

Sequences of full-length XMRV genomes from two CFS patients and a partial genome from a third patient were generated (table S1). CFS XMRV strains 1106 and 1178 each differed by 6 nt from

the reference prostate cancer strain XMRV VP62 (EF185282), and with the exception of 1 nt, the variant nucleotides mapped to different locations within the XMRV genome, suggesting independent

infections. In comparison, prostate cancer-derived XMRV strains VP35 and VP42 differed from VP62 by 13 and 10 nt, respectively. Thus, the complete XMRV genomes in these CFS patients

were >99% identical in sequence to those detected in patients with prostate cancer. To exclude the possibility that we were detecting a murine leukemia virus (MLV) laboratory contaminant, we determined the phylogenetic relationship among endogenous (non-ecotropic) MLV sequences, XMRV sequences, and sequences from CFS patients 1104, 1106, and 1178 (fig. S2). XMRV sequences from the CFS patients clustered with the XMRV sequences from prostate cancer cases and formed a branch distinct from non-ecotropic MLVs common in inbred mouse strains. Thus, the virus detected in the CFS patients' blood samples is unlikely to be a contaminant.

To determine whether XMRV proteins were expressed in PBMCs from CFS patients, we developed intracellular flow cytometry (IFC) and Western blot assays, using antibodies (Abs) with novel viral specificities. These antibodies included, among others, (i) rat monoclonal antibody (mAb) to the spleen focus-forming virus (SFFV) envelope (Env), which reacts with all polytropic and xenotropic MLVs (7); (ii) goat antisera to whole mouse NZB xenotropic MLV; and (iii) a rat mAb to MLV p30 Gag (8). All of these Abs detected the human VP62 XMRV strain grown in human Raji, LNCaP, and Sup-T1 cells (fig. S3) (5). IFC of activated lymphocytes (6, 9) revealed that 19 of 30 PBMC samples from CFS patients reacted with the mAb to MLV p30 Gag (Fig. 2A). The majority of the 19 positive samples also reacted with antisera to other purified MLV proteins (fig. S4A). In contrast, 16 healthy control PBMC cultures tested negative (Fig. 2A and fig. S4A). These results were confirmed by Western blots (Fig. 2, B and C) (6) using Abs to SFFV Env, mouse xenotropic MLV, and MLV p30 Gag. Samples from five healthy donors exhibited no expression of XMRV proteins (Fig. 2C). The frequencies of CFS cases versus healthy controls that were positive and negative for XMRV sequences were used to calculate a Pearson χ^2 value of 154 (two-tailed P value of 8.1×10^{-35}). These data yield an odds ratio of 54.1 (a 95% confidence interval of 23.8 to 122), suggesting a nonrandom association with XMRV and CFS patients.

To determine which types of lymphocytes in blood express XMRV, we isolated B and T cells from one patient's PBMCs (6). Using mAb to MLV p30 Gag and IFC, we found that both activated T and B cells were infected with XMRV (Fig. 2D and fig. S4A). Furthermore, using mAb to SFFV Env, we found that >95% of the cells in a B cell line developed from another patient were positive for XMRV Env (fig. S4B). XMRV protein expression in CFS patient-derived activated T and B cells grown for 42 days in culture was confirmed by Western blots (fig. S4C) using Abs to SFFV Env and xenotropic MLV.

We next investigated whether the viral proteins detected in PBMCs from CFS patients represent infectious XMRV. Activated lymphocytes (6) were cocultured with LNCaP, a prostate cancer cell line with defects in both the JAK-STAT and RNase L pathways (10, 11) that was previ-

ously shown to be permissive for XMRV infection (12). After coculture with activated PBMCs from CFS patients, LNCaP cells expressed XMRV Env and multiple XMRV Gag proteins when analyzed by Western blot (Fig. 3A) and IFC (fig. S5A). Transmission electron microscopy (EM) of the infected LNCaP cells (Fig. 3B), as well as virus preparations from these cells (Fig. 3C), revealed 90- to 100-nm-diameter budding particles consistent with a gamma (type C) retrovirus (13).

We also found that XMRV could be transmitted from CFS patient plasma to LNCaP cells when we applied a virus centrifugation protocol to enhance infectivity (6, 14, 15). Both XMRV gp70 Env and p30 Gag were abundantly expressed in LNCaP cells incubated with plasma samples from 10 of 12 CFS patients, whereas no viral protein expression was detected in LNCaP cells incubated with plasma samples from 12 healthy donors (Fig. 4A). Likewise, LNCaP cells incubated with patient plasma tested positive for XMRV p30 Gag in IFC assays (fig. S5B). We also observed cell-free transmission of XMRV from the PBMCs of CFS patients to the T cell line SupT1 (Fig. 4B) and both primary and secondary transmission of cell-free virus from the activated T cells of CFS patients to normal T cell cultures (Fig. 4C). Together, these results suggest that both cell-associated and cell-free transmission of CFS-associated XMRV are possible.

We next investigated whether XMRV stimulates an immune response in CFS patients. For this purpose, we developed a flow cytometry assay that allowed us to detect Abs to XMRV Env by exploiting its close homology to SFFV Env (16). Plasma from 9 out of 18 CFS patients infected with XMRV reacted with a mouse B cell line expressing recombinant SFFV Env (BaF3ER-SFFV-Env) but not to SFFV Env negative control cells (BaF3ER), analogous to the binding of the SFFV Env mAb to these cells (Fig. 4D and S6A). In contrast, plasma from seven healthy donors did not react (Fig. 4D and fig. S6A). Furthermore, all nine positive plasma samples from CFS patients but none of the plasma samples from healthy donors blocked the binding of the SFFV Env mAb to SFFV Env on the cell surface (fig. S6B). These results are consistent with the hypothesis that CFS patients mount a specific immune response to XMRV.

Neurological maladies and immune dysfunction with inflammatory cytokine and chemokine up-regulation are some of the most commonly reported features associated with CFS. Several retroviruses, including the MLVs and the primate retroviruses HIV and HTLV-1, are associated with neurological diseases as well as cancer (17). Studies of retrovirus-induced neurodegeneration in rodent models have indicated that vascular and inflammatory changes mediated by cytokines and chemokines precede the neurological pathology (18, 19). The presence of infectious XMRV in lymphocytes may account for some of these observations of altered immune responsiveness and neurological function in CFS patients.

We have discovered a highly significant association between the XMRV retrovirus and CFS. This observation raises several important questions. Is XMRV infection a causal factor in the pathogenesis of CFS or a passenger virus in the immunosuppressed CFS patient population? What is the relationship between XMRV infection status and the presence or absence of other viruses that are often associated with CFS (e.g., herpesviruses)? Conceivably these viruses could be cofactors in pathogenesis, as is the case for HIV-mediated disease, in which co-infecting pathogens play an important role (20). Patients with CFS have an elevated incidence of cancer (21). Does XMRV infection alter the risk of cancer development in CFS? As noted above, XMRV has been detected in prostate tumors from patients expressing a specific genetic variant of the *RNASEL* gene (5). In contrast, in our study of this CFS cohort, we found that XMRV infection status does not correlate with the *RNASEL* genotype (6) (table S2).

Finally, it is worth noting that 3.7% of the healthy donors in our study tested positive for XMRV sequences. This suggests that several million Americans may be infected with a retrovirus of as yet unknown pathogenic potential.

References and Notes

1. L. D. Devaran, J. R. Kerr, *J. Clin. Virol.* 37, 139 (2006).
2. T. L. Whiteside, D. Frberg, *Ann. J. Med.* 105, 275 (1998).
3. R. J. Suhadolnik et al., *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 377 (1997).
4. G. Casey et al., *Nat. Genet.* 32, 581 (2002).
5. A. Urisman et al., *PLoS Pathog.* 2, e25 (2006).
6. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.
7. R. Wolff, S. Koller, J. Rusconi, *Virology* 43, 472 (1982).
8. B. Chesbro et al., *Virology* 127, 134 (1983).
9. K. A. Smith, F. W. Rusconi, *Adv. Immunol.* 33, 137 (1981).
10. G. Dunn, K. Sheehan, L. Old, R. Schreiber, *Cancer Res.* 65, 3447 (2005).
11. Y. Xiang et al., *Cancer Res.* 63, 6795 (2003).
12. B. Dong et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 1655 (2007).
13. B. J. Poiesz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 742 (1980).
14. G. R. Pietroni, G. B. Harnett, M. R. Bucens, *J. Virol. Methods* 24, 85 (1989).
15. S. M. Yoo et al., *J. Virol. Methods* 154, 160 (2008).
16. L. Wolff, E. Scolnick, S. Rusconi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4718 (1983).
17. C. Power, *Trends Neurosci.* 24, 162 (2001).
18. X. Li, C. Hanson, J. Cmarik, S. Rusconi, *J. Virol.* 83, 4912 (2009).
19. K. E. Peterson, B. Chesbro, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 303, 67 (2006).
20. A. Lisso, C. Vanpouille, L. Margolis, *Curr. HIV/AIDS Rep.* 6, 5 (2009).
21. P. H. Levine et al., *Cancer Res.* 52, 5516s (1992).
22. We thank D. Borofente, Y. Huang, C. Hanson, and J. Troiler for technical assistance; K. Nagahima for EM; and C. Ware and K. Hunter for discussions. Funded by the Whittemore Peterson Institute and the Whittemore Family Foundation; the National Cancer Institute (NCI); NIH (under contract HHSN26120080001E); and grants to R.H.S. from NCI/NIH (CA04943), the U.S. DoD Prostate Cancer Research Program (W81XWH-07-1338), the V Foundation for Cancer Research, the Charlotte Geyer Foundation, and Mal and Lea Bank. The content of this publication does not reflect the views or policies of the U.S. DHHS, nor does mention of trade names, commercial products, or organizations imply endorsement by the U.S. government.

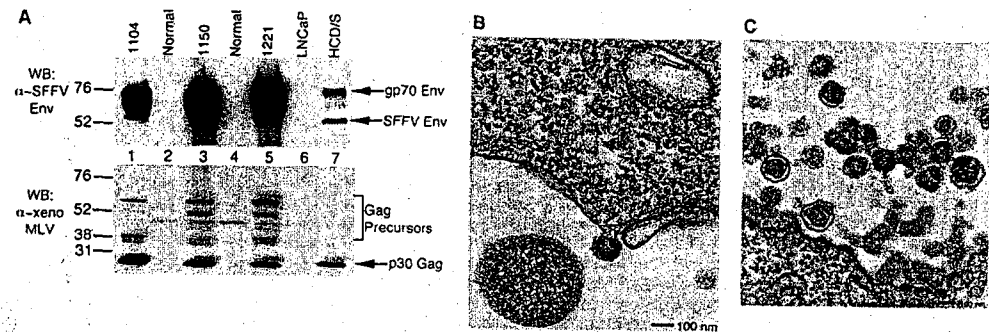


Fig. 3. Infectious XMRV in PBMCs from CFS patients. (A) Lysates of LNCaP cells cocultured with PBMCs from CFS patients (lanes 1, 3, and 5) or healthy donors (lanes 2 and 4) were analyzed by Western blots with rat mAb to SFFV Env (top panel) or goat antiserum to xenotropic MLV (bottom panel). Lane 6, uninfected LNCaP; lane 7, SFFV-infected HCD-57 cells. MW markers in kilodaltons are at left. (B) Transmission electron micrograph of a budding viral particle from LNCaP cells infected by incubation with an activated T cell culture from a CFS patient. (C) Transmission electron micrograph of virus particles released by infected LNCaP cells.

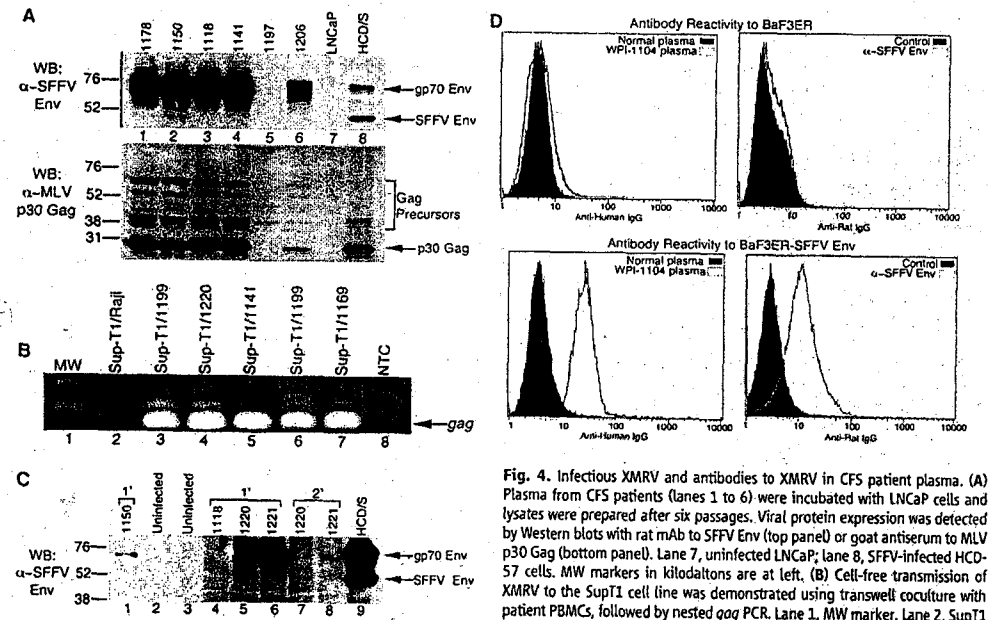


Fig. 4. Infectious XMRV and antibodies to XMRV in CFS patient plasma. (A) Plasma from CFS patients (lanes 1 to 6) were incubated with LNCaP cells and lysates were prepared after six passages. Viral protein expression was detected by Western blots with rat mAb to SFFV Env (top panel) or goat antiserum to MLV p30 Gag (bottom panel). Lane 7, uninfected LNCaP; lane 8, SFFV-infected HCD-57 cells. MW markers in kilodaltons are at left. (B) Cell-free transmission of XMRV to the SupT1 cell line was demonstrated using transwell coculture with patient PBMCs, followed by nested gag PCR. Lane 1, MW marker. Lane 2, SupT1 cocultured with Raji. Lanes 3 to 7, SupT1 cocultured with CFS patient PBMCs. Lane 8, no template control (NTC). (C) Normal T cells were exposed to cell-free supernatants obtained from T cells (lanes 1, 5, and 6) or B cells (lane 4) from CFS patients. Lanes 7 and 8 are secondary infections of normal activated T cells. Initially, uninfected primary T cells were exposed to supernatants from PBMCs of patients WPI-1220 (lane 7) and WPI-1221 (lane 8). Lanes 2 and 3, uninfected T cells; lane 9, SFFV-infected HCD-57 cells. Viral protein expression was detected by Western blot with a rat mAb to SFFV Env. MW markers in kilodaltons are at left. (D) Plasma samples from a CFS patient or from a healthy control as well as SFFV Env mAb or control were reacted with BaF3ER cells (top) or BaF3ER cells expressing recombinant SFFV Env (bottom) and analyzed by flow cytometry. IgG, immunoglobulin G.

P.H.S. may receive royalty payments in the future from Abbott Laboratories. Grant accession numbers are as follows: WPI-135, G0483508, WPI-118, G0483509, WPI-119, G0483510, WPI-117, G0497943, WPI-116, G0497944, and WPI-114, G0497945.
 Note: In proof, V.L.C. is operations manager of Viral Immune Pathologies Laboratory, which is in negotiations

with the Whittemore Peterson Institute to offer a diagnostic test to XMMV.
 Supporting Online Material
 www.sciencemag.org/content/311/5925/200C
 Materials and Methods
 Figs. S1 to S5

Tables S1 and S2
 References
 7 May 2009; accepted 31 August 2009
 Published online 8 October 2009
 10.1126/science.1179052
 Include this information when citing this paper.

REPORTS

別紙様式第 2-1
 番号 17

Complete Reconstitution of a Highly Reducing Iterative Polyketide Synthase

Suzanne M. Ma,¹ Jesse W.-H. Liu,² Jin W. Choi,³ Hui Zhou,¹ K. K. Michael Lee,³ Vijayalakshmi A. Moorithi,² Xinhai Xie,² James T. Kealey,² Nancy A. Da Silva,³ John C. Vederas,^{2*} Yi Tang^{1*}

Highly reducing iterative polyketide synthases are large, multifunctional enzymes that make important metabolites in fungi, such as lovastatin, a cholesterol-lowering drug from *Aspergillus terreus*. We report efficient expression of the lovastatin nonaketide synthase (LovB) from an engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*, as well as complete reconstitution of its catalytic action in the presence and absence of cofactors (the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate and 5-pyridylmethionine) and its partner enzyme, the enoyl reductase LovC. Our results demonstrate that LovB retains correct intermediates until completion of synthesis of dihydrolovastatin, but of folds incorrectly processed compounds as pyrones or hydrolytic products. Experiments replacing LovC with analogous MlcG from compactin biosynthesis demonstrate a gate-keeping function for this partner enzyme. This study represents a key step in the understanding of the functions and structures of this family of enzymes.

Nature uses an amazing array of enzymes to make natural products (1). Among these metabolites, polyketides represent a class of over 7000 known structures of which more than 20 are commercial drugs (2). Among the most interesting but least understood enzymes making these compounds are the highly reducing iterative polyketide synthases (IPKSs) found in filamentous fungi (3). In contrast to the well-studied bacterial type I PKSS that operate in an assembly line fashion (4), HR-IPKSs are megasynthases that function iteratively by using a set of catalytic domains repeatedly in different combinations to produce structurally diverse fungal metabolites (5). One such metabolite is lovastatin, a cholesterol-lowering drug from *Aspergillus terreus* (6). This compound is a precursor to simvastatin (Zocor, Merck, Whitehouse Station, NJ), a semi-synthetic drug that had annual sales of more than \$4 billion before loss of patent protection in 2006 (7).

Biosynthesis of lovastatin proceeds via dihydroxymethyl-CoA (acid form 1, lactone form 2), a product made by the HR-IPKS lovastatin nonaketide synthase (LovB), with the assistance of a separate enoyl reductase, LovC (8) (Fig. 1). LovB is a 33.5-kD protein that contains single copies of

some copy of the *Aspergillus nidulans* phosphopantetheinyl transferase gene *mgf1* (12), was the expression host. A C-terminal hexahistidine-tagged LovB was placed under the control of the *S. cerevisiae ADHI2* promoter (13, 14) on an episomal plasmid (YEP-LovB-6His). Abundant amounts of the intact LovB could be purified from the soluble fraction to near homogeneity with a final yield of ~4.5 mg/L (fig. S1). We used mass analysis of tryptic digest fragments to verify the identity of the recombinant LovB. The ACP domain of LovB was determined to be nearly completely phosphopantetheinylated by using a point ejection assay with high-resolution quadrupole orthogonal acceleration–time-of-flight mass spectrometry (fig. S2). To ascertain activity of the resulting LovB and to examine the need for cofactors, malonyl-CoA alone was first added to the purified enzyme in buffer. Whole-cell feeding studies of doubly [¹⁴C, ³H]-labeled acetate to cultures of *A. terreus* showed that all three acetate hydrogens were incorporated into the acetate-derived starter units for both the nonaketide and diketide moieties in lovastatin (15). The purified LovB can use malonyl-CoA for both chain priming and chain elongation, loading malonate with decarboxylation to make the acetyl starter unit. Although LovB is able to prime with and elongate the chain by two further condensations with malonyl-CoA, in the absence of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), no ketoreduction occurs. The dominant product is lactone 3 (Fig. 2A, trace 1), which forms by enolization and cyclization with off-loading of the unreduced triketide. Addition of NADPH to this system enables function of the KR domain. In this and subsequent experiments, the malonyl-CoA could be conveniently synthesized in situ by malonyl-CoA synthase (MalB) from *Rhizobium trifolii* using free malonate and CoA (16). With KR embedded, LovB makes pentaketide-, and heptaketide pyrones 4 to 6, as well as lactones 7 and 8 (Fig. 2A, trace 2). The structures were confirmed by chemical synthesis of authentic standards, except for heptaketide 6, which proved very unstable. However, the mass increase of 26 atomic mass units for 6 and its red shift in the ultraviolet spectrum when compared to 5 are consistent with its proposed heptaketide pyrone structure (table S3). Compounds 7 and 8 result from thioester hydrolysis of pent- and heptaketides stalling on the ACP at the β-keto stage. The resulting β-keto acids spontaneously decarboxylate to afford 7 and 8. Formation of compounds 4 to 8 illustrates that deactivation in the normal programmed steps, namely the lack of methylation due to the absence of 5-pyridylmethionine

医薬品
 医薬部外品
 化粧品
 研究報告 調査報告書

識別番号・報告回数	報告日	第一報入手日	新医薬品等の区分	厚生労働省処理欄
①②ポリエチレングリコール処理抗破傷風人免疫グロブリン ③乾燥抗破傷風人免疫グロブリン	2009年10月26日	2009年10月26日	該当なし	
一般的名称	研究報告の公表状況	第57回日本ウイルス学会学術集会(抄録No. IP074)	公表国 日本	
販売名(企業名)	① テタノブリンIH 静注 250 単位 (ベネシス) ② テタノブリンIH 静注 1500 単位 (ベネシス) ③ テタノブリン筋注用 250 単位 (ベネシス)			
研究報告の概要	<p>(目的) 日本で採血された血漿由来の静注用免疫グロブリン製剤(IVIG)に Classical Swine Influenza A(H1N1)ウイルス及び Influenza A(H1N1)pdm virus に反応する抗体が含まれているかを調べ、ドナーが免疫を獲得している可能性について検討した。</p> <p>(材料と方法) Classical Swine Influenza A(H1N1)virus は「A/Swine/Hokkaido/2/1981」を使用した。Influenza A(H1N1)pdm virus は大阪で分離したウイルスを用いた。IVIG は日本で採血された原料により 2008 年に製造されたロットを用いた。赤血球凝集抑制能(HI 価)は、8HA のウイルス液に等量の希釈サンプルを加え、モルモット赤血球に対する完全凝集制御を示す最大希釈倍数で求めた。中和抗体価(NT 活性)は 100FFU のウイルスに対して 50%以上の感染阻害を示す最大希釈倍数で求めた。</p> <p>(結果) IVIG にブタ及び新型ウイルスに対する HI 及び NT 活性が認められ、その値はそれぞれ 8 倍、64 倍であった。</p> <p>(考察) 日本で採血された血漿由来の IVIG にも HI 及び NT 活性が認められることから、日本においてもある程度まで Influenza A(H1N1)pdm virus に反応する抗体を保有しているドナーが存在すると推測された。</p>			<p>使用上の注意記載状況・その他参考事項等</p> <p>代表としてテタノブリン IH 静注 250 単位の記載を示す。</p> <p>2. 重要な基本的注意</p> <p>(1) 本剤の原材料となる血液については、HBs 抗原、抗 HCV 抗体、抗 HIV-1 抗体、抗 HIV-2 抗体陰性であることを確認している。更に、プールした試験血漿については、HIV-1、HBV 及び HCV について核酸増幅検査(NAT)を実施し、適合した血漿を本剤の製造に使用しているが、当該 NAT の検出限界以下のウイルスが混入している可能性が常に存在する。本剤は、以上の検査に適合した高力価の破傷風抗毒素を含有する血漿を原料として、Cohn の低温エタノール分画で得た画分からポリエチレングリコール 4000 処理、DEAE セファデックス処理等により抗破傷風人免疫グロブリンを濃縮・精製した製剤であり、ウイルス不活化・除去を目的として、製造工程において 60℃、10 時間の液状加熱処理及びウイルス除去膜による過処理を施しているが、投与に際しては、次の点に十分注意すること。</p>
報告企業の意見	<p>日本では採血された血漿を原料として製造された静注用免疫グロブリン製剤(IVIG)に新型インフルエンザウイルスに反応する抗体が含まれていたことについての報告である。</p> <p>インフルエンザA(H1N1)はオルソミクソウイルス科に属し、ヒリオンは球形で、直径80~120nmの脂質エンベロープを有する比較的大きなRNAウイルスである。万一、インフルエンザA(H1N1)が原料血漿に混入したとしてもBVDをモデルウイルスとしたウイルスパリエーション試験成績から、製造工程にて十分に不活化・除去されると考えられている。</p>			<p>今後の対応</p> <p>本報告は本剤の安全性に影響を与えないものと考えられるので、特段の措置はとらない。</p>



季節性インフルエンザウイルスに対するヒト免疫グロブリン製剤の抗体価

浦山 健^{1,2}、橋本律子³、辻川宗男⁴、柚木幹弘^{1,2}、萩原克郎⁵、高橋和郎⁶、奥野良信⁷、生田和良⁸、株式会社ベネクス 研究開発部 大阪研究所¹、大阪大学微生物学研究所 ウイルス免疫分野²、財団法人大阪大学微生物学研究所 細菌学研究所³、大阪府立公衆衛生研究所⁴、大阪府立大学 獣医学部⁵、徳島大学 獣医学部⁶、Eiyama Takem@nuk-pharma.co.jp

【目的と意義】

インフルエンザウイルスは流行季節に基いて接種株が決定され、国民に接種されている。このような管理をもつトナー製剤 (VIG) は、当然トナー製剤に用いられる血液製剤製剤 (HUI) を有する。しかしながら、本質的にトナー製剤に期待される機能は中和能 (NT) であるにも関わらず、MIG/NT に関する知見は少ない。また、VIG の製造時を起点とし、その前後の時期に分離されたウイルス株への感染反応性に関する知見も少ない。そこで私たちは VIG に含まれるトナー製剤ウイルス抗体の特異性を明らかにするために、製造時期及び地域 (米国と日本) の異なる VIG 及び HUI の製造時期及び地域を用いて、HUI と VIG の比較を行った。

【材料と方法】

製造時期 (1999-2008年) または、原料の採取場所 (米国又は日本) が異なる複数の VIG 及び HUI を用いて、各種インフルエンザウイルス株 (V) がトナー製剤及び HUI に対して示す HUI および VIG への感染性を、HUI は、8HA のウイルス液に等量の希釈トナーを加え、モット赤血球に対する完全凝集抑制を示す最大希釈倍率で求めた。NT 値は、100% HI のウイルスに対して 50% 以上の感染阻害を示す最大希釈倍率で求めた。

【結果と考察】

製造時期以前に分離され、且つその後トナー製剤として採用されたウイルス株に対して、MIG は高い抗体価を示した。また、製造時以降新たに分離されたウイルス株に対しても交差反応性を示した。これらの結果から VIG は製造時期や採取場所に関わらず、様々な季節性インフルエンザウイルスに反応する抗体を含んでいると考えられた。今後これらの分離時期、地域をまたがって反応する抗体の本質を明らかにする必要がある。

Classical Swine Influenza A (H1N1) virus 及び Influenza A (H1N1) pdm virus に対する静注用グロブリン製剤の抗体価

井手野祥次¹、橋本律子²、トウチアツリ³、佐々木正大⁴、浦山 健^{1,2}、柚木幹弘^{1,2}、萩原克郎⁵、高橋和郎⁶、奥野良信⁷、生田和良⁸、株式会社ベネクス 大阪研究所¹、大阪大学微生物学研究所 ウイルス免疫分野²、財団法人大阪大学微生物学研究所 細菌学研究所³、大阪府立公衆衛生研究所⁴、大阪府立大学 獣医学部⁵、徳島大学 獣医学部⁶、Iieno Shouji@namt-pharma.co.jp

【目的と意義】

2009年4月に顕在化した新型インフルエンザの世界的流行は想定されていたより由来の H5N1 とは異なり、アフリカ由来の A/H1N1 であった。今回発生した Influenza A (H1N1) pdm は古典型インフルエンザウイルス (タミフル、リレンザ) に感受性であるが、Seasonal Influenza A (H1N1) virus とは抗原性が異なり、従来の季節性インフルエンザウイルスに感染している。しかしながら、高齢者はこの新型インフルエンザに罹患しているという報告もあり、一部のトナー製剤は免疫を獲得していることが考えられた。そこで、私たちは日本産製剤された血液製剤として製造された静注用グロブリン製剤 (VIG) に Classical Swine Influenza A (H1N1) virus 及び Influenza A (H1N1) pdm virus に反応する抗体が含まれているかを調べ、トナーが免疫を獲得している可能性について検討を行った。

【材料と方法】

Classical Swine Influenza A (H1N1) virus は (A/Swine/Hokkaido/02/1981) を使用した。Influenza A (H1N1) pdm virus は大阪府で分離されたウイルスを用いた。VIG は日本で採血された原料に基づき 2008年に製造されたロットを用いた。HI 値は、8HA のウイルス液に等量の希釈トナーを加え、モット赤血球に対する完全凝集抑制を示す最大希釈倍率で求めた。中和抗体価 (NT) は 100% HI のウイルスに対して 50% 以上の感染阻害を示す最大希釈倍率で求めた。

【結果】

VIG は古く及び新型ウイルスに対する HI 及び NT 活性が認められ、その値はそれぞれ 48 倍、64 倍であった。

【考察】

米国における保存血液の Novel Influenza A (H1N1) virus に対する抗体保有率に関する報告が 2009年5月22日の MAMR に掲載された。日本で採血された血液由来の VIG に HI 及び NT 活性が認められることから、日本においてもある程度の率で Influenza A (H1N1) pdm virus に反応する抗体を保有しているトナーが存在すると推測された。

医薬品 医薬部外品 研究報告 調査報告書 化粧品

識別番号・報告回数	報告日	第一報入手日	新医薬品等の区分	厚生労働省処理欄
		2009年11月16日	該当なし	
一般の名称	人ハプトグロビン	研究報告の公表状況	FDA/Vaccines, Blood&Biologicals/2009/11/13	公表国 アメリカ
販売名 (企業名)	ハプトグロビン静注 2000単位「ベネクス」 (ベネクス)			
研究報告の概要	<p>米国FDAによる2009年11月付の業界向けガイダンス (案) 「パンデミック (H1N1) 2009インフルエンザウイルスへの対応における血液供給の保存、血液製剤の安全性、血液ドナーの適合性に関する推奨」が出された。示された推奨の内容は以下のとおりである。</p> <p>A. バックアップ要員の訓練 パンデミック (H1N1) 2009インフルエンザウイルスにより引き起こされる疾患の範囲は未知であるので、要員不足を予期し、適正なバックアップ要員を持つことを推奨する。更に、最重要な機能については複数のバックアップ要員を訓練すべきである。バックアップ要員は継続する訓練プログラムで訓練すべきである。</p> <p>B. 血液ドナー適合性、ドナーの延期そして製剤管理 一般的にドナーの医療歴は採血時に入手される。しかしながら、21 CFR 640.3 (a) 及び 640.63 (a) の下では全血または原料血漿の供給源としてのドナーの適合性は採血日に確立されなければならない。これらの規則は、明確に採血日を定義していない。時々、採血前にドナーに示された質問に対する返答は血液事業者による再調査により不完全であることが発見される。採血から 24 時間以内に、ドナー歴問診票に対するドナーの返答を明確にするあるいは省略された質問に対する返答を入手する必要がある。パンデミック (H1N1) 2009ウイルスに感染したまたは感染した疑いのあるドナーは、解熱剤の投薬なしで熱が下がり、それ以外の症状もなくなつてから、少なくとも 24 時間は採血を延期しなければならない。献血後 48 時間以内にパンデミック (H1N1) 2009インフルエンザあるいはインフルエンザ様疾患の可能性のあるドナーについて情報を入手した場合、メディカルディレクターは安全性を評価しなければならない。</p> <p>C. 承認された申請に対する変更 認定血液事業者としての承認済みの申請について、以下の変更申請を提出してもよい。その試験所が FDA に登録され、ドナー試験を実施しているならば、その外部試験所を使用すること、等。</p>			
報告企業の意見	<p>パンデミック (H1N1) 2009 インフルエンザウイルスへの対応における血液供給の保存、血液製剤の安全性、血液ドナーの適合性に関する業界向けガイダンス (案) である。インフルエンザ A (H1N1) はオルソミクソウイルス科に属し、ピリオンは球形で、直径 80~120nm の脂質エンベロープを有する比較的大きな RNA ウイルスである。万一、インフルエンザ A (H1N1) が原料血漿に混入したとしても BVD をモデルウイルスとしたウイルスバリデーション試験成績から、製造工程にて十分に不活化・除去されると考えている。</p>			
今後の対応	<p>本報告は本剤の安全性に影響を与えないものと考えるので、特段の措置はとらない。</p>			
使用上の注意記載状況・その他参考事項等	<p>2. 重要な基本的注意 (1) 本剤の原材料となる献血者の血液については、HBs 抗原、抗 HCV 抗体、抗 HIV-1 抗体、抗 HIV-2 抗体、抗 HTLV-I 抗体陰性で、かつ ALT (GPT) 値でスクリーニングを実施している。更に、プールした試験血漿については、HIV-1、HBV 及び HCV について核酸増幅検査 (NAT) を実施し、適合した血漿を本剤の製造に使用しているが、当該 NAT の検出限界以下のウイルスが混入している可能性が常に存在する。本剤は、以上の検査に適合した血漿を原料として、Cohn の低温エタノール分画で得た画分から人ハプトグロビンを濃縮・精製した製剤であり、ウイルス不活化・除去を目的として、製造工程において 60℃、10 時間の液状加熱処理及びウイルス除去膜によるろ過処理を施しているが、投与に際しては、次の点に十分注意すること。</p>			

