

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

新規風疹ウイルスゲノム検出 RT-PCR 法の検討

分担研究者：駒瀬勝啓¹

協力研究者：岡本貴世子¹、大槻紀之¹、田代真人¹、庵原俊昭²

¹国立感染症研究所、²国立病院機構三重病院

研究要旨

風疹感染の診断は血清中の IgM、IgG 抗体価の測定が主であるが、血清採取時期によっては必ずしも正しい結果が得られない。ウイルス抗原あるいはウイルス遺伝子の検出との併用がより風疹診断の正確度を向上させる。また、風疹ウイルスの伝播を追跡するためにウイルスゲノムの解析が必要となっている。妊娠初期の風疹感染により先天性風疹症候群(CRS)の子供を出産する可能性があることが知られており、風疹流行時には墮胎が増加する。羊水等からの風疹ウイルスゲノム検出は、CRS の出生前診断としての評価は必ずしも定まっていないが、行政検査依頼はしばしばあり、その意味でもウイルスゲノム検出法の検討は重要である。本研究では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作製した。

研究目的

妊娠早期に風疹ウイルスに感染すると出生児がしばしば先天性風疹症候群(CRS)と呼ばれる障害をもつ事が知られている。風疹はワクチンで予防可能疾患と考えられており、2006年からは麻疹風疹混合ワクチンの2回接種が始まったことにより、予防接種率の向上とともに流行の減少が期待されている。また、麻疹と共に風疹の排除をめざして2008年1月からは全数報告疾患となっている。WHOでも将来、風疹排除を目標としており、排除達成を確認するために実験室診断が要求されている。風疹感染の実験室診断はIgM抗体検出によるものが国際的に認められているが、血清採取の時期や再感染例、さらに一部に見られる持続性のIgMの存在などで必ずしも確度の高い診断法とはいえない。一方で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く、その有効性は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している。

方法:

平成19年度にE1領域の遺伝子配列を決定した風疹ウイルスおよび過去に報告されている日本のワクチン株(高橋、T0-336、松浦、松葉、TCRB19)ならびにその親株(TCRB株をのぞく)、WHO標準株を含む39株のE1配列を基に、WHOが推奨する genotype 解析領域(8731-9469 nt)を含む領域を増幅する primer を用いる検出条件1を作製した。これとは別に、WHO標準株を含む約30株のE1配列を基に primer

を設計し検出条件 2 とした。ただし、検出条件 2 の primer は genotype 解析領域をカバーしていない。標準 RNA として *in vitro* 転写により作製した T0-336 株の E1 領域をコードする合成 RNA および国内ワクチン株 To-336 とその親株 (genotype 1A)、94 年、01 年、02 年、03 年、04 年に当室で分離されたウイルス株 (genotype 1D, 1j) 由来のウイルス RNA を用いて、病原体検出マニュアルに記載されている RT-PCR 法 (1-step 法) の検出条件と、今回設計した primer を用いた検出条件の感度を比較した。

研究結果：

- 標準 RNA による感度は、検出条件 1 で 10^3 コピー、検出条件 2 で 10^2 コピー、病原体検出マニュアル法で 10 コピーであった。ただし、病原体検出マニュアル法では、目的のサイズの近傍を含め、非特異的増幅が複数認められた。
- ウイルス培養上清より抽出した RNA による感度は、国内のワクチン株が属する genotype 1A において検出条件 1 では 10^2 PFU、検出条件 2 は 1 PFU であった。80 年代後半から 90 年代中盤にかけて国内で分離された genotype 1D においては検出条件 1 では 10 PFU、検出条件 2 では 10^2 PFU であった。90 年代後半から 2000 年代前半にかけて分離された genotype 1j では両者とも $10\sim 10^2$ PFU と同程度の感度であった。一方で、病原体検出マニュアル法では、今回使用した全てのウイルス RNA においてスミアな非特異的増幅が複数認められ、目的のバンドとの判別が困難であった。

考察：

検査センターによる風疹感染の確認は、血清中の IgM 抗体価の測定、あるいはペア血清の IgG 抗体価の推移により行われるが、ウイルスゲノムの検出による確認は行われておらず、血清による診断ほど一般化されていない。しかし、1) 発症初期においては

血清中の IgM による診断より感度が優れている、2) ウイルスの排出期間が発疹の発症の時期とほぼ一致しているため適切な時期に検体の採取が可能である、3) 咽頭拭い液からも検出可能であるため、検体採取が比較的容易で、患者の負担も少ないと考えられる、4) WHO ではウイルスの遺伝子型でウイルスの移動をトレースする事を風疹排除に向けての情報として重視している、5) 評価は定まっていないが、CRS の出生前診断の判断材料として利用できる可能性がある、という点から、感度のいいウイルスゲノムの検出法の確立は重要である。また一本鎖 RNA ウイルスであることからゲノムの変異が大きい事が知られている。これらの事情を踏まえて、病原体検出マニュアルにある RT-PCR 法を検証し、必要ならば改良、改訂をする必要がある。本年度は現行の病原体検出マニュアルとは異なる二種の新しい検出条件を設定し、両者の感度を比較した。その結果、genotype 1A においては検出条件 2 で感度が高いことが示されたが、genotype 1D では検出条件 1 で感度が高く、genotype 1j では両者とも同程度の感度であった。一方で、今回は検討できなかったが、検出条件 2 で用いる primer の配列内には特に clade 2 (genotype 2A, 2B) および 1C に属する株との mismatch が複数存在するため、これらの株を検出できない可能性が考えられた。他方、検出条件 1 で用いる 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、検出条件 1 は WHO 推奨の Sequence region を増幅するため、陽性となった場合、迅速に direct sequence による genotype 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。

結論：

新しい風疹ウイルスゲノム検出 RT-PCR 法の条件を作製し、ウイルス RNA における感度を検討した。今

後、実用に向けて臨床検体を用いてさらに検討を行う必要がある。

健康危険情報：なし

1. 研究発表

1) 論文発表

- 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.
- 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):

2) 学会発表：

- 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
- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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

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

風疹・麻疹抗体測定法の標準化に関する研究

分担研究者 庵原俊昭 国立病院機構三重病院院長
研究協力者 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
落合 仁 落合小児科
渡辺正博 すずかこどもクリニック

研究要旨

風疹対策の目標は先天性風疹症候群(CRS)の排除であり、そのためには風疹抗体測定法の標準化と統一した結果の解釈が必要である。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 8 EIA 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。今回の検討から、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。

A. 研究目的

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、本邦での風疹抗体は、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り、HI 法や EIA 法で測定した血清抗体価の国際的解釈が困難であった。また、最近血清疫学調査で広く行われている EIA 法の有意上昇基準も未確定であった。今回、風疹 HI 抗体、EIA 抗体、LA 抗体の互換性の検討、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った。

B. 研究方法

- ①風疹抗体 HI 法、EIA 法、LA 法の互換性の検討
研究の目的を説明し、同意を得た 70 人から血清を採取した。風疹血清 HI 抗体価はガチョウ血球を用いた予研法で、EIA 抗体価はデンカ生研のキットで、LA 抗体価は極東製薬工業のキットで測定した。
- ②風疹抗体 EIA 法の有意上昇の検討

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 法で測定した。なお、いずれの検討も血清抗体価を 2 を低とする対数に変換後、解析した。

C. 研究結果

- ①風疹抗体 HI 法、EIA 法、LA 法の互換性の検討
38 検体を対象に行った、HI 抗体と LA 抗体の相関関係では、 $\log_2 LA = 0.99 \log_2 HI + 0.01$ ($R=0.929$, $P<0.0001$)と、傾きがほぼ 1 でしかも原点を通る相関直線が得られ、HI 抗体価はそのまま IU/ml にほぼ相当するという結果であった(表 1)。

次に、70 例を対象に行った EIA 抗体と LA 抗体との相関関係では、 $\log_2 LA = \log_2 EIA + 1.00$ ($R=0.917$, $P<0.0001$)と、傾き 1、Y 切片 1 であることから、EIA 法で測定された抗体価(EIA 単位)の 2 倍が IU/ml に相当するという結果であった。この結果から、風疹 HI 抗体、EIA 抗体と LA 抗体との互換性が示され、HI 抗体、EIA 抗体の国際単位への変換が可能となった。

- ③HI 法、EIA 法による風疹抗体陽性閾値、発症予防閾値、感染予防閾値の検討

WHO は抗体陰性 $<4IU/ml$ 、抗体陽性 $>7IU/ml$ 、発症予防 $10IU/ml$ 、再感染予防 $16IU/ml$ と報告している(Bull WHO 2008; 86:118)。今回の結果を

WHO の定義に当てはめると、HI 法では、HI 抗体 8 倍は抗体陽性であるが発症予防閾値ではないためワクチン再接種が必要であり、HI 抗体 16 倍は再感染予防レベルと判断される。また、EIA 法では、5 EIA 価以上が発症予防レベル、8 EIA 価が再感染予防レベルと判断され、HI 法および EIA 法で測定された抗体価を用いても、国際基準による風疹対策が可能であることが示された (表 2)。

③風疹抗体 EIA 法の有意上昇の検討

有意上昇の定義は、測定誤差以上の抗体上昇であり、2 倍階段希釈している場合は、2 管 (4 倍) 以上の抗体上昇である。しかし、EIA 法は連続的に測定結果が表示されるため、有意上昇の定義は未確立であった。EIA 法における測定誤差の範囲について検討したところ、HI 抗体 32 倍の EIA 抗体価 (2^n) は 1.74 ± 0.46 、64 倍の EIA 抗体価は 2.88 ± 0.54 、128 倍の EIA 抗体価は 3.80 ± 0.40 、256 倍の EIA 抗体価は 4.79 ± 0.46 、512 倍の抗体価は 6.01 ± 0.45 であり、HI 抗体価ごとの EIA 抗体の標準偏差の平均は 0.46、 $2SD=0.96$ であった (表 3)。一般に $2SD$ 以上の違いは測定誤差以上の違いと判断されており、ワクチン前後の抗体価の動きが $2SD$ 以上の上昇があれば有意上昇と判断できる。今回の検討では、HI 抗体 32 倍から 512 倍の間では、 $2^{0.96}$ (1.95) 倍以上の上昇が有意上昇と判断された。

HI 法による抗体有意上昇の基準をもとに EIA 法での上昇率を検討したところ、HI 抗体有意上昇群 16 例では、EIA 抗体上昇率 4.58 ± 1.50 であったのに対し、有意上昇しなかった 37 例の EIA 抗体上昇率は 1.74 ± 0.86 と、HI 抗体有意上昇群の方が有意に EIA 抗体も上昇していた ($P < 0.0001$)。次に、HI 法で有意上昇した 16 例、上昇しなかった 37 例の ROC 解析を行うと、EIA 抗体 2 倍以上上昇を有意上昇とすると感度 100%、特異度 75.7% であり ($P < 0.0001$)、2.5 倍以上上昇とすると感度 93.8%、特異度 86.5% であった ($P < 0.0001$) (表 4)。

D. 考察

一般にウイルスに対する血清抗体は 2 を低とする対数に変換すると正規分布する。今回本邦で広く使用されている風疹血清抗体価測定方法である HI 法、EIA 法、LA 法について、測定した抗体価を、2 を低とする対数に変換後、互換性について検討した。HI 法で示された抗体価は LA 法の抗体

価にほぼ一致し、EIA 法で示された抗体価の 2 倍が LA 法の抗体価にほぼ相当した。なお、LA 法による抗体価は IU/ml で表示されているので、今回の検討結果から HI 法および EIA 法で測定された風疹抗体の国際単位換算が可能となった (HI 抗体価 = LA 抗体価、EIA 抗体価 $\times 2$ = LA 抗体価)。

風疹対策で重要な課題は、CRS 児出生予防である。WHO によると風疹発症予防閾値は 10IU/ml、感染予防閾値は 16IU/ml とされている。今回の検討で、感染予防閾値である 16IU/ml は、HI 法では 16 倍、EIA 法では 8.0EIA 価に相当することが示され、この抗体価以下であれば風疹ワクチン追加接種の指標となると思われた。

EIA 法による抗体有意上昇の基準については未確立であった。今回風疹 HI 抗体価ごとの EIA 抗体の分布を検討したところ、測定誤差は 2 倍以内に収まっており、抗体有意上昇の定義を測定誤差以上の上昇とすると、2 倍以上の上昇が測定誤差以上の上昇、即ち有意上昇であることが示された。また、EIA 抗体 2 倍以上を有意上昇としたとき、HI 法による有意上昇と比べると、感度 100%、特異度 75.7% と、有意の相関性が認められた。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

(表1) 風疹 HI 抗体と LA 抗体、EIA 抗体と LA 抗体との相関

X 軸	Y 軸	相関直線	相関係数	P value
log ₂ HI 抗体	log ₂ LA 抗体	Y=0.99X+0.01	0.929	<0.0001
log ₂ EIA 抗体	log ₂ LA 抗体	Y=X+1.00	0.917	<0.0001

(表2) 風疹 HI 抗体と EIA 抗体の国際単位表示

抗体の基準	WHO (IU/ml)	HI 抗体価	EIA 抗体価
陰性	< 4	< 4	< 2
陽性	> 7	> 8	> 3.5
発症予防	1 0	1 0	5.0
再感染予防	1 6	1 6	8.0

HI 抗体価は倍、EIA 抗体価は EIA 単位、HI 抗体価 10 倍は測定できないので、16 倍に相当する。

(表3) 風疹各 HI 抗体価における EIA 抗体価

HI 抗体価 (2 ⁿ 倍)	例数	EIA 抗体価 (2 ⁿ EIA 価)
4	4	1.36 ± 0.07
5	10	1.74 ± 0.46
6	17	2.88 ± 0.54
7	36	3.80 ± 0.40
8	43	4.79 ± 0.46
9	6	6.01 ± 0.45

HI 抗体 32 倍から 512 倍の EIA 抗体価の平均 SD=0.46
測定誤差以上の上昇 > 2 SD 以上の上昇 ; 2^{0.96} 倍 = 1.95

(表4) 風疹 HI 抗体有意上昇例と EIA 抗体有意上昇との関係

1) EIA 抗体が 2 倍以上上昇					
	EIA 抗体 2 倍以上上昇	P value	感度	特異度	
HI 抗体有意上昇	あり	なし			
あり	1 6	0			
なし	9	2 8	<0.0001	100%	75.7%
2) EIA 抗体が 2.5 倍以上上昇					
	EIA 抗体 2 倍以上上昇	P value	感度	特異度	
HI 抗体有意上昇	あり	なし			
あり	1 5	1			
なし	5	3 2	<0.0001	93.8%	86.5%

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

分担研究者 岡田賢司（国立病院機構福岡病院）
 協力研究者 中臣康雄、小澤賢介、高橋崇道
 山崎 誠、権平文夫（デンカ生研株）、
 ウイルス検査技術連絡会

研究要旨

百日せき抗体価測定試薬の評価方法の標準化を図ることを目的とし、昨年度報告した百日せき患者由来血清を一次参照品として、健康人血清から二次参照血清候補を選定した。それら候補血清の反応性について、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する評価を行った。各血清は一次参照血清と同様の反応性と複数の試薬ロットに対して、各々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。今後は、百日せき凝集素価測定試薬の標準化（判定法、試薬ともに）並びに新規EIA試薬の改良を継続し、臨床診断へ応用できるデータを蓄積することで、百日せき抗体価測定法をEIA法に統一していく予定である。

A. 研究目的

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は標準的な評価方法が確立されていない。一方、EIA試薬は感度、特異性の面で優れてはいるが、ボールELISAという測定フォーマットのため、広く使用されていない状況にある。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。

B. 研究方法

① 二次参照血清候補の選択：健康人血清抗体価を凝集法にて測定し、3カテゴリーに属する抗体価を示す検体を、6検体選択した。その6検体につき試薬10ロットにおいて凝集価を測定し、試薬ロット毎の凝集価の変動を検討した。設定カテゴリーを以下に示す。

No.	名称	東浜株 凝集価	山口株 凝集価
1	陰性	<1:10～ 1:10	<1:10～ 1:10
2	一次参照 No.1相当	1:640～ 1:2560	1:640～ 1:2560
3	一次参照 No.2相当	1:40～ 1:80	1:80～ 1:320

② 抗PT、抗FHA抗体測定試薬の試作：百日咳菌（東浜株）より精製したPTおよびFHAを96穴プレートに結合させ、抗原とした。測定検体は1%BSAを添加したPBSにて希釈した。ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG、発色基質TMBは市販のものを使用した。対照としてのボールELISAはSRLに測定を依頼した。

C. 研究結果

①二次参照血清候補の選択

健康人血清検体（180検体）の凝集価を測定し、前述のカテゴリーに当てはまる検体を各2検体ずつ（計6検体）選択した。その後、東浜株抗原、山口株抗原各10ロットにて凝集価を測定したところ、すべての候補について、凝集価は最頻値の±1管に収まっていた。

②抗PT、抗FHA抗体測定試薬の試作

22検体（20検体：詳細病歴不明、2検体：百日咳患者血清）の解析では、PT、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。なお、東浜株・山口株の凝集価とPTおよびFHA（ボールELISAおよび試作試薬）EIA抗体価を比較した場合、これまでの報告通り相関性は認められなかった。

D. 考察

昨年度に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（No1およびNo2）は、評価指標として有用であった。そこで、この血清のトレースを行い、二次参照血清候補の検体選別を行った。百日咳

患者血清を収集することは困難であるため、健常人の血清の予備スクリーニングをおこない、カテゴリーに一致する検体を各カテゴリー2検体ずつ選択した。この検体を用い、東浜株、山口株の凝集価を抗原10ロットについて測定したところ、最頻値±1管とばらつきの少ない結果が得られた。このことは、この候補の選択が妥当であることを示している。さらに、この10ロットの抗原は昨年度に、一次参照血清として設定したものを使い製造管理を行っているものであるため、抗原性能のロット間での安定化が実現できていることも考えられる。

E I A試薬に関しては、抗P T、抗F H AともにボールE L I S A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E L I S A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。

東浜株・山口株の凝集価とP TおよびF H A（ボールE L I S Aおよび試作試薬）E I A抗体価を比較した場合、相関性は認められなかったことにより、凝集価は、P TおよびF H A抗体価とは別の抗体を示してしていることが確認できた。

今後、凝集法評価用の2次参照血清の作成を行う。さらにE I A法のpolish upを継続し、臨床検体を測定することで、抗体価の臨床的意義付けを行う予定である。

E. 結論

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。最終的な目標は、百日咳抗体測定法を凝集反応からE I Aに移行させ、一般化するところに置く。E I A法の確立までの間は凝集価の安定的な測定を行える条件をコントロールできるように検討を重ねながら、E I A法の早期確立を目指す。

F. 健康危険情報

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

3. その他

なし

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

百日咳体外診断薬における凝集反応用抗原の再評価

分担研究者 蒲地 一成 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

研究要旨 百日咳の血清診断である菌凝集素価法について、凝集反応用抗原の再評価を行った。凝集用抗原株(山口株、東浜株)と臨床分離株(26株、2005～2008年分離)との遺伝的相同性を比較したところ、東浜株(凝集因子 2, 4)は臨床分離株と異なる遺伝子型(clade C)、山口株(凝集因子 3, 6)は臨床分離株と等しい遺伝子型(clade B)を持つことが示された。また、すべての臨床分離株が凝集因子 3, 6を保有し、その凝集素価は山口株と同等であることが判明した。山口株の遺伝子型と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。

研究協力者

福田 靖(国立感染症研究所 細菌第二部)
豊泉裕美(同上)
韓 賢子(同上)
岡田賢司(国立病院機構福岡病院 小児科)

1952年の分離であり、その凝集因子が現在の流行株と一致しているのかは不明である。そこで、本研究では菌凝集素価法の再評価を目的に、近年の百日咳臨床分離株と凝集用抗原株の遺伝子型を比較するとともに、臨床分離株における凝集因子の保有状況を調査した。

A. 研究目的

百日咳は *Bordetella pertussis* の感染によって引き起こされる急性呼吸器感染症であり、その診断は主に菌凝集素価を指標にした血清診断が用いられている。菌凝集素価法は血清診断の簡便な方法として広く活用されており、現在、体外診断薬として百日咳菌東浜株(ワクチン株)と山口株(流行株)が百日咳凝集用反応抗原としてデンカ生研より販売されている。本法は特別な機器を必要としない利点を有するが、感度ならびに特異性が低いという欠点がある。特に、青年・成人層では感染とは無関係に高い凝集素価を示すことが多く、単血清による診断は困難な状況にある。

凝集用反応抗原である山口株と東浜株はそれぞれ主要な凝集原として因子 1, 3, 6と因子 1, 2, 4を保有し、山口株は 1979年以前の分離、東浜株は

B. 研究方法

菌株: 2005～2008年にわが国で分離された百日咳臨床分離株 26株を供試し、培養は Bordet-Gengou 寒天培地により行った。山口株(L5-2)と東浜株(L-7)は感染研保存株を供試した。

Multilocus sequencing typing: 百日咳菌の病原遺伝子(*ptxS1*, *prn*, *fim3*)をシーケンス解析し、その allele タイプの組み合わせから MLST を決定した。

パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE): 常法に従ってプラグを作製した後、DNA を制限酵素 *XbaI* により切断し、1%アガロースゲルにより分離した。系統樹解析は Fingerprinting II software (Bio-Rad) を使用し、UPGMA 法により行った。

スライド凝集反応試験: 常法に従い菌株を生理食塩水に懸濁し、抗因子 3, 6血清と抗因子 2, 4血清

に対する凝集の有無を肉眼で判定した。なお、抗因子血清はデンカ生研株式会社から分与を受けた。

マイクロプレート凝集試験:生理食塩水に懸濁した菌液(25 μ l, A_{650} = 0.7~0.8) と連続希釈した抗因子3, 6血清(25 μ l, $\times 10$ ~ $\times 640$)をU字マイクロプレートに入れ、攪拌後、37°Cで2時間静置した。その後、4°Cで一晩静置した後、凝集の有無を肉眼で判定した。判定は凝集強度を4段階(+++, ++, +, -)に分け、(-)を示す最低希釈倍数を凝集素価とした。

イムノブロット:百日咳臨床分離株の全タンパク質をSDS-lysis buffer を用いて抽出し、12.5% SDS-PAGEを用いて分離後、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体には抗因子3, 6血清、二次抗体にはHRP標識抗ウサギIgGヤギ抗体を使用し、LAS-3000により化学発光を検出した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床分離株を対象とし、倫理上特段の問題は発生しない。

C. 結果

わが国で分離された百日咳臨床分離株 26 株(2005~2008年分離)についてMLST解析を実施したところ、分離株はMLST-1, -2, -3, -4, -6に分類され、市中からは遺伝的に異なる百日咳菌が分離されていることが示された(Table 1)。そこで、これらの臨床分離株と凝集用抗原株(山口株、東浜株)との遺伝的相同性をパルスフィールドゲル電気泳動法により解析したところ、東浜株は臨床分離株とは異なるclade C、山口株はMLST-2, -3, -4を持つclade Bに分類されることが判明した(Fig. 1)。clade Bの臨床分離株は1990年代以降わが国で増加傾向にあり、山口株の遺伝子型は現在の流行株と一致することが示された。

百日咳臨床分離株における凝集因子の保有状況を検討したところ、すべての臨床分離株が山口

株と同じ因子3, 6を有し、東浜株が持つ因子2, 4の保有は認められなかった。そこで、臨床分離株における凝集因子3, 6の量的差異を検討するため、因子3, 6血清に対する凝集素価を測定した。その結果、自己凝集により測定不可能であった3株を除き、すべての臨床分離株が凝集素価 $\times 80$ または $\times 160$ を示し、その凝集素価は山口株($\times 80$)とほぼ同様であった(Fig. 2)。また、抗因子3, 6血清を用いたイムノブロット解析では、山口株ならびに臨床分離株ともに分子量約25 kDaの位置に強いシグナルが認められ、その強度に大きな差異は認められなかった(Fig. 3)。なお、凝集因子3, 6を持たない東浜株でもこのシグナルは検出され、さらに臨床分離株の1株(303)ではシグナルが低分子域にシフトしていた。以上の結果から、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。

D. 考察

本研究では百日咳の血清診断である菌凝集素価法の再評価を目的に、近年の臨床分離株を対象に凝集因子の保有状況を検討した。その結果、解析を行ったすべての臨床分離株が凝集因子3, 6を保有し、因子2, 4の保有は認められなかった。また、その保有量に差異は認められず、凝集用抗原株として現行の山口株を使用することの妥当性が検証された。しかし、解析を行った臨床分離株には山口株よりも有意に高い凝集素価を示す菌株は見出されず、現行の山口株を用いた菌凝集素価法の感度・特異性を向上させることは困難と考えられた。

百日咳の血清診断において菌凝集素価法の感度は低いとされ、WHOでは本法の使用を推奨していない。本法は操作が簡便なことからわが国ではいまなお使用されているが、今後も本法による診断を継続するためには感度・特異性の向上が必須である。特異性を向上させる手段として、凝集因子1の影響を排除することが挙げられる。凝集因子1は種特異抗原であり、東浜株、山口株を含むすべて

の百日咳菌が因子1を保有する。また、因子1は因子3, 6とならび主要な凝集原とされているため、現在の百日咳流行株にヒトが感染すると因子3, 6の他に因子1に対する抗体も産生される。結果的に流行株である山口株のみならずワクチン株である東浜株に対する凝集素価も上昇し、山口株に特異的な凝集素価の上昇は期待できない。この東浜株に対する凝集素価の上昇は診断の妨げとなり、流行株に対する特異的な菌凝集素価を得るためには因子1を欠損する百日咳菌を凝集用抗原に使用することが必要である。今後、遺伝子操作により因子1欠損山口株を作製し、凝集用抗原株としての評価が必要である。

E. 結論

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等であった。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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表(出版図書等)

- 1) 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
- 2) 持田恵子, 蒲地一成. 百日咳ワクチン. 感染制御, 4(6):535-538, 2008
- 3) 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
- 4) 蒲地一成. 微生物の基礎知識: 百日咳. 感染と消毒, 15:91-94, 2008
- 5) 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

2. 学会発表

- 1) 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. 知的所有権の出願・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

表1. 百日咳臨床分離株における病原遺伝子の変化、MLST

year	strain	<i>ptxS1A</i>	<i>prn</i>	<i>fim3</i>	MLST	year	strain	<i>ptxS1A</i>	<i>prn</i>	<i>fim3</i>	MLST	
2005	285	B	1	A	1	2007	312	A	2	A	2	
	289	A	2	A	2		314	B	1	A	1	
	291	B	1	A	1		317	A	1	A	3	
	292	B	1	A	1		318	B	1	A	1	
	294	A	2	B	4		336	A	2	A	2	
	295	B	13	A	6		327	B	1	A	1	
	297	A	2	A	2		330	A	2	B	4	
	298	A	2	A	2		2008	338	A	2	B	4
	299	B	1	A	1			342	A	2	B	4
	303	B	1	A	1			331	A	2	B	4
2006	306	A	2	B	4	Tohama	B	1	A	1		
	307	B	1	A	1	Yamaguchi	B	1	A	1		
	334	B	1	A	1							
	322	B	1	A	1							
	310	B	1	A	1							
	313	B	1	A	1							

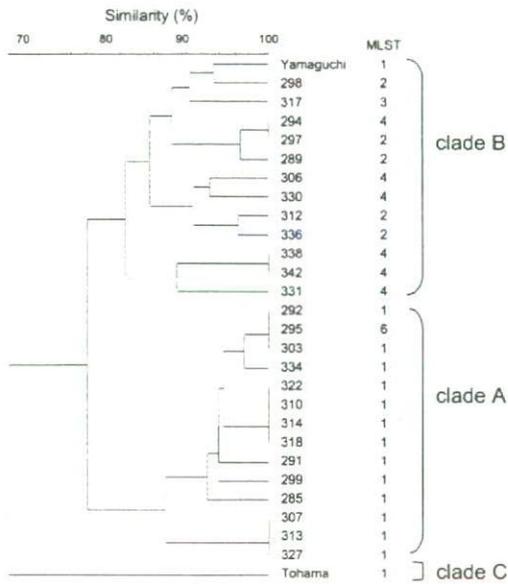


Fig. 1 凝集用抗原株と臨床分離株の遺伝的相同性 (UPGMA)
国内分離株 26 株(2005~2008 年分離)と凝集用抗原株(山口株、東浜株)をパルスフィールドゲル電気泳動により解析

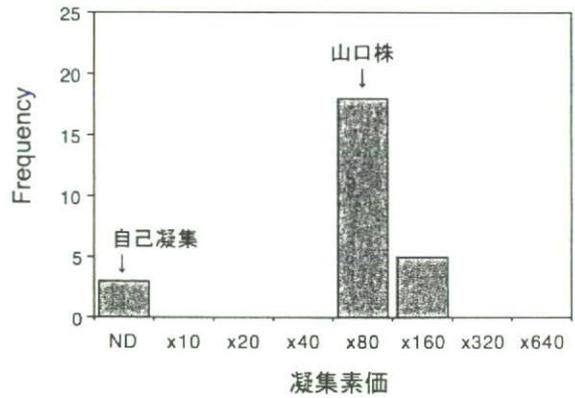


Fig. 2 臨床分離株の抗因子 3, 6 血清に対する凝集素価
ND, 自己凝集により解析不能(3 株)

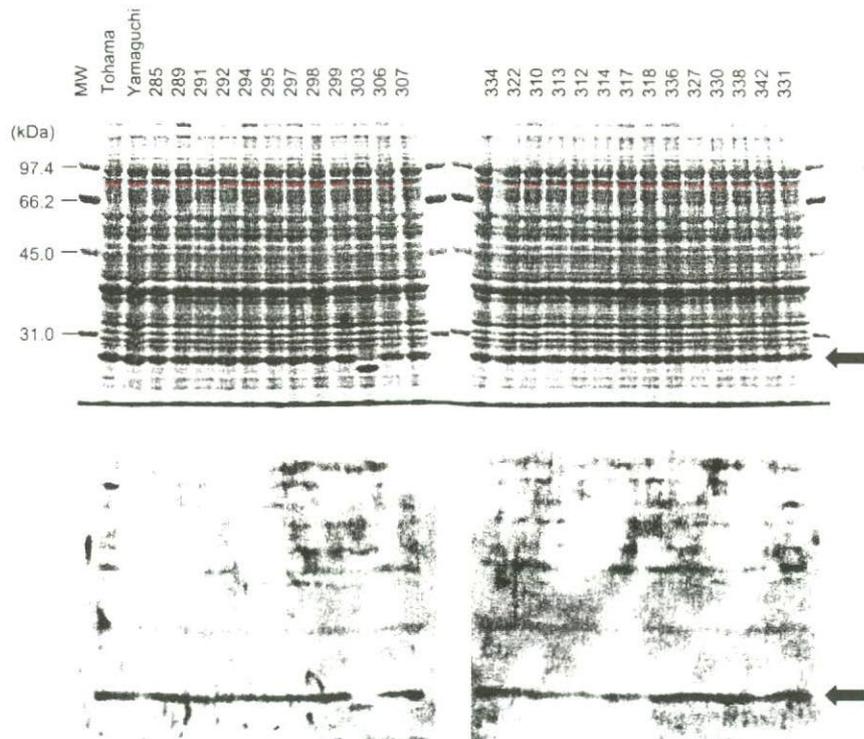


Fig. 3 臨床分離株における凝集因子 3, 6 の保有状況
菌体から全タンパク質を抽出し、12.5% SDS-PAGE により分離した。上段は CBB-R250 染色、下段は抗因子 3, 6 血清を用いたイムノブロット解析。矢印はシグナルが認められた 25 kDa protein

A型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価

分担研究者 大西 和夫 国立感染症研究所・免疫部
研究協力者 百瀬 俊也 日本赤十字社・血液事業本部

[研究要旨] 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、現時点でパネル作製のための体制整備と実際のパネル作製を行うことが必要である。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。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) をスクリーニングすることにより、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が作製できた。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 キットを用いて検討した結果、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、現行市販製品の良好な性能が確認された。

A. 研究目的

本研究の目的は、A型肝炎ウイルス (HAV) 感染を診断する体外診断薬の性能を評価するための試験に必要な抗 HAV 抗体陽性血清パネルを整備することであり、これにより、メーカーが製造した A型肝炎ウイルス感染診断キットの品質を担保することができる。国内で市販される体外診断薬の性能評価には国内血清を用いることが望ましいとされ、国内血清パネルの作成が必要である。

A型肝炎ウイルスに対する抗体を検出する体外診断薬 (抗 HAV 抗体検出キット) は、IgM 型抗体を検出するタイプと IgG/IgA 型抗体を含む総 HAV 抗体を検出する 2 種類がある。IgM 型抗体検出キットは A型肝炎診断の補助、IgG 型 (総) 抗体検出キットはワクチン接種対象者の選択・血清疫学調査・ISG (免疫血清グロブリン投与) の判断などに用いられる。

国内における急性 A型肝炎の 2008 年の発生報告数は約 160 例で、2000 年の 381 例、2001 年の 491 例と較べると急激な減少傾向にあり、HAV 抗体陽性国内血清の確保が非常に困難になってきている。IgG 型 HAV 抗体は A型肝炎罹患歴を示すもので、国内においては 1980 年代では 50 歳代の陽性率が 90% 以上であったのに対して、2003 年の統計では 50 歳で約 20%、40 歳以下では 2% 以下になり、国内

衛生環境の飛躍的向上が示唆されている (Kiyohara et al., 参考文献)。このような、IgG 型抗 HAV 抗体陽性年齢層の急激な高齢化シフトを勘案すると今のうちに国内陽性血清を収集しておく必要があり、将来的には国内血清パネルの作成が非常に困難になると考えられる。

以上の理由から、本年度は、とくに IgG 型抗 HAV 抗体陽性パネルの作成を行い、現在市販されている抗体キットの予備的な性能比較を行うと共に、昨年度から継続して進めている IgM 型抗 HAV 抗体陽性血清の収集体制の構築を続けた。

B. 研究方法

IgG 型抗 HAV 抗体陽性パネルを作製するために、日赤の協力を得て、献血血液のうち不適格となった血漿検体をスクリーニングした。すなわち、各ウイルスマーカー陰性血漿 (HBV, HCV, HIV, HTLV-1, TP, human parvovirus B19 等スクリーニング陰性) のうち ALT 高値のために排除される血漿のうち、IgG 型抗 HAV 抗体が陽性である確率の比較的高い 50 歳以上の条件をつけて予備スクリーニングを行った。この予備スクリーニングは、アボット社のアキシム HA ダイナパックを用いて行い、パネル用陽性血漿と陰性血漿の選択を行った。

日赤から連結不可能匿名化のうえ譲渡された検体は、新鮮凍結血漿 (FFP) 各 100 mL 以上で、1.3 mL/チューブに分注してリストを作製し、 -80°C で凍結保存して管理した。

パネルを構成する検体の抗 HAV 抗体価について、現在市販されている複数の IgG 型抗 HAV 抗体検出キットで測定し、各サンプルの特性を記述すると共に市販各キットの性能を比較した。

また、IgG 型血漿パネルとは別に、特に IgM 型抗 HAV 抗体陽性血清パネルを整備するために、HAV 発症例について血清検体を収集するシステムの整備を以下のごとく進める。

(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、患者血清の収集を行う。(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 型肝炎発症例のあった場合、即時に検体の提供を受けることができる体の構築を進め、インフォームド・コンセントの上、血清を収集する。収集した血清検体は連結不可能匿名化し、抗体価を測定するとともに品質を管理した上で血清パネルの作製に使用する。

(倫理面への配慮)

インフォームド・コンセントの上で収集する IgM 型抗 HAV 抗体陽性血清は連結不可能匿名化され、年齢・性別・臨床経過のみが国立感染症研究所に提供される。いずれの血清についても提供者の遺伝子情報等について調べることはない。国立感染症研究所医学倫理審査委員会の承認を受けて実施している。

C. 研究結果

(1) IgG 型抗 HAV 抗体陽性血漿パネルの作成：日赤の協力を仰ぎ、献血血漿のうち不適格な検体を用いたパネル作製を試みた。ALT 高値 (61 IU 以上) のため排除される献血血漿のうち、IgG 型抗 HAV 抗体が陽性である確率の高い 50 歳以上の検体、127 検体のスクリーニングを行った。その結果、25 検体の陽性検体を選択できた。この頻度は約 19% で、疫学的調査結果からの推定値に近いものであった。抗 HAV-IgG 抗体価は 300 IU/mL から 300、000 IU/mL まで良く分散しており、この点でパネル検体としての性能は良好であると考えられた。すべての検体において、IgM 型抗 HAV 抗体は陰性であった。陽性検体のうち 1 検体を除く 24 検体と 12 の陰性検体を加えた計 36 検体の新鮮凍結血漿 (FFP、各 100 mL 以上) の譲渡を受け、

パネルを作製した。

(2) 市販キットによる IgG 型抗 HAV 抗体価の測定：現在、市販されている IgG 型抗 HAV 抗体検出キットは 4 製品あり、すべて自動分析装置用のキットである。各メーカーに測定を依頼したところ、キットを改良中の 1 社を除く 3 キットの測定が可能になった。これらのキットはそれぞれ、競合法およびサンドイッチ ELISA 法にもとづく電気化学発光免疫測定 (ECLIA) 法および競合 EIA 法で、競合法によるものは、IgG 型、IgA 型、IgM 型を含む総 HAV 抗体価を測定し、サンドイッチ ELISA 法のものには IgG 型 HAV 抗体のみ測定する。各キットによるパネル検体の測定結果は、全体一致率、陽性一致率、陰性一致率ともに 100% であり、各キットの良好な性能が確認された。

(3) IgM 型抗 HAV 抗体陽性国内血清の収集：

HAV 抗体陽性国内血清を収集するにあたり、最も重要なインフォームドコンセントの取り扱いに関しては、国立感染症研究所・医学倫理審査委員会に申請し承認を受けている。

2006 年 7 月に滋賀県米原市で発生した HAV 集団感染に際して、上記委員会によって承認されたプロトコールに従って患者血清を収集し、12 検体の HAV 抗体陽性血清を成功裏に集めることができたが、この滋賀県の事例以降、国内での大きな HAV 集団感染の報告はない。2008 年の A 型肝炎報告数は約 160 例あったが、非常に低頻度、散発的な発生で、検体の収集は困難であった。

D. 考察

IgG 型抗 HAV 抗体の検体パネルとして、日赤のご協力を得て、陽性検体 24・陰性検体 12 からなるパネル作成用血漿を充分量確保することができた。陽性検体においては、抗 HAV 抗体価は 300-300、000 IU/mL まで良く分散した値を示した。各検体中に IgM 型抗体は検出されなかったことから、すべて、HAV 既往感染による抗体価上昇で、初感染 (肝炎急性期) の検体は含まれないと考えられる。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と考える。

上記パネル検体を用いて、市販されている IgG 型 HAV 抗体検出キットによる測定を行った結果、各キットとも良好な成績を示した。3 キットのうち 2 キットは競合法による総 HAV 抗体 (IgG, IgA, IgM) を検出し、1 キットはサンドイッチ ELISA 法により IgG 型のみ検出する。後者は、新しい世代のキットに属し、IgM の検出

を排除できる点で、既往感染に起因する抗体が急性期における抗体上昇かを明確に区別できる点でメリットがある。各メーカーでIgG型キットへの移行が進んでおり、今後このタイプの新製品が複数市販される予定である。それらの性能を担保する上でも今回作製したパネル検体が有用であると考えられる。

近年、急性A型肝炎の報告数は激減しており、体外診断薬承認前検査に必要な国内血清を確保することが急速に困難になってきている。2006年7月の滋賀県の事例以降、国内HAV集団感染の報告はない。2007年以後のA型肝炎報告は、非常に低頻度、散発的な発生で、これに対応する体制を作るのは非常に難しい。ただ、別目的で採取された急性A型肝炎患者血清を保管している医療機関があり、本研究に提供可能であるとの申し出を受けた例があった。現在、インフォームド・コンセントとの整合性をチェックし、解決策を検討している。

E. 結 論

A型肝炎ウイルス（HAV）体外診断薬の性能を評価するために必要な基盤整備として、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。

F. 健康危険情報

とくに無し。

（参考文献）

Kiyohara T, Sato T, Totsuka A, Miyamura T, Ito T, Yoneyama T. 'Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003.' *Microbiol Immunol.* 2007;51(2):185-91.

G. 研究発表

1. 論文発表
無し。
2. 学会発表
無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し

厚生労働科学研究助成金 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
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
分担研究報告書
体外診断薬の評価パネル作製に関する国際的動向

研究分担者： 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

〔研究要旨〕

体外診断薬のための標準品等に関する会議として NIBSC が開催する第一回 SoGAT-CV 会議に参加し、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情報を収集した。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 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。

A. 目的

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。

昨年度は NIBSC が主催した第 20 回 SoGAT 会議に参加し、2007 年 1 月に WHO が体外診断薬のための標準品整備 5 年計画を作って実施していること、イギリスと米国においてランコントロール等の整備が進んでいること等の情報を収集した。今年度から SoGAT 会議は従来の輸血のウイルス安全性の会議とは別に体外診断薬のための標準品等に関する SoGAT-CV 会議を開催することになった。

B. 研究方法

2007 年度に策定された WHO 体外診断薬のための標準品整備 5 年計画に基づく国

際共同研究への本邦からの参加を円滑に進めるため、今年度は、国立感染症研究所の体外診断薬委員会に諮って体制を整備した。

2008 年 6 月に NIBSC が主催した第一回 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 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。

C. 結果

1. 体外診断薬のための国際標準品整備 5 年計画 (WHO)

WHO Collaborating Centers であるイギリス NIBSC とドイツ PEI は 2007 年に提案した WHO の「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」を推進した。国際標準品の整備について、*Plasmodium falciparum* の Working Reagents と *Toxoplasmosis gondii* (RH Strain) の国際標準品を作製することが提案された。また、HCMV

と EBV の国際標準品制定のための共同研究を 2009 年に実施する予定で、その候補品の由来および性状についての意見交換を行った。また、HBV と B19 の Genotype/subtype パネル作製の経過が報告された。

2. イギリスにおけるウイルスの体外診断薬のための NAT ランコントロールの整備

NIBSC は UK Clinical Virology Network 及び Health Protection Agency と協力して、体外診断薬の標準化を行うプログラムを推進している。臨床検査所に提供する種々のウイルスのランコントロールの整備を進めている。ランコントロールは臨床検体の性状を反映させて 10mM Tris-HCl, 2% FCS に希釈した低レベルの陽性検体（リアルタイム RT-PCR Ct 値 30 程度）とし、2 段階評価を実施している。第一段階においては 4 - 5 施設で 3 段階の濃度の候補品を評価する。第二段階においては第一段階で選択した Ct 値約 30 の候補品を 20 - 25 施設で評価する。現在、Influenza A (H1N1, H3N2), Influenza B, Norovirus Herpes simplex virus (HSV-1, & HSV-2), Cytomegalovirus, EBV について第二段階の結果を集計中である。

3. PEI 参照品の作製

EU の OMCL が実施するプール血漿の HCV と HIV の NAT 試験の参照品 (PhEu Biological Reference Preparation) は PEI が共同研究を組織して国際単位で表示したものを作製した。PEI はその他にも WHO 国際標準品に準拠した参照品を整備した。

4. WHO 国際標準品、標準パネル作製のための国際共同研究への本邦における協力体制の

整備

今まで、WHO 国際標準品等を作製するための国際共同研究では標準品ごとに直接に研究者に参加を要請していたので、WHO がどの標準品をいつ作製するのかを把握することは困難であった。そのため、本邦に協力できる研究者がいながら共同研究に参加しなかった場合があると思われる。このたび「WHO の体外診断薬のための標準品整備 5 年計画」が明らかになって、国際標準品等の整備の進捗状況を把握することが可能になった。そこで、WHO の 5 年計画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。今年度は既にパルボ B19 標準パネルのための国際共同研究に参加が決まっていたが、更に同委員会を通じて HCMV 第一次国際標準品、EBV 第一次国際標準品、HIV-2 第一次国際標準品並びに HBV genotype 標準パネルの作製のための国際共同研究に参加した。

D. 考察

近年、わが国において体外診断薬の承認申請に国内検体のパネルを用いた試験成績の提出が求められるようになったが、国内検体の入手が困難なことから、承認手続きを迅速に行うために標準パネルの交付が求められるようになった。そこで、国立感染症研究所が日本赤十字社の協力をえて国内献血血液を用いて HIV-1 抗原/抗体標準パネルを作製した。パネルの数量に限りがあることから、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」を設置することになり、今後作製される国内標準パネルも含めてその交付が円滑に行われることが期待できる。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
蒲地一成	百日咳菌	バイオメディカルサイエンス研究会	バイオセーフティの辞典	みみずく舎	東京	2008	166-168

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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巻1号	10-12	2008年
川名 尚	特集 性感染症Ⅲおもな感染症 性器ヘルペスウイルス感染	小児科診療	71巻8号	1311-1317	2008年
川名 尚	産婦人科感染症診療マニュアルⅡ 感染症 単純ヘルペスウイルス	産科と婦人科	75巻11号	1490-1498	2008年
川名 尚	性器ヘルペス	日本臨牀	67巻1号	143-152	2008年
駒瀬勝啓	風疹ワクチンの効果と再感染	臨床とウイルス	36 No.1	32-38	2008
Sakata, M., Komase, K., Nakayama,	Histidine at position 1042 of the p150 region of a KRT live attenuated rubella vaccine strain is responsible for the temperature sensitivity	Vaccine	27	234-242	2009
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	45	9-14	2008
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	29	41-43	2008
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	34	18-21	2008

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巻	35-41	2009
持田恵子、蒲地一成	百日咳ワクチン	感染制御	4巻6号	535-538	2008
蒲地一成	微生物の基礎知識：百日咳	感染と消毒	15巻	91-94	2008
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巻3号	255-258	2008
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巻	111-115	2008