

- peripheral blood as endothelial-precursor cells, *J. Cell Physiol.*, 195, 119-129 (2003)
3. Shingo NIIMI, Tadashi OSHIZAWA, Teruhide YAMAGUCHI, Mizuho HARASHIMA, Taiichiro SEKI, Toyohiko ARIGA, Toru KAWANISHI, and Takao HAYAKAWA: Specific Expression Of AnnexinIII In Rat Small Hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 770-774 (2003)
  4. K., SATOH, Akiko IWATA, M., MURATA, M., HIKATA, Takao HAYAKAWA, Teruhide YAMAGUCHI: Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J. Virol. Methods.*, (in press)
  5. Iwata, A., Satoh, K., Murata, M. Hikata, M., Hayakawa, T., Yamaguchi, T.: Virus concentration using sulfonated magnetic beads to improve sensitivity in nucleic acid amplification tests. *Biol. Pharm. Bull.*, (in press)
  6. Toshie KANEYASU-TOYODA, Teruhide YAMAGUCHI, Tadashi OSHIZAWA, Eriko Uchida and Takao HAYAKAWA: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochemical Pharmacology*, (in press)
  7. 早川堯夫、山口照英、石井(渡部)明子、押沢 正:核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフィージビリティスタディ、*医薬品研究*、33, 275-284 (2002)
  8. 早川堯夫、山口照英、押沢 正:日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究—ウイルス安全性確保の基本要件一、*医薬品研究*、33, 210-230 (2002)
  9. 山口照英: ヒト由来細胞・組織利用医薬品等の品質及び安全性確保について。 *ファルマシア*, 38, 523-525 (2002)
- ## 2. 学会発表
1. 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 早川堯夫: AC133 陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析. 第1回日本再生医療学会, 平成14年4月, 京都
  2. 豊田淑江, 山口照英, 押澤正, 早川堯夫: ヒト末梢血におけるAC133陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析. 第23回日本炎症・再生医学会, 平成14年7月, 東京
  3. 豊田淑江, 押澤正, 内田恵理子, 早川堯夫, 山口照英: G-CSFによるHL-60細胞中球分化亢進と増殖促進におけるPKC $\alpha$ の役割. 第75回日本生化学大会, 平成14年10月, 京都
  4. 押澤正, 山口照英, 豊田淑江, 内田恵理子, 早川堯夫: HL-60細胞の好中球様細胞への分化に関するタンパク質の解析. 第75回日本生化学大会, 平成14年10月, 京都
  5. 豊田淑江, 押澤正, 鈴木孝昌, 早川堯夫, 山口照英: 臍帯血におけるAC133

陽性細胞由来血管内皮前駆細胞の解析,  
第2回再生医療学会, 平成15年3月,  
6. 山口照英: 生物由来製品、ウイルスを

巡る話題、平成15年JAPIC総会、平  
成15年3月戸

図1.最終製品の理論的リスクの算定方法の考え方

$$\begin{array}{ccccccc} \text{最終製品} & = & \text{原材料のリスク} & - & \text{リスク} & - & \text{投与量} \\ \text{のリスク} & & \text{製造時の混入リスク} & & \text{低減措置} & & \text{投与期間} \\ & & & & & & \text{投与方法} \end{array}$$

表1. 原材料自体の感染リスクの相対的な比較

カテゴリー	原材料※の類型	原料リスクの主たる特徴	感染リスクの要因					相対的リスク
			人由来	病原体自体	動物由来の未知因子の影響	病原体増殖	不特定多数	
1	人又は動物由来細胞・組織及び人由来成分を使用した製品 (血液製剤等)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 人対人の感染リスク(人由来原料)かつ不特定多数からの原料に由来するリスク(人由来原料)</li> <li>・ 未知の感染症のリスク(動物細胞組織製品)</li> </ul>	○		○		○	高
2	ウイルスを使用した製品 (ワクチン、遺伝子治療用医薬品等)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 病原体そのものである。</li> </ul>		○				高
3	病原菌を利用した製品 (ワクチン)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 病原体そのものである。</li> </ul>		○				高
4	株化した人又は動物の細胞(動物工場を含む。)を培養し、抽出した成分を含む製品 (遺伝子組換え医薬品等)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 不特定多数からの原料ではなくとも、生きた細胞の使用による病原体の増幅のリスク</li> </ul>	△		△	○		中
5	動物由来成分を含む製品 (ヘパリン等)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 不特定多数の動物からの原料に由来するリスク</li> </ul>			△		○	中
6	非病原菌を利用した製品(インスリン等)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 菌自体よりも製造工程中で使用する材料からのリスク</li> </ul>			△		△	低

※: 「原材料」とは、製品の有効成分のみならず、製品の製造工程中使用される生物由来の成分、添加剤として用いられる成分をいうものとする。

表2. 生物由来製品のウイルス安全性に関する基準等

細胞組織利用医薬品・医療機器	細胞組織医薬品・医療機器基準	
血液製剤	生物学的製剤基準	血漿分画製剤ウイルス安全性GL
ヒト生体由来製品		局方参考情報
自己由来細胞組織利用医薬品・医療機器	細胞組織医薬品・医療機器基準	
動物細胞医療機器(生細胞以外)		
ワクチン・抗血清等	生物学的製剤基準	
ヒト尿由来製品		局方参考情報
遺伝子組換え医薬品		ICH-Q5A
細胞培養医薬品		ICH-Q5A
動物由来成分抽出医薬品		局方参考情報
その他の医薬品(経口・外用剤等)	健康な動物	局方参考情報

表3. 生物由来原料基準

1. 血液製剤総則
  - －輸血用血液製剤総則
  - －血漿分画製剤総則
2. 人由来製品原料総則
  - －人細胞組織製品原料基準
  - －人尿由来製品原料基準
  - －人由来原料基準
3. 動物由来製品原料基準
  - －反芻動物由来原料基準
  - －動物細胞組織製品原料基準
  - －動物由来原料基準

厚生労働科学特別研究補助金  
分担研究報告書

RT-PCR 法によるA型肝炎ウイルス遺伝子の検出の検討

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部長

血液製剤等のウイルス安全性確保を目的として、A型肝炎ウイルス(HAV)RNAのRT-PCRを用いた高感度検出法の開発に関する基礎的検討を行った。設計したプライマーを用いて高感度にHAV RNAを検出することが可能であり、また設計したプライマーは各HAV間で遺伝的変異の違いが少ないところであることから、殆どのHAV遺伝子型に対して適応可能であると考えられた。

目的

A型肝炎ウイルス(HAV)は経口感染性のウイルスである。糞口感染によりA型肝炎を発症する。ヒト体内でのHAVの主な増殖の場は肝細胞であり、増殖したウイルスは胆汁中に分泌され、腸管から体外に排泄される。HAVは格段に熱安定性の高いウイルスであり、外界で長期間感染性が保たれる。水系の汚染、カキ等の二枚貝の接種、最近ではイチゴの接種によるA型肝炎の集団発生例が報告されている。潜伏期の長い肝炎ウイルスの特徴として、血液を介した感染があり、血漿由来の第八因子製剤でのA型肝炎の発生が社会的問題となっている。HAVは培養細胞に感染するが、ウイルス増殖は極めて遅いため、細胞培養でのウイルス分離は実用的ではない。またELISA、RIA等の免疫学的検出には $10^8$ 粒子/ml以上のウイルス濃度が必要となる。血液由来の医

薬品等に含まれる可能性のある微量のウイルスを証明するためには、HAV RNAの検出が不可欠である。その検出感度を高めることを目的として、PCRに用いるプライマーの設定、PCR反応の条件設定を行った研究を行った。

方法

HAVは血清型が1種類ではあるが、遺伝子塩基の相同性が85%以下の7種類の遺伝子型ウイルスが存在する。1型と3型は92.5%を基準としてAとBの亜型に分類されている。1A型遺伝子のHAVが最も多く報告されている。4、5、6型はサルからのみ検出されており、2、7型の検出例も少ないので、実用上は塩基相同性80%程度の1型と3型HAV遺伝子が共に検出可能なPCRプライマーが必要とされる。相同性が高く、各塩基の配列に偏りが少なく、他の部位との相同性が出来

る限り少ない個所を検索し、5' 非翻訳領域 (5' NCR) のプライマーセット、+300と-516を用意した。

+300 :  
GCTGTAGGAGTCTAAATTGGGGAC (24 mer)  
-516 : ACTCAATGCATCCACTGGATGAG  
(23 mer)

設定したプライマーを用いて Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600 により、PCR 条件の検討を行った。耐熱性 DNA ポリメラーゼとしては、Mg<sup>2+</sup>添加反応バッファーと dNTP 添付の Takara Taq (宝酒造) を用いた。反応液 0.1 ml あたり 2.5 単位のポリメラーゼを用い、プライマー濃度は 0.2 μM とした。0.2 ml 蓋付き MicroAmp tube に 20 μl あて反応液を分注し、氷冷下 1 μl のテンプレートを加えた。1回目の PCR 反応のテンプレートとしては遺伝子型 1B の HM175 株および 3B 型の KRM003 株 HAV RNA より RT-PCR 法で増幅した cDNA 断片 (塩基番号 30~1250) を使用した。この cDNA 断片の OD 値から濃度を算出し、0.1~10000 分子/μl 相当に 10 倍段階希釈して、5'NCR 領域の複製効率の検討に用いた。2回目の PCR には1回目の反応液の 1 μl を用いた。TBE 液で 2% MetaphorXR agarose (TaKaRa) ゲルプレートを作成し、5 μl の DNA marker (BioMarker EXT, BioVentures) と共に 10 μl の PCR 反応液を電気泳動した。エチジウムブロマイド染色により、UV イルミネーター下で、238bp を検出した。

## 結果

5'NCR 領域は異なる遺伝子型 HAV 株間でも塩基相同性の高い部位であるが、高次構造が多いこと、ピリミジンリッチの繰り返し配列が多いことなどが PCR プライマー設定の問題点である。HM175 と MBB は 1B 型、LA と GBM は 1A 型、KRM003 は 3B 型、AGM27 は 6型ウイルスである。設定されたセンスプライマー +300 (24 mer) 部位塩基配列は、サル HAV である 6型 AGM27 を含めて完全一致しており、アンチセンスプライマーの -516 (23 mer) は 1 及び 3 型でほぼ完全一致、AGM27 とは 3ヶ所の塩基置換を認めた。一般に PCR 増幅のためにはプライマーの 3' 末端の 3塩基が一致していることとされているので、1、2型のみならず 6型 HAV cDNA の増幅も可能と思われた。

PCR 反応は上述の反応で行ったが、PCR システムの温度をあらかじめ 96°C に設定し、チューブを挿入して 1分後に変性反応: 94°C 15 秒、アニーリング: 55 または 58°C 15 秒、伸長反応: 72°C 30 秒のサイクルを 40 回行い、最後に 4°C ホールドとした。1回目 PCR 反応で、55 および 58°C のアニーリング条件で 1B 型 cDNA、3B 型 cDNA 共に 100 分子相当をテンプレートとして加えたチューブまではっきりした 238bp のバンドを認め、10 分子相当でも薄いバンドを認めた。同じプライマーセットを用いて 1回目 PCR 液 1 μl を加えて 2回目の PCR を同条件で 30 回行くと、10 分子相当のテンプレートまで強陽性と判定された。

## 考察

最近 PCR 用の酵素として、高温になって初めて酵素活性を示す酵素が開発された。低温での酵素反応により起きるプライマーダイマーとかミスアニーリング由来の非特異反応を防ぐための hot start PCR が簡単に出来るとか、活性酵素量をターゲットの増幅にあわせて増加させる Time Release PCR が可能とかされている。更に検出感度をあげるために、こうした酵素を使用したり、またタックポリメラーゼ反応液中の Mg 濃度を検討することも必要であろう。

RT-PCR に 5'NCR 領域をの標的にすると遺伝子型間の塩基の違いが少ないため増幅が容易であり、10 分子相当のテンプレートの検出が可能であった。また 5'NCR 部位のプライマーセットにより、ほとんどの遺伝子型の HAV 株で cDNA の PCR 増幅が可能と思われる。医薬品のリスク評価の試験等には、ウイルス粒子から RNA の検出をすることになるので、RNA の抽出効率を加えた検討が更に必要である。



厚生科学研究費補助金（特別研究事業）  
分担研究報告書

C型肝炎ウイルスの感染価評価法の開発とリスク評価

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

研究要旨 C型肝炎ウイルス (HCV)が効率良く感染増殖する培養細胞は、いまだ確立されていない。本研究では、生物由来製品における HCV の除去、不活化の評価法となりうる HCV 感染実験系の構築を目的とした。ヒト肝由来または非肝臓細胞に HCV 血漿を感染させ、細胞に吸着、侵入した HCV 量をリアルタイム RT-PCR 法により定量した。ヒト肝癌細胞 HepG2 では、感染2時間後の細胞内 HCV レベルと感染ウイルス量がよく相関していた。本法は、HCV の感染性を短時間で定量的に評価できる実験系であり、ウイルスリスク評価技術に資するものと考えられる。

A. 研究目的

HCV は、一般にウイルスを含むヒトの血液を介して感染する。我が国のウイルス肝炎の約8割が HCV 感染によることや最近20年間増加している肝癌患者の7-8割に HCV の持続感染が認められることが明らかになっている。診断法の確立により、我が国では新たな HCV 感染はほぼ食い止められるようになったが、世界的には、HCV 感染は拡大傾向にあり、約2億人の感染者が存在すると推定されている。

現在、HCV 研究の最重要課題は、信頼できる培養細胞系を確立することである。近年、HCV RNA replicon を用いた実験が可能になり、遺伝子複製に関する研究に大きな進展がみられたが、依然として、HCV が効率良く感染増殖する培養細胞は得られていない。

本研究では、(3)生物由来製品における HCV の除去、不活化処理工程の能力評価に有用な HCV 感染実験系の確立を目的とした。

B. 研究方法

2. 2. HCV-RNA のリアルタイム RT-PCR による検出

C型肝炎患者血漿あるいは感染細胞から、RNA 抽出試薬 (SepaGene-RV) を用いて total RNA を調製した。HCV RNA は TaqMan Chemistry system (Applied Biosystems)を用いたリアルタイム RT-PCR 法により定量的に測定した。Reverse transcription (RT)-PCR 用試薬は TaqMan EZ RT-PCR Kit を用いた。反応液は、3 mM Manganese acetate を加えた TaqMan EZ buffer 中に 200 nM TaqMan probe, 500 nM forward/reverse primers, 200 uM dNTPs 及び 5U rTh polymerase, 0.5 U AmpErase UNG が含まれている。測定結果は Sequence Detector version 1.7 によって解析した。

C. 研究結果

3. HCV の HepG2 及び HeLa 細胞への感染とリアルタイム PCR による検出

HCV の感染実験に先立ち、TaqMan ケミストリを利用した HCV RNA の高感度定量法を確立した。図1に、合成 RNA を用いて作成した検量線と、血漿検体の測定値 (赤色のドット) を示した。検量線用の HCV RNA は、T7プロモ

ーターの下流に HCV 遺伝子の 5'非翻訳領域を組み込んだ発現ベクターを用いて試験管内で合成した。得られた RNA を 10 倍公比で段階希釈し RT-PCR 反応を行ったところ、相関係数 0.999 の検量線を得た。

次に、この定量法により、HCV 濃度が  $10^7$  copies/ml と測定された血漿 (NIHJ1)を用いて感染実験を行った。24-well-plate で培養したヒト肝臓由来細胞 HepG2 及び子宮頸癌細胞 HeLa にそれぞれ NIHJ1 血漿を添加した。37°C で 2 時間インキュベートした後、細胞表面をよく洗浄し、細胞を回収、RNA 抽出を行った。細胞中の HCV RNA 量の測定成績を図 2 に示した。HepG2 細胞では、血漿濃度依存的に 1200 6200 copies/ml の HCV RNA が認められたのに対し、HeLa 細胞では、血漿添加量に係わらず 200 800 copies/ml を示した。

#### D. 考察

### 3. HCV の *in vitro* 感染系の確立

HCV を効率良く増殖させる培養細胞系は確立されておらず、プラーク形成アッセイなどのウイルス力価定量法が存在しないだけでなく、感染後の発現産物をブロット法で検出することにも成功していない。そこで、HCV 感染実験を行うにあたり、リアルタイム RT-PCR を利用した高感度の HCV RNA 定量法を確立した。この方法は、PCR サイクルごとの増幅産物をリアルタイムにモニタリングし、鋳型 DNA の初期量を定量するシステムである。PCR 反応中にサンプルチューブを密封したままモニタリングすることができ、またプラトーに達する前の指数関数的増幅期の蛍光シグナルを検出することで、PCR 反応速度論に基づいた精度の高い定量と広い測定範囲を実現している。

感染実験としては、HCV 血漿添加後、37°C、2 時間培養を行い、洗浄後速やかに細胞内 HCV 量を測定した。この実験系では、細胞に吸着、

侵入したウイルスを定量できるものと想定されるが、実際、図 2 に示した実験では、HCV が感染しうる HepG2 細胞では、感染ウイルス量の濃度依存的に細胞内 HCV レベルの増加を認めただのに対し、HeLa 細胞では感染ウイルス量を増加させても HCV レベルは低値のままであった。

科学的、定量的なウイルスリスク評価法は、生物由来製品の安全性試験に重要であるが、HCV に関しては十分整備されていなかった。HepG2 細胞を用いた本 HCV 感染実験系は、ウイルスリスク評価技術として利用できるものと考えられる。

#### E. 健康危険情報

特になし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Tsutsumi T., Suzuki T., Shimoike T., Suzuki R., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Koike K., and Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor - $\alpha$  modulates its transcriptional activity. *Hepatology* 35, 937-946, 2002.
2. Aizaki H., Otsuka M., Matsuda M., Li Y.W., Harada T., Kawakami H., Seki N., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Characteristic gene expression in liver cell lines expressing entire polyprotein of hepatitis C virus. *Hepatology* 36, 1431-1438, 2002.
3. Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Yotsuyanagi H., Shintani Y., Fujie H., Matsuura Y., Kimuta S., Koike K., and Miyamura T. Intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in mice

- with transgene for hepatitis C virus core protein. *Virology* 304, 415-424, 2002.
4. Otsuka M., Aizaki H., Kato N., Suzuki T., Miyamura T., Omata M., and Seki N. Differential cellular gene expression induced by hepatitis B and C viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 443-447, 2003.
2. 学会発表
1. Aizaki H., Suzuki T., Matsuda M., Murakami K., Ishii K., Nagamori S., Kawakami H., Ishiko H., Kawada M., Matsuura T., Hasumura S., Matsuura Y., and Miyamura T. Production and release of infectious HCV particles from persistently infected human liver cell cultures transfected with full length-HCV RNA. 9th International Meeting on HCV and Related Viruses, San Diego, USA, July 7-11, 2002.
  2. Sasano T., Shimoike T., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Characteristic bases in HCV 5'UTR among genotypes identified by principal component and multidimensional scaling analyses. *ibid.*
  3. Suzuki R., Sakamoto S., Tsutsumi T., Rikimaru A., Shimoike T., Machida S., Matsuura Y., Miyamura T., and Suzuki T. Molecular determinants for the subcellular localization of HCV core protein. *ibid.*
  4. Moriishi K., Okabayashi T., Nakai K., Moriya K., Koike K., Murata S., Chiba T., Tanaka K., Suzuki R., Suzuki T., Miyamura T., and Matsuura Y. Nuclear localization of HCV core protein through PA28gamma-dependent pathway. *ibid.*
  5. Tsutsumi T., Matsuda M., Moriya K., Miyoshi H., Fujie H., Shintani Y., Koike K., Suzuki T., and Miyamura T. Proteomics analysis of mitochondrial proteins in the liver of the hepatitis C virus core-transgenic mouse and hepG2 cells expressing the core protein. *ibid.*
  6. Tsutsumi T., Suzuki T., Moriya K., Shintani Y., Fujie H., Miyoshi H., Koike K., Miyamura T. Activation of mitogen-activated protein kinases in the liver of transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. AASLD 53rd Annual Meeting, Boston, USA, November 1-5, 2002.
  7. 堤武也、鈴木哲朗、森屋恭爾、新谷良澄、藤江肇、三好秀征、松浦善治、小池和彦、宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における mitogen-activated protein kinase の活性化の検討. 第 38 回日本肝臓学会総会, 2002 年 6 月, 大阪.
  8. 堤 武也, 鈴木哲朗, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江 肇, 三好秀征, 松浦善治, 小池和彦, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア遺伝子トランスジェニックマウスの肝臓内における MAPK の活性化の検討. 第 61 回日本癌学会総会. 2002 年 10 月, 東京.
  9. 町田早苗, 石井孝司, 鈴木亮介, 赤塚俊隆, 鈴木哲朗, 宮村達男. 弱毒ワクシニアウイルス DIs を用いた C型肝炎ウイルス構造蛋白の発現. 同上.
  10. 村上恭子, 染谷友美, 根岸英雄, 石井孝司, 岩堀 徹, 相崎英樹, 鈴木哲朗, 宮村達男. HCV レプリコン活性に関与する宿主因子の検索. 同上.
  11. 鈴木亮介, 坂本真一郎, 堤 武也, 下池貴

志, 松浦善治, 宮村達男, 鈴木哲朗. C型肝炎ウイルスコア蛋白質の細胞内局在を規定するシグナルの解析. 同上.

12. 堤 武也, 松田麻未, 森屋恭爾, 三好秀征, 藤江 馨, 新谷良澄, 小池和彦, 鈴木哲朗, 宮村達男. C型肝炎ウイルスコア蛋白発現細胞におけるミトコンドリア蛋白のプロテオミクス解析. 同上.
13. 森石恒司, 中井康介, 鈴木亮介, 鈴木哲朗, 宮村達男, 松浦善治. PA28γ によるC型肝炎ウイルスコアタンパク質の核局在と核移行. 第25回日本分子生物学会, 2002年12月, 横浜.
14. 亀岡洋祐, Persad Amanda, 小池和彦, 堤武也, 松浦知和, 須藤 勉, 井出達也, 田中一雄, 佐田通夫, 日野邦彦, 神代正道, 橋本雄之, 宮村達男, 鈴木哲朗. G型肝炎ウイルス感染を制御する宿主遺伝要因の探索. 同上.

#### G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし。
2. 実用新案登録  
なし。
3. その他  
なし。

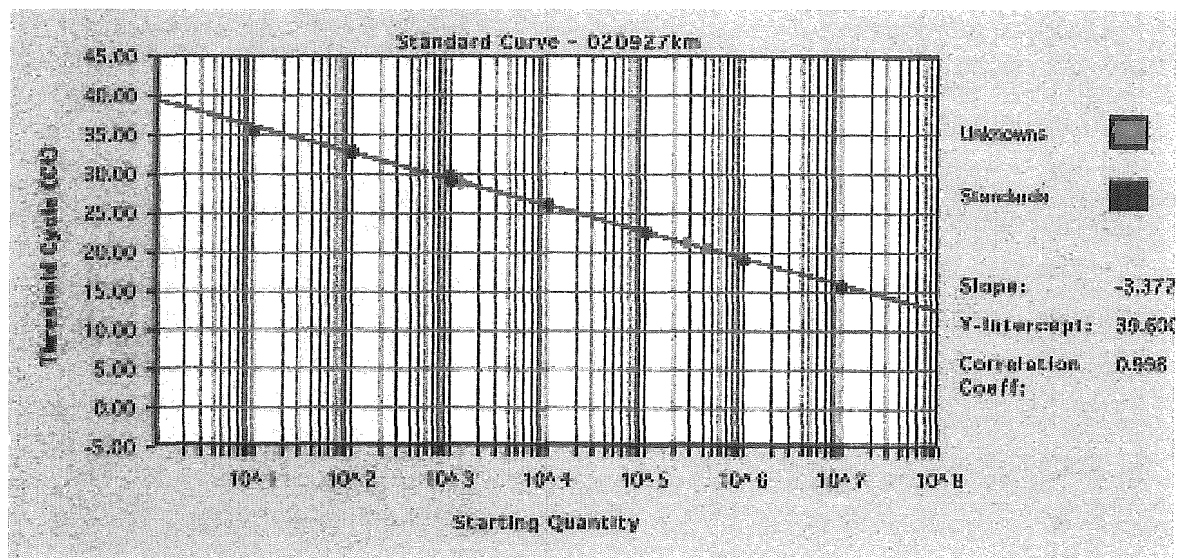


図2. TaqManリアルタイムRT-PCR法によるHCV RNAの定量

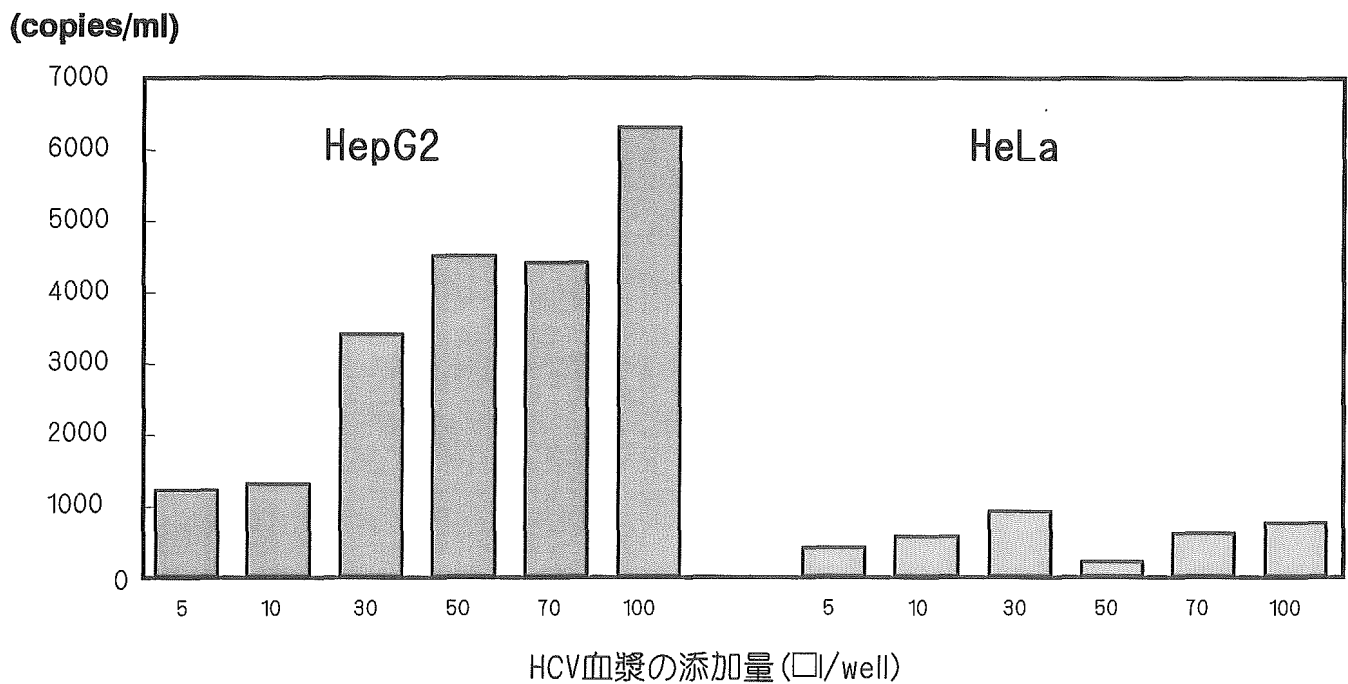


図3 HCV感染細胞における細胞内HCV RNA量

厚生労働科学研究費補助金  
平成14年度分担研究報告書

ウイルスのリスク評価に関する研究

分担研究者 東大医科学研究所  
甲斐知恵子

ヒト及び動物由来生物薬品のウイルス安全性確保を目的として、細胞内に感染した HCV の検出技術の基礎的検討及び動物および細胞からの牛痘ウイルス (RPV-1) の分離法の開発を目的とした検討を行った。その結果、HCV 発現細胞を認識する複数のモノクローナル抗体を樹立することができた。また、RT-PCR による RPV-1 の高感度検出法の確立ができた。

1. 目的

本分担課題では、牛由来の生物製剤を扱う際のウイルス検出法の確立のために牛のウイルス感染症である牛痘ウイルス (RPV)、また血液製剤などで感染危険性リスクの高いウイルスであるヒト肝炎ウイルス C 型 (HCV) を対象として、ウイルスのリスク評価に関する研究を行う。

(1) RPV

牛痘は反芻獣に伝播力の強い致死性感染症を引き起こす疾病で、OIE のリスト A にランクされているウイルス病である。発生すればその被害は大きく、また生畜と畜産物の厳重な移動制限も課せられるため国際流通への影響も大きく経済的被害は甚大となる。我が国には現在発生はないが、高速大量輸送時代を迎え、その予防法、診断法の開発は重要な課題である。このためには、流行の

伝播様式や病原体の生態を十分に理解し、また宿主と病原体との相互作用を究明することが必須である。牛痘ウイルスは、最近新興感染症を引き起こしたニッパやヘンドラウイルスと同様にパラミクソウイルスに属している。本ウイルス群はモノネガウイルス (マイナス鎖一本鎖 RNA ウイルス) で、リバーシジェネティクス技術の開発が困難であったため、病原ウイルスのウイルス遺伝子機能もほとんど解明されていなかった。我々はこの先端技術を確立し、我々のもつ優れた動物実験系と組み合わせることにより、病原性発現や免疫応答の分子機構を解明することによって、総合的理解に基づく疾病診断法や予防法の開発に役立てることを最終目的とする。

本年度は、牛痘ウイルスの実験感染動物を用い、ウイルス診断法とウイルス

分離法を確立することを目的に研究を行った。

#### 得られた研究成果

牛痘ウイルスのウサギ馴化株である RPV-L 株をウサギに接種し、臨床症状の極期である接種3日後に各種臓器と末梢血細胞(PBMC)を採取した。採取した各臓器の乳剤および PBMC を B95a 細胞と共培養してウイルスの分離を試みた。その結果、リンパ系臓器(脾臓、腸間膜リンパ節、膝下リンパ節、パイエル板)および PBMC からはウイルスが分離されたが、脳、肺、腎臓などからは分離されなかった。また感染ウサギの腸間膜リンパ節から RNA を抽出し、RT-PCR による効率的なウイルス診断法の開発を試みた。その結果、ウイルスのN遺伝子内の配列を用いた RT-PCR 法により、感染ウサギの腸間膜リンパ節において効率良く増幅産物を検出できることが明らかとなった。同時に、本 RT-PCR 法が培養細胞中のウイルスの混入の検出にも極めて有効であることを示した。

本研究において、動物および細胞からのウイルスの分離、PCR によるウイルス検出の方法を確立することができた。

#### (2) HCV

C型肝炎は、フラビウイルス科のC型肝炎ウイルス(HCV)によって引き起こされ、感染すると非常に高率に慢性肝炎と

なり、さらに肝硬変、肝癌へと移行することが明らかとなっている。主に血液を介して感染し、これまでは輸血や針事故、汚染針を用いた集団予防接種などが感染拡大の主原因とされ、WHO の報告では既に抗体陽性者が全世界で1億7千万人を超えるとされる重大な疾患である。HCV はプラス一本鎖 RNA をゲノムとして持ち宿主細胞 DNA に組み込まれる事なく持続感染するが、有効な試験管内の感染系や実験動物モデルがないためその研究進展に対する大きな障害となっていた。特に、HCV に汚染された細胞やヒト由来原料を検出する実験系は確立されていなかった。そこで我々は、唯一の感染感受性動物であるチンパンジーに感染性を示した患者血清から HCV 全長遺伝子をクローニングし、HCV 全ゲノムをスイッチング・持続発現する細胞株を樹立し、HCV が持続的に感染した場合に現れる抗原を特定して汚染検出系を開発する事を試みた。

本年度はまず、HCV 発現細胞を認識するモノクローナル抗体の樹立を試みた。

#### 得られた研究成果

本年度はまず、Cre/loxPシステムで全長 HCV をスイッチング発現後し持続発現したまま継代した細胞( $5 \times 10^6$ )をマウスに8回免疫し、ミエローム細胞と融合してハイブリドーマ

を作製した。また、これらのハイブリドーマのうち HCV 発現継代細胞に反応するクローンをスクリーニングするため、生きた細胞を抗原とした ELISA(Cell-ELISA)系を樹立した。この ELISA 系で 1000 クローン以上をスクリーニングし、HCV 発現継代細胞の表面で発現する抗原を認識するクローンを何種か得た。今後は、これらの中から HCV 汚染細胞や汚染ヒト由来組織などに反応するクローンを選択し、HCV 汚染検出系の確立を目指す予定である。



## 医薬品の安全確保対策としてのウイルスのリスク評価と リスク低減に関する研究

分担研究者

三代俊治（東芝病院研究部）

### 要約

近年俄に注目され始めた E 型肝炎ウイルス (HEV) が、輸血用血液製剤及び血漿分画血液製剤の安全確保上、如何程の危険因子たり得ているかを検討した。予備的な調査ではあったが、元来 fecal-oral transmission 様式を取るとされて来た HEV が、blood-borne route (具体的には輸血) を介しても感染する可能性が示された。安全性確保の為の適切な対策を立てる為には、更に詳細な実態調査が必要である。

#### A. 緒言

我々は、海外渡航歴の無い日本人急性肝炎患者より E 型肝炎ウイルス (HEV) 日本土着株を見だし、JRA1 株と名付けて其のゲノム全長塩基配列を決定し報告した [ref-1]。更に、JRA1 株の配列に基づいて「日本株」を検出するための新規プライマーをデザインし、従来「原因不明」とされてきた急性肝炎例から genotype I, III, IV に属する HEV 株をそれぞれ、1, 3, 3 本ずつ見だして報告した [ref-2]。これらの初期研究から、本邦に於ける HEV の国内感染リスクは、従前考えられていたよりも相当に高いことが示唆された。よって、血液・血液由来製剤の中に HEV が混入する可能性も絶無ではないと考えられ

た。

#### B. 方法

##### 1. 血漿分画製剤や供血者及びレシピエントの血液中の HEVRNA の検出

日本赤十字社日赤血漿分画センターとの共同研究による、血漿分画製剤中の HEV RNA の存在の有無の検討を行った。また、日本赤十字社北海道血液センターとの共同研究で、輸血後 E 型肝炎が疑われた患者及び、その供血者の HEVRNA の RT-PCR による検査を行い、陽性バンドについて塩基配列の解析を行った。さらに、供血血液の内、ALT 高価ドナーを対象として HEV RNA の存在の有無について RT-PCR による解析を行った。なお、

HEV RNA の検出は既報 [ref-2] に若干の修正を加えた RT-PCR 法 (unpublished) により行った。

### C.成績及び考察

#### 1. 血漿分画製剤や供血者及びレシピエントの血液中の HEVRNA の検出

凝固因子製剤及びアルブミン製剤、各々数ロットについて HEVRNA の検出を行ったが、全てのロットで陰性であった。輸血後 E 型肝炎が疑われたレシピエントの血液、及び当該輸血に用いられられた血液ロットについて HEVRNA の検出を行い、レシピエント及び 1 人の供血者の保存血液が HEVRNA 陽性となった。その血液の HEVRNA のシーケンスを行ったところ、ドナーとレシピエントの HEV RNA 塩基配列が、二つの異なる領域に於いて完全一致していた。

供血血液において、肝炎ウイルスの排除する目的で ALT 高値の血液は輸血用血液製剤や血漿分画血液製剤の製造に使われることは廃棄される。そこで、このような ALT 値が 500 IU/L を超える 18 人の供血者について、HEVRNA の検出を行ったところ、そのうち 6 人からの供血家血液が HEV RNA 陽性であった。

#### 2. 血漿分画製剤や供血者及びレシピエントの血液中の HEVRNA の検出

HEV の血液製剤の原料に混入する可能性についての解析は、現在も検討中であるが、すくなくとも 1 例の輸血後 HEV 感染が確認されたことは本研究の重要性を示している。本症例に関しては、すでに新聞報道もされ、血液対策課を中心に対応が取ら

れている。また、ALT 高値の供血血液から HEVRNA が多く見出されたことは、ALT 高値の血液を血液製剤の製造に用いないというこれまでの対応の正しさを物語るものである。しかしながら、ALT 高値でなくても輸血後 HEV の感染が起こる可能性が示されたことより、我が国の血液及び血液由来製剤の安全性を更に高める目的で、HEV に関する我が国の疫学的実態を早急に解明する必要があると考えられる。また、臨床症例の検討から、HEV viremia が予想以上に長期間持続感染するとの示唆が得られている [ref-1]。また、不顕性感染例も数多く存在すると考えられるので、輸血血液製剤及び分画製剤製造用原料血漿の原料に HEV が混入する危険性は存在すると考えられる。しかし、このような HEV の感染を防ぐためにスクリーニング等の対応を取るべきかについては、ドナー集団に於ける HEV RNA 陽性率について大規模な調査を行って判断する必要がある。

### D.参考文献及び業績:

1. Takahashi K, Iwata K, Watanabe N, Hatahara T, Ohta Y, Baba K, Mishiro S. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis E virus strain that may be indigenous to Japan. *Virology* 2001; 287: 9-12.

2. Takahashi K, Kang JH, Ohnishi S, Hino K, Mishiro S. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus recovered from Japanese patients with acute sporadic hepatitis. *J Infect Dis* 2002; 185: 1342-1345.

厚生労働科学研究費補助金(特別研究事業)  
分担研究報告書

臍帯血移植時におけるヘルペスウイルス混入の可能性の検討

分担研究者 堀本 泰介 東京大学医科学研究所助教授

研究要旨 造血幹細胞移植後にみられる発熱の原因として、病原微生物の感染や免疫反応(GvHD)を含めて、様々な可能性があり、治療時に用いた生物由来製剤からウイルスが混入、感染し、それが原因となる可能性も含まれる。今回、臍帯血移植後の患者から経時的に採血をし、その中にヘルペスウイルスが含まれるかどうかを高感度検出PCR法を用いて検索した。その結果、頻度は非常に低かったものの、ヒトサイトメガロウイルスおよびヒトヘルペスウイルス6型の遺伝子が検出された。これらのウイルスが果たして外部からの混入であるかどうかは不明である。

共同研究者:

真鍋淳(東京大学医科学研究所細胞療法)、  
河岡義裕(東京大学医科学研究所ウイルス感染)

A. 研究目的

造血幹細胞移植のための移植片として、免疫学的にナイーブな臍帯血を用いた場合、他の幹細胞移植後に比較して、多様なウイルス感染症が起こることが知られている。臨床的にそれらのウイルスを同定することはしばしば困難であり、患者の治療方針の決定に迷うことも多い。この原因ウイルスがはたして何に起因するのかは不明である。例えば、治療時に何らかの理由でウイルスが混入した場合、移植患者は免疫学的にナイーブなために、それが少量のウイルスであった場合にも、体内で増殖し、健康被害に結びつく可能性が高い。現在、ヒトに感染症を起こすヘルペスウイルスは8種類知られている(HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6, HHV-7, HHV-8)。今回私たちは、臍帯血移植後の患者から経時的に採血をし、その中にこれらヘルペスウイルスが含まれるかどうかを高感度検出PCR法を用いて検索した。

B. 研究方法

臍帯血移植後、day 0 から day 100 まで1週間に1度、末梢血を用いてヘルペスウイルスのDNA-directed DNA polymerase コンセンサス領域を nested PCR により検索した(Journal of Clinical Microbiology 34:1666-1671, 1996)。尚、患者さんにはインフォームド Consent のもと採血の協力をお願いした。

方法は、末梢血および血清から ISOGEN(ニッポンジーン社)により全DNAを抽出し、それを鋳型にして、ヘルペスウイルスコンセンサスPCRを実施した。用いたプライマーは 1stPCR 用に、  
KG1: GTCTTGCTCA  
CCAGNTCNACNCCYTT および DFA: GAY  
TTYGCNAGYYTNTAYCC。2<sup>nd</sup> nested-PCR 用に、  
IYG: CACAGAGTCCGTRTCN  
CCRTADAT および ILK: TCCTGGACAAGC  
AGCARNYSGCNMTNAA を用いた。増幅後のサンプルは、2%アガロース電気泳動によりバンドの有無を確認した後、バンドを切り出し、精製し、その direct sequence を行い、ヘルペスウイルスであるかどうかを確認した。

C. 研究結果および考察

合計 11 名の患者さんの協力を得て、127 血液

検体についてヘルペスウイルスの存在を調べた。その結果、2検体においてヒトヘルペスウイルス6型(HHV-6)が、同じく別の2検体からヒトサイトメガロウイルス(HCMV)が検出された。いずれも発熱時のサンプルであるため、この感染により発熱が起きている可能性が考えられる。前者は2名の患者、後者は1名の患者に由来する。私たちの研究室では、これらの感染性ウイルスあるいは遺伝子を全く扱ったことがないので、コンタミネーションではないと断言できる。

これらのウイルスの起源ははたしてどこにあるのか。患者自身に潜伏していたウイルスが、移植による免疫抑制状態下で活性化してきたのか、ドナーの臍帯血の中にいたものが患者に感染したのか、あるいは治療に伴い外部から予期せずウイルスが混入したのか。結論を出すためにはさらなる検討が必要とされる。しかし、ウイルス混入による健康被害は明らかであり、もし仮に治療時に用いた血液製剤がその感染源だとすれば大変な問題である。というのは、ヘルペスウイルスが混入しうるということは、他のもっと重篤な病気を引き起こすウイルスの混入もありうると想像される。

輸血用血液製剤の原材料として用いる血液に対して、例えばB型、C型肝炎ウイルス、あるいはヒト免疫不全ウイルスに対するスクリーニング体制は確立している。しかし、ヘルペスウイルスの混入を調べる試験は実施されない。ヘルペスウイルスは“常在”ウイルスであるので、そういった試験は一般には無駄であるかもしれない。しかし、それを移植患者に用いる場合には、ヘルペスウイルスフリーの状態であることが望ましい。したがって、移植患者用の血液製剤に関してより厳密なウイルススクリーニングの体制が期待される。

#### D. 結論

臍帯血移植患者から、HHV-6とHCMVが検出された。これが治療時に用いた血液製剤から混入した可能性は否定できない。

#### E. 研究発表

Ito, T., Kobayashi, Y., Morita, T., Horimoto, T., and Kawaoka, Y. 2002. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chicken. *Virus Res.* 84:27-35.

堀本泰介、八田正人、河岡義裕 2002年 香港トリインフルエンザ事情 *インフルエンザ* 3(2):64-67

堀本泰介、河岡義裕 2002年 *インフルエンザ* 抑制をめぐって *臨床とウイルス* 30(3):139-146.

堀本泰介、五藤秀男、高田礼人、河岡義裕 2002年 ウイルスの病原性発現における糖蛋白質の役割 *Molecular Medicine* 臨時増刊号「免疫 2003」39:212-226

堀本泰介、河岡義裕 2002年 *インフルエンザ* の流行学: 新型インフルエンザの襲来はあるか? *臨床と研究* 79(12):97-102.