

201328061A

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
(H25-医薬一般-015)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 濱口 功
平成26(2014)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
(H25-医薬-一般-015)

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 濱口 功
平成26(2014)年3月

研究組織

研究代表者

濱口 功 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

研究分担者

多屋馨子 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)

岡本貴世子 (国立感染症研究所・ウイルス第三部)

阿戸 学 (国立感染症研究所・免疫部)

加藤孝宣 (国立感染症研究所・ウイルス第二部)

草川 茂 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)

百瀬暖佳 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

研究協力者

高橋宜聖 (国立感染症研究所・免疫部)

荒木和子 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)

佐藤 弘 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)

新井 智 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)

奥野英雄 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)

水澤左衛子 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

目次

I. 総括研究報告

1. 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 ————— 4
濱口 功

II. 分担研究報告

1. ウイルス感染症の迅速診断キットに関する研究 ————— 11
多屋馨子

2. 風疹ウイルス遺伝子検出法の整備 ————— 16
岡本貴世子

- 表 1: 臨床検体からの風疹ウイルス遺伝子検出 ————— 18

3. インフルエンザウイルス A ヘマグルチニンに対するモノクローナル抗体を用いた
ELISA 法の確立 ————— 19
阿戸 学

- 図 1: 3 つの prime / boost 法によるマウスモノクローナル抗体の作製 ————— 22

- 表 2: マウスモノクローナル抗体の亜型特異性 ————— 22

4. C 型肝炎ウイルス検出を目的とした体外診断薬の再評価に関する研究
-HCV 検体パネルを用いた検討- ————— 23
加藤孝宣

5. Real-time PCR を使ったウイルス定量技術の標準化と第四世代検出試薬の体外診断薬
審査への応用 ————— 27
草川 茂

- 図 2: Real-time PCR の鋳型として用いたプラスミド ————— 30

- 図 3: 各サブタイプ・CRF・グループに対する HIV-1 MA 及びアンピシリン耐性遺伝子を
増幅するプライマーペアの増幅効率の比較 ————— 30

6. 血液を介して感染するウイルスの標準品整備に関する動向についての研究 ————— 31
百瀬 暖佳

- 表 3: 2013 年の WHO ECBS において承認されたウイルスの国際標準品等 ————— 35

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 36

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 39

I. 総括研究報告

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)
総括研究報告書

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

研究代表者 瀧口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長

研究要旨

ウイルス感染症について、従来臨床症状のみ、あるいは抗体測定ならびにウイルス分離等を組み合わせて診断されてきたが、近年、核酸増幅法の開発、迅速診断キットの開発・普及が行われてきた。医療上の必要性の高いウイルス検出において検出感度・特異度などを再評価するとともに、技術基盤の検討を行った。今年度は風疹ウイルス、インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスに関連する体外診断薬の性能を評価するためのツールを整備するとともに、キットの評価を行った。また、体外診断薬の評価には「標準品」の整備が不可欠であることから、国際機関と連携し、標準品の整備を進めた。

研究分担者

多屋馨子 国立感染症研究所・
感染症疫学センター・室長
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
阿戸 学 国立感染症研究所・
免疫部・部長
加藤孝宣 国立感染症研究所・
ウイルス第二部・室長
草川 茂 国立感染症研究所・
エイズ研究センター・主任研究官
百瀬暖佳 国立感染症研究所・
血液・安全性研究部・主任研究官

A. 研究目的

季節性、および新型インフルエンザウイルス、風疹ウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスにおけるウイルス抗原、遺伝子、および抗ウイルス抗体に関し、ウイルス検出用の体外診断薬の検出感度・特異性等を再評価し、感度、特異性、有用性等、医療上の必要性も踏まえた再評価方法等の技術基盤の検討を行う。

B. 研究方法

新型インフルエンザウイルス、風疹ウイルスおよびヒト免疫不全ウイルスの抗原、抗体の検出に関しては、キットの

性能を評価するための検体の整備や検出システムの構築、精度の高い特異抗体の作製を行った。季節性インフルエンザウイルス、C型肝炎ウイルスについては、測定に適した検体を整備した上で、市販の測定キットによる性能試験を行った。

(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。また、ヒトを対象にした医学研究については、国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会で承認を得てから行った。

C. 研究結果

迅速診断キットの検討：

インフルエンザウイルス迅速診断キット10キットの検出感度について検討した。検出感度の差は、A型株に対して $10^1 \sim 10^{2.0}$ であった。迅速診断キットによる検出対象がウイルス核タンパク質であることから、一般的なウイルス測定法によって測定したウイルス量を基準として、ウイルス株間における迅速診断キットの検出感度を比較することは困難である。しかし、1ウイルス株（同一ウイルス液）に対する迅速診断キットの検出感度の比較は可能である。以前より見られたキット間における検出感度

の差は小さくなり、また検出感度も向上していることから、臨床現場で多く用いられている迅速診断キットの信頼度は高くなっていると考えられた。（多屋馨子）

風疹ウイルス：

従来は血中風疹ウイルス抗体価の測定が主に行われているが、これらが上昇するのは発症数日後である。したがって、発症前後に多く排出されるウイルス遺伝子検出との併用が迅速診断には望ましい。最近の国内流行株を感度よく検出でき、かつコンタミネーションの恐れのない検出法を整備し、実験室診断に利用することが求められている。平成25年度は風疹疑い患者13名より提供された臨床検体を用い、TaqManリアルタイムPCRおよびReverse transcription-loop mediated isothermal amplification assay（RT-LAMP）法の性能を比較した。その結果、RT-LAMP法に比べてTaqManリアルタイムPCR法が優れている事が示された。また、検体としては鼻咽頭拭い液が適していることが示唆された。（岡本貴世子）

インフルエンザウイルス(亜型等)：

H7N9インフルエンザウイルスの発生に伴い、H3亜型とH7亜型の鑑別を可能とする診断系の確立が急がれる。診断系確立のためには、H3, H7亜型をそれぞれ特異的に認識するモノクローナル

抗体と、各ウイルスに交差結合するモノクローナル抗体が必要となる。平成 25 年度は H3 亜型と H7 亜型の鑑別を可能とする診断系の確立のため、モノクローナル抗体の作製を目指しハイブリドーマの作製に着手し、様々な prime / boost プロトコルを用いることにより、目的の抗原特異性を有するマウスモノクローナル抗体を作製することができた。今後、これら抗体の抗原エピトープと検出感度を解析し、H7 と H3 亜型の鑑別を可能とする抗体の組み合わせ、抗体濃度を決定する必要がある。(阿戸 学)

C 型肝炎ウイルス：

近年、C 型肝炎ウイルス (HCV) の検出には HCV-RNA 定量と HCV コア抗原定量が用いられているが、この両者の相関については詳細に検討されていない。平成 25 年度は、HCV RNA 定量法 3 種類と HCV コア抗原定量法 5 種類のキットを用いて国内献血検体由来の HCV 検体パネル 80 検体の測定を行い、その相関と検出感度の違いについて評価した。HCV RNA 定量法と HCV コア抗原定量法の結果を比較した結果、得られた測定値は概ね良い相関が得られたが、いくつかのコア抗原定量法では乖離する例を認め、コア領域の変異がこの測定値の乖離に関係している事が明らかになった。今後、コア抗原定量法についてはこの変異の影響を受けないようなキットの開発が望まれる。(加藤孝宣)

ヒト免疫不全ウイルス：

現在 HIV スクリーニング検査においては、HIV-1/2 特異抗体と HIV-1 p24 抗原を同時に検出し感染後早期の検出を可能にした第四世代試薬が導入されており、精度の高い検出系が確立されている。しかし、第四世代試薬を用いても感染初期の検出は困難である。本研究課題では、感染初期の抗原の検出能を定性的、定量的に試験できる系を検討する。そのために、あらゆるサブタイプ、CRF、グループの HIV-1 をほぼ同じ効率で増幅し RNA コピー数を定量することが可能な Real-time PCR の系を構築する。平成 25 年度は HIV-1 gag MA 領域に、SYBR Green 法で 127bp を増幅するプライマーを設計し 6 サブタイプ・4CRF・グループ各 2 株のゲノム完全長を含むプラスミドを鋳型として、増幅効率を検討した。その結果、全ての株で同等な効率で増幅がみられ、プライマーの有効性が示せたとともに、使用した全てのサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 分離ウイルスの定量に有用である可能性が示された。現在、RNA の抽出と Real-time RT-PCR プロトコルの標準化および第四世代試薬性能試験用の分離ウイルスの調整が進行中である。今回の方法で値付けされた HIV-1 分離ウイルスをスパイクした検体の作製を行い、コピー数で値付けされた抗原検出感度測定用検体を作製、第四世代試薬の抗原の検出能を

試験する系の確立へと進める予定である。(草川 茂)

国際標準品：

体外診断薬の再評価には、臨床検体に加えて標準品の活用が非常に有用であることから、高品質の国際標準品整備の過程を把握し、その動向を捉えることは重要である。現行の HCV-NAT 国際標準品は輸送時における力価の低下が問題となっており、NIBSC 担当部署での解析の結果、力価の安定性に対する抗 HCV 抗体の関与が考えられた。この検討結果は平成 26 年度の WHO CC (協力センター) 会議、SoGAT 会議、WHO ECBS (生物製剤の標準化に関する専門家会議) 等において議論されることとなっている。平成 25 年度の国際標準品の整備活動として、共同研究のメンバーとして実施した第 2 次 A 型肝炎ウイルス RNA-NAT 国際標準品、第 3 次パルボウイルス B19 DNA-NAT 国際標準品、第 1 次 B 型肝炎 e 抗原国際標準品、第 1 次 B 型肝炎 e 抗体国際標準品について、WHO の ECBS に参加し国際標準品の承認作業を行った。(百瀬暖佳、浜口功)

D. 考察

本研究で検討する検出技術の対象ウイルスは、季節性、および新型インフルエンザウイルス、風疹ウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスであり、「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 (感染症法)」に規定されており、医療上の必要性が高い。こうした病原体検出技術は、流行株の変化、病原体自身の変異に対応すべく、絶えず検出技術の改良が必要となる。この意味で、本研究成果は、現状に即した有効な体外診断薬の開発、評価に資するものである。また、体外診断薬の国際標準品は、ウイルス検出を目的とした体外診断用医薬品の再評価に不可欠である。

E. 結論

平成 25 年度は当初の研究計画に従い、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、インフルエンザウイルス、風疹ウイルスの検出キットの検出感度、特異性に関するそれぞれの課題を明確にするとともに評価、改善を行った。また、技術の開発も順調に進捗している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Huang L, Kusagawa S, Zeng H, Yang G, Sun B, Miura T, Yang R: Development of a novel rhesus macaque model with an infectious R5 simian-human immunodeficiency virus encoding HIV-1 CRF08_BC env. J Med Primatol (2014) 43, 11-21.

2. Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, and Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology*. 2013; 145(2), 447-55.
3. Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, and Takehara T. Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 437(1), 127-33.
4. Kondo Y, Kato T, Kimura O, Iwata T, Ninomiya M, Kakazu E, Miura M, Akahane T, Miyazaki Y, Kobayashi T, Ishii M, Kisara N, Sasaki K, Nakayama H, Igarashi T, Obara N, Ueno Y, Morosawa T, and Shimosegawa T. 1(OH) vitamin D3 supplementation improves the sensitivity of the immune-response during peg-IFN/RBV therapy in chronic hepatitis C patients-case controlled trial. *PLoS One*. 2013, 8(5), e63672.
5. Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Kato T, Wakita T, and Ishii K. The Hepatitis E virus capsid C-terminal region is essential for the viral life cycle: Implication for viral genome encapsidation and particle stabilization. *J Virol*. 2013, 87(10), 6031-6.
6. Ato M, Takahashi Y, Fujii H, Hashimoto S, Kaji T, Itamura S, Horiuchi Y, Arakawa Y, Tashiro M, Takemori T. 2013. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. *Vaccine*. 31:2184-90.
7. Saeed M, Gondeau C, Hmwe S, Yokokawa H, Date T, Suzuki T, Kato T, Maurel P, and Wakita T. Replication of hepatitis C virus genotype 3a in cultured cells. *Gastroenterology*. 2013, 144 (1), 56-58.

2. 学会発表

1. Sato K., Takahashi Y., Ato M., Asanuma H. 2013. TLR agonists induce high avidity of virus-specific antibodies upon a booster conditions. 第 42 回日本免疫学会学術集会. 12 月 11 日~13 日. 千葉市.
2. Onodera T., Adachi T., Tsubata T., Kurosaki T., Adachi Y., Ato M., Takahashi Y. 2013. Replenishment of Long-Live Plasma Cells is constitutively restricted by CD4+T cells in their maintenance phase after influenza vaccination. 第 42 回日本免

- 疫学会学術集会. 12月11日～13日.
千葉市.
3. Adachi Y., Ato M., Takahashi Y. 2013. The development and persistence of broadly cross-reactive germinal center and memory B cells in the lungs following influenza virus infection. 第42回日本免疫学会学術集会. 12月11日～13日. 千葉市.
 4. Ato M., Takahashi Y., Fujii H., Hashimoto S., Kaji T., Itamura S., Horiuchi Y., Arakawa Y., Tashiro M., Takemori T. 2014. Influenza A whole virion vaccine induces a rapid reduction of peripheral blood leukocytes via interferon- α -dependent apoptosis. The 7th Meeting of Japan Vaccine Adjuvant Research Consortium. 1月21日. 大阪府吹田市.
 5. 小野寺大志、田代真人、黒崎知博、阿戸 学、高橋宜聖. 2014. B細胞内因性TLRシグナルによるインフルエンザワクチンの奏功機序. The 7th Meeting of Japan Vaccine Adjuvant Research Consortium. 1月21日. 大阪府吹田市
 6. Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Shiina M, Wakita T, Kato T. Identification of cell-culture adapted hepatitis C virus JFH-1 variants by single virus isolation with end-point dilution method. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.
 7. Murayama A, Sugiyama N, Masaki T, Wakita T, Kato T. Assessment of antiviral activities of NS5A inhibitors on recombinant HCV replaced with NS5A from genotypes 1 and 2 strains. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.
 8. Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region in NS5A involves infectious virus production of hepatitis C virus. 20th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 6-10, 2013. Melbourne, Australia.
 9. Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Evaluation of second-generation NS5A inhibitors against hepatitis C virus by using NS5A replaced JFH-1 viruses and full-length infectious clones other than JFH-1. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.

10. Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Matsumura T, Shiina M, Asabe S, Wakita T, Imawari M. Antimicrobial peptide LL-37 deteriorate infectivity of hepatitis C virus. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.
11. Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Wonseok KW, Murayama A, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Substitution of amino acid 70/91 in the hepatitis C virus core region affects infectious virus production and cell surface expression of MHC class I. 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 2-5, 2013. Washington D.C., USA.
12. 藤田めぐみ、加藤孝宣、村山麻子、山田典栄、脇田隆字、朝比奈靖浩、坂本直哉. HCV Core 領域アミノ酸 70/91 変異株を用いた反応機序の解析. 第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 6-7 日、東京.
13. 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、脇田隆字、加藤孝宣. ISDR アミノ酸変異が C 型肝炎ウイルスの増殖に与える影響の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 10-12 日、神戸.
14. 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. An adaptive mutation in NS4A region enhances Hepatitis C Virus replication and virus production in cell culture. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸.

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 |

II. 分担研究報告

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

ウイルス感染症の迅速診断キットに関する研究

研究分担者 多屋 馨子 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)

研究協力者 荒木 和子、佐藤 弘、新井 智、奥野英雄

(国立感染症研究所・感染症疫学センター)

研究要旨

近年、様々な迅速診断キットが開発され臨床現場で用いられている。特にインフルエンザは治療薬の普及とともに、さらに 2008/9 シーズンの A(H1N1) pdm09 ウイルスによるパンデミックを期に新たな迅速診断キットが市販され、診断に用いられている。これらの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。各々のインフルエンザ迅速診断キットにおいて、最少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。年々新たなキットが市販される一方、製造販売中止となるキットもある。我々はこれまでの研究において、各流行年に主に用いられたインフルエンザ迅速診断キットの検出感度について研究を行ってきた。研究過程において、検出感度の比較、特にウイルス株の違いによる検出感度の比較を目的とする場合、各ウイルス株の条件をそろえる事は容易ではないことが判明した。当該研究においてインフルエンザ迅速診断キットの比較検討を行うにあたり、検体とするウイルス液の調整のための基礎的研究も行うこととした。また、昨年度臨床現場で多く用いられた上位 10 種を対象とし、A 型 (H1N1pdm09 および H3N2 亜型) に対する最少検出感度について検討した。

A. 研究目的

インフルエンザ迅速診断キットによ

る診断レベルの向上を目的とし、診断キットの比較検討を行う。

B. 研究方法

実験には以下12種のウイルス株（継代数の異なる、または野生株/ワクチン株の同一ウイルス株を含む）を用いた。野生株; A/California/7/2009 (H1N1) pdm09-4th、A/California/7/2009 (H1N1) pdm09-5th、A/Tokyo/150/2008 (H1N1)、A/Tokyo/155/200 (H3N2)、B/Tokyo/240/2008、B/Tokyo/241/2008.

ワクチン株; A/California/7/2009 (H1N1) pdm09、A/Texas/50/2012 (H3N2)-1119、A/Texas/50/2012 (H3N2) -1120、B/Brisbane/60/2008、B/Wisconsin/01/2010、B/Massachusetts/2/2012.

ウイルスは MDCK 細胞で培養し、その上清を用いた。

検体として用いるウイルス液の基礎的情報を得るため、異なる測定法によりウイルス量/力価の測定をおこなった。用いた測定法は以下に示すとおりである。

- 1) SYBR green 法による Real-time PCR
- 2) 感染価測定法 (Plaque forming unit 法および TCID₅₀ 法)
- 3) HA 法

インフルエンザ迅速診断キットは 2012/13 流行年において臨床現場で多く用いられ、かつ 2013 年 11 月において入手可能であった上位 10 種（以下）を対象とした。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。

製品名{製造販売元}; 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 Influenza A/B(H1N1)2009{アリーアメディカル(株)}、エスプラインインフルエンザ A&B-N {富士レビオ(株)}、チェック Flu A・B{ロート製薬(株)}、ラピッドテスト カラー-FLU スティック{積水メディカル(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)}、ブライトポック Flu{シオノギ製薬(株)}、Quick Vue ラピッド SP influ{DS ファーマバイオメディカル(株)}、プロラスト Flu{三菱化学メディエンス(株)}

A 型ウイルス {H1N1(n=4) および H3N2(n=2)}に対する上記 10 種の迅速診断キットデバイスの最少検出感度を調べた。検体とするウイルス液の調整は Real-time PCR 法によるコピー数を基準とした。各ウイルスを 10^{0.5} 段階希釈し、一定量のウイルスを各キット添付マニュアルに従い添加した。

倫理面への配慮

用いたワクチンウイルス株、および A/California /7/2009 (H1N1) pdm09 野生株は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を受けた。その他の野生株は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により分離された株を用いた。平成 19 年度第 4 回国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会(平成 20 年 2 月 6 日)で承認。

C. 研究結果

1) 測定法によるウイルス量/力価の比較

4 種の異なる測定法で 12 株のウイルス液のウイルス量/力価の測定を行い、測定法間の相関を調べた。その結果、A 型(n=5)では Real-time PCR 法によるコピー数と感染価(PFU および TCID₅₀)で相関が見られなかったが、その他の方法間では相関係数 0.62-0.96 の相関があった。B 型(n=7)では相関係数 0.66-0.99 の相関があった。

2) A 型インフルエンザウイルス株に対するキットデバイスの検出感度の比較

各 A 型インフルエンザウイルス株に対する 10 種類のキットの最少検出感度の差は $10^1 \sim 10^{20}$ であった。

A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株については継代数または野生株/ワクチン株と異なる 3 株について検出感度の測定を行ったが、10 キットデバイスにおける各株の最少検出感度平均値は $10^{2.9}$ 、 $10^{4.6}$ および $10^{3.25}$ と違いがあった。H3N2 亜型の野生株およびワクチン株の最少検出感度平均値は $10^{4.6}$ および $10^{4.7}$ と同程度であった。

10 種のキットデバイスにおける、ウイルス株別の最少検出感度は、上記のように差がみられたが、キット別の検出感度を比較すると、ある株に検出感度が高いキットは、他の株に対しても感度が高い傾向があった。また、逆に検出感度が劣るキットは、いずれの株に対しても劣る傾向があった。

D. 考察

4 種の異なる測定法で 12 株のウイルス液のウイルス量/力価の測定を行った結果、一部のウイルス液において、Real-time PCR によるコピー数と感染価(PFU および TCID₅₀)間において相関が見られなかった。迅速診断キットはモノクローナル抗体により、ウイルス核タンパク質を検出するのに対し、他の検出法では、ウイルス遺伝子、感染性粒子または外殻抗原の検出であり、検出している内容が異なっている。ウイルス核タンパク質の正確な定量は困難であることから、他の測定法によるウイルス量を基準にせざるを得ないが、対象抗原が異なることから、ウイルス亜型、または株間の違いとは別に、培養ウイルス液による違いが生じる可能性がある。しかしながら、遺伝子、感染粒子および HA 抗原と異なる抗原測定において、その測定値間で高い相関性があるウイルス液であるなら、ウイルス核タンパク質量との相関性も高いことが考えられる。今回、一部のウイルス株において Real-time PCR

法によるコピー数と感染価の相関が低かった理由として、これらの株におけるウイルス培養条件が適切でなかった可能性がある。また、Real-time PCR 法によるコピー数の測定値に誤りがあった可能性も考えられる。SYBR green 法による Real-time PCR 法において、その測定値の不安定要因として、RNA 抽出効率、RT 効率、PCR 効率、SYBR 取り込み効率等があげられる。他の測定法と異なり、遺伝子増幅による測定であるため、効率の違いによる僅かな違いが大きな差となる可能性がある。今後、Real-time PCR 法の精度を高める事についても検討したい。

迅速診断キット10種におけるA型株に対する最少検出感度の差は $10^1 \sim 10^{2.0}$ であった。2010/11シーズンに用いられた12種の迅速診断キットの比較では $10^{3.0}$ の差があった。検出感度の低いキットが販売中止となった結果、キットによる検出感度の差が少なくなったといえる。しかし、新しく開発されたキットの検出感度が必ずしも高いわけではなく、A型株6株すべてにおいて最も検出感度が優れていたのは、10種のキットの中で販売承認年が最も古いキットであった。

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)pdm09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

イルス性肺炎発症例が多かった、また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、臨床的対応に役立てる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。今回の検出感度の比較においてこのキットについてはH1N1亜型ではなくA型に対する検出成績を用いたが、H1N1亜型に対する検出感度が低いことは特にH1N1株流行時において、検体採取の時期によっては亜型判定を誤る可能性がある。

今回検討した10キットの臨床現場での使用割合は参照したデータベース上において全体の約70%相当であった。

E. 結論

迅速診断キットによる検出対象がウイルス核タンパク質であることから、一般的なウイルス測定法によって測定したウイルス量を基準として、ウイルス株間における迅速診断キットの検出感度を比較することは困難である。しかし、1ウイルス株(同一ウイルス液)に対する迅速診断キットの検出感度の比較は可能である。今回実施した10種類の迅速診断キットにおけるA型6株の最少検出感度の差は最大 $10^{2.0}$ であった。以前よりキット間における検出感度の差

は小さく、また検出感度も向上していることから、臨床現場で多く用いられている迅速診断キットの信頼度は高くなっていると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

風疹ウイルス遺伝子検出法の整備

研究分担者 氏名 岡本貴世子 (所属) 国立感染症研究所ウイルス第三部

研究要旨

現在、風疹感染の診断は血清中の IgM 抗体価の測定が主であるが、血清採取時期によっては必ずしも正しい結果が得られない。風疹では発症初期にウイルスが多く排出されるため、ウイルス遺伝子検出との併用が望ましい。これまでにコンタミネーションの恐れのない検出法として、TaqMan リアルタイム PCR 法、Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification assay (RT-LAMP) 法の条件検討を行ってきた。本年度は、両者の感度の比較、さらに検出に適した臨床検体の検討を行い、実験室診断利用に必要なデータを収集した。

A. 研究目的

妊娠早期の母体の風疹感染により出生児がしばしば先天性風疹症候群 (CRS) と呼ばれる障害をもつ事が知られており、国内では 2012 年から 2013 年にかけての流行により、これまでに 41 名の CRS 患児が報告されている。

WHO では将来、風疹排除を目標としており、麻疹と同様、排除達成を確認するためには実験室診断を要求している。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、血清採取の時期による偽陰性例などで必ずしも確度の高い診断法とはいえない。一方で麻疹では国内で遺伝子診断

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

これまでに新しい風疹ウイルス遺伝子検出 TaqMan リアルタイム PCR 法および RT-LAMP 法を作製し、感度および特異性の検討を行っている。本年度は風疹感染疑い患者より提供された臨床検体での両者の性能評価、風疹ウイルス遺

伝子検出に適した臨床検体の検討、臨床検体中のウイルス遺伝子量および IgM 等の抗風疹抗体価と臨床症状との関連を解析し、感染拡大防止のためのデータを得ることを目的とする。

B. 研究方法

公立昭和病院を受診した風疹感染疑い患者 13 名より提供された臨床検体（血漿、咽頭拭い液、尿、鼻咽頭拭い液）を用いて TaqMan リアルタイム PCR 法および RT-LAMP 法性能を比較した。各臨床検体中のウイルス遺伝子量を定量し、ウイルス遺伝子検出に適した臨床検体の種類について検討を行った。ウイルス遺伝子量、患者血清の IgM 抗体価、臨床症状との関連を解析した。

（倫理面への配慮）

臨床検体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」の承認を得ている。

C. 研究結果

血漿では TaqMan 法で 58%(7/12 検体)、LAMP 法で 8.3%(1/12)、咽頭拭い液では TaqMan 法で 61%(8/13)、LAMP 法で 7.7%(1/13)、尿では TaqMan 法で 45%(5/11)、LAMP 法で 9.1%(1/11)、鼻咽頭拭い液では TaqMan 法で 57%(4/7)、LAMP 法で 14%(1/7)の検出率であり、RT-LAMP 法より TaqMan リアルタイム PCR 法の感度が格段に優れていた（表

1）。検体中のウイルス遺伝子量は鼻咽頭拭い液で最も高く、他の検体の 10～1000 倍であった。IgM 抗体価については、33%(3/9)の陽性率であり、ウイルス遺伝子が検出された患者のうち 38%(3/8)で IgM 陽性となった。

D. 考察

検体種類別では、咽頭拭い液が最も検出率が高かったが、ウイルス遺伝子量は鼻咽頭拭い液の方が咽頭拭い液より 100 倍以上多かった（表 1）。今回の検討数は少なかったが、鼻咽頭拭い液で検出された 4 例とも全て 10^6 copies/mL 台であることから、風疹ウイルス遺伝子検出には鼻咽頭拭い液が適していることが強く示唆された。

本研究で採取された検体は発症（発疹出現）から 2～6 病日であったが、4 病日以内でウイルス遺伝子が検出された症例のうち IgM 抗体価が検出されたのは 29%(2/7)と低く、これまでの報告と同様、発症早期では十分な IgM の上昇が起こっておらず、偽陰性となる可能性が高いことが示唆された。一方で、そのような症例でも TaqMan リアルタイム PCR 法のようなウイルス遺伝子検出法であれば、診断が可能であることが示唆された。

E. 結論

Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法と TaqMan リア