

200735050A

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

ウイルス感染症の体外診断薬の
再評価に関する基盤整備に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 一成

平成20(2008)年3月

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

ウイルス感染症の体外診断薬の
再評価に関する基盤整備に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山口 一成

平成20（2008）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
ウイルス感染症の体外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究 主任研究者： 山口一成（国立感染症研究所・血液・安全性研究部）	1
II. 分担研究報告	
1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討	12
多屋 馨子(国立感染症研究所・感染症情報センター)	
浜本いつき(国立感染症研究所・感染症情報センター)	
山口 展正(山口耳鼻咽喉科医院)	
荒木 和子(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)	
藤本 嗣人(国立感染症研究所・感染症情報センター)	
岡部 信彦(国立感染症研究所・感染症情報センター)	
2. 単純ヘルペスウイルス抗体測定上の問題点	19
川名 尚（帝京大学医学部付属溝口病院・産婦人科）	
3. 風疹ウイルス遺伝子診断技術の検討	22
駒瀬 勝啓（国立感染症研究所・ウイルス第三部）	
岡本 貴世子(国立感染症研究所・ウイルス第三部)	
大槻 紀之（国立感染症研究所・ウイルス第三部）	
田代 真人（国立感染症研究所・ウイルス第三部）	
庵原 俊昭（国立病院機構三重病院）	
4. 風疹抗体測定上の問題点と標準血清に関する研究	25
庵原 俊昭（国立病院機構三重病院）	
二井 立恵（白子クリニック・小児科）	
菅谷 亜弓（白子クリニック・産婦人科）	
5. 麻疹の血清抗体測定法の諸問題と標準化に関する検討	28
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）	
浅沼 秀臣（苫小牧市立病院・小児科）	
6. 百日せき抗体価測定試薬評価用標準参照血清並びに パネル血清作成による評価の標準化に関する研究	30
岡田 賢司(国立病院機構福岡病院)	
中臣 康雄(デンカ生研株式会社)	
小澤 賢介(デンカ生研株式会社)	
7. A型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価	32
大西 和夫(国立感染症研究所・免疫部)	
8. 体外診断薬の評価パネル作成に関する国際的動向	35
水澤左衛子(国立感染症研究所・血液・安全性研究部)	
巽 正志(国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
鈴木 哲郎(国立感染症研究所・ウイルス第二部)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
IV. 論文別刷	39

厚生労働科学研究助成金 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
ウイルス感染症の体外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究

総括研究報告書

主任研究者 山口 一成 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

研究要旨

本研究においてはウイルス等体外診断薬の臨床での問題点を抽出するとともに、国内標準品や標準パネルを整備して体外診断薬の再評価のための基盤を整備することを目的としている。

1. インフルエンザ迅速診断キットの問題点：国内では 21 種類のインフルエンザ迅速診断キットが市販されており（あるいはされていた）、国内のインフルエンザの診療には不可欠な存在となっていることが文献のレビューにより推測された。今回、感度を比較検討した結果、キット間で AH1N1 亜型で 10 倍、AH3N2 亜型で 100 倍、B 型で 1000 倍異なっていた。検体の採取部位についての検討も行った。
2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点：現在、最も頻繁に用いられている補体結合法には問題が多く、今後は感度・特異性に優れ免疫グロブリン別に抗体を測定できる ELISA 法に移行すべきと思われる。
3. WHO は 2012 年までに麻疹、風疹の排除を目標としており、わが国においても 2006 年から麻疹風疹混合ワクチンの 2 回接種を開始するとともに、2008 年から全数報告疾患とした。排除がなされた事を確認するために実験室診断が求められている。
 - (1) 病原体検出マニュアルに記載されている風疹ウイルス遺伝子 RT-PCR 法では検出出来ないウイルスの存在が明らかになり、新たな方法を検討していく必要がある。
 - (2) 風疹 HI 抗体価と EIA 抗体価の相関が高いことを明らかにし、風疹陽性閾値 HI 抗体 8 倍は EIA 抗体陽性閾値 2.0EIA 価と、風疹 HI 抗体 16 倍は EIA 抗体 4.0EIA 価に相当することを確認した。
 - (3) 麻疹の実験室内診断法の血清診断法の標準化と精度管理が必要と考えられる。
4. 百日せき患者由来の標準参照血清並びに百日せき菌主要凝集因子に対する特異ウサギ抗血清を作成した。今回作成した各血清は百日せき凝集素価測定用体外診断薬の評価用として有用と考えられた。
5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備：抗 HAV 抗体陽性国内血清の収集計画を策定して国立感染症研究所・医学倫理審査委員会の承認を受けた。これに基づき、滋賀県で発生した集団感染における抗 HAV-IgM 陽性血清 12 検体を収集した。日本赤十字社の献血血漿の高 ALT 検体から HAV-IgG 陽性血漿パネル作製が可能なが判明した。
6. WHO は「血液の安全性に関する体外診断薬のための標準品整備 5 力年計画」を 2007 年に開始した。日本の関係者は WHO の共同研究に計画的に参加して貢献するとともに情報を交換して国内標準品や標準パネル作製に反映させることが望まれる。

- 〔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
第三室室長)
- 川名 尚
(帝京大学医学部付属溝口病院・産婦人科
客員教授)
- 駒瀬 勝啓
(国立感染症研究所・ウイルス第三部
第二室室長)
- 庵原 俊昭
(国立病院機構三重病院 院長)
- 沼崎 啓
(国立感染症研究所・ウイルス第三部
第三室室長)
- 岡田 賢司
(国立病院機構福岡病院 部長)
- 大西 和夫
(国立感染症研究所・免疫部 主任研究官)
- 水澤左衛子
(国立感染症研究所・血液・安全性研究部
主任研究官)
- 巽 正志
(国立感染症研究所・エイズ研究センター
第二室室長)
- 鈴木 哲郎
(国立感染症研究所・ウイルス第二部
第四室室長)
- 〔研究協力者〕
- 岡本 貴世子
(国立感染症研究所・ウイルス第三部)
- 大槻 紀之
(国立感染症研究所・ウイルス第三部)
- 田代 真人
(国立感染症研究所・ウイルス第三部
部長)
- 二井 立恵
(白子クリニック・小児科 院長)
- 菅谷 亜弓
(白子クリニック・産婦人科 医長)
- 中臣 康雄
(デンカ生研株式会社)
- 小澤 賢介
(デンカ生研株式会社)
- 浜本いつき
(国立感染症研究所・感染症情報センター)
- 山口 展正
(山口耳鼻咽喉科医院)
- 荒木 和子
(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)
- 藤本 嗣人
(国立感染症研究所・感染症情報センター
第四室室長)
- 岡部 信彦
(国立感染症研究所・感染症情報センター
センター長)
- 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)
- 浅沼 秀臣
(苫小牧市立病院 小児科 医長)

A. 研究目的

病原体の遺伝子型等の分布、新型や突然変異の出現、国内外の感染症の発生状況等の疫学的動向や新しい測定機器や測定方法の登場による試験法の進歩によって、現在使用されているウイルス等感染症の体外診断薬の中には承認から歳月が経って現状に合わなくなっているキットもありうる。よって、体外診断薬の再評価が求められている。本研究班で体外診断薬の臨床での問題点を抽出するとともに、国内標準品や標準パネルを整備して体外診断薬の再評価のための基盤を整備することを目的としている。

1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討：インフルエンザの適切な治療およびインフルエンザの感染拡大を阻止するためには迅速かつ正確な検査診断が必要不可欠である。そこで、国内で市販されているインフルエンザ迅速診断キットについて使用状況ならびに感度等について検討し、適切な臨床検体採取方法に関して検討することを目的とした。

2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点：単純ヘルペスウイルス(HSV)の血清診断の最終目標は、HSV感染を1型と2型に分けて型特異的に感染の有無を判断することである。このような観点から現在用いられている方法とその問題点を示すことを目的とした。

3. 風疹・麻疹の診断技術の標準化と国内標準血清及び標準パネル血清の整備：WHO、WPRO 地区では2012年までに麻疹、風疹の排除を目標としており、わが国においても2006年から麻疹風疹混合ワクチンの2回接種を開始するとともに、2008年から全

数報告疾患とした。排除がなされた事を確認するために実験室診断が求められている。

(1) 風疹ウイルスの存在を証明するためのRT-PCR法によるウイルスゲノム検出法は「病原体検出マニュアル」に記載されているが風疹ゲノムの情報は十分ではなく、その有効性は検証されていない。また、同方法では風疹ウイルスのトレースに必要な、ウイルスゲノムによる genotype 解析に十分な領域がカバーされていない。より精度と感度の高い風疹ウイルスゲノム検出法の確立を目的とした。

(2) 風疹対策で重要な課題の一つは、先天性風疹症候群(CRS)児出生予防であるが、血清抗体価の感染予防閾値の検討は不十分である。また、本邦では風疹の抗体表示は、赤血球凝集抑制(HI)法では倍、酵素免疫(EIA)法ではEIA 価、ラテックス凝集(LA)法ではIU/mlで表示され、抗体価の互換性が不明確である。本研究では風疹抗体の国際単位との互換性、測定方法の標準化を図ることを目的とした。

(3) 麻疹の全数報告ではウイルス分離、ゲノム検出、特異的血清IgM抗体の検出、急性期と回復期のペア血清でのIgG抗体の有意な上昇の確認などによる実験室的診断の重要性が再認識されている。血清抗体測定には、赤血球凝集抑制(HI)法、中和試験(NT)法、ゼラチン粒子凝集(PA)法、酵素抗体(EIA)法などがある。これらの検査法の確立と標準化のために検査法間の感度と特異性について比較することを目的とした。

4. 百日せき凝集素価測定用体外診断薬の性能評価並びに品質管理のための国内参照血清並びにパネル血清の整備：現在、百日せき感染症の血清学的診断に使用されてい

る凝集素価測定試薬の標準的な評価方法が確立されていない。本研究では、百日せき抗体価測定用キット評価方法の標準化並びに体外診断試薬安定供給を目標として百日せき凝集素価測定用体外診断薬の性能評価並びに品質管理に資する国内参照血清並びにパネル血清の作成を目的とした。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備：日本では急性 A 型肝炎の大規模な集団発生はみられないが、飲食店を介した感染や海外渡航者の感染がみられることから、その感染予防対策は社会的に重要な問題として認識されている。国内発生報告数は近年急激に減少しており、将来的に国内血清パネルの作製が非常に困難になると予想されることから、現時点で A 型肝炎ウイルス感染を診断する体外診断薬の性能を再評価するための抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルを整備することを目的とした。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向：体外診断薬の評価のための国内標準品と標準パネルは国内及び世界的な疫学的動向と測定技術の進歩を十分考慮して作製する必要がある。標準品等の整備に関する国際的動向を把握することを目的とした。

B. 研究方法

1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討：国内で市販されているインフルエンザ迅速診断キットの使用状況ならびに有効性について、論文ならびにキット添付文書等を用いてレビューした。また、ウイルス量既知の検体を用いて、その感度を比較検討した。また、インフルエンザの実験室診断に用いる適切な検体採取部位を検討す

ることを目的に、様々な検体部位から採取された臨床検体について RT-PCR 法を用いて検討した。

2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点：

(1) 現況の把握のために 7 商業機関へのアンケート調査を行った。

(2) HSV-1 または HSV-2 を抗原として用いた ELISA 法を構築し、HSV-1 感染 11 症例、HSV-2 感染 42 症例から得た血清 53 検体を用いて抗原により検出感度が異なるかを検討した。また、同じ検体の抗 HSV-1、抗 HSV-2 型特異抗体を HerpeSelect 1 or 2(Focus 社)で測定した。

(3) 補体結合法 (CF) における抗体価と抗補体活性について単純ヘルペスウイルス CF 抗原「生研」を用いて検討した。

3. 風疹・麻疹の診断技術の標準化と国内標準血清及び標準パネル血清の整備：

(1) 日本で過去約 30 年間に流行、分離された風疹ウイルス約 20 株の遺伝子解析を行い、現行の RT-PCR 法の有効性を検証した。

(2) 風疹血清 HI 抗体価は、コマーシャルラボに R-HI 法および予研法での測定を依頼した。また、風疹 EIA 抗体価もコマーシャルラボに測定を依頼した。

(3) 麻疹抗体価の EIA に関しては WHO/WPRO 地区の 19 施設においてパネル血清の評価を行った。NT 法に関しては B95a のみならず Vero/hSLAM 細胞で麻疹野生株および Edmonston 株の異なる遺伝子型の麻疹ウイルスを用いたブラック減少法および CPE 抑制法による試験の確立も検討した。また、HI、NT、EIA (IgM、IgG)、PA 法の各検査法間の感度と特異性について比較した。

4. 百日せき凝集素価測定用体外診断薬の性能評価並びに品質管理のための国内参照血清並びにパネル血清の整備：

(1) 百日せき患者由来一次参照血清の作成：百日せき患者由来の血清 2 検体について、ウイルス技術連絡会会員研究協力施設

(5 施設)において百日せき凝集反应用抗原「生研」を用いて抗体価のサーベイランスを行い、同検体の凝集価を設定した。

(2) 百日せき菌主要凝集因子特異抗体の作成：抗原因子 1、抗原因子 3 及び 6、抗原因子 2 及び 4 特異ウサギ抗血清を作成した。各凝集因子特異ウサギ抗血清の反応性について、百日せき凝集反应用抗原「生研」山口株及び同東浜株に対する反応性を評価した。

(3) 複数ロットの百日せき凝集反应用試薬に対する反応性を比較し、同血清を用いた品質評価の可能性について検討した。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備：抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルを整備するために、抗 HAV 抗体陽性血清（特に IgM 型抗 HAV 抗体陽性血清）を収集するシステムの構築を目指した。(イ)HAV 集団感染などが起きた時点で自治体担当部署および主治医に協力を要請し、患者血清の収集。(ロ)事前に肝炎専門医に協力を依頼し、低頻度で散発する急性 A 型肝炎発症例があった場合、即時に検体の提供を受けることができる体制の構築。(ハ)上記急性期の IgM 型抗 HAV 抗体陽性血清に加えて、感染後長期間持続する IgG 型の抗 HAV 抗体が陽性の血清について、献血血漿を用いたパネル作製。(ニ)国外の抗 HAV 抗体陽性血清についての収集体制構築。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向：2007 年 6 月に NIBSC が主催した SoGAT 会議に参加して、WHO による体外診断薬のための標準品整備 5 年計画とイギリス及び米国における標準品等の整備状況についての情報を収集した。

(倫理的な配慮：所属機関の倫理委員会の承認を得た。あるいは、研究目的に検体を使用することを患者に説明して同意を得ている。)

C. 研究結果

1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討：国内では、21 種類のインフルエンザ迅速診断キットがこれまでに市販されており、国内のインフルエンザの診療には不可欠な存在となっていることが推測された。しかし、キット間で見られた感度は AH1N1 亜型で 10 倍、AH3N3 亜型で 100 倍、B 型で 1000 倍異なっていた。感度の高い RT-PCR 法では、適切な検体採取部位の検討は不可能であった。

2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点：HSV 抗体測定に現在最も頻繁に用いられている補体結合法は感度・特異度などに問題が多く ELISA 法に移行することがすすめられる。この際、HSV には HSV-1 と HSV-2 があるため ELISA 法の抗原としてどちらが良いかを検討した。その結果 HSV-1 抗原を用いた場合やや低くはなるが HSV-2 抗体も検出されるので臨床的には大きな問題にはならないことが判明した。一方、補体結合法では 13.2%が抗補体作用のため判定不能であった。

3. 風疹・麻疹の診断技術の標準化と国内

標準血清及び標準パネル血清の整備：

(1) 過去 30 年間に分離された風疹ウイルス約 20 株の遺伝子解析を行った。19 株の E1 領域の塩基配列を新たに決定した。その結果、日本での流行株は 10? 20 年毎に風疹ウイルスの Genotype が変化していた。

また、「病原体検出マニュアル」に記載されている RT-PCR 法で使用する 8 つのプライマー領域にはいずれかの株で変異があり、株間で検出感度が異なると予想された。ことに、clade 2 genotype 2B に属する 1 株はウイルスゲノムの検出が不可能であった。

(2) 風疹抗体測定において B-HI 法と予研法を比較すると、抗体陰性血清は一致していたが、B-HI 法で測定した風疹 HI 抗体価は予研法と比べると低く判定されることが示された。次に予研法で測定された HI 抗体 16 倍血清を、キットに添付されている血清（陰性血清、HI 抗体 64 倍血清）に加えて標準血清として使用したところ、B-HI 法で測定した血清抗体価は予研法の抗体価とよく一致するようになった。次に HI 抗体価と EIA 抗体価と比較すると、 $R=0.9551(P<0.0001)$ の有意の相関が認められた。また HI 抗体 8 倍未満の陰性者数と EIA 抗体 2 未満の陰性者、HI 抗体 16 倍以下の弱陽性者数と EIA 抗体 4 以上 8 未満の弱陽性者数は一致した。

(3) 麻疹の血清診断における各検査法間の感度と特異性について比較した。現行の EIA キットを使用しても WHO/WPRO 地区の 19 施設でのパネル血清を用いた特異的血清 IgM 抗体測定成績に有意な差異は認められなかった。Vero/hSLAM 細胞でブラック減少法を用いた NT 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。HI 法では EIA IgG の強陽性例でも陰性例が存在した。HI 法は NT 法

との比較でも感度と特異性が低値であった。感染直後の高 PA 抗体価の血清においては NT 抗体価との相関が認められた。PA 抗体価のみが高値を持続することもあり、PA は EIA よりも感度、特異性ともに低値であった。

4. 百日せき凝集素価測定用体外診断薬の性能評価並びに品質管理のための国内参照血清並びにパネル血清の整備：

(1) 百日せき患者由来のヒト血清 (No1, No2) を作成した。この血清を研究協力施設において、それぞれの凝集素価を測定し、各々の凝集素価を設定して一次標準参照血清とした。この一次参照血清を用いて百日せき凝集反応用抗原「生研」山口株 5 ロットの反応性を評価した。血清 No.1 は 1:640~1:1280、血清 No.2 は 1:80~1:160 と一定の凝集価を示した。

(2) 百日せき菌の因子 1、因子 2,4 および因子 3,6 に対する特異ウサギ血清を作成した。各因子特異抗血清を用いて百日せき凝集反応用抗原「生研」山口株 5 ロットの反応性を評価したところ、抗因子 1 血清は 1:1600~1:3200、抗因子 2,4 血清は 1:6~1:12 及び抗因子 3,6 血清は 1:1920~1:3840 と一定の凝集価を示した。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備: 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルを整備することを目的として、血清検体収集体制の構築を進め、血清パネル作製に着手した。これまでに、収集計画を策定して国立感染症研究所・医学倫理審査委員会の承認を受け、これに基づき、滋賀県で発生した集団感染における IgM 型抗 HAV 陽性血清 12 検体を成功裏に収集することができた。また、IgG 型抗 HAV 抗体陽性国内血清の収集

に関して、日赤献血検体のうち ALT 落ちの血清（50 歳以上）をスクリーニングした結果、これを用いた血清パネル作製が可能性であると判断された。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向：WHO は「血液の安全性に関する体外診断薬のための標準品整備 5 年計画」を推進している。世界の疫学的動向や測定技術の進歩を鑑みて、ウイルス等病原体に関する国際標準品と国際参照パネルの整備を順次行う。また、イギリスと合衆国においてはウイルス等感染症検査法の標準化や精度管理のための標準品やパネル等の整備に取り組んでいる。

D. 考察

1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討：国内では、数多くのインフルエンザ迅速診断キットが市販されているが、キット間で感度の違いが見られた。B 型でその差違が大きい傾向が見られた。国内でのシェアは、臨床医らの相互の情報交換あるいは手技の簡便さなどを元を選択されていると考えられるが、今後は、臨床検体を用いて更に詳細に検討する予定である。採取部位の検討については、リアルタイム PCR 法を用いたウイルス量の定量が必要と考えられた。

2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点：商業機関を通じてのアンケート結果で感度・特異度・抗補体作用などの問題があるにも拘らず、CF 法が最も多用されていることが判明した。その理由は保険で行えるためと思われる。今回の検討でも抗補体の判定ができない例が 13%にみられている。ELISA 法に対する強い要請のあることが判明した。

今回、ELISA 法について検討を行なった結果、従来から用いられている HSV-1 を抗原とするプレートでも HSV-2 抗体は検出できることが判明した。現在、型特異抗体の測定は保険では行えないが、世界的には型特異抗体の臨床的意義が認められており本邦でも可能になることが望まれる。

3. 風疹・麻疹の診断技術の標準化と国内標準血清及び標準パネル血清の整備：

(1) 日本では過去において約 5 年の周期で流行が発生しており、2-3 回の流行でウイルスの genotype の変化がおこると考えられた。また、病原体検出マニュアルにある RT-PCR 法に用いるすべての primer 配列内で変異が見つかり、現に現行法では検出不可能なウイルスの存在が示された。今後、より確実な風疹ウイルス遺伝子検出方法の確立を目指す。

(2) 妊婦の風疹対策として、風疹 HI 抗体 16 倍以下の人への風疹ワクチン接種が勧められている。今回の検討から、検査機関での抗体測定方法の標準化を図るために、HI 抗体 16 倍の血清を含むパネル血清を作成し、提供することを計画している。また、抗体測定方法の違いによる抗体表示方法の違いを解消するため、各抗体価の目安となる国際単位を示す。

(3) NT 法は麻疹の感染防御能を反映するとされるが、現状では多数の検体処理は困難な状況にある。HI、CF、PA 各法では感度と特異性のみならず、手技上の問題点も明らかになった。EIA 法では国際的標準化、統一化は可能なものと判断された。

4. 百日せき凝集素価測定用体外診断薬の性能評価並びに品質管理のための国内参照血清並びにパネル血清の整備：今回一次参

照血清として設定した2つの百日せき患者由来血清は、百日せき凝集反応用抗原「生研」山口株5ロットでの反応は、何れの血清によっても一定の凝集価が得られた。また、百日せき菌株を用いて作成した主要各凝集因子に対するウサギ特異抗血清による試薬5ロットの評価では、何れの血清によっても一定の凝集価が得られた。今回作成した各血清は試薬の評価指標として有用と考えられた。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備：A 型肝炎ウイルス体外診断薬の承認前試験に必要な、抗 HAV 抗体陽性国内血清の収集計画を策定して国立感染症研究所・医学倫理審査委員会の承認を受けた。これに基づき、滋賀県で発生した集団感染における抗 HAV-IgM 陽性血清 12 検体を成功裏に収集することができた。この成果については、滋賀県庁健康福祉部、長浜保健所ならびに主治医のご協力に負うところが大きかった。別途、低頻度で散発する HAV 感染の国内患者血清を収集するためのネットワークの構築を進めている。日赤献血血漿で高 ALT 値のために不適格となった血漿から IgG 型抗 HAV 陽性血清パネルの作成が可能であると判断できた。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向：WHO の体外診断薬のための標準品整備 5 ヶ年計画に基づいて 2009 年までに実施される国際標準品と国際参照パネルの共同研究の計画が示された。国立感染症研究所はそのうちの 3 つの共同研究に参加している。今後実施される共同研究に関係者は計画的に参加して貢献するとともに情報を交換して国内標準品や標準パネル作製に反映させることが望まれる。

E. 結論

1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討：国内では、21 種類のインフルエンザ迅速診断キットが市販されており（あるいはされていた）、国内のインフルエンザの診療には不可欠な存在となっていることが推測された。しかし、キット間で見られた感度は AH1N1 亜型で 10 倍、AH3N2 亜型で 100 倍、B 型で 1000 倍異なっていた。感度の高い RT-PCR 法では、適切な検体採取部位の検討は不可能であった。リアルタイム PCR 法を用いたウイルス量の定量が必要である。

2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点：現在、最も頻繁に用いられている CF には問題が多く、今後は感度・特異度に優れた免疫グロブリン別に抗体を測定できる ELISA 法に移行すべきと思われる。ELISA 法で HSV-1 抗原を用いたプレートでも HSV-2 抗体は検出できることが判明した。

3. 風疹・麻疹の診断技術の標準化と国内標準血清及び標準パネル血清の整備：

(1) 病原体検出マニュアルに記載されている RT-PCR 法では検出出来ないウイルスの存在が明らかになり、新たな方法を検討していく必要がある。

(2) 風疹 HI 抗体測定上の問題点を示し、その解決法を明らかにした。また、風疹 HI 抗体価と EIA 抗体価の相関が高いことを明らかにし、風疹陽性閾値 HI 抗体 8 倍は EIA 抗体陽性閾値 2.0EIA 価と、風疹 HI 抗体 16 倍は EIA 抗体 4.0EIA 価に相当することを確認した。

(3) 麻疹の実験室内診断法の確立においては今後さらに血清診断法の標準化と精度

管理が必要と考えられる。

4. 百日せき凝集素価測定用体外診断薬の性能評価並びに品質管理のための国内参照血清並びにパネル血清の整備：百日せき患者由来の標準参照血清並びに百日せき菌主要凝集因子に対する特異ウサギ抗血清を作成し、複数ロットの凝集素価測定試薬に対する反応性について評価した。複数ロットに対して一定の凝集価を示し、今回作成した各血清は試薬評価用として有用と考えられた。今後さらに解析をすすめ、試薬評価法の標準化を目指す。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備：抗 HAV 抗体陽性国内血清の収集計画を策定して国立感染症研究所・医学倫理審査委員会の承認を受けた。これに基づき、滋賀県で発生した集団感染における抗 HAV-IgM 陽性血清 12 検体を成功裏に収集することができた。低頻度で散発する HAV 感染の国内患者血清を収集するためのネットワークの構築を進めている。IgG 型抗 HAV 抗体陽性国内血清の収集に関して、日赤献血検体のうち ALT 落ちの血清（50 歳以上）によるパネル作製の準備を行った。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向：WHO は「血液の安全性に関する体外診断薬のための標準品整備 5 年計画」を 2007 年に開始した。日本の関係者は WHO の共同研究に計画的に参加して貢献するとともに情報を交換して国内標準品や標準パネル作製に反映させることが望まれる。

F. 健康危険情報

1. インフルエンザ迅速診断キットの感度

には型によって最大 1000 倍の違いがあった。

2. 単純ヘルペスの診断に保険で認められている補体結合法では検体の 13% の抗体価が偽陰性となった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Haga T, Murayama N, Shimizu Y, Saito A, Sakamoto T, Morita T, Komase K, Nakayama T, Uchida K, Katayama T, Shinohara A, Koshimoto C, Sato H, Miyata H, Katahira K, Goto Y. Analysis of antibody response by temperature-sensitive measles vaccine strain in the cotton rat model. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2008 Feb 2.
- 2) Momose, F., Kikuchi, Y., Komase, K., and Morikawa, Y., Visualization of micro-tubule-mediated transport of influenza viral progeny ribonucleoprotein. *Microbes Infect.* 2007 Oct;9(12-13): 1422-33.
- 3) Fujino, M., Yoshida, N., Kimura, K., Zhou, J., Motegi, Y., Komase, K., Nakayama, T. Development of a new neutralization test for measles virus. *J Virol Methods*, 2007 142(1-2): 15-20.
- 4) 駒瀬勝啓、麻疹と麻疹ウイルス、診療研究、431: 10-16
- 5) 庵原俊昭：ウイルス検査法とその評価、SRL 宝函、別冊 s4-s16, 2007
- 6) 二井立恵、庵原俊昭、他：健康成人女性における風疹抗体価と低抗体陽性者に対するワクチン接種の検討。三重

- 県小児科医会会報 74:23-33,2007
- 7) 庵原俊昭: 予防接種をめぐる問題. 小児科診療 70:2121-2123,2007
- 8) 岡田 賢司 「ジフテリア・破傷風・百日咳ワクチン」日本医師会雑誌 135(10):2185-2189,2007
- 9) 岡田 賢司 「変貌する百日咳と進む世界の対策」小児科臨床別冊 60:2007-2008,2007
- 10) 川名 尚、新感染症学 下 - 新時代の基礎・臨床研究 - 感染症学総論 II . 感染症法分類 - 発症・病態・診断・治療 - 五類感染症(定点把握) 担当部分: 性器ヘルペスウイルス感染症 65(3):331-338;2007.
- 11) Numazaki K. Current problems of measles control in Japan and western pacific region. Vaccine 2007, 25: 3101-3104.
2. 学会発表
- 1) 海野幸子、大槻紀之、庵原俊昭、浅野喜造、岡田賢司、田代真人、駒瀬勝啓、風疹パネル血清候補の評価: 中和抗体価に関して、第 48 回日本臨床ウイルス学会、2007. 6. 2-3、富山
- 2) 樋口彰、駒瀬勝啓、中山哲夫、SSPE (亜急性硬化性全脳炎) ウイルスの細胞融合能の解析、第 55 回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 3) 二宮健吾、中山哲夫、駒瀬勝啓、竹内薫、永田恭介、ムンプスウイルス星野株のリバースジェネテックス系構築、第 55 回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 4) 澤田成史、駒瀬勝啓、中山哲夫、RS ウイルスの外殻蛋白を発現するキメラ麻疹ウイルスの作製、第 55 回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 5) 坂田真史、駒瀬勝啓、中山哲夫、弱毒風疹生ワクチン KRT 株が示す温度感受性を担うゲノム領域の同定、第 55 回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 6) 百瀬文隆、菊池雄士、駒瀬勝啓、森川裕子、新規抗インフルエンザウイルス NP モノクローナル抗体によるウイルス RNP 複合体の可視化、第 55 回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 7) 大橋喬、菊池雄士、駒瀬勝啓、百瀬文隆、森川裕子、H5N1 型高病原性鳥インフルエンザウイルス HA に結合する中和モノクローナル抗体のエピトープ解析、第 55 回日本ウイルス学会 2007. 10. 21-23、札幌
- 8) 佐藤弘、多屋馨子、駒瀬勝啓、田代真人、岡部信彦、我が国における麻疹及び風疹に対する抗体保有状況 (2006 年度感染症流行予測調査より)、第 11 回日本ワクチン学会学術集会、2007. 12. 8-9、横浜
- 9) 大槻紀之、田代真人、駒瀬勝啓、風しんワクチン株の全塩基配列の決定とワクチン品質管理への応用、第 11 回日本ワクチン学会学術集会、2007. 12. 8-9、横浜
- 10) 川名 尚: 「性器ヘルペスの診断と妊婦の管理について」福岡市 STD 研究会学術講演会 2007 年 5 月 25 日、福岡
- 11) 西澤美香、川名 尚: 「新しい単純ヘルペスウイルス型特異抗体キット Captia HSV の評価」第 48 回日本臨床ウイルス学会 2007 年 6 月 3 日、富山

- 1 2) 川名 尚、西澤美香、西井 修、
白木公康：「アミノ酸を一部欠失した
HSV-2 株について」第 20 回日本性感
染症学会学術大会 2007 年 12 月 2 日、
東京
- 1 3) Numazaki K. Current strategies
of measles elimination in western
pacific region. 5th World
Congress of the World Society for
Pediatric Infectious Diseases,
Bangkok, Thailand, November 15-18,
2007.
- 1 4) Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada.
Establishment of National
Standards for NAT Blood Viruses and
NAT Proficiency Study Program in
Japan. SoGAT XX In Warsaw,
Poland June 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

研究報告

ウイルス感染症の体外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究

(主任研究者：山口一成)

インフルエンザ迅速診断キットに関する検討

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第三室室長
研究協力者	浜本いつき	国立感染症研究所感染症情報センター流動研究員
	山口 展正	山口耳鼻咽喉科医院院長
	荒木 和子	国立感染症研究所感染症情報センター技術補佐員
	佐藤 弘	国立感染症研究所感染症情報センター研究員
	藤本 嗣人	国立感染症研究所感染症情報センター第四室室長
	岡部 信彦	国立感染症研究所感染症情報センター長

研究要旨

国内では、21種類のインフルエンザ迅速診断キットがこれまでに市販されており、国内のインフルエンザの診療には不可欠な存在となっていることが推測された。しかし、キット間で見られた感度はAH1N1亜型で10倍、AH3N2亜型で100倍、B型で1000倍異なっていた。感度の高いRT-PCR法では、適切な検体採取部位の検討は不可能であった。リアルタイムPCR法を用いたウイルス量の定量が必要である。

A. 研究目的

インフルエンザの適切な治療およびインフルエンザの感染拡大を阻止するためには迅速かつ正確な検査診断が必要不可欠である。そこで、国内で市販されているインフルエンザ迅速診断キットについて使用状況ならびに感度等について検討し、適切な臨床検体採取方法に関して検討することを目的とした。

B. 研究方法

国内で市販されているインフルエ

ンザ迅速診断キットの使用状況ならびに有効性について、論文ならびにキット添付文書等を用いてレビューした。また、ウイルス量既知の検体を用いて、その感度を比較検討した。

また、インフルエンザの実験室診断に用いる適切な検体採取部位を検討することを目的に、様々な検体部位から採取された臨床検体についてRT-PCR法を用いて検討した。

インフルエンザと診断した患者の鼻甲介、鼻咽頭、中咽頭を滅菌綿棒で拭い、検体保存液 2ml に懸濁したものを検体とした。検体 200 μ l から市

販キットを用いて RNA 抽出液 50 μ l を調整し、RNA 抽出液 4 μ l から RT 反応により cDNA 溶液 20 μ l を合成し、そのうち 2 μ l を PCR に用いた。Lam WY ら (JCM, 2007) の方法により A 型については Matrix 遺伝子領域の一部(412bp)の増幅 (A/H1N1 亜型および A/H3N2 亜型の両者とも検出可能)、B 型については Nucleoprotein 遺伝子領域の一部(883bp)の増幅する RT-PCR 法によりインフルエンザウイルス遺伝子の検出を行い、さらに塩基配列により型(亜型)の決定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究実施にあたり、臨床検体の採取に関しては国立感染症研究所倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 国内で市販されている(過去に市販されていたものを含む)キットの種類

以下の 21 種類であった。

1. エスプライン インフルエンザ A&B-N (富士レビオ)および改良型
2. クイック Ex-Flu 「生研」(デンカ生研)
3. スタットマーク インフルエンザ A/B (カイノス/東和薬品)
4. タミテスト インフルエンザ AB (ロシュダイアグノスティックス)
5. チェック Flu A.B (アルフレッサファーマ)
6. ポクテム インフルエンザ A/B (大塚製薬/シスメックス)

7. ラピッドテスト FLU スティック (第一化学薬品)
8. Quick Vue ラピッド SP influ (住友製薬バイオメディカル)
9. クリアビュー influenza A/B (日本シェーリング)
10. キャピリア FluA+B (アルフレッサファーマ)
11. BinaxNOW インフルエンザ (栄研化学)
12. キャピリア Flu A&B (日本ベクトンディッキンソン)
13. ラピッドビュー インフルエンザ A/B (住友製薬バイオメディカル)および改良型
14. プロラストチェック Flu A&B (三菱化学ヤトロン)
15. ラピッドテスト FLU AB (第一化学薬品)
16. インフル A・B・クイック「生研」(デンカ生研)
17. ディレクティジェン Flu A+B (日本ベクトンディッキンソン)
18. ジースタットフルーA&B キット (ニチレイ)
19. クイックチェイサー FLUA,B (ミズホメディター)
20. BD Flu エグザマン (日本ベクトンディッキンソン)
21. クイック S-インフル A・B (デンカ生研)

この中で、2006/07 シーズンに国内使用が可能であったキットは、1~11 の 11 キットであった。(原：小児科診

療、2007より)

2. 国内論文ならびにこれまでの報告のレビュー

2007/08 シーズンの ML インフルエンザ 流行 前線 情報 DB (<http://ml-flu.children.jp/>(プロジェクトリーダー：砂川富正、担当者：西藤なるを))によると、2008年1月21日現在、エスプライン インフルエンザ A&B-N(37.0%)、キャピリア Flu A+B(13.5%)、ラピッドテスト FLU スティック(10.2%)の使用頻度が高かった。

川上ら、原の論文で、迅速診断キットの検討が実施されていた。1999年1月に発売が開始された迅速診断キットのうち、A型およびB型インフルエンザウイルスの核蛋白に対するモノクローナル抗体を使用したキットとして、イムノクロマト法(簡便で迅速、現在この方法が主流)、酵素免疫法(感度は高いが測定時間が長く操作が煩雑)、フロースルー免疫測定法、イムノクロマト法と酵素免疫法の組み合わせがあり、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを検出するキットもあった。方式は主に、プレート(カセット)方式とディップスティック方式があった。

迅速診断キットによる検出には $10^3 \sim 5$ pfu/ml 以上のウイルス感染力価が必要と考えられており、分離や nested-PCR 法に比べると 1000 倍以上のウイルス量が必要とされ、鼻腔吸

引液では、鼻腔ぬぐい液、咽頭ぬぐい液に比べて100倍ウイルス感染力価が高いと報告されていた。

また、2004/05 シーズンは 2000 万人分以上のキットが使用されたと推測され、約 200 億円の市場と言われている。

キット間で、AH1 亜型で 20~100 倍、AH3 亜型で 20~200 倍、B 型で 10~100 倍の検出限界の差があったが、同一製品でもウイルス株により検出限界の幅に大小有り、それぞれの性能に特徴があった。B 型は A 型に比べると一般に低感度であると報告されていた。

3. キット間の感度比較(10キットについてウイルス液を用いて比較検討)

ウイルス量既知のウイルス液をキットに添付されている検体懸濁液を用いて10倍段階希釈し、10キットについて、感度を比較検討した。表1にA型(A/H1N1およびA/H3N2亜型)の結果を、表2にB型の結果を示した。A/H1N1についてはキット間で10倍、A/H3N2亜型はキット間で100倍、B型はキット間で1000倍の感度の違いが認められた。

4. 部位別検出状況

インフルエンザと診断した患者の鼻甲介、鼻咽頭、中咽頭を滅菌綿棒で拭い、それぞれのサンプルについて、

RT-PCR法を用いて、インフルエンザウイルスゲノムの検出を実施した。表3に示すように、いずれの部位からもインフルエンザウイルスゲノムが検出され、検出部位毎に差違は認められなかった。検出された型、亜型は2006/07シーズンに国内で流行した型・亜型の割合に一致していた。

D. 考察

国内では、数多くのインフルエンザ迅速診断キットが市販されているが、キット間で感度の違いが見られた。B型でその差違が大きい傾向が見られた。国内でのシェアは、臨床医らの相互の情報交換あるいは手技の簡便さなどを元に選択されていると考えられるが、今後は、臨床検体を用いて更に詳細に検討する予定である。採取部位の検討については、RT-PCR法のような感度の高い方法では、部位毎の差は認められず、リアルタイムPCR法を用いたウイルス量の定量が必要と考えられた。

E. 結論

国内では、21種類のインフルエンザ迅速診断キットが市販されており（あるいはされていた）、国内のインフルエンザの診療には不可欠な存在となっていることが推測された。しかし、キット間で見られた感度はAH1N1亜型で10倍、AH3N2亜型で100倍、B型で1000倍異なっていた。

感度の高いRT-PCR法では、適切な検体採取部位の検討は不可能であった。リアルタイムPCR法を用いたウイルス量の定量が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1 各社インフルエンザ迅速診断キットの検出限界 (A型)

製品名	ウイルス量	10倍段階希釈										→ ウイルス量多い 2006/07シーズンに 分離されたウイルス					
		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-				
H1N1	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3N2	A	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表2 各社インフルエンザ迅速診断キットの検出限界（B型）

製品名	ウイルス量				10倍段階希釈				→ ウイルス量多い	
	A	B	C	D	E	F	G	H		I
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2006/07シーズンに分離されたウイルス