

発表者	論文タイトル	発表誌	巻	ページ	年
Makoto Hirano, Xin Ding, Huy TT Tran, Tian-Cheng Li, Naokazu Takeda, Tetsutaro Sata, Shin Nakamura and <u>Kenji Abe</u>	Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various non-human primates- evidence of widespread infection among Japanese monkeys.	Japanese Journal of Infectious Diseases		印刷中	
Xin Ding, Hongxi Gu, Zhao-Hua Zhong, Xu Zilong, Huy Thien-Tuan Tran, Yohko Iwaki, Tian-Cheng Li, Tetsutaro Sata and <u>Kenji Abe</u>	Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China.	Japanese Journal of Infectious Diseases		印刷中	

平成 14 年度 分担研究報告

分担研究計画

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検討

分担研究者	池田久實	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	武田尋美・宮崎 孔	同上	検査部
	松林圭二・佐藤進一郎	同上	検査部
	加藤俊明	同上	検査部

研究要旨

HHV-8 の輸血感染リスクに関しては、未だ明らかにされていない。そこで我々は昨年度、献血者検体における HHV-8 抗体陽性率とその輸血感染リスクの指標として頻回輸血患者の抗体陽性率について調査した。今年度は、検体数を増やし献血者検体 2,228 例[健常献血者 (A 群) 1,868 例、HCV 陽性献血者 (B 群) 100 例、HBV 陽性献血者 (C 群) 100 例、梅毒抗体陽性献血者 (D 群) 100 例、HIV 感染リスクの自己申告者 (E 群) 55 例、HIV 陽性献血者 (F 群) 5 例]、頻回輸血患者検体 (G 群) 84 例の抗体陽性率について調査した。HHV-8 抗体スクリーニングは、国立感染症研究所で PEL 患者検体から樹立した HHV-8 感染細胞株 (TY-1) を用いて免疫蛍光抗体法 IFA (TY-1) により実施した。IFA (TY-1) 陽性を示した検体は市販の KS-1 細胞株を用いた IFA (KS-1) とウイルス特異的な mix ペプチドを固相した市販の ELISA で検査した。A~G 群における IFA (TY-1) 陽性例は、それぞれ 49 (2.6%)、5 (5%)、3 (3%)、7 (7%)、4 (7.3%)、0 (0%)、12 (14.3%) であったが、IFA (KS-1) 陽性例は 38 (2.05%)、2 (2%)、3 (3%)、5 (5%)、2 (3.6%)、0 (0%)、10 (11.9%) と IFA (TY-1) とは結果の乖離がみられるものの、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% と高い傾向が認められた。しかし、これらの IFA 陽性例のうち ELISA 陽性例は A 群の 1 例 (0.05%) のみであった。現段階では真の陽性を決定する標準法が確立されていないため、これらの結果より献血者における HHV-8 抗体陽性頻度の評価を行うことは困難と考えられた。そこで、より特異性に優れ、多数検体スクリーニングが可能な HHV-8 特異的膜蛋白質 K8.1A を用いた ELSA の開発を試みたが、IFA (TY-1) より 8~16 倍感度が低く、特異性についても十分な評価を行っていないため、今後更なる検討が必要と考えられる。

A. 研究目的

Human herpes virus-8 (HHV-8) は、1994 年に Chang らによって AIDS 患者のカポジ肉腫の組織片中から検出されたヘルペスウイルスファミリーに属するウイルスであり、B リンパ球に感染する。健常者では HHV-8 に感染しても病気は起こさないが、免疫系機能が低下した患者においてはカポジ肉腫 (KS) や primary effusion lymphoma (PEL) 等を発症することが知られている。HHV-8 の主な感染経路は性行為であると報告されているが、HHV-8 は B リンパ球中に潜んでいること、また静注薬物常用者において HHV-8 抗体陽性率が高いこと、更に HHV-8 は臓器移植によって伝播することが報告されていることから、血液を介して感染する可能性が考えられている。しかしながら、現在まで輸血により HHV-8 感染が伝播したとの報告はない。

そこで、我々は HHV-8 の輸血感染リスクを評価するために、昨年度は IFA (TY-1) を用いて、各種献血者集団における HHV-8 抗体陽性率と輸血感染リスクの指標として頻回輸血患者群の HHV-8 抗体陽性率について調査した。今年度は更に多数検体を用いて抗体スクリーニングを行った。また、IFA (TY-1) 陽性例は、市販試薬の IFA (KS-1) 及び ELISA と結果の乖離がみられ、

真の陽性を確認することが困難であったため、特異性に優れ、多数検体スクリーニングが可能な検査法の確立が必要と考えられた。そこで、HHV-8 の膜蛋白質の一部である K8.1A の組み換え蛋白質を大腸菌内で発現、粗精製し、これを固相した ELISA の開発を試みた。

B. 研究方法

B-1 検体

国立感染症研究所 (感染病理部 片野先生) より譲渡された HHV-8 陽性患者検体血清 1 例を陽性対照として用いた。IFA (TY-1) スクリーニングは北海道内で献血した B 型肝炎ウイルス (HBV)、C 型肝炎ウイルス (HCV)、梅毒 (TP)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-I) 等のウイルスマーカーがすべて陰性の健常献血者 (A 群) 1868 例、HCV RNA 陽性献血者 (B 群) 100 例、HBV DNA 陽性献血者 (C 群) 100 例、性行為感染症のハイリスクグループと考えられる TP 抗体陽性献血者 (D 群) 100 例、献血後に HIV 感染リスクの可能性があったと自己申告した献血者 (E 群) 55 例 (HIV RNA 陰性)、HIV RNA 陽性献血者 (F 群) 5 例、及び血小板輸血を繰り返し受けた頻回

輸血患者 (G 群) 84 例について検査を行った。また K8.1A ELISA の検討には新たな健常献血者検体 71 例を用いて実施した。

### B-2 IFA (TY-1)

国立感染症研究所 (感染病理部 片野先生) より譲渡された PEL 患者検体から樹立した HHV-8 陽性細胞 TY-1 を用いた IFA を同研究所からのプロトコールに基づいて実施した。IFA には、tetradecanoylphorbol acetate を 20ng/ml を加えて 37°C で 48 時間培養した TY-1 をスライドガラスに固定したものを使用した。このスライドガラスに 1% BSA/PBS で 40 倍希釈した被検血清を 10µl/well 分注し、37°C で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、FITC 標識抗ヒト IgG 抗体を 10µl/well 分注し、37°C で 30 分インキュベートした。PBS で洗浄後、0.05% エバンスブルー溶液で 5 分間染色し、洗浄後、蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察した。

### B-3 IFA (KS-1)

IFA (TY-1) 陽性検体について、市販の HHV-8 抗体 IFA 試薬 (Biotrin) を添付の説明書に従って実施した。

### B-4 ELISA (Biotrin)

IFA (TY-1) 陽性検体について、市販の HHV-8 抗体 ELISA 試薬 (Biotrin) を添付の説明書に従って実施した。

### B-5 K8.1A のクローニング、発現、粗精製

TY-1 から抽出した DNA を鋳型とし、HHV-8 の膜蛋白質をコードする K8.1A に相当する部位 (nt 125~902) を PCR で増幅した。Pin Point Xa-1 T-Vector Systems (Promega) を用いて増幅産物のクローニングと N 末に biotin、C 末に His tag を付加した組み換え蛋白質の発現を実施した。目的の増幅産物と Pin Point Xa-1 T-Vector を 15°C、一晩でライゲーションを行った。この Vector を大腸菌 JM 109 Competent cell に加え、氷上 30 分、42°C で 50 秒、氷上 2 分間インキュベートし、トランスフォーメーションを行った。SOC medium を加えて 37°C で 1 時間静置した後、100µg/ml ampicillin を含む LB 寒天培地で 37°C、一晩培養後、コロニーをピックアップした。シークエンスにより K8.1A DNA 配列を正しく保持しているクローンを選択し、100µg/ml ampicillin と 2µM Biotin を含む LB 培地で 37°C、1 時間振とう培養後 100mM isopropyl thiogalactoside を加えてさらに 4 時間振とう培養を行い、組み換え蛋白質の発現誘導を行った。この組み換え蛋白質を C 末に付加した His tag をターゲットとした Ni-NTA カラム (QIAGEN)、または N 末に付加したビオチンをターゲットとした Softlink™ Soft Release Avidin Resin (Promega) を用いて添付の説明書に基づいて粗精製した。精製した蛋白質は抗 His tag 抗体を用いた western blot 法により確認した。

### B-6 ポリスチレンプレート ELISA

96 well flat bottom microplate の各 well に 0.1M

bicarbonate buffer (pH9.6) で希釈した粗精製蛋白質 400ng/ml を 100µl 加え 4°C で一晩インキュベートした。洗浄バッファー (0.05% Tween20/PBS) で洗浄後、200µl のブロッキングバッファー (1% BSA/PBS) で 37°C、2 時間ブロックした。各 well に 0.2% BSA/1% triton X-100/PBS で希釈した血清を 100µl 加え、37°C、4 時間インキュベートした。洗浄バッファーで洗浄後、50,000 倍に希釈した HRP 標識 Goat anti-human IgG Fc (Jackson) を 100 µl 加え、37°C、1 時間インキュベートした。洗浄バッファーで洗浄し、各 well に TMB (DAKO) を 100µl 加え、暗所で 10 分間静置し、1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を各 well に 100µl 加え反応を停止し、マイクロプレートリーダーを用いてブランクを対照として波長 450nm の吸光度を測定した。

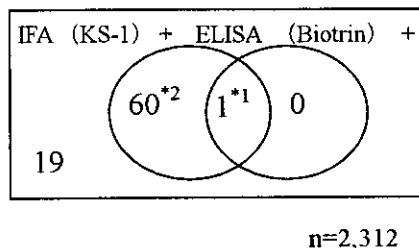
### B-7 Ni-NTA プレート ELISA

Ni-NTA HisSorb plate (QIAGEN) は Ni イオンと His tag が強い親和性をもつことから、組み換え蛋白質の His tag 修飾側をプレート方向に向けて固定できるプレートである。Ni-NTA HisSorb plate の各 well に 0.2% BSA/1% triton X-100/PBS で希釈した粗精製した蛋白質 40ng/ml を 100µl 加え 4°C で一晩インキュベートした。以下、ポリスチレンプレート ELISA と同様に行った。

## C. 研究結果

### C-1 献血者群、頻回輸血患者群における HHV-8 抗体陽性率の調査

IFA (TY-1) を用いて献血者群、頻回輸血患者群における HHV-8 抗体陽性率の調査を行い、陽性となった検体については IFA (KS-1) と ELISA (Biotrin) とで検査を行った。IFA (TY-1) で検査した計 2,312 例のうち陽性は 80 例 (3.6%) であり、このうち IFA (KS-1) 陽性は 61 例 (IFA (TY1) 陽性の 76.3%)、ELISA (Biotrin) 陽性は 1 例 (IFA (TY1) 陽性の 1.3%) のみであった (Fig. 1)。このうち健常献血者群 1,868 例では 49 例 (2.6%) が IFA (TY-1) 陽性を示し、このうち 38 例 (2.05%) が IFA (KS-1) で陽性、さらに 1 例 (0.05%) のみが ELISA (Biotrin) でも陽性であった。HCV 陽性献血者群 100 例、HBV 陽性献血者群 100 例、TP 陽性献血者群 100 例、HIV 自己申告者群 55 例、HIV 陽性献血者群 5 例での IFA (TY-1) 陽性はそれぞれ 5 例 (5%)、3 例 (3%)、



\*1: Healthy donor n=1

\*2: Healthy donors n=38, HCV positive donors n=2  
HBV positive donors n=3, TP positive donors n=5  
HIV call back donors n=2, Multi-transfused patients n=10

Fig. 1 IFA (TY-1) 陽性検体の確認検査結果

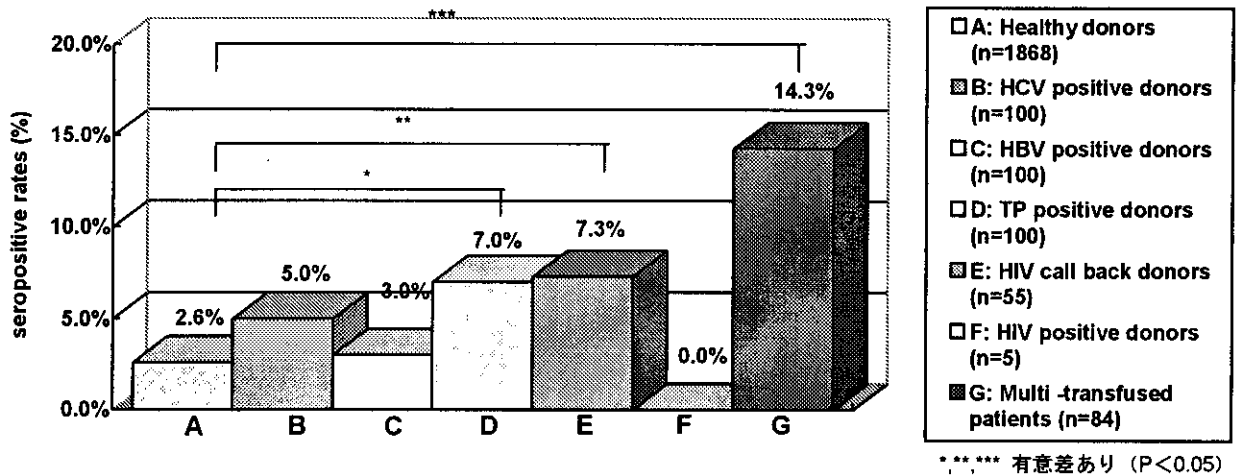


Fig. 2 IFA (TY-1) を用いた献血者、頻回輸血患者における HHV-8 抗体陽性率

7 例(7%)、4 例(7.3%)、0 例であった。このうち IFA (KS-1)も陽性を示したのはそれぞれ 2 例(2%)、3 例(3%)、5 例(5%)、2 例(3.6%)、0 例であり、ELISA (Biotrin)陽性は 1 例もなかった。一方、頻回輸血患者群 84 例では 12 例(14.3%)が IFA (TY-1)陽性を示し、このうち 10 例(11.9%)が IFA (KS-1)でも陽性を示した (Fig. 2)。

### C-2 HHV-8 膜蛋白質 K8.1A の発現と精製

目的の K8.1A の DNA 配列を保持したクローンは、検査した 3 クローンの全てに確認されたが、そのうち His tag の DNA 配列も保持したクローンは 1 クローンのみであった。このクローンを組み込んだ大腸菌を大量培養し、K8.1A 組み換え蛋白質を得た。Ni-NTA カラム、または Softlink™ Soft Release Avidin Resin により精製した K8.1A 組み換え蛋白質の精製物を western blot 法を用いて比較すると Ni-NTA カラムの方が高い回収率を示した(データは示さず)。以下の検討には Ni-NTA カラムで精製した蛋白質を使用した。

### C-3 HHV-8 膜蛋白質 K8.1A を固相した ELISA

Ni-NTA カラムで精製した K8.1A 蛋白質を用いて ELISA の作製を試みた。ELISA に用いたプレートはポリスチレンプレートとプレートに Ni-NTA を固相した Ni-NTA HisSorb プレートの 2 つを用いた。18 例の IFA (TY-1)陰性検体を測定した結果、ポリスチレンプレート、Ni-NTA HisSorb プレートの各吸光度の平均値はそれぞれ 0.24、0.49、SD は 0.077、0.17 を示したため、陰性群の平均値+4SD に相当する陰性コントロールの平均値の 2 倍を暫定的な cut off 値として設定し、吸光度を cut off 値で割った値 (cut off index) が 1 以上のものを陽性と判定した。

希釈した陽性対照を用いて IFA (TY-1)、ポリスチレンプレートを用いた ELISA、Ni-NTA HisSorb プレートを用いた ELISA の 3 法の感度比較では IFA (TY-1)が最も感度がよく、1280 倍希釈した陽性対照まで陽性と判

Table 2 3 法の感度比較

P.C dilution	Ni-NTA HisSorb プレート ELISA*	ポリスチレンプレート ELISA*	IFA (TY-1)
X 40	3.46	2.08	+
X 80	2.20	2.66	+
X 160	1.02	0.99	+
X 320	0.62	0.37	+
X 640	0.39	0.47	+
X 1280	0.33	0.60	+
X 2560	0.38	0.61	+/-
X 5120	0.34	0.27	N.D.

網掛け: 陽性

\*Cut off index (Cut off 値は陰性コントロールの平均値の 2 倍)

Table 3 一般検体スクリーニング結果 (n=71)

	Ni-NTA HisSorb プレート ELISA	ポリスチレンプレート ELISA	IFA (TY-1)
+	0	1*	0
-	71	70	71

\* ポリスチレンプレート ELISA での Cut off index: 1.07  
Ni-NTA プレート ELISA での Cut off index: 0.89

定できた。2 つの ELISA はほぼ同等の感度であったが、Ni-NTA HisSorb プレートを用いた ELISA の方が若干感度がよく 160 倍希釈した陽性対照まで陽性と判定できた (Table 2)。この 2 つの ELISA を用いて 71 例の献

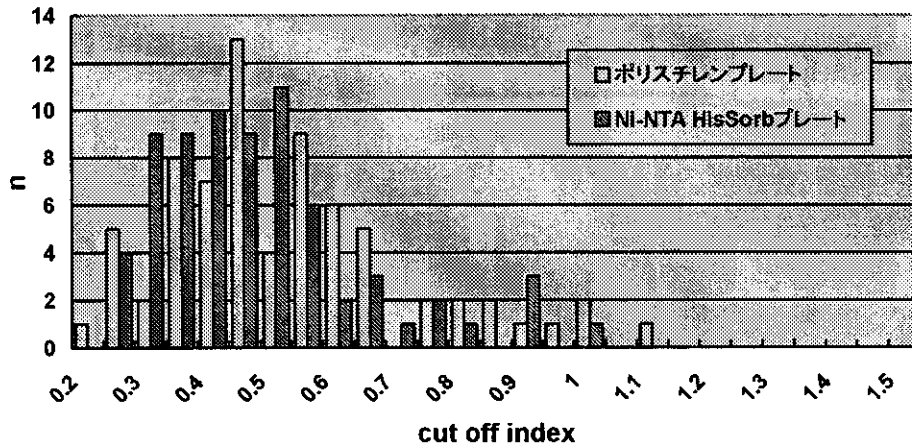


Fig. 3 自家製 ELISA の cut off index 分布

血者群の抗体スクリーニングを実施した (table 3, Fig. 3)。71 例中で陽性を示したのはポリスチレンプレート ELISA で 1 例のみであった。このときの cut off index は 1.07 で、Ni-NTA HisSorb プレート ELISA での cut off index は 0.89 であった。並行して IFA (TY-1) を行ったところ、全て陰性であった。また、健常献血者群から検出された IFA (TY-1)、IFA (KS-1)、ELISA (Biotrin) 3 法陽性の 1 検体はこの K8.1A 固相 ELISA 2 法とも陰性となった。

#### D. 考察

HHV-8 抗体陽性率の調査において、IFA (TY-1) では健常献血者群に比べ TP 陽性献血者群、HIV 自己申告者群、頻回輸血患者群間で有意差が認められたが、IFA (KS-1) では健常献血者群に比べ頻回輸血患者群間でのみ有意差が認められた。今回の検討において、IFA (TY-1) と IFA (KS-1) の結果に一部乖離が認められたが、HHV-8 抗体陽性率は健常献血者が 2.05 ~ 2.6%、頻回輸血患者では 11.9 ~ 14.3% と両法共に頻回輸血患者において高い傾向が認められた。しかし、ELISA (Biotrin) の結果においては IFA (TY-1) 及び IFA (KS-1) の結果に比べ著しい乖離が認められた。HHV-8 抗体陽性を確認するための標準検査法がないためどの検査法の陽性例が真の陽性かを確認することはできなかった。したがって、今回の調査では献血者における HHV-8 陽性頻度についての正確な評価はできなかった。我々の結果と同様な成績は幾つかの論文でも報告されており、それを裏付ける結果となった。これら検査法による結果の乖離の原因として、自家製の IFA で用いている細胞が PEL 患者群由来の TY-1 であり、市販の IFA ではカボジ肉腫患者検体由来の KS-1 であるという細胞株自体の違いが考えられる。使用する細胞株が異なる場合、細胞中に発現しているウイルス抗原の種類が質的、あるいは量的に異なっている可能性があり、それが抗体の反応性に影響を及ぼして乖離が生じている可能性が考えられる。また、他のヘルペスウイルスに対する抗体が交差反応を起こしている可能

性もある。なお、市販 ELISA は HHV-8 の構造蛋白質に対する抗体の検出が可能ないように数種類の HHV-8 特異的なペプチドを固相しており、他のヘルペスウイルスとの交差反応は起こさないことが確認されているが、感度特異性については、明確な評価はまだされていない。

そこで特異性に優れ、大量検体スクリーニングが可能な HHV-8 抗体検出系を開発するため、HHV-8 の膜蛋白質である K8.1A の組み換え蛋白質を発現させて ELISA 測定系の作製を試みた。ELISA の固相は通常のポリスチレンプレートに吸着結合する方法と、Ni-NTA が結合したプレートを用いて His tag を付加した組み換え蛋白質を特異的に結合する方法の両者について比較検討した。HHV-8 陽性対照の検出感度はどちらのプレートを用いた ELISA でもほぼ同等であったが、IFA (TY-1) より 8 ~ 16 倍低い結果となった。これは固相抗原に HHV-8 特異蛋白である K8.1A の 1 種類しか用いていないことが原因である可能性が考えられた。また、健常献血者群 71 例を用いたスクリーニングを行った結果、ポリスチレンプレート ELISA で 1 検体のみ陽性となったものがあつたが、IFA (TY-1) で明らかな陰性となったことから非特異反応であったと考えられる。また、計 2,312 例のスクリーニングで IFA (TY-1)、IFA (KS-1)、ELISA (Biotrin) 3 法陽性となった 1 例は、この K8.1A 固相 ELISA では陰性となったが、その理由として ELISA の感度が低いためこの検体を検出できなかった可能性が考えられる。自家製 ELISA の感度不足、また非特異の原因として、組み換え蛋白質の精製が不十分であることが考えられる。抗原蛋白質の精製度を上げることにより ELISA の特異性、及び感度が向上することが予測される。

ELISA の最適な条件設定、測定法の評価を行うためには HHV-8 抗体陽性検体を多数確保することが最重要課題である。

#### E. 結論

IFA (TY-1) 及び IFA (KS-1) を用いた HHV-8 抗体陽

性率は、健常献血者の 2.05～2.6%に比べ頻回輸血患者では 11.9～14.3%と高い傾向が認められた。しかし、これらの IFA 陽性例のうち ELISA 陽性例はわずか 1 例 (0.05%) と著しい結果の乖離が認められた。現段階では真の陽性を決定する標準法が確立されていないため、これらの結果より献血者における HHV-8 抗体陽性頻度の評価を行うことは困難と考えられた。そこで、より特異性に優れ、多数検体スクリーニングが可能な HHV-8 特異的膜蛋白質 K8.1A を用いた ELSA の開発を試みたが、IFA (TY-1) より 8～16 倍感度が低く、特異性についても十分な評価を行っていないため、今後更なる検討が必要と考えられる。ただし、HHV-8 抗体測定系においては golden standard が存在しないことや、陽性検体も入手困難等の問題があるため、それらの問題を解決していくことが検査法を確立していく上で重要と考えられる。

**F. 研究発表**

該当なし

**G. 知的所有権の取得状況**

該当なし