

平成12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

未知の感染症のリスク評価に
関する研究

国立感染症研究所

未知の感染症のリスク評価に関する研究

平成12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

佐々木毅 東北大学医学部 大学院 免疫血液病制御学 教授

岡田義昭 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 室長

片野晴隆 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

三代俊治 東芝病院 研究部 部長

鈴木哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部 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

協力研究者

佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部 部長

後藤希代子 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

長谷川秀樹 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

倉田 毅 国立感染症研究所 副所長

桜田紳策 国立国際医療センター 国際医療協力局

森 茂郎 東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野

稲見知子 日本大学医学部 第三内科 研究員

中村 伸 京都大学霊長類研究所 研究員

後藤俊二 京都大学霊長類研究所 研究員

佐藤進一郎 北海道赤十字血液センター 研究員

伊原弘美 北海道赤十字血液センター 研究員

酒谷真一 北海道赤十字血液センター 研究員

加藤俊明 北海道赤十字血液センター 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) HBV、HCV、HHV-8 感染の臓器移植での問題点	小室勝利	4
(2) 関節リウマチの発症要因とされるB19パルボウイルス感染に関する研究	佐々木毅	6
(3) ヒトパルボウイルスB19の感染系の開発	岡田義治	14
(4) 新規に発見されたヘルペスウイルス (HHV-6, 7, 8) の病原性に関する研究	片野晴隆	18
(5) TTV及びHCVの変異株の診断と病原性に関する研究	三代俊治	22
(6) TTウイルスの遺伝子発現機構の研究	鈴木哲朗	24
(7) Simian TTVの分離とゲノム構造の特徴	阿部賢治	29
(8) 献血血液におけるlow viremic HBV carrierの残存リスクに関する研究	池田久實	35
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		

厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要

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＝未知の感染症のリスク評価に関する研究

国庫補助金精算所要額＝11,000,000

研究期間＝2000～2003

研究年度＝2000

主任研究者＝小室勝利（国立感染症研究所）

分担研究者＝佐々木 毅（東北大医、大学院）、岡田義昭（国立感染症研究所）、片野晴隆（国立感染症研究所）、三代俊治（東芝病院）、鈴木哲朗（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）

研究目的＝病態、病原性の明確でないウイルス、新たな病気との関連が疑われるウイルス、変異株の出現により病原性の変化が疑われるウイルスにつき、その診断法の開発、病態、病原性の検討、分子疫学的研究を行い、これらウイルス感染のリスク評価を行い、必要な対応策に応用することを目的とする。

研究方法＝目的とするウイルスとして、B19 パルボウイルス、HHV-6,7,8, TTV, HBV, HCV 変異株をとりあげ、そのウイルス学的分析、分子疫学的分析、病態解析に必要なモデル系の開発、診断法に関する検討、臨床的意義についての研究を行った。

結果と考察＝本年度は以下の結果を得た。

- 1) ヒトパルボウイルス B19 の慢性関節リウマチ(RA)発症への関与の関係、特に、B19 の免疫系細胞内への侵入機構を知るための *in vitro*, *in vivo* のモデル系を開発した。免疫系細胞には、従来知られていないレセプターのあることを発見した。
- 2) ヒトパルボウイルス B19 の感染性を検討し得るモデル系を開発した。ヒト培養細胞 (KU812F) に B19 を感染させ、RT-PCR 法により検出する方法が高感度に感染性を評価できることが証明された。
- 3) HHV-8 の高率に感染する *in vitro* モデル系を開発した。臍帯血管内皮細胞と HHV-8 感染リンパ腫細胞を共培養する系が効率よく HHV-8 の感染を示した。同法を用いて、HHV-8 感染と造腫瘍性との関係を知る手がかりを得た。
- 4) TTV の母児感染症例、肝炎後再生不良性貧血の可能性としての TTV 感染症例につき

検討し、TTV の病原性につき考察した。

5) TTV の亜型、TTV-like virus として SANBAN, YONBAN, TLMV を同定し、これらが新種のウイルスであることを確認した。

6) TTV の遺伝子発現機構につき検討した。TTV ゲノム上の非翻訳領域に 110 塩基からなるコアプロモーターエレメントを同定し、更にその上流に、エンハンサーエレメントの存在を明らかにした。

7) TTV の霊長類における感染病態を分子疫学的に解析し、ヒト TTV とは異なる集団の s-TTV を発見した。チンパンジーの sTTV はヒトとの相同性は 48 ~ 54%であった。動物モデル作製等に应用したい。

8) 献血血液での low viremic HBV carrier の残存リスクを検討した。これらキャリアーの残存リスクを除くためには、核酸増幅法だけでなく、血清学的検査として、高感度抗原スクリーニングの導入と、HBc 抗体スクリーニングの継続が必要と考えられた。

9) 臓器移植に伴うウイルス感染、特にドナースクリーニングには、従来の輸血スクリーニングに用いている検査のみでなく考慮すべき点のあることについて考察した。

以上の様な結果が得られ、今後の研究の土台としての基礎的研究の第一歩は達成できたと考えられるが、研究はリスク評価に应用するには未だ満足すべくものではなく、さらなる検討が求められる。

結 論 = ウイルスの存在は確認されたが、病態、病原性が充分解明されていないウイルス (HHV-8, TTV 等)、既知のウイルスではあるが、変異株の出現、細胞内局在性等により診断法に改良の必要性のあるウイルス (HBV 等)、及び新たな病気への関与が疑はれるウイルス (B19 パルボウイルス、HHV-8 等) に関する基礎的研究を実施した。各ウイルスにつき疫学的、分子生物学的解析が行われ、又、動物モデル、in vitro 細胞系モデルの開発も行われ病態解析の土台が作られつつあると考えられた。病原性、臨床的意義等の検討と併せた一層の努力が必要と思われる。

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
未知の感染症のリスク評価に関する研究

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

未知の感染症のリスク評価と対策に役立てるため、ウイルスの存在は確認されたが、病態、病原性が十分に解明されていない新興ウイルス感染や、既存のウイルスではあるが、変異株の産生や、細胞内局在性等により、従来知られていなかった病原性を発揮したり、新たな病気への関与が疑われたりする再興ウイルス感染症としてヒトヘルペスウイルス（HHV-6、HHV-7、HHV-8）、TTV、B19 パルボウイルス、HBV、HCV を主に、診断法の開発、病原性、疾患との関連に関する研究、変異株の疫学的検討と病原性との関係等の検討を行い、以下の結果を得た。

1) ヒトパルボウイルス B19 感染と慢性関節リウマチ発症との関連を知る目的で、慢性関節リウマチの病変関節滑膜に存在する免疫系細胞と B19 の関係を検討した。B19 は、免疫系細胞内で持続感染して、TNF アルファらのサイトカイン遺伝子を活性化する。RA 病態形成に関係することの証明のため、*in vitro* の細胞系 (B19 NS-1 gene-introduced cell line) および *in vivo* (B19 NS-1 gene transgenic mice) モデルを作製した。

2) B19 パルボウイルス感染性系の開発を行った。赤芽球系細胞 (KU812F) を用い、感染性を RT-PCR 方により検出する方法で、高感度に感染性を評価し得る系を開発した。

3) HHV-8 の病原性につき検討した。臍帯血管内皮細胞と HHV-8 感染リンパ腫細胞を共培養する系で、効率よく HHV-8 が感染する系を開発した。本系を用いて HHV-8 の初期蛋白である K8 蛋白の造腫瘍性との関係を知る手がかりを得た。

4) TTV の母児感染例、肝炎後再生不良性貧血の原因の可能性としての TTV 感染例等、TTV と疾患の関係の可能性につき検討し、その可能性のあることを示唆した。

5) TTV の亜型、TTV-like virus として、SANBAN、YONBAN、TLMV を固定し、新種のウイルスであることを確認した。

6) TTV の遺伝子発現調節機構につき検討した。TTV ゲノム上の非翻訳領域に 110 塩基からなるコアプロモーターエレメントを固定し、更にその上流に、エンハンサーエレメントの存在を章かにした。

7) TTV の霊長類における感染病態を分子疫学的に検討した。ヒト TTV とは異なる集簇を形成しており、ヒト TTV との相同性は 48~54% であった。

8) 献血血液における low viremic HBV carrier の残存リスクを検討した。これらキャリアーの感染リスクを確実に排除するためには、核酸増幅法だけではなく、血清学的検査として、高感度抗原スクリーニングの導入と HBc 抗体スクリーニングの継続が必要であることが証明された。

9) 血液幹細胞移植、臓器移植後のウイルス感染防止には、従来の輸血後感染症に対する検査の他に、考慮すべき点のあることについて考察した。

分担研究者

佐々木毅 東北大医 教授
岡田義昭 国立感染研 室長
片野晴隆 " 研究員
三代俊治 東芝病院研究部 部長
鈴木哲朗 国立感染研 室長
阿部賢治 " 主任研究者
池田久寛 北海道赤十字血液センター 所長

により病原性の変化が疑われるウイルス等の診断法、分子疫学的研究、病原性の検討を主に実施し、これらウイルス感染症に対するリスク評価と対策に応用する目的で本研究を実施する。

B. 研究方法と結果

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

A. 研究目的

病態、病原性の明確でないウイルス、新たな病気との関連が疑われ始めたウイルス、組織細胞内に局在して検査のがれるウイルス、変異株の産生

1. 関節リウマチの発症要因とされる B19 パルボウイルスに関する研究
B19 感染後に RA に発展する症例の存在、関節

滑膜組織に B19-DNA/RNA を高頻度に証明できること、滑膜組織で B19 陽性細胞は、T、B、樹状細胞等の免疫系細胞であること、等より、RA 発症にヒトパルボウイルスが関与しているかを証明することを目的とし、本年度は、B19 の免疫系細胞への侵入機序の解明、RA モデルマウスの作成検討した。その結果、1).T 細胞株上には、P 抗原とは異なる未知のレセプターがあることを証明した。2).B19 は免疫系細胞内で持続感染して、TNF アルファからのサイトカイン遺伝子を活性化して、RA 病態形成担うことを証明するため、マクロファージ株 (U937) に、NS-1 領域を規定する遺伝子を挿入したクローン (NS-1 U937)、及び B19 NS-1 遺伝子のトランスジェニックマウスを作成できた。これらの *in vivo*、*in vitro* 系で NS-1 遺伝子による TNF 産生メカニズムについて検討中である。

2. ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発

B19 の病原性を解析するため、*in vitro* でのウイルス増殖系の確立を試みた。ヒト赤血球系細胞株 KU812 株のサブライン株である KU812F 細胞に、B19 陽性血漿を混合培養し、エリスロポイチエンを添加し培養、感染 2 日後に RNA を抽出し、RT-PCR 法にて感染状況を検討した。RT-PCR 法の感度を上げる検出系を確立し、B19 由来の RNA の有無によって、感染性が明確、且つ高感度に評価可能となった。感染機構につき検討中である。

3. 新規に発見されたヘルペスウイルス (HHV-6.7.8) の病原性に関する研究

本年度は、HHV-8 感染とカポジ肉腫やリンパ腫発症との関連につき、ウイルスの感染材構の解明、潜伏感染維持機構についての解明に利用するため、感染実験系の作製を試みた。その結果、1).初代培養の臍帯血管内皮と HHV-8 感染リンパ腫細胞を共培養することにより、血管内皮細胞に効率よく HHV-8 が感染することを発見した。2).HHV-8 の初期蛋白である K8 淡白が、核内の構造物である ND10 と呼ばれる場所で、promyelocytic leukemia protein (PML) とともに存在していることが証明され、HHV-8 の潜伏感染維持の機構を考える上で重要な示唆が得られた。造腫瘍性との関連を検討中である。

4. TTV 及び HCV の変異株の診断と病原性に関する研究

TTV 及びその variant、TTV-like viruses のウイルスの性状及び感染経路等に関する研究を行った。その結果 1) TTV 母児感染が疑われた四症例の塩基配列の検討の結果、小児における TTV

感染には、母児感染が寄与している可能性が示唆された。小児に認められた肝機能異常が TTV によるものかは明かではなかった。2) 肝炎後再生不良性貧血の病原として、TTV が関与した疑いのある症例の解析の結果、TTV は肝内より、骨髄内で効率よく増殖した所見が得られ、本症の原因の 1 つとして TTV も視野に入れて考える必要のあることが考えられた。3) TTV variant として、SANBAN、YONBAN を固定し、TLMV については 10 本の株について全塩基配列を決定し、系統解析を行った。これらが新種のウイルスであることが証明された。

5. TT ウイルスの遺伝子発現機構の研究

TTV の遺伝子発現機構を明らかにするため、東芝病院 三代先生、国立国際医療センター 土方先生らによって分離されたクローン SANBAN を用いて検討した。TTV ゲノム上 1.2Kb の非翻訳領域について、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして転写活性を検討し、110 塩基からなるコアプロモーターエレメントを固定した。更にその上流 215 塩基領域に、方向非依存的にプロモーター活性を増強するエンハンサーエレメントが存在することを明らかにした。TTV 遺伝子発現の組織特異性の解明等の手がかりになると考えられた。

6. Simian TTV の分離とゲノム構造の特徴に関する研究

TTV の起源、自然界における生態の解明及び動物モデルの確立を目的とし、ヒト以外の霊長類における TTV の感染実態を分子疫学的に検討した。その結果、TTV-DNA はチンパンジー (89%)、カニクイザル (14%)、日本ザル (1%)、アカゲザル (1.6%) の血清中に検出された。分子系統樹解析では、ヒト TTV とは明らかに異なる集簇を形成していた。チンパンジー由来の TTV から 1 株を選び、塩基配列を検討すると、ヒト TTV と 48~54% の相同性を示した。サル類に感染している TTV の存在が確認されたので、疾患との関係、病原性に関する検討を行っている。

7. 献血血液における low viremic HBV carrier の残存リスクに関する研究

北海道地域における献血者 540,161 例につき、献血血液の low viremic HBV carrier の残存リスクを検討した。現行の HBV スクリーニング法と高感度な化学発光免疫測定法 (CLIA 法) の並行試験を実施した。CLIA 法によってのみ検出された 65 例 (0.01%) の HBs 抗原弱陽性例のうち、47 例 (0.009%) は血清学的 HBV マーカーの成績から持続感染と考えられ、そのうち 39 例

(0.007%)にHBV-DNAが検出された。又、HBc抗体検査で輸血使用不可と判定された献血血液のうち、1,103例にnested PCRを行うと、12例(0.01%)にHBV-DNAが検出され、持続感染者と考えられた。これらのDNA量は100コピー/ml未満と極めて微量であった。この様な、low vivemic HBV carrierのリスクを排除するためには、核酸増幅法だけでなく、血清学的検査として、高感度HBs抗原スクリーニングの使用と、HBc抗体スクリーニングの継続が必要であると考えられる。

8. 臓器移植に伴う感染症対策の問題点

肝、腎移植等の臓器移植に伴うウイルス感染、特にドナーからの感染例の排除には、従来使用されているスクリーニング法とは異なる技術の採用、新たな導入が必要であることも考える必要があると考えられる。

C. 考察

輸血後感染症及び臓器移植後感染症対策として、肝炎ウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルスにつき、病原性が明らかなものについては、多くの手段がとられ、多大の効果をあげている。しかしながら、本研究でとりあげたウイルスであるB19パルボウイルス、HHV-6.7.8、TTVについてはスクリーニング等の対応はとられておらず、又、既存のHBV、HCV等についても変異性の出現、新しい治療法の導入に伴う対策等新たに考慮しなければならない問題も現れてきた。輸血後ウイルス感染症として、厚生労働省で検討中のものとして、B19パルボウイルス、TTVがあり、現時点では、その病態、病原性等の臨床的評価を待ち、対策を検討しようということになっている。

本年度研究では、これらに加え、カポジ肉腫の誘因ウイルスと考えられるHHV-8、についても今後対応をとることが必要であるか否かの検討を加えた。

TTV、B19、HHV-8については、ウイルス学的分析、疫学的分析、病態解析のためのモデル系の開発、一部臨床的意義づけの研究が行われ、各ウイルスともその基礎的研究の一步は進めたと考えられる。特に、TTVについては、分担研究者により、新ウイルスの発見報告があり、その成果は大なるものがあると考えられる。HVB、HCVについても、検査法に改良の余地が残っており、さらに、臓器移植後のウイルス感染を考えると、新たな検査法の導入も考慮する必要がある。これら基礎的研究をさらに発展させ、未知のウイルス感染症のリスク評価と対策作りのために後見できるように努めたい。

D. 結論

ウイルスの存在は確認されたが、病態、病原性が充分解明されていないウイルス(HHV-8、TTV等)、既知のウイルスではあるが、変異株の出現、細胞内局在性等により診断法の改良の必要性のあるウイルス(HBV等)及び新たな病気への関与が疑われるウイルス(B19パルボウイルス、HHV-8等)に関する基礎的研究を実施した。各ウイルスにつき、疫学的、分子生物学的解析と動物モデル開発及びin vitro細胞系モデル開発による病態解析の土台が作られつつあり、取り扱ったウイルスに対して今後どの様にリスク評価するかの方向性は作られつつあると考えられた。

しかしながら、広範に使用し得る診断法の開発、臨床的検討との関係については一層の努力が必要と思われる。

E. 研究開発

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa, T. Komuro, K. et al: 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
- 2) Naito, S. Komuro, K. et al: Anti-tetanus toxoid antibody production and protection against lethal doses of tetanus toxin in hu-PBL-SCID mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 123:149~154, 2000

HBV、HCV、HHV-8 感染の臓器移植における問題点

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

ウイルスの存在は確認されたが、その病態、病原性が十分に解明されていない感染症及び変異株の出現等により、新たな病原性に注意をはらわれなければならない感染症のリスク評価に際しては、これらウイルスが問題となる対応疾患、治療に伴う宿主の免疫学的変動等を常に考慮しておかなければならない。近年、肝炎ウイルス及びヘルペスウイルス群のうち HHV-8 の感染が臓器移植に際して、新たな問題点を投げかけているので、その内容と必要な対策について検査法を主に考察を行った。臓器移植後の感染症対策には、輸血とは異なった考え方の導入も将来的に必要と考えられる。

A. 研究目的

新興、再興感染症のリスク評価の1つとして、臓器移植に於て、注意すべきウイルス感染症に対する対策について考察した。

B. 研究方法

内外の学術雑誌や欧米の公的保健機関の発行する報告書などから、臓器移植に関連して問題となっている

肝炎ウイルス（HBV、HCV）及びヘルペスウイルスの1つ（HHV-8）について、報告例を検索し、その背景となる要因分析と対応について検討した。

C. 研究結果

1. HBV、HCV、HHV-8 の臓器移植時での問題点

HBV、HCV については輸血血液につき、HBs 抗原（HBs-Ag）、HCV 抗体、核酸増幅法（NAT 法）によるウイルス核酸の有無が検査され、さらに日本に於ては疑わせる血液は使用されないこととなっている。同様の検査システムは血液幹細胞移植、臓器移植ドナーについても導入される様になったが、近年、臓器移植に際し、HBs-Ag が血清中に陰性であるドナーからの肝移植で、HBV の感染例が報告され、さらに変異株の出現が従来の検査法では検出できない例が出現している。^① 又、治療による負荷が、変異株の出現を助けていることも考えられている。^②

HHV-8 についても、腎移植に際して、HHV-8 陽性ドナーからの移植が宿主にカポジ肉腫を発生させたとの報告がでてきた。^③ 現在 HHV-8 は、スクリーニングテストとして、導入されてはならず、今後考えていくべきものと考えられる。

治療の進歩、変化に伴い、従来用いられてきた検査法に対する再考、及び新たな検査法の導入を考慮する必要性が示唆されている。

2. NAT 法及び抗 HBc 抗体検査

日本赤十字社は、輸血用血液については、HBV、HCV、HIV-1 に対する NAT 法をすでに導入し、さらに以前より、抗 HBc 抗体の検査もスクリーニングに用い、高力価抗体を有する血液を除外している。臓器移植分野でも同様の検査法が導入されようとしている。NAT 法の導入は、微量ウイルスをより有効に検出できるだけでなく、HBV 等に於ては、血清検査で検出不可能な変異株をも検出できる可能性も有し、現在日赤では、データの収集、分析を行っていると聞く。抗 HBc 抗体は、日本、アメリカ赤十字、フランスでは検査項目に入っているが、他の国ではスクリーニングテストには入っておらず、その必要性につき、長い間議論されてきた。しかしながら、日赤法による輸血後肝炎の減少効果、及び肝移植時の HBV 感染予防に、HBc 抗体の測定が、潜在しているウイルス検出に有効に働くという結果等から、臓器移植分野では行うべきものと考えられる。^④

日赤が排除している高力価 HBc 抗体陽性例で約 4%、EIA 法による陽性率 10% を考慮すると、適合臓器の選択と併せて考えていく必要がある。

3. 細胞内局在ウイルスの検査

HBV、HCV が肝細胞以外、特に末梢血リンパ球内に存在することが知られており、又、末梢血中に陰性であるが、肝細胞内に陽性である例は多い。

現在の検査システムでは、血清、又は血清を検体として用いるため、細胞内で陽性、血清内陰性の例には感染の可能性が存在することになる。^④

HHV-8 に於ては、検出方法として、末梢単核球を用いたウイルス DNA の検出が必要であり、血清中の抗体測定のみではその感染性評価はできない。この場合も同様に、従来の血清検査では不十分であり、検査法については、充分考慮する必要

があろう。末梢血の輸血に関しては、最近ウイルス不活化法の研究が進み、近々、血小板、赤血球輸血について、応用されようとしているが、臓器移植の際には応用は困難であり、検査法に関する再検討が示唆される。

4. 検査法の評価と標準品の整備

日本国内に於ては、HBV、HCV 検出用キットが多数販売、使用されているが、相互の感度、特異性の比較、評価は充分に行われていない。これら検査法の評価には、共通のモノサシとなる標準品が必要になる。現在、世界的には、WHO を中心として、NAT 法評価に用いる HIV、HBV、HCV、HAV、B19-パルボウイルス標準品、HBs-Ag、HCV 抗体、HIV 抗体検査法評価に用いる。抗原、抗体標準非作製がサブクラス全体にわたり計画、実行されている。日本国内に於ても、NAT 法評価に用いる HCV、HBV、HIV 国内標準品作製作業が進行中で、HCV、HBV については完成した。これらはいずれも、輸血後感染症に応用するため、作製されており、必ずしも全てが臓器移植分野に適合できるかには問題が残るが、多くの分野での評価を実施し、検査法評価に応用できる様にすることが必要と考えられる。検査法の開発、改良とともに、その精度管理の重要性も考えたい。

D. 考察

輸血後のウイルス感染症に対する対応は、近年急速に進み、導入した方法はいずれも高い有効性を発揮し、輸血後ウイルス感染症は激減した。

一方、近年の造血幹細胞移植、肝や腎を主とする臓器移植の進歩に伴い、臓器移植後感染症に対する対応も重要性を増している。ウイルス感染症防止には、概当するウイルスの病態を把握し、如何なる方法で検出し、可能な対策をとるかが求められる。現時点で、臓器移植に伴う感染症対策は、ドナーからの感染を如何に防ぐか、免疫抑制状態にあるレシピエントへの感染を如何に防ぐかにかかっている。その分野での検討は、個々に行われているが、相互に連絡を保った検討が充分に行われていない傾向がある時、現時点での肝、腎移植時に考慮すべき点、特にドナー側に関する検査に於て、注意すべき点の一部考察した。

輸血後ウイルス感染症とは異なった視点での検査導入も必要であり、このことは、新興、再興感染症の検査法の開発、改良、応用に当る際、考察する必要がある。当班であつまっている感染症についても、現在その病態、病原性、検出法等の検討を行っているが、リスク評価を行うとともに、どのような手段がリスクを避けるために求められるかを検討するべきと考える。

E. 参考文献

1. Marusawa, H. et al. Latent hepatitis B virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen. *Hepatology* 31:488~495, 2000.
2. Ijaz, S. et al. Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface escape mutants and its application in liver transplant recipients. *J. Med. Virol.* 63:210~216, 2000.
3. Lippe, M. et al. Molecular evidence of organ-related transmission of kaposi sarcoma-associated herpesvirus or human herpesvirus-8 in transplant patients. *Blood* 96:3279~3281, 2000.
4. Schmidt, W. N. et al. hepatitis C virus (HCV) infection and cryoglobulinemia : analysis of whole blood and plasma HCV-RNA concentrations and correlation with liver histology. *hepatology* 31:737~744, 2000.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshikawa, T. Komuro, K. et al : 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.
- 2) Naito, S. Komuro, K. et al : Anti-tetanus toxoid antibody production and protection against lethal doses of tetanus toxin in hu-PBL-SCID mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 123:149~154, 2000.

研究主旨

慢性関節リウマチの病変関節滑膜の免疫系細胞で、ヒトパルボウイルス B19(B19)の活性化が認められた。B19 は免疫系細胞内で持続感染して、TNF α らのサイトカイン遺伝子を活性化し、RA 病態形成を担うことを証明するために in vitro (B19 NS-1 gene-introduced cell line)および in vivo (B19 NS-1 gene transgenic mice)モデルを作成した。

A. 研究背景と目的

慢性関節リウマチ(RA)を代表とする自己免疫疾患の発症には環境因子、特にウイルス感染の関与が疑われてきたが明確な機能は乏しかった。我々は、伝染性紅斑の原因ウイルスであるヒトパルボウイルス B19(B19)につき、以下の知見を得てきた。

(1)成人の B19 感染では急性感染症の経過にとどまらず、持続感染する場合がある。我々は臨床上で急性 B19 感染後に慢性関節リウマチ(RA)に発展する複数例を観察した。

(2)活動性 RA 例の関節滑膜組織に B19-DNA/RNA 及び B19 蛋白 VP1 を高頻度に検出する。一方、対照群の滑膜組織では B19-DNA を検出するが、B19-DNA, VP-1 は検出できない。

(3)RA 滑膜組織での B19 陽性細胞は T 細胞、B 細胞、樹状細胞などの免疫系細胞であった。

(4)RA 滑膜細胞と正常人由来扁桃腺細胞（免疫細胞を多数含む）や、単球細胞株 U937 を二重膜下で共培養すると TNF α 、IL-6 産生が著明に上昇し、この反応は抗 VP-1 抗体で抑制される。

以上より、RA 発症におけるヒトパルボウイルス B19 感染の役割及びその関与機序を明らかにすることを目的とした。

B., C. 研究方法及び研究成果

1. 患者検体

RA 及びその他の臨床検体は東北大学医学部附属病院血液免疫科受診例より得られた。検体の本研究における使用は、本人の承諾及び東北大学医学部倫理委員会の承認を得た。

(1)B19 の免疫系細胞への進入機序の解明 (B19

レセプター、RA 特有の B19 ウイルスの存在の追求)。

T 細胞株 H9 を用い B19 感染関連分子の同定を試みた。B19 empty capsid を標識し、H9 と共培養すると H9 表面に特異的吸着を示し、B19 感染関連分子の存在が示唆された。H9 表面には抗 P 抗原抗体で検出し得る P 抗原は認められず、H9 表面の B19 感染関連分子は P 抗原とは異なる未知のレセプターである可能性が推定され同定を試みている。

(2)RA 関節滑膜組織への免疫系細胞における B19 持続感染機序の追求

(a)ヒト免疫系細胞株（マクロファージ株、U937、THP-1）及びヒト末梢血 T 細胞、マクロファージにおける B19 感染様式の追求。

i) B19 のエリスロポイエチン添加の赤芽球株 KU812Ep26 への B19 感染において、著明な B19 DNA 量の増加、VP-1 陽性細胞の増加がもたらされた。一方、マクロファージ、M ϕ 株 U937 への B19 感染においては、有意の B19 DNA 増加を検出し難かったが、軽度の、しかし、有意の B19-NS-1 mRNA の経時的な増加を認めた。

ii) H9 細胞に B19 陽性血清を添加(B19 感染)し、細胞骨格蛋白である細胞内アクチン重合を FACS 解析で測定すると、細胞内アクチン重合が亢進し、細胞運動機能の促進が推定された。cell migration assay、cell adhesion assay では、B19 感染 H9 細胞の migration、接着は共に亢進していた。更に、B19 感染 H9 細胞では、細胞内チロシンのリン酸化がもたらされた。これらより、U937 細胞機能がウイルス蛋白によって変化していることが予想された。この現象は、抗 B19 中和抗体の添加により競合抑制された。

(b)RA 例病変部位より分離した B19 の DNA 配列と他の B19 株のそれらとの比較 (RA 特有の B19 に関する検索)。

6 例の RA 例関節滑膜より PCR にて増幅した B19 遺伝子の性状を追求した。配列、アミノ酸配列共に 0.9%以内ではあるが、多様性を示した。しかし、伝染性紅斑例由来の B19 のそれらに比して、RA 例に共通し、かつユニークとされる配列は現時点で見出されていない。持続感染を担う B19 と急性感染で分離される B19 遺伝子には明確な差はないと推定された。

(c)B19 の自然抗体の中和活性の測定法の確立、比較

P1 抗原を有する細胞株 KU812Ep6 (富士レピオ、宮川博士より) に B19 感染時に検体血清を添加し、B19-VP1 DNA の増加の抑制を検索する定量 PCR 系において、抗 B19 中和抗体測定系を確率した。B19 急性感染後、自然治癒した例では、抗 B19-IgG 抗体の出現に伴い中和能 (70%以上の感染阻止率) を認めたが、持続感染を呈する RA 例では抗 B19-IgG 抗体が検出されても、中和能の低下 (30%以下の感染阻止率) を示し、B19 持続感染の一因として抗 B19 中和抗体不全状態の関与が推定された。

(d)B19 感染による宿主細胞遺伝子、特にサイトカイン、アポトーシス関連遺伝子活性化機序の追求。

RA 由来 B19 のウイルス機能を担う NS-1 領域を規定する遺伝子を Mφ株 U937 挿入クローンとして作出した(NS-1 U937)。NS-1 U937 は RA 病態発現に重要な炎症性サイトカイン TNF α 産生惹起した。NS-1 遺伝子による TNF α 産生メカニズムについて検索中である。

(3) B19 と RA 発現

B19 トランスジェニックマウスによる RA モデル作成の可能性の追求。

B19 NS-1 遺伝子のトランスジェニック B6 マウスを作成した。このマウスに typell コラーゲンを投与したところ、多発関節炎が誘発された。

B6 マウスはコラーゲン誘発関節炎を発症しにくい系統であり、NS-1 遺伝子機能に基づく現

象と推定された。B19 感染と RA 発症との関連を追及する上で重要な所見と考えられる。

D. 考察

B19 の主たるターゲットは赤血球細胞に強く発現する P 抗原であることが知られている。我々の研究により、B19 は免疫系細胞表面上の P 抗原以外のレセプターに結合し、免疫系細胞の機能に変化を与えること、特に関節での RA 病態形成に最も重要とされる TNF α の産生を惹起しうることが証明されつつある。この事は in vitro (NS-1 遺伝子導入細胞株) 及び in vivo (B19-NS-1 遺伝子導入トランスジェニックマウス) モデルの作成により更に明らかとされよう。これらの研究により B19 の未知の感染・病態形成機序が明らかとしうると考える。

E. 結論

- (1)RA 関節病変部位に存在する B19 は RA に特有の塩基配列を示さなかった。
- (2)B19 は免疫系細胞に感染し、宿主細胞による炎症性サイトカイン TNF α 等の産生を惹起しう。
- (3)B19 の免疫系細胞での感染様式持続感染と RA 発現を追及しうる vitro 及び vivo モデルを確立した。

F. 研究発表

(1)論文発表

1. 佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 と慢性関節リウマチ、リウマチ、39:867-873, 2000
2. 石井恵子、高橋裕一、賀来満夫、佐々木毅：ヒトパルボウイルス感染と慢性関節、リウマチ、27:419-425, 2000
3. 藤巻慎一、船渡忠男、藤原淳子、佐藤淳子、三浦利彦、賀来満夫、遠宮靖雄、佐々木毅：定量 RT-PCR における RNA 基準量の設定に関する検討、臨床病理、48:54-59, 2000
4. 佐々木毅：リウマチ性疾患の診療に有用な検査、リウマチ科、23:282-286, 2000
5. 佐々木毅：リウマチ性疾患の診断と治療プロ

- セス、内科、86:218-224, 2000
6. Y.Suzuki, T.Funato, Y.Munakata, K.Sato, Y.Hirabayashi, T.Ishii, N.Takasawa, T.Ootaka, T.Saito, T.Sasaki: Chemically modified ribozyme to V gene inhibits anti-DNA production and the formation of immune deposits caused by lupus lymphocytes. *J Immunol* 165:5900-5905, 2000
 7. T.Funato, N.Satou, D.Abukawa, J.Satou, Y.Abe, K.Kumura, T.Ishii, K.linuma, M.Kaku, T.Sasaki: Quantitative evaluation of cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis. *J Virol Hepat* in press, 2000
 8. M.Takahashi, T.Funato, K.Kumura, T.Ishii, M.Kaku, T.Sasaki: Measurement of TNF α messenger RNA in synovial fibroblasts by real-time quantitative PCR. *J Clin Lab Anal* in press, 2000
 9. J.Satoh, T.Funato, N.Satoh, Y.Abe, K.K.Ishii, T.Sasaki, M.Kaku: Detection of human cytomegalovirus DNA from blood cells by quantitative PCR. *J Clin Lab Anal* in press, 2000
 10. T.Funato, T.Ishii, M.Kambe, K.J.Scanlon, T.Sasaki: Anti-K-ras ribozyme induces a growth inhibition and an increased chemosensitivity of human colon cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 7:495-500, 2000
 11. T.Funato, J.Satou, Y.Nishiyama, S.Fujimaki, T.Miura, M.Kaku, T.Sasaki: In vitro leukemia cell models of Ara-C resistance. *Leukemia Research* 24:535-541, 2000
 12. Y.Munakata, K.Masuda, S.Shibata, T.Sasaki: Detection of complement-fixing anti-phospholipid antibodies in association with thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis* 83:728-731, 2000
 13. S.Takahashi, K.Furuyama, A.Kobayashi, S.Taketani, H.Harigae, M.Yamamoto, K.Igarashi, T.Sasaki, N.Hayashi: Cloning of a coproporphyrinogen oxidase promoter regulatory element binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273:596-602, 2000
2. 学会発表
 1. 石井恵子、齋藤貴子、宗像靖彦、佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 の Tリンパ球への感染、第 48 回日本ウイルス学会、2000 年 11 月三重県津市
 2. 宗像靖彦、齋藤貴子、石井恵子、高澤徳彦、佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 の T 細胞への感染と慢性関節リウマチ、第 30 回日本免疫学会、2000 年 11 月、福島県郡山市
 3. 加藤一郎、宗像靖彦、齋藤貴子、石井恵子、渡辺美紀、齋藤真一郎、平林泰彦、柴田忍、鈴木隆城、佐々木毅：ヒトパルボウイルス B19 に罹患し、急性増悪との鑑別を要した SLE の 1 例、第 44 回日本リウマチ学会、2000 年 5 月、横浜
 4. 高澤徳彦、齋藤貴子、宗像靖彦、石井恵子、加藤一郎、渡辺美紀、齋藤真一郎、平林泰彦、柴田忍、佐々木毅：M 蛋白が出現したヒトパルボウイルス B19 慢性関節炎の一例、第 44 回日本リウマチ学会、2000 年 5 月、横浜
 5. 齋藤貴子、宗像靖彦、島山百合子、石井恵子、賀来満夫、佐々木毅：血清検査、DNA 検査に基づくヒトパルボウイルス感染の特徴、第 47 回日本臨床病理学会、2000 年 11 月、福島県郡山市
 6. Y.Munakata, K.Ishii, T.Sasaki: The role of human parvovirus B19 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. 1st International seminar on immunology--Pathogenesis and regulation of immunological refractory diseases--. Tokyo, Nov. 2000.
 7. Y.Munakata, T.Saito, K.Ishii, T.Sasaki: Human parvovirus B19 infection to macrophage-like cells and its role for inflammatory cytokine production. *Experimental Biology 2001 (Annual Meeting of American Society of Immunology)* Orland, U.S.A., March, 2001.

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Y.Munakata, K.Musuda, S.Shibata T.Sasaki	Detection of complement-fixing anti-phospholipid antibodies in association with thrombosis	Thrombosis and Hemostasis	83	728-731	2000
T.Funato, J.Satou, Y.Munakata K.Musuda, Y.Nishiyama, S.Fujimaki T.Miura, M.Kaku, T.Sasaki	In vitro leukemia cell models of Ara-C resistance	Leukemia Research	24	535-541	2000
T.Funato, T.Ishii, M.Kambe, K.J.Scanlon, T.Sasaki	Anti-K-ras ribozyme induces a growth inhibition and an increased chemosensitivity of human colon cancer cells	Cancer gene Therapy	7	495-500	2000
S.Fujimaki, T.Funato, H.Harigae M.Imaizumi, H.Suzuki, Y.Kaneto Y.Miura, T.Sasaki	A quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction method for the detection of leukemic cells with t (8;21) in peripheral blood	Eur J Haematology	64	252-258	2000
S.Takahashi, K.Furuyama, A.Kobayashi, S.Taketani, H.Harigae M.yamamoto, K.Igarashi, T.Sasaki N.Hayashi	Cloning of a coproporphyrinogen oxidase promoter regulatory element binding protein	Biochemical and Biophysical Research Communications	273	596-602	2000

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
T. Miura, T. Funato, S. Yabuki, T. Sasaki, M. Kaku	Detection of monoclonal proteins by capillary electrophoresis using a zwitterion in the running buffer	Clinica Chimica Acta	299	87-99	2000
Y. Suzuki, T. Funato, Y. Munakata K. Sato, Y. Hirabayashi, T. Ishii N. Takasawa, T. Ootaka, T. Saito T. Sasaki	Chemically modified ribozyme to V gene inhibits anti-DNA production and the formation of immune deposits caused by lupus lymphocytes	J Immunol	165	5900-5905	2000
T. Funato, Y. Nishiyama, N. Lortiani R. Matsuki, K. Yoshida, M. Kaku, T. Sasaki, H. Ideguchi, J. Ono	De tecton of mutations in adenine phosphoribosyltransferase (APRT) deficiency using the LightCycler system	J Clin Lab Anal	14	274-279	2000
S. Takahashi, K. Fykuyama, A. Kobayashi, S. Taketani, H. Harigae M. Yamamoto, K. Igarashi, T. Sasaki N. Hayashi	Cloning of a coprophyrinogen regulatory element binding protein.	Biochem biophys Res Commun	273	596-602	2000
T. Funato, N. Satou, D. Abukawa, J. Satou, Y. Abe, K. Kumura, Ishii K. Iinuma, M. Kaku, T. Sasaki,	Quantitative evaluation of cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis.	J Virol Hepat		in press	2000

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
J.Kameoka, T.Funato, Y.Obata, I.Kadowaki, H.Yokoyama, T.Kimura Y.Tomia, M.Yamada, I.Ishikawa, M.Takagawa, O.Sasaki, J.Kimura, H.Harigae, I.Miura, K.Meguro, M.Kak T.Sasaki,	Clonal evolution from trisomy into tetrasomy of chromosome 8 associated with the development of acute myeloid leukemia from myelodysplastic syndrome	Cancer Genetics and Cytogenetics		in press	2000
M.Takahashi, T.Funato, K.Kumura Ishii, M.Kaku, T.Sasaki	Measurement of TNF α messenger synovial fibroblasts by real-time quantitative RT-PCR	J.Lab Clin Med	137	101-106	2000
J.Satoh, T.Funato, N.Satoh, Y.Abe K.K.Ishii, T.Sasaki, M.Kaku,	Detection of human cytomegalovirus DNA from blood cells by quantitative PCR.	J Clin Lab Anal		in press	2000
T.Miura, M.Ouhira, N.Koseki, Y.Obata, S.Fujimaki, J.Kameoka, T.Sasaki T.Funato, H.Harigae, M.Kaku	Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia with four distinct immunophenotypes representing different stages of T-cell development.	Pediatr Hemat Oncol	18	in press	2000

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
M.Rahman, Y.Hirabayashi, T.Ishii T.Kodera, M.watanabe, N.Takasawa T.Sasaki	A repressor element in the 5'- untranslated region of human Pax 5 exon 1A	Gene	263	59-66	2001
K.K.Ishii, Y.Munakata, T.Funato, Y.F. M.Rahman, N.Koseki, T.Saito, M.Kaku, T.Sasaki	Genetic similarity of human parvovirus B19 isolates obtained from patients with rheumatoid arthritis and from patients with acute B19 infection	J.Med Viro		in press	2001
M.Takahashi, T.Funato, Y.Munakata K.Ishii, Y.Hirabayashi, T.Sasaki	Specific manipulation of inflammatorycytokines by ribozyme and DNAenzyme to TNF α mRNA	Arth.Rheum	43	100	2000
M.Takahashi, T.Funato, K.Kumura Ishii, M.Kaku, T.Sasaki	Measurement of tumor of necrosis factor - α messenger RNA in synovial fibroblasts by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction	J.Lab.Clin.Med.,	137	101-106	2001

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
佐々木毅	抗リン脂質抗体症候群関連血栓症	臨床病理	41	261-264	2000
佐々木毅	リウマチ性疾患の診断と治療プロセス	内科	86	218-224	2000
佐々木毅	リウマチ性疾患の診療に有用な検査	リウマチ科	23	282-286	2000
石井恵子, 高橋裕一, 賀来満夫 佐々木毅	ヒトパルボウイルス感染と慢性関節	リウマチ	27	419-425	2000
藤巻慎一, 松渡忠男, 藤原淳子 三浦利彦, 賀来満夫, 遠宮靖雄 佐々木毅	定量, RT-PCRにおけるRNA基準量の 設定に関する検討,	臨床病理	48	54-59	2000
松渡忠男, 藤巻慎一, 藤原淳子, 三浦利彦, 吉田克己, 賀来満夫 佐々木毅	がんの薬剤耐性の遺伝子診断	臨床病理	48 (2)	162-166	2000
佐々木毅	ヒトパルボウイルスB19と慢性関節 リウマチ	リウマチ	39	867-873	2000

ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所室長

研究要旨 ヒトパルボウイルス B19 (以下 B19 と略す) は、以前より慢性関節リュウマチや他の特発性疾患との因果関係が疑われてきているが、確かな証拠は得られていない。これまでに骨髓細胞や臍帯血以外に適当な培養系がなく、B19 の病原性の解析が充分に出来なかった。そこで、一般に利用可能な株化された細胞を用いての感染性系の確立を目指した。KU812F 細胞を用い、B19 の感染性を検索した。Bostic らの報告した RT-PCR 法をさらに感度を向上させた検出系を確立し、感染の有無を評価した。このアッセイにより、B19 由来の RNA の有無によって感染性が明確、且つ高感度に評価可能となり、数百個に1個の割合で KU812F 細胞に感染が生じることを明らかにした。

G. 研究目的

B19 は envelope を持たない DNA ウイルスであり、これまで、伝染性紅斑や胎児水腫の原因ウイルスであることが明らかにされている。最近、慢性関節リュウマチとの関連が報告されるなど、これまで原因が解らなかつた疾患への関与が疑われている。しかし、B19 は感染する細胞のトロピズムが極めて厳格なため、in vitro での培養は困難であった。B19 の病原性を解析するためには、in vitro でウイルス増殖系の確立が必要となった。本研究では、ヒト細胞株 KU812 のサブラインである KU812F 細胞を用いてウイルスの培養系の確立を目指した。

B. 研究方法

B19 抗原陽性血漿 (福岡赤十字血液センター佐藤博士より供与) 1 マイクロリットルを 1×10^6 の KU812F 細胞のペレットに接種し、4 度 C で 1 時間細胞に吸着させた。3 回洗浄後、エリスロポイエチン (最終濃度 2IU/ml) を添加した 10% FCS-RPMI 培養液にて 2×10^5 /ml 培養した。感染 2 日後に RNA を抽出し、15 マイクロの水に溶解後、5 マイクロを取り、Bostic (J. Infect. Dis. 1999; 179:

619-626) らの報告した B19 特異的プライマー B19-6 を用いた RT 反応を行った (Fig.1)。PCR は B19-6 と B19-9 をプライマーとして用いた。得られた PCR 産物は TA クローニングキットを用いてプラスミドに組換え、塩基配列を決定し、サブライシング部位を解析した。次に、B19 陽性血漿を PBS で $\times 10$, $\times 10^3$, $\times 10^5$ に希釈し、各々 10 マイクロリットルを 2×10^5 の KU812F 細胞に感染させ、検出限界を検討した。また、感染の検出感度を高めるために、B19-14 (2169-2189) をプライマーにして cDNA を作り、B19-14 と B19-9 で PCR を行い、2 マイクロの PCR 産物 B19 をさらに B19-9 と B19-6 のプライマーで semi-nested PCR を行った。一方、細胞側の感受性を高めるために、B19 が赤血球に分化傾向にある細胞に感染し易いことから、赤血球抗原の glycophorin A に対する抗体 (磁気ビーズ) で陽性細胞を選択した。これらの細胞に B19 を感染させ、細胞を 100 個、500 個、1000 個、10000 個に分け、各々 48 時間培養し、B19 の感染細胞の頻度を semi-nested PCR にて検討した。

C. 研究結果

B19 陽性血漿で感染させたところ、277bp と 157bp のバンドが認められた。これらのバンドは非感染細胞には認められなかった。2 つの PCR 産物の塩基配列を解析したところ、406-407、1909-1910、2029-2030 との間で RNA のスプライシングが生じていた。そのため B19-6 と B19-9 のプライマーを用いた PCR では、277bp と 157bp の PCR 産物が認められた。KU812F 細胞では 10^3 に希釈した血漿でも B19 の RNA が検出でき、これは UT/7 細胞より高感受性であった。また、B19-14 を用いて作製した cDNA を semi-nestedPCR によって増幅しても 277bp と 157bp のバンドが確認できた。さらに、glycophorin A 陽性細胞を磁気ビーズで濃縮すると細胞のペレットは赤色を呈し、赤血球に分化傾向にある細胞を集めることが可能となった。B19 感染細胞の頻度を解析したところ、親株では 10^4 では陽性、 10^3 では感染細胞は検出できなかった。一方、glycophorin A 陽性細胞では 500 個では陽性、100 個では陰性であった。よって、glycophorin A 陽性細胞では感染細胞の頻度は約 20 倍となった。(Fig.2)。

D. 考察

我々はこれまでの研究から、KU812 細胞が成長因子によって赤芽球に分化し易いことを見い出していたので、KU812 細胞を用いて B19 の感染系の確立を試みた。KU812 細胞には E と F のサブラインがあり、F の方がエリスロポイエチンのリセプターが多いと報告されていたので KU812F を用いた。B19 はエアロゾールで感染し、抵抗性が強いウイルスなので、実験室内での感染事故を予防する点からも RT-PCR 法は使い易い方法だと考えている。しかし、感染細胞の頻度からすると glycophorin A 陽性細胞においても 500 個に

1 個しか感染細胞が存在 (感染している細胞が 1 個存在していれば検出できると仮定して) していないことになる。この頻度が骨髓細胞や臍帯血と比較して、低いか否かさらに検討する必要がある。glycophorin A 陽性の細胞において明らかに感染細胞の頻度が増加したので、より赤血球に分化誘導することが B19 の病原性を解析する上で重要である。

E. 結論

KU812F 細胞が B19 に感受性があることを見出した。また、赤血球への分化傾向にある細胞がより高感受性であることを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Naito, S., Y. Okada, M. Takahashi, H. Kato, M. Taneichi, Y. Ami, Y. Suzaki, T. Oka, K. Okuma, K. Morokuma, H. Onodera, M. Inoue, Y. Takahashi, S. Yamazaki, H. Kimura, K. Komuro, and T. Uchida. 2000. Anti-tetanus toxoid antibody production and protection against lethal doses of tetanus toxin in hu-pbl-scid mice. *Int Arch Allergy Immunol* 123:149-154.

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、福島誉子、種市麻衣子、斎賀菊江、小室勝利. 2000. フィブリン接着剤の役割と安全性. *Surgery frontier*. 7:95-100.

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子、福島誉子、小室勝利: in vitro におけるパルボウイルス B19 感染の検出法. 第 48 回日本ウイルス学会. 2000 年.