

201132031A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成24 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成24（2012）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	1
小林 和夫	
II. 分担研究報告書	
IgM 抗体捕捉法による単純ヘルペスウイルス IgM 抗体の 解析と臨床応用における問題	9
川名 尚	
インフルエンザの検査診断に関する検討	13
多屋 馨子	
新型インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm) を検出する 迅速診断イムノクロマトキットの特性	17
高橋 宜聖	
ロタウイルス体外診断薬	21
岡田 賢司	
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	27
ーパルボウイルス B19 に対する抗体価の検討ー	
庵原 俊昭	
風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討	33
岡本 貴世子	
A 型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価に関する研究	37
大西 和夫	
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	41
水澤 左衛子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

# 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 23 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・第三室長)  
研究分担者 高橋 宜聖 (国立感染症研究所・免疫部・第四室長)  
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 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・第二室研究員)  
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（5 類定点）、ロタウイルス感染症（感染性胃腸炎、5 類定点）、パルボウイルス B19 感染症（伝染性紅斑、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。これら感染症の現行体外診断用医薬品の評価・問題点や新規診断薬（抗体、病原体・遺伝子検出）の開発に関し、研究を推進した。また、国際協力や協調の観点から、世界保健機関と共同し、体外診断薬の精度管理に資する E 型肝炎ウイルス (HEV) -RNA や B 型肝炎ウイルスの標準品候補を作成に参加した。

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（5 類定点）、感染性胃腸炎（5 類定点、特に、ロタウイルス感染症）、伝染性紅斑（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、横断的研究課題として、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	性器ヘルペスウイルス感染症の血清診断

- 多屋 馨子 インフルエンザ迅速診断キットの性能評価
- 高橋 宜聖 インフルエンザウイルス (A/H1N1pdm) を検出する迅速診断イムノクロマトキットの特性
- 岡田 賢司 ロタウイルス体外診断薬の性能評価
- 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ーパルボウイルス B19 に対する抗体価の検討ー
- 岡本貴世子 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討
- 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に関する研究

## B. 研究方法

### 1. IgM 抗体捕捉法による単純ヘルペスウイルス (HSV) IgM 抗体の解析と臨床応用における問題

同意の得られた患者検体から HSV を分離し、また、経時的に血清を採取した。血清抗体価の測定は IgM 抗体捕捉法および IgG 抗体間接法 (デンカ生研キット) を用いた。

### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

インフルエンザ迅速診断キット (15 キット) についてキットデバイスの最少検出感度について検討した。キットの臨床使用頻度はデータベース (ML インフルエンザ流行前線情報 DB; <http://ml-flu.children.jp>) を参照した。

2009 A/H1N1pdm ウイルスとして A/Narita/1/2009 を使用し、ホルマリン不活化全粒子で免疫したマウスから細胞融合によりハイブリドーマを作製した。Narita 株に結合し、季節性 A/H1N1 (Brisbane) 株に結合しない抗体のみを選択した。Narita 株のみに結合するハイブリドーマを限界希釈 (2 回) によりクローニングし、実験に用

いた。

### 3. ロタウイルス体外診断薬の性能評価

感染性胃腸炎患者からロタウイルス抗原陽性 (デンカ生研) 便検体を収集した。これらの検体を他の 2 キット (ロタウイルス TFB、ロタウイルス ラピッドテスト) でも評価し、3 キットを比較した。また、ウイルス遺伝子型を解析した。

### 4. 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ーパルボウイルス B19 (伝染性紅斑) に対する抗体価の検討ー

パルボウイルス B19 IgG 抗体定性試薬を用い、酵素免疫法 (EIA 法、デンカ生研) にて血清抗体価を測定した。なお、B19 血清抗体価を国際単位で表示するため、National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC、英国) から標準血清 (77.1 IU/mL) を購入した。

### 5. 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

約 30 株 (世界保健機関: WHO 標準株を含む) の存された遺伝子領域を選択し、検出 primer および probe を設計し、標準 RNA の段階希釈から検出限界を求めた。設計した primer や probe の感度や特異度を解析した。

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

感染研免疫部が保有する抗 HAV-IgM 陽性血清 (血漿) 国内検体、混合力価パネルとセロコンバージョンパネル (BBI 社) を用い、キット間で測定値乖離を認めた血清検体 (7 検体) について、RT-PCR により、HAV-RNA を増幅し、増幅遺伝子断片の塩基配列を解析した。HAV 抗原捕捉 ELISA 系の感度や特異性について、血清検体を用いて検討した。RT-PCR や HAV 特異的 IgM の測定は Inhouse 測定系を用いた。

### 7. ウイルスの体外診断薬に資する国内標準品の計画的な整備

第 4 回ゲノム増幅技術の標準化: Standardisation of Genome Amplification Techniques (SoGAT-CV) 会議 (2011 年 4

月)と WHO 生物製剤標準化に関する専門家委員会 (Expert Committee on Biological Standardization, ECBS, 2011 年 10 月) の議案書から、WHO 国際標準品と標準パネルの整備に関する最新の情報を収集した。

E 型 (HEV) や B 型 (HBV) 肝炎ウイルスに関し、WHO 国際標準品の作製や日本国内標準品候補の評価をした。

3. 第 2 次 HBV-DNA 国際標準品の更新のための WHO 国際共同研究に参加して候補品の力価を測定した。

## C. 結果

### 1. 単純ヘルペスウイルス (HSV)

初発例で 86.8% が陽性であったが、再発例でも 76.6% 陽性を示し、両者に有意差はなかった。抗体価は初発で 6.54、再発で 2.20 有意差を認めた。初発例の IgM 抗体価の推移から、IgM 抗体陰性・低値であり、潜伏 HSV の再活性化による初発例であった。

### 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 15 種類の「テストデバイス」の最少検出感度は  $10^2 \sim 10^5$  copies/test であった。A/H1N1 2009pdm 検出可能な 1 キットの最少検出感度は A 型に対しては  $10^3$  copies/test であった。統一綿棒による検体採取によるキット最少検出感度は、 $10^{3.5} \sim >10^5$  copies/test、平均  $10^{4.2}$  copies/test であった。14 キット中 9 キットの最小検出感度が  $10^4$  copies/test であった。

A/H1N1 2009pdm の迅速免疫診断キットの特異性を検証するため、使用した 2 種類のモノクローナル抗体 (NSP5、NSP23) が認識するエピトープ構造を解析した結果、両者ともにウイルス各蛋白 (NP) を認識すること、さらに、NSP5 のエピトープ構造に 53 番目のアスパラギン酸が重要な役割を果たしている

### 3. ロタウイルス体外診断薬の性能評価

22 検体 (1 歳未満 10 例、1~5 歳 11 例、6 歳以上 1 例、男児 12 例、女児 10 例) を収集した。3 キットによる検査結果が同じで

あった便は 20 検体であった。ウイルス遺伝子型では、G1P8: 13 件、G2P4: 3 件、G3P8: 3 件、G9P8: 3 件であった。結果が不一致検体の遺伝子型は全て G1P8 であった。

### 4. 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ーパルボウイルス B19 (伝染性紅斑) に対する抗体価の検討ー

B19 IgG 抗体判定試薬 (デンカ生研) は定性試薬の定量性、抗体の国際単位表示について検討した。国際標準血清 (77.1 IU/mL) を 2 倍段階希釈して、抗体価と吸光度の関係を検討すると、0.6~38.6 IU/mL まで直線性が認められた。市販強陽性血清は 21 IU/mL、弱陽性血清は 2 IU/mL に値付けられた。思春期血清および妊婦の抗体価の分布から、2 IU/mL 以上を陽性、1~2 IU/mL を判定保留、1 IU/mL 未満を陰性と定義した。B19 に対する抗体陽性率は 18~20 歳: 65.4%、17~30 歳妊婦: 66.7%、31~40 歳妊婦: 42.3%、31~40 歳妊婦は有意に低率であった。

### 5. 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

標準 RNA の感度は 10 コピー程度であり、 $10 \sim 10^6$  コピーの間で良好な直線性を示した。培養上清から抽出したウイルス RNA に対する感度は 10 plaque forming units (PFUs) であった。なお、輸入例 (2B) では 1 PFU まで検出可能であった。設計した TaqMan リアルタイム PCR 法の感度は RT-PCR 法よりも高かった。麻疹ウイルス、HHV-6、パルボウイルス B19 のウイルス核酸はすべて検出されなかった。

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

市販キット間で測定値が乖離するパネル血清から HAV ウイルス RNA を分離することができ、その VP1/2B 領域の塩基配列を決定したところ、何れも遺伝子型 I-A に分類された。この領域の塩基置換数は 12、アミノ酸置換数は 1 であり、測定値乖離 2 株は近縁であった。抗 HAV-IgM を検出する際に用いられる不活化 HAV 粒子の差異が測定値

乖離の原因と考えられた。

## 7. ウイルスの体外診断薬に資する国内標準品の計画的な整備

HBV や HEV-RNA 国際標準品が承認された。国立感染症研究所は体外診断薬委員会を通じて国際標準品等の作製のための国際共同研究に参加する体制を整備してきた。HEV-RNA の WHO 国際標準品と日本国内標準品を Paul Ehrlich 研究所 (PEI) と国立感染症研究所で共同して作製し、力価を測定した。力価 250,000 IU/mL の HEV-RNA 国際標準品 (code 6329/10) が制定された。また、国内標準品候補品の品質・力価が国際標準品と同等であることが示された。HBV-DNA 国際標準品 (code 10/264) : 力価 850,000 IU/mL が制定された。

## D. 考察

### 1. 単純ヘルペスウイルス (HSV) IgM 抗体捕捉法の評価

性器ヘルペスウイルス感染症の初発には初感染と非初感染例があり複雑な感染病態を示すため、IgM 抗体価と IgG 抗体価の両者の評価が必要である。

### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

標準ウイルス液を用いた結果ではあるが、「テストデバイス」の最小検出感度は  $10^2 \sim 10^5$  copies/test であり、キット間の性能格差 (最大  $10^3$ ) が臨床診断に与える影響を考慮すべきである。統一綿棒を用いて行った、14 キットのキット最少検出感度は  $10^{3.5} \sim >10^5$  copies/test であり、内 11 キットにおいて、 $10^4$  copies 以上で検出可能であった。採取 (鼻腔や咽頭スワブ) されたウイルス量で  $10^4$  copies 以上の場合、殆どの臨床医がインフルエンザウイルス抗原陽性と診断していると考えられる。

A/H1N1pdm ウイルスと他の H1N1 ウイルスを鑑別することが可能な免疫クロマトグラフィーキットを開発することに成功した。本キットで使用されている抗体は、従来のキットと同様、NP タンパクを認識した。さらに、1つの抗体は、53 番目のアスパラ

ギン酸がエピトープ構造に重要な役割を果たすことが明らかとなった。53 番目がアスパラギン酸である NP タンパクは、データベース上、A/H1N1pdm にしか存在していない。この結果は、本キットの特異性を支持するものである。

### 3. ロタウイルス体外診断薬の性能評価

国内で使用されているロタウイルス迅速診断キットを同じ便検体を用いて比較検討した。感度に大きな差は認められず、どのキットも有用と考えられる。抗体の抗原はロタウイルス栄研が G1-G3、ロタウイルスラピッドテストが G1-G4、G6 である。キットの結果が一致しなかった検体の遺伝子型は 2 件とも G1P8 であった。

### 4. 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

血清抗体価は、ワクチン予防可能疾患ではワクチン接種基準に用いられ、ワクチンで予防できない疾患では陰性者に対する感染予防対策が図られるなど、感染症対策に重要な役割を果たしている。今回、わが国で市販されているパルボウイルス B19 の血清抗体測定法である、パルボウイルス B19 IgG 抗体判定試薬の定量性や B19 の血清疫学について検討し、0.6 IU/mL から 38.6 IU/mL の間では定量性があると判断した。標準血清の直線性の検討から、0.6 IU/mL までは抗体があると考えられる。しかし、抗体価の分布をみると、思春期群、妊婦群ともに 2 IU/mL 未満と 16 IU/mL 以上に 2 峰性の山があるパターンを示した。この抗体価の分布から、パルボウイルス B19 抗体判定試薬で測定された抗体の判定基準を、2 IU/mL 以上を陽性、1~2 IU/mL を判定保留、1 IU/mL 未満を陰性とするのが妥当と判断した。

この基準を用いて、思春期および 17 歳~40 歳妊婦のパルボウイルス B19 に対する血清疫学を検討したところ、31~40 歳妊婦の血清抗体陽性率は 42.3% と、他の 2 群と比較し有意に低率であった。パルボウイルス B19 は妊婦に感染すると、母体に感染したウイルスが胎児に感染し、児は胎児水腫を

発症し死亡することが知られている。今回の血清疫学の結果から、31~40歳の方が妊娠したとき、パルボウイルス B19 感染を受けないよう注意することが大切であることが示された。

最後に、移行抗体について検討した。一般にウイルス抗体は、母親の抗体よりも 20~50%濃縮して移行する。パルボウイルス B19 に対する抗体は、他のウイルスに対する抗体と同様に IgG<sub>1</sub> 画分に属しているので、効率的に移行すると考えられている。今回の検討結果は、この考えを支持するものであり、母体よりも 1.17 倍濃縮して児に移行していた。

#### 5. 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

検査機関による風疹ウイルス感染の確認は血清 IgM 抗体価の測定、あるいは、対血清 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、また、ウイルスゲノムの検出は血清診断ほど一般化されていない。しかし、ウイルスゲノムの検出は 1) 発症初期においては血清 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) 咽頭拭い液または尿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) 評価は定まっていないが、先天性風疹症候群 (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。本年度は TaqMan リアルタイム PCR 法による新しい検出条件を設定し感度、特異性等を比較した。その結果、今回用いた genotype においては RT-PCR 法よりも優れていることが示された。genotype 2B の分離が数例報告されており、本方法はこの genotype も感度よく検出できたことから、今後の実験室病原体診断に有用であると考えられる。

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

キット間の HAV-IgM 測定値乖離の原因は

各キットで使用される不活化 HAV 粒子の差異である可能性が高く、限定したエピトープの差異によると予想される。HAV の血清型は 1 つであることから、HAV の主要エピトープの構造を解明することが必要である。HAV の主要エピトープの構造をより深く理解すれば、HAV の新規流行株に対する検出キットの性能を事前に評価することも将来的には可能になると考える。2010 年春に一過性に増加した国内での急性 A 型肝炎の集団感染において、分子疫学的調査から HAV 株は大きく 3 群に分類されることが示された。すなわち、日本に比較的古くから存在する 1A-1 型、最近フィリピンから由来した 1A-2 型、韓国から由来した 3A 型である。これらの株に対する上市抗 HAV 抗体検出キットの検出性能を監視することが必要であり、それと平行して、HAV 主要エピトープの変化を把握することが HAV 抗原検出技術の科学的根拠の理解に貢献すると考える。

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、ウイルス血症を捉えることが可能な感度である。また、蛍光試薬を検出系に用いることにより感度を約 10 倍上げることが出来る。今回、測定検体の数を増やして検出系の感度と特異性を検討した。その結果、無視できない偽陽性と偽陰性反応があり、重要な問題点 (使用したモノクローナル抗体の親和性、エピトープの不一致、検体中の抗原抗体複合体や可溶性 HAV 受容体) が浮上した。これらの原因について検討しており、免疫学的抗原捕捉検出系の実用化に向けた研究を続ける。

#### 7. 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

WHO-ECBS により、HBV や HEV-RNA 国際標準品が承認された。標準の制定に国立感染症研究所も関与していた。今後、国際標準品を用い、体外診断用医薬品の適切な性能評価が期待される。

## E. 結論

### 1. 単純ヘルペスウイルス (HSV) IgM 抗体捕捉法の評価

性器ヘルペスウイルス感染症の血清診断として、IgM 抗体価と IgG 抗体価の両者の評価が必要である。

### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

多くの臨床現場において、採取した臨床検体中に、 $10^4$  copies 以上のウイルス量が認められた場合に、インフルエンザウイルス抗原陽性と判定されていると考えられた。

A/H1N1pdm と季節性ウイルスを鑑別する迅速診断キットを開発し、本キットで使用する抗体のエピトープ構造を解析した。

### 3. ロタウイルス体外診断薬の性能評価

国内で使用されているロタウイルス迅速診断キットを同じ便検体を用いて直接比較検討した。感度に大きな差は認められず、どのキットも有用と考えられる。

### 4. 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

わが国で市販されているパルボウイルス B19 抗体判定試薬は 0.6 IU/mL から 38.6 IU/mL の間で定量性が認められた。思春期や妊婦の抗体価の分布から、1 IU/mL 未満を陰性、1~2 IU/mL を判定保留、2 IU/mL 以上を陽性とするのが妥当と判断した。また、血清疫学の検討から、31~40 歳女性は抗体陽性率が低く、この年齢群の妊婦はパルボウイルス B19 感染のハイリスク群と思われた。

### 5. 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

風疹ウイルス遺伝子検出 TaqMan リアルタイム PCR 法を作製した。本法は従来の RT-PCR 法よりも感度が高く、臨床検体由来の夾雑物の影響も受けにくいことから、今後実験室診断の選択肢の 1 つとして利用できると考えられる。

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

新規流行 HAV 株に対する市販各診断キットの検出感度が異なる可能性を示唆し、今

後、この点を監視する必要がある。また、新規診断技術として構築した免疫学的 HAV 抗原測定法の特異性についても検討した。

### 7. 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

WHO-ECBS により、HBV や HEV-RNA 国際標準品が承認された。標準の制定に国立感染症研究所も関与していた。今後、国際標準品を用い、体外診断用医薬品の適切な性能評価が期待される。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 川名 尚、小島俊行編. 2011. 『母子感染』金原出版. 357.
- 2) 川名 尚. 2011. 性感染症の診断と治療 Update I. 主な感染症と母子感染 2. 性器ヘルペスと単純ヘルペスウイルスの母子感染—産婦人科医の立場から—小児科臨床. 64: 347-360.
- 3) 川名 尚. 2011. 特集 母体感染症 up to date 単純ヘルペスウイルス. 周産期医学 41: 189-194.
- 4) Harada, Y., Ninomiya-Mori, A., Takahashi, Y., Shirakura, M., Kishida, N., Kageyama, T., Tada, Y., Tashiro, M., Odagiri, T. 2011. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. Vaccine 29: 8330-8337.
- 5) Fujii, H., Ato, M., Takahashi, Y., Otake, K., Hashimoto, S., Kaji, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Fujita, M., Adachi, A., Nayakaya, T., Taniguchi, M., Koyasu, S., Takemori, T. 2011. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. Int. Immunol. 23: 433-441.

- 6) 高橋宜聖、小野寺大志、小林和夫. 2011. 「ウイルス感染局所における記憶B細胞応答」実験医学増刊、29: 81-86.
  - 7) 庵原俊昭. 2011. ウイルス感染症の血清診断は、HI法、CF法、NT法、EIA法、どれがいいの？尾内一信編、小児の感染症診断の落とし穴. 南江堂、東京、56-58.
  - 8) 庵原俊昭. 2011. 症に感染症の診断. 岡部信彦編、小児感染症学、診断と治療社、東京、19-23.
  - 9) 庵原俊昭. 2011. 抗体検査：目的、結果、次にすることは. 小児感染免疫 23: 89-95.
  - 10) 庵原俊昭. 2011. 麻疹、風疹、水痘、ムンプスの患者に接触したときの感染予防措置はどうすればよいですか. 小児内科 43: s559-s601.
  - 11) Otsuki N, Abo H, Kubota T, Mori Y, Umino Y, Okamoto K, Takeda M, Komase K. 2011. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes. Vaccine 29: 1863-1873.
2. 学会発表
- 1) 小林和夫. 2011. 感染症における宿主免疫応答と橋渡し研究 (Workshop 7 感染症、免疫不全・免疫異常症). 日臨免誌、34: 268. 2011. 第39回日本臨床免疫学会総会 (東京、9月).
  - 2) 川名 尚、西澤美香、西井 修. 2011. IgM抗体の評価について. 第29回日本産婦人科感染症研究会 (倉敷、6月).
  - 3) 川名 尚、土屋裕子、西澤美香、西井修. 2011. 性器ヘルペスの実験室診断. 第29回日本産婦人科感染症研究会 (倉敷、6月).
  - 4) 土屋裕子、川名 尚、西澤美香、西井修. 2011. トキソプラズマIgM抗体陽性妊婦のAvidity Indexを用いた管理. 第29回日本産婦人科感染症研究会 (倉敷、6月).
  - 5) 川名 尚、西澤美香. 2011. IgM捕捉法による単純ヘルペスウイルスIgM抗体検出EIAキットの検討. 第52回日本臨床ウイルス学会 (三重、6月).
  - 6) 西澤美香、川名 尚. 2011. Dithiothreitol (DTT)を用いたIgM抗体の同定に関する研究. 第52回日本臨床ウイルス学会 (三重、6月).
  - 7) 荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、岡部信彦. 2011. インフルエンザ迅速診断キットのA (H1N1) pdm09に対する検出感度の比較検討. 第43回日本小児感染症学会学術集会. (岡山、10月).
  - 8) Takahashi, Y. 2011. 「Protective memory B cell responses to influenza virus infection」(シンポジウム、招待講演) 第40回日本免疫学会学術総会 (千葉、11月).
  - 9) Onodera, T., Aizawa, R., Hosono, A., Kaminogawa, S., Kobayashi, K., Takahashi, Y. 2011. 「Role of Toll-like receptor signaling for the development and reactivation of virus-specific memory B cells」第40回日本免疫学会学術総会 (千葉、11月).
  - 10) Yokoi, Y., Onodera, T., Hachimura, S., Ato, M., Kobayashi, K., Takahashi, Y. 2011. 「Localization and reactivation of virus-specific memory B cells at the site of virus infection」第40回日本免疫学会学術総会 (千葉、11月).
  - 11) 庵原俊昭. 2011. ワクチンによる職員の感染予防対策—MMRVワクチンとインフルエンザワクチン. 第65回国立病院総合医学会 (岡山、10月).
  - 12) 庵原俊昭、菅 秀、浅田和豊、一見良司. 2011. 思春期のサイトメガロウイルス(CMV)抗体保有率の検討. 第15回東海小児感染症研究会 (名古屋、10月).
  - 13) 庵原俊昭、菅 秀、浅田和豊、落合 仁、二井立恵、伊佐地真知子. 2011. 各種抗体測定方法による水痘抗体価の互換性の検討. 第43回日本小児感染症学会 (岡山、10月).
  - 14) Mori, Y., K. Okamoto, M. Sakata, N.

- Otsuki, H. Abo, M. Takeda. 2011. The plasma membrane is the genome replication site for rubella virus. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress(札幌、9月).
- 15) Sakata, M., **K. Okamoto**, N. Otsuki, H. Abo, M. Takeda, Y. Mori. 2011. The short N-terminal region of the rubella virus capsid protein critical to co-localize with the nonstructural P150 protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月) .
- 16) Otsuki, N., M. Sakata, **K. Okamoto**, K. Fujii, H. Abo, K. Kanou, K. Komase, M. Takeda, Y. Mori. 2011. Molecular mechanisms of the temperature-sensitive phenotype of live attenuated Japanese rubella vaccines. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月) .
- 17) 望月康子、傅舟一、小林和夫、**大西和夫**. 2011. A型肝炎ウイルス特異的抗体産生B細胞の動態解析. 第40回日本免疫学会学術総会(千葉、11月)
- 18) Baylis, S., **S. Mizusawa**, Y. Okada, C. M. Nubling, K.-M. Hansmann. 2011 Laboratory performance for hepatitis E virus RNA detection and development of a WHO International Standard. 14<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira, September. (ポルトガル共和国、マデイラ、9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

IgM 抗体捕捉法による単純ヘルペスウイルス IgM 抗体の解析と臨床応用における問題

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）  
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 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

性器ヘルペスの血清診断における IgM 分画の抗体の意義について検討した。単純ヘルペスウイルスを分離同定して診断した性器ヘルペス患者 初発 91 例（HSV-1 50 例、HSV-2 41 例） 再発 47 例（HSV-1 11 例、HSV-2 36 例）より経時的に 1~6 回（平均 3 回）血清を得て IgM 抗体（IgM 捕捉法）を測定した。

初発例で 86.8%が陽性であったが再発例でも 76.6%陽性となり有意差はみられなかった。しかし、抗体値をみると初発では平均 6.54、再発では平均 2.20 と有意に低く診断に役立つ可能性があった。初発例の IgM 抗体の推移には三つのパターンがみられた。その中の一つのパターンは IgM 抗体が検出されないか低値であった。これらは潜伏していた HSV の再活性化による非初感染初発例であった。性器ヘルペスの初発には初感染と非初感染例があり複雑な感染病態であるので IgM 抗体だけでなく定量的な評価と IgG 抗体の組み合わせが一つの答えになる。

次に妊婦における風疹感染は奇形児の発症率が高いため不顕性風疹感染を検出するため風疹に対する IgM 抗体の検出が行われている。この際現在定性的に判断しているがこの判断が臨床の現場に混乱を招いている。

IgM 抗体の評価に定量性を導入することがより正しい臨床的な評価につながると思われる。

A. 研究目的

性器ヘルペスを思わせる病変がみられる時、現状では精度の高い病原診断がないため血清診断が用いられる。この際用いるキットが臨床的に使い勝手のよいものを作る必要がある。現在用いているキットが臨床的に有意義であるかを検証しつつ問題点を明らかにする。

性器ヘルペスの原因となる単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）又は 2 型（HSV-2）は初感染の後潜伏感染し生涯慢性持続感

染が続く。そして時々再活性化して発症する。臨床的には初発と再発に分けられる。初発には初感染初発と非初感染初発がある。一方単純ヘルペスには無症候性感染者が多いため性器に病変を有する患者について血清抗体が陽性だからといって当該病変を HSV 感染と断定はできない。一般にあるウイルスに対する IgM 抗体は感染初期に検出されることから検出された場合は当該症状や病変はそのウイルスの感染によると診断され検出されなければそ

うでないとされる。性器ヘルペスは前述のような複雑な感染病態を有するのでこのような基準が単純には当てはまらない。そこで本研究では HSV を分離して性器ヘルペスと診断した患者について初発と再発に分けこれらの例がどのような IgM・IgG 抗体の推移を示すかを調べ、免疫グロブリン別抗体の検出による診断の精度について検討した。

次に IgM 抗体の検出は最近の感染の指標の判断に用いられているが妊婦に風疹、サイトメガロウイルス、トキソプラズマの IgM 抗体が検出されると初感染と診断され先天異常児の発生のおそれがあるとされ医師や妊婦にとって大きな問題となる。しかし、IgM 抗体の測定法や感度についての議論がされて来ていないため臨床的な評価が必ずしも正しくない。この点についても言及したい。

## B. 研究方法

### 1) 血清

(1) 性器ヘルペスウイルス感染症患者：HSV を R-66 細胞を用いて分離し、HSV に対するモノクローナル抗体（デンカ生研）にて同定と型の決定を行って性器ヘルペスと診断した患者から初診時から 70 病日の間に経時的に 1~6 回（平均 3 回）血清を得た。

初発 HSV-1 50 例、HSV-2 41 例、計 91 例  
再発 HSV-1 11 例、HSV-2 36 例、計 47 例

(2) 同意を得た 20 才前後の学生 366 例

### 2) 抗体検出法

IgM：IgM 抗体捕捉法（デンカ生研キット）カットオフ 1.20

IgG：IgG 抗体間接法（デンカ生研キット）カットオフ 4.0

陽性のカットオフ値は添付文書によった。

## C. 研究結果

a) IgM 抗体陽性率：同一症例で複数回検出した時、最高値を採用した。

初発例では HSV-1 感染 88.0%、HSV-2 感染 85.4%、合計 86.8%であったのに対し、

再発例では HSV-1 感染 63.6%、HSV-2 感染 80.6%、合計 76.6%であり有意差はみられなかった。学生では 7.1%と低かった。

b) IgM 抗体値の分布：抗体値は以下のように分布した。

HSV-1 感染 初発 0.66~12.22 平均 6.73  
再発 0.91~2.48 平均 1.51

HSV-2 感染 初発 0.57~13.41 平均 6.36  
再発 0.64~10.83 平均 2.80

学生 1.31~4.82 平均 2.30  
抗体値の平均でみると初発例は再発や学生に比べると有意に高いが初発例の中にも陰性例や低値を示すものもみられた。

c) 初発例の IgM 抗体推移パターン

初発例について経時的に IgM 抗体値の推移を調べた所三つのパターンに分けられた。

パターン A：陰性から急上昇する。IgG 抗体も陰性から陽転する。

パターン B：初診時から高い値。IgG 抗体も初診時から中程度陽性でその値はあまり変わらない。

パターン C：陰性で推移する。IgG 抗体が中程度から急激に上昇する。

その解釈としてパターン A は初感染、パターン B は初感染で受診日がおくれたものか活動性の HSV のある場合、パターン C は既感染の HSV が再活性したものと考えられる。今回の初発の症例では A が 60% B が 18%、C が 22%であった。初発の中の約 20%は IgM 抗体は検出されないと考えられる。

d) IgM 抗体判定保留例

今回の検討において判定保留域に入った例が HSV-1 感染例 14.3%、HSV-2 感染例 11.7%、学生 15.0%あった。

e) 妊婦の風疹 IgM 抗体陽性例の解析  
妊婦の風疹 IgM 抗体陽性例は初感染の疑いがあるため当科にコンサルトした例が 34 例あった。抗体価は 1.24~11.00<（平均 2.84）に分布した。これらの血清について Avidity Index を調べた所全例が 40%以

上となり 4 ヶ月以上前の感染と診断された。

#### D. 考察

性器ヘルペス初発例では IgM 抗体が 86.8%に、再発例では 76.6%が陽性となり高率に再発例でも陽性となり初感染の診断は不可能であった。ただ抗体値の平均は前者 6.54、後者が 2.20 と有意に低い傾向があった。定量的な評価も考慮するとよいのではないか。

初発例の IgM 抗体の推移には三つのパターンがありその中でも非初感染初発例では IgM 抗体は陰性か低値を示し IgM 抗体の検出による診断は難しい。このパターンは初発の 20%を占めた。ただ IgG 抗体の推移を考慮に入れると三つのパターンが分けられ診断に貢献できるようである。

IgM 抗体の判定保留例が約 15%にみられたが検査結果が判定保留になると臨床では患者の取り扱いに大変苦慮するのでこれをなるべく減らすようにキットの改善を希望する。

現在 IgM 抗体検出には感度が良く、間接法のようなリユーマチ因子の問題がないため IgM 捕捉法が汎用されている。この方法は感度が良く微量の IgM 抗体をも検出してしまいう上に定性的に判断することになっているため感染の時期の判断に用いる際に混乱が生じている。風疹の場合、胎児の奇形をおそれて IgM 抗体陽性のため無用の中絶をすることもある。IgM 抗体の定量的評価を導入すると共に IgG 抗体の同時測定はこれらの問題を一部解決できると考えられる。

#### E. 結論

単純ヘルペスウイルス感染を定性的 IgM 抗体のみで診断することは難しい。これに対して定量的な判断の導入や IgG 抗体の同時測定が診断の精度の上昇に貢献すると思われる。判定保留域を減らすようキットの改良が求められる。妊婦における IgM 抗体の評価に IgM 値の定量的評価と

IgG 抗体の同時測定が臨床的判断に貢献できるであろう。

#### G. 研究発表

##### 1. 書籍

1) 川名 尚,小島俊行編.2011.『母子感染』金原出版.357p.

##### 2. 論文発表

1) 川名 尚.2011.性感染症の診断と治療 Update I .主な感染症と母子感染 2.性器ヘルペスと単純ヘルペスウイルスの母子感染—産婦人科医の立場から—小児科臨床.64(3):347-360.

2) 川名 尚.2011.特集 母体感染症 up to date 単純ヘルペスウイルス.周産期医学 41(2):189-194.

##### 3. 学会発表

1) 川名 尚、西澤美香、西井修.2011.IgM 抗体の評価について.第 29 回日本産婦人科感染症研究会(倉敷、6月) .

2) 川名 尚、土屋裕子、西澤美香、西井修.2011.性器ヘルペスの実験室診断.第 29 回日本産婦人科感染症研究会(倉敷、6月) .

3) 土屋裕子、川名 尚、西澤美香、西井修.2011.トキソプラズマ IgM 抗体陽性妊婦の Avidity Index を用いた管理.第 29 回日本産婦人科感染症研究会(倉敷、6月) .

4) 川名 尚、西澤美香.2011.IgM 捕捉法による単純ヘルペスウイルス IgM 抗体検出 EIA キットの検討.第 52 回日本臨床ウイルス学会(三重、6月) .

5) 西澤美香、川名 尚. 2011 . Dithiothreitol (DTT) を用いた IgM 抗体の同定に関する研究.第 52 回日本臨床ウイルス学会(三重、6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うものである。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、本研究においては、2009/10 シーズンの流行株である A (H1N1) pdm09 ウイルスを用いて、各キットデバイスの最少検出感度および検体溶出容器と溶出液を含めたキットとしての最少検出感度等について検討を行った。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

2009/10 および 2010/11 シーズンに臨床現場で多く用いられたインフルエンザ迅速診断キット 12 キットおよび 2011/12 シーズンにおいて新たに用いられるようになった 3 キットを加えた、計 15 キットについてキットデバイスの最少検出感度について検討した。

診断キットの臨床現場での使用頻度はデータベース（ML インフルエンザ流行前線情報 DB; <http://mL-flu.children.jp>）を参照した。

検討対象としたキットは、{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)}、スタートマーク<sup>™</sup> FLU スティック AB{(株)ニチレイバイオサイエンス}クイックナビ<sup>™</sup>-Flu {デンカ生研(株)}、イムノエース Flu{(株)タウンズ}クリアライン Influenza A/B (H1N1)2009{アリーアメディカル(株)}である。

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、A、B型別検出が可能である。また、2011年に発売となった1キットはA、B型別に加え、A(H1N1)pdm09の鑑別が可能とされている。

キットの構成はいずれも、「テストデバイス」、「検体採取用綿棒」、「検体溶出用チューブ」および「検体溶出液」からなっていた。

「テストデバイス」の最少検出感度試験は前年度と同様の方法で行った。

本年度は「テストデバイス」の最少検出感度試験に加え、その他の要因についても比較検討を行うことを目的として、各キットに添付されている「テストデバイス」、「検体溶出用チューブ」、「検体溶出液」を一セット（仕様）として、比較検討を行った。

「テストデバイス」、「検体溶出用チューブ」、「検体溶出液」を一セット（仕様）として検討した際の最少検出感度を“キット最少検出感度”とし、上記キットについて検討した。但しポクテム<sup>®</sup>インフルエンザ A/B は発売中止となったため対象外とした。キット最少検出感度は、臨床における検査を模しておこなった。すなわち、一定量に希釈したウイルス抗原を 96well U 型マイクロプレートに 30  $\mu$  l /well 滴下し、これを検体採取用綿棒（球部組成：綿 50%、レーヨン 50%）で採取後、各キット仕様の検体処理および測定法により検出した。デバイス最少検出感度試験およびキット最少検出感度試験ともに、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た。

#### 倫理面への配慮

A/California/7/2009 [A (H1N1) pdm09 亜型] 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。臨床検体は用いていない。

#### C. 研究結果

A/California/07/2009pdm 株に対する 15 種類の「テストデバイス」の最少検出感度は  $10^2 \sim 10^5$  copies /test、幾何平均  $10^{2.8}$  copies/test であった。A(H1N1)pdm09 の検出も可能である 1 キットの最少検出感度は A 型に対しては  $10^3$  copies/test であったが、A(H1N1)亜型に対しては  $10^5$  copies/test であった。

統一綿棒による検体採取によって行った、キット最少検出感度は、 $10^{3.5} \sim >10^5$  copies/ test、幾何平均  $10^{4.2}$  copies/ test ( $>10^5$  は  $10^{5.5}$  として算出) であった。14 キット中 9 キットの最小検出感度が  $10^4$  copies/ test であり、これを含む 11 キットにおいては、 $10^4$  copies 以上のウイルス量があれば検出可能であった。

各「テストデバイス」の最少検出感度、デバイスへの添加液量および溶出液量から、計算上のキット最少検出感度（綿棒による検体のロスがない値）を算出した。実験上キット最少検出感度は  $10^{2.9} \sim >10^{5.5}$  copies/test であった。各キットにおける実験値と計算値の差が最も少なかったキットの検体溶出容器は、ソフトプラスチック製で綿球部の圧迫の容易な形状のものであった。また、計算値との差が最も大きかったキットの検体溶出容器はガラス製であった。

#### D. 考察

「テストデバイス」の最小検出感度は  $10^2 \sim 10^5$  copies/test であり、キット間の差は最大  $10^3$  と大きかった。亜型診断も可能である 1 キットにおいて、A(H1N1)pdm09 に対する最少検出感度は  $10^5$  copies/test であったが、A 型に対するキットデバイスの最少検出感度は  $10^3$  であり、 $10^2$  の差があった。ウイルス量が  $<10^5$  copies であった場合、それが例えば A(H1N1)pdm09 であったとしても、A 型が陽性で A(H1N1)pdm09 が陰性となることから、AH3N2 亜型と誤って判断される可能性が示唆された。2011/12 シーズンの流

行の中心はAH3N2 亜型と一部B型であり、A(H1N1) pdm09 ウイルスの検出は極めて少なかったことから、幸い上記の感度の差は、臨床現場において、問題にならなかったと考えられる。本研究において参照したデータベース (ML インフルエンザ流行前線情報 DB; <http://mL-flu.children.jp>) によると、臨床現場におけるこのキットの使用頻度は比較的高かった。

統一綿棒を用いて行った、14キットのキット最少検出感度は  $10^{3.5} \sim >10^5$  copies/test であり、内11キットにおいては、 $10^4$  copies 以上のウイルス量があれば検出可能であった。上記データベースにおける臨床医のキット使用割合と、本研究結果のキット最少検出感度を併せて検討すると、90%以上の臨床医が、採取されたウイルス量が  $10^4$  copies 以上の場合に、インフルエンザウイルス抗原陽性と診断していることになる。

綿棒から検体溶出液へ検体溶出時における検体溶出効率について検討するため、キットデバイス最少検出感度から計算上のキット最少検出感度 (綿棒による検体ロスが無い場合) を算出し、実験によるキット最少検出感度と比較した。多くのキットにおいて検体溶出液成分は表示されていないため、検体溶出容器の素材と形状で比較したところ、ガラス製の検体溶出容器において、検体のロスが大きい結果となった。綿球部の圧迫が不可能なことが理由と考えられる。この結果は昨年度プラスミドを用いて行った検体溶出容器の比較検討結果を裏付けるものであった。

## E. 結論

今回検討対象とした15キットにおけるA/California/7/2009 [A (H1N1) pdm09 亜型] 株に対するテストデバイスの最小検出感度は、 $10^2 \sim 10^5$  copies/test であり、キット間で最大  $10^3$  の差があった。統一綿棒を用いて行った、各キット最少検出感度は  $10^{3.5} \sim >10^5$  copies/test であった。多くの臨床現場において、採取した臨床検体中に、

$10^4$  copies 以上のウイルス量が認められた場合に、インフルエンザウイルス抗原陽性と診断されていると考えられた。

## G. 研究発表

1. 論文発表 なし

## 2. 学会発表

1) 荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、岡部信彦. 2011. インフルエンザ迅速診断キットのA(H1N1) pdm09に対する検出感度の比較検討. 第43回日本小児感染症学会学術集会. (岡山, 10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