

20031220

厚生労働科学研究費補助金
医薬品等医療技術リスク評価研究事業

国際的動向を踏まえた
体外診断薬の品質管理に関する研究
平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹森 利忠

平成 16 年 3 月

目 次

I. 平成15年度研究組織	1
II. 総括研究報告	
研究の統括	2
主任研究者： 竹森 利忠（感染研・免疫部）	
III. 分担研究者研究報告	
1. 品質管理のための国内標準パネル血清の作製に関する調査・研究 竹森 利忠（感染研・免疫部）	13
2. 風疹抗体検出キットの国内標準品の作製と評価 海野 幸子（感染研・ウイルス第三部） 堀内 善信（感染研・細菌第二部） 加藤 宏幸（感染研・ウイルス第三部） 大槻 紀之（感染研・ウイルス第三部）	15
3. 風疹抗体表示法の実態調査と風疹パネル血清作成の取り組み 浅野 喜造（藤田保健衛生大・医学部）	19
4. 産婦人科の臨床から風疹抗体測定に関する問題点の提起と商業検査施設の風疹抗体検査成績に関する研究 川名 尚（帝京大附属溝口病院・産婦人科） 干場 勉（石川県立中央病院・産婦人科）	22
5. 風疹抗体測定キットの対比検討 吉田 浩（福島県立医大・臨床検査医学講座）	25
6. 地方衛生研究所における風疹抗体測定標準化に関する調査研究 丹野嵯喜子（埼玉県衛生研） 島田 慎一（埼玉県衛生研・ウイルス担当）	29
7. HBs抗原検出用キットとHBs抗原濃度表記統一に関する研究 水落 利明（感染研・血液・安全性研究部）	31
8. 医療でのHBs抗原検出キット感度表記に関する調査・研究 林 茂樹（国立病院東京災害医療センター）	35
9. HBs抗原検査法の目的別利用法に関する考察 吉澤 浩司（広島大院・医歯薬学総合研究科）	38
10. 医療でのHBs抗原検出キットに関する研究 飯野 四郎（医療法人社団静山会清川病院）	42
研究協力者研究報告	
11. B型肝炎ウイルスのgenotypeパネルの作製とS抗原の解析 小室 勝利（感染研・血液・安全性研究部） 岡田 義昭（感染研・血液・安全性研究部）	47
12. 風疹抗体検出キットの品質管理に関する研究 岡部 信彦（感染研・感染症情報センター） 多屋 馨子（感染研・感染症情報センター） 佐藤 弘（感染研・感染症情報センター）	53
13. 商業検査施設の風疹抗体検査成績に関する研究 干場 勉（石川県立中央病院・産婦人科・部長）	55
14. 国際的動向を踏まえた診断薬の品質管理に関する研究 岡田 賢司（国立療養所南福岡病院・小児科）	57
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	59
V. 論文別刷	60

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

国際的動向を踏まえた体外診断薬の品質管理に関する研究班

平成 15 年度研究組織

- 主任研究者： 竹森 利忠（国立感染症研究所・免疫部・部長）
- 分担研究者： 海野 幸子（国立感染症研究所・ウイルス第三部・室長）
- 水落 利明（国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長）
- 田代 真人（国立感染症研究所・ウイルス第三部・部長）
- 宮村 達男（国立感染症研究所・ウイルス第二部・部長）
- 浅野 喜造（藤田保健衛生大学・医学部小児科学・教授）
- 川名 尚（帝京大学医学部附属溝口病院・産婦人科・教授）
- 吉田 浩（福島県立医科大学・臨床検査医学講座・教授）
- 丹野嗟喜子（埼玉県衛生研究所・所長）
- 林 茂樹（国立病院東京災害医療センター・副院長）
- 吉澤 浩司（広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・教授）
- 飯野 四郎（医療法人社団静山会清川病院・病院長）
- 研究協力者： 庵原 俊昭（国立療養所三重病院・副院長）
- 河合 忠（国際臨床病理センター・所長）
- 澤 倫太郎（社団法人日本医師会・常任理事）
- 西島 英利（社団法人日本医師会・常任理事）
- 干場 勉（石川県立中央病院・産婦人科・部長）
- 島田 慎一（埼玉県衛生研究所・ウイルス担当・主任）
- 岡田 賢司（国立療養所南福岡病院・小児科・医長）
- 前川 雅男（社団法人日本臨床検査薬協会・常務理事）
- 西村 和夫（日水製薬株式会社・薬事部・部長）
- 小室 勝利（国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長）
- 岡田 義昭（国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長）
- 岡部 信彦（国立感染症研究所・感染症情報センター・センター長）
- 多屋 馨子（国立感染症研究所・感染症情報センター・室長）
- 佐藤 弘（国立感染症研究所・感染症情報センター・研究員）
- 加藤 宏幸（国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任研究官）
- 堀内 善信（国立感染症研究所・細菌第二部・室長）
- 吉原なみ子（国立感染症研究所・エイズ研究センター・室長）

国際的動向を踏まえた体外診断薬の品質管理に関する研究

主任研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所・免疫部長

研究要旨

[風疹についての研究]

1. 風疹抗体測定キットの表示の統一に必要な国内標準品候補を作製した。
2. 臨床家や疫学者を対象とした調査で、90-80%の調査対象者が風疹抗体測定における国際単位(IU)表示導入と、パネル血清作製に期待することが明らかにされた。
3. HI 抗体測定法の品質管理の臨床的重要性を明らかにし、公的機関で行う必要性を示した。また IgM 抗体測定についても品質管理が不十分であるため、日常臨床において混乱が認められることが明らかにされた。
4. 日常検査に採用している測定法として、赤血球凝集抑制(HI)法が多く用いられ、シングル血清による急性期の診断には酵素抗体(EIA)-IgM法単独またはEIA-IgM法とEIA-IgG 法の併用が主流であることが明らかにされた。また各施設においてIgM/IgG 抗体検査結果のばらつきが認められた。
5. 現行使用されているキットを用いてHI法とIgG-EIA法測定結果の相関性を検討した結果相関は良く認められたが、同じHI抗体価を示す検体でのEIA IgG 価の値にばらつきが認められた。
6. 地方衛生研究所における風疹抗体測定の実施状況について調査するために、アンケート調査票を作成した。

[HBs 抗原についての研究]

1. 新規 HBs 抗原 WHO 国際標準品の制定に参画し HBs 抗原リファレンスパネルの評価作業を行った。
2. HBs 国際標準品に準拠した国内新規標準品作製の準備を行った。
3. HBs 抗原検査の使用目的に対応した選択基準について考察論議した。
4. 臨床経過での HBs 抗原検査、ALT 値、HBV DNA 量をそれぞれ比較し、臨床診断において HBs 抗原検査薬の感度の過度な上昇は必要ではない可能性が示唆された。
5. 近年、アフリカ・ヨーロッパ型の genotype A, HBV が急速に性感染を通して、日本全国に拡がりつつあり、成人感染においてキャリア化する可能性があることから、早急な対策が必要であることが明らかにされた。

6. HBV genotype パネル整備のためのシステムを作製した。
7. 全国のナショナルセンター・国立病院・療養所における HBs 抗原検出試薬を用いた通常検査には EIA/発光法が、緊急検査にはイムノクロマト法がそれぞれ最も多く使用されていることが明らかにされた。

[分担研究者]

海野 幸子

(感染研・ウイルス第三部・室長)

水落 利明

(感染研・血液・安全性研究部・室長)

田代 真人

(感染研・ウイルス第三部・部長)

宮村 達男

(感染研・ウイルス第二部・部長)

浅野 喜造

(藤田保健衛生大・教授)

川名 尚

(帝京大医溝口病院・教授)

吉田 浩

(福島県立医大・教授)

丹野嵯喜子

(埼玉県衛生研・所長)

林 茂樹

(国立病院東京災害医療センター・副院長)

吉澤 浩司

(広島大院・医歯薬学総合研究科・教授)

飯野 四郎

(医療法人社団静山会清川病院・病院長)

[研究協力者]

庵原 俊昭

(国立療養所三重病院・副院長)

河合 忠

(国際臨床病理センター・所長)

澤 倫太郎

((社)日本医師会・常任理事)

西島 英利

((社)日本医師会・常任理事)

干場 勉

(石川県立中央病院・産婦人科・部長)

島田 慎一

(埼玉県衛生研究所・ウイルス担当・主任)

岡田 賢司

(国立療養所南福岡病院・小児科・医長)

前川 雅男

((社)日本臨床検査薬協会・常務理事)

西村 和夫

(日水製薬株・薬事部・部長)

小室 勝利

(感染研・血液・安全性研究部・部長)

岡田 義昭

(感染研・血液・安全性研究部・室長)

岡部 信彦

(感染研・感染症情報センター・センター長)

多屋 馨子

(感染研・感染症情報センター室長)

佐藤 弘

(感染研・感染症情報センター研究員)

加藤 宏幸

(感染研・ウイルス第三部主任研究官)

堀内 善信

(感染研・細菌第二部・室長)

吉原なみ子

(感染研・エイズ研究センター・室長)

はじめに

我が国での医療及び公衆衛生上重要な体外診断用医薬品の国際動向を踏まえた品質管理のためには、国際標準品に準拠した国内標準品の作製、感度の統一的な表示、医療での適切な使用に関わる情報の提供が必要とされる。

風疹に対する抗体保有の把握は疫学的に重要で、風疹に対する妊婦の急性感染の診断は、先天性風疹症候群(Congenital rubella syndrome: CRS(白内障、難聴、心臓奇形))の発生予測とその結果が妊娠継続を左右するという点で社会的影響が極めて大きい。これまで我が国では、風疹に対する免疫学的診断は、風疹ウイルス E1 タンパク質の赤血球凝集(HA)活性の抑制を測定する HI 抗体測定により行われてきたが、近年、ウイルス全構成タンパク質への抗体の結合を測定する酵素抗体法(EIA: enzyme-linked immunosorbent assay)が導入されている。しかし、これらのキットの感度はそれぞれ独自の表示が用いられ統一的な判断に困難な場合が多い。更に、従来の HI 抗体測定値と EIA 測定値との相関が明らかでなくこれらの問題を解決する必要が求められている。

また我が国においては、母子感染あるいは性感染を主要感染経路として全人口の約 1%が HBV (Hepatitis B Virus)キャリアであると推定され、B 型肝炎の迅速で適確な診断は医療および公衆衛生上重要である。現在 HBV キャリアの診断に関して、B 型肝炎ウイルス外被抗原(HBs 抗原: Hepatitis B surface Ag)の検出を目的とする体外診断用医薬品が多く用いられているが、これらのキットの感度も"IU" (international unit)と"ng"、さらには各社独自の"unit"などが混在し、品質管理や臨床での診断に改良が必要とされている。

本研究ではこれらの問題を解消し、国際動向を踏まえ、我が国で市販される診断薬の品質管理の向上を図るために、風疹抗体、HBs 抗原診断キットにおける WHO の標準品に準拠する国内標準品を作製し、各キットの測定値及びその感度を一定の基準で表示するための基礎データを作製し、評価することを計画した。更に HBs 抗原検出キットの場合には、我が国で高頻度に存在する血清型、遺伝子型判定に対する診断薬の品質向上と国際動向の整合性について検討し、また目的に対応した適切な使用についての基準を考察することも研究調査の対象とした。風疹については EIA と HI 抗体価の相関性を明確にして情報提供するための基礎データを作製すること、また IgM 抗体測定キットの品質管理についての研究調査も計画した。

これらの問題については、医療機関、地方衛生研究所、日本医師会、日本臨床検査医学会、日本ウイルス学会、日本臨床検査薬協会、体外診断用医薬品業界と連携し、各診断薬キットの使用状況を調査し現況を把握するとともに、国際動向を踏まえかつ、風疹と HBV 検査薬の国内での感度表記の標準化とそれに伴う品質管理について、実施の可能性と方策について研究調査することを目的とした。

A. 研究目的

HBs 抗原検出キットの品質管理に関する研究として以下を計画した。

(1) 医療機関、商業的検査機関におけるキットの使用状況、判定の際の疑問点、問題点の有無について調査を行い学術的、臨床的な評価を行う。また国際動向を踏まえた感度

表示の統一の実施について調査する。

- (2) WHO 国際標準品に準拠した HBs 抗原国内標準感度パネル(IU/ml 表記)を作成する。
- (3) 日本臨床検査薬協会の協力のもとに、国内標準感度パネル(IU/ml 表記)を用い国内で販売されるキットの感度を測定する。このパネルは同時に、今後各メーカーにおいて定期的に実施されるキットの品質管理に使用されることを想定する。
- (4) HBs 抗原診断キットの適切な使用方法を検討する。
- (5) 我が国で高頻度に存在する遺伝子型判定に対する診断薬の品質向上と国際動向の整合性について検討する。

風疹抗体検出キットの品質管理に関する研究として、以下を計画実施した。

(1) キットの使用状況の調査

医療機関、地方衛生研究所、商業的検査機関におけるキットの使用状況、判定の際の疑問点、問題点の有無について調査を行い、現状を把握する。

(2) 国際動向を踏まえた感度表示統一に関する調査研究

1. WHO の国際標準品に準拠した国内標準品を作製する。風疹抗体陽性血清より IgG 及び IgM 抗体国内標準品を作製し、国際標準品に照らした平行線定量法により IgG-EIA における IU を求める。国際標準品及び国内標準品の IU と HI、NT、EIA 各抗体価の関係を明らかにする。
2. WHO の国際標準品に準拠した国内標準品の抗体価を、日本臨床検査薬協会の協力を得て、国内で販売されている各キットで測定し、キット間で得られる抗体価に違いが

あるか状況を把握する。この国内標準品は同時に、各メーカーにおいて定期的に実施されるキットの品質管理に使用されることを想定する。得られた結果をもとに、研究班での論議を踏まえ、関係各方面と連携し、現在市販されているキットの抗体価表示を IU に変更する可能性について研究調査する。

(3) 国際動向を踏まえた品質管理の確保

各社のキットにおける IgG-EIA 抗体価について IU 表示を行ない、さまざまな HI 抗体価と異なる性質の抗体を有するパネル血清を用いて、それぞれのキットにおける HI 抗体価と IU の相関性を明らかにする。

(4) 現存する各キットの特性と性能の検討

自然感染後の時期の異なる血清やワクチン接種後の血清など EIA において抗原との結合性に違いが見られる抗体を用いることにより、各キットの特性とキット間の性能の違いを明らかにし、現状の各キットに於ける品質管理の把握を行なう。

(5) 診断基準の検討

IgM 抗体の検出は妊婦の急性感染の診断に重要である。IgM 抗体の臨床的意義について、これまでに蓄積されている妊婦の抗体価と胎児への感染例のデータから、臨床現場での診断に役立つ基準を作成する。IgG 抗体に関しても、流行が減少した今、自然感染によるブースター効果を受けない時のワクチンによる抗体の持続性やその抗体の感染防御能について、これまでとは異なる状況が生まれている。急性感染の診断のみならず、CRS を防ぐために抗体価から何を指針として提起できるかを検討する。

B. 研究方法

[風疹についての研究]

- (1) 国際標準品として WHO の RUBI-1-94(800 IU/ml)を用いた。EIA 抗体価はデンカ生研キットを用いて測定し、Bioassay Assist の平行線定量法による解析から WHO 標準品に対する相対抗体価を算定した。HI 抗体価測定法はデンカ生研の HA 抗原を用いて、感染症流行予測調査事業検査術式に従った。中和抗体は、2003 年に分離された野外風疹ウイルスを用いてプラーク法で測定した。試験内及び試験毎の誤差を考慮するために、全ての抗体測定法で試料の独立した 3 希釈列を用い、繰り返し 3 回の試験結果を統計解析した。
- (2) 風疹の初感染を疑われたために相談に訪れた妊婦 12 例を対象として、抗体測定については EIA 法 (デンカ生研キット) を用い IgG 抗体、IgM 抗体、さらに Avidity Index (AI) を測定した。AI は風疹 IgG 抗体測定キットに検体を反応させた後 8M 尿素を室温で 15 分反応させたものと、未処置のものとの吸光度 (OD) の比を%で表して表示した。また測定にあたり各検体の OD を 1~1.5 程度になるように希釈して用いた。
- (3) 本邦で市販されている 5 種の IgM 型抗風疹抗体測定用 ELISA について、それらのコントロール検体、陽性患者とパネル検体および健常人血清の測定を行い、対比検討した。
- (4) 感染研で保管された血清 469 検体について風疹に対する抗体の測定を赤血球凝集抑制試験(HI)及び IgG 抗体測定キットを用いて行い相互の結果を比較した。この際 HI 法で抗体価 1:8 以上、EIA 法で IgG 価 1.0 以上を風疹抗体陽性とした。
- (5) 埼玉県衛生研究所で収集された血清検体 100 件について、感染症流行予測調査事業検査術式に従い、赤血球凝集抑制(HI)試験により風疹抗体価の測定を実施した。これらの検体のうち、HI 抗体価が 8 倍未満、8 倍、16 倍であったものを中心に 46 件を選び、EIA 法による市販の風疹抗体測定キットによる測定を添付文書に従って実施した。
- (6) 臨床ウイルス学会および小児感染症学会に属する臨床および疫学の研究者 116 人にアンケートを配布し、①免疫の確認および急性期診断に用いる風疹抗体測定方法、②風疹抗体価の IU 表示に対する意見、③風疹パネル血清に対する意見、について記名調査を行った。
- (7) 平成 15 年度第 37 回臨床検査精度管理調査において、臨床検査室における風疹抗体検査の実施状況についてアンケート調査を行い日常検査に採用している測定法の内訳を明らかにした。

[HBs 抗原についての研究]

- (1) 新規 HBs 抗原 WHO 国際標準品の制定に参画し HBs 抗原リファレンスパネルの評価作業を行った。
- (2) 多種多様な HBs 抗原検査キットの採用状況をアンケート方式で調査し、HBs 抗原検出キットが医療の実情と検査キットの特性を考慮して適正に採用されているか否かを調査した。
- (3) 過去 HBs 抗原陽性が明らかであることが確認された症例で、RPHA 法で HBs 抗原が陰性(6 例)あるいはごく低値陽性(2 例)と判定された検体について HBV DNA を PCR (Amplicor) 法、HBs 抗原をアーキテクト、

アキシム、IM x 法で検査し、その症例の診断名、ALT 値、HBs 抗原・抗体、院内の RPHA および EIA 法による HBs 抗原の結果と比較検討した。また、3 例については HBs 抗原陰性化の過程をシリーズ検体で検討した。なお、保存検体は患者の了解を得た上で研究用として保存されているものを用いた。

- (4) これまでに得られているデータをもとに作製した B 型肝炎ウイルス(HBV)の急性感染の経過図を念頭に置き、HBs 抗原検出法を選択するにあたっての利害得失を考察した。

C. 研究結果

[風疹についての研究]

- (1) 抗体価表示の統一をはかることを目的に国際標準品に準拠した国内標準品候補を作製した。すなわち風疹の既往歴のあるヒト血清を集めて IgG 抗体測定のための国内標準品候補(JPN'03)とし、風疹に自然感染した発症 2 週後の成人血清を集めて IgM 抗体測定用国内標準品候補(IgM-JPN'03)を作製した。
 - (2) IgM 抗体が検出されたとして相談を求められた 12 例の妊婦について血清学的診断法を検討した。IgG 抗体価は高値を示し、IgM 抗体について 4 例は陽性、8 例は陰性であった。陽性例について Avidity Index を求めたところ 44.4%~77.9%と高い値に分布し、最近の感染とは考えられないと判断し、妊娠を続けた。IgM 抗体が妊娠 12 週に 2.62 とやや高い値を示した例について AI を調べたところ 44%と高く、妊娠を継続し分娩に至った。いずれも出生時に臨床的・血清学的に検討したところ風疹の胎内感染はなかった。今回の研究からは IgM 抗体が陽性であっても、極く最近の感染とは考えにくい症例のある
- ことが判明した。
 - (3) IgM クラス抗風疹抗体価は風疹ウイルス感染の重要な指標となることから、本邦で市販されている 5 社の IgM-風疹抗体 ELISA について対比検討を行った。その結果、IgM 型抗体の ELISA による測定値はメーカーにより差が見られることから標準品による評価と統一化が必要であることが示唆された。
 - (4) 埼玉衛生研究所で保管する HI 陽性血清検体(97 検体)について市販 EIA キットによる抗体測定結果と HI 抗体価を比較したところ、高い相関が認められた。しかし個々の検体についてみると、HI 抗体価 16 倍の検体で EIA97 IU/mL と比較的高値である例が認められた。
 - (5) 81 人の臨床家、疫学専門家を対象としたアンケート調査で、感染確認に用いる抗体測定について HI 法使用者 51%、EIA-IgG 法使用者 28%、HI 法と EIA-IgG 法併用者が 21%であった。急性期診断での抗体測定については EIA-IgM 抗体のみの測定が 58%、EIA-IgM 抗体と EIA-IgG 抗体併用測定が 26%、HI 抗体と EIA-IgM 抗体の同時測定が 6%で、対象者の 90%が EIA-IgM 法含めた方法で血清抗体を測定することが明かとなった。
 - (6) 風疹抗体価の IU 表示の導入に関してアンケート対象者 81 人のうち 93%の者が賛意を示し、メーカーにより EIA 表示方法が異なり HI 法との表示の互換性について期待する意見が述べられた。更に日本における標準抗体価を表すパネル血清作成に関して 78%の賛同があった。
 - (7) 臨床検査室風疹抗体検査実施施設のうち、赤血球凝集抑制反応(HI 価)のみが 69 施設、

IgG 抗体・IgM 抗体に併用が 32 施設、HI 価・IgG・IgM 3 法併用が 14 施設であり、HI 価の測定を実施している施設が過半数を占めていた。半定量的測定法を実施している 92 施設のうち、特定の HI 価用試薬キットを採用しているのは 79 施設と大部分を占め、風疹 IgG/IgM 抗体検査実施施設についての回答では、特定の EIA キットの採用する偏りはないことが明かとなった。測定結果の判定について、「ペア血清による HI 抗体価の推移」と回答したのは 7 施設で、大部分が $\times 4$ 以上の変化があった場合に陽性と判定するとしている。シングル血清の HI 抗体価で判定する施設は 85 施設で、そのうち 76 施設が陽性カットオフ値を $\times 8$ としている。IgG/IgM 抗体検査結果の判定についてはかなりばらばらしていることが明かとなった。

[HBs 抗原についての研究]

(1) WHO collaborative study において、新規 HBs 抗原国際標準品候補の性状解析及び適合性が検討された(Phase 1 study)。新規標準品から作製されたリファレンスパネルを使用して、世界各国で現在用いているキットの感度を調べ、今後このパネルを世界各国の NRA(National Regulatory Agencies) がキットの評価に用いることができるか否かについて検討した(Phase 2 study)。本研究ではこの Phase 2 study に参加し、新規 HBs 抗原国際標準品(Phase 1 study により 33IU/ml とされた)を用いて富士レビオ社の Lumipulse HBsAg(CLIA 法)と ESPLINE HBsAg(イムノクロマト法)により判定を行った。この結果今回使用したリファレンスパネルは世界各国のキットの感度の違い

を網羅して判定できることが示された。

- (2) 外注および共同利用を除く 105 施設での HBs 抗原検出試薬採用状況は EIA 発光法採用 69 施設、イムノクロマト法 35 施設、その他 1 施設であった。採用理由としては、拾い出し精度が優秀 58 施設、既存機器利用のため 50 施設、偽陰性が少ない 22 施設、その他理由 20 施設であった。緊急検査と通常検査に用いる HBs 抗原検出試薬が同一である施設数は 60 で、異なる施設より多数を占めた。緊急検査に用いる HBs 抗原検出試薬の採用状況は、イムノクロマト法が 81 施設と大多数を占め、採用理由として、測定機器が不要、手技簡便、短時間反応であった。年間検査件数が 2,000 件未満の施設がほぼ半数を占めたが、そのうち 4 施設では施設外に検査が依頼されていた。
- (3) HBs 抗原と ALT の関係について、慢性肝炎の 1 例を除いて ALT が異常の例では RPHA 法で HBs 抗原すべて検出された。HBV DNA 量と HBs 抗原の関係では、HBV DNA 量が肝炎再発症の判定として問題となる 10^3 copies/ml 以上の例では RPHA 法で HBs 抗原はすべて陽性であった。RPHA 法より 100 倍前後鋭敏である検出法すべて陽性である。従って日常的に問題となる HBV キャリアを拾い出すには、ほどほどの検出感度の検出法で十分であると臨床的には考えられた。
- (4) 一般に HBV 初感染の場合、一定の潜伏期間を経てまず HBs 抗原が、次いで HBc 抗体が末梢血中に検出され、HBs 抗原が検出されなくなった後に HBs 抗体が検出される。しかし、NAT により HBV DNA の検出を行い感染の経過を追うと HBs 抗原の

出現前から HBV DNA は検出される。HBs 抗原の検査は下記の目的のために実施される。すなわち、①輸血用血液の安全性確保、②急性 B 型肝炎の診断、③HBV キャリアの発見(HBV 母子感染予防の対象妊婦の選定、B 型肝炎ウイルス検診による HBV キャリアの発見)、④医療関係者の感染予防、⑤B 型肝炎の自然経過の観察及び治療効果の判定、種々の目的のために選択すべき HBs 抗原検出法について考察を加える。この結果輸血用血液の安全性の確保を目的とした HBs 抗原検査では NAT によるバックアップ体制が軌道に乗っている現在では、徒に検出の感度のみを追求する必然性は無い。簡便、安価、迅速かつ特異性の高い現行の凝集法などが充分であろう。急性 B 型肝炎の診断を目的として HBs 抗原検査を行う場合、一般に急性 B 型肝炎の患者は肝炎の極期前後に医療機関を受診することが多い。受診時点では HBs 抗原量は多く、徒に検出感度のみを追求する必要はない。病期(経過)を判定するための情報が必要で定量性のある検査法を選択することが適切であろう。HBV キャリアの発見(HBV 母子感染防止の対象妊婦の選定、B 型肝炎ウイルス検診による HBV キャリアの発見)を目的として HBs 抗原検査を行う場合、一般に HBV キャリアでは HBs 抗原量が多いことから、この場合も徒に検出感度のみを追求する必要はなく、特異性の高い検査法を優先して選択することが必要である。

- (5) 目的のために選択すべき HBs 抗原検出法について考察が行われ、高感度の HBs 抗原検出法を輸血用血液の安全性の確保、急性 B

型肝炎の診断、HBV キャリアの発見、医療関係者への感染予防等の全ての領域で選択する必要性が少ないことが示唆された。

D. 研究考察

本研究は風疹抗体及び HBs 抗原検査のための国際動向を踏まえた標準品整備についての必要性を調査検討し、その実行のための基礎資料を作ることを目的とした。風疹については更に品質管理の向上を目的とした調査研究を行い、B 型肝炎にあつては、目的に適した診断薬の使用を考察し、これらの問題については班会議(全体班会議 1 回、個別班会議各 1 回)で discussion が行われ、各班員、研究者間での共通認識が得られた。

本年度研究班の成果として風疹 IgG 抗体測定キットの IgG 抗体標準品が整備され、また初期感染診断の要となる IgM 抗体測定キットの標準品候補も作製された(海野・加藤、堀内・田代)。今回作製された標準品について EIA, HI, 中和抗体価を測定し、WHO の国際標準品に対する相対抗体価を算出すると、IgG 抗体測定用国内標準品候補の相対抗体価はいずれの方法でも誤差の範囲で良く一致した。この結果作製された IgG 抗体標準品を用いて規格化された品質管理が可能となり、また EIA、中和、HI 間の異なったアッセイにおいて、共通の抗体価(IU)表示が可能となった。風疹抗体診断キットの利用状況を臨床検査室(河合・澤・西島)、医師等(浅野・庵原)を対象にして調査した結果、いずれの分野においても半数以上が HI 価測定法、次いで IgG-EIA を用いた検査が多く行われていることが明らかにされた。これらの使用状況は産婦人科領域での風疹抗体診断が HI 価を標準としていること、また現行の医

療保険制度(HI法での測定は90点、EIA法の測定は300点、EIA法でIgG抗体とIgM抗体とを同時に測定した場合は、一つしか保険請求できない)を反映しているものと思われる。

風疹抗体検査での測定結果の判定については、「ペア血清によるHI抗体価の推移」と回答したのは少数で、大部分が×4以上の変化があった場合に陽性と判定するとしている。検査施設ではシングル血清のHI抗体価で判定する施設は85施設と多く、うち76施設が陽性カットオフ値を×8としている。一方、IgG/IgM抗体検査結果の判定についてはかなりばらついていることが明らかとなり、施設間での技術や診断キットの精度の向上等今後改良の余地があることが示された(河合・澤・西島)。

調査結果で明らかなように多くの場合HI法かEIA-IgG法のいずれか一つの測定方法を用いて診断を行っていることを背景に、メーカー間での異なった尺度を用いたEIA表示方法の統一化や、HI法との表示の互換性期待して、風疹抗体価のIU表示の導入に関しては93%の者が賛意を示すことが本研究班での調査で明らかにされた(浅野・庵原)。

IgG型抗体測定キットについては、いずれのメーカーもWHO標準品に準じた常用標準品を作成しているが、IgM型抗体についてはWHO標準品が作成されておらず、品質管理の向上が必要であることが明らかにされ(吉田)、一方臨床においても診断キットの品質管理の向上が必要となること、またIgM抗体診断法の整備の必要性が明らかにされた(川名・干場、岡田、吉田)。今後本班で作製され、IgM抗体標準品候補の更なる改良を試み

つつWHOとも連携をとりその利用のためのプロセスを設定する必要がある。

本研究において風疹抗体陽性率が調査され(丹野・島田)、平成12～14年度感染症流行予測調査(H12:86.2%, H13:87.5%, H14:87.0%, 調査県の18～30歳のHI法による抗体陽性率)と比較して、ほぼ同様の結果であった。また、予防接種歴・罹患歴に関する質問票により、本調査対象者より得られた結果から、2003年9月30日までの経過措置の接種対象者(1979年4月2日から1987年10月1日生まれの未接種者)は42名存在し、このうち抗体陽性者は31名(73.8%)であった。風疹の抗体測定法として、HI法は臨床的及び疫学的に多く選択される標準法であり、特別な機器を必要としないという利点があるが、血清の前処理が必要なことや判定が主観的であるといった点もある。一方、EIA法は抗体検出感度が高く、一度に多くの検体を測定できる利点があるが検査費用が高い。またHI抗体価1:8以下である場合、ワクチン接種を勧奨する目安となるがEIA法では、IgG価から感染防御に有効な抗体を保有しているか否かの判断は難しい。従って疫学調査のように多数の検体の測定を行う場合、EIA法による測定が適しており、EIA法による測定結果から感染防御抗体レベルを推定することが可能であれば非常に有効な手段となりうる。検査法を変えるにあたって過去のデータとの比較を行う場合、HI法とEIA法との測定結果が相関し、かつ共通した単位で比較することが可能とならねばならない。そこでHI法とEIAを用いた測定の相関性を検討した(丹野・島田、岡部・多屋・佐藤)。その結果、相関性は良く認められたが同じHI抗体価を示す検体でのEIA IgG価の分布にばらつきが認められた。EIA法による測定

結果からの感染防御に有効な抗体レベルを推定するためには、さらなる検討が必要である。

WHOが行った collaborative study により、新規に HBs 抗原国際標準品(code 00/588)が制定されることとなり、同時にこれまでの国際標準品と現在使用されている他の標準品との比較を行った結果、今後は「IU」表記に統一すべきであるとの合意があることが報告された(水落)。

HBs 抗原検出法については、HBs 抗原検出感度、及び定量性の有無等をよく理解した上で目的に適した検査法を利用することが望ましいことが明らかにされ(飯野、吉澤)、目的に適した検査法の選択には各々の検査法の特性を共通の尺度で比較することが必要となる。これまでの標準尺度は ng/ml と IU/ml の両者が利用されてきた。しかし、ng/ml の表示は標準品作製時の HBs 抗原の精製度や HBs 抗原粒子表面への抗体等の血清タンパクの付着度の違いにより、標準品の Lot ごとに差異が生じ得ること、また HBs 抗原検出の精度は、HBs 抗原活性を相対的に表す尺度であることが議論され(吉澤)、今後は我が国においても国際標準に合わせた尺度(IU/ml)を利用できるシステムを確立することが望ましいことが確認された(吉澤、水落)。

従って WHO により新規に制定された HBs 抗原国際標準品に従い、今後は国内で使用されている HBs 抗原検出キットの添付文書に記載されている最小検出感度の表記も「IU/ml」に統一することが必要となろう。このためには HBs 抗原国内標準感度パネルの確立が必須であり、現在用いられている HBs 抗原国内標準品は 1997 年に当時の WHO 国際標準品を基準にして値付けされたもの

(102IU/vial)であることから、今回制定された新規標準品とも良好な相関関係を持っていることが示された(水落)。今後 HBs 抗原国内標準感度パネルをこの HBs 抗原国内標準品をもとにして作製することが可能であると考えられる。

またこれとは別に HBV 変異ウィルスや異なった genotype に対する現行の HBs 抗原検出診断薬の感度・特異性についての品質管理も必要であることが示された(飯野)。この観点から HBs 抗原検出試薬の評価に必要な HBV の genotype パネルの作製の試みとして各種 genotype を組み込んだプラスミドを作成し、肝細胞由来細胞株に遺伝子導入することにより HBs 抗原標準品を得る試みがなされた(小室・岡田)。今後多くの改良が必要とされるが当面での有意義な標準品となり得る可能性がある。

さて 105 施設の医療機関での HBs 抗原検出キットの使用状況を調査すると(林)、通常検査では、拾い出し精度が最も高いと信頼される EIA/発光法が多数の施設において採用されていた。しかしこの選択には既存機器利用のためという理由も少なからずあり、必ずしも検査キットの特性を第一選択理由として採用を決定しているわけではない。緊急検査を目的とした検査試薬は、イムノクロマト法の採用が大多数を占めていたが、施設の事情から通常検査と緊急検査の試薬を同一としている施設の割合が半数であった。

E. 結論

風疹抗体測定検査、HBs 抗原検出検査における国際動向を踏まえた標準品の作製の必要性を調査、論議し認められた。風疹については IgG、IgM 抗体測定のための国内標準品が作製され

た。更に品質管理に関する臨床での問題点が明らかにされるとともに風疹抗体診断キットにおいては HI 法、EIA 法測定との相関性が検討されある程度の一致が認められた。HBs 抗原検出キットに関して、国内標準感度パネル作製の準備が進められると同時に genotype 測定の重要性が示されそのための標準品作製が試みられた。また目的に対応した診断キットの使い方が整理され共通認識を得た。また医療機関での各キットの使用状況が明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H.Yoshida, Y.Imafuku, T.Nagai. Matrix effects in clinical immunoassays and the effect of preheating and cooling analytical samples. *Clin Chem Lab Med.* **42**, 51-56, 2004
- (2) 中島節子、海野幸子、加藤宏幸、田代真人、木添和博、濱野雅子、三春範夫「風疹のワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子構造の比較」病原微生物検出情報24、9-10、2003
- (3) 加藤宏幸、海野幸子「妊婦の風疹感染診断における抗体測定の実況と限界」臨床病理 51、263-267、2003
- (4) 川名 尚「新世紀の感染症学—ゲノム・グローバル時代の感染症アップデート—IV. 感染症持論『母子感染』」日本臨床61、297-302、2003
- (5) 川名 尚「OB/GYNウイルス感染症—外来診療マニュアル2003—『産婦人科医のためのウイルス学入門』」産婦人科の実際、

817-825、2003

- (6) 吉田 浩「風疹ウイルス抗体測定の実状と問題」検査と技術31、1253-1254、2003
- (7) Moriya, K., Shintani, Y., Fujie, H., Miyoshi, H., Tatsumi, T., Yotsuyanagi, H., Iino, S., Kimura, S., Koike, K. Serumlipid profile of patients with genotype 1b hepatitis C viral infection in Japan. *Hepatol. Res.* **25**: 371-376, 2003
- (8) Okuse, C., Yotsuyanagi, H., Okazaki, T., Yasuda, K., Fujioka, T., Tomoe, M., Hashizume, K., Hayashi, T., Suzuki, M., Iwabuchi, S., Nagai, T., Iino, S. Detection, using a novel method, of a high prevalence of cryoglobulinemia in persistent hepatitis C virus infection. *Hepatol. Res.***27**: 18-22, 2003
- (9) Iino S. Prevention of and measures against needlestick accidents. *JMAJ* **46**: 156-160, 2003
- (10) 多屋馨子、岡部信彦：風疹抗体の最新動向とワクチン接種. 日本医事新報. 4144. 17-23. 2003

2. 学会発表

- (1) 海野幸子、加藤宏幸、田代真人、中島節子「風疹ワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子配列及び抗原性の比較」第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年
- (2) 川名 尚「風疹ワクチンの今日的課題」第 44 回日本母性衛生学会、2003 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品等医療技術リスク評価研究事業)
分担研究報告書

品質管理のための国内標準パネル血清の作製に関する調査・研究

主任研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所・免疫部長

研究要旨

日本で使用される体外診断薬キットの品質管理には国内で作製された標準品、標準パネル血清が必要であるが整備はされていない。整備に向けて解決すべき問題点の整理分析を行った。この結果、実施のためには、①恒常的な多量の正常及び感染者血清の収集、②多数の収集血清のウィルス量、抗体価等の測定③データシート^③の作製、④管理保存、⑤的確な分与システムが必要であることが考察された。実施には各界の協力体制が必要で、特に血清収集については解決すべきことが多い。

A. はじめに

現在、体外診断用医薬品については血液型判定用抗体基準収載品、輸血に関するもの(HBV、HCV、HDV、HIV、HTLV)、公衆衛生上特に重要なもの(HAV、風疹ウィルス、クラミジア・トラコマティス)及び行政当局が必要と認めるものに関して国立感染症研究所へ試験が依頼されている。依頼試験を含む診断薬の品質管理において、日本人由来のパネル血清を用いた感度と特異性試験が望ましいが、現状では多くの場合米国BBI社のパネル血清の補充で検査を実施することが多い。本研究では国内での標準パネル血清整備に必要なファクターを抽出し実行案を考察する。

B. 研究方法

これまでの体外診断用医薬品依頼検査の過程で得られた主要問題点を整理分析し、また各

分野の専門家の意見を伺い実現可能なシステムについて考察した。

C. 研究結果・考察

現在体外診断用医薬品検査の対象となる風疹、HBV、HCV、HIV感染者からの血液の入手に関しては量と恒常性が問題とされ、またプライバシーの保護を必要とする。風疹に関しては本班において浅野喜造分担研究者及び庵原俊昭研究協力者が中心となり血液収集システムが整備されつつある。このシステムでは専門医師を中心とした協力体制が必要となるが恐らく血清の収集量は多くは望めない。但し、日本で使用されている風疹のキット数は少なく、量的な面で大きな問題とならないことが予想される。一方、HBs抗原、HCV抗体、HIV抗体体外診断医薬品国内標準パネル血清作製については日本での使用キットの種類や測定実施機関が

多いことから、標準パネル作製には大量の血液(200ml程度)を必要とする。この実施の方策が主要課題となる。

標準パネル血清の作製は一過性ではあるが専門家による多大な作業を必要とする。この作業の場として感染研が1つの候補として考えられるが、感染研内での論議が必要である。適切な情報を載せた添付書類の作製が必要で、この際BBIが行っているように、利用者の安全確保のため、複合感染の有無のチェックを行うことが必要である(例えばHBs抗原測定用標準パネル血清についてはHIV感染の有無等)。また標準パネル作製にあたって測定に使用する複数のキットの選択をどのような基準で考慮するか必要であり、ここでは日本臨床検査薬協会との協力実施が必要であろう。作製されたパネル血清の保存場所には候補として感染研が考えられる。管理と分与にあたっては的確で公平な実施が必要で、1つの案としては厚生労働省審査管理課、感染研、大学、厚生労働省他研究機関を含む複数の委員より構成される委員会形式で分与依頼の審査と許可を行うことが考えられる。分与を有償にし、本システムの運営維持を賄うことは可能であろう。

[謝辞]

本研究において種々御助言をいただいた飯野四郎先生、吉澤浩司先生、浅野喜造先生、庵原俊昭先生、海野幸子先生に感謝致します。

D. 結論

日本で使用される体外診断薬キットの品質管

理には国内で作製された標準品、標準パネル血清が必要である。このため①恒常的な多量の正常及び感染者血清の入手、②入手した血清についてウィルス、抗体価抗原量等の測定とデータシート作製の作製、③管理保存、④適切な分与システムが必要である。このシステム整備には各界の協力体制が必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

風疹抗体診断キットの国内標準品の作製と評価

分担研究者 海野幸子

協力研究者 堀内善信 加藤宏幸 大槻紀之

研究要旨

風疹抗体価の表示の統一をはかるために、風疹 IgG 及び IgM 抗体測定用の国内標準品候補を作製した。それらの EIA、HI、中和抗体価を測定し、WHO の国際標準品に対する相対抗体価を算出すると、IgG 抗体測定用国内標準品候補の相対抗体価はいずれの方法でも誤差の範囲で良く一致していた。それらの加重平均からその相対抗体価は 90.9 IU/ml と推定された。このことから、EIA、HI、中和のどの方法でも国際標準品に対する相対比較による測定を行うことにより、共通の抗体価が得られることが示された。IgM 抗体価の単位は世界的にも統一されていない為、IgM 抗体測定用国内標準品の単位表示については更に検討が必要であった。

A. 研究目的

近年、風疹抗体の測定法として酵素抗体法（EIA）が普及するようになり、従来の赤血球凝集阻止（HI）抗体価と EIA による抗体価の相関性に関する情報が求められている。また、抗体測定キットによって抗体価の表示が異なるために、得られた抗体価の比較を難しくしている。異なる方法や施設で測定された風疹抗体価を統一的に評価するためには、抗体価表示を統一し、HI 抗体価と EIA 抗体価の相関する範囲、キットの特性等が明らかにされる必要がある。そこで、抗体価表示

の統一をはかることを目的に国際標準品に準拠した国内標準品候補を作製した。

B. 研究方法

風疹の既往歴のあるヒト血清を集めて IgG 抗体測定のための国内標準品候補（JPN'03）とし、風疹に自然感染した発症 2 週後の成人血清を集めて IgM 抗体測定用国内標準品候補（IgM-JPN'03）を作製した。国際標準品として WHO の RUBI-1-94（800 IU/ml）を用いた。EIA 抗体価はデンカ生研キットを用いて測定し、Bioassay Assist の平行定量法による

解析から WHO 標準品に対する相対抗体価を算定した。HI 抗体価測定法はデンカ生研の HA 抗原を用いて、感染症流行予測調査事業検査術式に従った。血清の希釈は 2 倍希釈と誤差の観察を容易にするために 1.2 倍希釈を行った。中和抗体は、2003 年に分離された野外風疹ウイルスを用いてプラーク法で測定した。試験内及び試験毎の誤差を考慮するために、全ての抗体測定法で試料の独立した 3 希釈列を用い、繰り返し 3 回の試験結果を統計解析した。

国内標準品作製に用いた血清は、血清提供者に使用目的とその意義及び使用の際に血清の個人情報情報を明らかにしないことについて十分な説明を行い、書面をもってその使用が承諾されたものである。

C. 研究結果

JPN'03 の抗体価

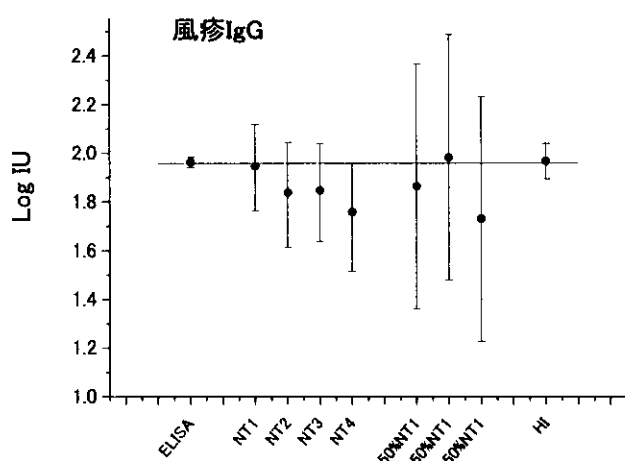
EIA による IgG 抗体価：誤差因として、当面希釈時の誤差および測定時の秤量を含む誤差を取り上げて評価することとし、3 回の実験でそれぞれ独立 3 希釈系列で各 7 用量について測定を行った。結果は用量、測定値ともに対数変換し、分散分析を行い、結果を表に示した。まず独立

風疹 IgG				
要因	平方和	自由度	平均平方和	F
検体間	0.0302	3	0.0101	9.532
回帰	6.4158	3	2.1386	2024.913
平行性	0.0002	3	0.0001	0.047
直線性	0.0136	12	0.0011	1.072
実験内用量間	6.4597	21	0.3076	291.254
実験内誤差	0.0507	48	0.0011	
実験間	0.0347	2	0.0174	16.429
検体間	0.0196	1	0.0196	12.315
回帰	6.4114	1	6.4114	4022.711
平行性	0.0001	1	0.0001	0.049
直線性	0.0120	4	0.0030	1.879
用量間	6.4431	7	0.9204	577.513
誤差	0.1020	64	0.0016	
合計	6.5451	71		

3 回の実験成績について評価したところ、各実験内の残差を誤差とした場合、実験間で有意に差があるという結果となった。すなわち考慮した要因以外に結果に影響する変動因がある可能性が示唆されたことから、3 回の実験で得られた各用量計 9 個の測定値をそれぞれ繰り返し測定値として分析をやり直した。その結果誤差は 0.0016 と推定され、当面この値を誤差の母推定値として平行線定量法による解析に用いることにした。その結果、IgG について WHO 標準品に対する国内標準品候補の抗体価は 91.8 IU/ml と算定された。中和抗体価：WHO 標準品および国内標準品候補の 2 倍階段希釈による 6~7 用量についてプラーク法による中和活性を測定した。対照ウイルスによるプラーク数を 100% として % に変換し、対数用量に対する中和直線を求め、平行線定量法による国内標準品候補の WHO 標準品に対する相対抗体価を求めた。この場合実測値は実験毎に異なることから、各実験独立に相対抗体価を算定した。一方、50% プラーク抑制を示す血清希釈の逆数で表した中和抗体価の平均値は $2^{5.1}$ となり、その値から算出した相対抗体価は平行線定量法で算出された相対抗体価と良く一致した。HI 抗体価：HI についても同様に繰り返し測定を行った。1.2 倍間隔の 4 独立階段希釈系列を測定して得た平均 HI 価は $2^{7.5}$ となった。

全ての結果より共通分散を算定し、誤差

の推定に用いた。こうして得られた結果から、加重平均により WHO 標準品に対する国内標準品候補の抗体価を計算した。図に示すように、EIA、中和、HI 何れによる測定値も、誤差の範囲でよく一致していた。国内標準品の抗体価は 90.9(86.9 - 95.1) IU/ml と推定された。



IgM-JPN'03 についても同様に WHO 標準品に対する相対抗体価を算出したが、JPN'03 と異なり、EIA、中和、HI でそれぞれ異なる結果となった。それはこの血清に IgG 抗体が混在しているためと考えられ、IgM-JPN'03 の相対抗体価については、更に検討を要した。

D. 考察

JPN'03 に含まれる IgG 抗体は WHO 標準品と同質であることが推測された。このような IgG 抗体については、EIA、中和、HI の何れでも標準品との相対比較による測定を行うことにより、共通の抗体価

(IU) 表示が可能であることが示された。このことがどのような血清にも応用できるのか、更に多種の血清の抗体価を測定して確認する必要がある。今回の結果をもとに、従来防御抗体レベルとされていた HI 価と EIA および中和価との関連付けが可能となるものと考えられる。

IgM 抗体測定用国内標準品の抗体価表示については、標準品として IgM 抗体の精製の必要性も合わせて、更に検討が必要であった。

E. 結論

JPN'03 は、EIA、HI、中和、何れの抗体測定法においても IgG 抗体測定用の国内標準品として用いることができると考えられた。

F. 健康危機情報

風疹は全国的大流行にはならなかったが、地域的流行が繰り返されている。臨床現場から保有 IgM 抗体価から風疹感染を疑われた妊婦の 29 症例で胎児への感染の危険性に関して相談があった。また、1 名の先天性風疹症候群の発生が報告されている (感染症発生動向調査)。

G. 研究発表

1. 論文発表

中島節子、海野幸子、加藤宏幸、田代真人、木添和博、濱野雅子、三春範夫 風疹のワクチン株と現在流行している野生株の遺伝子

構造の比較 病原微生物検出情報 24: 9-10,
2003

加藤茂孝、海野幸子 妊婦の風疹感染診
断における抗体測定の見況と限界 臨床
病理、51: 263-267. 2003

2. 学会発表

海野幸子、加藤宏幸、田代真人、中島節
子 風疹ワクチン株と現在流行している
野生株の遺伝子配列及び抗原性の比較
日本ウイルス学会第 51 回学術集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし