

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」

代表・分担研究報告書

百日咳の疫学的解析、並びにワクチンの評価に関する研究

研究代表者	神谷 元	国立感染症研究所 実地疫学研究センター
研究協力者	高橋琢理	国立感染症研究所 感染症疫学センター
	有馬雄三	国立感染症研究所 感染症疫学センター
	黒澤克樹	国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース(FETP)
	大森 俊	国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース(FETP)
	高橋賢亮	国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース(FETP)
	塚田敬子	国立感染症研究所実地疫学専門家養成コース(FETP)

【研究要旨】

2018年より全数把握疾患として百日咳のサーベイランスが開始された。その結果定点把握疾患サーベイランスでは詳細がわからなかった百日咳の疫学や患者の特徴等が明確になり、百日咳の疾病対策に関する新たな課題が明確になった。2021年もこれまで同様サーベイランスのデータの詳細を整理解析した。2021年は引き続き新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の影響により、報告患者数の大幅な減少が認められた。特に学童期の小児における患者報告数の減少が顕著であった。また、遺伝子検査実施の割合が低下し、血清抗体高値による診断の割合が上昇するとともに、新規保険収載されたイムノクロマト法による診断された症例も急増しており、サーベイランスへの影響が懸念された。

A. 研究目的

2018年1月1日よりこれまで感染症発生動向調査において5類感染症小児科定点把握疾患であった百日咳は全数把握疾患へと変更になった。この変更は2016年に百日咳核酸検出/LAMP法など複数の検査法の健康保険適応が大きく影響している。本研究では全数サーベイランス移行時に患者の届け出の統一を図るべく「百日咳感染症法に基づく医師届出ガイドライン」を作成し正確な国内の百日咳患者の疫学の把握に努めた。

過去2年間の全数百日咳サーベイランス結果より、国内の百日咳の疫学は①6か月未満、②5～15歳を中心とした学童、③30代後半から40代にかけての成人の3つのグループにピークがあることが判明した。特に①については多くがワクチン未接種な6

か月未満児が多く、その感染源として一番多いのが兄弟であること、②については80%近くが定期接種で求められているDPTワクチンの4回接種を接種していた。この結果に基づき三種混合ワクチン(DPT)に関して、就学前児に対する追加接種の必要性が明確となった。今年度は全数報告になったことにより新たに得られる感染源や患者居住地等の情報に着目し、全数サーベイランスの利点を検証することとした。

2020年2月以降、国内では新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が流行し、緊急事態宣言の発令や学校閉鎖等の対策により、国民の行動が大幅に変化した。また、行動制限解除後も多くの国民がマスクの着用やソーシャルディスタンスなど、飛沫感染対策を実施した。これらの変化は百日咳の疫学

にも影響を及ぼすと考えられた。今年度も COVID-19 流行下の国内の百日咳の疫学をまとめた。

B. 研究方法

1. サーベイランス情報の解析

2021年1月1日～12月31日までにNESIDへ報告された百日咳の症例について、「感染症法に基づく医師届出ガイドライン(第二版) 2021年12月28日、国立感染症研究所」(以下ガイドライン)に基づき症例を選別し、ガイドラインの届出基準に合致した症例のみをまとめ、患者の年齢分布や予防接種歴などを中心に記述疫学的手法を用いてまとめた。

【症例定義】

症例定義は以下のように定めた。

- ・感染症発生動向調査の届出基準を使用
- ・検査診断例: 百日咳が疑われる症状を有し、表中の検査方法により診断された者

検査方法	検査材料
分離・同定による病原体の検出	
核酸増幅法による病原体の遺伝子の検出 (PCR法・LAMP法・その他)	鼻腔、咽頭、気管支などから採取された検体
イムノクロマト法による病原体の抗原の検出	鼻咽頭拭い液
抗体の検出	
(ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇、血清又は単一血清で抗体価の高値)	

- ・臨床診断例: 百日咳が疑われる症状を有し、検査確定例と接触がある者

抗体検出にあたっては、ガイドラインの基準を満たす症例を抽出

- ・単一血清抗体価高値: 抗PT-IgG抗体 $\geq 100\text{EU/ml}$ または抗百日咳菌IgMまたはIgA抗体陽性
- ・ペア血清で抗体価の有意上昇
 - (1)1回目の抗PT-IgG抗体価 $< 10\text{EU/ml}$ かつ 2回目(1回目から2週間以上の間隔)の抗PT-IgG抗体価 $\geq 10\text{EU/ml}$
 - (2)1回目が $10\text{EU/ml} \leq$ 抗PT-IgG抗体価 $< 100\text{EU/ml}$ かつ 2回目(1回目から2週間以上の間隔)の抗体価が2倍以上

(倫理面への配慮)

本研究は連結不可能匿名化されているデータのみを用いた疫学研究である。

C. 研究結果

1. 2021年の百日咳疫学

2021年も引き続き COVID-19 の流行の影響を受け、報告患者数は低かった。一方で、イムノクロマト法が新たに保険収載され、届け出基準の診断方法として追加された(それに伴い、2021年12月28日、ガイドラインを第二版にアップデートした)。

2021年の届出ガイドラインに合致した百日咳患者は712人でうち、ワクチンの4回接種歴を認めた症例は全体で45%(320/712例)、20歳未満では74%(296/400例)、5～14歳に限定すると84%(139/165例)であった。また、昨年同様成人の肺炎症例の割合が増加した(3.9%、前年度比+1.7%)。2021年は検査診断例の割合が増加したが、図3に示すように、遺伝子検査の割合は大きく減少し、単一血清抗体高値の割合が最も大きく(65%)、次いでイムノクロマト法であった(29%)。

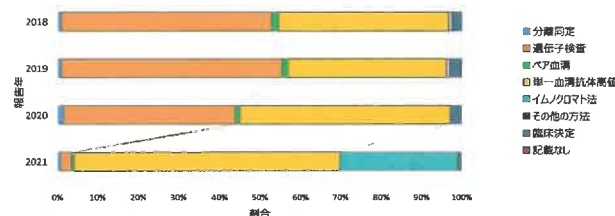


図 3. 届出ガイドラインに合致した百日咳報告患者の診断方法別割合、2018年-2021年

(複数の検査方法の記載がある場合、下記の順に1つの診断方法を決定

分離同定 → 遺伝子検査 → ペア血清 → 単一血清抗体高値 → イムノクロマト法 → 臨床決定)

D. 考察

2018年に全数化した百日咳サーベイランスは、正確な国内の百日咳の疫学の把握や問題点の把握を可能とした。

国内の百日咳の疫学は2021年も引き続き報告患者数は少なかった。学童期の小児における患者報告数減少が顕著した一方、6か月以上1歳未満及び1歳以上5歳未満の割合は増加した。また、成

人で肺炎を認める百日咳患者の報告割合が引き続き増加傾向を示すなど、COVID-19の影響は2021年も大きかったことが推測された。

2021年の大きな変化として検査診断の内訳が大きく変化したことにある。2020年までは約半数が遺伝子検査(主にLAMP法)が実施されていたが、2021年は単一血清抗体価による診断が65%を占め、また新たに保険収載されたイムノクロマト法による診断例も約3割に達した。COVID-19の影響により、鼻腔、咽頭、気管支などから採取された検体による検査が敬遠された可能性や、イムノクロマト法による迅速な検査結果が医師に好まれて使用頻度が増えた可能性などが考えられるが、新しい検査法が導入されるとサーベイランスに影響が生じることはこれまでの経験から知られていることである。今後もサーベイランスデータについて引き続き注視していく必要がある。

E. 結論

全数サーベイランスへの移行により、保健所毎にデータを分析するとアウトブレイクを早期に探知できる可能性がある。一方で、COVID-19の流行に伴い、選択される検査の変化や新規検査診断法の導入により、サーベイランスに今後影響が出る可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報(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

「感染症法に基づく医師届出ガイドライン(第二版) 2021年12月28日、国立感染症研究所」

https://www.niid.go.jp/niid/images/epi/pertussis/pertussis_guideline_211228.pdf

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

H. 知的財産権の出願・登録情報(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. 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	+	-	+	-	-

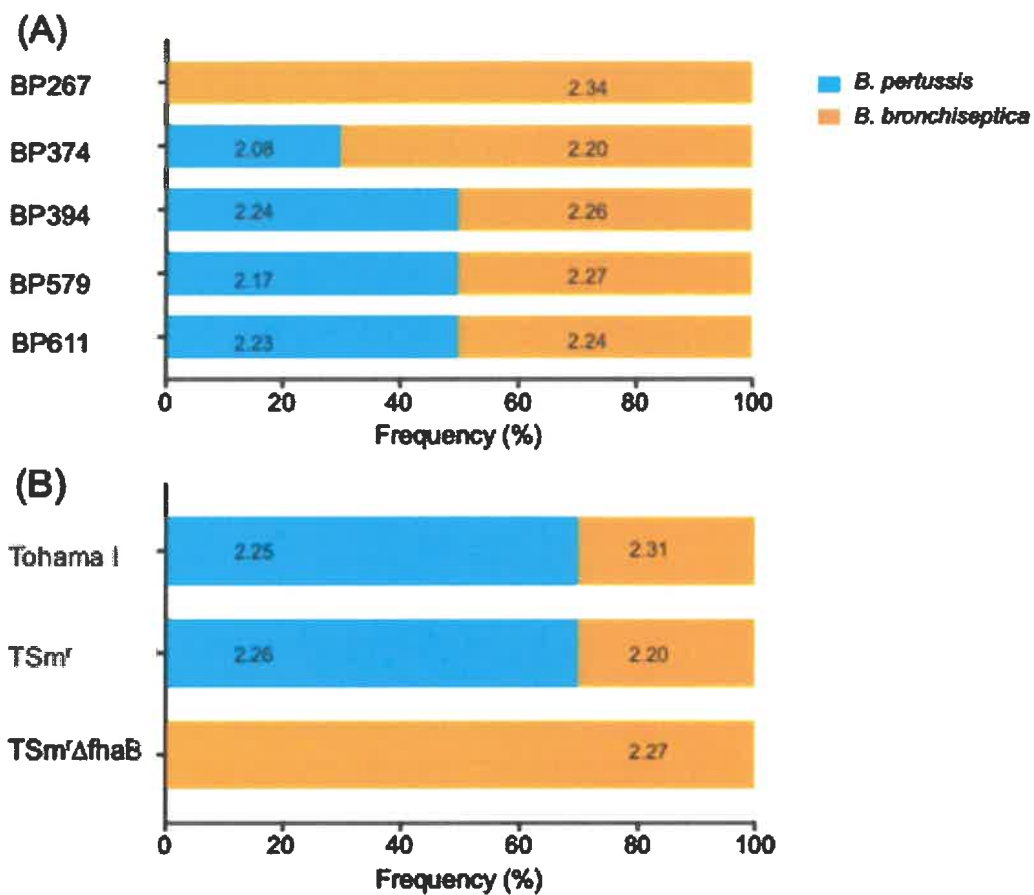


図 1. MALDI Biotyper による百日咳菌の菌種同定結果

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^f)

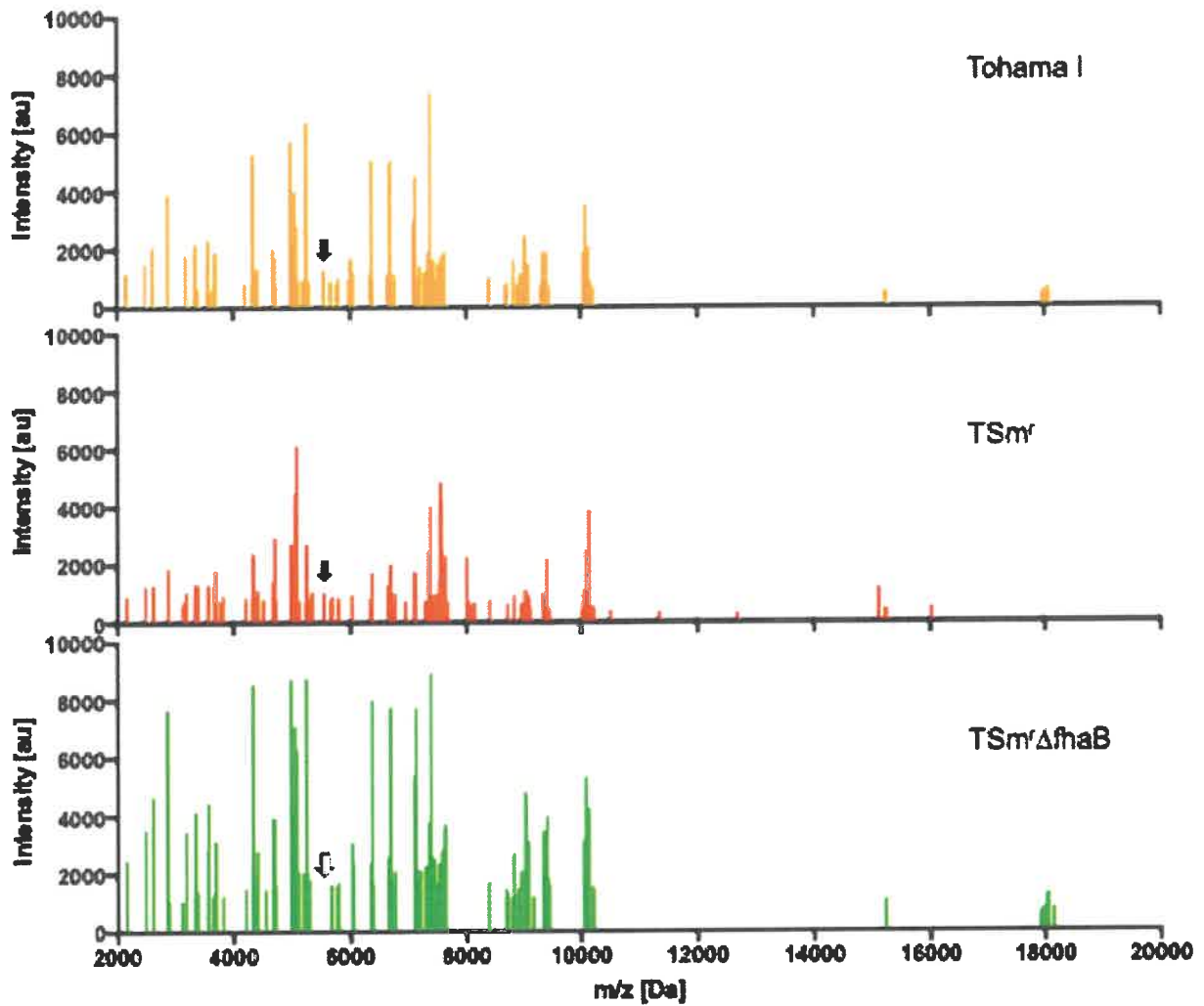


図 2. MALDI Biotyper で解析した百日咳菌のマススペクトラム

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)