

<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 Hiramatsu<sup>1)</sup>, Shuji Yoshino<sup>2)</sup>, Yoshiko Yamamura<sup>3)</sup>, Nao Otsuka<sup>1)</sup>, Keigo Shibayama<sup>1)</sup>, Mineo Watanabe<sup>4)</sup>, Kazunari Kamachi<sup>1)</sup>

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

<sup>3)</sup>Department of Pediatrics, Miyazaki Prefectural Miyazaki Hospital, <sup>4)</sup>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

the BvgAS system and, therefore, subsequent expression of Bvg-regulated virulence factors in *B. pertussis*.

<学会及び研究発表会>

○乳児下気道炎入院症例における百日咳の検討  
・三原由佳<sup>1)</sup>, 中谷圭吾<sup>1)</sup>, 吉野修司<sup>2)</sup>, 石井茂樹<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>宮崎県立宮崎病院小児科, <sup>2)</sup>宮崎県衛生環境研究所

「第90回日本感染症学会(平成28年4月15日, 16日 仙台市)」

【目的】冬期乳児下気道感染における百日咳の頻度とその臨床的特徴および百日咳の家族内感染について検討した。

【方法】2014年11月から2015年3月までに下気道炎で入院した1歳未満乳児全例を対象に, 鼻咽頭ぬぐい液を用い百日咳は分離培養・PCR法・LAMP法を実施し, 呼吸器ウイルスは11種類を対象として抗原迅速検査・multiplex RT-PCR法を実施した。百日咳感染例・非感染例それぞれの臨床像を後方視的に比較検討し, 百日咳感染例では同居家族の百日咳検査を行った。本研究は当院倫理委員会の承認・家族の同意を得た。

【結果】基礎疾患例を除外した49例中, 百日咳菌10例, 呼吸器ウイルスは重複例を含む41例(RSV 31), 両者の同時検出8例であった。A群: 百日咳分離陽性4例, B群: 百日咳遺伝子検査のみ陽性6例, C群: 百日咳非感染39例に分けて比較した。A群がB・C群に比べ有意だったのは, スタッカート, 発症より検査までの日数, 重症度, 白血球・リンパ球数だった。一方, B・C群ではいずれも有意差はなかった。また百日咳分離陽性例のうち3例で両親または同胞からの家族内感染を確認した。

【考察】乳児下気道ウイルス感染と百日咳の混合感染を比較的多く認めた。百日咳分離陽性例は百日咳に特徴的な症状を呈したが, 遺伝子検査のみ陽性例は非感染例との相違なく, 気づかれずに周囲への感染源となる可能性が考えられた。成人・青年層が乳児百日咳の感染源となっており感染対策が望まれる。

○下痢原性大腸菌およびノロウイルス感染症の発生動向

・吉野修司

「第51回日臨技九州支部医学検査学会シンポジウム(平成28年10月8日, 9日 佐賀市)」

EHECは菌の分離に特化した培地の使用やイムノクロマト法によるStx(行政用語ではVT)の検出により, 医療機関でも検査は可能であり, 毎年全国で4000件前後の届出がなされている。一方, 他の下痢原性大腸菌はPCR法等による遺伝子検査で病原因子を調べないかぎり非病原性大腸菌との区別が困難で, 下痢症の起原因菌であるかどうかは判断できない。地方衛生研究所では食中毒や集団感染が発生した際, 行政検査として起原因菌および病原因子の特定を行うが, 通常の医療機関等で病原因子の検出まで行える施設は限られており, EHECを除く下痢原性大腸菌の発生動向は掴めていないのが現状である。また, 別菌種である*E.albertii*を下痢原性大腸菌の範疇に含めるのか, 行政的な位置づけをどうするかなどが曖昧で, 下痢原性大腸菌の発生動向を把握するのはより困難な状況になっている。

ノロウイルス(NoV)は遺伝子群(Genogroup: GI~GV)で分類されており, ヒトに感染するNoVが主にGIとGIIであることから, 現在のところGIを9, GIIを22の遺伝子型(genotype: GI.1~9およびGII.1~22)に細分類している。なお, 多くの種類の遺伝子型はその抗原性も多様であることが示唆されており, 簡易キットにおける偽陰性の一因となっている。また, 通常の診療では遺伝子型別は不要であるが, 行政処分が伴う食中毒発生時などでは遺伝子型別まで求められる場合がある。2010年~2013年の各シーズンで報告されたNoVの遺伝子型別はGII.4が最も多いが, シーズン毎に変動する場合があります(IASR Vol.35 No.7), さらに新たにGII.17変異型も報告されていることから, 今後の流行状況に注意する必要がある。

○改良型CSM培地を用いた百日咳菌の分離について

・吉野修司, 水流奈己, 荒井路子, 元明秀成

「第42回九州衛生環境技術協議会(平成28年10月13日, 14日 福岡市)」