

- 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ィクス系構築、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、弱毒麻疹生ワクチン 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. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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

19. 岡本貴世子、大槻紀之、駒瀬勝啓、風疹ウイルス遺伝子検出 Real time PCR法の確立、第57回日本ウイルス学会2009.10.25-27、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

- 1) 特許；特になし
- 2) 実用新案登録；なし

厚生科学研究費補助金
(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)
総合研究報告書

風疹・麻疹抗体測定法の標準化に関する研究
：抗体測定方法の互換性と発症予防レベル・感染予防レベルの検討

研究分担者 庵原 俊昭 (国立病院機構三重病院・院長・小児科)
研究協力者 中野 貴司 (国立病院機構三重病院・小児科)
 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)
 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

本邦は麻疹の排除と先天性風疹症候群(CRS)の排除を目指しており、そのためには適切な方法で麻疹風疹抗体が測定され、その結果を適切に評価することが大切である。初年度は、風疹 R-HI 法は弱陽性血清の抗体価を低く判定する傾向があり、標準 HI 法 (予研法) で測定された HI 抗体 16 倍の血清を標準血清に加えることで、R-HI 法と予研法の結果はよく一致することを示した。次年度は、風疹 HI 抗体価 (倍) はそのままの値で LA 抗体価 (IU/mL) に、風疹 EIA 抗体価 (EIA 価) は 2 倍した値が LA 抗体価に換算できること、風疹 EIA 法の有意上昇 (測定誤差以上の上昇) の基準は 2 倍であることを示した。最終年度は、多くの人での風疹発症予防レベルは、 $HI \geq 16$ 倍、 $LA \geq 10IU/mL$ 、 $EIA \geq 5.0EIA$ 価、感染予防レベルは、 $HI \geq 32$ 倍、 $LA \geq 25IU/mL$ 、 $EIA \geq 12.5EIA$ 価であること、多くの人での麻疹発症予防レベルは、 $NT \geq 4$ 倍、 $PA \geq 64$ 倍、 $EIA \geq 4.0EIA$ 価、感染予防レベルは、 $NT \geq 32$ 倍、 $PA \geq 512$ 倍、 $EIA \geq 16.0EIA$ 価であることを示した。3 年間の研究成果をもとに、「麻疹風疹各抗体測定方法の互換性と発症予防レベル・感染予防レベルのガイドライン」を作成した。なお、適切に抗体を測定するためには、麻疹風疹ともに国際単位で表示された標準血清とパネル血清が必要と思われた。

A. 研究目的

本邦は麻疹排除と先天性風疹症候群 (CRS) 排除を目指している。麻疹および風疹を排除するためには、集団レベルにおいては 95% 以上の高い接種率による MR ワクチン 2 回接種が大切であり、個人レベルでは麻疹・風疹抗体の発症予防

レベル、感染予防レベルを明らかにし、各自の抗体価に沿った対策を立てる必要がある。

近年、欧米では麻疹・風疹などの血清抗体価は、測定方法による結果の相違や国別の測定結果の相違をなくすために、国際単位 (IU/mL) で表示する動きがあり、

風疹の発症予防レベルは 10IU//mL、感染予防レベルは 15~25IU//mL、麻疹の発症予防レベルは 125~200mIU//mL、感染予防レベルは 500~1000mIU//mL と報告されている。しかし、本邦での風疹抗体は、赤血球凝集抑制法(HI)では倍、酵素免疫法(EIA)では EIA 価、ラテックス凝集法(LA)では IU//mL と表示され、麻疹抗体は、中和法(NT)では倍、粒子凝集法(PA)でも倍、EIA 法では EIA 価と、それぞれ表示方法が異なり、抗体価の互換性が不明確なうえに、各測定方法で測定された血清抗体価の発症予防レベル、感染予防レベルの解釈が困難であった。

本研究では、初年度は、ガチョウ赤血球を用いる HI 法(予研法)と、乾燥ニワトリ赤血球を用いる R-HI 法との互換性について検討し、次年度は、風疹 HI 抗体、EIA 抗体、LA 抗体の互換性の検討、および風疹 EIA 抗体有意上昇の基準について検討し、最終年度は、麻疹の抗体測定方法である NT 抗体、PA 抗体、EIA 抗体の互換性を検討すると同時に、麻疹風疹各抗体測定方法での発症予防レベルおよび感染予防レベルについて検討し、更に MR ワクチン接種前後の抗体価の動きから、今回提唱する感染予防レベルの適切性について検討を行った。

B. 研究方法

1) 風疹 HI 法(予研法)と R-HI 法による HI 抗体の比較検討

研究の目的を説明し、同意を得た 186 人から血清を採取し、風疹血清 HI 抗体価を、乾燥ニワトリ血球を用いる R-HI 法およびガチョウ血球を用いる予研法で測定した。

2) 風疹 HI、LA、EIA 抗体の互換性と発症予防レベル・感染予防レベルの検討

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、HI 抗体、LA 抗体、EIA 抗体の互換性を検討した。また、各抗体測定方法における風疹発症予防レベルおよび感染予防レベルを検討した。なお、いずれの検討も抗体価は 2 を低とする対数に変換後、解析した。

3) 風疹 EIA 抗体有意上昇の検討

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、各 HI 抗体価における EIA 抗体価を比較検討した。

4) 麻疹 NT 抗体の国際単位化と、NT 抗体、PA 抗体、EIA 抗体の互換性および発症予防レベル・感染予防レベルの検討

麻疹抗体を国際単位で表示しているベニロン®を購入し、各濃度のベニロンが示す NT 抗体価から NT 抗体の国際単位化を検討した。

NT 抗体、PA 抗体、EIA 抗体の測定は、本研究に同意が得られた 67 人の血清を用いて行った。NT 抗体測定は B95a 細胞を用い、チャレンジウイルスには野生株である Yonekawa 株(遺伝子型 D5)を使用し、100%細胞変性効果を示す血清の最大希釈倍数の逆数を抗体価と表示した。PA 抗体(富士レビオ)および EIA 抗体(デンカ生研)は添付文書にしたがって測定した。また、測定結果をもとに、麻疹発症予防レベルおよび感染予防レベルを検討した。

5) 年齢群による MR ワクチン接種による風疹・麻疹 EIA 抗体有意上昇レベルの検討

MR ワクチン接種前後の抗体測定に同意が得られた 2 期接種群 75 人、3 期接種群 69 人、思春期群(19~23 歳)59 人を対象に、MR ワクチン接種前、接種 4 週後の血清抗体価を EIA 法で測定した。

C. 研究結果

1) R-HI 法と予研法の HI 抗体価の相関

R-HI 法で測定した HI 抗体価と予研法

で測定した HI 抗体価を比較すると、R-HI<8 倍の一致率は 92%(35/38)と高かったが、8 倍の一致率は 18%(6/34)、16 倍の一致率は 18%(20/114)と、弱陽性血清の一致率は低率であった。(表 1)。次に予研法で測定された HI 抗体 16 倍血清を、弱陽性血清の指標として用いると、予研法で弱陽性を示した 18 検体中 16 検体の抗体価は R-HI 法で 1 管以内の測定誤差範囲内に治まった。

2) 風疹 HI、LA、EIA 抗体の互換性と発症予防レベル・感染予防レベルの検討

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 抗体価の表示(倍)はそのまま IU/mL に変換できるという結果であった。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 価)の 2 倍が IU/mL に変換できるという結果であった。

風疹 HI 抗体価、EIA 抗体価が国際単位に変換できたことから、HI 抗体、LA 抗体、EIA 抗体の陽性レベル、発症予防レベル、感染予防レベルを表 2 に示した。

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。HI 抗体 32 倍の EIA 抗体価(2^4)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、各 HI 抗体価における EIA 抗体価の標準偏差の平均は 0.46 であり、 $2SD=0.96$ となった(表 3)。一般に 2

SD 以上の違いは測定誤差以上の違いと判定されており、今回の検討結果から、HI 抗体 32 倍から 512 倍の間では、 $2^{0.96}$ (1.95) 倍(約 2 倍)以上の上昇が有意上昇と判断された。

4) 麻疹 NT 抗体の国際単位化と、NT 抗体、PA 抗体、EIA 抗体の互換性および発症予防レベル・感染予防レベルの検討

10,000 mIU/mL に調整した IVIG の NT 抗体価は 256 (2^8) 倍を示し、1250 mIU/mL に調整した IVIG は NT 抗体価 32 倍 (2^5)、156 mIU/mL に調整した IVIG は NT 抗体価 4 (2^2) 倍を示した。NT における麻疹発症予防レベルは 4 倍、感染予防レベルは 32 倍と判定した。

麻疹 NT 抗体と PA 抗体との間には有意な相関があり($R=0.78106$ 、 $P<0.0001$)、その相関直線は $\log_2 NT = 0.78 \log_2 PA - 1.8$ であり、PA 抗体の方が NT 抗体よりも 2 管高めに表示された。NT 抗体と PA 抗体の分布から、NT の発症予防レベル 4 倍は PA では 64 倍に、感染予防レベル 32 倍は PA では 512 倍に相当した。NT と PA の発症予防レベルの相関は、感度 66.7%、特異度 95.1%、一致率 92.5% であり($P=0.00063$)、感染予防レベルの相関は、感度 87.5%、特異度 82.9%、一致率 85.1% であった($P<0.0001$ 、表 4)。

麻疹 NT 抗体価と EIA 抗体価の間には、麻疹 EIA 抗体 32 EIA 価までは NT との間に傾き 1 の有意な相関を示すが ($\log_2 NT = 1.07 \log_2 EIA - 0.14$ 、 $R=0.71929$ 、 $P<0.0001$)、32 EIA 価を越えると両者の間に相関はあるものの、傾きは 0.5 となり ($\log_2 NT = 0.52 \log_2 EIA + 4.10$ 、 $R=0.62592$ 、 $P=0.0006$)、NT 抗体 32 倍以上の高い抗体価を示す血清は、EIA では低く表示されることが認められた。また、麻疹発症予防レベルを $NT \geq 4$ 倍、 $EIA \geq 4.0$ EIA 価としたとき、感度 50%、特異度 95.1%、一致率 91.0% であり($P=0.00749$)、感染予防レベルを $NT \geq 32$ 倍、 $EIA \geq 16.0$ EIA 価とすると、感度

84.4%、特異度 80.0%、一致率 82.1%であった (P<0.0001、表 6)。

麻疹 NT 抗体、PA 抗体、EIA 抗体の発症予防レベル、感染予防レベルを表 6 に示した。

5) 年齢群による MR ワクチン接種による風疹・麻疹 EIA 抗体有意上昇レベルの検討

EIA 抗体では 2 倍以上の抗体上昇が有意上昇である。MR ワクチン接種による風疹抗体の有意上昇率は、2 期接種群では、4<8EIA 価 83.3%、8<16EIA 価 42.1%、3 期接種群では、4<8EIA 価 57.1%、8<16EIA 価 33.3%。思春期群では、4<8EIA 価 33.3%、8<16EIA 価 0% (17 例中 0 例) と、年齢が高くなるにつれて有意上昇を示す接種前抗体価が低下していた (表 7)。

次に麻疹抗体の有意上昇率は、2 期接種群では、8<16EIA 価 91.3%、16<32EIA 価 46.7%、3 期接種群では、8<16EIA 価 77.8%、16<32EIA 価 57.1%。思春期群では、8<16EIA 価 63.6%、16<32EIA 価 12.5%と、風疹と同様に年齢が高くなるにつれて有意上昇を示す EIA 抗体価が低下していたが (表 8)、有意上昇が誘導される EIA 抗体価は風疹よりも高値であった。

6) 麻疹風疹各抗体測定方法の互換性と発症予防レベル・感染予防レベルのガイドラインの作成

3 年間の研究成果を、「麻疹風疹各抗体測定方法の互換性と発症予防レベル・感染予防レベルのガイドライン」にまとめた (P8-P9)。

D. 考察

ウイルス感染症には、潜伏期間が比較的長く (2 週間) 全身でウイルスが増殖して症状が出現する全身性ウイルス感染症と、局所でウイルスが感染して直ちに症状が出現する局所性ウイルス感染症がある。ウイルスに対する抗体レベルには、抗体陽性レベル、発症予防レベル、感染

予防レベルがあり、感度の高い方法で測定された陽性レベルの抗体では発症予防ができないことが多いが、発症しても多くは軽症化する (修飾感染)。

発症予防レベルとは、ウイルスは感染するが症状が出現しないレベルであり、抗体の二次免疫応答が認められる。感染予防レベルとは、ウイルスが感染しないレベルであり、感染の曝露やワクチン接種を受けても抗体の有意上昇が見られないレベルである。病態的に、局所性ウイルス感染症では、発症予防レベルと感染予防レベルは近似しているが、全身性ウイルス感染症では、感染早期から二次免疫応答が始まり、感染したウイルスの増殖を抑制して発症を防ぐため、発症予防レベルと感染予防レベルは異なっている。

ウイルス感染の予防には、抗体を代表とする液性免疫だけではなく、細胞性免疫や粘膜免疫も関与しているため、発症予防や感染予防を抗体だけで決定するのは困難であるが、一般に容易に測定できる抗体が発症予防や感染予防の指標となっている。

ウイルス抗体測定のゴールドスタンダードは NT である。しかし NT は技術と手間と時間がかかるため、ウイルスに応じて簡便な抗体測定方法が開発されている。ウイルス抗体は、目的に応じて適切な方法を選択し、検査機関で適切に測定され、測定された結果を疫学的、ウイルス学的に適切に評価することが大切である。

今回の検討で、R-HI 法で測定された HI 抗体価は、スタンダードとされる予研法で測定された HI 抗体価よりも低めに判定されることが示され、予研法 HI 抗体 16 倍の弱陽性血清を標準血清に加えることで、R-HI 法の判定が改善された。以上の結果は、R-HI 法で HI 抗体を測定する場合は、HI 抗体 16 倍の弱陽性血清も同時に測定すると、弱陽性の抗体価が適切に判定されることを示しており、風疹 HI 抗体測定の標準化を図るために大切

な対策と思われた。

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 倍以上の上昇が有意上昇であることが示された。

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 HI 法、EIA 法、LA 法について、測定した抗体価を対数に変換後、互換性について検討した。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 抗体価 = LA 抗体価 (IU//mL)、EIA 抗体価 $\times 2 =$ LA 抗体価 (IU//mL) となり、HI 抗体価と EIA 抗体価の国際単位への換算が可能となった。また、この結果をもとに本邦で頻用されている HI 抗体と EIA 抗体の発症予防レベルと感染予防レベルを表 2 に示した。なお、まれに風疹不顕性感染により CRS 児の発症が報告されていること、風疹の感染予防レベルが 25IU//mL、HI 抗体 32 倍という報告もあることから、HI 抗体 16 倍は不顕性感染レベルであり、妊娠を考えている HI 抗体 16 倍の女性にはワクチン接種が勧められると判断された。

MR ワクチン接種によるブースター効果の検討によると、WHO が示す感染予防レベルは、思春期群では一致したが、2 期接種群や 3 期接種群では、WHO が示す抗体価よりも高い抗体価でも MR ワクチン接種によりブースター効果が認められた。MR ワクチン追加接種の結果から、2 期接種群、3 期接種群の感染予防レベルは 16EIA 価 (32IU//mL 相当)、成人では 8EIA 価 (16IU//mL 相当) と推定された。

本邦で頻用されている麻疹抗体測定方法 (NT、PA、EIA) の国際単位化および互換性を検討するために、麻疹抗体が国際単位で表示されている IVIG を

10,000mIU//mL に調整し、NT 抗体との相関を検討した。IVIG の NT 抗体価の検討では、10,000mIU//mL の IVIG は NT 抗体 256 倍を示し、NT 抗体における発症予防レベル、感染予防レベルは、それぞれ 4 倍、32 倍と判定した。

NT 抗体価と PA 抗体価の互換性、NT 抗体価と EIA 抗体価の互換性の検討では、PA 抗体価は NT 抗体価が高くなっても直線状に高く表示されたが、EIA 抗体は NT 抗体が高くなると低く表示されることが示された。EIA 抗体を読むときは注意を要すると思われた。

NT 抗体との相関性から考察される PA と EIA の発症予防レベル、感染予防レベルを表 4 に示したが、EIA 抗体の発症予防レベルについては、8.0EIA 価との報告もある。EIA 抗体 8.0EIA 価を発症予防レベルとしたときの感度 83.3%、特異度 86.9%、一致率 86.6% ($P=0.00071$) となり、4.0EIA 価を発症予防レベルとしたときと比較し、感度は上昇するものの、特異度と一致率は低下した。現在多くの人に MR ワクチン 2 回接種が勧められている。麻疹は感染力が極めて強い感染症である。麻疹流行規模が小さくなったとき、医療従事者を対象として院内感染対策を考えたときは、麻疹ワクチン接種基準を 8.0EIA 価に、日常生活を考えたときは 4.0EIA 価に設定するのが現実的と思われた。

今回の検討で、風疹と同様に麻疹においても、MR ワクチン接種により多くの人にブースターがかかるレベルが年齢群により異なっていた。追加接種の結果からは、2 期接種群・3 期接種群の麻疹感染予防レベルは 32EIA 価であり、思春期群では 16EIA であった。この思春期群の結果は成人において検討した麻疹 NT 抗体から推定される EIA 抗体の感染予防レベルと一致していた。なお、一般にワクチン接種により認められる抗体反応は、小児 > 思春期 > 成人 > 高齢者の順になっている。今回示した年齢群によりブース

ターがかかる抗体価の違いが、接種後の抗体反応の違いに関与していると推察された。

E. 結論

風疹 HI 抗体、EIA 抗体、LA 抗体の相関性から風疹 HI 抗体および EIA 抗体の国際単位への変換方法を示し、IVIG の麻疹 NT 抗体価から麻疹 NT 抗体の国際単位への変換方法を示した。また、文献的に示されている抗体価(IU/mL)から、風疹 HI 抗体、EIA 抗体、LA 抗体と麻疹 NT 抗体、PA 抗体、EIA 抗体の抗体陽性レベル、発症予防レベル、感染予防レベルを推定した。本研究成果は今後の麻疹風疹対策上有用な結果と思われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 庵原俊昭：ウイルス検査法とその評価. SRL 宝函、別冊 s4-s16,2007
2. 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
3. 庵原俊昭：予防接種をめぐる問題. 小児科診療 70:2121-2123,2007

4. 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
5. 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
6. 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
7. Ihara T: The strategy for prevention of measles and rubella prevalence with measles-rubella (MR) vaccine in Japan. Vaccine 27:3234-3236, 2009
8. 庵原俊昭：麻疹風疹(MR)混合ワクチン-麻疹ウイルス野生株の排除を目指して. 小児科臨床 62:2563-2570, 2009
9. 庵原俊昭、他：最近の麻疹・風疹血清疫学の特徴と麻疹・風疹混合(MR)ワクチンによる抗体反応. 三重県小児科医会会報 80:4-11,2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記することなし。

(表1) 風疹各種抗体測定方法と風疹発症予防レベル・感染予防レベル

	陽性レベル	発症予防レベル	感染予防レベル
文献(IU//mL)	4	10	15~25
LA (IU//mL)	4	10	15~25
HI (倍)	8*	16*	32*
EIA (EIA 価)	2.0	5.0	12.5

* : 風疹 HI 抗体は 8 倍から測定されるので、陽性感度は 8 倍である。風疹発症予防レベル 10IU//mL は HI 抗体 8 倍と 16 倍の間にあり、確実な発症予防レベルは 16 倍となる。また風疹感染予防レベルは 15~25IU//mL であり、高い数値をとると感染予防レベルは HI 抗体 32 倍となる。したがって、風疹発症予防を目的とするときの風疹ワクチン接種基準は、HI 抗体 : <8 倍および 8 倍、EIA 抗体 : <5.0 EIA 価であり、感染予防を目的とするときの風疹ワクチン接種基準は、HI 抗体 : ≤ 16 倍、EIA 抗体 : <12.5 EIA 価である。まれに風疹不顕性感染者から先天性風疹症候群(CRS)児出生の報告があるので、妊娠可能年齢の人では、感染予防レベル以上の抗体価 (HI 抗体 ≥ 32 倍) が期待される。

(表2) 麻疹 NT 抗体と PA 抗体との関係

		PA (2 ⁿ) 倍										
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
NT (2 ⁿ)	0	1	1	1								
	1			1	2							
	2			1	1	1	1					
	3				3	2	4	2				
	4				2	3	4		2			
	5		1	1			1	3	3			
	6					1		3	2	1	1	
	7						2	1	5	2	1	
	8							2		1	1	2
	9											
	10											1

発症予防レベル : NT4 倍、PA16 倍 (OR=38.7、P=0.00063)

感染予防レベル : NT32 倍、PA512 倍 (OR=33.8、P<0.0001)

(表3) 麻疹 NT 抗体と EIA 抗体との関係

PA (2 ⁿ) EIA 価		EIA 価								
		<1.0	1<2	2<3	3<4	4<5	5<6	6<7	7<8	8<
NT (2 ⁿ)	0		2	1						
	1		1	1	1					
	2		1	1	2					
	3		1	3	6	1				
	4		1		6	4				
	5			1	3	4	1			
	6				2		6			
	7			1		1	5	4		
	8					1	2	1	2	
	9									
10									1	

発症予防レベル：NT4 倍、EIA<4.0 EIA 価 (OR=19.3、P=0.00749)

感染予防レベル：NT32 倍、EIA<16 EIA 価 (OR=21.6、P<0.0001)

(表4) 麻疹の発症予防レベル・感染予防レベルとワクチン接種基準】

	陽性レベル	発症予防レベル	感染予防レベル
文献(mIU//mL)		125~200	500~1000
NT (倍)	2	4	32
PA (倍)	16	64	256
EIA (EIA 価)	2.0	4.0	16.0

注1) 添付文書による PA 抗体の陽性閾値は 16 倍であり、PA 32 倍は NT 2 倍に相当し、NT と PA は NT 256 倍までは傾き 0.8 で相関する。麻疹発症予防レベルを NT \geq 4 倍、PA \geq 16 倍としたときの感度=66.7%、特異度=91.0%であり(P=0.00063)、感染予防レベルを NT \geq 32 倍、PA \geq 512 倍としたときの感度=87.5%、特異度=82.9%である (P<0.0001)。

注2) 麻疹 EIA 抗体は、32 EIA 価までは NT 抗体と傾き 1.0 で相関するが、32 EIA 価を越えると傾きが 0.5 となり、NT 抗体価 32 倍以上の高い抗体価の血清は EIA では低く表示される。麻疹発症予防レベルを NT \geq 4 倍、EIA \geq 4.0 EIA 価としたときの感度=50%、特異度=95.1%であり(P=0.00749)、感染予防レベルを NT \geq 32 倍、EIA \geq 16.0 EIA 価としたときの感度=84.4%、特異度=80.0%である (P<0.0001)。

注3) 麻疹の集団免疫率は 90~95%であり、今回の発症予防レベルは 95%以上の人が発症を免れると予測されるレベルである。MCV 接種レベルを EIA <8.0 EIA 価に高めると、感度=83.3%、特異度 86.9%となる(P=0.00071)。

(表5) MR ワクチン接種による接種時期ごとの抗体価別風疹抗体反応

接種前 EIA 価	2期接種群(75)			3期接種群(69)			思春期群(59)		
	≥2倍	2>1.5倍	<1.5倍	≥2倍	2>1.5倍	<1.5倍	≥2倍	2>1.5倍	<1.5倍
<2	6			6			4		
2<4	13			9		1	7		1
4<8	15	1	2	16	9	3	2	3	1
8<16	8	7	4	6	11	1		2	15
16<32	1	2	10		1	6			13
32<64		1	3			1			8
64<128			2						3
合計	49	11	21	36	21	12	13	5	41
(%)	(57.3)	(14.7)	(28.1)	(52.2)	(30.4)	(17.4)	(23.0)	(8.3)	(69.5)

(表6) MR ワクチン接種による接種時期ごとの抗体価別麻疹抗体反応

接種前 EIA 価	2期接種群(75)			3期接種群(68)			思春期群(59)		
	≥2倍	2>1.5倍	<1.5倍	≥2倍	2>1.5倍	<1.5倍	≥2倍	2>1.5倍	<1.5倍
<2	8			5			4		
2<4	9			7			6		
4<8	14			16	1		13	1	2
8<16	21	2		21	4	2	14	7	1
16<32	7	1	7	4		3	1	3	4
32<64		2	2	1	1	3			1
64<128			2					1	1
合計	59	5	11	54	6	8	38	12	9
(%)	(78.7)	(6.7)	(14.7)	(79.4)	(8.8)	(11.8)	(64.4)	(20.3)	(15.3)

麻疹風疹対策：麻疹・風疹各抗体測定方法の互換性と発症予防レベル・ 感染予防レベルのガイドライン

【はじめに】

ウイルス抗体には、陽性レベル、発症予防レベル、感染予防レベルがあり、一般に、感度の高い方法で測定された陽性閾値レベルの抗体価では発症予防ができないことが多いが、発症しても多くは軽症化する（修飾感染）。発症予防レベルとは、ウイルスは感染するが症状が出現しないレベルであり、抗体の二次免疫応答が認められ、感染予防レベルとは、ウイルスが感染しないレベルであり、感染の曝露やワクチン接種を受けても抗体の有意上昇が見られないレベルである。

ウイルス感染症の発症防御には、抗体を代表とする液性免疫だけではなく、細胞性免疫や粘膜免疫も関与しているため、個々の発症予防や感染予防を抗体だけで決定するのは困難である。しかし、抗体は容易に測定できるため、抗体が発症予防や感染予防の指標として広く使用されている。

世界保健機関(WHO)からの報告を含む多くの文献は、麻疹と風疹の発症予防レベル・感染予防レベルを国際単位で表示している。しかし、本邦では血清抗体価の国際単位表示に馴染みがなく、また各抗体測定結果の互換性が示されていない。今回「ウイルス感染症の対外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究」の成果をもとに、今後の麻疹風疹対策の一助とするために、「麻疹・風疹各抗体測定方法の互換性と発症予防レベル・感染予防レベルのガイドライン」を作成した。なお、ウイルス抗体の測定には、目的に応じて適切な方法を選択し、検査機関で適切に測定され、測定された結果を疫学的、ウイルス学的に適切に評価することが大切である。

I. 目的に応じた抗体測定方法とその評価

1) 免疫保有状態の評価に用いる抗体測定方法

- ・風疹：HI法、EIA法、LA法
- ・麻疹：NT法、EIA法、PA法

2) 急性期感染の診断に用いる抗体測定方法と診断基準

- ・IgM抗体：検出（ペアで測定すると短期間に急上昇する）
- ・IgG抗体：ペア血清で陽性化または有意上昇（短期間に急上昇する）
成人陽性レベルと比較して高値（回復期シングル血清）*

(*注) 急性期のシングル血清で、IgG抗体が成人陽性レベルと比較して高値の場合は、感染による二次免疫応答の可能性がある。

3) 抗体有意上昇（測定誤差以上の抗体価の上昇）の基準

- ・HI法、NT法、PA法：2管（4倍）
- ・EIA法、LA法：2倍

II. 風疹の発症予防レベル・感染予防レベルとワクチン接種基準

	陽性レベル	発症予防レベル	感染予防レベル
文献(IU//mL)	4	10	15～25
LA (IU//mL)	4	10	15～25
HI (倍)	8*	16*	32*
EIA (EIA 価)	2.0	5.0	12.5

注1) 風疹 HI 抗体価 (倍) はそのまま IU//mL に相当する。

注2) 風疹 EIA 抗体価 (EIA 価) を 2 倍した値が IU//mL に相当する。

*: 風疹 HI 抗体は 8 倍から測定されるので、陽性感度は 8 倍である。風疹発症予防レベル 10IU//mL は HI 抗体 8 倍と 16 倍の間であり、確実な発症予防レベルは 16 倍である。また感染予防レベルは 15～25IU//mL であり、高い数値をとると感染予防レベルは HI 抗体 32 倍となる。したがって、風疹発症予防を目的とするときの風疹ワクチン接種基準は、HI 抗体: <8 倍および 8 倍、EIA 抗体: <5.0 EIA 価であり、感染予防を目的とするときの風疹ワクチン接種基準は、HI 抗体: ≤16 倍、EIA 抗体: <12.5 EIA 価である。まれに風疹不顕性感染者から先天性風疹症候群(CRS)児出生の報告があるので、妊娠可能年齢の人では、感染予防レベル以上の抗体価 (HI 抗体 ≥32 倍) が期待される。

III. 麻疹の発症予防レベル・感染予防レベルとワクチン接種基準

	陽性レベル	発症予防レベル	感染予防レベル
文献(mIU//mL)		125～200	500～1000
NT (倍)	2	4	32
PA (倍)	16	64	256
EIA (EIA 価)	2.0	4.0	16.0

注1) 100%細胞変性効果(CPE)を抑制する最大血清希釈倍数の逆数で NT 抗体価を表示すると、10,000 mIU//mL に調整した IVIG は NT 256 倍を、1250 mIU//mL に調整した IVIG は NT 32 倍を、156 mIU//mL に調整した IVIG は NT 4 倍を示す。

注2) PA 抗体の陽性閾値は 16 倍であり、PA 32 倍は NT 2 倍に相当し、NT と PA は NT 256 倍までは傾き 0.8 で相関する。

注3) 麻疹 EIA 抗体は、32 EIA 価までは NT 抗体と傾き 1.0 で相関するが、32 EIA 価を越えると傾きが 0.5 となり、NT 抗体価 32 倍以上の高い抗体価の血清は EIA では低く表示される。

注4) 麻疹の集団免疫率は 90～95%であり、今回示した発症予防レベルは 95%以上の人の発症を予防すると予測されるレベルである。医療従事者からの院内感染 100%予防を図るときは、麻疹ワクチン接種レベルを EIA <8.0 EIA 価に高める意見もある。

【まとめ】

血清抗体の測定結果を正しく臨床に利用するためには、①臨床側が目的にあった適切な測定方法を選択する、②検査側が正しく測定する (精度管理)、③臨床側が測定結果を正しく解釈する、ことが大切であり、②を評価するためには標準血清、パネル血清を用いた精度管理が大切である。

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)
総合研究報告書

A型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価に関する研究

研究分担者 大西 和夫 (国立感染症研究所・免疫部)
研究協力者 清原 知子 (国立感染症研究所・ウイルス第二部)
石井 孝司 (国立感染症研究所・ウイルス第二部)
百瀬 俊也 (日本赤十字社・血液事業本部)

研究要旨

HAV 抗体検出キットの再評価のための基盤整備を目的として HAV 抗体陽性の国内血清パネルを作製した。国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会の承認を受けてインフォームド・コンセントの上で患者血清を収集した。滋賀県で発生した HAV 集団感染における IgM 型抗 HAV 陽性血清検体を多数収集した。IgG 型抗 HAV 抗体陽性国内血清の収集に関しては、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) からなる高品質の血清パネルが作製できた。このパネルを用いて、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 キットについて性能を検討した結果、各キット間の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率とも 100%となることを確認した。また、IgM 型抗体検出キットについても市販 3 キットの検討を行い、現行市販製品の良好な性能が確認された。さらに、A 型肝炎体外診断薬の将来的な技術基盤を把握するため、抗 HAV 抗体検出キットのコア技術であるモノクローナル抗体と HAV 抗原エピソードの反応特性を評価するために新規 HAV 抗原特異的モノクローナル抗体を多数確立し、定量的評価システムを構築した。

A. 研究目的

急性 A 型肝炎は A 型肝炎ウイルス (HAV) 感染による疾患で、2~7 週間の潜伏期間ののち一過性の急性肝炎症状を起こす。HAV は糞口感染によって伝播するため、その発生状況は衛生環境に左右される。日本では 50 歳以下での抗体陽性者は極めて少なく、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、急性 A 型肝炎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。本研究の目的の一つは、日本国内で流行する A 型肝炎ウイルスによる感染を診断する体外診断薬の性能を再評価するための試験に必要な、国内血清パネルを整備することであり、これにより、メーカー

が製造し国内販売する 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。

急性 A 型肝炎の臨床診断ならびに疫学調査のための体外診断薬として、現行では血清中の抗 HAV 抗体を検出するキットが複数市販されている。これらのキットは数年ごとに感度・特異性の向上が図られ、新しいバージョンに置き換わっている。これらの改良の技術的基礎を把握することが市販されるキットの品質を担保する上で必要不可欠である。これらの技術の基礎となる HAV に対する免疫反応、すなわち使用されるモノクローナル抗体と HAV 抗原の特性および品質管理の評価手法を確立し、現行の診断薬の再評価を進めることが必要である。

以上の理由から、本研究では IgM 型ならびに IgG 型抗 HAV 抗体陽性血清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い、さらに将来的な HAV 体外診断薬基盤技術の評価準備を行った。

B. 研究方法

抗 HAV 抗体検出体外診断薬の再評価に必要な、抗 HAV 抗体陽性血清（特に IgM 型抗 HAV 抗体陽性血清）パネルを整備するために、現況で月 10 例程度散発する HAV 発症例について血清検体を収集するシステムを作る。研究期間内に、具体的に以下のごとく血清パネル整備を進める。

(I) IgM 型血清を収集するシステムの構築：抗 HAV 抗体陽性国内血清パネルを整備するために、(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制を構築する。(ハ) 国外の抗 HAV 抗体陽性血清についても、収集体制構築を目指す。

(II) IgG 型抗 HAV 抗体陽性パネルの作

製：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。

(III) 市販キットの性能比較：現在市販されている IgG 型抗 HAV 抗体検出キットならびに IgM 型抗体測定キットに関して、上記 IgG 型国内血清パネルならびに IgM 型国内血清検体を用いて測定し、パネル構成検体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。これらの測定結果は後述する Inhouse-ELISA 系の測定結果とも合わせて検討した。

(IV) 新規 HAV 特異的モノクローナル抗体を用いた HAV 抗原エピトープ反応特性評価系の確立：(イ) Genotype 1a, 1b, 3b の不活化 HAV をマウスに免疫して定法により多数のハイブリドーマを確立した。漸次新しいハイブリドーマ株の作成を続行している。モノクローナル抗体は、無血清培地で作成し、プロテイン G クロマトグラフィーで精製後、必要に応じてビオチン化標識、酵素標識した。(ロ) HAV 補捉ならびに HAV 抗体検出 ELISA について抗原濃度、抗体濃度、抗体の組み合わせ、抗体標識法、サンドイッチ法、競合法などの諸条件を検討し、最適化を行った。(ハ) HAV 抗体産生 B 細胞の検出と動態解析について、BALB/c または C57BL/6 マウスを不活化 HAV 粒子で免疫し、フローサイトメトリー法により免疫担当細胞の動態を観察した。HAV 特異的抗体を細胞表面に発現する B 細胞

胞について、HAV 免疫後 8-10 日のマウス脾臓細胞を不活化 HAV 粒子と反応後、ビオチン化標識抗 HAV モノクローナル抗体で染色することにより検出した。

倫理面への配慮

インフォームド・コンセントの上収集する抗 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研究倫理審査委員会の承認を受けて実施する。

C. 研究結果

(I) 血清を収集するシステムの構築：

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、上記、研究方法の項に記した計画を、国立感染症研究所・医学倫理審査委員会に申請し、承認を受けた。

この承認事項に基づき、i)インフォームド・コンセントの上収集する抗体陽性血清は連結不可能匿名化し、抗 HAV 抗体価を測定する試験に使用するのみであり、他の目的には使用しない、ii)血液の採取は、診断時もしくは主治医の判断で 20 ミリリットル以下 1 回のみ提供を受ける、等の制限を設け、実際に血清検体の収集を以下のように行った。

HAV 集団感染の事例：2006 年 07 月末に滋賀県米原市で起きた HAV 集団感染に際し、インフォームド・コンセントの上、患者血清の収集を行った。収集できた患者血清は 12 検体で、IgM 型抗 HAV 抗体は 1 例の判定保留例を除きすべて陽性であった。

また、この判定保留例を含む全例で、IgG、IgA 型を含むトータルの抗 HAV 抗体価が陽性と判定された。これらの検体は血清パネル作製に適する。各血清検体の量は 2 - 10/mL 程度であった。

(II) 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。

(III) 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。IgM 型キットについては 3 キットについて先に述べた滋賀県米原市の集団感染の際収集した血清を用いて検討し、全体一致率、陽性一致率、陰性一致率ともに 100% の、良好な性能を確認した。

(IV) モノクローナル抗体を用いた HAV 抗原エピトープ反応特性評価系：既に確立した 4 株のモノクローナル抗体 (A21、B8、E15、F1) について ELISA により競合試験を行った結果、A21、B8、F1 は同じエピトープかその近傍を認識し、E15 は異なるエピトープを認識すること、結合定数は F1>A21>B8>>E15 であることが示唆された。HAV 補捉ならびに HAV 抗体検出 ELISA

について、抗原濃度についてはサンドイッチ法、ヒト血清中の抗 HAV 抗体濃度については、サンドイッチ法、競合法について諸条件を検討し、十分な感度・特異性・再現性を得ることができた。HAV 抗体産生 B 細胞の検出と動態解析について、フローサイトメトリー法により、不活化 HAV 粒子で免疫したマウスの脾細胞を上記方法で観察すると、細胞表面に HAV を結合する B220 陽性 CD5 陰性 B 細胞が HAV 免疫後有意に増加しており、HAV 特異的細胞表面抗体を有する抗原特異的 B 細胞を検出する方法を世界で初めて確立した。

D. 考察

近年、国内急性 A 型肝炎の報告数は激増しており、特に低年齢層での HAV 抗体保有率は非常に低い。これは、国内の公衆衛生環境の飛躍的な向上を示すものであるが、韓国における最近の急性 A 型肝炎の大流行に見るように低年齢層の抗 HAV 抗体保有率の低下による HAV 感受性の増大が、将来的には大きな問題をはらんでいる。HAV 体外診断薬の拡充が重要である。

HAV 体外診断薬の性能拡充を目指す本研究において、まず、急性 A 型肝炎患者からの、インフォームド・コンセントをふまえた国内血清収集計画については、問題なく国立感染症研究所・医学研究倫理審査委員会承認を受けた。

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。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。今後、HAV 集団感染の発生に際して行動する場合、自治体担当部局の同意・協力が欠かせない点に留意する。

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 抗体力価は 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。

HAV 抗原エпитープ反応特性を評価する系の確立について、モノクローナル抗体の多くが、抗原捕捉 ELISA で競合することから、HAV 表面の特に優位なエпитープの存在が示唆されるが、これが、文献に報告のある VP3_Asp70 や VP1_Ser102 に相当するのか検討を要する。これとは異なる特異性を持つハイブリドーマも多数確立できており、抗体・抗原エпитープ反応特性の評価系構築が可能になった。不活化 HAV 粒子結合フローサイトメトリー法では、低レベルのシグナルが CD5 陽性細胞にも観察された。この結合が、HAV 受容体とされる huHAVcr-1 様 TIM-1 分子に由来するものなのか検討中である。

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・医学研究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

検体多数を成功裏に収集することができた。

IgG 型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。

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キットならびにIgM型3キットについて収集した血清検体を用いて測定し、各キットの良好な性能を確認した。

HAV体外診断薬の将来的な技術基盤の研究として、抗HAV抗体検出キットのコア技術であるモノクローナル抗体とHAV抗原エピソードの反応特性を評価する系を構築し、将来的な製品も含めて、市販される急性A型肝炎体外診断薬の品質を科学的根拠に基づいて担保する技術基盤を準備した。

(参考文献)

1. Kiyohara T, Sato T, Totsuka A,

Miyamura T, Ito T, Yoneyama T. 'Shifting sero-epidemiology of hepatitis A in Japan, 1973-2003.' Microbiol Immunol. 2007; 51(2):185-91.

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 大西和夫、清原知子、石井孝司、小林和夫. 2009. HAV 特異的モノクローナル抗体を用いたELISA検出系の最適化とHAV抗体産生B細胞動態解析法の検討. 第57回日本ウイルス学会学術集会（東京、10月）.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

厚生科学研究費補助金
(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)
総合研究報告書

百日咳体外診断薬における凝集反応用抗原の再評価と改良に関する研究

研究分担者 蒲地 一成 (国立感染症研究所 細菌第二部 室長)
研究協力者 齋藤 良一 (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 (Chonnam National University、大韓民国)
岡田 賢司 (国立病院機構福岡病院)
権平 文夫 (デンカ生研株式会社)
渡辺 峰雄 (北里大学生命研 免疫機能制御)

研究要旨

百日咳の血清診断に使用される菌凝集素価法について、凝集用抗原株(山口株、東浜株)の再評価と改良を試みた。近年の百日咳流行株が保有する凝集因子を解析したところ、すべての臨床分離株(26株)が山口株と等しい凝集因子1,3,6を持つことが判明し、山口株の凝集用抗原株としての妥当性が確認された。一方、東浜株は凝集因子として1,2,4を保有し、凝集因子1は種特異抗原として山口株にも認められる。そこで、菌凝集素価法の特異性向上を目的に、山口株と東浜株について凝集因子1欠損株の作製を試みた。凝集因子1であるVag8の変異遺伝子($\Delta vag8$)を構築し、相同組換えにより $\Delta vag8$ と $vag8$ を置換させた。スクリーニングの結果、 $\Delta vag8$ が導入された東浜株が得られ、イムノブロットによりVag8の欠損を確認した。現在、山口株のVag8欠損株の作製を進めており、欠損株の取得後、両株の凝集用抗原としての有用性を評価する予定である。

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、その診断には菌凝集素価を指標にした血清診断が主に用いられている。菌凝集素価法は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)が凝集用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、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あり、低い特異性が本法の問題点となっている。

凝集用抗原株である山口株と東浜株はそれぞれ主要な凝集因子として因子1,3,6と因子

1,2,4を保有し、山口株は1979年以前の分離株、東浜株は1952年の分離株である。これらの凝集因子、特に山口株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り、凝集素価法の再評価が必要である。そこで、本研究では菌凝集素価法の再評価として、近年の百日咳流行株が保有する凝集因子を調査した。また、本法の特異性の向上を目的に、山口株と東浜株に共通する凝集因子1欠損株の作製を試みた。

B. 研究方法

百日咳流行株における凝集因子の保有状況
菌株：2005~2008年にわが国で分離された百日咳臨床分離株26株を供試した。山口株

(L5-2)と東浜株(L-7)は感染研保存株を供試した。

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)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。

凝集因子1欠損株の作製

菌株：感染研保存株である東浜株(L7)と山口株(L5-2)を供試した。相同組換えには*E. coli* SM10 λ pir(アンピシリン耐性; Amp^r)を使用し、欠損株の選択にはアンピシリン(Amp; 50 μ g/ml)、ストレプトマイシン(Sm; 30 μ g/ml)ならびに5% Sucrose (Suc)を使用した。

凝集因子1の同定：臨床分離株(7株)より全タンパク質を抽出し、抗凝集因子1血清を用いてイムノブロットを行った。シグナルに相当する蛋白バンドを切り出し、質量分析により同定を行った。

Vag8欠損株の作製：pABB-CRS2プラスミドに Δ vag8(vag8中の約200bpを欠失させ制限酵素BamHI部位を挿入)を組み込んだpABB- Δ vag8プラスミドを構築した。*E. coli* SM10 λ pirにpABB- Δ vag8を形質転換し、Sm^r東浜株およびSm^r山口株に接合伝達させた。Amp耐性株の中からSm^rSuc^rAmp^s感受性(Amp^s)株をスクリーニングし、イムノブロットによりVag8産生能を解析した。

倫理面への配慮

本研究は臨床分離株についての解析であり、倫理上特段の問題点は発生しない。

C. 結果

百日咳流行株における凝集因子の保有状況

近年の流行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凝集因子3,6を有し、東浜株が持つ凝集因子2,4の保有は認められなかった。次に、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. 1)。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25kDa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. 2)。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、その保有に質・量的な差異はないものと結論された。

凝集因子1欠損株の作製

抗因子1血清を用いたイムノブロット解析により、凝集因子はvirulence associated geneにコードされるVag8と同定された。そこで、pABB- Δ vag8を構築し、東浜株と山口株に接合伝達させた。スクリーニングの結果、Sm^rSuc^rAmp^sを示す東浜株25株が得られた。それらの株について Δ vag8の相同組換えを確認したところ、9株において Δ vag8の相同組換えが確認された。このうち4株についてVag8蛋白質の発現を解析した結果、全株ともVag8を欠損することが判明した(Fig. 3)。一方、山口株ではpABB- Δ vag8プラスミドが染色体DNAへ挿入されたSm^rSuc^r株が多数得られたが、Sm^rSuc^rAmp^s株を得ることは出来なかった。なお、pABB- Δ vag8が挿入された山口株では、東浜株のVag8欠損株と同様にVag8の蛋白発現を認めなかった。このことから、 Δ vag8は目的の位置に挿入されているが、残り片方の組換えが生じていないものと推察された。

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