

# 百日咳の検査学的診断

*The laboratory method used for the diagnosis of pertussis*

東京医科歯科大学 大学院保健衛生学研究科 生体防御検査学分野 助教 齋藤良一

RYOICHI SAITO, MT, PhD. (Assistant Professor)

Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Health Care Sciences, Microbiology and Immunology

## 1. はじめに

百日咳(pertussis, whooping cough)は、百日咳菌 *Bordetella pertussis*によって起こる世界的に高い罹患率と致死率を示す重篤な伝染性疾患である<sup>1)</sup>。一方、パラ百日咳菌 *Bordetella parapertussis*によって起こるパラ百日咳(parapertussis)は、百日咳に類似した軽症の疾患である。これらの菌は、好気性の非運動性グラム陰性短桿菌であり、主に咳による飛沫感染で伝播され、上気道の線毛上皮細胞に結合し種々の病原因子を産生する。百日咳菌の病原因子として、百日咳毒素(PT)、線維状赤血球凝集素(FHA)、パータクチン、線毛、アデニル酸シクラーゼ毒素などが知られている<sup>1)</sup>。

本疾患の予防にはワクチン接種が最も効果的であり、現在わが国ではPTおよびFHAを主要抗原とする精製百日咳ワクチン(acellular vaccine)が利用されている。1950年にワクチン接種が開始されてから、国内の百日咳届出患者数(厚生労働省感染症発生動向調査による小児科定点からの報告)は減少傾向を示していたが、2002年以降成人患者が急増し、2008年には全報告患者数の36.7%を占めた。しかし、これらは小児科定点からの報告であるため、成人の百日咳症例を全て把握出来ていない可能性が指摘されている。同様の現象は、高いワクチン接種率を維持する先進国に共通して認められている<sup>2)</sup>。

WHOでは、百日咳の診断は培養検査を“gold standard”とし、さらに患者の年齢とワクチン接種歴によって検査方法を使い分けることを推奨している<sup>3)</sup>。ここでは、百日咳の診断に使用される検査法について述べたいと思う。

## 2. 細菌学的検査(培養同定検査)法

咳嗽、鼻咽頭分泌物や喀痰などが検査材料として用いられており、中でも鼻咽頭分泌物が最も用いられる傾向がある。分離培養には、抗生剤(cephalexin 20  $\mu$ g/mL)を添加したBordet-Gengou寒天培地(BG培地)またはシクロデキストリン固形寒天培地(CSM培地)が用いられている。百日咳菌は、上記培地で36 $^{\circ}$ C、4~5日間の培養により直径1mm程度の真珠または水銀様の光沢を示す小さなコロニーを形成する(図1)。培養後7日目まで百日咳菌様集落を認めない場合は培養陰性とするが、百日咳様患者からの百日咳菌分離率は10-20%程度と低く、本検査結果から百日咳を直ちに否定することはできない。一般的には、発症初期(カタル期)から第3病週までの分離率が高いとされる。また、抗生剤投与後の患者では、百日咳菌の分離率が低下することが知られており、投与後3~4日でほとんどが培養陰性となることを考慮しなければな



図1 BG培地上の百日咳菌(培養5日目)

らない<sup>4)</sup>。

同定検査は、純培養した菌について抗百日咳菌血清を用いたスライド凝集反応により行う。スライド凝集反応は簡便で迅速な方法であるが、百日咳菌の臨床分離株の中には凝集し難い、または自己凝集を示す菌株が存在するため判定に注意を要する。

### 3. 血清学的検査法

血清学的検査法では、百日咳菌凝集素価と百日咳菌抗体価の測定が用いられている。特に、百日咳菌凝集素価は、百日咳の血清学的診断の簡便な方法として広く活用されている。本法はマイクロプレート凝集反応法を測定原理とし、百日咳凝集反应用抗原(東浜株および山口株)の両抗原に対する凝集素価をそれぞれ測定する。現在、体外診断薬として百日咳凝集反应用抗原が販売されている。なお、凝集素価を測定する場合は、血清の非働化処理(56℃、30分)が必要である。凝集素価を用いた診断では、ペア血清で4倍以上の凝集素価の上昇、あるいは単血清で40倍以上の凝集素価を示す場合に百日咳を疑う必要がある。ただし、百日咳ワクチン接種者では、高い凝集素価を示すことがある。

百日咳菌抗体価は、血清中の抗PT IgGおよび抗FHA IgG抗体価を酵素免疫測定法(ELISA)にて測定する方法が一般的に用いられている。本法は簡便で再現性の良い測定が短時間でできることから、ワクチン接種による免疫評価にも使用され、我が国の感染症流行予測調査において統一的使用されている。しかし、百日咳菌の抗体価上昇には最低でも7日程度を要するため、感染初期の患者を診断することは困難とされている。そのため、凝集素価と同様、ペア血清による抗体価の上昇を確認することが重要である。また、ワクチン接種歴を考慮することも重要であり、WHOではワクチン接種から3年を経過した患者についてのみ抗体価測定を推奨している<sup>3)</sup>。

これら二つの血清学的検査法の診断基準は明確にはされておらず、WHOでも診断基準の提示は成されていない<sup>3)</sup>。蒲地らによって、百日咳の血清学的検査法における診断基準案<sup>5)</sup>が示されているのでぜひ参照されたい。

### 4. 遺伝子検査法

遺伝子検査法においては検査材料として、鼻腔分泌物が主に用いられる。百日咳の診断で最も感度が高いとされ、百日咳菌の挿入配列IS481を標的としたReal-time PCR法<sup>6)</sup>が一般的に用いられている。百日咳菌の挿入配列IS481は染色体上に多数存在するため、反応効率に優れ、約1時間程度で結果を得ることが可能である。しかし、専用の装置を必要とすること、および他の*Bordetella*属(*B. holmesii*, *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*)も同様にIS481をもつため、特異性が低いことが欠点として指摘されている。なお、パラ百日咳菌の検出は、挿入配列IS1001を標的として行われる<sup>7)</sup>。また、近年はPTのプロモーター領域を標的としたloop-mediated isothermal amplification(LAMP)法<sup>8)</sup>も開発されている。LAMP法は、現在もっとも高感度な遺伝子検査法であり、特異性が高く、百日咳菌以外のPTを産生しない*Bordetella*属を検出しないとされる。この方法の利点として、反応温度が一定温度(65℃)で行われるため特別な装置を必要としない、増幅効率が高いため1時間以内に反応が終了する、および目視判定が可能であることが挙げられる。

これらの方法は、検体中に微量でも百日咳菌が存在すれば陽性となる。培養法と比較して優れた感度を有しているが、コンタミネーションによる偽陽性や核酸の抽出不良、反応阻害物質(ヘモグロビンなど)の混入による偽陰性も存在するため、確定診断には注意が必要である。

### 5. おわりに

近年、高いワクチン接種率を維持する先進国において、百日咳患者数の増加が認められている。青年・成人層が百日咳に罹患しても重篤になることは少ないが、これらの保菌者からワクチン未接種児へ伝播する可能性が存在する。ワクチン未接種児では重篤化し易く、死亡事例も認められている。百日咳患者の早期探知には臨床症状に加え、細菌学的検査法、血清学的検査法および遺伝子検査法による診断が重要な鍵となっている。それゆえ、百日咳の診断に用いられる検査法の改良および新たな検査法の開発が期待される。

\* 18ページ 右欄へ続く(引用文献)