

Ⅲ 報告

大同生命厚生事業団地域保健福祉研究助成（平成 29～30 年度）

2016 年に流行した百日咳における病原菌検出状況と百日咳菌の遺伝子型

今野貴之

2016 年に秋田県では百日咳の大きな地域流行が確認された。百日咳の流行状況の詳細を明らかにするため、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）の検出状況を調査するとともに、検出された百日咳菌の遺伝子型（MLST 型）解析を行った。百日咳菌は、211 検体中 43 件から検出され、検出された患者らの平均年齢は 7.6 歳であった。患者らの症状への関与については不明であるが、百日咳菌が検出されなかった検体については半数からその他の病原菌が検出された。また、検出された百日咳菌 43 件の主な遺伝子型はワクチン株の遺伝子型とは異なる MLST-2 型であった。また、*ptxP* については確認された全てが毒素産生を調節する部位に変異の入った *ptxP3* であった。遺伝子型とワクチン効果の減弱との関連は不明であるが、百日咳菌の遺伝子型の変化が秋田県における 2016 年の百日咳の流行に影響した可能性が示唆された。

1. はじめに

百日咳は、小児で激しい発作性の咳などを特徴とする呼吸器感染症である。その名のとおり咳が長引き、生後 6 ヶ月以下の乳幼児では重症化し、死に至ることもある重大な感染症である。2017 年までの感染症法においては、百日咳は五類定点把握疾患に分類されていた¹⁾。

百日咳にはワクチンがあり、現在、四種混合ワクチンとして、ジフテリア、破傷風、ポリオとともに接種されており、百日咳の発生が予防されている。しかしながら、全国の小児科定点医療機関からの患者報告数は、2007 年頃から増加傾向を示している¹⁾。秋田県においても、2016 年に地域的な流行が確認され、検体数が大幅に増加した。本研究では、百日咳の流行状況の詳細を把握するため、これら百日咳疑い検体における病原菌検出状況を調査するとともに、検出された百日咳菌について遺伝子型解析を行い、2016 年の秋田県における百日咳の流行要因について検討した。

2. 方法

2.1 対象

県内医療機関から 2016 年に百日咳検査依頼のあった鼻腔拭い液 211 検体を対象にした。

2.2 病原菌の検出

DNA の抽出は、QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen)を用いて行った。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。

また、百日咳菌が検出されなかった検体については、nested-PCR 法により百日咳菌の類縁菌であるパラ百日咳菌²⁾、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³⁾、A 群溶血性レンサ球菌⁴⁾、モラクセラ・カタラリス⁵⁾、肺炎球菌⁶⁾及びインフルエンザ菌⁷⁾の検出を行った（表 1）。real-time PCR 法については、Ct 値<35 の場合を陽性と判定した。

2.3 百日咳菌の遺伝子型解析

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⁸⁾。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⁹⁾。

3. 結果

3.1 病原菌の検出状況

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 ヶ月から 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 13

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 CACCGCCTACGAGTTGGAGAT CGCTGGCTGCTGCTGCGCAA GTGGTTCCAGGCTTGCTTG	1st PCR 2nd PCR	2
クラミジア・ニューモニエ	ompA	GATCCGCTGCTGCAAACTATACT GTGAACCACTCTGCATCGTGTA TAGGCCGGGTTAGGTCTATCTACGGCAGT	5' FAM-3' TAMRA	3
A群溶血性レンサ球菌	speB	CTAAACCCCTTCAGCTCTTGGTACTG TTGATGCCTACAACAGCACTTTG CGGCGCAGGCGGCTTCAAC	5' FAM-3' TAMRA	4
モラクセラ・カタラリス	copB	GTGAGTGCCGCTTTACAACC TGATATCGCCTGCCAAGACAA TGCTTTTGCACTGTTAGCCAGCCTAA	5' FAM-3' TAMRA	5
肺炎球菌	lytA	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA TCGTGCGTTTTAATTCAGCT GCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG	5' FAM-3' TAMRA	6
インフルエンザ菌	P6	CCAGCTGCTAAAGTATTAGTAGAAG TTCACCGTAAGATACTGTGCC CATCGCATTAGGCCAACGTGTC	5' FAM-3' TAMRA	7 本研究

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。

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.

3.2 百日咳菌遺伝子型の特徴

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⁸⁾。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(図)。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。

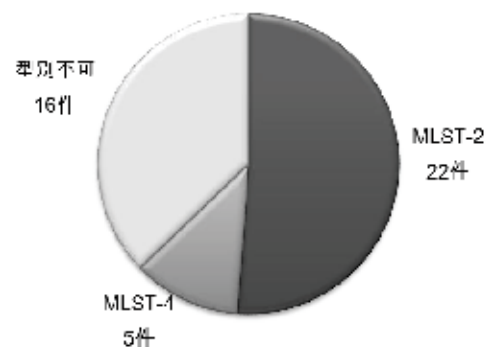


図 秋田県内で検出された百日咳菌の遺伝子型別結果の内訳

4. 考察

今回対象とした百日咳疑い検体からは43件の百日咳菌が検出された。感染症発生動向調査による患者報告数でも、2016年は秋田県における過去10年間で最大となる百日咳の流行が確認されており、検出状況と患者発生状況は一致していた。

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。また、今回の調査ではウイルスは対象にしていない。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、検査結果のみでは原因菌であるかどうか不明である。

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。現在は1981年に導入された沈降精製ジフテリア・百日咳・破傷風三種混合ワクチン（DPT）に不活化ポリオワクチンを加えた四種混合ワクチン（DPT-IPV）が定期接種され、標準的なスケジュールでは生後3ヵ月から1～2歳の間までに第Ⅰ期の接種を計4回行うことになっている。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¹⁰⁾。しかしながら、今回の百日咳が検出された患者は平均年齢からも分かるように主に小学生であり、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考えられた。

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、2016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、1991年から2007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⁸⁾、その後は全国的にMLST-2型の割合が増加しており¹¹⁾、近年の患者報告数の増加傾向と一致している。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^{12,13)}、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^{9,10)}、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2016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いることから、今後の流行に備え、その発生状況や流行要因となり得る遺伝子型等については、今後も注視していくことが必要と考えられる。

謝辞

本研究の一部は大同生命厚生事業団の地域保健福祉研究助成を受け行った。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所:百日咳 2017年1月現在, 病原微生物検出情報, **38**, 2017, 23–24.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Dunne EM., Marshall JL., Baker CA., Manning J., Gonis G., Danchin MH., Smeesters PR., Satzke C., Steer AC.: Detection of group a

- streptococcal pharyngitis by quantitative PCR, BMC Infect Dis., **13**, 2013, 312.
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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, 病原体検査マニュアル, 2011.
 - 9) Mooi FR., van Loo IH., Gent M., He Q., Bart MJ., Heuvelman KJ., 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.
 - 10) 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.
 - 11) Miyaji Y., 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.
 - 12) McGirr A., Fisman DN.: Duration of pertussis immunity after DTaP immunization: a meta-analysis, Pediatrics, **135**, 2015, 331–343.
 - 13) 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, 399-406.