

## 百日咳菌の遺伝子検査法

京塚 明美	伊藤 文明	山本美和子	田内 敦子
阿部 勝彦	宮野 高光	末永 朱美 <sup>*1</sup>	築地 裕美
国井 悦子	花木 陽子 <sup>*2</sup>	橋本 和久	笠間 良雄

### はじめに

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、近年、大人の集団発生も報告されるなど再び増加傾向にある。しかし、百日咳菌は分離培養が難しく、培養時間も要するため、診断は臨床症状に頼っている状況にある。このようななか、新しい検査法として遺伝子検査が報告されるようになってきた。今回我々は百日咳菌の検査をより迅速・正確に行うことを目的として遺伝子検査法を検討した。

### 方 法

#### 1 使用菌株

当所保存の百日咳菌の菌株。

#### 2 検査材料

百日咳疑いで感染症発生動向調査の病原体検査定点医療機関から依頼のあった咽頭ぬぐい液、鼻汁及び喀痰の18検体を供試した。

#### 3 遺伝子検査法及び使用プライマー

##### (1) LAMP 法

国立感染症研究所の蒲池らの方法<sup>1)</sup>に準じて行った。

##### (2) PCR 法

国立感染症研究所病原体検査マニュアルに準じて行った。

##### (3) Real-time PCR 法

DNA抽出法の比較試験では、IS-481を標的としたKtrin Kらの方法<sup>2)</sup>及び当所で作成した百日咳菌毒素遺伝子部分(BPT)を標的としたプライマーを使用した方法を行った。

なお、表1にLAMP法、PCR法及びReal-time PCR法に使用したBPTを標的としたプライマーの塩基配列を示した。

#### 4 検査方法

##### (1) 感度比較試験

百日咳菌から抽出したDNAを10倍段階希釈し、3

種類の遺伝子検査法について検出感度を比較した。

なお、BPTの一部を標的としたプライマーを用いたMPN Real-time PCR法(3本法)によりDNA量を算出し、他の2法については2回ずつ検査を実施した。

##### (2) DNA抽出法の比較試験

百日咳菌懸濁液をmini kit (Qiagen社)とアルカリ抽出法の2法でDNA抽出を行ったものを、LAMP法、PCR法、Real-time PCR法(IS-481の一部領域を標的としたプライマー使用)で遺伝子の検出を実施し、2抽出法の比較を行った。

##### (3) 検体からの検出試験

検査材料から抽出したDNAを用いて3種類の遺伝子検査法で百日咳菌DNA検出を実施した。

##### (4) 分離培養

検査材料18検体を、Bordet-Gengou血液寒天培地、ボルデテラCFDN寒天培地(日研生物医学研究所)を用いて常法により分離培養をした。

### 結 果

#### 1 感度比較試験

感度比較試験の結果を表2に示した。いずれの方法においても、1テストに10コピー以上のDNAがあれば検出可能であった。

#### 2 DNA抽出法の比較試験

DNA抽出法の比較試験の結果を表3に示した。Mini kit法もアルカリ抽出法もDNAの抽出効率は、同程度であると思われる。

#### 3 検体からの検出試験

遺伝子検査法では、18検体のうち、1検体が陽性で、残り17検体は陰性であった。また陽性となった1検体は3法とも陽性であった。

なお、陽性となった1検体のPCR産物(191bp)については、ダイレクトシーケンス法により百日咳毒素遺伝子のターゲット部分の塩基配列と同一であることを確認した。

#### 4 分離培養試験

菌の分離培養検査では全て陰性であった。

\*1: 現 健康福祉局保健部環境衛生課

\*2: 現 経済局工業技術センター

## ま と め

百日咳の検査依頼に対応するため、3種類の遺伝子検査法を比較検討した結果、菌懸濁液を用いた試験では、3法とも推定菌数が10個の百日咳菌遺伝子を検出することができた。

臨床検体18検体を検査した結果、すべての検体から菌分離はできなかったが、1検体から3種の遺伝子検査法で、百日咳菌遺伝子を検出した。

遺伝子増幅装置にかけてから結果が出るまでの時間は、LAMP法では約1時間、Real-time PCR法では約2時間そしてPCR法では約4時間を要した。

以上の結果から、ルーチン検査では、LAMP法かReal-time PCR法のどちらか1法を行い、確認にもう1法を実施し、更に詳細な検査が必要な場合には、PCR法を実施し、シーケンス法に供するなど、3法それぞれの特徴により検査法を使い分けることが重要と考えられた。

検体からの遺伝子検出をする際、当初IS-481を標的としたプライマーを用いたReal-time PCRを実施したところ、他の2法の遺伝子検査法では、結果が陰性であったが、本法のみ陽性となった検体が認められ、詳細な検査の結果 *Bordetella holmessi* と推定された。IS-481は、他の *Bordetella* 属菌にも存在するため、百日咳菌の毒素部分を標的としたプライマーを使用した方法の方がよいと考えられた。

今回、検体からの検出試験においては、供試検体が、喀痰等粘調性の高い検体であったため、QIAGEN QIAamp DNA Micro Kitで一昼夜インキュベートする

方法をもちいたが、今後は実際の検体を用いて、今回検討した抽出時間の短い、mini kit法(約1時間)、アルカリ抽出法(約30分)を実施し、実際の検体での使用の適否を検討していく予定である。

## 謝 辞

ご協力いただきました医療機関の関係各位に対し、深謝いたします。

## 文 献

- 1) Kamachi K et al: Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Bordetella pertussis* Infection, Journal of Clinical Microbiology, May 2006, P. 1899-1902
- 2) Ktrin K et al: Evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Bordetella pertussis* and *B. parapertussis* in clinical sample, J. Med. Microbiol, 50, 436-440 (2001)

表1 プライマーの塩基配列

### LAMP 法

BP-F3: 5'-CCGCATACGTGTTGGCA-3'  
 BP-B3: 5'-TGCGTTTTGATGGTGCCT-3'  
 BP-FIP: 5'-TTGGATTGCAGTAGCGGGATGTGCATGCGTGCAGATTCGTC-3'  
 BP-BIP: 5'-CGCAAAGTCGCGCGATGGTAACGGATCACACCATGGCA-3'  
 BP-LF: 5'-ACGGAAGAATCGAGGGTTTTGTAC-3'  
 BP-LB: 5'-GTCACCGTCCGGACCGTG-3'

### PCR 法

PTp1: 5'-CCAACGCGCATGCGTGCAGATTCGTC-3'  
 PTp2: 5'-CCCTCTGCGTTTTGATGGTGCCTATTTTA-3'

### Real-Time PCR

#### 毒素遺伝子領域

BP354F: 5'-CGTACATCCCGCTACTGCAA-3'  
 BP399P: 5'-FAM-AACACGGCATGAACGCTCCTTCG-TAMRA-3'  
 BP416R: 5'-GGACGGTGACCGGTACCA-3'

#### IS-481 領域

PPert: 5'-ATCAAGCACCGCTTTACCC-3'  
 APPert: 5'-TTGGGAGTTCTGGTAGGTGTG-3'  
 SPert: 5'-FAM-AATGGCAAGGCCGAACGCTTCA-TAMRA-3'

表 2 感度比較試験

検査法	コピー数/ $5\mu\text{L}^{*1}$	希 釈 列									
		$4\times 10^2$		$4\times 10^1$		$4\times 10^0$		$4\times 10^{-1}$		$4\times 10^{-2}$	
LAMP 法		+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
PCR 法		+	+	+	+	+	+	—	—		
Real-Time PCR 法 <sup>*2</sup>		+		+		+		+		—	
		+		+		+		—		—	
		+		+		+		—		—	

\*1 コピー数は、MPN Real-Time PCR 法（3 本法）により算出

\*2 BPT 領域を標的としたプライマー使用

表 3 抽出法の比較試験

検査法	Sample	抽出法	希 釈 列										
			$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$
LAMP 法	1	mini kit	+	+	+	+	+	—	—				
		アルカリ抽出	+	+	+	+	—	—	—				
	2	mini kit	+	+	+	+	+	—	—				
		アルカリ抽出	+	+	+	+	+	+	—				
PCR 法	1	mini kit	+	+	+	+	—	—	—				
		アルカリ抽出	+	+	+	+	—	—	—				
	2	mini kit	+	+	+	+	+	—	—				
		アルカリ抽出	+	+	+	+	—	—	—				
Real-time PCR 法*	1	mini kit	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
		アルカリ抽出	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	2	mini kit	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
		アルカリ抽出	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—

\* IS-481 領域を標的としたプライマー使用