

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告 書

百日咳抗原変異株のプロテオーム解析
—網羅的発現解析による病原因子の検索—

分担研究者 堀内 善信 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨

世界的に百日咳菌の流行株はワクチン型から抗原変異型への入れ替えが生じている。本研究では抗原変異株の出現を考察するために、変異株に特異的な蛋白質の同定を行った。プロテオミクスによる網羅的発現解析の結果、抗原変異株に7種の蛋白スポットの違いを見出し、パータクチン (Pm) を含む5種の蛋白質を同定した。シーケンス解析により、Pm と hypothetical protein BP0500 に遺伝子の変異を確認し、BP0500 は終止コドン直下の非翻訳領域 (TGACGG→TGACAG) に変異が生じていることが示された。また、Pm の遺伝子変異は既報と一致するものであったが、抗原変異株における Pm2 発現量はワクチン型 Pm1 よりも著しく高いことが新たに判明した。本研究により、近年の流行株の変化には Pm と BP0500 遺伝子が関与する可能性が強く示唆された。

研究協力者

蒲地一成 (国立感染症研究所 細菌第二部)
佐々木裕子 (国立感染症研究所 細菌第二部)

A. 研究目的

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって引き起こされる小児の呼吸器感染症であり、ワクチンの普及とともに世界の百日咳患者数は激減した。しかし、近年、高いワクチン接種率を維持する米国、オランダ、ポーランドでは患者数の増加が認められ、米国では再興感染症の一つとして位置付けられている。この再興原因の詳細は不明であるが、多くの研究者によって流行株の遺伝子変異が関与する可能性が指

摘されている。

流行株の遺伝子変異はワクチン抗原として重要な百日咳毒素 S1 サブユニット (PT-S1; *ptxS1*) と接着因子の一つであるパータクチン (Pertactin; *prn*) に認められ、この抗原変異株はワクチン株と異なる変異蛋白質を産生する。欧米諸国では患者数の増加開始時期と抗原変異株の出現時期が一致することから、変異株はワクチンによる免疫を回避するために出現した可能性があると考えられている。一方、我が国では患者数の増加は認められていないが、欧米諸国と同様に抗原変異株の出現が確認されている。患者発生動向に違いがあるものの、多くの国々で流行株の変化が認められている。

流行株の変化は世界的な現象であることから、抗原変異株に複数の遺伝子変異が生

じている可能性が十分に考えられる。現在まで、抗原変異株の遺伝子変異は *PtxS1* と *Pm* 以外に、百日咳毒素 *S3* サブユニットと *tracheal colonization factor* に見つかっているものの、これらの遺伝子変異からは近年の抗原変異株の出現を説明することはできない。また、抗原変異株に発現する蛋白質の網羅的発現解析はいままで実施されたことは無いため、抗原変異株が新たな病原因子を獲得している可能性も否定できない。そこで本研究では以上の背景を踏まえ、網羅的発現解析によるプロテオミクスを実施し、抗原変異株の出現理由となる新たな遺伝子変異を検索することを目的とした。

B. 研究方法

菌株：2004年4月に宮城県内の病院で分離された百日咳臨床分離株（BP235, BP233）をプロテオーム解析に供試した。なお、シーケンス解析により、BP235は *ptxS1A/prn2* の遺伝子を持つ抗原変異株、BP233は *ptxS1B/prn1* を持つワクチン型であることを確認した。

二次元電気泳動：菌体蛋白質は SDS-lysis buffer を用いて加熱抽出し、蛋白濃度は TCA-Lowry 法により測定した。二次元電気泳動は O'Farrell の方法に従い、Ampholine 5-7:3.5-10 = 4:1 の条件で 10 µg の全蛋白質を一次元目の IFE に供試した。泳動は 200V 1h, 400V 2h, 800V 14h の条件で実施し、二次元目は 12% SDS-PAGE に展開した。泳動後、分離蛋白質は銀染色を用いて検出し、解析は PDQuest 2-D analysis software (Bio-Rad) を用いて行なった。

LC-MS/MS：蛋白質の同定はトリプシンによるゲル内消化後、LC-MS LCQ deca XP (Thermo Electron Corp.) を用いた質量分析により行なった。データベース検索は

SEQUEST algorithm (Thermo Electron Corp.) を使用し、*B. pertussis* Tohama 株のゲノム情報を検索対象とした。

シーケンス解析：同定遺伝子の塩基配列は PCR による遺伝子増幅後、dye-terminator 法により決定した。シーケンス解析には ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer を使用した。得られた DNA 配列は、SEQUENCHER DNA sequencing software (Gene Codes) を用いてワクチン株である *B. pertussis* Tohama の配列と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は分離菌株についての解析であり、ヒト由来の臨床材料を使用しないため、倫理上特段の問題点は発生しないと判断された。

C. 結果

二次元電気電気泳動により、抗原変異株（BP235）とワクチン型百日咳菌（BP233）に発現する蛋白質を比較したところ、両菌株は極めて良く似たタンパクプロファイルを示した（図1）。2D-PAGE 画像解析ソフトを用いて、抗原変異株に特異的な蛋白スポットを検索したところ、7個の蛋白スポットに違いを認めた（図2）。SSP1107, 1211, 1702, 5209, 7701 は抗原変異株に特異的な発現スポットであり、SSP1204, 3302 はスポット位置の変化であった。質量分析による蛋白質の同定を行ったところ、SSP1107, 5209 は蛋白量が少ないため同定することができなかったが、SSP1204, 1211, 1702, 3302, 7701 については同定可能であった（表1）。同定された5種の蛋白質についてシーケンス解析を実施したところ、SSP1702, 7701 に遺伝子変異を確認した。なお、SSP1204, 1211, 3302 に遺伝子の変異

は確認されなかった。

SSP1702 はワクチン株の hypothetical protein BP0500 と同定され、その変異は終止コドン直下の非翻訳領域に認められた (図 3)。その変異はワクチン株である東浜株では TGACGG であるのに対し、抗原変異株である BP235 では TGACAC の配列を示した。二次元電気泳動の解析結果から、BP0500 はワクチン型百日咳菌 (BP233) では発現していない可能性が指摘されたが、この遺伝子変異が BP0500 の蛋白発現に与える影響は現在のところ不明である。

SSP7701 は質量分析から Pm と同定され、その塩基配列は既報の *prn2* に一致するものであった。しかし、二次元電気泳動における Pm の発現位置をワクチン型 BP233 と比較したところ、BP233 には Pm1 に対応する蛋白スポットが存在しないことが示された (図 4)。Pm1 は Pm2 と等しい等電点を持ち、Pm2 よりも 0.5 kDa 小さく産生されるが、BP233 のタンパクプロファイル上で Pm1 に相当する蛋白スポットを認めることはできなかった。このことから、Pm1 の発現量は Pm2 よりも著しく低いものと判断した。

D. 考察

本研究では抗原変異株の出現を考察するために、抗原変異株のプロテオーム解析を実施した。その結果、抗原変異株である BP235 とワクチン型 BP233 に hypothetical protein BP0500 遺伝子の点変異と Pm 発現量の違いを認めた。抗原変異株における BP0500 蛋白質の特異的発現は他の変異株とワクチン型菌株を解析した場合でも同様に認められたことから、BP0500 の特異的発現は抗原変異株に共通したものと考えられた。BP0500 の機能と発現様式は分かっ

ていないが、終止コドン直下の点変異が BP0500 の遺伝子発現に影響する可能性が示唆される。今後、BP0500 の機能を含めた詳細な検討が必要である。

本研究では BP0500 以外に、Pm の発現量に差があることが示された。Pm の機能は宿主細胞に対する接着因子であることがすでに明らかにされているが、Pm1 と Pm2 の蛋白発現量が異なる可能性を示した報告例はない。近年増加傾向にある抗原変異株の Pm2 発現量がワクチン型 Pm1 よりも高いことは、宿主細胞への感染を考えると合目的的と言える。なお、ワクチン株である東浜株では Pm1 の発現が確認されていることから、ワクチン型菌株においても Pm1 は発現しているものと推察される。今回、二次元電気泳動では Pm1 に相当する蛋白スポットをワクチン型 BP233 に見出すことはできなかったが、今後、抗 Pm 抗体を用いて Pm1 と Pm2 の蛋白含量を正確に定量していく必要がある。現在、免疫学的手法により Pm を検出するために、抗 Pm 抗体の作製を行っている。

E. 結論

網羅的発現解析により、抗原変異株とワクチン型菌株に Pm と BP0500 の発現量の違いを見出した。抗原変異株における Pm2 と BP0500 の発現量は著しく高いことから、近年の流行株の変化 (ワクチン型から抗原変異型) にはこれらの遺伝子が関与している可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kodama A., K. Kamachi, Y. Horiuchi, T. Konda, and Y. Arakawa. Antigenic divergence suggested by correlation between antigenic variation and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Bordetella pertussis* isolates in Japan. *J Clin Microbiol* **42**:5453-5457, 2004.

2. 学会発表

児玉温子、蒲地一成、近田俊文、堀内善信、荒川宜親、近年増加傾向にある百日咳菌が有する主要抗原遺伝子について、第 77 回

日本細菌学会総会、平成 16 年 4 月、大阪

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

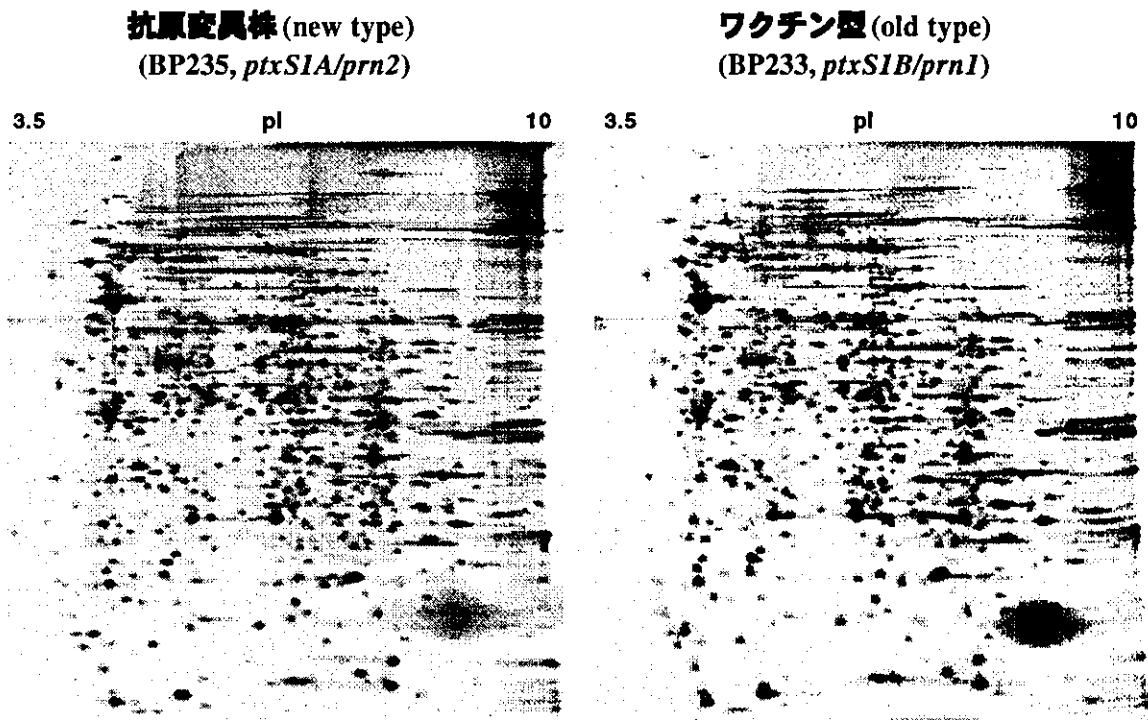


Fig. 1 抗原変異株 (BP235) とワクチン型菌株 (BP233) に発現する蛋白質の分離パターン
10 µg の全蛋白質を二次元電気泳動で分離後、銀染色により検出

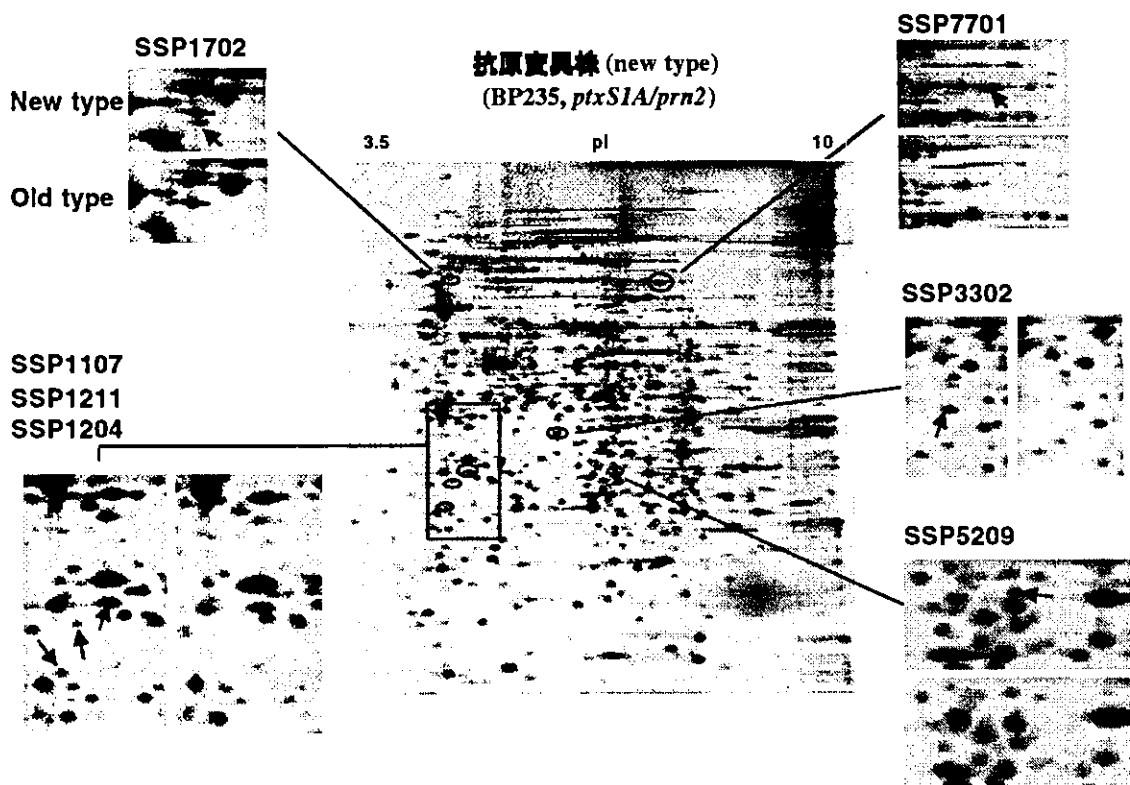


Fig. 2 抗原変異株 (BP235) に特異的な蛋白スポットの同定
New type は BP235、Old type は BP233 を示す

Table 1. LC-MS/MS による候補蛋白質の同定と変異解析

SSP ID	protein	score	mutation
SSP1107	?		
SSP1204	septum site-determining protein	170.4	none
SSP1211	indole-3-glycerol phosphate synthase	50.3	none
SSP1702	hypothetical protein BP0500	40.4	+ (noncoding)
SSP3302	putative extracellular solute-binding protein	60.4	none
SSP5209	?		
SSP7701	pertactin	164.3	+

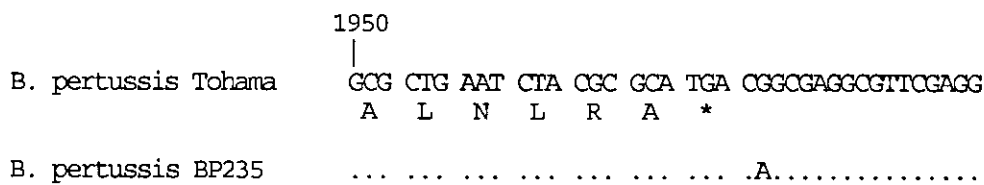
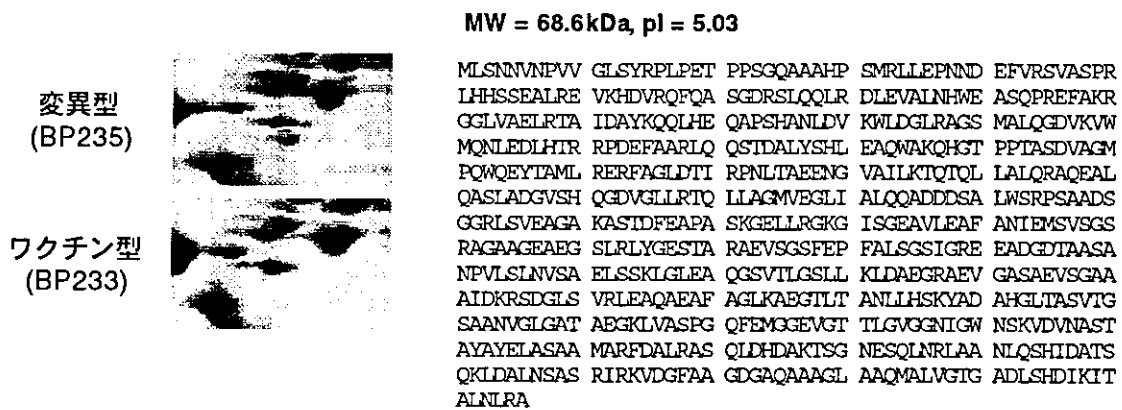


Fig. 3 hypothetical protein BP0500 のタンパクプロファイルと遺伝子の変異箇所

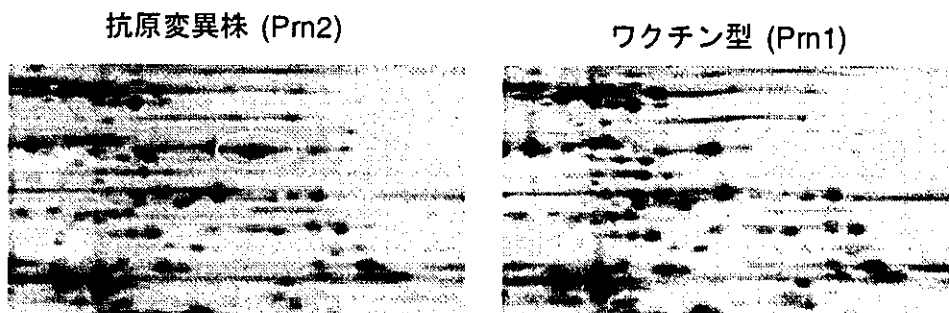


Fig. 4 抗原変異株 (BP235) とワクチン型菌株 (BP233) における Pm の発現

Fig. 2 の Pm2 発現位置 (白円) を中心に拡大し、BP233 と比較した

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

国内における百日咳発生動向調査と薬剤感受性分布
東京女子医科大学 感染症科
菊池 賢(分担研究者)
江東微生物研究所
大塚正之(協力研究者)

研究要旨:2001年12月より2004年12月までに全国91施設より提出された百日咳疑い患者300名の鼻咽頭300検体の培養、nested duplex PCR法(ndPCR)による百日咳菌の検出を行い、発生動向を調査すると同時に、得られた菌株の各種抗菌薬感受性を測定した。培養では59件(19.7%)、ndPCRでは112件(37.3%)が陽性となった。成人百日咳疑い患者16名の検体からも3件(培養1件、ndPCR3件)が陽性となり、伝播経路としては家族内感染と病院内感染が疑われた。抗菌薬感受性試験ではerythromycin耐性は認められず、macrolides, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracyclines, clindamycin, rifampicinなどが優れた抗菌力を示した。new quinolone薬のMICも非常に良好であった。今回、使用したndPCRは抗原変異、成人発症例などから世界的に対応の求められる百日咳の今後の発生動向調査に有用性が期待された。

A. 研究目的

昨年度の本研究で開発した nested duplex PCR法及び培養法を用いて、全国の百日咳の発生動向調査ならびに抗菌薬感受性調査を行った。

B. 研究方法

2001年12月より2004年12月までに全国91の医療施設で百日咳疑い患者より得られた鼻咽頭スワブ300検体につき、培養法とnested duplex PCR法(ndPCR、昨年度本研究班研究報告書に記載;IS481、IS1001を検出百日咳菌、パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii*

を区別して検出することが可能)による百日咳菌検出を行った。検体は生理食塩水300µlにresuspendし(鼻咽頭スワブ液)、cefalexin 40 mg/L添加Bordet-Gengou培地、Bordetella-CFDN培地に塗布後、37°C、7日間の好気湿潤培養を行った。百日咳菌の菌種同定はグラム染色、オキシダーゼ試験、血清によるスライド凝集反応によった。いずれかの培地で百日咳菌が確認できたものを培養陽性と判断した。鼻咽頭スワブ液50µlは100°C、20分間煮沸し、18,500 X g、10分間遠心し、上清をndPCR用のサンプルとした。ndPCRの検出感度は5

CFU / tube であった。PCR 産物は 1 X TAE buffer、2% agarose で電気泳動を行い、特異バンドの確認を行った。

各種薬剤の薬剤感受性(MIC)は Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden)、Bordet-Gengou 培地を用いて測定した。測定対象薬剤は amoxicillin/clavulanic acid, piperacillin, cefalexin, cefaclor, cefdinir, cefditoren, cefoperazone, erythromycin, azithromycin, clarithromycin, clindamycin, tetracycline, minocycline, chloramphenicol, rifampicin, ciprofloxacin, sparfloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, quinupristin/dalfopristin, trimethoprim/sulfamethoxazole の 21 薬剤とした。

(倫理面への配慮)倫理規定に沿った。

C. 研究結果

検出結果

表 1 に培養法と ndPCR 法による百日咳菌の検出成績を示した。陽性件数は培養法では 59 件(19.7%)、ndPCR では 112 件(37.8%)であった。培養陽性検体 59 検体中 58 件は ndPCR も陽性であったが 1 件は陰性であった。ndPCR の感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率はそれぞれ 98.3, 77.6, 51.8, 99.5%であった。

300 検体のうちパラ百日咳菌、*B. holmesii* は培養、ndPCR とともに検出されなかった。

患者背景の明らかな 287 検体 287 症例の男女別年齢分布と各陽性率を図 1 に示す。患者は圧倒的に 0 歳が多かった(男性 112 名;78.3%、女性 108 名;72.2%)。20 歳以上のいわゆる成人百日咳の疑わ

れた症例も 16 例あり(男性 5 例、女性 11 例)、培養陽性が 1 件、ndPCR 陽性が 3 件(両者とも陽性 1 件)認められた。培養か ndPCR で成人百日咳と診断された 3 件のうち 2 名は培養、ndPCR 陽性の百日咳患児 2 名の母親であり、家族内感染が疑われた。もう 1 件は 37 歳男性で ndPCR のみ陽性であったが、百日咳抗体上昇から診断された 46 歳女性の成人百日咳患者が感染源と推定され、小児を介さない成人同士の病院感染が疑われた症例であった。

図 2 には 2001 年 12 月から 2004 年 12 月までの検体数、培養か ndPCR いずれかでの陽性件数の推移を示した。季節では春から夏にかけて検体数、陽性例が増加する傾向が認められるが、2002 年は 1 月にもピークがみられた。

図 3 には検体由来地域とその陽性(培養ないし ndPCR いずれかでの陽性件数)を示す。検体は全国から回収され、関東地区から最も多く提出されていた。百日咳の検出率は 28.6-50%であった。

表 2 には培養陽性となった菌 52 株に対する各種抗菌薬 21 薬剤の MIC 分布を示す。百日咳の一選択治療薬として広く用いられている macrolide 系薬剤はいずれも良好な MIC を示しており、近年報告がみられる erythromycin 耐性菌は認められなかった。tetracycline, minocycline, rifampicin, chloramphenicol, clindamycin, trimethoprim/sulfamethoxazole の MIC もすべて 1 µg/ml 未満であった。一方、streptogramin 系の quinupristin/dalfopristin の MIC は比較的高かった。

いわゆる new quinolone 系薬剤は小児への適応が限られているが、いずれも非常に低い MIC 分布を示していた。β-lactam 系薬剤の MIC 分布は種類により異なっており、最も MIC の低い piperacillin, cefoperazone の MIC₉₀: ≤0.016 μg/ml から cefalexin の MIC₉₀: >256 μg/ml まで広い分布を示していた。経口セフェム薬では cefditoren だけが良好な MIC を示していた。

D. 考察

百日咳の診断方法として、今回我々は培養法と昨年度の本研究班で開発した ndPCR を発生動向調査に用いた。培養法は特異性が高く、gold standard と考えられ、菌株が得られれば分子疫学的解析、薬剤感受性試験も実施可能であり、発生動向調査には不可欠である。その一方で、感度が低く、検出までに時間がかかる欠点がある。ndPCR 法は感度に優れ、検出時間も 4 時間程と短い。検体提出日に結果を報告することができ、臨床現場での有用性は高いと思われる。今回検査を行った 300 検体についても培養法の陽性は 59 件 (19.7%) であったが ndPCR では 112 件 (37.3%) が陽性を示した。ndPCR は今回の検討でも感度、特異度に優れていることが示され、診断の難しい百日咳の大規模な発生動向調査に大変有用であると結論づけられた。

百日咳はワクチンが普及した現在でもしばしば集団発生や院内感染が報告されている。近年ではワクチン株と抗原の異なる菌が急増しており、世界的には患者数が増え続けている一

因と推定され、その実態調査と対策が急務とされている。また、最近では成人発症例が散見され、感染源としても注目されるが、我が国での成人百日咳の実態は不明である。今回は百日咳患者の家族内発症者などを中心に成人百日咳疑い 16 例の検査を行い、3 例の陽性を確認できた。感染ルートとしては家族内感染の他、患者からの感染でない職員同士での病院感染例が認められ、成人百日咳の問題は予想以上に大きいことが推察された。今後、慢性咳嗽患者などを対象とし、成人百日咳の動向調査を行う必要があると思われる。

薬剤感受性試験では近年、海外で問題になっている erythromycin 耐性は検出されず、通常使用される抗菌薬には良好な感受性を示した。小児への適応は限られるが new quinolone 薬の MIC は優れており、今後実態が明らかになれば、new quinolone 薬は成人百日咳の治療薬としての有用性が期待できるものと思われる。

E. 結論

培養法、ndPCR による我が国の百日咳の発生動向調査を行った。ndPCR は成人発症例を含めた百日咳の発生動向調査に有用であった。得られた百日咳菌に erythromycin 耐性菌は認められなかったが、今後も成人発症例を含める百日咳発生動向調査を続ける必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表:

大塚正之、菊池 賢、岡田賢司、東出正人、春藤和哉、砂川慶介、百日咳サーベイランス研究会. 2001年から2002年に分離された *Bordetella pertussis* の薬剤感受性成績と分子疫学的検討. 感染症学雑誌: 78(5):420-427, 2004.

2. 学会発表:

- 1) 大塚正之、春藤和哉、東出正人、菊池 賢、岡田賢司、砂川慶介. 2001年から2003年に分離された百日咳菌の臨床および疫学的検討. 第78回日本感染症学会総会(東京). 感染症学雑誌 78(臨時増刊号): 80, 2004.
- 2) 菊池 賢、朴 春成、戸塚恭一、藤 純一郎、安並 毅、山浦常、大塚正之、東出正人、春藤和哉、岡田賢司、砂川慶介. 近年分離された百日咳菌の薬剤感受性成績. 第52回日本化学療法学会総会(沖縄). 日本化学療法学会雑誌. 52(Suppl. A): 154, 2004.
- 3) 菊池 賢、朴 春成、戸塚恭一、藤 純一郎、安並 毅、山浦常、大塚正之、東出正人、春藤和哉、岡田賢司、砂川慶介. nested PCR による百日咳の迅速診断法. 第52回日本

化学療法学会総会(沖縄). 日本化学療法学会雑誌. 52(Suppl. A): 211, 2004.

- 4) 岡田賢司、大塚正之、菊池賢. 成人百日咳感染の臨床像—小児との違い. 第74回日本感染症学会西日本地方会総会(島根). 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I. 謝辞

百日咳疑い患者の検体をご提供いただきました百日咳サーベイランス研究会(参加施設: 下記)の各担当先生方に深謝致します。

百日咳サーベイランス研究会参加施設(担当者): 旭川医科大学小児科(室野晃一)・旭川厚生病院小児科(坂田宏)・札幌医科大学小児科(堤 裕幸、木下和子)・札幌社会保険総合病院小児科(宇加江 進)・札幌鉄道病院小児科(平賀洋明、成田光生)・北見赤十字病院(渡 智久)・名寄市立総合病院小児科(滝本昌俊、室野晃一、佐藤秀幸)・北海道小児総合保健センター小児科(皆川公夫、今野俊一)・美唄労災病院(佐々木雅一)・国民健康保険黒石病院(青山隆蔵)・弘前市立病院小児科(葛西幹雄)・東北労災病院小児科(遠藤廣子、高柳玲子、沼田美香)・大館市立病院小児科(高橋義博、遠野千佳子、遠藤泰史、太田和子、小松和子、和田忠士)・勝島小児科(勝島矩子)・横山小児科(横山新吉)・福島県立会津総合病院

(酒井英明、青木富美男)・福島県立医科大学小児科(鈴木 仁、鈴木順三)・希望の家療育病院(町田祐一、田中宏子)・桐生厚生病院小児科(桑島 信)・総合太田病院小児科(佐藤吉壮)・越谷市民病院(山本 勉、五十里博美)・埼玉医科大学小児科(佐々木 望、山崎 勉、上原すず子)・みさと健和病院小児科(長谷川裕美)・君津中央病院小児科(田島和幸、森 淳夫)・千葉市立海浜病院小児科(黒崎知道)・千葉大学医学部小児科(黒木春郎、石和田稔彦)・まなこどもクリニック(原木真名)・めぐろクリニック(目黒英典)・永寿堂医院(松永貞一)・国立病院東京医療センター小児科(岩田 敏)・小城医院(小城崇弘)・昭和大学医学部小児科(飯倉洋治、辻祐一郎)・聖路加国際病院小児科(細谷亮太、稲井郁子)・田園調布中央病院(岡秀)・同愛記念病院小児科(青木國輝)・東京女子医科大学第二病院小児科(鈴木葉子)・東京通信病院小児科(保科清)・東京都立駒込病院小児科(高山直秀)・東京都立清瀬小児病院新生児科(磯畑栄一)・博慈会記念総合病院小児科(田島 剛、中山栄一)・慶応大学医学部小児科(新庄正宣、関口進一郎)・東京女子医科大学感染症科(菊池 賢)・北里大学医学部感染症科(砂川慶介)・あざがみ小児科クリニック(阿座上志郎)・伊勢原協同病院小児科(木村和弘、山本敬一)・川崎市立川崎病院小児科(長 秀男、中尾 歩)・けいゆう病院小児科(木村恭子)・大口東総合病院小児科(新納憲司、高橋礼子、吉野谷友香)・昭和大学藤が丘病院小児科(山田耕一

郎、池田祐一)・高宮小児科(高宮 光)・帝京大学医学部附属溝口病院小児科(新保敏和、石黒 精)・平塚市民病院小児科(山田健一郎)・佐渡総合病院小児科(岡崎 実)・福井県立病院小児科(春木伸一)・井上内科小児科医院(井上利男)・山梨赤十字病院小児科(豊永義清、佐野正昭、古市嘉行)・厚生連揖斐総合病院(日江井邦彦、後藤加寿美)・瀬名こどもクリニック(望月康弘)・袋井市民病院小児科(中島俊彦、上村桂一)・名鉄病院小児科(岩井直一)・国立療養所三重病院小児科(庵原俊昭、中野貴司)・PL病院小児科(加藤伴親)・大阪市立総合医療センター小児救急科(塩見正司、外山正生)・大阪労災病院小児科(川村尚久)・森川こどもクリニック(森川嘉郎)・神戸市立中央病院小児科(春田恒和)・こばやし小児科(小林昌和)・川崎医科大学小児科(寺田喜平)・川崎医科大学小児科2講座(尾内一信、川崎浩三、古村 速、竹川剛史、福永真之介)・岡山医療センター小児科(金谷誠久、永礼旬)・岡山赤十字病院小児科(国富泰二)・広島県立広島病院小児科(坂野堯)・社会保険徳山中央病院小児科(内田正志)・山口県立中央病院小児科(村野一郎、吉井英樹、杉尾陽子)・山口赤十字病院(山村泰一、大淵典子)・国立療養所香川病院小児科(岡田隆滋、篠原ゆかり)・高知医科大学小児科(脇口宏、前田明彦、友田隆士)・久留米大学医学部小児科(津村直幹、長井健祐、大津 寧、升永憲治)・社会保険田川病院小児科(佐々木宏和)・福岡市立こども病院感染症センター(青木知信、水野由

美、江口克彦、渡辺高貴)・福岡大学医学部小児科(山口 覚、田中美紀)・国立療養所南福岡病院小児科(岡田賢司)・国立療養所東佐賀病院小児科(下山孝俊、冨永 薫)・やまだ小児科クリニック

(山田秀二)・対馬いづはら病院(島田康)・医療法人松本小児科(松本重孝)・沖縄県立那覇病院小児科(安慶田英樹)

添付図表の説明

表1: 百日咳菌検出における ndPCR と培養法の結果比較

表2: 百日咳菌 52 株に対する各種抗菌薬の MIC 分布

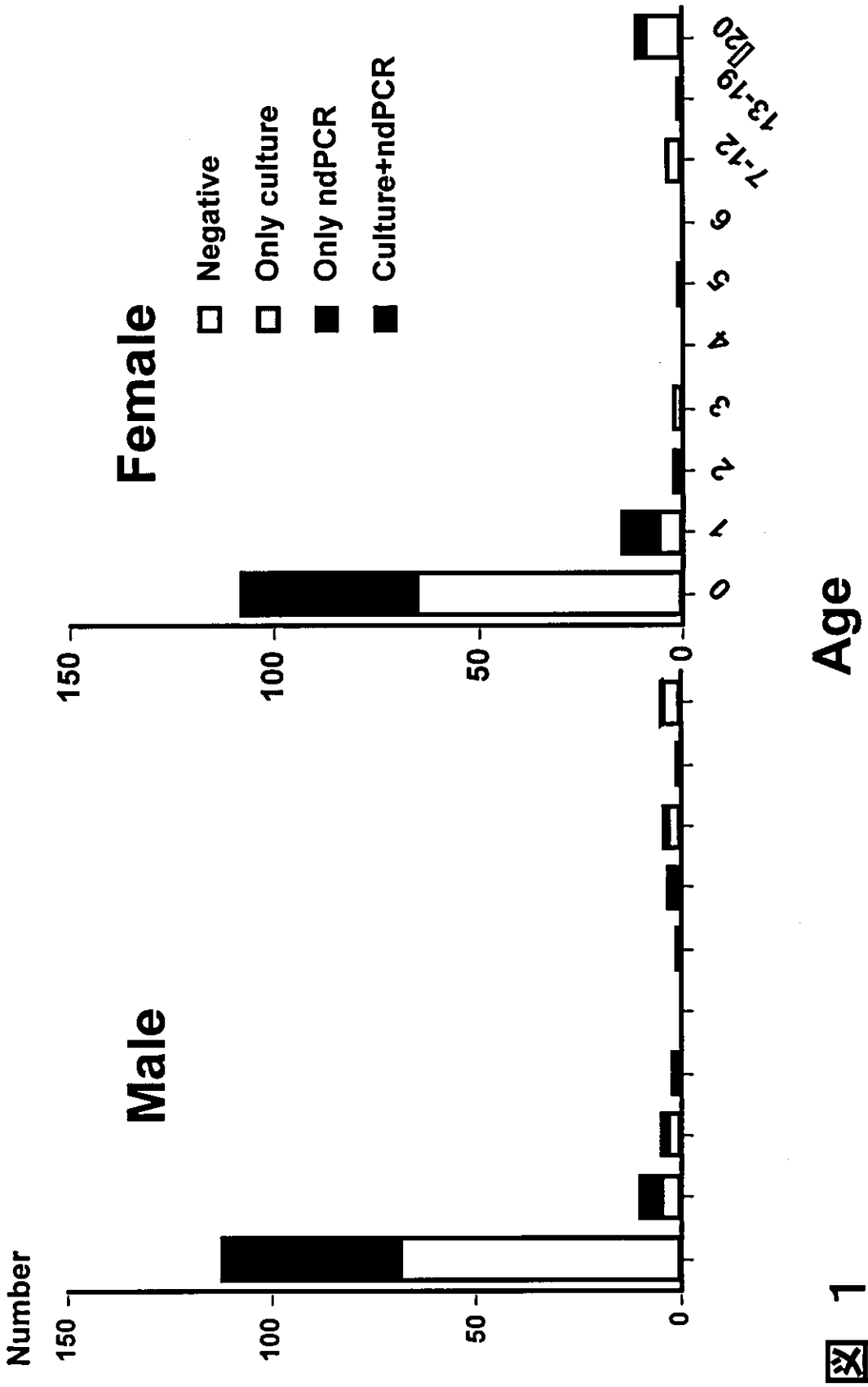
図 1: 百日咳検体の男女別年齢分布と陽性率

図 2: 百日咳検体の提出推移と陽性検体数の変動

図 3: 百日咳検体の提出地域別分布と陽性率

表1 百日咳菌検出における ndPCR と培養法の結果比較

Culture results	nested duplex PCR		Total
	Positive	Negative	
Positive	58	1	59
Negative	54	187	241
Total	112	188	300



1

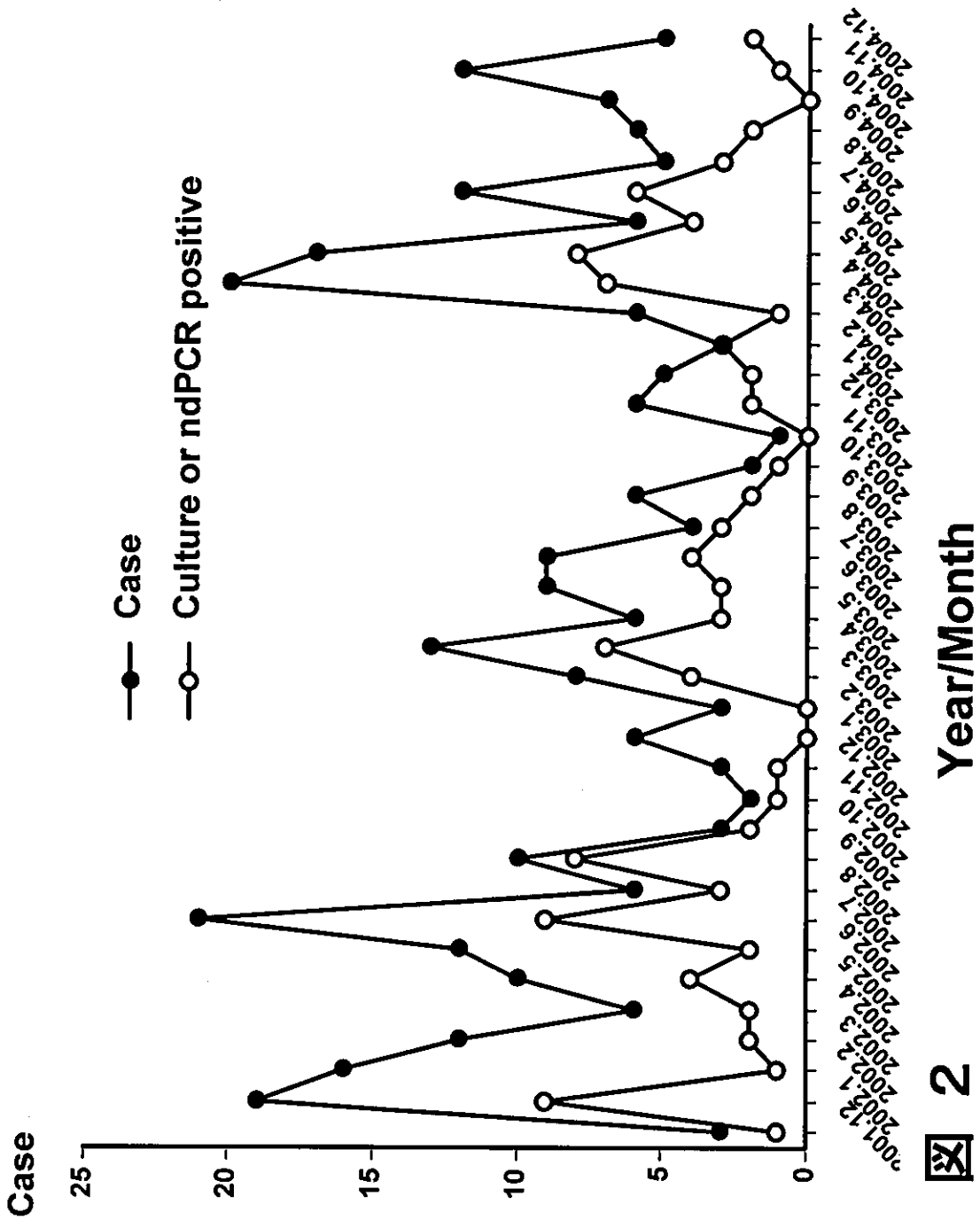
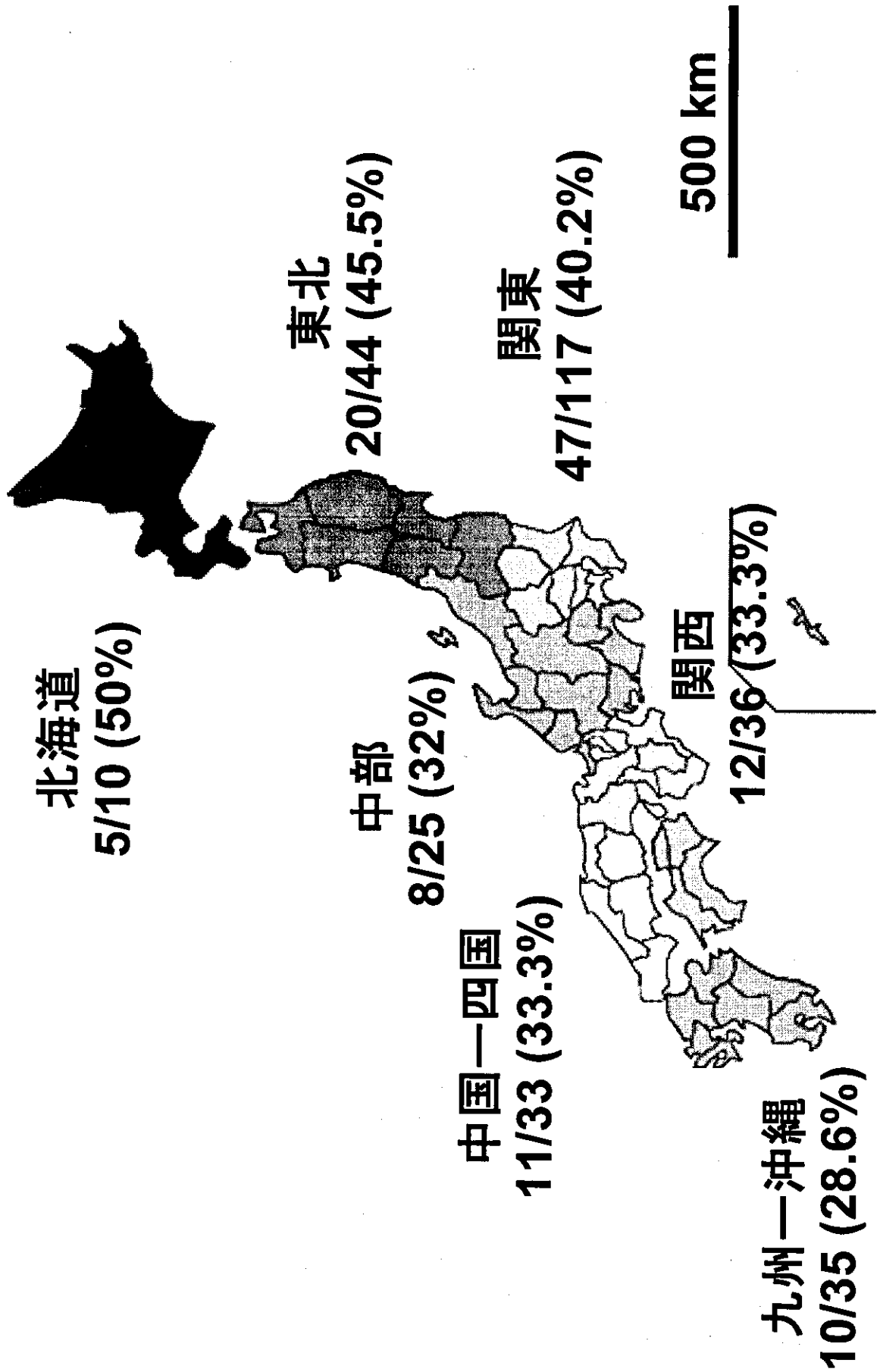


图 2

図3 検体分布と百日咳菌陽性率



厚生労働科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

ジフテリア

高橋元秀 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

協力研究者

岩城正昭、小宮貴子、福田 靖
国立感染症研究所 細菌第二部第三室

研究要旨: (1)ジフテリアの実験室内検査法の早期診断法の確立をめざし、現行PCR法、リアルタイムPCR法およびLAMP法を比較検討した。その結果、当室が実施している現行のPCR法はジフテリア菌DNA検出系として十分実用に耐える半面、LAMP法は今回のプライマーセットを用いた限りでは実用的でなく、またリアルタイムPCRは感度、再現性ともに良好で、今後期待できる実験系であると考えられた。(2)国内標準法であるジフテリアの病原体診断法をジフテリアの散発事例のあるベトナムで検証するために、共同研究として患者から分離された菌株および疫学情報を調査した。

A. 研究目的

ジフテリアは、日本ではワクチン接種の普及に伴い患者の報告は激減し、過去10年間に数例の発生が見られるだけで報告のない年もある。しかし1990年代には、旧ソビエト連邦では大流行があり、ジフテリアのサーベイランスとワクチン接種の重要性が再認識されている。また、欧州ではジフテリア様患者から毒素産生性 *C. ulcerans* の分離報告があり、日本国内でも2001と2002年に2名のジフテリア様患者から本菌が分離・確認された。近年、さまざまな疾病の診

断に分子学的検査法が盛んに導入されており、ジフテリアの検査においても早期且つ簡便な方法が求められている。また、アジア地区ではジフテリアの散発が報告されており、現地の研究室員と交流のあるベトナムにおけるジフテリアの細菌学的診断法および疫学調査を実施し、共同研究として現行の実験室診断の検証と近隣諸国でのジフテリア発生情報を収集し、海外からのジフテリア流入に対する事前対応策に資する。

B. 研究方法

1. 実験室内早期検査法の検討

(1) 鋳型 DNA

Corynebacterium diphtheriae ATCC700971 (NCTC13129) を BHI 液体培地で 37°C、一晩震盪培養し、翌日 1 μg/ml になるように Penicillin G を加えてさらに 2 時間培養を続けたのちに遠心集菌し、Qiagen Genomic Tip 100 と Qiagen Genomic DNA Buffer Set キットを用いて使用説明書に従って総 DNA を調製した。260nm の吸光度で測定した DNA 濃度は 135 μg/mL (ゲノム DNA を 1 μL あたり 5 × 10⁷ コピー含む) であった。これを滅菌水で 10²、10⁴、10⁶、10⁸ 希釈 (1 μl あたり 5 × 10⁵、5 × 10³、5 × 10¹、5 × 10⁻¹ コピー) し、下記の方法で 1 反応あたり 0.5-1 μL を用いた。非毒素原性ジフテリア菌 DMST15613 総 DNA をコントロールとして用いた。

(2) 従来法 PCR

Nakao et al. J. Clin. Microbiol. 1997, 35 (7) 1651-1655 に従って、A サブユニット遺伝子の一部 (248bp) を増幅するプライマーを用いて行なった。DNA ポリメラーゼはタカラバイオ製 Ex Taq を使い、使用説明書に示された比率で試薬を混合し、25 μL で反応を行なった。鋳型 DNA 溶液 0.5 μL を用いた。実験は duplicate で行なった。

プライマー：

Forward (Tox 1)

5'-ATCCACTTTTAGTGCGAGAACCTTCGTCA - 3'

Reverse (Tox 2)

5'-GAAAACCTTTCTTCGTACCACGGGACTAA - 3'

温度設定：

95°C 2分

↓

95°C 20 秒

55°C 30 秒

72°C 1 分 (35 サイクル)

↓

72°C 10 分

反応生成物 5 μL を 1% アガロースゲル電気泳動して増幅の有無をみた。

(3) リアルタイム PCR

Mothershed et al. J. Clin. Microbiol. 2002, 40 (12) 4713-4719 に従って、A サブユニット、B サブユニットそれぞれのプライマー、プローブを調製し、Applied Biosystems 社 ABI Prism 7000 型リアルタイム PCR 装置を用いて 5'-FAM、3'-TAMRA の設定で実験を行なった。反応試薬は TaqMan Universal PCR Master Mix を使い、説明書に従って下記の温度設定で 50 μL で反応を行なった。鋳型 DNA 溶液は 1 μL を用いた。実験は duplicate で行なった。プライマー、プローブ：

A サブユニット用セット

Forward primer: GGCGTGGTCAAAGTGACGTA

Reverse primer: CTTGCTCCATCAACGGTTCA

Probe FAM-CCAGGACTGACGAAGGTTCTCGCACT-TAMRA

B サブユニット用セット

Forward primer CGCCCTAAATCTCCTGTTTATGTT

Reverse primer GTACCCAAGAACGCCTATGGAA

Probe

FAM-TTCACAGAAGCAGCTCGGAGAAAATTCATTC-TAMRA

温度設定：

50°C 2分

↓

95°C 10分

↓

95°C15 秒

60°C1 分 (40 サイクル)

結果はリアルタイム PCR 装置付属のソフトウェアで解析した。

(4)LAMP 法

栄研化学製 LoopAmp DNA 増幅試薬キットを用い、説明書に従って試薬を混合し、25 または 50 μ l で反応を行なった。反応溶液 25 μ l あたり 0.5 μ L の鋳型 DNA 溶液を用い、反応は 64°C で 1 時間行なった。反応生成物 1 μ L を 1%アガロースゲル電気泳動し、増幅の有無をみた。プライマーは栄研化学 web サイトで無料運用中のプライマー設計ソフトウェア Primer Explorer version2 (<https://biodb.netlaboratory.com/lamp/index.html>) を用いて 3 種類の異なるプライマーセット (いずれも A サブユニット) を設計した。

プライマーセット 1

F3 TCTCACTGAACCGTTGATGG

B3 TTTCTGCACAGGCTTGAG

FIP GCACTACACGCGAAGCACCACCAAGCAAGTCGGAAACGGAAGA

BIP AACTGGGAACAGGCGAAAGCGTCTTGGCCACGTTTCCAC

プライマーセット 2

F3 CAAGTCGGAACGGAAGAGTT

B3 TTTCTGCACAGGCTTGAG

FIP TCCCTCAGCGAAGGGAAGGTCAAAGGTTTCGGTGATGGT

BIP TAACTGGGAACAGGCGAAAGCGTCTTGGCCACGTTTCCAC

プライマーセット 3

F3 GTGTAGTGCTCAGCCTTCC

B3 ACCTACTGATCGCCTGACAC

FIP AACGCTTTTCGCTGTTCCTCA-CTTCGCTGAGGGGAGTTCT

BIP TGAACCCGTGGAAACGTGGC-TTTCCTGCACAGGCTTGAG

PCR 試験法は、ジフテリア菌の DNA を

Qiagen 社の QIA amp blood キットを用いて単離後、毒素遺伝子の一部を増幅した。使用したプライマーは、ジフテリア毒素の A サブユニットの N 末端の部分に対応する DNA の 248 塩基対を増幅するように設計した。この方法では 50 cfu のジ菌を検出可能であることを予備試験で確認した。

2. ベトナムにおけるジフテリアの病原体診断と疫学調査：ベトナムにおける各疾病の国家検査機関は、ハノイにある National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) が中心となっている。NIHE の細菌部門の担当者とともに、ワクチン類の国家検定機関である National Center for Quality Control of Medicinal Biological Products (CENCOBI) の DPT ワクチン品質管理担当者を訪問し、ジフテリアの予防、診断および治療に関する情報交換を行い、共同研究に対する支援を要請した。

(倫理面への配慮) 本年度はヒト検体は扱わない。動物実験に関しては、「動物の保護及び管理に関する法律」(昭和 48 年法律第 105 号) 及び「実験動物の飼育及び管理に関する基準」(昭和 55 年総理府公示第 6 号) の法律基準のほか、「大学等における実験動物について」(文部省国際学術局長通知、文学情大 141 号) の通知を踏まえつつ、使用する実験動物が有効かつ適切に行われるように配慮する。また、国立感染症研究所内の動物実験指針に基づき、年度ごとに実験計画書を提出・審査を受け、用いる動物数は最小限とし、採血時には動物愛護の精神を基に実験を行っている。

C. 研究結果

1. 早期検査法の比較検討

(1) 通常の PCR : 精製ジフテリア菌 DNA を用いて検出感度の検討を行なったところ、図 1 に示すように精製 DNA 25 コピーを安定して検出することができた (duplicate の両方ともバンドが検出された)。Nakao らによれば、この方法での検出限界はジフテリア菌 50-500cfu であるという。Nakao らのように菌体から出発した場合には、そこに存在する菌体 (生死を問わず) のすべてが溶菌するとは考え難く、その意味で、精製 DNA から出発した場合より効率が低いと期待される。しかしその一方で、そこに存在する生菌のすべてがプレート上でコロニーを形成するとも考え難く、死菌も DNA を含んでいることを考えると、cfu 以上の「個数分」の DNA がそこには存在していると考えられる。これらのことを考えると、今回の実験で得られた 25 コピーという数字を cfu に換算することは困難である。従って次のステップは、生菌を出発材料とした同様の検討ということになる。操作の簡便性が実験系構築の大きな条件でもあるので、DNA 抽出は最低限の手間で、加熱抽出などが望ましいと考えられる。これらのことは、以後に述べるリアルタイム PCR と LAMP 法に関しても同様である。

(2) リアルタイム PCR は通常の PCR よりも高感度であることが期待されたと同時に、定量性が得られることも期待された。Mathershed らによる方法で実際に実験を行なってみたところ、A サブユニット遺伝子、B サブユニット遺伝子ともに 50 コピーを問題なく検出することができ、

50-5x10⁷ コピーの間でよい定量性がみられた (図 2、図 3)。図の曲線はそれぞれ duplicate の試料で得られた曲線である。再現性も良好であることがわかる。Mathershed らによれば検出感度は 2cfu ということであるが、今回はそこまでの検出感度は実現できなかった。

(3) 今回の実験では、LAMP 法が最も高感度であることが期待されたが、結果はその逆で、最も感度が低かった。プライマーセット 2 で duplicate の片方で 25 コピーの鋳型 DNA を検出できたが、それ以外では感度はそれ以下であった (図 4-図 6)。なお図で positive control とあるのは、キット付属のプライマー・鋳型セットである。

LAMP 法はプライマーの設計の困難さで知られる。今回の実験において検出感度が期待より低かったことから、用いたプライマーが最適のものでなかった可能性が考えられる。手間を惜しまず多種類のプライマーを用いた検討を行なえば、極めて高感度のアッセイ系が構築できる可能性はまだ残されている。

LAMP 法はプライマーの設計の困難さで知られる。今回の実験において検出感度が期待より低かったことから、用いたプライマーが最適のものでなかった可能性が考えられる。手間を惜しまず多種類のプライマーを用いた検討を行なえば、極めて高感度のアッセイ系が構築できる可能性はまだ残されている。

2. ベトナムの調査 : NIHE はベトナム中央の国家検査機関であるが主に北部地域が所轄であり、中央部はニヤチャンのパ