

[ノート]

## 感染症発生動向調査における百日咳疑い 患者からの病原体検出状況

秋山 由美\* 荻 美貴 齋藤 悦子 押部 智宏  
 近平 雅嗣 三村 昌司

### Detection of Infectious Agents from Patients with Pertussis-like Symptoms under the Epidemiological Surveillance

Yumi AKIYAMA\*, Miki OGI, Etsuko SAITO, Tomohiro OSHIBE, Masatsugu CHIKAHIRA  
 and Masashi MIMURA

*Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural  
 Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032,  
 Japan*

The surveillance of infectious agents was performed for the 65 clinical specimens obtained from patients with pertussis-like symptoms at pediatric sentinel clinics under the epidemiological surveillance of Hyogo prefecture during April in 2012 and August in 2013.

*Bordetella pertussis* was detected from 16 samples, *Bordetella parapertussis* was from 1 sample, and trace level of *Bordetella holmesii* was from 1 sample. In addition to detecting *Bordetella* spp., rhinovirus from 20 samples, parainfluenza virus from 5 samples, enterovirus and RS virus from each 4 samples, and *Mycoplasma pneumoniae* from 1 sample were also detected.

Superinfection with dual pathogens was observed in 10 clinical cases. Among those, most frequent combination of pathogens was *B. pertussis* and rhinovirus detected from 5 cases. Rhinovirus was also detected together with other respiratory virus in 3 cases.

Differentiation between not only *Bordetella* spp. but also pathogens that cause respiratory infections was required for the diagnosis of patients with pertussis-like symptoms.

#### I はじめに

百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) の感染により引き起こされる急性呼吸器感染症の主な症状は長期間続く咳嗽で、①発作性の咳込み、②吸気性笛声、③咳込み後の嘔

感染症部

\*別刷請求先 :〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29  
 兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター  
 感染症部 秋山 由美

吐が特徴的とされる。百日咳は小児の感染症とされ、我が国では乳幼児期にDPTワクチンの定期接種が行われてきたが、近年になって青年や成人患者が増加し、2010年には15歳以上の患者数が全患者のほぼ半数を占めるに至った<sup>1)</sup>。パラ百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*) や新しい百日咳類縁菌の *Bordetella holmesii* も百日咳類似の症状を示すことから、臨床診断でこれらを区別することは難しく、抗百日咳毒素IgG抗体価の測定や遺伝子検査等による検査診断が必要となっている<sup>2)</sup>。

さらに、百日咳集団感染を疑いながら、かぜ症候群の

病原体であるライノウイルス等が検出された事例報告<sup>3)</sup>がある一方、我々は保育所での集団感染において、百日咳菌とともにライノウイルスやコクサッキーウイルスA9型(CA9)を同時検出した事例を報告した<sup>4)</sup>。

そこで、このように多様な呼吸器感染症において、百日咳疑い患者の起因病原体を明らかにする目的で、感染症発生動向調査の小児科病原体定点医療機関から搬入された臨床検体について、*Bordetella*属の3種の類縁菌に加えて、マイコプラズマやライノウイルス等5種の呼吸器疾患に関与するウイルスの遺伝子検査を行った。その結果、百日咳菌、ライノウイルス、パラインフルエンザウイルス等の様々な病原体が検出されるとともに、これらの重複感染事例も認められたので報告する。

## II 材料と方法

### 1. 検査材料

2012年4月から2013年8月に、兵庫県内の感染症発生動向調査の小児科病原体定点医療機関から搬入された百日咳疑い患者の検体65検体（咽頭ぬぐい液35件、鼻腔ぬぐい液28件、気管吸引液1件、喀痰1件）を検査材料とした。なお、受診時の担当医によるインフォームド・コンセントにより、患者やその保護者からの承諾を得たうえで、検査材料や情報の提供を受けた。

### 2. 検査方法

#### 2.1 臨床検体からの遺伝子抽出

患者の咽頭や鼻腔等を拭った綿棒のゲンタマイシン（50 µg/ml）含有Veal Infusion Broth浸漬液を検体とした。気管吸引液は無処理で、また、喀痰は10倍量のPBSを加え、均質化後の遠心（3000rpm, 15分）上清を検体とした。

検体140 µl からE.Z.N.A. Viral RNA Kit（Omega Bio-tek）でDNAおよびRNAを抽出した。RNAは逆転写酵素（Prime-Script Reverse Transcriptase, TaKaRa）でcDNAに転換した。

#### 2.2 *Bordetella*属菌遺伝子の一斉スクリーニング

*Bordetella*属各菌の検出には、IS481, IS1001, IS1002およびhIS100I遺伝子の一部を増幅する4組のプライマーを混合したマルチプレックスPCR法<sup>5)</sup>を実施した。

#### 2.3 マイコプラズマ遺伝子の検出

*Mycoplasma pneumoniae*の16S rRNA遺伝子の一部を増幅するコンベンショナルPCR法<sup>6)</sup>を採用した。

#### 2.4 ウイルス遺伝子の検出と型同定

ライノウイルスおよびエンテロウイルスは、VP4/VP2遺伝子の一部を増幅するnested PCR法を行い<sup>7,8)</sup>、増幅

DNAのサイズの違いで両ウイルスを区別した。エンテロウイルスは増幅産物のダイレクトシーケンスを行い、DDBJ上のBLASTにより型を同定した。RSウイルスとヒトメタニューモウイルスは、Fタンパクのコード領域の一部を増幅するnested マルチプレックス PCR法を実施した<sup>9,10)</sup>。RSウイルスは、N/P領域を増幅するnested PCR法により、Subclass AおよびBに分類した<sup>11)</sup>。パラインフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ遺伝子あるいはPタンパク質遺伝子の一部を増幅するhemi-nested マルチプレックスPCR法<sup>12)</sup>で、4つの型別を同時に行った。

## III 結果および考察

### 1. *Bordetella*属菌の検出状況

検査した百日咳疑い患者の性年齢別分布と*Bordetella*属菌の検出状況をFig.1に示した。被験者は男女ともに6ヶ月未満の乳児が最も多く、全体の半数以上を占めた。百日咳菌は男性9名、女性7名の合計16名から検出され、そのうち9名が6ヶ月未満の乳児であった。4歳から9歳までの7名と6ヶ月未満の男児1名は、2012年7～8月に兵庫県西部の一保育所を中心に発生した集団感染事例<sup>4)</sup>の患者である。パラ百日咳菌は5歳の女児1名から検出された。また、42歳の女性1名からは*B. holmesii*が検出されたが、反応が弱かったため国立感染症研究所に確認試験を依頼したところ、LAMP法とリアルタイムPCR法により*B. holmesii*と確認された。ただし、検体中のDNA含量が非常に少なく、病原体検出マニュアル<sup>13)</sup>の陽性判定基準（50 fg/µl）未満であったことから、*B. holmesii*データベースへの登録は見送られた。

### 2. その他の病原体の検出状況

呼吸器疾患に関与するウイルスおよびマイコプラズマの検出状況をFig. 2に示した。

ライノウイルスは、男性11名、女性9名の合計20名から検出され、そのうち11名が6ヶ月未満の乳児であった。

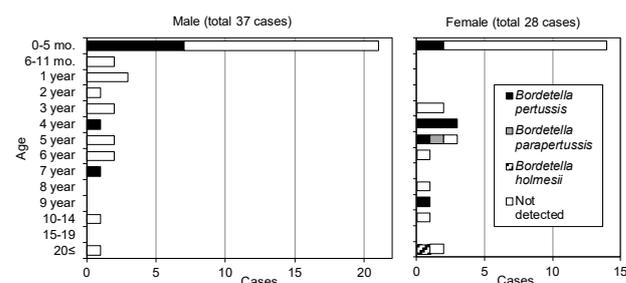


Fig. 1 Detection of *Bordetella* spp. from patients with pertussis-like symptoms

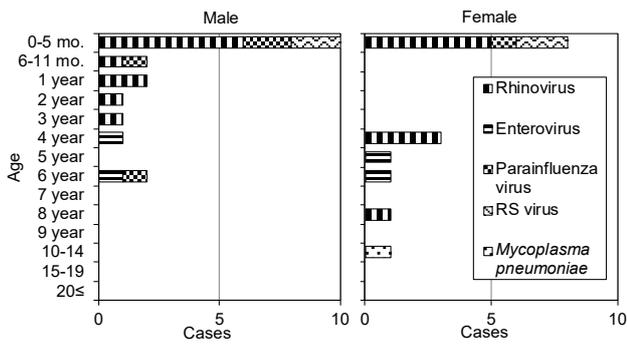


Fig. 2 Detection of rhinovirus, enterovirus, parainfluenza virus, RS virus and *Mycoplasma pneumoniae* from patients with pertussis-like symptoms

ライノウイルスによる感冒は呼吸器感染症の50%を占めるが、その症状は一般に軽く、数日で回復する上、不顕性感染も多いことが知られている<sup>14)</sup>。

多くの血清型があるエンテロウイルスは、今回の百日咳疑い患者から、CA9とエンテロウイルス68型 (EV68) がそれぞれ2例ずつ検出された。CA9は本研究期間中に発疹症や腸炎、咽頭炎、無菌性髄膜炎等の呼吸器感染症以外の様々な患者から検出されており、今回の症例との関連性にはついて必ずしも明らかではない。EV68は、1962年にカリフォルニア州で初めて下気道感染症の子供から検出されたウイルスで<sup>15)</sup>、呼吸器疾患に関与することが報告され<sup>16)</sup>、兵庫県の感染症発生動向調査における病原体サーベイランスでも気管支炎患者から多く検出された。

百日咳疑い患者からはその他にも、下気道に感染して肺炎の原因ともなるパラインフルエンザウイルス、RSウイルスおよびマイコプラズマが10名から検出された (Fig. 2)。パラインフルエンザウイルスは、3型が4名から、4型が1名から検出された。RSウイルスは、A型とB型が各2名、いずれも6か月未満の乳児から検出された。マイコプラズマは12歳の女性1名から検出された。マイコプラズマ肺炎は、発熱等の症状が消えても咳が長引くことから、臨床診断による百日咳との鑑別が難しい疾患であり、検査診断が必要となっている。

今回の病原体検索で、百日咳疑い患者65名中31名から *Bordetella* 属菌以外の病原体が検出され、*Bordetella* 属菌と合わせると、42名から起因病原体を検出できた。

### 3. 重複感染事例

2種類の病原体が同時検出された10名をTable 1に示した。百日咳菌とライノウイルスの同時検出例が5例と最も多かった。このうちの4名と百日咳菌とCA9が同時検出された1名は、2012年夏の集団感染事例の患者であ

Table 1 Cases infected with multiple agents

ID	Age		Sex	Sample	Detected infectious agents
	year	month			
1	4	8	F	pharyngeal swab	<i>B. pertussis</i> , Rhinovirus
2	4	7	F	pharyngeal swab	<i>B. pertussis</i> , Rhinovirus
3	0	3	M	pharyngeal swab	<i>B. pertussis</i> , Rhinovirus
4	4	1	F	nasal swab	<i>B. pertussis</i> , Rhinovirus
5	0	2	F	nasal swab	<i>B. pertussis</i> , Rhinovirus
6	4	11	M	pharyngeal swab	<i>B. pertussis</i> , Coxsackievirus A9
7	5	2	F	pharyngeal swab	<i>B. paraptussis</i> , Enterovirus 68
8	0	7	M	pharyngeal swab	Rhinovirus, Parainfluenza virus 3
9	0	1	F	pharyngeal swab	Rhinovirus, Parainfluenza virus 3
10	0	2	F	nasal swab	Rhinovirus, RS virus (A)

った<sup>4)</sup>。パラ百日咳菌とEV68の重複感染が1名で認められた。同時期にこの患者の兄も同様の症状を示したが、EV68のみが検出され、パラ百日咳菌は検出されなかった。

*Bordetella* 属菌が検出されずに、ライノウイルスとパラインフルエンザウイルス3型、あるいは、ライノウイルスとRSウイルス(A)の重複感染が、それぞれ2例と1例見つかった。ライノウイルスの単独感染は比較的軽症で経過するものの、児童では喘鳴や喘息の増悪の60~70%に関与すると報告されていることから<sup>14)</sup>、その感染年齢に注意する必要がある。また、呼吸器疾患に関与するウイルスに感染すると一時的に気道の粘膜が傷んだ状態になるため、細菌を主体とした二次感染を起こしやすく、高齢者ではこのような重複感染による重症化が報告されていることから<sup>17)</sup>、重複感染を想定した検査対応が必要と考えられる。

## IV 要旨

2012年4月から2013年8月に、兵庫県の感染症発生動向調査の小児科病原体定点医療機関から、病原体検査のために搬入された百日咳疑い患者の検体65検体中16検体から百日咳菌が、1検体からパラ百日咳菌が、1検体から微量の *B. holmesii* が検出された。これらの検体からは、*Bordetella* 属菌以外にも、ライノウイルスが20検体、パラインフルエンザウイルスが5検体、エンテロウイルスとRSウイルスが各4検体、マイコプラズマが1検体から検出された。この中には重複感染事例が10例あり、百日咳菌とライノウイルスの重複が5例と最も多く、ライノウイルスと他の呼吸器系ウイルスとの重複も3例あった。

## 文献

- 1) 国立感染症研究所：百日咳 2008~2011年. 病原微生物検出情報 (IASR), **33**, 321-322 (2012)
- 2) Loeffelholz, M.: Towards Improved Accuracy of

- Bordetella pertussis* Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Clin. Microbiol.*, **50**, 2186-190 (2012)
- 3) 徳島県立保健製薬環境センター, 他: 百日咳集団感染疑い事例における起因病原体の検索. 病原微生物検出情報 (IASR), **32**, 234-236 (2011)
  - 4) 秋山由美, 榎本美貴, 齋藤悦子, 近平雅嗣, 吉田昌史, 長尾尚子, 森田千尋, 八木千鶴子, 大橋秀隆, 岡本泰子: 兵庫県の保育所における百日咳集団感染事例. 病原微生物検出情報 (IASR), **33**, 326-327 (2012)
  - 5) 秋山由美, 齋藤悦子, 榎本美貴, 辻 英高, 近平雅嗣, 吉田昌史: コンベンショナルPCRを用いた *Bordetella*属菌の一斉スクリーニング法. 感染症学雑誌, **87**, 721-725 (2013)
  - 6) 生方公子: 呼吸器感染症起因菌の迅速検出法およびそのキット. 公開特許公報 特開2005-110545 (平成17年4月28日) (2005)
  - 7) 篠原美千代, 内田和江, 島田慎一, 後藤惇: コクサッキーウイルスA16型及びエンテロウイルス71型の検査法の検討. 感染症学雑誌, **73**, 749-757 (1999)
  - 8) 石古博昭, 島田康司, 與那覇麻里: 遺伝子系統解析によるエンテロウイルスの同定. 臨床とウイルス, **27**, 283-293 (1999)
  - 9) Grondahl, B., Puppe, W., Hoppe, A., Kuhne, I., Weigl, J. A. I. and Sshmitt, H-J.: Rapid Identification of Nine Microorganisms Causing Acute Respiratory Tract Infections by Single-Tube Multiplex Reverse Transcription-PCR: Feasibility Study. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1-7 (1999)
  - 10) 国立感染症研究所: ヒトメタニューモウイルス検査マニュアル, 平成20年7月 (2008)
  - 11) Stockton, J., Ellis, J.S., Saville, M., Clewley, J. P., and Zambon, M. C.: Multiplex PCR for Typing and Subtyping Influenza and Respiratory Syncytial Viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2990-2995 (1998)
  - 12) Bellau-Pujol, S., Vabret, A., Legrand, L., Dina, J., Gouarin, S., Petitjean-Lecherbonnier, J., Pozzetto, B., Ginevra, C. and Freymuth, F.: Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J. Virol. Methods*, **126**, 53-63 (2005)
  - 13) 国立感染症研究所: 病原体検出マニュアル 百日咳, 平成23年10月 (2011)
  - 14) 国立感染症研究所: ライノウイルス検査マニュアル, 平成21年7月 (2009)
  - 15) Schieble, J. H., Fox, V. L. and Lennette, E. H.: A Probable New Human Picornavirus Associated with respiratory Disease. *Am. J. Epidemiol.*, **85**, 297-310 (1967)
  - 16) Oberste, M. S., Maher, K., Schnurr, D., Flemister, M. R., Lovchik, J. C., Peters, H., Sessions, W., Kirk, C., Chatterjee, N., Fuller, S., Hanauer, J. M. and Pallansch, M. A.: Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2577-2584 (2004)
  - 17) 小橋吉博, 大場秀夫, 米山浩英, 沖本二郎, 松島敏春, 副島林造: 重複感染による市中肺炎に関する検討—単独感染群と起炎菌不明群との比較検討を含めて—. 感染症学雑誌, **75**, 283-290 (2001)

[平成26年4月1日受理]