

Z00501197 A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等

レギュラトリーサイエンス総合研究事業

体外診断薬に関する標準品に関する研究

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹森 利忠

平成 18 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
研究の統括 1
主任研究者： 竹森 利忠（感染研・免疫部）	
II. 分担研究者研究報告	
1. 体外診断薬品質管理の今後のあり方 13
竹森 利忠（感染研・免疫部）	
2. 風疹抗体診断キット国内標準品の作製と評価 23
海野 幸子（感染研・ウイルス第三部）	
庵原 俊明（国立病院機構三重病院・副院長）	
浅野 喜造（藤田保健衛生大・医学部）	
岡田 賢司（国立病院機構福岡病院・小児科・医長）	
堀内 善信（感染研・細菌第二部）	
大槻 紀之（感染研・ウイルス第三部）	
田代 真人（感染研・ウイルス第三部）	
3. 風疹及び麻疹パネル血清整備 27
岡田 賢司（国立病院機構福岡病院・小児科）	
植田 浩司（西南女学院大学）	
旭 隆宏（国立病院機構別府医療センター）	
西間 三馨（国立病院機構福岡病院）	
4. 風疹ウイルス遺伝子診断技術の評価 30
池田 智明（国立循環器病センター・周産期科）	
5. 医療での風疹抗体測定の問題点の解消 33
川名 尚（帝京大附属溝口病院・産婦人科）	
6. 風疹ウイルス遺伝子診断標準化と整備 36
種村 光代（名古屋市立大学大学院医学研究科生殖遺伝医学講座）	
7. 風疹ウイルス遺伝子診断技術改良の検討 40
加藤 宏幸（感染研・ウイルス第三部）	
8. 風疹及び麻疹パネル血清作製整備 42
庵原 俊明（国立病院機構三重病院・副院長）	
9. 麻疹ウイルス検査技術の比較検討 44
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）	
10. 麻疹ウイルス標準品整備 47
沼崎 啓（感染研・ウイルス第三部）	
11. HBs抗原変異とHBs抗原検出法に関する研究 49
山口 一成（感染研・血液・安全性研究部）	
水澤左衛子（感染研・血液・安全性研究部）	
12. B型肝炎ウイルスのgenotypeパネルの作製 57
岡田 義昭（感染研・血液・安全性研究部）	
13. HBs抗原genotype別国内標準品の評価 61
水落 利明（感染研・血液・安全性研究部）	
14. HBV感染でのHBV DNA量、HBs抗原量と肝炎発症との関係 69
飯野 四郎（医療法人社団静山会清川病院）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 71
IV. 論文別刷 73

体外診断薬に関する標準品に関する研究

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

本研究において HBs 抗原及び風疹体外診断薬の品質管理の向上を目的とし、HBs 抗原体外診断薬感度表示の統一を目的として WHO 国際標準品に準拠する標準品を作製した。更に HBs 抗原遺伝子型及び HBs 変異抗原により構成される組換え HBs 抗原標準候補品を作製した。

風疹抗体体外診断薬の品質管理に必要となる WHO 国際標準品に準拠する IgG 抗体標準品を作製するとともに、感染者、あるいはワクチン接種者 60 検体から構成されるパネル血清を整備した。また風疹ウイルス遺伝子検査の品質管理のために技術標準化の試みを行うとともに適切な診断のための考察を行った。更に、麻疹抗体測定に関しパネル血清の整備に着手するとともに現在用いられている方法を相互比較し、疫学的調査等においては HI 法にかわり凝集法、ELISA 法が優れていることが示唆された。

[分担研究者]

海野 幸子

(感染研・ウイルス第三部・室長)

岡田 賢司

(国立病院機構福岡病院・小児科・医長)

池田 智明

(国立循環器病センター・周産期科・専門外来部長)

川名 尚

(帝京大医溝口病院・教授)

種村 光代

(名古屋市立大医・講師)

加藤 宏幸

(感染研・ウイルス第三部・室長)

庵原 俊昭

(国立病院機構三重病院・副院長)

多屋 馨子

(感染研・感染症情報センター室長)

沼崎 啓

(感染研・ウイルス第三部・室長)

山口 一成

(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)

水落 利明

(感染研・血液・安全性研究部・室長)

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]

三宅 智

(感染研・企画調整主幹)

水沢左衛子

(感染研・血液・安全性研究部・主任研究官)

鈴木 哲朗

(感染研・ウイルス第二部・室長)

持田 嘉之

(㈱エスアールエル・感染免疫部・担当課長)

吉澤 浩司

(広島大院・医歯薬学総合研究科・教授)

峰松 俊夫

(愛泉会日南病院・疾病制御研究所・所長)

前川 雅男

(社団法人日本臨床検査協会)

西村 和夫

(日水製薬㈱・薬事部長)

斎藤由美子

(理化学研究所感染症研究感染症研究ネットワーク支援センター)

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス関連体外診断用医薬品（キット）に関する感度／特異性についての品質管理は正確な診断に重要な課題であり、様々な原理を用いるそれぞれのキット間での感度と特異性を可能であれば同一の基準をもって比較検討することが求められる。このためには、「標準品」や一定の検体群（パネル）の確立が必要である。

現在我が国には WHO 国際標準品を基準として値付けされた HBs 抗原国内標準品が存在する。しかし、現在流通する診断薬は各国異なった感度表示を行っており、品質管理及び使用者にとっては横断的な統一された感度表示が望ましい。一方この WHO 国際標準品は genotype A の HBs 抗原に由来したものであることから、我が国で流行する他の genotype を含めた genotype 別の HBs 抗原標準品の確立が望ましい。本研究はこれらの問題を解決し、国内で販売されている HBs 抗原検出キットの品質管理の向上に寄与することを目的とする。

風疹に対する抗体保有の把握はワクチンプログラム等風疹対策を講ずる上で疫学的に重要である。また先天性風疹症候群(Congenital rubella syndrome: CRS (白内障、難聴、心臓奇形))予防のための妊婦の風疹急性感染の診断は、抗体検査、ウイルス遺伝子検出検査のいずれの方法においても社会的貢献が高い。本研究で整備される IgG 抗体標準品と標準血清パネルは各社で行われている異なった感度表示の統一化を促し、体外診断薬キットの品質管理に不可欠なものとなる。更にウイルス遺伝子診断技術の標準化により我が国での診断技術の均一化がはかれるとともに、母子感染診断基準の指針の作製は行政的、社会的意義が高い。

現在わが国における麻疹の診断は主にペア血

清による麻疹特異的 IgG 抗体の陽転あるいは有意上昇、麻疹特異的 IgM 抗体の検出でなされていることが多い。しかし、今後麻疹ワクチン接種率が上昇し、麻疹患者が減少してくると、麻疹を診たことがない医師が増加し、臨床診断のみでは麻疹を迅速に診断することが困難になることが予想される。また、secondary vaccine failure といった非典型的な症状の麻疹患者の場合、ラボ診断がなければ、確定診断には至らない。これらの問題の解決には的確な診断法の確立が必要である。

B. 研究方法

1. 風疹パネル血清の評価： 血清は全てインフォームドコンセントにより使用目的が了承されて採取されたものを使用した。収集された 88 検体の抗体価を測定した。
2. 風疹 IgM 抗体陽性妊婦の抗体親和性の測定： 2000～2005 年の間に風疹 HI 抗体が高く IgM 抗体が陽性であるため帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科に紹介された 32 例 41 検体を対象とし、風疹 IgG 抗体、IgM 抗体、IgG 抗体の親和性(AI)を測定した。AI は予め被検血清を吸光度 1.0～1.5 になるように希釈したものを用い、抗原抗体反応をさせた後に 8M 尿素処理 15 分作用させたものとさせない対照について通常のように酵素反応を行い OD 値を測った。8M 尿素処理の OD 値を対照の OD 値で除し 100 をかけて%表示したものを AI とした。
3. 野外麻疹ウイルスの効果的な分離同定法の導入： 分離されたウイルスの遺伝子解析とともに麻疹の迅速かつ簡便な血清学的早期診断法について Vero/SLAM 細胞の有用性を検討した。
4. 成人血清抗麻疹抗体陽性率の比較： 2 つの

研究グループにより行われた。すなわち健康成人 81 人の成人血清抗体を赤血球凝集抑制(HI)法、マイクロ中和(mNT)法、酵素抗体(EIA)法で測定し、血清抗体陽性率を比較検討した。また他のグループにより健康人由来の 469 検体を調査材料とした。麻疹抗体の測定は、ゼラチン粒子凝集(PA)法および EIA 法ともに市販の抗体測定キットを用いた。得られた成績から、PA 法を基準とした場合の EIA 法の一致率、陽性的中率 (positive predictive value : PPV)、陰性的中率 (negative predictive value : NPV) など PA 法と EIA 法の相関性について検討を行なった。

5. 麻疹パネル血清の作製： 研究に同意を得た健康成人 90 人から 30ml 採血し、血清を採取した。
6. 変異型 HBs 抗原の発現： 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 を用いて作製した変異体プラスミドをヒト肝細胞由来細胞株に感染後の培養上清を変異型 HBs 抗原として使用した。これを用いて、免疫クロマトグラフィー法の診断用 HBs 抗原検出試薬で検査して、HBs 抗原の発現を確認した。
7. クローニングされた HBs 抗原遺伝子型 A から H までの HBV 全長を鋳型として、各遺伝子型の HBs 遺伝子にあわせてプライマーを作製し、増幅・精製した。各遺伝子を発現ベクター pEF6/V5-HisTOPO(invitogen)に組み込み HuH7 人肝癌細胞株に導入し、48 時間後の培養上清中の HBs 抗原の発現をエスプライン(富士レビオ社)を用いて測定した。発現が認められたクローンは S 遺伝子の塩基配列を解析し、genotype 及びアミノ酸配列を解析した。

8. Genotype 別 HBs 抗原検体を用いた HBs 抗原診断キット評価： HBV genotype B および C の検体は、北海道赤十字血液センターより承諾を得て供与された国内献血液 (HBs 抗原陽性) を用いた。各検体の HBs 抗原について、HBV genotype を塩基配列から決定して選択した。一方、HBV genotype A の検体は国際試薬(株)より購入した検体を用いた。さらにそれぞれの genotype について、組換え HBs 抗原(本研究班の岡田、水沢により作成された)を検体に加えた。Genotype A の 7 検体、genotype B の 13 検体、genotype C の 10 検体を、現在唯一「HBs 抗原定量キット」として承認されているアーキテクト・HBsAg QT(アボットジャパン(株))を用いて測定し、それぞれの検体を 10 IU (International Unit)/ml の濃度に調整した。
9. インフォームドコンセプトを経て得られた C 型肝炎通院患者の HCV 抗体を検査し、低抗体価であった例の残余血清について、血中 HCV RNA の存在の有無を検査(多くの例で再度)した。
10. 長期入院患者閉鎖集団における風疹ワクチン接種後の抗体反応の推移： 重症心身障害児病棟において、1972 年に風疹ワクチン松葉株の接種を受けた、当時 3~16 歳(平均 9.5 歳)の入院児についてワクチン接種後 7 年、12 年、15 年、19 年、23 年目、32 年目における抗体測定を行った。
11. 風疹ウイルス遺伝子診断法の整備と評価： 現在実施されている風疹遺伝子診断の複数のプロトコルを検討して、その相違を明らかにするとともに、検査が実施された症例数や臨床経過を見直して、それぞれの診断基準を明らかにして、検査法の標準化を検討した。

また、妊娠初期に風疹を疑われた妊婦の臨床対応と追跡調査も行い、本検査の適応についても検討した。これらの研究は、日本産科婦人科学会をはじめとする日本医学会分科会、及び関連組織の倫理規定やガイドラインの元に実施された。過去の臨床検体については、研究目的のための保存、利用についての説明、理解・同意（インフォームドコンセント）が得ているものを使用した。

12. 妊娠中の風疹再感染等における血清抗体の変化： 2004年に徳之島の1産科施設で取り扱った妊婦のうち、前回妊娠時に風疹抗体を保有していることが確認され、今回の妊娠で風疹 HI 抗体価が1024倍以上の上昇を認めた妊婦6人を対象として研究を行った。これら妊婦の疫学的背景を調査し、さらに風疹特異的 IgG と IgM の感染後の反応および風疹 IgG 親和性について検討した。

13. 風疹ウイルス遺伝子診断技術の標準化： 風疹ウイルス遺伝子診断結果を得るために、一般的な設備および市販されている試薬を用い、混入を避けるために可能な限り簡便な手順を採用した。陽性コントロール風疹ウイルス (M33) の段階希釈液 (各 3.3 倍) を調製し、異なるプライマーと2種類の 2nd PCR 試薬を用いた実験を行った。さらに共同研究者 (SRL、愛泉会日南病院、国立循環器病センター) の協力を得て、同一条件においてこれら検査施設間の感度の比較を行った。

C. 研究結果

1. 風疹パネル血清の評価： 88 検体の風疹パネル血清候補の抗体価を HI 法、EIA 法により評価した。3 検体が抗体陰性で、11 検体が HI 抗体陽性だが EIA-IgG 抗体陰性、他の 74

検体が両者陽性であった。ワクチン接種群 42 検体の平均 HI 抗体価は $2^{5.4}$ となり、罹患歴のある 22 検体の $2^{6.1}$ に比べ低かった。HI 抗体価と EIA によって得られた IU は良く相関し、両抗体価の変換が相互に可能であると考えられた。これら検体は EIA キットの評価に使用できる抗体を有していた。

2. 風疹ワクチン接種後の抗体の推移： 閉鎖集団における風疹ワクチン接種後 32 年間の風疹抗体価追跡調査とワクチン再接種後の抗体反応を解析した。風疹ワクチン松葉株接種後の HI 抗体価は全例陽転し 5~8 か月後には 32 倍~256 倍に分布し、幾何平均値は $2^{6.3}$ であった。その後 HI 抗体価は徐々に下降し、7 年後に $2^{5.2}$ 12 年後 $2^{4.1}$ 15 年後 $2^{3.5}$ 19 年後 $2^{3.9}$ 23 年後 $2^{3.1}$ となり、今回の 32 年後の調査では $2^{2.8}$ となった。接種後 12 年後には HI 抗体陰性例 (8 倍未満) が認められ、23 年後には 8.3%、接種後 32 年目では 23.1% が HI 抗体陰性である。一方、一部の接種者に 1 回目接種から 24 年目の 1996 年に 43 例に風疹ワクチン松葉株の 2 回目接種が行われた。当時、2 回目接種前 HI 抗体価が 8 倍未満および 8 倍の全例 (26 例)、HI 抗体価 16 倍の 7 例中 5 例 (71.4%) は再接種により 4 倍以上の有意な抗体価上昇が認められたが、接種前 HI 抗体価 32 倍以上の 10 例は再接種で有意な抗体上昇は認められなかった。この 2 回目接種群の中で 32 年目において 6 例を対象として観察した。この群の 1 回目接種後の幾何平均抗体価は 7 年後 $2^{5.1}$ 12 年後 $2^{4.5}$ 15 年後 $2^{4.1}$ 19 年後 $2^{4.0}$ 23 年後 $2^{3.0}$ と再接種しなかった群と差がなかった。24 年目の時点で 2 回目接種を受けた例では、2 回目接種半年後に $2^{5.0}$ と上昇したが、その 2 年後には

2^{3.1} 8年後は2^{4.0}となっていた。追加接種2年後では6例中3例が有意な抗体価の低下がみられ、1例は検出感度以下となっていた。8年後は4倍以上抗体価が低下した症例はなく、陰性化した症例も認められなかった。

3. 麻疹抗体測定に関する標準品に関する研究：わが国において、麻疹の抗体測定法にはHI、中和法、PA、ELISA法などが用いられている。本研究において、野外麻疹ウイルスの効果的な分離同定法の導入においてはVero/SLAM細胞の有用性が確認され、Vero/SLAM細胞は中和抗体測定への応用も可能であることが明らかとなった。麻疹血清抗体測定方法について、健常人81人の血清抗体をHI法とmNT法で測定すると、mNT法では80人(98.8%)が陽性であったが、HI法では64人(79.0%)しか陽性でなく、HIの陽性率はmNT法では98.6%(70人中69人)、EIA法では97.1%(35人中34人)と、この2方法間の陽性率には差はなかったが、HI法の陽性率は77.5%(89人中69人)と、有意に低率していた。更に469名での抗体陽性率をPA法、EIA法で検討するとそれぞれの陽性率が97.7%、97.2%であった。両方法における陽性/陰性判定の結果が不一致であったのは4検体あり、一致率は99.1%であったが、EIA法で陽性と判定された検体がPA法でも陽性である確率(PPV)、およびEIA法で陰性と判定された検体がPA法でも陰性である確率(NPV)はともに100%であった。さらに、両方法における抗体価の分布から相関図を作成したところ(PA価はlog₂に変換し、<1:16は0とした)、正の相関が認められ、その相関係数は0.707であった。

4. IgM抗体値の分布： 風疹HI抗体が高く、

IgM抗体が陽性として紹介された32例のうちでIgM抗体が陽性または判定保留の検体は19例であった。17例は3.0以下であったが、2例は7.0以上の高値であった。

5. 風疹IgM抗体陽性妊婦の管理： 妊娠中に風疹の症状はないが風疹HI抗体256倍以上の妊婦についてIgM抗体を測定することにした指針に従って測定されたIgM抗体の評価をAIを用いて行った。IgM抗体陽性検体のうち85%はAIが60%と高く、恐らく3~6ヶ月以上前の感染ではないかと考えられた。そのほとんどはIgM値3.0以下であった。以上よりIgM抗体陽性のみで数ヶ月以内の初感染と判定することは問題でAIも併用することがすすめられる。

6. HBs抗原変異と抗原検出法に関する研究： 分離された4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)、G145A、M133T、あるいはT123Nを有する変異型HBs抗原遺伝子プラスミドを導入した培養細胞の上清中でのHBs抗原の発現を免疫学的手法を用いて検討した。この結果、野生型とG145R、G145A、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明らかになった。また、野生型とG145A及びM133Tは培養上清中に分泌されることが明らかになった。

7. HBs抗原変異とHBs抗原検出法に関する研究： これまでにHBVの全長クローンを肝癌細胞株に遺伝子導入することにより培養液中にHBs抗原を産生することが可能となったが、各genotype間にプロモーター活性の違いによると考えられるHBsの産生量の差が認められた。このため今回、各genotypeのsmall-HBs遺伝子を同一のプロモーターの

下流に挿入することによって、プロモーター活性の影響を少なくした発現系を構築した。この系で産生された HBs 抗原が細胞内に蓄積することなく培養液中に分泌されることが確認され、リコンビナント HBs 抗原が得られた。これらの血清パネルを基に、本研究で用いた既知の 10 種類の HBs 抗原検出キットにおいて、いずれの genotype の HBs 抗原検体 (0.2 IU/ml) も陽性と判定することができた。しかし、一部のキット (No. 7) においては、genotype B 由来の検体に対する反応性が他の genotype (A, C) 由来の検体に比較して明らかに低いことが示された。また他の複数のキットにおいては genotype C 由来の HBs 抗原に対する反応性が、genotype A, B 由来の HBs 抗原に対する反応性よりも高いことが示された。

8. HCV 抗体低抗体価例の血中 HCV RNA の存在の有無について： HCV 抗体低力価 30 検体はすべて HCV RNA は陰性であった。これに対して、インターフェロン投与例の検体では 44 検体中 38 検体が陽性、6 検体が陰性であった。
9. 閉鎖集団における風疹ワクチン接種後 32 年間の風疹抗体価追跡調査とワクチン再接種後の抗体反応に関する研究： 保護者の同意が得られた患者を対象として風疹ワクチン松葉株接種により獲得された HI 抗体に関して、自然感染刺激のきわめて少ない閉鎖集団における 32 年間の推移を検討した。接種 12 年後には検出感度以下の症例が認められるようになり、23 年後には 8.3%、接種後 32 年目では 23.1% が HI 抗体陰性となっていた。風疹ワクチン松葉株 2 回目接種により抗体価が再上昇することが確認できたが、二次応

答で上昇した抗体価は初回接種後の抗体価減衰より、比較的早く減衰していく可能性が認められた。

10. 風疹ウイルス遺伝子診断標準化と整備： 風疹ウイルス遺伝子診断はごく一部の研究施設で実施されているがこのような状況下で、RNA の抽出がキット化されたり、異なるプライマーが使用されている場合もあり、各種変法が存在して感度や判定基準にばらつきが生じている可能性が示唆された。その原因の一つには PCR 増幅過程に用いられる機器の原理の違いによる PCR 条件の変更の必要性であることが示唆された。原法の RNA 抽出のステップについては、RNA 抽出キットを用いても同様の検出結果が得られることが、過去の風疹胎児感染症例の保存良好検体にて確認された。また、この原法を用いた場合と、他の研究施設にて実施されている異なるプライマーを用いた方法でも培養ウイルスでは同様の検出感度であることが確認された。しかし、各種臨床検体についての確認検査は、本年度は新たな臨床検体が得られず比較検査は実施困難であった。
11. 妊娠中の風疹再感染における血清抗体の変化に関する研究： 今回の検討では、ワクチン接種既往のある妊婦の自然感染では、HI および IgG は著明な高値を示したが、IgM は 2 例が陽性で、そのうち 1 例が高値を示したのみであった。風疹再感染後の抗体価の推移を捉えることは、不顕性感染が多いことから困難な場合が多いことが推察された。
12. 風疹ウイルス遺伝子診断技術改良の検討： 4 カ所の検査施設において、プライマーおよび Taq polymerase を比較したところ、感度差はほとんど見られなかった (3 倍以内)。次

に感染研を含む4検査施設において同一条件下で検査を行い、結果を比較した。

D. 研究考察

〔風疹〕

1. 風疹抗体血清パネル整備について

風疹抗体陽性血清パネル整備のために収集された各検体について解析を行った。風疹の流行予測調査で観察されているように、ワクチン接種群の抗体は罹患群に比べ低い傾向が認められた。またワクチン接種群ではHI抗体陽性でEIA-抗体陰性を示す傾向が多い。この現象は、EIAとHI双方の方法により認識される抗体の差に依存する可能性が考えられる。いずれにしても総じてHI価はEIAによる抗体価と高い相関性を示し、IUとHI価の関係を1次式($\log IU/ml = 0.105 + 0.234 \times \log_2 HI(1.2 \text{ 倍希釈})$)で表示できることが示された。今後HI価からIUへ或いはその逆の変換が可能になると考えられる。これらの解析を介して、最終的に風疹抗体パネル血清では、HI価とIUの相関範囲から外れて分布する検体は除外することとした。作製されたパネル血清の管理については竹森分担研究報告書の資料1, 2のような考察がある。今後この問題に関して意見の積み重ねが必要である。

2. 風疹ワクチン接種の有効性について

風疹の根絶をめざして、麻疹・風疹混合(MR)ワクチンとして就学前1年の幼児に2回目の接種が予定されることからワクチン接種後の長期持続抗体価の調査が必要である。本研究では自然感染による追加免疫を受ける可能性の少ない環境下での接種者の免疫反応を解析し、風疹ワクチン1回接種により獲得されたHI抗体価はこの結果接種後32年目では23.1%がHI抗体陰性となるこ

とが示唆された。この際、風疹ワクチン2回目接種により抗体価が再上昇することが確認できたが、二次応答で上昇した抗体価は比較的早く減衰していく可能性が示唆された。また、今回の調査はワクチン有効性について接種後長期に持続して産生される抗体価を測定しているが、正確な免疫状態を知るためには、各接種者における記憶細胞の頻度を計測する必要がある。今後の技術的な発展が望まれる所である。

3. 風疹ウイルス感染診断技術の評価

風疹ウイルスRNAの検出方法の標準化のためには、これまで感染研で確立された原法については引き続きRNA抽出キット導入などの臨床検討が必要である。Nested RT-PCRは極めて感度が良い方法であるため用いる試薬、機器、反応条件、操作手順などによって感度が大きく影響されると考えられる。このため臨床判断に利用する際に検査機関により感度が異なることが危惧される。今回の比較実験においても、異なる機器の使用に因ると思われる検出感度の極端な差異が見られた。しかしながら、標準検体を用いて適切に条件を変更することによって同程度に感度を得るに至ったり、標準検体を用いた品質管理の必要性が示唆された。

一方、臨床的には妊娠中に風疹を疑われた女性への対応では、母児への侵襲のない母体IgG親和性の測定の導入が先決とされる。一方、ウイルス遺伝子診断は先天性風疹症候群を疑う新生児が出生した場合には、院内感染予防の見地からも早急にウイルス排出の有無を確認できる利点があり、今後も原法の改良、簡易化の必要性は残る。いずれにしても、本検査の標準化と同時に、やはり風疹ワクチン接種の徹底がもっとも期待される。

本年度は風疹の流行も沈静化し、2005 年の先天性風疹症候群の報告例は 2 例にとどまった。今後の風疹流行の阻止と妊婦への問診の強化、IgG 親和性の測定の追加抗体価の解釈に関する適切な指針等により妊娠中の女性に対する先天性風疹症候群の危惧は十分に軽減可能であると思われる。

妊婦の風疹 IgM 抗体陽性者については、風疹の暴露のリスクについての疫学的状況をよく検討すると同時に感染時期の推定には AI を併用することが奨められる。母体の風疹特異的 IgM 抗体が陽性であっても、発疹なし、接触なし、ワクチン歴ありの妊婦からの先天性風疹症候群は皆無であった。やはり妊娠可能女性へのワクチン接種の啓蒙は必要不可欠であると考えられる。

風疹再感染妊婦の取り扱いに関して、現在明らかな指針は示されていない。再感染時は血中抗体価の急激な上昇によってウイルス血症が生じないため CRS の発生の危険は極めて低いと考えられている。風疹流行時において自然感染後の再感染率は 3.4%であるのに対して、ワクチン接種後の再感染が 80%と高率で、さらにウイルス分離がなされる例も存在することが過去報告され、ワクチンによって産生される抗体の再感染を防ぐ防御能に悲観的である。しかし、風疹はワクチンによって防ぐことが可能な感染症である。ワクチンの 2 回接種の導入あるいは風疹低抗体価妊婦における分娩後のワクチン接種の推奨等で予防ができるものと思われる。

〔麻疹〕

わが国における麻疹患者報告数は、2001 年の予防接種キャンペーン以降着実に減少し続けているが、今後とも 2012 年の西太平洋地域における麻疹の elimination 達成に向けて感受性者対策

は重要である。麻疹血清抗体測定法に関して、疫学的調査にはこれまで HI 法が用いられてきた。しかし、HI 法に用いる感度の高いアフリカミドリザル赤血球の入手が困難となり、また HI 法の感度に関して疑問が投げかけられている。本研究においても mNT 法と EIA 法の陽性率は同じであるが HI 法は mNT 法や EIA 法と比較して抗体陽性率が約 20%低値であることが示唆された。mNT 法は測定に手間がかかり、結果を得るには数日かかる抗体測定方法である。一方、EIA 法は定量性にはややかけるが、多数の検体を短時間で処理できる利点がある。また PA 法および EIA 法は、陽性率、一致率、PPV、NPV の結果から、麻疹の抗体測定方法として結果に差はなく、今後の感受性者対策に際し、迅速かつ簡便である両方法は有効な手段となりうると考えられる。

麻疹抗体測定のためのパネルと標準品は測定に用いるキットの品質が保証され、測定方法の手技が適切に行われることが必要である。このためには、パネル血清を用いて定期的に管理を行うことが大切である。平成 18 年度はパネル血清の作製に着手し、90 人分の血清を採取する予定であり、mNT 法、EIA 法、HI 法で抗体価を測定しパネル作製を計画している。なお、測定方法間による抗体の差を比較するために世界保健機関 (WHO) は標準血清を作製している。本邦では標準血清が無く測定方法間の抗体の差や測定機関間の抗体の差を比較するのは困難がある。本邦でも測定機関及び測定方法間差が比較できるよう、標準血清の導入をはかる必要がある。

〔変異型及び異なった遺伝子型に対する HBs 抗原標準品の仕事〕

日本で普遍的な subtype adr, genotype C の共通抗原基 a の変異、G145R、G145A、M133T 及び

T123N を有する HBs 抗原遺伝子プラスミドを作製した。G145R、G145A、M133T 及び T123N の変異型 HBs 抗原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。4 種類の変異の培養上清を 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。本研究で実施した方法を用いれば、日本で見られる subtype や genotype のバックグラウンドに入手困難な既知の変異を導入して、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。

更に各クローンを遺伝子導入して得た培養液で HBV の A から H までの HBs 抗原パネルを作製した。この系では常に同一の性状を有する HBs 抗原を供給することが可能で、診断薬の評価に大いに貢献すると考えられる。これらの標準品を用いて現在我が国で流通する 10 種のキットの評価を行った所、使用したキットによっては、遺伝子型が異なる HBs 抗原に対する反応性に若干の差異が見られた。その原因としてキットに用いられている抗 HBs 抗原抗体の違いが考えられる。

抗原捕捉 (capture) と抗原検出 (detection) のどちらか一方にポリクローナル抗体を用いている場合、genotype 間での感度差は少ないようである。しかし、両方にモノクローナル抗体を用いている場合では、genotype 間での感度差が比較的大きいものと、差が少ないものに区別された。これらの違いをより詳細に検討すると、“a” 抗原の中で、genotype の違いにより変異する部位と各 genotype 間で保存されている部位とがあるが、特に変異の頻度が高い loop 2 に対するモノクローナル抗体をキットに用いた場合には、genotype の違いにより検出感度に差が生じることが考えられた。

[肝炎診断診断薬の感度について]

本研究において HCV 抗体が AxSYM 法で低力価陽性 (COI 1.0~15) と定義された検体 30 検体では HCV RNA が全例陰性であり、対照とした、インターフェロン投与中で HCV RNA が血中から消失過程にある検体では 44 検体中 38 例が陽性であった。更に AxSYM 法で HCV 抗体の COI が 16~25 の症例 16 例で検討した結果、末期の C 型肝炎細胞癌例 3 例、C 型肝炎急性例 2 例、HCV 感染既往例 3 例、インターフェロンによる HCV 排除後例 6 例、詳細不明の 2 例であった。以上のように、ある程度の検出感度の調節がなされている AxSYM の系であっても検出感度はやや鋭敏で、COI を 10.0 に引き上げてもよいと思われる。臨床的に要求される最少抗体量の標準品を作成し、それにそれぞれの製品が cut off 値を合わせれば、現在の不要な HCV 抗体陽性を拾い出す状況は改善されると考えられる。

E. 結論

本研究において疫学及び社会的に重要な風疹抗体、ウイルス遺伝子検査における品質管理の向上を目的とし、IgG 抗体標準品と風疹感染あるいはワクチン接種者から収集した血清からなるパネル血清を作製した。また風疹ウイルス遺伝子検出技術法の標準化を目的として、現在 3 カ所で行われている診断の技術を比較検討した。本研究では風疹ワクチン接種後の HI 抗体価は自然感染による追加免疫がなければ接種後 32 年目では 23.1% が HI 抗体陰性となっていた。風疹ワクチン 2 回目接種により抗体価が再上昇する。二次応答で上昇した抗体価は比較的早く減衰していく可能性が示唆された。

診断に適切な麻疹抗体測定法について検討し、HI 法は mNT 法及び EIA 法と比較し、陽性率が約

20%低下するが、mNT 法と EIA 法の抗体陽性率に有意な差を認めなかった。またゼラチン粒子凝集試験 (PA 法) および酵素免疫法 (EIA 法) について検討し、陽性率、一致率、および陽性的中率、陰性的中率から、両方法では差がないことが示唆された。これらの結果から、麻疹の血清疫学調査に HI 法を用いるよりも EIA 法か mNT 法を用いるべきであることが示唆された。また、麻疹血清測定方法の品質管理のために、麻疹パネル血清の作製が必要である。

B 型肝炎ウイルス診断用医薬品について遺伝子型及び変異型診断のための標準候補品の作製を行った。すなわち、日本で普遍的な subtype adr, genotype C のバックグラウンドに *in vitro* mutagenesis 法をもちいて変異を導入し、ヒト細胞株の培養上清に分泌される 4 種類の既知の変異型 HBs 抗原を得た。

更に B 型肝炎ウイルスの genotype パネルの作製と S 抗原の作製のために、同一のプロモーター下流に genotype A から H までの HBs 遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した。各プラスミドを肝癌細胞に遺伝子導入することで培養上清中に HBs 抗原の発現を確認した。

遺伝子型についてこれらの作製された recombinant 抗原及び HBs 抗原陽性血液を用いて、HBV genotype 測定用のパネルを作成した。これを用い、国内で販売されている 10 種類の高感度 HBs 抗原検出キットを用いて評価した結果、各 genotype による検出感度の差が見られたものの、全てのキットにおいて陽性と判定された。作成した HBV genotype 別 HBs 抗原パネルは、今後 HBs 抗原国内標準品として用いられることが期待される。

一方 HCV 抗体は診断用医薬品の感度について臨床レベルで検討した結果、市販されている

HCV 抗体検出系は高感度にすぎるために、本来、HCV キャリアを拾い出すための検査が、それ以外の HCV 感染既往の感染者をより多く拾い出す結果になっており、適度の検出感度にする必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川名 尚 「風疹の今日的課題—先天性風疹症候群予防への戦略—」産婦人科の実際 54:139-144;2005.
- 2) 川名 尚 「高感度化測定による臨床的問題—風疹抗体を中心に—」日本臨床検査自動化学会誌 30: 149-152;2005
- 3) 川名 尚 他 「母子感染の立場からみた本学学生の抗体保有率の評価」帝京平成短期大学紀要 15:3-5;2005.
- 4) 川名 尚 「周産期ウイルス感染症の変遷と今後の展望」産科と婦人科 8:965-972;2005
- 5) 種村光代 「成人女性における風疹対策」チャイルドヘルス 8(9),25-29,2005
- 6) 庵原俊明 「ウイルス感染症の診断」小児科診療 68: 1992-1999, 2005
- 7) 庵原俊明 「ウイルス感染と感染制御」感染制御 1: 331-336, 2005
- 8) 多屋馨子 : 予防接種に関する最近の話題.臨床と微生物 32(4).390-392,2005.
- 9) 沼崎 啓. 感染制御と教育、市民（親や子ども）の教育/啓蒙・コミュニケーション—麻疹根絶に向けての取り組みを中心に— . 小児科臨床 2005, 58: 2575-2583.
- 10) Mizuochi T, Okada Y, Umemori K, Mizusawa

S, Sato S, and Yamaguchi K: Reactivity of genotypically distinct hepatitis B virus surface antigens in 10 commercial diagnostic kits available in Japan. Jpn J Infect Dis. 58: 83-87, 2005

11) 水落利明 他「国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なるHBV genotype由来HBs抗原の検出」臨床検 49: 1039-1042, 2005

2. 学会発表

1) 川名 尚「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について」第23回日本産婦人科感染症研究会、2005

2) 川名 尚「風疹IgM抗体陽性妊婦の管理」日本産婦人科学会千葉地方部会、平成17年度冬期学術講演会、2006

3) 種村光代、鈴森薫「先天性風疹症候群の発生に関するリスク因子の検討」第57回日本産科婦人科学会学術講演会、2005

4) 種村光代「予防できる先天異常—先天性風疹症候群の撲滅に向けて」第79回日本感染症学会総会、2005

5) 種村光代「『風疹の流行と先天性風疹症候群増加の危機における緊急提言』妊婦における先天性風疹症候群への対応」第108回日本小児科学会学術集会特別講演、2005年

6) 種村光代「先天性風疹症候群の発生に関するリスク因子の検討」第23回日本産婦人科感染症研究会学術講演会シンポジウム、2005年

7) 種村光代「出生前診断と臨床対応 周産期感染症」第45回日本先天異常学会学術集会シンポジウム4、2005年

8) 庵原俊明、中野貴司、神谷齊「職員採用時の麻疹・風疹・ムンプス・水痘抗体価9年間の比較検討」第79回日本感染症学会、2005

9) 佐藤 弘、多屋馨子、逸見佳美、岡部信彦「測

定方法による風疹抗体価の比較検討及びその臨床応用について」第46回日本臨床ウイルス学会、2005

10) 沼崎 啓「わが国の麻疹対策の現状と展望—WHO世界特別麻疹検査室および地域レファレンス検査室の役割を中心に—」平成17年ウイルス検査技術連絡会講演、2005

11) 沼崎 啓「世界から麻疹が消える日を目指して—WHOの麻疹根絶計画—」ワクチンセミナー「麻疹根絶をめざして」特別講演、2005

12) 岡田義昭、水沢左衛子、梅森清子、山口一成「In vivo プリオン検出系を用いたプリオン高親和性マウスリンパ球サブセットの検索」第53回日本ウイルス学会、2005

13) 水落利明「HBV genotype とHBs抗原検査」平成17年度北海道輸血療法検討会、2005

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・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

体外診断薬品質管理の今後のあり方

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 HBV, HCV, HIV 等の体外診断薬キットの品質管理のためには、国内で流行するウィルスの血清型、遺伝子型を反映して整備された標準品及び血清パネルが必要である。HBV, HCV, HIV 診断薬を対象とした血清パネル作製のためには多量の血清を必要とすることから、日本赤十字社からの協力が必要とされ、今後の確立されるべき協力体制について考察を加えた。一方、平成 17 年度において風疹抗体検査に関する血清パネルが整備されたことから今後の管理システムの構築を行った。これらの進行を踏まえ、今後の体外診断薬医薬品の承認前検査の方向について論議を行った。

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, HEV, HIV, HTLV)、公衆衛生上特に重要なもの (HAV、風疹ウイルス、クラミジア・トラコモティス) 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承認前検査として試験が依頼されている。依頼試験では血清パネルを用いて感度と特異性について試験を行い申請者側のデータと比較を行い、その結果を独立行政法人医薬品医療機構総合機構に報告する。従って検査にあたり国内で流行するウィルスの遺伝子型、血清型を反映された血清パネルを用いて試験が行えるか否か重要な key となる。一方、多くの診断薬について機械を用いた自動検査が

取り入れられている現在、今後現在のシステムの続行が望ましいか論議の余地がある。また現行のシステムにはいくつか改善が望まれる点があり、この問題について報告する。

B. 研究方法

これまでの研究班の業績や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考察した。

C. 研究結果・考察

平成 15-16 年度において本研究班で、HBs 抗原及び風疹抗体に関して WHO 国際標準品に準拠した国内標準品が作製された。市販キットでのこの標準品を基準とした感度表示により、横

断的な比較が可能となり、ユーザーにとって目的に応じた診断薬使用の選択の助けとなる。

一方、診断薬の感度と特異性を評価については、多数の感染者、非感染者の血清を組み合わせたパネルが必要である。しかし、これまでに体外診断薬品質管理のために国内でパネルが作製されたことはない。

この問題の解決の第一歩として、風疹診断薬に対応する血清パネルの整備が本研究班の事業として庵原分担研究者、岡田分担研究者、海野分担研究者により行われ、平成 17 年度には成人 90 人から得られた血清を HI 法、ELISA 法により解析し、その結果 60 人から得られた血清検体をもって風疹抗体診断用パネルとして整備された。

作製された風疹抗体血清パネルは感染研ウイルス 3 部に保存されるが管理と分与にあたっては資料 1 に認められる案が作製された。ここでは厚生労働省医薬食品局審査管理課、感染研、ウイルス学会、医療機関、日本臨床検査薬協会等からの複数の委員により構成される委員会方式で分与依頼の審査と分与を行う（資料 2）。しかし、留意しなければならないことは本委員会は単に保管管理の運営を行うのみでなく、そのパネルを用いた検査結果を評価する機能が含まれることが必要である。すなわちこの委員会ではパネル血清を適切に管理維持するのみでなく、プライドで分与され用いられたパネル血清の検査結果を判定し、品質管理の向上を促す機能が必要である。この方式の可否は今後広く議論することが必要である。

我が国での恒常的なパネル血清整備は日本で流行する病原体を適格に判定する診断薬の

選択に必要とされる。HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体体外診断医薬用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。この実施には日本赤十字社の協力が必要となる。資料 3 の観点から問題を考慮する必要があると考えている。国際動向に則した標準品の整備と国内での標準血清パネルの確保は現行の依頼検査のシステムをより合理的な方法に再構築するための礎となる。

将来的な国内標準品とパネル血清の整備により現行の承認前検査の替わりに、標準パネル血清を申請者に分与し申請者側の自己試験と外部における評価により品質を管理するシステムの確立が可能となる。更に実質的な診断作業は医療機関、検査会社で行われることから、作業担当の技術の維持とその管理にも利用可能である。

以上、可能となる将来像をまとめると、①国の研究機関あるいは他の機関で国際標準品に準拠した国内標準品の作製と国内の感染者由来のパネル血清の作製、②製造業者、検査会社、医療機関への分与と現場での検査実施、③検査結果についての第三者機関での評価と品質管理への利用、が考察された。

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。このシステム整備を基盤とした新たな体外診断薬品質管理のシステムの確立が可能となる。

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

資料 1

風疹抗体国内標準品及び風疹抗体パネル血清の整備

厚生労働科研「体外診断薬に関する標準品に関する研究」の補助金を受け、風疹抗体の国内標準品及びパネル血清の整備が終了した。風疹パネル血清はウイルス学会検査体制委員会の庵原俊昭先生（国立病院機構三重病院）、浅野喜造先生（藤田保健衛生大学医学部小児科学）、岡田賢司先生（国立病院機構福岡病院）の御尽力で集められ、これらの血清は感染研ウイルス第3部海野幸子室長より評価され最終的に確立された。これらの血清を、風疹抗体測定用体外診断薬の品質管理や検査施設での精度管理に用いることにより、風疹抗体検査による確定診断や抗体によるサーベイランスの精度の向上が期待される。

主な使用目的(案)：

1. 風疹抗体測定を目的とする体外診断薬の承認申請に伴う承認前検査
2. 風疹抗体測定体外診断薬の市販後における頻度管理
3. 臨床検査センターにおける測定精度管理
4. 抗体検査による風疹の確定診断の精度向上

血清の保管管理等運営の方法：

風疹国内標準品及び風疹パネル血清の利用に関する運営委員会を設置し、審査基準の作製と使用申請書審査、及び以下の項目 1-4 の血清管理全般を扱う。

構成：・厚生労働省（医薬食品局審査管理課）

- ・体外診断薬委員会委員長
 - ・承認前検査担当室長
 - ・企画調整主幹
 - ・ウイルス学会検査体制委員会担当者
 - ・臨床検査薬協会担当者
 - ・衛生微生物技術協議会 風疹流行予測調査担当者会議担当者
 - ・ウイルス検査技術連絡会担当者（検査センター、試薬メーカー約 14 社の自主的組織で精度管理を実施）
- 国立感染症研究所

1. 使用申請の方法：血清銀行の血清使用申請書を参考に申請書様式を作成。
2. 保管場所：現在は、村山庁舎、6号棟1階フリーザー室、専用超低温槽
3. 輸送方法と経費：血清は有料配布、輸送は着払い宅急便。これらの経費は運営管理費にあてる。
4. 申請書類及び審査結果の記録と保管、血清の出納記録の管理保管
5. 最終形態：最終的にはブラインドで血清を配布し、その測定結果を運営委員会で評価するシステムを考慮する。

風疹パネル血清使用申請書案(※採用・不採用)

(※については、委員会にて記入)

平成____年____月____日

研究代表者	ふりがな		※受付番号
	氏名	印	
	連絡先(希望される連絡方法に○をつけてください)	電話: (内線)	倫理委員会への申請の有無 (いずれかに○をつけてください) 未申請 申請中 承認済
		FAX: E-mail:	承認倫理委員会番号(承認を受けている場合)
所属研究機関 部局・職		※結果報告日 _____年 月 日 ※論文別刷提出日 _____年 月 日	
研究課題名 (具体的に)			
研究期間	_____年 月 ~ _____年 月 予定		
これまでの風疹パネル 使用の有無 (いずれかに○をつけてください)	過去に風疹パネルの血清を 使用したことがある場合、結果報告の有無 (いずれかに○をつけてください)	風疹パネルの趣旨を理解している (いずれかに○をつけてください)	
過去に風疹パネル血清を 使用したことが、 ある ない	結果を、報告した まだ報告していない	している していない	
使用希望血清			
(案) 風疹パネル標準血清のセットの種類(各血清は0.2mL/vial) A. IgG抗体のみ(陰性、低~高HI抗体価) B. IgG及びIgM抗体の混合 C. 既往/ワクチン歴別 D. 発症後経時血清			

資料 2

使用目的

当該分野におけるこの研究（計画）の社会的な意義、予想される結果について、焦点を絞り具体的かつ明確に記入してください。風疹パネル血清を使用する必要性について必ず研究目的の中に言及してください。

これまでの研究経過及び研究成果等

これまでの研究成果、準備状況について焦点を絞り、具体的かつ明確に記入してください。風疹パネル血清を希望する経緯について必ず言及してください。