

百日咳感染症疑い検体の NGS 解析

微生物部 ○津路 優菜、成田 翼、新田 真依子、副田 菜々美
引地 恵一、福留 智子、矢野 浩司
宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター 岡林 環樹

1 はじめに

近年、全国で流行している百日咳感染症は、軽い風邪症状から始まり、激しい咳が長期にわたって持続する気道感染症である。感染力は極めて強く、新生児や乳幼児では重症化することがある。宮崎県においても、患者数の増加が認められている¹⁾(図 1)。

当所には、行政検査として、発熱や咳などの症状により百日咳感染症が疑われる検体が医療機関から依頼され、4PlexReal-timePCR 法や LAMP 法により検査を行っているが、百日咳菌遺伝子が検出されず原因不明となる症例が多く存在する。

本研究では、百日咳感染症疑いで検査陰性となった検体について細菌性病原体を推定することを目的に菌種特有の配列が保存されている 16S rRNA 遺伝子配列をターゲットとしたメタゲノム解析を行った。

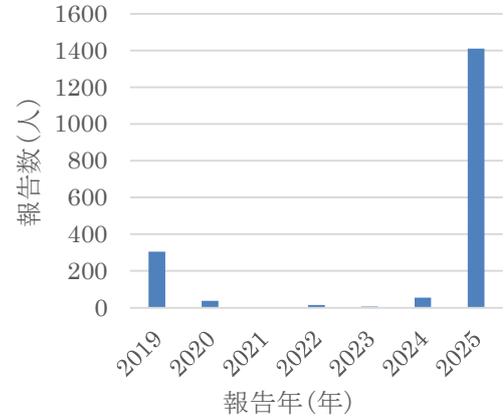


図 1：宮崎県における百日咳感染症発生数

2 対象

2019 年度～2024 年度において、県内の医療機関から当研究所に依頼された百日咳感染症疑いの鼻腔拭い液や咽頭ぬぐい液の検体のうち、検査陰性となった 95 検体を対象とした。

3 方法

QIAGEN 社の DNeasy Blood&Tissue Kit を用いて DNA を抽出後、Nanopore 社の 16S Barcoding Kit によりライブラリを調整し、GridION にてメタゲノムシーケンスを行った。データ解析には、まず Nanopore 社が提供している EPI2ME の wf-metagenomics を使用し、minimap2 モードでメタゲノム解析を行い、検体中に存在する可能性のある菌種を推定した。その後、web ベースプラットフォームの Galaxy にて Porechop を用いてアダプター処理を行い、さらに相同性検索に Blast を用いて推定された細菌の確認を行った。

4 結果

16S rRNA 遺伝子配列をターゲットとしたメタゲノム解析の結果、EPI2ME の解析により、常在菌を含む計 134 種類の細菌が確認された。これらについて Blast による相同性検索を行ったところ、95 検体中 49 検体(約 52%)から *Streptococcus pneumoniae*(*S.pneumoniae*)、*Haemophilus influenzae*(*H.influenzae*)、*Moraxella catarrhalis*(*M. catarrhalis*)が高頻度で検出された。このうち、95 検体中 10 検体(約 11%)で複数菌種による混合感染が認められた(図 2)。一方で、46 検体(約 48%)では、病原性が示唆される細菌が推定されなかった。なお、混合感染が認められた全ての検体が 5 歳未満の幼児であった。また、ネガティブコントロールからは細菌の検出は認められなかった。

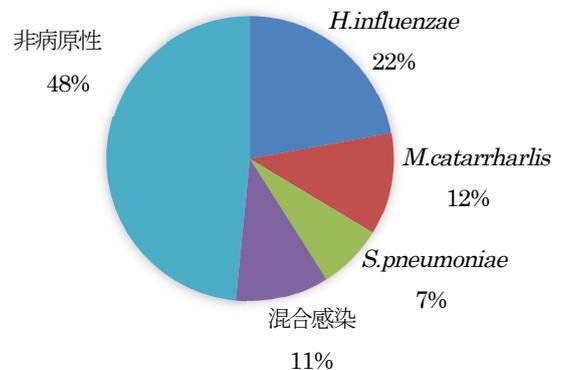


図 2：検査陰性検体における検出細菌の割合

臨床症状としては、発熱や咳を主体とした上気道炎および下気道炎が多く見られた。なお、Blast 解析では、16S rRNA 配列の一致率が 98.7%以上²⁾、かつ配列の長さが約 1500bp のものを同一菌種とした。また、EPI2ME では *Shigella* spp. が検出されたものの、Blast による相同性検索では検出されず、*Escherichia coli* (*E.coli*) が検出された検体が認められた。

なお、全ての検体から百日咳感染症の原因菌である *Bordetella pertussis* (*B.pertussis*) は検出されなかった。

5 考察

本研究において、全ての検体から *B.pertussis* が検出されなかったことから、*B.pertussis* 以外の病原体によって引き起こされていると考えられた。

本研究の対象の多くは小児であった(図 3)。高頻度に検出された *S.pneumoniae*, *H.influenzae*, *M. catarrhalis* はいずれも小児を中心とした細菌性呼吸器感染症の原因菌として知られており³⁾、百日咳感染症と類似した臨床症状を呈することがある。これらの菌種によって引き起こされる感染症は、百日咳感染症との鑑別が困難な可能性が示唆された。なお、解析時に用いたネガティブコントロールからは細菌は検出されず、本研究結果の信頼性は高いと考えられた。

一方、病原性が示唆される細菌が推定されなかった症例については、ウイルス感染症や未知の病原体、および細菌量が検出限界以下であった可能性が考えられた。

また、*Shigella* spp. と *E.coli* は 16S rRNA 配列の相同性が極めて高く、16S rRNA 遺伝子配列解析のみでは両者の鑑別が困難であることが知られている⁴⁾。このことから、EPI2ME に加えて Blast による相同性検索を併用する必要があることが示唆された。

また、本研究では複数の細菌による混合感染を認められた。PCR 検査等では 1 菌種しか検出できないのに対し、メタゲノム解析では検体の網羅的な解析を行うことで混合感染の有無を確認することができるという利点がある。本研究において、混合感染が認められた症例はいずれも 5 歳未満の幼児であったことから、特に小児においては、百日咳様症状を呈する疾患が多く、網羅的に細菌を推定できるメタゲノム解析が診断精度の向上に貢献する可能性が示唆された。

今後は、当所に保管されている未実施検体の解析を行うとともに、本研究で検出された病原性菌の同定を行い、メタゲノム解析の結果を検証する必要がある。加えて、ロングリードシーケンスとショートリードシーケンスによる比較も行うことで、メタゲノム解析におけるロングリードの有用性を確かめる。

昨年より全国で百日咳感染症が流行する中で、症状が類似した呼吸器疾患に関する知見を蓄積するとともに、研究発表会等を通じて関係機関と情報共有を行うことで、将来的には百日咳感染症疑い症例における鑑別診断の一助となることが期待される。

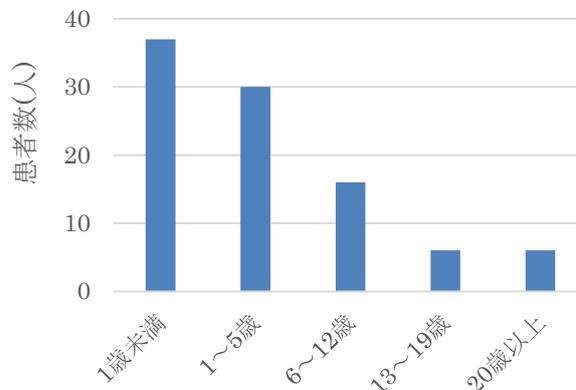


図 3：本研究で使用した検体の患者年齢分布

参考文献

- 1)宮崎県衛生環境研究所. 宮崎県感染症情報センター 感染症発生動向調査.
<https://www.pref.miyazaki.lg.jp/contents/org/fukushi/eikanken/center/>(2025年12月26日アクセス可能)
- 2)Kim M, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2014;64(2):346-351.
- 3)坂田 宏.小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2017に基づいた小児期市中肺炎の治療. *日本化学療法学会雑誌* 2018;66 (3): 366-372.
- 4)国立健康危機管理研究機構. 赤痢菌検査・診断マニュアル.
<https://id-info.jihs.go.jp/relevant/manual/010/shigella.pdf> (2025年12月26日アクセス可能)