



Title	Heat sensitivity of human parvovirus B19
Author(s)	柚木, 幹弘
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44630
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ゆの き み 幹 ひろ
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 1 9 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 10 月 28 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Heat sensitivity of human parvovirus B19 (ヒトパルボウイルス B19 の熱感受性)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 生 田 和 良 (副査) 教 授 松 浦 善 治 教 授 塩 田 達 雄

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

Parvovirus B19 (B19) DNA が凝固因子製剤を始めとして、いくつかの血漿分画製剤中に検出されることが 1996 年から 1997 年にかけていくつかの報告が相次いでなされた。B19 に対するリスク評価を実施するには同じパルボウイルス科の細胞培養可能な動物のパルボウイルスをモデルウイルスとして感染価で不活化・除去能を評価するか、PCR 法による B19 ウイルス DNA の挙動で除去能を評価するしかなかった。そこで、B19 の感染価測定法の確立を行い、その熱感受性を明らかにすることを目的として本研究を実施した。

〔 方 法 〕

PCR 及び RT-PCR 法はそれぞれ B19 の DNA 及び mRNA を検出することを目的として、DIG-ELISA 法にて B19 特異的プライマーを設定して定法にて実施した。DNA 検出については 100 copy/mL の感度を Run control によって常に確認した。mRNA 検出については細胞の Actin を常に検出することによって RNA 抽出についての成否のコントロールとした。

B19 の培養については宿主細胞を KU812 細胞とし、RPMI-1640 に 10%FBS、6 IU/ml Erythropoietin、100 U/ml Penicillin、100 μ g/ml Streptomycin and ITS-S supplement を添加したものを培養液として用いた。KU812 に B19 を感染させ、4 日間培養した後、抗 B19 抗体を用いた IFA 又は上記の RT-PCR 法によって感染後に発現した抗原又は mRNA を検出し、感染価を算出した。

〔 成 績 〕

得られた Clinical Isolates について IgG 含量 (Parvovirus B19 IgG、Dako) 及び B19DNA 量を調べたところ、これらの血漿は抗体陰性、ウイルス陽性の急性期血漿であることが確認できた。ウイルス DNA 量はそれぞれ 13.9、11.0、12.0、11.7 copies/mL (In house run control) であった。

B19 を KU812 細胞に 2 時間吸着させた後、直ちに IFA を行ったところ抗原は認められなかった。感染後 4 日目の細胞を IFA によって観察したところ、高 MOI であるにも係わらず全ての細胞に抗原が認められるわけではないこと、抗原陽性細胞核付近が強く反応するという特長が認められた。

次に感染細胞からの mRNA の検出について経時的に測定した。感染後 1 時間では mRNA は検出されなかったが、感染後 1 日以後培養が終了する 4 日目まで mRNA が検出された。ウイルスソースとして使用した血漿中に mRNA が認められないこと、上記の結果から検出された抗原及び m-RNA は感染によって発現されたものであり、測定系として成立していると判断した。

B19 を 25%又は 5%ヒト血漿アルブミン溶液 (25%HSA、5%HSA)、培養液 (Medium)、60%シュクロース液 (60%Sucrose) や PBS にスパイクしたものについて熱感受性を調べた。小分けしたチューブを 60℃のウォーターバスに完全に浸漬させ 60℃液状加熱処理を行い、規定時間後直ちに冷却、10 倍希釈系列で感染価を上記の方法で測定した。コントロールとして実施した 37℃条件での感染価は変化がなく不活化されていなかったこと、5% Albumin に B19 を添加したサンプルについて加熱前後での DNA 量は加熱前後とも 11 Log copies/ml で変化はみられなかったこと、複数の臨床株で再現性が得られたことから、これらの評価系は成立していると判断した。その結果、60℃加熱後の B19 の感染性は 60% sucrose を除く溶媒系では急速に不活化されるが、60% Sucrose 存在下においては熱抵抗性を示し、全く不活化されなかった。B19 と同じファミリーに属するイヌパルボウイルス (CPV) と 25% HSA 及び 0.5% Urinastatin 溶液を用いて同様の熱感受性試験を行ったところ B19 とは全く異なり、加熱処理 1 時間ではほとんど不活化されない熱感受性パターンを示した。

[総 括]

今回の試験において B19 は同じパルボウイルス科に属する CPV とは明らかに異なる熱感受性パターンを示し、今まで考えられてきた性状とは全く異なり、熱感受性であることが明らかになった。

本論文で確立した感染価測定法は IFA 及び RT-PCR の手法何れでも評価でき、且つ、複数の臨床株での再現性も確認できていることから、感染性を指標とした精度の高い直接評価が可能となった。この方法を用いて臨床における各種リスク評価及び抗 B19 薬の評価に展開が可能となった。

論文審査の結果の要旨

ヒトパルボウイルス B19 (B19) は伝染性紅班や溶血性貧血の原因となる。一般に、パルボウイルスはその性状から加熱処理を始め、各種のウイルス不活化・除去操作に耐性であると考えられている。いくつかの血液製剤中には B19 DNA が認められることが報告されており、血液製剤のこれまでの安全性評価は DNA の挙動を追跡することによって行われてきた。しかしながらこの方法では、ウイルスを不活化する方法についての評価を行うことはできないことから、感染性を評価する手法の確立が求められていた。これまでわずかに B19 の培養に関する報告があるが、細胞分与機関から入手できる、一般的な細胞を用いたものではなく、第 3 者が容易に確認できる試験系ではなかった。本研究は B19 の熱感受性を評価することを目的として感染価測定法を確立し、その熱感受性について検討したものである。

本研究において、細胞分与機関から入手できる KU812 細胞はこれまでの報告ではクローニングしないと効率のよい B19 検出細胞は得られないとされていたが、培地組成を改変することによって検出可能であることが明らかとなった。次に定法による間接蛍光抗体法によるウイルス抗原検出に加え、PCR 法によるウイルス m-RNA の検出法も確立して複数の検出法での評価を可能とした。B19 としては臨床分離株を 4 株用い、これらにより再現性や特異性を確認して感染価測定系を確立した。

この試験系を用いて B19 の熱感受性を評価したところ、B19 はこれまでの認識とは異なり熱に感受性であり、60℃の液状加熱では急速に不活化されることが判明した。しかし、この熱感受性は溶液の組成、特に安定化剤の種類に大きく依存することも判明した。

柚木幹弘君の研究内容は、B19 の感染価測定法を確立し、この系を用いて B19 は熱に感受性であることを明らかにした。さらに、その熱感受性は安定化剤によって極端に左右されることから、その不活化の方法については慎重に行う必要があることを初めて示したものであり、学位の授与に値すると考えられる。