

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

輸血用血液製剤の安全性向上に関する研究

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水落 利明

平成20年3月

目次

I. 総括研究報告

主任研究者：水落利明（感染研 血液・安全性研究部） ———— 1

II. 分担研究者研究報告

1. 血液製剤の核酸増幅試験の精度管理に関する研究 ———— 5

水澤左衛子（感染研 血液・安全性研究部）

2. HCV コア抗原パネルの作成及びコア抗原検出診断薬の評価 — 1 4

鈴木哲朗（感染研 ウイルス第2部）

3. 輸血用血液製剤における HIV に関わる安全性向上の研究 ——— 1 8

巽 正志（感染研 エイズ研究センター）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ———— 2 4

IV. 研究成果の論文別刷 ———— 2 6

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

輸血用血液製剤の安全性向上に関する研究

主任研究者： 水落利明 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 第2室長

研究要旨： 肝炎ウイルスおよび HIV 感染の迅速、高感度、かつ正確な診断は、輸血用血液製剤の安全性を確保するための最重要課題である。本研究班は、そのようなウイルス混入に対する血清学的検査法および遺伝子検出法の性能評価および最適化を検討する目的で構成された。肝炎ウイルスおよび HIV には様々な遺伝子型(genotype, subtype)が存在することから、現在国内で承認を受け販売されている血清学的診断キットがそのような遺伝子型の異なった抗原 (HBsAg, HCV core Ag, HIV gag p24 Ag) を遺漏なく検出できるかについて検討した。昨年度はそれぞれの抗原を作成したが、今年度の研究ではそれらを用いて各キットによる測定を行い興味ある結果を得た。遺伝子検出法に関しては、その精度管理の観点から、NAT (遺伝子増幅法) 検査のコントロールサーベイを実施することが薬事・食品衛生審議会血液特別部会安全性調査会の指示により決定したことを受けて、昨年度の HBV-NAT に引き続き今年度は HCV-NAT を対象としたコントロールサーベイを実施した。

[分担研究者]

水沢左衛子

(感染研・血液・安全性研究部・主任研究官)

鈴木 哲朗

(感染研・ウイルス第2部・室長)

巽 正志

(感染研・エイズ研究センター・室長)

A. 研究目的

輸血用血液製剤における肝炎ウイルスおよび HIV 混入のリスクを出来る限り少なくするためには、感度・特異性に優れた血清学的（抗原検出）および遺伝子検出（NAT）検査法が必須である。現在承認を受け使用されている各キットの性能を比較検討することは、特にウイルスの遺伝子多型（genotype や subtype）を考慮した場合に非常に重要である。本研究では、リコンビナント抗原を含め、性状の明らかなパネル検体を作成し、それらを用いてのウイルス抗原（HBsAg, HCV core Ag, HIV gag p24 Ag）検出用体外診断キットの性能評価を行なうことを目的とした。また遺伝子検出法については、血漿分画製剤の国内製造業者および輸入販売業者の製造元と、民間の衛生検査所で実施しているウイルス遺伝子（HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA）検出を対象とした NAT（遺伝子増幅法）検査のコントロールサーベイ実施を目的とした。

B. 研究方法

1) HCV コア抗原検出用キットの評価：昨年度の研究で作成した genotype 1a (H77c), 1b (NIHJ1), 2a (JFH-1) の各株、および genotype 2b, 3a の HCV コア抗原を用いてコア抗原検出用体外診断薬の評価を行った。その結果、2a 型コア蛋白は、FEIA 法では他の遺伝子型コア蛋白に比べ 1/4~1/14 の低値しか示さな

かったことから、コア抗原検出診断薬によって遺伝子型間/株間で検出感度が異なる可能性が示唆された。そこで今年度はこれらのアミノ酸多様性がコア蛋白検出の感度に影響するかどうかを明らかにするため、2a 型 (JFH-1 株) の T48A 変異体、1b 型 (NIHJ1 株) の N110T 変異体を作製し各野生型コア蛋白と比較解析を行った。

2) 種々の HIV-1 感染性分子クローン由来 HIV-1 p24 抗原を用いた抗原検出キットの性能評価：現在までに樹立した HIV 感染性分子クローンのうち世界での流行状況と国内感染者での subtype 分布を踏まえて subtype A, B, C, D 及び G と、流行組換え体 CRF01_AE, CRF02_AG 及び BF 組換え体から合計 32 クローンを選定した。各感染性分子クローンを transfection し 2 日間培養して回収し、TritonX-100 で可溶化した HIV-1 virion 全体の抗原液中における p24 gag 抗原量を「ルミパルス HIV-1 p24」キット（富士レピオ）で測定し抗原原液とした。現在国内で市販されている HIV-1 抗原・抗体同時測定キットのメーカーの協力を得て測定を依頼した。さらには欧州で事実上 HIV-1 p24 gag 抗原測定のデフォルトアッセイとされる HIV-1 p24 INNOTEST Assay による測定も、ドイツ Dade-Behring 社研究所の協力を得て同じパネルを送付して測定を依頼した。デ

一夕を回収後、各キットの抗原検出感度を比較した。

3) HCV-NAT コントロールサーベイ：WHO 国際標準品に準拠して作製された HCV-RNA 国内標準品 (genotype 1b) を用いて 10, 30, 100, 300, 1000, 3000, 10000 IU/ml の各希釈検体 (分注量 0.7ml) を作製した。これらに陰性 (0 IU/ml) 検体を加えた 8 種類の検体によるパネルを作製した。これらのパネル検体を、血漿分画製剤の国内製造販売業者及び輸入販売業者の海外製造元、さらには HCV-NAT を実施している国内民間衛生検査所に配布し、測定結果を回収後、国立感染症研究所において解析を行なった。

C. 結果

1) HCV コア抗原検出キットにおいては、HCV コア蛋白抗原アミノ酸配列における、第 48 番目の残基が重要であることが明らかになった。

2) 第 4 世代 HIV 抗原/抗体同時検出キットにおいて、各キット間で検出感度に相違があることが明らかになった。

3) HCV-NAT コントロールサーベイの結果から、全ての施設の全ての試験法において、ガイドラインで定められた目標検出感度 (100IU/mL) を満たしていることが明らかになった。

D. 考察

1) HCV コア抗原検出キットにおける抗

原検出感度の相違について、FEIA 法ではコア蛋白のアミノ酸 48 番が検出感度に影響し、同残基がスレオニンの場合はアラニンの場合に比べて検出感度が有意に低下することが明らかとなった。またアミノ酸 110 番の多様性は検出感度に大きな影響を与えないことが示唆された。より精度を高め、多様性の高い種々の HCV クローンに対応するためには、検出キットにおいて使用する抗コアペプチド抗体を見直すなど改良の余地があるものと思われる。

2) HIV 抗原/抗体同時測定キットの性能比較において明らかになった検出感度の違い、特にある特定の subtype を持つ HIV 抗原検出感度の違いは重要であり、今後は全ての市販キットについて本研究で樹立した感染性分子クローン由来の抗原パネルを用いてコントロールサーベイを実施する必要性が示唆された。

3) 製造販売業者等と衛生検査所において HCV-NAT の感度の精度管理が適正に行われていることが示唆された。今後は genotype パネルや subtype パネルを用いたコントロールサーベイを実施して、genotype 等の相違があっても見逃し無くウイルスを検出できているかについて実情を把握することが必要である。本研究で実施された HCV-NAT コントロールサーベイの結果は薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会に報告される予定である。

E. 結論

遺伝子多型を網羅するリコンビナント抗原（HBsAg, HCV core Ag, HIV gag Ag）は抗原検出キットの性能検査に非常に有用であることが示された。

HCV-NAT のコントロールサーベイの結果、全ての施設における全てのキットにおいて目標検出感度（100IU/mL）を達成していることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

(1) 論文発表

「研究成果の刊行に関する一覧表」参照

(2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：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）

輸血用血液製剤の安全性向上に関する研究

分担研究報告書

血液製剤の核酸増幅試験の精度管理に関する研究

分担研究者：水澤左衛子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 主任研究官

協力研究者：山口 照英 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 部長

堀内 善信 国立感染症研究所 細菌第二部 室長

岡田 義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

第二回 NAT コントロールサーベイ打ち合わせ会

血液製剤の安全性確保を目的として血漿分画製剤の国内製造業者及び輸入販売業者の製造元と民間の衛生検査所でウイルスの核酸増幅試験（NAT）を実施している。これらの NAT の精度管理の実情を把握するために初の全国的な調査として NAT コントロールサーベイを実施した。昨年度は第1回の HBV-NAT コントロールサーベイの結果を報告した。

今年度は第2回として HCV-NAT と HIV-NAT を対象としてコントロールサーベイを実施した。HCV-NAT サーベイには合計 15 機関 18 施設が参加し、のべ 23 セットの測定が実施され、全施設が結果を提出した。全施設の全ての測定において HCV-NAT の目標とする感度 100 国際単位/mL を達成していることが確認された。また、衛生検査所が測定に用いた HCV-NAT の定性診断薬キットの感度は達成されていた。HIV-NAT サーベイには合計 11 機関 14 施設が参加した。現在、HIV-NAT の結果の解析を進めている。

A. 研究目的

「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドライン」（平成16年7月、NATガイドライン）及び「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」（平成17年3月、遡及調査ガイドライン）が発せられ、当該施設での NAT のバリディションと精度管理が求められるようになった。また、国際標準品に基づいた3つのウイルスの国内標準品が作製され、ウイルスパネルの作製も進んでいることから、同一の標準試料を使用したコントロールサーベイの実施が可能になった。薬事・食品衛生審議会血液特別事業部会安全技術調査会（以後、調査会とよぶ）の指示に基づいて HBV、HCV 及び HIV

検出のための NAT についてコントロールサーベイの実施が調査会の山口照英委員（国立医薬品食品衛生研究所部長）に付託され、国立感染症研究所が検体の作製と配布及び結果の解析を担当することになった。

第1回として血漿分画製剤の原料のプールにおける NAT を実施している国内製造業者及び輸入販売業者の製造元（以後、製造販売業者等とよぶ）と輸血後検査として HBV-NAT を実施している衛生試験所を対象として HVB-NAT コントロールサーベイを実施し、昨年度その結果を報告した。

引き続き今年度は、製造販売業者等が実施している NAT の検出感度の目標を4課長通知に基づき 100 国際単位/mL (IU/mL) とし、各施設

が実施している試験が目標を達成していること
 の確認と実状を明らかにすることを目的と
 して HCV-NAT 及び HIV-NAT のコントロール
 サーベイを実施した。HCV-NAT の結果解析を
 行ったので報告する。現在、HIV-NAT の結果
 の解析中である。

B. 研究方法

(1) 実施組織

調査会の山口照英委員を座長とし、厚生労働
 省血液対策課が事務局を担当、国立感染症研究
 所が検体の作製と配布及び結果の解析を担当
 した。学識経験者、日本赤十字社血液事業部、
 サーベイ参加機関、試薬メーカーを加えた打ち
 合わせ会において実施要綱の検討と結果の確
 認を行った。コントロールサーベイの結果は調
 査会に報告される。

(2) 参加施設

血漿分画製剤の国内製造業者 4 社及び輸入
 販売業者 2 社の製造元。衛生検査所は自由参加、
 試薬メーカーはオブザーバー参加とした。

(3) 対象とする検査

第二回では HCV-NAT と HIV-NAT を対象
 とした。

(4) 材料と方法

〔検体〕 HCV-RNA 国内標準品(Genotype
 1b)を血漿で希釈して、次の通り濃度の異なる
 7 検体と陰性血漿 1 本の 8 検体からなる希釈
 系列パネルを作製した。国立感染症研究所から
 参加施設に分注量 1mL のブラインド化したパ
 ネル検体 3 組を送付した。一回の測定に必要な
 検体の容量を事前に調査し、1mL よりも多量
 の検体が必要な場合には必要量を送付した。

検体番号	濃度(IU/mL)
12	10000
16	1000
11	300
13	100
17	30
15	10
14	3
18	0

〔測定回数〕 日をかえて 3 回測定した。測定
 日ごとに新しい検体を融解して用いた。同じ検
 体の測定は 1 回限りとし、原則として再測定及
 び多重測定は行わないこととした。

〔試験法〕 製造販売業者等においては NAT
 ガイドラインに基づいてバリデートされ現に
 実施している試験法を対象とした。衛生検査所
 では HCV-NAT 診断薬の定性試験法を対象と
 した。

〔結果の記載方法〕 陽性/陰性を記載した。

(5) 結果の提出

参加機関は試料を受け取り後 50 日以内に測
 定結果を厚生労働省医薬食品局血液対策課に
 提出することとした。

(6) 結果の解析

国立感染症研究所において解析した。当初、
 プロビット法により解析する予定であったが、
 ほぼ全ての施設で目的とする 100IU/mL の検
 体を 3 回測定して 3 回検出したので、統計処理
 は行わずに検出回数を一覧表で示した。

(7) 病原体の取扱い

検体の配布は国立感染症研究所病原体等安
 全管理規程に従った。

C. 結果

(1) 参加施設 (表 1)

製造販売業者等 6 社、民間の衛生検査所 7 社、公的機関 1 機関、試薬メーカー 1 社の合計 15 機関 18 施設が参加した。一つの機関が複数の施設で測定を実施した内訳は次の通りである。国内製造販売業者等 4 社のうち 1 社では NAT を実施している全 3 施設が参加した。海外の製造販売業者等 2 社においてはそれぞれのヨーロッパの 1 施設と米国内で NAT を実施している共通の 1 施設が参加した。検体を送付したすべての施設が測定結果を提出した。

(2) 試験法 (表 2)

製造販売業者等は各社で採用している HCV-NAT で、衛生検査所では HCV-NAT 体外診断薬の定性試験法で測定した。

製造販売業者等においては 7 種類の定性試験法が用いられ、その内訳は次の通りであった。延べ 6 施設 (試薬メーカー 1、公的機関 1 を含む) がスクリーニング試薬コバスアンプリスクリーン マルチプレップ/コントロールで抽出してコバスアンプリスクリーン HCV テスト v2.0 で測定した (アンプリスクリーン HCV)。1 施設がスクリーニング試薬 cobas s201; TaqScreen MPX (TaqScreen MPX)、1 施設が体外診断薬 TMA アッセイ HCV、延べ 4 施設 (試薬メーカー 1 を含む) が自家法 A、3 施設がそれぞれ異なる自家法で測定した。

衛生検査所においては 3 種類の定性診断薬キットが用いられ、その内訳は次の通りであった。5 社 (試薬メーカー 1 社を含む) がアンプリキャップ GT HCV v2.0 で抽出してアンプリコア HCV v2.0 で測定 (アンプリキャップ GT/アンプリコア HCV)、2 社が標準法で抽出してコバスアンプリコア HCV v2.0 で測定、1 社が TMA アッセイ HCV で測定した。

(3) 製造販売業者等が実施している試験法の検出感度 (表 3)

6 社 9 機関が 7 種類の定性試験法で測定した。自家法の一例において目標とする濃度 100IU/mL の検体を 3 回測定のうち 1 回が陰性となったが、より低濃度の 30IU/mL の検体を 3 回測定して 3 回検出することができた。その他の測定においては全て 100IU/mL の検体を 3 回測定して 3 回検出することができた。また、全ての測定において陽性コントロール (検体 12、10,000IU/mL) は毎回陽性であり、陰性コントロール (陰性血漿、検体 18、0IU/mL) は毎回陰性であった。不成立となった測定は無かった。

(4) 民間の衛生試験所が実施している試験法の感度 (表 4)

7 社 7 施設が 3 種類の HCV-NAT 体外診断薬の定性キットで測定した。

コバスアンプリコア HCV による一つの測定において濃度 100IU/mL の検体を 3 回測定のうち 1 回が陰性であったが、より低濃度の 30IU/mL の検体を 3 回測定して 3 回検出することができた。その他のコバスアンプリコア HCV とアンプリキャップ GT/アンプリコア HCV の測定においては 30IU/mL と 100IU/mL の検体の検出率は 100%であった。衛生検査所と製造販売業者等のそれぞれ 1 社が TMA アッセイ HCV を用いて測定し、10IU/mL の検体の検出率は 100%であった。衛生試験所で実施した全ての測定において陽性コントロール (検体 12、10,000IU/mL) は毎回陽性であり、陰性コントロール (陰性血漿、検体 18、0IU/mL) は毎回陰性であった。不成立となった測定は無かった。

D. 考察

(1) (表 3) 製造販売業者等が実施している 7 種類の試験法では測定時に添加する検体の血漿相当量に最少 83 μ l から最大 1000 μ l まで

の幅があり、自家法よりも市販のスクリーニング試薬や診断薬キットのほうが検体量が多かった。濃度 10IU/mL の検体の検出率を比較すると市販の測定試薬や診断薬キットではいずれも 100%であったが、自家法で 100%検出できたのは 1 施設だけであった。血漿分画製剤の原料のプールに NAT を導入した後も市販の試薬やキットでは検体量を増やすなど改良が行われて性能が向上していることが窺われる。自家法の一例において目標とする濃度

100IU/mL の検体を 3 回測定のうち 1 回が陰性となったが、より低濃度の 30IU/mL の検体を 3 回測定して 3 回検出しており、その他の全ての測定では 100IU/mL の検体を 100%検出していることから、全施設のすべての測定において HCV-NAT の目標とする感度 100IU/mL は達成されているといえる。

(2) (表 4) 衛生検査所が実施している 3 種類の試験法では測定時に添加する検体の血漿相当量は最小 50 μ l から最大 500 μ l までの幅であった。検体量が最も少ないコバスアンプリコア HCV の一例で 100IU/mL の検体を 3 回測定のうち 1 回陰性であったが、より濃度の低い 30IU/mL の検体を 3 回測定して 3 回検出しており、その他の測定では全て 100IU/mL の検体を 100%検出していることから、全施設のすべての測定において HCV-NAT の目標とする感度 100IU/mL は達成されていたといえる。また、アンプリキャップ GT/アンプリコア HCV とコバスアンプリコア HCV の測定で 30IU/mL の検体の検出率は 100%であったのでそれぞれの診断薬キットの検出感度である 50IU/mL を満たしていた。衛生検査所と製造販売業者等の各 1 施設が TMA アッセイ HCV を用いて測定し、10IU/mL の検出率は 100%であったので診断薬キットの検出感度である 10IU/mL を満たしていた。

(3) 本研究よって製造販売業者等と衛生検査所において HBV-NAT と HCV-NAT の感度の精度管理が適正に行われていることが示唆された。解析中の HIV-NAT コントロールサーベイの結果も踏まえて、今後は genotype パネルや subtype パネルを用いたコントロールサーベイを実施して、genotype 等の相違があっても見逃し無くウイルスを検出できているかについて実情を把握することが必要である。

E. 結論

(1) 血漿分画製剤の製造販売業者等

国内製造業者 4 社 6 施設、及び輸入販売業者 2 社の製造元 3 施設を対象とした。7 種類の定性試験法が用いられ (自家法 4 種類を含む)、延べ 12 セットの測定が実施された。全施設のすべての測定において HCV-NAT の目標とする感度 100IU/mL が達成されていた。

(2) 民間の衛生検査所

衛生検査所 7 社が自主参加した。3 種類の定性診断薬キットが用いられ、7 セットの測定が実施された。すべての施設の測定においてそれぞれの診断薬キットの感度並びにサーベイの目標とする感度 100IU/mL が達成されていた。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 謝辞

パネル調製に用いる希釈血漿の原料として日本赤十字社から輸血用製剤として規格外の新鮮凍結血漿の譲渡をうけた。本研究報告書は第二回 NAT コントロールサーベイ打合会で確認された実施要綱等に基づいている。

第二回 NAT コントロールサーベイ打合せ会メンバー

山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所	生物薬品部	部長
吉澤 浩司	広島大学大学院	医歯薬学総合研究科	教授
柚木 久雄	日本赤十字社血液事業本部	中央血液研究所	
山口 一成	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	部長
水落 利明	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	室長
岡田 義昭	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	室長
水澤左衛子	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	主任研究官

財団法人 化学及血清療法研究所

日本製薬株式会社

株式会社 ベネシス 京都工場

日本赤十字社血漿分画センター

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

日本赤十字社血液管理センター

バクスター株式会社

CSL ベーリング株式会社

National Genetics Institute (USA)

株式会社 エスアールエル

株式会社 江東微生物研究所

株式会社 苫小牧臨床検査センター

株式会社 ビー・エム・エル

ファルコバイオシステムズ総合研究所

株式会社 保健科学研究所

三菱化学メディエンス株式会社

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

表1. 第2回NATコントロールサーベイ参加施設

機 関	HCV-NAT		HIV-NAT	
	機関	施設	機関	施設
国内	4	6	4	6
製造販売業者等	2	3	2	3
衛生検査所	7	7	3	3
試薬メーカー	1	1	1	1
公的機関	1	1	1	1
合 計	15	18	11	14

表 2. 参加施設が実施したHCV-NAT試験法(定性法)

方法	施設				Total
	製造販売業者等	公的機関	衛生検査所	試薬メーカー	
AmpliScreen	4	1		1	6
TaqScreen MPX	1				1
TMA Assay	1		1		2
In-house A	3			1	4
In-house	3				3
Amplicap/Amplicor			4	1	5
COBAS Amplicor			2		2
Total	12	1	7	3	23

表3. 製造販売業者等において実施した
7種類のHCV-NAT定性試験法の結果

Assay methods	AmpliScreen	TaqScreen MPX	TMA Assay	In house A	In House	Overall
No. of assay sets	6	1	1	4	3	15
Vol. of samples (μ L)*	250-1000	1000	500	200	83-135	83-1000
HCV RNA (IU/mL) 0	0/18(0)	0/3(0)	0/3(0)	0/12(0)	0/9(0)	0/45(0)
3	16/18(89)	2/3(67)	2/3(67)	2/12(17)	4/9(44)	26/45(58)
10	18/18(100)	3/3 (100)	3/3 (100)	7/12(56)	7/9 (78)	38/45(84)
30	18/18(100)	3/3 (100)	3/3 (100)	9/12(75)	9/9 (100)	42/45(93)
100	18/18(100)	3/3 (100)	3/3 (100)	12/12(100)	8/9 (89)	44/45(98)
300	18/18(100)	3/3 (100)	3/3 (100)	12/12(100)	9/9 (100)	45/45(100)
1000	18/18(100)	3/3 (100)	3/3 (100)	12/12(100)	9/9 (100)	45/45(100)
10000	18/18(100)	3/3 (100)	3/3 (100)	12/12(100)	9/9 (100)	45/45(100)

no.of positive/no.of tested (%)

* ;equivalent to plasma

**表4. 衛生検査所において実施した
3種類のHCV-NAT定性試験法の結果**

Assays	Amplicap GT/ Amplicor	COBAS Amplicor	TMA Assay	Overall
No. of assay sets	5	2	1	8
Vol. of samples (μL)*	300	50	500	50-500
HCV RNA (IU/mL) 0	0/15(0)	0/6(0)	0/3(0)	0/24(0)
3	4/15(27)	0/6(0)	3/3(100)	7/24(29)
10	12/15(80)	1/6(17)	3/3(100)	16/24(67)
30	15/15(100)	6/6(100)	3/3(100)	24/24(100)
100	15/15(100)	5/6(83)	3/3(100)	23/24(96)
300	15/15(100)	6/6(100)	3/3(100)	24/24(100)
1000	15/15(100)	6/6(100)	3/3(100)	24/24(100)
10000	15/15(100)	6/6(100)	3/3(100)	24/24(100)

no.of positive/no.of tested (%)

* ;equivalent to plasma

HCV コア抗原パネルの作製及びコア抗原検出診断薬の評価

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所 ウイルス第二部室長

研究要旨 HCV コア抗原検出診断薬が HCV 遺伝子型間または株間で検出感度に差異がないか評価した。HCV 遺伝子型 1a、1b、2a、2b、3a 由来のコア蛋白発現細胞検体を調製し FEIA 法、RIA 法で定量したところ、FEIA 法では 2a 型コア蛋白の検出感度が他に比べ低いことが示された。各体外診断薬に使われている抗コアペプチド抗体の抗原配列を検索し検出感度に影響しうるアミノ酸残基を推定した。それを検証するためコア蛋白の変異体を作製し野生型と比較した。その結果、FEIA 法による HCV コア抗原検出診断薬では、コア蛋白の 48 番アミノ酸が重要であること、同残基がスレオニンの場合 (2a 型)、アラニンの場合 (1a、1b、2b、3a 型) に比べその検出感度が顕著に低下することを見出した。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルス (HCV) は、血液を媒介にして感染し、急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌の主要な原因ウイルスである。HCV を高感度に検出し、かつ特異性の高い診断法を提供することは、より安全な輸血用血液製剤を確保する上で極めて重要である。本研究では、種々の遺伝子型由来の HCV コア抗原を組換え蛋白としてヒト細胞で産生させ抗原パネルを作製する。得られたパネルを使って HCV コア抗原検出診断薬の性能評価を行う。ウイルス遺伝子型間または株間で検出感度に差異がないかを評価する。

B. 研究方法

HCV 遺伝子型 1a (H77c)、1b (NIHJ1)、2a (JFH-1) 株の全長遺伝子を組み込んだプラスミドを鋳型として、コア蛋白領域の PCR を行い、動物細胞発現ベクター pCAGGS へサブクローン化した。PCR プライマーに FLAG エピトープタグ配列をデザインし、コア蛋白の N 末端に FLAG タグが付加し

た FLAG-コア融合蛋白発現ベクターを構築した。HCV 遺伝子型 2b また 3a を持つ肝炎患者血清からトータル RNA を抽出し RT-PCR によりコア蛋白遺伝子を増幅した。クローン化し HCV 遺伝子配列を確認した後、上記と同様に、FLAG タグ配列を含む PCR プライマーを使って増幅し、pCAGGS へサブクローン化し FLAG-コア融合蛋白発現ベクターを作製した。さらに、HCV JFH-1 クローン、NIHJ1 クローンのコア変異体は、各変異配列を含むプライマーを用いて増幅した cDNA を、シーケンシング後、同様に pCAGGS へクローン化した。

各発現ベクターをヒト胎児性腎臓細胞株 293T へトランスフェクションし、48 時間後に NP40 含バッファーにより細胞ライセートを調製した。融合蛋白の発現は抗 FLAG 抗体及び抗コア抗体により解析した。さらに、細胞ライセート中のコア蛋白量をラジオイムノアッセイ (RIA) 法及び蛍光酵素抗体 (FEIA) 法を用いて定量的に測定した (測定はオーソ・クリニカ

ル・ダイアグノスティックス社にて行われた)。

C. 研究結果及び考察

昨年度、HCV コア抗原検出用の体外診断薬の評価に用いる抗原パネルとして、HCV 遺伝子型 1a、1b、2a、2b、3a 由来のコア蛋白発現細胞検体を調製し、これを用いてコア抗原検出用体外診断薬の評価を行った。2a 型コア蛋白は、FEIA 法では他の遺伝子型コア蛋白に比べ 1/4~1/14 の低値しか示さなかったことから、コア抗原検出診断薬によって遺伝子型間/株間で検出感度が異なる可能性が示唆された。各体外診断薬に使われている抗コアペプチド抗体の抗原配列について、発現させた各 HCV 株のコア配列を比較したところ、アミノ酸 48 番が 2a 型 (JFH-1 株) ではスレオニンであるのに対し、それ以外の 4 クローンではアラニンであった。また、アミノ酸 110 番は 1b、2a、3a 型ではアスパラギン、1a、2b 型ではセリン/スレオニンであった。

今年度、これらのアミノ酸多様性がコア蛋白検出の感度に影響するかどうかを明らかにするため、2a 型 (JFH-1 株) の T48A 変異体、1b 型 (NIHJ1 株) の N110T 変異体を作製し (図 1) 各野生型コア蛋白と比較解析を行った。発現させたコア蛋白には N 末端に FLAG タグ配列が付加されており、抗 FLAG 抗体を利用したウエスタンブロット法により各コア蛋白の発現レベルを標準化することが可能である。これによりコア蛋白濃度をそろえた細胞ライセート 7 種類を調製し (図 2)、FEIA 法及び RIA 法でコア蛋白の定量を行った (図 3)。RIA 法では、各野生型、変異型とも 1600~2600 fmol/L であり大きなばらつきは認められなかった。FEIA 法では、1a、1b、2b、3a 野生型は 1800~2500 fmol/L であったのに対し、2a 野生型では 700 fmol/L と顕著に低値であった。一方、変異型は 2aT48A が 2300 fmol/L、1bN110T が 2400 fmol/L であった。すなわち、FEIA 法ではコア蛋白のアミノ酸 48 番が検出感度に影響し、同残基がスレオニンの場合はアラニンの場合に比べて検出感度が有意に低下することが明らかとなった。アミノ酸 110 番の多様性は検出感度に大きな影響を与えない

ことが示唆された。

データベース検索の結果、アミノ酸 48 番がスレオニンであるコア蛋白は 2a 型においても限られた少数クローンであることから、現行の FEIA 法でも概ね正確な測定が行われると考えられるものの、より精度を高め、多様性の高い種々の HCV クローンに対応するためには、使用する抗コアペプチド抗体を見直すなど改良の余地があるものと思われる。

D. 結論

FEIA 法による HCV コア抗原検出診断薬では、コア蛋白の 48 番アミノ酸が重要である。同残基がスレオニンの場合、アラニンの場合に比べその検出感度が顕著に低下する。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamoto T, Omori H, Kaname Y, Abe T, Nishimura Y, Suzuki T, Miyamura T, Yoshimori T, Moriishi K, Matsuura Y. A single amino acid mutation in hepatitis C virus NS5A disrupting FKBP8 interaction impairs viral replication. *J. Virol.* (in press).
2. Taguwa S, Okamoto T, Abe T, Mori Y, Suzuki T, Moriishi K, Matsuura Y. Human butyrate-induced transcript 1 interacts with hepatitis C virus NS5A and regulates viral replication. *J. Virol.* (in press).
3. Murakami K, Inoue Y, Hmwe SS, Omata K, Hongo T, Ishii K, Yoshizaki S, Aizaki H, Matsuura T, Shoji I, Miyamura T, Suzuki T. Dynamic behavior of hepatitis C virus quasispecies in a long-term culture of the three-dimensional radial-flow bioreactor system. *J. Virol. Methods.* (in press).
4. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59: 1200-1212

- (2007).
5. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* 42: 411-23 (2007).
 6. Shirakura M, Murakami K, Ichimura T, Suzuki R, Shimoji T, Fukuda K, Abe K, Sato S, Fukasawa M, Yamakawa Y, Nishijima M, Moriishi K, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T, Howley PM, Miyamura T, Shoji I. E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitylation and degradation of hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81:1174-1185 (2007).
 7. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, Murata S, Tanaka K, Suzuki T, Miyamura T, Koike K, Matsuura Y. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J. Virol.* 81: 1727-1735 (2007).
 8. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, Miyamoto H, Mori Y, Abe T, Murata S, Tanaka K, Miyamura T, Suzuki T, Koike K, Matsuura Y. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 1661-1666 (2007).
 9. Ishii K, Iijima S, Kimura N, Lee YJ, Ageyama N, Yagi S, Yamaguchi K, Maki N, Mori K, Yoshizaki S, Machida S, Suzuki T, Iwata N, Sata T, Terao K, Miyamura T, Akari H. GBV-B as a pleiotropic virus: distribution of GBV-B in extrahepatic tissues in vivo. *Microbes Infect.* 9: 515-21 (2007).
 10. Mizutani T, Endoh D, Shirato K, Shimizu H, Fukushi S, Saijo M, Sakai K, Kwang L, Ito M, Nerome R, Takasaki T, Ishii K, Suzuki T, Kurane I, Morikawa S, Nishimura H. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 322-324 (2007).
 11. Murayama A, Date T, Morikawa K, Akazawa D, Miyamoto M, Kaga M, Ishii K, Suzuki T, Kato T, Mizokami M, Wakita T. The NS3 helicase and NS5B-to-3'X regions are important for efficient hepatitis C virus strain JFH-1 replication in Huh7 cells. *J. Virol.* 81: 8030-8040 (2007).
 12. Inoue Y, Murakami K, Hmwe SS, Aizaki H, Suzuki T. Transcriptomic comparison of human hepatoma Huh-7 cell clones with different hepatitis C virus replication efficiencies. *Jpn. J. Infect. Dis.* 60: 173-178 (2007).
- F. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし。
 2. 実用新案登録
なし。
 3. その他
なし。

図1. 変異コア蛋白質の作製

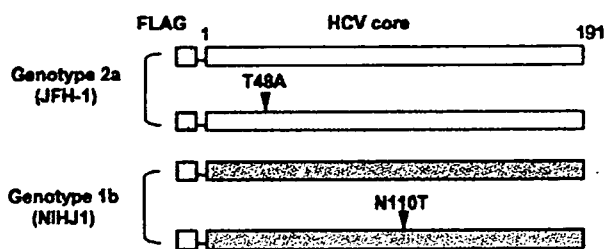


図2. 各遺伝子型のコア蛋白質及び変異体の発現

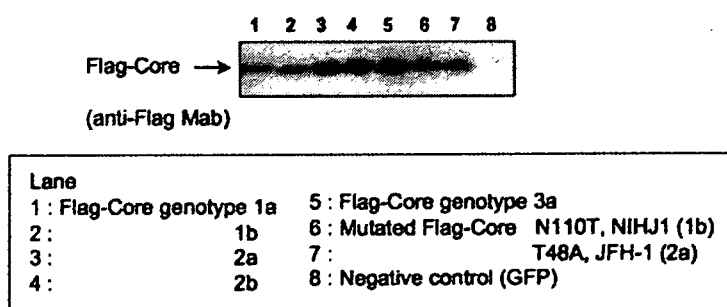
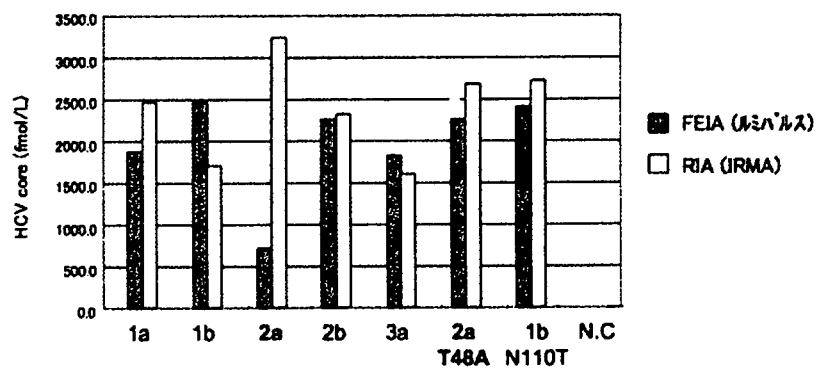


図3. FEIA法及びRIA法による各種コア蛋白質の測定



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

輸血用血液製剤における HIV に関わる安全性向上の研究

分担研究者：巽 正志 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

研究要旨： MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」による効率的感染性分子クローン樹立法を様々な subtype/CRF HIV-1 ウイルスに適用して作製した感染性分子クローン由来の HIV-1 p24 抗原が、HIV-1 抗原検出キットの性能検査および品質管理において有用な標準品となることが示唆された。

A. 研究目的

現在までの HIV 研究においては主に欧米に流行している subtype B の Molecular clones を用いてその病原性を担う遺伝子領域が検索されてきた。しかしながら最近の HIV-1 の感染中心は欧米からアフリカ、東南および南アジア地域に移行しており、そこで主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype C, subtype A, CRF01_AE および CRF02_AG 組換体が多くを占めている。HIV-1 subtype B は異性間の感染も認められるが主に同性愛者および麻薬静注者などの high risk group に侵淫していることが知られている。一方、subtype 間における感染経路による感染効率の違いが指摘されているにもかかわらず、subtype B 以外の感染性クローンが少ないため、その違いに由来する HIV-1

subtype 間の遺伝子構成の相違に基づく病原性解析の進展における隘路になっている。また多くの HIV 感染診断キットは欧米で流行している subtype B を標的として開発されており、HIV-1 の感染中心でもあり、著しい多様性に示すアフリカで流行している HIV-1 に対する有効性を検討した報告は限られている。本研究は本邦及び発展途上国で流行している subtype B 以外の subtype の感染性クローンの樹立を試み、クローン由来の p24 gag 抗原パネルが、現在 HIV-1 感染診断で汎用される第 4 世代抗原・抗体同時測定系における抗原検出感度比較の標準となりうるかについて検討し、HIV 感染診断キットの性能判定の科学的分子基盤を整備することを目的とする。

本年度は昨年度作成したパネルに国内