

愛媛県における百日咳の流行と分子疫学について(2007~2008年)

青木紀子 吉田紀美*¹ 烏谷竜哉 浅野由紀子 田中博 井上博雄 蒲池一成*²
林正俊*³ 豊田茂樹*⁴ 中野省三*⁵

Local epidemics of pertussis and molecular epidemiology in Ehime, 2007–2008.

Noriko AOKI, Kimi YOSHIDA, Tatsuya KARASUDANI, Yukiko ASANO
Hiroshi TANAKA, Hiroo INOUE, Kazunari KAMACHI,
Masatoshi HAYASHI, Shigeki TOYOTA, Shozo NAKANO

Pertussis is a category V infectious disease to be reported by pediatric sentinel clinics under the National Epidemiological Surveillance of Infectious Disease in Japan. The annual cases reported from 38 sentinels in Ehime had been 14 or less during 2002-2006 and patients had occurred sporadically. However, after August 2007, the number of cases was reported to increase in Uwajima health center's area, and after April 2008 also in Matsuyama health center's area. Therefore, we conducted an active survey based on laboratory confirmation test and epidemiological investigation. Eighty-four nasopharyngeal swabs were obtained from pertussis suspected patients and were performed conventional single PCRs, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method, and culture for the presence of *Bordetella pertussis*. As a result, though all the 84 samples showed negative by PTp1/p2-PCR, 16 samples (19.0%) were positive by LAMP and only one sample was culture positive. We were able to judge easily and rapidly by LAMP compared with conventional PCR. Multilocus sequence type (MLST) analysis of 16 samples which were positive by LAMP revealed that four were MLST-2 and three were MLST-1 in 2007 and two were MLST-1 in 2008. These results suggest that local epidemics of pertussis in Ehime Prefecture during from 2007 to 2008 were due to the prevalence of at least two types of genetic different strains.

Keywords : Pertussis, *Bordetella pertussis*, LAMP method, MLST

はじめに

百日咳は好気性のグラム陰性桿菌である百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染による急性の呼吸器感染症であり、培養および血清学的方法によって診断されている¹⁾。しかし、培養には 7 日から 10 日間を要し、血清診断でも急性期と回復期のペア血清を必要とする¹⁾ため、迅速な

診断が不可能である。さらに、百日咳毒素 (PT) プロモータ領域をターゲットとする PCR 法では百日咳菌に対する特異性が高いものの、その感度は低いとされている²⁾。そのため、百日咳に特異的でより感度の高い診断方法として LAMP 法を用いた方法が開発され²⁾、衛生微生物協議会百日咳レファレンスセンター³⁾に試薬が配布された。

一方、百日咳は感染症発生動向調査における小児科定点把握の 5 類感染症であり、全国約 3000 の定点から患者数が報告されている⁴⁾が、1981 年の沈降精製ジフテ

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

- *1 現松山保健所, *2 国立感染症研究所
*3 市立宇和島病院, *4 みかわクリニック
*5 石丸小児科

リア・百日咳・破傷風三種混合ワクチン(DPT)導入以降、患者数は減少し⁴⁾、病院内等の集団感染事例^{5,6)}をのぞき、大規模な発生の報告はなかった。しかし、2007年5月以降、全国各地で成人の集団発生が報告され⁷⁾、定点からの患者報告数も2007年6月頃から増加する傾向が見られた⁴⁾。愛媛県での37小児科定点からの百日咳患者報告数は、2003年以降年間14人以下で推移し、県下全域で散発的な患者発生に留まっていた⁸⁾。しかし、2007年8月以降、愛媛県南部の宇和島保健所管内からの患者報告が続いた。そこで県内の小児科定点の医療機関に検体採取を依頼し、各保健所の協力を得てLAMP法およびPCR法を用いた遺伝子検査と分離培養による病原体検索を行ない、百日咳の発生状況を分子疫学的に調査したので報告する。

材料と方法

1 検査材料

2007年9月から2008年7月にかけて、感染症発生動向調査における小児科定点のうち3ヶ所の医療機関で百日咳を疑われた患者の鼻咽頭分泌物84検体を用いた。鼻咽頭分泌物はシードスワブγ2号(栄研器材)を用いて採取し、当所へ搬入された。また、患者情報はカルテに記載されている内容に基づき集計した。

2 検査方法

検査は百日咳検査診断マニュアル⁹⁾に従い、シードスワブγ2号で採取した鼻咽頭分泌物を1%滅菌カザミノ酸溶液0.5mlに懸濁した後、分離培養と遺伝子検査

(LAMP法およびPCR法)を実施した(図1)。

(1)分離培養

分離培養は、カザミノ酸に懸濁させた液をボルデテラCFDN寒天培地(日研生物医学研究所)に塗抹後、36°Cの湿潤条件下で4~7日間培養した。培養後、培地上に発育した百日咳菌が疑われるコロニーを釣菌し、PTp1/PTp2プライマーを用いたPCR法^{9,10)}により同定を行った。191bpのバンドが確認された場合、百日咳菌とした。

(2)遺伝子検査

遺伝子検査に用いるDNAの抽出にはQIAamp DNA Micro Kit(QIAGEN)を用い、「組織サンプルからのゲノムDNA分離」の方法に従って行った。キャリアRNAを添加し、溶出は25μlで行なった。この抽出液を100°Cで5分間加熱変性させた後、PCR法とLAMP法に用いた。PCR法はPTp1/PTp2プライマーを用いた^{9,10)}。LAMP法²⁾は国立感染症研究所細菌第二部で作製されたLAMP試薬キットを使用し、65°Cで40分の反応後、80°Cで2分間反応を停止させた。その後、蛍光灯下で目視により黄緑色の蛍光の有無を確認した。さらに、LAMP法で陽性となったDNA検体については国立感染症研究所細菌第二部で、Multilocus sequence typing(MLST)による遺伝子型別¹¹⁾を実施した。今回のMLST型別は百日咳菌の3種類の病原遺伝子(*ptxS1*, *prn*, *fim3*)について、塩基配列の違いを解析して菌の遺伝子型を決定した。通常は分離菌株のタイピングに使用されるが、今回はDNA検体をnested-PCRにより増幅し解析した。

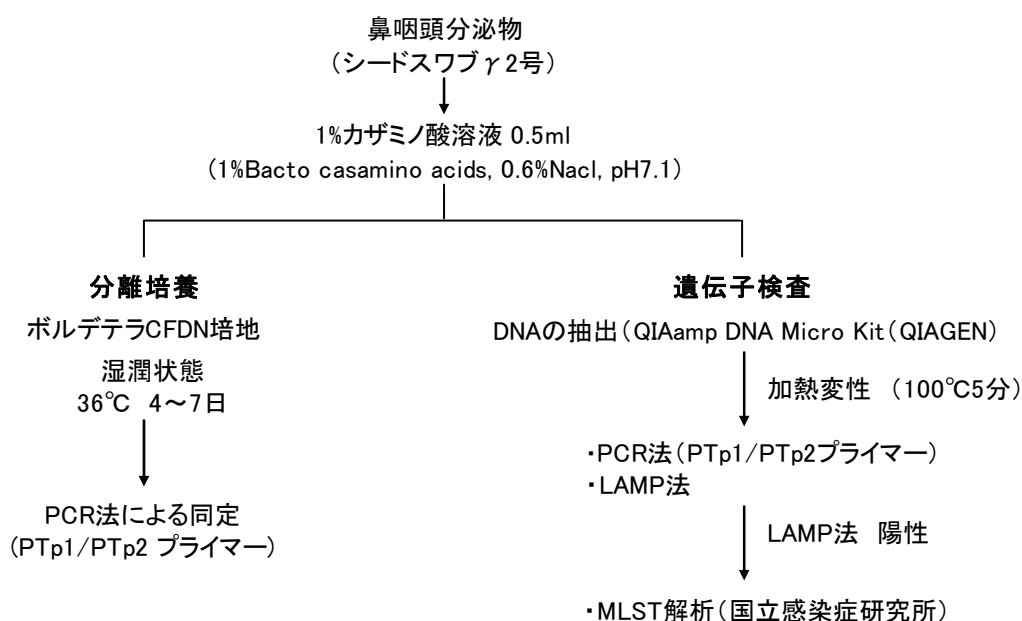


図1 検査方法

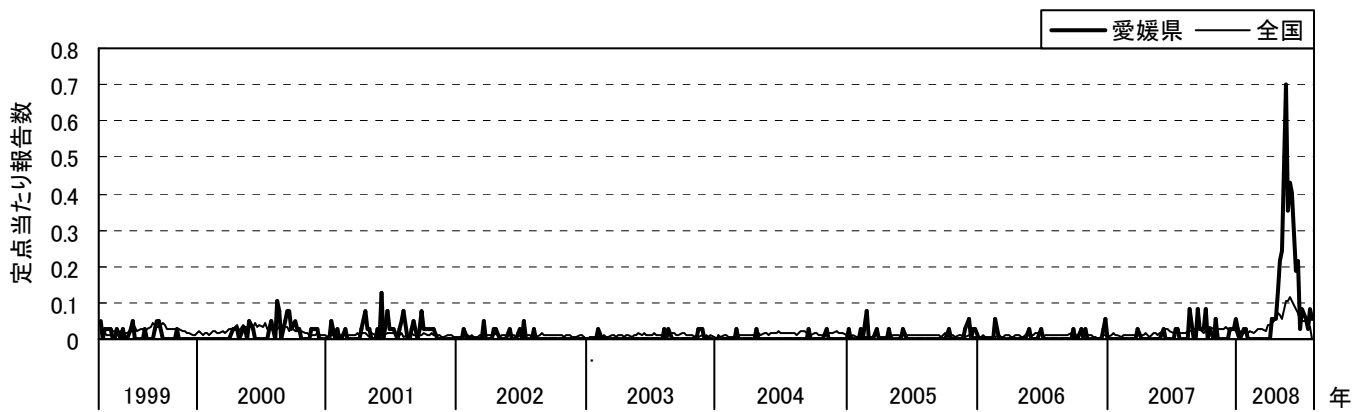


図2 全国および愛媛県における百日咳患者定点あたりの報告数（感染症発生動向調査による）

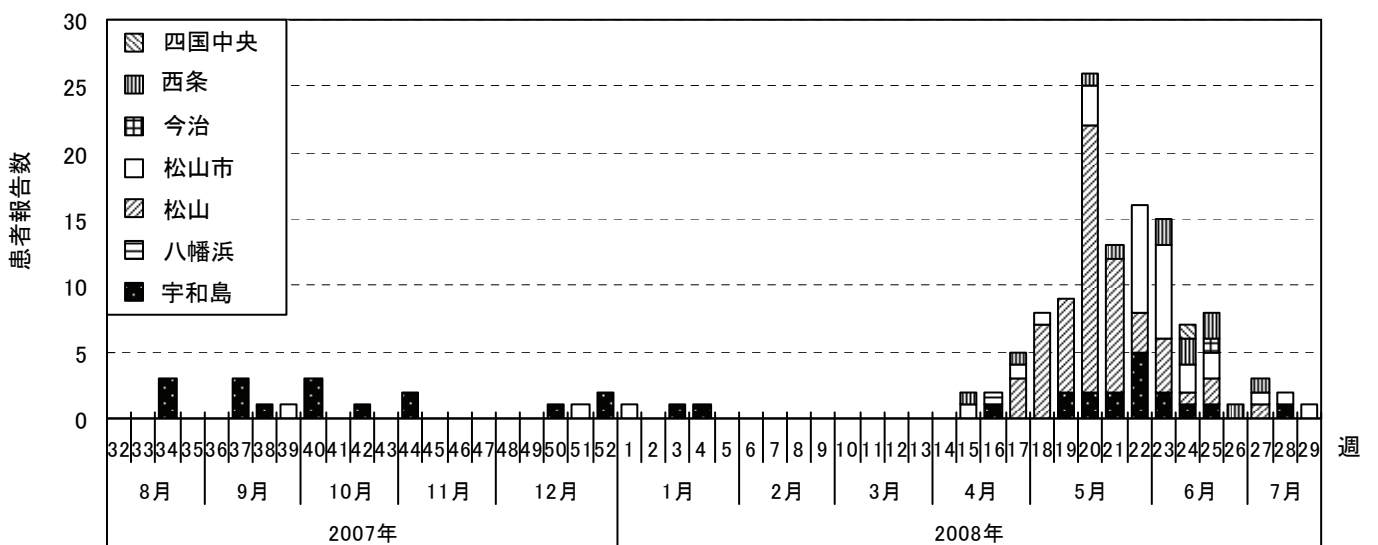


図3 愛媛県の保健所別患者報告数（感染症発生動向調査による）

結果

1 百日咳患者の発生動向

図2に感染症法施行後の1999年4月以降、感染症発生動向調査事業で集計された全国および愛媛県の定点あたりの患者報告数を示す。全国の定点あたりの患者報告数は1999年から2000年にかけて0.01から0.04であり、その後2007年まではほぼ0.01前後で、大きな変動は見られなかった。しかし2007年は6月から年末にかけて0.02から0.03と増加する傾向が見られた。2008年はさらに増加を続け、22週(5月)には1999年14週以降の過去最高となる343例が報告され、定点あたり報告数は0.11となった。一方、愛媛県での定点あたり患者報告数は、2000年から2001年にかけて0.1を超えることもあったが、2002年以降はほぼ0.05以下で推移していた。しかし、2007年8月以降、患者報告が続き、定点あたりの報告数は0.08を上回る週が見られた。患者報告は宇和島保健所管内に集中しており、8月から10月を中心に12

月以降も散発的にみられた(図3)。また2008年は全国の状況と同じく患者報告の増加が見られ、17週(4月)以降、主に松山保健所管内からの報告が増加した。20週(5月)には1999年以降最高となる26例の報告があり、定点あたりの報告数は0.7を超えた。その後も県内各地から患者報告があった。

2 患者情報

採取された84検体の患者年齢別月別検査数を表1に示す。1～4歳が36件(42.9%)で一番多かった。小児科定点からの検体ではあるものの、20歳代以降も13件(14.1%)みられた。

患者の臨床症状は、咳嗽が全員にみられその他に気管支炎18名(21.4%)、下気道炎14名(16.7%)、上気道炎13名(15.5%)などがみられた(表2)。表3に患者年齢別のDPTワクチンの接種状況を示した。84名中3回接種済みが47名、1回のみ2名、2回1名、未接種6名、残る28名については不明であった。1歳から9歳の小児

表1 患者年齢別月別検査数およびLAMP法陽性検体数

年齢層	LAMP法陽性検体数／検査数								
	計	2007年				2008年			
		9月	10月	11月	12月	2月	5月	6月	7月
0	2 / 6			1 / 2		1 / 2	0 / 1	0 / 1	
1-4	5 / 36	3 / 3	0 / 5	0 / 10	0 / 1		2 / 12	0 / 5	
5-9	7 / 21	2 / 2	2 / 4	2 / 4			1 / 8	0 / 3	
10-19	2 / 8		0 / 1	1 ^{*)} / 3			1 / 4		
20-	0 / 13			0 / 5		0 / 1	0 / 6	0 / 1	
計	16 / 84	5 / 5	2 / 10	4 / 24	0 / 1	0 / 1	5 / 32	0 / 10	0 / 1

*)百日咳菌分離

表2 患者の臨床症状

臨床症状	咳嗽	気管支炎	下気道炎	上気道炎	咽頭炎	発熱	気管支喘息	鼻水	嘔吐	腹痛	肺炎
人数	84	18	14	13	3	4	2	1	2	2	2
(%)	(100)	(21.4)	(16.6)	(15.5)	(3.6)	(4.8)	(2.4)	(1.2)	(2.4)	(2.4)	(2.4)

(n=84)

表3 DPTワクチンの接種状況

年齢層	計	未接種	1回	2回	3回	不明
0	6	3(50.0)	1(16.7)		1(16.7)	1(16.7)
1-4	36			1(2.8)	26(72.2)	9(25.0)
5-9	21	2(9.5)			15(71.4)	4(19.0)
10-	8	1(12.5)	1(12.5)		5(62.5)	1(12.5)
20-	13					13(100.0)
	84	6	2	1	47	28

人(%)

の接種率は 71～72%を示した。0 歳児の未接種者 3 名は月齢 5 ヶ月未満であった。

3 分離培養

分離培養では 1 検体(検体 No.36)から百日咳菌が分離された。ボルデテラ CF DN 培地上に生育した百日咳菌が疑われるコロニーを釣菌し、PTp1/PTp2 プライマーを用い PCR をおこなったところ 191bp のバンドを確認した(図 4)。

4 遺伝子検査

表1に LAMP 法の結果を、表 4 には LAMP 法陽性となった 16 検体の MLST 遺伝子型別の結果と患者情報について示す。PCR 法では 84 検体すべて陰性であったが、LAMP 法では 16 検体(0 歳 2 名, 1～4 歳 5 名, 5～9 歳 7 名, 10 歳代 2 名)が陽性となった。MLST 遺伝子型別は、2007 年 9～10 月の LAMP 法陽性 DNA 検体 7 件のうち 4 件が MLST-2 型と型別された。同じく 11 月の

LAMP 法陽性検体では 4 件のうち 3 件が MLST-1 型であった。2008 年は LAMP 法陽性だった 5 件のうち MLST 型別できたのは 2 検体であり、両者ともに MLST-1 型であった。

考 察

今回病原体検索を行なった検体は、感染症発生動向調査事業における小児科定点において採取されたものである。宇和島保健所管内での事例では、2007 年 8 月以降 1 小児科定点で患者報告数が増加したため、当所、保健所、医療機関の三者で検体採取の協議を行い、2008 年 2 月までに 41 件、5 月から 7 月にかけて 3 件の検体が搬入された。また、松山保健所管内での事例は、2008 年 4 月、管内の 1 開業医から保健所に百日咳流行の連絡があり、松山保健所への風邪様症状患者数の毎日報告が開始された。第 17 週から 1 小児科定点の報告数が増加し

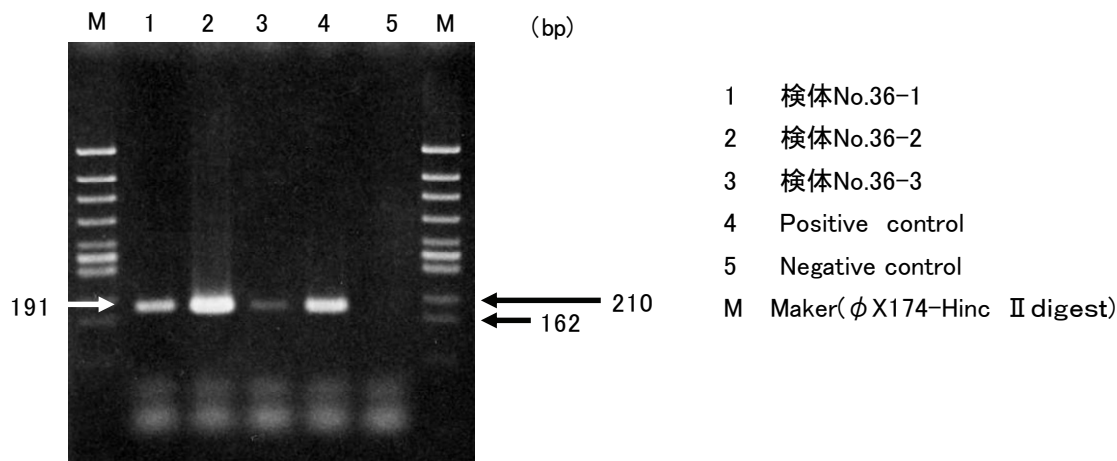


図4 百日咳菌分離株のPCR泳動像

始めたため、保健所から小児科定点へ検体採取の依頼をし、直接当所へ20件の検体が搬入された。松山市内の病原体定点は当所から直接検体採取を依頼し、20件の検体が搬入された。どの事例においても各関係機関の連携により、臨床症状、ワクチン接種状況等の患者情報と病原体の検索に必要な鼻咽頭分泌物を採取することができた。

LAMP 法陽性となった16名のDNA検体について

MLST 解析を実施した。MLST 型別は百日咳菌の3種類の病原遺伝子 (*ptxSI*, *prn*, *fim3*) について、塩基配列の違いを解析することによって菌の遺伝子型を決定する方法である¹⁾。通常は分離菌株のタイピングに使用されるが、本調査研究ではDNA検体を nested-PCR により直接増幅し解析した。2007年9~10月のLAMP法陽性DNA検体7件のうち9月の4件(検体No.07-1,3,4,5)がMLST-2型と型別された。同年の6月から7月には隣

表4 LAMP法陽性検体の患者情報およびMLST型別結果

検体NO. ¹⁾	管轄保健所	年齢	性別	DPT ²⁾	発病	検体採取日	病日	臨床症状	抗体価		培養	MLST	Allelic type		
									東浜株	山口株			<i>ptxSI</i>	<i>prn</i>	<i>fim3</i>
07-1	宇和島	8	女	+	2007/9/3	2007/9/26	23	咳嗽	320	1280	-	2	A	2	A
07-2	宇和島	6	男	+	8月末	2007/9/26	30	咳嗽	1280	2560	-	UT			A
07-3	宇和島	1	男	不明	2007/9/10	2007/9/25	15	咳嗽 発熱(38°C) 気管支炎	10	40	-	2	A	2	A
07-4	宇和島	3	男	+		2007/9/25	40	発熱(39.2°C) 咳嗽 気管支炎 上気道炎	80	160	-	2	A	2	A
07-5	宇和島	4	女	+	2007/9/15	2007/9/25	10	下気道炎 咳嗽			-	2	A	2	A
07-6	宇和島	7	男	+	2007/9/6	2007/10/1	25	気管支炎 咳嗽	1280	1280	-	UT			
07-7	宇和島	8	男	不明	9月半ば	2007/10/1	16	気管支炎 咳嗽	160	320	-	UT			
07-25 ^a	宇和島	7	女	-	2007/10/29	2007/11/5	7	咳嗽	10	40	-	1	B	1	A
07-26 ^a	宇和島	5ヶ月	男	-	2007/11/13	2007/11/16	3	気管支炎 発熱 咳嗽			-	UT		1	A
07-36 ^a	宇和島	10	女	-	2007/11/21	2007/11/28	7	上気道炎 咳嗽	10	20	+	1	B	1	A
07-39 ^a	宇和島	8	女	-	2007/11/22	2007/11/29	7	上気道炎 咳嗽	80	80	-	1	B	1	A
08-2	宇和島	9ヶ月	女	1回のみ	2008/4/15	2008/5/2	17	下気道炎 咳嗽 気管支炎			-	UT		2	A
08-19	松山	5	男	+	2008/5/18	2008/5/19	1	咳嗽 鼻汁			-	UT		2	A
08-28	松山市	12	女	+	2008/5/19	2008/5/27	8	上気道炎 咳嗽	320	320	-	UT		2	
08-29 ^b	松山市	1	男	+	2008/5/22	2008/5/29	7	上気道炎 咳嗽			-	1	B	1	A
08-30 ^b	松山市	1	男	+	2008/5/22	2008/5/29	7	発熱(37.2°C) 咳嗽			-	1	B	1	A

¹⁾: 同一アルファベットは同居家族を示す

²⁾: +: 3回以上接種 - : 未接種

県である高知県の大学および付属病院で百日咳集団感染が発生しており、関連も疑われたが、高知県での事例は MLST-1 型であり、疫学的に無関係と推察された。一方、11月の LAMP 法陽性 DNA 検体 4 件は同居家族での感染事例であり、そのうち 3 件(検体 No.07-25,36,39)は MLST-1 型と型別された。これらの結果から、愛媛県宇和島市で発生した百日咳の小流行は 2 型だけではなく、1 型による家族内発生も混在しており、その流行原因は単一でないことが推察された。また、2008 年の検体では LAMP 法陽性 DNA 検体 5 件のうち 2 件(検体 No.08-29,08-30)が MLST-1 型と型別された。この 2 件は県外在住の兄弟が帰省中に発症したが、潜伏期間から松山市での感染が推測された。残る 3 件については型別できなかったが、Allelic type(*ptxS1*, *prn*, *fim3*)の組み合わせにより、検体 No.08-29,08-30 とは異なる株であることが推察された。2007 年と同様に、複数の流行株が蔓延していたと考えられる。

高知の大学の事例ではワクチン接種歴 3 回以上の学生の発症率が低く、成人において一定の有効性があるとされている⁷が、今回 LAMP 法陽性となった 16 検体のうち、9 件は 3 回のワクチン接種歴があつたにもかかわらず百日咳に罹患していた。また、オランダではワクチンによる免疫を回避するために抗原変異株が出現した可能性があると報告されている¹²。今回、ワクチン未接種児 4 名(検体 No.07-25,26, 36,39)のうち 3 名は MLST-1 型であつた。ワクチン株である東浜株は MLST-1 型であり¹¹、ワクチン未接種との関連が指摘されるが、2 名の患児(検体 No.08-29,08-30)がワクチン三回接種にもかかわらず、MLST-1 型であつたため、その関連については不明である。

今回、LAMP 法を用いた百日咳菌の病原体検索を実施した。現在、百日咳の診断には長期間持続する咳や典型的な咳のほか、リンパ球の増加等、臨床診断が実施されている。確定診断には細菌学的または血清学的診断を必要とするが、菌分離や抗体価測定等の確定診断法はいずれも数日以上検査日数を必要とする。今回用いた LAMP 法は従来の PCR 法に比べて簡便で感度が高く特異度にも優れている²。この LAMP 法の試薬は、国立感染症研究所細菌第二部で開発され、百日咳レファレンスセンターに配布されたものである。操作の上で DNA の抽出に手間はかかるものの、反応時間は 45 分程度であり、特別な装置を必要とせず蛍光灯下の目視で明瞭に判定できるという利点を有している。非典型的な臨床症状の感

染初期患者にも迅速な診断が可能であるため、病院等の検査室でも利用が可能であると思われる。今後、この LAMP 法による百日咳診断法の普及が望まれる。

まとめ

感染症発生動向調査において愛媛県内での百日咳患者の多発を察知した。小児科定点、保健所の協力を得て、患者の検体採取を行ない、鼻咽頭ぬぐい液 84 検体を用いて病原体検索を行なった結果、

1 PCR 法では陰性であつたが、LAMP 法では 16 検体が陽性となり、迅速かつ明瞭な判定が可能であつた。

2 1 検体から百日咳菌が分離され、PCR 法を用いることにより確実に同定することができた。

3 MLST 型別では 2007 年 9 月から 10 月の 4 検体が MLST-2 型、11 月の 3 検体が MLST-1 型、2008 年 5 月の検体が MLST-1 型と型別され、愛媛県内での流行原は単一株によるものではないことが示唆された。

今回の調査にあたり、ご協力いただいた松山保健所および宇和島保健所の関係各位にお礼申し上げます。

文献

- 1) Mattoo et al.: J Clin Microbiol Rev.18, 326-382 (2005)
- 2) Kamachi et al.: J Clin Microbiol.44,1899-1902 (2006)
- 3) 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, 29, 42 (2008)
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター 感染症発生動向調査 <http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html>
- 5) 野孝之ほか: 感染症学雑誌. 75,916-922 (2001)
- 6) 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,26,64-66 (2005)
- 7) 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,29,68-73 (2008)
- 8) 愛媛県感染症発生動向調査事業報告書 <http://www.pref.ehime.jp/040hokenhukushi/140eikanken/kanjyo/index.htm>
- 9) 百日咳検査診断マニュアル 国立感染症研究所
- 10) 前側恒男ほか: 福井県衛生研究所年報.31,81-82 (1992)
- 11) Hyun-ja et al.: Vaccine.26,1530-1534 (2008)
- 12) Mooi et al.: Infect Immun.66,670-675 (1998)