

厚生労働省新興・再興感染症研究事業
自然災害時を含めた感染症サーベイランスの強化・向上に関する研究

病原性ナイセリア属菌感染症のサーベイランス及びそのシステムの構築

H24～26 年度

髄膜炎菌感染症のサーベイランスシステムの構築及び健康保菌率の調査の実施

研究分担者	高橋英之	国立感染症研究所	細菌第一部	主任研究官
研究協力者	大西真	国立感染症研究所	細菌第一部	部長
研究協力者	砂川富正	国立感染症研究所	感染症疫学センター	室長
研究協力者	齊藤 剛仁	国立感染症研究所	感染症疫学センター	研究員
研究協力者	羽賀将衛	北海道教育大学	保健管理センター	教授
研究協力者	北原武尊	新潟大学	医学部	学部生
研究協力者	松本壮吉	新潟大学	医学部	細菌学分野 教授

研究要旨

国内の病原性ナイセリア属菌である髄膜炎菌による感染症の実態は不明な点が多い。本研究では Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による髄膜炎菌の核酸検出法を構築し、さらにはその試料となる咽頭うがい液からの DNA 抽出方法も確立した。それらの手法を用いて北海道教育大学の学生 836 人の咽頭うがい液を採取し、その咽頭うがい液を用いて健康保菌率の調査を行なった。その結果、7 つ (約 0.8%) の陽性検体が検出され、さらにはその 5 つが血清群 Y、1 つが B であることが判明し、日本人の保菌率が低く、検出された菌の血清群 Y と B が主要な血清群であることが確認された。

A. 研究目的

ナイセリア属菌はヒトのみを宿主とし、ヒトの生活圏を介して伝播していると考えられている。ナイセリア属菌は 10 数種同定されているが、その中でも病原性を保持する病原性ナイセリア属菌は淋菌と髄膜炎菌のみである。髄膜炎菌感

染症は海外事情とは異なり、日本においては年間 20 例程度の稀少感染症となっていたが、2011 年の宮崎で発生した学生寮での集団感染事例は日本においても髄膜炎菌感染症は楽観視出来ないということを改めて認識させる事例となった。それを契機に髄膜炎菌にまつわる疫

学情報が改めて求められたが、髄膜炎菌による感染症に関して不明な点が多い。そこで本研究では昨年度に確立した髄膜炎菌の健康保菌者のサーベイランスのための咽頭うがい液を用いた迅速検出法を用いて、実際の咽頭うがい液のお用いた髄膜炎菌の保菌率調査を試みた。

B. 研究方法

1) 咽頭うがい液の採取

平成26年4月7日及び8日の二日間にて実施された、北海道教育大学の健康診断において、全学生を対象に事前説明と同意書を記入後に任意に咽頭うがい液の採取を依頼した。

なお、倫理面への配慮として国立感染症研究所及び北海道教育大学において「ヒトを対象とする医学研究倫理審査」には申請及び承認を得、さらに今回の調査に関してはサンプルは無記入、完全非連結化でサンプルと検体提供者が完全に特定できないようにした。

咽頭うがい液は生理的食塩水 20mL を学生に提供し、10 回程度のうがい後、その咽頭うがい液を 50mL チューブに保存した。

2) 咽頭うがい液から DNA 抽出法

北海道から空輸して、4°Cに保存しておいた咽頭うがい液を 12,000 回転で 10 分遠心し、その沈渣を 100 µL の TE に懸濁した。その懸濁液を DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製し、最終的に 100 µL の AE 溶液に入った DNA 溶液を調製した。

3) LAMP 法による髄膜炎菌 DNA の検出の確立

LAMP 法は栄研化学株式会社の DNA 増幅試薬キット (製品コード LMP201) を用いて、そのキットに添付されているプロトコールに従って行なった。UV 照射を用いて目視で DNA の増幅を確認するために栄研化学株式会社の蛍光・目視検出試薬キット (製品コード LMP221) を用いて LAMP 反応液中に添加した。プライマーは以下のものを実験に供した。

ctrB-F3: ACCAGTTGAACGATCGTGC

ctrB-B3: CCAGCTGGGTTTGAATCACA

ctrB-FIP:GAGAGGCTTCCTTTACCCGCTC

TGCTGATACGGTGCGCTAT

ctrB-BIP:TCTGACGGATTACCGGATTGCC

GGAAACCACCCCATTTGC

以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

2 × reaction mix.	12.5 µl
Primer: FIP(40 µM)	1 µl
BIP(40 µM)	1 µl
F3(20 µM)	1 µl
B3(20 µM)	1 µl
<i>Bst</i> DNA polymerase	1 µl
蛍光・目視検出試薬	1 µl
Distilled Water	5.5 µl

反応液を調製後、鋳型 DNA を 1 µl 反応液に添加し、汎用 0.2 ml PCR チューブ及び Takara PCR Thermal Cycler を用いて 65 °C × 60 分の反応させた。増幅した DNA は UV 照射による目視により確認した。

4) nested-PCR 法による陽性サンプルの

再検証

髄膜炎菌及び淋菌の病原性ナイセリアにしか存在しない *ggt* 遺伝子 (淋菌は *ggh* 遺伝子) をターゲットにした nested PCR を用いて前項の LAMP 法によって陽性検出されたサンプルの再検証を行なった。Nested PCR は以下のプライマーセットを用いた。

ggt-nested-1:

CTAAACATATTTATTGACTG

ggt-nested-2 :

CAAGCCTGACGACTGTGGCTCTAC

以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

10×Ex Tag buffer	1.25 μl
dNTPs	1 μl
100 μM <i>ggt</i> -nested-1	0.2 μl
<i>ggt</i> -nested-2	0.2 μl
Ex Taq DNA polymerase	0.2 μl
Distilled Water	8.65 μl

反応液を調製後、鋳型DNAを1 μl反応液に添加し、以下のサイクルでPCR反応を行なった。

94°C×5分

94°C×30秒

55°C×30秒

72°C×30秒

25 サイクル

2nd PCR は以下のプライマーセットを用いた。

ggt-29: GGATGTCAAGTCATCCATGCCAAT

ggt-20 :TGTCGTCTGCACCGCCACCATCGC

以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

10×Ex Tag buffer	1.25 μl
dNTPs	1 μl
100 μM <i>ggt</i> -29	0.2 μl
<i>ggt</i> -20	0.2 μl

Ex Taq DNA polymerase 0.2 μl

Distilled Water 8.65 μl

この反応液 2 μl を 1.5%アガロースゲルを用いて増幅産物の有無をエチジウムブロマイド染色にて確認した。

5) serogroup-nested PCR 法による陽性サンプルの血清群決定

以下の 1 及び 2 のプライマー、6 セットを用いて 1 サンプルにつき、6 反応を行なった。

nested-crgA-1 :CGCGATGCCGATGGTGCTGCATCT

nested-crgA-2 :CTAAACATTGGTGACCGGCAAGCT

nested-A-1:TATAGTTAAAAACTTAACAA TCAAAA

nested-A-2:TTCTTCATAGGGTAATGAAGATATTTCTG

nested-B-1:GCAAAAAAATATAACCGGTTTT TTTGCG

nested-B-2:AATTTCTTAATAATCTCTAAG TGTCT

nested-C-1:TTATAAACTATTGTCGAAAC ATTAAA

nested-C-2:GTTGGGCTGTATGGTGTATCG AAT

nested-Y-1:ATACAGATATCCTAATCATGACAT

nested-Y-2 :TTCCAGAAATATCACCAGTTT TAAAAA

nested-W-1 :ATACAGATATCCTGATCATGACAT

nested-W-2 :TTCCAGAAATATCACCAGTT TAAAAA

以下に 1 反応辺りの反応液組成を示す。

10×Ex Tag buffer	1.25 μl
dNTPs	1 μl
100 μM nested-1	0.2 μl
nested-2	0.2 μl
Ex Taq DNA polymerase	0.2 μl
Distilled Water	8.65 μl

反応液を調製後、鋳型DNAを1 μl反応液に添加し、以下のサイクルでPCR反応を行なった。

94°C×5分
 94°C×30秒
 55°C×30秒
 72°C×30秒

} 25 サイクル

2nd PCRは以下の1及び2のプライマー、6セットを用いて1サンプルにつき、6反応を行なった。

crgA-1 :GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAAT
TC

crgA-2 :CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCG
T

A-1 :CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC

A-2 :CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT

B-1 :GGATCATTTTCAGTGTTCACCA

B-2 :GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA

C-1 :TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT

C-2 :CAATCACGATTTGCCCAATTGAC

Y-1 :TCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA

Y-2 :CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTA
A

W-1 :CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA

W-2 :CACAACCATTTTCATTATAGTTACT
GT

反応液を調製後、1 μl の nested PCR 反応液を 2nd PCR 反応液に添加し、以下のサイクルでPCR反応を行なった。

94°C×5分
 94°C×30秒
 55°C×30秒
 72°C×30秒

} 25 サイクル

この反応液 2 μl を 1.5% アガロースゲルを用いて増幅産物の有無をエチジウムブロマイド染色にて確認した。

C. 研究結果

1) 髄膜炎菌検出用の簡便・迅速検出法の開発

莢膜多糖体合成遺伝子の一部である *ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法を用いた髄膜炎菌 DNA の簡易・迅速検出法を構築するために、その種特異性と検出限界に関して検討を行なった。*ctrB* 遺伝子の系はナイセリア属菌の中でも髄膜炎菌に特異的に反応することが明らかとなった (図 1、赤)。このことから *ctrB* 遺伝子を用いた検出系により髄膜炎菌を特異的に検出することが可能となった。更にこの検出系の検出限界を測定した結果、反応液中に 1 pg のゲノム DNA があれば検出出来ることも明らかとなり (図 2)、非常に感度が高いことが明らかとなった。

2) 咽頭うがい液を用いた髄膜炎菌の健康保菌率の調査

北海道教育大学の全学生の協力を求め、836 名の同意者から咽頭うがい液を採取

することが出来た。その咽頭うがい液から DNA を調製し、開発した LAMP 法による髄膜炎菌 DNA の検出を行なった。

全サンプルを解析した結果、約 46 のサンプルが陽性反応を示した (図 3)。その 1st スクリーニングの結果を再検証するために、それらの陽性サンプルをさらに LAMP 法にて検証した (2nd スクリーニング)。

2nd スクリーニングの結果、約 80% のサンプルに関しては「陰性」を示す結果が得られた。そのため、3 度 2nd スクリーニングの解析を繰り返した結果、確実に陽性が出るサンプルと陰性が出てしまうサンプルとに分かれる結果が得られた (図 4)。この結果から咽頭うがい液から得られた DNA 中に含まれる髄膜炎菌 DNA の量が極めて少なく、またサンプルによってばらつきがあることが推測された。また、LAMP 法で陰性を示すサンプルは陽性を示す結果が殆ど得られないことから、LAMP 法においては偽陰性が得られる可能性は少ないが、偽陽性が出る可能性はあるために、1st スクリーニング法としては十分な検出法であると考えられるが、確定のためには別の方法での再検証が必要と考えられた。

そこで髄膜炎菌に特異的であると検証済みの *ggt* 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法による検証を 6 回実験を繰り返すことにより試みた。その結果、nested PCR 法により得られる結果にもある程度陰性の結果が得られるサンプルも存在することが明らかとなった (図 5)。しかし、LAMP 法より検出感度及び陽性

の再現性は良好であることが推測できる結果となった。

LAMP 法及び nested PCR 法の結果を考察して、最終的な陽性率を判断すると、確実に陽性と考えられるサンプルは低く見積もって 7 つであると考えられた (図 6)。この結果から、今回の 836 人の咽頭うがい液から得られた髄膜炎菌陽性サンプルは 7 つで、髄膜炎菌の保菌率は $7/836=0.84\%$ であることが推測された。

3) 陽性サンプルの血清群決定

7 つの髄膜炎菌陽性サンプルに関してその血清群を決定するために、nested PCR 法を適用した PCR による血清群決定法 (serogroup-nested PCR 法) を新たに確立し、それを用いて血清群を決定した (図 7)。その結果、5 つのサンプルの血清群は Y、1 つのサンプルの血清群は B、残りの 1 つに関しては検出不可という結果が得られた。

検出できないサンプルがある上に同定できたサンプルに関しても増幅産物の量比に差異が認められ、咽頭うがい液から得られた DNA 中に含まれる髄膜炎菌 DNA の量が極めて少なく、またサンプルによってばらつきがあることがこの結果からも推測された。

D. 考察

2011 年の侵襲性髄膜炎菌感染症の集団感染事例を契機に髄膜炎菌の健康保菌率が問題となった。10 年ほど前に厚生労働省の研究班において実施された 2000 人程度の大学生を対象とした保菌

調査においては約 0.4%の保菌率が報告されていた。しかし、10年前のデータを現在に適用するには難しい部分も多かった。そこで、本研究においては咽頭うがい液中の髄膜炎菌を検出する手法をまず確立し、その手法を 836 人から採取した咽頭うがい液を検査材料として現在における髄膜炎菌の健康保菌率の再検証を行なった。

まず、咽頭うがい液中の髄膜炎菌を検出する手法として *ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法を用いた簡易迅速検出系を確立することが出来、検体中の髄膜炎菌の検出と同定が可能となった。

その迅速診断系を用いて 836 人の咽頭うがい液中の髄膜炎菌 DNA の存在を解析した結果、低く見積もった結果となるが、髄膜炎菌の健康保菌率は 0.83%で、10年前の調査結果の 0.4%という値と大きく異なることはなく、日本人の健康保菌率は非常に低いことが明らかとなった。また、その菌の血清群の内訳も本研究で開発した serogroup-nested PCR 法を用いて明らかにし、血清群 Y と B が多いという、従来及び現在の日本国内の臨床分離株の疫学結果と非常に合致する結果が得られた。このことから、日本国内では一般的には健康保菌率は非常に低く、その血清群の分布率がそのまま患者分離株に反映されている可能性が強く示唆された。

本研究で最も予想外であったのは、咽頭うがい液から精製した DNA を検査試料として用いた場合には、*ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法による解析

結果に偽陽性が多く含まれることであった。検出系においては偽陽性や偽陰性が含まれることは好ましくないと考えられる。一方で、*ggt* 遺伝子をターゲットとした nested PCR 法の検出感度が良好であった。しかし、その nested PCR の結果も陽性の結果が出たり、出なかったりしたサンプルがあった。このことから、LAMP 法及び nested PCR 法による髄膜炎菌 DNA の検出法自体に問題があると考えられる面もあった。しかし、LAMP 法においては陰性のものは全く、陰性であり、そのサンプルは nested PCR 法においても陰性であった（結果未掲載）。さらに serogroup-nested PCR 法においてもその増幅産物にはサンプル間の量的な差異が明らかに認められ、検出法そのものの不安定さと考えるよりは、咽頭うがい液から得られた DNA 中に含まれる髄膜炎菌 DNA の量が極めて少なく、検出感度ギリギリのところを解析しているために発生する不安定さである可能性が強く考えられた。それゆえ、咽頭うがい液を用いた髄膜炎菌の保菌調査は本研究のように確実に陽性となるサンプルのみを陽性とカウントする「低く見積もった」健康保菌率しか検出することができなく、また、サンプル調製において高価な試薬キットと多くの人的労働力を要することから、従来の咽頭スワブからの培養による健康保菌率の調査に比べてデメリットがあることも今回明らかとなった。

では、本研究で実施した咽頭うがい液を用いた健康保菌調査法は意味がない

のかと言うと、そうではないと考えている。従来の従来の咽頭スワブからの培養による健康保菌率の調査法は調査日から菌検出の作業までを検体を保存することなく培養までを行ない、同定までの細菌学的作業が出来る作業環境が必要となる。さらに、咽倫理申請や被験者への協力要請という点において完全な非侵襲性のサンプリング方法である咽頭うがい液に比べて、頭スワブを回収する際には申請認可や同意が得られにくい傾向がある。そうした地理的・物理的・倫理的な面で咽頭スワブを用いた培養法による健康保菌調査の実施が困難な場合には咽頭うがい液を用いた保菌調査は代替調査法となりうる場合が考えられる。本研究はそうした疫学調査の諸事情に合わせて保菌調査の手法の幅を広げたという意味においては非常に有意義だと考えられた。

E. 結論

LAMP 法を適用した髄膜炎菌の簡易迅速検出法を開発し、咽頭うがい液を用いた保菌調査を実施した。髄膜炎菌の健康保菌率は低く見積もって 0.8%程度であり、その血清群の内訳は Y 及び B 群で占められる。一方で、LAMP 法を用いた保菌率の調査法は調査現地での作業環境が確保できない場合には咽頭スワブ培養法による保菌率調査法の代替になりうるということが実証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hideyuki Takahashi, Tatsuo Yanagisawa, Kwang Sik Kim, Shigeyuki Yokoyama and Makoto Ohnishi: Meningococcal PilV potentiates *Neisseria meningitidis* Type IV pilus-mediated internalization into human endothelial and epithelial cells. *Infect. Immun.* 80(12): 4154-4166, 2012.

志牟田 健、飛田 収一、伊東 三喜雄、藤原 光文、上田 朋宏、亀岡 博、古林 敬一、川畑 拓也、大西 真
京都府と大阪府における 2010 -2011 年に分離された淋菌株の性情解析
日本性感染症学会誌.23(1):83-89. .2012.

Shimuta K, Unemo M, Nakayama S, Morita-Ishihara T, Dorin M, Kawahata T, Ohnishi M; Antibiotic-Resistant Gonorrhoea Study Group. Antimicrobial Resistance and Molecular Typing of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Kyoto and Osaka, Japan, 2010 to 2012: Intensified Surveillance after Identification of the First Strain (H041) with High-Level Ceftriaxone Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57:5225-5232.

Kei Yamamoto, Yasuyuki Kato, Takuma Shindo, Mugen Ujiie, Nozomi Takeshita, Shuzo Kanagawa, Junwa Kunimatsu, Yuiichi Tamori, Toshikazu Kano, Rumi Okuno, Hideyuki Takahashi, Norio Ohmagari. Meningococemia due to the 2000 Hajj-Associated Outbreak Strain (Serogroup W-135 ST-11) with Immunoreactive Complications. *Jpn J. Infect Dis.* 2013, 66 (5):443-445.

高橋英之、大西真、侵襲性髄膜炎菌感染

症、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、No. 26, 765-768、2013.

高橋英之、大西真、髄膜炎菌、病原体の今日的意味 改訂4版、312-319、2013.

高橋英之、大西真、2005～2012年までの髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌の血清学的及び分子疫学的解析、IASR、Vol. 34 No. 2, 363-364、2013.

高橋英之、髄膜炎菌性髄膜炎（侵襲性髄膜炎菌感染症）第1回～第3回、小学保健ニュース、（中学保健ニュース）[高校保健ニュース]、少年写真新聞、10月号～12月号、4-5、2013.

Hayakawa K, Itoda I, Shimuta K, Takahashi H, Morita M, Ohnishi M. Urethritis Caused by Novel *Neisseria meningitidis* Serogroup W in Man Who Has Sex with Men, Japan. *Emerg Infect Dis* 20(9):1585-1587, 2014.

高橋英之、大西真、髄膜炎菌感染症、小児疾患診療のための病態生理 1, 831-834、2014.

2. 学会発表

高橋英之、大西真：GltT-GltM トランスポーターを介した髄膜炎菌の宿主細胞侵入に関与する遺伝子の転写及び翻訳レベルでの網羅的解析、第87回日本細菌学会総会、東京都、2014年3月。

高橋英之、大西真：髄膜炎菌 GltT-GltM トランスポーターの宿主細胞侵入における作用機序の解明、第88回日本細菌学会総会、岐阜県、2015年3月。

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録
なし

H. 健康危険情報
なし

図1 髄膜炎菌検出用の髄膜炎菌 *ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法の髄膜炎菌特異性

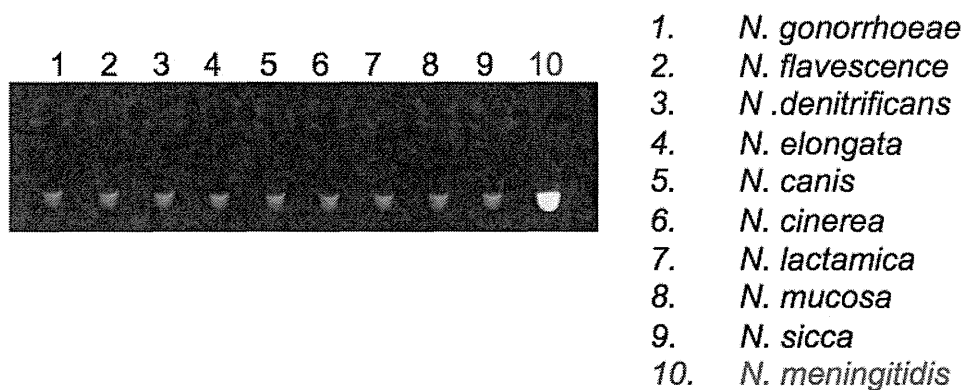


図2 髄膜炎菌検出用の髄膜炎菌 *ctrB* 遺伝子をターゲットとした LAMP 法の検出限界

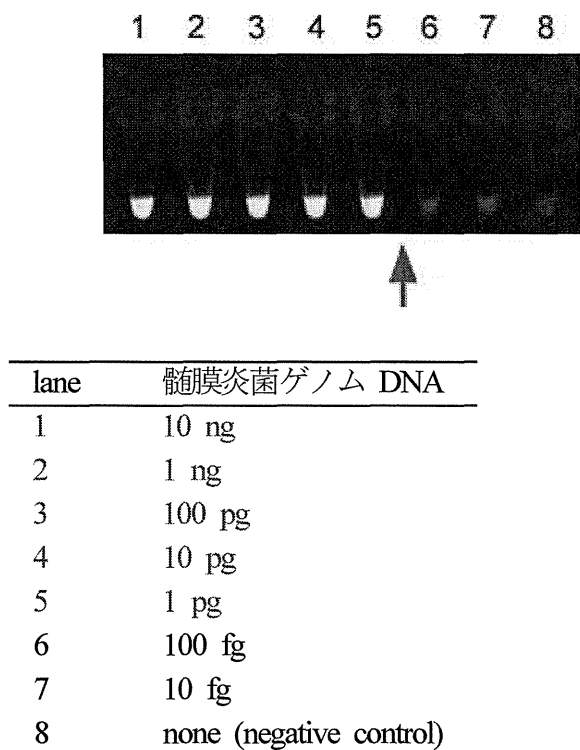


図3 LAMP 法による髄膜炎菌の検出
陽性を示したサンプルの番号は黒色以外で示した。

#327 #328 #329 #300 #301 #302 #303 #304 #305 #306 #307 #308 #309 #310 #311 #312 #313 #314 #315 #316 #317 #318 P N

#319 #320 #321 #322 #323 #324 #325 #326 #327 #328 #329 #330 #331 #332 #333 #334 #335 #336 #337 #338 #339 #340 P N

#341 #342 #343 #344 #345 #346 #347 #348 #349 #350 #351 #352 #353 #354 #355 #356 #357 #358 #359 #360 #361 #362 P N

#363 #364 #365 #366 #367 #368 #369 #370 #371 #372 #373 #374 #375 #376 #377 #378 #379 #380 #381 #382 #383 #384 #385 P N

#386 #387 #388 #389 #390 #391 #392 #393 #394 #395 #396 #397 #398 #399 #400 #401 #402 #403 #404 #405 #406 #407 P N

#408 #409 #410 #411 #412 #413 #414 #415 #416 #417 #418 #419 #420 #421 #422 #423 #424 #425 #426 #427 #428 #429 P N

#430 #431 #432 #433 #434 #435 #436 #437 #438 #439 #440 #441 #442 #443 #444 #445 #446 #447 #448 #449 #450 #451 Positive
#452 #453 #454 #455 #456 #457 #458 #459 #460 #461 #462 #463 #464 #465 #466 #467 #468 #469 #470 #471 #472 #473 P N
#474 #475 #476 #477 #478 #479 #480 #481 #482 #483 #484 #485 #486 #487 #488 #489 #490 #491 #492 #493 #494 #495 P N
#496 #497 #498 #499 #500 #501 #502 #503 #504 #505 #506 #507 #508 #509 #510 #511 #512 #513 #514 #515 #516 #517 P N
#518 #519 #520 #521 #522 #523 #524 #525 #526 #527 #528 #529 #530 #531 #532 #533 #534 #535 #536 #537 #538 #539 P N
#540 #541 #542 #543 #544 #545 #546 #547 #548 #549 #550 #551 #552 #553 #554 #555 #556 #557 #558 #559 #560 #561 P N
#562 #563 #564 #565 #566 #567 #568 #569 #570 #571 #572 #573 #574 #575 #576 #577 #578 #579 #580 #581 #582 #583 P N
#584 #585 #586 #587 #588 #589 #590 #591 #592 #593 #594 #595 #596 #597 #598 #599 #600 #601 #602 #603 #604 #605 P N
#606 #607 #608 #609 #610 #611 #612 #613 #614 #615 #616 #617 #618 #619 #620 #621 #622 #623 #624 #625 #626 #627 P N
#628 #629 #630 #631 #632 #633 #634 #635 #636 #637 #638 #639 #640 #641 #642 #643 #644 #645 #646 #647 #648 #649 P N
#650 #651 #652 #653 #654 #655 #656 #657 #658 #659 #660 #661 #662 #663 #664 #665 #666 #667 #668 #669 #670 #671 #672 P N
#673 #674 #675 #676 #677 #678 #679 #680 #681 #682 #683 #684 #685 #686 #687 #688 #689 #690 #691 #692 #693 #694 P N
#695 #696 #697 #698 #699 #700 #701 #702 #703 #704 #705 #706 #707 #708 #709 #710 #711 #712 #713 #714 #715 #716 #717 P N
#718 #719 #720 #721 #722 #723 #724 #725 #726 #727 #728 #729 P N
#730

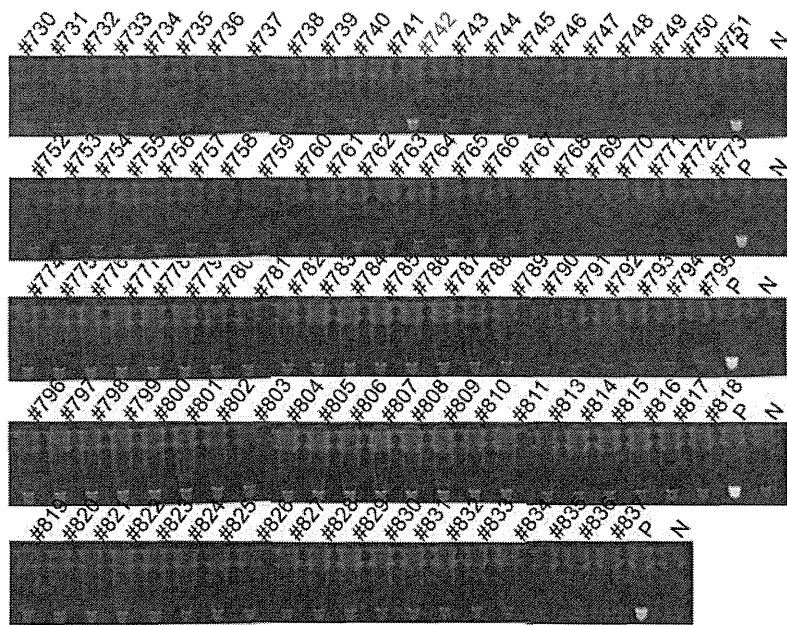
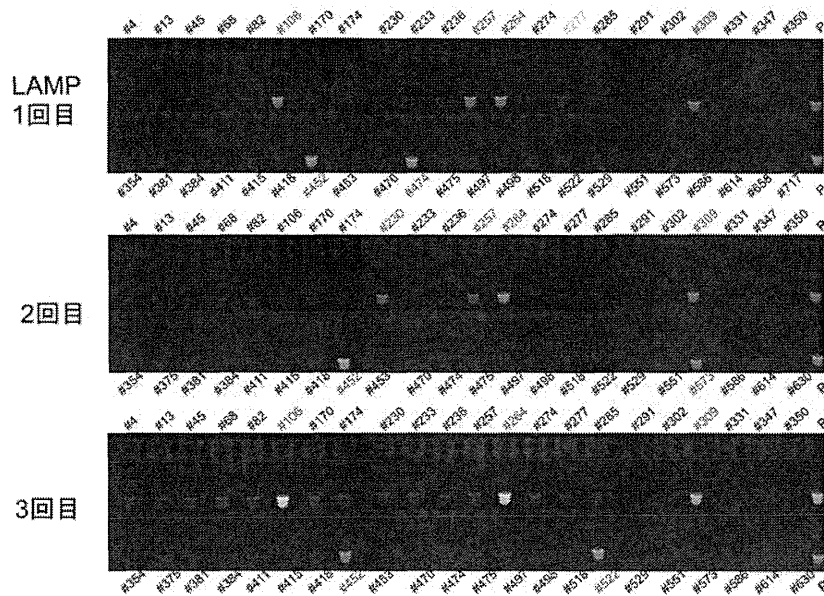


図4 陽性サンプルのLAMP法による再確認



LAMP	#45	#106	#230	#277	#309	#257	#264	#375	#452	#474	#522	#573	#630	#698
1回目	-	○	-	-	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
2回目	-	-	○	-	○	○	○	-	○	-	-	○	-	-
3回目	-	○	-	-	○	-	○	-	○	-	○	-	-	-

図5 ggt-nested PCR 法による陽性サンプルの再検証

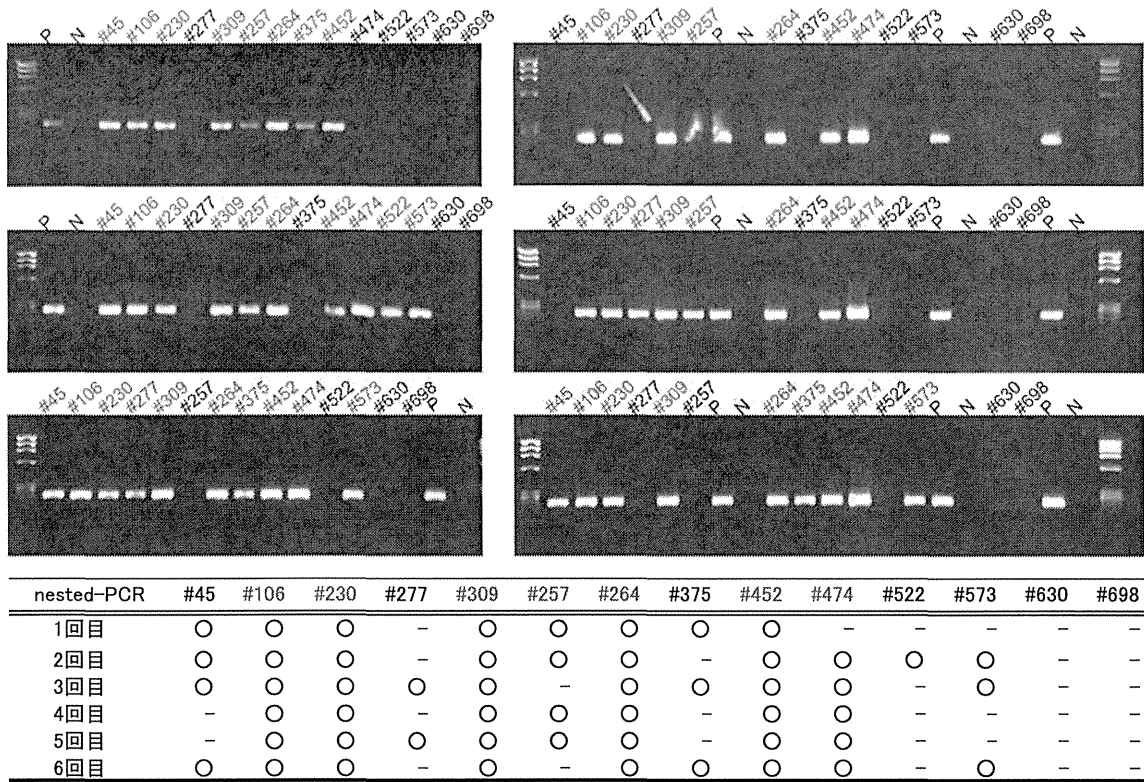


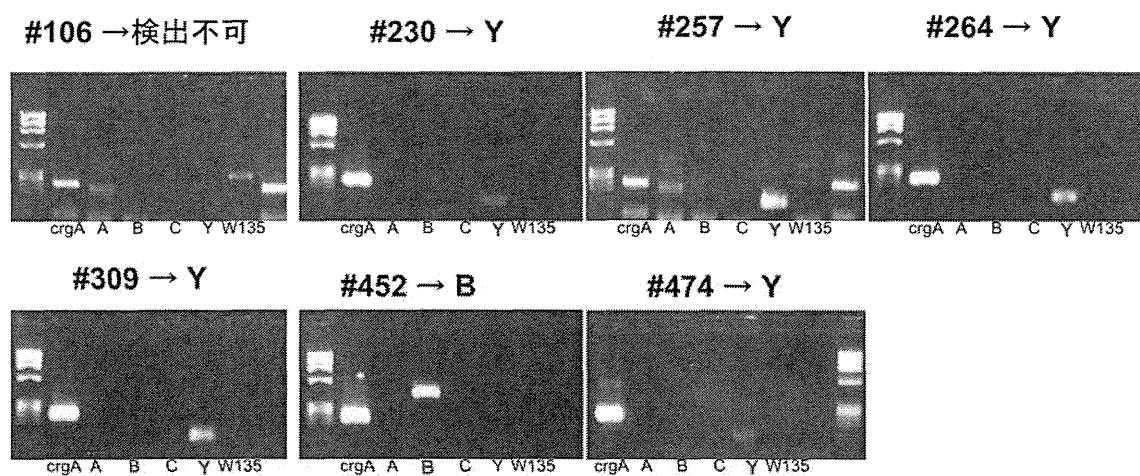
図6 LAMP 法及び nested PCR 法による検出結果のまとめ

LAMP	#45	#106	#230	#277	#309	#257	#264	#375	#452	#474	#522	#573	#630	#698
1回目	-	○	-	-	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
2回目	-	-	○	-	○	○	○	-	○	-	-	○	-	-
3回目	-	○	-	-	○	-	○	-	○	-	○	-	-	-

nested-PCR	#45	#106	#230	#277	#309	#257	#264	#375	#452	#474	#522	#573	#630	#698
1回目	○	○	○	-	○	○	○	○	○	-	-	-	-	-
2回目	○	○	○	-	○	○	○	-	○	○	○	○	-	-
3回目	○	○	○	○	○	-	○	○	○	○	-	○	-	-
4回目	-	○	○	-	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
5回目	-	○	○	○	○	○	○	-	○	○	-	-	-	-
6回目	○	○	○	-	○	-	○	○	○	○	-	○	-	-

灰色で示すサンプルを陽性サンプルと最終的に判断した。

図7 陽性サンプルの血清群決定



百日咳病原体サーベイランスの精度向上に関する研究

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 百日咳病原体サーベイランスの精度向上を目的に、4種類の病原体（百日咳菌、パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii*、*Mycoplasma pneumoniae*）を同時に検出可能な4PlexリアルタイムPCR法の開発を行った。百日咳菌の標的遺伝子には挿入配列IS481、パラ百日咳菌にはIS1001、*B. holmesii*には*recA*とIS481、マイコプラズマには*atpD*を使用し、本法の検出感度を検討した。検出感度は百日咳菌が10 fg DNA（菌量として2.4個）、パラ百日咳菌が100 fg（21個）、*B. holmesii*が1,000 fg（270個）、マイコプラズマが10 fg（12個）を示し、各標的遺伝子に対し理論値に近い増幅効率（97.9~116.7%）を持つことを確認した。国立感染症研究所では本法を百日咳の病原体検査に導入するとともに、2014年6月から地方衛生研究所を対象に本検査キットの配布を開始した。

研究協力者

吉野修司（宮崎県衛生環境研究所・微生物部）
勝川千尋（大阪府立公衆衛生研究所・感染症部）
梅田薫（大阪市立環境科学研究所・微生物保健グループ）
鱈坂裕美（国立感染症研究所・細菌第二部）
大塚菜緒（同上）
平松征洋（同上）

A. 研究目的

百日咳はワクチン予防可能疾患に含まれる小児の急性呼吸器感染症である。百日咳の起原菌は百日咳菌（*Bordetella pertussis*）であるが、同様な呼吸器症状を引き起こす病原体として百日咳類縁菌（パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii*）、マイコプラズマ（*Mycoplasma pneumoniae*）、その他ライノウイルスを始めとする呼吸器系ウイルスが挙げられる。臨床症状からこれらの病原体を鑑別することは難しく、百日咳の臨床診断には他疾患の紛れ込みを多く含むことが指摘される。特に感染症発生動向調査における百日咳報告基準は臨床症状に基づくため、その精度向上には実験室診断による病原体鑑別が必要となる。

百日咳菌の病原体鑑別には遺伝子検査が有用となり、現在米国では菌培養検査や血清学的検査に代わりPCR検査が広く用いられている。特にアウトブレイク調査ではPCR検査による病原体鑑別が望まれ、わが国では研究用試薬として百日咳菌LAMP検出キット（栄研化学）を利用することができる。ただし、本検査キットは百日咳菌に特異的であり、百日咳類縁菌を検出することが出来ないという欠点がある。以上の背景を踏まえ、本研究班では百日咳菌、百日咳類縁菌、マイコプラズマを一度に鑑別可能な4PlexリアルタイムPCR法（ver.1）を開発し、本法の臨床評価を基に改良を行った。さらに、本法（ver.3.2）を国立感染症研究所の百日咳病原体サーベイランスに導入し、2013~2014年に

おける百日咳発生動向について考察を加えた。

B. 研究方法

4PlexリアルタイムPCR：百日咳菌、*B. holmesii*、パラ百日咳菌、マイコプラズマの標的遺伝子にはそれぞれ挿入配列IS481、*recA*とIS481、挿入配列IS1001、*atpD*を使用した（表1）。*recA*と*atpD*の検出用プライマーとプローブは既報（Guthrie et al., JCM, 2010; Winchell et al., JCM, 2008）に従い、IS481とIS1001のプライマーとプローブ（Kösters et al., JMM, 2001）は一部改変して用いた。さらに、マルチプレック化のためレポーターの蛍光色素に変更を加えると同時に、蛍光クエンチャーを非蛍光クエンチャーに改変した（ver.3.2）。リアルタイムPCR装置はABI 7500Fast systemを使用し、Stage 1を95°C（10 sec）、Stage 2を95°C（3 sec）、60°C（30 sec）の40 cycleにより遺伝子増幅を行った。本法の反応組成を以下に示した。

2×Premix EX Taq (Takara)	10 µl
Mixed primer & probes	2 µl
Template DNA	2 µl
ROX dye II (Takara)	0.2 µl
DW	5.8 µl
Total	20 µl

感度評価：百日咳菌東浜株、*B. holmesii* ATCC51541、パラ百日咳菌 BAA-587、*M. pneumoniae* NBRC14401のゲノムDNAを供試した。精製DNAを1,000 pgから10倍間隔で連続希釈し、4PlexリアルタイムPCR（ver.3.2）の検出感度を評価した。同時にsingleplex PCRとの感度比較を行った。百日咳病原体サーベイランスへの応用：国立感染症研究所に検査依頼があった百日咳疑い患者検体355件を4PlexリアルタイムPCR（ver.3.2）に供試した（検体採取期間：2013年1月~2014年12月）。臨床検体はQiagen DNA Micro kitによりDNAを精製し、遺伝子

増幅は上述の条件で実施した。相対蛍光強度 (ΔRn) が 0.3 以上を示したものを陽性と判断した。なお、本検査は現行の遺伝子検査である LAMP 法 (百日咳菌, *B. holmesii*) と同時に実施し、マイコプラズマ陽性検体については Looamp マイコプラズマ P 検出試薬キット (栄研化学) による追試確認を行った。(倫理面への配慮)

臨床検体は医療機関において診断目的に採取・保存された患者検体を供試した。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. 研究結果

図 1 に 4Plex リアルタイム PCR と singleplex PCR の検量線を示した。各病原体に対する検量線は良好な直線性を示し、4Plex リアルタイム PCR の検量線は single PCR と等しく、マルチプレックス化による感度低下を認めなかった。4Plex リアルタイム PCR の検出感度は、百日咳菌が 10 fg DNA (菌数として 2.4 個)、パラ百日咳菌が 100 fg DNA (21 個)、*B. holmesii* が *recA* として 1,000 fg DNA (270 個)、マイコプラズマが 10 fg (12 個) と算出された (表 2)。PCR 増幅効率は 97.9~116.7% の範囲を示し、定性試験として十分な増幅効率を持つことが確認された。

国立感染症研究所の百日咳病原体サーベイランスに 4Plex リアルタイム PCR 法を導入し、2013 年 1 月から 2014 年 12 月に採取・送付された臨床検体に応用した。百日咳疑い患者検体 355 件中、94 件 (26%) が百日咳菌陽性、4 件 (1.1%) がパラ百日咳菌陽性、2 件 (0.6%) がマイコプラズマ陽性を示し、百日咳菌では 2014 年の 4~6 月に陽性数の増加を認めた (図 2)。パラ百日咳菌は 2013 年に 4 件検出され、百日咳菌と異なり季節性を認めなかった。マイコプラズマの陽性検体は 2013 年と 2014 年に各 1 件が認められた。なお、*B. holmesii* は不検出であった。表 3 に年齢別の陽性数を示した。百日咳菌は各年齢群で陽性者が認められたが、乳児 (生後 3 ヶ月以内) で最も高い陽性数 (21 件) を示した。一方、パラ百日咳菌とマイコプラズマの陽性者は 1~4 歳と 5~9 歳の年齢群に認められ、1 歳未満の乳児に陽性者は確認されなかった。次に年齢が判別している百日咳菌陽性患者 93 名について、年齢別の陽性率を解析した (図 3)。その結果、乳児 (生後 3 ヶ月以内) が最も高い陽性率 (49%) を示し、一方、1~4 歳の小児が最も低い陽性率 (17%) を示した。乳児 (生後 3 ヶ月) と比較した場合、月齢 4~11 ヶ月、1~4 歳、5~9 歳、20 歳以上の陽性率は有意に低かった ($P < 0.05$, Fisher's exact test)。なお、10~14 歳、15~19 歳では陽性率に有意差を認めなかった ($P \geq 0.05$)。

D. 考察

本研究では、百日咳病原体サーベイランスに有用となる 4Plex リアルタイム PCR の開発を行った。先に構築した測定系 (ver.1) では

標的遺伝子 IS481 と IS1001 に非特異的増幅が認められたことから、IS481 の検出用プライマー PPert とプローブ SPert について、PPert を 19 mer から 20 mer、SPert を 22 mer から 15 mer に変更した。さらに SPert の蛍光クエンチャー BHQ1 を非蛍光クエンチャーである NFQ-MGB に変更し、さらにパラ百日咳菌の検出用プローブ SPPara を 22 mer から 15 mer に変更した。これらの改良により、非特異的増幅は減少し、その一方でマルチプレックス化による感度低下を認めなかった。国立感染症研究所では本法 (ver.3.2) を実際の百日咳病原体サーベイランスに導入するとともに、2014 年 6 月から地方衛生研究所に本検査キットの配布を開始した。これまでに地方衛生研究所 6 施設に計 8 キットの配布を行った。

4Plex リアルタイム PCR の感度評価では、*B. holmesii* の検出感度が百日咳菌、パラ百日咳菌、マイコプラズマに比較して 1,000 fg DNA と低い数値を示した。そこで、臨床的感度を考察したところ、*B. holmesii* 感染者は検出限界の 100 倍以上の保菌量を示し、本法の臨床感度は十分に高いと判断された。国内で発生した *B. holmesii* の集団感染事例では、抗生剤未投与の患者 5 名は高い保菌量 (Ct 値: 21.6~28.7) を示していた (Kamiya et al., *Emerg Infect Dis*, 2012)。

今回の病原体サーベイランスでは百日咳菌の陽性率が 26% であったのに対し、パラ百日咳菌とマイコプラズマの陽性率はそれぞれ 1.1% と 0.6% と低値を示した。2008 年に実施された病原体サーベイランスでは、百日咳菌の陽性率は 31%、パラ百日咳菌は 0.9% であったことから、2008 年以降両菌の陽性率に変動はないと判断された。マイコプラズマに関しては、これまで百日咳疑い患者を対象とした国内調査例がないため、現時点で考察することは出来ず、引き続き調査が必要となる。一方、*B. holmesii* は 2010 年代始めに数例の呼吸器感染症例が認められたが、今回の調査では 1 例も確認されなかった。米国では *B. holmesii* の敗血症患者は 2010~11 年の百日咳流行時に増加したことから、*B. holmesii* は百日咳菌と同様に周期的に流行する可能性が指摘される。2011 年以降、日本では百日咳流行が認められていないことから、本菌の発生動向については今後も注視して行く必要がある。

百日咳類縁菌とマイコプラズマは百日咳様の呼吸器疾患を引き起こすことから、4Plex リアルタイム PCR はこれら病原体の鑑別に有用である。これまでの遺伝子検査は主に百日咳菌のみを対象としていたため、百日咳菌以外の病原体の関与については不明な点が多い。今後は本法の導入により、百日咳類縁菌とマイコプラズマに関する知見が集積することが期待される。

E. 結論

百日咳病原体サーベイランスに有用となる 4Plex リアルタイム PCR 法を構築し、本法を国立感染症研究所の百日咳病原体検査に導入した。また、地方衛生研究所を対象に本

検査キットの配布を開始した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(欧文)

- Allahyar Torkaman MR, Kamachi K, Nikbin VS, Lotfi MN, Shahcheraghi F. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for detecting *Bordetella pertussis*. J Med Microbiol. [Epub ahead of print]
- Nagasawa M, Kaku M, Kamachi K, Shibayama K, Arakawa Y, Yamaguchi K, Ishii Y. Loop-mediated isothermal amplification assay for 16S rRNA methylase genes in Gram-negative bacteria. J Infect Chemother. 20:635-8, 2014.
- 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. Transmission of *Bordetella holmesii* during pertussis outbreak, Japan. Emerg Infect Dis. 18:1166-9, 2012.

(和文)

- 蒲地一成. 微生物 ABC 百日咳. up-to-date 子どもの感染症. 2(2):18-21, 2014.
- 蒲地一成. 百日咳検査の使い方. SRL 宝函. 34(3):41-3, 2013
- 蒲地一成. 百日咳の迅速診断法. 小児科臨床. 65(12):2559-63, 2012.

2. 学会発表

- 大塚菜緒, 柴山恵吾, 蒲地一成. *Bordetella pertussis* fimbriae are regulated by BvgAS system and Pfim structure. 第 88 回日本細菌学会総会, 平成 27 年 3 月, 岐阜.
- 平松征洋, 大塚菜緒, 柴山恵吾, 鈴木英里, 渡邊峰雄, 蒲地一成. 百日咳類縁菌 *Bordetella holmesii* の自己凝集抑制因子 BipA に関する研究. 第 88 回日本細菌学会総会, 平成 27 年 3 月, 岐阜.
- 勝川千尋, 梅田薫, 河原隆二, 蒲地一成. 百日咳の診断における培養検査と遺伝子検査の有用性の検討. 第 87 回日本細菌学会総会. 平成 25 年 3 月, 東京
- 勝川千尋, 榎引千恵子, 西戸温美, 蒲地一成. 百日咳の細菌学的検査精度向上に関する多方面からの検討. 第 25 回日本臨床微生物学会総会. 平成 25 年 2 月, 名古屋
- 蒲地一成, 池田徹也, 伊瀬郁, 松本昌門, 石畝史, 烏谷竜哉, 江藤良樹, 山下和予, 柴山恵吾, 多屋馨子, 岡部信彦. 百日咳菌凝集素価法の診断精度について. 第 86 回日本感染症学会総会, 平成 24 年 4 月, 長崎

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

- 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)
- 実用新案登録：なし
- その他：特になし

Table 1. Primers and probes used for 4Plex real-time PCR (ver.3.2)

Target gene (organism)	Primer or probe	Sequence (5' to 3')	Reporter/Quencher	Amplicon (bp)	Optimal conc. (nM)	Reference
IS481 (<i>B. pertussis</i> and <i>B. holmesii</i>)	PPertM	ATCAAGCACCGCTTACCCG*	FAM/NFQ-MGB†	114	300	Kösters et al., JMM, 2001
	APPert	TTGGGAGTTCTGGTAGGTGTG				
	SPertM	CAAGGCCGAACGCTT*				
<i>recA</i> (<i>B. holmesii</i>)	BHrecA-F	CGGTTCGCTGGGTCTCG	VIC/NFQ-MBG	50	400	Guthrie et al., JCM, 2010
	BHrecA-R	CCCGCGGCAGACCAC				
	BHrecA-P	CATCGCATTGGGCG				
IS1001 (<i>B. parapertussis</i>)	PParaP	GATATCAACGGGTGACGGATC	NED/NFQ-MGB	103	300	Kösters et al., JMM, 2001
	APParaP	GTATGCCAACCAGTTTCGAA				
	SParaM	TGCAATCGAGCAACG*				
<i>atpD</i> (<i>M. pneumoniae</i>)	Mp3-F	CGATCTATGTGCCAGCTGATGA	Cy5/BHQ3‡	68	200	Winchell et al., JCM, 2008
	Mp3-R	AGCATCCAGGTGGGTAAGGT				
	Mp3-P	TTGACTGACCCCGCTCCGGC				

* Oligonucleotide length was modified.

† Non Fluorescent Quencher-Minor Groove Binder

‡ Black Hole Quencher 3

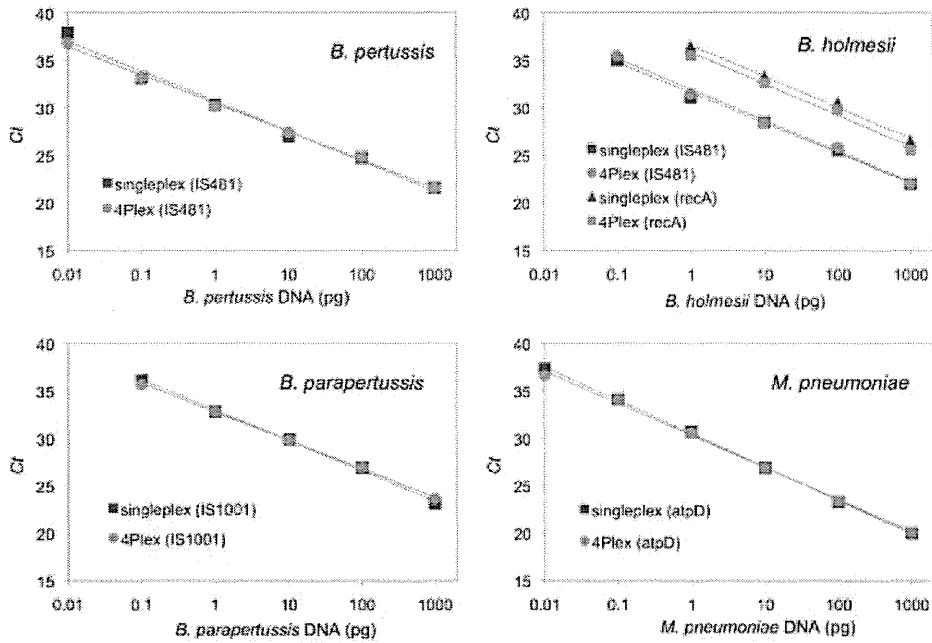


Table 2. Analytical sensitivity of 4Plex real-time PCR for target organisms

Organism	Target gene	Detection limit (genomic copy)	Amplification efficiency (%)
<i>Bordetella pertussis</i>	IS481	10 fg DNA (≈ 2.4)	116.7
<i>Bordetella parapaertussis</i>	IS1001	100 fg (≈ 21)	115.9
<i>Bordetella holmesii</i>	recA	1,000 fg (≈ 270)	101.2
	IS481	100 fg (≈ 27)	103.2
<i>Mucoplasma pneumoniae</i>	atpD	10 fg (≈ 12)	97.9

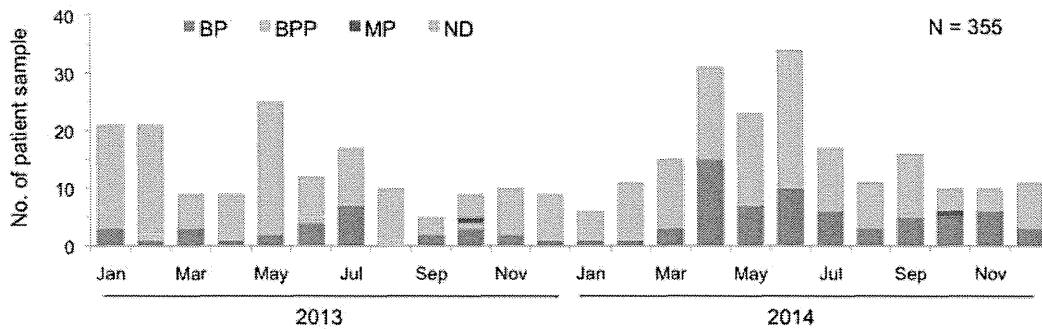


Fig. 2. Monthly distribution of PCR positive sample for *Bordetella pertussis* (BP), *Bordetella paraperussis* (BPP), and *Mycoplasma pneumoniae* (MP) between January 2013 and December 2014 in Japan. A total of 355 patient samples were tested by 4Plex real-time PCR. No samples were positive for *Bordetella holmesii*. ND, not detected.

Table 3. Results of 4Plex real-time PCR (ver.3.2) for 355 patient samples collected between 2013 and 2014

Patient age range	No. of samples tested	No. of positive			
		<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>M. pneumoniae</i>
≤3 months	43	21	–	–	–
4–11 months	42	11	–	–	–
1–4 years	70	11	3	–	1
5–9 years	76	20	1	–	1
10–14 years	51	15	–	–	–
15–19 years	21	6	–	–	–
≥20 years	49	9	–	–	–
unknown	3	1	–	–	–
Total	355	94 (26%)	4 (1.1%)	0	2 (0.6%)

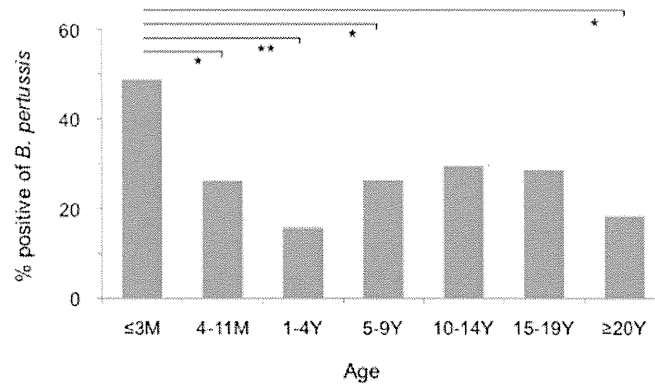


Fig. 3. PCR positive rates of *Bordetella pertussis* for age groups. A total of 93 patients were classified into 7 age groups. See Table 3 for the actual number of patients. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.