

表2 先天性 CMV 感染の予防と治療

1) 予 防	
・妊 婦	ワクチン(生ワクチン, サブユニットワクチン*)
2) 治 療	
・妊 婦	抗 CMV 抗体高力価免疫グロブリン(CMV-IG) 2~4 週ごとに 200 U/kg を静脈投与, 2 回 静注用免疫グロブリン(IVIG, CMV-IG の代用) 500 mg/kg [†] を妊婦に静脈投与
・胎 児	抗 CMV 抗体高力価免疫グロブリン 腹水あり: 2.5 g(50 ml) 以下を腹腔内投与, 1~2 週間の間隔をあけて 2 回以上 腹水なし: 1 g(20 ml) を 1 週間隔で 5 回腹腔内投与
・新生児	ガンシクロビル(GCV) 1 回 6 mg/kg を 12 時間ごとに 1 日 2 回, 6 週間投与 バルガンシクロビル(V-GCV) 1 回 15~16 mg/kg を 1 日 2 回, 6 週間投与

*: MF59 をアジュバントとするリコンビナント CMV エンベロープ gB ワクチンは phase III まで治療が進んでいる。感染予防を指標としたときの有効率は 50%。

†: 高力価 CMV 抗体免疫グロブリン 200 U/kg に相当する IVIG 量。

ゼチェーン反応(PCR)法によるウイルス核酸の検出は診断に有用である。CMV 抗原血症検査も診断に使用される⁸⁾。

2 胎児の CMV 感染の診断

TORCH 症候群が疑われる胎児の超音波検査所見や妊婦の血清抗体価から、臨床上胎児への CMV 感染が疑われたとき、羊水の PCR 検査が診断に有用である²⁾。羊水中の CMV ゲノム数が 1,000 コピー以上検出されると胎児感染成立のリスクが高く、5,000 コピー以上は症候性感染のリスクが高いとされている。

3 先天性 CMV 感染の診断

CMV は周産期にも感染するリスクがあるため、先天性感染を証明するためには生後 3 週間以内に尿、唾液、血液などのサンプルを採取する必要がある。古典的なウイルス学的診断法はウイルス分離である。CMV の分離にはヒト線維芽細胞が用いられる。ウイルス分離には時間を要するため、CMV 感染のウイルス学的な早期診断法として PCR 法が用いられている。尿や唾液のほうが血液よりも検出感度が高率である^{12)~15)}。母体の CMV に対する免疫状態により、出産時のウイルス血症の程度が異なるため

である。ウイルス抗原血症も胎内感染では陽性になりにくいとされている。IgM 抗体は母体から児に移行しないため、血清 IgM 抗体の検出も診断に有用である。児の IgG 抗体は移行抗体の影響を受けるため、先天性感染の早期診断には不適當である。

生後 2 週以降に先天性 CMV 感染を疑った場合や、出生後遅れて感音性難聴に気づかれ先天性 CMV 感染が疑われる場合、わが国では保存していた臍帯を用いて先天性 CMV 感染の診断が行われている¹⁶⁾。乾燥臍帯から DNA を抽出し、PCR 法にて血液中に含まれている CMV 核酸を検出する。乾燥臍帯を用いる検査は、先天性 CMV 感染の後方視的診断に有用な検査とされている。

5. 先天性 CMV 感染の治療 (表 2)

1 母体を介する胎児治療

妊娠 20 週までに CMV 感染が抗体検査やウイルス分離、ウイルス核酸検出などから診断された妊婦に、抗 CMV 抗体高力価免疫グロブリン(CMV-IG) 200 U/kg を 2~4 週ごとに 1~2 回点滴静注すると、先天性 CMV 感染や症候性先

表3 日本のCMV血清疫学

年	対象	地域	CMV抗体陽性率
～1990	成人	日本	≥90%
1999	妊婦	愛知	77.5%*
2005	20歳前後の女子学生	東京	63.6%
2010	17～30歳の妊婦	三重	64.6%
	31～43歳の妊婦	三重	71.2%
2010/11	思春期の男女†	三重	51.5%

* : CMV抗体陽性率は、25歳未満は67.7%、年齢が上がるにつれ上昇し、40歳以上は85.7%。

† : 多くは18歳。

天性CMV感染症の発症頻度が有意に低下する¹⁷⁾¹⁸⁾。なお、CMV-IGの入手が困難なときは、抗体量が同等になるように静注用免疫グロブリン(IVIG)500 mg/kgを用いている¹⁸⁾。CMV-IGの入手が困難なわが国ではIVIGを用いた治療は実際的である。なお、わが国ではCMV-IG 2.5 g(50 ml)を3日間静脈内投与する方法が提唱されている¹⁹⁾。

2 胎児への直接治療

わが国ではCMV-IGを胎児の腹腔内に直接投与する胎児治療が試みられている¹⁹⁾。胎児に腹水がある場合は、1回2.5 g(50 ml)以下を1～2週間の間隔をあけて2回以上胎児腹腔内に投与し、腹水がない場合は、1回1 g(20 ml)を、1週間隔で5回胎児腹腔内に投与する。症例数は少ないが、胎児の生命予後で評価した場合は有効な方法と評価されている。

3 先天性CMV感染症児の治療

CMVに効果があるガンシクロビル(GCV)や、GCVのプロドラッグであり、経口投与が可能なバルガンシクロビル(V-GCV)を用いた治療が試みられている^{20)～24)}。GCVを1回6 mg/kg、12時間ごとに1日2回、6週間投与すると、難聴の進行抑制や神経学的後遺症の発生率が減少している。一方、脈絡網膜炎に対しては6カ月間の治療が必要との意見もある²²⁾。V-GCVは、GCVと同じ薬物動態になるように、1回15～16 mg/kgを1日2回、6週間投与する²⁴⁾²⁵⁾。GCV

表4 CMV抗体陽性率60%としたときの出生児100万人に占める先天性CMV感染児の数

項目	頻度	人数(人)
出生数		1,000,000
抗体陰性者数	40%	400,000
初感染数	1%	4,000
胎内感染	40%	1,600
症候性感染	10%	160
正常発達	10%	16
後遺症	90%	144
無症候性感染	90%	1,440
正常発達	90%	1,296
遅発後遺症	10%	144
抗体陽性者数	60%	600,000
胎内感染	1%	6,000
無症候性感染	100%	6,000
正常発達	90%	5,400
遅発後遺症	10%	600

先天性CMV感染による難聴、知的障害などの後遺症発症者数は888人(0.09%)、出生時異常がなく症状が遅れて発症する児は744人(0.07%)。

と同様に難聴の進行が抑制されている。GCVとV-GCVの代表的な副作用は骨髄抑制による血球減少である。

6. CMV抗体保有率(表3)

成人のCMV抗体保有率は先進国では低く、開発国では高率である¹⁾。わが国におけるCMV抗体保有率は1990年頃までは90%以上であったが、その後の調査では年齢が下がるにつれ抗体陽性率は低下している²⁶⁾²⁷⁾。2010年の三重県下の妊婦のCMV抗体陽性率は、17～30歳64.6%、31～43歳71.2%であった²⁸⁾。また、2010年・2011年に検査した多くが18歳である専門学校生の集団では、抗体陽性率は51.5%と欧米の先進国並みに低下していた。

現在のCMV抗体保有率から、妊婦のCMV抗体陽性率を60%、出生数を100万人としたときの先天性CMV感染による後遺症者数を、図1を参考に計算した(表4)。抗体陰性妊婦の1%

表5 先天性 CMV 感染予防・診断のためのスクリーニング検査法

1. 妊婦を対象
<ul style="list-style-type: none"> ・血清 CMV-IgG 抗体の測定 ・血清 CMV-IgG 抗体と CMV-IgM 抗体の測定
2. 新生児を対象***
<ul style="list-style-type: none"> ・尿濾紙を用いた PCR 法によるウイルス核酸検出 ・唾液を用いた PCR 法によるウイルス核酸検出 ・ガスリー血を用いた PCR 法によるウイルス核酸検出 ・血清 CMV-IgM 抗体検出

*：新生児聴覚スクリーニング検査で難聴を指摘された場合は、先天性 CMV 感染も考慮する。

**：新生児スクリーニング検査の CMV 陽性率は、方法や地域により異なる。

例 1：尿濾紙	0.3% (日本)
例 2：乾燥唾液	0.4% (アラバマ)
例 3：ガスリー検査濾紙	0.7% (カリフォルニア)

が初感染を受け、40%が胎内感染し、うち症候性感染 10%、後遺症率 90%とすると、144 人が症候性先天性 CMV 感染により後遺症を遺し、無症候性感染 90%のうち後遺症率 10%とすると 144 人が後遺症を遺すことになる。抗体陽性妊婦の場合、胎内感染が 1%、後遺症率 10%とすると、600 人が後遺症を発症することとなる。以上を合計すると、100 万人当たり 888 人 (0.09%) が先天性 CMV 感染により後遺症を遺すこととなり、うち 744 人 (0.07%) は出生時無症状でその後に先天性 CMV 感染が関連する遅発性難聴などの後遺症を遺すと推測される。

7. 妊婦および新生児の CMV スクリーニング検査 (表 5)

スクリーニング検査をするにあたっては、感度と特異度がともに優れ、医療経済的に効果が認められる方法がベストである。先天性 CMV 感染は発症頻度の上からはスクリーニング検査が勧められる疾患である。しかし、CMV においては今のところ優れたワクチンがなく、治療方法も確立されていないため、先天性 CMV 感染のスクリーニング検査の必要性については意見が分かれている⁵⁾²⁹⁾³⁰⁾。一般にヨーロッパではスクリーニング検査が行われ、米国ではスク

リーニング検査は行われていない。また、スクリーニング対象者を妊婦にするか、新生児にするかについても意見が分かれている。なお、わが国では CMV 垂直感染の予防法・治療法が確立していないため、現状ではスクリーニング検査が必要とは考えられていない⁸⁾。

■ 妊婦のスクリーニング検査

妊婦が最初に医療機関を受診したときに CMV-IgM および CMV-IgG 抗体を測定し、抗体陰性者に CMV 感染予防のための介入をすることは、妊娠中の CMV 感染予防に有効である。特に保育施設に通っている 36 カ月未満の子どもがいる CMV 抗体陰性の母親は CMV 初感染のハイリスク者であるので、介入が大切である⁵⁾。おむつを替えたあとや唾液が付着したおもちゃに触れたあとの手洗いを含めた介入方法を表 6 に示した。

妊娠して最初に医療機関を受診したときと出産時(臍帯血)に血液を採取し、CMV に対する IgG 抗体と IgM 抗体を測定したベルギーの研究では、妊婦の抗体の動き(妊娠中の抗体陽転化 0.6%、最初の血清で IgM 抗体陽性 2.7%)から先天性感染が疑われる新生児をスクリーニングし、感染が疑われた新生児の尿を用いてウイルス分離を行う方法を提案している³¹⁾。この研究

表6 CMV 抗体陰性妊婦に対する CMV 感染リスクを減らすための介入方法

1. 3歳未満の子どもの尿や唾液中には CMV が含まれていると考える
2. おむつや汚れた衣類を替えたあと、子どもに食事を与えたあとやふろに入れたあと、子どもの鼻水やよだれを拭いたあと、子どものおもちゃ、おしゃぶり、歯ブラシに触れたあとは、石鹸をつけて手を十分に洗う
3. コップ、皿、家庭用具、歯ブラシ、食事などを共用しない
4. 子どもの口や口の周りにキスをしない
5. 子どもとタオルを共用しない
6. 子どもと同じベッドで就寝しない

(文献5を一部改変)

で先天性 CMV 感染があったのは 0.62% であり、感染が疑われた児の 18.8% が先天性 CMV 感染であった。

2 新生児のスクリーニング検査

新生児のスクリーニング検査の材料として、尿を用いたウイルス分離、臍帯血の IgM 抗体検出、ガスリー検査濾紙(乾燥血液濾紙)、乾燥唾液、乾燥尿(尿濾紙)を用いた PCR 法によるウイルス核酸検査などが提唱されている^{12)~16)}。時間と手間、感度、特異度を考えると、乾燥唾液または尿濾紙を用いてサンプルを採取し、PCR 法にてウイルス核酸を検出する方法は、乾燥血液濾紙を用いる方法や尿からのウイルス分離よりも優れている。

わが国では新生児聴覚スクリーニング検査が広く行われている。新生児聴覚スクリーニング検査で難聴があり、遺伝子異常による難聴でない場合は、先天性 CMV 感染の検査が必要である¹⁶⁾³²⁾。なお、先天性 CMV 感染による難聴の 2/3 は生後遅れて出現するため¹⁰⁾、新生児聴覚スクリーニング検査でパスしたとしても、先天性 CMV 感染は否定できないので注意が必要である。

8. CMV ワクチン

CMV ワクチン開発にあたっての問題点として、① 血中抗体は感染予防に十分に働くのか、

② 細胞性免疫、特にキラー T 細胞の誘導は必要かという二点がある³³⁾。今までのところ、血中中和抗体の感染予防効果は部分的であるが、中和抗体価が高いほど感染予防に働くと考えられている。なお、キラー T 細胞は生ワクチンでは誘導されるが、不活化ワクチンでは誘導されないため、抗体陰性者にキラー T 細胞を誘導するためには生ワクチンの開発が必須である。

現在開発中の CMV ワクチンには生ワクチンと、遺伝子工学を用いたサブユニットワクチンとがある。ヒト線維芽細胞を継代することで弱毒化した生ワクチン株が Town 株である。Town 株は腎移植後の CMV 感染症発症予防効果は認められるものの、CMV 感染予防効果は限定的であった。この原因として、野生株と Town 株の遺伝子配列の比較から Town 株は一部遺伝子が欠失しているためと考えられている³³⁾。Town 株の欠失部分を遺伝子工学的に補充したのが Town-Toledo リコンビナント生ワクチンである。現在開発が行われている。

遺伝子工学を用いたサブユニットワクチンとして、ウイルスの中和に関与している糖蛋白 B (glycoprotein B; gB) にアジュバントを加えたワクチンが開発されている。サノフィ社は gB にスクワレン系アジュバントである MF59 を加えたワクチンの開発を行っており、CMV 抗体陽性者に 3 回 (0, 1, 6 カ月) 接種すると抗体と CD4 細胞ともにブースター効果が認められている³⁴⁾。妊娠中の CMV 再感染予防、再活性化予防に向けた開発が期待されている。また、出産後 1 年以内の抗体陰性女性に 3 回 gB ワクチンを接種し、1 年間経過をフォローして、CMV 感染予防を効果の指標としたところ、50% の有効率が認められている³⁵⁾。なお、MF59 はヨーロッパでは HB ワクチンに加えられているアジュバントである。グラクソスミスクライン社は gB にアジュバントして AS01 [QS21 (サポニン) + monophosphoryl lipid A (MPL)] を加えたワクチンの開発を行っている。

まとめ

先天性 CMV 感染は比較的頻度の高い先天性ウイルス感染である。抗体陰性妊婦が妊娠早期に感染すると重篤な症状が児に出現し、予後不良である。わが国では後方視的に先天性 CMV 感染が疑われたときの診断に、乾燥臍帯を用いた CMV 核酸検出法が行われている。CMV 予防に有効なワクチンは開発されていないが、CMV 抗体陰性妊婦への生活指導の介入は胎児への感染予防に有効である。

文 献

- 1) Stagno S et al : Cytomegalovirus infections. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 6th ed. p739-781, Elsevier Saunders, 2006
- 2) 沼崎 啓 : サイトメガロウイルス. *臨床とウイルス* 40 : 36-42, 2012
- 3) Yamamoto AY et al : Congenital cytomegalovirus infection as a cause of sensorineural hearing loss in a highly immune population. *Pediatr Infect Dis J* 30 : 1043-1046, 2011
- 4) Ross SA et al : Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. *J Pediatr* 148 : 332-336, 2006
- 5) Adler SP : Congenital cytomegalovirus screening. *Pediatr Infect Dis J* 24 : 1105-1106, 2005
- 6) Pereira L et al : Insights into viral transmission at the uterine-placental interface. *Trends Microbiol* 13 : 164-174, 2005
- 7) Daiminger A et al : Pre- and periconceptual primary cytomegalovirus infection : risk of vertical transmission and congenital disease. *BJOC* 112 : 166-172, 2005
- 8) 丸山有子 : サイトメガロウイルス. *産婦の実際* 55 : 395-401, 2006
- 9) Iwasenko JM et al : Human cytomegalovirus infection is detected frequently in stillbirths and is associated with fetal thrombotic vasculopathy. *J Infect Dis* 203 : 1526-1533, 2011
- 10) Rosenthal LS et al : Cytomegalovirus shedding and delayed sensorineural hearing loss : results from longitudinal follow-up of children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J* 28 : 515-520, 2009
- 11) Ross SA et al : Mixed infection and strain diversity in congenital cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 204 : 1003-1007, 2011
- 12) Boppana SB et al : Saliva polymerase-chain-reaction assay for cytomegalovirus screening in newborn. *N Engl J Med* 364 : 2111-2118, 2011
- 13) Koyano S et al : Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper : feasibility and outcomes from multicenter study. *BMJ Open* 1 : e000118, 2011
- 14) Inoue N et al : Evaluation of screening tests for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 27 : 182-184, 2008
- 15) Kharrazi M et al : Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 157 : 191-197, 2010
- 16) Koyano S et al : Dried umbilical cords in the retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection as a cause of development delays. *Clin Infect Dis* 48 : e93-95, 2009
- 17) Nigro G et al : Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 353 : 1350-1362, 2005
- 18) Nigro G et al : Immunoglobulin therapy of fetal cytomegalovirus infection occurring in the first half of pregnancy : a case-control study of the outcome in children. *J Infect Dis* 205 : 215-227, 2012
- 19) 山田秀人 : 胎内治療の現況 (1) サイトメガロウイルス感染. *母子保健情報* 61 : 33-39, 2010
- 20) Whitley RJ et al : Ganciclovir treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection : results of phase II study. *J Infect Dis* 175 : 1080-1086, 1997
- 21) Kimberlin DW et al : Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system : a randomized, control trial. *J Pediatr* 143 : 16-25, 2003
- 22) Shoji K et al : Is a six-week course of ganciclovir therapy enough for chorioretinitis in an infant with congenital cytomegalovirus infection? *J Pediatr* 157 : 331-333, 2010
- 23) 森内浩幸 : 先天性 CMV 感染治療プロトコール. *小児感染免疫* 22 : 385-389, 2010
- 24) Stronati M et al : Valganciclovir treatment in

- a 6-month-old infant with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Pediatr Infect Dis J* 30 : 1124-1125, 2011
- 25) Kimberlin DW et al : Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 197 : 836-845, 2008
- 26) Nishimura N et al : Prevalence of maternal cytomegalovirus (CMV) antibody and detection of CMV DNA in amniotic fluid. *Microbiol Immunol* 43 : 781-784, 1999
- 27) 宮本智子ほか : 看護学生における抗体保有率に関する研究—風疹ウイルス, トキソプラズマ, サイトメガロウイルス, 単純ヘルペスウイルスについて. *母性衛生* 46 : 341-347, 2005
- 28) 庵原俊昭ほか : 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. *小児科学会誌* 116 : 317, 2012
- 29) Demmler GJ : Screening for congenital cytomegalovirus infection : a tapestry of controversies. *J Pediatr* 2005 : 162-164, 2005
- 30) Pass RF : Congenital cytomegalovirus infection : screening and treatment. *J Pediatr* 157 : 179-180, 2010
- 31) Naessens A et al : A serologic strategy for detecting neonates at risk for congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 146 : 194-197, 2005
- 32) Ogawa H et al : Etiology of severe sensorineural hearing loss in children : independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J Infect Dis* 195 : 782-788, 2007
- 33) Plotkin SA : Cytomegalovirus vaccine. *Vaccines*, 5th ed. p1147-1154, Saunders, 2008
- 34) Sabbaj S et al : Glycoprotein B vaccine is capable of boosting both antibody and CD4 T-cell responses to cytomegalovirus in chronically infected women. *J Infect Dis* 203 : 1354-1341, 2011
- 35) Pass RF et al : Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 360 : 1191-1199, 2009

ウイルス感染症の診断

IHARA TOSHIKI

庵原俊昭

◎国立病院機構三重病院小児科

要旨 古典的なウイルス学的診断方法は、ウイルス分離、IgM 抗体の検出、抗体の有意上昇である。近年分子ウイルス学の進歩により、迅速診断キットが開発され、ウイルス遺伝子増幅法が臨床に応用されるようになった。幅広くなったウイルス学的診断方法を有効に活用するためには、適切なサンプル採取と適切な結果の評価が大切である。

はじめに

ヒトに感染するウイルスの種類は多く、感染したウイルスにより、その病態や臨床像は異なっている。臨床現場では病態や病像から感染したウイルスを推測し、推測したウイルスにあったウイルス学的検査を行い、病原体診断を行っている¹⁾。また、抗体検査は感染症の診断だけでなく、感染症の疫学調査や院内感染予防のための職員健診に用いられている^{2,3)}。本稿ではウイルス学的検査によるウイルス感染症の診断について解説する。

■ウイルス学的検査が必要なとき

多くのウイルス感染症は、臨床症状や臨床経過および地域の流行状況から診断されている。しかし、疫学的視点から感染症の診断が必要なとき、患者の予後を推定し、治療方針を決定するとき、献血や手術時における他者への感染防止を図るときなどではウイルス学的検査が行われる(表1)。麻疹や風疹のようにワクチン接種率上昇により流行規模が小さくなった感染症では、伝染性紅斑、突発性発疹、エンテロウイルスによる発疹症との

表1 ウイルス感染症診断時にウイルス学的検査が必要なとき

- 1) 疫学的視点から検査を必要とするとき
 - ①ワクチンなどにより流行規模が小さくなった感染症の確定診断
 - ②地域で流行しているウイルス感染症の診断
 - ③患者を早期に見出し、防疫上の措置を行う必要があるとき
 - ④特定のウイルスに対する変異や薬剤感受性の調査
 - ⑤院内感染防止のためにワクチン予防可能疾患の免疫状態の調査
- 2) 患者の予後を推定し、治療方針を決定するとき
 - ①類似した病像を呈する感染症の鑑別診断
 - ②治療が可能なウイルス感染症の診断
 - ③免疫不全者(児)におけるウイルス感染症の診断
 - ④ワクチン後のウイルス感染症の診断
- 3) 献血や手術時における他者への感染防止
- 4) ワクチン接種後に発生した臨床反応の原因の究明

鑑別のために、ウイルス学的診断が必須である⁴⁾。また、地域で流行があるときの急性耳下腺腫脹はムンプスであるが、地域での流行がないときの急性耳下腺腫脹の原因のほとんどはムンプス以外である⁵⁾。流行がないときのウイルス感染症の診断

表2 日常経験する臨床症状と代表的な原因ウイルス

無菌性髄膜炎	エンテロウイルス ムンプスウイルス 単純ヘルペスウイルス	胃腸炎	ノロウイルス サポウイルス ロタウイルス
脳炎	エンテロウイルス ムンプスウイルス 単純ヘルペスウイルス 日本脳炎ウイルス	発疹性疾患	腸管アデノウイルス アストロウイルス 水痘帯状疱疹ウイルス 単純ヘルペスウイルス
急性弛緩性麻痺	ポリオウイルス エンテロウイルス		HHV6, HHV7 EBウイルス
呼吸器感染症	インフルエンザウイルス パラインフルエンザウイルス RSウイルス アデノウイルス ライノウイルス ヒトメタニューモウイルス コロナウイルス ボカウイルス	先天性感染	麻疹ウイルス 風疹ウイルス エンテロウイルス バルボウイルス B19 風疹ウイルス
伝染性単核球症	EBウイルス サイトメガロウイルス	周産期感染	サイトメガロウイルス 単純ヘルペスウイルス 水痘帯状疱疹ウイルス 単純ヘルペスウイルス サイトメガロウイルス

HHV6：ヒトヘルペスウイルス6型，HHV7：ヒトヘルペスウイルス7型

B型肝炎ウイルス，C型肝炎ウイルス，ヒト免疫不全ウイルスは周産期感染するが無症状。

にはウイルス学的検査が必要である。

日常臨床でよく遭遇する胃腸炎，呼吸器感染症の起因ウイルスは複数あり，一部のウイルスは迅速診断が可能である。臨床症状から推定される起因ウイルスを表2に示した。また，輸血時の感染を防止するために，献血時にはB型肝炎ウイルス (hepatitis B virus：HBV)，C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus：HCV)，ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus：HIV)，ヒトT細胞白血病ウイルス (human T cell leukemic virus：HTLV) の検査が行われている。

■ウイルス学的診断方法

ウイルス感染症のウイルス学的診断方法を表3に示した。代表的なウイルス学的検査法を紹介する。

1. ウイルス分離

ウイルス学的診断方法のゴールドスタンダードは，感染病巣からのウイルス分離である。病巣以

表3 ウイルス学的診断方法

①病変部位からのウイルス分離
②病変部位からのウイルス蛋白，ウイルス遺伝子の検出
・迅速診断法
気道感染：インフルエンザウイルス，RSウイルス，アデノウイルス，hMPV
眼感染：アデノウイルス
消化器感染：ロタウイルス，アデノウイルス，ノロウイルス
・PCR，real-time PCR
・LAMP，real-time LAMP
③血清IgM抗体の検出
④血清抗体 (IgG抗体) の有意上昇

hMPV：ヒトメタニューモウイルス

外の部位からウイルスが分離されたときは注意が必要である。しかし，エンテロウイルスによる無菌性髄膜炎時には便からのウイルス分離が，全身性サイトメガロウイルス (cytomegalovirus：CMV) 感染症時には尿や唾液からのウイルス分離が診断の参考となる。分離されたウイルスを用いて，ウイルス遺伝子型の検索や変異の検討，抗

表4 ウイルス分離用サンプル採取・サンプル輸送の原則

- ①病変部位（咽頭拭い液，後鼻腔液，ときに便）から綿棒を用いてサンプルを採取する
- ②採取したサンプルは検体輸送培地（ないときは生理食塩水）に入れ，乾燥させないようにする
- ③木の綿棒でサンプルを採取した場合は，綿棒を攪拌後サンプル液を絞り落とし，綿棒を取り除いておく*1
- ④血液はEDTAを用いて採取する*2
- ⑤髄液・尿・糞便・気管支肺胞洗浄液・鼻腔吸引液はそのまま保存する
- ⑥細胞に接種するまでの期間が短期間（1週間まで）の場合は，4℃で保存する
- ⑦細胞に接種するまでの期間が長期間の場合は-80℃で保存する．-20℃では保存しない
- ⑧PBMCを保存する場合は，EDTA血をフィコール比重遠心法で分離後，セルバンカー®に再浮遊させ，-80℃以下で保存する
- ⑨臨床症状および分離を目的とするウイルスを検査側に伝える

*1：木材は抗ウイルス作用や殺菌作用がある。

*2：ヘパリンはPCRによる核酸増幅を抑制する作用がある。近年はヘパリン血でもPCRを走らせる方法が開発されている。

・-20℃で保存すると，エンベロープを持つウイルスでは融解時エンベロープが破壊される。

・エンテロウイルスによる無菌性髄膜炎を疑うときは，髄液・便・咽頭拭い液を採取する。

・麻疹や風疹を疑うときは，咽頭拭い液・EDTA血・尿を採取する。

・エンテロウイルスの場合は便中に長期間ウイルスが排出され，麻疹の場合は回復後も尿中にウイルス抗原が検出される。

・パルボウイルスB19（血清中）やHHV6（PBMCに感染）は回復後も検出される。

ウイルス薬に対する感受性検査，ワクチン開発などが行われている。流行状況から疫学的検討が必要な場合は，各県・政令指定都市の地方衛生研究所（地研）に調査の協力を依頼する。

効果的にウイルス分離を行うためには，適切な検査材料の採取と適切な輸送，保存が大切である。ウイルス分離を行ううえでの基本事項を表4に記載した^{1,6)}。病変部位から綿棒で採取したサンプルは，1~2mLのウイルス検体輸送培地（ゼラチンやウシ血清アルブミンなどのウイルス安定剤が入った細胞培養液）に入れ，乾燥させないようにする。水疱液を採取する場合は，表面を生理食塩水で清拭し，水疱内容をツベルクリン注射器で採取後，0.2mLの生理食塩水を追加する。

サンプル採取後1週間以内に細胞に接種するときは4℃で，細胞に接種するまでに1週間以上要する場合は-80℃で保存する。エンベロープを有するウイルスを-20℃で保存すると，融解時にウイルスが失活するため，ウイルス分離用サンプルは-20℃では保存しない。末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell：PBMC）を長期間保存する場合は，フィコール比重遠心法で分離後，セルバンカー®に再浮遊させ-80℃以下で保

存する。

分離しようとする目的ウイルスにより，分離に用いる細胞は異なっている（表5）^{7~11)}。採取した検査材料の患者情報，目標とするウイルスなどを検査側に連絡することが大切である。ウイルス増殖は細胞変性効果（cytopathic effect：CPE）の出現で判定する。CPE出現までの期間は，早いと翌日，遅いと3週間以上必要である。数代盲継代するとCPEが出現することもある。分離されたウイルスは中和試験や蛍光抗体法で同定する。

2. ウイルス抗原検出検査

近年，病巣部からウイルス蛋白を迅速に検出する検査法が開発されている^{7~9)}。迅速診断検査法が市販されている対象ウイルスを表3に示した。測定にはラテックス凝集法（latex agglutination test：LA），酵素免疫法（enzyme immunoassay：EIA），免疫クロマト法が用いられている。いずれもウイルス蛋白とウイルス蛋白に対するモノクローナル抗体を反応させ，反応を金コロイド等により可視化させたものである。多くは 10^4 /mL以上のウイルスが存在すると陽性になる。ウイルス分離よりも感度は劣るが迅速性に優れている。

表5 目的とするウイルスと分離に用いる細胞

ウイルス	分離に用いる細胞
麻疹ウイルス	B95a 細胞, Vero-SLAM 細胞
風疹ウイルス	RK 細胞, Vero 細胞
ムンプスウイルス	Vero 細胞
VZV, HSV, CMV	ヒト線維芽細胞 (HF)
HHV6, HHV7	臍帯血由来末梢血単核球 (PBMC)
インフルエンザウイルス	MDCK 細胞, 発育鶏卵
RSウイルス	HEp-2 細胞, FL 細胞, Vero 細胞
ヒトメタニューモウイルス	LLC-MK2 細胞, VeroE6 細胞
アデノウイルス	A549 細胞, HEp-2 細胞, RD 細胞
エンテロウイルス	HF 細胞, HEp-2 細胞, Vero 細胞, RD-18S 細胞, GMK 細胞
ライノウイルス	HF 細胞, HEp-2 細胞, Vero 細胞
パラインフルエンザウイルス	Vero 細胞, VeroE6 細胞, LLC-MK2 細胞, HeLa 細胞

VZV: 水痘帯状疱疹ウイルス, HSV: 単純疱疹ウイルス, HHV: ヒトヘルペスウイルス

- ・ Vero-SLAM 細胞は Vero 細胞に麻疹ウイルス野生株のレセプターである SLAM を遺伝子挿入した細胞。
- ・ ウイルス分離は薬剤耐性などのウイルスの性状解析や抗原性の解析に必要である。
- ・ インフルエンザウイルスでは分離されたウイルスはワクチン候補株の選定に用いられる。

CMV 感染における好中球中の pp65 抗原検出は、移植患者などの免疫不全宿主における CMV 感染症の早期診断に有用である。

3. ウイルス核酸検査

ウイルス感染症の診断やウイルス感染症の病態の解明に、polymerase chain reaction (PCR) や loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を用いた核酸検出法, real-time PCR や real-time LAMP を用いたウイルス核酸の定量的検討が行われている。多くは専門の研究機関で行われているが、比較的頻度の高い HBV, HCV, HIV, 単純ヘルペスウイルス, CMV, EB ウイルスなどはコマーシャルラボでも検査が可能である。

2012 年を目途に排除を目指している麻疹では、咽頭拭い液, PBMC, 尿を用いた PCR 検査が診断に必須である。地研で検査するシステムが整理されている。2010 年から成人男性を中心に流行している風疹も咽頭拭い液, PBMC, 尿を用いた PCR 検査が診断に有用である。

PCR, LAMP ともに感度に優れた方法である。しかし、これらの検査法は必ずしも感染性のある

ウイルス粒子を検出していないこと、ときに潜伏感染しているウイルスを検出する危険性があること等、検査の限界を理解しておくことも大切である。多くのウイルス感染症では、病巣や末梢血から検出されるウイルス量と病勢とはよく一致している。ウイルス量が定量的に解析できる real-time PCR や real-time LAMP は、臨床経過の診断や病態研究に用いられている。

4. ウイルス抗体検査

ウイルス抗体検査法のゴールドスタンダードは、抗体の生物学的活性と抗体量が一度に測定できる (感染防御抗体が検出できる) 中和法 (neutralizing test: NT) である¹⁾。赤血球凝集抑制法 (hemagglutination inhibition test: HI) も抗体の生物学的活性を測定している。NT は手間と時間がかかるため、簡便に抗体が測定できる EIA 法, 粒子凝集法 (particle agglutination test: PA), LA が開発されている。いずれも抗体の蛋白量を測定する方法であるが、NT や HI との互換性が基準となっている¹²⁾。

抗体測定方法は、測定原理から 2 種類に分類される (表 6)。一つは血清を 2 倍階段希釈して測

表6 抗体測定の原因と測定方法

1. 階段血清希釈法	2. 一定濃度血清希釈法
1) 抗原抗体反応を検出	1) 検量線から算出
・粒子凝集法 (PA)	・酵素免疫法 (EIA)
・間接蛍光抗体法 (IFA)	・放射性免疫測定法 (RIA)
・免疫付着赤血球凝集法 (IAHA)	・化学発光免疫測定法 (CLIA)
2) 反応せずに残ったウイルス, 抗原または補体を検出	・ラテックス凝集比濁法 (LA)
・中和法 (NT)	
・赤血球凝集抑制法 (HI)	
・補体結合法 (CF)	

階段血清希釈法は一般に手作業で行われ、目視で判定される。抗体価は「倍」で表示される。一方、一定濃度血清希釈法は機械化が可能であり、多数の検体を測定するのに適している。抗体価は「単位」で表示される。

表7 目的に応じて選択する代表的なウイルス抗体検査法

ウイルス	免疫の有無 確認	感染症の診断	
		シングル血清	ペア血清 (有意上昇)
麻疹ウイルス	NT, EIA-IgG, PA	EIA-IgM	EIA-IgG, NT, HI, PA
風疹ウイルス	HI, LA, EIA-IgG	EIA-IgM	HI, LA, EIA-IgG
ムンプスウイルス	EIA-IgG	EIA-IgM	EIA-IgG, HI, NT
VZV	IAHA, EIA-IgG	EIA-IgM	IAHA, EIA-IgG
CMV	EIA-IgG, FA-IgG	EIA-IgM, FA-IgM	EIA-IgG, FA-IgG
EBウイルス	EBNA	VCA-IgM, EADR	VCA-IgG
パルボウイルス B19	EIA-IgG	EIA-IgM	EIA-IgG
インフルエンザウイルス	HI		HI
アデノウイルス	NT		NT, CF
RSウイルス	NT		NT, CF
日本脳炎ウイルス	NT		NT, HI
ポリオウイルス	NT		NT

IAHA: 免疫付着赤血球凝集法, FA: 蛍光抗体法, CF: 補体結合法

・NT, HI, PA, CF での有意上昇は4倍以上, EIA-IgG, LA での有意上昇は2倍以上の抗体上昇

・EBV 感染では感染早期に EADR 抗体, VCA-IgM 抗体が検出され, 次いで VCA-IgG 抗体が検出され, 抗体陽転化すると EBNA 抗体が検出される。EBV 持続感染では EBNA 抗体は検出されない。

定する方法であり、抗体価は血清希釈倍数 (倍) で表される⁴⁾。もう一つは、血清を一定濃度に希釈し、標準血清の検量線から抗体価を求める方法である。抗体価は単位で表される。世界保健機関 (WHO) は値付けした標準血清を作成し、測定方法にかかわらず抗体価を国際単位で表示するよう求めている。HBV, 麻疹, 風疹, 水痘, パルボウイルス B19 などでは標準血清が作成されている。

ウイルス抗体が測定されるのは、ウイルス感染症の診断時と免疫状態の診断時である。目的に

に応じて選択される抗体測定方法を表7に示した。

1) ウイルス感染の診断

ウイルス感染症初感染の診断には、急性期 IgM 抗体の検出と血清抗体の有意上昇が用いられる。本邦で頻用されているデンカ生研の IgM 抗体測定試薬は、早期診断を目的に開発されたため、感度は高いが、ときに非特異陽性や回復後も長期間低い値で陽性が持続することがある^{13,14)}。ムンプス IgM 抗体測定試薬は改良され¹⁵⁾、現在、麻疹 IgM 抗体測定試薬の改良が行われている。ウイルス血清抗体価は、体内で増殖したウイルス

表 8 ウイルス初感染・再感染・再活性化と抗体パターン

感染様式	IgM 抗体	IgG 抗体	
		抗体価	avidity
初感染	+ ~ ++	- ~ +	弱い
再感染	- ~ +	+++	強い
ワクチン後感染			
一次性的ワクチン不全	+ ~ ++	- ~ +	弱い
二次性的ワクチン不全	- ~ +	+++	強い
再活性化	- ~ +	+++	強い

- ・ウイルス再感染，二次性的ワクチン不全，再活性化時には，IgG 抗体は発症早期から上昇していることがあり，有意上昇を示さないことがある。
- ・avidity とは抗原と抗体の結合力のことであり，IgG3 画分に属する抗体は結合力が弱く，IgG1 画分に属する抗体は結合力が強い。再感染などでは早期から IgG1 画分の抗体が上昇するため急性期の血清でも強い avidity が認められる。

量に応じた免疫反応であり，時間の経過とともに IgG 抗体も IgM 抗体も上昇する。1 回の血清 IgM 抗体検査で感染症を診断するためには，発症 48 時間以降に測定することが望まれている。非特異陽性の場合，時間の経過による IgM 抗体の上昇が認められない。

血清抗体の有意上昇とは，急性期と回復期（急性期から原則 2 週間以上あける）の血清抗体価が測定誤差以上に上昇することである。抗体価が倍で表される方法では 2 管（4 倍）以上の，抗体価が単位で表される方法では 2 倍以上の上昇である。

ウイルス感染症再感染，二次性的ワクチン不全によるウイルス感染の場合は，ときに発症前から二次免疫応答が始まるため，急性期の血清抗体パターンは，IgM 抗体陰性または弱陽性，IgG 抗体高値を示す（表 8）。IgG 抗体は早期から上昇しているため，有意上昇を示さないことがある。ウイルス再活性化時の抗体パターンは再感染時と同様である。

初感染と再感染の血清診断に，抗原と抗体との結合力（avidity）を測定する方法がウイルスやトキソプラズマなどで用いられている¹⁶⁾。初感染の場合，まず循環性 B 細胞依存性形質細胞が抗原との結合力が弱い IgG3 画分に属する抗体を産生し，その後，濾胞性 B 細胞依存性形質細胞が抗原との結合力が強い IgG1 画分の抗体を産生す

る。一方，再感染や二次性的ワクチン不全の場合は，循環性 B 細胞依存性形質細胞も抗体を産生するが，早期から濾胞性 B 細胞依存性形質細胞が抗体を産生するため，発症早期でも avidity の強い抗体が検出される。抗体の avidity 測定は，8 モル尿素を含む洗浄液による EIA にて測定する。Avidity が弱い抗体では尿素を含む洗浄液で洗浄すると抗体価が著明に低下する。

2) 免疫状態の診断

個人の免疫状態を調べるための代表的な抗体測定方法を表 7 に示した。麻疹発症を予防する抗体価は 120mIU/mL であり，この抗体価は NT では 4 倍，EIA では 4.0EIA 価，PA では 64 倍に相当する¹⁷⁾。また，風疹発症を予防する抗体価は 4~10IU/mL であり，10IU/mL とすると，HI 抗体では 16 倍，EIA では 5.0EIA 価に相当する。ワクチン後の免疫を調べるときは，感度，特異度ともに優れた方法で測定する必要がある。

■先天性ウイルス感染症の診断

ウイルス感染症の特別な型として先天性ウイルス感染症がある。先天性ウイルス感染症の診断方法を表 9 に示した¹⁸⁾。特徴的な症状として，低出生体重児，肝脾腫，出血斑，脳内石灰化，白内障・網膜症，難聴などがある。ウイルスが児に先天性感染すると多くは持続感染するため，胎内の感染

表9 先天性ウイルス感染症の診断

- ①特徴的な臨床症状
- ②出生時のIgM抗体 \geq 20mg/dL
- ③ウイルス分離(原則生後3週以内)
 - ・尿, 唾液, 眼房水(先天性風疹症候群)
- ④ウイルス核酸の検出(PCR, real-time PCR, LAMP)
 - ・臍帯, 尿, 唾液
- ⑤特異的IgM抗体の検出

・IgG抗体は母体からの移行があるため早期診断に用いにくい。
 ・CMVは周産期感染, 母乳感染があるため先天性感染の診断は生後3週間以内に診断するか, 3週間以上経過した場合は乾燥臍帯を用いて診断する。
 ・主として母乳により感染するヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)感染の診断は3歳時に行う。

時期にかかわらず出生時からIgM抗体は検出される。IgG抗体は母体から児に移行するため, 早期診断には用いられない。

おわりに

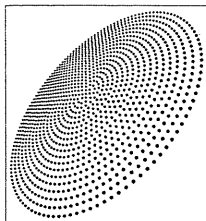
ウイルス感染症の診断方法について解説した。適切にサンプルを採取し, 適切にサンプルを輸送し, 適切に診断方法を使い分け, 適切に診断することが大切である。

文献

- 1) 庵原俊昭: ウイルス感染症の診断. 小児科診療 68: 1992-1999, 2005.
- 2) 庵原俊昭: 麻疹・風疹・水痘・ムンプスに対する病院および地域における感染制御対策の最近の動向. 医療 60: 483-488, 2006.
- 3) 庵原俊昭: 麻疹・風疹・ムンプス(流行性耳下腺炎)・水痘感染対策: 抗体測定とその評価. CAMPUS HEALTH 45: 9-14, 2008.
- 4) 庵原俊昭: 抗体検査: 目的・結果・次にすることは. 小児感染免疫 23: 89-95, 2011.

- 5) 庵原俊昭: ムンプスワクチン接種後のムンプス罹患時における病態と臨床像の特徴. 小児科 42: 1144-1149, 2001.
- 6) 庵原俊昭, 豊田美香, 中野貴司ほか: アメリカ微生物学会(ASM)のウイルス分離用採取ガイドラインからみたわが国のコマーシャルラボの採取方法の検討. 小児感染免疫 11: 103-107, 1999.
- 7) 川上千春, 渡邊寿美, 清水英明ほか: インフルエンザウイルス. 臨床とウイルス 40: 104-112, 2012.
- 8) 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未ほか: アデノウイルス. 臨床とウイルス 40: 115-122, 2012.
- 9) 高尾信一: RSウイルス, ヒト・メタニューモウイルス. 臨床とウイルス 40: 124-133, 2012.
- 10) 水田克己: エンテロウイルス・ライノウイルス. 臨床とウイルス 40: 134-141, 2012.
- 11) 改田 厚, 久保英幸, 入谷典弘ほか: ヒトパラインフルエンザウイルス感染症. 臨床とウイルス 40: 142-149, 2012.
- 12) 庵原俊昭: ウイルス検査法とその評価-抗体測定方法を中心に-. 第11回SRL感染症フォーラム講演集: 4-15, 2007.
- 13) 田中敏博, 小栗 泉, 川出博江: 伝染性紅斑の成人患者における血清中の麻疹ウイルスIgM抗体価の変動. 病原微生物検出情報 31: 268-269, 2010.
- 14) 佐藤 弘, 多屋馨子, 高崎智彦ほか: アング熱および突発性発疹と考えられる症例における麻疹IgM抗体陽性例. 病原微生物検出情報 31: 269-271, 2010.
- 15) 庵原俊昭, 中野貴司, 落合 仁ほか: 改良されたムンプス酵素免疫法(EIA)-IgM抗体検査法の臨床評価. 小児感染免疫 23: 123-129, 2011.
- 16) 庵原俊昭, 谷口清州, 神谷 齊ほか: ワクチン後のムンプス罹患例におけるムンプスIgG抗体とそのAvidityの検討. 臨床とウイルス 24: 389-393, 1996.
- 17) 庵原俊昭ほか: 風疹・麻疹抗体測定法の標準化に関する研究: 抗体測定方法の互換性と感染予防レベルの検討. ウイルス感染症の体外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究(研究代表者: 小林和夫)平成21年度総括・分担研究報告書, pp19-25, 2010.
- 18) 堤 裕幸: 健常児におけるウイルス感染症. 小児感染免疫 23: 403-407, 2012.

* * *



肝炎ウイルスの 核酸増幅試験法のための標準品

水澤左衛子* 岡田義昭*

はじめに

ウイルスの核酸増幅検査 (NAT) のために最初に作られた WHO 国際標準品は, 1997 年に制定された C 型肝炎ウイルス RNA NAT のための第 1 次国際標準品 (HCV RNA 第 1 次国際標準品) である。供血者の HCV 抗体スクリーニングが実施されると輸血後肝炎は激減した。しかし, ヨーロッパやアメリカ合衆国では抗体陰性の血漿をプールして製造した免疫グロブリン製剤による HCV 感染が報告された¹⁾。これは, 感染初期のウィンドウ期の HCV 陽性血漿が原料血漿プールに混入していたためと考えられた。そこで, 1997 年に欧州医薬品委員会 (CPMP: Committee for Proprietary Medicinal Products) は適切なランコントロールを用いて原料血漿プールの HCV RNA 検査を 1999 年 7 月 1 日から実施することを決めた。欧米諸国は自国で実施する NAT のために標準品を作製したが, HCV RNA 量の単位表示が異なっていたので, 標準品の HCV RNA 量や NAT 法の感度を相互に比較することができなかった。そこで, WHO コラボレイティングセンターラボラトリーであるイギリスの The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) が中心となって WHO 国際共同研究を実施し, 力価 100,000 国際

単位 (IU)/mL の世界共通の標準品として 1997 年に制定されたのが HCV RNA 第 1 次国際標準品である。その後, B 型肝炎ウイルス (HBV) DNA, A 型肝炎ウイルス (HAV) RNA および E 型肝炎ウイルス (HEV) RNA の国際標準品が制定された。これらの国際標準品は血液製剤の原料血漿プールや輸血用血液のウイルスのスクリーニングとして実施する NAT の標準品として使用することを目的とする一方, NAT を用いた体外診断薬の評価・標準化のために使用することも目的としている。本稿では, HCV RNA 国際標準品の制定を例にして, 肝炎ウイルスの NAT のための WHO 国際標準品の特徴と整備状況について述べる。また, 日本の国内標準品をはじめとする入手可能な二次標準品について紹介する。

1. C型肝炎ウイルスRNAの国際標準品

1.1 国際標準品の制定

NIBSC が中心となって実施した国際共同研究において, 世界中の実績のある 22 の研究室が参加して濃度約 10^5 genome equivalents/mL の 3 つの候補品 (同一の HCV 遺伝子型 1 の陽性血漿を陰性の脱クリオ血漿で希釈し, アンブルに 0.5 mL ずつ分注, 凍結乾燥したロットの異なる AA と BB, 凍結した液体の CC) を測定した。測定には, nested PCR 法をはじめとする種々

* 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

の自家開発の試験法や市販の測定試薬が用いられた。当時は希釈した検体を定性法で測定するエンドポイント法による測定が主であった。定量法の測定結果も少数ながら報告されたが、もともと定量法は臨床検体のウイルス濃度の定量を目的とした測定法であるので低濃度検体の測定には不向きであった。定性法の測定結果に基づく候補品 AA と BB の力価はともに $5.0 \log_{10}$ PCR detectable units/mL であった。この結果に基づいて、候補品 AA を力価 10^5 IU/mL の HCV RNA 第 1 次国際標準品 (96/790) として 1997 年に制定した²⁾。翌年、国際共同研究を実施して、イギリス、ドイツ、イタリア、アメリカ、オランダの 5 カ国が自国で使用しているワーキング試薬の力価を国際標準品を用いて値付けし、IU で表示した。その結果、それぞれのワーキング試薬を使用して血液製剤の原料血漿プールや輸血用血液で実施している NAT スクリーニング試験法の標準化とバリデーションが可能になった^{3,4)}。

1.2 国際標準品の更新

その後、第 1 次国際標準品の更新が必要になった。主だった研究機関による小規模な共同研究を実施して、最初の共同研究で第 1 次国際標準品と同時に力価を決定した候補品 BB を HCV RNA 第 2 次国際標準品 (96/798) に制定した (2003 年)⁵⁾。次の更新の時は、新たに製造した 3 つの候補品 (HCV 抗体陰性、HCV 遺伝子型 1a 陽性血漿を血漿で希釈し、ガラス瓶に 0.5 mL ずつ分注、凍結乾燥したロットの異なる Sample 2 と Sample 3、凍結した液体の Sample 4) の力価を第 2 次国際標準品を用いて決定するための国際共同研究が実施され、14 カ国 33 研究室が参加した。Real Time PCR 法の普及により、定量法 25 組、定性法 14 組の測定結果が報告された。全体の測定結果がよく一致したので、定性法と定量法の両方の測定結果に基づいて候補品 (Sample 2, Sample 3) の第 2 次国際標準品に対する相対力価を各々、5.19, $5.41 \log_{10}$ IU/mL と決定した。結論として、Sample 2 を力価 $5.19 \log_{10}$ IU/mL の HCV RNA 第 3 次国際標準品 (06/100) に制定した⁶⁾。Sample 3 は、次の更新時に主だった研究機関による小規模な共同研究によって、2011 年に力価 260,000 IU/mL (~ 5.41

\log_{10} IU/mL) の HCV RNA 第 4 次国際標準品 (06/102) に制定された⁷⁾。ところが、共同研究中に、第 3 次国際標準品 (06/100) と第 4 次国際標準品 (06/102) は常温輸送中に力価が低下することが判明したので、輸送にドライアイスを使用している。現在、第 5 次標準品と置き換えるべきか検討中である。

2. 肝炎ウイルス等遺伝子の国際標準品の制定

2.1 WHO ECBS と SoGAT 会議

血液製剤のウイルス安全性にかかわる国際標準品の制定は WHO 生物学的製剤標準化専門家会委員会 (ECBS: Expert Committee on Biological Standardization) が行っており、肝炎ウイルスの NAT のための国際標準品もこれに含まれる。1995 年、WHO がスポンサーとなって NIBSC が第 1 回遺伝子増幅試験法の標準化に関する国際ワーキンググループ (SoGAT: The International Working Group on the Standardisation of Genomic Amplification Techniques) 会議を開催した。会議には公的機関、血液製剤メーカー、血液センター、試薬メーカー、ウイルスの専門家等が参加し、血液製剤のウイルス学的安全性のために実施する NAT の標準化について討議した⁸⁾。以後、SoGAT では、WHO 文書「国際標準品及びその他の生物学的参照品の作製と制定のための留意事項」⁹⁾に基づいて国際標準品や国際パネルの必要性、候補品の性状、国際共同研究について科学的な討議を行い、ECBS に対して国際標準品の制定に関する報告や提案をしている。1997 年の HCV RNA 第 1 次国際標準品 (96/790) の制定に引き続き、1999 年に HBV DNA 第 1 次国際標準品 (97/746)¹⁰⁾、2004 年に HAV RNA 第 1 次国際標準品 (00/560)¹¹⁾、2011 年に HEV RNA 第 1 次国際標準品 (6329/10)¹²⁾ が制定された。また、この間に HCV RNA と HBV DNA^{13,14)} の国際標準品が順次更新された (表 1)。

2.2 国際標準品の性状

国際標準品には“Commutability”が求められている⁹⁾。“Commutability”とは、種々の異

表 1 肝炎ウイルス核酸増幅試験法のための WHO 国際標準品と WHO 遺伝子型パネルの制定

名称	制定年	力価 (IU/mL)	共同研究による測定値	交付機関	文献
WHO 国際標準品					
HCV RNA 第 1 次国際標準品 (96/790)	1997	100,000	5.0 log ₁₀ PCR detectable units/mL	NIBSC	2
HBV DNA 第 1 次国際標準品 (97/746)	1999	1,000,000	6.42 log ₁₀ 'equivalents' /mL	NIBSC	10
HCV RNA 第 2 次国際標準品 (96/798)	2003	100,000	5.0 log ₁₀ PCR detectable units/mL	NIBSC	5
HAV RNA 第 1 次国際標準品 (00/560)	2003	100,000	5.29 log ₁₀ PCR detectable units/mL or genome equivalents/mL	NIBSC	11
HBV DNA 第 2 次国際標準品 (97/750)	2006	1,000,000	6.30 log ₁₀ 'equivalents' /mL	NIBSC	13
HCV RNA 第 3 次国際標準品 (06/100)	2007	5.19log ₁₀	5.19 log ₁₀ IU/mL	NIBSC	6
HCV RNA 第 4 次国際標準品 (06/102)	2011	5.41log ₁₀	5.41 log ₁₀ IU/mL	NIBSC	7
HBV DNA 第 3 次国際標準品 (10/264)	2011	850,000	5.93 log ₁₀ IU/mL	NIBSC	14
HEV RNA 第 1 次国際標準品 (6329/10)	2011	250,000	5.39 log ₁₀ NAT detectable units/mL or 'copies' /mL	ポールエーリッヒ研究所	12
WHO 遺伝子型国際パネル					
HCV RNA 遺伝子型国際パネル	2002	3.81 ~ 4.65	遺伝子型 1, 2, 3, 4, 5, 6	NIBSC	15
HBV DNA 遺伝子型国際パネル (5086/08)	2009	1.10 ~ 6.87	遺伝子型 A, B, C, D, E, F, G	ポールエーリッヒ研究所	16

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、肝炎ウイルスの 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。NAT の対象となるウイルス遺伝子の物理的な量は微量であるので、測定結果は血液中の他の成分の影響を受けやすい。よって、これらの標準品は陰性血漿で希釈してから核酸の抽出、検出を行うべきである。緩衝液で希釈したり、標準品原液から抽出した核酸を希釈して使用すると、実際の臨床検体よりも核酸の抽出効率は高く、検出反応液中の阻害物質濃度は低くなる可能性があるため、試験法の性能の過大評価になり得るので注意が必要である。

2.3 国際標準品の表示単位

前述の WHO の文書には生物学的な国際標準品の表示単位は国際単位系 (SI) でも任意の IU でもよいと明記してある。これは、肝炎ウイルス遺伝子の NAT 標準品のような陽性血漿を原料とする標準品に含まれるウイルス遺伝子量を SI で表すのは困難だからである。HCV RNA 第 1 次国際標準品の制定の目的は原料血漿に混入する微量の HCV 遺伝子を検出するための NAT

の検出限界の評価にあったことから、高感度の定性法を用いたエンドポイント法の測定結果 (PCR detectable unit) に基づいて力価を決定し、表示単位を IU とした。ところで、HCV RNA 第 2 次国際標準品のエンドポイント法による測定値は、1997 年の共同研究においては 10⁵ PCR detectable units/mL であったが、2007 年の共同研究においては 10^{5.24} PCR detectable units/mL であった。10 年間に試験法の感度が向上したことによって PCR detectable unit で表示する測定値は高くなったが、HCV RNA 第 1 次国際標準品に対する相対力価は 10⁵ IU/mL であることに変わりなく、国際標準品を更新しても 1IU が表す HCV RNA 量は一定である。

2.4 遺伝子型国際パネル

ウイルスの NAT 試験法のバリデーションにおいて、特異性として主な遺伝子型を検出できることが求められている。WHO はウイルス毎に世界各地から様々な遺伝子型の陽性血漿を収集し、標準品と同様に国際共同研究を実施して WHO 国際パネルを制定している。2002 年に HCV RNA 遺伝子型国際パネル¹⁵⁾ が、2009 年に HBV DNA 遺伝子型国際パネル¹⁶⁾ が制定された。力価 (IU/mL) を定めた標準物質は国際標準品のみであるとの考えから、HBV パネルの個々のメンバーの力価は定めないこととした。国際共同研究におけるパネルメンバーの測定値は公表

表2 国際標準品に基づく NAT 国内標準品の整備

ウイルス	国内標準品			国際標準品		
	制定年	力価 IU/mL	遺伝子型	制定年	力価 IU/mL	遺伝子型
HCV	1999	1.0×10^5	1b	1997	1.0×10^5	1a
HBV	2002	4.3×10^5	C	1999	1.0×10^6	A
HIV*	2002	1.8×10^5	B	1999	1.0×10^5	B
HEV	2012	2.5×10^5	3b	2011	2.5×10^5	3a

*国際標準品の名称は HIV-1

されているので参考にすることは可能である。HCV 遺伝子型パネルの更新と、HAV および HEV の遺伝子型パネルを新規に作製することが決まっている。

3. WHO 国際標準品の二次標準品

WHO 国際標準品は配布する数量に限りがあり、国や地域で流行しているウイルス株が異なることから、二次標準品を作製することが推奨されている。

3.1 日本の国内標準品

わが国において、血液を介して感染する NAT の国内標準品の制定は薬事・食品審議会血液事業部会安全技術調査会血液製剤の安全性確保対策に関する検討小委員会（NAT 小委員会）が行っている。表2に国内標準品と国際標準品の対応を示す。国立感染症研究所が中心となって国内標準品作製のための国内共同研究を実施し、WHO 国際標準品に準拠した HCV RNA 国内標準品を 1999 年に¹⁷⁾、HBV DNA および HIV RNA 国内標準品を 2002 年に整備した。国内標準品はウイルス陽性の国内献血血漿を陰性血漿で希釈、分注した液体の凍結品である。2010～2011年にポールエーリッヒ研究所が中心となって HEV RNA 国際標準品候補品を評価するための国際共同研究を実施した。わが国においても国内標準品の作製を計画中であったので、国立感染症研究所が共同研究者として参画し、日本からは6施設が参加して、国際標準品候補品（遺伝子型 3a）と日本の国内標準品候補品（同 3b）を同時に評価した。2つの候補品は日本の献血由来の HEV 陽性血漿を原料とし、ISO13485:2003 を取得したスイスの同一の会社に委託して

分注、凍結乾燥した製品である。ほとんどの参加施設が自家開発の Real Time PCR 法を用いて測定を行った。20組の定量法、14組の定性法の測定結果が報告され、両方の測定結果に基づいて HEV RNA 第1次国際標準品（6329/10）の力価を 250,000 IU/mL と決定した。2つの候補品の力価の差は無視できるほどわずかであったので、日本の国内標準品候補品が国際標準品と同等の品質、同じ力価（250,000 IU/mL）であることが示された。2012年第1回 NAT 小委員会において HEV RNA 国内標準品の制定と、パルボウイルス B19 DNA 国内標準品を作製することが決定された。国内標準品の交付は国立感染症研究所が有償で行っている。

3.2 海外の参照品

HCV RNA 第1次国際標準品が制定されると欧米諸国のワーキング試薬の力価を IU で表示したことは1.1で述べたが、HCV RNA や HBV DNA の国際標準品の二次標準品が順次整備されていった。アジアにおいては日本、台湾、韓国、中国が国内標準品を作製した。現在、交付あるいは販売されている肝炎ウイルス遺伝子 NAT のための主な二次標準品を表3に示した。

おわりに

現在の国際標準品は、血液製剤の原料血漿プールに混入する微量のウイルス遺伝子を検出する試験法の標準品として制定され、性状は血漿の凍結乾燥品、力価は様々な試験法を用いた測定結果に基づいて決定され、IU で表示される。WHO は 2007 年「血液のウイルス学的安全性にかかわるウイルスの体外診断薬のための国際標準品整備の5か年戦略」¹⁸⁾に基づいて血清学的

表3 海外の参照品とパネル

NIBSC	HCV RNA ワーキング試薬 HCV RNA 遺伝子型パネル マルチプレックスワーキング試薬 (HCV, HBV, HAV, HIV, B19)
ポールエーリッヒ研究所 (PEI)	HBV-DNA PEI 参照品 HCV-RNA PEI 参照品
欧州医薬品品質部門 (EDQM)	PH. Eur.BRP HBV-DNA PH. Eur.BRP HCV-RNA
SeraCare ライフサイエンス株式会社	ACCURUN [®] コントロール HCV ACCURUN [®] コントロール HBV HCV リニアリティーパネル HBV リニアリティーパネル

検査や NAT のための標準品の整備を進めている。しかし、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、合成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¹⁹⁾。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。

■文献

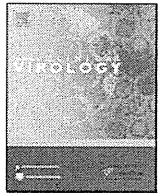
- 1) Yu MY, Mason BL, Tankersley DL: Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in immune globulins, *Transfusion*, **34**: 596-602, 1994.
- 2) Saldanha J, Lelie N, Heath A: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group, *Vox Sang*, **76**: 149-158, 1999.
- 3) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Nübling M, Yu M: Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV international standard. The Collaborative Study Group, *Vox Sang*, **78**: 217-224, 2000.
- 4) Saldanha J: Standardization: a progress report, *Biologicals*, **27**: 285-289, 1999.
- 5) Saldanha J, Heath A, Aberham C, Albrecht J, Gentili G, Gessner M, Pisani G: World Health Organization collaborative study to establish a replacement WHO international standard for hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology assays, *Vox Sang*, **88**: 202-204, 2005.
- 6) Baylis SA, Heath AB; Collaborative Study Group: World Health Organization collaborative study to calibrate the 3rd International Standard for Hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays, *Vox Sang*, **100**: 409-417, 2011.
- 7) Fryer J, Heath A, Wilkinson D, Minor P, the Collaborative Study Group: Collaborative Study to Evaluate the Proposed 4th WHO International Standard for Hepatitis C Virus (HCV) for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays, WHO/BS/2011.2173, ECBS 2011 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_BS_2011.2173_eng.pdf)
- 8) Rogers PM, Saldanha J, Allain JP: Report of EPFA/NIBSC workshop 'nucleic acid amplification tests (NAT) for the detection of blood-borne viruses' held on 31 October 1996 in Amsterdam, The Netherlands, *Vox Sang*, **72**: 199-206, 1997.
- 9) Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards (revised 2004) in WHO Expert Committee on Biological Standardization. Fifty-fifth Report., WHO Technical Report Series, No. 932, p. 79, World Health Organization, Geneva, 2006.
- 10) Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, Dawson P, Heermann K, Heath A; WHO Collaborative Study Group: An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques, *Vox Sang*, **80**: 63-71, 2001.
- 11) Saldanha J, Heath A, Lelie N, Pisani G, Yu MY; Collaborative Study Group: A World Health Organization International Standard for hepatitis A virus RNA nucleic acid amplification technology assays, *Vox Sang*, **89**: 52-58, 2005.
- 12) Baylis S, Mizusawa S, Okada Y, Hanschmann K: Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays, WHO BS 2011.2175, ECBS 2011 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_BS_2011.2175_eng.pdf)

- 13) Baylis SA, Heath AB, Chudy M, Pisani G, Klotz A, Kerby S, Gerlich W: An international collaborative study to establish the 2nd World Health Organization International Standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification technology-based assays, *Vox Sang*, **94**: 358-362, 2008.
- 14) Fryer J, Heath A, Wilkinson D, Minor P, the Collaborative Study Group: Collaborative Study to Evaluate the Proposed 3rd WHO International Standard for Hepatitis B Virus (HBV) for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays, WHO/BS/2011.2170, ECBS 2011, (http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/WHO_BS_2011.2170_eng.pdf)
- 15) Saldanha J, Heath A; Collaborative Study Group: Collaborative study to calibrate hepatitis C virus genotypes 2-6 against the HCV International Standard, 96/790 (genotype 1), *Vox Sang*, **84**: 20-27, 2003.
- 16) Chudy M, Hanschmann K, Kreß J, Gerlich W, Nübling M: Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Genotype Panel for Hepatitis B Virus Nucleic Acid Amplification Technique (NAT) - Based Assays, WHO/BS/09.2121, ECBS 2009 (http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_BS_09.2121_eng.pdf).
- 17) 水沢左衛子, 岡田義昭, 堀内善信, 田中建志, 佐藤功栄, 金子健二, 佐々木祐子, 田中利明, 伴野丞計, 友水健雄, 速水照一, 土方美奈子, 平子一郎, 真弓忠, 三上貢一, 三代俊治, 宮本誠二, 牟田健吾, Thomas Weimer, Todd Gierman, 小室勝利, 山口照英: C型肝炎ウイルス RNA の遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製. *日本輸血学会雑誌*, **51**: 515-519, 2005.
- 18) Development of WHO Biological Reference Preparations for Blood Safety-related *in vitro* Diagnostic Tests, Report of a meeting with the WHO Collaborating Centres for Biological Standards and Standardization, 29-30 January 2007 (http://www.who.int/medicines/publications/WHO_CCsIVD_MeetingReport.pdf)
- 19) Madej RM, Davis J, Holden MJ, Kwang S, Labourier E, Schneider GJ: International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing, *J Mol Diagn*, **12**: 133-143, 2010.

Standards for hepatitis viruses for nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays

Saeko Mizusawa*, Yoshiaki Okada*

**Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases*



First WHO International Reference Panel containing hepatitis B virus genotypes A–G for assays of the viral DNA

M. Chudy^a, K.-M. Hanschmann^a, J. Kress^a, S. Nick^a, R. Campos^b, U. Wend^c, W. Gerlich^c, C.M. Nübling^{a,*}

^a Paul-Ehrlich-Institut, Section of Molecular Virology, Langen, Germany

^b University of Buenos Aires, School of Pharmacy and Biochemistry, Buenos Aires, Argentina

^c Justus-Liebig-University Giessen, Institute for Medical Virology, Giessen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 June 2012

Received in revised form 9 August 2012

Accepted 16 August 2012

Keywords:

HBV genotypes

HBV DNA

HBV NAT

IVD

Validation

Calibration

ABSTRACT

Background: WHO International Standards (IS) are provided for the calibration and validation of diagnostic and screening assays, e.g. for hepatitis B virus (HBV). HBV forms numerous subgenotypes and the current IS for HBV DNA reflects subgenotype A2.

Objective: A reference panel with the most prevalent subgenotypes should facilitate evaluation of genotype-specific detection efficiencies.

Study design: 215 HBV positive plasma samples collected worldwide were characterized for HBV markers and sequenced. Fifteen subgenotype A1, A2, B2, B4, C2, D1, D3, E, F2 and G samples were selected for the panel. The lyophilized samples were tested in parallel with the IS in an international collaborative study with 16 laboratories using 13 different nucleic acid amplification techniques (NATs).

Results: Eight of 13 NAT had a HBV DNA detection efficiency which was independent of the genotype and consistent with the IS, while with five assays, certain deviations were noted, particularly with genotype F which was under quantitated or even missed by three assays. The panel was accepted by the WHO as the "1st WHO International Reference Panel for HBV Genotypes for HBV NAT-Based Assays".

Conclusions: The evaluation of HBV DNA assays should include many different genotypes. The WHO Reference Panel is universally available for manufacturers of HBV DNA assays, diagnostic laboratories and control authorities to facilitate standardized validation of HBV genotype specific detection efficiency of both diagnostic (quantitative and qualitative) and screening NAT assays.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Sensitive screening and accurate diagnostic assays play a crucial role in the prevention and management of HBV associated diseases. Sensitive HBV DNA assays by nucleic acid amplification techniques (NATs) detect more infected subjects in the early and in the low level chronic infection phase when compared to highly sensitive immune assays for HBsAg.^{1,2} Over the past years HBV NAT has been increasingly introduced in different countries into the screening programmes for blood donors.³ Highly sensitive detection of HBV DNA by NAT is also important for the detection of occult HBV infection, for the early detection of re-activating HBV infection under immune suppression, and for the decision on a potential discontinuation of long-term antiviral therapy.^{4–6} Quantitative HBV

DNA assays are required for the estimation of infectivity of an HBV infected subject, and for the decision on whether an antiviral therapy is indicated according to HBV treatment guidelines.^{6,7}

Due to the importance of HBV DNA as a screening and diagnostic marker, the first WHO International Standard (IS) for HBV DNA (97/746) was established in 1999 followed by the subsequent replacement standards, the 2nd WHO IS for HBV DNA (97/750) and the 3rd WHO IS (10/264). All these were derived from the same plasma of one highly viremic HBV carrier.^{8,9} HBV strains from different regions of the world differ in their genomic sequence. Eight HBV genotypes (A–H) have been defined so far with >8% inter-genotype nucleotide divergence over the entire viral genome.¹⁰ Some of the HBV genotypes are further differentiated into subgenotypes characterized by >4% intra-genotype divergence. The IS preparations are subgenotype A2 which is mainly prevalent in Western Europe and North America. However, on a global basis, this genotype represents only 1% of the HBV infected population. Currently available NAT assays target different regions of the HBV genome, e.g. the pre-S-, S-, core- or X-gene region. Despite the choice of conserved sequences for primers and probes, not all

* Corresponding author at: Paul-Ehrlich-Institut, Section of Molecular Virology, Paul-Ehrlich-Strasse 51–59, D-63225 Langen, Germany. Tel.: +49 6103 77 3304; fax: +49 6103 77 1280.

E-mail address: nuemi@pei.de (C.M. Nübling).