

## 5. 細菌第二部

### 部長 荒川宜親

#### 概要

細菌第二部は、第一室(旧抗生物質製剤室)、第二室(旧、安全性研究部無菌性制御室)、第三室(旧細菌製剤第三室)、第四室(旧細菌製剤第一室)、第五室(旧安全性研究部生物統計室、旧細菌製剤第二室)の5つの室から構成され、抗生物質製剤、DPT ワクチン、抗毒素製剤、BCG 製剤、精製ツベルクリンなどの力価試験などの品質管理業務(国家検定、国家検査、一斉監視指導収去検査、特別審査、依頼検査など)ならびにそれに必要な標準品の製造などを担当している。また、ウイルスワクチンを含む生物学的製剤の無菌試験、エンドトキシン試験などに従事し、同時に、生物学的製剤の試験結果の解析、評価などに関し生物統計学的側面からの支援を行ってきた。さらに、これらの生物学的製剤等の試験・検査、品質の向上に関わる各種の研究業務に従事した。さらに、日本薬局方の無菌試験法、エンドトキシン試験法などの改定に専門的な視点から協力と支援を行った。一方、国際協力の面では、WHO、JICA、国立国際医療センターの各種海外プロジェクトに協力し、同時に研修生等の受け入れや技術研修などの支援を行った。特に、WHO の “ Collaborating Center for Research and Reference Services for Immunological and Biological Products ” として、

(1) Standardization and making recommendations on the calibration of test methods for the quality control of biological products and other related activities. (2) Standardization and calibration of reference preparations for the quality control of biological products. (3) Training in methods to be used for the quality control of biological products. (4) Collaboration and consultation with other national and international standard setting organizations. などを行った。

平成 14 年度より細菌第二部へ組織再編された後は、

細菌学、細菌感染症学の研究部として細菌の病原性(薬剤耐性を含む)、細菌感染症の病態、細菌感染症の診断・予防・治療など広範にわたる研究が推進されている。また、生物学的製剤の品質管理技術の向上を目指して、種々検討や研究が行われた。

品質管理業務及び研究実績の詳細については各製剤担当室毎に後述するが、部として取り組んだ主要な業務や代表的な研究課題などを以下に示す。

1. 厚生労働省による「院内感染対策サーベイランス事業」への専門的な視点からの支援
2. 特定疾患の IgA 腎症などの特定疾患と微生物感染症との関連性についての研究
3. アジア諸国における細菌ワクチン製剤の品質管理の向上に関する国際協力および共同研究
4. 海外、主としてアジア地域における感染症の診断、予防などに関する技術支援。
5. 国内の医療施設で分離された薬剤耐性菌の遺伝子型別などの詳細な解析に関する技術支援

その他、ジフテリア菌、百日咳菌、破傷風菌、*Helicobacter pylori*、*Bartonella quintana*、*Haemophilus influenzae* などの病原細菌の分離・同定、病原性や病原因子、検査法、疫学などにかかわる様々な研究が実施された。

研究業務としては、厚生科学研究費補助金による各種の研究事業に協力し、さらに、新興・再興感染症研究事業、医薬安全総合研究事業、ヒューマンサイエンス財団国際研究グラント事業など各種の研究事業による研究に参加した。また、文部科学研究費補助金による様々な研究等が実施された。

常勤職員の異動としては、平成 17 年 3 月 31 日付けで小澤良之主任研究官が退職した。細菌第二部に客員研究員として木ノ本雅通、石田説而、協力研究員として黒川博史、川村久美子、黒川博史、小島 禎、土井洋平、八木哲也、山口佳宏、瀬戸幸路、坂本 崇、川端敏之、山本

十糸子、陳平紆、大石和恵、高塚尚和、井上雅可、沼田昇、流動研究員として石川暁志、木村幸司、和知野純一、研究生として、本間操、山田友紀、畑中公基、加藤宗博、脇本寛子、松永和代らが在籍し、細菌感染症に関する様々な研究を行った。臨時職員（事務補助、研究補助）として、瀬川晶子、甲斐久美子、横川滋子、南條友子、粕谷裕子、吉村由美子、増田まり子、久保田真由美、長岡芳昭、岡宮洋子、井口由美子、豊生幸子、豊泉裕美、片岡紀代（村山分室庶務課在籍）らが在籍し、事務補助、研究補助等に従事した。

## 業績

### 調査・研究

#### ・抗生物質に対する耐性菌に関する研究

1. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出と国内で初めて分離された新型 IMP-19, 20 型メタロ-β-ラクタマーゼの遺伝子解析

メタロ-β-ラクタマーゼは、カルバペネム系薬を含むほとんどすべての抗生物質を加水分解する強力な酵素であるため、臨床的に問題となっている。我が国では、IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌が圧倒的に多いことが明らかとなっているが、臨床分離株から我が国で初めて IMP-19 型および IMP-20 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生株を検出した。さらに遺伝子解析を行った結果、これらはクラス型インテグロン構造に担われており、同時にアミノグリコシド耐性遺伝子も保有しており、多剤耐性菌として問題になると考えられる。[柴田尚宏、横川滋子、荒川宜親]

2. CTX-M 型 β-ラクタマーゼ遺伝子タイピングの解析

検査依頼のあった臨床分離グラム陰性桿菌を用い、ディスク拡散法で β-ラクタマーゼ産生を推定し、PCR 法により遺伝子タイピングを試みてきた。その結果、CTX-M-1 型、CTX-M-2 型さらに CTX-M-9 型の 3 つのグループに分かれることが明らかとなったがさらに解析を進め、シーケンス解析から CTX-M-2 型、CTX-M-3 型、CTX-M-9 型、CTX-M-14 型が多く存在することを明らかとした。これらの菌は、院内感染も引き起こす可能性もあり、臨床に注意を要すると考えられた。[柴田尚宏、鈴木里和、横川滋子、荒川宜親]

3. CTX-M 型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌 O25 の広域伝播に関する解析

全国の医療機関より送付された CTX-M-型 β-ラクタマーゼ産生大腸菌のなかで血清型 O25, O86 のものが多く、地理的に隔離していても遺伝子型（PFGE）が類似している事を明らかにした。さらに血清型 O86 が散発的であるのに対し、血清型 O25 が集団発生といった形をとりやすいこと傾向も明らかになってきた。同一株による耐性菌の広域伝播がわが国においても発生している可能性があり、また伝播性に関しても菌による特性が存在する可能性があり、現在菌株および関連情報の収集および分子疫学的調査を進めている。また、大腸菌の O 抗原と ESBL 産生との間の関連についての検討も行っている。[鈴木里和、柴田尚宏]

4. アミノグリコシド高度耐性を示す臨床分離株の解析

臨床分離されたアミノグリコシドに高度耐性を示す腸内細菌について 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有の有無を確認した。方法はアルベカシン含有ディスクを用いて阻止円の形成が認められない菌に対して既存の 16S rRNA メチラーゼを multiplex PCR 法で確認した。その結果、一医療施設から分離された大腸菌が *rmtB* 陽性と判定された。[山根一和、甲斐久美子、荒川宜親]

5. 16S rRNA メチラーゼ産生菌の保有状況の全国調査

2004 年 9～10 月の 2 ヶ月間に全国の 169 施設で分離された 87,626 株について 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の保有状況を調べた。その結果、アミカシンの MIC 値が 32μg/ml 以上の 481 株についてアルベカシン含有ディスクを用いたスクリーニングを行った後に 16S rRNA メチラーゼの有無を PCR 法によって調べたところ、27 株が PCR 陽性と判定された。その内訳は RmtA 陽性株が緑膿菌 17 株、ArmA 陽性株は合計 9 株で、その内訳は *Acinetobacter baumannii* 4 株、大腸菌 2 株、*K. pneumoniae* 1 株、*Enterobacter aerogenes* 1 株、*E. cloacae* 1 株であった。RmtB 陽性株は最も少なく、大腸菌の 1 株のみであった。対象となった 169 施設のうち 1 株でも 16S rRNA メチラーゼ産生菌が分離された施設は 16 施設（9.5%）であった。さらに複数の同一菌種が分

離された施設は4施設あり、うち3施設ではパルスフィールド電気泳動法によって同一の菌株に由来する菌が複数認められた。これは16S rRNAメチラーゼ産生菌の院内伝播による院内感染を疑わせ、院内感染の原因になりうる事を示している。[山根一和、甲斐久美子、和知野純一、鈴木里和、柴田尚宏、加藤はる、横川滋子、吉村由美子、荒川宜親]

#### 6. リネゾリド耐性腸球菌の耐性機序の解析

バンコマイシン耐性腸球菌の治療薬として用いられるリネゾリドは日本では耐性菌の出現は確認されていなかったが、リネゾリドを長期投与された患者から分離された *Enterococcus faecium* は感受性検査でリネゾリド耐性を示した。耐性のメカニズムは従来から報告されている23S rRNA遺伝子の2576番目の塩基がG→Tに変異したためであった。この患者からはリネゾリド感性菌も分離されておりPFGEの結果同一の菌株由来であることが判明した。感性菌と耐性菌を共存させリネゾリド非存在下で培養すると5回の継代培養で感性菌のみとなった。また感性菌と比較して耐性菌の増殖曲線は感性菌よりも対数増殖期に入るタイミングが遅いことが分かった。[山根一和、甲斐久美子、荒川宜親]

#### 7. 血液から分離されたグラム陽性菌の菌名同定

患者血液から分離されたグラム陽性球菌を16S rRNA遺伝子の塩基配列によって菌名同定した。その結果、このグラム陽性菌は *Tsukamurella* 属に属することが判明した。[山根一和、荒川宜親]

#### 8. バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)に関する研究

(1) VREのPCRによるvan gene検出あるいは菌種同定について、洛和会音羽病院、洛和会丸太町病院、さいたま市保健所(食鳥由来株)、東京医科大学病院、東京女子医大第二病院、浜田医療センター、熊本市環境総合研究所、NTT東日本関東病院、東京都済生会中央病院、呉医療センター、金沢医科大学付属病院から、解析依頼のあった菌株について研究ベースにて解析を行った。[加藤はる、甲斐久美子、吉村由美子、近田俊文、荒川宜親]

(2) VREのPCRによるvan gene検出あるいは菌種同定について、山口県、熊本県、山梨県からの解析依頼

のあった菌株を行政検査として行った。[加藤はる、甲斐久美子、吉村由美子、近田俊文、荒川宜親]

(3) VREが糞便検体から分離された症例(山口県)について、糞便検体からの *Clostridium difficile* の分離を行った。[加藤はる]

#### . 抗菌薬関連下痢症に関する研究

1. *Clostridium difficile* における *slpA* シークエンスタイピングの確立と応用

*C. difficile* の新しいタイピング法として、細胞表面タンパクのひとつである *slpA* をコードする遺伝子のシーケンスを行う方法を検討し、他の方法によるタイピング結果と比較した。特に、日本の複数の病院で流行株となっているPCR ribotype smz株について検討し、type smz間では多様に乏しいことを発見した。糞便検体から抽出したDNAからの直接タイピングにも応用を試みたところ、培養ができないにもかかわらず *C. difficile* のタイピングが可能であった検体を認めた。[加藤はる、横山敏之(久美愛病院)、加藤秀章(豊川市民病院)]

2. 抗菌薬関連下痢症/腸炎の原因菌の究明

臨床的に抗菌薬関連下痢症/腸炎と診断された症例の糞便検体について、糞便検体中の、細胞毒素、*C. difficile* の toxin A、および *Clostridium perfringens* の enterotoxin の検出を行い、*C. difficile*、*C. perfringens* 及び *Bacteroides fragilis* の分離培養を行った。分離菌株における毒素遺伝子の検出に加え、糞便検体からDNAを抽出し、毒素遺伝子の検出を行った。[加藤はる、横山敏之(久美愛病院)、加藤秀章(豊川市民病院)]

3. 院内感染が疑われた複数の *Clostridium difficile* 関連下痢症/腸炎症例および再発症例から分離された菌株の解析と比較

解析依頼があり、研究ベースにて *C. difficile* 分離菌株の毒素産生性とタイピングを行った。[加藤はる、吉村由美子、中村敦(名古屋市立大学附属病院)]

4. 非典型的な経過あるいは重篤な症状を認めた *Clostridium difficile* 関連下痢症の細菌学的診断

解析依頼があり、研究ベースで糞便検体中の毒素、細

菌の分離等を行った。[加藤はる、吉村由美子、竹内英樹、小野聡（防衛医科大学校）、赤城一郎（日本大学）]

### ・マイコプラズマに関する研究

#### 1. 特定疾患の成立あるいは病状悪化への細菌、マイコプラズマ感染の関与についての検討

IgA 腎症患者における腎障害の原因は、糖鎖付加異常による異常 IgA の産生増加および腎への沈着によるものと考えられている。異常 IgA 産生の場合として扁桃が疑われることから、扁桃に感染する細菌種を 16S rRNA 遺伝子増幅法により同定した。IgA 腎症患者の扁桃からは、クリセオバクテリウム属の細菌の遺伝子が主に増幅された。マイコプラズマの遺伝子も特異プライマーで増幅された。血中抗体価を調べたところ、抗クリセオバクテリウム（一種）ならびに抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体価が患者群で有意に高く、IgA 腎症患者における高 IgA 血症の成立に扁桃感染細菌に対する特異的 IgA の関与が示唆された。[佐々木裕子<sup>1</sup>、松田和洋<sup>2</sup>、永田典代<sup>3</sup>、見理剛<sup>1</sup>、堀田 修<sup>4</sup>、宮崎真理子<sup>4</sup>、佐々木次雄<sup>1</sup>、荒川宜親<sup>1</sup>、1：細菌第二部、2：国立ガンセンター研究所、薬効試験部、3：感染病理部、4：仙台社会保険病院、内科・腎臓]

#### 2. プロテオーム解析を用いた *Mycoplasma penetrans* の新規抗原ならびに感染因子の探索

症例報告（健常人への重篤な呼吸器疾患）はあるものの疫学実態に不明な点の多い *M. penetrans* の新規診断法開発ならびに、ヒト細胞への感染機構、細胞障害因子を明らかにする目的で、抗原蛋白、ヒト細胞への付着器官関連蛋白の解析を行っている。昨年度同定した主要抗原 PDH の細胞外発現が、ピオチン化蛋白の解析から示唆された。付着器官関連蛋白群については、Triton-X100 不溶画分（triton-shell 画分。細胞壁を欠くマイコプラズマでは、細胞骨格蛋白と相互作用する付着蛋白群を含む）の解析で約 60 個が同定された。細気管支細胞等との相互作用に関わる菌側蛋白の解析には、分析感度等の検討課題を残した。[佐々木裕子<sup>1</sup>、新開大内 史子<sup>2</sup>、山河芳男<sup>2</sup>、川上隆雄<sup>3</sup>、見理 剛<sup>1</sup>、堀野敦子<sup>1</sup>、佐々木次雄<sup>1</sup>、1：細菌第二部、2：細胞化学部、3：東京医科大学、臨床プロテオームセンター]

#### 3. *Mycoplasma penetrans* の部位特異的組み換え酵素 MipR について

*M. penetrans* は細胞膜表面の膜リポタンパク質の発現プロファイルを頻繁に変化させる能力を持ち、宿主の免疫を回避していると考えられている。膜リポタンパク質の発現プロファイルの変化はプロモーター領域の DNA 逆位によって起こるが、我々は昨年この DNA 逆位に関与する組み換え酵素 MipR (Recombinase for Multiple Invertible Promoter) を同定した。MipR は *M. penetrans* の MYPE2900 遺伝子の産物であった。本年度は大腸菌でこの酵素を発現させて活性を調べた。膜リポタンパク質のプロモーター領域をプラスミドに組み込み、大腸菌に形質転換しても配列に逆位は起こらなかったが、この大腸菌に、UGA コドンを UGG に改変した MYPE2900 を組み込んだプラスミドを形質転換するとプロモーター領域の逆位が観察された。大腸菌内で DNA 逆位反応を再現できる系を確立するとともに、MipR が単独で DNA 組み換えを行う酵素であることを証明した。[堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄]

#### 4. マイコプラズマ肺炎患者血清の菌型特異的な血球吸着阻害活性

マイコプラズマ肺炎患者血清の *M. pneumoniae* に対する血球吸着（HA）阻害活性を調べると、HA 阻害活性を有する血清 22 検体のうち 21 検体は、I 型か II 型のどちらかの *M. pneumoniae* に対して優先的な阻害を示した。この菌型優先的な HA 阻害活性は、患者に感染した *M. pneumoniae* の菌型に対応していた。*M. pneumoniae* の感染時には、血清中に菌型特異的な接着阻害抗体が産生されと考えられ、これは臨床において I 型菌と II 型菌が交互に出現する現象の主な要因になりうると思われる。これらの患者血清を I 型菌と II 型菌の間で異なっている P1 接着タンパク質断片と反応性させると、血清中には菌型特異的な抗 P1 抗体が存在していることもわかった。この抗 P1 抗体が菌型特異的な接着阻害抗体である可能性が高いと考えられた。[見理剛、佐々木次雄、山崎 勉（埼玉医科大学）]

#### 5. *M. pneumoniae* の滑走運動性 (gliding motility) に

## 関する研究

顕微鏡下で *M. pneumoniae* の滑走運動を観察するための最適な条件を検討し、抗 P1 モノクローナル抗体が滑走運動に及ぼす影響を調べた。滑走運動している *M. pneumoniae* は、抗 P1 モノクローナル抗体の添加によって徐々に速度が低下し、ガラス表面から解離した。一方、滑走運動していない *M. pneumoniae* は、ガラス表面から解離しなかった。この挙動から *M. pneumoniae* の滑走運動には、P1 タンパク質の動的な変化(接着と解離を含むサイクル)が関与していることが示唆された。

[見理 剛、瀬戸真太郎(明海大学)、宮田真人(大阪市立大学)]

## 6. マクロライド耐性マイコプラズマ感染症に関する研究

2000 年以降、マクロライド耐性マイコプラズマがわが国において分離されるようになった。マイコプラズマはマクロライドで治療される事がほとんどである一方で、臨床現場において薬剤感受性検査は実施されていない。そのためマクロライド耐性マイコプラズマ感染症をマクロライドで治療した場合、感性菌にくらべどのような影響が生じるかを検討した。その結果耐性菌感染症の場合は感性菌に比べ有熱期間が 2, 3 日延長し効果が劣っている一方で、重症例などはなく、基礎疾患を有する患者などのときのみ薬剤変更を検討するのが妥当ではないかと結論付けられた。[鈴木里和、見理剛、佐々木次雄]

. *Haemophilus influenzae* に関する研究

1. ベトナムで髄液から分離された *Haemophilus influenzae* type b (Hib) の諸性状に関する研究。

ハノイにある国立小児病院で細菌性髄膜炎患者の髄液から分離した Hib 79 株について解析したところ、バイオタイプ 型が 68.3%、次いで 型が 22.8%であった。45 株(57%)がラクタマーゼ産生アンピシリン耐性(BLPAR)で、TEM-1 型が 44 株、ROB-1 型が 1 株であった。Hib 感染患者並びに同居 7 家族から分離した Hib の SmaI で処理した PFGE パターンは、各家族内では全く同じで、同居者が感染源になっている可能性を示唆するデータが得られた。[蒲池一成、久保田真由美、新谷三春、荒川宜親、佐々木次雄]

2. キノロン感受性臨床分離 *H. influenzae* 株からのキノロン低感受性株の in vitro 誘導及び GyrA QRDR のアミノ酸配列の変異

Isogenic なキノロン感受性株とキノロン低感受性株間で増殖速度等諸性状を比較するためにキノロン感受性の臨床分離 *H. influenzae* 8 株を 1×MIC のレボフロキサシンを含む Haemophilus Test Medium で 1 夜培養し、MIC の上昇した株を選択した。異なる親株由来の 4 株に対する 5 種類のキノロン薬の MIC は親株に対するものより、薬剤により 2~16 倍高くなっていた。更にこれら 4 株の DNA gyrase (GyrA, GyrB), DNA topoisomerase IV (ParC, ParE) の QRDR のアミノ酸配列を各親株と比較したところ、3 株において GyrA に 1 箇所ずつそれぞれ変異が生じていた (S84 L, D88 N, D88 V)。キノロンの MIC 上昇の最初の段階でこれら 2 箇所のアミノ酸変異が重要であることが確認された。今後 GyrA におけるアミノ酸変異の増殖への影響について調べる予定である。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

. *Helicobacter pylori* の病原性に関する研究

1. *H. pylori* のアポトーシス誘導蛋白 -glutamyl transpeptidase (GGT) の機能解析

*H. pylori* の GGT 遺伝子をクローニングし大腸菌で発現させ、リコンビナント蛋白を大量に精製する系を確立した。また *H. pylori* の GGT の酵素活性について生化学的解析を行い、アポトーシス誘導活性との関連性について解析を行った。[柴山恵吾、荒川宜親、Peter J.F. Henderson (英国 Leeds 大学)]

2. 臨床分離株の *H. pylori* の GGT の分子疫学解析

臨床分離株の *H. pylori* の GGT について、その発現量と疾患との関連性について疫学的解析を行った。[柴山恵吾、鈴木里和、荒川宜親]

3. *H. pylori* の GGT の発現機構の解析

*H. pylori* の GGT をコードする遺伝子について、promoter 部位を決定し、発現調節機構の解析を行った。[柴山恵吾、和知野純一、荒川宜親]

4 . *H. pylori* の培養に適する培地の検討

様々な培地、血清について *H. pylori* の増殖を調べ、菌の発育が良く、かつ安価な培地の検討を行った。[柴山恵吾、安藤貴文(名古屋大医)、長沢光章(防衛医大)、荒川宜親]

・ジフテリア

1 . 百日咳菌、ジフテリア菌、マイコプラズマ等の臨床分離菌の収集と分子疫学的解析に関する研究

ジフテリアの実験室内検査法の早期診断法の確立をめざし、現行 PCR 法、リアルタイム PCR 法および LAMP 法を比較検討した。その結果、当室が実施している現行の PCR 法はジフテリア菌 DNA 検出系として十分実用に耐える半面、LAMP 法は今回のプライマーセットを用いた限りでは実用的でなく、プライマーの設計を検討する。またリアルタイム PCR は感度、再現性ともに良好で、今後期待できる実験系であると考えられた。[岩城正昭、高橋元秀、小宮貴子、福田靖]

2 . 麻疹、ジフテリアおよび破傷風の実験室診断と疫学解析

カンボジアはポリオ根絶後、病原体診断のフォローアップとして検体が当所へ搬送され、検査を実施している。WHO WPRO の要請もあり、この輸送手段に便乗して、カンボジア内で発生したジフテリア、百日せきの疑患者から採取した材料を入手し検査を実施した。現在、両疾患の標準的検査法で数菌株が分離されており、現手法を現地検査システムに導入するための施策が今後の課題である。[高橋元秀、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信、岩城正昭、小宮貴子(感染研 細菌第二部)、遠田耕平(JICA EPI/ポリオ根絶計画) 国際医療協力研究委託事業]

3 . 厚労科研、宮村班「混合ワクチンの品質確保に関する研究」のため、海外市販品の DTaP2 ロット、DTaP-IPV 3 ロット、DTaP-IPV-Hib 1 ロット、DTaP-IPV-HepB 1 ロット合計 7 ロットのジフテリアトキソイド力価測定を、国内生物学的製剤基準の試験法に準拠して実施した。7 ロットの力価は、国内製剤の平均値 119 U/ml とほぼ同様の値であった。[小宮貴子、岩城正昭、福田靖、高橋元秀]

4 . ジフテリア菌 20kDa antigen の細胞表面における分布

プロリンに富む特異な反復配列を有するジフテリア菌蛋白抗原 20 kDa antigen ("1-1 ORF2"蛋白質)の局在を、同蛋白質に対する抗体(前年度年報参照)を用いた蛍光抗体法により共焦点レーザー顕微鏡で観察した。20kDa antigen は菌体表面に一様に分布し、特定の部位への局在は認められなかった。[岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

5 . マウスを用いたジフテリア菌感染実験系の検討

マウスはジフテリア菌の主要病原因子であるジフテリア毒素に非感受性である。このことを利用して、毒素以外のジフテリア菌病原因子を探索・解析するために、マウスを用いたジフテリア菌の感染実験を試みた。マウス背部皮内に  $10^6$ cfu のジフテリア菌を投与したところ 3 日後に最大で投与量の約 2 倍の生菌が回収され、菌は投与 13 日後まで回収された。また、あらかじめジフテリア菌死菌でマウスを免疫しておくことにより回収菌数は低下した。この実験系は新規病原因子の探索・解析に有用であると期待される。[岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

・破傷風

1 . 麻疹、ジフテリアおよび破傷風の実験室診断と疫学解析

パキスタンの 44 名の新生児破傷風患者の便から 2 株の破傷風菌を分離した。患者の聞き取り調査で、患者の治療記録、リスト及び便に記載された氏名の 3 者を照合した結果、一部不一致のものがあり、今後本試験に際しては現地と協議が必要である。[高橋元秀、福田靖、岩城正昭、小宮貴子：感染研 細菌第二部、Dr.Iftikhar Ahmed, CIDH, Peshawar、櫻田紳策、[国際医療協力研究委託事業)]

2 . 破傷風毒素構造遺伝子の塩基配列の比較

破傷風菌は菌株により毒力が大きく異なっている。そこで、これらの毒力の違いを解明するために、25 株の破傷風菌の毒素構造遺伝子における A フラグメントの活性中心部位を含む領域と C フラグメントのレセプター結合

## 細菌第二部

部位を含む領域の塩基配列と推定アミノ酸配列を株間で比較した。その結果、毒素の活性中心部位ではアミノ酸の変化はみられなかったが、レセプター結合部位では1菌株にのみアミノ酸の置換(H R)がみられた。しかし、この株の毒力は他の株の毒力と大きく異なっていなかった。他の領域についても、塩基(アミノ酸)配列の決定を進めている。[福田 靖、岩城 正昭、小宮 貴子、高橋 元秀]

3 .ヘモフィルス・インフルエンザ B 型菌ワクチン(Hib)に含まれる破傷風トキソイド(T-td)の免疫原性の検討  
Hib はキャリアー蛋白として T-td を含んでおり、DTaP との混合使用時の T-td の力価への影響が懸念されている。そこで海外で混合使用されている DTaP-IPV と Hib の T-td の力価をマウス法で定量した。DTaP-IPV と Hib の T-td の力価は 853 U/mL と 328 U/mL であったが、これらを混合した場合の力価は 3,091 U/mL と DTaP-IPV に比較して 3.6 倍高かった。Hib 単独の T-td の力価は国内 DTaP と比較しても高く、また、混合により DTaP-IPV の力価の増強も認められた。[福田靖、小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

### ・ボツリヌス

1 .ボツリヌス神経毒素の品質の管理方法と抗体の検出法の開発

毒素連続投与後に効果が得られない原因には、抗毒素抗体の誘導が考えられる。現在、治療中の3患者の血清中の抗毒素量をマウス皮下注射法で試みた。3患者中1名は測定限界以下の<0.003 単位以下であったが、他2名では、それぞれ0.01 単位および0.006 単位前後が確認された。また、毒素をウサギ、モルモットおよびラットに各々5, 2.5, 1.25, 0.63 マウス ipLD<sub>50</sub>の4用量を筋肉内注射して経時的に複合筋活動電位を測定した結果、毒素用量と反応の強さが相関することを確認した。今後、ヒトへの連続注射による抗体産生のモデル動物の確立を目指す。[高橋元秀、石田説而 (HS 総合研究事業)]

### ・全般、抗毒素

1 .フロキュラシオン検出系の改良

トキソイドの抗原量(Lf)測定に広く用いられているフ

ロキュラシオン法は、微視的な抗原抗体複合体の生成を指標とする測定法である。検出には肉眼による観察が用いられているが、より客観的な検出方法の開発による測定精度の向上が望まれる。我々はレーザー粒径測定型血小板凝集計(興和(株)製)を応用し、径9μm以上の抗原抗体複合体の検出を試みたところ肉眼観察よりも早く複合体を検出することができ、測定結果からは肉眼測定とよく一致する抗原量が得られた。また、統計学的な解析により、肉眼測定よりも少ない測定回数で十分高精度の測定結果が得られることが示唆された。肉眼測定の代替法となりうる可能性が期待される。[岩城正昭、堀内善信、小宮貴子、福田靖、高橋元秀]

2 .ボツリヌス毒素に対するヒト化(型)抗体の作出

「マウス抗毒素モノクローナル抗体のヒト化」及び「免疫ヒトリンパ球からヒト型中和抗体作製」の2法に集中して有効な抗体を作製し、両方法ともに中和能を有する数種の抗体が得られている。また、ジフテリア毒素に対するヒト中和抗体のエピトープの主要なものは、細胞結合活性のあるGTBに存在するが、酵素活性のあるGTAにも中和エピトープが存在することが証明された。しかし、モノクローンで十分な中和能が得られていないため、ボツリヌス、ジフテリアとともに、複数のモノクローナル抗体を組み合わせることによって、現行のウマ抗毒素製剤に代替しうる有効で、安全なヒト抗体の調製を計る。

[高橋元秀、佐々木次雄、岩城正昭:感染研、野崎周英:(財)化血研、向本雅郁:大阪府立大学、黒澤良和:藤田保健衛生大学、千葉 丈:東京理科大[医薬品等医療技術リスク評価研究事業]]

### ・BCG・ツベルクリン及び結核免疫に関する研究

1 .rBCG ワクチン免疫モルモットの抗結核免疫長期持続性

抗原ファミリーを過剰発現するrBCGで免疫したモルモットの結核菌噴霧感染5週後の初期結核防御能は、親株BCGに比べ高く、さらにAg85A,Ag85BおよびMPB51の3種類の抗原を同時発現させたrBCG-BA51は、それぞれ単独の抗原を発現するrBCGよりもさらに強い抗結核防御効果が認められた。一方、それらrBCGの免疫の長期持続性を調べるためrBCG 10<sup>3</sup>個を接種し

## 細菌第二部

たモルモットに結核菌 H37Rv を噴霧感染装置内で気道感染させ、各群間の体重変化、生存日数を 130 週以上にわたり比較したところ、rBCG-Ag85A はベクターコントロールの rBCG-pNN2 とほぼ同様の生存日数であったが、他の rBCG-Ag85B、rBCG-BA51、rBCG-MPB51 はいずれもコントロールより生存日数が短いことが認められた。〔Brandt,L., Lasco,T., Izzo,A.,Orme,I.(CSU), Yamamoto,T., McMurray,D.N.(TAMU),大原直也、山田毅(長崎大歯)、山本三郎〕

### 2 . 肉芽腫形成における MyD88 の機能解析

結核菌感染において肉芽腫形成は病態の進展、免疫の成立に重要である。MyD88<sup>-/-</sup>マウス (KO) と MyD88<sup>+/+</sup>マウス(Wild)の尾静脈にザイモサン A (0.1 mg) を投与した後、経時的に肝臓を採取し、組織学的並びに SYBR-Green 法による Real-time PCR 法を用いた解析を行った。1mm<sup>2</sup> あたりの肉芽腫数は、極期で差はほとんど認められなかったが、KO ではザイモサン投与 3 日後に、Wild では 5 日後にピークが認められた。平均面積は KO においてやや小さい傾向が認められた。mRNA の発現は、TNF $\alpha$  や MCP-1 の発現は KO で減弱していたが、IFN $\gamma$  や iNOS の発現は KO で増強していた。また、TLR2 の発現に殆ど差は認められなかったが、Dectin-1 は KO において強く発現していた。これらの結果から MyD88 が欠損していても Dectin-1 を介する MyD88 非依存性の経路が炎症性サイトカインを誘導するため、KO と Wild の肉芽腫の形成に大きな差が認められなかったと考えられる。〔高塚尚和(福井大医) 山本三郎〕

### 3 . BCG の RD16 クローンに関する研究

#### (1) 遅延型アレルギー誘導能

BCG Tokyo 株において RD16 領域の PCR 産物が 379bp または 401bp であるクローン株 BCG-I と BCG-II について、モルモットに対する遅延型アレルギー誘導能を検討した。それぞれの BCG クローン 0.1 mg または 0.0001 mg をモルモットに皮下免疫し、6 週後に PPD を皮内接種して 24 時間後の皮膚硬結を遅延型アレルギーとして測定したところ、0.1 mg の免疫ではいずれの BCG も遅延型アレルギー誘導能に差異はなかったが、0.0001 mg 接種では BCG-I に比べ BCG-II の誘導能は著

しく減弱することが認められ、I 株と II 株の増殖能の差異が示唆された。〔山本三郎、柴山恵吾、持田恵子 ; 芳賀伸治、山崎利雄 (細菌第一部)〕

#### (2) RD16 クローンの定量法の確立

BCG Tokyo 株に含まれる 2 種類の亜株について、Real Time PCR によりそれぞれを定量する系を確立した。〔柴山恵吾、持田恵子、山本三郎〕

### 4 . 結核菌、その他の抗酸菌の病原性に関する研究

BCG、結核菌の  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) について、その病原性への関与について検討を行った。今後遺伝子のクローニング、蛋白の発現精製、機能解析を行う予定である。〔柴山恵吾、石川暁志、荒川宜親〕

### 5 . モルモット脾臓および肺の BCG 増殖阻止因子に関する研究

BCG 免疫モルモットにおける BCG の増殖能を調べるため、モルモット足静脈内に BCG 生菌を接種し 1 週間後の脾臓および肺の生菌数を還元培養により求めた。臓器重量に対し、10 倍の水で希釈した懸濁液を培養した培地からは全く BCG のコロニーが認められなかったが、100 倍以上希釈した臓器懸濁液からは BCG が生育するという、通常の Dose-Response とは逆の結果が得られた。このことは、脾臓および肺臓器中に BCG のコロニー形成を阻害する因子が存在することを意味する。BCG 増殖阻止因子について、他の実験系を計画・検討中である。〔持田恵子、荒川宜親〕

### 6 . BCG ワクチンの副反応についての報告

乳幼児に接種された BCG ワクチンによる重篤な副反応例 (10 報)、膀胱癌患者の再発防止目的で膀胱内注入された BCG ワクチンによる副反応例 (8 報)、臓器移植が原因で発症した結核症例 (6 報) について文献を抄読し、今後の対策についての提言を行った。BCG は生ワクチンであるため、たとえ弱毒菌であっても免疫不全宿主においては菌増殖による敗血症を、逆に過敏反応を呈する宿主においては関節炎、間質性肺炎等の自己免疫反応を生じる場合があるので、十分なフォローアップが必要である。特に、膀胱癌治療に用いる BCG の菌量はワク



## 細菌第二部

チンとは比較にならないほど多量であるために、過剰投与が原因と思われる副反応の出現率が高い。今後、安全な投与量や副反応が生じにくい製剤の開発に関する検討が必要である。[持田恵子、荒川宜親]

### 7. *Mycobacterium smegmatis* の細胞壁の性状に影響を与える遺伝子の探索

抗酸菌は強固な脂質細胞壁を有する。通常、*M. smegmatis* ATCC607 のコロニーは Rough 型であるが、今回、ランダム変異株を作製することにより、一部 Smooth 型が得られたので、それについて報告する。*M. smegmatis* ATCC607 のランダム変異株の作製には、パスツールより分与された、Tn5367 トランスポゾンを用いて行った。約 20,000 の変異株を得たが、そのうち 5 株が Smooth 型であった。そのうち 2 株についてトランスポゾンの挿入位置を決定し、相同検索により、*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 株の MSMEG1042 および、MSMEG6056 であることが判明した。MSMEG6056 に関してベクタープラスミド pvv16 を用いて相補株、*M. smegmatis* ATCC607 MSMEG6056/pvv16 MSMEG6056 を作製したところ、コロニーの性状が Rough 型に復帰した。現在この遺伝子を解析中である。[石川暁志、小澤良之、荒川宜親]

### 8. 北西太平洋ミンククジラ及び沿岸アザラシのブルセラ症・結核症に関する研究

われわれの太平洋ミンククジラ由来ブルセラ菌 DNA の解析より、これまでの知られているブルセラ菌とは配列の異なる遺伝子を有することが明らかにされた。ブルセラ菌 *omp2* 遺伝子は 2 つの sister gene、*omp2a*、*omp2b* から構成されており、昨年度は Neighbor-joining (NJ)法、ならびに Maximum parsimony (MP)法により系統解析を行った。今年度は、Maximum likelihood (ML)法による系統樹の構築を試み、NJ, MP 法と同様のパターンが得られた。さらに、*omp2* 遺伝子のより詳細な解析と既知のブルセラ菌との比較を行なった。その結果、ブルセラ菌のこの遺伝子はモザイク構造を有していることが明らかになった。最初の 174 塩基までは、すべてのブルセラ菌でよく保存されていたが、それに続く領域では、太平洋ミンククジラ由来ブルセラ菌の *omp2a*、

*omp2b* では、特徴的な 5 つのモチーフ (M1-M5) が認められた。5' 側の 2 つのモチーフ (M1 と M2) は海棲哺乳類由来株にのみ見い出された。346 塩基以降の領域において、太平洋クジラ株の *omp2a* と *omp2b* は、*B. melitensis* 16M 株のそれぞれの遺伝子とほとんど同一であった。太平洋クジラ株と *B. melitensis* の 2 つの *omp2* 遺伝子の大きな差異はモチーフの存在であるが、これらの差異は、疎水性のパターンに大きな変化をもたらさず、太平洋クジラ株と *B. melitensis* では、*omp2* 遺伝子のコードするポーリン蛋白質の機能に大きな差はないと考えられる。一方、沿岸アザラシ 4 6 頭についてこれらの血清中結核菌アラビノマンナンをマイコドット法により調べたが、いずれの検体も陰性であった。[大石和恵<sup>1,2</sup>、山本三郎<sup>1</sup>、後藤義孝<sup>3</sup>、坂東武治<sup>4</sup> (1: 感染研, 2: 海洋研究開発機構, 3: 宮崎大農, 4: 鯨類研)]

### ・百日咳菌に関する研究

#### 1. 百日咳抗原変異株のプロテオーム解析

世界的に百日咳菌の流行株はワクチン型から抗原変異型への入れ替えが生じている。そこで抗原変異株の出現を考察するため、変異株に特異的な蛋白質の同定を行った。プロテオミクスによる網羅的発現解析の結果、抗原変異株に 7 種の蛋白スポットの違いを見出し、パータクチン (Prn) を含む 5 種の蛋白質を同定した。シークエンス解析により Prn と hypothetical protein BP0500 に遺伝子の変異を確認し、BP0500 では終止コドン直下に点変異を認めた。一方、Prn の変異は既報のものとは一致したが、抗原変異株の Prn 発現量はワクチン型よりも高いことが指摘された。[蒲地一成、佐々木裕子、堀内善信、荒川宜親]

#### 2. わが国の小児科担当医療従事者を対象とした百日咳菌の感染リスク評価

小児科担当医療従事者から乳幼児への百日咳菌の感染リスクを評価するために、小児科医療従事者 (12 施設、49 名) を対象に百日咳抗体の保有調査を実施した。血清診断により 1 名に感染の可能性が強く疑われたが、百日咳菌を分離することはできなかった。また、百日咳患者と接触した医療従事者は 16 名 (33%) 存在したが、百日咳を発症した者はいなかった。本調査から、小児科医

療従事者が百日咳菌の保菌者となる可能性は低く、乳幼児に対する感染リスクは小さいものと評価できた。[ 都健康安全セ、秋田衛研、千葉衛研、三重保環研、福岡保環研、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信 ]

### ・生物学的製剤の品質管理に関する研究

#### 1. DPT ワクチンに関する研究

(1) DTaP ワクチン追加接種時の局所反応原性に対する動物モデルの評価

当研究室で開発した DTaP ワクチンあるいは DT トキソイド追加接種時の局所反応に対する初回 DTaP ワクチンの感作能評価動物実験モデルについて、細胞によるサイトカイン産生を指標とした感作機構解析を試みた。百日咳毒素の用量を変えてマウスに1ヶ月間隔で免疫し、2週後にジフテリアトキソイドを足跡に投与する直前、投与後6、12、24時間後の動物の脾臓細胞を採取し、ジフテリアトキソイドによる炎症性サイトカインを測定した。その結果、百日咳毒素量による明確な相違はみられなかった。さらに詳細な検討が必要である。[ 山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信 ]

(2) IPV および DTaP-IPV の安全性評価

海外製市販 DTaP および DTaP-IPV 並びに国内の DTaP および DTaP-IPV 試作品について、生物学的製剤基準に基づく精製百日咳ワクチン毒性試験とマウス、ウサギを用いた局所反応原性に関する比較・評価を行った。毒性試験法ではマウス白血球増加およびマウスヒスタミン増感試験では、いずれのワクチンも差はみられなかったが、マウス体重減少毒性の強いものがあつた。エンドトキシン試験では海外の DTaP で、反応を強く阻害するワクチンがあつた。また IPV は国産、海外を問わず DTaP の局所反応原性への影響は示さなかつた。しかし国産と海外の DTaP では、接種局所での炎症反応の程度に顕著な差がみられ、新規ワクチンの評価の際に安全性評価の確立している既存の同種製剤との実験モデルを用いた比較が有効な方法であると考えられた。[ 片岡紀代、山本明彦、永田典代、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、荒川宜親、倉田 毅、堀内善信 ]

(3) 海外製沈降精製 DPT ワクチン中のエンドトキシ

ン量の評価法に関する研究

生物学的製剤基準が平成16年に改正され、DTaP ワクチンにエンドトキシン試験が適用されることになった。しかし海外製の DTaP ワクチンには添加したエンドトキシンのリムルス活性を強く阻害し、リムルス試験の適用が困難な製剤が認められた。そこで強い阻害作用を示す海外 DTaP ワクチン中のエンドトキシンを、LAL 試験により測定可能にするための前処理法の確立を試みた。[ 落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信 ]

(4) 参照百日咳ワクチン(毒性試験用)の更新に関する検討

WHO ガイドラインをはじめヨーロッパ薬局方において、マウスヒスタミン増感試験の標準品として百日咳毒素が整備されたことから、国内参照品についても現行の全菌体ワクチンから精製百日咳毒素に置き換えが可能であるか基礎的な検討を行った。その結果、マウス白血球数増加試験及びマウスヒスタミン増感試験のいずれの試験においても、精製百日咳毒素は、現行毒性参照品に比較して試験回毎の変動が大きく、現在のところ次期毒性参照品としては全菌体ワクチンが適当であると考えられた。今後毒性参照品として精製百日咳毒素を用いるためには、試験の再現性を改善する検討が必要である。[ 落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信 ]

#### 2. その他のワクチンに関する研究

(1) インフルエンザ b 型菌(Hib)ワクチン中のエンドトキシンに関する研究

破傷風トキソイドをキャリアーとした Hib ワクチンを輸入し、混入エンドトキシンを評価した。リムルス試験の結果、ワクチン中の LAL 活性は、ロットにより約 1~200 EU/dose と幅広いばらつきを示した。その生物活性をヒト末梢血と相同のエンドトキシン反応性を有する 28SC 細胞を用いて評価した。その際活性を日本薬局方標準エンドトキシンと相対比較した。その結果、Hib ワクチンはリムルス試験同様、ヒト由来 28SC 細胞でも強い IL-6 産生誘導を示したが、その比活性は日本薬局方標準エンドトキシンに比べて弱い事が示唆された。[ 山本明

彦、落合雅樹、片岡紀代、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信]

(2) インフルエンザ HA ワクチンのマウス白血球数減少試験に関する研究

マウス白血球数減少活性と、ワクチン中の総蛋白量及びワクチン株の関係について 2004/05 シーズンインフルエンザワクチン原液 (A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Wyoming/3/2003(H3N2), B/Shanghai/361/2002) を用いて評価したところ、ワクチン中の総蛋白量に依存したマウス白血球数減少活性の増加が認められたが、ワクチン株の違いによる活性の差は認められなかった。[落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、板村繁之(ウイルス第三部)]

3. エンドトキシンに関する研究

(1) 内毒素の in vitro 生物活性測定法の定量的評価

製剤のエンドトキシン汚染に関する安全性管理には、製剤によるエンドトキシン活性増強を考慮に入れる必要がある。アミノグリコシド系、ペニシリン系、カルバペネム系など抗生物質 2 1 種について、ヒトモノサイト由来 2 8 SC 細胞における IL-6 産生誘導を用いて評価した。臨床濃度に希釈した抗生物質とエンドトキシンの段階希釈を同時に細胞培養に加え、1 8 時間後に ELISA により培養上清の IL-6 を定量した。その結果、これらの抗生物質のうちアミノグリコシド系抗生物質はエンドトキシンによる IL-6 産生増強を惹起することが明らかになった。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

(2) ファージディスプレイ法による LPS 結合ペプチド作成の試み

安全性の高い低分子 LPS 親和性ペプチドは、臨床や医薬品製造において有用性が高い。ランダム配列の 1 2 アミノ酸からなるペプチドを発現する *E. coli* ファージライブラリーより、Lipid A 親和性ペプチド発現ファージを単離し、その DNA 配列よりペプチドを作成した。本年度は、5 種類の環状ペプチドのうち 1 種類に、エンドトキシンの LAL 活性および 28SC 細胞での IL-6 誘導活性に対する明らかな中和能が認められた。しかし未だボ

リミキシン B の中和能に比べると弱いものであり、今後さらに強い活性の親和性ペプチドを検索する予定である。

[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、蒲地一成、鈴木政嗣、松本めぐみ、丹羽允(協力研究)、堀内善信]

(3) ウサギ末梢血を用いたエンドトキシン試験に関する研究

生物製剤には凝固性因子製剤のようにエンドトキシン試験適用の困難なものがあり、発熱試験に替わる in vitro 試験法の確立が望まれる。ウサギ末梢血でのプロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生誘導を利用した新規の in vitro エンドトキシン試験及びウサギ発熱試験について、ウサギの個体差による影響を比較・評価した。その結果、ウサギ個体毎のプロスタグランジン E<sub>2</sub> 産生量と発熱反応は相関する傾向が認められた。ウサギ発熱試験ではこうしたウサギの個体差が直接影響してしまう。しかしウサギ末梢血を用いたエンドトキシン試験では、同一個体からの末梢血を用いた測定値により検体の活性を標準品に対する相対活性として算出するため、ウサギの反応性に関する個体差の影響を受けず、高精度の測定が可能であった。

[落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、山本明彦、蒲地一成、堀内善信]

(4) 日本薬局方エンドトキシン標準品力価検定に用いる試薬のバリデーションに関する研究

日本薬局方エンドトキシン標準品力価検定は、代表的な 3 種類のリムルス試薬による結果を用いて行われてきた。力価はすべての結果の加重平均値として標定される。従って用いる各試薬のエンドトキシン反応性、特に WHO 標準品と日本薬局方標準品に対する反応性が、常に変化しないことが重要である。今回 1 種類の試薬が、原料の採取場所を変更したことで、かつての試薬と反応性が異なっていることが判明した。そこで今後、同様の製造法の変更があった場合に、試薬性能の均質性を確認する方法を検討した。様々な種類の市販精製エンドトキシン標品に対する反応性を比較することで、完全に一致する場合、両試薬の結果は、傾き 1.0、切片がほぼ 0 に近似の関係式となる。この関係を利用して、高精度のバリデーション法を確立した。[片岡紀代、山本明彦、落合雅樹、豊泉裕美、蒲地一成、堀内善信]

## レファレンス業務

### ・臨床分離株の遺伝子検査レファレンス

#### 1. 臨床分離株の耐性遺伝子に関する検査

全国の医療機関より薬剤耐性菌の PCR 法による、β-ラクタマーゼ遺伝子解析依頼を受けた。解析結果は、主に IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌や CTX-M 型-β-ラクタマーゼ産生菌であった。また、ディスク拡散法も同時に行い、検査室で簡便に行える β-ラクタマーゼ産生菌の推定法として報告した。[柴田尚宏、横川滋子、荒川宜親]

#### 2. バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) に関する検査

VRE の遺伝子検査のためのレファレンス菌株譲渡と、PCR 方法および菌株保存等の指導を静岡県環境衛生科学研究所に対して行った。[加藤はる]

### ・会議出席等

1. 第 25 回衛生微生物技術協議会研究会において、ジフテリア百日せきレファレンスセンター会議に出席した (さいたま市：平成 16 年 7 月 8-9 日)

2. WHO 共催の DIPNET 2004 meeting (ELWGD: European Laboratory Working Group on Diphtheria を全世界規模に拡張)に出席し、日本のジフテリアレファレンスラボとして登録された。[岩城正昭(コペンハーゲン、平成 16 年 6 月 16-18 日)]

## サーベイランス業務

### ・院内感染対策に関する研究

#### 1. 院内感染サーベイランスに関する研究

200 床以下の中小規模病院を対象とした有効な院内感染対策サーベイランス手法の開発研究を実施している。2004 年度より協力医療機関の細菌検査室の情報を開発した手法に基づいて解析を実施し、その結果を医療機関に毎月還元している。これまで MRSA を中心とした院内感染疑い事例などを探知し、対策などに関して助言を行ってきた。[鈴木里和、山根一和]

2. 多剤耐性 *Enterobacter cloacae* による院内感染事例の疫学調査

多剤耐性 *Enterobacter cloacae* による院内感染が発生した医療施設との共同研究をおこなった。事例は血液内科病棟で発生しており、疫学調査の結果病棟の大部屋に入院している患者に多く分離されていた。その原因として医療スタッフ、患者、患者家族の感染予防対策の不備が考えられた。[山根一和、鈴木里和、甲斐久美子、荒川宜親]

#### 3. 院内感染事例の疫学調査

医療機関で発生した院内感染事例について、その感染源、感染経路および対応策に関する調査、助言を行っている。本年度は広島県および岐阜県の医療機関より *Enterobacter cloacae*, *Bacillus* spp.による院内感染事例に関しての調査研究依頼があり、現地調査を含め情報の収集および解析を実施し、院内感染対策への助言を行った。[鈴木里和、山根一和]

#### 4. 院内感染事例の分子疫学

医療機関で院内感染が発生した際に、原因となる菌の遺伝子タイピング (PFGE) を実施し、感染源感染経路の解明に協力している。本年度実施した菌は主にバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、メチシリン耐性黄色ぶどう球菌 (MRSA)、緑膿菌、大腸菌などである。[鈴木里和、山根一和、加藤はる、柴田尚宏]

### ・感染症流行予測事業

1. 平成 15 年度の感染症流行予測事業でジフテリアの抗体保有調査が行われ、以下のように結果を総括した。2003 年 7~10 月の間に 8 都道府県で 1120 名を対象として、血清中のジフテリア抗毒素を培養細胞法で測定した (対象年齢を 50 歳以上まで拡大)。生後 3 ヶ月からの DTaP、11~12 歳での DT の接種により、広い範囲の年齢層に抗毒素価が認められた。年齢群別に見るとワクチン接種直後の 1~4 歳から 20~24 歳までの 60%以上、25~29 歳での落ち込みがあるものの 40~44 歳までは 40%以上が発症防御レベルの抗毒素価を有していた。その後 45~49 歳で 10%以下へと急激に落ち込み、以後、年齢が上がるにしたがって再び増加した。[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

2. 平成 15 年度の感染症流行予測事業で破傷風の抗体調査が行われ、以下のように結果を総括した。2003 年 7 ~ 10 月の間に 8 都道府県で 1448 名を対象として破傷風に対する抗毒素の保有状況を解析した結果、破傷風の発症防御レベル (0.01 IU/ml) 以上の抗毒素陽性率は 0 歳では 80.6%であった。1 歳から 4 歳では陽性率は 92.5 ~ 98.7%に達し、24 歳までは 90%以上と高く維持されていた。その後、陽性率は低下し、30 代後半から急激に低下した。40 代及び 50 代前半の年齢層では平均 25%前後に推移し、50 代後半以降の年齢群では約 10%と極めて低値であった。以上の結果と、近年報告される破傷風患者は、多くが 40 歳以上の中高齢者であることを考え併せると、患者数の減少を期待するためには、30 代後半以降の成人への破傷風トキソイドを接種する方策が必要である。[ 福田靖、岩城正昭、高橋元秀 ]

## 品質管理に関する業務

### 1. 抗生物質医薬品の品質管理に関する研究

#### 1. 抗生物質医薬品標準品の日本薬局方微生物学的力価試験法での品質評価に関する業務研究

日本薬局方抗生物質標準品について、日局各条(原薬)掲載の円筒平板法による微生物学的力価試験法 (Bioassay) に準拠した定量法による品質評価試験を行った。今年度中に 19 品目の評価が完了し新規ロット標準品の交付を開始した。[ 加藤はる、鈴木里和、南條友子、山根一和、柴田尚宏、粕谷裕子、近田俊文 ]

#### 2. 抗生物質医薬品標準品の日本薬局方液体クロマトグラム法での品質評価に関する業務研究

日本薬局方抗生物質標準品について、日局各条(原薬)掲載の液体クロマトグラム法 (HPLC) に準拠した定量法による品質評価試験を行った。今年度中に 16 品目の評価が完了し新規ロット標準品の交付を開始した。更に、日局の吸光度法及びヨウ素滴定法での定量法の品質評価試験も各々 1 品目の評価が完了し新規ロット標準品の交付を開始した。[ 柴田尚宏、山根一和、鈴木里和、加藤はる、南條友子、粕谷裕子、近田俊文 ]

#### 3. 抗生物質の微生物学的力価試験法の改良に関する研究

日局の一般試験法「抗生物質の微生物学的力価試験法」を実施する上で有用なデータ並びに改良点を提供することを目的に、試験菌液及び試験芽胞液の調製について、各試験菌 (芽胞) 液濃度の客観的な数値化を目指した予備的な検討を行った。更に、力価試験法の円筒平板法と穿孔平板法の比較について、抗生物質溶液濃度に対する阻止円直径との関係についての統計学的な検討も行った。その結果、日局試験法を今後改良あるいは改正する際に必要な試験菌株 7 種類並びに標準品 25 品目についての基礎データが得られた。本研究の一部は「平成 16 年度 : 日本薬局方の試験法に関する研究 (日本公定書協会)」の研究事業費で行われた。[ 近田俊文、南條友子、加藤はる、鈴木里和、柴田尚宏、山根一和、粕谷裕子 ]

#### 4. 抗生物質の日本薬局方標準品の整備に関する業務研究

一昨年度から、日本薬局方抗生物質標準品のより良い整備を目的に、それら種々の整備システムの改良、改善を実施してきた。今年度までに第 14 改正日局抗生物質標準品 (全 137 品目収録) は 104 品目が新ロットとして整備された。なお、日本薬局方抗生物質標準品の在庫とその準備状況についての諸情報は、厚生労働省審査管理課、製薬企業団体 (東京医薬品工業協会、大阪医薬品協会、日本抗生物質学術協議会) にも順次提供した。[ 近田俊文、柴田尚宏、加藤はる、山根一和、鈴木里和、南條友子、粕谷裕子 ]

#### 5. 収去検査による抗生物質医薬品の品質管理研究

平成 16 年度の医薬品等一斉監視指導での収去検査は、抗生物質医薬品の経口剤 (ジョサマイシン : 1 ロット、プロピオン酸ジョサマイシン : 1 ロット) について力価試験、確認試験 (IR 及び NMR 解析) を、注射剤 (硫酸ネチルマイシン : 3 ロット、セフトリアキソンナトリウム : 10 ロット) について力価試験、確認試験 (IR 及び NMR 解析)、エンドトキシン試験、無菌試験を行い検査結果を報告した。なお、収去製剤の全ての試験で「適合」と判定された。[ 近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、山根一和、鈴木里和、南條友子、粕谷裕子、第二室、第五室、血液・安全性研究部第三室 ]

細菌第二部

6. 特別審査による抗生物質医薬品の品質管理研究

三郎、持田恵子、柴山恵吾、小澤良之、井口由美子]

前年度に受け付けた特別審査1件のドリベネム水和物(原薬、点滴用、皮内反応検査薬、標準品)について、製造承認申請書の品質管理試験法の精査後、申請された方法で確認試験(紫外吸収スペクトル、赤外紫外吸収スペクトル)、旋光度、純度試験(パラジウム、類縁物質、類縁物質)、水分、エンドトキシン、無菌試験、定量法、定量法(含量均一性試験)等を行った結果、総合的に「適合」と判定された。[近田俊文、山根一和、鈴木里和、柴田尚宏、加藤はる、南條友子、粕谷裕子、第二室、第五室、血液・安全性研究部第三室]

国家検定、国家検査、収去検査、特別審査、依頼試験等の実績

1. 国家検定の実績

(1) 生物学的製剤(無菌試験)

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	61	61	0	0	0
5	60	60	0	0	0
6	68	68	0	0	0
7	54	54	0	0	0
8	53	53	0	0	0
9	198	198	0	0	0
10	87	87	0	0	0
11	56	56	0	0	0
12	48	48	0	0	0
1	60	60	0	0	0
2	32	32	0	0	0
3	98	98	0	0	0
計	875	875	0	0	0

7. 注射用シナシッドの品質管理研究

承認書の力価試験(比濁法)が第三者機関で再現されていない注射用シナシッド(キヌプリスチン/ダルホプリスチン)について、厚生労働省審査管理課、医薬品医療機器総合機構、感染研、アベンティスファーマ株式会社の関係担当者による打合せ会が行われ、これまでの経緯の説明と確認並びに今後の方針が決定された。感染研では、承認事項が一部変更された後に力価試験(比濁法)を実施し再度確認することになったが、その実地試験の前に、一部変更承認書並びに自家試験データ等の内容を詳細に検討することとなった。今年度は照会事項の提出とその回答のやり取りを行っている。[近田俊文、加藤はる、鈴木里和、柴田尚宏、山根一和、荒川宜親、倉田毅(所長)]

(2) マイコプラズマ否定試験(無菌試験)

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	0	0	0	0	0
5	1	1	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	1	1	0	0	0
8	1	1	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
計	3	3	0	0	0

8. 乾燥 BCG 製剤及び精製ツベルクリン製剤の品質管理

平成16年度に実施したBCGワクチン13ロット及び膀胱内用BCG(日本株)5ロット計18ロットの定量培養による力価試験成績は  $49.6 \pm 13.5 \times 10^6$  CFU/mg(昨年は  $41.2 \pm 9.6 \times 10^6$  CFU/mg)であった。膀胱内用BCG(コンノート株)8ロットの力価試験成績は  $6.21 \pm 1.86 \times 10^6$  CFU/mg(昨年は  $6.2 \pm 2.3 \times 10^6$  CFU/mg)であった。浮遊菌液1mg/mlのODによる菌量測定試験は  $0.120 \pm 0.015$ (昨年は  $0.120 \pm 0.030$ )であった。精製ツベルクリンは一般診断用20ロット、強反応者用1ロット計35ロットについて力価試験を行った平均値は  $+0.90 \pm 3.12$ (昨年は  $+0.10 \pm 3.24$ )であった。[山本

細菌第二部

(3)	(5)
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン (最終段階)	沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン (小分け製品)
20 ロット	20 件
沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド	血液製剤のエンドトキシン試験
4 ロット	468 件
沈降破傷風トキソイド	生物製剤エンドトキシン試験
9 ロット	7 件
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン に使用するジフテリアトキソイド原液	インフルエンザワクチン マウス白血球数減少試験
6 ロット	74 件
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン に使用する破傷風トキソイド原液	コレラワクチン マウス体重減少試験
4 ロット	1 件
乾燥まむしウマ抗毒素	2. 国家検査(行政検査)の実績
2 ロット	(1)ジフテリア関係(試験担当者:小宮貴子)
乾燥はぶウマ抗毒素	平成 16 年 6 月 23 日付け(行政検査番号第 47016 号)
1 ロット	札幌市保健所からジフテリア診断のため、患者の咽頭ス ワブ、喉頭白苔スワブ、喉頭拭い液塗沫羊血液寒天培地、 ペア血清の検査依頼を受けた。検体からジフテリア菌及 び毒素、毒素遺伝子は検出されず、ペア血清のジフテリ ア抗毒素価も全て検出レベル以下で、抗毒素価の上昇は みられなかった。
(4)	
乾燥 BCG 製剤	40 ロット
内訳	
乾燥 BCG ワクチン(最終製品)	13 ロット
80mg	5 ロット
40mg	2 ロット
12mg	6 ロット
乾燥 BCG 膀胱内用日本株(最終製品)	5 ロット
乾燥 BCG 膀胱内用コンノート株	8 ロット
乾燥 BCG ワクチン(中間段階)	10 ロット
乾燥 BCG 膀胱内用日本株(中間段階)	4 ロット
精製ツベルクリン	35 ロット
内訳	
一般診断用(5µg)	1 ロット
一般診断用(1µg)	2 ロット
一般診断用(一人用)	31 ロット
強反応者用	1 ロット
ウイルスワクチン(結核菌否定試験)	3 ロット
内訳	
乾燥弱毒生風しんワクチン	1 ロット
乾燥弱毒生麻しんワクチン	2 ロット
書類審査	
ユニセフ向け乾燥 BCG ワクチン(皮内用 0.5 mg)	45 ロット
	平成 16 年 9 月 8 日付けで福島県衛生研究所より、臨 床分離菌の破傷風毒素産生試験の依頼を受けた。依頼菌 の培養濾液についてマウスによる毒性確認試験を行なっ た結果、依頼菌が破傷風毒素を産生する事を確認した。
	平成 16 年 9 月 24 日付けで島根県浜田医療センター より、患者血清中の破傷風抗体の検出試験と患者組織か らの破傷風菌の分離・同定試験の依頼を受けた。血清中 からは破傷風抗体は検出できなかった。組織から分離さ れた菌を培養した培養濾液についてマウスによる毒性確 認試験を行なった結果、分離菌が破傷風毒素を産生する 事を確認した。

平成 17 年 1 月 27 日付けで、福山市福山保健所より、  
検体からの破傷風菌の分離・同定試験と患者血清中の破

細菌第二部

傷風抗体と破傷風毒素の検出試験の依頼を受けた。分離菌はマウスによる毒性確認試験を行なった結果、依頼菌が破傷風毒素を産生しないことを確認した。血清中の破傷風抗体価を測定した結果、抗破傷風人免疫グロブリン製剤投与前では0.01 単位 / mL 未満であったが、投与後では1.28 単位 / mL であった。また免疫グロブリン製剤投与前の血清中からは破傷風毒素を検出する事ができなかった。(行政検査番号第 47080 号)

(3) ボツリヌス関係 (試験担当者: 高橋元秀)

平成 17 年 2 月に成田税関支署よりボツリヌス毒素(バイアル)の確認試験依頼があり、マウスによる腹腔内試験法により毒素を定量した結果、ほぼ表示のボツリヌス A 型毒素を含有していることを確認した。

3. 収去検査の実績

(1) 抗生物質医薬品

経口剤 ( ジョサマイシン )	1 ロット
経口剤 ( プロピオン酸 ジョサマイシン )	1 ロット
注射剤 ( 硫酸ネチルマイシン )	3 ロット
注射剤 ( セフトリアキソンナトリウム )	10 ロット

(2) 抗生物質製剤 (無菌試験)

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		適	不適		
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	2	2	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	13	13	0	0	0
計	15	15	0	0	0

(3)

抗生物質エンドトキシン試験 13 件

4. 特別審査の実績

(1) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構の依頼で平成 16 年 7 月 9 日、専門家として生物学的製剤の認可承認に関する対面相談に出席した。[ 高橋元秀 ]

(2) 薬事・食品衛生審議会薬事分科会 動物用医薬品等部会 動物用生物学的製剤調査会の委員等して、年 3~4 回開催される調査会に出席した。[ 高橋元秀 ]

(3) 生物製剤エンドトキシン試験 6 件

5. 標準品、参照品等

(1) 交付実績

日本薬局方抗生物質標準品 76 品目 計 644 本

日本薬局方外医薬品規格第四部常用標準品 1 品目

計 2 本

抗生物質試験用菌株 1 品目 計 1 本

標準ジフテリアトキソイド 4 本

標準沈降ジフテリアトキソイド 18 本

参照沈降ジフテリアトキソイド (混合ワクチン用) 104 本

標準ジフテリア抗毒素 11 本

参照ジフテリア抗毒素 (フロキュラシオン用) 27 本

ジフテリア試験毒素 (ウサギ試験用) 2 本

ジフテリア試験毒素 (モルモット用) 11 本

シック試験毒素 (動物用) 10 本

ジフテリア試験毒素 (培養細胞法用) 5 本

標準破傷風トキソイド 7 本

標準沈降破傷風トキソイド 33 本

参照沈降破傷風トキソイド (混合ワクチン用) 47 本

標準破傷風抗毒素 2 本

標準抗破傷風人免疫グロブリン 2 本

参照破傷風抗毒素 (フロキュラシオン用) 13 本

破傷風試験毒素 17 本

標準はぶ抗毒素 3 本

はぶ試験毒素 (出血) 5 本



## 細菌第二部

はぶ試験毒素(出血)	5本	抗毒素価測定依頼を受けた。
標準まむし抗毒素	8本	
まむし試験毒素(出血)	5本	(3)平成16年8月16日付けで久留米大学病院より、臨床分離菌の破傷風毒素産生試験の依頼を受けた。依頼菌の培養濾液についてマウスによる毒性確認試験を行なった結果、依頼菌が破傷風毒素を産生する事を確認した。(共同研究)
まむし試験毒素(致死)	15本	
標準ボツリヌスA型抗毒素	1本	
標準ガスエソ抗毒素 <i>Cl.perfringens</i> Type A	3本	
標準ガスエソ抗毒素 <i>Cl.septicum</i>	3本	
標準ガスエソ抗毒素 <i>Cl.oedematiens</i>	3本	
標準精製ツベルクリン	50本	(4)平成16年9月3日付けで茨城県衛生研究所より、依頼検体(血液寒天培地・GAM寒天培地)からの破傷風菌の分離・同定試験の依頼を受けた。分離菌の培養濾液についてマウスによる毒性確認試験を行なった結果、分離菌が破傷風毒素を産生しない事を確認した。(共同研究)
BCG Tokyo-172株	24本	
標準百日せきワクチン	81本	
参照百日せきワクチン(毒性試験用)	134本	

### (2) 分与

#### 参照沈降ジフテリアトキソイド(混合ワクチン用)

宮村班共同研究用 中国	2本	(5)平成16年11月10日付けで山梨県衛生公害研究所より、依頼検体(血液寒天培地)からの破傷風菌の分離・同定試験の依頼を受けた。検体から分離された菌についてマウスによる毒性確認試験を行なった結果、分離菌が破傷風毒素を産生する事を確認した。(共同研究)
参照沈降破傷風トキソイド(混合ワクチン用)		
宮村班共同研究用 中国	2本	

### (3) 標準菌株等(分与)

#### *Corynebacterium ulcerans*(ジフテリア毒素産生性)

大阪府立公衆衛生研究所	1本
-------------	----

### (4) 作成

参照用 BCG ワクチン(Tokyo 172-2)	2,000本
---------------------------	--------

## 6. 依頼試験等

(1)平成16年2月25日付け(共同研究の目的)、国保旭中央病院からヒト血清1検体のジフテリア抗毒素価測定依頼を受けた。これは、平成14年に千葉県旭市で発生したジフテリア毒素産生 *Corynebacterium ulcerans* 感染症患者の血中ジフテリア抗毒素価変動を経時観察するためのもので、今までの結果をまとめると、平成14年11月11日0.334 IU/ml、平成14年12月2日1.89 IU/ml、平成15年4月14日2.76 IU/ml、平成15年12月24日1.18 IU/ml、今回の平成16年2月25日は0.920 IU/mlであった。

(2)平成15年8月25日付け(共同研究の目的)、栃木県南食肉衛生検査所からヒト血清9検体のジフテリア

## 国際協力関係業務

### ・研修業務

1.中国上海生物製品研究所 朱威所長ら8名の来所に際して、ジフテリア破傷風トキソイドの品質管理に関する講義をおこなった(村山庁舎：平成16年4月22日)[第3室]

2.JICAの依頼により、ワクチン品質管理技術コース参加研修生(海外4名)にジフテリア破傷風トキソイドの品質管理について講義した(村山庁舎：平成16年11月1日)[第3室]

3.JICAの依頼により、ワクチン品質管理技術コース参加研修生(海外4名)に無菌性保証について講義した。(村山庁舎：平成16年11月1日)[第2室]

### ・国際協力[第5室]

1.WHO全菌百日せきワクチン基準見直しとガイドライン案作成への参加

## 細菌第二部

2. WHO コラボレーティングセンター活動
3. WHO SEARO の標準品作成および試験技術協力ネットワーク確立のための会議(Bangkok)参加
4. 台湾食品医薬品検検局(BFDA)ワークショップ参加
5. 英国 NIBSC との品質管理における協力
6. 欧州薬局方第 15 委員会での助言
7. 欧州薬局方百日せきワクチン力価試験法検討会議参加

### 研修業務

#### ・ *Clostridium difficile* 関連下痢症 / 腸炎の細菌学的診断の実技指導

1. 細胞培養法による toxin B の検出および培養、タイピングの研修

細胞培養法による糞便検体中の *C. difficile* toxin B 検出を中心とした *C. difficile* の細菌学的検査の実技研修を行った。[加藤はる、吉村由美子、豊川真弘(大阪大学医学部附属病院)、福田砂織(天理よろづ病院)]

2. PCR による毒素遺伝子の検出を中心とした細菌学的検査の研修

PCR による *C. difficile* 毒素遺伝子の検出を中心とした *C. difficile* の細菌学的検査の実技研修を行った。[加藤はる、吉村由美子、加藤宗博(名古屋市立大学臨床機能内科)、矢野久子、脇本寛子(名古屋市大看護学部)]

3. 平成 16 年度希少感染症診断技術研修会において、国内のガス壊疽の発生状況と問題点について講義した(戸山庁舎:平成 17 年 2 月 21 日)[第 3 室]

### その他

#### ・ 行政科学に対する対応、及び研究

1. 日本薬局方に関する活動  
(1) 独立行政法人医薬品医療機器総合機構の専門委員として、日本薬局方の抗生物質委員会及び標準品委員会に参加し、第 14 改正日局の改正案並びに第 15 改正日局の収載案の審議に従事した。[近田俊文]

(2) 生物試験法委員会と製薬用水委員会活動に参加した。生物試験法委員会では、非無菌医薬品試験法の国際

調和作業や微生物迅速計測法の日局導入作業に従事した。製薬用水委員会では、医薬品各条に記載されている製薬用水の見直し、参考情報に新規導入される「製薬用水の品質管理」の作成作業に従事した。[佐々木次雄]

2. 抗生物質医薬品の試験法についての対応

日本薬局方及び旧日本抗生物質医薬品基準に記載された抗生物質医薬品(標準品を含む)の試験法についての質問、相談に対して E-mail 等による書面での回答を行った。[近田俊文]

3. ISO/TC198 活動

WG9 (Aseptic processing of health care products) 国際委員として、今年度は ISO13408-1 (無菌操作法に関する一般要件) の見直し作業に従事した。また、これまで ISO/TC198 から出された医療機器の滅菌及び滅菌保証に関する各種 ISO 規格の解説書作成に従事した。[佐々木次雄]

4. 無菌医薬品製造ガイドライン作成

厚労省監視指導・麻薬対策課からの要請により、国際規格である ISO13408 シリーズ、FDA 無菌ガイドラインや EU-GMP に相当する日本版無菌ガイドラインとして「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針」を作成した。また、本指針の英訳版及び教育用 Power Point の作成にも従事した。[佐々木次雄、佐々木裕子]

5. 超ろ過法によって製された注射用水の品質に関する調査

日局では、超ろ過法による注射用水の製造を認めているが、欧米では認めていない。日本では数社が超ろ過法で製した水を注射剤の仕込み水として使用している。そこで、超ろ過法で製された注射用水の品質を調べ、日本で超ろ過法によって製された注射用水の品質に問題ないことを実証するための研究班活動に従事した。[佐々木次雄、他外部研究班員]

#### ・ 感染症についての対応

1. *Clostridium difficile* 感染症についての対応

*C. difficile* 感染症の検査診断や院内感染を中心に

E-mail や電話等による質問、相談に対して個別に回答した。〔加藤はる〕

## 発表業績一覧

### ・誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Wachino J., Doi Y., Yamane K., Shibata N., Yagi T., Kubota T. and Arakawa Y. : Molecular Characterization of a Cephamycin-Hydrolyzing and Inhibitor-Resistant Class A  $\beta$ -Lactamase, GES-4, Possessing a Single G170S Substitution in the  $\Omega$ -Loop. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 48(8): 2905-2910 August 2004
- 2) Doi Y., Wachino J., Ishiguro M., Kurokawa H., Yamane K., Shibata N., Shibayama K., Yokoyama K., Kato H., Yagi T. and Arakawa Y. : Inhibitor-Sensitive AmpC  $\beta$ -Lactamase Variant Produced by an *Escherichia coli* Clinical Isolate Resistant to Oxyiminocephalosporins and Cephamycins. *Antimicrobial Agents Chemother* 48(7):2652-2658 July 2004.
- 3) Wachino J., Doi Y., Yamane K., Shibata N., Yagi T., Kubota T., Ito H. and Arakawa Y. : Nosocomial Spread of Ceftazidime-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing a Novel Class A  $\beta$ -Lactamase, GES-3, in a Neonatal Intensive Care Unit in Japan. *Antimicrobial Agents Chemother.* 48(6): 1960-1967 June 2004
- 4) Doi Y., Wachino J., Yamane K., Shibata N., Yagi T., Shibayama K., Kato H. and Arakawa Y. : Spread of Novel Aminoglycoside Resistance Gene *aac(6')*-Iad among *Acinetobacter* Clinical Isolates in Japan. *Antimicrobial Agents Chemother.* ; 48(6): 2075-2080. June 2004
- 5) Arakawa Y., Ike Y. and Nagasawa M. : Where has vancomycin-heterogeneously resistant *Staphylococcus aureus* gone? *The Lancet*, Volume 363, Issue 9418, 24 April 2004
- 6) Kato H., Yokoyama T. and Arakawa Y. : Typing by sequencing the *slpA* gene of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan. *J. Medical Microbiology.* 54:167-171. 2005
- 7) Yamane K., Doi Y., Yokoyama K., Yagi T., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Kato H. and Arakawa Y. : Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents Chemother*, 48(6): 2069-2074, June 2004
- 8) Kanai K., Shibayama K., Suzuki S., Wachino J. and Arakawa Y. : Growth Competition of Macrolide-Resistant and  $\beta$ -Susceptible *Helicobacter pylori* Strains. *Microbiology and Immunology*, 48(12): 977-980, 2004
- 9) Kodama A., Kamachi K., Horiuchi Y., Konda T. and Arakawa Y.: Antigenic divergence suggested by correlation between antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates in Japan. *J. Clinical Microbiology*, 42(12): 5453-5457, 2004
- 10) Matsuoka M. and Sasaki T. : Inactivation of macrolides by producers and pathogens. *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 2004; 4 (3): 217-240
- 11) Matsuoka M., Narita M., Okazaki N., Ohya H., Yamazaki T., Ouchi K., Suzuki I., Andoh T., Kenri T., Sasaki Y., Horino A., Shintani M., Arakawa Y. and Sasaki T. : Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48 (12): 4624-4630
- 12) Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y., Sasaki T., Miyata M. : Use of fluorescent-protein tagging to determine the subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins encoded by the cytoadherence regulatory locus. *J. Bacteriol.* 2004, 186, 6944-55
- 13) Seto S., Kenri T., Tomiyama T., Miyata M. : Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions. *J. Bacteriol.* 2005, 187, 1875-1877.
- 14) Sasaki Y., Shinkai-Ouchi F., Yamakawa Y., Kenri T., Horino A. and Sasaki T. : Analysis of *Mycoplasma penetrans* by using proteomics: development of new ELISA system for diagnosis. *Proceeding of the 1st AOM meeting and the 31st JSM meeting.* 23-25
- 15) Horino A., Kenri T., Sasaki Y., Okamura N. and Sasaki T. : MipR catalysis the promoter inversions in P35 family lipoprotein genes of *M. penetrans*. *Proceeding of the 1st AOM meeting and the 31st JSM meeting.* 42-43
- 16) Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y., Sasaki T., and Miyata M. : Subcellular localization of *Mycoplasma*

## 細菌第二部

- pneumoniae* proteins visualized by fluorescent protein tagging. Proceeding of the 1st AOM meeting and the 31st JSM meeting. 95-96
- 17) Kenri T., Okazaki N., Narita M. and Sasaki T. : Typing analysis of clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae* in Japan. Proceeding of the 1st AOM meeting and the 31st JSM meeting. 97-98
- 18) Isaka M., Komiya T., Takahashi M., Yasuda Y., Taniguchi T., Zhao Y., Matano K., Matsui H., Maeyama J., Morokuma K., Ohkuma K., Goto N. and Tochikubo K. : Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria and tetanus antitoxin antibodies in mice by intranasal administration with diphtheria-pertussis-tetanus(DPT) combination vaccine. *Vaccine* 22. 3061-3068, 2004
- 19) Coplu N., Esen B., Gozalan A., Miyamura K., Yoshida I., Kurtoglu D., Nuvide Ozturk Dogan, Afacan G., Unal A., Ishida S. and Takahashi M. : Tetanus Antibody Assay Combining In-House ELISA and Particle Agglutination Test and Its Serosurvey Application in a Province in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57(3),97-102. 2004
- 20) Fukuda T., Iwaki M., Komiya T., Arakawa Y. and Takahashi M. : Attempt to curtail the observation period of mice in the tetanus vaccine potency tests. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57, 257-259, 2004
- 21) Ohishi K., Takishita K., Kawato M., Zenitani R., Bando T., Fujise Y., Goto Y., Yamamoto S. and Maruyama T. : Molecular evidence of new variant *Brucella* in North Pacific common minke whales. *Microbes and Infection*, 6 1199-1204, 2004.
- 22) Ohishi K., Takishita K., Kawato M., Zenitani R., Bando T., Fujise Y., Goto Y., Yamamoto S. and Maruyama T. : Molecular characterization of *Brucella* from North Pacific common minke whale. *Bridges Across the Ocean, Proceedings of Oceans'04*, pp. 499-504, 2004
- 23) Ohishi K., Takishita K., Kawato M., Zenitani R., Bando T., Fujise Y., Goto Y., Yamamoto S. and Maruyama T. : Chimeric structure of omp2 of *Brucella* from Pacific common minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Microbiology and Immunology* 49, 7889-7893, 2005
- 24) Aoki K., Matsumoto S., Hirayama Y., Wada T., Ozeki Y., Niki M., Domenech P., Umemori K., Yamamoto S., Mineda A., Matsumoto M. and Kobayashi K. : Extracellular Mycobacterial DNA-binding Protein 1 Participates in Mycobacterium-Lung Epithelial Cell Interaction through Hyaluronic Acid. *J. Biological Chemistry*. 279(38): 39798-39806, 2004
- 25) Matsumoto S., Matsumoto M., Umemori K., Ozeki Y., Furugen M., Tatsuo T., Hirayama Y., Yamamoto, S. Yamada T., Kobayashi K. : DNA Augments Antigenicity of Mycobacterial DNA-Binding Protein 1 and Confers Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection in Mice. *J Immunol* 175:441-449, 2005
- 26) Yamamoto A., Sakai T., Ochiai M., Kamachi K., Kataoka M., Toyozumi H. and Horiuchi Y. : Augmenting effect of antibiotics on endotoxin activity may cause a safety problem. *Microbiol. Immunol.* 48, 97-102, 2004.
- 27) Ochiai M., Kataoka M., Toyozumi H., Yamamoto A., Kamachi K., Arakawa Y., Kurata T. and Horiuchi Y. : Endotoxin content in *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57, 58-59, 2004
- 28) Kamachi K., Arakawa Y. : Expression of a C-terminally truncated form of pertussis toxin S1 subunit effectively induces protection against pertussis toxin following DNA-based immunization. *Infection and Immunity*, 72:4293-4296, 2004

## 2. 和文発表

- 1) 佐藤洋子、加藤はる、小岩井健司、酒井力：がんセンターにおける toxin A 陰性 toxin B 陽性 *Clostridium difficile* による下痢症の院内集団発生. *日本感染症学雑誌*, 78(4): 312-319, 2004
- 2) 加藤はる： *Clostridium difficile* 関連下痢症 - 分子疫学と細菌学的検査. *JARMAM*, 14(2): 121-126, 2004
- 3) 沼田昇、吉田菊喜、加藤はる、荒川宜親：環境中の *Clostridium difficile* 汚染の調査法の検討-菌の採取法と分離培地の比較. *日本環境感染学会雑誌*, 19(4): 475-482, 2004
- 4) 横山敏之、加藤はる： *Clostridium difficile* 関連下痢症発症の危険因子と感染についての疫学的検討. *共済工*

## 細菌第二部

グザミナー通信 15 号, 2004

5) 中村功、国広誠子、加藤はる : *Clostridium difficile* 菌血症の 1 例. 日本感染症学雑誌, 78(12):1026-1030, 2004.

6) 清水敬樹、甲嶋洋平、加藤はる、荒川宜親、横手龍、杉田学、三宅康史、清田和也 : 急激な経過をたどり究明し得なかった劇症型 *Clostridium perfringens* 感染症の 1 例. ICU と CCU, 29(1): 63-70, 2005

7) 鈴木里和、武澤純 : ICU における感染管理. CCU と ICU. 28(9): 669-675, 2004

8) 丸山英行、谷本弘一、柴田尚宏、菅野治重、池康嘉、荒川宜親 : 長期血液透析患者より分離されたバンコマイシン高度耐性の VanD 型 *Enterococcus raffinosus*. 日本臨床微生物学雑誌, 14(2), 104-110, 2004

9) 佐々木次雄 : 第 14 改正日本薬局方非無菌医薬品の微生物学的品質特性とその要件、p.65-81、技術情報協会編、2004。

10) 佐々木次雄 : 第 14 改正日本薬局方無菌試験法、p.149-162、技術情報協会編、2004

11) 佐々木次雄 : 日本薬局方 15 局へ向けての新しい考え方、PDA Journal of GMP and Validation in Japan, 6(1): 38-45, 2004.

12) 佐々木次雄 : 滅菌技術、パラメトリックリリースの動向を聞く、Pharm Tech Japan 20: 1999-2000, 2004

13) 佐々木次雄 : 製薬用水の国際調和、今後の展開について、Pharm Tech Japan 20: 2505-2510, 2004

14) 上寺祐之、重松宏、馬場善三、熊田直人、佐々木次雄、滅菌バリデーションのポイント、Infection Control 231-235, 2004

15) 佐々木次雄、那須正夫、坂根健、城野久美子、松原正利、田中憲志、梶原庸生、棚元憲一 : 製薬用水中の微生物評価培地 “R2A 培地” に関する研究、医薬品研究、35 (12): 638-652, 2004

16) 佐々木次雄、久保田真由美、成田光生、荒川宜親 : マクロライド耐性マイコプラズマ感染症に関する研究、Jpn. J. Antibiotics 58 Suppl. A 133-137, 2005

17) 佐々木次雄 : 日本の医療安全規制の現状と医療関係マネジメントシステムの動向について ; ISO/TC198(ヘルスケア製品の滅菌)、JIS ハンドブック、医療安全、835-840, 2005

18) 岩城正昭、山根一和、高橋元秀 : ジフテリア. からの科学増刊 新興再興感染症 岡部信彦編 p196-200. 日本評論社. 2004.5

19) 高橋元秀 : 破傷風トキソイド、ジフテリアトキソイド. (株)近代出版. 臨床と微生物 31(4) p327-332. 2004.7

20) 高橋元秀、小宮貴子 : ジフテリア. (株)医薬ジャーナル社 木村哲、喜田宏編. 人畜共通感染症 p183-186. 2004.8

21) 高橋元秀 : ポツリヌス. 法研. 最新版 家庭医学大全科. 2004.11

22) 岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀 : ジフテリア 感染症の事典 114-116 編集 ; 国立感染症研究所学友会 朝倉書店 2004.12

23) 岩城正昭、高橋元秀 : 乳児ポツリヌス症 感染症の事典 188-190 編集 ; 国立感染症研究所学友会 朝倉書店 2004.12

24) 福田 靖、岩城正昭、高橋元秀 : 破傷風 感染症の事典 196-198 編集 ; 国立感染症研究所学友会 朝倉書店 2004.12

25) 高橋元秀、岩城正昭、荒川宜親 : ポツリヌス症、感染症の診断・治療ガイドライン 2004、160-163、監修 ; 日本医師会感染症危機管理対策室および厚生労働省健康局結核感染症課、2004.12

26) 高橋元秀 : ポツリヌス症、361-365、感染症予防必携 第 2 版 編集者代表 山崎修道、(財)日本公衆衛生協会 2005.1

27) 高橋元秀 : ポツリヌス 116-118、ネオエスカ、感染症・アレルギーと生体防御、編著 倉田 毅、同文書院 2005.3

28) 高橋元秀、岩城正昭. ジフテリアの現状 - 第一回会議 (コペンハーゲン、WHO 欧州事務局) に参加して -. 感染症等情報 World Focus No. 66, 1-4, 2005

29) 山本三郎 : DNA ワクチン、松島綱治他編、予防医学事典、pp.49-50、朝倉書店、2005

30) 高氏留美子、伊保澄子、山本三郎、松木孝澄 : CpG DNA による plasmacytoid 樹状細胞のインターフェロン - 産生におけるシグナル伝達。臨床免疫。42(1):127-133, 2004

31) 山本三郎 : 結核、国立感染症研究所学友会編、感染

## 細菌第二部

症の事典、pp.85-87、朝倉書店、2004

32) 柴山恵吾、荒川宜親： *Helicobacter pylori* 感染と細胞内シグナル伝達、日本細菌学会誌 59(2):415-424, 2004.

33) 柴山恵吾、荒川宜親： *Helicobacter pylori* より新たに見出されたアポトーシス誘導蛋白、 *Helicobacter Research* Vol. 8 no.4: 321-325 2004

34) 山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信： 医薬品のエンドトキシン試験法に関する新視点、 *エンドトキシン研究* 7、209-216、2004

35) 鈴木政嗣、松本めぐみ、落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信 丹羽 充： フェージディスプレイ法によるエンドトキシン研究の新戦略、 *エンドトキシン研究* 7、65-72、2004

36) 片岡紀代、山本明彦、落合雅樹、豊泉裕美、蒲地一成、堀内善信： 「日本薬局方エンドトキシン標準品力価検定に用いる試薬のバリデーションに関する研究」 研究報告、 *医薬品研究*、36(3)、129-135、2003

### ・学会発表

#### 1 . 国際学会

1) Kato H., Arakawa Y. : Typing of *Clostridium difficile* strains causing multiple outbreaks in Japan by sequencing of the S-layer gene. First International *Clostridium difficile* Symposium. May, 2004, Slovenia.

2) Shibata N., Arakawa Y. : Characterization of class 3 integrons mediating metallo-beta-lactamase gene found in *Pseudomonas putida*. 4th Awaji Forum, Aug 31, 2004, Hyogo, Japan

3) Yamane K., Wachino J., Doi Y., Yokoyama K., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Kato H., Yagi T., Kai K., Arakawa Y. : Molecular Typing of 16S rRNA Methylase Genes Among Highly-Aminoglycoside Resistance Gram-Negative Bacilli Isolated in Japanese Hospital. American Society for Microbiology 104th General Meeting, May, 2004, New Orleans, USA

4) Suzuki S., Yoshida H., Sunagawa T., Ohyama T., Taniguchi K., Okabe N., Kamachi K., Arakawa Y. : Investigation of a *Serratia marcescens* outbreak in a neurosurgery unit related

to tube-feeding. American Society for Microbiology 104th General Meeting, 2004, New Orleans, USA

5) Sasaki Y., Shinkai-Ouchi F., Kamakawa Y., Kenri T., Horino A. and Sasaki T. : Analysis of major antigens of *Mycoplasma penetrans* by using proteomics: development of a new ELISA system for diagnosis. Joint Congress of the 1st meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology and the 31st meeting of Japanese Society of Mycoplasmaology. Tokyo, Japan, Sep 30-Oct 2, 2004

6) Sasaki Y., Kawakami T., Nishimura T., Kenri T., Horino A., Arakawa Y. and Sasaki T. : Pyruvate dehydrogenase E2 component as a major antigen of *Mycoplasma penetrans*, a new ELISA system using recombinant PDH-E2. 15th Congress of International Organization for Mycoplasmaology, Athens, Georgia, USA. July 11-16, 2004

7) Sasaki Y., Ishikawa J. and Sasaki T. Why *Mycoplasma penetrans* has relatively larger genome in the pneumoniae group? : a comparative analysis for the eight species in *Mollicutes*. 15th Congress of International Organization for Mycoplasmaology, Athens, Georgia, USA. July 11-16, 2004

8) Kenri T., Okazaki N., Narita M. and Sasaki T. : Type shift of clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae* in Japan. 15th Congress of International Organization of Mycoplasmaology, Athens, Georgia, USA. July 11-16, 2004

9) Kenri T., Seto S., Horino A., Sasasaki Y., Sasaki T. and Miyata M. : Subcellular localization of the proteins encoded in the cytoadherence regulatory locus of *Mycoplasma pneumoniae*. 15th Congress of International Organization of Mycoplasmaology, Athens, Georgia, USA. July 11-16, 2004

10) Horino A., Kenri T., Sasaki Y. and Sasaki T. : Promoter inversions of *p35* homologue lipoprotein family genes of *Mycoplasma penetrans* are regulated by site-specific recombinase. 15th Congress of International Organization of Mycoplasmaology, Athens, Georgia, USA. July 11-16, 2004

11) Horino A., Kenri T., Sasaki Y., Okamura N. and Sasaki T. : MipR catalysis the promoter inversions in P35 family lipoprotein genes of *M. penetrans*. Joint congress of the 1st Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmaology and the 31st Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology, Tokyo, September 30-October 2, 2004

## 細菌第二部

- 12) Kenri T., Seto S., Horino A., Sasaki Y., Sasaki T. and Miyata M. : Subcellular localization of *Mycoplasma pneumoniae* proteins visualized by fluorescent protein tagging. Joint congress of the 1st Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmology and the 31st Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmology, Tokyo, September 30-October 2, 2004
- 13) Kenri T., Okazaki N., Narita M. and Sasaki T. : Typing analysis of clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae* in Japan. Joint congress of the 1st Meeting of the Asian Organization for Mycoplasmology and the 31st Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmology, Tokyo, September 30-October 2, 2004
- 14) Yasuda Y., Isaka M., Zhao Y., Taniguchi T., Matano K., Matsui H., Mizokami M., Komiya T., Takahashi M., Maeyama J., Goto N., Morokuma K., Ohkuma K. and Tochikubo K. : Importance of cholera toxin B subunit as a mucosal adjuvant in induction of protective immunity upon intranasal vaccination with co-administration of diphtheria toxoid, pertussis acellular vaccine and tetanus toxoid or influenza hemagglutinin vaccine. 12th International congress of immunology and 4th annual conference of FOCIS. Montreal, Canada, July 18-23, 2004
- 15) Yasuda Y., Isaka M., Zhao Y., Taniguchi T., Matano K., Matsui H., Mizokami M., Komiya T., Takahashi M., Maeyama J., Goto N., Morokuma K., Ohkuma K. and Tochikubo K. : Mucosal adjuvant of recombinant cholera toxin B subunit on humoral immunity against diphtheria-pertussis-tetanus combination vaccine, hepatitis B vaccine and influenza vaccine. Fourth world congress on vaccines and immunization. Tsukuba Science City/Tokyo, Sep 30 – Oct 3, 2004
- 16) Iwaki M., Komiya T., Hatanaka A., Tsunoda A., Okamoto M., Nakamura A., Ooe K., Arakawa Y. and Takahashi M. : *Corynebacterium ulcerans* infection in Japan. Eighth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria, ELGWD and Diphtheria Surveillance Network (DIPNET). Copenhagen, June 16-18, 2004
- 17) Maeyama J., Isaka M., Yasuda Y., Tochikubo K., Yamamoto S. and Goto N. : Effect of cellular immune responses of recombinant cholera toxin B subunit as a mucosal vaccine adjuvant and its safety evaluation. The 4th World Congress on Vaccines and Immunisation, September 30-October 3, 2004, Tsukuba, Japan.
- 18) Osawa Y., Takauji R., Iho S., Kitagawa H., Takatsuka H., Matsuki T., Fujieda S., Yamamoto S. : Poly G-flanked palindromic CpG DNA Activates STAT1 and NF- $\kappa$ B through the p38 MAPK Pathway to Induce Autocrine IFN- $\alpha/\beta$  Receptor-Independent Production of IFN- $\alpha$ , IP-10, and MIP-1 $\alpha$  in Human Plasmacytoid Dendritic Cells. The 8th Conference of the International Endotoxin Society, Nov. 15-18, 2004, Kyoto, Japan
- 19) Takatsuka H., Yamamoto S., Iho S., Osawa Y., Iida R., Tsubota E., Hemmi H., Akira S., Matsuki, T. : Impaired hepatic granuloma formation with normal host defense in MyD88-deficient mice. The 8th Conference of the International Endotoxin Society, Nov. 15-18, 2004, Kyoto, Japan
- 20) Yamamoto S., Yamamoto T., Lasco T.M., McMurray D.N. : BCG-vaccination modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) production of the cells from guinea pigs infected with experimental pulmonary tuberculosis. The 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 7-10, 2004, Kyoto, Japan.
- 21) Matsumoto S., Aoki K., Hirayama Y., Wada T., Ozeki Y., Niki M., Domenech P., Umemori K., Yamamoto S., Mineda A., Matsumoto M. and Kobayashi K. : Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. The 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, December 7-10, 2004, Kyoto, Japan.
- 22) Ohishi K., Takishita K., Kawato M., Zenitani R., Bando T., Fujise Y., Goto Y., Yamamoto S. and Maruyama T. : Molecular characterization of *Brucella* from North Pacific common minke whale. Oceans'04, November 2004, Kobe.
- 23) Ohishi K., Takishita K., Kawato M., Zenitani R., Bando T., Fujise Y., Goto Y., Yamamoto S. & Maruyama T. New variant of *Brucella* from whales inhabiting western North

## 細菌第二部

Pacific. Wildlife Disease Association International Conference, June-July, 2005, Cairns, Australia

24) Yamamoto, A., Okada, K., Tsuda, B., Kimura, Y., Tanaka, K., Mizuguchi, Y., Kataoka, M., Nagata, N., Ochiai, M., Kmachi, K., Toyozumi, H., Miyazaki, C., Nishima, S., Ueda, K., Arakawa, Y., Kurata T. and Horiuchi Y. : Relationship between severe local reaction for booster doses of Diphtheria Tetanus Acellular pertussis vaccine and residual pertussis toxin activity, 4th world congress on vaccines and immunization, Ibaraki, 2004, 10.

25) Yamamoto A., Ochiai M., Kmachi K., Kataoka M., Toyozumi H., Arakawa Y., Horiuchi Y. : A cell line assay system for predicting the response of human blood to endotoxin, The 8<sup>th</sup> conference of the international endotoxin society, Kyoto, 2004, 11.

26) Ochiai M., Kataoka M., Toyozumi H., Yamamoto A., Kamachi K., Arakawa Y. and Horiuchi Y. : A quantitative in vitro assay for detecting biological activity of endotoxin using rabbit peripheral blood. The 8th Conference of the International Endotoxin Society, November 15-18, 2004, Kyoto, Japan

27) Yamamoto A., Ochiai M., Horiuchi Y., Suzuki M.F., Kobayashi T., Omi H., Takagi T., Niwa M. : Novel LPS-binding cyclic peptides and cytokine-binding peptides. The 8<sup>th</sup> conference of the international endotoxin society, Kyoto, 2004, 11.

28) Yamamoto A., Ochiai M., Horiuchi Y., Suzuki M.F., Matsumoto M., Takagi T., Niwa M. : Phage display method for isolating novel LPS-binding peptides. The 8<sup>th</sup> conference of the international endotoxin society, Kyoto, 2004, 11

### 2 . 国内学会

1) 加藤はる、山根一和、本田芳宏、佐藤洋子、荒川宜親 : *Clostridium difficile* 関連腸炎事例における臨床細菌検査の重要性 . 第 78 回日本感染症学会総会、2004 年 4 月

2) 加藤はる : 検査部における抗菌薬関連腸炎への対応 -*Clostridium difficile* の細菌学的検査、院内感染対策- . 第 7 回近畿耐性菌研究会学術講演会特別講演、2004 年 8 月

3) 加藤はる、荒川宜親、横山敏之 : *slpA* 遺伝子のシー

クエンスによる *Clostridium difficile* のタイピングと臨床検体からの直接タイピングへの応用 . 第 53 回日本感染症学会東日本地方会総会、2004 年 10 月

4) 加藤はる、荒川宜親 : *Clostridium difficile* の *slpA* 遺伝子のシークエンシングによる糞便検体からのダイレクト・タイピング . 第 34 回日本嫌気性菌感染症研究会、2005 年 3 月

5) 福田砂織、小松方、加藤はる、岩崎瑞穂、長坂陽子、阿部教行、山本慶和、松尾収二、荒川宜親 : *Clostridium difficile* toxin A-negative, toxin B-positive 株の分離調査 . 第 34 回日本嫌気性菌感染症研究会、2005 年 3 月

6) 山根一和、和知野純一、鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親 : グラム陰性桿菌にアミノグリコシド高度耐性を付与する 16S rRNA メチレーズの型別と臨床分離株の保有調査 . 第 16 回日本臨床微生物学会総会、2005 年 2 月、京都

7) 和知野純一、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、八木哲也、伊藤秀郎、荒川宜親 : *Klebsiella pneumoniae* より同定されたセファマイシン分解性 GES 型 classA -ラクタマーゼの解析 . 第 77 回日本細菌学会総会、大阪、4 月 1 日、2004 年

8) 柴田尚宏、山根一和、和知野純一、加藤はる、荒川宜親 : 腸内細菌科における CTX-M-型 -ラクタマーゼと IMP-1 型メタロ- -ラクタマーゼ遺伝子の同時保有株解析 . 第 78 回日本感染症学会総会、東京、4 月 6 日、2004 年

9) 吉田英樹、加来浩器、砂川富正、大山卓昭、谷口清州、岡部信彦、加藤はる、蒲池一成、柴田尚宏、山根一和、荒川宜親 : バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)院内感染事例の疫学調査 . 第 78 回日本感染症学会総会、東京、4 月 6 日、2004 年

10) 柴田尚宏、山根一和、和知野純一、鈴木里和、荒川宜親 : 同一医療施設から分離された新型 CTX-M-型 -ラクタマーゼ遺伝子と IMP-1 型メタロ- -ラクタマーゼ遺伝子を同時に保有する大腸菌および肺炎桿菌 . 第 33 回薬剤耐性菌シンポジウム、富山、7 月 30 日、2004 年

11) 柴田尚宏 : 我が国におけるグラム陰性桿菌のメタロ- -ラクタマーゼ産生菌と基質拡張型 -ラクタマーゼ産生菌 ( -ラクタマーゼ産生菌の検出法と -ラクタマーゼ遺伝子の保有状況 ) 第 33 回薬剤耐性菌シンポジウム、



## 細菌第二部

富山、7月31日、2004年

12) 小畑律子、山田友紀、昆浩、黒田牧子、伊東みち子、野々宮百合子、山端久美子、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宜親：当院で分離した VIM-2 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の一例。第 45 回東北医学検査学会、山形、10月9日、2004年

13) 柴田尚宏、和知野純一、山根一和、鈴木里和、黒川博史、加藤はる、荒川宜親：臨床分離株から検出された classC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の分布。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

14) 和知野純一、八木哲也、黒川博史、柴田尚宏、山根一和、鈴木里和、荒川宜親：ポロニ酸化化合物を用いた classC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の簡易検出法の開発。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

15) 鈴木里和、柴田尚宏、和知野純一、山根一和、伊藤健一郎、荒川宜親：CTX-M-型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生大腸菌の広域伝播に関する検討。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

16) 金森志津子、中河竜也、多賀由紀子、森田未香、吉田郁子、中村政雄、辻田由加利、柴田尚宏、荒川宜親：富山県下におけるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌調査。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

17) 檜本和美、西山秀樹、池上志乃富、服部真由子、白山秀夫、柴田尚宏、荒川宜親：当院におけるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌検出状況について。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

18) 山田友紀、畠山裕司、昆浩、黒田牧子、伊東みち子、野々宮百合子、小畑律子、山端久美子、小笠原理恵、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宜親：抗菌薬適正使用ガイドライン施行後におけるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の検出状況。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

19) 藪崎史子、榎田和美、勝岡康子、栗田雅史、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出された CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生腸内細菌 4 症例の検討。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

20) 堀光広、笹野正明、柴田尚宏、荒川宜親：下痢症患者

者より検出された CTX-M-9 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生非チフス性 *Salmonella* sp. について。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

21) 森木省治、野畑亜希子、森山英彦、柴田尚宏、熊倉俊一、益田順一、柴田尚宏、荒川宜親：血清型の異なる IMP-1 型 metallo- $\beta$ -lactamase 産生 *Pseudomonas aeruginosa* の臨床微生物学的検討。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

22) 藤方理恵、越智美智、西原真二、田村ひろみ、古谷敬三、北尾孝司、鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親：当院における ESBL 産生菌の集団発生について。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

23) 三浦明子、佐藤牧子、山田友紀、山端久美子、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出された ESBL 産生グラム陰性桿菌 8 症例について。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

24) 益井加代子、柴田尚宏、荒川宜親：創部開放膿より検出された CTX-M type  $\beta$ -ラクタマーゼ産生大腸菌の一症例。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

25) 小林治、柴田尚宏、荒川宜親：CTX-M-9 タイプ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* の 1 例。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

26) 本間操、大貫雅子、柴田尚宏、荒川宜親：国内で初めて検出された CTX-M-8 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* の一例。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

27) 畑中公基、鈴木弘子、齋藤武郎、下地眞哉、三田正行、柴田尚宏、荒川宜親：敗血症患者より検出された CTX-M-36 型  $\beta$ -lactamase を産生する *Klebsiella pneumoniae* について。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

28) 大貫雅子、岡田真実、本間操、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出された CTX-M-2 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Proteus mirabilis* の 2 症例。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

29) 高野さかえ、常松範子、斉木由美子、柴田尚宏、荒川宜親：関東で初めて検出された VIM-2 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas fluorescens* の 1 症例。第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2月4日、2005年

年

- 30) 村井明子、神農和枝、玉崎涼子、足立規子、田中信之、柴田尚宏、荒川宜親：尿培養より検出された IMP-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生緑膿菌の 1 例．第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2 月 4 日、2005 年
- 31) 上村桂一、柴田尚宏、鈴木健之、後藤文子、荒川宜親：IMP-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを保有した血液培養由来の *Enterobacter aerogenes* について．第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2 月 4 日、2005 年
- 32) 佐藤修子、原明子、高橋恵、西原弘人、渋谷泰寛、手島保、柴田尚宏、荒川宜親、上久律子：尿より検出された IMP-1 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloaca* の 1 症例．第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2 月 4 日、2005 年
- 33) 柴田尚宏：グラム陰性桿菌における  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌．第 33 回薬剤耐性菌シンポジウム、富山、7 月 30 日、2004 年
- 34) 柴田尚宏：モーニングセミナー 9：ここまでやっておこうグラム陰性桿菌の耐性検査．第 16 回日本臨床微生物学会総会、京都、2 月 6 日、2005 年
- 35) 門脇昭夫、小別所明美、鈴木里和、荒川宜親：VRE 院内感染報告．第 16 回日本臨床微生物学会、2005 年 2 月、京都
- 36) 名和由一郎、谷本一史、中瀬浩一、小塚輝彦、原雅道、萬井美貴子、森高智典、鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親：血液病棟における ESBL( Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase ) 産生大腸菌の集団発生事例の経験とその対策．日本血液学会・日本臨床血液学会回総会、2004 年 11 月
- 37) 佐々木裕子、マイコプラズマゲノムに見られる寄生体の宿主との相互作用：退行進化とパラログ形成、日本進化学会第 6 回大会（病原性の進化ワークショップ）、2004 年 8 月 4-7 日、東京
- 38) 佐々木裕子、永田典代、網 康至、須崎百合子、佐々木次雄、荒川宜親、*Mycoplasma fermentans* は、リンパ球にアポトーシスを誘発し血管内皮細胞と腎系球体に感染する、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月 1 日 3 日、大阪
- 39) 佐々木裕子、川上隆雄、大内( 新開 ) 史子、見理 剛、堀野敦子、山河芳夫、佐々木次雄、プロテオミクス解析を用いた *Mycoplasma penetrans* の抗原蛋白ならびに膜蛋白の解析、微生物ゲノム研究のフロンティア、第 7 回ワークショップ、2004 年 3 月 5-6 日、木更津、千葉
- 40) 佐々木次雄、久保田真由美、荒川宜親：*Bartonella quintana* 感染症( 塹壕熱 ) 疫学調査結果と血清診断法の問題点、第 77 回日本細菌学会総会、2004 年 4 月、大阪市
- 41) 佐々木次雄、久保田真由美、成田光生、荒川宜親：マクロライド耐性マイコプラズマ感染症に関する研究、マクロライド新作用研究会、東京、2004 年 7 月
- 42) 佐々木次雄：無菌操作法による無菌医薬品製造指針について、「GMP とバリデーションをめぐる諸問題に関するシンポジウム」、日本防菌防黴学会、2004 年 3 月、東京
- 43) 堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* 膜リポタンパク質遺伝子のプロモーター逆位の検出、第 77 回日本細菌学会総会、大阪、2004 年 4 月 1-3 日
- 44) 見理 剛、瀬戸真太郎、堀野敦子、佐々木裕子、宮田真人、佐々木次雄：GFP を利用した *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造の観察、第 77 回日本細菌学会総会、大阪、2004 年 4 月 1-3 日
- 45) 高橋元秀、岩城正昭、福田 靖、小宮貴子、新谷三春、荒川宜親、佐々木次雄：Hib ワクチンにキャリアーとして含まれる破傷風トキソイドの免疫原性、第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年 4 月 大阪
- 46) 片岡紀代、山本明彦、永田典代、後藤紀久、加藤博史、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、高橋元秀、荒川宜親、倉田毅、堀内善信：国内外沈降精製 DPT ワクチンの比較と検討 第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年 4 月 大阪
- 47) 岩城正昭、三枝智美、高橋元秀：マウスを用いたジフテリア菌感染実験系の検討 第 77 回日本細菌学会総会 平成 16 年 4 月 大阪
- 48) 岩城正昭、福田靖、小宮貴子、荒川宜親、高橋元秀：抗破傷風人免疫グロブリン製剤の現状、第 8 回日本ワクチン学会 平成 16 年 10 月 札幌市
- 49) 福田靖、小宮貴子、岩城正昭、益見厚子、末原章宏、多田善一、長井正昭、坂口孝廣、小幡朗、荒川宜親、高橋元秀：ジフテリア及び破傷風トキソイドにおけるトキ

## 細菌第二部

- ソイド抗原とたん白含量の測定に関する感染研と国内製造所による比較検討について、第8回日本ワクチン学会 平成16年10月 札幌市
- 50) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、諸熊一則、大隈邦夫、栃久保邦夫、後藤紀久：組換えコレラ毒素Bサブユニット(rCTB)添加BCG経鼻免疫後のrCTB単独頻回追加投与によるDTH増強効果、第77回日本細菌学会総会、2004年4月 大阪市。
- 51) 山崎剛、山本三郎、芳賀伸治、本多三男：結核防御免疫におけるBCG接種モルモットIFN- $\gamma$ およびCD4 double positive T細胞の意義、第74回実験結核研究会、2004年4月 名古屋市
- 52) 山本三郎：第52回化学療法学会総会シンポジウム：感染症におけるBRM療法の現状と展望 - CpG DNAを用いたBRM療法の可能性、2004年6月 宜野湾市
- 53) 山本十糸子、山本三郎：BCGの抗結核効果に及ぼすCpG DNAの修飾作用、第79回日本結核病学会総会、2004年4月 名古屋市
- 54) 大澤陽子、伊保澄子、高氏留美子、高塚尚和、松木孝澄、藤枝重治、山本三郎：CpG DNA刺激ヒト形質細胞様樹状細胞におけるNF- $\kappa$ Bとp38 MAPKの相互作用、第34回日本免疫学会学術集会、2004年12月 札幌市
- 55) 大石和恵、瀧下清貴、河戸勝、銭谷亮子、坂東武治、藤瀬良弘、後藤義孝、山本三郎、丸山正 北西太平洋に棲息するミンククジラにおけるブルセラ菌感染症の解析 第16回日本比較免疫学会、2004年8月 那覇市
- 56) 大石和恵、瀧下清貴、河戸勝、銭谷亮子、坂東武治、藤瀬良弘、後藤義孝、山本三郎、丸山正 PCR法による北西太平洋ミンククジラにおけるブルセラ菌遺伝子の検出と配列の解析 第138回日本獣医学会、2004年9月 札幌市
- 57) Matsumoto, S., Matsumoto, M., Umemori, K., Ozeki, Y., Furugen, M., Tatsuo, T., Hirayama, Y., Yamamoto, S., Yamada, T., Kobayashi, K.: The role of Mycobacterial DNA-binding protein 1-DNA complex in the host protection against *Mycobacterium tuberculosis*, 第34回日本免疫学会総会、2004年12月 札幌市
- 58) 柴山恵吾、荒川宜親：Apoptosis誘導に關与する-GTP様酵素、第77回日本細菌学会総会、大阪、4月1-3日、2004年
- 59) 山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、荒川宜親、堀内善信：ゲンタマイシンによるエンドトキシンの活性増強、第77回日本細菌学会総会、大阪 2004年4月
- 60) 堀内善信、豊泉裕美、片岡紀代、岡田賢司、山本明彦、永田典代、落合雅樹、蒲地一成、倉田毅、荒川宜親：ワクチンの実験室品質管理試験と安全性・副反応との関連性、第8回日本ワクチン学会学術集会、札幌 2004年10月
- 61) 落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、蒲地一成、山本明彦、荒川宜親、堀内善信、生体内での発熱活性を反映するエンドトキシン試験法の検討、第77回日本細菌学会総会、2004年4月、大阪
- 62) 片岡紀代、山本明彦、永田典代、後藤紀久、加藤博史、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、高橋元秀、荒川宜親、堀内善信、国内外沈降精製DPTワクチンの比較と検討、第77回日本細菌学会総会、2004年4月 大阪
- 63) 加藤博史、今井順一、浜口功、河村未佳、内藤誠之郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、野村信夫、渡辺慎哉、山口一成、遺伝子発現の網羅的解析によるワクチンの新しい安全性評価法の開発、日本薬学会第125年会、2005年3月 東京
- 64) 蒲地一成、永田典代、近田俊文、荒川宜親：百日咳菌に認められた広宿主域プラスミドの遺伝子解析。第77回日本細菌学会総会、大阪 4月2日 2004年
- 65) 児玉温子、蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親：近年増加傾向にある百日咳菌が有する主要抗原遺伝子について。第77回日本細菌学会総会、大阪 4月2日 2004年