

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 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・グループの各 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、**加藤孝直**、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、**加藤孝直**. 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、**加藤孝直**. 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 |