

# 福岡における百日咳の流行：分離状況および MIC 分布 (1990—1993)

<sup>1)</sup>福岡県保健環境研究所, <sup>2)</sup>九州大学医学部小児科学教室, <sup>3)</sup>宗像医師会病院

堀川 和美<sup>1)</sup> 岡田 賢司<sup>2)</sup> 石橋 哲也<sup>1)</sup>

村上 光一<sup>1)</sup> 大淵 典子<sup>3)</sup> 植田 浩司<sup>2)</sup>

(平成 7 年 3 月 24 日受付)

(平成 7 年 5 月 22 日受理)

Key words: *Bordetella pertussis*, MIC, microbroth dilution, susceptibility testing

## 要 旨

1990年8月から1993年3月までの30カ月間に福岡県内6病院小児科を受診した百日咳様患者を対象として、百日咳菌分離を行った。この期間に菌検索を行った179検体から43株(24%)の1, 3, 6型のK抗原因子を保有する百日咳菌と1株のパラ百日咳菌を分離した。百日咳菌を分離した患者の年齢は1歳未満が22名(51%), 1歳から10歳が18名(42%), 成人が3名であった。これら43名中39名がDPTワクチン未接種であったが、3名はDPTワクチン接種済みであった。分離菌株の23薬剤に対する最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。MIC測定は微量液体希釈法で行った。PIPC, EM及びCPZのMIC<sub>50</sub>(使用菌株50%に対するMIC値)は0.005, 0.02及び0.01 $\mu$ g/mlであった。また、CER及びCCLのMIC<sub>50</sub>は各々10及び20 $\mu$ g/mlであり、分離菌株はこれら薬剤に対して耐性であった。更に従来から用いられている寒天平板希釈法も併せて実施し、微量液体希釈法と比較検討した。両法による使用菌株のMICは何れの薬剤も同じかやや寒天平板希釈法の方が高かった。

## 序 文

日本における百日咳患者数は、1975年の全菌体DPTワクチン接種の中断及びその後のワクチン接種率の低下によって著しく増加した。その後のワクチン接種率の回復、更に1981年秋からは改良DPTワクチンの採用によって患者数は減少している<sup>1)</sup>。福岡県においても同様の傾向を辿っているが、百日咳様患者数は全国平均よりも多い<sup>2)</sup>。そこで我々は百日咳菌を検出することにより、その流行の実態を把握することを試みた。従来から百日咳菌の臨床分離は困難といわれている<sup>3)</sup>。その理由の1つに挙げられるのが分離培地の問題である。百日咳菌の分離培地は新鮮な血液の添加を必

要とするBordet-Gengou agar培地やcharcoal horse blood agar培地が使用されている<sup>4)</sup>が、これらの培地は保存性等の点で劣っている。今回の百日咳菌分離には、1983年に今泉らによって開発された血液を使用しないCyclodextrin Solid Medium(CSM寒天培地)<sup>5)</sup>を用いた。また、分離菌株の血清型別を行い、全国傾向と比較した。一方、分離菌株の薬剤に対するMICを微量液体希釈法及び寒天平板希釈法により測定し、百日咳菌の薬剤感受性について検討した。

## 材料及び方法

### 1. 検体材料

1990年8月から1993年3月までの30カ月間に、百日咳様疾患と診断された患者145例及びその家族34例から採取された計179例の鼻咽頭粘液を検査材料とした。

別刷請求先：(〒818-01) 太宰府市大字向佐野39

福岡県保健環境研究所 病理細菌課

堀川 和美

## 2. 百日咳菌の分離及び同定

分離培地は、CSM 寒天培地<sup>5)</sup>に cephalixin (CEX) 5 $\mu$ g/ml (Oxoid 社) を加えた CEX・CSM 寒天培地を使用した。CSM 培地作製に使用した dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin は帝人株式会社より分与された。綿棒で採取した材料を直接、分離培地上に塗抹し、35°C、3～7日間培養した。培養後2～3日以降に出現したやや黄色みを帯びた白色不透明の半円形に隆起した単一コロニー（直径0.5～1.5mm）をCSM培地で純粋培養した。百日咳菌及びパラ百日咳菌の同定は微生物検査必携<sup>6)</sup>に準拠した。血清型別は国立予防衛生研究所に依頼した。

## 3. 使用薬剤

薬剤感受性試験に使用した薬剤はペニシリン系3種 ampicillin (ABPC), piperacillin (PIPC), amoxicillin (AMPC), マクロライド系4種 erythromycin (EM), midecamycin (MDM), josamycin (JM), rokitamycin (RKM), テトラサイクリン系2種 tetracycline (TC), minocy-

cline (MINO), アミノグリコシド系3種 streptomycin (SM), gentamicin (GM), kanamycin (KM), セフェム系8種 cephaloridine (CER), cefoperazone (CPZ), cefotaxime (CTX), cefmetazole (CMZ), flomoxef (FMOX), cefaclor (CCL), cefixime (CFIX), latamoxef (LMOX) 並びに chloramphenicol (CP) 及びその他合成抗菌剤2種 sulfisoxazole (SA), nalidixic acid (NA) の合計23種である (Table 1)。

## 4. 薬剤感受性試験

微量液体希釈法及び寒天平板希釈法による薬剤感受性試験は NCCLS<sup>7)</sup>及び Hoppe ら<sup>8)</sup>の方法により実施した。

1) 薬剤の調整：各薬剤の希釈はCSM液体培地<sup>5)8)</sup>を用い、微量液体希釈法では400～0.005 $\mu$ l/ml, 寒天平板希釈法では800～0.01 $\mu$ l/mlの濃度で2倍階段希釈を行った。希釈した各薬剤は微量液体希釈法ではマイクロプレートに25 $\mu$ lずつ分注し、寒天平板希釈法では1mlをCSM寒天培地9mlに添加混合した。

Table 1 Antibiotics for susceptibility test of *Bordetella pertussis*

Drug groups	Drugs	Source
Penicillins	Ampicillin	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
	Piperacillin	Toyama Chemical Co., Ltd.
	Amoxicillin	Beecham Pharmaceuticals, Ltd
Macrolides	Erythromycin	Sigma Chemical Co.
	Midecamycin	Meiji Seika Kaisya, Ltd.
	Josamycin	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
	Rokitamycin	Asahi Chemical Industry Co., Ltd.
Chloramphenicol	Chloramphenicol	P.L Biochemical
Tetracyclines	Tetracycline	Sigma Chemical Co.
	Minocycline	Lederle (Japan), Ltd.
Aminoglycosides	Streptomycin	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
	Gentamicin	Sigma Chemical Co.
	Kanamycin	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Cephem antibiotics	Cephaloridine	Sigma Chemical Co.
	Cefoperazone	Toyama Chemical Co., Ltd.
	Cefotaxime	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
	Cefmetazole	Sankyo Company, Ltd.
	Flomoxef	Shionogi & Co., Ltd.
	Cefaclor	Shionogi & Co., Ltd.
Oxacephem antibiotic	Cefixime	Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.
	Latamoxef	Shionogi & Co., Ltd.
Others	Sulfisoxazole	Sigma Chemical Co.
	Nalidixic acid	Sigma Chemical Co.

2) 菌液の調整：薬剤感受性試験供試菌は、分離菌株中無作為に抽出した27株を用いた。各菌株をCSM寒天培地で35°C、2日間培養を2回繰り返した後、滅菌綿棒でかき取り、CSM液体培地<sup>5)</sup>にMcFarland No. 0.5相当に懸濁し、同液体培地で約10<sup>6</sup>CFU/mlとなるよう希釈した。微量液体希釈法では各ウエルに100 $\mu$ l、寒天平板希釈法では各寒天表面に1~2 $\mu$ lの各菌液を接種した。

3) 判定：両法いずれも菌を接種した後、35°C 3日間培養後、菌生育の有無を判定した。

## 成 績

### 1. 百日咳菌分離結果

菌検索を行った179検体から43株(24%)の百日咳菌と1株のパラ百日咳菌を分離した。百日咳菌43株中6株は、患児の父親1名、母親2名及び同胞3名から分離された。一方、調査期間中の分離数を月別に見ると初夏から秋にかけて多く、特に1991年6月から11月に全体の67%が分離された(Fig. 1)。また、Fig. 1に結核・感染症サーベイランス事業での福岡県における1地点当たりの患者数<sup>2)</sup>をこの期間について示した。その結果、今回の

百日咳菌分離数とサーベイランスによる患者数との月別の挙動が極めて良く一致していた。

2. 患者の年齢、DPTワクチン歴及び分離菌株の血清型別

百日咳菌を分離した患者の年齢は1歳未満が22名(51%)、1歳から10歳が18名(42%)、また成人が3名であった。これら43名中39名がDPTワクチン未接種者であったが、3名はDPTワクチン接種済みであった(Table 2)。今回分離された43株の百日咳菌は、いずれも1, 3, 6のK抗原因子を保有していた。地方衛生研究所で全国的に百日咳菌分離を実施した調査結果<sup>9)</sup>では、分離菌株の95%が1, 3, 6のK抗原因子を保有しており、福岡県における結果と一致するものであった。

### 3. 薬剤感受性結果

Table 3に各菌株の各薬剤に対する微量液体希釈法によるMICの分布を示した。PIPCのMICは0.001~0.156 $\mu$ g/mlで、極めて優れた百日咳菌発育阻止効果を示した。マクロライド系薬剤4種の百日咳菌に対するMIC<sub>50</sub>はいずれも0.078 $\mu$ g/ml以下を示し良好な結果であった。一方、CCL及びCERのMICはすべて5 $\mu$ g/ml以上であり、分離菌株は両薬剤に対して耐性であった。CMZのMICは1.25~2.5 $\mu$ g/mlであった。CPZは高い菌発育阻止効果を示し、そのMIC<sub>50</sub>は0.01 $\mu$ g/mlであったが、2株のMICは1.25 $\mu$ g/mlであった。また、LMOXのMICは0.02~0.078 $\mu$ g/mlと高い発育阻止効果が見られた。他のCTX、FMOX及びCFIXのMIC<sub>50</sub>は、それぞれ0.625、0.625及び1.25 $\mu$ g/mlであった。GM、SM及びKMのMIC

Fig. 1 Incidence of pertussis in Fukuoka

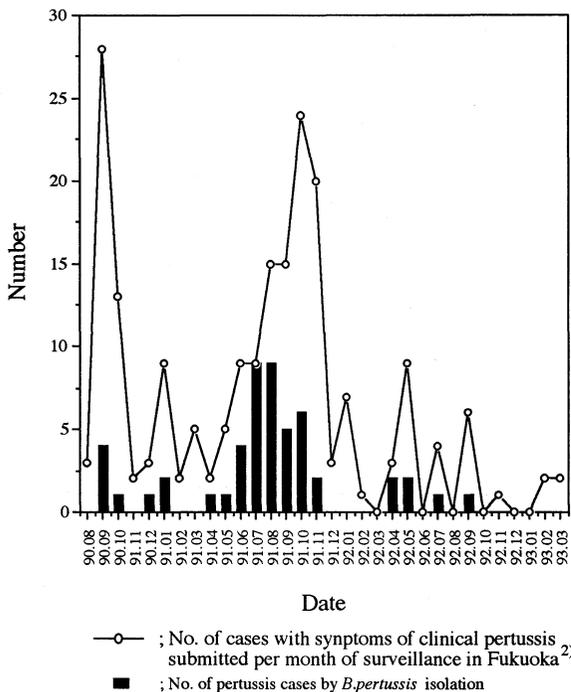


Table 2 Age and vaccination history of bacteriologically confirmed patients of pertussis

Age group	No. of isolates	Vaccination		
		unvaccinated	vaccinated	unknown
0-2 months	2	2		
3-4 months	4	4		
5-6 months	10	10		
7-11 months	6	6		
1-2 years	10	10		
3-5 years	4	3	1	
6-10 years	4	3	1	
28-32 years	3	1	1	1

Table 3 Distribution of differences in the MICs of 23 antimicrobial agents for 27 *B. pertussis* isolates

Drug	No. of isolates with MICs ( $\mu\text{g/ml}$ ) of:																	
	0.001	0.002	0.005	0.010	0.020	0.039	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.50	5.00	10.0	20.0	40.0	80.0	
Ampicillin	27																	
Piperacillin	2	3	14	2	2	1	3											
Amoxicillin										1	10	12	1	3				
Erythromycin				8	15	3	1											
Midecamycin						1	22	3	1									
Josamycin					1	19	6	1										
Rokitamycin					1	14	11	1										
Chloramphenicol							1	1	8	15	1	1						
Tetracycline							1	11	12	3								
Minocycline				1	6		19	1										
Streptomycin											1	15	11					
Gentamicin					1	3	18	5										
Kanamycin									1	19	7							
Cefaclor													1	15	7	4		
Cephaloridine													5	22				
Cefmetazole											19	8						
Cefoperazone	2	8	14				1	2										
Latamoxef					1	21	5											
Cefotaxime								8	11	6	1	1						
Flomoxef									20	6	1							
Cefixime											2	25						
Sulfisoxazole												27						
Nalidixic acid										4	23							

は、各々0.02~0.313, 0.625~2.5及び0.313~1.25  $\mu\text{g/ml}$ であった。MINOのMICは0.01~0.625  $\mu\text{g/ml}$ でTCの0.313~2.5  $\mu\text{g/ml}$ に比べて約40倍強い発育阻止効果が見られた。CP, SA及びNAのMIC<sub>50</sub>はいずれも1.25  $\mu\text{g/ml}$ であった。

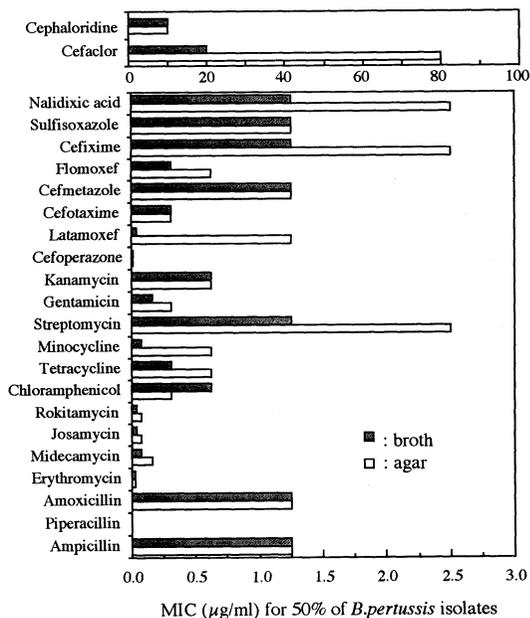
一方、薬剤感受性試験法には寒天平板希釈法が従来から実施されているので、両方法のMIC<sub>50</sub>について比較検討した。Fig. 2に23薬剤の27百日咳分離菌株に対するMIC<sub>50</sub>をヒストグラムで示した。CP以外の22薬剤では寒天平板法の方が微量液体希釈法に比べ、MIC<sub>50</sub>が同じかやや高い傾向にあった。

考 察

福岡における百日咳様患者からの菌分離数を、サーベイランス事業における定点からの報告数<sup>2)</sup>と月別に比較したが、両者の挙動は良く一致し、サーベイランス事業の情報が実際の百日咳の流行を反映していることが示唆された。

「百日咳の疫学に関する研究」(班長：木村三生夫)で1973~1974年に地方衛生研究所を中心とす

Fig. 2 Comparison of broth microdilution with agar dilution for susceptibility test of *B. pertussis* isolates



る百日咳患者及び免疫度調査が行われた<sup>10)</sup>。この調査時の百日咳菌の分離されている患者の年齢層は1～5歳が多く、全体の56%を占めていた。今回の福岡での調査では、1～5歳の患者は32%で、1歳以下の発生が全体の51%であった。また、Marchantら<sup>11)</sup>がMassachusettsでの百日咳の発生の低年齢化を報告しているが、福岡でも同様の傾向を示している。また、今回の調査期間中1991年の春から秋にかけて明らかに百日咳の流行があったと考えられた。さらに、今回成人から分離された3例はいずれも菌陽性患者の父母であった。成人3例中2例は百日咳症状は軽微であり、また1例は全く無症状であった。多くの研究者<sup>12)~14)</sup>は成人による百日咳菌の小児への伝播の可能性を指摘しているが、今回の患者の親から分離された3事例も親が感染源となっている可能性は否定できない。

一方、薬剤感受性試験結果についてみると、1987年に渡辺ら<sup>15)</sup>が1975～1985年に分離した菌株について10%脱繊維馬血液加感受性ディスク用培地を用い寒天平板希釈法によって19種の薬剤のMICを測定している。今回分離した百日咳菌の寒天平板希釈法でのMICの結果と比較すると、使用培地は異なるものの渡辺らの報告よりもABPC及びAMPCのMIC<sub>50</sub>が約10倍高かった。Hoppeら<sup>8)</sup>がEMについて百日咳菌の薬剤感受性試験を微量液体希釈法によって行い、そのMICは0.016～0.063μg/mlであり、我々の0.01～0.078μg/mlと同様の結果を示していた。その他のマクロライド系薬剤であるMDM, JM及びRKMのMIC<sub>50</sub>は0.078μg/ml以下であった。

最近ではPCR法を用いた診断法が普及し<sup>16)</sup>、菌陽性者の確認が迅速且つ高感度になっている。菌分離にこれらの手法を加え菌陽性者を確認することは、流行の事実確認と共にキャリア等の問題も含めて百日咳予防に役立つものと考えられる。

謝辞 稿を終るに臨み本研究に多大な協力を頂きました新宮光二先生、松本壽通先生、福岡大学医学部諸岡達也先生及び福岡市立こども病院青木知信先生、日高靖文先生、安慶田英樹先生に対し厚く感謝致します。また、終始懇切

な御校閲を頂きました福岡県保健環境研究所長森 良一先生に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Kimura, M. & Kuno-Sakai, H.: Pertussis vaccines in Japan. *Acta. Paediatr. Jpn.*, 30: 143—153, 1988.
- 2) 福岡県結核・感染症サーベイランス事業資料集, 1993.
- 3) Feigin, R.D. & Cherry, J.D.: Pertussis. *In* Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 2nd ed. (Feigin, R.D. & Cherry, J.D., eds.) p. 1227—1238, Saunders, Philadelphia, 1987.
- 4) Hoppe, J.E.: Methods for isolation of *Bordetella pertussis* from patients with whooping cough. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 7: 616—620, 1988.
- 5) Imaizumi, A., Suzuki, Y., Ono, S., Sato, H. & Sato, Y.: Heptakis (2,6-*o*-Dimethyl)  $\beta$ -Cyclodextrin: A novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 781—786, 1983.
- 6) 佐藤勇治: 4. 百日咳菌. 微生物検査必携, 細菌・真菌検査第3版 (厚生省監修), p. F62—F75, 財団法人日本公衆衛生協会, 東京, 1987.
- 7) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. NCCLS Approved Standard, Document M7—A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1990.
- 8) Hoppe, J.E., Halm, U., Hagedorn, H.-J. & Kraminer-Hagedorn, A.: Comparison of erythromycin ethylsuccinate and cotrimoxazole for treatment of pertussis. *Infection*, 17: 227—231, 1989.
- 9) 地方衛生研究所百日咳研究班, 平成3年度報告資料集
- 10) 木村三生夫: 百日咳の現況. 臨床と細菌, 3: 107—115, 1976.
- 11) Marchant, C.D., Loughlin, A.M., Lett, S.M., Todd, C.W., Wetterlow, L.H., Bicchieri, R., Higham, S., Etkind, P., Silva, E. & Siber, G.R.: Pertussis in Massachusetts, 1981—1991: Incidence, serologic diagnosis, and vaccine effectiveness. *J. Infect. Dis.*, 169: 1297—1305, 1994.
- 12) Baraff, L.J., Wilkins, J. & Wehrle, P.F.: The role of antibiotics, immunizations, and adenoviruses in pertussis. *Pediatrics*, 61: 224—230, 1978.
- 13) Lambert, H.P.: The carrier state: *Bordetella*

- pertussis*. J. Antimicrob. Chemother., 18: 13—16, 1986.
- 14) He, Q., Viljanen, M.K., Nikkari, S., Lyytikäinen, R. & Mertsola, J.: Outcomes of *Bordetella pertussis* infection in different age groups of an immunized population. J. Infect. Dis., 170: 873—877, 1994.
- 15) 渡辺 満, 原口怡子, 権田隆明, 青山辰夫, 小沢 広子, 村瀬雄二, 岩田 崇, 岩田 敏, 草野正一: 1975年から1985年にかけて分離した百日せき菌およびバラ百日せき菌の血清型別ならびに薬剤感受性. 感染症誌, 61: 79—86, 1987.
- 16) Bäckman, A., Johansson, B. & Olcén, P.: Nested PCR optimized for detection of *Bordetella pertussis* in clinical nasopharyngeal samples. J. Clin. Microbiol., 32: 2544—2548, 1994.

Prevalence of Pertussis in Fukuoka: Incidence and MICs of Antibiotics for *Bordetella pertussis* Isolate

Kazumi HORIKAWA<sup>1)</sup>, Kenji OKADA<sup>2)</sup>, Tetsuya ISHIBASHI<sup>1)</sup>, Koichi MURAKAMI<sup>1)</sup>, Noriko OHBUCHI<sup>3)</sup> & Kohji UEDA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics Faculty of Medicine Kyusyu University

<sup>3)</sup>Munakata Medical Association Hospital

For bacteriological examinations of whooping cough patients, nasopharyngeal specimens were directly inoculated on the cyclodextrin solid medium (CSM) supplemented with 5  $\mu\text{g}$  of cephalexin (CEX) per ml. The inoculated plates were cultured in an incubator at 35°C for 3 to 7 days. During the period from 1990 to 1993, *B. pertussis* (43 strains) and *B. parapertussis* (1 strain) were isolated from 145 whooping cough patients and 34 relatives. *B. pertussis* were isolated sufficiently in June to December during the year. It was suggested that during this period epidemics of whooping cough occurred. All isolates of *B. pertussis* had K antigen consisting of 1, 3, and 6.

The determination of minimal inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics to *B. pertussis* was carried out by the micro dilution technique modified from the standard methods. The Stainer-Scholte broth, supplemented with heptakis (2,6-*O*-dimethyl)  $\beta$ -cyclodextrin, was used for dilution of the drug, and also for cultivation of bacteria. For determining susceptibility of bacteria to antibiotics, twenty seven isolates of *B. pertussis* and one of *B. parapertussis* were precultured on CSM at 35°C for 2 days. The turbidity of broth cultures was adjusted to that of McFarland no. 0.5, and diluted to the concentration of 10<sup>6</sup> CFU/ml. One hundred  $\mu\text{l}$  of these suspensions were added to 25  $\mu\text{l}$  of each antibiotic solution. After incubation for 3 days at 35°C, the turbidity of the bacteria was read macroscopically for determining the MICs. On the other hand, we compared the agar dilution MICs of 23 antibiotics to the broth microdilution MICs for 27 *B. pertussis* isolates. MICs determined by the agar dilution method were approximately the same or 2 fold of MICs determined by the broth microdilution method. Therefore the *in vitro* data from the present studies confirm the excellent inhibitory activity of piperacillin, erythromycin and cefoperazone, MICs which ranged from 0.001–0.156, 0.01–0.078 and 0.002–0.078  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. Cephaloridine and cefaclor MICs for 90% of *B. pertussis* isolates were 10 and 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively.