

福島～青森県の猟犬については、各県のそれぞれの検体数は少ないため、県ごとに結果を判断することはできないが、まとめると東北地方の陽性は4/112 (3.6%) であり、全体平均よりもやや少ない結果であった。対象が猟犬でない東京、神奈川、栃木を除いて、猟犬のみで検討すると、陽性は16/596 (2.7%) となった (表3)。

B. canis はその自然宿主はイヌ科の動物に限られ、宿主特異性が高いが、参考として東京都のネコを調査した結果では2/280 (0.7%) が陽性であった。

D. 考察・結論

ブルセラ属菌は細胞内寄生菌であるため、抗体は菌の排除には余りに役に立たない。つまり抗体が存在すると言うことは、「菌がどこか (リンパ節など) に潜んでいて、時折、抗原刺激を与えている=感染が継続している」、と考えることもできる。そのため、抗体保有状況はそのときの感染状況を直接反映すると考えられている。今回、国内のイヌにおける抗体保有状況を調査し、すでに我々のところで得られていた結果と併せて比較検討したところ、4.9%が「抗体陽性=感染」、であった。この結果は、他のグループによる、国内の動物病院を受診しているイヌにおける抗体保有状況調査結果3.0%よりも、若干高くなっていた。

本調査では東京、栃木、神奈川についてはそれぞれの動物愛護センターに収容されたイヌ、それ以外の県については猟犬となっている。猟犬は特殊な用途のイヌグループではあるが、その陽性率は2.7%と全体平均よりも低く、神奈川県と同程度であった。このことは、飼育犬の用途 (愛玩用か猟犬か) に陽性率はあまり関わらないということを表している。また、本調査における全体平均は、先に示した動物病院調査よりも高値を示したが、これは、神奈川県や猟犬では2.5, 2.7%であるのに対し、栃木県と東京都の結果が、全体平均を押し上げていることによる。神奈川県の調査も2003~2006年度であり、ほぼ栃木県、東京都の調査時期と重なるにもかかわらず、なぜ栃木県や東京都で高い抗体保有率を示したのか、

理由は定かではない。ただ、近年は、両地域ともに抗体保有率に低下傾向が見えている。その理由が、何によるのかは推測の域を出ないが、2006年頃から一時期、イヌのブルセラ病そのものについてや、繁殖施設における集団発生情報が、マスコミ等にも取り上げられたことで、本疾患がより認知され、予防措置 (個人ブリーダーも含めて、繁殖施設内への保菌動物の侵入阻止や繁殖に供する動物の事前検査の実施など) が、徐々に取られるようになってきているのかもしれない。

B. canis は、その自然宿主はイヌ科の動物に限られ、宿主特異性が高い。また、ヒトに感染しても発症しない、または発症しても軽微なカゼ様で自然治癒すると言われる。ただ、2008年の繁殖犬による施設従業員の感染例のように比較的強い症状を示したものや、その他の報告例のような長期にわたる不明熱を示し、診断まで時間がかかったものなどがあり、患者数が少ないとはいえ公衆衛生的に無視して良い物ではない。またイヌにおける繁殖障害による経済的被害は業者にとっては甚大である。本疾患は明らかに国内のイヌで感染が維持されており、2~5%が感染・保菌している。一般飼育者を含めたイヌを取り扱う者に対して、本疾患及びその予防・対処法に関する情報を提供し、より一層、認知・実践してもらう必要があると考えられる。

ブルセラ症に関して、日本と同様の状況にある台湾については、現在、調査継続中であるが、2001年の調査では5/38 (13.2%) の抗体陽性 (感染) イヌが報告されている。現在、その抗体保有率が低下しているのかどうか、興味深い点である。また、これまで知られていなかった患者についても、徐々に明らかになってくるものと思われる。

謝辞: イヌ血清サンプルの採取・提供、データ解析のご協力について、藤澤美和子城南島出張所長ほか東京都動物愛護センターの皆様、栃木県保健環境センターの皆様、岐阜大学応用生物科学部獣医病理学教室の皆様へ深謝いたします。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表等

1. 論文・総説等

(1) 麻生さくら, 渡部信栄, 中村望, 細貝みゆき, 今岡浩一, 野本優二, 手塚貴文, 塚田弘樹. 血液培養から分離された *Brucella melitensis* の一症例. 医学検査, 61(5): 902-907, 2012

(2) Nakato,G, Hase,K., Suzuki,M., Kimura,M., Ato,M., Hanazato,M., Tobiume,M., Horiuchi,M., Atarashi,R., Nishida,N., Watarai,M., Imaoka,K. and Ohno,H. Cutting Edge: *Brucella abortus* exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor. J. Immunol., 189:1540-1544, 2012

(3) 今岡浩一, 木村昌伸. 日本におけるブルセラ症—感染症法施行前(1999年3月31日)まで—. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7): 186-187, 2012

(4) 今岡浩一, 鈴木道雄, 慕蓉蓉. 台湾におけるブルセラ症—33年ぶりの患者報告と届出疾患へ—. in: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7): 193-194, 2012

(5) 今岡浩一, 木村昌伸, 勝川千尋. ブルセラ症—ブルセラ症検査マニュアル—2012. in: 病原体検査マ

ニュアル(国立感染症研究所、地方衛生研究所全国協議会編), [http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/brucellosis_2012.pdf], 2012

(6) 今岡浩一. ブルセラ症の現状. in: 化学療法の領域, 医薬ジャーナル社, 28(12): 138-148, 2012

2. 学会発表・講演等

(1) Gaku Nakato, Koji Hase, Michio Suzuki, Masanobu Kimura, Manabu Ato, Misaho Hanazato, Minoru Tobiume, Motohiro Horiuchi, Ryuichiro Atarashi, Noriyuki Nishida, Masahisa Watarai, Koichi Imaoka, Hiroshi Ohno. Cellular prion protein on Peyer's patch M cells could serves as an invasive receptor for *Brucella abortus*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Sep. 11-14, 2012

(2) 鈴木道雄, 中藤学, 度会雅久, 木村昌伸, 堀内基広, 長谷耕二, 飛梅実, 阿戸学, 森川茂, 山田章雄, 大野博司, 今岡浩一. *Brucella abortus* は腸管パイエル板からの侵入に M 細胞上のプリオン蛋白質 (PrPc) を利用する. 第 155 回日本獣医学会学術集会, 東京, 2013 年 3 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1) 国内の *B. canis* 感染患者事例 (感染症法指定後、1999.4.1～2012.12.31)

診断年月	年齢	報告都道府県	推定感染地	推定感染経路	症状	血清抗体検査		菌分離	PCRによる同定
						abortus	canis		
2002.1	40代	東京都	東京都?	ペットの犬	発熱、食欲不振	—	陽性	(-)	実施せず
2005.12	10代	長野県	長野県?	不明	発熱、筋肉痛、腹痛	—	陽性	(-)	陰性(血清)
2006.6	20代	長野県	(イタリア)	不明	発熱、筋肉痛	—	陽性	(-)	陰性(血液)
2006.9	60代	長野県	長野県	不明	発熱、脾腫	—	陽性	(-)	実施せず
2006.10	70代	宮城県	宮城県	不明	発熱、中枢神経症状	—	陽性	(-)	実施せず
2007.4	40代	大阪府	大阪府	イヌ	リンパ節腫脹、倦怠感	—	陽性	(-)	実施せず
2008.6	10代	埼玉県	埼玉県	飼い犬	発熱、関節炎、筋炎	—	陽性	(-)	陰性(血清)
2008.8	70代	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱、脾腫、肝腫大	—	陽性	(+)	B. canis
2008.8	40代	愛知県	愛知県	繁殖犬	発熱	—	陽性	(+)	B. canis
2009.4	30代	埼玉県	埼玉県	繁殖犬	(無症状病原体保有者として届出)	—	陽性	(-)	実施せず
2010.6	60代	栃木県	栃木県	不明	発熱	—	陽性	(-)	実施せず
2011.11	60代	島根県	島根県	不明	発熱、中枢神経症状(脳脊髄炎)	—	陽性	(-)	陰性(血清・髄液)

表2) 国内のイヌにおける *B. canis* 集団感染事例

1971 : 実験動物用ビーグル犬繁殖場で発生

70年代 : 実験動物用、訓練学校、ペット用繁殖場などで発生報告

70年代後半の抗体保有状況 -- 調査報告の平均8.8%

(近年の集団発生)					
発生年	地区	飼育場・用途	感染イヌ	陽性犬の処置	感染者の届出
2003	静岡	繁殖施設	51 / 114	不明	なし
2005～2006	沖縄	繁殖施設(2カ所)	16 / 83	安楽殺処分または投薬治療	なし
2006～2007	大阪	繁殖施設	139 / 263	安楽殺処分	なし
2008	愛知	ペットショップ・繁殖施設	15 / 37	安楽殺処分	飼育者2名
2008	東京・千葉	ドッグレンタル・ドッグカフェ等	18 / 59	去勢	なし

表3) 国内のイヌにおける *B. canis* に対する抗体保有状況

都道府県	検査頭数	陽性数	陽性率(%)
青森	23	0	0.0
岩手	16	0	0.0
宮城	28	0	0.0
秋田	9	0	0.0
山形	20	3	15.0
福島	16	1	6.3
栃木	582	38	6.5
東京	519	41	7.9
神奈川	479	12	2.5
新潟	24	2	8.3
富山	9	0	0.0
長野	23	1	4.3
岐阜	36	3	8.3
静岡	46	1	2.2
愛知	15	0	0.0
三重	56	0	0.0
滋賀	5	0	0.0
広島	47	0	0.0
香川	8	0	0.0
高知	10	0	0.0
長崎	20	0	0.0
熊本	20	0	0.0
宮崎	20	1	5.0
鹿児島	110	2	1.8
沖縄	35	2	5.7
合計	2176	107	4.9

東京都一犬			
年度	検査頭数	陽性数	(%)
2007	50	5	10.00
2008	89	12	13.48
2009	106	8	7.55
2010	70	6	8.57
2011	125	7	5.60
2012	79	3	3.80
合計	519	41	7.90

栃木県一犬			
年度	検査頭数	陽性数	(%)
2002	245	18	7.35
2003	64	5	7.81
2004	99	7	7.07
2005	130	7	5.38
2012	44	1	2.27
合計	582	38	6.53

(参考)

東京都一猫			
年度	検査頭数	陽性数	(%)
2008	98	1	1.02
2009	102	0	0.00
2010	80	1	1.25
合計	280	2	0.71

東京：東京都動物愛護相談センター調査(2007-2012)

栃木：栃木県動物愛護指導センター調査(2003, 2012)

神奈川：神奈川県A市動物愛護センター調査(2003-2006)

その他：猟犬調査(2009-2012)

* 本表は、2012年度に入手した東京都(一部)、栃木県、東北地方の結果と、それまでの検査結果をまとめたものである

厚生労働科学研究費補助金(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

台湾および石垣島の渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査
と採集蚊からの鳥類由来病原体の検出

研究分担者 津田良夫 国立感染症研究所
研究協力者 金 京純 日本大学生物資源科学部

渡り鳥飛来地に生息する疾病媒介蚊に着目して、台湾と石垣島の水田地帯で媒介蚊採集を行った。調査はドライアストラップを用いた成虫調査による。2011年と2012年に各2回現地調査を実施して、合計31種類の疾病媒介蚊が採集された。このうち両地域で共通して採集された種類はコガタアカイエカ、ヨツホシイエカなど12種類で、いずれも生息密度の高い主要な種類であった。得られた蚊サンプルから、鳥由来の蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫の検出を行った。2011年の蚊サンプルから検出された鳥マラリア原虫の系統は7系統で、1種類 (*P. rouxi*) が共通していた。今回の調査で鳥マラリア原虫が検出された蚊の種類は台湾で5種類、石垣島では2種類で、共通する種類は認められなかった。サンプルに含まれていた吸血蚊を用いて体内に残された血液のDNAを分析し、吸血源となった動物の種類を同定したところ、コジュケイやハシブトガラス、アオバズクなどの野鳥類と人やハクビシンなど哺乳類を吸血したことがわかった。

A. 研究目的

台湾はフィリピンから南西諸島、沖縄本島、トカラ列島を経て日本列島そして極東ロシアあるいはカムチャッカ半島へと続く渡り鳥のルートの中で重要な位置にある。渡り鳥が鳥由来病原体を拡散させる要因のひとつとして、近年注目されており、蚊によって媒介される病原体の中にも、ウエストナイルウイルスのように渡り鳥などの野鳥の重要性が指摘されている病原体がある。

台湾と地理的に近い位置にある与那国島、西表島、石垣島などの中には、動物相や植物相に高い類似性が見られる。疾病媒介蚊に関して種類相を比較すると、台湾 (132 種類)

と我が国 (120 種類) の種類相の 1/4 (46 種類) が共通している。中でもイエカ属の類似性は最も高く 68% で、ヤブカ属の 14% や、ハマダラカ属の 20% よりもかなり高い。共通する種類が多いということは、仮に台湾産のある種の蚊によって媒介されている病原体が我国に持ち込まれた場合に、それと同じ種類の媒介蚊が我国に生息しており、わが国でもその病原体を媒介する可能性が高いことを意味している。しかしながら同じ種類の蚊であっても、台湾と日本に生息する集団は地理的に隔離され、また異なる気候条件に適応していることから、ある程度の遺伝的な違いがあることは十分予想される。

台湾と我が国の疾病媒介蚊や蚊によって媒介される病原体の間には、どのような遺伝的類縁関係があるかを明らかにし、蚊によって媒介される病原体の流行予測や監視に役立てることを目的として、台湾 CDC との共同研究を行っている。

本研究は渡り鳥飛来地に生息する疾病媒介蚊に着目して、台湾と石垣島の媒介蚊相を比較した。また、蚊媒介性病原体として日本脳炎ウイルスと鳥マラリア原虫をターゲットとして、これら病原体の蚊からの検出を行った。

B.研究方法

台湾における現地調査：2011年に引き続き台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地（蘇澳，無尾港水鳥保護区）を調査地として疾病媒介蚊の現地調査を行った。調査は渡り鳥が飛来する2012年5月と10月に実施した。成虫調査は1kgのドライアイス誘引源とするトラップ10台を設置して、連続した2日間採集を行った。捕獲された成虫は毎日回収し、台湾CDCの実験室に持ち帰って種類同定を行った。サンプルはその後の分析のために冷凍で保存した。

石垣島における現地調査：台湾北東部の蚊相と比較するために石垣島南部の水田地帯で、2012年3月と9月に現地調査を実施した。成虫調査はドライアイストラップ15台を用いて、連続した3日間行った。

蚊からの病原体の検出：台湾の調査で捕獲されたコガタアカイエカ成虫サンプルは、台湾CDCで日本脳炎ウイルスの分離を試みた。それ以外の成虫サンプルを用いて、鳥マラリア原虫の検出を行った。

吸血蚊の吸血源動物の同定：トラップ採集及び捕虫網採集によって採集された吸血蚊からは、DNAを抽出して、吸血源動物の同定と鳥

マラリア原虫の検出を行った。

C.研究結果

台湾と石垣島の現地調査によって採集された蚊の種類とその個体数を表1にまとめて示した。2年間の調査で台湾では合計19種類、石垣島では合計24種類の蚊が採集された。このうち台湾と石垣島の両方の調査地で採集されたのは、12種類であった。これら12種類はいずれも個体数が多く、調査地でふつうに採集される種類であった。

台湾で採集されたコガタアカイエカのサンプルからは日本脳炎ウイルスの検出を試みたが、検出できなかった。

コガタアカイエカ以外の蚊サンプルからの鳥マラリア原虫の検出結果を表2と3に示した。台湾の6月と9月のサンプルから、それぞれ4つの鳥マラリア原虫 (*Plasmodium*) 陽性サンプルが得られた。これらの *Plasmodium* 原虫はチトクロームB遺伝子の類似性から、既に報告されている3系統 (GRW6、*P. tacy*、*P. rouxi*) と新規の2系統 (Yilan01 と Yilan02) と同定された。鳥マラリア原虫が検出された蚊の種類は、カラツイエカ、クシヒゲカの種類、ミナミハマダライエカ、ヨツホシイエカ、サキジロカクイカの5種であった。

石垣島の6月のサンプルから、6つの鳥マラリア原虫陽性サンプルが得られた。このうち5つはムラサキヌマカから得られ、原虫系統はすべてORW1であった。残りの1陽性サンプルはネッタイエカで、原虫は *P. juxtannucleare* であった。9月のサンプルからは鳥マラリア原虫はまったく検出されなかった。

吸血源動物の同定結果と吸血蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果を表4と5に示した。台湾の調査地で得られた吸血蚊は5種類で、ネッタイエカ、ミナミハマダライエカ、サ

キジロカクイカは野鳥を吸血していた。コガタアカイエカは哺乳類（ハクビシンとネコ）を吸血していた。コジュケイを吸血していたネッタイエカからは、鳥マラリア原虫（*P. rouxi*）が検出された。石垣島で採集された吸血蚊は6種類で、ネッタイエカ、ヨツホシイエカ、ムラサキヌマカは野鳥から吸血していた。カニアナツノフサカは人を吸血しており、この個体からは鳥マラリア原虫（*P. rouxi*）も検出された。また、ヒヨドリを吸血していたムラサキヌマカから鳥マラリア原虫 ORW1 が検出された。

D. 考察

台湾北東部と石垣島の蚊相には12種類の共通種が確認された。また、蚊から検出された鳥マラリア原虫の系統は7系統で、1種類（*P. rouxi*）が共通していた。今回の調査で鳥マラリア原虫が検出された蚊の種類には、共通する種類は認められなかった。

本研究で検出された鳥マラリア原虫の系統には、世界的な分布を示す4系統とデータベースにない新規の系統2つが含まれていた。広範囲に分布する鳥マラリア原虫系統のひとつである *P. rouxi* は、台湾と石垣島の両方で検出されており、恐らく渡り鳥によって持ち込まれたのではないかと推測される。

検出された鳥マラリア原虫はそれぞれの調査地で感染サイクルを持つかどうかは、今の段階では不明である。我国の他地域での鳥マラリア原虫の研究では、調査地域に感染サイクルを持ち、高頻度でくり返し媒介蚊から検出される系統が存在する一方、数年間の調査を通じて1回しか検出されず野鳥によって偶

然持ち込まれたと推測される系統も存在することが示唆されている。本研究の調査地でどの鳥マラリア原虫系統がどの媒介蚊によって維持されているのかを、今後の研究によって明らかにすることが必要だろう。

石垣島のサンプルで、人の血液を吸血したカニアナツノフサカから鳥マラリア原虫が検出されている。これは、鳥由来の病原体を持った蚊が人を吸血したことを意味している。鳥マラリア原虫とは異なる鳥由来の病原体が人に伝播される潜在的な経路のひとつを示唆するものであり興味深い。

E. 結論

台湾北東部と石垣島南部の現地調査を実施し、合計31種類の疾病媒介蚊が採集された。このうち両地域で共通して採集された種類はコガタアカイエカ、ヨツホシイエカなど12種類であった。また、蚊から検出された鳥マラリア原虫の系統は7系統で、1種類（*P. rouxi*）が共通していた。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. 台湾北東部宜蘭県および石垣島の渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査結果

種 類	共通種	台湾		石垣島	
		2011	2012	2011	2012
コガタアカイエカ	○	565	5223	1081	884
ミナミハマダライエカ		151	325		
アシマダラヌマカ	○	38	305	246	278
ヒトスジシマカ	○	217	49	332	71
オオクロヤブカ	○	23	210	32	18
カラツイエカ	○	90	129	27	359
ムラサキヌマカ	○	27	182	150	204
ネットアイエカ	○	161	27	239	327
クシヒゲカ一種		28	100		
ヨツホシイエカ	○	69	38	474	563
vish gr	○	1	13	1016	202
シロハシイエカ	○	2	10	747	132
クロフクシヒゲカ	○		9	11	5
サキジロカクイカ		5			
アカツノフサカ			5		
ミツホシイエカ			3		
キンパラナガハシカ			2		
イエカ的一种		2			
フタクロホシチビカ	○	1	1		1
ハラオビツノフサカ					50
リバーシマカ				13	7
ハマダラナガスネカ				5	2
コガタハマダラカ				6	
クロフトオヤブカ				6	
キンイロヤブカ				3	2
シナハマダラカ				1	
ハラグロカニアナチビカ				1	
オオツルハマダラカ					1
オビナシイエカ					1
ヤブカ的一种				1	
チビカ的一种					1
捕獲総数		1380	6631	4391	3108
種類数	12	15	17	19	19

表 2 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地における 2011 年の調査で採集された蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果

月	種 類	採集数	供試虫数	プール数	検出された Plasmodium の系統と陽性 サンプル数
5 月	ネッタイエカ	112	110	11	0
	ミナミハマダライエカ	133	130	13	0
	カラツイエカ	80	80	8	3 (Yilan02)
	クシヒゲカの種類	23	23	3	1 (GRW6- <i>P. elongatum</i>)
	ヒトスジシマカ	13	13	2	0
	オオクロヤブカ	16	16	3	0
	アシマダラヌマカ	0			
	フタクロホシチビカ	1	1	1	0
9 月	ネッタイエカ	49	50	5	0
	ミナミハマダライエカ	18	18	2	1(P.rouxi)
	カラツイエカ	10	10	2	0
	ヨツホシイエカ	69	78	8	P.tacy と Yilan01
	ムラサキヌマカ	27	27	3	0
	アシマダラヌマカ	37	37	5	0
	クシヒゲカの種類	5	5	1	0
	ヒトスジシマカ	147	147	15	0
	オオクロヤブカ	5	5	1	0
	サキジロカクイカ	2	2	1	1(P.rouxi)

表3 石垣島の渡り鳥飛来地における2011年の調査で採集された蚊からの鳥マラリア原虫の検出結果

月	種類	供試虫数	プール数	検出された Plasmodium の系統と陽性サンプル数
6月	ヒトスジシマカ	140	7	ORW1(5) P. juxtannucleare(1)
	ムラサキヌマカ	135	9	
	ネッタイエカ	57	5	
	カラツイエカ	17	2	
	リバーシマカ	16	2	
	アシマダラヌマカ	15	1	
	オオクロヤブカ	15	2	
	カニアナツノフサカ	10	1	
	クロフクシヒゲカ	4	1	
	ハマダラナガスネカ	2	1	
	シナハマダラカ	1	1	
	キンパラナガハシカ	1	1	
	コガタハマダラカ	1	1	
9月	ヨツホシイエカ	450	24	
	アシマダラヌマカ	230	16	
	ネッタイエカ	137	10	
	ヒトスジシマカ	100	5	
	オオクロヤブカ	17	3	
	カラツイエカ	11	1	
	ムラサキヌマカ	11	1	
	コガタハマダラカ	6	1	
	クロフクシヒゲカ	6	1	
	ハマダラナガスネカ	3	1	
	インイロヤブカ	3	1	

表 4 台湾北東部宜蘭県の渡り鳥飛来地で採集された吸血蚊の吸血源動物の同定と鳥マラリア原虫の検出結果

種 類	吸血源動物	数	検出された <i>Plasmodium</i> の系統
ネッタイエカ	コジュケイ	2	1(<i>P. rouxi</i>)
ミナミハマダライエカ	コジュケイ	1	0
	台湾ヒメマルハシ	1	0
コガタアカイエカ	ハクビシン	1	0
	ネコ	1	0
サキジロカクイカ	台湾ヒメマルハシ	1	0
アシマダラヌマカ	Not amplified	1	0

表 5 石垣島の渡り鳥飛来地で採集された吸血蚊の吸血源動物の同定と鳥マラリア原虫の検出結果

種 類	吸血源動物	数	<i>Plasmodium</i>
カニアナツノフサカ	ヒト 1, 不明 7	8	<i>P. rouxi</i> (1)
ネッタイエカ	ハシブトカラス 1, イヌ 1	2	0
ヨツホシイエカ	アオバズク	1	0
ムラサキヌマカ	ヒヨドリ 1, 不明 1	2	ORW(1)
オオクロヤブカ	ウシ	1	0
リバーシマカ	セマルハコガメ 1, リュウキュウイノシシ 1	2	0

アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行調査と病原性解析

研究分担者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行状況を台湾 CDC と共同して調査した。百日咳様患者を対象に *B. holmesii* の遺伝子検査を実施した結果、日本における検査陽性者は487名中0名であったが、台湾では1名の *B. holmesii* 感染者を確認した。なお、百日咳菌の遺伝子検査陽性率は日本が9.0%、台湾が約10%とほぼ同様な成績を示した。また、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、呼吸器と血液由来株の蛋白発現を比較解析した。その結果、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質（FHA-like protein）が認められ、本蛋白質が繊維状赤血球凝集（FhaB）と異なることを確認した。今年度の調査では *B. holmesii* 陽性者が少なかったことから、本菌は百日咳菌と同様に周期的な流行を持つ可能性が指摘された。

研究協力者

鯉坂裕美（国立感染症研究所・細菌第二部）

大塚菜緒（同上）

藤戸亜紀（高知県衛生研究所）

鍋島 民（同上）

松本道明（同上）

岡田賢司（国立病院機構福岡病院）

姚淑滿（台湾 CDC）

江春雪（同上）

渡邊峰雄（北里大学・感染制御科学府）

A. 研究目的

Bordetella holmesii は1995年に米国 CDC により命名された新しい百日咳類縁菌であり、免疫系に基礎疾患を持つ患者に感染し、敗血症・心内膜炎などの原因菌となる。近年では基礎疾患を持たない青年・成人に感染し、百日咳と同様な臨床像（咳嗽）を引き起こすことが報告されている。これまで *B. holmesii* の症例報告は主に米国に限られていたが、2009年にわが国でも初の成人感染例が確認された。2010~11年の宮崎県で発生した百日咳集団感染事例では6例の感染者が認められ、世界で初めてヒト-ヒト感染の可能性が指摘された。さらに2011年には気管支炎を発症した幼児の *B. holmesii* 感染症例が確認され、本菌が幼児にも感染することが示された。これらの感染症例は *B. holmesii* がアジア地

域に広がっていることを示唆するが、その感染実態は明らかとなっていない。

B. holmesii の臨床像は百日咳菌と等しく、臨床診断では両菌を区別できないという問題がある。また、*B. holmesii* には百日せきワクチンが無効であるため、本菌の蔓延はワクチン有効性を低く見積もる原因となる。これらの問題点を克服するため、平成23年度の本研究事業では *B. holmesii* に特異的な遺伝子検査法、すなわち loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の開発を行った。今回アジアにおける *B. holmesii* の流行状況を把握することを目的に、台湾 CDC と共同して遺伝子検査による病原体サーベイランスを実施した。さらに、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、本菌の呼吸器と血液由来株のタンパク発現を比較解析した。

B. 研究方法

日本における検査体制：福岡県福岡市と高知県高知市で発生した百日咳様患者を対象に遺伝子検査を実施した。遺伝子検査は *B. holmesii* の LAMP (Otsuka et al., Microbiol Immunol, 2012) または duplex リアルタイム PCR により実施し、duplex リアルタイム PCR は既報 (Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010) のものを一部改変し、VIC 標識された TaqMan MGB プローブを用いた。福岡県の患者検体（鼻腔分泌物）は国立感染症研究所

細菌第二部、高知県の患者検体は高知県衛生研究所において検査を行った。高知県衛生研究所では百日咳強化サーベイランス事業として遺伝子検査を実施した。台湾における検査体制：国立感染症研究所から台湾 CDC に duplex リアルタイム PCR 法を技術移転するとともに、*B. holmesii* の陽性コントロール DNA を供与した。

イムノブロット解析：*B. holmesii* 患者の呼吸器から分離された 2 株 (BH2、BH6) と呼吸器以外から分離された 2 株 (BH7、BH ATCC51541) を供試した。BH7 株は心外膜炎患者の心嚢液 (Nei et al., J Clin Microbiol, 2012)、BH ATCC51541k 株は敗血症患者の血液から分離されたものであり、両株を血液由来株とした。菌株は Bordet-Gengou 培地で培養し、菌体から全タンパク質を抽出した。イムノブロット解析には、百日咳菌 FHA に対するマウス抗血清ならびに BH2 株の全菌体に対するマウス抗血清を用いた。

fhaB 欠損株の作製：相同組換えにより FHA をコードする *fhaB* 遺伝子を破壊した。BH2 株の破壊株を $\Delta fhaB$ -BH2 株と命名した。

(倫理面への配慮)

患者検体は診断目的に国立感染症研究所に搬入されたものを供試した。医療機関において患者の個人情報削除し、倫理上問題が発生しないよう配慮した。

C. 結果

世界における *B. holmesii* の検出状況を図 1 に示した。現在までに *B. holmesii* 感染症例が報告されているのはフランス、英国、オランダの EU 諸国、米国、オーストラリア、チリ、サウジアラビア、日本であり、アジアでは日本以外からの報告例はない。日本と米国では、2010~11 年に発生した百日咳流行において百日咳菌とともに *B. holmesii* が検出され、本菌が百日咳菌と同時に流行する可能性が示唆された。

今回の調査では、福岡県福岡市と高知県高知市の百日咳様患者 (計 487 名) について遺伝子検査を実施した。その結果、*B. holmesii* の陽性者は 0 名、百日咳菌の陽性者は福岡県 5 名 (3.9%)、高知県 59 名 (16.5%) であった (表 1)。両県を合わせた百日咳菌陽性者は 64 名、その陽性率は 9.0% を示した。一方、台湾 CDC が

実施した調査では、台湾における *B. holmesii* の陽性者は 1 名、百日咳菌の陽性率は約 10% であった。図 2 には 1999 年から 2012 年における日本国内の百日咳患者報告数の推移、図中の表は日本国内で文献および遺伝子検査で確認された *B. holmesii* の検出数を示した。百日咳の患者報告数は 2008~10 年に増加が認められ、その後 2011 年に *B. holmesii* の検出数が増加した。

B. holmesii の呼吸器と血液由来株のタンパク発現を比較したところ、呼吸器由来株 (BH2 株、BH6 株) に特異的に発現する高分子タンパク質 (FHA-like protein) を認めた (図 3、矢印)。この高分子タンパク質は抗 wBH2 抗体以外に抗百日咳菌 FHA 抗体でも検出されたが、その抗 FHA 抗体によるシグナルはきわめて微弱なものであった。この FHA-like protein の遺伝子を同定するため、BH2 株の *fhaB* 破壊株を作製し、そのタンパク発現をイムノブロットにより解析した。その結果、高分子タンパク質のシグナルは $\Delta fhaB$ -BH2 株に認められ、本蛋白質が百日咳菌の繊維状赤血球凝集素 (FHA) とは遺伝的に異なることが判明した。

D. 考察

今回、日本での *B. holmesii* 感染者は 0 名、台湾では 1 名が確認された。台湾における感染者は小学生であり、本菌の感染者が乳幼児よりも 10 歳代に多いという報告に一致した。ただし、今回の調査では陽性者が 1 名と少なく、アジアにおける本菌の流行を考察することは出来なかった。日本、米国、チリでは 2010~11 年に多数の感染者が認められたことから、本菌も百日咳菌と同様に周期性の流行を持つ可能性が示唆された。百日咳菌の流行周期は約 4 年であることから、*B. holmesii* についても継続的な流行調査が必要である。平成 25 年度も引き続き台湾 CDC と協力して本調査を実施する予定である。

B. holmesii の細菌学的解析において、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質を見出した。これまでに *B. holmesii* に対するワクチン開発は行われておらず、高い抗原性を持つ FHA-like protein はワクチン抗原候補の一つと考えられた。FHA-like protein は抗百日咳菌 FHA 抗体と弱く交差したが遺伝的に FHA とは異なることが示された。ワクチン開発には遺伝子同定

が必須となるが、本菌のゲノム解析が終了していないため今回は同定にまで至らなかった。ただし、公開されている contig 情報を用いて高分子量の ORF を検索したところ、定着因子として *fhaB* と *bipA* 遺伝子の存在を認めた。欠損株を用いた研究により FHA-like protein が FhaB である可能性は除外されることから、現在 BipA の可能性について検討を進めている。次年度は FHA-like protein をコードする遺伝子を同定するとともに、ワクチン抗原としての有用性を評価する。

E. 結論

台湾 CDC と共同で百日咳類縁菌 *B. holmesii* の病原体サーベイランスを実施し、台湾で1名の *B. holmesii* 感染者を確認した。今回の調査では *B. holmesii* 陽性者が少なかったことから、本菌は百日咳菌と同様に周期的な流行を持つ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

1) Katsukawa C, Kushibiki C, Nishito A, Nishida R,

Kuwabara N, Kawahara R, Otsuka N, Miyaji Y, Toyozumi-Ajisaka H, **Kamachi K**. Bronchitis caused by *Bordetella holmesii* in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection. J Infect Chemter, [Epub ahead of print]

2) 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.

2. 学会発表

1) 渡邊峰雄, 山口哲矢, 大塚菜緒, **蒲地一成**. *Bordetella holmesii* に対する新規ワクチンの開発. 第86回日本細菌学会総会, 平成25年3月, 幕張

2) 渡邊峰雄, 山口哲矢, 大塚菜緒, **蒲地一成**. 国内で分離された *Bordetella holmesii* に対する DPT ワクチンの効果. 第16回日本ワクチン学会学術集会, 平成24年11月, 横浜

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

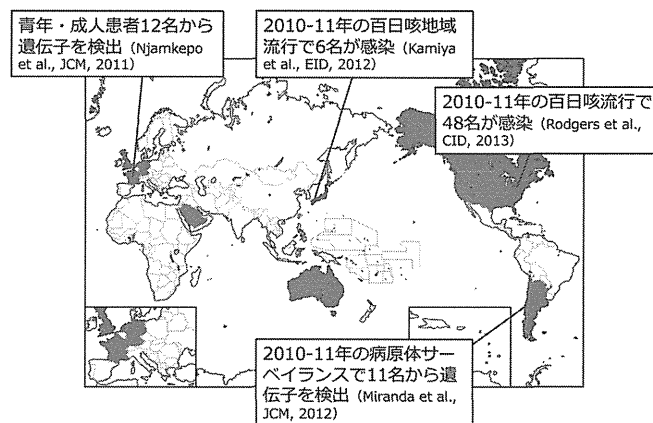


図1. 世界における *Bordetella holmesii* の検出状況

B. holmesii はEU諸国(フランス、英国、オランダ)、米国、オーストラリア、チリ、サウジアラビアで検出されている。アジアでは日本からのみ報告されている

表 1. 日本における *Bordetella holmesii* の検出成績 (2012 年)

調査場所	調査期間	検体数	<i>B. holmesii</i> 陽性数	百日咳菌陽性数 (%)
福岡県福岡市	2012 年 4~12 月	130	0	5 (3.8%)
高知県高知市	2012 年 8~11 月	357	0	59 (16.5%)
総計		487	0	64 (13.1%)

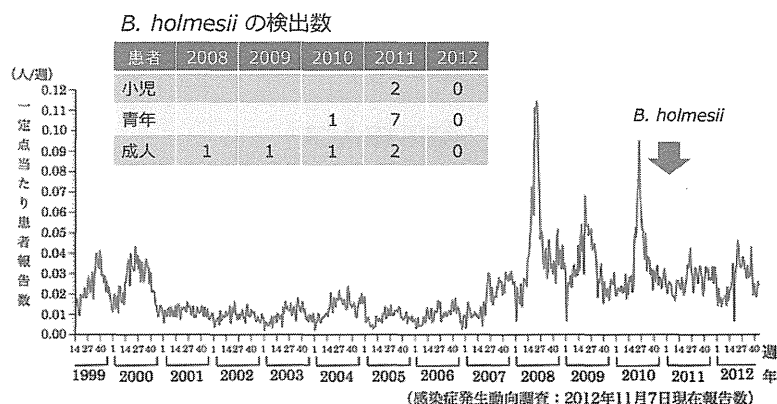


図 2. 日本における百日咳患者の報告数の推移

図中の表は日本国内で文献および細菌学的検査により確認された *B. holmesii* の検出数を示す。日本では 2008~10 年に大規模な百日咳流行が認められ、*B. holmesii* の検出数は 2011 年に最大の 11 症例を示した

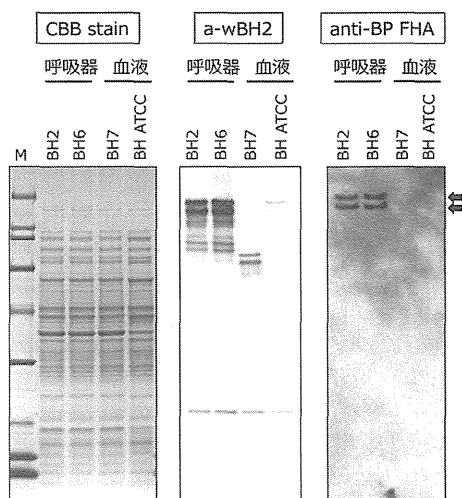


図 3. *Bordetella holmesii* の呼吸器由来株に認められる高分子タンパク質
呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH6, BH ATCC51541) から全タンパク質を抽出し、SDS-PAGE (10-20% gradient)により分離した。レーンあたり 5 μ g の全タンパク質を供試し、抗 wBH2 抗体または抗百日咳菌 FHA 抗体で検出した

NOTE

Simple and specific detection of *Bordetella holmesii* by using a loop-mediated isothermal amplification assay

Nao Otsuka¹, Shuji Yoshino², Kimiko Kawano², Hiromi Toyoizumi-Ajisaka¹, Keigo Shibayama¹ and Kazunari Kamachi¹

¹Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, and ²Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment, Gakuen Kibanadai Nishi 2-3-2, Miyazaki 889-2155, Miyazaki, Japan

ABSTRACT

A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for simple detection of *Bordetella holmesii* was developed. This assay discriminates between *B. holmesii* and other *Bordetella* species and successfully detect *B. holmesii* DNA in nasopharyngeal swab samples from subjects with suspected pertussis. The LAMP assay results were in complete agreement with the results of previously published real-time PCR assay, indicating that the former is a powerful tool for the accurate diagnosis and surveillance of *B. holmesii*.

Key words *Bordetella holmesii*, loop-mediated isothermal amplification, molecular diagnosis, *recA*.

Bordetella holmesii (formerly known as CDC nonoxidizer group 2) is a small Gram-negative coccobacillus that was first reported in 1995 (1). *B. holmesii* causes disease mainly in immunocompromised patients with serious underlying medical conditions, and is associated with bacteremia, endocarditis, pneumonia, and septic arthritis (1–7). *B. holmesii* has been detected in nasopharyngeal specimens from patients with pertussis-like symptoms (8, 9) and therefore may also be responsible for causing a disease similar to pertussis (whooping cough) in otherwise healthy patients, particularly young adults.

The bacterium *B. pertussis* is the predominant cause of pertussis, the diagnosis of which is frequently established by using PCR specific for a target insertion sequence IS481 (10, 11). Because IS481 is present in multiple copies in both the *B. pertussis* and *B. holmesii* genomes (12), IS481-based PCR assays may lead to misdiagnosis of *B. holmesii* as *B. pertussis* (12, 13). To specifically detect *B. holmesii*, RT-PCR assays have recently been developed that target the housekeeping gene *recA*, which is polymorphic in *Bordetella* species (8, 14). However, this assay has the disadvan-

tage that it requires expensive real-time PCR equipment, which may not be feasible for hospital laboratories.

During the last 10 years, a novel method, known as LAMP, for amplifying DNA with high specificity and simplicity has been developed (15). LAMP has become a powerful tool for facilitating the rapid diagnosis of various viral and bacterial infectious diseases. We have previously developed a LAMP assay that targets the pertussis toxin promoter (*ptxP*), thus permitting specific diagnosis of *B. pertussis* infection (16). However, there is currently no similar assay available for diagnosis of *B. holmesii*. In the present study, we therefore developed a *B. holmesii*-specific LAMP assay and compared its sensitivity, specificity, and diagnostic accuracy with the *B. holmesii*-specific RT-PCR assay.

For specific detection of *B. holmesii*, we designed five LAMP primers that target the *recA* gene (nucleotide position 216–425; GenBank accession number AF399661) using Primer Explorer V4 software (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>). As shown in Table 1, we employed two outer primers (BH-F3 and

Correspondence

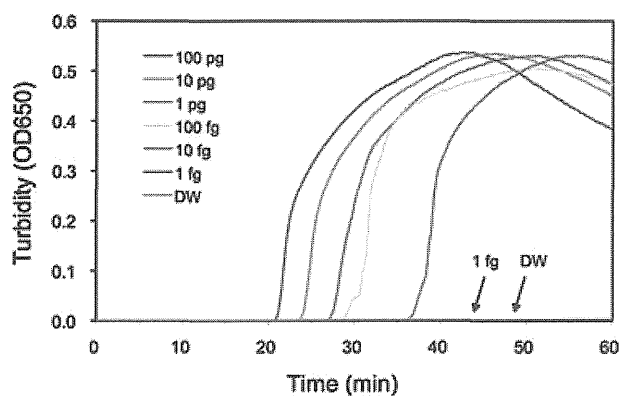
Kazunari Kamachi, Department of Bacteriology II, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81 42 848 7101; Fax: +81 42 561 7173; email: kamachi@nih.go.jp

Received 26 January 2012; revised 15 March 2012; accepted 30 March 2012.

List of Abbreviations: *B.*, *Bordetella*; BIP, backward inner primer; FIP, forward inner primer; IS, insertion sequence; LAMP, loop-mediated isothermal amplification; MGB, minor groove binder; NPS, nasopharyngeal swab.

Table 1. LAMP primers for *Bordetella holmesii* detection

Primer	Type	Sequence (5' to 3')
BH-F3	F3	GCTCTCCCAGATCGAAAAGC
BH-B3	B3c	TCGGCGATGACCTGCA
BH-FIP	F2-F1c	CAGCGAACCGGTGGAAACGAATGCGCTACGGCGACAAATG
BH-BIP	B1-B2c	ATTGGGCGTGGGTGGTCTGCGTGTGACGCGTGGTCTTGC
BH-LB	LB	GTCGTAGAAATCTACGGCCCCG

**Fig. 1.** Analytical sensitivity of LAMP for detection of *Bordetella holmesii* genome. Total DNA from *B. holmesii* ATCC 51541 was serially diluted from 100 pg to 1 fg, and amplified by LAMP. Amplification was monitored by a Loopamp real-time turbidimeter. The arrows indicate absorption lines of 1 fg DNA and negative control. DW, negative control; OD650, optical density at 650 nm.

BH-B3), two inner primers (BH-FIP and BH-BIP), and one loop primer (BH-LB). We purified all LAMP primers by reverse-phase high-performance liquid chromatography. We performed the LAMP reaction using the Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical, Tokyo, Japan). Briefly, we used a 25- μ L reaction mixture containing 40 pmol (each) of BH-FIP and BH-BIP primers, 5 pmol (each) of BH-F3 and BH-B3 primers, 20 pmol of BH-LB primer, 2 \times reaction mixture (12.5 μ L), *Bst* DNA polymerase (1 μ L), and template DNA (4 μ L). We denatured the template DNA at 95°C for 5 min, cooled it on ice, and then subjected it to amplification. We incubated the mixture at 67°C for 60 min and subsequently heated it at 80°C for 5 min to terminate the reaction. We confirmed LAMP amplification by real-time monitoring of the increase in turbidity using an LA-320C turbidimeter (Eiken Chemical).

We tested the analytical sensitivity of the LAMP assay by using 10-fold serial dilutions of *B. holmesii* ATCC 51541 DNA. As shown in Figure 1, LAMP amplification was observed for 100 pg–10 fg template DNA over a 60 min reaction. However, the assay failed to yield reproducible results with 10 fg DNA. Using 50 fg template DNA, the LAMP assay was able to reproducibly detect *B. holmesii* DNA from five isolates, (Table 2). On the other hand, the

Table 2. Specificity of *Bordetella holmesii*-LAMP assay

Strain	Genomic DNA/tube	Amplification ^a	
<i>B. holmesii</i>	BH1 ^b	50 fg	+
	BH2 ^b	50 fg	+
	BH3 ^b	50 fg	+
	BH4 ^b	50 fg	+
	BH5 ^b	50 fg	+
<i>B. pertussis</i>	Tohama	1 ng	–
	Yamaguchi	1 ng	–
	BP256 ^c	1 ng	–
	BP257 ^c	1 ng	–
	BP258 ^c	1 ng	–
	BP259 ^c	1 ng	–
	BP260 ^c	1 ng	–
<i>B. parapertussis</i>	BP289 ^c	1 ng	–
	BP290 ^c	1 ng	–
	BAA-587	1 ng	–
	ATCC15237	1 ng	–
	ATCC15311	1 ng	–
<i>B. bronchiseptica</i>	BPP01 ^d	1 ng	–
	R05 ^e	1 ng	–
<i>B. hinzii</i>	ATCC51730	1 ng	–
<i>B. avium</i>	ATCC35086	1 ng	–

^aturbidity assay with a 60-min reaction; ^bisolated from patients in a pertussis outbreak, 2010–2011; ^cisolated from patients in the period 2004–2005; ^disolated from a patient in 2002; ^eisolated from a rabbit in 1995; ATCC, American Type Culture Collection.

specificity of the LAMP assay was confirmed by using various *Bordetella* species: *B. pertussis* ($n = 9$), *B. parapertussis* ($n = 4$), *B. bronchiseptica* ($n = 1$), *B. hinzii* ($n = 1$), and *B. avium* ($n = 1$). With the exception of *B. holmesii*, all *Bordetella* species were negative (<0.01 turbidity) in LAMP assays using 1 ng template DNA (Table 2). Taken together, our results show that the LAMP assay is highly specific for *B. holmesii*, the detection limit being 50 fg DNA/tube for chromosomal DNA over a 60 min reaction.

Between 2010 and 2011, a pertussis outbreak caused by *B. pertussis* and *B. holmesii* infections occurred in Miyazaki Prefecture, Japan (17). The first patient (a 17-year-old male adolescent) was reported in September 2010; in this outbreak most patients were elementary and junior high school students. To easily and rapidly detect *B. holmesii* infection, we applied *B. holmesii*-LAMP assay to NPSs from 88 patients with pertussis-like symptoms. We performed this investigation for diagnostic purposes under the Japanese Infectious Diseases Control Law, Article 15. We obtained the NPSs using sterilized rayon-tipped swabs (Eiken Chemical), suspended them in 1 mL of cyclodextrin liquid medium (without Bactoagar) containing 5 μ g/mL of cephalixin (18). We inoculated approximately 10 μ L of the resulting NPS solution on Bordet-Gengou or blood agar plates for culture testing. We extracted total DNA

from the remaining NPS solution by using the QIAamp DNA Micro kit (Qiagen, Tokyo, Japan) (16), and subjected it to the LAMP assay and *B. holmesii*-specific RT-PCR (8). We performed the RT-PCR with a minor modification; we used a TaqMan MGB probe labeled with the VIC fluorescent reporter, instead of NED. Among 88 NPSs, six specimens that were positive for *B. holmesii* by RT-PCR and/or culture testing were also positive by LAMP. In contrast, 82 specimens that were negative for *B. holmesii* by RT-PCR/culture testing were all LAMP-negative. We failed to observe a significant difference in clinical sensitivity and specificity between the LAMP and RT-PCR assays. In conclusion, the LAMP assay described in the present study has the same levels of clinical sensitivity and specificity as RT-PCR for the detection of *B. holmesii*.

Previous surveillance studies conducted in the USA and Canada have revealed a low positive rate (0.1–0.3%) for *B. holmesii* infection by culture or RT-PCR in patients with coughs (8, 9). However, in a recent study, *B. holmesii* DNA was detected in 20% of NPSs collected from French adolescent patients who had previously been diagnosed with *B. pertussis* infection (19). These surveillance data indicate that *B. holmesii* infection has recently spread worldwide and that accurate diagnosis is needed to discriminate between *B. holmesii* and *B. pertussis* infections. The LAMP-based assay described here provides simple and specific detection of *B. holmesii*. Owing to its ease of operation in both hospital and diagnostic laboratories, this LAMP assay promises to become a powerful tool for diagnosis and surveillance of *B. holmesii*.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Drs. Yoshio Hidaka, Hajime Kamiya, Yuka Ando, Fumito Odaira, and Tomimasa Sunagawa for collecting clinical specimens. This work was supported by grants (H21–012 and H23–020) for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

DISCLOSURE

All authors declare no financial conflicts of interest.

REFERENCES

- Weyant R.S., Hollis D.G., Weaver R.E., Amine M.F., Steigerwalt A.G., O'Connor S.P., Whitney A.M., Daneshvar M.I., Moss C.W., Brenner D.J. (1995) *Bordetella holmesii* sp. nov., a new Gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol* **33**:1–7.
- Tang Y-W., Hopkins M.K., Kolbert C.P., Hartley P.A., Severance P.J., Persing D.H. (1998) *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis* **26**: 389–92.
- Njamkepo E., Delisle F., Hagege I., Gerbaud G., Guiso N. (2000) *Bordetella holmesii* isolated from a patient with sickle cell anemia: analysis and comparison with other *Bordetella holmesii* isolates. *Clin Microbiol Infect* **6**: 131–6.
- Shepard C.W., Daneshvar M.I., Kaiser R.M., Ashford D.A., Lonsway D., Patel J.B., Morey R.E., Jordan J.G., Weyant R.S., Fischer M. (2004) *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis* **38**: 799–804.
- Dörbecker C., Light C., Körber F., Plum G., Haefs C., Hoppe B., Seifert H. (2007) Community-acquired pneumonia due to *Bordetella holmesii* in a patient with frequently relapsing nephrotic syndrome. *J Infect* **4**: e203–5.
- Panagopoulos M.I., Saint Jean M., Brun D., Guiso N., Bekal S., Ovetckine P., Tapiero B. (2010) *Bordetella holmesii* bacteremia in asplenic children: report of four cases initially misidentified as *Acinetobacter iwoffii*. *J Clin Microbiol* **48**: 3762–4.
- Moissenet D., Leverger G., Mérens A., Bonacorsi S., Guiso N., Vu-Thien H. (2011) Septic arthritis caused by *Bordetella holmesii* in an adolescent with a chronic haemolytic anaemia. *J Med Microbiol* **60**: 1705–7.
- Guthrie J.L., Robertson A.V., Tang P., Jamieson F., Drews S.J. (2010) Novel duplex real-time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. *J Clin Microbiol* **48**: 1435–7.
- Yih W.K., Silva E.A., Ida J., Harrington N., Lett S.M., George H. (1999) *Bordetella holmesii*-like organisms isolated from Massachusetts patients with pertussis-like symptoms. *Emerg Infect Dis* **5**: 441–3.
- Dragsted D.M., Dohn B., Madsen J., Jensen J.S. (2004) Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. *J Med Microbiol* **53**: 749–54.
- Fry N.K., Duncan J., Wagner K., Tzivra O., Doshi N., Litt D.J., Crowcroft N., Miller E., George R., Harrison T.G. (2009) Role of PCR in the diagnosis of pertussis infection in infants: 5 years' experience of provision of a same-day real-time PCR service in England and Wales from 2002 to 2007. *J Med Microbiol* **58**: 1023–9.
- Reischl U., Lehn N., Sanden G.N., Loeffelholz M.J. (2001) Real-time PCR assay targeting IS481 of *Bordetella pertussis* and molecular basis for detecting *Bordetella holmesii*. *J Clin Microbiol* **39**: 1963–6.
- Loeffelholz M.J., Thompson C.J., Long K.S., Gilchrist M.J.R. (2000) Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay. *J Clin Microbiol* **38**: 467.
- Antila M., He Q., de Jong C., Aarts I., Verbakel H., Bruisten S., Keller S., Haanperä M., Mäkinen J., Eerola E., Viljanen M.K., Mertsola J., van der Zee A. (2006) *Bordetella holmesii* DNA is not detected in nasopharyngeal swabs from Finnish and Dutch patients with suspected pertussis. *J Med Microbiol* **55**: 1043–51.
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **28**: e63.
- Kamachi K., Toyozumi-Ajisaka H., Toda K., Soeung S.C., Sarath S., Nareth Y., Horiuchi Y., Kojima K., Takahashi M., Arakawa Y. (2006) Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* **44**: 1899–902.
- Kamiya H., Otsuka N., Ando Y., Odaira F., Yoshino S., Kawano K., Takahashi H., Nishida T., Hidaka Y., Toyozumi-Ajisaka H., Shibayama K., Kamachi K., Sunagawa T., Taniguchi K., Okabe N. (2012) Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. *Emerg Infect Dis* (in press)

18. Imaizumi A., Suzuki Y., Ono S., Sato H., Sato Y. (1983) Heptakis(2,6-*O*-dimethyl) β -cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. *J Clin Microbiol* 17: 781–6.
19. Njamkepo E., Bonacorsi S., Debruyne M., Gibaud S.N., Guillot S., Guiso N. (2011) Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *J Clin Microbiol* 49: 4347–8.

Bronchitis caused by *Bordetella holmesii* in a child with asthma misdiagnosed as mycoplasmal infection

Chihiro Katsukawa · Chieko Kushibiki · Atsumi Nishito · Rikou Nishida ·
Norimitsu Kuwabara · Ryuji Kawahara · Nao Otsuka · Yusuke Miyaji ·
Hiromi Toyozumi-Ajisaka · Kazunari Kamachi

Received: 4 July 2012 / Accepted: 9 September 2012
© Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases 2012

Abstract We report a case of a bronchitis caused by *Bordetella holmesii* in a 2-year-old girl with asthma. The patient had a moderate fever and productive cough, and her condition was initially diagnosed as mycoplasmal bronchitis on the basis of her clinical symptoms and rapid serodiagnosis of mycoplasmal infection. She was treated with a bronchodilator and clarithromycin, which resulted in complete recovery. However, after the initial diagnosis, nucleic acid amplification tests of her sputum showed the absence of both *Mycoplasma pneumoniae* and *Bordetella*

pertussis infections. Sputum culture showed the presence of a slow-growing, gram-negative bacillus in pure culture on *Bordetella* agar plates; the bacillus was later identified as *B. holmesii*. *B. holmesii* infection is rare in immunocompetent children; however, the organism is a true pathogen that can cause bronchitis in young children with asthma.

Keywords *Bordetella holmesii* · Bronchitis · Young child · Asthma

This article appeared in the Infectious Agents Surveillance Report (IASR), vol. 33, p. 15–16, 2012, in Japanese.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10156-012-0482-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Katsukawa · R. Kawahara
Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural
Institute of Public Health, Osaka, Japan

C. Kushibiki · A. Nishito
Department of Clinical Laboratory, Kishiwada Tokushukai
Hospital, Osaka, Japan

R. Nishida · N. Kuwabara
Department of Pediatrics, Kishiwada Tokushukai
Hospital, Osaka, Japan

N. Otsuka · Y. Miyaji · H. Toyozumi-Ajisaka ·
K. Kamachi (✉)
Department of Bacteriology II, National
Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen,
Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan
e-mail: kamachi@nih.go.jp

Y. Miyaji
Department of Pediatrics, St. Marianna University School
of Medicine, Kawasaki, Japan

Introduction

Bordetella holmesii was originally described as a CDC nonoxidizer group 2 pathogen. This small gram-negative coccoid bacillus was first reported in 1995 [1]. The organism is associated with bacteremia, endocarditis, and pneumonia, usually in patients with underlying disorders such as asplenia or sickle cell anemia, and has been isolated from blood and sputum samples [1–6]. *B. holmesii* may also cause a disease similar to pertussis (whooping cough) in otherwise healthy patients, particularly in adolescents and adults [7, 8]. Large surveillance studies have revealed that the organism was detected in nasopharyngeal specimens of patients with pertussis-like symptoms such as cough, paroxysms, whoop, and post-tussive vomiting [8–10].

Bordetella holmesii infection, which was considered rare in Asian countries, has been recently detected in Japan. The first reported case of *B. holmesii* infection was of an elderly patient with infectious pericarditis [11]. A pertussis outbreak caused by *B. holmesii* and *Bordetella pertussis* infections occurred in otherwise healthy people between 2010 and 2011 [8]. In Europe and the United States, *B. holmesii* infection has been observed mainly in adolescents and adults, and