

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

宮地 悠輔

専攻分野：小児科学

コース：

指導教授：山本 仁

主論文の題目：

Genetic Analysis of *Bordetella pertussis* Isolates from the 2008-2010 Pertussis Epidemic in Japan

(2008-2010年に発生した百日咳流行の細菌学的解析)

共著者：

Nao Otsuka, Hiromi Toyoizumi-Ajisaka, Keigo Shibayama, Kazunari Kamachi

緒言

百日咳は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、主にワクチン未接種の小児が感染する。百日せきワクチンの導入により百日咳の罹患率・死亡率は有意に減少したが、近年多くの先進国でワクチン既接種者である青年・成人患者の増加が認められている。青年・成人患者は重症化し易い乳児の感染源となることが問題視されており、日本においては2008-2010年に大規模な百日咳流行が発生した。本研究では2008-2010年の百日咳流行の原因を考察することを目的に、百日咳流行株の細菌学的解析を行った。

方法・対象

2002-2012年に国内で臨床分離された百日咳菌134株を供試し、流行前-1(2002-2004年; 23株)、流行前-2(2005-2007年; 39株)、流行時(2008-2010年; 33株)、流行後(2011-2012年; 39株)に区分して解

析を行った。遺伝子多型解析は4種類の病原遺伝子（百日咳毒素プロモーター：*ptxP*、百日咳毒素 S1 サブユニット遺伝子：*ptxA*、パータクチン：*prn*、絨毛 3：*fim3*）について行い、病原性への関与が指摘される *ptxP3*、*ptxA1*、*prn2*、*fim3B* 遺伝子の経時変化を解析した。表現型解析は Fim2 と Fim3 の有無により血清型を決定し、Prn の蛋白発現はイムノブロット法により解析した。百日咳菌の遺伝子型は multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) 法により解析し、流行前後の MLVA タイプ (MT) の変化を系統樹解析した。さらに MT を指標とする流行株の多様度はシン普森の多様度指数 (DI) を用いて解析した。なお、本研究は臨床分離株についての解析であり、倫理上の問題点は発生しない。

結果

遺伝子多型解析において、2002 年以降 *ptxP3*、*ptxA1*、*prn2* の各遺伝子型の増加が認められたが、この増加は 2008-2010 年の流行とは無関係であった。一方、*fim3B* を有する菌株は 2002-2004 年が 4.3%、2005-2007 年が 12.8%、2008-2010 年が 30.3%、2010-2011 年が 5.1% を示し、流行時に *fim3B* を有する菌株の一時的な増加を認めた。表現型解析では流行時に Prn 発現株の一時的な増加が認められたが、統計学的な有意差を認めなかった ($P > 0.05$)。同様に Fim2 と Fim3 の血清型にも流行との相関は認められなかった。

遺伝子多型解析により、解析を行った 134 株は 24 タイプに分類され、さらに遺伝子多型との組み合わせで 28 タイプに分類可能であった。流行時に増加が認められた *fim3B* 株は MT26、MT27d、MT27e、MT32、MT69 の 5 タイプに分類され、2008-2010 年の流行時には MT27d のみが認められた。MT27d の分離率は 2002-2004 年が 0%、2005-2007 年が 5.1%、2008-2010 年が 30.3%、2011-2012 年が 0% を示し、流行時に一時的に増加したことが判明した。なお、MT27d の血清型は Fim3、Fim2, 3 であり、全株が Fim3 発現株であった。同様に全株が Prn 発現株であった。さらに、遺伝子型の多様度は 2002-2004 年に 0.74、2005-2007 年に 0.85、2008-2010 年に 0.77、2011-2012 年に 0.59 を示し、流行後に多様度の減少が認められた。

考察

本研究により、2008-2010 年の百日咳流行時に百日咳菌 MT27d 株の関与が指摘された。MT27d 株は *fim3B*、*ptxP3*、*ptxA1*、*prn2* の遺伝子型を有し、表現型として Fim3 と Prn を発現する流行株であった。世界的に *ptxP3*、*ptxA1*、*prn2* の遺伝子型を有する百日咳菌の増加が認められ、これらの遺伝子型は百日咳再興との関連が論議されている。しかし、本

研究では 2008-2010 年の流行時に *ptxP3*、*ptxA1*、*prn2* 遺伝子との関連は見出されず、百日咳流行とは無関係であると考察された。

百日咳流行は世界的に散発しており、2000 年代に入ってからカナダ、ヨーロッパ、オーストラリアで大規模な流行が認められている。これらの流行では *fim3B* 株の関与が報告されており、さらに米国では百日咳再興と *fim3B* 株の出現に強い相関が認められている。一方、オランダでは 2000 年代初頭に *fim3B* 株の一時的な増加が認められたが、その後 2010 年には *fim3* 株は消失した。本研究でも流行後の 2011-2012 年には MT27d 株は分離されておらず、オランダと同様な現象が認められている。MT27d 株は百日咳流行だけでなく、近年の百日咳再興とも関与する可能性が示唆され、今後 MT27d 株の病原性に関し詳細な検討が必要である。

オランダで発生した百日咳流行では流行株の遺伝子型に変化が認められている。本研究でも流行時に遺伝子型に変化が認められたことから、流行株の遺伝子型解析は流行の早期探知に有効と考えられた。

結論

本研究により、2008-2010 年の百日咳流行と百日咳菌 MT27d 株との関連が強く示唆された。*fim3B* を有する MT27d 株は近年他国で流行する百日咳菌と共通の遺伝子型を持つことから、日本以外でも MT27d 株が大規模な百日咳流行を引き起こす可能性は否定出来ない。百日咳流行を監視する上で、今後 MT27d 株に着目した病原体サーベイランスが重要である。