

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班  
分担研究報告書

パラ百日咳菌の遺伝子型別法の開発

研究分担者 蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部

研究協力者 大塚菜緒 国立感染症研究所 細菌第二部  
文元 礼 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨 百日咳類縁菌であるパラ百日咳菌について、MLVA法を用いた遺伝子型別法の開発を行った。パラ百日咳菌のゲノム情報をもとに17箇所のVNTR候補を抽出し、臨床分離株において多様性を示す4箇所のVNTRを選択した。安定性試験において、これらのVNTRは培養10継代後も繰返し数に変化を認めず、in vitroで高い安定性を示した。また、4箇所のVNTRを用いたMLVA解析により、臨床分離株34株は18種類の遺伝子型に分類され、分離年と分離地域において疫学的な関連性を認めた。以上の結果から、本法はパラ百日咳菌の遺伝子型別法として有用と判断された。

#### A. 研究目的

パラ百日咳菌(*Bordetella parapertussis*)は百日咳流行後期に臨床分離されることが多く、近年米国では感染例の増加が認められている。わが国では本菌の感染症例は稀であるが、2016年に東京都文京区内で発生した百日咳流行では百日咳菌とともに複数のパラ百日咳菌が臨床分離された。この百日咳流行では3症例から百日咳菌が分離されるとともに、4症例からパラ百日咳菌が分離された。3株の百日咳菌は2種類の遺伝子型(MT186, MT27a)に分類されたが、パラ百日咳菌は遺伝子型別法が開発されていないため臨床分離株の疫学的な関連性は不明であった。

近年病原細菌の遺伝子型別法として multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA 法)が開発され、菌株間の分子疫学に広く活用されている。本法はゲノム中に存在する複数の縦列反復配列(variable numbers of tandem repeats, VNTR)の繰返し数を測定し、その組合せから

遺伝子型を決定する方法である。MLVA法は百日咳菌の遺伝子型別法として世界的に用いられるが、上述の通りパラ百日咳菌ではまだ開発には至っていない。以上の背景を踏まえ、本研究ではパラ百日咳菌の新規型別法として MLVA 法の開発を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1. VNTR 候補のスクリーニング

パラ百日咳菌 ATCC12822 株のゲノム情報を用いて Tandem repeats finder (Boston Univ.)によりVNTR候補のスクリーニングを行った。抽出された17箇所のVNTR候補に対しゲノム情報ならびに臨床分離株のシーケンス解析を実施し、最終的に4箇所のVNTR候補(VNTR4, VNTR13, VNTR14, VNTR15)を選択した(表1)。

##### 2. フラグメント解析 (MLVA 解析)

4種類の蛍光色素を用いたマルチプレックスPCR反応系を構築した(表2)。PCR反応は初期変性 94 2 min, 増幅反応 98 10

sec と 68 1 min の計 35 サイクル, 最終伸長反応 72 20 min の条件で行なった。増幅産物を蒸留水で 100 倍希釈した後, その 0.5  $\mu$ L を 9  $\mu$ L の Hi-Di ホルムアルアミドと 0.5  $\mu$ L の GeneScan 600 LIZ dye standard と混合した。95 5 min の熱処理後, キャピラリーシーケンサー (ABI 3130xl) を用いて PCR 産物のフラグメント解析を行なった。

### 3. VNTR の安定性試験

臨床分離株 (15 株) をサイクロデキストリン加寒天培地で 10 継代した後, 加熱処理により DNA を抽出した。抽出した DNA をマルチプレックス PCR に供試し, フラグメント解析により 4 箇所の VNTR サイズを測定した。比較対照には継代 1 回目の菌体 DNA を用いた。

### 4. 臨床分離株の MLVA 型別

国内臨床分離株 30 株 (1970s-2016 年分離) と国外株 4 株 (台湾株 2010-2015 年, カンボジア株 2005 年) を上記の MLVA 解析に供試した。系統樹解析は minimum spanning tree 法により行なった。

## C. 研究結果

### 1. VNTR の安定性評価

国内臨床分離株 15 株を 10 継代した後, VNTR 繰返し数の変化を調べた (図1)。その結果, すべての菌株に繰返し数の変化を認めず, *in vitro* における安定性が確認された。

### 2. 臨床分離株における VNTR の多様度

臨床分離株 34 株を用いて 4 箇所の VNTR について多様度を比較した (表3)。VNTR14 と VNTR15 は高い多様度 (DI, 0.632~0.635) を示し, VNTR4 と VNTR13 はやや低い多様度 (0.324~0.366) を示した。

### 3. 分子系統樹解析

臨床分離株 34 株を MLVA 解析に供試し, 4 箇所の VNTR 繰返し数の組合せから系統樹を作成した (図2)。国内臨床分離株 30 株と

国外株 4 株は 18 種類の遺伝子型に分類され, 2010 年に都内港区で分離された 3 株は同じ遺伝子型を示した。同様に 1970 年代に分離された国内株 7 株は互いに近縁関係にあることが判明した。一方, 2016 年に都内文京区で分離された菌株は 4 株中 2 株が同じ遺伝子型を示し, 台湾株は 3 株中 2 株が近縁な遺伝子型を示した。

## D. 考察

本研究ではパラ百日咳菌の分子疫学として新規 MLVA 法の開発を行なった。ゲノム情報から選択した 4 箇所の VNTR は *in vitro* で安定であるとともに, 臨床分離株において多様性が認められた。これらの VNTR を用いた MLVA 解析では臨床分離株 34 株は 18 種類の遺伝子型に分類され, 分離年と分離地域で疫学的な関連性が認められた。

近年米国ではパラ百日咳菌の感染例が増加し, 2014 年にミネソタ州南東部では本菌によるアウトブレイクが発生している。パラ百日咳菌は百日咳菌と同様な咳症状を引き起こすが, これまでタイピング法が開発されていなかったため流行株に関する知見は得られていない。今回開発を行なった MLVA 法では臨床分離株に疫学的な関連性が認められたことから, 本法はパラ百日咳菌の新規型別法として有用と判断された。ただし, 解析株が 34 株と少なかつたため, 今後解析株数を増やす必要がある。パキスタンではパラ百日咳菌の分離症例が多いことから, 現在同国の共同研究者に本菌の入手を依頼しているところである。

## E. 結論

近年増加傾向にあるパラ百日咳菌について新規の遺伝子型別法を開発した。本法により臨床分離株 34 株は 18 種類の遺伝子型に分類されたことから, パラ百日咳菌の遺伝子型別

に適用可能と考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant decrease in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Japan. Emerg Infect Dis. 23(4):699-701, 2017

G. 研究発表

論文発表

1. Moriuchi T, Vichit O, Vutthikol Y, Hossain MS, Samnang C, Toda K, Grabovac V, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K, Kamachi K. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. Int J Infect Dis. 62:56-58, 2017.
2. Moriuchi T, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Kamachi K. A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: Qualitative and quantitative analyses. PLoS One 12(7):e0181181, 2017.
3. Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N,

学会発表

1. 神谷元, 蒲地一成. 2016年の百日咳流行とその細菌学的解析. 第91回日本細菌学会総会. 3月27-29日, 2018年, 福岡.

H. 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

表1. 標的とする4種類のVNTR

VNTR	VNTR locus name	Size (bp)	Repeat sequence	Genome coordinate	Target gene	Ref.
VNTR4	BPP <sub>806</sub>	12	AAGGGCAAGGAC	806614	BPP_RS03760	Schouls et al., 2004
VNTR13	BPP <sub>4006</sub>	15	CTGTCCGCCTTGCCG	4006745	BPP_RS18680	This study
VNTR14	BPP <sub>4073</sub>	10	CGCAYCCTGC	4073141	non-coding	This study
VNTR15	BPP <sub>2388</sub>	9	CGGGGCGAG	2388542	non-coding	This study

*Bordetella parapertussis* strain 12822 NC\_002928.3  
Y = C or T

表2. VNTR に対する PCR プライマー

VNTR	Primer name	Primer sequence	Genome coordinate	Ref.
VNTR4	VNTR4-F	NED-CGTGCCCTGCGCCTGGACCTG	806713	Schouls et al., 2004
	VNTR4-R	GCCGCTGCTCGACGCCAGGGACAA	806562	
VNTR13	VNTR13-F	PET-CCTTCCAGCGGCAGGTCCTT	4006649	This study
	VNTR13-R	GACGTGCTGGCCGACCCATT	4006931	
VNTR14	VNTR14-F	VIC-CATCCGCAGCACCCGACAG	4073112	This study
	VNTR14-R	CGCTCGCAACGGCTGGCTTT	4073293	
VNTR15	VNTR15-F	FAM-AAGGGCGACGTCCGAGCTCA	2388446	This study
	VNTR15-R	CCGACGATCTCACCATCATCGCCA	2388618	

表3. 34株の臨床分離株におけるVNTRの繰返し数と多様度

VNTR	No. repeats	No. alleles	Diversity index
VNTR4	3, 4, 5	3	0.324
VNTR13	5, 6, 7	3	0.366
VNTR14	10, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21	8	0.632
VNTR15	3, 4, 5, 8	4	0.635

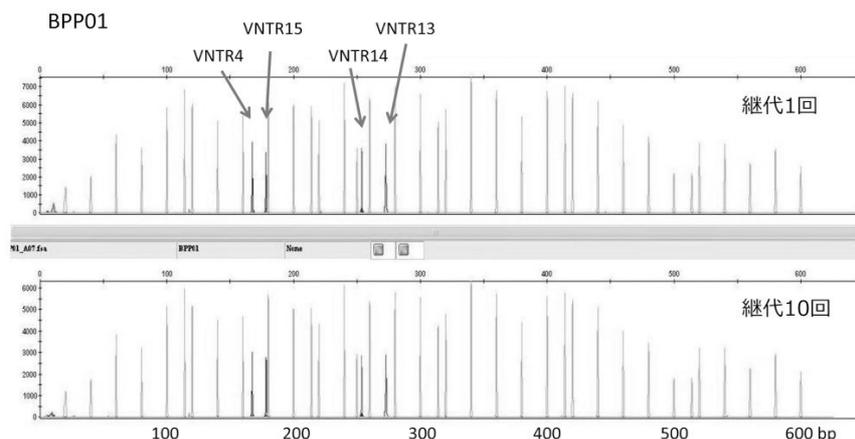


図1. VNTRの安定性評価. 臨床分離株をCSM寒天培地で10継代した後, 4箇所のVNTR(VNTR4, VNTR13, VNTR14, VNTR15)のサイズを測定した. 解析例として, 国内臨床分離株BPP01株を用いて継代1回目と比較した結果を示した

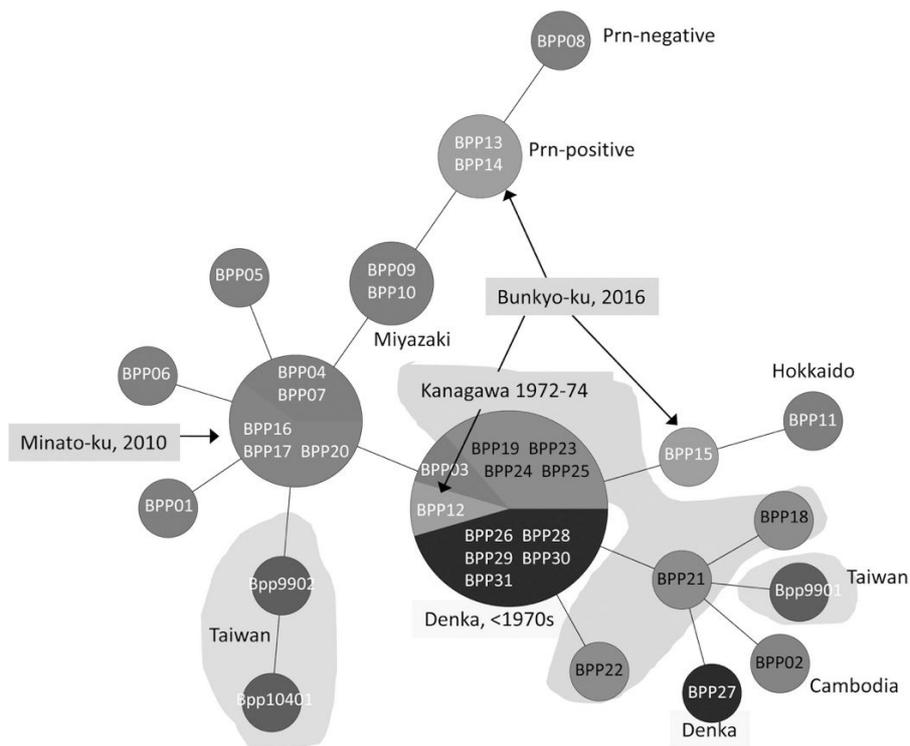


図2. パラ百日咳菌臨床分離株の系統樹. 国内分離株30株と国外分離株4株をMLVA解析に供試し, 4箇所のVNTR繰返し数の組合せから系統樹を作成した. 解析はminimum spanning tree法により

行なった