

厚生労働行政推進調査事業費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「百日咳とインフルエンザの患者情報及び検査診断の連携強化による感染症対策の推進に資するエビデ
ンス構築のための研究」

分担研究報告書

百日咳菌抗原欠損株の質量分析菌種同定装置による同定精度

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

【研究要旨】

百日咳菌の菌分離・同定を伴う病原体検出では、質量分析菌種同定装置(MALDI-TOF MS)を用いた菌種同定法が広く利用されている。MALDI-TOF MSは非常に有用な検査法ではあるが、百日咳菌の同定ではしばしば難渋することが臨床で報告されていた。本研究では、百日咳菌の抗原欠損がMALDI-TOF MSによる菌種同定の精度に与える影響を解析した。その結果、百日咳菌が主要抗原である繊維状赤血球凝集素(FHA)の産生を欠損すると、本法による同定精度が低下し、百日咳類縁菌である気管支敗血症菌と誤同定される確率が上昇することが明らかになった

A. 研究目的

百日咳は主に百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の感染で引き起こされる急性呼吸器感染症である。百日咳は感染症法の5類感染症に分類され、届出には菌分離、遺伝子検査、抗原検査、抗体検査のいずれかの所見が必要となっている。菌分離には分離菌の菌種同定が伴うが、これに質量分析菌種同定装置(MALDI-TOF MS)を用いる方法がある。本法は、菌体をイオン化し得られる菌種固有のスペクトルパターンをデータベースと照合して同定する。簡便かつ迅速で、コスト面においても優れた方法であるため、近年広く用いられている。

本研究班では百日咳サーベイランスの精度向上を目指して、これまで検査診断の評価を行ってきた。上に述べたように、MALDI-TOF MSは非常に有用な検査法ではあるが、百日咳菌の同定ではしばしば難渋することが報告されていた。この原因の一つに、百日咳菌の抗原産生欠損が考えられた。百日咳菌は百日咳毒素(PT)、繊維状赤血球凝集素(FHA)、パータクチン(PRN)、線毛(FIM)など様々な

病原因子を産生するが、臨床分離株では稀に遺伝子変異等によりこれらの抗原が産生されないことがある。そこで、本研究では、百日咳菌の抗原欠損がMALDI-TOF MSによる菌種同定の精度に与える影響を解析した。

B. 研究方法

1. 菌株

百日咳菌ワクチン株 Tohama I, 百日咳菌ストレプトマイシン耐性株 TSm^r, 百日咳菌臨床分離株 5株(BP267, BP374, BP394, BP579, BP611)。菌株は15%馬脱繊維血加ボルデジャング寒天培地に塗布し、36°Cで4日間生育させた。

2. 抗原産生解析

PT, FHA, PRNの産生はイムノブロットにより解析した。菌株をSDS-lysisバッファー(62.5 mM Tris-HCl, 1% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, pH 6.8)に懸濁し、得られたタンパク質試料 1 µgを12.5% SDS-PAGEで泳動した。泳動したタンパク質をニトロセルロース膜(Bio-rad)に転写し、抗原それ

それぞれに対するマウス抗血清とインキュベートした。これに horseradish peroxidase (HRP) 結合 2 次抗体を反応させ、化学発光 (Western Lightning Pro, パーキンエルマー社) により検出した。プロットイメージの検出にはルミノイメージアナライザー LAS-3000 (フジフィルム社) を用いた。

線毛 (Fim2 及び Fim3) の検出は Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法により行った。イムノプレートに 1% カザミノ酸液で懸濁した菌体を塗布し、25°C で一晩静置した。洗浄のちブロッキングバッファーを添加し、ウサギ抗 Fim2 または抗 Fim3 モノクローナル抗体 (NIBSC#04/154 または #04/156) にビオチンを結合させた 1 次抗体を反応させた。次にストレプトアビジン HRP (Thermo scientific) を 100 µl 添加し、25°C で 30 分反応させた。プレートを洗浄し、TMB 試薬を 25°C で 10 分反応させ、直ちに反応停止液 100 µl を添加した。プレートリーダーで波長 450 nm を測定した。

3. 百日咳菌 FHA 欠損株の作製

百日咳菌の FHA 欠損株は Gateway system (invitrogen) を用いて作製した。まず、FHA の本体をコードする *fhaB* 遺伝子 (全長 10,773 bp) の 388 bp を欠損した $\Delta fhaB$ 配列を含む PCR フラグメント (1,987 bp) を作製し、これを pDONR221 ベクターに組み込んだ (pDONR $\Delta fhaB$)。次に、pDONR $\Delta fhaB$ を酵素反応により相同組換えベクター pABB-CRS2 に乗せ換え、これをエレクトロポレーションで大腸菌 SM10 λpir に導入した。接合により大腸菌 SM10 λpir から百日咳菌 TSm^r に導入された pABB $\Delta fhaB$ は百日咳菌ゲノム DNA に挿入される。ベクターがゲノム DNA に挿入された TSm^r のコロニーをカザミノ酸液 1 ml に懸濁し、37°C で 5~10 時間振盪培養する。この時、2 回目の相同組換えが生じると、ベクター由来のマーカが脱落するため「アンピシリン感受性かつスクロース耐性」を指標に目的の変異株 (百日咳菌 TSm^r $\Delta fhaB$) を選択した。

4. MALDI 微生物同定装置による菌種同定試験

菌種同定試験には Microflex NID-1 Biotyper (ブルカー社) を用いた。シングルコロニーをターゲット

プレート上の所定のウェルに塗布し、HCCA マトリックスを 1 µl 添加した。内部標準物質には Bacterial Test Standard (ブルカー社) を用いた。マトリックス液が乾燥したのち直ちに装置で解析を行った。操作は MALDI Biotyper v3.1 ソフトウェアにより行い、スペクトル解析には MALDI Biotyper Library (MBT Compass Library, BDAL#7854) を適用した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床分離株を対象とし、倫理上特段の問題は発生しない。

C. 研究結果

1. 百日咳菌臨床分離株の抗原産生と菌種同定試験

表 1 に本研究で用いた百日咳菌臨床分離株 5 株の主要な抗原産生状況を示した。これら菌株はいずれかの抗原産生を欠損しており、実際にエイズ患者の血液培養から分離された BP611 は臨床現場で菌種同定が難渋した背景がある。これら 5 株に MALDI Biotyper による菌種同定試験を実施した結果、百日咳菌または類縁菌の気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) と判定された (図 1 (A))。Biotyper では同定結果の信頼性を 0.00~3.00 の範囲でスコア評価しており、2.00~2.29 は属レベル、2.30~3.00 で種レベルの高い同定精度があるとしている。しかし、今回の抗原欠損百日咳菌 5 株はいずれも score value >2.00 の高い精度で *B. bronchiseptica* と判定される確率が 50% を越えていた。特に、BP267 に至っては供試したシングルコロニー全てが *B. bronchiseptica* と誤同定され、その score value は種レベルの信頼性が期待できるとされる 2.34 であった。5 株は FHA および Fim2 を共通して欠損していたが、近年の国内臨床分離株では 9 割以上が Fim2/Fim3⁺ の産生パターンを示す。従って、Fim2 欠損よりも、分子量 220 kDa の巨大な繊維状タンパク質である FHA の欠損の方が MALDI-TOF MS による菌種同定により大きく影響すると考えられた。

2. 百日咳菌 FHA 欠損株の菌種同定試験

次に、FHA 欠損が菌種の誤同定につながる因子となることを確認するため、遺伝子組換え技術により百日咳菌 FHA 欠損株(TSm^rΔfhaB)を作出した。百日咳菌 Tohama IはFHAを産生するワクチン株、TSm^rはTohama Iにストレプトマイシン自然耐性を付与した菌株であり、TSm^rΔfhaBはTSm^rを親株として作製した。これら3株をBiotyperによる菌種同定試験に供試した結果を図1(B)に示す。Tohama I、TSm^rはいずれも70%の頻度で百日咳菌と同定されたが、30%は*B. bronchiseptica*と誤同定され、両者の同定スコアはいずれも高値を示した(score value 2.20~2.31)。一方、FHAを欠損させたTSm^rΔfhaBでは供試した全てのシングルコロニーが*B. bronchiseptica*と誤同定され、同定スコアも2.27と高い値を示した。以上のことから、Biotyperによる百日咳菌の菌種同定試験では、FHAを欠損することにより同定精度が低下することが明らかとなった。

3. スペクトルパターン解析

FHA 欠損により同定精度が低下するのであれば、百日咳菌 FHA 欠損株のスペクトルパターンにも変化が生じていることが推測された。図2にTohama I、TSm^r、TSm^rΔfhaBの代表的なスペクトルパターンを示した。各々の菌株で検出されたピークを比較したところ、Tohama IとTSm^rで存在する5,544 m/zのピークがTSm^rΔfhaBでは消失していることが判明した。

D. 考察

本研究では、百日咳菌の抗原欠損がMALDI-TOF MS菌種同定試験の精度に与える影響を検討した。各種抗原のうち、FHAを欠損するとBiotyperによる菌種同定精度が低下し、百日咳菌を類縁菌*B. bronchiseptica*と誤同定する確率が上昇することが明らかとなった。さらに、スペクトルパターン解析によりFHA由来と考えられる5,544 m/zのピーク消失が両菌種の判別を困難にする要因であることが示唆された。

一方、FHAを産生する百日咳菌Tohama Iであ

っても、*B. bronchiseptica*と誤同定される頻度が30%あることが判明し(図1B)、MALDI-TOF MSでボルデテラ属細菌を種レベルまで判別することの難しさが指摘された。ただし、本研究で用いたスペクトルライブラリー(BDAL#7854)には、ボルデテラ属細菌が9菌種55株登録されているが、いずれも海外の分離菌株で構成されているため注意が必要である。照合データベースに国内分離菌株のスペクトルパターンを追加することで、同定精度が改善する可能性が指摘された。

また、MALDI-TOF MSによる菌種同定が難渋した場合でも、代替試験による菌種の鑑別が必要である。研究レベルでは、百日咳菌LAMP法や4Plexリアルタイム法など遺伝子検査による菌種同定が考えられるが、これらは健康保険の適用外となる。今後、百日咳菌FHA欠損株の菌種同定に、百日咳菌免疫血清を用いた抗原抗体反応が利用可能であるか検討する予定である。

E. 結論

百日咳菌の主要抗原の一つであるFHAを欠損した菌株では、MALDI-TOF MSによる菌種同定試験の同定精度が低下することが指摘された。本法による分離菌同定が困難な場合は、百日咳菌を鑑別できる遺伝子検査法など代替試験を用いる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wakimoto Y, Otsuka N, Yanagawa Y, Koide K, Kamachi K, Shibayama K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. The First Reported Case of *Bordetella pertussis* Bacteremia in a Patient With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Open Forum Infect Dis*. 2022 Feb 7;9(3):ofac020.

2. 学会発表

なし

2. 実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

3. その他

1. 特許取得

なし

なし

表 1. 本研究で用いた百日咳菌臨床分離株の特徴

Isolate	Location	Year	MLVA type	Phenotype				
				PT	FHA	PRN	Fim2	Fim3
BP267	Fukuoka	2004	186	+	-	-	-	+
BP374	Miyazaki	2010	27a	-	-	-	-	-
BP394	Miyazaki	2011	27a	-	-	-	-	-
BP579	Tokyo	2015	27a	+	-	+	-	+
BP611	Tokyo	2019	36	+	-	+	-	-

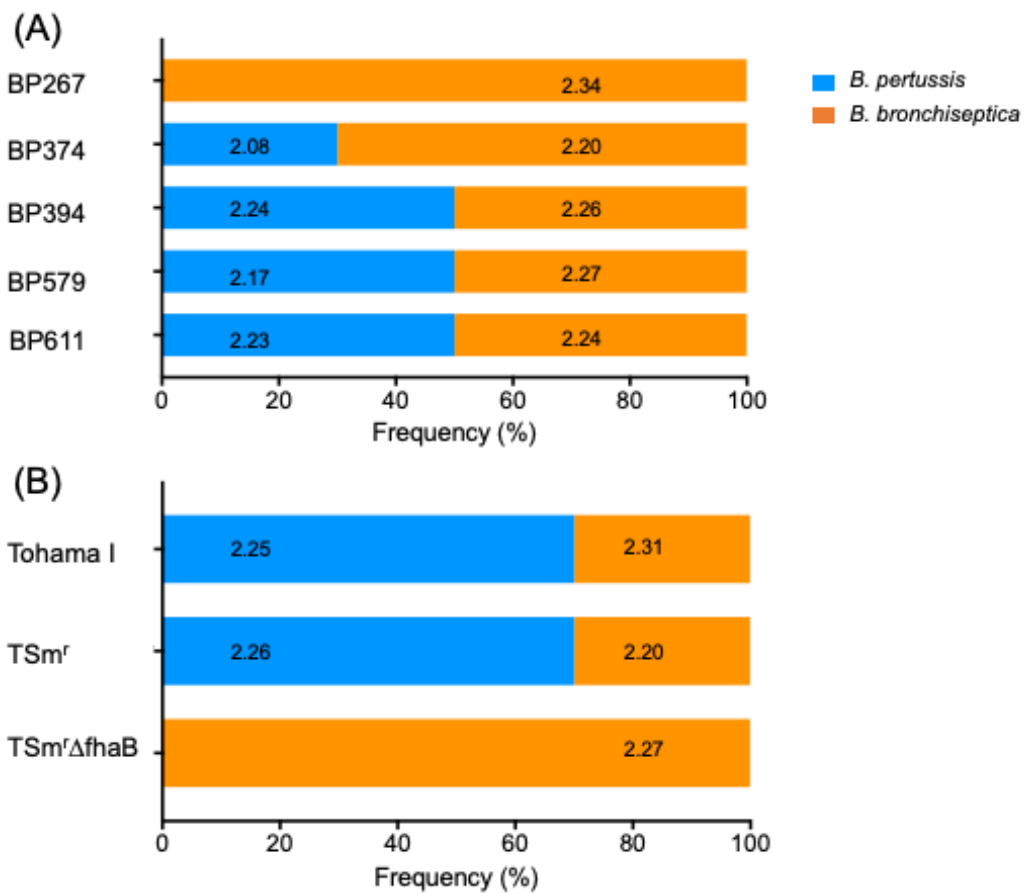


図 1. MALDI Biotyper による百日咳菌の菌種同定結果

各菌株 10 コロニーを供試し、百日咳菌または気管支敗血症菌と判定された頻度を示した。数字は同定スコアの平均値。(A)百日咳菌 FHA 欠損株 (B)fhaB 遺伝子破壊株およびその親株(Tohama I, TSm^r)

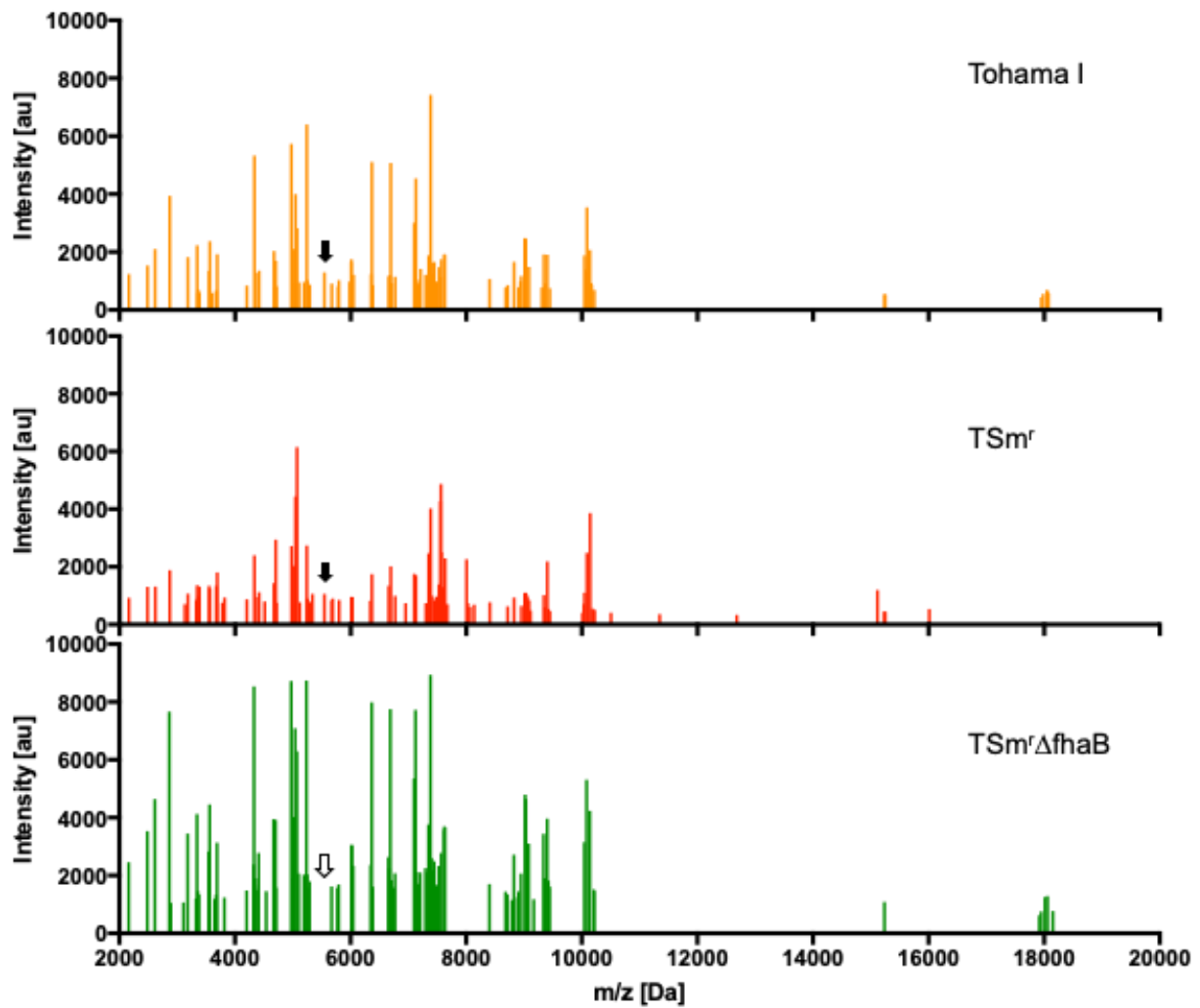


図 2. MALDI Biotyper で解析した百日咳菌のマススペクトラム

FHA を産生する Tohama I および TSm^r は 5,544 m/z のピーク(黒矢印)を有するが、FHA 欠損株である TSm^rΔfhaB 株では当該ピークの消失が確認された(白矢印)