

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の
診断、除去・不活化法の研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 19 (2007) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	
安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の 診断、除去・不活化法の研究	P1-P6
主任研究者 岡田 義昭	
II. 分担研究報告	
1. ウイルス不活化法とそれに伴う凝固因子活性等への影響の研究	P7-P13
池田 久實	
2. 加圧処理による血液製剤中の病原体の不活化	P14-P18
岡田 義昭	
3. LAMP 法によるパルボウイルス B19 の検出法の開発と感度評価	P19-P20
佐藤 博行	
4. フラビウイルス共通プライマーの開発と評価	P21-P24
高崎 智彦	
5. プラノバ 35N および 20N による E 型肝炎ウイルスの除去	P25-P27
武田 直和	
6. 動物コロナウイルスの血液製剤における除去・不活化に関する研究	P28-P30
田代 真人	
7. A 型肝炎ウイルスの不活化法	P31-P34
米山 徹夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	P35
IV. 研究成果の刊行物・別冊	P36-P48

厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
総括研究報告書

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の診断、除去・不活化法の研究

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨

1. 食品の滅菌技術として実用化されている高圧処理を血液製剤のウイルス不活化法として応用できるか検討した。エンブロープを有するウイルスとして日本脳炎ウイルス、エンベロープを持たないウイルスとしてパルボウイルス B19 を選択し、3000 気圧 1 分間の加圧を 3 回繰り返すことで 2 つのウイルスは約 5 log (10 万分の一) 不活化されることを明らかにした。この圧力では第 9 因子、アンチトロンビン III、フィブリノーゲンの活性は非加圧の血漿と同等であった。
2. パルボウイルス B19 を迅速・簡易・感度良く検出する方法を開発した。核酸抽出なしに血漿を加熱処理し、LAMP 法にてアッセイ当たり 2.3 コピーの B19 遺伝子を 3 時間で検出することが可能になった。
3. E 型肝炎ウイルス (HEV) では、ウイルス様中空粒子を用いた HEV 除去の評価系を作製し、35 nm のポアサイズのウイルス除去膜で除去効率を検討したところ約 5log 除去可能であった。
4. ウエストナイルウイルスを始めとするフラビウイルスの感染が拡大していることから、どのフラビウイルスでも検出可能な PCR 法を開発した。
5. 動物由来のコロナウイルスは SARS ウイルスと同等にウイルス不活化法に感受性を示した。
6. A 型肝炎ウイルスの加熱及び加圧処理などによる不活化の効率の検討の結果、評価に用いたウイルス株の違いによって 1.6~2log の差があることが判明した。

分担研究者

池田久實 北海道赤十字血液センター 所長
佐藤博行 福岡赤十字血液センター 副所長
高崎智彦 国立感染症研究所 室長
武田直和 国立感染症研究所 室長
田代真人 国立感染症研究所 部長
米山徹夫 国立感染症研究所 室長

近年、海外においてウエストナイルウイルスや SARS ウイルスのアウトブレイクが起こり、国内では輸血によって E 型肝炎ウイルス感染が報告されるなど血液製剤の安全性にとって脅威となるような新興・再興感染症が報告されている。この研究班はこれらのウイルスに加えて A 型肝炎ウイルス、B 型肝炎ウイルス、さらにパルボ

A. 研究目的

ウイルスB19などの診断、除去・不活化法とその評価についての研究を行うことによって血液製剤の安全性を確保することを目的としている。診断においては、スクリーニングに応用できるような簡便で高感度な検出法、または広範囲なウイルス属を検出できる検出法の開発を目指した。また、これまでの除去・不活化法の評価が、動物由来の類似したウイルスをモデルウイルスとして用いて実施されていたことから本研究班では可能な限り実際のウイルスを用いた評価を目指した。そのため、培養系がないウイルスでは感受性のある細胞株の検索や遺伝子工学の手法等を用いた新しい除去・不活化の評価系の開発も実施している。さらに、今後も次々に新しいウイルスが出現することが予想され、スクリーニングにも限界があることから血液の安全性確保のために非特異的にウイルスを不活化する新しいウイルス不活化法の開発も目指した。

B.研究方法と結果

各ウイルスの分担研究者の報告書に詳細は記載されているので、簡潔にまとめる。

1) 加圧による新しいウイルス不活化法の開発とそれに伴う凝固因子活性等への影響の研究

血漿中にウイルスが存在している場合、血漿タンパクは可溶性であり、ウイルスは形を有する構造物である。この物理学的な差を利用する新しいウイルス不活化法の開発を試みた。食品の無菌化法とし

て実用化されている高圧処理技術を血液製剤のウイルス不活化法として応用できるか検討した。加圧法は水をチッソガスで圧すことによって加圧し、数十秒で4000気圧まで加圧、10秒以内に大気圧まで減圧することができ、この操作を3回繰り返した。エンベロープを有するウイルスとして日本脳炎ウイルス、ないウイルスとしてB19を用いた。アルブミン中にウイルスを添加し、高圧処理後の不活化効果を評価した。3000気圧1分間の高圧処理を3回繰り返すことによって2つのウイルスは約5log感染価が減少した。3000気圧処理による血漿蛋白質の活性について検討したところ、第9因子やアンチトロンビンIII、フィブリノーゲンの活性は非加圧の血漿と同等であったが、第8因子活性は2300気圧処理までは保たれたものの3000気圧では非加圧の血漿の25%に減少した。その影響と考えられるが、部分活性型トロンボプラスチン時間(APTT)プロトロンビン時間(PT)も延長していた。

2) LAMP法によるヒトパルボウイルスB19の検出法の開発と感度評価

LAMP法は63℃の一定した温度によって短時間で反応が終了し、目的の遺伝子の増幅は濁度でモニターできる。今年度は、血清から核酸を得るための適切な処理法の検討を実施し、94℃2分間の加熱処理により精製DNAを用いたときと同等な感度が得られることがわかった。核

酸の抽出が必要ないことから、コンタミネーションのリスクを軽減すると同時に180分間で多数の検体の結果を得ることができる。B19の遺伝子が組み込まれたプラスミドを用いて感度を評価すると1アッセイ当たり2.3コピーのB19の検出が可能であった。現在のスクリーニング法ではB19の抗体の存在によって感度が低下するが、加熱による前処理では抗体存在の影響は受けなかった。

4) フラビウイルス共通プライマーの開発と評価

ウエストナイルウイルス(WNV)は世界の広い地域に存在し、地域ごとにウイルスに多様性が存在する。また、同じフラビウイルス属であるデングウイルスはWNVよりも感染者数が多く、我が国においても毎年60例前後の輸入感染症例がある。また、北海道にダニ媒介性脳炎ウイルスが常在していることからフラビウイルスを共通に検出できるPCR用の共通プライマーを開発した。日本脳炎ウイルス、デングウイルス1型、WNV、セントルイス脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、ネギシウイルス、ランガットウイルス、ヨコセウイルスを用いて検討した。塩基番号8695~9044領域のプライマーが最も適していることを明らかにした。

5) ウイルス除去膜によるE型肝炎ウイルスの除去

HEVは経口感染によって感染し、一部

のヒトが肝炎を発症する。現在のところ培養系がないこと、及びウイルス陽性血漿を充分量確保することは不可能であることからバキュロウイルスの発現系を用いて、HEV構造蛋白領域を発現させることによってウイルス様中空粒子(以下VLP)を作製した。ELISA法を用いたウイルス除去膜による除去効果を検討したが、測定可能な範囲が限られ有効な評価法にはならなかった。genotype3の構造タンパクを発現させたところネイティブなHEVに近いサイズのVLPを多量に得ることができた。電顕像によってVLP内に核酸が存在することが示唆され、精製したVLPからRNAを抽出し解析したところHEV特異的な遺伝子が検出された。そこで、VLP内に存在するHEV特異的遺伝子を標的とした定量可能な測定系を用いてHEVの除去が評価できるか検討した。既に血漿分画メーカーに導入されているウイルス除去膜によるHEV-VLP除去について解析した。静注用人免疫グロブリンに1/10容量のVLPを添加し、35nmのポアサイズの除去膜で濾過した結果、約5log除去された。20nmの除去膜では濾過前 1.09×10^7 の検体が除去後検出感度以下となった。

6) 動物コロナウイルスの血液製剤における除去・不活化に関する研究

血漿分画製剤のウイルス除去・不活化法として良く用いられている界面活性剤処理(S/D処理)、加熱処理、ウイルス

除去膜によって SARS コロナウイルスは効果的に除去・不活化されることを昨年度までに明らかにした。SARS コロナウイルスを取り扱うには P3 レベルの実験室が必要なことから、除去・不活化法の評価を一般的な施設で実施することは困難である。そこで、今年度は P2 レベルの実験室があれば取り扱えるコロナウイルスに属する動物由来のマウス肝炎ウイルス (MHV) を用いて S/D 処理、加熱処理、ウイルス除去膜による除去・不活化実験を行った。35 nm のウイルス除去膜処理、4 時間の S/D 処理、60°C 4 時間の加熱処理によって感染性は検出されなくなった。以上からマウス肝炎ウイルス (MHV) は S/D 処理、加熱処理、ウイルス除去膜による除去・不活化に対して SARS コロナウイルスと同等であり、モデルウイルスとして利用できることが示された。

7) A 型肝炎ウイルスの不活化法

A 型肝炎ウイルスの野外株の培養は困難であるため、細胞に馴化したウイルス株が除去・不活化法の評価に用いられている。4 つのウイルス株を用いて 60°C 10 時間の加熱処理による不活化効果を検討したところ、KRM003C 株と KRM031 株では約 5 log 不活化されたが、KRM238 株と TKM005 株では約 3log しか不活化されなかった。株間で不活化効果に 100 倍の差があった。また、加圧による不活化においても株間で約 10 倍の感受性

の違いが認められた。

C. 考察

今年度の申請時の研究概要は図 1 に示したとおりだが、スクリーニング法への応用として、パルボウイルス B19 検出のための簡便な検体前処理法の検討と LAMP 法との組み合わせによって高感度な検出系ができた。既に B19 のスクリーニングは導入されているが、妊婦、溶血性貧血、臓器移植後等のハイリスク患者への輸血用血液の検査として有用であると考えられた。また、フラビウイルスに属するウイルスは多種存在することから、幅広くフラビウイルスを検出できるプライマーの開発はスクリーニング検査のために極めて重要だと考えられた。

除去・不活化法の評価法の開発では、最近問題となっている E 型肝炎ウイルスの除去評価法を開発した。現在のところ培養系がなく現行の除去工程の効果を評価できなかったが、ネイティブなウイルスとほぼ同じ大きさの VLP を用いた評価系を開発した。HEV の核酸を持つ VLP を多量に得ることができる上に非感染性であるため有用な評価系になると考えられる。

また、SARS コロナウイルスを用いて除去・不活化を評価することは困難であるが、MHV は P2 で取り扱える利点がある。検討した 3 つのウイルス除去・不活化法による効果は 2 つのウイルス間で差が認められなかった。少なくともこれ

らの方法に関してMHVはSARSコロナウイルスのモデルウイルスになると考えられた。

さらに除去・不活化法の評価は多くの場合（モデルウイルスを含め）、細胞に馴化したウイルス株が使用されているが用いる株までは規定されていない。感受性のある株を用いれば過剰評価になる危険性がある。HAVの株間で加熱や加圧処理に対する抵抗性が異なることが明らかになったことから、ウイルスの除去・不活化の評価に用いるウイルスの「株」の適切な選択が重要となる。今後の除去・不活化法の評価に重大な問題を提起するものと考えられる。

新しいウイルスの不活化法として加圧処理による血液製剤のウイルス不活化について検討した。検討した2つのウイルスに対して3000気圧で約5logの不活化効果が認められた。特にB19に対しては加熱処理以外に有効な不活化法がない現状において3000気圧1分間の加圧を3回実施することで約5logの不活化効果が認められたことは注目に値する。一方、血漿中の各因子の活性は第9因子やアンチトロンビンIIIでは4000気圧までほとんど活性に影響は受けなかったが、第8因子の活性は3000気圧処理により非加圧血漿の25%に低下した。新鮮凍結血漿に本法を導入するには第8因子の失活を防ぐ方法の開発がさらに必要である。血漿分画製剤においては第9因

子製剤やアンチトロンビンIII製剤に應用できる可能性がある。食品の滅菌技術を応用したウイルス不活化法は今後ウイルスの適応範囲や血漿に与える影響等を詳細に解析する必要があるが、簡便で安価で、化学物質を添加しないことからウイルス不活化法の1つになると期待できる。

D. 結論

新興・再興感染症から血液製剤の安全性を確保するために、スクリーニングに有用な方法の開発、除去・不活化の新しい評価法の開発、除去・不活化の評価のための株間やモデルウイルスとの比較、新しい血液製剤のウイルス不活化法について不活化効率・凝固因子等への影響を評価した。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1.論文発表

岡田義昭、梅森清子：血漿分画製剤の安全性確保の現状、医学の歩み第218巻、625-630、2006年

2.学会発表

1) 岡田義昭：血漿分画製剤の感染症対策（シンポジウム）、第54回日本輸血学会、2006年、大阪

G. 知的所有権の取得状況

なし

血液製剤によって感染が危惧されているウイルス

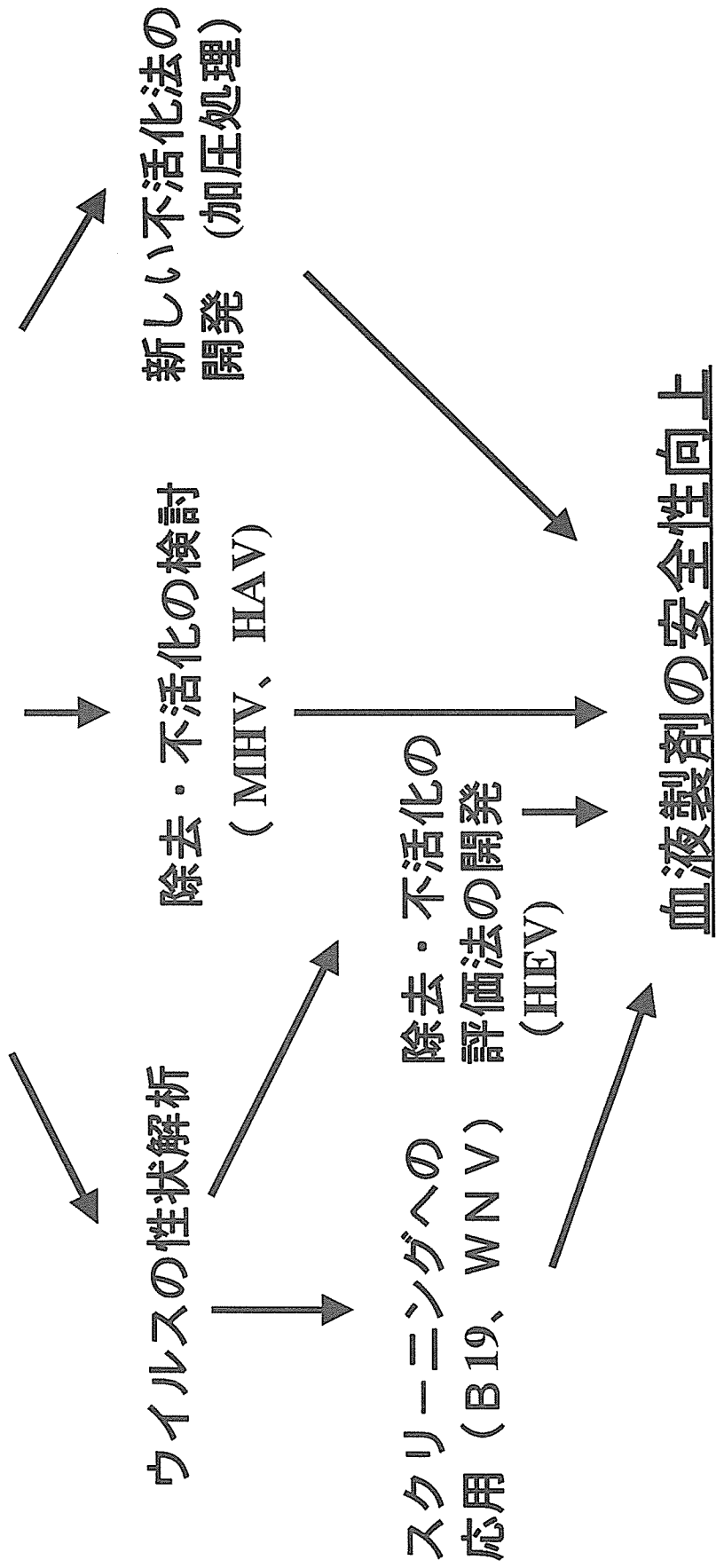


図-1

平成18年度 分担研究報告

安全な血液製剤を確保するための新興・再興感染症等の診断、 除去・不活化法の研究

分担研究者 池田久實 北海道赤十字血液センター 所長
研究協力者 東 寛 北海道赤十字血液センター 研究部長
藤原満博 北海道赤十字血液センター 研究部

課題：ウイルス不活化法とそれに伴う凝固因子活性等への影響の研究

研究要旨

ウィンドウ・ピリオドをすりぬけた感染，スクリーニング未実施のウイルスによる感染，さらに新興・再興感染症にかかわる病原体からの感染を予防するため，血液製剤中の病原体不活化の試みが検討されている．本研究班では，新しい不活化法として加圧処理の可能性の検討をおこなってきた．加圧法が血液製剤に用いられるためには，輸血にともなって伝播するウイルスを不活化するが，製剤の品質は維持できる加圧条件を設定することが必要である．そこで本年度は，新鮮凍結血漿の凝固因子活性等への影響について検討を試みた．その結果，内因系の凝固活性の指標となる部分活性型トロンボプラスミン時間(APTT)，外因系の凝固活性の指標となるプロトロンビン時間(PT)に対し，2300気圧まではほぼ影響がみられなかったが，3000気圧，4000気圧では凝固活性の著しい低下がみられた．第VIII因子活性に対する加圧処理の影響も同様であった．これに対し，第IX因子活性に対する加圧の影響は少なく，さらにフィブリノーゲン濃度やアンチトロンビンIII(AT-III)活性は4000気圧でも耐性がみられた．第VIII因子活性を維持しつつウイルス不活化できる加圧方法をさらに工夫していく必要が明らかとなった．

A. 研究目的

血液製剤による輸血感染症を予防するために血液センターにおいては，多くの方策がとられている．問診の強化，NAT検査を含めたスクリーニ

ング感度の上昇によって，ウィンドウ・ピリオドの短縮がなされてきた．しかし，ウィンドウ・ピリオドをすりぬけたウイルス感染，スクリーニングをおこなっていないウイルスに

よる感染の危険性は依然と残っている。そのため、未知のウイルスの感染の予防をふくめたウイルスの不活化が検討されてきている。その多くは、核酸指向性の光増感化合物と光照射を組み合わせ、化合物の核酸結合を介したウイルスの複製抑制や、活性酸素産生による核酸の螺旋構造の崩壊による複製抑制を応用するものである。これに対し、加圧処理は、タンパク質溶液中のタンパク質の機能は維持しつつ、混入するウイルスや細菌などの構造体の崩壊をおこすことが期待される方法である。この方法が血液製剤に応用されるためには、血液製剤が加圧に耐えられる処理気圧等の条件の設定が必須である。本年度は、血液製剤の中で新鮮凍結血漿を対象とし、加圧処理による凝固因子等への影響を検討した。

B. 研究方法

加圧処理

期限切れの新鮮凍結血漿を融解後、加圧処理 (0, 1000, 2000, 2300, 2700, 3000, 4000 気圧で各 1 サイクル、及び 2000 気圧, 3000 気圧で 3 または 5 サイクル) をおこなった。処理後、速やかに凍結し、測定まで -40℃ にて保存した。

凝固・抗凝固因子の活性測定

活性化部分トロンボプラスミン時間 (APTT: activated partial thromboplastin time), プロトロンビン時間 (PT: prothrombin time), 凝固第 VIII 因子活性, 凝固第 IX 因子活性及びフィブリノーゲン濃度は、データファイ・APTT, ネオプラスチン・プラス, 第 VIII 因子欠乏血漿, 第 IX 因子欠乏血漿, データファイ・フィブリノーゲンを用い、血液凝固測定装置 (KC-10A: Heinrich Amelung, Lehbrinksweg, Germany) で測定した。アンチトロンビン III (ATIII) は測定キットを用い、生化学的自動分析装置で測定した。

C. 研究結果

APTT に対する加圧処理の影響

APTT は、2300 気圧までは維持された。しかし 2700 気圧, 3000 気圧では、凝固時間の遅延がみられ、4000 気圧では APTT の凝固活性の消失がみとめられた (Fig 1)。

PT への影響

PT も同様に、2300 気圧までは維持された。しかし 2700 気圧, 3000 気圧では、凝固時間の遅延がみられ、4000 気圧では著しい遅延となった。2000 気圧 3 サイクル、及び 5 サイクルでは、PT の延長は 3000 気圧 1 サイクルよりも軽度であったが、3000 気圧 3 サイクル、及び 5 サイクルでは 4000

気圧と同等の遅延となった (Fig 2).

第 VIII 因子および 第 IX 因子活性に対する加圧の影響

FVIII は、2300 気圧まで維持され、その活性は 0 気圧の活性の、約 75% であった。2700 気圧では 50%、3000 気圧では 75% の活性の減少がみられ、4000 気圧では活性はみられなくなった。2000 気圧 3 サイクル、及び 5 サイクルでは、それぞれ 75%、60% の活性がみられたが、3000 気圧 3 サイクル、及び 5 サイクルでは 4000 気圧と同様に活性は消失した (Fig 3)。

一方、第 IX 因子活性は、2700 気圧から減少がみられるものの 4000 気圧においても 25% の減少であり、加圧に対し耐性を示した。また 3000 気圧 3 サイクル、及び 5 サイクルでの減少も 4000 気圧と同程度であった (Fig 4)。

フィブリノーゲンへの加圧の影響

フィブリノーゲン濃度は、4000 気圧また 3000 気圧 3 サイクル、及び 5 サイクルにおいても加圧に対し耐性を示した (Fig 5)。

ATIII に対する加圧の影響

抗凝固因子活性を持つ AT-III の活性は、4000 気圧にても影響を全く受けなかった (Fig 6)。

D. 考察

新しい病原体の不活化法として、加圧法が注目されている。この加圧法が血液製剤に用いられるためには、血液製剤の性状、品質に影響を与ることがなく、ウイルスを不活性化できる条件の設定が必要である。今回、新鮮凍結血漿へ加圧処理をおこなった結果、APTT 値と PT 値は、少なくとも 2300 気圧までは維持されるが、それ以上の気圧では、圧依存的な遅延が起きることが示された。内因系の凝固活性で重要な第 VIII 因子活性が、同様の圧依存的な低下を示したのに対し、第 IX 因子活性は比較的、圧に耐性であったことから、加圧による APTT の遅延の主たる要因は、第 VIII 因子活性の低下によると考えられた。

本研究班の結果では、パルボウイルス B19、麻疹ウイルス、MuLV、日本脳炎ウイルスが 3000 気圧でそれぞれ 5log10、3log10、2log10、5log10 以上の不活化がなされている。しかしながら、多くのウイルスが不活化される 3000 気圧では、第 VIII 因子活性が約 25% に減少してしまうことから、単純な加圧だけでは新鮮凍結血漿への応用は難しいと考えられる。2000 気圧 3 サイクル、および 5 サイクルでは、第 VIII 因子活性は少なくとも約 60% は維持されているので、この

条件でのウイルス不活化効率を精査すべきであると考えられた。

今回の検討で、第 IX 因子は比較的加圧に抵抗性を示し、またフィブリノーゲンと AT-III も加圧に耐性があることが示された。少なくとも一部の分画製剤におけるウイルス不活化に加圧処理は応用可能かもしれない。また、このような加圧に対する感受性の違いの機序を検討することによって、第 VIII 因子の活性を維持しつつ、ウイルス不活化をなす更なる工夫が必要と思われる。

E. 結論

新しい病原体の不活化法として、加圧法が注目されている。APTT, PT, 第 VIII 因子活性は、2300 気圧まではほぼ影響がみられなかったが、3000 気圧、4000 気圧では活性の著しい低下がみられた。一方、第 IX 因子活性

に対する加圧の影響は少なく、さらにフィブリノーゲン濃度や AT-III 活性は 4000 気圧でも耐性がみられた。第 VIII 因子活性を維持しつつウイルス不活化できる加圧方法をさらに工夫していく必要が明らかとなった。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大和田 尚、阿部英樹、東 寛、池田久實 「In vitro における HBV (B 型肝炎ウイルス) 不活化の検討」 第 54 回日本輸血学会総会 (大阪, 2006)

H. 知的財産の出願・登録状況

該当無し

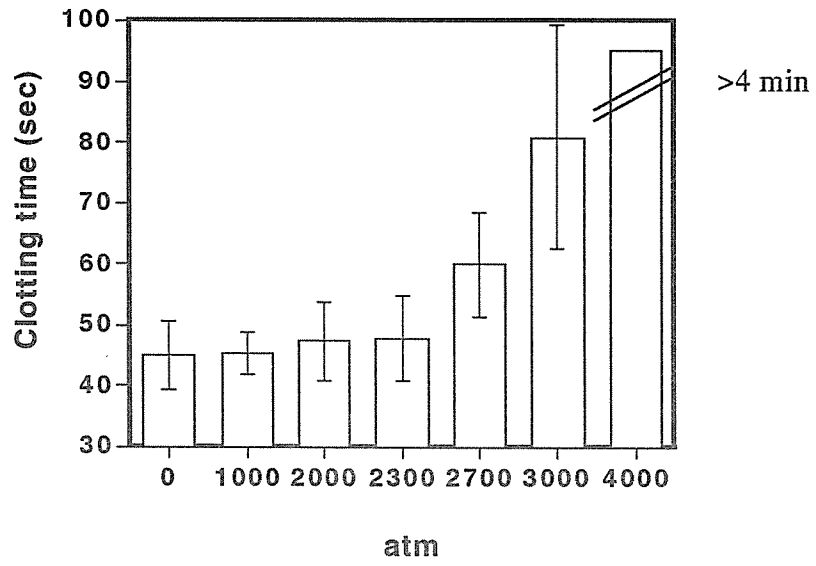


Fig 1. APTT に対する加圧の影響. Mean \pm SD (N=2-3). 4000 気圧では, >4 min を要した.

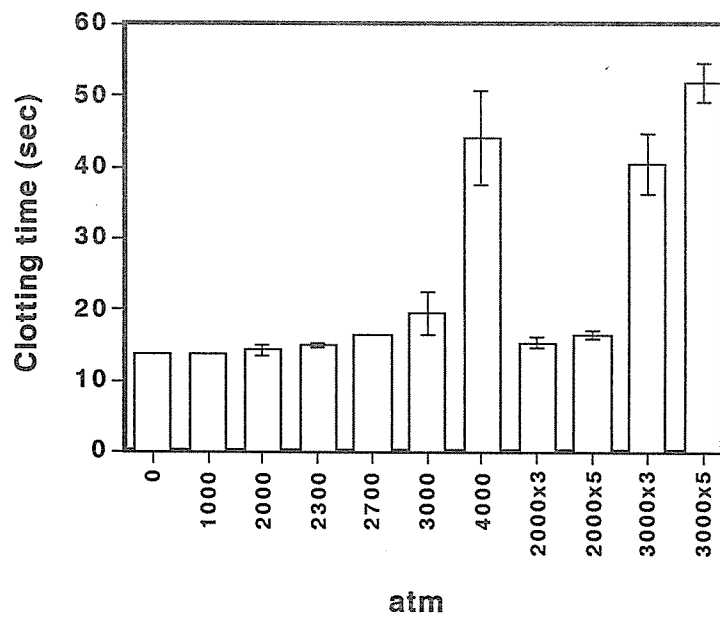


Fig 2. PT に対する加圧の影響. Mean \pm SD (N=2-3).

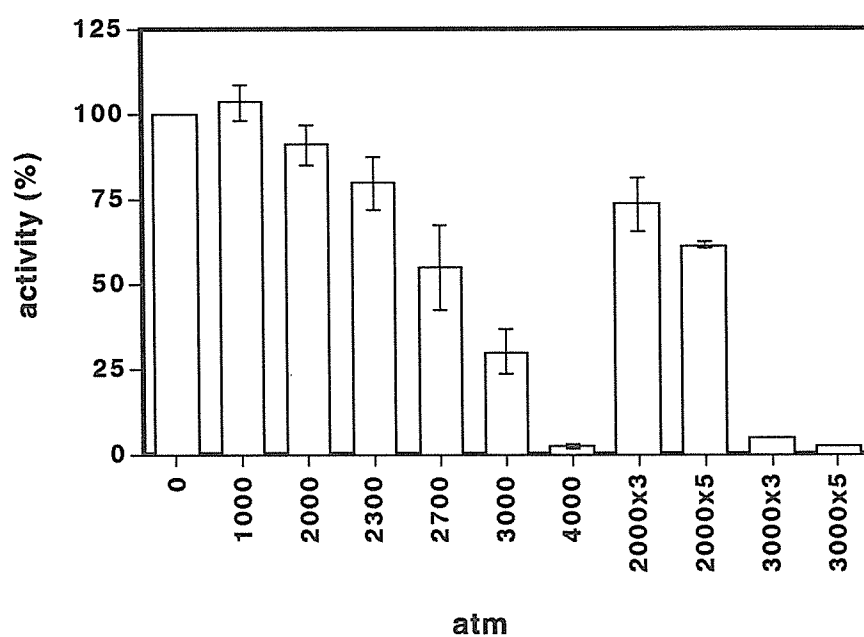


Fig 3. 第 VIII 因子活性に対する加圧の影響. 数値は, 加圧 0 気圧における第 VIII 因子活性を 100%として示した. Mean \pm SD (N=2-5).

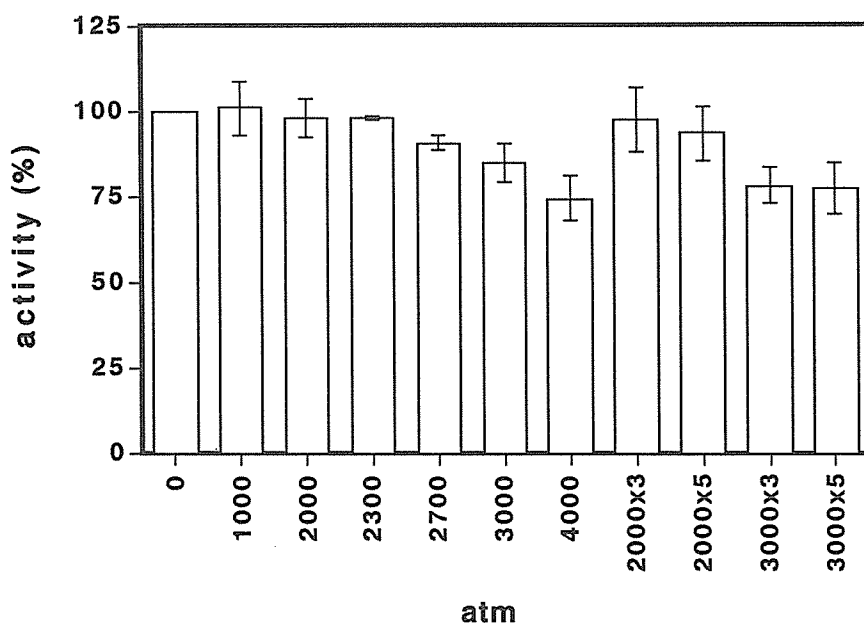


Fig 4. 第 IX 因子活性に対する加圧の影響. 数値は, 加圧 0 気圧における第 IX 因子活性を 100%として示した. Mean \pm SD (N=2-6).

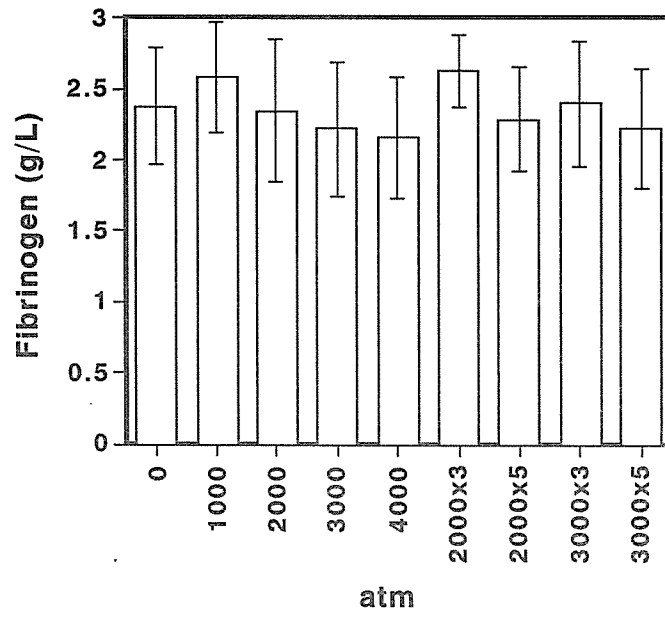


Fig 5. フィブリノーゲンに対する加圧の影響. Mean \pm SD (N=2-3).

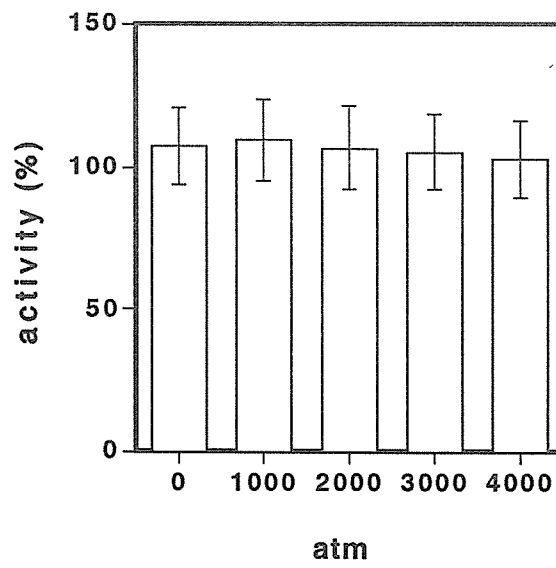


Fig 6. AT-III に対する加圧の影響. Mean \pm SD (N=3).

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス
総合研究事業）

分担研究報告書

加圧処理による血液製剤中の病原体の不活化

主任研究者 岡田義昭 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

協力研究者 梅森清子 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 研究員

研究要旨

血液製剤中に混入する可能性のある病原体を不活化する新しい方法として、食品の無菌化法として実用されている高圧処理に着目した。エンベロープのないヒトパルボウイルス B19、およびエンベロープを有する日本脳炎ウイルス JEV の高圧処理による不活化を検討した結果、3000 気圧、1 分処理でそれぞれ 5log の不活化が認められた。この不活化法は、現在導入されている除去・不活化法とは原理が異なり、広範なウイルスを不活化することが期待でき、さらに化合物や有機物の添加が不要なため毒性や変異原性などの有害な影響を回避できる優れた方法である。高圧処理による病原体不活化は、血液製剤の安全性を確保する上で重要な技術になり得ると考えられる。

A.研究目的

血液製剤は、問診、血清学的検査、核酸増幅検査によりその安全性が担保されており、これらの整備によって血液製剤の安全性は以前と比較して格段と向上した。しかし、国際交流の拡大に伴い今まで輸入感染症と考えられていた病原体が国内でも認められるようになり、さらに新興・再興感染症の報告が後を絶たない現在、スクリーニング未実施の病原体が血漿に混入する可能性が十分に考えられ、未然に防ぐための対策を立てる必要がある。病原体の混入を防ぐとともに、混入した病原体を確実に不活

化することが重要である。ここで、求められる不活化法は、広範囲な病原体を非特異的に不活化できること（特に不活化されにくいエンベロープのないウイルス）、有害な化合物などを添加しないこと、血液製剤の機能を損なわないことなどが挙げられる。現在、分画製剤の製造工程には複数のウイルス除去・不活化工程が導入されているが、ヒトパルボウイルス B19 などのエンベロープを持たないウイルスはエンベロープを有するウイルスと比較して血中ウイルス量も多く、有効な除去・不活化法が少ないことが知られている。血漿分画製剤は多数の

供血者由来の血漿を集めたプール血漿を原料にして製造されるため、1人の供血者由来の病原体が血漿プール全体を汚染させる可能性がある。ここ最近では、分画製剤による感染事故は幸い報告されていないが、ウイルスバリデーションにおけるさらなるセーフティマージンの向上のために、新しい不活化法の開発が期待されている。

そこで、我々は食品製造工程における無菌化技術に活用されている高圧処理による病原体不活化法に着目し、血液製剤のウイルス不活化への応用を試みた。この技術は、パック米、ジャムなどに応用され、実際に製品化されている。

エンベロープのないウイルスとしてヒトパルボウイルス B19、エンベロープを有するウイルスとして日本脳炎ウイルス JEV を用いて、加圧処理によりこれらのウイルスが不活化されるか否かを検討した。また血漿にあたる影響を評価した。

B. 研究方法

1. 加圧処理

ヒトパルボウイルス B19、および日本脳炎ウイルス JEV を 5% アルブミン製剤に 10% 容量となるように加えたものを作製し、これをウイルス溶液とした。各ウイルス溶液を超遠心チューブへ入れ、シーリングすることにより密封したものを加圧サンプルとした。このサンプルを加圧処理装置の試料部へ挿入し、加圧処理装置を作動させた。この加圧処理装置は、窒素圧により

水を押す力を利用したものであり、すべての操作が室温で行われた。20~40 秒程度で設定圧力値まで達し、一定時間処理後、数秒で大気圧まで減圧する事ができものである (図 1)。非加圧 (大気圧)、100 MPa, 200 MPa, 300 MPa 処理したウイルス溶液は、加圧処理後すぐに不活化評価に使用した。

2. 不活化評価

2-1 ヒトパルボウイルス B19

B19 ウイルスとして B19 陽性血漿を用いた。2x 10⁵ 個の NEC 細胞 (ヒト胎児性ガン細胞) を感染 1 日前に 24 穴プレートに巻き、10% FCS を含んだ RPMI で希釈した加圧済みのウイルス溶液、および非加圧ウイルス溶液を細胞に添加した。ウイルスの吸着効率を高めるためにポリブレンを最終濃度 5 μg/ml になるように加え、37°C に設定した CO₂ インキュベーター内で培養しウイルスを細胞へ吸着させた。2 時間後、1 ml の 10% FCS-RPMI 培養液を加え 2 日間培養し、細胞から RNA を抽出した。RNA は 15 μl に溶解し、5 μl を用いて nested RT-PCR を行い、感染することで生じる spliced RNA が検出された最大希釈倍率の逆数を感染価とした。

2-2 日本脳炎ウイルス JEV

JEV としては Beijing-1 smb37 株を用いた。6x 10⁵ 個の Vero9013 細胞を感染 1 日前に 6 穴プレートに巻き、2% FBS を含ん

だ EMEM 培地で希釈した加圧済みウイルス溶液、及び非加圧ウイルス溶液を細胞に添加した。37℃で 1 時間 CO₂ インキュベーター内で培養してウイルスを細胞へ吸着させた後、1%メチルセルロースを含む EMEM 3mL を重層させ 5~7 日培養した。3.7%ホルマリンで細胞を固定後、メチレンブルーで細胞を染色し、プラークの数を計測して感染価を求めた。

C. 研究結果

1 ヒトパルボウイルス B19 は 300MPa, 1 分 x 3 回の高圧処理により約 5 log 感染価が減少した (図 2)。

2 日本脳炎ウイルス JEV は、300MPa, 1 分 x 1 回の高圧処理により約 3.5 log、300MPa, 1 分 x 3 回の高圧処理により約 5 log 感染価が減少した (図 3)。

D. 考察

高圧処理による不活化法は、これまで有効な不活化法がなかった B19 に対し、血漿タンパクの変性がない条件下において、著明な不活化効果を有することが明らかとなった。またエンベロープを有する RNA ウィルスに対しても有効な不活化法であることが分かった。エンベロープを有するウィルスはエンベロープのないウィルスと比較して、処理する圧、処理時間、処理回数に依存して不活化効率が加算される傾向があり、エンベロープの有無により加圧処理による不活化のメカニズムが異なる可能性が示唆

された。JEV はウエストナイルウイルス (WNV) と同じフラビウイルスに属するため、WNV も JEV と同様に同じ条件で不活化できると考えられ、国内での流行が認められた場合、加圧による不活化処理により血漿中の WNV を不活化出来る可能性が示唆された。現段階では、B19 が不活化される 300MPa の処理では赤血球に溶血が生じ、赤血球製剤のウイルス不活化にはさらに工夫が必要である。溶血が生じない条件下では、マウスレトロウィルスのみ不活化効果が認められた。レトロウィルスである HIV に対しても同様な不活化効果が得られ、且つ処理に伴う赤血球製剤の安全性が確認されれば、方法的に簡便で処理に要する費用が安価なことから、HIV 感染率が高い地域の輸血の安全性向上に貢献することが期待できる。

E. 結論

食品の無菌化に実用化されている高圧処理技術を血液製剤のウイルス不活化法として応用できるかを検討した。その結果 300MPa の加圧処理により、エンベロープのない B19, エンベロープを有する JEV が 5log 減少した。特に有効な不活化法がないと言われているエンベロープのない B19 に対してはこれまでにない不活化効果が得られた。加圧処理は、血液製剤中の病原体を効率よく不活化できる新しい不活化法として期待出来る。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

1) 岡田義昭、水沢左衛子、種市麻衣子、
他：輸血、血液製剤の安全性の現状、公衆
衛生、第 69 巻、781-785、2005 年。

2.学会発表

1) 岡田義昭：血漿分画製剤の感染症対策(シ

ンポジウム)、第 54 回日本輸血学会、大阪、
2006 年

3.論文

岡田義昭、梅森清子：血漿分画製剤の安全
性確保の現状、医学の歩み第 218 巻、625-630、
2006 年

H. 知的所有権の取得状況

なし

図 1 加圧による圧力変化
(1min x 3 cy)

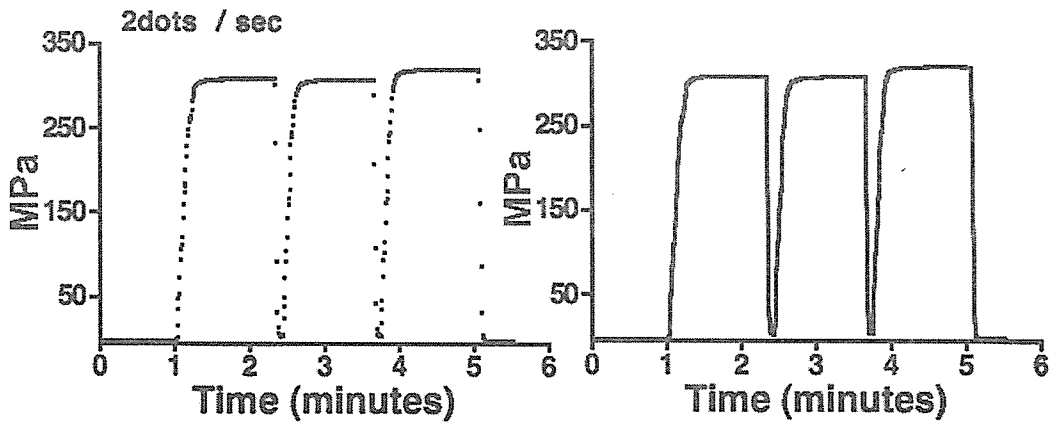


図2 B19の加圧処理による不活化

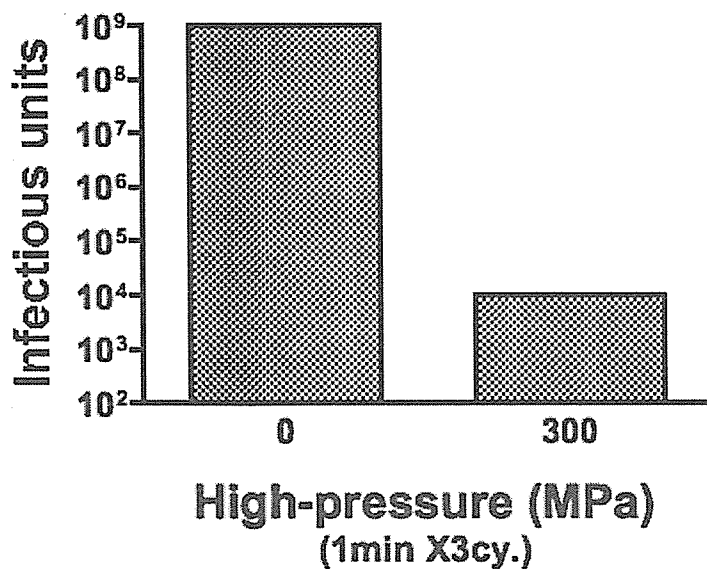


図3 JEVの加圧処理による不活化

