

平成28-30年度
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

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
	森内 巧	国立感染症研究所	細菌第二部
	平松征洋	国立感染症研究所	細菌第二部

研究要旨 百日咳感染症の新規検査法である Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D の性能評価ならびにパラ百日咳菌の遺伝子型別法の開発を行なった。2016 年に健康保険適用となった百日咳菌検出試薬キットは世界の流行株である *ptxP1* 株と *ptxP3* 株を高感度に検出し、本法の有用性が確認された。また、開発したパラ百日咳菌の反復配列多型解析法（MLVA 法）は、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

2016 年にわが国では百日咳感染症の遺伝子検査として新たに Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D（以下、百日咳菌 LAMP キット）が健康保険適用となり、百日咳の診断精度に大きく貢献することが期待されている。百日咳菌 LAMP キットは百日咳毒素プロモーター（*ptxP1* アレル）を標的遺伝子とするが、この *ptxP1* 遺伝子には複数の一塩基多型（SNP）が認められている。近年の流行株には *ptxP1* から *ptxP3* アレルへの変化が認められ、*ptxP3* 株の増加は百日咳菌 LAMP キットの診断精度を低下させる恐れがある。また、国内では *ptxP3* 株以外に *ptxP8* 株が少数ながら臨床分離されており、*ptxP8* 株に対する感度評価も必要となっている。

近年米国では百日咳類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、2016 年以降わが国でも 5 例の菌分離症例が発生している。これ

らの分離症例はすべて東京都文京区内で発生したものであるが、これまで本菌の遺伝子型別法は開発されていないため分離株の分子疫学的な関連性は不明であった。

以上の背景を踏まえ、本研究では百日咳病原サーベイランスの精度向上を目的に、1) 百日咳菌 LAMP キットの性能評価、2) パラ百日咳菌の新規遺伝子型別法（MLVA 法）の開発、を行なった。

B．研究方法

1. 百日咳菌 LAMP キットの評価

LAMP キットの標的遺伝子である *ptxP* 遺伝子（*ptxP1*、*ptxP3*、*ptxP8*）を PCR により増幅した。また、臨床分離株の *ptxP1* 株（n=20）、*ptxP3* 株（n=20）、*ptxP8* 株（n=1）から、それぞれゲノム DNA を精製した。*ptxP* 遺伝子を連続希釈し、 10^5 コピーから 10^2 コピーの鋳型 DNA 溶液を調製した。同様にゲノム DNA を希釈し、100 pg と 1 pg の DNA 溶液を調製した。希釈した DNA 溶

液を百日咳菌 LAMP キット (LMP542, 栄研化学) に供試し, 濁度測定装置 (LA-320C, 栄研化学) を用いて *ptxP* 遺伝子の増幅を行った (66°C, 40 分間)。Tt 値は濁度 (OD₆₅₀) が 0.1 を超えた時間 (min) とした。

2. パラ百日咳菌の新規 MLVA 法の開発

パラ百日咳菌のゲノム情報を用いて 4 箇所の VNTR (VNTR4, VNTR13, VNTR14, VNTR15) を選択し, マルチプレックス PCR により遺伝子増幅を行なった。PCR には異なる蛍光色素 (NED, PET, VIC, FAM) でラベルされたプライマーセットを使用した。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 (MLVA type, MT) を決定した。

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 MLVA 法に供試し, 各菌株の遺伝子型を決定した。多様性指数 (Simpson's diversity index) は Hunter & Gaston の方法に従って計算し, 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. 百日咳菌 LAMP キットの評価

PCR により増幅した 3 種類の *ptxP* 遺伝子 (*ptxP1*, *ptxP3*, *ptxP8*) は, すべて 10² から 10⁵ コピーで増幅が認められた。*ptxP1* と *ptxP8* は同様な Tt 値を示したが, *ptxP3* は *ptxP1* と *ptxP8* に比べ有意に低い Tt 値

を示した ($p < 0.05$, 10³~10⁵ コピー)。 *ptxP3* に対する検出感度は *ptxP1* と *ptxP8* よりも約 100 倍高いことが判明した。

ゲノム DNA を用いた感度評価において, *ptxP1* 株と *ptxP8* 株は同様な Tt 値を示し, *ptxP3* 株は *ptxP1* 株よりも有意に低い Tt 値を示した ($p < 0.01$) (表 1)。PCR 産物を用いた評価と同様に *ptxP3* 株に対する高い検出感度が確認された。

2. パラ百日咳菌の新規 MLVA 法の評価

解析菌株 53 株は 25 種類の遺伝子型 (MT1~MT25) に分類され, 本法の多様性指数は 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 は 11% (n=6), MT18 は 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

今回の検討により, 百日咳菌 LAMP キットは *ptxP1* 株以外に *ptxP3* 株と *ptxP8* 株に対しても高い検出感度を持つことが判明した。さらに, *ptxP3* 株は LAMP プライマーの標的配列内に SNP が存在するにも関わらず, *ptxP1* 株と *ptxP8* 株よりも高い感度

で検出されることが示された。世界の百日咳流行株の主要な *ptxP* アレルは *ptxP1* と *ptxP3* であり、臨床分離株の 99%以上を占めている。百日咳菌 LAMP キットが *ptxP1* 株のみならず *ptxP3* 株も高感度に検出したことから、本法は現在の百日咳流行株の検出に有用と判断された。ただし、新たな *ptxP* アレルを持つ流行株が今後増加する可能性は否定できないため、臨床分離株の *ptxP* アレル変化に関しては継続的な調査が必要である。

本研究ではパラ百日咳菌に対する新規 MLVA 法を開発し、本法が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示された。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、本法はアク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、アウトウレック調査のみならず、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

百日咳感染症の新規体外診断薬である Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D の評価を行い、本検査キットが近年の流行株に対し高い検出感度を持つことを確認した。また、パラ百日咳菌の遺伝子型別法を開発し、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解析手段に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.
2. 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.
3. 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.
4. Hiramatsu Y, Miyaji Y, Otsuka N, Arakawa Y, Shibayama K, Kamachi K. Significant decrease in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Japan. *Emerg Infect Dis.* 23(4):699-701, 2017
5. Kamachi K, Moriuchi T, Hiramatsu Y, Otsuka N, Shibayama K. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Microbiol Methods.* 133:20-22, 2017.

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.
4. 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.

5. 森内巧, 文元礼, 品川文乃, 新谷亮, 宮地悠輔, 勝田友博, 大塚菜緒, 平松征洋, 柴山恵吾, 蒲地一成. わが国の小児と成人における百日咳抗体の量的・質的解析. 第48回日本小児感染症学会総会・学術集会. 11月19-20日, 2016年, 岡山.

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. Detection of *Bordetella pertussis* ptxP1, ptxP3, and ptxP8 strains by the commercial LAMP assay

Strain	No. of clinical strains tested ^a	Tt value (min) ^b	
		100 pg DNA ^c	1 pg DNA
ptxP1	20	19.3 ± 0.5	21.8 ± 0.5
ptxP3	20	16.9 ± 0.3	19.0 ± 0.4
ptxP8	1	18.5 ^d	21.5 ^d

^a Genomic DNA sample prepared from *B. pertussis* clinical isolate.

^b Threshold time when the turbidity value reached OD₆₅₀ of 0.1.

^c Genomic DNA/reaction tube.

^d Average Tt values from two separate measurements.

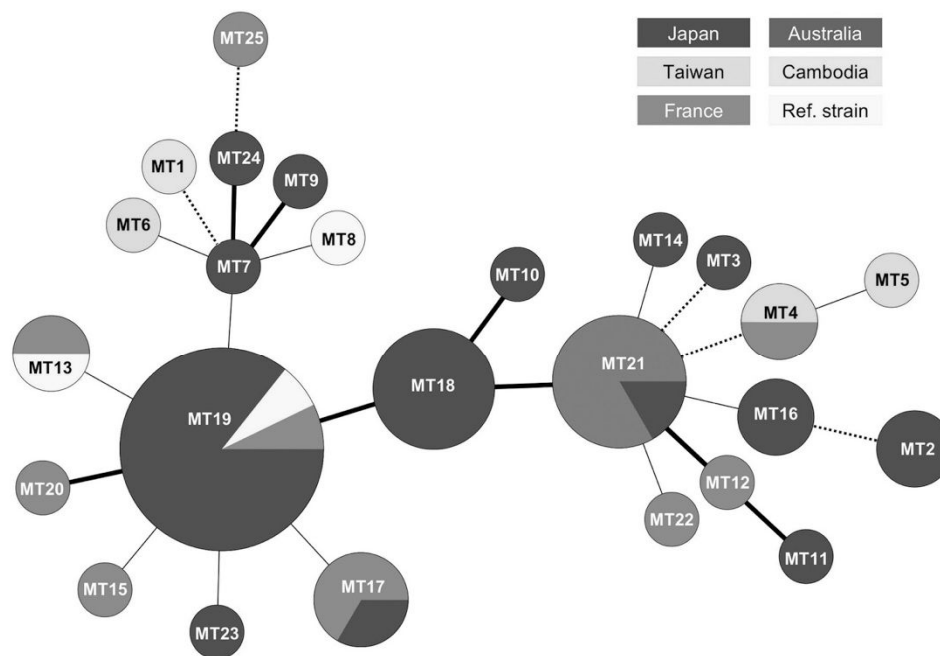


Fig. 1. Minimum spanning tree revealing the genetic diversity of the *Bordetella parapertussis* population. Each circle within a tree represents a unique MT type with the type number in the circle. The sizes of circles are representative of the number of strains in each group. The colour codes indicate 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.