

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

鰐坂裕美（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。

イムノプロット解析：*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。イムノプロット解析には、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プ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) とは遺伝子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

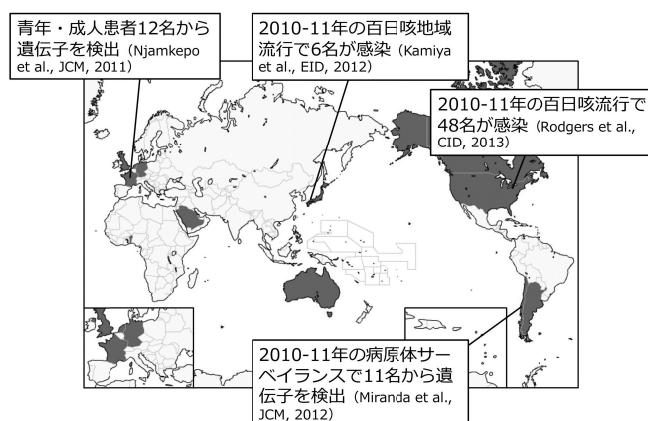


図 1. 世界における *Bordetella holmesii* の検出状況

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%)

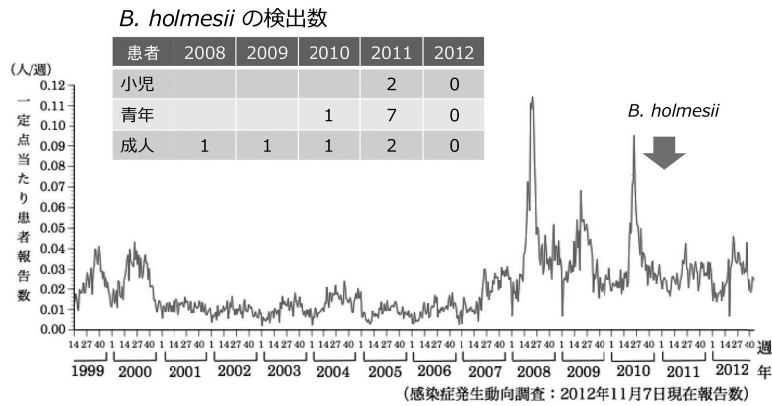


図 2 . 日本における百日咳患者の報告数の推移

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

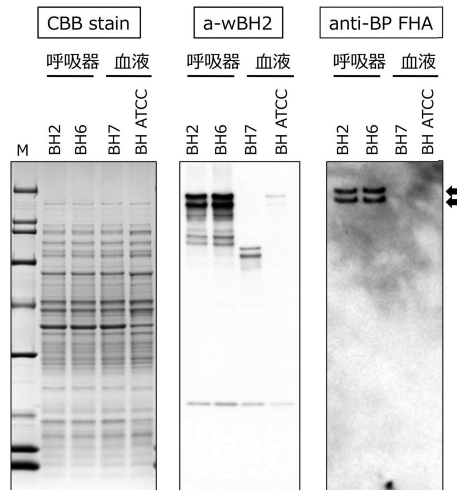


図 3 . *Bordetella holmesii* の呼吸器由来株に認められる高分子タンパク質

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