

対し 80 以下で IgM 抗体 3.0 以上の 10 例中 9 例は AI が 40%以下であった。

3. 出生児の結果

現在までに、persistent IgM と判断し分娩に至った 6 例では、いずれも児の IgM 抗体は陰性で胎内感染は否定的であった。

4. IgM 抗体の非特異反応の可能性

ルベラ IgM EIA「生研」とエンザイグノスト風疹 IgM のキットを用い比較検討した。全体としてよくし相関した(相関係数 0.972)。しかし、EIA「生研」で 1.2~1.8 の低い値ではあるが陽性と判断された 7 例でエンザイグノスト風疹 IgM で陰性となった。「生研」が非特異的反応をみているのかも知れないが逆に「生研」の方が感度がよいのかも知れない。

D. 考察

今回の研究から妊婦の風疹 IgM 抗体陽性の場合、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。即ち、風疹 IgM 抗体が陽性でも IgG 抗体が 80 以上の場合、また、IgM 抗体が 3.0 以下の場合 persistent IgM の可能性が高い。また、1 ヶ月の間において IgM 抗体がほとんど同じであれば persistent IgM である可能性が高い。

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 IgM 抗体陽性例では IgM 値と IgG 抗体値によりある程度の判断が可能ではないかと考えた。

非特異反応の有無を検討するべく「生研」とエンザイグノストの両方で同一検体を検討した。全体として両キットの IgM 値はよく相関していたが低い値の所でくい違いがみられているが、これは「生研」の方が感度が優れているのか非特異反応をみているのか判断はできない。しかし、いずれにせよ「生研」で IgM 値が 2.0 以下の場合には今

回の研究から初感染の可能性は低いようであり、IgG 抗体を測定してみると参考になろう。

E. 結論

妊婦の風疹 IgM 抗体が陽性の場合、初感染と persistent IgM を鑑別する際に AI を測定するのがよいが、できない場合でも IgG 抗体を同時に測定しておくことと、約 1 ヶ月後の IgM 抗体値の推移をみることによって鑑別が可能であろう。

本邦で用いられている風疹 IgM 検出キット「生研」とエンザイグノストはほぼ同等の検出感度である。

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

1) 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

2) 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.

2.学会発表

1) 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

2) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用案

なし

3. その他

なし

研究要旨 先天性風疹症候群の診断における羊水 PCR の役割について、検査設備とインフォームドコンセントの方法を整えて実施した。2005、2006 年に 17 例の相談があったが、内 6 例に羊水 PCR 検査を実施した。17 例すべてが妊娠を継続し、全例とも先天性風疹症候群児の出生をみなかった。羊水 PCR 検査を行うことは、患者および家族に対して CRS 発症の危険性を説明する上で、有用であった。

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

国立循環器病センター周産期科
池田智明、太田直孝
愛泉会日南病院疾病制御研究所
峰松俊夫

研究目的：2004 年 8 月に、風疹流行にともなう母児感染の予防的対策構築に関する研究班は、妊娠中に風疹を罹患した症例のための、先天性風疹症候群児（CRS）の発症リスクに対するフローチャートを提言した（1）。これによると、①妊娠中の発疹などの風疹感染症状、②妊娠初期における風疹 HI 抗体価、および③血清風疹 IgM の陽陰性によって、CRS 児出生の可能性を検討するものである。このフローチャートで疑わしいケースは、各地区ブロックの 2 次施設へ紹介されることとなるが、中には危険度推定に難渋するケースがある。金子らが報告した（2）、2004 年の徳之島における風疹流行時の 12 例はその良い例である。彼らは、再感染によって CRS をきたした 1 症例を報告しているが、この症例は、過去の妊娠にて風疹 HI 抗体価が 32 倍であり、CRS を発症した第 3 回目の妊娠時には発疹がなく、血清 IgM も初回は陰性であった。したがって、フローチャートからは「CRS の可能性は低い」ことになるが、妊娠 16 週における羊水 PCR は陽性であった。本症例は、患者・家族とも話し合った末に、妊娠を継続した

が、満期産で出生した児は先天性心疾患、白内障、難聴があり、CRS と診断された。この症例から、前述のフローチャートによって判断した場合の疑陽性・疑陰性例をできるだけ少なくする努力が必要であることを感じた。その改善策として、羊水 PCR の有用性を検討するために本研究を行った。

対象および方法：症例：2005、2006 年の 2 年間に渡って、主に近畿地区からコンサルテーションを受けた 17 例である。妊婦には、1991～1998 年における加藤らの実績（3）をもとに、以下の 4 点を説明することとしている。①羊水 PCR 検査は、先天性風疹症候群児の出生前診断の一般的な検査ではありません。未だ、研究的なものです。②これまで、わが国の最も例数の多いデータから、陽性であれば 7 例中 2 例（約 30%）の確率で CRS が出生、陰性であれば 0～1% の確率で出生しました。③羊水検査自体で流産するおそれは、200～300 例のうち、1 例ぐらいです。④羊水検査時に、染色体検査をすることもできます。

羊水 PCR は、原則として、primer A, B, C, D を用いる国立感染症研究所が行っている方法とともに、Bosma らが報告した（4）、primer R2, R7, R8c, R11 を用いる方法をともに行った。

倫理面への配慮

本年度の研究においては、調査対象のプライバシーに関わるデータは、年齢、性別

を含めて一切調査対象となっていない。

結果： 17 例の HI は 32 倍以上の高値であったが、妊娠中の発疹があった例、風疹患者と接触既往例は 1 例もいなかった。IgM 陽性 11 例中、また IgM 陰性 6 例中、羊水 PCR を行った例はそれぞれ 5 例と 1 例であった。この 6 例とも、PCR の結果は陰性であり、すべて妊娠を継続したが、臍帯血風疹 IgM は全例で陰性であり、CRS 徴候もなかった。コンサルトの結果、17 例中、妊娠中絶を選択した例はなかった。

考察： 2005、2006 年は非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。すなわち、陽性であれば約 30%、陰性であれば 0~1% という具体的数値を提言することは、患者・家族の妊娠継続をするか否かという決断を助けることが出来たという印象を持った。

しかし、羊水 PCR による胎児先天性風疹症候群の診断には注意を要することが、研究者によって述べられている。種村らは (5) は、出生前診断としての羊水 PCR の問題点を①感染 (seroconversion) してから羊水 PCR が陽性となるのに 4~6 週間かかった症例もあり、この期間まで羊水検査の間隔をあけることが望ましいとした。妊娠 16 週から 4~6 週間あけると、20~22 週となり、妊娠中絶期限の妊娠 22 週の間に時間的猶予がなくなるのである。Mace らも同様に、妊娠 16 週、17 週で PCR が陽性であるが、妊娠 21 週に再検したところ陽性であったと報告している (6)。もう一つの問題点は、羊水 PCR が陽性になったときの、CRS と CRI の鑑別法がないことである。

さらに、Mace らは PCR が陰性であった 14 例中 1 例 (7%) が中等度の小頭症と低出生体重児であり、わが国における加藤らの 0~1% との結果の開きを見せている。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、症例数を重ねなければならないと考えている。

結論

風疹流行にともなう母児感染の予防的対策構築に関する研究班編「妊娠中に風疹を罹患した症例のための、CRS の発症リスクに対するフローチャート」に、羊水 PCR 検査を行うことは、患者および家族に対して CRS 発症の危険性を説明する上で、有用であった。

健康危険情報

本年度の研究において、健康に危険をきたした可能性はない。

参考文献

1. 厚生労働科学研究費補助金新興・再興感染症研究事業分担研究班「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」：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.
2. 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.
3. 加藤茂孝：わが国の風疹流行の変遷と根絶への課題 産婦実録 50: 337. 2001.
4. Bosma TJ, Corbett KM, Eckstein MB et al. Use of PCR for prenatal and postnatal diagnosis of congenital rubella. 33: 2881. 1995.
5. Tanemura M, Suzumori K, Yagami Y et al. Diagnosis of fetal rubella infection with reverse transcription and nested polymerase chain reaction: a study of 34 cases diagnosed in fetuses. Am J Obstet Gynecol. 174: 578. 1996.
6. Mace M, Cointe D, Six C et al.

Diagnostic value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. J Clin Microbiol. 42: 4818. 2004.

研究発表

1. 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.

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

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

体外診断薬に関する標準品に関する研究
分担課題：風疹ウイルス遺伝子診断標準化と整備

分担研究者 種村光代
名古屋市立大学大学院医学研究科
生殖遺伝医学講座生殖発生医学分野講師

研究要旨

風疹ウイルス RNA の検出方法の標準化をはかる目的で、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。原法は、AGPC 法を用いて RNA を抽出し、逆転写反応にて cDNA を作成、PCR 法を用いてウイルスの構造遺伝子 E1 領域の 5' 側の SITE3、内部領域 SITE31 を二重に増幅する。原法の RNA 抽出については、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保存良好 2 症例からの検体にて確認された。ただし、10 年以上前の症例のうち、羊水、胎児血陽性の 1 症例で RNA 抽出キットを用いて再検査を実施したところ、羊水にて陰性であった。原法での再確認検査でも羊水では陰性となったため、この症例については保存状態に問題があったと推察された。プライマーは、原法により最も多くの臨床症例が正確に診断されたことを考慮すれば変更の必要性は低い、ウイルス検出の困難な新たな臨床症例への別プライマーセットの導入の必要性は残される。なお、相談を受けた妊婦の臨床症例 109 例では、詳細な問診の結果からは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り、出生前診断を実施した症例はきわめてわずかで、全例陰性であった。先天性風疹症候群患児の出生も 1 例も存在しなかった。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症例が 14 例確認された。今後風疹の流行そのものの阻止が可能ならば、妊婦への問診の強化、抗体価の解釈に関する適切なサポート、IgG 親和性の測定の追加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ろう。ただし、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風疹ウイルス遺伝子検査には早急にウイルス排出の有無を確認できるメリットがあり、今後も新たな臨床症例の検体試料を用いて原法の改良、簡易化の必要性は残る。最後に、流行の阻止のためには、本検査の標準化と同時に風疹ワクチン接種の徹底がもっとも期待される。

A. 研究目的

2004年に風疹の局地的流行があり、先天性風疹症候群（CRS）の報告例が増加した。ウイルス培養が困難な CRS 症例や流死産児の検体の精査、胎児を対象とした診断方法として、Polymerase Chain Reaction（PCR）を用いた風疹ウイルス RNA の検出方法が既に開発されている。流行状況に応じた対応を迅速に行う目的で、本検査の標準化をはかる。

B. 研究方法・対象

現在実施されている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、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。本研究は、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 Consent）を得ているものを使用した。なおヒトゲノムの解析や遺伝子解析には相当せず、実験動物の使用もない。

C. 研究結果

主たる原法は、AGPC 法を用いて RNA を抽出し、逆転写反応にて cDNA を作成、PCR 法を用いてウイルスの構造遺伝子 E1 領域の 5' 側の SITE3（369bp）、その内部領域 SITE31（283bp）を二重に増幅する（nested-PCR）。アガロースゲルで電気泳動、エチジウムブロマイドで染色後、UV 照射することにより蛍光 DNA バンドとして検出する。原法を含め、遺伝子診断は

ごく一部の研究施設で実施されているに過ぎない上、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昨年までの研究で示唆された。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も示唆されていた。

原法の RNA 抽出については、RNA キットを用いても同様の検出結果が得られることが、過去の保存良好な胎児感染陽性 2 症例（胎児血、羊水のいずれもウイルス陽性）からの検体にて確認された。ただし、10 年以上前の症例で、羊水、胎児血陽性の 1 症例で RNA 抽出キットを用いて再検査を実施したところ、羊水にて陰性であった。原法での再確認検査でも羊水では陰性となったため、この症例については検体試料の保存状態に問題があったと推察された。なお、原法を用いた場合と、他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ている。

なお、本年度も幸い大きな風疹の流行は認められなかった。そのため、新たな臨床検体が得られず新規症例での比較検査は実施困難であった。ただし、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 109 例あったものの、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。出生前診断症例は極めてわずかですべて胎児感染も陰性であった。追跡調査の結果でも、確認できた範囲内では、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ていない。

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が 14 症例存在した。

D. 考 察

原法は RNA 抽出のステップが煩雑でコンタミネーションの危険性が高いなどの問題点があったが、過去の臨床症例で保存状態良好な資料では 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ることが確認された。ただし、今後もさらに新たな臨床症例での追加検討が必要であろう。プライマーは、原法により最も多くの臨床症例が正確に診断されたことを考慮すれば変更の必要性は低い。しかし、流行ウイルス株の変化も予想され、ウイルス検出困難な新たな臨床症例への別プライマーセットの導入の必要性は残される。

ワクチン接種が徹底されて、今後も風疹の流行そのものの阻止が可能ならば、妊婦への問診の強化、抗体価の解釈に関する適切なサポート、IgG 親和性の測定の追加などにより妊娠中の女性に対する先天性風疹症候群の危険は十分に軽減可能であると思われる。実際のところ、104 例の相談症例からは出生前診断を実施した症例はきわめてわずかでありいずれも陰性であった上、その後の追跡可能な限りでは先天性風疹症候群は出生していなかった。

E. 結 論

風疹ウイルス RNA の検出方法の標準化という点では、RNA 抽出キットの導入について今後も新規臨床症例での検討が必要であるが、プライマーに関しては多様性を残すことの意義も大きいだろう。しかし、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であ

り、IgG 親和性の測定についても標準化の必要があると推察する。一方では、風疹の流行を認めない限りは出生前診断を必要とする症例は限られると推察する。そのためには、やはり風疹ワクチン接種と証明書発行の徹底が必須である。

なお、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風疹ウィルス遺伝子の検出方法には大きなメリットがあり、今後もさらなる原法の改良、簡易化の必要性は残る。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

産科領域における風疹対策. 小児科 47 (6), 988-995, 2006
種村光代

2. 学会発表

MATERNAL RISK FACTORS FOR THE DEVELOPMENT OF CONGENITAL RUBELLA SYNDROME.
13th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy. (5月29-31日、京都)
Mitsuyo Tanemura

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

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 麻疹の抗体測定法には、赤血球凝集抑制法（HI 法）、中和法（NT 法）、ゼラチン粒子凝集法（PA 法）、酵素免疫法（EIA 法）などがある。本研究では、迅速で簡便な方法である PA 法および EIA 法により同一検体の抗体測定を行い、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陰性結果の判定にほとんど差はないと考えられた。感染あるいは発症を防御できる抗体価の目安という点において、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目安は明らかにされていない。そこで、PA 法の結果を基準とした場合の EIA 法の PPV を算出し、それをもとに各 EIA 抗体価に相当する PA 抗体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、臨床の現場で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

麻疹の抗体測定法としては、赤血球凝集抑制法（HI 法）、中和法（NT 法）、ゼラチン粒子凝集法（PA 法）、酵素免疫法（EIA 法）などが知られている。HI 法は特別な機器や施設を必要とせず、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の入手が困難になってきている。さらに血清の前処理が必要なことなど操作が煩雑である。NT 法はウイルスの中和抗体（特異的防御抗体）測定が可能であるが、生きたウイルスや細胞を扱うためバイオセーフティ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。PA 法は迅速・簡便な方法であり、感度も非常に高い。また中和抗体との相関性（PA 抗体価が 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りうる。EIA 法の結果についてそのような目安は明らかでないが、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 方法は迅速に多数の検体について検討が必要な場合、特に有用と考えられる。

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

調査対象は麻疹の抗体測定に同意が得られた男性 361 名、女性 108 名の計 469 名であり、年齢分布は 18～30 歳（中央値 23 歳）であった。対象から採取された血清を調査材料とし、PA 法（富士レビオ）および EIA 法（デンカ生研）により抗体測定を行った。判定は、それぞれ添付文書に従い、PA 抗体価は 1:16 以上、EIA 抗体価（IgG index）は 1.0 以上を麻疹抗体陽性とした。なお、本結果の EIA 抗体価は単一力価の標準血清の測定値との相対値として算出されたものであり、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、医療機関に報告される EIA 抗体価（力価

の異なる複数の標準血清を用いた測定により得られた検量線から算出された相対値)は4.0以上が抗体陽性と判定されていることに注意が必要である。

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。

C. 研究結果

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。

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)。

(倫理面の配慮について)

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。

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、感受性者はいまだ多いと推定されており、2006年の4月から6月にかけては茨城県南部および千葉県を中心とした関東地方において麻疹の流行が発生し、多数の麻疹患者が発生した。また、これらの流行から疫学的な関連が確認された麻疹患者が全国各地から報告されている。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。しかし、本研究で用いたPA法とEIA法は検出する抗体が異なることから、病日の検討を含めたさらなる検討が必要である。また、国内では複数のEIA抗体測定キットが用いられていることから、キット間での検討も必要である。さらに、今回用いた検体はその多くが20代の健康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る。

E. 結論

麻疹の抗体測定についてゼラチン粒子凝集法(PA法)および酵素免疫法(EIA法)で行い、その結果について比較検討した結果、両法の陽性

率，一致率，陽性的中率，陰性的中率から，どちらの方法を用いても陰性の判定に差はないものと考えられた。また，PA 法の結果を基準とした場合の EIA 法の PPV を算出し，それをもとに各 EIA 抗体価に相当する PA 抗体価の目安を算出した。これは，今後，麻疹の免疫状態を判断する目安として臨床現場においても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）

なし

2. 学会発表

- 1) 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）

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

麻疹診断の標準化に関する検討

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
協力研究者 堤 裕幸 札幌医科大学小児科 教授
協力研究者 斉藤義弘 慈恵医科大学小児科 助手

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のおよ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、標準化などを目的とする。今年度は ELISA 法による麻疹特異的血清 IgM 抗体測定法の国際的標準化および Vero/hSLAM 細胞を用いた中和抗体測定法の確立について検討した。

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。特に血清学的診断法の国際的な統一化の必要性が指摘されていた。

B. 研究方法

我々はこれまで麻疹野生株のレセプターである signaling lymphocyte activating molecule (SLAM) を遺伝子操作で恒常的に発現させた Vero/hSLAM 細胞のウイルス分離への応用などについて報告した。

野外麻疹ウイルスの効果的な分離同定法の確立のみならず、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診断法の確立に関しても検討した。

具体的には WHO/WPRO 地区において Dade Behring, Denka などのキットによる

パネル血清の評価を行なった。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）

実験室内診断に関する手技の検討が主体であり、倫理面での配慮は特に必要としなかった。

C. 研究結果

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。

D. 考察

世界レベルでの麻疹抑制対策の実現には実験室確証に基づく、サーベイランス・システムの構築が不可欠である。また国際的な診断法の統一、標準化も必要である。わが国においては今後、全数報告を踏まえた検査の必須化も検討されなければならない。

E. 結論

本研究の成果により世界規模での麻疹抑制対策に対する貢献のみならず、麻疹ウイルスによる免疫抑制機構の解明やワクチンの有効性の評価、更には品質管理システムの改善などに寄与する事が期待される。

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

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

2. 学会発表

1).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.

2).Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region.Symposium1,Progress in Infectious Pathogens Vaccines and Immunization, Fifth World Congress on Vaccines, Immunization & Immunotherapy. Montreal, Quebec, November 6-9, 2006

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

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S抗原の解析と組み換えHBs抗原パネルの作製

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 今年度はHBs抗原パネルを充実させるために日本に多い遺伝子型である genotypeB (9 例)とC (10 例)からS遺伝子を増幅し、発現プラスミドにクローニングした。計 38 個のリコンビナントHBs抗原を発現するプラスミドを作製した。ダイレクトシーケンスによる塩基配列では検体間で約 2%異なっていたが、a 抗原決定基は保存されていた。同一検体ではダイレクトシーケンスによる塩基配列とプラスミドにクローニングした塩基配列とを比較すると 1-2 個のみが異なっていた。同一検体から複数のS遺伝子をクローニングし、解析したところ 1-2 個の塩基配列の違いが認められた。

A.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、昨年度の研究によって遺伝子型の異なる HBs 抗原のパネル整備を行った。一方、日本においては、B型肝炎の母子感染予防が効果的に実施され、HBs抗原陽性の小児は激減している。さらに、HBs抗原の評価に必要な充分量のHBs抗原陽性血漿を確保することが今後、倫理的に困難になることも予想されることから、同一の抗原性を持ち、反復して全く同じ抗原性を持つHBs抗原が作製可能なリコンビナントのパネルを整備することは

重要である。我々は、発現プラスミドにS抗原遺伝子を組み込むことによって上記の要求を満たすHBs抗原パネルの作製を行った。今年度は抗原性を考慮し、日本に多い genotype B と C 由来のHBs抗原パネルを作製した。

B.研究方法

昨年度までの本研究で遺伝子型が明らかな HBV 陽性血漿から genotypeB 9 例、genotypeC 10 例を選択し、各 100 μ l の血漿からスマイテストR&Dを用いて DNA を抽出した。DNA は 10 μ l の水に溶解し、全量を PCR の用いた。プライマーは各々 genotypeB と C の smallS 遺伝子の全長を増幅できるように genotype 別に作製した。PCR は 32 サイクルで実施し、電気泳動後、ゲルから目的のバンドを切り出し、発現ベクター pEF6/V5-HisTOPO(invitrogen)に組み込んだ(S遺伝子の 3 末にストップコドンを入れタ

グタンパクが発現しないようにしてある)。ベクターにインサートが挿入されたプラスミドをHuH7 人肝癌細胞株にリポゾームを用いてトランスフェクトし、48ー72 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)にて検出した(図 1)。また、遺伝子導入した細胞は蛍光抗体法を用いても発現を確認した。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 の確認とアミノ酸配列を解析した。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遺伝子をクローニングし、同一血漿内でのS遺伝子の多様性を解析した。

C. 研究結果

Genotype Bの 9 検体とCの 10 検体から計 38 個のHBs遺伝子が発現するプラスミドを作製し、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%の塩基配列が異なっていた。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とを比べると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ものが多かったが、少数ではあるが、9 個異なるクローンが得られた。

D. 考察

既に同一の発現プロモーター下流に各 genotype のHBs遺伝子が組み込まれたプラスミドが作製されていたので、抗原性を検討

するために genotypeB と C も同じプロモーターを持つプラスミドに組み込んだ。何れのプラスミドも HuH7 に遺伝子導入することでHBs 抗原は、培養液中に分泌されることが確認できた。血漿中に存在する native なHBs抗原に類似したリコンビナントHBs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かた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HBVのBとCのHBs抗原パネルを整備することができた。遺伝子解析まで実施してあるのでHBs抗原診断薬の評価に有用と考えられる。また、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

HBV の genotypeBとCのHBs遺伝子を同一のプロモーターの下流にクローニングし、38 個のHBs抗原発現プラスミドを作製した。これらは肝癌細胞株に遺伝子導入することによって培養液中に genotypeBとCのHBs抗原を産生した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

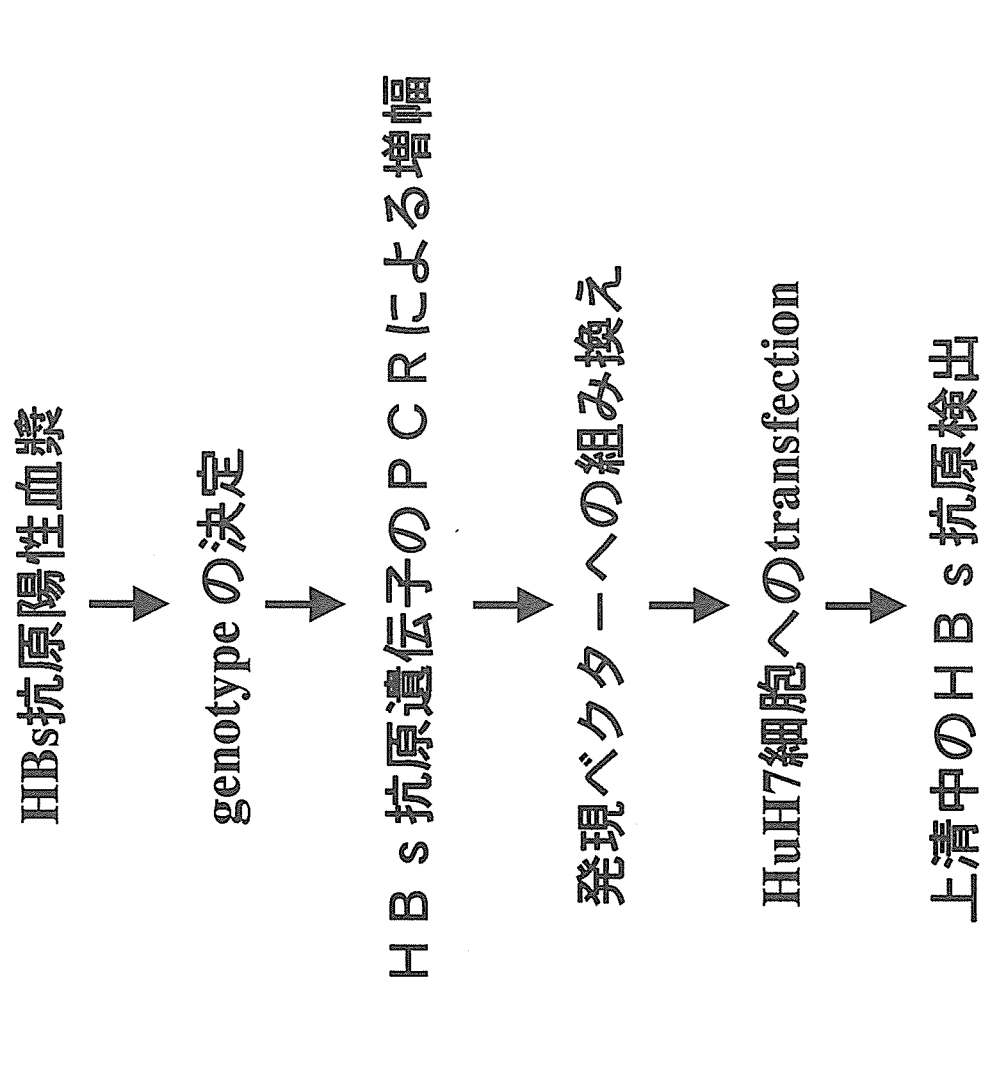


図1. リコンビナントHB s 抗原作製

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

HBV Genotype 別 HBs 抗原国内標準品候補の作製とその評価

分担研究者：水落利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第2室

研究要旨：昨年度の研究で作成した HBV genotype 別(A, B, C)HBs 抗原パネルは、HBs 抗原検出キットの性能検査において有用な標準品として用いられることが期待される。さらに、現在世界中で報告されているすべての genotype(A-H)由来のリコンビナント HBs 抗原を作成し、国内で販売されている10種類の高感度 HBs 抗原検出キットにて測定した結果、ある一種類のキットにおいては、genotype EとF由来のHBs 抗原に対する検出感度が低いことが見いだされた。本研究ではその原因を考察し、HBs 抗原の主要抗原決定基の一部のアミノ酸に改変を加えたところ、検出感度が上昇することを示した。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。

A. 研究目的

我が国におけるB型肝炎の母子感染は、1980年代半ばから制度化された新生児に対するHBワクチンやHBIG投与により、そのリスクが格段に低下した。しかし、昨今においては性感染症(STD)としてのB型肝炎という新たな側面が急浮上してきている。特に、これまで国内では検出頻度の低かったgenotype AのHBV感染者数が上昇の一途をたどっており、またその他のgenotypeのHBV感染についても報告が増加している。従って、genotypeの違いに左右されないHBV感染の迅速かつ正確な診断が医療および公衆衛生上非常に重要であることには異論がない。昨年度の本研究においては、現在市販されている種々のHBs抗原検出用体外診断用医薬品が、genotypeの異なるHBV由来のHBs抗原を、感度の相違なく検出することができるかについて検討した。つまり、国内で検出される頻度が高いHBV genotype

B, Cおよび最近その頻度の上昇が特に都市圏で報告されているHBV genotype AのHBs抗原標準品パネル候補品を作成し、国内で販売されている10種類の高感度HBs抗原検出キットにより測定した。その結果、キットによって感度の違いは見られたが、genotype A, B, C全てのHBs抗原をもれなく検出できることが明らかになった。さらに引き続きgenotype D, E, F, G, HのリコンビナントHBs抗原を作成し、同様に測定したところ、ある一種類のキットにおいては、genotype EとFのHBs抗原に対する検出感度が低いことが明らかになった。この原因について作業仮説を立て、それを検証することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

genotype 別 HBs 抗原検体: 各 genotype (A-H)のHBV感染者血漿は、北海道赤十字血液センター、台湾 FDA からの供与、あるいは市販(Teragenix 社)の血漿を用いた。それらの血漿検

体からクローニングされた HBV 遺伝子の配列を決定し、確認した後、各 genotype のリコンビナント HBs 抗原遺伝子を発現ベクターに組み込み、HuH-7 細胞に遺伝子導入し、培養上清を回収した。各 genotype の HBs 抗原濃度は、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。なお、検体の希釈には米国 BBI 社より購入した Multi marker negative matrix (Accurun 810)を用いた。そして、各検体を 1.0 IU/ml, 0.2 IU/ml の2段階に希釈して検査に供した。

アミノ酸置換 HBs 抗原の作成: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て Reverse PCR 法によってプラスミド全体を増幅後、アガロースゲル電気泳動で直鎖 DNA のバンドを精製、ライゲーションしてトランスフォーメーションに用いた。PCR には KOD plus DNA Polymerase (TOYOBO)を用いた。置換部位の塩基配列を確認後、HBs インサート全体の塩基配列を決定して置換部位以外に変異が無いことを確認した。

HBs 抗原検出キット:今回の HBs 抗原検出に使用したキットは、昨年度と同様に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(EIA 法、CLIA 法、CLEIA 法)である。

(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

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(図1)。図2では、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 で比較した。この配列から、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。

D. 考察

HBs抗原検出用体外診断用医薬品(HBs抗原検出キット)は、検体中のHBs抗原に対して高い特異性および高い親和性を持つ抗体を用いることによりその性能が保証される。現在国内で承認を受けて販売されている高感度のHBs抗原検出キットにおいては、各メーカーが独自に作成したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を、抗原捕捉抗体および酵素標識抗体として用いている。それぞれの抗体は異なった抗原決定基に対して親和性を持つことから、genotypeの異なる、つまり抗原決定基のアミノ酸配列に違いがある HBs抗原に対してもれなく結合できるかどうか

そのキットの性能に反映されることになる。本研究で明らかになったのは、キットによってはHBs抗原の主要抗原決定基のうちでたった一つのアミノ酸を置換することにより、HBs抗原検出感度が有意に上昇したことである。つまり、使用する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いる。

この結果は、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。

E. 結論

本研究で作成した genotype 別の HBs 抗原、およびアミノ酸置換を施した HBs 抗原は、HBs 抗原検出キットの性能を担保するうえで非常に有用な標準品となりうることを示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

英文 “Evaluation of 10 commercial diagnostic kits for in vitro expressed hepatitis B virus (HBV) surface antigens encoded by HBV of genotypes A to H “

Mizuochi, T., Y. Okada, K. Umemori, S. Mizusawa, and K. Yamaguchi

J. Virol. Methods 136:254-256, 2006.

和文 「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

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得 : なし

2. 実用新案登録 : なし