

百日咳抗体IgG検出EIA法による 診断補助ならびに ワクチン効果判定の有用性

国立病院機構福岡病院
統括診療部長

岡田 賢司



略歴

1981年鹿児島大学医学部卒業、九州大学医学部附属病院小児科、1987年同大学院修了、1996年九州大学医学部小児科講師、1999年国立療養所南福岡病院小児科医長（2004年より独立行政法人国立病院機構福岡病院に改称）、2009年より現職。

所属学会は、日本小児科学会（予防接種・感染対策委員会委員）、日本小児感染症学会（理事・評議員、予防接種関連委員会委員長）、日本小児保健協会（予防接種・感染症委員会副委員長）、日本感染症学会（ワクチン委員会委員）など。

独立行政法人医薬品医療機器総合機構専門委員、予防接種ガイドライン等検討委員会副委員長、ほか。

Kenji Okada

はじめに

感染症診断の基本が、細菌やウイルスなど起炎病原体の分離であることは、診断技術が進歩した今日でも変わらない。百日咳感染診断も同様で、抗菌薬、受診の遅れ、成人は小児に比較して感染菌量が少ないなど多くの要因で、日常臨床では血清診断が多く利用されている。本稿では、現在国内で利用されている百日咳の血清診断法の問題点を考える。

1. 百日咳の疫学の変化

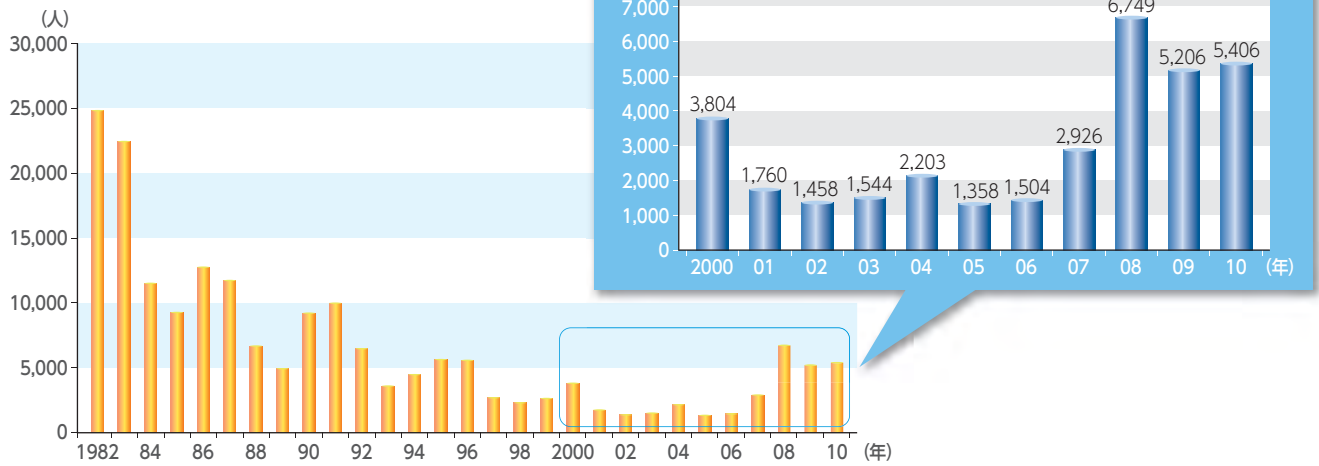
百日咳は世界中どこでも認められる感染症で、国内では感染症法五類感染症・定点把握疾患に分類され、全国約3,000の小児科定点から報告されている。図1に1982年に開始された感染症発生動向調査における定点当たりの累積報告数を示す。2005年には報告数が最も少なくなり、1982年と比較して約1/20まで減少したが、2006年以降は増加に転じた。

増加の主な要因は、成人患者数の増加である。図2に2000年以降の患者年齢割合を示す。2000年では、0歳46.7%、1歳18.1%で全体の60%以上を占め、20歳以上は2.2%であった。その後、0歳、1歳の割合は相対的に減少する一方、20歳以上の成人層の増加が顕著となり、2005年には10%を超え、2008年には1/3以上となり、2010年は全体のほぼ半数を占めるようになった。

2. 検査

ワクチン接種児や成人例に対する認識が高まってきたが、国際的にも診断基準が統一されていない。これまでの報告を参考に百日咳診断の目安を表1に示す。臨床的百日咳は臨床症状が中心で、「14日以上を基本に百日咳特有の咳（発作性の咳込み、whoop、咳込み後の嘔吐）を伴う場合」とした。確定診断は発症から4週間以内では培養と核酸増幅法（PCR法、LAMP法）、4週間以降なら血清診断を行う。

図1 百日咳累積患者数 (1982～2010年)



感染症発生動向調査での全国の小児科定点 (約3,000からの累積)

国立感染症研究所感染症情報センター資料から作成

図2 百日咳の年別・年齢群別割合 (2000～2010年)

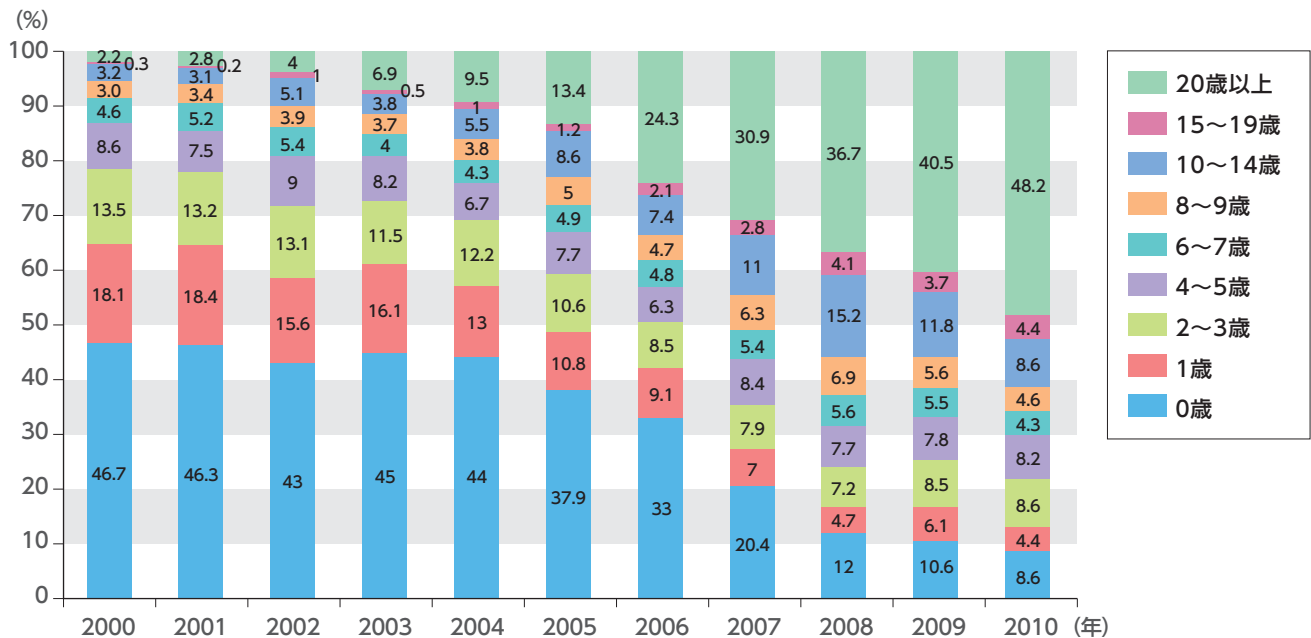
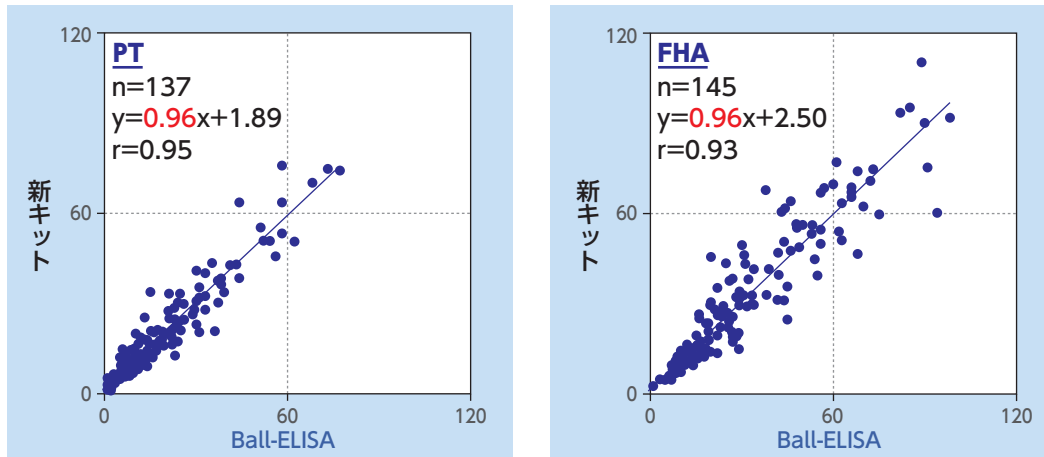


表1 百日咳診断基準(案)2012

臨床症状	14日以上のコがあり、かつ下記症状を1つ以上伴う (CDC 1997、WHO 2000) ① 発作性の咳込み ② 吸気性笛声(whoop) ③ 咳込み後の嘔吐
実験室診断 発症から4週間以内 培養、LAMP法 + ペア血清による血清診断 4週間以降 LAMP法 + ペア血清による血清診断	① 百日咳菌分離 ② 遺伝子診断:PCR法または LAMP法 現時点ではLAMP法は研究用試薬として利用できる。 全国数カ所の百日咳レファレンスセンター (国立感染症研究所および地方衛生研究所) など 限られた施設では集団感染事例には対応している。 ③ 血清診断: EIA法 抗PT-IgG抗体 1) DTPワクチン未接種児・者: 10 EU/mL 以上 2) DTPワクチン接種児・者または不明: 100 EU/mL 以上 ペア血清: 確立された基準はないが、2倍以上を原則とする *参考 単血清: 94 EU/mL 以上 (Baughman AL 2004) 100 EU/mL 以上 (de Melker HE. 2000)
臨床診断	臨床症状は該当するが、実験室診断はいずれも該当しないとき
確定診断	(1) 臨床症状は該当し、実験室診断の ①～③ のいずれかが該当するとき (2) 臨床症状は該当し、実験室診断された患者との接触があったとき

図3 Ball-ELISA と新しいキットとの相関性



帰直線の傾きが 1 ± 0.1 の範囲で、相関係数 $r \geq 0.9$ であれば両者は同等であるといえる (薬事法)

(1) 培養

感染症診断の基本は、病原体を分離することである。後鼻腔から軟らかい綿などが付いたスワブを用いて検体を採取し、選択培地に塗布する。検査室では選択培地に塗布する必要があるため、事前に検査室や検査センターに百日咳を疑っていることを伝えておくことが分離率を上げるポイントと思われる。分離率は第3病週までが高い。小児科医が百日咳と診断した症例での菌分離率は51.6%と高く、早期診断法として有用である。日常臨床で小児の患者の場合は、お勧めしたい検査の一つである。

(2) 核酸増幅法 (PCR法、LAMP法)

培養より感度がよく、時間的にも速く、死菌でも検出できる利点がある。LAMP法は特別な機器を必要としないため、今後日常検査として実施できる可能性がある。現在、保険収載まで至っていないが、研究用試薬としては入手できる。

(3) 血清診断法

1) 国内の検査が Ball-ELISA 法から通常の EIA 法に

EIA法で抗PT-IgG抗体が測定でき、第2～3病週で上昇してくる。ワクチン未接種児は10EU/mL以上を抗体陽性とする。ワクチン接種児では高い抗体価を示す場合が多く、単血清では診断できない。ペア血清が基本となるが、有意上昇の基準がなく、2倍以上の上昇で判定している。単血清の場合、アメリカ人を対象とした報告でEIA法の抗原や方法も異なるが、94EU/mL以上を有意としている¹⁾。

血清抗体測定は、わが国では菌体凝集反応による凝集素価測定が広く普及しているものの、DTPワクチンの中には凝集素を含むものもあるため、凝集素価測定では注意が必要となる。

EIA法はBall-ELISA法と呼ばれ、保険適応があり、検査センターなどで用いられてきた。ジフテリア破傷風百日咳 (Diphtheria-tetanus-pertussis: DTP) 三種混合ワクチンの効果判定のために、ワクチン接種前後の抗体価測定用とし

て開発された経緯から、感度に優れているが、操作が煩雑であるため日常臨床検査には不向きとされてきた。抗原は、百日咳菌から分泌される百日咳毒素 (pertussis toxin: PT) および菌体の表面にある接着因子の一つであるFHA (filamentous hemagglutinin) が用いられている。Ballにこの抗原を結着し、血清中のPTおよびFHAに対するIgG抗体と結合させ、更に酵素標識した二次抗体で検出する方法として長く利用されてきた。

今回、同じ抗原を用いて操作が通常のEIA法と同じ方法で、抗PT-IgG抗体および抗FHA-IgG抗体を測定する新しいキット試薬の基本性能を検討する機会を得た²⁾。新しいキットは、96穴マイクロプレート形態を採用しているため、汎用性に優れ、多検体を処理する検査センターなどでの自動化に適合させやすいと考えられる。新しいキットは、再現性に優れた安定した試薬であるとともに、国内で唯一の抗PT-IgG抗体、抗FHA-IgG抗体測定試薬である従来のBall-ELISA法との相関性も高く (図3)、薬事法上でも両者は同等であると確認できた。更に、海外で行われているIU値による抗PT-IgG抗体価³⁾とのデータ比較も可能であると考えられるため、新しいキットは、臨床における百日咳診断補助のみならず、ワクチン効果判定や、疫学調査など、幅広い用途に活用できるものと考えられた。

Ball-ELISA法は、供給の問題もあることから国内の検査センターでは2011年秋から新しいこのキットに順次切り替えられている。

2) 血清診断の意義

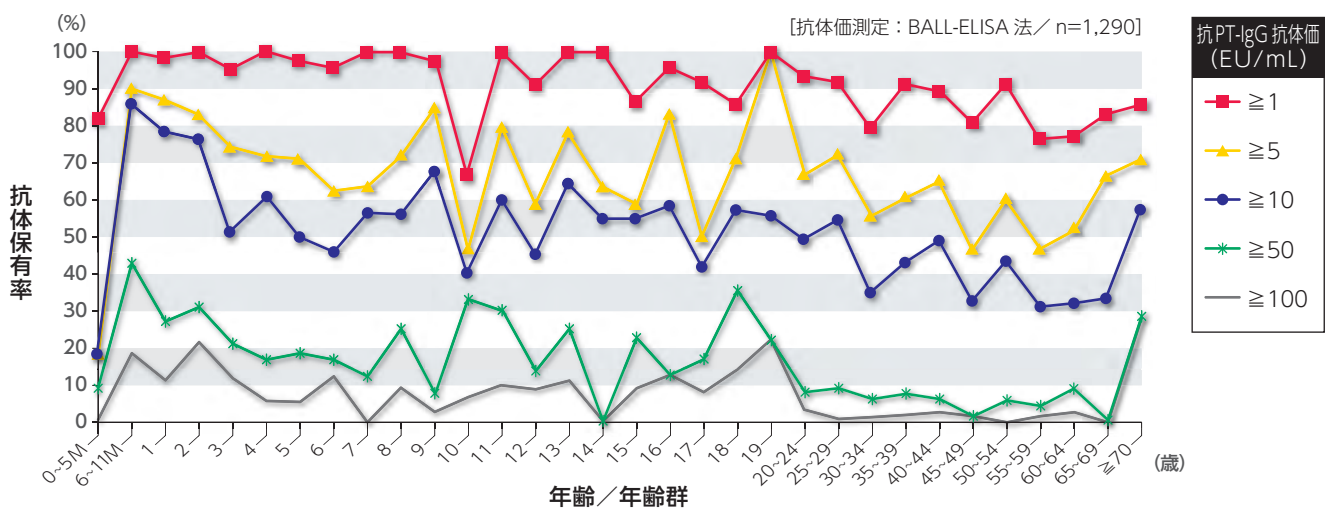
血清診断の感度は、抗原検出法 (培養やPCR) と比較して20⁴⁾～90%⁵⁾とされる。急性期 (発症後2週間以内) と回復期 (前採血から約4週間後) でのペア血清が基本であるが、急性期に検査できることは少ない。受診の遅れ、診断の遅れなどで回復期のみとなることも多い。PTは百日咳菌しか分泌しないため、PTに対するIgG抗体またはIgA抗体が最も特異度が高い検査とされている。これらの抗体は感染後平均4ヵ月半でcut-off値以下まで低下し、1年以内

表2 思春期・成人における抗 PT-IgG 抗体の cut-off 値

国	試験デザイン	cut-off(IU/mL)	感度 (%)	特異度 (%)
米国 (マサチューセッツ州)	Population study	~ 200	67	99.9
オランダ	Population study	125	70	99
		62	80	95
ドイツ	Population study	40	80	95
EU	Epidemiological survey	125	NA*	NA
米国	Epidemiological survey, model	94	NA	NA
		49	NA	NA
オーストラリア	Clinical validation	50	NA	NA

*NA : not applicable.
文献 6) より一部改変後和訳

図4 年齢/年齢群別の百日咳抗体保有状況 2008年* ~2008年度感染症流行予測調査より~



*19歳は9名、65~69歳群は6名、≥70歳群は7名の結果

<http://idsc.nih.gov/yosoku/Pertussis/Serum-Per2008.html>

に82%が陰性化すると報告されている⁶⁾。このため、単血清で抗PT-IgG抗体が高値の場合は、高い感度・特異度で急性百日咳感染と診断できるとされているが、国・地域によってそのcut-off値が異なる。思春期・成人での抗PT-IgG抗体価のcut-off値を表2に示す⁷⁾。米国マサチューセッツ州では、特異度を高めるためにcut-off値は200EU/mLとしている。オランダでは感度・特異度を考慮して125EU/mLと62EU/mLの2種類の値を示している。更に抗PT-IgG抗体価が100EU/mL以上あれば、ペア血清で診断された検体と同等と評価されている⁵⁾。

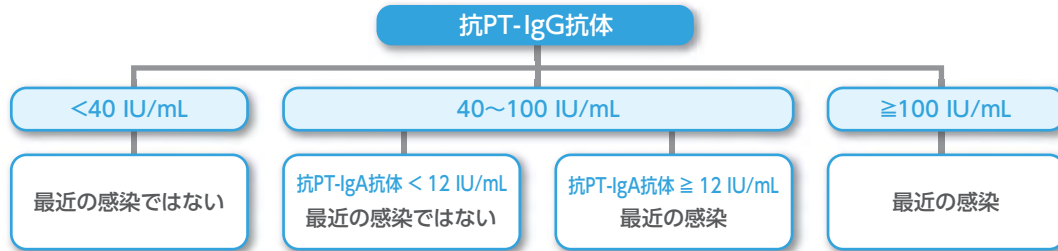
わが国では、2008年度感染症流行予測調査⁷⁾に示されているように、ワクチン接種の影響のない20歳以上の抗体保有率、特に100EU/mLは5%未満である(図4)。また、Riffelmannら⁸⁾は、国内ではまだ実用化されていない抗PT-IgG抗体価も考慮して単血清での診断のアルゴリズムを報告している(図5)。これらを参考に国内でも100 EU/mL以上を最近の感染と考え、診断の目安としてはどうかと考えている(図6、表1)。

これまでに百日咳菌が分離でき、咳の初日(1病日)が分かっている症例の抗PT-IgG抗体の動きを図7に示す。100EU/mLを超えてくるのは、早い例では20病日頃からで、30病日前後が多かった。60病日までには、ほとんどの症例が100EU/mL以上となっていた。

おわりに

百日咳の血清診断ではEIA法により抗PT-IgG抗体を測定することが望ましい。診断の目安はDTPワクチン未接種児・者で10EU/mL以上、DTPワクチン接種または不明児・者の単血清においては100EU/mL以上とし、ペア血清では確立された基準はないが、2倍以上の上昇と考えている。

図5 患者血清での抗PT-IgG 抗体の評価のためのアルゴリズム



Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J et al.: Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 48(12): 4459-4463, 2010. より改変

図6 百日咳血清診断の目安

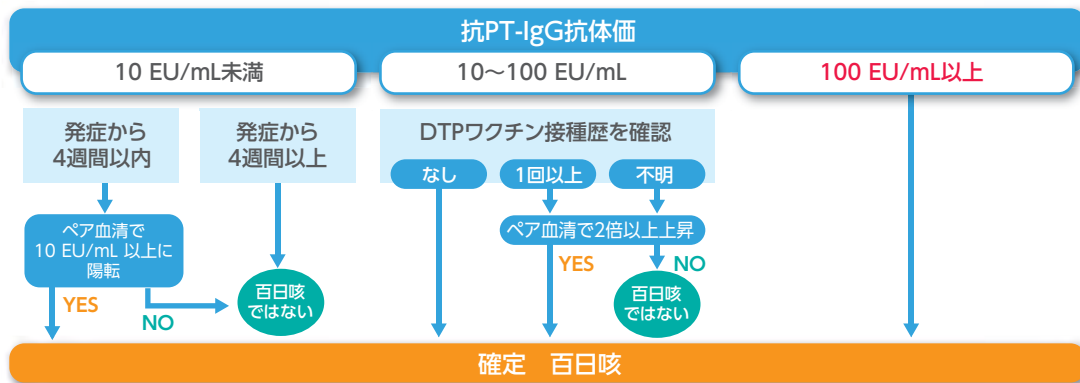
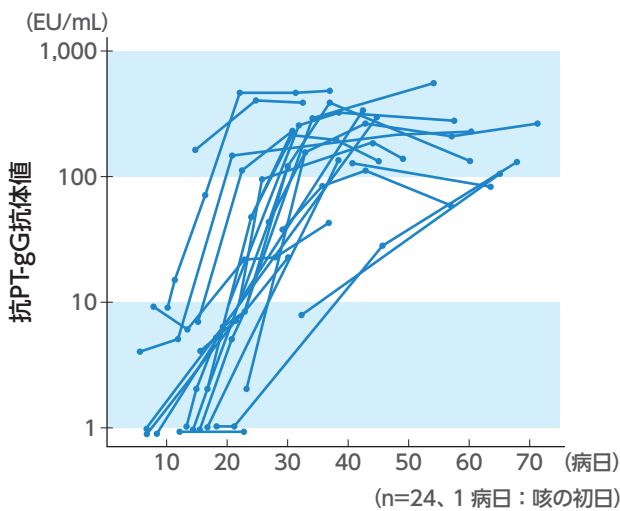


図7 百日咳患者(index case)抗体価



参考文献

- 1) Baughman AL, et al.: Establishment of diagnostic cutoff points for levels of serum antibodies to pertussis toxin, filamentous hemagglutinin and fimbriae in adolescents and adults in the United States. Clin Diagn Lab Immunol 11(6): 1045-1053, 2004
- 2) Okada K.: Evaluation of ELISA Kit for detection pertussis-associated IgG antibodies, Jpn J Med Pharm Sci 65(4) : 531-536, 2011
- 3) Guiso N, Berbers G, Fry Nk et al.: What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: recommendations from EU reference laboratories. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 30(3): 307-312, 2011.
- 4) Steketee RW, Burstyn DG, Wassiliak SGF et al.: A comparison of laboratory and clinical methods for diagnosing pertussis in an outbreak in a facility for the developmentally disabled. J Infect Dis 157: 441-449, 1988
- 5) DeMelker H, Versteegh F, Conyn-van Spaendonck M, et al.: Specificity and sensitivity of high levels of immunoglobulin G antibodies against pertussis toxin in a single sample for diagnosis of infection with *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 38: 800-806, 2000
- 6) Bamberger ES, Sruog I.: What is new in pertussis ? Eur J Pediatr 167: 133-139, 2008
- 7) 国立感染症研究所 HP : <http://idsc.nih.go.jp/yosoku/Pertussis/Serum-Per2008.html>
- 8) Riffelmann M, Thiel K, Schmetz J et al.: Performance of commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Bordetella pertussis*. J Clin Microbiol 48(12): 4459-4463, 2010.