

Bordetella holmesii の分離および LAMP 法に関する検討

吉野修司 河野喜美子 黒木真理子 大浦裕子 岩切 章
山田 亨 深江弘恵¹⁾ 堀田 剛²⁾ 蒲地一成³⁾ 豊泉裕美³⁾
大塚菜緒³⁾ 日高良雄⁴⁾ 西田敏秀⁴⁾ 木添茂子⁴⁾ 田多良佳代⁴⁾

A Comparative Study of Isolation and LAMP Method for Detection of *Bordetella holmesii*

Shuji YOSHINO, Kimiko KAWANO, Mariko KUROGI, Yuko OHURA, Akira IWAKIRI,
Tohru YAMADA, Hiroe FUKAE, Takeshi HORITA, Kazunari KAMACHI,
Hiromi TOYOIZUMI-AJISAKA, Nao OTSUKA, Yoshio HIDAKA,
Toshihide NISHIDA, Shigeo KIZOE, Kayo TATARA

A selective medium (Bordet-Gengou Medium, Charcoal Agar, Cyclodextrin Solid Medium) containing cephalixin has been widely used for the isolation of *Bordetella pertussis* in clinical specimens. However, cephalixin have an inhibitory effect on *B. holmesii*. In this study, we examined the concentration of cephalixin for the purpose of isolating both *B. pertussis* and *B. holmesii*. As a result, if selective medium is used with cephalixin at a concentration up to 5.0 µg/ml, this level appears to be culturable for *B. holmesii*.

B. holmesii-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay has been developed by the National Institute of Infectious Diseases. In this study, LAMP assay were compared to results of previously published real-time PCR assay for 88 nasopharyngeal swabs that were collected from the patients of pertussis outbreak in Miyazaki Prefecture in 2010-2011. The data obtained in this study were in complete agreement with the results of real-time PCR assay. The LAMP method offers many advantages compared to real-time PCR, such as simplicity, rapidity, and without the need for a thermal cycler; therefore, this technique has proven to be very useful in the detection of *B. holmesii* in clinical specimens.

Key words: *Bordetella holmesii*, cephalixin, LAMP assay

はじめに

Bordetella holmesii は 1995 年に米国 CDC から報告された百日咳類縁菌で¹⁾, 当初, 基礎疾患を有する免疫不全患者から分離される病原体と考えられていた^{2,4,8,9,11)}. 一方で *B. holmesii* は百日咳様症状を呈する患者からも検出されることから, 健常者, 特に青年・成人で百日咳様症状を起こす可能性が指摘され^{3,5,7,10,12,13)}, さらに, 近年では百日咳菌と同様にヒト-ヒト感染することが示

唆されている¹⁵⁾.

2010 年 11 月, 宮崎県 A 市で百日咳の集団発生が起こり, 百日咳様症状を呈した患者の鼻咽頭拭い液 6 件から, *B. holmesii* が遺伝子検査で検出され, そのうち 5 件から菌が分離された.

B. holmesii は国内での報告例が少ないことから, 確立した分離法も報告されていない. 通常, 鼻咽頭拭い液など臨床材料からの百日咳菌の分離には, 夾雑菌を抑えるため, セファレキシム (CEX) を含む選択分離培地が用いられる. しかし,

微生物部 ¹⁾現 県立宮崎病院 ²⁾現 高鍋保健所 ³⁾国立感染症研究所 細菌第二部 ⁴⁾延岡保健所

B. holmesii は CEX を含まない血液寒天培地等では発育できるが^{2,4,9)}，CEX を含む百日咳菌用選択分離培地では分離が困難で^{5,6)}，*B. holmesii* を見逃している可能性がある^{10,11)}。

今回，臨床材料から百日咳菌の分離に加え，*B. holmesii* の分離も併用することを目的として，百日咳菌用選択分離培地の CEX 添加濃度を検討したので報告する。

また，百日咳疑い患者の鼻咽頭拭い液を用い，臨床材料から特異的に *B. holmesii* を検出することを目的として，国立感染症研究所細菌第二部で開発された LAMP 法¹⁴⁾の検討も行ったので併せて報告する。

材料と方法

1 CEX 添加濃度の検討

選択分離の基礎培地として Bordet-Gengou 血液寒天培地 (BG 培地: Difco)，Chacoal Agar 血液寒天培地 (CA 培地: Oxoid) および Cyclodextrin Solid Medium (CSM 培地) を用いた。CEX はボルデテラ選択サプリメント (Oxoid) を用い，各培地とも一平板あたり最終濃度が 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう希釈添加し，各濃度につき平板を 5 枚ずつ作製した。

供試菌は 2011 年 1 月に分離された *B. holmesii* を用い，一平板あたり 100cfu/100 μL となるよう 10% スキムミルク溶液で希釈調製し，使用時まで -80°C で保存した。

調製した供試菌は 100 μL をコンラージ棒で均一に塗抹して 36°C ，3 日間好気培養を行い，CEX 非添加培地上のコロニー数を 100 としたときの CEX 添加培地上のコロニー数を実体顕微鏡下でカウントして回収率を求めた。

また，健常者 7 人分の咽頭ぬぐい液をプールして PBS で希釈した後，調製した供試菌と混合したものを模擬検体とし，模擬検体を前記で求めた至適濃度の CEX 添加培地で培養後，*B. holmesii* のコロニーが視認できるかどうか確認した。なお，CEX の代わりにバンコマイシンとセフジニルを含む市販の CFDN 培地 (日研生物医学研究所) も確認の対象とした。

2 LAMP 法の検討

臨床材料は 2010 年 11 月～2011 年 3 月末までに A 市管轄保健所管内で集められた百日咳疑い患者の鼻咽頭拭い液 88 件を用いた。鼻咽頭拭い液はレーヨン性の綿棒 (γ コレクトスワブ RII : 栄研化学) を CEX 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加 Cyclodextrin Liquid Medium に懸濁した後，QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出したものをテンプレートとした。判定は LA-320C (栄研化学) を用いて行い，*B. holmesii* の *recA* をターゲットとした real-time PCR 法¹⁰⁾と比較して感度と特異性を検討した。なお，LAMP 法および real-time PCR 法の試薬は国立感染症研究所細菌第二部から供与されたものを用いた。

結果

1 CEX 添加濃度の検討および模擬検体を用いた CEX 添加培地の確認

5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の CEX 濃度では BG 培地，CA 培地とも 100% の回収率で，CSM 培地では 66.7% の回収率であった。また，20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の CEX 濃度では回収率が極端に低下した。なお，通常用いられる CEX 濃度 (BG 培地: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，CA 培地: 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，CSM 培地: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では CSM 培地以外はほとんど回収できなかった (Table. 1)。

Table 1 Recovery rate of *B. holmesii* at each concentration of cephalexin

Medium	Concentrations examined ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	5	10	20	40
BG	100	51.4	1.7	1.1
CA	100	83.3	16.7	0
CSM	66.7	16.7	0	0

The gray fields show the concentrations of commonly used cephalexin in each medium

また、回収率が高かった CEX 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加の各培地に模擬検体を塗抹したところ、BG 培地および CA 培地では培養 3 日目には夾雑菌が著しく発育し、*B. holmesii* のコロニーを容易に認めることができなかつた。一方、CSM 培地および CFDN 培地では夾雑菌の発育が抑えられ、*B. holmesii* のコロニーが認められた(Fig. 1)。

2 LAMP 法の検討

88 件中 6 件が real-time PCR 法および LAMP 法で陽性であった。なお、88 件中 30 件から百日咳菌が、8 件から *M. pneumoniae* がそれぞれ検出されたが、これらの陽性検体は *B. holmesii* 用の real-time PCR 法および LAMP 法ですべて陰性で

あつた。

B. holmesii が分離された 5 件を含む陽性だった 6 件は real-time PCR 法の threshold cycle (Ct 値) が 21.6~36.6, LAMP 法の threshold time (Tt 値) が 21.48~38.24 で、Ct 値と Tt 値はよく相関していた。なお、分離陰性だった患者 11086 は検体採取前から抗生物質を服用していた (Table. 2)。

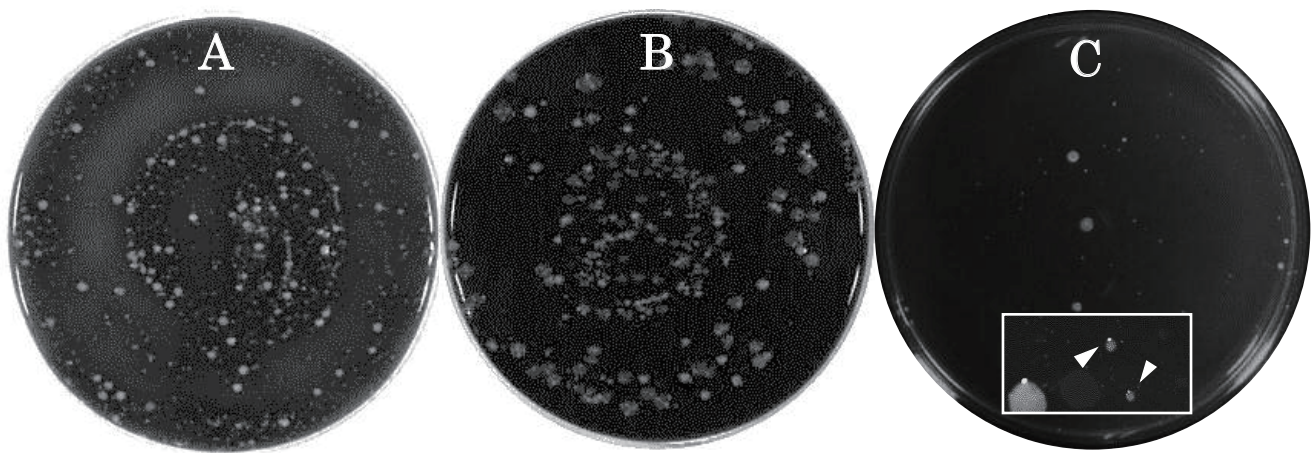


Fig 1 (A) *B. holmesii* - simulated nasopharyngeal specimens (NPs) mixture on BG supplemented with cephalaxin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) *B. holmesii* - simulated NPs mixture on CA supplemented with cephalaxin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (C) *B. holmesii* - simulated NPs mixture on CSM supplemented with cephalaxin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The insert shows a magnification of the areas of colony.

Table 2 Correlation between threshold cycle values of the real-time PCR assay and threshold time values of the LAMP assay

Patient no.	Age(yr)/sex	Result by		
		real-time PCR (Ct)	LAMP (Tt)	Culture
11015	17 / M	+ (28.7)	+ (26.30)	+
11056	15 / F	+ (23.4)	+ (24.24)	+
11059	15 / F	+ (21.6)	+ (21.48)	+
11064	14 / F	+ (25.1)	+ (25.06)	+
11079	40 / M	+ (27.0)	+ (27.24)	+
11086*	45 / F	+ (36.6)	+ (38.24)	-

※ Patient 11086 had been treated with antibiotics before the culture test

考察

今回の結果から、一般に用いられる CEX 濃度の百日咳菌選択分離用 BG 培地, CA 培地では *B. holmesii* の分離は難しく, CSM 培地では分離できるが, 発育が悪いことが推測された. 今回の実験では, 夾雑菌が多い場合を想定し, 3 日間培養後の判定と模擬検体の作製を行ったが, 実際の臨床材料で, 夾雑菌が少ない場合は CEX 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの BG 培地, CA 培地, あるいは CEX を含まない市販の血液寒天培地等を用いれば, 分離率は向上するものと思われた. なお, 海外ではオキサシリンもしくはメチシリンを含む BG 培地での分離報告があることから⁵⁾, 今後, 他の選択分離培地も含めて比較検討を行う必要があると考えられた.

B. holmesii に特異的な LAMP 法は real-time PCR 法と同等の高い感度と特異性を有することが確認された. LAMP 法は操作も簡便で, 高価な機器も必要としないことから, *B. holmesii* の診断に有用な方法と考えられた¹⁴⁾. なお, real-time PCR 法と同様, DNA の抽出精製操作が必要なことから, いかに迅速かつ簡便にテンプレートを準備できるかが今後の課題と思われた.

実際に百日咳疑いの患者が発生した場合, *B. holmesii* は臨床的に百日咳菌との鑑別が難しいことから, どちらの病原体も検出できる方法が望まれる. 現実的には, まず遺伝子検査を行い, その後, 陽性だった検体について適切な選択分離培地を用いて菌の分離を行う方が効率的と考えられる. しかし, 遺伝子検査と並行して分離を行う場合や選択分離培地を 1 種類しか準備できない場合は, 一般に用いられている CEX 濃度が 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの CSM 培地か市販の CFDN 培地を用いれば百日咳菌も *B. holmesii* も分離が可能であると考えられる.

B. holmesii は当初, 基礎疾患を有する患者からの報告が多かったが, 宮崎県での事例も含め, 基礎疾患のない百日咳様症状を呈する患者からも報告されている^{3,5,7,10,12,13)}. また, 疫学的にはヒト-ヒト感染も示唆されていることから¹⁵⁾, 今後, 公衆衛生上注意すべき病原体の一つになる可能性があり, 注意していく必要がある.

謝辞

感染症発生動向調査事業において検査材料を提供して下さった医療機関の先生方、ならびに検体採取にご協力いただいた定点医療機関の先生方に深謝いたします.

文献

- 1) Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, *et al.* : *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. J Clin Microbiol. 1995; 33: 1-7.
- 2) Tang YW, Hopkins MK, Kolbert CP, Hartley PA, Severance PJ, Persing DH: *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. Clin Infect Dis. 1998; 26: 389-92.
- 3) Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H: *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. Emerg Infect Dis. 1999; 5: 441-3.
- 4) Njamkepo E, Delisle F, Hagege I, Gerbaud G, Guiso N: *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. Clin Microbiol Infect. 2000; 6: 131-6.
- 5) Mazengia E, Silva EA, Peppe JA, Timperi R, George H: Recovery of *Bordetella holmesii* from patients with pertussis-like symptoms use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize circulating strains. J Clin Microbiol. 2000; 38: 2330-3.
- 6) Loeffelholz MJ, Thompson CJ, Long KS, Gilchrist MJ: Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. J Clin Microbiol. 2000; 38: 467.
- 7) Russell FM, Davis JM, Whipp MJ, Janssen PH, Ward PB, Vyas JR, *et al.* : Severe

- Bordetella holmesii* infection in a previously healthy adolescent confirmed by gene sequence analysis. Clin Infect Dis. 2001; 33: 129-30.
- 8) Reischl M, Lehn N, Sanden GN, Loeffelholz MJ: Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1963-6.
 - 9) Shepard CW, Daneshvar MI, Kaiser RM, Ashford DA, Lonsway D, Patel JB, *et al.* : *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. Clin Infect Dis. 2004; 38: 799-804.
 - 10) Guthrie JL, Robertson AV, Tang P, Jamieson F, Drews SJ: Novel duplex real-time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with Pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. J Clin Microbiol. 2010; 48: 1435-7.
 - 11) Panagopoulos MI, Saint Jean M, Brun D, Guiso N, Bekal S, Ovetchkine P, *et al.* : *Bordetella holmesii* bacteremia in asplenic children: report of four cases initially misidentified as *Acinetobacter lwoffii*. J Clin Microbiol. 2010; 48: 3762-4.
 - 12) Gross R, Keidel K, Schmitt K: Resemblance and divergence: the "new" members of the genus *Bordetella*. Med Microbiol Immunol. 2010; 199: 155-63.
 - 13) Njamkepo E, Bonacorsi S, Debruyne M, Gibaud SA, Guillot S, Guiso N: Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. J Clin Microbiol. 2011; 49: 4347-8.
 - 14) Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K: Simple and specific detection of *Bordetella holmesii* by using a loop-mediated isothermal amplification assay. Microbiol Immunol. 2012; 56: 486-9.
 - 15) Kamiya H, Otsuka N, Ando Y, Odaira F, Yoshino S, Kawano K, *et al.*: Transmission of *Bordetella holmesii* during Pertussis Outbreak, Japan. Emerg Infect Dis. 2012; 18: 1166-9.