

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

百日咳：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 昨年度に引き続きパラ百日咳菌の新規遺伝子型別法（MLVA法）の評価を行なった。今年度は新たに国内臨床株1株と国外株15株を収集し、実験室株3株と臨床分離株50株を合わせた計53株をMLVA法に供試した。解析株53株は25種類の遺伝子型に分類され、その多様度指数（Simpson's diversity index）は0.91（95%信頼区間、0.86～0.97）という高値を示した。本法はパラ百日咳菌に対し高い解析能力を持つことから、病原体サーベイランスやアウトブレイク解析において有用な解析手段となることが示された。

A．研究目的

近年米国では百日咳縁菌であるパラ百日咳菌（*Bordetella parapertussis*）の感染症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。2018年には同区内で百日咳流行が再度発生し、百日咳菌とともにパラ百日咳菌1株が臨床分離された。これまでパラ百日咳菌の遺伝子型別法は開発されていないため、文京区内で臨床分離されたパラ百日咳菌の分子疫学的な関連性は不明であった。

昨年度の本研究班ではパラ百日咳菌のタイピング法の開発を目的に反復配列多型解析法（MLVA法）を開発し、標的とする反復配列（VNTR）の安定性など基礎的な評価を行なった。今年度は新たに16株の臨床分離株を追加し、計53株の菌株を用いて本法の有用性を評価した。

B．研究方法

1. 解析菌株

パラ百日咳菌の国内臨床分離株 31 株（<1970s-2018年分離）、台湾株 3 株（2010-2015年）、カンボジア株 1 株（2005年）、フランス株 10 株（1997-2001年）、オーストラリア株 5 株（1998-2003年）、実験室株 3 株（12822, ATCC 15311, ATCC 15237）を供試した。

2. MLVA 法

昨年度に開発した MLVA 法を評価した。本法はパラ百日咳菌のゲノム上にある 4 箇所の反復配列多型（VNTR4, VNTR13, VNTR14, VNTR15）を標的とし、VNTR4 と VNTR14 は翻訳領域、VNTR15 と VNTR16 は非翻訳領域に存在する（表 1）。

各 VNTR は蛍光色素（NED, PET, VIC, FAM）でラベルされたプライマーセットを用いてマルチプレックス PCR により増幅した（表 2）。PCR 産物のフラグメントサイズはキャピラリーシーケンサー（ABI 3130xl）により解析し、検量線は GeneScan 600 LIZ standard を用いて作成した。各 VNTR の繰返し数の組合せから遺伝子型を決定した。

3. 統計処理および系統樹解析

多様度指数（Simpson's diversity index）は Hunter & Gaston の方法に従って計算した。系統樹は FDQ ソフトウェアを用いて最小全域木（minimum spanning tree, MST）を作成した。

C．研究結果

1. 標的 VNTR の多様度指数

解析株 53 株において、VNTR4 の繰返し数は 3～5, VNTR13 は 5～7, VNTR14 は 10～21, VNTR15 は 3～8 コピーを示した。各 VNTR のアレルバリエーションは VNTR4 と VNTR14 が各 3 種類、VNTR15 が 9 種類、VNTR16 が 5 種類であった。その多様度指数は VNTR4 が 0.30, VNTR13 が 0.33, VNTR15 が 0.70, VNTR16 が 0.67 と計算され、非翻訳領域に存在する VNTR15 と VNTR16 が高い多様性を示した（表 3）。

2. MLVA 法の多様度指数と解析能力

解析菌株 53 株は 25 種類の遺伝子型（MT1～MT25）に分類され、本法の多様度指数は 0.91（95%信頼区間 0.86～0.97）と計算された。MT19 は全菌株の 26%（n=14）、MT21 が 11%（n=6）、MT18 が 9%（n=5）を占め、その他はすべてマイナーな遺伝子型（n=1～3）であった（図 1）。国別に見ると日本株は主に MT19（39%）

と MT18 (16%) に分類され、その他はマイナーな遺伝子型に分類された。フランス株は MT17 に 2 株, MT4, MT12, MT13, MT15, MT19, MT20, MT22, MT25 に各 1 株が分類された。台湾株は MT4, MT5, MT6 に各 1 株, カンボジア株は MT1 に 1 株, 5 株のオーストラリア株はすべて MT21 に分類された。一方, 実験室株である 12822 株は MT13, ATCC 15311 は MT19, ATCC 15237 は MT18 に分類された。なお, 家族内感染事例から分離された 2 株の日本株は同じ遺伝子型 (MT18) を示した。

D. 考察

MLVA 法は簡便かつ迅速な遺伝子型別法として病原細菌のタイピングに広く利用されているが、これまでパラ百日咳菌に対する MLVA 法は開発されていなかった。本研究では新たに開発した MLVA 法を評価し、本法がパラ百日咳菌に対し高い解析能力を持つことを確認した。

これまでパラ百日咳菌は遺伝的な多様性が低いことが報告されていたが、本研究により百日咳菌など他の病原細菌と同様に高い多様性を持つことが判明した。また、家族内感染事例から分離された 2 株の国内臨床分離株が同じ遺伝子型を示したことから、本法はアウトブレイクなどの分子疫学的調査に適用可能であると考えられた。今後、アウトブレイク調査のみならず、本法は世界の流行株解析や系統進化の解析において有用な解析手段となることが期待できる。

E. 結論

パラ百日咳菌の MLVA 法を評価し、本法が病原体サーベイランスやアウトブレイク解析において有用な遺伝子型別法となることを確認した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Zomer A, Otsuka N, Hiramatsu Y, Kamachi K, Nishimura N, Ozaki T, Poolman J, Geurtsen J. *Bordetella pertussis* population dynamics and phylogeny in Japan after adoption of acellular pertussis vaccines. *Microb Genom.* 4(5): e000180, 2018.

学会発表

1. 砂川富正, 神谷元, 高橋琢理, 有馬雄三, 上月愛留, 松井珠乃, 蒲地一成, 大塚菜緒, 文元礼, 大石和徳. 第50回日本感染症学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2018年, 福岡.
2. 上月愛留, 神谷元, 高橋琢理, 有馬雄三, 松井珠乃, 蒲地一成, 大塚菜緒, 文元礼, 大石和徳, 砂川富正. 全数把握疾患への変更により明らかになった日本の乳児百日咳の疫学. 第50回日本感染症学会総会・学術集会. 11月10-11日, 2018年, 福岡.
3. 文元礼, 大塚菜緒, 神谷元, 蒲地一成. 健常人における抗百日咳菌IgA抗体と抗IgM抗体の保有調査. 第50回日本感染症学会総会・学術集会. 11月10-11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
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Table 1. Characteristics of variable number tandem repeat (VNTR) loci in *Bordetella parapertussis* strain 12822

| VNTR locus name | Standardised VNTR locus name | Gene* | Repeat sequence | Unit length (bp) | Genome coordinate* |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------|------------------|--------------------|
| VNTR4 | BPP ₈₀₆ | BPP_RS03760 | AAGGGCAAGGAC | 12 | 806614 |
| VNTR13 | BPP ₄₀₀₆ | BPP_RS18680 | CTGTCCGCTTGCCG | 15 | 4006745 |
| VNTR14 | BPP ₄₀₇₃ | Non-coding region between BPP_RS18980 and BPP_RS18985 | CGCAYCCTGC** | 10 | 4073141 |
| VNTR15 | BPP ₂₃₈₈ | 5' non-coding region of BPP_RS11290 | CGGGGCGAG | 9 | 2388542 |

*Genome sequence NC_002928.3

**Y = C or T

Table 2. Primers used for multiplex PCR targeting 4 variable number tandem repeat (VNTR) loci

| VNTR locus | Primer name | Primer sequence (5' to 3') | Genome coordinate* | Primer concentration (μM) |
|------------|-------------|----------------------------|--------------------|---------------------------|
| VNTR4 | VNTR4F | GCCGCTGCTCGACGCCAGGGACAA | 806562 | 0.2 |
| | VNTR4R | NED-CGTGCCCTGCGCCTGGACCTG | 806713 | 0.2 |
| VNTR13 | VNTR13F | PET-CCTTCCAGCGGCAGGTCCTT | 4006649 | 0.4 |
| | VNTR13R | GACGTGCTGGCCGACCCATT | 4006931 | 0.4 |
| VNTR14 | VNTR14F | VIC-CATCCGACGACCCGCCAGAC | 4073112 | 0.4 |
| | VNTR14R | CGCTCGCAACGGCTGGCTTT | 4073293 | 0.4 |
| VNTR15 | VNTR15F | FAM-AAGGGCGACGTCCGAGCTCA | 2388446 | 0.2 |
| | VNTR15R | CCGACGATCTCACCATCATGCCA | 2388618 | 0.2 |

*Bordetella parapertussis strain 12822: NC_002928.3

Table 3. Variation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in Bordetella parapertussis reference strains and isolates

| VNTR locus | Range of repeat copy no. | No. of allele variants | Simpson's DI |
|------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| VNTR4 | 3–5 | 3 | 0.30 |
| VNTR13 | 5–7 | 3 | 0.33 |
| VNTR14 | 10–21 | 9 | 0.70 |
| VNTR15 | 3–8 | 5 | 0.67 |

Data from three laboratory reference strains and 50 isolates
DI, diversity index

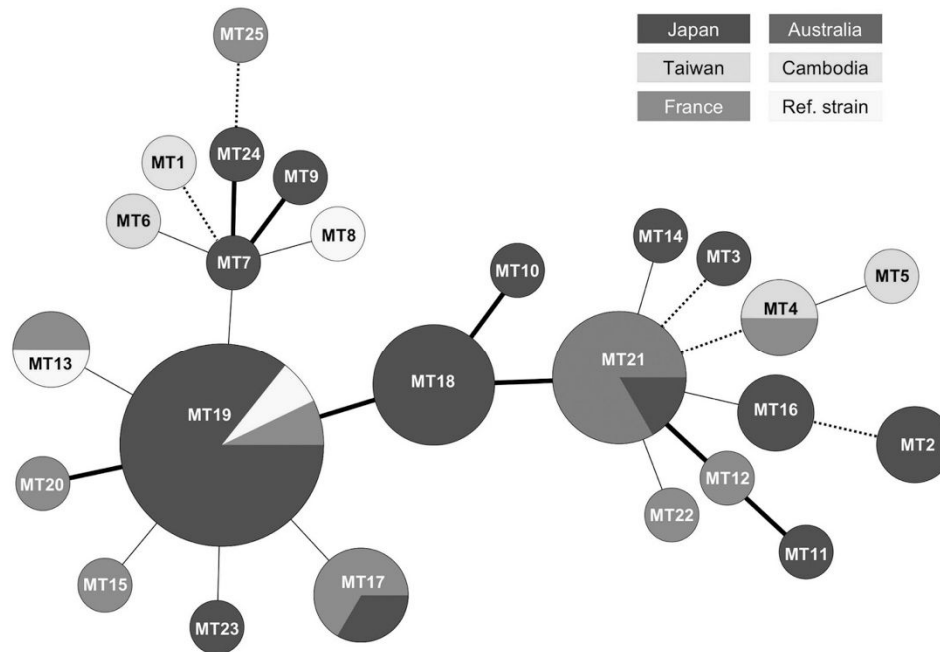


Fig. 1. Minimum spanning tree revealing the genetic diversity of the Bordetella parapertussis population. Each circle within a tree represents a unique MT type with the type number in the circle. The sizes of circles are representative of the number of strains in each group. The colour codes indicate country of origin or reference strain. Solid lines separate single-locus variants, whereas dotted lines separate double-locus variants. Thick lines represent differences of one repeat at one VNTR.