

2. 秋田県における百日咳流行要因解明のための分子疫学的解析法の検討と発生状況の解明

○今野貴之（秋田県健康環境センター）

【研究目的】

百日咳は、数年おきに流行を引き起こすことが知られており、平成 28 年には秋田県内でも流行が確認された。そこで、百日咳流行期における病原体の検出状況や細菌学的な特徴を調査し、平成 28 年の秋田県における百日咳の発生状況を明らかにする。本研究では、そのために必要な遺伝学的な手法である分子疫学的解析法等を検討すると共に、解析結果等をもとに百日咳流行要因を解明し、今後の地域の感染症対策に寄与することを目的とする。

なお、本研究は秋田県健康環境センター研究倫理審査委員会の承認を受けて行った。

【研究の必要性】

百日咳は、特有のけいれん性の咳発作を特徴とする呼吸器感染症である。症状の改善まで約 3 ヶ月を要し、生後 6 ヶ月以下では死亡する危険性も高い。国内では、百日咳のワクチンは、現在、四種混合ワクチンとして、ジフテリア、破傷風、ポリオと共に接種されており、百日咳の発生が予防されている。しかしながら、百日咳は数年おきに流行がみられ、秋田県でも平成 28 年に流行が確認され（図）、問題となった。今後の流行に備えるためには、百日咳流行期における病原体の検出状況や細菌学的な特徴を調査し、その発生状況の詳細を明らかにする必要がある。また、そのためには病原体である百日咳菌の詳細な遺伝情報を解析することが必須であることから、百日咳の分子疫学的解析法を検討する必要がある。

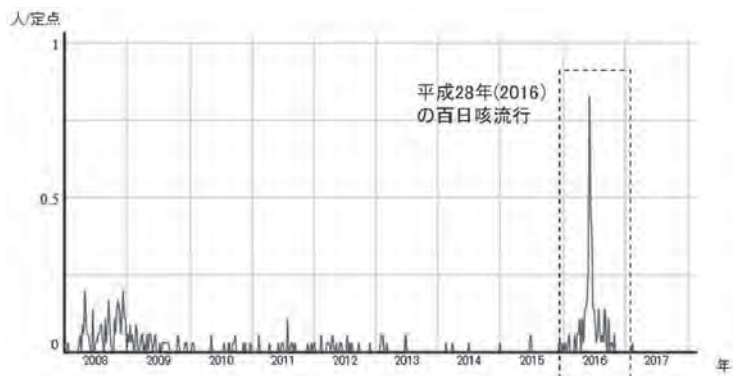


図. 秋田県における過去10年の百日咳の発生状況
(参照)秋田県感染症情報センター

【研究計画】

1. H29.9～H30.4 病原体検出状況調査

秋田県の地域的な百日咳菌の検出状況を調査する。さらに、百日咳との鑑別が必要な疾患の遺伝子解析手法を検討し、各病原体の検出状況との比較から百日咳の流行状況を解析する。鑑別疾患の遺伝子解析法として、小児の呼吸器感染症の主要な病原体の一

つであるモラクセラ・カタラリスや、百日咳菌に類似するパラ百日咳菌を想定し、迅速・高感度な解析が期待できるリアルタイム PCR 法、nested-PCR 法を検討する。

2. H30.4～H30.7 分子疫学的解析法の検討

百日咳菌の DNA 抽出検体から、遺伝子型を特定する分子疫学的解析法を検討する。分子疫学解析法は、特定の遺伝子配列の相同性をもとに判別が容易な Multi-Locus Sequence Typing (MLST 法) の有用性について検討する。

【実施内容・結果】

1. 病原体検出状況調査

秋田県内医療機関から平成28年に百日咳検査依頼のあった鼻腔拭い液211検体を対象に、百日咳菌とその他の病原菌6種類（パラ百日咳菌、クラミジア・ニューモニエ、A群溶血性レンサ球菌、モラクセラ・カタラリス、肺炎球菌、インフルエンザ菌）の検出状況を調査した。百日咳菌の検出は、Loopamp 百日咳菌検出試薬キット（栄研化学）を用いて、LAMP 法により行った。百日咳菌が検出されなかった検体について、nested-PCR 法により百日咳菌の類縁菌であるパラ百日咳菌¹⁾、real-time PCR 法により呼吸器系疾患の主要な病原菌でクラミジア・ニューモニエ²⁾、A群溶血性レンサ球菌³⁾、モラクセラ・カタラリス⁴⁾、肺炎球菌⁵⁾及びインフルエンザ菌⁶⁾の検出を行った（表1）。

供試した211検体の内、百日咳菌が検出されたのは43件であった。患者の年齢は、1ヵ月から14歳までで、平均7.6歳であった。

また、その他の病原菌ではクラミジア・ニューモニエが7件、A群溶血性レンサ球菌が

表1 その他の病原菌検出用のプライマー及びプローブ

菌種	標的遺伝子	配列 (5' -3')	備考	参考文献
パラ百日咳菌	IS1001	CGCCGCTTGATGACCTTGATA	1st PCR	1
		CACCGCCTACGAGTTGGAGAT		
		CGCTGGCTGCTGCTGCGCAA	2nd PCR	
		GTGGTTCCAGGCTTGCTCTTG		
クラミジア・ニューモニエ	<i>ompA</i>	GATCCGCTGCTGCAAACCTATACT		2
		GTGAACCACTCTGCATCGTGTA		
		TAGGCCGGGTTAGGTCTATCTACGGCAGT	5' FAM-3' TAMRA	
A群溶血性レンサ球菌	<i>speB</i>	CTAAACCTTCAGCTCTTGGTACTG		3
		TTGATGCCTACAACAGCACTTTG		
		CGGCGCAGGCGGCTTCAAC	5' FAM-3' TAMRA	
モラクセラ・カタラリス	<i>copB</i>	GTGAGTGCCGCTTTACAACC		4
		TGTATCGCCTGCCAAGACAA		
		TGCTTTTGCAAGCTGTTAGCCAGCCTAA	5' FAM-3' TAMRA	
肺炎球菌	<i>lytA</i>	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA		5
		TCGTGCGTTTTAATTCAGCT		
		GCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG	5' FAM-3' TAMRA	
インフルエンザ菌	P6	CCAGCTGCTAAAGTATTAGTAGAAG		6
		TTCACCGTAAGATACTGTGCC		
		CATCGCATTAGGCCAACGTCGTGC	5' FAM-3' TAMRA	

13 件、モラクセラ・カタラリスが 28 件、肺炎球菌が 29 件、インフルエンザ菌が 38 件検出され、一部の検体からは複数の病原菌が検出された（表 2）。百日咳の患者報告の中には、百日咳菌の類縁菌であるパラ百日咳菌の感染による場合が数%あるとされているが、今回の調査ではパラ百日咳菌の感染は確認できなかった。

2. 分子疫学的解析法の検討

百日咳が検出された検体については、3 種類の病原因子（*ptxA*, *prn*, *fim3*）の遺伝子配列の違いから遺伝子型（MLST 型）を決定した⁷⁾。また、毒素産生を制御している *ptxP* についても遺伝子配列の違いをもとに型別を行った⁸⁾。国内の百日咳菌は、それぞれ 2 種類のい

ずれかの *ptxA* (*ptxA1*, *ptxA2*), *prn* (*prn1*, *prn2*), *fim3* (*fim3A*, *fim3B*) を保有することが多く、その組み合わせから主に 5 種類の MLST 型に分類することが可能である⁷⁾。百日咳菌が検出された 43 件のうち、解析可能であったのは、*ptxA* が 33 件で全て *ptxA1*, *prn* が 35 件で全て *prn2*, *fim3* が 32 件で、このうち *fim3A* が 26 件、*fim3B* が 6 件であった。3 つの病原因子の組み合わせから MLST 型を決定できたのは 27 件で、MLST-2 型が 22 件、MLST-4 型が 5 件であった。また、*ptxP* については、解析可能であった 37 件全て *ptxP3* であった。

【考察と今後の課題】

今回対象とした百日咳疑い検体からは百日咳菌 43 件、百日咳菌が検出されなかった検体の半数からはその他の病原菌のいずれかが検出された。百日咳菌が検出されなかった検体については、これらの他の病原体の関与も想定されるが、今回調査した百日咳菌以外の病原菌は健康な人からも検出される場合があるため、原因菌であるかどうかについてはさらなる検討が必要である。

百日咳はワクチンによって予防可能な感染症であり、国内でもワクチン導入後に患者は急速に減少した。百日咳の流行要因の一つとしては、ワクチンの普及により患者が減少し、市中で百日咳菌に暴露される機会が少なくなり、ワクチン接種後のブースター効果が薄れ、免疫の維持が難しくなったことが考えられる。そのため、以前から成人による百日咳の集団感染が問題視されてきた⁹⁾。今回の百日咳が検出された患者は主に小学生であり、ワクチンによる感染予防効果は比較的早期に薄れていた可能性が示唆された。

表 2 その他の病原菌の検出状況

その他の病原菌の検出パターン			検出数
Bpp			0
Cp			6
Spy			9
Mc			13
Spn			6
Hi			18
Cp	Spn		1
Spy	Mc		1
Spy	Spn		1
Spy	Hi		1
Mc	Spn		3
Mc	Hi		2
Spn	Hi		9
Spy	Mc	Spn	1
Mc	Spn	Hi	8

Bpp:パラ百日咳菌, Cp:クラミジア・ニューモニエ, Spy:A 群溶血性レンサ球菌, Mc:モラクセラ・カタラリス, Spn:肺炎球菌, Hi:インフルエンザ菌.

現行のワクチンに使用されている菌株の遺伝子型は、MLST-1 型であるのに対して、平成 28 年に秋田県内で確認された百日咳菌の主要な遺伝子型は MLST-2 型であり、ワクチン株の遺伝子型とは異なっていた。MLST-1 型は、平成 3 年から平成 19 年までに国内で検出された百日咳菌では主要な遺伝子型であったが⁷⁾、その後は全国的に MLST-2 型の割合が増加している¹⁰⁾。近年の報告では、ワクチンを接種して 4 年後には約半数で感染予防効果が得られていなかったとの報告もあり^{11,12)}、今回の結果はこれらの報告とも合致した。また、今回確認した *ptxP* は全て *ptxP3* であったが、*ptxP3* では毒素の産生量を調節する部分に変異が入り、毒素産生量が増大して病原性が増すことが報告されていることから^{8,9)}、このような変異が流行に影響している可能性も考えられた。

以上のことから、百日咳菌の遺伝子型の変化とワクチン効果の減弱との関連について完全に証明された訳ではないが、秋田県における平成 28 年の百日咳の流行要因として、遺伝子の変異によるワクチンの抗原部分や病原性の変化により、ワクチンの感染予防効果が薄れた可能性が考えられた。百日咳は周期的な流行を繰り返すことが知られており、今後も百日咳の発生状況や流行要因となり得る遺伝子型を解析する上で、MLST 法の活用が期待される。

【参考文献】

- 1) Farrell DJ, Daggard G, Mukkur TK: Nested duplex PCR to detect *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* and its application in diagnosis of pertussis in nonmetropolitan Southeast Queensland, Australia., *J Clin Microbiol*, **37**, 1999, 606–610.
- 2) Apfalter P, Barousch W, Nehr M, Makristathis A, Willinger B, Rotter M, Hirschl AM: Comparison of a new quantitative *ompA*-based real-Time PCR TaqMan assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays., *J Clin Microbiol*, **41**, 2003, 592–600.
- 3) Dunne EM1, Marshall JL, Baker CA, Manning J, Gonis G, Danchin MH, Smeesters PR, Satzke C, Steer AC: *BMC Infect Dis*, **13**, 2013, 312.
- 4) Greiner O, Day PJ, Altwegg M, Nadal D: Quantitative detection of *Moraxella catarrhalis* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR., *J Clin Microbiol*, **41**, 2003, 1386–1390.
- 5) Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, Steigerwalt A, Whaley M, Facklam RR, Fields B, Carlone G, Ades EW, Dagan R, Sampson JS: Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA., *J Clin Microbiol*, **45**, 2007, 2460–2466.
- 6) Abdeldaim GM, Strålin K, Korsgaard J, Blomberg J, Welinder-Olsson C, Herrmann B: Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*., *BMC Infect Dis*, **10**, 2010, 310.

- 7) 大塚菜緒, 鰺坂裕美, 蒲地一成, 吉野修司, 岩出義人, 勝川千尋: 百日咳, *病原体検査マニユアル*, 2011.
- 8) Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q, Bart MJ, Heuvelman KJ, de Greeff SC, Diavatopoulos D, Teunis P, Nagelkerke N, Mertsola J: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence., *Emerg Infect Dis*, **15**, 2009, 1206–1213.
- 9) 菊池賢: 成人百日咳その診断と治療., *日本内科学会雑誌*, **101**, 2012, 3129–3133.
- 10) Miyaji Y1, Otsuka N, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2010 pertussis epidemic in Japan., *PLoS One*, **8**, 2013, e77165.
- 11) McGirr A, Fisman DN: Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis., *Pediatrics*, **135**, 2015, 331–343.
- 12) Schwartz KL, Kwong JC, Deeks SL, Campitelli MA, Jamieson FB, Marchand-Austin A, Stukel TA, Rosella L, Daneman N, Bolotin S, Drews SJ, Rilkoff H, Crowcroft NS: Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity., *CMAJ*, **188**, 2016, E399-E406.

【経費使途明細】

使 途	金 額
試薬代 (プライマー, プローブ, DNA シークエンス解析)	47,466 円
消耗品・器具 (プレート遠心機, ピペット, ピペットホルダー, アルミブロック)	242,460 円
事務費 (インクトナー, 実験ノート, 論文校正手数料, 振込手数料)	10,264 円
合 計	300,190 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円