

20010697

平成13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13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 教授
免疫血液病制御学

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 ウィルス第二部 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

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

海老原善郎 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

佐藤正夫 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

内藤秀夫 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

丁 欣 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

Huy T.T.Tran 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

岩崎陽子 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

早川依里子 国立感染症研究所 感染病理部 研究員

佐藤進一郎 北海道赤十字血液センター 研究員

丹羽尋美 北海道赤十字血液センター 研究員

宮崎 孔 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) 血液製剤のウィルス除去・不活化に関する WHO ガイドライン	小室勝利	4
(2) 関節リウマチの発症要因とされる B19 パルボウィルス感染に関する研究	佐々木毅	7
(3) ヒトパルボウィルス 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ィルス (HHV-6.7.8) の病原性に関する研究	片野晴隆	17
(5) “原因不明” 肝炎例に於ける HEV と TTV の関与： 特に HEV 日本土着株の分子疫学的研究	三代俊治	21
(6) TT ウィルス遺伝子の転写調節機構の研究	鈴木哲朗	23
(7) PCR 法による HBV の迅速・高感度ゲノタイピング法の開発と世界における HBV ゲノタイプ分布様式	阿部賢治	28
(8) 献血者における Human herpes virus 8(HHV-8)抗体陽性率とその輸血感染リスクに関する研究	池田久實	34
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		39

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＝10,000,000

研究期間＝2000～2002

研究年度＝2001

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 感染と慢性関節リウマチ発症との関連を知る目的で、ヒトパルボウイルス B19 の NS-1 遺伝子を導入したマウスモデルを作り、その作用を検討した。NS-1 遺伝子を導入したマウスには、タイプ II コラーゲン誘発関節炎が高頻度に発症した。又、慢性関節リウマチの病態形成に主役をなす TNF- α が誘導されていた。細胞株を使用した *in vitro* の結果から、NS-1 を導入すると、転写因子 AP-1、AP-2 が TNF- α の産生に関与していることが証明された。
- 2) ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発、改良を行った。KU812F 細胞が B19 の感染をおこすことを証明し、この中からエリスロポイエチンリセプターの陽性細胞をクローニングしたところ、数千個の B19 が存在すれば、感染する系を開発した。
- 3) 昨年度開発した HHV-8 高感度検出法を用い、様々な疾患を持った患者における感染率を検索した。カポジ肉腫患者は 100%陽性、同性愛エイズ患者では、高頻度に陽性であることが証明された。日本国内の地域別感染率、世界数ヶ国での陽性頻度の検討を開始した。
- 4) HHV-8 の輸血リスク評価のため、献血者における陽性率を検討した。健常献血者群では 1.1%陽性、頻回輸血患者群では 3.1%が陽性であることが証明された。検出法との関連を追求中である。
- 5) 日本に於ける HEV 土着株の検討、TTV と疾患の関係を検討した。HEV は、最早、輸入感染症ではなく、急性肝炎を疑った場合、HEV-RNA の検出を行うべきことが示唆された。感染ルート等の検討を行っている。
- 6) TTV 遺伝子の転写調節機構の解析を行い、非翻訳領域 1.2kb 内に、転写開始点に近接した約 110 塩基のコアプロモーターとその上流のエンハンサー領域を同定した。コアプロモーター領域

の詳細な検討を行った。TTVは遺伝子変異が激しく、数多くの遺伝子型が報告されているが、検討した領域の配列は、各遺伝子型でよく保存されていた。

7) 6型の主要なゲノタイプからなるHBVの型特異的なプライマーをデザインし、PCR法による迅速で、高感度なHBVゲノタイピング法を開発した。この方法で、11ヶ国から収集した臨床検体につき検討し、地理疫学的検討を行っている。

8) WHOの発表した血液製剤のウィルス不活化に関するガイドラインを紹介し、日本における対応を考察した。

以上の様な結果が得られた。昨年度の研究がさらに発展し、目的に近づくべく、基礎的研究は徐々にではあるが達成されていると考えられる。これら基礎的データは今後検討しなければならないリスク評価、とるべき対応を考える際、少しずつでもとり入れられることを期待している。今後とも、方向性に従った検討を行うつもりである。

結果＝ウィ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ィルス (HHV-8、TTV等)、既知のウィルスではあるが、変異株の出現、細胞内局在性等により診断法及び病原性に新たな対応が必要になるウィルス (HBV、HCV) 及び新たな病気への関与が疑われるウィルス (B19パルボウィルス、HHV-8等) に関する基礎的研究を実施した。各ウィルスにつき、分子生物学的解析、疫学的解析、動物モデル系の開発を応用した病態関与に関する解析、in vitro解析用細胞系の開発、等が行われ、病態解析の土台は作られつつあると考えられた。病原性、臨床的意義等をさらに検討することにより、リスク評価に応用できる様、努力を続けたい。

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、ウィ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、ヒトパルボウイルス B19 の NS-1 遺伝子を導入したマウスモデルを作り、その作用を検討した。NS-1 遺伝子を導入したマウスには、タイプ II コラーゲン誘発関節炎が高頻度に発症した。又、慢性関節リウマチの病態形成に主役をなす TNF- α が誘導されていた。細胞株を使用した *in vitro* の結果から、NS-1 を導入すると、転写因子 AP-1、AP-2 が TNF- α の産生に関与していることが証明された。
- 2) ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発、改良を行った。KU812F 細胞が B19 の感染をおこすことを証明し、この中からエリスロポイエチンリセプターの陽性細胞とクローニングしたところ、数千個の B19 が存在すれば、感染する系を開発した。
- 3) 昨年度開発した HHV-8 高感度検出法を用い、様々な疾患を持った患者における感染率を検索した。カポジ肉腫患者は 100%陽性、同性愛エイズ患者では、高頻度に陽性であることが証明された。日本国内の地域別感染率、世界数ヶ国での陽性頻度の検討を開始した。
- 4) HHV-8 の輸血リスク評価のため、献血者における陽性率を検討した。健常献血者群では、1.1%陽性、頻回輸血患者群では 3.1%が陽性であることが証明された。検出法との関連を追求中である。
- 5) 日本に於ける HEV 土着株の検討、TTV と疾患の関係を検討した。HEV は、最早、輸入感染症ではなく、急性肝炎を疑った場合、HEV-RNA の検出を行うべきことが示唆された。感染ルート等の検討を行っている。
- 6) TTV 遺伝子の転写調節機構の解析を行い、非翻訳領域 1.2kb 内に、転写開始点に近接した約 110 塩基のコアプロモーターとその上流のエンハンサー領域を同定した。コアプロモーター領域の詳細な検討を行った。TTV は遺伝子変異が激しく、数多くの遺伝子型が報告されているが、検討した領域の配列は、各遺伝子型でよく保存されていた。
- 7) 6型の主要なゲノタイプからなる HBV の型特異的なプライマーをデザインし、PCR 法による迅速で、高感度な HBV ゲノタイピング法を開発した。この方法で、11ヶ国から収集した臨床検体につき検討し、地理疫学的検討を行っている。
- 8) WHO の発表した血液製剤のウイルス不活化に関するガイドラインを紹介し、日本における対応を考察した。

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 " 主任研究官
池田久實 北海道赤十字血液センター 所長

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をのがれるウイルス、変異株の産生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

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 B19DNA/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ことが示唆されるため、ウイルスと発症要因との関連を検討している。本年度は、動物モデルを作製し、発症との関連性につき検討した。その結果、1)B19 の NS-1 領域をコードする遺伝子を導入したマウスでは、自然発症関節炎はみられなかったが、タイプ II コラーゲン (C II) の感作により、正常 (4% 未満) マウスに比し、高頻度 (65~70%) に多発性関節炎を発症した。NS-1 導入マウスでは血中 TNF- α が有意に上昇しているとともに、C II で刺激されたリンパ節では、高いサイトカイン産生が証明された。2)マクロファージ株 (U937) に NS-1 遺伝子を導入すると、転写因子 AP-1、AP-2 が NS-1 により影響を受け、TNF- α の産生に関与することが証明された。これらのことより、B19 の NS-1 が RA 発症での中心的役割をはたす TNF- α の産生を誘導することが示された。RA 発症と B19 パルボウイルス感染との関係が証明されてきた。

2. ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発

B19 は感染する細胞が限定され、in vitro での培養は困難であり、病原性の解析、感染性の証明、ウイルス不活化技術の評価等にも困難を来している。昨年度研究で、KU812F 細胞が B19 感染系として使用し得ることを証明したので、本年度は、感染効率の向上につき検討した。その結果、KU812F 細胞から、エリスロポイエチンリセプター陽性の細胞を選択し、クローニングしていったところ、極めて感染率の高い細胞株の樹立に成功した。この細胞は、数千個のウイルス粒子があれば感染の成立する細胞であり、ウイルスの培養、ウイルスの不活化能の評価等に有用であることが証明された。

3. HHV-6、7、8 に関する研究

HHV-6、7、8 などの新規ヘルペスウイルスの病原性につき、血清疫学や、他の疾患との関連、カポジ肉腫との関連にみられる造腫瘍性等を解明する目的で、本年度は、昨年度開発した ELISA 法を利用して、種々の疾患における感染率、国内外における感染率を検討した。その結果、1)カポジ肉腫、原発性体腔液性リンパ腫、多巣性キャスルマン病では高い感染率を示し、この 3 疾患が HHV-8 感染と関連していることが再確認された。

又、同性愛 HIV 感染者で約 6 割の感染がみられたが、血液製剤による HIV 感染者には陽性はみられなかった。2)感染経路とカポジ肉腫発症の地域差の解明のため、世界各地の健康人の血清につき、HHV 抗体陽性率を検討したところ、アフリカのガーナでは 32%、ルーマニアで 3.4%、の陽性率、中国のウイグル民俗で 47%の陽性率等が確認された。引き続き、国、検体数を増加させ、疾患との関連を検討中である。

4. 日本人献血者における HHV-8 感染率の検討

HHV-8 の輸血における感染リスクの評価に資する目的で、献血者におけるウイルス陽性率を検討した。HHV-8 スクリーニングは、国立感染症研究所で樹立した細胞株 (TY-1) を用いた IF 法により行い、陽性検体は市販の IF (KS-1) 法と ELISA 法で確認した。その結果、1)健康献血者検体では 8.8%が IF (TY-1) 陽性を示し、このうち 1.1%が IF (TY-1) /IF (KS-1) /ELISA の 3 法陽性となった。IF (TY-1) 陽性は、HBV 陽性献血者で 5.5%、HCV 陽性献血者で 5.5%、HIV 自己申告者で 9.4%が陽性であった。2)頻回輸血患者では 9.4%が IF (TY-1) 陽性を示し、このうち 3.1%が 3 法陽性を示した。3)3 法陽性者は健康献血者群では 1.1%であるのに比し、頻回輸血患者群では 3.1%と若干高い傾向を示した。輸血に伴う感染のリスクにつき引き続き検討中である。

5. 原因不明肝炎症例に於ける HEV と TTV の関与に関する研究

国内で発症する急性肝炎の半数近くが原因不明となっている。E 型急性肝炎は、従来、輸入感染症として捉えられているが、日本国内でみられる HEV 感染が輸入されたもののみであるかを知る目的で、日本固有株が存在するか否かを検討した。その結果、1)海外渡航歴のない E 型肝炎を発症した患者より得た HEV の全長ゲノム塩基配列 (本邦初例) を得て、HEV-JRA と命名した。2)JRA-1 は、アジア株の多くが所属する genotype I ではなく、欧米株の多くが所属する genotype III の中に分類された。3)HEV-viremia は、肝機能異常がピークに達した 1 ヶ月後も持続していた。4)症例を追加したところ、日本の HEV は多系統であることが判明した。これらのことから、日本で急性肝炎を診た場合、HEV-RNA RT-PCR 及び抗 HEVIgM 抗体検査を行うべきであることが示唆された。

6. TT ウィルス遺伝子の転写調節機構に関する研究

TTV の病原性を考える際の一助とするため、TTV 遺伝子の転写調節機構に関する検討を行っ

た。TTV 遺伝子は東芝病院、三代先生、国立医療センター土方先生らにより分離された SANBAN を使用した。このウイルスの非翻訳領域内に転写開始点に近接した約 110 塩基のコアプロモーターとその上流のエンハンサー領域を同定した。コアプロモーター領域について更に詳細な解析を行った結果、TATA ボックス配列の他、転写因子 USP、sp1 結合配列が TTV 転写活性に重要であることがわかった。またゲルシフト法により実際にこの領域に USF1、USF2 が結合することを見出した。TTV は遺伝子変異が顕著で、数多くの遺伝子型が報告されているが、これらの配列は各遺伝子型でよく保存されていることが判明した。TTV 遺伝子発現の細胞選択性の機序も明らかにしていく予定である。

7. HBV の迅速・高感度ゲノタイピング法の開発と疫学的検討

HBV の A 型から F 型株の pre-S1～S 領域からゲノタイプ特異的なプライマーをデザインし、nested PCR 法を用い、型特異的なタイピング法を用いた。この方法を用いて、各国由来 HBV 感染血清を検討したところ、各国における主要なゲノタイプはスペインでは A 型 (57%)、米国では A 型および C 型 (各 45%)、韓国では B 型 (53%)、ベトナムでは C 型 (57%)、日本では C 型 (75%)、中国では C 型 (79%)、ミャンマーでは C 型 (95%)、ロシアでは D 型 (62%)、エジプトでは D 型 (100%)、ガーナでは E 型 (75%)、ポリビアでは F 型 (75%) であった。ゲノタイプと肝病態との関係、変異株の流行様式、変異株と病態との関係等の関連を解析中である。

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 等についても変異株の出現、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、昨年度の TTV に引きつづき、日本固有の HEV 株が分担研究者により、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。

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

2001年、WHOが血液製剤の安全性向上のために行い得るウイルス除去・不活化法に関するガイドラインを発表した。本邦でもすでに同様のガイドラインが、血漿分画製剤に対して作られているが、血液成分製剤に関しては作成されていない。血漿分画製剤には種々の安全対策がとられているが、血液成分製剤ではウイルス除去・不活化は全く実施されていない。WHOガイドラインは血液製剤全般に渡って考慮されているので、紹介し、輸血の際、考えておかなければならない未知の感染症、変異株等、既存ではあるが、性状を変化させたウイルスに対する安全性向上のための方法について考察を加える。

A. 研究目的

血液製剤、特に血液成分製剤の安全性をより高めるためには、スクリーニングを逃れるウイルス、変異株、未知ウイルスに対するウイルスの除去・不活化法の導入が急がれる。これら方法を導入することを目的に、作られたWHOガイドラインの説明する。

B. 研究方法

報告者も参加して作られたWHOからの出版物の中から、特に赤血球、血小板、新鮮凍結血漿等の血液成分製剤に対するウイルス不活化法に関するガイドラインを検討する。

C. 研究成果

1. 血漿製剤

新鮮凍結血漿（FFP）等の安全性確保のためには、一定期間、採漿したプラズマを保管しておく方法（クアランチン）、安全性が保障されている特定ドナーの獲得（リピートドナー）、及びFFPへの不活化法の導入の3つが主に考えられる。このうち不活化法については以下の方法が主にとられている。

- 1)SD処理：プールされた血漿を1.0%のTNBP及び1%のTritonX-100で処理する方法で、被膜を持たないウイルスに有効である。血漿成分の機能には変化はみられず、EU、USA等で行われた臨床試験での有効性が確認され、モデルウイルスによる不活化量は、 $10^6 \sim 10^8$ となる。但し、被膜を有しない、B19パルボウイルス、HAV等のウイルスは不活化されない。現在、外国では臨床的に使用されている。
- 2)メチレンブルー光不活化法：メチレンブルーをはじめとする光増感色素を添加したFFPに光を照射し、その光増感作用により、ウイルスの感染性を低下させる方法である。広範な被膜

を有するウイルスの不活化に加え、一部の被膜を有しないウイルスにも有効である。その効果は十分でないという報告もあり、改良が加えられている。本法はプラズマをプールすることなく処理することができること、細胞内に存在するウイルスも不活化できる等の特徴を有している。

3)ソラレン誘導体光不活化法：ソラレン誘導体（S-59）に紫外線を用いる光不活化法で原理は2)と同じと考えてよい。本法は欧米で臨床試験が終了し、まもなく臨床応用されることになる。ウイルスを広範囲に不活化作用を有する。細胞内局在ウイルス、細菌の不活化も可能で、さらに混入しているリンパ球による副作用も防止できることが報告されている。

2. 赤血球製剤：赤血球製剤には、前述したメチレンブルー光不活化法の改良法であるジメチレンブルー光不活化法、S303法、INACTINE法、等が研究され、ウイルス不活化能力、細菌不活化能力等が確認され、現在、安全性を主とする臨床試験が開始されている。

3. 血小板製剤：血小板製剤には、ソラレン誘導体光不活化法、リボフラビン光不活化法が試みられている。ともに有効性が確認され、臨床試験の終了に近づいている。近々、利用されることになろう。

4. ウイルスに対する安全性の基本的考え方：日本、WHOガイドラインに記載されている安全性に関する基本的考え方に違いはない。その基本は、ウイルスの除去と不活化の併用である。血漿成分に於いては、この2つの方法を併用が可能であるが、赤血球、血小板等では、併用は困難である。しかしながら、ガイドラインには記載されなかつ

たが、赤血球製剤、血小板製剤に含まれる白血球を除去する方法等を不活化法とともに実施することが討議された。今後考察する必要があると考えられる。

D. 考察

輸血後感染症に対する対策は、近年急激に進み、分画製剤に対する加熱法、nanofiltration法の導入は、高い有効性を発揮し、輸血後感染症はほぼ無くなったといえる段階となった。一方、FFP、赤血球製剤、血小板製剤等の血液成分製剤に対する対応は、輸血前に実施される厳しいウィルスのスクリーニングと、クアランチンにとどまっている。HIV、HBV、HCVへの核酸増幅法(NAT)の世界に先がけた日本赤十字社の導入は、日本の成分製剤の安全性向上に大きく貢献した。しかしながら、スクリーニング検査の実施されていないウィルス、検査の網をくぐりぬけてきたウィルスに対する対策として、成分製剤へのウィルス不活化法の導入も今後要求されよう。日本に於いては、臨床治験が開始されてから、応用されるまで比較的時間のかかることが多いことから、早急に治験を開始する方策も考える必要があるものと考えられる。

E. 研究発表

- 1)Homes H,Komuro K, et al. : WHO working group report on reference preparations for testing hepatitis B, C and HIV diagnostic kits. WHO-Technical Reports (2001)
- 2)Nakano Y, Uchida T, Komuro K, et al. : Surface-linked liposomal antigen induces IgE-selective unresponsiveness regardless of the lipid components of liposomes. Bioconjugate Chem. 12:391~395, 2001
- 3)Horowitz B, Komuro K, et al. : Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products. WHO-Technical Reports (2001)

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	発表年
Nakano Y. Uchida T. Komuro K. et al.	Surface-linked liposomal antigen induced IgE-selective unresponsiveness regardless of the lipid components of liposomes.	Bioconjugate Chem	12	391-395	2001
Holmes H. Komuro K. et al.	WHO working group report on reference preparations for testing hepatitis B.C and HIV diagnostic kits.	WHO-Technical Reports			2001
Horowitz B. Komuro K. et al.	Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma procedures.	WHO-Technical Reports			2001

厚生省科学研究費補助金（振興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

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

分担研究者：佐々木 毅 東北大学大学院免疫・血液病制御学 教授

研究趣旨

ヒトパルボウイルス B19 (B19) の NS-1 遺伝子を導入した C57Bl/B6 マウスはタイプ II コラーゲン誘発関節炎を高頻度に発症した。ここでは、慢性関節リウマチの病態形成に主役をなす TNF α が誘導された。In vitro での NS1 遺伝子導入マクロファージ株 U937 の解析により、転写因子 AP-1、AP-2 が NS1 により TNF α の産生に関与することが判明した。

A. 研究背景と目的

ヒトパルボウイルスB19 (B19) は伝染性紅斑の原因ウイルスであるが、成人では多発性関節炎を主として発現させる。B19 感染ではこの他にも、貧血、血小板減少、肝障害他の多彩な病像を呈する。B19 関節炎は通常は一過性に経過するが時には年余に亘り、遷延し、慢性関節リウマチ (RA) の診断基準を満たす例も存在する。一方、RA の発症には古くから環境因子、特にウイルス感染の役割が注目されてきたが、証拠は乏しかった。我々は RA 発症における B19 の関連につき以下のことを明らかとし、追求している。

1. 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時に B19-DNA を検出するが、B19-DNA、VP-1 は検出できない。
2. 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。
3. 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 を二重チェンバーで共培養すると TNF α 、IL-6 産生が著明に上昇する。この反応は VP-1 抗体で抑制される。
4. RA 滑膜組織より B19 を得、その NS-1 領域をコードする遺伝子を用いて B19 トランスジェニックマウスを作成した。
5. 4. で得た NS-1 遺伝子をマクロファージ株 U937 に導入した株 U937 NS-1 を得、樹立した。

B.C. 研究方法及び研究成果

1. ヒトパルボウイルス B19 NS1 遺伝子導

入マウスにおける関節炎の発症

[方法]

RA 患者関節より分離した B19 の NS-1 遺伝子を native な NS1 promotor の下流に組み込んだ plasmid を作製した。これを、C57BL/6 マウスに導入し、NS-1 transgenic mouse (NS1Tg/B6) を系統化した。これについて type II コラーゲン (CII) を免疫し、コラーゲン誘導性関節炎の発症を観察した。更に、血中抗コラーゲン抗体価、TNF α 値を検査した。また in vitro の系において CII 刺激によるリンパ球からのサイトカイン産生を測定した。DBA/1 マウス、NS-1 非導入 C57 BL/6 (B6) マウスをそれぞれ、関節炎発症の陽性、陰性コントロールとして用いた。

[成果]

- (1) NS1Tg/B6 は自然経過においては関節炎の発症をみなかった。しかし、タイプ II コラーゲン (CII) の免疫により関節炎発易発症である DBA/1 マウスと同程度に (高頻度に) 多発性関節炎した。(65-70%)。一方、陰性コントロールの B6 での発症は 4% 未満に止まった。
 - (2) NS1Tg/B6 では血中抗 CII 抗体価、TNF α 価が有意に上昇していた。リン節、脾細胞を CII で刺激するとリンパ球からのインターフェロン α 、IL-10 などのサイトカイン産生が NS1 Tg/B6 マウスでは亢進していた。
2. B19 NS-1 によるマクロファージ系細胞 U937 での TNF α の発現誘導

[材料と方法]

- (1) B19 NS1 遺伝子を Lac オペレーターの下流に挿入した発現プラスミドを作成し、Lac レプレッサー産生プラス

ミドと共に単球系細胞株 U937 に電気穿孔法で導入した。プラスミド保有細胞を限界希釈法によって純化し、NS1 遺伝子保有株及びベクターを保有する対照株を複数樹立した。Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)によって Lac レプレッサーを不活性化し、NS1 遺伝子の発現を誘導した。

- (2) NS1 mRNA、TNF- α mRNA を real-time RTPCR 法により定量した。
- (3) NS1 mRNA を特異的に切断するリボザイムを NS1 発現細胞に導入し、TNF- α mRNA の産生に対する影響を検討した。
- (4) NS1 発現細胞および対照細胞の核抽出液と TNF- α プロモーターの転写因子結合配列を含むプローブを用いて electrophoretic mobility shift assay (EMSA)を行った。非標識プローブや転写因子及び NS1 に対する抗体を用いて反応の阻害を検討した。

[成果]

- (1) NS1 遺伝子導入細胞は IPTG による遺伝子発現誘導なしでも ng total RNA あたり 600 から 800 コピーの NS1 mRNA を産生し、IPTG 誘導後はその量が 2-3 倍増加した。この時、flow cytometry を用いた解析により、NS1 蛋白の発現を確認した。又、NS1 mRNA 発現と共に TNF- α mRNA 産生および TNF- α 蛋白質分泌の活性化が認められた。
- (2) NS1 発現に伴う TNF- α mRNA の産生は NS1 特異的リボザイムによって阻害された。
- (3) TNF- α プロモーターのレポーターアッセイにおいて、NS1 発現細胞は対照細胞に比較し、2-3 倍高いルシフェラーゼ活性を

示した。プロモーター領域の欠失や塩基置換変異実験により、NS1 によるプロモーター活性化に AP-1 及び AP-2 結合配列が関与することが明らかになった。

- (3) NS1 発現細胞の核抽出液中には AP-1 及び AP-2 配列に結合する因子が存在した。転写因子に対する抗体によって、AP-1 配列に結合する因子が AP-1 であり、AP-2 配列に結合する因子が AP-2 であることを同定した。NS1 に対する抗体はこれらの反応を阻害した。

D. 考察

RA 関節炎の発症には関節滑膜での免疫病機序、特に炎症性サイトカインの著明な産生増加が主たる役割を果たすと理解されている。本研究では in vitro, in vivo の実験系で B19 の NS-1 が RA 発症での中心的な役割を持つ TNF α の産生を誘導することを示した。すなわち (1) B19NS-1 トランスジェニック C57/B6 マウスは易関節炎を示した。ここで用いた C57B1/B6 は遺伝学的に関節炎発症に抵抗性であるが、B19-NS-1 は、H-2 バリアの制御を超え、関節炎を発症しやすくなったことを示している。この NS-1 トランスジェニックマウスの関節局所では NS-1 蛋白が高発現しており、病理組織学的にも RA と酷似する所見を呈した。血中 TNF α 等も上昇していた。B19NS-1 蛋白と TNF α の関連は in vitro でのマクロファージ株 U937 において B19NS-1 を発現させた系でもより明確に証明され、B19NS-1 が RA 病変を導くことをより支持する成績と考えられる。

E. 結論

- (1) B19 の機能蛋白 NS1 遺伝子の導入により、C57BL/6 の遺伝的背景に易関節炎症の形質をもたらすことができた。(B19NS-1 導入により関節リウマチのモデルマウスを作成することができた。)
- (2) B19-NS-1 遺伝子をマクロファージ株 U937 に導入すると、U937 の TNF α 遺伝子プロモーターを活性化し、TNF α 、IL-8 から炎症性サイトカインの産生が誘発された。
- (3) 上記の所見より B19 感染により生体に生じる炎症の機序が理解され、かつ、RA 発現における B19 の関与機序を支持するものである。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Y.Fu, K.K.Ishii, Y.Munakata, T.Saitoh, M.Kaku, and T.Sasaki.: Regulation of human TNF α promoter by parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J. Virology* in press, 2002
2. M.Takahashi, T.Funato, Y.Suzuki, H.Fujii, K.Kumuraishi, M.Kaku, and T.Sasaki: Chemically modified ribozyme targeting TNF- α mRNA regulates TNF- α and IL-6 synthesis in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *J.Clin.Immunol.* in press, 2002
3. O.Sasaki, K.Meguro, Y.Tohmiya, T.Funato, S.Shibahara, and T.Sasaki: Structural alteration of retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene, RIZ, in human leukaemia. *Tohoku. J. Exp. Med* in press, 2002
4. H.Harigae, R.Ichinohasama, I.Miura, J.Kameoka, K.Meguro, K.Miyamura, O.Sasaki, I.Ishikawa, S.Takahashi, M.Kaku, and T. Sasaki: Primary marginal zone lymphoma of thymus accompanied by chromosomal anomaly, 46X, dup (X) (P11P22). *Cancer Genetics cytogenetics* in press, 2002
5. M.Takahashi, T.Funato, K.Kumuraishi, M.Kaku, and T.Sasaki: measurement of tumor 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
6. T.Funato, N.Satou, D.Abukawa, J.Satou, Y.Abe, K.K.Ishii, K.Iinuma, M.Kaku, and T.Sasaki: Quantitative evaluation of cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis. *J.Viral hepatitis* 217-222, 2001
7. 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
8. M.Rahman, Y.Hirabayashi, T.Ishii, M.Watanabe, L.Malton and T.Sasaki: Prednisolone sodium succinate down-regulates BSAP/Pax5 and causes a growth arrest in the nalm6 pre-B cell line. *Tohoku.J.Exp.Med.* 193:237-244, 2001
9. N.Takasawa, N.Ishii, N.Higashimura, K.Murata, Y.Tanaka, M.Nakamura, T.

- Sasaki, and K. Sugamura: Expression of gp34 (OX40 ligand) and OX40 on human T cell clones. *Jpn. J. Cancer Res.* 92:377-382, 2001
10. S. Takahashi, H. Harigae, H. Yokoyama, M. Kaku, T. Sasaki: Genomic structure and regulation of a novel human gene, Klp1¹. *Biochim. Biophys. Acta* 91600: 1-5, 2001.
11. S. Fujimaki, H. Harigae, T. Sugamura, N. Takasawa, T. Sasaki, and M. Kaku: Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. *British Journal of Haematology.* 113:53-57, 2001
12. J. Satou, T. Funato, N. Satoh, Y. Abe, K. K. Ishii, T. Sasaki, and M. Kaku: Quantitative PCR determination of human cytomegalovirus in blood cells. *J. Clin. Lab. Anal.* 15:122-126, 2001
13. J. Kameoka, T. Funato, Y. Obara, I. Kadowaki, H. Yokoyama, T. Kimura, Y. Tomiya, M. Yamada, I. Ishikawa, M. Takagawa, O. Sasaki, J. Kimura, H. Harigae, I. Miura, K. Meguro, M. Kaku, and 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.* 124:159-164, 2001
14. 松木寮子、小澤鹿子、西山悠子、藤巻慎一、船渡忠男、吉田克巳、佐々木毅、賀来満夫: Light Cycler システムによる APRT 遺伝子変異迅速検出法の検討、臨床検査自動化学会誌、126: 14-19、2001
- (2)学会発表
1. 宗像靖彦、斎藤貴子、加藤一郎、高澤徳彦、石井恵子、佐々木毅: ヒトパルボウイルス B19 と慢性関節リウマチ、第 45 回日本リウマチ学会総会、シンポジウム 6. リウマチ性疾患とウイルス、東京、5/14-16, 2001
2. 斎藤貴子、宗像靖彦、宮川英二、佐々木毅: 抗パルボウイルス B19 抗体中和能測定系の確立、平成 13 年度日本ウイルス学会、大阪、11/18-20, 2001
3. 石井恵子、傅翼、宗像靖彦、斎藤貴子、佐々木毅: ヒトパルボウイルス B19 の NS-1 による TNF- α の発現誘導、平成 13 年度日本ウイルス学会、大阪、11/18-20, 2001
4. 傅翼、石井恵子、宗像靖彦、斎藤貴子、佐々木毅: AP-1 および AP-2 の活性化を介する B19-NS-1 の TNF- α 転写活性化、平成 13 年度日本ウイルス学会、大阪、11/18-20, 2001
5. 高澤徳彦、宗像靖彦、石井恵子、高橋美奈子、斎藤貴子、石井智徳、能勢真人、佐々木毅: ヒトパルボウイルス B19-NS1 遺伝子導入マウスにおける関節炎の発症、第 13 回日本免疫学会、大阪、12/11-13, 2001

文献一覧表

1. Y.Fu, K.K.Ishii, Y.Munakata, T.Saitoh, M.Kaku, and T.Sasaki: Regulation of human TNF α promoter by parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J. Virology* in press, 2002
2. M.Takahashi, T.Funato, Y.Suzuki, H.Fujii, K.Kumuraishi, M.Kaku, and T.Sasaki: Chemically modified Ribozyme Targeting TNF- α mRNA regulates TNF- α and IL-6 Synthesis in Synovial Fibroblasts of Patients with Rheumatoid Arthritis. *J.Clin. Immunol* in press, 2002
3. O.Sasaki, K.Meguro, Y.Tohmiya, T.Funato, S.Shibahara, and T.Sasaki: Structural alteration of retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene, RIZ, in human leukaemia. *Tohoku. J. Exp. Med* in press, 2002
4. H.Harigae, R.Ichinohasama, I.Miura, J.Kameoka, K.Meguro, K.Miyamura, O.Sasaki, I.Ishikawa, S.Takahashi, M.Kaku, and T.Sasaki: Primary marginal zone lymphoma of the thymus accompanied by chromosomal anomaly, 46X, dup(X)(p11p22). *Cancer Genetics cytogenetics* in press, 2002
5. M.Takahashi, T.Funato, K.Kumuraishi, M.Kaku, and T.Sasaki: measurement of tumor 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
6. T.Funato, N.Satou, D.Abukawa, J.Satou, Y.Abe, K.K.Ishii, K.Iinuma, M.Kaku, and T.Sasaki: Quantitative evaluation of cytomegalovirus DNA in infantile hepatitis. *Infantile CMV hepatitis* 217-222, 2001
7. 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
8. M.Rahman, Y.Hirabayashi, T.Ishii, M.Watanabe, L.Malton and T.Sasaki: Prednisolone sodium succinate down-regulates BSAP/Pax5 and causes a growth arrest in the nalm6 pre-B cell line. *Tohoku.J.Exp.Med.* 193:237-244, 2001
9. N.Takasawa, N.Ishii, N.Higashimura, K.Murata, Y.Tanaka, M.Nakamura, T.Sasaki, and K. Sugamura: Expression of gp34(OX40Ligand) and OX40 on Human T cell clones. *Jpn.J.Cancer Res.* 92:377-382, 2001
10. S.Takahashi, H.Harigae, H.Yokoyama, M.Kaku, T.Sasaki: Genomic structure and regulation of a novel human gene, Klp1¹. *Biochim.Biophys Acta* 91600:1-5, 2001.

11. S. Fujimaki, H. Harigae, T. Sugamura, N. Takasawa, T. Sasaki, and M. Kaku: Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. *British Journal of Haematology*. 113:53-57, 2001
12. J. Satou, T. Funato, N. Satoh, Y. Abe, K. K. Ishii, T. Sasaki, and M. Kaku: Quantitative PCR determination of Human Cytomegalovirus in Blood Cells. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 15:122-126, 2001
13. J. Kameoka, T. Funato, Y. Obara, I. Kadowaki, H. Yokoyama, T. Kimura, Y. Tomiya, M. Yamada, I. Ishikawa, M. Takagawa, O. Sasaki, J. Kimura, H. Harigae, I. Miura, K. Meguro, M. Kaku, and 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*. 124:159-164, 2001
14. 松木寮子、小澤鹿子、西山悠子、藤巻慎一、舩渡忠男、吉田克巳、佐々木毅、賀来満夫: Light Cycler システムによる APRT 遺伝子変異迅速検出法の検討、臨床検査自動化学会会誌、126 : 14-19、2001

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、熱や種々の化学物質に耐性を示すため極めて不活化し難く、また、これまで骨髓細胞や臍帯血以外に適当な培養系がなく、B19 の病原性の解析は充分に出来なかった。今年度は前年度に確立した方法を改良し、感染効率の向上を目指した。KU812F 細胞をエリスロポイエチンリセプター陽性の細胞をクロニングし、赤芽球に分化傾向の強い細胞を選択した。この細胞株を用いて感染性を評価したところ数千個の B19 が存在すれば感染性を検出可能になった。また、B19 の病原性の解析の他に不活化や除去法の評価に応用できる可能性が示唆された。

G. 研究目的

B19 は envelope を持たない DNA ウイルスであり、極めて安定である。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り、B19 の病原性を解析することは困難であった。昨年度の研究によって KU812F 細胞が B19 に感染することが明らかとなったので、今年度の研究では、感染効率の向上を目的に、細胞のクロニングと培養条件の検討を行った。

B. 研究方法

KU812F 細胞に抗エリスロポイエチンリセプター抗体を反応させ、磁気ビーズを用いてリセプター陽性の細胞を集め、限界希釈法にてクロニングを行った。培養液にはエリスロポイエチン (最終濃度 2IU/ml) を添加し、10%FCS-RPMI にて培養した。約 100 個の独立したクローンが得られ、その中から赤芽球に分化傾向の強いクローンを 10 個選び、感染実験とさらなるクロニングを行った。感染は前年度に用いた B19 抗原陽性血漿を PBS にて種々の濃度に希釈し、細胞に 2 マイクロ添加後 2 時間、水中にて吸着させた。血漿を洗浄後、エリスロポイエチン (最終濃度 2IU/ml) を添加した

20%FCS-RPMI にて培養した。感染の成立は感染させた細胞から 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) らの報告したプライマーを用いた RT - PCR 法にて検索した。また、感染の検出感度を高めるために、昨年報告したプライマーを用いて semi-nested PCR も行った。さらに、クロニングした細胞を用いて、グロブリン製剤に存在する B19 抗体が中和活性を持つことを測定可能か、検討した。

C. 研究結果

KU812F 細胞からエリスロポイエチンリセプター陽性の細胞を選択し、B19 に高感受性株の確立を目指したところ、顕微鏡下に自然に赤血球に分化 (脱核し、赤血球様に見える) する傾向の強い細胞株を得ることができた。B19 を用いた感染実験から 1-12 と 3-16 と名付けた 2 系統を選択し、さらにクロニングして 1-12-13、3-16-8、3-16-14 の 3 クローンを得た。B19 陽性血漿を種々の濃度に希釈して感染させたところ、105 に希釈した血漿 2 マイクロまで感染の成立が確認された。これは数千個のウイルス粒子に相当すると考えられる。また、B19 抗体が確認されているグロブリン製剤と

B19 陽性血漿とを混合し、感染性を評価したところ、感染が阻止され、製剤中に存在する B19 に対する抗体が中和活性を持つことが確認できた。

D. 考察

これまでの研究から、赤芽球に分化傾向にある細胞が B19 に高感受性になると考えられたので、B19 の病原性を解析する上で、このような性質を安定して持つ細胞の樹立が重要であった。候補の 1 つとして glycoporphineA 陽性の細胞について前年度に解析したが、安定した株を得ることはできなかった。そこで、今年度はエリスロポイエチンリセプター陽性の細胞からクローニングを行い、感受性の高い株を得ることができた。得られた株は当初、細胞のペレットは赤色を呈していたが、継代によってその性質は失われた（ヘミン等で刺激すれば赤血球に分化する）。しかし、感受性は現在まで維持されている。この細胞を用いて semi-nested PCR を行うことで、抗体の中和活性や B19 に対する種々のウイルス不活化法の評価に応用が期待される。また、我々はこの細胞を用いた感染実験によって、カスパーゼの発現が亢進することを明らかにした。非構造タンパクによって感染細胞にアポト - シスが誘導されるとの報告があり、B19 の病原性の解析に利用できるものと考えている。

E. 結論

KU812F 細胞からエリスロポイエチンリセプター陽性の細胞を選択し、クローニングを行い、B19 に感受性がある細胞株を得た。数千個のウイルス粒子が存在すれば感染性を検出可能と考えられた。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suriki,H., Suzuki,K., Baba,Y., Hasegawa,K., Narisawa,R., Okada,y., Mizuochi,T., Kawachi,H., Shimizu,F., and Asakura,H., Analysis of cytokine production in the colon of nude mice with experimental colitis induced by adoptive transfer of immunocompetent cells from infected with a murine retrovirus. 2000.Clinical immunology.vol.97.33-42.
2. Saldanha,J.,Lelie,N.,Yu,M.W.,Heath,A., and the B19 collaborative study group. Establishment of the first World Health Organization International standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. 2002.Vox Sanguinis. Vol.82.24-31.
3. 水沢左衛子、岡田義昭、奥山堅司、種市麻衣子、青木陽一郎、斎賀菊江、小室勝利.血漿分画製剤の安全性をめぐる最近の動向.2001.Biomedical perspectives.vol 10:227-232.

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：マウスレトロウイルスを用いた異性間感染の解析。
第 49 回日本ウイルス学会。2001 年。

H. 知的所有権の取得状況

なし