

LAMP 法による百日咳迅速診断の実施状況と検査結果の概要

八柳 潤 齊藤志保子 今野貴之

百日咳は、特有のけいれん性の咳発作を特徴とする急性気道感染症である。我々は、県内の百日咳対策に資するために、LAMP 法による百日咳検査を実施する体制を確立した。2008 年 8 月 22 日から 2009 年 5 月 8 日の間に送付された 113 検体中、17 検体が LAMP 法陽性であった。2008 年 12 月 29 日までに送付された 76 検体のうち、LAMP 法で陽性となった 11 検体、血清診断で陽性となった 13 検体、両法で陽性となった 2 検体について患者年齢、ワクチン接種歴、マクロライド系抗生物質投薬歴、検体採取日の病日を比較検討した。その結果、LAMP 法陽性者の 53.8%、血清診断陽性者の 80.8%がワクチン既接種者であること、百日咳患者の全てが典型的な臨床症状や白血球数、リンパ数の変動を示すとは限らないことなどが示された。さらに、百日咳が否定された患者の一部に *Mycoplasma pneumoniae*, *Parainfluenza virus*, *RS virus* 陽性者が確認され、百日咳の確実な診断には適切な病原診断が不可欠であることが示された。県内の、より多くの医療機関が LAMP 法による百日咳の診断を活用可能なように、検査依頼方法の詳細も併せて一層の周知を図る必要がある。ワクチン既接種者にも LAMP 法、血清診断共に陽性者が認められたことは、現行の百日咳ワクチンの有効性、有効期間などについて検討する必要性を示す重要な知見と考えられた。

1. 緒言

百日咳 (pertussis) は百日咳菌を原因とし、特有のけいれん性の咳発作 (痙咳発作) を特徴とする急性気道感染症である。鼻咽頭や気道からの分泌物による飛沫感染、および接触感染により感染し、麻疹ウイルスと並び高い感染力を有する。感染症法では 5 類感染症定点把握疾患に定められており、その報告数に基づいて年間罹患数は 2000 年 2.8 万人、2001 年 1.5 万人と推計されている。乳児期早期から罹患し、ことに生後 6 カ月以下では死に至る危険性も高いが、百日咳ワクチンを含む DPT 三種混合ワクチン接種の普及とともに百日咳の発生数は激減している。しかし、近年、ワクチン効果が減弱した青年・成人も百日咳に罹患することが明らかとなっている。実際、成人患者の割合が 2007 年には全患者の 31% を占めていることから、新たな対策の必要性が指摘されている。また、成人が百日咳菌を保菌した場合、本人が気づかないうちに乳幼児への感染源となることも問題とされている。

百日咳の確定診断は、臨床症状に加えて百日咳菌の検出または血清診断が必要であるが、菌の分離には 4～5 日間の培養時間を要すること、菌はカタル期後半に検出されるものの、痙咳期に入ると検出されにくくなることなどにより、菌分離同

定による病原診断は困難なことが多い。このため、医療機関では主に抗体検査による血清診断が行われているが、ワクチン接種者ではペア血清による診断が必要であり、流行株による診断が必要となる。とりわけ、成人患者は長期の咳または発作性の咳だけのことが多く、他の疾患との鑑別が困難であることに加えて、成人患者は保菌量が少ないため、菌の分離同定は一層困難であり、正確な診断には困難を伴う。百日咳診断に伴うこれらの問題を克服するため、近年、遺伝子診断法の応用が試みられてきている。

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法は、PCR 法と比較してサーマルサイクラーのような専用の機器を必ずしも必要とせず、増幅速度が速く、特異性も高いことを特徴とする比較的新しい遺伝子診断法である。感染研の蒲地らは、百日咳の遺伝子診断に LAMP 法を応用し、カンボジアでのフィールド試験においてその有用性を実証した¹⁾。当センターは地方衛生研究所技術協議会、北海道・東北・新潟ブロックにおける百日咳・ジフテリア・ボツリヌスレファレンスセンターを担当しており、レファレンスセンター業務の一環として百日咳 LAMP 法の試薬が配布され、検査を実施することとなっている。百日咳は約 4 年周期の流行を繰り返すことが知られており、

2008年には、調査が始まった1999年以降最も大きな患者発生ピークが見られ、秋田県内でも患者増加傾向が顕著に認められた。このことから、県内の百日咳対策に資することを目的として、2008年8月から秋田県の医療機関を対象としてLAMP法を実施する体制を確立したので、検査体制と検査結果の概要などについて報告する。

2. 方法

2.1 LAMP法による百日咳検査体制の確立

2008年8月初旬、県内のある医療機関から、百日咳が疑われる患者が発生したのでLAMP法による病原診断を実施して欲しい旨の問い合わせが担当保健所に寄せられたことを契機として、県内の医療機関にLAMP法による百日咳検査へのニーズが存在することが把握された。このため、健康推進課が主体となり県内の医療機関からのLAMP法検査依頼に対応すべき体制構築を試み、平成20年8月12日付け、社団法人秋田県医師会会長、社団法人秋田県病院協会会長、各病院長、各保健所長宛て秋田県健康福祉部長発健1515号、「健康環境センターの行うLAMP法による百日咳菌検査の利用について（通知）」を発出して県内全ての医療機関からのLAMP法による百日咳検査依頼に対応することとなった。

2.2 検体採取・検査依頼方法

LAMP法検査には鼻咽頭分泌物を供した。鼻咽頭分泌物を滅菌綿棒（コレクトスワブR）で採取した後、その綿棒を小試験管入り滅菌カザミノ酸培地に投入し、当日中に当所に搬送・到着が可能な場合には冷蔵、翌日以降に到着する場合は冷凍条件下で搬送することとした。検体には必要事項を記載したLAMP法百日咳検査依頼伝票（様式1）を添付することとし、検査終了後に結果を記入した様式1伝票を依頼元医療機関へFAXで送信することとした。検体採取に使用するコレクトスワブと滅菌カザミノ酸培地は当所で用意し、様式1検査伝票と検体採取方法を記載した資料とともに希望のあった医療機関に直接送付することとした。なお、医療機関からの要望の多い一部の保健所では、保健所内にこれらを常備することとした。

LAMP法の検査精度向上のための解析等が可能となるように、様式1検査伝票の記載事項は次

のとおりとした：患者年齢・性別、発病日、検体採取日、DPTワクチン接種歴、臨床所見（発熱、白血球数、リンパ球％、咳：発作性連続性、吸気性笛声、夜間咳・長引咳）、発生状況（散発、集団、家族、地域流行）、血清抗体価検査結果（凝集法）。

2.3 LAMP法

2008年8月22日から2009年5月8日の間に113検体の検体が送付された。国立感染症研究所が示したプロトコールに従い、QIAamp DNA マイクロキットを使用して検体からDNAを抽出し、国立感染症研究所から配布される百日咳LAMP法検査試薬キットを使用してLAMP法を実施した。検体到着から検査結果判明までの時間は、通常1時間30分以内であった。

2.4 検査結果の解析

2008年12月29日までに送付された76検体のうち、LAMP法で陽性となった11検体、血清診断で陽性となった13検体、両法で陽性となった2検体について患者年齢、ワクチン接種歴、マクロライド系抗生物質投薬歴、検体採取日の病日、臨床所見について比較検討した。なお、血清診断の判定基準は、ペアー血清で抗体値（凝集価）の4倍以上の上昇、単独血清ではワクチンの影響が認められる場合に山口株で抗体価320倍以上、ワクチンの影響がない場合には抗体価40倍以上とした。

2.5 百日咳菌以外の呼吸器系病原微生物の関与

百日咳が疑われる呼吸器症状を呈しているにもかかわらず、LAMP法、血清診断のいずれによっても百日咳が否定される患者が少なからず存在した。これらの患者に、百日咳菌以外の病原微生物が関与しているかどうかについても検討した。検索対象病原微生物は *Mycoplasma pneumoniae*²⁾、PIV type 1,2,3³⁾、RSV type A,B⁴⁾、hMPV subtype A,B⁵⁾とし、リアルタイムPCR法により検索を実施した。*M. pneumoniae* は71検体、PIV、RSV、hMPV は20検体を検索対象とした。

3. 結果・考察

3.1 LAMP法による百日咳検査の結果と検査結果の解析

2008年8月22日から2009年5月8日の間に送付された113検体のうち、17検体がLAMP法で百日咳陽性であることが示された。一方、2008年12月29日までに送付された76検体のうち、LAMP法で陽性となった11検体、血清診断で陽性となった13検体、両法で陽性となった2検体について患者年齢、ワクチン接種歴、マクロライド系抗生物質投薬歴、検体採取日の病日を比較検討した結果を表1に示す。LAMP法で陽性となった患者の年齢は血清診断で陽性となった患者の年齢よりも低い傾向がみられた。このことは、LAMP法陽性者にワクチン接種前の乳幼児がより多く包含されていることに起因していたが、LAMP法陽性者には10歳と15歳(小学生と高校生)の患者と26歳の成人患者も含まれていた。また、LAMP法陽性者の53.8%、血清診断陽性者の80.8%がワクチン既接種者であった。これらの結果は、LAMP法で成人や就学年齢の百日咳患者

の診断、及びワクチン既接種者の診断も可能であることを示していた。治療のためにマクロライド系抗生物質の投与を受けた患者は、LAMP法陽性者では11名中1名であったのに対して、血清診断陽性者では13名中7名であった。また、検体を採取した日の病日は、LAMP法陽性者では 12.0 ± 4.4 日、血清診断陽性者では 19.5 ± 11.1 日であった($P=0.032$ で有意)。以上の結果は、マクロライド投与後にはLAMP法の陽性率が低下することを示しており、このことはマクロライド系抗生物質の投与により、鼻咽頭における菌数が減少することに起因すると考えられた。また、LAMP法陽性者と血清診断陽性者に認められた検体採取病日の有意な違いは、病日が経過するにつれて鼻咽頭の菌数が減少することによりLAMP法の陽性率が低下し、血清診断が有用となることを示していると考えられた。

表1 百日咳陽性患者の年齢、ワクチン接種歴、マクロライド投与歴と検体採取日(病日)

	陽性数	患者年齢	ワクチン 既接種	マクロライド 投与	検体採取日(病日)
LAMP法	11	6.2(平均)	53.8%	1/11	12.0 ± 4.4
血清診断	13	11.0(平均)	80.8%	7/13	19.5 ± 11.1
両法陽性	2	4M, 10Y	両者+ (100%)	なし	10, 14

百日咳患者では白血球数の増加とリンパ球数の異常増多がみられることが知られており、これらの項目は百日咳罹患を示唆する指標ともされている。このことの妥当性について検討するために、調査票に記載されたLAMP法陽性患者、血清診断陽性患者、両法陰性患者の白血球数とリンパ球数を比較した。その結果を表2に示す。LAMP法陽性患者と血清診断陽性患者の白血球数に有意差が認められたものの、両方陰性患者とLAMP法陽性患者、両方陰性患者と血清診断陽性患者の白血球数には有意差が認められず、リンパ球数にはどのカテゴリーの患者間でも顕著な違いがみられなかった。限られた症例に基づく結果ではあるものの、以上の結果は、百日咳患者の全てが必ずしも白血球数、リンパ球数ともに典型的な増加を示すとは限らないことを示しており、これらの

数値が百日咳罹患を示唆する指標として妥当であるかどうかを判断するためには、さらに多くの症例について検討する必要があると考えられた。

表2 百日咳患者の白血球数とリンパ球パーセンテージ

	白血球数(N)	リンパ球%(N)
LAMP+	$12152.1 \pm 7572(10)^*$	$48.9 \pm 18(10)$
血清診断+	$7334.0 \pm 3017(15)^*$	$38.8 \pm 15(14)$
両法陰性	$8548.0 \pm 3103(20)$	$41.3 \pm 17(19)$

*: $P=0.026$

典型的な百日咳患者では発作性連続性咳、吸気性笛声、夜間咳・長引咳がみられることから、これらの症状も百日咳罹患を示唆すると考えられ

ている。このため、LAMP 法陽性患者、血清診断陽性患者、両法陰性患者について、調査票に記載されたこれらの症状を比較検討した。表 3 に示すとおり、LAMP 法あるいは血清診断により百日咳と診断された患者では、両法陰性の患者と比較して発作性連続性咳の発生頻度が 20%以上高いことが示されたものの、それ以外の症状については百日咳患者と両法陰性患者に発生頻度の顕著な違いはみられなかった。

表 3 百日咳患者における咳等の発現頻度

	発作性 連続咳	吸気性 笛声	夜間咳・ 長引咳
LAMP+	84.6%	23.1%	84.6%
血清診断+	86.7%	20.0%	93.3%
両法陰性	59.1%	22.7%	81.9%

以上の結果は、百日咳患者が典型的な臨床症状や白血球数、リンパ数の変動を示すとは限らないことを示しており、百日咳の確実な診断には病原診断と血清診断による必要があることを示唆していた。特に、ワクチン既接種者では非定型的な臨床症状を示す可能性が高いことから、適切な診断を実施することが大切であると考えられる。

3.2 百日咳菌以外の呼吸器系病原微生物の関与

臨床症状から百日咳が疑われながら LAMP 法、血清診断のいずれでも百日咳感染が否定された患者が認められた。これらの患者の呼吸器症状に百日咳菌以外の病原微生物の感染が関与しているかどうかリアルタイム PCR 法により検討した。その結果を表 4 に示す。供試した 71 検体中 1 検体が *M. pneumoniae* 陽性、20 検体中 1 検体が PIV、3 検体が RSV 陽性であることが明らかとなった。特に、*M. pneumoniae* については血清診断で陽性と判定された患者がさらに 3 名存在したことから、百日咳が疑われる臨床症状を惹起する病原微生物として重要であることが示唆され、百日咳の確実な診断のためには、これらの病原微生物との鑑別も重要であることが示された。

表 4 百日咳菌以外に検出された呼吸器系病原体

病原体	検査数	検出数	備考
<i>M. pneumoniae</i>	71	1	血清診断 3 名陽性
PIV	20	1 (Type 2)	百日咳 LAMP 陽性
RSV	20	3 (Type B)	1 名 <i>M. pneu.</i> 血清診断+
hMPV	20	0	

4. まとめ

2008 年 8 月 22 日付けで、県内の医療機関の全てから LAMP 法による百日咳検査依頼を受け付ける体制を確立した。LAMP 法では血清診断と異なり、急性期の病原診断が可能となる。今回の検討に供した症例は必ずしも多くはなかったが、LAMP 法では成人患者、ワクチン既接種者も病原診断が可能であることが実証された。また、検体はマクロライド投与前、発症後早い時期に採取することが LAMP 法による検査精度の向上には重要であることも示された。

県内のより多くの医療機関が LAMP 法による百日咳の診断を活用可能なように、検査精度の向上に重要と思われるこれらの情報と共に、検査依頼方法の詳細も併せて一層の周知を図る必要がある。

一方、ワクチン既接種者にも LAMP 法、血清診断共に陽性者が認められたことは、現行の百日咳ワクチンの有効性、有効期間などについて検討する必要性を示す重要な知見と考えられた。

参考文献

- 1) Kamachi K, Toyoizumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung S.C., et al. Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Bordetella pertussis* Infection. J Clin Microbiol, 44, 2006, 1899-1902.
- 2) Dumke R, Schurwanz N, Lenz M, et al. Sensitive Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in Human

- Respiratory Tract Samples by Optimized Real-Time PCR Approach. J Clin Microbiol, 45, 2007, 2726-2730.
- 3) Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, et al. Comparison of Real-Time PCR Assays with Fluorescent-Antibody Assays for Diagnosis of Respiratory Virus Infections in Children. J Clin Microbiol, 44, 2006, 2382-2388.
- 4) Kuypers J, Wright N, Morrow R. Evaluation of quantitative and type-specific real-time RT-PCR assays for detection of respiratory syncytial virus in respiratory specimens from children. J Clin Virol, 31, 2004, 123-129.
- 5) Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. J Clin Virol, 33, 2005, 299-305.