

原著

ELISA 法による抗 *Chlamydomphila pneumoniae* IgM 抗体
測定キットの比較岸 本 寿 男¹⁾ 尾 内 一 信²⁾ 沼 崎 啓³⁾
安 藤 秀 二⁴⁾ 山 崎 勉⁵⁾ 中 浜 力⁶⁾

要旨 リウマチ因子などによる非特異的反応を抑制し、新規診断基準により偽陽性率を低減した日立化成製「ヒタザイム C.ニューモニエ Ab-IgM」と Ani LabSystems 社製の抗 *C. pneumoniae* IgM 測定キットとの比較を行った。その結果、前者はリウマチ因子などの影響がなくなり偽陽性は改善されてはいるが、まだ他の因子の影響を受けている可能性が残されているものと思われた。後者は特異性が高い検査法であるが、その反面陽性率が低く、見落としの可能性が示唆された。それぞれの試薬の性能を考慮したうえで、各試薬を使用し診断することが必要と考えられる。

はじめに

Chlamydomphila pneumoniae (*C. pneumoniae*) 感染症^{1~3)}の診断法は、現在わが国において、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法による抗 *C. pneumoniae* 抗体検出試薬「ヒタザイム C.ニューモニエ (以下、ヒタザイム) Ab-IgG, IgA, IgM」^{4~6)}があり、一般検査室レベルで実施できる抗体検査法として保険適用となっている。

通常初感染の急性期に上昇するとされる IgM 抗体が急性感染の診断上有用と考えられ、検査数が増加してきた。一方データが蓄積されるに従い、ヒタザイム IgM の陽性率が予想以上に高く、IgM 陽性後に IgG, IgA が上昇しない例や、リウマチ

因子 (RF) などによる偽陽性例の存在などの問題点が指摘されてきた^{7,8)}。

われわれは、ヒタザイム IgM の新規の前処理剤を検討することで RF 高値検体などにおける非特異反応による偽陽性を低減し、さらに健常小児および健常成人の血清を用いてヒタザイム IgM によるカットオフ値を再設定することにより、小児、成人ともに、シングル血清でインデックス (ID) ≥ 2.0 の場合を急性感染の「確診」、 $1.1 \leq ID < 2.0$ の場合を急性感染の「疑診」と設定した^{9,10)}。

最近、新たな IgM 測定キットも導入されるようになったこともあり、今回、われわれはさらに上記の検討に対し、肺炎または急性気管支炎患者の検体およびすでに *C. pneumoniae* 急性感染と診断

Key words : クラミジア・ニューモニエ, IgM 抗体, 抗体検査法, 肺炎, 急性気管支炎

1) 岡山県環境保健センター

〔〒701-0298 岡山市南区内尾739-1〕

2) 川崎医科大学小児科

3) 国際医療福祉大学大学院医療福祉学研究所国際感染症学領域/国際医療福祉大学病院小児科・感染制御部

4) 国立感染症研究所ウイルス第一部

5) 埼玉医科大学小児科/若葉こどもクリニック

6) 中浜医院

された患者検体を用いて、Ani Labsystems 社製の IgM 測定キット (以下、AniLab 法) で測定し、ヒタザイム IgM および micro-IF (micro immunofluorescence test) との比較を行ったので報告する¹¹⁾。

I. 材料と方法

1. 対象患者^{9,10)}

2005 年 5 月～2007 年 3 月にかけて 19 施設の大学病院、一般病院、および開業医 (内科および小児科) の協力を得て、各施設を受診した小児 (0～15 歳) 63 例および成人 (16 歳以上) 69 例の肺炎または急性気管支炎患者 計 132 例を対象とした (気管支肺感染症例)。

また、micro-IF の簡便法である松本らの MFA (microplate immunofluorescence antibody technique)¹⁵⁾ で *C. pneumoniae* の急性感染と診断した 1989～2000 年に受診した 126 例 (小児 16 例, 成人 110 例) も対象とした (MFA 陽性例)。

2. 検査材料^{9,10)}

検査材料として、上記の気管支肺感染症例の対象患者 132 例から採取した血清 207 検体 (小児 78 検体, 成人 129 検体), および MFA 陽性例 126 例の血清 224 検体 (小児 20 検体, 成人 204 検体) を用いた。ヒタザイム, micro-IF による抗体測定を実施し、さらに AniLab で IgM を測定し、結果が乖離した検体についてはウェスタンブロットにより *C. pneumoniae* に特異的な抗体の有無を測定した。

3. 抗体測定法

1) ヒタザイム^{9,10)}

ヒタザイム C. ニューモニエ Ab-IgG, IgA, IgM の添付文書に従って抗体価を測定し、インデックス (ID) を算出した。IgG, IgA は ID が 1.1 以上を陽性とした。IgM については、ID ≥ 2.0 の場合を急性感染の「確診」、 $1.1 \leq ID < 2.0$ の場合を急性感染の「疑診」、ID < 1.1 の場合を「陰性」とした。

2) AniLab¹²⁾

Ani Labsystems 社製 IgM 測定キットの取扱説明書に従って測定し、シグナル/カットオフ単位 (S/CO) を算出した。S/CO < 0.5 の場合を陰性、 $0.5 \leq S/CO \leq 1.1$ の場合を判定保留、S/CO > 1.1 の

場合を陽性と判定した。

3) micro-IF¹³⁾

血清を 8 倍希釈した後 2 倍希釈系列を作り、スライドグラスに固定した *C. pneumoniae* の精製 EB に反応させ、蛍光標識した 2 次抗体を反応後、蛍光顕微鏡により倍率 400 倍でクラミジアの基本小体 (EB) を観察した。血清希釈 8 倍で EB 粒子の蛍光を観察できない場合を < 8 とし、EB 粒子の蛍光を観察できる血清希釈倍率を抗体価とした。国立感染症研究所で採用されている基準である抗体価 32 倍以上を陽性とし、16 倍を疑陽性、8 倍以下を陰性とした。

4) ウェスタンブロット¹⁴⁾

C. pneumoniae に特異的とされている 43 kDa, 46 kDa, 53 kDa のいずれかのバンドに反応がみられた場合を陽性とした。

II. 結果

1. 各方法での IgM 陽性率

気管支肺感染症例 207 検体での IgM 陽性率は、micro-IF で 12.1% (25 検体), ヒタザイムで 10.1% (21 検体) に対し、AniLab では 2.9% (6 検体) であった (表 1)。また、MFA 陽性例 224 検体での IgM 陽性率は、micro-IF で 43.3% (97 検体), ヒタザイムで 23.2% (52 検体) に対し、AniLab では 10.7% (24 検体) であった (表 2)。

2. 各方法間の比較

気管支肺感染症例と MFA 陽性例の計 431 検体において、2 つ以上の抗体測定法で陽性となった場合を真の陽性とした場合、sensitivity は micro-IF 100% (43/43), ヒタザイム 95.3% (41/43), AniLab 69.8% (30/43), specificity は、micro-IF 79.6% (309/388), ヒタザイム 91.8% (356/388), AniLab 100% (388/388) であった (表 3)。

また、PPV (positive predictive value: 陽性的中率) はヒタザイム 56.2% (41/73), AniLab 100% (30/30), micro-IF 35.2% (43/122), NPV (negative predictive value: 陰性的中率) は、ヒタザイム 99.4% (356/358), AniLab 96.8% (388/401), micro-IF 100% (309/309) であった。

3. ヒタザイムと AniLab の相関

ヒタザイムと AniLab との結果の相関を、それ

表 1 各方法による陽性率 (気管支肺感染症例 207 検体)

a : micro-IF

倍	n	%
≥32	25	12.1
16	30	14.5
<16	152	73.4
計	207	100

b : ヒタザイム

ID	n	%
≥2.0	21	10.1
1.1~2.0	49	23.7
<1.1	137	66.2
計	207	100

c : AniLab

S/CO	n	%
>1.1	6	2.9
0.5~1.1	3	1.4
<0.5	198	95.7
計	207	100

表 2 各方法による陽性率 (MFA 陽性例 224 検体)

a : micro-IF

倍	n	%
≥32	97	43.3
16	60	26.8
<16	67	29.9
計	224	100

b : ヒタザイム

ID	n	%
≥2.0	52	23.2
1.1~2.0	49	21.9
<1.1	123	54.9
計	224	100

c : AniLab

S/CO	n	%
>1.1	24	10.7
0.5~1.1	5	2.2
<0.5	195	87.1
計	224	100

表 3 各方法の感度と特異度

方法	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
micro-IF	100.0% (43/43)	79.6% (309/388)	35.2% (43/122)	100.0% (309/309)
ヒタザイム	95.3% (41/43)	91.8% (356/388)	56.2% (41/73)	99.4% (356/358)
AniLab	69.8% (30/43)	100.0% (388/388)	100.0% (30/30)	96.8% (388/401)

2つ以上の抗体測定法で陽性となった場合を真の陽性とした。

ぞれ図 1 および図 2 に示した。ある程度の相関は認められるものの、AniLab で陰性または判定保留 (S/CO ≤ 1.1) 検体が多く、そのうちヒタザイムで陽性 (ID ≥ 2.0)、かつ AniLab 陰性または判定保留 (S/CO ≤ 1.1) の不一致検体が、気管支肺感染症例で 17 検体 (8.2%)、MFA 陽性例で 28 検体 (12.5%) であった。

4. 不一致検体の解析

上記のヒタザイムと AniLab との不一致検体についてウェスタンブロットにより解析した結果、気管支肺感染症例では、ヒタザイム陽性 (ID ≥ 2.0) かつ AniLab 陰性または判定保留 (S/CO ≤ 1.1) であった 17 検体のうち、micro-IF またはウェスタンブロット陽性は 15 検体であった (表 4)。

また、MFA 陽性例では、ヒタザイム陽性 (ID ≥ 2.0) かつ AniLab 陰性または判定保留 (S/CO ≤ 1.1) であった 28 検体のうち、micro-IF またはウェスタンブロット陽性は 26 検体であった (表 4)。

III. 考 察

ヒタザイムの IgM は非特異反応による偽陽性が多く、それに比較して AniLab は特異性が高く確実に感染例を捉えている、と報告されている¹²⁾。われわれは、ヒタザイムの IgM の急性感染の基準を見直し^{9,10)}、AniLab で同検体を測定し解析を行った¹¹⁾。

気管支肺感染症例の場合、IgM の陽性率が

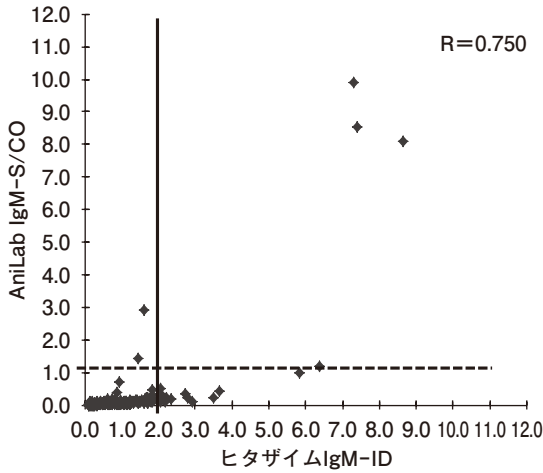


図 1 ヒタザイムと AniLab との相関 (気管支肺感染症例 207 検体)

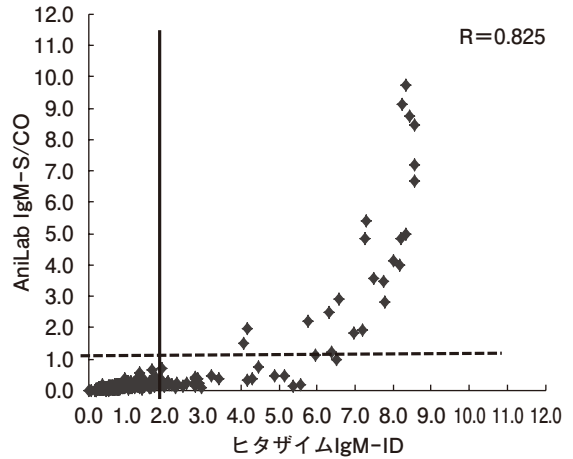


図 2 ヒタザイムと AniLab との相関 (MFA 陽性例 224 検体)

表 4 不一致検体の解析

a : 気管支肺感染症例 ヒタザイム陽性, AniLab 陰性または判定保留の乖離検体 : 17 検体

乖離検体	他法			検体数 (%)	
	判定	micro-IF	ウェスタンブロット		
17	+	+	+	15 (88.2%)	2
		+	-		1
		-	+		12
-	-	-	2 (11.8%)	2	

b : MFA 陽性例 ヒタザイム陽性, AniLab 陰性または判定保留の乖離検体 : 28 検体

乖離検体	他法			検体数 (%)	
	判定	micro-IF	ウェスタンブロット		
28	+	+	+	26 (92.9%)	7
		+	-		4
		-	+		15
-	-	-	2 (7.1%)	2	

micro-IF の 12.1% に対し、ヒタザイムで 10.1%、AniLab で 2.9% であり、retrospective 例の場合でも micro-IF の 43.3% に対し、ヒタザイムで 23.2%、AniLab で 10.7% であり、AniLab の陽性

率が最も低い結果であった。

2 つ以上の抗体測定法で陽性となった場合を真の陽性とした場合も、AniLab の sensitivity が低い結果となった。逆に micro-IF とヒタザイムで単独陽性例もみられ、これらの PPV が低い結果となった。

ヒタザイムと AniLab との相関をみても、AniLab で陰性または判定保留 ($S/CO \leq 1.1$) 検体が多く、ヒタザイム陽性域まで広く分布しているのがみられた。ヒタザイムと AniLab の不一致検体の詳細を検討した結果から、ヒタザイム陽性 ($ID \geq 2.0$) かつ AniLab 陰性または判定保留 ($S/CO \leq 1.1$) であった検体のうち、約 9 割程度が他法 (micro-IF またはウェスタンブロット) で陽性であることから、これらの検体は AniLab の偽陰性が示唆された。それに対し、約 1 割程度の検体にはヒタザイムの偽陽性が示唆され、今後検討が必要であると考えられた。

このことは、この 2 つの試薬のカットオフの設定が、ヒタザイムは健常人における測定の前平均 $ID + 3 SD$ 、AniLab は平均 $ID + 9 SD$ と大きく異なること、また、測定時の血清検体の希釈倍率が、ヒタザイムは 21 倍希釈、AniLab は 1,111 倍希釈と約 50 倍も異なることが大きな要因であると考えられた。

今後、さらに症例の集積を含めて、よりよい診

断法への模索を続けていく必要があると考えられた。

また、これらは血清診断であるので、当然採血時期や宿主の免疫状態にも影響される。したがって臨床症状やその他の検査結果を含めて、総合的に判断することが必要である。

おわりに

ヒタザイムは、リウマチ因子などの影響がなくなり偽陽性は改善されてはいるが、まだ他の因子の影響を受けている可能性が残されている。Ani-Lab は、特異性が高い検査法であるがその反面陽性率が低く、見落としの可能性が示唆される。それぞれの試薬の性能を考慮したうえで、各試薬を使用し診断することが必要であると考えられる。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Grayston JT, et al : *Chlamydia pneumoniae* sp. nov. for *Chlamydia* sp. strain TWAR. Int J Sys Bacteriol 39 : 88-90, 1989
- 2) 尾内一信, 他 : 日本における *Chlamydia pneumoniae* とその他のクラミジアの年齢別抗体保有率の検討. 感染症誌 65 : 19-25, 1991
- 3) 岸本寿男 : *Chlamydia pneumoniae* 感染症の疫学, 血清学的診断—*Chlamydia pneumoniae* 感染症の基礎と臨床, 化学療法の領域 12 : 31-37, 1996
- 4) 岸本寿男, 他 : ELISA 法による抗 *Chlamydia pneumoniae* 特異抗体の測定 1. 外膜複合体を用いた ELISA 法キットの評価. 感染症誌 70 : 821-829, 1996
- 5) 岸本寿男, 他 : ELISA 法による抗 *Chlamydia pneumoniae* 特異抗体の測定 2. 臨床的有用性及び血清学的診断基準の検討. 感染症誌 70 : 830-839, 1996
- 6) 岸本寿男, 他 : ELISA 法による抗 *Chlamydia pneumoniae* 特異抗体の測定 3. 血清学的診断基準の設定. 感染症誌 73 : 457-466, 1999
- 7) 中田慎一郎, 他 : 下気道感染急性期に *Chlamydia pneumoniae* 特異 IgM 抗体陽性を示した小児における特異 IgG, IgA 抗体価の変化. 日本小児呼吸器疾患学会雑誌 13 (2) : 136-140, 2002
- 8) Miyashita N, et al : Evaluation of serological tests detecting *Chlamydomphila pneumoniae*-specific immunoglobulin M antibody. Intern Med 45 : 1127-1131, 2006
- 9) 岸本寿男, 他 : 肺炎クラミジア感染症の血清診断における「ヒタザイム C. ニューモニエ Ab-IgM」の診断基準の見直し. 日治療会誌 55(supplement-A) : 196, 2007
- 10) Kishimoto T, et al : Assay of *Chlamydia pneumoniae*-specific IgM antibodies by ELISA method—Reduction of non-specific reaction and resetting of serological criteria by measuring IgM antibodies—. Jpn J Infect Dis 62 : 260-264, 2009
- 11) 岸本寿男, 他 : ELISA 法による *C. pneumoniae* IgM 抗体測定キットの比較. 第 28 回日本クラミジア研究会抄録集, 2010
- 12) Miyashita N, et al : Comparison of serological tests for detection of immunoglobulin M antibodies to *Chlamydomphila pneumoniae*. Respirology 13 : 427-431, 2008
- 13) Wang SP, et al : Immunological relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescent test. Am J Ophthalmol 76 : 367-374, 1970
- 14) Iijima Y, et al : Characterization of *Chlamydia pneumoniae* species-specific proteins immunodominant in humans. J Clin Microbiol 32 : 583-588, 1994
- 15) 別所敏子, 他 : *Chlamydia psittaci* の封入体を抗原とした簡単な抗体価測定法—microplate immunofluorescence technique—. 医学のあゆみ 128 : 571-572, 1984

**Evaluation of kits for detection of
Chlamydomphila pneumoniae-specific IgM antibodies**

Toshio KISHIMOTO¹⁾, Kazunobu OUCHI²⁾, Kei NUMAZAKI³⁾,
Shuji ANDO⁴⁾, Tsutomu YAMAZAKI⁵⁾, Chikara NAKAHAMA⁶⁾

¹⁾*Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health*

²⁾*Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School*

³⁾*Division of International Infectious Diseases, Graduate School/Departments of Pediatrics and Infection Control, University Hospital International University of Health and Welfare*

⁴⁾*Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases*

⁵⁾*Department of Pediatrics, Saitama Medical School/Wakaba Children's Clinic*

⁶⁾*Nakahama Clinic*

This study evaluated HITAZYME C. pneumoniae Ab-IgM improved by its reducing non-specific reaction with rheumatoid factor and resetting of the serological criteria and anti-C. pneumoniae IgM antibody detection kit made by Ani LabSystems Ltd. The results showed that the HITAZYME C. pneumoniae Ab-IgM kit did not have a non-specific reaction with rheumatoid factor but yielded a possibility of a non-specific reaction caused by other factors. The anti-C. pneumoniae IgM antibody detection kit showed high specificity, as well as low sensitivity, giving the likelihood of producing false-negative results. Thus, we should use these diagnostic test kits in consideration of the improved performance.

(受付：2012年9月13日，受理：2013年4月4日)

* * *