

病原体検出マニュアル

百日咳

第 3.0 版

2020 年 9 月改訂

目次

(1) 百日咳感染症の概要	2
(2) 検査に関する一般的注意	
1. 検査材料の採取	2
2. 検査材料の輸送	3
3. 検査の進め方	3
4. 検査の判定	4
(3) 検査方法	
1. 百日咳菌の分離、同定、保存	4
2. 百日咳類縁菌の分離、同定、保存	8
3. 抗百日咳菌抗体の検出	10
4. IS481 PCR による百日咳菌 DNA の検出	11
5. リアルタイム PCR による百日咳菌とその類縁菌の検出	13
6. LAMP 法による百日咳菌とその類縁菌の検出	21
7. PFGE による遺伝子型別	22
8. MLVA 法による遺伝子型別	25
9. マクロライド耐性菌の検出	28
(4) 引用文献	31
(5) 検査依頼先	32
(6) 執筆者一覧	33
(7) 百日咳レファレンスセンター	33

(1) 百日咳感染症の概要

百日咳は咳嗽を主訴とする細菌性の呼吸器感染症であり、ワクチン予防可能疾患 (Vaccine Preventable Diseases, VPD) の一つに含まれる。患者の多くはワクチン接種前の乳児や未接種の小児であるが、近年ではワクチン効果が減弱した青年・成人層の感染が新たな問題となっている。百日せきワクチンの免疫持続期間は 4~12 年と見積もられており、多くの先進国で青年・成人患者の増加が認められている。日本でも 2002 年以降成人患者が急増し、近年では小学生を中心に患者数の集積が認められている。青年・成人の保菌者は重篤化し易い乳幼児の感染源になることに注意が必要である。なお、わが国では百日咳毒素および繊維状赤血球凝集素を主要抗原とする精製百日せきワクチン (acellular vaccine) が接種されている。

百日咳の主な原因菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) であり、患者の上気道分泌物の飛沫や直接接触により感染し、経気道的に伝播される。百日咳菌以外にヒトに感染する *Bordetella* 属細菌としてパラ百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*) と *Bordetella holmesii* が挙げられるが、その感染割合は低く (<1%)、百日咳感染のほとんどが百日咳菌に由来する⁽¹⁾。百日咳菌は麻疹ウイルスと同様に強い感染力を有するため、医療関連感染や学校・職場などでの集団感染を容易に引き起こす。感染症発生動向調査では全数把握対象の 5 類感染症に分類され、原則として実験室診断により確定した症例が報告されている。2018 年の患者報告数は 11,946 例、2019 年は 16,785 例であった。

百日咳に罹患した乳幼児は、遷延性の咳嗽以外に百日咳の特徴的な吸気性笛声・痙咳発作を示すため臨床診断は容易である。一方、青年・成人患者の臨床像は非典型的であり、遷延性咳嗽だけのことが多い。そのため、同様な臨床像を示すマイコプラズマ肺炎、クラミジア肺炎、ライノウイルス感染症といった他の呼吸器感染症との鑑別が必要となる。現在、百日咳の実験室診断には菌培養検査、血清学的検査、遺伝子検査が用いられており、特に早期診断に有効な遺伝子検査はここ 10 年でめざましい進歩を遂げている。本稿では百日咳菌以外にヒトへの感染が確認されているパラ百日咳菌と *B. holmesii* についてもその検査法を解説する。

(2) 検査に関する一般的注意

1. 検査材料の採取

菌分離のための検体採取方法として、1) 咳嗽平板法、2) 鼻咽頭分泌物培養法、3) 喀痰培養法の 3 法が用いられる。咳嗽平板法は患者の咳嗽時に平板培地を口から 10~15 cm くらいの距離で暴露させたものを培養する。本法は分離菌数が少ないものの純培養に近い状態で菌が得られることがある。喀痰培養法は患者から喀出された痰を培養する方法で、鼻咽頭

分泌物の培養と同様に混在菌が多く培養される欠点がある。咳嗽平板法は百日咳菌用培地を常時準備しておく必要があること、さらに乳幼児からの喀痰採取は難しいことから、検査材料には鼻咽頭分泌物が一般的に用いられる傾向がある。

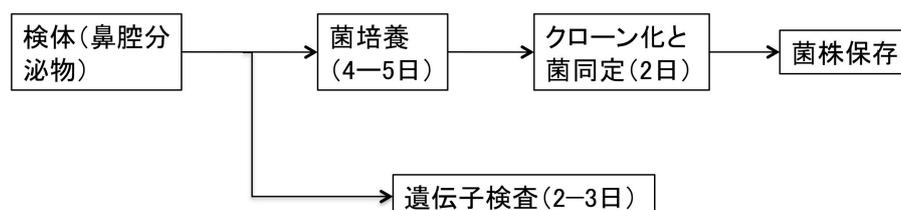
鼻咽頭分泌の採取はまず患者の頭を動かさないようによく押さえ、その後、滅菌綿棒を患者の後鼻腔に静かに挿入して粘液を採取する。百日咳菌は綿棒に含まれる不飽和脂肪酸により増殖阻害を受けるため、不飽和脂肪酸を含まないレーヨン性の綿棒（コレクトスワブ R アルミ軸、栄研化学）などを使用する。また、菌培養等で再検査する必要性を考え、綿棒 2 本分の検体を採取することが望ましい。検体を保存する場合、翌日に菌培養を行うのであればそのまま 4℃に保存する。また、長期（1~2 週間程度）に保存するのであれば -80℃に保存する。菌培養を中心に検査を行う場合は、検体採取に市販の検体保存輸送用シードスワブを使用する。咳嗽平板法および喀痰培養法の詳細については成書⁽²⁾があるので、そちらを参照して頂きたい。

2. 検査材料の輸送

検査材料（鼻咽頭分泌物など）の他施設への輸送は、短期間（1 日以内）であれば冷蔵で行う。輸送に数日を要する場合は雑菌の増殖を抑えるため冷凍で輸送し、可能ならばドライアイスの存在下で輸送する。検体にはバイオセーフティレベル 2 の百日咳菌が存在すると考え、輸送は各施設で決められた方法に準拠して行う。分離菌株の他施設への輸送は、菌株を新しい培地に塗布し、2~3 日後に生育が確認できたものを常温にて移送する。なお、夏季などに輸送中の温度上昇が懸念されるときは冷蔵で輸送する。

3. 検査の進め方

検体（鼻咽頭分泌物）を採取したら直ちに菌培養を行うことが望ましい。直ちに培養が出来ない場合は検体を -80℃に凍結保存する。検査は最初に菌培養を行い、続いて残ったサンプルを用いて遺伝子検査を実施する。ワクチン既接種者である青年・成人患者の保菌量は少ないため⁽³⁾、菌培養検査のほとんどが陰性となる。そのため、菌培養検査を実施せず、遺伝子検査を直接行っても良い。以下に百日咳の検査手順と検査日数を示した。



百日咳検査の手順。検査に必要な日数を括弧内に示した

抗生剤投与前の乳児患者の場合、培養による百日咳菌検出率は第1病週にはほぼ100%であるが、病週を追うごとにその検出率は低下する⁽²⁾。第6病週の検出率は20%にまで低下し、第8病週を過ぎると菌を検出することはできない。また抗生物質を投与した場合、投与3~4日後の菌分離成績はほとんど陰性となる。そのため、死菌の状態でも菌検出が行える遺伝子検査を進めることが重要となる。乳児の場合、抗生剤投与3週間までは遺伝子検査が陽性になると報告されている⁽⁴⁾。

4. 検査の判定

菌培養検査は培養7日後に判定を行い、百日咳菌が分離されなかった場合は培養陰性とする。ただし、菌培養検査の陽性率は低いため、百日咳菌の感染を直ちに否定することは出来ない。一方、高感度な遺伝子検査で陰性となった場合、百日咳菌感染の可能性は低く、百日咳類縁菌（パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii*）や他の細菌性およびウイルス性感染症の関与を疑う。なお、百日咳は5類感染症の全数把握疾患であり、感染症法の届出基準では次にあげるいずれかの検査所見が原則として必要となる。1) 分離・同定による病原体の検出、2) PCR法による病原体の遺伝子の検出（LAMP法を含む）、3) 抗体の検出。

(3) 検査方法

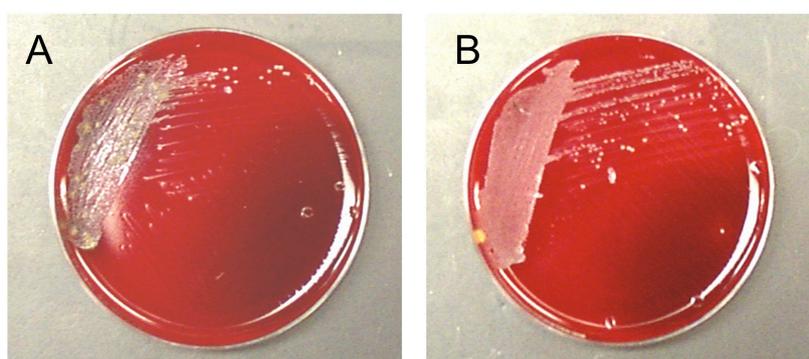
1. 百日咳菌の分離、同定および保存

百日咳菌の分離には Bordet-Gengou 血液寒天培地（BG 培地）、サイクロデキストリン寒天培地（CSM）⁽⁵⁾が一般的に用いられている。いずれの培地も雑菌の増殖を抑制するために抗菌薬（セファレキシン；CEX）を添加する。CSM 培地は長期保存（約4ヶ月）が可能であり、ボルデテラ CFDN 寒天培地として日研生物医学研究所から市販されている（製品コード P96511-005）。ボルデテラ CFDN 培地は CEX の代わりに 8 µg/mL のバンコマイシンと 4 µg/mL のセフジニルを含む。ここでは CEX 添加 BG 培地またはボルデテラ CFDN 寒天培地を用いて百日咳菌を分離する方法について解説する。

菌分離法

- ① 寒天培地（CEX 添加 BG 培地またはボルデテラ CFDN 寒天培地）を常温に戻す。培地表面が濡れている場合は軽く乾燥させる
- ② 鼻咽頭分泌物を拭った綿棒（患者検体）を直接寒天培地に塗り広げる。気管支吸引痰の場合、10 µL のディスク白金耳を用いて検体を塗り広げる。塗布後の綿棒は約 1 mL の生理食塩水に懸濁し、遠心後、遺伝子検査に供試する

- ③ 36~37℃のインキュベーターで7日間培養する。培養中の乾燥を防ぐため、プレートに適当な容器に入れる（蒸留水で湿らせたキムタオルも入れる）。また、培養期間中は定期的に観察を行い、培養状態を把握しておく
- ④ 百日咳菌は培養 4~5 日後に直径約 1 mm 以下の小さな集落を形成する。真珠または水銀様の光沢のある集落を選択し、菌同定のため再度新しい BG 培地（CEX 不含）に植え継ぐ
- ⑤ 抗菌薬非添加の培地では雑菌の増殖は速いため、1 日でコロニーを形成したものは雑菌と判断して問題はない。一方、継代培養 3 日後にコロニー形成が認められたものは百日咳菌の可能性が高い。被菌株について菌同定を行い、百日咳菌であることが確認されたら菌株保存を行う



百日咳患者組織からの百日咳菌の分離例。(A) 気管支組織洗浄液、(B) 右肺実質組織洗浄液。気管支組織洗浄液には百日咳菌の他に多数の雑菌の生育が認められる。一方、肺組織洗浄液ではほぼ純培養で百日咳菌の生育が認められる

試薬

- 20 µg/mL CEX 添加 BG 培地：蒸留水 250 mL に 9 g の Bacto-Bordet Gengou agar base dehydrated (Difco) と 3 g のグリセロールを加え、オートクレーブ（121℃、15 min）により滅菌する。滅菌後、50℃にまで冷却し、50 mL の馬脱繊維血（ジャパン・バイオシーラム）と 1.2 mL のセファレキシシン（5 mg/mL、ろ過滅菌）を添加する。添加後、シャーレ 1 枚あたり 17~25 mL を分注する。必要に応じ 36~37℃のインキュベーターに一晩置き、無菌性を確認する。無菌性を確認したら、乾燥しないように適当な容器に入れ、4℃に保存する

注意点

- 青年・成人患者の鼻咽頭分泌物には雑菌が多く存在し、百日咳菌の存在割合はかなり少ない。雑菌により百日咳菌の生育が阻害されるため、菌分離率はおおよそ 10%以下である
- 近年鼻腔常在細菌の薬剤耐性化が進み、CEX の添加効果が低くなっている。国外では 40 µg/mL CEX 添加の BG 培地が推奨されているが、その濃度では百日咳菌の増殖速度も遅

くなる。そのため、CEX は 20 µg/mL で使用することを勧める

- 炭酸ガス培養は百日咳菌の増殖を阻害する可能性があるため使用しない。過去の論文では炭酸ガス培養も散見されていたが、現在では使われていない
- 百日咳菌は肉眼で認められる集落を形成するのに、少なくとも 3 日以上の培養を必要とする。そのため、培養 2 日以前に発育した菌は百日咳菌ではないと考えて間違いはない。培養 7 日目になっても百日咳菌様集落が見つからない場合は、菌培養を陰性とする
- BG 培地は作製後、4℃に保存し、約 1 ヶ月以内に使用する

同定法

百日咳菌の同定は抗百日咳菌血清を用いたスライド凝集法により行う。ただし、臨床分離株には自己凝集能が強い菌株が認められることがある。自己凝集により菌同定が出来なかった場合、菌同定は遺伝子解析（16S rRNA 遺伝子のシーケンスまたは LAMP 法）により行う。なお、*Bordetella* 属の 16S rRNA 遺伝子配列は相互に類似性が非常に高く、種の判別までは行えない。そのため、*Bordetella* 属細菌が確認されたら、後述する遺伝子検査により菌種を同定する。

スライド凝集反応

- ① 培養増菌した被検株を白金耳でかき取り、生理食塩水に均等に浮遊させる。菌液濃度は $2\sim 5 \times 10^{10}$ cells/mL ($A_{600} \approx 1\sim 2$) が適当である
- ② スライドグラス上で百日せき I 相菌免疫血清「生研」（デンカ株式会社）と菌液を各 1 滴（25 µL 程度）混和する。4~6 枠のスライドグラスを使うと便利である
- ③ 陰性対照には抗血清の代わりに生理食塩水を用い、被検株が凝集しないことを確認する
- ④ 判定は明瞭な凝集塊が認められたものを陽性とする。陰性対照で自然凝集が認められたときは判定保留とする

注意点

- 自己凝集は CSM 培地やボルデテラ CFDN 培地で培養したときに強く認められる。被検株を BG 培地で培養すると自己凝集が抑制されることが多い
- 混和後、直ぐに凝集塊が形成されないことがある。その場合、乾燥を防いだ状態で静置し、15 分間後に再度観察する

16S rRNA 遺伝子のシーケンス⁽⁶⁾

- ① 被菌株を蒸留水に懸濁し、95℃ 10 min の加熱処理により DNA を抽出する。遠心操作により上清を得る

- ② 下記の条件で PCR 増幅 (98°C 10 sec、55°C 30 sec、68°C 2 min、30 cycle) を行い、増幅産物をシーケンスする。プライマーは 16S-10F と 16S-800R、16S-10F と 16S-1500R のいずれかの組み合わせにより行う。PCR 酵素には KOD FX 以外の Taq polymerase も使用できる

反応組成

2×KOD FX buffer	7.5
2 mM dNTPs	3.3
3 pmol/μL 16S-F	1.0
16S-800R or 16S-1500R (3 pmol/μL)	1.0
Template DNA	1.0
KOD FX (1 U/μL, TOYOBO)	0.5
DW	0.7
Total	15 μL

16S-10F: GTTTGATCCTGGCTCA
16S-800R: TACCAGGGTATCTAATCC
16S-1500R: TACCTTGTTACGACTT

- ③ 得られた DNA 配列を BLAST 解析し、菌種を同定する

百日咳菌の保存法

菌株の短期保存は百日咳菌用培地 (BG 培地、CSM 培地、ボルデテラ CFDN 寒天培地) にやや多めの菌量を接種し、36°C で約 1 日間培養後、乾燥を避けて冷蔵庫等の冷暗所に静置することにより行う。長期保存の際は凍結保存を行う。ここではスキムミルクを用いた凍結保存法について解説する。

凍結保存法

- ① 百日咳菌用培地に分離菌株を接種し、約 1~2 日間培養する
- ① 菌体 (培地 0.5 枚分程度) を滅菌綿棒で回収し、2~3 mL の滅菌 10% スキムミルク溶液に懸濁する
- ② 懸濁液をセラムチューブ等に約 0.2 mL ずつ分注し、フリーザー (-80°C) に保存する。使用の際は、菌液を半解凍させた後、適当量 (1~10 μL) を BG プレートなどに塗布し、残りは再度凍結保存する。国立感染症研究所ではこの方法で 10 年以上菌株を保存・維持している

試薬

- 10% スキムミルク溶液 : 蒸留水 100 mL に 10 g のスキムミルク (Difco) を溶解する。溶解しない場合は超音波処理により均一に分散する。希水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7.4 に合わせ、オートクレーブ滅菌する。保存は 4°C で行う。超音波処理を行わなかった場合、

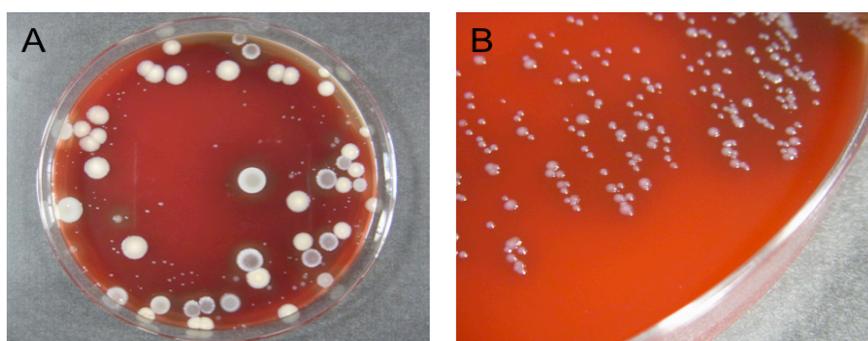
オートクレーブ処理後にスキムミルクの沈殿物が多量に発生することがある

2. 百日咳類縁菌の分離、同定、保存

百日咳菌の類縁菌であるパラ百日咳菌の分離・保存は百日咳菌と同様に行い、同定は挿入配列 IS1001 の有無をリアルタイム PCR により確認する ((3)-5 リアルタイム PCR による百日咳菌とその他類縁菌の検出を参照)。一方、*Bordetella holmesii* は高濃度のセファレキシシに感性を示すため、百日咳菌と異なる分離培地を必要とする。

Bordetella holmesii の分離法

B. holmesii はセファレキシシ (CEX) に感受性があるため、一般に百日咳菌の分離に用いられる CEX 20 µg/mL 添加 BG 培地や CEX 40 µg/mL 添加 charcoal agar (CA 培地) は使用できない。CEX を培地に添加する場合は、最終濃度を 5 µg/mL までとする。また、CEX 5 µg/mL 添加サイクロデキストリン加固形培地 (CSM 培地) や市販の CFDN 寒天培地 (日研生物医学研究所) でも分離できるが、菌の発育が遅れる傾向がある。ここでは市販の血液寒天培地を用いて *B. holmesii* を分離する方法を述べる。



Bordetella holmesii の臨床検体からの分離例。(A) 鼻腔スワブの懸濁液を直接塗布。(B) 純培養例。いずれも血液寒天培地で 36°C 培養 4 日目。A では雑菌の生育が見られる。小型の白いコロニーが *B. holmesii* である

- ① CEX 5 µg/mL 添加サイクロデキストリン加液体培地 (CEX-CLM 培地) 1 mL を入れた小試験管を準備する
- ② 検体 (鼻咽頭分泌物を拭った綿棒) を CEX-CLM 培地に入れ懸濁し、*B. holmesii* の分離および遺伝子検出に用いる。同時に百日咳菌の分離、遺伝子検出にも用いる
- ③ 検体懸濁液を市販の血液寒天培地に 1 白金耳塗抹する
- ④ 血液寒天培養 1 日目に出現したコロニーは *B. holmesii* ではないので、コロニーの大小に関わらず、除外するためにマークしておく
- ⑤ 血液寒天培養 2~3 日目に真珠様の光沢のある微細なコロニーが出現したら、グラム染色を行い、グラム陰性短桿菌であることを確認する

- ⑥ グラム陰性短桿菌が確認できたら *B. holmesii* を疑い、新しい血液寒天培地に純培養する
 ⑦ 培養は7日目まで行い、グラム陰性短桿菌が確認できなければ分離陰性とする

試薬

以下の組成に従って Basal medium、supplement、セファレキシン溶液を作製する。輸送用培地 (CEX-CLM) は 100 mL の Basal medium に対し、1 mL の supplement と 100 μ L のセファレキシンを添加し、1mL ずつ小試験管に分注する。密栓して冷蔵保存しておく。

Basal medium

mono-グルタミン酸ナトリウム	10.7 g
L-プロリン	0.24 g
NaCl	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
KCl	0.2 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 g
CaCl ₂	0.02 g
Tris	6.1 g
カザミノ酸 (Difco)	0.5 g
ヘプタキス (2,6 ジ- O-メチル) β シクロデキストリン	1.0 g
	fill up to 1,000 mL

pH を 7.4 に合わせ、121°C 15 分間滅菌する。すぐに使用しない場合は冷蔵保存しておく。なお、上記組成に寒天 (Difco agar) 15.0~18.0 g を加えれば CSM 培地となる

Supplement

L-システイン · 1 水塩	40 mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	10 mg
アスコルビン酸	20 mg
ナイアシン	4 mg
還元型グルタチオン	150 mg
	fill up to 10 mL

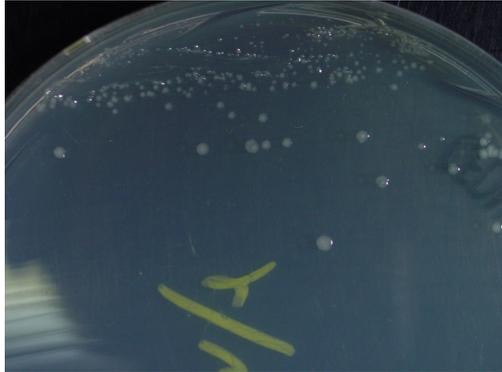
ろ過滅菌し、-20°C で凍結保存しておく

- 5 mg/mL セファレキシン : 4 mL の蒸留水に 20 mg のセファレキシンを溶解後、1 mL ずつ分注する。すぐに使用しない場合は-30°C で凍結保存しておく
- カザミノ酸溶液 : 1% カザミノ酸 (Difco)、0.6% NaCl, pH 7.1、オートクレーブ滅菌する

注意点

- CEX-CLM 培地を準備できない場合はカザミノ酸溶液からでも分離できる。ただし雑菌が多い場合は、血液寒天培地の代わりに CEX 5 μ g/mL 添加 CSM 培地や CFDN 寒天培地を用いたほうがよい
- 血液寒天培地が無い場合は CEX 非添加の BG 培地や CA 培地でもよい
- 遺伝子検査 (*B. holmesii*-LAMP、IS481 real-time PCR) が陰性となった場合、菌分離はほとんど期待できない

- CFDN 培地では菌増殖が遅くなる傾向が認められ、コロニー形成に 6 日間程度を要する



CFDN 培地を用いた *Bordetella holmesii* の分離例。百日咳菌に比較して、コロニーが小さく、色が薄い

B. holmesii の同定と保存

菌同定は *recA* 遺伝子のシーケンスまたは *B. holmesii*-LAMP 法により実施し、菌株保存は百日咳菌に準じて行う。以下に *recA* 遺伝子のシーケンス法を示す。

- ① 被菌株であるコロニーを釣菌し、蒸留水 50 μ L が入った PCR チューブに懸濁する。95 $^{\circ}$ C、10 min の加熱処理により DNA を抽出する
- ② 以下の反応組成で PCR 増幅 (98 $^{\circ}$ C 10 sec、68 $^{\circ}$ C 30 sec、30 cycle) を行う

2 \times KOD FX buffer	7.5
dNTPs	3.3
3 pmol/ μ L <i>recA</i> -F	1.0
3 pmol/ μ L <i>recA</i> -R	1.0
Template DNA	1.0
KOD-FX (TOYOBO)	0.33
DW	0.87
<hr/> Total	<hr/> 15 μ L

recA-F: CATGGACGACAAAACCCAGCAAG
recA-R: TCGATTCGGCCTTGCGCACC

- ③ 常法に従って PCR 増幅産物 (0.1~0.5 μ L) をシーケンスする。BLAST 解析により得られた配列が *B. holmesii* の *recA* と 100%一致することを確認する。PCR 増幅産物のサイズは 489 bp である

3. 抗百日咳菌抗体の検出

現在欧米では百日咳毒素 (PT) に対する血清診断が採用されており、わが国でも百日咳菌抗体キット (百日せき抗体 EIA「生研」) がデンカ株式会社から販売されている。本キットは ELISA 用 8 ウェルストリップに PT または繊維状赤血球凝集素 (FHA) が固相化されており、

標識二次抗体を用いた間接法により患者血清中の抗 PT-IgG および抗 FHA-IgG 抗体価を測定する。単血清を用いた診断基準値は各国で異なり、確実な診断を下すためにはペア血清を用いた測定が必要である。患者から異なった時期（急性期、回復期）に採血した血清を用い、抗 PT-IgG 抗体価が有意に上昇していることを確認する。抗 PT IgG を用いた診断では患者のワクチン歴を考慮する必要がある、WHO では免疫系が十分に発達していない乳児および百日せきワクチン接種後 1 年未満の患者には適用できないとしている。また、感染後の抗体誘導には時間がかかるため、米国 CDC では IgG 抗体を用いた診断は発症 2 週間後からの適用を推奨している。測定方法については診断キットに詳しい説明書が添付されているので、そちらを参照して頂きたい。

2016 年に百日咳菌の IgA と IgM 抗体を測定する百日咳抗体測定キット（ノバグノスト百日咳/IgM、/IgA、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス）が体外診断薬として承認された。この IgM と IgA 抗体はワクチン接種の影響を受けないことから、単血清での診断が可能とされている。また、IgM 抗体は IgG 抗体より早期に誘導されることから、本法は百日咳の早期診断に有用とされている。ただし、健常者の抗百日咳菌 IgA 抗体価は中高年層で高く、一方、抗 IgM 抗体価は小児と若年層で高いことが報告されている⁽⁷⁾。これらの年齢群は偽陽性を含むため判定には注意を要する。

4. IS481-PCR による百日咳菌 DNA の検出

百日咳菌はゲノム中に挿入配列 IS481 を 50~250 コピー持つため、IS481 を標的とする PCR は高感度に百日咳菌を検出できるという利点を持つ⁽⁸⁾。しかし、*Bordetella holmesii* ならびに一部の気管支敗血症菌（*Bordetella bronchiseptica*）も IS481 を保有することから特異性が低いという欠点がある。ただし、本法は *Bordetella* 属細菌に特異的であることから、リアルタイム PCR 装置が普及するまでは百日咳菌の標準的な遺伝子検査法であった。以下にそれぞれの遺伝子検査が検出する *Bordetella* 属細菌を示した。

各遺伝子検査が検出する *Bordetella* 属細菌

菌種	LAMP 法		リアルタイム PCR		
	BP-LAMP	BH-LAMP	IS481	IS1001	BH recA
<i>B. pertussis</i>	+	-	+	-	-
<i>B. parapertussis</i>	-	-	-	+	-
<i>B. holmesii</i>	-	+	+	-	+
<i>B. bronchiseptica</i>	-	-	+/-	-	-

+/- : 一部の菌を検出

臨床検体からの DNA 精製

DNA 精製にはさまざまな方法があるが、市販の DNA 抽出キットを用いると便利である。ここでは市販の DNA 抽出キット (QIAGEN QIAamp DNA Micro Kit) を用いる方法について解説する (キット添付の日本語プロトコール「組織サンプルからのゲノム DNA 分離」参照)。

- ① 鼻腔分泌物を採取した綿棒または菌培養検査後の綿棒を約 1 mL の生理食塩水に懸濁する。懸濁した検体溶液を 1.5 mL の遠心チューブに入れ、15,000 rpm で 10 分遠心する
- ② 上清を捨て、180 μ L の Buffer ATL および 20 μ L の Proteinase K を添加する。攪拌後、56°C で一晩インキュベートする
- ③ 200 μ L の Buffer AL を添加し攪拌する。必要に応じ 1 μ L のキャリア RNA を添加する。あらかじめキット添付のキャリア RNA を Buffer AE に溶かし、20 μ L ずつ凍結保存しておくこと便利である
- ④ 200 μ L のエタノールを添加し、攪拌後、室温で 5 分間インキュベートする
- ⑤ QIAamp MinElute カラムに全量を移し、8,000 rpm で 1 分間遠心する
- ⑥ ろ液を捨て新たなコレクションチューブをセットし、500 μ L の Buffer AW1 を添加する。フタを閉めて 8,000 rpm で 1 分間遠心する
- ⑦ ろ液を捨て新たなコレクションチューブをセットし、500 μ L の Buffer AW2 を添加する。フタを閉めて 8,000 rpm で 1 分間遠心する
- ⑧ ろ液を捨て新たなコレクションチューブをセットし、最高速度 (15,000 rpm) で 3 分間遠心する
- ⑨ QIAamp MinElute カラムを新しいマイクロチューブにセットし、25 μ L の Buffer AE をカラム中央に添加する。フタを閉め室温で 1 分間インキュベートする
- ⑩ 最高速度 (15,000 rpm) で 1 分間遠心し、DNA 画分を回収する。すぐに検査しない場合は DNA 検体を -20°C で凍結保存する

PCR 反応

- ① 以下の反応組成で PCR 増幅 (94°C 15 sec、56°C 15 sec、72°C 15 sec、35 サイクル) を行う

10×PCR buffer	1.5
dNTPs	1.5
3 pmol/ μ L BP1	1.0
3 pmol/ μ L BP2MOD	1.0
Template DNA	1.0
Taq DNA polymerase	0.1
DW	8.9
<hr/>	
Total	15 μ L

BP1: GATTCAATAGGTTGTATGCATGGTT
BP2MOD: TGGACCATTTTCGAGTCGACG

- ② PCR 反応後、反応液 2 μL を 3%アガロースゲル電気泳動分析に供試する。泳動後、0.5 μg/mL のエチジウムブロマイド溶液で染色し、トランスイルミネーターを用いてバンドを検出する。151 bp のバンドが認められたとき陽性と判定する

注意点

- PCR を行う際は必ず陽性コントロールと陰性コントロールをおく。陽性コントロールには精製した百日咳菌 DNA (10 ng) を使用する。陽性コントロール (百日咳菌東浜株 DNA) は国立感染症研究所から分与可能である
- Takara EX Taq では増幅が上手く行かない場合がある。Takara Taq と KOD-FX (TOYOBO) では良好な増幅結果が得られている

5. リアルタイム PCR による百日咳菌とその類縁菌の検出

リアルタイム PCR 装置の普及により、現在百日咳の実験室診断として世界的に広く用いられている方法である。本法の感度は高く、10 fg DNA (百日咳菌として 2.4 個) を検出できる。また、増幅産物の電気泳動を必要としないため、迅速な判定、さらには実験室汚染の防止に有用である。ここでは ABI7500 と TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法について解説する。

百日咳菌 (IS481 real-time PCR)

- ① 臨床検体からの DNA 抽出・精製は「(3)-4 IS481-PCR による百日咳菌 DNA の検出」に従う
- ② 本法は IS481 を標的とし、下記の反応組成ならびにプライマー、プローブを用いる⁽⁹⁾。ABI7500 Real-time PCR system と ABI7500Fast Real-time PCR system では反应用量および増幅条件が異なることに注意する

TaqMan プライマー配列 (5' to 3')

PPert	ATCAAGCACCGCTTTACCC	sense primer
APPert	TTGGGAGTTCTGGTAGGTGTG	antisense primer
SPert	FAM-AATGGCAAGGCCGAACGCTTCA-TAMRA	probe

ABI7500 Real-time PCR system を使用する場合

反応組成

2×Premix (Premix EX Taq, RR039A, Takara)	25.0
10 μM PPert	4.5
10 μM APPert	4.5
5 μM SPert	2.5
Template DNA	4.0
ROX reference dye II (Takara)	1.0
DW	8.5
Total	50 μL

反応条件

Stage 1 (Reps: 1) 95°C (10 sec)
Stage 2 (Reps: 45) 95°C (15 sec), 57°C (1 min)

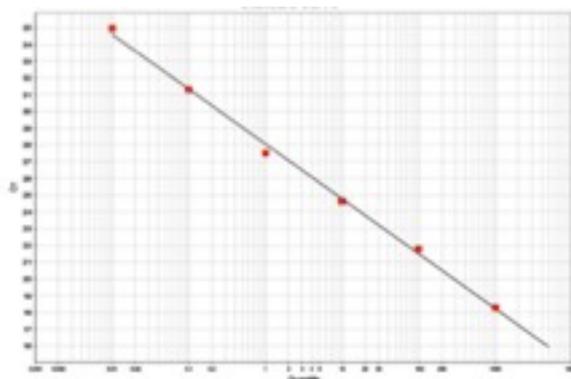
ABI7500Fast Real-time PCR system を使用する場合

反応組成

2×Premix (Premix EX Taq, RR039A, Takara)	10.0
10 μM PPert	1.8
10 μM APPert	1.8
5 μM SPert	1.0
Template DNA	2.0
ROX reference dye II (Takara)	0.4
DW	3.0
Total	20 μL

反応条件

Stage 1 (Reps: 1) 95°C (15 sec)
Stage 2 (Reps: 40) 95°C (3 sec), 57°C (30 sec)



IS481 real-time PCR の検量線

- ③ template DNA を除いたマスターミックスを各チューブに入れ、次いで検体 DNA、陽性コントロール、陰性コントロール (DW を使用) を入れる。陽性コントロールには百日咳菌東浜株 DNA (5 pg/μL) を使用し、各チューブに 2 μL を添加する。陽性コントロールは国立感染症研究所から分与可能である
- ④ プレートをシールまたはチューブの蓋を閉め、リアルタイム PCR 装置のマニュアルに従

って Run を行う。なお、蛍光検出には FAM と TAMRA を設定する

- ⑤ Run 終了後、陽性コントロールが増幅され、陰性コントロールが増幅していないことを確認する。検体のうち、有意な増幅が認められたものを陽性と判定する

注意点

- 本法は百日咳菌以外に *B. holmesii* および一部の気管支敗血症菌 (*B. bronchiseptica*) も陽性となることに注意する。ただし、百日咳菌以外の *Bordetella* 属感染は稀なので臨床上特に問題とはならない
- 解析終了後はプレートシールを剥がしたり、チューブの蓋を開けたりしない。実験室汚染を防ぐため、オートクレーブをせずにそのまま廃棄する
- 蛍光プローブの分解を防ぐため、強い光を当てない

パラ百日咳菌 (IS1001 real-time PCR)

- ① 臨床検体からの DNA 抽出・精製は「(3)-4 IS481-PCR による百日咳菌 DNA の検出」に従う
- ② 本法はパラ百日咳菌に特異的な挿入配列 IS1001 を標的とし、IS1001 はゲノム中に 20~21 コピー程度存在する。PCR 反応には下記の反応組成ならびにプライマー、プローブを用いる⁽⁹⁾。ABI7500 Real-time PCR system と ABI7500Fast Real-time PCR system では反応用量および増幅条件が異なることに注意する

TaqMan プライマー配列 (5' to 3')

PParaP	GATATCAACGGGTGACGGATC	sense primer
APParaP	GTATGCCAACCCAGTTCGAA	antisense primer
SParaP	FAM-TGCTGCAATCGAGCAACGTGCA-TAMRA	probe

ABI7500 Real-time PCR system を使用する場合

反応組成

2×Premix (Premix EX Taq, RR039A, Takara)	25.0
10 μM PParaP	4.5
10 μM APParaP	4.5
5 μM SParaP	2.5
Template DNA	4.0
ROX reference dye II (Takara)	1.0
DW	8.5
Total	50 μL

反応条件

Stage 1 (Reps: 1) 95°C (10 sec)
Stage 2 (Reps: 45) 95°C (15 sec), 57°C (1 min)

ABI7500Fast Real-time PCR system を使用する場合

反応組成

2×Premix (Premix EX Taq, RR039A, Takara)	10.0
10 μM PParaP	1.8
10 μM APParaP	1.8
5 μM SParaP	1.0
Template DNA	2.0
ROX reference dye II (Takara)	0.4
DW	3.0
Total	20 μL

反応条件

Stage 1 (Reps: 1) 95°C (15 sec)
Stage 2 (Reps: 40) 95°C (3 sec), 57°C (30 sec)

- ③ template DNA を除いたマスターミックスを各チューブに入れ、次いで検体 DNA、陽性コントロール、陰性コントロール (DW を使用) を入れる。陽性コントロールにはパラ百日咳菌 BAA-587 DNA (5 pg/μL) を使用し、各チューブに 2 μL を添加する。陽性コントロールは国立感染症研究所から分与可能である
- ④ プレートをシールまたはチューブの蓋を閉め、リアルタイム PCR 装置のマニュアルに従って Run を行う。蛍光検出には FAM と TAMRA を設定する。
- ⑤ Run 終了後、陽性コントロールが増幅され、陰性コントロールが増幅していないことを確認する。検体のうち、有意な増幅が認められたものを陽性と判定する

注意点

- 本法はパラ百日咳菌 (*B. paraptussis*) に特異的である
- 解析終了後はプレートシールを剥がしたり、チューブの蓋を開けたりしない。実験室汚染を防ぐため、オートクレーブをせずにそのまま廃棄する
- 蛍光プローブの分解を防ぐため、強い光を当てない

Bordetella holmesii (recA real-time PCR)

- ① 臨床検体からの DNA 抽出・精製は「(3)-4 IS481-PCR による百日咳菌 DNA の検出」に従う
- ② 本法は *B. holmesii* の *recA* 遺伝子を特異的に増幅し、PCR 反応には下記のプライマー、プローブおよび反応組成を用いる⁽¹⁰⁾

TaqMan プライマー配列 (5' to 3')

BHrecA_fwd	CGGTTTCGCTGGGTCTCG	sense primer
BHrecA_rev	CCCGCGGCAGACCAC	antisense primer
TaqMan MGB_recA	VIC-CATCGCATTGGGCG-NFQ/MGB	probe

ABI7500Fast Real-time PCR system を使用するときの組成

反応組成

2×Premix (Premix EX Taq, RR039A, Takara)	10.0
16 μM BHrecA fwd	1.0
16 μM BHrecA_rev	1.0
8 μM TaqMan MGB_recA	1.0
Template DNA	2.0
ROX reference dye II (Takara)	0.4
DW	4.6
Total	20.0 μL

反応条件

Stage 1 (Reps: 1) 95°C (15 sec)
Stage 2 (Reps: 45) 95°C (3 sec), 60°C (30 sec)

- ③ template DNA を除いたマスターミックスを各チューブに入れ、次いで検体 DNA、陽性コントロール、陰性コントロール (DW を使用) を入れる。陽性コントロールには *B. holmesii* ATCC51541 DNA (50 pg/μL) を使用し、各チューブに 2 μL を添加する。陽性コントロールは国立感染症研究所から分与可能である
- ④ プレートをしールまたはチューブの蓋を閉め、リアルタイム PCR 装置のマニュアルに従って Run を行う。なお、蛍光検出には VIC と NFG-MGB を設定する
- ⑤ Run 終了後、陽性コントロールが増幅され、陰性コントロールが増幅していないことを確認する。検体のうち有意な増幅が認められたものを陽性と判定する

注意点

- 本法は *B. holmesii* に特異的である
- 解析終了後はプレートシールを剥がしたり、チューブの蓋を開けたりしない。実験室汚染を防ぐため、オートクレーブをせずにそのまま廃棄する
- 蛍光プローブの分解を防ぐため、強い光を当てない

4Plex リアルタイム PCR

本法は 4 種類の病原体 (百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii*、*Mycoplasma pneumoniae*) を 1 反応チューブで鑑別可能なマルチプレックス PCR 法である⁽¹⁾。標的遺伝子には挿入配列 IS481 と IS1001、さらに *recA* および *atpD* を使用し、4 種類の蛍光色素により遺伝子増幅を検出する (下表)。なお、一部のプローブとプライマーは IS481 real-time PCR と *recA* real-time PCR のものと共通としている。本キット (プレミックス、混合プライマー & プローブ、ROX dye II、陽性コントロール) は国立感染症研究所から分与可能である。

Target organism	Target gene	Reporter	Quencher
百日咳菌 & <i>B. holmesii</i>	IS481	FAM	NFQ-MGB
<i>B. holmesii</i>	<i>recA</i>	VIC	NFQ-MGB
パラ百日咳菌	IS1001	NED	NFQ-MGB
<i>M. pneumoniae</i>	<i>atpD</i>	Cy5	BHQ3

- ① 臨床検体からの DNA 抽出・精製は「(3)-4 IS481-PCR による百日咳菌 DNA の検出」に従う
- ② PCR 反応には下記のプライマーとプローブの混合溶液を使用する

Target (organism)	Primer or probe	Sequence (5' to 3')	Reporter/Quencher	Amplicon (bp)	Optimal conc. (nM)
IS481 (<i>B. pertussis</i> & <i>B. holmesii</i>)	PPertM	ATCAAGCACCGCTTTACCCG*		114	300
	APPert	TTGGGAGTTCTGGTAGGTGTG			300
	SPertM	CAAGGCCGAACGCTT*	FAM/NFQ-MGB	200	
<i>recA</i> (<i>B. holmesii</i>)	BHrecA-F	CGGTTGCTGGGTCTCG		50	400
	BHrecA-R	CCCGCGGCAGACCAC			400
	BHrecA-P	CATCGCATTGGGCG	VIC/NFQ-MGB	300	
IS1001 (<i>B. parapertussis</i>)	PParaP	GATATCAACGGGTGACGGATC		103	300
	APParaP	GTATGCCAACCAGTTCGAA			300
	SParaM	TGCAATCGAGCAACG*	NED/NFQ-MGB	100	
<i>atpD</i> (<i>M. pneumoniae</i>)	Mp3-F	CGATCTATGTGCCAGCTGATGA		68	200
	Mp3-R	AGCATCCAGGTGGGTAAAGGT			200
	Mp3-P	TTGACTGACCCCGCTCCGGC	Cy5/BHQ3	100	

*原報のオリゴ DNA 鎖長を変更

ABI7500Fast Real-time PCR system を使用する場合

反応組成

2×Premix (Premix EX Taq, RR039A, Takara)	10.0
Mixed primers & probes	2.0
Template DNA	2.0
50×ROX reference dye II (Takara)*	0.2
DW	5.8
Total	20.0 μL

*50×ROX dye II の調製法: ROX dye I を DW で 5 倍希釈し、-20°C に小分分注する。Takara では 0.4 μL の添加を推奨しているが、ここでは 0.2 μL を使用する

反応条件

Stage 1 (Reps: 1)	95°C (15 sec)
Stage 2 (Reps: 40)	95°C (3 sec), 60°C (30 sec)

- ③ template DNA を除いたマスターミックスを各チューブに入れ、次いで検体 DNA、陽性コントロール、陰性コントロール（NC、DW を使用）を入れる。陽性コントロールは各チューブに 2 μ L を添加する。以下に陽性コントロールの濃度と添加量を示した

陽性コントロール DNA	DNA conc. (pg/ μ L)	添加量 (pg/well)
百日咳菌東浜株	5	10
<i>Bordetella holmesii</i> ATCC51542	50	100
パラ百日咳菌 BAA-587	5	10
<i>Mycoplasma pneumonia</i> NBRC14401	0.5	1.0

- ④ プレートをシールまたはチューブの蓋を閉め、リアルタイム PCR 装置のマニュアルに従って Run を行う。蛍光検出の設定は以下に従い、Y 軸の Δ Rn は真数表示とする

Target	Reporter	Quencher
IS481	FAM	NFQ-MGB
<i>recA</i>	VIC	NFQ-MGB
IS1001	NED	NFQ-MGB
<i>atpD</i>	Cy5	none

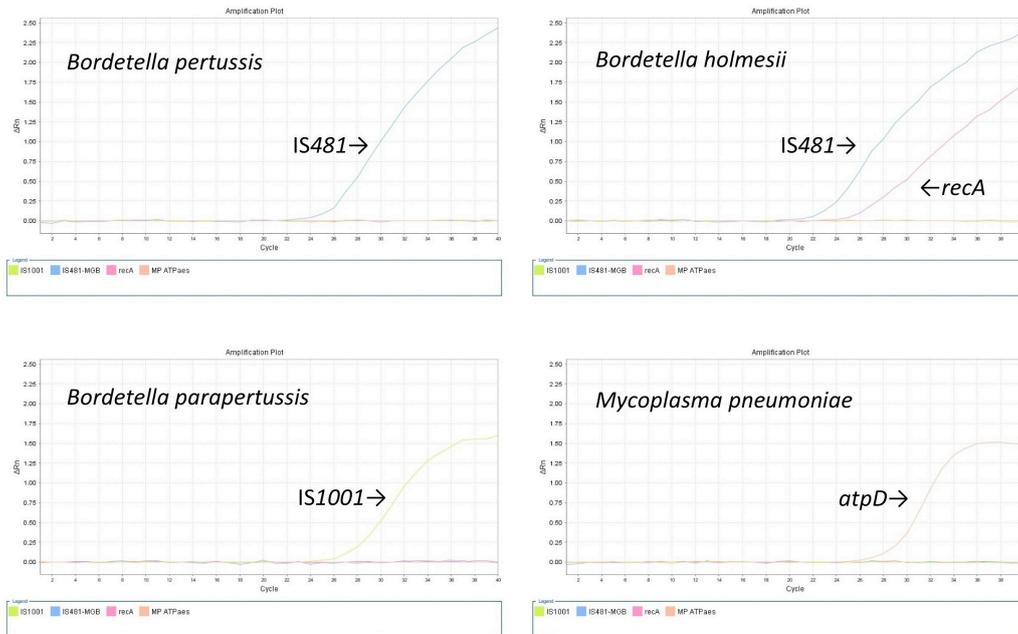
- ⑤ Run 終了後、Threshold Line (Δ Rn) を 0.3 に設定する。検体のうち、 Δ Rn が 0.3 を超えたものを陽性と判定する。なお、IS481 は百日咳菌と *B. holmesii* の両菌に存在し、IS481 が陽性で *recA* が陰性の場合は百日咳菌と判定する（下表）。一方、IS481 と *recA* の両者が陽性の場合は *B. holmesii* と判定する

	IS481	<i>recA</i>	IS1001	<i>atpD</i>
百日咳菌	+	-		
<i>B. holmesii</i>	+	+		
パラ百日咳菌			+	
<i>M. pneumoniae</i>				+

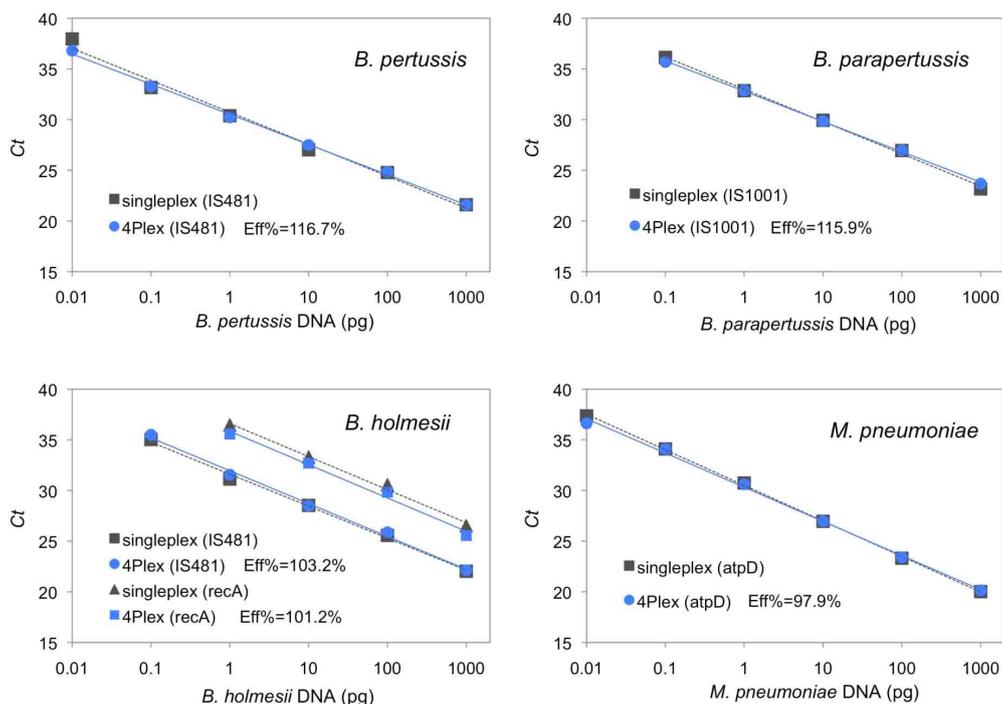
注意点

- 本法では百日咳菌と *B. holmesii* の重複感染は *B. holmesii* と判定されることに注意する
- 解析終了後はプレートシールを剥がしたり、チューブの蓋を開けたりしない。実験室汚染を防ぐために、オートクレーブをせずにそのまま廃棄する
- 蛍光プローブの分解を防ぐため、強い光を当てない
- PCR 反応には Premix EX Taq を使用する。他社の Premix 製品では安定したベースラインが得られない

- IS481 は検出感度が高いため、環境中からのコンタミネーションなどにより偽陽性が出やすい。陰性コントロールで増幅が認められた場合はカットオフ値 (ΔRn) を高めに再設定する ($\Delta Rn=0.5$)
- 純正品以外の PCR チューブやプレートには蛍光検出を阻害するものがある。事前に陽性コントロールが正しく検出されることを確認する



4Plex リアルタイム PCR における陽性コントロールの増幅



4Plex リアルタイム PCR の検量線. Single リアルタイム PCR との比較

6. LAMP 法による百日咳菌とその類縁菌の検出

LAMP 法は一定温度で DNA 増幅反応が進むため、恒温槽や PCR 装置を使って簡便に検査が出来るという利点を有する。通常、判定には専用の濁度測定装置が使われるが、蛍光目視検出試薬（栄研化学）を使った目視判定も可能である。百日咳菌の検出感度は 10 fg genomic DNA/tube（百日咳菌 2.4 個に相当）であり、IS481 リアルタイム PCR と同等な感度を有する。現在体外診断薬として Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D（LMP542、栄研化学）が販売されており、本稿では百日咳菌 LAMP 検査の説明は割愛する。興味のある方は原著論文⁽¹¹⁾を参照して頂きたい。ここでは、*Bordetella holmesii* の LAMP 検査⁽¹²⁾について解説する。

BH-LAMP (*Bordetella holmesii*)

- ① 臨床検体からの DNA 抽出・精製は、「(3)-4 IS481-PCR による百日咳菌 DNA の検出」に従う
- ② BH 混合プライマー、反応溶液 (2×RM)、DW、陽性コントロールを解凍し、軽く遠心した後、氷上に置く。DNA 検体は一本鎖にするため煮沸 (5 min) または PCR 装置で 95℃、5 分間の処理を行う。加熱後、急冷し氷上に置く
- ③ 1.5 mL チューブに DNA 検体 (template DNA) を除いたマスターミックスを作製する。氷上に LAMP 反应用チューブ (または 0.2 mL PCR クリアーチューブ) を置き、各チューブに 23 μ L のマスターミックスを分注する

2×reaction mixture, RM	12.5
<i>Bst</i> -DNA polymerase	1.0
混合プライマー	6.0
Template DNA	2.0
DW*	3.5
Total	25 μ L

*目視判定を行うときは、2.5 μ L の DW と 1.0 μ L の Fluorescent detection reagent (FD、栄研化学) を添加する

LAMP プライマーの配列

Primer	Type	Sequence (5' to 3')
BH-F3	F3	GCTCTCCCAGATCGAAAAGC
BH-B3	B3c	TCGGCGATGACCTGCA
BH-FIP	F2-F1c	CAGCGAACC GGTGGAACGAATGCGCTACGGCGACAATG
BH-BIP	B1-B2c	ATTGGGCGTGGGTGGTCTGCGTGTGTCAGCGTGGTCTTGC
BH-LB	LB	GTCGTAGAAATCTACGGCCCCG

- ④ チューブに 2 μ L の検体 DNA を添加する。陽性コントロールには 2 μ L の BH-recA、陰性コントロールには 2 μ L の DW を添加する。ふたを閉め軽くタッピングした後、遠心操作

により反応液をチューブの底に集める

- ⑤ チューブをリアルタイム濁度測定装置または PCR 増幅装置にセットし、67℃で 60 分間反応を行う。反応停止は 80℃、5 分間の処理により行なう
- ⑥ 判定は濁度測定装置の自動判定により行う（判定値を 0.1 に設定）。蛍光目視試薬を使用した場合は、蛍光の有無を目視により確認する。なお、陽性検体ではチューブの底に白色の沈殿物があることを確認する

試薬

- BH 混合プライマーは下記の組成で調製し、300 μL ずつ小分け分注する。-20℃で保存する

100 pmol/ μL BH-FIP	240
100 pmol/ μL BH-BIP	240
100 pmol/ μL BH-LB	120
100 pmol/ μL BH-F3	30
100 pmol/ μL BH-B3	30
TE-8	2940
Total	3600 μL

- *B. holmesii* の LAMP キットと陽性コントロール（BH-recA、100 fg DNA/ μL ）は、地方衛生研究所に分与可能である

注意点

- 本法は *B. holmesii* の *recA* 遺伝子を標的とし、*B. holmesii* に特異的である。ただし、反応温度 65℃では稀に非特異的増幅が認められることがある。そのため、反応は必ず 67℃で行う
- 検出感度は 50 fg genomic DNA/tube であり、*B. holmesii* のリアルタイム PCR と等しい感度を有する
- HPLC により精製された LAMP プライマーを使用する

7. PFGE による遺伝子型別

パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) は電場の方向を変化させることにより、通常の電気泳動法では分離できなかった巨大 DNA 断片をその長さに従って分離することができる。百日咳菌の臨床分離株は多様な遺伝子型を持つことが知られており、PFGE 解析は家族内感染や院内感染の解析に有効である。ここでは制限酵素 *Xba*I を用いた PFGE 法について解説を行う。

プラグ調製

- ① -80℃に保存していた菌株を百日咳菌用平板培地 (BG 培地等) の隅に塗布し、36℃で 2~3

日間培養を行う

- ② 菌の生育が認められたらプレート全面に塗り広げ、さらに 1 日間培養を行う
- ③ 菌体を滅菌綿棒で回収し、TE-8 に懸濁する。菌濃度は $A_{650} = 0.5$ に調整する
- ④ 0.5 mL の菌液に等量の 1%低融点アガロース溶液 (50℃) を加え、攪拌後、プラグモールドに分注する。プラグモールドを氷上に 20 分間置き、アガロースを固化させる。なお、1 検体当たり 2 個のプラグを作製する
- ⑤ 14 mL ラウンドチューブ (ファルコン、2059) にプラグを移し、1 mL のプロテアーゼ溶液を入れる。55℃で一晩、穏やかに振盪する
- ⑥ プロテアーゼ溶液を捨て、10 mL の TE-8 でプラグを洗浄する。洗浄後、5 mL の TE-8 および 50 μ l の 40 mg/mL PMSF を加え、55℃で穏やかに振盪する
- ⑦ 1 時間後、氷中に移し冷却する。冷却後、溶液を捨て、10 mL の TE-8 で再度洗浄する。洗浄後、2.5 mL の 0.5 M EDTA (pH 8.0) を加え、4℃に保存する

制限酵素処理

- ① プラグを 1/3 に切断し、切断したプラグ片を 10 mL の TE-8 が入ったラウンドチューブに移す。室温で 1 時間以上穏やかに振盪し、プラグ中の EDTA を除く。なおプラグを切断する際は、サランラップを敷き、その上で顕微鏡用のカバーガラスを用いて切断すると良い
- ② 1.5 mL チューブに 1 mL の制限酵素用緩衝液を入れ、プラグ片をその中に移す。1 時間程度穏やかに振盪し、プラグを制限酵素用緩衝液に平衡化する
- ③ 制限酵素用緩衝液を除き、200 μ L の制限酵素 XbaI 溶液を加える。37℃で一晩穏やかに振盪する
- ④ 制限酵素溶液を除き、1 mL の 0.5×TBE を加える。泳動するまで 4℃に保存する。なお、泳動は当日中に行う必要がある

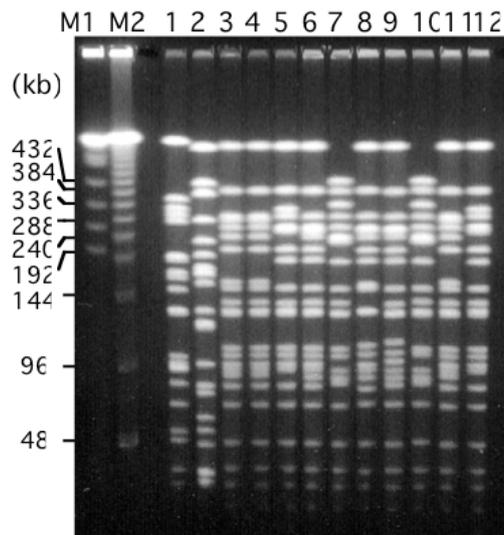
電気泳動

電気泳動は使用するパルスフィールド電気泳動装置の取り扱い説明書に従って行う。ここでは CHEF Mapper (Bio-Rad) を用いてパルスフィールド電気泳動を行う方法について解説する。

- ① 0.5×TBE 溶液を用いて 1%アガロースゲルを作製する。アガロースは PFGE 用に市販されているものを使用する。SeaKem GTG agarose (BioWhittaker Molecular Applications) などが適している
- ② 制限酵素処理を行ったプラグ片をサンプル溝に挿入する。サンプル溝はあらかじめ 0.5×TBE を満たし、プラグを壊さないように注意して挿入する。プラグを挿入した後、キムワイプで 0.5×TBE を除き、1%低融点アガロース (50℃) でシールする。市販の分子量

マーカーもサンプル溝に挿入し、シールする

- ③ 約 2 L の 0.5×TBE を泳動槽に入れ、泳動バッファーを循環させながら 14℃に冷却する。14℃に冷却されたらアガロースゲルをセットし、最小分子量 20 kbp、最大分子量 300 kbp の条件で泳動を開始する。自動設定では 6.0 V/cm、2.98 sec→26.29 sec、泳動時間は約 27 時間となる
- ④ 泳動終了後、0.5 µg/mL のエチジウムブロマイド溶液で 1 時間染色する。染色後、蒸留水で 1 時間洗浄し、トランスイルミネーターを用いてバンドを検出する



百日咳臨床分離株の PFGE 解析例。M1: *S. cerevisiae* marker, M2: Lambda marker, Lane 1: 百日咳菌 (18323 株), Lane 2: 百日咳菌 (東浜株、ワクチン株)、Lane 3~12: 国内で分離された百日咳臨床分離株

試薬および器具

- TE-8 : 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
- プラグモールド : ディスポーザブルプラグモールド (No. 170-3713, Bio-Rad)
- 20×TBE : 1 M Tris, 20 mM Na₃EDTA, 0.97 M ホウ酸, pH 8.2
- プロテアーゼ溶液 : 0.5 M EDTA (pH 8.0) に Proteinase K を終濃度 0.5 mg/mL、Na-sarkosyl を 1% (w/v)になるように溶解する
- 1%低融点アガロース溶液 : 低融点アガロース (SeaPlaque agarose, BioWhittaker Molecular Applications) を 0.5×TBE に終濃度 1%(w/v)となるように溶解する
- 40 mg/mL PMSF : 0.4 g の PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を 10 mL のイソプロパノールに溶解する。4℃保存。使用時は 55℃に加熱し、生成した結晶物を溶かす
- 10×制限酵素用緩衝液 (10×M buffer) : 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 mM NaCl、-20℃で保存する。使用時に蒸留水で 10 倍に希釈する

- *Xba*I 溶液：下記溶液をプラグ片 1 個当たり、200 μ L を調製する

10×M buffer	20
0.1% BSA	20
15 U/ μ l <i>Xba</i> I (Takara)	1.5
DW	158
<hr/>	
Total	200 μ L

- 分子量マーカー：CHEF DNA size standard, Lambda ladder (No. 170-3635, Bio-Rad)

注意点

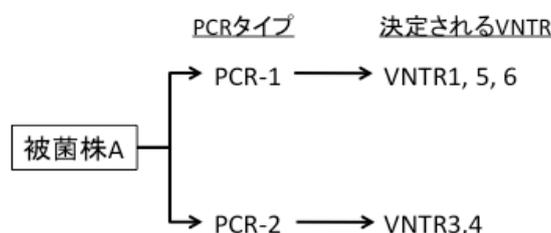
- パルスフィールド電気泳動に用いる菌は対数増殖期のものを使用する。上記条件下で培養した菌ならば問題はない
- 百日咳菌の溶菌はプロテアーゼ K のみで行うことができる。他菌のようにリゾチーム処理を必要としない
- 作製したプラグは 0.5 M EDTA 溶液中で長期保存が可能である
- 制限酵素は *Xba*I を用いる。制限酵素 *Spe*I, *Dra*I も使用することもできるが、*Xba*I が一般的である
- パルスフィールド電気泳動分析では DNA の移動速度は泳動温度に大きく影響される。温度が高いと移動速度が速くなり、低いと遅くなる。再現性のある結果を得るためには、泳動槽の温度管理に十分注意する
- パルスフィールド電気泳動像をもとに系統樹解析を行うことができる

8. MLVA 法による遺伝子型別

MLVA (Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) は、細菌ゲノム中に存在する複数の反復配列 (VNTR: Variable-number tandem repeat) を指標に遺伝子型別を行う方法である。本法では各 VNTR について設計した蛍光プライマーを用いて PCR を行い、キャピラリーシーケンサーおよびフラグメント解析ソフトウェアにより、そのリピート数を解析する。本法は簡便かつ迅速に多数の検体を型別することができるという利点を有する。百日咳菌では VNTR1, 3a, 3b, 4, 5, 6 の 6 ヶ所の組み合わせにより MLVA タイプ (MT) を決定する⁽¹³⁾。例えば、各 VNTR のリピート数が 9-7-0-9-7-11 の菌株は MT83 となる。百日咳菌の臨床分離株の多くはゲノム中に 2 コピーの VNTR3 を有するため、便宜上 VNTR3a, 3b と区別される。ただし、VNTR3a と VNTR3b は同じリピート数を示すことが多く、その場合フラグメント解析では両者を区別することが出来ない。なお、パラ百日咳菌も MLVA 法による遺伝子型別が行える⁽¹⁴⁾。

百日咳菌とパラ百日咳菌の MLVA 解析は、国立感染症研究所で依頼検査として実施可能である。

- ① 被菌株よりゲノム DNA を精製する。または、被菌株を TE-8 に懸濁し、95℃ 10 min の加熱処理により DNA を抽出する。遠心操作により得られた上清をテンプレートとする
- ② VNTR タイプにより PCR 条件が異なるため、1 菌株につき 2 種類の PCR (PCR-1, PCR-2) を行う。VNTR1, 5, 6 は PCR-1、VNTR3, 4 は PCR-2 により増幅し、プライマー配列と反応組成を以下に示した。PCR 反応は、PCR-1 が 96℃ 20 sec、68℃ 30 sec、72℃ 1 min の 40 cycle、PCR-2 が 96℃ 20 sec、60℃ 30 sec、72℃ 30 sec の 40 cycle、それぞれ最後に 72℃ 20 min の伸長反応を行う



プライマー配列

PCR type	VNTR loci	Primer sequence (5' to 3')
1	VNTR1	VIC-CCTGGCGGCGGGAGACGTGGTGGTG
1	VNTR1	AAAATTGCGGCATGTGGGCTGACTCTGA
2	VNTR3	FAM-GCCTCGGCGAAATTGCTGAAC
2	VNTR3	GCGGGCGAGGAAACGCCCCGAGACC
2	VNTR4	NED-CGTGCCCTGCGCCTGGACCTG
2	VNTR4	GCCGCTGCTCGACGCCAGGGACAA
1	VNTR5	PET-GAAGCCGGCCCACCCGAGCTCCAGGCTCTT
1	VNTR5	TGCCGGGTTTCGGCATCTCGATGGGATACG
1	VNTR6	FAM-CCAACGGCGGTCTGCTGGGTGGTC
1	VNTR6	CGCCGCCCGCTGCGCCGCTACC

PCR-1

2×KOD FX buffer	12.5
2 mM dNTPs	4.0
10 pmol/μL VNTR-1F primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-1R primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-5F primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-5R primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-6F primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-6R primer	1.0
Template DNA (≒10 ng)	1.5
KOD FX (1 U/μL, TOYOBO)	0.4
DW	0.6
Total	25 μL

PCR-2

2×KOD FX buffer	12.5
2 mM dNTPs	4.0
10 pmol/μL VNTR-3F primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-3R primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-4F primer	1.0
10 pmol/μL VNTR-4R primer	1.0
Template DNA (≅10 ng)	1.5
KOD FX (1 U/μL, TOYOBO)	0.4
DW	2.6
Total	25 μL

- ③ 反応終了後、DWでPCR-1の反応液を100倍希釈、PCR-2の反応液を200倍希釈する
- ④ 以下のローディングカクテルを調製し、サーマルサイクラーを用いて95℃で5分間加熱する。加熱後は直ちに氷上で冷却する

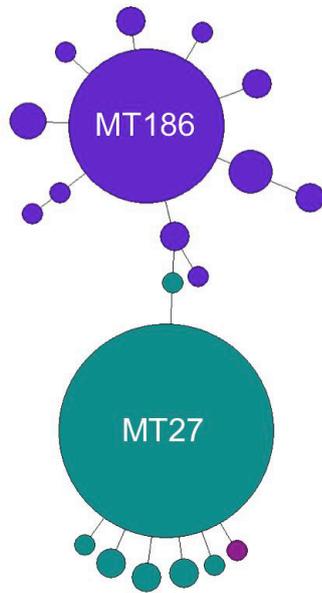
希釈した PCR 産物	0.5
600LIZ size standard (Applied Biosystems)	0.5
Hi-Di Formamide (Applied Biosystems)	10.0
Total	11.0 μL

- ⑤ サンプルを Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems) に移し、シールをして遠心する
- ⑥ DNA シーケンサーにより解析を行い、フラグメント解析ソフトウェアにより各 VNTR のリピート数を算出する。なお、国立感染症研究所では DNA シーケンサーとして ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)、フラグメント解析ソフトウェアとして GeneMapper software (Applied Biosystems) を使用している
- ⑦ 各 VNTR マーカーのリピート数をもとに MLVA タイプを決定する

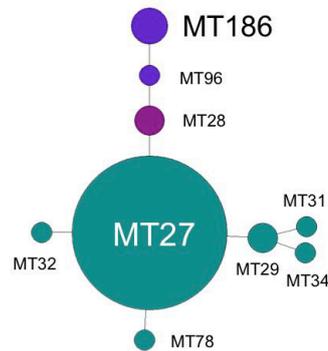
注意点

- 百日咳菌の MLVA タイプはオランダ国立公衆衛生環境研究所 (RIVM) のデータベースをもとに決定するが、現在ホームページが閉鎖されていて利用できない。感染研では RIVM が作成した MLVA データファイルを所有している
- 近年特定の遺伝子型を持つ流行株 (MT27 株) が増加し、MLVA 法の解析能力が低下している (下図)。MT27 株を起因とするアウトブレイク解析などでは、解析能力の高い SNP 型別法の実施が望まれる。国立感染症研究所では一塩基伸長反応に基づく簡便な SNP 型別を実施しており、解析が必要なときは国立感染症研究所まで問い合わせをお願いしたい

2005-2013年 (n=178)



2014-2017年 (n=65)



国内臨床分離株の MLVA タイプの変化。2005-2013 年の臨床分離株 178 株と 2014-2017 年の 65 株を MLVA 解析し、Minimum spanning tree 法により系統樹を作成した。円の面積は分離頻度、数字は MLVA number を示す

9. マクロライド耐性百日咳菌の検出

2010 年代初頭から中国ではマクロライド耐性百日咳菌 (MRBP) が蔓延し、その分離率は 57.5~91.9%と報告されている^(15,16)。近年ベトナムと台湾でも MRBP の出現が確認され、日本でも 2018 年に生後 2 ヶ月の患児から MRBP が分離された⁽¹⁷⁾。わが国でも MRBP に対する監視強化が望まれることから、国立感染症研究所では MRBP の迅速検出法として新たなリアルタイム PCR 法 (A2047G-cycleave PCR) を開発した⁽¹⁸⁾。

本法はサイクリングプローブ法によりマクロライド耐性に関与する 23S rRNA の SNP 変異を検出する。標的遺伝子は百日咳菌 23S rRNA の A2047* (2047 番目のアデニン) であり、2 種類のサイクリングプローブを用いて A2047G の変異導入を確認する。これまでに報告された MRBP のほぼ全てが 23S rRNA の変異を有し、A2047G 以外の変異箇所は報告されていない。本法は分離菌以外に臨床検体を用いた直接検出にも使用できるという利点を持つ。本キットは国立感染症研究所から地方衛生研究所 (百日咳レファレンスセンター) に分与可能である。

*ゲノム解析では SNP 変異箇所は A2037G となる。これまでの論文報告に従い、百日咳菌では便宜上 A2047G が使用されている。

- ① 分離菌からボイル法などを用いて DNA を抽出し、遠心操作により上清を得る。臨床検体からの DNA 抽出・精製は「(3)-4 IS481-PCR による百日咳菌 DNA の検出」に従う
- ② PCR 反応には下記のプライマーとプローブの混合液を使用する

Name	Sequence	Quencher/Reporter
BP_23S_rRNA-PrimerF	GAATGGCGTAACGATG	
BP_23S_rRNA-PrimerR	TGCAAAGCTACAGTAAAGG	
BP_A2047_ProbeG	gacgg(G)aag*	5'-Eclipse / 3'-HEX
BP_A2047_ProbeA	agacgg(A)aag*	5'-Eclipse / 3'-FAM

*括弧内の塩基は RNA を示す

ABI7500Fast Real-time PCR system を使用する場合

反応組成

2 × CycleavePCR Reaction Mix (CY505A, Takara)	10.0
Mixed primers & probes*	3.2
Template DNA	2.0
50 × ROX reference dye II (Takara)	0.4
DW	4.4
Total	20.0 μl

*終濃度はプライマー、プローブともに 0.2 μM になる

Run 条件:

Hold (初期変性)	Cycle: 1	95°C (20 sec)
3 Step PCR	Cycle: 40	95°C (3 sec), 60°C (10 sec), 72°C (25 sec)

- ③ template DNA を除いたマスターミックス (18 μL) を各チューブに入れ、次いで検体 DNA、2 種類の陽性コントロール (A2047-DNA fragment、A2047G-DNA fragment)、陰性コントロール (DW を使用) を入れる。陽性コントロールは各チューブに 2 μL を添加する。以下に陽性コントロールの濃度と添加量を示した

陽性コントロール (796 bp)	copies/μL	添加量 (copies/2 μL/well)
A2047-DNA fragment (wild type)	5×10 ³	1×10 ⁴
A2047G-DNA fragment (mutant type)	5×10 ³	1×10 ⁴

- ④ プレートをしールまたはチューブの蓋を閉め、リアルタイム PCR 装置のマニュアルに従って Run を行う。蛍光検出の設定は以下に従い、Y 軸の ΔRn は真数表示とする

Target	Reporter	Quencher
野生型 A2047	FAM	none
変異型 A2047G	VIC*	none

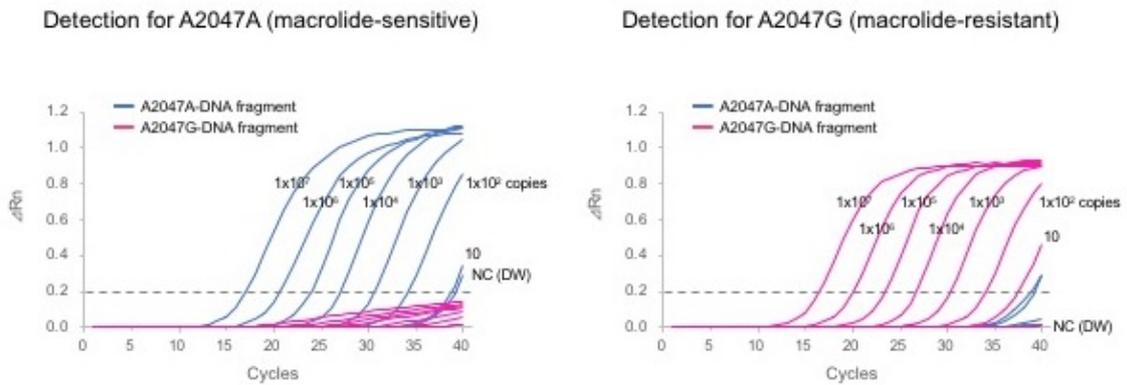
*HEX の代わりに波長の近い VIC チャンネルを代用する

- ⑤ Run 終了後、陽性コントロール (FAM、VIC) の増幅を確認する。検体のうち VIC の蛍光増加が認められた場合、マクロライド耐性菌 (A2047G) と判定する (下表)。FAM と VIC

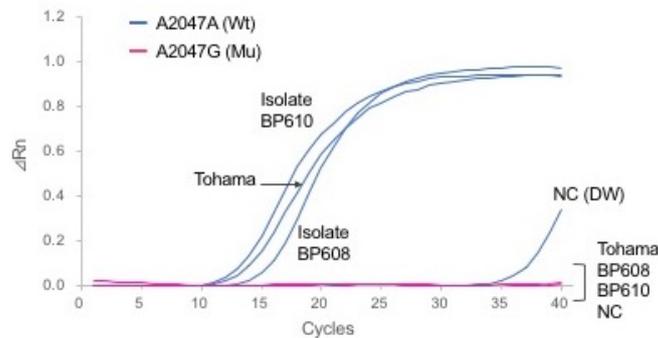
の蛍光増加が同時に認められた場合はヘテロ型と判定する。なお、ヘテロ型の耐性菌は極めて稀であり、1994年に米国の百日咳患児から分離された1株だけである

蛍光増加	判定
FAM	感性菌 (A2047)
VIC	耐性菌 (A2047G)
FAM + VIC	ヘテロ型 (A2047 + A2047G)*

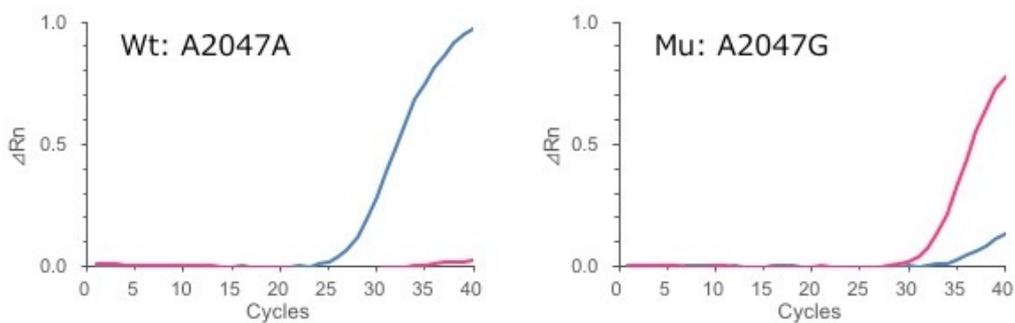
*百日咳菌はゲノム中に3コピーの23S rRNA 遺伝子を有し、ヘテロ型は1ないし2コピーがA2047Gとなっている



A2047G-cycleve PCR 法の検出感度



マクロライド感性百日咳菌を用いた解析例



国外の臨床検体を用いた解析例

注意点

- 融解後の CycleavePCR Reaction Mix は凍結せず、冷蔵庫（4°C）に保存する
- 解析終了後はプレートシールを剥がしたり、チューブの蓋を開けたりしない。実験室汚染を防ぐために、オートクレーブをせずにそのまま廃棄する
- 臨床検体は菌 DNA 含量が少ないため、野生型 A2047 または変異型 A2047G を示すシグナルが得られないことがある。その場合、A2047G は不検出と判定する
- サイクル数の増加とともに変異型 A2047G のバックグラウンドが増加するが、判定には影響しない
- 環境からのコンタミネーションなどにより、野生型 A2047 の増幅を示すピークが 35 サイクル以降に認められることがある（上図）。陰性コントロールで認められた場合、35 サイクル以降のシグナル増幅は判定に使用しない。なお、変異型 A2047G の非特異的増幅はほとんど認められない
- *Bordetella* 属では 23S rRNA 遺伝子が高度に保存されているため、本法はパラ百日咳菌や *Bordetella holmesii* にも適用できる

(4) 引用文献

1. Kamachi K, Yoshino S, Katsukawa C, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. (2015) *New Microbe New Infect* 8:70-74.
2. 厚生省監修「微生物検査必携：細菌・真菌検査第3版」、F 各論 3: 4. 百日咳菌（佐藤勇治）、財団法人日本公衆衛生協会、1987.
3. Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Otsuka N, Saito R, Tsuruoka J, Katsuta T, Nakajima N, Okada K, Kato T, Arakawa Y. (2011) Marked difference between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. *Clin Microbiol Infect* 17:365-370.
4. Bidet P, Liguori S, De Lauzanne A, Caro V, Lorrot M, Carol A, Faye A, Guiso N, Bingen E, Bonacorsi S. (2008) Real-time PCR measurement of persistence of *Bordetella pertussis* DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis. *J Clin Microbiol* 46:3636-3638.
5. Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y. (1983) Heptakis (2,6-O-dimethyl) β -cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. *J Clin Microbiol* 17:781-786.
6. Sasaki T, Nishiyama T, Shintani M, Kenri T (1997) Evaluation of a new method for identification of bacteria based on sequence homology of 16S rRNA gene. *PDA J Pharm Sci Technol* 51:242-247.
7. Fumimoto R, Otsuka N, Kamiya H, Sunagawa T, Tanaka-Taya K, Kamachi K, Shibayama

- K. (2019) Seroprevalence of IgA and IgM antibodies to *Bordetella pertussis* in healthy Japanese donors: Assessment for the serological diagnosis of pertussis. PLoS One. 14:e0219255.
8. Dragsted DM, Dohn B, Madsen J, Jensen JS. (2004) Comparison of culture and PCR for detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* under routine laboratory conditions. J Med Microbiol 53:749-754.
 9. Kösters K, Riffelmann M, von König CH. (2001) Evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* in clinical samples. J Med Microbiol 50:436-440.
 10. Guthrie JL, Robertson AV, Tang P, Jamieson F, Drews SJ. (2010) Novel duplex real-time PCR assay detects *Bordetella holmesii* in specimens from patients with pertussis-like symptoms in Ontario, Canada. J Clin Microbiol 48:1435-1437.
 11. Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, Horiuchi Y, Kojima K, Takahashi M, Arakawa Y. (2006) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol 44:1899-1902.
 12. Otsuka N, Yoshino S, Kawano K, Toyozumi-Ajisaka H, Shibayama K, Kamachi K. (2012) Simple and specific detection of *Bordetella holmesii* by using a loop-mediated isothermal amplification assay. Microbiol Immunol 56:486-489.
 13. Kurniawan J, Maharjan RP, Chan WF, Reeves PR, Sintchenko V, Gilbert GL, Mooi FR, Lan R. (2010) *Bordetella pertussis* clones identified by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. Emerg Infect Dis 16:297-300.
 14. Kamachi K, Otsuka N, Fumimoto R, Ozawa K, Yao SM, Chiang CS, Luu LDW, Lan R, Shibayama K, Watanabe M. (2019) A novel multilocus variable-number tandem repeat analysis for *Bordetella parapertussis*. J Med Microbiol. 68:1671-1676.
 15. Fu P, Wang C, Tian H, Kang Z, Zeng M. (2019) *Bordetella pertussis* infection in infants and young children in Shanghai, China, 2016-2017: clinical features, genotype variations of antigenic genes and macrolides resistance. Pediatr Infect Dis J. 38:370-376.
 16. Yang Y, Yao K, Ma X, Shi W, Yuan L, Yang Y. (2015) Variation in *Bordetella pertussis* susceptibility to erythromycin and virulence-related genotype changes in China (1970-2014). PLoS One. 25;10(9):e0138941.
 17. Yamaguchi T, Kawasaki Y, Katsukawa C, Kawahara R, Kawatsu K. (2020) The first report of isolation of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* in Japan [published online ahead of print, 2020 Apr 30]. Jpn J Infect Dis, PMID: 32350216.
 18. Kamachi K, Duong HT, Dang AD, Do DH, Koide K, Otsuka N, Shibayama K, Hoang HTT. (2020) Macrolide-resistant *Bordetella pertussis*, Vietnam, 2016–2017. Emerg Infect Dis. in press.

(5) 検査依頼先

国立感染症研究所 細菌第二部 第一室、大塚菜緒、小出健太郎、蒲地一成
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1. TEL: 042-848-7101 (直通)

(6) 執筆者一覧 (第 3.0 版)

蒲地 一成	国立感染症研究所 細菌第二部 (kamachi@nih.go.jp)
大塚 菜緒	国立感染症研究所 細菌第二部 (notsuka@nih.go.jp)
小出 健太郎	国立感染症研究所 細菌第二部 (kkoide@nih.go.jp)
山口 貴弘	大阪健康安全基盤研究所 微生物部 (yamaguchi@iph.osaka.jp)

(7) 百日咳レファレンスセンター

秋田県健康環境センター 保健衛生部
東京都健康安全研究センター 微生物部病原細菌研究科
三重県保健環境研究所 微生物研究課
大阪健康安全基盤研究所 微生物部微生物課
岡山県環境保健センター 細菌科
愛媛県立衛生環境研究所 微生物試験室
山口県環境保健センター 保健科学部細菌グループ
福岡県保健環境研究所 病理細菌課
熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部
国立感染症研究所 細菌第二部