

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32425

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08839

研究課題名(和文) 主要病原因子を産生しない新型百日咳菌の病原性の解明

研究課題名(英文) Pathogenesis of a Bvg(-) strain of Bordetella pertussis

研究代表者

渡邊 峰雄 (Watanabe, Mineo)

日本薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40279245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ほとんどの病原因子を持たないのに百日咳を起こす新型百日咳菌が分離された。この株はヒトへの付着性や、血清抵抗性、食菌抵抗性を持っていたため、この株の病原性にはバイオフィームや莢膜の形成が重要と考えられた。これを解析するため、新型百日咳菌のバイオフィームおよび/または莢膜欠損株を作成した。今後、作成した欠損株を使用して、新型百日咳菌の病原性とバイオフィーム、莢膜の関連性を明らかにする必要がある。また、新型百日咳菌を検出する抗体を作成した。これを使用してスクリーニングすることで、臨床分離株における新型百日咳菌の分離頻度を正確に把握できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存のワクチンは、百日咳菌の病原因子(繊維状赤血球凝集素、百日咳毒素、パータクチン、線毛)から作られている。新型百日咳菌はこれらのいずれも産生しないことから、現行ワクチンは無効である可能性が高い。この研究で得られる結果は、新型百日咳菌を制御できる新型ワクチンの開発につながるものである。新型百日咳菌のコロニー性状が通常の百日咳菌と同様であり、近年百日咳菌の分離に使用されている血液不含培地上では通常の百日咳菌と見分けが付かない。この研究で開発した抗体を使用してスクリーニングすることで、今まで気づかれなかった新型百日咳菌の分離頻度の正確な把握が期待できる。

研究成果の概要(英文)：A new type of *B. pertussis* has been isolated that causes pertussis (whooping cough), which does not produce most of the pathogenic factors. Since this strain showed adhesion to human cells, serum resistance, and resistance to phagocytosis, its surface structures, including biofilm and capsule formation, were considered important for the pathogenesis. To clarify the hypothesis, we created biofilm and/or capsule-deficient strains from the strain. The strains would help to clarify the relationship between the pathogenicity of the new *B. pertussis* and the biofilm and capsule formation. Moreover, we prepared antibodies that could discriminate against new-type *B. pertussis*. The antibodies would demonstrate the frequency of isolation of such *Bordetella pertussis* strains in clinical isolates.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 再興感染症 バイオフィーム 莢膜

## 1. 研究開始当初の背景

発作性の激しい咳を起こす百日咳は、年齢問わず発症し、乳幼児においては呼吸不能による低酸素血症から後遺症や死を引き起こす。近年、日本を含む世界各国で百日咳が再興しており、ワクチン導入前のレベルまで患者数が増加している地域(米国カリフォルニア州)すら存在する。百日咳再興の一因として、ワクチンの選択圧による百日咳菌の変化が挙げられる。現行ワクチンはワクチン株から精製された百日咳毒素、繊維状赤血球凝集素、パータクチン、線毛を成分とするが、現在世界で流行している株はそれらの因子に変異が起こったものがほとんどである。研究代表者は、国内の百日咳患者から分離された百日咳菌を収集、解析し、日本でも同様の状況が起こっていることを発表してきた。その中で研究代表者は、既知の主要病原因子をまったく産生しない百日咳菌(KF-19株)が百日咳を引き起こした例に遭遇した。付着因子であるパータクチンや百日咳毒素の各単独欠損株が分離された例はあるが、すべての主要病原因子が欠損した株が分離された報告は未だかつてない。いわば、KF-19株は、従来の学説では想定できなかった「主要病原因子なしで百日咳を惹起する新型百日咳菌」であった。また、KF-19株はワクチン成分となっている抗原を発現しないため、現行ワクチンは無効と推察された。さらに、研究分担者も地理的に異なる地域で類似の株を検出したことから(Hiramatsu *et al.* Pathog Dis.75:ftx011, 2017)このような株が散発的に発生しており、その病原性の解明は重要であると考えられた。

研究代表者は、KF-19株の病原性制御系 Bvg (Bordetella virulence gene) を構成するセンサータンパク質 BvgS にフレームシフトが起こっており、Bvg 制御下の主要病原因子の発現が起こらないことを見出した。KF-19株のコロニーは、病原性を有する東浜株 Bvg(+)と同様、真珠様であった。一方、病原性制御系 Bvg を欠損させ、病原性を失わせた東浜株 Bvg(-)の集落は大型扁平であり、KF-19株の表層(莢膜)構造は病原性を有する東浜株 Bvg(+)に近いと考えられた。さらに、KF-19株は東浜株 Bvg(+)と同様に、宿主付着性、初期クリアランス抵抗性を示した。これらの結果から、KF-19株の病原性には、食菌抵抗性、血清抵抗性、および/または付着性に関与し、かつ Bvg 制御下でない病原因子群が関与していると考えられた。また、全ゲノム解析における単塩基多型部分の検出結果も、それを裏付けていた。

## 2. 研究の目的

KF-19株の病原性解析は調べるべき点が非常に多いと考えられた。しかし、背景に記載した予備検討から、

付着性、血清抵抗性、食菌抵抗性すべてに寄与  
Bvg 非依存的な因子

の条件を満たすバイオフィームと莢膜が最も最優先すべき課題であると考えた。

このため、本研究の目的は、KF-19株の病原性におけるバイオフィームと莢膜の意義を解明することとした。

## 3. 研究の方法

### バイオフィーム欠損 KF-19株の作成

すでに解析済みの KF-19株の全ゲノム配列を利用して、KF-19株のバイオフィーム関連遺伝子 wcbP および wcbQ を欠損させた菌株を作成した。標的遺伝子前後 1 kb 程度の配列を PCR 増幅し、クローニングベクター上に欠失相同組換え用のコンストラクトを作製した。その後コンストラクトを pABB-CRS2 に組み込み、triparental transconjugation 法で KF-19株に導入した。組換え株のスクリーニングは薬剤耐性マーカーおよび高濃度ショ糖下培養によって行い、組換えの確認は、相同組換え標的部位の PCR とシーケンス解析によって行った。

### 莢膜欠損 KF-19株の作成

莢膜関連遺伝子である kpsM、kpsT、および kpsE を欠損した KF-19株を作成した。バイオフィーム欠損株と同様に作成した。

### バイオアッセイ系の構築

百日咳菌の宿主付着性アッセイとして、ヒト肺上皮細胞由来 A549細胞を使用した in vitro 実験系を構築した。百日咳菌の血清抵抗性は、百日咳抗体陽性のヒト血清と菌を混合し、生菌数を算定することで測定する系を構築した。食菌抵抗性はヒト白血球単球由来 THP 細胞をマクロファージに分化させ、百日咳菌を共存させることで測定する系を構築した。

## 4. 研究成果

新型百日咳菌におけるバイオフィーム関連遺伝子(wcbP および Q)欠損株と、莢膜関連遺伝子(kpsM、kpsT、および kpsE)欠損株の作成をすべて完了できた。また、同様に百日咳菌標準株 BvgS(+)においても同様の欠損株を作成できた。当初計画では、更に標準株 BvgS(-)に新型百日咳菌の上記遺伝子を導入した株も作成する予定であったが、研究年度内に代表者の所属機関が変わり、病原体(BSL2)研究環境や遺伝子組換え実験環境の構築、適正化に時間を要したため、

当初の目的を年度内に果たすことはできなかった。

しかし一方で、解析の中心をなすバイオアッセイ系においては、研究当初の実験系に比べ、ブラッシュアップを行い、今後の研究遂行はむしろ効率的になると考えられた。年度内の全計画完了はできなかったものの、既に得られた欠損株と改善されたバイオアッセイ系によって、課題の目標に至ることがすぐにでも可能である。

今後は、得られた材料と方法でバイオフィルムおよび莢膜の意義を示した後、BvgS(-)標準株へ新型百日咳菌遺伝子を導入した株を作出、利用することによって直接的な裏付けをしていきたいと考えている。

また、KF-19株のような**新型百日咳菌を簡便に検出するための特異抗体を作成した**。この抗体は新型百日咳菌のBvgSに生じるフレームシフト変異を検出する。新型百日咳菌のコロニー性状が通常の百日咳菌と同様であり、近年百日咳菌の分離に使用されている血液不含培地上では通常の百日咳菌と見分けが付かない。**臨床分離株においてこの抗体を使用したスクリーニングを行うことで、今まで気づかれなかった新型百日咳菌の分離頻度が正確に把握できることが期待される。**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊峰雄
2. 発表標題 既知病原因子を欠損した臨床分離株の病原性解析
3. 学会等名 北里生命科学研究所成果報告会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学北里生命科学研究所医療微生物学研究室（渡邊研究室）Facebookページ <a href="https://www.facebook.com/WatanabeLab/">https://www.facebook.com/WatanabeLab/</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	蒲地 一成  (Kamachi Kazunari)  (10260275)	国立感染症研究所・細菌第二部・室長   (82603)	