

[原 著]

百日咳菌検出における LAMP 法, 多項目 PCR 法, 4Plex real-time PCR 法および培養法の比較

小松頌子・岩本智花・中西典子
神戸市健康科学研究所第2衛生研究部

(令和7年10月8日受付, 令和7年11月5日受理)

2025年には百日咳の全国的流行が確認されている。本研究では百日咳の主要な検査診断法である Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法および多項目 PCR 検査パネル BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1 (FilmArray) と BioFire SpotFire R Panel (R Panel) (BioFire Diagnostics, LLC) の百日咳菌検出能を, 4Plex real-time PCR 法における Ct 値ならびに培養法と比較検討した。Ct 値が 30 未満では 3 法すべて陽性率 100% であった。Ct 値 30.0~35.0 では R Panel 100%, LAMP 82.4%, FilmArray 60.0%, Ct 値 35.0 を超えると R Panel 82.3%, LAMP 80.0%, FilmArray 0% であった。FilmArray 陰性の 8 検体のうち 3 検体は LAMP 陽性であった。3 法で陽性となった検体の培養陽性率は約 80% であり, Ct 値 37.3 と 37.6 の検体でも培養陽性が確認された。培養法は遺伝子検査に比べ感度で劣るものの, 高 Ct 値の検体からも分離可能であり, 疫学解析に有用であると考えられた。以上より, 遺伝子検査は最も高感度な方法であるが, 各検査法の特徴を理解したうえで, 臨床状況に応じて適切に検査法を選択することが重要である。

Key words: 百日咳菌, 遺伝子検査, 培養法, PCR 法, LAMP 法

序 文

百日咳は, 主に百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) によって引き起こされる急性気道感染症である。長期間続く咳嗽が主な症状であり, 特に新生児や乳児においては, 死亡率および重症化率が高いことが報告されている¹⁾。百日咳はワクチンで予防可能な感染症のひとつであり, 2024 年以降, 国内の定期接種には, 5 種混合ワクチン (DPT-IPV-Hib; 沈降精製百日せき・ジフテリア・破傷風・不活化ポリオ・Hib) が導入されている。

百日咳は, 2018 年 1 月 1 日以降, 感染症法に基づく感染症発生動向調査において 5 類全数把握対象疾患に指定されている。新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行により, 2020 年以降の届出数は激減した²⁾。しかし, 2024 年以降は増加傾向となり, 2025 年 7 週以降は 2018 年以降の同時期と比較して最多の患者数が報告され, 全国的な流行が確認されている。

百日咳の届出には百日咳の特徴的な臨床症状を有するとともに, 検査による確定診断が必要とされる。百日咳の検査診断法には, 病原体の分離・同定, 核酸増幅法 (PCR 法, LAMP 法など) による遺伝子検出, イムノクロマト法による抗原検出, 抗体検出がある³⁾。全国的な調査において, 2025 年第 12 週までに報告された百日咳症例における診断法の 59.1% が遺伝子検出法となっており, 主要な検査法となっている²⁾。こ

の背景として, LAMP 法が 2016 年に, PCR 法が 2024 年より保険適用となり, 臨床現場での使用頻度が増加したことが挙げられる。また, 医療機関では全自動遺伝子解析装置の導入が進み, 多項目 PCR 検査パネルを用いることで, 複数の呼吸器病原体を迅速かつ同時検出することが可能となっている。代表的なものとして, 22 種類 (ウイルス 18 種, 細菌 4 種) を対象とする BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1 (以下, FilmArray) や 15 種類 (ウイルス 11 種, 細菌 4 種) を対象とする BioFire SpotFire R Panel (以下, R Panel) があり, これら検査パネルに百日咳菌が検出対象として含まれる。神戸市においても, 百日咳流行期である 2024 年 52 週から 2025 年 31 週までに診断された百日咳症例の検査診断法は, 77.9% (800 件/1,027 件) が核酸増幅法 (PCR 法, LAMP 法など) による遺伝子検出が占めており, その内 63.5% (508 件/800 件) は LAMP 法による診断となっている (Table 1)。

一方で, 百日咳の実験室診断法としては, 百日咳菌が有する挿入配列 IS481 を標的としたリアルタイム PCR 法が世界的に汎用されている。IS481 は百日咳菌ゲノム中に 50~250 コピー存在し, 高感度に百日咳菌を検出できることが示されている。IS481 の他に *recA* (*Bordetella holmesii*), IS1001 (パラ百日咳菌), *atpD* (*Mycoplasma pneumoniae*) を標的に加えた 4Plex real-time PCR 法では 4 菌種を鑑別することができ, 地域の病原体サーベイランスに活用されている⁴⁾⁵⁾。

本市では百日咳の感染症発生動向調査として, 小児科病原体定点・急性呼吸器感染症 (Acute Respiratory Infection: ARI) 定点や届出医療機関より検体を収集し, 4Plex real-time PCR 法を用いた遺伝子検査, 菌分離および性状解析を実施している。本研究では, 主要な検査診断法である LAMP 法および多項目 PCR 検査パネルの百日咳菌検出能を, 4Plex real-time PCR 法における Ct 値ならびに培養法と比較検討

著者連絡先: (〒650-0046) 神戸市中央区港島中町 4-6-5
神戸市健康科学研究所第2衛生研究部
中西典子
TEL: +81-78-302-6251
FAX: +81-78-302-6402
E-mail: noriko_nakanishi@city.kobe.lg.jp

Table 1. Diagnostic methods employed for 1,027 pertussis cases diagnosed in Kobe from Week 52 of 2024 to Week 31 of 2025.

Diagnostic Methods	No. of cases (%)*
Culture	4 (0.4)
Nucleic acid amplification methods	800 (77.9)
LAMP	508
PCR	287
Other/Unknown	6
Immunochromatography	79 (7.7)
Antibody detection	151 (14.7)
Clinical confirmation	9 (0.9)

* Multiple diagnostic methods were applied to 16 cases.

した。

材料と方法

1. 対象

2024年52週から2025年31週の期間に神戸市健康科学研究所へ搬入された百日咳患者または疑い患者の鼻腔ぬぐい検体のうち、医療機関において以下のいずれかの方法により検査が実施された106検体を対象とした：LAMP法（36検体）、FilmArray（24検体）、R Panel（46検体）。検体は通常、医療機関において医療機関検査用および病原体サーベイランス用に同時に綿棒2本が採取された。なお、サーベイランス検体16件は医療機関検査検体と採取日が異なっていた。また、FilmArrayの一部は、医療機関検査実施後の綿棒をサーベイランス検体として用いた。サーベイランス用綿棒は空のスπιッツに入れ、冷凍保管された。検体は保冷ボックスを用いて搬送され、数時間以内に搬入された。

患者の年齢は0～32歳であり、月齢不明の6件（10歳：3件、12歳：1件、14歳：1件、32歳：1件）を除いた場合の年齢中央値は9歳6か月であった。

2. 菌培養検査

鼻腔ぬぐい綿棒に生理食塩水300 μ Lを加え、ボルテックスミキサーで30秒間懸濁し、得られた懸濁液をボルデテラCFDN寒天培地（日研生物）およびチャコール寒天培地（自家調製）に100 μ Lずつ塗布し、35 $^{\circ}$ C、好気条件（湿潤環境）で7日間培養した。菌種同定にはMALDI-TOF MS(Bruker)を用いた。

3. 4Plex real-time PCR法およびLAMP法による百日咳菌遺伝子の検出

菌培養検査後の鼻腔ぬぐい検体に、さらに生理食塩水を370 μ L添加して懸濁した。懸濁した検体溶液を遠心し、QIAGEN QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。抽出したDNAを用いて、QuantStudio 5 (Applied Biosystems)を使用し、4Plex real-time PCRを実施した。解析には Δ Rnによる蛍光シグナルを用い、Threshold Line (Δ Rn)を0.3に設定し⁴⁾、IS481のCt値を決定した。IS481のCt値を基準として、LAMP法、FilmArray、R Panelおよび培養法における陽性・陰性判定結果を比較した。

LAMP法とFilmArrayの百日咳菌検出能の比較を目的と

して、FilmArray陰性検体を対象に、Loopamp百日咳菌検出試薬キットD（栄研化学）を用いて、添付文書に従い、LAMP法を実施した。

結 果

1. 各検査法と4Plex real-time PCR法の比較

医療機関においてLAMP法による検査が実施された36件中、陽性が31検体、陰性が5検体であった。36検体の4Plex real-time PCR法におけるCt値の範囲は23.0～37.7であった（Figure 1a）。

FilmArrayによる検査が実施された24件中、陽性が16検体、陰性が8検体であった。24検体の4Plex real-time PCR法におけるCt値の範囲は18.3～37.9であった（Figure 1b）。

R Panelによる検査が実施された46件中、陽性が45検体、陰性が1検体であった。46検体の4Plex real-time PCR法におけるCt値の範囲は18.3～39.1であった（Figure 1c）。

4Plex real-time PCR法におけるCt値別の陽性率を比較すると、Ct値が30.0未満の検体では全検査法で陽性率は100%であった。Ct値30.0～35.0の検体では、R Panelは全検体（10/10検体）が陽性を示したのに対し、LAMP法とFilmArrayの陽性率はそれぞれ82.4%（14/17検体）、60.0%（3/5検体）であった。Ct値が35.0を超える検体では、R PanelとLAMP法の陽性率はそれぞれ83.3%（4/5検体）、80.0%（8/10検体）であったのに対し、FilmArrayは6検体全てが陰性であった（Table 2）。

2. LAMP法とFilmArrayの百日咳菌検出能の比較

FilmArray陰性の8検体に対してLAMP法を実施した結果、3検体が陽性となった（Table 3）。3検体中2検体のCt値は35.0未満であった。

3. 各検査法と培養法の比較

各検査法で陽性となった検体の培養陽性率は、LAMP法で80.6%（25/31検体）、FilmArrayで81.3%（13/16検体）、R Panelで84.4%（38/45検体）であり、検査法による差は認められなかった。一方で、LAMP法およびR Panelで陰性となった検体において、培養陽性となった検体はなかったが、FilmArrayで陰性となった検体の中には培養陽性となった検体が1検体認められた（Table 4）。

考 察

神戸市の百日咳流行期における感染症発生动向調査を通じて、百日咳の検査診断で広く用いられているLAMP法、FilmArray、R Panelの百日咳菌検出能について検討した。4Plex real-time PCR法および培養法との比較から、検査法間で検出感度の差が認められた。

Ct値が30.0を超えた検体における陽性率は、R Panelは他の検査法に比べて高かった一方、FilmArrayでは低い傾向が認められた（Table 5）。R Panelは線毛遺伝子（*fim2*）を⁶⁾、LAMP法およびFilmArrayは百日咳毒素遺伝子プロモーター領域（*ptxP*）を⁷⁾⁸⁾標的とし特異的に百日咳菌を検出する。この標的遺伝子の違いが、陽性率に差を生じさせた可能性が考えられる。また、R Panelでは、Ct値39.0を示した検体でも陽性となっていることから、*fim2*を標的とするPCR法は高い検出感度を有する可能性が示唆された。な

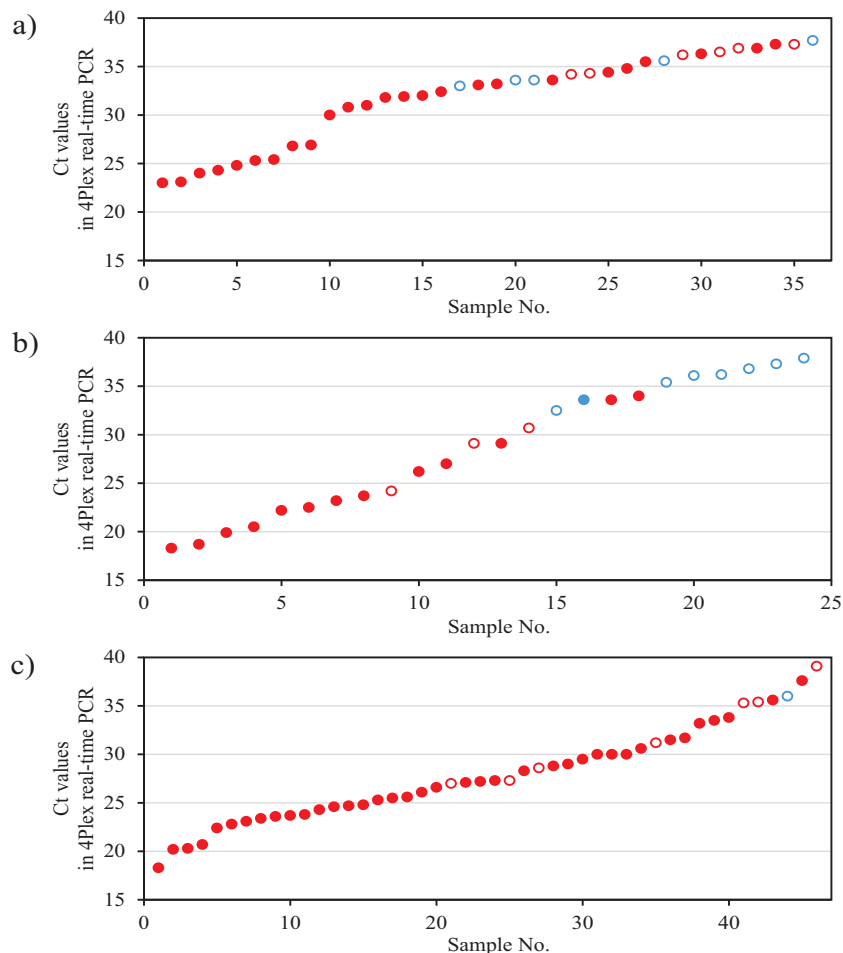


Figure 1. Comparison of Ct values in 4Plex real-time PCR with the results of each detection method and culture. a) LAMP, b) BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1, c) BioFire SpotFire R Panel. Each dot represents an individual sample. Red dots indicate positive samples, and blue dots indicate negative samples by the respective detection method. Filled circles denote culture-positive samples, whereas open circles denote culture-negative samples.

お、*fim2* を標的とした百日咳菌検出法に関する報告は限られており、今後、同一検体を用いた複数検査法の比較により、R Panel の検出感度をさらに詳細に評価する必要がある。

同一遺伝子 (*ptxP*) を標的とする LAMP 法と FilmArray を比較した結果、同一の Ct 値帯における陽性率は LAMP 法の方が高かった。さらに、FilmArray で陰性と判定された検体の中に、LAMP 法で陽性となるものも認められた。これらの結果から、LAMP 法は FilmArray よりも高い百日咳菌検出感度を有する可能性が示唆された。この理由として、FilmArray が多項目同時検出 (multiplex) に対応した設計である一方、Loopamp 百日咳菌検出試薬キット D は百日咳菌単独の検出に特化し最適化されている点が考えられる。

また、BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1 の先行モデルである Respiratory Panel 2plus (*ptxP* を標的とする) では、IS481 qPCR 法との比較において、Ct 値 28.0 を超える検体は陰性となることが報告されている⁹⁾。本研究では、Ct 値 30.0~35.0 の範囲で 40% (2/5 検体) が陰性判定であったが、陰性となった 2 検体の Ct 値は 32.5 および 33.6 であった。これらの結果から、Respiratory Panel 2.1 は先行モデルより

も改良されているものの、Ct 値 32 付近が検出限界である可能性が示唆された。

培養法は百日咳菌検出において最も特異性に優れるとされる一方で、陽性率が低いことが知られている¹⁰⁾¹¹⁾。本研究では、LAMP/FilmArray/R Panel で陽性となった検体における培養陽性率は約 80% であった。一般に、感染時の気道における百日咳菌量が多い乳児患者であっても培養陽性率は 60% 以下とされ、さらに青年や成人では鼻咽頭分泌物に雑菌が多く含まれるため、百日咳菌の占める割合が少なく菌分離はより困難になると報告されている⁴⁾¹²⁾。今回の百日咳の大流行を契機に、診療・検査体制および検体提出体制が強化され、その結果、検体採取手技や保存条件がより適切に実施されるようになったことも、培養陽性率の高さに寄与した可能性が考えられる。

一方で、FilmArray で陰性となったが培養陽性となった検体が 1 件あった。この検体の Ct 値は 33.6 であり、LAMP 法では陽性であった (Table 3. Sample No.16)。Ct 値 33 以上で LAMP 陽性であった 15 検体のうち、培養陽性は 9 検体 (60%) であり、Ct 値 33~34 の 3 検体はいずれも培養陽

Table 2. Correlation between Ct values in 4Plex real-time PCR and positivity rates of each detection method. a) LAMP, b) BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1, c) BioFire SpotFire R Panel.

	Ct values in 4Plex real-time PCR		
	<30.0 (n=9)	30.0-35.0 (n=17)	>35.0 (n=10)
a) positive (n=31)	9 (100%)	14 (82.4%)	8 (80.0%)
a) negative (n=5)	0 (0%)	3 (17.6%)	2 (20.0%)
	Ct values in 4Plex real-time PCR		
	<30.0 (n=13)	30.0-35.0 (n=5)	>35.0 (n=6)
b) positive (n=16)	13 (100%)	3 (60.0%)	0 (0%)
b) negative (n=8)	0 (0%)	2 (40.0%)	6 (100%)
	Ct values in 4Plex real-time PCR		
	<30.0 (n=30)	30.0-35.0 (n=10)	>35.0 (n=5)
c) positive (n=45)	30 (100%)	10 (100%)	4 (83.3%)
c) negative (n=1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (16.7%)

Table 3. LAMP results for eight negative samples by BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1.

Sample No.	Ct values in 4Plex real-time PCR	LAMP
15	32.5	positive
16	33.6	positive
19	35.4	negative
20	36.1	negative
21	36.2	negative
22	36.8	positive
23	37.3	negative
24	37.9	negative

性であった。したがって、本症例は FilmArray の検出限界付近に位置し、陽性判定されなかったと考えられた。

本研究では、菌分離のためにボルデテラ CFDN 寒天培地とチャコール寒天培地を併用した。チャコール寒天培地は Bordet-Gengou 血液寒天培地や CFDN 寒天培地と比較して、発育支持能および夾雑菌抑制能に優れていることが報告されている¹³⁾。本研究におけるチャコール寒天培地と CFDN 寒天培地の陽性率は、それぞれ 60.5% および 66.7% と同程度であり、両者に大きな差は認められなかった。しかし、一部の検体では、いずれか一方の培地においてのみ菌の分離が可能であった。結果には示していないが、チャコール寒天培地は百日咳菌量が少ない検体に有用であった。一方で、夾雑菌が多い検体ではチャコール寒天培地の抑制能が不十分な場合があり、その際には2種類の抗菌薬を含有する CFDN 寒天培地の方が有効であった。したがって、複数の培地を併用する

Table 4. Comparison of detection results between each diagnostic method and culture.

		culture	
		positive	negative
LAMP	positive (n=31)	25 (80.6%)	6 (19.4%)
	negative (n=5)	0 (0%)	5 (100%)
BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1	positive (n=16)	13 (81.3%)	3 (18.8%)
	negative (n=8)	1 (12.5%)	7 (87.5%)
BioFire SpotFire R Panel	positive (n=45)	38 (84.4%)	7 (15.6%)
	negative (n=1)	0 (0%)	1 (100%)

Table 5. Summary of the correlation between Ct values in 4Plex real-time PCR and the positive rates of each *B. pertussis* detection method.

Ct values	LAMP	FilmArray	R Panel	culture
<30.0	100%	100%	100%	90.4%
30.0-35.0	82.4%	60.0%	100%	75.0%
>35.0	80.0%	0%	83.3%	27.3%

ことで、培養陽性率の向上につながると考えられた。

さらに、Ct 値帯ごとの培養陽性率は、Ct 値 30.0 未満で 90.4%、30.0~35.0 で 75.0%、35.0 を超えると 27.3% であった (Table 5)。Ct 値が高いほど培養陽性率は低下する傾向を示したが、Ct 値 37.3 および 37.6 の検体から菌分離できたことから、Ct 値が高値であっても必ずしも培養陰性となるわけではないことが明らかとなった。また、Ct 値 30.0 未満であっても約 10% の検体が培養陰性となり、その中には夾雑菌が多い検体や抗菌薬投与後の検体が含まれていた。特に、抗菌薬投与後は菌分離が困難であることが報告されており¹⁴⁾、本研究でも同様の傾向が確認された。さらに、検体採取方法、保存条件、保管期間なども培養陰性に影響を及ぼす要因になったと考えられる。

本研究の限界として、LAMP 法、FilmArray、R Panel の検査結果は各医療機関や民間検査会社で実施されたものであり、検体採取の綿棒種類や検査手技が統一されていない点が挙げられる。また、抗菌薬投与歴の影響や、近年問題となっているマクロライド耐性百日咳菌との関連性については評価を行っていない。

百日咳の診断においては、病日や患者背景に応じて適切な検査法を選択することが推奨されている¹⁵⁾。遺伝子検査は最も高感度な方法であるが、各検査法の特性を理解したうえで、臨床状況に応じて適切に検査法を選択することが重要であると考えられた。

謝辞：本研究を遂行するにあたり、検体提出にご協力いた

いただきました神戸市内の医療機関の皆様には深謝いたします。なお、本研究は JSPS 科研費 JP25K24232 の助成を受けた。

利益相反：申告すべきものなし

文 献

- 1) Cherry, JD. 2016. Pertussis in young infants throughout the world. *Clin Infect Dis* 63 (Suppl 4): S119-S122.
- 2) 国立健康危機管理研究機構. 百日咳の発生状況について. https://id-info.jihs.go.jp/diseases/ha/pertussis/020/2504_pertussis_RA.html 2025年8月25日現在.
- 3) 厚生労働省. 百日咳. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-05-23.html> 2025年8月25日現在.
- 3) 国立健康危機管理研究機構. 病原体検出マニュアル 百日咳 第4.0版.
- 5) Kamachi, K, S Yoshino, C Katsukawa, et al. 2015. Laboratory-based surveillance of pertussis using multitarget real-time PCR in Japan: evidence for *Bordetella pertussis* infection in preteens and teens. *New Microbes New Infect* 8: 70-74.
- 6) bioMérieux. BIOFIRE SPOTFIRE Respiratory (R) Panel. <https://www.biofire.qarad.eifu.online/ITI/JP/all?keycode=ITI0103> 2025年8月27日現在.
- 7) Kamachi, K, H Toyozumi-Ajisaka, K Toda, et al. 2006. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol* 44 (5): 1899-1902.
- 8) ビオメリュー・ジャパン株式会社. FilmArray 呼吸器パネル 2.1. https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/ivdDetail/ResultDataSetPDF/530633_30200EZX00032000_A_05_05 2025年8月27日現在.
- 9) Guillot, S, A Mizrahi, N Armatys, et al. 2020. Low detection rate of *Bordetella pertussis* using the BioFire FilmArray Respiratory Panel 2plus. *Open Forum Infect Dis*. 7 (8): ofaa267.
- 10) Nikbin, V. S., F. Shahcheraghi, M. N. Lotfi, et al. 2013. Comparison of culture and real-time PCR for detection of *Bordetella pertussis* isolated from patients in Iran. *Iranian journal of microbiology* 5: 209-214.
- 11) Lee, A. D., P. K. Cassiday, L. C. Pawloski, et al. 2018. Clinical evaluation and validation of laboratory methods for the diagnosis of *Bordetella pertussis* infection: Culture, polymerase chain reaction (PCR) and anti-pertussis toxin IgG serology (IgG-PT). *PLoS one* 13: e0195979.
- 12) 国立健康危機管理研究機構. 2021. 百日咳. *IASR* 42 (6).
- 13) 河内 誠, 及川加奈, 魚住佑樹, 他. 2018. 3種類の百日咳菌分離用培地の比較検討. *医学検査* 67: 755-759.
- 14) 国立健康危機管理研究機構. 百日咳の検査診断. <https://id-info.jihs.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/7081-444r06.html> 2025年8月27日現在.
- 15) CDC. Whooping Cough (Pertussis) Laboratory Testing for Pertussis. <https://www.cdc.gov/pertussis/php/laboratories/index.html> 2025年8月27日現在.

Comparison of LAMP, FilmArray, and R Panel for detecting of *Bordetella pertussis* based on 4Plex real-time PCR and culture

Shoko Komatsu, Tomoka Iwamoto, Noriko Nakanishi
Health Research Department 2, Kobe Institute of Health

In 2025, pertussis is spreading nationwide in Japan. We compared the detection capabilities of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), BioFire FilmArray Respiratory Panel 2.1 (FilmArray), and BioFire SpotFire R Panel (R Panel), which are primary diagnostic tests for *Bordetella pertussis*, using 4Plex real-time PCR Ct values and culture results. For nasopharyngeal specimens with Ct values of >30.0, the R Panel showed higher positive rates than the other tests, whereas the Film Array exhibited a lower rate. When comparing LAMP and FilmArray, both targeting the *B. pertussis*-specific gene *ptxP*, LAMP showed a higher positive rate within the same Ct value range, and some specimens that were negative using Film Array were positive using LAMP. Among specimens positive by the LAMP/FilmArray/R Panel, culture positivity was approximately 80%. Although culture positivity decreased with increasing Ct values, specimens with a Ct value of 37 were still culture-positive, indicating that high Ct values do not necessarily correspond to negativity. Our findings indicate that understanding the characteristics of each diagnostic test and selecting the appropriate test according to the clinical context is critical.