

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  
研究協力者 大塚菜緒 国立感染症研究所 細菌第二部 主任研究官  
渡邊峰雄 北里大学大学院 感染制御科学府 准教授

**研究要旨** アジアにおける百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の流行状況を把握するため、昨年度に引き続き百日咳の病原体サーベイランスを実施した。国内で発生した百日咳様患者 433 名を対象に *B. holmesii* と百日咳菌の遺伝子検査を行った結果、*B. holmesii* の検査陽性者は 0 名、百日咳菌の陽性者は 29 名（6.7%）であった。また、*B. holmesii* の呼吸器症例の増加原因を考察するため、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質について解析を行った。その結果、高分子タンパク質は定着因子 BipA (*Bordetella* intermediated phase protein A) と同定され、血液由来株では 1 塩基欠失または負の転写調節により発現が抑制されていることが判明した。調査を実施した 2013 年は百日咳の非流行期にあったことから、*B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が示唆された。

#### 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・心内膜炎などの起原菌となる。近年では基礎疾患を持たない青年・成人に感染し、百日咳と同様な呼吸器症状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、わが国でも 2009 年に初の成人感染例が確認された。2010~11 年には百日咳地域流行で 6 名の感染者が認められ (Kamiya et al., Emerg Infect Dis, 2012), 2011 年には気管支炎を発症した幼児の *B. holmesii* 感染症例も確認された (Katsukawa et al., J Infect Chemther, 2013)。これらの感染症例は *B. holmesii* がすでにアジア地域に広がっていることを示唆するが、本菌の病原体サーベイランスが実施されていないためその実態は不明である。

*B. holmesii* 感染者の呼吸器症状は百日咳菌と等しいことから、両菌を臨床症状から区別することは不可能である。そこで、本研究事業では *B. holmesii* に特異的な遺伝子検査法 (LAMP 法) を開発し、2011 年から台湾 CDC と共同して遺伝子検査を用いた病原体サーベ

イランスを開始した。平成 25 年度は *B. holmesii* の病原体サーベイランスを継続するとともに、呼吸器症例の増加原因を考察するため本菌の病原性について検討を加えた。

#### B. 研究方法

**遺伝子検査:** 福岡県と高知県で発生した百日咳様患者を対象に遺伝子検査を行った。遺伝子検査は *B. holmesii* の LAMP 法 (Otsuka et al., Microbiol Immunol, 2012) またはリアルタイム PCR により実施し、TaqMan プローブは既報 (Guthrie et al., J Clin Microbiol, 2010) のものを一部改変して使用した。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。百日咳菌の遺伝子検査は LAMP 法またはリアルタイム PCR 法により行った。なお、高知県衛生研究所では百日咳強化サーベイランス事業の一環として遺伝子検査が実施された。

**解析菌株:** *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 ATCC51541 株は敗血症患者の血液から分離された菌株であり, 両株を血液由来株とした。菌株は BG 培地で培養し, 菌体の全タンパク質を 10-20% SDS-PAGE に供試した。

細菌学的解析: 血液由来株に特異的に認められた高分子タンパク質は質量分析により同定した。タンパク質の発現はイムノプロット法により解析し, 一次抗体には BH2 株の全菌体に対するマウス抗血清 (抗 wBH2) およびマウス BipA 抗血清 (R1, R3) を用いた。bipA 遺伝子のシーケンス解析は非翻訳領域を含めた 4.8 kb について実施し, bipA mRNA は TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV) を用いて解析した。

(倫理面への配慮)

臨床検体は百日咳診断を目的に国立感染症研究所・細菌第二部に搬入されたものを供試した。患者検体は医療機関において連結可能匿名化され, 患者個人が特定出来ないよう配慮した。

#### C. 結果

百日咳疑い患者 (計 433 名) について遺伝子検査を実施した結果, *B. holmesii* の陽性者は 0 名, 百日咳菌の陽性者は福岡県 12 名 (8.3%), 高知県 17 名 (5.9%) であった (表 1)。両県を合わせた百日咳菌陽性者は 29 名, その陽性率は 6.7% を示した。

*B. holmesii* の呼吸器由来株と血液由来株を比較したところ, 呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 (2 本の蛋白バンド) を認めた (図 1)。この高分子タンパク質は抗 wBH2 抗体に強く交差するとともに, 抗 BipA 抗体にも強く交差した。この蛋白質を質量分析に供試したところ, 2 本の蛋白バンドともに *Bordetella intermediated protein A* (BipA) と同定された。なお, 血液由来の BH7 株では低分子の位置に 2 本のバンドが確認され, この低分子タンパク質を truncated BipA と命名した。

血液由来株において BipA 発現が認められなかった原因を考察するため, bipA 遺伝子のシーケンス解析を行った。その結果, truncated BipA が認められた BH7 株では bipA 遺伝子に 1 塩基欠失 (c.1961delG) が確認された (図 2)。この遺伝子欠失は終止コドン新たに

形成し, 不完全長の truncated BipA を産生することが示された。なお, 血液由来株 BH ATCC51541 に遺伝子変異が確認されなかったことから, bipA 転写量について検討を加えた (図 3)。その結果, BH ATCC51541 では bipA mRNA がほとんど検出されず, 負の転写調節を受けていることが判明した。

#### D. 考察

百日咳様患者 433 名を対象に *B. holmesii* の病原体サーベイランスを実施した。遺伝子検査において全例が陰性を示し, 2012 年の調査と同様に *B. holmesii* 感染者は確認されなかった。一方, 2012 年の百日咳菌の検査陽性率は 13.1% (64/487) であったが, 2013 年は 6.7% (29/433) と減少傾向を示した。わが国では 2008~10 年に大規模な百日咳流行が発生し, 調査開始の 2012 年以降は百日咳の非流行年であったと考えられる。米国では *B. holmesii* の菌血症患者は 2010~11 年の百日咳流行時に増加したことから (Tartof et al., Clin Infect Dis, 2014), *B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する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* については今後も継続的な病原体サーベイランスが必要である。

米国では百日咳流行時に *B. holmesii* による菌血症患者が増加したが, 本菌の血流感染と呼吸器感染の関係は不明である。本研究では呼吸器感染症例の増加原因を考察するため, 呼吸器由来株と血液由来株を比較し, 呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 BipA を同定した。菌体の表層タンパク質である BipA は高い抗原性を持つこと, さらに気管支敗血症菌の BipA は BcfA (*Bordetella* colonization factor A) と共同して菌の定着に働くことが知られている。そのため, BipA が呼吸器感染症例の増加に関与する可能性は高く, 今後 BipA に焦点を当てた研究が必要である。また, 百日咳流行時に *B. holmesii* が流行する可能性は否定出来ないため, BipA の高い抗原性を利用したワクチン開発も重要な検討課題となる。

#### E. 結論

百日咳類縁菌 *B. holmesii* の病原体サーベイランスを実施し, 本菌が百日咳菌と同様に周期的に流行する可

能性が示唆された。また、近年の呼吸器症例の増加に定着因子 BipA の関与が指摘された。

## F. 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, 19:534-7, 2013.

### 2. 学会発表

1. *Bordetella holmesii* に対する無細胞ワクチンの開発 . 山口哲矢, 鈴木英里, 大塚菜緒, 蒲地一成, 渡邊峰

雄. 第 87 回日本細菌学会総会, 平成 26 年 3 月, 東京.

2. Kamachi K. Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan. The 10<sup>th</sup> Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.

## G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得: 百日咳の血清診断法 (特願 2013-77138, 平成 25 年 4 月出願)
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

表 1. 百日咳様患者における *Bordetella holmesii* と百日咳菌の検出状況 (2013 年)

調査場所	患者数	<i>B. holmesii</i> 陽性数	百日咳菌陽性数 (%)
福岡県	145	0	12 (8.3%)
高知県	288	0	17 (5.9%)
総計	433	0	29 (6.7%)

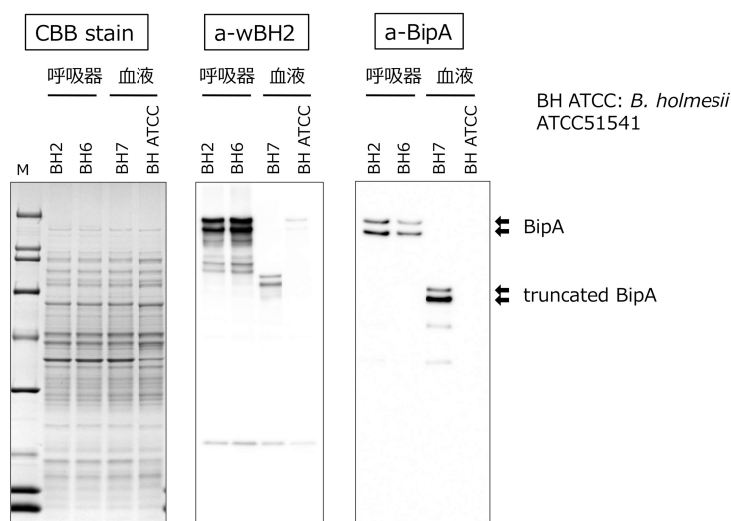


図 1. *Bordetella holmesii* の呼吸器由来株に発現する高分子タンパク質  
呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH7, BH ATCC51541) から全タンパク質を抽出し, SDS-PAGE (10-20% gradient) により分離した。呼吸器由来株に認められる 2 種類の高分子タンパク質は BipA, 血液由来の BH7 株に認められる低分子タンパク質は不完全長の truncated BipA を示した

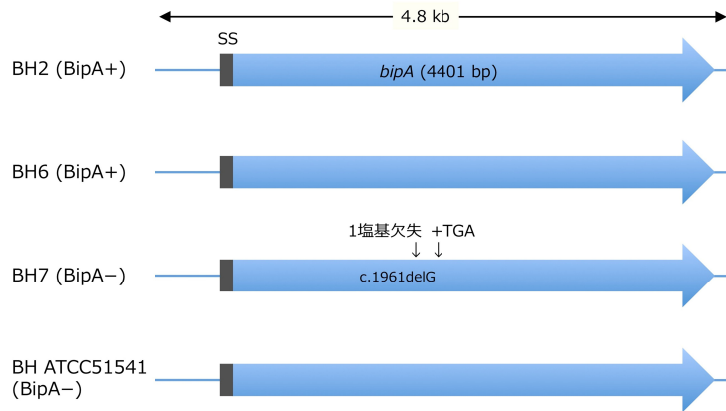


図2 . *Bordetella holmesii* の血液由来株 BH7 に認められた遺伝子変異  
呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH7, BH ATCC51541) の *bipA* 遺伝子 (4.8 kb) につ  
て、シーケンス解析を行った。その結果, BH7 株に 1 塩基欠失 (c.1961delG) による終止コドン  
の形成が認められた。一方, BH ATCC54541 株に遺伝子変異は確認されなかった

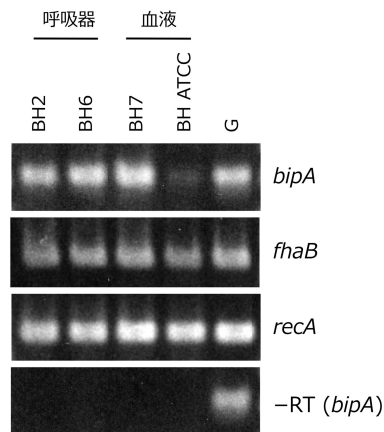


図3 . *Bordetella holmesii* ATCC54541 株における *bipA* mRNA の検出  
呼吸器由来株 (BH2, BH6) と血液由来株 (BH7, BH ATCC51541) から mRNA を調製し, RT-PCR  
法により *bipA* mRNA を検出した。 *fnaB* と *recA* は陽性コントロール, -RT は逆転写酵素を添加しな  
い陰性コントロール, G は BH ATCC51541 のゲノム DNA を増幅したサイズコントロールを示し  
た