

百日咳の発生実態の解明及び新たな百日咳ワクチンの開発に資する研究
業務項目：百日咳診断に関わる研究開発

研究分担者 北里生命科学研究所 ウイルス感染制御 教授 中山哲夫

【研究要旨】 百日咳は whooping を伴う咳込み等の典型的な症状から診断されるが、成人百日咳は典型的な症状を認めないため2週間以上持続する咳、夜間の発作性の咳、咳込み、嘔吐などの症状から診断されている。百日咳の流行は2007/08の大学キャンパス、職場等での流行、2010/11年の全国的な流行以降患者報告例数は減少している。しかしながら、地域的に散発例が報告されている。社会全体での百日咳の侵淫を知るために小学1年、中学1年、専門学校1年生のPT、FHA抗体の分布を検討した。DPT3回以上接種している児童では小学1年生で115/243(47%)がPT抗体陽性で、中学1年生では374/624(60%)、専門学校では58/78(74%)とそれぞれの6年間に陽性率が増加し、平均抗体価も上昇が認められた。同じくFHA抗体の陽性率は小学1年生で204/243(84%)がFHA抗体陽性で、中学1年生では569/624(91%)と陽性率が増加し専門学校1年生では68/78(87%)と陽性率は変化が認められなかった。春の入学時に採血しており、2014年10月に兄弟例で長引く咳と咳込み発作を認め臨床的に百日咳と診断され兄弟ともにPT<10から>160と上昇したことから百日咳と診断され百日咳の感染が確認された。PT<10の陰性血清についてワクチン抗原のFim2、流行野生株型のFim3抗体を検討しFim2抗体の陽性の陽性率は小学1年から中学1年までに減少し、一方Fim3抗体の陽性率は上昇した。以上のことから、社会全体での百日咳の侵淫が推察された

A. 研究目的

百日咳は乳幼児においては無呼吸発作や脳症を合併する重篤な感染症である。1968年からDPTワクチンとして定期接種のワクチンとなったが、1981年には百日咳菌の感染防御に関連する百日咳毒素(pertussis toxin: PT)、線維状赤血球凝集素(filamentous hemagglutinin; FHA)等を精製した無細胞型百日咳ワクチンとジフテリア・破傷風トキソイドとを混合した沈降精製三種混合ワクチン(acellular pertussis combined with DT: DTaP)が開発された。DTaP接種後では副反応の出現率は極めて低くDTaP接種率も90%近くになり百日咳患者報告数は減少してきた。

しかしながら2007/08年には大学キャンパスでの百日咳の流行が報告され成人百日咳の報告が増加している。2010/11年に大きな流行が観察されたがその後、報告数には減少に転じている。

成人ではワクチン接種の既往歴があり、抗菌剤の内服により軽症であることから百日咳は典型的な症状に乏しく、長引く咳が主たる症状

で医療機関を受診することはなく、不顕性感染を含めた百日咳の実態が明らかにされていない可能性がある。社会全体での百日咳の侵淫を知るために小学1年、中学1年、専門学校1年生を対象に血清疫学調査を実施した。

B. 研究方法

1) 対象

2014年4月の入学時に小学1年生249例、中学1年生641例、2013年入学の看護学部専門学校1年生86例から血清を採取した。

2) 血清抗体

PT, FHAのEIA抗体はデンカ生研のEIA法で測定した。ワクチン抗原のFim2、流行野生株のFim3抗体は蛍光EIA法で測定しコントロールウェルとの比率で500%以上を陽性とした。(本研究は北里研究所病院倫理委員会、慶應義塾大学倫理委員会、国立病院機構三重病院倫理委員会で承認された。)

C. 結果

1) PT, FHA抗体陽性率の推移

百日咳の患者は小学校低学年にピークが認められることから社会での侵淫度を調べるために小学1年生、中学1年生、専門学校1年生を対象に血清を採取した。DTaP ワクチンはI期追加接種が2歳には終了しその後百日咳の成分を含んだワクチンの接種は行われていない。DTaP ワクチン接種後ではほぼ100%の抗体陽転率を示し、DTaP ワクチンを3回以上接種している児のPT抗体の陽性率を図1に示した。DTaP 3回以上接種している児童では小学1年生で115/243 (47%)がPT抗体陽性で、中学1年生では374/624 (60%)、専門学校では58/78 (74%)とそれぞれの6年間に陽性率が増加した。同じくFHA抗体の陽性率を示した。小学1年生で204/243 (84%)がFHA抗体陽性で、中学1年生では569/624 (91%)と陽性率が増加し専門学校1年生では68/78 (87%)と陽性率は変化が認められなかった。

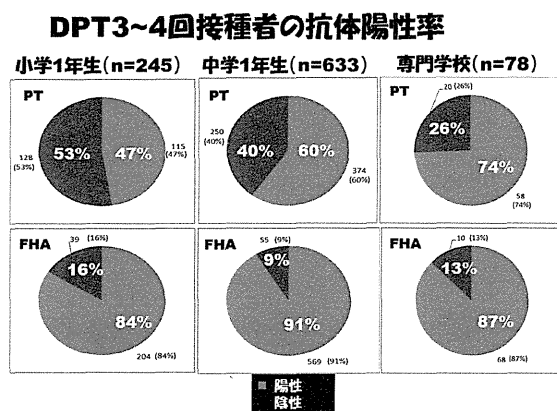


図1. 小学1年、中学1年、専門学校生のPT抗体、FHA抗体

2) PT, FHA抗体価の累積抗体分布

DPT3~4回接種者の抗体価分布の比較

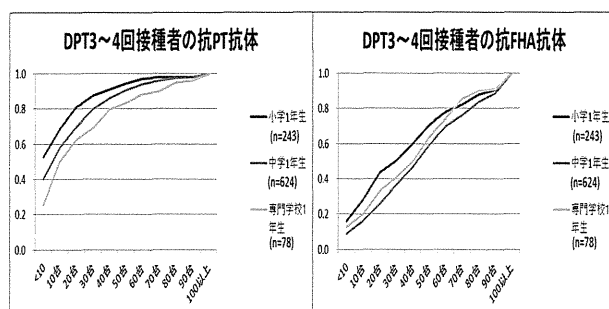


図2. PT, FHA抗体の累積分布

PT, FHA抗体の累積分布を図2に示した。小学1年生でPT抗体は128/243 (53%)が陰性でその後陽性に転じ抗体価の分布も高い方にシフトしていた。一方、FHA抗体価は小学1年生で39/243 (16%)がFHA抗体陰性でその後陰性率が低下し抗体分布は高い方にシフトしていた。抗体の累積分布には中学1年生と専門学校1年生では差が認められなかった。

3) PT, FHA抗体価の平均抗体価の推移

各学年のPT, FHA抗体の平均抗体価を図3に示した。PT抗体価は小学1年生で95%CIが16.0-20.6 EU, 中学1年生で21.8-25.8 EU, 専門学校生で24.7-37.0 EUと学年毎に有意な増加が認められた。

一方、FHA抗体は小学1年生で41.0-50.4 EU, 中学1年生では52.4-57.8 EU, 専門学校1年生では42.4-57.0 EUと各学年では有意な上昇は認められなかった。

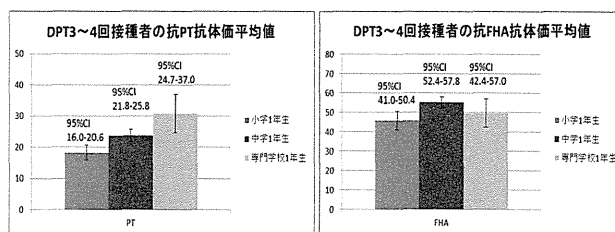


図3. PR, FHA平均抗体価の推移

4) PT抗体陰性者のFim2, Fim3抗体陽性率

PT陰性血清のFim2, Fim3抗体の陽性率

	PT<10	Fim2 >500	Fim2 >1000	Fim3 >500	Fim3 >1000
小学1年生	75	25 (33%)	18 (24%)	54 (72%)	18 (24%)
中学1年生	92	18 (20%)	10 (11%)	74 (80%)	32 (35%)

小学1年生でPT抗体陰性者75例、中学1年生で92例についてワクチン抗原であるFim2, 流行野生株Fim3抗体を検討した。Fim2抗体価>500の陽性率は25/75 (33%)から18/92 (20%)と減少し>1000でとって小学1年から中学1年までの間で減少していることが明らかとなった。流行野生株Fim3に対する抗体価は54/75 (72%)から74/92 (80%)と増加していることが明らかとなった。

5) 学園内での流行はあるのか?

春の入学時に採血しているが、2014年10

月に小学1年生、中学1年生の兄弟例で長引く咳と咳込み発作を認め臨床的に百日咳と診断され兄弟ともにPT <10 から>160 と上昇したことから血清学的にも百日咳と診断された。

D. 考案

DTaP ワクチンは1歳半から2歳までに1期追加接種が終了し以降ワクチン接種を受けることはない。DTaP ワクチン接種率は95%を超え1期追加接種後百日咳抗体の陽転率はほぼ100%である。今回の血清疫学調査でもほとんどの児童・学童が4回の接種を終了しており3回以上接種している児童・学童を対象としてPT, FHA の抗体分布を調べた。PT 抗体は小学1年生でDTaP ワクチン接種後4-5年経つとPT 抗体は50%以上が陰性化することが明らかとなった。その後6年経過する中学1年生で陰性率は40%、次の6年間で陰性率は26%と陰性率が減少してくる。DTaP ワクチン接種は2歳以降接種がないため6年ごとの調査では陽性率が低下するはずであるが逆に陽性率は増加し抗体分布は陽性側にシフトしている。

今回の調査の中で秋に百日咳と診断された兄弟例が存在し小学校では咳をしている児童が認められていた。今までの疫学調査でも百日咳の患者は7-10歳で増加することから目立った流行はなくても社会で百日咳は浸淫が認められる。百日咳対策として小学校入学前の追加接種を含めた予防接種戦略の見直しが必要と考える

E. 結論

諸外国では小学入学前にDTaP の追加接種が行われており、百日咳の抗体の減衰が早いことから小学入学前の追加接種のスケジュールを検討する必要がある。

F. 研究業績

1. 論文発表

2014年

1) Kashiwagi Y, Miyata A, Kumagai T, Maehara K, Suzuki E, Nagai T, Ozaki T, Nishimura N, Okada K, Kawashima H, Nakayama I. Production of inflammatory cytokines in response to

diphtheria-pertussis-tetanus (DPT), haemophilus influenzae type b (Hib), and 7-valent pneumococcal (PCV7) vaccines. *Human vaccine & Immunother* 2014; 10: 677-685.

- 2) Kashiwagi Y, Maeda M, Kawashima H, Nakayama I. Inflammatory responses following intramuscular and subcutaneous immunization with aluminum-adjuvanted or non-adjuvanted vaccines. *Vaccine* 2014; 32: 3393-3401.
- 3) Yamaji Y, Nakayama I. Recombinant measles viruses expressing respiratory syncytial virus proteins induced virus-specific CTL responses in cotton rats. *Vaccine* 2014; 32: 4529-4536.
- 4) Kumagai T, Yoshikawa T, Shiraki K, Yoshida M, Nakayama I, Ihira M, Asano Y. Virus specific cell-mediated immunity may play a role in controlling reactivated human herpes virus 6B in patients under measles induced immunosuppression. *J Med Virol* 2014; 86:658-665.
- 5) Kumagai T, Nakayama I, Okuno Y, Kase T, Nishimura N, Ozaki T, Miyata A, Suzuki E, Okafuji T, Ochiai H, Nagata N, Tsutsumi H, Okamatsu M, Sakoda Y, Kida H, Ihara T. Human immune response to influenza A(H1N1) pdm2009 in patients with natural infection and in vaccine recipients in the 2009 pandemic. *Viral Immunology* 2014; 27:368-374.
- 6) Jin L, Orvell C, Myers R, Rota PA, Nakayama I, Forcic D, Hiebert J, Brown KE. Genetic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes. *Rev Med Virol* 2014; DOI:10.1002/rmv.1819

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

小児百日咳における実験室診断法の検討

分担研究者 尾崎隆男 江南厚生病院こども医療センター顧問
研究協力者 西村直子 江南厚生病院こども医療センター長

研究要旨

2012年10月～2014年3月の1年6カ月間に、激しい咳や長引く咳などにより百日咳の鑑別を要した168例を対象に、百日咳の実験室診断法を後方視的に検討した。病原体診断法として全例から後鼻腔ぬぐい液を採取し、百日咳菌分離と loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による百日咳菌 DNA 検出を行った。126例については、血清診断法として PT-IgG 抗体価を測定した(ペア血清 67例, 単血清 59例)。実験室診断基準は、菌分離または DNA 検出または血清診断基準に該当したものとした。168例中 34例(20%)が百日咳と実験室診断され、初診時年齢の中央値は 0.9歳(日齢 17～12.3歳)であった。DNA 検出は 16例(47%)、菌分離は 9例(26%)であり、菌分離例は全て DNA 検出例であった。血清診断基準該当例は 31例(91%)であり、18例(53%)が血清診断基準のみに該当した。その中の 7例のワクチン未接種幼若乳児(日齢 17～3カ月)では、6例がペア血清で抗体価の低下を認め、1例は幽門狭窄症による咳込み嘔吐であった。これら 7例は母体の経胎盤移行抗体による血清診断基準偽該当例と考えられた。百日咳の実験室診断法として病原体診断がより確実であり、特に簡便・迅速で感度の高い LAMP 法は有用と思われた。

A. 研究目的

百日咳の実験室診断は、百日咳菌分離、百日咳菌 DNA 検出および血清診断で行なわれている。確定診断法のゴールドスタンダードは菌分離であるが、手間と時間がかかり、感度が低いという問題がある。近年、簡便で迅速な DNA 検出法の loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法が開発され¹⁾、当院では百日咳菌 DNA の検出法として使用している。

かつてわが国では百日咳凝集素価(山口株, 東浜株)の測定が血清診断法の主流であったが、2012年末に試薬の製造販売が中止され測定できなくなった。現在、酵素免疫測定法(EIA法)による PT

(pertussis toxin: 百日咳毒素)-IgG 抗体価が血清診断に用いられている。

今回、当院小児科における百日咳の実験室診断法を後方視的に検討した。

B. 研究方法

1. 対象

2012年10月～2014年3月の1年6カ月間に、激しい咳や長引く咳などを主訴に当院小児科を受診し、百日咳の鑑別を要した168例を対象とした。

2. 菌分離

全例から採取した後鼻腔拭い液 168 検体を分離材料とした。なお 168 検体中 4 検体は、回復後の再発症による同一患児からの重複採取である。百日咳菌の分離用培地として、Charcoal 寒天培地(OXOID)を用いた。培養条件は 35℃湿潤好気培養とし、検体を塗布後 7 日間まで毎日観察を行った。Charcoal 寒天培地にて発育した真珠様の光沢を有するドーム状に隆起した直径 1～2mm のコロニーを釣菌し、グラム陰性小桿菌、オキシダーゼ試験陽性および百日咳菌 I 相菌免疫血清(デンカ生研)凝集の全てを満たしたものを百日咳菌と同定した。

3. LAMP 法による DNA 検出

採取した後鼻腔拭い液検体から、QIAamp@DNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて DNA 精製を行った。その後、国立感

染症研究所細菌第二部で設計されたプライマーを使用し、Loopamp® turbidimeter RT-160C (栄研化学)を用いて百日咳菌 DNA の検出を行った。

4. 血清診断

血清採取は 126 例で施行された (ペア血清 67 例, 単血清 59 例)。SRL 社に PT-IgG 抗体価の測定を依頼し、図 1 に示す基準²⁾に基づいて血清診断を行った。

5. 実験室診断基準

実験室診断は、病原体診断 (菌分離または DNA 検出) または血清診断基準に該当したものとした。

(倫理面の配慮)

病原体検査のための後鼻腔拭い液採取および抗体検査のための血清採取は、全て保護者の同意を得て行った。特に、病原体検査の内容と意義については説明書を配布した。本検討の開始に際して情報を全て匿名化しており、個人が特定されることはない。また、日本小児科学会の定める利益相反に関する開示事項はない。

C. 研究成果

168 例中 34 例 (20.2%) が百日咳と実験室診断された。なお同一患児の重複診断例は無かった。実験室診断された 34 例について、診断基準別の内訳を図 2 に示す。DNA 検出は 47.1% (16/34)、菌分離は 26.5% (9/34)、血清診断が 91.2% (31/34) であった。百日咳菌が分離された 9 例は全例で DNA も検出されたが、2 例 (22.2%) が血清診断基準に該当しなかった。

百日咳実験室診断例の年齢別分布を図 3 に示す。年齢は日齢 17~12.3 歳 (中央値 0.9 歳)、6 カ月未満の幼若乳児が最も多く 44% (15/34) を占めた。一方、6 歳以上の学童例が 35.3% (12/34) を占めており、その 50% (6/12) が病原体診断されていた。

病原体診断と血清診断基準の双方に該当した 13 例の検査成績を表 1 に、病原体診断のみに該当した 3 例の検査成績を表 2 に示す。全例が百日咳と最終診断されていたが、表 2 の 3 例のうち 2 例では、ペ

ア血清が採取されたにもかかわらず PT-IgG 抗体価の有意上昇を認めなかった。

血清診断基準のみに該当した 18 例の検査成績を表 3 に示す。症例 No.17 から No.19 の 3 例は百日咳もしくは百日咳疑いと最終診断されたが、残る 15 例の最終診断名は百日咳ではなく、上気道炎 4 例、持続性咳嗽 3 例、気管支炎 2 例、咽頭扁桃炎 1 例、RS ウイルス感染症 1 例、肺炎 1 例、哺乳不良 1 例、肥厚性幽門狭窄症 1 例、不明 1 例であった。

D. 考察

培養法による百日咳菌分離は病原体診断法のゴールドスタンダードとされるが、特殊な培地を必要とし、さらに発育速度が遅いため最終判定までに 7 日間を要する。検体採取時期にも影響を受け、分離率は病週を追うごとに低下する。また抗菌薬が投与された場合には、投与 3~4 日後の菌分離は困難とされる。

感度および特異性に優れる遺伝子増幅検査として、LAMP 法が開発された。今回の調査で用いた LAMP 法では、使用するプライマーが PT のプロモーター領域を標的としている。PT は百日咳菌のみが産生する毒素であり、他の *Bordetella* 属では産生されない。そのため LAMP 法は PCR 法と同等の感度を有するだけでなく、他の *Bordetella* 属と交差反応を示さず、高い特異性を持つと考えられている。その他の利点として、増幅効率がよく PCR 法よりも短時間で結果が得られること、PCR 法よりも小型で安価な機器で実施可能であること、目視判定が可能であることなどが挙げられる。本検討において、菌分離例は全例で DNA が検出されており、LAMP 法の感度の高さが示された。

病原体診断されず、血清診断のみで実験室診断されたのは 18 例であった。最終診断名も百日咳であった 3 例を除く 15 例の最終診断名は上気道炎、気管支炎など百日咳以外の診断名であった。早期に DNA 検出の陰性が判明したと抗体測定結果が後日になって報告されている

ことから、百日咳の鑑別が十分になされなかつた可能性が考えられた。症例 20 はペア血清での抗体陽転がみられており、百日咳と考えられる。症例 No.21 から No.26 の 6 例は、日齢 17~3 カ月のワクチン未接種幼若乳児であった。全てでペア血清の回復期における PT-IgG 抗体価の低下がみられており、母体の経胎盤移行抗体による血清診断基準偽該当例であったと考えられる。ワクチン未接種者における 10EU/mL のカットオフ値は、幼若乳児への適応に問題のあることが示唆された。また、症例 No.27 の咳込み嘔吐は、幽門狭窄症が原因であった。症例 No.28 は単血清での診断基準に該当したが、母体の経胎盤移行抗体の残存は考えにくく、百日咳罹患例と考えている。症例 No.29~No.34 の 6 例はワクチン接種児であるが、PT-IgG 抗体価が 160EU/mL 以上と非常に高値であった。百日咳罹患の可能性は非常に高いが、ワクチンが誘導した抗体を完全には否定できない。病原体診断が陰性であった要因として、咳嗽の開始から当院受診までの経過が長かった、ワクチン既接種により菌量が少なかった、後鼻腔拭い液検体の不十分な採取手技、後鼻腔拭い液検体採取以前の抗菌薬投与、採取検体に DNA 検出の阻害剤となりうる血液が混入したなどの可能性が考えられた。

PT-IgG 抗体価による血清診断法は、日常診療で最も用いられている。しかし、結果判定に時間がかかるため早期診断での有用性の低いこと、病原体診断された例でも PT-IgG 抗体価が上昇しない例のあること、幼若乳児において母体の経胎盤移行抗体の紛れ込み例があること、ワ

クチン接種による抗体との鑑別が困難であることなど問題は少なくない。百日咳は伝染性の強い疾患でもあり、治療上および予防対策上、確実かつ迅速な診断法が必要である。今回の検討から、LAMP 法による DNA 検出は、簡便・迅速で感度も高く、日常診療での百日咳実験室診断法として非常に有用と考えられた。

E. 結論

百日咳の実験室診断法として病原体診断がより確実であり、特に簡便・迅速で感度も高い LAMP 法は有用と思われた。

G. 研究発表

- 1.論文発表
該当せず
- 2.学会発表
該当せず

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

I. 参考文献

- 1) Notomi T *et al.* : Loop-mediated isothermal amplification of DNA, *Nucleic Acids Res* 2000;28:e63
- 2) 咳嗽に関するガイドライン第 2 版作成委員会: 咳嗽に関するガイドライン第 2 版,33-36,日本呼吸器学会,東京,2012

研究協力者

江南厚生病院こども医療センター
後藤研誠、竹本康二
江南厚生病院臨床検査技術科
河内 誠、中根一匡、舟橋恵二

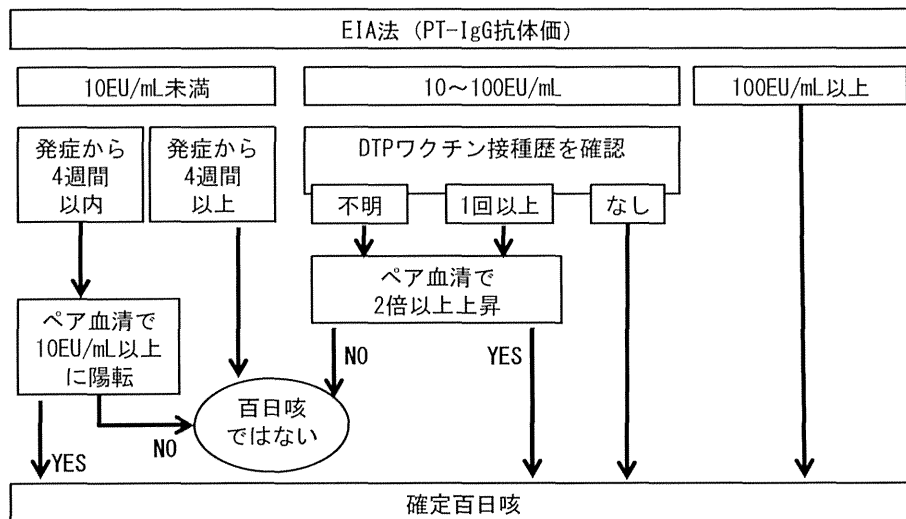


図1 百日咳の血清診断フローチャート2012²⁾

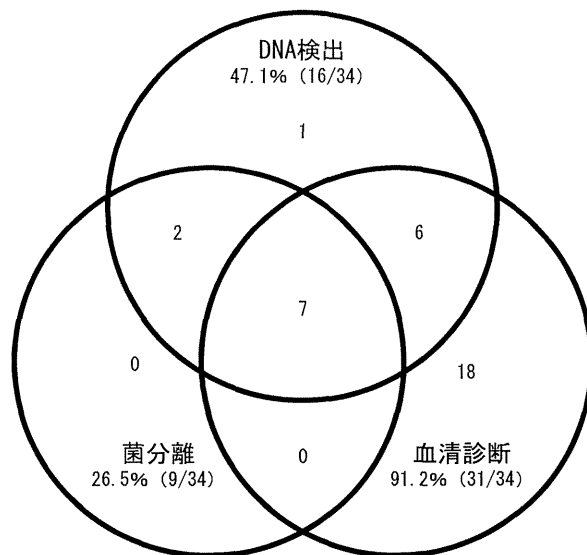


図2 百日咳実験室診断基準に該当した34例の内訳

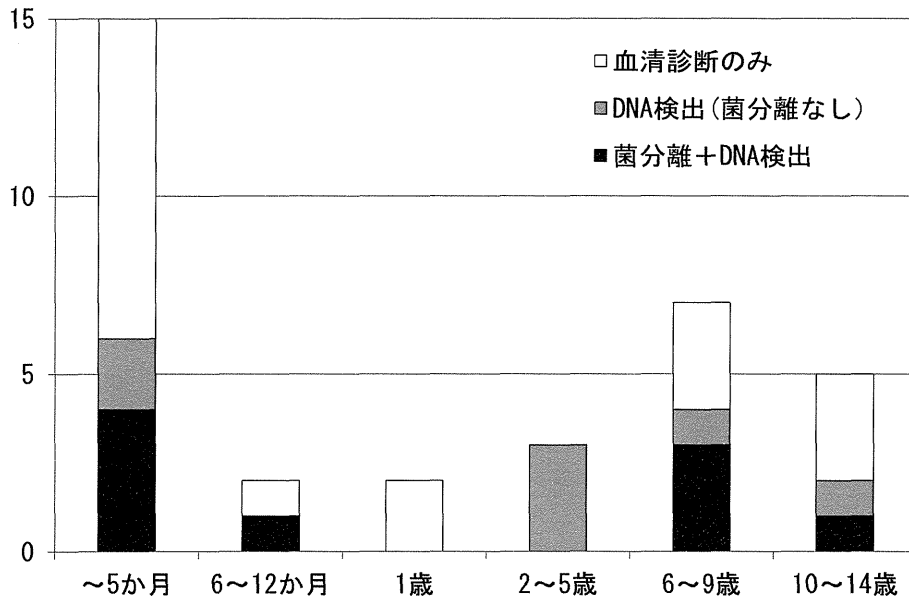


図3 百日咳実験室診断例の年齢別分布 (n=34)

表1 病原体診断基準と血清診断基準の双方に該当した13例

症例No	年齢	ワクチン歴	病原体診断		血清診断	PT-IgG (EU/mL)		最終診断名	入院	抗菌薬事前投与
			DNA検出	菌分離		急性期	回復期			
1	1か月	未	+	+	+(ペア*)	13	26	百日咳	○	なし
2	1か月	未	+	+	+(ペア)	68	≥160	百日咳	○	CPDX
3	3か月	未	+	+	+(ペア)	<1	32	百日咳	○	AMPC
4	6か月	未	+	+	+(ペア)	<1	77	百日咳	○	なし
5	7歳	3回	+	+	+(ペア)	2	123	百日咳	-	なし
6	8歳	4回	+	+	+(ペア)	10	146	百日咳+喘息	○	なし
7	9歳	4回	+	+	+(ペア)	10	≥160	百日咳	-	なし
8	4か月	1回	+	-	+(ペア)	<1	≥160	百日咳+中耳炎	○	EM, CDTR
9	2歳	未	+	-	+(ペア)	43	100	百日咳	○	なし
10	4歳	未	+	-	+(ペア)	5	97	百日咳	○	なし
11	1か月	未	+	-	+(単**)	14	12	百日咳+RSV	○	なし
12	7歳	4回	+	-	+(単)	≥160	ND	百日咳	-	CFPN, CAM
13	12歳	不明	+	-	+(単)	≥160	ND	百日咳	-	不明

*ペア血清での抗体陽転または上昇の血清診断基準に該当

**単血清での血清診断基準のみに該当

表2 病原体診断基準のみに該当した3例

症例No	年齢	ワクチン歴	病原体診断		血清診断	PT-IgG (EU/mL)		最終診断名	入院	抗菌薬事前投与
			DNA検出	菌分離		急性期	回復期			
14	1か月	未	+	+	-	7	9	百日咳	○	なし
15	3歳	4回	+	-	-	5	6	百日咳	-	CFPN
16	12歳	4回	+	+	-	34	ND	百日咳	-	なし

表3 血清診断基準のみに該当した18例

症例No	年齢	ワクチン区	抗原検査		血清診断	PT-IgG (IU/mL)		最終診断名	入院	抗体基準前接字
			OR検査	菌分離		急性期	回復期			
17	5か月	未	-	-	+ (単*)	36	ND	百日咳疑い	-	なし
18	6歳	4回	-	-	+ (単)	≥100	≥100	百日咳	-	なし
19	10歳	4回	-	-	+ (単)	99	≥100	1108*百日咳疑い	□	GAM
20	1歳	3回	-	-	+ (ペア**)	4	19	上気道炎	-	なし
21	17日	未	-	-	+ (単)	12	9	上気道炎	□	なし
22	24日	未	-	-	+ (単)	66	47	RSウイルス	□	なし
23	28日	未	-	-	+ (単)	14	10	杉No血性肺炎	□	なし
24	1か月	未	-	-	+ (単)	12	10	気管支炎	□	なし
25	1か月	未	-	-	+ (単)	33	13	上気道炎	□	なし
26	3か月	未	-	-	+ (単)	13	12	肺炎不良	□	なし
27	1か月	未	-	-	+ (単)	40	ND	喉門狭窄症	□	なし
28	5か月	未	-	-	+ (単)	20	ND	上気道炎	-	なし
29	5か月	2回	-	-	+ (単)	≥100	ND	特発性咳嗽	-	なし
30	1歳	4回	-	-	+ (単)	≥100	ND	咽頭扁桃炎	-	なし
31	9歳	4回	-	-	+ (単)	≥100	ND	不明	-	GAM
32	9歳	4回	-	-	+ (単)	≥100	≥100	特発性咳嗽	-	なし
33	10歳	4回	-	-	+ (単)	≥100	≥100	気管支炎	-	GPPM
34	12歳	4回	-	-	+ (単)	≥100	ND	慢性咳嗽	-	GAM

* 単血清での血清診断基準のみに該当

** ペア血清での抗体陽転または上昇の血清診断基準に該当

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

委託業務成果報告

百日咳の発生実態の解明及び新たな百日咳ワクチンの開発に資する研究

業務項目：百日咳診断に関わる研究開発

研究分担者 吉川 哲史 藤田保健衛生大学医学部、教授

研究要旨

藤田保健衛生大学小児科および刈谷豊田総合病院小児科に百日咳と診断され入院加療を受けた患児 4 名について、血清学的診断と LAMP 法による分子生物学的診断を行った。PT-IgG は、症例 1、症例 3 で 2 倍以上の抗体上昇を認めた。また FHA-IgG は、症例 1、2、3 で 2 倍以上の抗体上昇を認めた。一方 LAMP 法では症例 1 から 4 全例で陽性であった。1 例は重症化し、長期間の ECMO 管理が必要となった。さらに、感染経路を同定する目的で、同意の得られた家族から鼻腔拭い液を採取し LAMP 法を施行した。その結果、症例 1 の兄、姉は両者とも陽性、症例 2 の兄、母、祖母はいずれも陰性、症例 3 の姉、母は両者とも陽性、症例 4 の父母、姉、祖母は全例陰性であった。

A. 研究目的

DPT および DPT-IPV の接種率向上に伴い小児の百日咳患者は減少したが、地域的な流行は依然報告されている。またナチュラルブースター効果の減衰等により、現行のワクチン接種スケジュールでは年長児あるいは成人での感染防御能が低下し、それらの年代で百日咳患者が増加し感染源となることが問題視されている。しかし、各施設により抗体価測定、培養、ゲノム検出などの診断方法が均一化されておらず、正確な疫学的情報が得られないのが現状である。そこで百日咳の適切な診断法を開発するとともに正確な患者数の把握およびその伝播経路を明らかにすることで、将来的にワクチン接種スケジュールを変更する際の基礎的データ作成を目的としている。

今年度は、症例対照研究実施のため学内倫理審査委員会の承認を得るとともに、関連施設間での情報共有を図った。その中で、平成 25 年から 26 年の 1 年間に関連施設で経験した百日咳症例について後方視的に解析した。

B. 研究方法

(i) 百日咳の診断ならびに疫学的解析

- ① 実際に百日咳が疑われた入院患児に対し、入院時に鼻腔拭い液を採取し LAMP 法と培養を実施する。更に抗体価測定のために入院時（プレ）及び退院時もしくは退院後（ポスト）のペア血清を採取する。採取したペア血清の PT-IgG および FHA-IgG 抗体価を測定する。
- ② ①のいずれかの方法において百日咳と診断された患児と接触の多い家族（親、兄弟、祖父母など）から鼻腔拭い液を採取し LAMP 法および培養を施行し感染源の同定を試みる。
- ③ ワクチン接種や発症からの詳細な症状および受診歴や投薬状況を聴取。さらに家族を含めた生活歴の詳細も加えて聴取する。

(ii) 症例対照研究：以下に示す研究計画を本学疫学・臨床研究倫理審査委員会へ提出し承認を得た (No.14-281)

症例は、研究班・班員が所属する医療施設または関連病院において、百日咳と診断された 20 歳未満の患者、対照は、各症例に対し性、年齢（学年）が対応する同病院の受診患者 5 人（病院対照）および症例の友人 6 人（友人対照）である。症例および病院対照の代諾者（または本人）に対し、文書（様式 1-1、1-2）による説明を行い、様式 2 により同意を取得した後、①医師記入用調査票（様式 3）と②自記式質問票（様式 4）を用いて情報収集を行う。同意書は各施設で保存し、調査表は匿名化された状態で（研究責任施設）へ送付する。

友人対照については、代諾者（または本人）に対して、文書（様式 1-3）による説明を行った後、自記式質問票（様式 4）を用いて情報収集を行う。

収集した総ての情報はコード化を実施し、疫学解析に付す。解析では、多変量解析により、多因子の影響を補正し、百日咳発症に対する各要因の独立した効果を算出する。

（倫理面の配慮）

（i）百日咳の診断ならびに疫学的解析

a インフォームドコンセント：①-（i）採取した百日咳患児の鼻腔拭いおよび血清：本学ならびに関連施設で百日咳が証明された患児から通常診療として採取された鼻腔拭いおよび血清を用いるため、この場合検査制度管理目的等のために余剰検体が使用されることについての同意を患児の保護者より得られている。①-（i i）百日咳患児と診断された周囲の家族から採取した鼻腔拭い：本人に書面を用いて説明、同意を得た後に検体採取する。尚、同意しないことにより診療上の不利益のないことを明示する。②-（i）関連施設での百日咳感染疑い児の鼻腔拭い、血液：患児保護者に通常診療に必要な説明と同意を行った上で検体採取する。その他の研究内容については、ヒトからの検体採取、臨床情報を得るものではなくインフォームドコンセントについては該当しない。

b 個人への利益：①-（i）患児、ならびに①-（ii）に該当する患児の家族については個人への利益はな

い。

c 個人情報の保護については説明文書に記載。当院で採取した検体輸送に際しては、コード番号にて匿名化を図り、対照表を基に研究班班長のみ連結化が可能となるような形をとる。連結可能匿名化により個人情報を保護する。対照表は暗号化した上で、パスワードにて管理されたエクセルファイルにて管理する（研究責任者吉川哲史教授室内で施錠管理されたコンピューター）。検体輸送に際し、検体ラベルにはコード番号のみを記載し、別に保管した対照表を基に個人情報管理者：薬剤部鈴木竜太氏のみ連結化が可能となるような形をとる。中央に集積された検体、臨床情報はすべて、資料提供施設において連結可能匿名化する。対応表はLANに繋がれていないパスワードロックのかかるスタンドアローンのパソコンに保管し、研究終了後は継続保存の同意が得られた場合を除き、データを削除する。

d.利益相反：本研究に係る全ての費用は厚生労働科学研究費で支払われる。利益相反はなし。

（ii）症例対照研究

a 添付説明文書を使用し被験者に説明、同意書に署名を得た後実施。

b 個人への利益：対象者への謝礼として図書カード 1,000 円分をお渡しする。

不利益及び危険性：診療上入手したデータのみを使用し、収集した情報はすべてコード化を実施し、疫学解析するため該当しない。

c 個人情報の保護についても説明文書に記載。連結可能匿名化により個人情報を保護する。本大学及び関連施設での症例を FHU 症例〇〇本人、あるいは FHU 症例〇〇対照〇〇の通し番号で症例を管理し、これと症例のカルテ番号の連結表は、パスワードにて管理されたエクセルファイルにて管理する（小児科医局内で施錠管理されたロッカー内のコンピューターを使用。：管理責任者：薬剤部、鈴木 竜太。尚、コンピューターはインターネットとの接続はないものを使用）。

d.本研究にて利益相反はない。研究費は本研究班研究費、講座研究費等を使用する。

C. 研究成結果

- (1) 藤田保健衛生大学小児科および刈谷豊田総合病院小児科で百日咳と診断された入院患児4名に対し血清学的診断と分子生物学的診断（鼻腔拭い液）を実施した。プレの PT-IgG 平均抗体価（平均±SD）は 15.0±13.4、ポストの平均抗体価は 62.8±60.7 であった。症例1（プレ27、ポスト57）および症例3（プレ1、ポスト147）において2倍以上の抗体上昇を認めた。また FHA-IgG 平均抗体価（平均±SD）は 4.8±3.9、ポストの平均抗体価は 26.3±17.0 であった。症例1（プレ10、ポスト41）、2（プレ3、ポスト22）、3（プレ1、ポスト38）において2倍以上の抗体上昇を認めた。一方 LAMP 法は症例1から4すべてで陽性だった。
- (2) 感染経路を同定する目的で同意の得られた家族からの鼻腔拭い液を採取し LAMP 法を施行した。LAMP の結果は症例1の兄、姉は両方陽性、症例2の兄、母、祖母はいずれも陰性、症例3の姉、母は両方陽性、症例4の父母、姉、祖母すべてで陰性であった。
- (3) 患児4例中3例はワクチン未接種であった。そのうち1例の患児は呼吸器症状が増悪し人工呼吸管理を要したが、その後更に悪化した ARDS も併発したため ECMO を継続使用した。

D. 考察

- (1) 今回の症例はほとんどがワクチン未接種乳児の感染例であり、典型的症状を伴い特にその中の一例は重症化し ECMO による治療を要した。このような患児では鼻腔での百日咳菌増殖も強く、LAMP 法の陽性率が高いため確定診断を目的とした適切な検査法と考え

られる。一方、細菌増殖の少ない、あるいは増殖のピークを逃していると考えられる感染源の検索については LAMP 法でも必ずしも容易でないことが示唆された。

今後は、同様の検討を進めることで、百日咳感染の詳細な疫学的データを蓄積してゆく必要がある。また、このような症例を経験した際に、症例対照研究を実施することで百日咳感染のリスク因子を同定し、我が国での適切なワクチン接種スケジュールの設定に役立つ成績が得られると思われる。

E. 結論

- (1) 4 症例すべての陽性患児例で LAMP 法により百日咳と診断された。
- (2) 抗体価測定は発症後 4 週間以上経過しなければ十分な抗体上昇が得られないことがわかった。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず
研究協力者
藤田保健衛生大学医学部 小児科 菅田 健

研究要旨 百日咳の新規血清診断法である抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法に関し、本法のバリデーションに不可欠となる標準血清の導入を検討した。ヒト標準血清には WHO IS06/140 ならびに JN1H-10 を供試し、抗百日咳毒素 IgG を指標に用量依存性を評価した。その結果、WHO IS06/140 は低い用量反応（吸光度範囲、 $A_{450} = 0.34 \sim 0.52$ ）を示し、抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法の標準血清として不適と判断された。一方、JN1H-10 は高い用量反応（ $A_{450} = 0.14 \sim 0.98$ ）を示し、標準血清としての有用性が確認された。今後、抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法に標準血清 JN1H-10 を導入し、本法の臨床評価を実施する予定である。

研究協力者

大塚菜緒（国立感染症研究所 主任研究官）

平松征洋（同上 研究員）

山崎 誠（デンカ生研）

A. 研究目的

百日咳は主に百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症である。主な臨床症状は遷延性の咳嗽であり、乳児は典型的な臨床症状を示すのに対し、ワクチン既接種者、特に青年・成人の臨床像は非典型的とされている。そのため、臨床診断は他疾患の紛れ込みを含み、正確な診断には実験室診断が必要となる。百日咳の実験室診断として遺伝子検査と血清学的検査が挙げられ、現在わが国では抗百日咳毒素 (PT) IgG 抗体を指標とする抗 PT IgG ELISA が保険適用となっている。ただし、精製百日せきワクチンは不活化 PT 抗原を含むことから、ワクチン既接種者では正確な診断が出来ないという欠点がある。

国立感染症研究所では百日咳の新規血清診断法として抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法の開発を行い、本法が百日咳患者の早期診断に有用であることを確認した。本法は百日咳菌の膜タンパク質 Vag8 に対する IgM 抗体価を測定し、現行ワクチンに Vag8 抗原が含まれないことからワクチン既接種者にも適用できるという利点を有している。また、IgM は IgG よりも早期に誘導されることから、感染初期の患者にも適用することが可能である。抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法は現行の抗 PT IgG ELISA 法よりも優れた診断法となりうるが、これまでバリデーションに必要な標準血清が無いという欠点があった。以上の背景を踏まえ、本研究では、抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法にヒト標準血清の導入を検討した。

B. 研究方法

ヒト標準血清：WHO 国際標準品である WHO IS06/140 と国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）で製造された JN1H-10 を供試した。標準血清はともに凍結乾燥品であり、両者ともに 1 mL の蒸留水に溶解した。WHO IS06/140 は抗 PT IgG 抗体価が 160 IU/mL になるように再度希釈し、一方、JN1H-10 は 250 EU/mL になるように希釈した。なお、1 EU は 0.77 IU であることから、JN1H-10 の抗 PT IgG 抗体価を 192.5 IU/mL (250 EU/mL) と換算した。これら標準血清を 2 倍間隔 (5~160 IU/mL) で連続希釈し、常法に従って抗 Vag8 IgM-capture ELISA の吸光度 (A_{450}) を測定した。抗 Vag8 IgM-capture ELISA：抗ヒト IgM 抗体固相プレートに、緩衝液で連続希釈した標準血清を 100 μ l/well で添加し、25°C で 1 時間静置した ($n=2$)。洗浄後、組換え抗原である Vag8-malotose binding protein を 100 ng/100 μ l/well の条件で添加し、25°C で 1 時間静置した。洗浄後、ビオチン化抗 MBP IgG 抗体 (20,000 倍希釈, Vector laboratories) を添加し、25°C に静置した。1 時間後、プレートを洗浄し、ストレプトアビジン-HRP (40,000 倍希釈, Thermo scientific) を各 100 μ l/well で添加した。反応 30 分後にプレートを洗浄し、TMB 溶液で 30 分間発色させた。0.3 mol/L 硫酸で反応を停止した後、450 nm の吸光度を測定した。図 1 に本法の測定原理を示した。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト標準血清を使用するが、これらは公的機関により製造・頒布されたものである。よって、倫理上の問題は発生しない。なお、本研究ではヒト患者血清を用いた臨床評価を予定しており、現在、国立感染症研究所のヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会に申請中である。

C. 研究結果

図1に標準血清 WHO IS04/160 と JN1H-10 の測定結果を示した。WHO 06/140 の吸光度は 0.335~0.523 の範囲を示し、低い用量反応が確認された。一方、JN1H-10 の吸光度は 0.138~0.977 の範囲を示し、高い用量反応が確認された。なお、WHO 06/140 の傾きは 0.0009、JN1H-10 は 0.0052 と算出され、JN1H-10 の用量反応性は 5.8 倍高いことが示された。次に両軸を対数変換し、両標準品の直線性を比較した。その結果、JN1H-10 ($R^2=0.993$) は WHO 06/140 ($R^2=0.821$) よりも高い直線性を示すことが判明した。以上の結果から、JN1H-10 は WHO 06/140 よりも高い用量依存性を有し、抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法の標準血清として有用と判断された。

D. 考察

本研究により、抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法の標準血清として JN1H-10 の有用性が確認された。JN1H-10 は国立予防衛生研究所で製造されたヒト標準血清であり、百日咳罹患回復患者のプール血清を凍結乾燥させたものである。一方、WHO 06/140 の仕様書には患者血清の記載がなく、百日せきワクチン接種者のプール血清から製造された可能性がある。現時点で断定は出来ないが、WHO 06/140 の低い用量反応性は製造に用いた血清の違いに起因している可能性が指摘された。

抗 Vag8 IgM-capture ELISA は固相化された抗ヒト IgM capture IgG に血清中の IgM を結合させ、捕捉された IgM 中の抗 Vag8 IgM を検出する方法である。そのため、全 IgM 中に占める抗 Vag8 IgM 量が少ないと十分な吸光度が得られず、WHO 06/140 に認められたように低い吸光度でプラトーに達する。JN1H-10 は吸光度 1.0 まで良好な用量反応性が認められたことから、抗 Vag8 IgM の含有率は高いと推察された。これまでの臨床評価において、抗 Vag8 IgM-capture ELISA のカットオフ値は吸光度 0.35 が感度・特異度ともに優れることが明らかとなっている。JN1H-10 はカットオフ値 0.35 を挟んで良好な直線性を示したことから、本法の標準血清として有用と判断された。

これまで国立感染症研究所では抗 Vag8 IgM-capture ELISA 法の臨床評価を実施してきたが、患者血清の入手が難しいため小規模な評価となっていた。本研究班の分担研究者である尾崎隆男博士（江南厚生病院こども医療センター）は多数の百日咳患者血清を収集・保存していることか

ら、今後尾崎博士と共同して本法の臨床評価を進める予定である（医学研究倫理審査申請中）。その際、本研究成果である JN1H-10 を標準血清として導入し、本法のバリデーションを同時に進めて行く予定である。

E. 結論

百日咳の新規血清診断法（抗 Vag8 IgM-capture ELISA）のヒト標準血清として、JN1H-10 が適用できることを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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, 2015 (in press).
- Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. mBio 5:e01074, 2014.
- 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.

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 Pfm 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

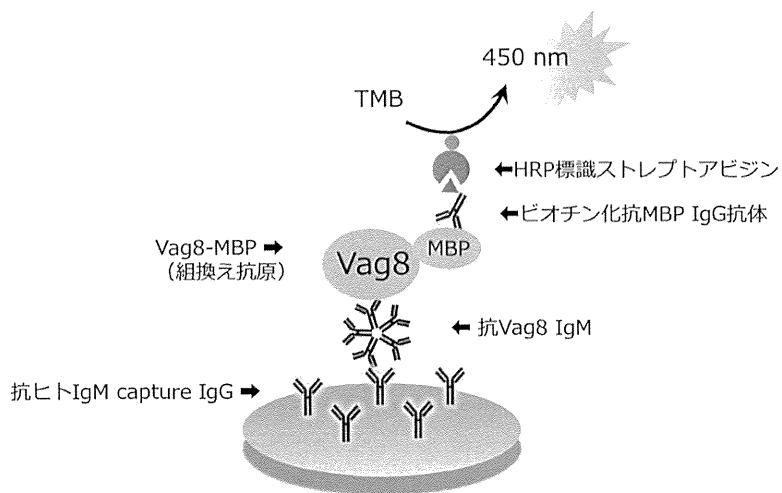


図1. 抗 Vag8 IgM capture ELISA 法の測定原理. 96 穴 ELISA プレートには抗ヒト IgM capture IgG が固定されており, 患者血清中の IgM を一定量固相化する.

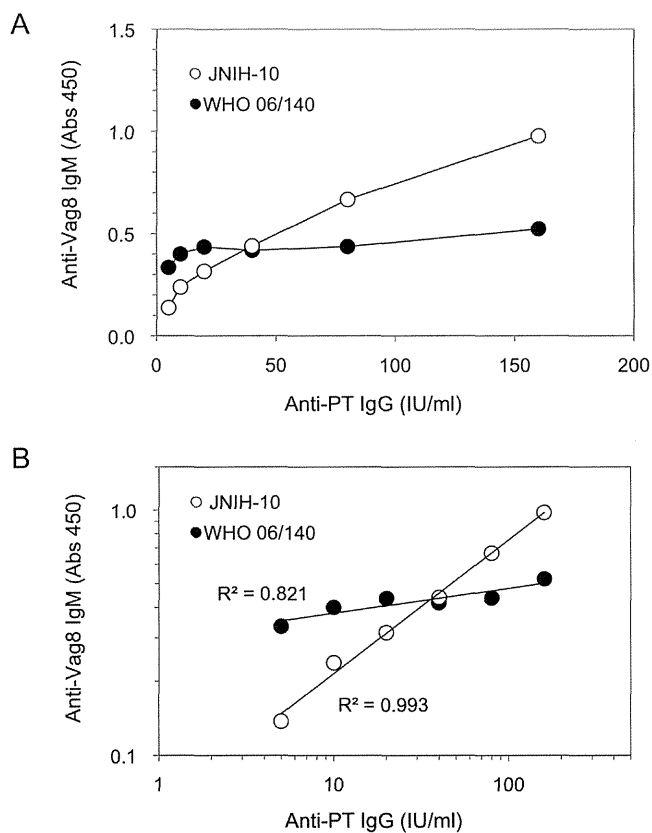


図2. 抗 Vag8 IgM capture ELISA 法におけるヒト標準血清 (JN1H-10, WHO 06/140) の用量依存性. 抗 PT IgG 抗体価を指標に標準血清を連続希釈し, 抗 Vag8 IgM の吸光度をプロットした (A, 真数表記; B, 対数表記).

線毛3を発現するワクチン株（東浜株）の開発に関する研究
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 現行の精製百日せきワクチンの改良を目的に、新たに線毛3（Fim3）を発現するワクチン株の作出を試みた。百日咳菌の線毛（Fimbriae）はワクチン抗原として有用とされるが、国内ワクチン株である Tohama 株は線毛2（Fim2）のみを産生し、Fim3を産生することが出来ない。そこで、Tohama 株に *fim3* 発現プラスミドを相補し、Fim2 および Fim3 の蛋白発現量を評価した。その結果、プラスミドを相補した Tohama 株は、本来産生している Fim2 に加え Fim3 も産生することが確認された。新規ワクチン株はより安定して Fim3 を産生させる必要があるため、今後ゲノムを改変した Fim3 発現 Tohama 株を作出する予定である。

研究協力者

大塚菜緒（国立感染症研究所 主任研究官）
平松征洋（同上 研究員）

A. 研究目的

百日咳はワクチン予防可能疾患（VPD）であり、ワクチン接種が最も有効な予防策となる。わが国では1950年代に全菌体百日せきワクチン（wP）、1981年に無細胞百日せきワクチン（aP）が導入され、ワクチンの普及とともに患者数は激減した。しかし、近年わが国を含む先進諸国では、高いワクチン接種率にも関わらず、青年・成人層の百日咳罹患率増加が問題となっている。これを受けて、アメリカなど一部の欧米諸国では成人用百日せきワクチン（Tdap）を導入した。ところが、2010年前後には再びアメリカ、オーストラリア、英国で大規模な流行が発生しており、百日咳の感染制御に苦慮する状況が続いている。

このような百日咳再興への対策として、新規百日せきワクチン開発の必要性が指摘されている。Warfelらは、霊長類であるマントヒヒを用いた百日咳感染モデルを構築し、wPおよび現行aPワクチンの評価を行った。その結果、aPワクチンは発症を防ぐが、感染を防ぐことができないと報告した（Warfel et al., 2014, PNAS）。そのため、高いワクチン接種率を維持する先進諸国においても、百日咳菌を保菌する不顕性感染者が多数存在し、百日咳の感染源となっていると示唆された

そこで今回我々は新規ワクチン抗原として、百日咳菌が感染を成立させるために必要とされる定着因子である線毛（fimbriae, Fim）に着目した。百日咳菌はゲノム上に *fim2*, *fim3*, *fimX* という3種類の異なる *fim* 遺伝子を有するが、これまでにタンパク質産生が検出されているのは Fim2 および Fim3 のみである。また、菌株によって Fim 産生パターンが異なり、Fim2 株、Fim3 株、Fim2/3 株

というように、血清型別に利用されている。Fimは免疫原性が高く、古くから防御抗原としての可能性が報告されてきたが、これまで積極的にワクチン抗原として用いられてこなかった。国内現行ワクチン株である百日咳菌 Tohama 株は Fim2 のみを産生するため、国内 aP ワクチンにはわずかな Fim2 を含むものしか存在しない。また、近年の国内流行株は 97%以上が Fim3 株となっており（Miyaji et al., 2013, PLoS One）、他の先進諸国でも同様に Fim3 株の優勢が報告されている。

百日咳菌 Tohama 株は *fim3* 遺伝子のプロモーター配列が非発現型となっているため、Fim3 を産生できない。本研究では、Tohama 株に *fim3* 発現プラスミドを相補し、Fim2 と Fim3 の蛋白発現量を解析した。

B. 研究方法

菌株：現行ワクチン株である百日咳菌 Tohama 株をレシピエントセルとして用いた。また、各種プラスミドのホストセルとして大腸菌 DH5 α 株を用いた。

fim3* 発現プラスミドの構築：fim3* 発現プラスミドの構築には Multisite Gateway system (Invitrogen) を用いた。*fim3* 遺伝子を Gateway donor vector である pDONR-221 にクローニングし、エントリークローンを作製した。*fim3* 遺伝子を乗せたエントリークローンは *fim3* 遺伝子上流の転写開始点を含む領域からクローニングしたもの（pDONR-*fim3*-1）および *fim3* 遺伝子の開始コドン以降をクローニングしたもの（pDONR-*fim3*-2）の2種類を作製した（図1）。次に、pDONR-*fim3*-1 または pDONR-*fim3*-2、百日咳類縁菌である気管支敗血症菌 *Bordetella bronchiseptica* の *fhaB* 遺伝子プロモーター配列を有する 5' エントリークローン（pDONR-*fhaP*）、*rrnB* 遺伝子ターミネータ配列を有する 3' エントリークローン（pDONR-*rrnB*）を各 5

fmol, さらに pRK-R4-R3-F ベクターを 10 fmol 混合し, LR Clonase II plus enzyme mix を添加して 25°C で 16 時間反応させた。LR Clonase II 酵素反応により *fim3* 発現プラスミド (pRK-fim3-1 および pRK-fim3-2) を作製した。これら発現プラスミドは大腸菌 DH5 α に導入した。プラスミド構築方法の概略を図 2 に示した。

百日咳菌の形質転換: *fim3* 発現プラスミドはヘルパープラスミド pRK2013 を用いた接合により大腸菌から百日咳菌 Tohama 株に導入した。百日咳菌 Tohama 株, 大腸菌 DH5 α /pRK2013, DH5 α /pRK-fim3-1 または pRK-fim3-2 をそれぞれ modified Stainer Sholte 液体培地 (mSS) +10 mM MgSO $_4$ で OD $_{650}$ =1.0 に調製し, 各 50 μ l ずつを混合した。菌混合液のうち 50 μ l を BG 培地に滴下し, 乾燥させたのち 36°C で 5 時間培養した。菌をスワブで回収し BG+CEX(40)TC(12.5)寒天培地に塗布した。36°C で 4 日間培養し, 百日咳菌 Tohama/pRK-fim3-1 または pRK-fim3-2 を選択した。**Fimbriae 発現解析:** 百日咳菌の fimbriae タンパク質発現は ELISA により解析した。1% カザミノ酸液で菌液を調製し, 56°C で 1 時間加熱処理したのち, PBS で希釈した。希釈菌液を 100 μ l/well ずつ 96 穴イムノプレートに添加し, 25°C で 1 晩静置した。洗浄後, 1% FBS-PBS を 150 μ l/well 添加し, 25°C で 1 時間静置した。洗浄後, ビオチン標識した抗 Fim2 または Fim3 モノクローナル抗体 (100 倍希釈) を 100 μ l/well 添加し, 25°C で 2 時間静置した。洗浄後, ストレプトアビジン-HRP (10,000 倍希釈, Thermo scientific) を各 100 μ l/well 添加した。25°C で 30 分反応後にプレートを洗浄し, 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate (Thermo scientific) により 15 分間発色させた。2M 硫酸で反応を停止した後, 450 nm の吸光度を測定した。Fimbriae 発現の陽性コントロール菌株として, Fim2 および Fim3 をともに発現する百日咳菌 18323 株を用いた。図 3 に Fim-ELISA 測定系の原理を示した。

(倫理面への配慮)

本研究では, ヒト臨床材料および患者の診療情報を使用しない。よって, 倫理上特段の問題は発生しない。

C. 研究結果

2 種類の *fim3* 発現プラスミドを百日咳菌 Tohama 株にそれぞれ導入し, Fimbriae の発現量を測定した (図 4)。その結果, *B. bronchiseptica* fhaB 遺伝子のプロモーターが Tohama 株内で機能し, その下流にクローニングした *fim3* 遺伝子が発現することが判明した。2 種類の発現プラスミド相補株は, 同等に Fim3 を産生していることが確認された。

一方, Fim2 産生に関しては両者に差異が認められた。*fim3* 遺伝子を転写開始点からクローニングした Tohama/pRK-fim3-1 では, Fim2 および Fim3 がともに産生されたのに対し, *fim3* 遺伝子を開始コドンからクローニングした Tohama/pRK-fim3-2 では, 本来 Tohama 株が産生する Fim2 の産生量が大幅に減少した。

D. 考察

本研究では, 新規百日せきワクチン株: Fim3 産生 Tohama 株の作製を目的として, まずは *fim3* 発現プラスミドの相補により, Tohama 株が Fim3 を産生しうるか検討した。その結果, Tohama 株においても発現型プロモーター配列の下流であれば, *fim3* 遺伝子が発現することが判明した。しかし, Fim2, Fim3 をともに産生させるためにはプロモーター配列と開始コドンに一定の距離を設ける必要があることが示唆された。

百日咳菌 *fim* 遺伝子の発現は, 2 成分制御系 BvgAS システムおよび, プロモーター領域 (Pfim) の特徴的な poly(C)配列により制御されることが知られている。現行ワクチン株 Tohama 株は Fim2 産生株であるが, *fim3* 遺伝子の Pfim3 poly(C)長が非発現長となっていることが原因で Fim3 を産生しない。百日咳菌 fimbriae は図 5 に示す機構で産生および菌体外に輸送されており, Fim2 と Fim3 は FimB (シャペロンタンパク質), FimC (アッシャータンパク質), FimD (チップタンパク質) というアクセサリタンパク質を共通で利用している。今回, 発現型プロモーターの下流に開始コドンから *fim3* 遺伝子をクローニングした pRK-fim3-2 相補株では Tohama 株が本来産生している Fim2 の産生量の大幅な低下が認められた。この原因として, *fim3* 遺伝子の転写量が過剰になり, 共通して利用している FimBCD アクセサリタンパク質の Fim2 への供給が不足したことが考察された。

本研究により, 百日咳菌 Tohama 株に Fim3 を産生させることが可能なことが示された。現行ワクチン株である Tohama 株は, 1981 年の aP ワクチン導入以来の使用実績があり, ゲノム配列が解明されているなど株情報が豊富である。また, 近年の臨床分離株に比べて生育速度が速く, 抗原産生能も高いため百日せきワクチン株として理想的な性質を備えている。今後, 新規ワクチン株として Fim3 をより安定して産生させるため, ゲノムを改変した Fim3 産生 Tohama 株を構築する必要があると考えられる。ただし, ゲノム改変の際には, *fim3* 遺伝子の発現が過剰になり過ぎない工夫が必要であると考察された。

E. 結論

発現プラスミドの相補により, Fim3 を産生する百日咳菌 Tohama 株を作製した。新規ワクチン株として Fim3 をより安定して産生させるために, Tohama 株ゲノムを改変した Fim3 産生株を構築する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, Cassiday PK, Chiang CS, Dalby T, Fry NK, Gaillard ME, van Gent M, Guiso N, Hallander HO, Harvill ET, He Q, van der Heide HG, Heuvelman K, Hozbor DF, Kamachi K, Karataev GI, Lan R, Lutyńska A, Maharjan RP, Mertsola J, Miyamura T, Octavia S, Preston A, Quail MA, Sintchenko V, Stefanelli P, Tondella ML, Tsang RS, Xu Y, Yao SM, Zhang S, Parkhill J, Mooi FR. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5:e01074, 2014.

- 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.
- 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

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

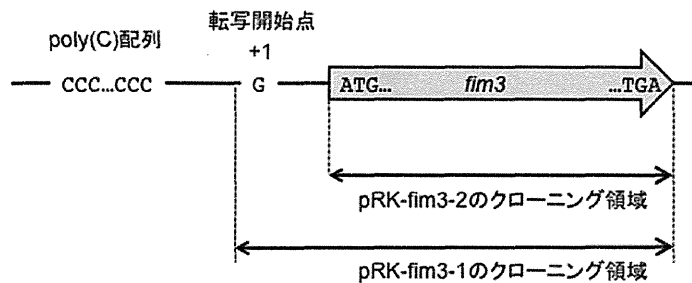


図 1. 百日咳菌 *fim3* 遺伝子とクローニング領域. pRK-fim3-1 は開始コドンから 54 bp 上流から, pRK-fim3-2 は開始コドンから, それぞれ *fim3* の終始コドンまでの領域をクローニングした。*fim3* 遺伝子のプロモーター領域には C が連続した特徴的な poly(C) 配列が存在する

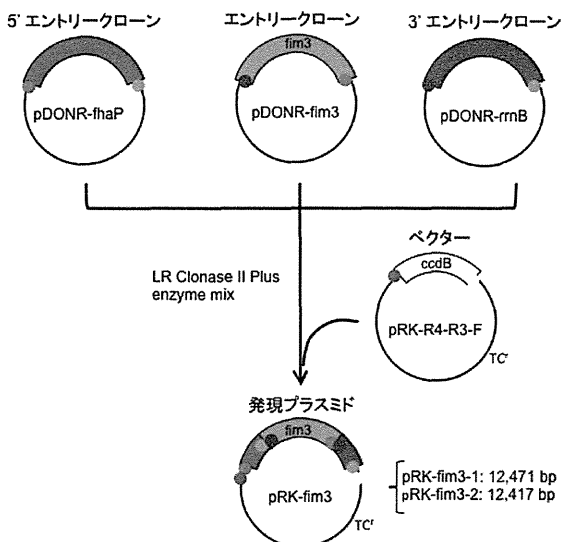


図 2. *fim3* 発現プラスミドの構築方法. *fim3* 発現プラスミドの構築には, Multisite Gateway system (invitrogen) を用いた。pDONR 上にクローニングされた 5'プロモーター配列, *fim3* 遺伝子, 3'ターミネーター配列および pRK-R4-R3-F 上の *ccdB* 遺伝子の両端には LR Clonase II により特異的組換えの生じる配列を付与してある

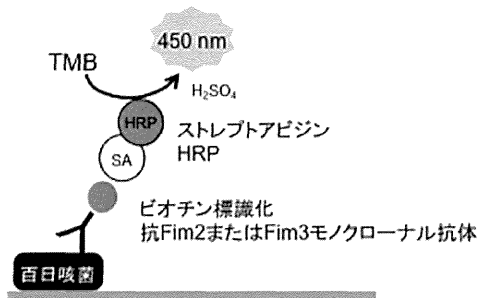


図3. Fim-ELISA の測定原理

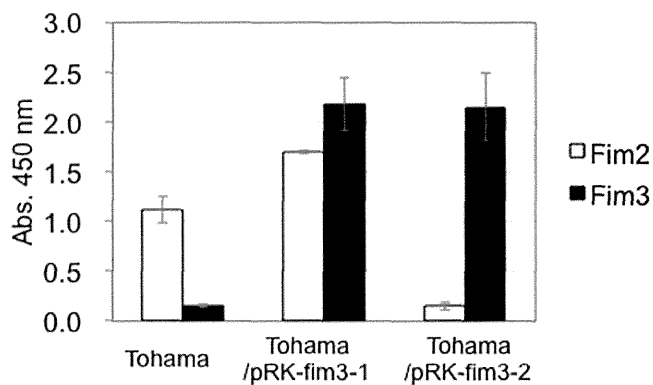


図4. 百日咳菌 Tohama 株の Fim 発現解析. プラスミドを相補すると Fim3 が産生されたが, pRK-fim3-2 では Fim2 産生の低下が認められた

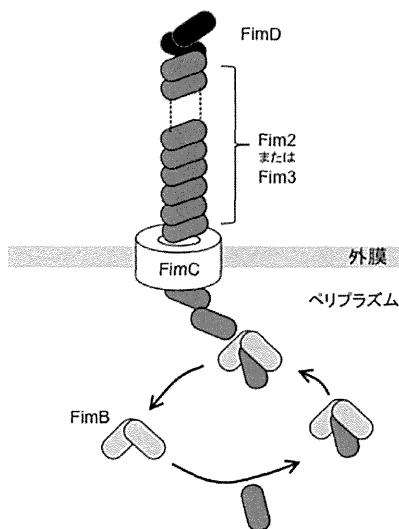


図5. 百日咳菌 fimbriae の産生および輸送機構. 百日咳菌の Fim2 および Fim3 はシャペロンタンパク質 FimB, アッシャータンパク質 FimC, fimbriae の先端に位置するチップタンパク質 FimD を共通で利用している

Ⅲ. 学会等発表実績