

## 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、抗毒素血清、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に従事している。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支援を行った。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。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たのに伴い、厚生労働省の審査管理課、監視指導・麻薬対策課、国立医薬品食品研究所、公定書協会などと協力し、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。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、同時に研修生等の受入れや技術研修などの支援を行った。

細菌第二部への組織再編後は、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 腎症などと微生物感染症の関連についての研究

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共同研究

4. 生物学的製剤の品質管理等に関する WHO (WPRO) コラボレーションセンターとしての協力

5. 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*、*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、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も実施された。

常勤職員の異動としては、平成15年10月1日付けで鈴木里和研究官が、12月1日付で小澤良之主任研究官が採用された。また八木哲也主任研究官の国立長寿医療センターへの異動、土井洋平研究員の退所(米国ニューヨーク市 Roosevelt 病院における臨床研修のため)があった。細菌第二部に客員研究員として木ノ本雅通、協力研究員として山本十糸子、黒川博史、陳 平紆、大石和恵、高塚尚和、井上雅可、沼田昇、久保田眞由美、流動研究員として石川暁志、研究生として小島 禎、三枝智美、児玉温子、実習生として和知野純一、猪股夢乃、本間 操、山田友紀、畑中公基らが在籍し、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、久保田眞由美、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。

## 研究業績

### I. 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

今年度も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品質評価試験を行った。今年度中に9品目の評価が完了し新規標準品(新規ロット)の交付を開始した。また、緊急対応として旧日抗基常用標準品ロットを日局標準品にするべく Bioassay 法での品質再評価試験を行い20品目が交付された。[加藤はる、鈴木里和、柴田尚宏、南條友子、山根一和、土井洋平、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

今年度も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品質評価試験を行った。今年度中に22品目の評価が完了し新規標準品(新規ロット)の交付を開始した。また、緊急対応として旧日抗基常用標準品ロットを日局標準品にするべく HPLC 法及び吸光度法での品質再評価試験を行い各々1品目が交付された。[山根一和、柴田尚宏、土井洋平、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

昨年度までの研究結果を基に、今年度から(1)日局一般試験法「抗生物質の微生物学的力価試験法」の試験菌液及び試験芽胞液の調製について、客観的な数値化を目指し、各菌種の試験菌液ロット間での精度管理を容易に行えるような検討を加えること、(2)力価試験法の円筒平板法と穿孔平板法の比較について、試験菌の発育阻止円の最適な直径を示すような至適濃度を目指して、溶液濃度に対する阻止円直

径との関係について統計学的な再検討を行うこと、(3)力価試験法の力価計算法について、統計学的な平行線定量法の計算法を採用して、各種抗生物質の力価についての試験測定誤差の範囲を明らかにすること、の主な3項目の研究を実施することとし、各項目で一部基礎データが得られた。[近田俊文、南條友子、加藤はる、鈴木里和、柴田尚宏、山根一和、土井洋平、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研究

昨年度から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、等)、標準品の保存法改良(システム的なフリーザー保存管理)、標準品の在庫管理及び製品交付並びにその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施してきたが、本年度は更にスムーズにそれらが実施できるように種々の改良、改善を実施した。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、土井洋平、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15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(ホスホマイシンカルシウム:13ロット、硫酸ポリミキシンB:4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(セフメタゾールナトリウム:10ロット、リン酸クリンダマイシン:6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、土井洋平、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

新規の抗生物質(ドリペナム水和物)の特別審査を受け付けて、申請書の品質管理試験法の精査を行った。今後、申請書の試験法に沿って実地試験を行う予定である。[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]

### 7. 依頼試験による抗生物質医薬品の品質管理研究

注射用シナシッド(キヌプリスチン/ダルホプリスチン)(特別審査:2001年度受付、2002年度力価試験等で「判定保留」とな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」判定)の一部変更承認書に記載された力価試験法(比濁法)について、厚生労働省(審査管理課、審査センター)の指導により、申請者(アベンティスファーマ株式会社)が本試験方法の確認のために感染研へ実地試験を依頼した。その結果、この力価試験(比濁法)については安定した再現性のある方法とは認められなかった理由により、力価品質規格を評価することは非常に困難という判定となった。その試験検査成績書は検定協議会で報告審議され、申請者に報告するとともに厚生労働省当局にも報告され、その後、感染研所長の意見書としても審査管理課長宛に送付された。今後、厚生労働省当局がどのような取り扱いをするか決める予定である。[近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、鈴木里和、南條友子、粕谷裕子、荒川宜親、吉倉廣(所長)]

## II. 抗生物質に対する耐性菌の研究及び検査

### 1. メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌(IMP-1型、IMP-2型、VIM-2型)の検出と解析

メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌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とIMP-1型、IMP-2型、VIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子特異的プライマーを作製し行う、PCR法を確立し、報告してきた。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、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も報告してきたが、新たな都府県で、VIM-2型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の検出を認め、全国的な拡散が示唆された今後もブドウ糖非発酵菌群や腸内細菌科において、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、鈴木里和、山根一和、荒川宜親]

### 2. β-ラクタマーゼ産生菌(CTX-M型)の検出状況調査研究

我が国では、欧米に比べ、CTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌の検出が多いとされているが、実体は明らかでない。我々は、全国19施設から分離された約400株の臨床分離株のCTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子の保有状況をPCR法を用い、調査した。その結果、CTX-M-1グループ、CTX-M-2グループ、CTX-M-9グループの大きく3種類に分類されることが明らかとなった。我が国で発見された、Toho-1型β-ラクタマーゼ産生菌は検出されなかった。菌種としては、腸内細菌科全般に拡がっていたが、クレブシエラ、大腸菌、プロテウスが多く検出された。一部院内感染の様相を示している施設もあり、今後も調査すべきと考えられた。[柴田尚宏、鈴木里和、山根一和、荒川宜親]

### 3. ESBL産生菌やメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌におけるβ-ラクタマーゼ遺伝子を担う因子の検討

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。我々の調査では、我が国におけるメタロ-β-ラクタマーゼ産生株は、IMP-1型、IMP-2型、VIM-2型を問わず、大部分の菌株がクラス1型インテグロンに担われていることが明らかとなった。また、近年インテグロン関連構造として報告されている、ORF513遺伝子は、CTX-M型β-ラクタマーゼ遺伝子に隣接して存在することが明らかとなっており、これらについても関連を調査した。その結果、CTX-M型β-ラクタマーゼ産生菌は、すべてインテグラーゼ遺伝子やORF513遺伝子を保有しているわけではないことが明らかとなった。別のトランスポゼースやISとの関連も考えられた。[柴田尚宏、荒川宜親]

### 4. 臨床分離株のβ-ラクタマーゼ遺伝子の依頼検査

## 細菌第二部

臨床分離株の薬剤耐性遺伝子検査依頼があり、特に 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査を中心に行った。検査方法は、主にディスク拡散法と PCR 検査などを行い報告した。対象施設は、全国約 40 施設で、検査総数は約 600 件であった。対象菌種は、腸内細菌科では大腸菌、クレブシエラ、セラチアなどで、ブドウ糖非発酵菌群では、緑膿菌、アシネトバクターなどが多かった。また、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、甲斐久美子、横川滋子、荒川宜親]

### 5. ESBL 産生大腸菌による院内感染事例の疫学調査および細菌学的解析

ESBL 産生大腸菌による院内感染事例が発生した医療機関との共同研究により、事例の疫学および細菌学的検討を行った。事例は院内感染対策が適切に行われていた血液内科病棟で発生しており、疫学調査により大腸菌のような腸内細菌叢を構成する菌の伝播には医療スタッフや医療処置のみならずトイレなどにおける患者間の接触もまた関与している事が示唆された。そのご積極的なスクリーニング検査などで、他病棟などにおいても ESBL 産生菌が分離されたが、院内において伝播している所見は無く、当該病棟においても事例は終息したと考えられた。細菌学的検討より、今回の事例は CTX-M-9 型 ESBL 産生大腸菌 O25:H4 によるものであり、PFGE による遺伝子解析上も同一株であった。[鈴木里和、柴田尚宏、荒川宜親]

### 6. ESBL 産生大腸菌 O25 の広域伝播に関する解析

医療機関より送付された CTX-M-9 型 ESBL 産生大腸菌のなかで血清型 O25、O86 のものが多く、また血清型 O25 に関しては疫学的関連のない医療機関より分離された株の PFGE が一致する。これらのことから、海外でしばしば報告される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、その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、荒川宜親]

### 7. オキシミノセファロスポリンとセファマイシンに耐性を示す臨床分離大腸菌株が産生する阻害剤感性 AmpC $\beta$ -ラクタマーゼの解析

1994 年に国内の病院で分離された広域セフェム耐性大腸菌 HKY-28 株の染色体性 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子をクローニングしたところ、オキシミノセファロスポリン、セファマイシン耐性、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤感性という特殊な表現型を示した。この AmpC は H-10 ヘリックス領域に 3 アミノ酸の欠失が認められ、この欠失を変異導入により復元すると AmpC に一般的な  $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤耐性が回復し、オキシミノセファロスポリン、セファマイシンへの耐性は低下した。この現象は精製酵素を用いた酵素解析によっても裏付けられた。 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤に対し感性化した変異型 AmpC を遺伝学的、酵素学的に検討したのはこれが世界で初めてである。[土井洋平、和知野純一、黒川博史、荒川宜親]

### 8. アルベカシン高度耐性緑膿菌が保有する *rmtA* 遺伝子の周辺構造の解析

臨床分離されたアルベカシン高度耐性緑膿菌が保有する *rmtA* の周辺構造を調べた結果、*rmtA* を含む周辺 6.2kbp (*rmtA* locus) は水銀耐性遺伝子を保有する Tn5041 に挿入される形で存在した。*rmtA* locus は両端に  $\kappa\gamma$  element と呼ばれる IS 様構造を持ち、トランスポゾンに類似した構造を持っていることが明らかとなった。またこれらの塩基配列は既存の病原細菌との相同性は低く、むしろ環境細菌と相同性が高いことから環境中の細菌から緑膿菌がこれらの構造を獲得した可能性が示唆される。[山根一和、土井洋平、荒川宜親]

### 9. アミノグリコシド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耐性を示す腸内細菌、*Pseudomonas* 属、*Acinetobacter* 属について 16S rRNA メチラーゼの保有状況を調べた。方法はアルベカシン濃度 50 mg/L 入り LB 培地に菌を接種し、コロニーを形成した菌株に対して既存の 16S rRNA メチラーゼ (*RmtA*, *RmtB*, *ArmA*) を

## 細菌第二部

multiplex PCR 法で検査した。現在のところ検査の依頼があった菌株については 16S rRNA メチラーゼを産生している菌株は認められない。[山根一和、和知野純一、甲斐久美子、荒川宜親]

### 10. アミノグリコシド高度耐性を付与する *rmtB* を保持するプラスミドの解析

16S rRNA メチラーゼの一種である *rmtB* は臨床分離された *Serratia marcescens* から初めて報告された。その後大腸菌 (C-316 株) から同様の遺伝子が分離され、プラスミドに保持されていることが判明した。このプラスミドは大きさが 80-90 kbp で、shot gun sequence 法により塩基配列を調べるとグラム陰性菌に広く分布している R100 と呼ばれる薬剤耐性プラスミドがプロトタイプであることが判明した。現在どのような薬剤耐性遺伝子を保有されているか解析中である。[山根一和、和知野純一、蒲地一成、荒川宜親]

### 11. アミノグリコシド高度耐性を示すセラチア・マルセッセンス臨床菌株が産生する 16S rRNA メチラーゼの解析

2002 年に国内の病院で分離されアミノグリコシド系抗菌薬に高度耐性を示したセラチア・マルセッセンス菌株より新規 16S rRNA メチラーゼ RmtB を同定した。RmtB は緑膿菌より同定された RmtA と 82% の相同性を有し、その責任遺伝子は大腸菌に接合伝達された。ヒスチジンタグ法を用い精製された RmtB は大腸菌の 16S rRNA に対し明らかなメチル化活性を示した。更に *rmtB* 遺伝子を保有する組み換えプラスミドをアミノグリコシド感受性大腸菌に導入したところ、ストレプトマイシンとネオマイシンを除く全てのアミノグリコシドに高度の耐性を示した。今回の研究により腸内細菌科にも 16S rRNA メチラーゼによるアミノグリコシド耐性機構が存在することが明らかになった。[土井洋平、山根一和、荒川宜親]

### 12. アシネトバクター属臨床分離株が保有する新規アミノグリコシド耐性遺伝子 *aac(6')-Iad* 遺伝子の同定

2002 年に国内で分離されたアシネトバクター属菌株より新規アミノグリコシド 6'-N-アセチル化酵素遺伝子 *aac(6')-Iad* を同定した。HPLC 法により 6'-N-アセチル化活性を有することを

確認したこの新たな酵素は、既知の同種酵素とアミノ酸配列で最高で 37% の相同性しか示さず、産生菌にアミカシン、トブラマイシン、シノマイシン、イセパマイシンへの耐性を付与した。そこで同時期に国内で分離されたアシネトバクター属 264 株について調査したところ、アミカシン非感性を示した 16 株のうち 7 株から PCR 法で *aac(6')-Iad* が検出され、推定アミノ酸配列は全て同一だった。このことから国内で日和見感染菌として問題となりつつあるアシネトバクター属のアミノグリコシド耐性に *aac(6')-Iad* が一定の役割を果たしていることが示唆された。[土井洋平、和知野純一、荒川宜親]

### 13. リネゾリド耐性 *Enterococcus faecium* の耐性機序の解析

リネゾリドは 2000 年に開発された新しい抗菌薬で日本ではバンコマイシン耐性腸球菌の治療薬として臨床で利用されている。依頼菌株はリネゾリドを長期投与された患者由来の *Enterococcus faecium* であった。耐性の機序を調べたところリネゾリドの作用部位である 23S rRNA 遺伝子の 2576 番目の塩基がグアニンからチミンに変異を起こしていることが明らかになった。この変異は黄色ブドウ球菌や腸球菌のリネゾリド耐性に関与する変異として外国では報告がなされている。今回の結果からリネゾリドの長期投与は容易に腸球菌などの耐性化を引き起こす可能性があることを示しており、臨床での使用に際しては注意を要すると思われる。[山根一和、荒川宜親]

### 14. バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の PCR による *van* gene 検出あるいは菌種同定

以下の解析依頼について (1) 尾道小児外科 (広島県) *vanCI* type、(2) 日本鋼管福山病院 (広島県) *vanA* type、(3) 静岡県立静岡ガンセンター (静岡県) *vanCI* type、(4) 焼津市立総合病院 (静岡県) *vanCI* type、(5) 藤田保健衛生大学病院 (愛知県) *vanA* type (16S rRNA gene の sequencing による菌種同定) を研究ベースにて受け、検討した。[加藤はる、甲斐久美子、吉村由美子、横川滋子、荒川宜親]

### 15. 臨床分離された黄色ブドウ球菌の病原因子の解析

臨床から分離された黄色ブドウ球菌の毒素産生性について検査を行った。依頼を受けた 6 株の黄色ブドウ球菌について

## 細菌第二部

enterotoxin A,B,C,D,E, TSST-1, exfoliative toxin A,B の 8 種類についてラテックス凝集反応による毒素の検出と PCR 法による毒素遺伝子の検出を行った。2 株で enterotoxin C と TSST-1 がラテックス凝集反応、PCR 法の両方で陽性となった。また 1 株は enterotoxin B が PCR 法で陽性となったが、ラテックス凝集反応は陰性だった。[山根一和、甲斐久美子、荒川宜親]

### III. 院内感染対策に関する研究

#### 1. 院内感染対策サーベイランスシステムに関する研究

現在、厚生労働科学研究費によってすすめられている 200 床以上の医療機関を対象とした院内感染対策サーベイランス (JANIS) と、200 床以下の中小規模病院を対象とした院内感染対策サーベイランスに関する研究の一環として、より実用性、実行性を改善したシステム設立のため、既存の細菌検査室データをを用いた解析を行っている。また、米国をはじめ諸外国における院内感染サーベイランスとわが国のそれとを比較しつつ、わが国の実情に応じたシステム設立のため、実際にサーベイランスを行っている医療機関との共同研究を行っている。[鈴木里和、山根一和、荒川宜親]

#### 2. 院内感染対策サーベイランス随時報告の検討

厚生労働省の院内感染対策サーベイランス担当に集積された随時報告データの送付を受け、種々の検討を加えた。[加藤はる、荒川宜親]

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

#### 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 蛋白をコードする遺伝子のシークエ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。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。[加藤はる、横山敏之(久美愛病院)]

#### 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*、および *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)]

#### 3. *Clostridium perfringens* の毒素型同定

肝膿瘍を伴った敗血症死亡症例の血液から分離された *C. perfringens* の major toxin の毒素型の同定の解析依頼があり、研究ベースにて解析を行った。[加藤はる、吉村由美子、清水敬樹(さいたま赤十字病院救命救急センター救急医学科)]

#### 4. 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)、加藤秀章(豊川市民病院)]

#### 5. *Clostridium difficile* 菌株の毒素産生性の解析

非典型的な毒素産生パターンを示す菌株の疑いで、毒素産生性の同定の解析依頼があり、研究ベースにて解析を行った。[加藤はる、吉村由美子、豊川真弘(大阪大学医学部附属病院)]

#### 6. *Clostridium difficile* 感染症についての対応

検査診断や院内感染を中心に E-mail や電話等による質問、相談に個別に回答した。[加藤はる]

### V. マイコプラズマに関する研究

## 細菌第二部

### 1. プロテオーム解析を用いた *Mycoplasma penetrans* の新規抗原探索と診断法開発への応用

血清抗体価測定用抗原として使用されてきたリポ蛋白群が抗原変異機構を有し、抗原性が一定でないことがゲノム解析から明らかになった為、新たな主要抗原を探索した。ピルベート、デヒドロゲナーゼ(PDH)が主要抗原の一つである事から、*pdh-c* の一部を大腸菌にクローニングし、リコンビナント抗原を作成し、抗体測定系を作成した。作成した ELISA 系において、健常人と *M. penetrans* 感染者の血中抗体価には明らかな違いが認められた。

(佐々木裕子1、新開-大内 史子2、山河芳男2、川上隆雄 3、西村俊秀 3、見理 剛1、堀野敦子1、佐々木次雄1、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)

### 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: IgA 腎症患者血中の抗マイコプラズマ抗体価測定の為の新規抗原作成と、血清抗体価測定

特異性のより高い抗体価測定系確立の為、*M. pneumoniae* と *M. penetrans* のリコンビナント抗原を作成し、*M. fermentans* 糖脂質 GGPL-III(松田分与)に対して、血中抗体価を測定した。IgA 腎症患者群における抗 *M. pneumoniae*-IgA 抗体価は、健常人と比較すると  $p < 0.0001$  と有意に高値を示し、抗 *M. fermentans*-IgG 抗体価は、 $p = 0.023$  と高く、抗 *M. penetrans* 抗体価は群としては変化がないものの1名が陽性であった。IgA 腎症患者の治療用摘出扁桃から、*M. pneumoniae* あるいは *M. fermentans*-DNA が検出され、陰窩上皮層の細胞浮腫、IgA 陽性細浸潤等の病理変化が見られた。

(佐々木裕子1、松田和洋2、永田典代 3、見理 剛1、堀田修4、宮崎真理子4、荒川宜親1、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)

### 3. *Mycoplasma pneumoniae* の細胞構造に関する研究

*M. pneumoniae* は細胞壁をもたないが、内部に細胞骨格様

の構造を持ち、細胞形態を支えていると考えられている。細胞骨格構造は *M. pneumoniae* の接着器官の形成に密接に関連しており、接着性や運動性においても重要な役割を担っていると考えられる。細胞骨格様構造の詳細を知るのを目的に、蛍光タンパク質を利用して *M. pneumoniae* のタンパク質の細胞内局在を調べている。これまで使用していた Enhanced yellow fluorescent protein (EYFP)に加えて、本年は Enhanced cyan fluorescent protein (ECFP)を *M. pneumoniae* で使用する系を確立した。これらを使用して *M. pneumoniae* の *crl* 遺伝子座 (cytadherence regulatory locus) にコードされるタンパク質の細胞内局在を調べると、接着器官の構成成分と考えられる P65、HMW2 タンパク質は接着器官部分に明らかな局在を示したが、機能未知の P41、P24 タンパク質は接着器官の基幹部に存在していることがわかった。この結果から P41、P24 タンパク質は接着器官をささえる細胞骨格の構成因子だと推測された。[見理 剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、瀬戸真太郎(明海大学・歯)、宮田真人(大阪市大・院理)]

### 4. マイコプラズマ肺炎の分子疫学

1995 年以降に日本で肺炎や気管支炎患者から分離された *M. pneumoniae* 株の P1 遺伝子型別結果を集計した。その結果 1995 年以降、日本で分離される *M. pneumoniae* はほとんどすべて II 型菌であったが、2001 年頃から I 型菌が分離されはじめ、現在は I 型菌が主流になっていることが明らかになった。I 型菌が分離されるようになった頃から、マイコプラズマ肺炎患者はやや増加傾向にあり、今後 I 型菌によるマイコプラズマ肺炎の流行が生じる可能性が考えられる。[見理 剛、佐々木次雄、岡崎則男(神奈川衛研)、成田光生(札幌鉄道病院)山崎勉(埼玉医大)]

### 5. マクロライド耐性 *M. pneumoniae* 感染症に関する研究

*Mycoplasma pneumoniae* を原因菌とするマイコプラズマ肺炎には、主にマクロライド抗生物質が治療薬として用いられるが、2000 年以降、本抗生物質に耐性を示す *M. pneumoniae* が臨床より分離されている。本研究では、近年流行の兆しをみせているエリスロマイシン(EM)耐性 *M. pneumoniae* の耐性機構解析を目的とし、本薬剤の作用部位である 23S rRNA の domain II 及び domain V(ペプチジルトランスフェラーゼ領域)、23S

## 細菌第二部

ribosomal protein L4, L22 の解析を行った。その結果、2000-2003 年に北海道、神奈川県、高知県の離れた場所から分離された *M. pneumoniae* 76 株のうち、13 株 (17%) が EM 耐性を示した。このうち 12 株は EM に高度耐性 (MIC > 200  $\mu$ g/ml)、1 株は中等度耐性 (MIC > 3.13  $\mu$ g/ml) であった。高度耐性を示した菌は、EM の作用部位である 23S rRNA ペプチジルトランスフェラーゼ領域 (ドメイン V) 内の 2063 又は 2064 位 (*E. coli* の 2058, 2059 位) のアデニン残基 (A) がシトシン残基 (C) に置換されたもので、当該変異は EM 耐性菌の多くで認められる。一方、中等度耐性を示した菌ではドメイン V の 2617 位でシトシンからグアニン残基への置換が見られた。

マイコプラズマ肺炎患者からは EM 耐性 *M. pneumoniae* が検出されたにもかかわらず、エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンによって治癒した例がみられ、このことはマクロライド抗生物質の抗炎症作用をもマイコプラズマ肺炎治癒の一因として考慮する必要性を示唆している。[久保田真由美、成田光生 (札幌鉄道病院)、岡崎則男 (神奈川県衛生研究所)、見理 剛、荒川宜親、佐々木次雄]

### 6. *Mycoplasma penetrans* における *p35* リポタンパク質遺伝子群のプロモーター逆位の検出

我々はこれまでに *M. penetrans* の *p35* リポタンパク質遺伝子群の発現が多数の逆位可能なプロモーターによって、調節されているモデルを提唱してきた。しかし、これまで 30 個以上発見されたリポタンパク質遺伝子群のプロモーター領域のうち、逆位が実験的に確認されていたのは、*p42* 遺伝子群のプロモーター領域のみであった。

今回我々は、PCR を用いてプロモーター領域の逆位を検出する実験系を作成した。この方法を用いて *M. penetrans* のリポタンパク質プロモーター領域 8 カ所について調べると、すべてのプロモーター部位で実際に *p42* のプロモーターと同様な DNA 逆位が起きていることが明らかになった。これ以外の *p35* リポタンパク質遺伝子群のプロモーター領域も、今回 DNA 逆位が検出されたプロモーターと類似したモチーフを有しているため、これらはみな *M. penetrans* の細胞内で DNA 逆位を起こすものと思われる。

[堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄]

### 7. *Mycoplasma penetrans* *p35* リポタンパク質遺伝子群のプロ

モーター領域の逆位に関する酵素について

部位特異的な遺伝子組み換えは、多くの場合、作用部位に特異的な酵素によって触媒される。この酵素としては  $\lambda$ -integrase family の tyrosine recombinase がよく知られている。*M. penetrans* のリポタンパク質遺伝子群の逆位に関する因子について、ゲノム情報を利用して BLAST 検索を行い、tyrosine site-specific recombinase にホモロジーのある二つの ORF、MYPE2900 と MYPE8180 を同定した。これらの ORF が *p35* リポタンパク質遺伝子群のプロモーター領域の逆位を触媒するか検討を行った。*M. penetrans* はこれまでのところ遺伝子操作ができないため、*M. pneumoniae* 細胞内で MYPE2900、MYPE8180 を発現させて検討を行った。その結果、MYPE2900 を導入した *M. pneumoniae* では、*p42* と *p35* プロモーター領域に DNA 逆位が起こることが確認された。一方、MYPE8180 を組み込んだ *M. pneumoniae* では、これらのプロモーター領域に DNA 逆位は起こらなかった。このことから、MYPE2900 がリポタンパク質遺伝子群のプロモーター領域の逆位を触媒する酵素であることが確認された。我々は MYPE2900 を MipR (Recombinase for Multiple Invertible Promoter) と名付けた。

[堀野敦子、見理 剛、佐々木裕子、佐々木次雄]

## VI. バルトネラ感染症に関する研究

1. 東京都豊島区において年2回行われている路上生活者対策事業を、昨年度に引き続き国立感染症研究所、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行った。インフォームド・コンセントを行い、採血及び衣類の一部提供を求めた。採取された血液及びコロモジラミからの *B. quintana* 分離及び *B. quintana* DNA 検出、血清抗体価測定を行った。対象者数 188 名中コロモジラミ寄生者は 7 名 (3.7%)、コロモジラミ中から *B. quintana* DNA 検出者は 2 名、血液中からの *B. quintana* DNA 検出者はなかった。IgG 抗体価 IFA:128 以上は 85 名 (74.6%) で、前回の当該対策事業における 38.3% を大きく上回り、わが国都市部に住む路上生活者間に、コロモジラミを介して *B. quintana* 感染症が広がりつつあることを示唆している。[久保田真由美、関なおみ (豊島区池袋保健所)、佐々木年則、澤邊京子、小林睦夫、荒川宜親、佐々木次雄]



## 細菌第二部

2. *B. quintana* 感染症の臨床診断における簡便性を目的とし、特異的血清診断法の開発に着手した。本研究では、ホームレス血清と特異的に結合する *B. quintana* 由来タンパク質のひとつが HbpD (hemi-binding protein D) であることを見だし、発現用ベクター-pET30c にクローニングした後、大腸菌中で当該タンパク質の発現を確認した。このタンパク質を用いた診断キットの開発に向け更に研究を進めている。[久保田眞由美、荒川宜親、佐々木次雄]

### VII. *Haemophilus influenzae* に関する研究

1. *H. influenzae* type b コンジュゲートワクチンの免疫原性の検討

破傷風トキシノイドをキャリア蛋白とする *H. influenzae* type b コンジュゲートワクチンを単独接種した場合の PRP に関する免疫原性について検討した。マウス(ICR、雄、4週)にワクチンを 1/5 single human dose ずつ 2週または 3週間隔で計 4回、皮下(5匹)または筋肉内(5匹)に接種し、各回の 2週間後に尾静脈より部分採血した。自家製チラミン化 PRP を固相化した ELISA により血中抗 PRP 抗体価を測定した。個体差はあるが 3回免疫後に血中抗体価の上昇が見られた。[新谷三春、佐々木裕子、長岡芳昭、高橋元秀、佐々木次雄、荒川宜親]

### VIII. 行政科学に関する研究

1. 生物学的製剤基準の改定作業

平成 5 年に改正が行われて以来全般的な見直しが行われていなかった生物学的製剤基準の大改正が行われ、本改正作業に従事した。今回の改正において、細菌第二部としては、BCG ワクチンの含湿度、抗毒素製剤の力価表現の改定、試験用動物規定、エンドトキシン試験法、無菌試験法、通則のロット定義の見直し等に積極的に貢献した。[佐々木次雄、堀内善信、山本三郎、高橋元秀、荒川宜親]

2. 日本薬局方活動

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、国際調和無菌試験法に沿って日局無菌試験法の改正作業、遺伝子解析による微生物の迅速同定法の作成を担当し、更に非無菌医薬品の国際調和作業に従事した。製薬用水委員会では、常水や注射用水の見直し作業に従事した。[佐々木次雄]

3. ISO/TC198 活動

WG9 (Aseptic processing of health care products) 国際委員として、今年度は凍結乾燥、アイソレータ、定置洗浄、定置滅菌の国際規格 (ISO 規格) 作成に従事した。また、これまで ISO/TC198 から出された ISO 規格の国内導入を目標に解説書出版作業にも関わった。

[佐々木次雄]

4. 無菌医薬品ガイドライン作成

平成 17 年 4 月の改正薬事法施行に合わせて、監視指導・麻薬対策課より「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針(案)」及び「最終滅菌法による無菌医薬品の製造指針(案)」作成要請があった。厚労省科学研究班「無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究(主任:棚元憲一)」の一員として今年度は、「無菌操作法による無菌医薬品の製造指針(案)」作成作業に従事した。[佐々木裕子、佐々木次雄]

### IX. 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" の多様性

"1-1 ORF2" はジフテリア菌に広く存在する抗原蛋白質であるが、菌株によっては、プロリンに富む高度反復配列を備えた variant を産生する。この反復領域を DNA レベルで見ると、5塩基からなる単位が (3 x n) 回並んだあとにさらに 3塩基が付加されて、総塩基数が 3 の倍数になり読み取り枠と合うような大きな単位を構成し、その大きな単位が繰り返すことにより、蛋白レベルでの繰り返し構造が実現されていることが明らかに

## 細菌第二部

なった。[岩城正昭、三枝智美、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀]

### 2. "1-1 ORF2"抗原遺伝子の内部欠失

ジフテリア菌 TMIH5 株(東京都健康安全センターより分与)が産生する"1-1 ORF2" variant のプロリンに富む高度反復配列の安定性を検討するため、TMIH5 株を 30 日間毎日継代培養したのち 50 の独立したクローンを単離して、それらの"1-1 ORF2"遺伝子の塩基配列を調べたところ、1クローンで反復配列の内部に欠失が起こっていた。欠失は2つの 5 塩基単位の間で相同的組換えによって起こったものと推測された。そのような組換えでは読み取り枠が損なわれる場合が多いと予想されたにもかかわらず、欠失した塩基数は、読み取り枠を損なわず蛋白質の産生を維持する 3 の倍数であった。このことから、この蛋白質がジフテリア菌にとって重要な蛋白質である可能性が示唆された。[猪股夢乃、三枝智美、岩城正昭、高橋元秀]

### 3. "1-1 ORF2"反復領域の遺伝子クローニングと抗原性の解析

TMIH5 株総DNAより、"1-1 ORF2"遺伝子内部の高度反復配列を含む領域を大腸菌発現ベクターpQE30 にPCRクローニングし、(His)<sub>6</sub>タグを利用して産物を精製した。この産物に対する抗血清をマウスで作成し、ジフテリア菌 14 菌株のライセートに対する反応性をWestern blottingで検討したところ、TMIH5 および類似の"1-1 ORF2"蛋白質を発現するTMIH4 株では抗体に反応するバンドが見られたのに対し、他の全ての菌株ではバンドは見られなかった。プロリンに富む高度反復配列がこの蛋白質の抗原性に決定的な役割を果たしていることが示唆された。[岩城正昭、三枝智美、猪股夢乃、小宮貴子、高橋元秀]

### 4. コラーゲンコート固相へのジフテリア菌の付着

ジフテリア菌の宿主への付着の機構の解析は、防圧の戦略を考える上で極めて重要である。我々はモデル系として、細胞外マトリクスへのジフテリア菌付着アッセイ系の確立を試みた。I 型および IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロ

ネクチンでそれぞれコートされた 96 穴プレートで、BHI 液体培地にジフテリア菌 C4、C7、DMST15613 (タイ NIH より分与)、PW8 株を培養したところ、I 型コラーゲンコートプレートに DMST15613 株が高い細胞付着能を示した。現在、このアッセイ系を用いて、付着能を失った変異株の単離を試みている。[三枝智美、猪股夢乃、岩城正昭、高橋元秀]

### 5. *Corynebacterium ulcerans* とジフテリア菌の共通抗原について

*C. ulcerans* はジフテリアに極めて類似する感染症の起因菌として近年注目されており、国内でも患者が発生している。我々がすでに遺伝子を単離している 12 種のジフテリア菌抗原が *C. ulcerans* 感染症の診断に有用かどうかを知るため、抗 *C. ulcerans* 抗血清をウサギで作成し、12 種のジフテリア菌抗原との反応性を検討した。12 種の抗原のうち 3 種が抗 *C. ulcerans* 抗血清と反応し、*Corynebacterium ulcerans* とジフテリア菌の共通抗原である可能性が示された一方、残りの抗原がジフテリア菌特異的な抗原としてジフテリアの診断に有用であることも示唆された。[岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀]

6. 地方衛生研究所で保存されていたジフテリア菌について生化学的および分子生物学的検査をおこなった結果、Api コリネキットによる生化学的検査とバイオタイプの確認は、菌の性状を確認する上で有意義であることが再確認された。ジフテリア毒素原性試験の感度の比較では、PCR 法 $\geq$ 培養細胞法 $\geq$ ウサギ皮内法 $>$ Elek 法の順であった。また、毒素を定量的に測定した場合、培養細胞法はウサギ皮内法より 4 倍程度感度が優ることが確認された。平成 15 年 10 月ー平成 16 年 2 月に、12 医療機関の小児科担当医療従事者 49 名について毎月 1 回ジフテリア菌の分離検査を実施した結果、ジフテリア菌は検出されなかった。なお、期間中に血中ジフテリア抗毒素価測定を 2 回行ったが、1名を除いて抗毒素価の変動は確認されなかった。

[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀、秋田県衛生科学研究所、東京都健康安全研究センター、千葉県衛生研究所、三重県科学技術振興センター、福岡県保健環境研究所]

## X. 破傷風に関する研究

## 細菌第二部

1. 2003年8月から6ヶ月間にパキスタンのペシャワール子供病院で破傷風と診断された100名の患者から、糞便、臍のうすワブ及び血清を採取した。検体は2004年2月に、パキスタン側と日本側の検疫、税関手続き後を完了後に搬入した。100検体のうち、年齢が1歳以上で新生児破傷風患者の区分にはいない検体が23例あり、これらを除いた77例の患者情報を分析した。患者の平均年齢は8.5日であった。患者の性別は、男児は59例、女児は19例であった。入院後に臨床診断までに要した日は、平均日数は3.8日、入院期間の平均日数は11.5日であった。臍帯切断後の処理方法では、牛の油でギーが18例(23%)、何らかの薬品が12例、灰が4例、HINAが3例、アルコール消毒が2例、粉が2例、無処理、不明が24例(47%)であった。患者の母親の破傷風トキソイド接種歴は、2回接種が5例、1回接種が1例、未接種が46例、不明が24例であった。菌分離試験については、現在試験中である。[高橋元秀、福田 靖、岩城正昭、小宮貴子、櫻田紳策、Iftikhal]

### 2. 破傷風患者の実験室内診断に関する再検討

破傷風患者由来の分離菌から破傷風毒素が検出された場合、感染症法では患者診断は、「臨床診断」から「病原体診断」となるので、毒素の検出は診断の確定に重要である。毒素の検出では、動物を用いて破傷風の特徴的症状を確認すると共に、抗毒素(中和)抗体による毒素の中和を確認する必要がある。毒素中和試験では、試験管内で抗体と破傷風毒素を反応させる試験法と、動物に抗体と毒素を別々に注射して体内で反応させる試験法があるが、これらの二法では、一定量の抗体が中和できる毒素量の相違について明確でなかった。そこで、マウスを用いて生体内と試験管内で0.1単位の抗体が中和する毒素量を比較した結果、抗体により中和される毒素量は、試験管内では $3.7 \times 10^3$  マウスLD<sub>50</sub>、生体内では110マウスLD<sub>50</sub>であった。この結果から、試験管内中和法では生体内中和法よりも多くの毒素を抗体は中和できるので、毒素中和試験では試験管内中和法の利用が推奨される。[福田 靖、高橋 元秀]

## XI. ボツリヌスに関する研究

1. ボツリヌスの実験室内診断法と予防に関する研究:ボツリヌスA型およびB型毒素による細菌テロを想定した時に、特定の対象者への予防を目的とした試作トキソイド作出のために、ボツリヌスA, B, E及びF型菌を培養、産生した毒素の精製を行い、最終4型混合トキソイド換算として約500用量相当の標品を得た。各型毒素ともに高度に精製し、過去に製造されたトキソイドに用いた毒素純度に比べて、安定且つ基本分子構造であるM型毒素標品を得た。各毒素は個々にホルマリンで無毒化し、4型混合トキソイドとして製剤化する。今後、安全性と有効性の評価は、実験動物を用いて確認する。[高橋元秀、岩城 正昭、福田 靖、小宮 貴子、小崎 俊司、幸田 知子(大阪府立大学)、大隈 邦夫、諸熊 一則、大塚 幹夫、中西 喜彦(化血研)]

2. ボツリヌス毒素を用いて、さまざまな筋肉の異常興奮症の治療がおこなわれようとしている。ボツリヌス毒素は微量で生物活性を発現するために、毒素そのものの品質管理方法を確立する必要がある。今までに、人体に直接用いられた細菌毒素にジフテリア毒素があり、この生物学的製剤基準に準拠してボツリヌス毒素の基準案を作成し、品質管理試験として必要な項目、内容を整理した。また、微量の毒素を連続投与により抗毒素を誘導する動物モデルとして、ラットを用いて毒素を複数回投与、観察した。実験期間210日以内に全身麻痺が出現するか、又は外見的に無症状のラットの血清中には、皮下注射法の検出レベルである0.003IU/mlの抗毒素価は検出されなかった。[高橋元秀、岩城 正昭、福田 靖、小宮 貴子、小崎 俊司、幸田 知子(大阪府立大学)]

## XII. 抗毒素に関する研究

1. 抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究:ウマ抗毒素製剤は、数種の製剤が国内数社の製造所により数年前までは製造されていた。しかし、製剤の使用頻度が少なく、さらにGMP対応施設の充実が近年求められており、企業として採算が見合わないことで製造を廃止する企業が多くなった。また、千葉血清は廃業に追い込まれたことにより、化血研で国内製剤のすべてを製造することとなった。化血研では承継した製剤については新規施設の立ち上げが終了し、増産が必要な製剤の製造計画・体制の調整も終了し、実製造がおこなわ

## 細菌第二部

れている。一方、ウマ抗毒素製剤の供給体制については、経済性から鑑みると海外から輸入することが容易な手段と考えられるが、海外製造企業もGMP導入が必要な状況である。国内製造品よりも品質の良い製剤を輸入ことは困難である。従って、効率的に抗毒素を製造し、備蓄体制の充実を計るには、医薬品の開発分野で先行しているバイオ技術の応用が考えられる。複数の手法により安全なヒト型(化)抗体の安定的且つ大量生産を目標とした基礎的研究を開始し、今年度は研究立ち上げの基盤を整えた。[高橋元秀、佐々木次雄、千葉 丈(東京理科大学)、野崎周英(化血研)、向本雅郁(大阪府立大学)]

### XIII. ワクチンの品質管理に関する研究

#### 1. ジフテリアトキソイド・破傷風トキソイドの抗原量測定法の検討

ジフテリアトキソイド・破傷風トキソイド製剤中の抗原濃度(Lf値)は、これらの製剤の抗原純度を評価する際に蛋白濃度と同様に重要である。製造所と感染研では、生物学的製剤基準に沿った方法でこれらを測定しており、特にLf値に関しては1994年に共同でキャリブレーション作業(目合わせ)を行なったが、その後10年を経て各所での測定値に「ずれ」が生じることが懸念された。そこで、国内5製造所で製造されたジフテリアトキソイドと破傷風トキソイドについてLf値を測定し、それぞれの製造所での測定値と比較した。感染研での測定値は、ジフテリアトキソイドでは各製造所での93.5~100%、破傷風トキソイドでは82.6~100%を示し、製造所での測定値が感染研での測定値を若干上回る傾向がみられた。今後、各製造所との一層の協力の下、これらの測定法の技術交流や情報交換を進めていく事が必要と考えられる。

[福田 靖、小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

2. 代表的な海外ワクチンとして Aventis Pasteur(Aventis)、Glaxo Smithcline Beecham(GSK)、Chironの欧州3社のDTaPワクチンを購入し、我が国の試験法による評価を行った。その結果、上記欧州製ワクチンは、いずれも力価は日本の基準に適合したが、特に破傷風、百日せきの力価について製造所間でかなりの違いがみられた。Hib ワクチン:キャリアー蛋白として破傷風トキソイドが用いられていることから、DTaPとの破傷

風免疫における干渉の有無を評価した。その結果、欧州製Hib ワクチンは、マウス、モルモットの何れにおいても、破傷風免疫に対して明らかにブースター効果を示すことが確認され、使用時に過剰免疫に関連した副反応に注意が必要であることが示唆された。

[小宮貴子、福田 靖、岩城正昭、高橋元秀]

3. 不活化ポリオワクチン、ヘモフィルスインフルエンザb型菌ワクチンおよびその混合ワクチンの国内導入 E 実用化に向けた基準案作成のための国内外の情報を整備し、今後検討が必要な科学的事象を整理した。また、過去に入手したDTaP-Hib ワクチンについて、日本国内の力価試験を実施した結果、破傷風トキソイドの力価が国内のDTaPと比較して、約10倍高い力価であった。ワクチンは力価が高いことが品質を保証するものでなく、疾病が征圧できる最低量の抗原量、免疫誘導することが副反応等の軽減にも結びつく。国内の予防接種計画(接種経路、ワクチン品質)に適合した規格、品質のワクチン使用・接種が望まれる。

[高橋元秀、岩城正昭、福田 靖、小宮貴子]

### XIV. BCG・ツベルクリン及び結核免疫に関する研究

#### 1. 結核菌噴霧感染モルモットのサイトカイン産生と結核菌増殖に及ぼす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の類似性から、ヒト結核症のモデル動物として適している。モルモットを微量の結核菌で噴霧感染後、11日目、15日目、20日目、25日目及び35日目に脾臓を採取し、抗原特異的に刺激したときの脾細胞のTNF- $\alpha$ 産生を測定した。非免疫モルモットを噴霧感染装置内で結核菌を気道感染させると、20日目ころから脾細胞は大量のTNF- $\alpha$ を産生することが認められた。一方、BCG免疫動物では、TNF- $\alpha$ 産生は感染前と同程度に抑制され、結核菌の増殖も抑制されることがわかった。

[Toshiko Yamamoto, Christine McFarland, David McMurray (Texas A&M 大学)、山本三郎]

#### 2. $\alpha$ 抗原過剰発現 rBCG で免疫したモルモットの抗結核防

## 細菌第二部

### 御効果の長期持続性

$\alpha$  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、BCG に比べ高く、3 種類の抗原を同時発現させた rBCG(BA51) は、さらに強い効果があることが認められた。そこで抗結核防御免疫の長期持続性を調べるため rBCG または Tokyo 172 BCG 103 個を接種し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、その後 1 年以上にわたり各群間の生存日数を比較し rBCG の抗結核防御効果の長期持続性を調べている。なお、用いた rBCG の RD16 PCR 産物はすべて 401bp であった。[Toshiko Yamamoto, David N. McMurray (Texas A&M University), Lisa Brandt, Todd Lasco, Ian Orme (Colorado State University), 大原直也、山田毅(長崎大歯)、山本三郎]

### 3. BCG による肉芽腫形成と MyD88 の役割

MyD88 は Toll Like Receptor (TLR) の細胞内シグナル伝達のアダプター分子として機能し、サイトカイン産生に深く関わることが知られている。そこで、BCG 感染における MyD88 の役割を明らかにするため、MyD88 KO マウスまたは正常マウスに BCG を経静脈接種後、肺・肝臓・脾臓を採取し、肉芽腫数、臓器内菌数、組織内マクロファージ数およびサイトカイン・ケモカインの発現を調べた。臓器重量、肉芽腫数、肉芽腫の平均面積は、MyD88 KO マウスでは、正常マウスと比べ減少していた。また BM-8 陽性細胞または Mac-1 陽性細胞は、いずれも約 2 分の 1 から 4 分の 1 程度にまで減少していた。しかし、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1 の発現ならびに臓器内菌数は MyD88 KO マウスと正常マウスで差は認められなかった。[高塚尚和 1,2、伊保澄子 1、松木孝澄 1、山本三郎 2、審良静男 3(1 福井大医、2 感染研、3 阪大微研)]

### 4. BCG の RD16 クローンの解析

日本株 BCG Tokyo 172-1 の RD16 領域を PCR で増幅して 379bp と 401bp にバンドを示す 2 種類のクローン(BCG-I、BCG-II)をそれぞれ 7H9 培地またはソートン培地で継代培養し、PCR を指標にクローンが変異する可能性を検討した。その結果、いずれの培地でも、RD16 の PCR 産物は、BCG-I は 379bp に、BCG-II は 401bp にあって、変異は認められなかった。[山

本三郎、持田恵子、柴山恵吾; 芳賀伸治、山崎利雄(細菌第一部)]

### 5. BCG 株の RD2 及び RD16 に関する研究

MPB64 たんぱくは、結核菌や早期に分与された日本株 BCG では産生されるが、後期に分与されたパスツール株 BCG では RD2 遺伝子が欠損している。一方、RD16 はブラジル株 BCG では欠損しているが、ほかのすべての BCG 垂株に存在し、日本株 BCG では 379bp と 401bp の PCR 産物が、それ以外の BCG 垂株では 401bp に認められる。感染研に長期保存の BCG 株 7 株(アルゼンチン、インドネシア、エクアドル、タイ、台湾、ブルガリア、ベトナム)について RD16 部位の PCR 産物及び RD2 の MPB64 たんぱく発現を検討した。対照として Tokyo 172 株と ATCC パスツール株 BCG を用いた。免疫クロマト法による MPB64 たんぱく検出は、Tokyo 172 株、タイ BCG、台湾 BCG、ブルガリア BCG は陽性、他は陰性であった。RD16 の PCR 産物は、Tokyo 172 株と台湾 BCG が 379bp と 401bp、他は 401bp のみであった。[山本三郎、持田恵子、柴山恵吾]

### 6. 細菌 CpG DNA によるヒト形質細胞様樹状細胞(PDC)の活性化機序

細菌 DNA は感染免疫の成立に重要な役割を担う菌体成分である。PDC における IFN- $\alpha$  および MIP-1a の産生は CpG 特異的であり、9-12 時間以降の培養上清中に確認される比較的遅い反応である。これに対し RANTES は CpG だけでなく non-CpG DNA によっても誘導され、早期に産生増強があり以後の変化は認められなかった。IFN- $\alpha$  および MIP-1a の産生はクロロキン、wortmannin、SB203580 によって阻害され、エンドゾーム成熟化および PI3K、p38 MAPK が関わるが、RANTES 産生は必要としない可能性が示唆された。[伊保澄子 1、高塚尚和 1,2、山本三郎 2(1 福井大医、2 感染研)]

### 7. 北西太平洋ミンクジラの抗酸菌症、ブルセラ症に関する研究

これまでに北西太平洋に棲息する鯨類、特にミンクジラにおけるブルセラ菌の感染を血清学ならびに病理学的検索により示唆したが、抗酸菌症については確認できなかった。調査

## 細菌第二部

捕鯨により北西太平洋にて2000年に捕獲した6頭、2001年に捕獲した16頭の精巣病変部からPCR法によりブルセラ菌DNAの検出を試み、10個体でブルセラ菌特異的PCR産物が観察された。5個体については遺伝子配列を決定し、解析の結果、北西太平洋ミンクジラ由来のブルセラ菌遺伝子配列は、既知のブルセラ菌とは異なるが、大西洋アザラシ由来株に最も類似していると考えられた。[大石和恵 1,2、山本三郎 1、後藤義孝 3、坂東武治 4 (1 感染研, 2 海洋研究開発機構, 3 宮崎大農, 4 鯨類研)]

### 8. 非定型抗酸菌におけるプラスミド保有株の解析

結核菌及び牛型結核菌においては、現在までのところプラスミドの存在は報告されていないが、非定型抗酸菌においては、数種についてプラスミドの存在が報告されている。これまで、非定型抗酸菌のプラスミドについては、病原性や薬剤耐性にかかわる遺伝子が認められず十分な解析はされていなかったが、最近になり、病原性にかかわるプラスミドの存在も示唆されるようになり、プラスミドの存在も重要視されてきている。そこで、非定型抗酸菌のうち迅速発育菌種15種(211株)また遅速発育菌6種(227株)につき、プラスミド保有の有無をアルカリ少量法により、解析中である。(小澤良之)

### 9. 結核菌におけるアポトーシス関連物質の解析

H37Rv や *M. bovis* 等の強毒菌は、マクロファージのアポトーシスを抑制しマクロファージ内で共存しているのに対して、H37Ra や BCG の弱毒菌はアポトーシスを誘導し、この結果、生体はアポトーシスをきたしたマクロファージの排除とともに弱毒菌を排除している。このアポトーシスの抑制反応は生菌だけに認められ、死菌やタンパク合成が阻害された菌ではみとめられないことから、強毒結核菌は、共存するマクロファージのアポトーシスの抑制に関わる何らかの物質を分泌していると思われる。本研究では、結核菌の病原性因子としてのアポトーシス関連物質の同定を目的として研究を進めている。(小澤良之、石川暁志)

### 10. ガンマー線不活化結核ワクチン開発に関する研究

ガンマー線照射不活化 BCG の免疫持続効果を BCG 生菌

および加熱処理 BCG と比較した。モルモットに各種 BCG 免疫14ヶ月後に PPD に対する遅延型過敏症誘導能を調べた。ガンマー線照射不活化 BCG 免疫群の遅延型過敏症反応は加熱処理 BCG 免疫群より有意に高く、BCG 生菌群とは有意差が認められなかった。さらにこの6週間後、モルモット静脈内に BCG 生菌を投与し、1週間後に脾臓、肝臓、肺を摘出した。現在、還元培養による残存生菌数からの生体防御能を検討中である。本実験により、ガンマー線照射不活化 BCG の免疫持続期間は BCG 生菌と同程度であることが確認された。[持田恵子、荒川宜親]

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

胃潰瘍、胃がんの原因とされている *H. pylori* のアポトーシス誘導蛋白  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase によるアポトーシス誘導メカニズムについて、生化学的な解析を行った。[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]

### 12. 乾燥 BCG 製剤及び精製ツベルクリン製剤の品質管理

平成15年度に実施した BCG ワクチン5ロット及び膀胱内用 BCG(日本株)4ロット計9ロットの定量培養による力価試験成績は  $41.2 \pm 9.6 \times 10^6$  CFU/mg( 昨年は  $42.6 \pm 10.1 \times 10^6$  CFU/mg )であった。膀胱内用 BCG(コンノート株)4ロットの力価試験成績は  $6.2 \pm 2.3 \times 10^6$  CFU/mg であった。浮遊菌液 1 mg/ml の OD による菌量測定試験は  $0.120 \pm 0.030$  (昨年は  $0.134 \pm 0.013$ ) であった。精製ツベルクリンは一般診断用20ロット、確認診断用1ロット計21ロットについて力価試験を行った平均値は  $+0.10 \pm 3.24$  (昨年は  $+0.79 \pm 1.05$ ) であった。[山本三郎、持田恵子、八木哲也、柴山恵吾、小澤良之、井口由美子]

## XV. 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 DTaP ワクチンの安全性に関する研究  
昨年に引き続き輸入した海外の市販 DTaP ワクチン及び DTaP-IPV ワクチンについて、マウスの足蹠およびウサギ背部

## 細菌第二部

皮内での局所反応原性を検討した。海外ワクチンでは同時に比較した国産ワクチンにみられないマウス足蹠での強い腫脹およびウサギ皮膚での長期にわたる硬結が認められた。病理組織学的検討の結果、国産ワクチン接種局所では一過性の軽い炎症を認めるだけであったが、海外ワクチンは強い炎症を惹起し、その結果ウサギでは壊死巣が繊維化し、長期の硬結として観察されることが明らかとなった。[片岡紀代、山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信、永田典代、倉田毅(感染病理部)]

### (2)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、細胞レベルでの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蹠に投与する直前、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細胞増殖を測定したが、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]

### (3)DPT ワクチン中のエンドトキシン量評価

平成16年の生物学的製剤基準改正に伴い、DPTワクチンにエンドトキシン試験が適用された。そこで、本年度国家検定に提出された全DPTワクチンのエンドトキシン含量を測定した。ワクチン中のエンドトキシン量は、すべて0.034 EU/mL以下であり、新基準(4.0 EU/mL以下)に適合す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. その他のワクチンに関する研究

### (1)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試験の試験精度向上のための検討を行った。採血法を改良することで、試験精度および再現性が向上した。また施設間での試験結果の再現性も改善した。[落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善

信]

### (2)マウス白血球数減少試験用参照インフルエンザワクチンの標準化

マウス白血球数減少試験用参照インフルエンザワクチン Lot 3 候補品が調製され、細菌製剤協会(4製造所)および当研究室 計5施設共同で活性単位の標定を行った。同参照インフルエンザワクチン Lot 2 に対して活性を比較したところ、参照インフルエンザワクチン Lot 3 は、12 単位/vialと評価された。[落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、細菌製剤協会]

### (3)インフルエンザ HA ワクチンのマウス白血球数減少活性の機構に関する研究

マウス白血球数減少試験の臨床的意義を検討する目的で、免疫部と一緒に白血球減少の機構について検討した。不活化ウイルス粒子を用いたワクチンでは、マウス腹腔投与により5時間および16時間後に2峰性の末梢白血球減少がみられることが、黒川らにより報告されている。今回この現象を確認するとともに、関連すると思われる生体内での変化を観察した。今後白血球減少活性に違いのあるHAワクチン原液等の比較により、関連性反応の特定を進める計画である。[藤猪英樹、高橋宜聖、山本紀一(協力研究員)、横田恭子、阪口雅弘、大西和夫、高須賀直美、橋本修一、磯貝まや(協力研究員)(免疫部)、落合雅樹、山本明彦、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、竹森利忠(免疫部)]

### (4)インフルエンザb型菌(Hib)ワクチン中のエンドトキシン量評価

ヨーロッパのワクチン製造所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トキシン量を測定した。LAL試験によりワクチン中の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、ロット間均一性が確認できなかった。強いLAL活性を示したロットは、*in vitro*エンドトキシン試験法およびウサギ発熱試験においても強いエンドトキシン活性を示した。従って、本ワクチンの安全性を確保するためには、エンドトキシン量の管理が必要であると考えられた。[落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信]

## 細菌第二部

(5)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

Aventis 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、ワクチン中に 300 EU/ml を超えるエンドトキシン汚染が認められたので、その生物活性をヒト由来 28SC 細胞に対する IL-6 産生誘導により評価した。その結果、リムルス試験同様、ヒト由来細胞でも強い IL-6 産生誘導が認められた。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信]

### 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。セフェム系抗生物質 6 種について、マウスマクロファージ由来の RAW264.7 細胞における高感度 TNF- $\alpha$  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 RAW264.7 細胞培養に加え、20時間後に ELISA により培養上清の TNF- $\alpha$  を定量した。その結果、これらの抗生物質はエンドトキシンによる RAW264.7 細胞での TNF- $\alpha$  産生に対して増強は示さなかった。さらに人末梢血とエンドトキシン反応性が相似の人モノサイト由来 28SC 細胞を用いて、同様の確認を行った。その結果、28SC 細胞でも  $\beta$ ラクタム系、セフェム系抗生物質によるエンドトキシン生物活性の増強は認められなかった。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信]

(2)ウサギ発熱試験の高感度 *in vitro* 代替試験法の開発

ウサギ末梢血のエンドトキシン刺激により産生される、発熱最終メディエーターであるプロスタグランジンE<sub>2</sub>量測定を用いた *in vitro* 試験法を開発した。本 *in vitro* 試験法により、高感度にエンドトキシン活性の定量が可能であった。また、種々の由来の異なるエンドトキシンに対する反応性で比較したところ、本試験法はウサギ発熱活性と相同のエンドトキシン反応性を持つことが確認されたことから、多数のウサギを必要とする発熱試験に替わり、エンドトキシンの発熱活性を定量的に測定可能な高感度代替試験法としての可能性が示された。[落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、山本明彦、蒲地一成、堀内善信]

(3)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7アミノ酸からなるペプチドを発見する *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。3種類の直鎖状ペプチドのうち 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。しかしポリミキシン B の中和能に比べて明らかに弱く、今後さらに環状ペプチドを含め、より強い親和性ペプチドの検索を行う予定である。[山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、蒲地一成、鈴木政嗣(協力研究)、松本めぐみ(協力研究)、丹羽允(協力研究)、堀内善信]

(4)日本薬局方(日局)エンドトキシン 100 標準品の力価評定

日本公定書協会で日局エンドトキシン 100 標準品(Lot 6, 7)候補品が調製され、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施設で力価共同評定を実施した。WHO エンドトキシン国際標準品、日局標準エンドトキシン 10000 標準品(Lot 5)を用いて標準化を行った。結果として、エンドトキシン 100 標準品の単位は Lot 6 候補品が 150 EU/vial、Lot 7 候補品が 160 EU/vial と評価された。[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(日本公定書協会)]

### 4. 百日咳菌に関する研究

(1)百日咳菌に認められた広宿主域プラスミドの解析

百日咳死亡患児から分離された百日咳菌にプラスミド(pBP136)の存在が確認され、患児死亡原因とプラスミドの関係性を明らかにするためプラスミドの遺伝子解析を行なった。その結果、pBP136 は 41,268-bp からなる広宿主域 IncP-1 $\beta$  プラスミドであることが判明した。プラスミドには 46 個の ORF が確認されたが、薬剤耐性遺伝子や既知の病原性遺伝子は認められなかった。このことから、プラスミド pBP136 の存在が患児死亡の直接的原因となった可能性は低く、患児は通常の百日咳感染により死亡したものと考察された。

[蒲地一成、曾田匡洋(環境科学技術研究所)、玉井友治(大



## 細菌第二部

分県立病院)、永田典代、近田俊文、井上敏郎(大分県立病院)、荒川宜親] (主任:荒川宜親)

### (2) 日本における百日咳菌の抗原変異と病原性の解析

1988年から2001年に我が国で分離された百日咳臨床分離株について、ワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株の出現状況を調査した。解析菌株 107 株はパルスフィールドゲル電気泳動により 3 タイプ(Type-A, -B, -C)に大別され、1994-1995年からType-B株の分離率が上昇していることが判明した。分離菌株の百日咳毒素 S1 遺伝子(*ptxS1*)とパータクチン遺伝子(*prn*)を解析したところ、Type-B 株は主にワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ抗原変異株であることが示され、我が国でも欧米諸国と同様に抗原変異株が出現していることが明らかとなった。日本では1991年以降、百日咳報告患者数は減少傾向にあることから、Type-B 株は現行ワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性は低く、ワクチンの有効性とは無関係な出現であると考察された。[児玉温子、蒲地一成、堀内善信、近田俊文、荒川宜親]

### (3) 福岡県内で分離された百日咳流行株の抗原遺伝子解析

昨年に引き続き、1991年に福岡県で発生した百日咳 outbreak を解析した。家族内感染事例を除いた 25 株の百日咳臨床分離株についてその抗原遺伝子(*ptxS1*, *prn*)を解析したところ、22 株(88%)がワクチン株と同じ *ptxS1B/prn1* 遺伝子を持つことが判明した。なお、2 株はワクチン株と異なる *ptxS1A/prn2*、1株は *ptxS1B*と新規の *prn*を有していた。欧米諸国では抗原変異株が百日咳 outbreak の原因菌と考えられているが、本事例解析によりワクチン株と同じ抗原遺伝子を持つ百日咳菌も outbreak の原因菌となることが明らかとなった。[蒲地一成、堀川和美(福岡県保環研)、山本明彦、落合雅樹、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、岡田賢司(南福岡病院)]

## ◆研究課題一覧

### 1. 厚生労働科学研究費補助金 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

厚生労働省の「院内感染対策サーベランス事業」に専門的な視点から、支援協力を行った。

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(群馬大学医学部))

分担研究課題:カルバペネム耐性菌広域β-ラクタム薬耐性菌及びアミノグリコシド耐性菌のレファレンスと研究(分担:荒川宜親、研究協力者:柴田尚宏)

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(国立国際医療センター))

分担研究課題:院内感染起因菌の薬剤耐性(分担:荒川宜親、研究協力者:柴田尚宏、鈴木里和、山根一和)

d. ツベルクリン検査・BCG等に代わる結核等の抗酸菌症に係る新世代の診断技術及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-線照射処理抗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)

e. 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:ボ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)

f. 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班(主任:佐々木次雄)

分担研究課題:マイコプラズマ肺炎の分子疫学的研究(分担者:見理剛)

分担研究課題:*Haemophilus influenzae* 臨床分離株の型別分布及び薬剤感受性分布に関する研究(分担研究者:荒川宜親、協力研究者:新谷三春)

分担研究課題:百日咳菌の解析(分担:堀内善信)

### 2. 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業

## 細菌第二部

- a. 集中治療部門(ICU,NICU)等、易感染症患者治療を担う部門における院内感染防止対策に関する研究  
(主任:武澤 純(名古屋大学医学部))  
分担研究課題:ICU・NICU における感染症の起因菌として問題となる多剤耐性菌に関する検討  
(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. 院内感染の防止のための監視体制の整備、細菌検査室の機能向上に関する研究(主任:山口恵三 東邦大学)  
分担研究課題:中小規模病院に対する院内感染対策支援に関する研究(分担:荒川宜親、研究協力者:鈴木里和、山根一和)
- d. 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)
- e. 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)
- f. 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)
- g. 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. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
- a. 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、国立感染症研究所、感染病理部)  
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  
(分担研究者:荒川宜親、協力研究者:佐々木裕子)
4. 厚生労働科学研究費補助金 医薬品等医療技術リスク評価研究事業
- a. 抗毒素製剤の効率的製造方法の開発に関する研究(主任:高橋元秀)  
総括研究課題: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)
- b. 無菌医薬品製造に関する国際規格の国内導入に関する研究(主任:棚元憲一(国立医薬品食品衛生研究所))  
分担研究課題:無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針案作成(分担者:佐々木次雄)  
分担研究課題:防腐剤無添加製剤の無菌性保証に関する研究(共同研究者:佐々木次雄)
- c. 混合ワクチンの品質確保に関する研究  
(主任:宮村達男)  
分担研究課題:百日せきワクチンおよび混合ワクチンの検討(分担:堀内善信)  
分担研究課題:*Haemophilus influenzae type b(Hib)*コンジュゲートワクチンの品質管理に関する研究(分担:新谷三春)
5. 厚生労働科学研究費補助金 厚生科学特別研究事業

## 細菌第二部

a. 国、自治体を含めた院内感染対策全体の制度設計に関する緊急特別研究(主任:小林寛伊(NTT 東日本関東病院))  
分担研究課題:全国規模の院内感染対策サーベイランスの普及と活用に関する研究(分担:荒川宜親、研究協力者:鈴木里和、山根一和、藤本修平(群馬大学医学部))

6. 厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

a. 国際的動向を踏まえた体外診断薬の品質管理に関する研究(主任:竹森利忠)  
協力研究課題:風疹 IgG 抗体標準品に対する相対抗体価測定法の応用(分担:海野幸子、研究協力:堀内善信)

7. 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)

8. 厚生労働省国際医療協力研究委託事業

a. ポリオ根絶後の拡大予防接種計画及び麻疹の制御に関する研究(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)

9. 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難治性神経筋疾患の治療薬の開発(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)

b. 結核防御粘膜免疫誘導性ワクチンに関する研究(主任研究者:山本三郎)

10. 文部科学研究費補助金

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(主任:加藤はる)

b. 腸内細菌群におけるプラスミド性クラスCβ-ラクタマーゼの解析と簡易検出法の検討(主任:土井洋平)

c. 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)

d. *Mycoplasma penetrans* の膜リポタンパク質抗原変化機構の解析(主任研究者 堀野敦子)

## その他、業務に関連する事項

第1室

I. 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

抗生物質医薬品:経口剤(ホスホマイシンカルシウム) 13 ロット

抗生物質医薬品:経口剤(硫酸ポリミキシンB)

4 ロット

抗生物質医薬品:注射剤(セフメタゾールナトリウム)

10 ロット

抗生物質医薬品:注射剤(リン酸クリンダマイシン)

6 ロット

(2) 特別審査

抗生物質医薬品:フィニバックス(ドリペネム水和物)

1 件

(3) 依頼試験

抗生物質医薬品:注射用シナシッドの力価試験(比濁法)

1 件

(4) 細菌行政検査

埼玉県から院内感染調査のために多剤耐性緑膿菌(4検体)を受け付けて遺伝子解析を実施した。[柴田尚宏、山根一

細菌第二部

和、荒川宜親		ガスエソウマ抗毒素	1ロット
		抗破傷風人免疫グロブリン	9ロット
2. 標準品、参照品等の作製状況(交付、分与の実績)		2. 標準品、参照品等の作成状況 (交付、分与の実績)	
(1) 交付		(1) 交付	
日本薬局方抗生物質標準品	83 品目 計 530 本	標準ジフテリアトキソイド	5本
日本薬局方外医薬品規格第四部常用標準品	2 品目 計 2 本	標準沈降ジフテリアトキソイド	41本
3. 標準菌株等(交付、分与の実績)		参照沈降ジフテリアトキソイド(混合ワクチン用)	
(1) 交付			98本
抗生物質試験用菌株	1 品目 計 1 本	標準ジフテリア抗毒素	9本
		参照ジフテリア抗毒素(フロキュラシオン用)	21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		ジフテリア試験毒素(ウサギ試験用)	3本
(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:近田俊文]		シック試験毒素(動物用)	5本
(2) 日本薬局方調査会・標準品委員会へ委員として参加協力[委員:近田俊文]		ジフテリア試験毒素(培養細胞法用)	22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	51本
		参照沈降破傷風トキソイド(混合ワクチン用)	44本
第2室		標準破傷風抗毒素	14本
		標準抗破傷風人免疫グロブリン	5本
1. 無菌試験		参照破傷風抗毒素(フロキュラシオン用)	12本
(1) 生物学的製剤(159 頁参照)		破傷風試験毒素	27本
(2) 抗生物質製剤(159 頁参照)		標準はぶ抗毒素	5本
(3) マイコプラズマ否定試験(159 頁参照)		はぶ試験毒素(出血Ⅱ)	5本
		標準まむし抗毒素	3本
		まむし試験毒素(致死)	4本
第3室		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
I. 生物学的製剤の品質管理に関する業務		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
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		(2) 分与	
沈降精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン		標準ジフテリア抗毒素を以下の研究所に1本ずつ分与した。	
(DTaP 最終段階)	27ロット	茨城県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、山形県衛生研究所、宮崎県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所、中国 蘭州生物製品研究所 合計 8 本	
沈降ジフテリア破傷風混合トキソイド	6ロット	ジフテリア試験毒素(培養細胞法用)を以下の研究所に2本ずつ分与した。	
沈降破傷風トキソイド	8ロット	茨城県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、山形県衛生研究所、宮崎県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研	
成人用沈降ジフテリアトキソイド	1ロット		
DTaP に使用するジフテリアトキソイド原液	8ロット		
DTaP に使用する破傷風トキソイド原液	6ロット		
乾燥まむしウマ抗毒素	1ロット		

細菌第二部

研究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所、  
甲子園大学 合計 16 本

VERO 細胞を以下の研究所に1本ずつ分与した。

茨城県衛生研究所、福井県衛生環境研究センター、山形県  
衛生研究所、宮崎県衛生環境研究所、愛媛県立衛生環境研  
究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所、  
甲子園大学

合計 8 本

3.標準菌株等(交付、分与の実績)

(1) 分与

*Corynebacterium diphtheriae*(PW8 株): 大阪府立大大学院  
1 本

*Corynebacterium ulcerans*(ジフテリア毒素産生性): 大阪府立  
大大学院 1 本

4. 行政検査の受入れ状況

(1)ジフテリア関係[小宮貴子、岩城正昭、高橋元秀]

平成 15 年 5 月 9 日と平成 16 年 1 月 9 日、 国保旭中央病  
院より、平成 14 年に千葉県旭市で発生したジフテリア毒素産  
生ウルセランス菌による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に、平成 15 年 4 月 14 日採血血清と平成  
15 年 12 月 24 日採血血清のジフテリア抗毒素価測定依頼を  
受けた。今までの結果をまとめると、平成 14 年 11 月 11 日  
0.334IU/ml、平成 14 年 12 月 2 日 1.89IU/ml、平成 15 年 4  
月 14 日 2.76IU/ml、平成 15 年 12 月 24 日 1.18 IU/ml であっ  
た。

(2)破傷風関係[福田 靖、岩城正昭、高橋元秀]

平成 15 年 4 月 17 日付けで、旭中央病院内科より、破傷風  
の疑いのある患者からの組織と血清に対して「患者由来組織  
からの破傷風菌の検出、患者血清からの破傷風毒素の検出・  
定量、患者血清からの破傷風抗体の検出・定量」の依頼を受  
けた。検査の結果、依頼された患者由来組織から破傷風毒素  
を産生する菌は検出されなかった。また、患者血清から、破傷  
風毒素は検出されなかったが、破傷風抗体(0.08 単位/mL)  
が検出された。

平成 15 年 10 月 27 日付けで、広島県(県保健環境センター)

より、患者分離菌に対して「破傷風に関する菌検査」の依頼を  
受けた(行検第 37064)。検査の結果、依頼された分離菌は、  
菌の形態が多くの破傷風菌とは異なっていた。そして、破傷  
風毒素遺伝子を保持していなかった。

5. 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

乾燥 BCG 製剤 29 ロット

内訳

乾燥 BCG ワクチン(最終製品) 5 ロット

80mg 1 ロット

40mg 1 ロット

12mg 3 ロット

乾燥 BCG 膀胱内用日本株(最終製品) 4 ロット

乾燥 BCG 膀胱内用コンノート株 4 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) 6 ロット

精製ツベルクリン 21 ロット

内訳

一般診断用(5 $\mu$ g) 1 ロット

一般診断用(1 $\mu$ g) 2 ロット

一般診断用(一人用) 17 ロット

確認診断用(一人用) 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 2 ロット

乾燥弱毒生麻しんワクチン 1 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)

細菌第二部

53 ロット

2. 標準品等

交付

標準精製ツベルクリン	60 本
BCG Tokyo-172 株	8 本

第5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(小分け製品) 27 件

(2) 血液製剤  
 エンドトキシン試験 540 件

(3) 生物製剤  
 エンドトキシン試験 7 件

(4) インフルエンザ HA ワクチン  
 マウス白血球数減少試験 60 件

(5) コレラワクチン  
 マウス体重減少試験 1 件

(6) 抗生物質  
 エンドトキシン試験 18 件

2. 標準品、参照品等の作成状況(交付、分与の実績)

(1) 交付

ア 標準百日せきワクチン	74 本
イ 百日せきワクチン毒性参照品	112 本

II. 国際協力

第1室

1. 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所薬品試験部の要請により、JICA 研修生(Bureau of Food and Drugs, Philippines)へ日本薬局方抗生物質標準品の品質管理業務についての解説と実地見学の研修を行った。[近田俊文、加藤はる、柴田尚宏、山根一和]

第3室

1. JICA 等研修生、実習生等受け入れ

(1)平成 14 年 9 月 1 日より平成 15 年 8 月 8 日まで 1 ヶ年、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、抗毒素製剤の品質管理の研究を実施した。

(2)平成 15 年度ジフテリア流行予測事業ジフテリア抗毒素価測定法(培養細胞法)の講習会を開催した。(平成 15 年 8 月 4 日 村山庁舎 参加者 茨城県衛生研究所 高木英、福井県衛生環境研究センター 宇都宮央子、宮崎県衛生環境研究所 東美香、山形県衛生研究所 安孫子千恵子 以上 4 名)

2. その他

平成 15 年 7 月 9 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 7 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]

平成 16 年 2 月 5 日、国立保健医療科学院の主催する 15 年度特別過程コース ボツリヌス毒素の検出で実験動物の試験法の実習を行った。[高橋元秀]

第5室

WHO 国際共同研究「精製百日せきワクチン力価試験法に関する第 II 期 WHO 国際共同研究」および総括会議(5月: Ferney-Voltaire)参加。

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

1) Keiko Yokoyama, Yohei Doi, Kunikazu Yamane, Hiroshi Kurokawa, Naohiro Shibata, Keigo Shibayama, Tetsuya Yagi, Haru Kato and Yoshichika Arakawa: Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa* Lancet, Vol.362, 1888-1893 December 2003,

2) Hiroshi Kurokawa, Naohiro Shibata, Yohei Doi, Keigo

- Shibayama, Kazunari Kamachi, Tetsuya Yagi, and Yoshichika Arakawa: A New TEM-Derived Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (TEM-91) with an R164C Substitution at the  $\beta$ -Loop Confers Ceftazidime Resistance  
Antimicrob. Agents Chemother. 2003 47: 2981-2983
- 3) Yohei Doi, Keiko Yokoyama, Kunikazu Yamane, Jun-ichi Wachino, Naohiro Shibata, Tetsuya Yagi, Keigo Shibayama, Haru Kato, and Yoshichika Arakawa: Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase in *Serratia marcescens* Conferring High-Level Resistance to Aminoglycosides  
Antimicrob. Agents Chemother. 48(2): 491-496 2004
- 4) Kunikazu Yamane, Jun Asato, Naofumi Kawade, Hajime Takahashi, Bon Kimura, and Yoshichika Arakawa: Two Cases of Fatal Necrotizing Fasciitis Caused by *Photobacterium damsela* in Japan.  
J. Clin. Microbiol. 42(3): 1370-1372 2004
- 5) M. Komatsu, H. Kato, M. Aihara, K. Shimakawa, M. Iwasaki, Y. Nagasaka, S. Fukuda, S. Matsuo, Y. Arakawa, M. Watanabe, Y. Iwatani: High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 22:525-529, 2003
- 6) E. Ozaki, H. Kato, H. Kita, T. Karasawa, T. Maegawa, Y. Koino, K. Matsumoto, T. Takada, K. Nomoto, R. Tanaka, S. Nakamura: *Clostridium difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. Journal of Medical Microbiology. 53:167-172, 2004
- 7) Naohiro Shibata, Y. Doi, K. Yamane, T. Yagi, H. Kurokawa, K. Shibayama, H. Kato, K. Kai, Y. Arakawa: PCR Typing of Genomic Determinants for Metallo- $\beta$ -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron.  
Journal of Clinical Microbiology, 41(12), 2003
- 8) Noriyuki Nagano, N. Shibata, Y. Nagano, Y. Arakawa: Nosocomial Outbreak of Infections by *Proteus mirabilis* That produces Extended-Spectrum CTX-M-2 Type  $\beta$ -Lactamase.  
Journal of Clinical Microbiology, 41(12), 2003
- 9) Masafumi Goto, Hisami Yasuzawa, Toshihiro Higashi, Yoshihiro Yamaguchi, Akiko Kawanami, Shiho Mifune, Hiromasa Mori, Hitoshi Nakayama, Kumiko Harada and Yoshichika Arakawa: Dependence of Hydrolysis of  $\beta$ -Lactams with a Zinc(II)- $\beta$ -Lactamase Produced from *Serratia marcescens*(IMP-1) on pH and Concentration of Zinc(II) Ion: Dissociation of Zn(II) from IMP-1 in Acidic Medium  
Biological & Pharmaceutical Bulletin Vol.26(5) 589-594
- 10) Maeyama, J., Isaka, M., Yasuda, Y., Matano, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Tochikubo, K., Yamamoto, S., and Goto, N.: Effects of Recombinant Cholera Toxin B Subunit (rCTB) on Cellular Immune Responses: Enhancement of Delayed-Type Hypersensitivity Following Intranasal Co-Administration of Mycobacterium bovis-BCG with rCTB.  
Microbiol Immunol 48(6): 457-463, 2004.
- 11) 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.
- 12) Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM, Brown WJ, Perri MB, Zervos MJ, Ozawa Y, Clewell DB.: " Plasmid content of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolate from a patient also colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA phenotype. " Antimicrob. Agents Chemother. 2003.Dec;47(12):p3954-p3959.
- 13) Yamamoto, A., Ochiai, M., Kamachi, K., Kataoka, M., Toyozumi, H. and Horiuchi, Y. : A cell line assay system for predicting the response of human blood to endotoxin, Jpn. J. Infect. Dis. 56, 93-100, 2003.
- 14) Ochiai, M., Kataoka, M., Toyozumi, H., Kamachi, K., Yamamoto, A. and Horiuchi, Y. Evaluation of endotoxin content of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined (DTaP) vaccines that interfere with the bacterial endotoxin test. Vaccine, 21, 1862-1866, 2003
- 15) Ochiai, M., Kataoka, M., Toyozumi, H., Kamachi, K., Yamamoto, A. and Horiuchi, Y. A quantitative in vitro assay method for detecting biological activity of endotoxin using prostaglandin E<sub>2</sub> induction in rabbit peripheral blood.

## 細菌第二部

Microbiol. Immunol., 47, 585-590, 2003

16) Kamachi K, T Konda, Y Arakawa: DNA vaccine encoding pertussis toxin S1 subunit induces protection against *Bordetella pertussis* in mice. *Vaccine* 21: 4609-4615, 2003.

17) Iwaki M, Komiya T, Fukuda T, Arakawa Y, Takahashi M. Collaborative study: Standardization of Japanese reference diphtheria and tetanus toxoids, (adsorbed, lot 2), for potency determination of diphtheria-tetanus-acellular pertussis combined vaccine. *Jpn J Infect Dis.* 56(4) 183-185, 2003 Aug.

18) Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, Arakawa Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2  $\beta$ -lactamase in cattle, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 10(1) 69-75, 2004 Jan.

19) Yamamoto A, Sakai T, Ochiai M, Kamachi K, Kataoka M, Toyozumi H, Arakawa Y, Horiuchi Y. Augmenting effect of antibiotics on endotoxin activity may cause a safety problem. *Microbiol. Immunol.* 48(2) 97-102, 2004.

### 2. 和文発表

1) 荒川宜親: 院内感染症対策サーベイランスの意義と現状  
新世紀の感染症学(上)ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート

日本臨床 61巻 増刊号2 2003

2) 荒川宜親: 厚生労働省「院内感染対策サーベイランス事業」特集 院内感染  
最新医療情報誌アニムス Winter 2003 No.29, 2003

3) 荒川宜親: バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌 (VRSA) 出現のインパクト 病院感染に一言 Front Essay  
INFECTION CONTROL Vol.12 2003

4) 荒川宜親: 肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)  
病原菌の今日的意味 改訂3版  
医薬ジャーナル社 2003

5) 荒川宜親他: EBM に基づく院内感染予防対策 Q&A  
(編集: 国立病院大阪医療センター感染対策委員会)  
南光堂 2003

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

7) 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ィフィシル毒素. 臨床検査 47(2):169-174, 2003

8) 加藤はる、加藤直樹: Toxin A陰性 toxin B陽性 *Clostridium difficile*. 検査と技術 31(7):666-669, 2003

9) 小宮山謙一、田村英行、多田圭子、柴田尚宏、荒川宜親: 当院で検出された CTX-M-1 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の一症例. 新潟県臨床衛生検査技師会誌, 43, 4, 2003

10) 荒川宜親: 薬剤耐性菌の出現を支える細菌の遺伝的超能力. フォーラム「薬剤耐性菌に関する研究の現状」  
日本細菌学会関東支部ニュース第 42 号 19-22 2003

11) 佐々木裕子: マイコプラズマのゲノム解析、臨床と微生物: マイコプラズマ感染症の基礎と臨床、30(1):9-13, 2003

12) 佐々木次雄: マイコプラズマ肺炎の細菌学的診断法、日本臨床微生物学雑誌、13: 101-106, 2003.

13) 佐々木次雄、棚元憲一: 製薬用水の製造及び品質管理に関する調査研究、医薬品研究、34: 703-716, 2003.

14) 佐々木次雄: 細菌感染症、日本輸血学会認定医精度審議会カリキュラム委員会編、改訂版日本輸血学会認定医制度指定カリキュラム、p.301-302、2003 年.

15) 佐々木次雄: 日本の医療安全性規制の現状と医療関係マネー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)、日本規格協会 577-582, 2004.

16) 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

17) 高氏留美子、伊保澄子、山本三郎: CpG DNA による plasmacytoid 樹状細胞の活性化. 臨床免疫 41(1):107 - 112, 2004.

18) 落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、山本明彦、豊泉裕美、堀内善信、「局方エンドトキシン標準品力価共同検定における測定値の変動因に関する研究」研究報告、医薬品研究、34(4)、230-233、2003

## II. 学会発表

### 1. 国際学会

1) Maja Rupnik, Geric Barbara, Stuart Johnson, Hanna Pituch, Haru Kato: Comparison of variant *Clostridium difficile* strains found in different hospitals. 13th European Congress of



## 細菌第二部

Clinical Microbiology and Infectious Diseases April, 2003

2) Naohiro Shibata, Y. Doi, K. Yamane, J. Wachino, K. Yokoyama, K. Shibayama, T. Yagi, Y. Arakawa: Genotyping of Metallo- $\beta$ -Lactamases Produced by *Chryseobacterium* and *Myeroides Species* in Japan. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

3) Y. Doi, H. Kurokawa, K. Yamane, K. Shibayama, Naohiro Shibata, K. Yokoyama, T. Yagi, Y. Arakawa: Molecular and Biochemical Characterization of Inhibitor-Sensitive and Extended-Spectrum AmpC  $\beta$ -lactamase from an *Echerichia coli* Clinical Isolate. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

4) T. Yagi, Y. Doi, Naohiro Shibata, H. Kato, K. Shibayama, K. Yamane, K. Yokoyama, T. Kawabata, H. Baba, M. Nagasawa, Y. Inuma, Y. Arakawa: Survey of Antimicrobial Resistance Among Glucose-Nonfermenters Including acinetobacter spp., *Burkholderia cepacia*, and *Pseudomonas aeruginosa*. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

5) K. Yamane, Y. Doi, K. Yokoyama, T. Yagi, Naohiro Shibata, K. Shibayama, H. Haru, Y. Arakawa: Genetic Environment of 16S genetic Environment of 16S Ribosomal RNA Methylase (magrA) gene of *Pseudomonas aeruginosa* Conferring resistance to Aminoglycosides. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

6) K. Shibayama, K. Kamachi, N. Nagata, T. Yagi, Y. Doi, Naohiro Shibata, K. Yamane, H. Kato, Y. Inuma, Y. Arakawa: A Novel Apoptosis-Inducing Protein from *Helicobacter Pylori*. American Society for Microbiology 101th General Meeting, May 20, 2003, Washinton D.C., USA

7) K. Shibayama, K. Kamachi, T. Yagi, K. Yamane, Y. Doi, N. Shibata, H. Kato, Y. Arakawa: A Novel Apoptosis-Inducing Protein from *Helicobacter pylori*. XVIth International Workshop, European Helicobacter Study Group, 2003, September 3-6, Stockholm, Sweden

8) Sasaki T. and Tanamoto K., Rapid identification of micro-organisms based on molecular biological method.

Microbiological Control Methods in the European Pharmacopoeia: Present and Future. Copenhagen, Denmark, 5-6 May 2003.

9) Yamamoto, S., Haga, S., Yamazaki, T., Yamazaki T., Yamamoto, T., Taneichi, M., Kamachi, K., Toida, I., Hashimoto, T., Yamada, T., Ohara, N. and Honda, M.: Protective ability of anti-HIV recombinant BCG on guinea pig pulmonary tuberculosis, and safety and stability. US-Japan Cooperative Medical Science Program Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, N.J. July, 2003.

10) Takauji, R., Iho, S., Takatsuka, H., Yamamoto, S., Takahashi, T., Kitagawa, H., Iwasaki, H., Iida, R., Yokochi, T. and Matsuki, T.: CpG-DNA Induced IFN- $\alpha$  Production Involves p38 MAPK-Dependent STAT1 Phosphorylation in Human Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. US-Japan Cooperative Medical Science Program Thirty-Eighth Tuberculosis and Leprosy Research Conference, Newark, N.J. July, 2003.

1 1) Tokunaga, T., Yamamoto, S. and Yamamoto, T.: Historical Review of CpG DNA. Nobel Forum 2003, Karolinska, Sweden, August, 2003.

1 2) 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, 2003, Tokyo.

1 3) Masaaki Iwaki, Tomomi Saegusa, Yumeno Inomata, Takako Komiya and Motohide Takahashi. Proline-rich repeat structure found in novel antigen of *Corynebacterium diphtheriae*, based on pentanucleotide repeat structure in its gene. 11th European Meeting on Bacterial Protein Toxins, June 2003, Prague (Czech Republic).

## 2. 国内学会

1) 加藤はる、加藤直樹、荒川宜親、小松方、相原雅典、佐藤洋子。Toxin A 陽性および toxin A 陰性 *Clostridium difficile* の

## 細菌第二部

- 分離と院内感染。第77回日本感染症学会総会 2003年4月
- 2) 加藤はる *Clostridium difficile* 関連下痢症 - 分子疫学と細菌検査。第16回臨床微生物迅速診断研究会教育講演 2003年6月
- 3) 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、荒川宜親: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β-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
- 4) 中野学、平井克典、柴田尚宏、荒川宜親:CTX-M-9型BL産生 *K. pneumoniae* とIMP-1型MBL産生 *Pseudomonas putida* を同時に分離し得た敗血症の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
- 5) 藤田良浩、結城千恵美、小林圭二、柴田尚宏、荒川宜親:CTX-M-3型β-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
- 6) 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、荒川宜親:院内感染対策上の対応が問題となったメタロβ-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
- 7) 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、荒川宜親:臨床分離 *Escherichia coli* と *Serratia marcescens* β-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
- 8) 松田真澄、柴田尚宏、荒川宜親:IMP-1型 metallo-β-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
- 9) 杉本直樹、遠藤三佳、柴田尚宏、荒川宜親:菌血症改善後の尿分離例を含む SHV-型 ESBLs 産生 *Serratia marcescens* 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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

## 細菌第二部

- 22) 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- $\beta$ -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
- 23) 柴田尚宏、和知野純一、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、荒川宜親: *Pseudomonas putida* におけるクラス3型インテグロンに担われるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年
- 24) 土井洋平、黒川博史、山根一和、柴山恵吾、柴田尚宏、横山佳子、加藤はる、八木哲也、荒川宜親: 大腸菌臨床分離株より同定された阻害剤感受性・基質拡張型 AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼの解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年
- 25) 和知野純一、柴田尚宏、土井洋平、山根一和、八木哲也、横山佳子、柴山恵吾、黒川博史、伊藤秀郎、荒川宜親: IMP-1型メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子を担うクラス3型インテグロン構造の解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年
- 26) 柴山恵吾、蒲池一成、八木哲也、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76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年
- 27) 八木哲也、柴山恵吾、加藤はる、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、横山佳子、荒川宜親: 緑膿菌の産生する抗抗酸菌物質の精製と解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年
- 28) 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、荒川宜親: アルベカシン高度耐性緑膿菌が保持する magrA 遺伝子の周辺構造の解析。第76回日本細菌学会総会、熊本、4月2日、2003年
- 29) 柴田尚宏、土井洋平、山根一和、和知野純一、八木哲也、荒川宜親: CTX-M-タイプ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌におけるインテグラーゼ遺伝子保有状況の調査。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、2003年
- 30) 荒川宜親、飯沼由嗣、長沢光章、加藤はる、八木哲也、柴田尚宏、土井洋平、山根一和: 我が国における多剤耐性のグラム陰性桿菌の分離状況と特徴について。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、2003年
- 31) 戸島洋一、服部万里子、和知野純一、柴田尚宏、荒川宜親: 国内で初めて検出された DHA-1 型クラス C $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Klebsiella oxytoca* の臨床的検討。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、2003年
- 32) 中野学、井端英憲、柴田尚宏、荒川宜親: 当院で分離したメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生株7症例の臨床的検討。第77回日本感染症学会総会、福岡、4月18日、2003年
- 33) 飯田眞佐栄、柴田尚宏、荒川宜親: 当研究所におけるメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の検出状況。第52回日本医学検査学会総会、埼玉、5月16日、2003年
- 34) 山森章、柴田尚宏、荒川宜親: 当院で検出された CTX-M-2 と IMP-1 型メタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌について。第52回日本医学検査学会総会、埼玉、5月16日、2003年
- 35) 斉藤優子、長野則之、長野由起子、岡本了一、柴田尚宏、荒川宜親: CTX-M-2 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Proteus mirabilis* による院内感染事例。第51回日本化学療法学会総会、横浜、5月30日、2003年
- 36) 長野則之、長野由起子、岡本了一、柴田尚宏、荒川宜親: CTX-M-2 型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生および AmpC $\beta$ -ラクタマーゼ同時産生性 *Acinetobacter baumannii* の解析。第51回日本化学療法学会総会、横浜、5月30日、2003年
- 37) 吉田耕一郎、二木芳人、宮下修行、小橋吉博、河口豊、荒川宜親、柴田尚宏、松島敏春: 当院で分離されたメタロ  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の臨床的検討。第51回日本化学療法学会総会、横浜、5月30日、2003年
- 38) 柴田尚宏、土井洋平、山根一和、八木哲也、黒川博史、柴山恵吾、加藤はる、甲斐久美子、荒川宜親: 我が国におけるメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼとインテグロンの遺伝子型別。第32回薬剤耐性菌シンポジウム、東京、8月25日、2003年
- 39) 横山桂子、土井洋平、山根一和、黒川博史、柴田尚宏、柴山恵吾、八木哲也、荒川宜親: 16S rRNA メチラーゼ遺伝子の獲得によりアミノ配糖体に高度かつ多剤耐性を獲得した緑膿菌の出現と拡散。第32回薬剤耐性菌シンポジウム、東京、8月25日、2003年
- 40) 本間操、大貫雅子、江原和人、森川征彦、柴田尚宏、荒川宜親:  $\beta$ -ラクタマーゼを産生するグラム陰性桿菌検出法に

## 細菌第二部

- についての検討。第23回小児臨床学会、大阪、9月23日、2003年
- 41) 柏倉千賀志、和田綾子、武田祐子、古川好美、齋藤公男、柴田尚宏、荒川宜親: 当院で分離された ESBL 産生 *Serratia marcescens*。第44回東北医学検査学会、弘前、10月17日、2003年
- 42) 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、横山桂子、加藤はる、荒川宜親: 臨床分離株から新たに検出された IMP-2型メタロβ-ラクタマーゼ産生グラム陰性桿菌の検討。第52回日本感染症学会東日本支部総会合同学会、東京、10月31日、2003年
- 43) 小寺聡、柴田尚宏、荒川宜親: *Erysipelothrix rhusiopathiae* による感染性心内膜炎の一例。第52回日本感染症学会東日本支部総会合同学会、東京、10月31日、2003年
- 44) 山根一和、横山桂子、土井洋平、柴田尚宏、八木哲也、荒川宜親: グラム陰性桿菌に高度アミノグリコシド耐性を付与する 16S rRNA methylase の保有状況について。第52回日本感染症学会東日本支部総会合同学会、東京、10月31日、2003年
- 45) 柴田尚宏、土井洋平、和知野純一、山根一和、荒川宜親: グラム陰性桿菌における CTX-M-型β-ラクタマーゼの型別とインテグラーゼ遺伝子保有状況の調査。第1回薬剤耐性菌研究会、群馬、11月14日、2003年
- 46) 柴田尚宏、土井洋平、和知野純一、山根一和、荒川宜親: CTX-M-型β-ラクタマーゼ遺伝子とIMP-1型メタロβ-ラクタマーゼ遺伝子を同時に保有するグラム陰性桿菌の検出。第1回薬剤耐性菌研究会、群馬、11月14日、2003年
- 47) 宮本則央、辻恵美、河辺逸朗、河辺洋一郎、吉田昌弘、柴田尚宏、荒川宜親: 当院における ESBLs 産生菌の検出状況とその臨床的背景。第52回日本農村医学学会学術総会、広島、10月9日、2003年
- 48) 朝妻義徳、柳田良子、星周一郎、松永克美、八木恵子、柴田尚宏、荒川宜親: *Streptococcus suis* type2(ブタ連鎖球菌)による細菌性髄膜炎の2症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 49) 小宮山謙一、田村英行、多田圭子、柴田尚宏、荒川宜親: 当院で検出された CTX-M-1 typeβ-lactamase 産生 *Escherichia coli* の4症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 50) 石川良子、塩練秀一、中澤陽子、柴田尚宏、荒川宜親: 血液から検出された CTX-M-9 型β-ラクタマーゼ産生 *Escherichia coli* の3症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 51) 市原美華、島貫美代子、柴田尚宏、荒川宜親: IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae*/*Citrobacter freundii* の分離例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 52) 藤森和美、塩練秀一、中澤陽子、柴田尚宏、荒川宜親: 血液から検出されたメタロβ-ラクタマーゼ産生 *Enterobacter cloacae* の3症例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 53) 山田友紀、昆浩、黒田牧子、山端久美子、伊東みち子、野々宮百合子、小畑律子、辻村正雪、小笠原理恵、諏訪部章、柴田尚宏、荒川宜親: 岩手医科大学附属病院におけるメタロβ-ラクタマーゼ産生菌の検出状況とその臨床背景。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 54) 土屋憲、橋本千紗子、米沢佳寿子、柴田尚宏、荒川宜親: メタロβ-ラクタマーゼ産生 *Acinetobacter baumannii* の臨床的検討。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 55) 小濱邦彦、片岡美由紀、柴田尚宏、荒川宜親: 微量液体希釈法を用いて検出したメタロβ-ラクタマーゼ産生菌について。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 56) 神田成夫、大石和伸、柴田尚宏、荒川宜親: 尿より検出された VIM-2 型メタロβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌の一例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 57) 黒川博史、和知野純一、八木哲也、山根一和、柴田尚宏、荒川宜親: CTX-M-型β-ラクタマーゼに類似した新しいβ-ラクタマーゼの発見。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 58) 服部万里子、柴田尚宏、荒川宜親: 下痢症より検出された IMP-1 型メタロβ-ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* の検討。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 59) 木下まり、柴田尚宏、荒川宜親: 当院における薬剤耐性グラム陰性桿菌の分離状況と検出時の対応について。第15回

## 細菌第二部

- 日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 60) 和知野純一、土井洋平、山根一和、柴田尚宏、黒川博史、八木哲也、窪田隆子、荒川宜親:GES型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* の解析。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 61) 畑中公基、柴田尚宏、荒川宜親:当院で分離されたESBLおよびCTX-M-型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の検出状況と臨床的解析。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 62) 飯田寿江、吹貝姿子、西倉紀子、柴田尚宏、荒川宜親:CTX-M-2型 $\beta$ -ラクタマーゼ産生 *Proteus mirabilis* について。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 63) 小林治、浅香敏之、千田靖子、三宅澄子、柴田尚宏、荒川宜親:石川県下におけるESBL/CTX-M-タイプ $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌の分離状況。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 64) 本間操、大貫雅子、柴田尚宏、荒川宜親:白血病患者より検出された *Chryseobacterium meningosepticum* の一例。第15回日本臨床微生物学会総会、つくば、1月24日、2004年
- 65) 柴山恵吾、蒲地一成、八木哲也、土井洋平、柴田尚宏、山根一和、加藤はる、荒川宜親:*Helicobacter pylori* のアポトーシス誘導蛋白の精製、同定。第9回日本ヘリコバクター学会総会、2003年6月
- 66) 柴田尚宏:グラム陰性桿菌の耐性の動向と検出法。平成15年度臨床微生物特別卒後教育セミナー、東京、7月25日、2003年
- 67) 柴田尚宏:グラム陰性桿菌を中心とした耐性菌について。第10回中部微生物検査研究班研修会、三重、11月1日、2003年
- 68) 佐々木裕子、堀野敦子、見理 剛、佐々木次雄:*Mycoplasma penetrans* ゲノムにおける未知病原遺伝子の探索、第76回日本細菌学会、2003年4月1-3日、熊本。
- 69) 佐々木裕子:マイコプラズマ科における *Mycoplasma penetrans* ゲノムの特徴、日本進化学会第5回大会、2003年8月2日-4日、福岡
- 70) 見理 剛、瀬戸真太郎、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、荒川宜親、宮田真人:YFP 蛍光タンパク質を用いた *M. pneumoniae* の接着器官の視覚化
- 第76回日本細菌学会 2003年4月、熊本。
- 71) 見理 剛、堀野敦子、佐々木裕子、佐々木次雄、蛍光タンパク質を用いた *M. pneumoniae* の細胞構造の観察、第30回日本マイコプラズマ学術集会、2003年10月、東京
- 72) 佐々木次雄:無菌医薬品の無菌製造法ガイドラインの現状と運用について、第19回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、2004.03.05、東京。
- 73) 佐々木次雄:日本薬局方15局へ向けての新しい考え方、日本PDA主催「製薬用水の調和動向に関する国際シンポジウム、2003.11.17、大阪。
- 74) 川端敏之、新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親:*Haemophilus influenzae* type b 荚膜多糖体の精製と利用、第76回日本細菌学会総会、2003年4月、熊本。
- 75) 新谷三春、佐々木次雄、荒川宜親:呼吸器由来 *Haemophilus influenzae* の型別及び薬剤感受性について、平成15年度日米医学協力研究会第8回急性呼吸器感染症部会日本側合同会議、2004年1月、東京。
- 76) 山本三郎、瀧井猛将、小野崎菊夫、高橋光良:BCG ワクチンの多様性について。第73回実験結核研究会、2003年4月 倉敷市。
- 77) Yamazaki, T., Hamanaka, M., Yamamoto, S., Honda, M. and Haga, S.: IFN- $\gamma$  ELISPOT assay analysis of the lymphocytes in guinea pigs vaccinated with BCG Tokyo. 第73回実験結核研究会、2003年4月 倉敷市。
- 78) 山崎剛、山本三郎、芳賀伸治:ELISA 及び ELISPOT によるモルモット・インターフェロンガンマ検出法の確立。第78回日本結核病学会総会、2003年4月、倉敷市。
- 79) 山本十糸子、山本三郎:モルモット肺結核モデルにおけるTNF- $\alpha$ 産生の調節。第78回日本結核病学会総会、2003年4月、倉敷市。
- 80) 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、栃久保邦夫、後藤紀久:BCG との同時経鼻投与でみた組換えコレラ毒素 B サブユニットの細胞性免疫増強効果。第76回日本細菌学会総会、2003年4月、熊本市。
- 81) 高氏留美子、伊保澄子、高塚尚和、北川治和、山本三郎、松木孝澄:CpG DNA によるヒト Plasmacytoid 樹状細胞のMIP-1 $\alpha$  及びIP-10誘導機構。第68回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003年7月、東京都。
- 82) 前山順一、山本三郎、井坂雅徳、安田陽子、谷口暢、諸

## 細菌第二部

- 熊一則、大隈邦夫、栃久保邦夫、後藤紀久:細胞性免疫増強効果からみた鼻粘膜アジュバントとしての組換えコレラ毒素 B サブユニット. 第 7 回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋市.
- 83) 山本三郎、山本十糸子、前山順一、後藤紀久、David N. McMurray: BCG 経鼻免疫モデルモットの抗結核作用と CpG DNA の免疫増強効果. 第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.
- 84) 山本十糸子、David N. McMurray、山本三郎: BCG 免疫モデルモット細胞の TNF- $\alpha$  産生と結核感染の影響. 第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.
- 85) 前山順一、井坂雅徳、安田陽子、栃久保邦夫、山本三郎、後藤紀久: B. brevis で産生させた組換えコレラ毒素 B サブユニットの粘膜アジュバント効果. 第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.
- 86) 高氏留美子、伊保澄子、高塚尚和、北川治和、山本三郎、松木孝澄: CpG DNA によるヒト Plasmacytoid 樹状細胞の MIP-1 $\alpha$  および IP-10 誘導機構. 第 33 回日本免疫学会学術集会、2003 年 12 月、福岡市.
- 87) 山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、堀内善信、抗生物質のエンドトキシン活性増強、第 76 回日本細菌学会学術集会、熊本、2003 年 4 月
- 88) 山本明彦、落合雅樹、蒲地一成、片岡紀代、豊泉裕美、荒川宜親、倉田 毅、堀内善信: 海外 DPT ワクチンの安全性の検討、第 7 回日本ワクチン学会学術総会、名古屋、2003 年 10 月
- 89) 山本明彦、落合雅樹、堀内善信: 抗生物質によるエンドトキシン活性増強作用、第 7 回エンドトキシン研究会、盛岡、2003 年 11 月
- 90) 落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信、沈降精製 DPT ワクチン(DPT ワクチン)中のエンドトキシン量の評価について、第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本
- 91) 落合雅樹、片岡紀代、山本明彦、蒲地一成、豊泉裕美、堀内善信、海外製の DTaP ワクチンおよび Hib ワクチン中エンドトキシン量の評価、第 7 回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋
- 92) 蒲地一成、永田典代、近田俊文、荒川宜親: 百日咳死亡事例から分離された百日咳菌の細菌学的解析、第 86 回日本細菌学会関東支部合同学術集会、2003 年 10 月、横浜
- 93) 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、2003 年 4 月、熊本
- 94) 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、4 月、熊本
- 95) 小宮貴子、岩城正昭、福田靖、堀川和美、村上光一、帆足喜久雄、緒方喜久代、八柳潤斎藤志保子、内村眞佐子、小岩井健司、荒川宜親、高橋元秀: ウシ、ネコ、イヌを対象とした *Corynebacterium ulcerans* の予備的疫学調査: 第 76 回日本細菌学会総会、平成 15 年 4 月、熊本。
- 96) 角田篤信、畑中章生、中村朗、大江健二、小宮貴子、高橋元秀: *Corynebacterium ulcerans* によるジフテリア様症状を呈した 2 例: 第 77 回日本感染症学会総会、平成 15 年 4 月、福岡。
- 97) 岩城正昭、小宮貴子、高橋元秀. ジフテリア症原因菌 *C. diphtheriae* と *C. ulcerans* の共通抗原について。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本。
- 98) 高橋元秀、小宮貴子、岩城正昭、福田靖、荒川宜親. 国内で発生した 2 例のジフテリア症から分離された *Corynebacterium ulcerans* の細菌学的性状について。第 76 回日本細菌学会総会、2003 年 4 月、熊本。
- 99) 岩城正昭、福田靖、小宮貴子、高橋元秀. 標準抗破傷風人免疫グロブリンの標準化試験。第 7 回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋。
- 100) 岩城正昭、福田靖、小宮貴子、高橋元秀. 標準抗破傷風人免疫グロブリンの標準化試験。第 7 回日本ワクチン学会学術集会、2003 年 10 月、名古屋。
- 101) 小宮貴子、岩城正昭、福田靖、荒川宜親、高橋元秀、国内で発生した *Corynebacterium ulcerans* によるジフテリア症。平成 15 年度日米医学協力研究会 第 8 回急性呼吸器感染症部会、2004 年 1 月、東京。

## III その他の研究発表

1. 平成 15 年 12 月 12 日、東京農工大学におけるバイオ人材育成事業のバイオハザード評価概論で「バイオトキシンハザード」について講義した。[ 高橋元秀 ]

細菌第二部

1. 無菌試験の実績

(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	60	60	0	0	0
5	54	54	0	0	0
6	65	65	0	0	0
7	87	87	0	0	0
8	76	76	0	0	0
9	124	124	0	0	0
10	98	98	0	0	0
11	60	60	0	0	0
12	89	89	0	0	0
1	63	63	0	0	0
2	55	55	0	0	0
3	69	69	0	0	0
計	900	900	0	0	0

(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	0	0	0	0	0
6	1	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	1	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	1	1	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

(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
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	8	8	0	0	0
3	8	8	0	0	0
計	16	16	0	0	0