

平成10年度 厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

研究報告書

接触及び血液由来感染症の
防御対策に関する研究

国立感染症研究所

接触及び血液由来感染症の防御対策に関する研究

平成10年度 研究組織

主任研究者

小室勝利 国立感染症研究所 安全性研究部 部長

分担研究者

宮村達男 国立感染症研究所 ウイルス第二部 部長

田代真人 国立感染症研究所 ウイルス製剤部 部長

渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌部 部長

荒川宜親 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 部長

岡田義昭 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長

水澤左衛子 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 主任研究官

岩崎琢也 国立感染症研究所 感染病理部 室長

阿部賢治 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

関口定美 北海道赤十字血液センター 所長

佐藤博行 福岡赤十字血液センター 副所長

協力研究者

鈴木哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 主任研究官

松浦義治 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

小浜友昭 国立感染症研究所 ウイルス製剤部 室長

塚野尋子 国立感染症研究所 細菌部 室長

倉田 毅 国立感染症研究所 感染病理部 部長

谷口貴代美、 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

旭 泰子 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

山本あつ子 三井記念病院 小児科 科長

池淵研二 北海道赤十字血液センター 副所長

阿部英樹 北海道赤十字血液センター研究部 研究員

目 次

1. 総括研究報告書	主任研究者	小室勝利	1-3 頁
2. 分担研究報告書			
(1) TTウイルス ORF1/ORF2 蛋白質の同定と機能解析		宮村達男	4-7 頁
(2) 生物製剤品質保証における国の役割に関する研究		田代真人	8-9 頁
(3) 血液製剤からY. enterocoliticaの検出		渡辺治雄	10-13 頁
(4) 血液製剤による細菌感染の防御に関する研究		荒川宜親	14-16 頁
(5) パルボウイルスの感染性の検討		岡田義昭	17-19 頁
(6) 非 A ~ G 型肝炎に関する研究		水澤左衛子	20-22 頁
(7) HCV、CMVに関する研究		岩崎琢也	23-26 頁
(6) 日本人由来G型肝炎ウイルス全長遺伝子の		阿部賢治	27-30 頁
(7) 血液成分のウイルス、細菌除去、不活化法の開発		関口定美	31-34 頁
(10) パルボウイルスに関する研究		佐藤博行	35-36 頁
3. 関連研究の学会報告および論文掲載 分担報告書に記載			

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書
接触及び血液由来感染症の防御対策に関する研究

主任研究者 小室勝利 国立感染症研究所 安全性研究部 部長

研究要旨

接触及び血液由来感染症の防御対策に役立てるため、現在問題となっている、又将来取り組む必要のある感染症として、HCV,HGV,非A～G型肝炎、パルボウイルス、ヘルペスウイルス群、エルシニア菌を主に、診断法（特にPCR法）の開発、改良標準となるベクターの整備を行うとともに、現在ウイルス、細菌の除去不活化の実施されていない血液成分製剤のウイルス、細菌除去不活化法の開発研究を行い以下の結果を得た。

- 1) 日本人由来のG型肝炎ウイルス(HGV)を分離、クローニングを行いその構造を決定した。分子疫学的にはアジア型に属していた。
- 2) 非A～G型肝炎として分類されるTTVのウイルス蛋白構造を決定し、検出法としての免疫沈降法及びウエスタンブロット法を開発した。
- 3) TTVの血漿分画製剤中への混入状況を検討したところ、凝固第Ⅷ因子、フィブリノーゲン製剤には高率に混入していることが分かった。
- 4) HHV6,HHV7,CMV,につき、血液細胞中、血漿中のウイルスゲノム検出法としてのsingle PCR法の改良、結果の再現性、増幅産物の性状につき検討し、本法の有効性を確認した。
- 5) パルボウイルスの核酸増幅法の開発とともに、ウイルスの感染能を検出する培養細胞系及びヒト末梢血幹細胞(CFU-E)を用いた感染系を確立した。
- 6) 血中エルシニア菌検出法として、マルチプレックスプライマーを用いたPCRによる迅速診断法の実用化にむけた検討を行った。コスト、操作法等、スクリーニング使用上の改良の必要性が示唆された。
- 7) 新鮮凍結血漿中に混入するウイルス不活化法として、メチレンブルーと光照射を併用する方法が、血漿の凝固因子活性を損なうことなく応用できることをHIVをモデルとして確認した。
- 8) 輸血用血液製剤の細菌汚染対策、品質保証法に関する方法につき、その対処法につき考察した。

分担研究者

宮村達男	国立感染症研究所	ウイルス第二部 部長
田代真人	国立感染症研究所	ウイルス製剤部 部長
渡辺治雄	国立感染症研究所	細菌部 部長
荒川宜親	国立感染症研究所	細菌・血液製剤 部 部長
岡田義昭	国立感染症研究所	細菌・血液製剤 部 室長
水澤左衛子	国立感染症研究所	細菌血液製剤部 主任研究官
岩崎琢也	国立感染症研究所	感染病理部室長
阿部賢治	国立感染症研究所	感染病理部 主任研究官
関口定美	北海道赤十字血液センター	所長
佐藤博行	福岡赤十字血液センター	副所長

A. 研究の目的

接触感染症(STD)及び輸血後感染症の防御対策に役立てることを目的に、現在問題の多い、又は治療の進歩に伴い新たに問題となり得るウイルス、細菌に対する診断法（特に核酸増幅法：NAT法）の開発、改良、そのための標準品の整備、管理交付体制の確立、現在不活化処理の行われていない血液成分製剤の安全性向上のためのウイルス、細菌の除去不活化法の開発を行う。

B. 研究方法と結果

1. 日本人由来G型肝炎ウイルス全長遺伝子のクローニングと変異速度の解析

G 型肝炎ウイルス(HGV)の全長ウイルスをクローニングし、その分子ウイルス学的特徴を明らかにし、HGV 感染の意義及び検出法につき検討した。

日本人肝疾患患者血清由来 HGV を分離(HGV-IH71)した。HGV-IH71 は、2873 個のアミノ酸をコードする polyprotein と、458nt と、310 nt より成る 5'-UTR と 3'-UTR を有していた。既知の GBV-C/HGV 株と比較すると、塩基レベルで西アフリカ株とは 81.1%、米国株とは 85.1%、日本人株とは 86.5%の相同性を有していた。同一患者血清から 1 2 年前に分離された HGV 遺伝子の比較から、その変異速度は 0.8×10^3 /site/year と推定された。

分子系統樹解析を含む HGV 検出法として本方法は有用な手段として応用可能である。

2. TT ウイルス(TTV)ORF1/ORF2 蛋白質の

同定と機能解析

1997 年、日本の非 A ~ G 型肝炎患者より分離された TTV のゲノム上に存在する 2 種類の読みとり枠(ORF1/ORF2)がコードする蛋白を同定し、ウイルスの生活環に於ける役割、機能の検討を行った。

ORF1 遺伝子をバキュロウイルスベクターを用いて発現させ、免疫沈降法及びウエスタンブロット法により ORF1 全長に相当する 95kDa 蛋白と、プロセスされた ORF1 蛋白を検出した。ORF2 についても同様に発現、解析し 22kDa 蛋白を同定した。

TTV の遺伝子組成、細胞内局在、構造蛋白との相互作用を解析し、TTV 遺伝子発現の調節作用、細胞障害性、血中の検出法等の検討を行う予定である。

3. 血漿分画製剤中の TTV 混入状況の検討

TTV の肝に与える影響についての詳細は十分に解析されていないが、その影響を考慮して、血漿分画製剤中にどの程度 TTV が混入しているかを nested PCR 法を用いて検討した。筋注用グロブリン製剤 14 ロットと第IX因子製剤 11 ロットからは TTV ゲノムは検出できなかったが、第VIII因子製剤では 67%(4/6)、フィブリノーゲン製剤では 3/3 が陽性を示した。陽性の製剤からは 1 ~ 10 PCR detectable unit/ml の TTV ゲノムが検出された。

陽性を示す分画製剤はいずれも加熱処理が行われており、ウイルス不活化は行われていると推定されるが、今後ウイルス不活化の行われていない、血液成分製剤の検討を行う予定である。

4. CMV,HHV に関する研究

ヘルペス群ウイルスは初感染後、体内に潜伏性に残存することを特徴とし、各々潜伏する細胞が異なっている。血液系細胞に潜伏する CMV,HHV6,HHV7,HHV8 につき、血液細胞及び血漿中のウイルスゲノム検出法を確立し、血液を介した感染における意義、防止法等の検討を行った。CMV,HHV6,HHV-7 は血液系細胞の潜伏感染が示唆された。HHV6 では、10 コピーのウイルスゲノムを検出できる PCR 法を開発し、臨床検体検出法として有用であることを確認し、サブタイプ検出も可能なことが明らかとなった。PCR 条件の検討とともに、HHV7,HHV8,CMV についても同様の方法の開発を行い、その有用性の確認を行う予定である。

5. パルボウイルスに関する研究

single PCR 法、nested PCR 法による血中パルボウイルス検出法はほぼ確立したので、ベクターの標準化等に取り組んでいる。PCR 法によるウイルス検出は、必ずしも感染性を意味しないので、パルボウイルスの感染性を測定し得る方法の開発を行った。ヒト骨髓細胞の代わりに、末梢血より分離した幹細胞(CFU-E)は、IL-3 とエリスロポイエチン存在下で 4 日間培養すると、骨髓細胞と同等の感染性を示し、in vitro の感染性の指標として使用し得ることを確認した。更に培養した末梢血単核細胞は凍結保存しても十分使用が可能であることが分かった。

6. 血液製剤からのエルシニア菌の検出

Y. enterocolitica を特異的に検出できる PCR 法の開発に成功した。このマルチプレックスプライマーを用いた PCR 法の実用化にむけた検討を行った。少数検体の場合は、本法が使用し得るが、多数検体のスクリーニングに使用するには、コスト、操作面からの改良が必要である。この方向での検討とともに、疑いのある検体の検出法に応用可能なベクターの評価と標準化作業を進めている。

7. 血液成分のウイルス、細菌不活化法の開発

新鮮凍結血漿中に混入したウイルスを不活化する法として、メチレンブルーと光照射を併用したウイルス不活化法の有効性につき検討した。血漿に HIV 又は HIV 産生細胞(Molt-III B)を添加し、メチレンブルーをあらかじめ入れてある細胞除去フィルターを有す

る血液バックにフィルターを介して移し、光照射した。添加した HIV は、 $20\text{J}/\text{cm}^2$ の照射により検出限界以下まで不活化され、 $6.7\log_{10}$ の不活化率が得られた。血漿中の凝固第VIII因子活性はわずかの低下を示したが、 -80°C 保存、1年後でも約76%は維持されていた。本法は、血液製剤の凝固活性を損なうことなく、細胞内外 HIV の感染性除去に有効であることを確認した。血小板、赤血球への応用も考慮し、検討を進める。

C. 考察

粘膜接触感染症 (STD) と輸血後感染症には、レトロウイルス、肝炎ウイルス等共通したウイルスが関係している。HIV, HTLV, HBV, HCV については抗原、抗体検査による輸血血液のスクリーニングが行われ、多くの成果を上げているが、ヘルペスウイルス群、パルボウイルスには、現在でも満足できる検査方法はとられておらず、さらに HGV, TTV 等の新しい肝炎ウイルスも登場している。HIV, HBV, HCV につき、輸血前スクリーニング検査が導入されてはいるが、ウインドー期の問題、高度医療の採用に基づく患者の感染に対する抵抗力の減退等の問題があり、さらなる安全性向上のためには、感染原の高感度検出法の導入、やむを得ず輸血をする場合はこれら危険因子をできるだけ除去することが必要になってくる。

本研究は、これら2つの問題に対処することを目的に、新興、再興感染症として考えるべき HCV, HGV, TTV, CMV, HHV6 ~ 8、パルボウイルス、エルシニア菌を対象としてとりあげ行われた。

1999年7月を目標に、日本に於ても HCV に対する核酸増幅法の輸血用血液スクリーニングの導入、義務化が予定されていると聞く。一方、新鮮凍結血漿のウイルス不活化法の導入も、日本赤十字社により検討されている。高感度検出法の開発、改良、標準化を行い、全国レベルで共通の評価のできる方法の検討を行いたい。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukushima, Y., Lewis, M.J., Monken, C., Komuro, K., Kusagawa, S., Sato, H., Takebe, Y., Yamazaki, S., Hien, N., Anh, H., Long, H.a.T., Honda, M., Hall, W.W. : Identification and molecular characterization of human T

lymphotropic virus type II (HTLV-II) infections in intravenous drug abusers in the former South Vietnam. *AIDS Research and Human Retroviruses* 14:537-540, 1998.

2. Okada, Y., Abe, E., Komuro, K. and Mizouchi, T. : Heterosexual transmission of murine AIDS virus. *J. Virol.*, 72 : 2541-2543, 1998.

3. Kato, H., Horino, A., Sakurai, S., Ushijima, H., Komuro, K., Uchida, T. : Inhibition of tumor cell growth by murine splenic adherent cells stimulated with INF- γ . *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 115 : 115-120, 1998.

4. Naito, S., Horino, A., Komiya, T., Fukuda, T., Takaahashi, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Oka, T., Okuma, K., Morokuma, M., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. : Induction of protection against tetanus toxin in mice by tetanus toxoid-liposome conjugate. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 116 : 215-219, 1998.

5. Fukuda, T., Komiya, T., Takahashi, M., Arakawa, Y., Ami, Y., Suzaki, Y., Naito, S., Horino, A., Nagata, N., Satoh, S., Gondaira, F., Sugiyama, J., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. : Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli*-O157:H7 in mice by Shiga-like toxin-liposome conjugate. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 116 : 313-317, 1998.

6. Kato, H., Horino, A., Taneichi, M., Fukuchi, N., Eto, Y., Ushijima, H., Komuro, K., Uchida, T. : Macrophage inhibition of lymphocyte and tumor cell growth is mediated by 25-hydroxycholesterol in the cell membrane. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 117 : 78-84, 1998.

7. Shoji-Tanaka, A., Tanaka, M., Komuro, K. : A highly efficient method for the site-specific integration of transfected plasmids into the genome of mammalian cells using purified retroviral integrase. *Gene* 216 : 67-76, 1998.

TTウイルスORF1/ORF2蛋白質の同定と機能解析

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長
研究協力者 鈴木哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官
松浦善治 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長

研究要旨

TTウイルス (TTV) ゲノム上には、ウイルス蛋白をコードしうる主要な読み取り枠 (ORF) としてORF1とORF2が存在する。構造蛋白領域と推定されるORF1遺伝子をバキュロウイルスベクターを用いて発現させ、免疫沈降法及びウエスタンブロット法によりORF1全長に相当する95kDa蛋白とプロセスされた数種類のORF1蛋白を検出した。今後、これらの蛋白が粒子形成を担っているか調べていきたい。ORF2についても同様に発現、解析し22kDa蛋白を同定した。

A. 研究目的

TTVは、1997年、我が国の非A - G型輸血後肝炎患者より分離された新しいDNAウイルスである。これまでに国内外の多くの研究施設で、PCR法により血清、肝組織などからTTV遺伝子の検出が試みられ、非A - G型肝炎患者の半数以上がTTV遺伝子陽性であるとともに、健常者においても既知の肝炎ウイルスに比べ陽性率が有意に高いことなどが報告されている。またそのゲノム構造などからパルボウイルスまたはサーコウイルスに近縁していると考えられているが、これまでTTVのウイルス蛋白質に関しては報文化されていない。本研究は、TTVゲノム上に存在する2種類の読み取り枠 (ORF1/ORF2) がコードする蛋白を同定し、ウイルスの生活環におけるそれらの役割、機能の解明を目的とする。

B. 研究方法

自治医大グループより分与されたTTV遺伝子断片 (5 クローン: T13-1-4、T11-2、T9-1、T4-7、T6-4) を基にしてORF1領域をpUC119にサブクローン化し、全領域の塩基配列を決定して欠損変異などが生じていないことを確認した。続いてこのORF1遺伝子あるいはその3'末端にFLAG遺伝子を結合させたものをバキュロウイルストランスファーベクターpAcYM1のSmaI部位へ挿入した (図1)。プラスミドDNAと致死欠損バキュロウイルスDNAを昆虫細胞Sf9にコトランスフェクションし、3日

目に相同組換えによって培養上清中に出てきた組換えウイルスをプラークアッセイによって選別した。組換えウイルス感染後3日目の細胞抽出物をSDS-PAGE電気泳動し、抗FLAG抗体またはTTV DNA陽性者血清を用いてウエスタンブロット法および免疫沈降法を行い、ORF1蛋白の発現を確認した。ORF2領域についても同様にサブクローン化した後、組換えバキュロウイルスを作製した (図1)。

C. 研究結果及び考察

TTVゲノムにはウイルス蛋白をコードしうる主要なORFとして、ゲノム中央から3'側に位置し2310塩基からなるORF1と5'側に位置し606塩基のORF2が存在する。パルボウイルスなどの類似性から、ORF1はウイルス構造 (キャプシド) 蛋白をORF2は非構造蛋白をそれぞれコードすると考えられる。まず我々はORF1遺伝子の動物細胞での発現を試みた。TTV粒子の単離が容易でないこと、遺伝子がnested PCRでしか検出されていないことなどからTTVの増殖効率は非常に低く、ウイルスゲノムを培養細胞に導入するTTV複製系の構築は難しいと考え、バキュロウイルスベクターを利用し昆虫細胞での発現を行った。パルボウイルスなどのキャプシド蛋白を組み込んだバキュロウイルスからはウイルス様粒子 (VLP) が産生されることが知られており、この系でTTV構造蛋白のアセンブリー、VLP形成が期待できる。一方、現在のところTTV蛋白に対する特異的抗体が得られていないことか

ら、第一段階として、ORF1のC末端にFLAGのエピトープ配列を付加したもの (AcTT1FG) を昆虫細胞で発現させ、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降法及びウエスタンブロット法を行ったところ、約95、40、35、25kDaの特異的なバンドが認められた。95kDaはORF1のアミノ酸配列から求められる分子量 (最初の開始コドンから翻訳される場合) とほぼ一致する。またTTV DNA陽性者血清 (信州大清澤グループより分与) を用いたウエスタンブロットからは約95kDa以外に70、50、40、35kDa蛋白が検出された。FLAGエピトープを含まないORF1を組み込んだバキュロウイルス (AcTT1) の場合も同様のパターンが得られた。どのようなメカニズムで短いORF1蛋白が産生されるのか、これらの蛋白は感染性粒子またはTTV感染細胞中に存在するのかなど不明な点が多いが、今後、RNAスプライシング及び翻訳後のプロテアーゼによる切断について検討しプロセシングの機序を明らかにしていきたい。

このようにバキュロウイルスAcTT1FG、AcTT1からORF1全長及びプロセスされたORF1蛋白が産生されることがわかったが、発現効率の良いバキュロウイルスベクターを用いたにもかかわらず、期待したほどの高発現は認められなかった (クマシーブルー染色で検出できない)。またパルボウイルスの場合、全長のキャプシド蛋白 (VP1) のみではVLPが形成されないが、N末端側約30%を欠失したVP2のみあるいはVP1、VP2を共発現させるとVLPが効率よく産生される。そこで、ORF1のN末端 (またはC末端) を一部欠失させた形で発現させると、ORF1蛋白が安定化しsteady-state levelが上昇して、その局所濃度が上がり高率にVLPが形成されるのではないかと考え3種類のトランスファーベクターpAcTT1d1、pAcTT1d2、pAcTT1d3を構築した (図1)。現在これらをトランスフェクトし組換えバキュロウイルスを調製中である。

一方、ORF2についても同様の手法で組換えバキュロウイルスを作製し、TTV DNA陽性者血清を使ってウエスタンブロットを行ったところ、約22kDaの位置に特異的なバンドを検出した。ORF2蛋白は既知の機能性蛋白との相同性は認められておらず、どのような役割を担っているのか全く不明である。まず、細胞内局在、構造蛋白との相互

作用を調べさらにTTV遺伝子発現の調節作用、細胞障害性などの有無を検討していく予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Subcellular localization of hepatitis C virus structural proteins in the liver of transgenic mice. Moriya K., Fujie H., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Tsutsumi T., Matsuura Y., Miyamura T., Kimura S., Koike K. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 50, 169-177 (1997).
2. Cloning of a full length cDNA of hepatitis C virus from an infectious blood sample. Aizaki, H. Aoki Y., Harada T., Ishii K., Matsuura Y., and Miyamura T. *Hepatology* 27, 621-627 (1998).
3. Critical point mutations which caused loss of the NS3 proteinase activity of hepatitis C virus. Yamada K., Mori A., Seki M., Kimura J., Yuasa S., Matsuura Y., and T. Miyamura. *Virology*, 246, 104-112 (1998).
4. Expression of target genes by coinfection with replication-deficient viral vectors. Yap C.C., Ishii K., Aizaki H., Tani H., Aoki Y., Ueda Y., Matsuura Y., and Miyamura T. *J. Gen. Virol.* 79, 1879-1888 (1998).
5. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. Hiasa Y., Horiike N., Fazle S.M., Saito I., Miyamura T., Matsuura Y., Onji M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249, 90-95 (1998).
6. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. Moruiya K., Fujie H., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Tsutsumi T., Ishibashi K., Matsuura Y., Kimura S., Miyamura T., and Koike K. *Nature Med.* 4, 1065-1067 (1998).
7. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. Ishii K., Rosa D., Watanabe Y., Katayama T., Harada H., Kiyosawa K., Aizaki H., Matsuura Y., Houghton M., Abrignani S., and Miyamura T.

- Hepatology 28, 1117-1120 (1998).
8. A human liver cell line exhibits efficient translation of HCV RNAs produced by a recombinant adenovirus expressing T7 RNA polymerase. Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Saito I., Matsuura Y., and Miyamura T. *Virology* 250, 140-150 (1998).
 9. Internal Processing of Hepatitis C Virus NS3 Protein. Shoji I., Sato M., Suzuki T., Aizaki H., Chiba T., Matsuura Y., and Miyamura T. *Virology*, 254, 315-323 (1999).
 10. Enzymatic activity of hepatitis C virus RNA polymerase mutants with deletions and amino acid changes in the conserved motifs. Ishii K., Tanaka Y., Yap C.C., Aizaki H., Matsuura Y., and Miyamura T. *Hepatology* (in press).
2. 学会発表
1. Matsuura Y., Takeda N., and Miyamura T. Development of HCV and HEV Vaccines. 3rd International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim. March 28-30, 1998, Bali, Indonesia.
 2. Matsuura Y., and Miyamura T., Characterization of hepatitis C virus core protein. 2nd International Virus Assembly Symposium. April 4-9, 1998, Las Palmas, Spain.
 3. Ishii K., Tamura K., Tsutsumi T., Aizaki H., Suzuki R., Matsuura Y., and Miyamura T., Biochemical evidence of the presence of cytoplasmic domain in HCV E1 glycoprotein. 5th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. June 24-28, 1998, Venice, Italy.
 4. Shoji I., Sato M., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T., Further cleavage of HCV NS3 protein. 同上.
 5. Tani H., Ishii K., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T., Apoptosis induced by transiently expressed HCV proteins. 同上.
 6. Yap C.-C., Aoki Y., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Ueda Y., Matsuura Y., and Miyamura T., Coinfection system consisting of replication-deficient viral vectors for expression of HCV RNA. 同上.
 7. Matsuura Y., Ishii K., Aizaki H., Takigawa S., Tani H., Whitt M.A., and Miyamura T., Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. 同上.
 8. Kohara M., Kaito M., Wakita T., Kohara K.T., Higashi K., Ohmori H., Inoue K., Matsuura Y., Yasui K. and Watanabe S., Maturation process of virion-like structure in transfected IMY cells with entire HCV genome. 同上.
 9. Nishimura Y., Kamei A., Tamaki S., Taniyama H., Matsuura Y., Miyamura T., Kim G., Kuribayashi K., Adachi Y. and Yasutomi Y., Novel animal model of hepatitis C virus (HCV) infection eliciting HCV specific cytotoxic T lymphocytes in mouse induced by intrahepatic inoculation with HCV DNA. 同上
 10. Moriya K., Fujie H., Yotsuyanagi H., Todoroki T., Ishibashi K., Matsuura Y., Shintani Y., Tsutsumi T., Kimura S., Miyamura T., Koike K., Analysis of hepatic steatosis in hepatitis C virus core gene transgenic mice. 同上
 11. Fujie H., Yotsuyanagi H., Moriya K., Shintani Y., Tsutsumi T., Takayama T., Makuuchi M., Matsuura Y., Miyamura T., Kimura S., Koike K., Intrahepatic core protein levels and steatosis in chronic hepatitis C. 同上
 12. Shoji I., Sato M., Suzuki T., Matsuura Y., Miyamura T. Further cleavage of HCV NS3 protein. 同上

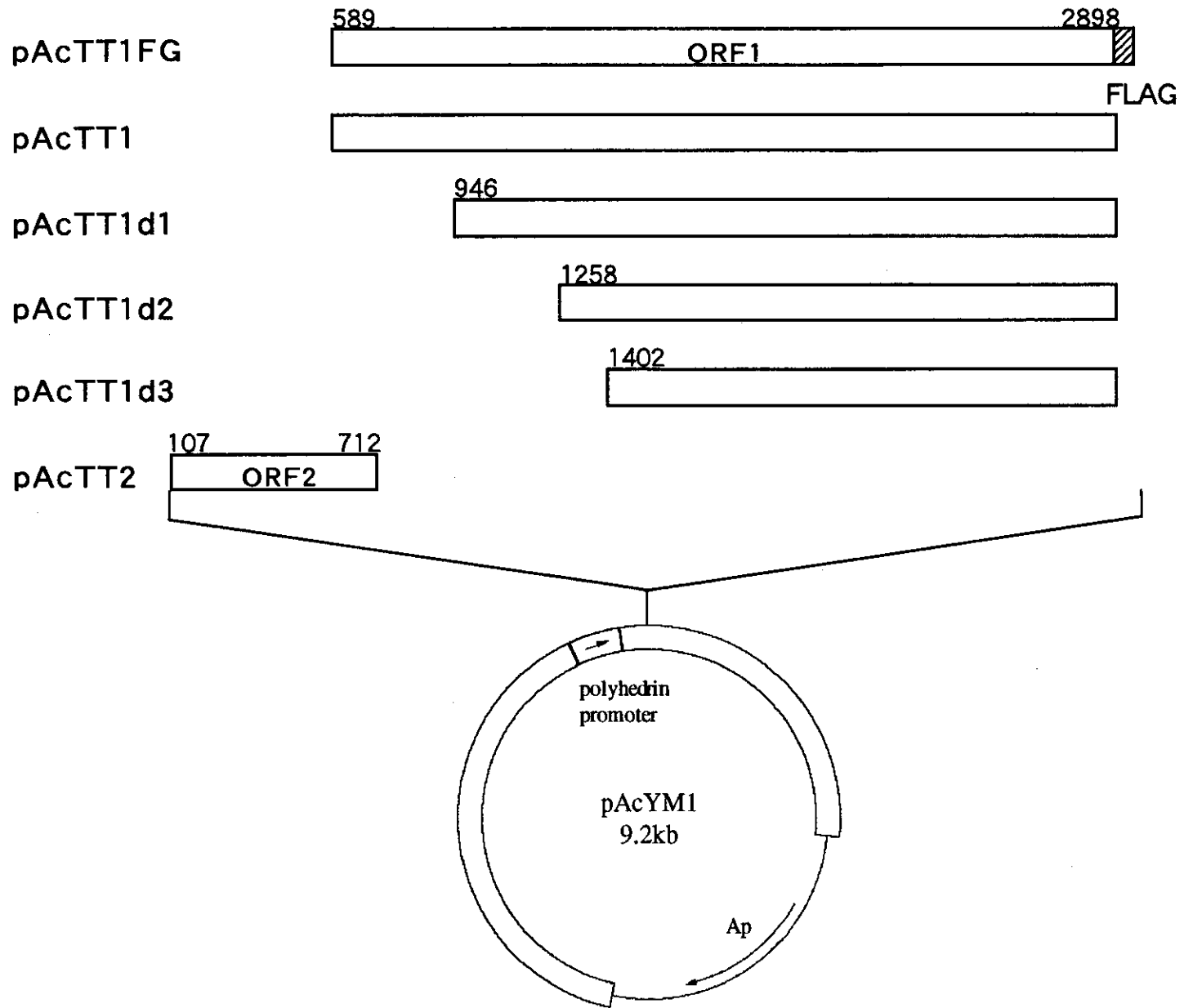


図1 TTV遺伝子を組み込んだバキュロウイルストランスファーベクター

厚生科学研究（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

生物製剤品質保証における国の役割に関する研究

分担研究者 田代真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部部長
協力研究者 小浜友昭 国立感染症研究所ウイルス製剤部室長

研究要旨

ワクチンの品質保証を担当する国の規制担当機関（NCA、NCL）の重要性について考察した。WHOの主催する生物製剤品質保証の標準化のためのミッションに参加し、NCAが備えるべき6項目の重要な機能について調査・研究を行い、我が国における生物製剤の品質保証体系の整備について考察を加えた。

A. 研究目的

接触及び血液由来感染症の防御対策としてワクチンが有望な候補の一つに挙げられている。ワクチンによって防御が可能である感染症にとって、そのワクチンの品質が常に保証されていることは最も重要である。生物製剤の品質保証及びその認可には国の規制担当機関（NCA、NCL）が主要な役割を担う。最近WHOから出された生物製剤標準化に関する提案では、ワクチンを自国生産しているすべての国で同じ品質の生物製剤を製造し、認可し、使用するについての監督責任をもち、その有効性・安全性についてのすべての情報を管理する能力をもったNCAを有するよう求めている。ワクチン製造国である日本も例外ではない。しかし我が国では生物製剤のGMPが1997年に開始されたばかりであり、これまで行われてきた生物製剤の国家検定いわばNCLの役割をも含めて、生物製剤の品質保証のために国の規制担当機関の機能に関して総合的な思想とその上に立った具体的な方法論を早急に確立する必要がある。本報告では、WHOが派遣した生物製剤品質保証の標準化のための中国及びベトナムへのミッションに参加し、NCAが備えるべき6項目の重要な機能について学ぶ機会を得たので、その骨子を述べ、我が国における生物製剤の品質保証体系の整備と質の向上に資することを目的とした。

B. 研究方法

WHO西太平洋地域事務所より依頼を受け、6名の専門家から成るミッションに計2回参加した（中国：1998年3月1日～14日および、ベトナム：1998年5月4日～13日）。これは、両国におけるワクチン及び血液製剤の品質管理を担当する国家機関（NCA、NCL）がその役割

の重要性を深く認識・理解することを求めて派遣されたものである。「生物製剤標準化に関する6項目の重要な機能」と題して各地で研修及び討論した中から、ワクチン製造国における資格と独立性を備えたNCAの職務を遂行するのに役立つと思われる項目を選び、以下にまとめた。

C. 研究結果

WHOの新しい提案によれば、NCA（NCLを含む）は高い品質の（安全で有効な）生物製剤を製造し、広く接種し、さらにその結果（効果、安全性、副作用など）についてもすべて監督責任、情報を網羅する役割を担う。それは生物製剤標準化に関して、以下に挙げる6項目の重要な機能としてまとめることができる。各機能を発揮するための目安となる指標は後に述べるが、生物製剤について始めから終わりまですべてを網羅してNCAが主導的役割を果し、しかもそれが体系化されすべての行為についてマニュアルを作成することが必要である。

NCAの法律上の資格と6つの管理機能

1. 認可に必要な基準の書式化されたものの1揃い
2. ワクチン分野における諸活動のサーベイランス
3. ロット認可のシステム
4. 実験室の利用
5. GMPのための規則的な査察
6. 臨床行為の評価

この6項目の機能を実行する前提として、NCAは次のような体系を確立しておくべきである。

- イ) NCAの確立と強制力のための法律上の基盤
- ロ) NCAの製造メーカーからの独立
- ハ) 他国のNCAを承認するための基準

ニ) 回収システム

ホ) ロット廃棄のための書式化されたガイドラインと書類調査

ヘ) スタッフの適切な専門技術

ト) スタッフの研修計画

上の6項目の機能を実現する目安として、それぞれ以下の指標が設けられる。ここでは生物製剤の品質保証におけるバリケーションに焦点を絞って考察を行う。従って、ここでは認可、書式化などに関する諸手続きについては省略し、主として第4、第5、第6の機能の指標について述べる。

第4の機能の指標：実験室における試験の利用

イ) 実験室の利用に文章で定義された一定の明白性があればその状態

ロ) きちんとした実験室の品質システム（文書管理、SOPs、原料の管理、サンプル、動物）

ハ) 標準品、参照品、試薬の適切な利用

ニ) 統計的手法を用いた実験方法とデータ分析の確認：再現性、精度、正確さ、信頼性、堅牢性、感度、特異性、検出限界、定量性の限界、直線性/dose-response

ホ) 製品毎のレベルでのデータの傾向の分析

ヘ) 再試験の方法

ト) 進行中の研修プログラム

第4の指標に対して本研究において行った具体的な対応としては、従来体系化されていなかった国家検定のすべての試験項目実施のための標準作業手順（SOP）を整備したことが挙げられる。

第5の機能の指標：GMPのための規則的な査察

イ) 書式化された基準または法律

ロ) GMP 検定書の受理と発給のための規定

ハ) 査察のための書式化された計画

ニ) 査察官の資質向上

ホ) 査察の時間帯

ヘ) 査察後に明白になった行動

ト) 査察官の製造者からの独立

チ) 対象が限定された査察チームの構成

リ) 査察過程をモニターするための確立された方法論

ヌ) 販売業者と卸売り業者の査察

第5の指標に対して本研究で行った対応としては、本年度より開始されたウイルス製剤製造施設（ワクチンメーカー）に対する査察の経験をもとに、それを体系的に行うための詳細なSOPを作成したことが挙げられる。

第6の機能の指標：安全性と有効性の臨床評価

イ) 臨床試験のGMP, GLP, GCP, 倫理的監視

ロ) 臨床試験がいつ必要であるかということについての書式化されたガイドライン

ハ) 工業的規模での製品についての臨床評価

ニ) 臨床データの寄託のための書式についての公開されたガイドライン

ホ) 臨床試験の立ち上げとその分析について助言するための疫学と統計学における専門技術

ヘ) 試験に供されている製品における専門家へのアクセス（試験方法における専門家を含む）

D. 考察

日本は生物製剤の品質保証体制に関しては先進国と考えられており、諸外国からの評価は高い。しかし、我が国の現状は生物製剤についてのGMPが1997年になってようやく実施されるようになったなど、6項目の機能の思想にはまだ十分に及んでいないと思われる。これをよりよく理解し、普及させ、名実ともに先進国としての体制を整える必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Okada, H., Takei, R., Tashiro, M.: HIV-1 Nef protein-induced apoptotic cytolysis of a broad spectrum of uninfected human blood cells independently of CD95 (Fas). FEBS Letters 414 3: 603-606 1997.

2) Okada, H., Takei, R., Tashiro, M.: Nef protein of HIV-1 induces apoptotic cytolysis of murine lymphoid cells independently of CD95(Fas) and its suppression by serine/threonine protein kinase inhibitors. FEBS Letters 417 1: 61-64 1997.

3) Tashiro, M., McQueen, Nancy L., Seto, J. T., Klenk, H-D., and Rott, R.: Involvement of the mutated M protein in altered budding polarity of a pantropic mutant, F1-R, of Sendai virus. J. Virol. 70 9: 5990-5997. 1996.

4) 田代真人：インフルエンザウイルスHA蛋白の解裂活性化と病原性のメカニズム-内因性プロテアーゼと細菌性プロテアーゼの役割、日本臨床 55、2633-2639、1997.

5) 田代真人：今後のインフルエンザ対策、臨床とウイルス 25、230-235、1997.

分担研究報告書

血液製剤から *Y. enterocolitica* の検出

分担研究者：渡辺治雄 国立感染症研究所細菌部長

塚野尋子

全身性感染細菌室長

研究要旨：近年、輸血するのに必要な安全基準を完全にクリアーしている血液製剤にもかかわらず、*Yersinia enterocolitica* に汚染された赤血球製剤の輸血が原因と見られる敗血症による死亡例が少数ではあるが諸外国（特に、ニュージーランド）で発生し、問題になっている。*Yersinia enterocolitica* は低温保存でも生存・増殖できるため、いずれも、健常者の血液にわずかに存在していた菌が保存中に増殖して輸血事故を引き起こした事例である。昨年我々は、この予防・対策の1つとして、血液中の少量の *Y. enterocolitica* を迅速に検出することを目的として、マルチプレックスプライマーを用いたPCRによる迅速診断法の開発を行なった。今回は、(1)実用に向けて、更に *Yersinia enterocolitica* を含む血液製剤を直接PCR法で検出する方法の検討を行なった。また(2)ドナー血液中の抗体価から間接的ではあるが *Y. enterocolitica* のコンタミ製剤をチェックする方法の検討も行なった。

A. 研究目的

Yersinia enterocolitica に汚染された赤血球製剤の輸血が原因と見られる死亡例が少数ではあるが外国で報告されている。世界的に見るとニュージーランドが一番多く五年間に8事例もあり、事故発生率は65,000回に1回、死亡率は104,000に1回とアメリカの死亡率の80倍以上である。此の死亡率の高い原因は不明であるが血液保存液の菌の増殖抑制効果に問題があるのではないかと考えられている。一方、アメリカで起きた事例は3週間以上長期冷蔵保存されたものであったため、菌の増殖と保存期間との関連が問題視されている。日本でも42日間の長期保存が可能な赤血球MAPが導入されてから少なくとも2検体に *Yersinia enterocolitica* が検出されたという報告がある。いずれも、幸いなことに輸血に使用されずに返品されたもので大事には至らなかったものの、日本でも、輸血後感染症の防止対策をこうじる必要がある。この予防法としては献血者への問診強化、保存期間の再検討、血液製剤の外観試験、白血球除去フィルターによる除去、菌の増殖を阻止する赤血球保存液の開発、少量の菌を迅速に検出するスクリーニング法の確立等が検討の対象となっている。この中で特に根本的な解決法は、多数検体から簡単に汚染されている検体をスクリーニングできるための有効な検出方法を早急に確立することである。少量の菌を迅速に検出する方法の確立と言う側面から、我々は昨年に引き続き我々が開発したPCR法を用いて、多数検体の中から *Yersinia enterocolitica* で汚染された検体をスクリーニングするための方法の開発と(2)ドナー血液中の抗体価を指標として、菌がコンタミした血液製剤をチェックするためのスクリーニング法としてenzyme-linked immunosorbent assayの有効性を検討した。

B. 研究方法

1) PCR法

(1) プライマー (Table 1に示した)

(a) *Y. enterocolitica* の染色体DNA上の特異的な病原性遺伝子: adhesion-invasion locus (*ail*)

(b) *Y. pestis* と *Y. pseudotuberculosis* に共通して存在するが *Yersinia enterocolitica* にはない染色体DNA上の *invasin (inv)* 領域

(c) *Yersinia* の病原細菌に存在する 4.2 Md プラスミド上の病原性遺伝子 (*virF*)

(d) *Y. pestis* に特異的な 7 Md プラスミド上の病原性遺伝子: plasminogen activator (*pla*),

此の4種類のプライマー間にはホモロジーがないことを確認している。

(2) 反応条件

- (a) DNAテンプレートは100℃、10分間菌を加熱処理して作製した。
(b) 反応条件は熱変性を94℃30秒、アニーリングを54℃1分、伸長を72℃90秒で30サイクルという条件で行った。

2) 血液中から少量の菌の回収法

少量の菌を迅速に検出する方法を検討するため、まず血液中の少量の菌の回収法の検討を行なった。人間から一番多く分離される *Yersinia enterocolitica*: serotype O:3菌を血液に 8CFU/ml, 80CFU/ml, 800CFU/mlの割合で接種し、従来のように菌を遠心による回収法と、超常磁性高分子ポリマー性ビーズを用いた回収法との間で菌の回収率の比較を行なった。

(1)遠心法による回収法、

菌を27℃で2日間Brain Heart Infusion(BHI) agarで培養後、生理食塩水(PBS)10 mlに 1×10^9 cells/mlになるように懸濁する。その懸濁液を羊血液6 mlに 8CFU/ml, 80CFU/ml, 800CFU/mlになるように接種する。その後、各々の菌液をエッペンドルフのチューブ3本に小分けし、直ちに、1,000Gで2分間遠心して細胞(白血球、赤血球等)を沈殿させた。その後、15,000 rpmで20分間遠心して菌を沈殿させた。その沈査を100 μ lのPBSに懸濁してから、血液寒天培地を用いて菌数をカウントした。

(2)*Yersinia enterocolitica* serotype O3特異血清結合dynabeads(超常磁性高分子ポリマー性ビーズ)を用いた回収法

2次抗体を結合させた 1×10^4 dynabeadsに過剰な1次抗体を加え37℃20分間作用させた後、マグネットを用いてPBSで3回洗浄する。洗浄したこのO:3特異血清結合dynabeadsに、予め、羊血液6 mlに 8CFU/ml, 80CFU/ml, 800CFU/mlの割合で菌を接種し、10分間ローターを使って良く混ぜた後、マグネットを用いて、菌結合dynabeadsを集めた。この菌を100 μ lのPBSに懸濁してから、血液寒天培地を用いて菌数をカウントした。

3) enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)による *Y. enterocolitica* の間接的検出

実験にはELISA mate kit (フナコシ株式会社) を使った。ルーチン化するために簡単で非特異反応がない範囲で実験を行うため、使用する抗原の濃度と抗体の希釈濃度について検討した。

(1) 抗原量の検討

精製した *Y. enterocolitica* serotype O:3 のLPSと *Y. pestis*の診断用抗原(Fraction 1)を各々50 μ g/mlになるように調整後、96穴プレート上で2段階希釈し、1時間反応させて吸着させた(final 100 μ l)。プレートを良く洗浄後、150 μ lのBSAを加えて5分反応させる。洗浄後、1000倍希釈した *Y. enterocolitica* serotype O:3診断用血清を、50 μ lずつ96穴プレートに分注し、1時間反応させた。良く洗浄後、2次抗体を50 μ lずつプレートに分注し1時間反応させた。良く洗浄後基質を50 μ lずつ加え、適当なカラーの濃さになった所で、停止液を入れてリーダーを用いて405 nmの波長で読んだ。

(2)抗体量の検討

此の実験条件下で使用する抗原量を上の実験で検討した結果、10 μ g/mlに調節した抗原量を100 μ l使用するのがmaximalにwellに吸着する量であることが分かった。だから、10 μ g/mlに調節した抗原を用いて1次抗体を原液から5段階希釈を行い、妥当な希釈抗体液の検討を行なった。

C. **研究結果**

1) 検体から少量の *Yersinia enterocolitica* をPCR法で検出するための試み

(1) PCRに必要な検出限界菌体数

我々はPCRの検出限界のテンプレート数(菌体数)を調べるため、テンプレート量を4 cells / 0.1ml ~ 4×10^7 cells / 0.1mlの間で換えてPCRを行なった。Table 2に示したように、 4×10 cells / 0.1mlの菌数があればPCRで検出できることが分かった。

(2) 血液製剤MAP中で菌が増殖できるための増殖限界数

赤血球MAP中の *Yersinia enterocolitica* serotype の数と増殖態度の関係を示した(名雲英人先生:駒込赤十字血液センター)結果によると、接種菌数が約4 CFU / mlの時は保存期間が42日でも菌は増殖しない。しかし、約80 CFU / mlの場合は14日目以降いずれも急激な増殖が見られた。これは菌数が少ない場合は白血球の貪食と殺菌作用によって排除されるが、菌が多い場合は一時的な貪食効果により菌が検出されないが、白血球の機能低下や崩壊で殺菌されない菌が血中に現れ、増殖するのではないかと考えられている。だからPCR法の感度は約80 CFU / ml以下で検出できなければならないことになる。

(3) 血液中から菌を回収する方法

血液中から菌を遠心法と超常磁性高分子ポリマー性ビーズ(dynabeads)を用いた方法で回収した場合、その回収率を比較すると、最初にスタートする全体の液量によって回収率は異なるが、血液量6mlでスタートした時の結果は dynabeads法では8CFU / ml, 80CFU / ml, 800CFU / mlと菌量を変えた場合、少量の8CFU / mlでも6%の割合で回収でき、800CFU / mlでは80%の回収率であった。従来の遠心法では回収率は悪く、8CFU / mlでは0%、80CFU / mlでは値が振れ、800CFUでも50%の回収率であった。だから少量の血液量から菌を回収する場合にはdynabeads法が非常に有効であることが分かった。

2) enzyme-linked immunosorbent assay(ELASA)による *Y. enterocolitica* の間接的検出

ドナー血液中の抗体価から間接的に *Y. enterocolitica* のコンタミをチェックするスクリーニング法として enzyme-linked immunosorbent assay の有効性を検討した。

(1) 25倍希釈ではわずかに *Y. pestis* の診断用抗原に反応したので、ルチン化する場合は、抗体の原液から出発して5倍段階希釈を行なうことが必要である。

(2) 使用する抗原濃度(wellの表面全体に抗原が吸着するための濃度)は、96穴プレートを用いて1時間反応させる場合は、10 μ g / mlに調整した抗原 (LPS) をwellあたり100 μ lを使用する。

D. 結論

1) 多数検体の中から *Yersinia enterocolitica* で汚染された検体をスクリーニングするための方法としてPCR法が応用できるか検討した。少数検体の場合は可能であるが多数検体の中から汚染された血液製剤をスクリーニングする場合はコストの面、操作の面からももう少し改良しなければならない。

2) ドナー血液中の抗体価から間接的に *Y. enterocolitica* をチェックするスクリーニング法として enzyme-linked immunosorbent assay の有効性を検討した。 *Y. enterocolitica* に感染しているドナーが必ず抗体価が上がっていれば汚染された血液を排除するためのスクリーニング法として enzyme-linked immunosorbent assay は有効と考える。しかし、 *Y. enterocolitica* に感染した人の抗体価は直ぐ落ちやすいので、治ったあとまで抗体価が高いのか? 初期患者でも抗体価が上がっているのか分からないので、此の方法を採用する場合は、 *Y. enterocolitica* に罹った患者の抗体価を、感染後の時間の経過と抗体価の変移から分析してから、結論を出す必要がある。更に我々は蛍光ELISA法は10-100倍感度が上がると期待されているので試みてみたい。

3) いずれにしても、現在直ぐに有効な方法はない。輸血後感染症が起こる頻度は非常に低いので、実験的に有効性が確認されているフィルター法も、全部の血液をフィルター処理するというのはコストの面からも考えても経済的でない。今は(1)採血基準に基づいた献血者への問診の強化を行い、過去1ヶ月位の間腹痛や下痢等の症状の有無を詳しく聞き、 *Yersinia enterocolitica* の臨床症状があった場合は献血を辞退もしくは延期してもらい保菌者からの採血を防止することが重要である。(2)事故の原因として保存期間との関連が指摘されている。諸外国の事故例から考えても、赤血球MAPを21日目までに使用すればかなり危険性が軽減するだろう。血液センターから医療機関へこの旨の協力をお願いするように計らって欲しい。(3) 菌の増殖を阻止するような赤血球保存液の開発が必要だろう。

Table 1. Oligodeoxynucleotide primers used

amplified gene	size of PCR product (bp)	oligonucleotide of primers		localization	GC content of gene (%)	Tm*
		pair	Sequence (5' to 3')			
<i>ail</i>	170	S	ACTCGATGATAACTGGGGAG	chromosome	50.0	60°C
		A	CCCCCAGTAATCCATAAAGG		50.0	60°C
<i>inv</i>	295	S	TAAGGGTACTATCGCGGCGGA	chromosome	57.2	66°C
		A	CGTGAAATTAACCGTCACACT		42.8	60°C
<i>pla</i>	480	S	ATCTTACTTTCCGTGAGAAG	7 Md	40.0	56°C
		A	CTTGGATGTTGAGCTTCCTA	plasmid	45.0	58°C
<i>virF</i>	591	S	TCATGGCAGAACAGCAGTCAG	42 Md	52.4	64°C
		A	ACTCATCTTACCATTAAGAAG	plasmid	33.3	56°C

* DNA melting temperature

S; sense-strand, A; anti-sense-strand

Table 2. Minimal bacterial numbers of necessity for *Yersinia enterocolitica*'s detection by PCR

bacterial suspension	PCR products			
	<i>ail</i>	<i>inv</i>	<i>pla</i>	<i>virF</i>
	170bp	295bp	480bp	591bp
4 x 10 ⁷ cells / 0.1ml	+	-	-	+
4 x 10 ⁶ cells / 0.1ml	+	-	-	+
4 x 10 ⁵ cells / 0.1ml	+	-	-	+
4 x 10 ⁴ cells / 0.1ml	+	-	-	+
4 x 10 ³ cells / 0.1ml	+	-	-	+
4 x 10 ² cells / 0.1ml	+	-	-	+
4 x 10 cells / 0.1ml	+	-	-	+
4 cells / 0.1ml	-	-	-	-

(+); positive, (-); negative

表3 赤血球MAP中の *Y. enterocolitica* の増殖態度

	接種菌数		保存日数					
	CFU/ml	白血球数 10 ⁶ /ml	7	14	21	28	35	42
1	4.4	4.6	0	0	0	0	0	0
2	4.3	2.9	0	0	0	0	0	0
3	4.4	7.0	0	0	0	0	0	0
4	82	3.2	0	2.8 × 10 ⁵	3.4 × 10 ⁶	2.1 × 10 ⁷	8.1 × 10 ⁷	5.8 × 10 ⁸
5	80	3.6	0	4.9 × 10 ⁶	2.4 × 10 ⁷	3.5 × 10 ⁷	8.7 × 10 ⁷	6.8 × 10 ⁸
6	78	5.4	0	65	5.8 × 10 ⁷	8.8 × 10 ⁷	8.9 × 10 ⁷	5.9 × 10 ⁸

血液製剤による細菌感染の防御に関する研究

分担研究者 荒川 宜親 (国立感染症・細菌・血液製剤部)

研究要旨

輸血用保存血液や血小板液などに細菌が付着・混入し、投与を受けた患者が敗血症などの感染症を発症したという報告は、欧米において多数報告されている。その場合、*Yersinia enterocolitica*や*Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*などが問題となることが多い。しかし、その他にも類似の機序で感染症を引き起こす危険性の有る病原体が存在する可能性があり、この点について文献的な調査研究を行った。その結果、*Mycoplasma fermentans*, *Chlamydia trachomatis*, *Coxiella brunetti*が血球細胞に付着あるいは潜伏し、被投与者に感染症を引き起こす危険性の有る細菌として新たに浮かび上がった。これまでにこれらの細菌による輸血後感染症などの報告は見当たらないものの、検出に特別な手技が必要であるため、看過されている可能性もある。輸血用の製剤がどの程度の頻度でこれらの細菌によって汚染されているかの調査・研究を推進する必要がある。

A. 研究目的

輸血用の赤血球液や血小板液などヒトの血液を原材料として作成される各種の血液製剤や、さい帯血から調製される血液幹細胞液などは、細菌やウイルスなど様々な微生物による汚染の可能性がある。これらの製剤は、感染防御能の低下した患者に投与される機会が多いため、病原体による汚染を少なくする事が重要である。特に、さい帯血を原料とする血液幹細胞液は、白血病や再生不良性貧血など好中球機能の著しく低下した易感染性の患者に投与される為、細菌などの混入を極力少なくする必要がある。製剤が汚染される原因としては、採血時点での微生物の混入が最も可能性が高く、次に血液製剤を調整する課程での汚染が指摘されている。また、ウイルス血症や菌血症などを起こしている供血者から採血した場合にも汚染の原因となりうるが頻度は低いと考えられている。細菌による血液製剤の汚染例としては、これまで*Yersinia enterocolitica*や*Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*などによる輸血用保存血液や血小板液の汚染が欧米において多数報告されており、最近では*Enterobacter cloacae*によるヒト血清アルブミン製剤の汚染が記憶に新しい。わが国ではこれまでに血液製剤が細菌により汚染されたことによる感染症の報告例は極めて希である。これは、この問題に対する医療関係者の関心がそれほど高く無い事による可能性もある。今回、その他の細菌の中に輸血用製剤を介して感染する危険性のあるものが存在するかについて、文献的に調査・研究を行った。

B. 研究方法

学術雑誌や欧米などの公的保健機関の発行する報

告書などから、輸血用赤血球液、血小板液、アルブミン製剤などの細菌の汚染や、輸血後の敗血症等の報告例を検索した。

C. 研究結果

1. マイコプラズマ

ヒトから分離されるマイコプラズマ属の中で、*M. fermentans*はリンパ球などに付着して全身性に循環する性質を有することが知られている。*M. fermentans*の病原性は弱いとされているが、感染防御能力の低下した患者に、*M. fermentans*が混入した輸血用の血球が投与された場合、感染症が引き起こされる危険性は否定できない。

R.F. Cheekらは、フローサイトメトリーを用いて、末梢血中のリンパ球に結合している*Mycoplasma fermentans*を検査した。その結果、10-15%のリンパ球から*M. fermentans*を検出し、初期の結合は、特にB-リンパ球に多く見られると報告している(1)。

G. Franzosoらは、実験的に*M. fermentans*をT-リンパ球にfusionさせることを試み、CD4陽性と陰性の細胞に対し、5-10%の割合でfusionが見られたが、末梢血由来のリンパ球では、やや高い12%程度のfusionがみられたと報告している(2)。

2. クラミジア

クラミジア属は、細胞内で増殖しあるいは潜伏する病原体として知られている。したがって、ヒト血液由来の血球製剤を介してこれらの病原体による感染症が起こる可能性がある。

Gerard HCらは、培養したヒトのリンパ球において*Chlamydia trachomatis*がどのように持続感染をするかを調べている。その結果、ヒトの単核球内では*C. trachomatis*は蛋白の合成を停止し、転写のみ持続

した状態で長期間生育しうると報告している(3)。

Kuipers JGらは、PCR法を用いて関節炎の患者の末梢白血球から、*C. trachomatis*の遺伝子を検出している(4)。

Boman Jらは、心臓血管系の疾患を有する患者や中年期の供血者の末梢単核球から、高率に*C. pneumoniae*のDNAをNested PCR法により検出したと報告している(5)。

Moazed TCらは、マウスにおいて、マクロファージを介する*Chlamydia pneumoniae*の全身性の播種が起きている事を報告している。

3. コクシエラ

コクシエラ属の中で*Coxiella burnetti*はQ熱の病原体として知られている。*C. burnetti*は、人畜共通感染症の起因菌であり、家畜や野性動物の糞等の飛末を介してヒトに感染すると言われているが、国内での報告例はそれほど多くはない。しかし、最近、岐阜大学の平井らのグループの調査によると、健常者の数%に*C. burnetti*の抗体陽性例が見られ、その血清をPCRで検査すると過半に陽性例が存在することが確認されている(7, 8, 9)。

D. 考 察

日常的な細菌検査法により分離・培養が比較的容易な腸内細菌やブドウ糖非発酵菌群は、輸血用血球製剤に混入した場合も検出されやすい。しかし、今回文献的考察を行った、*Mycoplasma*属や*Chlamydia*属、*Coxiella*属は、分離や培養に特別な培地や技術・経験を要するため、検査を実施できる施設が限られている。そこで、輸血後などにみられる原因不明の発熱やその他の症状の出現にこれらの病原体が関与していた場合も、看過されている可能性がある。したがって、これらの病原体によりどの程度、輸血用血球製剤が汚染されているかを調査し、問題が認められる場合には、日常業務における検査法の導入など必要な対策を講じる必要がある。

特に、白血病や再生不良性貧血などの患者では、術前の抗癌剤投与や放射線照射により殺菌力の中心である好中球の機能が著しく低下している。そのため、微量の細菌の混入が敗血症など致命的な感染症の原因となりうる。そこで、治療の一つである骨髄移植のかわりとして最近実施される機会が多くなった「さい帯血輸血」では、製剤中への細菌などの混入は極力抑える必要がある。したがって、汚染が最も起こりやすいと考えられるさい帯血の採取の方法

について、詳細な指針やマニュアルを作成する必要があると考えられる。

また、これらの製剤の無菌試験に用いられている検査法も、あらゆる細菌の混入を想定し、現在の赤血球液などで用いられている方法より、より高感度の培養法を採用する必要があると考えられる。

*C. burnetti*によるQ熱は、国内では稀な疾患とされている。しかし、平井らの調査では、数%程度の抗体陽性者が見られ、それらの血清をPCRで検査すると高率に*C. burnetti*に由来すると思われるDNAが検出されるとのことである。これがもし事実であるとするならば、赤血球液や血小板液、「さい帯血」などの輸血用血球製剤における*C. burnetti*の検査を日常的な試験・検査項目に加えることが必要となる。したがって、この件に関する予備調査を行政が主体となって早急に実施する必要があるだろう。

E. 参考文献

1. Cheek RF, Olszak I, Madoff S, and Preffer FI, In vitro detection of *Mycoplasma fermentans* binding to B-lymphocytes in fresh peripheral blood using flow cytometry, *Cytometry* 28:90-95, 1997.
2. Franzoso G, Dimitrov DS, Blumenthal R, Barile MF, and Rottem S, Fusion of *Mycoplasma fermentans* strain incognitus with T-lymphocytes, *FEBS Lett*, 303:251-254, 1992.
3. Gerard HC, Kohler L, Branigan PJ, Zeidler H, Schumacher HR, and Hudson AP. Viability and gene expression in *Chlamydia trachomatis* during persistent infection of cultured human monocytes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*187:115-120, 1998.
4. Kuipers JG, Jurgens-Saathoff B, Bialowons A, Wollenhaupt J, Kohler L, and Zeidler H, Detection of *Chlamydia trachomatis* in peripheral blood leukocytes of reactive arthritis patients by polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 41:1894-1895, 1998.
5. Boman J, Soderberg S, Forsberg J, Birgander LS, Allard A, Persson K, Jidell E, Kumlin U, Juto P, Waldenstrom A, and Wadell G, High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA in peripheral blood mononuclear cells in patients with cardiovascular disease and in middle-aged blood donors. *J Infect Dis* 178:274-277, 1998.

6. Moazed TC, Kuo CC, Grayston JT, and Campbell LA, Evidence of systemic dissemination of *Chlamydia pneumoniae* via macrophages in the mouse, J Infect Dis 177:1322-1325, 1998.
7. Zhang GQ, Hotta A, Mizutani M, Ho T, Yamaguchi T, Fukushi H, and Hirai K. Direct identification of *Coxiella burnetii* plasmids in human sera by nested PCR, J Clin Microbiol 36:2210-2213, 1998.
8. Hirai K, and To H, Advances in the understanding of *Coxiella burnetii* infection in Japan. J Vet Med Sci 60:781-790, 1998.
9. 平井 克哉, Q熱に関する最近の知見、日本獣医師会雑誌 第52巻：77-83,1999.

パルボウイルスの感染性の検討

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 細菌 血液製剤部

研究要旨 パルボウイルスの血液製剤への混入率が高いことを昨年度、報告した。今年度は混入しているパルボウイルスが果たして感染性を持つか検討するために、培養系の確立を目指した。ヒト赤白血病由来の KU 812 細胞株を用いて検討したところ、ポリブレンやエリスロポイエチンの添加では感染の成立は確認できなかった。一方、アクチビンによる赤芽球分化誘導は細胞の増殖性を著しく抑制し、感染系の確立のためにはさらなる検討が必要だ。

A. 研究目的

パルボウイルスは不活化や除去が極めて困難なウイルスであり、そのうえウイルス血症時には多量のウイルス粒子が血液中に存在するため、血液製剤から高頻度にウイルスゲノムが検出される。しかし、製剤を投与されたヒトからの感染、発症の報告は非常に稀である。血液製剤中に存在している中和抗体のためだと考えられているが *in vitro* での培養系がないため、証明は困難である。そこで、除去不可能な現時点において、混入しているウイルスが感染性を持つか検討できるような培養系の確立が必要と考え、これを目指した。

B. 研究方法

ヒト赤白血病由来の KU 812 細胞株にパルボウイルスを含む血漿と PCR 法によりウイルスゲノム陽性な第 8 因子製剤を用いて感染させ、感染 2-7 日後に PCR 法と蛍光抗体法を用いて感染の有無を解析した。また、感染効率を高めるために polybren 5 マイクログラム/ml を添加して第 8 因子製剤の感染性を検討した。さらに、パルボウイルスの増殖性を促進するために培養液中に 2 I.U./ml のエリスロポイエチンを加え培養した。

また、パルボウイルスは赤芽球系の細胞に感染することが知られている。一方、アクチビンが強力に細胞株を赤芽球に分化誘導することが知られるようになった。そこで、ヒトアクチビンを用い

てヒト赤白血病由来の KU 812 細胞株を赤芽球に分化させた。アクチビンを培養液に添加し、2 日後にパルボウイルスを感染させ、上記の方法で感染の有無を評価した。

C. 研究結果

第 8 因子製剤に polybren とエリスロポイエチンを添加して感染性を検討したところ、感染 5 日後には培養上清からはゲノムは検出できたが、細胞から抽出した DNA ではパルボウイルスのゲノムは nested PCR を用いても検出できなかった。一方、赤芽球への分化実験において、ヒト由来の細胞から誘導したアクチビンを用いたところ図 1 に示すようにアクチビンだけでは著明な細胞の増殖抑制と細胞死が認められた。そこで、培養に 2 I.U. のエリスロポイエチンを添加したところ細胞死を抑制することができた。アクチビンとエリスロポイエチンで処理 2 日後の細胞のペレットは赤色を呈し、ヘモグロビンが誘導されたと推定された。これらの細胞にパルボウイルスを含む 10 マイクロの血漿を用いて感染させたところ、4 日後蛍光抗体法によって、核に強いシグナルを呈する細胞が極少量だが観察することができた。

D. 考察

KU 812 細胞を polybren やエリスロポイエチンを用いることでパルボウイルスの感染系が確立することを期待したが、製剤の場合、5 日目に培