

平成29～令和元年度
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

分担研究総合報告書

百日咳

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】百日咳感染症の新規血清診断法であるノバグノスト百日咳/IgA, IgM についてキット性能評価を行なった。また、国内健常人における抗百日咳菌 IgA, IgM 抗体の保有調査を実施したところ、抗 IgA は加齢とともに抗体価が上昇し、抗 IgM は減少する傾向が認められた。両抗体とも特定の年齢層で抗体保有率が高いことが判明し、当該キットを用いた百日咳診断には注意を要すると判断された。一方、国内健常人においては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 歳群と比較して、3-6 歳群では急速に抗百日咳毒素(PT) IgG の量および質が低下していることが明らかとなり、この年齢群へのさらなるワクチン追加接種の必要性が指摘された。

A. 研究目的

百日咳は百日咳菌(*Bordetella pertussis*)により引き起こされる急性呼吸器感染症である。百日咳は感染症法第五類感染症であるが、2018 年 1 月より小児科定点把握疾患から全数把握対象疾患に変更された。これに伴い、届出には検査診断が必須となったため、国内百日咳サーベイランスの精度向上が期待されている。

百日咳の検査法としては、菌分離、遺伝子検査(百日咳 LAMP 法)、抗体検査(抗百日咳毒素(PT) IgG 測定法、抗百日咳菌 IgA・IgM 測定法)が健康保険適応となっている。このうち、抗百日咳菌 IgA・IgM 測定法は 2016 年に新たに導入された検査法であり、健康保険適応されているものの十分な性能評価がされていなかった。また、国内健常人における抗百日咳菌 IgA・IgM の保有状況についても不明であったため、調査が必要であった。

また、百日咳はワクチン予防可能疾患

(VPDs)の一つとされ、我が国では百日せきを含む 4 種混合ワクチン(DPT-IPV)を乳幼児期に 4 回接種するスケジュールとなっている。ところが、百日せきワクチンの免疫持続期間は 4~12 年と推定されており、2018 年の百日咳国内サーベイランスでは 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ることが判明した。そこで、今後有効な感染防御策を講じる上で国内健常人が保有する百日咳抗体の量および質について年齢別の調査を行う必要があった。

以上の背景を踏まえ、本研究班では 1)新規血清診断法「ノバグノスト百日咳/IgA, IgM」のキット性能評価、2)国内健常人における抗百日咳菌 IgA, IgM の抗体保有調査、3)国内健常人における抗 PT IgG, 抗繊維状赤血球凝集素(FHA) IgG の量的・質的評価、を行なった。

B. 研究方法

1. 血清検体(キット性能評価)

国立感染症研究所に保存されている百日咳患者血清 26 検体(15 人, 0~14 歳)と健常人血清 18 検体(18 人, 0~62 歳)を供試した。患者は遺伝子検査(LAMP 法)により確定診断されたものである。

2. 血清検体(健常人抗体保有調査)

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。抗体価の年齢群別解析では 1~60 歳を表 1 または図 2 のように区分して解析を行なった。

3. 抗体価測定

抗百日咳菌 IgA, IgM 抗体はキット添付文書に従って測定し, 各抗体価はノバグノスト単位(NTU)として算出した。判定は < 8.5 NTU を陰性, $8.5\sim 11.5$ NTU を判定保留, > 11.5 NTU を陽性とした。抗 PT, 繊維状赤血球凝集素(FHA) IgG 抗体価は in-house ELISA 法にて測定し, 国内百日咳標準血清(JNIH-10)を用いて EU/ml として算出したのち, 換算式により国際単位(IU/ml)に変換した。

4. 抗原抗体結合力(avidity index: AI)測定

抗 PT IgG, FHA IgG 抗体の抗原抗体結合力は, 1.5 M チオシアン酸アンモニウム(NH_4SCN)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 NH_4SCN 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: $([\text{NH}_4\text{SCN}$ 存在下での検体の OD405 値 - ブランクの OD405 値] / $[\text{NH}_4\text{SCN}$ 非存在下での検体の OD405 値 - ブランクの OD405 値]) $\times 100\%$

(倫理面への配慮)

試料提供者の個人情報には削除され, 個人が特定できないよう配慮した。また, 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. ノバグノスト百日咳/IgM, IgA の性能評価

図1に患者血清 26 検体と健常人血清 18 検体の抗体価分布を示した。ノバグノスト百日咳/IgA キットは患者血清 3 検体が陽性, 残り 23 検体が陰性と判定された。一方, 健常人血清は 1 検体が陽性, 1 検体が判定保留, 残り 16 検体が陰性と判定された。この成績から本キットの感度は 11.5%, 特異度は 88.9%と評価された。ノバグノスト百日咳/IgM キットは患者血清 2 検体が陽性, 4 検体が判定保留, 残り 20 検体が陰性と判定された。一方, 健常人血清はすべて陰性と判定された。この成績から本キットの感度は 7.7%, 特異度は 100%と評価された。

2. 健常人における抗百日咳菌 IgA, IgM の抗体保有調査

抗 IgA は年齢とともに抗体価が上昇し($r=0.27$, $P<0.001$), 抗 IgM は年齢とともに抗体価が低下する傾向が認められた($r=-0.37$, $P<0.001$)。1-5 歳群を基準にして抗体価を年齢群別に比較解析したところ, 抗 IgA はその他全ての年齢群で抗体価が有意に高く, 特に 46-50 歳群で最も高い平均抗体価を示した(図 1)。一方, 抗 IgM は学童期で高い抗体価が検出され, 11-15 歳群で最も高い平均抗体価が認められた。なお, 抗 IgA と IgM の抗体価間に有意な相関は認められなかった。

次に, 健常人の抗 IgA および IgM 抗体価を, 現行の診断基準値により判定した。抗 IgA は抗体価の高い中高年層で陽性率が高く, 46-50 歳群では 17.7%が百日咳陽性または判定保留と判定された。抗 IgM は学童期を含む 6-30 歳での陽性率が高く, 11-15 歳群では 39.5%が百日咳陽性または判定保留と判定された。

3. 国内健常人における抗百日咳抗体の量的・質的評価

図2に年齢群別の抗PT IgG, FHA IgGの抗体価およびAI分布を示した。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。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。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(AI)を年齢群別に解析した。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%)。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%)。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($P = 0.715$)。

D. 考察

少量の百日咳患者血清および健常人血清を用いた「ノバグノスト百日咳/IgM, IgA」のキット性能評価試験では, 両測定キットともに高い特異性を示したが, 感度が10%前後と非常に低いことが示された。また, 本キットを用いて国内健常人における抗百日咳菌IgA, IgMの保有状況を調査したところ, 被験者の年齢が抗体価に大きく影響し, 抗IgAは中高年層, 抗IgMは学童期の年齢層で保有率が高くなる傾向を示した。さらに, 現行の診断基準値を適用した場合, これらの年齢層では高い割合で百日咳陽性または判定保留と診断さ

れ得ることが判明した。百日咳の血清診断では, 診断抗原の種類および純度が検査精度に大きく影響することが報告されている。例えばFHAは他の細菌によっても類似タンパク質が産生されるとの報告があり抗FHA抗体の検出は特異度が低いことが知られている。本キットでは抗IgAの診断抗原にPTとFHAの混合物が用いられているため中高年層で抗IgA抗体価が高い理由の考察が難しいが, 抗PT IgAを反映した百日咳菌の不顕性感染が考えられた。一方, 抗IgMの診断抗原には不活化百日咳菌体を用いられており, 精度が低い抗原を用いたことに起因する偽陽性が懸念された。

国内健常人における百日咳抗体の量的質的評価では, 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, 1-2歳群に比べて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。

E. 結論

精度の高いサーベイランスには, 正確な検査診断が不可欠である。本研究で抗百日咳菌IgAおよびIgMを測定する百日咳新規血清診断法は, 感度が非常に低いことが判明した。さらに, 被験者の年齢が抗体価に大きく影響を与えることから, それぞれ診断精度が低くなる年齢層が認められた。以上のことから, 当該キットを用いた百日咳診断には注意を要すると判断された。

また, 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

論文発表

1. Moriuchi T, Otsuka N, Hiramatsu Y, Shibayama K, Kamachi K. A high seroprevalence of antibodies to pertussis toxin among Japanese adults: Qualitative and quantitative analyses. *PLoS One* 12(7): e0181181, 2017.
2. Fumimoto R, Otsuka N, Sunagawa T, Tanaka-Taya K, Kamiya H, Kamachi K. 2019. Age-related differences in antibody avidities to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in a healthy Japanese population. *Vaccine* 37:2463-2469.
3. 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.

学会発表

1. 神谷元, 蒲地一成. 2016 年の百日咳流行とその細菌学的解析. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月, 福岡.
2. 文元礼, 大塚菜緒, 神谷元, 蒲地一成. 健常人における抗百日咳菌 IgA 抗体と抗 IgM 抗体の保有調査. 第 50 回日本小児感染症学会総会. 2018 年 11 月, 福岡.
3. 砂川富正, 神谷元, 高橋琢理, 有馬雄三, 上月愛留, 松井珠乃, 蒲地一成, 大塚菜緒, 文元礼, 大石和徳. 百日咳新時代~新しいサーベイランスの導入と疫学の現状~. 第 50 回日本小児感染症学会総会. 2018 年 11 月, 福岡.
4. 上月愛留, 神谷元, 高橋琢理, 有馬雄三, 松井珠乃, 蒲地一成, 大塚菜緒, 文元礼, 大石和徳, 砂川富正. 全数把握疾患への変更により明らかになった日本の乳児百日咳の疫学. 第 50 回日本小児感染症学会総会. 2018 年 11 月, 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

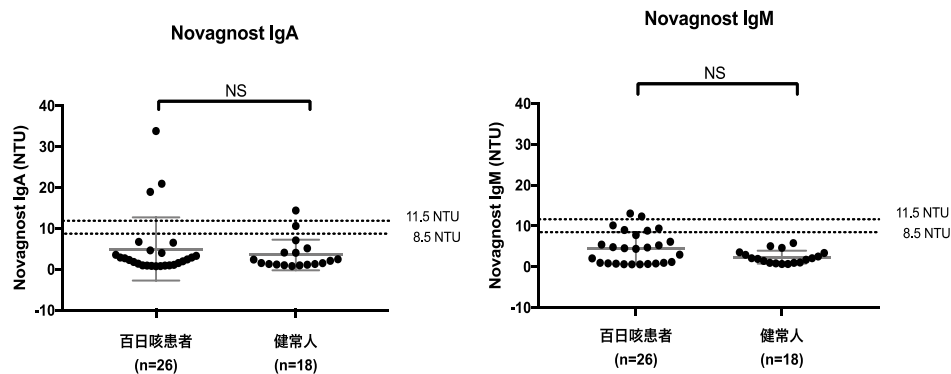


図1. 百日咳患者と健康人における百日咳菌IgAとIgM抗体価の分布. 患者血清(26検体)と健康人血清(18検体)をノバグノスト百日咳/IgA, IgM測定キットに供試し, 抗百日咳菌IgAとIgMのノバグノスト単位(NTU)をプロットした

表1. 国内健康人における年齢群別抗百日咳菌IgA, IgM抗体価

年齢群 (歳)	n	抗百日咳菌IgA (NTU)		抗百日咳菌IgM (NTU)	
		Mean ± SD	P value ^a	Mean ± SD	P value ^a
1-5	37	1.6 ± 1.1	-	5.5 ± 2.6	-
6-10	39	2.9 ± 2.2	0.007	7.7 ± 3.5	0.019
11-15	43	3.6 ± 3.0	<0.001	7.9 ± 3.2	0.006
16-20	34	4.1 ± 3.2	<0.001	7.3 ± 3.6	ns
21-25	39	4.0 ± 2.8	<0.001	7.2 ± 2.4	0.042
26-30	38	4.0 ± 2.5	<0.001	6.7 ± 2.5	ns
31-35	35	3.4 ± 2.9	<0.001	5.9 ± 2.3	ns
36-40	42	3.8 ± 2.4	<0.001	5.2 ± 2.0	ns
41-45	43	4.0 ± 3.5	<0.001	4.8 ± 1.9	ns
46-50	34	6.0 ± 6.3	<0.001	4.5 ± 1.8	ns
51-55	39	4.7 ± 4.2	<0.001	4.7 ± 2.0	ns
56-60	37	4.1 ± 5.1	<0.001	4.1 ± 1.6	ns

^a1-5歳群を基準とし, Dunn's multiple comparison testにより統計解析を実施した. $P < 0.05$ の場合, 有意差ありと判断した

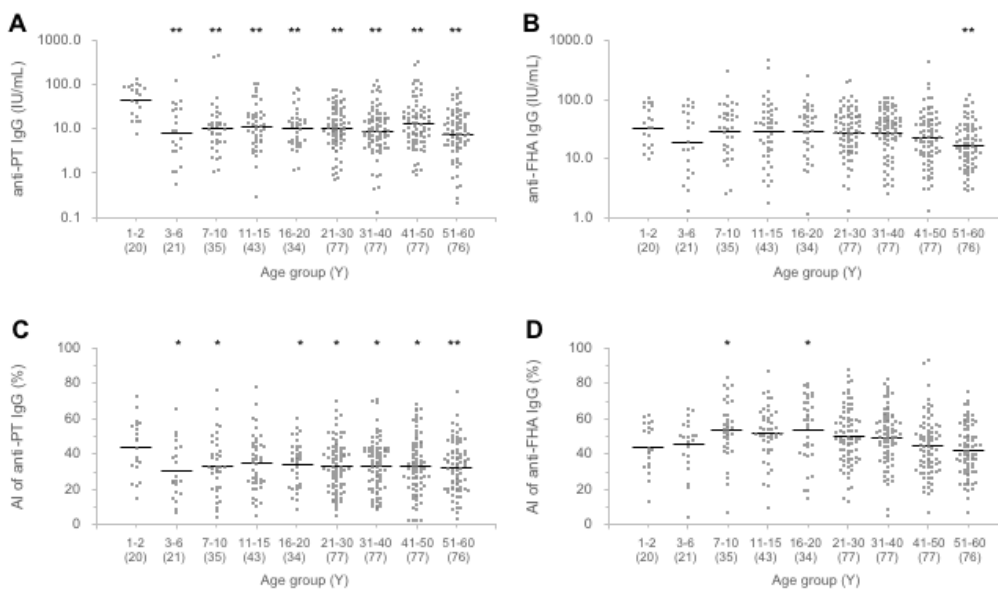


図2. 1-2歳群を基準とした各年齢群の抗PT IgG, 抗FHA IgG抗体価および抗原抗体結合力(AI) 1-2歳群と比較して統計的有意差が認められた年齢群は* ($P < 0.05$)または** ($P < 0.01$)で示した。