

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）

（総合）研究報告書

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 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系を開発し、台湾 CDC と共同でアジアにおける *B. holmesii* の流行状況を調査した。百日咳疑い患者（日本 920 名、台湾 495 名）を対象に遺伝子検査を実施した結果 *B. holmesii* の陽性者は日本が 0 名、台湾が 1 名（0.3%）であった。百日咳菌の陽性者は日本が 93 名（10.1%）、台湾が 90 名（18.2%）であり、日本の検査陽性率は台湾より低い値を示した。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。日本では調査を実施した 2012-13 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。

研究協力者

鱒坂裕美、大塚菜緒（国立感染症研究所・細菌第二部）
藤戸亜紀、鍋島民、松本道明（高知県衛生研究所）
岡田賢司（国立病院機構福岡病院）
吉野修司、河野喜美子（宮崎県衛生環境研究所）
Shu-Man Yao, Chuen-Sheue Chiang（Taiwan CDC）
渡邊峰雄（北里大学大学院・感染制御科学府）

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、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行った。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。

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、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。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明らかとなっていない。

B. 研究方法

B. holmesii-LAMP: Primer Explorer V4 ソフトウェアを用いて *B. holmesii* の *recA* 遺伝子(216~425 bp, GenBank, AF399661)に対し 5 種類の LAMP プライマーを設計した。LAMP 反応は Loopamp DNA 増幅試薬キット（栄研化学）を用い、25 μ l の反応系に 12.5 μ l の reaction mixture, 1 μ l の *Bst* DNA polymerase, 40 pmol の BH-FIP と BH-BIP プライマー, 5 pmol の BH-F3 と BH-B3 プライマー, 20 pmol の BH-LB プライマーを添加した。DNA 検体(4 μ l)は 95 で 5 分間加熱し、急冷後添加した。増幅反応は 67 で 1 時間行い、吸光度 650 nm の増加を濁度計 LA-320C（栄研化学）により測定した。
検査体制：百日咳様患者の鼻腔スワブを検査材料とした。遺伝子検査は *B. holmesii*-LAMP またはリアルタイム

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。福岡県の患者検体は国立感染症研究所・細菌第二部、高知県の検体は高知県衛生研究所、台湾の検体は台湾 CDC 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

B. holmesii-LAMP：*B. holmesii* 臨床分離株の DNA を用いて LAMP 検出系の感度を検討したところ、検出限界は 50 fg DNA/tube と判断された。次に *Bordetella* 族細菌 6 菌種 21 株を用いて本法の特異性を評価したところ、*B. holmesii* 以外の *Bordetella* 族細菌は 1 ng/tube という高濃度でも検出されず、本法は *B. holmesii* に高い感度と特異性を示した。

患者 DNA 検体を用いて本法の臨床感度を評価したところ、既報のリアルタイム PCR 法で陽性となった 6

患者検体はすべて陽性と判定された。同様にリアルタイム PCR 法で陰性となった 82 検体はすべて陰性と判定され、その一致度は 100% を示した。

病原体サーベイランス：百日咳様患者 (日本 920 名、台湾 495 名) について遺伝子検査を実施した結果、*B. holmesii* の陽性者は日本が 0 名、台湾が 1 名 (0.3%) であった (表 1)。百日咳菌の陽性者は日本が 93 名 (10.1%)、台湾が 90 名 (18.2%) であり、日本の陽性率は台湾より低い値を示した。

病原性解析：*B. holmesii* の呼吸器由来株と血液由来株を比較した結果、呼吸器由来株に特異的に発現する高分子タンパク質 (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。この遺伝子欠失は終止コドンを新たに形成し、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。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

過去に米国とカナダで実施された大規模調査では百日咳様患者の 0.1~0.3% に *B. holmesii* が検出され、本菌が百日咳の起因菌となることが示された。また、フランスの調査では百日咳と診断された青年患者の 20% に *B. holmesii* 遺伝子が検出されている。これらの病原体サーベイランスは近年 *B. holmesii* 感染が世界的に広がるとともに、百日咳菌と *B. holmesii* の鑑別の必要性を指摘する。本研究で開発した *B. holmesii*-LAMP は操作が

簡便であることから、*B. holmesii* の病原体サーベイランスに有用な手段となると期待された。

本研究事業では百日咳様患者(日本 920 名,台湾 495 名)を対象に遺伝子検査を実施し,台湾で 1 名の *B. holmesii* 陽性者を確認したが,日本では陽性者を確認できなかった。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。日本では 2012 年の百日咳菌の検査陽性率は 13.1%(64/487)であったが,2013 年には 6.7%(29/433)と減少した。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となる。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* に特異的な LAMP 検出系を開発し,台湾 CDC と共同で病原体サーベイランスを実施した。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るとともに,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 Chemther, 2013; 19: 534-7.
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.
3. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, Nakamura Y, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. PLoS ONE, 2012; 7(2): e31985.
4. Suzuki T, Kataoka H, Ida T, Kamachi K, Mikuniya T. Bactericidal activity of topical antiseptics and their gargles against *Bordetella pertussis*. J Infect Chemother, 2012; 18: 272-5.

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 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector Borne Diseases. September 12-13, 2013, Tokyo.
3. 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
4. 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
5. 蒲地一成. 百日咳の実験室診断, 困難な青年・成人患者の診断. 第 60 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会

合同地方会，平成 23 年 10 月，山形。

6. 大塚菜緒，吉野修司，豊泉(鰺坂)裕美，大平文人，蒲地一成 . 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* に特異的な LAMP 検出系の開発 . 第 60 回日本感染症学会東日本地方学術集会・第 58 回日本化学療法学会東日本支部総会合同地方会，平成 23 年 10 月，山形。
7. 大塚菜緒，吉野修司，河野喜美子，豊泉(鰺坂)裕美，柴山恵吾，蒲地一成 . LAMP 法を用いた百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* 検出系の開発 . 第 94 回日本細菌学会関東支部総会，平成 23 年 10 月，東京。

G . 知的所有権の出願・登録状況

1 . 特許取得：

1. 百日咳の血清診断法 (特願 2013-77138，平成 25 年 4 月出願)
2. LAMP 法を用いた百日咳菌遺伝子検出方法およびこの方法に用いるプライマーセット . 特許第 4806749 号 .
- 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

	調査年	検体数	<i>B. holmesii</i> 陽性数 (%)	百日咳菌陽性数 (%)
日本	2012-13	920	0	93 (10.1%)
台湾	2011-12	495	1 (0.3%)	90 (18.2%)

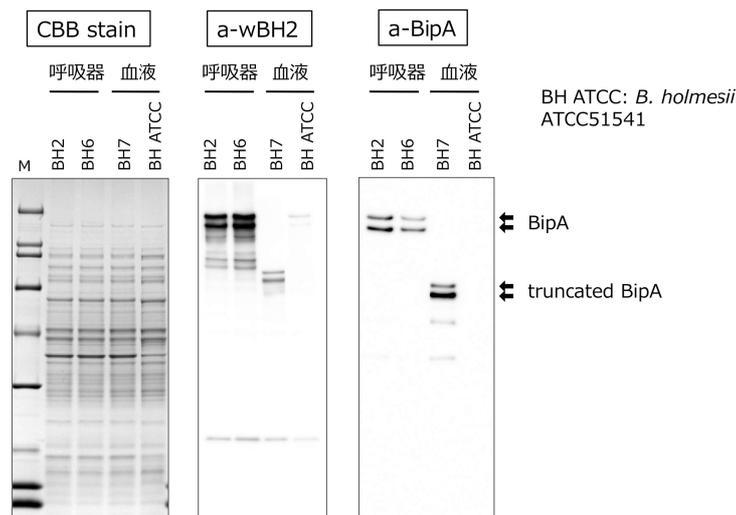


図 1 . *Bordetella holmesii* の呼吸器由来株に発現する高分子タンパク質

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