

ルタイム法を比較した。その結果、RT-LAMP 法より TaqMan リアルタイム PCR 法が風疹ウイルス遺伝子検出には優れていることが示された。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。

検査センターや医療機関による風疹感染の確認は、血清中の IgM 抗体価の測定、あるいはペア血清の IgG 抗体価の推移により行われており、発症初期においては血清中の IgM による診断より検出率が高いという点から、ウイルス遺伝

子検出法による風疹の診断は今後ますます重要になると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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 臨床検体からの風疹ウイルス遺伝子検出

	検体採取 病日		年 性 齢 別		血漿		咽頭拭い		尿		鼻咽頭拭い		術研結果 (Nested)	
					IgG	IgM	TaqMan Log10	LAMP	TaqMan Log10	LAMP	TaqMan Log10	LAMP		TaqMan Log10
1	2	57	男	<2.0	<0.80	3.50	0/3	3.62	0/3	3.49	1/3		ND	
2	2	29	女	<2.0	<0.80	3.84	0/3	3.12	0/3	3.15	0/3		陽性	
3	2	23	男			0	0/3	3.30	0/3				陽性	
4	4	45	男	35	<0.80	0	0/3	0	0/3	3.20	0/3		ND	
5	2	28	男	7.8	5.96	0	0/3	3.98	1/3	5.07	0/3		ND	
6	2	33	男	<2.0	<0.80	4.01	2/3	3.59	0/3	3.39	0/3	6.85	3/3	ND
7	3	24	男	<2.0	<0.80	3.18	0/3	0	0/3	0	0/3		陰性	
8	3	38	男	<2.0	1.04	3.44	0/3	3.78	0/3	0	0/3	6.30	0/3	
9	6	33	男	29.5	6.59	0	0/3	4.73	0/3	0	0/3	6.27	0/3	
10	2 (川崎 病)	1	男	33	<0.80			0	0/3			0	0/3	
11						0	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	
12						0	0/3	0	0/3	0	0/3	0	0/3	
13						4.52	0/3	4.53	0/3	0	0/3	6.66	0/3	

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

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

研究分担者 阿戸 学 (国立感染症研究所・免疫部)
研究協力者 高橋 宜聖 (国立感染症研究所・免疫部)

研究要旨

インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン (HA) の違いによる多数の亜型があり、新型インフルエンザのアウトブレイク等では季節性インフルエンザとの鑑別が極めて重要になると考えられる。本研究では、中国で鳥からヒトへの感染が発生している H7N9 ウイルスと、同じグループに属する季節性 H3N2 ウイルスの鑑別を可能にするマウスモノクローナル抗体の作製を試みた。3 種類の prime / boost プロトコールによりマウスを免疫した後、ハイブリドーマ法により 14 種類のモノクローナル抗体を樹立することに成功した。今後、これらの抗体の特異性、結合性を詳細に解析し、H7 と H3 亜型鑑別を可能にする抗体の組み合わせを選択する必要がある。

A. 研究目的

2013/2014 シーズンにおいて、H7N9 感染者数が中国で増加している状況を考慮し、本研究では、H7 亜型鑑別法の開発に着手した。

17 種類の HA 亜型が自然界に存在していることが知られている。しかし、過去にヒトで流行したことのある亜型、動物からヒトへの感染が問題となっている亜型は、H1, H2, H3, H5, H7 の 5 種類に限られ、その構造からグループ 1 (H1, H2, H5) とグループ 2 (H3, H7) に分類

される。近年、複数の HA 亜型に交差結合する抗体が分離され注目を集めているものの、そのほとんどは比較的相同性の高い同じグループ内の交差結合性に限られている。そのため本研究では、同じグループ 2 に属する H7 と H3 の鑑別に焦点を当て、これを可能にするマウスモノクローナル抗体の作製を行った。

B. 研究方法

(1) H1, H3, H5, H7 リコンビナント HA タンパクの作製

H1 亜型のウイルス (A/Narita/1/2009)、H3 亜型のウイルス (X31、A/Uruguay/716/2007)、H5 亜型のウイルス (NIBRG-14)、H7 亜型のウイルス (A/Anhui/1/2013) の HA 塩基配列から、バキュロウイルス発現系を用いることによりリコンビナント HA タンパクを作製した。

(2) ハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の作製

リコンビナント HA タンパクを 2 回皮下接種した BALB/c マウスから脾臓細胞を調製し、SP2/O ミエローマとの細胞融合によりハイブリドーマを作製した。限界希釈によりクローニングした後、培養上清中に産生される抗体の特異性を後述の ELISA 法により検証した。

(3) ELISA による抗体特異性の検証

様々な亜型のリコンビナント HA タンパクをコーティングした ELISA プレートを用意し、1% BSA でブロッキング後、ハイブリドーマの培養上清を添加した。プレートに結合したマウス抗体は、ペルオキシダーゼ標識した抗マウス IgG/A 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) モノクローナル抗体の作製

H7 と H3 の鑑別を可能にする抗体として、1) H7 亜型のみ結合する抗体、2) H3 亜型のみ結合する抗体、3) H7、H3 の両方の亜型に結合する抗体を作製し、これらの抗体を組み合わせ、H7 特異的な検出、H3 特異的な検出、H7 と H3 の同時検出、といった 3 グループの検出法の開発を試みた。抗原特異性の異なる 3 種類の抗体を作製するため、図 1 に示す 3 つの prime / boost プロトコルを用いて、マウスを免疫した。まず H7 亜型のみ結合する抗体を作製するため、H7 HA を 2 回接種したマウスを用意した。次に H3 亜型特異的に結合する抗体作製用として、H3 HA を 2 回接種したマウスを用意した。H3 亜型には、1968 年の発生以来多数の抗原変異株が存在しており、H3 亜型内で共通の構造を認識する抗体の分離が必要である。この目的のため、同じ株由来の H3 HA を追加接種するのではなく、1968 年に分離された H3 HA を初回免疫に使用した後、追加免疫には 2007 年に分離された H3 HA を使用した。約 40 年に渡る抗原変異の結果、ここで使用した 2 種類の H3 HA の相同性は 86.9% であり、この 2 種類の H3 HA に交差結合する抗体は、H3 亜型内の抗原変異に寛容

であると推定される。そして最後に、H7 HA で免疫した後、H3 HA で追加免疫したマウスを用意し、H7 と H3 に交差結合する抗体の分離を試みた。

2) マウスモノクローナル抗体の結合性
本研究でこれまでに得られたマウスモノクローナル抗体のリストと、様々な亜型の HA に対する結合性を表 2 に記した。これまで H7 HA に特異的に結合する抗体として 1 種類、H3 HA に特異的に結合する抗体として 7 種類、H7 と H3 に交差結合する抗体として 6 種類のマウスモノクローナル抗体を作製することに成功した。

D. 考察

様々な prime / boost プロトコー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。

E. 結論

H7 と H3 の鑑別に利用可能なマウスモノクローナル抗体を作製することに成功した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

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.

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.

5. 小野寺大志、田代真人、黒崎知博、

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 |

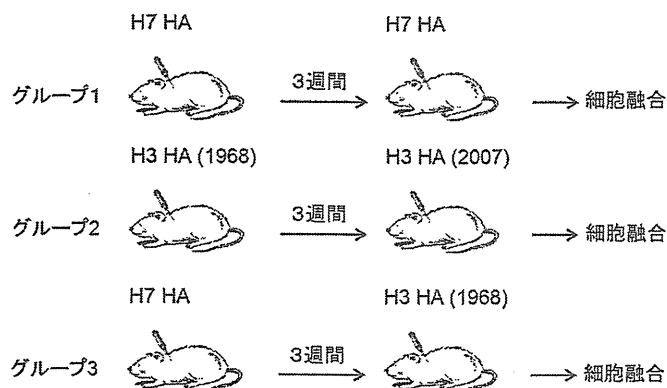


図1 3つのprime / boost法によるマウスモノクローナル抗体の作製

表2 マウスモノクローナル抗体の亜型特異性

Clone	H3 (1968)	H3 (2007)	H7	H1	H5
C208	-	-	+	-	-
B5	+	+	-	-	-
B11	+	+	-	-	-
B33	+	+	-	-	-
E5	+	+	-	-	-
E28	+	+	-	-	-
C151	+	+	-	-	-
E10	+	+	+	-	-
C11	+	+	+	-	-
C43	+	+	+	-	-
C57	+	+	+	-	-
C59	+	+	+	-	-
C73	+	+	+	-	-
C88	+	+	+	-	-

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

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-

研究分担者 加藤 孝宣 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨：日本赤十字社由来の HCV 陽性献血検体を用い、HCV 検体パネルを作製した。この検体パネルを用い、現在国内で使用されている HCV RNA 定量法および HCV コア抗原定量法の評価を行った。これらの測定キットを用いて得られた測定値は、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が認められた。この乖離の原因解明のために、これらの検体の HCV コア領域のシーケンスを確認したところ、コア領域の aa 47 - 49 のアミノ酸変異が HCV RNA 量とコア抗原量の乖離に関与している事が明らかになった。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルス(HCV)は世界中に広がっており、日本でも100万人以上の感染者が存在すると考えられている。HCV感染は成人感染でも高率に慢性化する事が知られており、慢性肝炎から肝硬変、肝癌に至る慢性肝疾患の原因となる。C型慢性肝炎患者に対して、現在ではペグインターフェロンとリバビリンを中心とした治療が行われているが、その治療効果は十分ではなく、いくつか治療効果に影響を与える因子が報告されている。特にウイルス量の高い症例では治療反応性が悪い事が報告されており、患者の血中ウイルス量は治療効果を予測する上で、重要な因子として知られている。現在、HCVのウイルス量測定法としてHCV-RNA定量とHCVコア抗原定量が用いられているが、

これらのキットによる測定値の相関については詳細な検討がなされていない。

我々は国内で献血された検体でHCV陽性であったものの供与を受け、HCVウイルス量測定法評価のための検体パネルを作製した。本研究では、現在臨床で用いられているHCV RNA定量法、HCVコア抗原定量法によりこのHCV検体パネルのウイルス量を測定し、測定値の分布と相関について検討を行った。

B. 研究方法

日本赤十字社よりHCV RNA陽性HCV抗体陽性の献血血漿80検体の供与を受け、HCV検体パネルを作製した。この検体パネルに含まれるHCV株の遺伝子型は、1a株が1検体、1b株が35検体、2a株が26検体、2b株が18検

体であり、国内で検出される主要な遺伝子型が全て含まれている。

これらの検体を HCV RNA 定量法 3 種類（コバス TaqMan HCV オート ver.1、コバス TaqMan HCV オート ver.2、アキュジーン m-HCV）、HCV コア抗原定量法 5 種類（アーキテクト・HCVAg、ルミパルス オート HCV 抗原、ルミスポット栄研 HCV 抗原、BLEIA 栄研 HCV 抗原、オート HCV 抗原 IRMA テスト）で測定を行い、得られた測定値の相関について検討した。

（倫理面への配慮）

本研究で使用する検体パネルは、日本赤十字社により献血者から同意を得て採取された検体であり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. HCV RNA 定量系の検討

HCV 検体パネルを HCV-RNA 定量系であるコバス TaqMan HCV オート ver.1、コバス TaqMan HCV オート ver.2、アキュジーン m-HCV で定量した。その結果、検体パネルの HCV-RNA 量は 3.68 ~ 7.08 log IU/mL に分布しており、これらキットの測定値は非常に良く相関していた。コバス TaqMan HCV オート ver.1 では、高ウイルス量検体で測定値が高値側にシフトする事や、遺伝子型 2 型の測定値が 15%ほど低値となるなどの問題点が指摘されているが、今回用いた検体パネルでは問題となる乖離は観察されなかった。

2. HCV コア抗原定量法の検討

さらに HCV コア抗原定量法 5 種類のキットを用いて、HCV 検体パネルの測定を行った。得

られた測定値を HCV RNA 定量の結果と比較した結果、概ね良好な相関を認めたが、いくつかの測定法では乖離する例が認められた。そこで、これらの検体に含まれる HCV 株のコア領域を PCR 法にて増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。その結果、コア領域の aa 47 - 49 のアミノ酸変異が HCV RNA 量とコア抗原量の乖離に関与している事が明らかになった。特にこの領域に 2 つのアミノ酸変異を認めた検体では、HCV RNA 量との相関から推定されるコア抗原量の期待値の 1/10 程度の値を示した。この領域の変異は測定した 80 検体中 12 検体（15%）に認め、変異を持つ HCV 株は国内に少なからず存在すると考えられた。遺伝子型別に、この領域に変異を持つ株の検出頻度を用いて検討したところ、この変異は遺伝子型 2a 株で最も多く約 30%に認める事が明らかになった。

D. 考察

コア抗原定量は HCV RNA 定量法に比べ安価であり広く用いられているが、抗原抗体反応を用いた測定法のためアミノ酸変異による影響を受ける。今回の検討により、コア抗原量測定値がコア領域の一部の変異により影響を受け、HCV RNA 定量測定値に比べ低く乖離する例があることが明らかになった。これらの変異株ではコア抗原量が HCV RNA 値に比べ低値となる可能性があり、また経過観察中にこれらの変異が出現した場合にはウイルス量の低下と判断される可能性もあるため注意が必要である。

E. 結論

HCV 検体パネルを用いて、HCV RNA 定量法および HCV コア抗原定量法の評価を行った。

これらの測定キットを用いて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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada N, Shigefuku R, Sugiyama R, Kobayashi M, Ikeda H, Takahashi H, Okuse C, Suzuki M, Itoh F, Yotsuyanagi H, Yasuda K, Moriya K, Koike K, Wakita T, and Kato T. Acute Hepatitis B of Genotype H Resulting in Persistent Infection. **World J Gastroentero.** in press.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 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) 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) 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.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Kato T, Sugiyama N, Murayama A, Takuya Matsumura, Masaaki Shiina, Shinichi Asabe, Takaji Wakita, Michio Imawari. 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.
- 6) Tasaka-Fujita M, Nao Sugiyama N, Wonseok Kang W, 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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. 知的所有権の出願・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)
分担研究報告書

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

研究分担者： 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)

研究要旨

現在 HIV スクリーニング検査の主流となっている、第四世代試薬の体外診断薬審査試験における抗原の検出能を試験する検体の作製のために、あらゆるサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 量を定量するための Real-time PCR 法の検討を行った。方法は、安価で操作方法の至適化が容易な SYBR Green 法を選択した。HIV-1 gag MA 領域に 127bp を増幅するプライマーを設計した。NarI 消化した pNL432 および 6 種類のサブタイプ・4 種類の CRF・グループ O のゲノム完全長を含むプラスミド 22 クローンを鋳型として用いた。増幅効率を、全プラスミドが有するアンピシリン耐性遺伝子領域増幅の結果と比較した。全ての鋳型で、これらの領域は同等な効率で増幅し、使用した全てのサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 ゲノムの増幅効率はほぼ同じであることがわかった。この方法が、多様なサブタイプ・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。

A. 研究目的

HIV の検査室レベルでの診断は、スクリーニング検査と確認検査に大別される。現在市販されているスクリーニング検査用の試薬は、抗体検出試薬である第三世代試薬と抗原抗体同時検出試薬である第四世代試薬に分けられる。抗原を検出できることによって、セロコンバージョン前の感染初期の検体を検出可能なことから、現在は第四世代試薬が HIV スクリー

ニング検査の主流となっている。第四世代試薬の性能試験は、市販のセロコンバージョンパネルを用いた第三世代試薬との検出採血日数の比較によって行われるが、これらのパネルに関し、市販の検出試薬による測定結果以外の情報は明らかでない。また実際に検査の現場で使用されている第四世代試薬の抗原検出感度が期待通りではなかった、あるいはサブタイプ/CRF 毎に抗原検出感度にばらつき

が見られたということも報告されている。本研究では、第四世代試薬の体外診断薬審査試験において、感染初期の検出に重要な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。試験用検体の作製にあたって、ウイルス量の標準化が必要になるが、現在研究用として市販されている HIV-1 定量試薬は、ウイルス株ごとに検出感度にばらつきがあるため、本年度は、あらゆるサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 量を定量するための Real-time PCR 系の樹立を行った。

B. 研究方法

分離ウイルスの定量では、比較的高コピー数の定量が出来れば良いので、より安価で操作方法の至適化が容易な SYBR Green 法を用いることにした。まず、ロスアラモス研究所の HIV Sequence Database に掲載されている HIV-1 塩基配列のアライメントをもとに、すべての HIV-1 サブタイプ・CRF・グループで相関性が高い領域を調べ、HIV-1 gag MA 領域に 127bp を増幅するプライマーを設計した。その感度と特異度を検討するために、NarI 消化して線状化した HIV-1 pNL432 および 6 種類のサブタイプ・4 種類の CRF・グループ O のゲノム完全長を含むプラスミド 22 クローン(図 2)を鋳型として用い、全プラスミドが有するアンピシリン耐性遺伝子を検出するプライマーペアによる増幅の結果と比較した。

(倫理面への配慮)

なし。

C. 研究結果

まず HIV-1 標準株としてよく用いられる、サブタイプ B のプラスミド pNL432 を用い、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確認を行った。pNL432 は定量値と塩基数からコピー数を算出、 10^4 から 10^1 まで 10 倍段階希釈し、鋳型として用いた。HIV-1 MA 領域・アンピシリン耐性遺伝子領域ともに、典型的な増幅曲線を示した。融解曲線から非特異的な増幅によると思われるピークは見られなかった。反応後、各サンプルをアガロースゲル電気泳動し、増幅の特異性を確認した。それぞれの Ct 値をもとに検量線を描き、増幅効率と相関係数を調べた。Slope 値からの計算される増幅効率はいずれもほぼ 100%で、いずれの領域においても、各コピー数における Ct 値はほぼ直線上にあり、相関係数もほぼ 1 であった。同一コピー数を鋳型に用いた時の、それぞれの領域の Ct 値をグラフにプロットし、その相関性を検討した。同一コピー数の鋳型を用いた時の Ct 値はほぼ同じで、相関係数 (R^2) はほぼ 1 となった。以上の結果から、用いたプライマーおよび反応条件が適切であること、2 種類プライマーペアの増幅効率がほぼ同じであることが示された。

次にこの系を使って、各サブタイプ・CRF・グループの HIV-1 を同じ効率で増

幅できるかどうかを確認する実験を行った。プラスミドは1反応当たり 1.4 フェムトグラム（約 100 コピー）を鋳型として用いた。全ての鋳型において典型的な増幅曲線が得られ、融解曲線から非特異的な増幅は観察されなかった。各鋳型の2つの領域の Ct 値を比較したところ、いずれの鋳型においてもほぼ同じ値となり、その値は 17.4 から 19 の間に分布していた。それぞれの領域の Ct 値をグラフにプロットしたところ、得られた近似曲線の相関係数 $R^2=0.93$ であった(図3)。アンピシリン耐性遺伝子の塩基配列は全てのプラスミドで 100%一致するので、その増幅効率もプラスミド間で同じであると考えられる。用いた全てのプラスミドで、HIV-1 MA 領域の Ct 値がアンピシリン耐性遺伝子の Ct 値とほぼ一致していたことから、今回設計した HIV-1 MA 領域を増幅するプライマーは、使用した全てのサブタイプ・CRF・グループを同じ効率で増幅することがわかった。

D. 考察

本研究では、様々なサブタイプ・CRF・グループの HIV-1 分離ウイルスをスパイクした試験用検体を用いて第四世代試薬の HIV-1 抗原検出感度の性能調査を行う系を確立することを目的としている。試験用検体を作製するにあたって、ウイルス量を標準化しておく必要がある。いくつかのメーカーから HIV-1 定量のための HIV-1 p24 抗原定量試薬が研究用試薬と

して販売されているが、サブタイプ・CRF・グループにより感度が異なることが指摘されている。

SYBR Green を用いた Real-time PCR 法は、培養上清中のウイルス定量のような高感度の検出を求められないウイルス RNA の検出を比較的安価に行うのに有効な方法である。今回すべての HIV-1 サブタイプ・CRF・グループを同じ効率で増幅できることを目標とし、新たに設計したプライマーの検出感度と PCR の条件を検討した。その結果、6種類のサブタイプ・4種類の CRF・グループをほぼ同じ効率で増幅できることが確認でき、様々な HIV-1 定量に適用できることが示された。塩基配列の相同性から、他のサブタイプや CRF、グループも同じように増幅できると予想される。

E. 結論

今回検討した SYBR Green を用いた Real-time PCR 法は、すべてのサブタイプ・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。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 学会発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

No.	Classification	Clade Name
1	Subtype A	92UG031.A4
2	Subtype A	92RW025.A17
3	Subtype B	DFR01E.19
4	Subtype B	PRD320.06B2
5	Subtype C	PRD320.05G15
6	Subtype C	IndieC1
7	Subtype D	PRD320.09D25
8	Subtype D	PRD320.10D02
9	Subtype F	PRD320.13F52
10	Subtype F	PRD320.14F45
11	Subtype G	PRD320.18D41
12	Subtype G	GH.NJ175.G18
13	Group O	PRD320.16O04
14	Group O	PRD320.19O02
15	CRF01_AE	PRD320.11AC61
16	CRF01_AE	93JP.NH1
17	CRF02_AG	PRD320.03AG06
18	CRF02_AG	97GH.AC1
19	CRF07_BC	98GN013.13
20	CRF07_BC	H8N43.3M11
21	CRF08_BC	W5035.BC41
22	CRF08_BC	DL001.BC06

図 2: Real-time PCR の鋳型として用いたプラスミド

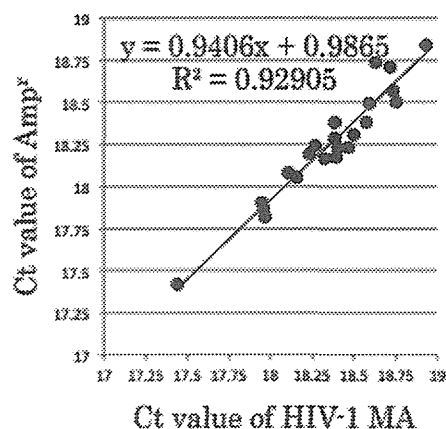


図 3: 各サブタイプ・CRF・グループに対する HIV-1 MA 及びアンピシリン耐性遺伝子を増幅するプライマーペアの増幅効率の比較

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

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

研究分担者 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
研究協力者 水澤左衛子 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員
研究代表者 濱口 功 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長

研究要旨

ウイルス検出を目的とした体外診断用医薬品の再評価には、国際的な共同研究によって力価が定められた国際標準品/参照品や国際参照パネルの存在が不可欠である。従って、国際標準品等の整備、および更新の動向を把握することは重要である。本研究ではWHO、およびWHO Collaborating Centerの専門家が集まる会議に提出された資料を精査し、国際標準品等に関する最新の動向を調査した。

A. 研究目的

ウイルス検出を目的とした体外診断用医薬品の技術の進歩はめざましく、国内外のメーカーが製造する体外診断用医薬品は世界各国で使用されている。これら体外診断用医薬品の再評価には様々なウイルスの国際標準品・参照品、国際参照パネルが必要不可欠である。ウイルスの国際標準品等はWHOの生物製剤標準化に関する専門家委員会(ECBS)において最終的に制定されるが、作製はNational Institute for Biological Standards and Control (NIBSC、イギリス)、Paul-Ehrlich-Institut (PEI、ドイツ)、Food and Drug Administration (FDA、

アメリカ)が主体となつて行われる。ECBSに先立ち、上記3機関が参集するWHO Collaborating Centers 会議やStandardization of Genome Amplification Techniques (SoGAT)会議等で実務者間の議論が進められる。本研究では、WHO国際標準品等の整備に関する最新の情報を収集し、その動向を把握することを目的とした。

B. 研究方法

WHO Collaborating Centers 会議での会議資料、SoGAT Blood Virology-Clinical Diagnostics 合同会議の会議資料、WHO

ECBS に提出された議案書を精査し、WHO 国際標準品・参照品、国際参照パネルの整備、更新の進捗状況について動向調査を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

1. 国際標準品の制定、更新の承認

2013 年の WHO ECBS において、ウイルス核酸に関する標準品・パネルとして第 1 次 HIV-1 CRF 参照パネル、第 2 次 HAV-RNA 国際標準品、第 1 次 HDV-RNA 国際標準品、第 3 次パルボウイルス B19-DNA 国際標準品が制定された。ウイルス抗原/抗体に関しては、第 1 次 HBe 抗原国際標準品、第 1 次抗 HBe 抗体国際標準品が制定された。第 1 次 HDV-RNA 国際標準品以外の 5 品目については、国立感染症研究所が国際共同研究に参加している(表 3 上)。

新規事業として、HCV-RNA 国際標準品の更新、抗 CMV 抗体(IgG)国際標準品の新規作製が承認された。また、抗風疹抗体測定法の標準化事業も ECBS において承認を受けた(表 3 下)。

2. HIV-2 RNA working reagent 作製へ向けた動き

第 1 次 HIV-2 RNA 国際標準品は 2009 年に WHO ECBS において制定されたが、力価が 1000 IU/mL と低く、定量試験に使

いにくいという指摘があった。そこで、高力価の第 2 次国際標準品の作製が NIBSC より提案されたが、第 1 次国際標準品が 1000 バイアル以上残っていること、定性試験には充分利用できること等から NIBSC の提案には否定的な意見が多く見られた。さらに、低力価の第 1 次国際標準品を用いて高力価の第 2 次国際標準品候補品の値付け作業(相対定量)が可能かどうか、また第 1 次国際標準品に対する相対定量で第 2 次国際標準品の値付けをしない場合の traceability の問題等から、国際標準品に代わり高力価の working reagent が作製される運びとなった。現在、力価を約 10^6 IU/mL に合わせた working reagent が準備され、不活化の影響、抗凝固剤の影響(ACD または EDTA)等を検討するための mini-study が計画されている。

3. 新たなウイルスの参照パネル作製へ向けた動き

ウエストナイルウイルス(WNV)-RNA 参照パネル、チクングニアウイルス(CHIKV)-RNA 参照パネルについて、FDA の the Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)と NIBSC が協力して整備の準備を進めている。いずれもアフリカミドリザル由来 Vero 細胞で増やしたウイルス株を用い、最終的には加熱処理によって不活化したものをを用いる予定になっている。しかし動物由来の細胞で増殖させたウイルスを国際輸送することが容易かどうか、また、参照パネル制定に先

立つ国際共同研究で臨床検体や生ウイルス等の検体を配布できるかは今後の検討課題である。

4. 国際標準品の安定性について

2013年のWHO ECBSにおいて承認された第2次HAV-RNA国際標準品は、4°Cにおける安定性の問題から、通常の室温発送とは異なり、ドライアイス輸送による交付が承認された。また、HCV-RNA国際標準品の更新が承認されたが、これは第3, 4次HCV-RNA国際標準品の加速試験における安定性に問題があり、室温発送に耐えうる新たな標準品が要望されたためである。

D. 考察

1. 国際標準品の制定、更新の承認

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、WHO Collaborating Centers 会議、SoGAT、ECBS へ提出された議案書等を活用して情報の収集を行った。現在、国際標準品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している。

2. HIV-2 RNA working reagent 作製へ向けた動き

国際標準品における traceability とは、標準品を更新する際に現行品と同等の力価・性状・genotype 等が望ましい、とする考え方である。HIV-2 RNA については、力価の traceability の観点から第2次国際

標準品ではなく高力価の working reagent を作ることとなった。

genotype の traceability の観点からは、国際標準品更新の際に現行品と同様の genotype が選択される。しかしながら、最初の国際標準品が制定された当時に多く見られた genotype と、現在感染率の高い genotype とが異なる場合もある。国際標準品は体外診断用医薬品の標準物質の値付けにも用いられることから、現状に合った genotype の方が良いという考え方もでき、今後議論が必要と考える。

3. 新たなウイルスの参照パネル作製へ向けた動き

今年度は WNV、および CHIKV の核酸参照パネルの進捗状況が報告された。中にはアメリカにおいて、国内参照パネルとして交付が開始されているものもあり、国間での検体の移動の問題が解消できれば、国際参照パネルの整備に前進が見られるであろう。デングウイルスの核酸参照パネルも今年度は進捗の報告が出ていないが、同時並行で進められているものと思われる。

4. 国際標準品の安定性について

国際標準品・参照パネル等に有効期限は定められていない。WHO の国際標準品・参照パネルは長期安定性を確認しているから、というのが一つの理由である。しかしながら、第3, 4次HCV-RNA国際標準品、および第2次HAV-RNA国際標

準品が、-20℃以下では安定とはいえ加速試験における安定性の問題から室温発送でなくドライアイス輸送となっている点は改善の余地がある。

HCV-RNA 国際標準品の安定性については、含湿度、残留酸素濃度に加え、抗HCV抗体の有無や、pH緩衝剤(HEPES)、トレハロースの添加効果が検討されており、NIBSCでの解析結果が待たれる。

2013年のECBSにおいて第2次HAV-RNA国際標準品として制定されたロット(NIBSC code: 00/562)は、第1次HAV-RNA国際標準品(00/560)と同時期に同一の原材料から製造されたロットである。製造された当初は、第1次国際標準品の在庫が僅少になった場合の更新の候補となる予定であったが、4℃保存で力価の低下が見られたことから、第2次標準品には適さないことが2007年のECBSで報告された(WHO/BS/07.2056)。故に、今回のHAV-RNA国際標準品の更新にあたっては新規にロット12/234が製造され、標準品の第一候補となった。しかし、国際共同研究における定性法と定量法の乖離が大きく、また、少数のサンプルを用いて行った3ヶ月の加速試験で-20℃保存での力価低下が予測されたことから、ロット12/234は第2次国際標準品には制定できず、結果的にロット00/562が第2次HAV-RNA国際標準品となった。HAV-RNA国際標準品の安定性に関しては解析の予定が示されていないが、HCV-RNA国際標準品での解析結果を参

考にしつつ、検討がなされることが期待される。

E. 結論

2013年度のWHO ECBSにおいて、ウイルスに関する標準品・パネルとして第1次HIV-1 CRF参照パネル、第2次HAV-RNA国際標準品、第1次HDV-RNA国際標準品、第3次パルボウイルスB19-DNA国際標準品、第1次HBe抗原国際標準品、第1次抗HBe抗体国際標準品が制定された。標準品制定のための国際共同研究では、国立感染症研究所が参加協力を行った。

新規事業として、HCV-RNA国際標準品の更新、抗CMV抗体(IgG)国際標準品の新規作製、抗風疹抗体測定法の標準化が承認された。

安定性が問題となっている一部のウイルス核酸の国際標準品については、含湿度、残留酸素濃度も含め、現在NIBSCにおいて解析が進められている。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

制定

	更新	標準品/参照品 名称	種類	感染研が国際共同研究に参加
核酸	1st	HIV-1 Circulating Recombinant Forms RNA for NAT assays	国際参照パネル	○
	2nd	Hepatitis A virus (HAV) RNA for NAT assays*	国際標準品	○
	1st	Hepatitis D virus (HDV) RNA for NAT assays	国際標準品	
	3rd	Parvovirus B19 (B19V) DNA for NAT assays	国際標準品	○
抗原/抗体	1st	Hepatitis B virus “e” antigen (HBeAg)	国際標準品	○
	1st	anti-Hepatitis B virus “e” antibodies (anti-HBe), plasma	国際標準品	○

* 4°Cで力価の低下が見られるため、ドライアイスで発送

新規事業

	更新	標準品/参照品 名称	種類
核酸	5th	Hepatitis C virus RNA for NAT assays	国際標準品
抗体	1st	anti-Cytomegalovirus IgG	国際標準品
		Standardisation of rubella antibody testing	試験法の標準化

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

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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
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.	43	11-21	2014
Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T	Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice.	Gastroenterology	145	447-455	2013
Ishida H, Kato T, Takehana K, Tatsumi T, Hosui A, Nawa T, Kodama T, Shimizu S, Hikita H,	Valine, the branched-chain amino acid, suppresses hepatitis C virus RNA replication but promotes infectious particle formation.	Biochem Biophys Res Commun.	437	127-133	2013