

疾患別のサーベイランス案： 咽頭結膜熱

1. 目的（病原体サーベイランスの公衆衛生的な意義）
 - 1) アウトブレイクをできるだけ早期に探知する。
 - 2) 咽頭結膜熱流行時における起因アデノウイルスの血清型、遺伝子的な変異を把握することによって、科学的に流行状況を把握する。例えば日本国内での検出はほとんどないが海外で致死感染の流行を引き起こしている 14 型など危険な型の流行を探知し国民および医療関係者に周知することにより発生・拡大を防止する。
 - 3) 流行株の Characterization により、病原体の流行型を特定し、今後の対策に役立てる。

2. 検体採取の対象
 - 1) 臨床的に発熱、咽頭発赤、および結膜充血から咽頭結膜熱と診断された症例
 - 2) 臨床的、疫学的、またはウイルス学的にアデノウイルス感染症が強く疑われ、他の起因病原体が確定していない肺炎症例および死亡例など・・・3, 7 および 14 型は咽頭結膜熱の起因病原体であると同時に肺炎、重篤な場合は致死感染も引き起こしやすい

3. 目的を達成するためのサンプリング方法
 - 1) ランダムサンプリング（この場合、目的を達成するために必要な検体数（サンプル数）と統計学的な解析のための分母としての総検査検体数）
 - 2) 集団発生例は、出来る限りサンプリングする。

- 3-1. すべての地衛研で行うべきか？
 - ・アデノウイルスは局地的な流行をすることがあるので、すべての地衛研で行うことが望ましい（ウイルス分離等）
 - ・しかし、精細な遺伝子解析等は、煩雑性、予算面等の制約から一定の地衛研のみで行うか、あるいは研究班を組織して、そのネットワークでやるべきと思われる。

4. 目的を達成するための必要な検索方法
 - ・ 分離・培養
 - ・ 血清型
 - ・ 遺伝子型(PCR-sequence など)

5. 健康危機と考えられる状況
 - ・ 日本でこれまで分離が希な型の検出
 - 例) 2010 年までに 2 例しか報告がなく、海外で重症例を多発させた 14 型
 - ・ アデノウイルス性肺炎の多発
 - ・ 新型アデノウイルスの流行
 - (近年報告されたアデノウイルス 56 型流行) など

サーベイランス スタンダード (咽頭結膜熱)

1) 疾病名 咽頭結膜熱

2) 疾病対策の目標 被害の軽減 (流行および集団発生の抑制、重症例や死亡例を最小限に抑えること)

3) サーベイランスの必要性 (戦略的考え方) 咽頭結膜熱はアデノウイルスにより発症する主要な感染症の一つである。そのため、咽頭結膜熱のサーベイランスはアデノウイルス性呼吸器感染症サーベイランスと言い換えることができる。アデノウイルスは、呼吸器からの飛沫感染や接触による感染など様々な経路で感染し、学校等で集団発生することがある。手指の衛生対策やマスクによって感染防御はある程度可能と思われる。特にアデノウイルス 7 型などの病原性が強い型が流行した場合、肺炎等の死亡例が発生することがあるので、病院等への感染拡大に注意するなど国民および医療関係者等に啓発する。

近年、アデノウイルス遺伝子を解析することで、変異株や新型株の流行を迅速に把握できるようになりつつある。変異株や新型株は流行しやすいので、その検出および報告は疾病対策の目標 (被害の軽減) に活用可能と思われる。近年、新型アデノウイルスがあいついで報告され、日本でも流行している。また、例えば日本国内での検出はほとんどないが海外で致死性の感染症の流行を引き起こしている 14 型など危険な型の流行を探知し国民および医療関係者に周知することにより発生・拡大を防止する。

4) 必要なサーベイランスのタイプ

- 定点サーベイランス
 - ・ 目的: Morbidity の Monitor
 - ・ 対象: 代表性のある定点医療機関での週毎の咽頭結膜熱疾患 (PCF) の診断数/週毎の総受診数
 - ・ 定義: PCF
- 病原体サーベイランス (ある意味では確定例サーベイランス)
 - ・ 目的: 流行ウイルスの血清型と変異の Monitor
 - ・ 対象: 病原体定点
 - ・ 定義: PCF
- (重症例/入院例サーベイランス)・・・将来的に保育園サーベイランス・学校サーベイランス等との連携で実現可能か検討
 - ・ 目的: 重症度の Monitor
 - ・ 対象: 要件等 (捕捉手法など)
 - ・ 定義: 重症例 (肺炎等の呼吸器感染症による入院症例)
- (クラスタ (アウトブレイク) サーベイランス)・将来的に保育園サーベイランス・学校サーベイランス等との連携で実現可能か検討
 - ・ 目的: 流行の早期探知
 - ・ 対象: 保育園サーベイランスの参加園 (1600)・学校サーベイランスの参加

校（1万）、同参加地域

- *2010年12月の参加数（全校の20%以上）
- 定義：（10名）以上の咽頭結膜熱様疾患（PCF）の集積

5) 症例定義

- 1) 発熱（37.5℃以上）AND 咽頭発赤 AND 結膜充血

[問題点と解決] 上記の3つの症状は同時に発症するわけではなく、特に結膜充血はアデノウイルスが咽頭から証明された症例の3割以下しか見られないことが報告され、結膜充血はアレルギー等他の疾患でも起こりえる。

そのため、次の2)も症例定義に加える。

- 2) 発熱（37.5℃以上）AND 咽頭発赤 AND アデノウイルスの咽頭または結膜から検出され、臨床的に咽頭結膜熱と診断された症例

6) 必要な報告データ

- 定点：1週間の各定点医療機関の年齢群別 PCF 診断数と総外来受診患者数
- 病原体：年齢、居住地（市町村）、検体採取日、定点医療機関番号、中和による血清型同定か遺伝子解析による型同定
- PCFに加えて、下気道炎、肺炎等を発病していないか
- 病原体については、1週間の総検体数

7) 想定される集計方法、解析と評価方法

- 定点あたり報告数（総数、年齢群別、地域別）
- 時系列の検出陽性率、型、種別検出数

8) アセスメントと対応具体的なアクションへのリンク

- いずれもベースラインを超えた時点より継続的な地域への情報提供
- ベースラインを超えた段階で、他のデータと総合して対策の転換を考慮する
⇒ ホームページ、通知、メディア等による注意喚起
- 重症例の増加（死亡例や肺炎症例からのアデノウイルス検出の増加）によって、ウイルスの血清型および詳細な遺伝子性状等の解析を地方衛生研究所、困難な場合はアデノウイルスレファレンスセンターで実施する。

9) サーベイランス評価のための指標

- 定点あたり報告数と病原体サーベイランス検体数の比率
- 都道府県別患者推計における標準誤差率
- 定点医療機関の人口捕捉率

10) 情報交換

- 地方情報センター、地方衛生研究所、中央情報センターにおける情報交換を密にするためコンタクトインフォメーションを明らかにしておく

厚生科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

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地方衛生研究所6機関の協力を得て、2009年9月から遺伝子検査に基づく百日咳サーベイランスを開始した。これまでに百日咳疑い患者検体 393 件について百日咳 LAMP 検査を実施し、26 検体(6.6%)が陽性を示した(調査期間:2009年9月~2011年1月)。陽性例は東京都 13 件、高知県 9 件、大阪府 4 件であり、秋田県、神奈川県、愛媛県では陽性例を認めなかった。流行株の遺伝子型を解析した結果、東京都では 4 種類、大阪府では 2 種類、高知県では 1 種類の流行株の存在を認めた。なお、平成21年度は高知県内でマイコプラズマの地域流行が認められ、同県では百日咳疑い患者の 5.4%(5/92)にマイコプラズマ遺伝子が検出された(百日咳菌の陽性率、1.1%)。百日咳の臨床診断にはマイコプラズマ肺炎が含まれることから、遺伝子検査による病原体鑑別の必要性が指摘された。

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)
堀野敦子(同上)

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。わが国では 2007 年に大学医学部生を中心とした集団感染事例が発生し、近年では中学生の集団感染や地域流行も認められている。ワクチン既接種者の臨床症状は非典型的であるため、臨床症状から百日咳の集団感染や地域流行を早期に探知することは困難である。そのため、狭い空間を長時間共有する施設に百日咳

菌が侵入すると、感染は容易に拡大する。事実、大学医学部で発生した集団感染事例では感染者が 200 名を超えた。

青年・成人百日咳患者の百日咳保菌量は乳幼児の 1/250 程度であり、その検出には高感度な遺伝子検査が有効である。百日咳遺伝子検査の一つである LAMP 法は特異性に優れることから、当該研究事業では本法を用いた百日咳サーベイランスシステムを構築し、平成 21 年 9 月から地方衛生研究所6機関の協力を得て運用を開始した。平成 22 年度は構築したサーベイランスシステムの評価を進めるとともに、遺伝子検査の有用性について検討を加えた。

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。検査材料は百日咳疑い患者の鼻腔スワブとし、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。

マイコプラズマ検査: 百日咳とマイコプラズマを鑑別するため、マイコプラズマに対する LAMP 検査も同時に実施した。マイコプラズマ検査は当該研究事業の一貫として実施され、マイコプラズマ LAMP キットは感染研・細菌第二部で作製されたものを使用した。

流行株の遺伝子型別: 百日咳 LAMP 陽性検体は感染研・細菌第二部に送付され、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研究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

2011 年 1 月までに百日咳疑い患者 393 名について遺伝子検査を実施し、26 件 (6.6%) が陽性を示した (表 1)。都府県別の陽性率は東京都 12.3%、大阪府 23.5%、高知県 5.4% であり、秋田県、神奈川県、愛媛県では陽性例を認めなかった。陽性件数を年別・都府県別にみると、2009 年の陽性例は高知県 7 件、大阪府 1 件、2010 年は東京都 13 件、大阪府 3 件、高知県 2 件であった (図 1)。

患者 DNA 検体を用いた遺伝子型別では 17 件中 8 件で MLST 型が決定され、2010 年は東京都で 3 種類の MLST 型 (MLST-1, MLST-2, MLST-4)、大阪府で 2 種類 (MLST-1, MLST-new type)、高知県で 1 種類 (MLST-2) の存在が確認された (表 2)。調査開始前の 2008 年には神奈川県と大阪府で 2 種類の MLST 型 (MLST-1, MLST-2) が検出されており、国内には少なくとも 4 種類の流行株が存在すること、さらに MLST-1 と MLST-2 の遺伝子型を持つ流行株が近年の主流を占めることが指摘された。

2010 年に高知県ではマイコプラズマの流行が認め

られ、百日咳疑い患者に対しマイコプラズマ遺伝子検査を同時に実施した (表 3)。2010 年 4 月から 2011 年 1 月までに百日咳と臨床診断された患者 92 名についてマイコプラズマの LAMP 検査を実施した結果、マイコプラズマ陽性者は 5 名 (5.4%)、百日咳菌陽性者は 1 名 (1.1%) であった。一方、マイコプラズマ肺炎と臨床診断された患者 (71 名) のうち、百日咳 LAMP 陽性者は 0 名であった。

D. 考察

2009 年 9 月から遺伝子検査に基づく百日咳サーベイランスを開始し、百日咳疑い患者 393 名のうち 26 名 (6.6%) から百日咳菌遺伝子を検出した。検査陽性例は東京都 (陽性率、12.3%)、大阪府 (23.5%)、高知県 (5.4%) に認められ、秋田県、神奈川県、愛媛県では陽性例を認めなかった。秋田県と愛媛県の検査数はそれぞれ 31 件と 9 件であり、両県では百日咳患者の発生自身が少ないものと考えられた。一方、神奈川県の検査数は 63 件であり、神奈川県では百日咳疑い患者は発生しているものの、真性の百日咳患者はかなり少ないものと推察された。今回、百日咳遺伝検査の陽性率が都府県で異なることが指摘され、この原因として 1) 地域流行の存在、2) 都府県における百日咳臨床診断の精度差、が挙げられた。

2010 年、東京都江戸川区では百日咳の地域流行が発生し、同年 7~8 月には区内の小中学生を中心に 8 株の百日咳菌が臨床分離された (図 1)。同時期における東京都の百日咳サーベイランス陽性率は 6 月が 0% (0/8)、7 月が 23.1% (3/13)、8 月が 50% (4/8)、9 月が 0% (0/21) であり、地域流行発生時に検査陽性率が上昇することが示された。このことから、遺伝子検査を用いた百日咳サーベイランスは地域流行の早期探知は難しいものの、地域流行の発生確認には有用と考えられた。ただし、2010 年は地域流行の発生自体が少なかったため、今後その有用性を検証する必要がある。

百日咳に罹患した乳児は咳嗽以外に吸気性笛声などの特徴的な臨床症状を呈するが、ワクチン既接種者の臨床症状は非典型的とされている。百日咳の類似疾

患としてクラミジア肺炎やマイコプラズマ肺炎が挙げられ、ワクチン既接種者を臨床症状から百日咳と診断することは困難である。2010年、高知県内ではマイコプラズマの流行が認められ、本調査では百日咳疑い患者に占めるマイコプラズマ疾患の割合についても検討を加えた。その結果、百日咳疑い患者の5.4%にマイコプラズマ遺伝子が検出され、百日咳疑い患者には遺伝子検査を用いた病原体診断の必要性が再確認された。一方、マイコプラズマ疑い患者71名から百日咳菌遺伝子は検出されず、マイコプラズマの臨床診断は百日咳を含まないことが示された。百日咳の臨床診断にはマイコプラズマ肺炎が含まれることから、遺伝子検査による病原体鑑別が必要である。

E. 結論

遺伝子検査を用いた百日咳サーベイランスを実施し、百日咳疑い患者の6.6%(26/393)から百日咳菌遺伝子を検出した。高知県では百日咳疑い患者の5.4%(5/92)からマイコプラズマ遺伝子が検出されたことから、遺伝子検査を用いた病原体診断の必要性が指摘された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表(出版図書等)

- 1) Han H-J, Kuwae A, Abe A, Arakawa Y, Kamachi K. Differential expression of type III effector BteA protein due to IS481 insertion in *Bordetella pertussis*. PLoS

ONE, in press.

- 2) Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Otsuka N, Saito R, Tsuruoka J, Katsuta T, Nakajima N, Okada K, Kato T, Arakawa Y. Marked difference between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. Clin Microbiol Infect. 17:365-70, 2011.
- 3) Kamano H, Mori T, Taminato T, Ishida T, Kishimoto N, Katami T, Sato M, Kamachi K, Mochida Y. Analysis of *Bordetella pertussis* agglutinin titers during an outbreak of pertussis at a university in Japan. Jpn J Infect Dis, 63:108-12, 2010.

2. 学会発表

- 1) 大塚菜緒, 蒲地一成, 豊泉裕美, 中村幸嗣, 荒川宜親. 百日咳菌における定着因子 Pm 欠損株の細菌学的特性. 第93回日本細菌学会関東支部総会, 平成22年10月, 東京
- 2) Kamachi K. Pertussis vaccine and *Bordetella pertussis*. The 7th Taiwan-Japan symposium on immunization and travel medicine, 2010, Taipei, Taiwan.
- 3) 中村幸嗣, 蒲地一成, 豊泉裕美, 齋藤良一, 鶴岡純一郎, 勝田友博, 立山悟志, 徳竹忠臣, 中島夏樹, 岡田賢司, 加藤達夫, 荒川宜親. 成人と小児における百日咳保菌量の差異について. 第84回日本感染症学会総会, 平成22年4月, 京都

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

表1. 百日咳LAMP検査の陽性率(地研別)

地研	検査数	陽性数	陽性率(%)
秋田	31	0	0
東京	106	13	12.3
神奈川	63	0	0
大阪	17	4	23.5
愛媛	9	0	0
高知	167	9	5.4
計	393	26	6.6

期間: 2009.9~2011.1

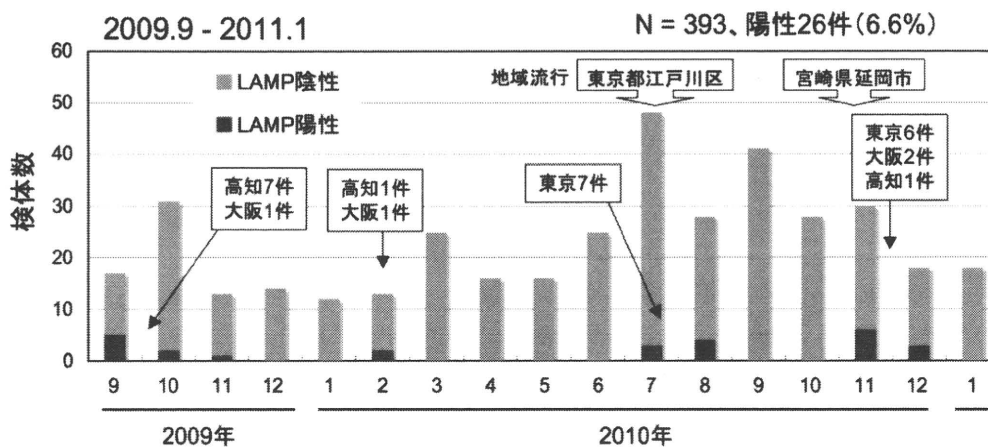


図1. 遺伝子検査を用いた百日咳サーベイランス, 2009年9月~2011年1月
百日咳疑い患者393名について百日咳LAMP検査を実施した。

表2. 百日咳流行株の遺伝子型 (MLST)

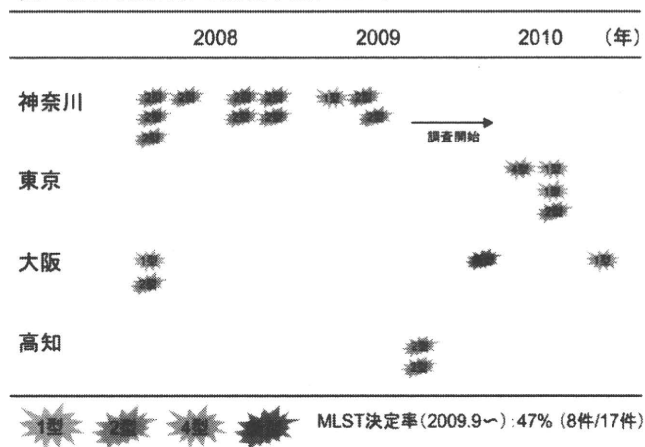


表3. 百日咳疑い患者からのマイコプラズマ遺伝子の検出^a

臨床診断	検査数	遺伝子検査 (LAMP法)	
		百日咳陽性数 (%)	マイコプラズマ陽性数 (%)
百日咳	92	1 (1.1)	5 (5.4)
マイコプラズマ肺炎	71	0	34 (47.9)

^a 高知県(2010年4月~2011年1月)

百日咳サーベイランス案

作成者: 蒲地一成、砂川富正、神谷元(国立感染症研究所)

1. 疾患名: 百日咳
2. 疾患対象の目標: 被害の軽減(重症例と死亡例を抑える)
3. サーベイランスの必要性: 百日咳は感染力が非常に強く、ワクチン未接種の乳幼児が感染すると死亡を含み重篤化し易い。本疾患はワクチン予防可能疾患に含まれるが、その免疫効果は4~12年とされ、免疫効果が減弱した青年・成人は乳幼児への感染源となる。百日咳サーベイランスは日本国内の青年・成人層を含めた流行を探知し、百日咳感染に対する注意喚起、乳児への百日せきワクチン接種の勧奨を促す。これらは最終的に乳幼児の重症例や死亡例の軽減に貢献する。
4. 必要なサーベイランスのタイプ
 - (ア) 青年・成人層を含んだ全数サーベイランス
目的: 現行の小児科定点把握では近年増加している青年・成人患者の把握が不可能であり、病原体診断を含めた正確な患者発生動向を把握し、適切な対応を実施し、疾病負荷を推定するためには全年齢層を網羅するサーベイランスが必要である
対象: 全数(小児科、新生児科、産婦人科、内科、耳鼻咽喉科を含む)
定義: 臨床診断例、可能性例および検査確定例(病原体診断)―要検討
 - (イ) 病原体サーベイランス
百日咳菌は培養陽性率が低く、広範囲に全ての臨床診断例に対して病原体の検出を行うことは労力的、予算的に不適である。近年の百日咳の流行は小学生以上の年長児・青年・成人を中心に認められることから、そのような流行の兆しが認められている地域の乳児、あるいはワクチン未接種児における臨床診断例・可能性例については全例、また、初期対応の重要性から施設等の集団発生例そのものについても病原体診断および継続的な病原体サーベイランスを実施する。
5. 症例定義(報告基準)
 - (ア) 臨床診断例(1、2をともに満たすもの):
 1. 2週間以上持続する咳嗽
 2. 以下のうち少なくとも一つを満たすもの
 - ① 吸気性笛声または痙攣性咳発作を伴う咳嗽発作
 - ② 咳嗽後の嘔吐または乳児の場合の無呼吸発作(* 孤発例、あるいは集団発生例にて、臨床診断例のみの報告である場合には、インフルエンザ、RS 感染症、マイコプラズマ、クラミジア、結核等の鑑別診断が除外可能であることが望ましい)
 - (イ) 可能性例:
 1. 臨床診断例(ア)を満たし、かつ発症からさかのぼって2週間以内に検査確定例との接触があること。
 - (ウ) 検査確定例:
 1. (ア)を満たし、かつ以下の検査①~③のいずれかが陽性となったもの。
 - ① 菌分離
 - ② LAMP 法・PCR 法などの遺伝子検査
 - ③ a-PT IgG を用いた血清学的検査―要検討(* 従来の東浜株・山口株を用いた菌血球凝集素を用いた検査法は乳幼児~成人のいずれにおいても採用しない)

6. 必要な報告データ

(ア) 症例基本情報 (性別、生年月日、居住地住所、診察を受けた医療機関名。学童・生徒・学生の場合には学校名・クラス名)

(イ) 臨床情報 (基礎疾患)

(ウ) 臨床症状：

- ① 以下の症状の有無 (2週間以上持続する咳嗽、吸気性笛声または痙攣性咳発作、咳嗽後の嘔吐または乳児の場合の無呼吸発作、発熱、鼻水、合併症 (肺炎・けいれん・脳症・他))
- ② 治療の有無・内容 (入院、抗菌薬投与・抗菌薬の種類・投与期間)
- ③ 検査の有無・内容 (菌分離、LAMP 法・PCR 法などの遺伝子検査、ペア血清 (抗 PT 抗体価)、鑑別診断検査 (* 孤発例、あるいは集団発生例にて、臨床診断例のみの報告である場合には、インフルエンザ、RS 感染症、マイコプラズマ、クラミジア、結核等の鑑別診断が除外可能であることが望ましい)

(エ) 家族における発症者状況 (特に乳幼児に関する情報は重要)：

(オ) ワクチン接種歴：DPT1 期初回 (1回・2回・3回)、1期追加、他

(カ) 感染源 (咳発症日より遡って2週間間の百日咳検査確定例との接触)

7. 想定される集計方法、解析と評価方法：

(ア) ラインリストに対する記述疫学、時系列での評価報告数 (総数、年齢群別、地域別)

8. アセスメントと対応具体的なアクションへのリンク

(ア) アセスメント：以下の①～⑤の項目の有無に対して検討する (IHR の概念を元に改変)

- ① 高い重症度 (死亡例を含む重症例の存在、乳児における発生)
- ② 異常な発生 (学校や施設などにおける集団発生のみならず、家族内感染などを経ての地域伝播の兆候が認められる)
- ③ 自治体 (市町村) を超えた伝播のリスクが高い
- ④ 自治体間の旅行や移動に対する注意喚起がなされたこと
- ⑤ 当該自治体より調査・対応支援の必要性に関する要請が感染研などの高次機関に寄せられる

(イ) アクション：上記 (ア) の①～④に該当する状況が発生した場合、以下の対応を行う。

- ① 当該地域への警報発令
- ② 乳幼児を中心として百日咳ワクチン接種対象者で未接種者における迅速接種勧奨 (当該自治体)
- ③ 医療機関内や乳幼児・出産まで 3 週間以内の妊婦のいる世帯に感染が波及した場合の積極的な介入
- ④ 当該地域の病原体サーベイランスの強化 (遺伝子検査の積極的導入、遺伝子検査による流行終息の確認)

9. サーベイランス評価のための指標

(ア) 乳児の報告数 (出来るだけ乳児人口当たり)

(イ) 他地域との比較、年毎の週別比較

10. 備考： 現行の届出基準は臨床診断に基づくため、病原体診断として菌培養検査と遺伝子検査を届出基準に加える (百日咳 LAMP—商品化)。現在用いられている凝集素価法などの血清診断は届出基準に入れない。WHO Recommended Surveillance Standards では、実験室診断として菌培養検査と遺伝子検査のみが挙げられている。

RECOMMENDED CASE DEFINITION

Clinical case definition

A person with a cough lasting at least 2 weeks **with at least one of the following:**

- paroxysms (i.e. fits) of coughing
- inspiratory “whooping”
- post-tussive vomiting (i.e. vomiting immediately after coughing)
- without other apparent cause

Laboratory criteria for diagnosis

- Isolation of *Bordetella pertussis*, or
- Detection of genomic sequences by polymerase chain reaction (PCR)

Case classification

Suspected: A case that meets the clinical case definition.

Confirmed: A person with a cough that is laboratory-confirmed.

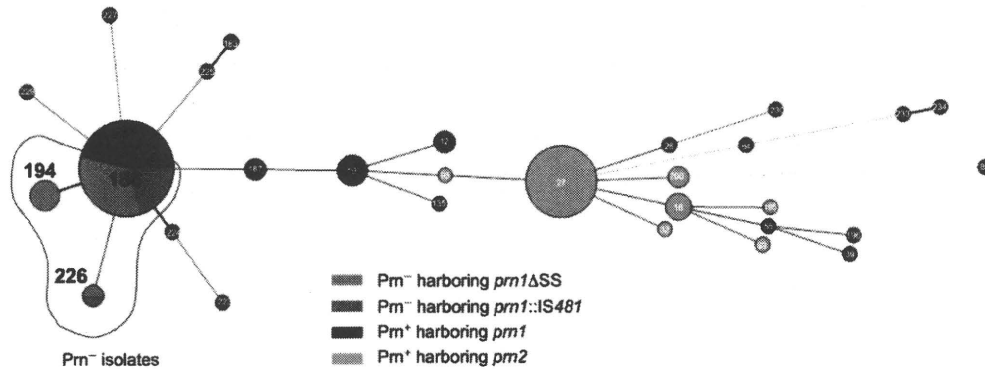
11. コンタクト情報

(ア) 国立感染症研究所(感染症情報センター+細菌第二部)、地方衛生研究所

百日咳病原体サーベイランス案

1.目的(病原体サーベイランスの公衆衛生的な意義)

- (ア) 咳を主訴とする疾患の集団発生時、百日咳の鑑別を確実に行うことが、その後の地域における乳児への対策強化、予防接種勧奨の強化のうえで重要である。
- (イ) 分離株を調べることにより、流行の実態を分子疫学的に把握することが可能となる
- (ウ) 複数の地域で流行が発生した場合、地域間の関連性を調べることが可能となる(広域アウトブレイク)
- (エ) 流行株の病原性ならびに抗原シフトの有無を解析することが可能となる



日本で分離された百日咳流行株(n=100)のMLVAタイプ。系統樹はMinimum spanning trees法により作図。オレンジは1995年以降に出現した欧米型流行株を示し、円の大きさは菌株数を反映する。

2.検体採取の対象

- (ア) 流行の兆しが認められる地域で、乳児およびワクチン未接種児の臨床診断例・可能性例については出来る限り全例
- (イ) 施設等で集団発生が発生した場合、典型的な有症者で抗菌薬未投与の者に限定
(集団発生の場合、通常は全患者数の1割以下の検査数で十分である。検査確定例との接触例における症例(可能性例)において検査は不要)

3.目的を達成するためのサンプリング法

- (ア) 「2. 検体採取の対象」の項と同様

・地方衛生研究所の関与

流行が認められた地域の地研が菌分離を実施し、流行が終息した時点で終了する。

4.目的を達成するための必要な検索方法

- (ア) 菌分離(地方衛生研究所)
- (イ) MLVA法による遺伝子型解析(地研または感染研)

5.健康危機と考えられる状況

- (ア) 流行において、新たな遺伝子型を持つ流行株が検出された場合(病原性)
- (イ) 複数のワクチン既接種者から菌分離がなされ、分離菌が単一の遺伝子型を示した場合(抗原シフト)
- (ウ) 重症例が複数報告され(重症度)、その分離菌が単一の遺伝子型を示した場合(病原性)

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

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* はヒトに感染して、肺炎や気管支炎を起こす。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、*p1* 遺伝子の配列に基づく菌の型別を行い、その結果を感染症情報センターの流行情報と比較して、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。今年度の目標としては地方衛生研究所からの検体がある

程度収集されたことから、その検体の解析を始める。まず、*M. pneumoniae* の型別を行い分離株の現状などを把握する。また、同時に送付される臨床情報についても検討を行う。

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ケースがあったことをふまえて、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。次いで *M. pneumoniae* 感染が疑われる患者について、同様に検討を行う。

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* の感染による疾患は「マイコプラズマ肺炎」という疾患名になっており、届出は肺炎が前提になっている。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。*M. pneumoniae* に感染した場合の臨床症状としては文献的に気管支炎、肺炎とされている。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届出を行う方がよい可能性も考えられるため、知見を収集し検討を行いたい。

また、届出基準には核酸診断法である PCR 法および LAMP 法が記載されていないが、*M. pneumopniae* の LAMP キットが発売されるなど、検査現場の現状をふまえて、これらを追記する働きかけも行いたい。

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 力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患者の鼻咽頭スワブから QIAamp DNA micro を用いて抽出したゲノム DNA を用いて百日咳（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。

今年度は *M. pneumoniae* 感染疑い例についても受け入れて検討する。

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 法の結果が陽性である検体のゲノム DNA は国立感染症研究所・細菌第二部に送付される。このゲノム DNA を鋳型として Nested 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、肺炎のほか、気管支炎、気道炎の患者でも、発熱、咳等の症状を呈する。このため感染源となることが考えられるが、現在のところ届出疾患名は肺炎マイコプラズマであり、肺炎を起こしていることが前提として考えられている。流行を把握する点からも、呼吸器疾患の患者から *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、地衛研より送付される患者の症状より知見を収集し検討する。

(倫理面への配慮)

平成22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* 感染と *M. pneumoniae* の診断情報について

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 法が行われ、毎月末に集計結果が送付されている。現在データ収集中であるが、高知県の例では百日咳疑い検体100件中、5例の *M. pneumoniae* 陽性が検出されている。一方で *M. pneumoniae* 感染疑いの検体からは現在のところ百日咳は検出されていない。また、地衛研から送付された *M. pneumoniae* LAMP 法陽性の患者症状の情報からは、約84%の患者が38.5℃以上の発熱を有することが示され、一般に発熱することの少ない百日咳疾患との鑑別の参考となる情報として38.5℃以上の発熱が有効であるとも考えられる。情報収集の継続を行う。

2) *M. pneumoniae* の型別と流行の関係

我々は昨年度より *M. pneumoniae* の型別に用いる RFLP 法を Nested 化して検討を行っている。この方法により検出感度は上昇したが、同時に非特異産物が増幅されて、制限酵素切断パターンが判定しにくくなっていった。このため、アニーリング温度の変更を行ったところ、非特異増幅がほとんどなくなり、判定が容易になった。現在、この方法で地方衛生研究所から送付される

M. pneumoniae LAMP 法陽性のゲノム DNA について、*M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子領域の配列に基づく型別を行っている。

型別の結果、これまで型別できた検体数は 53 件で、型別率は 71.6%、アニーリング温度の変更を行った後の型別率は 81.6%と上昇した。

型の割合は、Ⅰ型が 34%、Ⅱ型が 5.6%、Ⅱ型亜種が 60.4%となっている。高知は検体数も 37 件と全体の 50%を占めているが、Ⅱ型亜種の占める割合が 67.6%と顕著に高くなっている。次に検体数の多い愛媛ではⅠ型が 61.5%であった。また、Ⅱ型はすべての検体のうち、わずかに 3 件で、全体に占める割合は 5.7%にすぎなかった。

3) *M. pneumoniae*による感染症の届出について

肺炎以外の症状を呈する *M. pneumoniae* 感染症の患者の状況については現在知見収集中である。これまでのところ、患者情報がある *M. pneumoniae* 陽性の検体のうち、肺炎の報告がある患者は 38.7%であった。他の患者は気管支炎、上気道炎、下気道炎などの症状を呈していた。また、前述のように 84.5%の患者に 38.5℃以上の発熱があった。

4) *M. pneumoniae*の病原体サーベイランスについて

今年度、病原体サーベイランス指針の一例として *M. pneumoniae* の病原体サーベイランス案を作成し班会議で討論した。*M.*

pneumoniae は細菌の中でも培養や取り扱いが煩雑で、ある程度の習熟を必要とすることから、すべての検体について病原体を分離しようとすることは現実的ではない。しかしながら、病原体を分離し、保存しておくことにより、新たな薬剤耐性や遺伝子型などの検索が可能になる。また菌株を保有することにより薬剤感受性の測定など、表現系での検索を行うことができる。以上のことより、各地方衛生研究所で *M. pneumoniae* を分離できる技術レベルにあることが望ましい。その上で、病原体サーベイランスを行うのであれば、各地方ごとに *M. pneumoniae* の病原体サーベイランスを行える地方衛生研究所を指定し、データを収集する方法や、研究班の規模で *M. pneumoniae* の病原体サーベイランスを希望する地方衛生研究所と行う方法が現実的であると考えます。

D. 考察

この分担研究では全国から 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。

まずはじめに、百日咳感染が疑われる患者にどの程度 *M. pneumoniae* 感染者がいるのか、その実情を把握することを目的としていたため、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、検体は百日咳菌のゲノム DNA 抽出を行うことができる乾燥状態で輸送されている。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。しかし、この方法でも *M. pneumoniae* のゲノム DNA を検出するこ

とは可能であった。核酸検出法を目的とした場合には *M. pneumoniae* 専用の特殊な培地など必要とせず、スワブを乾燥状態で送付することが可能であることが示された。検体送付時に提出機関の負担の少ない方法である、

検体収集開始から今年度 1 月までの、型別率は前述のように 71.6% である。方法の改良を行ったことから型別率は今後上昇すると考えている。これまでの報告では、*M. pneumoniae* の流行株は I 型優勢と II 型優勢が数年ごとに交互に入れ替わることが確認されていた。2005 年の日本国内の報告では I 型が優勢であり、型別についてはその後報告がない。現時点で予想される優勢株は I 型がしばらく続いた後、II 型が優勢と考えられた。しかし、我々の結果では II 型がほとんど検出されず、現在のところ、1991 年に初めて日本で報告された II 型亜種が優勢になっていた。また、特徴的な点として、これまで I 型と交互に流行がみられた II 型がほとんど検出されていない。流行情報をみると、*M. pneumoniae* 感染症の流行は、2006-2007 の冬、2010-2011 の冬に現れている。この時期に型の変遷が起こったのかを明確には示すことができないが、これまでの報告からは 2006 年は I 型優勢

になった年であり、また今年度、2010-2011 冬期、は II 型亜種の優勢が示されている。この流行と型別については検討を継続し、実情を把握する必要があると考える。

今年度、班会議でも討論した *M. pneumoniae* の病原体サーベイランス指針については、病原体を分離しにくい細菌の取り扱い例として、引き続き方法を考えていく必要がある。

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

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 中山周一 国立感染症研究所 細菌第一部

研究協力者 志牟田健 国立感染症研究所 細菌第一部

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。2009年京都市において、セフトリアキソン耐性淋菌が世界で初めて分離された。京都市における強化サーベイランスを京都市、京都府医師会と共同して実施した。臨床検体を直接国立感染症研究所に送付し、分離同定を行ったのち薬剤感受性試験を行ってきた。今回の強化サーベイランスに必要な検体送付スキームと、核酸ベースの検査法を確立した。また、WHO/CDC共同で行っている国際的コンサルテーション “Strategic response to the threat of untreatable *Neisseria gonorrhoeae* and emergence of cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae*” に参加し、国内の薬剤耐性淋菌サーベイランスの構築に向けて検討を行った。

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 万件の症例があることが推測されている。

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。淋菌の多剤耐性化は国内のみならず、世界的に大きな公衆衛生上の問題と認識されてきている。国内外において、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 1）。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、使用量が増加に伴い容易に耐性獲得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, WHO/CDC international consultation, Manila, April 2010）。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。

2009年京都市において世界で初めてセフトリアキソン耐性淋菌が性風俗産業従事者咽頭より分離され、京都市近郊におけるセフトリアキソン耐性淋菌の拡散が危惧された。京都市、京都府医師会との協議の結果強化サーベイランスを実施することとなった。そのために必要な、検体採取とその分析スキームを作成することとなった。さらに、セフトリアキソン耐性淋菌(H041)株の耐性機構の解析から、ペニシリン結合タンパク2(PBP2)をコードする遺伝子 *penA* (*penA-H041*) がその耐性に関与していることが判明したため *penA-H041* を検出するPCR法の開発を目指した。

本年4月に開催されたWHO/CDC共同開催された国際的コンサルテーション“Strategic response to the threat of untreatable *Neisseria gonorrhoeae* and emergence of cephalosporin resistance in *N. gonorrhoeae*”での結論と推奨とに沿った薬剤耐性淋菌サーベイランスの国内における必要な要因を考察した。

B. 研究方法

1：強化サーベイランスの構築

京都市、京都市衛生環境研究所、京都府医師会との協議の結果、検体を直接国立感染症研究所に送付し、分離同定後、薬剤感受性試験を行うこととなった。輸送培地等の選定を行った。

2：*penA-H041*を検出するPCR法の開発

セフェキシム耐性淋菌において耐性に関

与している、*penA-X* allele とセフトリアキソン耐性に関与している *penA-H041* の塩基配列比較から、特異的プライマーセット構築した。

C. 研究結果

1：強化サーベイランスの構築

最終的に強化サーベイランスの組織図は図2に示した。情報還元は、検体を受け付ける毎に、検体受理報告を行い、淋菌分離／非分離確定時にその結果を報告した。月末に、京都市分離株全体の薬剤感受性試験結果を報告した。検体ごとの報告は、検体採取施設のみに、薬剤感受性報告は、参加施設の全てに加えて、京都市役所および京都市衛生環境研究所担当者に報告を行った。検体を輸送する際には、極東ナイセリア培地を利用した(図3)。10月以降、淋菌分離陽性率が低下する傾向が認められた(図4)。そこで、実験室内で輸送培地の種類と保存温度について検討を行った。その結果、シードスワブγ2号栄研は低温での淋菌生存に効果的であり、極東ナイセリア培地では低温で淋菌の死滅することが明らかとなった(図5)。今後、気温が低下する季節においてはシードスワブγ2号栄研の利用することが重要であることが示された。

分離菌株の薬剤感受性試験からは、セフトリアキソン耐性淋菌は認められなかった(図6)。ただし、京都市における淋菌の薬剤耐性プロファイルを医療機関に提供することが可能となった。

2：*penA-H041*を検出するPCR法の開発

セフトリアキソン耐性淋菌 (H041) 株の耐性機構の解析から、ペニシリン結合タンパク 2 (PBP2) をコードする遺伝子 *penA* (*penA-H041*) がその耐性に関与していることが判明した。つまり、*penA-H041* を獲得することで、感受性菌が耐性化することが示された。そこで、セフェキシム耐性 (セフトリアキソン感受性菌) がコードする *penA-X* allele と *penA-H041* allele との比較から、それぞれに特異的プライマーセットをデザインした。

penA-H041_F1

GTTTCCCATTGCCAAAGCGC

penA-H041_R1

GTCGCCTGTTTCGATAGGCC

penA-X_F1

CGTTTACCATTGCCAAAGCAT

penA-X_R1

TTTTGCCATCTGCGCCAGC

これらのプライマーセットを用いて、*penA-H041* を特異的に増幅する PCR 系を構築した (図 7)。

D. 考察

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。

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。

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 スタイルを構築するのは現実的ではない。GRASP においては、地域にある検査機関で、分離同定を行う。その後、菌株を GRASP reference laboratory に集約し検査を行う形態をとっている。しかしながら日本においては、淋菌の分離培養を行う地域検査機関の設定は検査機関のキャパシティから難しい状況にある。

そこで京都市における強化サーベイランスの際に構築した、医療機関から直接検体を国立感染症研究所に送付し、国立感染症研究所での解析結果を、参加医療機関と同時に地方衛生研究所にも還元する方式はひとつのオプションとして有効であると考えられた。出来るだけ速やかに協力医療機関への情報の還元を通じて、医療機関の協力を得ることが、日本における薬剤耐性淋菌サーベイランスの確立に重要となる。GRASP においては淋菌の分子タイピング

を薬剤感受性試験とともに実施しているが、今回構築したシステムでも分子タイピング解析が実施可能であり、マンスリー報告が可能である。

さらに、本研究においてセフトリアキソン耐性遺伝子の検出方法を考案した。現在、淋菌感染症診断においては培養法より感受性の優れた核酸検査が主流であり、全国規模での網羅的な耐性サーベイランスシステムの構築は困難である。複数地域を選定し地域サーベイランスを実施するとともに、核酸検査を実施するコマーシャルラボラトリーにおいて、セフトリアキソン耐性遺伝子の検出可能とすることは有効であると考えられる。そのためにも、今回考案したセフトリアキソン耐性遺伝子検出技術のバリデーションと、薬剤耐性との関連性を裏付けることが今後の課題となる。

E. 結論

淋菌の薬剤耐性化はますます高度化しており、治療困難な耐性株の出現が危惧されている。第3世代経口セファロスポリン耐性の出現とその拡散を許してしまった過去の経験から、国内において一刻も早い薬剤耐性淋菌に焦点を当てた病原体サーベイランス体系が必要である。

セフトリアキソン耐性淋菌の拡散は、淋菌感染症の制御において重大な危機をもたらす。平成23年度において、セフトリアキソン耐性菌サーベイランスを全国的に実施し(図8)、サーベイランスシステムの問題点を把握しつつ実効的な体制を構築することを目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi M, Ono E, Shimuta K, Watanabe H, Okamura N. Identification of TEM-135 β -lactamase in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 54: 3021-3023, 2010.

Ohnishi M, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Watanabe H, Kitawaki J. Emerging ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Emerging Infectious Diseases* (in press)

2. 学会発表

淋菌感染症と分子タイピング：大西 真
第5回 岐阜尿路・性器感染症研究会 岐阜、2010 10月

セフトリアキソン高度耐性株の出現とその分子機構：大西 真

第23回 日本性感染症学会 福岡、2010 12月

簡易的な淋菌のスクリーニング系の検討：志牟田健、中山周一、飛田収一、伊東三喜雄、藤原光文、大前利一、石川和弘、上田朋宏、大西真