

201034052A

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

# ウイルス検出を目的とした体外診断薬の 再評価技術基盤に関する研究

(H22－医薬－一般－008)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成23（2011）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

# ウイルス検出を目的とした体外診断薬の 再評価技術基盤に関する研究

(H22-医薬-一般-008)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成23 (2011) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
ウイルス検出を目的とした体外診断薬の再評価技術基盤 に関する研究 小林 和夫	1
II. 分担研究報告書	
単純ヘルペスウイルス（HSV）IgM 抗体捕捉法の評価 川名 尚	9
インフルエンザの検査診断に関する検討 多屋 馨子	13
現行インフルエンザウイルス体外診断薬の新型インフル エンザウイルス検出に関する研究 岡田 賢司	17
新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）を特異的に 検出する迅速診断イムノクロマトキットの開発 高橋 宜聖	21
各種ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン中 のウイルス抗体価の検討 庵原 俊昭	23
風疹 IgG 国内標準血清と風疹パネル血清の評価 岡本 貴世子	29
A 型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価に関する研究 大西 和夫	31
ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な 整備に関する研究 水澤 左衛子	35
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

# I. 総括研究報告書

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)  
総括研究報告書-平成 22 年度

ウイルス検出を目的とした体外診断薬の再評価技術基盤に関する研究  
(H22-医薬-一般-008)

研究代表者	小林 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・部長)
研究分担者	川名 尚	(帝京大学医学部附属溝口病院・産婦人科・客員教授)
研究分担者	多屋 馨子	(国立感染症研究所・感染症情報センター・室長)
研究分担者	岡田 賢司	(国立病院機構福岡病院・統括診療部・部長)
研究分担者	高橋 宜聖	(国立感染症研究所・免疫部・室長)
研究分担者	庵原 俊昭	(国立病院機構三重病院・院長)
研究分担者	岡本 貴世子	(国立感染症研究所・ウイルス第三部・研究員)
研究分担者	大西 和夫	(国立感染症研究所・免疫部・主任研究官)
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**

当該研究はウイルス感染症体外診断薬の臨床医学領域における問題点を抽出し、体外診断薬の再評価に基盤を提供し、臨床<->基礎医学領域の双方向的橋渡し研究を推進することを目的としている。性器ヘルペスウイルス感染症（感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律、5 類定点把握感染症）、インフルエンザ（新型インフルエンザ等感染症、5 類定点）、水痘（5 類定点）、風疹（5 類全数）、A 型肝炎（4 類）を研究対象感染症とした。HSV-IgM 抗体の検出は臨床的に初感染の診断に用いられ、捕捉法により検出された IgM 抗体は真の IgM 抗体と考えられた。季節性インフルエンザ迅速診断キット(12キット)における test device の最小検出感度は  $10^3$  copies の格差を認めた。国立病院機構で使用された季節性インフルエンザ迅速診断キットの感度は新型インフルエンザ（2009 A/H1N1）に対し、季節性インフルエンザと同等の性能を示した。季節性ウイルスと交差せず新型ウイルスのみを検出する迅速診断キット（検査所要時間：約 10 分）を開発した（感度：90.6%、特異度：99.7%）。水痘抗体や cytomegalovirus (CMV) 抗体測定方法間の互換性を明らかにした。本邦思春期女性の CMV 抗体陽性率は約 55% であり、妊娠中に CMV 感染し、先天性 CMV 感染症児の危険性が示唆された。風疹 IgG 国内標準血清候補 JPN'03 の WHO 国際標準血清に対する相対力価を再測定し、100 IU/mL と決定した。抗 A 型肝炎ウイルス (HAV) 単一クローン抗体を用い、HAV 抗原捕捉 ELISA 系を構築した。現行の抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価で、国内血清検体に対する測定値がキット間で乖離する例を認めた。2010 年の WHO 生物製剤標準化に関する専門家委員会 (ECBS) において、国立感染症研究所は国際共同研究に参加し、国際標準品候補：HBV genotype (HBsAg)、HEV-RNA、HIV-RNA や EBV-DNA の測定結果を報告し、国際動向の把握、さらに、体外診断薬の精度管理に資する標準品の整備を推進した。

## A. 研究目的

ウイルス感染症等体外診断薬の臨床医学領域における問題点を抽出し、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に基盤を提供し、臨床<→>基礎医学領域の双方向的橋渡し研究を推進することを目的としている。性器ヘルペスウイルス感染症（感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律、5類定点把握感染症）、インフルエンザ（新型インフルエンザ等感染症、5類定点）、水痘（5類定点）、風疹（5類全数）およびA型肝炎（4類）を研究対象感染症とした。

また、横断的課題として、体外診断薬の再評価に用いる基盤整備に関し、国際動向の把握や世界保健機関（WHO）-生物製剤標準化に関する専門家委員会（ECBS）に協力、さらに、体外診断薬の精度管理に資する国内・国際標準品を整備した。

担当者	研究課題
小林 和夫	研究の総括
川名 尚	単純ヘルペスウイルス（HSV）IgM抗体捕捉法の評価
多屋 馨子	インフルエンザの検査診断に関する検討
岡田 賢司	現行インフルエンザウイルス体外診断薬の新型インフルエンザウイルス検出
高橋 宜聖	新型インフルエンザウイルス（A/H1N1pdm）を特異的に検出する迅速診断イムノクロマトキットの開発
庵原 俊昭	各種ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン中のウイルス抗体価の検討
岡本貴世子	風疹IgG国内標準血清の整備と風疹パネル血清の評価
大西 和夫	A型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価に関する研究
水澤左衛子	ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な整備

## B. 研究方法

### 1. 単純ヘルペスウイルス（HSV）IgM抗体捕捉法の評価

中和法やWestern blot法によりヒトHSV-抗体を検出し、検出された抗体からHSV-IgM抗体を化学的に精製した。

### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

季節性（A/H1N1、A/H3N2、B）および2009年に発生したパンデミックインフルエンザ（2009 A/H1N1pdm）を対象とし、既存診断キットの性能評価をした。

さらに、インフルエンザ（2009 A/H1N1pdm）特異的単クローン抗体を樹立し、特異的迅速診断キットを開発した。性能評価として、感度、特異度やキット間格差を検証した。

### 3. 各種ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン中のウイルス抗体価の検討

水痘抗体価を免疫吸着赤血球凝集反応（IAHA）とA社の酵素抗体法（EIA）で測定した。また水痘抗体価およびcytomegalovirus（CMV）抗体価測定の同意が得られた91人を対象にA社およびB社のEIA法で抗体価を測定し、互換性を検討した。

### 4. 風疹IgG国内標準血清の整備と風疹パネル血清の評価

風疹抗体測定用の体外診断薬キットの表示法の統一化や感度の評価、さらに、臨床検査施設の精度管理等に資するため、1）風疹IgG国内標準血清の制定、2）風疹標準パネル血清、整備、評価した。

### 5. A型肝炎ウイルス（HAV）体外診断薬の再評価に関する研究

現行の抗HAV-IgM抗体検出キットの性能評価により性能格差を明らかにする。また、HAV抗原特異的単クローン抗体を樹立し、抗原検出系の開発した。

### 6. ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な整備

International Plasma Fractionation Association（IPFA）/Paul-Ehrlich-Institut（PEI）IPFA/PEI Workshop、Standardisation of Genomic Amplification Techniques

(SoGAT)-CV 会議世界保健機関 (WHO) 生物製剤標準化に関する専門家委員会 (ECBS) に参加し、情報を収集した。国際標準品作製のための共同研究に国立感染症研究所が参加協力した。

### 倫理面への配慮

生命倫理、動物愛護や遺伝子組換え実験、また、安全対策の観点から、機関で定められた規程に準拠し、機関で承認を得て遂行した。なお、利益相反はなかった。

## C. 研究結果

### 1. 単純ヘルペスウイルス (HSV) IgM 抗体捕捉法の評価

中和法や Western blot 法により検出された抗体を処理し、HSV-IgM 抗体であることが判明した。

### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

A/California/07/2009pdm 株に対する 12 キットの device の最小検出感度を調べた結果、 $10^2 \sim 10^5$  copies/test、平均  $10^{2.96}$  copies/test であった。

現行迅速診断キット (A/H1N1、A/H3N2、B) によるインフルエンザ (2009 A/H1N1pdm) の検出率は季節性インフルエンザと同等であった。

季節性インフルエンザウイルスに結合せず新型インフルエンザウイルス (2009 A/H1N1pdm) のみに結合するマウス単クローン抗体を樹立し、診断薬メーカー (デンカ生研株式会社) と国立感染症研究所との共同で、季節性ウイルスと交差せず新型ウイルスのみを検出する迅速免疫診断キット (検査所要時間: 約 10 分) を開発した (感度: 90.6%、特異度: 99.7%)。

### 3. 各種ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン中のウイルス抗体価の検討

水痘 IAHA 法と A 社の EIA 法との間には有意な相関があり、IAHA 抗体価 (倍) =  $1.4 \times$  EIA 抗体価 (EIA 価) の関係があった。B 社の EIA 抗体価と A 社の EIA 抗体価の間にも有意な相関があったが、B 社の陽性閾値

は A 社の陽性閾値や IAHA 法の陽性閾値より低値であり、B 社の方法で測定された場合水痘ワクチン接種基準は B 社陽性閾値の 100 mIU/mL よりも高い 200 mIU/mL に設定する方が適切と思われた。次に、A 社と B 社の EIA 法による CMV 抗体測定方法の互換性について検討したが、2 者の間には極めて高い相関が認められ、A 社の抗体価 (EIA 価)  $\times 200$  が B 社の抗体価 (倍) に相当した。

### 4. 風疹 IgG 国内標準血清の整備と風疹パネル血清の評価

風疹 IgG 国内標準血清の国際単位による値付け: 検査施設 5 社による再測定の結果は前回の 89.4 IU/mL に対し 85.3 IU/mL であり、同等の結果が得られた。前回 7 社による国内標準血清候補 JPN'03 の相対力価 100 IU/mL は妥当な値であった。パネル血清の力価測定: パネル血清候補の WHO 国際標準血清に対する相対力価を決定した。同時に測定した HI 価との相関を解析したところ、両者の間に良好な相関がみられ ( $R^2=0.897$ )、HI 価 16 倍以上においては  $\text{Log}_2(\text{IU 値}) \cong 0.9 \text{Log}_2(\text{HI 値})$  の変換が可能であると考えられた。また、外挿値より Cut off 値である HI 価 8 倍はおよそ 6.4 IU/mL に相当すると考えられた。

### 5. A 型肝炎ウイルス (HAV) 体外診断薬の再評価に関する研究

HAV 抗原捕捉 ELISA 系の構築に関し、新規に樹立した単クローン抗体クローン用い、HAV 抗原捕捉 ELISA 系を構築した。検出限界は 300-800 pg/mL ( $\sim 10^5$  pfu/mL) であった。核酸増幅試験 (NAT) の検出限界は 10 pg/mL ( $\sim 10^4$  pfu/mL) 以上であり、1 ~ 2 オーダーの差を認めた。

抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価として、上市されている 2 社の抗 HAV-IgM 抗体検出キットについて国内検体を含む血清パネルを測定したところ一部の検体においてその測定値に乖離を認めた。

### 6. ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な整備

2010 年の ECBS において第一次

HCMV-NAT 国際標準品と第一次 *Trypanosoma cruzi* 抗体標準パネルが承認された。新たに HBV-DNA 国際標準品の更新他 6 件の国際標準品とパネルを作製することが承認された。国立感染症研究所は国際共同研究に参加し、HBV 遺伝子型 (HBsAg) パネル、HEV-RNA 国際標準品、HIV-RNA 国際標準品、Epstein Barr virus (EBV) -DNA 国際標準品の候補品を測定して結果を報告した。新たに HBV-DNA 国際標準品更新のための共同研究に参加することになった。

#### D. 考察

##### 1. 単純ヘルペスウイルス (HSV) IgM 抗体捕捉法の評価

捕捉法によって検出されている IgM 抗体は抗 HSV-IgM 抗体と考えられる。開発した DTT 法は簡便で低い抗体価についても解析可能な方法と考えられる。

##### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

デバイスの最小検出感度に最大  $10^3$  copies の格差が認められ、その原因として、使用されている単クローン抗体の認識部位および濃度によると考えられる。また、流行株の種類により検出感度が異なることも考えられる。最も優れていたキットの最小検出感度は  $10^2$  copies/test であった。臨床検査で重要なのはウイルス量の少ない感染初期である。操作過程における抗原の損失を低減し、できるだけ多くの抗原をデバイスに添加できるようにすることが必要である。Swab の性能比較では、nylon fiber 製が劣る結果となった。臨床検体の性状は様々であることから、吸水性の違いが感度の違いに繋がるかについては、さらなる比較検討が必要と考えられた。検体溶出用チューブの比較において、材質 (ガラス、プラスチック) による格差を認めたが、検体溶出用チューブは外部から圧搾が容易な柔軟性があり、かつ圧搾条件が一定となりやすい形状であれば、溶出効率が高くなると考えられた。

現行迅速診断キットで施設間の差が認められた要因として、(1) 地域が異なること、(2) キット検査を依頼する医師の臨床診断規準 (発熱+上気道症状など典型的な臨床症状を呈した患者のみだけでなく、非典型例を含んでいるかどうかなど) が施設毎・医師毎で異なる可能性があること、(3) 診断キットを使用する検査技師の手順の違いなどが考えられる。

新型インフルエンザウイルス全粒子を免疫し、作製したマウス単クローン抗体を用い、季節性ウイルスを認識せず、新型ウイルスのみを認識する迅速免疫診断キットを開発することに成功した (検査所要時間: 約 10 分、感度: 90.6%、特異度: 99.7%)。従来の季節性ウイルス用のキットと同様、抗インフルエンザウイルス核蛋白 (NP) 抗体を利用することにより最も高い検出感度を得ることが可能となった。この結果は、おそらくウイルス一粒子あたりの NP 発現分子数が、他のタンパクよりも高い事を反映したものと推察される。今後、様々な亜型のインフルエンザウイルスに対する交差反応性や、抗体のエピトープ構造を解析し、本キットの特異性に関する更なる情報収集に努める予定である。

##### 3. 各種ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン中のウイルス抗体価の検討

水痘抗体価の検討では、IAHA 法と A 社の EIA 法との間には極めて良好な相関が認められた。一方、A 社の EIA 法と B 社の EIA 法との間では、B 社は A 社と比較して陽性閾値が低めであり、A 社で判定保留とされた 4 検体はすべて B 社では陽性と判定された。また、計算上 A 社の EIA 価の 64 倍が B 社の mIU/ml に相当しており、A 社の判定保留閾値である 2.0~4.0EIA 価は、計算上も B 社の陽性閾値に含まれる結果であった。

水痘抗体価は世界的に発症予防抗体価が決定されておらず、本邦では IAHA 抗体 4 倍以上、A 社 EIA 抗体価 4.0 以上を発症予防レベルとして感染対策が行われている。今回の検討から、A 社 EIA 価 4.0EIA 価は B 社で 256 mIU/mL に、IAHA 抗体価 4 倍は B



社で 184 mIU/mL に相当する。この結果から、B 社の陽性閾値 100 mIU/mL は、本邦で行われている水痘発症予防対策の抗体価よりも低く設定されており、B 社を用いた時の水痘ワクチン接種基準は、陽性閾値を用いるのではなく、200 mIU/mL を用いる方が本邦の基準に近いと判断された。

2 社の EIA キットを用いて CMV 抗体価を測定したが、世界的に使用されている B 社を基準としたとき、陽性一致率 100%、陰性一致率 98% と極めて高い相関が認められた。実際、思春期女性を中心とした CMV 抗体陽性率は、A 社のキットで 54.3%、B 社では 55.4% と大きな差を認めなかった。20 年以上前、本邦では多くの子どもは出生時に CMV に感染し、抗体保有率が 90% 以上と言われていたが、近年若い人たちの CMV 抗体価の保有率の低下が示されている。今回の検討でも用いた検査試薬による抗体陽性率に大きな差はなく、本邦妊娠可能年齢女性の CMV 抗体保有率は 55% と急速に低下していた。多くの先進国と同様に、本邦も妊婦の CMV 感染予防対策が重要な課題であることが明らかになった。

#### 4. 風疹 IgG 国内標準血清の整備と風疹パネル血清の評価

国内の臨床診療では HI 法と ELISA 法が混在し、抗体価の解釈に混乱が生じている。このため、ELISA キット間での統一表示の指標や HI 法と ELISA 法の相関を示し、適切に換算できる方法を示す必要がある。検査センターにおける精度管理や風疹抗体測定体外診断薬の製造所における品質管理には標準血清が必要であるが、国際標準血清は入手が困難であるため、国内標準血清の整備が必要である。本研究では、検査施設と共同で、国内で使用されている複数の ELISA キットを用いて国内標準血清候補 JPN'03 の相対力価 (IU/mL) を決定した。また、HI 法と ELISA 法に良好な相関を示した。これらの結果より、HI 価と ELISA の互換値を示すことができ、風疹抗体価の解釈による混乱を回避することが期待される。今後、相対力価を決定しパネル血清候補か

ら適切な力価の候補を選んでパネル血清を制定し、風疹抗体測定用の体外診断薬キットの品質管理、検査施設の精度管理等に利用できるよう整備したいと考えている。

#### 5. A 型肝炎ウイルス (HAV) 体外診断薬の再評価に関する研究

HAV 抗原捕捉 ELISA 系の検出感度は数百 pg/mL ( $\sim 10^5$  pfu/mL) であり、ウイルス血症を辛うじて検出できる感度である。検出系に蛍光試薬を用い、感度を約 10 倍上昇することが可能であり、克服できると考える。HAV は RNA ウイルスであり、普遍的に存在する RNase により容易に分解されるため、遺伝子検査 (NAT) は注意を要する。HAV 抗原捕捉 ELISA 系では HAV 抗原 (タンパク質) を検出するため、NAT に較べて安定である利点がある。抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価を行った結果、1 社のキットについて国内検体を含む血清検体の測定値が他社製より低値を示した。おそらく、HAV 流行株に対して最適化されていないためと考えられた。

#### 6. ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な整備

国際標準品の作製は EBCS の承認後、実施されるため、日本の担当者が国際標準品の担当者と連絡することにより、国際標準品の作製に関する適切な情報入手が可能である。個々の詳細についてはワーキンググループである SoGAT 会議において科学的な討論をすることが重要である。共同研究による国内標準品の作製に次の利点を挙げることができる。1) 国際標準品とほぼ同時に制定できる。2) 多施設で測定するため、正確な値付けが期待できる。3) ISO17511:2003 取得施設で凍結乾燥加工した候補品を製造することができた。

#### E. 結論

##### ・単純ヘルペスウイルス (HSV) IgM 抗体捕捉法の評価

IgM 捕捉法に検出された IgM 抗体は真の IgM 抗体と考えられ、性器ヘルペスウイルス感染症における初感染や再燃の診断に有

用である。

・インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

ウイルス溶液による現行キット（季節性インフルエンザ）の性能評価で現行キット間に検出格差（ $10^3$ copies）を認めた。

臨床性能評価で現行インフルエンザ迅速診断キットの陽性割合に大きな差は認められなかった。

季節性に反応せず、新型インフルエンザウイルスを認識するマウスモノクローナル抗体を作製し、新型インフルエンザウイルス（2009 A/H1N1pdm）を検出する迅速・簡便診断キットを開発した。

・各種ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン中のウイルス抗体価の検討

水痘 IAHA 法と A 社の EIA 法は有意な相関があり、IAHA 抗体価（倍）=  $1.4 \times$  EIA 抗体価であった。B 社の陽性閾値は低値であり、B 社の方法で測定された場合、水痘ワクチン接種基準は 200 m IU/mL に設定する方が適切である。A 社と B 社の EIA 法による CMV 抗体価の間には極めて強い相関を認めた。

・風疹 IgG 国内標準血清の整備と風疹パネル血清の評価

風疹 IgG 国内標準血清候補およびパネル血清候補の国際標準血清に対する相対力価を決定した。また、HI 価と ELISA による相対力価（IU/mL）の相関から、両者の変換式を得た。

・A 型肝炎ウイルス（HAV）体外診断薬の再評価に関する研究

HAV 抗原捕捉サンドイッチ ELISA 系を構築した。検出感度は 300-800 pg/mL（ $\sim 10^5$  pfu/mL）であった。現行抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価で乖離を認めた。

・ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な整備

2010 年の WHO 生物製剤標準化に関する専門家委員会（ECBS）において、国立感染症研究所は国際共同研究に参加し、国際標準品候補：HBV genotype (HBsAg)、HEV-RNA、HIV-RNA や EBV-DNA の測定

結果を報告し、国際動向の把握、さらに、体外診断薬の精度管理に資する標準品の整備を推進した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 東出誠司、西澤美香、川名 尚、保坂憲光、太田嘉則、神田秀俊. 2010. 新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による単純ヘルペスウイルス検出法の開発. 日本性感染症学誌.21:120-127.
- 2) 川名 尚. 2010. 感染症 単純ヘルペスウイルス. 産科と婦人科. 77:75-82.
- 3) 松井猛彦, 岩田力, 勝沼俊雄, 南部光彦, 岡田賢司, 近藤直実. 2010. 速報 新型インフルエンザ入院例に関する緊急第二次調査報告：基礎疾患のない症例との比較—呼吸器症状を呈した症例を中心に— 日本小児アレルギー学会誌 24 : 155-166.
- 4) 岡田賢司. 2010. 新型インフルエンザワクチンとアナフィラキシー 小児科臨床 63 : 1223-1229.
- 5) 岡田賢司. 2010. インフルエンザワクチンは吸入か皮下注射か、いずれがベターか 吸入療法 2 (2) 医薬ジャーナル社 : 62-67.
- 6) 岡田賢司. 2010. 新型インフルエンザ（パンデミック H1N1 2009）の臨床と治療（小児）PROGRESS IN MEDICIN - 新型インフルエンザの教訓と今後の対策— ライフサイエンス 30 : 23-26.
- 7) Kurosaki, T., Y. Aiba, K. Kometani, S. Moriyama, Y. Takahashi. 2010. Unique properties of memory B cells of different isotypes. Immunol. Rev., 237, 104-116.
- 8) Yuki, N., Y. Takahashi, T. Ihara, S. Ito, T. Nakajima, K. Funakoshi, K. Furukawa, K. Kobayashi, and M. Odaka. 2010. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination.

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry Nov 7. [Epub ahead of print]

- 9) 庵原俊昭、中野貴司、落合 仁、渡辺正博、二井立恵、伊佐地真知子. 2010. 麻疹・風疹血清疫学と麻疹風疹混合(MR)ワクチンによる抗体反応からみた今後の麻疹および風疹対策. 日本小児科医会会報 39: 120-123.
- 10) 庵原俊昭. 2010. 基礎疾患をもつ人への予防接種. 日本小児アレルギー学会雑誌 24: 193-202.
- 11) 庵原俊昭. 2010. ワクチンと免疫. 小児保健研究 69: 830-832.
- 12) Suzuki J., Goto H., Komase K., Abo H., Fujii K., Otsuki N., Okamoto K.. 2010. Rubella virus as a possible etiological agent of Fuchs heterochromic iridocyclitis. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 248: 1487-1491.
- 13) Okamoto K., Fujii K., Komase K. 2010. Development of a novel TaqMan real-time PCR assay for detecting rubella virus RNA. J. Virol. Methods 168: 267-271.
- 14) 小林和夫. 2010. 感染症の現状と制圧戦略. 昭和医会誌 70: 70-73.

## 2. 学会発表

- 1) 川名 尚、大貫裕子、西澤美香、西井修. 2010. 性器ヘルペスにおける単純ヘルペスウイルスの型について. 第28回日本産婦人科感染症研究会(京都、6月)
- 2) 川名 尚. 2010. 性器ヘルペスの研究—40年のあゆみ—. JHIF(札幌、8月)
- 3) 川名 尚、西澤美香、大貫裕子、西井修、東出誠司、保坂憲光、太田嘉則、神田秀俊. 2010. 新規核酸抽出法とLAMP法を用いた臨床検体からの単純ヘルペスウイルスの検出. 日本性感染症学会第23回学術大会(福岡、12月)
- 4) 高橋宜聖. 2007. Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs. 千葉大 G-COE シンポジウ

ム(東京、12月)

- 5) 小野寺大志、相澤竜太郎、細野 朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖. 2010. T cell-independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling. 第14回国際免疫学会(神戸、8月).
- 6) 庵原俊昭、中野貴司、落合 仁、渡辺正博、二井立恵、伊佐地真知子. 2010. 麻疹対策: 抗体測定方法による発症予防レベルと感染予防レベルの検討. 第51回日本臨床ウイルス学会(高松、6月)
- 7) 庵原俊昭. 2010. 抗体検査: 目的・結果・次にすることは? 第42回日本小児感染症学会(仙台、11月)
- 8) 岡本貴世子、大槻紀之、駒瀬勝啓、風疹ウイルス遺伝子検出による実験室診断技術の改良、第58回日本ウイルス学会(徳島、11月)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

## II. 分担研究報告書

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

単純ヘルペスウイルス（HSV）IgM 抗体捕捉法の評価

研究分担者	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	西井 修	帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科
研究協力者	西澤美香	帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科
研究協力者	平野 勝	デンカ生研株式会社 生物ウイルス試薬部
研究協力者	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

HSV IgM 抗体の検出は、臨床的には初感染の診断に用いられている。検出法には、IgM 捕捉法と間接法があるが、これらの間で検出感度に乖離がみられる。IgM 捕捉法の方が検出感度がよいが、これは、本当に感度がよいのか、または非特異反応をみているのかが問題となっている。今回 HSV 感染患者で、IgM 捕捉法によって陽性となった臨床検体について IgM 抗体であることを以下の方法で検証することを行った。

- (1) IgM 陽性血清より IgM を分画し、この分画に HSV 抗体があるかないかを a) Western Blot (WB)法、b) 中和法 により証明する。
- (2) DTT(dithiothreitol)による不活化できるかどうかをみる。

今回の研究の結果、捕捉法により検出された IgM 抗体は真の IgM 抗体と考えられた。

A. 研究目的

ウイルス感染の診断には IgM 分画の抗体(IgM 抗体)の検出が有用である。簡便で少量の検体でよい ELISA 法が開発され IgM 抗体が容易に測定できるようになり広く一般臨床で用いることができるようになった。しかし、二つの大きな問題がある。一つは ELISA 法による検出感度には大きな乖離がある点で、もう一つは結果の解釈を定性的に行うよう指示されているため、しばしば誤診につながっている点である。今回は捕捉法と間接法の乖離について検討することを目的とした。即ち、HSV 感染者の血清 IgM 抗体の検出において間接法では捕捉法の 40%しか陽性とならなかった。そこで、まず捕捉法において検出された IgM 抗体は正しいのかどうかの検証を行った。方法は血清から IgM を分画し、ここに活性があるかないかを中和法と WB 法を用いて行った。また、従来より IgM

抗体同定法として用いられてきた 2-ME 法に代る dithiothreitol 法が EIA 法の系でも用いられるかの検討を行った。

B. 研究方法

(1) HSV 感染者の血清より IgM 分画を精製し、ここに抗体活性があるか否かの検討を行った。

a) 血清：捕捉法で IgM 抗体が検出された

以下の 4 検体 ( )内 IgM 値

①HSV-1 初発 50 病日(10.44)

②HSV-2 初発 15 病日(5.17)

③HSV-1 再発 16 年目(5.71)

④一般人血清(4.00)

検体はすべてコード番号にして用いた。

b) IgM 分画法：Nab protein a plus spin kit (Thermo)を使用して IgM 分画を得た。この方法では原血清の 4~5 倍に稀釈される。

c) 抗体活性検出法

①中和法：IgM 抗体 25 $\mu$ L にシードウイルス

スとして HSV-1(TVK-171)または HSV-2 (THH-56)の 10 TCD<sub>50</sub> または 100TCD<sub>50</sub> 25  $\mu$ L さらに補体 25  $\mu$ L (10 単位)を加え 37°C,60 分反応後 R-66 細胞 25  $\mu$ L (5 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml)を加え、37°C,5 日間培養し CPE を観察して中和活性を判定した。

②Western Blot 法 : HSV-1(HF)および HSV-2(196R)を 2-メルカプトエタノール含有 SDS 緩衝液で処理後 PAGE にて電気泳動を行い、上記の血清を反応させた後、抗 IgM 標識抗体と反応、発色基質を用い、反応バンドの出現をさせることで判定した。予め、抗 HSV-1 モルモット血清を用いてバンドの同定を行った。

(2) dithiothreitol(DTT)による IgM 不活化法

DTT(Wako 社製)で処理した血清の IgM 活性が消失するか否かを捕捉法の EIA キットを用いて検討した。用いたキットはウイルス抗体 EIA「生研」ヘルペス IgM およびヘルペス IgG である。

### C. 研究結果

(1) 分画 IgM における検討

a) 中和法

検体 1 は 100TCD<sub>50</sub> を用いた時 2 倍希釈まで、検体 2 は 16TCD<sub>50</sub> を用いた時原液で、検体 3 は 5TCD<sub>50</sub> で 2 倍までそれぞれ中和活性が検出されたが検体 4 は 5TCD<sub>50</sub> を用いても検出されなかった。

b) Western blot 法

HSV-1 抗原に対し、検体 1、検体 2、検体 3 はすべて、MW140-160KD、70-80KD、30-40KD の位置にそれぞれ強弱の差はあるがバンドが観察された。検体 4 は MW140-160KD、70-80KD の位置にバンドが観察された。また、HSV-2 抗原に対しては、検体 1 は MW75KD、検体 2 は MW75KD、55KD、35-45KD、検体 3 は MW150KD、

75KD、35-45KD、検体 4 は MW150KD、75KD の位置にバンドが観察された。このバンドはすべて、抗 HSV-1 モルモット血清により認識される HSV-1 抗原および

HSV-2 抗原のバンドと一致した。

(2) DTT 法による IgM 抗体の同定に関する基礎的検討

HSV-2 初感染患者の第 14 病日(捕捉法による IgM7.00)、第 122 病日(4.89)、第 388 病日(2.25)、第 500 病日(2.02)の血清 20  $\mu$ L に 0.01M DTT 20  $\mu$ L または、対照として精製水 20  $\mu$ L を加え 37°C,30 分反応させた後、その 10  $\mu$ L を希釈液 2000  $\mu$ L に入れ、IgM 並びに IgG 抗体値を測定した。

結果は、DTT 処理前と処理後の IgM 値は 4 検体は(7.00 $\rightarrow$ 0.38)、(4.89 $\rightarrow$ 0.26)、(2.25 $\rightarrow$ 0.25)、(2.02 $\rightarrow$ 0.31)とそれぞれ減少した。

一方 IgG 抗体は、処理前と後と全く変らなかった。これらのことから DTT 処理は IgM 抗体活性を不活化していると考えられた。但し、DTT が IgM 抗体捕捉法のアッセイ系を抑制している可能性も考えられるので以下の点検を行った。

a) 抗ヒト IgM 抗体が固相してある IgM 測定用キットプレートを予め DTT0.025mM(検出系に持ちこまれる量)と 20 倍濃い 0.5mM で 1 時間処理した後 4 回洗浄したキットプレートを用いて IgM 抗体値 2.29 と 8.34 の血清について検討した所、不処理プレートと処理プレートで全く同じ値を示したのでプレートに付いている抗ヒト IgM 抗体への影響はないと判断した。

b) 次に捕捉された IgM が DTT により影響されないかをみた。

ヒト精製 IgM(ダコ社)を 0.250 mg/mL に希釈し、その 10  $\mu$ L に 0.01M DTT 10  $\mu$ L を加え 37°C,30 分反応後 101 倍に希釈し IgM プレートに添加した。ここに標識抗ヒト IgM( $\mu$ 鎖)を希釈して添加し、20°C 1 時間反応させ洗浄後、吸光度を測定した所、DTT 未処理と処理で全く同じ吸光度が得られた。DTT 処理がこの段階での抑制効果はないと判断した。

以上、二つの実験と用いている DTT はアッセイ系に入った時は非常に低い濃度であることからアッセイ系への影響はな

いと考えた。

c) 先に中和抗体のために分画した血清について DTT 法を応用した分画前の原血清については全て IgM 抗体値は DTT 処理により陰転化した。また、分画した IgM 抗体値も 2.48→0.48 となった。

#### D. 考察

血清を IgM に分画したものについて中和活性がみられたので捕捉法によって検出された IgM 抗体は IgM 抗体と云ってよい。但し、IgM 抗体が低いものについては中和法では活性を証明できなかったが、これはこの中和法における感度の限界であると思われた。WB 法によっても IgM 抗体の存在を示す特異的なバンドがみられた。但し、出現したバンドは一様ではなく感染している HSV の型、感染時期により異なることが判明した。

以上から、捕捉法によって検出されている IgM 抗体は間違いなく抗 HSV-IgM 抗体であると云える。中和法、WB 法共に検出限界があり低い抗体価の血清については不明であった。

今回開発した DTT 法は、簡便で低い抗体価についても用いることができる画期的な方法と考えられるが、この方法が本当に IgM 抗体を不活化しているのか、或いは単に DTT が捕捉法の EIA 法のアッセイ系を抑制しているのか検証を行った。結果的にはこの濃度の DTT はアッセイ系に影響を及ぼしている可能性はないと考えられた。従って、低い IgM 抗体が検出された場合、これが真の IgM 抗体価なのか或いは単なる非特異反応なのかの判定に用いることができると考えられる。今後簡便なこの方法を多くの臨床検体に応用し IgM

抗体の動態を明らかにすると共に IgM 抗体の臨床応用におけるあるべき姿を追求したい。

#### E. 結論

IgM 捕捉法に検出された IgM 抗体は真の IgM 抗体と考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 東出誠司、西澤美香、川名 尚、保坂憲光、太田嘉則、神田秀俊. 2010. 新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による単純ヘルペスウイルス検出法の開発. 日本性感染症学会誌. 21:120-127.
- 2) 川名 尚. 2010. 感染症 単純ヘルペスウイルス. 産科と婦人科. 77:75-82.

##### 2. 学会発表

- 1) 川名 尚、大貫裕子、西澤美香、西井修. 2010. 性器ヘルペスにおける単純ヘルペスウイルスの型について. 第 28 回日本産婦人科感染症研究会(京都、6 月)
- 2) 川名 尚. 2010. 性器ヘルペスの研究 -40 年のあゆみ-. JHIF(札幌、8 月).
- 3) 川名 尚、西澤美香、大貫裕子、西井修、東出誠司、保坂憲光、太田嘉則、神田秀俊. 2010. 新規核酸抽出法と LAMP 法を用いた臨床検体からの単純ヘルペスウイルスの検出. 日本性感染症学会第 23 回学術大会(福岡、12 月).

#### H. 知的財産権の出願・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

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

インフルエンザの検査診断に関する検討

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）  
研究協力者 荒木 和子（国立感染症研究所・感染症情報センター）  
研究協力者 佐藤 弘（国立感染症研究所・感染症情報センター）

研究要旨

インフルエンザ治療薬の普及とともに、様々なインフルエンザ迅速診断キットが市販され臨床現場で用いられている。これらキットによる診断は、治療薬投与の指標のみならず、本邦における流行状況の把握と対策にも関与している。当該研究課題は、インフルエンザ迅速診断のレベル向上に資することを目的とし、インフルエンザ迅速診断キットの比較検討を行った。各々のインフルエンザ迅速診断キットにおいて、最小検出感度が添付文書に記されているが、その検出法および検討に用いられたウイルス株はキットによって異なっており、添付文書のみによるキット間の比較は困難である。そこで、当研究においては2009/2010シーズンに世界的なパンデックとなったH1N1pdm株について、ウイルス量を一定にしてデバイスをはじめとした診断キットの構成要素各々について比較検討する。

A. 研究目的

インフルエンザ迅速診断キットによる診断レベル向上を目的とし、迅速診断キットの比較検討を行う。

B. 研究方法

2010年4月現在市販されている12キット：名{製造販売元}；エスプライン<sup>®</sup>インフルエンザA&B-N {富士レビオ(株)}、BD Flu エグザマン<sup>™</sup> {日本ベクトン・ディッキンソン(株)}、クイックチェイサー<sup>®</sup>FUL A,B {(株)ミズホメディ}、チェックFlu A・B {ロート製薬(株)}、ポクテム<sup>®</sup>インフルエンザA/B {シスメックス(株)}、プロラストFlu {三菱化学メディエンス(株)}、クリアビュー-Influenza A/B {インバネス・メディカル・ジャパン(株)}、ラピッドテスト<sup>®</sup>FLUスティック {積水メディカル(株)}、QuickVue ラピッド SP influ {DS ファーマバイオメディカル(株)}、キャピリア Flu<sup>®</sup> A+B {株} タウンズ、ラピッドテスト<sup>®</sup>FLU II {積水メディカル(株)}、スタットマーク<sup>™</sup>

FLU スティック AB {株} ニチレイバイオサイエンス、について比較検討を行った。これらのキットの抗原検出はいずれもイムノクロマト法によるものであり、キットの構成はいずれも、test device、検体採取用 swab、検体溶出用チューブおよび検体溶出液であった。

ウイルスは A/California/07/2009pdm 株を用いた。ウイルス量は real-time PCR によるコピー数を基準として、device の検出感度の比較を行った。また、A/California/07/2009 pdm 株の M gene を組み込んだプラスミドベクターを作成し、これを用いて real-time PCR によるコピー数の測定により、swab および検体処理チューブの比較をおこなった。実際の臨床検体は鼻腔ぬぐい液であることが多いため、検体処理チューブの比較検討に用いたウイルス液には、鼻汁に模し、試料に 0.5% gelatin で粘度をつけて検討した。

また検体溶出用チューブに入れた検体溶出液への swab の攪拌については、攪拌



の回数、手技を一定にして比較検討を行った。

検体溶出用チューブの比較については、ガラス製チューブのみ、外部からの圧搾が不可能であり、攪拌の手技を変えざるを得なかった。

### 倫理面への配慮

患者の臨床検体を用いた研究ではない。ウイルス株 A/California/07/2009pdm 株は国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターより分与を受けた。

### C. 研究結果

イムノクロマトに用いられている抗体はいずれもモノクローナル抗体であり、検出ライン呈色の原理は、酵素抗体反応(1 kit)、および抗原抗体反応による金または着色粒子結合反応 (11 kits)であった。Device の形状はカセット型(8 kits)およびストリップ型 (4 kits)であった。A/California/07/2009pdm 株に対する 12 キットの device の最小検出感度を調べた結果、 $10^2 \sim 10^5$  copies/ test、平均  $10^{2.96}$  copies/ test であった。

キットに添付されていた検体採取用 swab の球部の素材は以下 4 種であった：100% rayon (4 kits)、100% cotton (2 kits)、50% rayon/ 50% cotton (2 kits)、および 100% nylon (fiber, 4 kits)。各 swab の最大吸水量は、rayon 45  $\mu$ l、cotton 50  $\mu$ l、rayon/cotton 100  $\mu$ l、nylon 75  $\mu$ l [小サイズの nylon fiber 製 (1 kit) は 25  $\mu$ l] であった。ベクター ( $2 \times 10^5$  copies/ $\mu$ l) を含む 0.5% gelatin-TE を 30  $\mu$ l/well (96 well micro-plate) 滴下し、これをサンプルとして 4 種各々の swab で採取し、一定条件により TE で溶出し、溶出液中のコピー数を比較した結果、nylon fiber 製が他の 3 種に比べ有意に低値であった。これは、吸水力において nylon fiber が劣ることが原因と考えられた。他の 3 種の swab 間における有意差は無かった。

キットに添付されていた検体処理チュー

ブはソフトチューブ(11 kits)、ガラス製(1 kits)であった。ソフトチューブは形状等から 9 種に分類された。Swab (rayon/cotton) を用いて、swab の検討同様に検体処理チューブ中に入れたウイルス液 (試料) をキットに記載された方法で採取と溶出を行ない、チューブによるウイルス採取・溶出量の比較を行った。その結果、ガラスチューブは 9 種各々のソフトプラスチックチューブに比し有意に低値であった。プラスチックチューブ間における有意差は見られなかった。

### D. 考察

デバイスの最小検出感度に最大  $10^3$  の差が見られた。これは、主として使用されているモノクローナル抗体の認識エピソードおよび濃度によると考えられる。各添付文書には抗体作成に用いられた株名および抗原認識部位については記載されていない。流行株の種類により検出感度が異なることも考えられる。最も優れていたキットの最小検出感度は  $10^2$  copies/ test であった。臨床検査において特に問題となるのは、ウイルス量の少ない感染初期の検査である。また、この時期の検査の需要が最も高い。ウイルス量の多い検体を採取し、操作過程における抗原の損失を低減し、できるだけ多くの抗原をデバイスに添加できるようにすることが必要である。しかし device 本体の感度が  $10^5$  copies/ test と低い場合は、採取・溶出効率を高めたとしても、感染初期検体のウイルス検出は困難であろう。感度の問題とは異なるが、ストリップ型とカセット型の操作性については、検査実施者によって嗜好に異なりがあると考えられた。

Swab の比較において、nylon fiber 製が劣る結果となった。鼻汁に模し、試料に 0.5% gelatin で粘度をつけたにもかかわらず、nylon fiber の吸水性が悪いため 30  $\mu$ l の試料全量を採取できなかった。しかし臨床検体の性状は様々であることから、吸水性の違いが感度の違いに繋がるかについ

ては、さらなる比較検討が必要と考えられた。

検体溶出用チューブの比較において、ガラス製が劣っていた。これは溶出の際の、swab 部分の外部から圧搾の有無が溶出率の違いとなっていると考えられた。また、プラスチックチューブ間において有意差は見られなかったが、チューブ材質が柔らかいほうが、複数回試験における平均溶出量が多く、その一方分散値も高い傾向がみられた。材質が柔らかい方が外部からの圧力をかけ易い反面、圧搾強度に誤差が出やすいためと考えられる。これらのことから、検体溶出用チューブは外部から圧搾が容易な柔軟性があり、かつ圧搾条件が一定となりやすい形状であれば、溶出効率が高くなると考えられた。

## E. 結論

12キット間における test device の最小検出感度には  $10^3$  の差がみられた。Swab による検体採取・溶出量の比較実験の結果、

nylon fiber 製が有意に低値であった。これについては、臨床検体の性状の違いがどのように影響を及ぼすかについて今後検討が必要である。また、検体溶出用チューブ 10 種による swab 採取試料（ウイルス液）の溶出液中への溶出量を比較した結果、ガラス製が有意に低値であった。Nylon fiber 以外の組成の swab 間、およびプラスチックチューブ間における有意差は認められなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

特になし

### 2. 学会発表

特になし

## H. 知的財産権の出願・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

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

現行インフルエンザウイルス体外診断薬の新型インフルエンザウイルス検出に関する研究

研究分担者 岡田 賢司 （国立病院機構福岡病院）  
研究協力者 小松 和典 （国立病院機構東京病院）  
研究協力者 奥田 勲 （国立病院機構本部）  
研究協力者 西浦 明彦 （国立病院機構福岡病院）  
研究協力者 松尾 富士男 （スタットコム株式会社）

研究要旨

全国の国立病院機構の病院で使用されているインフルエンザ迅速診断キットの陽性割合を全国的な流行のピーク時期で比較した。半月で200検体以上検査された現行キットは、日常臨床では陽性割合に大きな差は認められなかったが、今後も継続して調査していく必要がある。

A. 研究目的

迅速診断キットを用いた診療体制が確立しているわが国では、多くのキットが日常診療で用いられているが、臨床的に比較検討されていない。国立病院機構では、平成17年10月から国立病院臨床検査技師協会の協力を得て、所属する各施設からのインフルエンザウイルス抗原検査の結果を国立病院機構臨床検査専門職が集計し、機構本部のホームページに公開している。流行したウイルスの型別のバイアスは少ない2009/2010シーズンの各地域の流行ピークを検索し、各施設が使用していたキットの陽性割合を比較することで、現行キットの比較を行った。

B. 研究方法

国立病院機構では、平成17年10月から国立病院臨床検査技師協会の協力を得て、所属する各施設からのインフルエンザウイルス抗原検査の結果を国立病院機構臨床検査専門職が集計し、機構本部のホームページに公開している。2009/2010シーズンのインフルエンザは、全国ほぼ一律に新型インフルエンザウイルス(A/H1N1 2009)の流行となった。流行したウイルスの型別のバイアスは少ないこのシーズンの各地域の新

型インフルエンザ流行のピークを検索した。全国的な流行のピーク月の各施設のインフルエンザ迅速キットの陽性割合を抽出した。検体数が200件以上の施設の陽性割合を統計解析した。

統計方法：全国とキット毎の陽性割合の分布は記述統計量（施設数、平均、標準偏差、最小、最大）で示した。キット別の陽性割合は、キット内における各施設をプール（各施設の陽性数単純合計を分子、各施設の検査数単純合計を分母）して計算した。すべての陽性割合の信頼区間はF分布を用いた正確な方法を使用した。区間推定の信頼係数は両側95%とした。

C. 研究結果

機構本部のホームページで公開されている所属施設のある都道府県のインフルエンザ陽性割合を2009年5月から確認した。2009/2010年シーズンの陽性割合のピークは2009年11月16日～30日の11月後半であった。このシーズンで使用されたキットは13種類で、全体の45%がエスプラインでもっとも多く、次いでクイックチェイサー12%、ポクテム11%であった。採用された理由としては、性能が良い（23%）、安価である（19%）、結果が見やすい（19%）

であった。

全国的な流行のピークであった 2009 年 11 月後半時点で、検査検体数が 200 件以上あった施設の使用キット、施設数および陽性割合の平均値・標準偏差、最大値・最小値を表 1 に示す。31 施設の平均陽性割合は、 $38.93 \pm 10.50\%$ であった。

表 2 にキット毎の施設をプールした陽性割合を示す。ほとんどのキットは 35%～45%の範囲に含まれていたが、範囲は（最小，最大）26.4（クイックエイサー-FluA,B）から 48.5（キャピリア FluA+B4）で大きな差（22.1%）が見られた。

表 3 に同じキットでの施設別陽性割合を示した。臨床的にインフルエンザが疑われてキットで検査されていると考えられるが、陽性割合は、同じキットでも“ばらつき”が認められたため、陽性割合の 95%信頼区間が「施設間で重なるかどうか」で評価した。最も多く採用されていたエスプラインでは、8 施設とも相互に信頼区間が重なっており施設間の差は小さいと考えられた。キャピリアでは、長崎と山口の施設間で、ポクテムでは青森とその他 3 つの施設間で信頼区間が重なっていないことから、施設間差が認められた（倫理面への配慮）

施設名は特定できないように、都道府県名で記載するよう配慮した。

#### D. 考察

同じキットでも施設間の差が認められた要因としては、（1）地域が異なること、（2）キット検査を依頼する医師の臨床診断規準（発熱＋上気道症状など典型的な臨床症状を呈した患者のみだけでなく、非典型例を含んでいるかどうかなど）が施設毎・医師毎で異なる可能性があること（3）診断キットを使用する検査技師の手順の違いなどが考えられる。

次年度は、できるだけ同じ地域で、同じような患者背景をもつ病院を抽出して比較検討する必要がある。さらに医師からの検査依頼の基準も様々であることが予想されるため、現状を調査したいと考えている。

キット間の陽性割合の差を検討する際、陽性割合の点推定値で、施設間差が 10%～15%以上開いているものが散見された。キットの診断精度として 10%の差は許容できるかどうかとも検討する必要がある。

#### E. 結論

現行のインフルエンザ迅速診断キットの陽性割合に大きな差は認められなかったが、更なる背景因子の解析が必要である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 松井猛彦, 岩田力, 勝沼俊雄, 南部光彦, 岡田賢司, 近藤直実. 2010. 速報 新型インフルエンザ入院例に関する緊急第二次調査報告: 基礎疾患のない症例との比較—呼吸器症状を呈した症例を中心に—日本小児アレルギー学会誌 24 (1) : 155-166.
- 2) 岡田賢司. 2010. 新型インフルエンザ ワクチンとアナフィラキシー 小児科臨床 63 (6) : 1223-1229.
- 3) 岡田賢司. 2010. インフルエンザワクチンは吸入か皮下注射か、いずれがベターか 吸入療法 2 (2) 医薬ジャーナル社 : 62-67.
- 4) 岡田賢司. 2010. 新型インフルエンザ（パンデミック H1N12009）の臨床と治療（小児）PROGRESS IN MEDICINE - 新型インフルエンザの教訓と今後の対策— ライフサイエンス 30 (9) : 23-26.

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・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