

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～18年度 総合研究報告書

主任研究者 竹森 利忠

平成19（2007）年3月

目 次

I. 総合研究報告

体外診断薬に関する標準品に関する研究 1

主任研究者： 竹森 利忠（感染研・免疫部）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 22

III. 論文別刷 25

体外診断薬に関する標準品に関する研究
総合研究報告書

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. 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。
2. 収集した風疹パネル血清の HI 抗体価と EIA 抗体価を比較検討した結果、両者は高い相関性を示し、日本で指標としてよく用いられている HI 価から国際的な標記法である IU 価への転換が可能であると思われた。
3. 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 力所で行われている診断の技術を比較検討し、同程度の感度を得るに至った。更に、適切な診断を行うための考察を行った。
4. 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。
5. 麻疹診断に適切な麻疹抗体測定法について検討し、HI 法よりも PA 法が EIA 法が優れていることが示唆された。また、麻疹抗体測定方法の品質管理のために必要な、麻疹パネル血清の作製のために血清の収集にとりかかった。
6. HB 抗原体外診断薬感度表示の統一を目標として WHO 国際標準品に準拠する標準品を作製した。
7. B 型肝炎ウイルス体外診断薬の品質管理に必要となる次のパネルを作製した。①本邦に普遍的な genotype A・C の血清とリコンビナント HBs 抗原からなる遺伝子型のためのパネル、②報告されたすべての genotype (A・H) のリコンビナント HBs 抗原パネル、③日本で普遍的な 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た 4 種類の変異型 HBs 抗原パネル。これらのパネルを用いて国内で販売されている高感度 HBs 抗原検出キットの性能評価を行った。
8. 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。

平成17年度

[分担研究者]

海野 幸子

(感染研・ウィルス第三部・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・ウィルス第三部・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・ウィルス第三部・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・ウィルス第二部・室長)

持田 嘉之

(株エスアールエル・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(株)・薬事部長)

斎藤由美子

(理化学研究所感染症研究ネットワーク
支援センター)

平成18年度

[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、
独立法人医薬品医療機器総合機構)

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

(感染研・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。平成 18 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ゴ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ゴ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。よって、B 型肝炎ウイルス体外診断薬（キット）に関する感度並びに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で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 抗原パネルの並びに変異型 HBs 抗原パネルの確立が望ましい。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。

B. 研究方法

1. 風疹パネルの評価： 90 検体の血清を収集し、その HI 抗体価、IU 価、中和抗体価を測定した。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血清を 2 倍、あるいは 1.2 倍希釈して測定した。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。IgM はルベラ IgM (II)・EIA 「生研」を使用した。中和抗体価はプラークリダクション法で測定した。なお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を使用した。
2. 風疹抗体測定方法の比較検討： 風疹抗体測定方法の優位性と標準血清およびパネル血清の

- 必要性を明らかにするために、風疹 HI 法と EIA 法の抗体陽性率や抗体分布について比較検討した。
3. 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。
4. 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。
5. 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 症例について初年度は分担研究者が考案した Avidity Index (AI) を測定することにより感染の時期を推定し妊婦管理に供した。次年度は、AI 値は一般臨床ではまだ測定できないので、一般臨床でも測定可能な IgG 抗体値で IgM 抗体の評価が可能か検討した。患者には本法の意味、評価方法について説明し口頭で同意を得た。
6. 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：初年度は 2004 年に徳之島の一産婦人科施設で取り扱った妊婦のうち、妊娠前に風疹抗体を有している 6 例の妊婦において、風疹 HI 抗体価の上昇から妊娠中の再感染が疑われた症例を免疫学的に検討した。これら妊婦の疫学的背景を妊婦との面接および診療記録から調査した。さらに風疹特異的 IgG と IgM の感染後の反応および風疹 IgG AI について検討した。また、分娩時の臍帯血を用いて風疹ウイルス RNA の検査を行った。
7. 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、primer A,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。
8. 麻疹抗体測定法の比較検討：麻疹の抗体測定に同意が得られた 469 名（男性 361 名、女性 108 名、年齢中央値 23 歳）から採取された血清を用いて、市販キットによりゼラチン粒子凝集法（PA 法）、酵素免疫法（EIA 法）による抗体測定を行い、得られた結果について比較し、解析を行なった（なお、本研究では取り扱う情報に個人が特定される情報は含まれておらず、研究成果の公表にあたっては、個人情報が含まれることはない）。
9. 麻疹パネル血清の作製－抗体測定方法の問題点：（1）麻疹パネルの作製；健康成人 90 人をリクルートし、研究目的を説明し、同意を得てから 30ml 採血し、血清を採取した。（2）麻疹抗体測定方法の優位性と標準血清およびパネル血清の必要性を明らかにするために、初年度は、麻疹 NT 法、HI 法、EIA 法の陽性率を比

較し、次年度は、麻疹 NT 法と EIA 法の抗体陽性率や抗体分布について比較検討した。

10. 麻疹の診断における標準化に関する検討：

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。(倫理面での配慮は特に必要としなかった。)

11. 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：(1) genotype A から H までの HBs 抗原の抗原性を評価し易くするために同一のプロモーター下流に各 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 genotype A から H までの各 HBs 抗原が得られた。(2) 日本に多い genotype B と C の HBs 抗原パネルを充実させるために、9 検体の genotype B 及び 10 検体の C の血漿から S 遺伝子を発現プラスミドにクローニングし、肝癌細胞株に遺伝子導入することによって HBs 抗原を得た。(3) 変移型 HBs 抗原を得るために、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、プラスミド全長を Reverse PCR 法で増幅することによって変異体を作製した。

12. HBV Genotype 別 HBs 抗原国内標準品候補

の作製とその評価：(1) genotype 別 HBs 抗原検体；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) より購入した検体について HBV genotype を決定して選択したものをを用いた。さらにそれぞれの genotype について、HBV 遺伝子導入して得られたリコン

ピナント HBs 抗原 (本研究班の岡田、水沢により作成された) も検体に加えた。これらの 30 検体 (genotype A: 7 検体, genotype B: 13 検体, genotype C: 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。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, 0.04 IU/ml の 3 段階に希釈して検査に供した。

(2) HBs 抗原検出キット；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) を測定に用いた。

13. 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。

14. HCV 抗体低抗体価の血中 HCV RNA の存在の有無について：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。

C. 結果

1. 風疹標準パネル血清の評価： 90 検体のうち使用に相当と考えられたものは 88 検体であった。うち 3 検体は HI、EIA、中和法で陰性、11 検体は擬陽性、74 検体は陽性であり HI 価で 16～256 倍に分散していた。またすべての血清から IgM 抗体は検出されなかった。HI 抗体価と IU 価はよく相関した。一方、中和抗体価と IU 価、あるいは HI 価とは相関する傾向にあるものの強い相関性はなかった。また、ワクチン接種者と自然罹患者の抗体価を比較したところ、ワクチン接種者の方が罹患者よりも抗体価の減衰が早いと考えられた。

2. 風疹パネル血清の作製－抗体測定方法の問題点： 健康成人 100 人の血清を用いて風疹 HI 抗体と EIA 法の比較を行った。抗体陽性者数は、HI 法 94 人(94%)、EIA 法 94 人(94%)と一致し、EIA 法抗体陰性者は、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。

3. 妊娠初期の 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. 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： 妊娠前に風疹抗体を有している 6 例の妊婦において、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。IgM が陽転したのは 2 例のみであり、IgG avidity index も全て 70%以上であった。IgM 陽性の 2 例において羊水中から風疹ウイルスゲノムが検出された。1 例においては、臍帯血風疹特異的 IgM 陽性で、臍帯血および新生児尿から風疹ウイルスゲノムを検出し CRS と診断した。

5. 風疹ウィルス遺伝子診断標準化と整備： 2 つのグループによって行われた。(1) 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。(2) 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。

6. 麻疹抗体測定法の比較検討： PA 法で PA 抗体価 1:16 以上、および EIA 法で EIA 抗体価 (IgG index：単一力価の標準血清の測定値との相対値) 1.0 以上をカットオフとしたときの抗体陽性率は、それぞれ 97.7%、97.2%とほとんど差はみられず、両法の一致率は 99.1%と非常に高かった。また、PA 法に対する EIA 法の陽性的中率、陰性的中率はともに 100%であった。さらに、EIA 法の結果から PA 抗体価に相当する EIA 抗体価の目安を算出した。
7. 麻疹パネル血清の作製－抗体測定方法の問題点： (1) 麻疹パネル血清の作製；健康成人 90 人の麻疹血清抗体価を、NT2 法と HI 法で測定し、パネルの組み合わせを検討中である (2) 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、原点をとおる傾き 1 に近似する直線になった。(3) 麻疹 NT 法、HI 法、EIA 法の比較；健康成人 81 人の麻疹抗体を NT 法で測定すると 98.8%が陽性であったが、HI 法では 79.0%しか陽性でなく、HI 法は NT 法と比較し、感度が低い方法であった。次に別のグループの健康成人 80 人を対象とした NT 法と EIA 法の比較では、NT 法での抗体陽性者数は 97.5%、EIA 法 92.5%とほぼ一致した。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。
8. 麻疹の診断における標準化に関する検討：

Vero/hSLAM は麻疹野生株の分離同定に有用であった。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。

9. B 型肝炎ウイルス S 抗原のリコンビナントパネルの作製：(1) genotype A から H までの HBs 抗原の抗原性を評価し易くするために同一のプロモーター下流に各 HBs 遺伝子を組み込んだプラスミドを構築した (2) 日本で最も普遍的な genotype C のバックグラウンドに既知の 4 種類の変異 (G145R、G145A、M133T 及び T123N) を導入した変異型 HBs 抗原パネルを作製した。(3) Reverse PCR 法による変異型プラスミドの作製法を考案し、任意の変異体を簡便に作製することが可能になった。
10. 昨年度においては、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。本年度においては、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。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。

D. 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 EIA, HI 並びに中和活性のいずれにおいても低い傾向が認められた。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。日本では指標としてよく用いられている HI 価から国際的な標記法である IU 価への転換が可能であると思われた。また、現在、並行して検討している風疹標準血清及び、今回のパネル血清は測定価の表示の統一化、精度の均一化、検査施設の技術の均一化等のための指標に有用であると思われた。作製されたパネル血清の管理については昨年度の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。

また、別のグループは成人 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. 風疹ウィ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。初年度において AI による鑑別を提案した。しかし、一般の臨床において AI 検査は難しいことから、次年度において IgG 抗体値、IgM 抗体値から判断する方法を検討した結果、妊娠初期に風疹 IgM 抗体が陽性の場合、IgG 抗体を同時に測定することや、1 ヶ月以上の間において 2 回測定することにより初感染と persistent IgM の鑑別が可能であることが示唆された。

〔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。本研究の結果から PA 法および EIA 法にほとんど差はみられず、麻疹の抗体測定には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 法は中和法との相関が報告され

ており（PA 抗体価が 1:128 あるいは 1:256 以上であれば、中和抗体も陽性）、本研究において算出した PA 抗体価に相当する EIA 抗体価の目安は、今後、臨床において免疫状態を判断する上で有用であると考えられる（ただし、本研究における EIA 法の測定値は、検査センター等で出される測定値とは相対値の算出法が異なることに注意が必要である）。

麻疹抗体を NT 法と EIA 法で測定し、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。

〔B 型肝炎ウイルス抗原〕

HBs 抗原検出用体外診断キットの性能を評価する際には、これまでのような検出感度といった量的な検討のみでなく、genotype が異なる HBs 抗原や、一部のアミノ酸に変異が起きた変異型 HBs 抗原も見逃すことなく検出できるかを検討する必要がある。しかし、特定の genotype や変異を持った HBV 陽性血漿は入手が困難であり、量にも限りがある。本研究では in vitro で作成できるリコンビナント HBs 抗原として作成し、標準品として整備することを目的とした。そのような抗原を実際に市販されている HBs 抗原検出キットにより測定し、全ての genotype 由来の HBs 抗原を、感度の差はあるものの、もれなく測定できることを確認できた。また、4 種類のリコンビ

ナント変異型 HBs 抗原を市販されている HBs 抗原検出キットで測定した結果、キットによって性能に影響を受ける変異が異なることが確認できた。今後、このようなリコンビナント抗原による標準品の整備が可能であることを示した。

〔肝炎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 型肝炎急性肝炎例 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 に引き上げてほしいと思われる。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ことが考えられる。

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、ウィ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。

収集した風疹パネル標準血清の HI 抗体価と EIA 抗体価を比較検討した結果、両者は高い相関性を示し、日本では指標としてよく用いられている HI 価から国際的な標記法である IU 価への転換が可能であると思われた。

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、同程度の感度を得るに至った。

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 PA 法か EIA 法を用いるべきであることが示唆された。また、麻疹抗体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のためのパネルの作製を行った。すなわち、B 型肝炎ウイルス S 抗原の genotype パネルの作製のために、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。

更に、B 型肝炎ウイルス診断用医薬品について変異型のためのパネルの作製を行った。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。

遺伝子型についてこれらの作製されたリコンビナント抗原及び 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、本邦に普遍的な genotype A-C においては各 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。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。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。

変異型についてこれらの作製された 4 種類のリコンビナント抗原を用いて、国内で販売されている 5 種類の高感度 HBs 抗原検出キットを用いて評価した結果、キットによって性能に影響を受ける変異が異なることが判明した。また、Reverse PCR 法を用いた簡便な *in vitro* mutagenesis 法を考案した。今後、この方法を用いて変異型 HBs 抗原パネルの充実が期待される。

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

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、て対処することが望ましい。

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
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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
 - 16) 庵原俊昭「風疹、先天性風疹症候群」小児内科 38 s 308- s 309, 2006
 - 17) 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
 - 18) 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 産婦人科の実践 55(3)」: 307-315;2006.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) Numazaki K. Current problems of measles

control in Japan and western pacific region.
Vaccine 2007, 25: (in press).

- 23) Numazaki K. Current concepts of management for congenital cytomegalovirus infection. Trends in Developmental Biology 2007, 3:(in press).
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) “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.
- 30) 「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) 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、鈴木薫 「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) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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

H. 知的財産の出願・登録状況
なし

- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.

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）

- | | | |
|---|---|----------|
| <ul style="list-style-type: none">・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 | } | 国立感染症研究所 |
| <ul style="list-style-type: none">・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） | | |

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) FAX : E-mail :	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
			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。

資料 2

研究計画・方法

どのくらいの期間でどこまで実施するか、また得られた結果をいつまでにどのような方法で公開するのか具体的に記入してください。希望する風疹パネル、必要量についてはその理由を明確に記載してください。

研究活動の状況

風疹パネル血清を使用して行う実験の社会的、学術的意義、同様の研究との比較、血清の提供を受けられなかった場合と提供を受けた場合の実験計画への影響について具体的に記載してください。