

インフルエンザウイルス抗体価測定に関する問題点
—2006/07 シーズンワクチン株 A/広島/52/2005 (H3N2) の
非特異的凝集抑制物質 (nonspecific inhibitor)
感受性に関する検討—

¹⁾ 大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学, ²⁾ 大阪府立公衆衛生研究所感染症部,

³⁾ 医療法人相生会九州臨床薬理クリニック

前田 章子¹⁾ 森川佐依子²⁾ 加瀬 哲男²⁾
入江 伸³⁾ 廣田 良夫¹⁾

(平成 23 年 12 月 5 日受付)

(平成 24 年 4 月 3 日受理)

Key words: influenza virus, hemagglutination inhibition test, nonspecific inhibitor

要 旨

インフルエンザウイルスに対する血清反応, 即ち抗体価測定に赤血球凝集抑制 (HI) 抗体や中和 (NT) 抗体測定が汎用されている。しかし, ヒトや動物血清中にはインフルエンザウイルス赤血球凝集素と反応する非特異的凝集抑制物質 (nonspecific inhibitor: 以下, インヒビター) が存在し, 抗体価測定の手技上, これらの物質を除去する前処理が必要である。インヒビターはその構成成分から α , β , γ 型に区別され, 通常ヒト血清中に含まれるインヒビターはムコイドを主成分とする α 型インヒビターが多く, RDE (Receptor Destroying Enzyme) 処理法で除去され, これが標準として採用されている。一方, ウイルスのインヒビター感受性は変異を生じることがあり, このようなウイルスを測定抗原に使用する場合は新たなインヒビター除去法について検討が必要である。

本報告は, 2006/07 インフルエンザシーズンのワクチン含有株 A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスがインヒビター感受性に変異を生じていたこと, その後の抗体価測定についての対応を報告するものであり, 同時に今後の血清反応の精度管理について注意を促すものである。

[感染症誌 86: 400~404, 2012]

序 文

インフルエンザウイルスに対する抗体価測定法として赤血球凝集抑制 (HI) 反応や中和 (NT) 反応, 補体結合 (CF) 反応, 抗ノイラミニダーゼ抗体測定などが確立されている。通常, 感染の診断や血清学的なサーベイランス, ワクチン接種による免疫応答を検討するなどの抗体価測定には HI ないしは NT 抗体価測定が用いられる。なかでも HI 抗体価測定は簡便性, 経済性から汎用されている。

一般に動物血清中にはインフルエンザウイルスのレセプター物質でもあるシアル酸配列をもつ物質が含ま

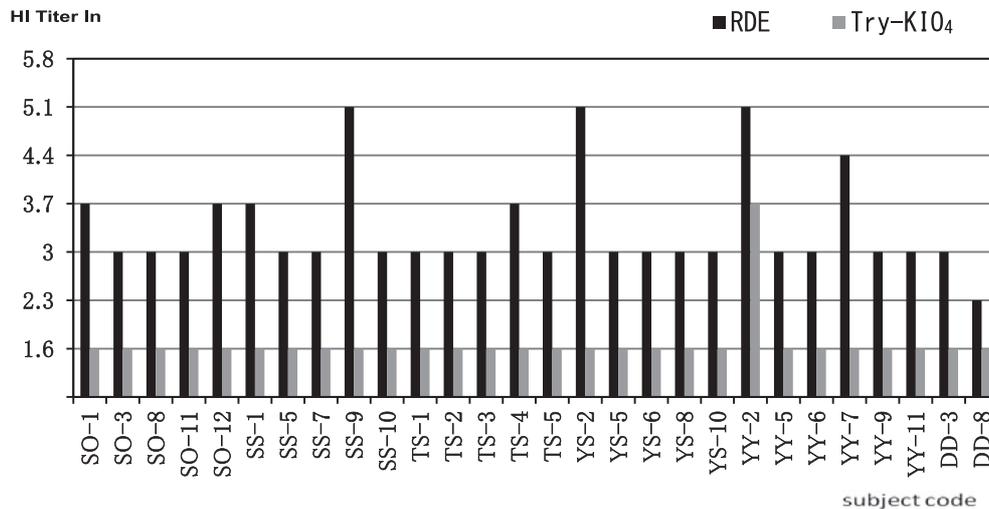
れており, この物質がウイルスに対する非特異的凝集抑制物質 (nonspecific inhibitor) として作用することは古くから報告されている¹⁾。これらの非特異的凝集抑制物質 (以下, インヒビター) は物質の構成成分から α , β , γ 型に区別され, ウイルス (HA 抗原) に対する抗体価を測定する場合, これらのインヒビター除去処理, 即ち血清の前処理が必要である。特にヒト血清中にはムコイドを主成分とする α 型インヒビターを含むことが多い²⁾。ヒト血清の前処理としてコレラ菌培養濾液から作製した粗製 RDE (Receptor Destroying Enzyme) を用いる処理法³⁾が試行されて以来, 1959 年には WHO でも検討され⁴⁾, その後 RDE が製品化されるに至って (デンカ生研: 東京) 主に RDE 処理法が現在の標準法として用いられている⁵⁾。

別刷請求先: (〒545-8585) 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3

大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学

前田 章子

Fig. 1 Hemagglutination inhibition (HI) antibody titers against influenza A/Hiroshima/52/2005 (H3N1) virus following removed of nonspecific inhibitors (by treatment with receptor-destroying enzyme (RDE) or trypsin-KIO₄ (Try-KIO₄) (age of subjects 6 ~ ≤ 11month)



一方、インフルエンザウイルスはさまざまな抗原変異を生じるが、インヒビター感受性にも変異を生じることがある。このような変異が生じたウイルスを測定抗原として抗体価を測定する場合には、被検血清のインヒビター除去法に注意を払わないと正確な抗体価の測定は不可能であり、最終的に総合的な結果にまで影響を及ぼすことがある。

また、インフルエンザウイルスは人獣共通の病原体であり、ヒトやヒト以外の動物血清を取り扱う機会も増えることも予想される。従って、インヒビター除去法については留意すべき点でもある⁵⁾。

本報告は、2006/07 インフルエンザシーズンにワクチン接種による免疫応答を検討した際、当該年の含有ワクチン株である A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスがインヒビター感受性変異を生じていたことを見出し、その後の対応について報告するものである。

対象と方法

1. 対象

2006/07 インフルエンザシーズン、ワクチン接種による免疫応答を検討するため、接種前、接種約 4 週後に採血し、一部外部依頼による測定も含め HI 抗体価を測定した⁶⁾。本報告の対象は、その測定に用いた後 -20℃ に凍結保存した血清を再試験に供したものである。

2. インヒビター (除去) 処理法

抗体価測定前のインヒビター除去処理法として、RDE (デンカ生研)、トリプシン: Trypsin (Difco 1:250)、過ヨード酸カリ: KIO₄ (SIGMA) を単独、または併用した。詳細な手順を以下に示す⁷⁾。

(1) RDE 処理法 (以下 RDE 処理)

- ①血清 1 容に RDE 3 容を加える。
- ② 37℃ 一夜 (18 時間) 静置する。
- ③ 56℃ 1 時間非働化する。

④リン酸緩衝食塩水: PBS 6 容を加える。(1:10 希釈検体)

(2) トリプシン-過ヨード酸カリ処理法 (以下 Try-KIO₄ 処理)

①血清 1 容に 0.8% Trypsin 1 容を加え、56℃ 45~60 分加熱する。

②冷却後、1/90M KIO₄ 3 容を加え、室温 45~60 分静置する。

③ 1% グリセロール加食塩水 3 容を加える。

④ PBS 2 容を加える。(1:10 希釈検体)

(3) 過ヨード酸カリ処理法 (以下 KIO₄ 処理)

①血清 (非働化済) 1 容に 1/90M KIO₄ 3 容を加える。

②室温 45~60 分静置する。

③ 1% グリセロール加食塩水 3 容を加える。

④ PBS 3 容を加える。(1:10 希釈検体)

(4) トリプシン処理法 (以下 Try 処理)

①血清 1 容に 0.8% Trypsin 1 容を加え、56℃ 45~60 分加熱する。

②冷却後に PBS 8 容を加える。(1:10 希釈検体)

処理後、測定に使用する赤血球沈渣を加え、4℃ 60 分静置した後遠心し非特異的赤血球凝集因子を除去、上清を測定用検体とする。

3. 赤血球凝集 (HA) および同抑制 (HI) 反応

測定抗原として A/広島/52/2005 (H3N2), A/New

Fig. 2 Distribution of HI Antibody to Influenza A/Hiroshima/52/2005 (H3N1) Antigen treated with RDE and Trypsin-KIO₄ to remove non-specific inhibitors (age of subjects 5 ~ 15 year)

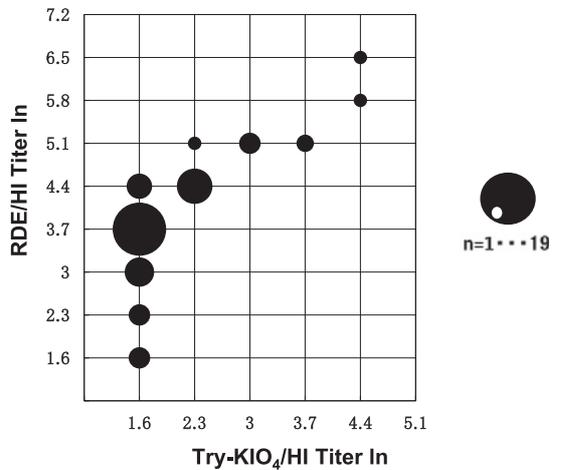
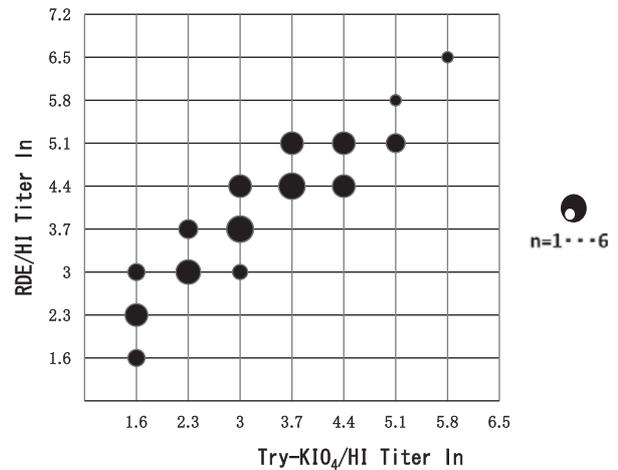


Fig. 3 Distribution of HI Antibody to Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) Antigen treated with RDE and Trypsin-KIO₄ to remove nonspecific inhibitors (age of subjects 5 ~ 15 year)



Caledonia/20/99 (H1N1) (デンカ生研体外検査試薬)を使用した。赤血球はヒトO型血球 (0.7%) を用い、定法に従った⁷⁾。

倫理的配慮

本研究に使用した検体は、倫理的配慮のもと、研究班 (厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 平成19年度 インフルエンザをはじめとした各種の予防接種の政策評価に関する分析疫学研究 主任研究者 廣田良夫) により実施された被検血清についての再測定である。

成績

- 2006/07 シーズンワクチン株 A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスがインヒビター感受性に変異を生じた株と判断した経過

外部依頼検査にて定法の前処理、即ち RDE 処理により測定された抗体価の結果を得た⁶⁾。その結果では、0 歳児 (6~11 カ月児 n=64) の A/広島/52/2005 (H3N2) 株に対するワクチン接種前の HI 幾何平均値は 1:15 (検出限界以下は 1:5 (ln 1.6) で算定)、抗体価 \geq 1:40 (ln 3.7) の保有割合は 13% (8/64) であった⁶⁾。

対象年齢層に過去のワクチン接種歴はなく、移行抗体残存の可能性が考えられる。しかし、その出現頻度からみて HI 抗体価測定上の手技的な問題、即ち RDE 処理で A/広島/52/2005 (H3N2) 株に対するインヒビターが充分除去されていない可能性を疑った。

- 2006/07 シーズンワクチン株 A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスのインヒビター感受性について検討

成績 1. の測定結果を得た対象のうち、抗体価 \geq 1:10 (ln 2.3) を示した 28 例の保存血清を改めて RDE

処理と Try-KIO₄ 処理を併用し再度測定した。結果が Fig. 1 である。両処理により抗体価を検出したものは 1 例のみであり、その他は全て Try-KIO₄ 処理で検出限界以下 ($<1:10$; ln 1.6) となった。従って、A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルス抗原に対する抗体価測定には RDE 処理によるインヒビター除去で不充分であり、測定抗原として使用した当該ウイルスのインヒビター感受性に変異が生じていることが示唆された。

- 2006/07 シーズンワクチン株 A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスのインヒビター感受性変異について

他の年齢層 (5~15 歳) のワクチン接種前後の対血清 (n=51) について RDE, Try-KIO₄ 処理を併用し HI 抗体価を測定した。接種前の被検血清について両処理間における抗体価の頻度分布を Fig. 2 に示した。この図から RDE 処理で除去不十分なインヒビターが影響する測定域を検出するために RDE 処理による抗体価を層化し、両処理間の抗体価分布の相関を求めた。 $\geq 1:40$ (ln 3.7) 群 (n=39) では 0.66 ($p < 0.001$) の相関係数が得られたが、 $\leq 1:20$ (ln 3.0) 群 (n=12) に相関は認めがたく (n. d.)、後者で RDE 処理により除去不十分なインヒビターが Try-KIO₄ 処理で除去されたことが示唆された。即ち、RDE 処理で充分除去されないインヒビターは抗体価として比較的低い値で測定される可能性があるとして推定された。

さらに、この対象について、処理別にワクチン接種による免疫応答、即ち A/広島/52/2005 (H3N2) 抗原に対する接種前後の抗体応答割合 (4-fold rise) を比較した。RDE 処理で 10/51 (20%)、Try-KIO₄ 処理で 18/51 (35%) となり、両処理間での抗体応答割合

Table 1 Distribution of HI antibody titers to influenza A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) antigen treated with RDE, Trypsin-KIO₄, Trypsin and KIO₄ to remove non-specific inhibitor (age of subjects 5 ~ 15 year)

RDE	Try-KIO ₄				Try				KIO ₄					
	1.6	2.3	3	3.7	1.6	2.3	3	3.7	1.6	2.3	3	3.7	4.4	5.1
HI Titer ln	1.6	2.3	3	3.7	1.6	2.3	3	3.7	1.6	2.3	3	3.7	4.4	5.1
1.6	1				1				1					
2.3										4				
3	4				4						10	3		
3.7	13				13							6	3	
4.4	4	5			7	2							3	
5.1		1	1	1		2	1						1	2

に有意水準 5% で差を認めた. (Mc Nemar test $> \chi^2$ (0.05))

4. 他のワクチン含有抗原についてインヒビター感受性の検討

前述の両処理被検血清について, 当該年ワクチン株に含有される A/New Caledonia/20/99 (H1N1) ウイルス抗原に対する抗体価も同時に測定した. 接種前の抗体価について両処理による頻度分布を Fig. 3 に示す. 両群間での相関係数は 0.88 ($p < 0.001$) であった. この結果, A/New Caledonia/20/99 (H1N1) 抗原に対する抗体測定は定法の RDE 処理でインヒビターが除去され, この測定抗原ウイルスのインヒビター感受性は変異が生じていないことが推察された.

5. A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスのインヒビター感受性変異の特性について

前述の結果から, A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスのインヒビター感受性は α 型から他の型に変異していることが示唆された. そこで α , β , γ 型いずれのインヒビターに感受性を示す変異か, さまざまな除去処理を行い検討した. 対象として接種前被検血清 30 例を前述の 2 種類の処理法に加え Try および KIO₄ 単独処理により抗体価を測定した. その処理別抗体価分布を Table 1 に示す. RDE 処理抗体価とその他の処理による抗体価の頻度分布を比較すると, Try-KIO₄ 処理, Try 単独処理は同じ傾向を示し, 文献 2) を参照にすると, A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスは β 型インヒビターに感受性を示すように変異した可能性が示唆された.

考 察

インフルエンザウイルスの血清反応, 特に赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価測定には, 測定抗原に対するインヒビターを除去するために被検血清の前処理が必要とされる. 通常ヒト血清に含まれるインヒビターは, その構成成分から α 型が多く, RDE 処理が定法として使用されている²⁾. しかし, 時としてインフルエンザウイルスのインヒビターに対する感受性に変異を生ずることがあり, この場合には定法外の対応が求められる. 本報告は 2006/07 インフルエンザシーズンのワ

クチン含有株 A/広島/52/2005 (H3N2) ウイルスがインヒビター感受性に変異を生じていると判断し, 検討した成績である. 定法の RDE 処理で充分除去されないインヒビターとの反応は測定値としては低値を示すものに多いと考えられる. 従って, 抗体の値が高い場合は測定上の希釈効率により最終的な測定値にほとんど影響しないこともあり得る. しかし低い抗体価レベルを判断基準として抗体の有無や保有割合, 対血清で免疫応答割合などを比較する場合, 結果に影響を与えることが想定される.

また新型インフルエンザ A (H1N1) pdm09 ウイルスに対する中和 (NT) 抗体測定にもインヒビター処理 (RDE 処理) が必要との報告もある⁸⁾. 高病原性 AH5 N1 ウイルスに対する血清反応のインヒビター処理については, 1997 年香港での発生時, CDC を中心に HI と NT の感度比較のための血清反応が実施され, ヒト血清, 動物免疫血清 (フェレット, ヤギ) を RDE 処理により測定したことが報告されている⁹⁾. このウイルスについては, その後も, ワクチンの免疫応答に関する報告も含め, 反応の感度を問題としていることが多く, NT ないしは ELISA 反応が多用され, 特にインヒビター感受性について問題は提起されていない.

また, 手技上の具体的な問題として温度感受性のインヒビターの存在がある. この影響を避けるために, 著者らは常に処理血清を測定する際には加熱処理 (56° 30 分又は 60° 2 分) を加えている²⁾. さらに, 凍結保存した血清は抗体価の変動を考慮して 2 回以上の凍結保存は避けるのが望ましい.

さらに, インフルエンザが人獣共通疾患として取り上げられる現在, ヒトやヒト以外の動物血清, 例えばブタ, トリを対象として侵淫状態を把握し, 感染拡大の予測や阻止する資料を得るためになどに血清反応を施行する必要性も増加するであろう. 従って測定する血清の動物種, ウイルスの変異も考慮し, 精度管理の一部として, 測定に用いるウイルス抗原のインヒビター感受性について注目することが必要と考える.

謝辞: 本研究において協力頂いた 一般財団法人 阪大微生物病研究会に深謝します. なお, 本研究は平

成 19 年度厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業 インフルエンザをはじめとした、各種の予防接種の政策評価に関する分析疫学研究として行われた。

(非学会員共同研究者：菅野恒雄；菅野小児科医院(盛岡市)，廣井 聡；大阪府立公衆衛生研究所感染症部，大藤さところ；大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学)

文 献

- 1) Shortridge KF, Lansdell A : Serum inhibitors of A2-Hong Kong influenza virus haemagglutination. *Microbios* 1972 ; 6 (24) : 213—9.
- 2) 国立予防衛生研究所学友会編：インフルエンザウイルス. ウイルス実験学各論. 丸善, 東京, 1968 ; p. 40—5.
- 3) Tyrrell D, Horsfall F Jr : A procedure which eliminates nonspecific inhibitor from human serum but does not affect specific antibodies against influenza viruses. *J Immunol* 1952 ; 69 : 563—74.
- 4) WHO Expert Committee on Respiratory Virus Diseases 1959.
- 5) WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance 2002.
- 6) 入江 伸, 大藤さところ, 伊藤一弥, 前田章子, 高見沢明久, 廣田良夫, 他：乳幼児におけるインフルエンザワクチンの免疫原性に関する研究 (2). 厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等・再興研究事業) 平成 22 年度 総括・分担研究報告書. 2011 ; 205—13.
- 7) 国立予防衛生研究所学友会編：オルソミクソウイルス. 改訂 2 版ウイルス実験学各論. 丸善, 東京, 1982 ; p. 287—330.
- 8) Lerdsamran H, Pittayawonganon C, Pooruk P, Mungaomklang A, Iamsirthaworn S, Puthavathana P, *et al.* : Serological response to the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus for disease diagnosis and estimating the infection rate in Thai population. *Plos ONE* 2011 ; 6 : e16164.
- 9) Rowe T, Abernathy R, Hu-primmer J, Thompson W, Cox N, Katz J, *et al.* : Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *J Clin Microbiol* 1999 ; 37 (4) : 937—43.

Characterization of a Nonspecific Inhibitor Found in Human Sera Raised Against the 2006/07 Influenza Vaccine Strain A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) Virus

Akiko MAEDA¹⁾, Saeko MORIKAWA²⁾, Tetsuo KASE²⁾, Sin IRIE³⁾ & Yoshio HIROTA¹⁾

¹⁾Department of Public Health, Osaka City University, Faculty of Medicine,

²⁾Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health,

³⁾Medical Co. LTA Clinical Pharmacology Center

The serology of influenza viruses typically uses hemagglutination inhibition (HI) or the neutralization test (NT). However, the sera of many humans and animals contain nonspecific inhibitors of hemagglutinin that must be inactivated or removed from the serum before use in the HI assay. Any nonspecific inhibitor in human serum is typically inactivated by pre-treatment with receptor-destroying enzyme (RDE). However, during the 2006/07 influenza circulating season, we observed that influenza vaccine strain A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) exhibited susceptibility to an RDE-resistant inhibitor in human serum. We report herein on a preliminary characterization of this inhibitor, including the development of a novel inhibitor-inactivating technique for pre-treatment of human serum to be used for HI with the A/Hiroshima/52/2005 (H3N2) virus.