

200838029A

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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 一成

平成21（2009）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20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山口 一成

平成21（2009）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 研究代表者： 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	11
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	15
川名 尚（帝京大学医学部付属溝口病院・産婦人科）	
平野 勝（デンカ生研株式会社・生物ウイルス試薬部）	
山崎 誠（デンカ生研株式会社・生物ウイルス試薬部）	
3. 風疹ウイルス遺伝子診断技術の検討	18
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	21
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）	
落合 仁（落合小児科）	
渡辺 正博（すずかこどもクリニック）	
5. 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	24
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）	
高橋 崇道（デンカ生研株式会社）	
山崎 誠（デンカ生研株式会社）	
権平 文夫（デンカ生研株式会社）	
ウイルス検査技術連絡会	
6. 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	26
蒲地 一成（国立感染症研究所・細菌第二部）	
福田 靖（国立感染症研究所・細菌第二部）	
豊泉 裕美（国立感染症研究所・細菌第二部）	
韓 賢子（国立感染症研究所・細菌第二部）	
岡田 賢司（国立病院機構福岡病院・小児科）	
7. A型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価	30
大西 和夫（国立感染症研究所・免疫部）	
百瀬 俊也（日本赤十字社・血液事業本部）	
8. 体外診断薬の評価パネル作成に関する国際的動向	33
水澤左衛子（国立感染症研究所・血液・安全性研究部）	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
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

研究代表者 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。標準パネルの管理及び譲渡申請に関する審査等の事項を適正かつ円滑に実施するために国立感染症研究所に「標準パネル運営委員会」を設置することが決まった。

1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討：国内では少なくとも 20 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、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。AH1N1, AH3N2 亜型、B 型各 1 株を用いて検討した結果、キット間で感度が異なった。最も適切な臨床検体採取部位は上咽頭であった。
2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点：HSV に対する型特異抗体の測定は臨床的には可及的速やかに可能になることが望まれるが、今回検討した Platelia キットは感度・特異度共に優れていた。
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) 現行の病原体検出マニュアルの RT-PCR 法よりも特異性、感度ともに優れた RT-PCR 法を開発した。本法は WHO が推薦する genotype の決定に必要な領域をカバーする。
 - (2) 風疹 HI 抗体および EIA 抗体の国際単位への変換方法を示した。風疹 EIA 抗体の有意上昇の基準は 2 倍以上の上昇であった。
4. 百日せき体外診断薬の評価法の標準化と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 1 次標準参照血清をもとに健常人由来の 2 次標準参照血清の候補を設定した。また、抗 P T および抗 F H A を測定する E I A 試薬を試作した。
 - (2) 百日せきの血清診断である菌凝集素価法について再評価を行った。山口株は近年の流行株と一致した遺伝子型と凝集因子を持つことを明らかとした。本法の診断精度の向上には凝集用抗原の見直しが必要である。
5. 抗HAV抗体陽性国内血清パネルの整備：IgG型抗HAV抗体陽性国内血清を収集し、高品質のパネルを作製することができた。市販されているIgG型抗HAV抗体検出キットを用いてこのパネル検体を測定した結果、現行市販製品の良好な性能が確認された。
6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向：WHO の「体外診断薬のための標準品整備 5 ヶ年計画 2007」に基づく国際共同研究への参加を円滑に進めるために、国立感染症研究所では体外診断薬委員会を通じて参加協力する体制を整備した。

〔研究分担者〕

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
帝京大学医学部附属溝口病院・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
岡田 賢司
国立病院機構福岡病院 部長
蒲地 一成
国立感染症研究所 細菌第二部 第五室室長
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

〔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
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
平野 勝 デンカ生研株式会社
山崎 誠 デンカ生研株式会社
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
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
落合 仁 落合小児科
渡辺 正博 すずかこどもクリニック
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
高橋 崇道 デンカ生研株式会社
山崎 誠 デンカ生研株式会社
権平 文夫 デンカ生研株式会社
ウイルス検査技術連絡会
福田 靖 国立感染症研究所細菌第二部
豊泉 裕美 国立感染症研究所細菌第二部
韓 賢子 国立感染症研究所細菌第二部
百瀬 俊也 日本赤十字社血液事業本部

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。現在わが国で用いられている方法では型特異抗体の測定はできない。外国で最近開発された型特異抗体測定キットでについて型特異性・感度を検討することを目的とした。

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) 風疹は麻疹と共に排除をめざして

2008年1月からは全数報告疾患となり、実験室診断が求められている。しかし、感染初期のIgM抗体測定は感度に問題がある。一方、RT-PCR法によるウイルスゲノム検出法は現行の「病原体検出マニュアル」にも記載されているが、この系の開発当時は風疹ゲノムの情報が十分ではなかったため、汎用性が十分には検証されていない。また、同法では風疹ウイルスのトレースに必要とされる、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。本研究は、特異性および感度の高い風疹ウイルスゲノム検出法による診断法を確立する事を目的とする

(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。世界保健機関(WHO)は、風疹発症予防閾値は10IU/ml、感染予防閾値は16IU/mlと提唱している。しかし、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価の互換性の検討、風疹抗体価の発症予防閾値および感染予防閾値の検討、更には風疹EIA抗体有意上昇の基準について検討を行うことを目的とする。

4. 百日せき体外診断薬の評価法の標準化と国内参照血清並びにパネル血清の整備：

(1) 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使用する国内参照血清並びにパネル血清を作成し、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図ること、および新規 EIA 測定系を構築し、標準化することを目的とする。

(2) 凝集素価測定法は感度と特異性が低いという問題点がある。凝集用抗原として山口株（流行株）と東浜株（ワクチン株）が使用されているが、近年の百日咳流行株には遺伝的な多様性が世界的に認められている。本研究では菌凝集素価法の再評価を目的として山口株が近年の流行株を代表するか否かの検討を行う。

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（HAV）体外診断薬の再評価のための基盤整備を目的として抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの作製を進めている。急性 A 型肝炎の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困難になると予想される。今年度は IgG 型抗 HAV 抗体陽性国内検体を収集し血漿検体パネルを作製した。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向：国内標準品や国内標準パネルは国際標準品に基づいて力価を表示し、国内外の疫学的動向や技術の進歩を考慮して作成することが必要である。本分担研究においては、WHO や諸外国における標準品や標準パネルの整備に関する動向を把握することを目的とする。

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：単純ヘルペスウイルス 1 型又は 2 型の感染者それぞれ 30 例から得た血清をもちいて、外国で最近開発された型特異抗体測定キットである Platelia を 2000 年より市販されてきた HerpeSelect と比較しながら精度を検討した。

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) 昨年度風疹ウイルスのゲノム遺伝子情報を収集し、一部の風疹ウイルスが現行の RT-PCR 法では検出できないことを報告した。今年度はその情報を用いて、あらたな RT-PCR 法を確立し、その汎用性、感度等を検討し、評価した。

(2) 研究の目的を説明し、同意を得た 70 人から採取した血清を用いて風疹抗体 HI 法、EIA 法、LA 法で抗体価を測定し、比較した。MR ワクチン接種前後の抗体測定に同意した 63 人を対象に、接種前後の血清抗体価を HI 法と EIA 法で測定し、風疹抗体 EIA 法の有意上昇を検討した。

4. 百日せき体外診断薬の評価並の標準化と国内参照血清並びにパネル血清の整備：

(1) 昨年度は百日せき患者由来血清から一次参照品を作成した。今年度は、健康人血清から二次参照候補血清を選定し、その反応性を一次参照血清により評価された複数ロットの現行百日咳凝集素価測定試薬に対して評価を行った。さらに今後、百日せ

き抗体価測定法をEIA法に統一していくため、血清中のPT-IgGおよびFHA-IgG抗体を測定可能なEIA試薬の試作を試みた。

(2)2005～2008年の臨床分離株を用いて遺伝子型と凝集因子の保有状況を調査した。

5. 抗HAV抗体陽性国内血清パネルの整備：本年度はIgG型の抗HAV抗体陽性国内血清を収集し、血漿検体パネルを作製した。すなわち、日赤の協力を得て、献血検体のうちALT高値のため排除された血漿(50歳以上)127検体をスクリーニングし、陽性検体24・陰性検体12(各100mL以上)からなるパネルを作製することができた。

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ヵ年計画2007」に基づく国際共同研究への参加を円滑に進めるために、国立感染症研究所では体外診断薬委員会を通じて参加協力する体制を整備した。2008年6月にNIBSCが主催する第一回SoGAT-CV会議に参加し、WHOの体外診断薬のための標準品整備5ヵ年計画とイギリス及びドイツにおける標準品等の整備の進捗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：2008/2009シーズンに国内では少なくとも20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、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。キット間で見られた感度はA/H1N1亜型については100～1000倍、A/H3N2亜型で10～100倍、B型で10倍の違いが認められた。適切な臨床検体採取部位の検討では、発熱の早期においては上咽頭が最も望ましい検体採取部位であると考えられた。

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1型又は2型の感染者それぞれ30例から得た血清を用いてPlateliaとHerpeSelectのHSV-1抗体とHSV-2抗体を測定したところ両者とも型特異性はほぼ完璧であった。初感染例について抗体陽転時期を検討したところ、1型感染例ではPlateliaの方が早く陽転した。2型については大体同じかPlateliaがやや早かった。

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) 現行の病原体検出マニュアルとは異なる新しいRT-PCR法の条件について検討し、現行の検出条件よりも特異性、感度ともに優れた条件を開発した。本法はWHOが推薦する風疹ウイルスgenotypeの決定に必要な領域をカバーしている。

(2) 本邦HI法の抗体価(倍)は、LA法で測定された抗体価(IU/ml)とほぼ1:1となり、EIA法の抗体価(EIA価)はLA法で測定された抗体価とほぼ1:2となった。WHOの再感染予防閾値の基準(16IU/ml)に当てはめると、この値はHI法では16倍、EIA法では8EIA価に相当した。また、HI法各抗体価におけるEIA抗体価の分布から、EIA法による風疹抗体測定誤差以上の上昇(有意上昇)の基準は2倍であり、HI法で

測定された有意上昇例と比較すると、感度 100%、特異度 75.7%となった。

4. 百日せき体外診断薬の評価法の標準化と国内参照血清並びにパネル血清の整備:

(1) 各二次血清は一次参照血清と同様の反応性を示し、複数の試薬ロットに対してもばらつきの少ない凝集価を示した。これと平行し、血清中の百日咳毒素 (PT) 並びに繊維状血球凝集原 (FHA) に対する IgG 抗体を測定可能な EIA 試薬の試作を試みた。

(2) 近年の臨床分離株は山口株と等しい凝集因子 3, 6 を有し、凝集因子の保有に質・量的な差異はないものと結論された。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備: 陽性検体 24・陰性検体 12 (各

100 mL 以上) からなる高品質の検体パネルを作製することができた。パネル構成検体から IgM 型抗 HAV 抗体は検出されないことから、全て既往 HAV 感染による抗体価上昇であることが示唆された。さらに、このパネル検体を用いて現在市販されている IgG 型抗 HAV 抗体検出キット 4 キット中 3 キットの検討を行ったところ、各キット間の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率とも 100% となり、市販現行製品の良好な性能が確認された。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する

国際的動向: WHO や諸外国はウイルス等感染症検査法の評価基盤として標準品やパネル等の整備を計画的に推進している。WHO の「体外診断薬のための標準品整備 5 ヵ年計画 2007」に基づく国際共同研究への参加を円滑に進めるために、国立感染症研究所では体外診断薬委員会を通じて参

加協力する体制を整備した。

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。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、今後は更に詳細な検討が必要である。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、発熱の早期の上咽頭が望ましいと考えられた。

2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点: 今回開発された HSV 型特異抗体測定のためのキットである Platelia は型特異性・感度共に十分使えることが判った。

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) 現行のウイルスゲノム検出法と比較して本法で使用する primer は株間における mismatch は少ないため、検出できない genotype は少ないと考えられる。また、WHO 推奨の Sequence region を増幅するため、迅速にウイルスの遺伝子解析解析が行えるという利点がある。今後、実用に向けて臨床検体を用いてさらに両者を比較検討する必要があると考えられる。

(2) HI 法および EIA 法で測定された抗体価の国際単位換算が可能となるとともに、EIA 法による有意上昇の基準も明らかとなり、これらの結果は風疹血清疫学研究に有用な結果と思われた。

4. 百日せき体外診断薬の評価法の標準化

と国内参照血清並びにパネル血清の整備：

(1) EIA試薬に関しては、抗PT、抗FHAともにボールELISAと相関性は認められたが、判定が乖離する検体も存在した。このことは、抗原の調製法などボールELISAの代替品となるためには、さらなる検討が必要と考えられる。

(2) 凝集素価測定法の精度向上にはワクチン株である東浜株を含む全ての百日咳菌が保有する凝集因子1を排除した変異株を使用することが必要である。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備： IgG 型抗 HAV 抗体の血漿検体パネルとして良い品質のものを作製できた。今後、IgG 型キットの新製品が複数市販される予定であり、それらの性能を担保する上で今回作製したパネル検体が有用であると考えられる。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向： 標準パネルの管理及び譲渡申請に関する審査等の事項を適正かつ円滑に実施するために国立感染症研究所に「標準パネル運営委員会」を設置することが決まった。

E. 結論

1. インフルエンザ迅速診断キットに関する検討： 2008/09 シーズン、国内では少なくとも 20 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、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。検討したウイルス株はそれぞれ 1 種類ずつであるが、AH1N1, AH3N2 亜型、B 型それぞれについて、キット間で感度が異なっていた。適切な臨床検体採取部位の検討では、感度の高い RT-PCR 法により上咽頭が最も適切な検体

採取部位であることが示唆された。

2. 単純ヘルペス抗体測定上の問題点： HSV に対する型特異抗体の測定は臨床的には一日も早く可能になることが望まれるが、今回検討した Platelia キットは感度・特異度共に優れていることが判明した。

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) 現行の病原体検出マニュアルの RT-PCR 法よりも特異性、感度ともに優れた RT-PCR 法を開発した。本法は WHO が推薦する風疹ウイルス genotype の決定に必要な領域をカバーしており、迅速な遺伝子解析を行うことが可能になる。

(2) 風疹 HI 抗体、EIA 抗体、LA 抗体は有意な相関があり、国際単位で表示されている LA 抗体との相関から、風疹 HI 抗体および EIA 抗体の国際単位への変換方法を示した。また測定誤差以上の上昇を有意上昇とすると、風疹 EIA 抗体の有意上昇の基準は 2 倍以上の上昇であった。

4. 百日せき体外診断薬の評価法の標準化と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 1 次標準参照血清をもとに健常人由来の 2 次標準参照血清の候補を設定した。また、抗 PT および抗 FHA を測定する EIA 試薬を試作した。

(2) 百日咳の血清診断である菌凝集素価法について再評価を行ったところ、近年の百日咳臨床分離株は凝集用抗原株である山口株と同じ凝集因子 3, 6 を保有し、その菌凝集素価は山口株のものと同様であった。山口株の凝集因子は現在の流行株と一致したが、本法の診断精度の向上には凝集用抗原の見直しが必要である。

5. 抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルの整備: 今年度は IgG 型抗 HAV 抗体陽性国内検体の収集をおこない、血漿パネルを作製した。日赤の協力を得て、献血検体のうち ALT 高値のため排除された血漿 (50 歳以上) を用いて、陽性検体 24・陰性検体 12 からなる高品質の血漿検体パネルを作製することができた。このパネル検体について、現在市販されている IgG 型抗 HAV 抗体検出キット 4 キット中 3 キットを用いて測定し、各キットの良好な性能を確認した。今後、IgM 型の血清パネルの作成について更に検討する。

6. 体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向: WHO や諸外国はウイルス等感染症検査法の評価基盤として標準品やパネル等の整備を計画的に推進している。WHO の「体外診断薬のための標準品整備 5 ヶ年計画 2007」に基づく国際共同研究への参加を円滑に進めるために、国立感染症研究所では体外診断薬委員会を通じて参加協力する体制を整備した。

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. 現在保険でできる HSV 抗体測定法は型特異的でないために臨床の現場で混乱を招いている。世界的には性器ヘルペスの診断における型特異抗体の測定が日常的に行われており本邦でもこれが保険適用になることが望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itsuki Hamamoto, Nobumasa Yamaguchi, Keiko Tanaka Taya, Hiroshi Satoh, Tsuguto Fujimoto and Nobuhiko Okabe. Comparison of three clinical specimen types for detection and quantitative analysis of human Influenza A virus by TaqMan PCR. Manuscript preparation.
- 2) 浜本いつき、山口展正、多屋馨子、荒木和子、佐藤 弘、岡部信彦: インフルエンザ迅速診断キットの感度の比較と検出限界の検討. 原稿執筆中
- 3) 多屋馨子: インフルエンザワクチン. 小児看護. 31(1):35-42, 2008
- 4) 佐藤弘, 多屋馨子: 日本におけるインフルエンザ対策. からだの科学. 259: 134-138, 2008.
- 5) 川名 尚: 初発性器ヘルペスの感染病態 日本産科婦人科学会千葉地方部会誌 1(1):10-12; 2008.
- 6) 川名 尚: 特集 性感染症 III. おもな性感染症性器ヘルペスウイルス感染. 小児科診療 71(8):1311-1317, 2008.
- 7) 川名 尚: 産婦人科感染症診療マニュアル II 性感染症「単純ヘルペスウイルス」産科と婦人科 75(11):1490-1498, 2008.
- 8) 川名 尚: 性器ヘルペス 日本臨牀 67(1):143-152, 2008
- 9) Sakata, M., Komase, K., and Nakayama, T. Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity. Vaccine 2009 7:27(2): 234-42.
- 10) 駒瀬勝啓, 風疹ワクチンの効果と再

- 感染、臨床とウイルス 2008; 36(1):
- 11) 庵原俊昭: 麻疹・風疹・ムンプス (流行性耳下腺炎)・水痘感染対策: 抗体測定とその評価. CAMPUS HEALTH 2008; 45:9-14
 - 12) 庵原俊昭: ワクチン接種とウイルス抗体検査の評価. SRL 宝函 2008; 29:41-43
 - 13) 庵原俊昭: 麻疹・風疹・ムンプスワクチンの現状. メディカル・サイエンス・ダイジェスト 2008; 34:18-21
 - 14) 蒲地一成, 岡田賢司. ワクチンで予防可能な疾患の病原診断とその読み方 6 百日咳. 小児科, 50:35-41, 2009
 - 15) 持田恵子, 蒲地一成. 百日咳ワクチン. 感染制御, 4(6):535-538, 2008
 - 16) 蒲地一成. 百日咳菌. バイオセーフティの辞典. 編集 バイオメディカル研究会, PP.166-168, 2008
 - 17) 蒲地一成. 微生物の基礎知識: 百日咳. 感染と消毒, 15:91-94, 2008
 - 18) 蒲地一成. 感染制御のための微生物学講座: 百日咳. 感染制御, 4(3):255-258, 2008
 - 19) 水落利明, 小高千加子: 山口一成. 国内で販売されている抗 HBs 抗体定量用体外診断用医薬品の評価: 国内標準品を用いた検討. 臨床検査, 52:111-115, 2008
2. 学会発表
- 1) 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 PLATELIA HSVの評価 第49回日本臨床ウイルス学会 2008年6月14日, 名古屋
 - 2) 西澤美香, 川名 尚, 西井 修: 新しい単純ヘルペスウイルス型特異抗体キッ
 - ト 日本性感染症学会第21回学術大会 2008年12月6日, 東京
 - 3) 大槻紀之, 田代真人, 駒瀬勝啓, clade の異なる風疹ウイルスに対する人血清中の中和活性の比較, 第49回日本臨床ウイルス学会, 2008. 6. 14, 犬山
 - 4) 鈴木潤, 駒瀬勝啓, 後藤浩, 第62回日本臨床眼科学会, 2008.10.23-26, 東京
 - 5) 加藤誠一, 扇本真治, Luna Batta Sharma, 綾田稔, 竹田誠, 竹内薫, 駒瀬勝啓, 庵原俊昭, 小倉壽, 麻疹ウイルスワクチン株 CAM-70 H 蛋白の CD46 と SLAM の利用能は低い, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008. 10.26-28, 岡山
 - 6) 關文緒, 山田健太郎, 染谷健二, 駒瀬勝啓, 田代真人, SSPE ウイルス SI 株のリバースジェネティクス系の構築, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008. 10. 26-28, 岡山
 - 7) 竹内薫, 藤枝奈緒, 中山哲夫, 駒瀬勝啓, 永田恭介, 神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) におけるムンプスウイルス増殖に重要な領域の同定, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008. 10.26-28, 岡山
 - 8) Yi Xin Ji, 駒瀬勝啓, 庵原俊昭, 中山哲夫, Amino acid substitutions in matrix (M), fusion (F) and hemagglutinin (H) proteins of wild measles virus for adaptation to Vero cells, 第56回日本ウイルス学会学術集会, 2008. 10.26-28, 岡山
 - 9) 佐藤弘, 多屋馨子, 駒瀬勝啓, 田代真人, 岡部信彦, わが国における麻疹および風疹に対する抗体保有状況 (2007年度感染症流行予測調査事業より),

- 第12回日本ワクチン学会学術集会、2008. 11. 8-9、熊本
- 10) 樋口彰、駒瀬勝啓、中山哲夫、風疹、ムンプスウイルスの envelope 蛋白を発現する組換え麻疹ワクチン株の作製、第12回日本ワクチン学会学術集会、2008. 11. 8-9、熊本
- 11) 澤田成史、駒瀬勝啓、中山哲夫、RSウイルス、インフルエンザウイルスの外殻タンパク質を発現するキメラ麻疹ウイルスの作製、第12回日本ワクチン学会学術集会、2008. 11.8-9、熊本
- 12) 蒲地一成. 百日咳毒素-予防・診断・疫学への応用-. 第82回日本感染症学会総会、平成20年4月、島根
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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

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 2008/09 シーズン、国内では少なくとも 20 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、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。検討したウイルス株はそれぞれ 1 種類ずつであるが、AH1N1, AH3N2 亜型、B 型それぞれについて、キット間で感度が異なっていた。適切な臨床検体採取部位の検討では、感度の高い RT-PCR 法により上咽頭が最も適切な検体採取部位であることが示唆された。

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為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 web 情報、キット添付文書等を用いてレビューした。また、ウイルス量既知のウイルス液を用いて、

キット間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。

臨床検体の採取に関しては、インフルエンザと診断した患者の鼻甲介、上咽頭、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 を合成後、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 (412 bp) 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 (883 bp)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. 2007/08 シーズンに国内使用が可能であったキットの種類

以下の 20 種類であった。

1. クイック Ex-Flu「生研」(デンカ生研)
2. クイックナビ™-Flu (デンカ生研/大塚製薬)
3. チェック Flu AB (アフレッサファーマ/ロート製薬)
4. BinaxNow インフルエンザ (Binax, Inc/栄研化学)
5. スタットマーク™インフルエンザ A/B (ニチレイバイオサイエンス/カイノス)
6. エスプライン インフルエンザ A&B-N (富士レビオ)
7. ラピッドテスト FluII (Genzyme Diagnosis/第一化学薬品)
8. BD Flu エグザマン (日本ベクトンディッキンソン)
9. ラピッドテスト FLU スティック (Genzyme Diagnosis/第一化学薬品)
10. タミテスト インフルエンザ AB (Genzyme Diagnosis/第一化学薬品)
11. ボクテム インフルエンザ A/B (シメックス/大塚製薬)
12. クリアビュー Influenza A/B (インバネスメディカルジャパン/富士製薬工業/関東化学/三和化学研究所)
13. スタットマーク™ FLU スティック AB (ニチ

レイバイオサイエンス/カイノス)

14. クイックチェイサー Flu A,B (協和メディックス/ミズホメディー)
15. キャピリア Flu A+B (アフレッサファーマ/ロート製薬)
16. QuickVue ラピッド SP influ (DS ファーマバイオメディカル)
17. プロラスト Flu (三菱化学ヤトロン/三菱化学メディエンス/アドテック)
18. 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)
19. イムノエース flu (タウンズ)
20. クイック S インフル A・B (デンカ生研)

本研究では、上記 20 種類のうち、18 種類のキットについて検討した。

2. 国内論文ならびにこれまでの報告のレビュー

2008/09 シーズンの ML インフルエンザ流行前線情報 BD (<http://ml-flu.children.jp/>)によると、2009 年 1 月 19 日現在、エスプライン インフルエンザ A&B-N (39.9%)、クイックナビ-Flu(25.1%)、キャピリア FluA+B (20.4%)の使用頻度が高かった。

川上ら (川上千春、三田村敬子、木村和広: 迅速診断キットの基礎検討. インフルエンザ Vol. 4 No. 4, 317-324, 2003、川上千春、市川正孝、三田村敬子: インフルエンザ迅速診断キットの現状. インフルエンザ Vol. 6No. 4, 309-316, 2005)、原 (原三千丸: インフルエンザの診断. 小児科診療、12、2199-2205, 2007) の論文では、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複雑)、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、カセット式とストリップ式があった。

迅速診断キットによる検出には $10^{3.5}$ 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 億円の市場と報告されている。

川上ら、原の検討では、キット間で、A/H1N1 亜型で 20~100 倍、A/H3N2 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あり、それぞれの性能に特徴があり、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 (18 キットについてウイルス液を用いて比較検討)

2006/07 シーズンに分離された臨床分離株 (AH1N1 亜型、AH3N2 亜型、B 型の 3 種類) それぞれ 1 株を細胞培養後、プラークアッセイならびに real time PCR 法を用いてウイルス量を定量し、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、18 キットについて、感度を比較検討した。キットの使用法、検出時間は、添付資料に沿って実施した。A 型 (A/H1N1 および A/H3N2 亜型) および B 型の結果を示した。キット間で見られた感度は A/H1N1 亜型については 100~1000 倍、A/H3N2 亜型で 10~100 倍、B 型で 10 倍 (判定可能であったキット間でのみ比較) の違いが認められた。

4. 部位別検出状況

臨床症状ならびに耳鼻咽喉科での診察、外来での

インフルエンザ迅速診断キットによる診断によりインフルエンザと診断した患者の鼻甲介、上咽頭、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。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たが、発熱後 24 時間以内では上咽頭でウイルス量が最も多く、その後減少した。また、最高体温が 38℃以上のインフルエンザの場合、上咽頭でウイルス量が最も多く認められた。検出された型、亜型は A/H1N1 で 2007/08 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。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、今後は更に詳細な検討が必要である。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、38℃以上の発熱を呈したインフルエンザの場合、発熱日を day 0 とすると、day 0-1 の上咽頭ぬぐい液がウイルス量も最も多く、検体採取の部位として適切であると考えられた。ウイルスの増殖は上咽頭で始まり、その後、鼻甲介、中咽頭に広がっていくことが推察された。発熱の早期に検体を採取する場合は上咽頭が望ましいと考えられた。

E. 結論

2008/09 シーズン、国内では少なくとも 20 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、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。検討したウイルス株はそれぞれ 1 種類ずつであるが、AH1N1、AH3N2 亜型、B 型それぞれについて、キット間で感度が (判定可能

であったキット間でのみ比較)異なっていた。適切な臨床検体採取部位の検討では、感度の高いRT-PCR法により上咽頭が最も適切な検体採取部位であることが示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Itsuki Hamamoto, Nobumasa Yamaguchi, Keiko Tanaka Taya, Hiroshi Satoh, Tsuguto Fujimoto and Nobuhiko Okabe. Comparison of three clinical specimen types for detection and quantitative analysis of human Influenza A virus by TaqMan PCR. Manuscript preparation.
- 2) 浜本いつき、山口展正、多屋馨子、荒木和子、佐藤 弘、岡部信彦：インフルエンザ迅速診断キットの感度の比較と検出限界の検討。原稿執筆中
- 3) 多屋馨子：インフルエンザワクチン。小児看護。31(1);35-42, 2008
- 4) 佐藤弘, 多屋馨子：日本におけるインフルエンザ対策。からだの科学.259; 134-138,2008.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

単純ヘルペスウイルス抗体測定上の問題点

分担研究者 川名 尚 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科客員教授
研究協力者 平野 勝 山崎 誠 デンカ生研株式会社 生物ウイルス試薬部

研究要旨

単純ヘルペスウイルス(HSV)には1型と2型があり、それぞれの感染病態には相異があり臨床的に型別抗体の測定が強く望まれている。現在わが国で用いられている全ての方法は型別に抗体測定ができないが、既に外国で開発されている HSV の glycoprotein G を用いた方法はこれが可能である。その一つである「Platelia」について精度を検討したところ感度・特異度共に優れていることが判明した。

A. 研究目的

1) 型特異抗体測定の必要性

HSV には1型と2型があるがその臨床的・疫学的に感染病態が異なる。HSV のヒトの自然感染部位は1型は上半身、2型は下半身と云われているが1型は性器にも感染する。しかし、2型の感染は殆ど全て性器を中心とする下半身である。性器ヘルペスは両型の感染によって発症するがその臨床像は1型と2型と異なる。2型は1型に比べて圧倒的に再発しやすくまた神経向性も強い。性器ヘルペス患者管理において感染している HSV が1型か2型でかなり異なる。また2型は下半身しか感染しないことから性器ヘルペスの診断に有力な手段となる。米国 CDC のガイドラインにも診断的意義が述べられている。わが国では型特異的測定法がなく代わりに非型特異的方法を用いて HSV 抗体を測定しているため誤診されるケースが頻繁にみられている。わが国で型特異的抗体の測定に用いられている中和法は1型と2型には交差がある点と抗原原罪のため以前に感染した抗体が優位になるという点から型特異的抗体の検出は不可能であるのに実際は大手検査センターで行われ臨床の現場に混乱を招いている。既に先進諸国では HSV 表面の gG が1型と2型で交差がないことを利用した EIA キットが開発され日常臨床に用いられている。前述の如く性器へ

ルペスの有力な診断法として CDC のガイドラインにも記載されている。

2) 型特異抗体測定キットの検討

外国で開発された型特異抗体測定キットには精度が悪いものもある上に発売後に問題が出てきたものもある。今回、最近開発された型特異的抗体測定キット「Platelia」について既に世界的に用いられてきた「HerpeSelect」と比較しつつ精度を検討したところ良好な結果を得た。

B. 研究方法

1) 血清

帝京大学溝口病院産婦人科を外陰症状を主訴として訪れた患者のうち HSV を分離して性器ヘルペスと診断した患者60例(HSV-1分離30例、HSV-2分離30例)から得た血清60検体と陽転時期の検討のため初感染後経時的に採血のできた HSV-1分離症例21例からの血清60検体、HSV-2分離症例12例からの31検体を用いた。血清抗体価の低いものから高いものまで均等に選んだ。患者には外陰疾患に対する血清診断と感染病態の解析のために採血することを話し口頭で承諾を得た。

2) 抗体測定法

a)型特異的抗体測定：最近開発された「Platelia」(BioRad社)を2000年に開発され現在諸外国で広

く用いられている「HerpeSelect」(Focus社)と比較しながら精度を検討した。両キット共 gG-1(抗 HSV-1 抗体検出用)、gG-2(抗 HSV-2 抗体検出用)を用いた ELISA 法である。リコンビナントによる gG-1、gG-2 抗体を用いているが、Platelia の HSV-2 は合成ペプチドを用いている。測定は添付文書によった。抗体値は抗体指数として表わし cut off 値は HSV-1、1.10、HSV-2、1.10 である。

b) 中和抗体測定：マイクロプレートを用い当科の標準株としている HSV-1 として TVK-71、HSV-2 として THH-54 株の 100TCD₅₀を用いて微量中和法を用いた。

C. 研究結果

1) 型特異性

a) HSV-1 を分離した 30 例から得た血清について HSV-1 抗体と HSV-2 抗体を検査した。

Platelia では 28 例は HSV-1 抗体のみ陽性で高い抗体価を有するものでも HSV-2 抗体の交差はなかったが、1 例において HSV-2 抗体が 1.2 と弱陽性を示したものの、低い値の 1 例が陰性となった。抗体値は 0.43~5.65 に分布した。HerpeSelect では 30 例が HSV-1 抗体のみで HSV-2 抗体陽性例はなかった。抗体値は 1.18~8.73 に分布した。

b) HSV-2 を分離した 30 例から得た血清について同じように HSV-1 抗体と HSV-2 抗体の検出を行ったところ Platelia で全例 HSV-2 抗体のみで抗体値は 1.63~7.25< に分布した。HerpeSelect も同様に 30 例全てに HSV-2 抗体のみで抗体値は 1.14~14.18 に分布した。

2) 初感染例の陽転時期

HSV-1 初感染例の陽転時期についてみると発症後 3 週目における陽転率は Platelia が 80% に対し HerpeSelect は 40% であった。HSV-2 初感染例の陽転時期についてみると発症後 2 週間の陽転率は Platelia がほぼ 100% であったのに対し HerpeSelect では 80% であったが 3 週目には両方

とも 100% になった。

3) Platelia と HerpeSelect の測定値についての相関性

HSV-1 抗体では相関性が相関係数 $\gamma = 0.787$ と高かったが HSV-2 抗体では $\gamma = 0.547$ と低かった。HSV-2 抗体は HerpeSelect で低い値を示したものが Platelia ではかなり高い値を示した 4 例があったからであった。そこで、これらの検体では Platelia に非特異的な反応がおこったためとも考えられたので、これらについて中和抗体法と Focus社による Western blot をみたところ 4 例とも HSV-2 抗体活性が認められ非特異反応ではなかった。

D. 考察

本邦において現在正確な HSV の型特異抗体の測定が一部の検査機関でしか行われていないが、この際どのキットを用いるかが大切である。今までに発売されてきた型特異抗体測定キットと称されたものには Gull, Captia, HerpeSelect, Platelia などがあるがそれぞれに問題がある。これらの中で HerpeSelect が 2000 年に FDA の認可を得て世界的に用いられてはいるものの問題点も指摘されている。今回開発された HSV 型特異抗体測定のためのキット Platelia HSV-1 IgG 及び Platelia HSV-2 IgG キットは型特異性・感度共に十分使えることが判った。陽転時期も HerpeSelect よりもやや早い。HSV-2 抗体については HerpeSelect よりも感度がよかった。

E. 結論

HSV に対する型特異抗体の測定は臨床的には一日も早く可能になることが望まれるが、今回検討した Platelia キットは感度・特異度共に優れていることが判明した。

F. 健康危険情報

現在保険でできる HSV 抗体測定法は型特異的でないために臨床の現場で混乱を招いている。世界的には性器ヘルペスの診断における型特異抗体の測定が日常的に行われており本邦でも一日も早くこれが保険でできるようになることが望まれる。

3. その他
なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川名 尚：初発性器ヘルペスの感染病態
日本産科婦人科学会千葉地方部会会誌
1(1):10-12;2008.
- 2) 川名 尚：特集 性感染症 III.おもな性感染症
性器ヘルペスウイルス感染
小児科診療 71(8):1311-1317,2008.
- 3) 川名 尚：産婦人科感染症診療マニュアル
II 性感染症「単純ヘルペスウイルス」
産科と婦人科 75(11):1490-1498,2008.
- 4) 川名 尚：性器ヘルペス
日本臨牀 67(1):143-152,2008.

2. 学会発表

- 1) 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 PLATELIA HSV の評価
第 49 回日本臨床ウイルス学会
2008 年 6 月 14 日, 名古屋
- 2) 西澤美香,川名 尚,西井 修：新しい単純ヘルペスウイルス型特異抗体キット
日本性感染症学会第 21 回学術大会
2008 年 12 月 6 日, 東京

G. 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