

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

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

研究分担者 高橋 宜聖（国立感染症研究所・免疫部）
研究協力者 小林 和夫（国立感染症研究所・免疫部）
研究協力者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部）
研究協力者 稲野 浩一（デンカ生研株式会社）

研究要旨

新型インフルエンザウイルス（2009 A/H1N1pdm）に特異的に結合するマウスモノクローナル抗体を作製し、これを利用した迅速・簡便診断キットを開発した（検査所要時間：約10分）。本キットの特異性を検証するため、キットに使用した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、どちらも NP タンパクを認識すること、さらに、NSP5 のエピトープ構造には、53 番目のアスパラギン酸が重要な役割を果たしていることを明らかにした。

A. 研究目的

新型インフルエンザウイルス（2009 A/H1N1pdm）と他の A/H1N1 ウイルスを鑑別することが可能な迅速診断キットの特異性を明らかにするため、キットに使用したマウスモノクローナル抗体のエピトープ構造を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 新型インフルエンザウイルス（2009 A/H1N1pdm）に結合するマウスモノクローナル抗体の作製

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を免疫した BALB/c 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 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、以後の実験に用いた。

(2) ELISA による抗体特異性の検証

哺乳動物細胞株あるいはバキュロウイルス発現系にて Narita 株や PR8 (H1N1)株の組換え NP タンパクを作製した。rNP タンパクを ELISA プレートにコーティングし、1% BSA でブロッキング後、段階希釈した NSP5、NSP23 抗体を加え、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG 抗体で検出した。

倫理面への配慮

病原体を使用する実験は、国立感染症研究所 戸山庁舎高度安全実験施設において、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に従い実施した。動物実験は、動物実験委員会規程に従い、動物実験委員会の承認を得てから行った。

C. 研究結果

(1) 新型インフルエンザウイルスに結合するマウスモノクローナル抗体（NSP5、NSP23）の作製

Narita 株に結合し、他の H1N1 株には結合

しない23種類のモノクローナル抗体を用い、迅速診断キットのプラットホーム上で検出感度と特異性の確認を行った。その結果、NSP5 と NSP23 の組み合わせにより、A/H1N1pdm ウイルスの特異的かつ高感度な検出が可能となった。

(2) NSP5 と NSP23 が結合するウイルスタンパクの同定

293T 細胞株にて作製した、Narita 株由来、あるいは PR8 株 (H1N1) 由来の組換え NP タンパクを用い、NSP5 と NSP23 の結合性を調べた結果、どちらの抗体も Narita 株由来の rNP タンパクに特異的に結合することが明らかとなった。

(3) NP タンパクに含まれるエピトープ構造の解析

Narita 株と PR8 株の NP タンパクでは、28 個のアミノ酸配列が異なる。どのアミノ酸配列がエピトープ構造に重要かを明らかにするため、NP タンパクの N 末 1-100 番目を含む rNP タンパクを作製し、結合性を解析した。その結果、NSP5 は、この N 末領域に結合することが明らかとなった。さらに、Narita 株に特有の 53 番目のアスパラギン酸を、PR8 株で使用されているグルタミン酸に変換した変異 NP タンパクでは、NSP5 の結合性が減弱することから、53 番目のアスパラギン酸が NSP5 のエピトープ構造に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*, Sep 10. [Epub ahead of print]
- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 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).
- 2) 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).

- 3) 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）.

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

ロタウイルス体外診断薬

研究分担者	岡田 賢司	（国立病院機構福岡病院）
研究協力者	内田 彩加	（国立病院機構福岡病院・検査科）
研究協力者	師岡 津代子	（国立病院機構福岡病院・検査科）
研究協力者	西浦 明彦	（国立病院機構福岡病院・検査科）
研究協力者	石橋 哲也	（福岡県保健環境研究所）
研究協力者	千々和 勝己	（福岡県保健環境研究所）

研究要旨

国内で広く利用されているロタウイルス迅速診断キットの比較を同じ便検体を用いて行った。さらにロタウイルスの血清型および系統樹解析を行った。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。

A. 研究の目的

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。今年度は、国内で広く利用されているロタウイルス迅速診断の比較を行った。さらに同じ便検体からロタウイルスの遺伝子型の決定、および系統樹解析を行った。

B. 研究方法

2011年2月～5月当院小児科に感染性胃腸炎で受診した患者の便からロタウイルス抗原が迅速診断キット（ロタウイルス 栄研）で陽性となった便検体を保存した。流行期が終了後、他の2キット（ロタウイルス TFB およびロタウイルス ラピッドテスト）でも、キットの検査様式に従って検査を行い、3キットを比較した。

同じ便検体について、福岡県保健環境研究所で、ロタウイルス VP7 領域と VP4 領域を標的とした RT-PCR を行った。VP7 領域は Beg-9/VP7-1 プライマーを、VP4 領域は con3/con2 プライマーを用いて RT-PCR を行い、増幅した産物については、さらに

ダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、それぞれの遺伝子型を BLAST 検索の結果により同定した。また、VP7 については 22 件全て、VP4 については解析可能であった 16 件について系統樹解析を行った。

C. 結果

2月3件、3月5件、4月11件、5月3件の合計 22 検体の検査を行った（表 1）。患児の年齢は、1歳未満 10例、1～5歳 11例、6歳以上 1例、男女別では男児 12例、女児 10例であった。

22 検体中 3 キットの結果が同じであった便は、20 検体であった。

22 検体の遺伝子型を表 1 に示す。G1P8 が 13 件、G2P4 が 3 件、G3P8 が 3 件、G9P8 が 3 件と様々な遺伝子型が認められた。3 キットの結果が一致しなかった検体の遺伝子型はいずれも G1P8 であった。

系統樹解析の結果を図 1、図 2 に示す。G1P8 のうち 5 件 (R70,71,72,79,80) と 2 件 (R65,67)、G2P4 のうち 2 件 (R61,63) は、解析した部分の遺伝子の塩基配列が完全に一致していた。

D. 考察

現在、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。

キットの添付文書では、使用されている抗体はロタウイルス栄研が G1,G2,G3、ロタウイルスラピッドテストが G1,G2, G3, G4, G6 となっている。3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。

E. 結論

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。

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

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. ロタウイルス迅速診断3キットの比較とロタウイルス血清型

検体番号	検査日 (2011年)	年齢	性別	ロタウイルス TFB	ロタウイルス 栄研	ロタウイルス フレッドテスト	遺伝子型
R59	2月18日	5	M	陽性	陽性	陽性	G1P8
R60	2月19日	11か月	F	陽性	陽性	陽性	G1P8
R61	2月25日	2	M	陽性	陽性	陽性	G2P4
R62	3月7日	5	M	陽性	陽性	陽性	G2P4
R63	3月9日	1	M	陽性	陽性	陽性	G2P4
R64	3月18日	2	M	陽性	陽性	陽性	G9P8
R65	3月22日	1	F	陽性	陽性	陽性	G1P8
R66	3月24日	2	F	陽性	陽性	陽性	G9P8
R67	4月8日	1	M	陽性	陽性	陽性	G1P8
R68	4月11日	1	F	陽性	陽性	陽性	G1P8
R69	4月11日	1	M	陽性	陽性	陽性	G1P8
R70	4月13日	7か月	M	陽性	陽性	陽性	G1P8
R71	4月15日	5か月	F	陽性	陽性	陽性	G1P8
R72	4月19日	8か月	M	陽性	陽性	陽性	G1P8
R73	4月19日	11か月	F	陽性	陽性	陰性	G1P8
R74	4月26日	1	F	陽性	陽性	陽性	G3P8
R75	4月27日	10か月	F	陽性	陽性	陽性	G3P8
R76	4月28日	10か月	F	陽性	陽性	陽性	G1P8
R77	4月28日	13	F	陽性	陽性	弱陽性	G3P8
R78	5月2日	8か月	M	陽性	陽性	弱陽性	G9P8
R79	5月9日	5か月	M	陽性	陽性	陽性	G1P8
R80	5月11日	5か月	M	陰性	弱陽性	陰性	G1P8

図1 VP7 領域の系統樹解析

系統樹解析 (VP7領域)

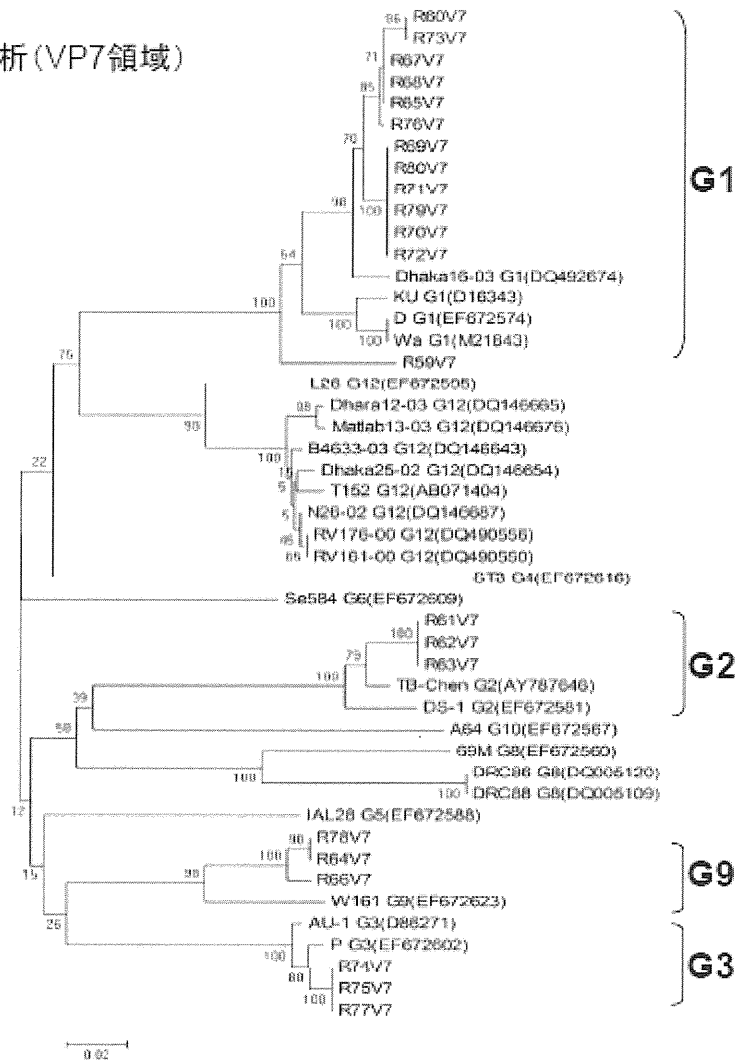
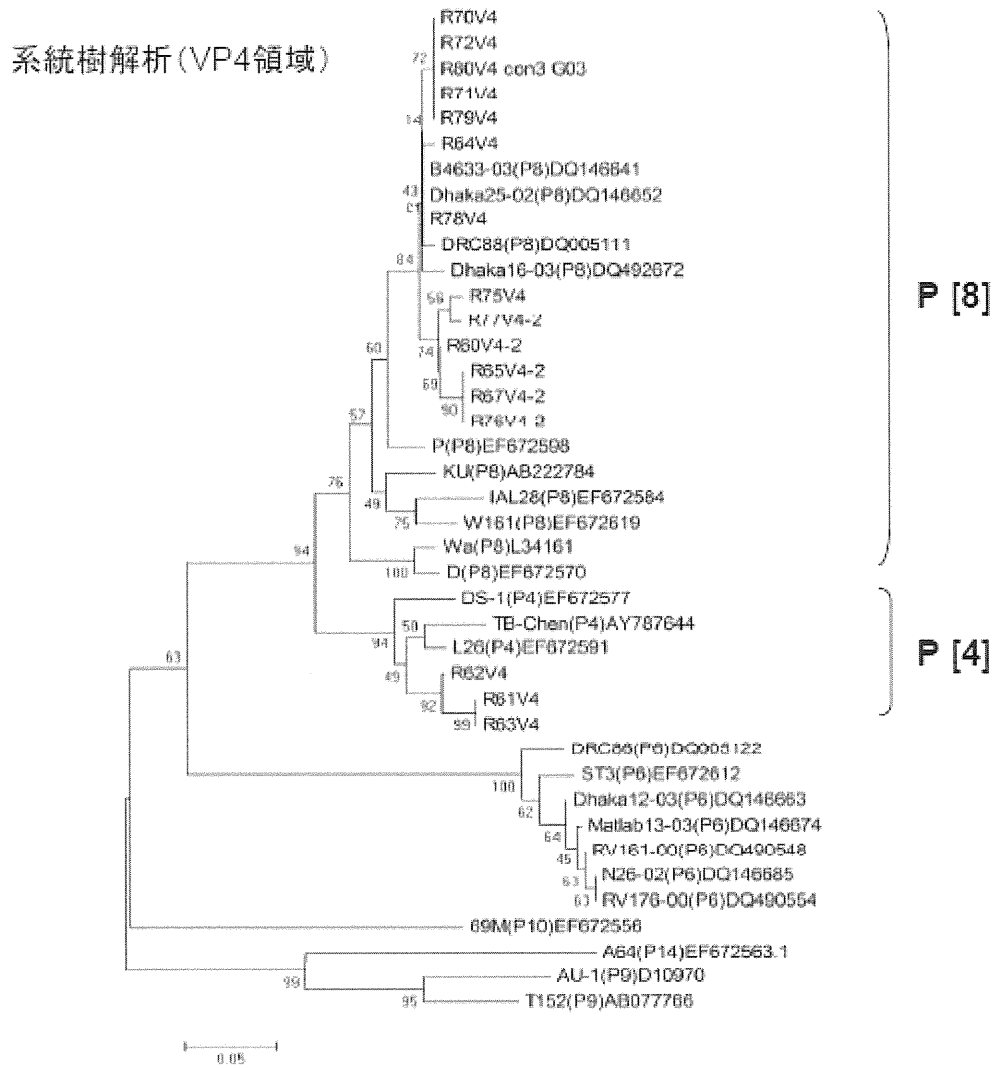


図2 VP4 領域の系統樹解析



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

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

研究分担者 庵原 俊昭（国立病院機構三重病院・小児科）
研究協力者 二井 立恵（白子クリニック・小児科）
研究協力者 伊佐地 真知子（白子クリニック・小児科）
研究協力者 落合 仁（落合小児科）

研究要旨

2010 年から 2011 年にかけてパルボウイルス B19 感染症である伝染性紅斑が流行した。本邦で市販されている B19 IgG 抗体判定試薬（デンカ生研）は定性試薬として使用されているが、この試薬の定量性、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 IU/mL～38.6 IU/mL まで直線性が認められ、この試薬を用いて抗体価の定量が可能と判断した。同時に市販されている強陽性血清は 21 IU/mL、弱陽性血清は 2 IU/mL に値付けられた。18～20 歳の思春期血清および 17～40 歳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(81 例)65.4%、17～30 歳妊婦(48 例)66.7%、31～40 歳妊婦(52 例)42.3%と、31～40 歳妊婦は有意に低率であった。以上の結果から、B19 IgG 抗体判定試薬は定量性があり、抗体価の国際単位表示が可能であること、31～40 歳の女性はパルボウイルス B19 感染のリスクが高く、31～40 歳の妊婦は、伝染性紅斑流行中は感染予防が大切なことが示された。

A. 研究目的

ウイルス抗体価の測定方法には種々の方法があり、測定方法により抗体価の表示方法が異なっている。WHO は異なった測定方法により測定された抗体価が相互に評価できるように、麻疹、風疹、B 型肝炎などでは国際単位で表示することを勧めている。

昨年度までの研究成果から、麻疹中和抗体 (NT) 価 4 倍は、150mIU/mL に相当すること、麻疹酵素免疫(EIA)抗体 4.0EIA 価は NT 抗体 4 倍に相当し、麻疹粒子凝集(PA)抗体 64 倍に相当すること、風疹赤血球凝集抑制(HI)抗体 8 倍は 8IU/mL に、風疹 EIA 抗体 4.0EIA 価は 8IU/mL に相当することを示した。また、水痘では免疫付着赤血球凝集(IAHA)法と EIA 法が良く相関し、IAHA 法の抗体価(倍)=EIA 抗体価(EIA 価)の関係があり、A 社の EIA 法と B 社の EIA 法の抗体価は良く相関することを示し

た。更に、サイトメガロウイルス(CMV)の抗体価も、A 社の EIA 法と B 社の EIA 法はよく一致し、わが国の思春期の CMV 抗体陽性率は 54%に低下し、他の先進国と同様に、先天性 CMV 感染のリスクが高まっていることを示した。

今年度は、2009 年、2010 年の 2 年間にわたり、わが国で流行した伝染性紅斑の血清疫学を明らかにするために、B19 IgG 抗体判定試薬の定量性を検討するとともに、B19 抗体価の国際単位表示について検討した。

B. 研究方法

対象は、本研究の目的を説明し、研究に同意が得られた 18～20 歳の専門学校生 81 人、17～40 歳の妊婦 100 人、伝染性紅斑に罹患した成人女性 3 人である。妊婦においては、出産時に臍帯血も採取した。

方法は、デンカ生研のパルボウイルス B19 IgG 抗体定性試薬を用い、添付文書に従い酵素免疫法 (EIA 法) 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に、NIBSC から標準血清(77.1 IU/mL)を購入した。測定する血清の抗体価の求め方は、血清抗体測定時に標準血清を 2 倍段階希釈し、測定された吸光度から標準曲線を作成し、測定する各血清の吸光度から標準曲線上の値を求め、その値を抗体価と表示した。

倫理面への配慮

本研究は国立病院機構三重病院倫理審査委員会で承認を受けて行った。

C. 研究結果

1) 標準血清の直線性の検討

一般に EIA 法では、ある値の範囲においては、2 倍段階希釈した血清の希釈倍数の対数(2 を底とする)と、測定された吸光度の対数(2 を底とする)は、直線性(linearity)を示すことが認められている。今回の検討では、吸光度 0.05~2.0 までの範囲ではほぼ直線性が認められた(表 1)。この範囲は標準血清では、0.6 IU/mL から 38.6 IU/mL に相当した。

2) 市販されているデンカ生研製パルボウイルス B19 標準血清の抗体価の国際単位表示

現在デンカ生研から、強陽性血清と弱陽性血清の 2 種類の血清が市販されている。強陽性血清および弱陽性血清を 2 倍段階希釈し、平行線定量からそれぞれの抗体価を求めたところ、強陽性血清の抗体価は 21 IU/mL、弱陽性血清は 2 IU/mL であることが示された(表 2)。

3) 伝染性紅斑回復期の血清抗体価

伝染性紅斑に罹患した 3 人の血清抗体価は、血清を 4 倍に希釈後、2 倍段階希釈で測定し、検量線から抗体価を算出した。3 人の血清抗体価は、それぞれ 89.8 IU/mL、194.4 IU/mL、231.2 IU/mL と、極めて高値であった。

4) 思春期および妊婦の抗体分布と陽性抗体価の検討

思春期の 81 人の抗体分布は、2 IU/mL 未満

34.6%、16 IU/mL 以上 60.5%と 2 峰性であり、2 IU/mL から 16 IU/mL 未満の人は 4 人(4.9%)であった。妊婦 100 人の抗体分布でも、2 IU/mL 未満 46%、16 IU/mL 以上 48%と 2 峰性であり、2 IU/mL から 16 IU/mL 未満の人は 6 人(6%)であった(図 1)。以上の結果から、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。

5) 血清疫学

抗体陽性閾値を 2 IU/mL としたとき、思春期の血清抗体陽性率は 65.4%、17~30 歳の妊婦では 66.7%、30~40 歳の妊婦 42.3%となり(表 3)、30~40 歳の妊婦は、17~30 歳の妊婦、思春期よりも抗体陽性率は有意に低率であった(それぞれ $P=0.01462$ 、 $P=0.00869$)。

6) パルボウイルス B19 の抗体移行(図 2)

母親の血清抗体と臍帯血の血清抗体との間には有意の相関が認められた($R=0.9847$ 、 $P<0.0001$)。その相関直線は、 $Y(\log_2 \text{臍帯血抗体価}) = 1.02X(\log_2 \text{母親抗体価}) + 0.17$ であり、母親の抗体価は 1.17 倍濃縮して児に移行していた。

D. 考察

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た。

今回の検討では、本試薬は 0.6 IU/mL から 38.6 IU/mL の間では、血清の希釈倍数(対数)と吸光度(対数)との間に直線性が認められ、38.6 IU/mL より高い抗体価は低めに表示され、0.6 IU/mL より低いところでは高めに表示されることが示された。以上の結果から、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。

次に、デンカ生研から市販されている標準血清および伝染性紅斑回復期血清を用い、各

抗体価の国際単位表示を平行線定量により算出した。平行線定量は、測定する血清を2倍段階希釈し、各濃度の抗体価を、2を底とする対数に変換したものを縦軸に、各血清の希釈倍数を、2を底とする対数に変換したものを横軸にとり、直線部分の回帰直線から抗体価を求める方法である。この方法から求められた、強陽性標準血清と弱陽性標準血清の抗体価は、それぞれ21 IU/mL、2 IU/mLであった。また、3人の伝染性紅斑回復期の血清は、それぞれ89.8 IU/mL、194.4 IU/mL、231.2 IU/mLと、極めて高値であった。

この試薬を用い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歳の人妊娠したとき、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IgG₁画分に属しているため、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。

E. 結論

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、NIBSCの標準血清を用いると、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。

G. 研究発表

1. 書籍・論文発表

- 1) 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、2011、56-58.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 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）.
- 2) 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）.
- 3) 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）.

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

(表1) 血清の希釈倍数と吸光度

	吸光度					
	NIBSC 標準血清		デンカ強陽性血清		デンカ弱陽性血清	
	実験 1	実験 2	実験 1	実験 2	実験 1	実験 2
原液	2.7881	2.7974	1.5216	2.1214	0.2490	0.3493
2 倍希釈	2.4548	2.6914	1.1587	1.1382	0.1424	0.1767
4 倍希釈	1.7851	2.0857	0.6526	0.8021	0.0637	0.0745
8 倍希釈	1.0815	1.3415	0.3226	0.3957		
16 倍希釈	0.6050	0.7337	0.1503	0.1999		
32 倍希釈	0.2972	0.3854	0.0652	0.0935		
64 倍希釈	0.1402	0.1861				
128 倍希釈	0.0639	0.0820				

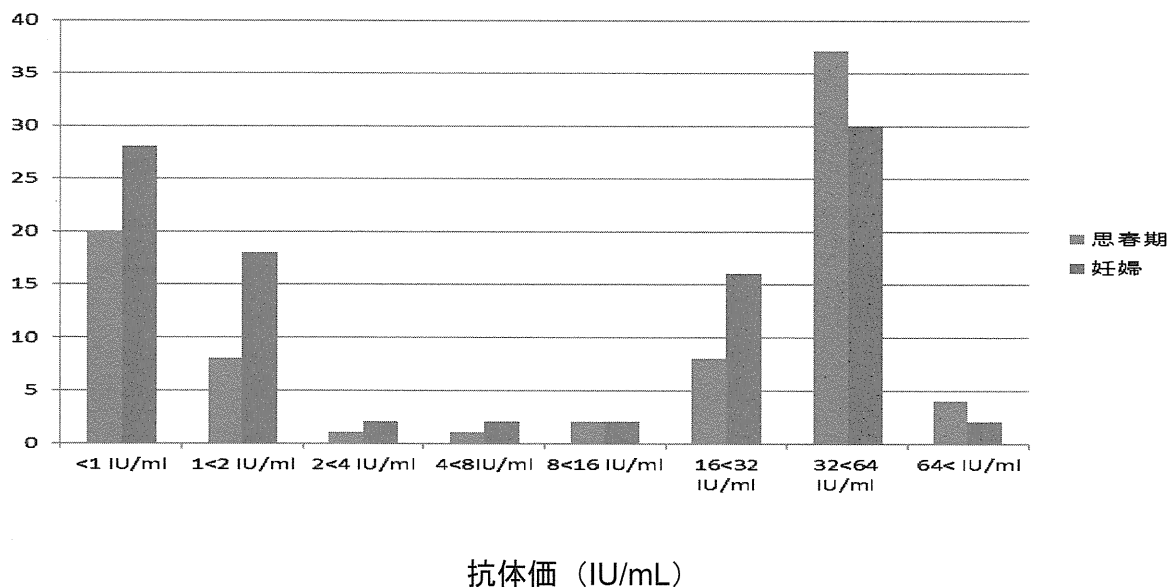
(表2) デンカ生研標準血清抗体価の国際単位表示

	抗体価 (log ₂ IU/mL)				抗体価(IU/mL)
	1 回目	2 回目	3 回目	平均	
強陽性血清	4.45	4.35	4.37	4.39	20.97
弱陽性血清	0.97	1.07		1.02	2.02

(表3) 思春期妊婦の血清疫学

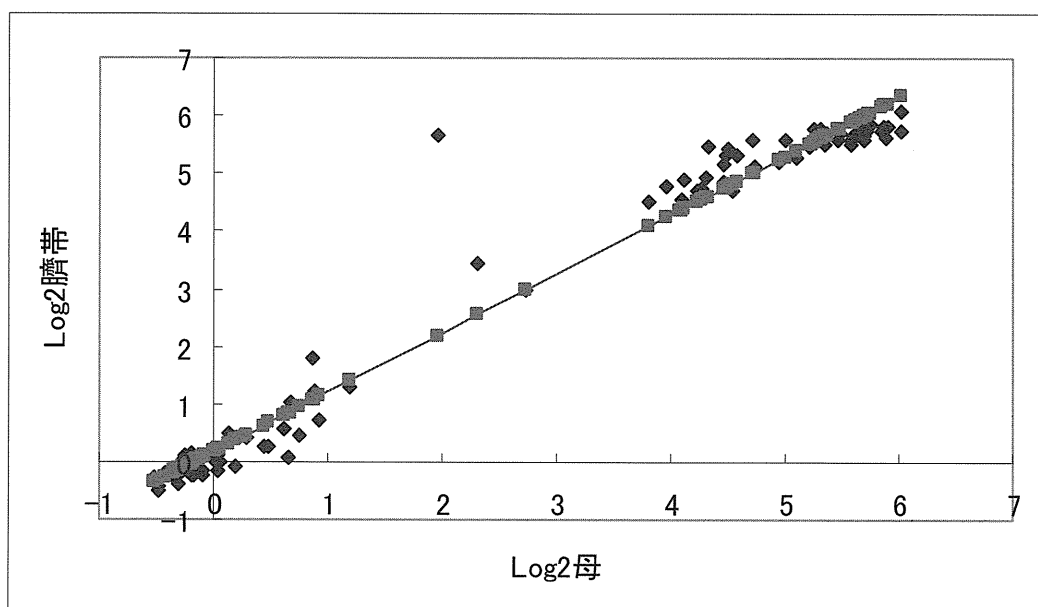
	合計	陰性・判定保留	陽性	陽性率	P value
思春期	8 1	2 8	5 3	65.4%	0.00869
17~30 歳妊婦	4 8	1 6	3 2	66.7%	0.01462
31~40 歳妊婦	5 2	3 0	2 2	42.3%	

(図 1) 思春期と妊婦のパルボウイルス B19 抗体価の分布



抗体価 (IU/mL)
 2IU/mL 以上を陽性とする、思春期の陽性率は 65.4%、妊婦の陽性率は 54%であった。

(図 2) 母体と臍帯血のパルボウイルス B19 抗体価の関係



$R=0.9847$ ($P<0.0001$)

$Y(\log_2 \text{ 臍帯血抗体価}) = 1.02X (\log_2 \text{ 母体抗体価}) + 0.17$

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

風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

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）
研究協力者 駒瀬 勝啓（国立感染症研究所・ウイルス第三部）
研究協力者 大槻 紀之（国立感染症研究所・ウイルス第三部）
研究協力者 森 嘉生（国立感染症研究所・ウイルス第三部）

研究要旨

現在、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、さまざまな検査環境に対応するためにも複数の診断法を整備しておくことが必要であると考えられる。本研究では新しい TaqMan リアルタイム PCR 法を作製し、現行の遺伝子検出法と比較検討を行った。

A. 研究目的

妊娠早期の母体の風疹感染により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。麻疹排除計画の一環として、風疹は排除をめざして 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、nested PCR 法のため、クロスコンタミネーションや陽性検体を増幅した場合の実験室汚染の可能性、所要時間、操作の煩雑さなどが問題となるため、ウイルス遺伝子検出にはリアルタイム PCR 法や Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法が近年汎用されている。本研究では、新しい風疹ウイルス遺伝子検出 TaqMan リアルタイム PCR 法を作製し、感度および特異性の検討を行った。

B. 研究方法

WHO 標準株を含む約 30 株の全遺伝子配列を基に保存された領域を選び、Primer Express Software Ver. 3 (アプライドバイオシステムズ)を用いて primer および probe を設計した。

設計した primer および probe の target 配列を含む領域をコードする標準 RNA の段階希釈を用いて検出限界を求めた。当室で保有している genotype (1a, 1B, 2B, 1D, 1j) のウイルス培養上清から抽出した RNA を用い、設定した条件と RT-PCR 法と感度を比較した。風疹と類似した臨床症状を示す麻疹、HHV-6、パルボウイルス B19 の遺伝子を解析に用い、特異性を解析した。風疹非感染健康人の咽頭拭い液に各濃度のウイルス液を添加したサンプルから抽出した RNA を用いて spike test (添加試験)を行い、臨床検体由来の夾雑物存在下での感度を RT-PCR 法と比較した。

倫理面への配慮

なし

C. 研究結果

標準 RNA の感度は、10 コピー程度であり、 $10^1 \sim 10^6$ コピーの間で良好な直線性が得ら

れた。ウイルス培養上清より抽出したウイルス RNA に対する感度は、国内のワクチン株が属する genotype 1a、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、90 年代後半から 2000 年代前半にかけて分離された genotype 1j において 10 PFU であった。また、2007 年に輸入例として分離された 2B については 1 PFU まで検出可能であった。今回設計した TaqMan リアルタイム PCR 法の感度は RT-PCR 法よりも高かった。臨床症状が風疹と類似している麻疹ウイルス、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。genotype 1a, 1D, 1j の添加試験では、すべて 10 PFU まで検出可能であったが、RT-PCR 法では 10^3 PFU でも検出できなかった。

D. 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、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。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。また、2011 年は風疹感染報告数が例年に比べ多く、2012 年の流行が懸念される。これまで 1 例しか報告のなかった 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、今後の実験室診断に有用であると考えられる。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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(10):1863-73.

2. 学会発表

- 1) Yoshio Mori, **Kiyoko Okamoto**, Masafumi Sakata, Noriyuki Otsuki, Hitoshi Abo, Makoto Takeda. 2011. The plasma membrane is the genome replication site for rubella virus. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (札幌、9月).
- 2) Masafumi Sakata, **Kiyoko Okamoto**, Noriyuki Otsuki, Hitoshi Abo, Makoto Takeda, Yoshio 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).
- 3) Noriyuki Otsuki, Masafumi Sakata, **Kiyoko Okamoto**, Kaoru Fujii, Hitoshi Abo, Kazuhiko Kanou, Katsuhiko Komase, Makoto Takeda, Yoshio 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).

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

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）

研究要旨

国内における急性 A 型肝炎の発生動向については昨年度（2010）に漸増したことから今後注意深い監視を要する。HAV 感染予防対策の基礎となる感染診断法のうち最も多用されるのは IgM 型 HAV 抗体検出キットで A 型肝炎診断補助検査全体の 95%以上を占める。本研究では、これまでに新規抗 HAV モノクローナル抗体を多数確立して HAV エピトープの解析と HAV 抗体検出 ELISA 系の構築・改良を進めており、同時に、上市されている各種 HAV 抗体検出キット製品の検出性能の比較検討を行っている。これまでに検討した検出キット製品のうち、IgG 型抗体を検出するものについては概ね良好な成績を確認している。しかし、IgM 型抗体を検出するキットについては、パネル血清の一部の検体にのみ低値を示す製品があった。このことは、このキットの測定系が国内流行 HAV 株を含む一部のウイルス株に対してのみ検出感度が劣る事を示唆しており、この点を詳細に検討した結果次のことが明らかになった。1) 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。2) 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 株は非常に近縁である。3) キット間の測定原理を比較した結果、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。以上のことは、新規流行 HAV 株に対する上市各キットの検出感度が異なる可能性を示唆し、今後常に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。

A. 研究目的

A 型肝炎ウイルス（HAV）は糞口感染によって伝播し、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そ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。2010 年には国内に於いて顕著な感染例の増加傾向を認めたと、2011 年における累積感染者数は 175 例で例年並みに落ち着いている。急性 A 型肝炎の体外診断薬として、血清中の抗 HAV 抗体（IgM 型ならびに IgG 型）を検出するキットがある。このうち、IgM 型 HAV 特異抗体を検出するキットが A 型肝炎診断補助検査全体の 95%以上を占める。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。また、診断補助において、糞便または血清中の HAV 抗原を検出する新世代キットが望まれるがまだ上市されていない。本研究では、IgM 型 HAV 特異抗体を検出するキットの検出性能特性の詳細な検討と、昨年度開発した免疫学的 HAV 抗原捕捉測定法の特異性の問題を解析した。

B. 研究方法

1) 抗 HAV-IgM 抗体検出キット間の測定値

乖離の機序の検討： 上市されている HAV-IgM 検出キット間で測定値に乖離があることは昨年度既に報告している。抗 HAV-IgM 陽性血清（血漿）検体として感染研免疫部が保有する国内血清検体および混合力価パネル（BBI 社）とセロコンバージョンパネル（BBI 社）を用いて抗体力価を測定した時に A 社キットと B 社キットで測定値乖離のおこる血清検体（40 検体中 7 検体）について、RT-PCR により、HAV-RNA の増幅を試みた（食監発第 0816001 号「ふん便及び食品中の A 型肝炎ウイルスの検査法について」の方法）。次に、増幅された遺伝子断片（VP1/2B 領域）の塩基配列を常法により解析した。

2) HAV 抗原捕捉 ELISA 系の特異性の検討：新規の免疫学的 HAV 抗原測定法として構築した HAV 抗原捕捉 ELISA の開発経緯については昨年度報告した。今年度はその感度、特異性について、1) で述べたと同様のパネル血清を用いて検討した。RT-PCR、HAV 特異的 IgM の測定は Inhouse の測定系を用いた。

倫理面への配慮

研究に使用する HAV 抗体陽性血清の収集については国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を既に受けている。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 抗体価と HAV 抗原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。動物実験に関しては国立感染症研究所・動物実験委員会の承認を受けて行う。

C. 研究結果

1) 抗 HAV-IgM 抗体検出キット間の測定値乖離の機序の検討： A 社キットと B 社キットで測定値が乖離する血清検体は、40 検体中 4 検体で、A 社のキットでは測定値が約 50% 低下した。それらを除く検体の測定値は乖離せず、測定値の相関性は良好であった。このことは、A 社のキットでは、乖離した 4 検体の HAV 感染例でのみ抗

HAV-IgM 抗体を検出する感度が低下していることを示し、この 4 例の感染例における HAV 株の型に特異的な現象であることが予想された。そこで、乖離した 4 例の HAV 株の性質を知る目的でそれらの検体から HAV ゲノムの一部を RT-PCR により増幅して単離し、測定値が乖離しない検体から分離した HAV ゲノムの塩基配列と比較検討した。その結果、乖離値由来株、正常値由来株とも遺伝子型は I-A に分類され、VP1/2B 領域の塩基配列の比較から、塩基置換の数は 12、アミノ酸置換の数は 1 であることが判明した。この結果は、正常値由来株と乖離値由来株が非常に近縁であることを示している。次に、A 社キットと B 社キットの測定原理を比較したところ、測定値乖離の原因となるキット構成因子は、血清 HAV-IgM を検出するために用いられる不活化 HAV 粒子である可能性が最も高い。すなわち、正常値由来 HAV 株と乖離値由来 HAV 株が、それぞれ感染した時に惹起される HAV-IgM のレパトア構成を検出する能力が、両キットで使用される不活化 HAV 粒子で異なることが、測定値乖離の原因となると考えられる。正常値由来 HAV 株と乖離値由来 HAV 株が非常に近縁であることから、乖離をもたらすエピトープはごく少数か、おそらくは一つのエピトープである可能性が高い。

2) HAV 抗原捕捉 ELISA 系の特異性の検討：本研究で構築した HAV 抗原捕捉 ELISA 系（開発過程は昨年度報告）は、新規モノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 系で、検出限界は 300-800pg/mL ($\sim 10^5$ pfu/mL) であった。同じ検体を核酸増幅試験(NAT)で測定すると検出限界は 10pg/mL ($\sim 10^4$ pfu/mL) 以上であり、1~2 オーダーの差がある。この HAV 抗原捕捉 ELISA 系を用いて、混合力価パネル血清 23 検体を測定したところ、陰性群と陽性群はよく分離したのでカットオフ値を陰性群の平均値+2SD と仮に設定し、検討を進めた。測定した混合力価パネル血清 23 検体について、ウイルスの存在を RT-PCR で検出した結果 4 検体が陽性であった。抗 HAV-IgM については、8 検体が

陽性であった。しかし、この両者の結果と HAV 抗原捕捉 ELISA 系の測定値の結果の判定一致率は低かった。すなわち、擬陽性と擬陰性が大きな問題となることが判明した。原因としては、擬陰性については、抗原検出感度が低いこと、使用したモノクローナル抗体のエピトープの不一致、阻害物質としての抗原抗体複合体や可溶性 HAV 受容体 (TIM1 分子) などの関与が疑われた。擬陽性の原因としては、HAV-RNA の分解、RT-PCR に用いたプライマーの不一致などが考えられた。

D. 考察

2つのキットで HAV-IgM 測定値が乖離した4例の血清検体において、感染した HAV 株の性質を知る目的でそれらの検体から HAV ゲノムの一部を RT-PCR により増幅して単離した。一方で、測定値が乖離しない検体からも HAV ゲノムを増幅・分離し、両者の塩基配列を比較検討した。その結果、両者が非常に近縁であり、予想されるエピトープの相違も大きくないことが明らかになった。このことは、乖離の原因が、両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最も高いことと考えあわせると、ご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 系については、昨年度本研究で初めて構築した。HAV ウイルス血症は発症時の ALT 増加にやや先行して起こり、そのウイルス力価は 10^4 - 10^5 pfu 程度であるとされる。構築した 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、無視できない擬陽性と擬陰性の反応があり、いくつかの重要な問題点が浮上した。すなわち、使用したモノクローナル抗体の親和性の問題、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 (TIM1 分子) などの関与の問題である。引き続き、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。所謂、第四世代体外診断薬と呼ばれる抗ウイルス抗体・ウイルス抗原同時検出キットについて、HIV 診断薬については既に販売が始まっており、HAV 体外診断薬も近い将来、第四世代製品が開発・上市されることが望まれる。この点において、今回の技術的検討は、将来の HAV 抗原捕捉 ELISA 系の科学的根拠の理解に貢献すると考える。

E. 結論

上市されている HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価を行った結果、2社のキットで測定値が大きく乖離する血清検体が有った。乖離血清検体から RT-PCR 増幅された HAV ゲノムの一部を解析した結果、乖離のない HAV ゲノムと非常に近縁なウイルス株であることが判明した。このことは、HAV-IgM 抗体検出系を構築する際、HAV の主要エピトープの構造が、微細な変化であっても大きく測定値に影響する可能性を示唆している。今後、HAV の主要エピトープ構造の包括的な理解が、新規 HAV 流行株の検出性能の評価に必要であり、同時に、HAV 国内流行株に対する各社キットの検出性能を監視する必要がある。

昨年度に開発した HAV 抗原捕捉 ELISA 系について、検出系の感度と特異性を検討した結果、無視できない擬陽性と擬陰性の反応があり、いくつかの重要な問題点が浮上した。今後、その原因について検討を続け、所謂、第四世代体外診断薬と呼ばれる抗ウイルス抗体・ウイルス抗原同時検出キットについての技術的検討を行う。

これらの技術の基礎となる HAV に対する免疫反応について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。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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 回日本免疫学会総会、(千葉、12 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし