

った。

C. 研究結果

(1) 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。

(2) 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な役割を果たす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。

(3) NSP5, NSP23 抗体の結合親和性の評価

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、どちらの抗体も 7M 尿素処理によって抗体が剥離しないことから、高親和性で NP タンパクに結合すると考えられた。

D. 考察

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。

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と結合親和性を明らかにした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 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
- 4) Ohnishi, K., Y. Takahashi, N. Kono, N. Nakajima, F. Mizukoshi, S. Misawa, T. Yamamoto, Y. Mitsuki, S. Fu, N.

Hirayama, M. Ohshima, M. Ato, T. Kageyama, T. Odagiri, M. Tashiro, K. Kobayashi, S. Itamura, Y. Tsunetsugu-Yokota. 2012. Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus. Jpn. J. Infect. Dis., 65: 19-27.

- 5) 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.
- 6) 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.

2. 学会発表

- 1) 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) .
- 2) 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) .
- 3) 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) .

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

ノロウイルス体外診断薬の改良に関する研究

研究分担者 岡田 賢司 （国立病院機構福岡病院）

研究協力者 権平 文夫 （デンカ生研）

研究要旨

従来のノロウイルス診断キットの適応検体は排泄便のみであり、臨床現場では直腸拭い液を取らざるを得ない場合もある。さらに新生児の便も適応外となっていた。今回、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。

A. 研究の目的

2012年4月からは、ノロウイルス迅速診断キットが、適応が限定されているが保険収載され利用が増加している。市販後当初は、検査の検体は便検体のみであり、直腸ぬぐい液や新生児の検体は適応外であった。この要因を検討した。

B. 研究方法

従来のノロウイルスのキット（クイックナビノロ）の改良品（クイックナビノロ2）を同一便検体を用いて感度・特異度を比較した。改良項目は、1）検体処理時の検体浮遊液の組成変更、2）検体採取のためのスワブの変更、3）検出抗体の組み合わせの変更と追加とした。

C. 結果

まず、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%と上昇した。続いて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。

D. 考察

従来キットから、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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表
 - 1) 岡田賢司. 2012. 感染性胃腸炎・食中毒について（主にノロウイルス対策について）平成24年度国立病院機構院内

感染対策研修会（熊本、1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

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

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 菅 秀（国立病院機構三重病院・臨床研究部）
研究協力者 浅田 和豊（国立病院機構三重病院・臨床研究部）

研究要旨

WHO は各種感染症の抗体価を国際単位で表示することを求めており、そのために標準血清を準備すると同時に水痘発症予防抗体価を 150 mIU/ml としている。今回デンカの EIA-IgG 抗体測定試薬で求められる抗体価を国際単位で表示するとともに、本邦献血者由来 IVIG に含まれる水痘抗体価を測定し、水痘患者接触後の発症予防に用いる IVIG の量について検討した。

デンカ水痘抗体標準血清各濃度の国際単位抗体価から、EIA 価の約 50 倍が国際単位(mIU/ml)に相当し、水痘発症予防抗体価である 150 mIU/ml は 2.75 EIA 価に相当した。本邦では現在デンカの抗体陽性閾値である 4.0 EIA 価を発症予防抗体価としているが、今回の検討でデンカの陽性閾値（4.0 EIA 価）を発症予防抗体価として問題はないと判断された。また、本邦 4 社の献血由来 IVIG の VZV 抗体価はメーカー間で差があり、ポリグロビン N が一番高値であった。4 社の IVIG を 100 mg/kg 投与すると、計算上いずれも発症予防レベルの 4 倍以上の抗体価になると推計され、免疫健全者では IVIG を 100 mg/kg 投与すれば発症予防が期待されると推察された。

A. 研究目的

WHO は水痘の発症予防抗体価を 150 mIU/ml と定義している。しかし、本邦で水痘抗体測定に頻用されている酵素免疫法(EIA)および免疫付着赤血球凝集法(IAHA)では、抗体価は国際単位で表示されていない。また、妊婦や免疫不全児が水痘患者と接触があった場合、欧米では水痘高単位ガンマグロブリン(VZIG)が使用されている。しかし、本邦では VZIG は市販されておらず、静注用ガンマグロブリン(IVIG)が代用されているが、使用量は確立されていない。

今回、NIBSC から水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)標準血清を購入し、本邦 EIA 法で測定される VZV 抗体価を国際単位で表示すると同時に、WHO の水痘発症予防抗体価を EIA 価で表示することを目的とした。また、本邦で製造された4社の献血由来 IVIG 中に含まれる VZV 抗体価を測定し、水痘患者との接触時

に発症予防に用いる IVIG 量を推計することを目的とした。

B. 研究方法

1) デンカ標準血清の国際単位表示

NIBSC から VZV 標準血清 (Code w1044、50 IU/ml) を購入した。デンカ各濃度水痘標準血清の国際単位表示は、デンカ生研の水痘 EIA-IgG 測定試薬を用い、NIBSC 標準血清を 2 倍段階希釈し、求められた値から検量線を作成し、デンカ各濃度水痘標準血清の抗体価を国際単位で求めた。4 回の測定で算出されたデンカ標準血清各濃度の抗体価から平均抗体価を求め、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 150mIU/ml に一致する EIA 価を求めた。

2) IVIG の VZV 抗体価の測定

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 (A 社 (ベニロン I) は 2007 年と 2012 年、B 社 (ポリグロブリン N)、C 社 (ベノグロブリン IH)、D 社 (グロベニン I) は 2008 年と 2012 年) を購入した (表 1)。NIBSC の標準血清を 2 倍段階希釈したものをスタンダードとし、IVIG を 2 倍段階希釈し、デンカ生研水痘 EIA-IgG 測定試薬を用いて抗体価を測定した。各濃度の抗体価から相関直線を算出し、IVIG 原液の VZV 抗体価を国際単位で算出した。4 回の測定を行い、平均値を各 IVIG の抗体価とした。

倫理面への配慮

本研究ではヒト由来のサンプルを用いていないが、ヒト由来のサンプルを用いるときは当院の倫理審査委員会に申請し、承認を得てから行うこととした。

C. 研究結果

1) デンカ標準血清の国際単位表示

4 回測定し、デンカ標準血清各濃度の国際単位抗体価は、128 EIA 価は 5415 mIU/ml (42.3 倍)、64 EIA 価は 2723 mIU/ml (42.5 倍)、32 EIA 価は 1543 mIU/ml (48.2 倍)、8 EIA 価は 438 mIU/ml (54.5 倍)、4 EIA 価は 224 mIU/ml (56.0 倍)、2 EIA 価は 103 mIU/ml (51.5 倍) と、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) \cong EIA 価 \times 50) に相当した。

2) IVIG の VZV 抗体価の測定

IVIG 中に含まれる VZV 抗体価は、ポリグロビン N が一番高く (2008 年 5735 mIU/ml、2012 年 5335 mIU/ml)、続いてベノグロブリン IH (2008 年 4426 mIU/ml、2012 年 4478 mIU/ml)、ベニロン I (2007 年 4040 mIU/ml、2012 年 4202 mIU/ml)、グロベニン I (2008 年 4083 mIU/ml、2012 年 3653 mIU/ml) 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開きは認められなかった (表 1)。なお、2012 年の抗体価では、一番高いポリグロビン N は一番低いグロベニン I の 1.46 倍多く VZV 抗体が含まれていた。また、各社とも 2007/08 年と 2012 年の抗体価には大きな差は認められなかった。

D. 考察

抗体測定方法には種々の方法がある。WHO は異なる測定方法で測られた抗体価を統一した単位 (mIU/ml) で表示することを求めており、このために標準血清を準備している。

多量の検体の抗体価を測定する方法として EIA 法が優れている。EIA 法を測定するキットとして、世界ではシーメンスのキットが、本邦ではデンカのキットがよく使用されている。シーメンスのキットを用いると、測定された水痘抗体価は国際単位 (mIU/ml) で表示されるが、デンカのキットで測定された水痘抗体価は EIA 価で表示されるため、EIA 価と国際単位の互換性が不明であった。

今回、デンカの VZV-IgG 抗体測定試薬を用い、NIBSC 標準血清の 2 倍段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することが可能となった。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。また、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 \cong 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。理論上 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。また、本邦ではデンカの EIA 法の陽性閾値は 4.0 EIA 価であり、今までの習慣上この値を水痘発症予防抗体価とする方が、判定保留域に

ある2.75 EIA 価よりも受け入れやすいと判断される。以上の検討結果から、IAHA 法 4 倍、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。メーカーごとおよび 2007/08 年と 2012 年に作成したロット間の抗体価の違いについて検討した。メーカーごとの検討では、ポリグロビン N が最も VZV 抗体価が高く（一番低いところの 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、日本人ドナー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。

ヒトの体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、ポリグロビン N 889 mIU/ml、ベノグロブリン 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（表 2）。以上の結果から、免疫健全者（者）では本邦の IVIG を 100mg/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の投与が必要と推察された。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 61:1301-1310.
- 2) 庵原俊昭. 2012. ウイルス感染症の診断. 臨床と微生物 39:649-655.

2. 学会発表

- 1) 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）.
- 2) 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 抗体とマイクログロブリン(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）.

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) 本邦の献血由来 IVIG の特徴と VZV 抗体価

	ベニロンI	ポリグロブリン N	ベノグロブリンI	グロベニンI
メーカー	化血研	日赤	ベネシス	日本製薬
性状	凍結乾燥	液状	液状	凍結乾燥
製造方法	スルフォ化	pH4.25 処理	PEG 処理	PEG 処理
血中半減期	25 日	29 日	27 日	18 日
VZV 抗体価(mIU/ml)				
2007/08 年	4040	5735	4426	4083
2012 年	4202	5335	4478	3653

PEG : ポリエチレングリコール

(表2) IVIG の投与量と推計される VZV 抗体価(mIU/ml)

	IVIG 抗体価	VZV 抗体価				
		IVIG 投与量(mg/kg)				
		2000	1000	400	200	100
ベニロンI	4202	3362	2801	1868	1201	700
ポリグロビン N	5335	4268	3357	2371	1524	889
ベノグロブリンI	4478	3582	2985	1990	1279	746
グロベニンI	3653	2922	2435	1624	1044	609

ヒトのガンマグロブリン濃度は 500 mg/kg であり、投与量に応じて抗体価が推計される
推計 VZV 抗体価 = IVIG の VZV 抗体価 × (投与量 / (投与量 + 500))

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。風疹感染では、発症初期にウイルスが多く排出されるため、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と考えられる。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。今年度は Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法の条件を検討し、前年度に作製した TaqMan リアルタイム PCR 法との感度比較を行った。

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。一方で麻疹では国内で遺伝子診断が定着しつつあり、麻疹排除計画の進行に貢献している。現在ウイルス遺伝子検出法で汎用されているのはリアルタイム PCR 法や Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法である。これらは所要時間が短く、反応後の増幅産物を取り扱わずに検出が可能であるため、遺伝子検出法として今後ますます重要な方法である。

前年度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。本年度は LAMP 法の条件検討を行い、TaqMan リアルタイム PCR 法と感度の比較を行った。

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 Explorer V3 (栄研化学)を用いて 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 CDC より分与された風疹ウイルスを含む全 genotype (13 種)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 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

表 1 LAMP 法における標準 RNA の検出限界値

Standard RNA (copies / reaction)	Number of positive samples / number of tested samples			Positive (%)
	1	2	3	
10 ⁶	3/3	3/3	3/3	100%
10 ⁵	3/3	3/3	3/3	100%
10 ⁴	3/3	3/3	3/3	100%
10 ³	2/3	2/3	3/3	78%
10 ²	0/3	0/3	1/3	11%
10	0/3	0/3	0/3	0%

表 2 各 genotype のウイルス RNA の検出感度

Genotype	Viral dose (PFU)											
	10 ³		10 ²		10 ¹		10 ⁰		10 ⁻¹		10 ⁻²	
	LAMP	TaqMan	LAMP	TaqMan	LAMP	TaqMan	LAMP	TaqMan	LAMP	TaqMan	LAMP	TaqMan
1a	25.6 ± 5.21	28.0 ± 0.06	30.5 ± 3.80	31.6 ± 0.12	60.0<	35.0 ± 0.34	60.0<	38.1 ± 0.60	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1B	20.7 ± 3.56	27.0 ± 0.04	60.0<	30.6 ± 0.12	60.0<	34.2 ± 0.19	60.0<	37.4 ± 0.51	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1C	22.6 ± 2.52	27.4 ± 0.07	32.0 ± 2.08	31.2 ± 0.08	60.0<	33.3 ± 0.39	60.0<	37.7 ± 0.31	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1E	20.4 ± 2.70	27.9 ± 0.30	27.4 ± 3.66	31.3 ± 0.12	60.0<	34.7 ± 0.32	60.0<	38.5 ± 0.96	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1F	23.0 ± 3.07	26.5 ± 0.05	60.0<	30.2 ± 0.10	60.0<	34.1 ± 0.17	60.0<	37.3 ± 0.45	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1G	18.4 ± 0.97	26.5 ± 0.13	25.4 ± 2.87	29.8 ± 0.19	60.0<	32.7 ± 0.27	60.0<	36.6 ± 0.80	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1h	19.7 ± 0.62	28.4 ± 0.08	26.1 ± 1.03	31.8 ± 0.17	60.0<	35.3 ± 0.32	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1i	22.9 ± 2.81	29.3 ± 0.07	31.2 ± 6.42	32.7 ± 0.26	60.0<	35.9 ± 0.21	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
2A	22.5 ± 2.39	29.3 ± 0.15	31.1 ± 2.34	32.8 ± 0.15	60.0<	36.2 ± 0.12	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
2B	24.8 ± 4.41	28.7 ± 0.26	60.0<	32.2 ± 0.18	60.0<	35.3 ± 0.43	60.0<	39.1 ± 0.56	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
2C	60.0<	28.8 ± 0.13	60.0<	32.2 ± 0.15	60.0<	35.6 ± 0.30	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1D	24.1 ± 5.21	26.7 ± 0.15	60.0<	30.8 ± 0.12	60.0<	34.3 ± 0.09	60.0<	37.8 ± 0.02	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<
1j	21.7 ± 1.87	28.3 ± 0.27	60.0<	32.2 ± 0.21	60.0<	35.7 ± 0.32	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<	60.0<	40.0<

表 3 添加試験

Genotype	Viral dose (PFU)									
	10 ³		10 ²		10 ¹		10 ⁰		10 ⁻¹	
	RT-LAMP	TaqMan	RT-LAMP	TaqMan	RT-LAMP	TaqMan	RT-LAMP	TaqMan	RT-LAMP	TaqMan
1E	22.74 ± 4.38	27.8 ± 0.36	29.78±4.01	31.0 ± 0.23	60.0<	34.5 ± 0.18	60.0<	34.5 ± 0.18	60.0<	40.0<
1h	20.12 ± 1.39	28.5 ± 0.39	26.24±2.57	31.6 ± 0.34	60.0<	35.0 ± 0.47	60.0<	35.0 ± 0.47	60.0<	40.0<
2B	22.30 ± 0.30	28.8 ± 0.21	60.0<	32.3 ± 0.24	60.0<	35.7 ± 0.18	60.0<	35.7 ± 0.18	60.0<	40.0<
1j	25.36 ± 4.90	29.4 ± 0.28	60.0<	33.0 ± 0.43	60.0<	35.7 ± 0.43	60.0<	35.7 ± 0.43	60.0<	40.0<

A 型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価

研究分担者 大西 和夫（国立感染症研究所・免疫部）

研究要旨

前回報告したように、上市されている急性 A 型肝炎体外診断薬のうち、一部の IgM 型 HAV 特異抗体検出キットは流行ウイルス亜株に対して検出特性が劣ることを明らかにしている。この事例は、HAV 体外診断薬の感度・特異性が一部の流行 HAV 亜株の検出に対して不十分となる可能性を示唆しており、そのメカニズムについての詳細な検討が必要である。診断キットの検出特性をウイルス亜株の抗原性の変化に対応させるためには、キットに含まれるウイルス粒子の抗原性を補う補正ペプチドの設計が重要である。しかし、HAV のウイルス粒子表面のエピトープ・ペプチドの解析はこれまで報告が少なく進んでいない。今回はこの点を重点的に検討し、近年報告された HAV ウイルス株ゲノム情報を精査し、ウイルス表面エピトープの変異について検討した。世界各地の HAV 汚染地域から分離されたゲノム情報は比較的迅速に公開されることから、ウイルス変異に即応して補正ペプチドを設計して診断薬の検出特性を担保する技術の実用化が必要である。ウイルス感染症免疫学的診断系の構築技術について、H5N1 インフルエンザウイルスの特異的検出系についても検討したので合わせて報告する。

A. 研究目的

2012 年の国内における A 型肝炎報告例は累積 157 例（12 月第 1 週まで）で集団感染事例は発生していない。報告例のうち約 3 分の 1 は直近の海外渡航歴があり、海外で感染した後国内で発症した可能性が高い。渡航先としては、南アジア、東南アジア、中近東が多かった。このように、近年の国内 A 型肝炎発症例は海外で感染して帰国後発症する例が無視できない。この事は、国内で販売される A 型肝炎ウイルス（HAV）診断キットが海外の HAV 汚染地域における各亜株に対応して検出特性を保持する必要がある事を示す。前回報告したように、一部の IgM 型 HAV 特異抗体検出キットは流行ウイルス亜株に対して検出特性が劣ることを明らかにしている。診断キットの検出特性をウイルス亜株の抗原性の変化に対

応させるためには、キットに含まれるウイルス粒子の抗原性を補う補正ペプチドの設計が重要である。しかし、HAV のウイルス粒子表面のエピトープ・ペプチドの解析はこれまで報告が少なく進んでいない。今回はこの点を重点的に検討し、近年報告された HAV ウイルス株ゲノム情報を精査し、ウイルス表面エピトープの変異について検討した。

B. 研究方法

ウイルス粒子表面の構造データが大量に蓄積されつつある。おもに米国 NCBI に蓄積されたウイルスゲノム情報、ウイルスタンパク質構造情報を取得して、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。具体的には、補正ペプチド候補として HAV の 2 つの線形ペプチド（VP1₁₁₋₂₅

と VP3_110-121) について HAV 亜株間のアミノ酸変異と分子構造学的な解析を行った。さらに、その免疫原性を調べるために、マウスを HAV ワクチンで免疫して抗体応答の測定を行い、VP1 と VP3 に対する抗体成分を検討する一方で、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。

HAV の結晶構造は未だ明らかになっていないので、同じピコルナウイルスに属する Rhinovirus の構造データを利用した。ホモロジーモデリング・分子動力学法・二次構造予測等の方法を用いた。

線形エピトープ VP1/VP3 の抗体誘導能力の検討については、マウスを HAV 粒子で免疫し、ELISA 法を用いて抗体応答の測定を行い、ウイルス粒子に対する抗体に占める VP1 および VP3 ペプチド抗体の占有率を検討した。

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。

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・コンセントの上で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. ピコルナウイルスの構造データを精査する事によって HAV の線形エピトープ VP1_11-25 (配列: TVSTEQNVDPQVGI) はウイルス表面に露出し、ランダムコイル状であることが予測され、抗体認識エピトープ

の要件を満たしていると考えられた。VP3_110-121 (配列: FWRGDLVDFQV) はβ-シート様の二次構造をとり、ウイルス粒子内部に位置していると考えられた。

2. NCBI に蓄積された HAV ゲノム配列の全てのデータ (12,092 配列) について、VP1_11-25 の変異について解析した。その結果、7箇所突然変異があり、この変異を考慮した7種類の補正ペプチドを合成すれば、全ての HAV 変異株の検出を可能にする事が示唆された。
3. ELISA による測定の結果、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 と結合することが示唆された。この事は、VP1_11-25 のエピトープが十分な免疫原性を持っている事を示唆する。
4. ピコルナウイルスの構造データから HAV の新規標的エピトープを設定した。類推される HAV ウイルス VP1 表面ペプチド (ループ A) について、二次構造予測と分子動力学解析を行い、立体構造を保持したペプチドを試作した。
5. 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、それを用いて検出特性に優れたウイルス粒子捕捉診断系を構築することが出来た。各モノクローナル抗体の特性を検討した。

D. 考察

VP1_11-25 と VP3_110-121 については、これまで蛋白化学的、構造学的な解析がなされていなかったが、これらの構成するエピトープが占めるウイルス粒子構造上の位置を予測することが出来た。VP1_11-25 はウイルス粒子表面のランダムコイルであり、B 細胞エピトープの要件を満たして優れた免疫学的標的であると考えられた。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。以上の事から、構造を保ったウイ

ルス粒子では VP1_11-25 が認識され、壊れたウイルス粒子では VP3_110-121 も認識される事が予想される。

HAV ワクチン免疫血清中に、VP1_11-25 はウイルス表面に対する抗体の約 10%、VP3 は約 6% の存在率で誘導されていた。これ等のみでは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、多種のピコルナウイルスの主要なエピトープとなる事が知られており、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、分子動力学法により、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てサンドイッチ ELISA の諸条件を検討して優れたウイルス粒子捕捉診断キットを構築することが出来た。同様の技術が HAV 診断キットにも応用できる。

E. 結論

世界各地で流行している HAV 亜株を漏れなく診断出来る体外診断薬が理想的である。この目的のために現在までの全ての 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定を行った（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必要がある。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が実現できれば、診断特性向上・感染防御に有用な抗体の開発が短時間で実現できる。また世界各地で流行している HAV ウイルス亜株に対しての免疫学的検出も飛躍的に進歩し、新規突然変異株の出現に迅速に対応する事が期待で

きる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **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.

2. 学会発表

- 1) 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 月）.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

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 2011-227748

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

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

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）

研究要旨

ウイルスの検出を目的とした体外診断薬の再評価には国際ハーモナイゼーションの点から国際標準品またはそれに準拠した国内標準品を用いることが望ましい。本研究においては、世界保健機関（WHO）国際標準品等の整備に関する最新の動向を把握し、国内標準品の整備計画に反映させることを目的とする。2012年のWHO生物製剤標準化に関する専門家委員会において第二次 HIV-1 核酸増幅試験（NAT）遺伝子型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 核酸増幅試験 遺伝子型パネルを作製するための国際共同研究に参加し、さらに、新たに作製することになった B 型肝炎 S 抗原とパルボウイルス B19-DNA 国際標準品作製のための共同研究に参加することになった。2011年に E 型肝炎 -RNA の WHO 国際標準品作製のための国際共同研究においてドイツのポールエーリッヒ研究所と国立感染症研究所が共同で国際標準品と日本国内標準品の候補品の評価を行い、2011年生物製剤標準化に関する専門家委員会（ECBS）において HEV-RNA 国際標準品が制定され、2012年に薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会 NAT 小委員会において HEV-RNA 国内標準品が制定された。国立感染症研究所が国内標準品の保管と交付を行っている。

A. 研究目的

ウイルス検出を目的とした体外診断薬の技術の進歩は著しく、国内外メーカーが製造する体外診断薬が世界中で使用されている。国際ハーモナイゼーションの点から、国内で使用されている体外診断薬の再評価に用いる国内標準品や国内標準パネルは WHO 国際標準品に基づいて力価を表示し、国内外の疫学的動向と技術の進歩を考慮して作製することが重要である。本研究においては、WHO 国際標準品等の整備に関する最新の動向を把握し、国内標準品の

整備計画に反映させることを目的とする。

B. 研究方法

1. 第 23 回 SoGAT-BV 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（ECBS, 2012 年 10 月）の議案書をレビューすることによって、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。

2. WHO 国際標準品および標準パネル作製のための国際共同研究に国立感染症研究所が参加協力した。

3. 2011 年の国際共同研究によって評価した HEV-RNA 国内標準品の承認を受けるために研究結果を平成 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）に報告した。国内標準品が制定されたことを同年 9 月の検定協議会に報告して国立感染症研究所が交付する標準品等としての承認を受けた。

倫理面への配慮

該当しない。

C. 研究結果

1. 体外診断薬のための国際標準品整備の動向

WHO が 2007 年から推進してきた「血液の安全性に関する体外診断薬のための標準品整備 5 カ年計画」と 2009 年に改訂した計画に基づいて、2012 年の 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。

2. WHO 国際標準品および標準パネル作製のための国際共同研究への本邦からの参加協力

国立感染症研究所では、平成 20 年度から、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協力してきた。2012 年に制定された HIV-1 genotype NAT パネルの国際共同研究に参加した。また、新たに作製することが決まった第三次 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。既に 2010 - 2011 年の ECBS で作製することが決まった国際標準品等のうち 11 の国際共同研究が現在進行中であり、国立感染症研究所は第一次 Mycoplasma-NAT 国際標準品をはじめとする 7 つの共同研究に参加協力し、第一次 Mycoplasma-NAT 国際標準品、第二次 HBeAg 国際標準品及び第一次 HBe IgG 抗

体国際標準品の候補品の力価を測定して報告した（表 1）。

3. HEV-RNA の WHO 国際標準品と日本の国内標準品の制定

2009 年にドイツのポールエーリッヒ研究所 (PEI) の Dr. Baylis の提案によって、HEV-RNA の WHO 国際標準品と日本の国内標準品を PEI と国立感染症研究所とで共同して作製し、2011 年 ECBS において力価 250,000IU/mL の第一次 HEV-RNA 国際標準品 (code 6329/10) が制定された。続いて、共同研究の結果を平成 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）に報告し、力価 250,000IU/mL の第一世代 HEV-RNA 国内標準品が制定された。同年 9 月の検定協議会において国立感染症研究所が交付する標準品等として承認され、11 月に交付が開始された。

4. 定量 NAT の臨床試験薬のための国際単位系にトレーサブルな核酸の認証標準物質

定量 NAT の臨床試験薬の普及に伴って、臨床検査の結果を経時的あるいは施設間で比較する必要性から、2002 年以来、Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM : the International Committee of Weights and Measure, the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, the International Laboratory Accreditation Cooperation)において国際単位系 (SI) にトレーサブルな核酸の認証標準物質の必要性が討議されてきた。核酸の認証標準物質はトレーサビリティ、種類と供給量、安定性の点で優れている。現在、ウイルス検査のための認証標準物質はアメリカの National Institute of Standard and Technology (NIST)が製造、認証、配布している Cytomegalovirus SRM 2366 のみである。日本では日本臨床検査標準評議会 (JCCLS)がガイドラインを整備している。産総研計量標準総合センター (AIST/NMIJ) が NMI としてバイオメディカル分野の認

証標準物質の開発をすすめているが、ウイルス検査の標準物質は現在ない。

一方、核酸を標準物質とする SI 表示の国際標準品について SoGAT においても討議されてきた。国際標準品には“Commutability”が求められている。“Commutability”とは、種々の異なる測定法を用いて測定しても国際標準品が実際の試験検体と同様の挙動を示すことを意味する。血液中のウイルスの遺伝子の NAT は核酸の抽出と検出の 2 つの過程からなっている。両方の過程を反映するにはウイルス粒子を含む血漿（ウイルス陽性血漿）が標準品に適しているとの考えから、ウイルス NAT のための国際標準品は陽性血漿を陰性血漿で希釈した凍結乾燥品である。例外として、HPV type 16-DNA と HPV type 18-DNA の国際標準品は plasmid である。

D. 考察

1. 2007 年に WHO が「血液の安全性に関する体外診断薬のための標準品整備 5 カ年計画」を発表してから、国際標準品等の整備に関する最新の動向を把握するために SoGAT 会議と EBCS の情報の収集と交換を継続して行ってきた。その結果、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。

2. 国際標準品に準拠した国内標準品を作製するためには国際標準品の入手が不可欠であるが、国際標準品が制定されてから交付を受けて国内標準品を作製すると更に 1-2 年を要することが問題であった。今回の HEV-RNA 標準品作製の共同研究によって国際標準品と同じ力価で同等の品質の国内標準品を迅速に制定し、国際標準品制定の 1 年後に交付を開始することが出来た。

3. 近年、種々のウイルス遺伝子を定量するための体外診断薬が開発されるに従い、核酸を標準物質とする SI 表示の国際標準品を求める声がある。SoGAT において議

題にされてきたが、合成核酸は核酸抽出の過程を反映することができないことから現段階では血漿中のウイルスの NAT の国際標準品には使用されていない。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だろう。

E. 結論

1. 2012 年の WHO 生物製剤標準化に関する専門家委員会において第二次 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。

2. 国立感染症研究所は HIV-1 genotype NAT パネルを作製するための国際共同研究に参加し、さらに、新たに作製することになった HBsAg とパルボウイルス B19-DNA 国際標準品作製のための共同研究に参加することになった。

3. ドイツのポールエーリッヒ研究所と国立感染症研究所が共同で HEV-RNA 国際標準品と日本国内標準品の候補品を評価した。2011 年 ECBS において HEV-RNA 国際標準品（力価 250,000IU/mL）が制定され、2012 年に薬事食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会 NAT 小委員会において HEV-RNA 国内標準品（力価 250,000IU/mL）が制定された。国立感染症研究所が国内標準品の保管と交付を行っている。

4. ウイルス定量 NAT の臨床試験薬のための国際単位系にトレーサブルな核酸の認証標準物質は現在のところアメリカの NIST が製造、認証、配布する Cytomegalovirus SRM 2366 のみである。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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) 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 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

2010

	1 st HHV-6-NAT IS	NIBSC
	1 st Adenovirus-NAT IS	NIBSC
★	1 st Mycoplasma-NAT IS	PEI, NIBSC, FDA
	1 st Anti-Babesia Antibody Panel	
	1 st Chikungunya-NAT Panel	CBER/FDA

2011

★	2 nd HAV-NAT IS	NIBSC
★	1 st HBeAg IS	NIBSC
★	1 st HBe(IgG) IS	NIBSC
★	1 st HEV Genotype Panel	PEI
★	2 nd HIV-1 NAT Genotype Panel	NIBSC
★	1 st HIV-1 CRF NAT Genotype Panel	NIBSC

2012

★	3 rd HBsAg IS	NIBSC
★	3 rd B19-DNA IS	NIBSC

Table1. On-going New Projects Endosed by ECBS in 2010-2012.
★ indicates NIID participation.

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
川名 尚、 土屋裕子、 西井 修、他	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	119-125	2012
川名 尚	単純ヘルペスウイルスの母子感染とその予防	臨床とウイルス	40	51-60	2012
川名 尚	性器ヘルペスの現状と治療の問題点	化学療法の領域	28	70-83	2012
Yanagibashi, T Hosono, A Oyama, A Takahashi, Y Morose, Y Itoh, K Hirayama, K Takahashi, K Kaminogawa, S	IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: Bacteroides acidfaciens promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA ⁺ B cells	Immunobiology	Epub ahead of print		2012
Kaji, T Ishige, A Hikida, M Taka, J Hijikata, A Kubo, M Nagashima, T Takahashi, Y Kurosaki, T Okada, M Ohara, O Rajewsky, K Takemori, T	Distinct cellular pathways select germline—encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory	J Exp Med	209	2079-2097	2012
Onodera, T Takahashi, Y Yokoi, Y Ato, M Kodama, Y Hachimura, S Kurosaki, T Kobayashi, K	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	2012
Ohnishi, K Takahashi, Y Kono, N Nakajima, N Mizukoshi, F Misawa, S Yamamoto, T Mitsuki, Y Fu, S Hirayama, N Ohshima, M Ato, M	Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus	Jpn J Infect Dis	65	19-27	2012