

2008 38043A

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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュ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 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 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 P 1 - P 7  
研究代表者 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 P 8 - P15  
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 P16 - P24  
野島 清子

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P 25

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 P26 - P32

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  
研究代表者 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し、下記の成果を得ることができた。

1. 血漿中の第 8 因子は室温での高圧処理によって 3000 気圧では著明な活性の低下が見られたが、4°Cの低温高圧処理によって約 60%の活性が維持できた。
2. 3000 気圧の低温高圧処理では、血漿中の第 7、9、11 因子、フィブリノゲン、ATIII、フォンビルブランド因子 (以下 vWF)、プラスミノーゲン、プロテイン C、プロテイン S の活性は維持された。しかし、第 13 因子の活性は維持できなかった。
3. 4°Cの低温高圧処理によってパルボウイルス B19 は、室温と同程度に不活化されたが、日本脳炎ウイルスは抵抗性を示し、不活化効率が低下した。低温高圧処理は凝固因子の失活を抑制するが、ウイルスの種類によっては不活化効率が低下する。
4. B 型肝炎ウイルスのモデルとして用いられている仮性狂犬病ウイルスについて高圧処理による不活化を検討し、3000 気圧では他のエンベロープ陽性のウイルスと同様に約 4Log 不活化された。
5. 仮性狂犬病ウイルスを用いて高圧処理による不活化効率を増強する方法を検討し、酸性の条件下に高圧処理することによってこれまで不活化効果が得られなかった低圧条件においても不活化効果が得られた。

### 分担研究者

野島 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。また、エンベロープ陰性のウイルスは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、実用化されている方法は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、それも不活化法そのものへの安全性への懸念等から一部の地



域で導入されているにすぎない。また、赤血球製剤の不活化法については開発中の方法がいくつかあるが実用化に至っていない。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から室温で高圧処理を行なう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ることが明らかとなった。今年度は4°Cの低温下での高圧処理による凝固因子の活性への影響とウイルス不活化効果への影響を詳細に解析した。さらに、これまで血漿分画製剤のガイドラインに記載されてあるウイルスの中でエンベロープを持つDNAウイルスに対する高圧処理による不活化効果が検討されてなかった。今年度はB型肝炎ウイルス(HBV)のモデルである仮性狂犬病ウイルスを用いて不活化効果を解析した。また、高圧処理による不活化効果を増強する方法についても検討し、凝固因子や赤血球に影響を与えない高圧条件下でウイルスの効率良い不活化法の開発を目指した。

## B. 研究方法

### 1. 低温での高圧処理法

加圧装置に循環型冷却装置を付加し、冷却条件下で不凍液を循環させ、装置内を低

温 4°C~5°Cに保てるように機器を改良した。

### 2. 高圧処理法

成分製剤として、新鮮凍結血漿を超速心チューブへ入れ、空気が入らないように注意して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。ヒトパルボウイルスB19、日本脳炎ウイルスJEV、仮性狂犬病ウイルス(ベゴニア株)は5%アルブミン製剤に10%容量となるように加え、これをウイルス溶液とした。各ウイルス溶液を超速心チューブへ入れ、同様にシーリングし、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、低温条件での操作は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るものである。非加圧(大気圧)、および高圧処理した新鮮凍結血漿は、加圧処理後すぐに凍結し、凝固因子活性測定直前に融解して試験に用いた。ウイルス液は加圧処理後すぐに試験に用いた(B19とJEV)。仮性狂犬病ウイルスは高圧処理後すぐに凍結し、感染価測定まで-80°Cに保存した。

### 3. 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。第7因子、第11因子、第13因子、フォンビルブランド因子、プラスミノーゲン、プロテインC、プロテインSの活性測定は、株式会社エスアールエルに依頼した。

#### 4.不活化の評価

##### (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 10<sup>5</sup>個のNEC細胞(ヒト胎児性ガン細胞)を感染1日前に24穴プレートに撻き、10% FCSを含んだRPMIで段階希釈した加圧処理ウイルス溶液、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5μg/mlになるように加え、37°Cに設定したCO<sub>2</sub>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15μlに溶解し、5μl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) 日本脳炎ウイルス JEV

JEVとしてはBeijing-1 smb37株を用いた。6x 10<sup>5</sup>個のVero9013細胞を感染1日前に6穴プレートに撻き、2%FBSを含んだ

EMEM培地で段階希釈した加圧処理ウイルス溶液、及び非加圧ウイルス溶液を細胞に添加した。37°Cで1時間CO<sub>2</sub>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、ブランクの数を計測して感染価を求めた。

##### (3) 仮性狂犬病ウイルス

仮性狂犬病ウイルスは市販されている弱毒生ワクチン(ベゴニア株)を用いた。

感受性のあるVero細胞とネコ腎細胞由来のCRFK細胞を用いて感染価を測定した。感染1日前に96穴プレートに3x10<sup>4</sup>/wellの細胞を蒔いた。ウイルス溶液は10倍ずつの段階希釈を行ない、10の各々独立した希釈系列を作製し、100μLずつ細胞に添加した。感染4日目にCPEの有無を観察し、Reed-Munchの計算式に従って各検体のTCID<sub>50</sub>を求めた。(4) 高圧処理によって不活化されなかったウイルスの高圧耐性の検討

3300気圧と4000気圧で処理した仮性狂犬病ウイルスによってCPEが認められたウエルから培養上清を100μL採り、ネコ腎細胞CRFKを用いて増やした。3日後にフラスコ中の細胞がCPEを起こしたことを確認後、上清を遠心し、1mLずつ分注し-80°Cで保存した。これらの上清を5%アルブミン製剤に10%容量となるように添加し、各3000気圧、3300気圧、4000気圧



の高圧処理を行ない、不活化効率を解析した。

#### 5. 高圧による不活化効率増強法の検討

ウイルスは陰性に荷電していることから陽性に荷電している生体物質を検索し、 $\alpha$ -ディフェンシン 1、2、3、5、 $\beta$ -ディフェンシン 1、3、4、について検討した。仮性狂犬病ウイルスを含む 5%アルブミンに最終濃度 5 $\mu$ g/mL になるようにディフェンシンを添加、1 時間の室温での反応後、2500、3000、2500、3000、3300 気圧による高圧処理を行ない感染価に与える影響を解析した。

また、タンパクを 50mg/mL 含有する溶液を中性と酸性に調整後、仮性狂犬病ウイルスを添加し 2500、3000 気圧で高圧処理した。

#### 6. B 型肝炎ウイルスの不活化法の検討

ヒト肝ガン由来の細胞株に B 型肝炎ウイルス (HBV) 陽性血漿を添加し、スフェロイド (spheroid) を形成させた。血漿添加 1 日後に培養液にて洗浄し、添加した HBV をできるだけ除去した。2 回/週の頻度で培養液を交換し、経時的に HBs 抗原と培養液中の HBV-DNA を半定量的に測定した。

### C. 研究結果

#### 1. 低温高圧処理によるウイルス不活化

エンベロープを有する JEV は低温高圧処理には抵抗性を示し、不活化効果が室温に比べて減弱した。一方、エンベロープのない B19 は低温高圧処理でも不活化され、室

温高圧処理とほぼ同程度の不活化効果が得られた。

#### 2. 低温高圧処理による凝固因子活性への影響

3000 気圧の室温加圧処理をした血漿の第 8 因子活性は 30%にまで低下していたが、低温加圧処理においては、59%の活性を維持していた。第 9 因子、フィブリノゲン、アンチトロンピン III の活性は、加圧処理に対して耐性が強く、3000 気圧でも活性を十分に維持できることが明らかとなった。

#### 3. 低温高圧処理による第 8 因子製剤活性に与える影響

血漿中の第 8 因子活性は室温高圧処理では失活したが、低温で加圧することによって失活を抑制することができた。市販されている第 8 因子製剤を用いて同様の解析を行なった。第 8 因子製剤には vWF を含む製剤と含まない製剤がある。どちらの製剤も低温処理の方がより活性が保たれたが、3000 気圧の高圧処理では vWF を含む製剤は血漿に類似した活性を示した。一方、含まない製剤は vWF を含む製剤よりも高圧処理に抵抗性を示し、4°Cでは 25%程度活性が低下しただけであった。高圧処理によって第 8 因子と vWF 間の結合にダメージを与えるために活性が低下する可能性が示唆された。

#### 4. 低温高圧処理が他の凝固因子の活性に与える影響

血漿を 3000 気圧の低温高圧処理し、第 7、11、13 因子、vWF、プラスミノゲン、

プロテイン C、プロテイン S の活性を解析した。13 因子の活性が著しく低下した他 VWF 活性も 15% 低下したが、その他の因子の活性は保たれた。

#### 5. 高圧処理による仮性狂犬病ウイルスの不活化効率の検討

2500 気圧では優位な不活化は認められなかったが、3000 気圧と 3300 気圧では約 4Log、4000 気圧では原液を感染させたウエル 1 個から CPE が見られた。これまで検討してきたエンベロープを有するウイルスと同様に 3000 気圧の高圧処理によって有効な不活化効率が得られた。

#### 6. 高圧処理によって不活化されなかったウイルスの高圧耐性の検討

3300 気圧と 4000 気圧の高圧処理によって不活化されなかったウイルスを増殖させ、再度高圧処理し、最初の高圧処理によって不活化されなかったウイルスが圧耐性であったか検討した。3000 気圧と 3300 気圧で高圧処理したところ、コントロール、3300 気圧及び 4000 気圧に耐性を示したウイルスは、各々約 4Log 不活化され、ウイルス間で不活化効率の差は認められなかった。

#### 7. 高圧による不活化効率増強法の検討

各種ディフェンシンの添加では著明な高圧処理による不活化効率の増強は認められなかった。一方、pH3 に調整した検体では 2500 気圧処理によって全く CPE が消失し、少なくとも 5Log 以上の不活化効果が得られた。

#### 8. B 型肝炎ウイルスの不活化法の検討

spheroid を形成した肝がん細胞株は長期間培養可能であった。添加した血漿由来の HBs 抗原が当初認められ、感染後 6 週間後で感度以下になった。培養を続けたところ 10 週間から再度陽性になった。また、培養液中の HBV-DNA も同様にいったん減少したが、感染 10 週では 1000 倍に希釈しても陽性となった。

#### 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。高圧処理装置に循環型の冷却装置を結合させることによって 4°C の温度を保ったまま高圧処理が可能になった。第 8 因子の活性は低温高圧処理によって 59% の活性が保てるように改善した。vWF を含む製剤の方が高圧処理によって失活され易いことが明らかとなった。また、第 7、9、11 の各因子、フィブリノゲン、ATIII、vWF、プラスミノゲン、プロテイン C、プロテイン S は 3000 気圧の高圧をかけても活性は保たれた。しかし、第 13 因子は著明に失活し、低温高圧処理においても活性を維持できなかった。第 8 因子と第 13 因子の活性を保てるような工夫がさらに必要であることが明らかとなった。一方、低温にすることによってウイルスも安定化する可能性がある。そこで B19 と日本脳炎ウイルスを検討したところ、B19 は温度の影響は認められなかったが、日本脳炎



ウイルスは低温下の高圧処理では安定化し不活化効果は減少した。ウイルスの不活化効率を考慮すると室温での加圧が必要であり、温度以外の方法で凝固因子活性を保つ方法を見いだすことが必要である。

また、これまでエンベロープ陽性の DNA ウイルスに対する高圧処理による不活化の評価がなされていなかったため仮性狂犬病ウイルスを用いて評価を行った。仮性狂犬病ウイルスは HBV のモデルウイルスとして血漿分画製剤のウイルスバリデーション試験の評価に広く用いられている。これまで我々が検討してきたエンベロープ陽性のウイルスと同様に 3000 気圧の高圧処理によって 4Log 不活化できた。また、3300 気圧と 4000 気圧の高圧処理によって極少量のウイルスが抵抗性を示し、感染性を示した。圧抵抗性のウイルスが選択されたのかを確認するためにこれらのウイルスを増殖させ、再度高圧処理による不活化の評価を行なった。増殖したウイルスはコントロールのウイルスと同等に不活化され、圧抵抗性でないことが示された。これは高圧処理によって不活化されないウイルスは遺伝的に圧に抵抗性を有していないことが示唆された。

これまでの結果から高圧処理による不活化法では、有効な不活化効率を得るために 3000 気圧が必要である。4°Cでの高圧処理によって第 8 因子と第 13 因子以外の活性は保たれたがウイルスによってはウイルスも安定化してしまう危険性もある。また、

この圧では、赤血球は溶血を生じてしまい赤血球製剤には応用できない。我々は、輸血用血液製剤を含めた広範な製剤に応用するために高圧処理の「増強法」を検索し、これらの因子や細胞に影響を及ぼさない圧によっても有効な病原体の不活化効率を得られ方法を求めてきた。これまで低温での高圧処理やディフェンシン処理などを検討したが飛躍的な不活化効率の向上は得られなかった。今回、pH を低下させた条件で高圧処理を行なったところ、3000 気圧だけでなく 2500 気圧においても仮性狂犬病ウイルスの感染性は全く認められなかった。処理前に  $4.9 \times 10^5$ /mL あった感染価が 1mL 当たり 0 にまで不活化された。アルブミンや pH7 では 3300 気圧においても数百の感染価が残存することから不活化効率は大幅に向上したと考えられる。酸性条件では果たして血液製剤に応用できるのか疑問もあるが、既にグロブリン製剤では pH4 前後の酸性を呈する製剤が市販されている。また、高圧処理後速やかに中性に戻すことや効果があるクリティカルな pH の値を見つけることによって凝固因子や赤血球などへの影響の少ない不活化法の開発が可能になると考えている。

#### E. 結論

高圧処理は、エンベロープ陽性の DNA ウイルスに対しても効果的な不活化法であった。また、酸性条件で高圧処理を行なうことによって不活化効率が向上し、これま

で効果が期待できなかった低圧においてもウイルスの不活化が可能であった。また、4°Cでの高圧処理によって第7、9、11因子、vWF、フィブリノゲン、ATIII、プラスミノーゲン、プロテインC、プロテインSの活性は維持された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) N. Shimazaki, T. Kiyohara, A. Totsuka, K. Nozima, Y. Okada et al: Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains. *Vox Sanguinis* 96:14-19. 2009

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：血小板製剤の病原体不活化、第15回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、大阪、2008年

2) 岡田義昭：血液製剤の現状と今後の課題、第22回エイズ学会ランチョンセミナー、大阪、2008年

3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE由来プリオンのin vitro感染系の確立とその応用(第2報)、プリオンシンポジウム2008、

新得(北海道)、2008年

4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、野島 清子、山口一成：BSE由来プリオンのin vitro感染系の確立と培養上清中における存在様式の解析、第56回日本ウイルス学会、岡山、2008年

5) 野島 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56回日本ウイルス学会、岡山、2008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

血漿分画製剤の高圧処理による病原体の不活化評価及び

不活化評価法の開発

研究代表者 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

輸血用血液を含めた血液製剤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化されている高圧処理法の応用を検討した。今年度は B 型肝炎ウイルス (HBV) のモデルウイルスとして広く使用されている仮性狂犬病ウイルス (別名オーエスキーク病ウイルス) に対する不活化効率を解析した。他のエンベロープ陽性のウイルスと同様に 3000 気圧の高圧処理によって約 4Log の不活化が見られた。また、高圧処理に抵抗性を示した仮性狂犬病ウイルスを再度高圧処理したところ、不活化効率に差がなく、抵抗性のウイルスが選択されたのではないことが明らかになった。また、凝固因子等の高圧処理による失活を防ぐために、低圧でも有効な不活化効率を得られる「増強法」を検討したところ、酸性条件下に高圧処理を行なうことによって著しい不活化効果の増強が認められた。中性では不活化が全く認められなかった圧力において、5Log 以上の不活化が認められた。酸性を呈する血液製剤は既に市販されており、詳細に不活化条件を検討することによって輸血用血液を含めた血液製剤の新しい病原体不活化法になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

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、様々な病原体が混入する可能性がある。そのため、安全対策として問診や各種の病原体に対するスクリーニング検査が導入され、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に混入する危険性がある。これらの全ての病原体に対してスクリーニング検査を導入することは実質不可能である。また、スクリーニング検査には検出限界があり、感染早期、変異体、遺伝子型の違い等によって検査をすり抜けることもある。これらから血液製剤の安全性を確保するためには病原体を不活化する技術を開発することが必要である。血漿分画製剤では、過去において凝固因子製剤からの HIV や HCV の感染が生じたが、病原体



の除去・不活化法の開発によって感染をなくすことに成功し、最近では製剤が原因の感染症の報告はない。一方、輸血用血液では、血小板製剤や新鮮凍結血漿への病原体不活化法は安全性への危惧や経済性から一部の国や地域で導入されているにすぎない。また、最も重要な赤血球製剤への不活化法はいまだ実用化されていない。我々は、輸血用血液を含めた血液製剤の安全性を向上させるために新しい病原体の不活化技術の開発を目指し、食品の無菌化工程で実用化されている高圧処理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。今年度はエンベロープ陽性の DNA ウイルスに対する不活化が検討されていなかったため、HBV のモデルウイルスとして広く用いられている仮性狂犬病ウイルスに対する不活化効率を検討した。

さらに、高圧処理による不活化効率を向上させるためにディフェンシンの添加や pH を変えて高圧処理を行ない効率の良い方法を検索した。

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、ヒト肝癌細胞株でスフェロイドを形成させ、B 型肝炎ウイルスに対する感受性を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 仮性狂犬病ウイルスの感染価測定

感受性のある Vero 細胞とネコ腎細胞由来の CRFK 細胞を用いて感染価を測定した。感染 1 日前に 96 穴プレートに  $100 \mu\text{L}$  ずつ  $3 \times 10^4$ /well の細胞を蒔いた。ウイルスは 10 倍ずつの段階希釈を行ない、10 の各々独立した希釈系列を作製し、 $100 \mu\text{L}$  ずつ細胞に添加した。感染 4 日目に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID<sub>50</sub> を求めた。なお、仮性狂犬病ウイルスは市販されている弱毒生ワクチン（ペゴニア株）を用いた。

### 2. 高圧処理による仮性狂犬病ウイルスの不活化効率の検討

仮性狂犬病ウイルスを 5% アルブミンに 10% 容量になるように添加し、検体とした。高圧処理の条件は室温 (20°C 前後) 下に、1 分間設定した圧で加圧後、急速に 1 気圧へ減圧した。これを 1 サイクルとして 3 回繰り返した。2500、3000、3300、4000 気圧で各々の検体を加圧処理し、加圧していない検体と感染価を比較した。

### 3. 高圧処理によって不活化されなかったウイルスの高圧耐性の検討

3300 気圧と 4000 気圧で処理した仮性狂犬病ウイルスによって CPE が認められたウエルから培養上清を  $100 \mu\text{L}$  採り、ネコ腎細胞 CRFK を用いてウイルスを増やした。3 日後にフラスコ中の細胞が CPE を起こしたことを確認後、ウイルスを回収し、1 mL ずつ分注し -80°C で保存した。これらのウイルスを 5% アルブミン製剤に 10% 容量となるように添加し、3000 気圧、3300 気圧、4000

気圧の高圧処理し、不活化効率の変化を解析した。

#### 4. 高圧処理における不活化効率増強法の検討

高圧処理によって多くのウイルスは3000気圧で不活化されるが、血液に含まれる凝固因子等への影響を少なくするために高圧処理によるウイルス不活化効率を増強する物質の検索を行なった。ウイルスは陰性に荷電していることから陽性に荷電している生体物質を検索した。 $\alpha$ -ディフェンシン1、2、3、5、及び $\beta$ -ディフェンシン1、3、4を検討した。最終濃度 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ になるようにウイルス液に添加、1時間の室温での反応後、2500、3000、3300気圧による高圧処理を行ない感染価に与える影響を解析した。

また、タンパクを $50\text{mg}/\text{mL}$ 含有する溶液のpHを酸性に調整後、仮性狂犬病ウイルスを添加した。2500、3000気圧で高圧処理し、5%アルブミン溶液、中性溶液、酸性溶液についてウイルス不活化効率を検討した。

#### 5. B型肝炎ウイルスの不活化法の検討

ヒト肝ガン由来の細胞株にB型肝炎ウイルス(HBV)陽性血漿を添加し、スフェロイド(spheroid)を形成させた。血漿添加1日後に培養液にて洗浄し、添加したHBVをできるだけ除去した。2回/週の頻度で培養液を交換し、経時的にHBs抗原と培養液中のHBV-DNAを半定量的に測定した。

### C. 研究結果

#### 1. 高圧処理による仮性狂犬病ウイルスの不活化効率の検討

3000気圧では約4Log、3300気圧では約4Logの不活化が認められた。4000気圧では原液を感染させたウエル1個からのみCPEが見られた。これまで実施してきたエンベロープを有するウイルスと同様に高圧処理によって感受性があることがわかった(図1)。

#### 2. 高圧処理によって不活化されなかったウイルスの圧耐性の検討

3300気圧と4000気圧の高圧処理によって不活化されなかったウイルスを増殖させ、再度高圧処理し、最初の高圧処理によって不活化されなかったウイルスが圧耐性であったか検討した。3000気圧と3300気圧で高圧処理したところ、コントロール(非加圧処理由来のウイルス)、3300気圧及び4000気圧に耐性を示したウイルスは、約4Log不活化され、ウイルス間で著明な差は認められなかった(図2)。

#### 3. 高圧による不活化効率増強法の検討

各種ディフェンシンの添加では著明は高圧処理による不活化効率の増強は認められなかった。一方、アルブミン溶液や中性では不活化効果が認められなかった2500気圧において、酸性に調整した検体では少なくとも5Log以上の不活化が得られ、著明に高圧処理の効果が増強した。(図3)。

#### 4. B型肝炎ウイルスの不活化法の検討

spheroidを形成した肝ガン細胞株は長期間培養可能であった。添加した血漿由来



の HBs 抗原が当初認められ、感染後 6 週前後で感度以下になった。培養を続けたところ 10 週頃から再度陽性になった。また、培養液中の HBV-DNA も同様にいったん減少したが、感染 10 週では X1000 に希釈しても陽性となった。

#### D. 考察

血液製剤における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。今年度はエンベロープ陽性の DNA ウイルスに対する高圧処理による不活化効果の評価を行った。仮性狂犬病ウイルスは HBV のモデルウイルスとして血漿分画製剤のウイルスバリデーション試験に広く用いられている。これまで我々が検討してきたエンベロープ陽性のウイルスと同様に 3000 気圧の高圧処理によって 4Log 不活化できた。また、3300 気圧と 4000 気圧の高圧処理によって極少量のウイルスが抵抗性を示し、感染性を示した。不活化されなかったウイルスが、圧抵抗性であるかどうかを確認するためにこれらのウイルスを増殖させ、再度高圧処理による評価を行なった。増殖したウイルスはコントロールのウイルスを高圧処理した場合と同等に不活化され、圧抵抗性でないことが示された。これは高圧処理によって不活化されないウイルスは遺伝的に圧に抵抗性を有していないことが示唆された。

これまでの高圧処理による不活化法では、

有効な不活化効率を得るために 3000 気圧が必要であった。この圧では、第 8 因子の活性は低下し、赤血球では溶血を生じ、不活化法としては応用できない。我々は、輸血用血液製剤を含めた広範な製剤に応用するために高圧処理の「増強法」を検索し、これらの因子や細胞に影響を及ぼさない圧によっても有効な病原体の不活化効率を得られ方法を求めていた。これまで低温での高圧処理やディフェンシン処理などを検討したが飛躍的な不活化効率の向上は得られなかった。今回、pH を低下させた条件で高圧処理を行なったところ、3000 気圧だけでなく 2500 気圧においても仮性狂犬病ウイルスの感染性は全く認められなかった。処理前に  $4.9 \times 10^5$ /mL あった感染価が 1mL 当たり 0 にまで不活化された。アルブミンや pH7 では 3300 気圧においても数百の感染価が残存することから不活化率は大幅に向上したと考えられる。酸性条件では果たして血液製剤に応用できるのか疑問もあるが、既にグロブリン製剤では pH4 前後の酸性を呈する製剤が市販されている。また、高圧処理後速やかに中性に戻すことや効果があるクリティカルな pH の値を見つけることによって凝固因子や赤血球などへの影響の少ない不活化法の開発を進める予定である。

#### E. 結論

高圧処理は、エンベロープ陽性の DNA ウイルスに対しても効果的な不活化法であった。また、酸性条件で高圧処理を行なうこ



とによって不活化効率が増強し、効果が期待できなかった圧においてもウイルスの不活化が可能になった。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) N. Shimazaki, T. Kiyohara, A. Totsuka, K. Nozima, Y. Okada et. al: Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains. *Vox Sanguinis* 96.14-19.2009

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：血小板製剤の病原体不活化、第15回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、大阪、2008年

2) 岡田義昭：血液製剤の現状と今後の課題、第22回エイズ学会ランチョンセミナー、大阪、2008年

3) 岡田 義昭、水沢 左衛子：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立とその応用（第2報）、プリオンシンポジウム2008、新得（北海道）、2008年

4) 岡田 義昭、水沢 左衛子、野島 清子、山口一成：BSE由来プリオンの *in vitro* 感染系の確立と培養上清中における存在様式の解析、第56回日本ウイルス学会、岡山、

2008年

5) 野島 清子、岡田 義昭、水沢 左衛子、嶋崎 典子、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56回日本ウイルス学会、岡山、2008年

図1-高圧処理による仮性狂犬病ウイルスの不活化

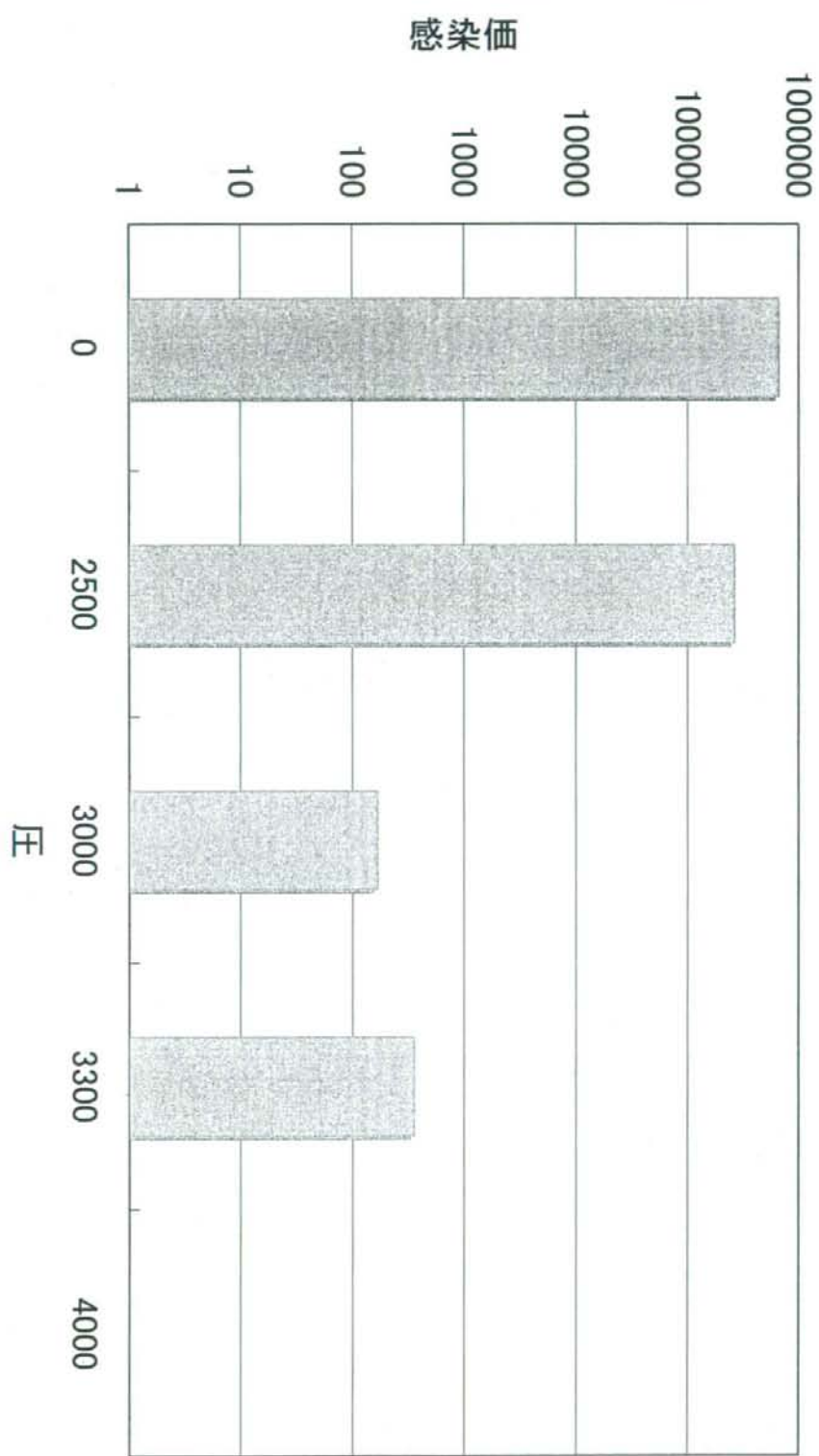


図2-圧耐性を示したウイルスに対する高圧処理による不活化

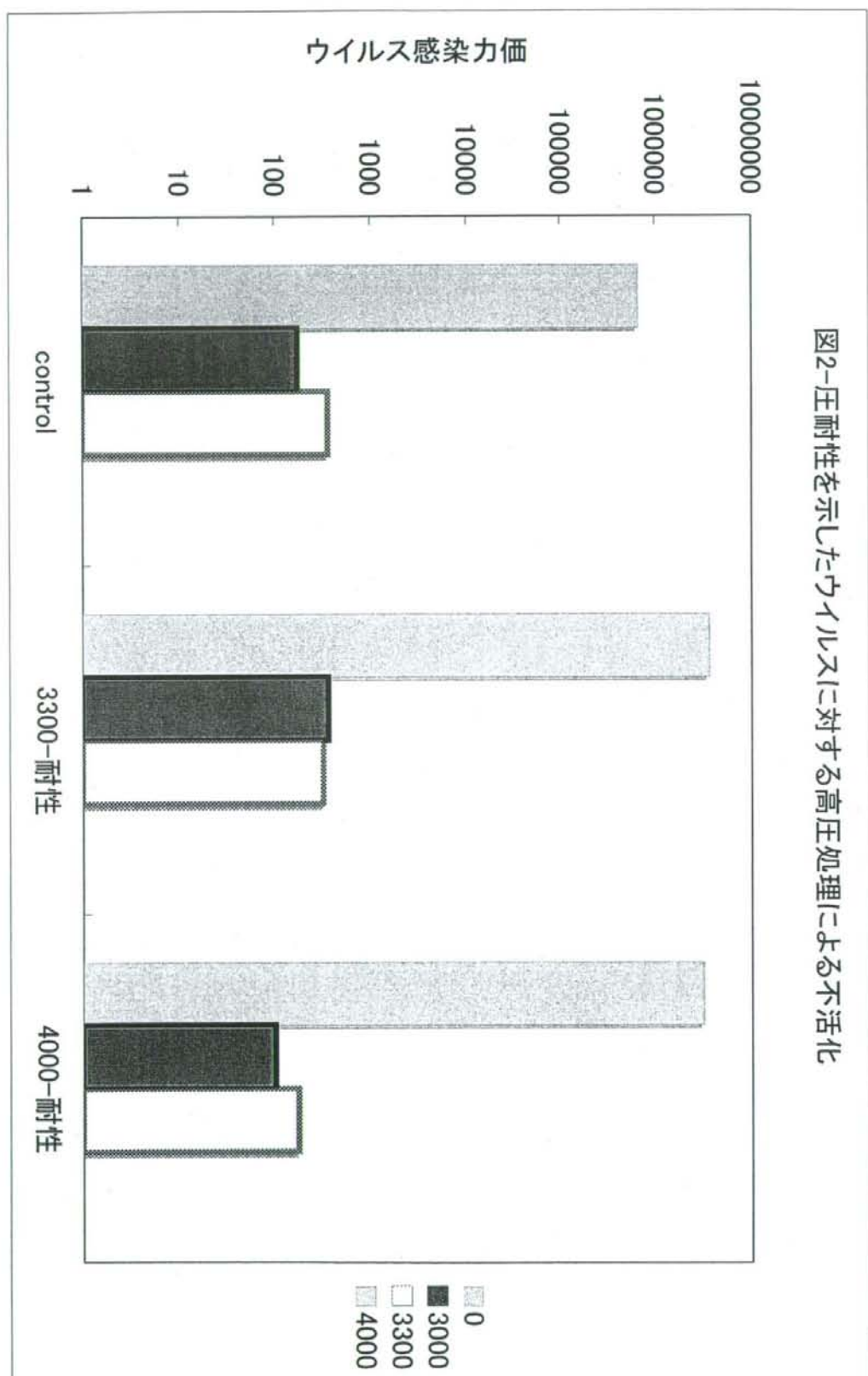
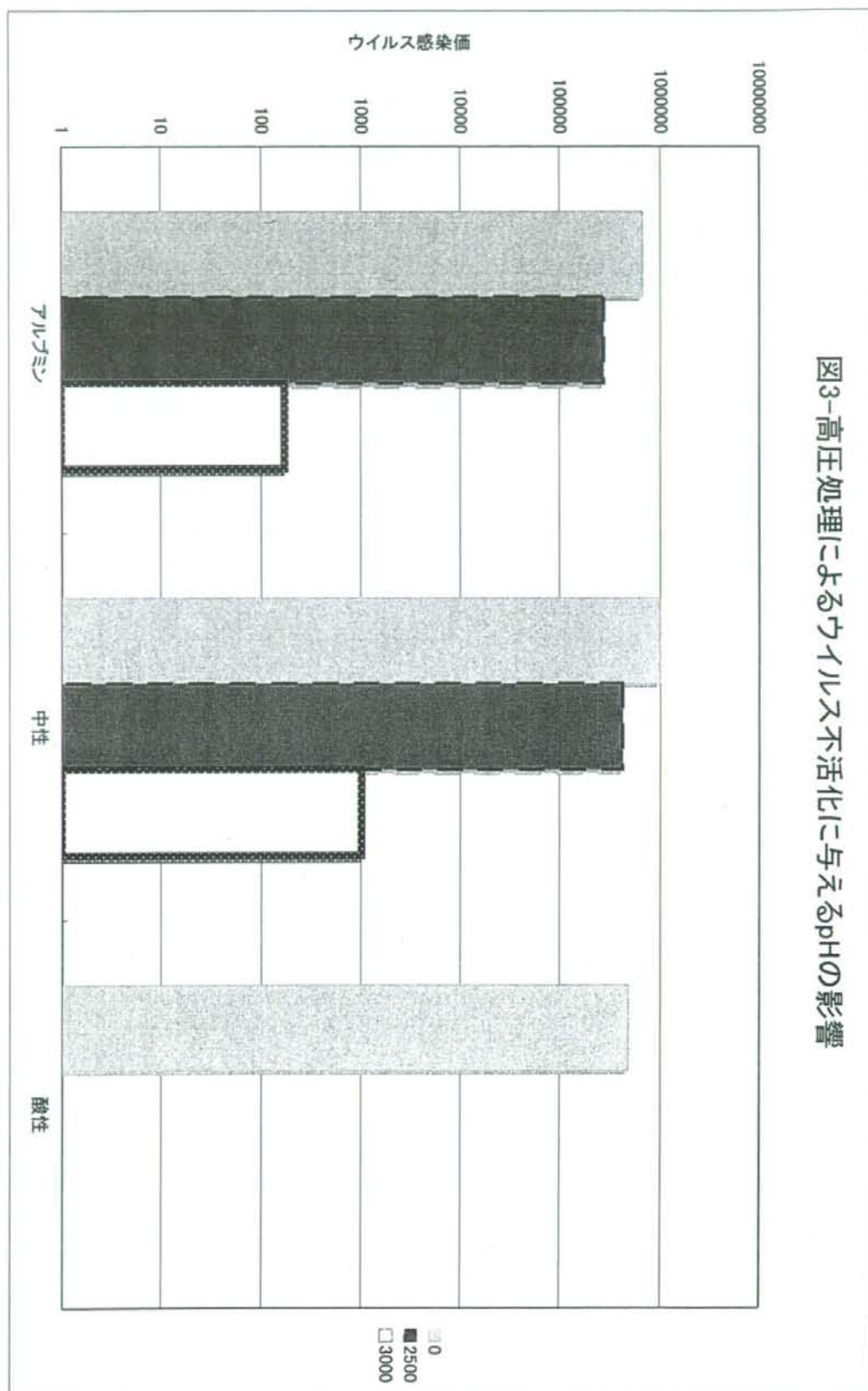




図3-高圧処理によるウイルス不活化に与えるpHの影響



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：高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

本年度は 300MPa 低温加圧によるヒトパルボウイルス B19、日本脳炎ウイルス JEV の不活化効果を検討した。B19 は室温加圧処理と同様に十分な不活化効果が認められたが、JEV ウイルスの不活化効果は室温加圧処理と比較して著しく低下することが確認された。また、低温加圧処理をした時の血漿の機能維持を検討するために、新鮮凍結血漿中の凝固因子活性を詳細に検討した。第 8 因子の活性低下の抑制が再度確認され、第 9 因子、フィブリノゲン、ATIII、第 7 因子、第 11 因子、フォンビルブランド因子、プラスミノゲン、プロテイン C、プロテイン S の活性が維持されることが明らかとなった。また第 13 因子活性は 300MPa 低温加圧処理により著しく低下していた。

これらの結果より、低温条件下での加圧処理による不活化法は、B19 の不活化には有効であり血漿の機能を維持することができるが、しかし、エンベロープを有する日本脳炎ウイルスの不活化効果が低く、JEV 以外のエンベロープウイルスに対しても効果が期待出来ない可能性が考えられる。加圧処理時の温度は 4 度よりも室温の方が、より確実な不活化効果が期待される。今後は製剤としての機能を効率良く維持することができる添加剤、安定剤等の開発が必須である。

### 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。現在利用可能な不活化法としては、ソラレン、メチレンブルー、リボフラビン等を添加して不活化処

理を行う方法があるが、十分な安全性が未だ確認されておらず、日本でつくられている成分製剤（血小板製剤、新鮮凍結血漿、濃厚赤血球製剤）の製造工程においては、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を有効に不活化できること、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、そして実際に製造工程中への導入が可能であること、が重要である。一方で、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、アンチトロンピンⅢ、アルブミン）の製造においては、複数の除去・不活化の工程を経て製剤が製造されているため、これら製剤の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、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す。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、高濃度に汚染された、たった1人の供血者由来の病原体が血漿プール全体を汚染してしまう可能性がある。よって、血漿分画製剤の製造工程にも導入可能で、エンベロープのないウイルスに特に有効な除去・不活化法が開発されれば、エンベロープのないウイルスに対してもより高いセ

イフティーマージンを確保でき、安全性のさらなる向上が期待できる。

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、ジャムなどの多くの食品に応用され、食品の無菌化だけでなく、同時に食品本来が持つ風味、食品中の機能性タンパクの維持にも貢献している。我々はこれらの技術により、血液製剤を汚染する病原体を不活化し、かつ製剤本来の持つ機能を維持することが可能であると考え、血液製剤の不活化への応用を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 低温での高圧処理

加圧装置に循環型冷却装置を付加し、冷却条件下で不凍液を循環させ、装置内を低温4°C~5°Cに保てるように機器を改良した。

### 2. 高圧処理法

新鮮凍結血漿を超遠心チューブへ入れ、空気が入らないように注意して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。ヒトパルボウイルスB19、および日本脳炎ウイルスJEVは5%アルブミン製剤に10%容量となるように加え、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、同様にシーリングし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4°C~5°Cで行った。この装