

## 様式C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590463

研究課題名(和文) 百日咳起因菌の感染によって誘導される特異抗体の検索

研究課題名(英文)

Immune responses to pertussis

研究代表者

渡辺 峰雄(WATANABE MINEO)

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号:40279245

研究成果の概要：百日咳患者血清または感染動物血清を使用し、百日咳菌およびパラ百日咳菌の感染によって誘導される抗体応答を解析した。二次元電気泳動とウェスタンブロッティングによって、百日咳菌の感染時に特異的に認識される抗原3分子と、パラ百日咳に認識される抗原10分子を検出した。それらの分子は全て現行のワクチンに含まれていないことから、ワクチン接種者と患者を鑑別できる改良型血清診断法に使用可能と考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	900,000	270,000	1,170,000
20年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：百日咳菌、パラ百日咳菌、診断、再興感染症、ワクチン、赤血球凝集素

### 1. 研究開始当初の背景

百日咳百日咳は咳を主症状とする呼吸器感染症であり、百日咳菌またはパラ百日咳菌の感染によって引き起こす。病名どおり、患者は長期(2週～数ヶ月)にわたる咳発作を呈する。過去、百日咳は小児の病気と考えられがちであったが、近年の調査によって年齢を問わず感染、発症する病気であると認識されている。約60年前に始まるワクチンの開発普及によって百日咳の死者数、古典的典型的症例数は激減した。このためワクチンが普及した先進国では、近年

まで百日咳はまれな病気となったと信じられてきた。さらに既存ワクチンが典型的百日咳症例を激減させたことも合わさり、百日咳に対する関心は薄れ、研究者の激減と医師の診断スキル低下を招いた。しかし1990年前後から百日咳は先進国を中心に再び患者数、死者数を増やし始め、米国においては年を追うごとに最高記録が更新され続けている。この現象は先進的で詳細な疫学調査の行われたほぼすべての国で観測されている。近年の百日咳で特筆すべきことは、現在の百日咳はワクチン接種歴のある青年

や成人にも感染し、発症させると言うことである、この現象は従来見られなかったものであり、ワクチンの使用やサーベイランスを含む百日咳感染制御の大きな転換点にさしかかっているとの認識が世界的なコンセンサスとなっている。百日咳の伝染性の高さを考慮すると、適切なサーベイランス、ワクチン、早期診断の充実無くしては再興を押しえ込むことはできない。

現在のサーベイランスと診断に関するもっとも大きな問題は、百日咳には未だクリアカットな感染検出法（および診断法）がないということである。菌の分離は非常に高い習熟が必要であり、ほとんどの検査室では困難である。また抗生物質を既に投与された患者からは菌分離は不可能となる。PCR は感度は高いものの、培養と同様の問題をはらんでいる。現行の ELISA 法はワクチン抗原に対する抗体を検出するため、ワクチン接種者と百日咳感染者を区別することができない。このようにクリアな診断法がないという問題は、百日咳の診断を難しくし、結果として百日咳の検出感度の低下を起している。これは感染制御を不能にし、再興の土台を形作っている。

## 2. 研究の目的

血清診断法は生菌が消失した後も診断が可能であること、多くの医療機関で実行可能なフォーマットであることから有用と考えられる。しかし現行の血清診断法はワクチンに含まれる抗原成分に対する抗体を指標としているため、ワクチン接種者と感染者の鑑別ができない。本課題では現行の特異性に欠ける血清学的診断法を改善し、正確な疫学調査に寄与する基盤データを提供することを目的として、百日咳関連菌の感染によって特異的に誘導される免疫応答を解析した。

## 3. 研究の方法

百日咳菌の菌体および分泌タンパク質を二次元電気泳動法を使用して展開し、展開された全てのタンパク質を PVDF またはニトロセルロース膜に転写した。一方、培養法によって診断が確定した百日咳患者の血清をワクチン抗原で吸収処理した。その血清を使用して上記膜を染色し、ワクチン抗原を除く感染特異抗原を検出した。検出された特異抗原を TOFF-MS にて解析し、百日咳菌ゲノムデータベースから各タンパク質を特定した。

パラ百日咳菌感染特異的抗原の解析に関しても同様の手法で行った。ただしパラ

百日咳菌感染患者血清が期間中に入手できなかったため、マウス経鼻感染モデルを使用してパラ百日咳菌を感染させたマウスの血清を使用した。

同定された抗原の内、パラ百日咳菌の産生する繊維状赤血球凝集素についてはドミナントエピトープ部位の解析を行った。当該分子を N 末側から 4 ドメイン (B0/R1, B1/R2, R2/B2, C) に分けて組換えタンパク質を作成し、それぞれについて感染マウス血清の反応性を確認した。

## 4. 研究の成果

特異抗体検出系（二次元電気泳動、ウェスタンブロットティングおよびプロテオミクス解析）の最適化を行い、成功した。その後感染者血清または感染動物の血清を使用して感染特異抗体が認識する抗原の特定を試みた。その結果、百日咳菌感染者の血清が特異的に認識する百日咳菌タンパク質 3 分子および繊維状赤血球凝集素関連抗原を含むパラ百日咳菌タンパク質 10 分子を同定した。検出された抗原の性状をデータベース解析し、感染特異性の点で特に有望と考えられる分子（百日咳菌関連 3 分子およびパラ百日咳菌関連 7 分子）を確認した（表 1）。

表 1. 感染回復期血清が認識する特異抗原

産生菌	名称または機能
百日咳菌	ヒートショックタンパク質
百日咳菌	ATP合成酵素
百日咳菌	ペプチダーゼ
パラ百日咳菌	線毛構成タンパク質
パラ百日咳菌	オートトランスporter
パラ百日咳菌	リポタンパク質
パラ百日咳菌	DNA結合タンパク質
パラ百日咳菌	外膜タンパク質
パラ百日咳菌	細胞壁結合タンパク質
パラ百日咳菌	繊維状赤血球凝集素

各抗原の遺伝子をクローニング後、組み換えタンパク質を調製し、それらが患者または感染動物によって認識され、血清診断用抗原の候補となりうることを確認した。

パラ百日咳菌の産生する繊維状赤血球凝集素は百日咳菌のものと非常に高い相同性を有するにも関わらず、パラ百日咳菌感染特異性が高かった。このためそのドミナントエピトープの解析を試みた。ドミナン

トエピトープは繊維状赤血球凝集素の分泌部分C末側(Cドメイン)に存在し(図1)、その部位は百日咳菌とパラ百日咳菌から得られた繊維状赤血球凝集素の間でアミノ酸配列の相違が際だっていた。この部位は百日咳起因菌2菌種を鑑別しうる血清診断に使用できる可能性が高いと考えられた。



図1. パラ百日咳菌の繊維状赤血球凝集素に対する感染回復期血清の反応。ドメイン構造はKajava, A.V. et al. *Mol Microbiol* 42: 279-292, 2007を参照した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 7件)

①小松栄司, 渡辺峰雄. パラ百日咳菌感染に対する感染防御免疫の解析. 第20回遺伝子とその周辺研究会. 2007年8月9日. 大船渡市.

②渡辺峰雄, 小松栄司. パラ百日咳菌に対する防御免疫の解析. 第56回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 2007年10月26日. 東京.

③渡辺峰雄. 帰ってきた百日咳. 北里大学微生物アカデミー学術集会. 2007年12月15日. 東京.

④小松栄司, 渡辺峰雄. 百日咳の再興機序の解析. 第179回北里研究会. 2008年2月29日. 東京.

⑤小松栄司, 渡辺峰雄. パラ百日咳菌感染における防御免疫の誘導と解析. 第82回日本感染症学会学術集会. 2008年4月17日. 島根.

⑥ Komatsu E, Watanabe M. Protective effect of a *Bordetella parapertussis* vaccine in a murine model of respiratory infection. 108th General meeting of American Society for Microbiology. 2008年6月2日. Boston, MA, U.S.A.

⑦小松栄司, 江口正浩, 渡辺峰雄. パラ百日咳菌ワクチンの感染防御効果. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月13日. 名古屋.

渡辺峰雄. Pertussis today. 第82回日本細菌学

会総会. 2009年3月14日. 名古屋.

[その他] (計 2件)

①報道 日経バイオテク. 百日咳ワクチンを巡り活発な議論. 2009年3月16日

②ホームページ

[http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/immun\\_reg/](http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp:8080/immun_reg/)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 峰雄 (WATANABE MINEO)

北里大学・大学院感染制御科学府・准教授  
研究者番号: 40279245

(2) 研究分担者

2007年度

小松栄司 (KOMATSU EIJI)

北里大学・北里生物製剤研究所・研究員

研究者番号: 70435543

(3) 連携研究者

2008年度

小松栄司 (KOMATSU EIJI)

北里大学・北里生物製剤研究所・研究員

研究者番号: 70435543

(4) 研究協力者

Alison A. Weiss

University of Cincinnati

江口正浩 (EGICHI MASAHIRO)

北里大学・大学院感染制御科学府・准教授

研究者番号: 00312215