

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

血液製剤の安全性向上をめざした高圧処理による
病原体不活化法の研究

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 岡田 義昭

平成 20 (2008) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

血液製剤の安全性向上をめざした高圧処理による
病原体不活化法の研究

P1 - P4

主任研究者 岡田 義昭

II. 分担研究報告

1. 高圧処理による血液製剤中の病原体の不活化の研究

P5 - P9

岡田 義昭

2. 高圧処理による血漿タンパクの機能維持の検討

P10 - P17

野島 (梅森) 清子

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P18

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

血液製剤の安全性向上をめざした高圧処理による病原体不活化法の研究
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

高圧処理法が血液製剤の新しい不活化法として応用可能か検討するために、グロブリン製剤と新鮮凍結血漿の高圧処理の影響とウイルス不活化効率を解析し、下記の成果を得た。

1. ヒト免疫グロブリン製剤は 3000 気圧 (300MPa) の高圧処理では副作用の原因となる凝集体は検出されなかったが、4200 気圧以上では検出されるようになった。また、抗補体価も 3000 気圧まではコントロールと同等であったが、3200 気圧以上になると増加し、4000 気圧では生物学的製剤基準を超えた。
2. 新鮮凍結血漿を室温で 3000 気圧の高圧処理した結果、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) は 60 秒以上延長し、内因性凝固因子活性の著名な低下が観察された。しかし、低温での高圧処理では APTT の延長は抑制され、凝固因子の活性が維持された。第 9 因子、フィブリノゲン、アンチトロンビン III 等の活性は 3000 気圧の高圧処理では非加圧と同等であった。
3. 凝固因子が安定化した低温高圧処理によってもパルボウイルス B19 は、室温と同程度不活化された。
4. 高圧処理の温度を低温で行なうことによって凝固因子の活性を保持し、病原体のみを不活化できる高圧処理条件を明らかにした。

分担研究者

野島 (梅森) 清子 国立感染症研究所 研究員

A. 研究目的

血漿分画製剤は、問診、ウイルスのスクリーニング検査、製造工程での原理が異なるウイルス不活化法の導入によって安全性は飛躍的に向上した。しかし、スクリーニ

ング未実施の病原体が血液製剤に混入する可能性は常に存在する。特に、エンベロープ陰性のウイルスは一般的にウイルス不活化法に抵抗性を示し、エンベロープ陽性のウイルスほど不活化されないのが現状である。一方、輸血用血液に対しては、輸血用血液に導入可能な方法は海外で認可された血小板製剤と新鮮凍結血漿への病原体不活化法だけであり、赤血球製剤への方法は実

用化されていない。我々は、食品製造工程での無菌化に応用されている高圧処理による病原体不活化法が新しい血液製剤の病原体不活化法として応用できる可能性を明らかにしてきた。血液製剤では、血液製剤の機能を保った状態で病原体のみを不活化できる方法が求められている。我々のこれまでの検討では室温で高圧処理をすると凝固因子活性が低下し、失活しない加圧条件を見いだすことが実用化の上から必要であった。今年度は低温下での高圧処理による凝固因子の影響とウイルス不活化の検討を行った。

B. 研究方法

1. 低温での高圧処理法

循環型冷却装置を高圧装置に付加し、冷却条件下で不凍液を循環させ、4°C~5°Cの温度条件での高圧処理ができるようにした。

2. 血液製剤の室温及び低温高圧処理による凝固因子活性等への影響

新鮮凍結血漿とグロブリン製剤を 2000 から 4000 気圧まで室温と 4°Cにて高圧処理した。凝固因子は活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), プロトロンビン時間(PT), 凝固第 8 因子活性、凝固第 9 因子活性、フィブリノゲン活性、アンチトロンビン III 活性を測定した。また、グロブリン製剤は高速液体クロマトグラフィーを用いて凝集体の検出を行なった。抗補体価は、感作ヒツジ血球、乾燥モルモット補体を用いて、Mayer 法により補体価を測定した。

3. 低温高圧処理によるウイルス不活化効率の影響

ヒトパルボウイルス B19 (以下 B19) を 5%アルブミン製剤に 10%容量となるように加え、室温 (25°C前後)、及び 4°Cで高圧処理を行なった。2500 気圧と 3000 気圧にて B19 の不活化を評価した。

4. アンチトロンビン III 製剤における液状加熱処理と高圧処理による B19 の不活化効率の比較検討

5%アルブミン製剤と指定の濃度に溶解したアンチトロンビン III 製剤に B19 陽性血漿を 10%容量となるように加え検体とした。室温で 3000 気圧高圧処理を行ない、液状加熱では 60°C、10 時間加熱処理を実施し、不活化効率を比較検討した。

C. 研究結果

1. 血液製剤の室温及び低温高圧処理による凝固因子活性等への影響

グロブリン製剤を高圧処理したところ、グロブリンの凝集体は 3000 気圧まで検出されなかった。凝集体が生じると高値となる抗補体価は 3000 気圧ではコントロールと差がなかった。360MPa の加圧処理から抗補体価の上昇がはじまり、400MPa では生物学的製剤基準を超えた。

新鮮凍結血漿を 3000 気圧で高圧処理を室温で行なったところ、内因性凝固因子活性の指標である APTT が 60 秒も延長し、凝固因子活性が著しい低下が観察された。しかし、冷却(4°C)高圧処理では APTT, PT

ともに凝固時間の延長が抑制された。

また、3000気圧の高圧処理では血漿中の第9因子活性、フィブリノゲン活性、アンチトロンビンIII活性は非加圧のコントロールと差がなかった。

2. 低温高圧処理によるウイルス不活化効率の影響

3000気圧の高圧処理では室温、4℃とも4Log不活化され、高圧処理の温度と不活化効率に著名な差は認められなかった。

3. アンチトロンビン III 製剤における液状加熱処理と高圧処理による B19 の不活化効率の比較検討

液状加熱ではアンチトロンビン III 製剤中の B19 は 6Log 不活化された。アルブミンでは 4Log 不活化された。一方、3000気圧の高圧処理では室温と 4℃において 5log 不活化された。

D. 考察

血液製剤の病原体の不活化法は血液に含まれている凝固因子等の機能を失活させることなく、病原体のみを不活化できる方法が求められている。室温で新鮮凍結血漿の高圧処理をおこなったところ APTT と PT の凝固時間が延長し、高圧処理による凝固因子の失活が明らかとなった。これは不活化法として実用化するには大きな壁となった。しかし、温度を低下させた状態で高圧処理を行なうことによって、これらの凝固因子の失活を抑制することに成功した。一方、凝固因子が安定化したことはウイルス

も安定化し、不活化効率が低下する懸念があったが、種々の不活化法に抵抗性を示す B19 について検討したところ不活化効率に差は認められなかった。また、B19 を液状加熱による不活化と高圧処理による不活化効果を検討した結果、同等であることが判明した。液状加熱では 10 時間を要したが、高圧処理では僅か 1 分の処理で同等な効果が得られたことは注目すべきことと考えられた。

E. 結論

血液製剤の高圧処理で問題となった凝固因子の失活は、低温での高圧処理によって機能を保持することに成功した。ウイルスの不活化効率が室温と差がなかったことから、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) 嶋崎 典子、岡田義昭、米山 徹夫：医薬品からの感染が危惧されるウイルス疾患と安全対策、月刊薬事、90 巻、No .11、1691-1697、2007 年

2) 種市 麻衣子、岡田 義昭、上村 晃一郎、他：血液凝固第 9 因子国内標準品の力価測定、日本輸血細胞治療学会誌、第 54 巻、第 1 号、43-47、2008 年

2. 学会発表

- 1) 岡田義昭：血液製剤の安全性向上目指したプリオン検出法の研究（教育講演）、第55回日本輸血学会、名古屋、2007年
- 2) Y.Okada, K.,Umemori, and K.Yamaguchi:Preparation of plasmids containing HBv-fullgenome of genotype A to H and trial of HBV inactivation method. 20th SoGAT international working group meeting. Warsaw. 2007.
- 3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立、プリオンシンポジウム2007、津南、2007年
- 4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、山口一成：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用、第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年
- 5) 梅森 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、嶋崎 典子、米山 徹夫、山口一成：血液製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス不活化法の開発、第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年
- 6) 嶋崎 典子、清原 知子、戸塚 敦子、梅森 清子、岡田 義昭、米山 徹夫：加熱および加圧によるA型肝炎ウイルスの不活化法—株間の差異の検討—、第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年

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

高圧処理による血液製剤中の病原体の不活化の研究

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

現在市販されている血漿分画製剤はウイルスのスクリーニング検査と複数のウイルス不活化工程の導入によって投与による感染症発症の報告はない。一方、輸血用血液に対する不活化法は、実用的な方法が少なく、また化学物質を添加する必要があることから安全性への危惧があり、導入している国や地域もあるが、導入に慎重である。我々は、輸血用血液のための新しい病原体不活化法として、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。血液製剤の成分を失活させることなく病原体のみを不活化させる加圧条件として、温度を低下させた状態で高圧処理（低温高圧処理法）し、病原体の不活化効率について検討した。種々の不活化法に抵抗性を示すヒトパルボウイルス B19（以下 B19）を用いて検討したところ、室温と 4℃ で 3000 気圧の高圧処理によってそれぞれ 5log の不活化が認められ、温度による不活化効果への影響は認められなかった。また、B 型肝炎ウイルスの感染評価系構築のために肝由来細胞や肺由来細胞株に B 型肝炎ウイルスを感染させたところ、HBs 抗原陽性の細胞が少数ながら存在していた。

A. 研究目的

血漿分画製剤は、問診、ウイルスのスクリーニング検査、製造工程での原理が異なるウイルス不活化法の導入によって安全性は飛躍的に向上した。しかし、国際交流の拡大に伴い、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、さらに海外で新興・再興感染症のアウトブレイクが報告されるなど、スクリーニング未実施の病原体が血液製剤に混入する可能

性が考えられる。特に、エンベロープ陰性のウイルスは一般的にウイルス不活化法に抵抗性を示し、エンベロープ陽性のウイルスほど不活化されないのが現状である。一方、輸血用血液に対しては、国内ではウイルス不活化法は導入されていない。現状では、輸血用血液に導入可能な方法は海外で認可された血小板製剤と新鮮凍結血漿への病原体不活化法だけであり赤血球製剤への方法は今だ実用化されていない。我々は、

これまでの研究によって、食品製造工程での無菌化に応用されている高圧処理による病原体不活化法が新しい血液製剤の病原体不活化法として応用できる可能性を明らかにしてきた。血液製剤で重要なことは、血液製剤の機能を保った状態で病原体のみを不活化できることである。高圧処理で不活化に影響を与える因子として、圧力、加圧時間、回数、温度、等が考えられる。今年度は、加圧する温度に関して B19 の不活化を中心に検討した。

また、B19 はアンチトロンビン III 製剤中では液状加熱に対して抵抗性を示すことが報告されたので、液状加熱と高圧処理による B19 の不活化効率を比較検討した。

さらに、高圧処理による B 型肝炎ウイルスの不活化を評価するために、今年度は、感染評価系が確立されていない B 型肝炎ウイルスについて種々のヒト由来細胞株に対する感受性を検討した。

B. 研究方法

1. 低温高圧処理によるウイルス不活化効率の影響

ヒトパルボウイルス B19 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。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。このサンプルを高圧処理装置の試料部へ挿入し、加圧処理を行なった。温度制御可能な循環装置を高圧装置に結合させ、高圧装置の試料部の温度を室温

(25℃前後)、及び 4℃に保ち、各温度で 2500 気圧、及び 3000 気圧の高圧処理を行なった。高圧処理の条件は 1 分間加圧後急激に 1 気圧への減圧を計 3 サイクル実施した。

2. アンチトロンビン III 製剤における液状加熱処理と高圧処理による B19 の不活化効率の比較検討

5%アルブミン製剤と指定の濃度に溶解したアンチトロンビン III 製剤に B19 陽性血漿を 10%容量となるように加え検体とした。高圧処理では、室温で 3000 気圧 3 回の処理を行ない、液状加熱では 60℃、10 時間加熱処理を実施した。処理前後の B19 の感染価を求め、不活化効率を検討した。

3. ヒトパルボウイルス B19 不活化評価

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 穴プレートに蒔き、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℃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、1ml 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。

4. B 型肝炎ウイルスの培養細胞株の感受性の検討

ヒト肝ガン及び肺ガン由来の細胞株をスライドチャンバーに撒き、100 倍に希釈した HBV 陽性血漿を添加し、5 日間培養した。培養後、蛍光抗体法にて HBs 抗原の有無と、DNA を抽出し covalent closed circular HBV-DNA の有無を PCR にて検出した。

C. 研究結果

1. 低温高圧処理法によるウイルス不活化効率の影響

2500 気圧の高圧処理では、室温条件では B19 は全く不活化されなかったが、4°C では 1 Log 不活化された。3000 気圧では室温、4°C とも 4Log 不活化され、高圧処理の温度と不活化効率に著名な差は認められなかった (図 1)。

2. アンチトロンビン III 製剤における液状加熱処理と高圧処理による B19 の不活化効率の比較検討

アンチトロンビン III 製剤と 5% アルブミン製剤に B19 を添加して 60°C、10 時間の液状加熱を行なったところ、アンチトロンビン III 製剤では 6Log 不活化された。アルブミンでは 4Log 不活化された。一方、3000 気圧の高圧処理では室温と 4°C において 5log 不活化された。

3. B 型肝炎ウイルスの培養細胞株の感受性の検討

感染後 5 日目の肺ガン細胞株から蛍光抗

体法にて、細胞質に顆粒状に光る HBs 抗原陽性細胞を少数ながら確認できた。

D. 考察

血液製剤の病原体の不活化法は血液に含まれている凝固因子等の機能を失活させることなく、病原体のみを不活化できる方法が求められている。温度を低下させた状態で高圧処理を行なうことによって不活化効率が増加することが、食品では報告されている。我々が検討した B19 の 3000 気圧による不活化では、著名な不活化効果の増幅は確認できなかったが、液状加熱による不活化と同等の高い不活化効果が得られた。一方、液状加熱では 10 時間を要したが、高圧処理では僅か 1 分の処理で同等な効果がありことは注目すべきことと考えられた。これまでの我々の研究から、血漿成分の多くは 3000 気圧まで失活する率は少なかったが、中には 4000 気圧以上の加圧でも失活しない因子も存在した。これらは 4000 気圧以上加圧できることから、低温高圧処理によって不活化効率が室温よりも増幅する可能性がある。

B19 の感染系が確立し、他の動物由来のパルボウイルスよりも熱に対して感受性が高いことが明らかとなったが、最近、アンチトロンビン III 製剤の中では液状加熱処理に耐性であるとの報告がされたので、我々の実験系を用いて同様な実験を行なったところ、液状加熱によってアルブミン製剤よりも効率に不活化された。また、高圧処理によってもアルブミンと同程度不活化され

た。

E. 結論

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) 嶋崎 典子、岡田義昭、米山 徹夫：医薬品からの感染が危惧されるウイルス疾患と安全対策、月刊薬事、90 巻、No.11、1691-1697、2007 年

2) 種市 麻衣子、岡田 義昭、上村 晃一郎、他：血液凝固第 9 因子国内標準品の力価測定、日本輸血細胞治療学会誌、第 54 巻、第 1 号、43-47、2008 年

2. 学会発表

1) 岡田義昭：血液製剤の安全性向上目指したプリオン検出法の研究（教育講演）、第 55 回日本輸血学会、名古屋、2007 年

2) Y.Okada, K., Umemori, and K. Yamaguchi: Preparation of plasmids containing HBV-fullgenome of genotype A to H and trial of HBV inactivation method. 20th SoGAT international working group meeting, Warsaw, 2007.

3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE 由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立、プリオンシンポジウム 2007、津南、2007 年

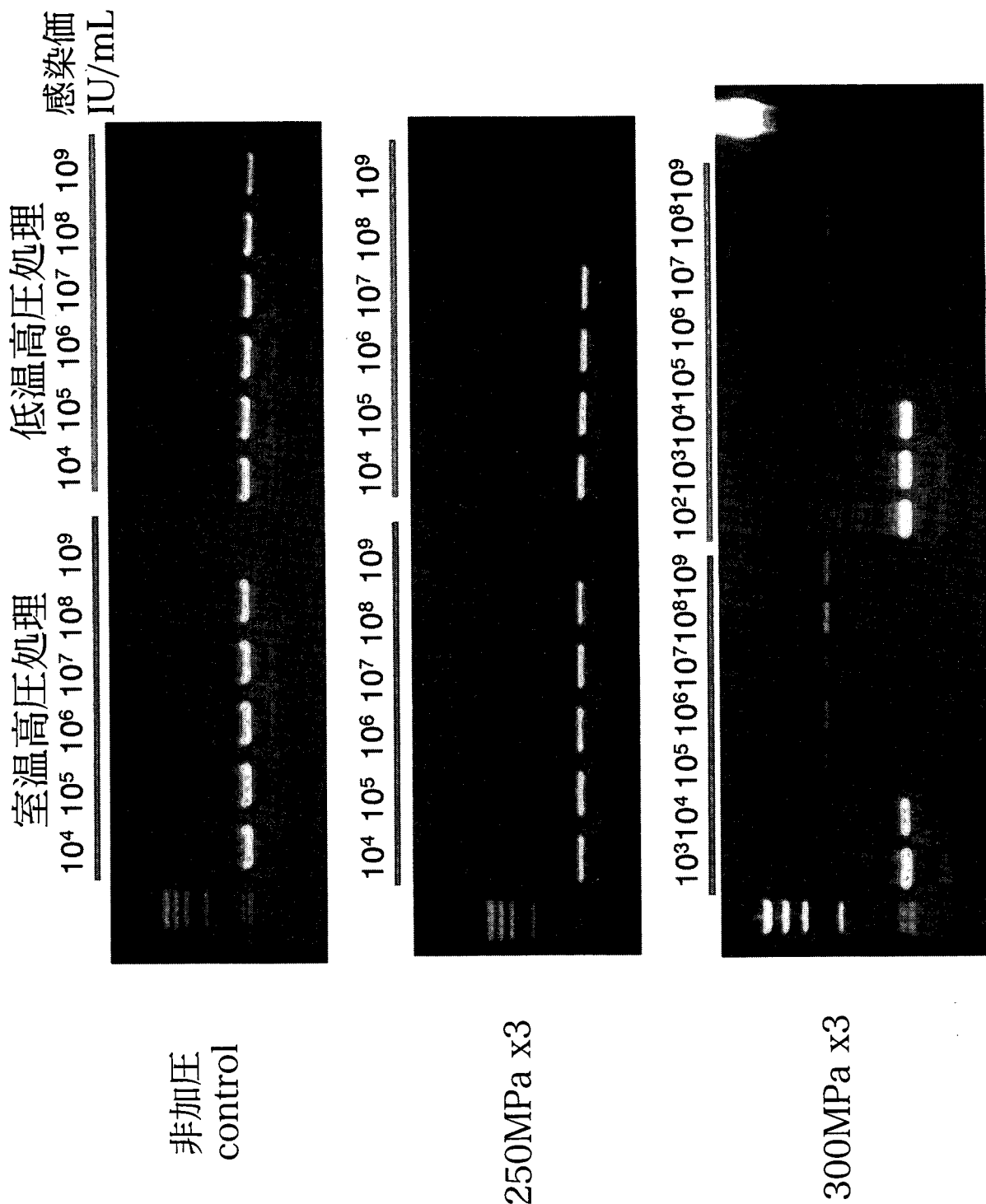
4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、山口一成：BSE 由来プリオンの *in vitro*

感染系の確立とその応用、第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年

5) 梅森 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、嶋崎 典子、米山 徹夫、山口一成：血液製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス不活化法の開発、第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年

6) 嶋崎 典子、清原 知子、戸塚 敦子、梅森 清子、岡田 義昭、米山 徹夫：加熱および加圧による A 型肝炎ウイルスの不活化法—株間の差異の検討—、第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007 年

図1 室温および低温高压処理におけるウイルス不活化



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

分担課題：加圧処理による血漿タンパクの機能維持の検討

分担研究者 野島(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

日本の血液製剤は近年格段と向上したが、スクリーニング未実施の病原体やウィンドウ期間をすり抜けた病原体などが血液製剤に混入する可能性は否定できない。これらの病原体を効率よく不活化する方法として、食品の無菌化法として実用されている高圧処理による不活化法に着目した。これまでに室温条件下、300MPaでの加圧処理により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 が効率よく不活化されるが、血漿の第8因子等の凝固因子活性は低下することを明らかにしてきた。

本研究では、まず室温加圧処理によるグロブリン製剤への影響を検討した結果、300MPaの処理ではグロブリンへの影響は観察されなかった。

次に、凝固因子の活性を維持したまま病原体のみが不活化されるように、冷却条件下での高圧処理を行った。その結果、低温での加圧処理により凝固因子活性はほぼ維持されることが明らかになった。

これらの結果より、加圧処理による不活化は、化合物や有機物を添加することなく広範な病原体を不活化することができる優れた方法であると考えられ、この新しい病原体不活化法は、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た。

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。現在、日本の成

分製剤（血小板製剤、新鮮凍結血漿、濃厚赤血球製剤）は、不活化処理に対する安全性の危惧から、不活化処理は導入されていない。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が重要である。

一方、血漿分画製剤（第8因子、第9因子、フィブリノゲン、グロブリン、ハプログロビン、アンチトロンビンIII、アルブミン）の製造工程中では、複数の除去・不活化の行程を経て製剤が製造されているため、安全性は非常に高く、ここ最近では、感染例の報告はない。しかし、これらの不活化法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いうえに、多くの不活化処理に対して耐性を示し、エンベロープのないウイルスにも有効な除去・不活化法が少ないことが問題である。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ため、さらなるセイフティーマージンの向上のために、エンベロープのないウイルスにも効果のある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応用されている高圧処理による

病原体不活化法に着目した。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。我々はこれらの技術の血液製剤の病原体不活化への応用を試みた。高圧処理が血漿タンパクの機能へ与える影響として、成分製剤としては新鮮凍結血漿、血漿分画製剤としては、グロブリン製剤を用いて、その機能の維持を検討した。

B. 研究方法

1. 低温での高圧処理

循環型冷却装置を加圧装置に付加し、冷却条件下で不凍液を循環させ、装置内を低温4°C~5°Cに保てるようにした。

2. 高圧処理法

成分製剤としては、新鮮凍結血漿、血漿分画製剤としては、グロブリン製剤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、すべての操作は室温、および4°C~5°Cで行った。この装置は、20~40秒程度で設定圧力値まで達し、一定時間の高圧処理後、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）、200MPa,300MPa 処理したグロブリン製剤および、濃厚赤血球溶液は、加圧処理後すぐに評価にした。非加圧（大気圧）、200MPa,300MPa 処理した新鮮凍結血漿は加圧処理後すぐに凍結し、用事溶解して評価に用いた。

3. グロブリンの凝集体の検出

加圧処理グロブリン製剤に含まれるグロブリン凝集体は、東ソーG3000SWXLカラムを2本タンデムにつなぎ、0.1M Na₂SO₄を含む1/7.5Mリン酸緩衝液(pH6.4)を溶離液として用いて、高速液体クロマトグラフィーにより分析を行った。

4. 抗補体性否定試験

グロブリンの抗補体価は、感作ヒツジ血球、乾燥モルモット補体を用いて、Mayer法により補体価を測定した。検体/モルモット補体の補体価とモルモット補体の補体価の差を抗補体価とした。

5. 凝固、抗凝固因子の活性測定

活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、プロトロンビン時間(PT)、凝固第8因子活性、凝固第9因子活性、フィブリノーゲン濃度は、それぞれ、データファイ・APTT、ネオプラスチン・プラス、第8因子欠乏血漿、第9因子欠乏血漿、データファイ・フィブリノーゲンをを用い、血液凝固測定装置で測定した。アンチトロンビンIIIは測定キットを用いて生化学的自動分析装置で測定した。

C. 研究結果

1. グロブリン製剤は、ヒトパルボウイルスB19や日本脳炎ウイルスJEVが不活化される300MPa, 1分x1回の高圧処理条件において、副作用を引き起こすようなグロブリン凝集体(図2矢印)は産生されなかった。
2. 300MPa, 1分x1回の高圧処理グロブリンの抗補体価は非加圧時と変化がなかった。

360MPaの加圧処理から抗補体価の上昇がはじまり、400MPaでは抗補体価の大幅の上昇が観察され、生物学的製剤基準の抗補体価を上回った(図3)。

3. 血漿に対して(ヒトパルボウイルスB19や日本脳炎ウイルスJEVが不活化される)300MPa, 1分x1回の高圧処理を行った結果、内因性凝固因子活性の指標であるAPTTが60秒延長し、凝固因子活性が著しい低下が観察されたが、一方、冷却(4°C)加圧処理では同じ圧力処理におけるAPTTの延長はわずか9秒であった(図4)。

4. 300MPa, 1分x1回の冷却高圧処理条件においてはAPTT、PTともに凝固時間の延長が抑制された(図5)。

5. 300MPa, 1分x1回の冷却高圧処理条件においては、血漿中の第9因子活性、フィブリノーゲン活性、アンチトロンビンIII活性は非加圧時と同様に維持され、大幅な活性低下は認められなかった。

6. 300MPa, 1分x1回の冷却高圧処理条件においては、血漿中の第8因子活性は約50%に低下した。

D. 考察

高圧処理による不活化法はエンベロープの有するウイルスにも、エンベロープのないヒトパルボウイルスB19にも効果を発揮するが、その際に、凝固因子の低下が大きな問題となっていた。しかし、圧色処理時の温度を4°Cへ下げることにより、凝固因子の活性が維持されることが明らかになった。

第8因子の活性は50%に低下したが、この血漿の第8因子低下によるAPTTやPTの延長は認められなかった。また、タンパク質としては溶解度が低いために安定性の低い性質を持つグロブリン製剤に対して加圧処理を行っても、360MPaまでは変性による凝集体の産生はみとめられず、副作用に結びつく抗補体性の上昇も認められなかった。これらの結果より、加圧処理に病原体不活化は、血液製剤の新規不活化法として期待できると考えられる。その理由として以下があげられる。①エンベロープの有無に関わらず、細菌を含む広範囲の病原体に対して不活化効果が期待でき、今後、スクリーニング未実施の病原体が混入したとしても不活化効果が期待できる。②欧米で検討されているメチレンブルー、ソラレン、リボフラビンなどの化学物質を添加してUV照射を施す方法と比較しても、核酸への結合をターゲットとしておらず、物理的な破壊による不活化であるため、より安全な不活化法である可能性が考えられる。③400MPa程度の高圧をかけるとタンパクは変性するが、病原体(ウイルス)が不活化される圧力は300MPaであるため、タンパク変性によるネオアンチゲンの産生は生じにくいと考えられる。④輸血バッグごと加圧処理ができるので簡便である。⑤加圧処理コストが廉価である。⑦短時間での処理が可能である。今後は、加圧処理における安全性を検討することが課題である。

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が不活化でき、冷却条件で高圧処理することにより、凝固因子の活性も十分に維持できることが明らかになった。化学物質の添加もないことから、より安全な新しい不活化法として期待でき、血液製剤の安全性確保へ貢献できる可能性が高いと考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 梅森清子、岡田義昭、水澤左衛子、嶋崎典子、米山徹夫、山口一成：血液製剤の安全性向上をめざした新規ウイルス不活化法の開発、第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年
- 2) 岡田義昭、水澤左衛子、梅森清子、山口一成：BSE由来プリオンのin vitro感染系の確立とその応用 第55回日本ウイルス学会、札幌、2007年
- 3) 嶋崎典子、清原知子、戸塚敦子、梅森清子、岡田義昭、米山徹夫；加熱および加圧によるA型肝炎ウイルスの不活化 一株間の差異の検討第55回日本ウイルス学会、札幌、2007
- 4) Y. Okada, K. Umemori, and K. Yamaguchi : Preparation of Plasmids

containing HBV-full genome of genotype A to H and trial of HBV inactivation method. 20th SoGAT international working group meeting. Warsaw. 2007

2.論文発表
なし

H. 知的所有権の取得状況
なし

図1 加圧による圧力変化
(1 min x 3 cy)

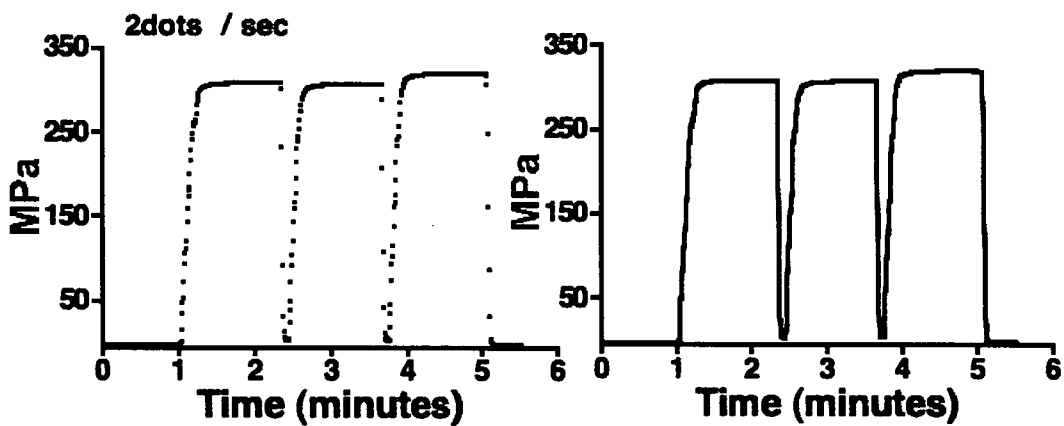


図2 グロブリン製剤の加圧処理による凝集体の産生

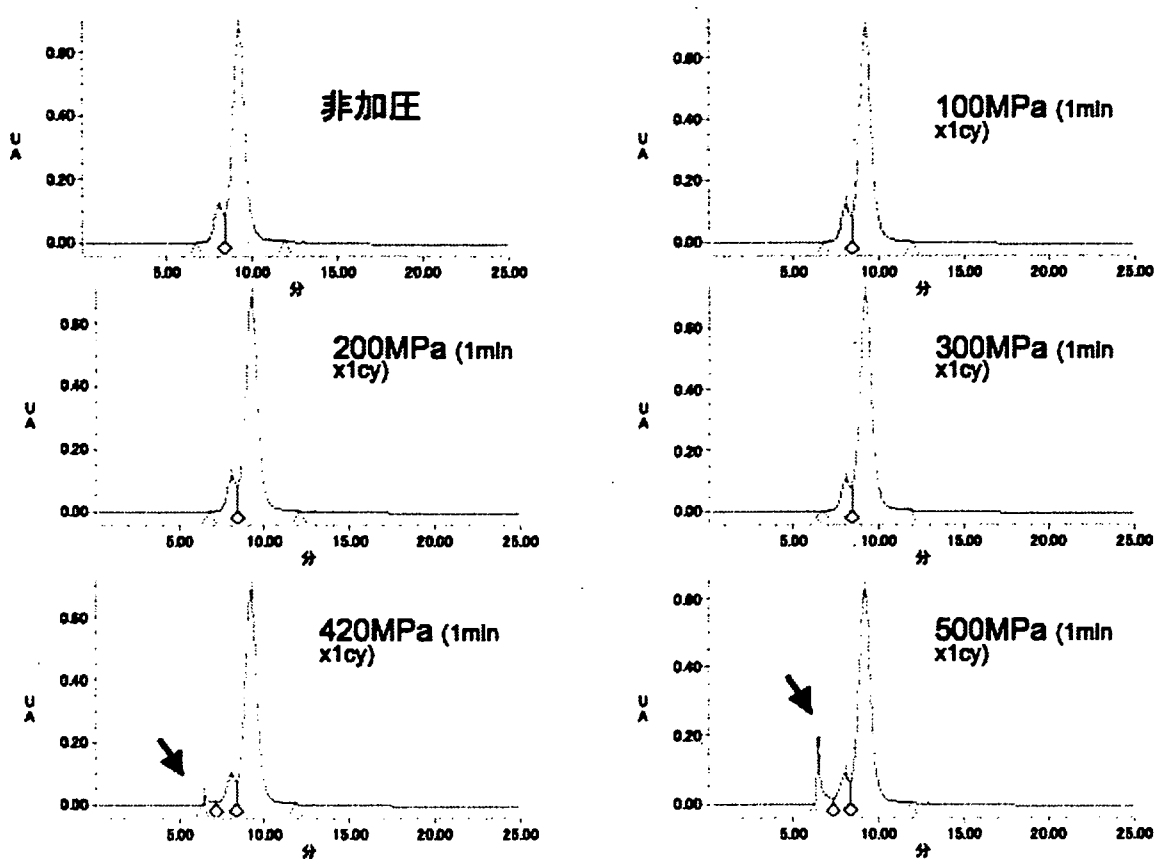


図3 加圧処理による抗補体価の変動

加圧条件	抗補体価	凝集体含量(%)
非加圧	10.4±1.6	0.00±0.00
300MPa	10.4±0.7	0.03±0.00
330MPa	12.1±0.3	0.05±0.01
360MPa	13.1±0.6	0.36±0.01
400MPa	30.0±0.5	1.66±0.01

図4 室温加圧と冷却加圧処理によるAPTTの延長

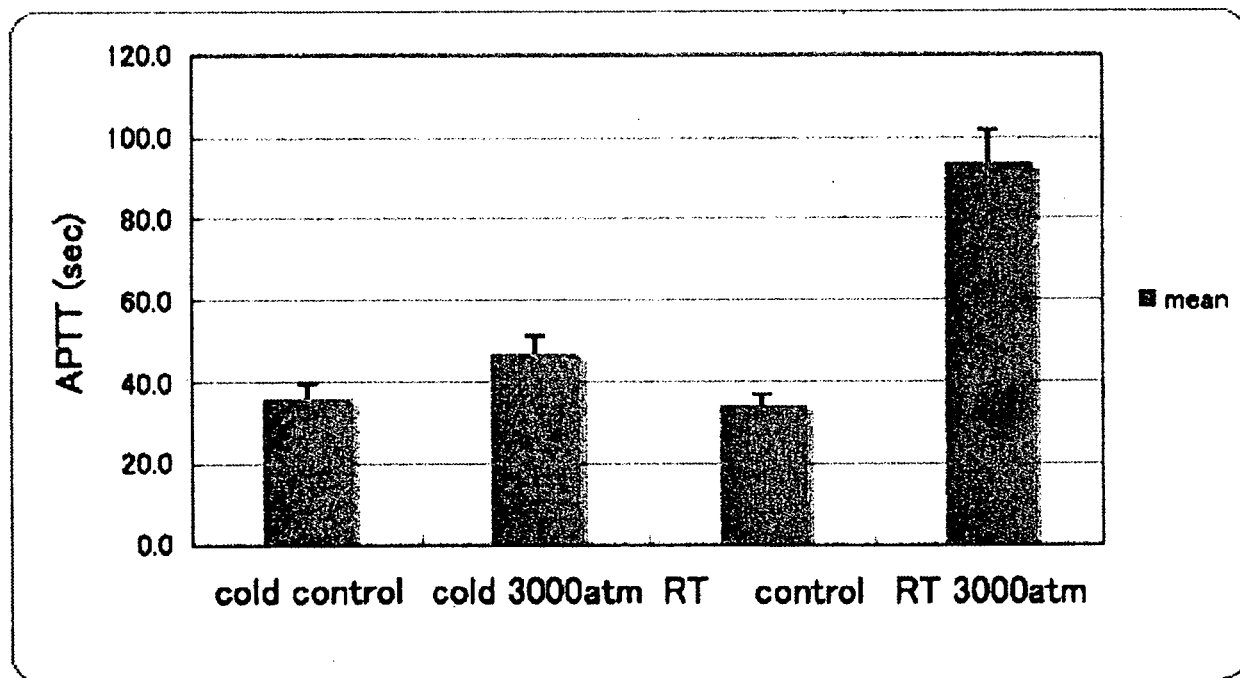
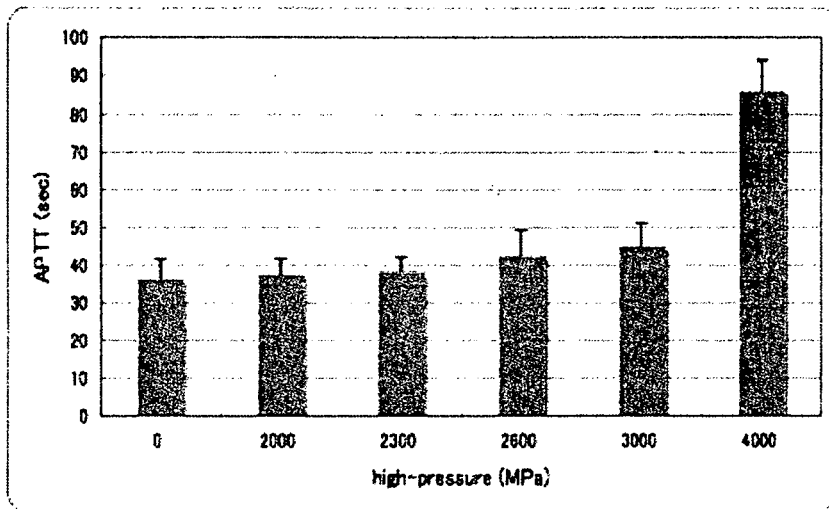
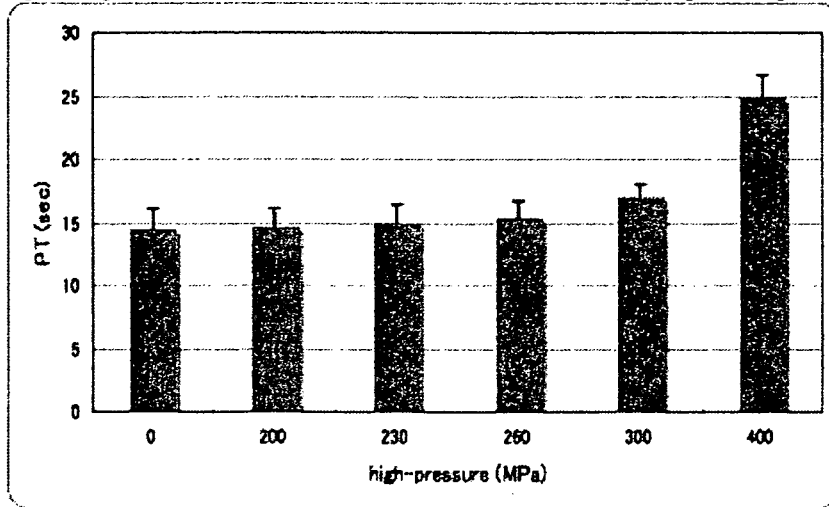


図5 冷却加圧処理による凝固活性



別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年