

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15441

研究課題名（和文）マクロライド耐性化による百日咳菌の増殖性および病原性の変化

研究課題名（英文）Differences in growth and virulence between macrolide-resistant and -susceptible *Bordetella pertussis*

研究代表者

小出 健太郎（Koide, Kentaro）

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：30874276

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究によって、治療薬であるマクロライドに対する耐性を百日咳菌が獲得しても、その細菌が増殖や生存において大きな不利を受けない可能性が高いことがわかった。さらに、マクロライドの選択圧がない環境下で長期間培養しても百日咳菌はマクロライド耐性を失わないことが確認された。加えて、全ゲノム解析によって、マクロライド耐性を持つ百日咳菌が中国から日本へ侵入していることが示唆された。これらの結果から、今後日本でマクロライド耐性を示す百日咳菌が広がる可能性は高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、マクロライド耐性獲得に伴う百日咳菌株の表現型がマクロライド感受性百日咳菌株と大きく異ならないことを初めて明らかにした。また、マクロライド耐性百日咳菌の完全長ゲノム配列を解明し、国際的なデータベースに登録したことは、今後の百日咳菌研究において極めて重要な基礎情報を提供する。これにより、効果的な治療法の開発や予防戦略の構築に寄与することが期待される。さらに、本研究の成果は、マクロライド耐性百日咳菌が今後蔓延化する可能性が高いことを示しており、公共衛生上の対応策を強化するための科学的根拠を提供する点で社会的意義も高いと言える。

研究成果の概要（英文）：This study reveals that *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, is likely to acquire resistance to macrolide antibiotics without incurring significant disadvantages in terms of growth or survival. Moreover, it was confirmed that *B. pertussis* retains its macrolide resistance even after prolonged cultivation in an environment devoid of macrolide selective pressure. Additionally, whole-genome analysis suggests that macrolide-resistant *B. pertussis* has been introduced from China to Japan. These findings indicate a high potential for the future spread of macrolide-resistant *B. pertussis* in Japan.

研究分野：細菌学

キーワード：百日咳 薬剤耐性 マクロライド耐性 全ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

百日咳は百日咳菌（*Bordetella pertussis*）によって引き起こされる急性の呼吸器感染症である。痙攣性の咳発作を主徴とし、免疫力の低い乳幼児では死に至る危険性がある。治療薬には Erythromycin や Clarithromycin などのマクロライドが使用されているが、2010 年以降中国を中心にマクロライドに対して耐性を示す百日咳菌の増加が報告されている。百日咳菌は、23S rRNA の 2047 番目の塩基がアデニン（A）からグアニン（G）に置換した A2047G 変異によってマクロライド結合部位の構造変化を起こすことで耐性を獲得することが知られている。マクロライド耐性百日咳菌は、カンボジアやベトナム、台湾でも複数年にわたって検出されており、日本でも 2018 年に初めて耐性菌が分離されたことから、今後日本国内での蔓延化が危惧されている[1, 2]。

百日咳菌の分子疫学調査や全ゲノム解析は行われているが、マクロライド耐性百日咳菌に関する研究は非常に少ない。MLVA 法や全ゲノム解析によって、中国で流行している耐性株が中国国内だけでなく、国境を超えて広がっていることが明らかになっている。その一方、特にマクロライド耐性百日咳菌の表現型に関する研究は非常に少ない。表現型とは菌株の形態的または生理的な特性のことであり、薬剤耐性や増殖性などがあげられる。ある細菌が特定の形質を持つことで生じる生存に対する不利な影響のことを fitness cost といい、百日咳菌以外の菌種ではマクロライド耐性変異の獲得によって増殖性が低下するという研究結果が報告されている[3]。耐性菌と感受性菌の表現型の違いを明らかにすることは、細菌の耐性獲得メカニズムの理解や耐性菌の制御方法を考える上で重要な知見となる。

2. 研究の目的

本研究では、日本で分離されたマクロライド耐性百日咳菌株とマクロライドに対して感受性を示す国内流行株の表現型の差異を明らかにする。加えて、耐性株の全ゲノム解析を行い、中国の百日咳菌株の全ゲノム解析データと合わせることで、日本国内での蔓延化の可能性を考察する。

3. 研究の方法

(1) 使用した菌株および薬剤感受性試験

本研究では、2 株のマクロライド耐性百日咳菌 BP616 および BP625、そして国内流行株である BP617 を使用した。研究開始時、マクロライド耐性菌株は大阪で分離された BP616 のみであったが、その後東京で BP625 が分離されていたことが明らかになった。マクロライドに対して感受性を示す BP617 は、2020 年に中部地方で分離された菌株であり、MLVA 法による遺伝子型は国内および国外で流行しているタイプと同一であった。

BP625 に対する複数の薬剤の最小発育阻止濃度（MIC）を計測することで薬剤耐性を評価した。使用した薬剤は、百日咳の治療で使用される Erythromycin、Clarithromycin の 2 剤に加えて、過去の研究からマクロライド耐性菌にも抗菌効果が期待できる Piperacillin（βラクタム）、Ampicillin、Trimethoprim/Sulfamethoxazole、Ciprofloxacin、Gentamicin、Meropenem の合計 8 剤である。MIC の測定は Etest を用い Bordet-Gengou（BG）寒天培地上で行った。

(2) 増殖性の評価

菌の増殖に伴う液体培地の濁度の上昇をマクロライド耐性菌株と感受性菌株で比較した。菌株をシクロデキストリン固形寒天培地（CSM 培地）で培養したのち、modified Stainer-Scholte 液体培地（mSS 培地）に OD600 が 0.5 になるように濁度を調整した菌液を作成した。菌液 100 μL を 2.9 mL の mSS 培地に添加したのち、36℃で 3 日間培養し、24 時間毎の濁度を計測した。次に、マクロライド耐性菌である BP616 と感受性菌である BP617 を様々な割合で混合し 37℃で 3 日間培養した。培養後、寒天培地に培養液を散布し、ランダムに選出した 20 個のコロニーのマクロライド耐性を調べることで、混合培養液中の耐性菌の割合を計測し、培養前後での変化を調べた。

(3) 細胞付着性の評価

細胞培養用マルチウェルプレートでヒト肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 細胞を培養し、細胞と細菌の割合が 1:200 となるように菌株の濃度を調整した菌液を細胞のプレートに入れた。36℃で 5 分間静置したのち、細胞を PBS で 4 回洗浄し、1.0% triton-X 100 を加えて細胞を溶解させた。溶解液を CSM 培地に散布し 36℃で 5 日間培養後、培地上に発育したコロニー数を数えるこ

とで、BP616 と BP617 の細胞への細胞付着性を比較した。

(4) マクロライド耐性変異の安定性の評価

BP616 を CSM 寒天培地で 3 日ごとに新しい培地に継代し、180 日間培養した。30 日ごとに 200 コロニーずつ採取し、Erythromycin を 100 μ g/mL 含む CSM 培地で再培養することでマクロライドに対する耐性の有無を調べた。さらに、180 日目の菌から DNA を抽出し、全ゲノム解析を実施し一塩基変異の有無を調べた。

(5) 全ゲノム解析

BP616 および BP625 から DNA を抽出し、全ゲノム解析を実施した。得られたショートリードデータを使用し、国際的なデータベースに登録されている中国の百日咳菌株のショートリードデータと合わせて、一塩基変異を基にした系統分析を実施した。また、ロングリードとショートリードを組み合わせたハイブリッドアセンブリによって BP616 および BP625 の完全長ゲノム配列を決定し、DDBJ/EMBL/GenBank に AP024746.1 (BP616)、AP026936.1 (BP625) として登録した。

4. 研究成果

BP616 および BP625 はどちらも Erythromycin および Clarithromycin に対して 256 μ g/mL を超える MIC を示し、マクロライド耐性を示すことが確認された (表 1)。また、BP616 と BP625 に対する Trimethoprim/Sulfamethoxazole の MIC はそれぞれ 0.094 μ g/mL、0.064 μ g/mL と低い。過去の研究で示されている様に、マクロライド耐性菌に対して効果的な治療薬となる可能性が示された。そのほかの薬剤に対しても BP616 と BP625 は同一もしくは近い MIC を計測した。また、どちらの株も Cycleave real-time PCR 法 [4] およびサンガー法によって 23S rRNA にマクロライド耐性変異である A2047G 変異を有していることが確認された。

時間経過に伴う液体培地中の濁度の上昇は、耐性株 (BP616、BP625) と流行株 (BP617) で明らかな差はなかった (図 1)。その一方、BP616 と BP617 を混合培養すると、混合した割合とは関係なく 72 時間経過後にはマクロライド耐性菌の割合が培養前よりも減少した (図 2)。これらの結果は、百日咳菌はマクロライド耐性を獲得したことに伴う増殖の fitness cost は非常に小さく、生存において大きな不利とはならないが、流行株と比較すると増殖性は僅かに劣ると考えられる。マクロライド耐性株の特性の理解を深めるために流行株以外の菌株との混合培養による試験が今後必要である。また、細胞付着性の評価において BP616 と BP617 の間で顕著な差は見られなかった。100 倍希釈した細胞溶解液を CSM 培地に散布し、出現したコロニー数の平均は、BP616 が 56.7 個 (標準偏差 17.5) に対して BP617 が 64.0 個 (標準偏差 17.7) となった。細胞付着性は菌が標的組織の細胞へ接着し感染の土台を作る為の要因である。本研究は、マクロライド耐性の獲得は菌の増殖性や感染性に大きな不利とならない可能性が高いことを示した。

マクロライド耐性株は、マクロライドの選択圧がない環境下で培養を繰り返してもマクロライド耐性を維持した。BP616 を 180 日間継代後に分離したコロニーは全て A2047G 変異を有し、マクロライド耐性を示した。このことは、先の試験で示された様に、マクロライド耐性変異が細菌の生存にとって負担が小さいことを示している。また、全ゲノム解析の結果、全長で 400 万塩基対を超える BP616 のゲノム上の 2 箇所で一塩基変異が確認された。百日咳菌のゲノムは高い安定性があり、マクロライド耐性変異を自然に失う可能性は低いと考えられる。

表 1. 各薬剤に対する最小発育阻止濃度

Antimicrobial agent	MIC (μ g/mL)	
	BP625	BP616*
Erythromycin	>256	>256
Clarithromycin	>256	>256
Piperacillin	<0.016	<0.016
Ampicillin	0.064	0.094
Trimethoprim/sulfamethoxazole	0.064	0.094
Ciprofloxacin	0.012	0.012
Gentamicin	0.19	0.19
Meropenem	0.047	0.047

* 引用文献2

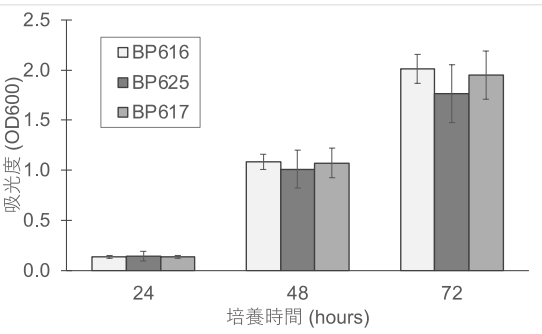


図 1. 時間経過に伴う液体培地の濁度の変化

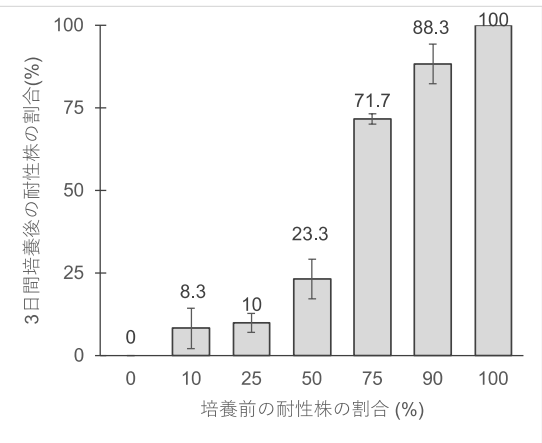


図 2. 混合培養後の耐性株の割合

一塩基変異に基づく系統解析の結果、BP616 と BP625 の 2 株とも中国のマクロライド耐性菌と同じサブクレードに属しており、中国株と遺伝的に近縁であることが明らかになった(図 3)。BP616 と BP625 のゲノムを比較すると、11 箇所に一塩基変異があり、遺伝的に異なる菌株であることが示された。これらの結果は、BP616 と BP625 が異なる感染経路で中国から持ち込まれた可能性が高いことを示唆している。

本研究によって、百日咳菌のマクロライド耐性獲得に伴う fitness cost は小さく、マクロライドの選択圧がない環境でも耐性を失わないことが示された。さらに、全ゲノム解析によって、中国のマクロライド耐性百日咳菌が日本国内へと侵入していることが明らかとなった。これらのことから、マクロライド耐性百日咳菌が今後国内でさらに分離される可能性が高いと考えられる。

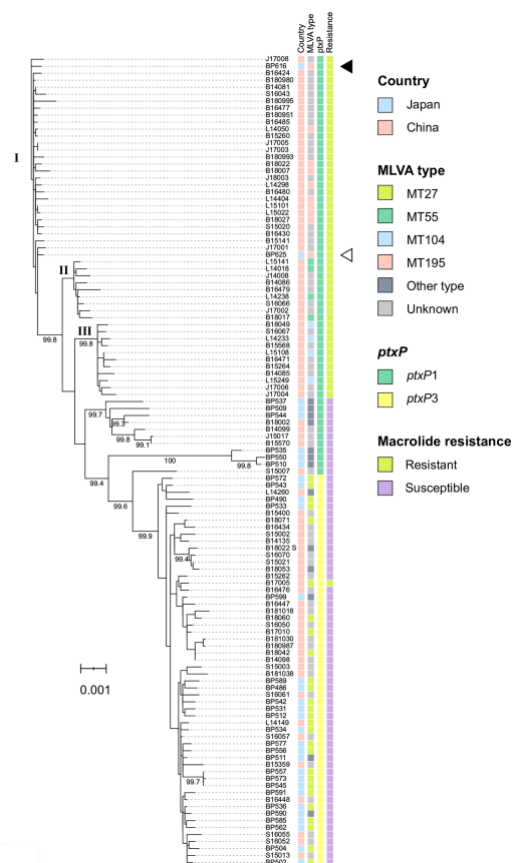


図 3. 日本および中国で分離された百日咳菌株の系統樹
BP616 は参照ゲノムとして使用され、系統樹に含まれている。黒矢印は BP616、白矢印は BP625 の位置を示す。ローマ数字の I-III はマクロライド耐性百日咳菌のサブクレードを示す。

引用文献

1. Koide K, Yao S, Chiang CS, Thuy PTB, Nga DTT, Huong DT, et al. Genotyping and macrolide-resistant mutation of *Bordetella pertussis* in East and South-East Asia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022. Epub 20221018. doi: 10.1016/j.jgar.2022.10.007. PubMed PMID: 36270447.
2. Yamaguchi T, Kawasaki Y, Katsukawa C, Kawahara R, Kawatsu K. The First Report of Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Isolation in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2020;73(5):361-2. Epub 20200430. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.421. PubMed PMID: 32350216.
3. Hao H, Dai M, Wang Y, Peng D, Liu Z, Yuan Z. 23S rRNA mutation A2074C conferring high-level macrolide resistance and fitness cost in *Campylobacter jejuni*. *Microb Drug Resist*. 2009;15(4):239-44. doi: 10.1089/mdr.2009.0008. PubMed PMID: 19857128.
4. Kamachi K, Duong HT, Dang AD, Hai T, Do D, Koide K, et al. Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis*, Vietnam, 2016-2017. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(10):2511-3. doi: 10.3201/eid2610.201035. PubMed PMID: 32946738; PubMed Central PMCID: PMC7510698.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koide Kentaro, Yamaguchi Takahiro, Katsukawa Chihiro, Otsuka Nao, Kenri Tsuyoshi, Kamachi Kazunari	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of a Macrolide-Resistant Bordetella pertussis Isolated in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00718-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koide Kentaro, Uchitani Yumi, Yamaguchi Takahiro, Otsuka Nao, Goto Masataka, Kenri Tsuyoshi, Kamachi Kazunari	4. 巻 19
2. 論文標題 Whole-genome comparison of two same-genotype macrolide-resistant Bordetella pertussis isolates collected in Japan	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0298147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 Kentaro Koide, Tomomi Uchitani, Takahiro Yamaguchi, Nao Otsuka, Masataka Goto, Tsuyoshi Kenri, Kazunari Kamachi
2. 発表標題 Comparative Genomic Analysis of Macrolide Resistant Bordetella pertussis Isolated in Japan
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------