

20020606

平成14年度 厚生労働科学研究費補助金
(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

目次

1. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書概要		頁
2. 総合研究報告書		1
3. 厚生労働科学研究費補助金総括報告書概要		5
4. 総括研究報告書		7
5. 分担研究報告書		
(1) 血液製剤のウイルス感染の現状と問題点	小室勝利	11
(2) ヒトパルボウイルス B19 の病原性に関する研究 —関節リウマチ発症との関連	佐々木毅	16
(3) ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発	岡田義昭	22
(4) 原因不明の肝炎例に於ける HEV の関与	三代俊治	26
(5) TT ウイルス遺伝子の転写調節機構の研究	鈴木哲朗	28
(6) HBV pre-S 遺伝子変異株の流行様式の研究 —世界10ヶ国における比較研究	阿部賢治	33
(7) 献血者における Human herpes virus(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	40
6. 関連研究の学会報告および論文掲載 分担報告書に記載		

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書概要

研究費の名称＝厚生労働科学研究費

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（円）＝29,000,000

研究機関（西暦）＝2000－2003

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ィルス、新たな病気との関連が疑われるウィルス、変異株の出現により病原性の変化が疑われるウィルスにつき、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、これらウィ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＝目的とするウィルスとして、B19パルボウィルス、TTV、HHV-8、HEV、HBV変異株をとりあげ、そのウィルス学的分析、分子疫学的分析、病態解析、モデル系の開発、診断法、臨床的意義についての研究を行った。

結果と考察＝各ウィルスにつき以下の結果を得た。

- 1) B19パルボウィルス：慢性関節リウマチ発症要因としてのB19感染の意義及びそれらの検出系の確立、*in vitro*感染形の開発によるリスク評価への応用を実現した。
 - 2) TTV：分子疫学的研究により、新ウィルスの発見、系統樹の作成、ウィルス発現調整機構による病原性との関連等、今後のリスク評価に有用な成果をあげた。
 - 3) HHV-8：検出法及び*in vitro*感染系を確立し、疫学的応用、病原性解析への道を開いた。国内の献血者の疫学的調査を実施した。
 - 4) HBV変異株：検出法の開発、改良と国際協力による疫学的調査を行った。診断法、予防治療法へのリスク管理に多大の示唆を与える結果を得た。
 - 5) HEV：分子疫学的検討により、国内での対策を早急に実施する必要性を示唆する結果を得た。輸血領域でも同様の対応が必要と考えられる。
- 以上、申請時、目的とした内容は、それなりに達成できたものと考えられる。

結論＝B19パルボウィルス、HHV-8、TTV、HEV、HBV変異株を主に、検査法、病原性との関連、分子疫学的検討等をウィルス学的に、輸血学領域と絡めて実施した。

各々に、相応の成果があげられてきたと考える。将来これら研究が医療の多くの分野で、リスク評価として利用されることを期待する。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総合研究報告書

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 血液・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、病原性が解明されていない新興ウイルス感染や、既知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のうち、B19パルボウイルス、TTV、HEV、HCV、HHV-8を主に、診断法の開発、病原性、疾患との関係、分子疫学的解析、ウイルス学的分析等につき検討した。多くのウイルスで、リスク評価に有用な成果があげられたと考えられる。

異なるので、3年間に実施した研究の方法と結果をまとめて記載することとする。

分担研究者

佐々木 毅 東北大学医学部 教授
岡田 義昭 国立感染症研 室長
片野 晴隆 国立感染症研 室長
三代 俊治 東芝病院研究部 部長
鈴木 哲朗 国立感染症研 室長
阿部 賢治 国立感染症研 主任研究官
池田 久實 北海道赤十字血液センタ
— 所長

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を逃れるウイルス、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。

（倫理面への配慮）

患者材料を研究に使用する際は、インフォームドコンセントとプライバシーの確保に努める。各研究施設では、動物を使用する際には「実験動物委員会」、倫理上、検討を要する研究には「医学研究倫理審査会」が設置され、討議の上、決定するシステムが存在する。研究はこれら委員会の承認の下、定められた規定に従って行われるので、問題は生じないと考える。

B. 研究方法と結果

各分担研究者の扱うウイルス、方法が

1. 関節リウマチ（RA）の発症要因とされるB19パルボウイルスに関する研究

B19パルボウイルス感染が、RA発症の要因となることが示唆されたので、両者の関係につき検討を加えた。その結果、1). RAの病変関節滑膜に存在する免疫系細胞内にB19は持続感染してTNF- α のサイトカイン遺伝子を活性化する。この反応が発症に関係すると考えられること。2). RA病態形成に関係することを証明するための*in vitro*細胞系及びモデル動物（Tgマウス）系を確立した。3). B19のNS-1遺伝子を導入したマウスモデルには、コラーゲン誘発感染炎が高頻度に発症した。病態形成に主役をなすTNF- α が多く産生されていた。4). 細胞株を利用した*in vitro*の結果でもNS-1導入はTNF- α 産生に影響を与えている。5). ヒト抹消血、骨髄でのB19-DNA量はB19関連臨床所見を呈する疾患で高い値を示す。6). RA症例の多くで、抗B19中和抗体活性が低下している。7). B19の機能性蛋白であるNS-1を特異的に制御するDNAenzymeを加えると、TNF- α の抑制が起こる こと等を証明した。B19感染がRAの発症要

因となっていると思われる成果が数多く示された。

2. ヒトパルボウイルスB19感染系の開発

B19感染の病態解析、血液製剤の安全性評価に使用しうる細胞培養系の開発と改良を行った。その結果：1) 赤芽球型細胞(KU812F)を用い、感染性をRT-PCR法により検出する方法を開発した。2) 高感度感染系を作成するため、KU812Fの中から、エリスロポリエチンリセプター陽性細胞をクローニングし、数千個のB19が存在すれば、感染を示す高感度細胞のクローニングに成功した。3) このクローンは安定で、感染性ウイルスを培養液中に分泌、産生していることを証明した。この高感度感染系は、目的とする方向に、有効に利用できると考えられ、使用している。

3. HHV-8に関する研究

カポジ肉腫、種々のリンパ腫と関係するHHV-8につき診断法、発症との関連、輸血に伴う感染のリスク等につき検討を加えた。その結果：1) 血管内皮細胞を利用した効率の良いHHV-8感染系を開発した。HHV-8の初期蛋白と造腫瘍性との関係を知る手がかりを得た。2) HHV-8を検出し得る高感度検出法を開発した。3) HHV-8の感染に関する疫学的調査を実施した。カポジ肉腫患者は100%要請、エイズ患者では高頻度に陽性で、日本国内での地域別感染率の検討を開始した。4) 献血者リスク評価のため、献血者集団、及び頻回輸血患者等のHHV-8抗体陽性率を比較した。健常献血者のよう成立は2.05%~2.6%であり、頻回輸血患者では11.9%~14.3%と高い傾向が認められた。HHV-8の示す病原性、検出法の改良を行っている。

4. TTVに関する研究

病原性の不明とされるTTVのウイルス学的、分子疫学的、生物学的検討を

行った。その結果：1) 変異株の検討、塩基配列の決定、系統解析を行い、新種のウイルスを発見した。2) TTVの増殖部位の検討を行ったところ、TTVは肝内より骨髄内で効率よく増殖した疾患のあることを証明し、肝以外の疾患への関与が示唆された。3) TTVの母児感染が考えられる症例検討を行った。4) ヒト以外の霊長類におけるTTVの分子疫学的検討を行ったところ、分子系統樹解析では、ヒトTTVと異なるものが発見された。5) TTVの遺伝子発現機構を明らかにする研究より、プロモーター、指向性等の検討を行った。引き続き、病原性との関係、遺伝子発現機構等につき検討を加えている。

5. HBV、HCV変異株に関する研究

変異株に関する診断法の改良、分子疫学的検討を行った。その結果：1) 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タイピング法を開発した。2) HBVpre-S変異株の流行実態を世界10ヶ国と共同研究で実施した。HBVの広く流行している東南アジアの国では、高い頻度で、HBV変異株が流行していることが証明された。3) 献血血液のlow-viremicHBVcarrierの残存リスクを検討した。これらの残存リスクを排除するためには、核酸増幅法だけでなく、高感度抗原スクリーニング法の使用と、HBcスクリーニングの継続が必要であることが示唆された。

6. 原因不明の肝炎例に於けるHEVの関与に関する研究

原因不明とされてきた急性・劇症肝炎例を対象とする分子疫学的解析による、日本におけるHEV感染のリスク評価を行った。其の結果：1) 北海道地区の病院での原因不明急性肝炎の39%はHEV-RNA陽性。2) 新潟大学、埼玉大学との共同研究ではそれぞれ21%と18%。3) 岡山、愛媛地区との共同研究では頻度が低く、

東に比べて西が低率である可能性が証明された。4) 輸血後HEV感染例の解析と血漿分画製剤への混入も検討した。分画製剤にはHEVは証明されなかった。日本においても輸入感染ではないE型肝炎が高頻度に存在することが明らかとなった。

C. 考察

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を逃れるウイルス、変異株の産生により病原性の変化が疑われるウイルスの診断法、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ことを目的に本研究を実施してきた。

3年間、扱ってきたウイルスとして主にB19パルボウイルス、HHV-8、TTV、HEV、HBV変異株があげられる。B19パルボウイルスについては、RAとの関連がより具体的に明らかになるとともに、感染系の作製が、血液製剤のリスク評価に使用するため、国内外からの細胞分与の要求とともに使用されるようになり、それなりの貢献をするようになった。

HHV-8は、国内独自の検査法の開発が行われ、疫学調査に使用されるようになり、感染系の作製は将来、病原性解明に利用されることになる。

TTVについては、分子疫学的研究が新ウイルスの発見につながり、発現機構の解析は、病気との関係の研究に応用の道が開かれてきている。HBV変異株の分析は、病原性の変化との関連、診断法の問題、ワクチン有効性の評価等、今後リスク評価に重要な示唆を与えてくれた。HEVについては、国内で高率に抗体陽性者が存在することが解明され、原因不明の急性肝炎の原因となっていることが判明、輸血においても感染者が出現していることから早急な対策の必要性を示唆した。

現時点でのリスク管理は、これらウイルスに対して、充分実施されてはいないが、患者の条件によっては、問題と

なる場合もあり、本研究班の成果が利用されることを希望する。

3年間の研究は、当初期待した以上の成果があげられたと、主任研究者としては考えている。御協力に感謝する。

D. 結論

B19パルボウイルス、HHV-8、TTV、HEV、HBV変異株を主に、検査法、病原性との関連、分子疫学的検討等をウイルス学的に、輸血学領域と絡めて実施した。

各々に、相応の成果があげられてきたと考える。将来、これら研究が医療の多くの分野でリスク評価として利用されることを期待する。

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書概要

研究費の名称＝厚生労働科学研究費

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（総括研究報告書）

国庫補助金精算所要額（円）＝8,000,000

研究機関＝2001－2003

研究年度＝2002

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）、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ィルス、新たな病気との関連が疑われるウィルス、変異株の出現により病原性の変化が疑われるウィルスにつき、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、これらウィ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＝目的とするウィルスとして、B19パルボウィルス、TTV、HHV-8、HEV、HBV変異株をとりあげ、そのウィルス学的分析、分子疫学的分析、病態解析、モデル系の開発、診断法、臨床的異議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) . ヒトパルボウィルスB19感染と慢性関節リウマチ発症との関連を知る目的で、B19の機能性蛋白NS-1の役割、B19に対する中和抗体等の役割を検討した。NS-1を特異的に制御するDNA enzymeを加えると、滑膜細胞によるTNF- α 産生が抑制され、RAにおけるB19の関与が示唆された。又、RA症例の中に、B19中和抗体の著減しているものがあり、発症との関連が疑われた。

2) . ヒトパルボウィルスB19 *in vitro* 感染系の改良を行い、高感受性クローンを得ることに成功した。1000個/mlのウィルスが存在すれば感染が成立し、病原性の解析や、血液製剤のリスク評価等に応用できることが証明された。

3) . 本邦における急性・劇症肝炎例を対象とするHEVの分子疫学的解析により、HEV感染のリスク評価を行った。本邦に於いても、E型肝炎の発生が看過出来ぬ頻度で存在することが証明された。

4) . TTVの病原性解析への応用のため、TTV遺伝子の転写調節機構及び遺伝子発現の細胞指向性の解析を行った。TTVの転写活性には細胞選択性があること、非肝臓細胞でも活性を示す細胞の存在することを証明し、その遺伝子構造における背景を証明した。

5) . HBV pre-S変異株の流行実態を世界10ヶ国で共同で検討した。HBV浸淫地帯である東南アジア諸国で、高い頻度でHBV変異株が流行していることが証明された。

輸血後感染症、臓器移植後感染症のみならず、新しく発見されたウィルス、変異株の出現が認められるウィルス、病原性の明確でないウィルス等に対する対策は、それらのウィルス学的、疫学

的、生物学的解析の上に作られるものと考えられる。

本年度の研究課題で取り上げた、B19パルボウイルス、TTV、HEV、HBV変異株、HHV-8等も、各々、今後の対策を如何にとるかという視点から重要なウイルスと考えられる。ウイルスによって、その対応は異なるが、今回及び今後明らかにされていくであろう研究結果が幅広く、利用されていくことが期待される。

結論＝ウイルスの存在は確認されたが、病態、病原性が十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(B19パルボウイルス、HHV-8等)及び最近問題となっているHEV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よう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。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

統括研究報告書

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 血液・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、病原性が解明されていない新興ウイルス感染や、既知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のうち、HHV-8、TTV、HEV、B19パルボウイルス、HBV変異株につき、診断法の開発、病原性、疾患との関係、疫学的検討等を行い、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、B19の機能性蛋白NS-1の役割、B19に対する中和抗体等の役割を検討した。NS-1を特異的に制御するDNA enzymeを加えると、滑膜細胞によるTNF- α 産生が抑制され、RAにおけるB19の関与が示唆された。又、RA症例の中に、B19中和抗体の著減しているものがあり、発症との関連が疑われた。
- 2). ヒトパルボウイルスB19の*in vitro*感染系の改良を行い、高感受性クローンを得ることに成功した。 10^4 /mlのウイルスが存在すれば感染が成立し、病原性の解析や、血液製剤のリスク評価等に応用できることが証明された。
- 3). 本邦における急性・劇症肝炎例を対象とするHEVの分子疫学的解析により、HEV感染のリスク評価を行った。本邦に於いても、E型肝炎の発生が看過出来ぬ頻度で存在することが証明された。
- 4). TTVの病原性解析への応用のため、TTV遺伝子の転写調節機構及び遺伝子発現の細胞指向性の解析を行った。TTVの転写活性には、細胞選択性があること、非肝臓細胞でも活性を示す細胞の存在することを証明し、その遺伝子構造における背景を証明した。
- 5). HBV pre-S変異株の流行実態を世界10ヶ国で共同で検討した。HBV浸淫地帯である東南アジア諸国で、高い頻度でHBV変異株が流行していることが証明された。
- 6). 輸血によるHHV-8感染の可能性を知る目的で、HHV-8抗体陽性率について健常献血者、HCV陽性献血者、HBV陽性献血者、梅毒抗体陽性献血者、HIV感染リスクの自己申告者、HIV陽性献血者、頻回輸血患者で調査した。頻回輸血患者では高い傾向にあったが、検査法の改良が必要であることも証明された。
- 7). 血液製剤の安全性についての現状と将来の問題点につきリスク評価した。

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
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	国立感染研 主任研究官
池田久實	北海道赤十字血液センタ ー 所長

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、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

各分研究者の扱うウイルス、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。

1. 関節リウマチ (RA) の発症要因とされる B19 パルボウイルスに関する研究

B19 感染症と未知の病態 (特に RA) との関係を知る目的で、ウイルス量と臨床病態との関連、B19 に対する中和抗体測定系の確立、RA 病態に対する B19 関与等につき検討した。

その結果: 1). 抹消血、骨髄での B19 DNA 測定によると、B19 関連臨床所見を伴う症例では 1×10^3 以上の B19 DNA

コピー数を示し、B19 関連臨床所見を示さない血液疾患では 10 コピー未

満であった。 2). 赤芽球株への感染阻止能を示標とする中和抗体測定系を確立した。 3). RA 例の多くの例で、抗 B19 中和抗体活性が減少していた。 4). B19 の機能性蛋白 NS-1 を特異的に制御する DNA enzyme を加えると、滑膜細胞による病態と関連する TNF- α 産生が抑制された。

2. ヒトパルボウイルス B19 の感染系の開発

B19 ウイルスの関係する疾患の病態解析、血液製剤等のリスク評価に使用する目的で、高感受性の細胞クローン開発、改良を行った。赤芽球株(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、クローニングを行った。培養条件を改良し、昨年報告したクローンより、さらに高感受性クローンを確立した。このクローンは安定で、この株にウイルスを感染させると、48~96 時間で 10^4 /ml の感受性ウイルスが分泌されていることが証明された。この感染系を使用することで、病原性の解析、ウイルスの不活化や除去法のリスク評価が行えることが証明された。

3. 原因不明の肝炎例における HEV の関与

原因不明とされてきた急性・劇症肝炎例を対象とする分子疫学的解析による、日本に於ける HEV 感染のリスク評価を行った。その結果: 1) 北海道地区の病院での原因不明急性肝炎の 39% が HEV-RNA 陽性 2) 新潟

大学、埼玉大学との共同研究では夫々21%と18% 3) 岡山、愛媛地区との共同研究では頻度が低く、東に比べて西が低率である傾向が証明された。4) 輸血後HEV感染例の解析と血漿分画製剤への混入も検討した。分画製剤にはHEVは証明されなかった。日本に於いても、輸入感染ではないE型肝炎が高頻度に存在することが明らかとなった。

4. TTVウィルス遺伝子の転写調節機構に関する研究

TTVの病原性との関連を知る目的で、TTV遺伝子の転写調節機構及び遺伝子発現の細胞指向性の解析を行った。TTV SANBAN遺伝子の部分的欠損変異を用いたレポーターアッセイから、エンハンサーの約300塩基上流がTTV遺伝子発現において、リプレッサーとして働く可能性が考えられた。TTVプロモーター/エンハンサー活性の細胞指向性を検討したところ、ヒト肝細胞以外に、アフリカミドリザル腎臓癌、マウス肝癌、チャイニーズハムスタ卵巣癌で高い転写活性が認められ、ウィルスの宿主域の広いことが証明された。

細胞選択性の機序を明らかにしている。

5. HBV pre-S遺伝子変異株の流行様式に関する研究

HBV変異株の流行様式を明らかにし、病態との関連、ワクチン対策、治療方法、安定した診断法への応用に使用する目的で、世界10ヶ国との共同研究で、HBV pre-S領域変異株の流行式の様式を検討した。日本・韓国・

中国・ベトナム・ミャンマー、ネパール、米国、スペイン、ボリビア、ガーナから収集したHBV陽性血清からRCP産物を用いて、ダイレクトシーケンシスを行い、PCR産物を用いて、塩基配列を決定した。その結果：1) 検索した126例中26例(20.6%) pre-S deletionを伴った変異株が観察された。2) 国別ではベトナム15/28例(53.6%)、ミャンマー7/30(23.3%)、ガーナ1/11(9.1%)の検出率であり、日本、米国、スペインでは観察されなかった。3) 疾患別では変異株の58%を、肝硬変、肝癌側が占めた。東南アジアでは変異株が流行していることが明らかとなり、今後の対策に重要な示唆が与えられる結果を得た。

6. 献血者におけるHHV-8抗体陽性率と輸血感染リスクに関する研究

HHV-8の輸血感染リスクを評価するため、献血者集団における抗体陽性率を調査するとともに、検査法の開発、検査法による結果の分析等の検討を行った。

その結果：1) 蛍光抗体法によるHHV-8抗体陽性例は、健常献血者(49/1868)、HCV陽性献血者(5/100)、HBV陽性献血者(3/100)、梅毒陽性献血者(7/100)、HIV感染リスクの自己申告者(4/55)、HIV陽性献血者(0/5)、頻用輸血患者(12/84)ほどの数となり、方法により若干の差は認められるものの、健常献血者の陽性率は2.05~2.

6%であり、頻回輸血患者では11.9%~14.3%と高い傾向が見られた。2). 蛍光抗体法とELISA法の間には結果に差が認められるため、特異的に優れ、多数検体スクリーニングが可能なELISA法の開発を試み、その評価を行っている。

C. 考察

輸血後感染症、臓器移植後感染症のみならず、新しく発見されたウイルス、変異株の出現が認められるウイルス、病原性の明確でないウイルス等に対す対策は、それらのウイルス学的、疫学的、生物学的解析の上に作られるものと考えられる。

本年度の研究課題で取り上げた、B19パルボウイルス、TTV、HEV、HBV変異株、HHV-8等も、各々、今後の対策を如何にとるかという視点から重要なウイルスと考えられる。ウイルスによって、その対応は異なるが、今回及び今後明らかにされていくであろう研究結果が幅広く、利用されていくことが期待される。

D. 結論

ウイルスの存在は確認されたが、病態、病原性が十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)及び最近問題となっているHEV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および*i n v*

*i t r o*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ようにリスク評価するかの方角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。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

血液製剤のウイルス感染の現状と問題点

主任研究者 小室勝利 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

研究要旨

2003年3月時点における血液製剤投与によるウイルス感染症のリスクは、スクリーニングテスト法の進歩、拡大、分画製剤におけるウイルス除去、不活化法の導入、採血時間診法の拡充等により、多幅に減少した。血漿分画製剤では、ほぼ完全に近いところまでリスク管理が行われる様になり、新興、再興感染症対策は充分その成果をあげた。しかしながら、血液成分製剤に於いては、未だ充分とは言えず、種々の問題点を残している。これらの現状と、解決すべき点につき、現状を述べ、考察する。

A. 研究目的

血液製剤の安全性をより高めるためには、採血時から、最終的に製剤を完成させるまで、多くの対策がとられている。これら対策の導入により獲られたリスク管理の成果と残された問題点をあげ、将来のより良い製剤完成のための方向を考察することを目的とする。

B. 研究方法

血液製剤の安全対策に関わる審議会、委員会、会議等に参加した際の討論、文献的検討を基に、血液の安全性につき、検討を加える。

（倫理面への配慮）

多くの会議等は公開で実施されている。患者材料を使用した研究には、インフォームドコンセントとプライバシーの確保に努めた。分担研究者の所属する国立感染症研究所では、「医学研究倫理審査会」、「実験動物委員会」等が設置され、討議の上、諾否を決定するシステムが存在し研究はこれら委員会の承認の下、定められた規定に従って行われる。

C. 研究結果

1. 血漿分画製剤によるウイルス感染症
（表1）

血漿分画製剤の安全性は、採血時間診の強化、スクリーニング検査への核酸増幅法（NAT）の導入、製造工程に於いて、注意すべき点についてのガイドラインの作成等を通し、リスク管理はほぼ完成したとよいてよいところまで到達した。

表1に示すように、アルブミン製剤、グロブリン製剤、凝固線溶系製剤とも問題の多いウイルス感染は、1990年代前半に少数発生したが、1995年以後発生は認められず、最後まで感染の危険性の残ったB19パルボウイルスについても、スクリーニング検査の導入後は感染は起こっておらずその危険性はほぼゼロに近いと考えられる。近年問題とされるウエストナイルウイルス、E型肝炎ウイルス等についても、現在使用されているウイルス除去、不活法が有効と考えられるので、問題はないものと考えられる。

2. リコンビナント血液凝固第Ⅷ因子製剤の安全性（表2）

リコンビナントF-Ⅷ製剤は、現在、血友病A

患者の50%以上に使用されている。リコンビナント製剤の製造管理、安全性に関するガイドライン (ICH ガイドライン) の適応等により管理されており、安全性は極めて高い。添加剤に加えられているアルブミンからのパルボウイルス、TTVの感染が報告されたが、臨床上の副作用は認められず、又、パルボウイルスについては、スクリーニング導入により、その感染を阻止されていると考えられる。血漿分画製剤と同等またはそれ以上の安全性が保たれていると考えてよいと思われる。

3. 血液成分製剤の安全性：検査法の限界 (表3)

赤血球、血小板等の血液成分製剤には、ウイルス除去、不活化法が導入されていないため、スクリーニング検査で検出できないウイルス感染の危険性は残されている。それらの感染の可能性と対策を表3に示す。世界的に臨床知見のすんだ不活化法の導入、または phase IIIまで進んだ不活化法の導入等、対策をとることを検討することが必要であろう。

4. 輸血領域で検討を要する項目 (表4、表5)

今後、安全性向上のために対策を考えていかなければならない点を表4、表5に示す。

製剤については、感染症に対する対応、特にスクリーニング未実施ウイルスに対する対応と、輸血による同種免疫反応に対する対応が主になると考えられる。

その際、最も考慮しなければならない点は、分画製剤と、成分製剤への対応は区別して実施されることが大切と考えられる。

D. 考案、結論

血液製剤の安全性は飛躍的に向上している。しかしながら血液成分製剤については残された問

題も存在する。これらを完成させるためには、多方面からの対策が必要であり、規制強化のみの対策では充分とはいえない。

新興、再興感染症については、そのウイルス学的知見、ウイルスの生物学的性状の分析等を考慮した緻密な対応が必要と考えられる。

E. 研究発表

1. Suzaki Y, Ami Y, Nagata N, Naito S, Kato H, Taneichi M, Takahashi M, Komiya T, Satoh S, Gondaira F, Sugiyama J, Nakano Y, Mori M, Komuro K, Uchida T.

Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates.

Int Arch Allergy Immunol. 2002Apr ; 127(4):294-8

2. Taneichi M, Naito S, Kato H, Tanaka Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Ishida H, Komuro K, Uchida T.

T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen.

J Immunol 2002 Oct 15;169(8):4246-52.

3. Naito S, Taneichi M, Kato H, Tanaka Y, Ami Y, Suzaki Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Morokuma K, Ohkuma K, Miyake H, Kinwa M, Komuro K, Uchida T.

Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral pre-treatment with OVA-liposome conjugates.

Int. Arch allergy Immunol. 2002Dec; 129(4) : 314-9.

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

血漿分画製剤によるウイルス感染症 (除去、不活化後) (表1)

アルブミン製剤:	HIV, HBV, HCV	無
	B19 パルボ	報告 有
	(臨床副作用無し)	
	現在はスクリーニング検査実施	
グロブリン製剤:	HIV, HBV, HAV, B19	無
	HCV	1990年代前半報告有り
	それ以後は無し	
凝固因子製剤:	HIV, HCV	無
	HBV	1990年代前半報告有り
	それ以後無し	
	HAV, B19 パルボ	(?)
	現在はスクリーニング検査実施	

リコンビナント F-VIII の安全性 (表2)

- 1、インヒビター産生率：血漿由来 F-VIII と有意差なし
- 2、異種蛋白に対する抗体産生
 - 培養細胞由来 (ハムスター細胞)
 - 培養液由来 (BSA 等)
 - 精製法に使用 (マウスモノクロー抗体等)(抗体産生量は少なく、副作用は起こさない)
- 3、ウイルス感染
 - B19 パルボウイルス感染報告有り (1996、1997)
 - TTV 感染報告 (2001 etc)(添加剤のアルブミン由来と考えられる。
臨床副作用無し)
- 4、人獣共通感染症
報告無し。

*安全性保証は、ICH ガイドラインに従って実施されている

輸血後感染症対策：検査法の限界 (表3)

現在採用している検査技術には検出限界の有る事を認識

- 1、ウインドー期の存在 (感度の限界)
- 2、escape mutants の存在 (特異性)
(HIV, HBV, HCV 等)
- 3、末梢血リンパ球、臓器内局在ウイルスの存在
(HBV, HCV, CMV, HHV-8 等)
- 4、海外からのウイルス等の持ち込み、移入
(HAV, マラリア 等)

ウイルス、細菌が潜在している事を前提とした対策

- 1、ウイルス、細菌除去、不活化法の成分製剤への導入
- 2、多種検査法の併用と標準法、標準品の設定
- 3、特殊患者への陰性確認血の投与
- 4、白血球除去製剤の投与

輸血領域で検討を要する項目 (表4)

- 1、受血者条件の検討
免疫不全患者、妊婦、移植医療関係 等
 - 2、同種免疫反応
GVHD,
TRALI(Transfusion related acute lung injury) 等
 - 3、感染症
ウイルスの変異、薬剤耐性への対応
細胞内又は臓器内局在ウイルス
未スクリーニング、未知ウイルス
診断法
ウイルス除去、不活化法の評価
成分製剤へのウイルス、細菌不活化法の導入
 - 4、ウイルス、細菌遺伝子、及び産生蛋白の生体への影響の検討
-

輸血後感染症対策：スクリーニング未実施ウイルス (表5)

- 1、HAV, HEV
分画製剤では問題なしと考えられるが、成分製剤
では、感染の可能性有り
 - 2、ヘルペスウイルス群 (CMV, HHV-8 等)
分画製剤はOKであるが、成分製剤では問題あり。
特殊条件下での陰性血の投与
 - 3、HGV, TTV, SEN-V
現状ではウイルスの生物学的、ウイルス学データの収集に
当り、当面新たな対策はとらない。
(血液安全技術調査会、1999年、8月)
 - 4、B19 パルボウイルス
関連疾患の報告の増加 (心筋炎、肝炎、髄膜炎 等)
1万—10万コピー以下のウイルス残存有り
↓
除去、不活化法の改善、開発
特殊患者への陰性血の投与
 - 5、プリオン病
スクリーニング方法の開発、
-

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakano Y, Mori M, Yamamura H, Naito S, Kato H, Taneichi M, Tanaka Y, Komuro K, Uchida T	Cholesterol inclusion in liposomes affects induction of antigen-specific IgG and IgE antibody production in mice by a surface-coupled liposomal antigen.	Bioconjugate Chemistry	13	744-749	2002
Taneichi M, Naito S, Kato H, Tanaka Y, Komuro K, Uchida T.	T cell-independent regulation of IgE antibody production induced by surface-linked liposomal antigen.	The Journal of Immunology	169	4246-4252	2002
Naito S, Taneichi M, Kato H, Ami Y, Suzaki Y, Mori M, Nakano Y, Yamamura H, Morokuma K, Ohkuma K, Miyake H, Kuniwa M, Komuro K, Uchida T.	Selective inhibition of systemic anti-OVA IgE production in response to oral preadministration with OVA-liposome conjugates.	International Archives of Allergy and Immunology	129	in press	2002

ヒトパルボウイルス B19 の病原性に関する研究

—関節リウマチ発症との関連—

分担研究者 佐々木 毅 (東北大学大学院医学系研究科免疫・血液病制御学)
研究協力: 宗像 靖彦 (東北大学大学院医学系研究科免疫・血液病制御学)
石井 恵子 (東北大学大学院医学系研究科分子診断学)
斉藤 貴子 (東北大学大学院医学系研究科検査部)

研究要旨

関節リウマチ(RA)例の関節滑膜細胞を分離し、これにヒトパルボウイルス B19(B19)の機能蛋白 NS-1 を特異的に制御する DNA enzyme を加えると、滑膜細胞による TNF α 産生が抑制された。B19 の感染を阻止しうる中和抗体活性が著しく遷延する B19 感染症例及び RA 例の半数近くでは著明に低下していた。また、B19 の未知の細胞レセプターを追求した。

A. 研究背景と目的

ヒトパルボウイルス B19(B19)は多彩な病態を惹起する。急性 B19 感染症でのほとんどの例は一過性に経過するが時には年余に亘り遷延し、関節リウマチ(RA)に移行する例もある。B19 感染症が遷延し、慢性疲労症候群、貧血他の原因となる場合も判明してきている。B19 感染症の未知の病態を明らかとし、その克服を計るために本年は以下を目的とした。

1. 定量的 PCR により B19DNA 量を定量的に把握し、ウイルス量と臨床病態の関連を追求する。
2. 臨床検査として使用しうる B19 の中和抗体測定系の確立を計る。これより臨床病態、特に遷延型 B19 感染症、関節リウマチ(RA)と B19 中和抗体活性の関連を追求する。
3. B19 の未知のレセプターを追求する。
4. RA 由来関節滑膜細胞での B19 阻害により、RA の病態の主体とされる TNF α 産生への影響を追求し、RA における B19 関与につき、詳細に解析する。

B. C. 研究方法及び研究成果

1. 臨床病態での定量的 PCR による B19 解析: 急性及び遷延 B19 感染症(持続型 B19 関節炎、貧血、慢性疲労症候群様所見等)や各種血液疾患で末梢血及び骨髄での B19DNA を Taqman システムにより B19 の

定量的解析を行った。その結果、B19 関連臨床所見を伴う例では 1×10^3 以上の B19DNA コピー数を示した。一方 B19 関連臨床所見を主しない血液疾患骨髄では定性的 nested PCR 陽性でも 10 コピー未満であった。

2. B19 中和抗体能の測定法の確立

B19 を in vitro で赤芽球株 KU812Ep6 に感染し、B19 の増殖能を定量的 PCR にて評価した。この B19 感染時に濃度の異なるモノクロナル抗 VP-1 抗体あるいは各種血清を加え B19 増殖の阻止率を検索した。数種類のヒト及びマウスモノクロナル抗 B19 抗体は、B19 増殖阻止活性(中和能)を認めしたが、その阻止率は 0~84%と多様であった。B19 感染既往を示す IgG 型抗 B19 抗体陽性健常者は 80%以上の感染阻止率(中和能)を示した。一方、IgG 抗体陰性健常者のサンプルは 0~2%と B19 感染の阻止能を欠いた。

3. 関節リウマチと B19 抗体

- (1) RA と抗 B19 抗体: デンカ生研キットを用いた B19(VP1+VP2)に対する IgG 型抗体の頻度及び抗体価は RA 及び非 RA で著明な差はなかった。しかし RA 例で IgM 型抗体を有する例も散見された。
- (2) RA52 例で B19IgG 型抗体陽性であったが、この陽性者のうちの 42%では感染阻止率(中和能)が 0~20%未満に止まっていた。急性 B19 感染より半年~一年以上に亘る B19 遷延感染を示す例の 60%でも中和能が

著明に低下していた。一方、急性感染後、軽快した42例では全例が70~95%以上の感染阻止を示した。

4. ヒトパルボウイルス B19 の免疫系細胞への感染様式の追求。

(1) B19 の単球系細胞への感染を検出するため、単球系細胞株 U937 を用いて *in vitro* での B19 感染を計った。その結果、B19-DNA は U937 細胞内で緩徐ではあるが経時的に増加した。Fc レセプターを有する U937 での B19-DNA は中和能を有する抗 B19 抗体の前添加では抑制されず、むしろ B19-DNA 量は有意に増加し、B19 感染では Antibody dependent enhancement が生じると推定された。この抗体による B19 増殖の増強効果は抗 Fc レセプター抗体の添加で抑制された

(2) 未知なる B19 レセプターを検出するため、B19 の感染ターゲットとして赤芽球系細胞株 KU812Ep6、免疫細胞系細胞株を含む各種細胞株を用いた。細胞株表面蛋白とリコンビナント B19 抗原との沈降を計った。その結果、リコンビナント B19 抗原の免疫系細胞株表面蛋白への特異的結合を認めた。結合蛋白は既知の P 抗原とは異なる未知のレセプターである所見を得つつある。

5. 関節リウマチ滑膜細胞のサイトカイン産生と B19

関節リウマチ(RA)の関節滑膜細胞(SVC)中にヒトパルボウイルス B19(B19)の DNA/RNA, ウイルス蛋白 VP-1 が存在するという我々のこれまでの知見に基づき、RA の SVC による TNF α 産生での B19 の関連様式を追求した。RA 関節より分離し、調整した RA・SVC では無刺激下でも TNF α mRNA を検出できる。この系に NS-1 Ribozyme を加えると濃度依存性に TNF α RNA 産生の抑制が認められた。同様に二重チェーンにて RA・SVC と健常人扁桃腺

細胞や U937 との混合培養する系に TNF DNA enzyme, B19 レセプター抗体(抗 P 抗体など)を添加し、それらの影響を検索した。その結果、TNF DNA enzyme, B19 の NS1 DNA enzyme B19 レセプター抗体が TNF α 産生を有意に抑制しうることを認めた。

D. E. 考察及び結論

1. RA 例の少なからざる例では抗 B19 中和抗体活性が著減していた。B19 急性及び遷延感染例の関連する成績を合わせると B19 の中和不全が生体よりの B19 駆逐不全、そして B19 持続感染を導き、更には RA 発現と関連することが示唆される。
2. B19 は赤芽球系細胞以外に単球系細胞株 U937 にも *in vitro* で感染しうることを示された。感染経路として、単球細胞の Fc レセプターを利用した感染経路と、細胞表面の結合蛋白を介した感染経路の存在が推定された。前者については中和抗体がむしろ B19 感染の増強効果をもたらす。いわゆる ADE の関与様式が示され、B19 感染メカニズムとして興味深い。
3. 細胞表面に B19 感染に対応するコレセプターの存在が強く示唆された。この分子の同定により B19 感染メカニズムの詳細な解明が期待しうると推定している。
4. RA・SVC 細胞自身の TNF α 産生、及び RA・SVC より免疫系細胞への TNF α 産生誘導において B19 が直接的に関与することを B19mRNA 発現を抑制する実験より示した。

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. F. Yi, K. K. Ishii, Y. Munakata, T. Saitoh, M. Kaku, T. sasaki: Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. J. Virology, 76: 5395-5403, 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 22: 228-236, 2002
3. 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 133: 142-147, 2002
4. Y. Minami, T. Sasaki, Y. Arai, T. Hosokawa, S. Hisamichi, and The Miyagi Lupus Study Group: Psychological Profiles and Health Status in Japanese Female Patients with Systemic Lupus Erythematosus: The Miyagi Lupus Collaborative Study. Journal of Epidemiology 12: 55-63, 2002
5. T. Funato, S. Uehara, M. Takahashi, K. Kozawa, J. Satoh, T. Sasaki, and M. Kaku: Microsatellite instability in gonadal tumors of XY pure gonadal dysgenesis patients. Int J Gynecol Cancer. 12: 192-197, 2002
6. Y. Minami, T. Sasaki, Y. Arai, T. Hosokawa, S. Hisamichi, and the Miyagi Lupus Study Group: Psychological profiles and health status in Japanese female patients with systemic lupus erythematosus: the Miyagi Lupus Collaborative Study. J. Epidemiology. 12: 55-63, 2002
7. S. Fujimaki, T. Funato, H. Harigae, J. Fujiwara, J. Kameoka, K. Meguro, M. Kaku, and T. Sasaki: Quantitative analysis of a MDRI transcript for prediction of drug resistance in acute leukemia. Clinical Chemistry. 48:811-817, 2002
8. O. Sasaki, K. Meguro, Y. Tohmiya, T. Funato, Shibahara S, and Sasaki T. Nucleotide alteration of retinoblastoma protein-interacting zinc finger gene, RIZ, in human leukemia. Tohoku J Exp Med. 196, 193-201, 2002
9. M. Okuda, J. Nomura, H. Takeno, J. Kameoka, and T. Sasaki. CD546 positive intestinal T-Cell lymphoma: treatment with high dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation. Internal Medicine. 41: 734-737, 2002
10. T. Saito, Y. Munakata, Y. Fi, K. Ishii, H. Fujii, E. Miyagawa, T. Sasaki: Evaluation of anti-parvovirus B19 neutralizing activity by quantitative polymerase chain-reaction-based assay. J. Virol. Meth. 107:81-87, 2003
11. Y. Hirabayashi, S. Saito, M. Takeshita, T. Kodera, Y. Munakata, T. Ishii, H. Fujii, M. Shimura, and T. Sasaki. Mononeuritis multiplex, protein-losing gastroenteropathy and chroidopathy seen together in a case systemic lupus erythematosus. Modern. Rheumatol. In press, 2003
12. Y. Minami, T. sasaki, S. Hisamichi. Dietary factors in relation to clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. J. Rheum. In press, 2003
13. N. Takasawa, Y. Munakata, Y. Takahashi, M. Takahashi, Y. Fu, T. Node, M. Nose, T. Sasaki. Human parvovirus B19-transgenic mice become susceptible to polyarthritis. J. Clinical. Investigation. In press, 2003
14. H. Harigae, O. Nakajima, N. Suwabe,