

養上清からは検出できても核からできなかったことから感染は成立していないと推定された。細胞表面や培養容器に付着したウイルスを検出しているのかもしれない。感染性の血漿を用いてさらなる解析が必要だ。また、アクチピンによる赤芽球分化誘導はエリスロポイエチンを添加することで細胞死を抑制できたが、細胞の増殖性を著しく低下させる結果となった。ウイルスが感染できても増殖できないために、蛍光抗体法でみるかぎり感染細胞が少なかった原因かもしれない。アクチピンとエリスロポイエチンの量を検討し、増殖抑制が少ない条件を求めることが必要だ。

#### E.結論

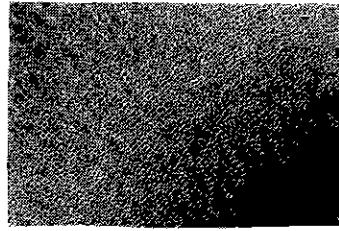
KU 812 細胞を polybren やエリスロポイエチンで処理することで感染効率の向上を目指したが効果を確認できなかった。赤芽球への分化誘導による感染系は条件のさらなる検討が必要だ。

#### F.研究発表

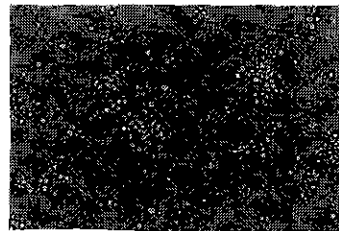
##### 1.論文発表

Okada, Y., E. Abe, K. Komuro, and M. Mizuochi.: Heterosexual transmission of a murine AIDS virus. *J. Virol.* 72; 2541-2543. 1998.

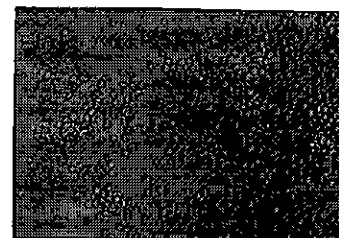
Suruga, Y., M. Makino, Y., Okada, H. Tamaka, E. D. Clercq, and M. Baba.: Prevention of murine AIDS development by (R)-9-(2-phosphonylmethoxypropyl) adenine. *J. Acquir. Immune. Defic. Sydr.* 18: 316-322; 1998.



Control



Activin



Activin + Erythropoietin

Fig.1 Induction of Erythroblast-like Cells  
by Activin and Erythropoietin

## 研究報告書

### 非A～G型肝炎に関する研究

分担研究者 水沢左衛子 国立感染症研究所 主任研究官

協力研究者 岡田義昭、小室勝利 国立感染症研究所

1997年に既知の肝炎ウイルスによらない輸血後肝炎患者から新たなウイルス TTV が発見され、非A～G型肝炎ウイルスとして注目されている。そこで、我々は、現在国内で使用されている血漿分画製剤にどの程度 TTV が混入しているか検討した。凝固因子製剤及び筋注用グロブリン製剤 1 ml から核酸を調製し nested PCR 法によって TTV ゲノム検出を試みた。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 ゲノムは検出されなかった。第VIII因子製剤のうち、モノクローナル抗体精製の 4 ロットからは検出されなかったが、そうでない製剤では 67% (4/6) が陽性であった。また、フィブリノゲンは試験した 3 ロットすべてが陽性であった。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。

#### A. 研究目的

輸血や血液製剤によるウイルス感染のリスクは社会的に憂慮されている問題である。供血者の HBs 抗原と抗 HCV 抗体のスクリーニングが実施されてからは、輸血後肝炎は著しく減少した。しかし、既知の肝炎ウイルスによらない輸血後肝炎が存在しており、TTV は新たな輸血後肝炎の原因ウイルスとして注目されている。血友病患者、透析患者、薬物乱用者などでは TTV 保有率が高いことから、輸血や血液製剤による TTV 感染リスクの把握が必要である。日本の献血者の TTV 保有率は 12% で、スコットランドやアメリカ合衆国の健康な供血者の TTV 保有率 1.9% ないし 1% と比べて高い。そこで、本研究では我が国で使用されている血漿分画製剤にどの程度 TTV が混入しているか検討した。

#### B. 研究方法

材料：高 ALT 値の血漿 20 検体をスクリーニングして TTV 陽性血漿を得た。血漿分画製剤の試験には筋注用グロブリン製剤 14 ロット、第IX因子製剤 11 ロット、第VIII因子製剤 10 ロット、フィブリノゲン 3 ロットを用いた。

DNA 抽出法：スマイテスト Ex R&D(住友金属)を用いて調製した。血漿 100  $\mu$ l は添付文書に従って処理した。

血漿分画製剤は 1 検体 1 ml を試料として基本的には添付文書の 10 倍スケールで処理した。但し、PK 処理を 1 時間に延長、共沈剤を 10  $\mu$ l に減量し、インプロパノール沈殿を少量の蒸留水に溶解して再沈殿、沈殿を 70% エタノールで洗浄・風乾、蒸留水 10  $\mu$ l に溶解して全量を PCR に供した。

nested PCR と単位：1<sup>st</sup> PCR、2<sup>nd</sup> PCR とともに TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、94°C (2') x 1 サイクル、94°C (15")-55°C (15")-72°C (15") x 32 サイクル、72°C (3') x 1 サイクルの反応を行った。プライマーとして次の A から C の 3 セットを用検討した。A (M. Mayumi *et al.* 1997) B (P. Simmonds *et al.* 1998), C (N. Naumov *et al.*)。血漿分画製剤の PCR にはセット B の A5430 と A5427 (5'-CAGACAGAGGAGAAGGCAACATG-3', 5'-TACCAYTTAGCTCTCTATTCTWA-3') 及び A8761 と A5432 (5'-GGMAAYATGYTRTGGATAGACTGG-3', 5'-CTACCTCTGGCATTACCACCA-3') を用いた。増幅産物はアガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイドで染色して検出した。血漿分画製剤では再試験を行って結果の確認を行った。どの試料も 2 回の試験結果は一致した。筋注用グロブリン (試験を繰り返して TTV 陰性を確認したロット) と TTV 陽性血漿

(PL29) を 30  $\mu$ l 添加した筋注用グロブリンを陰性及び陽性コントロールとした。試料から抽出した DNA を蒸留水で 10 倍ずつ段階希釈し、検出限界の TTV ゲノム量を 1 PCR detectable unit (PCR DU) としてあらわすことにした。

TTV PCR 産物の塩基配列決定：血漿からの 2nd PCR 産物はプラスミドベクター pCR2.1 にクローニングして、また血漿分画製剤の 2nd PCR 産物は直接ダイターミネーション法で塩基配列を決定した (ABI 社 310 型 DNA シークエンサー)。

### C. 結果

プライマーの検討：3 種のプライマーセットを用いて nested PCR を行い、高 ALT 値の血漿 20 検体をスクリーニングした。反応は当研究室で各種ウイルスゲノム検出法として日常行っている条件で行った。プライマーセット A で 4 検体、B で 2 検体、C で 1 検体から TTV の PCR 産物が検出され、ぜんたいとしての陽性率は 20% (4/20) であった。シーケンシングの結果プライマーセット A, B による PCR 産物が TTV の増幅産物であることが確認された。次に、血漿 100  $\mu$ l から調製した DNA を段階希釈 (10 倍) して PCR を行い、プライマーによる検出感度を検討した。プライマーセット A は  $10^1$  希釈、B は  $10^3$  希釈まで検出できた。陽性血漿の検出率はプライマーセット A では 4/20 と高かったが、製剤に混入する TTV ゲノムは低濃度と予想されるので、本研究では高感度のプライマーセット B を用いることにした。また、いずれのプライマーセットでも TTV が検出された血漿 (PL29、ALT 値 142) を TTV 陽性血漿コントロールとした。本研究の条件では PL29 の TTV ゲノム量は  $10^3$  PCR DU/ml であった。

血漿分画製剤への TTV の混入：現在我が国で使用されている各種血漿分画製剤 35 ロットについて TTV の混入について検討した。グロブリン製剤としては比較的精製度の低い筋注用免疫グロブリン製剤 7 ロット、抗 HBs 免疫グロブリン製剤 (筋注用) 7 ロット計 14 ロットを調べたがすべて陰性であった。第 IX 因子製剤 11 ロットはすべて陰性であった。第 VIII 因子製剤ではモノクローナル抗体精製第 VIII 因子 4 ロットすべてが陰性であつ

たが、モノクローナル抗体で精製していない第 VIII 因子製剤では 67% (4/6) が陽性であった。このうち 1 ロットには 10 PCR DU/ml の TTV ゲノムが混入していた。TTV 同様に non-envelope DNA ウイルスであるパルボウイルス B19 の nested PCR を行った結果、すべての第 VIII 因子のロットが陽性であった。フィブリノゲンは 100% (3/3) が TTV 陽性、パルボウイルス B19 陽性であった。このうち 2 ロットには 10 PCR DU/ml の TTV ゲノムが混入していた。

### D. 考察と結論

Simmonds らによると血漿分画製剤に混入する TTV ゲノムは極めて少量なため、検出には 5-10ml を超遠心してウイルスの濃縮が必要であったが、スコットランドでは第 VIII 因子の 56%、第 IX 因子製剤の 44% が陽性であった。また、TTV は non-envelope ウイルスで S/D 処理に耐性のため、S/D 処理製剤からも TTV ゲノムが検出されたが、加熱製剤からは検出されなかった。製剤のウイルス不活化処理以降に治療を受けた血友病患者の TTV 保有率が一般のレベルであることから、S/D 法も加熱処理も TTV 不活化に有効と報告している。本研究では、加熱フィブリノゲン及びモノクローナル抗体で精製していない加熱第 VIII 因子製剤 1ml から TTV ゲノムを検出した。これは日本における TTV 保有率がスコットランドの 10 倍でほど高いためと考えられるが、また、TTV ウイルス量が多い場合には加熱処理してもなお 10 PCR DU/ml の TTV が検出されるロットがあること示された。Simmonds らの方法と我々の方法とで検出感度が同じと仮定すると、これらの製剤にはスコットランドの製剤の 10-100 倍の TTV ゲノムが混入していることになる。ウイルス量が多い場合に、加熱処理によって TTV が十分に不活化されるかどうかを知ることはゆいぎであると、製剤を投与された患者の疫学的な研究が必要であろう。TTV と輸血後肝炎や劇症肝炎との関連が報告される一方で、我が国の健康者で保有率が高いことから、TTV の病原性については研究が進められている段階である。

### F. 研究発表 該当なし

表1. 各種血漿分画製剤中のTTVウイルスゲノムの検出

製剤	製造者	ウイルス除去・不活化	TTV陽性
乾燥濃縮第Ⅷ因子製剤 モノクローナル抗体精製	A	S/D処理、	0 / 4
	B	加熱、	2 / 4
	C	加熱	2 / 2
乾燥濃縮第Ⅷ因子製剤	B	加熱、ウイルス除去膜	0 / 3
乾燥濃縮第Ⅸ因子製剤	C	加熱、ウイルス除去膜	0 / 3
第Ⅸ因子複合体	D	加熱、ウイルス除去膜	0 / 3
第Ⅸ因子複合体	E	加熱、輸入製剤	0 / 2
筋注用人免疫グロブリン	B	ウイルス除去膜	0 / 2
	C	ウイルス除去膜	0 / 2
	D	ウイルス除去膜	0 / 2
	F	加熱、輸入製剤	0 / 1
抗BHs人免疫グロブリン	A		0 / 1
	B	ウイルス除去膜	0 / 2
	C	ウイルス除去膜	0 / 2
	D	ウイルス除去膜	0 / 2

## 接触及び血液由来感染症の防御対策に関する研究

(代表研究者：小室勝利)

### HHV、CMV に関する研究

分担研究者	岩崎琢也	国立感染症研究所感染病理部室長
研究協力者	倉田 毅	国立感染症研究所感染病理部部長
	谷口貴代美、旭 泰子	国立感染症研究所感染病理部
	山本あつ子	三井記念病院小児科科長

**研究要旨**  $\beta$ -ヘルペスウイルスに分類されるヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6)、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV7)は血液系細胞の潜伏感染が示唆され、血液を介した感染症が問題となる。今年度は昨年度開発した HHV6B の single PCR による高感度検出法について、再現性と予想サイズ外の増幅産物について検討した。また、HCMV についての検討も開始した。HHV6 については、突発性発疹の時期ならびに回復期に採血したのべ34検体について3回の解析を行ない、再現性について検討した。また、PCR の予想サイズ以外の増幅産物についても検討を行い、ウイルスゲノム由来ならびに宿主遺伝子由来を区別した。

#### A. 研究目的

ヘルペス群ウイルス(human herpesviruses, HHV)は初感染後体内に潜伏性に感染することを特徴とし、それぞれ潜伏する細胞が異なる。本分担研究においては血液系細胞に潜伏する $\beta$ -ヘルペスウイルスのヒトサイトメガロウイルス (HCMV) (HHV5)、ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV6)、ヒトヘルペスウイルス (HHV7) と $\gamma$ -ヘルペスウイルスのヒトヘルペスウイルス 8 (HHV8) ならびに Epstein-Barr ウイルス (EBV) (HHV4)が対象としている。本研究ではこれらのウイルスについて血液細胞ならびに血漿中のウイルスゲノムの検出法を確立し、血液を介した感染において有用な情報を獲得し、その意義とその防止方法を確立することが目的となる。

HCMV の初感染は胎児においては先天性疾患を引き起こし、生後の初感染では伝染性単核球症様の症状を稀に示し、その再活性化に伴って、重篤な局所性あるいは全身性の HCMV 感染を引き起こす。HHV6 の初感染は突発性発疹であり、熱性痙攣の原因であることが示唆されているが、それ以外の疾患における病原性は明らかにされていない。HHV7

も同様に山西らにより突発性発疹の原因であることが示されたが、それ以外の病原性は不明である。HHV8 は Kaposi 肉腫、body cavity-based lymphoma, Castelman 症候群の原因ウイルスとして同定されているが、その疫学ならびに感染経路、初感染の臨床症状など不明な点が多い。EBV は伝染性単核症の原因ウイルスで、日和見リンパ腫、Burkitt リンパ腫、Hodgkin 病、さらには胃ガン、日和見平滑筋肉腫の原因となることが最近明らかにされている。

今年度の解析は初年度の昨年度に引き続き、HHV6 の血液細胞の感染について解析を行った。昨年度は、HHV6 の 10 コピーのウイルスゲノムを検出できる PCR による検出法を開発し、実際の臨床検体において有用であることを確認した。また、増幅産物の切断パターンにより、2 種類のサブタイプが可能であることも示した。今年度は、この PCR による解析の信頼度を確認するために同一サンプルについて3回の解析を行い、その再現性、さらには、予想サイズ外の増幅産物について、増幅産物の塩基配列を検討し、ウイルスゲノムあるいはヒトゲノム由来かについても検討した。

## B. 材料と方法

ウイルスゲノム：HHV6B Z29 株の制限酵素切断断片が挿入されたプラスミドベクターの組み換え体を米国アトランタ州、Centers for Disease Control の P.E. Pellett 博士より供与を受けた。また、HHV6B の Hst 株を大阪大学細菌学教室の山西教授より供与を受け、MT4 細胞に感染させ、感染細胞より核酸を抽出して使用した。

血液細胞：乳幼児を含めた症例より採血した 2 ml ないし 1 ml のヘパリン血より、単核細胞をリンホプレップチューブ (Nycomed Pharma AS, Norway) を使用し、その使用書に従い、分離した。なお、分離する前に、血漿成分をあらかじめ、遠心分離により分け、別に保存した。

核酸の抽出：DNA ならびに RNA をそれぞれ独立して抽出精製した。DNA は SDS, EDTA の存在下で Proteinase K (Boehringer Mannheim, Germany) 処理を行い、その後、フェノールを用いて蛋白を除去し、エタノール沈殿により精製した。RNA は Trizol (Life Tech BRL) を使用し、使用書に従い RNA を分離精製した。

PCR：昨年度設計した HHV6 の主要カプシド蛋白の ORF 内に設計したプライマーを使用して検討した。PCR の反応条件は 94 度 30 分、56 度 1 分、72 度 5 分で 40 サイクル行い、最後に 72 度 10 分を加え、以後 PCR 産物は 4 度に保存した。増幅産物の確認は 2%アガロースゲル電気泳動を低電圧の条件で行い、終了後 Ethidium bromide で染色し、紫外線下で観察した。PCR による増幅産物が目的の塩基配列であるかの確認は増幅産物を種々の制限酵素を用いて切断し、アガロース電気泳動にてその切断様式を検討した。

増幅産物の塩基配列の解析：予想サイズならびに予想サイズ外の一部の増幅産物について塩基配列を解析した。1.5%アガロースゲル電気泳動を行い、長波長の紫外線下で目的の産物をゲルより切り出し、pGEM-T ベクターに TA クローニングを行い、ベクターのクローニング部位の両端にある塩基配列をプライマーとし、dideoxy-dye termination 法によりを解析

した。

## C. 結果

### 1. HHV6 ウイルスゲノムの PCR 解析

a. 昨年度に引き続き臨床解析。総計 56 検体の末梢血単核細胞から抽出した DNA サンプルについて HHV6 のウイルスゲノムの有無を PCR により検討した。うち 35 検体が陽性であった。これらの例の大部分は 1 才未満の症例で、かつ発熱を伴った例である。

### b. 再現性の解析。

a で解析した症例のうち、30 検体 (17 例) の乳幼児の末梢血単核細胞から抽出した核酸において、HHV6 のウイルスゲノムの有無について、3 度解析を行った (表)。その結果、3 度とも陽性となったのは 11 検体 (9 例) で、うち 5 例は血清抗体価の変動より HHV6 による突発性発疹と診断されている。また、3 例は HHV7 によると思われる突発性発疹症例で、急性期には HHV6 は検出されず、回復期の末梢血単核細胞にウイルスゲノムが検出されている。

10 検体では 3 度の解析のうち 1 回あるいは 2 回陰性となり、検体中のウイルスゲノムが微量であるか、測定誤差と判断した。なお、これらの例においては PCR による  $\beta$ -globin の検出は陽性であった。

### c. 予想外サイズの増幅産物の解析。

b の再度の解析のうち、予想サイズの 4 kb 以外のサイズの増幅産物が認められることがあった。この予想外サイズの大きさには一定のサイズに集中する傾向がみられ、4.6 kb, 2.5 kb, 1 kb, 0.5 kb が頻回に認められた。これらの 4 種類の増幅産物ならびに予想サイズの増幅産物について、塩基配列を検討した。その結果、4 kb 以外にも 1 kb と 0.5 kb の増幅産物が HHV6 の MCP 領域の塩基配列を有していることが判明した。のこりの、4.6 kb と 2.5 kb の産物はヒトゲノム由来であることが推定された。

### 2. HCMV のウイルスゲノムの PCR による解析。

Soederberg-Naucier C らの報告 (Cell 91: 119-126, 1997) に基づき nested PCR のプライマーを合成し、上記の臨床検体について検討を行った。全例陰性であった。

Case	Age (year)	HHV6 genome	$\beta$ -globin
A	1 0.8	3/3	+
	2 0.9	3/3	+
B	1 0.3	0/3	+
	2 0.4	3/3	+
C	1	3/3	+
D	1 1.3	3/3	+
	2 1.4	2/3	+
E	1 0.7	0/3	+
	2 0.8	3/3	+
F	1 0.8	0/3	+
	2 0.8	0/3	+
G	1 0.7	3/3	+
H	1 0.9	2/3	+
	2 1.0	1/3	+
I	1 0.7	1/3	+
	2 0.8	1/3	+
J	1 1.2	1/3	+
	2 1.6	0/3	+
K	1 0.8	1/3	+
	2 1.1	2/3	+
L	1 0.8	3/3	+
	2 0.8	3/3	+
M	1 0.8	0/3	+
N	1 0.8	0/3	+
	2 0.8	3/3	+
O	1 0.4	2/3	+
	2 0.7	3/3	+
P	1 1.2	1/3	+
	2 1	0/3	+
Q	1 0.9	1/3	+

表. 末梢血単核細胞より抽出した DNA の HHV6 MCP 領域を標的とした PCR によるウイルスゲノム検出。症例は A-Q の 17 症例。1 は急性期（発熱時）、2 は回復期。年齢は年で表示。月齢は 12（年）の商。ウイルスゲノム検出は 3 度繰り返し分子はその陽性の回数。

#### D. 考察

本研究の目的は HHV の血液ならびに血液製剤を介した感染症の防御対策に有用な診断法の開発、改良、標準化である。HHV6B に対する血清抗体価の疫学的解析より、このウイルスの感染は大多数の人が生後 3 才までに感染を受けていることが明らかにされている。一方、HCMV 感染は成人の 50%以上が抗体価陽性であり、若年時に水平感染していると考えられている。

初年度と第 2 年度の対象とした 56 検体は 2 才未満の乳幼児で、かつ発熱を契機として来院した症例で、HHV6 の初感染例が必然的に多く含まれている。これらの例において、急性期に高頻度に検出される場合と、回復期にのみ検出される場合、急性期（発熱時）と回復期の両者にもみられる場合の 2 通りの組み合わせが存在し、急性期にみられる場合は HHV6 による突発性発疹の症例であることが多く、回復期にみられる場合は他の疾患の症例に多く認められた。したがって、HHV6 が末梢血単核細胞中に多量に出現する疾患としては、急性期の HHV6 感染による突発性発疹と、他の疾患で、何らかの機転で再活性化した症例があることになる。

現在行っている HHV6B の 10 コピー数の感度の single PCR の解析系の対象に使用している末梢血由来単核細胞の DNA 量は 100 ng 前後であり、これは細胞数としては  $10^5$ - $10^6$  個から抽出した DNA に相当する。末梢血 2-10ml 中には論理的には  $4-6 \times 10^3 \times 10^3 \times 2-10 = 8-60 \times 10^6$  と  $10^7$  前後の細胞数が存在し、輸血量が 200 ml から 500 ml とすると、この細胞数はさらに 2 桁増加し、ほとんどの場合 HHV6 感染細胞が混入してしまう可能性がある。現時点で、HHV6 抗体陽性ゲノム陰性の血液では何個の細胞あたり感染細胞が存在するかの推定はできていない。今後、この点を検討する必要がある。また、血漿中のウイルスゲノム量についても今後検討する必要がある。

予想サイズ外の増幅産物についての塩基配列解析により、増幅産物にはウイルスゲノム由来とヒトゲノム由来があることが判明した。また、条件によっては 4 kb の予想サイズの増幅産物がみられず、短いウイルスゲノム由来の増幅産物のみがみられた。このことは PCR の条件によっては短絡的な PCR が生じてしまう可能性を意味している。この点については



さらに PCR の条件等の改善を必要としている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Chen Z, Sahashi Y, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Comparison of the ability of viral protein-expressing plasmid DNAs to protect against influenza. *Vaccine* 16: 1544-1549, 1998

Mitsuishi T, Sata T, Iwasaki T, Matsukura T, Manaka I, Nogita T, Ohara K, Kawashima M: The detection of human papillomavirus 16 DNA in erythroplasia of Queyrat invading the urethra. *Br J Dermatol* 138: 188-203, 1998

Yoshikawa T, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Suga S, Iwasaki T, Kurata T, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y: Human herpesvirus 6 latently infects mononuclear cells but not liver tissue. *J Clin Pathol* 52: 65-67, 1999

Iwasaki T, Tamura S, Kumasaka T, Sato Y, Hasegawa H, Asanuma H, Aizawa S, Yanagihara R, Kurata T: Exacerbation of influenzavirus pneumonia by intranasal administration of surfactant in a mouse model. *Arch Virol* (in press)

Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, Takashima I: Pathogenicity of tick-borne encephalitis isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* (in press)

Chen Z, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S: Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs. *Vaccine* 17: 653-659, 1999

### 2. 学会発表

熊坂利夫、佐多徹太郎、岩崎琢也、植草俊公、須田耕一、倉田毅: 膠原病肺における KHSV (HHV8) の検出。第 87 回日本病理学会総会 1998, 4, 東京

岩崎琢也、笠原健弘、佐藤由子、佐多徹太郎、倉田毅: VZV 感染における前初期蛋白 ORF63 産物の発現。第 87 回日本病理学会総会 1998, 4, 東京

千葉暢行、岩崎琢也、水谷哲也、刈和宏明、倉田毅、高島郁夫: ダニ脳炎ウイルス北海道分離株のマウスに対する病原性。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

永田典代、網康至、吉井久美子、須崎百合子、原島綾子、岩崎琢也、倉田毅: ポリオウイルスレセプター遺伝子導入トランスジェニックマウス PVR-Tg21) とカニクイサルにおけるポリオウイルス病

原性の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

荒尾雄二郎、岩崎琢也、山田雅夫、倉田毅: Human herpesvirus 6 variant B (HHV-6B) によるヒト単球系 U937 細胞の増殖抑制は HHV-6B 複製によらず、連鎖反応的に拡大する。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

岩崎琢也、佐藤由子、谷口貴代美、熊坂利夫、田村慎一、倉田毅: インフルエンザウイルス気道感染に及ぼすサーファクタントの影響。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

陳則、松尾和俊、浅沼秀樹、高橋秀宗、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルスの主要な蛋白質を発現するプラスミド DNA の感染防御能力の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

松尾和俊、陳則、浅沼秀樹、岩崎琢也、倉田毅、田村慎一、鈴木雄二郎、相沢主税: インフルエンザウイルス経鼻感染および経鼻ワクチン接種時のマウス NALT 領域でのサイトカイン mRNA の比較。第 46 回日本ウイルス学会総会 1998,10, 東京

## 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

分担研究者 阿部賢治 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官

### 研究要旨

全長 9387 nt よりなる日本人肝疾患患者血清由来 HGV を分離し、HGV-IM71 と命名した。HGV-IM71 は 2873 個のアミノ酸をコードする polyprotein と、458 nt と 310 nt よりなる 5'-UTR と 3'-UTR 各々有していた。3'-UTR 終末部に poly-A は存在しなかった。既知の GBV-C/ HGV 株を比較すると、塩基レベルで西アフリカ株(GBV-C)とは 81.1%、米国株(HGV-PNF2161)とは 85.1%、日本株(GT230)とは 86.5%の相同性を有していた。分子系統樹解析では大きく三群に大別でき、HGV-IM71 はアジア型に分類できた。更に同一患者血清から 12 年前に分離された約 6Kb の HGV 遺伝子との比較から、その変異速度は  $0.8 \times 10^{-3}/\text{site}/\text{year}$  と推定された。

### A. 研究目的

近年新たな肝炎ウイルスとして発見された 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することを目的とした。更に、分離株の変異速度を求めた。

### B. 研究方法

HBV, HCV, HGV の持続感染（三重感染）を認める日本人肝硬変患者を対象とした。さらに、現在と 12 年前の血清から HGV を分離し比較検討した。方法は、血清 100ul より RNA を抽出し nested RT-PCR 法により HGV の各領域を増幅後、サブクローニング法にて塩基配列を決定した。全長遺伝子の解析に際しては、12 のフラグメントに区分けした。5'-UTR および 3'-UTR 領域は RACE 法にて増幅した。特に、後者に際しては、poly(A) polymerase を用いた polyadenosine 付加後に RACE 法を実施した。これは、HGV の場合、3'-UTR 終末部には、poly(A) が存在しないとされることによる。分離株は、database より入手した既知の HGV を含めて、近隣結合法を用いて分子系統樹解析を行った。

### C. 研究成果

全長 9387 nt よりなる HGV(HGV-IM71 と命名： DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号 =AB008342)を分離した。HGV-IM71 は、2873 個のアミノ酸をコードする polyprotein と、458 nt と 310 nt よりなる 5'-UTR と 3'-UTR 各々有していた。3'-UTR 終末部に poly-A は存在しなかった。既知の HGV/GBV-C 株と比較した結果、塩基レベルで西アフリカ株(GBV-C)とは 81.1%、米国株(HGV-PNF2161)とは 85.1%、日本株(GT230)とは 86.5%の相同性を有していた。各領域別におけるサイズは、以下の通りであった。Core=141 nt, 47 aa; E1=564 nt, 188 aa; E2=1161 nt, 387 aa; NS2=843 nt, 281 aa; NS3=2031 nt, 677 aa; NS4=945 nt, 315 aa;

NS5a=1245 nt, 415 aa; NS5b=1689 nt, 563 aa。分子系統樹解析の結果、HGV-IM71 は 3 型（アジア型）に分類できた（図 1）。更に同一患者の 12 年前の血清からも同様の方法で HGV ゲノム（約 6Kb）を分離し、IM71 株と比較した結果、その変異速度は  $0.8 \times 10^{-3}/\text{site}/\text{year}$  と推定された。また HCV のエンペロープ領域に存在する高変異領域に相当する領域は、IM71 株には認められなかった。

### D. 考察

HGV-IM71 は既知の HGV/GBV-C 株とは高い相同性を有していた。一般の RNA ウイルスと同様に時間の推移による遺伝子変異を認めたと、HCV にみられる高変異領域を示唆する所見は得られなかった。HGV 遺伝子の大きな特徴の一つに、極端に短いコアゲノムの存在がある。IM71 株においても同様で、コア領域のアミノ酸残基数はわずか 47 個であった。このような不完全なウイルスがどのようにして自己増殖をし、キャリアに移行するのか、また病原性との関連は、などについて今後も検討を加えたい。

### E. 結語

日本人肝疾患患者血清から HGV の全長遺伝子を分離し、IM71 と命名した。IM71 株は 3 型（アジア型）に属し、既知の HGV/GBV-C 株とは高い相同性を示した。またその時間的推移による変異速度を求めた。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Tamiko Saito, Teiichiro Shiino, Yasuyuki Arakawa, Shigeki Hayashi, Kenji Abe: Geographical characterization of hepatitis G virus genome: evidence for HGV genotypes based on phylogenetic analysis. Hepatology Research 10: 121-130, 1998

2) Ikuo Miyauchi, Mitsuhiko Moriyama, David Y. Zhang, Kenji Abe: Further study of hepatitis C virus RNA detection in formalin-fixed, paraffin-embedded liver tissues by ligation-dependent polymerase chain reaction. *Pathology International* 48: 428-432, 1998

3) Kenji Abe, Yoshihiro Edamoto, Young Nyun Park, Abraham M.Y. Nomura, Teresa Casanovas Taltavull, Masayoshi Tani, Swan N. Thung: In situ detection of hepatitis B, C and G virus nucleic acids in human hepatocellular carcinoma tissues from different geographic regions. *Hepatology* 28: 568-572, 1998

4) Kenji Abe, Nami Konomi: Hepatitis C virus RNA in dried serum spotted onto filter paper is stable at room temperature. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 3070-3072, 1998

5) Tamiko Kaneko, Shigeki Hayashi, Yasuyuki Arakawa, Kenji Abe: Molecular cloning of full-length sequence of hepatitis G virus genome isolated from a Japanese patient with chronic liver disease. *Hepatology Research* 12: 207-216, 1998

6) Kenji Abe, Nami Konomi, Mohamed Abdel-Hamid: Direct polymerase chain reaction for detection of hepatitis B, C and G virus genomes from serum without nucleic acid extraction—simple, rapid and highly sensitive method. *Hepatology Research* 13: 62-70, 1998

7) Takahide Saito, Koh-ichi Ishikawa, Mubarak Osei-Kwasi, Tamiko Kaneko, James A. M. Brandful, Victor Nuvor, Simeon Aidoo, William Ampofo, Frank A. Apeagyei, Jane E Ansah, Yaw Adu-Sarkodie, Francis K. Nkrumah and Kenji Abe: Prevalence of hepatitis G virus and characterization of viral genome in Ghana. *Hepatology Research* 13: 221-231, 1999

8) Thomas D. Schiano, Maria Isabel Fiel, Kenji Abe, Swan N. Thung and Henry C. Bodenheimer: Absence of hepatitis G virus within liver tissue of patients undergoing liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Transplantation* (in press)

9) Hideo Naito, Khin Maung Win and Kenji Abe: Identification of a novel genotype of hepatitis G virus in Southeast Asia. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1217-1220, 1999

10) Abdel Rahman El-Zayadi, Kenji Abe, Osaima Selim, Hideo Naito, Georg Hess and Adham Ahdy. Prevalence of HGV viraemia among blood donors, health care personnel, chronic non-B non-C hepatitis, chronic hepatitis C and hemodialysis patients in Egypt. *Journal of Virological Methods* (in press)

## 2. 学会発表

1) K Abe, N Konomi, M Abdel-Hamid: Direct PCR for detection of hepatitis B, C and G virus genomes from serum without nucleic acid extraction—simple, rapid and highly sensitive method. 49th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1998, Chicago, U.S.A.

2) K Abe, H Naito, T Kurata, H Sato, Y Takebe, DY Zhang: Prevalence of HCV and HGV in patients infected with HIV: Isolation of a new HGV genotype. 49th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1998, Chicago, U.S.A.

3) N Konomi, K Abe: Dried serum hepatitis C virus RNA spotted onto filter paper is stable at room temperature. 49th Annual Meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, November 1998, Chicago, U.S.A.

4) 内藤秀夫、斎藤民子、倉田 毅、林茂樹、阿部賢治: G型肝炎ウイルス遺伝子5'非翻訳領域の塩基構造と翻訳開始コードン位置の関係. 第87回日本病理学会総会、1998年4月、広島

5) 内藤秀夫、佐藤裕徳、武部 豊、倉田 毅、David Y. Zhang、阿部賢治: HIV感染者におけるHCVおよびHGV感染の地理疫学調査. 第87回日本病理学会総会、1998年4月、広島

6) 斎藤民子、椎野禎一郎、荒川泰行、林茂樹、倉田 毅、阿部賢治: 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. 第87回日本病理学会総会、1998年4月、広島

7) 許斐奈美、Mohamed Abdel-Hamid、倉田 毅、阿部賢治：血清を直接用いたDirect (RT)-PCRによるウイルスRNA/DNAの検出。第87回日本病理学会総会、1998年4月、広島

8) 許斐奈美、荒川泰行、倉田 毅、阿部賢治：濾紙スポット血清を用いたC型肝炎ウイルスRNAの検出。第87回日本病理学会総会、1998年4月、広島

9) 山口真理、薄井 貢、浅井義征、David Y. Zhang、阿部賢治：新しい遺伝子診断法 (LD-PCR法)の肝炎ウイルス感染症領域における有用性の検討。第87回日本病理学会総会、1998年4月、広島

10) 許斐奈美、Mohamed Abdel-Hamid、荒川泰行、阿部賢治：核酸抽出せずに血清を直接用いたDirect-PCRによる肝炎ウイルス感染症の迅速診断。第2回日本肝臓学会大会、1998年10月、金沢

11) 許斐奈美、三好知明、枝元良広、内藤秀夫、金子民子、武田直和、Enrigueta Rojas、阿部賢治：ボリビアにおける肝炎ウイルスの血清疫学とHGVの分子クローニング。第2回日本肝臓学会大会、1998年10月、金沢

12) 内藤秀夫、佐藤裕徳、武部 豊、倉田 毅、David Y. Zhang、阿部賢治：HIV感染者におけるHCV・HGV感染の分子疫学と新しいHGVゲノタイプの分離。第2回日本肝臓学会大会、1998年10月、金沢

13) 内藤秀夫、斎藤民子、倉田 毅、林茂樹、阿部賢治：G型肝炎ウイルス遺伝子5'非翻訳領域の塩基構造と翻訳開始コドン位置との関係。第2回日本肝臓学会大会、1998年10月、金沢

14) 枝元良広、木内哲也、許斐奈美、阿部賢治、田中紘一：成因不明劇症肝炎におけるTTV感染の検討－TTV感染の疑われた生体肝移植症例。第2回日本肝臓学会大会、1998年10月、金沢

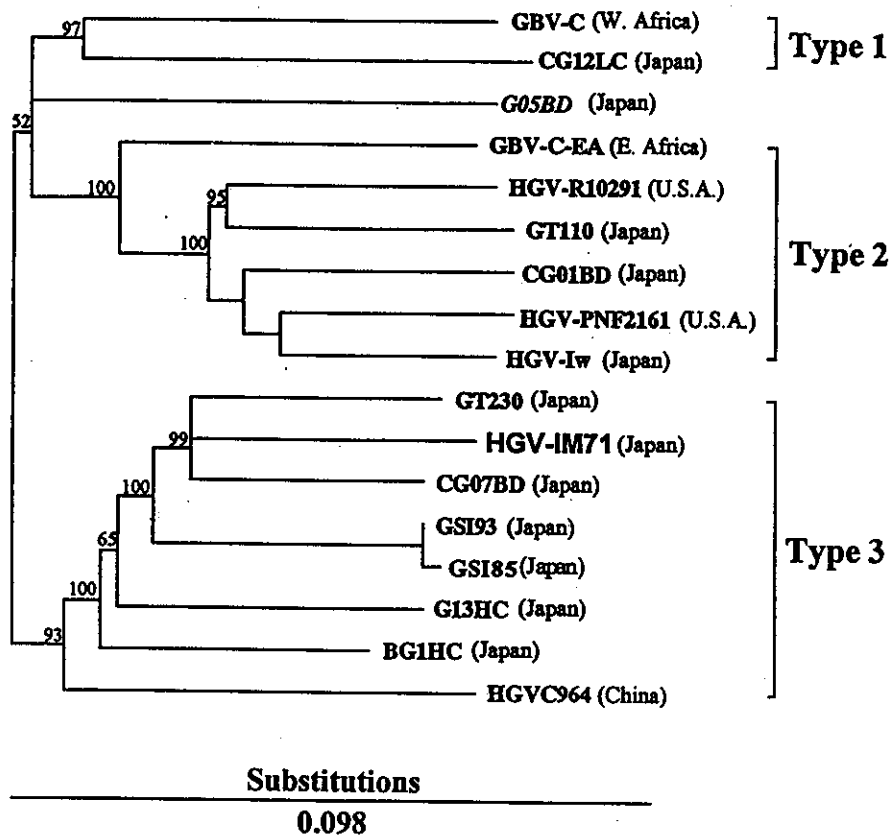


図1. HGV/GBV-C 全長遺伝子からなる分子系統樹とゲノタイプ分類。

厚生科学研究「新興・再興感染症研究事業」  
接触及び血液由来感染症の防御対策に関する研究班

平成10年度 分担研究報告

分担研究計画  
血液成分のウイルス、細菌除去、不活化法の開発

分担研究者 関口定美 北海道赤十字血液センター所長  
研究協力者 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

### 研究要旨

輸血用血漿製剤の安全性を高める方法として、メチレンブルーと光照射を組み合わせたウイルス光不活化法がある。今回ヒト免疫不全ウイルス（HIV）を用い、メチレンブルー光不活化システムについて検討した。血漿にHIVあるいはHIV産生細胞Molt4<sub>III</sub>を添加し、本システムに組み込まれた細胞除去フィルターを介して、メチレンブルーがあらかじめ入った血液バッグに移し、光照射した。添加したHIV（感染価 $10^{6.2}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL）は20 J/cm<sup>2</sup>の照射により検出限界まで不活化され、6.7 log<sub>10</sub>の不活化率が得られた。一方Molt4<sub>III</sub>を用いた検討では、処理後の血漿にはHIV感染性は認められず、HIV DNAも検出されなかった。また処理後の血漿には赤血球、白血球、血小板は認められなかった。血漿中凝固第VIII因子活性は、20 J/cm<sup>2</sup>照射により低下したものの、その後-80℃、1年間の保存においても76%以上維持されていた。以上の結果より、本システムにより血漿製剤の凝固活性を損なうことなく、細胞外、細胞内HIVの感染性除去が可能であることが分かった。

### A. 研究目的

輸血用血漿製剤による輸血後感染を防止し、その安全性を高める方法として、メチレンブルーと光照射を組み合わせたウイルス光不活化法がある。この方法は血漿中に浮遊するウイルス（細胞外ウイルス）には有効であるが、白血球に潜伏しているウイルス（細胞内ウイルス）の不活化が困難であると報告されている。そこで細胞内ウイルスを不活化するため実際的に行われているのが、血漿の凍結融解を行い、白血球を破壊する方法である。この方法はまた、細胞内ウイルスを光不活化の作用を受けやすくすることにもなる。しかし、最近の別の報告では凍結融解後もかなりの数の白血球が生存していることが示されており、凍結融解による細胞内ウイルス不活化効果の懸念となっている。一方、細胞内ウイルスの不活化するには、フィルターにより感染細胞そのものを除去することが有効であると考えられる。今回このような方法を採用したシステムが考案されたので、本研究において検討した。

### B. 研究方法

#### 血漿

献血者由来新鮮血漿を用いた。採血当日分離血漿は凝固活性の検討に、採血翌日分離血漿はウイルス不活化実験に用いた。

#### MB光不活化処理

HIV産生細胞Molt4<sub>III</sub>をRPMI1640/FCS10%（RPMI(10)）で37℃、5% CO<sub>2</sub>下で培養し、その培養上清をHIV懸濁液として用いた。プール後小分けした血漿225 mLにHIV懸濁液25 mLを添加し、フィルターを内蔵したバッグ回路に無菌的に接続した。その後1.5 mの高さからフィルター濾過を介してMB入りバッグに血漿を移した。この時MB終濃度は1 μMである。専用光照射装置にて最大20 J/cm<sup>2</sup>の可視光を照射した。

Molt4<sub>III</sub>をPBSで洗浄し、細胞内HIVとして用いた。血漿にMolt4<sub>III</sub>を終細胞数 $1 \times 10^4$  cells/mLで添加し、MBバッグにフィルターを介して移した後、20 J/cm<sup>2</sup>の可視光を照射した。

HIV感染性はM10細胞を宿主とし、抗HIV血清を用いた間接蛍光抗体法により検出した後、Reed-Muench法により感染価TCID<sub>50</sub>を算出した。

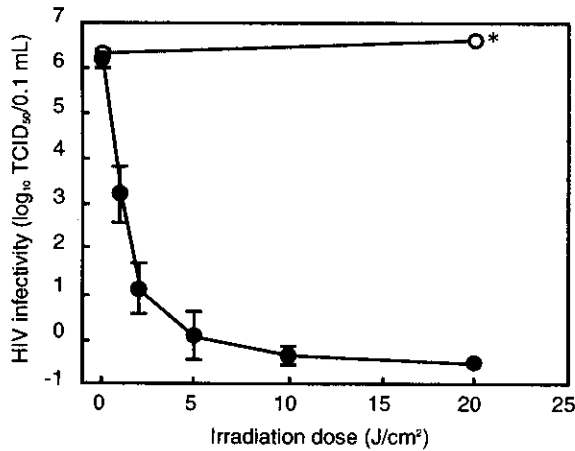


Figure 1. HIV inactivation in fresh plasma by MB phototreatment. Fresh plasma spiked with HIV was filtered and irradiated in the presence of 1  $\mu$ M MB. Closed symbols, phototreated plasma; open symbols, plasma kept in the dark. Results are from three experiments (mean  $\pm$  SD). Error bars are not shown when smaller than symbols. \*n = 1.

#### 細胞数計測

赤血球はノイバウエル血球計算版，白血球はフローサイトメーター，血小板は自動血球計数装置にて計測した。また，白血球に対しては $\beta$ -グロビン遺伝子を，Molt4<sub>infB</sub>はHIV DNAを標的としたPCRを行い，検出を行った。

#### 血漿凝固活性

市販のキットを用い，凝固法により，第VIII因子活性，フィブリノゲン，活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT），プロトロンビン時間（PT）を測定した。

### C. 研究結果

#### HIV感染性の除去

血漿に添加したHIVは光照射量依存的に不活化

Table 1. HIV infectivity in fresh plasma spiked with Molt4<sub>infB</sub>.

		IF assay (culture days)		
		day 5	day 7	day 11
Exp. 1	pretreatment	+++	+++	+++
	treated	NC	NC	-
Exp. 2	pretreatment	+++	NT	NT
	treated	NC	NC	-

NC, noncommittal; NT, not tested.

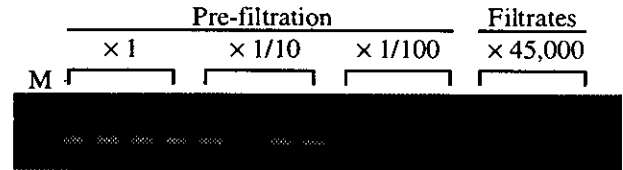


Figure 2. HIV DNA in Molt4<sub>infB</sub>-inoculated FP before and after the filtration. A serially 10-fold diluted samples of pre-filtered FP and a concentrated samples of filtered FP was analyzed by nested-double PCR for HIV DNA in quadruplicate.

され，6.2 log<sub>10</sub>の感染性は2 J/cm<sup>2</sup>照射で1.1 log<sub>10</sub>に減少し，20 J/cm<sup>2</sup>照射では検出限界以下となった（図1）。その結果6.7 log<sub>10</sub>の不活化が得られた。光照射をしない場合は，MBが存在してもHIVは不活化されなかった。

Molt4<sub>infB</sub>添加血漿を濾過し光照射処理したところ，処理血漿を遠心して得た細胞画分のHIV感染性は検出されなくなった（表1）。しかし，濾過のみではHIV感染性を除去することはできなかった（データ示さず）。一方，PCRによりHIV DNAの検出を試みたところ，遠心して得た細胞画分からHIV DNAは検出されなかった（図2）。

#### 処理血漿中の残存血球

処理前の血漿は1バッグ当たり，白血球，赤血球，血小板をそれぞれ10<sup>6</sup>個，10<sup>7</sup>個，10<sup>9</sup>個オーダーで含んでいることが分かった。しかし濾過後にはいずれの血球成分も検出限界以下となった。白血球がもつ $\beta$ -グロビン遺伝子はPCRで検出されたが，DNA分解酵素に感受性であり，非細胞性のDNAに由来するものであることが分かった（データ示さず）。

#### 血漿凝固活性

MB光処理により，凝固第VIII因子活性，フィブリノゲン活性の低下がみられた（図3）。しかし保

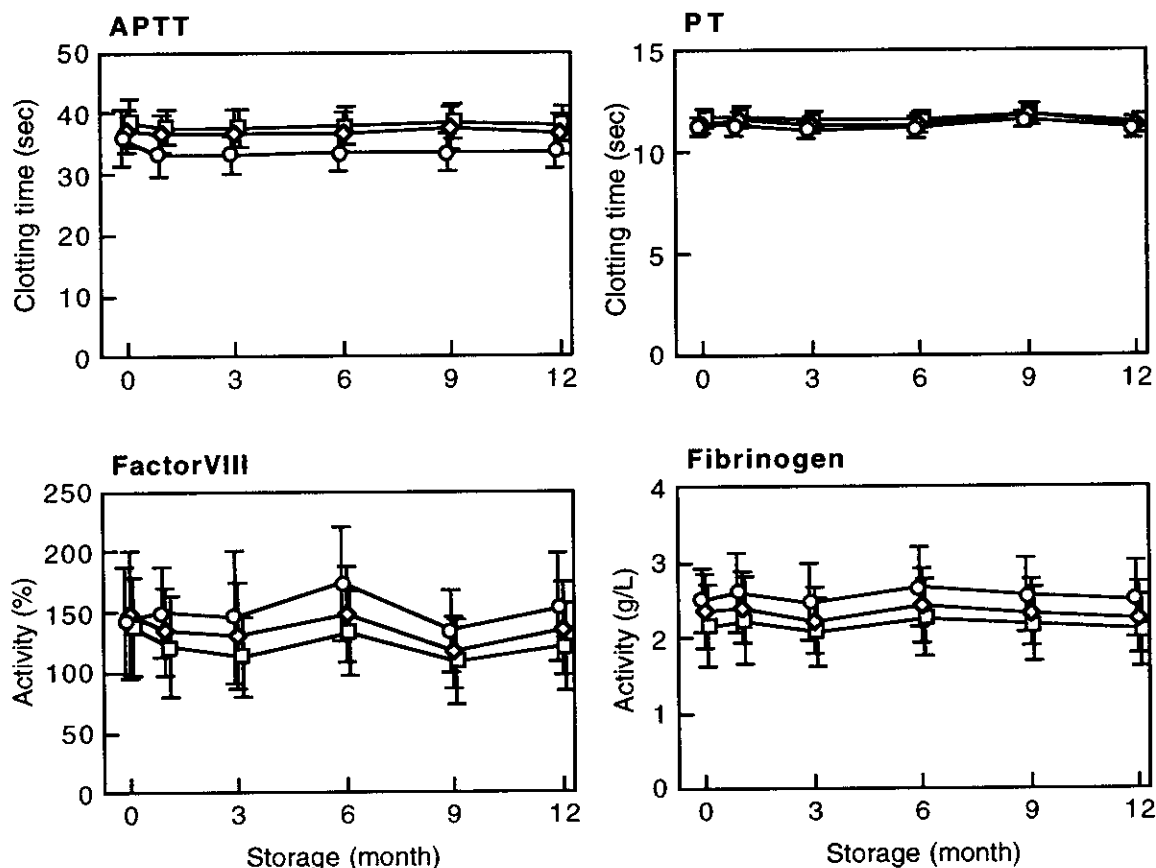


Figure 5. Changes of plasma coagulation activities of untreated and MB phototreated plasma during storage. Circles, untreated; diamonds, filtered and MB phototreated at 10 J/cm<sup>2</sup>; squares, filtered and MB phototreated at 20 J/cm<sup>2</sup>. Mean  $\pm$  SD, n = 8.

存後更に低下することはなく、12カ月保存後においても第VIII因子で76%、フィブリノゲンで84%が維持されていた。一方内因系、外因系凝固の指標となるAPTT、PTは、APTTに若干の延長がみられたもののPTはほとんど影響を受けなかった。

#### D. 考察

今回検討したMB光不活化システムにより細胞外及び細胞内HIVの感染性を血漿から除去することができた。無症候性HIV患者の血漿中のHIV感染価は30 TCID<sub>50</sub>/mLと報告されていることから推測すると、今回得られた6.7 log<sub>10</sub>の不活化率は、HIV感染ウィンドウ期血液中のHIVを不活化するには十分な能力であると考えられる。

採用されているフィルターにより細胞内HIV感染を防止するのみならず、混入白血球を除去することが明らかとなった。最近これら混入白血球が、非溶血性副作用や同種抗原感作などの原因となりうると懸念されている。したがって、本シス

テムはウイルス感染のみならず、これらの副作用防止効果も期待できる。

#### E. 結論

MB光不活化システムにより、細胞外及び細胞内HIVの感染性を血漿から除去することができたことから、本システムは輸血用血漿製剤の安全性をより高めることができる。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当なし。

2. 学会発表

第46回日本輸血学会総会

メチレンブルーによる血漿のウイルス光不活化システム。日本輸血学会雑誌, 44(2): 179, 1998.



G. 知的所有権の取得状況  
該当無し.

## 分担研究報告書

### パルボウイルスに関する研究

分担研究者 佐藤博行 福岡県赤十字血液センター副所長

#### 研究要旨

in vitro で分化誘導させた末梢血の細胞が入手困難な骨髄細胞の代わりにヒトパルボウイルスB19 (以下B19ウイルス) の感染性の検定に用いられるか否かを検討した。IL-3 とエリスロポエチンを用いて四日間培養した末梢血単核細胞はCFU-E 障害試験に於て骨髄細胞と同等の感染性を示し、in vitro の感染性の検定に用いることが可能であった。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。

#### A. 研究目的

末梢血を用いたヒトパルボウイルスB19 の in vitro 感染系の確立。

#### B. 研究方法

##### 1. 末梢血中の赤血球系前駆細胞からCFU-E への分化誘導

比重遠心法によって得られた末梢血単核細胞を30%牛胎児血清を含むIMDM培地で一日培養した後の非付着細胞を30%牛胎児血清、10%ヒトAB血清、2%ヒト血清アルブミン、50U/ml IL-3、2U/ml エリスロポエチンを含むIMDM培地で培養し、経時的にCFU-Eを測定した。

##### 2. CFU-E の測定

エリスロポエチンを含む半固形培地(メチルセルロース)で7日間培養し、CFU-Eコロニー数を計測した。

##### 3. CFU-e 障害試験

ヒト骨髄細胞又は培養末梢血由来細胞にB19ウイルス陽性血清を加えた後CFU-Eの測定を行った。

#### C. 研究結果

培養末梢血由来細胞中のCFU-EはIL-3及びエリスロポエチン添加後4～5日目に最大となった。次に、この四日目の細胞とヒト骨髄細胞に種々の濃度のB19ウイ

ルス陽性血清を加えたCFU-E 障害試験を行ったところ両者は各々の濃度で同等のCFU-Eコロニー数の減少を認めた。又、四日目の培養末梢血由来細胞を凍結し、59日間液体窒素中に保存した後、融解し、種々の濃度のB19ウイルス陽性血清を加えてCFU-E 障害試験を行い凍結前の結果と比べたところ、凍結前後の差は認められなかった。

#### D. 考察

B19ウイルスのin vitroの感染性は今までヒトの正常骨髄由来のCFU-Eが用いられてきた。しかしながら正常骨髄細胞は非常に得るのが難しく採取に苦痛を伴うのが難点であった。一方、末梢血中にはCFU-Eは少ないがその前駆細胞であるBFU-Eはかなり存在している。そこでin vitroでBFU-EからCFU-Eへ分化誘導してCFU-E 障害試験に用いる試みを行ったところ骨髄細胞と遜色が無いことが分かった。末梢血は簡単に大量に得ることが可能で、分化誘導させた細胞を凍結保存することが出来ることから、97年度に報告したRHA法による抗原検出法と共に、ウイルスの不活化を含む種々の応用が考えられる。又、中和抗体の

同定にも有用な方法と思われる。

## E. 結論

IL-3 とエリスロポエチンを用いて培養した末梢血単核細胞は骨髓細胞と同等の感染性を示し、in vitro の感染性の検定に応用可能と考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Wakamatu,C., Takakura,F., Kojima,E., Kiriyama, K., Goto,N., Matumoto,K., Oyama, M., Sato,H., Okochi,K. and Maeda,Y. :Screening of blood donors for human parvovirus B19 and characterization of the results. Vox Sang. 76: 14-21 (1999)

佐藤博行: RHA によるヒトパルボウイルスB19 抗原スクリーニング .Medical Technology 26:628-629 (1998)

### 2. 学会発表

桐山佳子、大山政則、高倉文博、佐藤博行、前田義章: 末梢血単核球を用いたヒトパルボウイルスB19 infectivity assay の検討 . 第46回日本輸血学会総会、京都、(1998)

後藤信代、桐山佳子、高倉文博、佐藤博行、前田義章: ヒトパルボウイルスB19 抗体検査法の検討 . 第46回日本輸血学会総会、京都、(1998)

佐藤博行: 輸血とパルボウイルス . 第72回日本感染症学会総会、大坂、(1998)