

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 竹森 利忠

平成19（2007）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
研究の統括	
主任研究者： 竹森 利忠（感染研・免疫部）	 1
II. 分担研究者研究報告	
1. 風疹パネル血清の評価	 13
駒瀬 勝啓（感染研・ウイルス第三部）	
海野 幸子（感染研・ウイルス第三部、医薬品医療機器総合機構）	
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）	
庵原 俊昭（国立病院機構三重病院・院長）	
浅野 喜造（藤田保健衛生大学医学部・小児科）	
岡田 賢司（国立病院機構福岡病院・部長）	
2. 麻疹・風疹パネル血清の作製－抗体測定方法の問題点－	 16
庵原 俊昭（国立病院機構三重病院・院長）	
岡田 賢司（国立病院機構福岡病院・部長）	
3. 妊婦における風疹IgM抗体の評価	 18
川名 尚（帝京大学医学部付属溝口病院・産婦人科）	
4. 先天性風疹感染症診断における羊水PCRの役割に関する検討	 21
池田 智明（国立循環器病センター・周産期科）	
太田 直孝（国立循環器病センター・周産期科）	
峰松 俊夫（愛泉会日南病院・疾病制御研究所）	
5. 風疹ウイルス遺伝子診断標準化と整備	 24
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）	
6. 麻疹抗体測定法の比較検討	 27
多屋 馨子（国立感染症研究所・感染症情報センター）	
佐藤 弘（国立感染症研究所・感染症情報センター）	
7. 麻疹診断の標準化に関する検討	 30
沼崎 啓（国立感染症研究所・ウイルス第三部）	
堤 裕幸（札幌医科大学・小児科）	
斉藤 義弘（慈恵医科大学・小児科）	
8. B型肝炎ウイルスS抗原の解析と組み換えHBs抗原パネルの作製	 32
岡田 義昭（感染研・血液・安全性研究部）	
9. HBV Genotype 別HBs抗原国内標準品候補の作製とその評価	 36
水落 利明（感染研・血液・安全性研究部）	
10. HBs抗原変異とHBs抗原検出法に関する研究	 42
山口 一成（感染研・血液・安全性研究部）	
水沢左衛子（感染研・血液・安全性研究部）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	 46
IV. 論文別刷	 47

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

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 客員研究員

研究要旨

風疹抗体検査法、風疹ウイルス遺伝子検査法、麻疹抗体検査法並びに HBs 抗原検査法の品質管理の向上を目的として本研究を実施した。

1. 昨年度において作製した風疹標準パネル血清の性状を検討する意味から、各血清の中和抗体価を検討した。ワクチン接種により誘導される免疫反応が中和活性においても HI 法と同様に自然罹患より弱いことが示唆された。また、中和抗体価は、HI 抗体価や IU 抗体価との間に、ある程度の相関性が観察された。
2. 風疹 IgM 抗体陽性の妊婦の先天性風疹症候群罹患児出生のリスク評価法としての IgM 抗体の評価、並びに、風疹ウイルス遺伝子診断法の考察を行った。
3. 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、診断に適切な麻疹抗体測定法について検討した。PA 法および EIA 法は、麻疹の抗体測定法として差はなく、また、感染あるいは発症を防御できる抗体レベルの目安となりうることが示された。よって、迅速かつ簡便である両法は今後の感受性者対策並びに臨床診断における有用性が示唆された。
4. 昨年度において作製した遺伝子型及び変異型リコンビナント HBs 抗原パネルを使用して、国内で使用されている B 型肝炎抗原検出キットの性能を評価した。すなわち、既知のすべての genotype (A-H) に由来するリコンビナントパネルを国内で使用している 10 種類の HBs 抗原検出キットで測定した結果、一部のキットにおいて genotype E と F 由来の低濃度 (0.2 IU/ml) 検体を陰性と判定することが示唆された。また、国内で最も普遍的な genotype C のバックグラウンドに導入した 4 種類の遺伝子組換え変異型 HBs 抗原を 5 種類の HBs 抗原検出キットを用いて測定した結果、キットによって性能に影響を受ける変異型が異なることが示された。この結果により、HBs 抗原検出キットの性能向上にとって有用な情報を提供することができた。

〔分担研究者〕

山口 一成

（感染研・血液・安全性研究部・室長）

駒瀬 勝啓

（感染研・ウイルス第三部・室長）

海野 幸子

（感染研・ウイルス第三部・客員研究員、
医薬品医療機器総機構）

庵原 俊昭

（国立病院機構三重病院・院長）

岡田 賢司

（国立病院機構福岡病院・部長）

川名 尚

（帝京大学医学部附属溝口病院・
産婦人科・客員教授）

池田 智明

（国立循環器病センター・
周産期科・専門外来部長）

種村 光代

（名古屋市立大学大学院医学研究科・講師）

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）

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）

〔研究協力者〕

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・部長）

浅野 喜造

（藤田保健衛生大学医学部・小児科・教授）

太田 直孝

（国立循環器病センター・周産期科）

峰松 俊夫

（愛泉会日南病院・疾病制御研究所・所長）

佐藤 弘

（国立感染症研究所・感染症情報センター）

堤 裕幸

（札幌医科大学・小児科・教授）

斉藤 義弘

（慈恵医科大学・小児科・助手）

水沢左衛子

（感染研・血液・安全性研究部・
主任研究官）

A. 研究目的

妊娠の早期に風疹ウイルスに感染すると出生児に先天性風疹症候群（CRS）をもたらす事が知られており、特に妊婦における風疹の確定診断は抗体検査、ウイルス遺伝子検出検査のいずれにおいても社会的意義が大きい。一方、風疹は予防接種法でワクチン勧奨接種対象疾患となっており、ワクチンによって予防、制御が可能な疾病であると考えられている。今年度からは麻しん風しん混合ワクチンとして1歳児、及び就学前の2回接種が導入され、CRSの発生をより抑える効果が期待されている。こういった環境の中では風疹抗体の保有状況の把握も重要であり、確実な診断法が必要となっている。本研究で整備する風疹標準パネル血清は風疹抗体測定用の体外診断薬キットの感度表示法の統一化や感度の評価、さらには臨床検査施設の精度管理等を実施するための重要な基盤となる。更に、ウイルス遺伝子検出診断技術の標準化により検査機関間での診断技術の均一化、更に母児感染診断基準の指針の作成が可能になり、行政的、社会的意義が高い。

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った。しかし、予防接種が普及して麻疹患者数が減少してくると、麻疹の臨床経験のない医師が増加し、臨床所見のみでは診断が困難になることが予想される。また、非典型的な症状の患者の確定診断にはラボ診断が不可欠である。WHOは世界レベルでの麻疹排除対策戦略計画の実行に当り、免疫状態の把握と患者のラボ診断による確定診断を求めている。本研究では、本邦で用いられている種々の麻疹抗体測定方法を比較検討して有用性と問題点を明らかにすることを目的とする。

日本においてB型肝炎の母子感染予防対策が実施され、HBs抗原陽性の小児は激減している。しかし、ワクチンに対するエスケープ変異が出現して予防・治療上の問題となっている。更に、昨今

においては今まで国内では検出頻度の低かった genotype A 等の HBV 感染が増加しており、性感染症としての B 型肝炎という新たな側面が浮上してきた。従って、ウイルスの変異並びに genotype の違いに左右されない HBV 感染の診断は医療および公衆衛生において重要である。そこで、昨年度において既知の全ての genotype (A-H) 由来のリコンビナント HBs 抗原パネル、並びに、わが国でもっとも普遍的な genotype C のバックグラウンドに変異を導入した HBs 抗原パネルの作製を作製した。今年度は昨年度に作製したリコンビナント HBs パネルを用いて国内で使用されている診断薬キットを評価することを目的とする。一方、HBs 抗原陽性の小児は激減しているため、HBs 抗原検出キットの評価に必要な陽性血漿を確保することが今後困難になると予想されることから、すでに収集した HBs 抗原陽性血漿からリコンビナント HBs 抗原パネルを作製することを目的とする。

B. 方法

1. 風疹パネルの評価

90検体の血清を収集し、その中和抗体価を測定した。中和抗体価はプラークリダクション法で測定した。攻撃ウイルスはHiroshima 03株（2003年に分離）を用いた。細胞は RK-13株を用いた。HI抗体価は国立感染症研究所、流行予測調査の術式を用いて測定し、EIA法はルベラ IgG (II)・EIA「生研」(デンカ生研)を用い、平行線定量法で IU価を算出した。（倫理面への配慮）収集した血清はインフォームド Consent により使用目的が了承されたものである

2. 風疹抗体測定法の比較検討

風疹HI法とEIA法の比較成人血清100検体を、風疹HI法とEIA法（デンカ）で測定し、比較検討した。（倫理面への配慮）なお、いずれの血清も、研究目的を説明し、同意を得てから採取し

た。

3. 妊娠初期のIgM抗体の評価

妊娠初期に風疹IgM抗体が検出されたために先天性風疹症候群のリスクについてコンサルトを求めてきた妊婦44症例についてIgG抗体のAvidity Index、IgM抗体、IgG抗体をデンカ生研製キットを用いELISA法で測定した。(倫理面への配慮)IgM抗体の評価のために我々の開発したAvidity Indexを測定して参考にする旨の同意を口頭で得た上で行った。

4. 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：2004年に徳之島の1産科施設で取り扱った妊娠前に風疹抗体を保有している妊婦のうち、風疹HI抗体価の上昇から妊娠中の再感染が疑われた6症例を免疫学的に検討した。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。また、分娩時の臍帯血を用いて風疹特異的IgM測定及び風疹ウイルス遺伝子の検出を行った。

5. 風疹ウイルス遺伝子診断法の整備と評価：2つのグループによって行われた。すなわち(1)2005、2006年に主に近畿地区からコンサルテーションを受けた17症例について、原則として、primerA,B,C,Dを用いる国立感染症研究所で実施している方法とともに、Bosmaらが報告した、primer R2, R7, R8c,R11を用いる方法とともに行った。(2)複数のプロトコルを検討して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診断基準を明らかにして標準化を検討した。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。(倫理面への配慮)インフォームドコンセントを得ているものを使用した。

6. 麻疹抗体価の異なる測定法の比較検討：3つのグループによって実施された。即ち、(1)①

麻疹NT法による抗体価の比較：成人血清50検体、臍帯血49検体を、チャレンジウイルス米川株、培養細胞B95a細胞の組み合わせ(NT法1)と、チャレンジウイルス長畑株、培養細胞Vero細胞の組み合わせ(NT法2)で、麻疹NT抗体価を測定し、比較検討した。②麻疹NT法とEIA法の比較：成人血清80検体を、麻疹NT2法とEIA法(デンカ)で測定し、比較検討した。(倫理面への配慮)いずれの血清も、研究目的を説明し、同意を得てから採取した。(2)469の検体について同一検体を用いて市販キットにより

PA法、EIA法による麻疹抗体測定を行った。両法の陽性率、一致率、およびPA法に対するEIA法の陽性的中率、陰性的中率を算出するとともに、EIA法の結果からEIA抗体価(IgG index)に相当するPA抗体価の目安を算出した。取り扱う情報に個人が特定される情報は含まれていない。(3)WHO/WPRO地区においてDade Behring,Deankaなどのキットによるパネル血清の評価を行った。Vero/hSLAM細胞で麻疹野生株およびEdmonston株を用いたブラック減少法による中和試験の確立も検討した。(倫理面への配慮)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ない。従って研究成果の公表にあたって個人情報が含まれることはない。

7. リコンビナントHBs抗原の作製：(1)HBV陽性血漿からPCR法によってクローニングしたS遺伝子を、肝癌細胞株で発現させた。(2)Reverse PCR法による変異型プラスミドの作製：置換する塩基配列を持ったプライマーとそれに隣接する逆向きのプライマーを用い、KOD plus DNA Polymerase(TOYOBO)を用いてReverse PCR法によってプラスミド全長増幅、ライゲーションにより再環状化して変異体を作製した。

8. リコンビナントHBs抗原パネルを用いた

HBs 抗原検出キットの評価： (1)現在報告されているすべての HBV genotype (A-H) のリコンビナント HBs 抗原を作成し、国内で販売されている高感度 HBs 抗原検出キットを用いて、それぞれのキットが genotype の異なる HBs 抗原をもれなく検出できるかを検討した。さらに、ある特定の genotype 由来 HBs 抗原の主要抗原決定基の一部にアミノ酸置換を行ない、キットの測定感度に変化が生じるかについても検討した。(2) 4 種類の変異型 HBs 抗原パネル (G145R、G145A、M133T 及び T123N) を作製し、国内で販売されている高感度 HBs 抗原検出キットを用いて、それぞれのキットが変異型 HBs 抗原をもれなく検出できるかを検討した。(倫理面への配慮) 本研究において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検体(ヒト血液由来成分を含むが、取り扱いおよび廃棄については細心の注意を払った)、および市販の血漿検体を用いているために倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

1. 風疹パネル血清の評価： パネル標準血清候補、90 検体のうち使用に相当と考えられた 88 検体で中和抗体価を測定した。HI 法、EIA 法で陰性、あるいは擬陽性だった血清 14 検体はすべて中和抗体価が 6 倍未満であった。一方、HI 抗体価 16-64、EIA 法 INDEX で 1.4 以上を示す血清 74 検体の中に中和活性 6 倍未満の血清が 30 検体あった(40.1%)。ワクチンのみ接種者(51 人)のうち、中和抗体活性 6 倍未満の者は 31 名と約 60% にのぼったが、自然罹患のみの者(20 名)のうち 6 倍未満の者は 7 名(35%)であり、ワクチン接種者の方が高かった。風疹罹患年齢とワクチン接種年齢を比較すると、ワクチン接種の平均年齢は 12.1 才(今回の採血までは平均 8.8 年間)、罹患平均年齢は 4.8 才(同 14.9 年)

であった。また HI 抗体価、EIA 法から算出された IU 値と中和抗体価は HI 価・IU 抗体価のような定量性を持つ相関を示さなかったがある程度の相関性を示した。

2. 風疹ウィルス遺伝子診断標準化と整備： 風疹ウィ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。なお、本年度は幸い大きな風疹の流行は認められなかった。HI 高値あるいは風疹特異的 IgM 抗体が陽性であるため相談を受けた妊婦の臨床症例は多数あったものの、発疹なし、患者接触なしにて先天性風疹症候群の危険性は極めて低い症例ばかりであった。追跡調査の結果でも、これらの症例からの先天性風疹症候群患児の出生例は存在しなかった。また母体 IgG 親和性の測定を導入することで妊娠中の初感染が否定できて安心感を得られた妊婦の症例も確認された。

3. 妊婦における風疹 IgM 抗体の評価： 「persistent IgM」では、(1) IgG 抗体の Avidity Index が 70%と高く、(2) 1 ヶ月以上間において 2 回測定してもその値はほとんど同じであり、(3) 同時に測定した IgG 抗体が 80 以上と高値を示す などの特徴があり、初感染と鑑別が可能と思われた。

4. 麻疹抗体測定法の比較検討： 496 検体の血清を用いて PA 法と EIA 法で麻疹抗体を測定した。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) 認められたが、一致率は 99.1% (465/469) と非常に高かった。また、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 抗体価は希釈倍数で 2 倍ずつ、および EIA 抗体価は IgG index で 1.0 ずつ増やし、それぞれの組み合わせについて PA 法に対する EIA 法の PPV を算出したところ、表 1 の結果が得られた。1 つを例にとると、「EIA 抗体価が 1.0 以上の結果のとき、PPV 95.0%以上で PA 抗体価は 1:128 以上である」となる。さらに、両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、相関係数は 0.707 であった。
5. 麻疹・風疹パネル血清の作製—抗体測定法の問題点： (1) 麻疹 NT 法による抗体価の比較； NT 法 1 と NT 法 2 の陽性・陰性の感度および特異度は 100%であり、完全に一致した。2 管以上の差があったサンプルは 4 検体のみであり、96% が測定誤差範囲に収まった。また、両抗体測定方法の相関は、 $R=0.9236$ 、相関直線 $Y=0.96X-0.01$ と、原点を通る傾き 1 に近似する直線になった。(2) 麻疹 NT 法と EIA 法の比較； 健康成人 80 人の抗体陽性者数は、NT 法 78 人(97.5%)、EIA 法 74 人(92.5%)とほぼ一致した。また、EIA 法で判定不能 (equivalent, $\pm$) の 4 人は NT 法ではすべて陽性であった。NT 法と EIA 法の抗体分布を比較すると、NT 法の中央値は 32 倍であったが、EIA 法では 8~16EIA 価に含まれ、EIA 法で測定した抗体は、NT 法よりも低い値に分布した。(3) 風疹 HI 抗体と EIA 法の比較；健康成人 100 人の抗体陽性者数は、HI 法 94 人(94%)、EIA 法 94 人(94%)と一致し、EIA 法で抗体陰性者は、すべて HI 法陰性であった。HI 法と EIA 法の抗体分布を比較すると、HI 法の中央値は 128 倍であったが、EIA 法では 16~32EIA 価に含まれ、陽性閾値を補正しても、EIA 法で測定した抗体は、HI 法よりも低い値に分布した。
6. 麻疹診断の標準化に関する検討： 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、現行の簡易キットを用いても WHO/WPRO 地区の 19 施設でのパネル血清を用いた測定成績に大きな差異は認められず、本法による国際的標準化、統一化は可能なものと判断された。Vero/hSLAM 細胞を用いた中和試験方法は従来の CPE を用いた方法と比較しても再現性、客観性が良好であった。
7. B 型肝炎ウイルス S 抗原の解析と組み換え HBs 抗原パネルの作製： Genotype B の 9 検体と C の 10 検体から計 38 個の HBs 遺伝子を発現するベクターを作製し、塩基配列を決定した。何れのプラスミドもヒト肝癌細胞株 HuH7 に遺伝子導入することによって培養上清中に HBs 抗原を産生した。ダイレクトシーケンスでは遺伝子型が同一な個体間では約 2%の塩基が異なっていた。ダイレクトシーケンスとプラスミドにクローニングした塩基配列を比べると 1-2 個の違いが認められた。また、genotype C の 2 検体については各々 5 クローン、10 クローンの S 遺伝子を解析したところ、1-2 個の塩基配列が異なるプラスミドが多かったが、少数ではあるが、9 個異なるクローンが得られた。
8. HBV Genotype 別 HBs 抗原国内標準品候補の作製とその評価： 本研究で用いた 10 種類の HBs 抗原検出キットにおいては、いずれの

genotype(A・H)のHBs抗原検体(1.0 IU/ml)も陽性と判定することができた。しかしながら、低濃度(0.2 IU/ml)のHBs抗原を測定した場合、一部のキット(No. 8)においては、genotype EとF由来の検体をcut-off値付近ではあるが陰性と判定することが示された。HBs抗原主要抗原決定基であるNo. 98-161のアミノ酸配列を各genotypeで比較、genotype EとFのみが他のgenotypeと異なり、140番目がT(Threonine)ではなくS(Serine)残基であることに注目した。そこで、S→Tの置換を行なったgenotype EとFのHBs抗原を作成し再度測定したところ、図3に示すようにどちらのgenotypeにおいても、wild typeに比較してアミノ酸置換を行なったHBs抗原の検出感度が明らかに上昇することが示された。

9. HBs抗原検出キットによる変異型HBs抗原の測定: 4種類の変異型HBs抗原の濃度を0.2 IU(International Unit)/mlの濃度に調整して試料とし、国内で販売されている5種類の高感度HBs検出キットを用いて測定した。測定に影響を与える変異はキットにより異なることが示された。すなわち、4種類の変異のうちG145AとM133Tはいずれのキットによっても検出できた。G145R-1とG145-11はキットNo.2とNo.3では陽性と判定できたが、キットNo.4とNo.5ではcut-off値付近であった。一方、T123NはキットNo.2とNo.3ではcut-off値付近であったが、キットNo.4とNo.5では野生型よりも測定値は高かった。また、Reverse PCR法を用いることにより変異型HBs抗原の効率的な作成が可能になった。

D. 考察

〔風疹〕

1. 風疹抗体血清パネルの整備について

一般に風疹の診断にはHI抗体価、あるいは

EIAによるEIA-INDEXが用いられているが、手技の困難さ、生ウイルスを使用するなどの点から中和抗体価を指標にした情報の集積は少ない。今回は標準パネル血清候補の性状を検討する意味から、各血清の中和抗体価を検討した。ワクチン接種者の中和抗体価は、接種後経過した時間が短いにもかかわらず、自然罹患者のそれより相対的に低かった。HI抗体価でも同様の傾向が示されており、ワクチン接種により誘導される免疫反応が中和活性においても自然罹患より弱い可能性がある。今回は攻撃ウイルスとして近年分離した野生株を用いたが、ワクチン株での検討を行う必要があるだろう。中和抗体価は、HI抗体価やIU抗体価との間に、HI抗体価・IU抗体価間にみられる様な強い相関関係はなかったが、ある程度の相関性は観察された。今回の情報は今後、パネル血清の選択に有用であろう。

また成人100人の血清抗体価をHI法とEIA法を用いて測定し、抗体の陽性率、抗体価の分布を比較した。陽性率には大きな違いは認められなかったが、EIA法で測定した抗体価は、NT法やHI法と比べ、低く表示されることが示された。このように異なる方法で測定した抗体価を比較するためには標準血清が必要である。

2. 風疹ウイルス感染診断技術の評価

風疹IgM抗体が長期にわたって検出されるpersistent IgMは意外に多い。従って妊婦の風疹IgM抗体陽性の場合、初感染によるIgM抗体と区別することは临床上重要である。今回の研究の結果から初感染とpersistent IgMの鑑別にIgG抗体の測定と経時的IgM抗体の測定が有用であることが示唆された。AIは、その確立した方法がなく一般の市中検査機関では測定はできず、従って開業医レベルでは検査が難しい。このような状況下において今回の方法はIgG抗体値、IgM抗体値から判断ができるので一般日常臨床でも十分応用が可能である。現在までは妊娠初期のIgM

抗体を persistent IgM と判断して分娩に至った 6 例では全て胎内感染はなかった。現時点で症例数は少ないので今後症例を増やして検討する必要がある。

風疹ウイルス RNA の検出方法の標準化を引き続き検討した。感染研で確立された原法の RNA 抽出過程をキット化しても原法と同様の結果が得られた。原法により最も多くの臨床例が正確に診断されたことを考慮すればプライマーを変更の必要性は低い。今後もワクチン接種が徹底されて、風疹の流行を阻止できれば、妊娠中に風疹を疑われた女性への対応では、問診の強化、抗体価の解釈に関する適切なサポート、IgG 親和性の測定などにより妊婦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。一方、ウイルス遺伝子診断は CRS 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。

2005、2006 年は流行期ではないため、17 例という比較的少ない症例数であったものの、羊水 PCR は風疹感染のおそれのある妊婦に対して、さらなる risk subpopulation group に分けるのに有用であった。しかし、出生前診断としての羊水 PCR の問題点として①感染(seroconversion)してから羊水 PCR が陽性となるのに 4~6 週間かった症例がある、②羊水 PCR が陽性の場合先天性風疹症候群と胎児感染との鑑別法がない③羊水 PCR 陰性の場合に先天性風疹症候群の頻度が臨床研究によって異なるということが挙げられる。したがって、今後とも羊水 PCR の先天性風疹症候群に対する診断的有用性を検討するために、症例数を重ねる必要がある。

〔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、現在まで着実に減少してきているが、WHO 西太平洋地域においては 2012 年に「麻疹 elimination」を掲げており、その達成に向けて、今後とも感受性者対策は重要である。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、麻疹の抗体測定法として差はなく、今後の感受性者対策に際し、迅速かつ簡便である両法は有効な手段となりうると考えられる。EIA 法は一般に抗体の有無のみを判定する定性試験に用いられる測定法であるが、今回、NT 法と相関が認められている PA 法を基準に、EIA 法の測定結果から得られる PA 抗体価の目安を算出した。これは、感染あるいは発症を防御できる抗体レベルの目安として、臨床現場において有用なものと考えられる。

麻疹抗体を NT 法と EIA 法で測定した比較した。抗体陽性率に大きな違いは認められなかったが、EIA 法で測定した抗体価は NT 法と比べて低く表示されることが示された。測定値を相互に比較するには標準血清が必要であると思われた。現在、抗体価は国際単位で表示するように求められており、本邦でも抗体価の国際単位表示に向けて歩み出すときに来ている。また、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うことが大切である。

〔リコンビナント HBs 抗原パネルの整備〕

昨年度に作製した genotype(A-H)由来のリコンビナントを国内で使用されている診断薬キットを用いて測定した。10 種類の HBs 抗原検出キットにおいては、低濃度 (0.2 IU/ml) の HBs 抗原を測定した場合、一部のキットにおいては、genotype E と F 由来の検体を陰性と判定するこ

とが示された。そこで HBs 抗原の主要抗原決定基の一部にアミノ酸置換を行なった genotype E と F の HBs 抗原を作成し再度測定したところ、wild type に比較してアミノ酸置換を行なった HBs 抗原の検出感度が上昇することが明らかになった。つまり、抗原捕捉、あるいは酵素標識抗体の抗原認識様式は非常に限られた変異に対して敏感であることを示しており、genotype の違いだけでなく mutant HBs 抗原に対する反応性も、使用する抗体の影響を強く受けることを示唆しており、これは今後の HBs 抗原検出キットの性能を向上させる上で重要な情報である

共通のバックグラウンドに導入した 4 種類の遺伝子組換え変異型 HBs 抗原を国内で使用している 5 種類の HBs 抗原検出キットを用いて測定した結果、変異 G145R と T123N とではキットによって性能に与える影響が異なった。この結果は、HBs 抗原検出試薬の評価系としての遺伝子組換え HBs 抗原パネルの有用性を示している。また、*in vitro* mutagenesis 法を改良した結果、変異型 HBs 抗原の効率的な作成が可能になった。今後、国内で報告されている変異や海外から持ち込まれる可能性のある変異を反映した遺伝子組換え HBs 抗原パネルを整備すれば、HBs 抗原検出試薬の性能の向上に寄与することが可能となる。

すでに収集した HBs 抗原陽性血漿から日本に多い genotype B と C 由来の HBs 抗原パネルを作製し、遺伝子を解析した結果から同一血漿から得られた HBs 遺伝子はほぼ同一であることから、多くは同一の HBs 遺伝子を有するウイルスで占めていることが推定された。一方、極少数の異なった HBs 遺伝子を持つ(2%以下の違いであるが)ウイルスの存在も示唆された。

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、昨年度において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。今回は標準パネル血清候補の性状を検討する意味から、各血清の中和抗体価を検討した結果、パネル血清の選択に有用な情報が得られた。すなわち、ワクチン接種により誘導される免疫反応が中和活性においても HI 法と同様に自然罹患により弱いことが示唆された。また、中和抗体価は、HI 抗体価や IU 抗体価との間に、ある程度の相関性は観察された。

妊婦の風疹 IgM 抗体陽性の場合、初感染による IgM 抗体と区別することは临床上重要である。IgG 抗体、IgM 抗体値と AI 値との関係を考察した結果、IgG 抗体、IgM 抗体値から persistent IgM の可能性を鑑別出来ることが示唆された。

診断に適切な麻疹抗体測定法について検討し、PA 法および EIA 法は、陽性率、一致率、PPV、NPV の結果から、麻疹の抗体測定法として差はなく、今後の感受性者対策に際し、迅速かつ簡便である両法は有効な手段となりうると考えられる。EIA 法は一般に抗体の有無のみを判定する定性試験に用いられる測定法であるが、今回、NT 法と相関が認められている PA 法を基準に、EIA 法の測定結果から得られる PA 抗体価の目安を算出した。これは、感染あるいは発症を防御できる抗体レベルの目安として、臨床現場において有用なものと考えられる。

麻疹抗体を NT 法と EIA 法で測定した比較した。抗体陽性率に大きな違いは認められなかったが、EIA 法で測定した抗体価は NT 法と比べて低く表示されることが示された。測定値を相互に比較するには標準血清が必要である。本邦でも国際単位で表示された抗体標準品の整備が望まれる。

国内で使用されている B 型肝炎抗原検出キットの性能を昨年度において作製した遺伝子型及び変異型リコンビナント HBs 抗原パネルを使用して評価した。すなわち、genotype(A-H)由来のリコンビ

ナントパネルを10種類のHBs抗原検出キットで測定した結果、一部のキットにおいてgenotype EとF由来の低濃度（0.2 IU/ml）検体を陰性と判定することが示された。そこでHBs抗原の主要抗原決定基の一部にアミノ酸置換を行なったgenotype EとFのHBs抗原を作成し再度測定したところ、wild typeに比較してアミノ酸置換を行なったHBs抗原の検出感度が上昇することから、genotypeの違いだけでなくmutant HBs抗原に対する反応性も、使用する抗体の影響を強く受けることが示唆された。これは今後のHBs抗原検出キットの性能を向上させる上で重要な情報である。

共通のバックグラウンドに導入した4種類の遺伝子組換え変異型 HBs 抗原を国内で使用している5種類の HBs 抗原検出キットを用いて測定した結果、キットによって性能に影響を受ける変異型が異なることが示された。また、*in vitro* mutagenesis 法を改良した結果、変異型 HBs 抗原の効率的な作製が可能になった。国内で報告されている変異や海外から持ち込まれる可能性のある変異を反映した遺伝子組換え HBs 抗原パネルを整備する上で有用である。また、HBs 抗原陽性の小児は激減しているため、HBs 抗原検出キットの評価に必要な陽性血漿を確保することが今後困難になると予想されることから、すでに収集した HBs 抗原陽性血漿からリコンビナント HBs 抗原パネルを作製した。

F. 健康危険情報

妊娠初期の妊婦に風疹 IgM 抗体が検出された場合、直ちに初感染と判断して妊娠中絶するのではなく、その IgM 抗体が persistent IgM の可能性を考慮し疫学的状況と本研究結果を参考にし対処することが望ましい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, Kiyono H, McGhee JR, Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J Immunol.* 2006 Sep 1;177(5): 3045 - 54.
- 2) 駒瀬勝啓「インフルエンザをめぐる諸問題Ⅸ、インフルエンザワクチン、アレルギー・免疫」2006;13(11): 68-74.
- 3) 海野幸子「予防接種 光と影、風疹、臨床とウイルス」2006: 34(4): 245-252.
- 4) 庵原俊昭「麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向」医療 60: 483-488、2006
- 5) 庵原俊昭「風疹、先天性風疹症候群」小児内科 38 s 308・s 309、2006
- 6) 川名 尚「母子感染に関する新しい流れ」平成看護短期大学紀要第 16 号,2006 年 3 月
- 7) 川名 尚 「特集 周産期ハンドブック 周産期感染症の最近の動向と課題 産婦人科の実際 55(3)」: 307-315;2006.
- 8). Kaneko M, Sameshima H, Ikenoue T et al. Rubella outbreak on Tokunoshima Island in 2004: serological and epidemiological analysis of pregnant women with rubella. *J Obstet Gynaecol Res.* 32: 461. 2006.
- 9) Tanaka K, Yamada H, Minami M, Kataoka S, Numazaki K, Minakami H, Tsutsumi H. Screening for vaginal shedding of cytomegalovirus in healthy pregnant women using real-time PCR: Correlation of CMV in the vagina and adverse outcome of pregnancy. *J Med Virol* 2006;78:757-759.
- 10) Koizumi Y, Ndembu N, Miyashita M, Lwembe R, Kageyama S, Mbanya D, Kapture L, Numazaki K, Fujiyama Y, Ichimura H. Emergence of ART resistance-associated

primary mutations among drug-naïve HIV-1 individuals in rural western Cameroon. J Acquir Immune Defic Syndr 2006, 43: 15-22.

11) Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. Vaccine 2007, 25: (in press).

12) Numazaki K. Current concepts of management for congenital cytomegalovirus infection. Trends in Developmental Biology 2007, 3:(in press).

13) 沼崎 啓.「サイトメガロウイルス感染症」小児科診療 2006, 69: 増刊号 小児の治療指針 209-212.

14) 沼崎 啓.「診断・治療のポイント マイコプラズマ感染症」. Infectious Diseases Report 2006, No. 37.

15) 沼崎 啓他「小腸血管腫より出血を来した Blue Rubber Bleb Nevus syndrome の 1 例」臨床小児医学 2006, 54: 45-47.

16) 沼崎 啓.「先天性感染と HCMV 日本臨床増刊号 ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩—」2006, 496-499.

17) 沼崎 啓 「.突発性発疹.小児内科小児外科編集委員会共編」小児内科 2006, 38: 増刊号 小児疾患の診断治療基準.東京,東京医学社,2006,318-319.

18) “Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H “ T. Mizuochi., Y. Okada, K. Umemori, S. Mizusawa, and K. Yamaguchi J. Virol. Methods 136:254-256, 2006.

19) 「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(続報)」水落利明、岡田義昭、梅森清子、水澤左衛子、山口一成 「臨床検査」(印刷中)

2. 学会発表

1) 海野幸子、堀内善信、庵原俊昭、浅野喜造、岡田賢司、大槻紀之、田代真人、竹森利忠、「風疹抗体国内標準品および風疹パネル血清の整備」第 47 回日本臨床ウイルス学会、2006.6.3-4、東京

2) 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、「弱毒風疹生ワクチン(高橋株)の reverse genetics 法の確立」第 10 回日本ワクチン学会、2006.10.21-22、大阪

3) 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、「弱毒風疹生ワクチン高橋株を用いた reverse genetics 法の確立」第 54 回日本ウイルス学会総会、2006.11.19-21、名古屋

4) 庵原俊昭 「小児感染症の基本的考え方」第 30 回日本小児皮膚科学会 2006.6.17-18

5) 川名 尚、武久 徹、森川義郎：「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 年 1 月 28 日、幕張

6) 川名 尚 「母子感染と分娩管理」東北周産期セミナー、2006 年 7 月 29 日、仙台

7) 佐藤 弘、多屋馨子、岡部信彦「麻疹の抗体測定法による比較検討およびその臨床応用について」第 38 回日本小児感染症学会、2006 年 11 月、高知

8) Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. 4th Global Measles & Rubella Laboratory Network meeting, WHO HQ, Geneva, Switzerland, August 28-30, 2006.

9) 沼崎 啓.「小児呼吸器感染症の新しい概念と治療戦略」.平成 18 年相模原市医師会小児科医会総会特別講演、2006 3. 15、相模原.

10) 沼崎 啓.「マイコプラズマ・クラミジア小児呼吸器感染症の新しい概念」平成 18 年江戸川区小児科医会学術講演会特別講演、2006 7. 29、

東京.

11) 沼崎 啓,岡野素彦(司会). シンポジウム「ウイルスの分子疫学」. 衛生微生物技術協議会第27 回研究会, 2006 6. 29-30,札幌.

12) Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. *Symposium 1* ,Progress in Infectious Pathogens Vaccines and Immunization, Fifth World Congress on Vaccines, Immunization & Immunotherapy. Montreal, Quebec, November 6-9, 2006.

13) Numazaki K. Vero/SLAM cell line. WHO/WPRO Hands-on Training/Workshop on the Laboratory Diagnosis of Measles Virus Infection. 2006, March 13-18, Hong Kong.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1 EIA 法の結果から得られる PA 抗体価の目安
(PPV95.0%以上の場合)

EIA 抗体価 (IgG index) ※	PA 抗体価
≥1.0	≥1:128
≥2.0	≥1:256
≥3.0	≥1:512
≥4.0	≥1:512
≥5.0	≥1:512
≥6.0	≥1:512
≥7.0	≥1:1024
≥8.0	≥1:1024
≥9.0	≥1:2048

※ EIA 抗体価が≥1.0 の場合, 検査センター等でデンカ生研社製キットにより測定された場合の≥4.0 に相当する (他の EIA 抗体価についてはデータが得られていない)。

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)
分担研究者報告書

風疹パネル血清の評価

分担研究者：駒瀬勝啓¹、海野幸子^{1, 2}

協力研究者：大槻紀之¹、田代真人¹、庵原俊昭³、浅野喜造⁴、岡田賢治⁵

¹国立感染症研究所、²医薬品医療機器総合機構、³国立病院機構三重病院、
⁴藤田保健衛生大学医学部小児科学、⁵国立病院機構福岡病院

研究要旨

パネル標準血清候補、90 検体のうち使用に相当と考えられた 88 検体の中和抗体価を測定した。HI 法、EIA 法で陰性、あるいは擬陽性だった血清 14 検体はすべて中和抗体価も 6 倍未満であった。一方、HI 抗体価 16-64、EIA 法 INDEX で 1.4 以上を示す血清 74 検体の中にも中和抗体価 6 倍未満の血清が 30 検体 (40.1%) あった。また、ワクチン接種者から採取された血清は、罹患者から採取された血清より、接種（感染）後経過した時間が短いにもかかわらず、中和抗体 6 倍未満のものが多かった。中和抗体価と昨年度測定した HI 抗体価、EIA 法により得られた抗体価 (IU) との相関性を検討したところ、HI 抗体価 - IU 抗体価間のような定量的な相関性は示さないものの、中和抗体価と IU 価、あるいは HI 価にはある程度、相関性があることが示された。

研究目的

妊娠の早期に風疹ウイルスに感染すると出生児に先天性風疹症候群 (CRS) をもたらす事が知られており、特に妊婦における風疹の確定診断は社会的に意義が大きい。一方、風疹は予防接種法でワクチン勧奨接種対象疾患となっており、ワクチンによって予防、制御が可能な疾病であると考えられている。今年度からは麻しん風しん混合ワクチンとして 1 歳児、及び就

学前の 2 回接種が導入され、CRS の発生をより抑える効果が期待されている。こういった環境の中では風疹抗体の保有状況の把握も重要であり、確実な診断法が必要となっている。日本では主に赤血球凝集阻止 (HI) 法、酵素抗体 (EIA) 法で風疹感染、抗体価の診断がなされているが、まだその感度表示法は統一されておらず、臨床現場ではしばしば混乱の原因となっている。また特に、EIA キットでは製造社間でも

値の表示法が異なっている。本研究は、現在、風疹抗体測定用の体外診断薬キットの感度表示法の統一化や感度の評価、さらには臨床検査施設の精度管理等のための風疹標準パネル血清を収集、整備、評価すること、またその性状の検討をすることを目的としている。

方法

90 検体の血清を収集し、その中和抗体価を測定した。中和抗体価はプラークリダクション法で測定した。攻撃ウイルスは Hiroshima 03 株（2003 年に分離）を用いた。細胞は RK-13 株を用いた。HI 抗体価は国立感染症研究所、流行予測調査の術式を用いて測定し、EIA 法はルベラ IgG (II) - EIA 「生研」(デンカ生研)を用い、平行線定量法で IU 価を算出した。なお収集した血清はインフォームドコンセントにより使用目的が了承されたものである。

研究結果：

- パネル標準血清候補、90 検体のうち使用に相当と考えられた 88 検体で中和抗体価を測定した。HI 法、EIA 法で陰性、あるいは擬陽性だった血清 14 検体はすべて中和抗体価が 6 倍未満であった。
- 一方、HI 抗体価 16-64、EIA 法 INDEX で 1.4 以上を示す血清 74 検体の中に中和活性 6 倍未満の血清が 30 検体あった (40.1%)。
- ワクチンのみ接種者 (51 人) のうち、中和抗体活性 6 倍未満の者は 31 名と約 60% にのぼったが、自然罹患のみの者 (20 名) のうち 6 倍未満の者は 7 名 (35%) であり、ワクチン

接種者の方が高かった。

- 風疹罹患年齢とワクチン接種年齢を比較すると、ワクチン接種の平均年齢は 12.1 才 (今回の採血までは平均 8.8 年間)、罹患平均年齢は 4.8 才 (同 14.9 年) であった。
- HI 抗体価、EIA 法から算出された IU 値と中和抗体価は HI 価 - IU 抗体価のような定量性を持つ相関を示さなかったがある程度の相関性を示した。

考察

一般に風疹の診断には HI 抗体価、あるいは EIA による EIA-INDEX が用いられているが、手技の困難さ、生ウイルスを使用するなどの点から中和抗体価を指標にした情報の集積は少ない。今回は標準パネル血清候補の性状を検討する意味から、各血清の中和抗体価を検討した。ワクチン接種者の中和抗体価は、接種後経過した時間が短いにもかかわらず、自然罹患者のそれより相対的に低かった。HI 抗体価でも同様の傾向が示されており、ワクチン接種により誘導される免疫反応が中和活性においても自然罹患により弱い可能性がある。今回は攻撃ウイルスとして近年分離した野生株を用いたが、ワクチン株での検討を行う必要があるだろう。中和抗体価は、HI 抗体価や IU 抗体価との間に、HI 抗体価 - IU 抗体価間にみられる様な強い相関関係はなかったが、ある程度の相関性は観察された。今回の情報は今後、パネル血清の選択に有用であろう。

結論

収集した血清の中和抗体価から、ワクチンによって誘導される免疫は自然感染によるものよりやや弱いと考えられた。中和抗体価においても、HI 価、EIA による抗体価とある程度の相関性を示した。これらの情報はパネル血清を選択する時に有用である。

健康危険情報：なし

1. 研究発表

1) 論文発表

- Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, Kiyono H, McGhee JR, Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. J Immunol. 2006 Sep 1;177(5): 3045 - 54.
- 駒瀬勝啓、インフルエンザをめぐる諸問題IX、インフルエンザワクチン、アレルギー・免疫, 2006:13(11): 68-74.
- 海野幸子、予防接種 光と影、風疹、臨床と

ウイルス、2006: 34(4): 245-252.

2) 学会発表：

- 海野幸子、堀内善信、庵原俊昭、浅野喜造、岡田賢司、大槻紀之、田代真人、竹森利忠、風疹抗体国内標準品および風疹パネル血清の整備、第 47 回日本臨床ウイルス学会、2006. 6. 3-4、東京
- 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、弱毒風疹生ワクチン（高橋株）の reverse genetics 法の確立、第 10 回日本ワクチン学会、2006. 10. 21-22、大阪
- 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、弱毒風疹生ワクチン高橋株を用いた reverse genetics 法の確立、第 54 回日本ウイルス学会総会、2006. 11. 19-21、名古屋

2. 知的財産権の出願・登録状況(予定をふくむ)

- 1) 特許；特になし
- 2) 実用新案登録；なし
- 3) その他；なし

麻疹・風疹パネル血清の作製—抗体測定方法の問題点—

分担研究者 庵原俊昭 国立病院機構三重病院 院長

分担研究者 岡田賢司 国立病院機構福岡病院 部長

研究要旨

麻疹・風疹の抗体測定方法には種々の方法がある。麻疹中和(NT)抗体測定方法にも、いくつかのチャレンジウイルスと培養細胞の組み合わせが用いられている。米川株(野生株)と B95a 細胞の組み合わせで測定した麻疹 NT 抗体価と、長畑株(Vero 細胞馴化株)と Vero 細胞の組み合わせで測定した麻疹 NT 抗体価は、99 検体中 95 検体(96.0%)が 1 管以内におさまり、極めて強い相関があった。また、成人血清を用いて、麻疹 NT 法と EIA 法、風疹 HI 法と EIA 法の抗体陽性率と抗体分布を比較したところ、抗体陽性率には大きな差を認めなかったが、EIA 法で測定した抗体価は、NT 法や HI 法に比べ低いところに分布していた。以上の結果から、異なった方法で測定した抗体価を比較検討するためには、基準となる血清が必要となることがうかがわれた。

A. 研究目的

麻疹・風疹ともに抗体測定方法には種々の方法がある。感染防御に関わる生物学的活性を持った抗体量のトータルを測定している中和法(NT)は、抗体測定のゴールドスタンダードである。しかし、NT 法は手技に手間がかかり、判定までに時間がかかることから、赤血球凝集抑制(HI)法、酵素免疫(EIA)法、受身凝集(PA)法などが、NT 法に代わって用いられている。EIA 法や PA 法で測定される抗体は、抗原と結合するタンパク量であり、必ずしも生物学的抗体量を反映していない欠点がある。

本邦で用いられている麻疹 NT 法は、チャレンジするウイルス株や用いる細胞によりいくつかの方法がある。今年度は、2 種類の麻疹 NT 法の比較検討を行い、測定方法による麻疹 NT 抗体価の相違について検討した。また、麻疹 NT 法や風疹 HI 法を基準とし、本邦でよく用いられている EIA 法の陽性率や抗体分布について比較検討を行った。

B. 研究方法

1. 麻疹 NT 法による抗体価の比較

成人血清 50 検体、臍帯血 49 検体を、チャレンジウイルス米川株(野生株、遺伝子型 D5)、培養細胞 B95a 細胞の組み合わせ(NT 法 1)

と、チャレンジウイルス長畑株(Vero 細胞馴化株)、培養細胞 Vero 細胞の組み合わせ(NT 法 2)で、96 穴マイクロプレートを用いて麻疹 NT 抗体価を測定した。血清抗体価は、100% 細胞変性抑制効果を示す血清最大希釈倍数の逆数で表示した。

2. 麻疹 NT 法と EIA 法の比較

麻疹抗体は NT 法 2 を用いて NT 抗体を測定し、EIA 法はデンカのキットを用いて、添付文書にしたがって測定し、抗体陽性率や抗体分布について比較検討した。

3. 風疹 HI 抗体と EIA 法の比較

成人 100 例の血清抗体価を、HI 法と EIA 法(デンカ)で測定し、抗体陽性率や抗体分布について比較検討した。

なお、研究に用いたいずれの血清も、研究目的を説明し、同意を得てから採取した。

C. 研究結果

1. 麻疹 NT 法による抗体価の比較

NT 法 1 と NT 法 2 の陽性・陰性の感度および特異度は 100%であり、完全に一致した。2 管以上の差があったサンプルは 4 検体のみであり、96%が測定誤差範囲に収まった。また、両抗体測定方法の相関は、 $R=0.9236$ 、相関直線 $Y=0.96X-0.01$ と、原点を通る傾き 1 に近似

する直線になった。

2. 麻疹 NT 法と EIA 法の比較

健康成人 80 人の抗体陽性者数は、NT 法 78 人(97.5%)、EIA 法 74 人(92.5%)とほぼ一致した。また、EIA 法で判定不能 (equivalent, $\pm$) の 4 人は NT 法ではすべて陽性であった。NT 法と EIA 法の抗体分布を比較すると、NT 法の中央値は 32 倍であったが、EIA 法では 8~16EIA 価に含まれ、EIA 法で測定した抗体は、NT 法よりも低い値に分布した。

3. 風疹 HI 抗体と EIA 法の比較

健康成人 100 人の抗体陽性者数は、HI 法 94 人(94%)、EIA 法 94 人(94%)と一致し、EIA 法で抗体陰性者は、すべて HI 法陰性であった。HI 法と EIA 法の抗体分布を比較すると、HI 法の中央値は 128 倍であったが、EIA 法では 16~32EIA 価に含まれ、陽性閾値を補正しても、EIA 法で測定した抗体は、HI 法よりも低い値に分布した。

D. 考察

世界保健機関(WHO)は、各種生化学検査だけではなく、抗体測定においても国際標準化を目指しており、麻疹や風疹抗体の標準血清を準備している。また、麻疹・風疹の血清疫学調査を行うに当たっては、EIA 法を推奨している。

現在本邦は麻疹と風疹の流行消滅を目指している。適切な麻疹・風疹消滅戦略を立てるためには、的確な血清疫学を把握することが大切であり、このためには適切な抗体測定方法で麻疹抗体や風疹抗体を測定する必要がある。

今回の検討では、米川株と B95a 細胞の組み合わせで麻疹 NT 抗体を測定しても、長畑株と Vero 細胞の組み合わせで麻疹 NT 抗体を測定しても、一致することが示された。しかし、Toyoshima 株と Vero 細胞を用いた NT 法や市ノ瀬株と B95a 細胞を用いた NT 法もあり、これらの方法で測定した NT 抗体価が一致するかについては不明である。このような問題をクリアするためには、共通の標準血清を用いて抗体価を測定する必要があると思われる。

麻疹においては、NT 法と EIA 法を用いて、

風疹においては HI 法と EIA 法を用いて、抗体の陽性率、抗体価の分布を比較した。麻疹も風疹も抗体陽性率には、大きな違いは認められなかったが、EIA 法で測定した抗体価は、NT 法や HI 法と比べ、低く表示されることが示された。EIA 法で測定した抗体価と HI 法や NT 法で測定した抗体価を比較するためにも、標準血清が必要であると思われる。

現在、抗体価は国際単位で表示するように求められており、本邦でも抗体価の国際単位表示に向けて歩み出すときに来ている。また、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うことが大切である。

E. 結論

異なった方法で測定した抗体価を比較検討するためには、基準となる血清が必要であることが示された。

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：麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向. 医療 60 : 483-488、2006
- ・庵原俊昭：風疹、先天性風疹症候群. 小児内科 38 : s 308・s 309、2006

2. 学会発表

- ・庵原俊昭：小児感染症の基本的考え方. 第 30 回日本小児皮膚科学会 2006.6.17-18

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

妊婦における風疹IgM抗体の評価

分担研究者 川名 尚 帝京大学医学部付属溝口病院産婦人科客員教授

研究要旨

妊娠初期の妊婦に風疹IgM抗体が検出された時、最近の初感染かpersistent IgMなのかをIgM抗体値、Avidity Index、IgG抗体値を参考に判断して妊婦を管理することを提唱したい。

A. 研究目的

一昨年提案された厚生労働省の「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」の指針では、妊娠初期の妊婦の風疹 HI 抗体価 256 倍以上ある場合は、風疹特異的 IgM 分画の抗体 (IgM 抗体と略) を測定して感染時期を推定して妊婦の管理に資することが薦められている。

IgM 抗体は次の三つの場合に検出される。

- (1) 初感染による。
- (2) 感染後長期にわたり IgM 抗体が検出される「Persistent IgM」による。
- (3) 非特異反応による。

若し(1)であれば先天性風疹症候群の可能性があり、(2)であればその可能性は低いので、臨床ではこれらを如何に鑑別するかが要求される。

今回これらの鑑別に役立つ簡便な方法の開発を試みた。

B. 研究方法

対象：2000 年 4 月～2006 年 11 月に風疹の IgM 抗体が陽性であったり、HI 抗体価が高いために当科に紹介された 44 症例から採取した 57 検体を対象とした。対照として石川県立中央病院 干場勉氏より提供された風疹の初感染 7 例から得た 10 検体を用いて比較した。

IgM 抗体はルベラ IgM EIA「生研」を用い、IgG 抗体はルベラ IgG EIA「生研」を用いて測定し、

Avidity Index(AI)もこれを用いて測定した。なお、このキットによる IgM 抗体の非特異反応の有無を調べるためにエンザイグノスト風疹 IgM を用いて比較検討した。患者には、口頭で IgM 抗体による判定の問題点や persistent IgM、AI 測定の意義を話し同意を得た。

C. 研究結果

1. 妊婦 IgM 抗体の推移

persistent IgM 抗体と考えられる例では経時的にみても恐らく抗体値にあまり変動はないであろうという考えから経時的に調べた。7 例において 1 ヶ月の間において再度検査した所、すべてほとんど同じ値であった。これら例の初回の AI はいずれも 70%以上と高かった。これに対し 2 例ではあるが風疹初感染例では、1 ヶ月後の IgM 値は初回のもので半分以上の低下を示した。AI はいずれも 20%以下であった。

2. IgG 抗体による persistent IgM の判断は可能か

IgM 抗体陽性妊婦について初感染と persistent IgM を簡便に鑑別できる方法として IgG 抗体値が利用できないかを検討した。AI が 40%以下を初感染と一応考えて判断した。

IgG 抗体が 80 以上の 42 例では AI40%以下は全くなかった。80 以下の場合 IgM 抗体 3.0 以下の 13 例では AI40%以下は全くなかった。これに