

高知県下で分離された百日咳菌の分子疫学解析

藤戸 亜紀・松本 一繁・松本 道明・今井 淳

Molecular Epidemiologic Analysis of *Bordetella pertussis* Isolated in KOCHI

Aki FUJITO, Kazushige MATSUMOTO, Michiaki MATSUMOTO, Atsushi IMAI

【要旨】百日咳は百日咳菌(*Bordetella pertussis*)による呼吸器疾患であり、感染症発生動向調査における小児科定点把握の5類感染症に指定されている。ワクチンの導入により患者数は減少していたが、近年報告数が再び増加している。

当所では2008年から国立感染研究所の病原体検査マニュアルにより、分離培養と遺伝子検査(LAMP法とPCR法)を実施しはじめた。2008年5月から2009年5月までに県内で採取された百日咳疑いの83検体中、15例(18.1%)で遺伝子検査が陽性となり、そのうち10例(66.7%)で百日咳菌が分離された。この10例についてパルスフィールドゲル電気泳動法により分子疫学解析を行なったので報告する。

Key words : 百日咳菌、LAMP法、パルスフィールドゲル電気泳動法

Bordetella pertussis, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

I はじめに

百日咳は百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の気道感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症である。百日咳菌は患者の上気道分泌物の直接接触や飛沫により感染し、高い感染力を有する。沈降精製ジフテリア・百日咳・破傷風三種混合ワクチン(DTP)の導入により患者数は減少していたが、近年再び報告数が増加している¹⁾。2007年には日本各地で百日咳集団感染が発生し²⁾、ワクチン効果が減弱した青年・成人による百日咳の罹患が問題となっている。高知県でも2007年に大学での集団感染が報告された³⁾。

当所では2008年5月から小児科定点病院からの百日咳疑い検体が搬入されるようになり、2009年2月以降は検体数が急増した。そうした中、2009年5月までに搬入された83検体のうち10例で百日咳菌が分離され、これら菌株についてパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE法)による分子疫学解析を実施したので報告する。

II 材料と方法

1 材料

2008年5月から2009年5月までに感染症発生動向調査事業における小児科定点より当所に搬入された百日咳疑い83検体を検査材料とした。

2 方法

百日咳検査診断マニュアル⁴⁾に基づき、シードスワブ2号(栄研)を用いて採取された鼻咽頭分泌物について遺伝子検査(LAMP法およびPCR法)と分離培養を、分離された菌株についてパルスフィールド電気泳動法(PFGE法)により分子疫学解析を実施した。

(1) 遺伝子検査

DNAの抽出には当初QIAamp DNA Mini Kit(50)(QIAGEN)を使用していたが、2009年5月からQIAamp DNA Micro Kit(QIAGEN)に変更した。このDNA抽出液をLAMP法とPCR法により検査した。LAMP法(loop-mediated isothermal amplification法)は国立感染症研究所細菌第二部で作製された

LAMP 試薬キット⁶⁾を使用し、蛍光の有無を目視により確認した。PCR 法では Aoya-1/Aoya-2 プライマーおよび PTP1/PTP2 プライマーを用いて同定を行なった。

(2) 分離培養

ボルデテラ CFDN 寒天培地(日研生物医学研究所)を用いて分離培養し、セファレキシリン無添加の Bordet Gengou Agar Base (日本ベクトン・ディッキンソン)に馬脱繊維血とグリセリンを加えて調整した平板培地に継代培養した。分離菌は PCR 法を用いて同定した。

(3) PFGE 法

制限酵素は *Xba* I (Roche)を用い、泳動条件はブロック 1 : パルスタイム 4-8sec, 泳動時間 12 時間, 6.0V/cm、ブロック 2 : パルスタイム 8-50sec, 泳動時間 10hr, 6.0V/cm で行なった。マーカーにはスラダーと *Salmonella Braenderup* H9812 株を用いた。泳動パターンの解析には Fingerprinting II (Bio-Rad)を使用した。

III 結果

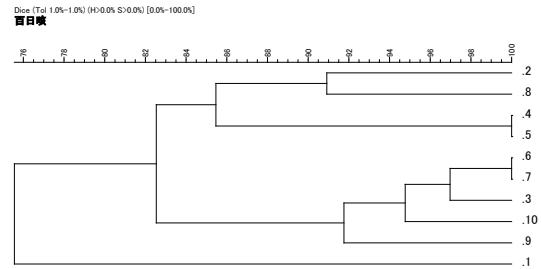
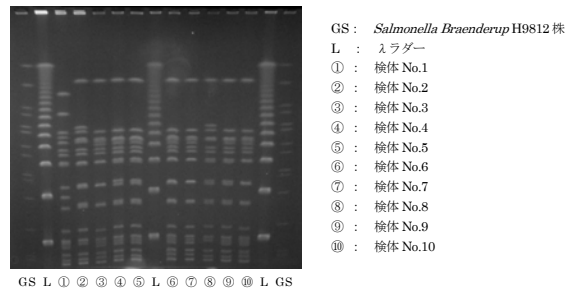
検査材料 83 検体のうち、15 例の DNA 抽出液で遺伝子検査陽性となった。LAMP 法のみ陽性となった例および LAMP 法・PCR 法ともに陽性となった例があったが、どちらも遺伝子検査陽性と判定した。遺伝子検査陽性 15 例のうち、10 例で百日咳菌が分離培養された。10 例の搬入月による内訳は、2008 年 12 月 1 例、2009 年 2 月 2 例、3 月 1 例、4 月 4 例、5 月 2 例となっている(表 1)。

(表 1) 搬入月による検体の内訳

搬入月	検体数	遺伝子検査陽性	分離培養陽性	PFGE 検体 No.	
2008 年	5 月	1	0	0	
	9 月	2	0	0	
	10 月	2	0	0	
	12 月	2	1	1	No.1
2009 年	1 月	1	0	0	
	2 月	7	2	2	No.2, 3
	3 月	19	1	1	No.4
	4 月	28	6	4	No.5, 6, 7, 8
	5 月	21	5	2	No.9, 10
計	83	15	10		

PFGE 法の泳動像は図 1、系統樹は図 2 となった。2008 年 12 月に検出された検体 No.1 はバンドパターンが明らかに異なっていた。2009 年 2 月以降に検出された No.2 から No.10 の 9 検体は 82.53%の一致率であるが、90%以上の一致率の 3 グループ(No.2,8)(No.4,5)(No.3,6,7,9,10)に分けることができた。

(図 1) PFGE 法の泳動像



さらに、LAMP 法陽性であった検体の遺伝子抽出液および分離培養された菌株を国立感染症研究所細菌第二部第五室に送付し、multilocus sequence typing (MLST)による遺伝子型別⁶⁾を依頼した。その結果、検体 No.1 は MLST-4 (*ptxA1/prn2/fim3B*)と、No.2 から No.10 は MLST-2 (*ptxA1/prn2/fim3A*)と型別された。

IV 考察

2008 年 12 月に採取された検体 No.1 と、2009 年 2 月以降に採取された検体 No.2 から No.10 までの 9 検体とは PFGE 法による泳動パターンおよび遺伝子型別がともに異なっており、この間に流行している菌の遺伝子型が変化したとも考えられる。しかし、2009 年採取の 9 検体の一致率は 82.53%と低いため、単一菌株による流行ではなく、市中に存在する異なる百日咳菌による散発的な流行が示唆された。

当所では 2009 年 5 月に、スワブからの DNA 抽出に使用するキットを QIAamp DNA Mini Kit(50)から QIAamp DNA Micro Kit(50)に変更した。これ以降、LAMP 法で陽性であるが、PCR 法では陰性で分離培養ができない検体が増えている。このことから、QIAamp DNA Mini Kit(50)にくらべ、QIAamp DNA Micro Kit(50)がわずかな菌量でも DNA 抽出ができること、LAMP 法の感度が PCR よりも良いことが推測されるが、検体数が少ないため、今後もっと事例を増やして検討する必要があると思われる。

稿を終えるにあたり、今回の調査研究に際して LAMP 法試薬を分与くださり、かつご助言をいただき

ました国立感染症研究所細菌第二部第五室の蒲地一成先生に謝辞を申し上げます。

文献

- 1) 国立感染症研究所感染症情報センター 病原微生物検出情報 (IASR), Vol. 29 p. 65-66: No. 3 (No. 337) March 2008
- 2) IASR, Vol. 29 p. 68-75: No. 3 (No. 337) March 2008
- 3) IASR, Vol. 29 p. 70-71: No. 3 (No. 337) March 2008
- 4) 病原体検出マニュアル: p. 1002-1025
- 5) Kamachi K, et al., J Clin Microbiol 44: 1899-1902, 2006
- 6) 病原体検出マニュアル: p. 1002-1025
- 7) Kamachi K, et al., J Clin Microbiol 44: 1899-1902, 2006
- 8) Han H-J, et al., Vaccine 26: 1530-1534, 2008