

原著

LAMP 法を用いて診断した百日咳確定症例の検討

伊 東 宏 明¹⁾ 黒 木 春 郎¹⁾ 神 谷 元²⁾ 岡 田 賢 司³⁾

要旨 LAMP 法を用い小児 7 例を百日咳と診断した。7 例は、DPT ワクチンを標準的スケジュールで 2~10 年前に接種しており、重篤ではなかった。このうちの 4 歳女児は当初、特有の咳嗽を伴っていなかったが、LAMP 法により迅速に百日咳と診断し得た。重症化しやすいとされる月齢である 3 カ月の妹に早期に抗菌薬を予防内服させ、発症を予防し得た。LAMP 法が実用化されれば、迅速な治療・感染対策が行えることが期待できる。

はじめに

近年、再興感染症として注目されている百日咳だが、年長児やワクチン既接種児においては、特有の咳嗽を伴わない非定型的な症状が多く、診断が困難とされる^{1,2)}。また日常診療における簡便な実験室診断法がないことから、その疾病負担は過小評価されている可能性がある。

欧米諸国においては、就学前に DPT (沈降精製百日せきジフテリア破傷風) ワクチン 5 回目を、また DT (沈降ジフテリア破傷風混合) ワクチンの代わりに百日咳抗原を含有する Tdap (Tetanus Toxoid, Reduced Diphtheria Toxoid and Acellular Pertussis) ワクチンでブースター追加接種を実施し、免疫を強固にすることで年長児や成人の百日咳患者の制御を目指している^{3,4)}。

今回、血清学的診断や分離培養と併せて、迅速

かつ簡易にできる核酸増幅法である loop-mediated isothermal amplification 法 (LAMP 法) を用い、百日咳と確定診断した小児における臨床症状を予防接種歴と関連して検討した。

I. 対象と方法

平成 23 年 4~9 月までに、咳嗽を主訴に外房こどもクリニックを受診し、臨床的・疫学的に百日咳が疑われた小児 35 例を対象とした。抗百日咳毒素抗体〔以下、抗 PT (pertussis toxin) 抗体〕を用いた血清学的診断を 1 例、上咽頭拭い液検体による分離培養 (百日咳菌の検出に特化し、ボルデテラ CFDN 寒天培地のみを使用) を 25 例行った。上咽頭拭い液を検体とした LAMP 法による核酸増幅検査を 35 例に併せて実施した。百日咳症例の診断基準は、非定型的な百日咳も診断できるよう咳嗽持続期間を 7 日以上と設定し^{5,6)}、百日咳

Key words : 百日咳, LAMP 法, 就学前 DPT ワクチン追加接種

- 1) 外房こどもクリニック
〔〒 299-4503 いすみ市岬町和泉 1880-4〕
- 2) 国立感染症研究所感染症情報センター
- 3) 国立病院機構福岡病院

診断の目安 2008 (案) ver 1⁷⁾を参考にした(表 1).

II. 結 果

臨床的, 疫学的に百日咳が疑われた小児 35 例に LAMP 法で検査を行い, 7 例が陽性であった. 分離培養は 25 例に行い 2 例が陽性, 血清学的検査を行った 1 例は診断基準に適合していた(重複含む). 実験室診断により小児 8 例を百日咳菌感染症と診断し, 前述の診断基準の臨床症状である ① 発作性の咳込み, ② 吸気性笛声, ③ 咳込み嘔吐のいずれも伴わなかった症例 6 を除いた 7 例を百日咳と確定診断した. このうち 6 例は同一地

区で 3 km ほどの距離にある小学校と保育園に通っていた. 性別は男児 2 例, 女児 5 例, 年齢分布は 7 歳以上 13 歳未満が 5 例, 7 歳未満が 2 例で, 平均年齢は 7 歳 1 カ月であった(表 2). 血清学的検査が行われた 1 例では, ペア血清での凝集素価(山口株)で 4 倍以上の上昇があり, かつシングル血清で抗 PT 抗体が 100 EU/ml 以上であった. WBC 5,300/ μ l, リンパ球 31%とリンパ球優位の白血球増多は認めなかった. この症例は, アジスロマイシンの前投与があり, LAMP 法と細菌培養も合わせて行ったが, とともに陰性であった. 疫学的接触による診断はなかった.

臨床的もしくは疫学的に百日咳が疑われた小児 35 例のうち, 27 例は実験室診断検査が陰性であった. この内訳として, 「発作性咳嗽」が 11 例, 「吸気性笛声」が 1 例, 「咳込み後の嘔吐」が 5 例, 「2 週間以上持続する咳嗽」が 7 例, 「百日咳確定症例と接触があったもの」が 8 例(重複含む)であった. これらは, 前述の診断基準を満たさず百日咳とは診断しなかった.

症例 1~4 は同一小学校(症例 1, 2 と症例 3, 4 はそれぞれ同じクラス)に通っており, 2 カ月以内にすべての症例が発症していた. 症例 5, 7 は同一保育園に通園しており, 1 カ月の間隔で発症していた.

症例 6 (生後 3 カ月) は症例 5 の妹で, 症例 5 が百日咳と診断された時期には無症状だった.

表 1 百日咳診断基準

A, B をともに満たす者	
A.	臨床症状: 7 日以上咳があり, ①~③のいずれか一つ以上を伴う
	① 発作性の咳込み
	② 吸気性笛声
	③ 咳込み嘔吐
B.	病原診断: ①~③のいずれか一つ以上を伴う
	① 菌陽性(① 培養陽性, あるいは② LAMP 法陽性)
	② 血清学的診断
	1. 抗 PT 抗体値がペア血清で 2 倍以上上昇, あるいは
	2. シングル血清で 100 EU/ml 以上
	③ 疫学的関連: 過去 1 カ月以内に病原診断された百日咳患者との接触歴により医師が百日咳と診断した者

表 2 細菌・血清・疫学的診断の結果

症例	年齢	性別	培養結果	LAMP 法	PT (EU/ml)	凝集素価 (山口株)
1	8 歳	男	未	陽性	未	未
2	8 歳	男	未	陽性	未	未
3	7 歳	女	陰性	陽性	未	未
4	7 歳	女	陰性	陽性	未	未
5	4 歳	女	陰性	陽性	未	未
6	3 カ月時	女	陽性	陽性	未	未
	4 カ月時	女	陽性	陽性	未	未
7	5 歳	女	陽性	陽性	未	未
8	11 歳	女	陰性	陰性	≥ 100	<10 倍 \Rightarrow 40 倍

姉妹
小学校
保育園

症例 6 は百日咳診断基準を満たさず, 症例 8 はアジスロマイシンの前投薬あり.

DPT ワクチン 1 回のみ接種で無呼吸発作や脳症など重症化が予測される生後 3 カ月以下であったため、上咽頭拭い液検体での分離培養、LAMP 法検査を行ったうえで、クラリスロマイシン (15 mg/kg/day, 7 日間) を予防投与した。抗菌薬開始前の培養と LAMP 法はともに陽性であった。姉の咳が始めて 4 週間 (抗菌薬予防投与開始から 3 週間) は無症状であったが、5 週間目 (生後 4 カ月時) に軽度の咳嗽があり来院した。臨床症状は軽微であり、治療を受けた発端者の姉以外の家族には、百日咳を疑う臨床症状も認められなかったため、慎重に経過観察を行った。念のため、細菌培養、LAMP 法検査を再検した。培養も LAMP 法もともに陽性であったが、百日咳に特有の咳嗽に進展することなく、咳嗽持続期間も 1 週間程度であった。百日咳菌は分離されたものの、臨床症状は百日咳の診断基準を満たさなかった。2 回目の検査でも菌が分離された時点では、臨床症状はほぼ消失していたが、除菌目的にクラリスロマイシンを再投与した。

百日咳確定症例 7 例の臨床症状については、咳嗽の持続期間はおおむね 2 週間で、発熱を認めたものはなかった。百日咳に特有な咳とされる「発作性咳嗽」は症例 6 を除いて 7 例に認められたが、「咳込み嘔吐」は 2 例、「吸気性笛声」が認められた児はいなかった (表 3)。

百日咳患者の予防接種歴を母子手帳によって確認した。症例 6 は、生後 3 カ月時の初診より 1 週間前に 1 回目の DPT ワクチンを、生後 4 カ月時の咳嗽が出現した日に DPT ワクチンの 2 回目を接種していた。症例 6 以外の 7 例は、標準的な接種期間に規定回数の DPT ワクチン接種を済ませていた。DPT ワクチン 4 回目接種から 2~10 年後に百日咳を発症したことになる (表 4)。

百日咳患者との濃厚接触者への抗菌薬予防投与を家族に提示したが、「症例 6」と「症例 7 の母」以外は抗菌薬予防投与を希望されなかった。その後、発端者以外に家族で百日咳に特有の咳嗽や長

表 3 臨床症状

症例	年齢	発作性咳嗽	吸気性笛声	咳込み嘔吐	咳持続期間
1	8歳	あり	—	—	2週間
2	8歳	あり	—	—	2週間
3	7歳	あり	—	—	2週間
4	7歳	あり	—	—	3週間
5	4歳	あり	—	あり	4週間
6	3カ月時	—	—	—	—
	4カ月時	—	—	—	1週間
7	5歳	あり	—	—	1週間
8	11歳	あり	—	あり	3週間

表 4 DPT ワクチン接種歴

症例	年齢	DPT 1 回目	DPT 2 回目	DPT 3 回目	DPT 4 回目	最終接種後百日咳罹患までの期間
1	8歳	8カ月	9カ月	1歳0カ月	2歳0カ月	6年5カ月
2	8歳	7カ月	8カ月	9カ月	2歳0カ月	6年6カ月
3	7歳	5カ月	6カ月	7カ月	1歳9カ月	5年7カ月
4	7歳	1歳1カ月	1歳2カ月	1歳4カ月	2歳5カ月	4年11カ月
5	4歳	5カ月	6カ月	8カ月	1歳10カ月	2年6カ月
6	3カ月時	3カ月 ^{#1}	—	—	—	—
	4カ月時	3カ月 ^{#1}	4カ月	—	—	—
7	5歳	11カ月	1歳1カ月	1歳2カ月	2歳3カ月	3年7カ月
8	11歳	3カ月	7カ月	8カ月	2歳0カ月	9年8カ月

^{#1}初回検査前 1 週間

引く咳嗽などを認めたものはいなかった。

III. 考 察

LAMP 法、培養、血清学的診断にて 8 例を百日咳菌感染症と診断し、臨床的百日咳の診断基準を満たさなかった症例 6 を除いた 7 例を百日咳と確定診断した。このうち 6 例は、LAMP 法が陽性で、1 例は培養も陽性であった。LAMP 法が陰性だった 1 例は、血清学的基準により診断した。これまで報告^{8,9)}されているように、①国内の標準的接種スケジュールで DPT ワクチン接種を完了した児でも百日咳を発症すること、②DPT ワクチン接種児の症状はワクチン未接種児と比較して特徴的な検査所見や咳症状に乏しいことが確認できた。現行のワクチンスケジュールでは、ワクチン接種児の重症化は予防できているが、確実な感染予防および発症予防は期待できないと考えられる。今回、地域的に百日咳患者報告の情報もあり、積極的に百日咳を疑い、感染症診断の基本である分離培養や LAMP 法も併用することにより、早期から確定診断し得た。DPT ワクチン接種率の高いわが国の日常診療においては、今回の症例のような重篤でない非定型的な百日咳が正確に診断されていない可能性がある。このような症例が、重症化しやすいワクチン未接種の乳児への感染源となっている可能性が十分に考えられる^{8,10)}。

今回提示した症例 6 はハイリスクとされる生後 3 カ月児で、姉（症例 5）からの感染伝播が強く疑われた。この時点では、DPT ワクチン 1 回目接種より 1 週間しか経過しておらず、ワクチンによる効果は期待できないものと考えられる。LAMP 法による迅速な診断がなされたこともあり、姉が確定診断された時点で、抗菌薬予防投与などの適切な対策がなされたが、もし診断や抗菌薬治療が遅れていれば重症化した可能性は否定できない。このような家族内感染の場合、潜伏期間内に適切な抗菌薬療法が行われると、感染は成立するが典型的な症状には進展しないことが確認できた貴重な経過であった。母親からは処方されたクラリスロマイシンの服薬コンプライアンスは良好であったと確認できているが、抗菌薬予防投与後 4 週間目の 2 回目の検査でも菌培養検査、

LAMP 法検査がともに陽性であった。この要因として、①7 日間では期間が十分でなかった、②抗菌薬予防内服をしなかった家族からの感染伝播などが考えられるが、これ以上の精査は行っていない。

症例 5（症例 6 の姉）は、DPT ワクチンを国内の標準的接種スケジュールで接種し、最終接種（4 回目）から 2 年 6 カ月で発症し、妹への感染源となったと推定される。百日咳重症化のハイリスクとされる生後 3 カ月未満児への感染対策として、同胞である幼児に対して、米国のように DPT ワクチンの 5 回目の追加接種が必要と考える。

LAMP 法は栄研化学株式会社が独自に開発した核酸増幅法である。本法を応用した百日咳 LAMP 法は百日咳菌に特異的であり、さらに簡便かつ迅速に同菌遺伝子を検出することが可能である¹¹⁾。百日咳を迅速に診断できることは患者治療のみならず、速やかな感染対策を講じることができ有用である。現在、LAMP 法による百日咳診断検査は研究用試薬で、保険収載されていないため、多くの医療機関では利用できない。今後、保険収載され、広く日常診療で実施することによって、これまでの検査では診断が困難な非定型的な百日咳をも積極的に確定診断でき、百日咳感染症の全体像把握につながると考えられる。さらに精度の高い百日咳サーベイランスを行ったうえで、諸外国と同様に就学前の DPT 追加接種や、思春期・成人に対する Tdap ワクチンの必要性について検討する必要がある^{12,13)}。

米国小児科学会などからは、家族などの濃厚接触者へは予防接種の有無に関係なく、抗菌薬予防投与が推奨されている¹⁴⁾。今回、同居家族に対して抗菌薬を予防投与する必要性を説明したが、発端者の症状は重症ではなかったため、百日咳の及ぼし得る合併症など十分に認識できなかったのか、または保険適用外で費用全額負担となるためか、ほとんどの家族は抗菌薬予防投与を希望されなかった。百日咳に対する抗菌薬予防投与に関するわが国の指針作成と、これに関する保険収載が望まれる。

本研究の一部は、厚生労働科学研究補助金（新

興・再興感染症研究事業)「インフルエンザ及び近年流行が問題となっている呼吸器感染症の分析疫学研究」(主任研究者:廣田良夫)のなかの百日咳分科会によってなされた。

なお、本稿を作成するにあたり国立感染症研究所細菌第二部の浦地一成先生、豊泉裕美先生、外房こどもクリニックの館野規子先生にご教示いただきました。ここに深謝いたします。

文 献

- 1) Hewlett EL, et al : Pertussis—not just for kids. *N Engl J Med* 352 : 1215–1222, 2005
- 2) 中野貴司 : 再興感染症としての百日咳—わが国においても対策の大切さを認識しましょう—。小児臨床 59 : 1673–1680, 2006
- 3) Pichichero ME, et al : Combined tetanus, diphtheria, and 5-component pertussis vaccine for use in adolescents and adults. *JAMA* 293 : 3003–3011, 2005
- 4) Broder KR, et al : Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents : use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 55 : RR–3, 2006
- 5) Salmaso S, et al : Sustained efficacy during the first 6 years of life of 3-component acellular pertussis vaccines administered in infancy : the Italian experience. *Pediatrics* 108 (5) : E81, 2001
- 6) Joel IW, et al : Efficacy of an acellular pertussis vaccine among adolescents and adults. *N Engl J Med* 353 : 1555–63, 2005
- 7) <http://idsc.nih.gov/iasr/29/337/graph/dt33771.gif>
- 8) 伊東宏明, 他 : 百日咳確定診断例のDPTワクチン接種歴について。外来小児科 13 (2) : 125–131, 2010
- 9) 永井文栄, 他 : 千葉県君津郡市で流行した百日咳症例の臨床的検討。小児感染免疫 18 (4) : 377–383, 2006
- 10) 黒木春郎, 他 : 小児一次医療における百日咳菌分離例の検討。外来小児科 9 : 17–23, 2006
- 11) Kamachi K, et al : Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* 5 : 1899–1902, 2006
- 12) Okada K, et al : Safe and effective booster immunization using DTaP in teenagers. *Vaccine* 28 (48) : 7626–7633, 2010
- 13) 伊東宏明, 他 : 成人を対象としたジフテリア・百日咳・破傷風混合ワクチンの安全性と免疫原性。日小児会誌 3 : 485–491, 2010
- 14) Recommended antimicrobial agents for treatment and postexposure prophylaxis of pertussis. 2005 CDC Guidelines Vol. 54/No. RR–14 *MMWR*, 2005

Seven laboratory confirmed pertussis cases diagnosed by the Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method

Hiroaki ITO¹⁾, Haruo KUROKI¹⁾, Hajime KAMIYA²⁾, Kenji OKADA³⁾

1) *Sotobo children's clinic*

2) *Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases*

3) *Fukuoka National Hospital*

Seven pediatric pertussis cases were diagnosed using the Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) method. All cases had completed the standard Japanese DPT vaccine series two to ten years ago and no severe cases were found. One case, a four year old female presented to the clinic with atypical pertussis symptoms. However, pertussis was diagnosed by using the LAMP method. Due to this early diagnosis, her three month old sister was placed on prophylaxis early and enabled protection from pertussis infection. More frequent utilization of the LAMP method can prevent more vulnerable infants and children from pertussis.

(受付 : 2012 年 4 月 3 日, 受理 : 2012 年 9 月 24 日)