

表7 抗菌薬開始日から解熱までの日数に関する各種因子
(Cox回帰分析による多変量解析)

ML耐性(35症例)に限定したサブ解析

独立因子	基準	ハザード比	(95%信頼区間)	P
年齢	1歳当り	0.97	(0.84-1.12)	0.7144
性別	女性	1.47	(0.60-3.58)	0.3940
コピー数	1コピー当り	1.0	(1.00-1.00)	0.7982
外来・入院	入院	2.17	(0.75-6.98)	0.1566
発症～抗菌薬開始日	1日当り	1.16	(0.91-1.49)	0.2440
最初の抗菌薬の選択				
AZM	TFLX	4.37	(0.95-25.22)	0.0584
CAM	TFLX	1.64	(0.48-7.68)	0.4537
MINO*	TFLX	36.97	(2.68-988.60)	0.0083
抗菌薬変更の有無	変更無し	0.30	(0.04-1.76)	0.1821

*TFLXに比べてMINOでは解熱する確率が36.97倍高い。

図3 ML感受性と耐性の違いによる解熱時間の違い

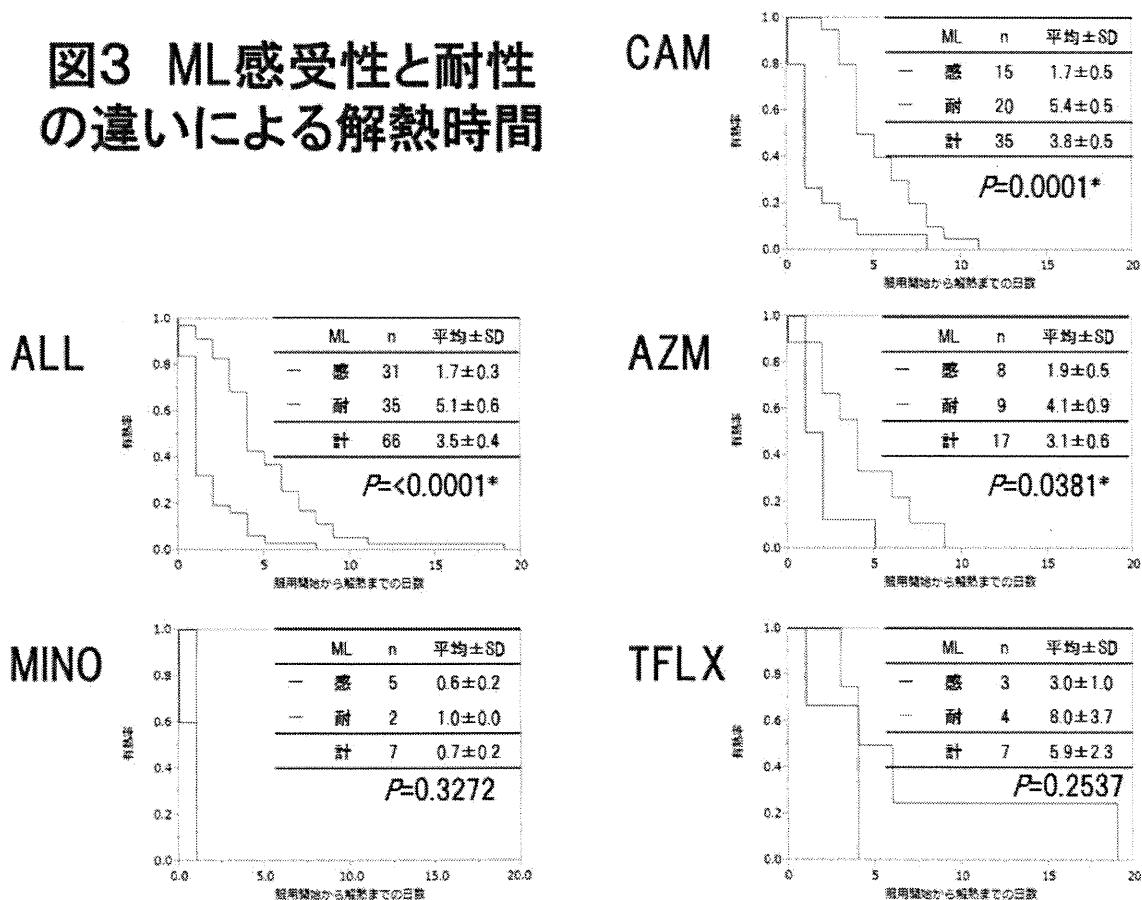


図4 抗菌薬開始から解熱するまでの日数

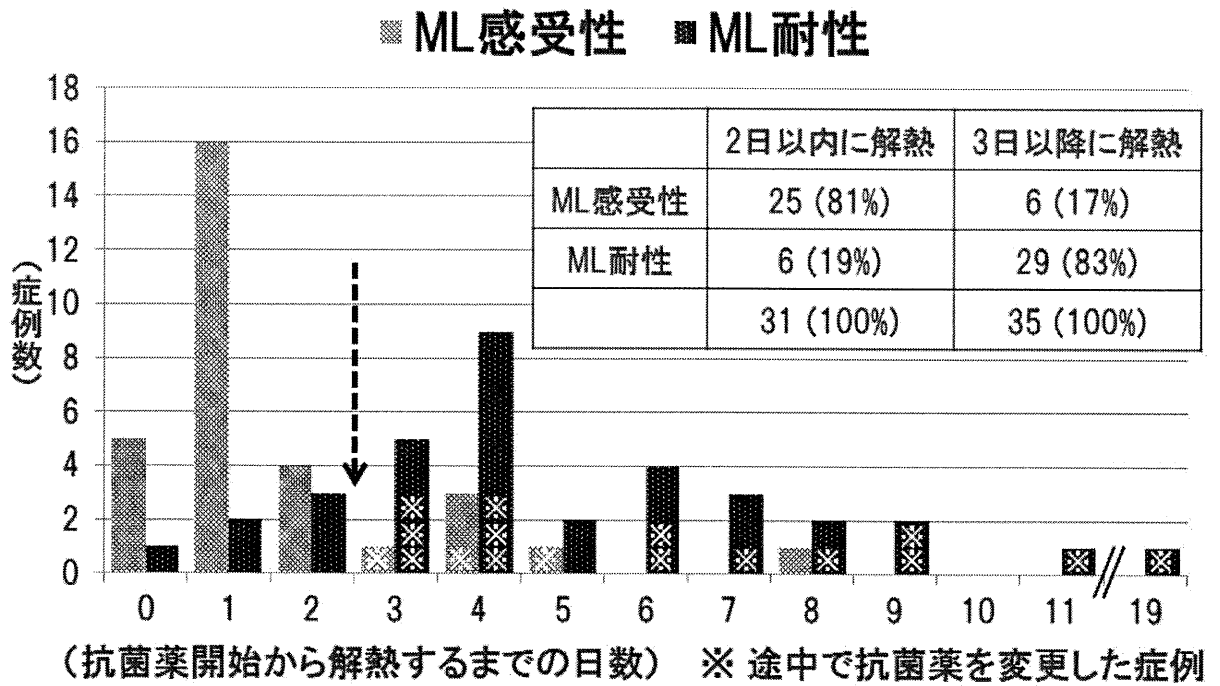
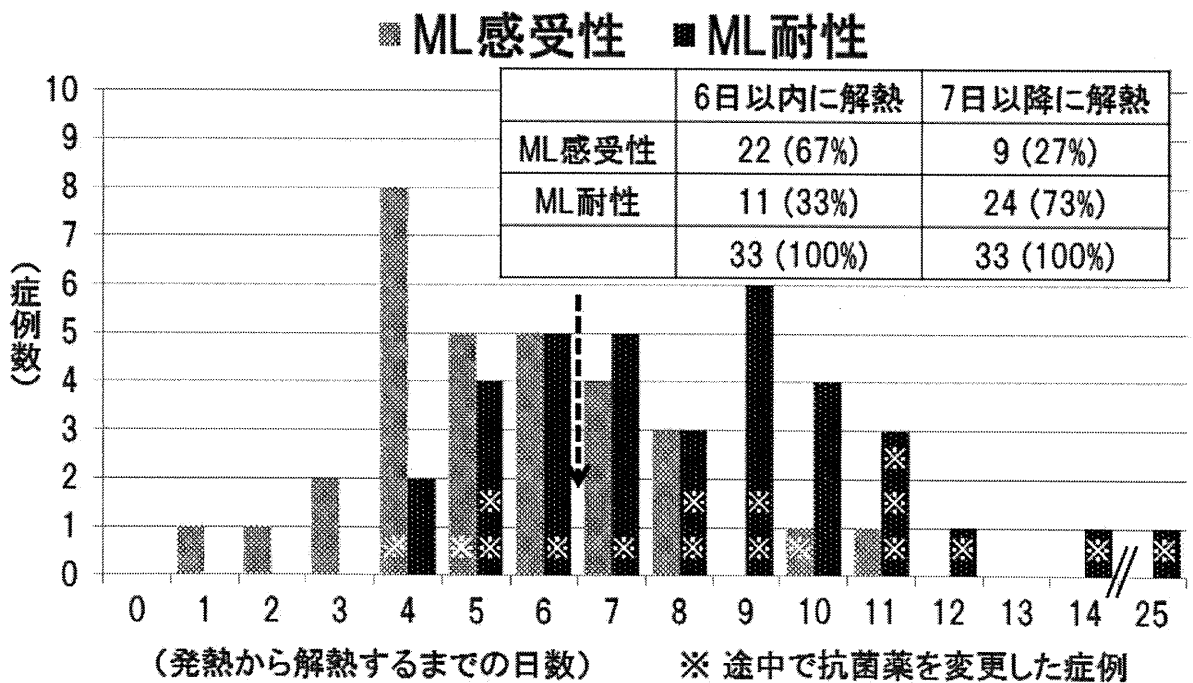


図5 発熱から解熱するまでの日数



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

自然災害時を含めた感染症サーベイランスの強化・向上に関する研究

肺炎マイコプラズマサーベイランスの現状の分析と向上

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 石黒 信久 北海道大学

研究要旨

本研究においては、マイコプラズマ肺炎の起因菌である *Mycoplasma pneumoniae* の *p1* 遺伝子型別プロファイルとマイコプラズマ肺炎流行との関係について経時的に知見を得ることを目的として検討を行ってきた。今年度も *p1* 遺伝子型別の状況について調査し報告する。今年度はこれまでとは異なり北海道の検体を解析した。その結果、他の国内地域とは異なる *p1* 遺伝子型プロファイルが示され、特に北海道内の地域ごとに顕著に異なるプロファイルを示した。これは北海道のみの現象なのかについては、さらなる検討が必要である。また、*M. pneumoniae* の分離を目的として凍結保存されていた輸送培地から菌を分離することが可能であるか検討を行った。その結果、凍結保管されていた培地ほぼすべてより *M. pneumoniae* の分離を行うことが可能であった。また、検体の長時間陸送は輸送時に問題となるところであるが、常温3日をドライアイス詰め陸送輸送で行っても *M. pneumoniae* の分離を行うことが可能であることも併せて示された。*M. pneumoniae* の菌体分離操作は煩雑であり、かつ菌が死滅しやすいため、菌体の分離は敬遠されやすい作業である現状から、この結果は分離を目的として輸送を行う場合には有用な情報と考えられる。

A. 研究目的

これまで継続して *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型別を行い、そのプロファイルとマイコプラズマ肺炎の流行状況について経時的にデータを収集してきた。今年度はこれまでとは異なり非流行期の北海道の検体を用いて *p1* 遺伝子型別の検討を行い、以前の日本国内の他の地域のデータと比較検討することとした。

加えて、今回、遺伝子検査で陽性となり凍結保存されていた輸送培地から *M. pneumoniae* の分離が可能であるか検討を行い、煩雑とされる *M. pneumoniae* の分離培養の改良につながるか、また、保存された培地の輸送が可能か確認することを目的とした。

B. 研究方法

北海道大学より国立感染症研究所・細菌第二部に送られた、*M. pneumoniae* 陽性のゲノム DNA を鋳型として使用し、*p1* 遺伝子型別法を Nested-PCR RFLP 法により行った。この方法では *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子配列上に 2 箇所存在する多型部位の配列の違いに基づき遺伝子型を決定する。PCR 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する。この方法は *M. pneumoniae* の抗原性に関与するタンパク質である P1 の遺伝子の違いに基づく型別であり、抗原性の違いを見ることができると考えられる。現在までのところ、日本では Subtype 1, Subtype 2, Variant 2a, Variant 2b および Variant 2c の 5 種類の *p1* 遺伝子型が報告されている。さらに北海道大学で -80 °C で凍結保存されていた *M. pneumoniae* 分離用の輸送培地をドライアイス詰めで 3 日かけて細菌第二部に送り、これまで本研究でも検討してきた病原体検出マニュアルに従い *M. pneumoniae* の分離を試みた。

(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. 研究結果

1) *p1* 遺伝子型別について

今回は北海道で収集された 2013 年度の検体について型別を行った。その結果、北海道では地域によりプロファイルに大きな差があった。特に室蘭市では Subtype1 が全く検出されず、逆に現在日本国内では非常にまれな Subtype2 が検出された。一方、人の出入

りが比較的多いと思われる札幌市では、これまで検討してきた国内の他の地域と類似したプロファイルが示された。(図 1)

2) 凍結検体を用いた *M. pneumoniae* の分離培養について

適切な保管条件 (-80 °C とドライアイス詰めの輸送条件を維持すれば、保管後の臨床検体を長距離輸送しても *M. pneumoniae* は分離可能であることが示された。これまで検体採取後輸送培地にスワブが入っている状態から、なるべく早く分離培養を行うのが望ましいとされていたが、スワブが入っていない凍結保存状態からでも培養は可能であった。また、スワブが入っていないことにより輸送培地をセラムチューブに移して保管が可能であり、保管と輸送をコンパクトに行うことが可能となった。

D. 考察

今回行った北海道の検体を用いた *p1* 遺伝子型別ではこれまで *p1* 遺伝子型別を行ってきた国内の他の地域の検体と異なるプロファイルが示された。特に室蘭市でこれまで数年検出されていない Subtype 2 が検出された点は特徴的であり、加えて Subtype1 が全く検出されないプロファイルは前回の流行後のものとしては珍しいものである。北海道のプロファイルの中では札幌市が北海道以外の他の地域と類似したものとなっていた。これは札幌市には千歳空港があり北海道外からの人の流れが他の地域に較べて多いためではないかと考えられる。全国的なマイコプラズマ肺炎と流行と *p1* 遺伝子型別のプロファイルの関連をみるにはある程度人の流れの多い大都市を選択することが望ましいかもしれない。

M. pneumoniae の分離培養は経験のない施設では扱いにくく、採取した検体をそのたびに分離可能な施設等へ輸送するのは手間も費用もかかる。また、長距離の陸送では菌の死滅や *M. pneumoniae* 以外の菌の増殖といった問題があった。今回、凍結保管したスワブのない輸送培地から問題なく *M. pneumoniae* が培養可能であった。培養法は迅速に検出ができないため検出法として行う場合には不向きであるが、遺伝子検査で陽性となった輸送培地を -80 °C 保管しておき、その後の解析のために分離培養するには適していることが示された。また、検体採取の都度ではなく、まとめて作業を行うことが可能であるため、効率的に検討を行うことができる。この情報は今後の病原体検出マニュアル改訂時に有用と考えられる。

E.結論

今年度行った北海道の検体による *p1* 遺伝子型別解析ではこれまでとは異なるプロファイルが示された。この結果より、*p1* 遺伝子型プロファイルと流行の関係を経時的にみるには、可能であればできるだけ大きな都市を選択するほうが日本全体の流行を見る上ではより望ましいと考えられた。しかしながら、非流行期に *M. pneumoniae* の検体を収集するという作業そのものが困難なものとなっており、機会があれば *p1* 遺伝子型別解析を行っておく必要がある。

また、今回の検討で、輸送培地の凍結保存により分離培養が比較的スムーズに行える事が明らかになったため、機会があれば非流行期の菌を保管しておくことも次回の流行時に以前の菌に遡って比較検討を行えるため重要な作業であると考ええる。

F.健康危機情報

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(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

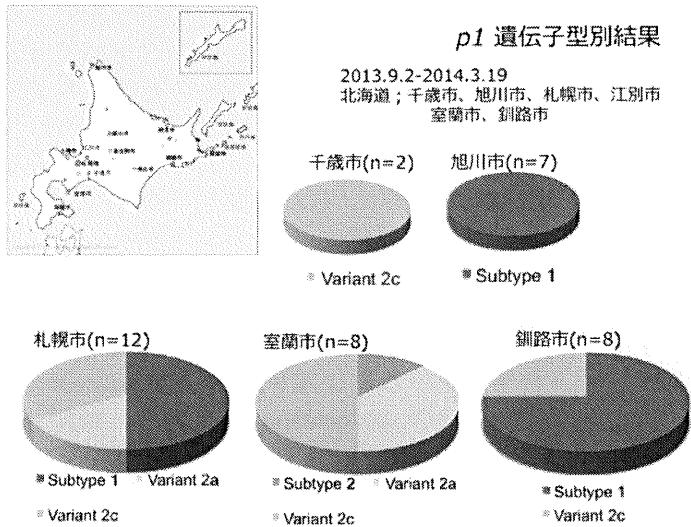


図1. 北海道における地域別 p1 遺伝子型別結果

厚生労働省新興・再興感染症研究事業

自然災害時を含めた感染症サーベイランスの強化・向上に関する研究

病原性ナイセリア属菌感染症のサーベイランス及びそのシステムの構築

H26年度 咽頭うがい液を用いた髄膜炎菌の保菌調査

研究分担者	高橋英之	国立感染症研究所	細菌第一部	主任研究官
研究協力者	大西真	国立感染症研究所	細菌第一部	部長
研究協力者	砂川富正	国立感染症研究所	感染症疫学センター	室長
研究協力者	齊藤 剛仁	国立感染症研究所	感染症疫学センター	研究員
研究協力者	羽賀将衛	北海道教育大学	保健管理センター	教授
研究協力者	北原武尊	新潟大学	医学部	学部生
研究協力者	松本壮吉	新潟大学	医学部	細菌学分野 教授

研究要旨

国内の病原性ナイセリア属菌である髄膜炎菌による感染症の実態は不明な点が多い。昨年度までに **Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)**法による髄膜炎菌の核酸検出法の構築とその試料となる咽頭うがい液からの **DNA** 抽出方法を確立した。本年度は北海道教育大学の学生 **836** 人の咽頭うがい液を採取し、その咽頭うがい液中の髄膜炎菌 **DNA** の存在率を検証した。その結果、**7** つ (約 **0.8%**) の陽性検体が検出され、さらにはその **5** つが血清群 **Y**、一つが **B** であることが判明し、日本人の保菌率が低く、検出された菌の血清群 **Y** と **B** が主要な血清群であることが確認された。

A. 研究目的

ナイセリア属菌はヒトのみを宿主とし、ヒトの生活圏を介して伝播していると考えられている。ナイセリア属菌は **10** 数種同定されているが、その中でも病原性を保持する病原性ナイセリア属菌は淋菌と髄膜炎菌のみである。髄膜炎菌感染症は海外事情とは異なり、日本におい

ては年間 **20** 例程度の稀少感染症となっていたが、**2011** 年の宮崎で発生した学生寮での集団感染事例は日本においても髄膜炎菌感染症は楽観視出来ないということを改めて認識させる事例となった。それを契機に髄膜炎菌にまつわる疫学情報が改めて求められたが、髄膜炎菌による感染症に関して不明な点が多い。

そこで本研究では昨年度に確立した髄膜炎菌の健康保菌者のサーベイランスのための咽頭うがい液を用いた迅速検出法を用いて、実際の咽頭うがい液のお用いた髄膜炎菌の保菌率調査を試みた。

B. 研究方法

1) 咽頭うがい液の採取

平成 26 年 4 月 7 日及び 8 日の二日間にて実施された、北海道教育大学の健康診断において、全学生を対象に事前説明と同意書の記入後に任意に咽頭うがい液の採取を依頼した。

なお、倫理面への配慮として国立感染症研究所及び北海道教育大学において「ヒトを対象とする医学研究倫理審査」には申請及び承認を得、さらに今回の調査に関してはサンプルは無記入、完全非連結化でサンプルと検体提供者が完全に特定できないようにした。

咽頭うがい液は生理的食塩水 20mL を学生に提供し、10 回程度のうがい後、その咽頭うがい液を 50 mL チューブに保存した。

2) 咽頭うがい液から DNA 抽出法

北海道から空輸して、4°C に保存しておいた咽頭うがい液を 12,000 回転で 10 分遠心し、その沈渣を 100 µL の TE に懸濁した。その懸濁液を DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製し、最終的に 100 µL の AE 溶液に入った DNA 溶液を調製した。

3) LAMP 法による髄膜炎菌 DNA の検

出

LAMP 法は栄研化学株式会社の DNA 増幅試薬キット (製品コード LMP201) を用いて、そのキットに添付されているプロトコールに従って行なった。UV 照射を用いて目視で DNA の増幅を確認するために栄研化学株式会社の蛍光・目視検出試薬キット (製品コード LMP221) を用いて LAMP 反応液中に添加した。プライマーは以下のものを実験に供した。

ctrB-F3: ACCAGTTGAACGATCGTG

ctrB-B3: CCAGCTGGGTTTGAATCACA

ctrB-FIP:GAGAGGCTTCCTTTACCCGCTC
TGCTGATACGGTGCGCTAT

ctrB-BIP:TCTGACGGATTACCGGATTGCC
GGAAACCACCCCATTTGC

以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

2× reaction mix.	12.5 µl
Primer: FIP(40 µM)	1 µl
BIP(40 µM)	1 µl
F3(20 µM)	1 µl
B3(20 µM)	1 µl
<i>Bst</i> DNA polymerase	1 µl
蛍光・目視検出試薬	1 µl
Distilled Water	5.5 µl

反応液を調製後、鋳型 DNA を 1 µl 反応液に添加し、汎用 0.2 ml PCR チューブ及び Takara PCR Thermal Cycler を用いて 65 °C × 60 分 反応させた。増幅した DNA は UV 照射による目視により確認した。

4) nested-PCR 法による陽性サンプルの再検証

髄膜炎菌及び淋菌の病原性ナイセリアに

しか存在しない *ggt* 遺伝子（淋菌は *ggh* 遺伝子）をターゲットにした nested PCR を用いて前項の LAMP 法によって陽性検出されたサンプルの再検証を行なった。nested PCR は以下のプライマーセットを用いた。

ggt-nested-1:CTAAAACATATTTATTGACT
G

ggt-nested-2:CAAGCCTGACGACTGTGGCT
CTAC

以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

10×Ex Taq buffer	1.25 μl
dNTPs	1 μl
100 μM ggt-nested-1	0.2 μl
ggt-nested-2	0.2 μl
Ex Taq DNA polymerase	0.2 μl
Distilled Water	8.65 μl

反応液を調製後、鋳型DNAを1 μl反応液に添加し、以下のサイクルでPCR反応を行なった。

94℃ × 5 分

94℃ × 30 秒

55℃ × 30 秒

72℃ × 30 秒

25 サイクル

2nd PCR は以下のプライマーセットを用いた。

ggt-29: GGATGTCAAGTCATCCATGCCAAT

ggt-20:TGTCGTCTGCACCGCCACCATCGC

以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

10×Ex Taq buffer	1.25 μl
dNTPs	1 μl
100 μM ggt-29	0.2 μl
ggt-20	0.2 μl
Ex Taq DNA polymerase	0.2 μl
Distilled Water	8.65 μl

反応液を調製後、1 μl の nested PCR 反応液を 2nd PCR 反応液に添加し、以下のサイクルでPCR反応を行なった。

94℃ × 5 分

94℃ × 30 秒

55℃ × 30 秒

72℃ × 30 秒

25 サイクル

この反応液 2 μl を 1.5%アガロースゲルを用いて解析し、増幅産物の有無をエチジウムブロマイド染色にて確認した。

5) nested-PCR 法による陽性サンプルの血清群決定

以下の 1 及び 2 のプライマー、6 セットを用いて 1 サンプルにつき、6 反応を行なった。

nested-crgA-1:CGCGATGCCGATGGTGCT
GCATCT

nested-crgA-2:CTAAACATTGGTGACCGG
CAAGCT

nested-A-1:TATAGTTAAAAAACTTAACAA
TCAAAA

nested-A-2:TTCTTCATAGGGTAATGAAGA
TATTTCTG

nested-B-1:GCAAAAAAATATAACCGGTTT
TTTGCG

nested-B-2:AATTTCTTAATAATCTCTAAG
TGTTCT

nested-C-1:TTATAAACTATTGTCGAAAC
ATTAAA

nested-C-2:GTTGGGCTGTATGGTGTATCG
AAT

nested-Y-1:ATACAGATATCCTAATCATGA
CAT

nested-Y-2 :TTCCAGAAATATCACCAGTTT
TAAAAA

nested-W-1 :ATACAGATATCCTGATCATG
ACAT

nested-W-2 :TTCCAGAAATATCACCAGTT
TTAAAAA

以下に1反応辺りの反応液組成を示す。

10×Ex Taq buffer	1.25 μl
dNTPs	1 μl
100 μM nested-1	0.2 μl
nested-2	0.2 μl
Ex Taq DNA polymerase	0.2 μl
Distilled Water	8.65 μl

反応液を調製後、鋳型DNAを1 μl 反応液に添加し、以下のサイクルでPCR反応を行なった。

94□×5分

94□×30秒

55□×30秒

72□×30秒

25 サイクル

2nd PCR は以下の1及び2のプライマー、6セットを用いて1サンプルにつき、6反応を行なった。

crmA-1 :GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAAT
TC

crmA-2 :CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCG
T

A-1 :CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC

A-2 :CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT

B-1 :GGATCATTTTCAGTGTTCACCA

B-2 :GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA

C-1 :TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT

C-2 :CAATCACGATTTGCCCAATTGAC

Y-1 :TCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA

Y-2 :CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTA
A

W-1 :CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA

W-2 :CACAACCATTTTCATTATAGTTACT
GT

反応液を調製後、1 μl の nested PCR 反応液を 2nd PCR 反応液に添加し、以下のサイクルでPCR反応を行なった。

94□×5分

94□×30秒

55□×30秒

72□×30秒

25 サイクル

この反応液 2 μl を 1.5% アガロースゲルを用いて解析し、増幅産物の有無をエチジウムブロマイド染色にて確認した。

C. 研究結果

1) 咽頭うがい液を用いた髄膜炎菌の健康保菌率の調査

本年度は北海道教育大学の全学生の協力を求め、836名の同意者から咽頭うがい液を採取することが出来た。その咽頭うがい液からDNAを調製し、昨年度開発したLAMP法による髄膜炎菌DNAの検出を行なった。

全サンプルを解析した結果、約46のサンプルが陽性反応を示した(図1)。これを1stスクリーニングとし、1stスクリーニングの結果を再検証するために、それらの陽性サンプルをさらにLAMP法にて検証した(2ndスクリーニング)。

その結果、約80%のサンプルに関しては「陰性」を示す結果が得られた。そのために2ndスクリーニングを3度繰り返

した。その結果、確実に陽性が出るサンプルと陰性が出てしまうサンプルとに分かれる結果が得られた (図 2)。この結果から咽頭うがい液から得られた DNA 中に含まれる髄膜炎菌 DNA の量が極めて少なく、またサンプルによってばらつきがあることが推測された。また、LAMP 法で陰性を示すサンプルは陽性を示す結果が殆ど得られないことから、LAMP 法においては偽陰性が得られる可能性は少ないが、偽陽性が出る可能性はある (考察も参照) ために、1st スクリーニング法としては十分な検出法であると考えられるが、確定のためには別の方法での再検証が必要と考えられた。

そこで髄膜炎菌に特異的であると検証済みの *ggt* 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法による検証を 6 回検証を繰り返すことにより試みた。

その結果、nested PCR 法によって得られる結果にも一定の割合で陰性の結果が得られるサンプルも存在することが明らかとなった (図 3)。しかし、LAMP 法より検出感度及び陽性の再現性は良好であることが推測できる結果となった。

LAMP 法及び nested PCR 法の結果を考察して、最終的な陽性率を判断すると、確実に陽性と考えられるサンプルは低く見積もって 7 つであると考えられた (図 4)。この結果から、今回の 836 人の咽頭うがい液から得られた髄膜炎菌陽性サンプルは 7 つで、髄膜炎菌の保菌率は $7/836=0.84\%$ であることが推測された。

2) 陽性サンプルの血清群決定

7 つの髄膜炎菌陽性サンプルに関してその血清群を決定するために、nested PCR 法を適用した PCR による血清群決定法を確立し、それを用いて血清群を決定した (図 5)。その結果、5 つのサンプルの血清群は Y、1 つのサンプルの血清群は B、残りの 1 つに関しては検出不可という結果が得られた。

検出できないサンプルがある上に同定できたサンプルに関する増幅産物の量比に差異が認められ、咽頭うがい液から得られた DNA 中に含まれる髄膜炎菌 DNA の量が極めて少なく、またサンプルによってばらつきがあることがこの結果からも推測された (考察も参照)。

D. 考察

2011 年の侵襲性髄膜炎菌感染症の集団感染事例を契機に髄膜炎菌の健康保菌率が問題となった。10 年ほど前に厚生労働省の研究班において実施された 2000 人程度の大学生を対象とした保菌調査においては約 0.4% の保菌率が報告されていた。しかし、10 年前のデータを現在に適用するには難しい部分も多く、本研究においては咽頭うがい液中の髄膜炎菌を検出する手法を用いて、836 人を対象として現在における髄膜炎菌の健康保菌率の再検証を行なった。その結果、低く見積もった結果となるが、髄膜炎菌の健康保菌率は 0.83% で、10 年前の調査結果の 0.4% という値と大きく異なることはなく、日本人の健康保菌率は非常に低いことが明らかとなった。また、その菌の血清群の内訳も本研究で開発

した serogroup 決定用の nested PCR 法を用いて明らかにし、血清群 Y と B が多いという、従来及び現在の日本国内の臨床分離株の疫学結果と非常に合致する結果が得られた。このことから、日本国内では一般的には健康保菌率は非常に低く、その血清群の分布率がそのまま患者分離株に反映されている可能性が強く示唆された。

本研究で最も予想外であったのは *ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法による解析結果に偽陽性が多く含まれることであった。検出系においては偽陽性や偽陰性が含まれることは好ましくないと考えられる。一方で、*ggt* 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法の検出感度が良好であった。しかし、その nested PCR の結果も陽性の結果が出たり、出なかったりしたサンプルがあった。このことから、LAMP 法及び nested PCR 法による髄膜炎菌 DNA の検出法自体に問題があると考えられる面もあった。しかし、LAMP 法においては陰性のものは陰性であり、そのサンプルは nested PCR 法においても陰性であった（結果未掲載）。さらに serogroup-nested PCR 法においてもその増幅産物にはサンプル間の量的な差異が明らかに認められ、検出法そのものの不安定さと考えるよりは、咽頭うがい液から得られた DNA 中に含まれる髄膜炎菌 DNA の量が極めて少なく、検出感度ギリギリのところまで解析しているために発生する不安定さである可能性が強く考えられた。それゆえ、咽頭うがい液を用いた髄膜炎菌の保菌調査は

本研究のように確実に陽性となるサンプルのみを陽性とカウントする「低く見積もった」健康保菌率しか検出することができなく、従来の咽頭スワブからの培養による健康保菌率の調査に比べてデメリットがあることも今回明らかとなった。

では、本研究で実施した咽頭うがい液を用いた健康保菌調査法は意味がないのかと言うと、そうではないと考えている。従来の咽頭スワブからの培養による健康保菌率の調査法は調査日から菌検出の作業までを検体を保存することなく培養までを行ない、同定までの細菌学的作業が出来る作業環境が必要となる。さらに、咽頭スワブを回収するに際しても、倫理申請や被験者への協力要請という点において完全な非侵襲性のサンプリング方法である咽頭うがい液に比べて申請認可や同意が得られにくい傾向がある。そうした地理的・物理的・倫理的な面で咽頭スワブを用いた培養法による健康保菌調査の実施が困難な場合には咽頭うがい液を用いた保菌調査は代替調査法となりうる場合が考えられる。本研究はそうした疫学調査の諸事情に合わせて保菌調査の手法の幅を広げたという意味においては非常に有意義だと考えられた。

E. 結論

髄膜炎菌の健康保菌率は低く見積もって 0.8%程度であり、その血清群の内訳は Y 及び B 群で占められる。一方で、LAMP 法を用いた保菌率の調査法は調

査現地での作業環境が確保できない場合には咽頭スワブ培養法による保菌率調査法の代替になりうるということが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hayakawa K, Itoda I, Shimuta K, Takahashi H, Morita M, Ohnishi M. Urethritis Caused by Novel *Neisseria meningitidis* Serogroup W in Man Who Has Sex with Men, Japan. *Emerg Infect Dis* 20(9):1585-1587, 2014.

高橋英之、大西真、髄膜炎菌感染症、小児疾患診療のための病態生理、1、831-834、2014.

2. 学会発表

高橋英之、大西真：髄膜炎菌 GltT-GltM トランスポーターの宿主細胞侵入における作用機序の解明、第 88 回日本細菌学会総会、岐阜県、2015 年 3 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

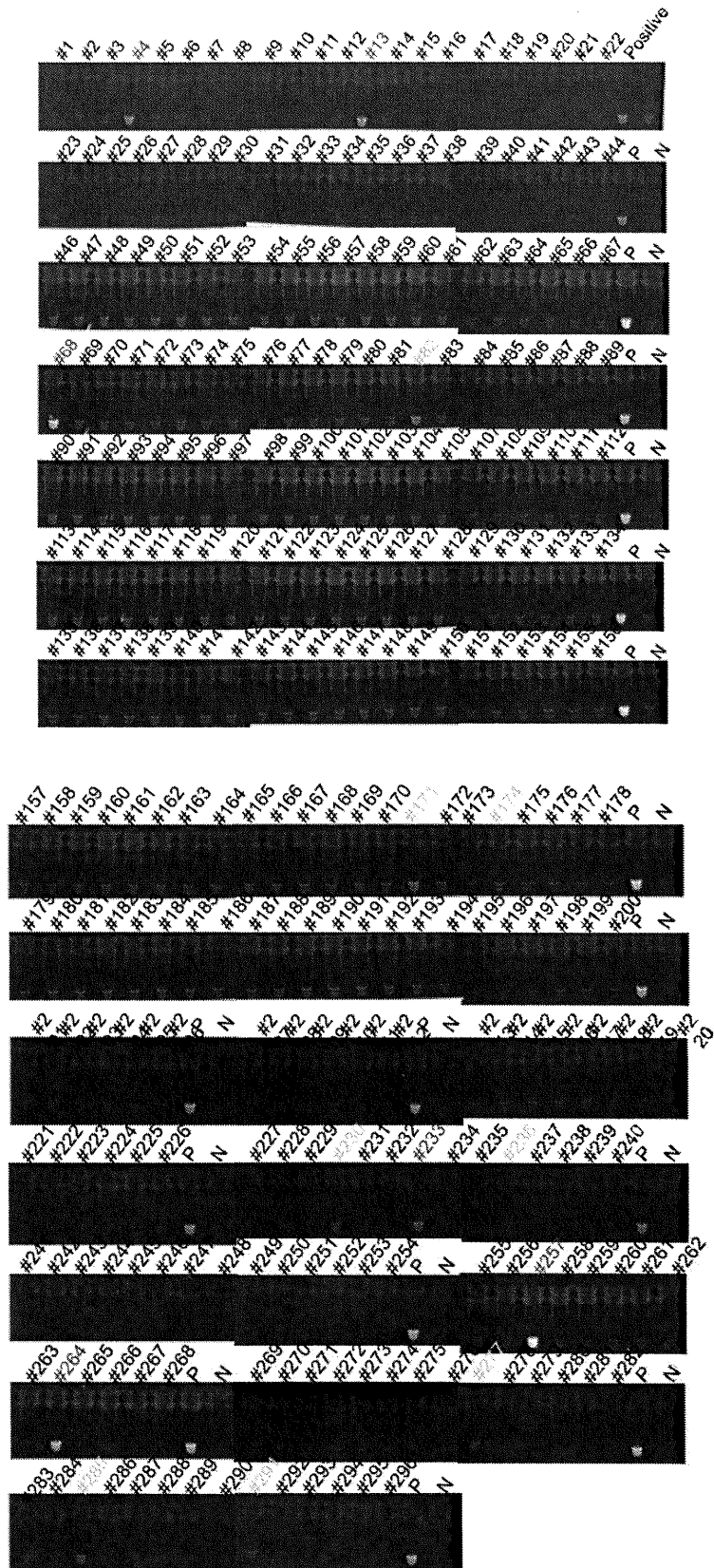
なし

H. 健康危険情報

なし

図1 LAMP 法による髄膜炎菌の検出

陽性を示したサンプルの番号は黒色以外で示した。



#297 #298 #299 #300 #301 #302 #303 #304 #305 #306 #307 #308 #309 #310 #311 #312 #313 #314 #315 #316 #317 #318 P N
[REDACTED]

#319 #320 #321 #322 #323 #324 #325 #326 #327 #328 #329 #330 #331 #332 #333 #334 #335 #336 #337 #338 #339 #340 P N
[REDACTED]

#341 #342 #343 #344 #345 #346 #347 #348 #349 #350 #351 #352 #353 #354 #355 #356 #357 #358 #359 #360 #361 #362 P N
[REDACTED]

#363 #364 #365 #366 #367 #368 #369 #370 #371 #372 #373 #374 #375 #376 #377 #378 #379 #380 #381 #382 #383 #384 #385 P N
[REDACTED]

#386 #387 #388 #389 #390 #391 #392 #393 #394 #395 #396 #397 #398 #399 #400 #401 #402 #403 #404 #405 #406 #407 P N
[REDACTED]

#408 #409 #410 #411 #412 #413 #414 #415 #416 #417 #418 #419 #420 #421 #422 #423 #424 #425 #426 #427 #428 #429 P N
[REDACTED]

#430 #431 #432 #433 #434 #435 #436 #437 #438 #439 #440 #441 #442 #443 #444 #445 #446 #447 #448 #449 #450 #451
#452 #453 #454 #455 #456 #457 #458 #459 #460 #461 #462 #463 #464 #465 #466 #467 #468 #469 #470 #471 #472
#473 #474 #475 #476 #477 #478 #479 #480 #481 #482 #483 #484 #485 #486 #487 #488 #489 #490 #491 #492 #493 #494 #495
#496 #497 #498 #499 #500 #501 #502 #503 #504 #505 #506 #507 #508 #509 #510 #511 #512 #513 #514 #515
#516 #517 #518 #519 #520 #521 #522 #523 #524 #525 #526 #527 #528 #529 #530 #531 #532 #533 #534 #535 #536
#537 #538 #539 #540 #541 #542 #543 #544 #545 #546 #547 #548 #549 #550 #551 #552 #553 #554 #555 #556
#557 #558 #559 #560 #561 #562 #563 #564 #565 #566 #567 #568 #569 #570 #571 #572 #573 #574 #575 #576
#577 #578 #579 #580 #581 #582 #583 #584 #585 #586 #587 #588 #589 #590 #591 #592 #593 #594 #595
#596 #597 #598 #599 #600 #601 #602 #603 #604 #605
#606 #607 #608 #609 #610 #611 #612 #613 #614 #615 #616 #617 #618 #619 #620 #621 #622 #623 #624 #625 #626 #627
#628 #629 #630 #631 #632 #633 #634 #635 #636 #637 #638 #639 #640 #641 #642 #643 #644 #645 #646 #647 #648
#649 #650 #651 #652 #653 #654 #655 #656 #657 #658 #659 #660 #661 #662 #663 #664 #665 #666 #667 #668 #669
#670 #671 #672 #673 #674 #675 #676 #677 #678 #679 #680 #681 #682 #683 #684 #685 #686 #687 #688 #689
#690 #691 #692 #693 #694 #695 #696 #697 #698 #699 #700 #701 #702 #703 #704 #705 #706 #707 #708 #709 #710
#711 #712 #713 #714 #715 #716 #717 #718 #719 #720 #721 #722 #723 #724 #725 #726 #727 #728
#729 #730 #731 #732 #733 #734 #735 #736 #737 #738 #739 #740 #741 #742 #743 #744 #745 #746 #747 #748
#749 #750 #751 #752 #753 #754 #755 #756 #757 #758 #759 #760 #761 #762 #763 #764 #765 #766 #767 #768
#769 #770 #771 #772 #773 #774 #775 #776 #777 #778 #779 #780 #781 #782 #783 #784 #785 #786 #787 #788
#789 #790 #791 #792 #793 #794 #795 #796 #797 #798 #799 #800 #801 #802 #803 #804 #805 #806 #807 #808
#809 #810 #811 #812 #813 #814 #815 #816 #817 #818 #819 #820 #821 #822 #823 #824 #825 #826 #827
#828 #829 #830 #831 #832 #833 #834 #835 #836 #837 #838 #839 #840 #841 #842 #843 #844 #845 #846 #847 #848
#849 #850 #851 #852 #853 #854 #855 #856 #857 #858 #859 #860 #861 #862 #863 #864 #865 #866 #867 #868
#869 #870 #871 #872 #873 #874 #875 #876 #877 #878 #879 #880 #881 #882 #883 #884 #885 #886 #887 #888
#889 #890 #891 #892 #893 #894 #895 #896 #897 #898 #899 #900 #901 #902 #903 #904 #905 #906 #907 #908
#909 #910 #911 #912 #913 #914 #915 #916 #917 #918 #919 #920 #921 #922 #923 #924 #925 #926 #927 #928
#929 #930 #931 #932 #933 #934 #935 #936 #937 #938 #939 #940 #941 #942 #943 #944 #945 #946 #947 #948
#949 #950 #951 #952 #953 #954 #955 #956 #957 #958 #959 #960 #961 #962 #963 #964 #965 #966 #967 #968
#969 #970 #971 #972 #973 #974 #975 #976 #977 #978 #979 #980 #981 #982 #983 #984 #985 #986 #987 #988
#989 #990 #991 #992 #993 #994 #995 #996 #997 #998 #999

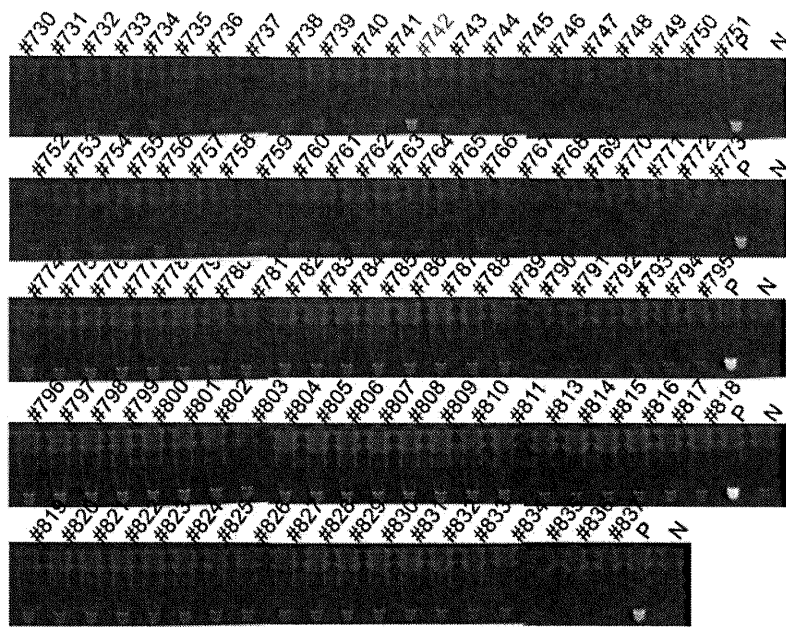
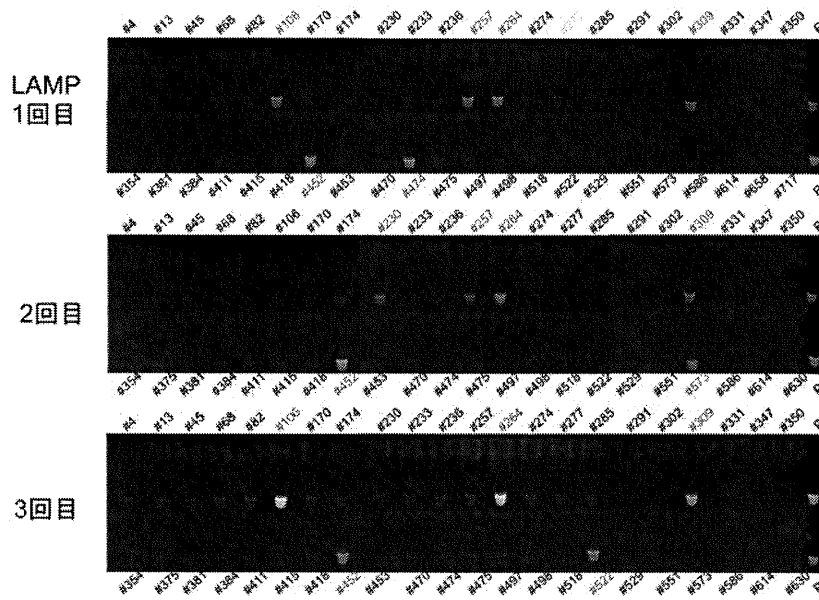


図2 陽性サンプルのLAMP法による再確認



LAMP	#45	#106	#230	#277	#309	#257	#264	#375	#452	#474	#522	#573	#630	#698
1回目	-	○	-	-	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
2回目	-	-	○	-	○	○	○	-	○	-	-	○	-	-
3回目	-	○	-	-	○	-	○	-	○	-	○	-	-	-

図3 *ggt*-nested PCR 法による陽性サンプルの再検証

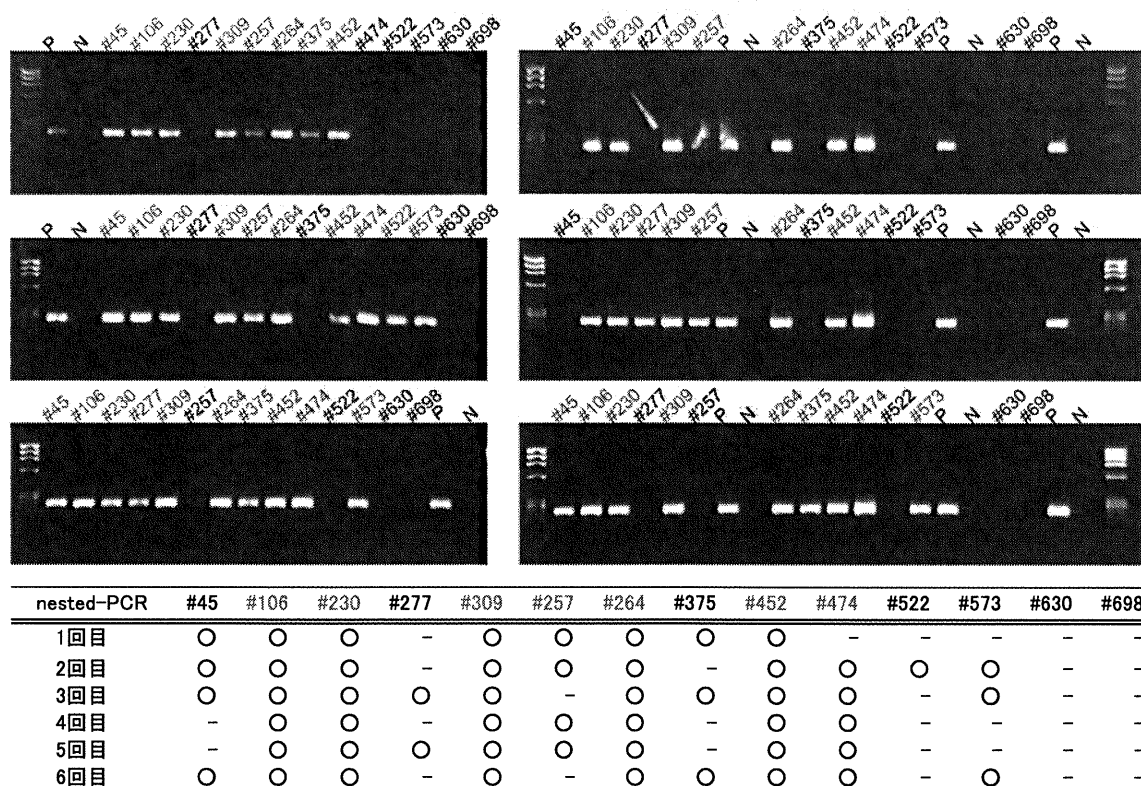


図4 LAMP 法及び nested PCR 法による検出結果のまとめ

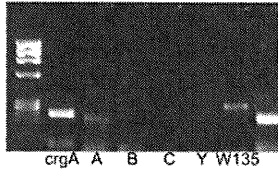
LAMP	#45	#106	#230	#277	#309	#257	#264	#375	#452	#474	#522	#573	#630	#698
1回目	-	○	-	-	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
2回目	-	-	○	-	○	○	○	-	○	-	-	○	-	-
3回目	-	○	-	-	○	-	○	-	○	-	○	-	-	-

nested-PCR	#45	#106	#230	#277	#309	#257	#264	#375	#452	#474	#522	#573	#630	#698
1回目	○	○	○	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-
2回目	○	○	○	-	○	○	○	-	○	○	○	○	-	-
3回目	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○	-	○	-	-
4回目	-	○	○	-	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
5回目	-	○	○	○	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
6回目	○	○	○	-	○	-	○	○	○	○	-	○	-	-

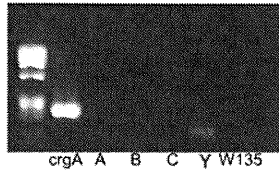
灰色で示すサンプルを陽性サンプルと最終的に判断した。

図5 陽性サンプルの血清群決定

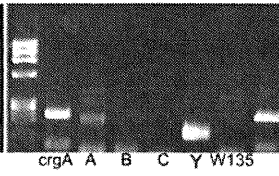
#106 → 検出不可



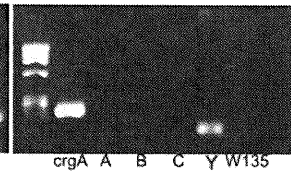
#230 → Y



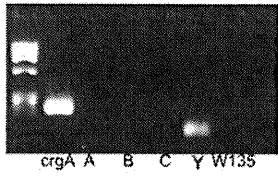
#257 → Y



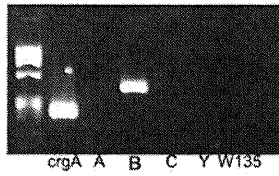
#264 → Y



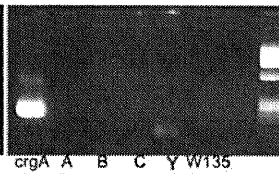
#309 → Y



#452 → B



#474 → Y



百日咳病原体サーベイランスに関する研究

研究分担者 蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 百日咳病原体サーベイランスに有用となる 4Plex リアルタイム PCR 法について改良を加えた。本法 (ver.1) の臨床評価において一部の標的遺伝子に非特異的増幅が認められたことから、蛍光クエンチャーに代わり非蛍光クエンチャー (NFQ-MGB) を採用し、さらにプライマーとプローブの鎖長ならびに濃度の至適化を行った。これらの改良により、改良法 (ver.3.2) は理論値に近い増幅効率 (97.9~116.7%) を示し、さらにマルチプレックス化による感度低下を認めなかった。国立感染症研究所では本法を百日咳の通常検査に導入するとともに、2014年6月から地方衛生研究所を対象に本検査キットの配布を開始した。

A. 研究目的

百日咳はワクチン予防可能疾患に含まれる小児の急性呼吸器感染症である。百日咳の起原菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) であるが、同様な呼吸器症状を引き起こす病原体として百日咳類縁菌 (パラ百日咳菌, *Bordetella holmesii*)、マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*)、その他ライノウイルスを始めとする呼吸器系ウイルスが挙げられる。臨床症状からこれらの病原体を鑑別することは難しく、百日咳の臨床診断には他疾患の紛れ込みを多く含むことが指摘される。特に感染症発生动向調査における百日咳報告基準は臨床症状に基づくため、その精度向上には実験室診断による病原体鑑別が必要となる。

百日咳菌の病原体鑑別には遺伝子検査が有用となり、現在米国では菌培養検査や血清学的検査に代わり PCR 検査が広く用いられている。特にアウトブレイク調査では PCR 検査による病原体鑑別が望まれ、わが国では研究用試薬として百日咳菌 LAMP 検出キットを利用することができる。ただし、本検査キットは百日咳菌に特異的であり、百日咳類縁菌を検出することが出来ないという欠点がある。以上の背景を踏まえ、昨年度の本研究班では百日咳菌、百日咳類縁菌、マイコプラズマを一度に鑑別可能な 4Plex リアルタイム PCR (ver.1) を開発し、検出感度などの基礎評価を行った。本研究では本法の臨床評価を実施し、問題点の改良と百日咳病原体サーベイランスへの応用を試みた。

B. 研究方法

臨床評価：宮崎県衛生環境研究所と国立感染症研究所の2施設で 4Plex リアルタイム PCR (ver.1) の臨床感度を共同評価した。本法の問題点として、*B. holmesii* の標的遺伝子である *recA* の非特異的増幅、百日咳菌の標的遺伝子である *IS481* の非特異的増幅が指摘された。

4Plex リアルタイム PCR の改良：*IS481* の検出用プライマー PPert とプローブ SPert について、PPert を 19 mer から 20 mer、SPert を 22 mer

から 15 mer に変更した (表 1)。さらに SPert の蛍光クエンチャー BHQ1 を非蛍光クエンチャーである NFQ-MGB に改変した。また、パラ百日咳菌の検出用プローブ SPPara を 22 mer から 15 mer に変更した。リアルタイム PCR 装置は ABI 7500Fast system を使用し、Stage 1 を 95°C (10 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。本法の反応組成を以下に示した。

2×Premix EX Taq (Takara)	10 µl
Mixed primer & probes	2 µl
Template DNA	2 µl
ROX dye II (Takara)	0.2 µl
DW	5.8 µl
Total	20 µl

感度評価：百日咳菌東浜株、*B. holmesii* ATCC51541、パラ百日咳菌 BAA-587、*M. pneumoniae* NBRC14401 のゲノム DNA を供試した。精製 DNA を 1000 pg から 10 倍間隔で連続希釈し、4Plex リアルタイム PCR (ver.3.2) の検出感度を評価した。同時に singleplex PCR との感度比較を行った。

百日咳病原体サーベイランスへの応用：国立感染症研究所に検査依頼があった百日咳疑い患者検体 355 件を 4Plex リアルタイム PCR (ver.3.2) に供試した (検体採取期間：2013年1月~2014年12月)。臨床検体は Qiagen DNA Micro kit により DNA を精製し、遺伝子増幅は上述の条件で実施した。相対蛍光強度 (ΔRn) が 0.3 以上を示したものを陽性と判定した。なお、本検査は現行の遺伝子検査である LAMP 法 (百日咳菌, *B. holmesii*) と同時に実施し、マイコプラズマ陽性検体については Looamp マイコプラズマ P 検出試薬キット (栄研化学) による追試確認を行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体は医療機関において診断目的に採取・保存された患者検体を供試した。患者検体は医療機関において連結可能匿名化され、患者個人が特定出来ないよう配慮した。