

表3 セロディア HIV-2 が陽性であった検体のHIV-1/2、HIV-1 PA価

日赤No.	セロディア HIV-2	ジェネディア HIV-1/2	セロディア HIV-1
Y3-8	× 32	× 10 <sup>4</sup>	× 10 <sup>4</sup>
Y3-18	× 32	× 10 <sup>5</sup>	× 10 <sup>5</sup>
Y3-24	× 32	× 10 <sup>4</sup>	× 10 <sup>4</sup>
Y3-34	× 32	× 10 <sup>5</sup>	× 10 <sup>5</sup>
Y3-37	× 4096	≧ 10 <sup>5</sup>	≧ 10 <sup>5</sup>

表 4 HIV検査陽性検体52例の血中ウイルス量

RNA量 (copies/ml)	検体数
400以下 (標準法、検出限界以下)	1
400~10000未満	18
10000~100000未満	28
100000以上	5
合 計	52

表5 献血血液におけるHIV-1検査陽性

検体のサブタイプ(2003年)

合 計	HIV-1サブタイプ (env C2V3)			
	B	E	A	C
52	49	1	1	1

## B型肝炎ウイルス抗原新規 WHO 国際標準品の制定および国内標準感度パネル整備の必要性について

分担研究者：竹森利忠（国立感染症研究所免疫部・体外診断薬委員会）  
研究協力者：水落利明（国立感染症研究所細菌・血液製剤部・体外診断薬委員会）

2001年6月から同年11月にかけて、厚生労働省審査管理課指導のもと、当時販売されておりまたその後も販売継続を予定していた約40種類に及ぶHBs抗原検出キットについて、国立感染症研究所体外診断薬委員会による性能検査が実施された。その結果は厚生労働省安全性情報、および学会誌等（臨床病理 vol.49 p.917-924、医学検査 vol.50 p.1495-1503、Japanese Journal of Infectious Diseases vol.54 p.201-207）にすでに発表されている。この再検査の当初の目的は、近年において抗原検出技術が格段に向上したことを鑑みて、それらのキットの検出感度および特異性についての最新情報を収集し、それらを医療関係者に対して適切に提供することであった。その結果、同一原理に基づくにもかかわらず明らかに感度が低いキットについては自主的に製造販売が取り下げられたケースもあった。ところが、そのような再点検実施の際に、各キットにおけるHBs抗原最小検出感度の表記単位が統一されていないことが明らかとなった。つまり各社のキット添付文書における「ng/ml」と「IU/ml」が混在していることが示された。WHOは以前より「IU/ml」を推奨してきたが、米国あるいはEUにおいては依然として「ng/ml」が主流となっている。異なるキット間での感度を比較する場合に、このような単位の不統一が支障となることは明らかで、速やかな統一が望まれる。そんな折り、本年（2003年）10月にWHO（ジュネーブ）で開かれた国際会議において、新規のHBs抗原国際標準品（33IU/vial, subtype: adw2, genotype: A）が制定された。そして同時に、今後は「ng/ml」を用いずに「IU/ml」に統一することが米国、EUを含めた各国により承認された。したがって、今後は国内で販売されているHBs抗原検出キットの添付文書において、最小検出感度は「IU/ml」で表記されることが望まれる。そのためには「IU/ml」表示による国内標準感度パネルの作製が必須であろう。現在国立感染症研究所で保有／供給しているHBs抗原国内標準品（102 IU/vial）は従来のWHO国際標準品を基準にして作製さ

れたものであるが、新規標準品との整合性も確認できている。従ってこの国内標準品をもとにして、国内標準感度パネルを作製することが可能であり、それを用いて国内で現在販売されているキットの最小検出感度を「IU/ml」に統一することができるだろう。

現在国内で使用されている HBs 抗原検出キットを手法／原理で分類した場合、EIA 法とイムノクロマト法がそれぞれ約 40%と 30%を占め主流となっている。このようにイムノクロマト法が EIA 法に比較して感度が低いにもかかわらず汎用されているのには（1）感度の違いが認識されていない（2）保険点数が低い（3）簡便に使用できるなどの理由が考えられる。ここで、（1）の理由でイムノクロマト法を使用しているのであれば、しっかりと情報を与え感度の違いを理解してもらうべきであるが、その一方で、単に感度が低いという理由でイムノクロマト法を排除することは早計であろう。測定機器を用いずに、また緊急な検査に対応できるイムノクロマト法の利点は無視できない。ただ、スクリーニングにはイムノクロマト法より EIA 法を用いることが、弱陽性検体を看過しないという目的からも理にかなっているだろう。実際に日本人間ドック学会では、HBs 抗原検査にはイムノクロマト法を用いないことが定められた。結局はユーザーがそれぞれのキットの利点／限界を理解して選択するべきであり、そのためにはより多くの情報を厚生労働省、日本医師会、日本臨床検査技師会、臨薬協などが連携してユーザーに提供することが必要である。従って今後は、HBs 抗原国内標準感度パネルを整備し、それを用いて各キットの最小検出感度を「IU/ml」で統一表示し、その情報を公開していくことが望まれる。HBs 抗原検出キットはそれらのほとんどが「定性キット」であることから、最小検出感度の表示は「定量キット」であるとの誤解を招く危惧がある。しかしながら、検査機関において同一原理／測定法に基づく異なったキットを用いての判定に乖離が生じた際には、それぞれのキットの感度を比較することができることは有意義であり、また異なった原理／測定法に基づくキット間での感度の違いを理解する上にも必要な情報であることには疑いがない。

現在ほとんどのキットが HBs 抗原の small particle に表現される”a”抗原決定基を検出する目的で製造されており、WHO 国際標準品も、すべての subtype, genotype に共通した”a”抗原をその主成分と考えている。しかし厳密には mutation あるいは genotype の違いによる抗原決定基の変化を考慮に入れる必要があり、将来は少なくとも genotype 別の HBs 抗原標準品の整備が必要になってくるだろう。

厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）  
分担研究報告書

血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

分担研究者 山口照英 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部長

【研究要旨】 血液製剤の精度管理法の開発を目的として、以下のような研究を行った。(1) ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発を目的として、ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮技術に関する検討を行った。PEI 磁気ビーズは、主としてエンベロープウイルスに対して優れたウイルス濃縮効果を示すこと、また 100 倍から 1,000 倍の濃縮効果をもたらすとともに検出限界の大幅な高感度化が可能であることを見出した。一方、スルホン酸磁気ビーズは PEI 磁気ビーズで濃縮できなかった非エンベロープウイルスにも適応可能であり、検出限界の高感度化も可能であった。これらのウイルス濃縮法は、遠心操作も必要なく短時間の操作でウイルスを濃縮することができるもので、簡便性・迅速性にも優れており、これらの濃縮法を組み合わせることにより、ウイルス検出のための核酸増幅法 (NAT) の高感度化が可能であることが示された。

研究協力者

岩田 明子 埼玉県赤十字血液センター  
研究員  
佐藤 功栄 埼玉県赤十字血液センター  
室長

防ぐことにある。血液製剤のウイルス安全性確保を目的として、平成 11 年に「血漿血液製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドライン」が策定され、また平成 14 年の薬事法改正に基づいて、血液製剤原料基準が策定されようとしている。この血液製剤原料基準において、HBV、HCV、HIV 等のウイルス血清学検査に加えて、HBV、HCV、HIV の NAT 導入を薬事法で求めることになる。また、安全性技術調査会においても、HBV、HCV、HIV の NAT ガイドラインの作成が行われている。

A. 研究目的

輸血用血液製剤や血漿分画血液製剤は国民の医療において重要な柱を占めており、その安全性や品質の確保に対する国民の強い要請があるとともに、そのリソースが限られていることから安定供給を計ることも求められている。血液製剤の安全性、特に感染性因子に関する最も大きな関心事は、HBV、HCV、HIV をはじめとするウイルス汚染をいかに検出し、その伝播を

そこで本年度は、NAT によるウイルス検出の高感度化を目指した基礎的検討を行った。このために、ポリエチレンイミン

磁気ビーズや2価イオンとスルホン酸磁気ビーズを組み合わせたウイルス濃縮法の開発を行い、磁気ビーズにトラップされたウイルスの核酸をPCRを用いて検出する手法の確立を目指した。

## B. 研究方法

### 1. ウイルスのポリエチレンイミン及びスルホン酸磁気ビーズによる濃縮

ポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズは、カルボキシル基を持つ磁気ビーズに、水溶性カルボジイミド存在下、平均分子量10,000のPEIをカップリングして作製した。同様にスルホン酸基の導入は、デキストラン硫酸を磁気ビーズに結合させて行った。

通常の実験では、100 $\mu$ L (5mgの磁気ビーズを含む)のPEI溶液を種々の濃度のウイルス液1mLないしは10mLに添加した。10分後に磁気ビーズを含む懸濁液を磁性スタンドにセットし、10分間静置した。10分後、上清を分取し、磁気ビーズを含む残液100 $\mu$ L及び磁気ビーズを添加する前のウイルス液100 $\mu$ Lの各液にウイルスゲノム抽出液 (EX-R&D、ゲノムサイエンス社)を加え、添付プロトコールに従ってウイルスゲノムを抽出した。

### 2. 1 PCR及びRT-PCR

抽出したDNAウイルスゲノムの検出は、表1のプライマーの組み合わせを用いて94 $^{\circ}$ C、30秒；56 $^{\circ}$ C、45秒；72 $^{\circ}$ C、60秒を35サイクルするPCR反応で行った。RNAウイルスの場合には、抽出したウイルスゲノム全量をTE液に溶解後、トリウイルス逆転写酵素を用いて42 $^{\circ}$ C、45分間のcDNA合成を行った。合成したcDNA

を鋳型として上記と同様のPCR反応を行い、増幅した。増幅産物は、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロミドないしはサイバークリーンによる染色後、目的バンドを確認した。

抽出したウイルスゲノムを定量するためにリアルタイムPCR及びリアルタイムRT-PCR反応を行った。用いたプライマーとプローブのセットは表2の通りである。プローブの記載されていないウイルスゲノムの検出には、サイバークリーンを用いて定量した。

### 1. 2 ウイルスの感染価の測定

ウイルス感染価は、それぞれのウイルスの指向性細胞に感染させて解析した。単純ヘルペスウイルスタイプ1 (HSV-1)、ポリオウイルス、水泡性口内炎ウイルス (VSV)、シンドビスウイルスはVero細胞を、ブタパルボウイルス (PPV)はESK細胞を、SV40ウイルスはCV-1細胞を用いてTCID<sub>50</sub>を求めた。

### 3. 倫理面への配慮

本年度は株化された培養細胞等のみを用いる研究を行い、研究内容の倫理的妥当性について倫理委員会等による審査・承認を特に得る必要はないものと判断した。

## C. 結果

### 1. ポリエチレンイミン磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

血液製剤の安全性確保に当たっては、ウイルス等の感染性因子の混入をいかに防ぐかが最重要課題となっている。そのためには、最も感度よくかつ非特異的な反応を抑えてウイルス等の感染因子の検出を行う必要がある。本年度は、モデルウイルス

を用いてポリエチレンイミン (PEI) 磁気ビーズが、主としてエンベロープウイルスの濃縮に有効であることを見出した。

Vero 細胞に感染させたシンドビスウイルス、ESK 細胞に感染させたブタパルボウイルス (PPV)、CV-1 細胞に感染させた SV40 ウイルスの上清を段階希釈し、その 100 $\mu$ L よりウイルスゲノムを抽出した。一方、それぞれのウイルス希釈液 1 mL に 10mg/0.1mL のポリエチレンイミン磁気ビーズを添加し、ビーズに結合したウイルスよりウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムを PCR あるいは RT-PCR 反応により検出した結果を図 1 に示す。SV40 ウイルスやシンドビスウイルスの場合、単なるウイルス培養上清の段階希釈液での検出限界に比較して、磁気ビーズでの検出限界は明らかに上回っていた。すなわち、磁気ビーズに結合したウイルスから抽出した試料の方が、より薄く希釈した試料からでもウイルスゲノムが検出され、効率よくウイルスが濃縮されていることが示された。一方、PPV ではこのような磁気ビーズによる濃縮効果は認められなかった。

次いで、ウイルス感染価を指標として PEI 磁気ビーズによる濃縮を検討した。Vero 細胞に感染させた単純ヘルペスウイルス (HSV)、ポリオウイルス、シンドビスウイルス及び水泡性口内炎ウイルス (VSV) の培養上清、並びに ESK 細胞に感染させたブタパルボウイルス (PPV)、CV-1 細胞に感染させた SV40 ウイルスの各 1 mL の培養上清に、PEI 磁気ビーズを添加して磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。さらに、PEI の濃縮を行った上

清に残存するウイルス力価を培養上清の力価と比較した。その結果を表 3 に示す。PEI 処理を行った SV40 ウイルス、HSV、VSV 及びシンドビスウイルスの上清のウイルス感染価は、元の培養上清に比べ非常に低下していた。従って、これらのウイルスの殆どが PEI 磁気ビーズに結合したと考えられる。一方、PPV 及びポリオウイルスでは、PCR による検出同様、PEI に結合していないことが明らかになった。

PEI 磁気ビーズのウイルス吸着能力を明らかにするために、ビーズの添加量と濃縮できるウイルス量との関係を調べた。10<sup>8</sup>から 10<sup>9</sup> コピー数の HSV-1 及びシンドビスウイルスを含む培養液に種々の濃度のビーズを添加し、ビーズに結合したウイルス量をリアルタイム PCR 及び RT-PCR により測定した (図 2)。添加したビーズ量が 0.1~10 $\mu$ L までは用量依存的にビーズに結合するウイルス量は増加するが、10~100 $\mu$ L では殆ど変化が認められない。したがって、以下の検討では、100 $\mu$ L のビーズを添加することとした。

次に、濃縮に及ぼす血清の影響について検討した。種々の濃度の血清存在下に、HSV-1、SV40 ウイルス及びシンドビスウイルスの濃縮を行った。図 3 に示すように、50%血清存在下で濃縮を行うとウイルス濃縮効率の顕著な低下が認められるものの、通常よく用いられる血清範囲 (10%以下) では濃縮効率の低下は認められなかった。

さらに、PEI 磁気ビーズを用いて定量的なウイルス濃縮の可能性と検出限界近くでのウイルス濃縮の可能性について検討した。図 4 に、HSV-1 やシンドビスウイ



ルスの培養上清の 1mL 及び 10mL から濃縮（10 倍濃縮及び 100 倍濃縮）を行った場合のウイルス検出の結果を示している。種々の希釈を行ったこれらのウイルスを PEI 磁気ビーズで濃縮すると、期待通りのウイルス量が検出された。特に RNA ウイルスであるシンドビスウイルスでは、100 倍濃縮を行った場合に 1,000 倍以上の濃縮効果が得られ、これはウイルス濃縮中に RNase のような阻害物質が除去されたためではないかと推定された。さらに、検出限界以下になるような希釈を行った場合にも、PEI 磁気ビーズを用いることにより、検出限界の高感度化が可能であった。

一方、複数のウイルスが共存した場合にも PEI 磁気ビーズによる濃縮が可能か検討した。図 5 に示すように、SV40 ウイルス、シンドビスウイルス及び HSV-1 を混合し、PEI 磁気ビーズによる濃縮を行ったところ、それぞれのウイルスが効率よく濃縮されていることが確認された。

## 2. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

PEI を用いてのウイルス濃縮において結合しなかったウイルスは、脂質膜を持たない非エンベロープウイルスである。そこで、スルホン酸磁気ビーズを用いた非エンベロープウイルスの濃縮作用について検討を行った。PEI の場合と同様に、各ウイルスを感染させた細胞 1mL の培養上清に 100 $\mu$ L のスルホン酸磁気ビーズを添加し、さらに 5mM CuSO<sub>4</sub> を添加した後、磁気ビーズ結合分画とその上清に分けた。培養上清 100 $\mu$ L 及びスルホン酸結合分画からウイルスゲノム DNA あるいは RNA を抽

出し、限界希釈法によりそれぞれのウイルスゲノムの検出を行った。図 6 に示すように、シンドビスウイルスの培養上清では 10<sup>-4</sup> まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では 10<sup>-4</sup> 希釈してもまだウイルスバンドは検出できた。また、PPV でも同様に、10<sup>-6</sup> まで希釈するとウイルスバンドの検出ができなくなるが、スルホン酸磁気ビーズに結合した分画では 10<sup>-6</sup> 希釈してもまだウイルスバンドが検出できた。さらに、ポリオウイルスの培養上清では 10<sup>-8</sup> 希釈した場合に殆どウイルスが検出できないが、スルホン酸磁気ビーズでは 10<sup>-4</sup> 希釈してもウイルスゲノムの検出ができた。

一方、スルホン酸磁気ビーズの濃縮を行った上清に残存するウイルス力価を培養上清の力価と比較した。その結果を表 4 に示す。スルホン酸磁気ビーズ処理を行ったシンドビスウイルス、PPV 及びポリオウイルスの上清のウイルス感染価は、元の培養上清に比べ非常に低下していることが確認された。

次いで、スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮の定量性と検出限界近くでのウイルス濃縮の可能性について検討した。図 7 に、ポリオウイルス及び PPV の培養上清を 1mL 及び 10mL から濃縮（10 倍濃縮及び 100 倍濃縮）を行った場合のウイルス検出の結果を示している。ポリオウイルスは効率よく濃縮されることが示され、また、検出限界の高感度化も認められた。一方、PPV では 10 倍濃縮した場合には理論通りの濃縮効果が認められたが、100 倍濃縮では目的とする濃縮効率は得

られなかった。しかし、100倍濃縮した場合には、検出限界の顕著な高感度化が認められた。

#### D. 考察

現在、ウイルス検出法として最も高感度な方法はPCR法などのNATを利用する方法である。しかし、ウインドウ期の存在やサンプリング上の問題もありNAT法を用いても必ずしもすべてのウイルスを検出できるとは限らず、さらなる高感度化が求められている。ウイルスやウイルスゲノムの濃縮には、従来、超遠心法やポリエチレングリコール法あるいはアルコール沈殿法などが用いられているが、超遠心法はHCVやHGV等のウイルスのようにウイルス粒子の比重が軽い場合などは適用が困難である。また、現在用いられている方法は操作が非常に煩雑であり、NAT法のような高感度検出系においては目的試料以外からの汚染の可能性も多くなるという大きな欠点がある。さらに、HTLV-I、IIのように対象とする細胞のごく一部にしかウイルスが感染していないようなケースにおいてもより適切な濃縮法の開発が望まれている。従って、出来る限り操作が簡便でかつ確実なウイルスあるいはウイルスゲノムの濃縮法はNAT法の高感度化には必須のテーマである。そこで、本研究では、NAT法によるウイルス検出の高感度化を目指してウイルス濃縮法の開発を行った。その結果、PEI磁気ビーズやスルホン酸磁気ビーズを用いて、エンベロープウイルスや非エンベロープウイルスを濃縮することができることを明らかにした。さらに、定量的PCR解析より、PEI磁気

ビーズを用いると、100倍から1000倍の濃縮が可能であることが示された。特に強調すべき点として、通常の操作では検出限界以下のウイルスしか存在しない場合にも、濃縮を行うことにより検出限界のさらなる高感度化が行えることが示されたことである。一方、PEI磁気ビーズを用いて濃縮できなかった非エンベロープウイルスを2価イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズを用いることにより、10・100倍ほどの検出感度の高感度化が可能であった。この検出限界の高感度化は、ウイルス検出において最も重要な要素であり、培養上清にわずかにしか含まれないようなウイルスでも、濃縮により確実にウイルスが検出できれば、ウイルス安全性は飛躍的に向上することが期待される。

#### E. 結論

(1) ウイルス等の感染性危険因子の高感度検出のための基盤技術の開発や評価方法に関する研究として、PEI磁気ビーズ及びスルホン酸磁気ビーズを用いたウイルス濃縮技術に関する検討を行った。PEI磁気ビーズは、主としてエンベロープウイルスに対して優れたウイルス濃縮効果を示すこと、また100倍から1000倍の濃縮効果をもたらすとともに検出限界の大幅な高感度化が可能であることを見出した。一方、スルホン酸磁気ビーズはPEI磁気ビーズで濃縮できなかった非エンベロープウイルスにも適応可能であり、検出限界の高感度化も可能であった。これらのウイルス濃縮法は、遠心操作も必要なく短時間の操作でウイルスを濃縮することができるもので、簡便性・迅速性にも優れており、

これらの濃縮法を組み合わせることにより、ウイルス検出のための NAT の高感度化が可能であることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表及び著書

- 1) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Uchida E, Hayakawa T: The role of c-Myc on granulocyte colony-stimulating factor-dependent neutrophilic proliferation and differentiation of HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 66:133-140, 2003
- 2) 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.* 26, 1065-1069 (2003)
- 3) Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T: CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J Cell. Physiol.* 195:119-129, 2003.
- 4) Niimi, S., Oshizawa, T., Yamaguchi, T., Harashima, M., Seki, T., Ariga, T., Kawanishi, T., Hayakawa, T.: Specific expression of annexin III in rat-small-hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 300, 770-774 (2003)
- 5) Iwata,A., Satoh,K., Yamaguchi,T., Tomoda,A.; Antiviral activity of 2-amino-4,4a-dihydro-4a-7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one on polyiovirus. *Tohoku J. Exp. Med.* 200, 161-165, 2003
- 6) Oshizawa,T., Yamaguchi,T., Suzuki,K., Yamamoto,Y., Hayakawa,T.; Possible Involvement of Optimally Phosphorylated L-plastin in Activation of Superoxide Generating NADPH Oxidase. *J. Biochem.*, 134, 827-834 (2003)
- 7) Sakurai F, Mizuguchi H., Yamaguchi T., Hayakawa T. Characterization of in vitro and in vivo gene transfer properties of adenovirus serotype 35 vector. *Mol. Ther.*, 8, 813-821 (2003)
- 8) Koizumi,N., Mizuguchi,H., Sakurai,F., Yamaguchi,T., Watanabe,Y., Hayakawa,T.; Reduction of natural adenovirus tropism to mice liver by fiber-shaft exchange in combination with both CAR- and v integrin-binding ablation. *J Virol.* 77, 13062-13072 (2003)
- 9) Satoh,K., Iwata,A., Murata,M., Hikata,M., Hayakawa,T., Yamaguchi,T.; Virus Concentration Using Polyethyleneimine-conjugated Magnetic Beads for Improvement of Sensitivity in Nucleic Acid Amplification Tests. *J Virol. Methods*, 114, 11-19, 2003
- 10) Ishii-Watabe I,A., Uchida,E., Iwata,A., Nagata,R., Satoh,K., Fan,K., Murata,M., Mizuguchi,H., Kawasaki,N., Kawanishi,T., Yamaguchi,T., Hayakawa,T.; Detection of Replication-Competent Adenoviruses Spiked into Recombinant Adenovirus Vector Products by Infectivity-PCR Combined with Glass Beads-Based DNA Extraction. *Mol. Therapy*, 8, 1009-1016 (2003)
- 11) Tomofumi Fujino, Yoji Sato, Mizuho Une, Toshie Kanayasu-Toyoda, Teruhide Yamaguchi, Koichi Shudo, Kazuhide Inoue, and Tomoko Nishimaki-Mogami; In vitro farnesoid X receptor ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.* In press
- 12) Xu,Z., Mizuguchi,H., Sakurai,F., Koizumi,N., Hosono,T., Kawabata,K., Watanabe,Y., Yamaguchi,T., Hayakawa,T. : Approaches to Improving the kinetics of adnovirus-delivered genes and gene products. *Adv Drug Del Rev.* In press.
- 13) 山口照英、内田恵理子：生物薬品のウイルス安全性を目的とした核酸増幅検査 (NAT) のフィージビリティースタディー. *医薬品研究*, 34, 763-769 (2003)

### 2. 学会発表

- 1) 藤野智史、宇根瑞穂、豊田淑江、山口照英、井上和秀、最上 (西巻) 知子：表面プラズモン共鳴センサーを用いた

- 核内受容体 FXR リガンド結合の測定. 日本薬学会 123 年会. (2003. 3. 23、長崎)
3. その他 なし
- 2) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T: Role of PKC $\alpha$  on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. The 6<sup>th</sup> World Congress on Inflammation. (2003. 8. 5 Vancouver, Canada).
- 3) Kanayasu-Toyoda, T., Oshizawa, T., Suzuki, T., Uchida, E., Hayakawa, T. and Yamaguchi, T Role of PKC $\alpha$  on G-CSF signaling pathway in differentiating HL-60 cells into neutrophils. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 16、横浜)
- 4) Fujino T, Sato Y, Une M, Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Shudo K, Inoue K and Nishimaki-Mogami T : In vitro FXR ligand sensor assay using surface plasmon resonance and based on ligand-induced coactivator association. 第 76 回日本生化学大会. (2003. 10. 17、横浜)
- 5) 有川稔多加、豊田淑江、山口照英、小村健、早川堯夫、森田育男 ; 血管内皮細胞化に伴う各種コネクシンの発現変化 第 24 回日本炎症・再生医学会. (2003. 11. 26、京都)

F.知的財産権の出願, 登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

表 1. PCR 及び RT-PCR に用いたプライマーセット.

	Primer set
HSV-1* <sup>1</sup>	5'-ATCCGAACGCAGCCCCGCTG-3' 5'-TCTCCGTCCAGTCGTTTATCTTC-3'
SV-40 * <sup>2</sup>	5'-ATAATTTTTTTGTATAGTAGTGCA-3' 5'-GGAAAGTCCTTGGGGTCTTCTTACC-3'
Sindbis virus	5'-GGATTGGSTTYGAYACCACYCAGTTCATGT-3' 5'-TGCCCYATGCGKAGYCCMGAAGAYCC-3'
VSV	5'-AGGATATGTCTACCAAGGCC-3' 5'-GGTTATTTTGCAGAGGTGTCC-3'
PPV * <sup>3</sup>	5'-TTGGTAATGTTGGTTGCTACAATGC-3' 5'-TATGTTCTGGTCTTTCCTCGCATC-3'
Poliovirus * <sup>4</sup>	5'-TGCGAGATACCACACAT-3' 5'-ATCATGCTTTC AAGCATCTG-3'

\*1-4: Each primer set was prepared according to the original papers: HSV-1 (Kessler et al., 2000), SV-40 (Fedele, 1999), PPV (Soares, 1999) and Poliovirus (Kilpatrick, 1998).

表 2. リアルタイム PCR に用いたプライマー/プローブセット.

	Primer and probe set
HSV-1	5'-GCGTCATGGTCATGGCAAG-3' 5'-TTGACTCTACGGAGCTGGCC-3' FAM-labeled 5'-TGGAGCTGATGCCGTAGTCGG-3'
Sindbis virus	5'-CAGGACGTCTATAACGCTCC-3' 5'-GAGAACATGAACTGGGTGGTGTC-3'
VSV	5'-AGGATATGTFCTACCAAGGCC-3' 5'-GGTTATTTTGCAGAGGTGTCC-3'
SV-40 virus	5'-ATAATTTTTTTGTATAGTAGTGCA-3' 5'-GGAAAGTCCTTGGGGTCTTCTTACC-3'
Poliovirus	

DNA and RNA from Sindbis virus, VSV and SV-40 virus were quantitatively determined using Syber Green PCR Master Mix™ (Applied Biosystems)

表3. ポリエチレンイミン磁気ビーズ処理による培養上清中のウイルス感染価の低下

		TCID <sub>50</sub> in Virus suspension (xlog <sub>10</sub> )
SV-40 virus	Applied Sample	7.8 ± 6.1*
	Upper layer treated with PEI-beads	3.0 ± 2.3
HSV-1	Applied Sample	7.8 ± 6.0
	Upper layer treated with PEI-beads	2.5 ± 1.5
Sindbis virus	Applied Sample	6.5 ± 4.8
	Upper layer treated with PEI-beads	3.3 ± 2.0
VSV	Applied Sample	8.6 ± 6.6
	Upper layer treated with PEI-beads	2.5 ± 1.8
PPV	Applied Sample	6.8 ± 5.3
	Upper layer treated with PEI-beads	6.6 ± 5.1
Poliovirus	Applied Sample	7.0 ± 5.7
	Upper layer treated with PEI-beads	7.0 ± 6.0

Means ± S.D. (n=4)

表4. Zn<sup>2+</sup>イオン存在下にスルホン酸磁気ビーズ処理を行うことによる培養上清中のウイルス感染価の低下.

		Concentration of Infectious Virus (x log <sub>10</sub> )
Sindbis virus	Applied Sample	6.5 ± 4.8
	Upper layer treated with PEI-beads	4.3 ± 2.0
PPV	Applied Sample	6.8 ± 5.3
	Upper layer treated with PEI-beads	4.5 ± 2.4
Poliovirus	Applied Sample	7.0 ± 5.7
	Upper layer treated with PEI-beads	3.3 ± 1.5

Means ± S.D. (n=4)

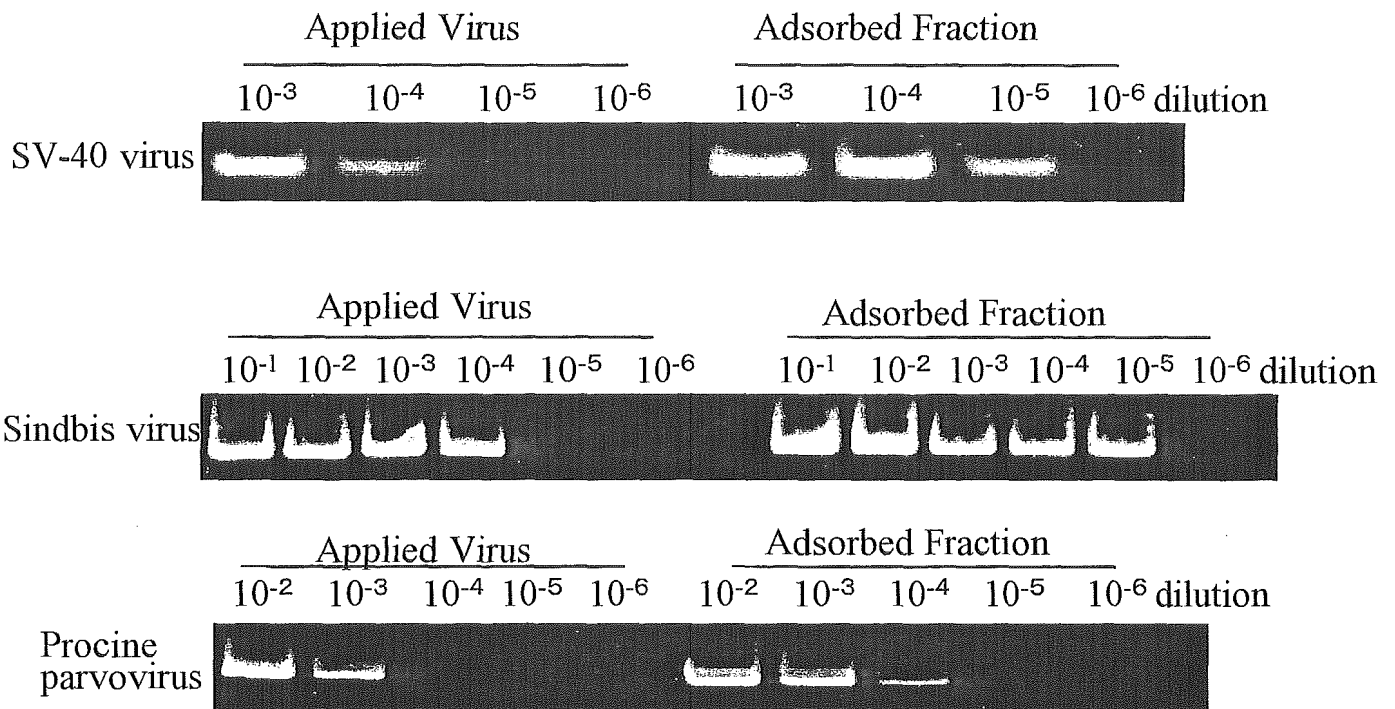


図1. ポリエチレンイミン (PEI)磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮  
 ウイルス上清の段階希釈液1mlをPEI磁気ビーズを用いて100 $\mu$ lに濃縮し、ウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムをPCRあるいはRT-PCRにより増幅した。

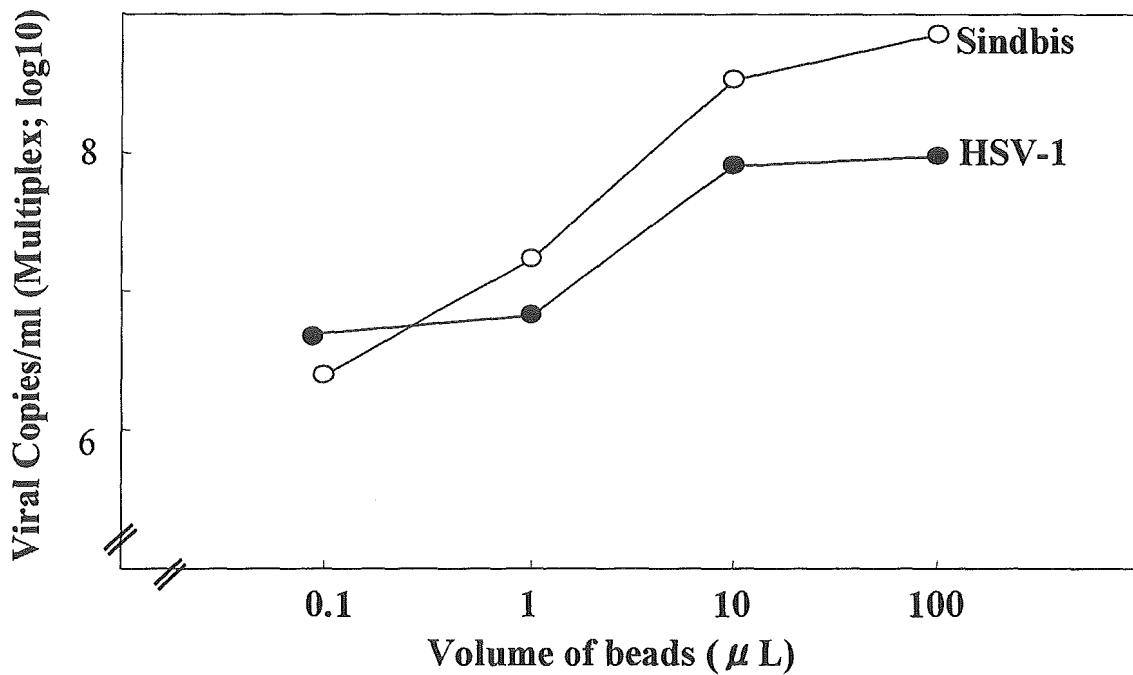


図2. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮の用量依存性

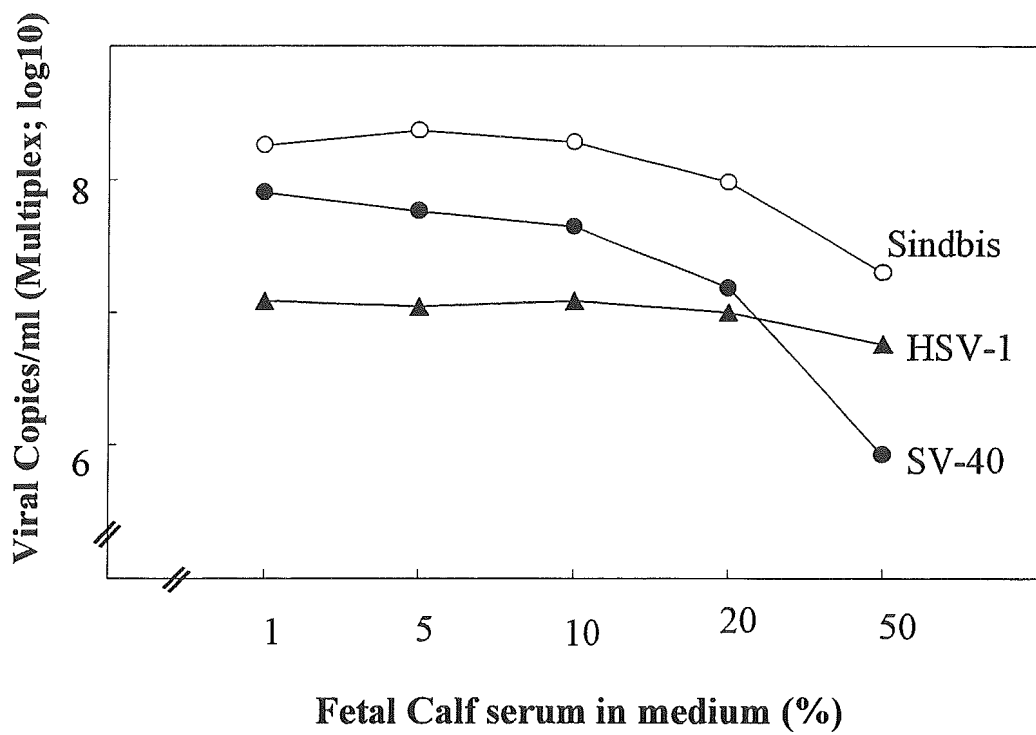


図3. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮に対する血清の影響



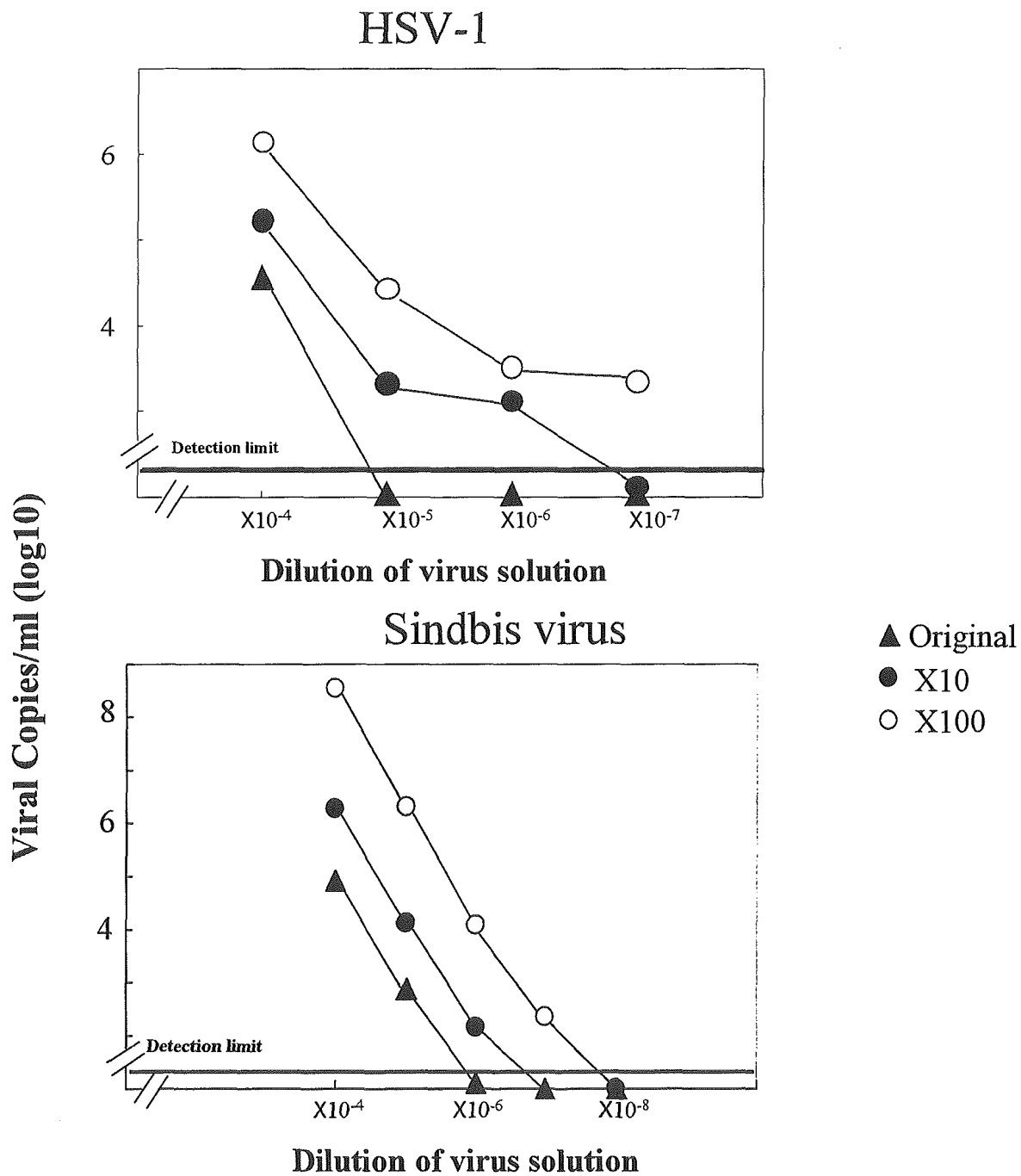


図4. PEI磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

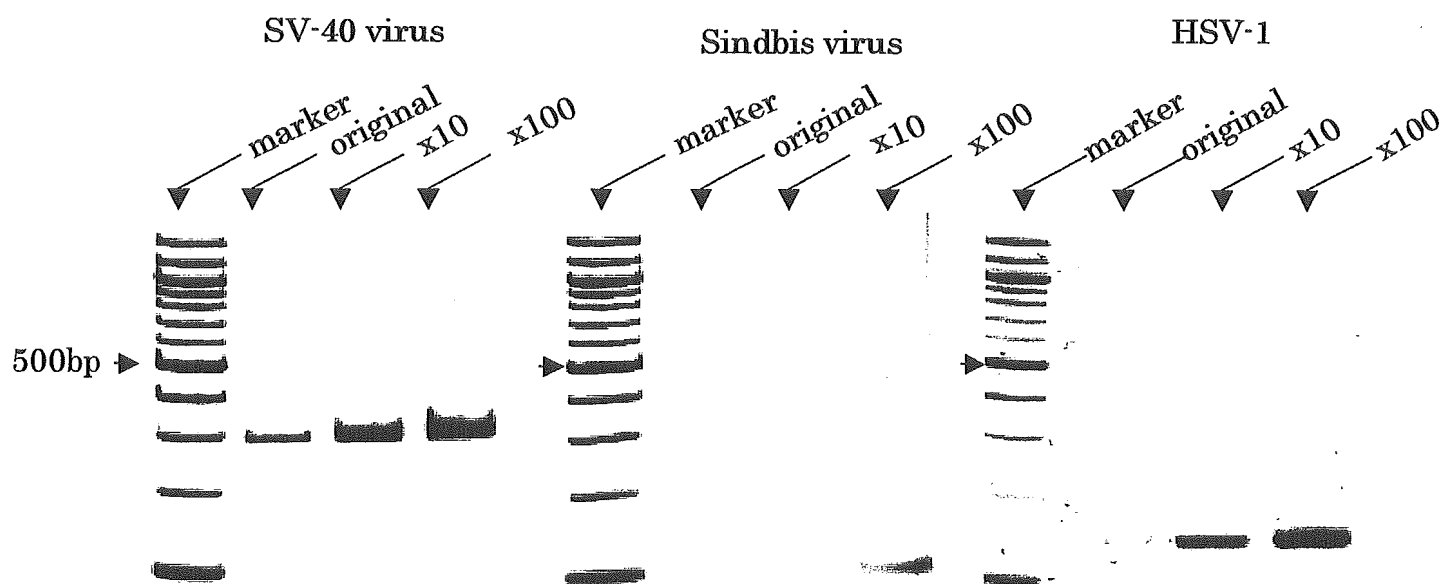


図5. 3種類のウイルスを混合した時のPEI磁気ビーズによるウイルス濃縮

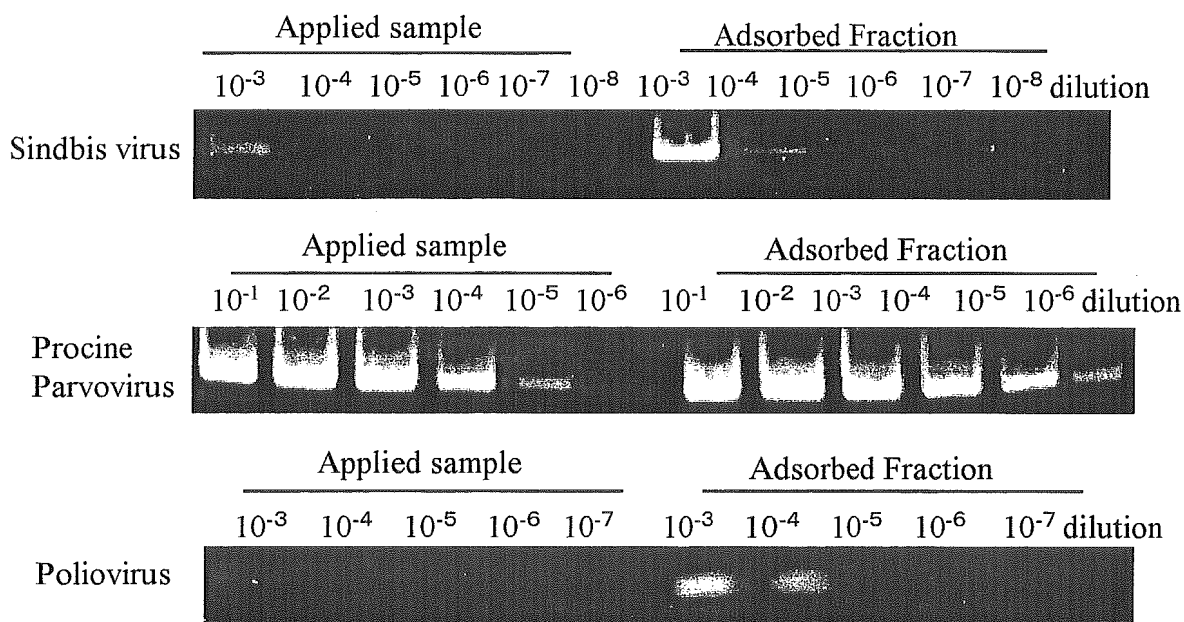


図6. スルホン酸磁気ビーズを用いたウイルスの濃縮

ウイルス上清の段階希釈液1mlをスルホン酸磁気ビーズを用いて100 $\mu$ lに濃縮し、ウイルスゲノムを抽出した。抽出したウイルスゲノムをPCRあるいはRT-PCRにより増幅した。

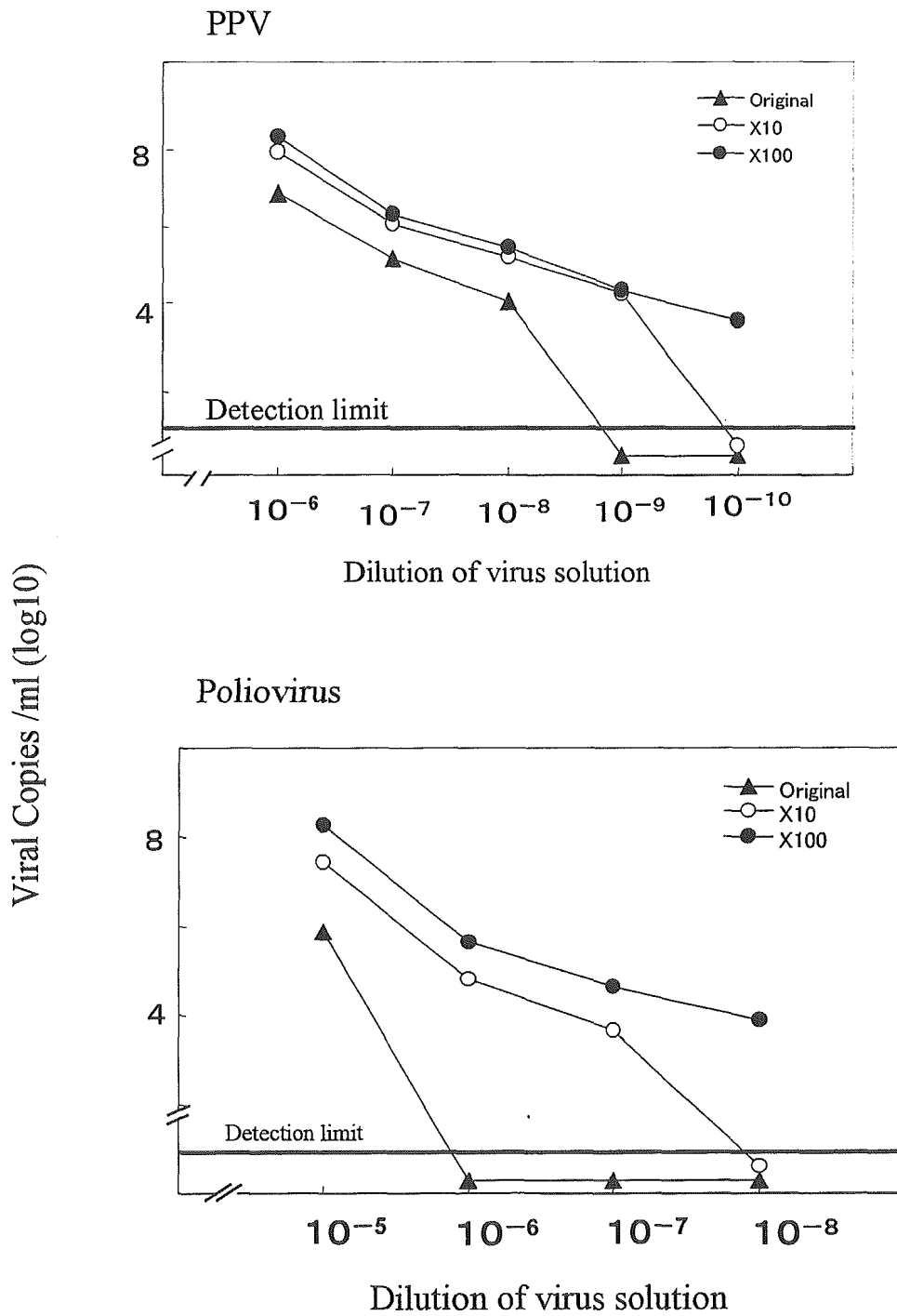


図7. スルホン酸磁気ビーズによるウイルス濃縮のリアルタイムPCRとリアルタイムRT-PCRによる解析

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金（医薬品等医療技術リスク評価研究事業）

分担研究報告書

安全な血液製剤を確保するための技術の標準化及び  
血液製剤の精度管理法の開発に関する研究

『安全な血液製剤の精度管理と安全性評価—  
血液保存バッグから溶出する可塑剤フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の  
リスクアセスメント』

主任研究者	広島大学医学部	吉澤 浩司
分担研究者	星薬科大学	中澤 裕之
研究協力者	星薬科大学	吉村 吉博
		井之上 浩一
		伊藤 里恵
		川口 研

研究要旨

本研究において、血液製剤の保存や輸血に利用されているポリ塩化ビニル製血液バッグに残留する化学物質について GC/MS 法によるスクリーニング試験を実施し、残留量からリスク評価の順位を決定した。リスク評価に基づき、最も使用頻度が高く、残留量も多いフタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP)の新規分析法を構築し、溶出挙動の解明を実施してきた。本法は、DEHP 及び代謝物である MEHP の同時分析が可能であることから、現在利用されている血液製剤 78 検体からの可塑剤の測定を行い、残留量と暴露量の調査研究を行った。結果として、血液製剤の種類や保存期間によって、可塑剤溶出が異なる傾向が観察された。また、溶出量では、DEHP の方が、MEHP よりも 10 倍以上高く、代謝での変換は少ないと推測できた。また、最も高濃度検出された検体：No.42 (DEHP: 83.2  $\mu\text{g/ml}$ )の 400 mL 採血由来の人全血液約 456 mL (抗凝固剤添加量を考慮)を全量投与したと仮定すると 37.9 mg の暴露となる。体重 50 kg の成人が本製剤を一回投与された場合、0.76 mg /kg weight /1 回の DEHP 暴露量になる。厚生労働省「医薬品・医療用具等 安全性情報 No.182 (2002)」でも取り上げている TDI: 40~140  $\mu\text{g /kg weight /day}$  をリスク評価の対象とし、概算値を算出すると、TDI に 1 回の血液製剤投与で十分に達してしまう。つまり、今後本製剤を利用するにあたり、リスクとベネフィットを十分に考慮する必要性があると思われる。