

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

血液でのプリオンタンパクの存在様式の解析と

血液製剤からのプリオン除去の研究

平成14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成17(2005)年3月

目 次

- I. 総合研究報告書
血液でのプリオンタンパクの存在様式の解析と血液製剤からの
プリオン除去の研究 P1-P10
岡田 義昭

- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 P11

- III. 研究成果の刊行物・別冊 P12-21

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全性高度化推進研究事業)

総合研究報告書

血液でのプリオンタンパクの存在様式の解析と血液製剤からのプリオン除去の研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨 本研究班はこれまでのプリオン研究が主に神経学からの視点で実施されてきたことを踏まえ、血液の安全性を確保するためには血液の視点からプリオンを研究することが求められている。これまでの感染実験や除去等が脳乳剤を用いて実施されており、血液を反映しているのか議論があるところであった。本研究では血液中の異常プリオンは感染細胞から産生される、という考えから「in vitro における感染系の確立」を中心に研究を実施し、幸いにも目標を達成することができた。これまでに「in vitro における感染系の確立」は特殊なスクレーピ株以外に報告されていない。14年度に感受性の高い細胞を得るために神経系由来の細胞株を検索し、既に感受性が有ることが知られている細胞株（マウスN2細胞）からは多数のサブクローンを分離した。また、血液中では血小板に正常プリオンが豊富に存在していることを確認した。15年度と16年度ではBSE由来の脳乳剤を用いて in vitro 感染実験を実施し、数種類の細胞株に1年以上の持続感染が確認できた。1つの細胞株はその上清中に、 $10^6/m l$ 以上の感染性の異常プリオンを含むことが明らかとなった（感染細胞の頻度は20倍対物レンズの一視野に数個程度であった）。ウイルス除去膜を用いて除去を試みたところ、一過性に感染価の減少は認められたことから培養上清中には大小様々な PrP^{Sc} が存在することが明らかになった。また、血球系細胞の中で、最も正常プリオンが多く存在する血小板に分化能を有する巨核球系の細胞株にも持続感染を成立させた。さらに、持続感染細胞株の培養上清をマウスリンパ球のサブセットに添加することによって、腹腔内に存在する細胞は異常プリオンに親和性が有ることを明らかにした。

分担研究者

水沢 左衛子 国立感染症研究所
主任研究官

永田 典代 国立感染症研究所
主任研究官

A.研究目的

日本において初めての変異型CJDと診断された症例が報告され、一方では牛海綿状脳症（BSE）と診断された牛は17頭になった。本研究では血液を介したプリオン病の感染を未然に防止するために、血液中 PrP^{Sc} がどのような形で存在しているの

か、また、血球系の細胞に感染又は結合するのか、等これまであまり研究されていない血液の視点から見たプリオン病の解析を目的としている。これまでの研究は神経学から見た研究が主に行われており、感染ハムスタ-由来の脳乳剤を使用した実験によって感染性や除去等の評価がされていた。しかし、BSE 由来と考えられているvCJDはリンパ組織からも異常プリオンが検出されることから古典的なCJDと同一に考えることは危険である。そのためにBSE由来の検体を用いた解析が必要である。しかし、得られる脳組織はわずかであり、また、脳乳剤が血液を本当に反映しているのか、という大きな問題点も存在する。in vivoの実験は小動物を使用せざるを得ないという制約と発症までに長時間を要することが大きな障害となっている。そのため、血液の安全性確保のためには血液中に存在している状態により近いモデルを作ることが必要であった。血液系や神経系の細胞株にin vitroにおいてPrP^{sc}を感染させ、感染細胞から培養液中に異常プリオンが産生される系が確立されれば、血液に極めて類似した感染モデルになるものと考えた。そこで、主に神経系由来細胞株、肺ガン細胞株、網膜芽腫などの正常プリオンタンパクの発現を解析し、発現量の多い細胞株を選んだ。さらに、正常血液中では血小板に多くプリオンが存在することから、血小板に分化傾向を示す巨核球細胞株CMKにも感染させ、異常プリオンの有無を検討した。

持続感染が成立すれば培養上清中にPrP^{sc}が存在する可能性と継代によって持ち込んだ脳乳剤の影響を除くことができる。また、動物を使用しないで異常プリオンの感染価が測定できれば除去・不活化法の効果が評価し易くなることも期待される。そこで、感染が確認された細胞株を継代し、持続感染の有無と異常プリオンの発現量の多い細胞株においては培養上清中の感染性プリオンを測定した。さらに、スクレーピー由来プリオン株に感染したマウスのin vivoにおける異常プリオン陽性細胞の分布を病理学的に検索した。また、感染マウス由来のリンパ球を各サブセットに精製して異常プリオンの蓄積しているサブセットや、非感染マウスから各リンパ球のサブセットを分離し、感染細胞株の培養上清を添加し、感染の有無を検索した。また、感染価の測定が可能になったので、分画製剤のウイルス除去工程で実際に導入されているウイルス除去膜による除去効果についても解析した。さらに、ストレスによって生体に誘導される分子STI1に注目し、正常プリオンとの結合性も検討した。

B.研究方法と結果

1. マウス細胞株を用いた in vitro 感染系の研究

これまでの報告からマウス由来の神経芽細胞種N2がPrP^{sc}に感受性を示すことが明らかになっていたので、N2細胞からより高感受性のクローンを選択するために10cmディッシュにN2細胞を播き、様々

な形態をとる細胞のコロニーをペニシリンカップを用いて分離・培養してクローンを得た。これらのクローンの細胞表面の正常プリオンタンパクの発現はフローサイトメトリーで解析し、同時にウエスタンブロットで細胞のプリオンタンパクの発現を解析した。N2 細胞は形態的に種々のクローンを含んでおり、様々な形態をとる細胞株が得られたが神経突起様の突起を出す細胞株と胞体が大きな細胞株の 2 つに分けられた。どのクローンも細胞表面にプリオンタンパクを発現していたがクローンによって発現量は異なっていた。こうして得たクローンにスクレーピー由来マウス馴化プリオン株と日本で発症した BSE 由来の各々の脳乳剤を添加し、感染させた。脳乳剤を添加した各細胞株を週 2 回の頻度で継代し、経時的に細胞を集め異常プリオンの検出を行った。2~2.5X10⁶ の細胞に対し、PK の濃度を各 20、40、80 μg/ml として 37℃、30 分間 PK 処理を行った。非感染細胞も同様な処理を実施し、正常細胞に発現している正常プリオンと異常プリオンとが区別可能な濃度を決定した。マウス細胞では 40 μg/ml の PK 濃度で処理を行った。PK 処理した検体はウエスタンブロット法を用い、検出にはマウス単クローン抗体の SAF70 と SAF84 を使用した。スクレーピーと BSE 由来プリオンに感染した各の細胞株を得ることができた。1 年以上継代を続けている細胞株からも異常プリオンが検出で

き、持続感染しているものと考えられた。また、それらの細胞培養上清中には他の非感染細胞に対して異常プリオンの伝達性が認められた。

2. ヒト細胞株を用いた in vitro 感染系の確立の研究

CJD や vCJD といったプリオン病は中枢神経系に異常プリオンが蓄積していることから、ヒトグリオーマ細胞株、網膜芽腫由来細胞株、神経芽腫、肺由来の小細胞癌細胞株、等の細胞株を選択し、正常プリオンの発現量をウエスタンブロットで測定した。発現量の多い細胞株を選び、BSE 由来脳乳剤を用いて感染させた。細胞と異常プリオンが結合し易いように最終濃度が 5 μg/ml になるようにポリブレンを添加した。週 2 回の頻度で脳乳剤を添加した各細胞株を継代した。経時的に細胞を集め、異常プリオンの検出を行った。2~2.5X10⁶ の細胞に対し、PK の濃度を各 20、40、80 μg/ml として 37℃、30 分間 PK 処理を行った。非感染細胞も同様な処理を実施し、正常細胞に発現している正常プリオンと異常プリオンとが区別可能な濃度を決定した。ヒト細胞では 80 μg/ml で PK 処理を行った。PK 処理した検体はウエスタンブロット法を用い、検出にはマウス単クローン抗体の 3F4、SAF70、SAF84 を使用した。脳乳剤添加 4 週後のグリオーマ由来細胞株において PK 耐性の異常プリオンが検出された。さらに継代を続け、10

ヶ月以上継代しても分子量 27-30Kd 付近に強いシグナルが検出され（しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できない）、BSE に持続感染していることが明らかとなった。週に 2 回の間隔で継代したことから最初の感染時に持ち込まれた脳乳剤を検出している可能性はない、と考えられた。なお、同時に感染させた他の細胞株においても持続感染が確認できた。

3. in vitro による感染価測定

2 で得られた感染細胞株の中で最も強く異常プリオンが検出されたヒトグリオーマ由来の細胞株の継代期間が感染後六ヶ月を過ぎ、週に 2 回の間隔で継代したことから最初の感染時に持ち込まれた脳乳剤は混入していないと考えられた。そこで、細胞株の培養上清を集め、段階希釈した上清を非感染細胞に感染させて感染価を求めた。希釈した培養液を添加してから 2、3、4、5、6 週後に細胞を回収し異常プリオンの感染の有無をウエスタンプロット法にて解析した。感染 2 週後より濃度の高い培養液を用いて感染させた細胞に陽性のバンドが確認された。4 週を過ぎると 10^{-5} においても PK 耐性のプリオンが検出された。これらから細胞培養液の感染価は 10^6 /m l 以上あることが示された。

4. ウイルス除去膜によるプリオン除去

3 において持続感染したヒトグリオーマ株は細胞培養上清中に高い感染性の異

常プリオンを産生していることが明らかとなったので、ウイルス除去膜による除去実験を実施した。前処置として、感染細胞株の培養上清を集め、10000 G、10 分間の遠心にて細胞残屑を除去後、0.45 μ m のフィルターで濾過した。20 nm 及び 35 nm のポアサイズのウイルス除去膜（プラノバ）に各々 3 m l の検体を濾過した。濾液を 3 で実施した様に段階希釈し非感染細胞に感染させ感染価を求めた。感染 2、3、4、5、6 週後に細胞を回収し、異常プリオンの感染の有無をウエスタンプロット法にて解析した。20 nm のウイルス除去膜を用いて処理した細胞培養液は、感染 4 週後では希釈倍率の高い検体において異常プリオンは検出されなかった。また、希釈倍率の低い検体の陽性シグナルも減少していた。しかし、感染 6 週後では希釈による差はなくなり、無処理の細胞培養液と比較しても差がなくなった。

5. 血液成分における正常プリオンタンパクの分布に関する研究

ヒトの血液から CD45、CD3、CD19、血小板、血漿などを分離、精製し PrP^c の発現をフローサイトメトリーとウエスタンプロット法で解析した。また、Megakaryocyte 様の性質を持つ細胞株も同様に PrP^c の発現を解析した。CD45、CD3、CD19、血小板での PrP^c の発現が確認されたが、主に血小板画分から検出された。血小板を除いた血漿中の PrP^c は

検出感度以下になった。Megakaryocyte 様の性質を持つ細胞株からも同様の PrP^c の発現が確認できた。

6. 白血病由来細胞株を用いた in vitro TSE 感染系

5 において血小板は豊富に正常プリオンを発現していることから、血小板を産生している巨核球も同様に高発現しているものと推定された。これまで我々が得ている感染細胞は神経系由来の細胞株が多く血球系での感染細胞株は得られていなかった。そこでの Megakaryocyte 様の性質を持つ細胞株であるヒト白血病由来細胞株 CMK85-2 と CMK85-L に BSE 感染脳乳剤を添加し、in vitro においてこれらヒト血球系細胞に感染が成立するか、検討した。感染後、週 2 回の割合で細胞を継代し、感染 15 日、35 日、141 日に細胞を集め、PK40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて 37 度 30 分間処理後、ウエスタンプロット法にて異常プリオンの有無を検索した。35 日後に約 30 kD の異常プリオンのバンドが検出され、以後 141 日目まで同様の陽性バンドが検出された。このことから CMK85-2 と CMK85-L は異常プリオンに持続感染しているものと考えられた。

さらに、CMK85-L の細胞培養上清をヒトグリオーマ由来の細胞株に添加し、異常プリオンの伝達性を検討した。実験に用いた細胞株は正常プリオンの産生が多いため、非感染細胞にも弱い PK 耐性

プリオンタンパクが検出されたが、CMK85-L の培養上清を添加した細胞において非感染細胞よりも強いシグナルが検出された。このことから CMK85-L の培養上清中には感染性の異常プリオンが産生されていると考えられた。

7. プリオン感染マウスにおける脾臓での PrP^{sc} 陽性細胞の解析

vCJD や遺伝的 CJD のマウス馴化株を用いた実験から白血球に感染性が証明されている。バツフィーコートには好虫球、リンパ球、単球などが含まれており、これらの細胞が感染又はキャリア-としてプリオンを運ぶ可能性がある。どのようなサブセットに感染細胞が存在するか免疫組織学的に解析した。スクレイピ由来プリオン株を接種した 148 日目のマウス（動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会規定に従い実施した）から脳と脾臓を摘出し、ホルマリン緩衝液にて固定後、ギ酸処理等によって PrP^{sc} を不活化した。121°C20 分のオートクレーブ処理後ウサギ由来の抗プリオン抗体で検出した。B 細胞領域の濾胞中心にのみ陽性細胞が検出された。陽性細胞のサブセットの解析を試みたがギ酸処理を行った組織切片では染色できなかった。そこで感染マウス由来の脾細胞を抗 Fc 抗体で処理後 Thy1、CD19、CD11b の各磁気ビーズを添加し、MACSMidi にて Thy1 陽性細胞、CD19 陽性細胞、CD11b 陽性細胞を各々分離した。分離された細胞は変性剤存在

下で $40\mu\text{g/ml}$ の PK にて 30 分処理し、DNase 処理後アルコールでタンパクを沈澱濃縮した。SDS-PAGE は 12%ゲルで電気泳動し、イモビロン膜 (ミリポア社) に転写した。検出はマウス単クローン抗体の SAF70 と SAF84 を用いた。CD11b 陽性細胞に分子量 27-30Kd 付近に強いシグナルが検出された。しかし、脳乳剤に認められるような 20Kd と 25Kd 付近のバンドは確認できなかった。

8. マウスリンパ球における異常プリオン親和性サブセットの解析

マウス脾細胞を抗 Fc 抗体で処理後 Thy1、CD19、CD11b、CD11c の各抗体が付いた磁気ビーズを添加し、MACSMidi にて Thy1 陽性細胞、CD19 陽性細胞、CD11b 陽性細胞、CD11c 陽性細胞を各々精製した。また、プラスチックディッシュに付着した細胞をマクロファージ、腹腔内洗浄液から回収した細胞を PEC (peritoneal exudative cell) として実験に用いた。分離した細胞群を各々 1×10^6 づつ 24 穴のプレートに播き、1 で得られたスクレーピー由来プリオン及び BSE 由来プリオンに持続感染している N2 細胞から調整した細胞培養液を 1ml 添加し、2-3 日間培養した。培養後、細胞を回収し、5 回細胞を洗浄することで培養液の持ち込みを極力減らした。凍結融解を 3 回繰り返すことで細胞を破壊し、非感染細胞の N2 細胞にポリブレン存在下に添加、培養した。感染 1 日後に培養

上清を吸引し、新しい培養液と交換した。感染、2、3、4、5、6 週後に細胞を回収し、異常プリオンの感染の有無をウエスタンブロット法にて解析した。cell lysate をもって感染させた N2 細胞は感染 6 週目において PEC 由来の lysate のみに異常プリオンが検出された。このことから血球系細胞には異常プリオンに親和性が有る細胞群が存在することが示唆された。一方、異常プリオンは感染早期に follicular dendritic cell (FDC) から検出されるために、FDC が産生しているケモカイン BLC (B lymphocyte chemoattractant) に対する各リンパ球サブセットの遊走性を解析した。FDC が BLC を産生することから脾細胞と PEC(peritoneal exudative cell) の BLC に対する遊走性を検討したところ、脾細胞にも遊走性が認められたが、PEC に高い遊走性が認められた。

9. 異常プリオン発現培養細胞のプリオンタンパク存在様式についての病理学的解析

BSE 由来ウシ異常プリオンに持続感染したヒトグリオーマ細胞株を用いて異常プリオンの局在を解析した。ラプテックチャンバースライドにて 2 日間培養後培養上清を捨て、4%パラフォルムアルデヒド固定を室温 30 分あるいは 4°C 一晩行った。1% (w/v) NH_4Cl in PBS で中和後、0.1% Triton X-100 in PBS にて 5 分間浸漬し、正常プリオンを除去するために 3M

guanidinium thiocyanate in PBS で5分間処理した。一次抗体として抗プリオン抗体の SAF32, SAF61, SAF70, PRI308, 3F4 モノクローナル抗体を用いた。抗マウス IgG ウサギ血清を二次抗体として引き続きストレプトアビジンビオチン複合 (sABC) 法を行った(LSAB キット、DAKO, Japan)。あるいは蛍光標識抗体 Alexa Fluor 546 goat anti-mouse IgG (H+L) (Molecular probes, Netherland) を二次抗体として用い蛍光免疫染色を行った。sABC 法による検出では、非特異反応が高かったが、蛍光免疫染色によって 3F4 モノクローナル抗体で異常プリオン抗原が細胞質に顆粒状に検出された。その検出頻度は 20 倍対物レンズの一視野に数個程度であった。

10.STI1 の発現とプリオンタンパクとの結合の解析

STI1(stress inducible protein 1)は正常プリオンのリガンドであることが最近報告された。正常だけでなく異常プリオンにも同様の結合性があれば血液製剤から異常プリオンを除去する有力な生体分子となる期待がある。そこでリコンビナントの STI1 を作り結合性を検討した。PCR によってヒトの STI1 遺伝子を増幅し、pEF6/V5-His6-TOPO にクローニングし、COS7 細胞にて発現させ、精製した。一方、ヒトプリオンタンパクを発現させた COS7 細胞をスライドガラスに固定し、精製した STI1 タンパクを反応させ、FITC 標識した抗 V5 抗体を

もって結合を解析した。また、逆に STI1 を発現させた COS7 に精製した PrP-HisTag を反応させ、FITC 標識抗 His-Tag 抗体で結合性を解析した。ヒトプリオンタンパクを発現させた COS7 細胞をスライドガラスに固定し、精製した STI1 タンパクを反応させ、FITC 標識した抗 V5 抗体を用いて結合性を検討したところ、周囲の細胞に比較して強い蛍光を発する細胞が存在した。逆の組み合わせにおいても同様の細胞が観察された。これらからヒト STI1 と正常プリオンが結合することが示唆された。

C. 考察

この研究班によってやらなければならない重要なことは、脳乳剤を使用しないで血液にできるだけ近いモデルを開発することであった。マウスの *in vivo* の実験から白血球に感染性があるとの報告や *in vitro* における少数の感染実験から、細胞に異常プリオンが感染する(いずれもスクレーピー由来のプリオン)と推定した。しかし、極限られたスクレーピー株の亜株のみだけが感染するとも言われていた。一方、BSE については *in vitro* における感染系の報告さえなかった。また、今後 vCJD や BSE の研究をする上で、検体が充分量入手できる可能性はない。以上の理由から、供与を受けた 1ml の脳乳剤を *in vitro* で増やす方法を開発せざるを得なかった。そこで中枢神経系由来の細胞株に感染させ、一過性の感染成

立を試みた。ヒトとマウスの各細胞株における正常プリオンの発現を比較したところ、全ての細胞株が発現している一方、マウスの細胞株は高発現していなかった。数種類のヒト細胞株に感染させたところ正常プリオンを最も多く発現している細胞株に感染が成立した。マウスN2細胞においてもスクレーピー及びBSE由来のプリオンが感染したがシグナルはヒト細胞株に比較して弱かった。感染に脳乳剤を用いていたので、添加した脳乳剤のプリオンを検出している可能性を否定するために長期にわたる継代を続けた。結果として、長期の継代によって脳乳剤のBSE由来異常プリオンがヒト細胞に馴化したと考えられ、その結果六ヶ月以上継代した培養液中には少なくとも $10^6/m l$ の感染性が認められた。この細胞株が得られたことで、培養によって大量の異常プリオンを得ることが可能になり、ほぼ同一の性質を持つプリオンを試験に用いることが可能になった。さらに、供与することも可能であるため、多くの研究者が利用できる。一番の利点は感染細胞から培養上清中に異常プリオンが産生されるため、血液中に存在する異常プリオンに極めて近いと考えられるからである。さらに、持続感染している細胞株とその親株の非感染細胞を組み合わせることによって、培養液に存在する感染価を *in vitro* で測定し、さらにウイルス除去膜による異常プリオン除去効果を検討することが

できた。最終的には *in vivo* 感染実験によって確認する必要があるが、6週間以内に *in vitro* での感染価を出すことが可能である。除去実験によって、20nmでは一過性に陽性シグナルが減弱することから20nm以上の大きさの以上プリオンは除去されるがそれ以下の小さなものは通過してしまうことが明らかになった。培養液中では大きさの異なる様々な異常プリオンが存在しているものと推定された。最終的には20nmよりも小さなプリオンが感染し差が消失するが、除去膜を使用することによって完全な除去は無理だが負荷を減少させることは可能だと考えられた。また、巨核球様のヒト血球系の細胞株においても持続感染を確認した。詳細な解析は今後の課題だが、血小板に正常なプリオンが豊富に存在することから、感染細胞を血小板に分化させ血小板中の異常プリオンの有無の検索は、今後プリオン病予防のために白血球除去が導入される予定のため、予防効果の点からも重要な課題となる。同様に、細胞株の培養上清とマウスから精製したリンパ球を数日間混合培養し、異常プリオンと親和性のあるマウスリンパ球サブセットを求めた実験から、マウスにおいては腹腔に存在する細胞群に親和性が認められた。親和性の有るこれらの細胞群に感染が成立するかは今後の課題であるが、細胞に異常プリオンを付着させてFDC等の細胞に運ぶメカニズムは感染成立や感染の

拡大に重要な意味を有しているものと考えられる。また、ヒトにおいても同様の細胞が存在するか、今後早急に解析し、白血球除去の有効性を高めるために貢献したい。

最後に、正常プリオンのリガンドが ST11 であるとの報告から、我々も正常プリオンでの結合を解析したが異常プリオンを用いた解析までは達しなかった。プリオン病を発症する以前の供血者における血液中の異常プリオンは非常に少ないと考えられ、スクリーニングによって検出することは現在の技術では困難である。その意味で有効な除去法の開発が望まれているが、ST11 は生体分子であることから異常プリオンとの結合が確認されたならば、有効な除去法の開発に貢献すると思われる。

D. 結論

1. BSE 由来の異常プリオンが持続感染するマウス及びヒト細胞株を複数（ヒト由来白血球細胞株を含む）作成した。
2. 培養上清中に高い感染価を有する異常プリオンを産生する細胞株を樹立した。
3. ウイルス除去膜を用いた解析から、培養液中には様々な大きさの異常プリオンが存在し、一部は除去可能であるが完全には除去できない。
4. マウスのリンパ球細胞を用いた検討から異常プリオンは PEC に親和性が

あることを見出した。

5. 持続感染している細胞株における感染細胞の頻度を蛍光抗体法を用いて評価したところ 20 倍対物レンズの一視野に数個程度であった。
6. stress inducible protein 1 と正常ヒトプリオンタンパクが結合することが示唆された。
7. スクレーピー由来マウスプリオンに感染したマウスは異常プリオンが脾臓の B 細胞領域の濾胞中心から検出され、磁気ビーズを用いて精製されたリンパ球のサブセットからは CD 11 b 陽性細胞から最も強く検出された。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、他：血液製剤の安全性のための核酸増幅検査（NAT）、臨床検査、第 48 巻、1125-1130、2004 年。

2) 岡田義昭：血液と血液製剤の安全性、サークルズ、6 巻、4-7、2004

2. 学会発表

1) Y.Okada: B19 infectivity assay with an epithelial cell line, International Scientific Working group on the Standardization of Genome Amplification Techniques for the Safety testing of Blood, tissues and organs with Regard to Blood Borne Pathogens. Paris May 2004

2) 岡田義昭、梅森清子、水沢左衛子、
山口一成：上皮性細胞株を用いたパルボ
ウイルス B19 の感染系の確立、第 52 回
日本ウイルス学会、2004 年

G. 知的所有権の取得状況

なし

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

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	巻号	ページ	出版年
岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、他	血液製剤の安全性確保のための核酸増幅検査（NAT）	臨床検査	第48巻	1125-1130	2004年
岡田義昭	血液と血液製剤の安全性	サークル	第6巻	4-7	2004年

特殊検査

血液製剤の安全性確保のための 核酸増幅検査(NAT)

岡田義昭¹⁾/水沢左衛子²⁾/種市麻衣子²⁾/
梅森清子²⁾/斉賀菊江²⁾/小室勝利³⁾

[SUMMARY] 血液製剤の安全性確保のために核酸増幅検査が導入され、これまでの血清学的検査では検出できなかった window 期の血液を排除することが可能になった。一方、核酸増幅検査は高感度であるが種々の条件によって感度が影響を受けるため、精度管理のための国際標準品が整備された。〔臨床検査 48:1125-1130, 2004〕

[KEYWORDS] 核酸増幅検査, window 期, ミニプール, 残存リスク

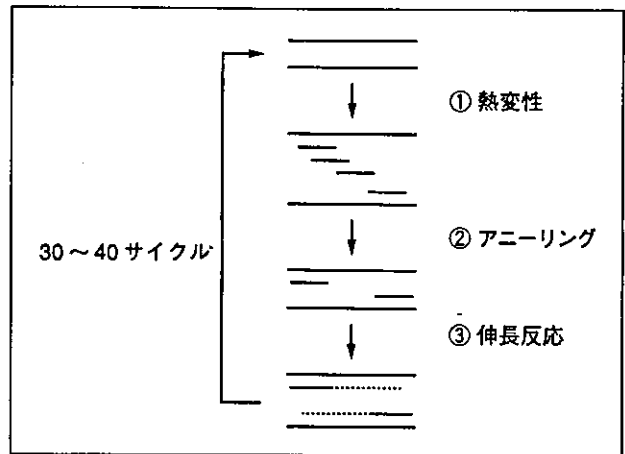


図1 PCR法の原理

はじめに

核酸増幅検査(nucleic acid amplification testing; NAT)は1980年代の代表的発明と呼ぶに相応しく、生物学ならびに医学分野の発展に大いに貢献し、また今後も貢献は続くものと考えられている。本稿では、特に輸血および血液製剤の安全性確保のために核酸増幅検査は必須なものになっているが、どのように応用され、貢献をしているのか、また感度や特異性などの核酸増幅検査の精度管理について解説したい。

核酸増幅検査の原理

核酸増幅検査はPCR法と同一だと思われているが、正確には核酸増幅検査の1つがPCR(polymerase chain reaction)法である。最初は核酸増幅検査といえばPCR法しかなかったが、

最近ではDNAを増幅するLAMP法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)やRNAを増やすTMA法(Transcription-Mediated Amplification)などが新たに開発されたので、方法は問わず核酸を増幅する検査は一括して核酸増幅検査(NAT)と呼ばれている。そうはいつても基本的原理はPCR法であるので、その原理を説明する。図1に示すように、ステップ①熱変性: 93~95°Cに加熱して2本鎖DNAを一本鎖にする。ステップ②アニーリング反応: 1本鎖になった鋳型DNAとプライマーが結合する。本来鋳型DNAは1本鎖に変性しても穏やかな温度下降によって相補的な配列同士が結合することで元の2本鎖DNAに戻る性質があるが、急激な温度の下降では塩基配列の短いプライマーが先に結合する。しかも鋳型DNAに比してプライマーは多量の分子数が存在するので、相補的な塩基配列によ

1) OKADA Yoshiaki 国立感染症研究所 血液・安全性研究部・室長

2) MIZUSAWA Saeko, TANEICHI Maiko, UMEMORI Kiyoko, SAIGA Kikue 同

3) KOMURO Katsutoshi 同・部長

り結合しやすくなる。プライマーの50%が相補的なDNAと水素結合対を形成し、残りのプライマーが遊離している状態の温度をTm値と呼び、通常Tm値の5°C前後低い温度でアニーリング反応は行われている。アニーリングの温度を高く変えることによって非特異的なシグナルを抑えたり、逆に温度を下げることで鋳型DNAといくつかの塩基配列が異なるプライマーを用いることによっても目的の遺伝子を増幅することが可能であったりする。ステップ③伸長反応：Taqポリメラーゼによって鋳型DNAの相補的配列に結合したプライマーがdATP、dGTP、dCTP、dTTPを基質にして5'から3'方向へDNAの合成が行われる。反応温度は通常72°Cである。伸長反応の時間は増幅する核酸の長さによって変わるが、通常の1k以下の場合には1分で行われることが多い。以上のステップ①～③を1サイクルとして30～40サイクル繰り返すことで、目的の遺伝子を約100万倍にまで増幅するといわれている。詳細な条件は用いるキットの添付文書を参照するとよい。

血液への核酸増幅検査の導入

通常、ウイルスに感染するとウイルスが増殖し発症するが(なかには感染しても発症しないですむヒトもいる。これを不顕性感染という)、やがてウイルスの感染力を中和してしまう抗体や感染細胞を破壊するCTL(cytotoxic T cell)が体内で作られるとウイルスは体から排除される。しかし、HIVやHCVではウイルスと抗体(この場合の抗体にはウイルス成分に結合できても感染を中和する能力はない)が共存する状態が維持され、持続感染となっている。逆に、これらのウイルスに対する抗体を検査すれば、ウイルスそのものを検出しなくても感染の有無をスクリーニングできることになる。日本においては、HIV-1の抗体スクリーニング検査は1986年から、HCVの抗体検査は1989年から献血のスクリーニング検査に導入された。すでに1972年より導入されていたHBs抗原スクリーニング検査と併せてHBV、HCV、HIVの3つのウイルスに対する血清学的検査が1989年より実施されている¹⁾。血清学的

検査法の改良による検出感度向上などによって、日本の輸血後肝炎の発生率は売血時代の50.9%から1995年前後には0.48%までに劇的に減少した¹⁾。一方、欧米諸国でも同様な血清学的検査が実施されているが、HIV抗体陰性の血液を輸血された患者がHIVに感染した症例²⁾やHCV抗体陰性の血液によってHCV感染が生じた症例³⁾が報告された。日本においても輸血によるHBVの感染例が報告されている。さらに1994年、米国の某企業がHCV抗体のスクリーニング検査が実施されているHCV抗体陰性の血漿を用いて製造した静注用ヒト免疫グロブリンによって、世界中で約200例のHCV感染者が発生する感染事故が報告された⁴⁾。最終製品を調査してみると、第2世代のHCV抗体測定キット(第1世代はNS4からNS5にかけてのHCV非構造蛋白を認識する抗体を検出し、第2世代はさらにコア領域に対する抗体を検出できる)を用いたにもかかわらず、25ロット中20ロットから核酸増幅検査によってHCV-RNAが検出された。また、ドイツのPaul-Ehrlich研究所から、第1世代のHCV抗体測定キットを用いてのスクリーニング検査に合格した85件の原料血漿から65件(76%)、第2世代のHCV抗体測定キットでは88件中46件(52%)でHCV-RNAが検出されたとの報告がなされた⁵⁾。これらの報告が意味することは、感染初期においては抗体出現までに時間を要するため、抗体検出が可能になる時期までウイルス陽性の血液を排除できないことであった。なお、感染してから血清学的検査が陽性になるまでの期間をwindow期という(後ほど解説するが、最近では感染初期において感染を検出できない期間をwindow期と呼ぶので、“血清学的window期”と呼んだほうが適切かもしれない)。このwindow期にある血液からウイルスを見つけだして排除することは、血液製剤の安全性確保の点から重要な問題である。どうしたら検出できるだろうか? 図2に模式的に示すように、HCVやHIVのwindow期のウイルス量は抗体陽性になる前のほうが多く、表1に示すように 10^7 gEq/mlに達する場合もある。これを可能にしたのが核酸増幅検査である。少量の検体からでもウイルス遺伝子を増幅できるため、微量なウイルスの混入を検

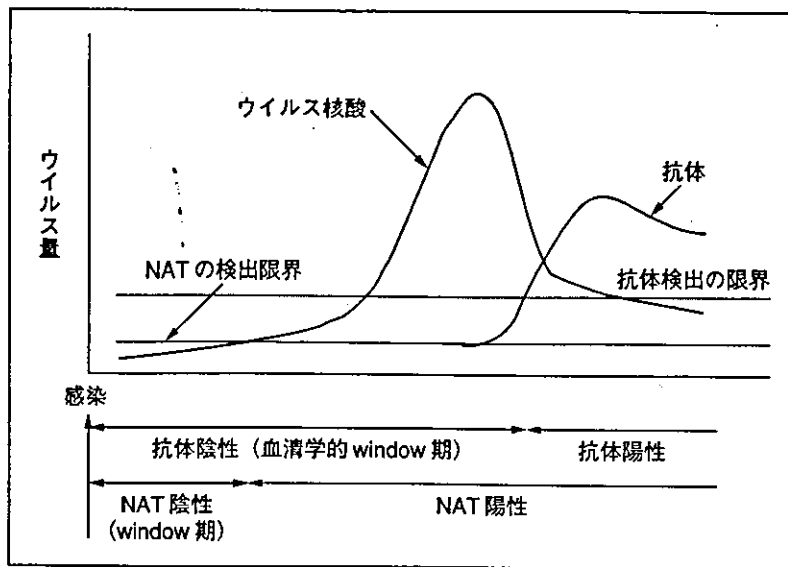


図2 HCVとHIV感染のwindow期

表1 核酸増幅法によるwindow期の短縮効果

	HIV	HCV	HBV
window期の期間(日)	22(6~38)	82(54~192)	59(37~87)
核酸増幅法によるwindow期の短縮(日)	11	59	25
window期のウイルス量(gEq/ml)	$10^2 \sim 10^7$	$10^5 \sim 10^7$	$10^2 \sim 10^4$
ウイルスのdoubling time	10~20時間	5.8~21時間	2.56~3.7日

[文献6~11)より引用して改変]

出することが可能である。しかし、核酸増幅検査は①血液からの核酸の抽出、②増幅反応、③増幅した目的遺伝子の検出、の3つのステップから成り立っている。どのステップも核酸増幅検査の感度や特異性を確保するために重要である。これらのステップを献血などの一検体ごとに実施することは、時間的にも経済的にも困難であった。しかし、window期のウイルス量が多いこと、および核酸増幅検査が高感度であることなどから、数十から100前後の検体を混ぜ合わせて検査用検体(ミニプールと呼ばれている)を作り、核酸増幅検査を実施することは可能である。日本をはじめ欧米の国では、この方法が輸血用血液や血漿分画用の原料血漿のスクリーニングに導入されている。ミニプールが陽性に出た場合にはさらに少数の検体でミニプールを作り検査を行い、最終的には陽性血漿を特定し排除している。こうすることで他のウイルスが混入していない血液を破棄することなく使用できる。

核酸増幅検査の有効性と限界

核酸増幅検査の導入によって、血清学的検査に比べてどのくらい安全性が向上するのだろうか？ Schreiberらは、表1に示すように核酸増幅検査によってもウイルスを検出できないwindow期は、HIVにおいて血清学的検査では平均22日が11日間短縮され、HCVでは平均82日が59日間短縮、HBVでは平均59日が25日間短縮されることが理論上期待できる、と報告している⁶⁾。また、このwindow期の短縮によってどれくらい血清学的検査をすり抜けたウイルス陽性血を排除可能なのかを検討し、HIVでは50%、HCVでは72%、HBVでは42.4%排除できると報告した⁶⁾。簡単にいえば、HCVでは核酸増幅検査の導入によって輸血(正確には成分製剤)によるHCV感染は4分の1に減らすことができ、HBVやHIVでも約半分に減少させることが期待できることになる。核酸増幅検査の検出感度が異なる可能性があるため、この報告がそのまま日本に当てはまるとは限らないが、日本赤十字社の

表2 核酸増幅検査のための国際標準品の性状

	HBV	HCV	HIV	B 19	HAV
genotype	A	1	B	—	—
Potency (IU/ml)	1×10 ⁶	1×10 ⁵	1×10 ⁵	1×10 ⁶	1×10 ⁵
Physical property	freeze-dried	freeze-dried	freeze-dried	freeze-dried	freeze-dried

(文献 13~16)より引用して改変)

報告では2000年2月から2002年5月末までの間に核酸増幅検査によってHBV 247検体、HCV 39検体、HIV 6検体の計292検体からおのこのウイルス遺伝子を検出した¹⁾。核酸増幅検査が導入されていなかったら、最悪の場合292人の患者さんが輸血後に感染した可能性があった。

一方、核酸増幅検査の導入によっても図2および表1に示すようにwindow期が存在する。先ほど挙げたwindow期の短縮は個別に核酸増幅検査を実施した場合の短縮可能な期間であって、現在行われている数十人の血液を集めた核酸増幅検査では、ウイルス陽性者の血液が数十倍に希釈されてしまうためwindow期は長くなってしまふ。どれくらい長くなるかはウイルスのdoubling time(ウイルスが2倍に増殖するのに要する時間)に関係し、HCVは5.8~21時間⁷⁾、HIVは10~20時間^{8,9)}と非常に速く増殖するため数日間の延長ですむ。一方、HBVでは2.56~3.7日^{10,11)}と増殖が遅いためミニプールを構成する人数の影響を受けやすい。そのため、日本では人口での感染率が欧米に比べて高いこともあって核酸増幅検査によって発見される件数も多いが、検査をすり抜ける可能性の血液もあり、現在でも輸血後のHBV感染が問題となっている。時間と費用の関係で今の時点では個別での核酸増幅検査は困難であるが、個別に実施しても、また、ウイルスの濃縮などによって感度を向上させることは可能だが、window期は短縮されても必ず存在すること、つまり残存リスク(residual risk)が存在することを忘れてはならない。

核酸増幅検査のための国際標準品の確立と精度管理

核酸増幅検査は、先ほど述べたように3つのステップから構成されおのこのステップが検出感度に重大な影響を与える。そのため、ウイルス検

出力はこれまでの検査法よりも優れているが、一般の臨床検査として、また、スクリーニング検査として確立するためには感度や特異性などの精度管理が重要な課題である。核酸増幅検査に関して検討され始めたころの1996年に実施されたA型肝炎ウイルス(HAV)の国際共同研究による感度測定を例とすると、この感度試験はHAV陽性血漿を10⁻³から10⁻⁸まで希釈した7つの検体と陰性コントロール3検体の計10検体から構成されるパネルを12の参加研究機関に送付し、ブラインドで試験を実施した。国際共同研究の特徴として、先ほど述べた核酸増幅検査の3つのステップは各研究機関に任されている。結果は感度の高い研究機関と低いところの間で約100倍の感度の差が認められたが、その一方で、ある濃度の前後に結果が集中することがわかった¹²⁾。この研究を実施したのはWHO International Working Group on the Standardisation of Gene Amplification Techniques for the Virological Safety Testing of Blood and Blood products(SoGAT)というWHOのワーキンググループである。また、血漿分画製剤は主に米国で採血された血漿を原料に製造され、世界に輸出されている。同様に、核酸増幅検査キットもいくつかの診断薬メーカーが製造し世界に供給されていることから、核酸増幅検査の精度管理のためにはすべての基本となる国際標準品の作成が必要になった。このワーキンググループはHAVでの共同研究と同様の方法を用いて、1997年に核酸増幅検査のためのHCV-RNA国際標準品を確立した¹³⁾。さらに続いてHBV-DNA¹⁴⁾、HIV-1-RNA¹⁵⁾、パルボウイルスB 19-DNA¹⁶⁾、HAV-RNAなどの国際標準品を確立していった。これらの国際標準品は英国のNIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)が管理し、有料だが購入することができる(www.nibsc.ac.uk)。国際標準品の性状を表2に示す。力価はIU(international

unit)になっている。これまではコピーや gene Equivalent が用いられていたが IU で統一された。核酸増幅検査では国際標準品の候補を $10^{0.5}$ づつ希釈して検出可能な最大希釈を統計処理し力価とした(つまり、 $100 \mu\text{l}$ の血漿を 10^5 倍まで希釈してもウイルス遺伝子が検出された場合、 10^6 IU/ml となる)からである。合成した核酸を用いれば質量からモル数を計算することが可能であるが、血漿中に存在するウイルス核酸はウイルスの構造蛋白内に存在するので抽出効率も考慮する必要性や血漿中に存在するウイルスが単一である保証はないこと、さらに核酸増幅検査は定性試験であることなどから IU は適切な単位と考えられている。また、表 2 をよく見ると genotype の記載がある。HBV, HCV, HIV の 3 つのウイルス (HAV や B 19 においても詳細に解析すれば存在する) は同じウイルスであっても地域や国によって塩基配列が異なるウイルス株が存在し、genotype や subtype と呼ばれている。表 3 に HBV の genotype の分布を示すが、国際標準品は主に欧米から分離される genotype A である。HIV-1 や HCV の国際標準品も同様に欧米に分布している genotype である。また、国際標準品は数千本作成されるが、世界の多くの研究機関や企業などからのリクエストがあるため感度の評価などに十分な量を得ることはできない。そこで、自国に分布する genotype を用いて国内参照品を作る必要がある。その場合、力価は国際標準品と国内標準品の候補とを同時に測定し、相対力価として決定される。日本においても HBV は genotype C, HCV は genotype 1b, HIV は genotype B の国内標準品が作られ、当局の国内標準品としての承認等が得られれば供与を受けることができる。国際標準品や国内標準品を用いることによって、世界の国々がほぼ同じ「ものさし」をもって核酸増幅検査の感度を評価できることになる。なお、核酸増幅検査の感度は、異なる日に独立した希釈でもって核酸増幅検査を実施し評価されるもので、通常 95% の確率で検出できる値が感度になる。つまり、最低でも 20 回の独立した検査で 19 回以上陽性が出るウイルス量が核酸増幅検査の感度となる。診断薬として承認された核酸増幅検査キットには感度が記載されてい

表 3 B 型肝炎ウイルスの genotype と主に検出される地域

genotype	Geographic distribution
A	Northern Europe, USA
B	Eastern Asia, Far East
C	Eastern Asia, Far East
D	Mediterranean area~South Asia
E	Western sub Saharan areas
F	USA, Africa
G	Recently isolated in France and USA

ることが多いが、この値は企業が最高に熟練したスタッフを用いて最適な条件下で実施した場合の感度であると考えべきである。キットを導入した企業等は自分の施設での感度を評価しておく必要がある。すでに EU などでは核酸増幅検査のガイドラインが定められており、品質管理などで核酸増幅検査を用いている場合にはそれに沿った試験の実施が求められている。日本においても同様の核酸増幅検査のガイドラインの整備が進められているので、制定された後には日本のガイドラインに従わなければならない。感度で注意しなければならないことは、genotype や変異株に対しての感度評価である。現在においては航空機の発達によってヒトの移動が活発であり、これまで存在しないタイプの genotype が進入してくる可能性がある。また、HCV や HIV では変異が多いことがすでに知られているが HBV でも血清学的検査に反応しない株も報告されている。診断薬として承認されているキットでは genotype や実際の検体を用いた臨床トライアルを実施し、この点を評価してあることが多い。自分で核酸増幅検査のシステムを作る場合、プライマーはデータベースなどを利用して良く保存されている塩基配列の部分を選択することや、市販されている陽性血漿などを用いて感度を検討することが重要である。

おわりに

血液製剤のスクリーニング検査として核酸増幅検査が導入され、血清学的検査では検出できなかった感染初期の血液を排除できるようになった。しかし、今の技術をもってしても残存リスクは 0 ではない。また、核酸増幅検査は万能ではなく、血清学的検査を併行して実施することでお互いの

弱点を補い合っこそ安全性が確保されることを忘れてはならない。その証拠に血清学的検査を止めて核酸増幅検査だけにした国はない。

文 献

- 1) 西岡久壽彌：B型肝炎・C型肝炎。病原微生物検出情報 23：163-164, 2002
- 2) Ward JW, Holmberg, SD, Allen JR：Transmission of immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusion screened as negative for HIV antibody. *N Engl J Med* 318：473-478, 1988
- 3) Vrielink H, van der Poel CL, Reesink HW, et al：Transmission of hepatitis C virus by anti-HCV negative blood transfusion. *Vox Sang* 68：55-56, 1995
- 4) Yu MW, Mason BL, Guo ZP, et al：Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet* 345：1173-1174, 1995
- 5) Nubling CM, Willkommen H, Lower J：Hepatitis C transmission associated with intravenous immunoglobulins. *Lancet* 345：1174, 1995
- 6) Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, et al：The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* 334：1685-1690, 1996
- 7) Nubling CM, Unger G, Chudy M, et al：Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. *Transfusion* 42：1037-1045, 2002
- 8) Little SJ, Mclean AR, Spine CA, et al：Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* 190：841-850, 1999
- 9) Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al：Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors；implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17：1871-1879, 2003
- 10) Whalley SA, Murray JM, Brown D, et al：Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* 193：847-854, 2001
- 11) Biswas R, Tabor E, Hsia CC, et al：Comparative sensitivity of HBV NATs and HBsAg assays for detection of acute HBV infection. *Transfusion* 43：788-798, 2003
- 12) Saldanha J, the HAV Collaborative Study Group：Sensitivity of PCR assay for the determination of hepatitis A virus RNA in plasma pools. *Vox Sang* 76：163-165, 1999
- 13) Saldanha J, Lelie N, Heath A：Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assay for HCV RNA. WHO collaborative study group. *Vox Sang* 76：149-158, 1999
- 14) Saldanha J, Gerlich W, Lelie N, et al：An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 80：63-71, 2001
- 15) Holmes H, Davis C, Heath A, et al：An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *J Virol Methods* 92：141-150, 2001
- 16) Saldanha J, Lelie N, Yu MW, et al：Establishment of the first World Health Organization international standard for human parvovirus B19 nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang* 82：24-31, 2002

血液と血液製剤の安全性

国立感染症研究所血液・安全性研究部室長

おかだ よしあき
岡田 義昭

はじめに

1980年代前半の凝固因子製剤によるヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染によって、血液製剤の危険性が注目され社会問題にまで発展した。この悲惨な事件が起こった当時に比べ、現代の輸血用血液を含めた血液製剤の安全性は比較にならないくらい向上した。これを支えたのは、ウイルス学の進歩による診断法の開発とスクリーニング法への応用、さらに血漿分画製剤におけるウイルス不活化法の開発などがあげられる。今回、医療現場で実際に使用されている血液及び血液製剤の安全性確保について感染症対策を中心に解説する。

成分製剤の感染対策

—ウイルス感染した献血の排除方法

血液製剤というと一般的には血漿分画製剤を意味することが多いが、輸血に用いられる赤血球濃厚液、濃厚血小板製剤、新鮮凍結血漿などの成分製剤と、血漿から作られる血漿分画製剤を総称して、血液製剤と定義される。これらの製剤が製造されるまでのフローを図1に示す。

最初に、問診によって肝炎や輸血等の既往歴、海外への渡航歴、脳外科手術の既往、伝染性紅斑の既往、入れ墨やピアスの有無、不特定多数との性的接触の有無、同性愛の有無等がチェックされる。これによって感染症のリスクを持つ供血者や HIV感染の検査を目的とする供血者からの採血を防止している。

採血された血液は、図1に示すように血清学的検査によっ

て各種ウイルス感染の有無が検査される。1999年6月まで日本の輸血用血液は、これらの血清学的検査で陰性の血液が医療機関に供給されていた。しかし、欧米などで、HIV抗体やC型肝炎ウイルス (HCV) 抗体陰性の血液によってHIVやHCV感染が起こった症例が報告され²⁾、血清学的検査だけでは安全性は確保できないことが明らかとなった。

なぜ抗体陰性の血液によってHIVやHCV感染が起こったのだろうか？これは、図2に示すように感染初期においては、ウイルスに感染していてもウイルスに対する抗体が検出されないため、抗体が検出可能になるまではウイルス陽性の血液を見つけだすことができないからである。感染してから抗体陽性になるまでの期間はウインドー期 (window period) と呼ばれている。なお、HIVやHCV感染では、ウイルスに対する抗体にはウイルスの感染性をなくすような中和活性はなく、ウイルスと抗体が共存している。B型肝炎ウイルス (HBV) ではHBs抗原を測定するので、HBVが肝臓で増殖し検出試薬の検出感度を越えなければ陽性とならない。この期間は同様にウインドー期と呼ばれている。

これらの血清学的検査で検出されないウイルス陽性の血液を排除する方法としては、1980年代後半に発明されたPCR (polymerase chain reaction) 法が有効であった。PCR法は分子生物学をはじめ、生命科学の分野に一大貢献をなした (現在もその貢献は続いている) もので、少量の遺伝子断片を一連の反応で約100万倍に増幅することができる方法である。この方法によって抗体陰性の血液からでもウイルスが検出できるようになった。表1に示すように、血清学的ウインドー期はNAT (nucleic acid amplification testing) によって、HBVでは6～15日間、HCVでは41～60