

XMRV と輸血

浜口 功

2006年に米国でRNaseLに遺伝子異常を持つ前立腺がん患者の前立腺組織より発見された新規ヒトレトロウイルス Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV)は、2009年には原因不明の疾患である慢性疲労症候群(CFS)に関与するという可能性が同じ米国より報告され、大きな社会的関心を生んだ。またこの報告では健康人での血液細胞および血漿中からもウイルスが検出されており、輸血による感染が危惧される事態となった。このような中、XMRVの検査法の確立と国内のXMRV感染状況の確認が急がれた。国内のCFS患者、前立腺癌患者においてXMRV感染の可能性を検索したが全例陰性であった。さらに、国内感染状況を把握することを目的に、血清学的検査法および、既に公表されているNAT法を用いて献血ドナーのXMRV NATスクリーニングを行った。血清学検査およびNATスクリーニングの結果はすべて陰性であった。これらの解析結果より、国内においては、XMRV流行は起こっていないことが確認された。

キーワード：XMRV、レトロウイルス、輸血、前立腺がん、慢性疲労症候群

はじめに

輸血用血液を含めた血液製剤は、ヒトの血液を原料に製造される医薬品であり、血液を介して多種の病原体が感染する可能性がある。2006年に米国でRNaseLに遺伝子異常を持つヒト前立腺がんから発見されたレトロウイルスXMRV (Xenotropic Murine leukemia virus-related virus)¹⁾が、2009年に同じ米国より慢性疲労症候群の患者から高率に検出されたという報告²⁾によって注目を集めた。健康人からも3.6%の頻度で検出されたことから、血液製剤を介した感染が危惧され血液製剤の安全性確保のためにその検出法の確立が急務となった。平成22年に厚生労働科学研究「我が国における新規ヒトレトロウイルスXMRVの検査法確立等に関する研究」班(研究代表者 浜口功)に大阪府赤十字血液センター研究部・古田里佳、山形大学医学部腎泌尿器外科・富田善彦、京都大学ウイルス研究所・細胞生物学研究部門・信号伝達学研究分野・宮沢孝幸、国立感染症研究所・血液・安全性研究部・岡田義昭、日本赤十字社・血液事業本部・百瀬俊也が加わりXMRVに関する検討が開始された。

1. 核酸検査法の開発

XMRVは他のxenotropic mouse leukemia virusと比較してgag領域に特徴的な24塩基の欠損が存在する。欠損した塩基配列を跨ぐようにsense primerを作製し、3'末側に2つのantisense primerを作製することに

よってsingle PCRやsemi-nested PCRを行なった。精製したDNA又はPCRを鋳型にして核酸増幅法を行ない、増幅産物は2%アガロールゲルの電気泳動によってXMRV遺伝子の有無を解析した。また、感染価は、ヒト前立腺癌株LN-Capにウイルスを含む検体を添加し、ウイルスと細胞の接着を高めるためにポリブデンを最終濃度10 μ g/mlになるように加え、3週間培養した。その結果、XMRVゲノム構造を考慮し設定したプライマーを用いたRT-nested PCRによって、培養上清中には10⁸希釈までXMRV遺伝子が検出された(図1a)。また、細胞に上清を感染させた場合は、10⁷希釈まで感染が確認できた(図1b)。

2. 検査における問題点の解明

当初CFS患者において報告されたXMRV感染が追認できないとする報告が相次いで出された(表1)。検査キットへのXMRV遺伝子の混入の可能性を検討するために、One step RT-PCRキットを用いてXMRVのgag遺伝子領域の一部を検出しようと試みた。One step RT-PCRキットは大手メーカー4社から購入した。XMRVや他のMLV関連ウイルスのgag遺伝子を増幅させるために、XMRV研究で広く使われているプライマーセット(419Fと1154R、GAG-I-FとGAG-I-R)を使用した。増幅された産物の塩基配列を決定し、既知の多指向性内在性MLV(PmERV)、CFS患者から分離されたXMRVや他のMLV関連ウイルスの塩基配列と比較した。XMRV

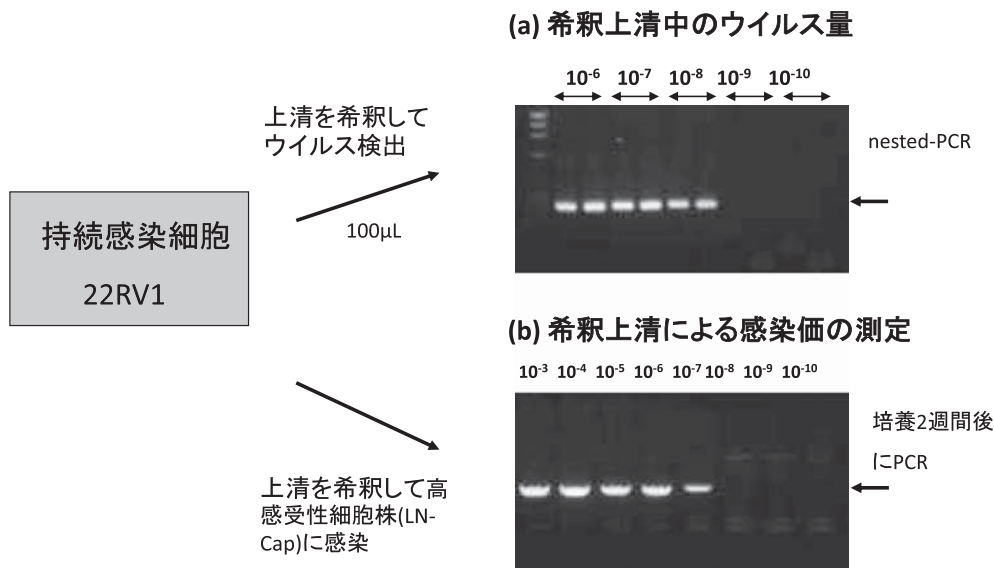


図1 XMRVの検出系と感染系の構築

表1 CFS患者におけるXMRVの検出報告

Detected	Country	Group	Date
Yes (68/101; 67%)	USA	Lombardi et al.	Oct, 2009
Yes; MLV-related (32/37 ; 86.5%)	USA	Lo et al.	Sep, 2010
No (0/186)	UK	Erlwein et al.	Jan, 2010
No (0/299)	UK	Groom et al.	Feb, 2010
No (0/32)	Dutch	van Kuppeveld et al.	Feb, 2010
No (0/50)	USA	Switzer et al.	July, 2010
No (0/65)	China	Hong et al.	Sep, 2010
No (0/32)	USA	Henrich et al.	Nov, 2010

核酸検査を行った際、陰性対照の検体で陽性のバンドが予想通りの大きさと頻りに検出された。そこで、キット自体に内在性マウス白血病ウイルス (MLV) のゲノムまたは XMRV が極少量混入していた可能性を考え、RT-PCR キットの品質評価を行った。その結果、1社の One step RT-PCR キットの酵素 mix に PmERV 由来の RNA が混入していることを確認した(図2)。RT-PCR により増幅された混入産物の gag 領域の一部は、第7染色体上の PmERV の配列とほぼ同一 (99.4%の相同性) であり、CFS患者から検出・同定された MLV 様ウイルス³⁾に極めて類似していた (96.9~97.6%)。その混入産物の env 配列の一部を決定したところ、PmERV の配列とほぼ同一 (99.6%)であった。XMRV を含め、これまでにレトロウイルス感染とヒトの疾患の可能性が検討されてきた事例は多々おこっている。例えば、1972年に報告された RD-114 ウイルスは、ヒトの横紋筋肉腫由来の細胞株 (RD-114細胞) から分離され原因ウイルスの可能性が示唆された。しかしその後の検討から、細胞株樹立時にネコの脳内に移植した際にネコの内在性ウイルスが伝達されたものと考えられる。この

ように、最終的に結論に到達せずいわゆる rumor virus とされるものが多数存在する。検査を実施する現場で動物由来のレトロウイルス核酸が混入している可能性は十分想定しておく必要があり、最初に報告する研究者は特に注意が必要である。

3. XMRV 感染状況の確認

a) ヒト細胞株およびヒト末梢血単核球を用いた XMRV の感染力の検討

ヒト細胞株 CEM5(T細胞株), Raji(B細胞系), U937(単球細胞), T-98g(glioma), ONS-76(meduroblastoma), YKG(glioma), LN-Cap(prostate cancer)を 2×10⁵/well ずつ 24穴のプレートに撒き、XMRVを感染させた。感染1日目に PBS で3回洗浄し、添加したウイルスを取り除いた。週2回の継代を行ない、3週間培養を行なった。3週後に細胞と培養上清を回収し、DNAとRNAを精製した。上記プライマーを用いた single-PCR (32サイクル)を行ない、XMRV 遺伝子の有無を解析した。血球系(T, B, 単球), 神経系, 前立腺癌細胞株等、感染させた全ての細胞株から XMRV の遺伝子が、核酸増

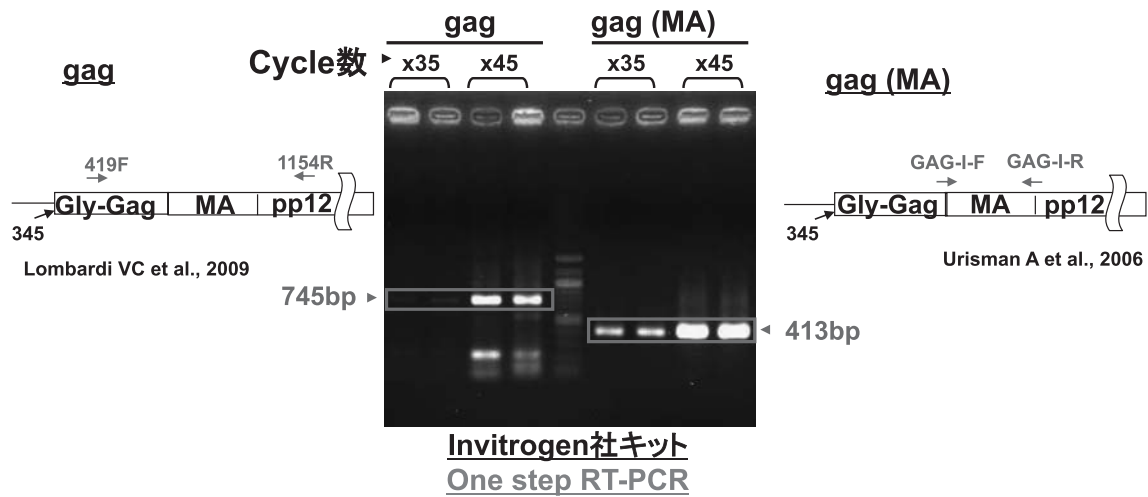


図2 XMRV 核酸のコンタミネーションの可能性

幅法によって検出できた。また、感染3週後のCEM5, Raji, ONS76, LN-Capの培養上清からRNAを抽出し、核酸増幅法を用いてXMRV遺伝子を増幅したところ、 $10^4 \sim 10^6$ 希釈まで増幅産物が確認できた(図3a)。これによってXMRVに感染した細胞は、感染しただけでなく感染した細胞から新たなウイルスが産生されていることが明らかとなった。また、ヒト末梢血単核球(PBMC)への感染性を確認するために、血液からフィコールを用いてPBMCを分離した。これにコンカナバリンAを最終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ 加え、T細胞を活性化した。1日後にXMRVを感染させ、感染2日目に細胞を回収し、DNAを精製し、XMRV遺伝子の有無を核酸増幅法によって解析した。コンカナバリンA刺激によって活性化した細胞し、XMRVを感染させた細胞からXMRVの遺伝子が検出された(図3b)。株化された細胞だけでなく、正常細胞にもXMRVは感染することが示された。

b) CFS患者における解析

CFS患者100名の血清をウエスタンブロット(WB)法で解析した。WB法における感度は、Gag capsidについてはコントロールモノクローナル抗体R187の640,000倍希釈、Env SUについてはコントロールウサギポリクローナル抗体の8,000倍希釈まで検出可能であった。CFS患者100名の血清を100倍希釈でWBにより検査したところ、Gag capsidに対する陽性反応が3.0%認められた。しかし、Envタンパク質に対する抗体反応は全く認められなかった。確認検査として、大腸菌で産生させた組換え capsid タンパク質およびバキュロウイルス系で発現させた Env SU タンパク質を抗原としたWBも行ったが、ウイルス粒子同様、血清は capsid タンパク質のみに反応性を示した。上記の結果から、全て陰性と判断した⁴⁾。

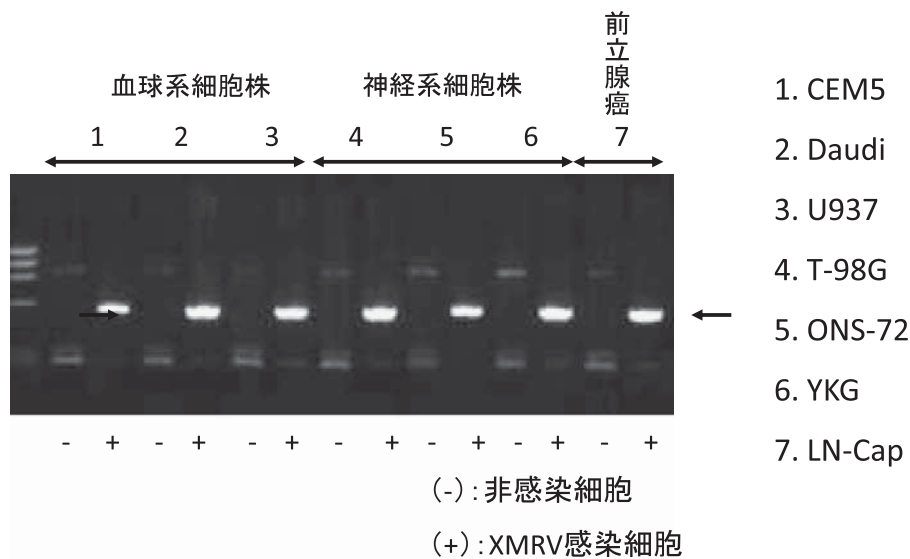
c) 前立腺癌患者における解析

山形大学病院及び関連施設で前立腺癌の診断を受け、山形大学病院を受診し、本研究に使用することの同意が得られた計26例の患者から採血し、血漿とPBMCを分離後使用まで -20 度にて凍結保存した。なお、本研究は、山形大学及び国立感染症研究所の倫理審査委員会の承認を得て実施した。患者血漿および末梢血単核球から核酸を抽出し、平成22年度に検討した検出系を用いてXMRV遺伝子の有無について解析を行った。病理組織学的に前立腺癌と診断された患者より、血漿、末梢血単核球を採取し、高感度PCRによるXMRVの検出XMRVプロウイルス陽性の患者26名においては存在しなかった。

d) 献血ドナーにおける解析

2011年5月から6月にかけて関東地域で献血された血液のうち無作為に1,030検体を抽出し、連結不能匿名化を行い、日本赤十字社中央血液研究所にてXMRV NATを実施した。XMRVスクリーニングNATは、反応当たり10コピーのウイルスを確実に検出できる感度である。スクリーニングNATで陽性疑いの検体は、XMRV nested PCR(検出限界3コピー/反応)および前年度までに確立したXMRV抗体検査(Western blot法)にて確認検査を行った。検査した1,030検体(男性712名、女性318名、16歳~66歳)中、1,029検体はXMRVスクリーニングNAT陰性であった。1検体(検体番号75番)がXMRV gagおよびenvプライマーセットでわずかに増幅が認められた。しかし、同じ検体をnested PCRで再検査したところ陰性であった。また、検体75番の血清中にXMRVに対する抗体は検出されなかったことから、スクリーニングNATで認められた弱い陽性反応は非特異増幅であり、XMRV感染ではないと判断した⁵⁾。

(a) ヒト細胞株を用いたXMRVの感染力の検討



(b) ヒト末梢血単核球を用いたXMRVの感染力の検討

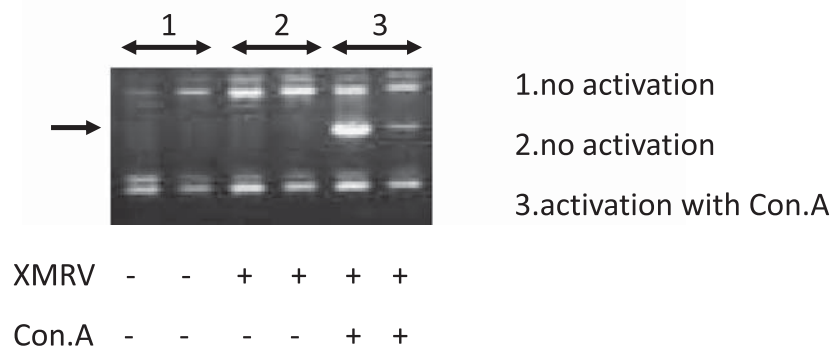


図3 XMRVの感染力の確認

4. 海外での動き

当初, CFS患者において有意にXMRVが感染しているとする報告がなされた²⁾³⁾. これに伴い, カナダ, ニュージーランド, オーストラリア, イギリスにおいては, CFS患者からの献血制限を実施した. 一方日本においては, CFS患者における解析においてすべて陰性であった結果をもって患者の献血制限は行っていない. その後, CFS患者と健常人との間に陽性率の差がなく, 陽性例では全てマウスのDNA陽性も陽性との報告もあり, XMRVとCFSとの関連を否定する報告がわれわれの報告を含め複数なされた^{6)~9)}. さらに米国での大規模な献血者からのXMRV遺伝子の検出調査が実施されたが, 1例もXMRV遺伝子は検出されなかった. これらからXMRVは血液を介して感染が拡大しているウイルスではないことが示された. さらに同一検体を多数の施設で測定する共同研究も実施され, 高率にXMRVが検出された施設において疑陽性も明らかになり, 論文に掲

載された一部のデータの信頼性が疑われ撤回することに発展した.

おわりに

新興感染症疑いとしてXMRVが報告されてから, 輸血用血液の安全性確保のために国内での流行把握に努めた. 国外の報告ならびに本研究班での研究結果から, XMRVは自然流行しておらず, 当面の医学的脅威ではないという確固たるエビデンスを短期間に集積することができた. 情報の少ない中でXMRVに対する検査法確立および国内の実態調査を効率よく実施し, 2年で一応のまとめに至る事ができた. 関係者にこの場をかりてお礼を述べたい. また, 今回わが国における血液担当部署の対応及び検査確認がスムーズに進められたことは, 今後問題となる病原体が出現した際に有効に機能すると思われる.

文 献

- 1) Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, et al: Identification of a novel gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant. *PLoS Pathog*, 2: e25, 2006.
- 2) Lombardi VC, Ruscetti FW, Das Gupta J, et al: Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome. *Science*, 326: 585—589, 2009.
- 3) Lo SC, Pripuzova N, Li B, et al: Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors. *Proc Natl Acad Sci*, 107: 15874—15879, 2010.
- 4) Furuta RA, Miyazawa T, Sugiyama T, et al: No association of xenotropic murine leukemia virus-related virus with prostate cancer or chronic fatigue syndrome in Japan. *Retrovirology*, 8: 20, 2011.
- 5) Matsumoto C, Igarashi M, Furuta R, et al: Proviral DNA of Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus (XMRV) was not Detected in Blood Samples Donated in Japan. *Jpn J Infect Dis*, in press, 2012.
- 6) Robinson MJ, Erlwein OW, Kaye S, et al: Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV. *Retrovirology*, 7: 108, 2010.
- 7) Oakes B, Tai AK, Cingöz O, et al: Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences. *Retrovirology*, 7: 109, 2010.
- 8) Sato E, Furuta RA, Miyazawa T, et al: An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV. *Retrovirology*, 7: 110, 2010.
- 9) Hué S, Gray ER, Gall A, et al: Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination. *Retrovirology*, 7: 111, 2010.

XMRV AND TRANSFUSION*Isao Hamaguchi*

Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases

Keywords:

XMRV, retrovirus, transfusion, prostatic cancer, chronic fatigue syndrome