

香川県における LAMP 法による百日咳遺伝子検出状況

Detection of the *Bordetella Pertussis* Gene by the LAMP method in Kagawa Prefecture

宮本孝子

有塚真弓

関和美

内田順子

池本龍一

Takako MIYAMOTO Mayumi ARIZUKA Kazumi SEKI Junko UCHIDA Ryuichi IKEMOTO

要 旨

香川県で感染症発生動向調査の強化目的として、2011年8月から12月の間、県内にある小児科病原体定点のうち、2医療機関に検体採取を依頼し、百日咳が疑われた患者の鼻咽頭ぬぐい液について、百日咳菌検出試薬キット（栄研化学）を用いたLAMP法による検査を実施した。

その結果、LAMP法陽性者が、予防接種を受ける機会の少ない6か月以下の乳児に多くみられ、うち家族内感染の可能性のある事例も少なからず認められたことから、重症化しやすい乳児を中心とする百日咳に対する公衆衛生上の注意が改めて必要であることが明らかとなった。

キーワード：百日咳 LAMP法 乳児 家族内感染 香川県

I はじめに

百日咳は、百日咳菌の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、主にワクチン未接種の乳児が感染し、感染力が極めて強いことが特徴である。また、百日咳菌は一般細菌と異なり培養が難しく検出しにくいとされている¹⁾。今回、遺伝子増幅法であるLAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法による百日咳菌検出試薬キット（栄研化学）を用い、百日咳が疑われた患者の鼻咽頭ぬぐい液について検査を実施したのでその結果を報告する²⁾。

II 方法

2011年8月から12月の間、県内に4つある小児科病原体定点のうち2医療機関に依頼し、百日咳が疑われた患者の鼻咽頭ぬぐい液を滅菌綿棒を用い採取し、すみやかに冷蔵にて搬送してもらい、検査を行った。すぐに検査できない場合は冷凍保存し、後日検査した³⁾。また検体に関する発症日、検体採取日、年齢、性別、住所、家族内感染の有無、主な症状などの基本情報をとりまとめた。

検査は、採取検体が入った滅菌試験管に生食を加えミキサーにてよく混ぜ、適量を滅菌チューブにとり15,000rpm 10分間遠心した沈渣を用いた。

DNA抽出は、QIAGEN社のQIAamp DNA Micro kitを用い、核酸溶出、核酸吸着、洗浄、溶出を行いDNAを抽出した。抽出した検体は、ヒートブロックを用い95°C 5分加熱後、氷上で急冷しそのまま5分以上静置したものをDNA溶液とした。このDNA溶液を百日咳菌検出試薬キット（栄研化学）の調整した試薬と混合した後、リアルタイム濁度測定装置（栄研化学 Loopamp LA-320C）を用いて増幅した。増幅設定温度は65°C、測定時間40分とし、増幅反応の副産物であるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物質）の濁度の上昇を計測し判定を行った。陽性コントロールと同様に濁度の上昇が認められた場合を陽性、濁度の上昇が認められない場合を陰性と判定した。

III 結果

2医療機関より5か月間に百日咳疑いとして検体送付のあった症例件数は、男性24件、女性34件の計58件であった。LAMP法陽性は男性6件女性8件の計14件であり、生後0か月から3か月が5件（女性5）、4か月から6か月が4件（男性2、女性2）、6才から11才が3件（男性3）、12才から14才が1件（男性）、30代が1件（女性）であった。表1にLAMP法陽性および陰性に分類しそれぞれの基本情報を示した。

陽性者は、生後6か月以下の乳児に多く見られた(64%)。また、陽性者に占める成人は1件のみであった。

発症から検体採取日までの平均日数は陽性で5.4日、陰性で8.1日であった。

家族内感染は、依頼伝票の記載情報によると陽性で5件(36%)、陰性で12件(27%)であった。家族内感染が疑われ検体採取のあった事例を表2に示した。事例1, 2, 7では、子供が陽性で母親が陰性であった。

また、主な症状として陽性でレプリーゼ(連続した咳と吸気時の笛音)2件(14%)上気道炎2件(14%)無

呼吸1件(7%)下気道炎・気管支炎4件(29%)肺炎1件(7%)、陰性でレプリーゼ1件(2%)上気道炎5件(11%)無呼吸1件(2%)下気道炎・気管支炎15件(34%)肺炎6件(14%)であった。

次に、図1に月別検査件数を示した。陽性14件の月別の検体数は、8月は4件、9月は3件、10月は3件、11月は4件、12月は0件であった。

図2には、記載情報をもとに陽性14件の香川県の分布状況を示した。高松市が6件、中・西讃が各3件、東讃が1件、愛媛県東部が1件であった。

表1 香川県の2小児科病原体定点において実施されたLAMP法検査の結果の概要(2011年8月~12月)

| | | LAMP法陽性 | | LAMP法陰性 | |
|---------------------|-----------|-------------|-----|---------|-----|
| 計 58件 | | 14 | 24% | 44 | 76% |
| 発症から検体採取日までの平均日数(日) | | 5.4 | | 8.1 | |
| 性別 | 男性 | 6 | | 18 | |
| | 女性 | 8 | | 26 | |
| 年齢(才) | 範囲 | 0-37 | | 0-74 | |
| | 平均値 | 5.5 | | 19.4 | |
| 年代分布(人) | 0-3か月 | 5 | | 6 | |
| | 4-6か月 | 4 | | 2 | |
| | 7-11か月 | 0 | | 1 | |
| | 1-5才 | 0 | | 7 | |
| | 6-11才 | 3 | | 5 | |
| | 12-14才 | 1 | | 3 | |
| | 15-19才 | 0 | | 0 | |
| | 20代 | 0 | | 7 | |
| | 30代 | 1 | | 8 | |
| | 40代 | 0 | | 3 | |
| | 50代 | 0 | | 0 | |
| | 60代 | 0 | | 0 | |
| 70代以上 | 0 | | 2 | | |
| 家族内感染(記載分のみ) | 有 | 5 | 36% | 12 | 27% |
| | 無 | 1(学校集団発生) | | 0 | |
| | 空白 | 8 | | 32 | |
| 主な症状(記載分のみ・一部重複有) | レプリーゼ | 2 | 14% | 1 | 2% |
| | 上気道炎 | 2 | 14% | 5 | 11% |
| | 無呼吸 | 1 | 7% | 1 | 2% |
| | 下気道炎・気管支炎 | 4 | 29% | 15 | 34% |
| | 肺炎 | 1(学校集団発生)7% | | 6 | 14% |

表2 家族内感染百日咳疑い事例

| 事例 | 採取日 | 年齢 | 性別 | LAMP法結果 | | 発熱有無 | 臨床症状 |
|----|--------|--------|----|---------|----|-------|-------------|
| 1 | 8月30日 | 30才代 | 女 | | 陰性 | | |
| | 8月30日 | 0-3か月 | 女 | 陽性 | | | 肺炎 |
| 2 | 9月13日 | 30才代 | 女 | | 陰性 | | 下気道炎 |
| | 9月13日 | 4-6か月 | 男 | 陽性 | | 37.6℃ | |
| | 9月14日 | 6-11才 | 男 | | 陰性 | | 下気道炎 |
| 3 | 10月3日 | 0-3か月 | 女 | 陽性 | | | リブリーゼ、チアノーゼ |
| | 10月4日 | 6-11才 | 男 | 陽性 | | | |
| 4 | 10月18日 | 0-3か月 | 男 | | 陰性 | | 肺炎 |
| | 10月18日 | 20才代 | 男 | | 陰性 | | |
| 5 | 10月25日 | 30才代 | 女 | | 陰性 | | |
| | 10月25日 | 30才代 | 男 | | 陰性 | | |
| 6 | 10月27日 | 1-5才 | 女 | | 陰性 | 38.0℃ | 肺炎 |
| | 11月3日 | 40才代 | 男 | | 陰性 | | 気管支炎 |
| | 11月3日 | 70才代 | 男 | | 陰性 | | 気管支炎 |
| | 11月3日 | 70才代 | 女 | | 陰性 | | 気管支炎 |
| 7 | 11月18日 | 0-3か月 | 女 | 陽性 | | | 上気道炎 |
| | 11月18日 | 30才代 | 女 | | 陰性 | | |
| 8 | 12月9日 | 1-5才 | 男 | | 陰性 | | |
| | 12月9日 | 30才代 | 女 | | 陰性 | | |
| 9 | 11月7日 | 6-11才 | 男 | 陽性 | | | 気管支炎 |
| | 11月20日 | 12-14才 | 男 | 陽性 | | | 咳 |

件

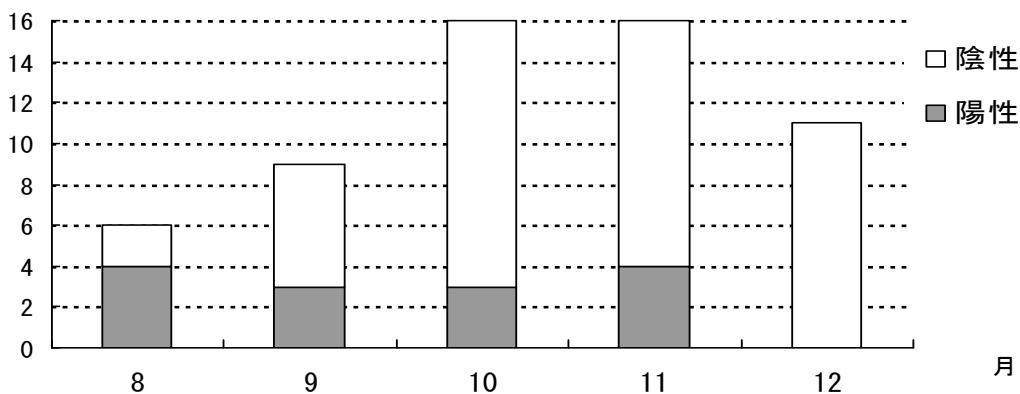


図1. 香川県におけるLAMP法月別検査件数 (2011年)

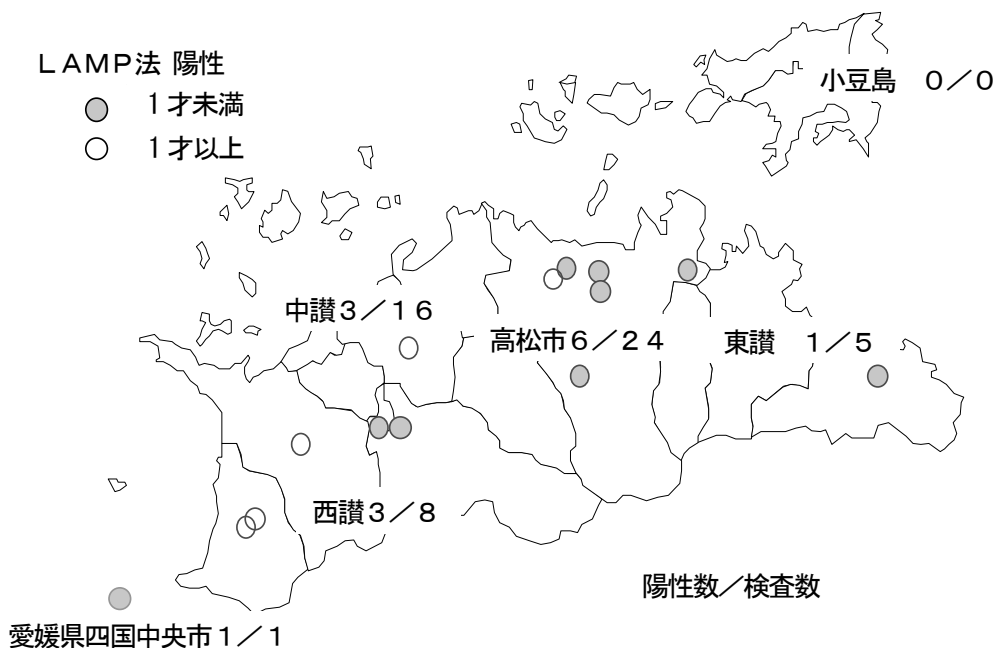


図2. 香川県における百日咳のLAMP法陽性患者の分布表

IV 考察

百日咳の予防法は、ワクチンの接種である。初回接種については、生後3月に達した時から生後12月に達するまでの期間を標準的な接種期間として、20日から56日までの間隔を置いて3回行う。追加接種については、初回接種終了後、12月に達した時から18月に達するまでの期間を標準的な接種期間として、1回行う⁴⁾。

ゆえに、生後間もない乳児は予防接種の機会が少ない。今回、陽性者が生後6か月以下の乳児に多くみられたのは、予防接種が未接種か接種の機会がとてもなく、移行免疫も有効に働かないのが要因であると推察された。本報において検討対象となった陽性患者の予後は良好であったとの情報を得ている。

また、陽性者に占める成人は1件のみであったことから、成人の患者が実際に少なかったか、あるいは感染していても菌量が少なく検出しにくいことが考えられた。

家族内感染が疑われた事例のうち3例は、6か月以下の乳児が陽性で、感染源と考えられる母親が陰性であった。これは、母親の保菌量が少ないため検出できなかったか、検体採取時期が感染力の強いカタル期を過ぎていたため検出できなかったと推察された。

V まとめ

百日咳菌は一般細菌と異なり検体採取時期や保菌量により培養が難しく検出しにくいのが現状である。今回、LAMP法を用いて百日咳遺伝子を検出し、陽性者の年齢、性別、家族内感染、地域性、症状との関連性をみた。

陽性者は、生後6か月以下が多く、性別の違いはあまりみられなかった。家族内感染も少なからずみられ、地域性はあまり関係なく発生し、レプリーゼや上気道炎、無呼吸の症状がみられた。

重症化しやすい乳児を中心に陽性を認め、家族内感染の可能性のある事例も認めたことから、百日咳に対する公衆衛生上に対する注意が改めて必要であると思われる。

文献

- 1) 国立感染症研究所：感染症の話，感染症発生動向調査週報，36，(2003)
- 2) 国立感染症研究所：香川県におけるLAMP法による百日咳遺伝子検出状況，33(4)，104-105，(2012)
- 3) 百日咳検査診断マニュアル 国立感染症研究所
- 4) 厚生労働省 定期（一類疾病）の予防接種実施要領

Abstract

We were commissioned by two medical institutions to conduct an investigation of pediatric pathogens in Kagawa prefecture, with a view to strengthening the Kagawa Prefectural Infectious Disease Outbreak Trend Analysis Project. Between August and December 2011, we swabbed the nasopharynxes of patients with suspected whooping cough and tested them with *Bordetella Pertussis* detecting reagent kits (produced by the Eiken Chemical Co., Ltd.), which use the LAMP method.

Amongst those that tested positively, there were many infants under 6 months old. This age group is less likely to have been vaccinated. There were also cases where the disease may have been transmitted to the patient from his or her family. The investigation shows that more attention must be paid to sanitation with regards to diseases, like whooping cough, which can easily become severe in infants.