

<誌上発表>

○Cyclodextrin Pyruvate Solid Medium (CPSM 培地) を用いた百日咳菌の分離

・吉野修司, 水流奈己, 荒井路子, 元明秀成
病原微生物検出情報 Vol.33 No12. 2017

【はじめに】保存性に優れた CSM 培地を迅速に準備できるよう作製法を変更し, さらに最終濃度 5mM のピルビン酸ナトリウムを添加した CPSM 培地として改良することで, 原法に比べ百日咳菌を良好に分離できることが確認されているので報告する.

【CPSM 培地作製法】基礎培地: 各試薬の保存液を作製し, メジューム瓶等に入れ 121°C15 分滅菌する. 滅菌後は冷蔵保存しておく.

サプリメント: 各試薬の溶液を混合後, DW で全量を 100mL とし, 0.22 μm のフィルターでろ過滅菌する. ろ過滅菌後は 5mL ずつ分注し, -20°C以下で凍結保存しておく. 培地が必要になった際は冷蔵保存しておいた基礎培地の各保存液を規定量混合し, 寒天を加えて 121°C15 分高圧滅菌する. 滅菌後は 52°Cに冷却後, 凍結保存しておいたサプリメントを加え平板とする.

【培養法および CPSM 培地上でのコロニー鑑別】百日咳菌は培養後 4~5 日目から微細なコロニーとして観察されるが, 7~10 日後に出現することもあるため, 乾燥しないよう空き缶などに入れ長期培養する. なお, CEX 添加培地では百日咳菌が分離されにくい傾向があり, CEX 非添加培地を優先的に用いた方がよい. 百日咳菌は教科書的に培養 4~5 日目に形成される真珠様の光沢のあるコロニーと表現されるが, 夾雑菌との鑑別が難しい場合は実体顕微鏡を利用した方がよい. 疑わしいコロニーはグラム染色を行い, グラム陰性短桿菌であれば検査マニュアル等に準じ同定を行う. また, 分離株の多くは粘稠性が高く, 釣菌時にコロニーがソフトクリーム状になることも参考になる. なお, パラ百日咳菌が分離された場合は培地が褐色を呈するので鑑別は容易である.

【おわりに】百日咳菌の分離はワクチン未接種の乳児では比較的容易であるが, 検査対象がワクチン既接種の学童・青年・成人層では難しい. しかし, 培地改良後の 2015 年以降, 乳児以外の散发事例や家族調査において LAMP 法陽性者の約 54

%から菌が分離され, 60~70 代の高齢者や無症状者からも菌が分離されていることから, 当所では遺伝子検査で陽性になった検体については積極的に菌の分離を実施することになっている. また, 今回示した方法は保存溶液を作製しておけば, 集団発生などの突発的な事例でも迅速に培地が作製できることから, 地方衛生研究所として菌の分離や PFGE まで含めた行政検査依頼にも対応できるものと思われる.

○The proline residue at position 319 of BvgS is essential for BvgAS activation in *Bordetella pertussis*

・Yukihiro Hiramatsu¹⁾, Shuji Yoshino²⁾, Yoshiko Yamamura³⁾, Nao Otsuka¹⁾, Keigo Shibayama¹⁾, Mineo Watanabe⁴⁾, Kazunari Kamachi¹⁾

¹⁾Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, ²⁾Department of Microbiology, Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment,

³⁾Department of Pediatrics, Miyazaki Prefectural Miyazaki Hospital, ⁴⁾Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University

Pathogens and Disease, 75(1), 2017, ftx011

Bordetella pertussis is the etiological agent of pertussis and produces various virulence factors, including pertussis toxin (PT), filamentous hemagglutinin (FHA) and pertactin (PRN), most of which are positively regulated by the BvgAS two-component sensory transduction system. Here, we describe a *B. pertussis* isolate not expressing PT, FHA and PRN recovered from a pertussis patient. Sequencing revealed that the bvgS gene of this isolate contains a spontaneous mutation (C>A at position 955) causing the proline residue at position 319 of the BvgS protein to be substituted by threonine. Moreover, loss of PT, FHA and PRN expression was completely restored by complementation with a wild-type bvgAS locus, indicating that this non-synonymous substitution in bvgS leads to impaired BvgS function. Our findings indicate that the proline residue at position 319 in this protein plays an essential role in activation of