

200838043B

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～平成 20 年度 総合研究報告書

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～平成 20 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

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 8

研究代表者 岡田 義昭

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

P 9

III. 研究成果の刊行物・別刷

P 10 - P16

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)
総合研究報告書

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 3000 気圧の高圧処理によって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。また、製剤ではフォンビルブラント因子（以下 vWF）を含まないものの方が失活し難い傾向があった。
2. 3000 気圧の 4°C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、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。なお、第 9 因子、フィブリノゲン、ATIII は室温での 3000 気圧の高圧処理においても安定であった。
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 4°Cでの高圧処理では凝固因子と同様に安定化し、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ことが明らかとなった。
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 RNA ウィルスと同様に約 4Log 不活化できた。
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

血漿分画製剤は、問診、ウィ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ィ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

A.研究目的

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。我々は、効果的なウイルス不活化が可能で、各種凝固因子や赤血球への影響の少ない不活化法の開発を目指している。この2年間で高圧処理によって広範なウイルスに対して不活化が可能であることや加圧する温度によって凝固因子への影響が異なることを明らかにしてきた。また、不活化効果を高め、より低い圧で効果的なウイルス不活化が可能なる高圧処理効果の「増強法」の検討も行った。残念ながらすぐ実用化には至らなかったが、「増強法」につながる成果を得ることができた。凝固因子等に与える影響の解析はこれからだが、更なる解析を進めることによって輸血用血液にも応用可能な病原体の不活化法となる可能性

が得られた。

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、日本脳炎ウイルス JEV、仮性狂犬病ウイルス（ペゴニア株）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遠心チューブへ入れ、同様にシーリングすることに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、低温条件下での操作は 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で保存した。

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 (以下、ATIII) 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.高圧処理によるグロブリン製剤への影響

グロブリン製剤は室温で高圧処理し、生物学的製剤基準に従い凝集物は高速液体クロマトグラフィーを用いて測定し、抗補体価は、感作ヒツジ血球と乾燥モルモット補体を用いて Mayer 法により測定した。

5.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 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 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。

(3) 低温高圧処理によるウイルス不活化効率の影響

B19と日本脳炎ウイルスは各々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で高圧処理を行ない、各々の温度における不活化効果を解析した。

(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。高圧処理では、室温で 3000 気圧の加圧を行ない、液状加熱では 60°C、10 時間の加熱処理を実施し、各々の不活化効率を比較検討した。

(5) 仮性狂犬病ウイルス

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 μ L ずつ 3×10^4 /well の細胞を蒔いた。検体は 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 μ 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 TCID₅₀ 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（ベゴニア株）を用いた。

(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 μ L 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、ウイルスを集め、1 mL ずつ分注して -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。

6. 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、 α -ディフェンシン 1、2、3、5、 β -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 μ 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、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 mg/mL 含有する溶液の pH を中性と酸性に調整後、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、酸性溶液におけるウイルス不活化効率を検討した。

7. 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

2. 高圧処理による凝固因子活性への影響

室温で新鮮凍結血漿を 3000 気圧で高圧処理を行なったところ、内因性凝固因子活性の指標である APTT が 60 秒も延長し、凝固因子活性の著しい低下が観察された。しかし、4°C の低温高圧処理では APTT や PT の凝固時間の延長が抑制された。第 8 因

子の活性を解析すると室温での高圧処理ではコントロールの30%まで低下したが、4°Cでは約60%の活性を維持することができた。さらに血漿ではなく市販されている第8因子製剤を用いて同様な検討を行った。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、vWFを含まない製剤は含む製剤よりも失活し難い傾向があり、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ことが示唆された。また、血漿を4°Cで3000気圧の低温高圧処理したところ、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の活性は維持できたが、第13因子の活性が著しく低下し、4°Cでも維持できなかった。なお、第9因子、フィブリノゲン、ATIIIの活性は、室温で3000気圧の高圧処理を行っても活性を十分に維持できることが明らかとなった。

4. 高圧処理によるグロブリン製剤への影響

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。3600気圧の高圧処理から抗補体価の上昇がはじまり、4000気圧では生物学的製剤基準で規定されている抗補体価を超えた。

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は低温高圧処理に対して抵抗性を示し、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。

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気圧では有意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の不活化効果が確認された。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、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。

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 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。この 2 年間で血漿分画製剤におけるウイルス不活化のガイドラインに記載されているエンベロープを持つ

DNA ウイルス (仮性狂犬病ウイルス)、RNA ウイルス (日本脳炎ウイルス)、エンベロープを持たない DNA ウイルス (B19)、RNA ウイルス (A 型肝炎ウイルス) について高圧処理による不活化効率を解析してきた。A 型肝炎ウイルスを不活化するためには 4000 気圧を超える圧が必要であったが、その他のウイルスは 3000 気圧で約 4Log 不活化されることを明らかにした。一方、血漿を室温で 3000 気圧の高圧処理を行なうと APTT の延長が認められ、第 8 因子の活性が 30% になるなど凝固因子の失活が

生じた。そこで 4°C の低温で 3000 気圧の高圧処理を行なったところ 59% の活性が保てるように改善した。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 等の活性も保たれた。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、低温高圧処理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。実用化を考えた場合、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、高圧処理によって不活化されずに生き残ったウイルスは遺伝的に圧耐性になるのだろうか？そこで仮性狂犬病ウイルスを 3300 気圧と 4000 気圧の高圧処理した場合に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「増強剤」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 4.9×10^5 /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前後を呈する製剤が市販されている。また、加圧時に酸性にする必要があるだけで、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低圧での病原体不活化法の開発が可能になると考えている。

E. 結論

高圧処理は幅広いウイルスを不活化でき、血液製剤の新しい不活化法に発展する可能性がある。しかし、単に高圧をかけるだけではウイルスは不活化できても血液製剤の機能を低下させる欠点があった。酸性条件で高圧処理を行なうことによってこれらの欠点を克服できる可能性が出てきた。

F. 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) 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

2) 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

3) 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

4) 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

5) 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

6) 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の存在様式、第 56 回日本ウイルス学会、岡山、2008 年

7) 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

G. 知的所有権の取得状況

なし

III.研究成果の刊行に関する一覧表

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
なし							

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
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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains

N. Shimasaki,^{1,2} T. Kiyohara,¹ A. Totsuka,¹ K. Nojima,³ Y. Okada,³ K. Yamaguchi,³ J. Kajioaka,⁴ T. Wakita¹ & T. Yoneyama¹

¹Department of Virology II, ²Division of Biosafety Control and Research, ³Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen, Musashimurayama, Tokyo, Japan

⁴Kitasato Research Center for Environmental Sciences, Kitasato, Sagami-hara, Japan

Vox Sanguinis

Background and Objectives Hepatitis A virus (HAV) transmission via contaminated blood products has been reported. Cell-adapted HAV strains are generally used to confirm virus inactivation in manufacturing blood products, but the strains may differ in their sensitivity to inactivation treatment. To select an appropriate cell-adapted HAV strain for virus validation, we compared the inactivation efficiency among four strains under two different physical inactivation treatments: heat and high hydrostatic pressure.

Materials and Methods The cell-adapted HAV strains used here were KRM238, KRM003 (subgenotype IIIB), KRM031 (IA), and TKM005 (IB). The strains were treated at 60°C for up to 10 h or under high hydrostatic pressure (up to 420 MPa). The reduction in HAV infectivity was measured by an immunofocus-staining method.

Results The heat treatment at 60°C for 10 h reduced HAV infectivity in the range of 3 to 5 log₁₀ among the strains; KRM238 and TKM005 were harder to inactivate than the other two. The high hydrostatic pressure treatment at 420 MPa also reduced infectivity in the range of 3 to 5 log₁₀ among the strains, and KRM031 was easier to inactivate than the other strains.

Conclusion Heat treatment and high hydrostatic pressure treatment revealed differences in inactivation efficiencies among cell-adapted HAV strains, and each strain reacted differently depending on the treatment. KRM238 may be the best candidate for virus validation to ensure the safety of blood products against viral contamination, as it is harder to inactivate and it replicates better in cell culture than the other strains.

Key words: heat inactivation, hepatitis A virus, high hydrostatic pressure inactivation, variation among strains, virus validation.

Received: 2 May 2008,
revised 19 September 2008,
accepted 20 September 2008,
published online 2 November 2008

Introduction

Hepatitis A virus (HAV), which is responsible for acute viral hepatitis, is transmitted primarily by the fecal-oral route,

either through the ingestion of contaminated food or water or through person-to-person contact [1,2]. On the other hand, parenteral HAV transmission has also been reported via contaminated blood [3] or blood products [4,5]. Moreover, *in vivo* HAV infection via blood reportedly has a much higher HAV infection efficiency than does oral HAV infection [6]. In developed countries such as Japan, HAV infections have become less common, owing to improved hygiene resulting from the maintenance of water and sewage facilities. Infections in early childhood are relatively rare, and thus the majority

Correspondence: Noriko Shimasaki, Division of Biosafety Control and Research, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1, Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan
E-mail: shima@nih.go.jp

Table 1 Characteristics of HAV strains used

Strain	Subgenotype	Source	Year of recovery	Number of passages on African green monkey kidney cells	Titre of stock virus (FFU/ml)	Reference	Accession no.
KRM238	IIIB	Outbreak	1977	59	1.5×10^8	[21]	AB300205
KRM003	IIIB	Sporadic	1979	72	1.5×10^8	[15,18]	AB425339
KRM031	IA	Outbreak	1977	47	1.5×10^8	[15]	AB300206
TKM005	IB	Travel-associated	1981	48	0.5×10^8	[15]	AB300207

of adults remain susceptible to infection, because they lack the immunity to HAV [7]. As this could potentially facilitate massive outbreaks of hepatitis A in the general population, treatment to inactivate HAV in blood and blood products should be improved.

Previous results have demonstrated that, because HAV is a non-enveloped virus, it is quite resistant against chemical inactivation approaches, such as solvent/detergent treatments used in the preparation of blood products [8]. HAV can be inactivated however by pasteurization [9], γ -irradiation [10], and short wavelength ultraviolet light irradiation [11].

Because environmental HAV strains that have just isolated from human generally grow poorly in cell culture, cell-adapted HAV strains are generally used to test virus inactivation. As extensive genetic variation is found among cell-adapted strains [12], the strains may differ in their sensitivity to inactivation treatments. But no studies have considered the variation among cell-adapted HAV strains in testing the efficiency of inactivation treatments.

HAV strains recovered from different parts of the world have been classified into six genotypes (I–VI). Genotypes I, II and III are found in humans, and each of them is further divided into subgenotypes A and B. Most human HAV strains belong to genotypes I and III [13–15]. Subgenotype IA appears to be the predominant virus of hepatitis A cases worldwide, whereas subgenotypes IB and IIIA have been found in Scandinavia and in the Mediterranean region [16,17]. Subgenotype IIIB is unique to Japan [15,18].

To select an appropriate HAV laboratory strain for use in virus validation, we compared the rates of inactivation efficiency among cell-adapted HAV strains by using two different physical inactivation treatments – heat treatment at 60°C and high hydrostatic pressure treatment – among four cell-adapted HAV strains belonging to three subgenotypes. Heat treatment was used as a conventional inactivation treatment for blood products. High hydrostatic pressure treatment is a promising new virus-inactivating technique that is applicable to human immunodeficiency virus in blood products [19] and has been applied to HAV in food [20]. It is expected to be useful for inactivating a broad range of micro-organisms in blood products under conditions without applying high temperatures.

Materials and methods

Virus strains and propagation

Four laboratory HAV strains (KRM238, KRM003, KRM031, and TKM005) were isolated from patients with hepatitis A in Japan [15,21], and these strains were adapted by numerous passages on African green monkey kidney cells. Table 1 shows each strain's subgenotype, passage history, and stock virus titre. All four strains were propagated on an established African green monkey kidney cell line, GL37 [18].

GL37 cells were grown in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 50 μ g/ml gentamycin. To prepare the virus stocks, GL37 cells were infected at a multiplicity of infection of 0.1 focus forming units (FFU) per cell in Eagle's minimum essential medium containing 2% FBS, and were incubated for 2 weeks at 36.5°C in the presence of 5% CO₂. The infected cells were harvested by replacing the medium with phosphate-buffered saline containing 2% FBS. Virus stocks were obtained as supernatants of centrifugation at 2380 *g* for 5 min after release of the viruses by three freeze-thaw cycles and sonication of infected cells. The virus stocks were then stored at –80°C until use.

Infectivity assay

The infectious titre of each HAV strain was measured by the immunofocus-staining method described previously [21]. Briefly, a 100 μ l portion of the virus dilution was inoculated into duplicate GL37 cells cultures in six-well plates at 36.5°C in the presence of 5% CO₂. After 60 min adsorption, 5 ml of the medium containing 0.6% agarose and 2% FBS was overlaid on each well. The plates were incubated at 36.5°C in the presence of 5% CO₂ for 9 days. The cells were fixed with 80% methanol containing 0.03% H₂O₂ after removal of the agarose medium. HAV foci were revealed by anti-HAV rabbit serum and horse-radish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (MBL, Nagoya, Japan) followed by colour development with DAB substrate solution (0.5 mg/ml diaminobenzidine, 0.03% (NH₄)₂Ni(SO₄)₂, 0.03% CoCl₂, and 0.03% H₂O₂ in phosphate-buffered saline).

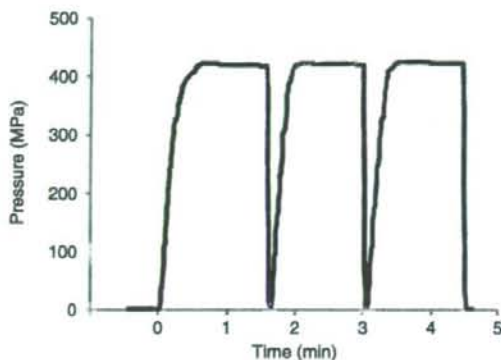


Fig. 1 The pattern of pressure change with high hydrostatic pressure at 420 MPa. Samples were treated at 25–30°C by three cycles of pressurization at the indicated pressure for 1 min followed by immediate release of the pressure. Essentially similar patterns were obtained at other hydrostatic pressures.

Heat treatment

The samples used for the heat treatment were prepared by adding one volume of each virus stock to 9 volumes of 25% human serum albumin (Benesis Corporation, Osaka, Japan). The samples were divided into microcentrifuge tubes in amounts of approximately 0.8 ml, and the tubes were sealed. The samples were heated at 60°C for 1 or 10 h and were then cooled on ice rapidly to arrest the heating process.

Two or three independent trials were conducted for all samples. The 95% confidence limits of these data were statistically determined and assessed; the difference was significant if it was over the 95% confidence limits.

High hydrostatic pressure treatment

The samples used for the high hydrostatic pressure treatment were prepared by adding one volume of each virus stock to 9 volumes of 5% human serum albumin. The samples were divided into ultra-centrifuge tubes (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) in amounts of approximately 1.5 ml, and the tubes were sealed. The sealed tubes were placed in the chamber of a laboratory-sized high hydrostatic pressure instrument designed for food processing (Echigo Seika, Co., Ltd, Niigata, Japan). High hydrostatic pressure was controlled by water filled in the chamber. The samples were treated at 25–30°C by repeating three cycles of pressurization at the indicated pressure for 1 min and then immediately releasing the pressure. Three different pressures (300, 350, or 420 MPa) were used. At 420 MPa, the pattern of pressure change with treatment is shown in Fig. 1.

Two or three independent trials were conducted for all samples. The 95% confidence limits of these data were

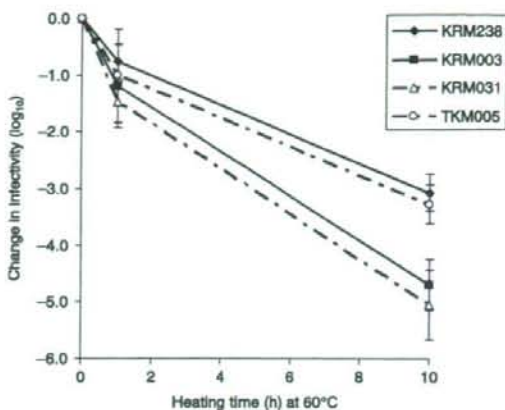


Fig. 2 Inactivation of HAV strains by heat at 60°C. The cell-adapted strains in 25% human serum albumin were treated by heat at 60°C for the indicated times. Data are the means of two or three replicates. Error bars represent the 95% confidence intervals. Change in infectivity (\log_{10}) = \log_{10} (titre of treated samples) – \log_{10} (titre of untreated samples).

statistically determined and assessed; the difference was significant if it was over the 95% confidence limits.

Results

Inactivation by heat treatment at 60°C

The four cell-adapted HAV strains were treated in 25% human serum albumin with heat at 60°C for 1 or 10 h. The infectious titres of HAV in the samples were measured after heat treatment, and the reduction in HAV infectivity was then calculated. For all four strains, infectivity was reduced by approximately 1 \log_{10} after heat treatment at 60°C for 1 h, indicating that HAV was resistant to heat inactivation as compared, for example, to poliovirus, which Barrett *et al.* reported was much more thermostable than HAV [22].

With heat treatment at 60°C for 10 h, the reduction of HAV infectivity ranged from approximately 3 to 5 \log_{10} among the four strains, as shown in Fig. 2. The reduction in the infectivity of KRM238 was 3.1 \log_{10} , that of KRM003 was 4.7 \log_{10} , that of KRM031 was 5.1 \log_{10} , and that of TKM005 was 3.3 \log_{10} . In other words, two strains (KRM238 and TKM005) were more resistant to inactivation by heat treatment than the other two (KRM003 and KRM031). There was 2.0 \log_{10} difference between the most resistant strain KRM238 and the most sensitive strain KRM031. There was 1.6 \log_{10} of variation in the inactivation rate between KRM238 and KRM003, even though they belong to the same III B strain subgenotype. These differences mentioned here were significant.

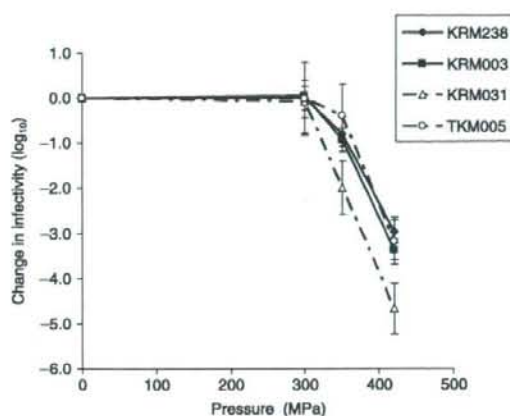


Fig. 3 Inactivation of HAV strains by high hydrostatic pressure. The cell-adapted strains in 5% human serum albumin were treated at the indicated pressures by repeating three cycles. Data are the means of two or three replicates. Error bars represent the 95% confidence intervals. Change in infectivity (\log_{10}) = \log_{10} (titre of treated samples) - \log_{10} (titre of untreated samples).

Inactivation by high hydrostatic pressure treatment

The four cell-adapted HAV strains were treated in 5% human serum albumin with high hydrostatic pressure at 300, 350, or 420 MPa. The infectious titres of HAV in the samples were measured after the treatment, and the reduction in HAV infectivity was then calculated.

None of the HAV strains were inactivated by high hydrostatic pressure of less than 300 MPa, but all of the strains began to show inactivation at pressures exceeding 300 MPa. At 420 MPa, the reduction of HAV infectivity ranged from approximately 3 to 5 \log_{10} among the strains, as shown in Fig. 3. The reduction in the infectivity of KRM238 was 3.0 \log_{10} , that of KRM003 was 3.4 \log_{10} , that of KRM031 was 4.7 \log_{10} , and that of TKM005

was 3.2 \log_{10} . There was at least 1.3 \log_{10} difference, which was significant, between the resistant strains and the sensitive strain KRM031. In other words, high hydrostatic pressure inactivation was more effective against KRM031 than against the other three strains. As with heat inactivation, high hydrostatic pressure inactivation showed variation among the strains.

Accumulative effects of inactivation by heat and pressurization

To evaluate efficiency of two such inactivation treatments in the manufacture of blood products, the combined effects of inactivation by heat at 60°C for 10 h and by high hydrostatic pressure at 420 MPa are calculated by addition as shown in Table 2.

With either treatment, the degree of variation in infectivity reduction between resistant and sensitive strains was approximately 2 \log_{10} . KRM238 and TKM005 well resisted inactivation by either heat or high hydrostatic pressure.

The combined reduction in the infectivity of KRM238 was 6.1 \log_{10} , that of KRM003 was 8.1 \log_{10} , that of KRM031 was 9.8 \log_{10} , and that of TKM005 was 6.5 \log_{10} .

Discussion

Cell-adapted strains are useful in studies aimed at validating the virus-inactivation procedures used in manufacturing. We report here on variation in inactivation rates – whether by heat treatment or high hydrostatic pressure treatment – among laboratory HAV strains. As shown in Table 2, if both inactivation treatments could be combined, the variation between resistant and sensitive strains would increase. For example, the most sensitive strain, KRM031, showed an estimated total reduction of 9.8 \log_{10} via the combined treatments; on the other hand, the most resistant strain, KRM238, showed only a 6.1 \log_{10} reduction. The maximum variation among the HAV strains after combined treatment inactivation was predicted to be about 3.7 \log_{10} . To ensure the safety of

Table 2 Inactivation among HAV strains by heat and pressurization

HAV strain	Reduction in infectivity (\log_{10})		
	By heat at 60°C for 10 h	By high hydrostatic pressure at 420 MPa	By combination ^b of heat and high hydrostatic pressure
KRM238	3.1 (\pm 0.32) ^a	3.0 (\pm 0.25)	6.1
KRM003	4.7 (\pm 0.45)	3.4 (\pm 0.22)	8.1
KRM031	5.1 (\pm 0.61)	4.7 (\pm 0.56)	9.8
TKM005	3.3 (\pm 0.35)	3.2 (\pm 0.52)	6.5

^aParentheses indicate 95% confidential limits.

^bExpected values calculated by addition.

manufactured blood products, it is important to avoid overestimating HAV-inactivation rates. Thus, the HAV strain that is most resistant to inactivation treatment should be used in virus validation.

Considering that KRM238 grows better in cell culture than TKM005 (Table 1), it can be concluded that, among the four strains used here, KRM238 is the best candidate for virus-validation to ensure the safety of blood products against viral contamination. In general, the evaluation of inactivation processes will depend on the strains used for testing.

Our results also indicated that we should evaluate carefully the efficiency of inactivation by selecting an appropriate strain that is resistant to inactivation treatment, and that a strain that is resistant to one particular inactivation treatment may not always be resistant to another. Here, KRM003 was easily inactivated by heat treatment, showing a 4.7 log₁₀ reduction, but was more stubborn against high hydrostatic pressure, which resulted in only a 3.4 log₁₀ reduction. Indeed, when a novel inactivation treatment is applied to the manufacture of blood products to prevent viral contamination, inactivation treatment must be validated carefully. In other words, the efficiency of inactivation should be evaluated not only by using a strain that has shown resistance to the standard inactivation treatment, but also by selecting an appropriate strain that is resistant to a newer inactivation treatment. A test strain of virus validation for a newer inactivation should be selected carefully for avoiding a risk of overestimating the resistance of the test strain to a newer inactivation.

Pressurization has emerged as a new technique for inactivating pathogenic viruses in blood plasma and plasma-derived products, as pressurization at 400 MPa exerted no effect on the recovery of biologically active plasma proteins, with the exception of factor XIII [19]. Most enveloped viruses are markedly inactivated at pressures below 400 MPa, as summarized by Grove *et al.* [23]. However, small RNA viruses can vary widely in their sensitivity to high pressure. For example, HAV and poliovirus are both members of the picornavirus family, but they exhibit quite different susceptibilities. HAV is inactivated by 3–5 log₁₀ of infectivity at 420 MPa, whereas poliovirus remains essentially unaffected even at 600 MPa [24]. At this point in time, the mechanism underlying virus inactivation by pressurization is still poorly understood.

Heat inactivation is currently used to inactivate enveloped viruses in particular, such as human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus, in blood products. Moreover, non-enveloped viruses such as HAV and poliovirus differ greatly in terms of their sensitivity to heat inactivation [22]. As with pressurization, in heat treatment the mechanism underlying inactivation of non-enveloped viruses remains unclear.

The cell-adapted HAV strains exhibited disparate sensitivities to the two different treatments used in this study. These findings are important in terms of ensuring safety in

the manufacture of blood products. Further studies will be needed in order to validate the inactivation procedures for naturally occurring viral strains.

Acknowledgements

We thank Dr Takashi Shimoike, National Institute of Infectious Diseases, Japan, for his greatly enlightening discussions. We also thank Echigo Seika Co for kindly providing a laboratory-sized high hydrostatic pressure instrument. This study was supported in part by a grant (#H16-IYAKU-017) from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

References

- 1 Fiore AE: Hepatitis A transmitted by food. *Clin Infect Dis* 2004; 38:705–715
- 2 Hollinger FB, Emerson SU: Hepatitis A virus; in Knipe DM, Howley PM (eds): *Fields Virology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007:911–947
- 3 Gowland P, Fontana S, Niederhauser C, Taleghani BM: Molecular and serologic tracing of a transfusion-transmitted hepatitis A virus. *Transfusion* 2004; 44:1555–1561
- 4 Soucie JM, Robertson BH, Bell BP, McCaustland KA, Evatt BL: Hepatitis A virus infections associated with clotting factor concentrate in the United States. *Transfusion* 1998; 38:573–579
- 5 Chudy M, Budek I, Keller-Stanislawski B, McCaustland KA, Neidhold S, Robertson BH, Nübling CM, Seitz R, Löwer J: A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. *J Med Virol* 1999; 57:91–99
- 6 Purcell RH, Wong DC, Shapiro M: Relative infectivity of hepatitis A virus by the oral and intravenous routes in 2 species of non-human primates. *J Infect Dis* 2002; 185:1668–1671
- 7 Kiyohara T, Sato T, Totsuta A, Miyamura T, Ito T, Yoneyama T: Shifting seroepidemiology of hepatitis A in Japan, 1973–2003. *Microbiol Immunol* 2007; 51:185–191
- 8 Robertson BH, Erdman DD: Non-enveloped viruses transmitted by blood and blood products. *Dev Biol (Basel)* 2000; 102:29–35
- 9 Hilfenhaus J, Nowak T: Inactivation of hepatitis A virus by pasteurization and elimination of picornaviruses during manufacture of factor VIII concentrate. *Vox Sang* 1994; 67:62–66
- 10 Pruss A, Kao M, Gohs U, Koscielny J, von Versen R, Pauli G: Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals* 2002; 30:125–133
- 11 Chin S, Williams B, Gottlieb P, Margolis-Nunno H, Ben-Hur E, Hamman J, Jin R, Dubovi E, Horowitz B: Virucidal short wavelength ultraviolet light treatment of plasma and factor VIII concentrate: protection of proteins by antioxidants. *Blood* 1995; 86:4331–4336
- 12 Cohen JL, Rosenblum B, Ticehurst JR, Daemer RJ, Feinstone SM, Purcell RH: Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:2497–2501
- 13 Lu L, Ching KZ, de Paula VS, Nakano T, Siegl G, Weitz M, Robertson BH: Characterization of the complete genomic

- sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J Gen Virol* 2004; 85:2943-2952
- 14 Nainan OV, Xia G, Vaughan G, Margolis HS: Diagnosis of hepatitis A virus infection: a molecular approach. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:63-79
- 15 Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G, Widell A, Margolis HS, Isomura S, Ito K, Ishizu T, Moritsugu Y, Lemon SM: Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992; 73:1365-1377
- 16 Heitmann A, Laue T, Schottstedt V, Dotzauer A, Pichl L: Occurrence of hepatitis A virus genotype III in Germany requires the adaptation of commercially available diagnostic test systems. *Transfusion* 2005; 45:1097-1105
- 17 Stene-Johansen K, Jonassent TØ, Skaug K: Characterization and genetic variability of hepatitis A virus genotype IIIA. *J Gen Virol* 2005; 86:2739-2745
- 18 Totsuka A, Moritsugu Y: Hepatitis A vaccine development in Japan; in Nishioka K, Suzuki H, Mishiro S, Oda T (eds): *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo, Springer-Verlag, 1994:509-513
- 19 Nakagami T, Ohno H, Shigehisa T, Otake T, Mori H, Kawahata T, Morimoto M, Ueba N: Inactivation of human immunodeficiency virus by high hydrostatic pressure. *Transfusion* 1996; 36:475-476
- 20 Calci KR, Meade GK, Tezloff RC, Kingsley DH: High-pressure inactivation of hepatitis A virus within oysters. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:339-343
- 21 Yoneyama T, Kiyohara T, Shimasaki N, Kobayashi G, Ota Y, Notomi T, Totsuka A, Wakita T: Rapid and real-time detection of hepatitis A virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods* 2007; 145:162-168
- 22 Barrett PN, Meyer H, Wachtel I, Eibl J, Dörner F: Inactivation of hepatitis A virus in plasma products by vapor heating. *Transfusion* 1997; 37:215-220
- 23 Grove SF, Lee A, Lewis T, Stewart CM, Chen H, Hoover DG: Inactivation of foodborne viruses of significance by high pressure and other processes. *J Food Prot* 2006; 69:957-968
- 24 Kingsley DH, Hoover DG, Papafragkou E, Richards GP: Inactivation of hepatitis A virus and a calicivirus by high hydrostatic pressure. *J Food Prot* 2002; 65:1605-1609