

反省された。今後データベースにおける迅速な情報共有の意義や、有用性、簡便性についての理解を得ることの情報提供を積極的に努める必要がある。情報を共有することによって、必要があれば改めて調査することなく対策を行うことができる運用ができることも、併せて説明していく必要があると思われた。

2008年の百日咳の週別の定点当たり報告数は第22週がピークで、データベースでは19週でピークがみられているが、これは発生動向調査では報告日となっているが、データベースでは発症日となっているので、その差異ではないかと考えられる。

今後も各地域で起こりうる集団発生に対して、迅速な対応を行う必要があるが、そのためには、百日咳患者の実態把握と関係者での迅速な情報の共有が必要と考える。データベースでは、発生動向調査では明らかにできなかったワクチン接種歴や検査情報、転帰などの詳細情報を得ることができたことは、今後の対策を考えるうえで有益だと示唆された。

Hib データベースについては、今後、各関係方面における情報の共有が不可欠と考える。そのためにも、データベースが、全国の医療従事者や公衆衛生部局関係者で情報共有され、今後の有効な対策の一助となることを期待している。

今後のデータベースの改善としては、入力権限のある方(医師・公衆衛生担当者)のみへの還元情報を自動化(年齢(0歳児月年齢

再掲)・転帰・症状のみ)する。

これらのデータベースによる医師の自発的な登録の方法は、2008年1月から始まった麻疹の全数報告になる前に、「麻疹発生データベース」として運用されていたものと同じである。データベースにはそれまでの定点報告では得られなかったワクチン接種の有無の情報があることから、麻疹対策に有効であることが明らかとなり、この情報が全数報告に継ぐ形となった。この百日咳や Hib のデータベースにおいても、今後、流行の実態を正確に把握するために(百日咳は成人を含めた年齢層に対するサーベイランスを必要としていく議論のためにも、)対策に有効であることを今後も発信していくためにも、登録報告数を増やしていくことが望まれる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 論文発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特になし

図1. 百日咳データベースのトップページ及び一般公開の内容

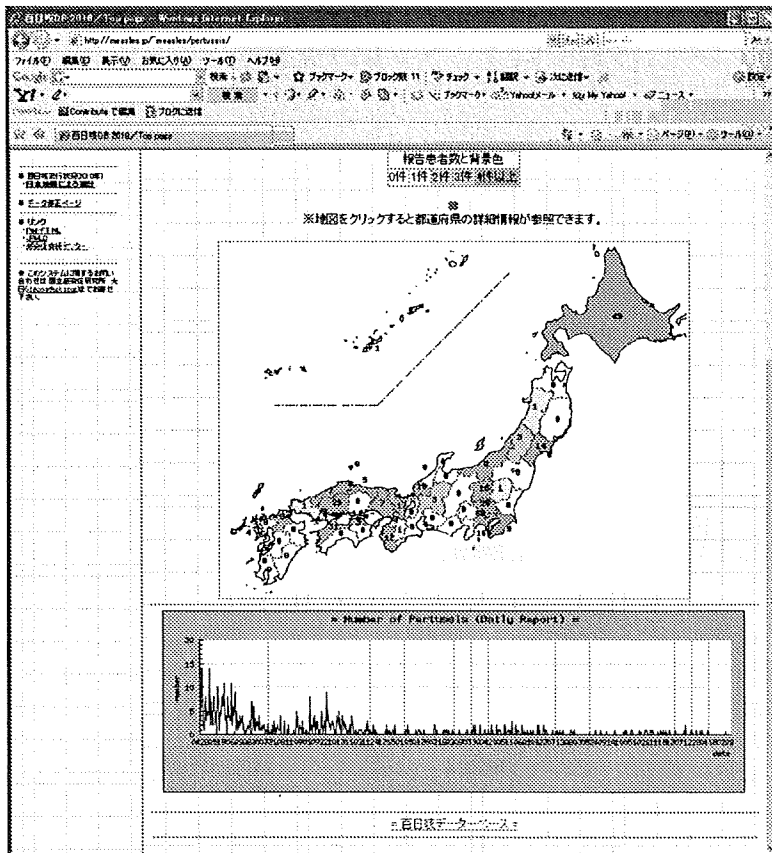
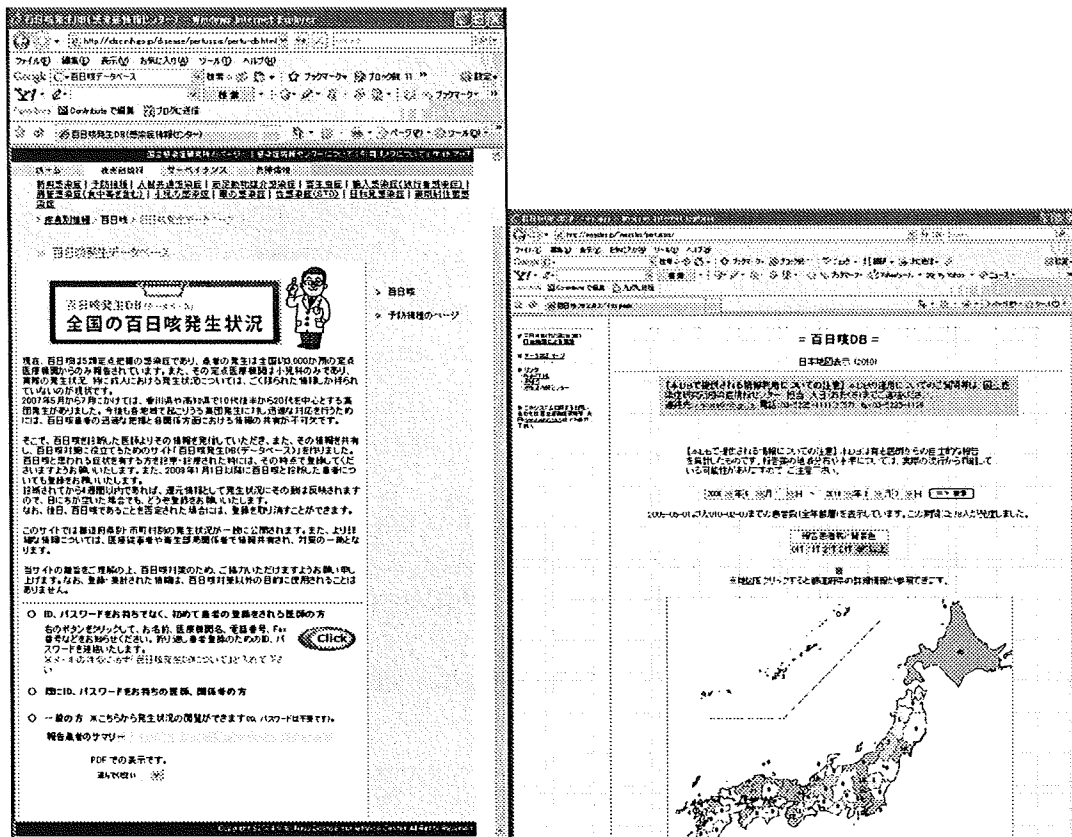


図 2. 百日咳発生動向調査

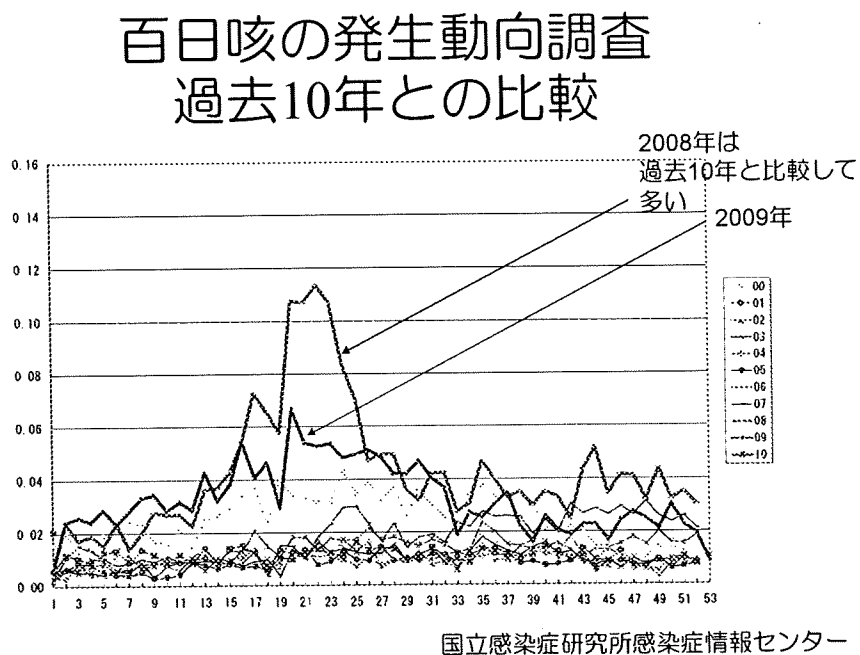


図 3. 百日咳発生動向調査とデータベース

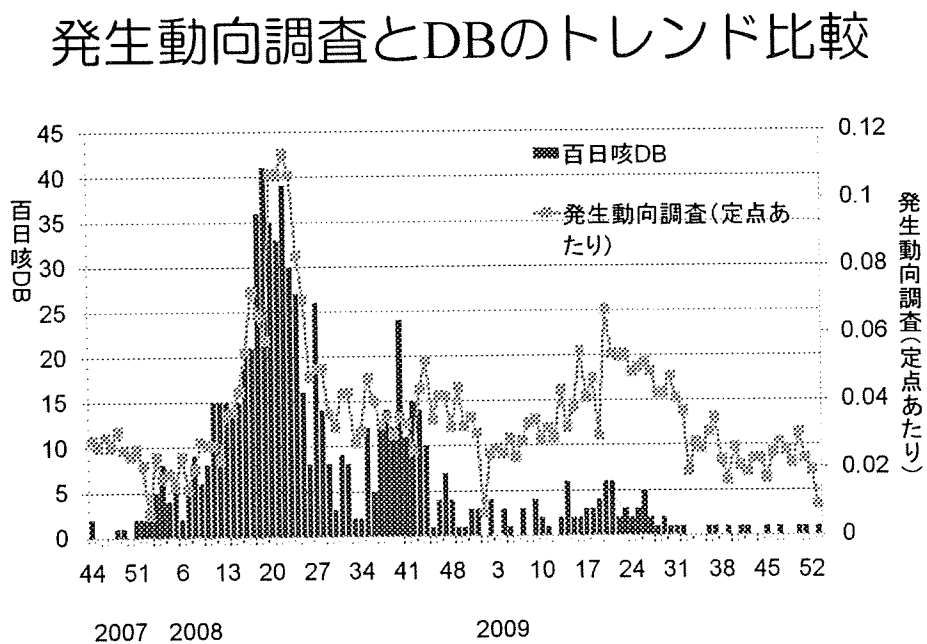


図4. データベースによる発症週別報告数分布

発症週別報告数分布: 2008年5月8日～2009年12月28日報告

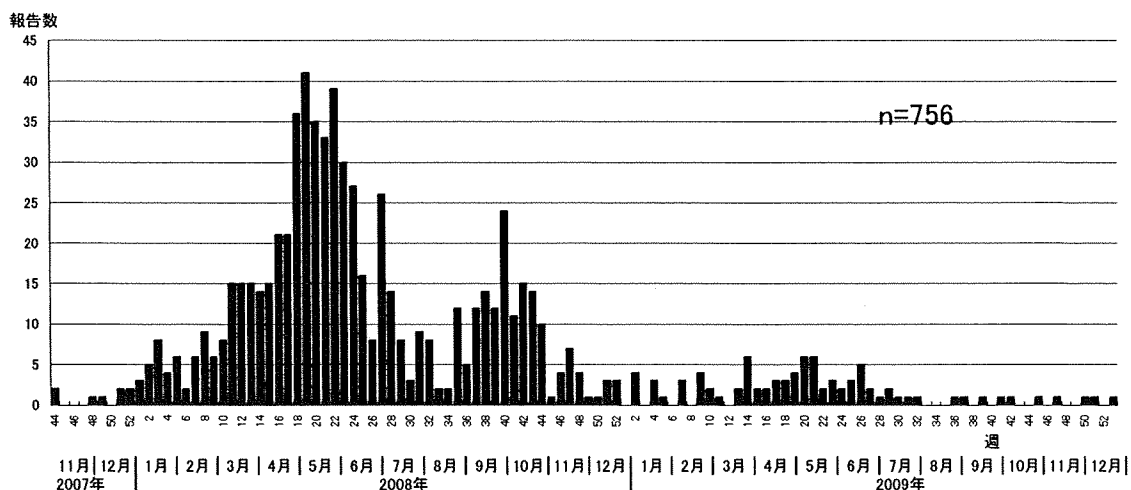


図5. データベースによる都道府県別報告数分布

都道府県別報告数分布: 2008年5月8日～2009年12月28日報告

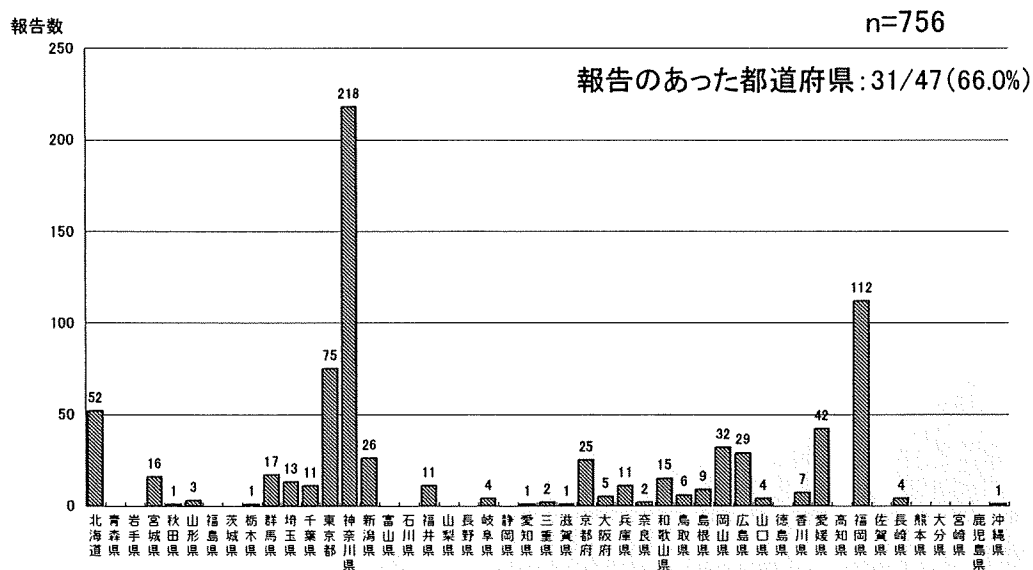


図 5. データベースによる発症週別報告数分布その 2

発症週別報告数分布

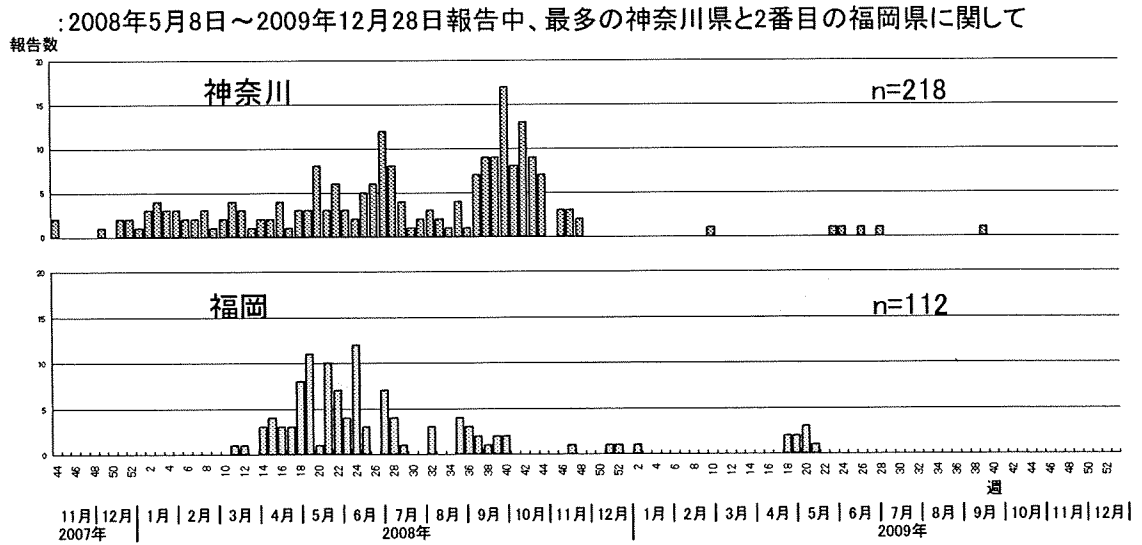


図 6. データベースによる年齢別予防接種歴別報告数分布

年齢別予防接種歴別報告数分布 : 2008年5月8日～2009年12月28日報告

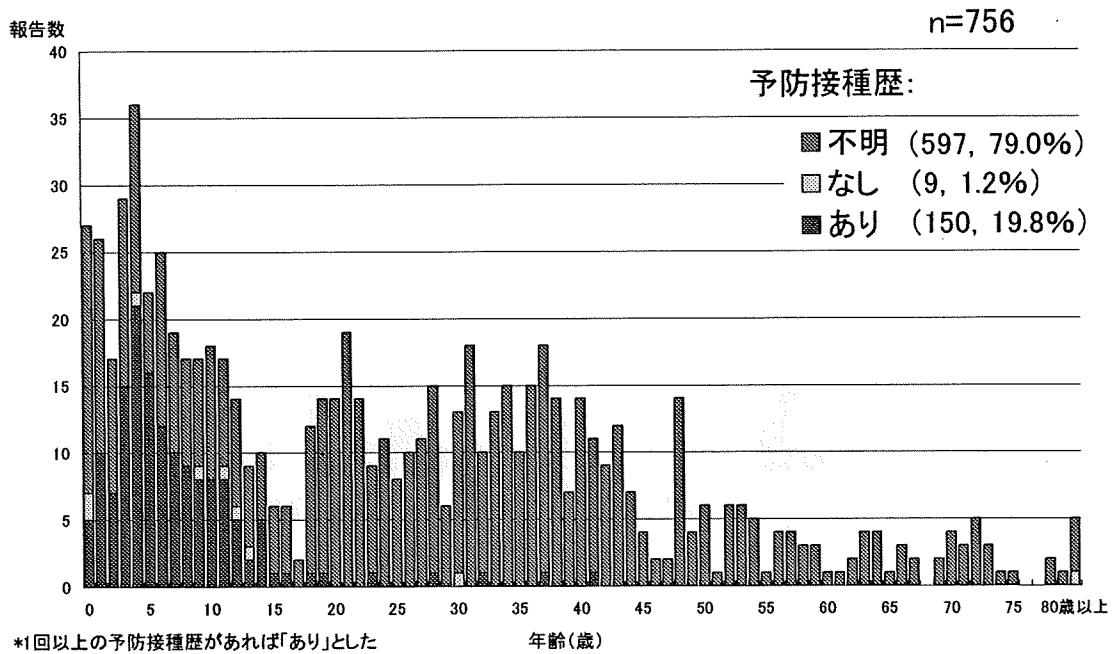


図 7. データベースによる検査診断の有無とその内容

検査診断の有無とその内容: 2008年5月8日～2009年12月28日

検査依頼: あり511 (67.6%) なし245 (32.4%)



		実施件数	陽性/検出件数
菌分離		121	6
菌凝集素価	ペア血清	34	27
	シングル血清	387	352
抗PT抗体・ 抗FHA抗体	ペア血清	2	2
	シングル血清	92	79
遺伝子検査 (PCR, LAMP)		101	82
その他 (詳細不明)		6	6

図 8 . Hib データベースのトップページ及び一般公開の内容

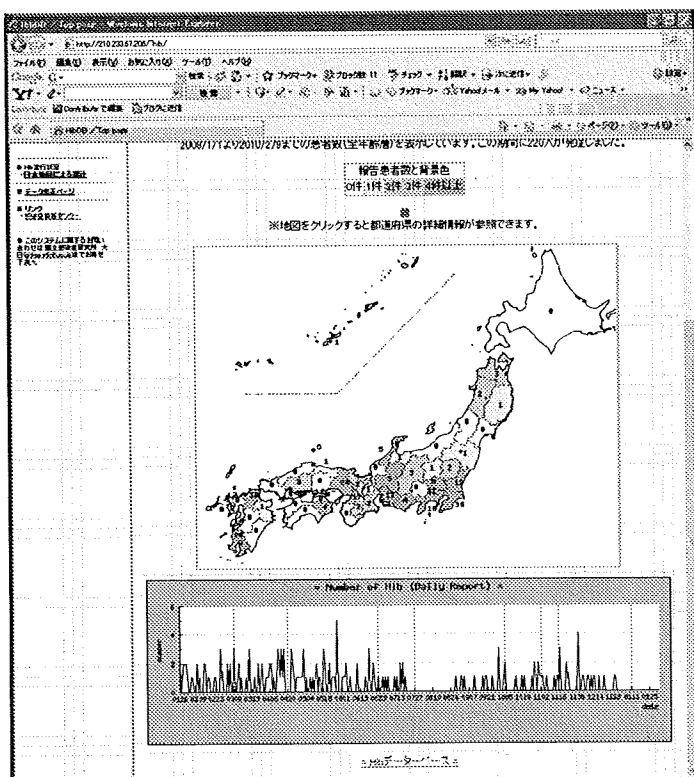
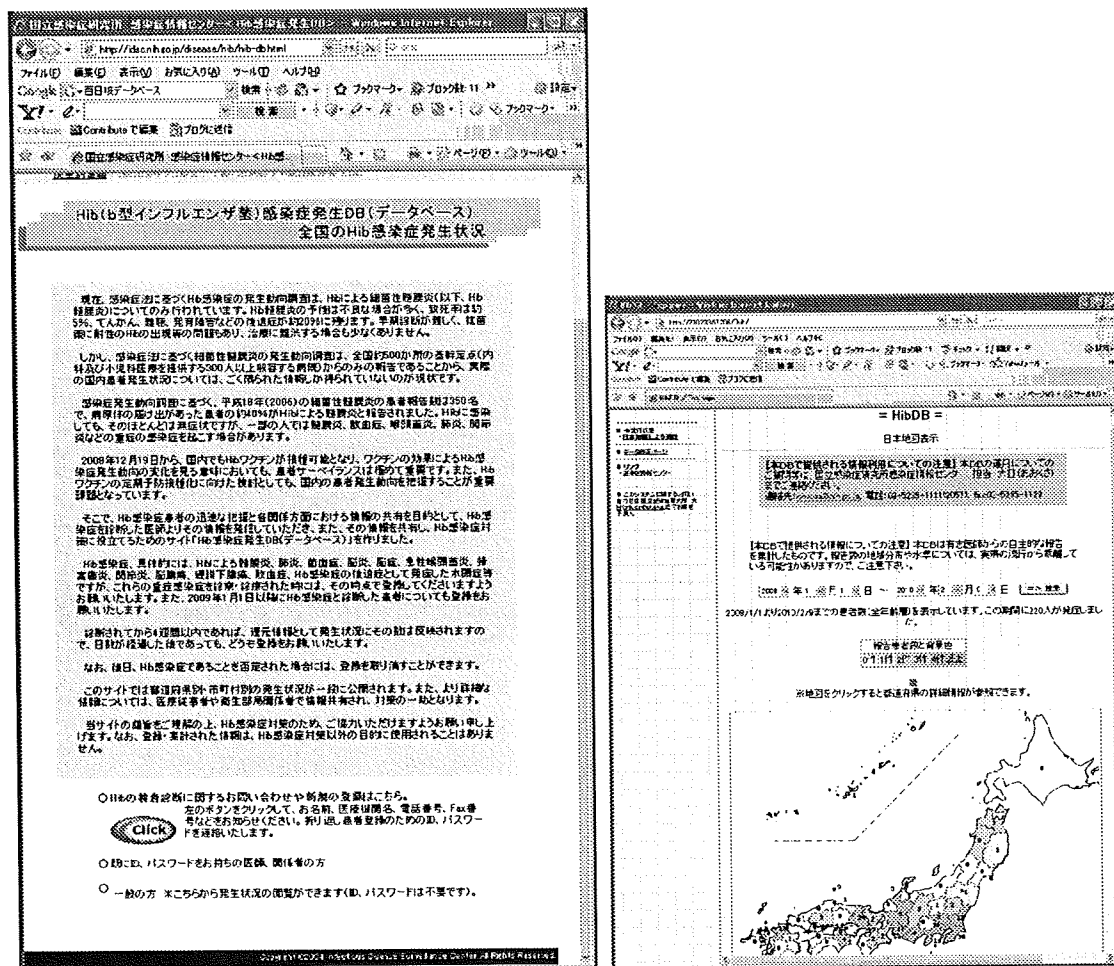


図 9. Hib データベースの調査内容

藤沼府県

市区町村
（市町村を指定する場合は、「藤沼府県」の市区町村を指定してください。また、市区町村を指定しない場合は、調査対象の市区町村を指定してください。）

12. 千葉県

<input type="radio"/> 1. 千葉市中央区	<input type="radio"/> 2. 千葉市花見川区	<input type="radio"/> 3. 千葉市稲毛区	<input type="radio"/> 4. 千葉市若葉区	<input type="radio"/> 5. 千葉市緑区
<input type="radio"/> 6. 千葉市美浜区	<input type="radio"/> 7. 狛子市	<input type="radio"/> 8. 市川市	<input type="radio"/> 9. 船橋市	<input type="radio"/> 10. 鎌山市
<input type="radio"/> 11. 木更津市	<input type="radio"/> 12. 松戸市	<input type="radio"/> 13. 野田市	<input type="radio"/> 14. 茂原市	<input type="radio"/> 15. 成田市
<input type="radio"/> 16. 佐倉市	<input type="radio"/> 17. 黄金市	<input type="radio"/> 18. 旭市	<input type="radio"/> 19. 習志野市	<input type="radio"/> 20. 柏市
<input type="radio"/> 21. 勝浦市	<input type="radio"/> 22. 市原市	<input type="radio"/> 23. 津山市	<input type="radio"/> 24. 八千代市	<input type="radio"/> 25. 習志野市
<input type="radio"/> 26. 鴨川市	<input type="radio"/> 27. 鎌ヶ谷市	<input type="radio"/> 28. 君津市	<input type="radio"/> 29. 富津市	<input type="radio"/> 30. 浦安市
<input type="radio"/> 31. 四街道市	<input type="radio"/> 32. 袖ヶ浦市	<input type="radio"/> 33. 八街市	<input type="radio"/> 34. 印西市	<input type="radio"/> 35. 白井市
<input type="radio"/> 36. 富美市	<input type="radio"/> 37. 南房総市	<input type="radio"/> 38. 匝瑳市	<input type="radio"/> 39. 香取市	<input type="radio"/> 40. 山武市
<input type="radio"/> 41. いすみ市	<input type="radio"/> 42. 酒々井町	<input type="radio"/> 43. 印旛村	<input type="radio"/> 44. 本笠村	<input type="radio"/> 45. 安町
<input type="radio"/> 46. 神崎町	<input type="radio"/> 47. 多古町	<input type="radio"/> 48. 夷住町	<input type="radio"/> 49. 大網白里町	<input type="radio"/> 50. 九十九里町
<input type="radio"/> 51. 芝山町	<input type="radio"/> 52. 横芝光町	<input type="radio"/> 53. 一宮町	<input type="radio"/> 54. 睦沢町	<input type="radio"/> 55. 長生村
<input type="radio"/> 56. 白子町	<input type="radio"/> 57. 長柄町	<input type="radio"/> 58. 長南町	<input type="radio"/> 59. 大宮町	<input type="radio"/> 60. 野町
<input type="radio"/> 61. 総南町				

データベースへの報告日 2009年07月04日 ※ 本日の日付となります。

診断日 2009年7月4日

発症日(Hib感染症状出現日) 2009年7月4日

症例の性別と年齢 性別: --- 年齢: 歳 力月

保育園保育所への通園通所の有無 有 無 不明

診断 (複数回答可)

<input type="checkbox"/> 髄膜炎	<input type="checkbox"/> 肺炎	<input type="checkbox"/> 菌血症	<input type="checkbox"/> 脳炎	<input type="checkbox"/> 脳症	<input type="checkbox"/> 急性喉頭炎	<input type="checkbox"/> 肺炎球菌炎	<input type="checkbox"/> 関節炎
<input type="checkbox"/> 髄膜炎	<input type="checkbox"/> 硬膜下膿瘍	<input type="checkbox"/> 敗血症	<input type="checkbox"/> 水頭症	<input type="checkbox"/> その他(具体的に: _____)			

項目	検査値
髄液細胞数	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 増加
髄液蛋白濃度	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 増加
髄液糖濃度	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 低下

※ ページが表示されました

検査

項目	検査値
髄液細胞数	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 増加
髄液蛋白濃度	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 増加
髄液糖濃度	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 低下
髄液細菌培養	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性
髄液迅速(遠末)検査	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性
血液細菌培養	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性
その他培養すべき細菌培養 (具体的に: _____)	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性
血中白血球数	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 正常 <input type="radio"/> 低下 <input type="radio"/> 増加
CRP	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性
その他 (具体的に: _____)	<input type="radio"/> 未実施 <input type="radio"/> 結果待ち <input type="radio"/> 陽性 <input type="radio"/> 陰性

あり なし 不明

接種歴がある場合はこちらに接種歴情報をご記入ください

1回目		2回目	
接種年月日	年 月 日	接種年月日	年 月 日
ロットNo.		ロットNo.	
3回目		4回目	
接種年月日	年 月 日	接種年月日	年 月 日
ロットNo.		ロットNo.	

分類	薬剤名	使用/効果
	アンピシリン	使用なし
	ペニシリン	使用なし
	β内酰胺/βラクタム	使用なし
	セフトキシム	使用なし

※ ページが表示されました

薬剤	分類	薬剤名	使用/効果
	抗生剤	アンピシリン	使用なし
		ペニシリン	使用なし
		パロペネム/ベタミプロン	使用なし
		セフトキシム	使用なし
		セフトリアキソン	使用なし
		セフトキシム	使用なし
		メロペネム	使用なし
		バンコマイシン	使用なし
		その他(具体的に:)	使用なし
		その他(具体的に:)	使用なし
		その他(具体的に:)	使用なし
		その他(具体的に:)	使用なし
	ステロイド剤		使用なし
既往歴(手術歴)			
予備 (複数回答可)	<input type="checkbox"/> 外来のみで治療 <input type="checkbox"/> 入院後、退院 <input type="checkbox"/> 通院治療中 <input type="checkbox"/> 入院治療中 <input type="checkbox"/> 軽度の後遺症(脳波、OT、MRVなどの異常所見のみ) <input type="checkbox"/> 聴覚障害 <input type="checkbox"/> てんかん <input type="checkbox"/> 中程度の後遺症(日常生活に支障ない程度の障害 (具体的に:)) <input type="checkbox"/> 重度の後遺症(発達・知能・運動障害など) <input type="checkbox"/> 死亡 <input type="checkbox"/> Hib否否定		
入院期間 (入院された場合で退院されている場合のみ記入可)	年 月 日 ~ 年 月 日		

図 10. Hib データベースの年齢構成

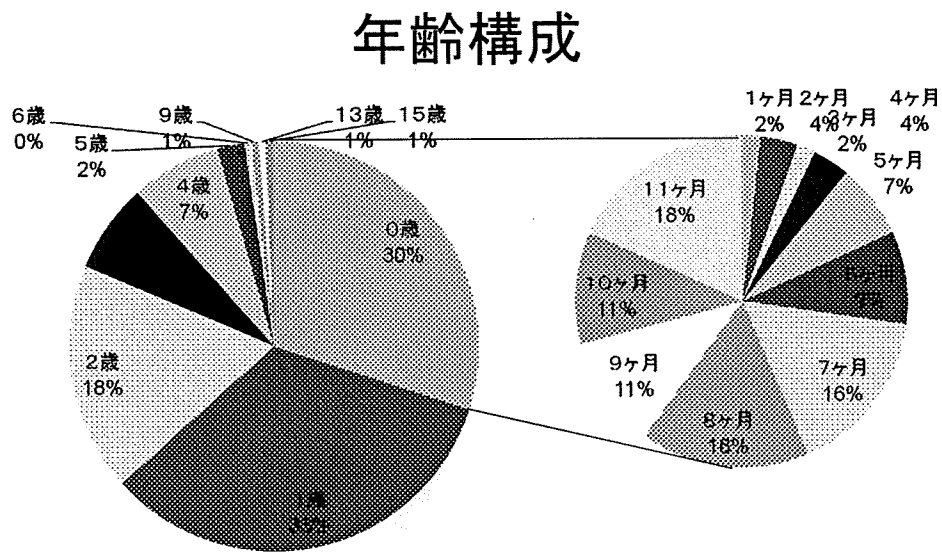


図 11. Hib データベースの内訳

内訳

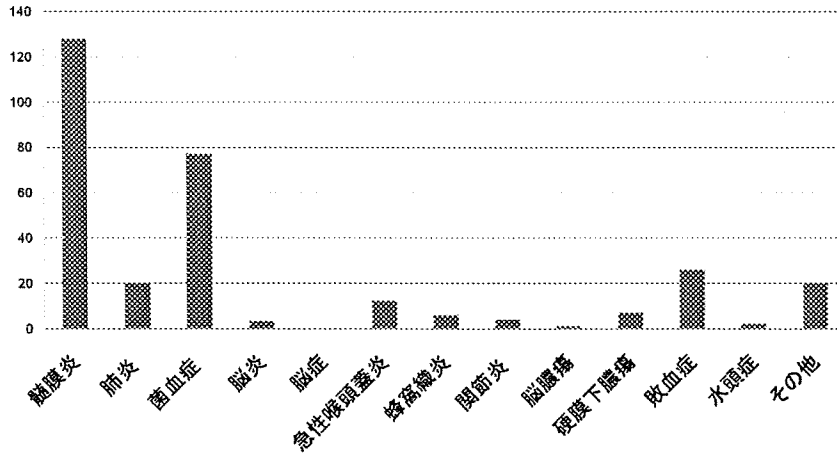


図 12. Hib データベースの髄膜炎のみの年齢構成

髄膜炎のみ年齢構成

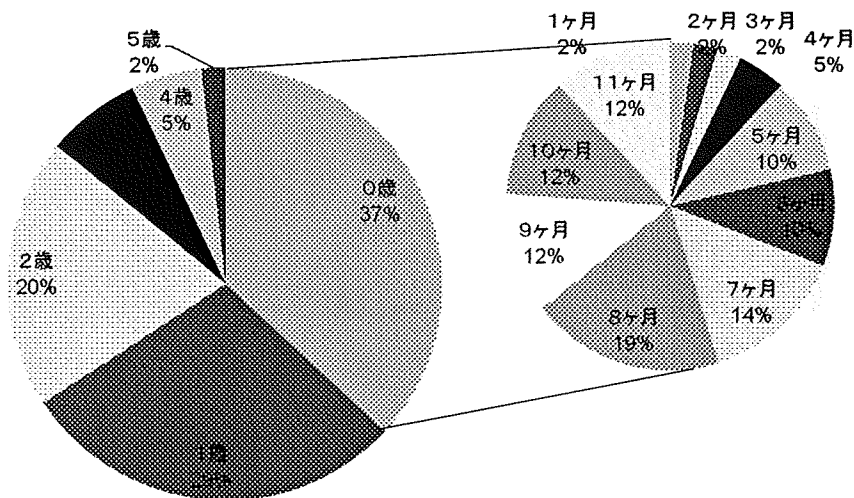


図 13. Hib データベースの転帰

転帰

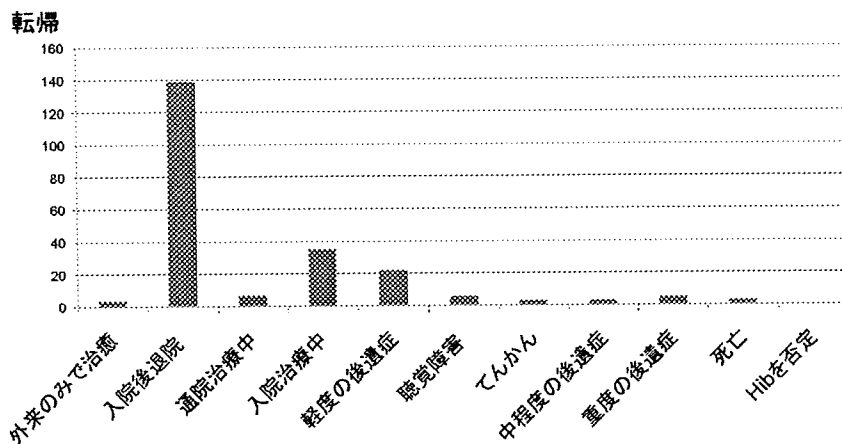


図 14. Hib データベースの髄膜炎のみの転帰

転帰(髄膜炎患者のみ)

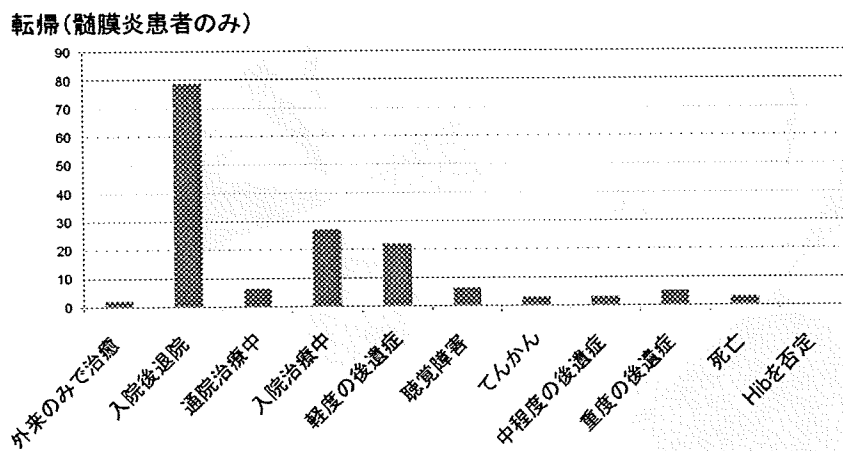


図 15. Hib データベースの検査

検査

	未実施	正常	増加		
検査(髄液細胞数)		64	13	123	
検査(髄液蛋白濃度)		85	17	98	
	未実施	正常	低下		
検査(髄液糖濃度)		69	37	93	
	未実施	陰性	陽性		
検査(髄液細菌培養)		72	21	106	
検査(髄液迅速(塗沫)		102	23	75	
検査(血液細菌培養)		39	17	143	
検査(その他細菌培養)		118	19	62	
	未実施	正常	低下	増加	
検査(血中白血球数)		25	32	12	131
	未実施	陰性	陽性		
検査(CRP)		32	5	163	
検査(その他)		182	3	15	

図 16. Hib データベースの薬剤

薬剤

	使用なし	有効	無効	効果不明
アンピシリン	199	0	1	0
ペニシリン	156	39	2	3
パニペネム/ベタミブロン	198	2	0	0
セフトジジム	100	94	0	6
セフトリアキソン	134	65	1	0
セフォタキシム	120	76	1	3
メロペネム	199	0	1	0
バンコマイシン	158	29	3	10
ステロイド剤	91	83	0	25

分担研究報告書

百日咳の血清学的診断法の確立

研究分担研究者: 中山哲夫(北里生命科学研究所)

研究協力者: 渡邊峰雄(北里生命科学研究所)

小口 薫、宮田章子(みやた小児科)

吉田菜穂子(国家公務員共済組合連合会 立川病院 小児科)

和山行正(北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所)

【研究要旨】百日咳は菌分離が困難で、遺伝子診断が利用され始めたが、受診するまでの時間が長いこと、抗菌剤による治療が始められており分離率、遺伝子検出率は低い。流行株とワクチン株の凝集素抗体を比較して血清学的診断を行ってきたが、過去にDPTワクチンの接種を受けており野外流行株の自然感染を確実に証明する血清学的診断法がない。臨床的に百日咳が疑われた99例を対象に後鼻腔ぬぐい液を採取しLAMP法による遺伝子検索、急性期血清はPT, FHA,凝集素価の測定と、ワクチン抗原には含まれない catalytic region of adenylate cyclase toxin (catACT), C-terminal of filamentous hemagglutinin (cFHA), Fimbria (Fim3)抗体を測定した。遺伝子検出率は8%と低く乳幼児では診断的価値は高いが、学童成人例では検出率は低かった。ワクチン抗原に含まれないcatACT+cFHA+ Fim3の3抗体陽性率は66/99(67%)でcFHA+Fim3の2抗体の陽性率と一致した。catACT, cFHA, Fim3のIgM抗体の検討も行ったが上昇する例はきわめて少なくIgM抗体での診断は困難である。

A. 研究目的

DPTワクチンは90%以上の高い接種率であるが2歳前後でのI期追加接種後百日咳成分を含んだワクチンの接種は行われてなく、また無細胞型ワクチンの効果の持続も短いことから、百日咳抗体の減衰により近年成人百日咳が増加している。百日咳は2週間以上持続する咳発作を主症状とし乳幼児では無呼吸、チアノーゼ、スタカート、レプリーゼの典型的な症状をみとめるが、成人百日咳では典型的な症状をとらないため診断が困難で、家庭に持ち込みDPTワクチン接種前の乳幼児への感染が増加している。

百日咳の実験室診断は菌分離であるが、医療機関を受診するときは発症後、時間が経過し抗生剤の投与、ワクチンの既往があるために感染しても菌の増殖が抑えられ検出率が低い。分離に代わって遺伝子診断が利用され始めたが、同様の理由から遺伝子検出率も低い。血清学的診断法として流行株(山口株)とワクチン株(東浜

株)の凝集素抗体を比較する血清学的診断が普及はしているものの過去にDPTワクチンの接種を受けており野外流行株の自然感染を確実に証明する実験室診断法がない。百日咳の実態を把握するためには実験室診断に基づいた疫学調査が必要であり流行株の感染を確実に診断する方法の開発が必須であり、ワクチン抗原には含まれない catalytic region of adenylate cyclase toxin (catACT), C-terminal of filamentous hemagglutinin (cFHA), Fimbria (Fim3)抗体の測定法を臨床的に百日咳と診断された症例で検討した。

B. 研究方法

1) 対象

2006年9月から2009年1月までに外来を受診した臨床的に百日咳と考えられた99症例(生後2週から61歳:平均年齢は23.9歳)を対象とした。百日咳の臨床診断は2週間以上続く咳、

または発作性の咳き込み、吸気性笛声、嘔吐を伴う咳を診断基準とした。来院時の後鼻腔ぬぐい液を採取し百日咳遺伝子検索をおこなった。来院時血清を採取し百日咳抗体価を測定した。DPT ワクチン接種前後の 237 例を対象に Fim3 抗原に対する抗体を測定した(倫理委員会承認、同意書確認済)。

2) 百日咳遺伝子の検出

後鼻腔拭い液から DNA を抽出し IS481 領域と 5'PT 領域に設定した LAMP 法をおこなった。

3) 百日咳抗体

catACT, cFHA は EIA 法で測定し抗原非添加 well の吸光度との比で 1.5 以上を陽性と判定した。Fim3 抗体は蛍光 EIA 法で測定し抗原非添加 well の蛍光強度の 4 倍以上(400%)を陽性と判定した。

C. 結果

1) 百日咳抗体陽性数

各年齢ごとの抗体陽性数を表 1 に示した。3 歳未満では 12 例中 3 例(25%)が 3 抗体陽性であった。4-12 歳では 14/23(61%),13-20 歳で 10/10(100%),21-40 歳で 27/40(68%), 41 歳以上では 12/14(86%)で全体でも 66/99(67%)が 3 抗体陽性であった。2 抗体の組み合わせをみると cFHA と Fim3 の 2 抗体陽性例は 3 抗体陽性例と一致した。各年齢群でも cFHA と Fim3 の組み合わせは 3 抗体陽性一致した。

表 1. 百日咳抗体の陽性率

年齢	catACT, cFHA, Fim3の陽性症例数								
	1抗体陽性			2抗体陽性			3抗体陽性		
	catACT+	cFHA+	Fim3+	catACT+ cFHA+	catACT+ Fim3+	cFHA+ Fim3+	catACT+ cFHA+ Fim3+		
0-3y (n=12)	8(67%)	5(42%)	7(58%)	5(42%)	5(42%)	3(25%)	3(25%)		
4-12y (n=23)	21(91%)	21(91%)	15(65%)	20(87%)	14(61%)	14(61%)	14(61%)		
13-20y (n=10)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)		
21-40y (n=40)	39(98%)	31(78%)	35(88%)	31(78%)	34(85%)	27(68%)	27(68%)		
>41y (n=14)	14(100%)	13(91%)	13(93%)	13(93%)	13(93%)	12(86%)	12(86%)		
計 (n=99)	92(93%)	80(81%)	80(81%)	80(81%)	76(77%)	66(67%)	66(67%)		

2) 山口株凝集素価との比較

従来からの百日咳の血清診断はペア血清で野生株山口株に対する凝集素価の上昇を確認するが、単一血清では山口株凝集素価 320 倍

以上で最近の感染が強く疑われることになるが、確定診断とはならない。各年齢層における山口株凝集素価が 320 倍以上を示した割合と、catACT, cFHA, Fim3 の 3 抗体の陽性数を比較して図 1 に示した。3 歳未満では山口株凝集素価 320 倍以上の症例はなく 4-12 歳で 2/23、13-20 歳で 6/10、20-39 歳で 12/40、41 歳以上で 4/14 で全体でも 24/99 が百日咳と血清診断されるが 3 抗体陽性の 66 例の診断率からみると凝集素価 320 倍では診断できない例がある。

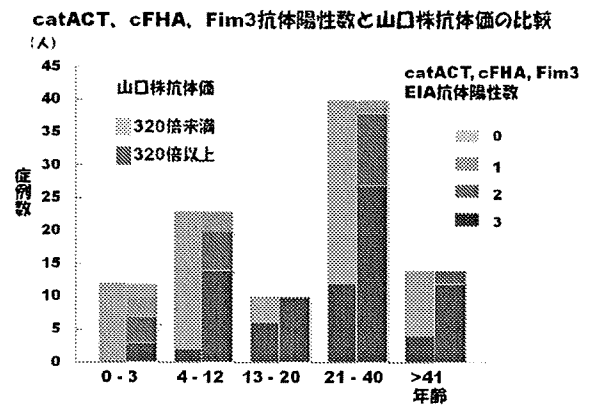


図 1. 山口株凝集素価と他の抗体陽性数の比較

2) LAMP 陽性例の血清抗体価

99 例中後鼻腔拭い液から百日咳遺伝子が検出された 8 例の血清抗体価を示した。生後 2 週の新児は無呼吸で入院した新生児で Fim3 は弱陽性であったが他の抗体は陰性であった。45 歳の症例は 30 日間咳が持続し肋骨骨折を認めている。Fim3 抗体は 329 Units であったが catACT, cFHA は高値を示していた。

表 2. LAMP 陽性例の抗体価

LAMP法で百日咳の遺伝子が検出された8症例						
年齢	予期持種	感染	持続期間	catACT	cFHA	Fim3
2w	-	家族+	無呼吸	0.24	0.13	454
4y	4回	家族+	14	7.01	6.55	709
7y	3回	家族+	3	7.09	9.07	861
9y	?	-	5	2.54	1.73	501
12y	4回	学校+	7	10.57	5.83	337
15y	4回	家族+	18	12.17	4.01	401
45y	?	-	30	1562.20	1412.70	329
46y	?	家族+	30	6.87	6.21	496

3) ワクチン接種前後の Fim 2, Fim3 抗体

DPT ワクチン接種前後の抗体価を測定し図 2 に示した。Fimbria 抗原に関してワクチン株東浜株は Fim2 のみ発現し Fim3 は発現していない。一方、最近流行野生株は Fim2+Fim3 もしくは Fim3 を抗原として発現しておりワクチン接種後の Fim2 抗体は接種後多くの症例が上昇しているが、Fim3 抗体は接種前後で変動を認めないことが明らかとなった。

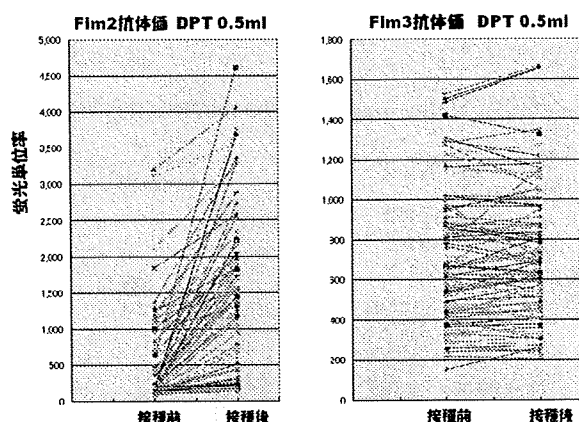


図 2. ワクチン接種前後の Fim2, Fim3 抗体の変動

D. 考案

乳幼児の百日咳は典型的な症状から臨床的に診断できるが、成人の百日咳は長引く咳だけで典型的な症状をとらないことから臨床診断が困難である。受診するまでに時間がかかることや抗菌剤が既に投与されていること、ワクチン接種の既往があることから百日咳菌を検出できる期間も短く、菌量も少ないと考えられる。菌分離、遺伝子診断が困難であり血清診断がよりどころとなる。既にワクチン接種を受けているところから野生株による感染とワクチン免疫を鑑別することが肝要である。

ワクチン成分はメーカーにより差があり PT, FHA を精製して加える方法と部分精製する方法がある。どちらの製造方法でもワクチン抗原には含まれない成分を用いる必要がある。catACT は百日咳菌の出す毒素で好中球機能を抑制する働きがありその N 末端 400 アミノ酸は百日咳菌に特異性の高い領域である。FHA は繊維性凝集素抗原でワクチン抗原のひとつである。FHA はシグナル配列の後の 220KD のタンパクは Protease で切断され菌体から培養液中に分泌

されワクチン抗原となる。残った C 末 130KD が菌体に残っている。Fimbria の抗原性は Fim2, Fim3, Fim2+3 が存在し諸外国では Fim3, Fim2+3 が主流株となっておりワクチン株の東浜株は Fim2 で Fim3 は発現していない。これら 3 抗原 (catACT, cFHA, Fim3) はワクチン抗原には含まれていない抗原であることからワクチン免疫と自然感染を区別できる。臨床的に百日咳と診断した 99 例中 66 例が 3 種類の抗原に対する抗体が陽性であり cFHA と Fim3 の 2 種類の抗体陽性例に一致することから、この 2 抗原に対する抗体を測定することでワクチン免疫との鑑別が可能である。

従来からの血清診断法として山口株凝集素価を測定し 320 倍以上が百日咳の可能性が高いとされていた。今回検討した 99 例中 24 例において山口株凝集素価が 320 倍以上であったが cFHA と Fim3 抗体の組み合わせの方が感度が高く自然感染例の血清診断が可能である。

理論的にワクチンには含まれていないと考えられる Fim3 抗原は、実際ワクチン接種前後で比較しても Fim2 抗体は動いていても Fim3 に対する抗体は有意な変動を示さなかったことからその特異性が確認された。

E. 結論

百日咳の実験室診断法として cFHA, Fim3 抗体を測定することでワクチン免疫と自然感染の鑑別が可能であることが明らかとなった。しかしながら乳幼児では抗体反応が十分でないため LAMP 法を含めた遺伝子診断が必要である。

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Nakamura A, Sakano T, Nakayama I, Shimoda H, Okada Y, Hanayama R, Nomoto K, Suto T, Kinoshita Y, Furue T, Ono H, Ohta T. Neonatal pertussis as acute bronchiolitis: direct detection of the *Bordetella pertussis* genome using loop-mediated isothermal amplification. *Eur J Pediatr* 2009; 168(3): 347-349

2 学会発表

小口 薫、宮田章子、吉田菜穂子、渡邊峰雄、
和山行正、中山哲夫:百日咳の実験室診断—
遺伝子診断とワクチン免疫との血清学的鑑別—
第 13 回日本ワクチン学会:2009. 9. 26-27. 札
幌

G. 知的財産の出願、登録状況

なし

厚生科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

ワクチン戦略による麻疹および先天性風疹症候群の排除、およびワクチンで予防可能疾患の疫学並びに
ワクチンの有用性に関する基礎的臨床的研究

百日咳流行株の病原性解析

分担研究者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 百日咳流行株は病原因子の allele タイプからワクチン型と欧米型に分けられ、1980 年以降世界の流行株はワクチン型から欧米型へシフトしている。本研究ではこの流行株のシフトに関与する蛋白質の同定を行い、欧米型に細胞障害活性を持つタイプ III エフェクター BopC の強発現を見出した。このワクチン型と欧米型における BopC の発現差異を解析したところ、ワクチン型の *bopC* プロモーターには挿入配列 IS481 が特異的に組込まれていること、さらにワクチン型における BopC の負の発現制御は転写後の調節を受けていることが判明した。以上の結果から、百日咳流行株のシフトには BopC の発現量、すなわち病原性の差異が関与するものと考察された。

研究協力者

韓 賢子(Chonnam National University)
桑江朝臣(北里大生命研・細菌感染制御)
阿部章夫(同上)

A. 研究目的

百日咳菌の流行株には遺伝子的なシフトが認められ、世界の流行株はワクチン型から欧米型への入れ替わりが生じている。この新しい流行株はワクチン抗原と異なる病原因子を産生することから、欧米ではワクチンとの関係、すなわち抗原シフトの可能性が指摘されている。特にオランダでは1990年代後半に大規模なアウトブレイクが発生し、多くの罹患者がワクチン既接種者であったことから、流行原因として抗原シフトの可能性が提唱された。ただし、高いワクチン接種率を維持する先進国では小児の罹患者数に大きな増加は認められておらず、わが国でも小児の患者報告数に増減は認められていない。このことは、欧米型流行株の増加原因は抗原シフトのみでは説明出来ないことを指摘する。

わが国では1994年に欧米型百日咳菌が出現し、近年の市中からの分離率は50%程度となっている。また、2002年以降、他の先進国と同様にわが国でも青年・成人の罹患者の増加が認められており、欧米型流行株との関連が示唆される。そこで、本研究では欧米型流行株の増加原因を考察するため、プロテオミクスによる網羅的発現解析を実施した。その結果、欧米型に特異的に発現する蛋白質としてタイプ III エフェクター BopC が見出され、今回、BopC の発現差異について遺伝子解析を試みた。

B. 研究方法

菌株: わが国で2002年から2004年に臨床分離された百日咳菌(ワクチン型5株、欧米型5株)を供試した。
細胞障害活性の測定: HeLa 細胞(1×10^3 cells)に百日咳菌(1×10^7 bacterial cells)を添加し、8時間後に培養液中に遊離した LDH 量を測定した。
プロテオーム解析: 百日咳菌の全蛋白質を二次元電気泳動により分離し、銀染色により蛋白スポットを検出した。ワクチン型と欧米型で異なる蛋白スポットを切り出

し、質量分析により蛋白質の同定を行った。

遺伝子解析: ワクチン型ならびに欧米型の *cfbC-bopC* 領域(*bopC* ORF+5'-UTR+3'-UTR, 2,899 bp)をシーケンスし、両者の遺伝子構造を解析した。

BopC 抗体: BopC 抗原はマルトース結合蛋白質 (MBP)との融合蛋白質として大腸菌内(BL21)で発現させた。BopC-MBP 融合蛋白質はアミロースカラムならびに Resource Q カラムを用いて精製後、マウスに免疫した。得られた抗血清に精製 MBP を添加し、抗 MBP 抗体を免疫吸収させることにより抗 BopC 特異抗体を調製した。

BopC 蛋白質の検出: ワクチン型と欧米型について、菌体の全蛋白質および培養液中の BopC 蛋白質をイムノブロットにより検出した。

bopC 転写量の測定: ワクチン型と欧米型から全 RNA を調製し、cDNA を作製した。*bopC* mRNA 量は TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR により測定した。

bopC の転写開始点: 5'-RACE 法を用いて、ワクチン型と欧米型における *bopC* の転写開始点をそれぞれ決定した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床分離株についての解析であり、倫理上特段の問題点は発生しない。

C. 結果

ワクチン型と欧米型百日咳菌の細胞障害活性を測定したところ、ワクチン型と欧米型の平均 LDH 放出量はそれぞれ 6.8%と 12.6%を示した (Fig. 1)。次に、網羅的発現解析により両株の蛋白プロファイルを比較したところ、分子量 66 kDa 付近の酸性蛋白質に欧米型に特異的な蛋白スポットを認めた (Fig. 2)。そこで、この蛋白スポットを質量分析により解析した結果、hypothetical protein BP0500 と同定された。BP0500 は *Bordetella bronchiseptica* のタイプ III エフェクター BopC (別名 BteA) と 98%のアミノ酸配列の相同性を示したことから、BP0500 を BopC と判断した。

ワクチン型と欧米型における BopC 発現をイムノブロットにより検討したところ、欧米型の 5 株はすべて BopC を発現し、一方、ワクチン型 5 株はほとんど BopC を発現しないことが確認された (Fig. 3)。なお、BopC のシャペロン蛋白質である CfbC とタイプ III 分泌装置の構成蛋白質である BopD は両株で発現していた。次に、培養液中の BopC 分泌を解析したところ、欧米型では培養時間に関わらず BopC を分泌することが示された (Fig. 4)。一方、ワクチン型の BopC 分泌は培養時間に関わらず低いことが判明した。

ワクチン型と欧米型における *bopC* 転写を PCR により定性解析した。その結果、ワクチン型と欧米型の両方で *bopC* mRNA の発現が確認された (Fig. 5A)。リアルタイム PCR を用いて *bopC* 転写量を測定したところ、両者の転写量に有意差は認められなかった (Fig. 5B)。次に、*cfbC-bopC* 領域の遺伝子構造を解析したところ、ワクチン型の *bopC* 5'-UTR に IS481 の特異的な挿入を認めた (Fig. 6)。この IS481 の挿入はワクチン型の 98% (65/66 株) で認められ、その挿入位置と方向性はすべて一致していた。一方、欧米型 28 株に IS481 の挿入は認められなかった。

bopC の転写開始点を 5'-RACE 法により解析した結果、欧米型の *bopC* 転写開始点は翻訳開始点の -68 bp (P1)、ワクチン型では P1 より 79 bp 上流の IS481 中に新たに P2 が決定された (Fig. 6)。ワクチン型における P1 と P2 に依存する *bopC* mRNA 量をリアルタイム PCR により測定したところ、P2 に依存する *bopC* mRNA 量は全体の 88% (range, 70-109%) を占めることが示された。このことから、ワクチン型における *bopC* 転写は主に IS481 のプロモーターに依存することが判明した。

D. 考察

本研究では百日咳流行株の遺伝的シフトの原因を考察するため、プロテオミクスによる網羅的発現解析を実施した。その結果、近年の流行株である欧米型にタイプ III エフェクター BopC の強発現を認めた。一方、世界的に分離率が減少傾向にあるワクチン型では BopC の発現量はきわめて低く、この原因は *bopC* プロモータ

一への IS48I 挿入によることが示された。BopC は細胞障害活性を持つエフェクターと知られ、動物に感染する *B. bronchiseptica* では細胞毒素として重要な働きを担うことが報告されている。一方、百日咳菌ではタイプ III エフェクターに関する報告例はなく、本研究が初めての同定例となった。

先進国では百日咳は再興感染症と位置付けられており、わが国を含め多くの先進国で青年・成人罹患者の増加が認められている。この増加原因の一つとして、ワクチン株と異なる抗原遺伝子を持つ欧米型百日咳菌の関与が指摘されている。欧米型の百日咳毒素ならびにパータクチンにはワクチン抗原と異なる遺伝子変化が認められており、ワクチンに対する免疫回避、すなわち抗原シフトとの関係が論議されている。しかし、わが国を始めとする先進国ではワクチン接種児の罹患者数は増加しておらず、ワクチン型から欧米型への変化を抗原シフトのみで説明することは困難であった。今回、我々の研究により、欧米型はワクチン型よりも高い細胞障害活性を持つこと、さらに細胞障害活性を有する BopC が欧米型では強発現していることが明らかとなった。このことから百日咳流行株の抗原シフト、すなわち流行株の遺伝的シフトには病原性の差異が強く関与するものと考察された。

本研究により、近年の流行株である欧米型は高い病原性を持つことが示された。しかし、今回解析を行った菌株は日本で臨床分離されたものであるため、世界的な百日咳再興と BopC 発現との関係は不明である。今後は国外の欧米型菌株における BopC 発現を検証する必要がある。

E. 結論

先進国では百日咳流行株の遺伝的シフトが認められており、その原因の一つとしてワクチンによる選択圧が

提唱されている。本研究により、流行株の変化にはタイプ III エフェクター BopC の発現量、すなわち病原性の差異が関与する可能性が新たに指摘された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表(出版図書等)

1) 蒲地一成: 百日咳毒素と分泌機構, 化学療法の領域, 25:21-27, 2009.

2. 学会発表

1) 蒲地一成, 豊泉裕美, 中村敦, 中島夏樹, 石川隆, 多屋馨子, 荒川宜親, 岡部信彦, 岡田賢司. 咳嗽成人患者を対象とした百日咳保菌率調査. 第 83 回日本感染症学会総会, 平成 21 年 4 月, 東京

2) 蒲地一成. 分子疫学から見た百日咳流行株の細菌学的特性. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 22 年 3 月, 横浜(予定)

3) 大塚菜緒, 蒲地一成, 豊泉裕美, 中村幸嗣, 齋藤良一, 荒川宜親. 百日咳菌における定着因子 Pm の欠損機構. 第 83 回日本細菌学会総会, 平成 22 年 3 月, 横浜(予定)

4) 中村幸嗣, 蒲地一成, 豊泉裕美, 齋藤良一, 鶴岡純一郎, 勝田友博, 立山悟志, 徳竹忠臣, 中島夏樹, 岡田賢司, 加藤達夫, 荒川宜親. 成人と小児における百日咳保菌量の差異について. 第 84 回日本感染症学会総会, 平成 22 年 4 月, 京都(予定)

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

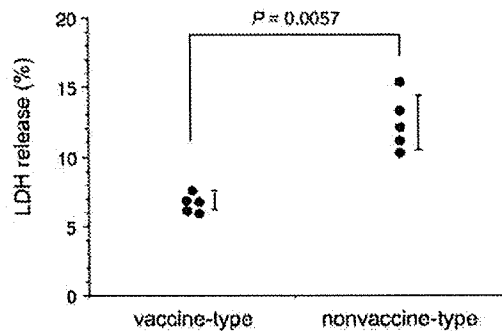


FIG. 1. Cytotoxicity of *B. pertussis* vaccine-type and nonvaccine-type strains. HeLa cells were infected with the vaccine-type (BP155, BP156, BP232, BP233 and BP243) and nonvaccine-type clinical strains (BP157, BP159, BP162, BP228 and BP235) for 8 h. Cleared supernatants were analyzed for LDH release as a measure of cell lysis. Each point represents one strain and vertical bars indicate standard deviation.

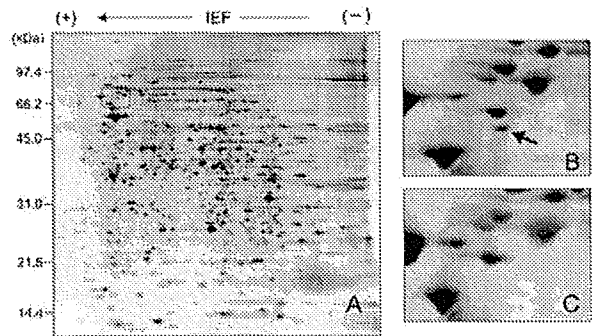


FIG. 2. Comparative proteomic analysis of *B. pertussis* nonvaccine-type and vaccine-type strains. Total protein (10 μ g) of the nonvaccine-type clinical strain BP235 and the vaccine-type clinical strain BP233 were separated by 2-D gel electrophoresis and silver stained. (A) Protein profile of the nonvaccine-type strain. (B) The boxed area in panel A is enlarged. (C) Protein profile of the vaccine-type strain corresponding to panel B. The arrow in panel B indicates a protein spot of type III effector BopC/BteA that was identified by LC-MS/MS analysis.

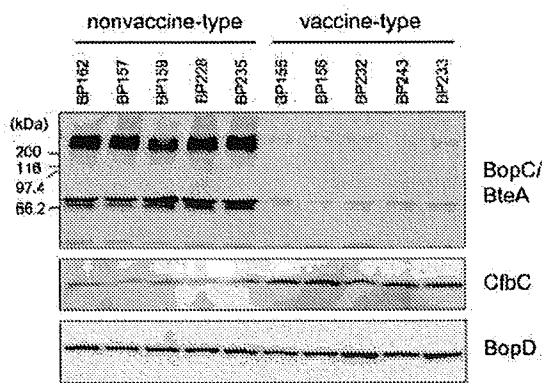


FIG. 3. Expression of BopC/BteA, CfbC and BopD proteins in *B. pertussis* nonvaccine-type and vaccine-type strains. The nonvaccine-type clinical strains (BP157, BP159, BP162, BP228 and BP235) and vaccine-type clinical strains (BP155, BP156, BP232, BP233 and BP243) were cultured in modified SS medium for 18 h. Total protein extracted from bacterial cells was analyzed by immunoblot with anti-BopC/BteA, anti-CfbC and anti-BopD antiserum.

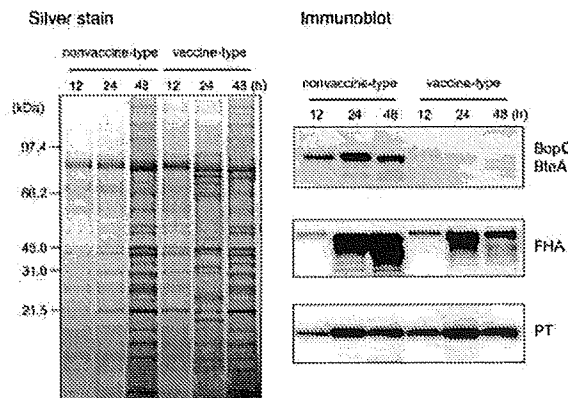


FIG. 4. BopC/BteA secretion from *B. pertussis* nonvaccine-type and vaccine type strains. The nonvaccine-type strain BP235 and vaccine-type strain BP233 were cultured in modified SS medium, and the culture supernatants were collected at 12, 24 and 48 h. Protein samples prepared by precipitation with 10% trichloroacetic acid were separated by 12.5% SDS-PAGE followed by silver staining (left panel). BopC/BteA, FHA and PT secretions were analyzed by immunoblot with anti-BopC/BteA, anti-FHA and anti-PT antiserum (right panels).