

令和5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に関するサーベイランス手法及びワクチン効果の評価に資する
研究」
分担研究報告書

百日咳菌抗原キット「リボテスト百日咳」の精度評価と偽陽性原因の探索

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 後藤雅貴 蒲地一成	国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部 国立感染症研究所 細菌第二部

【研究要旨】新規百日咳菌抗原キット「リボテスト百日咳」の精度評価と偽陽性原因の探索を行なった。呼吸器症状を呈した百日咳疑いの小児170名に対してリボテスト及び百日咳菌特異的遺伝子検査であるLAMP法を実施し、検査結果を比較解析した。170検体のうち、リボテスト陽性は68検体、LAMP法陽性は1検体であり、リボテストの高い偽陽性率（39.6%）が示された。リボテストで交差反応を示す病原体を検索するため、リボテスト検査残液から抽出したDNAを16S rDNA細菌叢解析に供試したところ、複数の候補病原体が検出された。本研究により、当該キットによる検査結果には注意が必要であることが指摘された。

A. 研究目的

百日咳は主として百日咳菌(*Bordetella pertussis*)により引き起こされる急性呼吸器感染症である。典型的な臨床症状では連続的な短い咳(staccato)と笛声(whoop)吸気を繰り返す咳嗽発作が見られる。一方、ワクチン未接種の乳児では特徴的な咳が見られず、突然の無呼吸発作からチアノーゼ、痙攣、呼吸停止と進展することがある。また、成人例でも百日咳に特徴的な咳嗽発作が認められず、長期の咳が持続したのち回復する。しかし、この間にも菌の排出があるため周囲への感染源として注意が必要である。百日咳菌は*Bordetella*属に属するが、パラ百日咳菌(*Bordetella parapertussis*)、*Bordetella holmesii*といった百日咳類縁菌も百日咳様症状を引き起こすことが知られている。その他、治療を行う上ではウイルス性呼吸器感染症、*Mycoplasma pneumoniae*、*Chlamydia pneumoniae*などとの鑑別が必要となる。

百日咳の新規検査診断法として、2021年5月に百日咳菌抗原キット「リボテスト百日咳」が健康保険適用された。本法は百日咳菌L7/L12を標的にしたイムノクロマトグラフィ法である。細菌リボソームの構成タンパク質の一つであるL7/L12タンパク質には菌固有の領域があり、本検査キットでは百日咳菌L7/L12に特異的なマウスモノクローナル抗体(mAb)を使用している。金コロイド標識されたmAbが患者試料中の

百日咳菌L7/L12抗原と結合したのち、テストラインに塗布された抗百日咳菌L7/L12抗体に捕捉されると、赤紫色の呈色反応が目視確認できる仕組みとなっている。

本キットは簡便かつ迅速であるという特徴から、医療機関での使用が拡大しているが、その一方で偽陽性が疑われる事案が発生している。そこで、本研究班では令和4年度より本キットの精度評価を実施してきた。本研究ではリボテスト百日咳と遺伝子検査LAMP法、さらにはリアルタイムPCR法との検査結果を比較して精度を明らかにすることを目的とした。また、次世代シーケンサーを用いた細菌叢解析により偽陽性原因となる病原体の網羅的検索を実施した。

B. 研究方法

1. 被験者と臨床検体

令和5年度は、協力医療機関16施設のうち9施設から検体の提供を受け、百日咳疑いと診断された110名を被験者とした。本研究では前年度までの検体と合わせて合計170検体の成績を解析した。170名の被験者の年齢分布は生後1ヶ月～20歳9ヶ月であった(中央値:5歳)。

2. リボテスト百日咳と遺伝子検査

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。リボテスト検査は各医療機関で実施され、同一患者の鼻腔スワブ検体に対して民間検査会社にて百日咳菌 LAMP 検査が実施された。なお、一部の検体については感染研・細菌第二部において LAMP 検査が実施された。

リボテスト残検体は感染研・細菌第二部に送付され、QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN)を用いて DNA が精製された。マルチプレックスリアルタイム PCR (百日咳菌、パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii*、*Mycoplasma pneumoniae* を鑑別する) による確認試験を実施した。測定は参考文献 (Kamachi K et al., New Microbes New Infect 2015 Vol. 8 Pages 70-4) に従って実施した。

3. 16S rDNA 細菌叢解析

リボテスト陽性検体 (n=35) および陰性検体 (n=15) 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。

4. リボテスト交差反応の確認試験

Pandoraea apista NCTC13158, *Burkholderia cepacia* Aichi_2023 を用いてリボテスト百日咳での交差反応を確認した。両菌株とも Bordet-Gengou 血液寒天培地 (BG 培地) を用いて 36°C で 1 日間培養した。各菌株について、予め Abs.650 での吸光度値と CFU 数の相関を確認し、リボテスト試験には 10^3 ~ 10^7 CFU/10 μ L/assay の菌量を用いた。

(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 1611)。

C. 研究結果

1. リボテスト百日咳の精度評価

令和 4 年度~令和 5 年度に収集した 170 検体について、リボテスト百日咳と百日咳 LAMP 法またはマルチプレックスリアルタイム PCR 法との比較解析を行った。

研究期間中に 1 検体が LAMP 陽性となり、本検体はリボテスト百日咳でも陽性を示した (陽性的中率: 1.47%) (表 1)。一方、百日咳 LAMP 陰性となった 169 検体のうち、67 検体はリボテストで陽性を示し、偽

陽性率は 39.6% と算出された。百日咳 LAMP 陰性であった残り 102 検体はリボテスト百日咳でも陰性となり、特異度 60.4%、陰性的中率は 100.0% と算出された。

次に、リボテスト百日咳とマルチプレックスリアルタイム PCR 法での検査結果の相関を表 2 に示した。170 検体のうち、リアルタイム PCR では百日咳菌 1 検体、パラ百日咳菌 12 検体が検出され、*B. holmesii* は検出されなかった。*M. pneumoniae* は 3 検体で検出された。残り 154 検体からは本法が標的とする 4 菌種は検出されず陰性となった。リボテスト百日咳では、パラ百日咳菌が検出された 12 検体のうち、11 検体で陽性が確認された。リボテスト百日咳が標的とする 23S リボソーム L7/L12 タンパク質のアミノ酸配列は百日咳菌を含む *Bordetella* 属細菌間で類似性が高い。添付文書に記載された臨床試験成績および当室のリボテスト交差反応確認試験では、パラ百日咳菌、*B. holmesii* との交差反応が確認されている。そこで、*Bordetella* 属間での交差反応を許容して評価したところ、感度は 92.3%、特異度は 64.3%、陽性的中率は 17.6%、陰性的中率は 99.0%、偽陽性率は 35.7% と算出された。

2. リボテスト偽陽性原因の探索-1: 病原体探索

リボテスト陽性 31 検体、陰性 15 検体の抽出 DNA に対して、次世代シーケンサー Miseq を用いた 16S rDNA 細菌叢解析を実施した。各検体における鼻腔内細菌叢構成種 (属レベルの分類) の相対割合を図 1 に示した。本解析では、リボテスト陽性検体では 7/31 検体、陰性検体では 1/15 検体から *Bordetella* 属菌 DNA が検出された。鼻腔内細菌叢の構成細菌種は、リボテスト百日咳の陽性・陰性に関係なく、被験者ごとに大きく異なっていた。本細菌叢解析では、233 の細菌属が検出されたが、このうちリボテスト百日咳が標的とする L7/L12 タンパク質のアミノ酸配列が NCBI Protein データベースに登録のあった 177 細菌属について、その代表菌種の系統樹解析を行った (図 2)。また、図 2 では当該細菌種について、リボテスト陽性検体、陰性検体において検出された割合を併記した。177 菌種のうち 13 菌種はリボテスト百日咳キットの添付文書または当室における交差反応確認試験でリボテスト陰性が確認されているものであった。まず、リボテスト陽性検体でのみ高頻度に検出され、リボテスト陰性検体では検出されていないことを指標に交差反応を示す原因細菌を探索したが、これに該当する病原

体は認められなかった。リボテスト百日咳キットのテストラインには捕捉抗体として抗百日咳菌 L7/L12 マウス IgG1 抗体が固相化されている。そこで、百日咳菌 Tohama I 株の L7/L12 アミノ酸配列を B cell epitope 予測プログラム (BCEPS) で検索したところ、44-63 または 80-122 番目のアミノ酸領域で抗原性が高いことが予測され、リボテスト捕捉抗体でもこの領域を認識している可能性が示唆された。リボテスト陽性検体で高頻度 (60%以上) に検出された 9 菌属 (Corynebacterium, Burkholderia, Pandoraea, Moraxella, Haemophilus, Escherichia, Staphylococcus, Streptococcus, Dolosigranulum) について、L7/L12 アミノ酸配列を比較したところ、Burkholderia 属及び Pandoraea 属細菌はこの領域における百日咳菌配列との類似性が高いことが判明した。また、これら細菌属はこれまでに交差反応の確認試験が行われていなかった。

3. リボテスト偽陽性原因の探索-2: 交差反応菌種の確認試験

16S rDNA 細菌叢解析で、リボテスト百日咳キットでの交差反応の可能性が示唆された Burkholderia 属及び Pandoraea 属細菌から、それぞれ *Burkholderia cepacia* および *Pandoraea apista* を選択し、生菌を用いてリボテスト交差反応確認試験を実施した。両菌種ともに $10^3 \sim 10^7$ CFU/10 μ L/assay の菌量を用いてリボテストを実施したが、いずれも反応時間内 (15 分間) に陽性反応は認められなかった。

D. 考察

本研究では、遺伝子検査 LAMP 法との比較により、リボテスト百日咳キットの高い偽陽性率 (39.6%) が明らかになった。百日咳菌を含む *Bordetella* 属細菌の交差反応を許容した場合でも、偽陽性率は 35.7% と高く、臨床での使用に問題があることが指摘された。一方、現在までに解析した 170 検体のうち、LAMP 法により百日咳菌陽性となった検体は 1 検体しか含まれていない。陽性的中率などその他指標の解釈については、十分な百日咳菌陽性検体を解析してから評価する必要がある。

リボテスト百日咳キットにおいて、16S rDNA 細菌叢解析により交差反応 (偽陽性) を引き起こす細菌種の同定を試みたところ、Burkholderia 属及び Pandoraea 属菌が候補に挙げられた。Burkholderia 属の基準種 *B. cepacia* は自然環境に常在する土壌細菌であり、しばしば日和見感染菌として呼吸器感染や血流感染を引き起こすことが知ら

れる。一方、Pandoraea 属の臨床代表種である *P. apista* は主に嚢胞性肺線維症 (Cystic Fibrosis, CF) の患者喀痰から検出される日和見病原体である。これまで、Pandoraea 属細菌が CF 患者以外から検出されることは稀とされており、本研究で小児の鼻腔細菌叢解析で高頻度に検出されたことは新たな知見であった。本研究班のこれまでの検討で、病原体以外の偽陽性原因としてはヒト抗マウス抗体 (HAMAs) や Fc ガンマ受容体 (FCGRs) の存在が示唆されており、複数の要因により偽陽性が引き起こされる可能性が考察された。今後は、これら病原体以外の偽陽性原因を検討するとともに、細菌叢解析により検出されたその他病原体のリボテスト交差反応の確認を進める必要がある。

E. 結論

百日咳菌抗原キット「リボテスト百日咳」は偽陽性率が高く、臨床での使用に注意が必要である。百日咳の診断には遺伝子検査等、他の検査診断法との併用が望ましい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Otsuka N, Koide K, Goto M, Kamachi K, Kenri T. Fim3-dependent autoagglutination of *Bordetella pertussis*. Sci Rep. 2023;13(1): 7629.

学会発表

1. 大塚菜緒, 松井真理, 神谷元. 百日咳菌 FHA欠損株に対するMALDI-TOF MS の菌種同定精度. 4月28日, 2023年, 横浜

I. 知的財産権の出願・登録状況

(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. リボテスト百日咳と百日咳LAMP法の相関

		百日咳 LAMP		合計
		陽性	陰性	
リボテスト百日咳	陽性	1	67	68
	陰性	0	102	102
合計		1	169	170

表2. リボテスト百日咳と4PlexリアルタイムPCR法の相関

		4Plex リアルタイム PCR					合計
		<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>M. pneumoniae</i>	陰性	
リボテスト	陽性	1	11	0	0	56	68
百日咳	陰性	0	1	0	3	98	102
合計		1	12	0	3	154	170

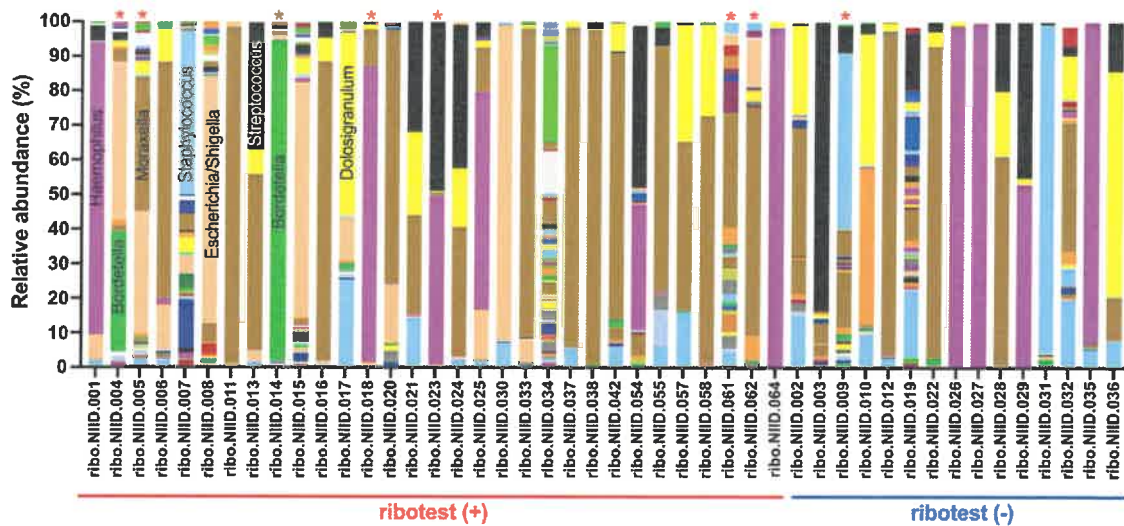


図1. リボテスト被験者の鼻腔内細菌叢解析

リボテスト百日咳で陽性を示した31名、陰性を示した15名のリボテスト検査残液からDNAを抽出し、16S rDNAを標的とした細菌叢解析を実施した。*は本解析により *Bordetella* 属細菌が検出された8検体を示す (リボテスト陽性検体では7/31検体、リボテスト陰性検体では1/15検体)。

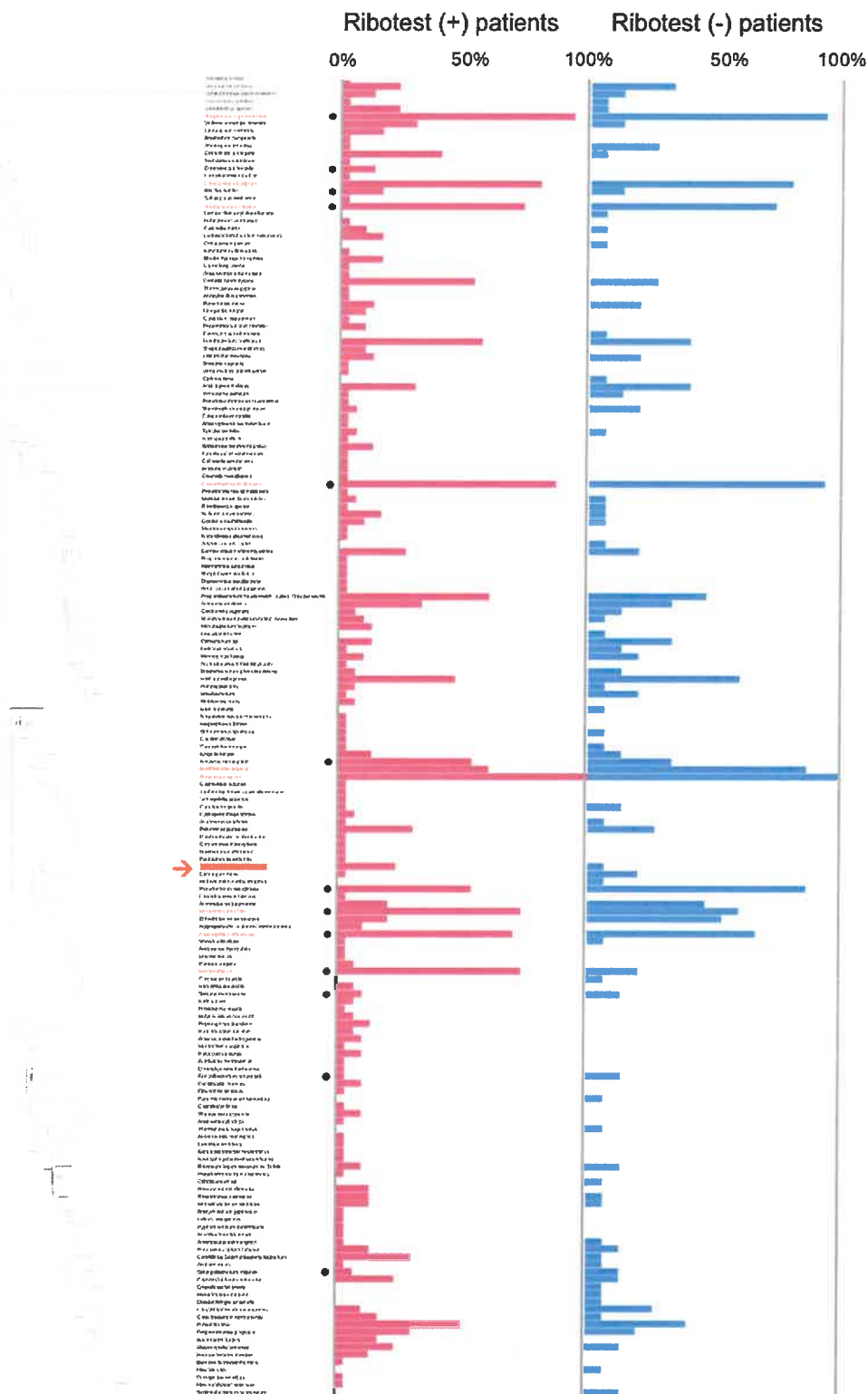


図2. 細菌叢解析で検出された細菌属の50SリボソームL7/L12アミノ酸配列に基づく系統樹

16S rDNA解析で検出された233細菌属のうち、リボテスト百日咳が標的とする細菌50SリボソームL7/L12タンパク質のアミノ酸配列がNCBI Proteinデータベースに登録のあった177代表菌種について系統樹を描き、各細菌種のリボテスト被験者での検出割合を比較した（陽性者35名、陰性者15名）。→は百日咳菌Tohamia I株、●はリボテスト百日咳キットにおいて陰性が確認されている細菌種を示す。