

LAMP法による百日咳の診断

Diagnosis of *Bordetella pertussis* infection by the LAMP method

おか だ けん じ
岡 田 賢 司
Kenji OKADA

I. 百日咳の現状

国内外とも年長児や思春期・成人の発症が多くなっている。百日咳は、感染症法5類感染症・定点把握疾患に分類され、全国約3,000の小児科定点から報告されている。感染症発生動向調査における定点あたりの累積患者報告数を示す(図1)。1982年から4～5年ごとに小さな増減を繰り返しながら報告数は着実に減少してきたが、2005年からわずかに増加し、2008年は過去10年にない多くの患者が報告された。小児科定点から報告される患者年齢に変化が認められる。年齢群別累積報告数を図2に示す。2006年までは乳児が最も多かったが、2007

年以降、全年齢群で増加した。とくに20歳以上の成人の増加が目立つ。2008年に多く報告されたのは、この成人層であった。2012年以降は、各年齢群に大きな変化はないが、2014年に10～14歳群だけが増加している。

この報告は、小児科定点医療機関からの報告であるため、思春期・成人症例を含めた百日咳の全体像を表していない。小児科定点だけでなく内科を含めた報告システムと病原体検査に基づいた正確な診断が必要である。

II. 百日咳の検査

上記の感染症発生動向調査における報告基準を表1

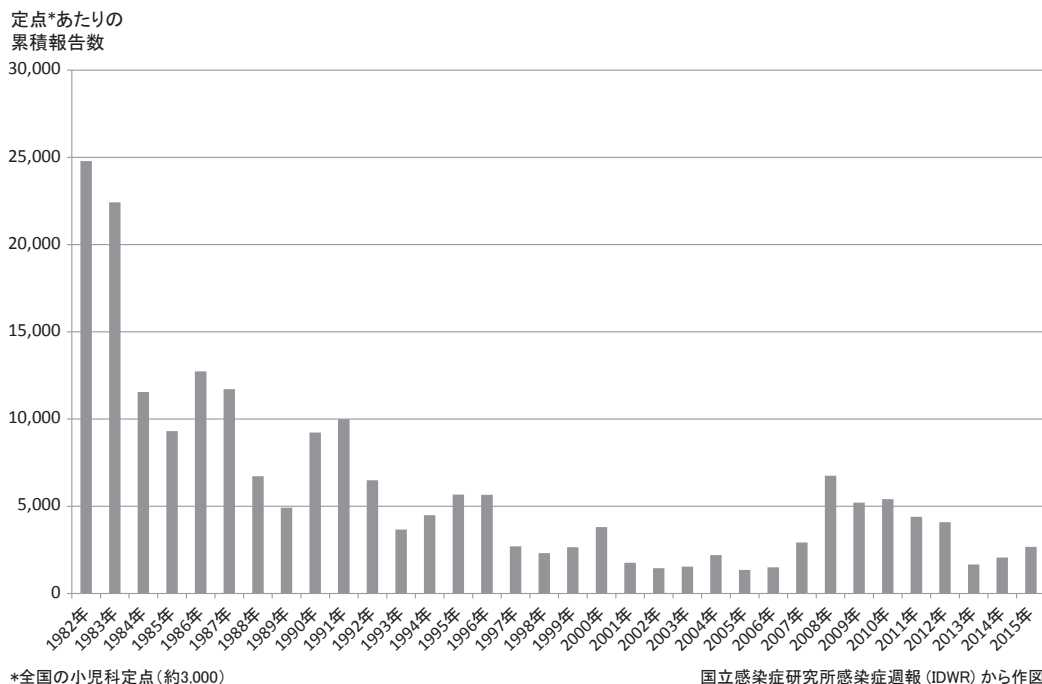


図1 百日咳 定点あたりの累積患者数 (1982～2015年)

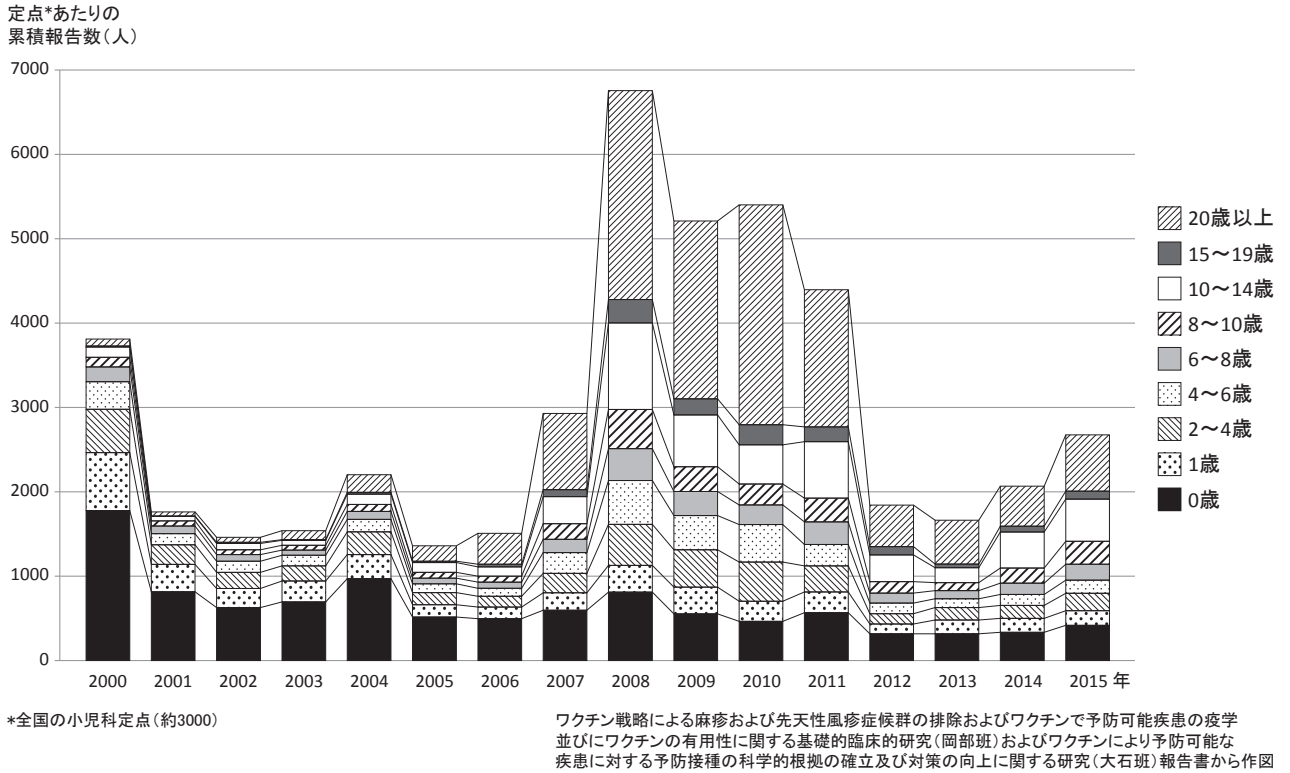


図2 年齢群別小児科定点あたりの百日咳累積報告数(2000~2015年)

表1 感染症発生動向調査における届出基準：百日咳(5類感染症小児科定点把握疾患)

- (1) 定義
Bordetella pertussisによって起こる急性の気道感染症である。
- (2) 臨床的特徴
潜伏期は通常5~10日(最大3週間程度)であり、かぜ様症状で始まるが、次第に咳が著しくなり、百日咳特有の咳が出始める。典型的な臨床像は、顔を真っ赤にしてコンコンと激しく咳込み(スタッカート)、最後にヒューッと音を立てて大きく息を吸う発作(ウープ)となる。嘔吐も伴い、眼瞼の浮腫や顔面の点状出血がみられることがある。幼児乳児や、年長児、また成人では典型的な症状がみられず、診断が難しいことも少なくない。乳児では重症になり、特に新生児がかかると無呼吸となり、致死的となることがある。肺炎、脳症を合併することがある。
- (3) 届出基準
ア 患者(確定例)
指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、(2)の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から百日咳が疑われ、かつ、(4)により、百日咳患者と診断した場合には、法第14条第2項の規定による届出を週単位で、翌週の月曜日に届け出なければならない。
イ 感染症死亡者の死体
指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、(2)の臨床的特徴を有する死体を検察した結果、症状や所見から、百日咳が疑われ、かつ、(4)により、百日咳により死亡したと判断した場合には、法第14条第2項の規定による届出を週単位で、翌週の月曜日に届け出なければならない。
- (4) 届出のために必要な臨床症状(ア及びイを満たすもの)

ア 2週間以上持続する咳嗽
イ 以下のいずれかの要件のうち少なくとも1つを満たすもの (ア) スタッカート及びウープを伴う咳嗽発作 (イ) 新生児や乳児で、他に明らかな原因がない咳嗽後の嘔吐又は無呼吸発作

http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekkaku-kansenshou/kekkaku-kansenshou11/01.html

に示す。届出のために必要な臨床症状は、(1) 2週間以上持続する咳嗽 かつ (2) 次のいずれかの要件のうち少なくとも1つを満たすもの(ア) スタッカート及びウープを伴う咳嗽発作 (イ) 新生児や乳児で、他に明らかな原因がない咳嗽後の嘔吐又は無呼吸発

作となっており、病原体検査は含まれていない。

感染症の診断には病原体検査が必要である。このため、研究班¹⁾から病原体検査を含む新しい診断の目安(表2) およびフローチャート(図3)が出されている。

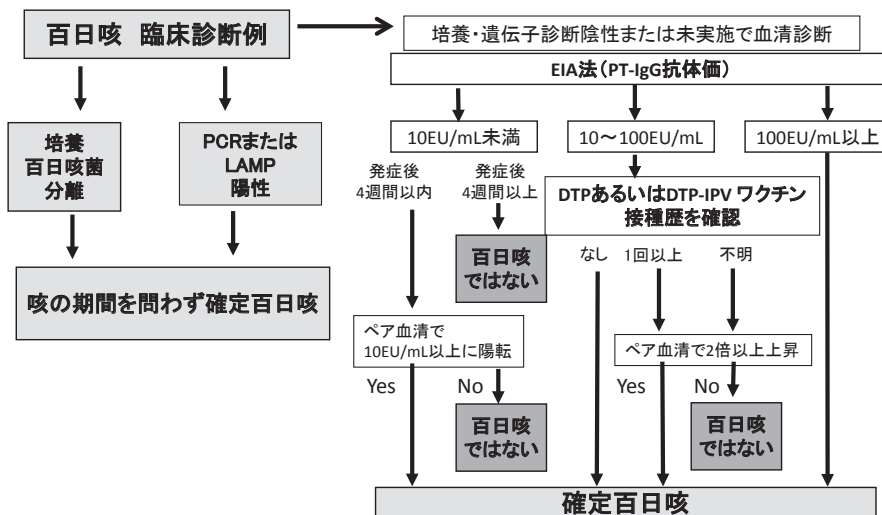
表2 百日咳診断（届出）基準の改訂案

<p>(1) 1歳未満</p> <p>臨床診断例：咳があり（期間は限定なし）、かつ以下の特徴的な咳、あるいは症状を1つ以上呈した症例</p> <ul style="list-style-type: none"> ・発作性の咳嗽 ・吸気性笛声 ・咳嗽後の嘔吐 ・無呼吸発作（チアノーゼの有無は問わない） <p>確定例：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・臨床診断例の定義を満たし、かつ検査診断陽性 ・臨床診断例の定義を満たし、かつ検査確定例と接触があった例
<p>(2) 1歳以上の患者（成人を含む）</p> <p>臨床診断例：1週間以上の咳を有し、かつ以下の特徴的な咳、あるいは症状を1つ以上呈した症例</p> <ul style="list-style-type: none"> ・発作性の咳嗽 ・吸気性笛声 ・咳嗽後の嘔吐 ・無呼吸発作（チアノーゼの有無は問わない） <p>確定例：</p> <ul style="list-style-type: none"> ・臨床診断例の定義を満たし、かつ検査診断陽性 ・臨床診断例の定義を満たし、かつ検査確定例と接触があった例

検査での確定

- ・咳発症後からの期間を問わず、百日咳菌の分離あるいはPCRまたはLAMP陽性
- ・咳発症後2週間以上8週間以内の抗PT抗体価：100 EU/mL以上

平成26年度 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
『百日咳の発生実態の解明及び新たな百日咳ワクチンの開発に資する研究』班報告書



平成26年度 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
『百日咳の発生実態の解明及び新たな百日咳ワクチンの開発に資する研究』班報告書

図3 百日咳 臨床診断例の検査での確定フローチャート（案）

1. 分離培養法¹⁾

百日咳菌感染症の病原体診断の基本で、特異性が高く、菌株は分子疫学的解析や薬剤感受性試験にも利用できる。培地は従来 BG 培地が使われていたが、セファレキシン添加で選択性を向上させた改良 BG 培地や charcoal 添加で長期保存が可能な Regan-Lowe charcoal 培地、菌の発育促進作用のある cyclodextrin が添加された cyclodextrin solid medium (CSM) 培地なども有用である。検体は、後鼻腔拭い液が望ま

しい。早めに培地に接種することが原則であるが、室温で1～2日間なら分離できる。選択培地が必要であるため、臨床医には「検査室に目的菌を事前に知らせておく必要があること」を周知している。

分離率は発症初期から第3病週までが高いが、感受性のある抗菌薬治療が行われている場合、分離率が低下すること、および同定までに6～7日の日数が必要であることが、日常臨床ではあまり実施されない理由と考えられる。

2. 抗体検出法 (血清診断法)

酵素免疫法 (EIA) で PT (pertussis toxin)-IgG および FHA (filamentous hemagglutinin)-IgG 抗体価が測定できる。ただ、抗原の PT および FHA は、国内で広く接種されている百日咳含有ワクチン (DTaP-IPV: ジフテリア・破傷風・無細胞百日咳・不活化ポリオ四種混合ワクチン、DTaP: ジフテリア・破傷風・無細胞百日咳三種混合ワクチン) の主要成分であるため、百日咳含有ワクチン接種児では感染かワクチン接種によるものか、正確な診断ができない。対血清での検査が基本となるが、国内外で有意上昇の基準がない。また、回復期血清が必要であるため、最終判定までに数週間を要する。

さらに、乳児期早期では移行抗体との鑑別ができないことも課題の一つである。

新しい診断の目安では、咳発症後 2 週間以上 8 週間以内の抗 PT 抗体価が 100 EU/mL 以上を感染の可能性があるとされているが、乳児など百日咳含有ワクチン接種後の場合は、正確な判断ができないと考えている。

3. 遺伝子診断

百日咳でも菌の挿入配列 (IS481) や百日咳毒素遺伝子 (ptx) を標的とした PCR 法が実験室診断として利用できる。

国内で開発された LAMP 法 (Loop mediated isothermal Amplification)³⁾ は、様々な病原体の検出に応用されており、百日咳菌の検出も 2006 年に Kamachi ら⁴⁾ によって報告された。現在、体外診断用医薬品として「Loopamp[®] 百日咳菌検出試薬キット D」が発売され、また保険適用申請中である。

1) LAMP 法の特徴

- ① 遺伝子増幅反応が恒温で進行する。
- ② 6 領域を認識する 4 種類のプライマーを使用するため特異性が高い。
- ③ 増幅効率が高く、短時間の増幅が可能。
- ④ 増幅量が多く、目視検出が可能で簡易検出としても利用できる。
- ⑤ PCR 法と比較して、遺伝子増幅反応を阻害する生体成分の影響を受けにくいいため簡易な前処理で得られた粗核酸抽出サンプルからの増幅反応も可能。

などが挙げられている。

2) 測定原理

核酸抽出液と、百日咳菌特異的プライマー (百日咳菌ゲノム DNA の百日咳毒素遺伝子プロモーター領域内に設計) を含むプライマーミックス dBP を CAP 乾燥試薬の反応チューブ (内側に鎖置換型 DNA 合成酵素及びデオキシヌクレオチド 3 リン酸が乾燥・保持) で混合し 66°C でインキュベートすることで、鎖置換型 DNA 合成酵素によりサンプル溶液中の百日咳菌ゲノム DNA から核酸増幅反応が進行する。増幅反応の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウムによる濁度変化を専用リアルタイム濁度測定装置で測定することにより行われる。LAMP 反応のメカニズムは複雑であり、詳細については栄研化学株式会社の Eiken Genome Site にある LAMP 法の原理 (<http://loopamp.eiken.co.jp/lamp/index.html>) を参照されたい。

3) 使用方法

Kamachi らの方法⁴⁾ を基に改良・開発された Loopamp[®] 百日咳菌検出試薬キット D の概要を紹介する。キットは、百日咳菌特異的な百日咳毒素プロモーター領域を標的とした Kamachi ら⁴⁾ の LAMP プライマーを基に改良された液状プライマーミックスと、酵素や基質をチューブフタ部分に乾燥固着化された試薬よりなる。

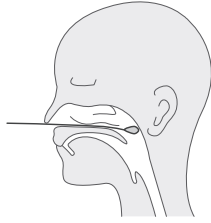
(A) 操作手順 (図 4, 5)

- ① 検体採取: FLOQ スワブを用いて、後鼻腔拭い液を採取する。
- ② サンプル溶液の調製: DNA 分離用試薬を使用して、サンプル溶液を調製する。
- ③ 増幅反応の準備: CAP 乾燥試薬を室内温度で 5 分間放置した後、反応チューブを必要本数 (検体 + 陽性・陰性コントロール) 分だけ取り出す。各反応チューブにプライマーミックス dBP を 15 μ L ずつ分注し、サンプル溶液又は各コントロールを 10 μ L 添加する。
- ④ 増幅反応と判定: 測定装置の反応ブロックに反応チューブをセットし、増幅反応 (LAMP 反応) をスタートする (66°C、40 分間)。反応終了後、陽性・陰性コントロール及びサンプル溶液の濁度上昇の有無 (増幅曲線パターン) を確認し、判定する。

4) 臨床試験での感度・特異度

STEP 1 検体採取

FLOQスワブを使用して後鼻腔拭い液を採取します。



後鼻腔拭い液

被験者の頭を動かさないようによく押さえ、その後、綿棒を後鼻腔に静かに挿入して粘液を採取します。

必要な器具・器材・試薬等

- ① FLOQスワブ、又はその同等品
- ② QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN社)、又はその同等品
- ③ マイクロ遠心機
- ④ 核酸低吸着1.5mLチューブ
- ⑤ ピペット及びフィルター付きチップ
- ⑥ ヒートブロック
- ⑦ 冷却用アルミ製ラック及びクラッシュアイス、又はその相当品
- ⑧ 微量簡易遠心機
- ⑨ 8連マイクロチューブ用簡易遠心機
- ⑩ リアルタイム濁度測定装置 (LAMP法専用)
- ⑪ ボルテックスミキサー

STEP 2 サンプル溶液の調製

DNA分離用試薬を使用してサンプル溶液を調製します。

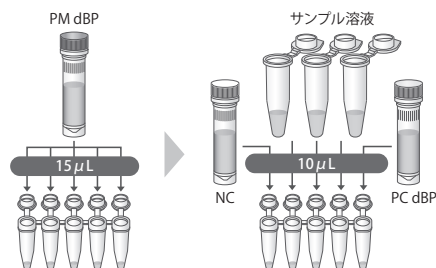
QIAamp DNA Micro Kitを用いる場合

- ① 後鼻腔拭い液を1.0mLのカザミノ酸溶液又は生理食塩水に懸濁溶解します。
- ② 懸濁溶解液300 μ Lを遠心分離 (14,000 \times g、10分間) し、上清を除いた沈渣画分にBuffer ATL 180 μ L及びProteinase K 20 μ Lを添加し、56°Cで加熱 (小児検体: 1時間、成人検体: 一晚) します。
- ③ Buffer AL・キャリアRNA混合液を200 μ L添加し、混和します。
- ④ エタノールを200 μ L添加し、混和後、室温で5分間放置します。
- ⑤ QIAamp MinElute Columnに全量を移して遠心分離 (6,000 \times g、1分間) し、カラム部分を外して新しいコレクションチューブに装着します。
- ⑥ Buffer AW1を500 μ L添加し、遠心分離 (6,000 \times g、1分間) 後、カラム部分を外して新しいコレクションチューブに装着します。
- ⑦ Buffer AW2を500 μ L添加し、遠心分離 (6,000 \times g、1分間) 後、カラム部分を外して新しいコレクションチューブに装着します。
- ⑧ 遠心分離 (20,000 \times g、3分間) 後、カラム部分を外して1.5mLの核酸低吸着チューブに装着します。
- ⑨ Buffer AEを100 μ L添加し、室温で1分間放置します。遠心分離 (20,000 \times g、1分間) 後、溶出した分画をDNA抽出液とします。
- ⑩ DNA抽出液を15 μ L程度採取し、95°Cで5分間加熱後、氷上にて急冷してサンプル溶液とします。

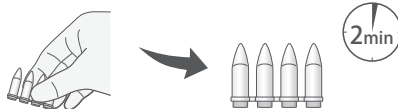
図4 検体採取とサンプル溶液の調整

STEP 3 増幅反応の準備

- ① CAP乾燥試薬を室内温度で5分間放置した後、反応チューブを必要本数 (検体+陽性・陰性コントロール) 分だけ取り出します。
- ② 各反応チューブにプライマーミックス dBPを15 μ Lずつ分注します。
- ③ サンプル溶液又は各コントロールを10 μ L添加します。



- ④ 反応チューブを転倒して溶液をフタへ移し、転倒した状態のまま2分間放置します。



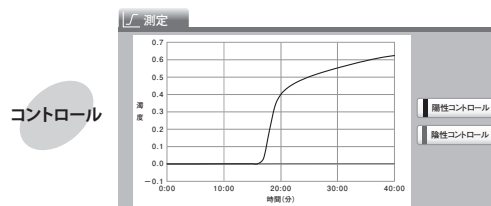
- ⑤ 反応チューブを5回転倒混和し、スピンドウンします。



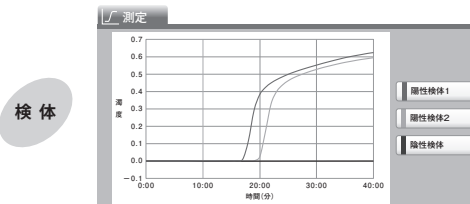
STEP 4 増幅反応と判定

- ① 測定装置の反応ブロックに反応チューブをセットし、増幅反応 (LAMP反応) をスタートさせます (66°C、40分間)。
- ② 反応終了後、陽性・陰性コントロール及びサンプル溶液の濁度上昇の有無 (増幅曲線パターン) を確認し、判定を行います。

増幅曲線パターン (判定方法)



陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していないことを確認します。
上記が確認できれば、増幅反応は正常に終了しています。



サンプル溶液の濁度を確認し、判定を行います。
陽性: 濁度の上昇が認められた場合
陰性: 濁度の上昇が認められなかった場合

図5 増幅反応の準備と増幅反応と判定

本キットを用いた前向き試験⁵⁾が報告された。試験期間は2013年4月～2014年2月、対象は発作性の咳き込み、吸気性笛声、咳き込み後の嘔吐(成人の場合は、夜間の咳き込みによる不眠症状、胸痛)など臨床的に百日咳を疑われた患者で、年齢は生後26日～65歳。検体は後鼻腔拭い液を用い、培養とLAMP法で抗原検出を行った。抗体検査は、対血清(初診時と発症から4～8週後)を用い、抗PT-IgG抗体価が測定された。期間中は百日咳の流行はなく陽性検体が少なかったため、各施設に保存されている検体(核酸抽出液)も利用された。

臨床的百日咳患者における各検査法の感度、特異度、全体一致率を表3に示す。感度は、培養法が最も低く(11.1%)、血清診断法が最も高かった(93.8%)。培養法と遺伝子検査法の偽陽性はなかったが、血清診断では9検体の偽陽性がみられた。

百日咳菌の遺伝子検査は、培養法よりも感度が高く、血清診断測定法より特異度が高いことが示された。同じ遺伝子検査法であるreal-time PCR法と

LAMP法との相関も検討された。Realtime PCR法と比較した結果を表4に示す。感度71.4%、特異度100.0%、全体一致率98.1%であった。不一致(LAMP法陰性 real-time PCR法陽性)の2検体のうち、1検体は16S rRNA遺伝子のシーケンス解析の結果 *Bordetella holmesii* と同定された。もう1検体は、IS 481 遺伝子のシーケンス解析の結果から、百日咳菌以外の *Bordetella* 属菌であることがわかった。保存検体を用いた相関を表5に示す。感度、全体一致率は臨床検体より高かった。LAMP法で検出できなかった3検体(LAMP法陰性 real-time PCR法陽性)は、反応阻害は認められなかったことから、検体中の百日咳菌がごく微量であったためと考えられた。

これらの結果を、これまでのガイドラインに則って確定した割合は、LAMP法では45.5%(5/11)、培養法では18.2%(2/11)となった。他の報告^{6,7)}における培養法の検出率は約10%(7.31～14%)、欧米で実施されているPCR法の検出率^{6,7)}は40%前後

表3 検査法による感度、特異度、全体一致率

		臨床診断				
		百日咳	非百日咳	合計		
培養法	陽性	2	0	2	感度 特異性 全体一致率	11.1% 100.0% 84.5%
	陰性	16	85	101		
	合計	18	85	103		
抗PT抗体価 ^{*1}	陽性	15	9	24	感度 特異性 全体一致率	93.8% 86.8% 88.1%
	陰性	1	59	60		
	合計	16	68	84		
real-time PCR法	陽性	7	0	7	感度 特異性 全体一致率	38.9% 100.0% 89.3%
	陰性	11	85	96		
	合計	18	85	103		
LAMP法被験試薬	陽性	5	0	5	感度 特異性 全体一致率	27.8% 100.0% 87.4%
	陰性	13	85	98		
	合計	18	85	103		

*1: 19検体が判定不能であったため、合計84検体で集計

表4 LAMP法被験試薬のreal-time PCR法に対する相関(1)

		real-time PCR法				
		陽性	陰性	合計		
LAMP法被験試薬	陽性	5	0	5	感度 特異性 全体一致率	71.4% 100.0% 98.1%
	陰性	2	96	98		
	合計	7	96	103		

表5 LAMP法被験試薬のreal-time PCR法に対する相関(2)

		real-time PCR法				
		陽性	陰性	合計		
LAMP法被験試薬	陽性	83	0	83	感度 特異性 全体一致率	96.5% — 96.5%
	陰性	3	0	3		
	合計	86	0	86		

であり、国際的に比較しても LAMP 法の感度は、同等と考えられる。

5) LAMP 法の適用期間

百日咳ワクチン対象月齢前の生後3カ月未満児の百日咳感染は重症化しやすく、ハイリスク群である。この群は移行抗体の影響もあり早期診断・早期治療ができないことも多かった。この試験では、ワクチン未接種乳児3検体はすべて LAMP 法で検出できていた。早期診断・早期治療が求められるハイリスク群にも適用できることが示されている点は、特記事項と考えられる。

病原体の分離や抗原検出は、早期診断法として有用である。ただ、日常臨床では百日咳含有ワクチン接種者や成人の場合には、症状が非定型的なこともあり、医療機関へ受診するまで、発症後4週間以上経過している場合も少なくない。今回の報告⁵⁾においても、成人例は全例、発症から4週間以上経過していた検体で確定できている。この成人例も含めて、8/22 (36.4%) は発症から4週間以上経過した検体であった。発症から4週間以上経過した場合、検査の感度は低下するが、抗菌薬治療が必要な患者を見逃してしまう可能性があるため、新しい診断の目安では、抗原検査の適用期間を“咳発症後からの期間を問わず”と改訂した(表2、図3)。

Ⅲ. LAMP 法の有用性

現在、百日咳感染症の診断に用いられる培養および血清診断は、有用な検査であるが、正確な判定結果が得られない場合もある。

百日咳含有ワクチン接種前の生後3カ月未満児の百日咳感染は、死亡率・重症化率が高く、早期に確実に診断し迅速な治療が必要であることは、よく知られている¹⁾。また、乳児の感染源は周囲の成人や同胞である場合が多く、疑わしい咳がある場合、百日咳と早期に確実に診断し、適切な抗菌薬治療が求められる。このため、日常臨床では迅速かつ高感度で正確な検査法が望まれており、遺伝子検査法はこれらの課題が解決できる検査法と考えられる。

臨床試験⁵⁾の結果から、遺伝子検査法は培養法よりも高感度であり、血清診断法よりも特異度が高く、両検査よりも短時間で判定結果を得ることができた。さらに、抗菌薬投与後の患者(培養検査陰性)検体において、遺伝子検査陽性であったことから、抗菌薬治療例であっても確定診断が可能であることも示された。

米国では、百日咳の診断には PCR 法が最も使われている。世界的に利用されている PCR 法は IS481 を標的配列とした方法⁸⁾であり、百日咳菌と同じ配列を有する *Bordetella holmesii* や、一部のパラ百日咳菌、*B. bronchiseptica* と交差反応がある。

LAMP 法は、培養法および血清診断法と合わせて、総合的に百日咳を早期に確実に診断する有用な検査法と考えられる。

文 献

- 1) 岡田賢司：百日咳の発生実態の解明及び新たな百日咳ワクチンの開発に資する研究 平成26年度厚生労働科学研究委託費(厚生労働科学研究委託事業)研究総括報告書。
- 2) 岡田賢司：百日咳菌とボルデテラ属 戸田新細菌学改訂34版(吉田眞一・柳雄介・吉開泰信 編)pp290-293 南山堂東京, 2013.
- 3) Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., et al : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 ; 28, E63.
- 4) Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, et al : Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol.* 2006 ; 44 : 1899-1902.
- 5) 岡藤輝夫、黒木春郎、西村直子 他 ; Loopamp[®]百日咳菌検出試薬キットDの臨床的評価 診療と新薬. 2015 ; 52 (12) : 1133-1140.
- 6) Templeton KE, Scheltinga SA, van der Zee A, et al : Evaluation of real-time PCR for detection of and discrimination between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella holmesii* for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2003 ; 41 : 4121-4126.
- 7) Bamberger E, Lahat N, Gershtein V, et al : Diagnosing pertussis : the role of polymerase chain reaction. *Isr Med Assoc J.* 2005 ; 7 : 351-354.
- 8) 国立感染症研究所：百日咳に関するファクトシート(平成22年7月7日版), 2010.