201451001A

厚生労働科学研究委託事業

医薬品等規制調和・評価研究事業

血液製剤のウイルス等安全性確保のための評価技術開発に関する研究

平成２６年度　委託業務成果報告書

業務主任者　山　口　　照　英

平成２７年（２０１５年）３月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（医薬品等規制調和・評価研究事業）による委託業務として、内田恵理子が実施した平成26年度「遺伝子組換え技術応用医薬品の利用における生物多様性の確保に係る規制のあり方に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託事業

医薬品等規制調和・評価研究事業

血液製剤のウイルス等安全性確保のための評価技術開発に関する研究

平成２６年度　委託業務成果報告書

業務主任者　山　口　　照　英

平成２７年（２０１５年）３月

目　次

I.　委託業務成果報告（総括）

血液製剤のウイルス等安全性確保のための評価技術開発に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・ 1
山口　照英

II.　委託業務成果報告（業務項目）

1.　血液製剤の NAT 試験の評価技術の開発と国際動向の研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19
内田恵理子

2.　HBV-NAT の国内標準品の再値付けのための国内共同研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31
浜口　功

3.　NAT の実施及び精度管理に関するウイルス学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43
岡田　義昭

III.　学会等発表実績・・・ 49

IV.　研究成果の刊行物・別刷

平成 26 年度厚生労働科学研究委託事業（医薬品等規制調和・評価研究事業）
委託業務成果報告（総括）

血液製剤のウイルス等安全性確保のための評価技術開発に関する研究

業務主任者　山口照英（国立医薬品食品衛生研究所　生物薬品部　主任研究官）

研究要旨：

血液製剤のウイルス安全性確保の一環として、以下の検討を行った。

Parvovirus B19(PV B19)の NAT 試験の精度評価のための参照パネルについて、IU 単位と感染価の関係を評価するために Ku812 細胞のサブクローンを分離し、従来よりも定量性のあるインビトロ細胞アッセイ系の確立を行った。その結果、ジェノタイプ 1 及びジェノタイプ 2 について感染性を比較可能な細胞系を樹立できた。従来の手法はインビトロで細胞に感染した Parvovirus B19 ゲノムから読み取られたスプライシング mRNA を測定するものであったが、今回ウイルスゲノム DNA そのものの増幅を指標に感染性を評価することが可能となった。

この感染系を用いて Parvovirus B19 が感染するとされる網状赤血球のいくつかの受容体発現と感染性の関係についても明らかにすることができた。次年度以降に本アッセイ系を用いて Parvovirus B19 の国際単位と感染能との関係について明らかにする予定である。

Parvovirus B19 の検出感度の設定に関しては、ヒト Parvovirus B19（以下 B19V）は一過性の高いウイルス血症を呈する一方、供血者の 40%～50%が B19V に対する抗体を保有していることから、FDA は原料血漿の基準として 10^4IU/mL と過去の感染例を参考に決定されている。品質基準の適切性を評価するために、筋注用人免疫グロブリンを用いた *in vitro* 感染系によって中和活性を評価し、10^4IU/mL が適した基準であることを実験的に示すことができた。

また、デングウイルスを検出するために NAT 検査が実施されているが、血液製剤の安全性確保の点から血清型別に実施するのではなくユニバーサルに検出できる系を考案する必要がある。そのために 4 つのデングウイルスの血清型に共通する塩基配列を検討した。各血清型を検出できたが、感度に 100 倍以上の差が認められ、更なる検討が必要であった。

血液製剤のウイルス安全性の確保対策として 1990 年代後半より実施されている原料血漿と輸血用血液のウイルス核酸増幅試験（NAT）のための国内標準品は当時の WHO 国際共同研究の方法に準じエンドポイント法によって力価が定められた。その後、定量法の性能が飛躍的に向上したことから国際標準品の更新のための共同研究において定量法を用いて標準品の力価を決定するようになった。そこで、本研究においては国際標準品の共同研究に準じ、現在使用されている定量法を用いて NAT のための国内標準品の力価を再評価することを目的として共同研究を実施することとした。平成 26 年度は HBV-DNA 国内標準品の力価の再評価を目的とする共同研究を実施し、国内 7 施設が参加した。

血液製剤のウイルス安全性確保の一環として、E 型肝炎ウイルス（HEV）参照パネルについてリアルタイム PCR を用いて 2 つのジェノタイプ（ジェノタイプ 3 及び 4）の国際単位に対する校正を行い、参照パネルを用いて NAT 試験のバリデーションを行う場合の情報を提供するようにした。

研究分担者
内田恵理子　国立医薬品食品栄研究所　遺伝子医薬部　第一室長
岡田　義昭　埼玉医科大学病院　輸血・細胞移植部　部長
浜口　功　国立感染症研究所　血液・安全性研究部　部長

研究協力者
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
塙　美玲　国立医薬品食品衛生研究所
豊田　淑江　国立医薬品食品衛生研究所

A. 目的

血液製剤のウイルス安全性は長年にわたる検出手法の開発、改良により大きく向上してきている。特に、1990 年代後半より、原料血漿のウイルススクリーニングとして核酸増幅試験（NAT）が実施されるようになり、その安全性は飛躍的に増してきている。しかしながら、NAT 検査においても現在の技術では検出できないウインドウ期が存在し、きわめて低頻度であるが検査をすり抜けたウイルス陽性血液製剤により感染が起こることが報告されてきている。また、輸入感染症とも言われる海外のみで見られるサブタイプ、ジェノタイプへの対応も指摘されてきている。

一方で、NAT の技術開発にも大きな努力が払われており、試験に用いる検体量や抽出効率の改良、さらには輸入感染症への対応などに多くの努力が払われている。わが国でも、欧米と同様に血液製剤のウイルス安全性指針の下位指針として NAT のウイルス検査についてのガイドラインを発出しているが、FDA 等では既に、このような技術進歩や社会的要因を含めた対応のためにガイドラインの策定や改定が行われている。

その一方で、近年 NAT のすり抜けによる HIV 感染が起こり、現行の高感度な NAT 試験法でも検出されないほどの低濃度の HIV 感染血であっても伝播が起こりうることが分かった。血液製剤のウイルス安全性にゴールはないかもしれないが、可能な限りそのリスクを低減化していく対応が求められる。

さらに NAT 試験としては HCV、HBV、HIV を対象として、これらのウイルスの標準品や参照パネルが作製され、さらに採用する NAT 試験の要件として、これらのウイルスについて 100IU（HCV、HBV）から 200IU（HIV）の感度を求めている。

さらに NAT 技術の進歩に応じて、科学的根拠に基づいた新技術の評価基盤の整備の必要性が高まり、その一環として国際整合性のある国内標準品等の整備が求められている。わが国で現在使用されている HCV, HBV 及び HIV の NAT のための国内標準品は当時の WHO 国際共同研究の方法に準じエンドポイント法によって国際標準品に対する相対力価が定められた。その後、定量法の性能が飛躍的に向上したことから国際標準品の更新のための共同研究において主に定量を用いて標準品の力価を決定するようになっている。このような観点から、現行の国内標準品についても定量的 NAT 試験による再測定が必要ではないかと考えられた。

しかし、これ以外のウイルスについてもいくつか輸血後感染の事例が報告され、今後試験の実施の必要性について議論が必要となってきている。すでに HEV についてはその疫学的な情報等から北海道地域に限定して試行的な NAT スクリーニング試験が実施されている。また、Parvovirus B19 についても一部の血液製剤メーカーで NAT による試験が実施されている。また米国の FDA は Parvovirus B19 に関しては抗体の保有率や、治験中に発生した S/D 処理プラズマによる B19V の感染事例の解析から感染が成立しなかった（抗体が陽転しなかった症例）ウイルス濃度を根拠に、血漿分画製剤の原料血漿は 10^4IU/ml 以上の感度を持つ試験の実施が必要としている。欧州では、通常の血漿分画製剤用の血漿に規格は設定していないが、抗 D ヒト免疫グロブリンは妊婦に投与することから原料血漿を 10^4 IU/mL 以下と規定している。欧米の両規制当局とも同じ検出感度を Parvovirus B19 に求めているが、その基礎データが十分にあるとは言えない。

本研究では、このような現状を考慮し、現行の NAT 試験の対象とされている HCV、

HBV、HIV 以外のウイルスについて標準品や参照パネルの整備を行うと共に、NAT で求めるべき感度の基礎データを得るために国際単位と感染性との関連について評価を行う。

本年度はヨーロッパ薬局方で NAT 試験の導入が提案されていることを受け、HEV 参照パネルについて国際標準品との校正を行った。

Parvovirus B19 の参照パネルを活用していくために、Parvovirus B19 のより定量性の高い感染系の確立を目指した。

NAT の国内標準品について、本年度は HBV を取り上げ、国内共同研究を実施し、定量法による測定結果に基づいて力価の再校正を行うこととした。

ウイルス NAT の環境整備を目的として、以前樹立した E 型肝炎ウイルス（HEV）の参照パネルについて、コピー数により表示されている表示単位を国内標準品を、用いた国際単位に換算するための検討を実施した。

B. 方法

B.1. PV B19 の感染性評価系の開発

EPO 存在下で Ku812 細胞を限界希釈による培養を行い、PV-B19 を感染させた時に最もゲノムコピー数の増加が得られるクローンを選択した（図１）。最も高い増幅が得られたクローンを複数選択し、さらに細胞増殖性などを考慮して２つのクローン Ku812 E2 及び Ku812 E17 を選択した。

PV B19 のゲノムの複製が最も起こる条件を明らかにするために、複数の培養条件でウイルスの増幅を測定した。すなわち Ku812 E2 細胞を OptiMEM に 1 x 10^6 cells/ml になるように懸濁し、10^6 ウイルス/ml になるように PV B19 を添加して 1 時間インキュベートした。細胞を遠心操作により分離後、ASF104 無血清培地、１％ FBS を含む RPMI1640 培地、及び 10%FBS を含む RPMI1640 培地に懸濁し、培養を行った。培養開始０日として、一定時間ごとに細胞を含む培養液、細胞のみ、細胞上清をサンプリングし、ゲノム抽出を行った。

B.2.1. PV B19 参照パネルの感染性評価系による評価

Ku812 E2 に PV-B19 を感染させ細胞を含む培養懸濁液から DNA を抽出し、ウイルスゲノム量を定量的 PCR により解析した。プライマー／プローブの組合わせとしては次の２種類を検討した。

NS１プライマー／プローブ

Forward primer (1909-1925): 5'-CTCAT CACYCCA GGCGC-3'

Reverse primer (2009-1989): 5'-GAGG AAACTG RGCTTCCGACA-3'

Probe (1961-1984): 5' FAM-TCCCC GGGACCAGTTCAGGAGAAT-TAMRA-3'

VP2 プライマー／プローブ

Forward primer: 5'-TGG CCC ATT TTC AAG GAA GT-3'

Reverse primer: 5'-CTG AAG TCA TGC TTG GGT ATT TTT C-3'

Probe: 5'(FAM)-CCG GAA GTT CCC GCT TAC AAC-(TAMRA)3'

B2.2.Ku812 E2 細胞の網状赤血球分化抗原による分離

網状赤血球の分化抗原である CD55（グリコシル-ホスファチジルイノシトール（GPI）結合型の単鎖細胞表面タンパク質である Decay Accelerating Factor (DAF)）、CD59（プロテクチンもしくは Membrane Inhibitor of Reactive Lysis（MIRL））、Glycophorin A を指標として、Ku812 E2 細胞をそれぞれの陽性細胞と陰性細胞に分画した。こられの細胞を OptiMEM に 1 x 10^6 cells/ml になるように懸濁し、10^6 ウイルス/ml になるように PV B19 を添加し、1 時間インキュベートした。細胞を遠心操作により分離後、10%FBS を含む RPMI1640 培地に懸濁し、培養を行った。

B.2.3.PV B19 ジェノタイプの感染性の差異

PV B19 のジェノタイプの感染性の強さの違いについて Ku812 細胞で評価可能か検討するために上記と同様の方法で感染実験を行った。

B3. PV B19 の Ku812 細胞を用いる感染性実験系

1) PV B19 感染性の評価

B19V は細胞に侵入すると DNA から RNA に転写され、数カ所でスプライシングされて最終的にタンパク質に翻訳される。この性質を利用して PV B19 を感染させた細胞からスプライシングされた RNA が検出できた場合に感染性を有すると判断した。塩基配列の 584 番と 585 番の間で切れ、同様に 2087 番と 2088 番の間で切れて 584 番と 2088 番が結合した RNA ができるためスプライシング部位を挟むように RT と 1stPCR、及び 2nd PCR 用の 2 組のプライマーを用いた。増幅産物はスプライシングされてできる RNA 由来の cDNA と添加した PV B19 由来の DNA とを明確に区別できる。

2) 筋注用人免疫グロブリン製剤による B19V 中和活性の評価

血漿分画製剤の製造用血漿が入手できないので代用として市販されている筋注用人免疫グロブリン製剤を用いた。筋注用人免疫グロブリン製剤は IgG を 150mg/mL 含有し、血漿の約 10 倍の濃度である。5%アルブミン 400μL に筋注用人免疫グロブリン製剤 50μL、5%アルブミンで 10^{-1}～10^{-8} に稀釈した PV B19 50μL を加え計 500μL 調整し、4℃で混和させながら 2 時間反応させた。中和させた溶液から別なチューブに 200 μL 取り、そこへ 3 x 10^5/50 μL に調整した F10（Ku812 細胞由来、当研究室で分離・維持している）添加し、ローテーターで回転させながら室温で 1 時間ウイルスを感染させた。感染後、1mL の 10%FCS-RPMI（エリスロポエチン 3 単位/mL 含む）を加え 2 日間培養し、遠心にて細胞を回収した（図 8)。細胞に RNAsol を添加して RNA を抽出し、最終的に RNA は 12μL の蒸留水に溶解した。RT 及び 1stPCR は PrimScript One Step RT-PCR Kit Ver.2(Takara) を用い、RNA10μを用いた。 2nd PCR は 5μL の 1stPCR 産物を用いた。抗 PV B19 陰性の免疫グロブリン製剤はないので中和活性なしのコントロールとして 5%アルブミンを用いた。スプライシングされた RNA が増幅された最大稀釈率を求めた。

なお、筋注用人免疫グロブリン製剤は 3 つの異なる製造所が製造した製剤を用いた。

B4. NAT によるデングウイルス検出のためのユニバーサルプライマーの検討

デングウイルスは 4 つの血清型があり、それぞれ特異的なプライマーを用いて検出が実施されている。従って 4 つの NAT 検査を実施していることになる。血液製剤の安全性確保のためには、デングウイルスの有無を効率良く評価できることを優先することからユニバーサルに血清型を検出できるプライマーを検討した。これまで報告されたプライマーとデングウイルスの遺伝子配列からプライマーを決定し、各血清型由来のデングウイルス RNA の検出を試みた。

B5. HEV パネル力価の国内標準品による校正

1) HEV パネル

HEV 参照パネルは日本血液製剤機構(旧(株)ベネシス)より供与されたパネル候補品を基に国内共同検定により樹立したもので、国立医薬品食品衛生研究所で参照パネルとして保管しているものを使用した。パネルの詳細を Table 1 に示す。

2)感度検定用標準 RNA

標準 RNA 液は HEV PC RNA（G3jp、G3sp、G4jp 用）と HEV G3us PC RNA（G3us 用）の 2 種類ある。Pellet Paint（Novagen）という共沈剤を含み、70%エタノール中で不溶化した状態で 10^7copies/1.5mL チューブに-80℃下で保存したものを用いた。本チューブを室温で溶解後、卓上遠心機で 14000rpm 10 分遠心した。遠心により Pellet Paint の鮮やかなピンク色の沈殿を吸い込まないように上清を除いた。300μL の 70%エタノールを添加しチューブ内を洗浄後、14000rpm、3 分間遠心し再度上清を除き、ふたを開けたまま数分間放置した。その後 1mL の滅菌水を加え、細いチップで沈殿をほぐし、20 回ピペッティングして溶解させた後、ふたを閉め vortex を 15 秒間行ない、遠心機でスピンダウンし、本液を 10^5 copies/10μL 液とした。次に滅菌水 900μL を加えた 1.5mL チューブに 10^5 copies/10μL 液を 100μL 加

え、前述と同様の操作を行ない 10^4 copies/10μL液を調製した。さらに同様の操作で 10^3 copies/10μL液、10^2 copies/10μL液を調製した。これら4本の調製液を標準RNA液として定量RT-PCRを各濃度3wellで実施した。

3)国内標準品
HEV-RNA国内標準品（第一世代）はロット番号JEV-(3b)HE3、250,000IU/mLの0.5mL凍結乾燥品であり、国立感染症研究所から入手後、-80℃で保存した。使用時には室温に戻し、注射用水0.5mLに溶解後、分注して使用し残りは-80℃で保存した。

4)ウイルスRNAの抽出
HEV参照パネル及びHEV-RNA国内標準品からのウイルスRNAの抽出は、QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen)を使用してマニュアルに従い試料140μlから抽出を行い、50μlのBuffer AVEで溶出した。定量PCRには溶出液40μLをとり、60μLのTEを加えて2.5倍希釈後、各試料1wellに10μLずつ3wellを用いて定量RT-PCRを実施した。

5)定量RT-PCR
定量RT-PCRはQuantiTect Probe RT-PCR kit (Qiagen)を使用し、ABI7500定量PCR装置を用いて定量した。使用したプライマー、プローブセットの配列を以下に示す。
●HEV PC RNA(#1-4)測定用
Forward primer (HE86): 5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'；
Reverse primer (HE87) : 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3'
TaqMan probe (FHE88) : 5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ1-3'
●HEV G3us PC RNA(#5)測定用
Forward primer (HE86), Reverse primer (HE87)はHEV PC RNA測定用と同じ。
TaqMan probe (FHE100) : 5'-FAM-TGATTCCCAGCCCTTCGC-BHQ1-3'
●HEV G3us PC RNA(#5)と国内標準品同時測定用（M8-2）
Forward primer M8-F-2 : 5'-CCTTCGCCCTCCCCTATATTCA-3'
Reverse primer M8-R-2 : 5'-CCAGCCCCGGATTGTGAAAC-3'
TaqMan probe M8-P-2 : 5'-FAM-CAACCAACCCCTTCGCCGCCGAT-BHQ1-3'

B 6. 定量的PCRによるHBV国内標準品の再校正
参加機関：国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所、血液事業者等、民間の衛生試験所、体外診断薬メーカー。
2.材料
標準品（S）： 第三次HBV-DNA国際標準品（10/264）、力価850,000 IU/mL、分注量0.5mL/vialの凍結乾燥品。試料（J）：第一次HBV-DNA国内標準品(HBV-129)、力価430,000 IU/mL。HBV genotype C陽性血漿を脱クリオ又はそれと同等の陰性プール血漿で希釈、0.5mL/vialに分注、-80°Cで凍結したもの。希釈用血漿：HBV-DNA陰性、HCV-RNA陰性、HIV-1-RNA陰性、HBs抗原陰性、HCV抗体陰性、HIV-1/2抗体陰性のプール血漿。希釈用血漿には日本赤十字社から譲渡を受けた輸血に適さない血液を使用した。
3. 力価の測定
標準品として国際標準品を用いた定量法で力価の測定を実施した。各参加施設において定量性が確認されている範囲で標準品と試料を3段階以上の10倍段階希釈し、それぞれの値を測定した。日を替えて3回測定した。
4. 力価の決定
各施設が報告した測定値を感染研において統計解析し、国際標準品に対する相対力価として決定する。

C. 結果
C-1. PV B19の感染性評価系の樹立
PV B19はエリスロポエチン（EPO）存在下でKu812細胞に感染することが知られており、この細胞系を用いて感染性を評価されている。この感染系では細胞に感染したPV B19は細胞変性を起こすことはなく持続感染をするのみであり、またゲノ

ムの増幅を検出することも難しいとされている。このためPV B19ゲノムから読み取られたスプライシングmRNAを検出することにより感染性が評価されている。この場合必ずしもウイルスゲノムの増幅とは相関しない。

そこで、EPO存在下にKu812細胞を限界希釈による培養を行い、PV-B19を感染させた時に最もゲノムコピー数の増加が得られるクローンを選択した（図1）。最も高い増幅が得られたクローンを複数選択し、さらに細胞増殖性などを考慮して2つのクローンを選択した（Ku812 E2、Ku812 E17)。ウイルス増幅能の高いクローンと増幅能の低いクローンを選択し感染後のウイルスゲノムの増幅を継時的に測定すると図2に示すように、増幅能の違いが明確となった。選択したクローン(Ku812 E2細胞)を遠心して細胞を沈殿させるとペレットはヘモグロビン産生によると考えられる赤色を呈していた(図3)が、増幅能のほとんどないクローンはこのようなヘモグロビン由来と考えらえる赤色は呈していなかった。また、この細胞を凍結融解により細胞を破砕し、その抽出物のスペクトル解析を行うとヘモグロビンに相当する可視部に吸収スペクトルが得られた。親株であるKu812細胞ではクローン株のような赤色を呈することはなく、また抽出操作を行ってもヘモグロビンのスペクトルは得られなかった。
このことからPV B19に指向性のある細胞はヘモグロビン産生を行うまでに分化した網状赤血球であると考えられた。

C-2. Ku812細胞でのPV B19の増幅条件の検討

Ku812 E2細胞にPV B19を感染させた後、無血清培地や低血清条件、及び通常の10%FBS存在下で培養を行い、ウイルスゲノムが最も増幅する条件を検討した。図4に示すように、通常、ウイルス増幅は細胞の増幅を抑制するような1%FBS条件化で培養したときに高い増幅が観察されるが、PV B19は10%FBSの方が1%FBSよりもはるかに高い増幅を示した。

これは単に細胞の増幅条件として10%FBSが適しているということではないと考えられる。というのも2種類の無血清培地を用いて培養を行ったが、両方の培地でKu812 E2細胞はRPMI 1640培地と同等の増幅が認められたのにも関わらず、ウイルスの増幅はやはり10%FBSを含むRPMI1640培地が最も高いPV B19の増幅が認められたからである。

一方この培養条件で増幅したPV B19のゲノムが細胞内あるいは上清のどちらに検出されるのかを検討した。その結果、いずれの条件においても上清中にはわずかしか検出されず、ウイルスは細胞内にのみ検出された。また、この上清、あるいは細胞溶解液に感染性ウイルスが存在するかの検討を行った。しかし、いずれの条件でもKu812 E2細胞への感染性を検出できなかった。従って、Ku812 E2細胞へのPV B19の感染ではゲノムの複製が起こっているものの、感染性をもつウイルス粒子は放出されないと考えられる。

一方、Ku812E2細胞にPV B19を感染させた後、細胞内PV B19粒子タンパク質の翻訳が起きているかを抗PV B19抗体を用いて免疫染色を行ったところ、ウイルスタンパク質の発現が蛍光免疫染色によって確認された。

C-3. Ku812細胞へのPV B19の感染に及ぼす抗PV B19抗体の影響

すでに抗PV-B19抗体がKu812細胞を用いた*in vitro*感染実験系で感染能を阻害することが示されている。我々も抗PV B19抗体がKu812 E2細胞への感染を阻害するか確認した(図5)。2種類のPV B19検体を用いて感染実験を行ったが、抗体非存在下では継時的なウイルスゲノムの増幅が確認されたが、抗体存在下ではこのようなウイルスゲノムの増幅は認められなかった。また、WHOのPV B19参照パネルはジェノタイプ1から3を含み、それぞれに抗PV B19抗体が添加されている。WHO参照パネルはこのKu812 E2細胞での感染性が示されず、WHOが安全性の観点から添加している抗体が十分にその機能を果たしていることが示される。

C-4. PV B19参照パネルの感染性評価

PV B19の安全対策の一環としてこれま

でに厚生労働科学研究事業においてジェノタイプ 1 とジェノタイプ 2 の高タイター及び低タイター参照パネルを作製した。それぞれのタイターは国際標準品に対して校正されている。

この PV B19 の参照パネルの有用性を評価する目的の一環として上記で樹立した Ku812 E2 細胞を用いてその感染性を比較することにした。

ウイルスの増幅能の比較では、Ku812 E2 細胞と Ku812 E17 細胞の 2 種類の細胞を用いて、ジェノタイプ 1 とジェノタイプ 2 の 2 つのウイルスを感染させ、そのゲノムの増幅を継時的に測定した。図 6 に示すように、感染後の継時的なゲノム量の増幅はジェノタイプ 2 の方がジェノタイプ 1よりも高いという結果が得られた。このジェノタイプ 1 と 2 の感染力の差異は、用いる細胞が変わっても同様の傾向が得られた。感染性が高い細胞内でのゲノムの増幅能に違いがあるのかについては不明である。

C-5. Ku812 E2 細胞での網状赤血球抗原の発現の違いと PV B19 の増幅能の差異

網状赤血球の表面マーカーとしては CD55、CD59、Glycophorin A などが知られている。そこでこれらのの網状赤血球抗原の発現の違いと Ku812 細胞の PV B19 に対する感受性を評価した。このために網状赤血球抗原発現の陽性、及び陰性細胞を分取し、PV B19 を感染させて、PV B19 の増幅能を比較した。図 7 に示すように、CD55+細胞と CD55-細胞は同様の PV B19 増幅能を示したが、CD59-陰性細胞では CD59+陽性細胞に比較して殆ど PV B19 の増幅が認められなかった。また、Glycophorin+細胞も Glycophorin 陰性細胞に比較して PV B19 の増幅は殆ど認められなかった。これらの結果から、PV B19 の増幅に感受性のある細胞は網状赤血球でも特定の抗原を持つ細胞に限定される可能性が示された。Glycophorin A+細胞はヘモグロビンをほとんど持たない細胞であり、Glycophorin A-細胞はヘモグロビンを強く発現していた。

C-6. 抗 Parvovirus B19 抗体

1) 筋注用人免疫グロブリン製剤による B19V 中和活性の評価

ヒト IgG を含まない 5%アルブミン（中和活性がない場合のコントロール）では、10^7 倍まで PV B19 の感染性が認められた。一方、筋注用人免疫グロブリン製剤では、検体間に差がなく 10 倍希釈あるいは 100 倍稀釈まで感染性が認められた。同一検体を反復測定しても 10 倍希釈あるいは 100 倍稀釈まで感染性が認められた。 100 倍稀釈では感染性を示すシグナルは 10 倍稀釈に比べて弱い傾向があった。以上から 15mg の人 IgG によって感染価は少なくても 5Log 中和されることが示された（図 9）。

2) NAT によるデングウイルス検出のためのユニバーサルプライマーの検討

Am.J.Trop.Med.Hyg.vol.56.424-429.1997 及び J.Clin.Micro 2323-2330.2002 を参考にして RT と 1st PCR は、10,406～10,432 と 10,674～10,694、2 nd PCR は 10,406～10,423 と 10,617～10,634 のプライマーを用いて semi-nested PCR を行なった。4 つの血清型のどの型にも合うように血清型間で異なる塩基配列の部分は ミックス配列とした。ほぼ同量のデングウイルス RNA が存在すると考えられる各血清型のデングウイルスの検出を行なったところ、各血清型デングウイルスは検出できたが、血清型 3 と 4 に比較して血清型 1 は 1/10、血清型 2 は 1/100 以下の感度であった。

C-7. HEV パネルの表示単位の国内標準品を用いた校正

我々は、2010 年に国内 6 施設（国立医薬品食品衛生研究所、国立感染症研究所、（株）ベネシス、日本赤十字社、日本製薬（株）、（財）化学及血清療法研究所）の参加による共同検定を実施し、HEV-NAT 試験用参照パネルを樹立した。参照パネルは国内の HEV の遺伝子型である 3 型又は 4 型の 4 種類のクラスター（G3jp, G3us, G3sp, G4jp）に属し、実験感染ブタ糞便から得た 4 株と培養細胞で増幅した 1 株の計 5 株をヒト血清で約 10^5 copies/ml に希釈し、0.5ml ずつ分注したものである。共同検定では、感度検定用標準 RNA としてパネル

#1-4 は HEV PC RNA を、パネル#5(G3us) は HEV G3us PC RNA を用いてコピー数で値付けした（Table 1）。しかし、HEV genotype 3b 陽性血漿を原料として製造された HEV-RNA 国内標準品が 2013 年に制定されたことから、コピー数で表示されている各パネルの表示単位について、国内標準品に基づく国際単位（IU）でも表示するための検討を行った。

まず、HEV-RNA 国内標準品を定量 PCR のスタンダードとし、各参照パネルを IU 単位で定量する方法を試みたが、HEV G3us PC RNA(#5)測定用のプライマー、プローブセットでは HEV-RNA 国内標準品は検出できず、この方法では swJB-M8(G3us)の IU 単位を求められないことが判明した。また、HEV-RNA 国内標準品を用いて各パネルの IU 表示単位をそれぞれ新たに算出すると、共同検定により定めたコピー数が IU 表示単位に反映されないことになる。そこで、共同検定の際、コピー数を定めるために用いた感度検定用 RNA を基準として定量 RT-PCR により HEV-RNA 国内標準品（250,000IU/mL）を測定して何コピーに相当するかを算出し、コピー数と IU 単位との換算係数を求め、換算係数を基に各パネルの IU 単位を算出することにした。また、HEV G3us PC RNA を感度検定用標準 RNA とし、FHE100 をプローブとした場合、HEV-RNA 国内標準品を測定できないことから、HEV G3us PC RNA 及び参照パネル #5(G3us)と HEV 国内標準品を同時に測定可能な新たなプライマー・プローブセットとして、両者をミスマッチなく検出可能な M8-2 を設計して使用することとした。

HEV-RNA 国内標準品について、4 回の試験を実施して IU とコピー数の換算係数（IU/copies）を求めたところ、HEV PC RNA を基準にした場合の平均値が 0.41、HEV G3us PC RNA を基準にした場合の平均値が 0.59 と算出された(Table 2)。得られた IU/copies 換算係数を用いて参照パネルの換算 IU 値を算出した（Table 3）。

C-8．定量的 PCR による HBV 国内標準品の再校正

共同研究には国内の 7 施設（公的機関 2、血液事業者等 1、民間の衛生試験所 2、体外診断薬メーカー2）が参加し、日常実施している定量試験法を用いて国内標準品と国際標準品を測定した。4 施設がコバス TaqMan HBV「オート」v2.0 で、3 施設がアキュジーン m-HBV で 2 施設が In-house の TaqMan PCR を用いて測定し、合計 9 セットの測定結果が得られた（表 1）。参加施設から報告された結果を国立感染症研究所が解析して、HBV-DNA 国内標準品の力価を国際単位を用いて改めて決定することになっている。

D. 考察

PV B19 のジェノタイプパネルの有用性評価の一環として、より簡便にその感染性を評価可能な Ku812 細胞クローンの選択を行った。樹立した細胞は、ゲノムコピー数の増幅を指標としてウイルスの感染性を簡便に測定可能であり、また継時的なウイルス増幅測定も可能であった。また、従来の *in vitro* 感染系と同様に抗 PV B19 抗体により感染性が中和されることも確認できた。

この Ku812 E2 細胞を用いて PV B19 のジェノタイプによる感染・増幅能の差異について検討した。その結果、ジェノタイプ 2 がジェノタイプ 1 に比較して高い増幅能を示した。この差異はウイルスの感染性の違いによるのか増幅能の違いによるのかについては不明であった。感染した Ku812 E2 細胞内でのウイルス抗原の発現について差異があるか検討したが、ゲノムコピー数の差異ほどの大きな違いは認められなかった。

また、PV B19 の Ku812 細胞への感染は網状赤血球への感染のモデルと考えられている。そこで網状赤血球の分化抗原を指標として Ku812 E2 細胞を分画し、分化抗原の発現と PV B19 への感受性の関係について解析を行った。その結果、Ku812 E2 細胞で $CD59^{+}$/Glycophorin A^{-}/$CD55^{+/-}$ 細胞という限定された抗原陽性細胞で遺伝子の増幅が認められることが示された。このことは PV B19 は網状赤血球の特定のステージで感染・増幅が起こることを示している可能性がある。

今後 PV B19 の増幅ステージでの同定を行うと共に、この定量的な感染性評価系

を用いて、*in vitro* での最小感染価を明らかにすると共に、その感染価と IU との関係を明らかにする。これらの結果を検査で求められる検出感度と PV B19 の感染性との相関性を明らかにすることに用いていく。

B19V は多くの場合不顕性感染となるため抗体保有率は、大人の 40～50%と言われている。抗 PV B19 抗体は中和活性があることが知られている。米国の S/D 処理した新鮮凍結血漿による B19V 感染事例から、10^7 IU/mL 以上では感染が生じ、10^4IU/mL 以下では感染例がなかったこと知られている。これを基に米国では 10^4IU/mL 以下を原料血漿の規格値としている。一方、症例数は少ないが輸血による B19V 感染の解析から 103IU/mL 以下では感染した症例がないことも報告されている。全血から感染したとすると 1 バッグの血漿量から約 2 x 10^5IU が、PV B19 抗体陰性の人が感染する最少の量と推定できる。原料血漿の基準を 10^4IU/mL とし、原料血漿プールの容量を 3000L とした場合、プール全体で最大 3 x 10^{10}IU の PV B19 が混入していることになるが、我々の実験結果から血漿中に存在する抗体によって 5Log 感染性がなくなると推定できる。その結果、プール血漿中の感染性ウイルスは 3 x 10^5IU となり最大 1 人を感染させる量が残存するだけになる。製造工程によってさらに PV B19 は除去･不活化されるので最終製剤にまで感染性ウイルスが残存する可能性は極めて低くなると考えられる。

我々は、これまで PV B19 の感染性の評価を行い、方法を改良してきた。今回、製造工程を考慮し、中和反応を 4℃で行なった。また、ヒト免疫グロブリンと B19V を反応させる容量を 500μL に増量することで混和がし易いようにした。また、感染させる F10 細胞を 1.5 倍にしたことで RNA の沈殿が明瞭になり操作が容易になった。その結果、安定した結果が得られるようになった。

デングウイルス検出のためのユニバーサルプライマーの検討では、今年度のプライマーでは血清型間で 2Log 以上の感度の差が生じた。特に 2 型の感度が悪かったので塩基配列を再検討し、感度の向上をはかる必要がある。

HEV は EU で感染の広がりが懸念されており、血漿分画製剤原料に対して HEV の検査の必要性が議論されている。わが国は、EU ほど陽性頻度が高くないことなどから、陽性頻度の高い北海道で試験的に NAT 検査が実施されている。一方、2014 年から日本赤十字北海道支所での HEV NAT 検査に個別検査が適用されたが、その結果陽性頻度が高くなる傾向が示されている。まだデータ収集が開始されたばかりであり、現時点で判断するのは困難であるが、将来の対応を考える場合に NAT 試験評価に HEV 参照パネルを用いることができるのではと期待される。

2010 年に共同検定を行った HEV パネルについて HEV 国際標準品が作製されたことからその IU 単位への校正を行った。その結果 Table 3 で示すように、4 つのジェノタイプについて IU 値を求めることができた。但し、クラスターG3us Genotype swJB-M8 は用いるプラーマーが異なる点に配慮が必要と考えられる。

E. 結論

Ku812 細胞から EPO 存在下に PV B19 に感受性の高いクローンを樹立した。このクローンを用いて PV B19 のジェノタイプによる感染・増幅能の差異を評価可能であった。今後、この細胞を用いて検査で求められる検出感度と PV B19 の感染性との相関性を明らかにすることに用いていく。

B19V の中和活性測定法を改良し、血漿相当量の人免疫グロブリンによって約 5Log 中和されることを明らかにし、原料血漿の基準 104IU/mL は、実験的にも適切であることが示された。また、デングウイルスの血清型全てを検出するためのユニバーサルプライマーを検討したが、血清型によっては感度が 1/100 以下となり、更なる改良が必要である。

HEV-RNA 国内標準品を用いて、コピー数で表示されている HEV-NAT 試験用参照パネルの参考値として国際単位（IU）

を算出した。

HBV 国内標準品の再校正に関して、HBV-DNA 国内標準品の力価を国際標準品に準拠して再評価することを目的として、国内共同研究を実施した。7 か所の参加施設から報告された結果を国立感染症研究所が解析して、国内標準品の力価を国際単位に換算することになっている。

希釈用血漿を譲渡していただいた日本赤十字社に感謝いたします。

G. 研究発表

1. 山口照英、内田恵理子：遺伝子治療の開発に関する我が国の規制と海外動向、Pharma Medica （印刷中）
2. 内田恵理子，古田美玲，菊池裕，窪崎敦隆，遊佐精一，宮原美知子，佐々木裕子，小原有弘，大谷梓，松山晃文，大倉華雪，山口照英：日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究、マイコプラズマ学会雑誌（印刷中）
3. 内田恵理子、五十嵐友香、佐藤陽治：遺伝性難病に対する遺伝子治療薬の臨床開発促進のためのレギュラトリーサイエンス共同研究、衛研報告 132, 10-12（2014）
4. 内田恵理子，古田美玲，菊池裕，窪崎敦隆，遊佐精一，宮原美知子，佐々木裕子，小原有弘，大谷梓，松山晃文，大倉華雪，山口照英：細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の PCR 法の見直しに関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45 (5), 442-451 (2014)
5. Teruhide Yamaguchi and Eriko Uchida: Oncolytic Virus: Regulatory Aspects from Quality Control to Clinical Studies, Current Cancer Drug Targets (in press)
6. 岡田　義昭、輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。検査と技術、42 巻、4～7 ページ、2014 年
7. Epstein J, Ganz PR, Seitz R, Jutzi M, Schaerer C, Michaud G, Agbanyo F, Smith G, Prosser I, Heiden M, Saint-Marie I, Oualikene-Gonin W, Hamaguchi I, Yasuda N: A shared regulatory perspective on deferral from blood donation of men who have sex with men (MSM). Vox Sang, 107(4):416-9,2014
8. Okuma K, Fukagawa K, Tateyama S, Kohma T, Mochida K, Hiyoshi M, Takahama Y, Hamaguchi Y, Hirose K, Buonocore L, Rose JK, Mizuochi T, Hamaguchi I: Development of an Infectious Surrogate Hepatitis C Virus Based on a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins and Green Fluorescent Protein. Jpn J Infect Dis. in press
9. Kuramitsu M, Okuma K, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi　S, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, Hamaguchi I, Identification of TL-Om1, an Adult T-Cell Leukemia (ATL) Cell Line, as Reference Material for Quantitative PCR for Human T-Lymphotropic Virus 1. J. Clin. Microbiol. 53(2):587-96, 2015

G-2 学会発表

1. 内田恵理子、豊田淑江、古田美玲、山口照英、佐藤陽治：パルボウイルス B19 感染系の改良とジェノタイプの違いによる増殖能の比較、日本薬学会第 135 年会(2015.3)神戸
2. 古田美玲、内田恵理子、山口照英：再生医療製品のマイコプラズマ否定試験としての NAT の適用に関する研究、第 14 回日本再生医療学会総会(2015.3)横浜
3. 内田恵理子：新しいマイコプラズマ否定試験法、第 15 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム(2015.2)
4. 内田恵理子：遺伝子治療用製品指針改定の取り組み－品質及び安全性の確保と遺伝子治療製品の開発促進のために、第 5 回国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラム(2015.1)

5. 山口照英、内田恵理子、小野寺雅史：遺伝子治療製品の品質/安全性確保のための指針改定と国際調和、IMSUT-CGCT キックオフシンポジウム 2014, 2014. 11. 21、東京
6. 内田恵理子：マイコプラズマ否定試験の改正による NAT 法の積極的活用、第 13 回日本薬局方に関する研修会 2014 年 10 月 9 日(大阪)，15 日(東京)
7. Eriko Uchida : Current situation of advanced therapy regulation in the world, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会(2014.8) (東京)
8. Eriko Uchida, Yuka Igarashi, Yoji Sato, Masafumi Onodera, Teruhide Yamaguchi : Study on the biosafety of ex vivo transduced cells with retroviral vectors and Cartagena protocol domestic law, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会(2014.8) (東京)
9. Yuka Igarashi, Eriko Uchida, Masafumi Onodera: Quality control for the supernatants of retroviral vectors using a next-generation DNA sequencer, 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会(2014.8) (東京)
10. 内田恵理子、古田美玲、菊池裕、窪崎敦隆、遊佐精一、宮原美知子、佐々木裕子、小原有弘、大谷梓、松山晃文、大倉華雪、山口照英：日本薬局方参考情報収載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究、日本マイコプラズマ学会第 41 回学術集会、2014 年 5 月 22 日～23 日 (東京)
11. 鈴木雅之、青木麻衣子、加藤光洋、玉栄建次、内野富美子、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭：同種骨移植のための骨保管支援業務の現状、第 62 回日本輸血･細胞治療学会総会、平成２６年５月、奈良
12. 岡田義昭、小林清子、池淵研二：リアルタイム RT-PCR を用いた B19-RNA 定量による B19 感染評価系の開発、第 62 回日本輸血･細胞治療学会総会、平成２６年５月、奈良
13. 山田攻、加藤光洋、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭：当院における産婦人科緊急輸血症例の分析とその対策、第 62 回日本輸血･細胞治療学会総会、平成２６年５月、奈良
14. Kitazawa J, Odaka C, Hamaguchi I, and the Hemovigilance Research Group supported by Japan's Ministry of Health, Labour and Welfare. Hemovigilance in Japan: 2nd Interim Report, AABB annual meeting, 2014.10.25 Philadelphia, USA
15. 井上由紀子、守田麻衣子、相良康子、後藤信代、倉光球、浜口功、迫田岩根、入田和男、清川博之、WB 判定保留事例の Follow-up -HTLV-1 抗体確認検査に関する考察-第１回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014. 8.
16. 栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、浜口功、HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析、第１回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014. 8.
17. 大隈和、日吉真照、滝澤和也、齋藤益満、浜口功、CCR4 リガンド TARC を用いた新規抗 HTLV-1 分子標的治療薬の開発、第１回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014. 8.
18. 佐竹正博、相良康子、岩永正子、浜口功、献血者のデータから明らかになった HTLV-1 水平感染の実態、第１回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2014. 8.
19. Kuribayashi W, Mizukami T, Takizawa K, Kuramitsu M, Asada Y, Iwama A, Matsuoka M, Hamaguchi I, Identification and characterization of cancer stem cells in an HBZ transgenic mouse model of ATL、第 76 回日本血液学会学術集会、大阪、2014. 10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H-1 特許取得 なし

H-2 実用新案登録 なし

H-3 その他 なし

Table 1 共同検定による HEV 参照パネルの表示コピー数

#	HEV 参照パネル	クラスター	由来	Accession No.	容量 (mL)	Log copies/mL
1	swJR-P5	G3jp	実験感染ブタの糞便	AB481229	0.5	5.07±0.35
2	swJB-E10	G3sp	実験感染ブタの糞便	AB481226	0.5	4.80±0.33
3	swJB-E10cul	G3sp	swJB-E10 株感染培養細胞上清		0.5	4.43±0.31
4	swJB-M7	G4jp	実験感染ブタの糞便	AB481227	0.5	4.91±0.42
5	swJB-M8	G3us	実験感染ブタの糞便	AB481228	0.5	5.27±0.39

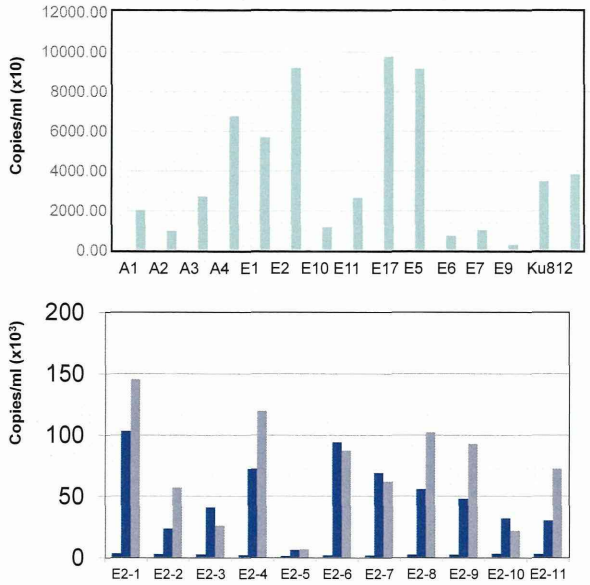
Table 2 HEV 国内標準品の RNA 標準品による測定での IU/copies 換算係数

定量スタンダード	国内標準品 (250,000 IU/mL) の測定値						
		1 回目	2 回目	3 回目	4 回目	平均	SD
HEV PC RNA	コピー数	593,829	631,650	676,194	553,981	613,914	45,246
	IU/copies 換算係数	0.42	0.40	0.37	0.45	0.41	0.03
HEV G3us PC RNA	コピー数	359,890	443,302	518,032	427,805	440,408	56,205
	IU/copies 換算係数	0.69	0.56	0.58	0.52	0.61	0.06

Table 3 HEV 参照パネルの IU 換算値

#	HEV 参照パネル	クラスター	共同検定値		IU/copies 換算係数	IU 換算値	
			Log copies/mL	copies/mL		IU/mL	Log IU/mL
1	swJR-P5	G3jp	5.07±0.35	117,490	0.41	48,171	4.68
2	swJB-E10	G3sp	4.80±0.33	63,096	0.41	25,869	4.41
3	swJB-E10cul	G3sp	4.43±0.31	26,915	0.41	11,035	4.04
4	swJB-M7	G4jp	4.91±0.42	81,283	0.41	33,326	4.52
5	swJB-M8	G3us	5.27±0.39	186,209	0.59	109,863	5.04

図1. Ku812細胞のクローニングとPV-B19の増幅能



多くのクローンを分取し、PV B19を感染後4-5日目に細胞懸濁液よりDNAを抽出した。

図2. 増幅能の大きく異なるKu812クローン（Ku812 E2細胞とKu812 A2細胞）でのPV-B19の増幅パターン

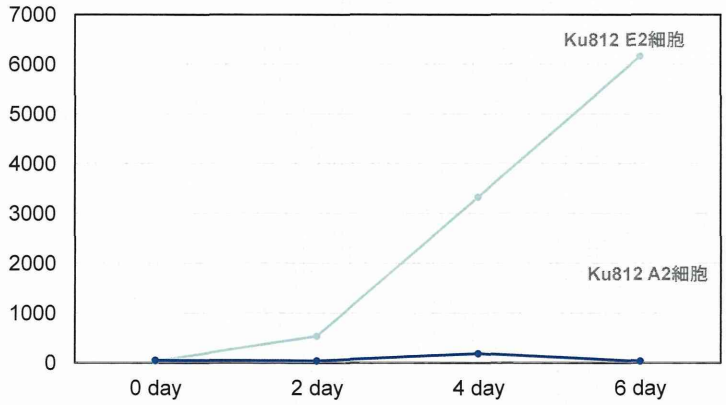
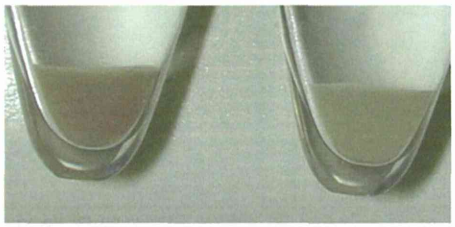


図3. Ku812とKu812-E2細胞の比較



Ku812-E2
細胞

Ku812
細胞

Ku812細胞とKu812-E2細胞、それぞれ107細胞を遠心して沈殿させた。Ku812-E2細胞は網状赤血球様にヘモグロビンを産生している.

図4. Ku812-E2細胞でのParvovirusB19の増幅と抗体の影響

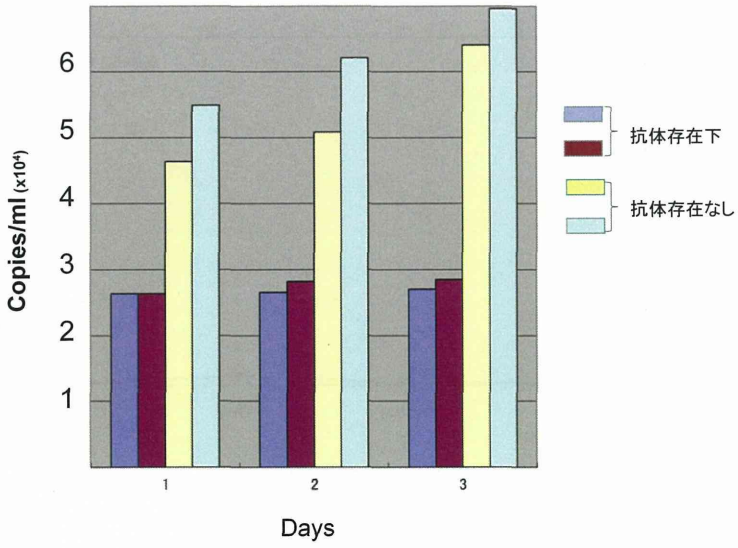


図5. PV B19のインビトロでのウイルス増幅に及ぼす培養条件の影響

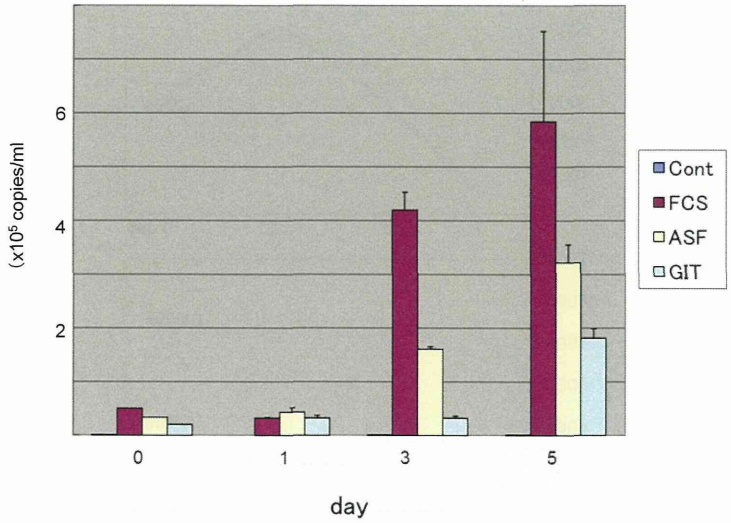
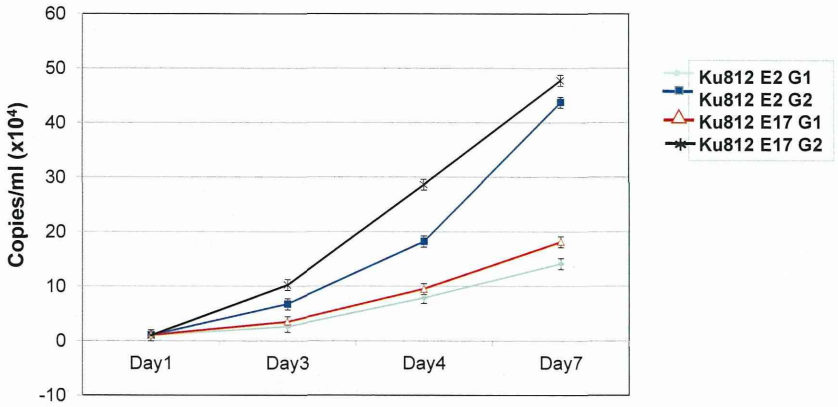
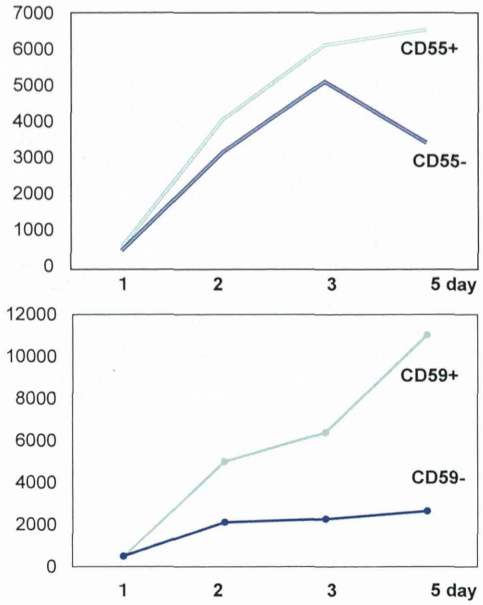


図6. 2種類のKu812細胞クローンによるPV B19のジェノタイプの増幅



Ku812 E2及びKu812 E17を用いてPV B19のジェノタイプ1と2の増幅を解析した.
indicator cellの違い、1:ジェノタイプ1、2:ジェノタイプ2

図7. CD59+細胞とCD5-細胞でのPV-B19の増幅



Ku812E2細胞よりCD55及びCD59の陰性、陽性細胞を分離し、PV B19の増幅を解析した

IgG
50μL(15mg)
*Diluted B19V 50μL
5% alb. 400μL

control
5% alb. 450μL
*Diluted B19V 50μL

*Diluted B19V : 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} with 5%alb.

↓ 4℃ for 2h

Infection for F10 with 200μL sample

↓

Harvest and extraction of RNA

図8.人免疫グログリン製剤による B19Vの中和活性