

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（以下 B19）の血液製剤に於ける除去・不活化の方法は未だ確立されておらず、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、安価、迅速、簡易、精確な遺伝子増幅法である LAMP 法で、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。本年度は、血清サンプルの最適な前処理方法を検討し、短時間で多検体処理可能な反応系が得られた。更に、ウイルスのほぼ全領域を含むゲノムをプラスミドにクローニングし、感度評価に用いたところ、180 分の反応で 2.3 コピーのターゲット DNA を 90% の確立で検出し得た。核酸増幅反応の副産物である magnesium pyrophosphate の白濁をリアルタイムに測定することにより、検量線を用いて定量も可能であった。今までに報告してきた非構造蛋白 NS1 の多型性に基づいたサブタイプ A~E の全てに反応し、抗体の存在下でも、非存在下と同等の検出感度を示した。この方法はウイルス検出除去が必要な種々の用途に応用可能であると思われる。

A. 研究目的

LAMP 法によるヒトパルボウイルス B19 の検体前処理を含めた検出法を確立し、感度、サブタイプとの反応性等の評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

B19 ゲノムの構造蛋白 VP1 領域に 3 対のプライマーを設定し、LAMP 法による反応を行った。反応は 63℃で行い、濁度計でモニターした。25  $\mu$ l の反応系に於けるサンプル量、サンプル血清中のウイルスサブタイプ、抗体の有無、サンプル血清の前処理を種々の条件で検討した。又、ウイルスのほぼ全領域を含むゲノムをプラスミドにクローニングし、既知のコピー数のサンプルで検量線を求め感度評価に用いた。

C. 研究結果

サンプル血清の前処理は血清を 94℃2 分処理した時、ウイルス DNA を抽出した時とほぼ同等の感度が得られた。加熱前処理は抗体の有無に関わらず有効であった。25  $\mu$ l の反応系に於ける血清サンプル量は 2  $\mu$ l が最適であった。B19 サブタイプとの反応性は今まで報告してきた A~E 全てをカバーしていた。既知量のプラスミドを希釈して 2.3 コピーのサンプルを 10 本作成し、そのうち 9 本（90%）で陽性の結果が得られた。更に、加熱前処理をせずに LAMP 反応を行った時、遅れてウイルス核酸の増幅が見られる現象が観察された。

（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。）

D. 考察

LAMP 法は PCR と異なり、一定の温度（63℃）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、簡単な短時間加熱の前処理と組み合わせることにより、核酸増幅検査で最も問題となるコンタミネーションの可能性を最小限に抑え、しかも全工程 200 分以内で高感度定量化を達成することができた。現在 B19 スクリーニングに用いられている RHA 法や ELISA 法の弱点である抗体が出現した後のウイルス血症をも検出できた。B19 の不活化除去のモニターのみならずウイルス陰性の輸血を必要とする受血者即ち、妊婦への輸血に際して B19 による胎児水腫を予防する場合や、溶血性貧血患者の輸血時に急性赤芽球癆を予防する目的や、持続感染の可能性のある AIDS 患者、造血幹細胞移植レシピエント等の為のスクリーニングに用いることが可能であり、更に、加熱前処理をせずに 63℃で LAMP 反応を行った時、遅れてウイルス核酸の増幅が見られたことは、この温度でウイルス粒子が不安定となり、核酸が遊離された事を意味し、液状加熱による不活化の可能性を示唆していると思われる。

#### E. 結論

今回開発した LAMP 法と加熱処理を組み合わせたヒトパルボウイルス B19 の高感度検出法は、B19 陰性の輸血用血液を選ぶ方法として用いることができる。種々のスクリーニングにも応用可能と思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. Nakashima A, Tanaka N, Tamai K, Kyuuma M, Ishikawa Y, Sato H, Yoshimori T, Saito S, Sugamura K. Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology*. 2006 Jun 349(2):254-63.
2. 本研究内容は平成 19 年度に発表予定。

#### 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

フラビウイルス共通プライマーの開発と評価

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：林 昌宏 (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。しかし、蚊が媒介するウイルス感染症としては、同じフラビウイルス属のウイルスであるデングウイルス感染によるデング熱・出血熱が、世界的にはるかに患者数が多く、わが国の輸入デング熱症例は毎年60例前後の多数を数えている。また、ダニ媒介性脳炎ウイルスも北海道には常在しており、このような点から、フラビウイルス属共通のPCR法を開発した。

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。北米では、その後も毎年流行は持続し、2006年も4219人(死亡161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。しかしながら、フラビウイルス属の輸入症例とし

ては、デング熱が2005年74例、2006年も57例(第52週時点)とはるかに多い。その他、オーストラリアでは時にマレー溪谷脳炎も流行することがある。

B.研究方法

1) フラビ共通プライマーの設計  
下記の4領域を候補とした。(図1)  
2,229-2,813 (E-NS1領域)  
4,744-5,573 (NS3領域)  
7,918-8,735 (NS5領域)  
9,667-10,122 (NS5領域)

2) 反応条件と反応時間は下記の如くである。|  
逆転写 (RT) 反応は、53°C・30分間行い  
その後の条件は以下の如くである。  
熱変性： 92°C2分間

熱変性： 92℃ 1分間  
アニーリング： 48℃ 1分間  
伸長反応： 72℃ 1分間  
  
伸長反応： 72℃ 1分間  
保存： 4℃

プライマー設計のために遺伝子情報を用いたウイルスは以下のウイルスである。JEV JaGAR01

JEV JaOArS982  
JEV Nakayama  
WNV Eg101  
WNV NY99  
WNV FCG  
KUNV FLSDX  
KUNV pAKUN  
MVEV 1-51  
SLEV Parton  
DENV-1  
YFV-17D

また、実際に検出に関して使用したウイルスは、日本脳炎ウイルス・デングウイルス1型・ウエストナイルウイルス・セントルイス脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス・ネギシウイルス・ランガットウイルス、ヨコセウイルスを用いて検討した。

#### C. 研究結果

候補として設定した4領域のうち、デングウイルス、日本脳炎ウイルス血清群、ダニ媒介性ウイルス群の3群を増幅できた領域は7,918-8,735 (NS5領域)であった。しかし、黄熱ウイルス、ヨコセウイルス、マレー溪谷ウイルスが検出できなかったため、プライマー設定領域をさらに小さくした。

FVcx.7905s と FVcx.8727c のプライマーセット (FVcx7905-8727) と FVcx.8695s と FVcx.9044c (FVcx8695-9044) のプライマーセットを作製し検討した (図2)。

その結果、FVcx7905-8727 はセントルイス脳炎ウイルスで目的のサイズの産物が得られなかった (図3)。一方 FVcx8695-9044

は、蚊媒介性フラビウイルス属の日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、マレー溪谷ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、黄熱ウイルスで目的の大きさの産物が得られ、ダニ媒介性フラビウイルスであるダニ媒介性脳炎ウイルス、ランガットウイルス、ネギシウイルスおよびでもベクターの不明なヨコセウイルスでも目的の大きさの産物が得られた (図4)。

#### D. 考察

蚊媒介性ウイルス感染症は、近年各地で大きな流行をみている。米国でのウエストナイル熱・脳炎の流行、熱帯・亜熱帯地域におけるデング熱・出血熱は世界的な大きな問題であるが、日本脳炎も中国、東南アジアを中心に世界的には年間4万人におよぶ感染症であり、より広範囲で高感度なフラビウイルス検出法が必要である。今回、NS5領域における8700塩基領域を起点とした塩基配列8695-9044領域のプライマーが、最も適していることが判明した。今後この領域を標的としてリアルタイムPCR法などより高感度なウイルス遺伝子系を確立することが可能であると考えられる。

#### E. 結論

フラビウイルス属共通のPCR法を開発した。その標的領域として8695-9044領域のプライマーセットが最も適していることが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

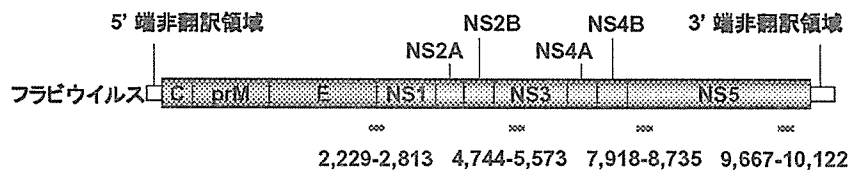
なし

##### 2. 学会発表

なし

図1

### フラビウイルス共通プライマーの設計



**設計に用いたウイルス**

- JEV JaGAr01    • KUNV FLSDX
- JEV JaOArS982 • KUNV pAKUN
- JEV Nakayama • MVEV 1-51
- WNV Eg101    • SLEV Parton
- WNV NY99    • DENV-1
- WNV FCG    • YFV-17D

**蛋白質**

**WNVの遺伝子ポジション**

C	97 - 465
pr	466 - 741
M	742 - 966
E	967 - 2469
NS1	2470 - 3528
NS2A	3529 - 4218
NS2B	4219 - 4611
NS3	4612 - 6468
NS4A	6469 - 6915
NS4B	6916 - 7680
NS5	7681 - 10395

図2

### フラビウイルス属共通RT-PCR用プライマーの設計

プライマー	塩基配列 (5'-3')	正負
FVcx.7905s	ggatgtggaagaggcggctgg	+
FVcx.8727c	caaaggctgtggtgtcagtcac	-
FVcx.8695s	atgactgacaccacagcctt	+
FVcx.9044c	tctctcttgcccatcatggt	-

図3

プライマーセットFVcx7905-8727の種々の  
フラビウイルスに対する反応性の検討

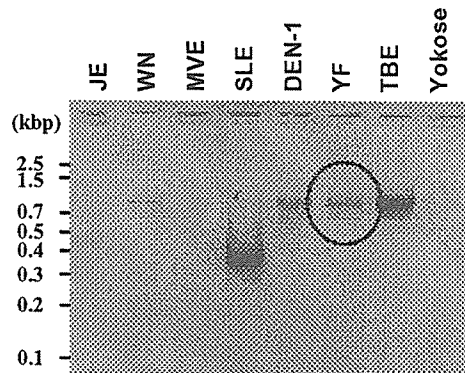
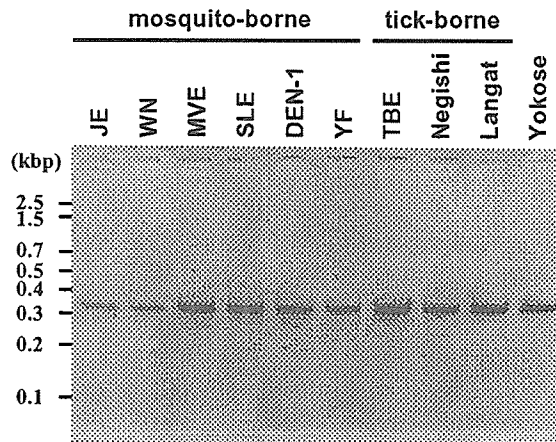


図4

プライマーセットFVcx8695-9044の種々の  
フラビウイルスに対する反応性の検討



プラノバ 35N および 20N による E 型肝炎ウイルスの除去

分担研究者 武田直和（国立感染症研究所ウイルス第二部）

研究要旨 E 型肝炎ウイルスの構造タンパクをコードする遺伝子を粒子内に取り込んだ組換えウイルス粒子を作製した。この粒子は直径 35~38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有していた。この粒子を用いプラノバ 35N および 20N の除去効果を評価した。プラノバ 35N では完全除去が困難と思われたが、プラノバ 20N では、完全ではないが、極めて高い除去率が得られた。

協力研究者 李 天成、岡田義昭（国立感染症研究所）

A. 研究目的

E 型肝炎ウイルス（HEV）は E 型肝炎の原因ウイルスである。現在、少なくとも四つの遺伝子型が知られている。これまで先進国において E 型肝炎は輸入感染症と思われてきたが、近年、まったく海外渡航歴のない急性 E 型肝炎患者が発見されるなど、日本でもすでに土着しているウイルスであることが明らかになってきた。わが国でも血液を介した感染が報告されるようになった。HEV が増殖できる培養細胞系は確立されておらず、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて作製されたウイルス様中空粒子（VLP）がウイルスの形態や抗原性の研究に用いられてきた。本研究では 3 型の構造蛋白を発現し、ネイティブな HEV に近いサイズを持つ VLP を作製し、プラノバ 35N および 20N の除去効果を評価した。

B. 研究方法

3 型 HEV ORF2 の全長領域を RT-PCR 法で増

幅し、常法どおり組換えバキュロウイルスを作製した。昆虫細胞を MOI:10 で感染後、ORF2 全長を発現し感染細胞から VLP を回収し、ショ糖密度勾配遠心法、塩化セシウム平衡密度勾配遠心法で精製した。ウサギ抗 VLP 抗体、E 型肝炎患者血清、および遺伝子型 1 に対する単クローン抗体を用い、免疫電子顕微鏡、ELISA 法等で抗原性を比較した。

VLP 83  $\mu\text{g}$  を Eagle's MEM あるいは 5%アルブミン溶液に懸濁し、有効膜面積 0.001  $\text{m}^2$  のプラノバ 20N あるいはプラノバ 35N でろ過した。ろ過前後の VLP 量を HEV ORF2 をターゲットにした real-time RT-PCR で定量し、HEV の除去効率を評価した。

C. 研究結果

1. ORF2 の全長の発現

感染細胞内には感染 2 日目に、非感染細胞やバキュロウイルス野生株感染細胞では検出されない分子量 72k および 58k のバンドが出現した。発現は 5 日目にプラトーに達し、7~8 日目には 66k、および 54K のバンドが出現した。上清からはウイルス特異蛋白は全く検出されなかつ

た。感染 7 日目の感染細胞を回収し、細胞を破碎後、遠心上清を回収した。超遠心法で濃縮し、その沈査を電子顕微鏡で観察したところ、直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子が多数観察された。

## 2. 中空粒子内に取り込まれた核酸の解析

直径 35-38nm のネイティブなウイルス粒子とほぼ同じ直径を有する粒子は、その電顕像から粒子内部に核酸分子を取り込んでいることが予想された。VLP から抽出した核酸分子は RNase A に感受性、DNase I に抵抗性を示したことから RNA 分子であること、またアガロース電気泳動による解析から 2 kb と 3 kb の長さを有していることが明らかになった。そこで、精製粒子を用い、HEV 構造タンパク領域を増幅するプライマーを用いて増幅し、その塩基配列を解析した。その結果、増幅産物は HEV 特異的な配列を持つ核酸であった。

## 3. プラノバ 20N およびプラノバ 35N による HEV VLP の除去

組換え HEV VLPs(83  $\mu$ g)を膜面積 0.001 m<sup>2</sup> のプラノバ 35N および 20N でろ過し、ろ過前後の HEV RNA を RT-PCR で定量した。83  $\mu$ g の VLP は  $4 \times 10^{12}$  の粒子数に相当する。ろ過溶液から RNA 抽出、抽出 RNA から cDNA、cDNA から real-time RT-PCR への過程でコピー数は 1/200 に減少している。プラノバ 35N での反応あたりのコピー数はろ過前が「 $1.23 \times 10^7$ 」、ろ過後が「 $1.72 \times 10^2$ 」、プラノバ 20N でのそれらは「 $1.09 \times 10^7$ 」と「Undetectable」であった。また、ろ過前後の溶液について ORF2 をターゲットに RT-PCR で増幅し、増幅産物をアガロース電気泳動で分離してみたところ、ろ過前は 35N、20N、ともに陽性、ろ過後の溶液では 35N は弱いバンドが検出された。20N ではバンドは検出されなかった。さらに nested PCR で増幅したところ、ろ過後のサンプルは全て陽性となった。

## D. 考察

遺伝子型 3 HEV の構造蛋白領域全長を組換えバキュロウイルスで発現することによって、ネイティブな粒子と同じ大きさの VLP を作成することができた。また、産生された VLP の内部には ORF2 をターゲットにした RT-PCR で増幅可能な RNA 分子が含まれていた。real-time RT-PCR で定量の可能であった。

VLP のサイズが 35~38 nm であることから、プラノバ 35N で完全に除去することが困難であることは予想されていた。しかし、 $10^5$  の除去効率を得ることができたことから、VLP は 35 nm より 38 nm に近いサイズを有していることが明らかになった。今後、この粒子の三次構造の解析により、ネイティブな HEV 粒子の構造に関する情報が得られることも期待できる。

プラノバ 20N では  $10^7$  の除去効率を得られた。ろ過後の溶液からは、nested PCR ではあるが、遺伝子が増幅されたことから除去は完全とはいえない。ここで検出された RNA の性状は現時点では不明であるが、壊れた粒子に由来する、あるいは精製が完全ではなく、用いたサンプルにはじめからコンタミしていた、などの可能性を踏まえ今後検討したい。

## E. 結論

組換えバキュロウイルスで発現した粒子はネイティブ粒子と同じ直径 35~38nm であった。プラノバ 35N では完全除去が困難と思われたが、プラノバ 20N では、完全ではないが、極めて高い除去率が得られた。血液中に含まれる HEV 粒子の濃度とカラムの除去率との兼ね合いが重要である。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表



松浦 友紀子、恒光 裕、李 天成、有川 二郎、宮村 達男 武田 直和。日本に生息するシカの E 型肝炎ウイルス抗体保有。日本ウイルス学会、第 54 回学術集会 2006 年 11 月 名古屋

## 2. 論文発表

Li T-C, Miyamura T, Takeda N: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2007;76:170-172.

Li T-C, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N: Serological evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006;74:932-936.

Nakai I, Kato K, Miyazaki A, Yoshii M, Li TC, Takeda N, Tsunemitsu H, Ikeda H: Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis e virus at three Japanese Swine farms. Am J Trop Med Hyg 2006;75:1171-1177.

Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, Ishida T, Li TC, Takeda N, Ikeda H, Tsunemitsu H: Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. Vet Rec 2006;159:853-854.

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

## 動物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

研究分担者：田代真人（国立感染症研究所ウイルス第3部）

協力研究者：田口文広（国立感染症研究所ウイルス第3部）

川瀬みゆき（国立感染症研究所ウイルス第3部）

### 研究要旨

血液製剤に含まれる SARS コロナウイルス (SARS-CoV) は 35nm フィルター濾過、界面活性剤 (S/D) 及び熱 (60℃ 2時間) 処理により、完全に感染性が失われることが、これまでの研究から明らかにされた。本年度は、動物コロナウイルス、マウス肝炎ウイルス (MHV) のこれら薬剤、処理に対する感受性を検討した。MHV も SARS-CoV と同様、35nm フィルター処理、S/D 処理、熱処理により、ほぼ完全に感染性が失われた。このことから、SARS-CoV で認められた性状は、他のコロナウイルスにも適用できることが推測された。また、MHV は 20% アルコールで 1 時間処理の条件では、約 10% の感染性がみとめられたが、70% アルコール処理では、10 分で完全に感染性が失われた。コロナウイルスのアルコールによる不活化には 70% アルコールの使用が重要であることが判明した。

### A. 研究目的

SARS は 2002 年から 2003 年にかけて中国広東省から香港に飛び火し、その後東南アジアを中心とする全世界へ伝播した。SARS は死亡率が高い事から世界を震撼させた新興感染症である。世界各国の共同研究により、原因病原体はそれまで報告されたウイルスとは異なる新たなコロナウイルス (SARS コロナウイルス) であることが明らかにされた。SARS は感染初期には呼吸器、血液中から感染性ウイルスやウイルスゲノムを検出するのが困難であり、確定診断が難しい感染症である。本研究は、SARS 感染極初期 (発熱前) 患者の血清が血液製剤として利用される可能性もあり、血液製剤中から SARS-CoV を取り除く方法を確立する目的で遂行された。これまでの研究から、SARS-CoV は熱、界面活性剤、35nm フィルター処理により、ほぼ完全に感染性が失われることを明らかにしてきたが、本年度は他のコロナウイルスを用いて同様の検討を行なった。

### B. 研究方法

MHV は、容易に高い力価の種ウイルスを作成できる MHV-A59 株を用いた。

MHV-A59 は肝臓に親和性を示し、中等度の病原性を示す株である。ウイルス増殖及び定量にはマウスアストロサイト由来の株化培養細胞である DBT 細胞を用いた。ウイルスは感染価が大凡  $1.0 \times 10^7$  PFU/ml の力価の種ウイルスを使用した。MHV-A59 の血漿分画製剤中の S/D 処理による不活化は以下の方法に依った。血漿分画製剤としては、5% グロブリン溶液及び 5% アルブミン溶液を用いた。血漿分画製剤の対照として細胞培養用培地 (DMEM, 日水) を用いた。これらの溶媒中に  $1 \times 10^5$  PFU/50  $\mu$ l になるよう MHV-A59 を調整し、同量の S/D 剤を更に加え (全量で 500  $\mu$ l)、室温で 4 時間ゆっくりと攪拌した。その後、S/D を取り除くための biobeads を加え、室温で 4 時間攪拌し、2000 回転 5 分遠心し、biobeads を含まない溶液を分離後、溶液中のウイルス感染価 (PFU) を下に述べる plaque assay で定量した。60℃ 中の熱安定性については以下のように行った。5% グロブリン溶液 2.7 ml に 0.3 ml の MHV-A59 を加え、60℃ で 1、及び 4 時間恒温槽で処理し、そのウイルス力価を測定した。ウイルスの定量は以下のような micro-plaque assay により行った。DBT 細胞を 24 well plate に培

養し、confluent 細胞の培養液を除き、10 倍階段希釈したウイルス液を 50  $\mu$ l/well で、それぞれを 2 well に接種した。37°C で 1 時間吸着後、1% FCS, 0.75% methyl cellulose を含む DMEM 0.5 ml を加え、37°C で更に一晚 (12~16 時間) 培養した。更に、10%ホルマリンを各 well に 0.5 ml 加え、30 分固定した後、細胞を crystal violet で染色し、MHV-A59 により形成される多核巨細胞を plaque として倒立顕微鏡下で算定した。

### C. 結果

血漿分画製剤グロブリンに含まれる MHV-A59 を 35 nm のフィルターで濾過した材料には、感染性ウイルスは全く認められなかった。また、アルブミン、グロブリン中の MHV-A59 を S/D 剤で 4 時間処理したところ、対照の DMEM に含まれる MHV-A59 と同様、完全に感染性が消失した。また、5%グロブリン溶液中のウイルスを 60°C 1 時間処理により、その感染性は完全に失われ、この条件下でウイルスが完全に不活化されることが示されたが、アルブミン溶液中のウイルスは 1/100 まで下がったが、完全に不活化するためには、4 時間の熱処理が必要とされた。

### D. 考察

MHV も SARS-CoV と同様のエンベロープを持つウイルスであり、Tween 20, NP-40 などの non-ionic detergent に感受性である。今回行った界面活性剤 S/D の処理によっても、感染性が完全に消失することが判明し、この結果は今までの界面活性剤を用いた結果と合致する。また、MHV-A59 の熱による不活化に関して、56°C 30 分の処理により、ウイルス感染性が著しく低下することが報告されており、SARS-CoV と同様熱に弱いことが指摘されていた。今回行った実験では、60°C 4 時間で感染性が完全に失われたが、この結果もこれまでの報告と合致するものである。

### E. 結論

血漿分画製剤中の動物コロナウイルス MHV-A59 は SARS-CoV と同様で界面活性剤である S/D より完全に除去できること、また 5%グロブリン溶液中の SARS-CoV は 60°C 1 時間の熱処理により完全に不活化されることが明らかとなった。動物コロナウイルスも SARS-CoV 同様の物理化学的性状を持っていることが明らかとなり、今後これらの実験には、ヒトに対して病原性のない動物コロナウイルスがモデルとして、使用できる可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Okada M, Okuno Y, Hashimoto S, Kita Y, Kanamaru N, Nishida Y, Tsunai Y, Inoue R, Nakatani H, Fukamizu R, Namie Y, Yamada J, Takao K, Asai R, Asaki R, Kase T, Takemoto Y, Yoshida S, Peiris JS, Chen PJ, Yamamoto N, Nomura T, Ishida I, Morikawa S, Tashiro M, Sakatani M. (2007). Development of vaccines and passive immunotherapy against SARS corona virus using SCID-PBL/hu mouse models. Vaccine. In press

Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Kanaji Y, Kurane I, Taguchi F, Tashiro M, and Morikawa S. (2006) Evaluation of a novel vesicular stomatitis virus pseudotype-based assay for detection of neutralizing antibody responses to SARS-CoV. J Med Virol. 78: 1509-1512.

Ishii K, Hasegawa H, Nagata N, Mizutani T, Morikawa S, Suzuki T, Taguchi F, Tashiro M, Takemori T, Miyamura T and Tsunetsugu-Yokota Y. (2006) Induction of protective immunity against severe acute

respiratory syndrome coronavirus  
(SARS-CoV) infection using highly  
attenuated recombinant vaccinia virus  
Dis. *Virology* 351: 368-380.

なし

Matsuyama S, Ujike M, Ishii I, Fukushi  
S, Morikawa S, Tashiro M, and Taguchi  
F. (2006) Enhancement of SARS-CoV  
infection by proteases. *Adv. Exp. Med.  
Biol.* 581: 253-258.

Ishii K, Yokota Y, Takemori T,  
Hasegawa H, Mizutani T, Morikawa  
S, Taguchi F, Miyamura T. (2006)  
Highly attenuated vaccinia virus  
Dis as a potential SARS vaccine.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 581: 593-596

Okada M, Takemoto Y, Okuno Y,  
Hashimoto S, Fukunaga Y, Tanaka T,  
Kita Y, Kuwayama S, Muraki Y,  
Kanamaru N, Takai H, Okada C,  
Sakaguchi Y, Furukawa I, Yamada K,  
Izumiya M, Yoshida S, Matsumoto M,  
Kase T, Peiris JS, DeMello DE, Chen PJ,  
Yamamoto N, Yoshinaka Y, Nomura T,  
Ishida I, Morikawa S, Tashiro M,  
Sakatani M. (2006) Development of  
vaccines and passive immunotherapy  
against SARS coronavirus using mouse  
and SCID-PBL/hu mouse models. *Adv  
Exp Med Biol.* 581:561-566.

Nagata N, Iwata N, Hasegawa H,  
Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A,  
Morikawa S, Saijo M, Itamura S, Saito T,  
Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T.  
(2006) Pathological and virological  
analyses of severe acute respiratory  
syndrome-associated coronavirus  
infections in experimental animals.  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 581:515-518.

## 2. 学会発表

## A型肝炎ウイルスの不活化法

分担研究者：米山徹夫（国立感染症研究所 ウイルス 2 部）

共同研究者：嶋崎典子（北里衛生科学センター）、

清原知子、戸塚敦子（国立感染症研究所 ウイルス 2 部）

岡田義昭、梅森清子（国立感染症研究所、血液・安全性研究部）

### 研究要旨

A型肝炎ウイルス(HAV)の不活化を加熱と加圧で試み、不活化の程度に HAV 株間の差異があることを見出した。

#### A.研究の背景

血液を介したA型肝炎ウイルス(HAV)の感染効率は、通常の感染ルートである経口感染より非常に高いことが動物実験で示されている。外国では血液製剤や輸血を介して感染した報告がいくつかあり、HAV の検査体制を整えている国もある。日本では毎年数百人の患者報告がある現状から、血液や血液製剤を介した感染の可能性を常に念頭においた安全対策が必要である。

#### B.研究目的

HAV の野外株は培養細胞で増殖させるのは難しく、実験室で扱うのは細胞に馴化させたウイルス株である。血液製剤の製造工程で使われる加熱処理、あるいは新規の不活化法である加圧処理に対して、遺伝子型の違う複数の HAV 細胞馴化株間で、不活

化の程度に違いがあるか検討した。

ウイルス安全性試験に適切な株を選別することが目的である。

#### C.研究方法

1) ウイルス：HAV の細胞馴化株、KRM003C、KRM238（遺伝子型 IIIB）、KRM031（IA 型）、TKM005（IB 型）を使用した。

2) 感染価の測定：HAV を感染させた GL37 細胞を免疫染色法（Immunofocus assay）で感染価を測定した（詳細は昨年度報告）。

3) 加熱試験：25%アルブミン中の HAV を、60℃で1時間及び10時間加熱した。

4) 加圧試験：25℃の温度で、1分毎の3回パルスをかけ、300Mpa から420Mpa まで加圧した。

#### D.研究成果

## 1. 加熱試験

HAV の 4 株に対し、25%アルブミン下、60°Cによる加熱を 1 時間及び 10 時間で行った。不活化され易い株と不活化されにくい株とに分かれた。不活化され易い株 KRM003C と KRM031 は 10 時間の加熱で  $5\log_{10}$  の不活化が認められたのに対し、加熱に対して不活化されにくい株 KRM238 と TKM005 は約  $3\log_{10}$  の不活化であった。両者で約  $2\log_{10}$  の差があった (図 1)。同じ遺伝子型の KRM238 と KRM003C でも不活化効率に  $1.6\log_{10}$  の差があった。

## 2. 加圧試験

HAV は 300Mpa 以下では加圧不活化に抵抗性であったが、300Mpa を超えてから不活化され始め、420Mpa では感染価は使用した 4 株中 3 株が  $3\sim 3.4\log_{10}$  低下した。使用した 4 株中の 1 株(KRM031)に  $4.7\log_{10}$  の不活化をみた。加圧不活化にも、HAV の株間で不活化され易い株とされにくい株とがある事が分かった (図 2)。

## E. 考察

HAV はエンベロープもなく、血液製剤の不活化処理で一般に不活化されにくいウイルスである。しかしながら不活化効率は HAV の株間で差があり、その評価は慎重になされなければならない。表 1 に実験の結果をまとめたが、Validation 等の試験に使用

する株は、細胞で良く増殖し、加熱や加圧に不活化されにくい KRM238 株の使用が医薬品の安全性上望ましい。加圧による不活化 HAV は 420MPa を必要とする。300MPa 以上の加圧では血液製剤はその生物活性を損なうことが多い。加圧不活化を HAV に適用するには更なる工夫が必要である。

## F.健康危険情報

なし。

## G.研究発表

### 論文発表

1. Kiyahara T., Sato S., Totsuka A., Miyamura T., Ito T.,and Yoneyama T. Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan,1973-2003. Microbiol. Immunol.51:185-191, 2006

### 学会発表

1. Kiyahara T., Sato S., Totsuka A., Miyamura T., Ito T.,and Yoneyama T. The Shifting Seroepidemiological Pattern of Hepatitis A in Japan, as of 2003. 5th World Congress on Vaccination, Immunization and Immunotherapy. Fairmont The Queen Elizabeth, Montreal, Canada.6-9 November 2006
2. 米山徹夫、\_ 原知子、下池貴志、戸塚敦子 : A 型肝炎ウイルス(HAV)の RT-LAMP 法による迅速診断、第 54

回日本ウイルス学会総会、名古屋、  
2006年.

H.知的所有権の取得状況  
なし

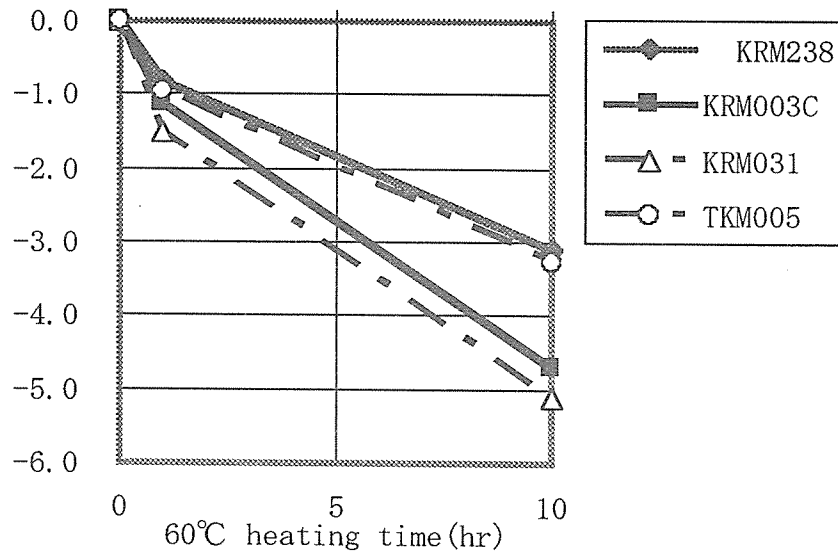


図1 加熱による不活化

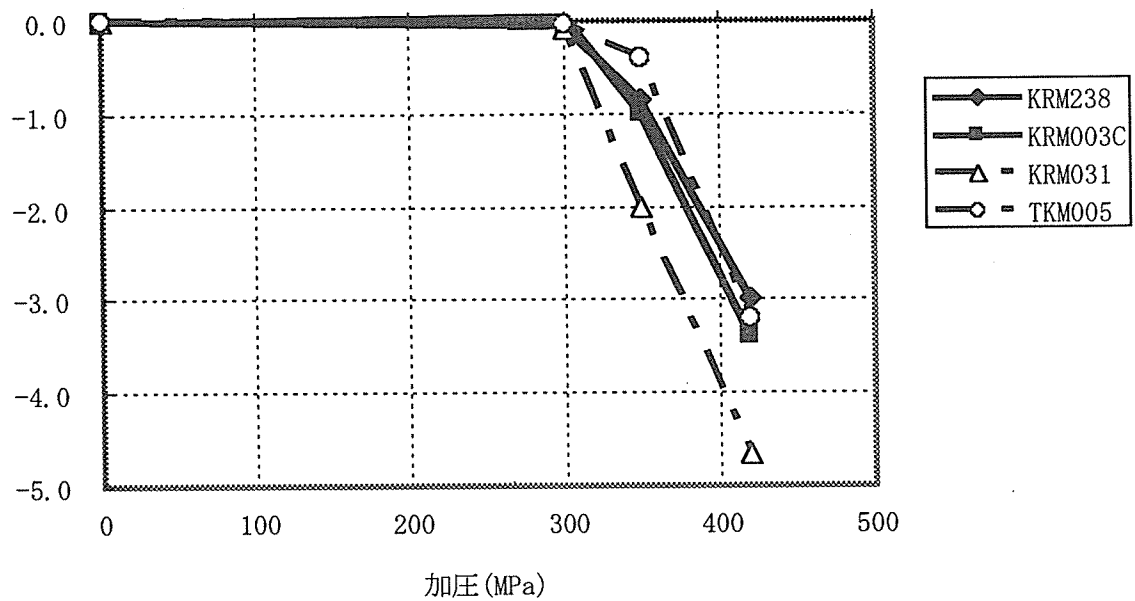


図2 加圧による不活化効果

表1 加熱・加圧による HAV の不活化効果

Geno- type	HAV strain	加熱不活化効果	加圧不活化効果	Initial Titer (FFU/ml)
		$\log_{10}(0\text{hr})-\log_{10}(10\text{hr})$	$\log_{10}(0\text{MPa})-\log_{10}(420\text{MPa})$	
III B	KRM23 8	3.1	3.0	$1.5 \times 10^8$
III B	KRM00 3C	4.7	3.4	$1.5 \times 10^8$
I A	KRM03 1	5.1	4.7	$1.5 \times 10^8$
I B	TKM005	3.3	3.2	$5 \times 10^7$



研究成果の刊行に関する一覧表

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

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、 梅森清子	血漿分画製剤の安全性確保の現状	医学の歩み	218	625-630	2006
Kiyohara,T,Sato ,T,Tosuka,A., et.al.	Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan,1973-2003	Microbiol.I mmunol.	51	185-191	2007

# 血漿分画製剤の安全性確保の現状

Viral safety for plasma derivatives



岡田義昭(写真) 梅森清子

Yoshiaki OKADA and Kiyoko UMEMORI

国立感染症研究所血液・安全性研究部

◎血漿分画製剤は数千～数万人の供血者からの血漿を混ぜ合わせた原料血漿から製造され、最終的に数千～1万本のまったく同一の品質を有する製剤となる。血漿分画製剤は高度に精製されているため、疾患の治療に必要な成分のみを補充することを可能にし、医療の発展におおいに寄与した。その一方、多くの供血者の血漿から製造されるため、原料となる血漿や最終製品にウイルスが混入する可能性は完全には否定できない。かつて凝固因子製剤によって HIV や HCV の感染が発生し、大きな社会問題になった。現在ではこのような感染を防止するために、①採血段階での問診や血液のスクリーニング(血清学的検査および核酸増幅検査)によって可能な限りウイルスが混入していない血漿を確保すること、②製造工程にすくなくとも2つ以上の異なる原理のウイルス除去・不活化工程を導入すること、が実施され、血漿分画製剤の安全性は飛躍的に向上した。しかし、ヒトの血液を原料としているため、感染症伝播のリスクを完全には排除することはできないことを認識し、適正使用することが重要である。



ウイルス除去・不活化、ウイルスクリアランス指数、モデルウイルス、特定生物由来製品

## 原料血漿の安全性確保の現状

分画製剤の安全性を確保するためには、可能な限りウイルスなどの病原体が混入していない血漿を原料血漿として用いることが重要である。原料血漿は、日本赤十字社が採血した“献血由来の血漿”と海外で採血された“有償の血漿”とがあるが、最近では海外で採血された“有償の血漿”は抗 HBs ヒト免疫グロブリン製剤や抗破傷風ヒト免疫グロブリン製剤といった特殊免疫グロブリン製造用の原料血漿が血漿のまま輸入されている。一方、ヒト血清アルブミン製剤や加熱ヒト血漿蛋白製剤はその多くを海外に依存しているが、原料血漿を輸入して製造するのではなく、最終製品として輸入されていることが多い。血漿分画製剤の原料血漿の由来を明確にするために、献血由来の血漿で製造された製剤には“献血”“原産国日本”，海外で採血された血漿で製造されたものには“非献血”“原産国〇〇……”と箱に明記され、区別できるようになっている。

安全性確保のために、献血血はその多くは全血で採血された後に遠心分離され、赤血球成分と血漿成分とに分けられ、輸血と同じ基準をクリアした血漿が原料血漿となる(図1)。赤血球はすぐに使用されるが、血漿成分は新鮮凍結血漿あるいは原料血漿として6カ月間保存される(貯留保管という)。その間に赤血球製剤を投与された受血者の感染症情報や供血者が再度献血した場合のウイルスマーカーの陽転化などの情報が集められ、疑わしい血漿は廃棄される。

“非献血”由来の有償血漿は、その多くがアメリカで採血された血漿である(ほかにヨーロッパ由来の血漿もある)。有償という“売血”の暗く危険なイメージがあるが、現在は FDA の基準を満たす血液センターだけが採血を認可されている。有償血の安全対策として問診と血清学的検査(HBV, HCV, HIV-1/2)や NAT(HBV, HCV, HIV-1)が導入されているが、NAT においても window 期が存在するため、window 期の血漿を除外するため

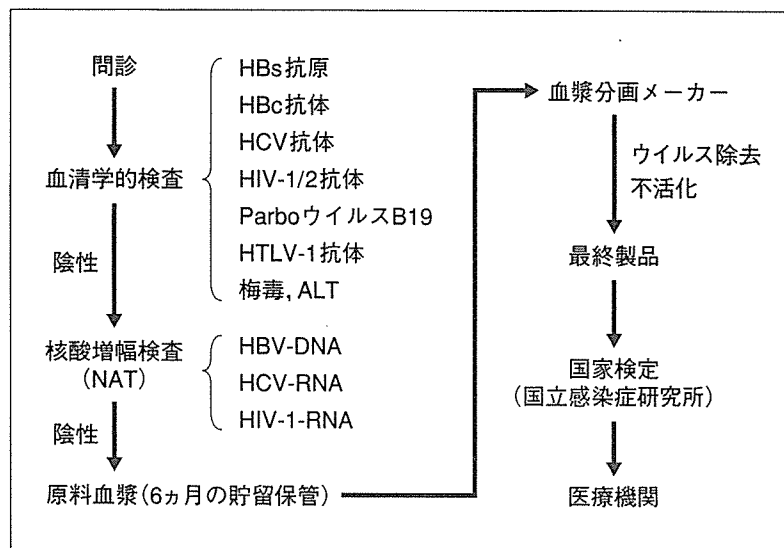


図 1 血漿分画製剤の安全性確保

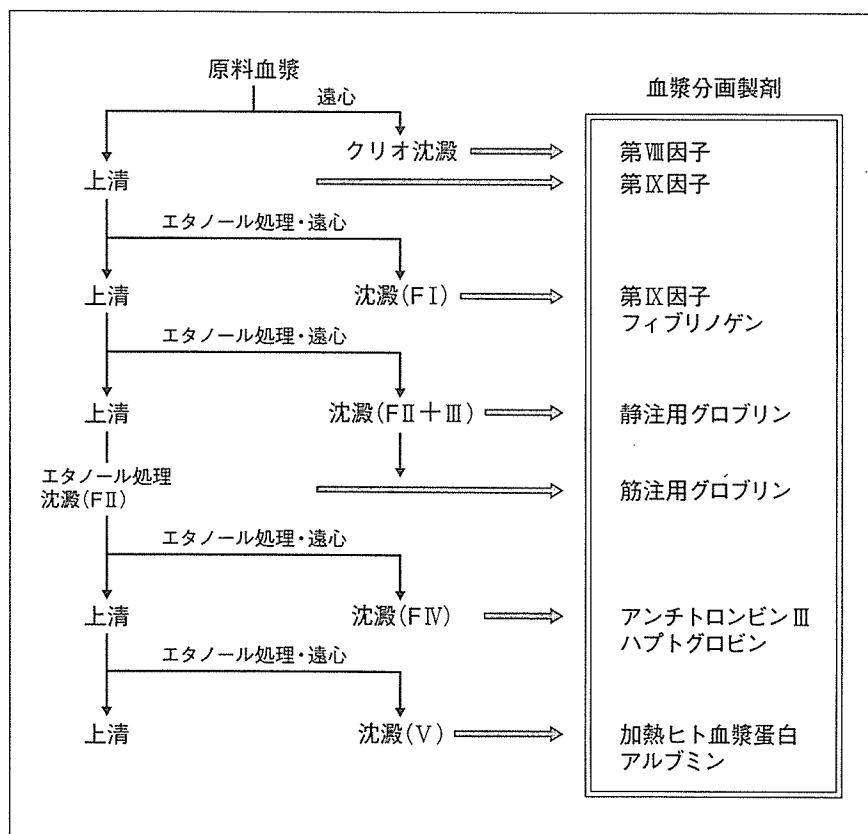


図 2 Cohnのエタノール分画法と血漿分画製剤

に、最初の採血でとった血漿はすべての検査が陰性であっても使用せずに冷凍保管し、ある一定の間隔をおいて(60日とホームページに明記している企業もある)、ふたたび採血したときの検査結果が陰性であった場合に最初の血漿を製造に用いるという安全対策を導入している企業が多い。これ

は有償の供血者は反復して供血するように血液センターから求められているからである(反復して供血に来ない者の血漿は破棄される)。

このようにして献血・非献血とも、原料血漿にウイルスの混入が可能なかぎり少なくなるような対策を導入している。

## ● 血漿分画製剤の製造工程での安全性確保の現状

### 1. 血漿分画製剤の製造工程

上述した検査や貯留保管などを経て集められた原料血漿は 3,000l 前後(数千人～数万人分に相当)がタンク内で混合され、図 2 に示すようにアルコール濃度、pH(図 2 では pH とアルコール濃度の数値は省略してある)、温度、さらにイオン強度による血漿蛋白の溶解度の違いによって種々の分画に粗精製される(Cohn の低温エタノール分画法)。粗精製された分画は(製剤によっては別のタンクで粗精製されたものと混合されることもある)、さらに精製とウイルスの除去・不活性化工程を経て最終的に数千～1 万本のバイアルに分注される(この一群の製品は品質的にまったく同等と考えられるので、ロットとよばれ、各製品に製造番号として記載されている。製品に何らかの問題が生じたときに、該当するロット番号の製品の回収や投与された患者の特定に役立っている)。

このように、血漿分画製剤は多数の供血者の血漿から同一の品質をもつ製剤が多数製造される。もしこれらの原料血漿がウイルスに汚染し、製造工程によっても十分に除去・不活性化されなかった場合、投与を受けた多数の患者が感染する可能性がある。前述したように血清学的試験や NAT が導入され、混入するウイルス(HBV, HCV, HIV, B19)は劇的に減少したが、NAT でも検出できない感染早期の window 期に採血された血漿や変異株の存在など、これらの検査をすり抜けてしまう場合やスクリーニングされていないウイルスの存在、さらに未知のウイルスが原料血漿に混入する可能性はつねに存在している。これらのリスクから血漿分画製剤の安全性を確保するためには、種々のウイルス除去・不活性化法を製造工程に導入することが重要である。

### 2. ウイルス除去・不活性化法

一般的なウイルス除去・不活性化法として、①加熱処理(1. 乾燥加熱：凍結乾燥後加熱する、2. 液状加熱：液体の状態で加熱処理する。パストリゼーションともよばれている。60°Cで 10 時間加熱することが多い)、②有機溶媒/界面活性剤処理(solvent/detergent 処理：S/D 処理とよばれる。トリ-

n-ブチルフォスフェートなどの有機溶媒と Tween 80 などの界面活性剤を添加してウイルスを不活化する)、③ウイルス除去膜、などがある。

また、製剤特有なウイルス除去・不活性化法として、①アフィニティークロマトグラフィ(乾燥濃縮第Ⅷ因子製剤、乾燥濃縮第Ⅸ因子製剤、アンチトロニンⅢ製剤)、②スルホ化処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)、③ポリエチレングリコール処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)、④pH4 処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)、⑤ペプシン処理(静注用ヒト免疫グロブリン製剤)などがあり、各製剤の添付文書に記載されている。これらの処理工程は各製剤の製法上の特有な工程であるとともに、ウイルスの除去・不活性化が期待できる工程でもある。このほかに Cohn の低温エタノール分画法もウイルス除去・不活性化が期待できる。

ウイルスは、エンベロープとよばれる細胞膜に近い組成の脂質の膜を有するウイルス(HBV, HCV, HIV など)と、もたないウイルス(A 型肝炎ウイルス, Parvo ウイルス B19 など)とがある。S/D 処理はエンベロープをもつウイルスの不活性化にきわめて有効であるが、もたないウイルスに対してはまったく無効である。加熱処理はウイルス全般に有効であるが、エンベロープをもつウイルスに比較して、もたないウイルスは抵抗性を示すことが多い。また、ウイルス除去膜は物理学的にウイルスの大きさによってウイルスが除去できるため、エンベロープの有無にかかわらずきわめて有効な除去法である。当然ながら膜の穴の大きさが小さいほどウイルスの除去効率はよいが、製剤によっては成分となる蛋白の分子量などの違いによって効率よく濾過できないこともあり、用いられる除去膜の穴の大きさが限られる場合がある。ヒト免疫グロブリン製剤や第Ⅷ因子製剤など血漿分画製剤の多くでは 35 nm のものが使用されているが、アンチトロニンⅢ製剤などは 15 nm が使用されていることが多い。

### 3. ウイルスの除去・不活性化法の評価

血漿分画製剤の製造工程においてどの程度のウイルスの除去・不活性化が期待できるのかを評価することは、血漿分画製剤の安全性確保のうえからきわめて重要である。実際の工程にウイルスを投