてきた。そこで、アデノウイルス 2 型の凍結融解を 1~5 回実施して細胞変性効果を比較した。その結果、凍結融解は 2~3 回が最も力価が高く、4 回以上凍結融解を繰り返すと力価が低下することが示唆された。

これらのことから、アデノウイルスの分離には A549 細胞を用いるのが適切と考えられ、盲継代時の凍結融解は 3 回実施するのが適切な可能性が示された。サンプリングの際に凍結された臨床検体を 4 回以上凍結融解することはウイルス分離率を下げる可能性が考えられた。

## A. 研究目的・背景

日本国内でのアデノウイルスサーベイランスにおけるウイルス分離において HEp-2 細胞が多用されていることが知られている。我々は 2006 年にアデノウイルスレファレンス活動の一環として全国の地方衛生研究所 77 ケ所を対象に分離に用いている細胞のアンケート調査を実施した。その結果、10 ケ所以上の施設でアデノウイルス分離に用いている細胞は使用施設が多い順に RD(n=33)、HEp-2(n=32)、Vero(n=26)、HeLa (n=16) および FL (n=10) 5 種類であることが明らかになった(1)。

HEp-2 および FL 細胞は HeLa derivative とされ(ATCC ホームページ等による)、由来は HeLa 細胞と考えられる。したがって、FL および HEp-2 を HeLa 細胞と考えることができるので、以後 HEp-2 および FL 細胞を HeLa 細胞と呼称する。

アデノウイルス分離培養に適した細胞を示す目的で A549 細胞とこれらの細胞のアデノウイルスに対する感受性を調べた。また、PCR 試験によりアデノウイルス陽性の検体 34 件のウイルス分離率を A549、HeLa、RD および Vero 細胞と比較した。また、A549、HeLa および RD 細胞のアデノウイルス 2 型に対する感受性を長期間観察・比較した。

また、アデノウイルス分離のためには、培養細胞の凍結融解による培養細胞の植え継ぎ(盲継代)が必要であり、病原体検出マニュアル(国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会)によると 3 回となって

いる。凍結融解回数は何回が最適であろうか? その基礎的なデータを得ることを目的に、凍結融解回数のウイルス力価への影響を調べた。

## B. 方法

**臨床検体**：感染症発生動向調査で採取されゲノム解析によりアデノウイルスが検出された咽頭ぬぐい液 34 件を用いた。7 日間、A549、HeLa、RD および Vero 細胞を使用してアデノウイルスを分離培養した。

**ウイルス株**：感染症発生動向調査で我々が分離しアデノウイルス 2 型と同定された分離株を用いた。

**ウイルス精製**：過剰な構造蛋白・ゲノムを除くため Adeno-X virus purification kit (クロンテック社)で精製・濃縮した。

**ウイルス同定**：マイクロ中和反応によった。

**ウイルス分離**：24 ウェルマイクロプレートを用いて定法により CO2 インキュベーター内で培養して細胞変性効果を顕微鏡で観察した。

**ウイルス力価の測定**：マイクロタイター法で 1 希釈系列に 8 穴ずつ用いて  $10^{-2}$  ~  $10^{-12}$  倍まで 10 倍階段希釈し、3 種類の細胞に  $50 \mu\text{L}$  ずつ接種して 35 日間、顕微鏡により細胞を観察した。ウイルス力価を Reed-Muench 法で計算して細胞間で比較した。

**Real time PCR 反応**：既報(2)に準じてアデノウイルスゲノムコピー数を測定した。

**ウイルスの凍結融解実験**：24 ウェルマイクロプレートに単層培養した A549 細

胞に接種後 4 日で細胞変性効果（以下 CPE）が 100%になる濃度にアデノウイルス 2 型を接種した。維持培地として 2%FBS 添加の D-MEM 培地を 1mL 加えて培養した。CPE が 100%となった段階で培養液および培養細胞をマイクロチューブ 5 本に回収した。それぞれのチューブを凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ および  $37^{\circ}\text{C}$ での凍結融解をチューブごとに 1 回~5 回実施した。凍結融解の回数の異なるウイルス培養液をそれぞれ 2%FBS 添加の D-MEM 培地で 10 倍階段希釈し、 $10^8$  乗まで希釈した。希釈したウイルス液を希釈系列ごとに 96 ウェルマイクロプレートに単層培養した A549 細胞 5 ウェルずつに  $50\mu\text{l}$  ずつ接種し CPE の出現を観察した。

## C. 結 果

### C-1 アデノウイルス分離培養に用いる細胞

● **ウイルス分離**：4 種類の細胞（A549、HeLa、Vero-E6 および RD-18S）において接種後 7 日目まで CPE が完全に出現した検体数からアデノウイルスによる CPE 出現率を求めた。CPE がウェルの面積の 70%以上見られた検体の割合は、高い順に A549 が 94%、HeLa が 85%、RD-18S が 35%、Vero が 26.5%であった。Vero 細胞と RD 細胞では、CPE が 100%となりにくい傾向が見られた。

それぞれの血清型別結果(血清型 1~7 および 11 型)および臨床検体中のアデノウイルスゲノムコピー数は表 1 のとおりであった。

● **アデノウイルス 2 型のゲノムコピー数**：アデノウイルス 2 型を精製し、コピー数を測定したところ  $10.40 \pm 0.35$  (SD) /mL であった。

● **細胞ごとの TCID<sub>50</sub>/mL**：14 日間観察した時点(接種 336 時間)での LogTCID<sub>50</sub>/mL は、

A549 細胞	10.0
HeLa	9.6
RD	8.1

であった。

● HeLa 細胞は 14 日以上培養が困難であったので、それ以後は A549 および RD 細胞を比較した。28 日目の LogTCID<sub>50</sub>/mL は

A549 細胞	10.6
RD	9.6

であり、14 日目で A549 細胞は RD 細胞の約 100 倍の力価が高く測定された。14 日以上 HeLa 細胞の維持は困難であった。A549 細胞で 14 日目と 28 日目のウイルス力価を比較すると 4 倍以下しか力価が上がらずプラトーに近かった。

● 14 日目の HeLa の力価と 28 日目の RD 細胞での力価は同じであった。

● 細胞の感受性は A549 > HeLa > RD の順であり、ウイルス分離陽性率の高い順と結果と一致した。

● HeLa 細胞を維持することができた 14 日目までの比較結果を表 2 に示した。

### C-2 アデノウイルス盲継代時の凍結融解回数の影響

● アデノウイルス 2 型の凍結融解回数と力価を比較すると表 3 に示したとおり、2 回の凍結融解で力価が最も高く 4 回以上では、むしろ力価が低下した。

## D. 考 察

● 少なくとも 2006 年のアンケート時までには、地方衛生研究所でアデノウイルス分離に A549 細胞はほとんど使用されていなかった。

しかし、Smith(3)らは1986年にA549細胞がアデノウイルスおよび単純ヘルペスウイルスを分離する際に効率的・実用的で経済的な株化細胞であることを報告している。彼らは、HEK細胞およびCMK細胞と比較してA549がアデノウイルスの臨床検体からの分離率および分離に要する日数の点で優れていることを報告している。

我々の結果は、日本の病原体ウイルスサーベイランスの中のアデノウイルス分離に一般的に使用されているHeLaおよびその派生細胞株であるHEp-2等よりもA549がアデノウイルス分離に適していることを強く示唆している。地方衛生研究所で実施されるアデノウイルスサーベイランスにおいて、A549の使用は分離率の向上に役立つものと思われる。

すでに、地方衛生研究所と我々の共同により、A549細胞がアデノウイルス分離に役立つことがいくつか報告されている。大金ら(4)は、流行性角結膜炎患者の眼検体について5種類の細胞で検討し、分離率がA549、HEp-2、CaCo-2細胞の順に高く、それぞれ9件(9/20; 45%)、4件(4/20; 20%)、2件(2/19; 11%)であったが、VeroおよびRD-18S細胞ではウイルス分離陰性であった。ウイルス分離陽性となった継代数はA549細胞およびCaCo-2細胞はすべて2代以内で陽性になったのに対し、HEp-2細胞では4~8代を要したことを報告している。また、榎本ら(5)は、アデノウイルス2型のTCID<sub>50</sub>を細胞ごとに7日間観察して、HEp-2ではおおむね10<sup>6</sup>、A549では10<sup>5</sup>、RD-18Sでは10<sup>4</sup>と高い感受性を示したが、L20Bでは3.1×10と低かったことを報告している。これらの結果はいずれもA549細胞がアデノウイルス分離に適し

ていることを示し、我々の検討結果と矛盾がないものであった。

これまで、アデノウイルスの盲継代において5回以上の凍結が必要と経験的に言われているが3回で十分であり、それ以上の凍結融解はかえってウイルス分離効率を下げる可能性があることが示唆された。我々は、以前電子顕微鏡を用いて凍結融解回数ごとのアデノウイルスを観察した。その際に、凍結回数3回以上ではアデノウイルス粒子に損傷が見られきれいなウイルス写真を撮ることができなかった。アデノウイルスは細胞核内で増幅し、細胞外にウイルスを放出するために凍結融解が必要であるが、その回数は病原体診断マニュアルにあるとおり3回が適していることが示唆された。ただし、このデータについては繰返し実験によって多種の血清型についての検証が必要である。ただし、本データからアデノウイルス分離に用いる臨床検体を4回以上凍結融解することは避けるべきと考えられた。

## E. 結論および提言

A549細胞がアデノウイルスの病原体サーベイランスに適していると考えられたので、地方衛生研究所等でも積極的に導入すべきである。アデノウイルス分離の際の臨床検体の凍結融解を4回以上することは避けるべきと考えられた。

## F. 文 献

- 1 藤本嗣人、松野重夫、岡部信彦(2007)：アデノウイルスレファレンス活動のためのアンケート調査，第8回日本アデノウイルス研究会要旨，2007札幌市。
- 2 Watanabe M, Kohdera U, Kino M,

Haruta T, Nukuzuma S, Suga T, Akiyoshi K, Ito M, Suga S, Komada Y. (2005): Detection of adenovirus DNA in clinical samples by SYBR Green real-time polymerase chain reaction assay. *Pediatr Int.* 47: 286-291.

3 Smith CD, Craft DW, Shiromoto RS, Yan PO.(1986): Alternative cell line for virus isolation. *J Clin Microbiol.* 24: 265-268.

4 大金映子、船渡川圭次、藤本嗣人、浜本いつき、岡部信彦(2008)：栃木県における流行性角結膜炎患者からの5種類の細胞によるウイルス分離結果。病原微生物検出情報。29：101~101.

5 榎本美貴、近平雅嗣、藤本嗣人(2008)：アデノウイルスに対するL20B細胞（ポリオウイルス特異検出細胞）の感受性—兵庫県。病原微生物検出情報。29：101~102.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Fujimoto T, Izumi H, Okabe N, Enomoto M, Konagaya M, Chikahira M, Munemura T, Taniguchi K.(2009): Usefulness of real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the diagnosis of echovirus aseptic meningitis using cerebrospinal fluid. *Jpn J Infect Dis.* 62: 455-457.

2) 藤本嗣人、榎本美貴、小長谷昌未、谷口清州(2009): フロックスワブのアデノウイルス検体採取での有用性。感染症学雑誌。83: 398~400.

### 2. 学会発表

1) アデノウイルス採取におけるフロックスワブの有用性。臨床ウイルス学

会抄録集。37：S27(2009、高知).

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

表 1. 臨床検体のアデノウイルス血清型およびコピー数 (n=34)

血清型	検体数(n)	ウイルスコピー数(copy/ $\mu$ L)
1 型	7	$1.47 \times 10^4$ — $1.61 \times 10^7$
2 型	7	$6.74 \times 10^4$ — $1.13 \times 10^8$
3 型	8	$1.23 \times 10^6$ — $1.81 \times 10^8$
4 型	2	$5.48 \times 10^6$ — $1.60 \times 10^7$
5 型	5	$6.48 \times 10^5$ — $5.50 \times 10^7$
6 型	2	$1.43 \times 10^5$ — $9.82 \times 10^7$
7 型	2	$2.69 \times 10^4$ — $2.05 \times 10^7$
11 型	1	$1.22 \times 10^5$

表 2 アデノウイルス 2 型接種後の細胞別力価

Date after inoculation	Log TCID <sub>50</sub> /mL		
	HeLa	A549	RD
0.7	4.8	4.5	4.3
1	5.3	4.8	4.8
1.6	5.6	5.6	4.8
1.8	5.8	5.8	4.8
2	6.3	5.8	5.5
4	7.3	6.8	5.8
6	7.8	7.7	6.8
7	8	8.7	6.8
8	8	9.3	6.8
9	8	9.3	6.8
10	8.8	9.5	7.5
12	9.3	9.9	7.7
13	9.3	10	8
14	9.6	10	8.1

7 日以上(表のマーク部分)で A549 細胞の TCID50 が HeLa より高い。  
HeLa 細胞は 14 日間以降、細胞の維持が難しかった。



表 3 凍結融解回数とウイルカ価

維持日数	アデノウイルス 2 型凍結融解の回数と TCID <sub>50</sub> /mL				
	1 回	2 回	3 回	4 回	5 回
1 日目	6.4×10 <sup>3</sup>	1.0×10 <sup>4</sup>	6.4×10 <sup>3</sup>	6.4×10 <sup>3</sup>	6.4×10 <sup>3</sup>
2 日目	6.4×10 <sup>4</sup>	6.4×10 <sup>4</sup>	6.4×10 <sup>4</sup>	6.4×10 <sup>4</sup>	6.4×10 <sup>4</sup>
3 日目	4.0×10 <sup>6</sup>	1.0×10 <sup>6</sup>	6.4×10 <sup>5</sup>	6.4×10 <sup>5</sup>	6.4×10 <sup>5</sup>
4 日目	6.4×10 <sup>9</sup>	6.4×10 <sup>9</sup>	6.4×10 <sup>9</sup>	6.4×10 <sup>8</sup>	1.0×10 <sup>9</sup>

遺伝子検査を用いた百日咳サーベイランスシステムの構築と評価に関する研究

分担研究者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

**研究要旨** 百日咳流行の早期探知を目的に、遺伝子検査に基づく百日咳サーベイランスシステムの構築を行った。地方衛生研究所 6 機関(秋田、東京、神奈川、大阪、愛媛、高知)の協力を得て、2009年9月より百日咳疑い患者を対象に百日咳 LAMP 検査を開始した。検査結果は月毎に国立感染症研究所細菌第二部において取りまとめを行い、地方衛生研究所と情報の共有化を図った。2010年1月までの検査実績は 74 件であり、そのうち 7 件(9.5%)が検査陽性を示した。陽性検体はすべて高知県内の医療機関から提出されたものであり、同県内では百日咳が散発している可能性が指摘された。次年度から本サーベイランスシステムの精度ならびに有用性の評価を行う予定である。

**研究協力者**

八柳潤(秋田県健康環境センター)  
奥野ルミ(東京都健康安全研究センター)  
高橋智恵子(神奈川県衛生研究所)  
勝川千尋(大阪府立公衆衛生研究所)  
烏谷竜哉(愛媛県立衛生環境研究所)  
藤戸亜紀(高知県衛生研究所)  
松本一繁(同上)  
鯉坂裕美(国立感染症研究所 細菌第二部)

**A. 研究目的**

百日咳は百日咳菌(*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、近年では青年・成人患者の増加が世界的に認められている。百日咳の臨床像は長期の咳嗽、発作性の咳であるが、小児に比較して青年・成人の臨床像は非典型的である。そのため、青年・成人患者の臨床診断は難しく、わが国で報告されている青年・成人患者数は氷山の一角と考えられている。2007年、わが国では大規模な百日咳集団感染事例が散発し、その多くが大学等の施設で発生した。その際、流行を早期に探知することが出来なかったため、感染者が 200 名を超える大規模な集団感染事例にまで発展した。

百日咳の早期探知には病原体診断が有効であり、特に簡便な LAMP 法(loop-mediated isothermal amplification)は百日咳の遺伝子診断に有効な方法と考えられている。しかし、遺伝子検査は国内外を含めまだ研究室レベルで実施されているに過ぎず、病院検査室への普及が今後の課題となっている。国立感染症研究所では地方衛生研究所と協力して百日咳検査の強化・拡充を図り、現在多くの地方衛生研究所で百日咳 LAMP 検査が可能となってきた。

以上の背景を踏まえ、本研究では百日咳の地域流行の早期探知を目的に、地方衛生研究所 6 機関と協力して LAMP 法を用いた百日咳サーベイランスシステムの構築を行った。また、世界の百日咳流行株には遺伝的変化が認められていることから、流行株の遺伝子型別を同時に実施した。

**B. 研究方法**

**検査体制:** 百日咳の遺伝子検査は、地方衛生研究所 6 機関(秋田県健康環境センター、東京都健康安全研究センター、神奈川県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、愛媛県立環境研究所、高知県衛生研究所)において実施した(Fig. 1)。検査材料は百日咳疑い患者の鼻腔スワブとし、検査には百日咳 LAMP 法を用いた。

なお、施設間差を排除するため、百日咳 LAMP キットは感染研・細菌第二部で作製されたものを統一して使用した。

検査結果の取りまとめ：検査結果は月毎に感染研・細菌第二部に電子メールで報告し、検査数と陽性数を同部で集計した。集計結果は地方衛生研究所の研究協力者に電子メールにて報告した。

遺伝子型別：百日咳 LAMP 陽性検体は感染研・細菌第二部に郵送し、同部において遺伝子型別を実施した。

遺伝子型別は百日咳菌のアレル遺伝子 (*ptxA*, *prn*, *fim3*) を標的とした multilocus sequence typing により実施し、標的遺伝子を患者 DNA 検体から直接 nested PCR により増幅した。

(倫理面への配慮)

患者検体は医療機関において連結可能匿名化し、研究協力者ならびに分担者には患者個人が特定出来ないよう配慮した。なお、検体は診断目的に採取され、医療機関の依頼を受けて検査を実施した。

### C. 結果

地方衛生研究所 6 機関の協力を得て、LAMP 法を用いた百日咳サーベイランスシステムを構築した (Fig. 2)。2009 年 9 月から検査を実施し、2010 年 1 月までの検査実績は 74 検体であり、そのうち高知県内で採取された 7 検体 (9.5%) が検査陽性を示した (Table 1)。一方、高知県以外では検査件数 (31 件) が少ないものの、陽性例を認めることは無かった。高知県での陽性率は 16.3% (7/43) を示したことから、同県内では百日咳が散発している可能性が指摘された。なお、高知県における陽性検体は 2009 年 9-11 月に認められ、2009 年 12 月以降はすべて検査陰性を示した。

LAMP 陽性検体について遺伝子型別を実施した結果、7 検体中 2 検体で遺伝子型が決定された (Table 2)。遺伝子型が決定された 2 検体はいずれも MLST-2 (*ptxA1/prn2/fim3A*) を示し、遺伝子型は欧米型の流行株に一致した。なお、アレル遺伝子である *ptxA*, *prn*, *fim3* の決定率はそれぞれ 71% (5/7)、29% (2/7)、43% (3/7) と算出され、*ptxA* に比較して *prn* と *fim3* の決定率

が低いことが指摘された。

### D. 考察

本研究では、地方衛生研究所 6 機関の協力を得て LAMP 法に基づく百日咳サーベイランスシステムの構築を行った。本システムは地域的な百日咳流行の早期探知ならびに流行株の監視を目的とし、次年度以降、本システムの精度ならびに有用性を評価する予定である。2009 年 9 月から本システムを稼働させ、現在 (2010 年 1 月) までに 74 検体について遺伝子検査を実施した。そのうち 7 検体が検査陽性を示し、それらの検体はすべて 2009 年 9-11 月に高知県内の医療機関で採取されたものであった。高知県以外では陽性例が認められなかったことから、高知県では百日咳が散発している可能性が指摘された。ただし、2009 年 9-11 月における高知県の百日咳報告患者数は 43 名であり、感染症発生動向調査では散発の可能性は指摘されていない。同時期 (第 32-48 週) に全国から報告された患者数は 1,258 名であり、高知県は全体の 3.4% を占めるに過ぎなかった。今後、感染症発生動向調査との感度比較が必要である。

百日咳流行株は複数の遺伝子型を示し、世界の百日咳流行株はワクチン型 (MLST-1) から欧米型 (MLST-2) にシフトしている。わが国では欧米型は 1994 年に出現し、近年では臨床分離株の約 50% を占めるようになった。この欧米型はワクチン株とは異なる抗原遺伝子 (*ptxA*, *prn*, *fim3*) を有することから、欧米ではワクチンを回避するために出現した可能性が指摘されている。今回構築したシステムでは流行株の監視を第二の目的とし、患者検体からの直接タイピングによりワクチン型と欧米型の流行状況を把握できるようにした。現在までに検査陽性 7 検体についてタイピングを行い、高知県内で採取された 2 検体はいずれも欧米型 (MLST-2) を示し、同県内では欧米型による散発例の可能性が指摘された。なお、7 検体中 5 検体では *ptxA*, *prn*, *fim3* のうち 1 または 2 遺伝子が解析できなかったため、流行株の遺伝子型を決定することは出来なかった。この原因として検体中の菌 DNA 量が低いことが上

げられ、MLST 法に代わる高感度な型別法の必要性が指摘された。

### E. 結論

百日咳流行の早期探知を目的に、地方衛生研究所 6 機関の協力を得て遺伝子検査に基づく百日咳サーベイランスシステムを構築した。本システムは 2009 年 9 月から稼働し、現在までに 74 検体について検査を実施した。次年度からは本サーベイランスシステムの有用性を評価する予定である。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表(出版図書等)

なし

#### 2. 学会発表

- 1) 蒲地一成. 分子疫学から見た百日咳流行株の細菌学的特性. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 22 年 3 月, 横浜(予定)

### 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



Fig.1 遺伝子検査を用いた百日咳サーベイランスの協力機関

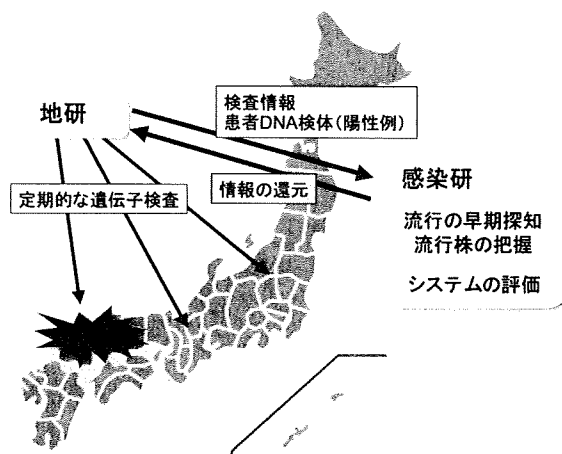


Fig.2 百日咳サーベイランスの概要

Table 1. 百日咳LAMP検査の結果(2009-2010.1)

	陽性数/検査数				
	2009年				2010年
	9月	10月	11月	12月	1月
秋田県		0/2			
東京都		0/4	0/1	0/2	
神奈川県		0/9	0/4	0/2	
大阪府		0/0	0/0	0/0	
高知県	4/14	2/16	1/4	0/8	0/1
愛媛県		0/0	0/1	0/1	0/5
合計	4/14	2/31	1/10	0/13	0/6

Table 2. 百日咳菌の遺伝子型(MLST)

		都道府県	ID	MLST	<i>ptxA</i>	<i>prn</i>	<i>fim3</i>
2009年	9月	高知県	1109	ND	1	ND	ND
		高知県	1110	ND	ND	ND	A
		高知県	1136	2	1	2	A
		高知県	1118	2	1	2	A
10月	高知県	1125	ND	1	ND	ND	
	高知県	1131	ND	ND	ND	ND	
11月	高知県	1147	ND	1	ND	ND	

厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興研究事業)  
分担研究報告書

マイコプラズマ感染症サーベイランス戦略のための研究

分担研究者 堀野敦子 国立感染症研究所・細菌第二部 研究員

協力研究者 荒川宜親 国立感染症研究所・細菌第二部

見理 剛 国立感染症研究所・細菌第二部

八柳 潤 秋田健康環境センター

奥野ルミ 東京都健康安全研究センター

高橋智恵子 神奈川県衛生研究所

勝川千尋 大阪府立公衆衛生研究所

松本一繁、藤戸亜紀 高知県衛生研究所

烏谷竜哉 愛媛県立衛生環境研究所

研究要旨

*Mycoplasma pneumoniae* は *Mycoplasma* 属の細菌で細胞壁を持たず、宿主に依存して生存する自律増殖可能な最小クラスの細菌である。*M. pneumoniae* はヒトにマイコプラズマ肺炎を起こす。マイコプラズマ肺炎は第五類感染症に指定されており、全国の基幹定点から報告がなされている。このマイコプラズマ肺炎は、高熱、特徴的な肺炎像のほかに長引く乾性の咳が特徴である。マイコプラズマ肺炎同様に、長引く咳が特徴的な呼吸器疾患の一つに百日咳があるが、最近、百日咳が疑われた症例の中にマイコプラズマ肺炎が原因である症例が報告された。これをうけて、百日咳疑いの症例に *M. pneumoniae* 感染症がどの程度含まれるのか、全国 6 カ所の地方衛生研究所の協力を受けて、検討を行うこととした。また、*M. pneumoniae* の感染が確認された場合には菌の型別を行い、感染症情報センターの流行情報と比較し、全国の流行と型別の関連を調べることとする。*M. pneumoniae* の流行と菌型の変遷には相関がある可能性がこれまでに示唆されているが、この可能性についても検討を行えると期待される。

また、*M. pneumoniae* 感染症のサーベイランスを行う上で、マイコプラズマ肺炎だけでなく、肺炎に至らない *M. pneumoniae* 感染症をサーベイランスの項目に含める可能性についても知見を収集し検討を行う。

## A. 研究目的

本研究では、百日咳感染が疑われた患者から *M. pneumoniae* による感染が確認されたことを受けて、まず、百日咳感染が疑われた患者のうち *M. pneumoniae* に感染した患者がしめる頻度について検討する。これまでこのような調査が行われていないことから、現状を把握する必要があると考えている。

さらに、患者検体から *M. pneumoniae* 遺伝子が検出された場合には、菌型の型別を行う。*M. pneumoniae* の菌型は宿主への細胞吸着に関与するタンパク質の遺伝子 *p1* の型によって分類される。日本ではこれまで I 型、II 型、II 型亜種が報告されている。患者から検出される *M. pneumoniae* の菌型の遷移と肺炎マイコプラズマの流行には関連があるのではないかという報告があるが、詳細は明らかになっていないため、今回の検体で可能であれば、感染症情報センターの流行情報と併せて検討を行う。

現在、*M. pneumoniae* の感染が遺伝子検査で検出された際でも、症状が肺炎ではない場合には報告ができない。しかし、肺炎マイコプラズマは通常、比較的病状が軽い肺炎で「walking pneumonia」とも呼ばれている。また、肺炎を起こしていない患者であっても、感染を広げる可能性はある。これらのことから、肺炎に至らない呼吸器感染症の患者から *M. pneumoniae* が検出

された場合にもサーベイランスに入れたほうがよいか、知見を収集し検討を行いたい。

## B. 研究方法

### 1) 百日咳感染が疑われる患者検体中にしめる *M. pneumoniae* 感染について

秋田県、東京都、神奈川県、大阪府、高知県、愛媛県の 6 カ所の地方衛生研究所の協力を受けて検討を行う。各地方衛生研究所で、百日咳感染が疑われる鼻咽頭スワブから QIAamp DNA micro を用いて抽出したゲノム DNA について百日咳（分担研究者蒲地分）と肺炎マイコプラズマについて LAMP 法を行う。毎月末に、その結果が国立感染症研究所・細菌第二部・分担研究者に報告される。百日咳が疑われた患者に占める *M. pneumoniae* 感染の割合を検討する。

### 2) *M. pneumoniae* の型別と流行の関係

各地方衛生研究所で行われた *M. pneumoniae* の LAMP 法の結果が陽性だった検体のゲノム DNA が細菌第二部に送付される。このゲノム DNA を用いて PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 法で *p1* 遺伝子の型別を行う。

### 3) *M. pneumoniae* による感染症の届出について

*M. pneumoniae*に感染した場合、肺炎に至らない患者でも、発熱、咳等の症状は呈するため、感染源となることが考えられるが、現在のところ *M. pneumoniae*に感染していても肺炎の症状を呈さない場合には届出を行うことができない。流行を把握する点からも、患者から *M. pneumoniae* の感染が確認された場合には、届出を行うことが望ましい可能性も考えられるため、知見を収集し検討する。

(倫理面への配慮)

平成21年度は倫理面に配慮が必要な検討は行っていない。

## C. 研究結果

### 1) 百日咳感染が疑われる患者検体中にしめる *M. pneumoniae* 感染について

今年度はまずシステムの構築と立ち上げを行った。平成21年10月より、全国6カ所の地方衛生研究所で *M. pneumoniae* の LAMP 法を行って貰い、毎月末に集計結果を送付してもらっている。現在データ収集中であるが、既に数例 *M. pneumoniae* 感染例が検出されている。

### 2) *M. pneumoniae* の型別と流行の関係

RFLP 法の基礎検討を行ったところ、*M. pneumoniae* の型別に用いるためにこれまで使用してきた PCR-RFLP 法のプライマーセットでは感度が低く、臨床検体を鋳型

とした場合に PCR で増幅できないケースがあることが明らかになった。このため、まず、PCR-RFLP 法を Nested PCR 化することにした。新しく設計した Nested primer セットを使用したところ、臨床検体における型別の成功率が上昇した。このプライマーセットを用い、地方衛生研究所から送付されたゲノム DNA を鋳型として *M. pneumoniae* の型別を行っている。現在5例について型別が終了した。

### 3) *M. pneumoniae* による感染症の届出について

現在知見収集中である。

## D. 考察

今年度は、まず、システムの立ち上げを行った。全国から6カ所の地方衛生研究所が協力機関として参加している。

この研究では、まず、百日咳感染が疑われる患者にしめる *M. pneumoniae* 感染者の実情を把握することを目的としているため、スワブによるサンプリングは百日咳感染が疑われる患者の鼻咽頭から行い、検体は乾燥状態で輸送される。このため乾燥に弱い *M. pneumoniae* は死滅するので、生菌の分離は行うことができない。

今年度はデータの収集が始まったばかりだが、ゲノム DNA からは LAMP 法により数例の *M. pneumoniae* が検出されている。今後、データを集積して検討を行う予定である。

また、送付された DNA を用いた菌の型

別も検討が始まったところだが、今までとは異なるシフトが起きている可能性も考えられる。過去の報告から、現在は日本ではⅡ型優勢になっているとみられていたが、現在のところⅡ型は検出されず、Ⅱ型亜種とⅠ型が半々となっている。データの収集を続けて実情を把握する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許所得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

特筆事項なし



別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年

国際的な感染症情報の収集、分析、提供機能および我が国の感染症サーベイランスシステムの改善・強化に関する研究

性感染症発生動向調査強化のための個別動向調査に関する研究

研究分担者 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 渡辺 祐子 神奈川県衛生研究所

研究要旨：

淋菌の多剤耐性化は国内のみならず、世界的な公衆衛生上、大きな問題となってきた。これまで様々な耐性淋菌が世界に先駆けて出現した日本において、薬剤耐性淋菌サーベイランスの必要性が高い。本研究では、淋菌感染症に関して個別動向調査設計のために単一定点を設定し、レトロスペクティブに薬剤耐性度の推移を解析した。1990年代後半に日本で初めて分離された経口第3世代セファロスポリン剤に対する耐性菌の分離数の解析から、1995年に初めて分離された後、3年後の1998年には5%以上の耐性率を示した。また、2001年には30%以上の耐性率であったことが示されていた。一地域あたり年間50株程度の解析を行うことで、その地域の薬剤耐性動向を把握可能であり、耐性菌の広がりを早期検知することも可能であることが示唆された。この結果を踏まえて、薬剤耐性淋菌のサーベイランスの基本設計を行った。

A. 研究目的

淋菌感染症の推定新規発生数は世界で年間6200万人とされる。国内での性感染症定点からの新規報告数は1万件程度であり、年間3～8万件が実数として推測されている。

淋菌感染症対策の根幹は効果的な治療に基づいた感染サイクルの遮断し、新たな感染の抑止することにある。しかしながら、近年多様な抗生物質に対する耐性化が進み、現在では世界的に治療に用いられる薬剤は限定されてきた（図1）。淋菌の多剤耐性化は国内のみならず、世界的な公衆衛生上で大きな問題となってきた。内外において、事実上治療に用いられる薬剤は2種、3剤に限られている（図2）。その中のひとつスペクチノマイシンに対しては、過去に耐性菌が出現した事実から、使用量が増加する事で容易に耐性菌が出現することが予測

されている。そのため、注射用セファロスポリンであるセフトリアキソン耐性淋菌の出現は、世界的な淋菌感染症対策の大きな脅威となっている。

薬剤耐性淋菌対策のために、効果的なサーベイランスが必要であることが提唱されている（WHO consultation on STI management guidelines, Montreux, April 2008）。しかしながら、国内において複数の施設で独立した地域サーベイランスは存在してきたが、体系的なサーベイランスは存在せず、また地域でのサーベイランスを統合したデータの蓄積はない。本研究において薬剤耐性淋菌のサーベイランス戦略を提案し、公衆衛生行政への提言に結びつけることを目的とする。

国内において、薬剤耐性淋菌の出現様式は2つに大別されると考えられる。一つは、世界で初めての耐性菌が国内で分離され、

国内での蔓延を経て、海外へ輸出されるケースである。1990年代末に出現したセフェキシム低感受性／耐性淋菌がその例とあげられる。もうひとつの様式は、海外で出現し国内へ侵入するケースである。ペニシリン分解酵素産生性淋菌のケースがその例としてあげられる。

本年は、国内で出現したケースを想定して、過去の耐性淋菌の出現と国内での拡散をレトロスペクティブに解析することで、戦略的なサーベイランス構築のために利用することとした。

解析対象に用いたのは、1999年世界で初めてその出現が認められた第3世代経口セファロスポリン低感受性／耐性淋菌とした。本耐性菌は、北九州市での分離例が最初の報告となる。その後、全国的に蔓延した。それまで、国内で頻用されていた経口第3世代セファロスポリン剤、セフェキシム、の利用が推奨されなくなった低感受性／耐性菌出現事例である。

## B. 研究方法

神奈川県衛生研究所で実施されている淋菌サーベイランスで得られた、菌株情報を基にレトロスペクティブに解析を行った。対象は経口第3世代セファロスポリン、セフェキシム低感受性／耐性淋菌とした。0.25 µg/ml以上のMICを示す株を、セフェキシム低感受性／耐性菌とした。

## C. 研究結果

これまでのセフェキシム低感受性／耐性

淋菌の出現に関して、その初期段階(1999-2001)における現状を報告した論文から、以下のようにまとめることができる(図3)。

(1) 1999年5月：北九州市で初めて分離された。

(2) 1999年12月には分離された約半数が耐性菌であり、地域内で蔓延したこと。

(3) 2000年には、東京において既に分離率は10%を超えていたこと。

(4) 中部地方では、2000年には耐性菌の分離が認められなかったが、2001年には分離率は20%を超えていたこと。

いずれの報告においても、検体数は年間50例～150例となっていた。

そこで神奈川県衛生研究所で実施されている淋菌サーベイランスのうち、1995-2001年における分離数とセフェキシム低感受性／耐性株数を調査し、図4にまとめた。

この期間に収集された菌株数は498株であり、年間35株から94株であった。

神奈川県研で分離されたセフェキシム低感受性／耐性淋菌の初発例は1995年であった。1996年の分離例はなかったが、1997年再度セフェキシム低感受性／耐性淋菌が分離された。その後1998年には87株中5株が低感受性／耐性菌であり、分離頻度は5%を超えた。その後分離頻度は5~10%程度で推移し、2001年には30%を超えたことが示されていた。

この結果は、初発例はこれまでの報告よ

り4年近く遡ることを示すことになった。

一方で、東京での分離報告とは良く一致していた。つまり、東京での2000年分離淋菌の解析53株中9株(17%)がセフェキシム低感受性/耐性淋菌であり、神奈川衛研での結果は54株中6株(11.1%)であった。

中部地方での蔓延は、北九州および東京/神奈川での蔓延からは、1~3年遅れていたことが推測された。

#### D. 考察

薬剤耐性淋菌に関して限られた情報のなかで、独立した地域サーベイランスの情報をレトロスペクティブに統合する試みを行った。それぞれのサーベイランスは比較的少数の検体(n=35~150)をあつかったものであるため、サーベイランスデータとしての精度等に関しては不十分である。しかしながら、薬剤耐性菌の早期探知に限れば、十分に意味のあるデータを得ることが出来ていたと考える。

日本で出現し、国内で拡散したケースを取り上げてデータの精査を行った。このようなケースにおいては、年間50株の解析を行うことで、(1)臨床上問題になった時期よりも数年早く耐性菌の出現を早期探知することが可能であったこと、(2)菌株情報に基づいた複数施設による地域サーベイランスから得られたデータ比較を行うことで国内での拡散の様子をトレースすることの可能性を示唆する結果を得た。

地域性を考慮しながら、複数地域に病原体サーベイランス定点を設定することで新

規に出現する薬剤耐性淋菌を早期探知することが可能である。一定点の解析サンプル数は50株程度が妥当であると考えられる。また各地域サーベイランスのデータ比較を行うことが重要である。

海外における薬剤耐性淋菌のサーベイランスとしては、米国の Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP) と英国の Gonococcal Resistance to Antimicrobials Surveillance Programme (GRASP)が現在稼働しており、そのシステムは我が国で必要とされるサーベイランスシステムの設計の参考となる(図5・6)。いずれも、全国に20-30カ所のSTDクリニックを定点として設定している。

薬剤耐性淋菌のトレンドを把握すること、新規耐性株の出現を早期に検出することを目的としていることから、それぞれのシステムにおいて対象菌株は制限されている。これは淋菌が他の病原細菌に比べて培養、特に保存と輸送が容易ではないことが原因であると思われる。GISP においては各定点における月はじめから25分離株を対象としており、GRASP においては6-8月の分離株に限定して解析を行っている。

淋菌の分離、保存、および薬剤感受性試験をどの機関、施設で行うのかは、現実的な問題として大きい。GISP に関しては、各クリニックでの分離同定後保存し、一月に一度4つの地域検査機関にまとめて送付する形態となっている。国内においては検査室を併設する医療機関へのSTD患者の受診は稀であり、GISP スタイルを構築す