

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「百日咳とインフルエンザの患者情報及び検査診断の連携強化による感染症対策の推進に資する疫学
手法の確立のための研究」班

分担研究報告書

国内健常人における抗百日咳抗体の量的・質的評価

研究分担者 大塚菜緒 国立感染症研究所 細菌第二部

研究協力者 文元 礼 国立感染症研究所 細菌第二部
蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部

【研究要旨】国内健常人の保有する抗百日咳抗体の量的・質的評価を行うために、抗百日咳毒素(PT) IgGおよび抗繊維状赤血球凝集素(FHA) IgGの抗体価および抗原抗体結合力(avidity index: AI)を測定し、年齢群別解析を加えた。乳幼児期の百日せきワクチン接種直後の年齢である1-2歳群を基準とすると、3-6歳群では抗PT IgGの抗体価・AIともに有意に低いことが判明した。このことから、ワクチン接種により得られる有効な抗PT IgGは急速に減弱する可能性が示唆された。今後、国内百日咳患者数を抑制するためには、3-6歳群へのワクチン追加接種など対策を講じる必要がある。

A. 研究目的

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呼吸器感染症である。百日咳はワクチン予防可能疾患(vaccine preventable diseases: VPDs)の一つとされ、最も有効な予防策はワクチン接種である。我が国では、1950年に全菌体百日せきワクチン(whole cell vaccines: WCVs)、そして1981年には世界に先駆けて安全性の高い無細胞精製百日せきワクチン(acellular vaccines: ACVs)が導入された。現行の国内ACVsは、ワクチン抗原として百日咳毒素(PT)、繊維状赤血球凝集素(FHA)を主に含有しており、乳幼児期に初回接種3回(3, 4, 5ヶ月)および追加接種1回(18~23ヶ月)の合計4回接種するスケジュールとなっている。

ところが、諸外国の疫学研究からACVsの免疫持続期間は4~12年と推定されており、これを我が国に当てはめると中学生以降の年齢では百日咳に感受性となる可能性が指摘されていた。2018年の百日咳国内サーベイランスでは11,946件の患者

報告のうち、7歳をピークとした5歳から15歳未満までの学童期の小児患者が全体の64%を占めた。さらに、この患者年齢群の81%に4回のワクチン接種歴があったことから、百日せきワクチンのさらなる追加接種が検討されている。本研究では、国内健常人が保有する百日咳抗体の量的・質的評価を目的に抗体価および抗原抗体結合力(avidity index: AI)の解析を行った。

B. 研究方法

1. 血清検体

国立感染症研究所・血清銀行に保存されている国内健常人血清460検体(2015-2016年採血、1~60歳)を供試した。抗体価、AIの年齢群別解析では1~60歳を9つの年齢群に分けて解析を行った(表1)。

2. 抗体価測定

血清中の抗PT IgG, FHA IgG抗体価はin-house enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)法で測定した。96穴プレートに

PTまたはFHA抗原をコートし、スキムミルク液でブロッキングしたのち、1:200希釈した非加熱血清検体を添加して36°Cで2時間インキュベートした。抗原に結合したIgG抗体はアルカリホスファターゼラベルした2次抗体と結合し、最終的にはp-ニトロフェニルホスフェイトの添加により用量依存的に発色する。測定には波長405nm、参照波長650nmを用いた。国内標準ヒト血清(JNIH-10)を1~160EU/mlの範囲で段階希釈して得られた検量線を抗体価の算出に用いた。国内単位EU/mlとして算出された抗体価は、抗PT IgGの場合1.19、抗FHA IgGの場合1.01を乗じて国際単位IU/mlに換算した。

3. 抗原抗体結合力(AI)の測定

抗PT IgG、FHA IgG抗体の抗原抗体結合力は、1.5Mチオシアン酸アンモニウム(NH₄SCN)を解離剤として用いて測定した。測定は上述のin-house ELISAsと同様に実施し、血清添加後にNH₄SCNを添加する操作を加えた。AIは次に示す計算式で算出した：([NH₄SCN存在下での検体のOD₄₀₅値-ブランクのOD₄₀₅値]/[NH₄SCN非存在下での検体のOD₄₀₅値-ブランクのOD₄₀₅値])×100%

(倫理面への配慮)

国内血清銀行では血清検体の研究利用について、試料提供者に対し口頭および文書により説明し同意を得ている。本研究は国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会において承認を受けた(承認番号886)。

C. 研究結果

1. 抗PT IgG、FHA IgG抗体価とAI

表1に年齢群ごとの抗PT IgG、抗FHA IgG抗体価およびAI(%)を示した。抗PT IgG抗体価は1-2歳群で最も高く(45.1 IU/ml)、51-60歳群で最も低かった(7.9 IU/ml)。1-2歳群を基準とすると、その他全ての年齢群で有意な抗体価の減少が認められた(図1A)。同様に、抗FHA IgG抗体価も

1-2歳群で最も高く(35.5 IU/ml)、51-60歳で最も低かった(17.1 IU/ml)。抗FHA IgG抗体価は1-2歳群と51-60歳群間でのみ有意な抗体価の差が検出された(図1B)。抗PT IgG、FHA IgGともに1-2歳群と比較すると、3-6歳群では非常に低い抗体価を示した。

次に、抗体の質的評価を加えるため抗PT IgG、FHA IgGの抗原抗体結合力を年齢群別に解析した(表1,図1CD)。抗PT IgGはやはり1-2歳群で最もAIが高く(40.5%)、11-15歳群を除くその他の年齢群では1-2歳群と比較して有意にAIが低かった(26.5-31.9%)。また、3-6歳群で最も低いAIを示した(26.5%)。一方、抗FHA IgGは16-20歳群で最も高いAIを示し(50.4%)、51-60歳群で最も低いAIを示した(39.4%)。また、1-2歳群と比較して7-10歳群および16-20歳群では有意に高いAIを示した。1-2歳群を比較基準とすると、3-6歳群は抗PT IgGのAIが非常に低かったのに対し($P < 0.01$)、抗FHA IgGのAIは同程度であった($P = 0.715$)。

2. 抗体価と抗原抗体結合力の相関

抗PT IgGの抗体価とAIは全体的に正の相関を示した($r_s = 0.498$; $P < 0.01$)。年齢群別解析では、16-20歳群を除いて全ての年齢群で統計的に有意な正の相関を示した(図2, $r_s = 0.288-0.753$)。相関の程度は、1-2、3-6、7-10、11-15歳群で中程度($r_s = 0.508-0.685$)、41-50歳群で強い相関が認められた($r_s = 0.753$)。41-50歳群の例外はあるが、全体的な傾向としては加齢に伴い抗体価とAIの相関の程度が低下していた。

抗FHA IgGの抗体価とAIも全体的に正の相関を示した($r_s = 0.653$; $P < 0.01$)。年齢群別解析では、全ての年齢群で抗体価とAIは有意な正の相関を示した(図3, $r_s = 0.489-0.782$; $P < 0.01$)。特に7-10、11-15、16-20歳群で強い相関を示し($r_s = 0.728-0.782$)、その他の年齢群では中程度の相関を示した($r_s = 0.489-0.652$)。

D. 考察

本研究で、乳幼児期の百日せきワクチン接種直後の年齢である1-2歳群は、抗PT IgG, FHA IgGともに他の年齢群よりも有意に高い抗体価を有することが明らかとなった。抗体の質を評価する指標であるAIも、抗PT IgGについては他の年齢群よりも高い値を示したが、抗FHA IgGに関しては比較的低い値であった。また、3-6歳群では抗PT IgG, FHA IgGともに抗体価・AIが低い値を示した。このことより、乳幼児期のワクチン接種により得られた有効な抗PT IgGが急速に減弱する可能性が示唆された。一方、抗FHA IgGに関しては同様の傾向は認められなかった。

抗原抗体結合力(AI)は、抗体の抗原との親和性の度合いを機能的に評価する指標であり、AIが高い抗体ほど強固な抗原抗体複合体を形成すると考えられている。百日咳菌感染および百日せきワクチン接種によっても、抗PT IgGのAIが上昇することが報告されているが、両者では自然感染により得られた抗体の方がよりAIが高いことが知られている。以前の研究で、抗PT抗体のAIが高いレベルを維持できるのはワクチン追加接種から2年以内であるとの報告があり、我々が本研究で見出した結果もこれに一致する。

抗FHA IgGのAI持続期間に関してはこれまでに研究が行われていないことから、抗FHA IgGのAIが抗PT IgGのAIと同様の挙動を示さなかったことに関しての考察は難しいが、小児において抗FHA IgGは抗PT IgGよりもワクチン接種により誘導されたAIレベルがより長く持続する可能性が考察された。ただし、抗PT IgGに比べるとワクチン接種により誘導された抗FHA IgGは、AIが低いレベルであることから、ワクチン抗原として含まれる

FHAの立体構造などの影響で現行ACVsの接種では十分に質の高いFHA抗体を得るのが難しいという可能性が示唆された。

E. 結論

我が国では、乳幼児期のワクチン接種直後の年齢である1-2歳群と比較して、3-6歳群では抗PT IgGが抗体価・AIともに有意に低いことが明らかとなった。これはワクチン接種により得られた有効な抗PT IgGが急速に減弱する可能性を示唆している。今後国内百日咳患者数を抑制するためには、3-6歳群へのワクチンの追加接種など感染防止策が必要であることが指摘された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Fumimoto R, Otsuka N, Kamiya H, et al. Seroprevalence of IgA and IgM antibodies to *Bordetella pertussis* in healthy Japanese donors: Assessment for the serological diagnosis of pertussis. PLoS One 2019; 14(7): e0219255.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. 抗 PT IgG, 抗 FHA IgG の年齢群別抗体価および抗原抗体結合力(AI)

年齢群 (歳)	平均年齢 (歳)	検体数	抗PT IgG抗体		抗FHA IgG抗体	
			IU/mL (95%CI)	AI(%) (95%CI)	IU/mL (95%CI)	AI(%) (95%CI)
1-2	1.4	20	45.1 (31.2-65.3)	40.5 (33.7-48.7)	35.5 (25.2-50.0)	41.8 (35.4-49.4)
3-6	4.5	21	8.2 (4.4-15.3)	26.5 (20.6-34.2)	19.2 (10.9-33.8)	40.4 (31.2-52.3)
7-10	8.7	35	10.4 (6.7-16.1)	29.0 (23.5-35.8)	30.9 (22.0-43.5)	50.0 (43.1-58.0)
11-15	12.6	43	11.5 (8.1-16.5)	30.6 (25.9-36.2)	28.6 (20.1-40.8)	49.1 (43.7-55.1)
16-20	18.2	34	10.4 (7.3-14.8)	31.9 (27.4-37.1)	30.2 (21.1-43.2)	50.4 (43.5-58.3)
21-30	25.5	77	10.1 (7.8-13.0)	30.0 (26.7-33.6)	28.1 (22.8-35.0)	47.3 (43.6-51.4)
31-40	35.4	77	9.1 (6.9-12.0)	30.4 (27.2-34.1)	27.3 (22.2-33.7)	46.5 (42.2-51.3)
41-50	45.3	77	13.0 (9.8-17.2)	28.0 (23.9-32.9)	22.1 (17.5-27.9)	40.9 (37.2-44.9)
51-60	55.3	76	7.9 (5.9-10.5)	29.1 (25.7-33.0)	17.1 (14.0-20.9)	39.4 (36.0-43.2)

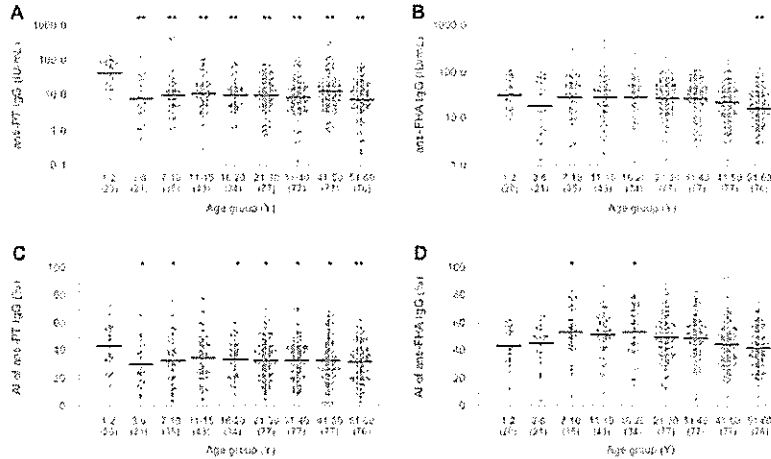


図 1. 1-2 歳群を基準とした各年齢群の抗 PT IgG, 抗 FHA IgG 抗体価および抗原抗体結合力(AI) 1-2 歳群と比較して統計的有意差が認められた年齢群は* ($P < 0.05$)または** ($P < 0.01$)で示した。

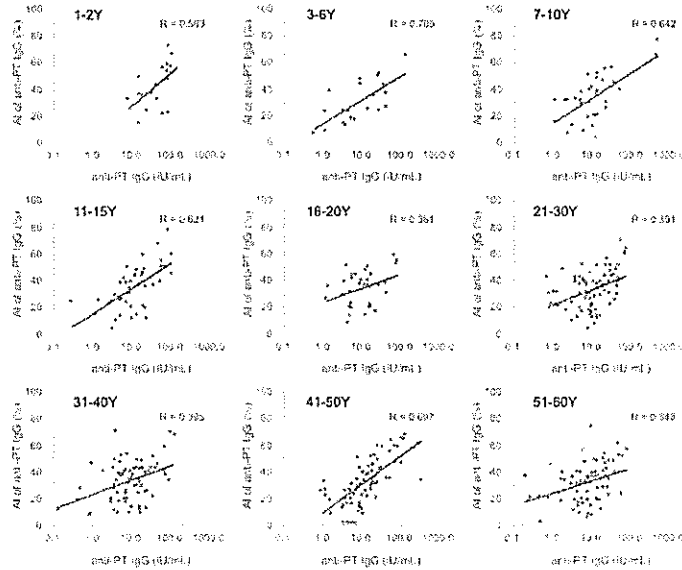


図 2. 抗 PT IgG 抗体価と AI の年齢群別相関解析

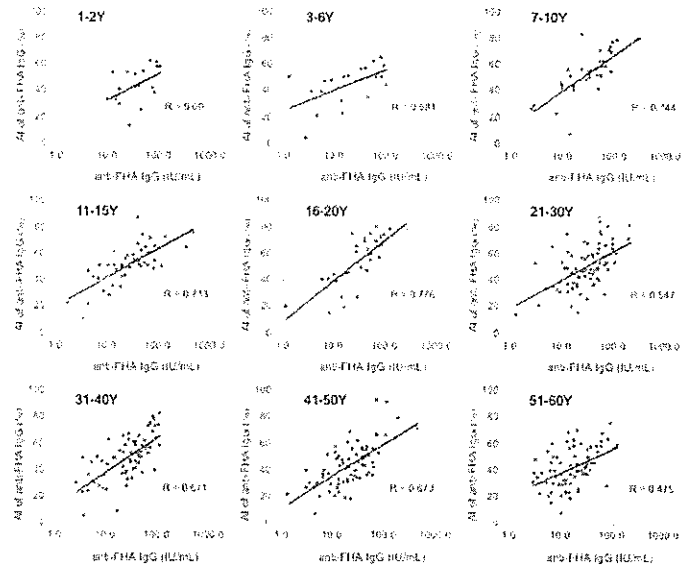


図 3. 抗 FHA IgG 抗体価と AI の年齢群別解析