

201235005B

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者 小林 和 夫

平成25（2013）年3月

# 目 次

I. 総合研究報告書	
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	15
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	21
現行のロタウイルス体外診断薬の再評価とノロウイルス体外診断薬の改良に関する研究 岡田 賢司	25
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	29
風疹感染診断技術に関する検討 岡本 貴世子	39
A型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価 大西 和夫	45
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	53
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	57
IV. 研究成果の刊行物・別刷	61

# 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)  
総合研究報告書-平成 22 年度～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た。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・ロタウイルス感染症（感染性胃腸炎、5 類定点）、パルボウイルス B19 感染症（伝染性紅斑、5 類定点）、風疹（5 類全数）、A 型肝炎（4 類）を研究対象感染症とした。これら感染症の現行体外診断用医薬品の評価・問題点や新規診断薬（抗体、病原体・遺伝子検出）の開発に関し、研究を推進した。また、国際協力や協調の観点から、世界保健機関と共同し、体外診断用医薬品の精度管理に資する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用医薬品の臨床医学領域における問題点を抽出し、国内標準品や標準検体パネルを整備して体外診断用医薬品の再評価に基盤を提供し、臨床<→>基礎医学領域の双方向的橋渡し研究を推進することを目的としている。性器ヘルペスウイルス感染症（感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律、5 類定点把握感染症）、インフルエンザ（5 類定点）、感染性胃腸炎（5 類定点、特に、ロタウイルス感染症、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、体外診断用医薬品を再評価するための基盤整備に関し、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、体外診断用医薬品の精度管理に資する国内・国際標準品を整備する。

担当者 研究課題  
小林 和夫 研究の総括

川名 尚	性器単純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	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
岡田 賢司	現行のロタウイルス体外診断薬の再評価とノロウイルス体外診断薬の改良に関する研究
庵原 俊昭	各種ウイルス抗体価の互換性およびガンマグロブリン中のウイルス抗体価の検討
岡本貴世子	風疹ウイルス感染診断技術に関する検討
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. 性器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. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

インフルエンザ迅速診断キット (18 キット) について、検出感度、検体溶出効率を検討した。キットの臨床使用頻度はデータベース (ML インフルエンザ流行前線情報 DB; <http://mL-flu.children.jp>) を参照した。

ホルマリン不活化全粒子 A/Narita/1/2009 で免疫したマウスから細胞融合により抗体産生細胞融合腫 (ハイブリドーマ) を作製した。Narita 株に結合し、季節性 A/H1N1 (Brisbane) 株に結合しない抗体のみを選

択した。Narita 株のみに結合するハイブリドーマをクローニングし、ELISA 実験に用いた。

### 3. 現行のロタウイルス体外診断薬の再評価とノロウイルス体外診断薬の改良に関する研究

感染性胃腸炎で受診した患児の糞便からロタウイルス抗原が迅速診断キットで陽性となった便検体を保存し、他の 2 キットと性能を比較した。ノロウイルス感染症の診断キット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

水痘抗体価の互換性、国際単位表示、静注用免疫グロブリン製剤 (IVIG、4 社) に含まれる水痘抗体価の測定、サイトメガロウイルス (CMV) 抗体価の互換性およびパルボウイルス B19 抗体価について検討した。

### 5. 風疹ウイルス感染診断技術に関する検討

患者血清 (90 検体) を収集し、うち 76 検体を測定に供した。感染研において、平行線定量法により、各血清に含まれる抗風疹ウイルス IgG 抗体の平行性と直線性を確認した。次に、国内検査施設 5 施設において、国際標準血清 RUB-I-1-94 に対する各血清の IgG 相対力価を各施設が通常使用している試薬・機器を用い、測定した。各施設の独立した 3 回の試験結果から平行線定量法により国際標準血清に対する相対力価をそれぞれ算出し、幾何平均値を求めた。

### 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

不活化 HAV をマウスに免疫後、ハイブリドーマを樹立し、HAV 抗原捕捉 ELISA 系を構築した。抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価に関し、抗 HAV-IgM 陽性ヒト血清 (血漿) 国内検体、混合力価パネル (Boston Biomedica、BBI 社) とセロコンバージョンパネル (BBI 社) を用い、既承認抗 HAV-IgM 抗体検出キットにより抗体力価を測定した。測定値に乖離が生じた血清検体について、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

により HAV-RNA を検出した。増幅された遺伝子断片 (VP1/2B 領域) の塩基配列を解析した。米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI) のウイルスゲノムやタンパク質情報から、標的エピトープの抗原性と立体構造を検討した。また、免疫原性について、HAV ワクチンで免疫して抗体応答を解析した。さらに、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、性能を評価した。

## 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

世界保健機関 (WHO) 生物学的製剤標準化に関する専門家委員会 (Expert Committee on Biological Standardization, ECBS) と Standardisation of Genome Amplification Techniques (SoGAT-CV) 会議に参加、または、議案書を閲覧し、WHO 国際標準品と標準検体パネルの整備に関する最新情報を収集した。WHO 国際標準品および標準パネルを作製するため、国際共同研究に国立感染症研究所が参加協力した。E 型肝炎ウイルス (HEV) -RNA WHO 国際標準品を作製するため、候補品の評価を行った。

## C. 結果

### 1. HSV 感染症の血清診断

抗体検出方法 (IgM 補足法や間接法) により、感度の相異が認められ、補足法は高感度であった。初診時と 2 週間後の対検査により初発 HSV 感染症の血清診断が可能であった。HSV-IgM 検出の改良により、感度・特異度が改善した。型 (HSV-1、-2) 特異的抗体検出キットは優れた特異性を示した。

### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

18 キットの A/California/07/2009 pdm 株に対する最小検出感度は  $10^{2.5} \sim 10^{5.0}$  copies/test であった。B/Wisconsin/1/2010

株の最小検出感度は  $10^4 \sim 10^{5.5}$  copies/test であった。対象としたすべてのキットにおいて A、B の型別検出が可能であった。検体採取用スワブの溶出効率では素材のレーヨンや綿に比し、ナイロンファイバーが低値であった。容器の溶出効率では素材のプラスチックに比し、ガラス製は低値であった。統一綿棒による検体採取によるキット検出感度は  $10^{3.5} \sim >10^5$  copies/test であった。

インフルエンザ A/H1N1pdm 特異的迅速免疫診断キットは既に試作した (感度: 90.6%、特異度: 99.7%)。試作キットに用いた抗体の抗原決定基を解析するため、Narita 株由来、あるいは、PR8 株 (H1N1) 由来の組換え核蛋白 (rNP) を用い、NSP5 と NSP23 の結合性を解析した結果、両抗体とも Narita 株由来 rNP に特異的に結合した。エピトープ構造について、NSP5 は、この N 末領域に結合することが明らかとなった。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 抗体は高親和性で NP に結合すると考えられた。

### 3. 現行のロタウイルス体外診断薬の再評価とノロウイルス体外診断薬の改良に関する研究

ロタウイルス感染症に関し、2011 年シーズンは合計 22 検体の検査を行った。3 診断キットの結果が同じであった糞便は 20 検体であった。遺伝子型は 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。2012 年シーズンは 27 検体を検討した。27 検体の遺伝子型は G1P8 が 26 件、G9P8 が 1 件で G1P8 が大部分を占め、2011 年シーズンとは異なる流行形態であった。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。2011 年シーズンは系統樹解析を行った。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。

ノロウイルス迅速診断キットの非特異反応を最小限にするため、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表面積の大きいフロックスワブの採用により採取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

水痘（免疫付着赤血球凝集法、IAHA）抗体価と酵素抗体法（EIA）抗体価は相関係数  $R=0.8897$  ( $P<0.0001$ )、相関直線は、 $\log_2 \text{IAHA 抗体価} = 1.04 \times \log_2 \text{EIA 抗体価} + 0.51$  であった。相関直線から求められる両抗体価の間には、IAHA 抗体価（倍） $= 1.4 \times \text{EIA 抗体価 (EIA 価)}$  の関係が認められた。IAHA 法を基準としたとき、EIA 法の陽性一致率100%、陰性一致率100%と極めて良好な関係が認められた。デンカ標準血清各濃度の国際単位水痘抗体価は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 (mIU/mL  $\doteq$  EIA 価  $\times 50$ ) に相当した。IVIGに含まれる水痘・帯状疱疹ウイルス (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は認められなかった。A社のサイトメガロウイルス (CMV) 抗体価 (EIA) とB社の抗体価 (倍) との間には、有意の相関 ( $P<0.0001$ ) があり、相関直線は  $\log_2 \text{B社抗体価 (倍)} = 1.28 \times \log_2 \text{A社EIA抗体価} + 7.84$  の関係が認められ、相関直線から

求められる両抗体価の間には EIA 価  $\times 200 \doteq$  倍の関係があった。思春期女性のCMV抗体陽性率は約55%であった。パルボウイルスB19抗体価は0.6-38.6 IU/mLに相当した。平行線定量からパルボウイルス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であった。パルボウイルス感染症（伝染性紅斑、3名）の血清抗体価は、90-230 IU/mLであり、著明高値であった。思春期（81名）の血清パルボウイルス抗体価分布は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名の抗体分布でも、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。以上から、2 IU/mL以上を陽性、1-2 IU/mLを判定保留、1 IU/mL未満を陰性とするのが妥当と判断した。抗体陽性閾値を2 IU/mLとした場合、思春期の血清抗体陽性率は65.4%、17-30歳の妊婦：66.7%、30-40歳の妊婦：42.3%であり、30~40歳の妊婦の抗体陽性率は有意に低率であった。母親と臍帯血の血清パルボウイルス抗体との間には有意の相関が認められた ( $R=0.9847$ ,  $P<0.0001$ )。母親の抗体価は1.17倍濃縮して児に移行していた。

#### 5. 風疹ウイルス感染診断技術に関する検討

国内パネル血清候補のWHO国際標準血清に対する相対力価を決定した。同時に測定した赤血球凝集抑制 (HI) 価との相関を解析したところ、両者の間に良好な相関がみられ ( $R^2=0.897$ )、HI 価16倍以上においては  $\text{Log}_{10}(\text{IU 値}) \doteq 0.26 \text{Log}_2(\text{HI 価}) + 0.084$  の変換が可能であると考えられた。また、外挿値よりCutoff値であるHI 価8倍はおよそ7.5 IU/mLに相当すると考えられた（論文投稿中）。

#### 6. HAV体外診断薬の再評価に関する研究

新規モノクローナル抗体を組み合わせ、HAV抗原捕捉ELISA系を構築した。検出限界は300-800 pg/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 10 pg/mL ( $\sim 10^4$  pfu/mL) 以上であり、10-100 倍の感度格差があった。NAT ではパネル血清 (8 検体) の 2 検体に HAV-RNA が検出された。HAV 抗原捕捉 ELISA はこの 2 検体を陽性検体とした。また、NAT 陰性の 2 検体が陽性となった。上市されている抗 HAV-IgM 抗体検出キット (A 社と B 社) について、国内検体 10 検体、混合力価パネル 25 検体 (海外検体)、セロコンバージョンパネル 5 検体 (海外検体) に対して行った。その結果、国内検体 3 検体およびセロコンバージョンパネル陽性検体の計 4 検体において、A 社と B 社キットの測定値が乖離した。A 社のキットでは、乖離した 4 検体でのみ抗 HAV-IgM 抗体を検出する感度が低下していた。A 社と B 社キットで測定値が乖離した。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。その他の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。乖離した 4 例の HAV 株の性状を解析するため、HAV ゲノムを RT-PCR により増幅して単離し、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。HAV 抗原捕捉 ELISA 系を用いて、陰性と陽性のカットオフ値を陰性群の平均値+2SD に設定した。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 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く、偽陽性と偽陰性が問題となることが判明した。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 箇所の突然変異があった。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、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 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

2011 年、HBV 遺伝子型 (HBsAg) パネル、EBV-DNA、HIV-RNA、HEV-RNA、HBV-DNA 及び HCV-RNA 国際標準品が制定された。また、HEV-RNA 国際標準品 (code 6329/10) が制定され、HEV-RNA 国内標準品が制定され、2011 年 11 月から、国立感染症研究所は交付している。2012 年、HIV-1 NAT 遺伝子型パネルが制定された。2010-2012 年に国立感染症研究所はヒトサイトメガロウイルス (HCMV) -NAT 国際標準品などの制定に貢献した。

#### D. 考察

##### 1. 性器 HSV 感染症の血清診断

性器 HSV 感染症の臨床病型には初感染と非初感染があるが、本研究結果から対血清の HSV-IgM および-IgG 抗体を測定することにより、血清診断が可能と考えられる。判定に際し、カットオフ値のキット間格差があり、設定を再評価することが必要である。型 (HSV-1、-2) 特異的抗原 (糖たんぱく質) を用いることにより、型特異的血清診断が可能となった。

##### 2. インフルエンザ迅速免疫診断キットの評価や開発

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、本研究で検討を行った全 18 キットについて、A/California/07/2009 pdm 株に対する最小検出感度は、 $10^{2.5} \sim 10^{5.0}$  copies/test であったが、研究期間中に最も感度が低かったキットが販売終了となり、研究期間最終年に用いられていた 16 キットにおけるデバイスの最小検出感度は  $10^{2.5} \sim 10^{3.5}$  copies/test とキット間における検出感度の差が小さくなった。対象とした 16 キットすべてにおいて、B 型 (B/Wisconsin/1/2010)

に対するデバイスの最小検出感度は A 型 (A/California/07/2009pdm) に比べ劣っていた。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。

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 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. 現行のロタウイルス体外診断薬の再評価とノロウイルス体外診断薬の改良に関する研究

国内で使用されているロタウイルス迅速診断キットの感度に大きな差は認めず、どのキットも有用と考えられる。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。ノロウイルス診断キットについて従来キットから、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

デンカ生研の 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。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、抗体価 2.75 EIA 価に相当した。水痘発症予防抗体価として IAHA 法 4 倍、A 社 EIA 法 4.0 EIA 価を提唱する。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、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。ポリグロビン N が最も VZV 抗体価が最も高く、他の 3 社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、日本人献血者の

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計算上 500 mg/kg である。IVIG 100 mg/kg 投与すると、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 の濃度はいずれも発症予防抗体価の 4 倍以上の抗体価が推計された。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の投与が必要と推察された。2 社の EIA キットを用いて CMV 抗体価を測定したが、世界的に使用されている B 社を基準としたとき、陽性一致率 100%、陰性一致率 98% と極めて高い相関が認められた。EIA 法を用いて CMV 抗体の血清疫学を行う際には、どちらを用いても大きな違いはないと判断された。2 社のキットを用いて、思春期女性を中心とした CMV 抗体陽性率は約 55% であり、多くの先進国と同様に、本邦も妊婦の CMV 感染予防対策が、今後重要な課題になることが推察された。わが国のパルボウイルス B19 IgG 抗体判定試薬は定性試薬として市販されている。今回、この試薬の定量性や B19 の血清疫学について検討したところ、0.6 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、定量性があると判断した。3 人のパルボウイルス B19 感染症(伝染性紅斑)回復期の血清抗体価は 90-231.2 IU/mL を示し、極めて高値であった。抗体価の分布および抗体の直線性から、パルボウイルス B19 抗体判定基準を 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、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%、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、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 歳の人が妊娠した場合、パルボウイルス B19 感染を受けないよう注意することが重要であることが示された。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母体よりも 1.17 倍濃縮して児に移行していた。

## 5. 風疹ウイルス感染診断技術に関する検討

風疹ウイルスゲノムの検出は血清診断に比し、高感度・特異度を示す。TaqMan リアルタイム PCR 法による新しいウイルスゲノム検出条件を設定し感度、特異性等を比較した。その結果、今回用いた遺伝子型においては RT-PCR 法よりも優れていることが示した。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遺伝子型 2B の分離が数例報告されており、本方法はこの遺伝子型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。

## 6. HAV 体外診断薬の再評価に関する研究

HAV-RNA は RNase により分解されるため、NAT による検出には注意を要するが、HAV 抗原捕捉 ELISA 系ではタンパク質抗原を検出するため、NAT に較べて安定である利点がある。HAV ウイルス血症は alanine aminotransferase (ALT) 上昇にやや先行し、ウイルス量は  $10^4$ - $10^5$  pfu である。HAV 抗原捕捉 ELISA 系の検出感度は数百 pg/mL ( $\sim 10^5$  pfu/mL) であり、検出系に蛍光試薬を用いることにより、約 10 倍、上昇することが期待される。感度と特異度について、偽陽性と偽陰性の問題点が浮上した。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。抗 HAV ウイルス抗体・ウイルス抗原同時検出キットの研究開発に HAV 抗原捕捉 ELISA 系が貢献するであろう。抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価では、1 社のキット測定値は他社より

低値を示し、乖離した。おそらく、測定方法が一部の HAV 流行株に対して最適化されていないためと考えられる。HAV-IgM 測定値が乖離した 4 例の原因が、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と、限定したエピトープの差異によると予想される。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。分子疫学的調査から HAV 株は大きく 3 群 (1A-1 型、1A-2 型、3A 型) に分類され、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、加えて、HAV 主要エピトープの変化を把握することが重要である。HAV 粒子表面のエピトープ・ペプチドの解析から、構造を保ったウイルス粒子では VP1<sub>11-25</sub> が認識され、壊れたウイルス粒子では VP3<sub>110-121</sub> も認識されることが予想される。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。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 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できた。同様の技術が HAV 診断キットにも応用可能である。

## 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

HEV-RNA 標準品は国際共同研究によって国際標準品と同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 年後に国内交付できた。しかし、感染性国内標準品の凍結乾燥を受託する施設が国内になく、候補品製造施設の確保が今後の課題である。国際標準品作製のため、国際共同研究に国立感染症研究所が参加し、国際貢献に資する体制が構築された。

## 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 に対する診断キットの検出感度は向上し、またキット間格差も小さくなった。16 キット間における B/Wisconsin/1/2010 に対する検出感度の差は小さかったが、検出感度は A/California/07/2009pdm より低かった。B 型インフルエンザウイルスの検出に関し、より高感度のキットの開発が望まれる。

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. 現行のロタウイルス体外診断薬の再評価とノロウイルス体外診断薬

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。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

3 種類の水痘抗体測定方法に互換性があること、水痘発症予防抗体価である 150 mIU/mL を A 社では 2.75 EIA 価に相当した。本邦献血由来 IVIG の VZV 抗体価は、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、発症予防レベルの 4 倍以上の抗体価となり、免疫健全児では発症予防が可能と推察された。CMV においては、A 社 EIA 法と B 社 EIA 法の間で極めて強い相関が認められた。パルボウイルス B19 に関し、0.6 から 38.6 IU/mL の間で定量性が認められ、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 以上を陽性と判定した。また、血清疫学の検討から、31~40 歳妊婦はパルボウイルス B19 流行時には感染予防が必要な集団と思われた。

### 5. 風疹ウイルス感染診断技術に関する検討

日本国内の風疹の検査診断では、血清抗

体を測定する HI 法と ELISA 法が用いられている。体外診断用医薬品の性能評価や品質管理に標準パネル血清が必要である。本研究では、HI 法と ELISA 法の相関性を検討するため、検査施設と共同でヒト血清 76 検体の IgG と HI 価を測定し、HI 価と ELISA による抗体価との相関を示し、両者の互換性を示した。これにより風疹抗体価の標準化が期待される。さらに、パネル血清を国立感染症研究所認定標準パネルとして登録した。今後風疹抗体測定用の体外診断薬キットの品質管理、検査施設の精度管理等に利用したいと考えている。

### 6. HAV 体外診断薬の再評価に関する研究

HAV 抗原捕捉サンドイッチ ELISA 系を構築した。検出感度は 300-800 pg/mL ( $\sim 10^5$  pfu/mL) であった。2 社のキットで HAV-IgM 抗体測定値が乖離した。HAV 亜株を漏れなく検出可能な体外診断薬が望まれる。検出特性を保証する 7 種類の補正ペプチドを設計した。

### 7. ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な整備

WHO-ECBS で HCMV-NAT、HBV 遺伝子型 (HBsAg) や HEV-RNA パネルが制定された。国立感染症研究所は国際標準品等の制定に貢献した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

1. 論文発表：一覧表・各報告書を参照
2. 学会発表：一覧表・各報告書を参照

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特記事項なし
2. 実用新案登録 特記事項なし
3. その他 特記事項なし

## 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

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

①ウイルス感染の血清診断には特異的 IgM 分画の抗体が用いられる。単純ヘルペスウイルス特異的 IgM 抗体検出キットには IgM 捕捉法と間接法があるが検出感度に乖離がみられ臨床の場で混乱がみられる。IgM 捕捉法は間接法より感度が良く、感染後長期に陽性が続いた。

性器ヘルペスの初発例には初感染が 8 割であるが非初感染が 2 割あり、前者は IgM 抗体が 100%検出されしかも値が高かったが、後者は検出されない例が多かった。初発の診断には 1 回の IgM 抗体検出だけでの診断は難しいが、IgM 抗体と IgG 抗体を初診時と 2 週間後のペア血清で測定し定量的に評価すれば初発例の血清診断は可能である。しかし、再発例の診断は難しくこの場合は型特異抗体の検出が有用である。

②現在本邦で用いられている単純ヘルペスウイルス IgM 抗体検出キットには判定保留がかなりみられたため改良が行われたが、改良品は感度がやや低下したが判定保留が減少しより優れたものになった。

③性器ヘルペスの診断には単純ヘルペスウイルス 2 型に対する特異抗体の検出が臨床的に有用であり、外国ではキット化されている。HerpeSelect、Plateria、Captia の三つ EIA キットを評価したが今回は Kalon（HSV-2 抗体のみ）、Bioplex（HSV-1 抗体と HSV-2 抗体）を評価した。両キットとも特異性は良好であったが、感度についての検討が今後の課題である。

④本研究を通じて以下の点を提言したい。

- 1) 新しく承認されたキットについてカットオフ値など臨床的にも評価することが必要である。
- 2) EIA 法の評価に定量的評価を導入する。
- 3) 検査法の違いによる IgM 抗体の検出結果の乖離が臨床の場で混乱を招いている。  
妊婦における風疹、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、トキソプラズマに対する IgM 抗体の検出の乖離は特に影響が大きい。
- 4) 単純ヘルペスウイルス型特異抗体検出法の早期承認を要望する。

#### A. 研究目的

ウイルス感染の血清診断にはしばしば IgM 分画の特異抗体（IgM 抗体と略）が用いられる。医師は臨床症状とこの結果によ

り診断し治療するので高い精度が要求される。単純ヘルペスウイルス（HSV）感染をモデルとして現在汎用されている EIA 法を用いた IgM 抗体の臨床的意義とその

問題点について検討することを目的とした。さらに HSV には 1 型と 2 型があり感染している HSV の型を血清学的に分けて測定することは臨床的、疫学的に有意義であり海外で開発された型特異抗体検出キットについて評価を行った。

本研究を通して厚生労働省におけるキット承認に加えて臨床的評価も認可基準に加えることが望ましい点を提言したい。さらに研究分担者は産婦人科医であるので妊婦の IgM 抗体検査における問題を指摘したい。

## B. 研究方法

### 1. 血清

1) 東大分院、帝京大溝口病院産婦人科を受診し HSV を分離した性器ヘルペス患者、初発 91 例、再発 47 例について診断を目的として採血して得た血清の残余を用いた。検体はコード化して用いた。

2) 健康診断のために採血した血清の残余について同意の得られた学生 366 検体、某会社従業員 612 検体についてコード化して用いた。

### 2. HSV の分離と同定

Vero 細胞または R-66 細胞を用いて分離し同定と型の決定はマウスモノクローナル抗体に蛍光標識したものをを用いた。

### 3. 抗体測定法

#### 1) EIA 法

① IgM 特異抗体検出：捕捉法（デンカ生研キット）、間接法（Enzygnost）

② IgG 抗体検出：間接法（デンカ生研キット）

③ 2012 年に改良された IgM 抗体捕捉法キット（デンカ生研）

#### 2) 中和法

HSV-1 (TVK-171)、HSV-2 (THH-56) の 100TCD50 を用いマイクロプレートを用いた微量中和法で行った。

### 4. 型特異抗体測定キットの評価

感染した HSV の型が判明している患者血清を用いて最近開発された Kalon 社の HSV-2 型特異抗体検出キット、Biorad 社

Bioplex キットを評価した。

## C. 研究結果

### 1) 抗体検出法の違いによる検出感度の乖離についての検討

IgM 抗体検出法は IgM 捕捉法と間接法（サンドイッチ法）の二種類があるが、本邦では主に前者が用いられている。HSV-1 または HSV-2 による性器ヘルペス初感染の患者について IgM 抗体の検出を行ったところ IgM 捕捉法では 100% 陽性になり約 50% は 300 病日まで陽性であったのに対し間接法では 20~30% しか陽性にならず 100 病日以内に陰転化した。この大きな乖離の原因を明らかにするためには捕捉法の検出している抗体が非特異的かまたは特異的で感度が優れているのかを明らかにする必要がある。そこで捕捉法で IgM 陽性の患者血清について① IgM を分画して中和法で検討したところ中和活性が IgM 抗体値と相関して認められた。② ウェスタンブロット法にでも HSV 抗原に一致したバンドが認められた。③ dithiothreitol (dTT) 処理により特異的抗体活性は消失した。このことから捕捉法により検出された IgM 抗体は HSV 特異抗体であると考えられた。本法は感度が非常に良いことが判明したが逆にこのことが臨床的な判断に混乱を招くことにもなった。

### 2) IgM 抗体捕捉法による単純ヘルペスウイルス IgM 抗体の臨床応用と問題

一般にある症状の原因ウイルスを特定するために IgM 分画の抗体の検出が行われる。HSV の感染による性器ヘルペスについて血清診断の可能性を追求した。性器ヘルペスの発症は HSV の初感染によるものと既に潜伏感染していた HSV が免疫低下により再活性化される場合があり臨床的には区別ができない。初発性器ヘルペス 87 例（1 型によるもの 50 例、2 型によるもの 37 例）について初診時より経時的に 70 病日までの間に 1 例平均 3 回の IgM 抗体の検出を行った。67 例（77%）は高い IgM 抗体値を示し、これらは初感染初発と

考えられ、20 例（23%）は陰性か低い抗体しか示さず非初感染初発と考えられた。しかし後者は初診時から高い IgG 抗体を有していた。結論的には初診時と 2 週間後の 2 回 IgM 抗体と IgG 抗体を測定することにより初発 HSV 感染の血清診断は可能であることが判った。しかし再発例については IgG、IgM 抗体を用いても診断は困難であった。

### 3) 現行品の IgM 抗体検出キットの改良

本研究の過程で市販されている HSV-IgM 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。この点の改良を目指した改良品について検討したところ初発の陽性率が 87.4% から 72.4% に、再発で 76.6% が 25.5% と減少したが、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% と激減し臨床的にも検査の立場からも改良品が優れていることが判明した。

### 4) 型特異抗体測定キットの評価

HSV には 1 型と 2 型があり、性器ヘルペスにおいて感染している型により再発率、向神経性などが異なるので治療やカウンセリングに大きく影響する。従来用いられている検査法では抗原的に 1 型と 2 型の交差があるため正しく 1 型抗体と 2 型抗体を分けて検出することができなかったが glycoprotein G が 1 型と 2 型で異なることが判りこれを用いて型特異抗体の検出が可能となり世界的に多くのキットが販売されている。我々は既に HerpeSelect (Focus Diagnostics)、Captia (Trinity Biotech)、Plateria (BioRad) を評価してきたが、今回 Kalon (HSV-2 抗体のみ) (Kalon Biological)、Bioplex2200 (BioRad) の二つのキットを評価した。いずれのキットも特異性は良好であるが感度がやや低かった。

5) 本研究において EIA 法による IgM 抗体検査の評価の過程で以下の点が今後の課題として考えられた。

①キットの臨床的評価：新しいキットが厚労省の機関で承認されたあとカットオフ値などが臨床的に妥当であるか評価する必要がある。

②測定法間の乖離の是正：IgM 抗体の測定法には IgM 捕捉法と間接法があるがどちらも市販され用いられているが感度に大きな乖離があり臨床の現場で混乱の一因となっている。

③定性的評価の問題：IgM 抗体の測定結果の報告が定性的に行われているが却ってそのために不適当な解釈とそれに伴う治療が行われることがあり、定量的評価も合わせて行い、より妥当に評価できるようにしたい。

④既承認検査法の評価：既に承認された検査法について再評価して、不適当なものは排除し、より臨床的に役立つ検査法を推奨すべきである。

⑤臨床医への情報の提供：次々と出現する新しい検査法について臨床医はついていけない。しかも、機序の異なる検査法間の乖離などについての情報も乏しい。臨床の現場での混乱は結局患者さんが被害を被っている。

## D. 考察

1) 初発性器ヘルペスの血清診断は不可能とされているが、その理由は初発には初感染と非初感染があるからと考えられる。本研究では初発のうち非初感染初発が 20~40% もあることを示した上で、HSV 特異的 IgM 抗体と IgG 抗体を初診日と 2 週間後のペア血清を用いれば初発の診断が可能であることを明らかにした。但し、再発例では IgM、IgG 抗体による血清診断は難しいが型特異抗体の検出は有用であると思われる。

2) IgM 抗体検出法には IgM 捕捉法と間接法があり感度に大きな差がある上に定性的に判断することが求められているために臨床の現場で混乱が生じている。

3) キットメーカーが設定したカットオフ値により定性的に判定した結果がそのま



ま臨床の現場にでるため臨床の現場で混乱している。設定されたカットオフ値が臨床的に妥当であるか検討する必要がある。

4) 妊娠初期に風疹、サイトメガロウイルス、トキソプラズマ、単純ヘルペスウイルスに感染すると奇形児を出産するおそれがあるため、これらの病原体の妊娠中の初感染の時期を推定するため IgM 抗体が測定されている。しかし、検査法により感度が異なるために結果が乖離することがある。また、定性的な判断は感染時期の推定には妥当ではないが臨床の現場では用いられている。その結果、時に妊婦は奇形児の出産を過剰におそれるため妊娠中絶に至ることもある。尊い生命が必ずしも妥当とは言えない検査結果により奪われていることも起きている。

5) 単純ヘルペスウイルス感染の血清診断の目標は HSV の感染の診断と感染している HSV の型を診断することである。型特異的抗体は HSV の glycoprotein G を用いれば可能で、既に海外では5つの EIA キットが市販されている。HerpeSelect、Captia、Plateria、Kalon、Bioplex を評価したがいずれも特異性は良好であるが感度に優劣がみられる。本邦で早急に型特異抗体の測定が保険で可能になることを多くの専門家が切望している。

#### 提言

- 1) キットメーカーの設定したカットオフ値などについて臨床的に評価することが必須である。
- 2) EIA 法の評価に定量的評価を追加してほしい。
- 3) 方法論の違いによる結果の乖離が原因でおきる混乱をなくしたい。
- 4) 単純ヘルペスウイルスに対する型特異抗体検出法の早期承認を要望する。
- 5) 妊婦における風疹、サイトメガロウイルス、トキソプラズマ、単純ヘルペスウイルスに対する IgM 抗体の検出では特に正確性が求められる。方法論の違いによる乖離はあってはならない。

#### G. 研究発表

##### 1. 書籍・論文発表

- 1) 川名 尚,小島俊行編.2011.『母子感染』金原出版.357p.
- 2) 東出誠司、西澤美香、川名 尚、保坂憲光、太田嘉則、神田秀俊. 2010.新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による単純ヘルペスウイルス検出法の開発. 日本性感染症学会誌.21:120-127.
- 3) 川名 尚. 2010. 感染症 単純ヘルペスウイルス. 産科と婦人科.77:75-82.
- 4) 川名 尚. 2011. 性感染症の診断と治療 Update I .主な感染症と母子感染 2.性器ヘルペスと単純ヘルペスウイルスの母子感染ー産婦人科医の立場からー小児科臨床. 64(3):347-360.
- 5) 川名 尚. 2011. 特集 母体感染症 up to date 単純ヘルペスウイルス. 周産期医学 41(2):189-194.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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、大貫裕子、西澤美香、西井 修. 2010.性器ヘルペスにおける単純ヘルペスウイルスの型について. 第 28 回日本産婦人科感染症研究会 (京都、6 月) .
- 2) 川名 尚. 2010. 性器ヘルペスの研究ー40 年のあゆみー. JHIF (札幌、8 月).
- 3) 川名 尚、西澤美香、大貫裕子、西井 修、東出誠司、保坂憲光、太田嘉則、神田秀俊. 2010. 新規核酸抽出法と

- LAMP 法を用いた臨床検体からの単純ヘルペスウイルスの検出. 日本性感染症学会第 23 回学術大会(福岡、12 月).
- 4) 川名 尚、西澤美香、西井 修. 2011. IgM 抗体の評価について. 第 29 回日本産婦人科感染症研究会(倉敷、6 月).
  - 5) 川名 尚、土屋裕子、西澤美香、西井修. 2011. 性器ヘルペスの実験室診断. 第 29 回日本産婦人科感染症研究会(倉敷、6 月).
  - 6) 土屋裕子、川名 尚、西澤美香、西井修. 2011. トキソプラズマ IgM 抗体陽性妊婦の Avidity Index を用いた管理. 第 29 回日本産婦人科感染症研究会(倉敷、6 月).
  - 7) 川名 尚、西澤美香. 2011. IgM 捕捉法による単純ヘルペスウイルス IgM 抗体検出 EIA キットの検討. 第 52 回日本臨床ウイルス学会(三重、6 月).
  - 8) 西澤美香、川名 尚. 2011. Dithiothreitol (DTT) を用いた IgM 抗体の同定に関する研究. 第 52 回日本臨床ウイルス学会(三重、6 月).
  - 9) 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).
  - 10) 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

## 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、当研究においては、2009/10 シーズンの流行株である A(H1N1)pdm09 ウイルスおよび、2012/13 シーズンの B 型ワクチン株である B/Wisconsin/1/2010 を用いて、各キットのテストデバイスの最小検出感度の比較を行った。さらにデバイス以外のキット構成要素（検体採取用スワブ、検体溶出用容器等）についても検討した。

### 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

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について、A/California/07/2009 pdm 株および B/Wisconsin/1/2010 に対する検出感度の比較を行った。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/>を参照した。

初年度において臨床現場で用いられて

いたキットに加え、毎年新たに発売され使用されてきたキットについて検討を行った。

本研究において対象としたキットは以下計 18 キット；製品名{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)}, 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)}である。

このうち、研究期間内に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) の販売が終了し、またラピッドテスト FLU スティックがラピッドテストカラーFLU スティックに名称変更されたため、2012/13 シーズンの B 型ワクチン株である B/ Wisconsin/1/2010 についての検討は 2012/13 シーズンに販売されているキットについてのみ実施した。

対象とした 18 キットはいずれもイムノクロマト法によるものであり、キットの主な構成要素は、テストデバイス、鼻腔検体採取用綿棒、検体溶出用チューブおよび検体溶出液であった。デバイスの形状はカセット型またはスティック型であった。A,B 型インフルエンザウイルスに対する抗体はいずれもモノクローナル抗体であり、検出ライン呈色の原理は、抗原抗体反応によって結合した金または着色粒子 (17 キット)、または酵素反応 (1 キット) によるものであった。

A/California/07/2009 pdm 株および 2012/13 シーズンの B 型ワクチン株 B/ Wisconsin/1/2010 を MDCK 細胞で培養し、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。

上記キットについて以下の検討を行った。

**1. キットデバイスの最小検出感度** ; 希釈した既知量のウイルスを各キットデバイスの反応液量 (滴下/吸収) 中に添加し、

各キット添付文書に従って判定した。検討したキット数は、A/ California/07/2009 pdm 株 (18 キット) および B/Wisconsin/1/2010 株 (16 キット) である。

**2. 検体採取用スワブの球部素材による検体溶出効率の検討** ; スワブ綿球部の素材別 4 種類 (100%レーヨン、100% 綿、レーヨン・綿各 50%, 100%ナイロン (fiber) についてその検体溶出効率を検討した。

A/California/ 07/2009 pdm 株の M gene を組み込んだプラスミドベクターを作成し、これを添加 ( $2 \times 10^5$  copies/ $\mu$ L) した 0.5% gelatin -TE を U 型 96 well microplate に 30 $\mu$ l/well 滴下した。これを検体と模して 4 種各々の swab で採取し、一定条件により TE で溶出した。溶出液中のコピー数をリアルタイム PCR で測定し、比較した。

**3. 検体溶出用容器における検体溶出効率の比較 (12 キット)** ; 各キット添付の検体溶出用チューブ、溶出液による溶出効率を調べた。統一した検体採取用スワブ (50% レーヨン/ 50% 綿) を用いて、上記スワブの検討同様、同一条件でプラスミドベクターを添加した溶液を採取し、各検体溶出用チューブで検体溶出を行い、リアルタイム PCR でコピー数を測定した。

検体採取用スワブおよび検体溶出用容器における検体溶出効率の比較は Kruskal Wallis test による多重比較検定によった。

**4. 統一した検体採取用スワブを使用し、販売されているキット (14 キット) として一連の過程についての最小検出感度 (キットの最小検出感度) を比較検討** ; 一定量に希釈したウイルス (A/ California/07/2009 pdm 株) を U 型 96well マイクロプレートに 30 $\mu$ L/well 滴下し、これを統一したスワブ (綿 50%、レーヨン 50%) で採取後、各キット添付の方法によって検体処理および判定を行った。

**5. スワブによって採取した検体を処理する過程において生じる検体のロスを検討** ; 1 で測定したデバイス最小検出感度から算出したウイルス量と、4 で測定したキ