

百日咳菌の検査法改良及び分子疫学解析

吉野修司 水流奈己 元明秀成

Molecular Epidemiology and Improvement of the Test Method for *Bordetella pertussis*

Shuji YOSHINO, Nami TSURU, Hidenari GANMYO

要旨

集団発生など公衆衛生上問題となる可能性が高い百日咳の患者発生時に、地方衛生研究所としてより迅速に効率よく対応できるよう、Duplex real-time PCR法によるスクリーニング法の導入を図った。

また、ワクチン既接種者や青年・成人では菌の分離が難しいことから、培地の改良を試み、最終濃度5mMのピルビン酸Naを添加することで百日咳菌が良好に分離できることを確認した。

さらに、宮崎県で分離される百日咳菌のほとんどはFim3を発現しており、約60年前に分離されたワクチン株である東浜株とは遺伝的にもタンパクの発現においても異なっていることが明らかとなった。

キーワード：*Bordetella pertussis*, Duplex real-time PCR法, ピルビン酸Na, Fim3

はじめに

宮崎県では2010年と2014年に中学校を中心とした百日咳の集団感染が発生した¹⁾。患者はいずれも軽症であったが、集団発生後には長期にわたって散発的に患者が発生する傾向があり(図1)、重篤になりやすいワクチン未接種児に対する感染が懸念された。また、国内における百日咳の検査はLAMP法²⁾を中心とした遺伝子検査が主流になりつつあるが、医療機関での遺伝子検査は難しく、散発事例が発生した際、当所に対し百日咳の検査要望が多く寄せられた。

当所には2010年4月～2015年3月までに集団発生時の検体も含め、百日咳疑いの検体が519件搬入されているが、そのうち陽性は97件(18.7%)、陰性は422件(81.3%)で、約8割が陰性であった。これらのことから、検体の採取時期や抗菌薬服用による陰性化を考慮しても臨床診断だけでは他の呼吸器感染症との鑑別は難しいことが推測された。

百日咳は現行の感染症法では小児科定点把握の5類感染症で届出要件も臨床診断となっている。しかし、これまでの経緯から、百日咳は典型的な症状を示さない場合、臨床診断が難しく医療機関での検査も困難であることから、今後も集団発生

など公衆衛生上問題となる可能性が高い感染症のひとつと考えられた。

以上のことから、百日咳疑いの患者が発生した際に地方衛生研究所として、より迅速に効率よく対応できるよう、これまで実施してきたIS481-conventional PCR法、LAMP法、培養法の同時検査を見直し、人に病原性を示す*Bordetella*属菌(*B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii*)を一度に検出するスクリーニング法を導入することにした(表1)。

表1 従来実施法とスクリーニング法の比較

検出菌	従来実施していた3つの方法(標的遺伝子)			スクリーニング法
	conv PCR法 (IS481)	LAMP法 (PT promoter)	培養法	Duplex real-time PCR法 (IS481・IS1001)
<i>B. pertussis</i>	○	○	○	○
<i>B. parapertussis</i>	×	×	○	○
<i>B. holmesii</i>	○	×	○	○
所要時間 [※]	約2時間	約40分	4~10日	約40分

※遺伝子検査はDNA抽出後の所要時間

さらに、菌の分離は特殊な培地を必要とするが、集団発生時には培地を大量に使用することから、迅速かつ簡便に培地を作製することを目的として保存性に優れた半合成培地であるCyclodextrin Solid Medium(CSM培地)³⁾の作製法を変更した。

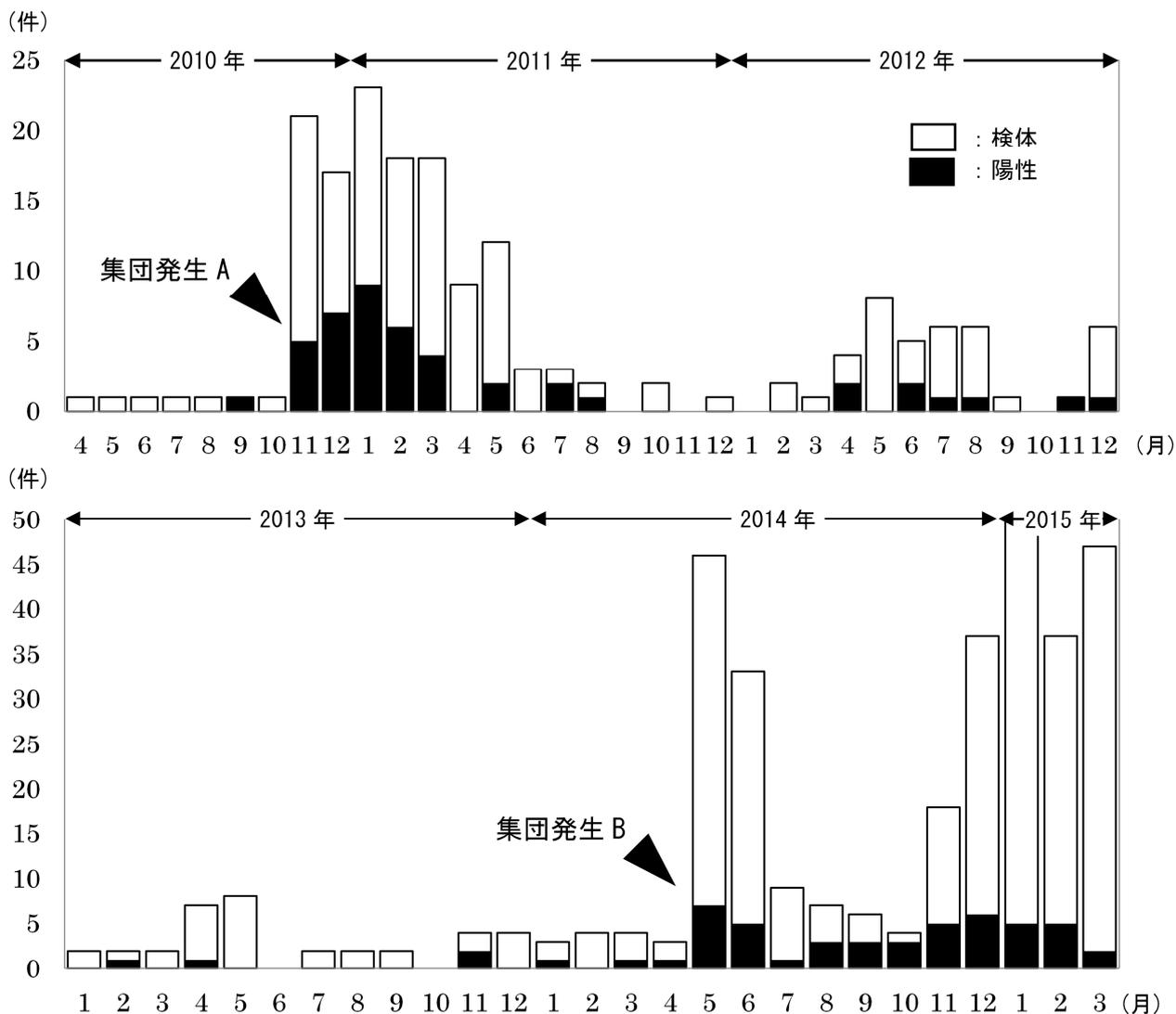


図1 当所に搬入された百日咳疑い検体の推移(2010年4月~2015年3月)

表2 改良型 CSM 培地の組成と調製法

Basal medium			Supplement		
Component	Concentration	mL/L	Component	Concentration	uL/L
sodium L-glutamate(mono)	1M	57.2	L-cysteine	0.1M	2278
L-proline	0.1M	20.9	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05M	719
NaCl	5M	8.6	ascorbic acid	0.1M	1136
KH ₂ PO ₄	0.25M	14.7	niacin	0.05M	650
KCl	2M	1.3	reduced glutathione	0.2M	2441
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.05M	9.8	sterilization by 0.22μm filtration		
CaCl ₂	0.05M	3.6	※ Add to final concentration of 5 mM sodium pyruvate		
Tris-HCl buffer (pH7.6)	1M	50.4			
heptakis(2,6-O-dimetyl)β-cyclodextrin	5%	20.0			
Casamino Acids	5%	10.0			
Bacto-Agar	18g	-			

Autoclave for 15 minutes at 121°C and cool before adding supplements, fill up to 1L with dH₂O

また、ワクチン既接種者や青年・成人では菌の分離も難しいことから、培地の改良を試み、最終濃度 5mM のピルビン酸 Na を添加することで原法と比較し、百日咳菌が良好に分離できることを確認したので報告する。

なお、現在宮崎県で分離されている百日咳菌は pertactin (Prn) および fimbriae (Fim)3 を発現している MLVA-27 型が主流であることが明らかとなったので併せて報告する。

方法

1 Duplex real-time PCR 法

4Plex real-time PCR 法⁴⁾を基に、本県の実情に合わせ *B. pertussis* および *B. holmesii* を検出する目的で IS481 を、*B. paraptussis* を検出する目的で IS1001 をそれぞれ標的遺伝子とした。

2 改良型 CSM 培地の作製法

CSM 培地の組成をモル濃度換算し、ストック溶液を作製後、調製した。また、pH は市販のトリス-塩酸バッファ溶液(pH7.6)を用いて調整し、最終濃度 5mM のピルビン酸 Na を加えた(表 2)。

3 ピルビン酸 Na 添加培地の検証

ピルビン酸 Na の効果を検証するため、MLVA のタイプが異なる 3 種類(MT26, MT27, MT29)の臨床分離株およびワクチン株である東浜株を用いた。各菌株は事前に希釈調整したものを、原法と改良型の各培地 5 枚ずつに 100 μ L 滴下し、コンラージ棒で広げ、培養 4 日目に出現するコロニ

一の平均数を実体顕微鏡下でカウントした。

4 分子疫学解析

分離株は *Xba* I を用いて PFGE を行い、トレランス 1.2% で解析した。また、国立感染症研究所細菌第二部で MLVA のタイピングおよび Prn, Fim の発現解析を行った。

結果と考察

スクリーニング法の導入により、人に病原性を示す *Bordetella* 属菌を DNA 抽出後、約 40 分で一度にスクリーニングでき、遺伝子検査で陽性になったもののみ培養等を実施すればよいことから、大幅な省力化が図られた。なお、*B. pertussis* と *B. holmesii* は共に IS481 を保有していることから、この方法で陽性となった場合は、LAMP 法²⁾⁵⁾等で鑑別する必要がある。

CSM 培地は保存性に優れた半合成培地であるが、組成が複雑で微量成分を含むことから、秤量、および pH 調整が困難であった。変更した作製法では秤量ではなく容量で調製でき、pH 調整も不要であることから、誰が調製してもロット間差を生じることなく迅速に培地が作製可能となった。

また、CSM 培地に出現したコロニー数を 1 とした場合、改良型培地では MT26 : 2.9 倍、MT27 : 3.1 倍、MT29 : 2.7 倍、東浜株 : 3.3 倍と MLVA のタイプに関わらずコロニー数が増加し、コロニーの大きさも原法に比べ大きくなることが認められた(図 2)。

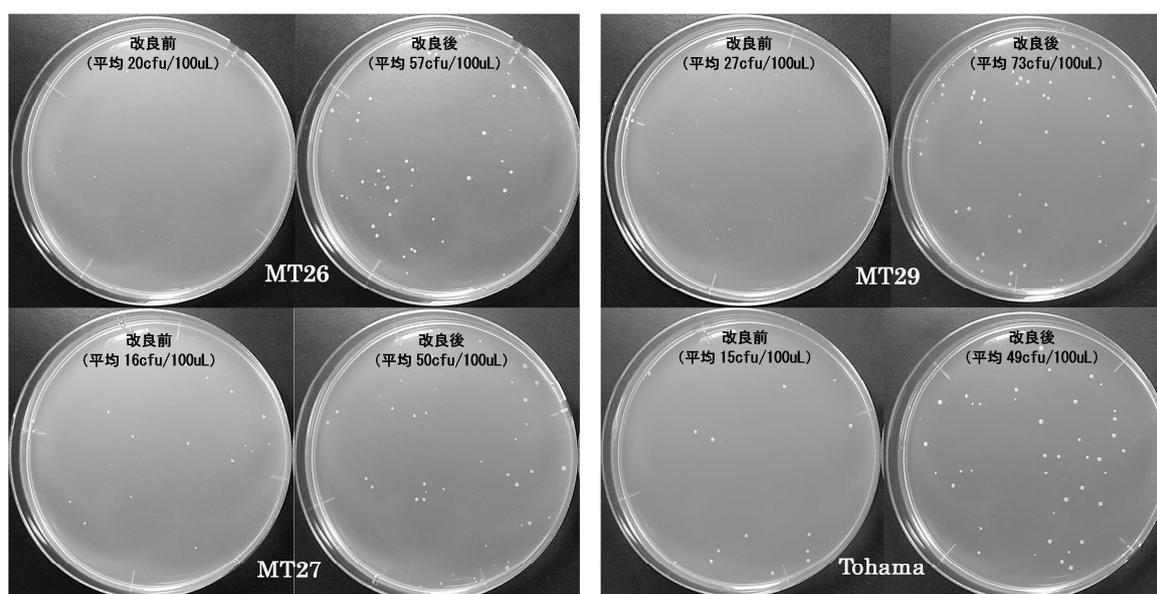


図 2 MLVA タイプ別の培地改良前後のコロニー数・大きさの比較

近年の *B. pertussis* は欧米で流行している MT27 と過去に流行した MT186 に大別されるが、宮崎県で分離される百日咳菌は MT27 の遺伝子型が主流であった。なお、現行のワクチン株として使用されている東浜株は Fim2 を発現しているが、本県の分離株のほとんどは国内分離株と同様の Fim3 を発現しており⁶⁾、約 60 年前に分離された東浜株とは遺伝的にもタンパクの発現においても異なる部分があることが明らかとなった(図 3)。

百日咳はこれまでワクチンによる予防可能な疾患の一つと考えられ、患者数も減少傾向にあった。しかし、2008 年頃から患者数は増加傾向を示し⁷⁾、乳児だけでなく青年・成人における患者数の増加、さらにワクチン既接種者の感染も認められ、遺伝子検査など検査技術の向上だけでは患者数の増加は説明できなくなりつつある。この患者数の増加は日本だけでなく世界的に認められており⁸⁾、近年では動物感染実験や疫学解析等の結果から、現行ワクチンは症状を軽減させるが、感染や菌の増殖は抑えられないことも報告され⁹⁾¹⁰⁾、百日咳は、ワクチンはあるが制御できない再興感染症¹¹⁾との認識が広まりつつある。

現在、遺伝子検査は、国立感染症研究所細菌第二部との共同研究で *Bordetella* 属菌 3 菌種に加え、

Mycoplasma pneumoniae も検出可能な 4Plex real-time PCR 法が開発されており⁴⁾、必要に応じてプローブを増やすことが可能となっている。

一方、菌の分離は特殊な培地が必要なこと、菌の分離も比較的難しいこと、届出要件として検査が必須ではないことなどから、地方衛生研究所でも実施している施設は少ないのが現状で、日本における変異株や薬剤耐性菌の出現監視体制は脆弱になっている。

今後、百日咳は公衆衛生上問題となる可能性が高いことから、地方衛生研究所としての役割を考慮し、菌の分離を含む病原体サーベイランスの強化を図っていくことが急務だと思われる。

謝辞

本研究において MLVA 解析ならびにタンパク発現解析にご協力いただいた国立感染症研究所細菌第二部の蒲地一成先生、大塚菜緒先生、平松征洋先生、データ解析に協力いただいた荒井路子女士に深謝いたします。

参考文献

- 1) 吉野修司ら：地域内流行における百日咳検査法の比較：宮崎県衛生環境研究所年報 (23)，

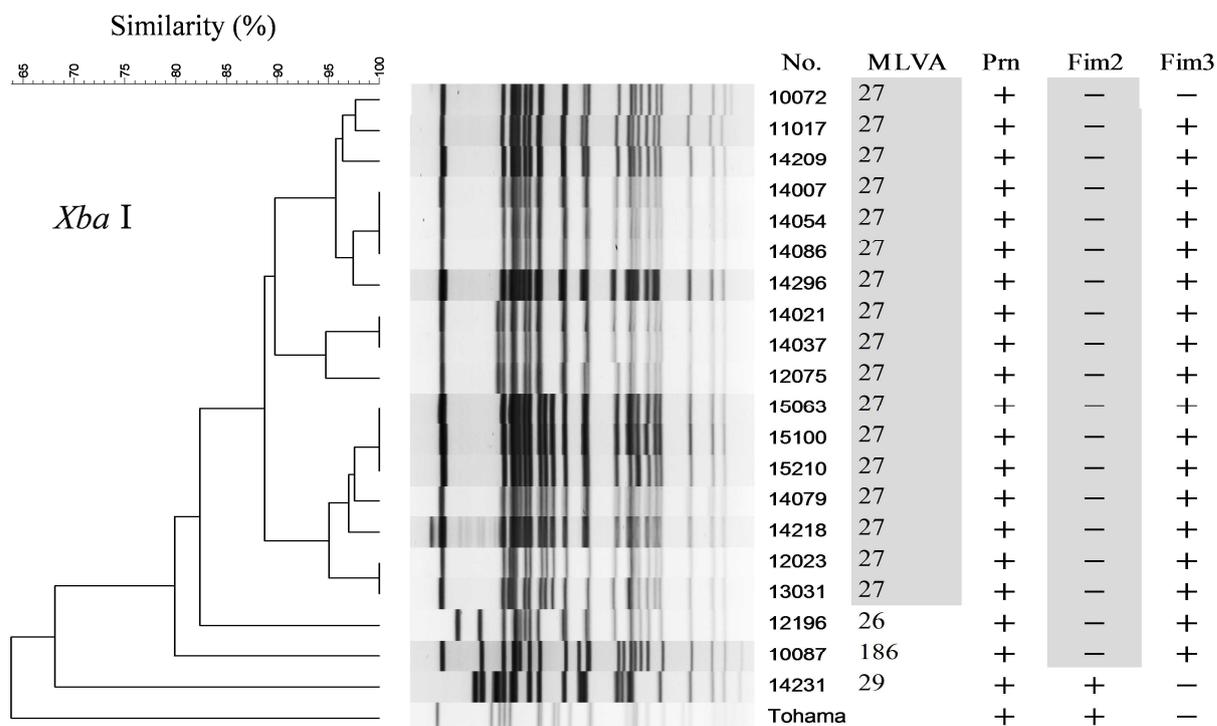


図 3 宮崎県で分離された百日咳菌の PFGE, MLVA タイピングおよび Prn, Fim の発現解析

- 67-71, (2011)
- 2) Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, *et al*: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection, *J Clin Microbiol*, 44, 1899-902, (2006)
 - 3) Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y: Heptakis (2,6-O-dimethyl) beta-cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I, *J Clin Microbiol*, 17(5), 781-6, (1983)
 - 4) Kamachi K, Yoshino S, Katsukawa C, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K: Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens, *New Microbe New Infect*, 8, 70-74, (2015)
 - 5) 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*, 56(7), 486-9, (2012)
 - 6) Miyaji Y, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan, *PLoS One*, 4, 8(10), (2013)
 - 7) 国立感染症研究所: <特集> 百日咳 2008~2011, 病原微生物検出情報, 33, 321-322, (2012)
 - 8) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Pertussis epidemic-Washington, 2012, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 20, 61(28), 517-22, (2012)
 - 9) Warfel JM, Zimmerman LI, Merkel TJ: Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model, *Proc Natl Acad Sci USA*, 14, 111(2), 787-92, (2014)
 - 10) Althouse BM, Scarpino SV: Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*, *BMC Med*, 24, 13, 146, (2015)
 - 11) 渡邊峰雄ら: 百日咳ワクチン開発の歴史: 全菌体ワクチンの開発から無細胞型ワクチンへの転換, これからのワクチン, 臨床とウイルス, 43(1), 13-16, (2015)