

ともに PBP3 遺伝子の PCR プライマーとアニールする領域に、アミノ酸変異を引き起こさない、サイレントな変異が入る等の可能性も示唆されたため、その理由について引き続き詳しい解析が必要である。一方ペニシリン系薬の小児 *H. influenzae* 肺炎に対する臨床効果から見ると、起炎菌に対する ABPC の MIC が $2 \mu\text{g/ml}$ の場合ペニシリン系以外の抗菌薬に比べて治療効果は劣らないという報告があり、治療薬選択という目的のためならば、日常的な細菌検査の現場における遺伝子学的方法を用いての *pbp3* 変異型判定の実用性は低いかも知れない。今回用いた試薬は、Wild 株として Rd KW20 株、BLNAR 株として ME870 株の、*ftsI* の大部分重なる領域を標的配列として、変異塩基を 3' 末端としてプライマーを設計し、3' 末端の塩基のミスマッチによる増幅効率の差を利用して野生型と変異型とを区別することを意図している。しかしながら今回の実験では Rd KW20 型配列にアニールするプライマーと ME870 型配列にアニールするプライマーの両方で増幅するものが数株あり、この原因については、細菌の膜の変化やプライマー領域のサイレントな変異など複数の因子が関与している可能性を考慮し、今後も引き続き検討課題としたい。PBP3 は、セファロスポリン系薬の主たる標的分子であるため、PBP3 変異株はセファロスポリン系薬に対する感受性に、より強く影響を受けると言われてきた。我が国では、これまで経口セファロス

ポリン系薬が、外来施設で多用されてきたのも事実である。その結果、ペニシリン系薬よりもセファロスポリン系薬に対してより抵抗性を示す PBP3 変異株が選択されて来たとも指摘されている。最近、ファロペネムなどの新しい系統の経口薬も認可され、外来診療現場において利用されるようになり、インフルエンザ菌を含む市井感染症、急性呼吸器感染症、耳鼻咽喉科領域感染症の起炎菌における薬剤感受性の動向を引き続き監視を継続する必要がある（荒川）。

E. 結 論

研究対象病原体が 4 種類であることより、百日咳・ジフテリア菌グループとマイコプラズマ・インフルエンザ菌グループに分けて、患者材料や患者情報の収集がスムーズに行く体制（国立感染症研究所—地方衛生研究所—医療機関及び分担研究者—医療機関）を整備しつつ、研究を行った。第三年度の特記すべき研究成果は、百日咳・ジフテリア菌においては、1) Prn 欠損株の解析から、わが国において認められる抗原シフトには、IS481 による遺伝子破壊が関与する可能性が指摘された。2) LAMP 法による *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* の検出系（LAMP-IS481, LAMP-IS1001, LAMP-PTX）を開発した。これらの方法はいずれも 2 時間以内に結果が得られ、特別な機器を要せず、簡便、安価、優れた感度から、我が国

の百日咳の今後の発生動向調査に広く適用可能であると考えられた。3) 今回の調査では小児科を受診した患者から *C. diphtheriae* および *C. ulcerans* は分離できなかつた。百日咳菌は患者と診断された5人のうち1人から分離することができた。我が国では予防接種により抗体保有率が高く維持されており、これらの菌による国内での感染は少ないと考えられた。しかし、百日咳菌は、我が国に常在していることから、ワクチン未接種者の感染に注意を払う必要のあることが示唆された。

肺炎マイコプラズマにおいては、1) 日本において *M. pneumoniae* の臨床株の多くは、現在 I 型菌が占めていることが明らかになった。しかし、II 型亜種菌も以前より多く見られるようになってきている。今回、II 型亜種も検出型別できる nested PCR 法をデザインしたが、この方法は従来の *M. pneumoniae* の検出法よりも感度が高かつた。これは *M. pneumoniae* の早期診断法としても利用価値が高いと考える。2) マクロライド耐性肺炎マイコプラズマによる肺炎では、発熱期間の延長は認められるものの、臨床経過が必ずしも重症化する傾向は認められていない。したがって当面は、現行の14-, 15-員環マクロライド剤を第1選択とした肺炎の治療で大きな問題は起こらないものと考えられる。一方で治癒遷延例あるいは重症例で、かつ耐性菌による感染が強く疑われる際には、以前に本研究にても報告した

ごとくテトラサイクリン系、あるいはニューキノロン系薬剤投与の必要性を考慮すべき場合も有る。

インフルエンザ菌においては、1) インフルエンザ菌は、小児肺炎の原因微生物として最も多く 35.5% で検出されたが、他の微生物との混合感染例も多く、単独で原因微生物と判定されたものは、16例 (10.3%) であった。単独感染症例についてのみ検討すると、インフルエンザ菌による症例は *M. pneumoniae* による症例に比べて、有意に年齢が低く、経過中の最高白血球数は有意に高値であった。2) 呼吸器由来 *H. influenzae* 臨床分離株の β -ラクタマーゼ産生株及び β -ラクタマーゼ非産生株を *pbp3* 遺伝子変異の型により群別し、各種 β -ラクタム薬に対する感受性を群間で比較した結果、 β -ラクタマーゼ非産生株の方が Wild 型株と BLNAR 型株の感受性の差が大きくなる事が確認された。しかし、Low-BLNAR 型株は、 β -ラクタマーゼ産生株及び β -ラクタマーゼ非産生株ともに Wild 型株との感受性の差は大きくはなかつた。BLNAR 型変異株の大部分は ABPC の MIC が $4 \mu\text{g/ml}$ 以上でありその鑑別は β -ラクタマーゼ活性と ABPC の MIC を測定すればほぼ可能であると考えられる。しかし、その際には ABPC の MIC が $2 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$ の株の中には BLNAR 型株も存在することに留意する必要がある。BLNAR 型変異株ではセファクロル、セフカペン、セフポドキシムで感受性が低下し、また低頻度ながらセフォタキシム、セフタ

ジジムに非感受性の株も見られたため、それらの動向について引き続き監視と解析が必要と考えられる。

F. 健康危機情報

- ① 海外では、ジフテリア菌の常在地も存在することから、検査体制を維持し、サーベイランスによる患者情報の把握を継続していく必要がある。
- ② 2000年以後の日本においては肺炎マイコプラズマ野生株の約15%がマクロライド耐性であり、全有熱期間の中央値は感受性群で5日（平均5.5日）であったのに対し、耐性群ではこれが8日（平均9.2日）と有意に延長していた。マクロライド耐性 *M. pneumoniae* に感染した患者の治療におけるマクロライド投与については、今後検討の余地がある。
- ③ β -ラクタマーゼ非産生で PBP3 が変異した *H. influenzae* は第3世代セファロスポリンのセフォタキシム、セフトラジジムでも感受性低下の程度が見られ、まだ頻度は低いものの感性の範疇 (MIC, $\leq 2 \mu\text{g/ml}$) を越える株も散見されるため、それらの動向については、今後も引き続き監視が必要と考えられる。

G. 研究発表

(分担研究者については各々の報告書に記載)

1. 佐々木次雄, 久保田眞由美, 成田

光生, 荒川宜親. マクロライド耐性マイコプラズマ感染症に関する研究. *Jpn. J. Antibiotics*, 58 (Suppl.): A133-137, 2005.

2. Suzuki S., Yamazaki T., Narita M., Okazaki N., Suzuki I., Andoh T., Matsuoka M., Kenri T., Arakawa Y., and Sasaki T. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 709-712, 2006.
3. Seki N., Sasaki T., Sawabe K., Sasaki T., Matsuoka M., Arakawa Y., Marui E. and Kobayashi M. Epidemiological studies on *Bartonella quintana* infections among homeless peoples in Tokyo, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 59: 31-35, 2006.
4. Huong P. L. T., Thi N. T., Anh D. D., Huong V. T. T., Minh L. N., Canh T. Q., Matsuoka M., Kamachi K., Yamazaki T., Arakawa Y., and Sasaki T. Genetic and Phenotypic characterization of *Haemophilus influenzae* type b isolated from children with meningitis and their family members in Vietnam. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 59:xxx, 2006.

H. 知的所有権の取得状況

該当するものなし

II. 分担研究報告書

わが国における百日咳流行株の遺伝子変異
－ パータクチン欠損株の解析－

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

わが国で分離された百日咳臨床分離株を対象に、定着因子であるパータクチン（Prn）遺伝子の発現を解析した。1990—2005年に分離された臨床分離株（80株）を解析したところ、Prn欠損株は18株（23%）に認められ、その分離率は1997年以降増加傾向にあることが示された。遺伝子解析により、Prn欠損はワクチン型百日咳菌に特異的な現象であること、さらに欠損原因はシグナル配列の欠失（12株）とIS481の挿入（6株）であることが明らかとなった。なお、PFGE解析により、シグナル配列の欠失株は同一起原、一方IS481挿入株は遺伝的に異なることが示された。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おり、この抗原シフトにIS481による遺伝子破壊が関与する可能性が指摘された。

研究協力者

蒲地一成（国立感染症研究所 細菌第二部）

大塚正之（江東微生物研究所）

佐々木裕子（国立感染症研究所 細菌第二部）

豊泉裕美（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る。百日咳ワクチンの導入によって世界の百日咳患者数は激減したが、近年欧米諸国では患者数が増加傾向にある。この原因は不明であるが、ワクチン既接種者である青年・成人層での罹患率増加が一因であると考えられている。細菌学的解析からは、流行株の遺伝子変異が報告され、世界の流行株はワクチン型から抗原変異型

に入れ替わっていることが報告されている。この流行株の入れ替わりは抗原シフトと呼ばれ、遺伝子変異は主に百日咳毒素S1サブユニット（*ptxS1*）とパータクチン（*prn*）に認められている。

わが国では抗原シフトは1990年代半ばから認められ、流行株に占める抗原変異株の割合は増加傾向にある。欧米諸国では抗原シフトと患者数増加の時期が一致することから、抗原変異株はワクチンによる免疫防御を回避するために出現した可能性が指摘されている。しかし、いまだ抗原シフトの原因となる遺伝子等は見いだされておらず、その発生原因は不明のままである。

本研究事業ではわが国の抗原シフトを解析することを目的に実施し、昨年度の研究においてパータクチン蛋白質（Prn）を欠損する菌株の存在を確認した。Prnは菌の宿

主への定着に関与することから、本研究では Prn 欠損株と抗原シフトの関係について考察を行なうことを目的に、Prn 欠損株の出現状況ならびにその遺伝子解析を実施した。

B. 研究方法

菌株：1990—2005年にわが国で分離された百日咳臨床分離株（80株）を供試した。供試した菌株中、*ptxS1B/prn1*の遺伝子を持つワクチン型菌株は55株、抗原変異型（*ptxS1A/prn2*）は17株、変遷型（*ptxS1A/prn1*）は8株であった。

Prn発現解析：菌体より全蛋白質をSDS-lysis bufferを用いて加熱抽出し、蛋白質濃度をTCA-Lowry法により測定した。全蛋白質1 µgを10% SDS-PAGEで分離後、抗Prn2抗体を用いたイムノブロット法により解析した。なお、検出にはLAS-3000を用いた。

シーケンス解析：Prn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。なお、プライマーは百日咳菌東浜株のゲノム情報を元に作製した。シーケンス解析にはABI PRISM 3100 Genetic Analyzerを使用し、得られたDNA配列はSEQUENCHER DNA sequencing software (Gene Codes)を用いてアッセンブリーを行なった。

パルスフィールド電気泳動：PFGEは常法に従い、制限酵素XbaIを用いてワクチン型菌株（55株）について実施した。系統樹解析にはUPGMA法を用いた。

（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

イムノブロット法により、抗原変異株とワクチン型百日咳菌におけるPrn発現を解析したところ、Prn欠損株はワクチン型菌株に多く存在することが示された（図1）。そこで、臨床分離株80株についてPrn発現の有無を調べたところ、Prn欠損株は抗原変異型および変遷型百日咳菌には認められず、ワクチン型に特異的な現象であることが示された（表1）。さらに分離時期とPrn発現の関係を調べたところ、Prn欠損株は1990—1995年には認められなかったものの、1997年以降その分離率が徐々に上昇していることが明らかとなった。このPrn欠損株は1997—2000年には関東地方のみで分離されていたが、2001—2005年では全国の各地域から分離されていることが判明した（図2）。

Prn欠損株（18株）のPrn遺伝子についてシーケンス解析を行なったところ、Prn欠損は2種のメカニズムによって引き起こされていることが判明した。一つはPrn蛋白質のシグナル配列の欠失であり、もう一つは挿入配列IS481による遺伝子破壊であった。Prnのシグナル配列欠失株は12株認められ、そのすべてが同一箇所での欠失（28aa）であった（図3）。一方、IS481の遺伝子挿入は1598位のAGG/CAGに認められ、6株とも同じ位置での挿入であった。しかし、IS481の挿入方向には違いが認められ、5株はトランポゼースの正方向での挿入、1株は逆方向での挿入であった（図4）。

PFGEによりPrn欠損株の遺伝的相同性を解析したところ、シグナル配列欠失株は1株を除き全て同じ遺伝子型を示し、これらの菌株は遺伝的に同一な菌株であること

が示された(図5)。一方、6株の IS481 挿入株は4種の遺伝子型に分類され、6株中4株は遺伝的に異なることが明らかとなった。

D. 考察

本研究は Prn 欠損株の出現状況を調査し、その欠損理由を遺伝子レベルで明らかにすることを目的に実施した。その結果、分離率が減少傾向にあるワクチン型菌株に Prn 欠損株が多く発生していることが明らかとなった。この Prn 欠損株の分離率は近年増加傾向にあるが、わが国の罹患者数の増減は認められていない。Prn は宿主細胞への定着に関与する重要な蛋白質と考えられており、Prn 欠損株のヒトへの定着には他の因子が関与している可能性が指摘された。今後、Prn 欠損株の定着力について詳細な検討を行ない、百日咳感染における Prn の役割について再考することが必要である。なお、市中における Prn 欠損株の流行を示した報告例は無く、本研究が初めての発見である。

今回、Prn の欠損原因として1) 挿入配列 IS481 による遺伝子破壊、2) シグナル配列の欠失が明らかとなった。シグナル配列を欠失した菌株は単一なクローンであったが、IS481 の挿入株は遺伝的に異なることが示された。このことから、IS481 による遺伝子破壊はワクチン型百日咳菌の間で一定の頻度で生じているものと考えられた。IS481 は百日咳菌のゲノム上に 50—280 コピー程度存在することが知られており、この IS481 はゲノム上を自由に飛び回ることが可能である。IS481 は菌の生育にとって必須な遺伝子 (house keeping gene) にも一定の頻度で挿入されているものと考えられ、これらの遺伝子が破壊された場合、菌は生

育することができない。本研究ではワクチン型百日咳菌にのみ IS481 による遺伝子破壊が認められたことから、IS481 はワクチン型に数多く存在している可能性が強く示唆される。IS481 による遺伝子破壊が近年の抗原シフトに関与する可能性は高く、今後、ワクチン型と抗原変異型菌株における IS481 のコピー数の違いについて詳細な検討が必要である。

E. 結論

Prn 欠損株の解析から、わが国において認められる抗原シフトには、IS481 による遺伝子破壊が関与する可能性が指摘された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, Horiuchi Y, Kojima K, Takahashi M, Arakawa Y. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol (in press)

2. 学会発表

蒲地一成、大塚正之、菊池賢、堀内善信、荒川宜親、我が国における百日咳抗原変異株の発生動向について、第79回日本感染症学会総会、平成17年4月、愛知

蒲地一成、岡田賢司、堀川和美、村上光一、豊泉裕美、落合雅樹、山本明彦、片岡紀代、堀内善信、荒川宜親、百日咳 outbreak から分離された百日咳菌の抗原遺伝子解析、第

78 回日本細菌学会総会、平成 17 年 4 月、
東京

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許出願

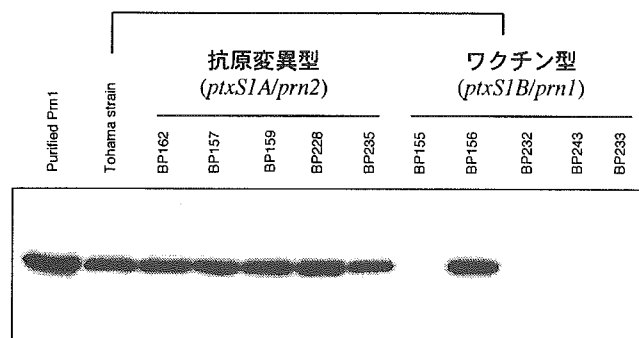


Fig. 1 ワクチン型と抗原変異型百日咳菌における Prn の発現
全蛋白質 (1 µg) をイムノブロッティング解析に供試

表1 パータクチン発現と菌型との関係

菌型 (<i>ptxS1/prn</i> alleles)	分離年	菌株数 (n)	Prn 発現の有無 (%) ^a	
			(+)	(-)
ワクチン型 (<i>ptxS1B/prn1</i>)	1990-1995	15	15 (100)	0 (0)
	1996-2000	20	15 (75)	5 (25)
	2001-2005	20	7 (35)	13 (65)
抗原変異型 (<i>ptxS1A/prn2</i>)	1994-2005	17	17 (100)	0 (0)
変遷型 (<i>ptxS1A/prn1</i>)	1990-2003	8	8 (100)	0 (0)

^aイムノブロット解析

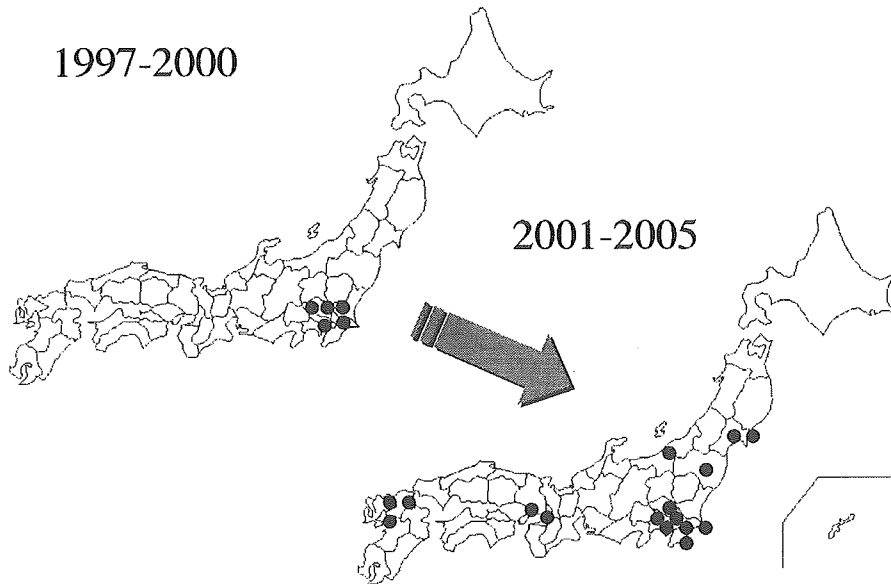


Fig. 2 Prn 欠損株の発生状況
黒丸は分離場所を示した

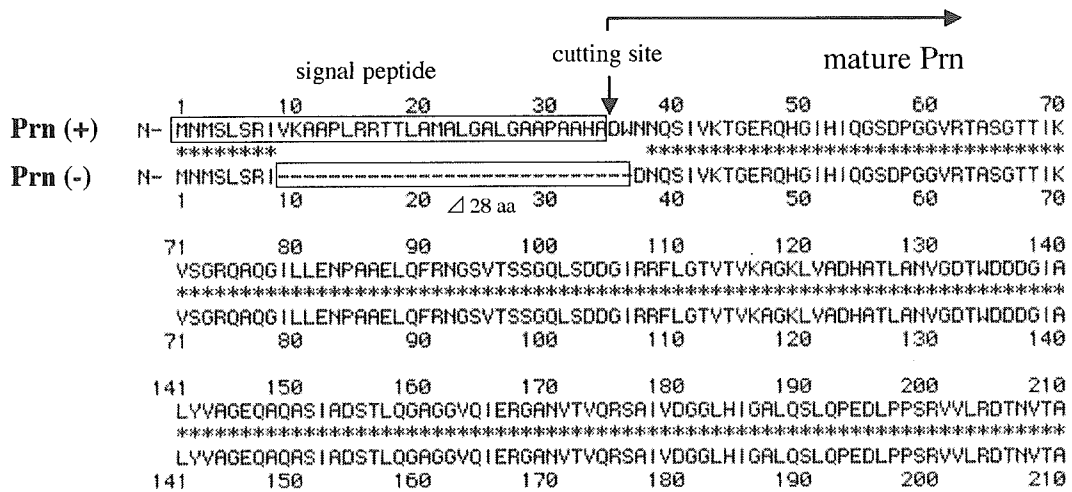


Fig. 3 Prn 欠損株におけるシグナル配列の欠失 (12 株)
N 末端領域の配列を表示

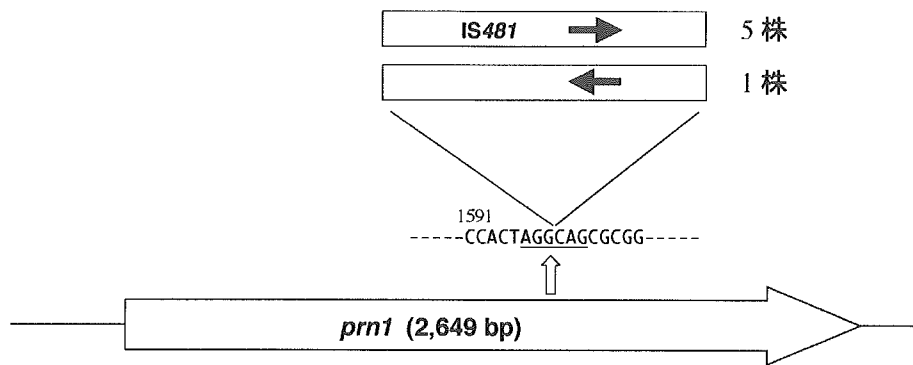


Fig. 4 Prn 欠損株（6 株）における IS481 の挿入位置
IS481 遺伝子の矢印はトランスポゼースの転写方向を示した

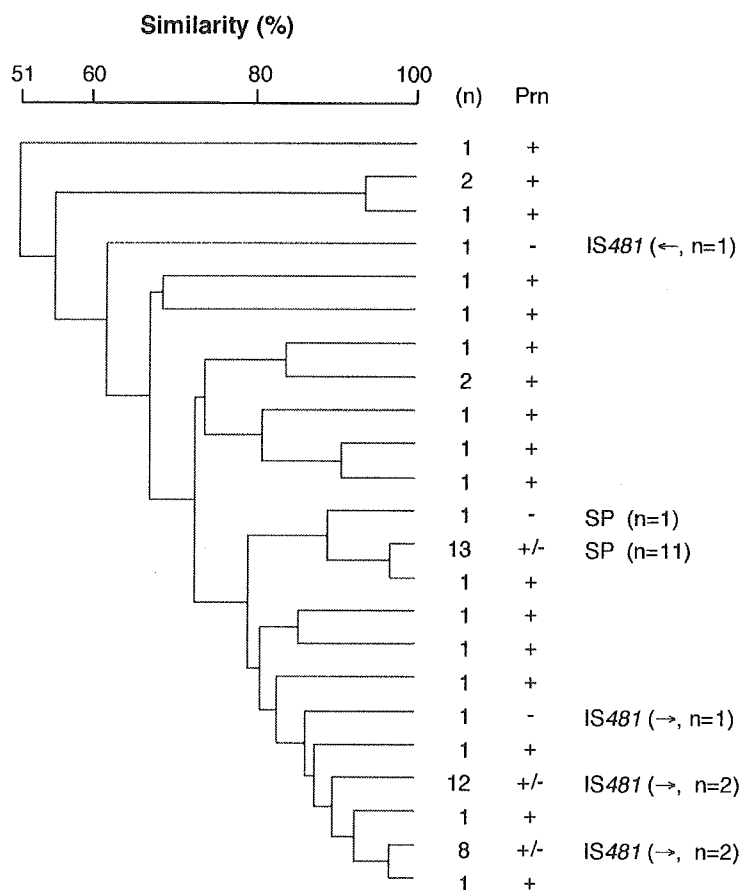


Fig. 5 ワクチン型菌株における Prn 欠損株の遺伝子型
矢印 (→) は IS481 の挿入方向を、SP は Prn のシグナル配列欠失株を示した

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

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法による百日咳迅速診断方法の開発

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)

国立病院機構福岡病院 小児科

岡田賢司(協力研究者)

研究要旨: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による百日咳の迅速診断法の開発を行った。LAMP 法による検出系として、*Bordetella pertussis* IS481, pertussis toxin promotor (PTX), *Bordetella parapertussis* IS1001 のそれぞれ 3 種類を設計し、培養法、IS481-IS1001 の nested duplex PCR (nPCR) 法と比較検討した。各 LAMP 法は nested PCR に比べ、10-100 倍の検出感度(0.1-2.5 copies/tube)を示し、特異性にも極めて優れていた。検出時間は 30-70 分であり、検体からの DNA 抽出時間を含めても 2 時間以内に検査結果が得られた。全国 88 施設の小児科より寄せられた百日咳疑いの臨床検体(鼻咽頭スワブ)からの検体陽性は培養 59 (19%)、nested PCR (IS481) 109 件 (35%)、LAMP-IS481 158 件 (51%)、LAMP-PTX 72 件 (23%)であった。臨床検体から *B. parapertussis* は培養、nPCR、LAMP-IS1001 のいずれによっても検出されなかった。LAMP 法による百日咳診断法は特別の機器を必要とせず、ベッドサイドでの診断も可能であり、百日咳の簡便かつ迅速な診断法として、今後、成人百日咳などを含む百日咳の臨床現場での診断、疫学調査に極めて有用であると考えられた。

A. 研究目的

本研究で開発した nested duplex PCR 法は臨床現場へ応用可能な検出感度、検出時間が得られたものの、特殊な機器

を必要とし、作業は煩雑で熟練を要し、十分に満足できるものとは言い難かった。百日咳—特に診断の困難な成人百日咳—の疫学調査には、どこでも使用可能な、

簡便な検出方法の開発が求められていた。今回、我々はnPCR法や培養法に代わる百日咳の迅速診断法として loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による *B. pertussis*, *B. parapertussis* の検出系を開発した。

B. 研究方法

百日咳菌検出系として *Bordetella pertussis* IS481, pertussis toxin promotor (PTX), パラ百日咳菌検出系として *Bordetella parapertussis* IS1001 の特異領域にそれぞれ4本の loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primer を、IS481, IS1001, には1本、PTX には2本の loop primer を Primer Explorer V3(<https://primerexplorer.jp/lamp3.0.0/index.html>) を用いて設計した。表1に使用プライマーを示す。プライマーは全てHPLC精製品 (Operon Biotechnology, 東京) を用いた。LAMP 反応には *Bst* DNA polymerase を含む Loopamp DNA 増殖試薬キット (栄研化学、東京) を用い、FIP, BIP primer 各 40 pmol, F3, B3 primer 各 5 pmol, loop primer 20 pmol、全量 25 μ l とし、thermal cycler GeneAmp PCR System 9600-R (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA) または LAMP 用リアルタイム濁度検出器 Realoop-30 (Moritex, つくば、茨城) を用い、63°C、60–90 分—80°C、2 分で反応を行った。使用菌株は *B. pertussis* CCUG 30873^T, *B. pertussis* ATCC 8467, *B. pertussis* Tohama, *B. pertussis* TWCC 40218, *B. pertussis* TWCC 40260, *B. parapertussis* CCUG 413^T,

B. avium CCUG 13726^T, *B. bronchiseptica* CCUG 219^T, *B. hinzii* CCUG 22847^T, *B. holmesii* CCUG 34073^T, *B. holmesii* CCUG 33848, *B. holmesii* CCUG 34074, *B. holmesii* CCUG 47500, *B. petrii* CCUG 43448^T, *B. trematum* CCUG 32381^T とし、10% skim milk 中 -85°C で保存し、随時 Bordet-Gengou 培地 または *Bordetella*-CFDN 培地で、37°C、3–5 日間の好気湿潤培養を行い、使用した。TE buffer で MacFarland 2.0 に調整した菌液を 100°C、15 分煮沸し、18,500 X g, 5 分間遠心した上清を DNA 粗抽出液とした。2001 年 12 月より 2004 年 12 月までに全国 88 の登録医療施設で百日咳疑い患者より得られた鼻咽頭スワブ 310 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 300 μ l 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 50 μ l は 100°C、15 分間煮沸し、18,500 X g、10 分間遠心し、上清を nPCR 法、LAMP 法用のサンプルとした。nPCR 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。LAMP法は目視及び濁度計による濁度測定で判定を行った。

(倫理面への配慮)倫理規定に沿った。

C. 研究結果

LAMP法検出感度・検出時間

図1にLAMP-IS481による*B. pertussis* CCUG 30873^Tの検出感度・検出時間を示す。検出限界は0.1 copies/tubeで、75分までに陽性になっている。nPCRの検出限界である10 copies/tubeでは60分以内に陽性となっており、2段階のPCRが必要なnPCRよりも短い時間で検出可能な系であることがわかる。

図2にLAMP-PTXによる*B. pertussis* CCUG 30873^Tの検出感度・検出時間を示す。検出限界はLAMP-IS481と同じ0.1 copies/tubeで、70分までに陽性になっている。nPCRの検出限界である10 copies/tubeでは40分で陽性となっており、LAMP-IS481同様、極めて短い検出時間であることがわかる。

図3にLAMP-IS1001による*B. parapertussis* CCUG 413^Tの検出感度・検出時間を示す。検出限界はLAMP-IS481、LAMP-PTXよりも更に低く、0.01 copies/tubeで、70分までに陽性になっている。nPCRの検出限界である10 copies/tubeでは50分で陽性となっており、他のLAMP2法と同等の極めて短い検出時間であることがわかる。いずれの方法も検体処理を含めて、2時間以内に検査結果が得られていた。

表2にはLAMP3法による*Bordetella*

属の各菌種の反応を示した。LAMP-PTXは*B. pertussis*のみ陽性となるが、LAMP-IS481では*B. holmesii*でも陽性となり、これのみで百日咳の診断はできない。LAMP-IS1001は*B. holmesii*、*B. parapertussis*で陽性となるため、LAMP-IS481との組み合わせで*B. pertussis*陽性の判断が可能となる。

表3には臨床検体310件に対する、培養法とnPCR、LAMP-IS481、LAMP-PTXの比較成績を示す。今回検討した検体から*B. parapertussis*、*B. holmesii*は培養、nPCR、LAMP-IS1001いずれの方法でも検出されなかった。*B. pertussis*は培養法では59件(19.7%)、nPCRでは112件(37.8%)陽性になった。一方、LAMP-IS481では158件(51.0%)が陽性となった。培養陽性検体59検体中58件はnPCR、LAMP-IS481ともに陽性であったが1件は陰性であった。一方、LAMP-PTXで陽性と判定されたものは72件(23.2%)にとどまり、培養陽性59件中6件は陰性であった。

表4に培養法を陽性対照とした場合のnPCR、LAMP-IS481、LAMP-PTXの感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率を示す。感度はnPCR、LAMP-IS481が共に98.3%と優れていたが、LAMP-PTXでは89.8%とやや劣っていた。特異度はLAMP-IS481が培養陰性検体からの陽性率が高いことを反映して低値を示した。

D. 考察

百日咳はワクチンによる予防体制が確立しているにもかかわらず、近年、世界

各国で百日咳の発生件数は増加傾向にある。その理由として、ワクチン株と比較して抗原変異のみられる株が増加していること、ワクチンの効果が落ちる思春期以降の青年、成人が罹患する成人百日咳が増えていることが挙げられているが、その実態はまだまだ明らかでないことも多い。アメリカでは昨年度より百日咳ワクチンの追加投与が開始され、思春期以降の成人を対象にした投与の必要性も議論されているが、我が国での実態はほとんど明らかにされていない。

成人百日咳を含む百日咳の詳細な疫学調査には、迅速性、感度、特異性を兼ね備えた簡便、安価な検査の確立が欠かせない。我々は昨年度の本研究班分担研究において IS481-IS1001 を同時に検出する nPCR 法による百日咳の迅速診断方法を開発した。この方法は感度を 10 copies/tube まで上げることに成功し、臨床検体からの *B. pertussis* の直接検出を可能とした。検出時間も 4 時間程なので、検体提出日に結果を報告することができ、臨床現場での百日咳診断、疫学調査への有用性は高いと思われた。また、この系は我が国での実態が百日咳以上にほとんど明らかにされていない *B. parapertussis*, *B. holmesii* も検出することが出来ることから、有用性が高いものと考えられた。

しかし、nPCR には thermal cycler と検出系としての電気泳動装置などの特殊機器が必要であり、また、2 段階の PCR をかけるなど手技が煩雑であり、どこの検査室でも対応可能な検査法とは言い難かった。

LAMP 法は 60-65℃ の一定温度で DNA 増幅反応を行う新しい方法で、primer 設定が 4 カ所になるため極めて特異性が高く、検出感度が nested PCR と同等ないしそれ以上と優れている。更に Loop primer を併用することで反応時間を短縮することができる。PCR のように温度の上昇-下降を繰り返すサイクル反応は不要で、温度は一定に保つのみで良いため、特殊な機器は一切必要ない。また、反応産物としてピロリン酸カルシウムが生じるため、陽性検体は反応液の白濁が起こり、目視で容易に判定ができる。また、濁度を real time で検出すれば、real-time PCR のような定量 PCR も可能である。

今回、開発した LAMP 法 3 法はいずれも従来の nPCR に比較して 100-1000 倍の検出感度と 1/3-1/4 の検出時間を示しており、臨床現場のベッドサイドでも施行可能な迅速検査として、臨床での百日咳診断に威力を発揮するものと期待された。実際、LAMP-IS481 は nPCR と同等の感度を呈し、検出時間も短いことから、現時点では百日咳の迅速診断に最も有用な方法と考えられた。

IS481 は *B. pertussis* のみならず、*B. holmesii* にも数 copy 存在することが明らかにされている。このため、IS481 の検出は *B. pertussis* 陽性を必ずしも意味しない。*B. holmesii* には *B. parapertussis* に共通して IS1001 も含まれるため、LAMP-IS1001 と併せて実施することで、この点は解決できると考えている。無論、LAMP-IS481, LAMP-IS1001 両者が陽性になった場合には、*B. holmesii* なのか、

B. pertussis, *B. parapertussis* 混合感染なのか厳密に否定できないが、今回の臨床検体 310 件の検討でも、このようなケースは認められず、文献的にも実際には非常に稀であると考えられており、現実的には次の LAMP-PTX を併用すれば、あまり問題ないものと考えられる。

LAMP-PTX は pertussis toxin promoter region を検出する系で、*B. pertussis* 以外の *Bordetella* 属には含まれず、理論的特異性が極めて高い。今回の基礎検討でも nPCR の 100 倍の検出感度と優れた特異性を示したが、臨床検体からの検出では培養陽性検体から陰性となる偽陰性が 6 件含まれていた。この理由として pertussis toxin promoter region は 1 遺伝子中 1 copy しか存在せず、このことが 200 以上の copy 数を持つ IS481 との検出率の違いに影響しているものと思われた。

現在のところ、検出感度を考えると LAMP-IS481 が簡便で、検出率が高く、スクリーニング検査には最も有用ではないかと考えている。

我が国での成人百日咳を含む百日咳の実態はまだまだ未解明な部分が多く、今後の大規模な疫学調査は必須である。今回新たに開発した LAMP3 法は特別な機器を要せず、簡便、安価、優れた感度から、我が国の百日咳の今後の発生動向調査に広く適用可能であると期待される。

E. 結論

LAMP 法による *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. holmesii* の検出系

(LAMP-IS481, LAMP-IS1001, LAMP-PTX) を開発した。これらの方法はいずれも 2 時間以内に結果が得られ、特別な機器を要せず、簡便、安価、優れた感度から、我が国の百日咳の今後の発生動向調査に広く適用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 なし

学会発表

- 1) 大塚正之、菊池 賢、岡田賢司、東出正人、春藤和哉、砂川慶介: 成人百日咳の臨床所見および分離株の遺伝子型解析 感染症学雑誌 79 (臨時増刊号): 293, 2005. 第 79 回日本感染症学会総会、名古屋、2005 年 4 月
- 2) 蒲地一成、大塚正之、菊池 賢、堀内善信、荒川宜親 我が国における百日咳抗原変異株の発生動向について 感染症学雑誌 79 (臨時増刊号): 295, 2005 第 79 回日本感染症学会総会、名古屋、2005 年 4 月
- 3) 岡田賢司、大塚正之、菊池 賢、砂川慶介: 成人百日咳の臨床像—小児との違い— 感染症学雑誌 79 (臨時増刊号): 294, 2005 第 79 回日本感染症学会総会、名古屋、2005 年 4 月
- 4) 中野貴司、庵原俊昭、神谷 齋、岩出義人、山内昭則、杉山 明、

大塚正之、菊池 賢、岡田賢司、
蒲地一成、荒川宜親 百日咳の
家族内伝播に関する検討 感染
症学雑誌 79 (臨時増刊号): 294,
2005 第 79 回日本感染症学会総
会、名古屋、2005 年 4 月

- 5) 菊池 賢、大塚正之、春藤和哉、
岡田賢司、戸塚恭一、砂川慶介:
Loop-mediated isothermal
amplification 法による百日咳の
迅速診断法の開発 第 54 回日
本化学療法学会総会、京都、

2006 年 5 月発表予定

- 6) 大塚正之、菊池 賢、岡田賢司、
東出正人、春藤和哉、砂川慶介:
近年分離された百日咳菌の薬剤
感受性成績とキノロン低感受性
第 54 回日本化学療法学会総会、
京都、2006 年 5 月発表予定
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図 1: LAMP-IS481 による *B. pertussis* CCUG 30873^T の検出感度と検出時間

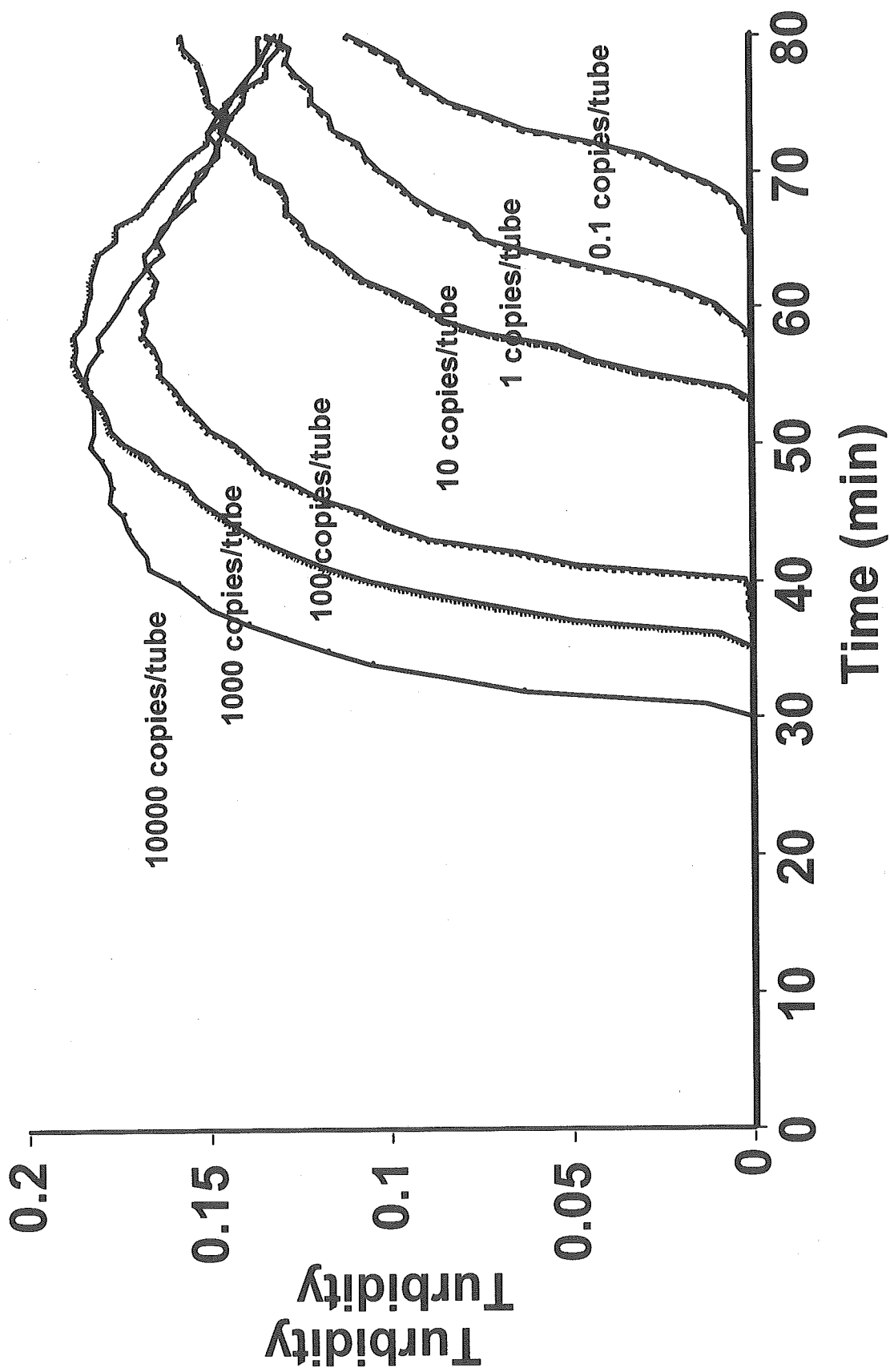


図 2: LAMP-PTX による *B. pertussis* CCUG 30873^T の検出感度と検出時間

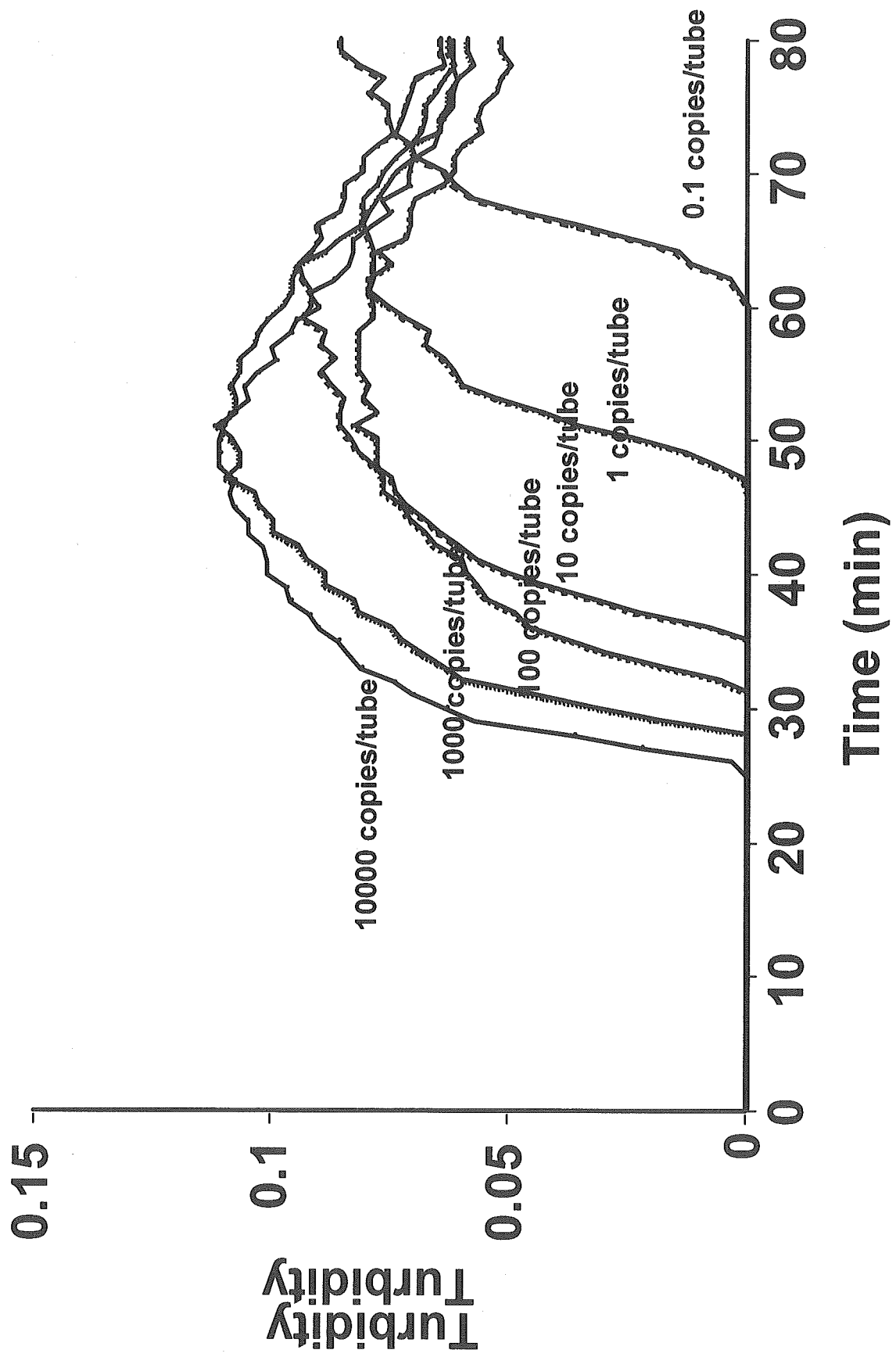


図 3: LAMP-IS1001 による *B. pertussis* CCUG 413^T の検出感度と検出時間

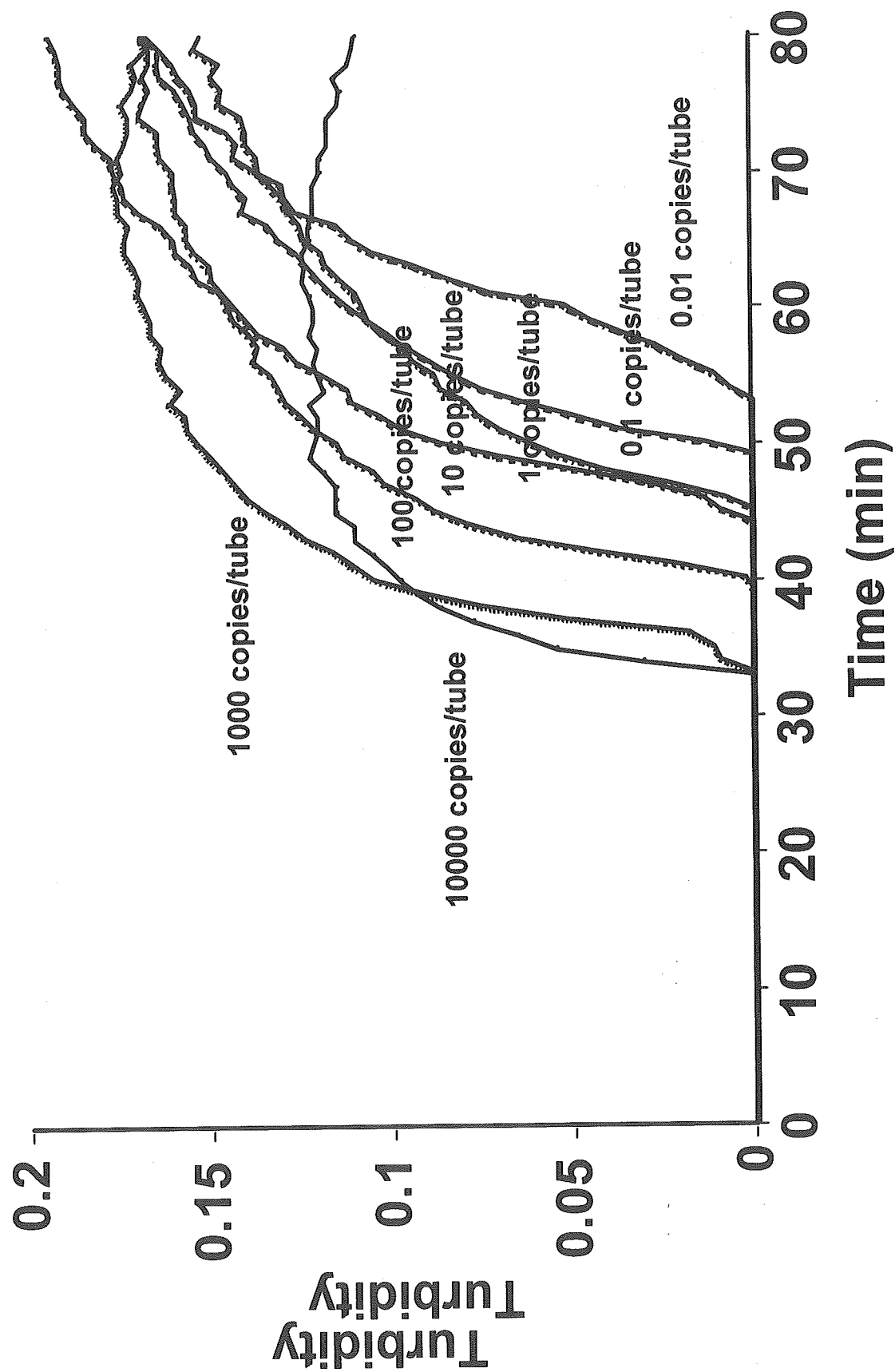


表1. LAMP法プライマー

LAMP	Organism		Target		Oligonucleotide	
	Gene	Gene Bank No.	Name of primer	Sequence		
LAMP-IS481	IS481	M28220	IS481-FIP2	5'-GCTTGATGCCCAGCTCATGGCAACAATGGCTCGGCCTTTTCG-3'		
			IS481-BIP1	5'-AGACCAATGGCAAGGCCGAATTGGGAGTTCTGGTAGGTGT-3'		
			IS481-F3-1	5'-ATCCAGCGCTTGCTCAC-3'		
			IS481-B3-1	5'-TTTCATGGCATCGGCTCG-3'		
			IS481-Loop B	5'-CATCCAGTCGGCCTTGCGTG-3'		
LAMP-PTX	PTX	X16347	PTX-FIP1	5'-TTACGGATCACACCATGGCAGGCTCCTTCGGCGCAAAGT-3'		
			PTX-BIP1	5'-AGGCACCATAACGCAGAGGGCCCTGTTCTTGGGTTTGG-3'		
			PTX-F3-1	5'-TCCAACACGGCATGAACG-3'		
			PTX-B3-1	5'-AGAATCGCCAGCCACCGT-3'		
			PTX-Loop F	5'-ACGGTGACCCGTACCATCG-3'		
			PTX-Loop B	5'-GTTGCACTCGGGCAATTCCG-3'		
LAMP-IS1001	IS1001	X66858	IS1001-FIP1	5'-TTGATTGGCCTGATCCACGGCCCATGTCGTGGCCCAAGTATGG-3'		
			IS1001-BIP1	5'-CGCAACCCGTGACAACCTGGAGGCTTGCAGCAATTCGTCCG-3'		
			IS1001-F3-1	5'-GGCGGAGATCGTCTATGACT-3'		
			IS1001-B3-1	5'-ACATAGACCCGTCAGCAGCG-3'		
			IS1001-Loop F	5'-ACCCGATCAATGACCTCTCGT-3'		