

課題番号1

改良型培地で分離される 百日咳菌の解析

微生物部

○ 吉野修司 水流奈己※ 宮原聖奈

※:現感染症対策室

研究経緯

2010年:百日咳の集団発生事例で*Bordetella holmesii*の存在を確認 (Emerg Infect Dis. 2012 Jul;18(7):1166-9)

2012年:国立感染症研究所と共同で*B. holmesii*の遺伝子検出系を開発 (Microbiol Immunol. 2012 Jul;56(7):486-9)

2015年:国立感染症研究所と共同でヒトに病原性を示す
*Bordetella*属菌全般の遺伝子検出系を開発
(New Microbes New Infect. 2015 Oct22;8:70-4)



遺伝子検出法は進展したが、菌の分離技術は脆弱

百日咳分離培地の改良

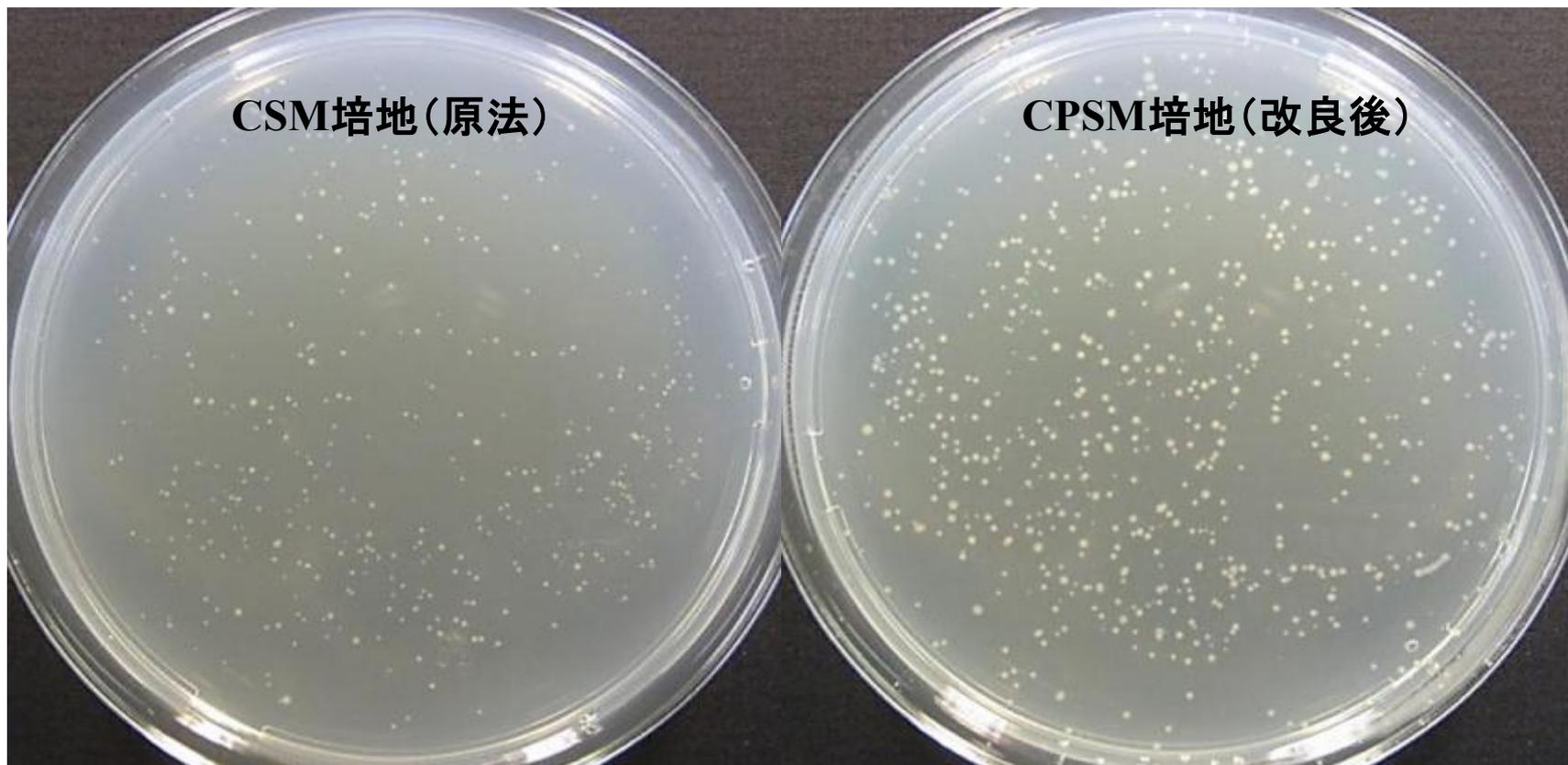
培地	特徴
BG培地 (Bordet-Gengou)	15%の割合で羊血液を添加 保存が難しい 選択剤として通常40ug/mLのセファレキシンを添加
CA培地 (Chacoal Agar)	10%の割合で馬血液を添加 保存が難しい 選択剤として通常40ug/mLのセファレキシンを添加
CSM培地※ (Cyclodextrin Solid Medium)	血液を加えない半合成培地のため長期保存が可能 組成が複雑 選択剤として通常5ug/mLのセファレキシンを添加
CFDN培地※ (Cefdinir)	血液を加えない半合成培地のため長期保存が可能 市販の生培地(500円/枚と高価) 選択剤としてバンコマイシンとセフジニルを添加

※パラ百日咳菌は培地が褐色となり視認が容易



CSM培地に最終濃度 **5mMのピルビン酸Na**を加えることで分離率が向上

CSM培地の改良(前→後)



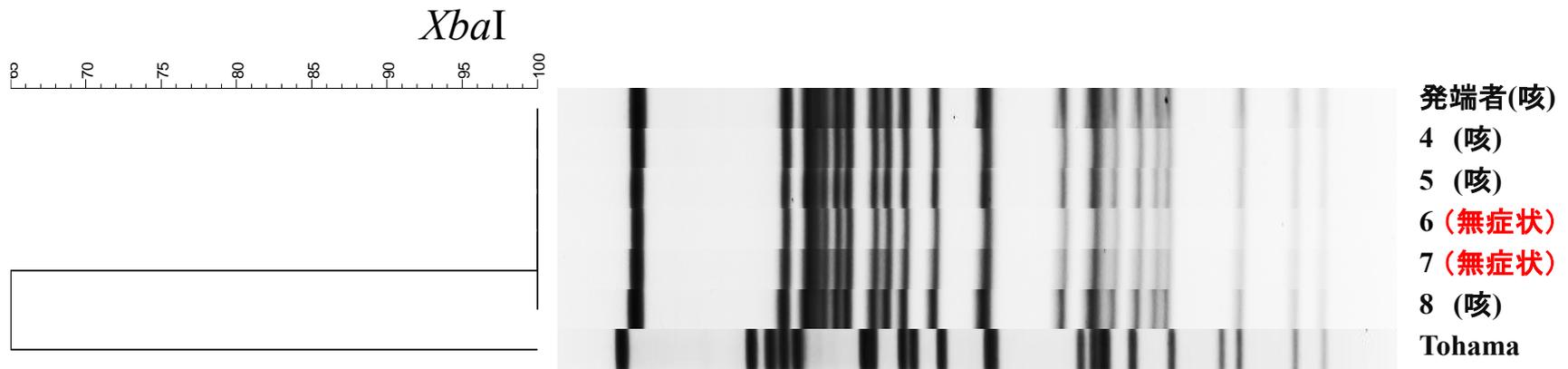
原法に比べコロニー数が多く、より大きく明瞭になる(培養4日目)



検証のためMLVAのタイプが異なるMT26、MT27、MT29、東浜株を用い原法と改良型を比較しても良好な結果が得られた

無症候性保菌者からの百日咳菌の分離

家族内発生事例において無症状者からも菌が分離された



PFGEの結果から分離された菌は同一由来
同一由来の菌でも症状には差が認められた



百日咳は無症候性保菌者も存在し、発症の有無は宿主側に要因がある

成人(高齢者)からの百日咳菌の分離

乳児重症例の家族内調査において高齢者から菌が分離された



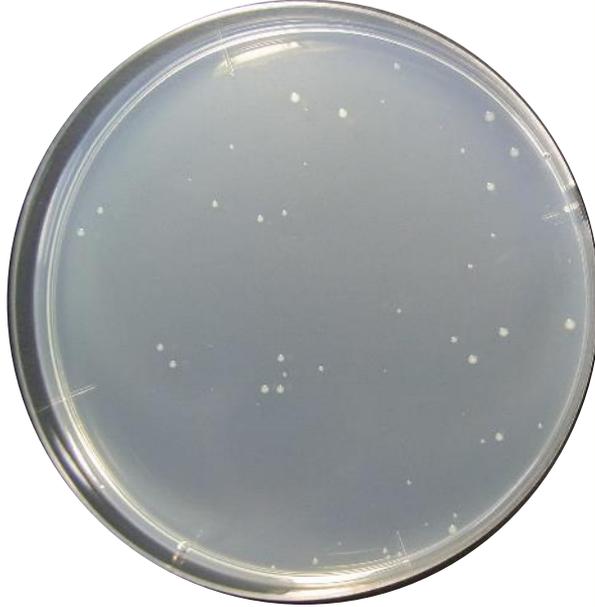
遺伝子検出だけでなく菌が分離されたことから
乳児に対して高齢者も感染源になり得る



これまでに成人14名から百日咳菌を分離

培地の検討中に見られた不可解な現象

CPSM培地



BG培地



CA培地



培地の検討中、BG培地、CA培地で発育の悪い百日咳菌がみられた



国立感染症研究所でWB法による病原因子の発現解析



PT, FHA, PRNが発現していないことを確認

病原因子非発現株の解析



国立感染症研究所におけるBG培地での再現写真

国立感染症研究所・北里大学において病原因子制御系遺伝子 (*bvgS*) の解析

bvgS (病原因子の制御系遺伝子)

955
コントロール TTCGCGCCCTTCACC シトシン
非発現株 TTCGCGACCTTCACC アデニン

BvgS

319
コントロール FAPFT プロリン
非発現株 FATFT スレオニン

アミノ酸変異を伴う一塩基置換が原因

まとめ

- 百日咳は無症候性保菌者も存在する
- 百日咳菌は成人からも分離される
- 百日咳は高齢者も乳児等に対して感染源になる
- 病原因子（PT, FHA, PRN）が発現していない百日咳菌はBvg⁻相と推定され改良型培地では分離される
- 病原因子非発現株は海外で汎用されている培地では分離されにくい可能性が高い