

周産期感染症

種村光代

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

該当なし

分担研究報告書

風疹ウイルス遺伝子診断技術改良の検討

分担研究者 加藤 宏幸 国立感染症研究所ウイルス3部主任研究官

協力研究員 斎藤 由美子（SRL）、峰松 俊夫（愛泉会日南病院）、

太田 直孝（国立循環器病センター）

研究要旨 RT-PCRを用いた風疹ウイルス遺伝子の検出法は極めて有用であるが、検体の処理方法、使用する試薬、プライマー等によって感度の差が生じる場合が多い。本研究においては試薬、プライマーによる感度差を調べるとともに4ヶ所の検査施設において同一条件下で試験を実施し感度の比較を行った。その結果、SRL、愛泉会日南病院、国立循環器病センター、当研究所すべてにおいて3倍以内の感度差が得られたことから、本プロトコルを用いて安定した試験を行うことができる可能性が示された。

A. 研究目的

RT-PCRを用いたウイルス遺伝子の検出法は極めて高感度かつ再現性の良い方法であり汎用されているが、異なる条件下での検査による検出感度の差が結果の一貫性と臨床応用に課題を残している。本研究においては、風疹ウイルス遺伝子の検出について RT-PCR に用いる試薬、プライマー等の違いによる感度の差を調べるとともに、同一検査条件における異なる検査施設間の感度を比較した。これにより安定した検査法の確立を目指した。

B. 研究方法

検査施設によらず安定した結果を得るために、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。まず当研究室において、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（図1）と2種類の2nd PCR 試薬（Clontech 社、advantage 2 PCR kit および Takara Ex Taq polymerase）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。

図1：風疹ウイルス RT-PCR プライマー

プライマーセット1：(rubella virus nucleotide number)

1st primer, E1P5: GCCATGCTACCGTCGAAATGCC,

E1P6: GGCTGAAGTTCAAGACAGTTTCGC,

2nd primer, E1P7: GCAGCCCACTCCGCCAGGTC,

E1P8: GCACAGCAAGCGAGTAAGCCAG

プライマーセット2：

1st primer, 1F: TCCCGTGGGTCCTGATATT

9R: GAGAGTTGCCAGACGGTCCT

2nd primer, 5F: TCACCGCGGTCGTCCTGCAG

1R: ACTTGACCCGGACGGTCTTG

C. 研究結果

当研究室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（表1）。感度差は最大で約10倍、1例を除き3倍以内であった。ただし、施設2においては、当初は検出できず、PCR の各

反応時間を延長することによって検出が可能となった。このことはサイクラーの機種によっては条件を調整する必要があることを示している。

表1：複数の検査施設における風疹ウイルスのRT-PCRの感度比較

	0	1	2	3	4	5	6	7	8
感染研	—	—	—	—	+	+	+	+	+
施設1	—	—	—	+	+	+	+	+	+
施設2*	—	—	—	±	+	+	+	+	+
施設3	—	—	—	—	—	+	+	+	+

0: 陰性コントロール、1-8: 0.006, 0.005, 0.016

0.05, 0.16, 0.5, 1.6, 5 各 PFU/10 µl

* 条件の変更前は検出不可

D. 考察

異なるプライマーと 2nd PCR Taq polymerase を用いた場合にも検出感度に大きな差異が見られなかったことは、これらに関して必ずしも指定する必要はないことを示している。各施設間の差異は、主に使用する機器（サイクラーの種類）の違いに起因していたが、適切な条件変更によって解決した。尚、本標準手順の配付前には全く検出できない事例もみられ、特に RNA の調製過程が差異を与える可能性が高く、詳細な標

準手順の配付の必要性を感じた。

E. 結論

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。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さ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ことは、標準検体の配付の意義を示すとともに、今後の風疹ウイルス RT-PCR 法の臨床応用に安心感を持てる結果となった。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

特に無し

麻疹血清抗体測定方法の問題点と麻疹パネル血清の作製

分担研究者 庵原俊昭 国立病院機構三重病院 院長

研究要旨

赤血球凝集抑制(HI)法による血清抗体陽性率は、マイクロ中和(mNT)法および酵素抗体(EIA)法と比較し、約 20%低率であったが、mNT 法と EIA 法の抗体陽性率には有意な差を認めなかった。この結果から、麻疹の血清疫学調査に HI 法を用いるのは不適切と判断された。また、麻疹血清測定方法の品質管理のために、麻疹パネル血清作製に着手した。

A.研究目的

現在本邦は麻疹消滅を目指している。適切な麻疹消滅戦略を立てるためには、麻疹の血清疫学調査が大切であり、的確な血清疫学を把握するためには、適切な麻疹抗体測定方法で麻疹抗体を測定する必要がある。麻疹抗体測定方法には、赤血球凝集抑制(HI)法、マイクロ中和(mNT)法、酵素抗体(EIA)法、受身凝集(PA)法などがある。今年度は麻疹血清疫学を調査するために適切な方法を検討するとともに、麻疹血清測定方法の精度を高めるために、パネル血清作製に着手した。

B.研究方法

1.成人血清抗体陽性率の比較

成人血清抗体を、HI 法、mNT 法、EIA 法で測定し、血清抗体陽性率を比較検討した。

2.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。

C.研究結果

1.成人血清抗体陽性率の比較

健康な成人 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 法に比較し、約 20%感度が低下していた。次に成人血清の陽性率を比較すると、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、有意に低率であった。

2.パネル血清の作製

健康成人 90 人をリクルートし、血清の採取をスタートした。

D.考察

麻疹血清抗体測定方法には数種類あり、以前は麻疹血清疫学を調査するためには HI 法が用いられてきた。しかし、最近 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、HI 法の感度に関して疑問が投げかけられてきた。

今回の調査結果でも、HI 方は mNT 法や EIA 法と比較して、抗体陽性率が約 20%低値であり、HI 法を麻疹血清疫学調査に用いるのは不適切であることが示された。

今回の調査から、mNT 法と EIA 法の陽

性率は同じであることが示された。mNT法は測定に手間がかかり、結果がでるまでに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欠けるが、多数の検体を短時間で処理できる方法である。今回の結果から、麻疹の血清疫学調査には、EIA法を用いるのが適切であると思われた。なお、EIAは費用がかかる方法であり、費用面からはmNT法が優れている。

適切な血清抗体の測定結果を得るためには、測定に用いるキットの品質が保証されることと、測定方法の手技が適切に行われることが大切である。このためには、パネル血清を用いて、定期的に品質のチェックと手技のチェックを行なうことが大切である。今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る。今後mNT法、EIA法、HI法で抗体価を測定し、パネル作成を計画している。

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なく、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である。本邦でも測定機関および測定方法間の差が比較できるよう、標準血清の導入を図る必要があると思われた。

E.結論

HI法による麻疹血清抗体陽性率は、mNT法およびEIA法と比較し、約20%低率であったが、mNT法とEIA法の抗体陽性率には有意な差を認めなかった。この結果から、麻疹の血清疫学調査にHI法を用いるのは不適切であり、EIA法かmNT法

を用いるべきである。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。

F.健康危険情報

特記することなし。

G.研究発表

1.論文発表

・庵原俊昭：ウイルス感染症の診断，小児科診療 68：1992-1999、2005

・庵原俊昭：ウイルス感染と感染制御，感染制御 1：331-336、2005

2.学会発表

・庵原俊昭、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 2005.4.14-15

H.知的財産権の出願・登録状況

なし。

体外診断薬に関する標準品に関する研究

「麻疹抗体測定法の比較検討」

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 麻疹の抗体測定方法は中和試験（NT法）、赤血球凝集抑制試験（HI法）、ゼラチン粒子凝集試験（PA法）、酵素免疫法（EIA法）など様々である。本研究では、迅速で簡便な方法であり、麻疹の抗体測定方法として今後広く普及すると考えられるPA法およびEIA法により抗体測定を行い、その結果について検討した。合計469検体の血清を用いて測定を行った結果、PA法とEIA法の測定結果には正の相関が認められ（相関係数0.707）、抗体陽性率にもほとんど差はみられなかった（PA法：97.7%、EIA法：97.2%）。また、PA法を基準とした場合、EIA法の陽性／陰性判定の一致率は99.1%、陽性的中率（PPV）および陰性的中率（NPV）はともに100%と非常に高かったことから、PA法とEIA法はどちらの方法を用いても測定結果にほとんど差はないと考えられる。感染あるいは発症を防御できる抗体価の基準という点において、PA法についてはNT法と相関があり、PA価が1:128あるいは1:256以上であればほぼ中和抗体陽性であるとの報告があるが、EIA法についてはそのような基準は明らかにされていない。そこで、PA法の結果を基準にEIA法のPPVを算出し、それをもとに各PA価に相当するEIA価の目安を算出した。これは、EIA法で測定した場合においても、その抗体レベルを判断する目安として有用であると考えられる。

A. 研究目的

麻疹の抗体測定方法としては、中和試験（NT法）、赤血球凝集抑制試験（HI法）、ゼラチン粒子凝集試験（PA法）、酵素免疫法（EIA法）などが知られている。NT法は感度が高く、特異的防御抗体が測定できるが、生きたウイルスや細胞培養を扱うため感染防止に配慮した施設が必要であり、また結果がでるまでに時間を要する。HI法は特別な施設は必要とせず、従来から広く用いられている方法であるが、近年、赤血球凝集活性が欠損しているウイルス株が分離されていることや、試験に用いるアフリカミドリザルの赤血球が入手困難になってきている。PA法は迅速・簡便な方法であり、感度も高い。また中和抗体との相関性（PA価が1:128あるいは1:256以上で

あればほぼ中和抗体陽性）も報告されており、その結果は感染・発症防御の目安ともなる。EIA法はそのような目安となる基準はないが、一度に多数の検体を測定でき、感度や迅速性にも優れている。またIgGやIgM抗体をクラス別に測定できるという利点がある。以上のような理由から、後の2方法は麻疹の抗体測定方法として今後広く普及するものと考えられる。

そこで本研究では、PA法およびEIA法により、同一血清の抗体測定を行い、得られた結果について比較、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およ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。麻疹抗体の測定は、PA 法および EIA 法ともに市販の抗体測定キット（PA 法：富士レビオ，EIA 法：デンカ生研）を用い、それぞれ添付文書に従った。判定は、PA 価は 1:16 以上、EIA 価（IgG index）は 1.0 以上を麻疹抗体陽性とした。得られた成績から、PA 法を基準とした場合の EIA 法の一貫率、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。

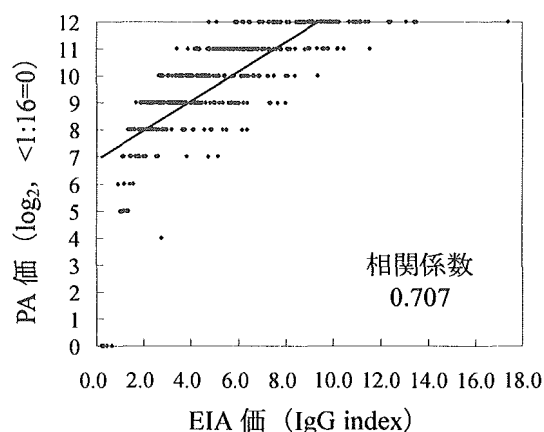
C. 研究結果

調査対象となった学生およ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。抗体陽性率は、PA 法で 97.7%（458/469）、EIA 法で 97.2%（456/469）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（PA 法で陽性 2 検体と陰性 2 検体が EIA 法で判定保留）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。また、PA 法の $\geq 1:64$ から $\geq 1:2048$ に相当する EIA 価の目安を算出し、表 1 に示した。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 \log_2 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（図 1）。

表 1 PA 法の $\geq 1:64$ から $\geq 1:2048$ に相当する EIA 価の目安（PPV $\geq 95.0\%$ の場合）

PA 価	EIA 価 (IgG index)
$\geq 1:64$	≥ 1.0
$\geq 1:128$	≥ 1.0
$\geq 1:256$	≥ 1.5
$\geq 1:512$	≥ 3.0
$\geq 1:1024$	≥ 6.5
$\geq 1:2048$	≥ 8.5

図 1 PA 法および EIA 法による麻疹抗体価の相関図（n = 469）



（倫理面の配慮）

なお本研究では、取り扱う情報の中に個人が特定されるような情報が含まれることは原則としてない。従って研究成果の公表にあたって個人的情報が含まれることはない。

D. 考察

わが国における麻疹患者報告数（全国約 3,000 の小児科定点あたり報告数）は、2001 年の予防接種キャンペーン以降、現在まで着実に減少してきているが、いまだ感受性者は多いと推定され、2012 年の西太平洋地域における麻疹の elimination 達成に向けて、今後とも感受性者対策は非常に重要である。本研究において 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。

また、一般に定性試験に用いられる EIA 法の測定結果から、感染あるいは発症を防御できる抗体レベルの基準について、目安となる EIA 価を算出した。しかし、この目安となる EIA 価は、NT 法と相関が認められている PA 法を基準に算出したものであることから、直接に NT 法と EIA 法、あるいは従来から広く

行われている HI 法と EIA 法との相関性についての検討も必要と考えられる。本研究で用いた検体はその多くが 20 代の健常人の血清であることから、幼小児や高齢者といった異なる年齢層での検討に加え、可能であれば麻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ろう。

E. 結論

麻疹の抗体測定をゼラチン粒子凝集試験 (PA 法) および酵素免疫法 (EIA 法) で行い、その結果について検討した結果、両方法の陽性率、一致率、および陽性的中率、陰性的中率から、どちら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、PA 法で得られた結果を基準に算出した各 PA 価に相当する EIA 価は、今後、麻疹の免疫状態を判断する目安として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：予防接種に関する最近の話題。
臨床と微生物 32 (4). 390-392, 2005.

2. 学会発表

1) 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 年 6 月, 福岡)

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

体外診断薬に関する標準品に関する研究

分担研究者 沼崎 啓 国立感染症研究所ウイルス第三部 室長

研究要旨

世界レベルでの麻疹排除対策戦略計画の実行には疫学的監視体制とウイルス学的及び遺伝子学的特性に基づいた科学的監視体制の充実が不可欠である。本研究では麻疹の迅速かつ簡便な実験室内診断法の開発、確立、標準化について検討した。

沼崎 啓
国立感染症研究所ウイルス第三部
室長

A. 研究目的

わが国においては従来より、麻疹の診断は臨床所見に基づくものが主体であり実験室内診断法は軽視される傾向にあった。また検査法の確立、標準化に関しても多くの課題が指摘され早急な対応が求められていた。

B. 研究方法

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の開発、評価、標準化を行った。

（倫理面への配慮）

実験室内診断に関する手技が主体であり、倫理面での配慮は必要としなかった。

C. 研究結果

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た。Vero/SLAM 細胞は中和抗体測定への応用も可能であった。

D. 考察

わが国では臨床症状のみで診断することが多かったが、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。現在までのところ麻疹特異的血清 IgM 抗体測定的重要性が確認されているが、今後更に検討が必要なもの判断された。

E. 結論

本研究の成果により、麻疹ウイルスによる免疫抑制機構の解明、ワクチンの品質管理システムの改善などに寄与が可能であった。

F. 健康危険情報

特に関連性は認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

- 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 9. 16, 東京.
- 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 10. 7, 苫小牧.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

特記すべきこと無し

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 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 HBs 抗原を含むパネルの整備が求められている。本研究では変異型 HBs 抗原パネルの作成を目的として、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。

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、近年抗原変異株が分離されるようになった。しかし、診断用 HBs 抗原検出試薬の中には変異型 HBs 抗原を検出できない例のあることが報告されている。これらの変異は B 型肝炎ワクチン接種や HBs 抗体の投与によって共通抗原基 a（中和抗体認識部位、図 1）に変異を起こしたエスケープ変異や HBV 持続感染者から自然経過の中で生じた変異として報告されており、B 型肝炎の予防・治療のうえで問題となっている。そこで、診断用 HBs 抗原検出試薬の評価のために種々の変異型 HBs 抗原を含むパネルの整備が求められているが、このような変異型 HBs 抗原を含む血漿は入手が困難であり、容量に限りがある。我々はすでに診断用 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 に変異を導入した組換え体を作成し、ヒト培養細胞で発現する 3 種類の変異型 HBs 抗原を作製した。しかし、代表的な変異である G145R として報告した変異が実は既知の異なる変異 G145A であることが判明した。本年度は改めて G145R を作成し、その特異性を調べたので、すでに作成した 3 つの変異と合わせて報告する。

B. 研究方法

1) *in vitro mutagenesis*

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（本研究班分担研究者 岡田）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 2 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 PCR を行い、増幅産物を blunting-kination-ligation 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 (図 3)。

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。また、G145R は共通抗原基 a に対するマウスモノクローナル抗体を一次抗体として蛍光免疫染色を実施した。

(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 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、図 4A に示すとおり G145R は野生型と比較して非常に弱い陽性を、また図 4B に示す通り M133T 及び G145A は

野生型よりは弱いながらも明らかな陽性を示した。T123N は濃縮しなければ検出できなかった。図 5A に示すように G145R はウサギ抗 HBs 抗原抗血清を一次抗体として蛍光免疫染色した結果、野生株より薄いながらも明瞭に蛍光染色された。これは、すでに報告した、G145A、M133T 及び T123N の結果と同様であった。共通抗原基 a に対するマウスモノクローナル抗体を一次抗体として G145R を蛍光免疫染色した結果、野生株と同程度に明瞭に蛍光染色された (図 5B)。

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、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。HBs 抗原検出試薬 A を用いて培養上清 HBs 抗原を検出した結果、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。一方、G145R と T123N は免疫染色の結果とは異なり、培養上清では非常に弱い反応しか示さなかった。G145R は測定法によって検出能に差のあることが知られている。また、すでに報告したように T123N は細胞抽出液も HBs 抗原検出試薬 A で陰性を示すことから、G145R と T123N 変異型 HBs 抗原は培養上清に分泌されているがこの測定法によっては検出されにくいと考えられる。

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、G145A、M133T 及

び T123N の 4 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、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。また、G145R と T123N の変異型 HBs 抗原は培養上清に分泌されているが実験方法によって検出成績に差がみとめられたことから、臨床検体の変異型 HBs 抗原の特異性を反映していると期待できる。この点を明らかにするために、わが国においても代表的な変異である G145R 変異の臨床検体と G145R 組み換え HBs 抗

原とを各種の診断用 HBs 抗原検出試薬を用いて測定し、比較検討する計画である。

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。

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>GGACACCTTCGAAGTAGGGTT</u> AAATGTATACC*	34(20)
145-RV567-547		5'CAA CAA GAG GGA AAC ATA GAG	21
G145R-Fw568-597	GGA to GCA	5'CTGTACAAAACCTTCGGAC <u>G</u> AAATTGCAC	30
145-RV567-547		5'CAA CAA GAG GGA AAC ATA GAG	21
G145A-Fw568-597	GGA to GCA	5'CTGTACAAAACCTTCGGAC <u>G</u> AAATTGCAC	30
133Rv541-520		5'TTGAGCAGGAATCGTGCAGGTC	22
M133TFw542-564	ATG to ACG	5'GGAACCTCTA <u>G</u> TTTCCCTCTTG	23
123RV511-488		5'TCCCGTACTGGTAGTTGATGTTCC	24
T123NFw512-534	ACC to AAC	5'CCATGCAAG A <u>C</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	Origin
G145R	Arg145	adw	Italy
G145A	Ala145	-	Japan
M133T	SA7	ayw	South Africa
T123N	BA3.4	ayw	Pakistan

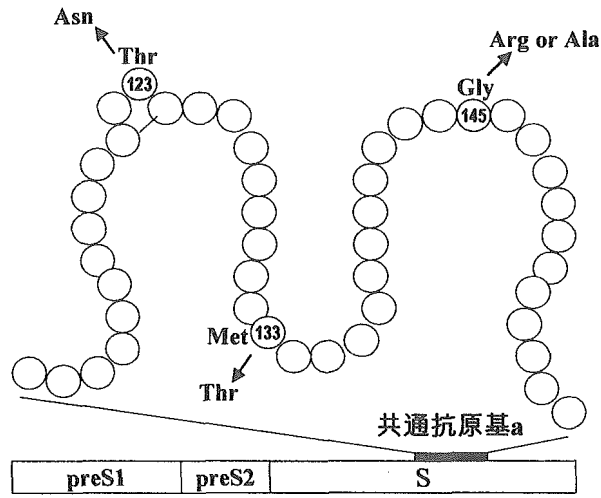
Loss of d/y antigenicity

Chronic Liver disease, diagnostic failure

Liver transplant-HBIG treated

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

図1. 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

図2 Construction of HBs Mutants

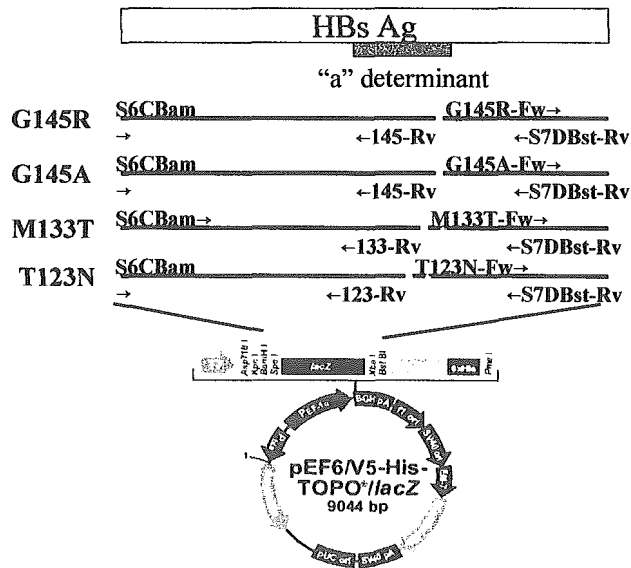
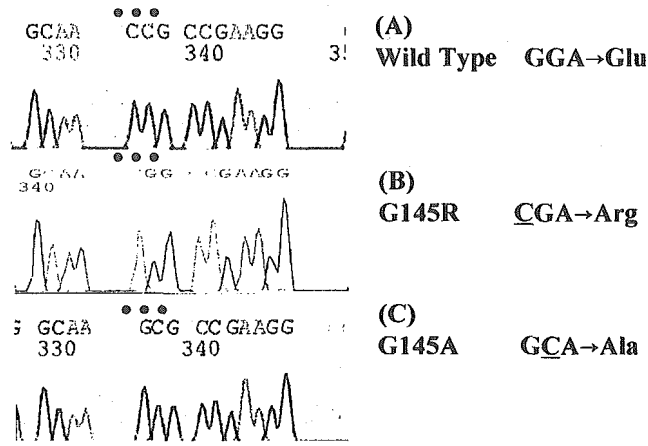


図3 DNA Sequence of G145 mutants



図の塩基配列はアンチセンス、... は145番目のアンチコドンを示す。

図4 Antigenic Detection of HBsAg in the Culture Supernatants

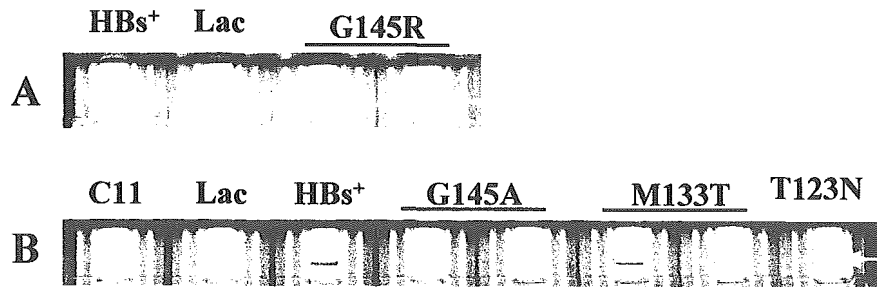
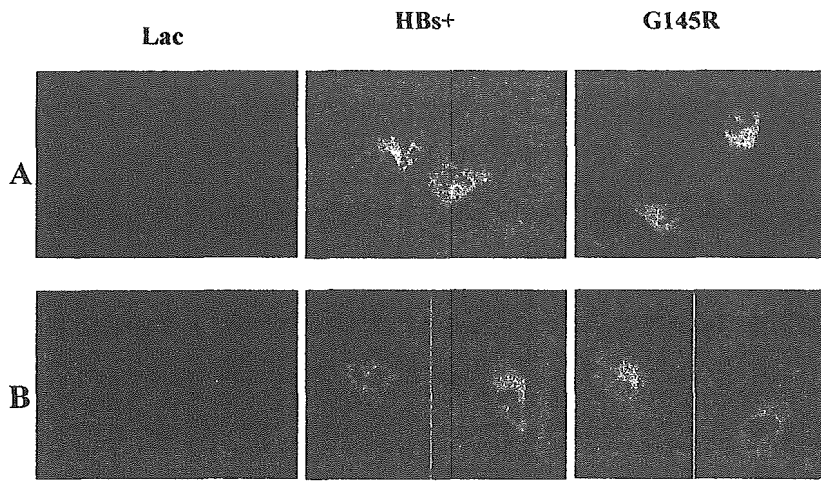


图5. Immunofluorescence of Cells Expressing HBs



A Rabbit anti-HBsAg pAb

B Mouse anti-"a-determinant" MoAb

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

B型肝炎ウイルスの genotype パネルの作製と S 抗原の解析

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 genotype A から G までの HBV 全長をクローニングした各種プラスミドを用いて発現させた HBs 抗原の抗原性を各 genotype 間で検討したが、各クローンが有するプロモーター活性の影響を否定できないことが示唆された。本研究では、より抗原性の違いを評価し易くするため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 抗原の発現が確認された。

G. 研究目的

HBV は全世界に広く分布し、遺伝子的に genotype A から H までの 8 グループに分類され、国や地域によって存在する遺伝子型が異なっていることが報告されている。一方、国際間の交流が頻繁になっている現在において、日本人の献血者から本来日本には存在しない genotype A や H の HBV 検出されている。これらのことから、市販されている HBs 抗原診断薬がこれらの遺伝子型の異なる HBs 抗原を検出できるか検討する必要がある。そのためのパネルの整備が必要であるが、日本に存在しない遺伝子型の HBs 抗原陽性血漿を十分な量を確保することは困難である。パネルの条件として、同一の検体が大量に、さらに同一の抗原性を有する検体が反復して得られることが必要であり、さらに利便性を考えると感染性のないこともパネルの条件になる

と考えられる。我々は、既に genotype A から H までの HBV の全長をプラスミドにクローニングすることで、理論的には半永久的に同一のアミノ酸配列を持つ HBs 抗原を産生する系を確立してある。しかし、HBs 抗原の発現量は各クローンが有するプロモーター活性によって制御されていることから抗原性の検討は困難である。本研究では同一のプロモーターの下流に各 genotype の HBs 遺伝子を挿入し、発現量を揃えることによって HBs 抗原の抗原性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

クローニングされた genotype A から H までの HBV 全長を鋳型として、各遺伝子型の HBs 遺伝子に合わせてプライマーを作り、増幅・精製後発現ベクター pEF6/V5-HisTOPO(invitogen) に組み込んだ。インサートが挿入されたプラ

スミドを HuH7 人肝癌細胞株にトランスフェクトし、48 時間後の培養上清中の HB s 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。また、異なるドナー由来の HB s 抗原陽性血漿から DNA を抽出し、S 遺伝子を PCR によって増幅後、ダイレクトシーケンスによって genotype を解析した。さらに発現ベクター pEF6/V5-HisTOPO(invitogen) にクローニングし、HuH7 細胞にトランスフェクションすることで HB s 抗原の発現を確認した。発現が確認されたクローンはさらに塩基配列も解析している。

C. 研究結果

Genotype A から H までの HB s 遺伝子を各発現ベクターにクローニングし、人肝癌細胞株に遺伝子導入することによって培養上清中の HB s 抗原の発現を解析した。図 1 に示すように培養液中から全ての genotype の HB s 抗原が検出された。また、各 HB s 遺伝子の塩基配列から各々鋳型に用いた genotype 由来の HB s 抗原であることを確認した。

D. 考察

以前の研究では HB V の全長が挿入されているクローンを肝癌細胞株に遺伝子導入することによって培養液中に HB s 抗原を産生させていたが、各 genotype 間にプロモーター活性の違いによると考えら

れる HB s の産生量の差が認められた。そのため、HB s 抗原の genotype 間の抗原性の検討は困難であった。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することができた。しかも産生された HB s 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できたので、血漿中に存在する native な HB s 抗原に類似したりコンビナント HB s 抗原が得られたと考えている。しかも人肝癌細胞株由来のため糖鎖等の付き型も類似しているものと考えている。今回の各クローンを遺伝子導入して得た培養液で HB V の A から H までの HB s 抗原パネルを作製した。遺伝子解析まで実施しているので HB s 抗原診断薬の評価に有用と考えられる。特に特定の遺伝子型に対する検出感度が低い場合にアミノ酸レベルで感度の低い原因を解析することが可能になり、理論的な予測の基に診断薬の改良が実施されることが考えられる。

また、プラスミドにクローニングされているため、全く同一な HB s 抗原を供給することができ、診断薬の評価に大いに貢献すると考えられる。

E. 結論

HBV の genotype A から H までの HB s 遺伝子を同一のプロモーターの下流にクローニングし、HB s 抗原発現プラス