

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（業務項目）

NAT の実施及び精度管理に関するウイルス学的研究

担当責任者 岡田義昭 埼玉医科大学病院 輸血・細胞移植部 部長

研究要旨

ヒトパルボウイルス 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。米国では原料血漿の基準として 10^4 IU/mL と過去の感染例を参考に決定されている。我々は、筋注用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、 10^4 IU/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。

A. 研究目的

輸血用血液を含めた血液製剤の安全性向上のために HBV、HCV、HIV を対象とした核酸増幅検査が実施されているが、これらの検出感度は、検出試薬の感度を考慮して決定されていることが多い。一方、B19V は一過性に高いウイルス血症を生じるが、感染者の多くが不顕性感染となるため献血者の 40～50%が B19V に対する抗体陽性と考えられている。そのため、血漿分画製剤の原料血漿における B19V の NAT 検査は、高いウイルス血症を排除するために実施されている。その一方で規格値を設定する際に

は、中和抗体の存在も考慮して決定する必要があると考えられる。米国の FDA では、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 10^4 IU/mL 以下と規定している。欧州では、通常血漿分画製剤用の血漿には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。我々は、B19V の国内標準品が設定されたことから血漿分画製剤の原料血漿に規格を設定する場

合、どれくらいのウイルス量が適切であるのか B19V の感染系を用いて評価を試みた。また、今年度デングウイルスが国内で発生したことを受け、デングウイルスを検出する NAT 検査法を検討し、4 つの血清型をユニバーサルに検出できる NAT を試みた。

B. 研究方法

1) B19V 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 B19V 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 2ndPCR 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 B19V 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 400 μ L に筋注用人免疫グロブリン製剤 50 μ L、5%アルブミンで 10^{-1} ~ 10^{-8} に希釈した B19V 50 μ L を加え計 500 μ L 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 μ L 取り、そこへ 3×10^5 /50 μ L に調整した F10 (KU812 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 (エリスロポイチン 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 1)。細胞に RNAsol を添加して RNA を抽出し、最終的に RNA は 12 μ L の蒸留水に溶解した。RT 及び 1_{st}PCR は PrimScript One Step RT-PCR Kit Ver.2(タカラ)を用い、RNA10 μ を用いた。2_{nd}PCR は 5 μ L の 1stPCR 産物を用いた。抗 B19V 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。3)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が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。文献から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。

C. 研究結果

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

人 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 B19V 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 倍稀釈あるいは 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 倍稀釈あるいは 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とも 5Log 中和されることが示された (図 2)。

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、2nd 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。

D. 考察

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 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、 10^4 IU/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 10^4 IU/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 10^3 IU/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 2×10^5 IU が、B19V 抗体陰性の人感染する最少の量と推定できる。原料血漿の基準を 10^4 IU/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 3×10^{10} IU の B19V 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 3×10^5 IU 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 B19V 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 B19V 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 500 μ L 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。

E. 結論

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 10^4 IU/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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

1) 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

2) 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

3) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし