

風疹感染診断技術に関する検討

研究分担者 岡本 貴世子（国立感染症研究所・ウイルス第三部）
研究協力者 駒瀬 勝啓（国立感染症研究所・ウイルス第三部）
研究協力者 大槻 紀之（国立感染症研究所・ウイルス第三部）
研究協力者 森 嘉生（国立感染症研究所・ウイルス第三部）

研究要旨

風疹は妊娠初期の妊婦が感染すると胎児に先天性障害をもたらす恐れがあることから、迅速かつ精度の高い診断法の整備が必須である。また、ワクチンで予防可能な感染症であるため、感染防御に必要な抗風疹抗体価の測定法を整備することも重要である。本研究では抗風疹抗体のパネル血清と、風疹ウイルス遺伝子検出法として TaqMan リアルタイム PCR 法および Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法の整備を行った。

1) 風疹パネル血清の評価

A. 研究目的

妊娠早期に風疹ウイルスに感染すると出生児が先天性風疹症候群（CRS）とよばれる障害をもって生まれることがある。風疹はワクチンで予防可能な疾患であり、妊娠前の検査において感染防御に十分な風疹抗体価がある事を確認し、必要に応じてワクチンを接種することが CRS の唯一の予防法である。日本では主に赤血球凝集阻止（HI）法、酵素抗体法（ELISIA）で風疹感染、抗体価の診断がなされているが、まだその表示は統一されておらず、臨床現場ではしばしば混乱の原因となっている。また、ELISA キットでは製造社間でも値の表示法が異なっている。本研究は、風疹抗体測定用の体外診断薬キットの表示法の統一化や感度の評価、さらには臨床検査施設の精度管理等のために、風疹標準パネル血清の収集、整備、評価を目的としている。

B. 研究方法

90 検体の血清を収集し、そのうち使用に相当と考えられた 76 検体を測定に供した。感染研において、3 点希釈による平行線定量

法により、各血清 IgG 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の作業で使用している試薬・機器を用い、通常行っている測定方法（HI 法および ELISA 法）により 1 点希釈で測定した。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。定量範囲を超えた検体については改めて希釈を行い再測定した。

倫理面への配慮

収集した血清はインフォームドコンセントにより使用目的が了承されている。

C. 研究結果

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 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 $\text{Log}_{10}(\text{IU 値}) \cong 0.26 \text{Log}_2(\text{HI 値})+0.084$ の変換が可能であると考えられた（図 1）。また、外挿値より Cut off 値である HI 価 8 倍はおおよそ 7.5 IU/mL に相

当すると考えられた。(論文投稿中)

D. 考察

日本国内の臨床現場では、HI 法と ELISA 法が混在している状況である。また、ELISA キットについては、製造社間で検量線や表示法が異なるため、臨床現場では抗体価の解釈に混乱が生じている。このため、ELISA キット間での統一表示の指標や HI 法と ELISA 法の相関を示し、適切に換算できる方法を示す必要がある。一方で、風疹抗体測定用の体外診断薬製造メーカーにおける品質管理にパネル血清が必要であるが、これまで国内で使用可能なパネル血清はなかった。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解釈による混乱がなくなる事が期待される。さらに、これらの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。

E. 結論

パネル血清候補の国際標準血清に対する相対力価を決定し、HI 価と ELISA による抗体価の互換性を示した。これら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。

2) 風疹ウイルス遺伝子検出法の検討

A. 研究目的

風疹は2008年1月から麻疹とともに CRS の排除をめざして全数報告疾患となった。日本が属する WHO、WPRO 地区でも 2016 年までに麻疹、CRS の排除を目標としており、排除がなされた事を確認するために実験室診断が重要となっている。風疹感染の実験室診断は IgM 抗体検出によるものが国際的に認められているが、血清採取の時期や再感染例、さらに一部に見られる持続性の IgM の存在などで必ずしも確度の高い診断法とはいえない。ウイルスの存在を証明するため

の RT-PCR 法によるウイルス遺伝子検出法は nested PCR 法のため、クロスコンタミネーションや陽性検体を増幅した場合の実験室汚染の可能性、所要時間、操作の煩雑さなどが懸念される。実際、ウイルス遺伝子検出にはリアルタイム PCR 法や Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法が近年汎用されている。そこで本研究では、風疹ウイルス遺伝子検出法として、TaqMan リアルタイム PCR 法および Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を新しく作製することを目的としている。

B. 研究方法

約 30 株の風疹ウイルス全遺伝子配列を基に保存された領域を選び、TaqMan リアルタイム PCR 法については Primer Express Software Ver. 3 (アプライドバイオシステムズ)を用いて primer および probe を設計し、LAMP 法については Primer Explorer V3 (栄研化学)を用いて primer を設計した。設計した primer の target 配列を含む領域をコードする標準 RNA の段階希釈を用いて検出限界を求めた。米国 CDC より分与された風疹ウイルスを含む全 genotype (13 種) のウイルス培養上清から抽出した RNA を用い、設定した条件と TaqMan リアルタイム法と感度を比較した。風疹と類似した臨床症状を示す麻疹のウイルス RNA を解析に用い、特異性を解析した。風疹非感染健康人の咽頭拭い液に各濃度のウイルス液を添加したサンプルから抽出した RNA を用いて spike test (添加試験)を行い、臨床検体由来の夾雑物存在下での感度を検討した。

倫理面への配慮

該当なし

C. 研究結果

TaqMan リアルタイム PCR 法の標準 RNA に対する感度は 10 コピー程度であり(表 1)、 $10 \sim 10^6$ コピーの間で良好な直線性が得られた。LAMP 法では、 10^3 コピーで 78%、 10^4 コピーで 100%検出可能であり(表 2)、TaqMan リアルタイム法に比較して、 $1/10^2$

〜 10^3 の感度であった。ウイルス培養上清より抽出したウイルス RNA に対する検出感度は、TaqMan では 1a、1B、1C、1D、1E、1F、1G、2B が 1 pfu、1h、1i、1j、2A、2C が 10 pfu であったのに対し、LAMP 法では 1a、1C、1E、1G、1h、1i、2A が 10^2 pfu、1B、1D、1F、1j、2B、2C が 10^3 pfu であり、genotype 2C は 10^3 pfu でも検出できず、TaqMan 法に比べて低い感度であった（表 3）。風疹非感染健康人の咽頭拭い液を用いた添加試験では、TaqMan 法では用いた 4 genotype とともに 1pfu まで検出可能であったが、LAMP 法では、1E、1h が 10^2 pfu、1j、2B が 10^3 pfu の検出感度であった（表 4）。両者とも麻疹のウイルス RNA に対しては反応しなかった。

D. 考察

ウイルスゲノムの検出による風疹感染の確認は、コマーシャルラボでは行われておらず、血清による診断ほど一般化されていない。しかし、1)発症初期においては血清中の IgM による診断より感度が優れている、2)ウイルスの排出期間が発疹の発症の時期とほぼ一致しているため適切な時期に検体の採取が可能である、3)咽頭拭い液からも検出可能であるため、検体採取が比較的容易で、患者の負担も少ないと考えられる、4)WHO ではウイルスの遺伝子型でウイルスの移動をトレースする事を風疹排除に向けての情報として重視している、5)評価は定まっていないが、CRS の出生前診断の判断材料として利用できる可能性がある、6)検査施設の設備に応じて検出法を選択できる環境を整える、という点から、感度のいいウイルスゲノムの検出法を複数整備しておくことは重要である。本研究において、TaqMan リアルタイム PCR 法と LAMP 法の二種の新しい検出条件を作製し、種々の genotype のウイルス RNA を用いて両者の感度を比較した。その結果、TaqMan リアルタイム PCR 法が優れた感度を有することが示された。一方で LAMP 法は感度において TaqMan リアルタイム法に及ばなかったものの、反応にサーマルサイク

ラーを必要としないという利点から、検査設備の整わない風疹流行地域でのスクリーニングに利用できる可能性が考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki J., Goto H., Komase K., Abo H., Fujii K., Otsuki N., Okamoto K. 2010. Rubella virus as a possible etiological agent of Fuchs heterochromic iridocyclitis. Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 248(10):1487-91.
- 2) Okamoto K., Fujii K., Komase K. 2010. Development of a novel TaqMan real-time PCR assay for detecting rubella virus RNA. J. Virol. Methods 168(1-2):267-71.
- 3) Otsuki N., Abo H, Kubota T, Mori Y, Umino Y, Okamoto K., Takeda M, Komase K. 2011. Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with in vitro and in vivo vaccine virus phenotypes. Vaccine 29(10):1863-73.

2. 学会発表

- 1) 岡本貴世子、大槻紀之、駒瀬勝啓. 2010. 風疹ウイルス遺伝子検出による実験室診断技術の改良、第 58 回日本ウイルス学会（徳島、11 月）.
- 2) Yoshio Mori, Kiyoko Okamoto, Masafumi Sakata, Noriyuki Otsuki, Hitoshi Abo, Makoto Takeda. 2011. The plasma membrane is the genome replication site for rubella virus. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress（9 月）.
- 3) Masafumi Sakata, Kiyoko Okamoto, Noriyuki Otsuki, Hitoshi Abo, Makoto Takeda, Yoshio Mori. 2011. The short N-terminal region of the rubella virus capsid protein critical to co-localize with the nonstructural P150 protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress（9 月）.
- 4) Noriyuki Otsuki, Masafumi Sakata, Kiyoko Okamoto, Kaoru Fujii, Hitoshi

Abo, Kazuhiko Kanou, Katsuhiro Komase, Makoto Takeda, Yoshio Mori. 2011. Molecular mechanisms of the temperature-sensitive phenotype of live attenuated Japanese rubella vaccines. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (9月) .

- 5) 岡本貴世子、大槻紀之、坂田真史、森嘉生、竹田誠. 2012. 風疹ウイルスワクチン株の温度感受性とモルモットにおける抗体誘導能の関連性. 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪、11月) .
- 6) 坂田真史、岡本貴世子、大槻紀之、安楽正輝、竹田誠、森嘉生. 2012. 風疹ウイルスCタンパク質とp150タンパク質の共局在がウイルス産生へ及ぼす影響. 第60回日本ウイルス学会学術集会(大阪、11月) .

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

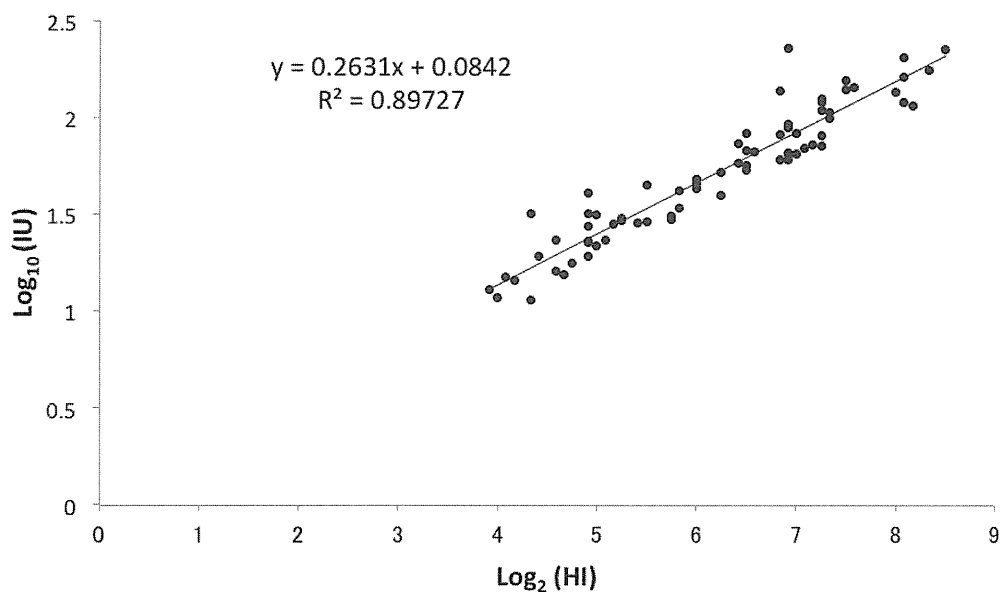


図1 HI抗体価とIU値の相関

表1 TaqMan リアルタイムPCR法における標準RNAの検出限界値

Standard RNA (copies / reaction)	Number of positive samples / number of tested samples					Positive (%)
	1	2	3	4	5	
10 ⁶	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	100%
10 ⁵	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	100%
10 ⁴	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	100%
10 ³	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	100%
10 ²	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	100%
10	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	100%
1	0/3	2/3	0/3	3/3	2/3	47%

表2 LAMP法における標準RNAの検出限界値

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

表3 各 genotype のウイルス RNA の検出感度

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

表4 添加試験

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

A 型肝炎ウイルス体外診断薬の再評価

研究分担者 大西 和夫（国立感染症研究所・免疫部）

研究要旨

急性 A 型肝炎の国内発生動向について近年漸増した事から注意深い監視を要する。HAV 感染予防対策の基礎となる感染診断法のうち最も多用されるのは IgM 型 HAV 抗体検出キットで A 型肝炎診断補助検査全体の 95%以上を占める。本研究では、これまでに新規抗 HAV モノクローナル抗体を多数確立して HAV エピトープの解析と HAV 抗体検出 ELISA 系の構築・改良を進めた。また HAV 抗原捕捉 ELISA 系の構築も試みた。さらに、上市されている各種 HAV 抗体検出キット製品の検出性能の比較検討を行った。市販の検出キット製品のうち、IgG 型抗体を検出するものについては概ね良好な成績を確認しているが、IgM 型抗体を検出するキットについては、パネル血清の一部の検体にのみ低値を示す製品があった。このことは、このキットの測定系が国内流行 HAV 株を含む一部のウイルス株に対してのみ検出感度が劣る事を示唆しており、この点を詳細に検討した結果、抗 HAV-IgM を検出する際に用いられる不活化 HAV 粒子の差異が測定値乖離の原因と考えられた。診断キットの検出特性をウイルス亜株の抗原性の変化に対応させるためには、キットに含まれるウイルス粒子の抗原性を補う補正ペプチドの設計が重要であると考えた。しかし、HAV のウイルス粒子表面のエピトープ・ペプチドの解析はこれまで報告が少なく進んでいない。そこで、近年報告された HAV ウイルス株ゲノム情報を精査し、ウイルス表面エピトープの変異について検討した。その結果、ウイルス表面分子 VP1 のエピトープに関して 7 種類の補正ペプチドを設定すれば全てのウイルス亜株を検出する補正が可能である事が示唆された。世界各地の HAV 汚染地域から分離されたゲノム情報は比較的迅速に公開される事から、ウイルス変異に即応して補正ペプチドを設計して診断薬の検出特性を担保する技術の実用化が期待できる。ウイルス感染症免疫学的診断系の構築技術について、H5N1 インフルエンザウイルスの特異的検出系についても検討した。

A. 研究目的

A 型肝炎ウイルス（HAV）感染によって引き起こされる急性 A 型肝炎は、2～7 週間の潜伏期間ののち一過性の急性肝炎症状を起こす。HAV は糞口感染によって伝播し、その発生状況は衛生環境に左右されることから、急性 A 型肝炎の感染予防対策は社会的に重要な問題として認識されている。急性 A 型肝炎の臨床診断ならびに疫学調査のための体外診断薬として、現行では血清中

の抗 HAV 抗体を検出するキットが複数市販されている。急性 A 型肝炎の体外診断薬として、血清中の抗 HAV 抗体（IgM 型ならびに IgG 型）を検出するキットがある。このうち、IgM 型 HAV 特異抗体を検出するキットが A 型肝炎診断補助検査全体の 95%以上を占める。これらのキットは数年ごとに感度・特異性の向上が図られ、新しいバージョンに置き換わっている。これらの改良の技術的基礎を把握することが市販される

キットの品質を担保する上で必要不可欠である。また、診断補助において、糞便または血清中の HAV 抗原を検出する新世代キットが望まれるがまだ上市されていない。本研究では、IgM 型 HAV 特異抗体を検出するキットの検出性能特性の詳細な検討と、免疫学的 HAV 抗原捕捉測定法の特異性の問題を検討した。

本研究では一部の IgM 型 HAV 特異抗体検出キットは流行ウイルス亜株に対して検出特性が劣ることを明らかにした。診断キットの検出特性をウイルス亜株の抗原性の変化に対応させるためには、キットに含まれるウイルス粒子の抗原性を補う補正ペプチドの設計が重要である。しかし、HAV のウイルス粒子表面のエピトープ・ペプチドの解析はこれまで報告が少なく進んでいない。この点を重点的に検討し、近年報告された HAV ウイルス株ゲノム情報を精査し、ウイルス表面エピトープの変異について検討し、全ての HAV ウイルス亜株を検出するための補正ペプチドを設定する。

B. 研究方法

1) HAV 抗原捕捉 ELISA 系の構築；不活化 HAV をマウスに免疫して確立した多数のハイブリドーマをその反応性から 4 群に分類した。各群の代表的なハイブリドーマを選び、無血清培地で培養し、プロテイン G クロマトグラフィーを用いて抗体を精製後、必要に応じてビオチン化標識または酵素標識した。各群のモノクローナル抗体を組み合わせるサンドイッチ ELISA 系を作成し、HAV 抗原検出について抗原濃度、抗体濃度、抗体の組み合わせ、抗体標識法などの諸条件を検討して最適化を行った。血清中の HAV を検出する核酸増幅検査(NAT)は、食監発第 0816001 号「ふん便及び食品中の A 型肝炎ウイルスの検査法について」の方法を血清用に改良して行った。

2) 抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価；抗 HAV-IgM 陽性血清（血漿）検体として感染研免疫部が保有する国内血清検体および混合力価パネル（BBI 社）とセロコンバージョンパネル（BBI 社）を用いて上市

されている抗 HAV-IgM 抗体検出キットにより抗体力価を測定し比較した。

3) 抗 HAV-IgM 抗体検出キット間の測定値乖離の機序の検討；上市されている HAV-IgM 検出キット間で一部の血清検体で測定値に乖離が有る。抗 HAV-IgM 陽性血清（血漿）検体として感染研免疫部が保有する国内血清検体および混合力価パネル（BBI 社）とセロコンバージョンパネル（BBI 社）を用いて抗体力価を測定した時に A 社キットと B 社キットで測定値乖離のおこる血清検体（40 検体中 7 検体）について、RT-PCR により、HAV-RNA の増幅を試みた（食監発第 0816001 号「ふん便及び食品中の A 型肝炎ウイルスの検査法について」の方法）。次に、増幅された遺伝子断片（VP1/2B 領域）の塩基配列を常法により解析した。

4) おもに米国 NCBI に蓄積されたウイルスゲノム情報、ウイルスタンパク質構造情報を取得して、標的エピトープの抗原性と立体構造に関する検討を行った。具体的には、補正ペプチド候補として HAV の 2 つの線形ペプチド（VP1_11-25 と VP3_110-121）について HAV 亜株間のアミノ酸変異と分子構造学的な解析を行った。HAV の結晶構造は未だ明らかになっていないので、同じピコルナウイルスに属する Rhinovirus の構造データを利用した。ホモロジーモデリング・分子動力学法・二次構造予測等の方法を用いた。

5) さらに、その免疫原性を調べるために、マウスを HAV ワクチンで免疫して抗体応答の測定を行い、VP1 と VP3 に対する抗体成分を検討する一方で、ウイルスタンパク質における立体構造を付与した新規のエピトープ・ペプチドを探索・設定することを試みた。線形エピトープ VP1/VP3 の抗体誘導能力の検討については、マウスを HAV 粒子で免疫し、ELISA 法を用いて抗体応答の測定を行い、ウイルス粒子に対する抗体に占める VP1 および VP3 ペプチド抗体の占有率を検討した。

6) H5N1 インフルエンザウイルス粒子のヘマグルチニン分子についても同様の検討を行い、モノクローナル抗体を作成して免

疫診断系を構築し性能の評価を行った。

倫理面への配慮

研究に使用する HAV 抗体陽性血清の収集については国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認を既に受けている。インフォームド・コンセントの上収集する抗体陽性血清は連結不可能匿名化し、抗 HAV 抗体価と HAV 抗原を測定する試験に使用するのみであり、他の目的には使用しない。血液の採取は、診断時もしくは主治医の判断で 20 ミリリットル以下の提供を受ける。動物実験に関しては国立感染症研究所・動物実験委員会の承認を受けて行う。

C. 研究結果

1) HAV 抗原捕捉 ELISA 系の構築；本研究で確立した新規モノクローナル抗体を組み合わせる 6 系統の HAV 抗原捕捉サンドイッチ ELISA 系を構築した。検出系はビオチン化抗体に対して過酸化酵素 (HRP) 化ストレプトアビジンを用いた発色法とした。不活化 HAV ウイルス粒子を正常ヒト血清で段階希釈してそれらの感度を求めたところ、検出限界は 300-800pg/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 10pg/mL ($\sim 10^4$ pfu/mL) 以上であり、1~2 オーダーの差がある。

実際のウイルス血症を捉える実験として、HAV 抗体混合力価パネル血清 (8 検体) を測定した。核酸増幅試験 (NAT) による測定では、このパネル血清中の 2 検体に HAV ウイルス RNA が検出され、ウイルス血症を起こしていることが示された。今回構築した HAV 抗原捕捉サンドイッチ ELISA はこの 2 検体を陽性とした。さらに、NAT 陰性の 2 検体が陽性となった。このことの原因として、ウイルスゲノムの不安定性 (後述) による場合と、ELISA 系の非特異的反応による場合が考えられ、今後の検討を要する。

2) 抗 HAV-IgM 抗体検出キットの性能評価；上市されている HAV 抗体診断キット (IgM 型ならびに IgG 型) の一部について

その性能を検討してきた結果、それらの良好な成績を確認しているが、新規国内流行株についての感度・特異性についての研究は未だに不十分でありその検討を進める必要があった。今回、上市されている 2 社 (A 社と B 社とする) の抗 HAV-IgM 抗体検出キットについて国内検体を含む血清パネルを測定したところ一部の検体においてその測定値に乖離を認めた。測定は国内検体 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。このうち、国内検体 3 例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 社キットと B 社キットによる測定値が大きく乖離した。すなわち、A 社のキットでは測定値が約 50% 低下した。それらを除く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。このことは、A 社のキットでは、乖離した 4 検体の HAV 感染例でのみ抗 HAV-IgM 抗体を検出する感度が低下していることを示し、この 4 例の感染例における HAV 株の型に特異的な現象であることが予想された。

3) 抗 HAV-IgM 抗体検出キット間の測定値乖離の機序の検討； A 社キットと B 社キットで測定値が乖離する血清検体は、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。それらを除く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。このことは、A 社のキットでは、乖離した 4 検体の HAV 感染例でのみ抗 HAV-IgM 抗体を検出する感度が低下していることを示し、この 4 例の感染例における HAV 株の型に特異的な現象であることが予想された。そこで、乖離した 4 例の HAV 株の性質を知る目的でそれらの検体から HAV ゲノムの一部を RT-PCR により増幅して単離し、測定値が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。この結果は、正常値由来株と乖離

値由来株が非常に近縁であることを示している。次に、A社キットとB社キットの測定原理を比較したところ、測定値乖離の原因となるキット構成因子は、血清 HAV-IgM を検出するために用いられる不活化 HAV 粒子である可能性が最も高い。すなわち、正常値由来 HAV 株と乖離値由来 HAV 株が、それぞれ感染した時に惹起される HAV-IgM のレパトア構成を検出する能力が、両キットで使用される不活化 HAV 粒子で異なることが、測定値乖離の原因となると考えられる。正常値由来 HAV 株と乖離値由来 HAV 株が非常に近縁であることから、乖離をもたらすエピトープはごく少数か、おそらくは一つのエピトープである可能性が高い。

4) HAV 抗原捕捉 ELISA 系の特異性の検討: 本研究で構築した HAV 抗原捕捉 ELISA 系は、新規モノクローナル抗体を組み合わせたサンドイッチ ELISA 系で、検出限界は 300-800pg/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 10pg/mL ($\sim 10^4$ pfu/mL) 以上であり、1~2オーダーの差がある。この HAV 抗原捕捉 ELISA 系を用いて、混合力価パネル血清 23 検体を測定したところ、陰性群と陽性群はよく分離したのでカットオフ値を陰性群の平均値+2SD と仮に設定し、検討を進めた。測定した混合力価パネル血清 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 については、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かった。すなわち、擬陽性と擬陰性が大きな問題となることが判明した。原因としては、擬陰性については、抗原検出感度が低いこと、使用したモノクローナル抗体のエピトープの不一致、阻害物質としての抗原抗体複合体や可溶性 HAV 受容体 (TIM1 分子) などの関与が疑われた。擬陽性の原因としては、HAV-RNA の分解、RT-PCR に用いたプライマーの不一致などが考えられた。

5) ピコルナウイルスの構造データを精査する事によって HAV の線形エピトープ

VP1_11-25 (配列: TVSTEQNVDPQVGI) はウイルス表面に露出し、ランダムコイル状であることが予測され、抗体認識エピトープの要件を満たしていると考えられた。VP3_110-121 (配列: FWRGDLVDFDQV) は β -シート様の二次構造をとり、ウイルス粒子内部に位置していると考えられた。NCBI に蓄積された HAV ゲノム配列の全てのデータ (12,092 配列) について、VP1_11-25 の変異について解析した。その結果、7箇所突然変異があり、この変異を考慮した7種類の補正ペプチドを合成すれば、全ての HAV 変異株の検出を可能にする事が示唆された。ELISA による測定の結果、HAV 粒子に対する抗体の約 10% が VP1_11-25 と結合し、約 6% が VP3_110-121 と結合することが示唆された。この事は、VP1_11-25 のエピトープが十分な免疫原性を持っている事を示唆する。さらに、ピコルナウイルスの構造データから HAV の新規標的エピトープを設定した。類推される HAV ウイルス VP1 表面ペプチド (ループ A) について、二次構造予測と分子動力的解析を行い、立体構造を保持したペプチドを試作した。

6) インフルエンザウイルスの H5 を特異的に認識する複数のモノクローナル抗体を確立し、それを用いて検出特性に優れたウイルス粒子捕捉診断系を構築することが出来た。各モノクローナル抗体の特性を検討した。

D. 考察

今回構築した 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、ウイルス血症を辛うじて捉えることの出来る感度である。この点については、検出系に蛍光試薬を用いることにより感度を 1 オーダー (約 10 倍) 上げることが出来、それにより克服できる可能性がある。

HAV ウイルスのゲノムは+鎖 RNA であり、血清検体の保存状態が悪いと 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。これに対して HAV 抗原捕捉 ELISA 系では HAV 抗原 (タンパク質) を検

出するため検出条件がNATに較べて安定である利点がある。

HAVウイルス血症は発症時のALT増加にやや先行して起こり、そのウイルス力価は 10^4 - 10^5 pfu 程度であるとされる。構築した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、ウイルス血症を捉えることが可能な感度である。また、蛍光試薬を検出系に用いることにより感度を約10倍上げることが出来る。今回、測定検体の数を増やして検出系の感度と特異性を検討した。その結果、無視できない擬陽性と擬陰性の反応があり、いくつかの重要な問題点が浮上した。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。引き続き、これらの原因について検討しており、免疫学的抗原捕捉検出系の実用化に向けた研究を続ける。所謂、第四世代体外診断薬と呼ばれる抗ウイルス抗体・ウイルス抗原同時検出キットについて、HIV診断薬については既に販売が始まっており、HAV体外診断薬も近い将来、第四世代製品が開発・上市されることが望まれる。この点において、今回の技術的検討は、将来のHAV抗原捕捉ELISA系の科学的根拠の理解に貢献すると考える。

抗HAV-IgM抗体検出キットの性能評価を行った結果、1社の抗HAV-IgM抗体検出キットについて国内検体を含む血清検体の測定値が他社のものより低値を示し、乖離する例を認めた。これは、このキットの測定方法が、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た。おそらく、キットの測定原理のうち、免疫反応に用いられる不活化HAV粒子の型が、乖離した検体の感染HAVの型と一致しなかったことが原因と考えられる。上市されている抗HAV抗体検出キットの新規流行株に対する検出性能を監視することが必要である。

2つのキットでHAV-IgM測定値が乖離した4例の血清検体において、感染したHAV株の性質を知る目的でそれらの検体からHAVゲノムの一部をRT-PCRにより増幅し

て単離した。一方で、測定値が乖離しない検体からもHAVゲノムを増幅・分離し、両者の塩基配列を比較検討した。その結果、両者が非常に近縁であり、予想されるエピトープの相違も大きくないことが明らかになった。このことは、乖離の原因が、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が最も高いことと考えあわせると、ごく限定したエピトープの差異によると予想される。HAVの血清型は1つであることから、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。HAVの主要エピトープの構造をより深く理解すれば、HAVの新規流行株に対する検出キットの性能を事前に評価することも将来的には可能になると考える。2010年春に一過性に増加した国内での急性A型肝炎の集団感染において、分子疫学的調査からHAV株は大きく3群に分類されることが示された。すなわち、日本に比較的古くから存在する1A-1型、最近フィリピンから由来した1A-2型、韓国から由来した3A型である。これらの株に対する上市抗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、それと平行して、HAV主要エピトープの変化を把握することがHAV抗原検出技術の科学的根拠の理解に貢献すると考える。

診断キットの検出特性をウイルス亜株の抗原性の変化に対応させるためには、キットに含まれるウイルス粒子の抗原性を補う補正ペプチドの設計が重要である。しかし、HAVのウイルス粒子表面のエピトープ・ペプチドの解析はこれまで報告が少なく進んでいない。HAVウイルス粒子の構成分子ペプチドであるVP1₁₁₋₂₅とVP3₁₁₀₋₁₂₁については、これまで蛋白化学的、構造学的な解析がなされていなかったが、これらの構成するエピトープが占めるウイルス粒子構造上の位置を予測することが出来た。VP1₁₁₋₂₅はウイルス粒子表面のランダムコイルであり、B細胞エピトープの要件を満たして優れた免疫学的標的であると考えられた。VP3₁₁₀₋₁₂₁はウイルス粒子内部に位置すると考えられるが、HAVワクチンで免疫したマウス血清では有意に抗体価が

上昇していた。以上の事から、構造を保ったウイルス粒子ではVP1_11-25が認識され、壊れたウイルス粒子ではVP3_110-121も認識される事が予想される。

HAV ワクチン免疫血清中に、VP1_11-25はウイルス表面に対する抗体の約10%、VP3は約6%の存在率で誘導されていた。これ等のみでは感染防御に不十分と考えられたため、新しいエピトープ・ペプチドの設定を行った。VP1のループ構造Aは、多種のピコルナウイルスの主要なエピトープとなる事が知られており、この情報を利用して標的エピトープの設定が可能であった。ループ構造Aの立体構造を保つため、ジスルフィド結合を付与し、分子動力学法により、エピトープ・ペプチド構造の最適化を試みた。

H5N1 インフルエンザに対するモノクローナル抗体を作成してサンドイッチ ELISA の諸条件を検討して優れたウイルス粒子捕捉診断キットを構築することが出来た。同様の技術がHAV診断キットにも応用できる。

E. 結論

本研究で確立した新規モノクローナル抗体を組み合わせて6系統のHAV抗原捕捉サンドイッチ ELISA系を構築した。検出感度は300-800pg/mL ($\sim 10^5$ pfu/mL)であった。今後検出系を蛍光法に変えて感度を上げ改良する。これにより、近い将来開発される第四世代HAV体外診断薬の技術基盤の理解に貢献する。

上市されているHAV-IgM抗体検出キットの性能評価を行った結果、2社のキットで測定値が大きく乖離する血清検体が有った。乖離血清検体からRT-PCR増幅されたHAVゲノムの一部を解析した結果、乖離のないHAVゲノムと非常に近縁なウイルス株であることが判明した。このことは、HAV-IgM抗体検出系を構築する際、HAVの主要エピトープの構造が、微細な変化であっても大きく測定値に影響する可能性を示唆している。HAV国内流行株に対する各社キットの検出性能を監視する必要がある。

この事も踏まえて、世界各地で流行して

いるHAV亜株を漏れなく診断出来る体外診断薬の性能が理想的である。この目的のために現在までの全てのHAVゲノム情報を精査・解析して検出特性を保証する7種類の補正ペプチドの設計を行った(論文準備中)。すなわち、この7種類の補正ペプチドを用いれば、世界各地のHAVウイルス亜株に対する検出特性を向上させる事が期待できる。今後、これらのペプチドに対して抗体を作成し、HAVの検出特性補正能を検討する必要がある。さらに、エピトープ・ペプチドの抗原性を立体構造に基づいて最適化する技術が実現できれば、診断特性向上・感染防御に有用な抗体の開発が短時間で実現できる。また世界各地で流行しているHAVウイルス亜株に対しての免疫学的検出も飛躍的に進歩し、新規突然変異株の出現に迅速に対応する事が期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Ohnishi K.**, Takahashi Y., Kono N., Noriko Nakajima N., Mizukoshi F., Misawa S., Yamamoto T., Mitsuki Y., Fu S., Hirayama N., Ohshima M., Ato M., Kageyama T., Odagiri T., Tashiro M., Kobayashi K., Itamura S. and Tsunetsugu-Yokota Y. 2012. Immunological detection of H5N1 influenza viruses by newly established monoclonal antibodies. *Jpn.J.Infect.Dis.* 65(1): 19-27.

2. 学会発表

- 1) 望月康子、傅舟一、小林和夫、**大西和夫**。2011. A型肝炎ウイルス特異的抗体産生B細胞の動態解析。第40回日本免疫学会総会(千葉、12月)。
- 2) CHEN Fu, FU Shuichi, SUN Lin **OHNISHI Kazuo**. 2012. Detection and characterization of influenza virus vaccine-reactive B cells. 第41回日本免疫学会学術集会総会(神戸、12月)。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願 H5亜型インフルエンザウイルスを特異的に認識するモノ

クローナル抗体（出願番号）特願 201

1-227748

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

（参考文献）

病原微生物検出情報月報(IASR)

Vol. 31 p. 287-289: 2010

「2010年春季に日本で多発したA型肝炎の分子疫学的解析」

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

ウイルスの体外診断薬のための国内標準品の計画的な整備に関する研究

研究分担者 水澤 左衛子（国立感染症研究所・血液・安全性研究部）

研究要旨

ウイルスの検出を目的とした体外診断薬の再評価には国際ハーモナイゼーションの点から国際標準品またはそれに準拠した国内標準品を用いることが望ましい。本研究においては、WHO 国際標準品等の整備に関する最新の動向を把握し、国内標準品の整備計画に反映させることを目的とする。2010-2012 年の WHO 生物製剤標準化に関する専門家委員会（ECBS）において第一次 HCMV-NAT 国際標準品や HBV genotype (HBsAg) パネルをはじめ 8 件の国際標準品やパネルが制定された。また、新たに第 1 次 *Mycoplasma*-NAT 国際標準品をはじめ 15 件の国際標準品やパネルを作製することが承認された。国立感染症研究所は第一次 HCMV-NAT 国際標準品をはじめとする 6 件の国際共同研究に参加して国際標準品等の制定に貢献した。現在、進行中の 9 件の国際共同研究に参加協力している。また、2011 年に HEV-RNA WHO 国際標準品作製のための国際共同研究においてドイツのポールエーリッヒ研究所と共同で国際標準品候補品と日本の国内標準品候補品の評価を同時に行った。その結果、国際標準品と同等の品質で同じ力価（250,000IU/mL）の国内標準品を迅速に作製することができた。2011 年に HEV-RNA 国際標準品が制定され、2012 年に薬事食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会の NAT 小委員会において HEV-RNA 国内標準品が制定された。国立感染症研究所が国内標準品の保管と交付を行っている。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

1. ECBS とそのワーキンググループである SoGAT 会議に参加または議案書をレビューすることによって、WHO 国際標準品と標準パネルの整備に関する最新の情報を収集した。
2. WHO 国際標準品および標準パネル作製のための国際共同研究に国立感染症研究所が参加協力した。
3. 2011 年に HEV-RNA WHO 国際標準品作製のための国際共同研究においてドイツのポールエーリッヒ研究所（PEI）と共同で国際標準品と日本の国内標準品の二つの候

補品の評価を同時に行った。2011年 ECBS において HEV-RNA 国際標準品が制定された。国内標準品の承認を受けるために研究結果を平成 24 年度第一回薬事食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会 NAT 小委員会（平成 24 年 5 月）に報告した。国内標準品が制定されたことを同年 9 月の検定協議会に報告して国立感染症研究所が交付する標準品等としての承認を受けた。

倫理面への配慮
該当しない。

C. 研究結果

1. 体外診断薬のための国際標準品整備の動向

WHO が 2007 年から推進してきた「血液の安全性に関する体外診断薬のための標準品整備 5 カ年計画」と 2009 年に改訂した計画に基づいて、2010 年 ECBS において第一次 HCMV-NAT 国際標準品と第一次 T. cruzi 抗体標準パネルが制定され、新たに HBV-DNA 国際標準品の更新他 6 件の国際標準品とパネルを作製することが承認された。2011 年には HBV genotype (HBsAg) パネル、EBV-DNA 国際標準品、第 3 次 HIV-RNA 国際標準品、HEV-RNA 国際標準品、第 3 次 HBV-DNA 国際標準品及び第 4 次 HCV RNA 国際標準品が制定され、第二次 HAV RNA 国際標準品、HBeAg 国際標準品、HBe (Ig) 国際標準品、HEV genotype パネル、第二次 HIV-1 genotype パネル、HIV-1 CRF genotype パネルを作製することが承認された。2012 年には第二次 HIV-1 NAT genotype パネルが制定され、第三次 HBsAg 国際標準品と第三次パルボウイルス B19-DNA 国際標準品を作製することが承認された。

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

国立感染症研究所では、平成 20 年度から、体外診断薬委員会を通じて国際標準品等の作製のための国際共同研究に参加する体制を整備して協力してきた。2010-2012 年に

国立感染症研究所は第一次 HCMV-NAT 国際標準品をはじめとする 6 件の国際共同研究に参加して国際標準品等の制定に貢献した（表 1）。現在、進行中の 9 件の国際共同研究に参加協力している（表 2）。

3. HEV-RNA の WHO 国際標準品と日本の国内標準品の制定

2009 年に PEI の Dr. Baylis の提案によって、HEV-RNA の WHO 国際標準品と日本の国内標準品を PEI と国立感染症研究所とで共同して作製し、2011 年 ECBS において力価 250,000IU/mL の第一次 HEV-RNA 国際標準品 (code 6329/10) が制定された。続いて、共同研究の結果を平成 24 年度第一回薬事食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会 NAT 小委員会（平成 24 年 5 月）に報告し、力価 250,000IU/mL の第一世代 HEV-RNA 国内標準品が制定された。同年 9 月の検定協議会において国立感染症研究所が交付する標準品等として承認され、11 月に交付が開始された。

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

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、2002 年以來、Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) において国際単位系 (SI) にトレーサブルな核酸の認証標準物質の必要性が討議されてきた。SoGAT においても討議されてきたが、核酸の標準品では核酸抽出の過程を反映することができないことから血漿中のウイルスの NAT の国際標準品に使用されていない。現在、ウイルス検査のための核酸の認証標準物質はアメリカの National Institute of Standard and Technology (NIST) が自ら製造、認証、配布している Cytomegalovirus SRM 2366 のみである。

D. 考察

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

を継続して行ってきた。その結果、国際標準品等の作製のための国際共同研究の多くに国立感染症研究所が参加することが可能になった。

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

しかし、感染性のある国内標準品の凍結乾燥を受託する施設が国内には無いため、候補品製造施設の確保が今後の課題である。

3. 近年、種々のウイルス遺伝子を定量するための体外診断薬が開発されるに従い、核酸を標準物質とするSI表示の国際標準品を求める声がある。SoGATにおいて議題にされてきたが、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。核酸を国際的な標準物質にする場合の“Commutability”の問題をどうすれば解決できるか、科学的な議論をすすめる必要があるだろう。

E. 結論

1. 2010-2012年のWHO生物製剤標準化に関する専門家委員会(ECBS)において第一次HCMV-NAT国際標準品やHBV genotype (HBsAg)パネルをはじめ8件の国際標準品やパネルが制定された。また、新たに第1次Mycoplasma-NAT国際標準品をはじめ15件の国際標準品やパネルを作製することが承認された。

2. 国立感染症研究所は第一次HCMV-NAT国際標準品をはじめとする6件の国際共同研究に参加して国際標準品等の制定に貢献した。現在、進行中の9件の国際共同研究に参加協力している。

3. 2011年にHEV-RNA WHO国際標準品作製のための国際共同研究においてドイツのポールエーリッヒ研究所と共同で国際標

準品候補品と日本の国内標準品候補品の評価を同時に行った。その結果、国際標準品と同等の品質で同じ力価(250,000IU/mL)の国内標準品を迅速に作製することができた。2011年にHEV-RNA国際標準品が、2012年に国内標準品が制定された。国立感染症研究所が国内標準品の保管と交付を行っている。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Baylis SA, Heath AB; Collaborative Study Group. 2011. 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. (**Mizusawa S.** as a member of the Collaborative Study Group)
- 2) 水澤左衛子、岡田義昭. 2012. 肝炎ウイルスの核酸増幅試験法のための標準品. 臨床化学. 41: 234-239.
- 3) Chudy M, Hanschmann KM, Kress J, Nick S, Campos R, Wend U, Gerlich W, Nübling CM. 2012. First WHO International Reference Panel containing hepatitis B virus genotypes A-G for assays of the viral DNA. J. Clin. Virol. 55: 303-309. (**Mizusawa S.** as a member of the Collaborative Study Group)

2. 学会発表

- 1) Sally Baylis, **Saeko Mizusawa**, Yoshiaki Okada, C. Micha Nubling, Kay-Martin Hanshmann. 2011. Laboratory performance for hepatitis E virus RNA detection and development of a WHO International Standard. 14th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira, September
- 2) 水澤左衛子、岡田義昭. 2012. 核酸増幅検査のためのE型肝炎ウイルスのWHO国際標準品の制定のための共同研究と日本の国内標準品の作製について. 第60回日本輸血・細胞治療学会総

会（福島、5月）.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
川名 尚	総論 A. 母子感染総論	川名 尚 小島俊行	母子感染	金原出版	東京	2011	2-14
大貫 裕子 川名 尚	総論 H. 妊婦検診における感 染症スクリーニング	川名 尚 小島俊行	母子感染	金原出版	東京	2011	58-76
川名 尚	総論 I. 母子感染における臨 床検査	川名 尚 小島俊行	母子感染	金原出版	東京	2011	77-94
川名 尚 大貫 裕子 西井 修	各論 5. ヘルペスウイルス 5-1. 単純ヘルペスウイル ス感染妊婦の取り扱い	川名 尚 小島俊行	母子感染	金原出版	東京	2011	219-234
高橋 宜聖 小野寺大志 小林 和夫	ウイルス感染局所にお ける記憶B細胞応答	中山俊憲 徳久剛史 山本一彦	実験医学増刊 免疫記憶の制 御と疾患治療	羊土社	東京	2011	81-86
庵原 俊昭	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	小児の感染症 診療の落とし 穴	南江堂	東京	2011	56-58
庵原 俊昭	小児感染症の診断	岡部信彦	小児感染症学	診断と 治療社	東京	2011	19-23

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
東出 誠司、西澤美香、川名 尚、保坂 憲光、太田嘉則、神田 秀俊	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の検出	日本性感染症学会誌	21	120-127	2010
川名 尚	単純ヘルペスウイルス	産科と婦人科	77	75-83	2010
川名 尚	性器ヘルペスと単純ヘルペスウイルスの母子感染－産婦人科医の立場から－	小児科臨床	64	347-360	2011
川名 尚	単純ヘルペスウイルス	周産期医学	41	189-194	2011
川名 尚、土屋 裕子、西井 修、他	LAMP 法に簡易核酸抽出法 (PURE 法) を組み合わせた PURE-LAMP 法による単純ヘルペスウイルスの簡易迅速検出法の臨床評価	産婦人科の実際	61	119-125	2012
川名 尚	単純ヘルペスウイルスの母子感染感染とその予防	臨床とウイルス	40	51-60	2012
川名 尚	性器ヘルペスの現状と治療の問題点	化学療法の領域	28	70-83	2012
Kurosaki, T. Aiba, Y. Kometani, K. Moriyama, S. Takahashi, Y.	Unique properties of memory B cells of different isotypes	Immunol Rev	237	104-116	2010
Harada, Y. Ninomiya-Mori, A. Takahashi, Y. Shirakura, M. Kishida, N. Kageyama, T. Tada, Y. Tashiro, M. Odagiri, T.	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	2011
Fujii, H. Ato, M. Takahashi, Y. Otake, K. Hashimoto, S. Kaji, T. Tsunetsugu-Yokota, Y. Fujita, M. Adachi, A. Nakayama, T. Taniguchi, M. Koyasu, S. Takemori, T.	HIV-1 Nef impairs multiple T-cell functions in antigen-specific immune response in mice	Int Immunol	23	433-441	2011
Yanagibashi, T. Hosono, A. Oyama, A Takahashi, Y Morose, Y Itoh, K Hirayama, K	IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: Bacteroides acidfaciens promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number	Immunobiology	Epub ahead of print		2012