

「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エビデンス構築のための研究」班

分担研究総合報告書

百日咳(病原体診断)

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	小出健太郎	国立感染症研究所 細菌第二部
	後藤雅貴	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】百日咳の検査診断法について精度評価を行った。血清診断法「ノバグノスト百日咳IgA, IgMキット」は百日せきワクチン接種による抗体価の上昇は認められなかったが、健常児でも高頻度で抗体高値が検出されたことから小児百日咳診断への本検査キットの適用は見直しが必要であることが指摘された。また、MALDI微生物同定装置はFHA抗原を欠損した百日咳菌に対する同定精度が低く注意が必要であることが示された。百日咳抗原キット「リボテスト百日咳」は偽陽性率が高いことが示され、ある種の病原細菌および抗マウスIg (HAMA) が当該キットで交差反応を引き起こす可能性が指摘された。

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。感染症法における百日咳患者届出の検査診断法は大きく分けて①抗体検査、②菌分離および同定、③イムノクロマト法による抗原検査、④遺伝子検査の4種類があるが、近年は新規の検査法が次々と開発されている。百日咳の国内サーベイランスは、2018年1月から検査診断に基づく全数報告システムを取り入れたが、正確な疫学情報を得るためには精度の高い検査診断法が用いられなければならない。そこで、本研究では新規百日咳検査法について検査精度の評価を行った。

血清診断法「ノバグノスト百日咳 IgA, IgM キット」は、これまでの研究で①特異度は高いが感度が低い、②被験者の年齢が抗体価に影響する、という知見が得られていた。本キットはさらに「測定抗体価が百日せきワクチン接種の影響を受けない」こと

を一つの利点としているため、本研究では DPT 接種が本診断キットで測定される抗体価に与える影響を評価した。百日咳菌が臨床分離された場合、菌種同定試験が必須となる。百日咳菌を含む *Bordetella* 属細菌は、16S rRNA 遺伝子配列の類似性が高く、質量分析計による菌種鑑別が困難であるとされてきた。本研究では、臨床現場で百日咳菌 FHA 欠損株の菌種同定が難渋した事例を受けて、MALDI 微生物同定装置による百日咳菌 FHA 欠損株の同定精度を検証した。また、疫学調査により、百日咳菌抗原キット「リボテスト百日咳」を診断に用いた特定の医療機関から、百日咳患者の集積が探知された。そこで本抗原検査キットの精度評価を目的に、百日咳疑い患者に対して本キットと遺伝子検査 LAMP 法を適用し、検査結果の比較を行った。また、偽陽性原因となる病原体およびその他の物質の探索を合わせて実施した。

B. 研究方法

1. 血清検体

本研究班で別に実施した DPT 追加接種臨床試験 (DPT-5-BST) に参加した就学前児童 (5~6 歳、113 名) の血清を用いて抗体価の変動を調査した。DPT 接種歴が 4 回あり基礎疾患などのない就学前児童をリクルートし、保護者の同意を得たうえで、児童に対して DPT の追加接種を行い接種前、接種 1 か月後、接種 1 年後の血清を採取した。

2. 抗百日咳菌 IgA, IgM 抗体価測定

ノバグノスト百日咳/IgA とノバグノスト百日咳/IgM キット (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社) の添付文書に従って、百日咳菌に対する IgA と IgM 抗体価を測定した。IgA と IgM 抗体価はノバグノスト単位 (NTU) として算出し、添付文書に従って陰性を < 8.5 NTU、判定保留を 8.5~11.5 NTU、陽性を > 11.5 NTU とした。

3. 菌株

百日咳菌ワクチン株 Tohama I, 百日咳菌ストレプトマイシン耐性株 TSm^r, 百日咳菌 FHA 欠損変異株 TSm^rΔfhaB, 百日咳菌臨床分離株 5 株 (BP267, BP374, BP394, BP579, BP611) は、30 μg/mL ストレプトマイシン含有または不含の 15% 馬脱繊維血加ボルデジャング寒天培地に塗布し、36°C で 4 日間生育させた。

4. MALDI 微生物同定装置による菌種同定試験

菌種同定試験には Microflex NID-1 Biotyper (ブルカー社) を用いた。シングルコロニーをターゲットプレートの所定のウェルに塗布し、HCCA マトリックスを 1 μl 添加した。内部標準物質には Bacterial Test Standard (ブルカー社) を用いた。マトリックス液が乾燥したのち直ちに装置で解析を行った。操作は MALDI Biotyper v3.1 ソフトウェアにより行い、スペクトル解析には MALDI Biotyper Library (MBT Compass Library, BDAL#7854) を適用した。

5. リボテスト評価における被験者

百日咳疑いと診断された 34 名を被験者とした (5 ヶ月~12 歳 2 ヶ月、中央値: 4 歳 10 ヶ月)。本

研究には国内 10 医療機関に研究協力を依頼したが、令和 4 年度の研究期間内に上記百日咳疑い患者を診察したのは 3 医療機関であった。なお、すべての被験者が百日咳様の咳嗽症状を呈していた。

6. リボテスト百日咳

被験者からキット付属の綿棒を使用して鼻咽頭ぬぐい液を採取し、添付文書に従い綿棒付着抗原の抽出を行った。調製試料をイムノクロマトグラフィーカセットに滴下し (4 滴)、15 分間室温で静置したのち目視判定を行った。なお、検査は各医療機関で実施された。

7. 16S rDNA 解析

リボテスト陽性検体 (n=21) の検査残液から精製した DNA を用いて、16S rDNA 解析 (細菌叢解析) を行った。16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の V3-V4 可変領域を PCR 増幅し、次世代シーケンサー Miseq (イルミナ) によるシーケンス解析に供試した。得られたリードデータを OTU (operational taxonomic unit) により分類し、検体に含まれる菌種の帰属および菌叢構成種を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では、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, 1410)。

C. 研究結果

1. DPT 接種のノバグノスト百日咳への影響

DPT 接種に伴う抗百日咳菌 IgA, IgM 判定値の変動を表 1 に示した。抗百日咳菌 IgA を指標にした場合、百日咳陽性値を示す人の割合が、DPT 接種前は 3.5% であったのに対し、接種 1 ヶ月後には 8.8% (2.5 倍) に上昇することが明らかとなった。また、接種 1 ヶ月後に陽性または判定保留域の抗体価を示す割合は 11.5% であった。

抗百日咳菌 IgM を指標とした場合は、抗体価

の変動と同じく、判定値においても DPT 接種の影響は認められなかった。本研究班では以前、抗百日咳菌 IgM を指標にした場合は健常人であっても若年層で抗体価が高くなる傾向があることを見出していたが、(平成 30 年度神谷班)、本研究でも同様の傾向が認められた。被験者である 5~6 歳児では DPT 接種前でも 18.6%が百日咳陽性と判定される抗体価を示した。また、陽性または判定保留域の抗体価を示す割合が被験者の約 50%に達していた。

2. MALDI 微生物同定装置による百日咳菌 FHA 欠損株の菌種同定精度

臨床分離百日咳菌 FHA 欠損株 5 株はいずれも score value >2.00 の高い精度で *B. bronchiseptica* と判定される確率が 50%を越えていた(図 1)。特に、BP267 に至っては供試したシングルコロニー全てが *B. bronchiseptica* と誤同定され、その score value は種レベルの信頼性が期待できるとされる 2.34 であった。

次に、FHA 欠損が菌種同定精度の低下に影響することを確認するため、FHA を産生する Tohama I 株から遺伝子組み換えにより $\Delta fhaB$ 株 (TSM^r $\Delta fhaB$) を作製して Biotyper による菌種同定試験に供試した。親株 Tohama I、TSM^r はいずれも 70%の頻度で百日咳菌と同定されたが、30%は *B. bronchiseptica* と誤同定され、両者の同定スコアはいずれも高値を示した (score value 2.20~2.31)。一方、FHA を欠損させた TSM^r $\Delta fhaB$ では供試した全てのシングルコロニーが *B. bronchiseptica* と誤同定され、同定スコアも 2.27 と高い値を示した。以上のことから、Biotyper による百日咳菌の菌種同定試験では、FHA を欠損することにより同定精度が低下することが明らかとなった。

3. リボテスト百日咳の性能評価

百日咳疑い患者 34 名から得られた検体について、リボテスト百日咳と LAMP 法の比較解析を行った。34 検体のうち、リボテスト百日咳では 21 検体が陽性、13 検体が陰性と判定された。一方、百日咳

菌 LAMP 法では全て陰性となり、リボテスト百日咳の偽陽性率は 61.8%と算出された。リボテスト百日咳で偽陽性を引き起こす病原体検索のため、16S rDNA 解析を実施した(図 2)。その結果、キットが標的とする L7/L12 配列が *Bordetella* 属菌と類似する 5 菌属 (*Streptomyces*, *Derxia*, *Parasutterella*, *Providencia*, *Turicibacter*)、リボテスト陽性検体で検出頻度が高い細菌属として 2 菌属 (*Pandora*, *Dolosigranulum*) が同定された。一方、患者検体中に抗マウス Ig (HAMA) が含まれると、マウス抗体を利用したイムノクロマト法で偽陽性を引き起こすことが報告されている。そこで、リボテスト残検体の HAMA 抗体価を測定したところ、リボテスト陽性/*Bordetella* 属 DNA 陰性の 1 検体でリボテスト陽性となりうる濃度の HAMA が検出された。

D. 考察

抗百日咳菌 IgA は DPT 接種により若干の抗体価上昇が認められたが、ワクチン接種の影響は非常に小さいものであった。被験者全体としては接種 1 ヶ月後に 1.3 倍の抗体価上昇を認めたが、上昇率には個人差が観察された(0.4~19.2 倍)。今回の治験に使用された DPT ワクチン(阪大微生物病研究会、トリビック)には百日せきワクチン抗原として精製 PT および FHA が含有されている。従って、本 DPT ワクチンの接種で抗 PT IgA および抗 FHA IgA の上昇が生じるため、ノバグノスト百日咳/IgA キットでもこれらが総合的に検出され抗百日咳菌 IgA の上昇に反映されていると考えられた。抗百日咳菌 IgM は DPT 接種の影響が認められなかった。しかし、ノバグノスト百日咳/IgM キットは測定抗原として百日咳菌全菌体を用いているため、DPT 接種後に抗百日咳菌 IgM が上昇しなかった理由が、①非特異抗原の存在による抗 PT IgM、抗 FHA IgM の上昇阻害の為なのか、②真に DPT 接種では IgM 抗体価が上昇しない為なのか、判別することができなかった。

MALDI 微生物同定装置 Biotyper は、百日咳

菌が FHA 抗原の産生を欠損すると菌種同定精度を著しく低下させ、百日咳菌を類縁菌 *B. bronchiseptica* と誤同定する確率が上昇することが明らかとなった。各々の菌株で検出されたピークを比較したところ、Tohama I と TSm^r で存在する 5,544 m/z のピークが FHA 欠損変異株 TSm^rΔfhaB では消失していることが判明した。当該ピークの消失が百日咳菌と *B. bronchiseptica* の鑑別を困難にする要因であることが考察された。また、MALDI 微生物同定装置による菌種同定が難渋した場合でも、代替試験による菌種の鑑別が必要となる。遺伝子検査法である百日咳菌 LAMP 法および 4Plex リアルタイム法は FHA 欠損の影響を受けず菌種同定が可能であることが確認されたが、従前より使用されていた百日咳菌抗血清を用いたスライド凝集法は同定精度が低い。百日咳菌の菌種同定が困難な場合には、これら遺伝子検査法の使用が推奨される。

E. 結論

血清診断法「ノバグノスト百日咳 IgA, IgM」、MALDI 微生物同定装置による菌種同定、抗原検査キット「リボテスト百日咳」はいずれも百日咳の検査診断法として用いる際に注意すべき点があること

が指摘された。新規に開発された検査診断法については、臨床知見や評価研究の蓄積により検査精度の実態を明らかにしていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wakimoto Y, Otsuka N, Yanagawa Y, Koide K, Kamachi K, Shibayama K, Teruya K, Kikuchi Y, Oka S. The First Reported Case of *Bordetella pertussis* Bacteremia in a Patient With Human Immunodeficiency Virus Infection. *Open Forum Infect Dis.* 2022 Feb 7;9(3):ofac020.

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. DPT 接種と抗百日咳菌 IgA, IgM を指標とした判定値の変動

	抗百日咳菌 IgA			抗百日咳菌 IgM		
	接種前	接種 1 ヶ月後	接種 1 年後	接種前	接種 1 ヶ月後	接種 1 年後
GMT (NTU)	2.9	3.7	2.2	8.2	8.1	8.5
GMT fold-increase	-	1.3	0.8	-	1.0	1.0
陽性 (%)	3.5	8.8	2.7	18.6	15.9	24.8
判定保留 (%)	1.8	2.7	0.9	29.2	27.4	23.9
陰性 (%)	94.7	88.5	96.5	52.2	56.6	51.3
陽性+判定保留 (%)	5.3	11.5	3.5	47.8	43.4	48.7

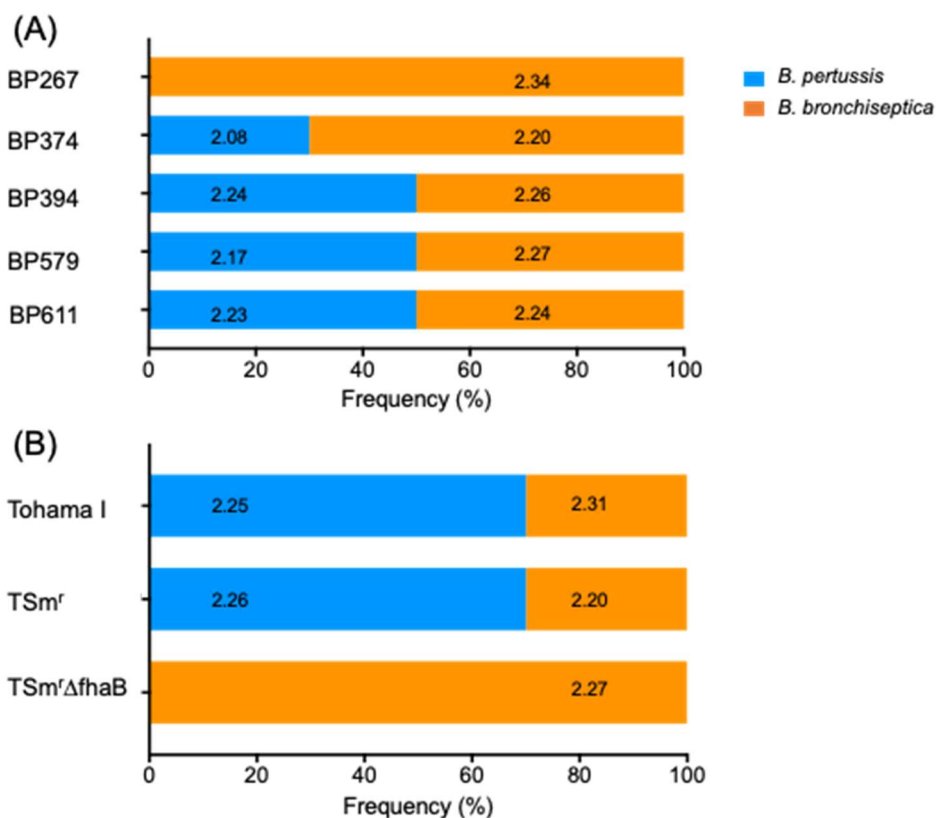


図 1. MALDI Biotyper による百日咳菌の菌種同定結果

各菌株 10 コロニーを供試し、百日咳菌または気管支敗血症菌と判定された頻度を示した。数字は同定スコアの平均値。(A)百日咳菌 FHA 欠損株 (B)*fhaB* 遺伝子破壊株およびその親株(Tohama I, TSm^r)

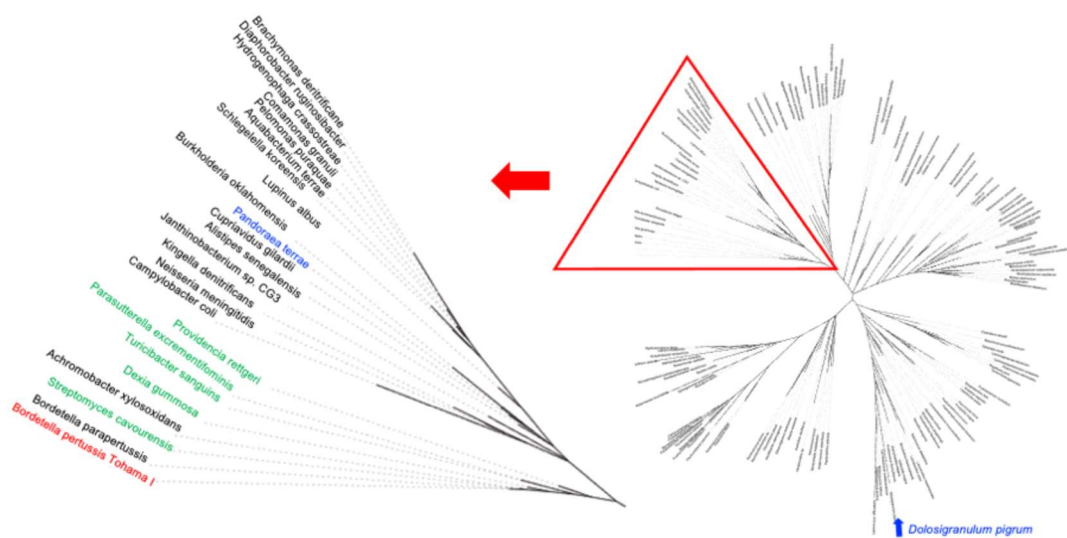


図 2. リボテスト陽性検体から検出された 143 細菌属の系統樹解析

代表的な菌種の L7/L12 アミノ酸配列に基づき最尤推定法による系統樹解析を行った。百日咳菌 Tohama I (赤色) を含む *Bordetella* 属との L7/L12 類似性が高い 5 菌種を緑色、リボテスト陽性検体で高い検出頻度を示した 2 菌種を青色で示した。