

百日咳の検査診断

国立感染症研究所 細菌第二部
蒲地一成

1. 百日咳の起因菌
2. 実験室診断法
3. 成人百日咳の感染実態

百日咳 (Pertussis)

- *Bordetella* 属細菌の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症
- ワクチンによる免疫防御が最も効果的であるが、その免疫効果は約10年で消失する（中学生以降は感性者）
- 世界中で青年・成人患者が急増（検出感度の上昇？）
- 1980年以降、世界の百日咳流行株には遺伝子的な変化が認められている（抗原変異、病原性、定着因子の欠損など）

百日咳の症状

乳幼児の場合

- しつこい咳
- 吸気性笛声
- 痙咳発作
- 白血球数の増加

青年・成人の場合

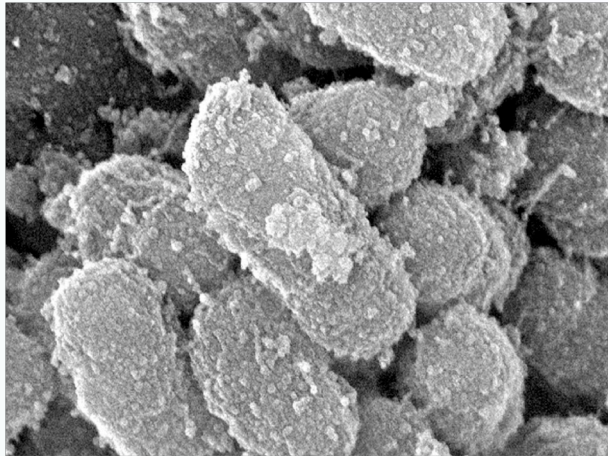
- 遷延性の咳
- 臨床像は非典型的



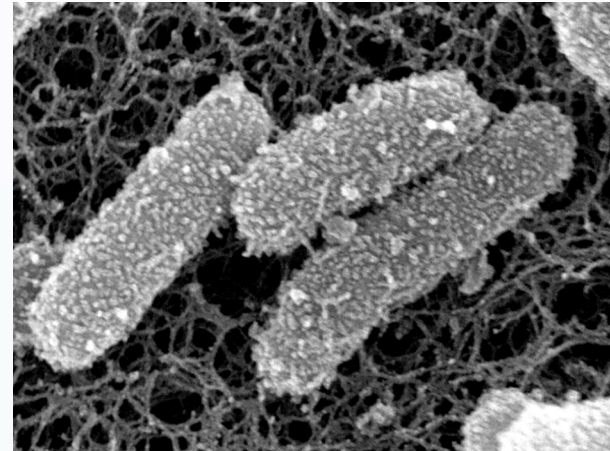
臨床診断が困難

百日咳の起因菌

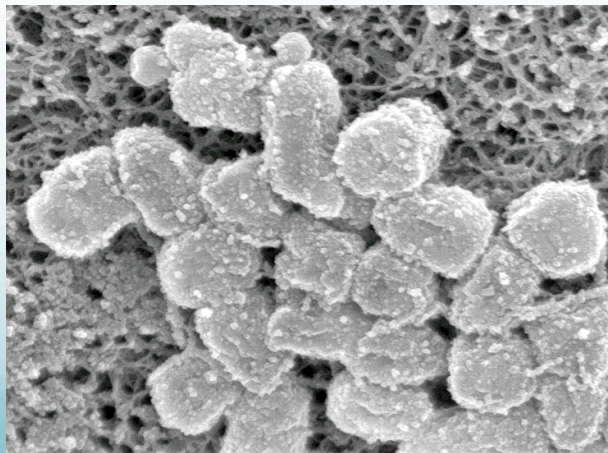
Bordetella pertussis (百日咳菌)



Bordetella parapertussis (パラ百日菌)



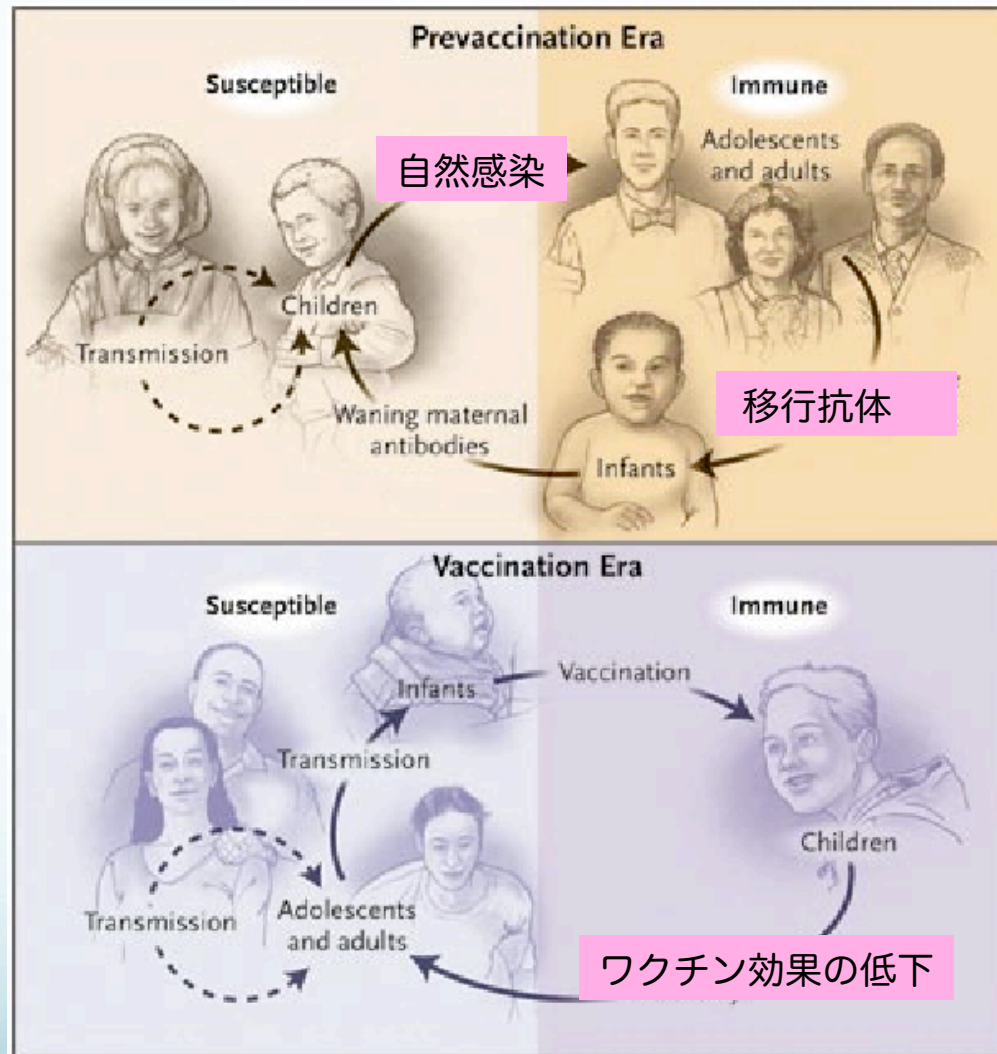
Bordetella holmesii



臨床での分離頻度

百日咳菌 >> パラ百日咳菌
B. holmesii

ヒトにおける百日咳菌の循環



ワクチン導入前

子供 ⇄ 子供

ワクチン導入後

子供 ⇄ 大人

百日咳の実験室診断法

- 菌培養検査
- 血清学的検査
- 遺伝子検査

検体の採取法（菌培養検査、遺伝子検査）

- ◆ 検査材料：鼻腔スワブ
（咽頭スワブ）



- ◆ 採取用具：滅菌綿棒（コレクトスワブRアルミ軸、栄研）
→ レーヨン性の綿棒を使用。通常の綿棒には不飽和脂肪酸が含まれており、百日咳菌はこの脂肪酸に弱いとされている

- ◆ 輸送と保存：冷蔵
→ 長期の輸送・保存では冷凍



菌培養検査

分離培地：ボルデテラ CFDN 寒天培地（日研生物）など

→ 百日咳菌専用の培地が必要

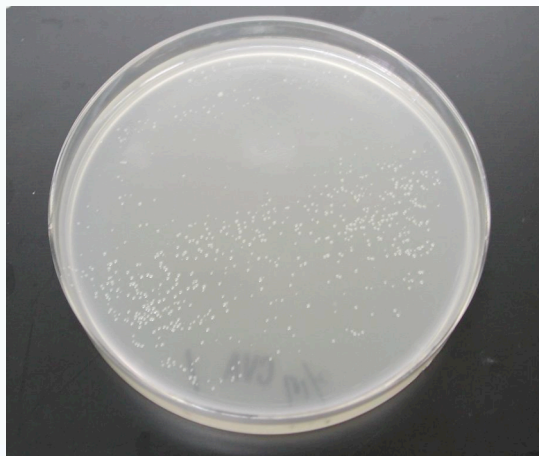
培養：36~37°C、7日間（湿潤条件、乾燥させないように密閉容器に入れ、さらに濡れたキムワイプを入れる）

→ コロニー形成に5日間を要する

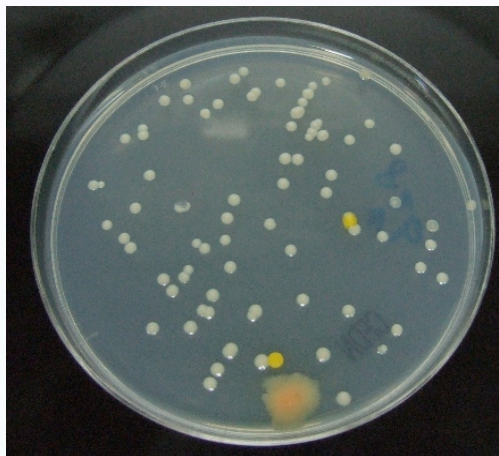


培養検査の実施例

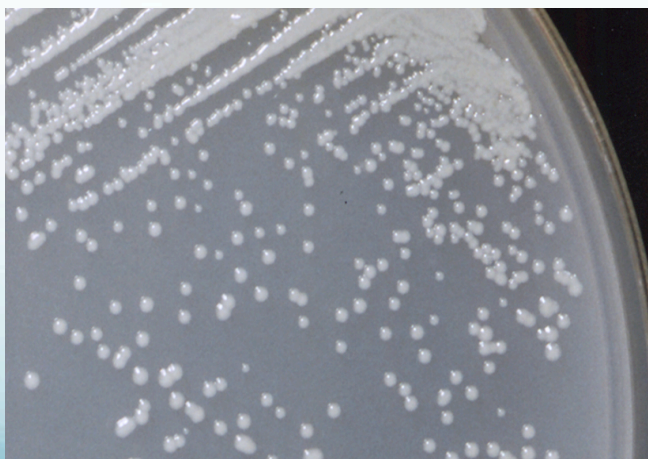
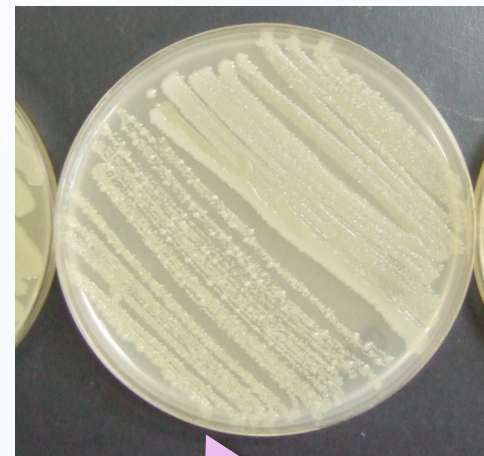
陽性例（純培養）



陽性例（典型的）



陰性例（雑菌多）



培養陽性率： <10%

培養検査が陰性となっても、百日咳
感染を否定することは出来ません

血清学的検査

- ◆ ELISA法（抗百日咳毒素IgG、抗繊維状赤血球凝集素IgG）
- ◆ 菌凝集素価法（東浜株、山口株） ← 特異性が低いため不適

百日咳患児の抗体価上昇（菌分離陽性例）

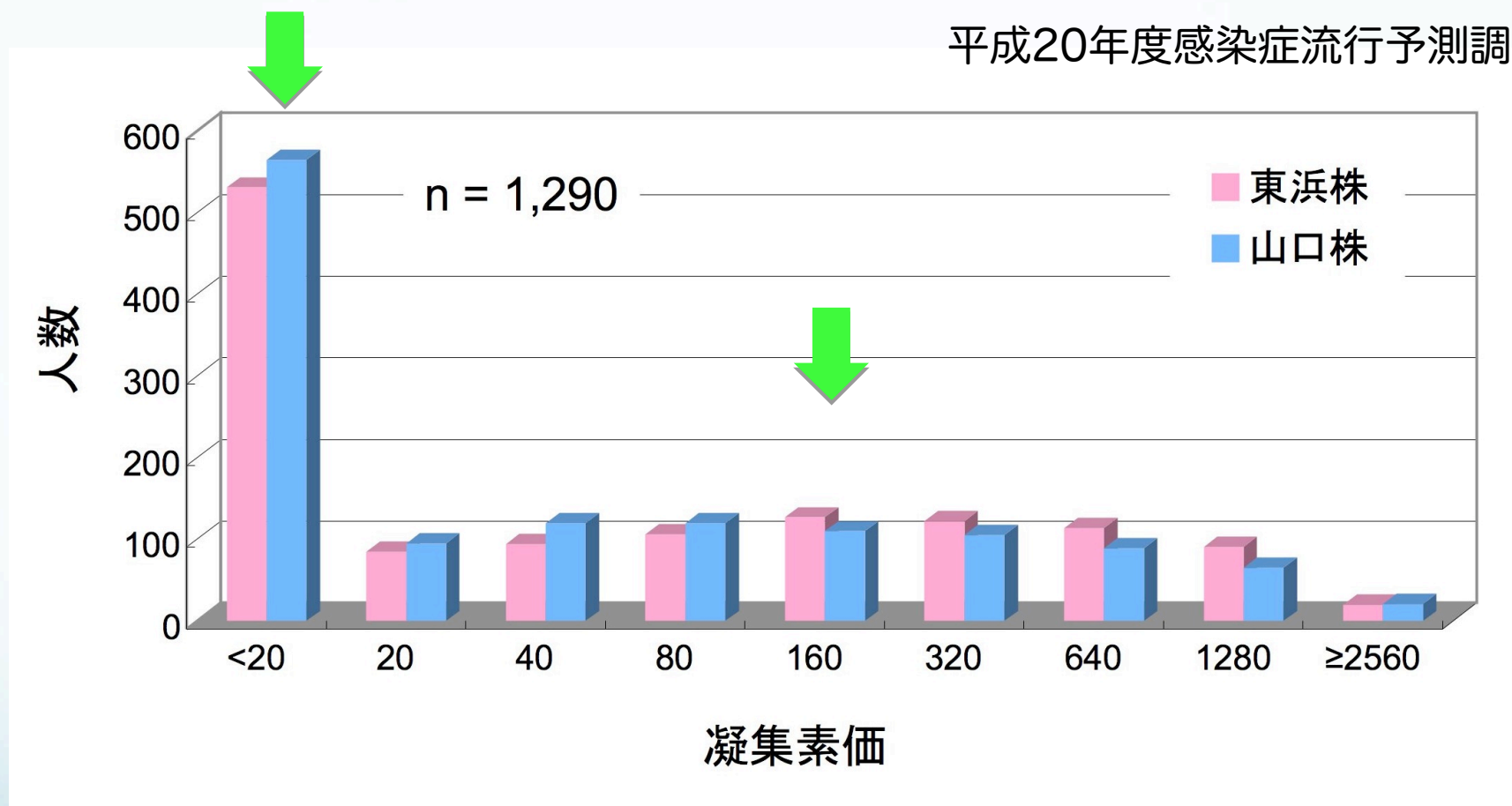
事後診断

測定法	病日（入院からの日数）					
	0	7	13	60		
患児1（1ヶ月、女児）	抗体価 (EU/ml)	anti-PT IgG	0.5	25.0	53.0	-
		anti-FHA IgG	20.0	17.0	16.0	-
	凝集素価	東浜株	320	320	320	-
		山口株	20	80	40	-
患児2（2ヶ月、男児）	抗体価 (EU/ml)	anti-PT IgG	0.5	55.0	87.0	450.0
		anti-FHA IgG	0.7	0.8	1.1	22.0
	凝集素価	東浜株	<20	<20	<20	<20
		山口株	<20	<20	<20	<20

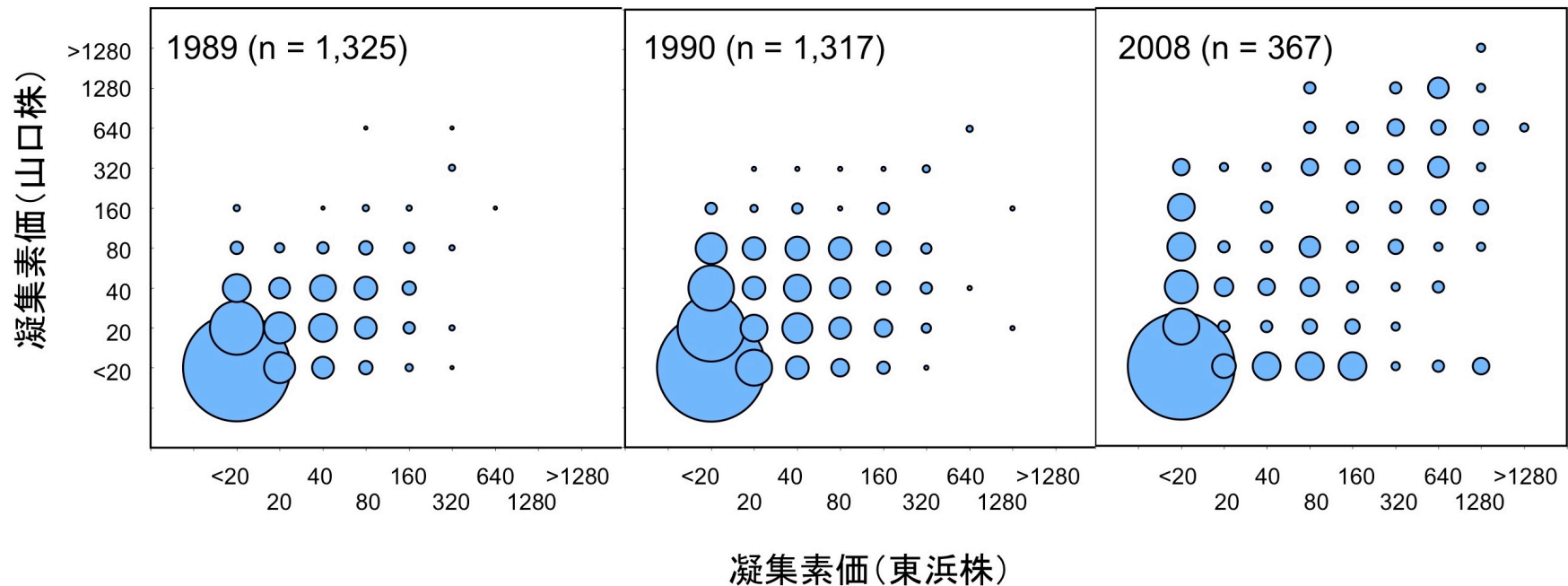
中野ら（国立病院機構三重病院）、未発表データ

健常者における菌凝集素価の分布

平成20年度感染症流行予測調査



小児における菌凝集素価分布の割合変化，1989~1990年度調査との比較



横軸に東浜株に対する凝集素価、縦軸に山口株に対する凝集素価をプロットし、円の面積はその分布割合を示した

平成20年度感染症流行予測調査

病原微生物検出情報(IASR), 32(8): 236-237, 2011


遺伝子検査

IS481 real-time PCR

- ◆挿入配列 (IS481) を標的とする
- ◆ゲノム上に 50~250 copies が存在するため感度が高い
- ◆特異性が低い (*B. holmesii*、一部の気管支敗血症菌、パラ百日咳菌を検出)
- ◆欧米で一般的に使われている検査法

LAMP法

- ◆百日咳毒素のプロモーター領域を標的とする
- ◆感染研でLAMPプライマーを開発 (Kamachi et al., JCM, 2006)
- ◆百日咳菌に特異的であり、IS481-PCRと同等の感度を有する

 多くの地衛生研究所で検査可能

IS487 real-time PCR

長所：

- 約1時間で結果が得られる
- 一度に大量の検体を検査できる

短所：

- 高価なPCR装置が必要
- 百日咳菌とその他の*Bordetella*属細菌を区別出来ない



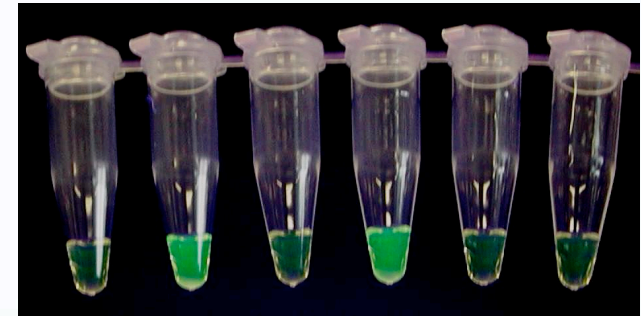
ABI 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems)

現在、ほとんどの地方衛生研究所がリアルタイムPCR装置を保有しています

百日咳LAMP法

長所：

- 高い感度と特異性を持つ
- 簡便・迅速（反応時間 40 min）
- 目視判定が可能
- 栄研化学から研究用試薬として販売中



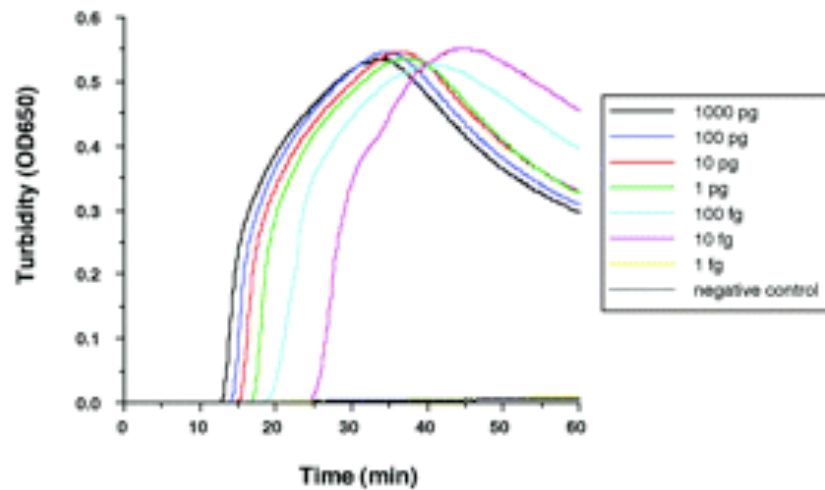
短所：

- 検体からDNAの精製を必要とする

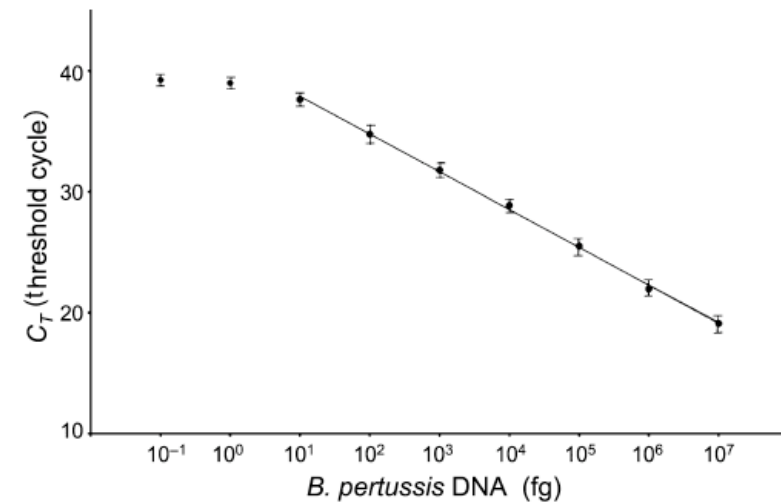
現在、一部の地方衛生研究所では*B. holmesii* のLAMP検査も実施可能

LAMPとIS487 real-time PCRの感度比較

LAMP



IS487 real-time PCR



検出限界: 10 fg DNA (菌数として3.3個)

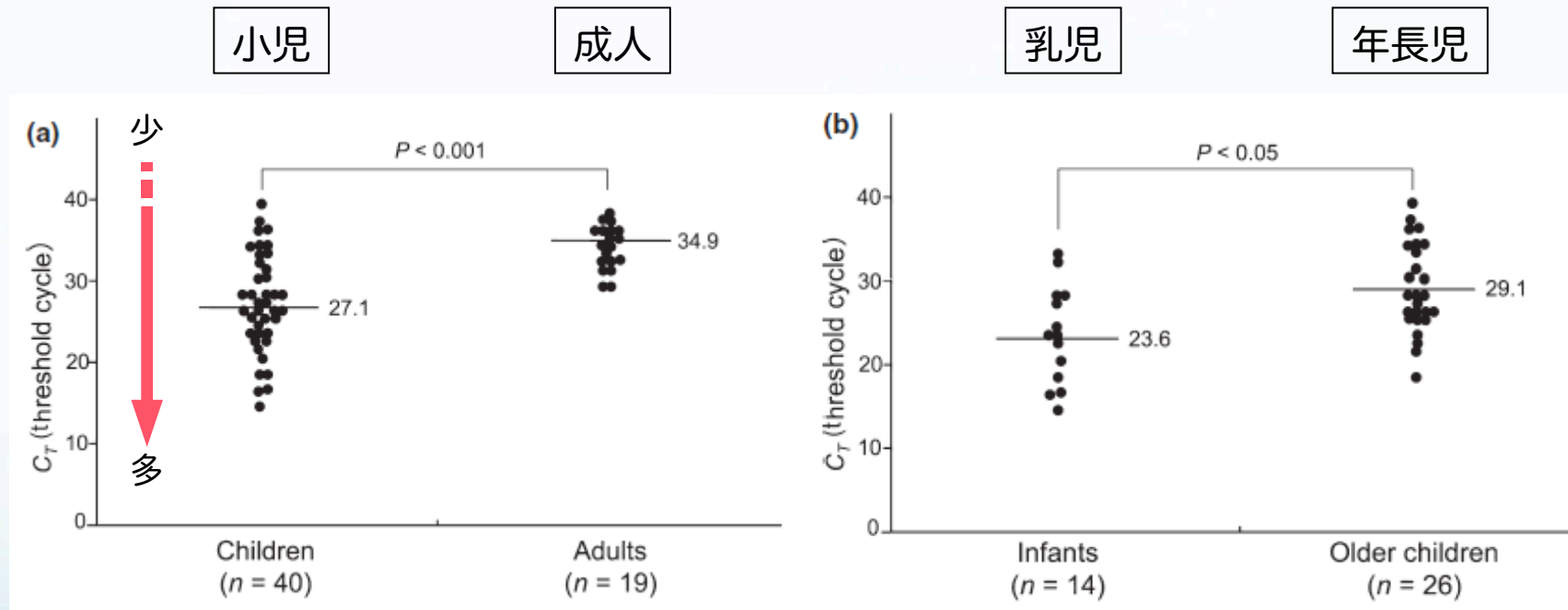
実験室診断の感度比較

検査法	検査対象	
	子供	青年・成人
菌培養	+	-
血清学的検査	凝集素価	不適
	ELISA (anti-PT IgG)	?
遺伝子検査	IS487 real-time PCR	+++
	LAMP	+++

成人百日咳の感染実態

成人と小児における百日咳保菌量の違い

IS487 real-time PCRにより百日咳菌DNA量 (Ct値) を測定



小児と成人における百日咳保菌量（推定値）

Patient	Number of patients	Mean age (range)	<i>B. pertussis</i> cells/swab (95% CI) ^a
Infant	14	2.9 months (1–6 months)	1.1×10^6 (1.2×10^5 to 8.9×10^6)
Older child	26	9.2 years (2–15 years)	2.1×10^4 (5.3×10^3 to 8.3×10^4)
Adult	19	43.3 years (22–83 years)	320 (120–910)

^aBacterial cells were calculated for *B. pertussis* Tohama cell.

成人：年長児：乳児 = 1：65：3,400

成人の非典型的な症状と低い培養陽性率の原因
→ 成人の診断には遺伝子診断が有効

まとめ

- 百日咳菌を保菌する青年・成人患者は乳幼児への感染源となりうる
- 菌培養検査は保菌量の低い青年・成人患者には不適である
- 血清診断は事後診断となるため、早期診断には遺伝子検査が有効である（特に集団感染疑い事例では遺伝子検査による確定診断が必要）
- 菌凝集素価法は特異性が低いため、血清診断法として不適である

最後に. . .

百日咳疑いの集団感染が発生した場合は、各都道府県市の地方衛生研究所にご連絡下さい。
感染研・細菌第二部では地方衛生研究所とともに検査診断の協力を行っています（集団感染疑い，重症例）。

百日咳レファレンスセンター

