

地域内流行における百日咳検査法の比較

吉野修司 河野喜美子 黒木真理子 大浦裕子
岩切 章 山田 亨 深江弘恵¹⁾ 堀田 剛²⁾

Comparison of Detection Methods for *Bordetella pertussis*, in an Epidemic Area: A Retrospective Study

Shuji YOSHINO, Kimiko KAWANO, Mariko KUROGI, Yuko OHURA,
Akira IWAKIRI, Tohru YAMADA, Hiroe FUKAE, Takeshi HORITA

From 2010 to 2011, a pertussis outbreak occurred in the northern part of Miyazaki Prefecture. In this study, we retrospectively investigated 65 patients aged 2 to 63 years inclusive who had been coughing for 14 days or more. The median age of case patients was 14 years (mean, 20 years). Sixty-five nasopharyngeal specimens were used to compare *B. pertussis* detection by culture, IS481-PCR, and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. A total of 29 (44.6%) specimens were positive by one or more tests. Of these, 15 were positive by all three tests, 23 were positive by IS481-PCR and LAMP, and 6 were positive by LAMP only. All culture-positive specimens were also positive with the IS481-PCR and LAMP assay. These patients had received 3 or 4 doses (mean, 3.9 doses) of pertussis-containing vaccine. The results suggest that these patients may be *B. pertussis* reservoirs from which transmission may occur to infants.

Culture is the “gold standard” for laboratory diagnosis of pertussis. However, many factors have an influence on the sensitivity of culture. In general, isolation rate of *B. pertussis* decrease when transport takes longer than 48 hours. However, we were able to isolate *B. pertussis* after 4 days or more (mean, 4.8 days) of storage in the cyclodextrin liquid medium incubated at 4°C.

Key words: *Bordetella pertussis*, outbreak, IS481-PCR, LAMP assay

はじめに

百日咳は百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の感染によって起こる小児の代表的な急性呼吸器感染症である。また、百日咳菌は感染力が強いが、ワクチンによる予防可能な疾患の一つで、小児の届出患者数はワクチン接種の一時中止に伴う1976年～1981年の流行以降、減少傾向にある^{1,2)}。しかし、一方で、ワクチンの免疫持続が4～12年程度であることから³⁾、近年では青年・成人における患者数が増加傾向にあり、青年・成人保菌者が乳幼児に対して感染源になることが問題になっている⁴⁾。

また、成人の百日咳患者は臨床像が多彩で他の呼吸器感染症との鑑別が難しいことから、適切な実験室診断法が望まれている。現在、これまで広く利用されていた百日咳菌の凝集素価による血清診断法が成人やワクチン既接種児には適さないことから⁵⁾、感度、特異性に優れたLAMP法⁶⁾などの遺伝子診断法が普及しつつある。なお、百日咳菌の分離は特異性が100%であることから“Gold Standard”と位置付けられ、抗原変異株の出現を監視する観点からも分離の重要性が指摘されている⁷⁾。しかし、ワクチン既接種者や青年・成人患者からは菌の分離が難しいのが現状である⁴⁾。

微生物部 ¹⁾現 県立宮崎病院 ²⁾現 高鍋保健所

2010年11月、宮崎県A市B地区の中学校を中心として発生した百日咳の地域内集団感染において、菌の分離、IS481-PCR、LAMP法を実施した。今回、同様の百日咳集団感染が発生した際に、地研としてより適切な対応がとれるよう、後方視的に百日咳検査法の比較検討を行ったので報告する。

材料と方法

1 対象

対象期間は流行期間中の2010年11月から2011年3月までの間とした。対象者は宮崎県A市B地区に居住し、咳が2週間以上続く2歳から63歳までとした。このうち、百日咳と同様の症状を呈し、*Bordetella holmesii*および*Mycoplasma pneumoniae*が分離・検出された11名（データ未提出）を除く65名を百日咳疑い例とし、今回の比較検討の対象とした。なお、65名の対象者のうち乳幼児は3名のみで、全体の年齢の中央値は14歳（平均20歳）であった。

2 材料

臨床検体は鼻咽頭拭い液をレーヨン性綿棒で一人につき2本採取後、cephalexin(CEX) 5 µg/mL添加Cyclodextrin Liquid Medium(CLM) 1mLにそれぞれ懸濁したものをを用いた。採取された検体は2本を混和した後、1mLを遺伝子診断用に、残りを菌の分離に用いた。遺伝子診断用のテンプレートはQIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出し、最終25 µLで溶出したものをを用いた。

なお、対象地区と当所が距離的に離れていることから、検体搬送に時間がかかる場合は、懸濁させた検体を試験に供するまで医療機関もしくは保健所の冷蔵庫で保存した。

3 菌の分離

当初、選択培地としてCEX 40 µg/mL添加Bordet Gengou 血液寒天培地 (BG培地: Difco) とCEX 5 µg/mL添加Cyclodextrin Solid Medium (CSM培地: 自家製) を併用した。しかし、夾雑菌の発育が著しい場合、BG培地では百日咳菌と夾雑菌との鑑別が難しいことから、2011年1月以降はCSM培地のみを使用した。分離された菌株はCEX非添加CSM培地で純培養した後、市販の百日咳菌同定用免疫血清（デンカ生研）で血清学的同定を行った。

4 遺伝子診断

百日咳菌の挿入配列IS481を標的としたPCR法および国立感染症研究所細菌第二部より供与された百日咳菌PTのプロモーター領域を標的としたLAMP法を行った。

5 Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

PFGEは、病原体検査マニュアル⁸⁾を若干改変して行った。すなわち、分離株は5mLのCEX非添加CLMで36°C、150回/分、3~4日振盪培養後、McFaland 5程度に調整した。制限酵素は*Xba*Iおよび*Spe*Iの2種類を用いた。泳動はCHEF DR III(Bio Rad)を用い、14°C、6V/cm、ブロック1: 4-8秒、11時間、ブロック2: 8-50秒、9時間の条件で行った。解析はFPQuest (Bio Rad)を用い、トレランス1.2%で解析した。なお、同じ時期に宮崎県以外の地域で分離された散発事例4株と東浜株を比較対照として用いた。

結果

65名中29名(44.6%)がいずれかの方法で陽性となった。LAMP法・IS481-PCR・分離とも陽性は15名(23.1%)、LAMP法・IS481-PCR陽性は23名(35.4%)、LAMP法のみ陽性は6名であった。

平均年齢は陽性が16.2歳、陰性が23.1歳であった。病日の記載があった患者の平均病日は陽性が8.3日、陰性が15.3日であった。試験までに要した検体の平均保存期間は陽性が4.4日、陰性が4.3日であった。陽性者のDTPワクチン接種回数は平均3.9回であった。また、LAMP法のTt値はLAMP法・IS481-PCR・分離とも陽性は平均19.02、LAMP法・IS481-PCRのみ陽性は平均25.33、LAMP法のみ陽性は29.68であった (Table.1)。

Table 1 Results of LAMP, IS481-PCR, and culture for detection of *B. pertussis*

Result by (positive rate)			No. of patients (n = 65)	Mean				
LAMP (44.6)	PCR (35.4)	Culture (23.1)		Age(yr)	Days after onset	Specimen storage time (days)	DTP vaccination	Tt ^b
(+)	(+)	(+)	15	15.8	8.5	4.8 ^a	3.5	19.02
(+)	(+)	(-)	8	21.1	10.0	5.4	4.0	25.33
(+)	(-)	(-)	6	10.8	6.0	2.3	3.8	29.68
Positive subtotal			29	16.2	8.3	4.4	3.9	22.97
(-)	(-)	(-)	36	23.1	15.3	4.3	-	-

^aLongest period: 12day, ^bThresholds time values of the LAMP assay

Table 2 Comparison of different detection methods in three age groups

Age groups	No. of total positive specimens (%)			Mean		
	LAMP	PCR	Culture	Age(yr)	Days after onset	Specimen storage time (days)
2-12 years n = 23	15 (65.2)	11 (47.8)	7(30.4)	9.9	9.3	4.6
13-15 years n = 22	11(50.0)	8(36.4)	7(31.8)	14.1	10.4	2.9
16-63 years n = 20	3(15.0)	3(15.0)	1(5.0)	38.2	17.7	5.7

今回の流行が中学校を中心として発生したことから、対象者 65 名を 12 歳以下、13 歳～15 歳、16 歳以上の 3 つの年齢群に分けて比較した場合、LAMP 法陽性は各 65.2%、50%、15%、PCR 陽性は各 47.8%、36.4%、15%、分離陽性は各 30.4%、31.8%、5%であった。また、平均年齢は各 9.9 歳、14.1 歳、38.2 歳で、平均病日は各 9.3 日、10.4 日、17.7 日、検体の平均保存期間は各 4.6 日、2.9 日、5.7 日であった (Table.2)。

PFGE の結果は制限酵素 *Xba* I、*Spe* I とも集団発生事例はほぼ同一で、散発事例および東浜株とは異なるパターンを示していた (Fig.1)。

考察

今回、PCR は比較的感度の良い IS481-PCR で実施したが、LAMP 法はさらに感度が良いことが確認された。また、LAMP 法は real-time PCR 法に比べ定量性に欠けるが、Tt 値の平均を比較すると、菌量のある程度反映している結果が得られた。さらに、Tt 値が 20 以内であれば菌分離の可能性

も高くなることが推測された。

本事例における陽性者 29 名の DTP ワクチン接種歴は平均 3.9 回で、さらに、百日咳菌が分離された患者 15 名のワクチン接種歴も平均 3.5 回であったことから、ワクチン既接種者も乳幼児等に対して感染源になる可能性があることが改めて示唆された。また、16 歳以上では検出率が極端に低下し、平均病日も小児に比べ長い傾向にあった。これは、年齢とともに保菌量が少なくなる⁹⁾ことに加え、医療機関を受診するのが遅れるため、分離および検出がより難しくなることが考えられた。なお、データには示していないが、最長 21 病日の患者からも LAMP 法・IS481-PCR で百日咳が検出された。しかし、今回の流行では、他に *B. holmesii* や *M. pneumoniae* が分離、検出されていることから、本事例は他の呼吸器感染症との混合流行も考えられた。さらに、他のウイルス性呼吸器感染症の病原体検索は実施していないことから、対象とした 65 名の病日と百日咳検査法の比較および評価は慎重に行う必要があると考えられた。

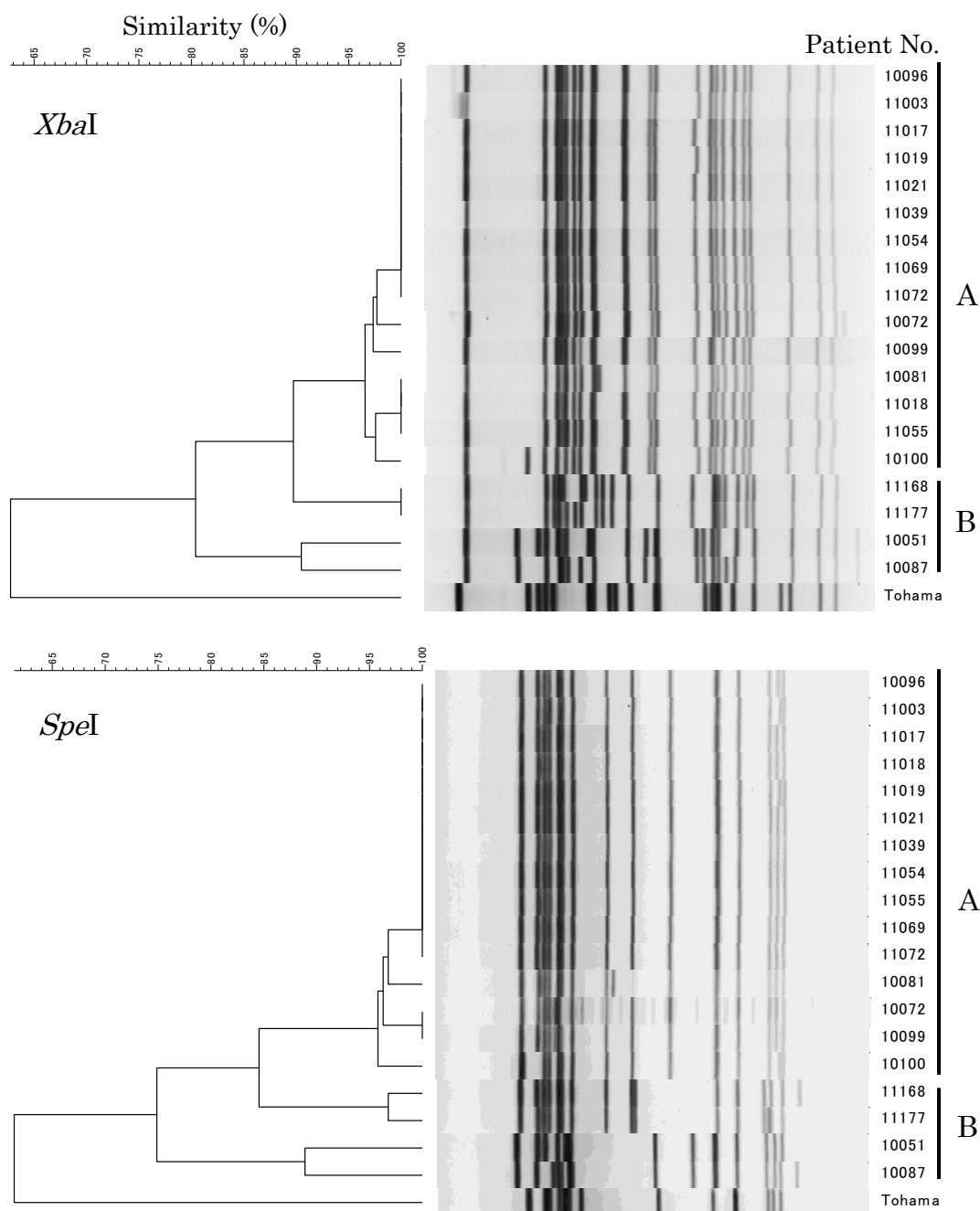


Fig 1 Dendrogram of PFGE patterns digested with *XbaI* and *SpeI*
 Dendrogram created using UPGMA clustering of Dice coefficient values.
 Similarity matrix based on band-matching analysis, optimization and tolerance settings of 1.2%. (A: Outbreak cases, B: Sporadic cases)
 For comparison, Tohama strain was used as a reference strain.

感染症における検体は、採取後速やかに検査を行うことが望ましい。百日咳の検査においても一般的に検体採取後 24 時間～48 時間以内に検査を行うことが望ましいとされている¹⁰⁾。しかし、今回のデータでは、検体搬送用として CLM 培地

を用い、冷蔵庫で保存した場合、検体の保存期間による差は陽性と陰性の間で認められず、平均 4.8 日 (最長 12 日) でも菌の分離は可能であった。

今回、抗生物質投与が検査に与える影響について検討を行えなかったが、検体保存期間は検出率

に大きく影響しないものと思われ、今後、同様の事例が発生した場合は、目安として発病後一週間程度までの患者について、検体採取後4日までに検査を行えば、菌の分離も含めた検出率はより高くなる可能性があると考えられた。

謝辞

感染症発生動向調査事業において検査材料を提供していただいた感染症発生動向調査事業定点医療機関ならびに検体採取にご協力いただいた医療機関の先生方、延岡保健所の皆様に深謝いたします。また、LAMP法の試薬を供与いただいた国立感染症研究所 細菌第二部の蒲地一成先生、豊泉裕美先生、大塚菜緒先生、*M. pneumoniae*の陽性コントロールを分与いただいた見理 剛先生に深謝いたします。

文献

- 1) 国立感染症研究所: <特集>百日咳 1982～1996, 病原微生物検出情報. 1997; 18: 101-103.
- 2) 国立感染症研究所: <特集>百日咳 1997～2004, 病原微生物検出情報. 2005; 26: 61-70.
- 3) Wendelboe AM, Van Rie A, Salmaso S, Englund JA: Duration of immunity against pertussis after natural infection or vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24: S58-S61.
- 4) 国立感染症研究所: <特集>百日咳 2005～2007, 病原微生物検出情報. 2008; 29: 65-77.
- 5) 国立感染症研究所: 菌凝集素価法を用いた百日咳血清診断について, 病原微生物検出情報. 2011; 32: 236-237.
- 6) Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, Toda K, Soeung SC, Sarath S, Nareth Y, *et al.*: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 1899-902.
- 7) World Health Organization: Laboratory manual for the diagnosis of whooping cough caused by *Bordetella pertussis*/*Bordetella parapertussis*. 2007; WHO/IVB/ 04.14: 6-7.
- 8) 国立感染症研究所: 病原体検査マニュアル 百日咳(*Bordetella pertussis*). 2003; 19-22.
- 9) Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi - Ajisaka H, Otsuka N, Saito R, Tsuruoka J, *et al.*: Marked difference between adults and children in *Bordetella pertussis* DNA load in nasopharyngeal swabs. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 365-70.
- 10) Riffelmann M, Wirsing von König CH, Caro V, Guiso N; Pertussis PCR Consensus Group: Nucleic Acid amplification tests for diagnosis of *Bordetella* infections. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 4925-9.