

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の
診断、除去・不活化法の研究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 17 (2005) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

- 安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の
診断、除去・不活化法の研究 P 1-P 4

主任研究者 岡田 義昭

II. 分担研究報告

1. ウイルス不活化法とそれに伴う凝固因子活性等への影響の研究 P 5-P 12
池田 久實
2. 上皮性細胞株を用いたパルボウイルス B19 の不活化の評価 P 13-P 17
岡田 義昭
3. パルボウイルスの高感度診断系の開発 P 18
佐藤 博行
4. ウエストナイルウイルスの加熱処理・濾過処理法の検討 P 19-P 29
高崎 智彦
5. プラノバ 35N およびプラノバ 20N による P 30-P 31
E 型肝炎ウイルスの除去
武田 直和
6. SARS コロナウイルスの血液製剤における P 32-P 35
除去・不活化に関する研究
田代 真人
7. A 型肝炎ウイルスの加熱不活化及びウイルス除去試験 P 36-P 39
米山 徹夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P 40

IV. 研究成果の刊行物・別冊 P 41-P 56

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

総括研究報告書

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の診断、除去・不活化法の研究

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 血漿分画製剤は複数のウイルス除去・不活化法が製造工程に組み込まれて、その能力は一般的には動物由来のモデルウイルスを用いて評価されている。この班では、新興・再興感染症、及び血液製剤で問題となるパルボウイルス B19 と B 型肝炎ウイルスを対象にして、培養可能なウイルスに対しては加熱処理によるウイルス不活化の評価、ウイルス除去膜によるウイルス除去の評価を実施した。ウエストナイルウイルスと SARS ウイルスは加熱処理、及び 35 nm のウイルス除去膜によって検出限界以下にまでウイルスは減少し、現状の除去・不活化法が有効であることが示された。一方、エンベロープを持たない A 型肝炎ウイルスやパルボウイルス B19 は加熱によって 3log から 4log 程度の感染性が減少し、さらなる不活化法の開発の必要性が示唆された。培養ができない HBV や HEV のウイルス除去・不活の評価のために、HBV では酵素処理による肝癌細胞と HBV の結合から細胞内での複製に関する不活化評価が期待できるアッセイ系の開発、HEV ではウイルス様粒子を作製し除去の評価が可能な測定系を開発した。

分担研究者

池田久寛 北海道赤十字血液センター所長
佐藤博行 福岡赤十字血液センター副所長
高崎智彦 国立感染症研究所 室長
武田直和 国立感染症研究所 室長
田代真人 国立感染症研究所 部長
米山徹夫 国立感染症研究所 室長

はこれらのウイルスに加えて A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、さらにパルボウイルス B19 などの診断、除去・不活化法とその評価についての研究を行うことによって血液製剤の安全性を確保することを目的としている。特に、これまでの除去・不活化法の評価が動物由来の類似したウイルスをモデルウイルスとして用いて実施されていたことから実際のウイルスを用いた評価を実施した。また、培養系がないウイルスの除去・不活化の評価は困難であるが、感受性のある細胞株の検索や遺伝子工学の手法を用いて、由来するウイルスに限りなく類似した粒子形成を作製するなど、新し

A. 研究目的

近年、海外においてウエストナイルウイルスや SARS ウイルスのアウトブレイクが起り、国内では輸血によって E 型肝炎ウイルス感染が報告されるなど血液製剤の安全性にとって脅威となるような新興・再興感染症が報告されている。この研究班

い方法を用いての除去・不活化の評価法の開発も目指した。さらに、新しい除去・不活化法の開発の検討も目的とした。

B. 研究方法と結果

各ウイルスの分担研究者の報告書に詳細は記載されているので、簡潔にまとめる。

1) エストナイルウイルスの除去・不活化法の研究

静注用グロブリン製剤と 25%アルブミン製剤に各々容量の 10%のウイルス液を添加し、60℃にて 10 時間加熱処理を行い Vero 細胞によって感染価を測定した。何れの製剤からもウイルス遺伝子は検出されたが、感染性は検出できなかつたことから 10^5 以上不活化されたと考えられた。また、静注用グロブリン製剤にウイルスを添加し、35 nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ感染性は検出されず、 10^4 以上除去されたと考えられた。

2) SARS コロナウイルスの血液製剤における除去・不活化に関する研究

静注用グロブリン製剤と 25%アルブミン製剤に各々容量の 10%のウイルス液を添加し、60℃にて 5 時間、及び 10 時間の加熱処理を行い VeroE6 細胞によって感染価を測定した。何れの製剤からも、感染性は検出限界以下となったことから 5 時間では 2.5×10^4 、10 時間では 1×10^5 以上不活化されたと考えられた。また、静注用グロブリン製剤にウイルスを添加

し、35 nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ感染性は検出限界以下となり、 1.1×10^4 以上除去されたと考えられた。

3) A 型肝炎ウイルスの加熱不活化及びウイルス除去試験

静注用グロブリン製剤と 25%アルブミン製剤に各々容量の 10%の A 型肝炎ウイルス (KRM238 株) 液を添加し、60℃にて 10 時間加熱処理を行い GL 細胞によって感染価を測定した。アルブミン製剤では $10^{3.7}$ 不活化された。一方、グロブリン製剤では抗 A 型肝炎ウイルス抗体が存在しているために 37℃において 2 log 程度の感染性の減少が認められ、60℃10 時間処理では検出限界以下になった。加熱による不活化はアルブミンと同程度であると考えられた。また、静注用グロブリン製剤にウイルスを添加し、35 nm のポアサイズのウイルス除去膜を用いて濾過したところ感染性は検出されず、 10^4 以上除去されたと考えられた。

4) パルボウイルス B19 の高感度診断系の開発

日本赤十字社で採血時の B19 のスクリーニング検査として導入されている RHA(receptor-mediated hemagglutination)は簡便で優れた方法であるが、抗体の出現以降は多くの場合に RHA 陰性となる。感染後 RHA 陰性となった時期における In vitro での感染性は証明できないが PCR 法によって 1 年

以上B19のウイルス遺伝子が検出された。

5) 上皮性細胞株を用いたパルボウイルス B19 の不活化の評価

最近までB19 の適当な培養系がないために不活化の評価はモデルウイルスを用いて実施されていた。B19 は稀に肝炎の原因となることから発生学的に肝と類似する睾丸由来の胎児性癌細胞株の感受性を検討し、これまでに報告されている血球系の細胞と同程度の感受性があることを明らかにした。この細胞株を使ってアルブミン製剤（5%と25%）の加熱による不活化を評価したところ血球系の細胞株と同等に4 logの不活化が確認された。上皮性の細胞株は安定性があり、感染細胞の回収などに遠心操作が不要なことからバイオセーフティ上も利便性が高い。

6) ウイルス不活化法とそれに伴う凝固因子活性等への影響の研究

B型肝炎ウイルスは現在でも培養に成功していないウイルスの1つであり、ヒト以外ではチンパンジーのみ感受性があるとされている。そのためにHBVの除去・不活化はモデルウイルスを用いる以外に方法がなかった。少量のHBVが原料血漿に混入する可能性があり、実際のHBVを用いた評価系が開発されることが切望されていた。肝癌の細胞株にアシアロ糖蛋白受容体が発現していることに注目し、HBVをノイラミニダーゼ処理することで肝癌細胞に結合させることによって、細胞内でHBVが環状2本鎖

になることを見いだした。結合に関する不活化の解析はできないが、細胞内にHBVが侵入した後の複製に関する不活化の評価に使用できるものと考えられた。

7) プラノバ 35N及びプラノバ 20Nによる E型肝炎ウイルスの除去

E型肝炎ウイルス(HEV)はこれまで輸入感染症と考えられていたが、海外渡航歴のない感染者の発生や過去の保存されていた血清からHEV遺伝子が検出されるなど国内に存在していることが明らかになり、実際に輸血による感染例も報告された。HEVは現在のところ培養系がなく、ウイルス陽性血漿を充分量確保することは不可能である。そこで、遺伝子組み換え技術を用いて、パキウロウイルスにHEV構造蛋白領域を発現させることによってネイティブなHEVと同じ大きさを持つ組み換え粒子を多量に得ることが可能になった。この粒子を静注用グロブリン製剤に添加し、35nmと20nmのポアサイズのウイルス除去膜を用いて除去を検討した。35nmでは91-95%のウイルスが除去されたが、20nmの除去膜では組み換えウイルス粒子は検出されなかった。電子顕微鏡による観察から粒子は35-38nmであることから20nmのウイルス除去膜の有用性が示唆された。

C.考察

ウエストナイルウイルスとSARSウイルスは、エンベロープを有するウイルスで大きさが35nm以上あるため加熱

及び 35 nm のウイルス除去膜によって容易に除去・不活化されることが確認された。一方、小型でエンベロープを持たない A 型肝炎ウイルスや B19 は加熱処理によって 3log から 4log 不活化されたが、エンベロープを有するウイルスに比べて抵抗性を示した。これらの結果はモデルウイルスを用いての除去・不活化の評価と傾向が一致した。B19 に関してはモデルウイルスより熱に感受性があった。HBV や HEV などの培養できないウイルスの除去・不活化に関しても実際のウイルスに近い形での評価可能な方法を開発した。これらの方法の有用性と応用に関しては、さらなる検討を必要と考えられた。

以上の結果から血漿分画製剤はエンベロープを持たないウイルスに対してさらなる除去・不活化法の開発が必要である。一方、輸血用血液に対してはスクリーニング法の開発、及び新しいウイルス不活化法の開発を実施する必要がある。

D. 結論

培養可能なウイルスについては加熱処理とウイルス除去膜による除去・不活化の評価を実施し、モデルウイルスから予想される結果を得た。培養ができないウイルスでは培養細胞の検索や酵素処理による新しい不活化の評価系の開発を行った。また、ネイティブなウイルスに類似した粒子を多量にバキュロウイルスを用いて作製し、モデルウイルスの代わりに

除去の評価に用いた。

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

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の診断，
除去・不活化法の研究

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 東 寛 北海道赤十字血液センター 研究部長
大和田尚 北海道赤十字血液センター 研究部

課題：ウイルス不活化法とそれに伴う凝固因子活性等への影響の研究

研究要旨

in vitro における B 型肝炎ウイルス (HBV) の感染性評価系・培養系を構築することを旨し検討を行ってきた。実験の試みとしては、肝実質細胞表面に特異的に高発現し、かつエンドサイトーシスに関与する；アシアロ糖蛋白受容体 (ASGP-R) に着目し、ノイラミニダーゼ (NA) を用いてアシアロ化した HBV を、肝実質細胞株; HepG2 に作用させた。その結果、NA 非存在化では認められなかった感染性* (HBV 環状 2 本鎖 CCC-DNA の検出による) が、明らかに検出されるようになり、最適なアシアロ化条件下において、感染性はコントロール比概算 1,000 倍上昇していた。本系を応用することで、in vitro における感染価の定量が可能となった。今回示した HBV の感染性評価技術は、これまでに報告されてきた他の実験と比較しても、非常に鋭敏に評価し得る方法の一つと考えられた。今後、本研究を発展させることで、HBV 感染制圧の為の研究開発に応用できると考えられた。*) 本研究における HBV の感染性はあくまでも、通常の HBV 遺伝子を元に肝細胞核内で形成される CCC-DNA の検出による。

A. 研究目的

安全な血液製剤を確保する上で、様々な病原ウイルスの不活化・除去の研究を行うことは重要である。しかし HBV に関しては、in vitro における感染系が存在せず、このことが研究を進める上で大

きな障壁となっている。現在、HBV の感染性を評価・定量するには、モデル動物や初代肝細胞の使用など、大規模かつ煩雑な方法に頼らざるを得ない。そこで我々は、肝細胞株を用いた簡便かつ鋭敏な HBV 感染性評価系構築の可能性に

ついて検討を行ってきた。

B. 研究方法

肝実質細胞株としては HepG2 を用い、HBV は献血者由来の陽性血漿を用いた。血漿中からのウイルスの精製は、30%シヨ糖溶液のクッションを用いた超遠心操作によって行い、得られたウイルスを 10% FCS DMEM 培地に懸濁し HBV ストック溶液とした。10⁶個の HepG2 に対して、NA 存在下で 10⁶コピーの HBV を作用させた。酵素反応に要する 3 時間後に、HepG2 を PBS (-) で洗浄し、ウイルス定量を行いウイルス結合量とした。また、HepG2 の回収後にこれをトリプシン/EDTA で処理し、洗浄後に回収・定量された HBV を侵入量として算出した。HBV の定量については、まず回収された HBV や HepG2 から DNA 抽出 (Qiagen) を行い、得られた抽出 DNA に対して HBV-DNA S 領域を挟む特異プライマー、および TaqMan プローブを用いた定量的 PCR 法 (TaqMan PCR) による。尚、侵入効率については別法; TC₅₀ (50% の確率で HBV-DNA が検出される希釈倍率) 法によっても検討を行った。具体的には、抽出 DNA に対して予め 3 倍段階希釈を行い、得られたそれぞれの DNA 希釈液に対して、HBV-DNA P 領域に対する特異プライマーを用いた

PCR を施し、遺伝子産物検出の有無とその時の希釈倍率の関係から TC₅₀ を算出した。また感染性については、HBV 感染成立によって HepG2 核内において形成される CCC-DNA を、特異プライマーによって PCR 増幅させ、得られた遺伝子産物をナイロンメンブレンに対してアルカリトランスファーを施し、Southern-hybridization 法によって検出を行った。まず、初期濃度 10⁶コピーの HBV 溶液を起点として 10 倍段階希釈を行い、それらを HepG2 に感染させた。感染 24 時間後に、抽出された DNA に対して上述の操作を施し、遺伝子産物の有無とその時のウイルス希釈倍率から、TCID₅₀ (50% 培養細胞感染量) を算出し、NA 添加に伴う感染性発現の検討を行った。

C. 研究結果

HBV の結合試験：図 1

HepG2 に対して、NA (濃度 0 ~ 1.0U/mL) 存在下で HBV を作用させた。その結果 TaqMan PCR による定量値から、コントロール比 16.5 倍の結合率上昇が認められた。この上昇は NA 濃度 0.1U/mL でほぼプラトーに達していた。

HBV の侵入試験：図 2

結合試験で得られた結果に基づき、NA 濃度 0.1U/mL 下でウイルス感染させた

HepG2 をトリプシン/EDTA 処理し、細胞内に侵入したウイルス量を定量した。その結果、感染 24 時間後における侵入効率が最も高く、コントロール比 27.8 倍の上昇が確認された。TaqMan PCR による本結果の信頼性を確かめる為に、TC₅₀ 値の比較も行った。その結果、0.1U/mL の NA 濃度下で 34.7 倍の上昇が確認されたが、これは TaqMan PCR による測定結果とほぼ同値であった。以上から、NA 処理によって HBV と HepG2 との相互作用は明らかに高まることが確かめられた。

NA による HBV の感染性発現：図 3

NA 処理された HBV では、その結合・侵入効率は大きく上昇していた。そこで次に感染性に対する影響を調べた。感染性の指標は、肝細胞核中で形成される HBV CCC-DNA の検出とした。HBV 溶液に対して予め 10 倍段階希釈を行い、その後各希釈ウイルスを HepG2 に感染させ、24 時間後に回収された宿主細胞中の CCC-DNA の存在有無を調べた。その結果、0.1U/mL の NA 存在下で感染性が見出された。また本感染実験においては、0.3U/mL の酵素存在下で最も感度よく感染性が検出され、10³ コピーの HBV を作用させるだけで CCC-DNA が検出された。コントロールの NA 非存在下では

10⁶ コピーのウイルスを作用させても、感染性は見出せなかった。

アシアロフェチュイン・EDTA が、NA 処理済 HBV の結合におよぼす影響：図 4, 5

NA 処理を行った HBV と HepG2 との結合が、肝細胞表面の ASGP-R を介した結合であることを間接的に証明する為、ASGP-R と親和性の高いアシアロフェチュインの影響を調べた。その結果、アシアロフェチュイン濃度依存的にウイルスの結合は阻害されていた。またアシアロ化合物と ASGP-R との結合が、Ca イオン依存的である事実に基づき、EDTA による NA 処理済 HBV の結合阻害能を確認した所、やはり濃度依存的に低下していた。

D. 考察

NA 処理した HBV の HepG2 に対する作用を、ウイルスの結合・侵入効率、並びに感染性の発現において検討を行ってきた。その結果、NA 処理した HBV の結合・侵入効率は明らかに上昇していた。この結合率の上昇がアシアロフェチュインや Ca キレーターである EDTA によって阻害されたことから、NA によってアシアロ化された HBV 表面と、HepG2 表面の ASGP-R が特異的に結合し、細胞

内に侵入すると推測された。また、この ASGP-R を介して侵入した HBV の感染性発現について調べたところ、NA 添加時で感染性の指標である CCC-DNA が検出された。感染させた HBV 溶液中のウイルスコピー数・希釈倍率・CCC-DNA 検出の有無などから HBV の感染価 (50% 培養細胞感染量 ; TCID₅₀) を算出したところ、0.1U/mL の NA 存在下では 10⁶ コピーの HBV は 10^{1.60} TCID₅₀ に相当することが分かった。またこの感染実験では、NA 濃度を変化させた至適濃度下における TCID₅₀ の算出も行った。結果として、NA 濃度 0.3U/mL において最も高い感染価 10^{2.30} TCID₅₀ が得られた。この感染価から逆算して、4,960 コピーあれば 50% の確率で HBV の感染性が確認されると判断された。

これまで HBV などの肝炎ウイルスは、株化細胞を用いた *in vitro* の系で効率的に感染・培養させることはできず、それ故細胞側レセプター・ウイルス側リガンドも同定されてこなかった。その為簡便な感染性の評価方法は存在しなかった。我々は、肝実質細胞に特異的に高発現する ASGP-R にターゲットを絞り、ウイルスを NA でアシアロ化し、その後作用させることで、*in vitro* でも比較的簡便に感染性が評価できることを見出した。本方法では、HBV 関連蛋白や持続的な

ウイルス産生までを確認することはできなかったものの、この CCC-DNA までの検出を感染成立の指標として、HBV の不活化・除去実験などに応用できると期待された。今後は CCC-DNA から先、HBV の産生系・培養系を目指すことで、より詳細な感染・不活化実験への応用、HBV 感染メカニズムの解明に着手したいと考えている。

E. 結論

NA を用いてアシアロ化した HBV を、肝実質細胞株 HepG2 に作用させることで、CCC-DNA までの確認までではあるが、感染性として検出できるようになった。本系を利用することで、様々な HBV 不活化実験が可能になると思われた。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Owada T. et al.: Interaction between Desialylated Hepatitis B Virus and Asialoglycoprotein Receptor on Hepatocytes may be Indispensable for Viral Binding and Entry: Journal of Viral Hepatitis (2005) in press

2. 学会発表

第 52 回日本輸血学会総会 平成 16 年 6

月 23-25 日, 札幌市

大和田尚 他, HBV 陽性血漿からのウ
イルス感染性検出の試み

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

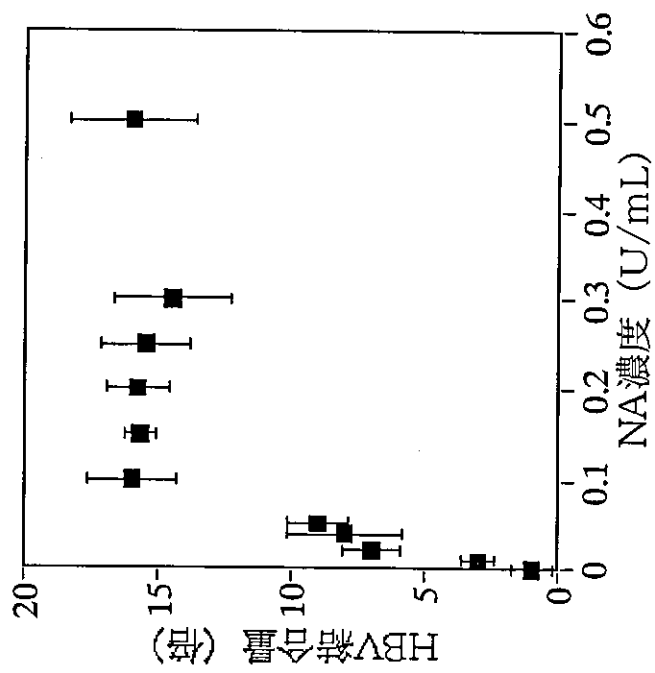


図1: ノイラミニダーゼ (NA) 添加に伴うHBV結合率の上昇

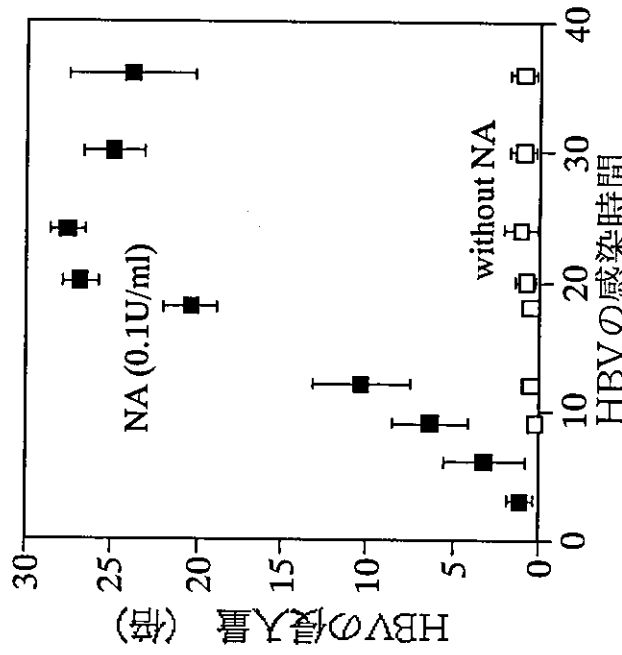


図2: NA添加に伴うHBV侵入率の上昇

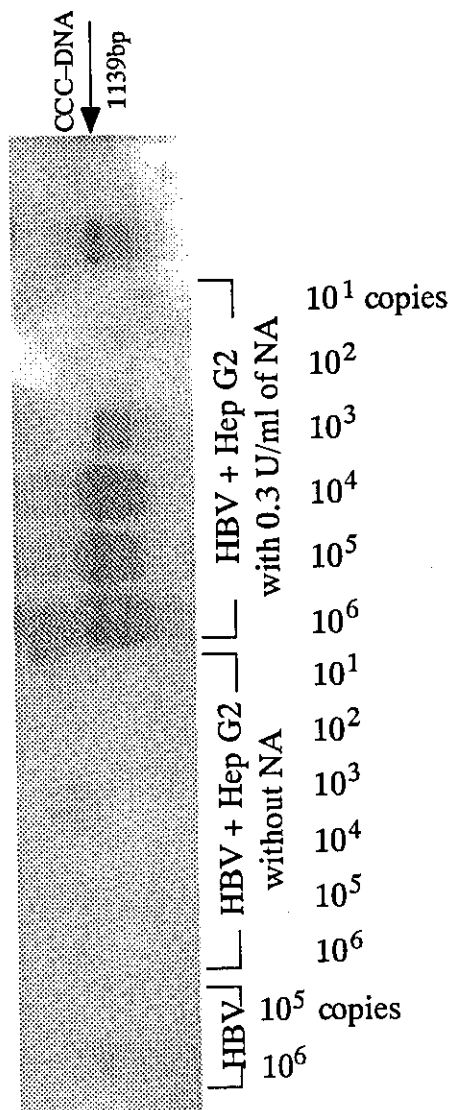


図3 : NA (0.3U/mL)添加による感染性 (CCC-DNA)の発現

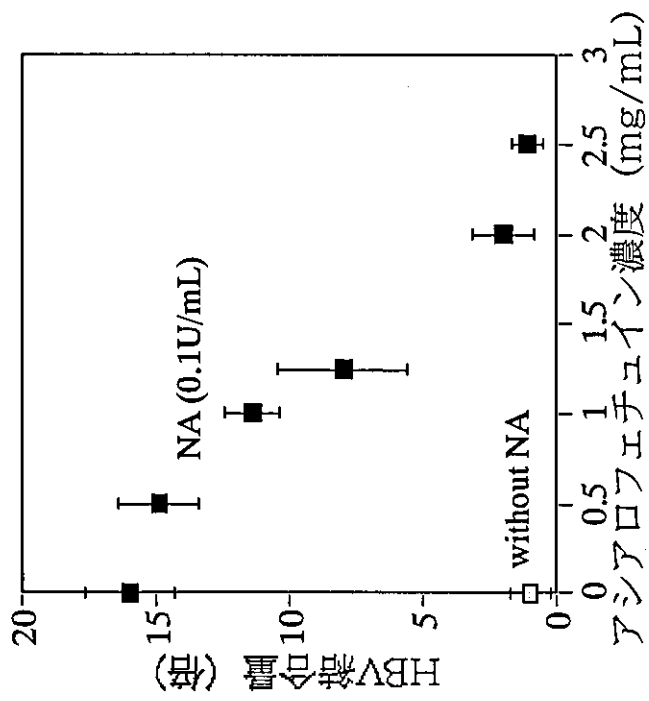


図4：アシアロフェリン添加に伴うHBV結合率の低下

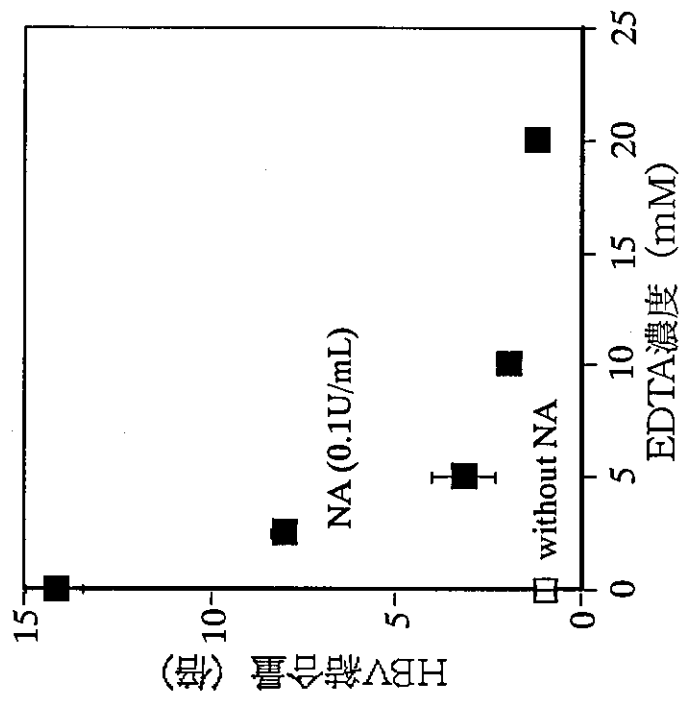


図5：EDTA添加に伴うHBV結合率の低下

厚生労働科学研究費補助金

分担研究報告書

上皮性細胞株を用いたパルボウイルス B19 の不活化の評価

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

協力研究者 梅森清子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員

研究要旨 パルボウイルス B19 (以下 B19 と略) は培養が困難なウイルスであったが、最近、ヒト由来白血病細胞株 (KU812) を用いて培養に成功した報告がされた。我々は、血液由来以外の細胞株における B19 の感受性を検討し、ヒト睾丸由来の胎児性癌 NEC を見いだした。この細胞株は付着性であることから操作が容易でバイオセーフティ上も安全に取り扱うことができた。さらに、KU812 細胞株と同等に B19 に対して感受性を示すことがわかった。この株を用いて B19 の不活化を検討したところ、60℃10 時間の熱処理によって 3-4log の不活化が確認された。

A. 研究目的

B19 は一般的に病原性は弱く、多くのヒトは不顕性感染を示すことが多いが、ウイルス血症時のウイルス量が非常に多いこと、及び小型の DNA ウイルスであるため除去・不活化に抵抗性を示すことなどから血液製剤の安全性確保の上では重要なウイルスの 1 つである。B19 は最近まで骨髓細胞や臍帯血を用いて培養が行われていたが、均一した性状の細胞を充分確保することは倫理的にも困難であった。そのためモデルウイルスとしてイヌパルボウイルスを用いて除去・不活化が評価されていた。最近、ヒト由来白血病細胞株 (KU812) の 1 クローンが B19 に対して高感受性を示すことが報告され、これを用いて B19 の除去・不活化の評価が実施されるようになった。我々は同じ細胞株から赤芽球に分化する細胞を選択し、独自に好感受性株

(KU812-NIID-1) を得、除去・不活化の評価を行った。しかし、クローンの性状を維持するためにはエリスロポイエチン等が必要であり、さらに感染させた細胞を回収するために遠心操作が必要であった。遠心時には B19 を飛散させる危険性があることから遠心操作の必要としない細胞株を得ることは重要である。我々は、B19 が時に肝炎を引き起こすことからヒト肝細胞癌由来の細胞株での B19 感受性を検討し、KU812 に比べて低い感受性を持つことを明らかにした。そこで、より感受性の高い細胞株を得るために肝臓と発生学的に近い胎児性癌 (NEC) の感受性を検討し、さらに加熱による B19 の不活化についても検討した。また、新しいウイルス不活化法の基礎研究も実施した。

B. 研究方法

(B19 陽性血漿)

B19 陽性血漿 #4 は日本赤十字社より譲与された。KU812-NIID-1 を用いた感染性の検討から感染価は $1 \times 10^8 / \text{ml}$ とした。

(感染性の定義)

B19 は DNA ウイルスであるが、細胞に感染するとゲノムから RNA に転写され、その転写された RNA は数カ所でスプライシングされる。Bostic らの報告 (J.Infect.Dis.vol.179.619-626, 1999) に従ってスプライシングされる部位の前後にプライマーを作製し、nested-RT-PCR を行い、スプライシングされてゲノムより短くなった RNA の検出された場合を感染成立とした (図 1)。

(感染方法)

感染 1 日前に NEC 細胞 2×10^5 個を 24 穴プレートに播く。10% FCS を含んだ RPMI を用いて B19 陽性検体を希釈し、培養液を吸引した各ウエルに $100 \mu\text{l}$ ずつ加えた。ウイルスの吸着効率を高めるためにポリブレンを最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、 37°C にて 2 時間 CO_2 インキュベーター内にて吸着させる。2 時間後 1ml の培養液を加え 2 日間培養した。2 日後、培養液を吸引し、 1ml の RNA-Bee を加えて細胞を溶解して RNA を抽出した。RNA は $15 \mu\text{l}$ に溶解し、 $5 \mu\text{l}$ を用いて nested RT-PCR を行い感染することで生じる spliced RNA が検出された最大希釈倍率の逆数を感染価とした (図 1)。

(加熱による B19 不活化)

5% アルブミン製剤、又は 25% アルブミン製剤に製剤容量の 10% になるように B19 陽性血漿を加え、 60°C 、10 時間加熱した。なお、蒸発による濃縮を防ぐために流動パラフィンを重ねた。加熱前、加熱後の検体は試験まで -80°C にて保存した。

C. 研究結果

NEC はポリブレンを添加することによって KU812-NIID-1 と同等の感受性を B19 に対して示した。また、アルブミン製剤に添加しての加熱処理によって感染価は $3 \log$ から $4 \log$ 減少し (図 2)、濃度の違い (5% 製剤と 25% 製剤) による不活化の影響はなかった。また、新しい不活化法の研究では麻疹ワクチン株に対して不活化効果が確認された。

D. 考察

これまで我々は、KU812 由来の細胞株を用いて B19 の感染価を測定してきたが、細胞を 1.5ml のチューブに分注、チューブに希釈した検体を添加してのウイルスの感染、遠心操作による感染細胞の回収など細かな操作を必要とした。特に、ウイルスを含んだ感染細胞の遠心は、B19 が飛沫感染するウイルスであることから注意を要した。また、感染性を維持するために継代にエリスロポイエチンの添加が必要であった。今回、我々が見いだした NEC 細胞株は睾丸由来の胎児性癌であり、付着性に増殖する。成長因子の添加は不

要であり、良好な増殖をし、形態的にも安定した細胞株である。NEC を使用することによって、付着性であることから遠心操作をすることなく、プレート内で感染から感染細胞の回収まで実施でき、RNA 抽出のためのグアニジン処理後に安全キャビネットから出すためにバイオセーフティ上からも極めて安全である。このB19 感染系を用いて来年度は新しいウイルス不活化法の研究を実施する予定である。

E. 結論

我々はB19 に感受性を有する上皮系細胞株、NEC を見いだした。NEC はKU812-NIID-1 と同等の感受性を示しただけでなく、実験操作の利便性や実験者の安全性確保の面からも優れていた。また、B19 は NEC においても熱処理によって不活化されることが確認できたことから従来の血球系細胞株の結果と合わせると、モデルウイルスとして用いられていた動物由来パルボウイルスに比較してB19 は熱に感受性があることが確認された。

F. 健康危機情報

なし

G. 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

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

H. 知的所有権の取得状況

なし

Fig.1 Detection of B19 infectivity on epitherial cells

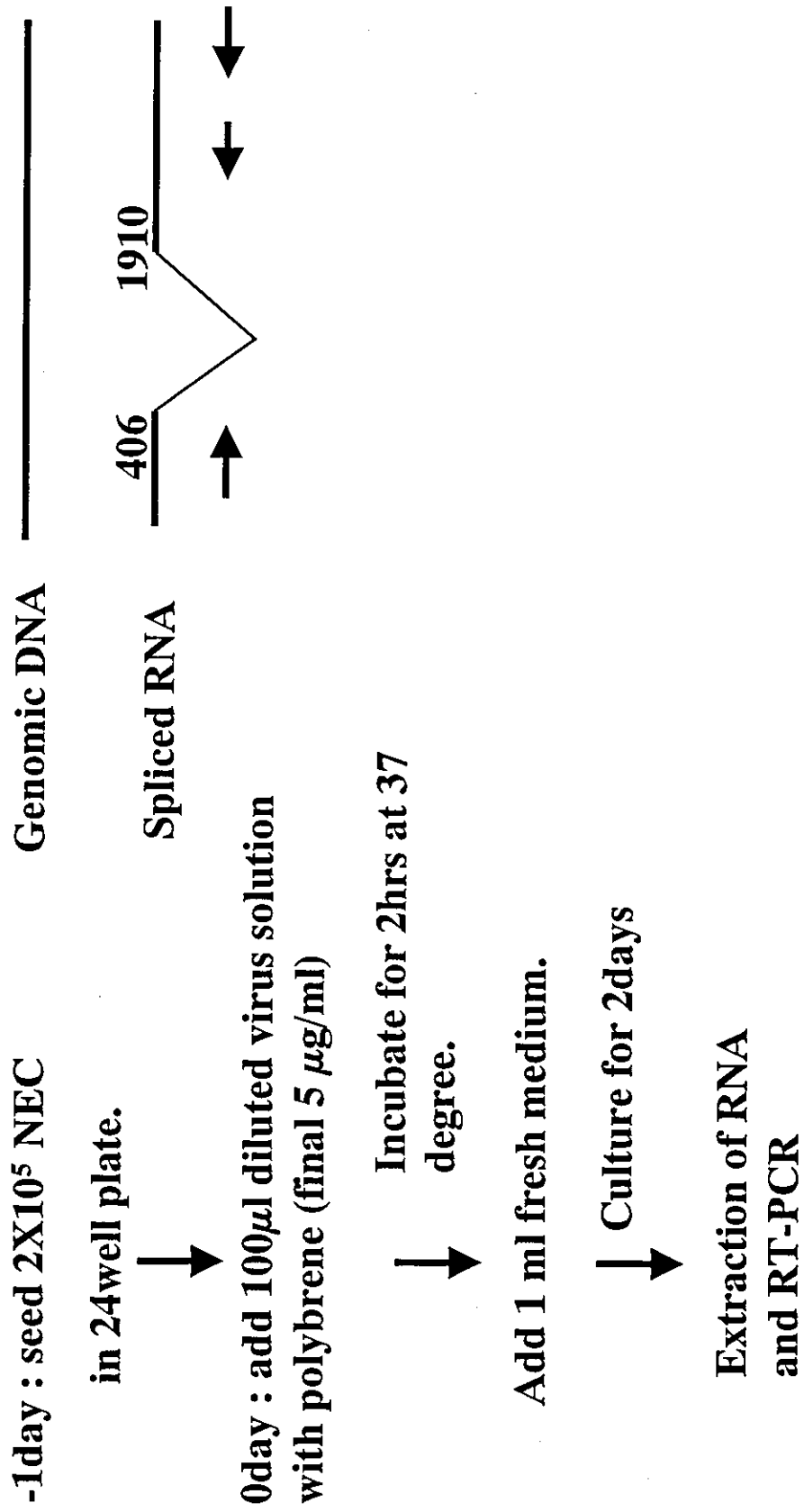
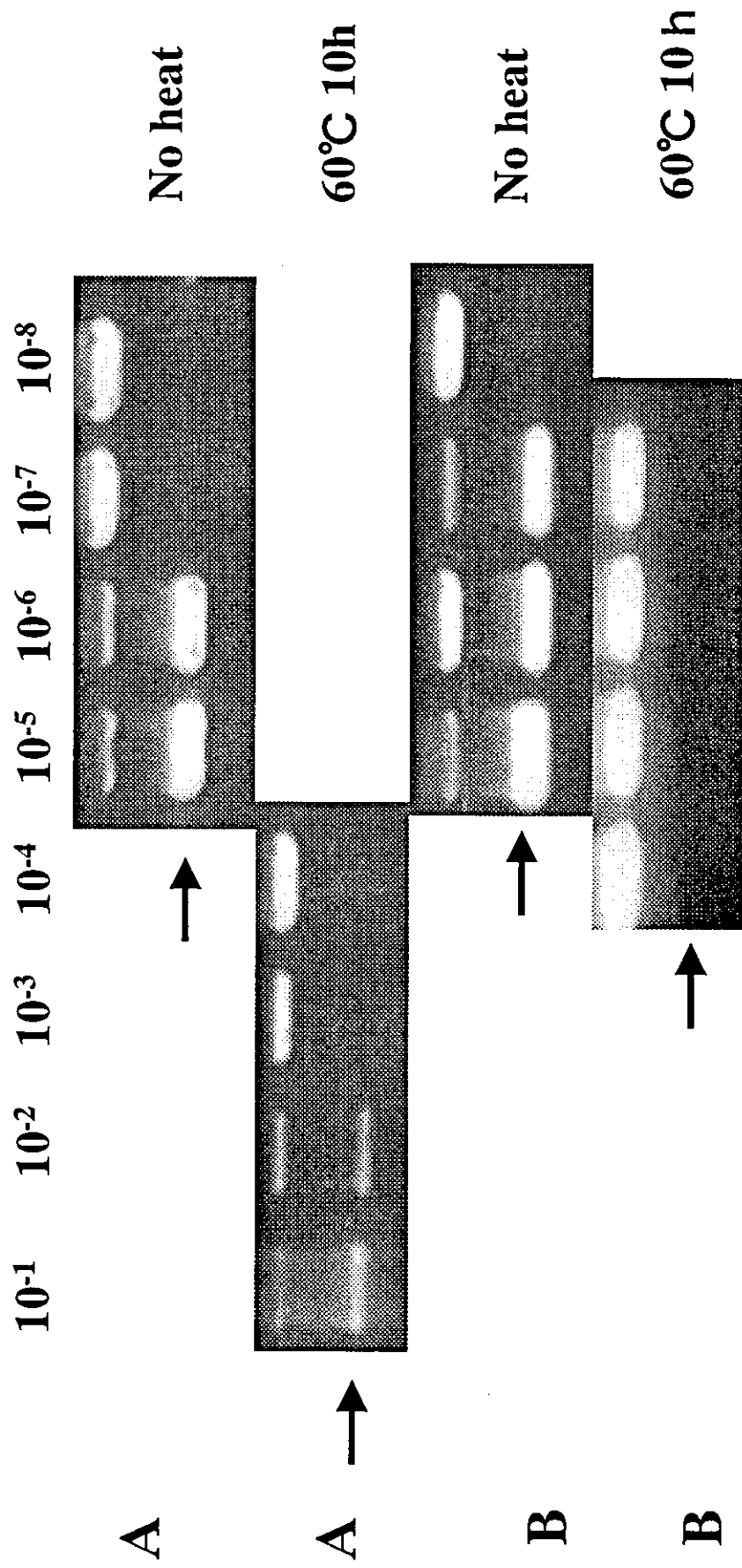


Fig.2 Inactivation of B19 by heat treatment



A: 5% albumin B: 25% albumin

分担研究報告書

パルボウイルスの高感度診断系の開発

分担研究者 佐藤 博行 福岡県赤十字血液センター副所長

研究要旨 ヒトパルボウイルス B 19 は小型(直径 20nm)のエンベロープの無いウイルスで、血液製剤に於ける除去・不活化の方法は確立されておらず、検討を要する。又、ウイルスのスクリーニングに於いても、抗体出現後のウイルス血症期に対しては現状の検査方法では検出が難しい。そこで、ウイルス血症が証明された献血者の長期フォローアップを行い、ウイルスに対する抗体が出現した後もウイルス核酸は1年以上に亘って検出されることが明らかになった。

A. 研究目的

ウイルス感染後の抗体の出現如何に依存しない高感度検出系の到達点を調査することを研究目的とした。

B. 研究方法

現時点でヒトパルボウイルス B 19 の最も高感度な検出系である核酸増幅法 (nested PCR) を用いて、現在用いられている献血者スクリーニング法である RHA (receptor-mediated hemagglutination) 法にてウイルス抗原が検出された献血者を長期に亘って追跡し、どの時点までウイルスが検出されるかを検討した

(名前の特定されない検体しかもウイルスという寄生体を検査解析することは倫理上問題ないと解釈された。)

C. 研究結果

27 名の献血者の追跡調査が可能であった。初めてウイルス血症が確認された日数を day 0 とし、最後に陽性となった日数は 344±86、初めて陰性となった日数は 472±109 であり、その中間点の日数は 408 日となった。

D. 考察

感染後ウイルス血症が出現するまでの期間はほぼ 5-7 日であり、10-14 日後から抗体が出現することは知られていたが、1 年以上もウイルス血症が続くことは報告されていない。抗体出現以降のウイルス血症の時期は、多くは RHA 陰性で、赤血球系の細胞を用いた in vivo の実験からは、出現してくる抗体は中和活性をもち、感染性は証明できないが、in vivo でどの時点まで感染性があるのかは不明である。この時期の血液でウイルス量が多いものは血漿分画製剤の原料としては不適であり、PCR を含む新たな対応が必要となるであろう。

E. 結論

ヒトパルボウイルス B 19 に感染すると、ほぼ 1 年以上に亘ってウイルス核酸が検出されることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし。(投稿予定)

H. 知的財産権の出願_登録状況

なし。