

201427010A

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  
(医薬品等規制調和・評価研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口 功  
平成27(2015)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  
(医薬品等規制調和・評価研究事業)

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26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜口 功  
平成27(2015)年3月

## 研究組織

### 研究代表者

浜口 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

三田村敬子 (公益財団法人 ライフ・エクステンション研究所附属  
永寿総合病院 小児科/感染制御部)

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)

奥野英雄 (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)

水澤左衛子 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部)

大隈 和 (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 ————— 1  
浜口 功

### II. 分担研究報告

1. インフルエンザウイルスおよびロタウイルス迅速診断キットの比較検討 ————— 6  
多屋馨子

2. 国内風疹 IgG 測定キットの性能評価 ————— 9  
岡本貴世子

表 1: 使用可能な国立感染症研究所登録パネル血清 ————— 10

表 2: 現在使用可能なパネル血清 ————— 10

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 — 11  
阿戸 学

4. 培養細胞発現系を用いた HBs 抗原測定用体外診断薬評価系の構築 ————— 14  
加藤孝宣

図 1: 遺伝子型 A-H 株のコンセンサス配列による HBs 抗原測定値の評価 ————— 15

図 2: 遺伝子型 A-C 株のワクチンエスケープ変異導入株を用いた HBs 抗原測定値の評価 ————— 16

図 3: 国内の B 型肝炎症例から得られた HBV 株を用いた HBs 抗原測定値の評価 ————— 16

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 — 18  
草川 茂

表 3: 用いた HIV-1 分離株の分類 ————— 20

図 4:  $1 \times 10^5$  copies/mL 検体のコバス Taqman オート Ver.2.0(ロシュ・ダイアグノスティクス)による測定 ————— 20

図 5:  $1 \times 10^6$  copies/mL 検体の Innostest HIV Antigen mAb (Innogenetics)による測定 ————— 20

図 6: ELISA を原理とするスクリーニング試薬を用いて試験検体の測定 ————— 21

図 7: 抗原抗体同時検出 IC 試薬「エスプライン HIV Ag/Ab」を用いた試験検体の測定 ————— 21

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 ————— 22  
百瀬 暖佳

表 4: 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 ————— 24

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 25

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 27

# 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  
(医薬品等規制調和・評価研究事業))  
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 浜口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

研究要旨 ウイルス感染症は臨床症状のみ、あるいは抗体測定や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、診断技術の向上が見られている。これまでに研究班で実施した、インフルエンザ迅速診断キットの性能調査から、キット間の最少検出感度に差があることが明らかとなった。また、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かった。こうした、市販されているウイルス診断キットの性能を定期的に比較解析することは、現状にあった診断能力を適切に維持することにつながる重要な研究といえる。平成26年度は当初の研究計画に従い、B型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、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。同時に、技術の開発も順調に進捗している。また、本年度より臨床において感染症の診断・治療に診断キットを使用する臨床医に参加を願い、臨床の現場から、求められる検査試薬のあり方についての情報提供および提言をいただいております、加えて検討した。

研究分担者	荒木和子	国立感染症研究所・	
多屋馨子	国立感染症研究所・	感染症疫学センター	
	感染症疫学センター・室長	奥野英雄	国立感染症研究所・
岡本貴世子	国立感染症研究所・	感染症疫学センター	
	ウイルス第三部・主任研究官	佐藤 弘	国立感染症研究所・
阿戸 学	国立感染症研究所・	感染症疫学センター	
	免疫部・部長	水澤左衛子	国立感染症研究所・
加藤孝宣	国立感染症研究所・	血液・安全性研究部	
	ウイルス第二部・室長	大隈 和	国立感染症研究所・
草川 茂	国立感染症研究所・	血液・安全性研究部	
	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		
研究協力者			
三田村敬子	公益財団法人 ライフ・エクステン		
	ション研究所附属永寿総合病院		
	小児科/感染制御部		
高橋宜聖	国立感染症研究所・免疫部		

**A. 研究目的**

医療上必要性の高い季節性、および新型インフルエンザ、風疹、肝炎、エイズ等のウイルスについては、ウイルス抗原、遺伝子、および抗ウイルス抗体が感染症診断に用いられている。これらの体外診断薬が現状の検出能力に合致しているかについて、その検出感度・特異性等を評価すると

ともに、評価に必要な感度、特異性、有用性等の技術基盤向上のための検討を行う。

## B. 研究方法

医療上必要性の高い季節性、および新型インフルエンザ、風疹、肝炎、エイズ等のウイルスについて、現状の検出能力に合致しているか体外診断薬の検出感度・特異性等を評価した。また、評価に必要な感度、特異性、有用性等の技術基盤向上のための検討を行った。

B型肝炎ウイルスについては、性能調査に用いる抗原の整備を行った。風疹ウイルスについては、性能調査に用いる抗体パネルの整備を行った。インフルエンザウイルス(H1、H3、H7亜型)、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。また、季節性インフルエンザウイルスA型(H1N1、H3N2)、B型について、キット間の検出感度の調査を行った。さらに、体外診断薬の再評価に用いる高品質の国際標準品整備の状況を、関連する国際会議等に出席し調査するとともに、標準品整備に貢献した。

### (倫理面への配慮)

パネル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」の承認を得ている。

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。

本研究で使用したB型急性肝炎症例のHBVゲノム配列はインフォームドコンセントを得て採取された検体を用いて行った解析から得た。これらの検体の使用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において審議され承認を得ている(受付番号398、平成24年12月28日付)。

## C. 研究結果

### B型肝炎ウイルス：

HBs抗原測定用体外診断薬の評価のため、HBs抗原の*in vitro*発現系の構築を行った。培養細胞で発現可能なEFプロモーターからFLAGタグが付加されたHBs抗原が発現されるコンストラクトを作製した。HBs抗原の配列は、遺伝子型A-Hのコンセンサス配列、および国内のB型肝炎患者から得られた遺伝子型A-CのHBV株の配列にあわせて作製した。これらの発現コンストラクトを培養細胞に導入し、ウエスタンブロットにて目的のサイズの蛋白質が発現していることを確認した上で、培養上清のHBs抗原量をアーキテクトHBsAg-QT(アボットジャパン)とルミパルスII HBSAg-HQ(富士レビオ)、ルミパルス HBsAg-HQ(富士レビオ)にて測定した。その結果、それらの測定値に相関が見られ、各遺伝子型のコンセンサス株については十分な検出能を有していると考えられた。一方、遺伝子型A、B、C株のワクチンエスケープ変異導入株については相関が低く、測定値にキット間の差が有ると考えられた。これらの成果に基づきHBs抗原測定用体外診断薬の性能調査を行い、体外診断薬の再評価に供する。

### ヒト免疫不全ウイルス(HIV)：

第四世代HIVスクリーニング検査試薬において、感染初期の検出に重要な抗原の検出感度を評価するため、*in-house* real-time RT-PCR法を用いて多様なHIV-1サブタイプ/CRF/グループを等しい効率で定量する方法を確立した。これを使ってHIV-1抗原検出感度用パネルの試作品を作製し、性能評価に有用であることを示した。今後は性能調査のためのパネルを整備するとともに、性能調査を計画する。また、新しいHIV確認検査法として注目され、今後製造承認申請が出る可能性が高いHIV-1核酸増幅検出試薬の性能検査用検体の作製と試験審査へも供する。

### 迅速診断キットの検討：

インフルエンザ迅速診断キットは多くの製品が臨床現場で使用されているが、各キットの添付文書に記載されている検出感度は、用いられたウイルス株や定量方法が異なるため一概に比較することが困難である。今年度はA(H1N1)亜型、A(H3N2)亜型、B型について比較を行うため、臨床現場で多く使用された上位10キットについて検討した。いずれのインフルエンザウイルス株においてもキット間の差は $10^1 \sim 10^2$  copies/testであった。今後もウイルス感染症に対する迅速診断キットの評価ならびに性能向上に資する知見を得ることを目的とし、流行シーズンごとに抗原性の変異が比較的大きいA(H3N2)亜型についてさらなる検討を行う。一方、ロタウイルスについては、ロタウイルスG1P[8]の標準株であるWa株を用い、10%便乳剤により2倍階段希釈したウイルス液を用いて検出感度の検討を行った。その結果、キット間で感度に差が認められた。

### インフルエンザウイルス(亜型等)：

インフルエンザ亜型鑑別が可能な迅速診断法の確立を目指し、ヘマグルチニン(HA)抗体を利用したウイルス検出系の構築を試みた。この目的のため、亜型特異性と検出感度に優れた新規HA抗体パネルを作製し、H3亜型検出に最適な抗体の組み合わせを決定した結果、H3亜型ウイルスを特異的に高感度で検出できる系が確立された。今後、他の亜型(H7など)を選択的に検出する方法の開発を進め、検出可能な亜型の種類を増やすとともに、検査技術基盤向上のための検討を行う。

### 風疹ウイルス：

今年度は検討に用いるパネル血清の検索・選定を行った。国立感染症研究所パネル血清として登録済みの76パネルのうち、数に余裕のある44パネルを使用することとした。うち陰性は2、HI価8以上16未満は1パネルであり、最も重要であると考えられるカットオフ付近のパネルが不足していた。そこで、新たに収集した血清も含めることとした結果、陰性は6とほぼ十分数を確保できた

が、HI価8以上16未満は2とまだ不十分であった。今後HI価8以上16未満の検体を収集してパネルを拡充するとともに、市販されている風疹診断キットの性能調査を行い、体外診断薬の再評価に供する。

### 国際標準品：

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。そこで、ウイルスに関する国際標準品等の整備状況を調査した。現在、HCV、HEV、HIV、HTLVに関わる国際標準品、国際参照パネルの整備が進められている。一方、現行の国際標準品の一部は輸送時の力価低下が問題となっている。含湿度および残留酸素濃度がWHO推奨基準を超えているものもあり、次期ロットより封に改良が加えられる予定である。今後も引き続き国際標準品等の動向調査を行うと共に、欧州における体外診断用医薬品の品質管理について情報収集を行う。

### **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、ロタウイルス、風疹ウイルス、肝炎ウイルス、HIV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)」に規定される医療上の必要性が高い。一方で、流行株の変化など病原体自身の変異に対応すべく、病原体検出技術は、絶えず検出技術の改良が必要となる。本研究課題に基づく成果は現状に即した有効な体外診断薬の整備を促進するものであり、厚生労働行政、国民の保健・医療・福祉の向上に大いに寄与することが期待される。また、国際標準品は体外診断薬の精度管理に必須のものであり、最新の情報を入手するとともに、国内の体外診断薬用の標準品の整備に貢献することができる。

### **E. 結論**

平成26年度は当初の研究計画に従い、B型肝炎ウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、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。同時に、技術の開発も順調に進捗している。また、本年度より三田村敬子医師に参加を願い、臨床の現場から、求められる検査試薬のあり方についての情報提供および提言を受けた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakata M, Otsuki N, Okamoto K, Anraku M, Nagai M, Takeda M, Mori Y : Short Self-interacting N-terminal Region of Rubella Virus Capsid Protein Is Essential for Cooperative Actions of Capsid and Nonstructural p150 Proteins. *J. Virol.* 2014
- 2) Abo H, Okamoto K\*, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y: Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses. *J Virol. Methods* 24;207C:73-77. 2014. (\* corresponding author)
- 3) Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Nakauchi, M., Takahashi, Y., Onodera, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matsumura, T., Ato, M., Kobayashi, K., Shimotai, Y., Mizuta, K., Hongo, S., Tashiro, M., Nobusawa, E. 2014. Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of A/(H1N1)pdm09 Virus by Using Monoclonal Antibody Escape Mutants. *J. Virol.* 88: 12364-12373.
- 4) Sugiyama N, Murayama A, Suzuki R, Watanabe N, Shiina M, Liang TJ, Wakita T, Kato T. Single strain isolation method for cell culture- adapted HCV by end-point dilution and infection. *PLoS One*, 9(5), e98168, 2014
- 5) 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, Kato T. Acute hepatitis B of genotype H resulting in persistent infection. *World J Gastroenterol*, 20(11), 3044-9, 2014.
- 6) Kondo Y, Ninomiya M, Kimura O, Machida K, Funayama R, Nagashima T, Kobayashi K, Kakazu E, Kato T, Nakayama K, Lai MM, Shimosegawa T. HCV infection enhances Th17 commitment, which could affect the pathogenesis of autoimmune diseases. *PloS One*, 9(6), e98521, 2014.
- 7) Sung PS, Murayama A, Kang W, Kim MS, Yoon SK, Fukasawa M, Kondoh M, Kim JS, Kim H, Kato T, Shin EC. Hepatitis C virus entry is impaired by claudin-1 downregulation in diacylglycerol acyltransferase-1-deficient cells. *J Virol*, 88(16), 9233-9244, 2014.
- 8) Masaki T, Matsunaga S, Takahashi H, Nakashima K, Kimura Y, Ito M, Matsuda M, Murayama A, Kato T, Hirano H, Endo Y, Lemon SM, Wakita T, Sawasaki T, Suzuki T. Involvement of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation mediated by casein kinase I-alpha in infectious virus production. *J Virol*, 88(13), 7541-7555, 2014.
- 9) Takebe Y, Naito Y, Raghwan J, Fearnhill E, Sano T, Kusagawa S, Mbisa JL, Zhang H, Matano T, Brown AJ, Pybus OG, Dunn D, Kondo M: Intercontinental dispersal of HIV-1 subtype B associated with transmission among men who have sex with men in Japan. *J Virol.* 88(17), 9864-9876, 2014.
- 10) Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I: Identification of TL-Om1, an ATL cell line, as a reference material for human T-lymphotropic virus 1 quantitative polymerase chain reaction: *J Clin Microbiol.* 2015 Feb;53(2):587-96
- 11) 岡本貴世子、森嘉生 先天性風疹症候群の予防と風疹抗体価の推移 検査と技術 42: 464-469 2014.
- 12) 安達悠、高橋宜聖、阿戸学 2014. インフルエンザワクチンの免疫原性と抗原エピソード 感染炎症免疫 44: 22-31.

### 2. 学会発表

1. Takahashi, Y., Ato, M., Adachi, Y. B cell pathways for protective memory responses against influenza virus infection. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara (奈良、9月)
2. Adachi, Y., Inoue, T., Kurosaki, T., Ato, M., Takahashi, Y. Persistent local germinal centers select cross-reactive antibody into immunological memory following influenza virus infection. 第43回日本免疫学会 (京都、12月)
3. Onodera, T., Adachi, T., Tsubata, T., Kurosaki, T., Adachi, Y., Ato, M., Takahashi, Y.: CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination. 第43回日本免疫学会 (京都、12月)

4. 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宜聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之：剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対するTLRアゴニストの影響 第18回日本ワクチン学会学術集会（福岡、12月）
5. Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Hepatitis C virus replication in a monkey kidney-derived cell line. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.
6. Kato T, Sugiyama N, Murayama A, T Matsumura, M Shiina, S Asabe, Wakita T, M Imawari. Antimicrobial Peptide LL-37 Deteriorate Infectivity of Hepatitis C Virus. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.
7. Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Wakita T, Kato T. Elucidation of effects on HCV propagation and ISG induction by amino acid substitution in interferon sensitivity-determining region. 21th International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, September 7-11, 2014. Banff, Canada.
8. Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Infection and Replication of Hepatitis C Virus in Vero cells Derived from Green Monkey Kidney. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 7-11, 2014. Boston, USA.
9. 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. NS5A-ISDR アミノ酸変異がHCV増殖に与える影響の解析. 第24回抗ウイルス療法研究会総会、2014年5月.
10. 村山麻子、藤原圭、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルスの細胞培養系を用いた第二世代NS5A阻害剤の抗ウイルス活性の評価. 第50回日本肝臓学会総会、2014年5月29-30日、東京.
11. 杉山隆一、杉山奈央、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、新田沙由梨、脇田隆字、加藤孝宣. NS5A-ISDR アミノ酸変異によるHCV増殖およびIFN感受性への影響. 第62回日本ウイルス学会学術集会、2014年11月10-12日、横浜.
12. 村山麻子、杉山奈央、脇田隆字、加藤孝宣. C型肝炎ウイルスが感染複製可能なベロ細胞株の樹立. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月25-27日、横浜
13. Madoka Kuramitsu and Isao Hamaguchi: Development of a HTLV-1 DNA standard, Scientific Working Group on the Standardisation of Genome Amplification Techniques (SoGAT) – 2<sup>nd</sup> Joint Blood Virology and Clinical Diagnostics Meeting, Graz, Austria – 28-29 May 2014

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

#### 利益相反の開示

EpiVax社と秘密保持契約を締結し、HA塩基配列に関する情報提供を受けた。

## 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  
(医薬品等規制調和・評価研究事業))  
分担研究報告書

インフルエンザウイルスおよびロタウイルス迅速診断キットの比較検討

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 第三室 室長  
研究協力者 荒木和子 国立感染症研究所 感染症疫学センター 第三室 協力研究員  
研究協力者 奥野英雄 国立感染症研究所 感染症疫学センター 第三室 研究員  
研究協力者 佐藤 弘 国立感染症研究所 感染症疫学センター 第三室 研究員

**研究要旨** ウイルス検出用として多くの種類の迅速診断キットが臨床現場で使用されており、これらのキットによる診断は治療方針を決定する際の指標のみならず、流行状況の把握等にも関与している。各キットの最小検出感度は添付文書に記載されているが、測定法や検討に用いられているウイルス株がキットにより異なることから、添付文書の記載内容のみでは一概に比較することが困難である。そこで、本研究においてインフルエンザウイルスおよびロタウイルスの迅速診断キットについて、同じウイルス株を用いて比較検討を行った。

インフルエンザウイルスについては、A型およびB型のいずれのウイルス株においても最小検出感度の差はキット間で $10^1 \sim 10^2$  copies/testであり、以前の我々の検討と比較してキット間の差は減少していた。しかし、今年度は、臨床医の使用頻度が高いキットを上から順に10キット選択して検討したことから、より感度の高いキットが臨床医に選択されている可能性が考えられた。

ロタウイルスについては、12種類の迅速診断キットが販売されていることが判明した。イムノクロマト法を原理とするキットは7種類、凝集法（ラテックス）が3種類、サンドイッチELFA法（アルカリホスファターゼ）が1種類、サンドイッチELFA法（ペルオキシダーゼ）が1種類であった。イムノクロマト法を原理とするキットでは、スティック型が4種類、カセット型が3種類であった。カセット型の3種類中2種類は、同じ製造元のキットで、一方がロタウイルスのみを検出するキット、他方がロタウイルスとアデノウイルスの両者を検出するキットであったことから、原理・感度は同等と考え、感度の検討に際しては1種類とみなした。ロタウイルス抗原陰性の10%便乳剤を作成し、それを用いてウイルス液を段階希釈し、ロタウイルス腸炎患者の便にみためて、キットの種類別に検出感度を検討した。

#### A. 研究目的

ウイルス検出を目的とした迅速診断キットは多くの種類が市販され、臨床現場で利用されているが、診断におけるキットの検出感度は治療方針等を決定する上で非常に重要である。そこで、診断レベルの向上を目的とし、インフルエンザウイルスおよびロタウイルスの迅速診断キットについて比較検討を行った。

#### B. 研究方法

インフルエンザウイルスのキットについては、有志医師の報告に基づくデータベース「MLインフルエンザ流行前線情報DB (<http://ml-flu.children.jp/>)」を参照し、2013/14シーズンに臨床現場で多く使用された上位10キット〔商品名（製造販売元）：エスプライン インフルエンザA&B-N（富士レビオ）、チェックFluA・B（ロート製薬）、プロラストFlu（LSIメディエンス）、クリアビューInfluenza A/B（アリーアメディカル）、ラピッド

テスタ カラー-FLU スティック (積水メディカル)、QuickVue ラピッド SP influ (DS ファーマバイオメディカル)、クイックナビ-Flu (デンカ生研)、イムノエース Flu (タウンズ)、クリアライン Influenza A/B/ (H1N1) 2009 (アリーア メディカル)、ブライトポック Flu (ニチレイバイオサイエンス) ※測定原理はいずれもイムノクロマト法]を対象とした。

ウイルス株には2013/14シーズンのインフルエンザワクチン株を含む計11株 [A (H1N1) 亜型またはA (H1N1) pdm09 亜型: 4株、A (H3N2) 亜型: 2株、B型: 5株] を用い、各キットデバイス (カセット型あるいはスティック型) と反応させるウイルス量を一定 ( $10^{1.5} \sim 10^{5.5}$  copies/test) にする調整を行った他は、各キットの添付文書に従い測定を行った。

また、ロタウイルスのキットについては、検討時点で市販されていたキットの測定原理、デバイスの形状を比較した。イムノクロマト法を原理とするキットは7種類、凝集法 (ラテックス) が3種類、サンドイッチ ELFA 法 (アルカリホスファターゼ) が1種類、サンドイッチ ELFA 法 (ペルオキシダーゼ) が1種類であった。イムノクロマト法を原理とするキットでは、スティック型が4種類、カセット型が3種類であった。カセット型の3種類中2種類は、同じ製造元のキットで、一方がロタウイルスのみを検出するキット、他方がロタウイルスとアデノウイルスの両者を検出するキットであったことから、原理・感度は同等と考え、感度の検討に際しては1種類とみなした。今年度の検討では測定原理がイムノクロマト法であった6キット [BD Rota/Adeno エグザマン スティック (日本ベクトン・ディッキンソン)、イムノカード ST ロタウイルス (テイエフビー)、クイックチェイサー Rota/Adeno (ミズホメディー)、ディップスティック'栄研'ロタ (栄研化学)、ラピッドエスピー《ロタ》 (DS ファーマバイオメディカル)、ラピッドテスタ ロタ-アデノ (積水メディカル)] を対象とした。

ウイルス株には G1P[8]の標準株である Wa 株を用い、10%便乳剤により2倍階段希釈 (1:2~1:512) したウイルス液をそれぞれロタウイルス腸炎患

者の便とみなし、その後の操作を各キットの添付文書に従い測定を行った。

### C. 研究結果

インフルエンザウイルスのキットにおけるデバイスの最小検出感度について比較すると、A (H1N1) 亜型またはA (H1N1) pdm09 亜型のウイルス株では① $10^{2.5} \sim 10^{3.5}$  copies/test、② $10^{2.5} \sim 10^{4.0}$  copies/test、③ $10^{3.5} \sim 10^{5.0}$  copies/test、④ $10^{3.5} \sim 10^{5.5}$  copies/test であり、いずれのウイルス株についてもキット間で  $10^1 \sim 10^2$  copies/test の差がみられた。

同様にA (H3N2) 亜型のウイルス株では① $10^{3.5} \sim 10^{5.0}$  copies/test、② $10^{4.0} \sim 10^{5.5}$  copies/test と、キットによる差は  $10^{1.5}$  copies/test であった。また、B型のウイルス株では① $10^{2.5} \sim 10^{4.0}$  copies/test、② $10^{4.0} \sim 10^{5.0}$  copies/test、③ $10^{4.0} \sim 10^{5.5}$  copies/test、④ $10^{4.0} \sim 10^{6.0}$  copies/test、④ $10^{4.5} \sim 10^{6.0}$  copies/test であり、キットにより  $10^1 \sim 10^2$  copies/test の差がみられた。

次に上記の比較に用いた各ウイルス液のコピー数、感染価 (PFU、TCID50)、HA 価のそれぞれの相関性について検討した結果、A型 (6株) ではコピー数とHA 価 (相関係数 0.922)、PFUとTCID50 (同 0.964)、PFUとHA 価 (同 0.794) で高い相関がみられた。またB型 (5株) では、コピー数とPFU (相関係数 0.993)、TCID50 (同 0.722)、HA 価 (同 0.920)、およびPFUとTCID50 (同 0.795)、HA 価 (同 0.921) で高い相関があった。

一方、ロタウイルスのキットについて2倍階段希釈したウイルス液を用いて各キットの検出感度の検討を行った結果、キット間で感度に差が認められた。各キットの検出感度 (希釈倍数) の幾何平均は 1:29、中央値は 1:32 であった。

### D. 考察

臨床現場で多く用いられているインフルエンザ迅速診断キットの最小検出感度について検討した結果、今回用いたA型およびB型のいずれのウイルス株においてもキット間の差は  $10^1 \sim 10^2$  copies/test であった。

以前（2012年度）の我々の検討では、キット間で最大  $10^3$  copies/test の差があったことから、現在使用されているキット間の検出感度の差が減少しているか、あるいは、感度の高いキットが臨床医に選択されて使用頻度が高くなっている可能性が考えられた。しかし、今回検討したキットの中には、複数のウイルス株に対して全体的に検出感度が低いキットも存在した。

イムノクロマト法を測定原理としたインフルエンザウイルスの検出は、A型およびB型の共通抗原とモノクローナル抗体との抗原抗体反応によるものであり、キット間の検出感度の比較においては、共通抗原である核内タンパク質を基準とするのが良いと考えられる。しかし、核内タンパク質の測定は手技的に困難であることから、感染価やHA価、コピー数等が感度の目安として用いられていることが多い。今回の比較に用いた各ウイルス液については、コピー数以外に他の測定法でも検討を行ったが、A型およびB型のいずれにおいてもコピー数とHA価に高い相関性が認められた。しかし、A型ではB型と比較してコピー数や感染価に対しHA価が低い傾向がみられた。今回のHA価の測定にはニワトリ赤血球を用いたが、由来となる動物種により血球凝集活性（HA価）が異なることが報告されていることから、HA価を基準とした比較の際には注意を要すると考えられた。

ロタウイルスの迅速診断キットについて、10%便乳剤で2倍階段希釈ウイルス液をロタウイルス腸炎の便検体に見立てて各キットの検出感度を検討した結果、キット間に差が認められたが、デバイスにアプライするウイルス量について詳細に検討する必要があると考えられた。

キットの性能は、添付文書では感染価やコピー数、ウイルス濃度など様々な測定法を用いて示されているため、添付文書のみではキット間の性能を

一概に比較することは困難である。今回は、同じウイルス株の培養液を10%便乳剤で2倍階段希釈し、その液を用いて各キットの性能について検討を行ったが、今後はウイルス液の定量を含めて、インフルエンザ迅速診断キットの比較で行ったのと同様の方法で詳細に条件設定を行った上で、検討する予定である。

## E. 結論

2013/14シーズンに臨床現場で多く用いられたインフルエンザ迅速診断キットにおいて、A型およびB型のいずれのウイルス株についても最小検出感度の差は  $10^1 \sim 10^2$  copies/test であり、以前に我々が行った検討結果と比較して、キット間の検出感度の差は小さかった。これはキット間の感度格差が小さくなったためか、あるいは臨床医の使用頻度が高い順に10キットを選択したことから、感度の高いキットがより多く臨床医に選択されている可能性が考えられた。

ロタウイルスの迅速診断キットの比較に関しては、今後は詳細な条件設定を行った上で、検討を行う予定である。

## 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

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  
(医薬品等規制調和・評価研究事業))  
分担研究報告書

国内風疹 IgG 測定キットの性能評価

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

国内風疹 IgG 測定キットの性能評価に用いるパネル血清の検索を行った。国立感染症研究所パネル血清 76 パネルのうち、44 パネルを使用することとしたが、うち陰性は 2、HI 価 8 以上 16 未満は 1 パネルであり、最も重要であると考えられるカットオフ付近のパネルが不足していた。そこで、新たに収集した候補血清も含めることとした結果、陰性は 6 パネルとほぼ十分数を確保できたが、HI 価 8 以上 16 未満は 2 パネルとまだ不十分であった。

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、44 名の CRS 患児が報告されている。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。従って風疹抗体価測定法の精度を維持することが重要である。日本では主に赤血球凝集阻止 (HI) 法で測定されていたが、近年、酵素免疫法 (EIA)、ラテックス免疫凝集法 (LTI) 等、様々な測定法によるキットが発売されており、値の表示法が異なっている。一方で、国外では陽性検出率や抗体価が測定キット間で大きく異なることが報告されていることから、国内で使用されているキットでの検証が急務となっている。

本研究では、風疹抗体測定用の体外診断薬キットの検査精度の維持および表示法の統一化を目的として、国内で承認されている抗風疹 IgG 測定キットの性能評価を行う。

B. 研究方法

本年度は、評価に用いるパネル血清の検索と

選定を行った。国立感染症研究所パネル血清として登録済みの 76 パネルのうち、使用可能なパネルを検索し、これらの抗体価の分布を調べ、使用パネルの整備を行った。

(倫理面への配慮)

パネル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」の承認を得ている。

C. 研究結果

国立感染症研究所パネル血清として登録している 76 パネルのうち、比較的数に余裕のあったのは 44 パネルであった。内訳は表 1 の通りで、最も重要であると考えられるカットオフ付近のパネルが不足していた (表 1)。そこで、今年度新たに収集した候補血清も含めることとした。その結果、陰性は 4 増え 6 パネルとほぼ十分数を確保できたが、HI 価 8 以上 16 未満は 1 増えたのみで合計 2 パネルとまだ不十分であった (表 2)。

D. 考察

国外では、陽性検出率や抗体価がキット間で大きく異なることが報告されており、国内の測定キットについても同じパネルを用いて性能を評価することが必要である。また、各キット

の測定法の相関を示し、適切に換算できるようにキット間での統一表示の指標を示すことができれば、臨床現場の混乱を防ぐ事ができると考えられる。

本年度、評価に用いるパネル血清の検索を行った結果、現在使用可能なパネルは 62 であり、最も重要であると考えられる陰性パネルは 6 と十分なパネル数となったが、HI 価 8 以上 16 未満は 2 とまだ不十分であった。

## E. 結論

診断キットの性能を評価する上で、カットオフ付近のパネルは重要であることから、来年度再度血清を収集し、パネル補完後、各測定キットの性能評価を行う。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sakata M, Otsuki N, Okamoto K, Anraku M, Nagai M, Takeda M, Mori Y : Short Self-interacting N-terminal Region of Rubella Virus Capsid Protein Is Essential for Cooperative Actions of Capsid and Nonstructural p150 Proteins. *J. Virol.* 2014
- 2) Abo H, Okamoto K\*, Anraku M, Otsuki N, Sakata M, Icenogle J, Zheng Q, Kurata T, Kase T, Komase K, Takeda M, Mori Y: Development of an improved RT-LAMP assay for detection of currently circulating rubella viruses. *J Virol. Methods* 24;207C:73-77. 2014. (\* corresponding author)
- 3) 岡本貴世子、森嘉生 先天性風疹症候群の予防と風疹抗体価の推移 検査と技術 42: 464-469 2014.

### 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 使用可能な国立感染症研究所登録  
パネル血清

HI 価 (参考値)	使用可能パネル数
<8	2
8 以上 16 未満	1
16 以上~32 未満	12
32 以上~64 未満	12
64 以上~128 未満	9
128 以上~256 未満	5
256<	3

表 2 現在使用可能なパネル血清

HI 価 (参考値)	使用可能パネル数
<8	6
8 以上 16 未満	2
16 以上~32 未満	14
32 以上~64 未満	15
64 以上~128 未満	15
128 以上~256 未満	7
256<	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  
(医薬品等規制調和・評価研究事業))  
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

A 型インフルエンザの亜型鑑別を可能とする免疫クロマト迅速診断キットは実用化されていない。しかし、亜型間で病原性や薬剤耐性ウイルスの発生率が異なる例が過去にあったこと、さらに新型インフルエンザ発生時には季節性と新型ウイルスの亜型鑑別が必要になることを考慮すると、現行の A 型と B 型の鑑別にとどまらず、A 型内での亜型鑑別を可能とする迅速診断キットの開発が望ましい。2014/2015 シーズンに流行した H3 亜型鑑別キットへの応用を目指し、本研究では H3 抗体パネルの中から、亜型特異性と検出感度に優れた抗体セットの特定を試みた。その結果、H3 亜型内の複数の抗原変異株を検出する一方、H1 や H7 亜型には交差しない抗体セットを特定することに成功した。さらに、この抗体セットは、現行の免疫クロマト迅速診断キットに使用されている NP 抗体とほぼ同程度の検出感度を有していた。以上の結果から、本研究で特定した抗体セットは、H3 亜型特異性と検出感度に優れており、今後、H3 亜型鑑別を可能にする免疫クロマト迅速診断キットへの応用が期待される。

### A. 研究目的

A 型インフルエンザの簡易な亜型鑑別法は、臨床現場での需要が見込まれるものの、これまで実用化には至っていない。実現のためには、亜型特異性と検出感度に優れた HA 抗体の作出が必要不可欠である。本研究では、昨年度作製した抗体パネルの中から、2014/2015 年シーズンに流行した H3 亜型の鑑別を可能とする亜型特異性ならびに検出感度を有する抗体セットの特定を目的とする。

### B. 研究方法

#### (1) ウイルス抗原の調製

H1N1 ウイルス株として、A/Puerto Rico/8/34 (PR8)株を使用した。H7N9 ウイルス株として、リバースジェネティクスにより内部タンパクを PR8 由来に置き換えた H7N9 株を使用した。H3N2 株として、PR8 由来の内部タンパクを有する X31 株と、その抗原変異株として A/Uruguay/716/07 株を使用した。各ウイルスを発育鶏卵

で増幅した後、ショ糖密度勾配遠心法で精製し、0.05%ホルマリンで不活化した。

#### (2) サンドイッチ ELISA によるウイルス抗原の検出

免疫クロマトキットと同様、2種類の抗体を用いたサンドイッチ法により、ウイルス抗原の検出感度を検討した。まず、一次抗体を ELISA プレートにコーティングした後、1% BSA によりブロッキングした。一次抗体に、段階希釈したウイルス抗原を添加し培養した後、ビオチン標識した二次抗体を添加した。最終的に、ペルオキシダーゼ標識したストレプトアビジンを添加し、ウイルス抗原を検出、定量した。

#### (3) ELISA による抗原認識部位の検証

HA2 ペプチド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、サンプル抗体を添加した。プレートに結合した抗体は、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) H3 亜型鑑別用抗体の特異性の検証

A 型インフルエンザウイルスは、ヘマグルチニン (HA) の構造に基づいた 18 種類の亜型が存在する。その中には、季節性 H1、H3 亜型や、新型インフルエンザへの変異が危惧されている H7 亜型等が含まれる。H1 と H3 亜型間で病原性や薬剤耐性の発生率が異なる例が過去にあったこと、さらに新型インフルエンザ発生時には季節性と新型ウイルスの鑑別が必要になることを考慮すると、現行の A 型と B 型の鑑別にとどまらず、A 型内での亜型鑑別を可能とする迅速診断キットの開発が望ましい。本研究では、2014/2015 シーズンに流行した H3 亜型鑑別キットの開発を目指し、優れた亜型特異性と検出感度を有する抗体の特定を試みた。

まず、昨年度作出した 6 種類の H3 抗体の中から、予備実験により結合性の優れた 2 つの抗体を選択した。この抗体セットの H3 亜型特異性を検証するため、複数のウイルス株をサンドイッチ ELISA に供し、検出の可否を比較した。まず、抗原性の大きく異なる 2 種類の H3 亜型ウイルスと、H3 亜型と同じグループの H7 亜型ウイルス、そして同じ季節性ウイルスである H1 亜型ウイルスを用いて解析した。その結果、この抗体セットを使用すると、2 種類の H3 亜型ウイルスを高感度で検出可能なことが判明した。この 2 種類の H3 型ウイルスは、同一亜型としてはアミノ酸相同性が低く (87%以下)、抗原性が大きく異なるウイルスである。このことから、この抗体セットは H3 亜型内の抗原変異に寛容であると判断した。さらに、同条件で H7 や H1 亜型ウイルスは検出限界以下であることから、H3 亜型の鑑別が可能な抗体セットであると考えられた。

### 2) H3 亜型鑑別用抗体の検出感度の検証

次に、現行の迅速診断キットで使用されている NP 抗体を対照とし、検出感度の比較を行った。すると、これら 2 種類の H3 亜型に結合する抗体は、NP 抗体と同程度の感度でウイルスを検出可能であることが明らかとなった。

### 3) H3 亜型鑑別用抗体の抗原認識部位

最後に、これら 2 種類の抗体の HA 抗原認識部位を検証した。従来の HA 抗体のほとんどは HA1 領域に結合する。しかし、抗原変異に寛容であることから、この抗体セットは抗原変異が起きづらい領域に結合することが予想される。そこで、抗原変異が起きづらい HA2 のアミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、この抗体セットが結合するか否かを検証した。すると、どちらの抗体も H3 亜型の HA2 に結合する一方で、対照とした H1 亜型の HA2 には結合しないことが判明した。以上の結果から、これら抗体は H3 の HA2 を認識することが明らかとなった。

## D. 考察

HA 抗体を用いた免疫クロマト迅速診断キットは、検出感度等の要因から、亜型鑑別用のキットとして臨床現場で広く普及するには至っていない。その要因として、用いた HA 抗体の特異性や検出感度が十分でなかった可能性が考えられる。これまで親和性と特異性に優れた複数のマウス H3 モノクローナル抗体を我々は作出しており、本年度の研究では、この抗体パネルの中から、H3 亜型への特異性と検出感度に優れた抗体セットを特定するに至った。今後、鼻腔拭い液等を用いて、現行のキットと検出感度や特異性を比較する必要がある。

## E. 結論

H3 亜型特異性と検出感度に優れた抗体セットを特定した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Nakauchi, M., Takahashi, Y., Onodera, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matsumura, T., Ato,

- M., Kobayashi, K., Shimotai, Y., Mizuta, K., Hongo, S., Tashiro, M., Nobusawa, E. 2014. Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of A/(H1N1)pdm09 Virus by Using Monoclonal Antibody Escape Mutants. J. Virol. 88: 12364-12373.
2. 安達悠、高橋宜聖、阿戸学 2014. インフルエンザワクチンの免疫原性と抗原エピソード 感染症免疫 44: 22-31.
2. 学会発表
1. Takahashi, Y., Ato, M., Adachi, Y. B cell pathways for protective memory responses against influenza virus infection. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara (奈良、9月)
2. Adachi, Y., Inoue, T., Kurosaki, T., Ato, M., Takahashi, Y. Persistent local germinal centers select cross-reactive antibody into immunological memory following influenza virus infection. 第43回日本免疫学会(京都、12月)
3. Onodera, T., Adachi, T., Tsubata, T., Kurosaki, T., Adachi, Y., Ato, M., Takahashi, Y.: CD273+ memory B cells replenish bone marrow plasma cells in the steady state after influenza vaccination. 第43回日本免疫学会(京都、12月)
4. 佐藤佳代子、浅沼秀樹、高橋宜聖、阿戸学、小田切孝人、板村繁之：剤形の異なるインフルエンザワクチンにより誘導される抗体の性状に対するTLRアゴニストの影響 第18回日本ワクチン学会学術集会(福岡、12月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況**
- |           |      |
|-----------|------|
| 1. 特許取得   | 出願予定 |
| 2. 実用新案登録 | なし   |
| 3. その他    | なし   |
- 利益相反の開示**
- EpiVax社と秘密保持契約を締結し、HA塩基配列に関する情報提供を受けた。

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  
(医薬品等規制調和・評価研究事業))  
分担研究報告書

培養細胞発現系を用いた HBs 抗原測定用体外診断薬評価系の構築

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：**培養細胞での HBs 抗原発現系を用い、培養上清の測定による HBs 抗原検出系の評価を行った。遺伝子型 A-H 株のコンセンサス株、遺伝子型 A, B, C 株でワクチンエスケープ変異を持つ株、国内の B 型肝炎症例から得られた HBV 株で HBs 領域に変異を持つ株それぞれの HBs 抗原を発現するベクターを構築し、培養細胞に導入後に上清中の HBs 抗原量を、3つの HBs 抗原検出系を用いて測定を行った。その結果、遺伝子型に依存した検出能の差は明らかではなかったが、ワクチンエスケープ変異を含む HBs 領域の変異による試薬間の測定値の乖離が認められ、これらの検体では試薬によって HBs 抗原検出能に差が有る可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

B 型肝炎ウイルス (HBV) はヘパドナウイルス科に属する DNA ウイルスであり、主に肝臓で増殖し肝炎を起こす。感染者の血液や体液などを介して感染し、全世界に 4 億人以上の感染者がいて推定されている。成人期の感染では肝炎は一過性で収束することが多いが、分娩時や幼少期での感染では持続感染を引き起こすことが知られている。この HBV 感染の検出には、その表面抗原である HBs 抗原の検出系が用いられ、現在国内では定性試薬、定量試薬を含め多くの診断薬が使用可能である。近年、HBs 抗原測定系の高感度型定量系が開発され、HBs 抗原は感染の確認のみでなくウイルス増殖の指標や治療効果予測にも用いられるようになってきている。

国立感染症研究所では平成 13 年に厚生労働省の依頼により HBs 抗原検出用試薬の性能評価を行った。その結果、検出感度が不十分な試薬が幾つか指摘され、これらの試薬については自主的な販売中止が行われている。その後 10 年以上が経過し、性能評価後に発売された試薬もあり、また測定方法が異なるものも発売されているため、再調査の必要性が指摘されている。しかし、多くの診断薬を対象とした性能評価で

は、多量の HBV 陽性の検体が必要となる。また、現在蔓延している HBV 株を含む臨床検体の評価では、今後国内に侵淫してくる可能性がある稀な遺伝子型株検出能の評価が難しいという問題点もある。そこで本研究では、HBV 各遺伝子型のコンセンサス株を含む多くの株の HBs 抗原発現コンストラクトを構築し、それらの導入細胞の培養上清を用いることで、HBs 抗原検出用試薬の評価を行った。

#### B. 研究方法

HBV 配列情報データベースより得た配列を用いて遺伝子型 A-H 株それぞれの HBs 領域のコンセンサス配列を持つコンストラクトを作製した。このコンストラクトは HBs 抗原をコードする領域の上流に EF プロモーターを持ち、肝細胞に導入することで HBs 抗原を発現するように設計されている。さらに国内で感染者の多い遺伝子型 A, B, C 株のコンセンサス HBs 抗原発現ベクターについては、ワクチンエスケープ変異として知られている T/I126S と G145R の変異を持った株の HBs 抗原発現ベクターも作製した。また国内の B 型肝炎症例から得られた HBV 株で S 抗原領域に変異を持つもの 22 株を選択し (遺伝子型 A ; 5、遺伝子型 B ; 7、遺伝子型 C ; 10)、