

図3 自由記述の内容

＜風疹抗体測定の実施について＞

- ・ 風疹予防接種の重要性及び先天性風疹症候群の発症防止等について国から通知が発出されているところであり、また地元医師会も同様の意見である。本自治体としては、主管課が広報媒体を活用し住民への啓発や情報提供に努めている。当所では検査体制は整っている。
- ・ 検査対象者の抽出と協力の問題や検査担当者の人数の問題があり、現在のところ実施予定は(保健所側も含め)ありません。
- ・ インフォームドコンセントを受けることが困難であるため、一般住民の血清疫学調査を行なうことは困難であり、国レベルでの何らかの対策を必要とする。
- ・ 健康診断で若い女性に風疹検査を実施すれば、妊娠しても不安な思いをせずにすむのではないか。
- ・ 近年、依頼件数が激減しているため検査の外注化を検討しているが、風疹の地域的流行など発生動向を見ながら、検査対応が必要な場合は検査を実施する事にしている。
- ・ 保健所からの依頼検査が年に1、2件程度と減少し、検査キットを購入しても殆どの試薬が無駄になっていたため現在では実施していない。来年度は保健所の一般健康診断が廃止の方向で検討されていることや民間検査機関で実施できる項目であるので、今後も風疹検査を実施する機会はないと思われる。
- ・ 平成16年4月から県として正式に風疹抗体検査の廃止を行った。今後の再開等の予定は未定。
- ・ 他の検査と比べて煩雑なので、出来ればやめたい。
- ・ 当所では行政的に要請されたことがないため、これまでに実施した実績はありません。

＜風疹抗体測定における問題点等について＞

- ・ 流行時には、動向把握のため、即刻勉強会、研修会等を開催して頂きたいと考えています。
- ・ 風疹も麻疹 PA 抗体検査のようなキットが開発されれば、地域による誤差も少なく比較しやすい結果が得られるのではないかとと思われる。
- ・ 検査に使用しているデンカ生研のキットは、試験操作が煩雑で操作をよく間違えます。PA 法等のより簡便な方法が開発される事を望みます。
- ・ 当所では従来から血清前処理にアセトン法を用いている。この方法はカオリン処理に比べて操作の繁雑さが少なく多量の検体処理が可能です。

＜抗体価の表記統一について＞

- ・ HI 法、ELISA 法の抗体価の表記の統一が必要である。
- ・ 測定法の統一は、比較のため当然必要です。是非お願いします。
- ・ CRS という重大な問題に関わる可能性を考えると、風疹抗体検査の精度管理、抗体価の表記統一は必要であると思う。
- ・ 産婦人科等から ELISA 法による IgM の測定結果について解釈を聞かれることがあったが、詳しい情報があれば知りたい。
- ・ 当所では妊娠前の女性を対象に単一血清による風疹 HI 抗体検査を実施しているが、被験者が知りたいのは CRS 発生危害の有無であり、それには抗体の陰性、陽性判定及び陽性の際の HI 抗体価の高低から推測するしか無い。検査法が統一されていない現在、異なる検査法による風疹抗体測定値の統一表記はその一助になると思います。
- ・ 異なる検査法での抗体価を統一することは、感染防御抗体レベルを考えると困難ではないか。低抗体価の再感染率が問題となっている。早期に各検査法での感染防御抗体レベルを明確にして欲しい。
- ・ 検査法は、同じ HI 試験を行っても条件が違えば結果は1、2管の差が出るので、表記だけ統一しても意味が無いと思われます。検査法を統一する必要があります。

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

「風疹抗体検出キットの品質管理に関する研究」

分担研究者 多屋馨子（国立感染症研究所・感染症情報センター）

研究協力者 佐藤 弘（国立感染症研究所・感染症情報センター）

研究要旨 風疹の抗体測定方法として、従来、赤血球凝集抑制試験（HI法）が多く用いられてきたが、近年、酵素免疫法（EIA法）やラテックス凝集比濁法（LA法）の普及により、抗体価の表示法は様々になってきている。本調査では、各方法による測定結果の相関性について比較・検討した。合計469検体の血清を用いて測定を行った結果、HI法とEIA法、HI法とLA法には正の相関が認められた。各方法の抗体陽性率に差はみられなかったが（85.7%）、EIA法及びLA法におけるHI法を基準とした陽性/陰性判定の一致率は98.5～99.6%であり、陽性的中率（PPV）も99.8～100.0%と高かった。また、最近の知見ではHI抗体価1:8及び1:16は発症を予防できる抗体価の目安としては低いとみなされていることから、HI抗体価1:32以上を陽性とした場合の各方法におけるPPVを算出した。さらにHI抗体価1:64以上、1:128以上、1:256以上についても同様にPPVを算出した。99.0%以上のPPVを示す測定値を各方法においてそれぞれのHI抗体価に相当する目安とした。2003年から2004年にかけて風疹の地域流行がみられ、先天性風疹症候群は2004年10例が報告されており、また、風疹の流行は数年続くことが予想されることから、本調査においてHI法と相関性、一致率、PPVの高かったEIA法及びLA法がHI法とともに風疹感受性者対策等に有効な手段となると考えられる。さらに、抗体価の表示においてEIA法やLA法でHI抗体価に相当する目安の測定値が設定されたことは、医療従事者にとっても非常に有用であると考えられる。

A. 研究目的

風疹抗体の測定方法としては、従来、赤血球凝集抑制試験（HI法）が一般的であり、抗体価の表示はHI価（血清希釈倍数）であることが多く、感染の有無あるいは感受性者検索等の目安とされてきた。近年、酵素免疫法（EIA法）による測定が普及し、吸光度の比（IgG index）や国際単位（IU/ml）での表示が多くなってきている。前年度の調査でHI法とEIA法（デンカ生研製キット使用）の成績に高い一致率

（99.6%）及び相関性（相関係数：0.928）が認められ、定性試験においてはどちらの測定方法も同様に有用であることが確認された。

本年度はさらに他社製品を用いたEIA法及びラテックス比濁法（LA法）による抗体測定を行い、HI法との相関性について以前実施したEIA法とあわせて比較・検討した。

B. 研究方法

2003年10月に採取された医科系大学の学生

及び同大学附属病院の研修医の血清，計 469 検体を調査材料とした。風疹抗体の測定は，EIA 法及び LA 法ともに市販の風疹抗体測定キット（EIA：Dade Behring，LA：極東製薬）を用い，それぞれ添付文書に従い行った。判定は，EIA 法で吸光度 >0.2 ，LA 法で抗体価 ≥ 10 IU/ml を風疹抗体陽性とした [HI 法は抗体価 $\geq 1:8$ ，EIA 法（デンカ生研）は IgG index ≥ 1.0 を陽性と判定]。

C. 研究結果

調査対象となった学生及び研修医の内訳は男性 361 名，女性 108 名であり，年齢分布は 18～30 歳（中央値 23 歳）であった。各法の相関性は，HI と EIA-デンカ（相関係数：0.928），HI と EIA-Dade（0.900），HI と LA（0.659）のそれぞれで相関が認められた。抗体陽性率は HI 法，EIA 法で 85.7%（402/469），LA 法で 85.3%（400/469）であった。HI 法を基準とした場合の陽性/陰性判定の一致率は，測定方法により判定が不一致であった検体もあり，EIA-デンカ：99.6%，EIA-Dade：98.5%，LA：99.6%であった。また，EIA 法あるいは LA 法で陽性と判定された検体が HI 法でも陽性である確率をあらわした陽性的中率（PPV）は，EIA-デンカ：99.8%，EIA-Dade：100.0%，LA：100.0%であった。さらに，EIA 法及び LA 法において 95.0%以上の PPV で HI 価 $\geq 1:16$ から $\geq 1:256$ に相当する目安となる測定値を表 1 に示した。

表 1 HI 価を基準とした場合に他法において目安となる測定値（PPV $\geq 95.0\%$ ）

HI 抗体価	EIA-デンカ	EIA-Dade		LA
	吸光度比 IgG index	吸光度 Δ Abs.	抗体価 * IU/ml	抗体価 IU/ml
$\geq 1:16$	≥ 1.0	≥ 0.2	≥ 10	≥ 10
$\geq 1:32$	≥ 2.5	≥ 0.5	≥ 30	≥ 20
$\geq 1:64$	≥ 4.5	≥ 0.9	≥ 60	≥ 60
$\geq 1:128$	≥ 6.0	≥ 1.5	≥ 170	≥ 170
$\geq 1:256$	≥ 6.5	≥ 1.7	≥ 250	≥ 310

* 添付文書に従い算出した抗体価

D. 考察

本調査において，EIA 法及び LA 法は HI 法と比較してそれぞれ相関性が認められ，一致率及び PPV ともに非常に高く，風疹の抗体測定方法として，各法の結果に差はないと考えられる。

現在，様々な抗体測定方法が普及しており，その表示方法も様々である。風疹においては，従来，HI 法による抗体価の表示が免疫状況を検討する上で一般的であったが，本調査において EIA 法及び LA 法の成績から HI 価に相当する測定値の目安が得られた。風疹は 2003 年から 2004 年にかけて地域流行がみられ，先天性風疹症候群は 2004 年 10 例が報告されている。また，これまでの流行のパターンから風疹の流行は数年続くことが予想され，今後の感受性者対策に際し，一度に多数の検体を測定できる EIA 法及び LA 法は有効な手段となりうる。調査に用いた検体のほとんどは 23 歳を中央値とする若年成人の血清であり，また風疹の既往歴やワ

クチン接種歴を考慮した検討も必要であるが、EIA 法及び LA 法における測定値の目安は、感染や既往の有無を判定する上でも有効に活用されうると考えられる。

E. 結論

風疹の抗体測定を赤血球凝集抑制試験 (HI 法)、および酵素免疫法 (EIA 法)、ラテックス凝集比濁法 (LA 法) で行い、結果の相関性について比較・検討した。HI 法を基準とした場合、他法の相関性、一致率、陽性的中率はともに高く、いずれの方法を用いても結果に差はないものと考えられる。また、HI 価 $\geq 1:16 \sim \geq 1:256$ に相当する測定値の目安が得られ、それらは今後、風疹の抗体測定による判定を行なう上で非常に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (著書を含む)

- 1) 多屋馨子: 風疹(三日ばしか). pp 2699-270. 家庭医学大全科. 監修 高久史麿、猿田享男、北村惣一郎、福井次矢. 株式会社法研. 東京. 2004. 10.
- 2) 多屋馨子: 能動免疫と受動免疫 (翻訳) pp1-53. R-Book2003. 日本版. 小児感染症の手引き. 監修 岡部信彦. 日本小児医事出版社. 東京. 2004. 10.
- 3) 風疹流行にともなう母児感染の予防対策構築に関する研究 (班長: 平原史樹横浜市立大学大学院医学研究科教授) 班: 風疹流行および先天性風疹症候群の発生抑制に関する緊急提言. 2004. 8.
- 4) 多屋馨子: 予防接種の現状と問題点 定期接種 副反応. 小児看護. 27(12);1609-1615, 2004.
- 5) 多屋馨子: わが国の麻疹・風疹の現状と対策 この秋にぜひ風疹ワクチンを. 臨床と微生物. 31(5); 446-447, 2004.
- 6) 多屋馨子: 医療関係者に対する予防接種. 総合臨床. 53(6); 1886-1890, 2004
- 7) 多屋馨子: わが国の風疹の現状と対策. LABEAM, 2004

2. 学会発表

- 1) 多屋馨子: ワクチンに関する最近の話題予防接種の最新情報と vaccine preventable disease の国内発生状況. 第 45 回日本臨床ウイルス学会 (2004 年 6 月, 大阪)
- 2) 佐藤 弘, 多屋馨子, 逸見佳美, 新井 智, 砂川富正, 大山卓昭, 岡部信彦: 医科大学の医学生および研修医における風疹・麻疹の抗体調査. 第 45 回日本臨床ウイルス学会 (2004 年 6 月, 大阪)
- 3) 逸見佳美, 砂川富正, 大山卓昭, 佐藤弘, 多屋馨子, 岡部信彦: 防衛医科大学校の医学生(1-6 年)および研修医に対して行ったワクチン予防可能疾患(風疹・麻疹)の既往歴・接種歴の認識等に関する調査: 第 45 回日本臨床ウイルス学会(2004 年 6 月, 大阪)
- 4) 多屋馨子, 新井智, 佐藤弘, 荒木和子, 岡部信彦, 担当都道府県ならびに都道府県衛生研究所: 感染症流行予測調査事業より得られた近年の年齢別麻疹, 風疹, MMR ワクチン接種状況. 第 8 回日本ワクチン学会 (2004 年 10 月, 札幌)
- 5) 上野正浩, 中島一敏, 砂川富正, 大山卓昭, 多田有希, 多屋馨子: 1999 年 4 月以降の感染症サーベイランス施行後における先天性風疹症候群の状況. 第 8 回日本ワクチン学会

(2004年10月、札幌)

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

分担研究報告書

IgM クラス抗風疹抗体測定系の評価と健常人・高齢者での抗体検出と
ワクチン投与後の抗体の推移

分担研究者 吉田 浩 福島県立医大 臨床検査医学・教授

研究要旨

IgM クラス抗風疹抗体の検出が長期にわたることについて、測定系の感度等との関連の可能性が指摘された。前年は本邦で用いられている ELISA キットについて対比検討を行った。今年は基礎検討として、コントロール血清、キットの測定精度および風疹ワクチンによる抑制試験を行った。コントロール血清は種々成分のものが用いられ、また、本邦で用いられているワクチンによる抑制は見られなかった。臨床検討として、健常人および高齢者での抗体頻度とワクチン接種後の抗体推移、さらに陽性化血清についての使用ワクチンによる抑制反応を試みた。高齢者では抗体の低値傾向が見られたが、高値例もみられた。ワクチンは抗体陰性者 4 名と弱陽性者 (IgG,HI) 5 名に接種した。陰性者中、2 名は接種後、3 週間後から 8 週までの観察期間中、IgM・と IgG・抗体価が上昇した。他の 2 名の抗体価は陰性域であった。IgG 抗体と HI 法陽性者では IgM 抗体はいずれも産生されず、IgG 抗体価上昇も明らかとはいえない。ワクチン接種後の IgM 抗体陽性血清の同一ワクチンによる抑制を試みたが明らかでなく、原因解明が必要である。抗体陰性例ではワクチン接種にて抗体産生の軽度な例があり、ワクチン接種後の抗体測定が必要である。

A. 研究目的

IgM クラス(-)抗風疹抗体(IgM・風疹抗体)測定系の基礎的検討と同抗体が長期間持続する実態を解析するため、臨床的検討を行った。

基礎的検討として、IgM-抗風疹抗体測定キットの精度について検討し、併せ本邦で用いられている風疹ワクチンとの反応性を検討した。臨床的検討として、健常人および高齢者における

IgM・抗体の検出と IgG・抗体との関連、ワクチン接種後の抗体の推移および陽性化血清中の抗体とワクチンとの反応を検討した。

B. 研究方法

IgM-抗体測定用 ELISA はデンカ生研(DS)、バイオラド(BD)、ピオメリュー(BM)、デイドベーリング (DB)、ロシュ(RO)社製品である。今回、主に用いたのは DS 社のもので、IgM-

と IgG-抗体用 ELISA と HI 法試薬を用いた。汎用機での測定は極東製薬社試薬を用い、日立 7600 にて測定した。

風疹ワクチンは阪大微研(松浦株)、タケダ薬品(TO-336 株)、北里研究所(高橋株)および化血研(松葉株)製品を用い基礎的検討を行った。ELISA に用いられた抗原(Baylor 株)はデンカ生研より提供された。陽性血清とワクチンとの反応は陽性コントロール血清を倍々希釈し、各々に接種用に希釈されたワクチンの等量を混合、37°Cに 30 分、さらに室温に 30 分間放置後、IgG 抗体用 ELISA(デンカ生研)にて測定した。また、ワクチン後に陽性化した血清とも同様に反応させ、IgM 抗体用 ELISA にて測定した。

ヒト血清は健常成人 130 例と高齢者(80 歳以上)23 例から採取し、使用まで-70°Cに保存し、匿名化して測定した。抗体陰性者の 4 名と弱陽性者の 5 名に阪大微研製ワクチンを接種し、抗体価の推移をみた。これらのボランティアからは承認書を得た。また、福島医大倫理委員会の承認も得て実施した。

C. 研究結果

1) 基礎検討

各社キット中のコントロール血清についての電気泳動パターンを図 1 に示す。DS 社コントロールは陽性と陰性のいずれも希釈されたものでグロブリン域が染色されない。BR と BM 社陽性コントロールは患者血清と思われる。一方、DB と RO 社陽性コントロールはアルブミンのみ強く染色され、特に後者は移動度の変化から動物アルブミンが加えられているよう。

IgM 測定用 ELISA の精度について、直線性は 5 種のコントロール血清について検討し、類似のパターンが示された。日差再現性は弱陽性コントロールでの CV は 15%(n=7)、強陽性コントロールでの CV は 30.0%(n=7)とやや大きかった。IgG-陽性コントロール血清とワクチンとの反応を抑制試験を用いて検討した。ELISA に用いられた Baylor 株抗原では抑制がみられたが、ワクチンによる抑制はいずれも明らかではなかった(表 1)。

2) 健常人血清および高齢者患者血清中抗体
IgG-抗風疹抗体(ELISA)と HI 法による健常成人 130 例および 80 歳以上(平均 83.4 歳)23 例血清の検討で陰性は前者で 121 例(9.2%)、後者で 1 例のみ(4.2%)であった。IgG 抗体陽性例中、IgM 抗体陽性～境界値は 2 例にみられ、0.5 以上は 4 例にみられた(表 2)。ほとんどの例は 0.2 以下である。高齢者群では青年群に比し低下傾向がみられたが、HI 法で 128 倍以上の高値例もみられた。

3) 風疹ワクチン接種後の抗体産生

IgG 抗体又は HI 抗体が陰性の 4 例および弱陽性の 5 例にワクチン接種を行った。図 2 の如く、陰性群の中で、2 例(症例 1 と 2)は 3 週時より 8 週後迄陽性を示したが、症例 3 と 4 はいずれも陰性(1.2 以下)であった。8 週以降は観察予定である。IgG 抗体産生も同様で、前者では 3 週目から上昇が認められ、後者では陽性域とならなかった。抗体陽性群の 5 例では、いずれも IgM-抗体価上昇はみられず、IgG 抗体価の上昇も明らかとは言えなかった。症例 1 の IgM 陽性検体を用い、免疫に用いたワクチンとの反応

性を検討したが、明らかな抑制は認められなかった。

D. 考察

風疹抗体測定法の中で IgM-抗体測定は高感度で特異性の高い immunocapture 法が中心となっている。本邦でも DB 社以外は immunocapture 法であるが、血清希釈は 20 倍～200 倍と種々である。陽性コントロールの電気泳動パターンをみても、各社で用いるコントロールの内容は様々であろう。同一キットを用いて経過をみることは問題ないと思われるが、他キットでの測定値の評価は、前年度も報告したが、注意すべきであろう。基準となる IgM-抗風疹抗体作成が進行中であるが、とりあえず、国内で早急に利用できることをお願いしたい。

IgM クラスのウイルス抗体は数ヶ月で検出感度以下になるとの一般的認識に対し、IgM-抗体が風疹ウイルス感染後、長時間持続する例がある。この機序については不明なことが多いが、本抗体の診断的意義については妊婦のみならず産科医にとっても重大なことである。IgG-抗体または HI 法での健常人の陽性頻度は約 90%で、それらの IgM-抗体指数は 0.2 以下を示すものが多い。しかし抗体指数が 1.0 以上を示したのが 2 例見出された。いずれも病院勤務者で、近年、風疹に罹患したと思われる自他覚所見はみられない。また、陰性者 4 名にワクチンを接種し、抗体の推移を観察中であるが、8W 後迄の観察で、2 例は陽性化した。他の 2 例は陰性のままである。IgM-抗体と IgG-抗体のいずれも、接種 3 週間後より検出された。一方、(弱)陽性者への接種では IgM-抗体価の上昇は

みられず、IgG 抗体価についても上昇は明らかでなく、ブースター効果があるとは考えられない。

一般にワクチンが集団的に接種される場合、血中抗体測定は行われず、妊娠可能女性や妊婦に限られている。これらでの抗体陰性者には接種が行われる。昨夏の通達で、医療従事者や医療系学生は風疹、水痘、流行性耳下腺炎のウイルスに対する抗体を保有することが求められた。施設によっては一律にワクチン接種を行うことも考えられているが、これらワクチン接種は抗体陰性者に限るべきであろう。今日の検討で 20 歳台女性でワクチン接種後も抗体産生が軽微で陽性域に達しない例が見出された。このような low～poor responder が 1～2%に存在するものと思われる。この機序解明の研究も必要であるが、それらの方々への対応も検討しなければならない。ワクチンをしたのに先天性風疹症候群児の出生例については、当該女性では抗体産生が低かった可能性も考えられる。このことから、抗体陰性の女性ではワクチン接種後に抗体産生の有無を確認する必要がある。

E. 結論

1) 各社コントロールの蛋白分画パターンは種々である。

2) 健常人での抗風疹抗体(IgG、HI 法)陽性率は約 90%で、これらの中に IgM-抗体指数が 1.0 以上の例が 2 例見出された。

3) 風疹抗体陰性者へのワクチン接種で、4 例中 2 例は IgG と IgM 抗体が陽性化した。他の 2 例は陰性域にとどまった。5 例の抗体陽性者への接種で IgG 抗体の産生増強は明らか

でなかった。

4) 風疹ワクチンは抗体陰性者に限り接種されるべきであり、接種後の抗体価確認も必要であろう。

F. 健康危険情報

風疹ワクチンは抗体陰性者に接種すべきであり、陰性者では接種後の抗体測定による確認が必要であろう。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

吉田 浩、海野 幸子、高木 康、河合 忠：
風疹抗体測定キットの対比検討 臨床
病理 52(補)：269、2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 抗風疹抗体—吸収試験成績

	Buffer	デンカ生研抗原	ワクチン			
			微研	武田	化血研	北里
強陽性コントロール						
1:1	0.89*	0.03	0.85	0.80	0.75	0.72
1:2	0.56	0.01	0.55	0.53	0.48	0.47
1:4	0.31	0.01	0.31	0.30	0.26	0.26
1:16	0.10	0.01	0.09	0.08	0.07	0.07
1:64	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02
Buffer	0.01					

*OD

表2 IgM - 抗風疹抗体価(AI) 0.5 以上例
(健常成人)

	性別	年齢	IgM-AI ¹	IgG-AI ²	HI(倍) ³
1	女	30	1.63	2.82	32
2	女	44	1.05	4.70	128
3	女	35	0.59	5.01	128
4	女	48	0.59	5.94	256
5	女	73	0.53	4.70	128

¹陽性>1.2
陰性<0.8

²陽性≥1.0
陰性<0.5

³陽性≥8

図1 コントロールの電気泳動図

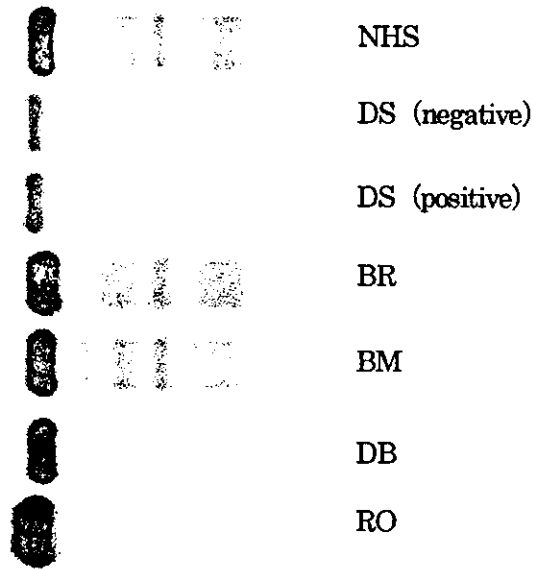
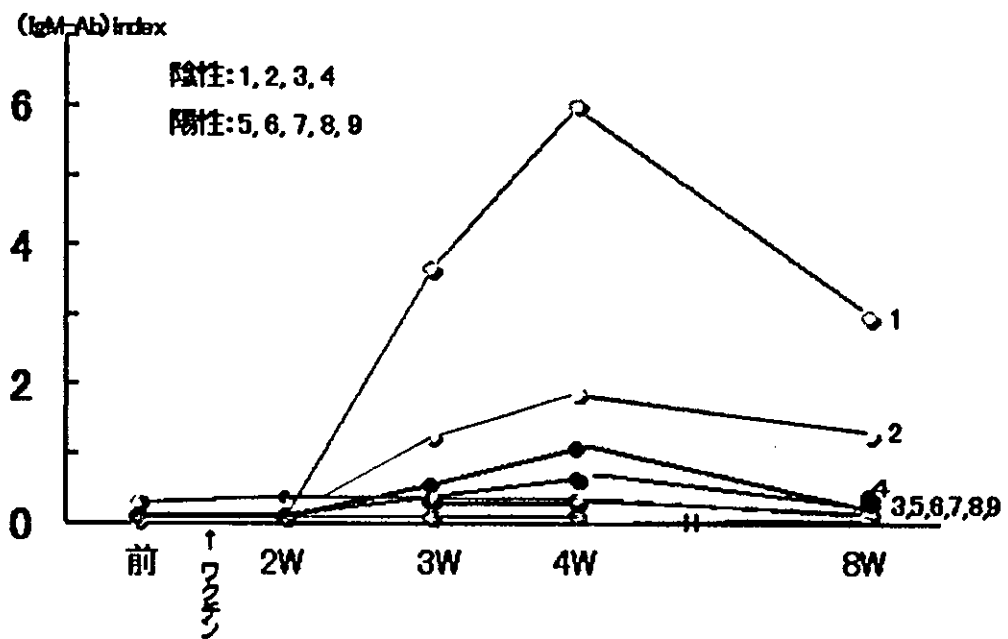


図2 抗風疹抗体(IgG,HI法)陰性例, 弱陽性例へのワクチン接種前後のIgM抗体価推移



追記 本稿は、平成 15 年 9～10 月、2812 施設を対象に実施された日本医師会精度管理調査の中で行われた風疹抗体測定に関する調査成績である。竹森班の研究協力者として河合 忠、西島 英則の両先生が参加されており、調査の実際は高木 康先生(昭和大医学部教授)が担当した。貴重な資料であり、日本医師会精度管理委員会の了承を得て第 37 回臨床検査精度管理調査結果報告書(平成 15 年度、日本医師会) p.114 - 116、より転載させていただいた。(吉田 浩 記)

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

「風疹抗体価測定に関するアンケート結果」

研究協力者 河合 忠 (国際臨床病理センター所長)
(平成15年度) 西島 英利 (日本医師会常任理事)

風疹ウイルス抗体の検索は、急性の発疹性疾患の確定診断に重要であるばかりでなく、妊娠初期の妊婦が感染した場合高頻度に発症する先天性風疹症候群の発症予測を行うための重要な検査として日常的に行われている。しかし、測定法が一定せず、陽性・陰性の判定基準が一定していないことから、産婦人科医師から改善が期待されている。このため、今回、風疹抗体価測定の現状を調査した。

1. 実施施設

回答のあった2,328施設のうち、施設内で風疹抗体価測定を実施している施設はわずか130施設(5.6%)であった(表12)。大学・研修病院でもわずか36施設(10.5%)、登録衛生検査所でも40施設(12.0%)であり、限られた施設が風疹抗体価測定を行っていることが確認された。

2. 実施方法

風疹抗体価の測定法には、赤血球凝集抑制反応(HI)、補体結合反応(CF)、受身血球凝集反応(PHA)、酵素抗体法(ELISA)などがある。それぞれの方法で検査の診断効率が論議されているが、今回の調査では表13に示すごとく、CF法を用いている施設は存在しなかった。最も用いられている方法は、HI法であり、これだけを行っている施設が69施設、HI法とELISA法の両方法を行っている施設が14施設であり、HI法は83施設(63.8%)で用いられている。次に多いのはELISA法であり、IgG抗体のみを測定している施設が6施設、IgGとIgMの2つの抗体価を測定している施設が32施設であった。したがって、IgG抗体をELISA法で測定している施設は38施設(29.2%)である。PHA法は少なく、9施設(6.9%)であった。

3. 半定量試験(HI法とPHA法)に用いられている試薬キット

半定量試験で用いられている試薬キットと外注先で用いられている試薬キットの比較を表14に示した。検査を実施している施設では、79施設(85.9%)がR-HI「生研」(デンカ生研)を使用しており、PHA法であるランピアラテックスRUBELLAを使用しているのは9施設(9.8%)、自家製の試薬でHI法により測定している施設が4施設(4.3%)であった。

外注先の調査ではこの結果と異なる回答であった。すなわち、どこの施設でも実施していないCF法を128施設(8.1%)が外注先での検査法として認識している。外注先での検査法に対する認識不足か、あるいは実施している施設での誤認による乖離と考えられ、外注先との密接な連絡の重要性を示唆しているものと考えられる。

4. 測定項目によるIgG抗体価測定試薬キットの違い

IgG抗体価を測定している施設で使用している試薬キットの違いを表15にまとめた。HI価とIgG&IgM抗体価を測定している施設では、HI価をR-HI「生研」(デンカ生研)で行ったため、IgG&IgM抗体価もルベラEIA「生研」(デンカ生研)を用いている施設が全14施設中12施設(85.7%;抗体価測定を行っている全52施設の23.1%)であるが、IgG&IgM抗体価だけを測定している施設では、エンザイグノストB/風疹(デイドベーリング)(16施設30.8%)やバイダスRUB(ピオメリュウ)(22施設42.3%)を使用している施設が多い。

外注先の調査では、HI価測定を依頼しているために、IgG&IgM抗体価もルベラEIA「生研」で検査を行っている結果であった。

5. 判定基準

陽性・陰性の判定基準について表16にまとめた。抗体価の推移とする施設が7施設（5.4%）、抗体価（絶対値）とする施設が111施設（85.4%）である。最も多いのは「×8」であり、HI法では全78施設中67施設（85.9%）がこの値としていた。一方、抗体価を測定している施設では、独自の基準を設定している施設が多く、例えばバイダスでは12施設がメーカー設定のIgG \geq 15 IU/ml、IgM \geq 1.2 IU/mlを基準としていた。また、エンザイグノストB/風疹ではCOIを基準として用いており、 \geq 1.0とする施設が5施設、2.0とする施設が5施設であった。

6. まとめ

今回の調査で、風疹抗体価測定は極めて限られた施設で行われており、また試薬キットを提供しているメーカーもごく限られており、今後施設間の密接な交流を通して標準化への可能性に期待できるとの印象を受けた。しかし、判定基準では同じ試薬キットを使用しているにもかかわらず、基準値が大きく異なっており、これがどこに起因しているかを早急に究明する必要がある。また、臨床医からの要望や苦情については、「結果をHI価で報告してほしい」「妊婦風疹抗体価（判定）保留の考え方」「ワクチン接種時の判定基準」「HI法では陰性者が多くワクチン接種対象者となるためELISA法で測定してほしい」などが挙げられていた。今後、測定の標準化を図ることでこれらが解決されるものと思われる。現在、厚生労働科学研究費による「国際的動向を踏まえた体外診断薬品質管理に関する研究班」が標準化に向けた活動を始めている。

(高木)

表12 風疹抗体価測定実施状況

施設	実施している	実施していない		その他
		外注している	受付していない	
大学・研修病院	36	292	3	11
一般病院	30	1,134	13	41
精神病院・療養所		97	5	6
医師会病院検査センター	20	124		3
登録衛生検査所	40	261	11	22
健診機関	3	58	53	5
その他	1	40	16	3
合計	130	2,006	101	91

表13 実施方法

測定方法	施設数
赤血球凝集抑制反応 (HI価)	69
受身血球凝集反応 (PHA価)	9
IgG抗体価	6
IgG&IgM抗体価	32
HI価とIgG&IgM抗体価	14
合計	130

表14 赤血球凝集抑制反応と受身血球凝集反応

メーカー名	実施施設	外注施設
R-HI「生研」	79	953 (60.4%)
風疹ウイルスCF「生研」		128 (8.1%)
ランピアRUBELLA	9	21 (1.3%)
自家製	4	70 (4.4%)
その他		400 (25.4%)
未回答		5 (0.3%)
合計	92	1,577

表15 測定項目によるIgG抗体価測定試薬の違い

	自施設で実施				外注先
	HI価+IgG&IgM	IgG&IgM	IgG	合計	
ルベラIgG (II) EIA「生研」	12			12	1,308 (83.3%)
エンザイグノストB/風疹	1	14	1	16	54 (3.4%)
バイダスRUBIgG	1	17	4	22	40 (2.5%)
自家製					5 (0.3%)
その他		1	1	2	140 (8.9%)
合計	14	32	6	52	1,547

表16 判定基準

	抗体価の推移		抗体価 (絶対値)										
	×4	×16	×8	×10	×16	×64	IgG≥15 IgM≥1.2	COI≥2.0	COI≥1.0	15IU/ml	その他	未回答	合計
R-HI「生研」	3	1	67		4	1						2	78
ランピアRUBELLA	1		2	4							1	1	9
バイダスRUB			3				12				1	6	22
エンザイグノストB/風疹	1		2					5	5			3	16
自家製	1		2										3
その他										2			2
合計	6	1	76	4	4	1	12	5	5	2	2	12	130

分担研究報告書

HBs 抗原変異と HBs 抗原検出法に関する研究

分担研究者：山口 一成 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

協力研究者：水沢左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

Small HBs 抗原はB型肝炎ウイルス感染の主要マーカーであるが、共通抗原基 a（中和抗体認識部位）に変異を起こした HBs 抗原変異株が分離されるようになって、HBV 感染予防と治療上の問題となっている。診断用 HBs 抗原検出試薬の中にはこのような変異をもった HBs 抗原を検出できない例が報告されており、診断薬の評価のために種々の変異型 HB s 抗原を含むパネルの整備が求められている。本研究では日本で普遍的な subtype adr, genotype C のバックグラウンドに共通抗原基 a の既知の変異である G145R、M133T 及び T123N の 3 種類の変異を *in vitro* mutagenesis 法をもちいて導入し、ヒト細胞株の培養上清に分泌される変異型 HB s 抗原を得た。診断用 HBs 抗原検出試薬の評価系への応用が期待できる。

A. 研究目的

HBs 抗原はB型肝炎ウイルス感染の主要マーカーであるが、HB ワクチン接種や抗 HB s 抗体の投与によって共通抗原基 a（中和抗体認識部位）に変異を起こしたエスケープ変異株が出現することが知られている。また、HBV 持続感染者からも自然経過の中で生じた HBs 抗原変異株が分離されている。ところが、診断用 HBs 抗原検出試薬の中にはこのような変異をもった HBs 抗原を検出できない例のあることが報告されており、診断薬の評価のために種々の変異型 HB s 抗原を含むパネルの整備が求められている。しかし、このような変異型 HB s 抗原を含む血漿は入手が困難であり、容量に限りがあ。そこで、本研究では診断用 HBs 抗原検出試薬の評価のための変異型 HB s 抗原パネルの作製を目的として、*in vitro* mutagenesis

により共通抗原基 a に変異を導入した 3 種類の組換え体を作製し、ヒト培養細胞で発現する変異型 HBs 抗原を作製した。

B. 研究方法

1) *in vitro* mutagenesis

昨年度、本研究班分担研究者の岡田が HBV-DNA full genome 組み換えプラスミドを作製し、ヒト肝細胞由来細胞株で発現させた HBs genotype パネルを作製した。本研究ではその中から日本でもっともよく見られる subtype adr, genotype C の HBV-DNA 国内標準品由来のプラスミド c11.2 をもちいて変異型の HBs 抗原領域をサブクローニングした。図 1 に示すように、プラスミド c11.2 を鋳型とし、表 1 のプライマーを用いて S 遺伝子を 2 つの断片に分けて P C R を行い、増幅産物を blunting-kination 処理、両端を BamHI と

NspV(BstBI)で切断し、真核細胞発現 vector pEF6V5His の BamHI と BstBI site に挿入した。ABI Prism 3100 で塩基配列を決定して変異を確認した。

2) 変異型 HBs 抗原の発現

作製した変異体プラスミドを lipofectin 試薬を用いてヒト肝細胞由来細胞株に DNA 感染、2 日後の培養上清と細胞の凍結融解抽出液を免疫クロマトグラフィー法の診断用 HBs 抗原検出試薬 (HBs 抗原検出試薬 A) で検査して、HBs 抗原の発現を確認した。DNA 感染細胞で発現する抗原をウサギ抗 HBs 抗原抗血清を一次抗体とした蛍光免疫染色法で確認した。

(倫理面への配慮) 本研究では研究材料として国内標準品由来の DNA 組み換え体を用いたので、倫理面での配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

分離された背景の異なる 3 種類の共通抗原基 a の変異 G145R (145 番目のアミノ酸が Gly → Arg に変異)、M133T、あるいは T123N を導入して、変異型 HBs 抗原遺伝子もつ真核細胞発現プラスミドを作製した (表 2 及び図 2)。各プラスミドを DNA 感染させた培養細胞の上清中での HBs 抗原の発現を HBs 抗原検出試薬 A で試験した結果、野生型と G145R 及び M133T は明らかな陽性を、T123N は非常弱い陽性を示した。同様に細胞抽出液を試験した結果、G145R 及び M133T は明らかに陽性であったが、T123N は陰性であった (図 3)。一次抗体にウサギ抗 HBs 抗原抗血清を用いて細胞を蛍光免疫染色した結果、野生型と 3 つの変異株 (G145R、M133T 及び T123N) のいずれにおいても明瞭に蛍光染色される細胞が観察された (図 4)。

D. 考察

DNA 感染細胞のウサギ抗 HBs 抗原抗血清による免疫染色の結果から野生型と G145R、M133T 及び T123N 変異型の HBs 抗原が細胞内で発現していることが示された。HBs 抗原検出試薬 A を用いて培養上清及び細胞抽出液中の HBs 抗原の検出した結果、野生型と G145R 及び M133T は細胞で産生されて培養上清中に分泌されることがしめされた。一方、T123N は培養上清では弱陽性、細胞抽出液では陰性であり、免疫染色の結果と異なった。これは、T123N は培養上清に分泌されているが、測定法によって野生型や他の変異型と比較して弱い反応を示す場合のあることを示唆している。他の検出系を用いて変異型 HBs 抗原の検出感度を比較検討する必要がある。

E. 結論

日本で普遍的な subtype adr, genotype C のバックグラウンドに共通抗原基 a の既知の変異である G145R、M133T 及び T123N の 3 種類の変異を導入して、変異型 HBs 抗原遺伝子もつ真核細胞発現プラスミドを作製した。G145R、M133T 及び T123N の変異型は培養細胞で発現し、ヒト細胞株の培養上清に分泌された。3 種類の変異の培養上清及び細胞抽出液を HBs 抗原検出試薬 A で試験すると変異によって反応の強さに差が認められた。本研究で用いた *in vitro* mutagenesis 法は簡便な操作で効率よく組み換えプラスミドを得ることができ、ヒト培養細胞で発現することが実証された。この方法を用いれば、報告されているが入手困難な変異を日本で見られる subtype や genotype のバックグラウンドに導入して、わが国で使用

する診断用 HBs 抗原検出試薬の評価のための
変異型 HBs 抗原パネル作製への応用が期待で
きる。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

(1) 論文発表 なし

(2) 学会発表 なし

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

Table 1. Primers Used for *in vitro* Mutagenesis of the S Gene

Name	Mutation	Sequence	Length in base
S6CBamFw129		5' <u>GCAACGGGATCCCGAGGACTGGGACCCTG</u> *	31(18)
S7DBstRv842		5' <u>GGACACC</u> <u>TCGAAAGTTAGGGTT</u> CAATGTATACC*	34(20)
145-RV567-547		5'CAA CAA GAG GGA AAC ATA GAG	21
G145R-Fw568-597	GGA to GCA	5'CTGTACAAACCCTTCGGAC <u>GCA</u> AATTGCAC	30
133RV541-520		5'TTGAGCAGGAATCGTGCAGGTC	22
M133TFw542-564	ATG to ACG	5'GGAACCTCT <u>ACG</u> TTTCCCTCTTG	23
123RV511-488		5'TCCCGTACTGGTAGTTGATGTTCC	24
T123NFw512-534	ACC to AAC	5'CCATGCAAG <u>AAC</u> TGCACGATTCC	23

All Primers are numbered according to the system used by Okamoto et al (J Gen Virol, 1998)

Bases changed for *in vitro* mutagenesis are underlined

*: Primers used by Ireland et al (Hepatology, 2001) are modified by changing the restriction sites as underlined.

Table 2. The Origins of the Introduced Mutations in the S Gene

Mutation	Sample	Subtype	Origen
G145R	Arg145	adw	Italy Vaccinee
M133T	SA7	ayw	South Africa Chronic Liver disease, diagnostic failure
T123N	BA3.4	ayw	Pakistan Liver transplant-HBIG treated

According to J-Reynaud et al (J Med Virol, 2001) with modification

図1. Construction of HBs Mutants

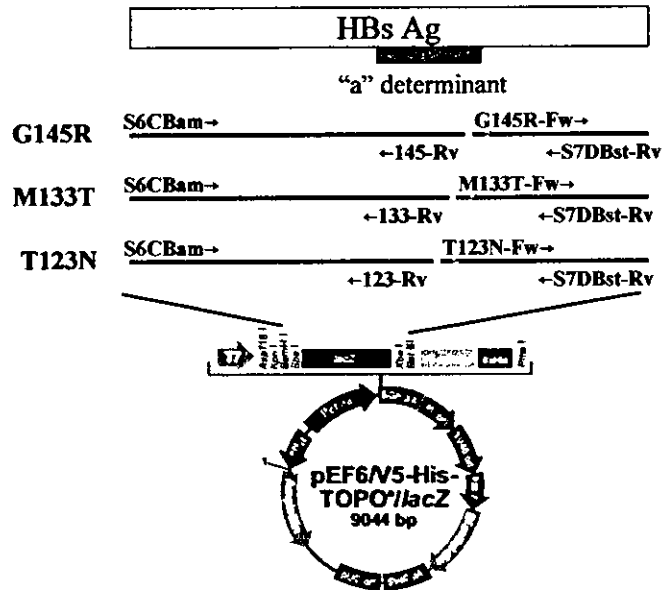
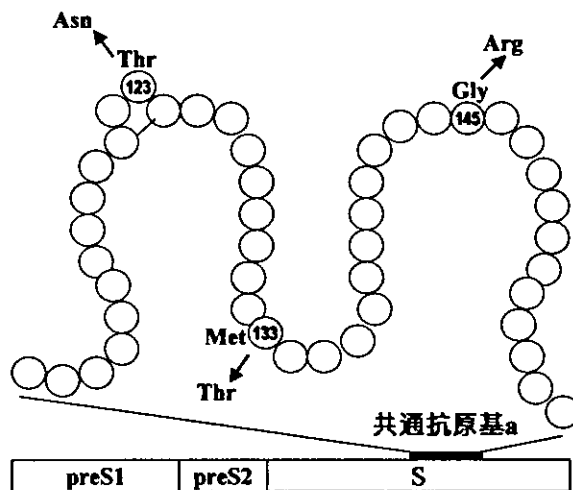


図2. HBs抗原の共通抗原基aに導入した変異



岡本宏明、日本臨床62巻p98(2004)より改変、引用