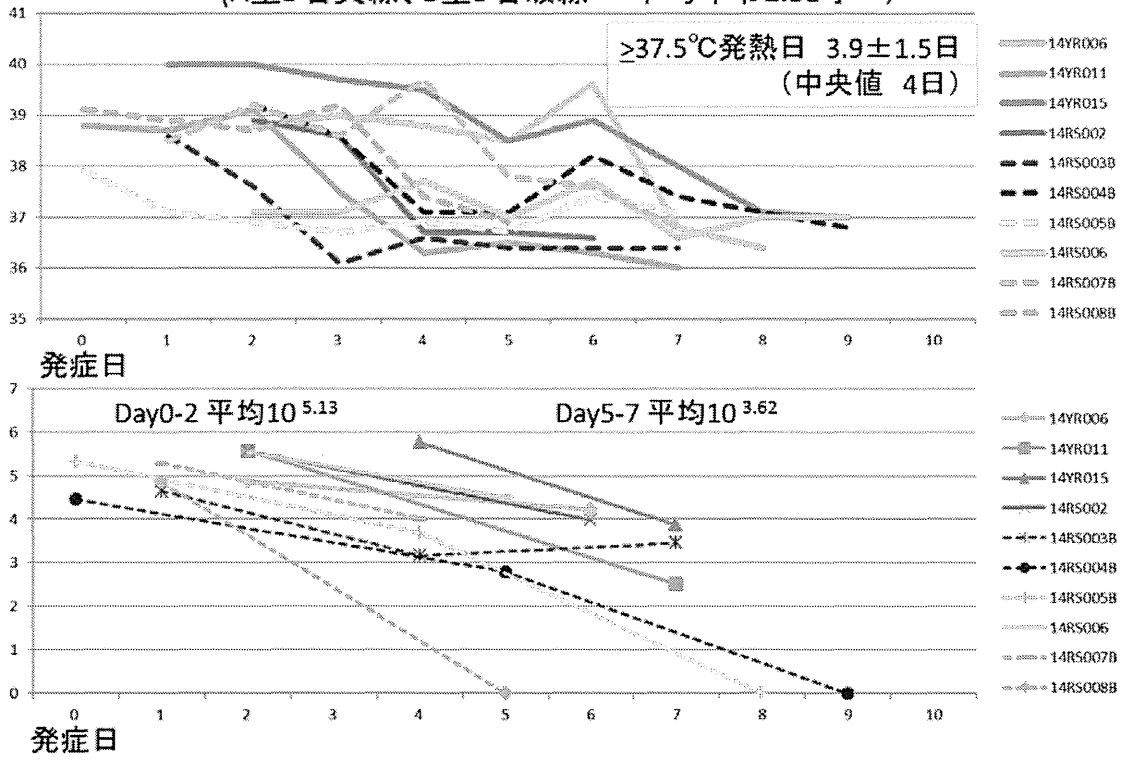


図5 2014-2015年 発症日を基準としたRSV罹患児10名の熱経過(上段)とウイルス量(下段)
(A型5名実線、B型5名破線 平均年齢1.53才)



薬剤耐性インフルエンザウイルスおよび急性呼吸器感染症起因ウイルス
のサーベイランスに関する研究

研究分担者 佐多 徹太郎 富山県衛生研究所

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 現行の病原体サーベイランスを補完する目的で、1) ノイラミニダーゼ阻害薬（NI）投与中の薬剤耐性インフルエンザウイルスの発生状況、2) インフルエンザウイルス以外の急性呼吸器感染症（ARI）起因ウイルスの流行実態を調査した。その結果、1) 2011/12 シーズンの入院小児患者 11 名から、NI 投与前後で A(H3N2)ウイルス 27 株を分離して 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。2) 呼吸器ウイルスの遺伝子検出診断系（duplex リアルタイム RT-PCR）を構築し、平成 25 年 10 月から平成 27 年 1 月の期間に採取された 209 検体のうち 167 検体から 21 種類のウイルスが検出された。

A. 研究目的

全国 77 か所の地方衛生研究所では、感染症法に基づいて感染症発生動向調査を実施している。しかし、病原体サーベイランスの対象のなかには検体の収集が困難であったり、検査法が標準化されていないものもあり、十分なサーベイランスが行われているとはいえない。そこで、本研究では現行の病原体サーベイランスを補完する目的で以下の 2 点について検討した。

1) 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。国立感染症研究所が主体となって抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施しているが、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、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。2) インフルエンザウイルスを除いた急性呼吸器感染症（ARI）起因ウイルスは病原体サーベイランスの対象外であるため、

その流行実態は明らかでない。そこで、簡便で検出感度が高い呼吸器ウイルスの遺伝子検出診断系を構築し、ARI 患者検体を収集してウイルスの検出・同定を試みた。

B. 研究方法

1. NI 耐性インフルエンザウイルスの検出
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シング法により PCR 産物の塩基配列を解読し、既知の薬剤耐性変異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。

2. ARI 起因ウイルスの流行実態調査

富山県内2カ所の小児科医院（平成26年10月より1カ所追加）において、インフルエンザを除くARIで受診した小児（各医院で毎週1~2名）から、鼻腔ぬぐい液を採取した。Katano et al.（J Med Virol, 83:322-330, 2011）の方法を改良して、23種類の呼吸器ウイルス（ライノウイルスA・B・C、RSウイルスA・B、パラインフルエンザウイルス1・2・3・4型、A・B・C型インフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、コロナウイルスOC43・229E・NL63・HKU1株、エンテロウイルス、アデノウイルスB・C・D・E、ヒトボカウイルス）を対象としたduplexリアルタイムRT-PCRの系を構築し、本法によりウイルスを検出・同定した。

（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・変1、平成25年度受付番号4・9、平成26年度受付番号3）。

C. 研究結果

1. NI 耐性インフルエンザウイルスの検出

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検体を採取した。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。

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、次世代シーケンサーで各PCR産物につき61,786~731,669リードの塩基配列が得られた。しかし、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、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。

2. ARI 起因ウイルスの流行実態調査

平成25年10月から平成27年1月の期間に、急性咽頭炎や気管支炎の小児209名から検体を採取した。これら検体から呼吸器ウイルスの検出を行ったところ、167検体から21種類のウイルスが検出された。ライノウイルスが通年で検出され、最も多かった。次いで、パラインフルエンザウイルス、ヒトボカウイルスと続き、これら3種のウイルスが全検出ウイルスの6割を占めた。さらに、28検体からは2種類以上のウイルスが検出された。ヒトボカウイルス、アデノウイルスではその傾向が強かった。

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。Kisora（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。

呼吸器ウイルスの中にはヒトボカウイルスやコロナウイルスのように分離培養が困難なものもあるが、今回構築したリアルタイム RT-PCR 法ではこのようなウイルスも検出できた。一方、調査期間中にはライノウイルスが通年で、かつ最も頻繁に検出された。本ウイルス感染症は普通感冒の 30～40%を占めるといわれるが、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患の憎悪への関与も報告されており、今後も注視すべき呼吸器ウイルスと考えられた。また、平成 26 年 3 月には、ヒトボカウイルスが単独で多く検出され、その地域小流行が示唆された。本ウイルスは他の呼吸器ウイルスと同時に検出されることが多く、疾患への関わりも不明な点が多いことから、更なる調査が必要である。今後も本調査を継続してデータを蓄積し、各ウイルスの季節消長を明らかにするとともに、臨床所見や罹患年齢と各ウイルスの関連性を明らかにしたい。

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。一方、小児における ARI 起因ウイルスの流行実態調査では、ライノウイルスが最も多く検出された。今後も調査を継続し、各ウイルスの季節消長や臨床所見等との関連性を明らかにしたい。

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) Obuchi M, Adachi Y, Takizawa T and Sata T. Influenza A(H1N1)pdm09 virus and asthma. *Front. Microbiol.* 4:307, 2013.

2. 学会発表

1) 小淵正次、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.

2) 小淵正次、八木信一、小栗絢子、稲崎倫子、稲畑 良、佐多徹太郎、滝澤剛則. 富山県における呼吸器感染症罹患児からの呼吸器ウイルスの検出と分子疫学. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014 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

マクロライド耐性マイコプラズマによる市中感染症の現状と
その治療効果に関する前向き観察研究

研究分担者	石黒信久	北海道大学病院 感染制御部 部長
研究協力者	小関直子	北海道大学医学研究科 小児科学分野
	海方美紀	北海道大学医学研究科 小児科学分野
	有賀 正	北海道大学医学研究科 小児科学分野 教授
	菊田英明	北海道大学 客員教授
	大庭幸治	東京大学大学院 情報学環・学際情報学府 准教授
	富樫武弘	札幌市立大学 看護学部 特任教授

研究要旨

【目的】小児におけるマクロライド(ML)耐性マイコプラズマ感染症の現状把握、各種抗菌剤の治療効果、マイコプラズマ迅速検査キット及びLAMP法の感度・特異度の調査。

【方法】前向き観察研究。2012年12月1日より2014年12月31日までに724名の患者から鼻咽頭ぬぐい液を採取してML耐性率の地域差について解析を行うと同時に、各種抗菌剤の治療効果を判定した。さらに、real-time PCR検査結果を基準として迅速検査キット及びLAMP法の感度・特異度を算出した。

【結果】(1) マイコプラズマが検出された検体のうち49.1%はML耐性(A2063G変異)であった。(2) ML耐性の検出率には地域差が存在した(例：釧路市で採取された29検体全てが耐性であり、旭川市で採取された19検体中18検体は感受性であった)。(3-1) 抗菌薬開始から解熱するまでの日数を検討したところ、治療開始後2日以内に解熱する症例の81%はML感受性であり、発熱が3日以上持続する症例の83%はML耐性であった。(3-2) 発熱から解熱するまでの日数を検討したところ、発熱後6日以内に解熱する症例の67%はML感受性、発熱が7日以上持続する症例の73%はML耐性であった。(4) ML感受性症例の抗菌薬開始から解熱までの日数はAZM, CAM, MINO, TFLX間で有意差はなかった。ML耐性症例の抗菌薬開始日から解熱までの日数はMINOの有熱期間が有意に短かった。(5) 迅速検査によるマイコプラズマ検出の感度と特異度は、A社は55%、82%、B社は36%、94%であった。LAMP法によるマイコプラズマ検出検査の感度99%、特異度100%であった。

【結語】(1) ML耐性マイコプラズマの検出には地域によって大きな偏りが存在した。各地域の臨床医は地域におけるML耐性マイコプラズマの検出率を知ったうえで治療にあたる必要がある。(2) ML耐性マイコプラズマ感染症に対する各種抗菌薬の効果について、今後ともデータを収集する必要がある。(3) 今後、マイコプラズマ感染症の抗菌薬の選択に際しては、迅速検査やLAMP法などの検査結果を加味する必要がある。

A. 研究目的

近年、マクロライド(ML)耐性マイコプラズマの出現が大きな問題となっている。ML耐性菌は *in vitro* の検査でエリスロマイシン(EM)、クラリスロマイシン(CAM)、アジスロマイシン(AZM)等に対して耐性を示すが、臨床的には ML 耐性菌による感染症の治療に対して ML が全く無効で、ミノサイクリン(MINO)やトスフロキサシン(TFLX)を必要とするのか等については統一した見解が得られていない。小児に対する MINO 使用は小児の健康問題（歯牙着色）、TFLX 使用は関節障害やキノロン耐性菌出現増加の危険性を抱えており、その安易な使用は慎むべきである。これらの理由から、ML 耐性マイコプラズマ感染症の現状把握とその治療指針の作成は急務である。

本研究では小児におけるマイコプラズマ感染症の実態を明らかにするとともに、それらに対する抗菌剤の選択を調査すること、マイコプラズマの ML 耐性率を調査すること、ML 耐性マイコプラズマ感染症に対する各種抗菌剤の治療効果を追跡調査すること、近年開発されたマイコプラズマ感染症の迅速検査キットの感度・特異度を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. 研究の種類・デザイン

前向き観察研究（検体による探索的研究）

2. 対象患者

2012年12月1日以降、北海道大学病院小児科、東栄病院小児科など道内30余の医療機関に通院または入院したマイコプラズマ感染症（疑いも含む）患者のうち、18歳以下で、胸部レントゲン写真上で肺炎あるいは気管支炎の所見があり、本研究の参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理

解の上、患者本人（代諾者を含む）の自由意思による文書同意あるいは口頭説明で同意が得られた患者を対象とする。迅速検査で他の病原体（アデノウイルス、溶連菌、RSウイルス等）が検出された患者は除外する。

3. 検体採取方法

喀痰（咽頭ぬぐい液でも可）を2本の綿棒で採取する。採取した1本の検体はBDユニバーサルバイラルトランスポートに入れて、北海道大学大学院医学研究科小児科学分野に運び、「遺伝子検査方法」に示す測定をおこなう。残りの1本は各医療機関にてマイコプラズマ感染症の迅速検査キットにて検査を行う。

4. 遺伝子検査方法

採取した咽頭ぬぐい液から QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて核酸を抽出し、real-time PCR 法にてマイコプラズマ遺伝子を検出する。プライマーの設計や各種条件設定は Winchell らの報告に従った(J. Clin. Microbiol. 2008, 46(9): 3116)。ML 耐性遺伝子の検出は Matsuoka らの報告に従い、23S リボソーム RNA ドメイン V 上の A2063C, A2063G, A2064G, C2617G 変異の有無を検査した(Antimicrob Agents Chemother. 48: 4624, 2004)。

5. 被験者の診療情報

以下の項目について、被験者への調査票と主治医への調査票から情報を入手する。

被験者への調査票から入手する診療情報：①性別、②生年月日、③発症日（体温が37.5度以上になった日、咳嗽が出現した日）と体温・咳嗽の推移、④マイコプラズマ感染症と診断され、抗菌薬が処方された日、⑤④以降の体温・咳嗽の推移、⑥抗生剤の服用状況。

主治医への調査票から入手する診療情

報：①整理番号、②患者の体重、③疾患情報（マイコプラズマ感染症と診断した日、感染症名）、④迅速検査の結果、⑤基礎疾患、⑥血液検査所見、⑦胸部レントゲン検査所見、⑧経過中に処方した抗菌薬に関する情報、⑨その他の併用薬、⑩入院した場合にはその期間、血中酸素飽和度の最低値、治療、⑪有害事象（抗菌薬と因果関係があると推定される場合）。

6. 統計学的解析

主要評価項目は抗菌薬服用開始日から解熱（37.5 度未満）までに要した時間とする。

ML 感受性あるいは ML 耐性マイコプラズマ感染症患者に使用された抗菌薬の効果を検定する場合、抗菌薬服用開始日から解熱（37.5 度未満）までに要した時間を横軸、37.5 度以上の有熱率を縦軸とする Kaplan-Meier 曲線を作成し、ログランク検定（log-rank test）を用いて 2 つの曲線の差を検定する。

Cox 比例ハザード・モデルを用いて、抗菌薬服用開始日から解熱（37.5 度未満）までに要した時間に影響を与える因子を解析する。

7. 倫理的配慮

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言（2008 年 10 月修正）」および「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年 7 月 31 日改正、以下臨床研究倫理指針）」を遵守して実施する。本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の審査を経て、北海道大学病院により承認されている（臨床研究番号：自 012-0174）。

C. 研究成果

1. 検体収集状況

2012 年 12 月 1 日より 2014 年 12 月 31 日までに合計 724 名の患者から検体を採取

し、106 名(14.6%)よりマイコプラズマ遺伝子を検出した。このうち 66 名の患者情報を取得した。

2. ML 耐性マイコプラズマの検出状況

106 検体中 54 検体(50.9%)は ML 感受性マイコプラズマであり、52 検体(49.1%)は ML 耐性マイコプラズマであった。ML 耐性株は全て A2063G 変異を有していた。

ML 耐性率の地域差をみるために、5 件以上のマイコプラズマ陽性検体が検出された市を対象として解析を行ったところ、ML 耐性株の検出率には地域差が存在した。例えば、釧路市で採取された 29 検体全てが耐性株であるのに対して、旭川市で採取された 19 検体中 18 検体は感受性株であった。（図 1、表 1）。札幌市で採取された 38 検体中 21 検体(55.3%)が ML 耐性株であったが、市内の地区によりその検出率に違いがあった（図 2）。

入院患者における ML 耐性株の検出率は外来患者よりも高く(80.0% vs 44.3%, $P=0.0021$)（表 2）、病院における ML 耐性株の検出率はクリニックよりも高かった(77.4% vs 9.1%, $P<0.0001$)（表 3）。

3. ML 感受性株と耐性株による有熱期間

66 名の患者背景を表 4 に記載した。入院患者に ML 耐性株の検出率が高いこと、入院患者と外来患者との間に最初に選択された抗菌薬の選択に偏りがあることを除けば、年齢、性別、マイコプラズマ遺伝子のコピー数、発熱から治療開始までの日数に差異はなかった。

抗菌薬開始日から解熱までの日数に関与する各種因子を Cox 回帰分析による多変量解析にて解析したところ、最初に選択した抗菌薬、ML 耐性遺伝子が影響を与えることが判明した（表 5）。即ち、TFLX に比べて AZM では解熱する確率が 2.66 倍高く、

TFLX に比べて MINO では解熱する確率が 6.67 倍高く、ML 耐性に比べて ML 感受性では解熱する確率が 2.57 倍高かった(表 5)。

ML 感受性(31 症例)に限定したサブ解析を行うと、最初に選択した抗菌薬は抗菌薬開始日から解熱までの日数に影響を与えなかった(表 6)。ML 耐性(35 症例)に限定したサブ解析を行うと、TFLX に比べて MINO では解熱する確率が 36.97 倍高くなった(表 7)。

ML 感受性株と耐性株の違いによる解熱時間を最初に選択した抗菌薬別に解析したところ、ML 耐性株に ML 系抗菌薬(クラリスロマイシン、アジスロマイシン)を使用した場合、ML 感受性株に比べて発熱が 3 日間程度長引くことが判明した(図 3)。MINO を使用した症例数は少ないが、ML 感受性と ML 耐性株共に有熱期間は短く、両者に有熱期間の有意差はなかった(図 3)。TFLX を使用した症例数も少ないが、ML 感受性と ML 耐性株による有熱期間の有意差はなかった(図 3)。

抗菌薬開始から解熱するまでの日数を、ML 感受性あるいは耐性株に分けて検討したところ、治療開始後 2 日以内に解熱する症例の 81%は ML 感受性であり、発熱が 3 日以上持続する症例の 83%は ML 耐性株であった(図 4)。発熱から解熱するまでの日数でみると、発熱後 6 日以内に解熱する症例の 67%は ML 感受性、発熱が 7 日以上持続する症例の 73%は ML 耐性株であった(図 5)。

4. 迅速検査の感度・特異度

Real-time PCR 検査結果を基準として、マイコプラズマ迅速検査(A 社、B 社)の感度と特異度を算出したところ、A 社迅速検査の感度は 55% (6/11)、特異度は 82% (23/28)、B 社迅速検査の感度は 36% (21/59)、特異度

は 94% (236/252)であった。

5. LAMP 法による検査の感度・特異度

LAMP 法によるマイコプラズマ検出検査の感度は 99% (105/106)、特異度 (117/117)であった。

D. 考察

1. ML 耐性マイコプラズマの検出頻度

全体の集計では、ML 耐性株の占める割合は 49.1% (52/106)であったが、ML 耐性率には地域による大きな偏りが存在した。(例：釧路市で採取された 29 検体全てが耐性であり、旭川市で採取された 19 検体中 18 検体は感受性であった。)「ML 耐性株 49.1%」が「目前のマイコプラズマ感染症患者の半数が ML 耐性株に感染している」ことを示しているわけではないことに注意する必要がある。

入院患者と外来患者の ML 耐性率には有意差があり(入院患者 80.0%、外来患者 44.3%, $P=0.0021$)、病院受診患者とクリニック受診患者の ML 耐性率には有意差があった(病院受診患者 77.4%、クリニック受診患者 9.1%, $P=0.0001$)。

ML 感受性株が流行している地域には ML 耐性株は流行しないのであろうか？その逆は如何か？今後とも地域毎に経時的なサーベイランスが必要と思われる。

2. ML 耐性株と ML 感受性株による感染症は有熱期間から区別が可能か？

治療開始後 2 日以内に解熱する症例の 81%は ML 感受性であり、発熱が 3 日以上持続する症例の 83%は ML 耐性株であった。また、発熱後 6 日以内に解熱する症例の 67%は ML 感受性、発熱が 7 日以上持続する症例の 73%は ML 耐性株であった。従って、治療開始から解熱までの期間、あるいは発熱から解熱までに期間により、ML 耐性株に

よる感染症か ML 感受性株による感染症かの区別はある程度可能であると考えられる。

3. ML 耐性株による感染症に有効な抗菌薬

ML 感受性株によるマイコプラズマ感染症においては、AZM, CAM, MINO, TFLX を使用した群では抗菌薬開始から解熱までの日数には有意差はなかった。一方、ML 耐性株によるマイコプラズマ感染症においては、MINO を使用した群では抗菌薬開始日から解熱までの日数が有意に短かった。今後、症例数を積み重ねる必要がある。

4. 抗原迅速検査の有用性

A 社, B 社共に特異度に優れている(A 社 82%, B 社 94%)ものの、感度には改善の余地があると考えられる(A 社 55%, B 社 36%)。現時点では、抗原迅速検査の結果にのみ頼ってマイコプラズマ感染症診療を行うことは慎むべきであろう。

5. LAMP 法による検査の有用性

迅速性には欠けるものの、real-time PCR 法とほぼ同等の感度、特異度を示した。LAMP 法によるマイコプラズマ検出法は保険収載されており、利用される機会は増えてくると考えられる。

E. 結論

ML 耐性マイコプラズマの検出には地域によって大きな偏りが存在した。各地域の臨床医は地域における ML 耐性マイコプラズマの検出率を知ったうえで治療にあたる必要がある。

ML 耐性マイコプラズマ感染症に対する各種抗菌薬の効果について、今後ともデータを収集する必要がある。

今後、マイコプラズマ感染症の抗菌薬の選択に際しては、迅速検査や LAMP 法などの検査結果を加味する必要がある。

※謝辞：

本研究にご協力頂いた先生方に厚く御礼申し上げます。森田啓介先生（旭川赤十字病院小児科）、岡村暁子先生（うめつ小児科）、山崎茂先生（ウルトラ内科小児科クリニック）、梶井直文先生、信太知先生（江別市立病院小児科）、永島哲郎先生、仲西正憲先生（釧路赤十字病院小児科）、高橋豊先生、吉岡幹朗先生（KKR 札幌医療センター小児科）、上野範博先生（琴似小児科クリニック）、今野武津子先生（札幌厚生病院小児科）、川村信明先生（市立札幌病院小児科）、石坂明人先生（住吉こどもクリニック）、高田 公彦先生（たかだ小児科クリニック）、竹林武恭先生（竹林小児科医院）、菊田英明先生（特定医療法人とこはる 東栄病院小児科）、長野奈緒子先生（ながのこどもクリニック）、柴田睦郎先生（北海道医療大学病院小児科）、澤田博行先生、古山秀人先生（北海道社会保険病院小児科）、松藺嘉裕先生（まつぞの小児科医院）、小池明美先生（宮の沢小池こどもクリニック）、古賀康嗣（みんなのこどもクリニック）、村下眞理（むらしたこどもクリニック）、畑江 芳郎先生、大倉有加先生（医療法人北農会 恵み野病院小児科）、山中樹先生（医療法人社団 山中たつる小児科）、渡辺徹先生（わたなべ小児科・アレルギー科クリニック）、田端祐一先生（岩見沢こども・産科婦人科クリニック）、汲田喜宏先生（医療法人社団 くみたこどもクリニック）、間峽介先生（はざま小児科クリニック）、内藤広行先生（市立千歳市民病院小児科）、飽津泰史先生（医療法人社団 あくつこどもクリニック）、青柳勇人先生（帯広協会病院小児科）、飛世克之先生、飛世千恵先生（とびせ小児科内科医院）、東克己先生（あずまこども家庭クリニック）、佐々木聡先生（財団法人小児愛育協会附属 愛育病院）、坪内

友先生（医療法人社団香友会 富丘まごころ
内科クリニック）。（順不同）

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nobuhisa Ishiguro, Naoko Koseki,
Miki Kaiho, Hideaki Kikuta, Takahiro
Togashi, Toru Watanabe, Tadashi Ariga
and Hokkaido Pediatric Respiratory
Infection Study Group. Sensitivity and
Specificity of a Loop-Mediated Isothermal
Amplification Assay for Detection of
Mycoplasma pneumonia from
Nasopharyngeal Swab Samples
Compared with those of Real-time PCR.
Clinical Laboratory 2014 (in press)

2. 学会発表

(1)石黒信久、小関直子、有賀正、菊田英明、
渡辺徹、富樫武弘。マイコプラズマのマク
ロライド耐性率は地域によって大きく異なる。
第46回日本小児感染症学会総会・学術
集会(2014/10/18-19)

(2)石黒信久、小関直子、有賀正、菊田英明、
渡辺徹、富樫武弘。マクロライド感受性及
び耐性マイコプラズマの治療効果に関する
前向き観察研究。第46回日本小児感染症学
会総会・学術集会(2014/10/18-19)

H. 知的財産の出願・登録情報

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1 マクロライド耐性マイコプラズマの検出状況

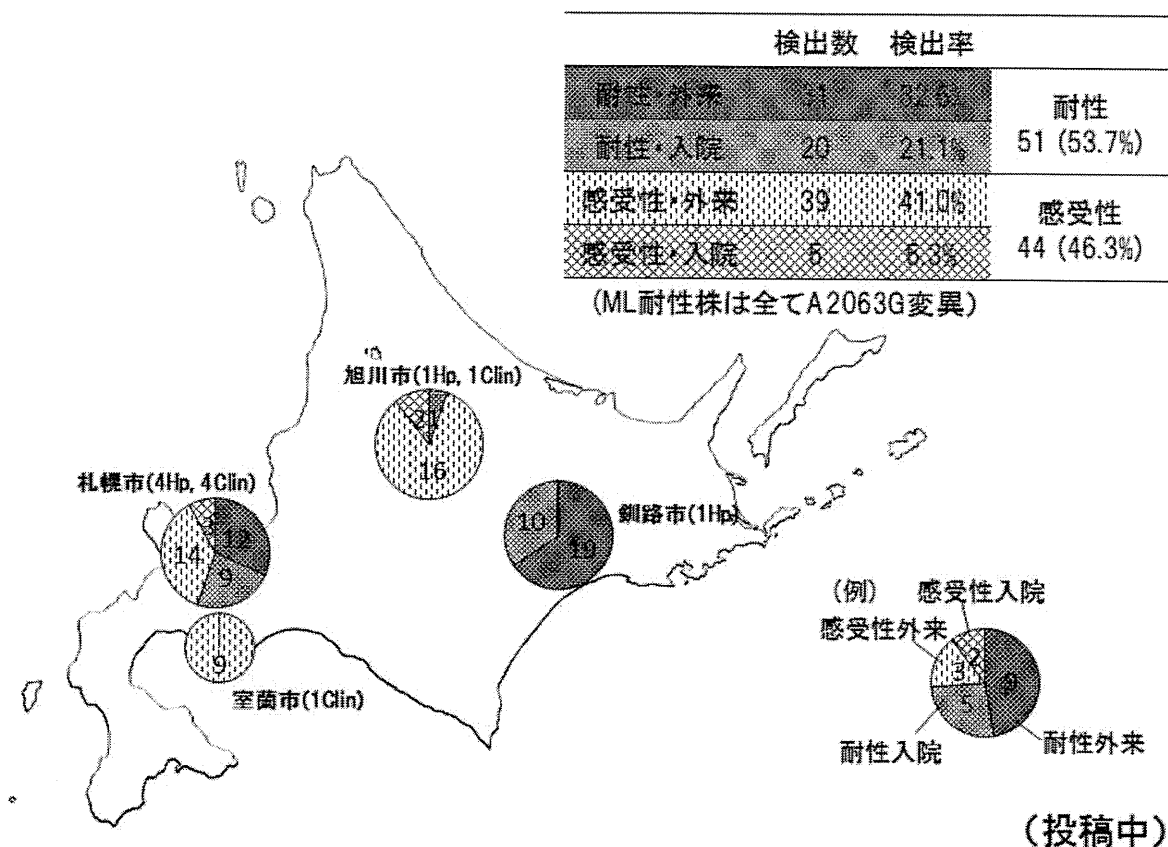


表1 4市におけるマクロライド耐性マイコプラズマ

市	マクロライド耐性マイコプラズマ 検出数/総数 (%)	
札幌市	21/38 (55.3%)	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> 有意差がないのは 「旭川市vs.室蘭市」のみ </div>
旭川市	1/19 (5.3%)	
釧路市	29/29 (100.0%)	
室蘭市	0/9 (0.0%)	
51/95 (53.7%)		

*P値 (カイ2乗テスト) <0.0005
 **P値 (カイ2乗テスト) <0.0001

(投稿中)

図2 マクロライド耐性マイコプラズマの検出状況:札幌市

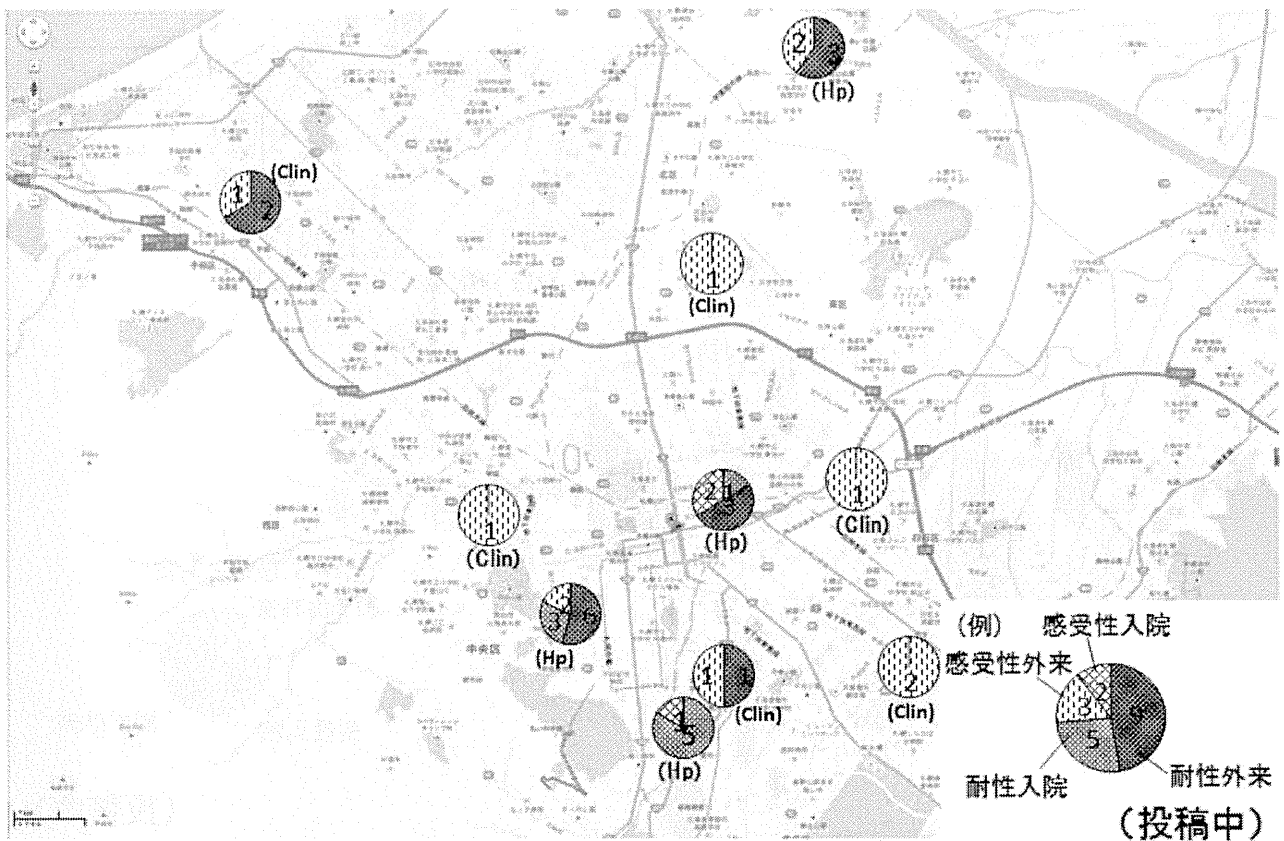


表2 外来/入院患者別にみたマクロライド耐性マイコプラズマの検出状況

	総数	マクロライド感受性	マクロライド耐性	<i>P</i> 値 (カイ2乗)
外来患者	70	39 (55.7%)	31 (44.3%)	0.0021*
入院患者	25	5 (20.0%)	20 (80.0%)	

(投稿中)

表3 病院/クリニック受診患者別にみたマクロライド耐性マイコプラズマの検出状況

	総数	マクロライド感受性	マクロライド耐性	<i>P</i> 値 (カイ2乗)
病院受診患者	62	14 (22.6%)	48 (77.4%)	<0.0001*
クリニック受診患者	33	30 (90.9%)	3 (9.1%)	

(投稿中)

表4 患者背景

		ML感受性	ML耐性	<i>P</i>
患者数		31	35	
年齢 (歳)	平均 ± 標準偏差	8.6 ± 2.9	8.9 ± 3.1	0.6915
	範囲	3 - 14	3 - 15	
性別	女性患者数 (%)	15 (48.4%)	18 (51.4%)	0.8052
	男性患者数 (%)	16 (51.6%)	17 (48.6%)	
コピー数	平均 ± 標準偏差	1598 ± 3839	1487 ± 2386	0.8866
	範囲	1 - 16615	4 - 10591	
外来/入院別	外来患者数 (%)	25 (80.7%)	19 (54.3%)	0.0214*
	入院患者数 (%)	6 (19.3%)	16 (45.7%)	
発熱から治療開始までの日数	平均 ± 標準偏差	3.8 ± 2.0	3.3 ± 2.0	0.3808
	範囲	0 - 7	0 - 6	
最初に選択した抗菌薬	CAM	15 (48.4%)	20 (57.2%)	0.5714
	AZM	8 (25.8%)	9 (25.7%)	
	MINO	5 (16.1%)	2 (5.7%)	
	TFLX	3 (9.7%)	4 (11.4%)	

表5 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)

独立因子	基準	ハザード比	(95%信頼区間)	P
年齢	1歳当り	0.96	(0.87-1.05)	0.3613
性別	女性	0.80	(0.46-1.39)	0.4316
コピー数	1コピー当り	1.0	(1.00-1.00)	0.4394
外来・入院	入院	1.81	(0.84-4.22)	0.1332
発症～抗菌薬開始日	1日当り	1.13	(0.96-1.33)	0.1590
最初の抗菌薬の選択				
AZM*	TFLX	2.66	(1.03-7.82)	0.0421*
CAM	TFLX	1.56	(0.66-4.31)	0.3285
MINO**	TFLX	6.67	(1.73-27.39)	0.0061*
抗菌薬変更の有無	変更無し	0.53	(0.22-1.31)	0.1672
ML耐性の有無***	ML耐性有	2.57	(1.42-4.68)	0.0019*

*TFLXに比べてAZMでは解熱する確率が2.66倍高い。

**TFLXに比べてMINOでは解熱する確率が6.67倍高い。

*** ML耐性有に比べてML耐性無では解熱する確率が2.57倍高い。

表6 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感受性(31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	0.98	(0.81-1.16)	0.7935
性別	女性	0.48	(0.20-1.13)	0.0942
コピー数	1コピー当り	1.0	(1.00-1.00)	0.3095
外来・入院	入院	1.92	(0.53-7.63)	0.3261
発症～抗菌薬開始日	1日当り	1.16	(0.89-1.54)	0.2729
最初の抗菌薬の選択				
AZM	TFLX	3.72	(0.77-23.60)	0.1045
CAM	TFLX	2.52	(0.65-13.13)	0.1890
MINO	TFLX	6.49	(0.84-70.90)	0.0747
抗菌薬変更の有無	変更無し	0.30	(0.04-1.76)	0.1844

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

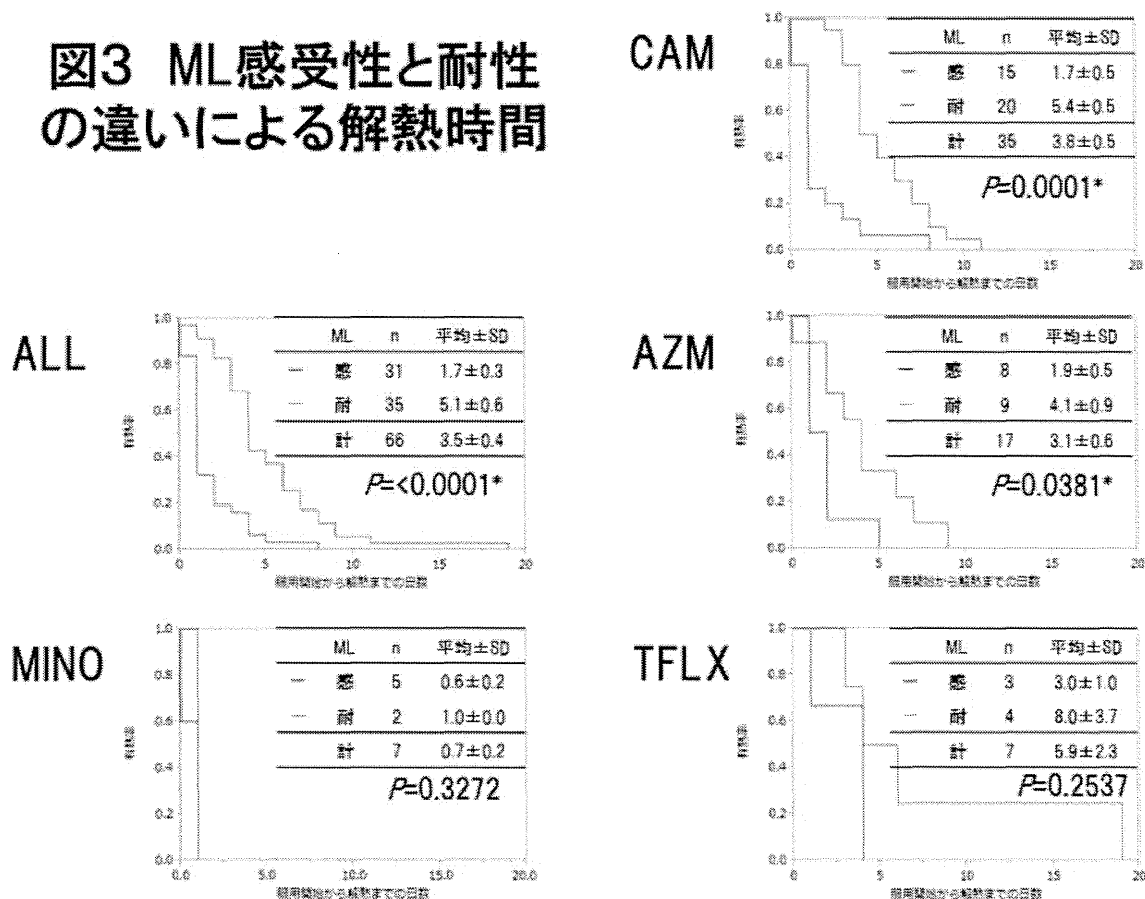


図4 抗菌薬開始から解熱するまでの日数

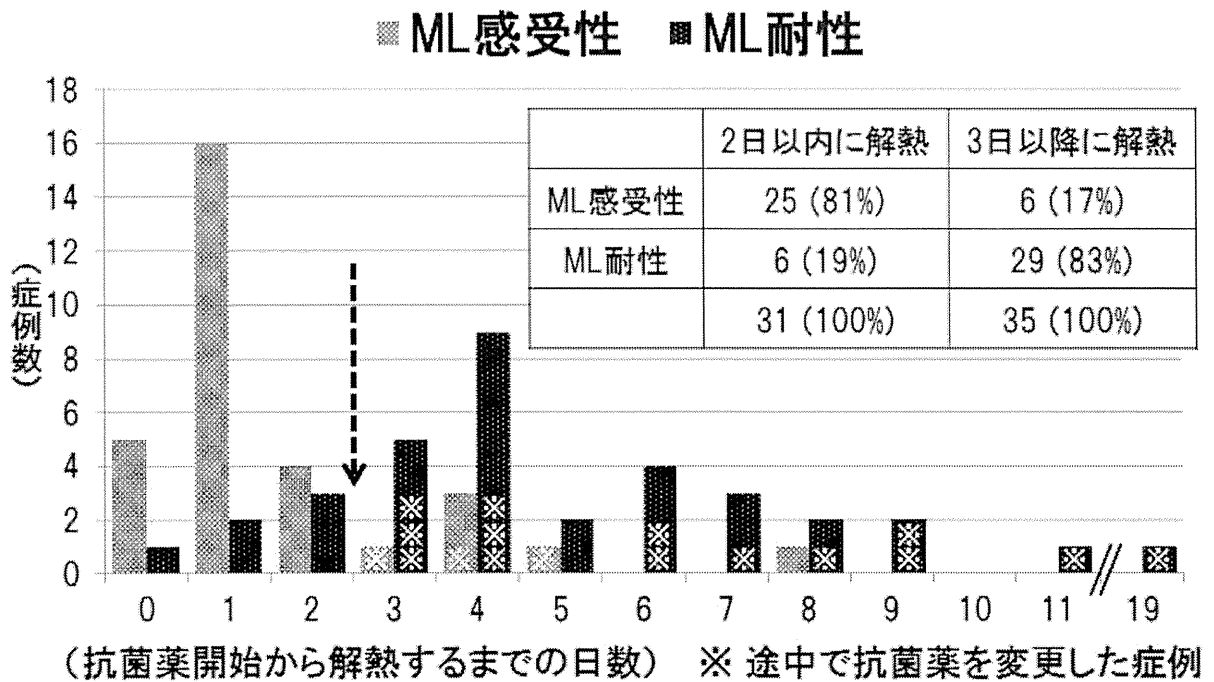
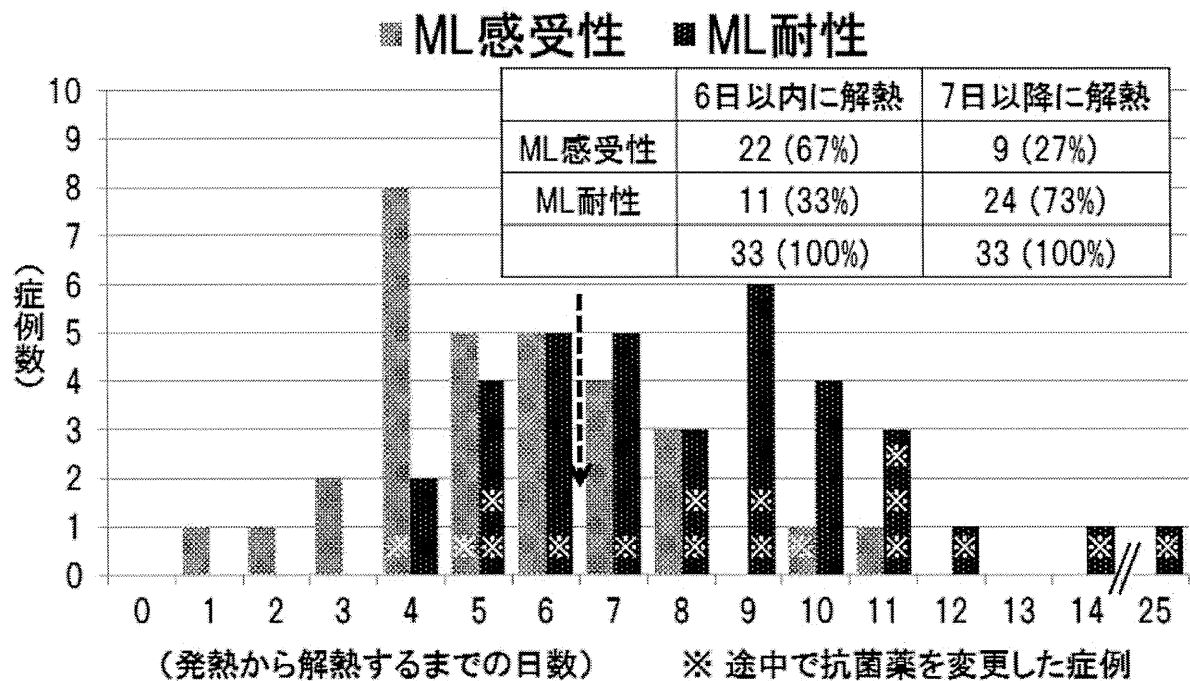


図5 発熱から解熱するまでの日数



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

研究分担者 国立感染症研究所・細菌第二部 堀野敦子

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* はヒトに感染し肺炎や気管支炎を起こす。また、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は欧州で 2010-2011 年にかけて大きな流行が報告されたが、日本国内では 2011 年の夏頃より近年にない大きな流行が報告された。2013 年 12 月時点で報告数は平年並みの報告数となり流行は終息した。本研究においては、*M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型別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、非流行期を含めた経時的な相関関係の知見を得ることを目的とする。この経時的観察により前回の流行期には特異的に Subtype 1 型の *M. pneumoniae* が増加したことが示された。

また、凍結保存されていたマイコプラズマ分離用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。これまで *M. pneumoniae* の分離培養の際には速やかな検体輸送と適切な温度管理が求められていたが、凍結保存した検体からも菌の分離を行うことが可能である事が示された。*M. pneumoniae* の臨床検体輸送の際に有用な情報になると思われる。

A. 研究目的

これまで本分担研究では地方衛生研究所と共同研究で、*M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型プロファイルとマイコプラズマ肺炎の流行の相関について知見を得ることを目的として検討を行ってきた。この研究は、2011 年に始まったマイコプラズマ肺炎の流行前から開始しており、流行期間を通じて検体を収集している。さらに流行後にも検体の収集を継続し、流行前から流行後まで経時的に型別された *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型について解析することを目的とした。最終年度には北海道の検体について検討を行い、*p1* 遺伝子型プロファイルについてこれまでの結果と比較検討を行った。

また、凍結保存を行った肺炎マイコプラズマ分離用輸送培地から *M. pneumoniae* が分離可能であるか、検討を行う事とした。可能であれば *M. pneumoniae* の菌体分離時に役立つ情報であると考えられる。

B. 研究方法

検体は長引く乾性の咳嗽症状を呈する患者由来の鼻咽頭スワブとした。これらは協力研究機関である各地方衛生研究所へ送付さ

れた。地方衛生研究所では鼻咽頭スワブから抽出したゲノム DNA を鋳型として用い LAMP 法で *M. pneumoniae* の検出を試みた。

LAMP法で *M. pneumoniae*陽性になった検体由来のゲノム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。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。手法は Nested PCR-RFLP法を用いた。PCR増幅産物を制限酵素 *Hae*III 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。最終年度には北海道大学より感染研・細菌第二部に送られた、北海道で2013年に採取された *M. pneumoniae* 陽性のゲノム DNA を鋳型として使用し、*p1* 遺伝子型別法を上記と同様に行った。さらに北海道大学で凍結保存されていた *M. pneumoniae* 分離用の輸送培地を細菌第二部に送り、これまで本研究でも検討を行ってきた病原体検出マニュアルに従い *M. pneumoniae* の分離培養を試みた。

（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

日本では2011-2012年にかけてマイコプラズマ肺炎の大流行が発生し、*M. pneumoniae* 陽性の検体を例年に較べて非常に多く得ることができた。流行が終息する前の2012年までに収集された *M. pneumoniae* 検体を *p1* 遺伝子型別した結果、Subtype 1 が 64.2%、Subtype 2 が 1.4%、Variant 2a が 11.6%、Variant 2b が 4.1%、Variant 2c が 18.7%であった。2013年 はマイコプラズマ肺炎の流行が終息し、搬入される検体数が激減した。流行時には月に 20-30 件程度受け付けていた検体数が流行終息後は月に数件未満となった。それらの検体の型別の結果、流行終息後の2013年の *p1* 遺伝子型は全てが subtype1 であった (図 1)。

研究期間を通じて最も多く検体が収集されている高知県における LAMP 法による *M. pneumoniae* の陽性率は 26.4%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の *p1* 遺伝子型別率は 71.7%であった。

また、2013年度に北海道で収集された検体について型別を行った結果、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、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 2)。

凍結検体を用いた *M. pneumoniae* の分離培養については、適切な保管条件 (-80 ℃ とドライアイス詰めの輸送条件を維持すれば、凍結保管後の臨床検体を長距離輸送しても *M. pneumoniae* は分離培養可能であることが示された。これまでは輸送培地にスワブが入っている状態から直ちに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。今回送付された、遺伝子検出法で *M. pneumoniae* が陽性であった輸送培地検体 52 件からの *M. pneumoniae* 培養率は 98.1% であった。

D. 考察

マイコプラズマ検体は2011-2012年の流行の期間を含む2010年から2012年にかけて収集され、現在も継続して収集が行われている。マイコプラズマ肺炎の流行により検体数が増加するにつれて Subtype 1 の検出数が増加する一方で、他の遺伝子型の検出数はある一

定の検出数を保ち増加しなかった。流行終息後2012年までは全てが Subtype 1 で流行時の *p1* 遺伝子型を維持していた。その他、本研究期間中の *p1* 遺伝子型別の結果で最も顕著な点は、これまで日本で Subtype 1 と交互に優位となってきた主要な型の Subtype 2 が、この時期には優位になると予想されたにもかかわらず、ほとんど検出されなかったという点である。流行期に入り検体数が増えた2012年の状況でも Subtype 2 は検出されなかった。国外の状況を参照すると、マイコプラズマ肺炎の流行があったフランスでは日本と同じく Subtype 1 が主要な型として検出されているが、Subtype 2 がほとんど検出されないという報告はない。他のヨーロッパ諸国においても Subtype 2 が検出されないという報告はない。これは2012年までの所、日本国内で特徴的な現象であった。

日本国内における Subtype 1、Subtype 2 以外の *p1* 遺伝子型については、Variant 2a と 2c が Subtype 1 の次に主要な型となっている。検出される割合は Variant 2c が徐々に増加する一方で、Variant 2a が徐々に減少しているように見受けられる。この研究班においては2011年に初めて検出された Variant 2b についての報告数は少ないが、一定の割合で検出が続いている。

マイコプラズマ肺炎の流行と *p1* 遺伝子型の関係については、前述のとおり2011年の流行開始と共に Subtype 1 の検出のみが顕著に増加し、終息後の *M. pneumoniae* の遺伝子型が Subtype1 であったことから前回の国内流行に関わったのは Subtype 1 であると考えられる。

しかし、H26年度に行った2013年に採取された北海道の検体を用いた遺伝子型別ではこれまで検討してきた他の地域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、加えて同市で 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の流行と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。

p1 遺伝子型別法は *M. pneumoniae* の抗原性に関与する部位に基づく方法であり、市中

のヒトマイコプラズマ血中抗体と関連があるのではないかと考えられている。現在は Subtype 1 に対する抗体を持つヒトが多いため、次には Subtype 1 以外の *p1* 遺伝子型の *M. pneumoniae* が流行する可能性がある。このため継続して *p1* 遺伝子型のモニタリングを行うことが重要と考える。*M. pneumoniae* の研究を行うにあたり、非流行期における継続した検体収集は常々問題となるところであり、安定した収集が課題となっている。

一方、*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り、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、凍結保管されてい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。遺伝子検出法により陽性であった培地からの培養率は 98.1% であり、以前に本分担研究で新鮮な輸送培地を臨床検体として用いて遺伝子検出法と培養法を行ったときと比較して遜色ない結果であった。従って、この方法は菌の生育に時間がかかるために分離培養を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。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

M. pneumoniae の *p1* 遺伝子型について、2011 年から 2012 年にかけての流行期と、その流行前、流行後に型別された結果について検討を行った。

その結果、2011 年にマイコプラズマ肺炎の報告数が増加し始めてから顕著に Subtype 1 の検出数が増加した。一方でそれ以外の型の検出数は内訳には変化があるものの、ある一定数を保っていた。このことより今回の流行に関与した *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型は Subtype 1 であると考えられた。これまで主要な遺伝子型のひとつであった Subtype 2 は、流行時で *M. pneumoniae* の検出数が多いにもかかわらず 2012 年にも報告されていなかった。Subtype 1 以外の主要な型としては Variant 2a と Variant 2c が占めており 2a の検出数がやや減少する一方で 2c の検出数がやや増加している。また、Variant 2b の検出数は少ないが一定の割合で検出されており、日本国内でも広がっていることが示唆された。

しかし、H26 年度に行った 2013 年に収集された北海道の検体による *p1* 遺伝子型別解析では上記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平均的に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、機会があれば解析を行っておく必要がある。前回の流行時に全国的に優位であった Subtype 1 型が変化し始めると次の流行が始める可能性が有り、今後も *p1* 遺伝子型のモニタリングを行うことが重要であると考えられる。また、Subtype 2 にかわる主要な型が Variant 2a と 2c になるのか、マイコプラズマ肺炎の大流行する時にはかつて強毒株とよばれていた Subtype 1 が優位になるのか、今後長期にわたって *p1* 遺伝子型のモニタリングの継続を行うことも重要であると考えられる。

また、今回の検討で *M. pneumoniae* の分離培養は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、次回のマイコプラズマ肺炎流行時に過去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られる。

F. 研究発表 (24~26年のもの)

1. 論文発表
 - 1) 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) Identification of *Mycoplasma pneumoniae* type 2b variant strains in Japan, Kenri T, Ohya H, Horino A., Shibayama K, *J Med Microbiol.*, Nov;61, 1633-5, 2012

2. 学会発表 (24~26年のもの)

- 1) 2011 年のマイコプラズマ流行を考える。堀野敦子、第 39 回日本マイコプラズマ学会 学術集会、2012 年 5 月、盛岡
- 2) Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae p1* genes detected in Japan from 2009 to 2012, Horino A., Kenri T., Matsumoto J., Katsukawa C., Takahashi C., Taniguchi K. 19th International Organization for Mycoplasma (IOM), Toulouse, France, 2012
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

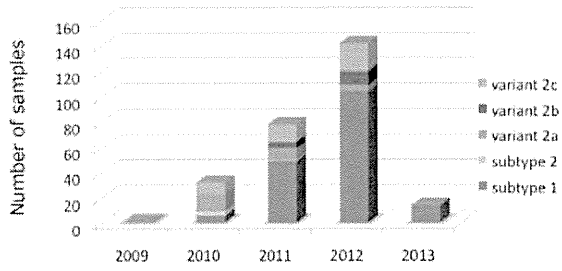
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1

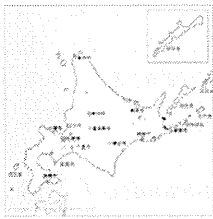
2009-2013年のp1 遺伝子型の内訳

高知から提出された検体のp1 遺伝子型別結果

2009-2013



2011年から2012年にかけてSubtype 1のみが目立って増加した。2013年は検体数が激減し、14件全てがSubtype 1であった。



p1 遺伝子型別結果

2013.9.2-2014.3.19

北海道；千歳市、旭川市、札幌市、江別市、空知市、釧路市

千歳市(n=2)

旭川市(n=7)

Variant 2c

Subtype 1

札幌市(n=12)

空知市(n=8)

釧路市(n=6)

Subtype 1, Variant 2a, Variant 2c

Subtype 2, Variant 2a, Variant 2c

Subtype 1, Variant 2c

図2

北海道地域別のp1 遺伝子型別プロフィール