

b. 罹患時につぶやくユーザーを増やす

Twitter ユーザーが、flu に罹患したときにいつもツイートを書き込むとは限らない。罹患時にツイートを書き込んでもらうためには、インフルエンザの流行を探るプロジェクトが存在していることをユーザーに、広く知ってもらう事は有益であろう。

そのために、能動的な情報発信が一つの方法である。それには TweetFlu の集計結果を一定の時間毎に自動的にツイートするボットを作成した。同ボットをフォローするユーザーはまだ多くないが、有益な情報を発信するボット（ユーザー）には多数のフォローをするユーザーが現れる。本サイトの存在と意義を知ってもらい、ツイートで社会貢献できる事を広く知ってもらえると期待する。

3. 展望

感染症の流行は様々な情報源より集計を行い、実際の流行を推察するべきである。罹患した患者自身からの情報提供という経路は、まだ研究の蓄積が乏しい。最も早く流行を知るという点では、罹患した患者から直接得る情報の収集手段は今後も検討の余地がある。

「インフル」を含むツイートから、flu に対する市民の反応が読み取れる。Tweetflu が示すツイート数の推移は、市民や社会が flu で受けた衝撃、影響の強さとも言える。

また抽出するキーワードをさまざまな症状に置き換える事で、まだ臨床症状が明らかでない感染症の流行を早期に察知する症候群サーベイランスとして利用できる可能性もある。

疾病の流行とツイートに関する調査は、早稲田情報技術研究所の加藤らが行い、以下の Web サイトを構築し感染症の早期探知を試みていた。

感染症トレンド検知 <http://infection.wit.jp/>

また荒巻らはエスエス製薬などと共同で、大規模かつリアルタイムな疾患情報の収集を目指し、twitter の発言内容から症状で困っている人の発言が否かを識別し可視化する研究を行い、「カゼミル」という Web サイトを運営している(図 5)。

カゼミル <http://kazemiru.jp/>

今後は感染症の流行を早期に察知する手段として、Twitter などの Web 上のコミュニケーションの解析に調査や研究が行われ、次第に解析手法も確立していくと思われる。

E. 結論

1. Twitter が提供する API を用いて「インフル」という単語をキーワードにツイート数を集計表示する Web サイトを構築した。
2. flu 関連ツイート数と IDWR との報告数の推移の比較をおこない、強い相関が観られた。
3. flu 罹患したユーザーに特異的なツイートの抽出方法の検討が必要である。
4. flu に罹患した場合に自主的にツイートを書き込むユーザーを増やす必要がある。
5. Web 上のコミュニケーションの解析による感染症の流行調査の手法が、次第に確立していくと思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

3. メディア

1. 読売新聞 2月8日 夕刊 「インフル情報 つぶやき速報」
2. 日経メディカル・オンライン 「パンデミ

ックに挑む」

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

なし

図1 Webサイト「TweetFlu」

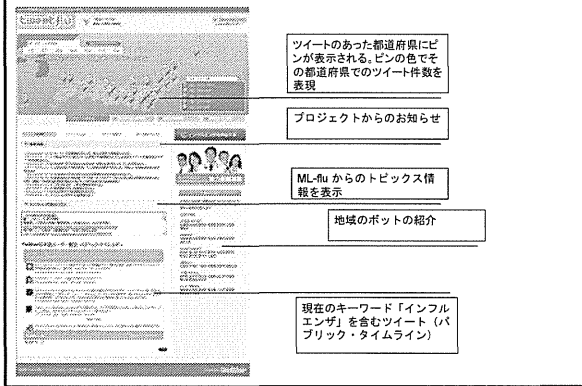


図2 否定語一覧

- 予防
- 注射
- 接種
- 摂取
- 打つ
- 鳥
- 鶏
- ツル
- 対策
- 陰性
- じゃなくて
- だったらどうしよう
- もし

図3 ツィートが書き込まれた都道府県分布

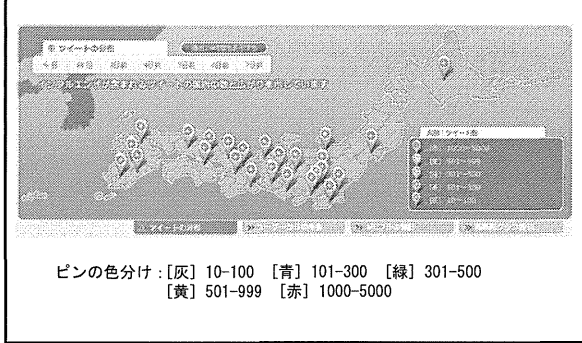


図4-1 ツィート数とIDWR報告数の推移と相関

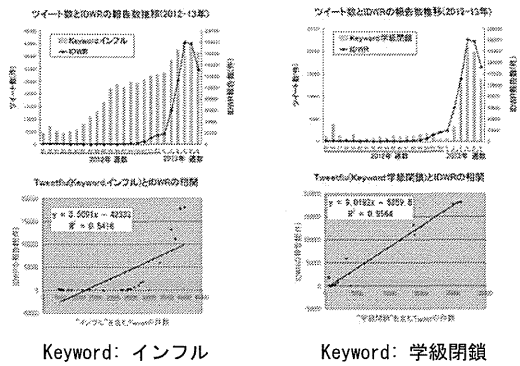


図4-2 ツィート数とIDWR報告数の推移と相関

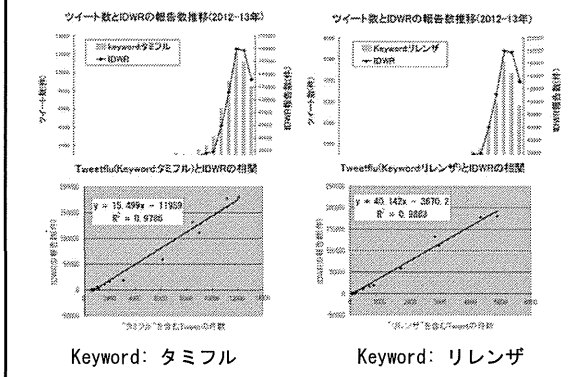


図4-3 ツィート数とIDWR報告数の推移と相関

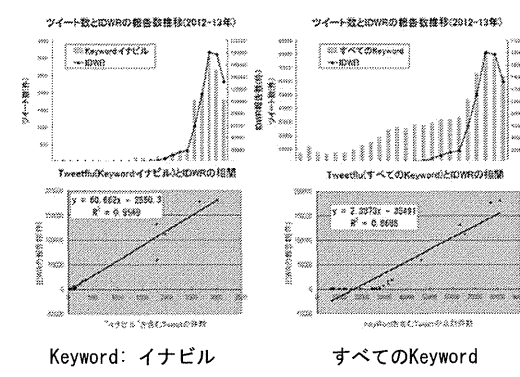


表1 各keywordの件数と線形近似式、決定係数

Keyword	件数	割合	線形近似式	決定係数(R ²)
インフル	496035	68.5%	$y = 3.5091x - 42333$	0.5416
学級閉鎖	95939	13.2%	$y = 9.0192x - 5859.6$	0.9564
タミフル	65320	9.0%	$y = 15.499x - 11989$	0.9786
リレンザ	20247	2.8%	$y = 40.142x - 3670.2$	0.9883
イナビル	12955	1.8%	$y = 60.662x - 2550.3$	0.9569
すべてのKeyword	724664	100.0%	$y = 2.3873x - 38491$	0.8688

Keyword “リレンザ” が、最もIDWRとの相関が高い。

表2 ツイートの分類(2012-2013)

Keyword	本人の罹患	家族の罹患	知人の罹患	学校での流行	職場での流行	周囲の流行	罹患者不明	話題	意見・願い	総計
インフル	23	2	57	2	3	5	5	16	26	139
タミフル	12		21				2	5	1	41
イナビル	2		1					2	0	11
リレンザ	4							3		7
学級閉鎖			1					41	60	102
総計(件)	41	2	80	2	3	5	7	67	93	300

有罹患者のツイート 140
46.7%

160
53.3%

図5 「カゼミル」



<http://kazemiru.jp/>

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）
分担研究報告書

ノイラミニダーゼ阻害薬投与患者における薬剤耐性 A 型インフルエンザウイルスの検出

研究分担者 佐多 徹太郎 富山県衛生研究所長

研究協力者 小渕 正次、滝澤 剛則 富山県衛生研究所ウイルス部

研究要旨 ノイラミニダーゼ阻害薬 (NI) 投与中の薬剤耐性変異ウイルスの発生状況を明らかにするため、インフルエンザ入院患者における NI 投与前後の検体から薬剤耐性ウイルスの検出を試みた。2011/12 シーズンの患者 11 名から、NI 投与前後で A(H3N2)ウイルス 27 株を分離した。それら分離株について NA 遺伝子を解析したが、薬剤耐性変異は検出されなかった。さらに、ペラミビル投与患者 11 名の検体から直接 NA 遺伝子断片を増幅し、次世代シーケンサーを用いて薬剤耐性変異を有するマイナーポピュレーションを検索したが、投薬前後で変異は検出されなかった。

A. 研究目的

わが国ではインフルエンザの治療にノイラミニダーゼ阻害薬 (NI) が日常的に用いられているため、薬剤耐性ウイルスの出現が危惧されている。国立感染症研究所の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスでは、過去 3 シーズンの市中流行株の NI 耐性ウイルスの検出率は、A(H1N1)pdm09 亜型、A(H3N2)亜型および B 型の各ウイルスで、それぞれ 0~2%、0~0.7%、0%であった。しかし、調査対象のほとんどは定点医療機関で初診時に採取された検体由来のウイルスであるため、投薬中の耐性ウイルスの発生状況は明らかではない。そこで、本研究では A 型ウイルスに焦点を当て、インフルエンザ入院患者における NI 投与前後の検体から薬剤耐性ウイルスの検出を試みた。

B. 研究方法

富山県内の 6 医療機関（富山県立中央病院、富山赤十字病院、黒部市民病院、高岡市民病院、厚生連高岡病院、市立砺波総合病院）において、2011/12 年シーズンにインフルエンザで入院加療した小児患者から、投薬前後に鼻腔ぬぐい液等を採取した。MDCK 細胞を用

いて臨床検体からウイルス分離を行い、抽出した RNA から RT-PCR 法によりノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子全長を増幅した。次いで、ダイレクトシーケンス法により PCR 産物の塩基配列を解読し、*in vivo* および *in vitro* における既知の薬剤耐性変異 (E119V、E119I、D151E、R152K、R224K、H274Y、E276D、R292K、N294S、R371K) を指標として薬剤耐性ウイルスの検出を行った。

さらに、ペラミビル投与患者 11 名について、臨床検体から直接 RNA を抽出し、RT-PCR 法により E119V ならびに R292K (N294S) 変異部位の近傍約 200 塩基の領域を増幅した。得られた PCR 産物について、次世代シーケンサー (MiSeq、Illumina 社) によるディープシーケンスを行い、E119V、R292K、N294S の各変異を有するサブポピュレーションの有無を検索した。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究における倫理指針」に基づき、富山県衛生研究所倫理審査委員会に申請し、承認された (平成 23 年度 受付番号 1 および変 1) 。

C. 研究結果

1. ウイルス分離株における薬剤耐性変異の検出

迅速診断キットでA型陽性の入院患者27名から、NI投与前33検体と投与後30検体が採取された（同一患者から同日に採取した鼻腔ぬぐい液と咽頭ぬぐい液等の複数検体を含む）。これら検体からA(H3N2)ウイルス37株が分離された。そのうち、NI投与前後で分離できたウイルスは11名分17株であった。分離ウイルスについてNA遺伝子を解析した結果、ペラミビル、オセルタミビル、ラニナミビルのいずれを処方された患者からも薬剤耐性変異株は全く検出されなかった（表1）。

2. ディープシーケンスによる薬剤耐性変異の検出

ペラミビル投与前後に採取した患者11名の28検体において、各PCR産物につき61,786~731,669リードの塩基配列が得られた（表2）。これまで臨床分離株で報告されているE119V、R292K、N294Sの変異部位について、それぞれのPCR産物当たり0~0.18%の変異がみられたが、投与前後の検体でその検出率に大きな違いは認められなかった（表2）。

検出された薬剤耐性変異のなかには、PCRのポリメラーゼエラーやシーケンサーの検出エラーも含まれる可能性がある。そこで、薬剤感受性ウイルスのNA遺伝子断片を挿入したプラスミドを鋳型として、同条件でPCRおよびシーケンシングを行った。その結果、いずれの薬剤耐性変異部位においても、上述の変異率とほぼ同じ頻度で変異が検出され（データ未提示）、検出限界は0.1%程度であることがわかった。

D. 考察

今回の調査では、NI投与前後の検体から得られたA(H3N2)ウイルス分離株37株にお

いて、既知の薬剤耐性変異は全く検出されなかった。常法のキャピラリーシーケンサーを用いた塩基配列の解読では、ウイルスポピュレーション中に極わずか存在するようなマイナーポピュレーションの変異ウイルスまでは検出できない。そこで、ペラミビル投与患者11名の検体について、次世代シーケンサーを用いてPCR産物のディープシーケンスを試みた。しかし、得られたリードの薬剤耐性変異は検出限界以下であった。したがって、本研究ではNI投薬中の薬剤耐性ウイルスの発生は確認できなかった。しかし、Kisoら（Lancet, 364:795-765, 2004）の報告ではオセルタミビル投与後の検体由来A(H3N2)ウイルス分離株の18%で薬剤耐性が検出されていることから、今後も調査件数の拡大や検体採取時期の延長などさらなる検討が必要であると思われる。

E. 結論

今回の調査では、A(H3N2)ウイルスにおいてNI投薬中に薬剤耐性ウイルスの発生はみられなかったが、調査件数の拡大や他の亜型ウイルスについても検討が必要であると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Obuchi, M., Toda, S., Tsukagoshi, H., Oogane, T., Abiko, C., Funatogawa, K., Mizuta, K., Shirabe, K., Kozawa, K., Noda, M., Kimura, H., Tashiro M. Molecular analysis of genome of the pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus associated with fatal infections in Gunma, Tochigi, Yamagata, and Yamaguchi prefectures in Japan during the first pandemic wave. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 65: 363-367, 2012.

2. 学会発表

小渕正次、畑崎喜芳、津幡眞一、篠崎健太郎、

辻 隆男、鮎井正春、小西道雄、稲崎倫子、名古屋 (小原) 真弓、堀元栄詞、佐多徹太郎、滝澤剛則. ノイラミニダーゼ阻害薬投与患者における薬剤耐性 A(H3N2)インフルエンザウイルスの検出. 第 49 回日本細菌学会中部支部総会、金沢、2012 年 11 月.

G. 知的財産権の出願・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

H. 謝辞

本研究の実施にあたりご協力いただいた富山県立中央病院小児科、富山赤十字病院小児科、黒部市民病院小児科、富山県立中央病院小児科、富山赤十字病院小児科、高岡市民病院小児科、厚生連高岡病院小児科、市立砺波総合病院小児科の先生方に深謝いたします。

表 1. A(H3N2)分離株における薬剤耐性変異の検出

薬剤	患者数	投薬	薬剤耐性株数			
			E119V/I	R292K	N294S	他 6ヶ所
ペラミビル	9	前			0/12	
		後			0/10	
オセルタミビル	1	前			0/1	
		後			0/2	
ラニナミビル	1	前			0/1	
		後			0/1	

表 2. ディープシーケンスによる薬剤耐性変異の検出

患者	薬剤投与	検体	ウイルス分離	変異率(%) [リード数]		
				E119V	R292K	N294S
1	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.016 [66959]	0.022 [162574]	0.063 [163377]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0.015 [66867]	0.021 [158221]	0.097 [159094]
2	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.017 [96038]	0.017 [218710]	0.081 [221709]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0.016 [88101]	0.01 [258820]	0.074 [262034]
3	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.015 [61786]	0 [163790]	0.18 [164617]
	後	鼻腔ぬぐい液	×	0.015 [67965]	0.023 [175548]	0.076 [176526]
4	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.011 [91582]	0.017 [223491]	0.08 [225274]
		咽頭ぬぐい液	○	0.011 [173129]	0.011 [353555]	0.063 [357053]
	後	鼻腔ぬぐい液	×	0.014 [148020]	0.015 [329366]	0.066 [322539]
		咽頭ぬぐい液	○	0.018 [166689]	0.017 [337881]	0.06 [340656]
5	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.021 [379628]	0.018 [613141]	0.08 [664063]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0.021 [355923]	0.014 [678804]	0.074 [731669]
6	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.019 [64698]	0.026 [175728]	0.079 [176969]
	後	咽頭ぬぐい液	×	0.015 [87819]	0.015 [100393]	0.101 [100851]
7	前	咽頭ぬぐい液	○	0.029 [66406]	0.029 [177300]	0.091 [178189]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0.01 [79758]	0.049 [162754]	0.068 [163505]

表 2. 続き

患者	薬剤投与	検体	ウイルス分離	変異率(%) [リード数]		
				E119V	R292K	N294S
8	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.015 [89203]	0.035 [195964]	0.058 [197057]
		咽頭ぬぐい液	○	0.011 [73719]	0.02 [167856]	0.076 [168867]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0 [84887]	0.018 [192673]	0.077 [193509]
		咽頭ぬぐい液	○	0.027 [101213]	0.022 [204546]	0.082 [205387]
9	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.024 [84540]	0.016 [189790]	0.088 [190826]
		咽頭ぬぐい液	○	0.011 [89797]	0.018 [180193]	0.093 [181161]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0.023 [101099]	0.025 [48836]	0.092 [49135]
		咽頭ぬぐい液	×	0.019 [77614]	0 [67571]	0.105 [67863]
10	前	鼻腔ぬぐい液	○	0 [72174]	0.019 [155069]	0.077 [156026]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0.011 [75561]	0.015 [208775]	0.072 [210012]
11	前	鼻腔ぬぐい液	○	0.016 [111085]	0.02 [223925]	0.063 [225332]
	後	鼻腔ぬぐい液	○	0.012 [120677]	0.032 [205795]	0.074 [207137]

百日咳サーベイランスの精度向上に関する研究

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 百日咳サーベイランスの精度向上を目的に、百日咳菌と百日咳類縁菌を同時に検出可能な triplexリアルタイム PCR 法の開発を行った。百日咳菌の標的遺伝子には挿入配列 IS481、パラ百日咳菌には IS1001、*Bordetella holmesii* には *recA* を使用し、本法の感度を既報のリアルタイム PCR 法と比較した。その結果、IS481 と *recA* に対する分析感度は既報の duplexリアルタイム PCR 法と等しく、マルチプレックス化による感度低下を認めなかった。一方、IS1001 に対する分析感度は、非蛍光クエンチャー (NFQ) の採用により約 10 倍程度上昇した。臨床検体を用いた評価では、百日咳菌 IS481 に対する検出感度は duplexリアルタイム PCR 法と等しく、百日咳菌検出に十分な感度を持つことが示された。国立感染症研究所・細菌第二部では、平成 24 年度から百日咳の依頼検査に対し本法の試験運用を開始した。

研究協力者

鯉坂裕美(国立感染症研究所・細菌第二部)
大塚菜緒(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。百日咳菌感染と同様な咳嗽症状を引き起こす病原体として、百日咳類縁菌であるパラ百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*) と *Bordetella holmesii* が挙げられる(図1)。パラ百日咳菌は古くから百日咳類縁菌として知られ、百日咳患者の 0~4.7% を占めることが報告されている。一方、*B. holmesii* は 1995 年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、免疫不全患者に敗血症を引き起こすことが知られている。しかし、近年では百日咳菌と同様な咳嗽を引き起こし、患者呼吸器からの分離症例が増加している。日本では 2010~11 年に宮崎県で発生した百日咳流行で 6 例の *B. holmesii* 感染者が確認され、本菌がヒト-ヒト感染により伝播される可能性が指摘された。

現在わが国の百日咳サーベイランスは主に臨床診断に基づくため、正確な患者数、特に青年・成人患者数の把握が困難な状況にある。さらに、百日咳疑い患者には他疾患の紛れ込みが多く、百日せきワクチンの有効性を正しく評価するためには百日咳類縁菌、マイコプラズマ、その他呼吸器系ウイルスとの病原体鑑別が必要となる。この病原体鑑別には遺伝子検査が有用であり、既に百日咳菌と *B. holmesii* を同時に鑑別可能な duplexリアルタイム PCR 法が開発されている。しかし、現時点でパラ百日咳菌を含めたマルチプレックスリアルタイム PCR 法の開発はなされていない。以上の背景を踏まえ、本研究では百日咳サーベイランスの精度向上を目的に、百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii* を同時に検出可能な triplexリアルタイム PCR 法の開発を行った。

B. 研究方法

triplex リアルタイム PCR 法の構築: 百日咳菌と *B. holmesii* の検出には既報の duplex リアルタイム PCR 法(Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010)を準用し、*B. holmesii* の蛍光プローブを NED から VIC に改変して

用いた(図2)。パラ百日咳菌の検出には既報の single リアルタイム PCR 法(Kösters et al., J Med Microbiol, 2001)を準用し、蛍光プローブを FAM-TAMRA から NED-NFQ/MGBに改変して用いた。リアルタイムPCR 装置は ABI 7500FastリアルタイムPCRシステムを使用し、Stage 1を95°C(15 sec)、Stage 2を95°C(3 sec)、60°C(30 sec)の40 cycleにより遺伝子増幅を行った。分析感度の評価:*B. holmesii* ATCC51541 株とパラ百日咳菌 BAA-587 株のゲノム DNA を供試した。精製したゲノム DNA を連続希釈し、構築した triplexリアルタイム PCR および既報のリアルタイム PCR 法(Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010、Kösters et al., J Med Microbiol, 2001)を用いて Ct 値を測定した。各測定を3回繰り返し、その平均値を比較した。

臨床検体を用いた評価: 百日咳患者の鼻腔スワブ DNA (n=27) を供試し、百日咳菌 IS481 に対する Ct 値を triplexリアルタイム PCR 法と duplexリアルタイム PCR 法により測定した。なお、患者検体は LAMP 法により百日咳菌感染が確認されたものを供試した。

(倫理面への配慮)

患者検体は診断目的に採取され、国立感染症研究所・細菌第二部に保存されていた鼻腔 DNA 検体を供試した。なお、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。

C. 結果

triplexリアルタイム PCR 法の分析感度を検討した結果、本法は既報の duplexリアルタイム PCR 法と同等の検出感度を持つことが示された(図3)。百日咳菌と *B. holmesii* を検出する IS481 は 10 fg ゲノム DNA で Ct 値 33.88 を示し、1 ng~10 fg DNA の範囲で良好な直線性が確認された。triplex リアルタイム PCR 法の Ct 値は duplex リアルタイム PCR 法とほぼ同様な数値を示した。同様に *B. holmesii* のみを検出する *recA* も 10 fg ゲノム DNA で Ct 値 33.65 を示し、マルチプレックス化による感度低下を認めなかった。一方、パラ百日咳菌を検出する IS1001 は 100 fg ゲノム DNA で Ct

値 31.49 を示し、既報の singleリアルタイム (Ct 値 35.84) よりも高い検出感度を示した。この感度の上昇理由として、TaqMan プローブを非蛍光クエンチャーの NFQ に変更したことが挙げられる。既報のプローブはクエンチャーとして TAMRA を使用するが、本測定系にはバックグラウンドの低い NFQ を採用した。これにより検出感度が約 10 倍程度上昇し、検出限界は 10 fg ゲノム DNA になるものと推定された。

百日咳患者の鼻腔 DNA 検体(n=27)を用いて、triplexリアルタイム PCR 法の感度を duplexリアルタイム PCR 法と比較した(図4)。その結果、測定された IS481 の Ct 値は duplexリアルタイム PCR と等しく、本法の臨床的有用性が確認された ($R^2=0.971$)。なお、パラ百日咳菌と *B. holmesii* の陽性検体が少なかったため、今回両菌に対する臨床的有用性は評価できなかった。

D. 考察

百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii* を同時に検出可能な triplexリアルタイム PCR 法を開発し、本法が上記3菌種に対し高い分析感度を持つことを確認した。また、患者検体を用いて本法が百日咳菌に対し十分な検出感度を持つことも確認した。

本法が百日咳菌に対し高い検出感度を示したことから、国立感染症研究所・細菌第二部では平成24年度から本法の試験運用を開始した。これまで医療機関等からの検査依頼には百日咳菌に特異的な LAMP 法を実施し、LAMP 法が陰性となった場合に duplexリアルタイム PCR 等により百日咳類縁菌の検索を行ってきた。その場合、*B. holmesii* とパラ百日咳菌のリアルタイム PCR を個別に行うことから、検査時間が長くなるという欠点があった。また、患者 DNA 検体を3回分使用することから、検体保存という点でも問題があった。今回構築した triplexリアルタイム PCR は 2 μ l の患者 DNA 検体で検査可能であり、さらに30分程度で3菌種の結果が得られるという利点がある。今後の試験運用により、本法のパラ百日咳菌と *B. holmesii* に対する臨床的有用性を確認する予定である。

現有する ABI 7500Fastリアルタイム PCR 装置は最大 4 種類までの蛍光色素を検出することができる。今回開発した triplexリアルタイム PCR には蛍光色素 Cy5 が追加できることから、本測定系に新たな病原体検査を組み入れることが可能である。百日咳と鑑別が必要な疾患としてマイコプラズマ肺炎が挙げられることから、平成 25 年度は開発した triplexリアルタイム PCR 法に *Mycoplasma pneumoniae* の検出系を組み入れ、病原体鑑別のさらなる簡便化を図る。

E. 結論

百日咳サーベイランスの精度向上を目的に百日咳菌と百日咳類縁菌を同時に検出可能な triplexリアルタイム PCR 法を開発した。本法が百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii* に対し高い分析感度を持つこと、さらに臨床検体からの百日咳菌検出に適用可能であることを確認した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kamiya H, Otsuka N, Ando Y, Odaira F, Yoshino S, Kawano K, Takahashi H, Nishida T, Hidaka Y, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K, Sunagawa T, Taniguchi K, Okabe N. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerg Infect Dis*, 2012; 18:1166-9.

2) 蒲地一成. 百日咳の迅速診断法. *小児科臨床*. 2012; 65(12):2559-63.

2. 学会発表

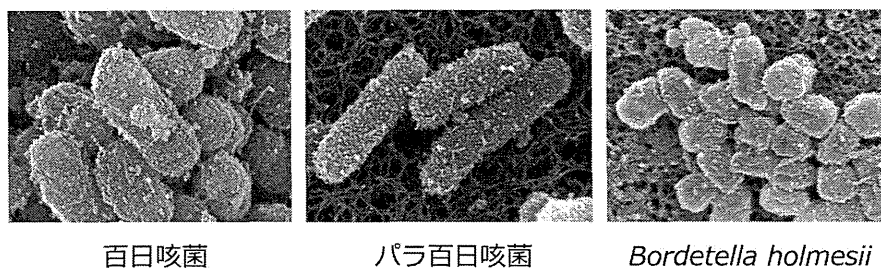
1) 蒲地一成, 池田徹也, 伊瀬郁, 松本昌門, 石畝史, 烏谷竜哉, 江藤良樹, 山下和予, 柴山恵吾, 多屋馨子, 岡部信彦. 百日咳菌凝集素価法の診断精度について. 第 86 回日本感染症学会総会, 平成 24 年 4 月, 長崎

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



百日咳菌

パラ百日咳菌

Bordetella holmesii

図 1. 百日咳菌と百日咳類縁菌の走査電子顕微鏡像
百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) とヒトに感染する百日咳類縁菌 (*Bordetella parapertussis*, *Bordetella holmesii*)

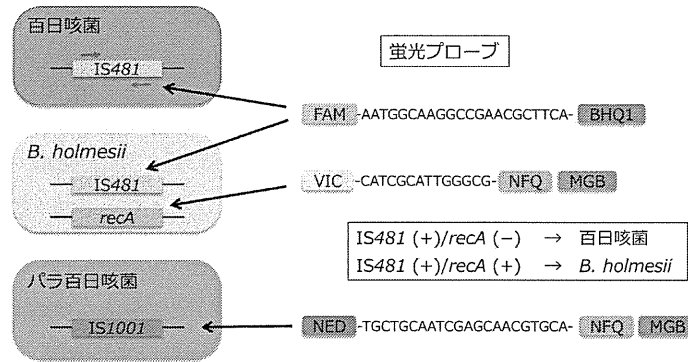


図2. triplex リアルタイム PCR 法の原理

百日咳菌の検出には多重遺伝子である挿入配列 IS481、*Bordetella holmesii* には IS481 と *recA*、パラ百日咳菌には IS1001 を用いた。IS481 に対する蛍光プローブは FAM-BHQ1、*recA* は VIC-NFQ/MGB、IS1001 は NED-NFQ/MGB をラベルしたものをそれぞれ使用した

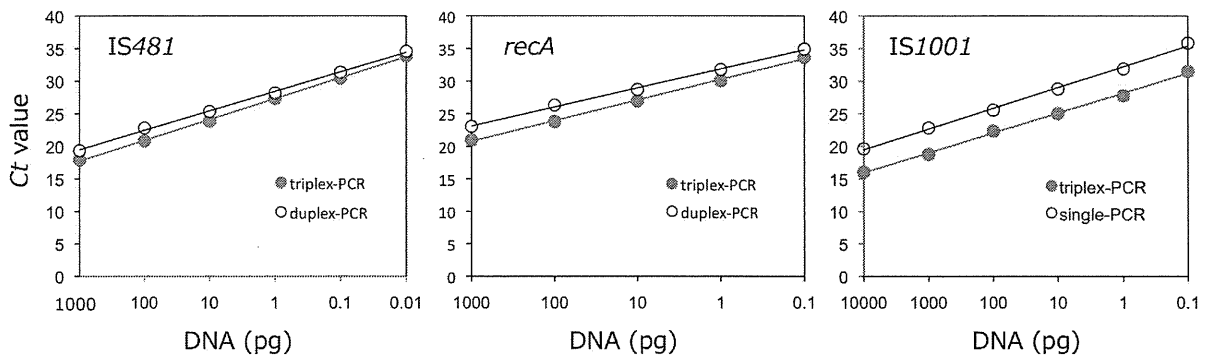


図3. triplex リアルタイム PCR の分析感度

Bordetella holmesii ATCC51541 株のゲノム DNA を用いて IS481 と *recA* に対する Ct 値を既報の duplex リアルタイム法と比較した。IS1001 の評価にはパラ百日咳菌 BAA-587 株のゲノム DNA を供試し、既報の single リアルタイム PCR 法と比較した

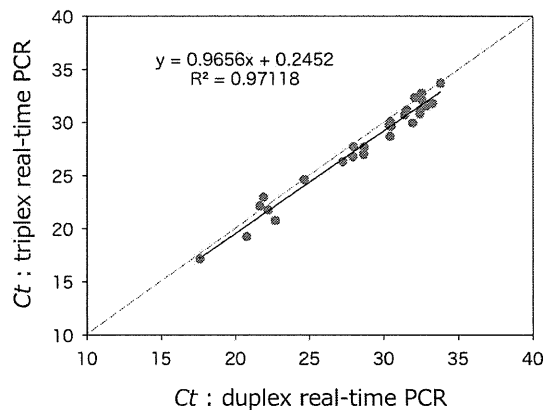


図4. 臨床検体を用いた triplex リアルタイム PCR の感度評価

百日咳患者 DNA 検体 (n=27) を用いて、triplex リアルタイム PCR の Ct 値を既報の duplex リアルタイム PCR と比較した

厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業
分担研究報告書

百日咳サーベイランスのあり方に関する研究

研究分担者	砂川 富正	国立感染症研究所	感染症情報センター主任研究官
研究協力者	神谷 元	国立感染症研究所	感染症情報センター主任研究官
研究協力者	八幡裕一郎	国立感染症研究所	感染症情報センター主任研究官
研究協力者	谷口 清	国立感染症研究所	感染症情報センター客員研究員
研究協力者	大平 文人	大阪府健康医療部保健医療室	地域保健感染症課主査
研究協力者	土橋 酉紀	岡山県保健福祉部主任	
研究協力者	安藤 由香	岡山赤十字病院小児科	
研究協力者	蒲地 一成	国立感染症研究所	細菌第2部室長
研究協力者	羽賀 将衛	北海道教育大学健康管理センター	センター長
研究協力者	松本 道明	高知県衛生研究所	技術次長

研究要旨

高知県内全域の医療機関、および北海道内の大学保健管理センターネットワークのそれぞれにおいて、百日咳に関する強化サーベイランスを実施している。前者においては、本研究に登録された2012年8-9月分届出症例総数は181例であり、後者の大学保健管理センターからは27例の情報が寄せられた。高知県内においては中央部から西部にかけての地理的分布があった。LAMP陽性例については年齢中央値3.5歳と若年であった2週間持続する咳や、スタッカート/ウープを伴う咳発作の診断上の有用性を認めた。LAMP陽性者36名中17名は2週間以上の持続する咳は無く、確定例(LAMP陽性or抗PT抗体陽性)と比較して、流行極期における分析として、「1週間以上の咳+咳そう発作or新生児乳児の特有咳」の症状クライテリアにおける診断上の有用性を最も認めた。北海道では、百日咳様疾患の集団発生が認められたが検査結果は、百日咳、マイコプラズマ、*B. holmesii*のいずれも陰性であった。

特異性の低い百日咳の症状にどのように検査診断を組み合わせていくかは大きなチャレンジであることが分かった。年齢層別に把握すべき症状に加えて、適切な検査診断体制をどう構築するかが重要である。今後も両サーベイランスの体制を維持し、評価していくことが重要である。

A. 研究目的

(1) 高知県内における百日咳強化調査

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やすい。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、乳幼児期のみ予防接種を実施している我が国においては、免疫効果が減弱した青年・成人（乳幼児への感染源となりえる）における流行、例えば2007年の高知大学医学部・附属病院における数百人規模の集団発生のような青年・成人層の集団感染例が発生している。現行の百日咳サーベイランスは小児科定点のみを対象としており、小児科定点以外で集団発生や流行が起こった場合には全く把握が出来ないことから、成人以外の年齢層を含めた百日咳発生の迅速な探知の体制構築が必要である。加えて、現在国内の現場で汎用されている、百日咳菌凝集素価による血清学的診断は、成人やワクチン既接種者においては有用でないことが明らかとなりつつある。特に公衆衛生上の対応が必要な百日咳感染を疑わせる事例の確定検査においては、LAMP法などの病原体検査の積極的な導入が必要と考えられる。なお、幅広い年齢層を対象として百日咳を疑わせる患者の情報を把握することは必要であるものの、疑い患者全てに対して検査を実施することは現実的ではないことから、その効率的な検査体制を含めた新たな百日咳サーベイランスの構築が国レベルで求められている。地域における百日咳の全容が明らかとなる体制が構築可能となったところで、疾病負荷の推定や、鑑別診断のための症状や検査所見の整理、ワクチン効果の推定などが可能となる。

そこで、過去にも百日咳の集団発生時などに臨時の百日咳全数把握を実施し、関係者の意欲や関心が非常に高い高知県の衛生研究

所と共同で、新たな百日咳サーベイランスの構築に関する研究を検討した。この研究は全体として以下の目的を有している。

- 1) 百日咳発生動向を的確に把握するための病原体診断を含めたサーベイランスのモデルケースを探る。百日咳が実際に流行する恐れなどが危惧される場合には、公衆衛生上の観点から、速やかに保健所や県庁等と情報を共有し、必要な対応を取る一助とする。
- 2) 高知県における成人を含む百日咳の発生成数や疾病負荷を疫学的に推定する。また、現行のサーベイランスシステムを評価する。
- 3) 非流行時の百日咳様疾患において可能性のある病原体検出を遺伝子検査を用いて行い（例：百日咳菌、マイコプラズマ、*B. holmesii*）、真の百日咳診断に必要な症状、検査所見を整理し、医師の診断の精度向上につなげる情報、および集団発生時には乳幼児期のワクチン効果についてまとめる。
- 4) 分子疫学的解析により、地域間の百日咳菌の関連性を解析する。

特に本研究グループにおいては、「サーベイランスの構築」に重きを置き、上記の1)2)、特に「現行のサーベイランスシステムを評価し、病原体診断を含めたサーベイランスのモデルケースを探る」、ことを主眼に据える。

(2) 北海道内の大学保健管理センター百日咳サーベイランス

平成22(2010)年以降、関東地方や九州を中心に大学生の間で百日咳の集団発生事例が多くみられており、インパクトの高い公衆衛生的な介入を行うには、大学での百日咳の流行を早期探知することは重要であるとの認識が広がった。しかしながら、大学生の多くが体調不良時に利用することの多い大学保健管理センターは、感染症法による発生動向調査の対象である医療機関の分類には含まれておらず、大学における感染症発生の情報をも

たらされるのは、問題が巨大化した時点であることが多い(例:2007年の高知大学における百日咳集団発生)。この状況を受け、協力関係にあった北海道内大学保健管理センターネットワーク(仮称)による大学生の百日咳全数サーベイランスの実施が提案された。目的としては、各大学内において百日咳集団発生の早期検出を行い、検査診断を加えて迅速な対応を行うことと同時に、本試みが、通常の感染症サーベイランスでは把握が困難な大学生における百日咳を始めとする感染症の真の動向を把握し、地域の公衆衛生対策の実施を容易にするための有用なツールの基礎資料とすることが期待される、とした。

B. 研究方法

1) 高知県内における百日咳強化調査

本研究においては、高知県内における全医療機関(約700)のうち、内科・呼吸器科・耳鼻咽喉科・小児科のいずれかを標榜する医療機関(約500)に対しては、感染症法に基づく発生動向調査を強化する高知県の事業として、百日咳の症例定義を満たす者(成人を含む)について発生動向調査と同等の情報のみの収集を行う。また、集団発生が検知された際には、感染症法に基づく積極的疫学調査を保健所が中心となって実施する。

[研究の対象]: 調査期間中の通常の外来患者から採取される咽頭ぬぐい液 計約200人分(年)

[実施場所]: 検体採取: 通常時には計20医療機関(下記)。

No	医療機関	管轄 HC	小児科	内科
1	A	中央東	○	○
2	B	中央東	○	
3	C	中央東	○	
4	D	高知市	○	○

5	E	高知市	○	○
6	F	高知市	○	○
7	G	高知市	○	○
8	H	高知市	○	
9	I	須崎	○	
10	J	幡多	○	○
11	K	須崎		○
12	L	高知市		○
13	M	安芸	○	○
14	N	中央西	○	
15	O	幡多	○	
16	P	高知市	○	
17	Q	高知市	○	
18	R	高知市	○	
19	S	高知市	○	
20	T	中央西	○	

集団発生検知時(調査強化時)は通常時の20医療機関を含む、当該保健所地域ごとの対応医療機関(県下全体では62医療機関)。全体の構造については、図1に示される通りである。「症候群強化サーベイランス」「病原体強化サーベイランス」「流行の探知(アウトブレイクサーベイランス:EBS)」を組み合わせている。医療機関の配置を図2に示す。

[研究方法]: 当該医療機関を受診した患者で、感染症法に基づく発生動向調査の百日咳の症例定義を満たす者(成人を含む)について、標準的質問票(後掲)に基づく聞き取りと共に、咽頭ぬぐい液を採取する。記入された質問票は高知県衛生研究所にファックスし、検体は同研究所において検査される。疫学的な解析を行う。流行や集団発生が検知された場合は、必要な公衆衛生上の対応が保健所を中心に行なわれる。

* 感染症法に基づく届出のために必要な臨床症状(ア及びイを満たすもの)。

ア 2週間以上持続する咳嗽。

イ 以下のいずれかの要件のうち少なくとも

1つを満たすもの。

－ (ア) スタッカート及びウープを伴う咳嗽発作。

－ (イ) 新生児や乳児で、他に明らかな原因がない咳嗽後の嘔吐又は無呼吸発作。

[分析方法] 分析を行う上での症例定義 (以下、暫定定義と称する) および分類を以下のように行った。

(確定例) 百日咳が疑われ、培養検査、百日咳遺伝子検査 (特に LAMP 法)、血清抗 PT 抗体検査が行われたもののうち、菌培養陽性 or LAMP 法検査陽性 and/or 血清抗 PT 抗体 100 EU/ml 以上、とした。

(可能性例、疑い例) 百日咳が疑われ、検査実施も、遺伝子検査であれば発症後 3 週間以内ではない例、血清抗 PT 抗体検査であれば発症後 3 週間より後の検査ではない例、あるいはいずれも未検査の例で、感染症法上の届出臨床基準を満たすもの (→可能性例)、感染症法上の届出臨床基準のうち、2 週間以上の持続する咳嗽のみを満たすもの (→疑い例)、とした。

(否定例) 上記いずれを満たしても咽頭ぬぐい液マイコプラズマ LAMP 法陽性となったもの。

(倫理面への配慮について)

本調査は、国立感染症研究所倫理審査を受け、受理されている (平成 24 年 6 月)。

2) 北海道内の大学保健管理安全センター百日咳サーベイランス

インターネット上に Web データベースを構築し、標準的な様式に基づく情報収集、参加大学 (国公立、私立合わせて 50 校) とし、各大学にて、「長い期間咳が続いていたり、百日咳または百日咳の疑いと診断されたりした場合」には、保健管理センターより入力することを依頼した。

C. 研究結果

1) 高知県内における百日咳強化調査

本研究に登録された 2012 年 8-9 月分届出症例総数 (n=181) のうち、症候群情報のみが 46 例で、症候群+病原体情報は、135 例であった。症例全体について暫定定義にて作成した流行曲線を図 2 に、地理的分布と推移を図 3 に、ヒト情報の疫学的なまとめを表 1 に示す。

以上を暫定結果についてまとめると、期間中 (8 月中旬) の流行を認め (流行状態)、高知県中央部から西部にかけての地理的分布があった。症例・非症例の年齢間の違いは無かったが、LAMP 陽性例については年齢中央値 3.5 歳と若年であった 2 週間持続する咳や、スタッカート/ウープを伴う咳発作の診断上の有用性を認めた。LAMP 陽性者 36 名中 17 名は 2 週間以上の持続する咳は無かった。これについては、さらに分析対象期間を広げての評価を実施した。

分析対象期間を 2012 年 8 月～11 月に広げて、高知県の病原体強化定点のみから得られた感染症法定義に基づく症例 (n=77) と、暫定定義に基づく症例の流行曲線 (n=63) とを比較した (図 4)。流行期においては従来定義

(2 週間の咳持続+咳嗽発作 or 新生児乳児特有の咳) の「2 週間」を待たずになされた検査診断例が多いことが分かったので、さらに、症状別の感度・特異度 (全体) を、受信者動作特性 (receiver operating characteristic: ROC) 曲線として分析を行った (図 5)。確定例 (LAMP 陽性 or 抗 PT 抗体陽性) と比較して、流行極期における分析として、「1w 以上の咳+咳そう発作かつ新生児乳児の特有咳」 (=⑥) が図 5 左上から距離が最小で有用性を最も認めた。

2) 北海道内の大学保健管理安全センター百日咳サーベイランス

2012年4月から6月中にかけて、主に札幌市内を中心に居住する大学生において、百日咳疑い例の情報が複数の大学における保健管理センターより多数入力された（ $n=27$ ：一部札幌市外を含む）。流行曲線を図6に示す。年齢中央値は19歳（範囲：18–23歳）で、この間に入院を要する等の重症者の情報はなかった。本試行サーベイランス上の異常として関係者と協議の上で札幌市保健所に連絡、合意の上で、念のために、検体を採取し、検査を行うこととなった。国立感染症研究所細菌第2部において、6月の新規症例9例より咽頭ぬぐい液を採取し、百日咳菌、パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii* についての検査が実施され、全て陰性であった。公衆衛生上の対応として、調査時点での病原体は不明であったが、引き続きモニタリングを継続することとし、保健管理センターを通して咳エチケットの励行強化を推奨した。また、百日咳の関与が疑われる場合にはマクロライド系抗菌薬の投与も実施することを確認した。その後、本報告書提出時点までの間には、百日咳疑い例の集団発生は検出されていない。

D. 考察

わが国において、より有効な百日咳サーベイランスの構築に向けて何が必要かを提言することを目標として、本研究グループにおいては高知県内全域における強化調査（強化サーベイランス）、および北海道内の大学保健管理安全センターを対象とした百日咳サーベイランスを試行している。百日咳様患者の増加は、世界的に大きな問題となっており（米国、イギリス、オーストラリアなど）、わが国のように、長年に渡り無菌体ワクチンを使用してきた国におけるサーベイランスの評価や構築の試みは、世

界的にも重要な知見を発信出来るチャンスがあると考えられる。

高知県内における百日咳強化調査においては、百日咳として報告される疾患の年齢層の症状（特に特有の咳）に関する感度、特異度、ひいては症例定義をさらに検討する必要がある、特に流行状態においては、1週間の咳持続であっても、特有な咳症状をもって届出基準とすることの有用性が高い可能性有がある。また、本報告書の対象となった期間、高知県内では流行が認められたので、本報告書は流行期間内における検討となったが、症状にそれ程特異性が認められない百日咳においては、非流行期における有効な症例定義のあり方を規定することはかなり難しいと考えられる。情報収集を継続する必要がある。特に病原体強化サーベイランスにおいて、百日咳菌、マイコプラズマ、*B. holmesii* の検出を行うことで、実際にはマイコプラズマなどの他の病原体が百日咳として報告されることが少なくないことが示された。病原体検査を適切に行うことはより重要である。効率的に進めるために、検査診断基準の確立することが必要であろう。図7に示すように、発症後の期間、年齢層により、検査診断基準が多様に推移することが考えられる。わが国の百日咳対応の目的に沿った検査体制の整備が、百日咳サーベイランスのあり方を考える上で必須である。上記を踏まえて、効率的な検査診断を行うためにもアウトブレイクサーベイランス（Event-based surveillance: EBS と同義）が整備されることが極めて重要であることを改めて強調したい。サーベイランスのシステム評価を行っていないが、全体に得られている情報源や、地域の情報から、（特に熱心な一部の）小児科医に偏った報告であると示唆される（未評価）。今後も高知県の各医療機関における協力を得て、サーベイランスを継続する必要がある。

北海道内の大学保健管理センターのネット

ワークの協力を得て実施中の強化サーベイランスについては、実際の疑い例を一件検出したものの、実際には百日咳では無かった。今回の事例の検出は、アウトブレイクサーベイランスとしては成功であり、その後の検体検査も実施された点での公衆衛生上の意義はあったと考えられる。さらに、関係する大学の協力を得て、実際の検出増につなげると共に、システム評価を実施して、有用性や課題の抽出、全国的なシステムの提言につなげていきたい。

E. 結論

高知県内全域の医療機関、および北海道内の大学保健管理センターネットワークのそれぞれにおいて、百日咳に関する強化サーベイランスを実施している。特異性の低い百日咳の症状にどのように検査診断を組み合わせていくかは大きなチャレンジである。年齢層別に把握すべき症状に加えて、適切な検査診断体制をどう構築するかが重要である。今後も両サーベイランスの体制を評価していく。

謝辞：高知大学医学部小児科教授・藤枝幹也先生、高知県小児科医会・石黒成人先生、高知県医師会、高知県内の他の協力医療機関の先生方、高知県庁、高知市を含む高知県内保健所の方々に心より感謝申し上げます。また、北海道大学保健センター長・武藏学先生、北海道内の大学保健管理センターネットワーク協力機関の皆様に心より感謝申し上げます。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表（著書を含む）

なし

2. 学会発表

- ・砂川富正ら. 第 50 回全国大学保健管理協会北海道地方部会研究集会 (2012 年 8 月. 札幌)
- ・羽賀将衛. 第 50 回全国大学保健管理研究集会 (2012 年 10 月. 神戸)
- ・砂川富正. 第 16 回日本ワクチン学会 (2012 年 11 月. 横浜)

H. 知的財産権の出願・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

<以下、図表>

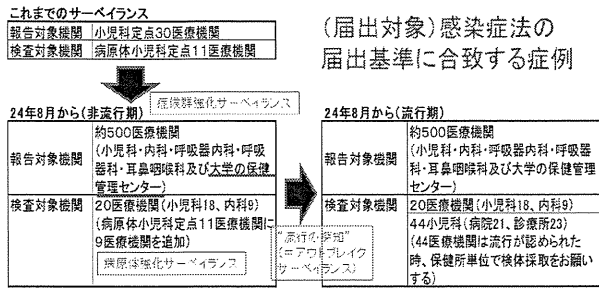


図 1. 高知県内における百日咳強化調査(強化サーベイランス)の全体の構造

	症例		非症例	OR(95%CI)	p-value
	全体	2wLAMP陽性			
年齢中央値	比較 65	36	98		
性別	15	15	9		p<0.05
(職業)	0-71	0-39	0-80		
診断までの日数					
平均日数(日)	20.0	10	10.2		p=1.58
範囲(日)	1-82	1-81	0-91		
2週間以上持続する例(n=12)					
男	84	19	35	0.28(0.14-0.57)	
女	19	17	63	1	
2週間未満の例(n=180)					
男	63	23	67	1.92(1.04-3.52)	
女	22	9	41	1	
乳児以下の移り込み例(n=65)					
男	8	5	13	1.15(0.34-3.8)	
女	8	2	15	1	
感染源と検査された例(n=121)					
同居家族	5	3	11	0.81(0.20-3.02)	
学校・友人	3	2	2	2.09(0.30-12.78)	
保育所	6	6	7	1.16(0.36-3.70)	
不明	37	21	50	1	
2週間以上のDPTワクチン接種の有無(n=181)					
有	28	15	31	0.99(0.42-2.3)	
無・不明	57	21	67	1	

表 1. 暫定定義に基づくヒト情報(2012年)

調査施設数	管内人口	病原体調査(非流行期)				症候群調査		本事業における1医療機関あたり人口	
保健所	(百万を切り捨て)	病院(a)	うち小(うち児科)	内科	診療所(b)	病院(c)	診療所(d)	(a+b+c+d)	
安芸保健所	54,000	1	1		7	29	36	1500.00	
中央東保健所	126,000	1	1	2	19	62	83	1518.07	
高知市保健所	343,000	5	4	5	5	58	173	236	1453.39
中央西保健所	75,000				2	15	38	55	1363.64
須崎保健所	66,000	1		1	1	7	29	37	1783.78
種多保健所	95,000	1	1	1	1	19	39	59	1610.17
計	759,000	9	7	8	11	125	370	506	1500.00

図 2. 高知県内における百日咳強化調査(強化サーベイランス)の保健所地域ごとの医療機関の分布

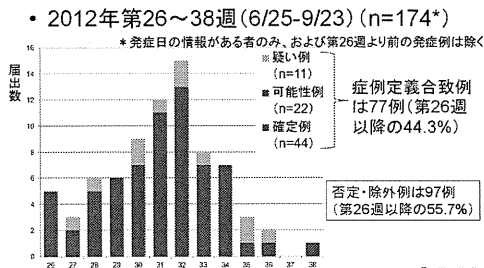


図 3. 暫定定義に基づく、高知県内における百日咳流行曲線 (n=174)

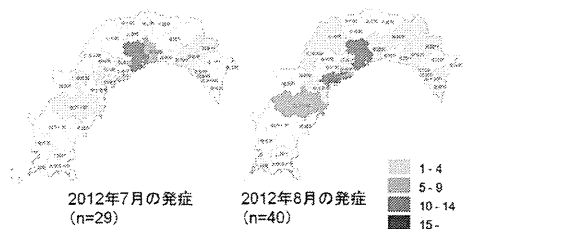


図 4. 暫定定義に基づく、高知県内における百日咳発症の地理的分布の推移 2012年7月 (n=29)、2012年8月の (n=40)

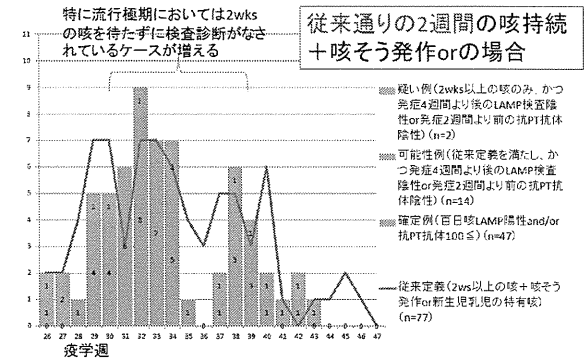


図 4. 高知県の病原体強化定点のみから得られた感染症法定義に基づく症例 (n=77) と、暫定定義に基づく症例の流行曲線 (n=63): 2011年8月~11月

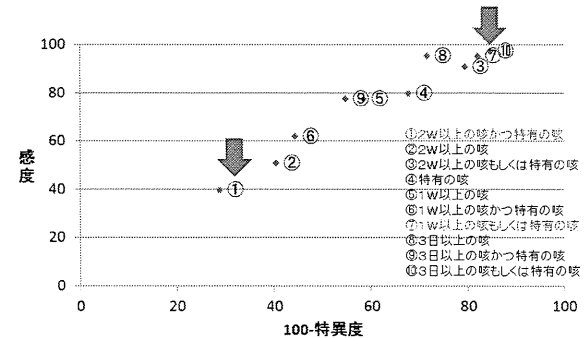


図 5. 症状別の感度・特異度 (全体) (高知県: 2011年8月~10月)