

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11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	池田久實	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	同上	研究部
	平山順一	同上	研究部

研究要旨

メチレンブルー (MB) あるいはジメチルメチレンブルー (DMMB) と光照射を組み合わせたウイルス光不活化法について、vesicular stomatitis virus (VSV) を用い検討した。人工酸素運搬体の原料となるストローマフリーヘモグロビン溶液 (SFH) にVSV及びMBあるいはDMMBを添加し、可視光を照射した。VSVは、1 μ M MB存在下11.4 J/cm²可視光照射により、5.6 log₁₀不活化された。このときメトヘモグロビン含量の増加、P₅₀の低下において有意な変化がみられた。一方、1 μ M DMMBでは照射量1.7 J/cm²にて、6.4 log₁₀の不活化率が得られ、メトヘモグロビン含量およびP₅₀とも、ほとんど変化がなかった。これらの結果から、DMMB光処理によりヘモグロビンに傷害を与えることなくSFH中のウイルスを不活化でき、より安全性の高い人工酸素運搬体原料を調製できることが示された。

A. 研究目的

赤血球製剤をはじめ輸血用血液製剤の安全性は高まりつつあるが、依然としてわずかではあるがウイルス感染の危険性が残されている。そこで、赤血球製剤の安全性をより高める方法として、メチレンブルー (MB) あるいはジメチルメチレンブルー (DMMB) と光照射を組み合わせたウイルス光不活化法が検討されている。一方、赤血球製剤の病原体感染の危険性を無くし、長期保存が可能となる人工酸素運搬体の開発も行われている。人工酸素運搬体の原料の一つとして、ヒト赤血球から調製したストローマフリーヘモグロビン溶液 (SFH) が用いられる。しかしこのヒト赤血球は赤血球製剤由来であるため、ウイルス感染の危険性を完全に否定することはできない。そこでSFHの安全性をより高める方法の一つとして、MBあるいはDMMBによるウイルス光不活化法を検討した。

B. 研究方法

SFHの調製

期限切れ赤血球製剤を生理的食塩水で洗浄後、2

倍容のH₂Oで溶血し、遠心、濾過によりSFHを調製した。

MB及びDMMB光不活化法

SFHにvesicular stomatitis virus (VSV)、終濃度1あるいは5 μ MのMBあるいはDMMBを添加し、6ウェルプレートに1 mLずつ分注し (液厚1 mm)、赤色光 (660 nm) を照射した。VSV感染性はVero細胞を用いたプラークアッセイにより求めた。メトヘモグロビン含量 (%Met-Hb) は、シアンメトヘモグロビン法により、酸素親和性 (P₅₀) はHemox-Analyzerにより、SOD活性は吸光度法により測定した。

C. 研究結果

MB 1 μ M, 11.4 J/cm²光照射により、VSVは5.6 log₁₀不活化された (表1)。この時%Met-Hbは1.3%から4.5%へと増大し、P₅₀は10.7 mmHgから9.3 mmHgに減少した。一方、DMMB 1 μ M存在下では、1.7 J/cm²光照射により、VSVは6.4 log₁₀不活化されたが、%Met-Hb及びP₅₀ともほとんど変化がなかった。MBおよびDMMB 1 μ Mでは、SOD活性はほとんど低下しなかった。

表1. MB及びDMMB光処理によるSFH中VSVの不活化.

Dye (μM)	Irradiation (J/sq cm)	VSV inactivation (log10)	Met-Hb (%)	P ₅₀ (mmHg)	SOD (U/ml)
MB					
1	0	0	1.27±0.17	10.67±0.31	3.30±0.25
1	1.71	1.84±0.14	2.27±0.31	N.T.	3.25±0.09
1	2.85	2.65±0.33	3.06±0.34	N.T.	3.25±0.14
1	5.70	3.72±0.35	4.25±0.86	N.T.	3.32±0.13
1	8.55	5.04±0.37	4.53±0.82	N.T.	3.25±0.17
1	11.40	5.61±0.97	4.49±0.56	9.30±0.47	3.15±0.15
5	11.40	N.T.	13.24±0.71	N.T.	3.06±0.23
DMMB					
1	0	0	1.30±0.19	10.50±0.35	3.32±0.17
1	0.57	2.23±0.07	1.30±0.21	N.T.	3.41±0.50
1	1.14	4.97±1.04	1.11±0.01	N.T.	3.20±0.06
1	1.71	6.43±0.69	1.40±0.16	9.83±0.47	3.37±0.13
1	11.40	N.T.	1.74±0.15	N.T.	3.22±0.09
5	11.40	N.T.	4.62±0.23	N.T.	3.09±0.20

Values of VSV inactivation, Met-Hb, P₅₀ and SOD are the mean ± S.D. of separate experiments (n=3).

N.T., not tested

D. 考察

MB及び新規のMB誘導体DMMBを用いた光処理により、SFH中VSVを不活化できることが示された。DMMBは、MBよりも、より低濃度でより高いウイルス不活化効果が得られた。しかもヘモグロビンの酸化や酸素親和性に対する影響がほとんどないことがわかった。したがって、DMMB光処理法はSFH中ウイルス不活化法として、MBよりも適していると考えられた。

E. 結論

DMMB光処理によりヘモグロビンに傷害を与えずにSFH中のウイルスを不活化でき、より安全性の高い人工酸素運搬体原料を調製できることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirayama J, et al. Virus photoinactivation in stroma-free hemoglobin (SFH) with methylene blue (MB) or 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB). Photochem Photobiol, 71:90-93, 2000.

2. 学会発表

第47回日本輸血学会総会

平山順一, 他. メチレンブルーおよびジメチルメチレンブルーによるヘモグロビン溶液中のウイ

ルス光不活化. 日輸血会誌, 45(2): 187, 1999.

第6回日本血液代替物学会年次大会

平山順一, 他. メチレンブルーおよびジメチルメチレンブルーを用いたヘモグロビン溶液に対するウイルス光不活化. 人工血液, 7(3): 75, 1999.

第6回日本光生物学協会講演会

平山順一, 他. 光増感物質メチレンブルーおよびジメチルメチレンブルーを用いたヘモグロビン溶液のウイルス光不活化 (1999.11.12-13).

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

1998年9月から全国的規模で開始されたヒトパルボウイルスB19（以下B19ウイルス）の供血者スクリーニングに伴い、B19ウイルス感染の経時的、地理的流行の実態調査が可能になった。その為の手段としてB19ウイルスのサブタイプを同定した。サブタイプのマーカーとなるB19ウイルスの核酸配列は非構造蛋白をコードする領域内の5'側に同定された。スクリーニングにより収集された232検体についてサブタイプを決定したところ、流行を境にして大部分を占めるサブタイプが入れ代わっている事が観察され、このサブタイプの交代現象は流行の前から始まっている事が分かった。これはサブタイプの分布をモニターする事は、新たな流行を予測する為の一手段となることを意味している。

A. 研究目的

B19ウイルスのサブタイプの同定とその疫学的応用

B. 研究方法

1. 材料

1980年以来収集された献血者のB19ウイルス陽性血清サンプル232検体を材料とした。B19ウイルス陽性血清サンプルは1995年迄は免疫対向電気泳動法で、以後は赤血球凝集反応（RHA法）でスクリーニングされたものを用いた。

名前の特定されない検体しかもウイルスという寄生体を検査解析することは倫理上問題ないと解釈し、以下の実験を行った。

2. B19ウイルスの塩基配列の決定

上記サンプルから任意に10検体を選びPCRにて増幅後、全長5.6kbpのうち4145bp(Open reading frameの96.3%)の塩基配列をcapillary sequencer(ABI Prism 310)を用いて決定した。

3. サブタイプの同定

B19ウイルス陽性血清サンプル232検体からサブタイプ決定領域をPCRにて増幅し、その塩基配列からサブタイプを同定した。

C. 研究結果

任意の10検体の塩基配列、及び既に報告されている塩基配列(B19-Au)からアミノ酸置換を伴うpolymorphic region(nt.2011-nt2123)がNS蛋白のC末端近傍をコードする領域に見い出された。526、554、558、563番目のアミノ酸によってAからEまでの5種のサブタイプに分類できることが判明した。則ちサブタイプAはF/F/P/Vであり、サブタイ

プBはF/F/S/V、サブタイプCはL/S/P/V、サブタイプDはF/F/S/A、サブタイプEはF/S/P/Vとなった。そこで、残りの222サンプルのこの領域をPCRで増幅して塩基配列を決定した。サンプルの採取時期とサブタイプの頻度を算出したところ、図1に示すように1980-1981年ではサブタイプDが全てであったものが1992-1993年の流行時のサンプルではサブタイプCが60%を占める迄になり1996年の流行の前にはサブタイプAが80%と主流になり、そのまま流行に至った。その後、1998年から徐々ではあるがサブタイプEが増加傾向を示していた。更に、各サブタイプの地理的分布を検討したが、同時期のサンプルで見える限り偏りは見いだせなかった。また、nt.721-726にもpolymorphismがみられたが、上記サブタイプとリンクしていた。

D. 考察

伝染性紅斑は1982年以前は局地的小流行に過ぎなかったが、それ以後は全国的な流行に発展するようになった。5-6年間隔で流行し、最近では1987年、1992年、1996年の流行が確認されている。1995年にB19ウイルスによる赤血球凝集反応(RHA)が開発され供血者を対象にしたマススクリーニングが可能になった。日本赤十字社は1998年9月から試験的に全国的規模で開始した。大規模の供血者スクリーニングに伴い、B19ウイルス感染の経時的、地理的流行の実態調査、B19ウイルス陽性供血者の長期追跡調査、血漿分画製剤中のB19ウイルスを指標としたスクリーニングの評価が可能となり、現在では血漿分画製剤の精製法の改善も手伝って日赤製の

血漿分画製剤からB19ウイルスを核酸検査で検出できないレベル迄低下させる事が出来た。今回、B19ウイルスのサブタイプを決定するマーカーとなり得る塩基配列を検出することができた。現在のところ5種のサブタイプに分類できた。それを時間的地理的分布の解析に応用したところ、流行ごとにサブタイプが交代していることが明らかになり、流行の前から異なったサブタイプの頻度が優勢になる現象が観察され、流行を予測する指標となりうると思われる。更に感染経路の検索にも応用可能と考えられた。又、決定されたマーカーとなり得る塩基置換はウイルスの複製や細胞とのクロストーク、則ちNF-κBを介するIL-6の産生やアポトーシスを含む細胞障害性を担う非構造蛋白のアミノ酸置換を意味するもので、サブタイプによる機能的な変化の可能性を秘めている。

E. 結論

B19ウイルスを5種のサブタイプに分類するマーカー塩基配列を検出することができた。この分類は疫学的には流行動態及び新たな流行を知る為に意義が有るとと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

a). 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)

b).Miyagawa,E., Yoshida,T., Takahashi, H.,Yamaguchi,K., Nagano,T., Kiriyama,Y., Okochi,K., and Sato,H. :Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19infectivity. J. Virol. Methods. 83:45-54 (1999)

c). 佐藤博行：輸血とパルボウイルス .Medical Corner. 104:14-17 (1999)

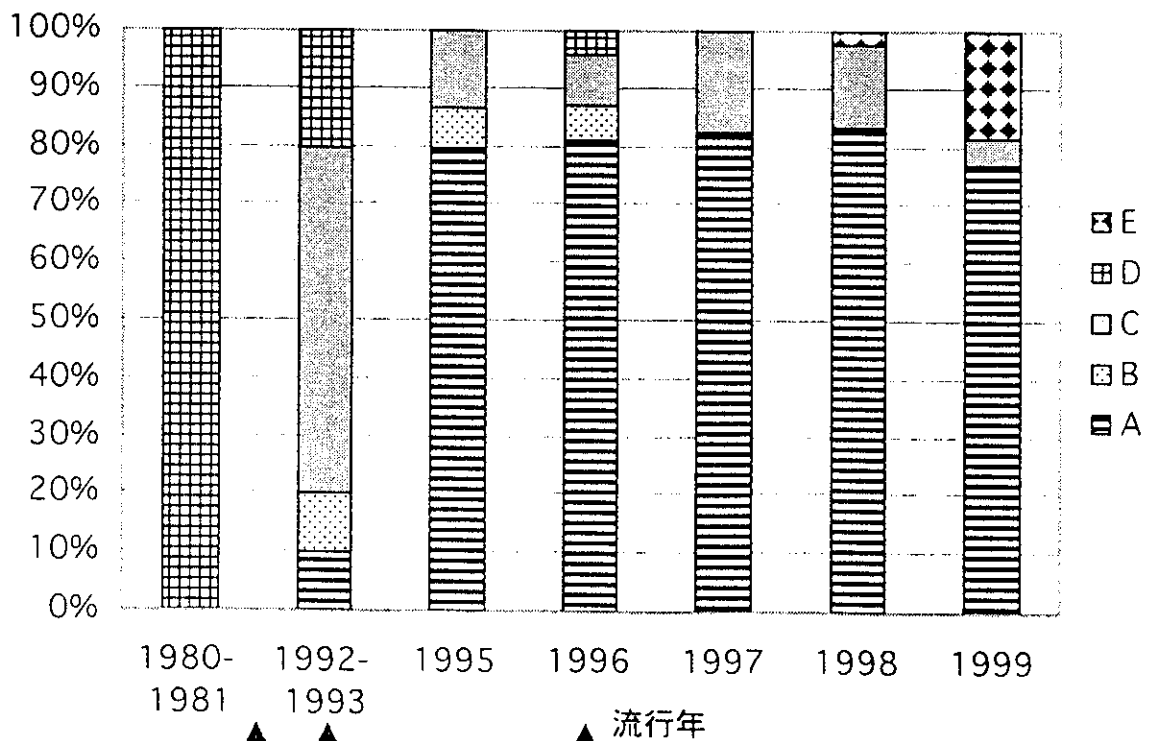
d)桐山佳子、高倉文博、佐藤博行、前田義章：HTLV-I, ヒトパルボウイルスB19と輸血. 臨床と研究. 76:1281-1285 (1999)

2. 学会発表

a).横田聡子、松本浩二、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陽性者の追跡調査. 第47回日本輸血学会総会、仙台、(1999)

b).長野冬子、後藤信代、高倉文博、佐藤博行、前田義章：自己血よりヒトパルボウイルスB19が検出された一例. 第47回日本輸血学会総会、仙台、(1999)

図1 B19陽性サンプルのサブタイプの経時的変化



厚生科学研究費補助金総合研究報告書概要

研究費の名称＝厚生科学研究費

研究事業名＝新興・再興感染症研究事業

研究課題名＝接触及び血液由来感染症の防御対策に関する研究

国庫補助金精算所要額＝ 18,000,000

研究期間＝ 1997～1999

主任研究者＝小室勝利（国立感染症研究所）

分担研究者＝鈴木哲朗（国立感染症研究所）、田代真人（国立感染症研究所）、渡辺治雄（国立感染症研究所）、荒川宜親（国立感染症研究所）、岡田義昭（国立感染症研究所）、水澤左衛子（国立感染症研究所）、岩崎琢也（国立感染症研究所）、阿部賢治（国立感染症研究所）、池田久實（北海道赤十字血液センター）、佐藤博行（福岡赤十字血液センター）

研究の目的＝接触感染症及び血液由来感染症の防御対策に役立てることを目的に、現時点で問題を残している、又は、治療の進歩等に伴い、新たな問題となり得るウイルス、細菌に対する高感度診断法（核酸増幅法、NAT法）の開発、改良、そのための標準品の作製、維持、管理交付体制の確立、及び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研究を行う。

研究方法＝標的ウイルスとして、HCV, HGV, TTV, CMV, HHV-6～8, B19パルボウイルス、標的細菌としてエルシニア菌を考慮し、これらに対するNAT法確立のためのプライマーの作製と評価、NAT用標準品、標準ウイルス、細菌株の収集と維持管理、交付体制の整備及び検査をのがれて血液製剤の中に混入したウイルス、細菌の感染防御対策としての除去不活化法の研究を実施した。

結果と考察＝3年間、各ウイルス、細菌に対する取り組み及び血液製剤の安全性向上にむけた研究から、得られた成果を各々列挙すると以下の様になる。

1. HCV

1) HCVのウイルス構造遺伝子、ウイルス構成蛋白の解析、特にHCVの複製機構、発癌機構の解明に資するため、コア蛋白質とゲノムRNAとの結合性に関する検討を行い、HCVのコア蛋白質は、自身のポジティブ鎖RNAと特異的に結合することが初めて明らかにされた。

2) HCV-RNA検出のための核酸増幅法(NAT法)の評価に用いるWHO国際標準品作製作業に参加し、genotype 1の国際標準品が設定された。この国際標準品に基づき、日本国内に於いても、医薬安全局、血液対策課主催の血液安全技術調査会、NAT小委員会にて国内標準品の作製を行っている。又、血液製剤基準にNAT法の導入が決定された。

2. HGV

1) HGVの安定したPCR法を確立し、日本人由来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、その80%は3型のゲノタイプに属していることがわかった。

2) 東南アジアにおけるウイルス分離と塩基配列の解析を行った結果、ミャンマー、ベトナム人由来の血清より、既知のHGV株28株とは異なる2株を発見することができた。新たなゲノタイプ(4型)であることが確認できた。肝疾患との関係、流行予測や防御対策への応用を検討中である。

3. TTV

1) 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。ウイルス転写調節機構の解明、病態との関係を解析中である。

2) TTV のウイルス構造蛋白を決定し、検出法としての免疫沈降法、ウエスタンブロット法を開発した。PCR 法の改良と併せると 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することが可能となった。

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混入していることが証明された。製法との関係を検討中である。

4. CMV

1) 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が行えるようになった。

2) 血液細胞中、血漿中のウイルスゲノム分析が可能となり、サブタイプ分類、血液を介した感染における意義、防止対策法の検討を進めている。

5. HHV-6 ~ 8

1) 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、本法の有用性を確認した。HHV-6 の PCR 法では、10 コピー数の感度まで検出できる様になった。

1) HHV-6 の細胞内局在性を証明するとともに、突発性発疹におけるウイルス動態について検討した。末梢血単核球中に高頻度にウイルスゲノムが存在することから、今後における輸血における対策の必要性も示唆された。

6. B19 パルボウイルス

1) 供血者スクリーニングに用いるための RHA 法を開発した。この RHA 法は $10^{4.5}$ コピー/ml を検出限界とする試験系であるが、現在、日赤に於いてスクリーニング法として応用されることとなった。

2) Competitive PCR 法を新たに開発し、ウイルスの定量的解析が可能となった。ベクターの標準化作業を実施している。

3) NAT 法の改良とともに、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。これら培養系と、培養細胞内 B19-RNA を RT-PCR 法で測定することを併用すると、ウイルス感染性を高感度に測定できる系であることが証明された。

4) PCR 法により B19 サブタイプ決定を行うことにより、流行調査を実施した。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、開発した方法の臨床的応用範囲が拡大された。

7. エルシニア菌

1) エルシニア菌の遺伝子解析、宿主抵抗性の研究から、微量の血中エルシニア菌を特異的に検出する PCR 法用のプライマーの作製を可能とした。

2) 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、スクリーニング使用のためへの改良を行っている。

3) 開発したエルシニア菌の検出法を用いて、血液製剤中から除去するための、採血後の保存条件 (室温、5 時間が望ましい)、白血球除去フィルターの有効性 (貧食白血球の 99% 以上は除去され) の確認を行った。

8. 血液製剤の有効性、安全性向上のための研究

1) 血液成分製剤に混入する可能性のある細菌についての疫学的分析、検出法のコスト、操作法等、対処法につき検討した。緑膿菌、エルシニア菌等については、耐性菌の出現報告もあり、十分な注意が必要であることが示唆された。

2) 血漿分画製剤製造用の原料血漿中に含まれる麻疹ウイルス抗体価の年代別比較を行い、その有効性検討を行った。麻疹ウイルス抗体価、A 型肝炎抗体価が供血者の間で、年代別により異なっている場合があり、今後、免疫グロブリン製剤の有効性を考える際には、十分な検討の必要性が示唆された。

3) 新鮮凍結血漿 (FFP)、人工酸素運搬体 (人工赤血球) 中に添加したウイルスの不活化法とし

て、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、各々の機能を障害することなく、極めて高い不活化率を示し、臨床応用可能であることを証明した。

研究目的としてあげた、HCV,HGV,TTV,CMV,HHV-6～8, B19 パルボウイルス、エルシニア菌の高感度検出法（核酸増幅法）の開発と、応用に必要なプライマー、ウイルス、菌株の整備については、充分とはいえないが実施し得たと考える。又、血液製剤の安全性向上に対する研究についても、応用可能な段階となり、今後導入されるであろう方法の評価のためにも有効に役立てられると思われる。

病原性の明らかでないウイルスについても、高感度診断法の開発が臨床材料の検査に使用可能となり、診断、病態解析への応用が期待される。しかしながら、ウイルス変異株、耐性菌の出現、細胞内局在性ウイルスの患者治療法の進展に伴う新たな対処方法の必要性等、解決しておかなければならない問題点も多く残されており、今後もこの方向での研究が望まれる。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総合研究報告書
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

接触感染症及び血液由来感染症の防御対策に役立てることを目的に、現在問題を残している感染症、病原性の明確でない感染症として、HCV,HGV,TTV,CMV,HHV-6,HHV-8, B19 パルボウイルス、エルシニア菌をとりあげ、これに対する高感度診断法の開発と臨床応用化、及び血液製剤の有効性、安全性向上のために急を用する対策に関する研究を行った。充分とはいえないが、3年間でこれら目的には近づける成果があげられたと考えられる。しかしながら、変異ウイルス、耐性菌の出現、病原性の明確でないウイルスの病態解析等、多くの問題点が残されているので、今後の研究に期待したい。

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

A. 研究の目的

接触感染症及び血液由来感染症の防御対策に役立てることを目的に、現時点で問題を残している。又は治療の進歩等に伴い、新たな問題となり得るウイルス、細菌に対する高感度診断法（核酸増幅法、NAT法）の開発、改良、そのための標準品の作製、維持、管理交付体制の確立、及び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研究を行う。

B. 研究方法

標的ウイルスとして、HCV,HGV,TTV,CMV, HHV-6～8, B19 パルボウイルス、標的細菌としてエルシニア菌を考慮し、これらに対する NAT 法確立のためのプライマーの作製と評価、NAT 用標準品、標準ウイルス、細菌株の収集と維持管理、

交付体制の整備、及び検査をのがれて血液製剤の中に混入したウイルス、細菌の感染防御対策としての除去不活化法の研究を実施した。

C. 研究の結果

3年間、各ウイルス、細菌に対する取り組み及び、血液製剤の安全性向上にむけた研究から得られた成果を、各々列挙すると以下の様になる。

1. HCV.

1) HCV のウイルス製造遺伝子、ウイルス構成蛋白の解析、特に HCV の複製機構、発癌機構の解明に資するため、コアタンパク質とゲノム RNA との結合性に関する検討を行い、HCV のコアタンパク質は、自身のポジティブ鎖 RNA と特異的に結合することが初めて明らかにされた。

2) HCV-RNA 検出のための核酸増幅法 (NAT 法) の評価に用いる WHO 国際標準品作製作業に参加し、genotype 1 の国際標準品が設定された。この国際標準品に基づき、日本国内に於いても、医薬安全局、血液対策課主催の血液安全技術調査会、NAT 小委員会にて国内標準品の作製を行っている。又、血液製剤基準に NAT 法の導入が決定された。

2. HGV

1) HGV の安定した PCR 法を確立し、日本人由来 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、その 80% は 3 型のゲノムタイプに属していることがわかった。

2) 東南アジアにおけるウイルス分離と塩基配列の解析を行った結果、ミャンマー、ベトナム人由来の血清より、既知の HGV 株 28 株とは異なる 2 株を発見することができた。新たなゲノタイプ (4

型)であることが確認できた。肝疾患との関係、流行予測や防御対策への応用を検討中である。

3. TTV

1) 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、その全て塩基配列を決定した。ウイルス転写調節機構の解明、病態との関係を解析中である。

2) TTV のウイルス構造蛋白を決定し、検出法としての免疫沈降法、ウエスタンブロット法を開発した。PCR 法の改良と併せると 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することが可能となった。

1) 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混入していることが証明された。製法との関係を検討中である。

4. CMV

1) 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が行える様になった。

2) 血液細胞中、血漿中のウイルスゲノム分析が可能となり、サブタイプ分類、血液を介した感染における意義、防止対策法の検討を進めている。

5. HHV-6 ~ 8.

1) 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、本法の有用性を確認した。HHV-6 の PCR 法では、10 コピー数の感度まで検出できるようになった。

2) HHV-6 の細胞内局在性を証明するとともに、突発性発疹におけるウイルス動態について検討した。末梢血単核球中に高頻度にウイルスゲノムが存在することから、今後輸血における対策の必要性も示唆された。

6. B19 パルボウイルス

1) 供血者スクリーニングに用いるための RHA 法を開発した。この RHA 法は $10^4 \sim 5$ コピー/m¹ を検出限界とする試験系であるが、現在、日赤に於いて、スクリーニング法として応用されることとなった。

2) Competitive PCR 法を新たに開発し、ウイルスの定量的解析が可能となった。ベクターの標準化作業を実施している。

3) NAT 法の改良とともに、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。これら培

養系と、培養細胞内 B19-RNA を RT-PCR 法に測定することを併用すると、ウイルス感染性を高感度に測定できる系であることが証明された。

4) PCR 法により、B19 サブタイプ決定を行うことにより、流行調査を実施した。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、開発した方法の臨床的応用範囲が拡大された。

7. エルシニア菌

1) エルシニア菌の遺伝子解析、宿主抵抗性の研究から、微量の血中エルシニア菌を特異的に検出する PCR 法用のプライマーの作製を可能とした。

2) 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向けた検討を行った。コスト、操作法、スクリーニング使用のためへの改良を行っている。

3) 開発したエルシニア菌の検出法を用いて、血液製剤中から除去するための、採血後の保存条件 (室温、5 時間が望ましい)、白血球除去フィルターの有効性 (貧食白血球の 99% 以上は除去される) の確認を行った。

8. 血液製剤の有効性、安全性、安全性向上のための研究

1) 血液成分製剤に混入する可能性のある細菌についての疫学的分析、検出方法のコスト、操作法等、対処法につき検討した。緑膿菌、エルシニア菌等については、耐性菌の出現報告もあり、対策には十分な注意が必要であることが示唆された。

2) 血漿分画製剤製造用の原料血漿中に含まれる麻疹ウイルス抗体価の年代別比較を行い、その有効性検討を行った。麻疹ウイルス抗体価、A 型肝炎抗体価が供血者の間で、年代別により異なっている場合があり、今後、免疫グロブリン製剤の有効性を考える際には、十分な検討の必要性が示唆された。

3) 新鮮凍結血漿 (FFP)、人工酸素運搬体 (人工赤血球) 中に添加したウイルスの不活化法として、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、各々の機能を障害することなく、極めて高い不活化率を示し、臨床応用可能であることを証明した。

D. 考察

粘膜接触感染症及び輸血後感染症には、共通したウイルスが関係している。

本研究班では、従来より抗原、抗体検査による輸血スクリーニングが行われているが、検出感度、検出方法に問題のあるウイルス、及び今後問題と

なり、対策を必要とするであろうウイルス、細菌に対する防御策の検討を考慮し、その高感度検出法の開発改良、臨床的応用性の検討を行い、さらに、血液製剤の有効性、安全性向上のため、直ちに取り組まなければならない問題点に関する研究を実施してきた。

3年間の研究で、HCV,HGV,TTV,CMV,HHV-6～8, 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、標準化が進み、臨床材料を用いた検討が可能となってきた。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、細菌汚染対策上必要とされる注意点の指摘等、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。

しかしながら、HBV,HCVを始めとする変異の出現、特定の genotype の HGV,TTV の病原性への関与、耐性細菌の出現、細胞内にのみ局在するため、従来の検査をのがれるウイルスの存在等、新たな問題を提起している再興感染症、さらに、未だ病原性の明確でないヘルペスウイルス群 (HHV-6,8等) も存在し解明すべき点は多く残された。

本研究班で得られた核酸増幅用のプライマー、標準品の供給、ウイルス、細菌株の維持、管理交付については、国立感染症研究所にて可能であるので、有効に利用することを考えていただきたい。

E. 結論

研究目的としてあげた、HCV,HGV,TTV,CMV, HHV-6～8, B19パルボウイルス、エルシニア菌の高感度検出法(核酸増幅法)の開発と、応用に必要なプライマー、ウイルス、菌株の整備については、充分とはいえないが実施し得たと考える。又、血液製剤の安全性向上に対する研究についても、有効に役立てられると思われる。

病原性の明らかでないウイルスについても、高感度診断法の開発が、臨床材料の検査に使用可能となり、診断、病態解析への応用が期待される。しかしながら、ウイルス変異株、耐性菌の出現、細胞内局在性ウイルスの患者治療法の進展に伴う新たな対処方法の必要性等、解決しておかなければならない問題点も多く残されており、今後もこの方向での研究が望まれる。

F. 研究発表

1. Nakano, Y., Mori, M., Nishinohara, S., Komuro, K., Uchida, T. et al : antigen-specific, IgE-selective unresponsiveness induced by antigen-liposome conjugates. Int. archi. 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., Nakaano, 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.