

## 5. 細菌第二部

部長 荒川 宜親

### 概要

平成14年度の感染研の組織再編に伴い、旧細菌・血液製剤部と旧安全性研究部との間で一部の室の移動が行われ、新たに細菌第二部が発足した。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)の5つの室から構成され、抗生物質製剤、DPT ワクチン、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を行った。また、ウイルスワクチンを含む生物学的製剤の無菌試験、エンドキシン試験、生物統計などに従事、協力した。さらに、これらの生物製剤等の品質の向上に関わる各種の研究業務に従事した。他方、国内的には、抗生物質製剤の管理基準が日本抗生物質医薬品基準から日本薬局方に切り替えられるのに伴い、国立医薬品食品研究所などと協力し、切り替え作業に参加した。さらに、日本薬局方の無菌試験、エンドキシン試験法などの改定に専門的な視点から協力し注射用水などの改定に支援を行った。他方、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、研修生等の受入れや技術研修など支援を行った。

また、細菌第二部への組織再編に伴い、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た。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 バイランス事業」への専門的な視点からの支援
2. 遺伝子組み替え食品の安全性評価に関する研究への協力
3. 特定疾患のIgA 腎症と微生物感染症の関連についての研究
4. アジア諸国における細菌ワクチン製剤の品質管理に関する国

際共同研究(国立国際医療センターの研究事業費)

5. WHO(WPRO)による細菌製剤の品質管理等に関するコラボレーションセンターとしての協力

6. 新しい結核ワクチンの開発等に関わる研究

7. 輸入鶏肉のVRE 付着状況の調査研究

その他、ジフテリア菌、百日咳菌、*Helicobacter pylori*、*Baltonella quintana*、*Hemophilus influenzae*などの病原細菌の病原性や病原因子、検査法などにかかわる様々な研究を行った。

研究業務としては、厚生科学研究費補助金による諸研究事業に協力し、新興・再興感染症研究事業、医薬安全総合研究事業、ヒトゲノム・再生医療等研究事業、ヒューマンサイエンス財団国際研究グラント事業、国際医療協力研究委託事業、高度先端医療研究事業、エイズ対策研究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研究等も実施された。

平成14年度には、常勤職員の異動、退職は無かったが、細菌第二部に客員研究員として木ノ本雅通、協力研究員として黒川博史、横山佳子、川端敏之、山本十糸子、大石和恵、高塚尚和、高橋好春、井上雅可、粕谷裕子、久保田眞理美、研究生・実習生として和知野純一、金井京子、児玉温子、三枝智美、猪股夢乃らが在籍し、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、南條友子、松村昭子、増田まり子、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。

### 研究業績

・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での定量法評価に関する研究

## 細菌第二部

日本抗生物質医薬品基準から日本薬局方への完全移行(2003年1月1日付)に伴い、日局各条原薬収載の円筒平板法による微生物学的力価試験(Bioassay)に準拠した定量法による標準品力価の評価を行った。今年度末までに11品目の評価が完了し新規標準品の交付を開始した。また、日局各条原薬収載の吸光度法に準拠した1品目の評価も完了し新規標準品の交付を開始した。[柴田尚宏、加藤はる、南條友子、土井洋平、山根一和、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定量法評価に関する研究

日本抗生物質医薬品基準の日本薬局方への完全移行(2003年1月1日付)に伴い、日局各条薬収載の液体クロマトグラム法(HPLC)に準拠した定量法による標準品力価の評価を行った。今年度末までに28品目の評価が完了し新規標準品の交付を開始した。[山根一和、土井洋平、柴田尚宏、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

昨年度に改良した方法を用いて標準品作製並びに各種検査(収去検査、依頼検査、特別審査)を行った。その結果、力価試験の再現性が向上した。更に、力価算出については統計学的な検討も加えて行い、試験法改良の基礎的なデータの集積を行った。一方、使用微生物の管理については、凍結乾燥品も製造して菌株交付業務がスムーズに行えるように改良した。[加藤はる、南條友子、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、粕谷裕子、近田俊文]

### 4. 抗生物質の日本薬局方標準品の整備に関する研究

日本薬局方抗生物質標準品(全136品目)のより良い整備を目的に、新規候補品の安定した入手システムの改良(感染研所長名依頼文の改訂)、交付用標準品の小分製品の改良(窒素置換バイアル充填法の採用と改良)、日局収載原薬定量法に準拠した品質評価実施(Bioassay法、HPLC法、吸光度法)、標準品の保存法改良(システムのフリーザー保存管理)、標準品の交付並びに準備状況の把握改善及びメーカーへの照会と回答の連絡手順の整備(検定係との情報交換改善)の各項目について実行あるいはその準備を行った。その結果、かなり整備され

たが、よりスムーズに実施できるように更なる改良、改善を行う予定である。[土井洋平、柴田尚宏、加藤はる、山根一和、南條友子、粕谷裕子、近田俊文]

### 5. 収去検査による抗生物質医薬品の品質管理研究

平成14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(アムホテリシンB:4ロット、セフトリジンプロピレングリコール:7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(硫酸ゲンタマイシン:5ロット、塩酸バンコマイシン:3ロット)について力価試験、確認試験(IR及びNMR解析)、エンドキシン試験、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、土井洋平、山根一和、南條友子、第二室、第五室、血液・安全性研究部第三室]

### 6. 特別審査による抗生物質医薬品の品質管理研究

(1)前年度に受け付けた特別審査4件、注射用シナシッド(キヌプリスチン/ダルホプリスチン)、アジスロマイシン水和物錠600mg、ファンガード(ミカファンギンナトリウム)、ストロメクトール錠3(イベルメクチン)について、申請書品質管理試験法の精査後、申請された方法で各試験の確認を行い、総合結果を報告した。ファンガードとストロメクトール錠3は総合的に「適合」と判定された。注射用シナシッドは力価試験(比濁法)、純度試験・類縁物質で「判定保留」あるいは「規格値を満たさない」の結果となったことにより、総合的に試験法の一部変更申請等を行うことを条件にして「条件付き適合」と判定された。アジスロマイシン水和物錠600mgは定量法試験、含量均一性試験、純度試験及び溶出試験で「規格値を満たさない」あるいは「判定保留」の結果となったこと及び先行認可済の同種製剤と異なる品質管理試験法を規定していること等の理由により、総合的に「判定保留」と判定された。[近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、南條友子、粕谷裕子、荒川宜親、第二室、第五室、血液・安全性研究部第三室]

(2)今年度に受け付けた特別審査2件、パッカム(塩酸セフチゾキシムアラビボキシル)、ケテック(テリスロマイシン)について、申請書品質管理試験法の精査後、申請された方法で各試験の確認を行い、総合結果を報告した。両方とも総合的に「適合」と判定された。[近田俊文、土井洋平、山根一和、加藤はる、柴田尚宏、南條友子、粕谷裕子、荒川宜親、血液・安全性研究

## 細菌第二部

### 部第三室]

#### ・抗生物質に対する耐性菌の研究及び検査

#### 1.メルカプト酢酸ナトリウムを用いたディスク拡散法と PCR 法による IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出、解析

メタロ-β-ラクタマーゼの中でも IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼなどプラスミド性に遺伝子がコードされているタイプは、臨床的に菌種を超えた拡散が問題となる。その迅速検出法として、2-メルカプトプロピオン酸、メルカプト酢酸ナトリウムなどチオール化合物を利用したディスク拡散法を用い、全国各地に臨床分離株におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を検出した。さらに IMP-1 型、IMP-2 型、VIM-2 型特異的プライマーを作製し、メタロ-β-ラクタマーゼ産生株の遺伝子保有状況を調べた。その結果、IMP-1 型は全国的に拡がりを見せているだけでなく、我が国ではまだ稀である、VIM-2 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌が一部の地域では院内感染の様相を呈しているケースも認められることが示唆された。また、緑膿菌からだけでなく、新たに *Pseudomonas putida* から VIM-2 型が検出され、今後もブドウ糖非発酵菌や腸内細菌において、こうした耐性菌の監視が必要であると考えられた。[柴田尚宏、土井洋平、山根一和、荒川宜親]

#### 2.メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌におけるクラス3型インテグラーゼ遺伝子型別の検討

メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子やアミノグリコシド耐性遺伝子、消毒剤耐性遺伝子などには、インテグロン構造に担われ、多剤耐性の一因であることが明らかとなっている。しかし、近年の臨床分離株におけるインテグロン構造の保有状況は不明である。昨年度までに検出した臨床分離グラム陰性桿菌において、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の確定した菌株を用い、インテグラーゼ遺伝子特異的プライマーによる PCR 法により、遺伝子の保有状況を解析した。その結果、約 290 株のメタロ-β-ラクタマーゼ産生株の殆どはクラス1型インテグラーゼ遺伝子を保有していたが、特定の2施設から分離された4株のみクラス3型インテグラーゼ遺伝子を保有していた。菌種は *Pseudomonas putida* であり、クラス3型インテグラーゼ遺伝子保有株では、海外でも例がなく、初めての検出で

あった。検出した1施設の分離株では、パルスフィールドゲル電気泳動による解析により、院内感染が示唆された。このようにプラスミド性メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子が我が国で多く報告され問題となっているが、院内感染も引き起こす可能性もあり、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を検出した場合は、臨床上注意を要すると考えられた。[柴田尚宏、土井洋平、山根一和、荒川宜親]

#### 3.新規 16S rRNA メチラーゼ MagrB の同定

アミノ配糖体系抗生物質に高度耐性を示す *Serratia marcescens* 臨床分離株より新しい 16S rRNA メチラーゼ MagrB を同定した。MagrB は当室で昨年度 *Pseudomonas aeruginosa* 臨床分離株より同定した 16S rRNA メチラーゼ MagrA とアミノ酸配列で 82%一致した。さらに機能解析により MagrB が実際に 16S rRNA をメチル化しアミノ配糖体系抗生物質に高度耐性を付与していることが明らかになった。腸内細菌科の細菌に同種のタンパク質が存在することが示されたのは今回が初めてである。[土井洋平、山根一和、荒川宜親]

#### 4.大腸菌臨床分離株が産生する阻害剤感受性 AmpC β-ラクタマーゼの解析

大腸菌が生来産生する AmpC β-ラクタマーゼは一般に β-ラクタマーゼ阻害剤に耐性を示すことが知られている。今回、阻害剤感受性の大腸菌臨床分離株を入手したのでその AmpC をクローニングしたところ、阻害剤感受性の表現型を示した。この AmpC は通常の AmpC と比較し H-10 ヘリックスに 3 アミノ酸の欠失を有しており、変異導入実験によりこの欠失が阻害剤感受性を惹起していることが確認された。現在基質拡張型 β-ラクタマーゼ (ESBL) のスクリーニングには阻害剤への感受性が利用されているが、阻害剤感受性 AmpC は ESBL と誤判定される可能性があるため、現在さらに検討中である。[土井洋平、山根一和、荒川宜親]

#### 5.アルベカシン高度耐性緑膿菌が保有する *mgarA* の周辺領域の遺伝子配列の解析

臨床分離されたアルベカシン (ABK) 高度耐性緑膿菌 (AR-2 株) の保有する *mgarA* の周辺領域の遺伝子配列を調べた。*mgarA* とその周辺構造は水銀耐性遺伝子群を保有する

## 細菌第二部

Tn5041 に挿入される形で存在した。両端には Tn5041 内に存在する IS 様の構造である  $\kappa\gamma$  element が存在し、トランスポゼース様の配列をもち、magrA とその周辺構造はトランスポゾン類似の構造をしていることが判明した。magrA の周辺構造の塩基配列は臨床で問題となる病原菌と相同性は低く、環境中の細菌と比較的相同性を持っており緑膿菌が環境中の細菌からこの遺伝子を獲得した可能性が示唆された。[山根一和、土井洋平、横山佳子、荒川宜親]

### 6. アルベカシン高度耐性緑膿菌の耐性機構の解析

臨床分離されたアルベカシン (ABK) 高度耐性緑膿菌 (AR-2 株) の耐性機構について、昨年クローニングした ABK 耐性遺伝子の産物 (MagrA) が、16S rRNA メチル化酵素としての機能を有するかどうかを検討した。酵素反応を行うため、magrA 遺伝子を保有した緑膿菌クローンの菌体から粗酵素抽出液を得た。またアイソトープ標識した S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とし、緑膿菌 PAO1 からリボソームの 30S サブユニットを抽出し、反応基質とした。以上を用いて酵素反応を行った結果、放射活性の取りこみが認められ、MagrA は 16S rRNA メチル化酵素であることが強く示唆された。[横山佳子、土井洋平、山根一和、荒川宜親]

### 7. 臨床分離株の薬剤耐性遺伝子の依頼検査

臨床分離株の薬剤耐性遺伝子検査依頼があり、主に PCR 検査を中心としておこなった。総数は、全国約 50 施設より約 550 件であった。菌種は大腸菌、クレブシエラ、セラチアなど腸内細菌群、緑膿菌、アシネトバクターなどブドウ糖非発酵菌群は、ESBL (基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ) 産生菌やメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の検出を、腸球菌などは VRE を対象として、主に Van 遺伝子検出を行った。特に大腸菌、クレブシエラなどでは、CTX-M-タイプ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌が多く検出されていた。メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生株は殆どが IMP-1 型であったが、稀ではあるが VIM-2 型も新たな施設で検出され、こうした耐性菌の拡散防止に努めることが必要と考えられた。[柴田尚宏、土井洋平、山根一和、荒川宜親]

### 8. バンコマイシン耐性腸球菌の院内集団発生事例の検査

バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の院内集団発生事例について、感染症症例、キャリア、および病院環境から分離された VRE 菌株約 120 株について、同定、耐性遺伝子の検討、biotyping を行った。[加藤はる、山根一和、土井洋平、甲斐久美子、荒川宜親]

### 院内感染対策サーベイランスシステム構築に関する業務

昨年と同様に、院内感染対策サーベイランス事業における、現在検査部門、集中治療部門、全入院部門の 3 部門についてデータを参加施設から収集し解析を行った上で感染症情報センターのホームページ上 (<http://idsc.nih.go.jp/index-j.html>) にデータの還元を行った。[山根一和、荒川宜親]

### *Clostridium difficile* に関する研究及び検査

#### 1. Toxin A 陰性 toxin B 陽性 (A-B+) *Clostridium difficile* の日本の病院における臨床分離についての検討

Toxin A 陰性 toxin B 陽性 (A-B+) *C. difficile* が、ヒト消化管において toxin A 陽性 toxin B 陽性 (A+B+) 株と同様に消化管感染症を引き起こす可能性が最近報告され始めた。日本の複数の病院における分離株を見当したところ、A-B+ 株の臨床分離が稀ではないことがわかった。さらに 2 病院においては、A-B+ 株の分離頻度が高く、PCR ribotyping およびパルスフィールド電気泳動による検討から同一クローンの院内集団発生であったことが明らかとなった。さらに、院内集団発生の流行株となった A-B+ 株に特徴はないか検討した。[加藤はる、小松方 (天理よろず相談所病院)、佐藤洋子 (千葉県立がんセンター)]

#### 2. *Clostridium difficile* の院内集団発生事例の調査及び検査

*Clostridium difficile* の院内集団発生事例について、主に無症候キャリアの調査を行った。院内感染の中心とな

## 細菌第二部

ったと考えられた病棟の入院患者、入院歴のある患者から採取した約 100 検体の糞便検体について、細胞培養および酵素免疫法による検体中の毒素検出、*C. difficile*、*Clostridium perfringens* およびメチシリン耐性ブドウ球菌の分離培養、さらに分離菌株の毒素産生性の検討とタイピングを行った。[加藤はる、山根一和、甲斐久美子、柴山恵吾、新谷美春、沼田昇(仙台市衛生研究所)、荒川宜親]

### 3. *Clostridium difficile* の院内感染を疑わせる事例への指導

問い合わせのあった病院における *Clostridium difficile* の院内感染を疑わせる事例について、菌株の解析、分離培養の指導、院内感染対策に関する指導、を行った。[加藤はる]

## マイコプラズマに関する研究

### 1. 全ゲノム配列から予測される *Mycoplasma penetrans* の特徴と感染因子

重度の呼吸器窮迫を呈した *Mycoplasma penetrans* 感染症患者の気道吸引液より分離された HF-2 株の全ゲノム配列を決定したことにより、予測される代謝経路ならびにヒトへの感染因子を、昨年度に引き続き解析した。これまでに全ゲノムが解析された他のマイコプラズマ属の種と比較して得られる *M. penetrans* の特徴は、以下のものであった。1)ピリミジン代謝に必須と考えられていた酵素の遺伝子を欠いている、2) Arginine dihydrolase Orotate 経路による ATP 産生が可能である、3)マイコプラズマ属ではじめて見つかった two-component system とみられる遺伝子セットを持つ、4)ヒトへの感染に関わる因子として接着器官の細胞骨格を形成する蛋白(*M. pneumoniae* の HMW2 のオソログ)、溶血素、抗活性酸素物質、膜表面の抗原変異を担うポ蛋白 P35 群(44 遺伝子より構成される)等が予測された。系統解析で近縁なニューモニエグループの中でも *M. penetrans* の比較的大きなゲノムには、*M. pneumoniae*、*M. genitalium* や *Ureaplasma urealyticum* など小型ゲノムを有する種には無い特徴が認められ、一般細菌と共通の祖先である大きなゲノムサイズを持つ種の特徴を、残していると考えられた。今後、予測された

ヒトへの感染因子の同定が必要である。

[佐々木裕子、石川 淳<sup>1</sup>、山下敦士<sup>2</sup>、大島健志朗<sup>2</sup>、見理 剛、古谷恵子<sup>2</sup>、吉野智絵<sup>2</sup>、堀野敦子、柴 忠義<sup>2</sup>、佐々木次雄、服部正平<sup>2,3</sup>(<sup>1</sup>生物活性物質部、<sup>2</sup>北里、理学部、<sup>3</sup>理化学研究所、ゲノム総合研究センター)]

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

ギラン、バレー症候群(GBS)の中の脱髄型 GBS と細菌感染の関連が示唆されている。*Mycoplasma pneumoniae* 感染後 GBS 患者では、血清中に各種糖脂質すなわち、抗ガラクトセプロシド(GaIC)や抗 GM1 抗体が存在し、これらの抗体が、ヒト末梢神経の髄鞘に存在する GaIC 等糖脂質を損傷するのではないかと考えられている。我々は、*M. pneumoniae* 以外のマイコプラズマ感染が GBS の先行感染になっている可能性を考え、感染を調べる為に、GBS 患者血清中の *M. pneumoniae*、*M. fermentans* ならびに *M. penetrans* に対する抗体価を ELISA 法で測定した。結果は、抗 *M. pneumoniae*-IgG 抗体陽性 1.7%、同 IgM 抗体陽性 6%で、両陽性 1.7%が非 GBS 患者群の 0%と比べて高く、*M. pneumoniae* 感染との関連が示唆された。抗 *M. fermentans*-IgG 抗体については、低い率で陽性者はいたものの、非 GBS 患者群との大きな違いは無かった。GBS の一亜型であるフィッシャー症候群の中に IgG 抗体陽性者は居なかった。抗 *M. penetrans* 抗体は、全員陰性であった。

[佐々木裕子、荒川宜親(細菌・血液製剤部)、古賀道昭、結城伸泰(獨協医科大・神経内科)]

### 3. *Mycoplasma penetrans* への遺伝子導入法の検討

*M. penetrans* は昨年、我々のグループによって全ゲノム配列の解析が終了し、その情報を利用して次の研究を進める段階に入っている。今後 *M. penetrans* の病原性や遺伝学的な検討を行う上で、*M. penetrans* の遺伝子操作法が必要な手段となる。しかし、*M. penetrans* ではプラスミドの存在も知られておらず、現時点では遺伝子導入などの操作は成功していない。*Mycoplasma* 属においては、全般的に遺伝子操作が困難であるが、近年、いくつかの種では、transposon を利用した遺伝子導入が可能になっている。そこで、今回我々は、*M. penetrans* に対して transposon を利用した遺伝子導入法の検討を行った。

*M. pneumoniae*、*M. genitalium* 等の種で現在有効に利用

## 細菌第二部

されている transposon Tn4001 を *M. penetrans* に試したところ、Tn4001 をそのまま *M. penetrans* に導入することはできなかった。原因として、1) *M. penetrans* では Tn4001 上の薬剤耐性遺伝子が働かない可能性、2) *M. penetrans* では Tn4001 上の transposase が働かない可能性などが考えられた。このため、Tn4001 の耐性遺伝子、並びに transposase 遺伝子のプロモーターを *M. penetrans* のプロモーターに置き換えた組換え Tn4001 を構築し、現在、検討を継続中である。また、最近、*oriC* plasmid による相同組み換えの成功例が *M. pulmonis* で報告されたことから、この方法による遺伝子導入法も検討中である。

[堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄]

### 4 . GFP を使用した *M. pneumoniae* の接着器官観察の検討

*M. pneumoniae* は、菌体の一端に存在する接着器官 (attachment organelle) によってヒトの気道粘膜上皮細胞に接着し、肺炎や気管支炎を起こす。この *M. pneumoniae* の細胞接着の過程をさらに詳しく理解するために、*M. pneumoniae* 生細胞の接着器官を GFP (green fluorescent protein) を使用して観察する検討を行った。接着器官は多数のタンパク質が集合して形成されているが、今回はその構成タンパク質の一である P65 を GFP の誘導体である EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) で標識した。P65 と EYFP の遺伝子を連結して、トランスポゾン Tn4001 によって *M. pneumoniae* に導入すると、発現した EYFP-P65 タンパク質は蛍光顕微鏡によって接着器官に強局在していることが観察できた。この方法で、生きた *M. pneumoniae* の接着器官を直接観察することが可能になった。この系を利用して、滑走運動する *M. pneumoniae* 細胞の接着器官の観察や、接着変異株における、P65 タンパク質の局在性についての検討をおこなった。

[見理 剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、瀬戸真太郎 (大阪市大・院理)、宮田真人 (大阪市大・院理)]

### 5 . マイコプラズマ肺炎の迅速早期診断法の開発研究

マイコプラズマ肺炎には β-ラクタム剤が無効であり、適切な薬剤を選択し治療に反映するためにも、簡便な早期確定診断法が望まれている。しかし、マイコプラズマ肺炎の早期確定診断は現在も容易ではない。早期診断法としては、IgM 抗体を検出する方法や PCR 法があげられるが、感度や特異性あるいはコスト面で

の問題点も残されている。我々はこれらの方法に加えて、*M. pneumoniae* の抗原を特異的、高感度に検出する方法を検討している。この目的で昨年作製した抗 *M. pneumoniae* 抗原モノクローナル抗体を使用して特異検出系の検討を行った。

[見理 剛、富山哲雄 (富山研究所)]

### 6 . 薬剤耐性肺炎マイコプラズマに関する研究

マクロライド系抗生物質に対する *M. pneumoniae* の薬剤耐性機構獲得には、23S rRNA の 2063 又は 2064 の A が G に点変異がある。これまで患者から分離された耐性菌は全て A2063G であったが A2063C も今年度分離された。低度の薬剤耐性を示す分離菌の中には、23S rRNA の第5ドメインに点変異を起こしていないものもあり、他の領域で変異を引き起こしている可能性もある。また近年、薬剤耐性 *M. pneumoniae* が増えつつあるので、早期診断法の確立とともに薬剤投与についても見直しが必要かも知れない。

[佐々木次雄、成田光生 (札幌病院)、岡崎則男 (神奈川県衛生研究所)、見理剛、荒川宜親]

### . *Haemophilus influenzae* に関する研究

#### 1 . *H. influenzae* の産生する β-ラクタマーゼの PCR による型別

前年度に β-ラクタマーゼ活性陽性株について β-ラクタマーゼ遺伝子型別を行った。今年度は β-ラクタマーゼ活性陰性株についても PCR を行い、526bp (TEM 型) 或いは 692bp (ROB 型) 付近にバンドの出た株についてさらにサザンハイブリダイゼーションを行って確認したところハイブリダイズしたバンドはなかった。β-ラクタマーゼに関して表現型と遺伝子型とは一致していた。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

#### 2 . *H. influenzae* 臨床分離株の薬剤感受性

*H. influenzae* 臨床分離株 (主に呼吸器由来) を用いて薬剤感受性の分布を調べた。ampicillin, ampicillin/sulbactam, piperacillin, aztreonam, meropenem, cefotaxime, ceftriaxone, cefaclor,

## 細菌第二部

cefepime, ceftazidime, cefditoren, cefcapen, azithromycin, clarithromycin, chloramphenicol, levofloxacin の 16 薬剤(各 6 濃度)を含むドライブレートをを用い微量液体希釈法を用いた。596 株で MIC が得られた。aztreonam, meropenem, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefditoren, cefcapen, azithromycin, levofloxacin に対しては殆どの株が感受性であった。ampicillin, ampicillin/sulbactam, cefaclor, clarithromycin, chloramphenicol に対してはそれぞれ 14.7, 7.0, 17.0, 1.0, 3.5%の株が耐性であった。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

### 3 . *H. influenzae* 臨床分離株のアmpiシリン耐性の解析

596 株のうち 29 株(4.9%)が BLNAR(ampicillin の MIC を 4  $\mu$ g/ml 以上とする)であった。市販キット(インフルエンザ菌遺伝子検出試薬、湧永製薬)を用いて  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株について PBP3 変異を調べたところ BLPACR( $\beta$ -ラクタマーゼ産生かつ PBP3 変異)も 15 株(2.5%)検出された。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

### 4 . キノロン低感受性 *H. influenzae* の解析

596 株のうち 3 株のキノロン低感受性株が見つかり、*gyrA*, , *parC*, *gyrB*, *parE* の QRDR の塩基配列を調べたところ 2 株では GyrA と ParC の 1 箇所ずつに、他の 1 株では GyrA の 1 箇所のみ にアミノ酸変異が見られた。前年度に調べたキノロン耐性株(4 株)に比べ変異箇所は少なく、耐性の程度と平行していた。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

### 5 . 外膜蛋白(outer membrane proteins, OMP)の解析

病原因子のひとつであり、variation があるため疫学マーカーとしても利用し得る OMP の単離、SDS-PAGE によるプロファイル解析を行った。Carlone 等(1986)の迅速微量調製法(rapid outer membrane protein[ROMP]procedure)に従って OMP を調製した。Nontypeable 株間では biotype が同じでもパターンが異なった。莢膜保有株では biotype が違っても serotype が同じだとパターンは似ていた。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

## 6 . PRP 定量法の検討

PRP の定量法について免疫化学的方法(サンドイッチ ELISA)と化学的方法(構成成分であるリンの比色定量)を検討した。サンドイッチ ELISA については捕捉抗体にまだ問題があることがわかった。リンの比色定量については Hib conjugate ワクチンを検体として前処理(過塩素酸-硫酸混液を用いる湿式灰化)により完全に酸化分解して無機リンとして定量し、PRP 量に換算した。[新谷三春、川端敏之、矢野茂生(血液・安全性研究部)、佐々木次雄、荒川宜親]

## 7 . Hib conjugate ワクチン同定法の検討

Hib conjugate ワクチン同定法として PRP 及びキャリアー蛋白である破傷風トキソイドとそれぞれに対する特異抗体との反応により沈降線を作らせるオクタロニー法を検討した。破傷風トキソイドについては明瞭な沈降線が得られたが、PRP については明瞭な沈降線が得られず、さらに検討が必要である。[川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親]

## 8 . バルトネラ感染症に関する研究

### 1 . 路上生活者における *Bartonella quintana* 感染の疫学調査

前年度に引き続き、東京都豊島区の路上生活者対策において、コロモジラミ症及びバルトネラ感染症の疫学調査を国立感染症研究所、豊島区池袋保健所、豊島区中央保健福祉センターの共同研究として 2 回行った。インフォームドコンセントを十分行った上で採血し、血液からの *B. quintana* DNA 検出、血清抗体価及びイムノブロットングで抗体パターンを調べた。計 146 人の受診者中、コロモジラミ寄生者は 6 名(4.1%)、コロモジラミ中から *B. quintana* DNA 検出者はなく、血液中からの *B. quintana* DNA 検出者は 7 名(4.8%)、IgG 抗体価(IFA>128)は 56 名(38.3%)であった。血清抗体価は特異性がなく、実験室診断法としては、現在のところ血液からの *B. quintana* DNA 検出が感染傍証にはなる。しかし、臨床所見との相関性がなく、更なる検討が必要である。

[佐々木次雄、関なおみ(豊島区池袋保健所)、佐々木年則、小林睦生、荒川宜親]

## 細菌第二部

### 行政科学に関する研究

#### 1. 国際規格の作成

ISO/TC198(ヘルスケア製品の滅菌及び無菌性保証に関する技術委員会)のWG9(無菌操作法)で、定置洗浄(CIP)、定置滅菌(SIP)、凍結乾燥、アイソレータに関する国際規格の作成に従事した。

[佐々木次雄]

#### 2. 日本薬局方活動

日本薬局方調査会「生物試験法委員会」で、無菌試験法の国際調和及び日局無菌試験法の改正作業、保存効力試験法の改正作業、遺伝子解析による微生物の迅速同定法のドラフト作成を担当した。その他、エンドキシン試験法の一部改正作業、発熱試験法の改正作業の審議に参加した。

[佐々木次雄]

### ジフテリアに関する研究

#### 1. ジフテリア菌新規抗原遺伝子"1-1 ORF2 蛋白質"の一次構造の解析

ジフテリア菌ワクチン株 PW8 から見出された分子量約 26kDa の新規抗原蛋白質("1-1 ORF2")の塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列からその構造を推定した。この蛋白質は N 末端側に典型的な分泌シグナル配列と C 末端側に膜貫通部分を持つ膜蛋白質であり、他のジフテリア菌菌株から単離された相同遺伝子との比較により、中央部分に抗原性を有すると予想された。[岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

#### 2. ジフテリア菌新規抗原遺伝子"1-1 ORF2 蛋白質"の多様性

新規抗原蛋白質"1-1 ORF2"遺伝子の相同遺伝子は、ワクチン株 PW8 だけでなく 10 株のジフテリア菌臨床分離株(東京都衛生研究所より分与)にも存在したがその大きさが互いに異なっていた

(昨年度年報)。これらの相同遺伝子の塩基配列を決定したところ、遺伝子間の相違は ORF の中央部分で大きく、両端部分は相同性が高いことが判明した。推定アミノ酸配列の解析により、いくつかの菌株では"1-1 ORF2 蛋白質"の中央部分にプロリンに富む高度反復配列が存在することが明らかになった。[岩城正昭、三枝智美、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀]

#### 3. ジフテリア菌に広く存在する新規抗原の探索

ジフテリアの血清診断のためには、ジフテリア菌に広く存在し、他の菌には存在しない新規抗原を見出すことが重要である。しかし、"1-1 ORF2 蛋白質"は、由来する菌株によって抗原性が異なると予想されるためこの目的には適していない。そこで、診断ツールとして応用可能な新たな抗原蛋白質の探索を開始した。"1-1 ORF2 蛋白質"以外の新規抗原蛋白質の遺伝子を含むジフテリア菌染色体 DNA 断片を遺伝子ライブラリーから選び、その塩基配列から抗原遺伝子の ORF7 種を新たに推定した。それらがジフテリア菌臨床分離株に広く存在するかどうかを、臨床分離株 10 菌株の総 DNA を鋳型とした PCR で調べたところ、"10-1 ORFN3F"、"10-1 ORFN6R"の 2 種の ORF は中それぞれ 9 菌株、8 菌株から検出され、*C. diphtheriae*以外のコリネバクテリウム属 10 菌種の DNA を鋳型とした PCR では検出されなかった。ジフテリア菌特異的と考えられるこれらの ORF がコードする蛋白質の診断への応用が期待される。[猪股夢乃、三枝智美、岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

#### 4. ヒト細胞に対する付着能を指標にしたジフテリア菌付着因子の遺伝子クローニングの試み

ジフテリア菌の感染初期に必須と考えられる宿主細胞への付着の機構は、防圧の戦略を考える上で重要であるにもかかわらずほとんど知見がない。我々は、株化ヒト頬粘膜上皮細胞 HO-1-N-1 に付着することがわかっているジフテリア菌 C7 株(毒素非産生)のコスミドライブラリーを大腸菌 VCS257 株を用いて作成し HO-1-N-1 細胞に加えて、付着するクローンを回収した細胞に加えるというサイクルを繰り返すことにより、高い細胞付着能を持つクローンを複数得ることができた。これらのクローンの性質について解析中である。[三枝智美、猪股夢乃、岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

#### 5. 遺伝子組換え作物の安全性に関する研究: 遺伝子組換え作



## 細菌第二部

物の安全性に関する研究

ンター]

遺伝子組換え作物の作出時にマーカーとして用いられるカナマイシン耐性遺伝子 *nptII* が、自然形質転換能を持つ細菌を形質転換して薬剤耐性を与えるかどうかを調べる目的で研究を行なっている。前年度までに *Acinetobacter* sp. BD413 株の高頻度自然形質転換系を構築し、本年度は、*nptII* 遺伝子をマーカーとして持つ遺伝子組換えジャガイモとパパイヤ由来DNAによる形質転換を試みた。遺伝子組換え *Acinetobacter* sp. BD413 株に、フレームシフト変異により不活化した *nptII* 遺伝子を持つプラスミド pKT230neoKm<sup>S</sup> を保持させ、組換え植物DNAによる自然形質転換を試みたところ、最大でも 30/μgDNA の低頻度ではあるが、形質転換体を得ることができた。しかしこれらの実験は高頻度の自然形質転換のために最適化された受容菌を用い実験室内の条件下で行なわれたものであり、自然界での条件を完全に反映したものではない。実際に、最適化されていない *Acinetobacter* sp. を用いた実験では形質転換頻度はその  $3 \times 10^5$  分の 1 であった。組換え植物にマーカーとして用いられる Km 耐性遺伝子によって自然界の細菌が形質転換される可能性は否定できないが、その頻度は極めて低いと考えられる。[岩城正昭、荒川宜親]

6. 平成 13 年と 14 年に千葉県旭市でジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* によるジフテリア症患者が 2 名発生した。この菌の国内分布状況の調査と実験室内診断法（現行のジフテリア検査法使用）の妥当性を調べるため、昨年度に引き続き検討を行った。平成 14 年 4 月～平成 15 年 3 月に、ヒト、イヌ、ネコ、ウシの鼻腔及び咽頭スワブ総計 261 検体とイヌ、ネコの血清総計 270 検体を検査した。更に平成 15 年 2 月～3 月に、千葉県獣医師会の山武、海匝、香取支部地域のネコ鼻腔及び咽頭スワブ 207 検体と血清 200 検体を検査した。合計 468 検体のスワブからコリネバクテリウム属 13 種 76 菌株、その他のグラム陽性桿菌 11 種 43 菌株が分離された。コリネバクテリウム属の中で、千葉県動物病院の 1 匹のネコ鼻腔スワブからジフテリア毒素原性陰性の *C. ulcerans* が 1 株検出された。その他、今回分離された全菌株も、ジフテリア毒素原性は陰性であった。血中ジフテリア抗毒素価は 470 検体全て検出レベル以下であった。以上の結果より、現行法は *C. ulcerans* の診断に有効と思われるが、今回の検体からはジフテリア毒素産生性の *C. ulcerans* は検出されなかった。[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀、千葉、秋田、大分、福岡の各衛生研究所、旭中央病院、千葉県動物愛護センター、海浜動物医療セ

### ・破傷風に関する研究

#### 1. 破傷風モノクローナル抗体による破傷風トキソイド抗原の評価

ウェスタンブロッティング法により、異なる抗原認識部位を持つ 6 種類の破傷風モノクローナル抗体を用い、破傷風トキソイド抗原の評価を試みた。その結果、これらのモノクローナル抗体とトキソイドにより得られたバンド像では、使用するモノクローナル抗体により濃淡の差は認められたが、大きく異なっていなかった。そこで、今回使用したモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、破傷風トキソイド抗原を評価できないと考えられた。[福田靖、岩城正昭、高橋元秀]

### ・抗毒素に関する研究

#### 1. まむし毒素の投与経路（静脈内と腹腔内）によるマウスに対する致死毒性の予備検討

マウスを用いたまむし抗毒素の抗致死価の測定方法は、日本では静脈内投与法であるが、中国と韓国では腹腔内投与法である。そこで、投与経路によるマウスに対する致死毒性の違いを検討するために、日本のまむし試験毒素（Lot 4）を用いて予備的な検討を実施した結果、静脈内投与では、腹腔内投与と比較して、毒素はマウスに対し 1～1.5 倍高い致死活性を示した。今度、さらに厳密に致死活性の違いを測定するとともに、各国に生息するマムシが産生するそれぞれのまむし毒素で同様な試験を実施する。[福田靖、高橋元秀]

2. 国内でバイオテロなどにより大量に必要となり、将来、枯渇が予想されるボツリヌス抗毒素製剤の緊急対応策として、国内需給体制の再構築が必要となった。昨年度までに海外の抗毒素製剤の品質管理、需給体制を調査して得た実績を基に、本研究班で得られた成績では中国製のボツリヌス抗毒素の品質は国内製剤に劣らないことが確認できたため、緊急対策用として各型（A,B,E 及び F 型）のウマ免疫血清を酵素処理、部分精製した原液を輸入し、国内の抗毒素を永続的に確保することを目的として

## 細菌第二部

検討した。具体的には、中国蘭州研究所への委託製造としてポツリヌス抗毒素の製造用の原血清製造を2年間で完了し、国内の唯一の抗毒素製造所(化血研)で約250本のABEF型多価ウマ抗毒素を最終製剤として完成させた。製剤の品質管理試験は、現行のポツリヌスウマ抗毒素の生物学的製剤基準の試験項目について実施し、各試験成績は問題のないことが確認されている。[高橋元秀、福田 靖、岩城正昭、小宮貴子、中国蘭州生物製品研究所、(財)化学及血清療法研究所、厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業]

3. わが国ではガス壊疽抗毒素を現在もなお国家事業として生産・備蓄しており、毎年ほぼ一定量(約200本)のガス壊疽抗毒素が臨床現場からの要請に従って供給されている。このガス壊疽抗毒素がわが国で現在どのように利用されているかについて明らかにするために、ガス壊疽抗毒素を実際に使用した医療機関を対象にアンケート調査を行なった。その結果、非クロストリディウム性ガス壊疽患者の治療に利用されている例が約半数に上ることが明らかになった。ガス壊疽抗毒素の医療現場での使用が適正に使用されていないことが判明した。本製剤の約半分が適応疾患の誤認により使用されているため、国家備蓄品である本製剤の出庫要請時の内容確認、製剤の使用書への追加説明、医療現場への本疾患の治療方法の啓蒙等について適切且つ具体的な施策が必要である。

[高橋元秀、福田 靖、岩城正昭、杉本 央 大阪大学大学院、厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業]

4. 海外の抗毒素製剤に関する情報のデータベース化のために、WHOより入手した「International List on Availability of Vaccine and Sera」(1999)に基づいた海外の抗毒素製剤情報及び国内で製造されている抗毒素製剤情報について、製造している海外企業名、連絡先等を再調査し、可能だけ新しいデータベースに修正した。整理した情報はCDに焼き付けて関係機関に配布すると共に情報の提供依頼があった場合にはCDを分与できる体制が整った。[桑原 靖、高橋元秀、細菌製剤協会、厚生科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業]

・ BCG・ツベルクリン及び結核免疫に関する研究

1. BCG 経鼻投与モルモットの抗結核作用に及ぼす CpG DNA の免疫アジュバント効果

細菌DNAやCpG DNAが感染症・癌・アレルギーに対する治療効果やワクチンのアジュバント効果を有することが報告されている。そこで結核ワクチンであるBCGの免疫誘導におけるCpG DNAのアジュバント効果を結核感受性の高いモルモットを用いて検討した。有効配列としてAACGTTを含む30塩基鎖長CpG DNAをBCGとともにモルモットに経鼻投与し、8週後に結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rvを噴霧感染した。BCG+CpG DNAを経鼻投与した場合、脾臓・肺臓の臓器内菌数はBCGのみ投与に比べ減少が認められた。

[山本十系子、山本三郎、David N. McMurray (Texas A&M 大学)]

2. 結核菌噴霧感染モルモットのサイトカイン産生とBCG免疫の影響

モルモットは結核菌に対する感受性や遅延型アレルギー反応などがヒトと類似であるため結核のモデル動物として適している。今回はBCGで免疫したモルモットの感染初期の結核抵抗性を解明するため、結核菌噴霧感染5週後のモルモットから脾細胞、BAL細胞、腹腔細胞をとりだし、抗原特異的な *in vitro* TNF- $\alpha$  産生を検討した。その結果、結核菌感染モルモットでは非常に高いレベルのTNF- $\alpha$  産生が認められたが、BCG免疫モルモットのTNF- $\alpha$  産生は非感染モルモットと同レベルに低下した。BCGによる免疫は菌の増殖を抑えるばかりでなくTNF- $\alpha$  の過剰産生を調節することが示唆された。[山本十系子、山本三郎、David N. McMurray (Texas A&M 大学)]

3. BCG ワクチンの多様性に関する研究

(1) ATCC-ブラジル株に関する研究

BCGはフランス・パスツール研究所から世界各国に分与され、それぞれの分与先で継代培養を続けるうちに多くのBCG亜株が派生し今日に至っている。近年、結核菌の全塩基配列が解明され、結核菌とBCGの遺伝子の比較から、BCGの欠損領域が明らかとなりつつある。BCG亜株間で違いが見られる領域のうち、RD2には *mpb64* 遺伝子などが含まれる。RD2は初期に分与されたブラジル株、ロシア株、日本株には存在するが、後期に分与されたConnaught株、Pasteur株などには存在しない。RD8はFrappier株及

## 細菌第二部

びそれに由来する Connaught 株では欠損している。RD14 は Pasteur 株でのみ欠損している。RD16 はブラジル株で欠損する以外の全ての株に存在し、401bp の PCR 産物が認められる。日本株では 401bp のほか 379bp の産物も認められる。今回、ATCC-ブラジル株について MPB64 のタンパク発現をキャピリア TB で、RD16 を PCR で調べたところ、MPB64 の産生は認められず、RD16 欠損がないことが確認された。感染研及び結核研保有のブラジル株では、MPB64 は産生されず、RD16 は欠損していた。これらの結果はこの ATCC 株がブラジル株とは異なることを強く示唆している。[山本三郎、瀧井猛将、小野崎菊夫(名古屋市)、高橋光良(結核研)]

### (2) 日本株 BCG ワクチンに関する研究

日本株 BCG ワクチンの RD16 部位に変異が存在することが報告されている。この遺伝子変異を検定に合格した製品 12 ロットについて調べた結果、ほとんどのロットで変異株優位であるが、変異株/非変異株の存在比に差が認められた。これまでの力価検定では存在比の違いによる力価の差異は認められないが、製品の品質管理上、存在比率のバラツキを明らかにする必要があると考え、両株の分離、精製、判別のための定量法の開発を行った。本年度は両株の分離、株の質的安定性の確認を行った。[持田恵子、八木哲也、柴山恵吾、山本三郎]

## 4. 北西太平洋に棲息する鯨類の抗酸菌症・ブルセラ症に関する研究

海棲哺乳動物の大量死やスタンディングの報告あるいは野生生物のヒトや家畜に与える影響などから、海棲哺乳動物を含む感染症研究の重要性が指摘されている。試料は 2000 年の北西太平洋調査捕鯨で捕獲したミンククジラ 40 頭、ニタリクジラ 43 頭、マッコウクジラ 5 頭ならびに 2000/2001 年の南極海鯨類捕獲調査において捕獲したクロミンククジラ 440 頭を対象とした。その結果、ミンククジラの 35%、ニタリクジラの 5%の生殖器に抗酸菌あるいはブルセラ菌に特徴的な乾酪化、石灰化病変や間質の繊維化、肉芽腫病変が種々の程度に観察された。マッコウクジラ、クロミンククジラでは病変は認められなかった。全症例について Ziel-Neelsen 染色を行ったが抗酸菌は確認できなかった。また症例の一部はブルセラ抗体陽性であったため、PCR によるブルセラ菌検出を試みている。[大石和恵、山本三郎、後藤義孝(宮崎大)、坂東武治(鯨類研)]

## 5. 抗酸菌細胞壁アラビノガラクトサン(AG)とペプチドグリカン(PG)の

## 結合反応

*Mycobacterium smegmatis* の cell envelope 分画を用いて UDP-[14C]Galactose または 5-phospho-[14C]ribose pyrophosphate によるラベリングで AG の合成経路及び PG との結合反応を解析した。AG のアラビナンはガラクトサン合成中間体にアラビノースが付加されていく形で合成されることが示唆された。また *in vitro* ではじめて、AG と PG の結合反応を実現した。[八木哲也]

## 6. 緑膿菌由来の抗抗酸菌物質の精製

スクリーニングにより、一部の緑膿菌分離株は抗酸菌 *M. smegmatis* に対して発育阻止作用のある物質を分泌していることが示唆された。そこで、最も発育阻止作用の強かった緑膿菌 NCB244 の培養上清から薄相クロマトグラフィー・シリカゲルカラムなどを用いてこの抗抗酸菌物質の精製したところラムリビドが見い出された。緑膿菌 NCB244 でラムリシルトランスフェラーゼ遺伝子(rhlA)を破壊すると、ラムリビドが産生されなくなると共に、抗抗酸菌活性が消失した。[八木哲也、荒川宜親]

## 7. *M. bovis* BCG 日本株のトランスポゾン変異株の作製

結核菌の病原性を解析するため遺伝学的に、結核菌に非常に近縁である *M. bovis* BCG をもちいてトランスポゾン変異株を作製した。得られた 27 株の変異株において、その破壊された遺伝子を特定したところ、脂質代謝に関連する遺伝子の変異株が 9 株、細胞への侵入に関わると考えられる遺伝子の変異株が 2 株、トランスポーター遺伝子変異株が 2 株、プロテアーゼ遺伝子変異株が 2 株、PPE family 遺伝子変異株が 1 株、その他の遺伝子変異株が 12 株であった。[八木哲也]

## 8. 結核菌のもつ fadD6 の解析

結核菌のゲノム上には脂肪酸の代謝に関係すると考えられる fadD と名のつく遺伝子が 34 個も存在する。結核菌が人の体内で潜伏感染している場合の栄養源は、脂肪酸ではないかも考えられており fadD 遺伝子産物の中でも fatty acid-CoA synthetase と命名されている遺伝子産物の機能を解析する事は、結核菌の病原性の解明や、新しい抗結核剤の開発の上で重要と考えられる。我々は、その中でもほ乳類の very long chain fatty acid-CoA

## 細菌第二部

synthetase 蛋白と相同性がある fadD6 に注目し解析を行った。この蛋白を大腸菌で発現させると、脂肪酸の取込みが増加し、半精製した蛋白の解析により fadD6 も very long chain fatty acid-CoA synthetase 活性がある事が示された。現在 fadD6 の *M. bovis* BCG での発現、結核菌でのノックアウトも検討中である。〔八木哲也〕

### 9. ガンマー線不活化結核ワクチン開発に関する研究

ガンマー線照射により不活化したBCGの免疫効果をBCG生菌および加熱処理 BCG と比較した。PPD に対する遅延型過敏症誘導能はすべての BCG 免疫群で認められ、群間での有意差は認められなかった。一方、生菌およびガンマー線照射 BCG 免疫後 8 週目に比べ 12 週目での TNF 産生、IFN- mRNA 発現、殺菌活性は顕著に低下したが、加熱 BCG 免疫群ではこのような活性の低下は認められず、両者での質的差が明らかとなった。今後、生および半生 BCG ワクチンによる宿主応答低下の機序を検討する予定である。〔持田恵子、荒川宜親〕

### 10. *Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導機序の解析

*H. pylori* の  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase がアポトーシス誘導活性を持ち、この蛋白がこの菌の持つアポトーシス誘導活性において主要な役割を果たすものの一つであることを明らかにした。〔柴山恵吾、土井洋平、柴田尚宏、八木哲也、加藤はる、山根一和、荒川宜親〕

### 11. 乾燥 BCG 製剤及び精製ツベルクリン製剤の品質管理

平成 14 年度に実施したBCGワクチン 9 ロット及び膀胱内用BCG 6 ロット計 15 ロットの定量培養による力価試験成績は  $212.8 \pm 50.3$  ( 昨年は  $205.9 \pm 41.3$  ;  $0.5 \times 10^{-5}$  mg中のCFU)であった。浮遊菌液 1 mg/ml のODによる菌量測定試験は  $0.134 \pm 0.013$  (昨年は  $0.131 \pm 0.010$ )であった。精製ツベルクリンは一般診断用 10 ロット、確認診断用 2 ロット計 12 ロットについて力価試験を行った平均値は  $+0.79 \pm 1.05$  (昨年は $+0.68 \pm 3.11$ )であった。〔山本三郎、持田恵子、八木哲也、柴山恵吾、井口由美子〕

### XIII. 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) 海外で製造された沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合 (DTaP)ワクチンの品質評価に関する研究

現在、西欧諸国を中心に広く使われている DTaP のうち、3製造所(Chiron 製1ロット、SmithKline Beecham 製2ロット、Aventis Pasteur 製2ロットの計5ロット)のワクチンについて国内基準による評価を行った。いずれのワクチンもマウス白血球数増加試験およびマウスヒスタミン増感試験に適合したが、マウス体重減少試験ではかつての全菌ワクチン並の強い毒性を示し不適合と評価された。〔落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信〕

(2) 海外製 DTaP ワクチン中のエンドキシン量の評価に関する研究

海外製 DTaP ワクチン(3製造所、計5ロット)は、かつての全菌ワクチン並の強いマウス体重減少(BWD)毒性を示した。そこで、これらのワクチン中のエンドキシン含量をリムルス試験により評価したところ、2製造所のワクチンで添加したエンドキシンのリムルス活性が強(阻害されリムルス試験による評価は困難であった。Aventis 製ワクチン中のエンドキシン量はリムルス試験による評価が可能であったが、BWD 試験で示唆されたような大量のエンドキシン汚染は認められなかった。また、これらのワクチンはウサギ発熱試験ですべて陰性であった。〔落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信〕

(3) 海外で製造された DTaP ワクチンの局所反応源性に関する研究

現在、西欧諸国を中心に広く使われている DTaP のうち、3製造所のワクチンについて入手する機会を得たので、マウスの足蹠反応系を用いて局所反応原性の検討を行った。日本のワクチンと比較して、いずれの海外ワクチンもマウスに著しい足蹠反応を強く惹起し、局所の腫脹は持続した。

〔山本明彦、片岡紀代、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信〕

(4) 変異百日咳毒素遺伝子を用いた百日咳 DNA ワクチンの開発研究

新規百日咳ワクチンの開発を目的に、変異百日咳毒素遺伝子を用いた DNA ワクチンを作製し、その有効性について検討を行った。変異導入は毒素活性ドメインである C180 の R9 (R9K), E129 (E129G)について行い、毒素活性が消失する3種の DNA ワクチン (pcDNA/C180-9K, /C180-129G, /C180-9K/129G)を試作した。試作 DNA ワクチンの有効性をマウスを用いた動物実験により評価

## 細菌第二部

したところ、3種の DNA ワクチンはいずれも変異導入による免疫原性の低下は認められず、毒素攻撃に対し有効なワクチンとなることが判明した。

[蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親]

(5)DTaP ワクチン局所反応の定量的動物モデルを用いた局所腫脹反応の評価

当研究室にて開発された DTaP ワクチンによる、2回目感作あるいは12歳時の DT トキソイド追加接種の際の強い局所反応を予測可能な定量的動物実験モデルについてその局所腫脹反応の作用機作を明らかにするための実験を行った。今回は、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、その2週間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時間後に採血してその血清中のサイトカインを定量したが変化はなかった。

[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、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キシン量の評価に関する研究

Avantis Pasteur 製の破傷風トキソイドをキャリアーとした Hib ワクチン中のエンドキシン量を評価した。リムルス試験によりワクチン中には 300 EU/ml を超える強いリムルス活性が認められた。そこでウサギ末梢血を用いた *in vitro* 試験法およびウサギ発熱試験により生物活性の確認をしたところ、リムルス試験と同様、強い発熱活性が認められ、相当量のエンドキシンが汚染していることが確認された。[落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信]

(2)インフルエンザ HA(HA)ワクチンのマウス白血球数減少試験に関する研究

近年、HA ワクチンのマウス白血球数減少活性が増加し、その品質管理試験における高精度判定が必要となってきた。一昨年度急遽参照品を作成し定量試験法の導入を行ったが、なお精度および施設間での再現性等の問題点があったため、これらの問題解決のための試験法の精度向上を試みた。接種部位、マウス系統および採血時の加温等の条件検討を行った。その結果、ddY4週齢マウスに比較して ICR6週齢マウスにおいて精度および感度が向上する傾向が認められた。また採血直前のマウス加温により、かなりの精度および感度の向上が見込めることがわかった。[落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

### 3. エンドキシンに関する研究

(1)抗毒素製剤中のエンドキシン量の評価に関する研究

インドネシアおよびブルガリアで製造された各種抗毒素の混入エンドキシンの評価を試みた。インドネシア製の抗毒素は概してリムルス試験に強い阻害作用を認めた。しかし大部分の製剤で検体の希釈によりエンドキシン試験の適用が可能であると考えられた。一方、ブルガリア製の抗毒素製剤の中には強いリムルス活性を示すものが認められた。しかし、このリムルス活性はポリミキシンB処理に抵抗性であり、リムルス試験擬陽性物質による活性であると考えられた。今回試験した抗毒素製剤には顕著なエンドキシン汚染は認められなかったものの、一部の抗毒素製剤にエンドキシンの混入が認められた。[落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、高橋元秀]

(2)日本薬局方(日局)エンドキシン 100 標準品の標準化

日本公定書協会で日局エンドキシン 100 標準品(Lot 4, 5)候補品が調製され、前回同様、当研究室で作成した標準プロトコールに準じて、日本公定書協会、当研究室他 計7施設の参加の下に、米国薬局方エンドキシン標準品、日局標準エンドキシン 10000 標準品(Lot 5)を用いて標準化を行った。結果として、エンドキシン 100 標準品の単位は Lot 4 候補品が 140 EU/vial、Lot 5 候補品が 120 EU/vial と計算された。[堀内善信、山本明彦、蒲地一成、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、村井敏美(日本公定書協会)、中川ゆかり(国立医薬品食品衛生研究所)]

(3) 内毒素の *in vitro* 生物活性測定法の定量的評価

内毒素の *in vitro* 生物活性測定法の定量的評価のためにマウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞を用いた TNF- $\alpha$  産生系を用いて抗生物質製剤とエンドキシンとの協同作用を評価した。今年度はラクタム系抗生物質5種を調べた。臨床濃度に希釈したこれらの抗生物質とエンドキシンを段階希釈したものと同時に TNF- $\alpha$  産生系に加えて20時間後の培養上清のマウス TNF- $\alpha$  産生量を ELISA で定量した。その結果、これらの抗生物質には TNF- $\alpha$  産生の増強はみられなかった。

[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

(4) 内毒素のヒト由来細胞株を用いた *in vitro* 生物活性測定系の作成

昨年に引き続いてヒトに特異的な作用を示す生物製剤の内毒素との協同作用を測定するために、ヒト由来細胞を用いてエンドキシンに対するサイトカイン産生系を用いる検討を行った。本年は、ま

## 細菌第二部

ずヒト特異的と言うことに注目してヒト末梢血でのヒトインターフェロン製剤によるエンドキシンのサイトカイン産生増強についてヒト由来細胞と反応性を比較した。その結果、両者の間にはよい相関が得られた。

[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

### 4. 百日咳菌に関する研究

#### (1) 百日咳死亡事例において分離された百日咳菌の細菌学的解析

百日咳死亡事例において分離された百日咳菌について細菌学的解析を行った。死亡患児から分離された2種の百日咳菌(A1-, A2-type)について解析を行った結果、A1-type に 40 kb のサイズを持つプラスミドの存在が確認された。プラスミド解析の結果、本プラスミドは大腸菌の F-plasmid 上にコードされる *traL* 遺伝子を有することが判明し、このプラスミドは他菌から百日咳菌に水平伝播したものと考えられた。現在、患児死亡原因とプラスミドの関係を明らかにするため、プラスミドの全塩基配列決定を進めている。

[蒲地一成、永田典代、近田俊文、玉井友治、井上敏郎(大分県立病院)、荒川宜親]

#### (2) 2001-2002 年に日本で分離された百日咳臨床分離株の分子疫学的解析

日本における百日咳感染症の発生動向を把握することを目的に、2001 年から 2002 年に我が国で発生した百日咳臨床分離株(29 株)の遺伝子型を解析した。PFGE 解析の結果、1) 解析菌株は2タイプ(A-, B-type)に分類され、その分離率は A-type が 52%、B-type が 48%であること、2) B-type の遺伝子型を有する百日咳菌の分離率が近年上昇傾向にあることが確認された。B-type の分離率上昇理由を考察するため、発生状況について疫学的解析を加えたところ、発生地域、患者年齢、発生時期、ワクチン歴との間に相関は認められなかった。

[蒲地一成、大塚正之(江東微研)、児玉温子、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、荒川宜親]

#### (3) 福岡県内で発生した百日咳流行の分子疫学的解析

1991 年を中心に福岡県内で百日咳の outbreak が認められた。この outbreak を解析するため、百日咳様患者より分離された 29 株の百日咳菌について PFGE による遺伝子型解析を行った。解析の結果、29 株の百日咳菌は3タイプに大別され、型が 23 株(79%)、型が 4 株(14%)、型が 2 株(7%)であった。遺伝子型と分離時期との関係を解析したところ、1) 1991 年の流行時には全ての

遺伝子型(、型)の百日咳菌が分離されていること、2)

型の百日咳菌は 1990、1992、1995 年にも分離されていることが示された。分離菌株について百日咳毒素遺伝子のコピー数を解析したところ、解析を行った菌株はすべて1コピーであった。以上の結果から、福岡県内で認められた百日咳 outbreak は主に型の遺伝子型を有する百日咳菌の伝播により発生したものと結論された。

[蒲地一成、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀川和美(福岡県保環研)、岡田賢司(南福岡病院)、堀内善信]

### 5. 薬剤耐性菌の感染事例解析

#### (1) 北九州市内の病院で発生した VRE 感染事例の解析

北九州市内の K 病院において我が国最大の VRE 感染事例が発生した。本感染事例の実態を細菌学的見地より把握するため、1998 年から 2002 年にかけて入院患者・職員・環境より分離された VRE(*E. faecalis*: 65 株、*E. faecium*: 14 株、*E. avium*: 32 株、*E. casseliflavus*: 1 株)について PFGE 解析を行った。遺伝子型解析の結果、同一の遺伝子型を有する VRE が異なる入院患者から多数分離されていることが判明し、患者間で VRE の伝播が生じていた可能性が指摘された。また、同一の *vanA* fragment size を有する VRE が異なる菌種間で見出されたことから、異菌種間において *vanA* 遺伝子の伝達が生じていたものと考えられた。

[蒲地一成、加藤はる、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、近田俊文、甲斐久美子、八木哲也、柴山恵吾、荒川宜親]

#### (2) NICU で発生した新生児 MRSA 感染事例の分子疫学的解析

2002 年に大阪府内の小児専門病院の NICU において7例の新生児に MRSA が感染し、7 例中4例がブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群(SSSS)を発症した。患児より分離された MRSA の遺伝子型を PFGE により解析したところ、7株の MRSA は全て同一の遺伝子型に分類され、NICU 内での施設内伝播の可能性が強く示唆された。また、病院が実施した疫学的調査から病院内に勤務する助産婦が感染源である可能性が指摘され、助産婦からは新生児から分離された MRSA と同一の遺伝子型を有する MRSA が分離された。以上の結果から、本感染事例は助産婦を感染源とする新生児 MRSA 感染事例であると考えられた。

[蒲地一成、山本明彦、荒川宜親]

## 細菌第二部

### 研究課題一覧

#### 1. 新興・再興感染症研究事業

a. 薬剤耐性菌の発生動向のネットワークに関する研究(主任: 荒川宜親)

b. 新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに薬剤耐性機構の解析及び迅速・簡便検出法に関する研究(主任: 池康嘉)

分担研究課題: カルバペネム耐性グラム陰性桿菌から分離された新しいタイプのメタロ-β-ラクタマーゼ IMP-2 に関する解析(分担: 荒川宜親、研究協力者: 柴田尚宏他)

c. 院内感染の発症リスクの評価及び効果的な対策システムの開発に関する研究(主任: 倉辻忠俊)

分担研究課題: 海外におけるセラチア等グラム陰性桿菌による血流感染症等の報告状況に関する研究(分担: 荒川宜親)

d. 感染症診断・検査手法の精度管理並びに標準化及びその普及に関する研究(主任: 倉田毅)

分担研究課題: 通常の細菌学的同定検査により同定不能な菌種の同定法に関する検討(分担: 荒川宜親、研究協力者: 柴田尚宏他)

f. ツベルクリン検査・BCG 等に代わる結核等の好酸菌症に係る新世代の診断技術および予防技術の開発に関する研究(主任: 牧野正彦)

分担研究課題: g-線照射処理好酸菌による感染防御免疫の誘導(分担: 荒川宜親、研究協力者: 八木哲也、持田恵子)

g. 効果的な感染症発生動向調査のための国及び県の発生動向調査の開発に関する研究(主任: 岡部信彦)

分担研究課題: 百日咳・ジフテリア及びマイコプラズマの病原体分離等調査研究

日本における百日咳菌臨床分離株の染色体パターン解析と分子疫学(分担: 荒川宜親、研究協力者: 児玉温子、蒲地一成他)

h. 生物テロに使用される可能性の高い病原体による感染症の蔓延防止、予防、診断、治療に関する研究

(主任: 佐多徹太郎)

分担研究課題: ポツリヌスの迅速な病原体検出法、蔓延防止策、予防、診断、治療法の開発(分担: 高橋元秀、研究協力者: 岩城正昭、小宮貴子、福田 靖)

#### 2. 医薬安全総合研究事業

a. 新生児および乳幼児の MRSA 感染等の院内感染リスク評価および対策に関する研究(主任: 武澤 純)

分担研究課題: NICU で院内感染を引き起こす細菌に関する検討(分担: 荒川宜親)

b. 海外において製造、使用されているワクチンの品質評価に関する研究(主任: 倉田毅)

分担研究課題: 細菌ワクチンの検討(分担: 荒川宜親、研究協力者: 近田俊文他)

c. 安定供給に向けた国内外の抗毒素製剤の品質管理に関する研究(主任: 高橋元秀)

主任研究課題: 総括 抗毒素の有効性に関する研究(研究協力者: 岩城正昭、小宮貴子、福田 靖)

分担研究課題: 中国における生物学的製剤の製造と品質管理の現状調査(分担: 佐々木次雄)

d. 医薬品、医療用具等の無菌性保証及びその妥当性に関する研究(主任: 棚元憲一(国立医薬品食品衛生研究所))

分担研究課題: 日本薬局方「製薬用水」の在り方に関する研究(分担: 佐々木次雄、他)

分担研究課題: 日本薬局方導入を目指す試験法及び手法の科学的妥当性に関する研究(分担: 佐々木次雄、見理剛)

分担研究課題: 医薬品製造におけるバイオセーフティ対策に関する研究(分担: 佐々木学(北里研究所)、佐々木次雄)

e. 人工ポリクローナル Fv グロブリン製剤の開発に関する研究(主任: 鈴木和男)

分担研究課題: MPO-ANCA 自己免疫疾患治療に有効な抗体作製に関する研究(分担: 新井孝夫、佐々木次雄)

## 細菌第二部

- f. 院内感染を防止するための医療用具及び院内環境の管理及び運用に関する研究(主任: 山口恵三(東邦大学医学部))  
分担研究課題: 医療現場での滅菌に関する指針案作成に関する研究(分担: 佐々木次雄、大久保憲、他11名)  
分担研究課題: 医療用具・環境関連感染症への対応及び無菌保証: 院内環境関連感染症への対応(分担: 大久保憲、佐々木次雄)
3. 特定疾患対策研究事業  
特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究  
(主任: 佐多徹太郎)  
分担研究課題: 微生物の慢性感染が関与する特定疾患におけるマイコプラズマの探索(分担: 荒川宜親、研究協力者: 佐々木裕子他)
4. ヒトゲノム・再生医療等研究事業
- a. バイオテクノロジー応用食品の安全性確保および高機能食品の開発に関する研究(主任: 首藤紘一)  
研究協力課題: 薬剤耐性の伝達性に関する研究(研究協力者: 荒川宜親、岩城正昭)
5. ヒューマンサイエンス財団国際研究グラント事業
- a. 結核防御粘膜免疫誘導性ワクチンに関する研究(主任: 山本三郎)
6. 国際医療協力研究委託事業
- a. 開発途上国における生物学的製剤の品質管理に関する研究(主任: 堀内善信)  
分担研究課題名: 百日せきワクチンの品質管理(力価試験法))[分担: 近田俊文]  
分担研究課題: ジフテリア・破傷風トキソイドの品質管理(分担: 岩城正昭、研究協力者: 高橋元秀、小宮貴子、福田 靖)  
分担研究課題: ベトナムに対する微生物管理試験法の技術指導とGMP指導(分担: 佐々木次雄)
- b. ポリオ根絶達成の実証とその他 EPI 疾患サーベイランス手法強化に関する研究(主任: 山本悌司(福島県立医科大学医学部))  
分担研究課題: ジフテリアと破傷風の実験室診断と疫学解析(分担: 高橋元秀、研究協力者: 岩城正昭、小宮貴子、福田 靖)
7. 高度先端医療研究事業
- a. 各種疾患の治療に役立つヒト抗体の単離調整(主任: 黒沢良和)  
分担研究課題: 各種毒素の調整と抗体の検定(分担: 高橋元秀)
8. 創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
- a. ボツリヌス A F 型神経毒素を用いたジストニア等の治療方法の確立(主任: 小熊恵二(岡山大学医学部細菌学教室・教授))  
分担研究課題: ボツリヌス毒素・抗毒素の微量定量法と品質管理(分担: 高橋元秀、研究協力者: 岩城正昭、小宮貴子、福田 靖)
9. 文部科学研究費
- a. 遺伝子解析技術を用いたデフィシル菌院内感染発生時における流行株の解明[加藤はる]
- b. カルバペネム耐性グラム陰性桿菌におけるメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子および基質拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の解析[柴田尚宏]
- c. 腸内細菌群におけるプラスミド性クラス C  $\beta$ -ラクタマーゼの解析と簡易検出法の検討[土井洋平]
- d. ヘリコバクターピロリのアポトーシス誘導因子の精製(主任: 柴山恵吾)



細菌第二部

その他、業務に関連する事項

1. 無菌試験

第1室

・生物学的製剤と抗生物質製剤の品質管理に関する業務

1. 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) 収去検査

抗生物質：経口剤(アムホテリシンB) 4ロット

抗生物質：経口剤(セファトリジンプロピレングリコール) 7ロット

抗生物質：注射剤(硫酸ゲンタマイシン) 5ロット

抗生物質：注射剤(塩酸バンコマイシン) 3ロット

(2) 特別審査

抗生物質：注射用シナシッド(キヌプリスチン/ダルホプリスチン)

1 件

抗生物質：アジスロマイシン水和物錠 600mg 1 件

抗生物質：ファンガード(ミカファンギンナトリウム) 1 件

抗生物質：ストロメクトール錠3(イベルメクチン) 1 件

抗生物質：パッカム(塩酸セフチゾキシムアラビボキシル) 1 件

抗生物質：ケテック(テリスロマイシン) 1 件

(3) 依頼試験

抗生物質：標準品(硫酸ペプロマイシン)の力価試験 1 件

2. 標準品、参照品等の作製状況(交付、分与の実績)

(1) 交付

抗生物質医薬品標準品 39 品目 計 401 本

3. 標準菌株等(交付、分与の実績)

(1) 交付

抗生物質試験用菌株 1 品目 計 1 本

4. 行政関係の各種委員会等への委員等としての参加協力

(1) 日本薬局方調査会・抗生物質委員会へ委員として参加協力[委員：荒川宜親、代理：近田俊文]

(2) 財団法人日本公定書協会・公定書標準品整備検討委員会へ委員として参加協力[委員：荒川宜親、代理：近田俊文]

第2室

(1) 生物学的製剤

月	試験実施 件数	判定		再試験	取下げ
		合格	不合格		
4	55	55	0	0	0
5	83	83	0	0	0
6	62	62	0	0	0
7	51	51	0	0	0
8	81	81	0	0	0
9	144	144	0	0	0
10	79	79	0	0	0
11	65	65	0	0	0
12	60	60	0	0	0
1	59	59	0	0	0
2	58	58	0	0	0
3	67	67	0	0	0
計	864	864	0	0	0

(2) 抗生物質製剤

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	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0

細菌第二部

10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0			
1	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0
計	6	6	0	0	0

成人用沈降ジフテリアトキソイド 1ロット  
 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 7ロット  
 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 9ロット  
 乾燥まむしウマ抗毒素 2ロット  
 乾燥はぶウマ抗毒素 1ロット  
 抗破傷風人免疫グロブリン 5ロット

2002年度(平成14年度)

(3) マイコプラズマ否定試験

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	1	1	0	0	0
7	1	1	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0
11	1	1	0	0	0
12	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0
計	6	6	0	0	0

2. 標準品、参照品等の作成状況 (交付、分与の実績)

(1) 交付

標準ジフテリアトキソイド 5本  
 標準沈降ジフテリアトキソイド 16本  
 参照沈降ジフテリアトキソイド(混合ワクチン用)  
 60本  
 標準ジフテリア抗毒素 2本  
 参照ジフテリア抗毒素(フロキュラシオン用) 5本  
 ジフテリア試験毒素(ウサギ試験用) 2本  
 シック試験毒素(動物用) 6本  
 ジフテリア試験毒素(培養細胞法用) 18本  
 標準破傷風トキソイド 5本  
 標準沈降破傷風トキソイド 29本  
 参照沈降破傷風トキソイド(混合ワクチン用) 31本  
 標準破傷風抗毒素 14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 11本  
 標準はぶ抗毒素 17本  
 はぶ試験毒素(出血) 8本  
 はぶ試験毒素(出血) 12本  
 標準まむし抗毒素 3本  
 まむし試験毒素(致死) 8本

第3室

1. 生物学的製剤の品質管理に関する業務

1. 国家検定、国家検査、収去検査、特別審査、依頼検査等の実績

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)

30ロット

沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド 7ロット

沈降破傷風トキソイド 8ロット

(2) 分与

標準沈降ジフテリアトキソイド 台湾 FDA 4本  
 標準ジフテリア抗毒素 計 6本  
 (台湾2本、甲子園大学2本、東京都都立衛生研究所2本)  
 ジフテリア試験毒素(培養細胞法用) 計 15本  
 (台湾5本、甲子園大学2本、タイ5本、東京都都立衛生研究  
 所3本)  
 参照沈降破傷風トキソイド(混合ワクチン用)

## 細菌第二部

	中国	2本	
標準破傷風抗毒素	計	3本	
(中国2本、阪大微研1本)			
破傷風試験毒素	計	6本	
(中国2本、タイ2本、インドネシア2本)			
標準まむし抗毒素	韓国 FDA	2本	
まむし試験毒素(出血)	韓国 FDA	3本	
まむし試験毒素(致死)	韓国 FDA	3本	

### 3. 標準菌株等(交付、分与の実績)

<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (PW8 株)	1本
<i>Corynebacterium ulcerans</i> (ジフテリア毒素産生性)	4本

### 4. GMP 査察等への協力

平成 15 年 1 月 9-10 日の間、厚生労働省医薬局血液対策課長の要請により、(財)化血研主催で開催されたウマ抗毒素等に関する住民説明会に専門家として参加し意見を述べた。[高橋元秀]

#### 行政検査の受入れ状況

ジフテリア関係[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

平成 14 年 6 月 22 日、藤田保健衛生大学病院よりジフテリア診断のため、患者1名からの扁桃白苔、分離培養菌株、血清について検査依頼を受けた。全検体についてジフテリア菌の検出及び毒素原性試験は陰性であった。血中ジフテリア抗毒素価は 0.668 単位/ml であった。

平成 15 年 1 月 16 日、横浜衛生研究所よりジフテリア診断のため、患者1名からの偽膜、咽頭スワブ、左右の鼻腔スワブを血液寒天培地に塗抹培養された検体と血清 3 本(平成 14 年 12 月 12 日、16 日、25 日採血)について検査依頼を受けた。全検体についてジフテリア菌の検出及び毒素原性試験は陰性であった。血中ジフテリア抗毒素価は採血日順に、0.0905、0.256、0.181 単位/ml であった。

平成 15 年 1 月 17 日、島根県保健環境科学研究所よりジフテリア診断のため、患者1名から咽頭スワブ、咽頭スワブ分離培養菌株、血清 2 本(平成 15 年 1 月 15 日、1 月 20 日採血)について検査依頼を受けた。全検体についてジフテリア菌の検出及び毒素原性試験は陰性であった。分離培養菌株は

*Corynebacterium striatum* であった。血中ジフテリア抗毒素価は採血日順に、0.0288、0.0407 単位/ml であった。

平成 15 年 1 月 29 日、王子生協病院より *Corynebacterium ulcerans* 診断のため、分離培養菌株 1 検体について検査依頼を受けた。この菌株は *Corynebacterium striatum* であり、ジフテリア毒素原性試験は陰性であった。

破傷風関係[福田 靖、岩城正昭、高橋元秀]

平成 14 年 10 月 16 日、常滑市民病院 臨床検査センターより、破傷風菌の疑いがある患者由来菌株からの破傷風毒素遺伝子検出試験と毒素産生能試験の依頼があった。検査の結果、依頼菌株より破傷風毒素遺伝子と破傷風毒素検出されなかった。

平成 14 年 11 月 14 日、秋田県衛生科学研究所より、破傷風菌の疑いがある患者由来菌株からの破傷風毒素遺伝子検出試験と毒素産生能試験の依頼があった。検査の結果、依頼菌株より破傷風毒素遺伝子と破傷風毒素が検出された。

平成 15 年 1 月 30 日、旭中央病院 内科より、破傷風菌の疑いがある患者血清からの破傷風毒素と破傷風抗体の検査依頼があった。検査の結果、依頼血清より破傷風毒素と破傷風抗体は検出されなかった。

平成 15 年 2 月 25 日、九州労災病院 神経内科より、破傷風菌の疑いがある患者血清(7 検体)からの破傷風毒素と破傷風抗体の検査依頼があった。検査の結果、1 検体の依頼血清より破傷風毒素が検出され、他の 6 検体から破傷風抗体が検出された。

### 6. その他、行政関係の各種委員会等への委員等としての参加協力

・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 ]

#### 第4室

##### 1. 生物学的製剤の品質管理に関する業務

###### 1. 国家検定等

###### (1) 国家検定

細菌第二部

乾燥 BCG ワクチン(最終製品)	9 ロット	(2)血液製剤のエントキシン試験	504件
内訳 80mg	4 ロット	(3)インフルエンザワクチン	
40mg	1 ロット	マウス白血球数減少試験	51件
12mg	4 ロット	(4)コレラワクチン	
乾燥 BCG ワクチン(中間段階)	5 ロット	マウス体重減少試験	1件
乾燥 BCG(膀胱内用)(最終製品)	6 ロット	(5)抗生物質	
乾燥 BCG(膀胱内用)(中間段階)	5 ロット	エントキシン試験	8件
精製ツベルクリン	12 ロット		
内訳 一般診断用(5 µg)	1 ロット	2. 標準品、参照品等の作成状況(交付、分与の実績)	
一般診断用(1 µg)	1 ロット	(1)交付	
一般診断用(一人用)	8 ロット	ア 標準百日せきワクチン	58 本
確認診断用(一人用)	1 ロット	イ 標準百日せきワクチン毒性参照品	111 本
確認診断用	1 ロット	(2)分与	
ウイルスワクチン(結核菌否定試験)	6 ロット	ア 標準百日せきワクチン(韓国 FDA)	10 本
内訳 乾燥弱毒生風しんワクチン	1 ロット	イ 標準百日せきワクチン(台湾 NLFD)	10 本
乾燥弱毒生麻しんワクチン	3 ロット		
乾燥弱毒生おたふくカゼワクチン	1 ロット		
経口生ポリオワクチン	1 ロット	. 国際協力	

書類審査

第1室

乾燥 BCG ワクチン(皮内用 0.5 mg) 49 ロット

2. 標準品等

交付

標準精製ツベルクリン

10 本

BCG Tokyo-172 株

40 本

1. JICA プロジェクトへ協力

JICA トルコ感染症プロジェクト(宮村紀久子専門家)に対して百日咳抗体価測定に関する技術的な情報提供を行った。[近田俊文]

2. 国際医療協力研究委託費による国際共同研究

研究事業「開発途上国における生物学的製剤の品質管理に関する研究」の一環として、2002年11月18-19日に開催された「DTP及びDTaPワクチン品質管理試験と臨床相関」の会議に参加し、中国、台湾、韓国、タイ、インドネシアの各国研究者と百日咳ワクチン及び百日咳菌の研究成果について情報交換を行った。[堀内善信、蒲地一成、近田俊文]

標準化

標準精製ツベルクリン(小分製品)Lot40-2の在庫減少に伴い日本ビーシー製造(株)に依頼して標準精製ツベルクリン原末Lot40から小分製品を3000本作成し標準精製ツベルクリン(小分製品)Lot40-3とした。感作モルモットによる力価試験の結果Lot40-3はLot40及びLot40-2と等力価であることが確認された。

第5室

第3室

1. 国家検定、国家検査、収去検査、特別審査、依頼検査等の実績

(1)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) 30 ロット

1. JICA 等研修生、実習生等受け入れ

(1)平成13年9月1日より1ヶ年の予定で、中国蘭州生物製品研究所 陳平紆研究員を当部協力研究員として受け入れ、DPT ワクチン関連の品質管理の研究を実施中である。[第三室]

## 細菌第二部

(2)平成 15 年月日

### 2. JICA 等プロジェクトへの参加、協力

国際医療協力研究「開発途上国の生物学的製剤品質管理に関する研究」班の活動として、平成 14 年 9 月 22 日～10 月 1 日の間、韓国 FDA にてジフテリアトキソイド力価試験法の技術指導を行った。[小宮貴子、高橋元秀]

国際医療協力研究「開発途上国の生物学的製剤品質管理に関する研究」班の活動として、平成 14 年 6 月 13 日～18 日の間、中国薬品生物製品検定所にてジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験法の協議、技術指導を行った。[福田 靖]

国際医療協力研究「開発途上国の生物学的製剤品質管理に関する研究」班の活動として、平成 15 年 2 月 18 日～26 日の間、タイ国 NIH にてジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験法の協議、技術指導を行った。[岩城正昭]

国際医療協力事業団の要請を受けて、平成 14 年 7 月 20～31 日の間、モンゴル国母と子のプロジェクトの技術支援として、ジフテリアの調査に係わる技術指導のために赴いた。[高橋元秀]

厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業に関する研究活動として、平成 14 年 10 月 8～17 日の間、中国上海生物製品研究所と蘭州生物製品研究所に研究打ち合わせおよび技術指導のために出張した。[高橋元秀]

### 3. WHO 等による国際標準化作業等への参加協力

アジア地域内の参照まむし抗毒素の作製：厚生労働科学研究費補助金を受けて、日本（感染研と化学及血清療法研究所）、韓国（食品医薬品検査所）と中国（中国薬品生物製品検定所と上海生物製品研究所）で、共通に使用する参照まむし抗毒素の標準化を実施した。標準化の結果、参照まむし抗毒素 1 バイアル当たりの抗致死価は 32,000 単位、抗出血価は 36,000 単位と決定した。[福田 靖、高橋元秀]

### 4. WHO 等国際的公的機関が主催する会議等への参加

平成 14 年 12 月 16-17 日にオランダで開催された“WHO meeting on harmonization of potency assays and consistency measurement”に参加し、ジフテリア、破傷風トキソイドの力価試験について討議した。[高橋元秀]

### 5. その他

平成 14 年 7 月 18 日、国際保健医療交流センターの要請により、感染症対策専門家養成研究のために、海外 8 名、国内 2 名の研修生に、DPT の診断とその対策について講義した[高橋元秀]。

第5室

国際医療協力研究事業「開発途上国の生物製剤品質管理に関する研究」を、中国、韓国、台湾、タイ、インドネシアの国立品質管理研究所と実施し、DPT ワクチンの品質管理試験の国際調和と関連する臨床データ収集・解析システムを導入した。

## 発表業績一覧

### I. 誌上発表

#### 1. 欧文発表

- 1) Maja Rupnik, Naoki Kato, Miklavz Grabnar, Haru Kato: New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolated from Asia. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:1118-1125, 2003.
- 2) Doi Y, N Shibata, K Shibayama, K Kamachi, H Kurokawa, K Yokayama, T Yagi, Y Arakawa: Characterization of a Novel plasmid-mediated cephalosporinase(CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolates.: *Antimicro. Agent and Chemotherapy*, 46(8): 2427-34, 2002.
- 3) Ohkawa T, M Yoshinaga, N Ikarimoto, H Miyahara, K Miyata, Y Doi, N Shibata, Y Arakawa: Characterization of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains that produce CTX-M-2-type broad spectrum beta-lactamase isolated from a child with leukemia.: *The Pediatric Infect. Dis. J.* 21(3): 260-62, 2002.
- 4) Ozawa Y, Tanimoto K, Nomura T, Yoshinaga M, Arakawa Y, Ike Y. Vancomycin-resistant enterococci in humans and imported chickens in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002 Dec;68(12):6457-61.
- 5) Kurosaki H, Yasuzawa H, Yamaguchi Y, Jin W, Arakawa Y, Goto M. Detection of a metallo-beta-lactamase (IMP-1) by fluorescent probes having dansyl and thiol groups. *Org. Biomol. Chem.* 2003 Jan 7;1(1):17-20.

## 細菌第二部

- 6) Sasaki Y., Ishikawa J., Yamashita A., Oshima K., Kenri T., Furuya K., Yoshino C., Horino A., Shiba T., Sasaki T. and Hattori M. The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Research* 30(23): 5293-5300, 2002.
- 7) Horino A., Sasaki Y., Sasaki T., and Kenri T. Multiple promoter inversions generate surface antigenic variation in *Mycoplasma penetrans*. *J. Bacteriol.* 185: 231-242, 2003.
- 8) Sasaki T. Parametric release for moist heated pharmaceutical products in Japan. *PDA J. GMP and Validation*, 4: 7-10, 2002.
- 9) Sasaki T. Sterile product manufacturing in Japan. *PDA J. GMP and Validation*, 4: 80-84, 2002.
- 10) Yasushi Torii, Yoichi Tokumaru, Seijirou Kawaguchia, Nanae Izumia, Seika Maruyama, Masafumi Mukamoto, Shunji Kozaki, and Motohide Takahashi : Production and immunogenic efficacy of botulinum tetraivalent (A, B, E, F) toxoid. *Vaccine* 20, 2556-2561, 2002
- 11) TAKAHASHI, M. OMORI-SATOH, T. : What is the rabbit skin test method by Kondo et al.(1960) for determining hemorrhagic activities of snake venom? *Toxicon* 40, 2002
- 12) Yuriko Suzaki, Yasushi Ami, Noriyo Nagata, Seishiro Naio, Hiroshi Kato, Maiko Taniguchi, Motohide Takahashi, Takako Komiya, Sachihiro Satoh, Fumio Gondaira, Junichi Sugiyama, Yoshio Nakano, Masahito Mori, Katsutoshi Komuro and Tetsuya Uchida: Protection of Monkeys against Shiga Toxin Induced by Shiga Toxin-Liposome Conjugates. *International Archives of Allergy and Immunology* 127:294-298, 2002
- 13) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Nojima, Y., Umemori, K., Phalen, S., McMurray, D.N., Kuramoto, E., Iho, S., Takauji, R., Sato, Y., Yamada, T., Ohara, N., Matsumoto, S., Goto, Y., Matsuo, K. and Tokunaga, T.: Discovery of immunostimulatory CpG-DNA and its application to tuberculosis vaccine development. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55, 37-44, 2002.
- 14) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Tokunaga, T.: "Historical Perspectives. Microbial DNA and Host Immunity". Edited by Ras, E. pp9-14. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2002.
- 15) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Kataoka, T., Iho, S., Tokunaga, T.: Activation of NK cell by immunostimulatory Oligo-DNA in mouse and human. "Microbial DNA and Host Immunity". Edited by Ras, E. pp81-89. Humana Press, Totowa, NJ, USA. 2002.
- 16) Takauji, R., Iho, S., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Kitagawa, H., Iwasaki, H., Iida, R., Yokochi, T., Matsuki, T.: CpG-DNA-induced IFN-alpha production involves p38 MAPK-dependent STAT1 phosphorylation in human plasmacytoid dendritic cell precursors. *J. Leukoc. Biol.* 72(5):1011-1019, 2002.
- 17) Ohishi, K., Zenitani, R., Bando, T., Goto, Y., Uchida, K., Maruyama, T., Yamamoto, S., Miyazaki, N., Fujise, Y.: Pathological and serological evidence of *Brucella*-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 26:125-136, 2003.
- 18) Shibayama K., Kamachi K., Nagata N., Yagi T., Nada T., Doi Y., Shibata N., Yokoyama K., Yamane K., Kato H., Inuma Y., Arakawa Y.: Novel Apoptosis-inducing Protein from *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 47(2):443-51, 2003.
- 19) Ochiai, M., Tamura H., Yamamoto, A., Aizawa M., Kataoka, M., Toyozumi, H. and Horiuchi, Y. A Limulus amoebocyte lysate activating activity (LAL activity) that lacks biological activities of endotoxin found in biological products. *Microbiol. Immunol.*, 46, 527-533, 2002
- 20) Kataoka, M., Toyozumi, H., Yamamoto, A., Ochiai, M. and Horiuchi, Y. Chinese Hamster Ovary (CHO) cell clustering does not correlate with *in vivo* histamine-sensitization when measuring residual activity of aldehyde-treated pertussis toxin (PT). *Biologicals*, 30, 297-302, 2002
- 21) Yamamoto, A., Ochiai, M., Kataoka, M., Toyozumi, H. and Horiuchi Y.: Development of a highly sensitive in vitro assay method for biological activity of endotoxin contamination in biological products. *Biologicals*. 30, 85-92, 2002.
- 22) Yamamoto, A., Nagata, N., Ochiai, M., Kataoka, M., Toyozumi, H., Okada, K. and Horiuchi, Y. Enhanced sensitisation of mice with diphtheria tetanus acellular pertussis vaccine to local swelling reaction to the booster immunization. *Vaccine*, 20, 3088-94, 2002.

## 2. 和文発表

- 1) 加藤はる、加藤直樹: *Clostridium difficile* 感染症と細菌学的検査. *日本臨床微生物学会誌* 12(3):115-122, 2002.
- 2) 加藤はる: 病原微生物の迅速検査 - 各論、消化管感染症起因菌の迅速検査、クロストリディウムデフィシル毒素. *臨床検査* 47(2):169-174, 2003.

## 細菌第二部

- 3) 柴田尚宏, 荒川宜親: 誰でもわかる遺伝子検査: 薬剤耐性菌. 検査と技術, 増刊号, Vol. 30, No. 10, 1043-1052, 2002.
- 4) 佐々木裕子, 石川 淳, 山下敦士, 大島健志朗, 見理 剛, 古谷恵子, 吉野智絵, 堀野敦子, 柴 忠義, 佐々木次雄, 服部正平, *Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の解析, 日本マイコプラズマ学会雑誌 29, 59-62, 2002.
- 5) 堀野敦子, 見理 剛, 佐々木裕子, 佐々木次雄: *Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質の遺伝子発現機構, 日本マイコプラズマ学会誌, 29: 63-67, 2002
- 6) 見理 剛: マイコプラズマの遺伝子学, 日本臨牀増刊号, 新世紀の感染症学(下)ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート, 61: 772-778, 2003.
- 7) 佐竹元吉, 関田節子, 佐々木次雄, 有本恵子, 熊倉秀樹, 国定孝夫, 川西利昭, 新邦夫, 清水袈裟光, 大橋眞一, 谷健次, 林三千夫, 阪本光男, 庄司雄三, 久保利之, 白鳥誠, 宮沢愛夫, 杉浦昭夫: 生薬の腸内細菌とその他のグラム陰性菌試験, 防菌防黴, 30: 525-530, 2002.
- 8) 曲田純二, 佐々木次雄: 濾過滅菌について, Infection Control, 11: 34-38, 2002.
- 9) 佐々木次雄, 棚元憲一: 遺伝子解析による微生物の迅速同定法, 医薬研究, 33: 763-769, 2002.
- 10) 高橋元秀, 岩城正昭, 荒川宜親: ポツリヌス症 感染症の診断・医療ガイドライン(生涯教育シリーズ 51) 日本医師会雑誌 第 128 巻, 第 1 号 2002.7.1
- 11) 戸井田一郎, 高松勇, 菅原勇, 芳賀伸治, 山本三郎: BCG 基礎研究の過去, 現在, 未来. 資料と展望 42: 49-56, 2002
- 12) 山本三郎: 細菌性 CpG DNA による免疫系の活性化. 血液・免疫・腫瘍 7(4):41-46, 2002
- 13) 山本三郎: CpG DNA の免疫活性とその臨床応用. 臨床免疫 39(1):104-108, 2003
- 2) Naohiro Shibata, T. Nakamura, Y. Doi, T. Yagi, H. Kato, K. Shibayama, K. Yokoyama, Y. Arakawa: Detection of Both IMP-1 and IMP-2 Metallo-beta-Lactamases Producing *Serratia marcescens* Isolated in Japan.: American Society for Microbiology 102th General Meeting, May 20, 2002, Salt Lake City, USA.
- 3) Y. Doi, K. Yokoyama, K. Yamane, H. Kurokawa, Naohiro Shibata, K. Shibayama, T. Yagi, Y. Arakawa: Prevalence of Putative 16S rRNA Methylase Gene Conferring Consistent Resistance to All Aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Japan.: American Society for Microbiology 102th General Meeting, May 20, 2002, Salt Lake City, USA.
- 4) K. Shibayama, K. Kamachi, Y. Doi, Naohiro Shibata, T. Yagi, Y. Arakawa: Purification of Apoptosis-inducing Agent from *Helicobacter pylori*: American Society for Microbiology 102th General Meeting, May 20, 2002, Salt Lake City, USA.
- 5) Sasaki Y., Ishikawa J., Yamashita A., Oshima K., Kenri T., Furuya K., Yoshino C., Horino A., Shiba T., Sasaki T. and Hattori M. : Determination of the complete genome sequence of *Mycoplasma penetrans* HF-2 strain. 14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), July 7-12, 2002, Vienna, Austria.
- 6) Horino A., Sasaki Y., Sasaki T. and Kenri T. : Promoter inversion is involved in phase variable expression of P46 (pepIMP13) lipoprotein of *Mycoplasma penetrans*. 14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), July 7-12, 2002, Vienna, Austria.
- 7) Kenri T., Seto S., Sasaki Y., Horino A., Sasaki T. and Miyata M. : Visualization of the attachment organelle of *Mycoplasma pneumoniae* by yellow fluorescent protein fusion. 14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology (IOM), July 7-12, 2002, Vienna, Austria.
- 8) Sasaki T. : Sterile product manufacturing in Japan. PDA-USP Joint Conference, 20-22 May, 2002, Florida.
- 9) Yamamoto, T., Lasco, T.M., Yamamoto, S., McMurray, D.N.: BCG-vaccinated guinea pigs modulate TNF- production after pulmonary challenge with virulent *M. tuberculosis*. 4th World Congress on Tuberculosis, Washington, D.C., U.S.A., June, 2002.
- 10) Yamamoto, S., Yamamoto, T., Nojima, Y., Umemori, K., Goto, N., Maeyama, J., Yamada, T., Ohara, N., Toida, I., Iho, S., Takauji, R.: Protective efficacy of BCG and rBCG on guinea pig pulmonary

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

- 1) Haru Kato, Naoki Kato: Multicenter typing analysis of *Clostridium difficile* isolates from geographically diverse hospital. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2002, April, Milan Italy.

## 細菌第二部

tuberculosis and its modification with unmethylated CpG-DNA. US-Japan Cooperative Medical Science Program Thirty-Seventh Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Kyoto, Japan, August, 2002.

11) Saburo Yamamoto, Shinji Haga, Toshio Yamazaki, Tsuyoshi Yamazaki, Toshiko Yamamoto, Maiko Taneichi, Kazunari Kamachi, Ichiro Toida, Takeru Hashimoto, Takeshi Yamada : Safety, Stability and Protective Efficacy of Recombinant BCG. International Symposium on Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus-Based HIV Vaccine, Tokyo, Japan, February 2003

12) K. Shibayama, K. Kamachi, Y. Doi, N. Shibata, T. Yagi, Y. Arakawa : Purification of Apoptosis-inducing Agent from *Helicobacter pylori*. American Society for Microbiology 102nd General Meeting, Salt Lake City, U.S.A., May 2003

### 2. 国内学会

1) 加藤はる、荒川宣親、小松方、佐藤洋子 : *Clostridium difficile* toxin A 陰性 variant 株による院内集団発生。第 51 回日本感染症学会東日本地方会 2002 年 10 月。

2) 加藤はる、加藤直樹、荒川宣親、小松方、相原雅典、佐藤洋子 : *Clostridium difficile* 毒素遺伝子変異株の臨床分離。第 14 回日本臨床微生物学会総会 2003 年 2 月。

3) 加藤はる、荒川宣親、加藤直樹 : Toxin A 陰性 toxin B 陽性 *Clostridium difficile* 臨床分離株の解析。第 33 回日本嫌気性菌感染症研究会 2003 年 2 月。

4) 黒川博史、山田大輔、柴田尚宏、土井洋平、柴山恵吾、八木哲也、荒川宣親 : CTX-M-2 タイプ -ラクタマーゼ産生菌の薬剤耐性パターンと分子遺伝学的な解析。第 75 回日本細菌学会総会、4 月、2002 年、横浜。

5) 横山佳子、土井洋平、柴田尚宏、黒川博史、山根一和、柴山恵吾、八木哲也、加藤はる、荒川宣親 : アルベカシン高度耐性緑膿菌から新規に発見されたプラスミド性 16SrRNA メチル化酵素。第 75 回日本細菌学会総会、4 月、2002 年、横浜。

6) 柴山恵吾、蒲池一成、八木哲也、土井洋平、柴田尚宏、荒川宣親 : *Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導因子の精製。第 75 回日本細菌学会総会、4 月、2002 年、横浜。

7) 鈴木知子、佐々木辰也、畠山朝夫、内藤由子、柴田尚宏、荒川宣親 : 尿路感染症の 1 症例より検出した CTX-M-1 タイプ -ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* について。第 51 回日本医学検査

学会総会、5 月 15 日、2002 年、仙台。

8) 松田真澄、桑原澄江、柴田尚宏、荒川宣親 : CTX-M-1 type の ESBLs 産生 *Serratia marcescens* の 1 症例。第 41 回中部医学検査学会、10 月 5 日、2002 年、富山。

9) 山根一和、土井洋平、横山佳子、八木哲也、柴田尚宏、柴山恵吾、加藤はる、荒川宣親 : アルベカシン高度耐性緑膿菌から分離された 16S rRNA メチル化酵素遺伝子の周辺構造の解析。日本感染症学会東日本支部会、10 月 31 日、2002 年、東京。

10) 柴田尚宏、土井洋平、和知野純一、山根一和、黒川博史、八木哲也、加藤はる、荒川宣親 : クラス 3 型インテグロンに担われた IMP-1 型メタロ- -ラクタマーゼ産生 *Pseudomonas putida* の検討。日本感染症学会東日本支部会、10 月 31 日、2002 年、東京。

11) 柴田尚宏、和知野純一、土井洋平、山根一和、黒川博史、八木哲也、荒川宣親 : メルカプト酢酸ナトリウムを使用したディスク法と PCR 法による各種メタロ- -ラクタマーゼ産生株の比較検討。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

12) 中野学、平井克典、柴田尚宏、荒川宣親 : CTX-M-9 型 BL 産生 *K. pneumoniae* と IMP-1 型 MBL 産生 *Pseudomonas putida* を同時に分離した敗血症の 1 例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

13) 藤田良浩、結城千恵美、小林圭二、柴田尚宏、荒川宣親 : CTX-M-3 型 -ラクタマーゼ産生 *Serratia marcescens* による敗血症の 1 例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

14) 山田友紀、小畑律子、野々宮百合子、三浦明子、辻村正雪、山端久美子、黒田牧子、小笠原理恵、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宣親 : 院内感染対策上の対応が問題となったメタロ- -ラクタマーゼ産生緑膿菌を検出した小児水頭症の 1 例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

15) 黒川博史、若松篤、山田大輔、勝又一成、柴田尚宏、土井洋平、八木哲也、柴山恵吾、荒川宣親 : 臨床分離 *Escherichia coli* と *Serratia marcescens* -ラクタム薬耐性株の分離状況調査。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

16) 松田真澄、柴田尚宏、荒川宣親 : IMP-1 型 metallo- -lactamase 産生 *Pseudomonas putida* の 3 症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。

17) 杉本直樹、遠藤三佳、柴田尚宏、荒川宣親 : 菌血症改善後の尿分離例を含む SHV-型 ESBLs 産生 *Serratia marcescens* の 3



## 細菌第二部

- 症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 18) 徳永幸子、新粥葉子、吉村玲子、大谷佳代、坂森よしみ、柴田尚宏、荒川宜親：当院で経験したメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *P. aeruginosa* の 3 症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 19) 林卓司、竹内千智、越村真紀、柴田尚宏、荒川宜親：当院におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の検出状況。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 20) 小林治、柴田尚宏、荒川宜親：当院で分離した CTX-M-type β-lactamase 産生大腸菌の 2 症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 21) 塩田量子、武下公子、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌 4 症例について。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 22) 松波充子、鈴木更織、大嶽宏幸、奈田俊、柴田尚宏、荒川宜親：当院で検出されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Alcaligenes xylosoxidans*, *Pseudomonas putida* について。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 23) 志田原郁子、佐藤恵子、澄川孝之、藤井千登勢、元井信、柴田尚宏、荒川宜親：尿から検出した IMP-1 型メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Serratia marcescens* 3 症例の臨床的検討。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 24) 本間操、土井洋平、柴田尚宏、荒川宜親：当院における ESBL 産生グラム陰性桿菌の検査法および検出状況について。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 25) 畑中公基、吉田順子、鈴木隆幸、三田正行、柴田尚宏、荒川宜親：腸内細菌群における ESBL 産生菌の簡易判定法に関する検討および解析結果。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 26) 松永克美、八木恵子、朝妻義徳、星周一郎、柳田良子、永井久美子、佐藤誠子、柴田尚宏、荒川宜親：メタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Alcaligenes xylosoxidans* を検出した 3 症例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 27) 樋口元弥、名古屋洋、森山美昭、柴田尚宏、荒川宜親：急性骨髄性白血病に発症した CTX-M タイプ β-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* 敗血症の一例。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 28) 浅野裕子、石郷潮美、柴田尚宏、荒川宜親：血液培養由来の CTX-M-タイプ β-ラクタマーゼ産生菌の臨床細菌学的検討。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 29) 小林裕美、柴田尚宏、土井洋平、荒川宜親：当院におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出状況。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 30) 沢辺悦子、千田俊雄、岡村登、武部功、角田千能、遠井初子、古畑紀子、西堀眞弘、宮坂信之、三宅修司、吉澤靖之、柴田尚宏、荒川宜親：同一病棟内から分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生株二株を含む *Serratia marcescens* の分子疫学的解析。第 14 回日本臨床微生物学会総会、名古屋、2 月 1 日、2003 年。
- 31) 嶋村浩市、田中継朗、中島崇智、山内貴雄、河口正雄、板垣智之、山根一和：本邦初と考えられた *Neisseria elongata* subsp. *nitroreducens* による僧帽弁置換術後心内膜炎の 1 例。日本循環器学会関東甲信越地方会、2002 年 6 月。
- 32) 佐々木裕子、石川 淳、山下敦士、大島健志朗、見理剛、古谷恵子、吉野智絵、堀野敦子、柴 忠義、佐々木次雄、服部正平：*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の決定、第 25 回日本分子生物学会、2002 年 12 月、横浜。
- 33) 佐々木裕子、石川 淳、山下敦士、大島健志朗、見理剛、古谷恵子、吉野智絵、堀野敦子、柴 忠義、佐々木次雄、服部正平：*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の解析、第 29 回日本マイコプラズマ学会、2002 年 5 月、札幌。
- 34) 佐々木裕子、見理 剛、堀野敦子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* 全ゲノム配列の決定、第 75 回日本細菌学会総会、2002 年 4 月、横浜。
- 35) 見理 剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄：Global transposon mutagenesis による *Mycoplasma pneumoniae* の細胞吸着関連因子の検索、第 75 回日本細菌学会総会、2001 年 4 月、横浜。
- 36) 堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質の遺伝子発現機構について、第 29 回日本マイコプラズマ学会学術集会、2001 年 5 月、札幌。
- 37) 堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄：*Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質の遺伝子の発現は多数の逆位可能なプロモーターによって調節される、第 25 回日本分

## 細菌第二部

子生物学会年会、2002年12月、横浜。

38) 佐々木次雄: 無菌製造法に関する ISO 13408 の一般要件と局方との関係について、微生物管理(無菌操作法)に関する ISO/TC198 京都国際会議報告会、日本 PDA、2002年6月、東京。

39) 佐々木次雄: 国内製薬企業の製薬用水の実態とJPの課題、第10回日本 PDA 年会、2002年11月、東京。

40) 川端敏之、新谷三春、黒川博史、佐々木次雄、荒川宜親: *Haemophilus influenzae* 臨床分離株の疫学とニューキノロン耐性菌株の解析、第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜。

41) 新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親: *Haemophilus influenzae* type b 莢膜多糖体 PRP の分離精製とその性状並びに免疫化学的測定法への利用、第6回日本ワクチン学会学術集会、2002年11月、千葉。

42) 岩城正昭、小宮貴子、福田靖、高橋元秀: ジフテリア菌から見いだされた新規抗原の解析。第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜。

43) 岩城正昭、三枝智美、小宮貴子、高橋元秀: ジフテリア菌新規抗原遺伝子: 5塩基単位の繰り返し構造による多形性。第85回日本細菌学会関東支部総会、2002年10月、東京。

44) 岩城正昭、三枝智美、小宮貴子、高橋元秀: ジフテリア菌の新規抗原遺伝子に見られた繰り返し構造。日本分子生物学会第25回年会、2002年12月、横浜。

45) 小宮貴子、岩城正昭、福田靖、荒川宜親、高橋元秀: ジフテリア毒素産生性 *Corynebacterium ulcerans* の実験室内診断法の確立 試験法確認のための予備的調査報告。第6回日本ワクチン学会学術集会、平成14年11月、千葉。

46) 堀内善信、高橋元秀、荒川宜親、倉田毅: ワクチン国際化の潮流に関する一考察。第6回日本ワクチン学会学術集会、平成14年11月、千葉。

47) 高橋元秀、小宮貴子、岩城正昭、福田靖: モンゴル国内における健康人の血中のジフテリア、破傷風抗体の調査結果。第6回日本ワクチン学会学術集会、平成14年11月、千葉。

48) 井坂雅徳、安田陽子、谷口暢、小宮貴子、前山順一、諸熊一則、大隈邦夫、高橋元秀、後藤紀久、朽久保邦夫: 組換えコレラ毒素Bサブユニットを添加した試作調整 DPT ワクチンの経鼻投与におけるジフテリアと破傷風の毒素中和抗体誘導について。第6回日本ワクチン学会学術集会、平成14年11月、千葉。

49) 柿田麻衣、鈴木和宏、高橋剛、森野和彦、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀: ヒト抗体ライブラリーからのジフテリア毒素中和抗体の単離。第25回日本分子生物学会 2002年12月 横浜。

50) 高橋 剛、柿田麻衣、鈴木和宏、森野和彦、辻 孝雄、黒澤良和、小宮貴子、高橋元秀: ヒト抗体ライブラリーからクローニングされた抗ジフテリア毒素中和抗体の検定。第25回日本分子生物学会 2002年12月 横浜。

51) 伊保澄子、山本三郎: 細菌 DNA の免疫賦活作用。日本細菌学会、2002年4月、横浜市。

52) 前山順一、山本三郎、安田陽子、井坂雅徳、谷口暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久: BCG 鼻粘膜投与における組換えコレラ毒素 B サブユニットのアジュバント効果について。日本細菌学会、2002年4月、横浜市。

53) 戸井田一郎、高松勇、菅原勇、芳賀伸治、山本三郎: BCG 基礎研究の過去、現在、未来。第72回実験結核研究会シンポジウム、2002年4月、東京都。

54) 山本三郎: 結核菌 DNA による免疫賦活の機序と応用。第77回日本結核病学会総会、2002年4月、東京都。

55) 山本三郎、山本十糸子: BCG 免疫結核菌噴霧感染モデルの抗原特異的 TNF- $\alpha$  産生の動態。第77回日本結核病学会総会、2002年4月、東京都。

56) 山崎剛、山崎利雄、山本三郎、赤川清子、芳賀伸治: BCG の経気道接種による結核菌噴霧感染への防御効果。第77回日本結核病学会総会、2002年4月、東京都。

57) 前山順一、井坂雅徳、安田陽子、朽久保邦夫、山本三郎、後藤紀久: 組換えコレラ毒素 B サブユニットによるマウスマクロファージの IL-1 $\beta$  産生誘導機構の解析。第67回日本インターフェロン/サイトカイン学会、2002年7月、東京都。

58) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、谷口暢、諸熊一則、大隈邦夫、朽久保邦夫、後藤紀久: 粘膜ワクチン用組換え CTB アジュバントの BCG 経鼻投与に対する効果。第6回日本ワクチン学会学術集会、2002年11月、千葉市。

59) 高氏留美子、伊保澄子、高塚尚和、北川治和、星野孝、山本三郎、松木孝澄: Plasmacytoid 樹状細胞における CpG DNA 刺激によるケモカインの産生。日本免疫学会総会、2002年、12月、東京都。

60) 八木哲也、荒川宜親: *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 172 のトランスポゾン変異株の作製と解析 第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜

## III その他の研究発表

- 61) 八木哲也: 抗酸菌細胞壁アラビノガラクトンの生合成経路の解析 - 特にアラビノガラクトンとペプチドグリカンの結合について - 第77回日本結核病学会総会、2002年4月、東京
- 62) 柴山恵吾、蒲地一成、八木哲也、奈田俊、土井洋平、柴田尚宏、横山佳子、山根一和、加藤はる、飯沼由嗣、荒川宜親: *Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導蛋白の精製、同定。第85回日本細菌学会関東支部総会、2002年11月、東京
- 63) 落合雅樹、山本明彦、堀内善信、沈降精製 DPT ワクチン (DPT ワクチン) 中のエンドキシン定量法について、第75回日本細菌学会総会、2002年4月、横浜
- 64) 落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、開発途上国における生物学的製剤の品質管理に関する研究 - wP、aP ワクチンに関して -、第6回日本ワクチン学会学術集会、2002年11月、千葉
- 65) 蒲地一成、児玉温子、堀内善信、荒川宜親: 百日咳毒素遺伝子を用いた百日咳 DNA ワクチンの開発研究、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002、11
- 66) 児玉温子、蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親: 児玉温子日本における百日咳臨床分離株の染色体パターン解析と分子疫学、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002、11
- 67) 蒲地一成、児玉温子、堀内善信、荒川宜親: 変異百日咳毒素遺伝子を用いた百日咳 DNA ワクチンの開発研究、第76回日本細菌学会総会、熊本、2003、4
- 68) 児玉温子、蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親: 日本で分離された百日咳臨床分離株の遺伝子型と病原性の関係、第76回日本細菌学会総会、熊本、2003、4
- 69) 山本明彦、落合雅樹、永田典代、堀内善信: 沈降精製 DPT ワクチンによる局所腫脹作用の動物モデルによる評価の試み、第75回日本細菌学会総会、横浜、2002、4。
- 70) 山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信: ワクチン類へのエンドキシン試験におけるヒト由来株価細胞の適用の検討、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002、11。
- 71) 堀内善信、高橋元秀、荒川宜親、倉田 毅: ワクチン国際化の潮流に関する一考察、第6回日本ワクチン学会学術集会、千葉、2002、11。

- 1) 柴田尚宏: 本邦における薬剤耐性菌の分離状況について。第9回関東甲信越マイクロスキャン研究会、東京、7月13日、2002年。
- 2) A. Kodama, K. Kamachi, T. Konda, and Y. Arakawa: Genomic DNA analysis of *Bordetella pertussis* strains clinically isolated in Japan. Conference of Quality Control Tests for DTP and DTaP Vaccines and Clinical Relevance. November 2002, Tokyo, Japan.
- 3) 堀内善信 韓国食品医薬品局 (KFDA) “KFDA International Symposium on Biological Standardization” (2002年11月28 - 29日) での講演
- 4) 堀内善信 韓国食品医薬品局 (KFDA) “International Symposium on Pertussis: Current status and Prospect” (2003年2月24日) での講演