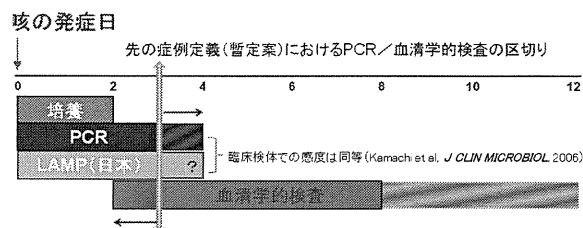


図 6. 北海道の大学内保健管理センターネットワークにて検出された大学生における百日咳様疾患の集団発生 (札幌市内・周辺) (n=27)



1. 先の症例定義(暫定案)に対して、PCRを4週間以内、血清抗体価測定を2週間以降、の案も検討してはどうか
2. LAMPの検体採取最適タイミングについては臨床情報のさらなる集積が重要

図 7. 週ごとの最適な検査診断方法の可能性

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

H24 年度

薬剤耐性淋菌のサーベイランスネットワークの拡大と  
髄膜炎菌サーベイランスのための簡便・迅速検出法の開発

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 志牟田健 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

研究要旨

日本における病原性ナイセリア属菌である淋菌と髄膜炎菌による感染症の実態に関しては不明な点が多い。本研究では淋菌に関しては昨年度に引き続き関西地区における臨床分離株の薬剤耐性の検査の継続と共に北海道や沖縄地区へのサーベイランスネットワークの拡大を図り、髄膜炎菌に関してはサーベイランスの基本手法となる髄膜炎菌の迅速簡便な Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)法による核酸検出法を構築した。

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。淋菌は性感染症の主要な起炎菌の 1 つとして知られ、近年はその多剤耐性化の進行が問題視されている。一方、髄膜炎菌性感染症は海外においてはヒト-ヒト感染による集団感染事例が多く報告され、常に公衆衛生的注視を余儀なくされているが

日本においては年間 20 例程度の稀少感染症となっている。しかし、2011 年 5 月に宮崎の高校生の寮で発生した髄膜炎菌性感染症の集団感染事例は日本においても髄膜炎菌性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り、ワクチンの導入経験もない日本において何故髄膜炎菌性感染症が少ないのか、そもそも健康保菌者の髄膜炎菌保菌率はどのようになっているのかを問われる事例となった。しかし、髄膜炎菌の保菌率は簡便な検査システムの不備もあり、その実態は不明である。

このように病原性ナイセリア属菌である淋菌と髄膜炎菌による感染症はそのサーベイランスシステムの不備により日本におけるその実態に関しては不明な点が多い。そこで本研究では淋菌感染症に関してはサーベイランスシステムの構築とその拡大、髄膜炎菌性感染症に関しては健康保菌者のサーベイランスのための簡便・迅速検出法の開発を試みた。

## B. 研究方法

### 1) 薬剤耐性淋菌のサーベイランス

#### a) 臨床分離淋菌株の収集

京都府2ヶ所(飛田医院、伊東泌尿器科)大阪府3ヶ所(亀岡クリニック、そねざき古林診療所、安本クリニック)の診療所の協力のもと、患者由来の検体を極東ナイセリア培地に接種後、ポスタルパックにて国立感染症研究所へ郵送してもらい、検体到着後は速やかに37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で一日培養後、病原性ナイセリア属菌分離培地であるMTM培地に転培養し、更に37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で一日培養した。病原性ナイセリア属菌のコロニーとして特徴的な乳白色のコロニーをピックアップし、更にオキシダーゼ試験及びグラム染色試験の後、IDテストHN-20 Rapid(日水製薬)を用いて最終的な生化学的性状を試験し、最終的に淋菌と同定した。

#### b) 薬剤感受性試験

分離同定された淋菌の、薬剤感受性試験はClinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)の標準法に準じて行った。MICの決定はE-test(CTRX、CFIX、

PG、AZM、CPFX)を用いた。CPFX、PCG、CFIX、CTRX及びAZMはそれぞれMIC値が1、2、0.5、0.5、1(μg/ml)以上を耐性株とし、またそれぞれ0.125-0.5、0.125-1、0.125-0.25、0.125-0.25、0.5(μg/ml)のMIC値を示す株を低感受性とした。

### 2) 髄膜炎菌検出用の簡便・迅速検出法の開発

#### a) 菌の生育方法

凍結保存された髄膜炎菌及びナイセリア属菌をGC寒天培地に塗布後、37°C、5%CO<sub>2</sub>条件下で一晩培養した。

#### b) 菌体の処理

プレート上の菌体を1mlのTEに懸濁した。その懸濁液を100°Cで5分間処理して不活化した後、15,000rpm×5分間遠心後、その上清を粗抽出DNA溶液としてLAMP法の鋳型として供した。

LAMP法の検出限界を検討するDNAは上記DNAをQIAGEN Kitにより精製後A260にて濃度測定を行ない、実験に供した。

#### c) プライマーの設計

本研究ではナイセリア属菌の中でも病原性ナイセリア属菌のみが保持する髄膜炎菌γ-glutamyl aminopeptidase 遺伝子(*ggt*)及びその偽遺伝子淋菌*ggt-homolog* 遺伝子(*ggh*)をLAMP法のターゲットとした。更に髄膜炎菌を淋菌と区別するために髄膜炎菌に特異的な、莢膜多糖体合成遺伝子の一部*ctrB*遺伝子もターゲットとして選定した。プライマーの設計は栄研化学株式会社のNet laboratoryのホームページ(<https://biodb.netlaboratory.com/lamp/inde>

x.html) にて最適化された部位を選択した。以下にそのプライマーの塩基配列を示す。

ggt-F3: TAT GGA AGC GGT GGT CGG

ggt-B3: TTC GGC AAA AAA TAA GCG  
GC

ggt-FIP: TTC CCC AAG GCA ATA CAC  
CGT GGT ACG CCT GCT ATC CCT

ggt-BIP: GGT TTT GAG GTG TCG CCA  
AGG TAG CGT GCC AAA TGC  
TGC

ctrB-F3: ACC AGT TGA ACG ATC GTG  
C

ctrB-B3: CCA GCT GGG TTT GAA TCA  
CA

ctrB-FIP: GAG AGG CTT CCT TTA CCC  
GCT CTG CTG ATA CGG TGC GCT  
AT

ctrB-BIP: TCT GAC GGA TTA CCG GAT  
TGC CGG AAA CCA ACC CCA TTT  
GC

#### d) LAMP 法

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。以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

2× reaction mix.	12.5 μl
Promer: 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、65 °C × 60 分のインキュベーション後 80 °C × 10 分処理して反応を停止させた。増幅した DNA は UV 照射による目視により確認した。

反応チューブは汎用 0.2 ml PCR チューブを用い、Gene Amp PCR system 9700 (Perkin Elmer) を用いてインキュベーションを行なった。

#### C. 研究結果

##### 1) 薬剤耐性淋菌のサーベイランス

2012 年 4 月から 12 月までの 9 ヶ月間に 120 の臨床検体を回収し、その検体から分離同定解析を経て 86 株の臨床分離株を得た。さらに 104 株の臨床分離株を収集し、総計 190 株に関して薬剤感受性試験を実施した。その結果、近年の淋菌感染症の治療薬として最も有効とされているセフトリアキソン(CTRX)に関しては耐性株が認められなかった (図 1)。一方で、セフィキシム(CFIX)は中間の耐性を示す株が 50%含まれており、セフィキシムの淋菌治療への適用の困難さを予想させる結果も得られた。またかつては淋菌感染症の治療薬として使用されていたペニシリン(PG)やシプロフロキサシン(CPFX)は耐性化が進んでいることが本研究で収集された株に限ってみてもはっきりと確認された。

## 2) 髄膜炎菌検出用の簡便・迅速検出法の開発

髄膜炎菌の検体から簡便、迅速、鋭敏に検出する方法として LAMP 法の条件検討を行なった。

ナイセリア属菌検出用として選定した髄膜炎菌 *ggt* 遺伝子及びそのホモログ淋菌 *ggh* 遺伝子をターゲットとした検出系に関してはナイセリア属菌の中でも淋菌及び髄膜炎菌に特異的に反応し、他の非病原性ナイセリア属菌には反応しないことが明らかとなった (図 2)。更にこの検出系の検出限界を測定した結果、反応液中に 10 pg のゲノム DNA があれば検出出来ることも明らかとなった (図 3)。

しかし、*ggt* 及び *ggh* 遺伝子をターゲットとしたこの検出系では髄膜炎菌と淋菌を区別することが不可能なため、更に莢膜多糖体合成遺伝子の一部である *ctrB* 遺伝子をターゲットとした系を更に構築し、その種特異性と検出限界に関して検討を行なった。*ctrB* 遺伝子の系はナイセリア属菌の中でも髄膜炎菌に特異的に反応し、淋菌には反応しないことが明らかとなった (図 4、赤)。このことから *ctrB* 遺伝子を用いた検出系により髄膜炎菌を淋菌と区別して判別することが可能となった。一方で、ゲノム株の全塩基配列情報ではホモログの存在が確認出来なかった *N. lactamica* においては陽性反応が確認された (図 4、青、考察の項参照)。更にこの検出系の検出限界を測定した結果、反応液中に 11 pg のゲノム DNA があれば検出出来ることも明らかとなり (図 5)、前述の髄膜炎菌 *ggt* 遺伝子及びその淋菌

*ggh* 遺伝子をターゲットとした系よりも約 10 倍感度が高いことが明らかとなった。

以上の結果から淋菌においては関西エリアを中心としたサーベイランスを行い、臨床分離株 190 株には淋菌感染症の有効治療薬セフトリアクソンの耐性菌は検出されなかった。一方、髄膜炎菌においては検体中の髄膜炎菌 DNA を 1~10 pg のレベルで 1 時間以内に検出することが可能となった。

## D. 考察

日本においては淋菌の多剤耐性化が進み、従来の淋菌感染症の治療に使用されていたペニシリンやニューキノロンが効かなくなる症例が多くなってきている。その状況下で淋菌感染症の治療薬として最後の砦として考えられているセフトリアキソンについても 2009 年に京都市でセフトリアキソン耐性淋菌株が世界で初めて分離され、その拡大が懸念されていた。従来から日本の臨床においては淋菌感染症の検査は淋菌の分離同定が困難なことからクラミジアと共に核酸検査に供されることが常体化しており、それ故に菌株自体が得られないと判別出来ない淋菌の薬剤耐性化の状態に関しては不明であった。本研究では世界初のセフトリアキソン耐性淋菌株が現れた関西地区を中心に臨床の先生方の協力の元に積極的に淋菌の臨床分離株を分離・収集し、その薬剤耐性化に関して解析を行なった。今年度の研究では 190 の臨床分離株にはセフトリアキソン

ンの耐性菌は検出されず、とりあえず淋菌のセフトリアキソン耐性の拡大はないのではないかと推測された。また経口薬のセフィキシムに関しても感受性株の割合が減少していることやシプロフロキサシンにおいては耐性株が全体の70%以上を占め、淋菌感染症の治療薬としてしてはもはや有効ではないことも本研究の解析結果から明らかとなった。しかし、より広義的なサーベイランスによる淋菌の薬剤耐性化の現状を把握するために、臨床分離株の薬剤耐性を解析すると共に関西エリア以外にもサーベイランスシステムの拡大を図り、より広大な範囲で日本の淋菌薬剤耐性化に関して解析を実施して行く必要があり、次年度以降の課題として考えられた。

髄膜炎菌に関しては2011年5月に発生した髄膜炎菌性感染症の集団感染事例を契機に健康保菌状態を含む日本の髄膜炎菌感染症の実態が問われたがその詳細は不明な点が多く、その一因は髄膜炎菌の簡易迅速診断法の不備であったと考えられた。本研究においてはLAMP法を用いた髄膜炎菌 *ggt* 遺伝子及びそのホモログ淋菌 *ggh* 遺伝子をターゲットとした病原性ナイセリア属菌の検出系を確立することが出来た。更には *ctrB* 遺伝子をターゲットとした検出系も構築することにより髄膜炎菌を淋菌と判別する診断系も確立することが出来た。後者の検出系は *N. lactamica* のゲノム株では *ctrB* 遺伝子及びそのホモログは見出すことが出来ないため、本研究において *N. lactamica* が陽性に出た要因の詳細は

不明だが、可能性としては1) 本研究に供した *N. lactamica* 株にはゲノム株には存在しない *ctrB* 遺伝子ホモログが存在する、2) 研究に供した *N. lactamica* 株のゲノム溶液中に非常に微量の髄膜炎菌ゲノム DNA がコンタミしていた、ことが推測され、更に検討する必要があるであろう。いずれにせよ、*ggt* 系及び *ctrB* 系の検出系を用いれば検体中の病原性ナイセリア属菌の検出及び髄膜炎菌の同定が可能となった。来年度以降は本年度開発した迅速診断法をヒトの臨床検体(うがい液)に適用して従来の咽頭スワブからの培養検査との検出率の相違を検討後、大学生を母集団とした健康保菌検査に展開させる予定である。

## E. 結論

淋菌のセフトリアキソン耐性の拡大は今年度のサーベイランスでは確認されなかった。また、髄膜炎菌の簡易迅速検出法を開発した。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hideyuki Takahashi, Tatsuo Yanagisawa, Kwang Sik Kim, Shigeyuki Yokoyama and Makoto Ohnishi: Meningococcal PilV potentiates *Neisseria meningitidis* Type IV pilus-mediated internalization into human endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* 80(12): 4154-4166, 2012.

志牟田 健、飛田 収一、伊東 三喜雄、

藤原 光文、上田 朋宏、亀岡 博、古林 敬  
一、川畑 拓也、大西 真

京都府と大阪府における 2010 -2011 年に  
分離された淋菌株の性情解析

日本性感染症学会誌.23(1):83-89. .2012.

2. 学会発表

中西典子、田中忍、志牟田健、飯島義雄、  
白井千香、岩本朋忠、大西真:神戸市内分  
離淋菌株を用いた薬剤耐性淋菌モニタリ  
ングシステム構築への試み、

日本性感染症学会第 25 回学術大会、岐阜  
市、2012 年 12 月

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

図1 淋菌臨床分離株 190 株の薬剤感受性試験の結果

S (sensitive : 感受性)、I (intermediate : 中間)、R (resistant : 耐性)を示す。

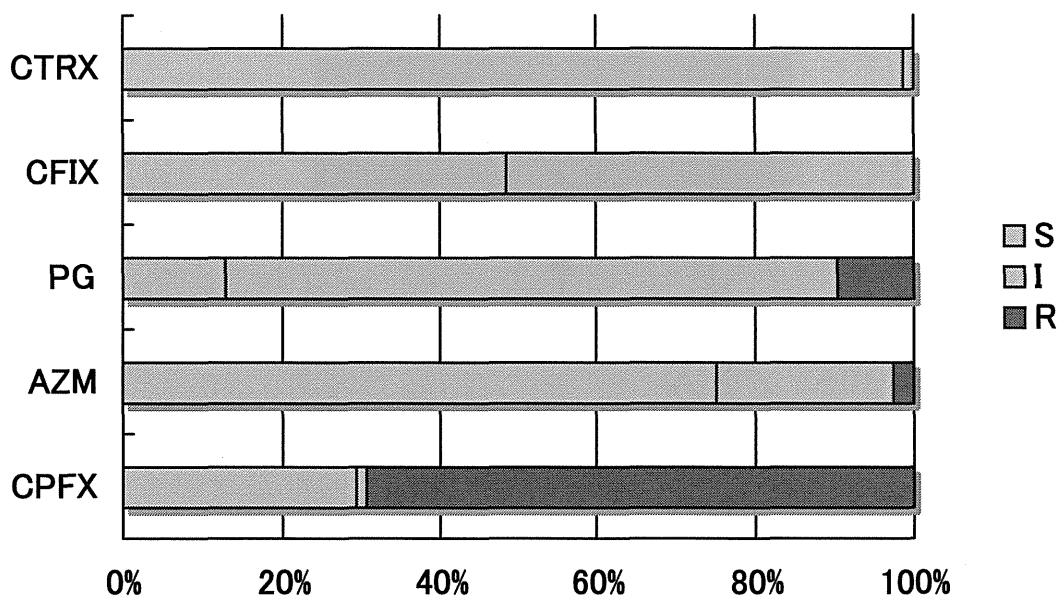


図2 病原性ナイセリア属菌検出用の 髄膜炎菌 *ggt* 遺伝子及び淋菌 *ggh* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法の特異性

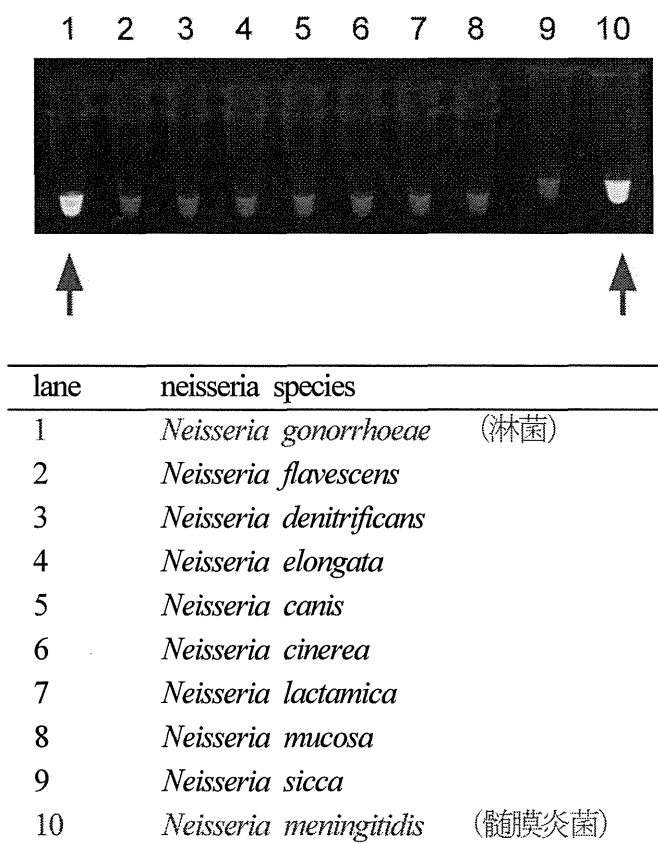




図3 病原性ナイセリア属菌検出用の髄膜炎菌 *ggt* 遺伝子及び淋菌 *ggh* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法の検出限界

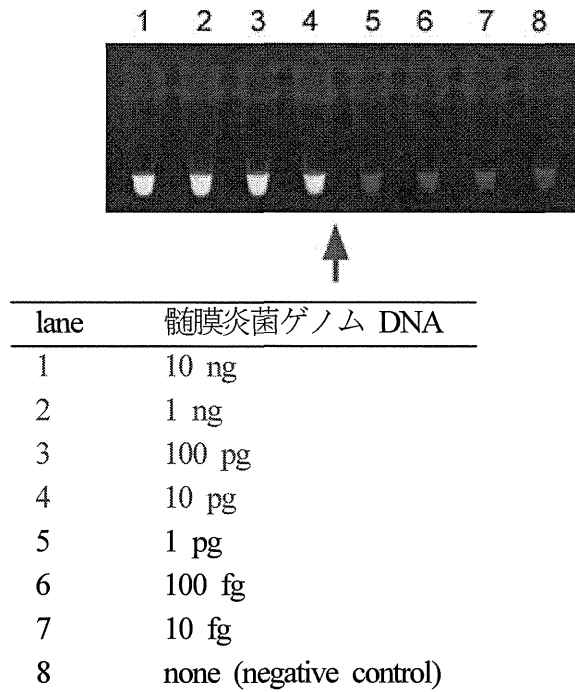


図4 髄膜炎菌検出用の髄膜炎菌 *ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法の特異性

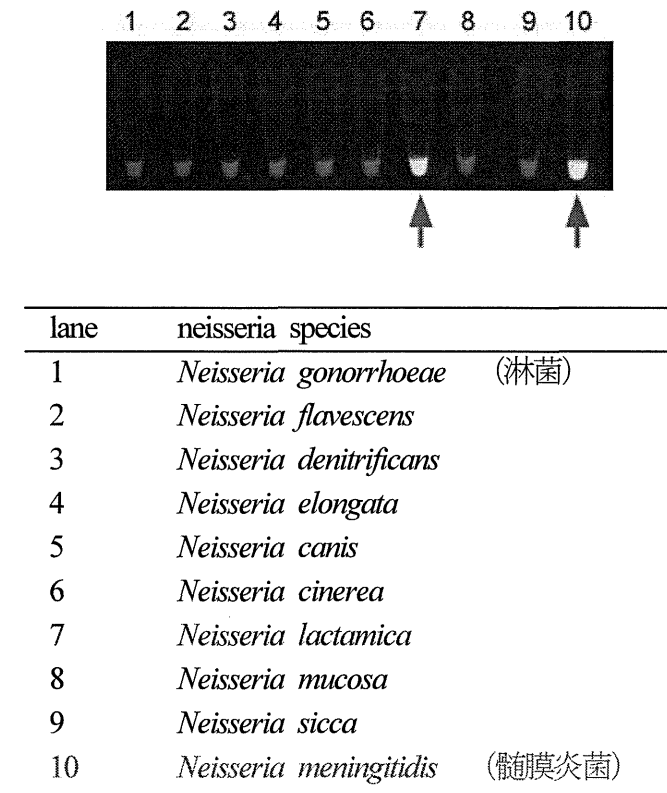
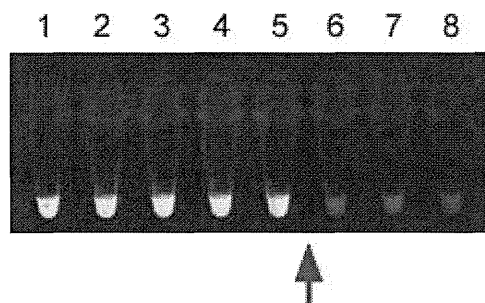


図5 髄膜炎菌検出用の髄膜炎菌 *ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法の検出限界



lane	髄膜炎菌ゲノム DNA
1	10 ng
2	1 ng
3	100 pg
4	10 pg
5	1 pg
6	100 fg
7	10 fg
8	none (negative control)

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

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、鍋島 民

#### 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は日本国内で 2011 年の夏頃よりこれまでにない大きな流行が観察された。2013 年 2 月時点で報告数は減少しつつあるが、引き続き留意する必要がある。H24 年度の本分担研究では、継続課題である *p1* 遺伝子による遺伝子型別の検討を引き続き行った。本研究では地方衛生研究所で LAMP 法により *M. pneumoniae* 陽性となった検体について国立感染症研究所で *p1* 遺伝子型別を行っている。さらに、H24 年度はマイコプラズマ肺炎の流行の実体を把握するために、外来患者で抗菌薬未投与のマイコプラズマ肺炎疑い患者の検体を用いて菌株の分離を試み、臨床分離株菌株を用いて薬剤耐性の検討を試みることにした。

*p1* 遺伝子型別では、これまでにマイコプラズマ肺炎の流行と流行時に検出される *M. pneumoniae* の遺伝子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。今回のマイコプラズマ肺炎の流行によ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可能であった。加えて今回の流行前から検体の遺伝子型別を継続して行っていることより、流行と遺伝子型の相関の可能性について検討を行うことができると考えられた。2005 年頃までに国内で検出された *M. pneumoniae*

の *p1* 遺伝子型別状況をみると、Subtype 1 と Subtype 2 の間で約 10 年周期で優位に検出される株の変遷が起きており、2006 年以降は Subtype 2 型優位になると予想されたが、本研究期間内の分離菌では Subtype 2 はほとんど検出されず Subtype 1 と Variant 2a の二つの菌型が占めていた。さらに Variant 2a とされていたものの過半数は Variant 2c であったことも示された。また、これまで国内ではほとんど報告がなかった Variant 2b がこの研究では H23 年 10 月にはじめて検出され、その後も少数ではあるが継続して検出されている。現在までの所、マイコプラズマ肺炎の流行により検体数が増加するに従い、Subtype 1 の検出数が増加し他の型の検出数はある一定の割合を保っている。この結果から今回の流行は Subtype 1 によるものと考えられる。現時点で流行が終息していないため流行後の *p1* 遺伝子型の推移は観察できていないが、引き続き検討を行う予定である。

加えて今年度においても引き続きマイコプラズマ肺炎の流行が報告されており、その流行の実体を把握するために、マイコプラズマ肺炎疑いで医療機関を受診し抗菌薬未投与の患者から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

これまで地方衛生研究所と共同研究で、長引く乾性の咳嗽を呈する患者由来の鼻咽頭スワブを検体として *M. pneumoniae* の検出を LAMP 法で試み、陽性となった検体については国立感染症研究所・細菌第二部で *p1* 遺伝子型別を行ってきた。この検討は 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ため、今年度は流行前から流行時にかけて型別された *p1* 遺伝子の型の変化を解析することを目的とした。

## B.研究方法

長引く乾性の咳嗽症状を呈する患者の鼻咽頭スワブ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されたゲノム DNA を鋳型として用いて 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 *p1* 遺伝子内に 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。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 増幅産物は制限酵素 *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。

(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 2011-2013 年にかけてマイコプラズマ肺炎の大流行が発生しており、*M. pneumoniae* 陽性の検体を例年に較べて多く得ることができた。2012 年までに収集された検体を *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。また、協力研究期間の都合で H24 年度に入ってからほとんどが高知からの検体となった。

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、患者の最年長は 51 歳、最年少は二ヶ月であった。研究期間を通した年齢別の割合では 0-2 歳が 10.6%、3-5 歳が 19.5%、6-15 歳が 63.9%、16 歳以上が 4.6%、記載なしが 1.4%であった。流行時の 2012 年に限って年齢別の割合を見ると 0-2 歳が 10.3%、3-5 歳が 5.6%、6-15 歳が 78.5%、16 歳以上が 4.2%、記載なしが 1.4%であった。

## D.考察

マイコプラズマ検体は 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。2010 年は Subtype 1 が 31.1%、Subtype 2 が 6.7%、Variant 2a が 62.7% という結果であり、2011 年度は Subtype 1 が 67.8%、2012 年の 8 月までの集計では Subtype 1 が 64.2% とその割合が増加した状態が続いている。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割合を保ち増加しなかった。その他、本研究期間中の *p1* 遺伝子型をモニタリングした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。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

については報告数は少ないが、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、今回の流行開始と共に Subtype 1 の検出のみが顕著に増加したことから本流行に関わったのは Subtype 1 であると考えられる。流行後の *p1* 遺伝子型の割合がどうなるのか、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

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

その結果、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。前年度にも言及したが、これまで主要な遺伝子型のひとつであった Subtype 2 は、流行時で検出数が多いにもかかわらず 2012 年にも報告されなかった。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。今後、マイコプラズマ肺炎流行の終息に

ともない Subtype 1 の検出数が減少するの  
かどうか、検討を継続する予定である。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  
流行時には Subtype 1 が優位になるのか、今  
後長期にわたって *pl* 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する。

- 1.特許取得  
なし
- 2.実用新案登録  
なし
- 3.その他

#### F.健康危機情報

なし

#### G.研究発表

##### 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

- 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 pl*  
genes detected in Japan from 2009 to 2012,  
Horino A., Kenri T., Matsumoto J., Katsukawa C.,  
Takahashi C., Taniguchi K. 19<sup>th</sup> International  
Organization for Mycoplasma (IOM),  
Toulouse, France, 2012

#### H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

平成 24 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)  
「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」(研究代表者:  
谷口清州)

## 分担研究報告書 下痢症アデノウイルスの分子疫学調査

研究分担者 藤本嗣人 国立感染症研究所感染症情報センター・第四室長

研究協力者

花岡 希 国立感染症研究所感染症情報センター

小長谷昌未 同 (協力研究員)

榎本美貴 同 (協力研究員) , 兵庫県立健康生活科学研究所

清水英明、松島勇紀 川崎市衛生研究所

入谷展弘、久保英幸、改田厚 大阪市立環境科学研究所

地区アデノウイルスレファレンスセンター

### 要 旨

**目的:** 自然災害時には下痢症関連ウイルスが流行し、感染力が極めて強いアデノウイルスもその一つの起因病原体である。そこで、下痢症アデノウイルスの分子疫学的な調査を行う。

**方法:** 下痢症関連アデノウイルス流行状況を分子疫学的に把握するため下痢症アデノウイルス(40 および 41 型)の主要な蛋白コード領域の塩基配列を調べた。今年度は、大阪市において 2003 から 2010 年までにエライザ法(アデノクローン E)で下痢症アデノウイルスが陽性と判定された 25 件について分子疫学的解析をおこなった。

**結果:** すべての株が 41 型と同定され、近年 40 型がほとんど流行していないことが確認された。ヘキソン領域およびファイバー(長鎖)をコードする遺伝子配列により、GTC1 および GTC2 に分類された。年により流行する遺伝子型が変化していた。

**考察:** 8 年間に大阪市で下痢症を引き起こしていたのは 41 型である。これは、近年に世界的に 40 型の検出が減少して 41 型が流行していることと一致した。年により GTC1 と GTC2 が入れ替わる傾向が見られることは、集団免疫に対抗する点で、この変化が有利に働いていることを示唆するものと考えられた。



## A. 研究目的

自然災害時には下痢症関連ウイルスが流行し、感染力が極めて強いアデノウイルスもその一つの起因病原体である。そこで、下痢症アデノウイルス(F 種)の分子疫学的な調査を行う。

## B. 研究方法

下痢症関連アデノウイルス流行状況を分子疫学的に把握するため下痢症アデノウイルス(40 および 41 型)の主要な蛋白コード領域(図 1)の塩基配列を調べた。今年度は、大阪市において 2003 から 2010 年までにエライザ法(アデノクロン E)で下痢症アデノウイルスが陽性と判定された 24 名から採取された 25 件について分子疫学的解析をおこなった(表 1)。

表 1. 大阪市における感染性腸炎総検査数とアデノウイルス陽性株数および陽性率(12 歳以下、散発例)

年	検査総数	株数	陽性%
2003	109	5	4.6%
2004	123	7	5.7%
2005	86	1	1.2%
2006	98	1	1.0%
2007	44	3	6.8%
2008	57	1	1.8%
2009	52	2	3.8%
2010	77	5	6.5%
Total	646	25	3.9%

(倫理面への配慮)

本研究は感染症法発生動向調査の一環として行われ、個人情報とのリンクはなく、倫理的問題を生じない

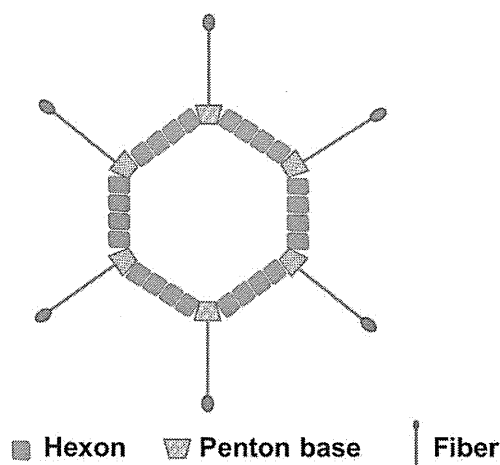


図 1. アデノウイルスの3つの重要な構造タンパク

## C. 研究結果

### 1) ヘキソン領域

アデノウイルスのヘキソン領域の全塩基配列を 18 株で調べて系統解析をおこなったところ、大きく 2 つのクラスターに分かれ(図 2)、アミノ酸に翻訳しても同様であった。

アミノ酸に翻訳した配列のアライメント結果(図 3)によると、変異は超可変領域(HVR)1~7 までの 4 以外でみられ、HVR に集中していた。

### 2) ファイバー領域

F 種には 2 種類のファイバー(long fiber と short fiber)がある。このうち short fiber の働きは良く分かっていない。Long fiber は、細胞のレセプター(Coxsackie Adenovirus Receptor, CAR)に結合する。

ロングファイバー(1689bp)の塩基配列を系統解析すると図 4 のとおり、ヘキソンと同様に 2 つのクラスターに分類された。それらの分類は、ヘキソンと一致していた。

25 検体中、1 件で 45 塩基の欠損が見られ、シャフト領域が 15 アミノ酸分短かった(表 2<sup>1)</sup> および図 5)。

#### D. 考察

感染症発生動向調査によると、全国で2000～2011年に41型が患者319名の患者から検出されている。その臨床症状は、311名(97.5%)で胃腸炎、114名(35.7%)で発熱、27名(8.5%)で上気道炎が認められた。40型は4名からしか検出されず、うち3名(75%)が胃腸炎を発症し、発熱は1名(25%)にのみ認められている<sup>2)</sup>。

本研究でアデノクローンEによってF種と同定されていたアデノウイルスはすべて41型であった。大阪市における8年間の感染症発生動向調査において感染性胃腸炎検体の3.9%で41型が検出された。患者年齢は、生後2ヶ月から3歳までであった。遺伝子のクラスターは2種類に分かれ、ヘキソンにおいてもロングファイバーにおいてもいずれも同じクラスターに属している(表3)。年によりGTC1とGTC2が入れ替わる傾向が見られることは、集団免疫に対抗する点で、この変化が有利に働いていることを示唆するものと考えられた。

ファイバーにおいてシャフト領域で15アミノ酸の欠損があるウイルス(表2、No4)がみられたが1株のみであった。

25件中3件(12%)は、ロタウイルスA群(2件)およびノロウイルス1件との重複感染であった(表3)。このことは、アウトブレイクでも観察され、単独のウイルスのみを検査では不十分なことを示唆するものと考えられた<sup>2)</sup>。

F種以外のアデノウイルスでも胃腸炎が見られることがある(図6)が、F種とくに41型が感染性胃腸炎の起因病原体として重要であることが裏付けられた。

#### E. 結論

8年間に大阪市で下痢症を引き起こしていたのは41型であった。これは、近年に世界的に40型の検出が減少して41型が流行していることと一致した。年によりGTC1とGTC2が入れ替わる傾向が見られる。ロタウイルスやノロウイルスとの重複検出がみられ、感染性胃腸炎の起因病原体の重複感染が多いことが示唆された。

#### 参考文献

- 1) Dey RS, Ghosh S, Chawla-Sarkar M, Panchalingam S, Nataro JP, Sur D, Manna B, Ramamurthy T. Circulation of a novel pattern of infections by enteric adenovirus serotype 41 among children below 5 years of age in Kolkata, India. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49 (2):500-505.
- 2) 藤本嗣人、井手忍、柴原乃奈、加納和彦、花岡希、松島勇紀、清水英明:アデノウイルス胃腸炎. *臨床と微生物.* 3号. 2013.

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 論文発表

- 1: Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, Watanabe Y, Adachi F, Mitani K, Fujimoto T, Phan TG, Ushijima H. Genome sequence of a novel virus of the species human adenovirus d associated with acute gastroenteritis. *Genome Announc.* 2013 Jan;1(1). doi: pii: e00068-12. 10.1128/genomeA.00068-12.

- 2: Yamane S, Lee AW, Hanaoka N, Gonzalez G, Kaneko H, Ishida S, Kitaichi N, Ohno S, Koyanagi KO, Aoki K, Fujimoto T, Yawata N, Watanabe H. Identification of contamination in the American type culture collection stock of human adenovirus type 8 by whole-genome sequencing. *J Virol*. 2013 Jan;87(2):1285-6.
- 3: Enomoto M, Okafuji T, Okafuji T, Chikahira M, Konagaya M, Hanaoka N, Adhikary AK, Takai D, Sugawara T, Hayashi Y, Oishi K, Fujimoto T. Isolation of an intertypic recombinant human adenovirus (candidate type 56) from the pharyngeal swab of a patient with pharyngoconjunctival fever. *Jpn J Infect Dis*. 2012; 65(5):457-9.
- 4: Sugiura H, Fujimoto T, Sugawara T, Hanaoka N, Konagaya M, Kikuchi K, Hanada E, Okabe N, Ohkusa Y: Prescription surveillance and polymerase chain reaction testing to identify pathogens during outbreaks of infection. *BioMed Research International*,
- 5: Adhikary AK, Ushijima H, Fujimoto T. Human adenovirus type 8 genome typing. *J Med Microbiol*. 2012 Nov;61(Pt 11):1491-503.
- 6: Fujimoto T, Matsushima Y, Shimizu H, Ishimaru Y, Kano A, Nakajima E, Adhikary AK, Hanaoka N, Okabe N. A molecular epidemiologic study of human adenovirus type 8 isolates causing epidemic keratoconjunctivitis in Kawasaki City, Japan in 2011. *Jpn J Infect Dis*. 2012;65(3):260-3.
- 7: Matsushima Y, Shimizu H, Kano A, Nakajima E, Ishimaru Y, Dey SK, Watanabe Y, Adachi F, Suzuki K, Mitani K, Fujimoto T, Phan TG, Ushijima H. Novel human adenovirus strain, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*. 2012 May;18(5):846-8.
- 8: Taniguchi K, Yoshihara S, Tamaki H, Fujimoto T, Ikegame K, Kaida K, Nakata J, Inoue T, Kato R, Fujioka T, Okada M, Soma T, Ogawa H. Incidence and treatment strategy for disseminated adenovirus disease after haploidentical stem cell transplantation. *Ann Hematol*. 2012 Aug;91(8):1305-12.
- 9: 菅原民枝、藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、大日康史：流行の早期探知システムと病原体診断との連携の試み。 *臨床とウイルス* 40:169-175, 2012
- 10: 菅原民枝、藤本嗣人、大日康史、杉下由行、小長谷昌未、杉浦 弘明、谷口清州、岡部信彦：病原体診断を伴うリアルタイムサーベイランスによる流行抑制の可能性—保育園での手足口病流行での事例検討—。 *感染症学雑誌* 86: 405-410, 2012
- 11: 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未：日常の実験手法となった Polymerase chain reaction (PCR)と電気泳動の進展：超高速 PCR(Hyper-PCR) および microcapillary

electrophoresis (MultiNA). 臨床とウイルス  
40: 184-191, 2012.

12: 花岡希、小長谷昌未、谷口清州、岡部  
信彦、藤本嗣人: 新型アデノウイルス(53, 54  
および 56 型)に対するイムノクロマトキットの  
性能評価. 感染症学雑誌 86: 425-426,  
2012

13: 藤本嗣人: 病原体検査と遺伝子検査\_呼  
吸器・消化器ウイルス. 臨床と微生物 39(増刊  
号): 570-574, 2012

14: 藤田秀昭、ファン・ジェーン、小沢昌彦、  
吉富秀亮、世良暢之、鬼木信乃夫、花岡希、  
岡部信彦、藤本嗣人、内尾 英一: 新型アデノ  
ウイルス 56 型による流行性角結膜炎の 1 例.  
臨床眼科 66: 659-662, 2012.

15: 藤本嗣人、井手忍、柴原乃奈、加納和彦、  
花岡希、松島勇紀、清水英明: アデノウイルス  
胃腸炎. 臨床と微生物. 3: 51-54, 2013. (印  
刷中)

16: 藤本嗣人: アデノウイルス感染症. 日本臨  
床. 印刷中

17. 藤本嗣人、野田衛: 腸管アデノウイルス.  
食品衛生検査指針. 印刷中

## 学会発表

1. 菅原民枝、藤本嗣人、大日康史、杉下由行、  
谷口清州、岡部信彦: 症候群サーベイランス  
と早期の検査による流行抑制の可能性: 保育  
園での手足口病及びRSウイルス感染症の流  
行での事例. 第 86 回日本感染症学会学術総

会. 2012 年 4 月. 長崎市.

2. 花岡希、小長谷昌未、藤本嗣人: リアルタ  
イム PCR で陰性でキャピラリー電気泳動で陰  
性となる微量エンテロウイルス. 第 86 回日本  
感染症学会学術総会. 2012 年 4 月. 長崎市.

3. 藤本嗣人、中村雅子、渡部香、渡邊香奈子、  
榎本美貴、花岡希、田村務: 1988~2011 年  
のアデノウイルス 3 型のヘキソン超可変領域  
アミノ酸配列による流行状況の検討. 第 60 回  
日本感染症学会. 2012 年 11 月. 大阪市.

4. 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未: 流行性角  
結膜炎を引き起こしているアデノウイルスのフ  
ァイバーコード領域. 第 61 回日本感染症学会  
東日本地方会学術集会. 2012 年 10 月. 東京  
都港区

5. 松島勇紀、清水英明、三谷幸之介、牛島廣  
治、藤本嗣人、岡部信彦: 感染性胃腸炎患者  
から分離された新型組換えアデノウイルスの  
バイオインフォマティクス解析. 第 60 回日本ウ  
イルス学会. 2012 年 11 月. 大阪市

6. 藤本嗣人、中村雅子、渡部香、渡邊香奈子、  
榎本美貴、花岡希、田村務: 1988~2011 年  
のアデノウイルス 3 型のヘキソン超可変領域  
による流行の検討. 第 60 回日本ウイルス学  
会. 2012 年 11 月. 大阪市

## H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願  
なし
2. 実用新案登録  
なし