

ット最小検出感度とを比較検討し、その差は一連の過程で生じたロスと見なした。スワブで採取した検体を溶出液中に溶出処理する過程でロスが無い場合のキット最小検出感度は、以下の計算によって求めた。

(デバイス最小検出感度) / (デバイスへの添加・吸収液量) × (検体溶出液量)

倫理面への配慮

用いたウイルス株はすべて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いただいた。臨床検体は用いていない。

C. 研究結果

1. キットデバイスの最小検出感度

18キットにおける 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。その幾何平均は 10^3 copies/test、中央値は 10^3 copies/test であった。研究期間中に販売終了となった2キットを除く16キットにおける最小検出感度では $10^{2.5} \sim 10^{3.5}$ copies/test、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 株に対する上記16キットにおける最小検出感度は $10^4 \sim 10^{5.5}$ 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。

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が、これに加えて、新たにH1N1亜型の検出(2011年)、あるいはRSウイルスの検出(2012年)が可能でキットが発売され、臨床現場で用いられていた。H1N1亜型の検出が可能でキットにおける A/California/07/2009pdm (H1N1)の最小検出感度はA型に対しては 10^3 copies/test であったが、H1N1亜型に対しては 10^5 copies/test と低値であった。RSウイルスの検出感度については検討していない。

2. 鼻腔検体採取用スワブの球部素材による検体溶出効率

A/California/07/2009 pdm 株の M gene を組み込んだプラスミドベクター (2×10^5 copies/ μ l) を 0.5% gelatin -TE 検体に加えた溶液を検体と模して行った実験の結果、各スワブの検体溶出率は、レーヨン; 58%、綿; 68%、レーヨン・綿; 60%、ナイロン; 35%であり、ナイロンファイバー製が他の3種に比べ有意に低値であった($p < 0.01$)。他の3種のスワブ間における有意差は無かった。

3. 検体溶出用容器における検体溶出効率の比較

検体処理容器の素材はソフトプラスチック製(11)、ガラス製(1)であった。ソフトプラスチック製容器はその外部および内部形状から9種類に分類された。A/California/07/2009 pdm 株の M gene を組み込んだプラスミドベクター (2×10^5 copies/ μ l) を 0.5% gelatin -TE 検体に加えた溶液を検体と模して行った実験の結果、ガラス製容器はソフトプラスチック製容器すべてに比し、有意に低値であった($p < 0.01$)。ソフトプラスチック容器間における有意差は無かった。

4. キットの最小検出感度

統一スワブを用いて行った結果、14キットの最小検出感度は、 $10^{3.5} \sim >10^5$ copies/test であり、幾何平均は $10^{4.1}$ copies/test ($>10^5$ は $10^{5.5}$ として算出) であった。14キット中11キットの最小検出感度は 10^4 copies/test 以下であった。

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の検討

キットデバイスの最小検出感度から、4で測定した「一連のキットとしての最小検出感度」(計算値)を算出した結果、 $10^{2.9} \sim >10^{5.5}$ copies/test であった。計算値と4の実験値との差(検体処理中の検体ロス)は、 $10^{0.5} \sim 10^{2.0}$ copies/test であった。その差が最小であったキットの検体溶出用の容器はソフトプラスチック製で、スワブ球部の圧迫が容易な形状であった。また、その差が最も大きかったキットの溶出容器はガラス製であった。

D. 考察

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、研究期間最終年に多く用いられていた 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。そ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。

今回の成績はキットデバイスの検出感度の比較であること、また実験に用いたウイルス株が異なることから、他の報告における成績と単純に比較することはできないが、過去の研究において、B 型の検出感度の方が低いとの報告がある一方、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 型の感染の場合より採取し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迅速診断キットによる検査診断をより困難にしていると考えられる。

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。

鼻腔検体採取用スワブの球部素材による検体溶出効率の比較実験において、ナイロンファイバー製が劣る結果となったが、その原因は、吸水力においてナイロンファイバーが劣ることが考えられた。

事前の実験において PCR 反応を阻害しない gelatin 濃度は 0.5% が限度であったため、今回の実験では検体を模した溶液として 0.5% gelatin を加えたがその粘稠度は低く、ナイロンファイバー製ではマイクロウエル中の 30 μ L の検体全量を吸水することが不可能であった。

キットに添付される鼻腔検体採取用スワブの種類が変更される頻度は高く、研究期間中に 2 回以上変更となったキットもあった。ナイロンファイバー製への変更が多い傾向があり、現在使用されているキットの過半数においてナイロンファイバー製スワブが添付されている。

対象としたほとんどのキットにおいて、検体溶出時にスワブ球部を検体容器外部から圧迫して検体を抽出液中に揉み出すことが指示されており、また一部のキットでは容器内部につけられた線状突起でスワブ球部を圧迫する工夫がなされている。

今回行った研究では、スワブから抽出液に検体を溶出するのに適したスワブ球部材質、検体処理容器の材質形状のものが検体溶出効率においてすぐれた結果となった。

年々インフルエンザ迅速診断キットに多く添付されるようになっているナイロンファイバー製スワブは、鼻汁等、粘稠度がある検体の採取、および溶液中への溶出の点で優れているためと考えられる。ナイ

ロンファイバー製スワブの球部はプラスチック製で固く、検体揉みだしには適していない。実際、他の素材のスワブ使用の場合においても検体揉みだしは技術を要する点であり、検体が十分に溶出できないことも考えられる。ナイロンファイバー製スワブを用いる場合、検体溶出に適した揉み出し方法と検体容器を用いることにより、検出感度が向上することが考えられる。

統一綿棒を用いて行った、15 キットのキット最小検出感度は $10^{3.5} \sim >10^5$ copies/test であり、14 キット中 11 キットが 10^4 copies/test 以下の量のウイルスの検出が可能であった。

「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/>に記載されていた臨床医のキット使用割合と、本研究結果のキット最小検出感度を併せて検討すると、90%以上の臨床医が採取されたウイルス量が 10^4 copies 以上の場合に、インフルエンザウイルス抗原陽性と診断していると考えられた。

E. 結論

販売終了、あるいは新たに発売されたインフルエンザ迅速診断キットがあり、結果として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は向上し、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ては、より高い検出感度のキットの開発が望まれる。

適切な検体採取および検体処理時の検体ロスを少なくするためには、検体採取用スワブ、検体溶出容器および検体溶出方法について検討することも重要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

- 1) 荒木和子、佐藤弘、多屋馨子、岡部信彦. 2011. インフルエンザ迅速診断キットの A(H1N1) pdm09 に対する検出感度の比較検討. 第 43 回日本小児感染症学会学術集会. (岡山, 10 月).

H. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

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. B 細胞内因性 TLR シグナルによる B 細胞応答の制御機構、臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 58、275-282.
- 7) Harada, Y., A. Ninomiya-Mori, Y. Takahashi, M. Shirakura, N. Kishida, T. Kageyama, Y. Tada, M. Tashiro, and T. Odagiri. 2011. Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Vaccine*, 29: 8330-8337.
- 8) Fujii, H., M. Ato, Y. Takahashi, K. Otake, S. Hashimoto, T. Kaji, Y. Tsunetsugu-Yokota, M. Fujita, A. Adachi, T. Nayakaya, M. Taniguchi, S. Koyasu, and T. Takemori. 2011. HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice. *Int. Immunol.*, 23: 433-441.
- 9) 高橋宜聖、小野寺大志、小林和夫. 2011. ウイルス感染局所における記憶 B 細胞応答. *実験医学増刊*、29、81-86.
- 10) Kurosaki, T., Y. Aiba, K. Kometani, S. Moriyama, Y. Takahashi. 2010. Unique properties of memory B cells of different isotypes. *Immunol. Rev.*, 237: 104-116.
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) .
- 4) Takahashi, Y. 2011. Protective memory B cell responses to influenza virus infection. 第40回日本免疫学会 (千葉、11月) .
- 5) Onodera, T., R. Aizawa, A. Hosono, S. Kaminogawa, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2011. Role of Toll-like receptor signaling for the development and reactivation of virus-specific memory B cells. 第40回日本免疫学会 (千葉、11月) .
- 6) Yokoi, Y., T. Onodera, S. Hachimura, M. Ato, K. Kobayashi, and Y. Takahashi. 2011. Localization and reactivation of virus-specific memory B cells at the site of virus infection. 第40回日本免疫学会 (千葉、11月) .
- 7) 高橋宜聖 . 2010. Protective memory B cells against influenza virus infection in the lungs.千葉大G-COEシンポジウム. (東京、12月).
- 8) 小野寺大志、相澤竜太郎、細野朗、上野川修一、小林和夫、高橋宜聖. 2010. T cell-independent activation of virus-specific memory B cells requires Toll-like receptor (TLR) signaling. 第14回国際免疫学会 (神戸、8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 |

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

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

研究要旨

国内で広く利用されているロタウイルス迅速診断キットの比較を同じ便検体を用いて行った。感度・特異度に大きな差は認められず、現行のキットはいずれも有用と考えられた。

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

迅速診断キットを用いた診療体制が確立しているわが国では、多くのキットが日常診療で用いられているが、臨床的に比較検討されていない。国内で広く利用されているロタウイルス迅速診断の比較を行った。さらに同じ便検体からロタウイルスの遺伝子型の決定、および系統樹解析を行った。

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

（1）ロタウイルス診断キット

2011年2月～5月および2011年12月～2012年5月の2シーズン当院小児科に感染性胃腸炎で受診した患者の便からロタ

ウイルス抗原が迅速診断キット（ロタウイルス 栄研）で陽性となった便検体を保存した。流行期が終了後、他の2キット（ロタウイルス TFB およびロタウイルスラピッドテスト）でも、キットの検査様式に従って検査を行い、3キットを比較した。

同じ便検体について、福岡県保健環境研究所で、ロタウイルス VP7 領域と VP4 領域を標的とした RT-PCR を行った。VP7 領域は Beg-9/VP7-1 プライマーを、VP4 領域は con3/con2 プライマーを用いて RT-PCR を行い、増幅した産物については、さらにダイレクトシーケンスで塩基配列を決定し、それぞれの遺伝子型を BLAST 検索の結果により同定した。また、VP7 については 22 件全て、VP4 については解析可能であった 16 件について系統樹解析を行った。

（2）ノロウイルス診断キット

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

(1) ロタウイルス診断キット

2011年シーズンは合計22検体の検査を行った。患児の年齢は、1歳未満10例、1～5歳11例、6歳以上1例、男女別では男児12例、女児10例であった。22検体中3キットの結果が同じであった便は、20検体であった。

22検体の遺伝子型は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。患児の年齢は、1歳未満12例、1～5歳14例、6歳以上1例、男女別では男児15例、女児12例であった。27検体中3キットの結果が同じであった便は、25検体であった。

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。

(2) ノロウイルス迅速診断キット

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ワブに変更した。表面積の大きいフロック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

(1) ロタウイルス診断キット

現在、国内で使用されているロタウイルス迅速診断キットを同じ便検体を用いて直接比較検討した。感度に大きな差は認められず、どのキットも有用と考えられる。キットの添付文書では、使用されている抗体はロタウイルス栄研がG1,G2,G3、ロタウイルスラピッドテスタがG1,G2,G3,G4,G6となっている。3キットの結果が一致しなかった検体の遺伝子型は2件ともG1P8であった。

(2) ノロウイルス診断キット

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

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。

G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表

- 1) 岡田賢司. ロタウイルス感染症とワクチン-接種医として知っておきたい事-相模原市小児科医会・町田市小児科部会（東京、5月）.
- 2) 岡田賢司. ロタウイルス感染症とワクチン-接種医として知っておきたい事-. 第2回杉並区小児科医会(東京、6月).
- 3) 岡田賢司. ロタウイルス感染症とワクチン-接種医として知っておきたい事-神戸市小児科医会（神戸、7月）.
- 4) 岡田賢司. ロタウイルス感染症とワクチン-接種医として知っておきたい事-. 第3回旭川小児科医会（旭川、8月）.
- 5) 岡田賢司. ロタウイルス感染症とワクチン-接種医として知っておきたい事-. 県北小児科医会（佐世保市、9月）.
- 6) 岡田賢司. ロタウイルス感染症とワクチン-接種医として知っておきたい事-. 豊橋市小児科医会（豊橋、9月）.
- 7) 岡田賢司. ロタウイルス感染症とワクチン-接種医として知っておきたい事-. 倉敷小児感染症予防セミナー（倉敷、10月）.
- 8) 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）
総合研究報告書

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

研究要旨

抗体測定方法には種々の方法があるが、測定方法により抗体価の単位が異なっている。WHO は各種ウイルス抗体の国際標準品を作成し、測定方法が異なっても同じ単位(IU/ml)で抗体価を表示することを求めているが、本邦では一部のウイルスを除いて抗体価の表示が統一されておらず、互換性も十分に検討されていない。今回、水痘、サイトメガロウイルス(CMV)、パルボウイルスの抗体について検討した。

水痘においては、IAHA 法、A 社 EIA 法、B 社 EIA 法の間には極めて強い相関があること、国際標準品を用いて、A 社の水痘 EIA-IgG 抗体測定試薬に用いられる標準血清各濃度の抗体価を国際単位で算出し、EIA 価の約 50 倍が国際単位(mIU/ml)に相当すること、水痘発症予防抗体価である 150 mIU/ml は 2.75 EIA 価であることを示した。更に、本邦 4 社の献血由来 IVIG の水痘抗体価を測定すると、ポリグロビン N が、一番抗体価が高値であったが、いずれも高い水痘抗体を含んでおり、メーカーに関わらず IVIG を 100 mg/kg 投与すると、計算上発症予防レベルの 4 倍以上の抗体価となり、免疫健全者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 法の間には極めて強い相関が認められた。パルボウイルス B19 に関しては、A 社のパルボウイルス B19 抗体判定試薬は、0.6 IU/ml 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 以上を陽性と判定することを提唱した。また、血清疫学の検討から、31~40 歳の妊婦は抗体陽性率が低く、パルボウイルス B19 流行時には感染予防が必要なハイリスク群と思われた。

A. 研究目的

ウイルス感染症の診断や各ウイルス感染症に対する免疫保有状態を調べるために抗体測定が行われる。抗体測定には種々の方法があり、表示される抗体価は測定方法により値も単位も異なっている。WHO は抗体測定方法による結果の異なりをなくすために、一部のウイルス感染症では国際標準品を作成し、抗体価を国際単位(IU/ml)で表示することを求めている(表 1)。本邦では A 型肝炎ウイルス(HAV)、

B 型肝炎ウイルス(HBV)など、一部の感染症では国際単位を導入しているが、麻疹、風疹、水痘などは導入しておらず、ムンプス、サイトメガロウイルス(CMV)などは国際標準品が作成されていないのが現状である。

ウイルス抗体測定のゴールドスタンダードは中和法(NT)である。しかし、NT は手技上の手間や判定までの時間的な関係から、より短時間で大量のサンプルが測定できる赤血球凝集抑制法(HI)、免疫付着赤血球凝集法(IAHA)、

酵素免疫法(EIA)などが開発され、臨床の現場で用いられている。しかし、国際単位表示が導入されていない感染症では、測定方法による抗体価の互換性については十分に検討されていない。我々は平成21年度までの研究で麻疹抗体、風疹抗体について、測定方法による抗体価表示の互換性について検討を行った。平成22年度から3年間は、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、サイトメガロウイルス、パルボウイルスについて、抗体測定方法による互換性について検討を行った。

また、水痘は免疫不全者や妊婦が発症すると重篤化する感染症であり、水痘患者との接触時の発症予防に欧米では高単位VZV抗体ガンマグロブリン(VZIG)が用いられている。一方、本邦ではVZIGは入手不可能であり、静注用ガンマグロブリン(IVIG)が代用されているが、投与量は決定されていない。接触時に用いるIVIGの投与量を決定するために、本邦で使用されている献血IVIGの抗体価を測定し、種々の量で投与したときの理論上のVZV抗体価を算出し、発症予防に用いる投与量を提唱することを目的とした。

B. 研究方法

1) 水痘抗体測定方法による互換性の検討

本研究の目的を説明し同意が得られた63人を対象に、IAHA法とA社のEIA法で水痘抗体価を測定した。また91人を対象にA社およびB社のEIA法を用い、添付文書に従い的手法で抗体価を測定した。血清抗体価は対数変換すると正規分布するので、2を底とする対数に変換後互換性を検討した。各抗体測定方法の陰性、判定保留、陽性の判定基準を表2に示した。

2) 水痘抗体価国際単位表示の検討

NIBSCからVZV標準血清(Code w1044、50 IU/ml)を購入した。A社標準血清各濃度の抗体測定は、A社の水痘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、A社標準血清各濃度のVZV抗体価を国際単位で求めた。4回の測定で算出されたA社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、各濃度の抗体価から相関直線を算出し、得られた直線から150 mIU/ml

に一致するEIA価を求めた。

3) 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(C社(ベニロンI)は2007年と2012年、D社(ポリグロブリンN)、E社(ベノグロブリンIH)、F社(グロベニンI)は2008年と2012年)を購入した(表3)。NIBSC標準血清をスタンダードとし、IVIGを2倍段階希釈し、A社水痘EIA-IgG測定試薬を用いて各濃度の抗体価を測定した。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) CMV抗体価の互換性の検討

CMV抗体測定の同意が得られた91人を対象に、A社およびB社のEIA法で添付文書に従い的手法で抗体価を測定した。抗体価の互換性は、2を底とする対数に変換後検討した。

5) パルボウイルスB19抗体価の測定

対象は、18~20歳の専門学校生81人、17~40歳の妊婦100人、伝染性紅斑に罹患した成人女性3人である。妊婦においては、出産時に臍帯血も採取した。

方法は、A社のパルボウイルスB19 IgG抗体定性試薬を用い、添付文書に従い血清抗体価を測定した。なお、B19血清抗体価を国際単位で表示するために、NIBSCから購入した標準血清(77.1 IU/ml)をスタンダードとして標準曲線を作成し、測定する各血清の吸光度から抗体価を算出した。

倫理面への配慮

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、承認を得てから研究を行った。

C. 研究結果

1) 水痘抗体測定方法による互換性の検討

水痘IAHA抗体価(倍で表示)とEIA抗体価(EIA価で表示)との間には、相関係数 $R=0.8897$ と有意の正の相関があり($P<0.0001$)、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、 $\text{IAHA抗体価(倍)}=1.4 \times \text{EIA抗体価(EIA価)}$ の関係が認められた(IAHA4倍は2.9EIA価に相当)。

IAHA 抗体の陰性、陽性と EIA の陰性、判定保留、陽性との関係について検討した。IAHA 抗体価<2 倍の血清 2 検体は 1 検体が陰性、他の 1 検体が判定保留となり、IAHA 抗体価 4 倍以上の陽性検体 61 検体はすべて EIA 法で 4.0EIA 価以上の陽性を示した(表 4)。EIA の判定保留を陰性に含めると、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。

A 社の EIA 法の抗体価 (EIA 価) と B 社の EIA 法の抗体価 (mIU/ml) との間には、相関係数 $R=0.924$ と有意の相関があり ($P<0.0001$)、相関直線は $\log_2 B \text{社抗体価(mIU/ml)} = 0.85 \times \log_2 A \text{社抗体価(EIA 価)} + 6.57$ であった。相関直線から求められる両抗体価の間には A 社抗体価 (EIA 価) $\times 64 \div B \text{社抗体価(mIU/ml)}$ の関係があった。また、この数式から IAHA (倍) $\times 46 = B \text{社抗体価(mIU/ml)}$ の関係が算出された。

A 社の陰性、判定保留、陽性と B 社の陰性、判定保留、陽性との関係を検討した(表 5)。A 社の陰性 1 検体は B 社でも陰性であったが、A 社の判定保留 4 検体はすべて B 社では陽性であり、A 社の陽性 87 検体はすべて B 社では陽性であった。A 社の判定保留を陰性に含めると、B 社を基準にしたときの陽性一致率 95.7%、陰性一致率 100%であった。

2) 水痘抗体価国際単位表示の検討

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) \div EIA 価 $\times 50$) に相当した。

3) 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差は認められなかった(表 3)。なお、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。

4) CMV 抗体互換性の検討

A 社の抗体価 (EIA 価) と B 社の抗体価 (倍) との間には、相関係数 $R=0.9793$ と有意の相関があり ($P<0.0001$)、相関直線は $\log_2 B \text{社抗体価(倍)} = 1.28 \times \log_2 A \text{社抗体価(EIA 価)} + 7.84$ 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 $\times 200 \div$ 倍の関係があった。

A 社の陰性、判定保留、陽性と B 社の陰性、判定保留、陽性との関係では、A 社の陰性 41 検体は B 社では陰性 40 検体、判定保留 1 検体、A 社の判定保留 1 検体は B 社では陽性、A 社の陽性 50 検体は B 社ではすべて陽性であった(表 6)。A 社の判定保留を陰性に含め、B 社を基準にしたとき、陽性一致率 100%、陰性一致率 98%であった。なお、思春期女性の CMV 抗体陽性率は、A 社では 54.3%(50/92)、B 社では 55.4%(51/92)と、大きな差を認めなかった。

5) パルボウイルス B19 抗体価の測定

EIA 法では、ある値の範囲では 2 倍段階希釈した血清の希釈倍数の対数 (2 を底とする) と測定された吸光度の対数 (2 を底とする) は、直線性 (linearity) を示す。今回の検討では、吸光度 0.05~2.0 までの範囲で直線性が認められ、この範囲の抗体価は 0.6 IU/ml から 38.6 IU/ml に相当した。

A 社パルボウイルス B19 標準血清 (強陽性血清と弱陽性血清) を 2 倍段階希釈し、平行線定量から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。

6) 伝染性紅斑回復期のパルボウイルス B19 血清抗体価

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

7) 思春期および妊婦のバルボウイルス B19 抗体分布と陽性抗体価の判定

思春期の81人の抗体分布は、2 IU/ml未満34.6%、16 IU/ml以上60.5%と2峰性であり、2 IU/mlから16 IU/ml未満の人は4人(4.9%)であった。妊婦100人の抗体分布でも、2 IU/ml未満46%、16 IU/ml以上48%と2峰性であり、2 IU/mlから16 IU/ml未満の人は6人(6%)であった(図1)。以上の結果および標準血清希釈後の直線性から、抗体の判定基準を、2 IU/ml以上を陽性、1~2 IU/mlを判定保留、1 IU/ml未満を陰性とするのが妥当と判断した。

8) パルボウイルス B19 の血清疫学

抗体陽性閾値を2 IU/mlとしたとき、思春期の血清抗体陽性率は65.4%、17~30歳の妊婦では66.7%、30~40歳の妊婦42.3%であり(表7)、30~40歳の妊婦は、17~30歳の妊婦、思春期よりも抗体陽性率は有意に低率であった(それぞれ $P=0.01462$ 、 $P=0.00869$)。

9) パルボウイルス B19 の抗体移行 (図2)

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

D. 考察

1) 水痘抗体

血清抗体価は、感染症の診断、予防対策に重要な役割を果たしている。本邦では水痘抗体は主にIAHA法、EIA法(2社)で測定されており、EIA法は多量の検体を短時間で測定できる利点から、血清疫学研究では広く用いられている。

今回の水痘抗体価の検討では、IAHA法とA社EIA法との間には極めて良好な相関が、A社EIA法とB社EIA法との間にも高い相関が認められた。抗体価の互換性では、 $IAHA(\text{倍})=1.4 \times EIA \text{ 価}$ 、 $mlU/ml=64 \times EIA \text{ 価}$ の関係が算出された。

A社のEIA法とB社のEIA法の陽性閾値の検討では、A社で判定保留とされた4検体は、B社ではすべて陽性と判定されており、B社はA社と比較して陽性閾値が低めに設定されていることが示された。また、計算上A社のEIA価とB社の mlU/ml の互換性から、A社の判定保留閾値である2.0~4.0EIA価は、計算上もB社の陽性閾値に含まれる結果であった。

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 mlU/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A社の抗体価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。3年間の検討から「IAHAの抗体価 $\div 1.4 \times EIA \text{ 価}$ 」であり、2.75 EIA価はIAHA抗体2倍(1.43 EIA価 ≤ 2.86 EIA価)に含まれており、確実な発症予防抗体価はIAHAでは4倍に相当する。また、A社のEIA法の発症予防抗体価については、陽性閾値が4.0 EIA価であることから、判定保留域にある2.75 EIA価よりも、4.0 EIA価を発症予防抗体価とする方が受け入れやすいと思われる。以上の結果から、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。

2) IVIGの水痘抗体と感染予防対策

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が最も水痘抗体価が高く(一番低いところの1.46倍)、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、ポリグロビン N 889 mlU/ml、ペノグロブリン I 746 mlU/ml、ベニロン I 700 mlU/ml、グロベニン I 608 mlU/ml、と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（表 8）。以上の結果から、免疫健全児（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、免疫不全者では健全者の 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。

3) CMV 抗体

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。実際、今回の検討でも思春期女性を中心とした CMV 抗体陽性率は、A 社のキットで 54.3%、B 社では 55.4%と大きな差を認めなかった。

20 年以上前、本邦では多くの子どもは出生時に CMV に感染し、抗体保有率が 90%以上と言われていたが、近年若い人たちの CMV 抗体保有率の低下が報告されている。今回の検討でも、本邦妊娠可能年齢女性の CMV 抗体保有率は 55%に低下していた。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。

4) パルボウイルス B19 抗体

わが国で市販されているパルボウイルス 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 IU/ml から 38.6 IU/ml の間では、血清の希釈倍数（対数）と吸光度（対数）との間に直線性が認められ、38.6 IU/ml より高い抗体価は低めに表示された。以上の結果から、0.6 IU/ml から 38.6 IU/ml の間では定量性があると判断した。

平行線定量は、測定する血清を 2 倍段階希釈し、各濃度の抗体価を、2 を底とする対数に変換したものを縦軸に、各血清の希釈倍数を、2 を底とする対数に変換したものを横軸にと

り、直線部分の回帰直線から抗体価を求める方法である。この方法から求められた、強陽性標準血清と弱陽性標準血清の抗体価は、それぞれ 21 IU/ml、2 IU/ml であった。また、3 人の伝染性紅斑回復期の血清は、それぞれ 89.8 IU/ml、194.4 IU/ml、231.2 IU/ml と、極めて高値であった。

この試薬を用いた NIBSC 標準血清の直線性の検討から、0.6 IU/ml までは抗体があると考えられた。しかし、抗体価の分布をみると、思春期群、妊婦群ともに 2 IU/ml 未満と 16 IU/ml 以上に 2 峰性の山があるパターンを示した。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 抗体判定試薬での抗体の判定基準を、2 IU/ml 以上を陽性、1~2 IU/ml を判定保留、1 IU/ml 未満を陰性とするのが妥当と判断した。

この基準を用いて、思春期および 17 歳~40 歳妊婦のパルボウイルス B19 に対する血清疫学を検討したところ、31~40 歳妊婦の血清抗体陽性率は 42.3%と、他の 2 群と比較し有意に低率であった。パルボウイルス B19 は妊婦に感染すると、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 歳の人々が妊娠したとき、パルボウイルス B19 感染を受けないよう注意することが大切であることが示された。

最後に、移行抗体について検討した。一般にウイルス抗体は、母親の抗体よりも 20~50%濃縮して移行する。パルボウイルス B19 に対する抗体は、他のウイルスに対する抗体と同様に母体よりも 1.17 倍濃縮して児に移行していた。

E. 結論

水痘においては、3 種類の抗体測定方法に互換性があること、A 社の水痘 EIA-IgG 抗体測定試薬に用いられる標準血清の抗体価を国際単位で算出するとともに、水痘発症予防抗体価である 150 mlU/ml を A 社では 2.75 EIA 価に相当することを示した。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、計算上発症予防レベルの 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法の間には極めて強い相関が認められた。パルボウイルスB19に関しては、わが国で市販されているパルボウイルスB19抗体判定試薬は、0.6 IU/ml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。

G. 研究発表

1. 書籍・論文発表

- 1) 庵原俊昭、中野貴司、落合 仁、渡辺正博、二井立恵、伊佐地真知子. 2010. 麻疹・風疹血清疫学と麻疹風疹混合(MR)ワクチンによる抗体反応からみた今後の麻疹および風疹対策. 日本小児科医会会報 39:120-123.
- 2) 庵原俊昭. 2010. 基礎疾患をもつ人への予防接種. 日本小児アレルギー学会雑誌 24:193-202.
- 3) 庵原俊昭. 2010. ワクチンと免疫. 小児保健研究 69:830-832.
- 4) 庵原俊昭. 2011. ウイルス感染症の血清診断は、HI法、CF法、NT法、EIA法、どれがいいの？尾内一信編、小児の感染症診断の落とし穴. 南江堂、東京、56-58.
- 5) 庵原俊昭. 2011. 小児感染症の診断. 岡部信彦編、小児感染症学、診断と治療社、東京、19-23.
- 6) 庵原俊昭. 2011. 抗体検査：目的、結果、次にすることは. 小児感染免疫 23; 89-95.
- 7) 庵原俊昭. 2011. 麻疹、風疹、水痘、ムンプスの患者に接触したときの感染予防措置はどうすればよいですか. 小児内科 43: s559-s561.
- 8) 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.
- 9) 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、中野貴司、落合 仁、渡辺正博、二井立恵、伊佐地真知子. 2010. 麻疹対策：抗体測定方法による発症予防レベルと感染予防レベルの検討. 第51回日本臨床ウイルス学会（高松、6月）.
- 2) 庵原俊昭. 2010. 抗体検査：目的・結果・次にすることは？第42回日本小児感染症学会（仙台、11月）.
- 3) 庵原俊昭. 2011. ワクチンによる職員の感染予防対策—MMRVワクチンとインフルエンザワクチン. 第65回国立病院総合医学会（岡山、10月）.
- 4) 庵原俊昭、菅 秀、浅田和豊、一見良司. 2011. 思春期のサイトメガロウイルス(CMV)抗体保有率の検討. 第15回東海小児感染症研究会（名古屋、10月）.
- 5) 庵原俊昭、菅 秀、浅田和豊、落合 仁、二井立恵、伊佐地真知子. 2011. 各種抗体測定方法による水痘抗体価の互換性の検討. 第43回日本小児感染症学会（岡山、10月）.
- 6) 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）.
- 7) 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）.

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) 世界と日本の主なウイルス感染症における抗体価表示の現状

WHO 標準品	日本の導入	主なウイルス感染症
あり	すみ	A型肝炎ウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス
あり	未	麻疹、風疹、水痘、パルボウイルス
なし	未	ムンプス、サイトメガロウイルス、EBウイルス

WHO 標準品が導入されると、測定方法に関わらず抗体価は国際単位(IU/ml)で表示される。

(表2) 測定方法による水痘抗体、CMV抗体、B19抗体の判定基準

	測定方法	単位	陰性	判定保留	陽性
水痘	IAHA	倍	<2		≥2
	EIA (A社)	EIA 価	<2.0	2.0<4.0	≥4.0
	EIA (B社)	mIU/ml	<50	50<100	≥100
CMV	EIA (A社)	EIA 価	<2.0	2.0<4.0	≥4.0
	EIA (B社)	倍	<250	250<500	≥500
B19	EIA (A社)	IU/ml	<1.0	1.0<2.0	≥2.0

パルボウイルス B19 の判定基準は今回の検討結果からの提唱

(表3) 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4) 水痘 IAHA 抗体と EIA 抗体 (A 社) との相関

		EIA 抗体 (EIA 価)						合計	
		<2	2<4	4<8	8<16	16<32	32<64		64<128
IAHA	<2 倍	1	1						2
	2 倍								0
	4 倍			2					2
	8 倍			4					4
	16 倍				9	2			11
	32 倍			1	5	12	3		21
	64 倍					3	9	2	14
	128 倍						5	3	8
	256 倍								
	512 倍							1	1
合計		1	1	7	14	17	17	6	63

(表5) 水痘 EIA 抗体 : A 社と B 社の相関

		B 社	陽性	判定保留	陰性	合計		
A 社	陽性	8	7	0	0	8	7	陽性一致率=95.6%
	判定保留	4		0	0	4		陰性一致率=100%
	陰性	0		0	1	1		全体一致率=95.7%
	合計	9	1	0	1	9	2	

(表6) CMV の EIA 抗体 : A 社と B 社の相関

		B 社	陽性	判定保留	陰性	合計		
A 社	陽性	5	0	0	0	5	0	陽性一致率=98.0%
	判定保留	1		0	0	1		陰性一致率=100%
	陰性	0		1	4	4	1	全体一致率=98.9%
	合計	5	1	1	4	9	2	

(表7) 思春期および妊婦のパルボウイルス B19 抗体陽性率

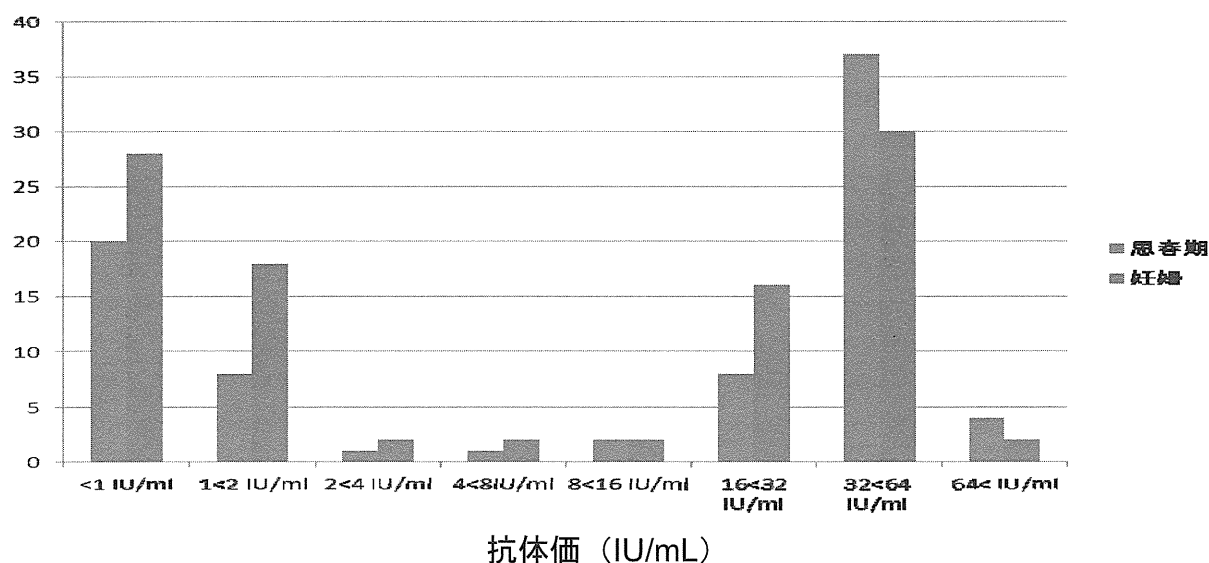
	合計	陰性・判定保留	陽性	陽性率	P value
思春期	81	28	53	65.4%	0.00869
17～30 歳妊婦	48	16	32	66.7%	0.01462
31～40 歳妊婦	52	30	22	42.3%	

(表8) 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

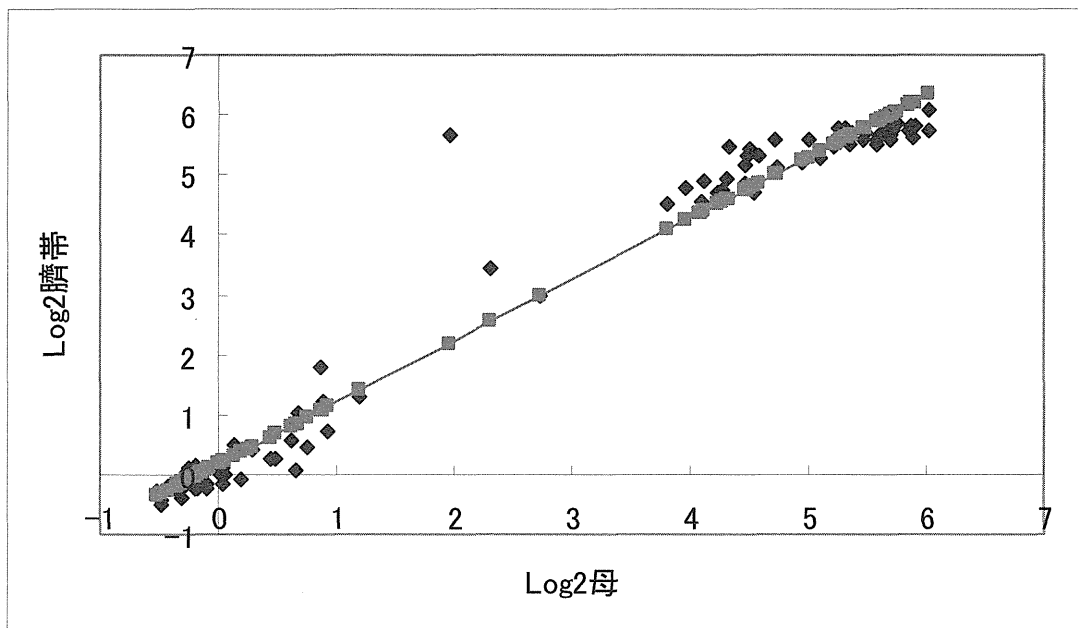
ヒトのガンマグロブリン濃度は 500mg/kg であり、投与量に応じて抗体価が推計される
 推計 VZV 抗体価 = IVIG の VZV 抗体価 × (投与量 / (投与量 + 500))

(図1) 思春期と妊婦のパルボウイルス B19 抗体価の分布



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

(図2) 母体と臍帯血のパルボウイルス B19 抗体価の関係



R=0.9847 (P<0.0001)

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