

201235005A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成25 (2013) 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感染の血清診断に関する研究 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
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 高橋 宜聖	17
ノロウイルス体外診断薬の改良に関する研究 岡田 賢司	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
風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討 岡本 貴世子	27
A型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価 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	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	41

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 24 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・主任研究官)
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・再任用職員)

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）、ノロウイルス感染症（感染性胃腸炎、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。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ヒト免疫不全ウイルス（HIV）-1、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、ノロウイルス感染症）、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	インフルエンザの検査診断に関する検討

- 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クロマトキットの特性
- 岡田 賢司 ノロウイルス体外診断薬の性能評価
- 庵原 俊昭 水痘ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン抗体価の検討
- 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. 単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染症の血清診断

同意の得られた HSV 感染症患者および健康診断受診者から血清を採取した。血清抗体価は免疫グロブリンクラス (IgM および IgG) 別に測定した。また、HSV-1 および-2 型特異的抗体測定キットを用い、性能評価した。

2. インフルエンザの迅速免疫診断

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、インフルエンザ迅速診断キット (3 キット: 2009 pdm A 型、13 キット: A 型、16 キット: B 型) の性能について比較検討した。供試ウイルスは MDCK 細胞培養系を用いて複製し、copy 数で示した。

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。ELISA による抗体特異性と親和性の検証は Narita 株や PR8 (H1N1) 株の組換え NP タンパクを作製した。rNP タンパクを固相化抗原とし、

段階希釈した NSP5、NSP23 抗体を添加した。最終的にプレートに結合した抗体量、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG 抗体で検出・定量した。

3. ノロウイルス体外診断薬の性能評価

ノロウイルス感染症の迅速診断キット (クイックナビノロ) の改良品 (クイックナビノロ 2) について同一便検体を用いて感度・特異度を比較した。

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

1) デンカ標準血清の国際単位表示

National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC、英国) から水痘帯状疱疹 (VZV) 標準血清 (Code w1044、50 IU/mL) を購入した。国際単位表示は、デンカ生研の水痘 EIA-IgG 測定試薬を用い、NIBSC 標準血清を段階希釈し、検量線を作成し、デンカ水痘標準血清の抗体価を国際単位で求めた。平均抗体価を国際単位抗体価とした。また、各濃度の平均抗体価から相関直線を算出し、得られた直線から EIA 価を求めた。日本人献血者から製造された静注用ガンマグロブリン 4 種類を購入した。段階希釈した NIBSC 標準血清を対照とし、IVIG に含まれる VZV 抗体価をデンカ生研水痘 EIA-IgG 測定試薬で測定し、国際単位で算出した。

5. 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

WHO 標準株を含む約 30 株の全遺伝子配列を基に保存領域を選び、検出 primer を設計した。設計した primer 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。米国疾病管理予防センター (CDC) より分与された風疹ウイルスを含む全遺伝子型 (13 種) から抽出した RNA を用い、設定した条件と TaqMan リアルタイム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のウイルス遺伝子を解析に用い、特異性を解析した。風疹非感染健康常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 TaqMan リアルタイム法と比較した。

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

主として、米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のウイルス情報を取得して、標的エピトープの抗原性と立体構造に関する検討を行った。免疫原性はマウスを HAV ワクチンで免疫して抗体応答を評価し、また、ウイルスタンパク質における立体構造を付与した新規のエピトープ・ペプチドを探索・設定することを試みた。H5N1 インフルエンザウイルス粒子のヘマグルチニン分子についても同様の検討を行い、モノクローナル抗体を作成して免疫診断系を構築し性能の評価を行った。

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 23 回 Standardisation of Genome Amplification Techniques (SoGAT-CV) 会議 (2012 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, 2012 年 10 月) の議案書を閲覧することによって、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。標準品作製のため、国際共同研究に国立感染症研究所が参加協力した。HEV-RNA 国内標準品の承認を受けるため、平成 24 年度第一回薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会核酸増幅試験 (NAT) 小委員会 (平成 24 年 5 月) に報告し、国内標準品が制定された。

C. 結果

1. 単純ヘルペスウイルス (HSV)

HSV 初感染初発の 77% は IgM 高抗体価を示したが、非初感染初発の 23% は IgM 低値-陰性であった。しかし、後者は初診時より IgG 抗体は陽性である上に 2 週間で急上昇することが判明した。これらから初診時と 2 週間後のペア血清について IgM 抗体と IgG 抗体を測定すれば血清診断は可能であると考えられた。しかし、再発例につい

ては免疫グロブリンクラス別の抗体検出では診断は不可能であった。非 HSV 患者の IgM 抗体陽性率は約 10% であったが、抗体価は低値であった。改良された血清診断キットは既存キットに比し、性能が優れていた。HSV-1 および-2 型特異的抗体測定キットで Kalon Biological 社製の型特異性は良好であったが、BioRad 社製に比し、低感度であった。なお、BioRad 社製の型特異性は良好であった。

2. インフルエンザの迅速免疫診断

16 キットにおける A/California/07/2009pdm 株に対するデバイスの最小検出感度は $10^{2.5} \sim 10^{3.5}$ copies/test であった。B/Wisconsin/1/2010 に対する検出感度は $10^4 \sim 10^{5.5}$ copies/test であった。16 キットすべてにおいて B 型より A 型ウイルスはより少ない量で検出可能であり、A 型と B 型の検出感度の差は $10^{0.5} \sim 10^{2.5}$ copies/test であった。B 型インフルエンザウイルス感染では A 型感染に比し、臨床検体に含まれるウイルス量が少ないことが報告されており、今回の成績から、これに加えて診断キットにおける B 型の検出感度が低いことは B 型インフルエンザの診断をより困難にしていると考えられる。

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した。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。エピトープ構造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。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、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。NSP5、NSP23 抗体の抗原結合親和性を評価するため、7M 尿素処理により、低親和性抗体を剥離した後の抗体残存率を ELISA で測定した。その結果、7M 尿素処理によって両抗体が剥離せず、NP タンパクに高親和性結合していた。

3. ノロウイルス体外診断薬の性能評価

非特異反応を最小限に抑えるために検体希釈液の組成変更を行った。その結果、特異度は従来品の 98.9%から 99.3%に上昇した。次に検体採取に用いるスワブを従来のコットンからフロックススワブに変更した。表面積の大きいフロックススワブの採用により採取されるウイルス量は増加した。さらに検出抗体の変更と追加により、直腸拭い検体で感度が 85.1%から 90.0%、特異度は 64.3%から 96.8%とそれぞれ上昇した。これら 3 項目の検討により、排泄便と直腸ぬぐい検体の一致率が 89.3%から 98.3%と上昇した。

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

デンカ標準血清各濃度の国際単位抗体価は、128 EIA 価は 2 EIA 価から 128 EIA 価まで強い直線性が認められた。得られた値から求めた相関直線は $Y(\log_2 \text{国際単位})=0.93X(\log_2 \text{EIA 価})+5.87$ であった ($P=0.993$ 、 $P<0.0001$)。この直線から得られる水痘の発症予防抗体価である 150 mIU/mL は、2.75 EIA 価に相当した。また、デンカ標準血清各濃度の EIA 価と国際単位の倍率から、EIA 価の約 50 倍が国際単位(国際単位(mIU/mL) \div EIA 価 \times 50)に相当した。

IVIG 中に含まれる VZV 抗体価は、ポリグロビン N が最も高く、続いてベノグロブリン IH、ベニロン I、グロベニン I の順であり、ポリグロビン N 以外の他の 3 社の抗体価には大きな差異はなかった。

5. 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

標準 RNA の検出感度は 10^3 コピーで 78%、 10^4 コピーで 100%であった。TaqMan リアルタイム法に比較して、 $1/10^2$ - 10^3 の感度であった。培養上清から抽出したウイルス RNA に対する感度は genotype 1a、1C、1E、1G、1h、1i、2A で 10^2 pfu、その他の 1B、1D、1F、1j、2B で 10^3 pfu、2C は 10^3 pfu でも検出できなかった。臨床症状が風疹と類似している麻疹の原因ウイルス RNA は検出されなかった。genotype 1E、1h、1j、2B の添加試験では、1E、1h が 10^2 PFU、

1j、2B が 10^3 PFU であった。TaqMan リアルタイム法に比較して、 $1/10^2$ - 10^3 の感度であった。

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

NCBI の HAV ゲノム配列から VP1_11-25 の変異について解析し、7 箇所の突然変異があった。ELISA の結果、HAV 粒子に対する抗体の約 10%が VP1_11-25 と結合し、約 6%が VP3_110-121 と結合した。ピコルナウイルスの構造データから類推される HAV ウイルス VP1 表面ペプチドについて、二次構造予測と分子動力的解析を行い、立体構造を保持したペプチドを試作した。インフルエンザウイルスの H5 を特異的に認識する複数のモノクローナル抗体を確立し、検出特性に優れたウイルス粒子捕捉診断系を構築した。

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

2012 年、ECBS に第二次 HIV-1 NAT genotype パネルが承認された。新たに第三次 HBsAg 国際標準品と第三次パルボウイルス B19-DNA 国際標準品を作製することが承認された。

国立感染症研究所は HIV-1 genotype NAT パネルの国際共同研究に参加した。第三次 HBsAg 国際標準品と第三次パルボウイルス B19-DNA 国際標準品の共同研究に参加協力することになった。平成 24 年度第一回薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会 NAT 小委員会(平成 24 年 5 月)で、250,000 IU/mL の HEV-RNA 国内標準品が制定され、11 月に交付が開始された。

D. 考察

1. HSV 感染症の血清診断

現在、酵素抗体測定法 (EIA) は定性的に判断するように設定されているが、定量的評価を導入することにより、性能が向上すると考えられる。改良された HSV-IgM 抗体測定キットでは判定保留が減少し、有用である。型特異抗体測定法の特異性は良好であるが、感度についての検討が必要である。

2. インフルエンザ迅速免疫診断キット

B 型インフルエンザウイルス感染では A 型感染に比し、臨床検体に含まれるウイルス量が少ないことが報告されており、今回の成績から、これに加えて診断キットにおける B 型の検出感度が低いことは B 型インフルエンザの診断をより困難にしていると考えられる。H1N1 亜型の検出キットの最小検出感度は A 型検出については他のキットと同等であるものの、H1N1 亜型に対する検出感度はその 1/100 であったことから、特に H1N1 株流行時においては、採取されるウイルス量が少ない場合、A 型陽性、H1N1 陰性の判定となる可能性があり、亜型判定を誤る可能性がある。

A/H1N1pdm ウイルスと他の H1N1 ウイルスを鑑別する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。このアミノ酸に着目することにより、本キットの特異性を推定できる可能性が示唆された。

3. ノロウイルス体外診断薬の性能評価

既存キットから、検体希釈液の組成および検体採取スワブの変更、検出抗体の追加などの改良により、新しいキットは直腸ぬぐい検体および新生児検体での適応が拡大された。

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

デンカの VZV-IgG 抗体測定試薬を用い、NIBSC 標準血清の階希釈液から検量線を作成することで、デンカ標準血清各濃度の抗体価を国際単位で表示でき、EIA 価の約 50 倍が国際単位に相当した。WHO は 150 mIU/mL を発症予防抗体価としているが、今回得られた国際単位と EIA 価との相関直線から、この値はデンカの抗体価 2.75 EIA 価に相当した。

本邦では水痘の発症予防抗体価は麻疹の経験から測定感度の 2 倍の値 (IAHA では 4 倍、EIA では 4.0 EIA 価) としていた。2010

年の我々の検討から「IAHA の抗体価 \approx 1.4 \times EIA の抗体価」であり、2.75 EIA 価は IAHA 抗体 2 倍 (EIA 抗体 1.43 EIA 価 \leq 2.86 EIA 価) に含まれる。IAHA 抗体 2 倍には、発症予防以下の抗体価も含まれるため、確実な発症予防抗体価は IAHA では 4 倍に相当する。デンカ EIA 法 4.0 EIA 価を水痘発症予防閾値と判断して良いと思われた。

本邦では日本人献血由来の IVIG が 4 社から市販されているが、ポリグロブリン N の VZV 抗体価が最も高く (他社製品の最低価の 1.46 倍)、他の 3 社には大きな差を認めなかった。また、4、5 年前のロットの抗体価と 2012 年の抗体価には、各メーカーでは差がなく、日本人供血者の水痘血清抗体価はこの 4、5 年間に大きな変化がないと推測された。

ヒトのガンマグロブリン濃度は 500 mg/kg である。IVIG 100 mg/kg 投与すると、計算上投与された IVIG は約 6 倍希釈される。6 倍希釈した時の各 IVIG の濃度は、ポリグロブリン N 889 mIU/mL、ペノグロブリン I 746 mIU/mL、ベニロン I 700 mIU/mL、グロベニン I 608 mIU/mL、といずれも発症予防抗体価の 4 倍以上の抗体価が推測される。以上の結果から、免疫健全児 (者) では本邦の IVIG を 100 mg/kg 投与すれば、理論上発症予防が期待されると推察された。なお、麻疹の発症予防では、免疫不全者では健常者の 2 倍量の投与が必要とされており、水痘でも免疫不全者には免疫健全者の倍量投与が必要と推察された。

5. 風疹ウイルス遺伝子検出技術に関する検討

臨床検査施設による風疹の確認は血清 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、風疹ウイルス遺伝子検出法は血清診断より、好感度と考えられる。本年度は loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法と TaqMan リアルタイム法と比較した。LAMP 法は TaqMan 法の $1/10^2$ - 10^3 程度と低感度であった。LAMP 法は精度の高い診断には適していないが、TaqMan リアルタイム法

や reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法が必要とする高額機器（サーマルサイクラーなど）が不要であるため、検査設備が十分ではない風疹流行地域のスクリーニングへの利用が考えられた。

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

VP1_11-25 はウイルス粒子表面のランダムコイルであり、B 細胞エピトープとして免疫学的標的と考えられた。VP3_110-121 はウイルス粒子内部に位置すると考えられるが、HAV ワクチンで免疫したマウス血清では有意に抗体価が上昇していた。構造を保った HAV ウイルス粒子では VP1_11-25 が認識され、破壊されたウイルス粒子では VP3_110-121 も認識されることが予想される。HAV ワクチン免疫血清中に、VP1_11-25 は抗体の約 10%、VP3 は約 6% の存在率で誘導されていたが、感染防御に不十分と考えられたため、新しいエピトープ・ペプチドの設定を行った。VP1 のループ構造 A はピコルナウイルスの主要なエピトープであることから、この情報を利用して標的エピトープの設定が可能であった。ループ構造 A の立体構造を保つため、ジスルフィド結合を付与し、エピトープ・ペプチド構造の最適化を試みた。H5N1 インフルエンザに対するモノクローナル抗体を作成し、優れたウイルス粒子捕捉診断キットを構築できた。

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

国際標準品等の作製のための国際共同研究の多くに国立感染症研究所が参加することが可能になった。HEV-RNA 標準品の共同研究から国内標準品を迅速に制定し、交付を開始することが出来た。合成核酸を国際的な標準物質にする場合の“Commutability”の問題をどうすれば解決できるか、科学的な議論をすすめる必要がある。

E. 結論

1. HSV 感染症の血清診断

IgM と IgG 抗体の定量測定、キットの改良、さらに、HSV 型別など、血清診断の向上が認められた。

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 に対するキットの検出感度は向上し、また、キット間格差も改善した。

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と結合親和性を明らかにした。

3. ノロウイルス体外診断薬の性能評価

ノロウイルス診断キットは、直腸拭い検体や新生児検体でも排泄便と同様の感度・特異度が確認できた。

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

デンカの水痘 EIA-IgG 抗体測定試薬に用いられる標準血清の国際単位抗体価は、128 EIA 価は 5415 mIU/mL、32 EIA 価は 1543 mIU/mL、4 EIA 価は 224 mIU/mL であり、デンカ標準血清各濃度の国際単位抗体価との倍率から、EIA 価の約 50 倍が国際単位に相当した。水痘発症予防抗体価である 150 mIU/mL は 2.75 EIA 価に相当し、陽性閾値である 4.0 EIA 価を発症予防抗体価としても問題ないと推測された。また、本邦献血由来 IVIG の VZV 抗体価はメーカー間に差があり、ポリグロビン N が一番高値であったが、4 社の IVIG を 100 mg/kg 投与すると、計算上発症予防レベルの 4 倍以上の抗体価になると推計された。

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 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法の新しい条件を作製した。本法は TaqMan リアルタイム法より感度が低かったが、その簡便さから、風疹流行地域のスクリーニングの選択肢の 1 つとしての利用が考えられた。

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

現在までの全ての HAV ゲノム情報を解

析して検出特性を保証する7種類の補正ペプチドの設計を行った(論文準備中)。今後、これらのペプチドに対して抗体を作成し、HAVの検出特性補正能を検討する。さらに、エピトープ・ペプチドの抗原性を立体構造に基づいて最適化する技術は有用な抗体の開発を短時間で実現できる。

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

HIV-1 NAT genotype パネル、HBsAg 国際標準品と第三次パルボウイルス B19-DNA 国際標準品を作製することが承認された。2012年にHEV-RNA国内標準品が制定された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川名 尚、土屋裕子、西井 修、他。2012. LAMP 法に簡易核酸抽出法(PURE 法)を組み合わせたPURE-LAMP法による単純ヘルペスウイルスの簡易迅速検出法の臨床評価。産婦人科の実際。61(1):119-125.
- 2) 川名 尚。2012. 単純ヘルペスウイルスの母子感染感染とその予防。臨床とウイルス。40(1):51-60.
- 3) 川名 尚。2012. 特集・性感染症の現状と治療の問題点5.性器ヘルペスの現状と治療の問題点。化学療法領域28(5):70-83.
- 4) Yanagibashi, T., A. Hosono, A. Oyama, M. Tsuda, A. Suzuki, S. Hachimura, Y. Takahashi, Y. Morose, K. Itoh, K. Hirayama, K. Takahashi, and S. Kaminogawa. 2012. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA⁺ B cells. Immunobiology Aug 8, Epub ahead of print
- 5) Kaji, T., A. Ishige, M. Hikida, J. Taka, A. Hijikata, M. Kubo, T. Nagashima, Y. Takahashi, T. Kurosaki, M. Okada, O. Ohara, K. Rajewsky, and T. Takemori. 2012. Distinct cellular pathways select germ-line encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory. J. Exp. Med. 209: 2079-2097.
- 6) Onodera, T., Y. Takahashi, Y. Yokoi, M. Ato, Y. Kodama, S. Hachimura, T. Kurosaki, and K. Kobayashi. 2012. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 2485-2490
- 7) Yuki, N., Y. Takahashi, T. Ihara, S. Ito, T. Nakajima, K. Funakoshi, K. Furukawa, K. Kobayashi, and M. Odaka. 2012. Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination. J. Neurol, Neurosurg. & Psychiatry 83: 116-117.
- 8) 小野寺大志、小林和夫、高橋宜聖。2012. 臨床免疫・アレルギー科(科学評論社) B細胞内因性TLRシグナルによるB細胞応答の制御機構、58、275-282.
- 9) 庵原俊昭。2012. 先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症の病態・診断・治療・予防(後方視的診断も含め)。産婦人科の実際 61: 1301-1309.
- 10) 庵原俊昭。2012. ウイルス感染症の診断。臨床と微生物 39: 649-655.
- 11) Ohnishi K., Takahashi Y., Kono N., Noriko Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa S., Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., Kageyama T., Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and Tsunetsugu-Yokota Y. 2012. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. Jpn. J. Infect. Dis. 65(1): 19-27.
- 12) 水澤左衛子、岡田義昭。2012. 肝炎ウ

イルスの核酸増幅試験法のための標準品. 臨床化学 41 巻 3 号 234-239 頁.

- 13) Chudy M, Hanschmann KM, Kress J, Nick S, Campos R, Wend U, Gerlich W, N?bling CM. 2012. First WHO International Reference Panel containing hepatitis B virus genotypes A-G for assays of the viral DNA. J. Clin. Virol. 55: 303-309. (**Mizusawa S.** as a member of the Collaborative Study Group)

2. 学会発表

- 1) **川名 尚**、土屋裕子、西澤美香、**西井修**. 2012. 女性性器ヘルペスの血清診断とその問題点. 日本性感染症学会第 25 回学術大会 (岐阜、12 月).
- 2) **川名 尚**、西澤美香、土屋裕子、**西井修**. 2012. 新しい単純ヘルペスウイルス 1 型、2 型特異抗体検出法免疫蛍光分析装置 BioPlex™ の評価. 日本性感染症学会第 25 回学術大会 (岐阜、12 月).
- 3) **Takahashi, Y.**, T. Onodera, M. Tsuiji, and **K. Kobayashi**. 2012. Increased affinity maturation in lung memory B cells following influenza virus infection. 第 41 回日本免疫学会 (神戸、12 月).
- 4) Onodera, T., T. Kurosaki, **K. Kobayashi**, and **Y. Takahashi**. 2012. B-cell intrinsic Toll-like receptor signaling accelerates memory B cell response to booster influenza vaccination. 第 41 回日本免疫学会 (神戸、12 月).
- 5) Sato, K., **Y. Takahashi**, M. Ato, and H. Asanuma. 2012. Split-virion influenza vaccines induce high levels of virus-specific antibodies upon responses to a booster immunization. 第 41 回日本免疫学会 (神戸、12 月).
- 6) CHEN Fu, FU Shuichi, SUN Lin **OHNISHI Kazuo**. 2012. Detection and characterization of influenza virus vaccine-reactive B cells. 第 41 回日本免疫学会学術集会総会 (神戸、12)
- 7) **庵原俊昭**、**浅田和豊**、一見良司、**菅 秀**、二井立恵、伊佐地真知子. 2012. 三重

県における思春期および妊婦のサイトメガロウイルス抗体保有率の検討. 第 115 回日本小児科学会学術集会 (福岡、4 月).

- 8) **庵原俊昭**、**菅 秀**、**浅田和豊**、二井立恵、伊佐地真知子、落合 仁、奥野良信. 2012. インフルエンザ HI 抗体とマイクロ中和(MN)抗体の互換性の検討. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会 (横浜、10 月).
- 9) **岡本貴世子**、**大槻紀之**、坂田真史、**森嘉生**、竹田 誠. 2012. 風疹ウイルスワクチン株の温度感受性とモルモットにおける抗体誘導能の関連性. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪、11 月).
- 10) 坂田真史、**岡本貴世子**、**大槻紀之**、安楽正輝、竹田 誠、**森 嘉生**. 2012. 風疹ウイルス C タンパク質と p150 タンパク質の共局在がウイルス産生へ及ぼす影響. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪、11 月).
- 11) **水澤左衛子**、**岡田義昭**. 2012. 核酸増幅検査のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国際標準品の制定のための共同研究と日本の国内標準品の作製について. 第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会 (福島、5 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

大西和夫: H5 亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノクローナル抗体 (出願番号) 特願 2011-2277448

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感染の血清診断に関する研究

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

初発性器ヘルペスは初感染と非初感染があり血清診断は難しいとされてきた。しかし、前者は高いIgM抗体が検出され、後者はIgM抗体は低い陰性であるがIgG抗体が検出される。そこで、IgM抗体とIgG抗体をペア血清で測定すれば血清診断は可能であることが判明した。しかし、再発例の血清診断は難しい。従来より定性的に評価してきたIgM抗体の評価に定量性を導入することにより診断的意義は上昇する。改良されたHSV-IgM抗体検出キットは判定保留が減少し現行品より優れている。最近開発された型特異抗体測定キットであるKalonとBioplexは共に特異性は良好であるが感度についての検討が必要である。

A. 研究目的

単純ヘルペスウイルス(HSV)感染では精度の良い病原診断の保険適用がなく、また常に病変があるわけではないので血清診断の意義は大きい。HSVは初感染後知覚神経節に潜伏感染し、しばしば再活性化し発症するという独特の感染病理を有するだけでなく、1型と2型の2つの型があるため複雑な血清反応を呈する。臨床的には初発と再発に分けられるが初発は初感染と非初感染があるため血清診断は困難とされてきた。そこで、HSV感染の初発例についてEIAを用いたIgM抗体捕捉法を用いた血清診断の可能性を検討すると共に現行用いられているキットの問題点を指摘し改良された改良キットの評価を行った。また、最近開発された型特異抗体測定キットの評価を行った。

B. 研究方法

1. 血清

1)性器ヘルペス患者：HSVを分離して性

器ヘルペスと診断した初発例(1型によるもの50例、2型によるもの37例、計87例)と再発例(1型によるもの11例、2型によるもの36例、計47例)から初診時から70病日の間に1例につき平均3回診断を目的として採血して得た血清の残余を用いた。

2)健康診断のために採血した血清の残余について同意を得た20才前後の学生366検体、某会社従業員612検体を用いた。すべての血清はコード化して用いた。

2. 抗体測定法

1)免疫グロブリンクラス別HSV抗体測定

a)EIA法によるHSV-IgM抗体はIgM抗体捕捉法であるデンカ生研社製キット、HSV-IgG抗体は間接法を用いているデンカ生研社製キットを用いた。いずれも既に承認され市販されているものである。現行品の欠点を改良した同社製の改良品についても検討した。

2)HSV型特異抗体

最近開発されHSV-gG1またはgG2抗

原を用いた次の2つのキット、

① Kalon Biological 製 HSV type 2 IgG キット(EIA 法)

② Biorad 製 Bioplex2200 HSV-1 & HSV-2 IgG キット

について、既知の HSV-1 抗体、HSV-2 抗体保有血清 計 60 検体を用いて評価した。

C. 研究結果

1. HSV-IgM 抗体を用いた初発性器ヘルペスの診断の可能性

性器ヘルペスの初発には初感染初発と非初感染初発があり、初感染初発の 67 例(77%)は高い IgM 抗体を示したが、非初感染初発の 20 例(23%)は IgM 抗体は陰性～低抗体となり診断はできなかった。しかし、後者は初診時より IgG 抗体は陽性である上に 2 週間で急上昇することが判明した。これらから初診時と 2 週間後のペア血清について IgM 抗体と IgG 抗体を測定すれば血清診断は可能であると考えられた。しかし、再発例については免疫グロブリンクラス別の抗体検出では診断は不可能であった。

対照として検討した非性器ヘルペス患者の 10%程度に IgM 抗体が陽性であったが抗体値は低かった。IgM 抗体について定量的な評価を取り入れれば診断効率を上昇する。例えば、初発性器ヘルペスの診断においてカットオフ値を現行の 1.20 から 3.00 にすれば感度は 87.3%から 74.7%に下がるが陽性適中度は 74.5%から 92.9%に上昇した。

2. 改良 IgM キットの評価

市販されている HSV-IgM 抗体検出キットでは判定保留例が性器ヘルペス初発例で 10.3%、再発例で 19.1%もあり、さらに HSV-IgG 陰性例についても 17.1%もみられた。そこで改良されたキットについて検討したところ、初発の陽性率は 87.4%から 72.4%、再発で 76.6%が 25.5%に減少したものの、判定保留が初発で 4.6%、再発で 8.5%と半減し HSV-IgG 陰性例でも 0.6%と激減した。臨床的にも検査の立

場からも改良品が優れていると考えられる。

3. 新しい型特異抗体キットの評価

HSV-gG1、gG2 を用いた型特異 IgG 抗体検出キット、HerpeSelect、Platelia、Captia は既に評価したが、新しく開発された Kalon 社(HSV-2 抗体のみ)と Bioplex(HSV-1 と HSV-2 抗体)のキットについて検討した。Kalon 社は型特異性は良好であるが感度が HerpeSelect より悪い。Bioplex は型特異性は良好である。感度についての検討は今後の課題である。

D. 考察

性器ヘルペスの血清診断は難しいとする考えが一般的であるが、それは HSV の複雑な感染病理に起因する。しかし、酵素抗体法(EIA)を用いて免疫グロブリンクラス別にペア血清で測定すれば初発の診断は可能であると思われる。但し、再発例について難しい。現在 EIA 抗体は定性的に判断するように設定されているが、定量的な評価を入れることにより精度は上昇すると考えられる。改良された HSV-IgM 抗体キットでは判定保留が減少し、臨床的、検査法的により有用である。型特異抗体測定法である Kalon 社と Bioplex は共に特異性は良好であるが、感度についての検討が必要である。

E. 結論

- 1) HSV-IgM、HSV-IgG 抗体をペアで測定すれば初発性器ヘルペスの診断は可能である。
- 2) EIA 法による抗体の評価を定量的にも行えるようにした方がよい。
- 3) 改良 HSV-IgM 検出キットは現行品より優れている。
- 4) 型特異抗体検出キットである Bioplex と Kalon(2型のみ)は特異性は良好である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 川名 尚、土屋裕子、西井 修、他。

2012. LAMP 法に簡易核酸抽出法 (PURE 法) を組み合わせた PURE-LAMP 法による単純ヘルペスウイルスの簡易迅速検出法の臨床評価. 産婦人科の実際. 61(1):119-125.

- 2) 川名 尚. 2012. 単純ヘルペスウイルスの母子感染感染とその予防. 臨床とウイルス. 40(1):51-90.
- 3) 川名 尚. 2012. 特集・性感染症の現状と治療の問題点5.性器ヘルペスの現状と治療の問題点. 化学療法の領域 28(5):70-83.

2. 学会発表

- 1) 川名 尚、土屋裕子、西澤美香、西井修. 2012. 女性性器ヘルペスの血清診断とその問題点. 日本性感染症学会第 25 回学術大会 (岐阜、12 月) .
- 2) 川名 尚、西澤美香、土屋裕子、西井修. 2012. 新しい単純ヘルペスウイルス 1 型、2 型特異抗体検出法免疫蛍光分析装置 BioPlex™ の評価. 日本性感染症学会第 25 回学術大会 (岐阜、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）
研究協力者 新井 智（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、臨床現場で使用されている主なインフルエンザ迅速診断キットの検出感度を測定し、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 2009/2010 シーズンの流行株である H1N1pdm および 2012/13 シーズンの B 型ワクチン株に対する迅速診断キットの検出感度を比較検討した。

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

これまでの研究において 2009/2010、2010/2011 および 2011/2012 シーズンにおいて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、計 15 キット；キット名{製造販売元}；エスプラインインフルエンザ A&B-N {富士レビオ(株)}、BD Flu エグザマン {日本ベクトン・ディッキンソン(株)}、クイックチェイサー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)}、ラピットテスト 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 A+B {(株)タウンズ}、ラピッドテスト FLU II {積水メディカル(株)}、スタットマーク 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-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 InfluenzaA/B/(H1N1) 2009 {アリーアメディカル(株)}について、A/California/07/ 2009 pdm 株に対する検出感度の比較を行ってきた。

臨床現場で多く使用されているキットの選択にあたっては、「ML インフルエンザ流行前線情報データベース：プロジェクトリーダー砂川富正/DB 管理人西藤なるを」[http:// ml-flu.children.jp/](http://ml-flu.children.jp/)を参照した。上記HPにおいて臨床現場で使用されて

いるキットとされていても、特殊な機械を使用するキットは除外した。

上記キットのうち、2013年1月現在までに2キット（ポクテムインフルエンザA/B、スタットマークFLUスティックAB）が販売終了となった。また、ラピットテストFLUスティックは、ラテックス色が3色に変更され、商品名をラピットテストカラーFLUスティックに変更された。一方、新たに3キット（スタットマークFLUスティックN {株}ニチレイバイオサイエンス）、イムノファインFLU {株}ニチレイバイオサイエンス）、プライムチェックFLU・RSV {アルフレッサファーマ株}が発売された。

新たに使用されるようになったこれら3キットを含め、現在臨床現場で使用されている計16キットについて2012/13シーズンのB型ワクチン株B/Wisconsin/1/2010に対するキットデバイスの最小検出感度を測定した。

また、A/California/07/2009 pdm 株について、新たに使用されている3キットについてキットデバイスの最小検出感度を測定するとともに、検出感度測定の一貫性を図る為、他の13キットについても再度試験を行った。

各ウイルスをMDCK細胞に感染させ、その培養上清を検出感度測定に用いた。培養上清中のウイルス量はreal-time PCRによるコピー数で表した。ウイルス液は $10^{0.5}$ 階段希釈し、各キットの検体希釈液中に $10^{6.0} \sim 10^{1.5}$ copies/testとなるように添加し、各デバイスの最小検出感度を求めた。

倫理面への配慮

用いたウイルス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された。臨床検体は用いていない。

C. 研究結果

対象とした16キットにおけるA/California/07/2009pdm株に対するデバイスの最小検出感度は $10^{2.5} \sim 10^{3.5}$ copies/

testであった。また、幾何平均は $10^{2.9}$ copies/test、中央値は 10^3 copies/testであった。

B/Wisconsin/1/2010に対する検出感度は $10^4 \sim 10^{5.5}$ copies/test、幾何平均は $10^{4.4}$ copies/test、中央値は $10^{4.5}$ copies/testであった。

16キットすべてにおいてB型よりA型のウイルスの方がより少ない量で検出可能であり、A型とB型の検出感度の差は $10^{0.5} \sim 10^{2.5}$ copies/testであった。

D. 考察

16種類のインフルエンザ迅速診断キットのB型(B/Wisconsin/1/2010)に対する最小検出感度はA型(A/California/07/2009pdm)に対する検出に比べ劣っていた。最小検出感度の平均値の比較では、B型はA型の約30倍の高濃度のウイルスが必要となる結果であった。今回、本研究において行ったのはキットデバイスの検出感度の比較であり、また用いたウイルス株は、本研究と他の研究では異なることから、その成績を単純に比較することはできない。過去の研究において、B型の検出感度の方がA型より低いとの報告がある一方、少数ではあるがA型、B型の検出感度に差はみられないとの報告もある。

B型インフルエンザウイルス感染の場合、A型インフルエンザウイルス感染の場合より採取された臨床検体中のウイルス量が少ないことが報告されており、今回の成績から、これに加えて診断キットにおけるB型の検出感度が低いことは、B型インフルエンザの診断をより困難にしていると考えられる。

16キットにおける最小検出量はA/California/07/2009pdm株では $10^{2.5} \sim 10^{3.5}$ copies/test、B/Wisconsin/1/2010では $10^4 \sim 10^{5.5}$ copies/testであり、キット間の検出感度に大きな差は見られなかった。A/California/07/2009pdm株に対するキット間の検出感度の差が以前より少なかった

理由として、他のキットに比べ検出感度が劣っていたキットが販売終了となったことが理由として考えられる。

今回対象としたキットはすべてイムノクロマト法によるものであり、すべてのキットにおいてインフルエンザ A、B 型別の検出が可能であった。それに加えて H1N1 亜型かどうかの鑑別が可能なキット、インフルエンザウイルスに加えて RS ウイルスの検出が可能なキットが新たに開発され使用されている。

型別検出に加え H1N1 亜型の検出が可能なキットは、2009 年に世界的大流行を起こした A (H1N1) pdm 株によるインフルエンザの臨床症状がそれまでの季節性インフルエンザと異なり、ウイルス性肺炎が多く報告されたり、喘息の既往歴があった小児で突然の呼吸状態の悪化などが報告されていたことから、臨床的対応に役立つことも目的の一つとして開発されたと考えられる。しかし、このキットの A/California/07/2009pdm に対するデバイス最小検出感度は A 型検出については他のキットと同等であるものの、H1N1 亜型に対する検出感度はその 1/100 であったことから、特に H1N1 株流行時においては、採取されるウイルス量が少ない場合、A 型陽性、H1N1 陰性の判定となる可能性があり、亜型判定を誤る可能性があるのではないかと考えられた。

今回の研究目的がインフルエンザ迅速診断キットの比較検討であったことから、インフルエンザウイルスと RS ウイルスの両方を検出可能なキットについて、RS ウイルスの検出感度の検討は行っていない。このキットの価格は 1 テストあたり他のキットの約 1.5 倍であり、16 キット中最も高価であるが、1 度のテストでインフルエンザウイルスと RS ウイルスの鑑別が可能であることは特に乳幼児および高齢者の診断時において有用と考えられた。

E. 結論

本年度に販売終了あるいは新たに発売

されたキットがあるが、現在市販されているキットにおける A/California/07/2009pdm に対するキットの検出感度の平均は以前より高くなり、またキット間の差も小さくなった。

16 キット間における B/Wisconsin/1/2010 に対する検出感度の差は少なかったが、A/California/07/2009pdm に対する検出感度より低かった。特に B 型に対し、検出感度の向上が望まれる。

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 |

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。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。最後に、抗体の結合親和性を評価したところ、NP タンパクに高親和性で結合することが判明し、本キットの感度に貢献していると考えられた。

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評価するため、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と結合親和性を明らかにする。

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 による抗体特異性と親和性の検証
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 抗体を加えた。抗体親和性を評価する実験では、7M 尿素をウェルに添加した。最終的にプレートに結合した抗体量、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG 抗体で検出・定量した。

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