

究所に搬入された。百日咳 LAMP キットは感染研・細菌第二部で作製し、各地方衛生研究所に配布された。

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が実施された。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 (MLST) により実施し、標的遺伝子を患者 DNA 検体から直接 nested PCR により増幅後、シーケンスによりアレルを決定した。

(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

百日咳疑い患者について LAMP 検査を実施し、802 検体中 97 検体 (12.1%) から百日咳菌遺伝子が検出された。都府県別の陽性率は東京都 15.1%、神奈川県 5.4%、大阪府 26.2%、高知県 7.6% であり、愛媛県では陽性例を認めなかった (秋田県は 1 件陽性)。陽性率を年別にみると、2009 年が 10.7%、2010 年が 6.0%、2011 年が 16.6% であり、2011 年の陽性率が高かった (図1)。特に 2011 年 7~10 月の陽性率は 17.9~25.0% という高値を示し、陽性数も月あたり 10~11 件と多かった。一方、百日咳の流行シーズン (4~6 月) の陽性率は 2010 年が 0% (0/47)、2011 年が 14.4% (14/97) であり、調査年により大きく変動することが示された。

患者 DNA 検体を用いた遺伝子型別では LAMP 陽性検体 97 件中 55 件で MLST 型 (ST) が決定され、その解析率は 56.7% を示した。2009 年は ST2 (*ptxA1/prn2/fim3A*)、2010 年と 2011 年は ST1 (*ptxA2/prn1/fim3A*)、ST2、ST4 (*ptxA1/prn2/fim3B*)、ST-7 (*ptxA1/prn9/fim3B*) が認められ、遺伝子型として ST1 (56.4%) が最も多く、次いで ST2 (29.1%)、ST4 (10.9%)、ST7 (3.6%) の順であった (図2)。なお、ST7 は新しい遺伝子型であり、この遺伝子型を持つ流行株は 2009 年に高知県で初めて臨床分離された。

D. 考察

遺伝子検査に基づくサーベイランスにおいて、2010 年の検査陽性率は 6.0%、2011 年は 16.6% を示した。2010 年は百日咳の 4 年周期の流行から外れていたことが、この低い陽性率の原因と推察された。ただし、医療現場では臨床症状から百日咳と誤診断され、臨床診断には多くの類似疾患を含む可能性が改めて指摘された。一方、検査陽性率は大阪府、東京都、高知県、神奈川県の順で高く、大都市では陽性率が高くなる傾向が認められた。この原因として、1) 大都市における地域流行の発生、2) 都府県での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百日咳患者が認められた (病原体検出情報 IASR, 32:340-341, 2011)。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傾向が認められた。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であると考えられた。

百日咳菌は菌分離が難しい疾患として知られ、流行株の解析は限定的である。本調査では患者検体から直接菌タイピングをすることで遺伝子型を決定し、近年の流行株には少なくとも 4 種類存在することが示された (ST1, ST2, ST4, ST7)。ST7 は 2009 年に高知県で初めて確認された遺伝子型であり、本調査でも大阪府で 2010 年と 2011 年に 1 例ずつ確認されている。ST7 の遺伝子型を持つ臨床分離株の病原性は不明であるが、国内で広がりを見せていることから今後その発生動向には注意が必要である。

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 12.1% から百日咳菌遺伝子を検出した。遺伝子検査の陽性率は 2010 年と 2011 年で大きく異なったことから、臨床診断に類似疾患を多く含む百

日咳では遺伝子検査に基づくサーベイランスが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS ONE, 2012, 7(2): e31985.

2) Suzuki T, Kataoka H, Ida T, Kamachi K, Mikuniya T. Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. J Infect Chemother, in press.

2. 学会発表

1) 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. 百日咳菌に認められる自己凝集能の解析. 第95回日本細菌学会総会, 平成24年3月, 長崎(予定).

2) 蒲地一成. 百日咳の実験室診断, 困難な青年・成

人患者の診断. 第60回日本感染症学会東日本地方学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会, 平成23年10月, 山形.

3) 大塚菜緒, 吉野修司, 豊泉(鰹坂)裕美, 大平文人, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系の開発. 第60回日本感染症学会東日本地方学術集会・第58回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会, 平成23年10月, 山形.

4) 大塚菜緒, 吉野修司, 河野喜美子, 豊泉(鰹坂)裕美, 柴山恵吾, 蒲地一成. LAMP 法を用いた百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* 検出系の開発. 第94回日本細菌学会関東支部総会, 平成23年10月, 東京.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得:LAMP 法を用いた百日咳菌遺伝子検出方法およびこの方法に用いるプライマーセット. 特許第4806749号.

2. 実用新案登録:なし

3. その他:なし

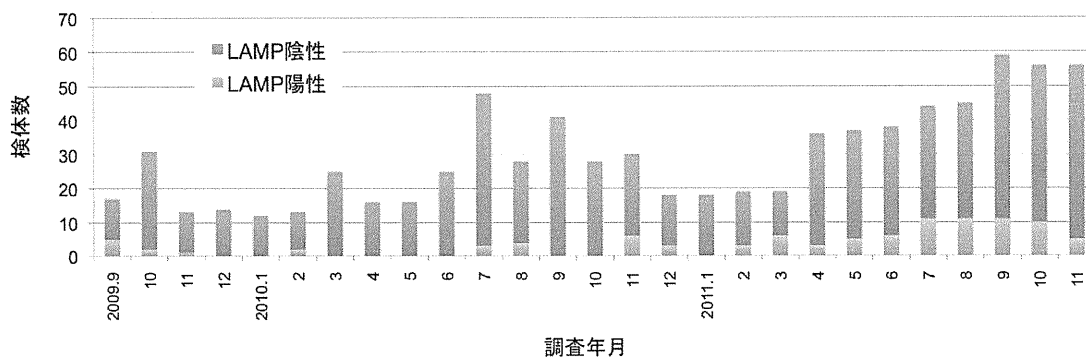


図1. 遺伝子検査を用いた百日咳サーベイランス, 2009年9月～2011年11月
百日咳疑い患者から採取された鼻腔スワブについて百日咳LAMP検査を実施した。検査陽性数と陰性数を月別に示した。

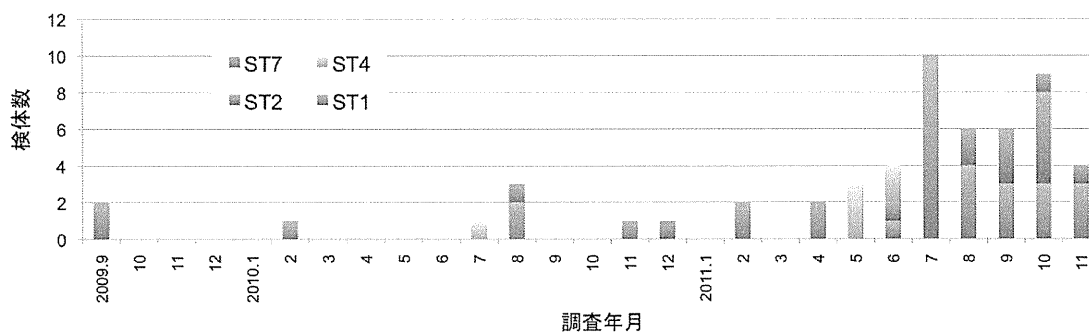


図2. 臨床検体からの遺伝子型解析, 2009年9月～2011年11月
百日咳患者DNA検体を用いてMLST法による遺伝子型を決定した。ST1は $ptxA2/prn1/fim3A$ 、ST2は $ptxA1/prn2/fim3A$ 、ST4は $ptxA1/prn2/fim3B$ 、ST7は $ptxA1/prn9/fim3B$ のアレルを保有する。

厚生労働科学研究費補助金（新興再興新型インフルエンザ等研究事業）

分担研究報告書

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

マイコプラズマサーベイランスシステムの改善に関する研究

分担研究者 国立感染症研究所・細菌第二部 堀野敦子

協力研究者 国立感染症研究所・細菌第二部 見理 剛

秋田健康環境センター 八柳 潤

東京都健康安全研究センター 奥野ルミ

神奈川県衛生研究所 高橋智恵子

大阪府立公衆衛生研究所 勝川千尋

高知県衛生研究所 松本一繁、藤戸亜紀

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。H23 年度は全国 6 カ所の地方衛生研究所の協力を得て、長引く乾性咳嗽患者の検体について検討を行うこととした。*M. pneumoniae* が患者検体から LAMP 法により検出された場合には、*p1* 遺伝子の配列に基づく菌の型別を行い、年度別、地域別の型別の傾向を検討することにする。これまでに、*M. pneumoniae* の流行と流行時の菌型の変遷には相関があるという可能性が示唆されているが、この可能性について検証を行うことができると考えられた。

2011-2012 年にかけてマイコプラズマ肺炎の大きな流行があり、地方衛生研究所から送付される *M. pneumoniae* 陽性の検体も多く、まとまった数の検体の解析を行うことができた。これまでの国内分離株の型別状況をみると、I 型と II 型の間で変遷が起きていたが、

この研究期間内の分離菌ではⅡ型はほとんど検出されずⅠ型とⅡa型の二つの菌型が占めていた。また、これまで国内ではほとんど報告がなかったⅡb型がこの研究ではH23年10月にはじめて検出された。本研究では流行前から型別を追っており、今回のマイコプラズマ肺炎の流行前、流行中、流行後とモニタリングを継続することにより、流行と型別の変遷の関連性について情報を得られることが期待された。

報告書作成時点では肺炎マイコプラズマの流行がまだ収束せず、今年度で目的を達成することはできないが、本研究期間を通してⅡ型がほとんど検出されないという点は諸外国のデータと比較してもこれまでの流行時と顕著に異なる点であると考えられた。

さらに今年度は肺炎マイコプラズマの流行が観測され、肺炎マイコプラズマの流行の実体を把握するために患者臨床情報の解析と、入院患者を対象にした菌株の分離を試みている。菌株が得られた場合には薬剤耐性を確認する予定である。現時点でこの研究は進行中であり、三月末までにはデータをまとめる予定である。

A.研究目的

前年度までは百日咳が疑われる患者の鼻咽頭スワブからゲノムDNAを抽出し、地方衛生研究所でLAMP法による*M. pneumoniae*の検出を試みてきた。今年度はマイコプラズマ肺炎が疑われる患者を含む長引く乾性の咳嗽を呈する患者検体、主に鼻咽頭スワブからゲノムDNAを抽出しLAMP法で*M. pneumoniae*の検出を試みることにした。この方法で*M. pneumoniae*陽性であった検体を国立感染症研究所・細菌第二部で*p1*遺伝子の配列に基づき型別し、流行型のモニタリングを行う。年度別、地域別で型に差があるか検討を行う。

B.研究方法

百日咳感染もしくは肺炎マイコプラズマ感染が疑われる患者の鼻咽頭スワブは協力研究期間である6カ所の地方衛生研究所へ送付され、地方衛生研究所で鼻咽頭スワブか

ら抽出されたゲノムDNAを鋳型として用いて*M. pneumoniae* LAMP法で検出を試みた。

M. pneumoniae LAMP法陽性になったゲノムDNAは感染研・細菌第二部に送付され*p1*遺伝子型別を行うためにNested-PCRを行った。増幅産物は制限酵素*HaeIII*で消化し、2%アガロースゲル電気泳動で切断断片のパターンを確認した。

(倫理面への配慮)

本研究では患者の個人情報を取り扱っておらず倫理審査を行う必要のある研究は行っていない。

C.研究成果

今年度は2011-2012年にかけて肺炎マイコプラズマの大流行が発生し、*M. pneumoniae*陽性の検体を例年に較べて多

く得ることができた。2011年に収集された検体を型別した結果、I型が67.8%、II型が1.1%、IIa型が26.7%、IIb型が4.4%であった。また、これまで高知からの検体が多かったが、高知の検体の増加に加え大阪からの検体が増加した。県別にみても、2011年の型別結果では高知、大阪でI型が優位であった。

また、本研究期間を通して、LAMP法が陽性であった検体数は174件、そのうち、これまでに型別が可能であった検体数は139件で、県別の割合は高知が70.5%、愛媛が9.4%、大阪が18.0%、神奈川が2.1%であった。また、患者の平均年齢は8歳5ヶ月、最年長は51歳、最年少は2ヶ月であった。年齢別では1歳未満が2.2%、1-5歳が38.8%、6-10歳が36%、11-15歳が18.0%、16-20歳が0.7%、21歳以上が4.3%であり、1歳から10歳までが74.8%と大部分を占めた。

D. 考察

マイコプラズマ検体は主に2010年から2011年にかけて収集された。2010年はI型が31.1%、II型が6.7%、IIa型が62.7%という結果であり、今年度はI型が67.8%とその割合が増えたように見える。これは、今年度の報告数が増加した大阪の型別結果がI型が9割を占めていたという点、また、報告数の多い高知でも、IIa型の報告数は前年度とかわらないままでI型の報告数が増えた事による。本研究期間中の*p1* 遺伝子型をモニタリングした結果、最も顕著な点はこれまで日本でI型と交互に優位となってきた主

要な型であるII型がほとんど検出されなかったという点である。国外でもII型がほとんど検出されないという報告はみられない。一方、本研究期間の結果を見ると、以前は報告数の少なかったIIa型がI型と共に主要な型となっている。また、欧州、米国ではよく分離されているIIb型が今年度、日本でも高知と大阪で分離された。この株については過去に日本でも別の地域で報告例があることから、検出数は少ないものの日本に広がっていると考えられ、IIa型のように今後主要な型となる可能性も考えられる。流行と遺伝子型の関係について今年度の流行が終息するまでモニタリングを継続する予定である。

E. 結論

H23年度は主に*M. pneumoniae*の*p1*型別を行い、その結果について本年度の流行時と流行前の結果について比較検討を行った。

その結果、これまで主要な遺伝子型であったII型がほとんど報告されず、一方、これまでは検出数が少なかったIIa型がI型とともに大きな割合を占めた。また、IIb型が今年度続けて検出されており、日本国内でも広がっていることが示唆された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Complete Genome Sequence of *Mycoplasma*

pneumoniae Type 2a Strain 309, Isolated in
Japan, Kenri T., Horino A. et al. *J. Bacteriol.*
March 2012 194:1253-1254;

2. 学会発表

なし

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

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。京都市および大阪府における強化サーベイランスを京都市、京都府医師会、大阪府公衆衛生研究所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た。また、核酸ベースの新規検査法を確立した。

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。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。平成22年度は、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した。それに伴い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*) の高感度に検出する PCR 法の開発を目指した。

B. 研究方法

1：強化サーベイランスの構築

京都市におけるサーベイランスは前年度までに構築したシステムを用いた。また同様に大阪府の泌尿器科クリニックの参加により範囲を拡大した。

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、高感度の検出系を構築した(図1)。プライマー配列およびプローブ配列は以下の通りである。

H041-F1 CCCATTGCCAAAGCGCT

H041-F2 GTCAATACGCCTGCCTATGAGC

H041-R GGTGGCCGGGCCAA

H041-Probe

FAM-TGGATACGACCGATACATTCAACACCTTGC-BH

Q

H041-F1 および H041-R、H041-F2 および H041-R のプライマーセットと H041-probe

を用いたリアルタイム PCR 法を実施した。PCR の条件は、15分 95°C の反応後、95°C 15秒、60°C 60秒のサイクルを45回実施した。

C. 研究結果

1：強化サーベイランスの構築

最終的な強化サーベイランスの組織は図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。セフトリアキソン感受性試験は、分離直後に実施し耐性株が分離された場合は即時報告する体制を整えた。月末に、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、地方自治体担当者に報告を行った。

分離株数は京都の協力医院からの34検体から24株、大阪の協力医院からの145検体から104株が分離された(2011年01月-2011年12月)。それぞれ、淋菌感染症が臨床的に疑われた検体からの分離率は70.5%、71.7%であった。

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が、低感受性株が約20%分離されており今後の動向に注意すべきであると考えられた(図3)。両地域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を明らかにしている。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、*penA-H041* allele に特異的プライマーセットをデザインした。H041-PCR1 および H041-PCR2 を用いてリアルタイム PCR 法により、67 株の淋菌株、100 株の非淋菌ナイセリア属菌株を用いて特異性を検討した。H041 株のみが H041-PCR1 および H041-PCR2 の両方で陽性結果を得た。H041-PCR1 のみ陽性が *Neisseria subflava* 2 株で認められた。

Table 2. List of isolates and specimens tested in this study

Isolate/specimens	PCR results (no. positive)	
	H041-PCR1	H041-PCR2
Clinical isolates (n=167)		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (n=67)		
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> H041 strain (n=1)	POSITIVE (1)	POSITIVE (1)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (other than H041) (n=66)	negative	negative
non gonococcal species (n=100)		
<i>Neisseria canis</i> (n=1)	negative	negative
<i>Neisseria cinerea</i> (n=7)	negative	negative
<i>Neisseria elongata</i> (n=1)	negative	negative
<i>Neisseria flavescens</i> (n=1)	negative	negative
<i>Neisseria lactamica</i> (n=12)	negative	negative
<i>Neisseria meningitidis</i> (n=29)	negative	negative
<i>Neisseria mucosa</i> (n=4)	negative	negative
<i>Neisseria polysacchariae</i> (n=5)	negative	negative
<i>Neisseria sicca</i> (n=6)	negative	negative
<i>Neisseria subflava</i> (n=21)	POSITIVE (2)	negative
<i>Neisseria weaver</i> (n=1)	negative	negative
<i>Moraxella catarrhalis</i> (n=10)	negative	negative
<i>Moraxella osloensis</i> (n=2)	negative	negative
Clinical specimens (n=252)		
<i>N. gonorrhoeae</i> positives (n=59)		
urogenital (n=45)	negative	negative
anal swabs (n=8)	negative	negative
throat swabs (n=6)	POSITIVE (1)	negative
<i>N. gonorrhoeae</i> negatives (n=193)		
urogenital (n=143)	negative	negative
throat swabs (n=50)	POSITIVE (7)	negative

臨床検体を用いた解析で、淋菌陽性の検体 (n=52) では、H041-PCR1 のみ陽性の咽頭スワブが 1 検体のみ認められ、他は全て陰性であった。淋菌陰性検体 (n=193) では、

H041-PCR1 のみ陽性の咽頭スワブが 50 検体中 7 検体認められ、他は全て陰性であった。H041-PCR2 陽性検体は認められず、臨床検体を用いても *penA-H041* allele を特異的に検出できる可能性が示された。

D. 考察

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と考えている。一定点の解析サンプル数は 50 株/年程度以上であることが妥当であると考えられる。今回の京都、大阪でのサーベイランスシステム構築の結果から、3-4 のクリニックの協力を得ることが可能であれば、十分な菌株数を収集することが可能となることが示された。

如何にそのような協力医療機関を設定するかが重要である。国立感染症研究所と地方自治体との協力関係を基盤として、地域の実情を反映させながら、医療機関への呼びかけが重要である。また、情報還元とその利用方法の周知することで、より参加協力が得られやすい環境を整えることが重要である。淋菌感染症は検査室を持たないクリニックでの診療が大部分を占めること、今日では淋菌感染症診断において、感受性が良好でクラミジア感染症診断と同時に行うことが可能な核酸検出検査が主流になっていることを十分に考慮し、各医療機関の実態に合致した検査スキームを確立することが重要である。このようなクリニックでは日常診療に加えて検体の採取を行うこと

の負担は大きい。さらに、淋菌の細菌学的性状からその保存／輸送には煩雑さが大きいことから、さらに負担が増すと考えられる。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。そのような視点では、淋菌の分子タイピングを薬剤感受性試験とともに実施することが重要であろう。菌株識別情報を付加する事で、特定の菌株の蔓延を検知する可能性が示唆されている。

研究分担者は、薬剤耐性淋菌の拡散において淋菌の持つ自然形質転換能が重要な役割を果たしていることを示してきた。この知見を基盤として、薬剤耐性パターンと分子タイピング情報を統合した形でより詳細なデータを提供し、耐性株の拡散抑制に利用可能である。

また、本年度では菌株の分離を経ない、直接検体の核酸検査を実施することで薬剤耐性遺伝子の存在を示す系の確立を行った。あくまでも菌株の分離と薬剤感受性試験の実施が標準であり、検体中の薬剤耐性遺伝子の検索は補助的な検査法に過ぎない。しかしながら、クラミジア感染症診断と同時に行うことが可能な核酸検出検査をモニタリングの為に進行可能性を追求することは今後の検討課題であろう。

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。

海外で稼働している薬剤耐性サーベイランスシステムを参考にし、現在独立して稼働している大学を中心とした地域サーベイランスとの協調的なシステムとして体系化することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Unemo M, Golparian D, Nicholas R, **Ohnishi M**, Galloway A, Sednaoui P. High-level cefixime- and ceftriaxone-resistant *N. gonorrhoeae* in Europe (France): novel *penA* mosaic allele in a successful international clone causes treatment failure. *Antimicrob Agents Chemother* (in press)

Goire N, **Ohnishi M**, Limnios A, Lahra M, Lambert S, Nimmo G, Nissen M, Sloots T, Whitley D. Enhanced gonococcal anti-microbial surveillance in the era of ceftriaxone resistance: a real-time PCR assay for direct detection of the *Neisseria gonorrhoeae* H041 strain. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. (in press)

Nakayama S, Tribuddharat C, Prombhul S., Shimuta S, Srifuengfung S, Unemo M, **Ohnishi M.** Molecular analyses of TEM genes and their corresponding penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Bangkok, Thailand. Antimicrob Agents Chemother 46: 916-920. 2012

Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M. Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhoea? Detailed characterization of the first high-level ceftriaxone resistant strain. Antimicrob Agents Chemother. 55: 3538-3545, 2011.

2. 学会発表

多剤耐性淋菌の出現とその広がり

大西 真

第21回感染研シンポジウム 東京 2011 5月

京都府と大阪府における2010年-2011年に分離された淋菌株のMLST及びNG-MAST型別を用いた系統解析と淋菌株の薬剤耐性の傾向について

志牟田健 飛田収一 伊東三喜雄 藤原光文 石川和弘 上田朋宏 亀岡博 古林敬一 安本亮二 川畑 拓也 中山周一 大西真

第24回 日本性感染症学会 東京 2011 12月

The New Superbug *Neisseria gonorrhoeae* Makes Gonorrhoea Untreatable? First High-Level Ceftriaxone Resistance Worldwide and Public Health Importance. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, Saika T, Hoshina S, Iwasaku K, Nakayama S, Kitawaki J, Unemo M.

19th International Society for STD Research ケベック 2011年 7月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

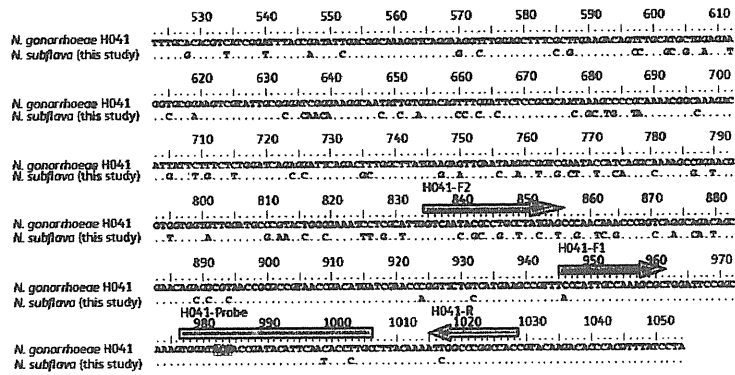


Figure 1. Sequence alignment of partial *penA* sequences of *N. gonorrhoeae* H041 (GenBank accession no. AB546858) and *N. subflava* (H041-PCR1-positive isolates from this study). H041-F1, H041-F2 and H041-R primer targets are represented by arrows at positions 946-962, 835-856 and 1029-1011, respectively. The probe target is represented by the box at position 977-1006. The Ala328Thr alteration is represented by the ACG codon at positions 982-984 (highlighted in grey).

図 2

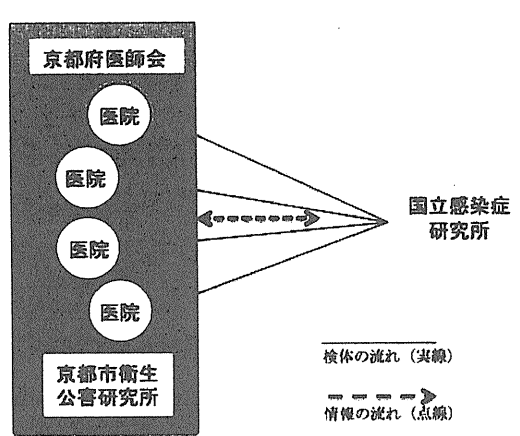
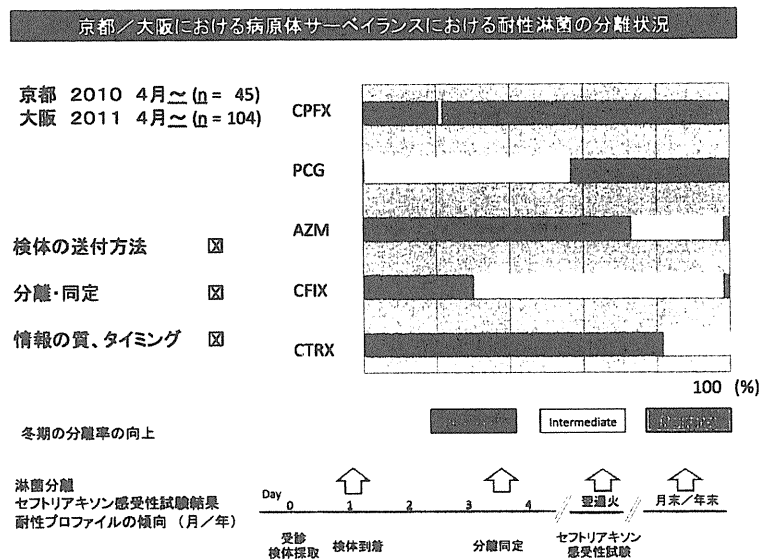


図 3



平成 23 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・再興感染症研究事業)

「2010-2011 年、2 シーズンの新潟市の RS ウイルス疫学と、大都市圏におけるパンデミック (H1N1) 2009 の流行動向の検討」

分担研究者 鈴木宏

新潟青陵大学看護福祉心理学部看護学科

共同研究者：齋藤玲子、井内田科子、イゾルデ・ダパット、クライド・ダパット、近藤大貴、(新潟大学大学院医歯学総合研究科国際保健学分野)、鈴木康司(動物衛生研究所)、佐野康子(佐野医院)

研究要旨

1. 2010-2011 年の 2 シーズンに新潟市内の 1 小児科にて RS ウイルスの検体調査を行い、191 件の検体を採取した。A 型 61 件、B 型 26 件が検出された。2010 年 9 月—2011 年 4 月までは A 型 RSV 優位の流行であったが、2011 年 5 月以降は B 型 RSV 優位の流行となった。A 型 RSV は全て NA1 遺伝子型であったが、B 型は BA7-10 とバラエティに富んでいた。特に B 型は第二可変部位の糖鎖不可部位が変化しており抗原性が変化して A 型に変わって 2011 年に流行した可能性がある。この点について今後も調査を進める予定である。
2. パンデミック (H1N1) 2009 は、札幌、東京、名古屋、大阪、福岡などの大都市圏では、他の地方都市と比較してより早期の患者の増加が確認された。これらの情報は、大都市圏におけるパンデミック対策は重要と考えられた。

(I) 2010-2011 年、2 シーズンの新潟市の RS ウイルス疫学

A. 研究目的

RS ウイルスはネガティブストランド 1 本差 RNA ウイルスで、主に 2 才以下の小児に下気道感染症を引き起こす。時として重症化するため、小児科領域では先天性心疾患や未熟児に RS ウイルスに対するモノクローナル抗体 (パリビズマブ) による感染予防が本邦では行われている。

これまで、我々は約 10 年間新潟市内の 1 小児科で RS の検体調査を行い、分子疫学による流行の特徴を調べてきた。特に、ウイルスの呼吸上皮細胞へのアタッチメントに関与する G 蛋白は、宿主の中和抗体の標的

をなり、その選択圧を逃れるために遺伝子可変領域を持つ。本教室では米国 CDC の Peret らの方法に従い、G 蛋白第二可変領域のシークエンス (270-330 塩基) を行い、樹形図解析により遺伝子型を決定する方法で、これまで A 型と B 型がほぼ 1 年おきに交代で流行していること、2004-05 年シーズンには、NA1 という新しい A 型 RSV の遺伝子型が出現し大流行したことを報告した。新しい遺伝子型の出現に G 蛋白可変部位の糖鎖付着に変化があった可能性が示唆された。

本研究では継続調査により、2010-2011

年の2シーズンに新潟市内で流行したRSウイルスの遺伝子型を明らかにした。

B. 研究方法

2010-2011年に新潟市内の1小児科を受診したRSウイルス感染症疑いの小児から鼻腔吸引液を採取し、新潟大学に搬送した。検体は100 μ Lをランダム・プライマーとMMLV-RTにてcomplementary DNAを作成し、Peretらの方法によりRSVのG蛋白第二可変領域をターゲットとしたRT-PCRを行った。PCR産物を遺伝子シーケンスを行い、MEGAを用いてこれまでのリファレンス株と共にNeighbor-joining法を用いて樹形図解析を行った。Boot strap値が70%以上の主な分岐をクレードと定義した。また、第二可変領域の多重配列から糖鎖不可部位を推定した。

(倫理面への配慮)

本調査においては、検体採取と患者情報聴取に当たって、患者及に十分な説明を各医療機関で行い、新潟大学の倫理委員会で承認を得ている。

C. 研究結果

2010-2011年の2年間に合計191件の検体を採取した。うち、RSV陽性(RT-PCR)は、86件であった。RS陽性患者の平均年齢は1.21才の乳幼児であった。罹患者の85%は2才未満であり、2才以上は15%のみであった。2年間を通じてA型RSVが61件、B型RSVが25件検出された。

2010年9月~2011年4月までは、A型が優位の流行をみとめ、2011年11月にピークがあった(図1)。2011年5月以降は、B型が優位に切り替わった。6月と、9月に小さなピークをみとめた。シーズンの切り替えの都合上、2010年9月から2011年8月までを2010-2011年シーズン、2011年9月

空を2011-2012年シーズンとして説明する。2010-2011年シーズンはRSA型が優位で75%をしめた(図2)。全てが遺伝子型ではNA1に属した。B型は全体の25%をしめ、遺伝子型はBA7が5株、BA8が2株、BA9が12株、BA10が1株とバラエティに富んでいた。

2011-2012年(2011年9月以降)は1株のみRSAのNA1遺伝子型が見つかったのみで、残りはRSBであった。RSBの遺伝子型はBA8が2株、BA9が2株であった。

樹形図解析を図3, 図4に示す。2010-2011年に認められたRS-Aは全てNA1に属し、2010-2011年に認められたRSBはBA7, BA8, BA9に属した。特に2011年5月以降にB型優位となってからは、BA8とBA9が検出された。

RSBについて、G蛋白第二可変領域の糖鎖付加部位を推定したところ、2010-2011年に採取されたRSに特にBA8に糖鎖部位の変化をみとめた。

D. 考察

RSは乳幼児に時として重篤な下気道感染症を引き起こすウイルス性疾患である。2才頃までにはほぼすべての小児が罹患すると言われる。我々はRSウイルスを継続して調査を行っており、A型、B型が交互に流行すること、過去には新しい遺伝子型が出現して大流行を起こしたことをすでに報告した。

2011年秋は全国的にRSが大流行したとされるが、新潟では感染症発生動向調査によればそれほど大きな流行ではなく、平成21, 22年より流行のピークは低かった。全国的には特に関西にRSの流行が大きかったようであるが、新潟で流行したRSと同じ遺伝子型のものが流行ったのか不明である。我々の解析では新潟で流行したRSBは一部で糖鎖付加部位の変化があったが、秋に流行した全てに見られたわけではなく、A型

からの交代を全て説明できるわけではない。インフルエンザと同様にポピュレーション中に一定の割合で免疫ができてしまうと、選択圧で型が変わったり新しい遺伝子型が出現したりすると考えられる。今後は F 蛋白、G 蛋白の全シークエンスを行って変化を見ていく必要がある。

新しい遺伝子型の出現に対して、RS モノクローナル抗体（パリビズマブ）の使用が選択圧を高め、出現を加速しているということも考えられる。最近、臨床株からパリビズマブ耐性 RSV も報告されており、今後

(II) 大都市圏におけるパンデミック (H1N1) 2009 の流行動向の検討

A. 研究目的

パンデミック (H1N1) 2009 は 2009 年に世界的な大流行となり、日本でも最初の感染者が 5 月連休中に報告され、以後全国各地でウイルスが検出された。本ウイルスの国内の感染拡大状況と感染経路の検討は、将来のパンデミックに備える上でも重要と思われる。

本研究では、過去の季節性インフルエンザの感染症発生動向調査の定点報告をもとに、パンデミックシー

C. 研究結果

流行の拡大は人口の多い大都市圏から地方都市への影響が懸念されることから、大都市圏とその他の地域の報告数の変化を最初に検討した。季節性インフルエンザの 2005/06 シーズンでは、札幌、東京、名古屋、大阪、福岡等の大都市圏を含む都道府県（北海道、埼玉、千葉、東京、神奈川、愛知、滋賀、京都、大阪、兵庫、福岡）の大都市圏とその他の県の流行動向には差はみられず（図 5）、一方 2006/07 シーズンでは、大

臨床検体からパリビズマブ耐性株のサーベイランスを行うべく、準備しているところである。

E. 結論

新潟市内 1 小児科における RS ウイルス遺伝子型の推移を報告した。新しい遺伝子型の出現が大流行につながることもあり、今後もサーベイランスが重要である。RS ウイルスの分子疫学は報告も少なく、今後も調査を継続の予定である。

ズンとなった 2009 年のパンデミック (H1N1) 2009 の発生動向を比較によりその特徴を検討した。また大都市圏とその他地域における流行特徴の比較、検討を進めた。

B. 研究方法

感染症発生動向調査のインフルエンザ定点データを用いて、都道府県単位で週単位の患者数の変化と特徴について検討した。

都市圏がその他の県と比較して顕著な増加がみられた（図 6）。

パンデミック (H1N1) 2009 の定点報告数は、大都市圏はパンデミック早期の第 35 週で 2.54 人（定点あたり）となり、その緩やかな増加を示したが、第 39 週より急増して第 41 週には 20.36 人まで増加した。しかし、その他の県ではシーズン開始から第 39 週までほぼ横ばいが続き、第 41 週でも 5.21 人に留まり、それほど増加がみられなかった。

D. 考察

パンデミック（H1N1）2009 ウイルスは国内では数週間の内に全国に広がったと推察されているが、初期のパンデミック（H1N1）2009の患者の変化は、季節性インフルエンザに比べて低調であり、散発的であった。しかし、通常秋から始まるインフルエンザが夏に始まり、比較的低調な始まりとなり、ある時期から急増するのが大都市での特徴となった。人

口の多い大都市圏において、その他の地域よりも人→人感染が進んだと推察される。

E. 結論

パンデミックにおける大都市圏での流行は、他の地方都市と比較し、ある時期から急増する傾向を示し、早期の予防・封じ込め等対策の重要性を強く示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi M, Sano Y, Daput IC, Saito R, Suzuki Y, Kumaki A, Shobugawa Y, Daput C, Uchiyama M, Suzuki H. High frequency of repeated infections due to emerging genotypes of human respiratory syncytial viruses among children during eight successive epidemic seasons in Japan. J Clin Microbiol. 49(3): 1034-40, 2011

2. 学会発表

なし

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

特記すべきこと無し

RSV epidemic curve

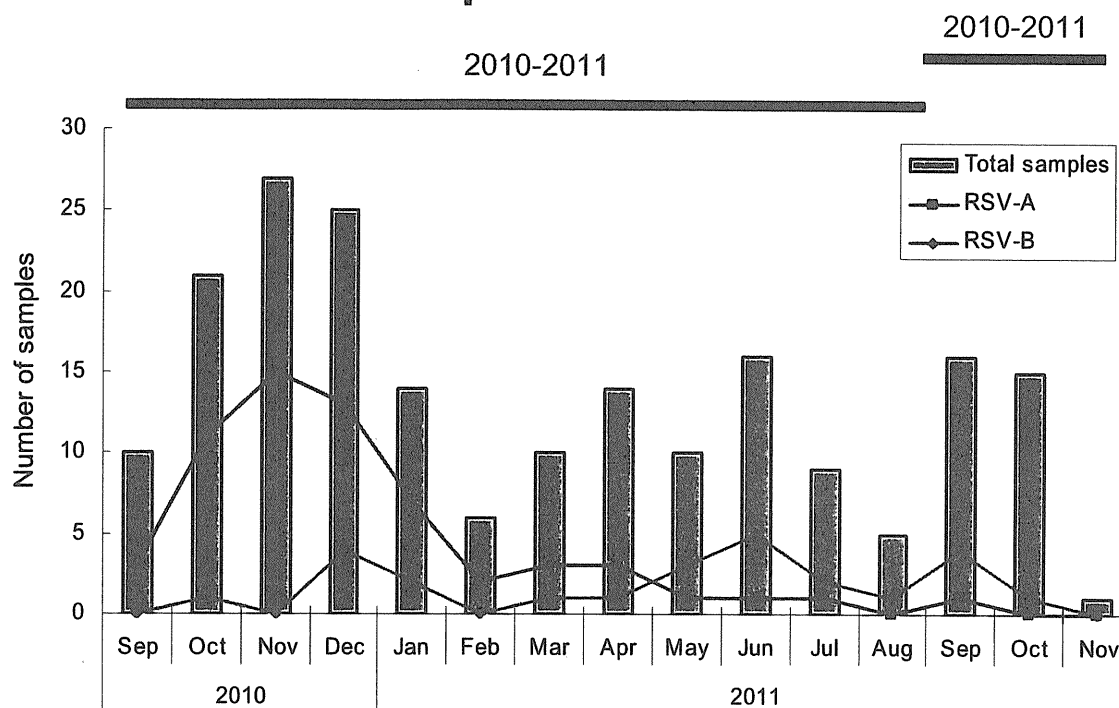


図1. 2010-2011年シーズンの新潟市内のRSV流行疫学曲線

RSV samples 2010-11 (n=168)

	A	B	Negative	Isolates
Samples	60	20	88	1
Genotype				
NA1	60			1
BA7		5		
BA8		2		
BA9		12		
BA10		1		

RSV samples 2011-12 (n=23)

	A	B	Negative	Isolates
Samples	1	5	17	0
Genotype				
NA1	1			
BA		1		
BA8		2		
BA9		2		

図2. 検出されたRSVの型と遺伝子型

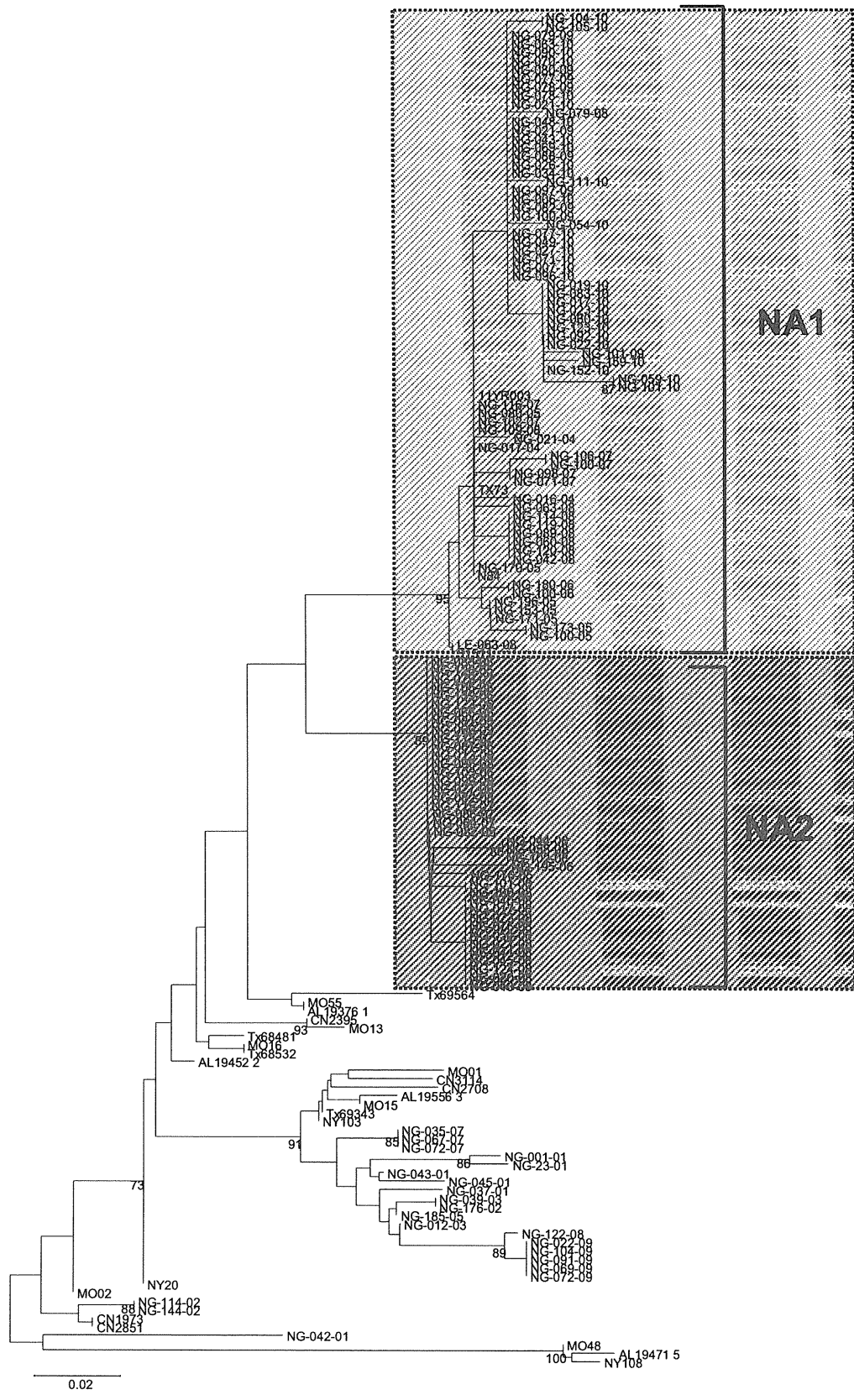


图 3. RSV-A Phylogenetic tree G gene (270 nt)

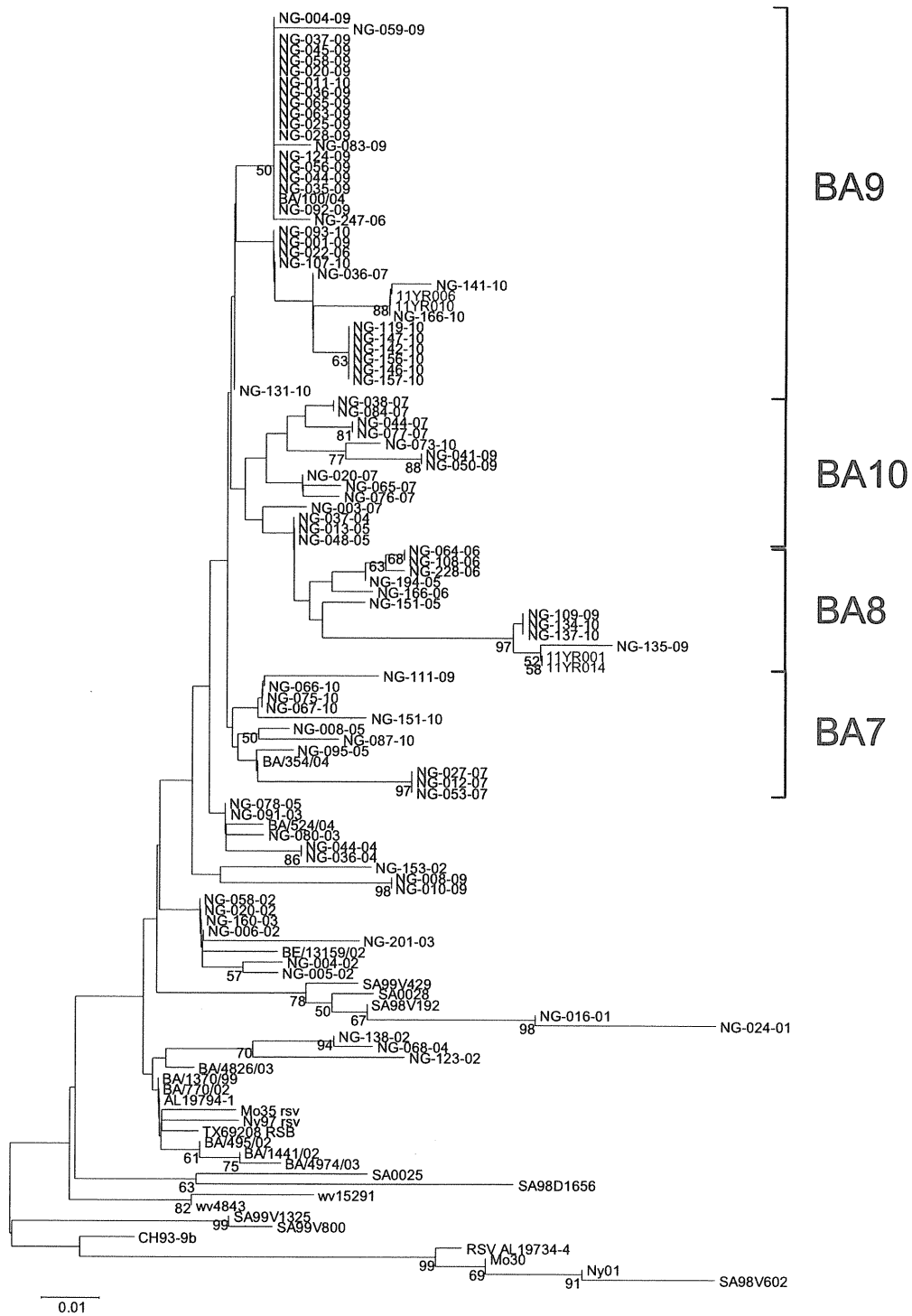


図4. RSV-B Phylogenetic tree G gene (330 nt)