

平成11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11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

鈴木哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 室長

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

池田久實 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

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

岡田晴恵 国立感染症研究所 ウイルス製剤部 研究員

小船富美夫 国立感染症研究所 安全性研究部 室長

塚野尋子 国立感染症研究所 細菌部 室長

安藤靖恭 国立感染症研究所感染病理部
国際医療福祉大学臨床医学研究センター

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

平山順一 北海道赤十字血液センター研究部 研究員

目 次

1. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要	主任研究者	小室勝利	
2. 総括研究報告書	主任研究者	小室勝利	頁 1
3. 分担研究報告書			
(1) 抗HCV抗体測定キット評価用、国際標準品の作製		小室勝利	5
(2) TTウイルスの転写調節機構：プロモーター／エンハンサー領域の同定と機能解析		鈴木哲朗	9
(3) CMV, HHVに関する研究		田代真人	12
(4) 血液製剤のMAP中のYersinia, enterocolitica 汚染を白血球除去フィルターを用いて除去するための製造法の検討		渡辺治雄	15
(5) 血液製剤による細菌感染の防御に関する研究		荒川宜親	22
(6) ヒトパルボウイルスB19の感染性評価法の開発		岡田義昭	24
(7) B型肝炎ウイルス核酸増幅法の品質管理と標準化に関する研究		水澤左衛子	28
(8) HHV, CMVに関する研究		岩崎琢也	30
(9) 東南アジアにおける新型 G型肝炎ウイルス株の分離と全長鎖ゲノムの解析		阿部賢治	34
(10) 血液成分のウイルス、細菌除去、不活化法の開発		池田久實	38
(11) パルボウイルスに関する研究		佐藤博之	40
4. 関連研究の学会報告および論文掲載 分担報告書に記載			
5. 厚生科学研究費補助金総合研究報告書及び概要			
(1) 厚生科学研究費補助金総合研究報告書概要		小室勝利	43
(2) 厚生科学研究費補助金総合研究報告書		小室勝利	47

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, TTV等の肝炎ウイルス、B19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、高感度診断法（NAT法）の開発、改良、標準となるベクター及び陽性血漿標準品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除去、不活化法の開発研究を行い、本年度は以下の結果を得た。

- 1) HCV, HIV, HBV検出のためのNAT法に使用する国際標準品作製グループに参加し、その作製を終了した。
- 2) TTVゲノム上の非翻訳領域内にプロモーター活性を証明し、その全塩基配列を決定した。
- 3) HGVの塩基配列分析による分子疫学的調査から、新たなHGV株を分離し、その全塩基配列を決定した。
- 4) ヒトCMVのPCR法を用いた定量測定系の開発を行った。real-time PCR法及びnested PCR法が応用可能であり、臨床材料による比較を行った。
- 5) B19パルボウイルスの経時的、地理的流行調査を、PCR法によるサブタイプ決定法により実施した。流行を境にして、大部分を占めるサブタイプが入れ替わっていることが証明された。開発したベクターによるPCR法の有用性が確認された。
- 6) 赤血球系統の培養細胞にB19パルボウイルスを感染させ、培養細胞内のB19-RNAをRT-PCR法により測定する方法が、ウイルスの感染性を評価する高感度な方法であることが証明された。
- 7) 血液製剤中からエルシニア菌を除去するため、採血後の保存条件、白血球除去フィルターの有効性を確認した。
- 8) 血液成分製剤汚染の原因となり、近年問題となっている細菌の同定と、その分析法につき検討し、その対策について考察した。特に緑膿菌、エルシニア菌等については、耐性菌の出現が多数報告されておられ、その対策には充分注意を払う必要がある。
- 9) 血漿分画製剤製造用の原料血漿中に含まれるウイルス抗体価の年代別比較を行い、その有効性の検討を行った。
- 10) メチレンブルー又はジメチルメチレンブルーと光照射を併用する光不活化法が人工酸素運搬体中のウイルス不活化に極めて有効であることを証明した。

分担研究者		
鈴木哲朗	国立感染症研究所	ウイルス第二部 室長
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・血液製部 部長
岡田義昭	国立感染症研究所	細菌・血液製部 室長
水澤左衛子	国立感染症研究所	細菌・血液製部 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
池田久實	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、臨床的有用性の検討、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

各分担研究者のあつかうウイルス、細菌が異なるので方法と結果をまとめて記載することとする。

1. TTウイルスの転写調節機構：プロモーター／エンハンサー領域の同定と機能解析が推定される非翻訳領域について、種々の長さの遺伝子断片をPCR法にて作製し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクター(pGL3-Basic)のXhoI-Hind III部位に挿入、これらと内部標準用pRL-TKとをヒト肝癌由来細胞にトランスフェクションした。24時間後に細胞のルシフェラーゼ活性を測定し、プロモーター領域の同定を行った。ORF2の上流約230塩基に存在するGC-rich 配列、AP1, AP2結合配列を含む215塩基長がプロモーター領域であることを明らかにした。今後TTVの転写調節を担う因子の同定を行い、ウイルスの病態解明も行う。

2. 新型G型肝炎ウイルス株の分離と全長鎖ゲノムの解析

HGVの塩基配列の解析、PCR法の改良を行いつつ、これら方法を利用して、東南アジアにおけるウイルス分離と、それらウイルスの塩基配列の解析を行った。ミャンマー、ベトナム人由来の血清より分離したHGV株の5' UTR領域の塩基構造を決定し、分子系統樹解析によるゲノタイプ分類を行った。5' UTRの終末部を除くほぼ全長HGV遺伝子を2株分離することができ、既知のHGV株28株との全長遺伝子領域における分子系統樹解析により、この2株は、従来の分類には属さない、新たなゲノタイプ(4型)であることを確認した。これらゲノタイプが示す肝疾患との関係、流行予測や感染防御対策への応用も検討していく予定である。

3. ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)検出系の開発

HCMVの定量系の開発の試みとして、real-time PCR法及びnested PCR法による測定系を比較検討した。real-time PCR法では1サンプル中10コピーまで検出することが可能となり、nested PCR法では1コピーまで検出できることが証明された。同法を用いてHCMV網膜炎患者の前房水中のHCMVのゲノム数を検討したところ、前房水中には3,000~4,000コピー/ μ lと多量のウイルスゲノム数が存在すること、回復期には10コピー未満/ μ lに低下していることが証明された。

nested PCR法とreal-time PCR法を組み合わせることにより、臨床面に応用可能であることが証明された。

4. パルボウイルスに関する研究

PCR法に使用する多種のプライマーが作製されたので、その評価と疫学的応用を試みた。供血者検体を使用して、B19ウイルス感染の経時的、地理的流行の実態調査を行った。検体をPCRにて増幅後、

その一部塩基配列を決定、さらにサブタイプ同定を、サブタイプ決定領域を増幅して行った。流行を境にして、大部分を占めるサブタイプが入れかわっていることが観察され、この交代現象は流行の前から始まっていることが分かった。サブタイプの分布をモニターする事は、新たな流行予測の一手段として応用できる。

5. ヒトパルボウイルスB19感染性評価法の開発

血液製剤の安全性をより高めるため、製剤中に混入しているB19の感染性を評価する方法につき検討した。赤血球系の培養細胞にB19を感染させ、2日培養の後、RNAを抽出、RT-PCR法により、細胞内ウイルスゲノムの存否を検討した。本法が細胞レベルで、B19パルボウイルスの有無、感染性を高感度に評価できる系であることが証明された。

6. 血液製剤中からのエルシニア菌の除去条件に関する検討

エルシニア菌検出のためのPCR法が確立されたので、これら方法を他と組み合わせ、血液製剤中のエルシニア菌除去条件の検討、白血球除去フィルターの効果についての評価を行った。全ての菌を白血球に貧食させるためには、採決後少なくとも5時間は室温に置く必要があること、白血球除去フィルターを使用すると、貧食白血球の99%は取り除かれること、白血球除去後は4℃以下に保存することが望ましいとの結果を得た。

7. 血液汚染細菌の現状と対策につき、近年の報告例、疫学的検討をもとに検討した。

菌血症を引き起こしやすい細菌、採血時の汚染を注意すべき細菌、製剤の調整中に問題となる細菌について実例を示し、保存条件として注意すべき点、より高度な分離培養法、高感度検出法の必要性につき考察した。近年特にグラム陰性桿菌(エルシニア菌等)に於いては、耐性菌が出現しており、特に注意すべきである。無菌的視点からの一貫した管理の充実が大切である。

8. 免疫グロブリン製剤中の抗ウイルス抗体価の検討

免疫グロブリン製剤に含まれているウイルス、細菌に対する抗体価の低下が問題となっている。グロブリン製剤中の麻疹ウイルスに対するHI抗体価の推移を輸入原料血漿、国内原料別に、過去17年間にわたり、経年的に検討した。輸入原料血漿から作られたものは、1980年代と比較し、1990年代では、約1/2に低下していたが、国内原料血漿ではその変化が認められなかった。今後、抗体価の推移につき、特に臨床的必要性を

考慮して検討していくことが大切であると考えられた。

9. 血液成分製剤のウイルス、細菌除去、不活化法の開発

赤血球製剤、人工酸素運搬体等のウイルス細菌不活化法として、メチレンブルー (MB)、ジメチルメチレンブルー (DMMB)と光照射を組み合わせた光不活化法の効果を検討した。VSVをモデルウイルスとして光不活化法を用いると、 $10^5 \sim 10^7$ の不活化率が得られた。この際人工酸素運搬体の機能には変化がみられず、極めて有効な方法であることが証明された。

10. NAT用国際標準品の作製

EU, アメリカ, 日本が中心となり、HCV, HIV, HBV検出のためのNAT法の評価に用いるWHO国際標準品作製グループに参加し、各々1種の国際標準品作製を終了した。

今後、HCV, HIVのサブタイプにつき、同様の国際標準品を作る予定になっている。

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スクリーニング法がとられておらず、さらにHGV, TTV等の新しいウイルスの登場、エルシニア菌による敗血症の発症等、解決しなければならない問題も多い。

一方、従来のように、血漿中のウイルス、細菌の存否を検査するだけでは、十分に効果を発揮し得ない、細胞内局在性ウイルスの存在、血清反応では検出できないウイルスサブタイプの存在等、技術的に残されている点も多くみられる。

本研究班では、これら問題に対処することを目的に新興再興感染症として、HCV, HGV, TTV, HCMV, HHV6~8, B19パルボウイルス、エルシニア菌を主にとりあげ、高感度検出法 (核酸増幅法) の開発、改良と標準化、やむを得ず、ウイルス、細菌の混入している血液を輸血する際、如何にこれら危険因子を除去するかについて検討を続けた。

3年間の研でHCV, HGV, TTV, HHV-6, HHV-8, B19パルボウイルス、エルシニア菌については、核酸増幅法に用いるプライマーの作製、評価、標準化がある程度進み、臨床材料を用いた検討に入ることが可能となった。又、血液製剤の安全性向上対策についても、種々のウイルス除去不活化法の検討等、

近々、日本に於いて取り入れられるであろう方法の評価に貢献できたと考えられる。

1999年日本に於いてもHCVスクリーニングに核酸増幅法が導入され始めた。新鮮凍結血漿へのウイルス不活化法の導入も予定されている。

本研究班のこれまでの成果をさらに発展させ、応用範囲を広げることができる様にしたい。尚、HCV, HGV, TTV, HHV-6, HHV-8, B19パルボウイルス、エルシニア菌の検出のための核酸増幅法に用いるプライマーについては国立感染症研究所に問い合わせをすれば、供給等、可能と考えられる。

D. 結論

接触及び血液由来感染症の防御対策に役立てるため、新たに問題となっている感染症および、将来対策をとる必要のあると考えられる感染症として、HCV, HGV, TTV, B19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、高感度検出法 (NAT法) の開発、改良、標準となるベクターおよび陽性血漿標準品の整備をおこなうとともに、検査をすりぬけた感染症対策として、血液成分製剤からのウイルス、細菌除去法の研究を行った。核酸増幅法 (NAT法) に用いるベクターの開発、改良については、ほぼその目的を達し、標準品の整備をはじめ、臨床応用に供し得る段階となり、WHOの行う標準品作成作業にも参加し、貢献することができた。血中ウイルス、細菌除去、不活化法の研究も進み、本研究班で得た成果は、近々実施されるであろう新鮮凍結血漿のウイルス不活化法に対し多くの参考となると考えられる。

本研究班でとりあげたウイルスについては、近年、変異株の出現、新たな病原性の発見、耐性株の出現等、新たな問題を投げかけている。特に、変異株の出現と、それに伴う病原性の変化、及びヘルペスウイルス群の様に、未だ病原性の明確でないものについては、引き続き、検索を続けることが必要と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. et al : Antigen-specific, IgE-selective unresponsiveness induced by antigen-liposome conjugates. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 120:199 ~ 208, 1999.

2. Holmes, H., Bowers, K., Komuro, K. et al WHO working group report on reference preparations for testing Hepatitis B, C and HIV diagnostic kits. WHO-Technical Reports (in press).

3. Yoshikawa,T., Uchida,T., Naito,S., Horino,A., Taneichi,M., Kato,H., Komuro,K., Nakano,Y., Mori,M., Nishinohara,S., Chiba,J., Kurata,T., Tamura,S., : Suppression of specific IgE antibody responses by liposome-conjugated ovalbumin in mice sensitized with ovalbumin via the respiratory tract. *Int. Arch. allergy Immunol.*, 121:108-115, 2000.

抗 HCV 抗体測定キット評価用、国際標準品の作製

分担研究者 小室勝利 国立感染症研究所 安全性研究部 部長
協力研究者 水落利明 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長

研究要旨

抗HCV抗体の測定には多種の測定キットが使用されているが、それぞれの感度、特異性には差異が認められ、輸血スクリーニングに使用する際には、その違いを認識した上で使用することが必要である。従って各検査キットの持つ性能を正しく評価するシステムが求められ、さらに評価に使用する標準品の作製が必須となる。WHOがスタートした抗HCV抗体測定用キット評価に使用する国際標準品作製作業に参加し、genotype 1の標準品候補を決定した。今後genotype 1～6についても作製する計画となっている。

A. 研究の目的

HCV抗体測定用キットの感度、特異性評価に使用する国際標準品を作ること、及び国際標準品候補血清を使用して、各国で使用されている輸血用スクリーニングキットの性能の概要を知ることとする。

B. 研究方法

31種のHCV抗体陽性血清より12種のgenotype 1の血清を選択、プールし、HCV抗体(-)、HIV抗体(-)、HBs抗原(-)の血清で希釈し、候補品とした。12ヶ国、13施設の参加で、各国で使用している抗HCV抗体測定用キットで感度、特異性を測定、イギリスのNIBSCにデータを集め統計処理して結果をまとめた。得られた結果は、WHOの評価委員会で検討され、国際標準品として決定される手順となる。候補血清収集にあたっては、各国の倫理規定に従って行われる。

C. 研究結果

各施設の使用した検査方法を表1に示す。8種類のEIAキットと6種のイムノプロット法、1種のPHAが使用された。13施設から得られたデータをまとめた結果を表2に示す。同一キット使用で異なった施設で得られた結果には、カットオフ値で2倍以内におさまっており、施設間の差は10～30%以内である。今回使用した検査キット間の差は、それほど大きくはなく、genotype 1については、多くの測定キットが正しく測定される結果となった。

今後は、genotype 1については、本候補品を標準品として設定することになると考えられる。

D. 考察

輸血用スクリーニングには、HIV抗体、HTLV抗

体、HCV抗体、HBs抗原の検査が義務付けられ、まもなく、HCV-RNA、HIV-RNA、HBV-DNA検出のための核酸増幅法（NAT法）も導入されようとしている。国際標準品及び国内標準品の設定はこれら血液スクリーニング法の機能評価に必須なものとなり、その作業が続いている。今回、WHOが中心となり抗HCV抗体測定用キットの評価に使用する国際標準品作製作業が開始された。

今回得られた結果によるとgenotype 1のHCVに対する抗体測定キットには、大きな感度、特異性に差はみられなかった。しかしながら、HIV抗体測定キットでは、サブタイプ0、HIV-2に対する感度がキットにより大きく異なることが知られており、HCVに於いても他のgenotype に対しては、差異の生ずる可能性がある。又、HCVには、多くの変異株の出現も報告され、診断キットの性能には、十分な注意をはらう必要があると考えられる。

国際標準品も、次のステップとして、genotype 1～6について作製する計画となっており、検査キット評価に、多用されることになろう。国際標準品を基本に、国内で使用可能な標準品又は、参照品の作製、スクリーニングキットの再評価も必要になるのではないかと考えられる。

E. 結論

抗 HCV 抗体測定用キット類の感度、特異性評価のために使用する HCV 陽性血清 (genotype 1) の中から WHO 国際標準品候補を選択した。この候補品には、世界で広く使われている検査キットは、感度、特異性に多くの差はみられず、よく反応していた。

今後、genotype 1～6につき、標準品作製を進めていく予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. et al : Antigen-specific, IgE-selective unresponsiveness induced by antigen-liposome conjugates. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 120:199 ~ 208, 1999.

2. Holmes, H., Bowers, K., Komuro, K. et al : WHO working group report on reference preparations for testing Hepatitis B, C and HIV diagnostic kits. WHO-Technical Reports (in press).

3. Yoshikawa, T., Uchida, T., Naito, S., Horino, A., Taneichi, M., Kato, H., Komuro, K., Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Chiba, J., Kurata, T., Tamura, S. : Suppression of specific IgE antibody responses by liposome-conjugated ovalbumin in mice sensitized with ovalbumin via the respiratory tract. *Int. Arch. allergy Immunol.*, 121:108-115, 2000.

Table 1

Diluent and test kits used by different laboratories

Laboratory	Diluent	Assay Kit
1	PBS+1%FCS	UBI-HCV EIA 4.0
2	Human serum	Ortho HCV 3.0
3	Human serum	AxSYM HCV 3.0
3	Human serum	Ortho HCV 3.0
3	Human serum	Sanofi Monolisa anti-HCV Plus v 2
4	PBS+1%BSA	Sanofi Monolisa anti-HCV Plus
4	PBS+1%BSA	Ortho HCV 3.0 with enhanced SAve
5	Normal Human serum	Ortho HCV 3.0 with enhanced SAve
5	Normal Human serum	Sanofi Monolisa anti-HCV Plus
6	Negative plasma	Murex Biotech SA
7	Negative human serum	Ortho HCV 3.0
8	Human serum	Sanofi Monolisa anti-HCV Plus
9	Human serum	AxSYM HCV 3.0
10	Human serum	Abbott HCV PHA 2ml gen
10	Human serum	AxSYM HCV ID 30-20
11	MRIA diluent buffer	Abbott HCV 3.0
12	PBS+5% human serum	Abbott HCV 3.0
12	PBS+5% human serum	ICMRT-anti-HCV peptides
13	Human serum	Ortho HCV 3.0
13	Human serum	Shanghai SHC KeHua Biotec Co Ltd (PR. Chin

Table 2

Dilution of candidate reference material A equivalent to cut-off from individual laboratories

ASSAY KIT	LAB CODE	NUMBER OF ASSAYS	DILUTION EQUIVALENT TO CUT-OFF	95%LIMITS
Abbott	11	4	135	123-148
	12	3	237	150-376
AxSym	03	3	305	209-445
	09	4	232	193-277
	10	4	301	239-378
ICMRT	12	5	63	48-84
Murex	06	1	188	-
Ortho	02	3	180	127-255
	03	3	370	256-534
	04	4	260	134-503
	05	4	239	164-348
	07	3	374	193-725
	13	4	220	205-236
Sanofi	03	3	234	207-264
	04	4	179	134-239
	05	4	218	149-321
	08	6	296	270-326
Shanghai UBI-HCV	13	4	219	160-301
	01	6	157	112-221

TTウイルスの転写調節機構：プロモーター／エンハンサー領域の同定と機能解析

分担研究者 鈴木哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官

研究協力者 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) ゲノム上にある約 1.2 kb の非翻訳領域についてプロモーター活性を検討した。ヒト肝癌由来細胞株に TTV 遺伝子を含むレポータープラズミドを導入しルシフェラーゼ活性を測定したところ、ORF2 の上流約230塩基に存在し GC-rich 配列、AP1、AP2 結合配列を含む 215 塩基長がプロモーター領域であることが明らかとなった。今後、TTV の転写調節を担うユニバーサルまたは細胞選択的な因子の同定を行っていききたい。

A. 研究目的

TTV は、1997年秋、我が国の非 A-G 型輸血後肝炎患者（TT症例）から分離された新しいウイルスである。今日までに、TTV は envelope を持たず、ウイルス遺伝子として環状一本鎖（マイナス鎖、4 kb 長）DNA を持ち、広く世界中に分布していることなどが明らかにされている。その遺伝子構造の特徴から、TTV はサーコウイルスに最も近縁であると考えられているが、これまでヒトのサーコウイルスは同定されておらず、その感染、複製様式に関する分子ウイルス学的な解析は十分になされていない。本研究は、TTV ゲノム上の転写プロモーター及びエンハンサー領域を同定し、その転写調節機構を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

TTV 遺伝子は、東芝病院三代先生、土方先生より分与されたクローン SANBAN を用いた（Virology 260, 17-22 (1999)）。推定される非翻訳領域について種々の長さの遺伝子断片を PCR

法により作製し、ホタルルシフェラーゼレポーターベクター pGL3-Basic の XhoI-HindIII 部位に挿入した。これらのコンストラクトと内部標準用 pRL-TK（HSV TK プロモーター下でウミシイタケルシフェラーゼを発現する）とを TransIT-LT1（Mirus corp.）を利用してヒト肝癌由来細胞 FLC4 または HepG2 へトランスフェクションした。24 時間後に細胞を回収、可溶化し、そのルシフェラーゼ活性をルミノメーター（Berthold）で測定した。Dual-Luciferase Reporter Assay System（Promega）を用いて、2種類のルシフェラーゼ（ホタル、ウミシイタケルシフェラーゼ）を連続的に定量した。各転写活性は、ウミホタルルシフェラーゼ活性（内部標準）に対するホタルルシフェラーゼ活性の値で算出した。

C. 研究結果

TTV ゲノムには、ORF2 の開始コドンの上流（あるいは ORF1 領域の終止コドンの下流）に約 1.2 kb の非翻訳領域が存在する（図1）。この中にはグアニン／シトシン（GC）に富んだ約 120

塩基の配列 (90%以上がGC) が含まれているが、この配列は特徴的な stem-loop 構造をとると推定され、実際ニワトリ貧血ウイルスなど動物サーコウイルスでは遺伝子複製に重要であることが示されている。そこで、本年度は、ポリA付加シグナル配列 (推定) から ORF2 開始コドンまでの 1 kb 領域について 5' または 3' 末端側を欠損させた断片を作製しホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしてその転写活性を測定した。HepG2 細胞では、5' 末端側を 562 塩基欠損させた 442 塩基長でもその転写活性は完全に保持されていたが、さらに 215 塩基欠くとそのルシフェラーゼ活性は 80%以上低下した。また、3' 末端側を 65 塩基欠損させても活性の低下は認められなかった。一方、ヒト肝癌由来 FLC4 細胞においてもほぼ同様の傾向が観察された。すなわち、ORF2 の上流 442 塩基中にプロモーター領域が存在し、その転写活性は 5' 末端側 215 塩基の欠失によって劇的に低下しすることがわかった。しかしながら、FLC4 細胞では HepG2 の場合と異なり 3' 末端側 65 塩基の欠損で約 50% 転写活性が低下した。

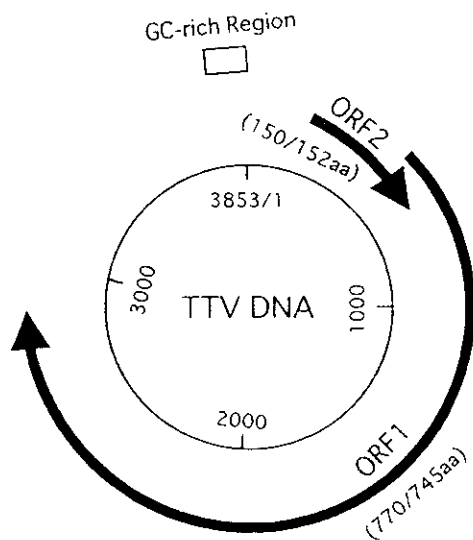


図1 TTV の遺伝子構造

以上の結果より、TTV のプロモーター領域はヌクレオチド 3601-8 番目 (環状遺伝子のためヌクレオチド 3808 番は 0 番と一致) の 215 塩基にマップされた。この領域内には、GC-rich 配列が含まれると共に、AP1 及び AP2 といった転写因子の結合配列が保存されている。また、FLC4 細胞には、ORF2 の上流 65 塩基領域に相互作用する (宿主) 細胞選択的な転写調節因子が存在するのかもしれない。今後、ゲルシフトアッセイ、DNaseI フットプリント法などによって TTV の転写調節因子の同定を行う予定である。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. Aizaki, H., Aoki, Y., Harada, T., Ishii, K., Suzuki, T., Nagamori, S., Toda, G., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Full-length complementary DNA of hepatitis C virus genome from an infectious blood sample. *Hepatology* (1998) 27: 621-627.
2. Shoji, I., Suzuki, T., Sato, M., Aizaki, H., Chiba, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Internal processing of hepatitis C virus NS3 protein. *Virology* (1999) 254: 315-323.
3. Suzuki, R., Suzuki, T., Ishii, K., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Processing and functions of hepatitis C virus proteins. *Intervirology* (1999) 42: 145-152.
4. Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology* (in press).

2. 学会発表 (国際)

1. Manabe, N., Uchino, K., Suzuki, T., Matsuura, Y., Miyamura, T., Takamatsu, S., Kojiro, M.,

- and Miyamoto, H.: Hepatocyte apoptosis is strongly correlated with liver fibrosis and TGF-beta1-mRNA expression in chronic hepatitis B. The 13th International Forum of Jacques Cartier Center, Bordeaux, France, December, 1998.
2. Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura T. : Identification of differentially expressed genes in hepatitis C virus core gene transgenic mice. 6th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Bethesda, USA, June, 1999.
 3. Moriya K., Fujie H., Shintani Y., Tsutsumi T., Yitsuyanagi T., Ishibashi K., Todoroki T., Watanabe K., Aoyama T., Suzuki T., Matsuura Y., Kimura S., Miyamura T., and Koike K.: Expression pattern of lipid metabolic and mitochondrial enzymes in HCV core transgenic mouse liver. 6th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Bethesda, USA, June, 1999.
 4. Shimoike T., Tani H., Aizaki H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T.: Expression of HCV core protein specifically suppresses its viral RNA translation. 6th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Bethesda, USA, June, 1999.
 5. Tanaka Y., Ishii K., Shimoike T., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T.: Interaction of HCV core protein with synthetic oligonucleotides. 6th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Bethesda, USA, June, 1999.
 6. Matsuura Y., Ishii K., Takikawa S., Tamura K., Tani H., Suzuki R., Suzuki T., Houghton M., Abrignani S., Whitt M., and Miyamura T.: Characterization of hepatitis C virus envelope proteins. The 11th International Congress of Virology, Sydney, Australia, August, 1999.

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

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、岡田晴恵、小船富美夫（国立感染症研究所ウイルス製剤部）

研究要旨

麻疹ワクチン接種政策の推進により、南北米では麻疹の流行はすでに制圧され、麻疹免疫に対する自然感染によるブースターが起こらず、麻疹抗体価の低下が危惧されている。一方、現行の麻疹ワクチンは40年以上前の流行株に由来しており、最近の流行株には抗原変異が起きている報告もあるため、ワクチンに対する抗体の最近の流行株における有効性を保持しているか否かを再検証する必要がある。以上の背景を踏まえて、本研究では、

1. 多くの輸入血を用いて製造されているグロブリン製剤の麻疹抗体価の測定において、40年前の流行株を用いた現行のHI試験の妥当性を検証した。
2. 輸入血、また国内血を原料としたグロブリン製剤において、それぞれの麻疹抗体価、防御能の低下はみられないか。更に現行のワクチン株に対する抗体は、最近の流行株にも有効であるか。発症予防目的の使用に耐えられるかを解析した。

A. 研究目的

WHOの方針に基づいて各国の麻疹対策が推進されており、北米南米では麻疹患者発生は年間100人を下まわっている。しかし、我が国では今なお麻疹の小流行がくり返されており、年間10万人の患者を出している。この現状の中で、臨床現場ではグロブリン製剤（筋注用）が麻疹の発症予防を目的として使用されている。近年のグロブリン製剤における麻疹発症予防の有効性については以下二つの視点から検討が必要である。

1. 麻疹ウイルスはRNA一本鎖のウイルスであり、近年その遺伝子変異が報告されているが、最近の流行株の抗原性にも変化はみられるのか。つまり、現行の豊島株（約40年前）を抗原としたHI試験のデータと最近の流行株を抗原とした中和抗体価に十分な相関がありえるのか。また、現行のHI試験に妥当性があるのか。
2. 現在のグロブリン製剤の原料血は米国からの輸入血と国内の献血血が使用されている。米国では麻疹ワクチン接種の強力な推進により麻疹の流行はみられない。従って麻疹免疫のブースターがかからず、抗体価の低下が危惧されている。この環境下で、米国輸入血原料のグロブリン製剤において麻疹抗体価、防御能の低下はみられないか。更に現行のワクチン株は40年前の流行株由来のものであり、ワクチン株に対する抗体は、最近の流行株にも有効であるか。発症予防目的の使用に耐えられるか。

また、国内の献血血においてもすでにワクチン世代が献血世代となり、野外ウイルス感染者からの

製剤に比較して麻疹抗体価の変化は認められないか。

上記1, 2より発症予防効果とその指標となる検査方法の妥当性を検討した。

B. 研究方法

グロブリン製剤のHI試験の成績の推移を、輸入血原料、国内原料に分類して過去17年間の試験成績を経年的な変化を調べた。

C. 研究結果

付表の通り、輸入血原料の静注用グロブリン製剤のHI値は80年代に比較して90年代では約1/2に低下していた。一方、国内血原料のHI抗体価では製造が始まった過去10年間では変化していない。

この傾向は他社のグロブリン製剤、また静注用の製剤についても同様であった。

D. 考察

1. 輸入血（米国）原料製剤においては、1990年代では80年代の約1/2にHI抗体価が低下していた。これらは、麻疹が制圧されている米国からの製剤であり、今後この推移を充分把握し、対処する必要がある。

2. 国内血原料のグロブリン製剤ではHI試験値の低下は認められなかったが、現在の麻疹をめぐる環境の変化と併せて1と同様に十分なデータの把握と対応が必要である。

3. このHI試験は40年前に流行していた豊島株を抗原として使用しており、最近の流行株での反応性を十分に反映するものではない。そこで、早急に最近の流行株に対する中和試験データとの整

合性を評価検討するべきである。

4. グロブリン製剤は現在、麻疹発症予防だけでなく、その主たる目的は骨髄移植や心臓移植の患者のサイトメガロウイルス感染の治療に使用されている。この現状に加えて、以前はグロブリン製剤の活性の指標としてきた麻疹抗体価も麻疹ワクチンの接種の普及により現在ではその妥当性を再検証すべき時期に来ている。今後は、麻疹抗体価だけでなくサイトメガロウイルスの抗体価を調べていく必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, Takayama N, Tsuchiya T, Tashiro M: Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch. Virol.* 145: 1-15, 2000.

2. 学会発表

Okada H, Kobune F, Sato T, Yoshino N, Tashiro M, Takayama N, Tsuchiya T, Takeuchi Y: Comparative analysis of cell markers of PBMC from measles patients and vaccinees. XI. International Congress of Virology (Sidney, Australia) p. 10, 1999.

岡田晴恵、小船富美夫、佐藤威、田代真人、土屋喬義、宮塚幸子、高山直秀、武内可尚：麻疹ウイルス感染患者における免疫抑制機構の年齢別解析 第47回日本ウイルス学会総会（横浜）抄録 p. 289, 1999.

岡田晴恵、小船富美夫、佐藤威、片山未来、佐藤直子、田代真人、岡部信彦、土屋喬義、高山直秀、武内可尚、宮塚幸子、片山章、樋口薫、七条孝三郎：麻疹ワクチン被接種者と麻疹患者との宿主反応の比較 第3回日本ワクチン学会学術集会（名古屋）抄録 p. 51, 1999.

ガンマグロブリン製剤の麻疹抗体価における経年推移

輸入血	製造年	HI値(test/reference)	相対HI値	国内血	製造年	HI値(test/reference)	相対HI値
A-1	1983	224/80	2.8	A-101	1991	40/40	1
A-2	1984	224/112	2	A-102	1991	40/40	1
A-3	1985	224/80	2.8	A-103	1992	56/51	1.1
A-4	1989	224/80	2.8	A-104	1992	56/56	1
A-5	1989	160/56	2.9	A-105	1992	56/56	1
A-6	1989	160/56	2.9	A-106	1995	56/80	0.7
A-7	1990	224/80	2.8	A-107	1997	80/56	1.4
A-8	1990	224/80	2.8	A-108	1997	56/56	1
A-9	1992	112/64	1.8	A-109	1999	56/56	1
A-10	1995	112/80	1.4				
A-11	1996	112/56	2				
A-12	1997	56/40	1.4				
A-13	1997	80/56	1.4				
A-14	1998	112/56	2				
A-15	1998	160/112	1.4				
A-16	1999	112/64	1.8				

輸入血	製造年	HI値(test/reference)	相対HI値
B-1	1984	896/112	8
B-2	1984	896/112	8
B-3	1987	1280/112	11.4
B-4	1989	896/80	11.2
B-5	1991	224/40	5.6
B-6	1992	448/80	5.6
B-7	1993	448/56	8
B-8	1995	448/80	5.6

厚生科学研究費補助金
分担研究報告書

血液製剤 MAP 中の *Yersinia enterocolitica* 汚染を白血球除去フィルターを用いて除去するための製造法の検討。

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：*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で発生している。その対策として、厚生省の中央薬事審議会血液製剤特別部会は6月28日、輸血用血液を出荷する前の段階で白血球除去フィルターを用いて白血球の除去を導入する方針を決めた。現在此の方針を受け、小委員会を設置し、白血球除去製剤の基準等の具体的な検討を行っている。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ているため、今回我々は、血液中に存在する僅かな菌を全て効率良く白血球が貪食・殺菌するための条件（保存温度、時間等）と、白血球除去フィルター使用後の血液の保存方法について検討した。その結果、（1）全ての菌を白血球に貪食させるため、赤血球 MAP 液を採血後少なくとも5時間以上は室温（22～24℃）置く必要がある。その後4℃で保存し、白血球除去フィルター処理は採血後24時間経ってから行う。（2）除去フィルターで99%の白血球が取り除かれるが、もしわずかに残っている白血球に菌が取り込まれている可能性も無いとは言えないので、白血球除去後は、4℃以下か、出来れば菌の増殖が全く見られない温度（0℃）で保存するのが好ましい。

A. 研究目的

輸血するのに必要な安全基準を完全にクリア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は少数ではあるが、死亡率が非常に高い合併症なので世界的に問題視されている。*Yersinia enterocolitica* は1～6℃という冷蔵庫の保存温度でも増殖できるので他の菌のコンタミネーションと違って大変危険性が高い。日本で使用している MAP 液（有効期限：42日）は1992年1月に製造承認された後輸血が原因となる *Y. enterocolitica* の感染例はでていないが、外観試験で製剤の変色に気づき、返品された MAP 製剤の2検体から *Yersinia enterocolitica* が検出されたと言う報告がある。原因は、菌量が少ない場合は白血球の貪食と殺菌作用によって菌が排除されるが、菌が多い場合は菌の一部は殺菌されずに生き残り、低温でも増殖するためではないかと考えられる。現在日赤血液センターでは保存期間の再検討を行い、採血後25日以内に使用するように医療機関に協力を求めている。これまで日本でも、輸血後感染症の防止対策について継続的に検討や改良がされてきた。この予防法

として、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について検討されてきたが、コスト、簡便さの面から抜根的対策がこうじられなかった。今回、厚生省の中央薬事審議会が出した方針は、輸血用血液を出荷する前の段階で白血球除去フィルターを通して除菌を行うというもので、施行されれば非常に効果的な方法である。しかし、*Yersinia enterocolitica* は細胞と接触したり、37℃で Ca^{++} が低濃度の場合は抗食菌活性因子 (YopH)、アポトーシ誘導因子 (YopP, YopJ)、白血球遊走阻止因子 (LcrV, YopB, YopD)、細胞毒性因子 (YopE) 等を産生し、菌は生き残るために、白血球の貪食・殺菌作用に抵抗する。我々は菌がそれらの殺菌抵抗性因子を産生しない条件下で製剤を管理するため、低濃度の菌が完全に白血球によって貪食されるための条件（血液の保存温度、時間等）や、除去フィルター処理後の保存温度の検討を行った。

B. 研究方法

1) *Yersinia enterocolitica*: の温度に依存した増殖曲線

人間の輸血後感染症患者から分離されている株は国内外ともに O:3 がほとんどなので O:3 の菌株を使用した。27°C 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 になるように調整し、その懸濁液を BHI broth 10 ml に 10^2 CFU / ml, 10^4 CFU / ml になるように接種し、各々を 0, 4, 8, 20°C で培養し、各々のチューブから 0.3 ml ずつサンプリングを行い、その増殖カーブを調べた。サンプルは適当に希釈して、その 0.1 ml を 3 枚以上の BHI-agar に撒いて生菌数をカウントした。

2) 血液製剤 MAP 中における生菌数と白血球除去処理を施す時期との関係

0.5% のクエン酸ナトリウムを含んだウサギの全血液を 4000 rpm で 13 分間遠心してパフィーコート、血漿と赤血球画分に分け、赤血球画分を MAP 液に懸濁した。この MAP 液中に *Yersinia enterocolitica* :O3 を 5, 50, 2×10^2 , 10^3 cfu/ml の割合で接種後、白血球数をカウントして 10^6 /ml になるように調整した。予め 24 穴プレートの well の中にカバーガラスの置いたもの（顕微鏡観察用）とカバーガラスの置いてないもの（コロニーカウント用）を作製し、 5×10^5 白血球/well になるように撒き、室温に放置した。5, 24, 48 時間目に一方はメタノールで固定してからギムザ染色を行い顕微鏡観察を行い、もう一方は MAP 液を適当に希釈して、その 0.1 ml を 3 枚の BHI-agar に撒いて生菌数をカウントした。

C. 研究結果

1) 白血球除去フィルターによる菌の除去条件の検討

(1) ウサギ MAP 液に 5, 50, 2×10^2 , 10^3 /ml になるように菌を接種後、時間を追って MAP 液中の生菌数をカウントした（表 1）。いずれの接種菌量においても 5 時間、24 時間、48 時間後の MAP 液の生菌数は 0 であった。同時に行った顕微鏡観察の結果は 2×10^2 , 10^3 /ml 菌を接種群の場合、5, 24, 48 時間目の細胞の一部に菌が観察されたが、5, 50/ml 接種菌の顕微鏡観察からは、菌はもう検出されなかった。これらの結果から、(1) 大量に接種した 10^3 /ml 菌の場合でも 5 時間経過すれば、白血球によって菌は全て貪食されることが分かった。(2) 生菌数カウント結果によると、大量接種群の MAP 液からは、菌が検出されなかったが、顕微鏡観察結果からは白血球中の一部に菌が存在することが確認できた。いずれの接種菌群でも、採血後 24 時間では白血球の崩壊像は観察されなかったが、大量接種菌群

では 48 時間目に一部の白血球の中に崩壊像が観察された。だから、フィルター処理は大事をとって 24 時間前後に行ったほうが良いのではないと思われる。

2) 除去フィルター処理後の保存温度の検討

白血球除去フィルターを使用後、もし除去されなかった 1% の白血球の中に菌がいた場合、何度で保存したらどのくらいの期間安全かを検討した。接種する菌量を大量接種群 (1×10^4 cfu/ml) と少量接種群 (1×10^2 cfu/ml) に分け、培養温度も 0, 4, 8, 20°C の組み合わせで行った時の、log phase, generation time, stationary phase に達するまでの時間を各々比較した（表 2）。4°C における大量接種群および少量接種群の log phase は 20°C の log phase の 720 倍、7 倍の時間がかかり、generation time は 5.7 倍、8.4 倍の時間がかかった。しかし、Max に達した時の菌量はほぼ等しく $1 \sim 3 \times 10^{10}$ cells/ml であった。大量接種菌群を 4°C、8°C、20°C で保存した場合、stationary phase に達するまでの時間は 24.7 日、13.3 日、4 日であったが、少量接種菌群では、54 日、23.5 日、5.8 日であった。又、いずれにおいても、0°C 保存では菌の増殖は観察されなかった。フィルター処理後の保存温度は菌の増殖を起こさないために 0°C の保存を推奨したいが実面的な面からすれば、問題があるので少なくとも 4°C 以下で保存が必要である。

D. 考察

外国では少数例ではあるが、輸血事故に起因する敗血症及び敗血症ショックによる死亡例が報告されている。何れも、外見上は健康で無症状なドナーから採決された血液が原因となっている。外国の場合はいずれも 21 日以上長期保存した赤血球製剤が原因とされ、保存期間を短縮するように FDA の諮問委員会が提言したがアメリカでは赤血球不足や汚染血の頻度が非常に低いため有効期限の短縮はの見直されていない。日本では、日赤血液センターでは、万が一の危険性を考えて、採血後 25 日以内に使用するように医療機関に協力を求めている。事態は良く調べないと分からないが、そのためか、輸血による感染症は起こっていない。しかし、いつ何時起こる可能性を秘めているので、なるだけ早く、*Yersinia enterocolitica* による敗血症を起こさない安全な白血球除去 血液製剤 MAP の基準を作り、実現化されれば国民にとって非常に良いことである。特に基準として問題になるのは、白血球が全ての菌を貪食するための条件、白血球除去フィルターを使用する時期である。外見上健康で、無症状なドナーの血液の中には 200 個/ml 以上の菌がいるとは考えずら

い。我々の実験では 10^4 /mlの菌を接種した場合でも5時間後には全て貪食されていた。今、現実に日赤血液センターで行っている操作は、採血された全血液を2時間室温に置いた後、自動血液分離装置を用いて血漿及びリンパ球の90%と白血球の60%を含む(パフィーコート)を除去して血液MAP製剤を作っている。此の操作を終了するまで常温に5~6時間は置くことになる。採血後5時間から24時間以内まで、このMAP製剤を冷蔵4°C以下で保存すれば、白血球の殺菌活性の低下や、白血球の崩壊は少なくとも起こらないと考えられる。その後更に、白血球除去フィルターで白血球を除去すれば、殺されないで生き残っている菌もほとんど除去される。しかし、1%の除去されない白血球中に菌がいる可能性も無とは言え無いので、もし製剤中に1~2 cfu/mlの菌があった場合でも、菌の発育が観察されなかった0°Cで保存すれば事故は起きないと考える。しかし、名雲先生等のデータでは製剤を4°C以下で保存しても菌の増殖は起きていないの、実用的な観点から考えれば4°C以下で保存すれば、まあ安全だろうと判断される。我々は人血液製剤MAPが手に入らないため、日赤医療センターの名雲先生やアムステルダムの赤十字バンクのR. N. I. Pietersz等、テキサス大学のR. M. Bradley等、スエーデンのウッパサラ大学のC. F. Hogman等、バクテル健康管理社のD. H. Buchholz等などの文献を参考にして更に検討を行なった。主にヨーロッパで使用しているSAGM液(有効期間:35日)、アメリカで使用しているADSOL液(有効期間:42日)はもちろん日本で使用しているMAP液(有効期限:42日)とは成分や保存期間も違うので同じレベルでの検討はできない。名雲先生等は全血液中に*Yersinia enterocolitica*:O3を $4, 8 \times 10, 2 \times 10^2$ cfu/mlの少量接種群、中等量接種群、大量接種群の3段階に分けて接種し、常法によって調整した血液製剤MAPを24時間、72時間、5日目にフィルター処理後4°Cで6週間保存して、1週間間隔で生菌数を調べた。

(1)フィルター処理しない場合は、少量接種群(4.3 cfu/ml)では42日間、菌の増殖は観察できなかった(表3)。80C.F.U/mlの中等量接種群では保存14日目以降に何れも急速な菌の増殖が見られ、保存42日目には何れの検体からも 5.8×10^8 以上の菌が検出された(表4)、又、 2×10^2 cfu/mlの大量接種群では保存7日目から4検体中2検体においてMAP液中に菌が検出された(表5)。菌量が少ない場合は白血球の貪食と殺菌作用によって菌が排除されるが、菌が多い場合は菌の一部は殺菌されずに生き残り、保存による

白血球の機能低下や崩壊によって菌は再び血中に現れ増殖するのではないかと推測される。

(2)24時間時にフィルター処理した中等量接種群並びに大量接種群のMAP液からは保存42日以降も菌は検出できなかった(表4、表5)。

(3)フィルター処理を採血後24時間、72時間、5日目で施し、MAP液中の菌の発育傾向を調べた。表4に示したように、72時間並びに5日目でフィルター処理したMAP液の4検体中2検体に、早いものでは7日目、遅いものでも14日目までには菌の発育を観察した。

(4)少量接種群(4.3 cfu/ml)のパフィーコート1検体から保存42日目に 1.0×10 cfu/mlの菌を検出した(表3)。恐らく、パフィーコートは作製後、直ぐ冷蔵保存するので、完全に貪食・殺菌されなかったことが原因として考えられる。採血後血液を直ちに冷蔵しないで、少なくとも5時間位は室温に保管しておくことが、白血球の貪食と殺菌作用のために必要ではないかと考えられる。同様な結論をC. F. Hogman等によっても得られている。

E. 結論

血液製剤MAPの製造過程に白血球除去フィルター処理を導入すれば現行の血液製剤MAPより遥に安全性が高い製剤が得られることが明らかになった。 10^4 /mlの大量接種群でも5時間以内に全ての菌は貪食されることが我々やHogman等の実験で明らかになったので、5時間後に白血球除去フィルター処理をしても問題ないと判断されるが、しかし、除去フィルター処理中に白血球が壊れて、生菌が放出される可能性もあるので更に、菌を殺す操作を長く取ったほうが良いだろう。しかし、大量接種菌群を採血後48時間まで放置した場合、白血球の一部に崩壊像が見られたので、我々は除去フィルター処理は採血後24時間位で行うのが妥当ではないかと考える。又、0°Cでは菌の増殖は観察されなかったので、白血球処理製剤MAP液は0°Cでの保存を推薦したいが、0°C保存法は今現在、実用的ではないので少なくとも4°C以下で保存する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

H. Tsukano, F. Kura, S. Inoue, S. Sato, H. Izumiya, T. Yasuda, H. Watanabe. *Yersinia pseudotuberculosis* blocks the phagosomal acidification of B10.A mouse macrophages through the inhibition of vacuolar H⁺-ATPase activity.