

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 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 18 (2006) 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 10  
池田 久實
2. パルボウイルス B19 の不活化と新たなウイルス不活化法の開発 P 11-P 16  
岡田 義昭
3. LAMP 法によるパルボウイルス B19 の検出法の開発と感度評価 P 17-P 17  
佐藤 博行
4. WNV 検出のための TaqMan RT-PCR, SYBR Green I Based RT-PCR  
同時アッセイ法の開発 P 18-P 23  
高崎 智彦
5. 定量可能な組み換え E 型肝炎ウイルス様粒子の作製 P 24-P 26  
武田 直和
6. 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 P 27-P 29  
田代 真人
7. A 型肝炎ウイルスの不活化法 P 30-P 35  
米山 徹夫

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P 36

### IV. 研究成果の刊行物・別冊 P 37-P 47

## 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 1.HBVの感染評価系を開発し、加熱処理、メチレンブルー処理の評価を行った。2.パルボウイルスB19、HAV、SARS コロナウイルスのS/D処理による不活化を評価し、モデルウイルスから予想された結果を得た。3.ウエストナイルウイルスを特異的に且つウイルス間の多様性に対応可能な検出法を開発した。4.HAV においては、ウイルス株間で加熱に対する抵抗性が異なり 100 倍の差が認められた。5.食品の滅菌技術を血液製剤のウイルス不活化法として応用し、血漿が変性しない条件下で有効なウイルス不活化効果が得られた。

分担研究者

池田久實 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

#### 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との相違が重要な問題となる。本研究班では可能な限り実際のウイルスを用いた評価を目指した。そのため、培養系がないウイルスでは感受性のある細胞株の検索や遺伝子工学の手法等を用いた新しい除去・不活化の評価系の開発も実施している。さらに、今後も次々に新しいウイルスが出現することが予想されるため、非特異的にウイルスを不活化する新しいウイルス不活化法の開発も目指した。

#### 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) 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 つであるが、昨年度の本研究によって、HBV をノイラミニダーゼ処理することで肝癌細胞株 HepG2 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。環状 2 本鎖は HBV 複製時に存在するのでこれを指標に感染性の評価を検討した。HBV を 60℃10 時間加熱処理することによって 3 log 感染価は低下した。また、Methylene Blue(MB) 処理では 1-2log の感染価の低下が認められた。細胞への HBV 吸着量は不活化処理によっても変わらないことから環状 2 本鎖形成に係わるウイルス側の変化を反映しているものと推定された。

## 2) パルボウイルス B19 の不活化と新たなウイルス不活化法の開発

ヒト胎児性癌細胞株を用いた B19 の感染系を確立し、昨年度に加熱によるウイルス不活化を検討した。今年度は界面活性剤処理 (S/D 処理) による B19 不活化を検討した。S/D 処理では全く不活化効果が認められず、これまでに報告されているモデルウイルスの結果と一致していた。

また、食品に既に導入されている滅菌法が血液製剤のウイルス不活化に有用であることを明らかにした。B19、麻疹ウイルス、マウスレトロウイルスについて検討し、血漿の変性しない条件下において有効なウイルス不活化効果が認められた。特に B19 では他の不活化法に比べて著明

に不活化された。また、マウスレトロウイルスでは赤血球が溶血を起こさない条件下においても不活化効果が得られた。

## 3) LAMP 法によるヒトパルボウイルス B19 の検出法の開発と感度評価

LAMP 法は 63℃の一定した温度によって短時間で反応が終了し、目的の遺伝子の増幅は濁度でモニターできることから、核酸の抽出を除けばコンタミネーションのリスクを減少することができる。日本で分離された 2 種の B19 の塩基配列に共通する配列から 4 種類のプライマーを設計した。他の方法で B19 遺伝子の陰性・陽性が確認されている検体を LAMP 法を用いて測定し、特異性を確認することができた。

## 4) ウエストナイルウイルス検出のための TaqMan RT-PCR、SYBR Green I Based RT-PCR 同時アッセイ法の開発

ウエストナイルウイルス (WNV) は世界の広い地域に存在し、地域ごとにウイルスに多様性が存在する。特異性と高感度を維持し、さらにウイルス株の多様性に対応可能な検出法が必要である。単独の検出系では特異性と多様性を併せ持つ検出系を作ることに限界があるので、TaqMan RT-PCR と SYBR Green I Based RT-PCR とを組み合わせ、特異性と高感度を維持し、且つウイルス遺伝子の多様性に対応できる検出系を開発した。

## 5) 定量可能な E 型肝炎ウイルス様粒子

の作製

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、バキュウロウイルスの発現系を用いて、HEV 構造蛋白領域を発現させることによってウイルス様中空粒子（以下VLP）を作製した。昨年度は ELISA によってウイルス除去膜による除去効果を検討したが、測定可能な範囲が限られ、有効な評価法とは言えなかった。今年度は定量性の範囲が広い測定系の開発を目指した。genotype3 の ORF2 全長を発現させることでネイティブな 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できたが、電顕像によってVLP内に核酸が存在することが示唆された。そこで、精製したVLPから RNA を抽出し、HEV 構造タンパク領域をPCRで増幅したところ HEV 特異的な遺伝子が検出された。VLP内に核酸が存在することが明らかとなったことから定量可能な測定系開発に応用できると考えられた。

#### 6) 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

血漿分画製剤のウイルス不活化法として良く知られている界面活性剤処理（S/D処理）による SARS コロナウイルスの不活化を評価した。培養液、静注用グロブリン製剤、5%アルブミン製剤に各々容量の 10%のウイルス液を添加し、4 時間室温で S/D 処理を行った。S/D は

biobeads で除去した。処理によって何れの検体からも SARS コロナウイルスは検出感度以下となった。約 5 log 以上の不活化効果が得られた。また、静注用グロブリン製剤では 60℃にて 2 時間の加熱処理によっても感染性は検出限界以下となった。加熱や S/D 処理が SARS コロナウイルスに有効なウイルス不活化法であることを明らかにした。

#### 7) A 型肝炎ウイルスの不活化法

S/D 処理、ガンマー線照射、加熱による A 型肝炎ウイルスの不活化効果を検討した。S/D 処理では non-envelope ウイルスであることより理論的に効果がないと予想されていたが、理論通り全く不活化効果は認められなかった。また、3 つのウイルス株を用いて株間の加熱処理による不活化効果を検討したところ、株間で 100 倍の差があった。同じサブタイプ間でも 1.5log の差が認められた。ガンマー線照射では 10 kGy で 2.7log、25 Kgy で 6.7log のウイルス不活化効果が認められた。

#### C. 考察

B19 と HAV に対する S/D 処理はモデルウイルスを用いた報告と同様に全く不活化が認められなかった。S/D 処理に関しては non-envelope ウイルスのモデルウイルスとヒトの実際のウイルスとは一致するものと考えられた。また、HAV では株間で加熱に対する抵抗性が異なることが明らかとなった。これまで、

このような報告はなく、不活化の評価において適切なウイルス株を用いないと過剰に評価してしまう危険性があることを明らかにした。HBVを酵素処理し、cccDNA形成を指標とした感染性評価はさらなる解析が必要であるが、これまでに有用な in vitro 評価系はなく、重要な評価法に発展する可能性がある。また、食品の滅菌技術を応用したウイルス不活化法は今後ウイルスの適応範囲や血漿に与える影響等を詳細に解析する必要があるが、簡便で安価で、化学物質を添加しないことから新しい機序のウイルス不活化法の1つになると期待できる。

#### D. 結論

B19、HAV、SARS コロナウイルスに対するS/D処理による不活化は、モデルウイルスから予想された報告と一致した。また、HBVの酵素処理による不活化評価系開発し、加熱等の不活化効率を評価した。WNVでは広範囲にウイルス遺伝子を検出可能な系を開発した。また、新しいウイルス不活化法として有効な方法の基礎的検討を行った。

#### 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：輸血、血液製剤の安全性の現状、公衆衛生、第69巻、781-785、2005年。
- 2) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内喜信、他：

C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製、日本輸血学会雑誌、51巻、515-519、2005

##### 2.学会発表

1) Okada,Y. Umemori,K.,and Yamaguchi,K.:B19 inactivation by heat treatment with epithelial cell lines. 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. Washington .May 2005

2) 梅森清子、岡田義昭、水沢左衛子、山口一成：上皮性細胞を用いたヒトパルボウイルス B19 不活化の評価系の確立、第53回日本ウイルス学会、横浜、2005年

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

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）

分担研究報告

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

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

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とし検討を行ってきた。昨年度は、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 に作用させる系を確立した。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、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ことを報告した。今年度は、昨年度確立したアッセイ系を用いて、HBV の不活化効率を算出することを試みた。不活化処理としては熱処理と Methylene Blue(MB)処理を行い、不活化前後の CCC-DNA の検出限界を検討した。その結果熱処理で約 3log, MB 処理で 1~2log 不活化できることを示すことができた。

A. 研究目的

HBV の、*in vitro* における感染系・培養系の構築は難しく、それ故、本ウイルスの不活化実験を行う為には、モデルウイルスの使用やチンパンジーを用いた動物実験に頼らざるを得なかった。しかしモデルウイルスの使用が、実際の HBV の不活化にもそのまま当てはまるかどうかは疑問である。また動物実験や初代肝細胞の使用は煩雑であり、大量アッセイにも不向きである。昨年度はアシアロ

化した HBV を、アシアロ糖蛋白受容体が排他的・特異的に高発現している肝細胞株；HepG2 に作用させることで、細胞核中に HBV の感染性中間体である HBV CCC-DNA が検出できるようになったことを報告した。本研究では、この DNA の検出を感染成立と見なすことで、様々な不活化操作による、HBV の感染性低下率を調べることを目的とした。

B. 研究方法

HBV は、HBs 抗原、e 抗原強陽性の献血者由来の血漿から 30%蔗糖をクッションとした超遠心操作によって分離・回収したものを使用した。

結合試験： $10^6$  個の HepG2 に対して、NA 濃度(0.1U/ml)存在下で  $10^6$  個のウイルスを 3 時間作用させた。その後細胞を PBS(-)で洗浄し、ウイルス定量を行い、ウイルス結合量(binding)とした。ウイルスの細胞へ結合が、Asialofetuin, EDTA, あるいは S 抗体陽性血清によって阻害されるかどうかを、反応系にそれぞれを添加することにより検討した。また HepG2 の回収後にこれをトリプシン/EDTA で処理し、洗浄後に回収し、定量された HBV を侵入量として算出した。

ウイルスのコピー数の定量は、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) によった。

不活化効率の検討： $10^7$  コピーの HBV 溶液 (10%牛胎児血清含有 DMEM) に対して、 $60^{\circ}\text{C}$ 10 時間の加熱、或いはメチレンブルー；MB 添加状態 (液厚 5mm) で、Baxter 社製 FTX-1080 照射装置を用いて光照射を行った (MB 濃度：1~ $10\mu\text{M}$ , 光エネルギー：10~ $50\text{J}/\text{cm}^2$ ) 処理後、ウイルス溶液に

対して 10 倍段階希釈を施し、 $10^6$  の HepG2 に対して、この希釈済みウイルス  $200\mu\text{L}$  を  $0.3\text{U}/\text{mL}$  のアジアロ化剤；neuraminidase 存在下で作用させた。感染 24 時間後に、細胞をトリプシン EDTA で回収、洗浄した。キアゲン社製 DNA 抽出キットでウイルス DNA を回収し、特異プライマーを用いて PCR を施し、その後、サザンハイブリダイゼーション法によって、目的のバンドである HBV CCC-DNA を検出した (Fig.1) このとき、同時に HepG2 に侵入したウイルス量も定量した。

### C. 研究結果

#### 結合試験

NA で処理した HBV の HepG2 への結合は Asialofetuin, EDTA, S 抗体陽性の血漿により濃度依存性に抑制された (Fig 2 and 3)。

#### 不活化効率の検討

$60^{\circ}\text{C}$ 10 時間の加熱によって感染性は約 3Log 低下した。このとき、侵入していたウイルスの総数の減少は、未処理のウイルスの場合の  $0.05\log(10.3\%)$  と殆ど変わらなかった。MB (濃度：1~ $10\mu\text{M}$ ) の光 (光のエネルギー：10~ $50\text{J}/\text{cm}^2$ ) 増感作用を利用した不活化では、1~2Log 程度



の低下であった。この時、細胞に侵入していたウイルスの量も未処理の時の1~2log 低下していた(Fig. 4).

#### D. 考察

昨年度は、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し、NA 処理した HBV の結合・侵入効率は明らかに上昇すること示した。この結合率の上昇が asialofetuin 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。今回の検討でも、この結果は再現性のあることが示された(Fig. 2)。また、native な HBV に対して感染阻止効果があるとされる S 抗体陽性血清によっても結合が阻害されることが示された(Fig. 3)。このことは NA 処理後でも、未処理のウイルスと類似のメカニズムで細胞に結合することを示唆していると思われる。今回の検討では 60℃、10 時間の熱処理で、HBV がおおよそ 3log 不活化されたと判断できた。細胞に侵入しているウイルスのコピー数はほとんど変化してないことから、熱処理によ

っても細胞内に侵入できるが核まで到達できないあるいは、核まで到達できるが CCC-DNA の形成まで至らなくなっている可能性がある。一方、MB+光による不活化処理では、ウイルスコピーおよび感染効率とも 1~2log 程度の低下にとどまった。原因として、(1)本研究においては、感染性の指標を HBV CCC-DNA の検出までとしたため、もしウイルスの産生という観点でみることであればより高い不活化効率が得られたかも知れない。(2)実験で用いた HBV 粒子が凝集をおこし MB と作用しづらい状態にあった、などが挙げられる。また、このアシアロ化した HBV の感染系が、正確な in vivo 感染機構を反映しているかについても、今後更に綿密な研究が必要と思われた。

#### E. 結論

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、その為簡便な感染性の評価方法は存在しなかった。本方法でも、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いが、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・除去実験などの評価に応用できると思われる。

#### 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: J Viral Hepat.

2006 13:11-18

2. 学会発表

なし

- H. 知的財産の出願・登録状況

該当無し

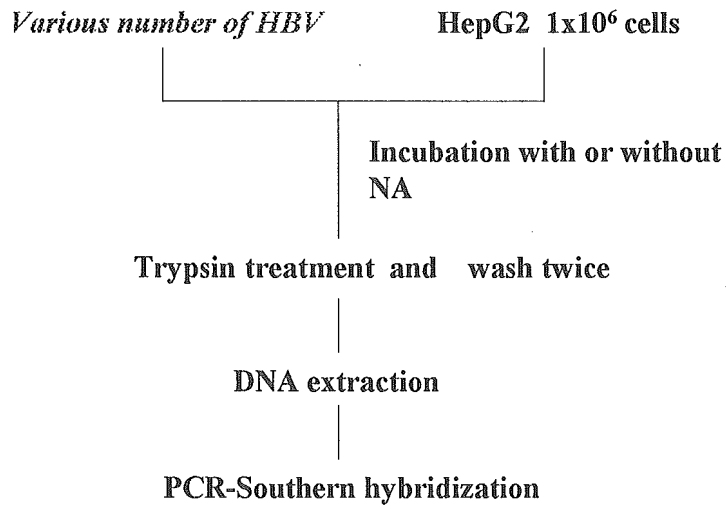


Fig. 1 Protocol for detection of ccc-DNA

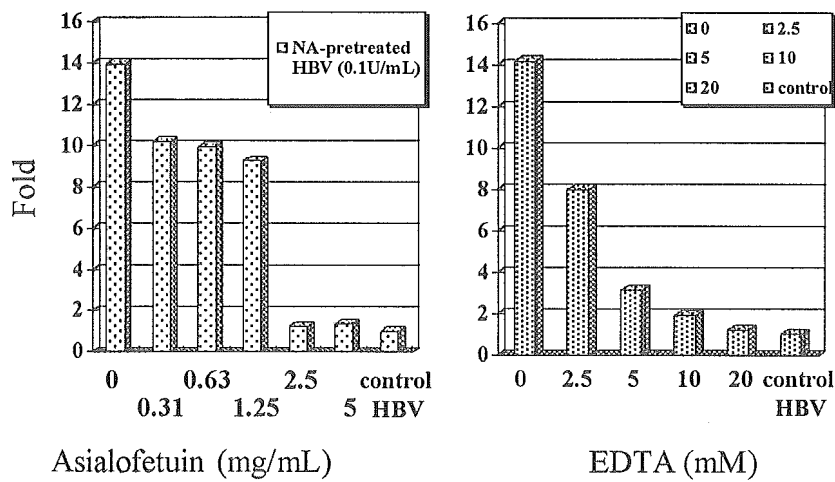


Fig.2 change of HBV binding

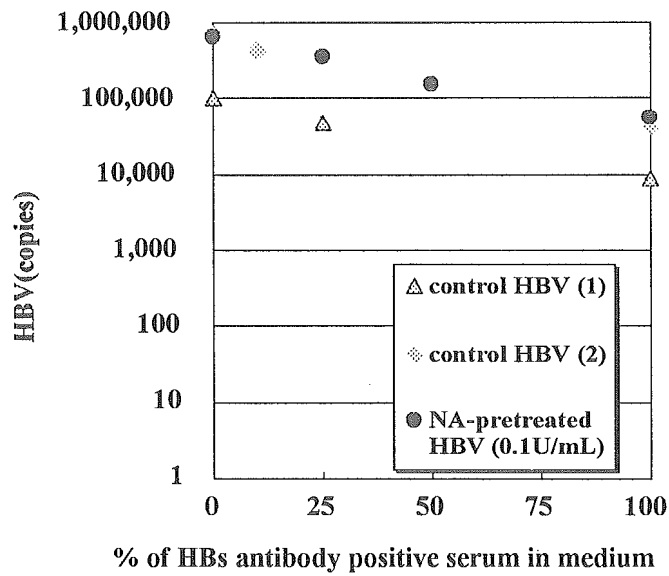


Fig. 3 Changes of HBV binding to cell surface

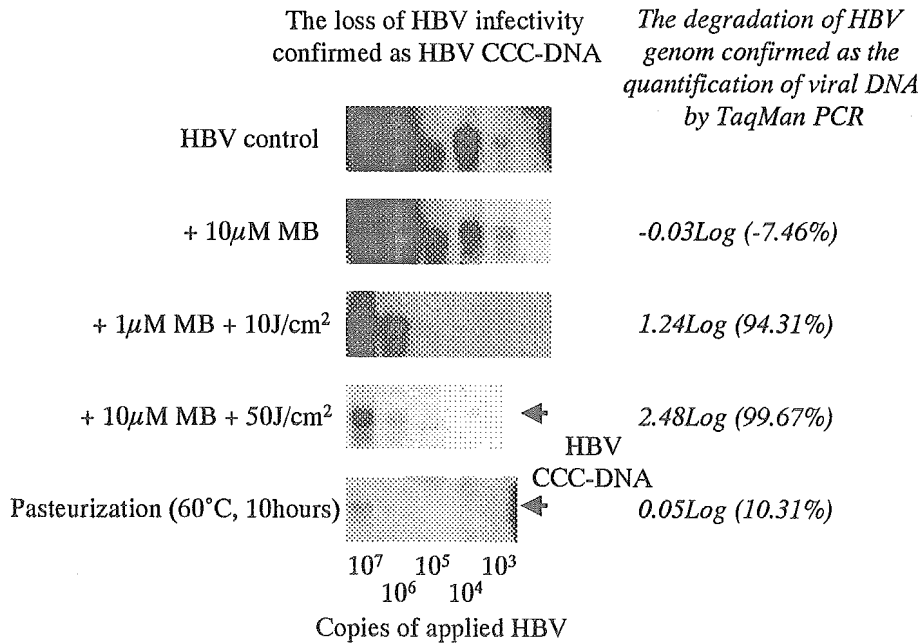


Fig. 4 Effect of photo and heat inactivation on HBV

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）

### 分担研究報告書

パルボウイルス B19 の不活化と新たなウイルス不活化法の開発

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 成果 1：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、我々はヒト胎児性癌 由来の NEC 細胞株や NCC 細胞株が B19 に感受性を持つことを見だし B19 の不活化の評価に応用している。今年度は界面活性剤処理（S/D）の評価を実施し、これまで報告された動物由来パルボウイルスと同様に不活化効果がないことを明らかにした。

成果 2：我々は食品分野で既に実用化されている滅菌法を血液製剤のウイルス不活化法に応用するために基礎的な検討を実施した。B19、マウスレトロウイルス、麻疹ウイルス等への不活化効果を検討し、血漿の変性しない条件下において有効なウイルス不活化効果があることを明らかにした。特に、B19 に関しては他の不活化法に比べて著明な不活化効果が認められた。この不活化法は血液製剤に導入されているこれまでの方法と全く異なり、新興・再興感染症から血液製剤の安全性を確保する上で重要な技術になると考えられる。

#### A. 研究目的

B19 は一般的に病原性は弱いですが、除去・不活化に抵抗性を示すことから血液製剤の安全性確保する上で重要なウイルスの 1 つである。B19 は最近まで培養が困難であったが、ヒト由来白血病細胞株 (KU812) が感受性を持つことが報告され、感染性の評価ができるようになった。我々は昨年度の本研究でヒト胎児性癌の細胞株（NEC、NCC）も感受性を持つことを明らかにした。一般に、培養が困難なヒトウイルスのウイルス除去・不活化の評価はウイルス学的性状が類似した培養可能な動物由来ウイルスをモデルウイルスとして評価

が実施されている。その場合、得られた結果の評価は慎重に行わなければならない。モデルウイルスよりも実際のウイルスが抵抗性を持っていることが否定できないからである。科学技術の進歩によって感染性の評価が可能になったウイルスに対してはモデルウイルスとの比較検討を実施し、相違を評価しておくことは安全性確保に重要だと考えられる。我々が検討した B19 はこれまでモデルウイルスとしてイヌパルボウイルスを用いて製造工程のウイルス除去・不活化が評価されていた。昨年度に加熱処理による不活化を検討し、モデルウイルスでは不活化効果が期待されないが、B19

においては加熱に対して高感受性を示すことを明らかにした。今年度は分画製剤のウイルス不活化法として一般的に用いられている界面活性剤処理（S/D処理）の評価を実施した。

また、多数の供血者からの血漿を集めて製造される分画製剤は新興・再興感染症を始め、既知・未知のウイルスが混入する可能性が常に存在している。現在でも製造工程に複数のウイルス除去・不活化工程が導入されているが、エンベロープを持たないウイルスに対する有効な工程は少ない。分画製剤の安全性のさらなる向上のために、新たなウイルス除去・不活化法の開発は必要である。また、輸血用血液については、血小板や新鮮凍結血漿の不活化法が導入されている国や地域もあるが安全性や処理能力に解決すべき点もある。重要なことは赤血球製剤に対する不活化法は現時点では全くないことである。成分製剤に対する有効な不活化法が開発されれば世界の人々への貢献は計り知れない。昨年度から我々は、食品の滅菌に既に実用化されている滅菌法を輸血用血液を初めとした血液製剤のウイルス不活化法として応用可能か、基礎的検討を行ってきた。今年度はウイルスの種類を増やし、また、血漿に与える変性等の影響を評価した。

## B. 研究方法

### 1. S/D処理によるB19の不活化の検 (S/D処理法)

各々の最終濃度が2%となるようにト

リ-(n-ブチル)-フォスフェート(TNB P)にTritonX-100をPBSに添加した溶液、又はTNB PにTween80を添加したPBS溶液を各々作製した。500マイクロのS/D溶液に等量のPBSで10倍に希釈したB19陽性血漿とを混ぜ、4時間ローターにて攪拌し、S/D処理を行った。S/D処理に用いた試薬は細胞毒性が強いので、0.2gのbiobeadsを含んだ1mlのPBSを添加し、2時間攪拌することによってS/Dを吸着・除去した。S/D処理しないウイルス液も同様にbiobeads処理を行った。

### (感染方法)

感染1日前にNCC細胞 $2 \times 10^5$ 個を24穴プレートに播く。10%FCSを含んだRPMIを用いてS/D処理した検体を希釈し、細胞に添加した。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 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、 $37^\circ\text{C}$ にて2時間 $\text{CO}_2$ インキュベーター内にて吸着させた。2時間後1mlの10%FCS-RPMI培養液を加え2日間培養し、細胞を回収し、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。

### 2. 新しいウイルス不活化法の開発

B19、麻疹ウイルス、マウス白血病ウイルス(レトロウイルス)を5%アルブミン製剤に10%容量を加え、評価のため

の試料とした。ウイルスの感染価測定は B19 は上記 1 と同じ方法を用いた。麻疹ウイルスは Vero 細胞にウイルスを吸着させた後に寒天を重層し形成されるプラーク数によって感染価を測定した。マウスレトロウイルスは SC-1 細胞にウイルスを感染させ、3 日後に UV 照射によって SC-1 細胞を不活化後、XC 細胞を重層し形成されるプラーク（実際は巨細胞）数を持って感染価を評価した。不活化処理による血液製剤への影響を評価するために不活化処理の回数、時間等をグロブリン製剤、血漿、赤血球を用いて評価した。

#### C. 研究結果

1: B19 に対する S/D 処理による不活化処理

S/D 処理によって B19 の感染価に変化が全く認められず、効果がないと評価した (図 1)。

2: 新しいウイルス不活化法の評価

B19 は約 5 log 感染価が減少した (図 2)。また、麻疹ウイルスは測定限界以下となった (ワクチン株のため高力価のウイルスが得られないので)。マウスレトロウイルスは 3 log 以上減少し、測定感度以下となった。これらの不活化処理の条件ではグロブリンや血漿に明らかな変性は認められなかった。しかし、赤血球は溶血を生じた。赤血球が溶血しない条件ではマウスレトロウイルスのみに不活化効果が認められた。

#### D. 考察

NCC 細胞株を用いて、S/D 処理による B19 の不活化効果を検討した。ブタパルボウイルスでの結果では envelope がいないために効果がないと報告されていたが、B19 についての報告は我々が見た範囲ではない。S/D 処理によって B19 の周囲に付着しているタンパクが取り除かれ、処理によって逆に感染価が上昇する可能性もあったが、感染価に全く変化が認められなかった。その結果はモデルウイルスの結果と一致していることが確認された。

新しいウイルス不活化法の開発では、これまで有効な不活化法がなかった B19 に対し、血漿タンパクの変性がない条件下において著明な不活化効果が認められた。Envelope を有する RNA ウイルスに対しても有効な不活化効果があることが明らかとなった。しかし、現段階ではこれらのウイルスを不活化する条件では赤血球に溶血が生じ、赤血球製剤のウイルス不活化にはさらに工夫が必要である。溶血が生じない条件下ではマウスレトロウイルスのみに不活化効果が認められた。HIV に対しても同様な不活化効果が得られ、且つ処理に伴う赤血球製剤の安全性が確認されれば、方法的に簡便で処理に要する費用が安価なことから、HIV 感染率が高い地域の輸血の安全性向上に貢献することが期待できる。

#### E. 結論

血漿分画製剤のウイルス不活化法として一般的に導入されているS/D処理に対するB19の不活化効果を検討し、これまでに報告されているモデルウイルスと同様にB19では不活化効果が全く認められなかった。これによってS/D処理に関して、モデルウイルスから得られた結果はB19を反映しているものと考えられた。

新しいウイルス不活化法ではB19、麻疹ウイルス、マウスレトロウイルスに対して有効なウイルス不活化が、血漿を変性させない条件下で得られた。特にB19に対してはこれまでにない不活化効果が得られた。

#### 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：輸血、血液製剤の安全性の現状、公衆衛生、第69巻、781-785、2005年。
- 2) 水沢左衛子、岡田義昭、堀内喜信、他：C型肝炎ウイルスRNAの遺伝子検査法のための第一次国内標準品の作製、日本輸血学会雑誌、51巻、515-519、2005

##### 2.学会発表

- 1) Okada, Y. Umemori, K., and Yamaguchi, K.: B19 inactivation by heat treatment with epithelial cell lines. 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. Washington, May 2005

- 2) 梅森清子、岡田義昭、水沢左衛子、山口一成：上皮性細胞を用いたヒトパルボウイルスB19不活化の評価系の確立、第53回日本ウイルス学会、横浜、2005年

#### H. 知的所有権の取得状況

なし



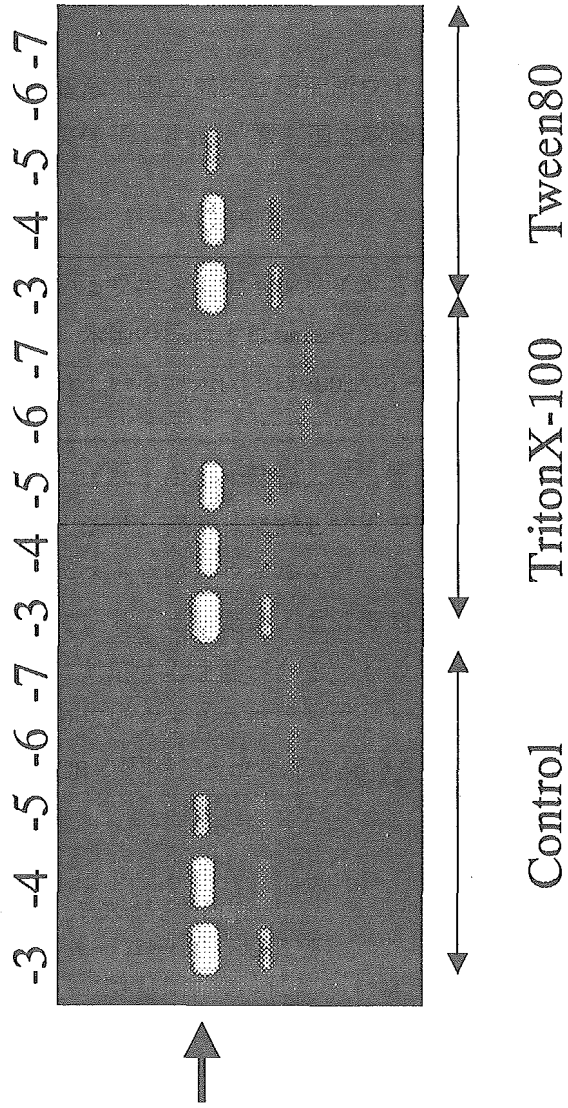


図1. S/D処理によるB19の不活化効果

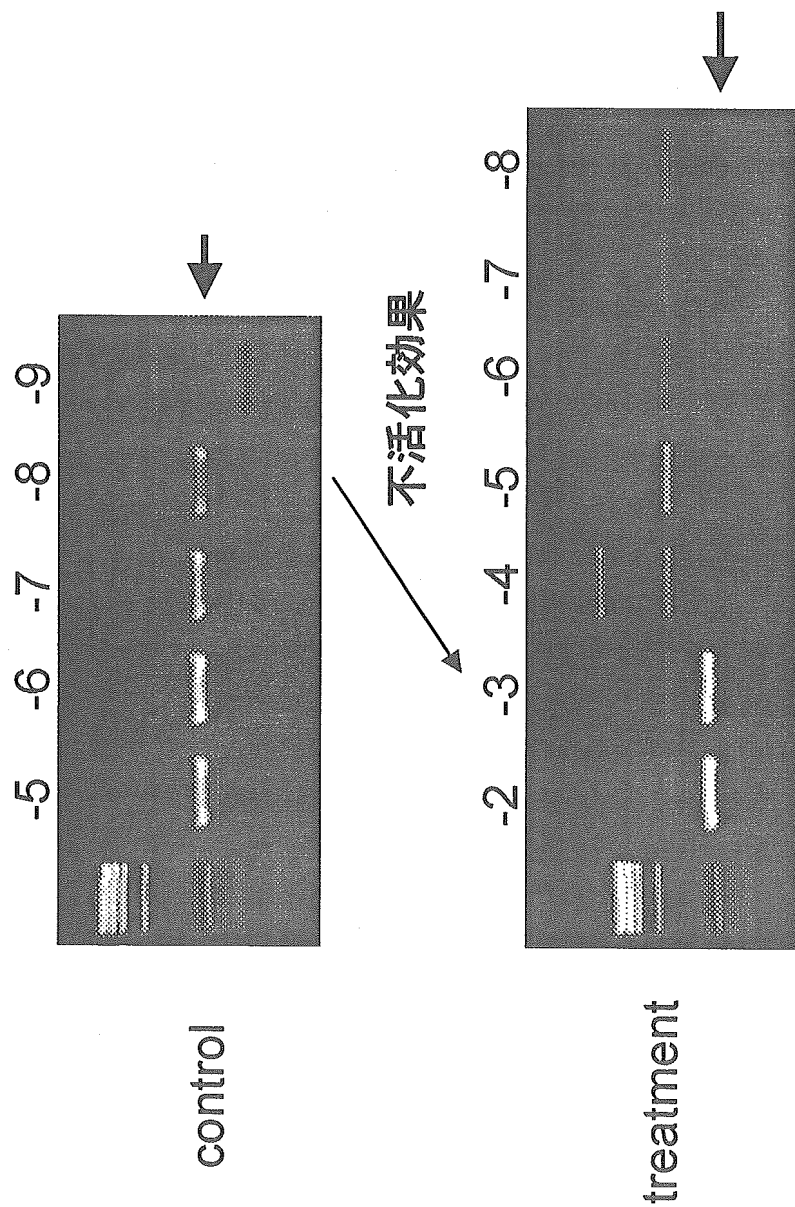


図2 新規不活化法によるB19の不活化

LAMP 法によるヒトパルボウイルス B19 の検出法の開発と感度評価

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 B19 は直径 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・不活化の方法は未だ確立されていない。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。前年度の研究で献血者の長期フォローアップを行い、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り、輸血によす感染例も報告されている。そこで、安価、迅速、簡易、精確な遺伝子増幅法である LAMP 法を用いた検出法の開発を行い、従来の核酸増幅法と同様に増幅産物を検出することができた。

A. 研究目的

ウイルス感染後の抗体の存在下でも検出可能な高感度検査として LAMP 法を用いた核酸増幅法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

現時点でヒトパルボウイルス B19 の最も高感度な検出系である核酸増幅法 PCR を基準にして、新しい拡散増幅法である LAMP 法による検出を行った。

C. 研究結果

海外で分離されたウイルス株の塩基配列データ及び本邦で分離された 2 種のウイルス株の塩基配列を決定し、共通する配列を基に 4 種類のプライマーを設計し、検体の前処理を含めた反応条件の微細な設定は進行中であるが、とりあえず RHA 法陽性検体 20 本、RHA 法陰性 PCR 法陽性の検体 5 本で、LAMP 法による検出を試みたところ全例陽性を確認できた。（PCR 法陰性 5 本は全て陰性）（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。）

D. 考察

LAMP 法は PCR 法のような変性、アニーリング、DNA 合成に伴う温度設定を必要とせず、一定の温度（63 度 C）で、しかも短時間で反応は終了し、増幅の有無を反応チューブを開けることなく濁度でモニターすることができ、反応後の検出操作も必要が無いので、核酸増幅検査で最も問題となるコンタミネーションも避けることができる。又、プライマーを 4 種類用いることによって高い特異性を確保することが出来る。RHA 法の弱点である感染直後及び抗体が出現した後のウイルス血症を検出できる検査法としての LAMP 法の可能性を更に検討する予定である。

E. 結論

LAMP 法はヒトパルボウイルス B19 の高感度検出法となる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

なし。

H. 知的財産権の出願\_登録状況

なし。

厚生労働科学研究費補助金  
(厚生労働省医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

分担研究報告書

WNV 検出のための TaqMan RT-PCR, SYBR Green I Based RT-PCR  
同時アッセイ法の開発

分担研究者 高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

協力研究者: 伊藤美佳子、小滝 徹 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

米国で流行しているウエストナイルウイルスは蚊によって媒介される節足動物媒介性ウイルスであるが、米国の流行では輸血や凍結血漿での感染例や、臓器移植により感染した症例も報告されている。米国では2003年6月から9月までに、約250万献血血液がスクリーニングされ1285検体(0.05%)がPCRで陽性であった。我が国では平成17年9月には、米国からの日本人ウエストナイル熱輸入感染症例が確認された。現在、ウエストナイルウイルス遺伝子検出法は、米国株に対して高感度な方法が開発され、使用されている。しかしながら、ウエストナイルウイルスは、アフリカ、中近東、ヨーロッパ、ロシアと広い地域に分布している。このため、血液製剤からのウイルス遺伝子検出に関して、より広いウイルス株に対応する必要がある。そのためリアルタイムPCR (TaqMan法) の感度を維持しつつより広いウイルス株に対応した検出法としてTaqMan RT-PCRおよびSYBR Green I Based RT-PCRの同時アッセイ系を開発した。

A.研究目的

ウエストナイルウイルスが、1999年、西半球で初めて米国ニューヨーク市および周辺地域で流行した。北米の流行では従来  
の流行より、感染鳥の発病や死亡、ウマと  
ヒトにおける脳炎の発生が顕著である。北  
米での流行はその後毎年拡大しており、  
2002年には4156人、2003年には9862人  
の患者が発生し、2004年はカリフォルニア  
やアリゾナでの流行が大きく、全米で  
2470人の患者が発生した。そして、2005  
年も2900人(死亡116例)の患者が報告  
された。

蚊によって媒介されるウエストナイルウ

イルスの特殊な感染経路として、2002年  
の米国の流行では輸血や凍結血漿での感染  
例や、臓器移植により感染した症例も報告  
されている。そのため現在、米国では輸血  
用製剤のスクリーニング検査が実施されて  
いる。実際に我が国でも平成17年9月には、  
米国からの日本人ウエストナイル熱輸入  
感染症例が確認された。現在、ウエスト  
ナイルウイルス遺伝子検出法は、米国株に  
対して高感度な方法が開発され、使用され  
ている。しかしながら、ウエストナイルウ  
イルスは、アフリカ、中近東、ヨーロッパ、  
ロシアと広い地域に分布している。このた