

200940061A

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

赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法の
開発と不活化評価法の開発

(H21-医薬-一般-015)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 22 (2010) 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

赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法の
開発と不活化評価法の開発
(H21-医薬-一般-015)

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(国立感染症研究所)

平成 22 (2010) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法の開発と不活化評価法の開発

P 1 - P 6

研究代表者 岡田 義昭

II. 分担研究報告

1. 赤血球製剤における病原体の不活化法開発と B 型肝炎 E 型肝炎ウイルスの不活化評価法の開発 P 7 - P13

岡田 義昭

2. 高圧処理による病原体の不活化法の改良と品質管理 P14 - P17
野島 清子

3. 異常プリオンの不活化法の研究 P18 - P19
-----海外事例調査----- 太組 一郎

4. C 型肝炎ウイルスの不活化評価法の開発と不活化の評価 P20 - P23
下池 貴志

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

赤血球製剤を含めた血液製剤の病原体不活化法開発と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

赤血球製剤では、実用可能な病原体の不活化法は開発されていない。我々は、赤血球製剤の病原体不活化法開発を目的としている。酸性条件下で病原体が不活化されることに注目して不活化法を検討した。赤血球の溶血しない酸性の等張溶液では不活化効率は低かったが、15分間加温することでB型肝炎ウイルスのモデルとして使用されている仮性狂犬病ウイルスを効率良く不活化でき、赤血球の溶血も少なかった。しかし、ウシ下痢症ウイルスには全く効果がなかった。加温時間が15分を超えると赤血球の溶血は増加したが、溶液のpH等を僅かに変えるだけで45°Cに加温しても数時間赤血球は溶血しなくなった。赤血球製剤の病原体不活化法の1つに成りうる可能性がある。

C型とE型肝炎ウイルスの培養系を用いて不活化評価系を検討した。C型肝炎ウイルスは 10^4 /mL以上の感染価が得られ、種々の不活化法の評価が可能になった。一方、E型肝炎ウイルスは 10^7 /mLの高ウイルス量のウイルス液が得られたが、感染価は低かった。その原因として感染価測定に用いている細胞の感受性が低いことが推定され、高感受性を示す細胞クローンを得る必要がある。

分担研究者

野島 清子 国立感染症研究所 研究員

下池 貴志 国立感染症研究所
主任研究官

太組 一郎 日本医科大学小杉病院
講師

血液を介して多種の病原体が混入する可能性がある。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が、検査のすり抜けや新興・再興感染症のアウトブレイク、さらにはプリオン病も報告されるなど、スクリーニングだけで血液製剤の安全性を確保することは限界がある。最近、血小板製剤や新鮮凍結血漿中の病原体を不活化する技術が開発され、欧州の1部の

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、

地域で導入されている。しかし、開発された不活化法は化学物質の添加と紫外線照射を必要とし、加える化学物質の安全性への危惧や経済性から欧米各国では導入することに慎重になっている。一方、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。紫外線が赤血球に吸収されてしまうため、血小板のように化学物質を添加して紫外線照射する方法では病原体を不活化することは不可能であるからである。我々は、赤血球製剤に使用できる新しい病原体の不活化技術の開発を目的に、本研究を行なっている。さらに新鮮凍結血漿の病原体不活化技術においても可能な限り凝固因子等の活性を損なうことなく病原体を不活化できる方法を目指している。

その一方で B 型・C 型肝炎ウイルスは、これまで *in vitro* でウイルスが増殖可能な培養系がなく、性状が似ている動物由来のウイルスをモデルウイルスとして用い不活化・除去を評価してきた。しかし、本当に HBV や HCV を反映しているのか正確にはわからなかった。最近、HCV の培養系が確立されたので HCV のモデルウイルスであるウシ下痢症ウイルスとの相違を明らかにすることができる。

また、E 型肝炎ウイルスはこれまで輸入感染症と考えられていたが国内に常在し、輸血を介した感染例も報告されている。エンベロープを持たないウイルスであることから血漿分画製剤に導入されている

不活化法に抵抗性である可能性がある。最近、E 型肝炎ウイルスの *in vitro* 感染系が報告され、細胞株で増殖させることが可能になった。本研究ではこの系を用いて E 型肝炎ウイルスの不活化の評価も行なうことにした。

さらに英国において血友病患者の脾臓から異常プリオンが検出され、治療に用いていた血漿由来の第 8 因子製剤が原因と推定されている。これらから異常プリオンの除去・不活化について海外を含めて広い範囲から情報を収集し、血液製剤の安全対策に反映させる。

B. 研究方法

(1) 不活化法の研究

1. 赤血球製剤の不活化の研究

仮性狂犬病ウイルスを酸性の等張な溶液に 10% 容量になるように添加し、検体とした。検体をそれぞれ室温と 40°C に保ち、15 分、30 分、60 分後に検体の 1 部を取り、直ちに 10mMNaOH で中和し、ネコ腎細胞株 CRFK を用いて感染価を測定した。また、ウシ下痢症ウイルスは、酸性の等張な溶液に 10% 容量になるように添加し、検体とした。検体をそれぞれ室温と 42°C に保ち、30 分、60 分、120 分後に検体の 1 部を取り、直ちに 10mMNaOH で中和し、MDBK 細胞株を用いて感染価を測定した。

また、濃厚赤血球液を 10% 容量になるように酸性バッファーに添加し、40°C 又は 45°C に加熱し、経時的に溶血の有無を確認

した。

2.血漿の不活化法の研究

アルギニンおよび塩酸アルギニンは 0～0.4M の濃度となるように 5% アルブミン液に溶解した。ヒトパルボウイルス B19 (B19) 陽性血漿を予めアルギニンを添加した 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。加圧装置を用いて 100～300MPa の圧を 1 分間加圧した。B19 の感染価は NEC 細胞に処理した B19 を感染させ、2 日後に RNA を抽出し、スプライシングされた RNA を RT-PCR 法によって検出し、スプライシングが検出できた検体を陽性と判断した。

(2) 不活化評価法の開発

1.HCV の不活化法の研究

JFH-1 クローンの cDNA が T7 プロモータ下に入ったプラスミドをテンプレートにし、*in vitro* で HCV RNA を合成した。この RNA 10 μ g を 1x10⁶ 個のヒト肝癌由来細胞 Huh7.5.1 にトランスフェクションし、4、5 及び 6 日後にその細胞上清を、また 6 日後には細胞も回収した。細胞上清はそのまま感染効率を調べるために用いた。一方、回収した細胞は培地に懸濁後、超音波破碎により細胞から HCV 粒子を回収した。

これらの培養液、及び破碎した細胞をコーゲンコーティングしたプレートで培養した Huh7.5.1 細胞に感染させ、感染 4 日後にコア抗原の発現を抗コア抗体を用い

た蛍光抗体法によって解析した。

2.HEV の不活化法の研究

国立感染症研究所ウイルス 2 部李天成主任研究官よりヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 (以下 PLC) に馴化した HEV (遺伝子型 3 と 4) の供与を受けた。非感染の PLC 細胞に譲渡された HEV を感染させ、感染二ヶ月後の培養液を集めウイルス液とした。感染価は種々の濃度に希釈したウイルス液を PLC 細胞に感染させ、感染後 3～4 週後に培養液中の HEV-RNA の有無を nested-PCR 法によって検出した。また、ウイルス液に最終濃度 0.5% になるように TritonX-100 を添加し、1 時間室温で反応後 10 倍ずつの段階希釈をおこない、それぞれを PLC 細胞に感染させ感染価を求めた。

(3) 異常プリオン不活化法の研究

異常プリオンが血液製剤の管理上問題となる事例を、文書・論文等を渉猟することにより調査・検証した。

C.研究結果

(1) 不活化法の研究

1. 赤血球製剤の不活化の研究

酸性室温の条件では処理直後のコントロールにくらべ、15 分で感染価は約 1/2、30 分では 1/10 になり、60 分では 1/100 に減少した。40°C に加熱した場合、処理直後では感染価が 2.4X10⁵/mL を示した検体は、15 分後では約 5Log 感染価が減少した。30 分と 60 分処理した検体から CPE は確認で

きなかった。加熱することで不活化効率は著明に増加した。しかし、ウシ下痢症ウイルスでは酸性条件下に 42°C に加熱しても不活化効果は全く認められなかった。一方、赤血球を同様な条件で 40°C に加熱し、経時的に溶血の程度を観察すると 15 分では軽微な溶血であったが 30 分後には明らかな溶血が認められた。

2. 血漿の不活化法の研究

B19 を 260MPa の加圧処理、又は L-アルギニン添加では不活化効果は認められなかったが、0.05M~0.4M L-アルギニン存在下で 260MPa の加圧処理を行ったところ、いずれの L-アルギニン濃度においても B19 の感染価は 5log 低下した。処理する圧力を下げて、0.05M L-アルギニン存在下で 100MPa の加圧処理を行ったが、B19 の感染価の低下は認められなかった。また、L-アルギニンの代わりに塩酸アルギニンを用いて同様な検討を行ったが、B19 の不活化は認められなかった。

(2) 不活化評価法の開発

1. HCV の不活化法の研究

JFH-1 RNA を Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションすることで（上清中、細胞内の）感染性 HCV を得た。培養液中の感染価は、HCV RNA トランスフェクション後、4、5、6 日でそれぞれ 4.0、5.0、 5.0×10^4 /ml であった。また、HCV RNA トランスフェクション 6 日後の細胞から回収された HCV 粒子の感染価は

2.5×10^4 /ml であった。

2. HEV の不活化法の研究

感染二ヶ月後の PLC 細胞から得られた HEV 液を 10 倍ずつの段階希釈後、核酸を抽出し nested-PCR を行なった。 10^6 まで培養液を希釈しても HEV-RNA は検出できた。PL 細胞に感染させ、感染価を測定したところ、ウイルス液を 100 倍希釈したところまで細胞への感染が確認できた。ウイルスが凝集、又は細胞膜由来の被膜で覆われている可能性があり、Triton X-100 をウイルス液に添加し、感染価を再検討したが、感染価の増加は認められなかった。

(3) 異常プリオン不活化法の研究

2009 年 2 月に公表された、英国血友病患者サーベイランスで偶発的に CJD 陽性となった事例の詳細が明らかとなった。投与された第 8 因子製剤の原料血漿に発症前の vCJD 患者の血漿が含まれており、血漿分画製剤による vCJD 感染が疑われた。発症リスクアセスメントの詳細は文献 1 (vCJD Risk Assessment Calculations for a Patient with Multiple Routes of Exposure. Peter Bennett and Jenny Ball. Health Protection Analytical Team Department of Health, 9th June 2009) に、事例の概略は文献 2 (Haemophilia (2010), 1- 9. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. A. PEDEN et al) に示されて

いる。当該英国患者は73歳男性の神経症状を呈しなかった血友病患者剖検例(129M/V)で、発症前のvCJD由来の血漿を含む9000単位の第8因子製剤と、未発症のvCJDのドナーを含まないと推定される400,000単位の第8因子製剤を投与されていた。加えて、14単位の赤血球製剤輸血、手術、内視鏡検査等を受けていることが判明した。

D. 考察

赤血球製剤の病原体不活化法は、現在のところ実用可能な方法は報告されていない。我々は、いろいろな不活化法を検討し、赤血球に使用できる不活化法として酸による病原体不活化を試みた。大きな問題として、病原体が不活化されるpHで赤血球が溶血に耐えられるかどうかであった。等張な溶液をいろいろなpHにして赤血球を添加して検討したところ、意外にも赤血球は酸性に抵抗性を示した。しかし、溶血しないpHではウイルスの不活化効率は低く、不活化法としては期待できなかった。そこで、さらに温度の負荷をかけたところ不活化効率は増強し、不活化法になりうる期待がでてきた。しかし、効果が認められたのはB型肝炎ウイルスのモデルとして使用されている仮性狂犬病ウイルス(Pseudorabies virus)であり、C型肝炎ウイルスのモデルであるウシ下痢症ウイルス(bovine viral diarrhoea virus、以下BVDV)には全く効果がなかった。BVDVも不活化できるように

加熱時間を検討したが、不活化が確認できたpHでは赤血球は40°Cで15分を超えると溶血が強くなり、15分の処理が限界と思われた。そこで、pHや組成等を変更したところ、僅かにpHを変更するだけで、酸性下に45°C4時間まで著明な溶血は生じないことがわかった。この条件での病原体の不活化は検討できなかったが、来年度に実施する予定でいる。この方法が実用化に必ずしも直結しないかもしれないが、赤血球製剤の不活化も決して不可能ではないことが示唆された。

一般的に肝炎ウイルスは培養が困難であり、不活化法の評価には培養可能な動物由来のウイルスが使用されていた。本研究班ではHCVとHEVの培養系を用いて不活化法の評価系構築を検討した。HCVでは 10^4 /mL以上の感染価を示すHCV液が得られたので2年目以降に液状加熱、エタノール処理、S/D処理等の実製造工程に導入されている不活化法の不活化効率を検討する予定でいる。これまでHCVを用いた検討は不可能であったので成果が期待できる。HEVに関しては、ウイルス量は高いにも係らず感染価が非常に低かった。界面活性剤の種類を変更することや高感受性のクローンを選択して感染価の測定を行なうことで不活化の検討をする必要がある。

また、スクリーニング法がないプリオン病に関しては、血漿分画製剤を介したと推定されるvCJD感染例が報告され、血漿分画製剤の理論的リスクが現実のリスクとなっ

た。国内外の vCJD 感染例の把握、英国における感染者数の推移、および血漿分画製剤の製造工程における異常プリオンの除去等の新しい情報を集め、評価する必要がある。

E. 結論

酸性条件下に 15 分加熱することによって仮性狂犬病ウイルスを不活化することが可能であった。しかし、ウシ下痢症ウイルスには効果がなかった。pH 等を僅かに変化させるだけで長時間の加熱によっても赤血球に溶血しなかった。赤血球製の不活化のためには至適な溶液条件を求める必要がある。

また、HCV と HEV の培養系を用いて高いウイルス量の培養液を得ることができた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizuochi T., Mizusawa S., Nojima K., Okada Y., and Yamaguchi K.: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) “ a,, determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. Clinica chimica Acta (in press)

2. 学会発表

1) 岡田義昭：パルボウイルス感染の解析、第 79 回日本感染症学会西日本地方会学術

集会、福岡、2009 年

2) 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 3 報)、プリオンシンポジウム 2009、蔵王 (宮城)、2009 年

3) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子：プリオン感染細胞から培養液中に産生される異常プリオンの性状、第 57 回日本ウイルス学会、東京、2009 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

赤血球製剤における病原体の不活化法開発と B 型肝炎及び E 型肝炎ウイルスの
不活化評価系の開発

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

赤血球製剤では、実用可能な病原体の不活化法は開発されていない。我々は、赤血球の病原体不活化法開発を目的に研究を行った。酸性条件下で病原体が不活化されることに注目して不活化の検討を行った。B 型肝炎ウイルスのモデルとして使用されている仮性狂犬病ウイルスを酸性の等張溶液中で 15 分間加熱することで効率良く不活化することができた。この条件では赤血球の溶血も少なかった、しかし、ウシ下痢症ウイルスには全く効果がなく、加熱時間が 15 分を超えると赤血球の溶血は強くなった。溶液の pH 等を僅かに変えると 45°C で数時間赤血球は溶血を生じなくなった。

E 型肝炎ウイルスの不活化評価系を検討し、*in vitro* 培養系によって高いウイルス量を含むウイルス液を調整することができたが、感染価は低かった。E 型肝炎ウイルスに高感受性を示す細胞クローンを得ることが不活化の評価に必要である。

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、血液を介して多種の病原体が混入する可能性がある。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が、検査のすり抜けや新興・再興感染症のアウトブレイクが報告されるなど、スクリーニングだけで血液製剤の安全性を確保することは限界がある。最近、血小板製剤や新鮮凍結血漿中の病原体を不活化する技術が開発され、欧州の 1 部の地域で導入されている。しかし、

開発された不活化法は化学物質の添加と紫外線照射を必要とし、加える化学物質の安全性への危惧や経済性から欧米各国では導入することに慎重になっている。一方、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、赤血球製剤に使用できる新しい病原体の不活化技術の開発を目指し、本研究を行なっている。赤血球製剤では紫外線が赤血球に吸収されてしまうため、血小板のように化学物質を添加して紫外線照射する方法では病原体を不活化することは困難である。我々は、高圧処理法による病原体不活化法を検討した際

に酸性条件下で加圧すると不活化効率が増強することを発見した。そこで赤血球の不活化法として「酸性処理法」が、ウイルスの不活化に有効であるのか、また赤血球が酸性に耐えうるのかについて検討した。

一方、E型肝炎ウイルスはこれまで輸入感染症と考えられていたが国内に常在し、輸血を介した感染例も報告されている。E型肝炎ウイルスはエンベロープを持たないウイルスであることから血漿分画製剤に導入されている不活化法に抵抗性である可能性がある。最近、E型肝炎ウイルスの *in vitro* 感染系が報告され、細胞株で増殖させることが可能になった。本研究ではこの系を用いてE型肝炎ウイルスの不活化の評価も行なうことにした。

B.研究方法

(1) 不活化法の研究

1. 仮性狂犬病ウイルスの感染価測定

感染 1 日前に 96 穴プレートに 3×10^4 /well のネコ腎細胞株 CRFK を $100 \mu\text{L}$ ずつ蒔いた。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 5~7 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_{50} 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。

2. ウシ下痢症ウイルスの感染価測定

感染 1 日前に 96 穴プレートに 3×10^4 /well のウシ腎細胞株 MDBK を蒔い

た。不活化処理したウシ下痢症ウイルス (BVDV) 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 7~10 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って各検体の TCID_{50} を求めた。

3. 酸性処理による仮性狂犬病ウイルスの不活化

仮性狂犬病ウイルスを酸性の等張な溶液に 10% 容量になるように添加し、検体とした。検体をそれぞれ室温と 40°C に保ち、15 分、30 分、60 分後に検体の 1 部を取り、直ちに 10mMNaOH で中和し、感染価を測定した。

4. 酸性処理によるウシ下痢症ウイルスの不活化

ウシ下痢症ウイルスを酸性の等張な溶液に 10% 容量になるように添加し、検体とした。検体をそれぞれ室温と 42°C に保ち、30 分、60 分、120 分後に検体の 1 部を取り、直ちに 10mMNaOH で中和し、感染価を測定した。

(2) HEV の不活化の研究

1. HEV のウイルス液の調整

国立感染症研究所ウイルス 2 部李天成主任研究官よりヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 (以下 PLC) に馴化した HEV (遺伝子型 3 と 4) の供与を受けた。非感染の PLC 細胞に HEV を感染させ、感染二ヶ月後の培養液を集めウイルスのストックとした。感染細胞は

30mM-MgCl₂ を含む 5%FCS-199 培養液で培養し、2 回/週の頻度で培養液を交換した。

2.HEV の検出法

フィルターで細胞の断片等を除いた培養液 100μL から R&D を用いて RNA を抽出した。RNA は 10μL の水に溶解し、5μL を用いて cDNA を合成した。岡本ら (J.Virol.Meth.137.325-333.2006) のプライマーを用いて nested PCR を行ない、HEV 特異的遺伝子の増幅の有無を電気泳動にて確認した。

3.HEV の感染価測定法

感染 1 日前に 2X10⁵ の PLC 細胞を 24 穴プレートに蒔いた。培養液を除去し、100 μL の培養液を加え、種々の濃度に希釈したウイルス液を 100μ 添加し、2 時間吸着させた。吸着後、1mL の 30mM-MgCl₂ を含む 5%FCS-199 培養液を加え培養した。感染 1 日後に PBS を用いて各ウエルを洗い添加したウイルスを除去した。2 回/週の頻度で培養液を交換し、感染 3~4 週間後に複数回 100 μL の培養液を採取し、HEV-RNA の有無を nested PCR にて検査した。培養液の交換時にはできるだけ培養液を吸引し、添加したウイルスを除去した。

4.HEV の性状解析

調整したウイルス液を 10¹~10⁹ まで培養液で 10 倍ずつに段階希釈し、それぞれ 100μL から RNA を抽出した。2 の方法に従い検出可能な最大希釈倍率を求め、ウイルス量とした。さらにウイルス液に最終濃

度 0.5% になるように TritonX-100 を添加し、1 時間室温で反応後 10 倍ずつの段階希釈をおこない、それぞれを PLC 細胞に感染させ感染価を求めた。

C.研究結果

1. 酸性処理による仮性狂犬病ウイルスの不活化

酸性室温の条件では処理直後のコントロールに比べ、15 分で感染価は約 1/2、30 分では 1/10 になり、60 分では 1/100 に減少した。酸性条件で 40°C に加熱した場合、処理直後では感染価が 2.4X10⁵/mL を示した検体は、15 分後では約 5Log 感染価が減少した。30 分と 60 分処理した検体から CPE は確認できなかった。加熱することで不活化効率は著明に増加した (図 1)。赤血球を同様な条件で 40°C に加熱し、経時的に溶血の程度を観察すると 15 分では軽微な溶血であったが 30 分後には明らかな溶血が認められた。

2.酸性処理によるウシ下痢症ウイルスの不活化

1 時間と 2 時間の室温での処理では感染価に減少は認められず、不活化効果は認められなかった。42°C 処理では 1 時間で感染価は 1/2 になり、2 時間では 1/3 になった。ウシ下痢症ウイルスでは酸性条件下に 42°C に加熱しても不活化効果は全く認められなかった (図 2)。

3.HEV の培養上清中の性状解析

ウイルス液を 10 倍ずつに段階希釈後、そ

れぞれから核酸を抽出し nested-PCR を行なった。HEV-RNA は 10^6 まで培養液を希釈しても検出できた (図 3)。

4. HEV の感染価の検討

種々に希釈した HEV を添加し、3~4 週後の培養液中の HEV-RNA の有無を検索した。培養液を 100 倍希釈したものまで HEV-RNA の産生が認められた。Triton X-100 処理したウイルス液も同様に感染価を見たところ 100 倍希釈まで HEV の感染が認められ、PBS を添加したコントロールと差がなかった (図 3)。

D. 考察

赤血球製剤の病原体不活化法は、現在のところ実用可能な方法は報告されていない。血小板等で実用化されている、核酸に結合する化学物質を添加し紫外線照射する手法が使えないからである。従って、これらの方法と異なる原理の不活化法を開発する必要がある。我々はこれまでの経験から、酸性下に病原体を処理すると不活化されることは既知であった。問題は、赤血球を酸性条件下に置き、さらに温度の負荷をかけた場合、赤血球がどの程度まで溶血に耐えられるかどうかであった。意外にも赤血球は酸性に抵抗性を示したが、ウイルスの不活化効率は低く不活化法としては期待できなかった。そこで、酸性に温度の負荷をかけたところ不活化効率は増強し、不活化法になりうる期待がでてきた。しかし、効果が認められたのは B 型肝炎ウイルスのモデル

として使用されている仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies virus) であり、C 型肝炎ウイルスのモデルであるウシ下痢症ウイルス (bovine viral diarrhea virus) には全く効果がなかった。仮性狂犬病ウイルスは B 型肝炎ウイルスのモデルウイルスとして使用されているが、ヘルペスウイルスに属し、一般的にヘルペス属は酸性条件で不活化され易いと言われているためと思われる。不活化を検討した等張溶液では、赤血球は 40°C で 15 分を超えると溶血が強くなり、15 分の処理が限界と思われた。そこで、溶液の pH 等を僅かに変更したところ、 45°C で 4 時間まで著明な溶血は生じなかった。この条件でウイルスの不活化は検討できなかったが、来年度に実施する予定でいる。

HEV の不活化の検討ではウイルス濃度が高い HEV を得ることができたが、感染価が非常に低くこのままでは不活化の評価に使用できない。ウイルス量と感染価との間に 4 Log の差があり、TritonX-100 や EDTA を添加し、感染価を比較したがコントロールと差がなかった。自然感染では HEV は胆汁や消化酵素にさらされることから、培養液を界面活性剤等で処理したが感染価の増加は認められなかった (界面活性剤処理に抵抗性を持つことは明らかにできたが)。界面活性剤の種類を変えて検討する必要があるが、感染価測定に用いている細胞株の感受性が低い可能性も否定できない。高感受性のクローンを選択する必要がある。

E.結論

40°Cの酸性条件下に処理することで、仮性狂犬病ウイルスを短時間に効率良く不活化することが可能であった。しかし、ウシ下痢症ウイルスには効果がなかった。処理時間が15分以上になると赤血球に溶血が生じるため、赤血球製の不活化のためには至適な溶液の条件を求める必要である。

また、HEVの培養系を用いて高いウイルス量のウイルス液を得ることができたが、感染価は低かった。HEVの不活化を評価するには高感受性の細胞を得る必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

Mizuochi T., Mizusawa S., Nojima K., Okada Y., and Yamaguchi K.: Single amino acid substitution in the hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) “ a,, determinant affects the detection sensitivity of an HBsAg diagnostic kit. Clinica chimica Acta (in press)

2.学会発表

- 1) 岡田義昭：パルボウイルス感染の解析、第79回日本感染症学会西日本地方会学術集会、福岡、2009年
- 2) 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3報）、プリオンシンポジウム2009、蔵王（宮城）、2009年

- 3) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子：プリオン感染細胞から培養液中に産生される異常プリオンの性状、第57回日本ウイルス学会、東京、2009年

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

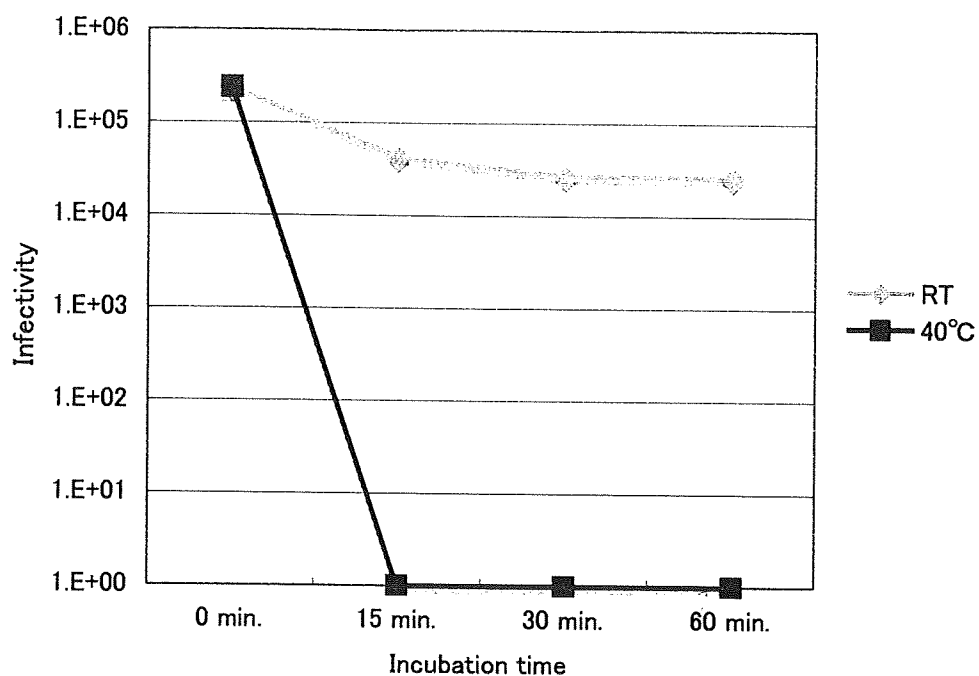


図1. Pseudorabies virus inactivation by acidic solution

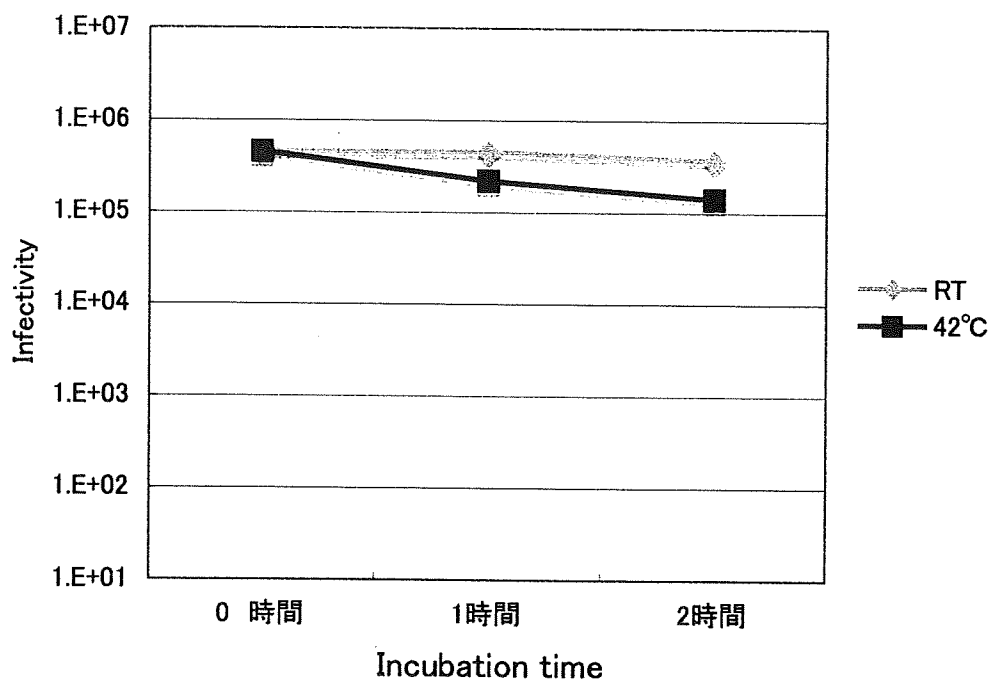
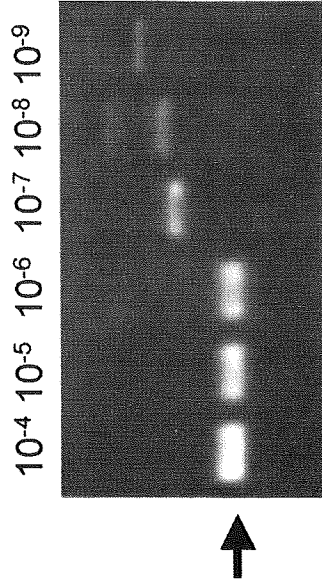


図2. Bovine viral diarrhea virus inactivation by acidic solution

(A)ウイルス量



(B)感染価

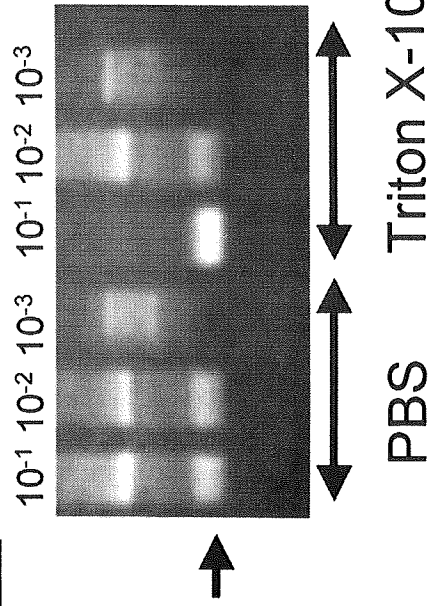


図3.培養上清中のE型肝炎ウイルスの

ウイルス量と感染価

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：高圧処理による病原体の不活化法の改良と品質管理

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

輸血用血液を含む血液製剤の感染症に対する安全性は飛躍的に向上した。しかし、検査感度以下のウイルスやスクリーニング未実施の病原体などが血液に混入している可能性は否定できない。血液製剤の安全性向上のためには、安全な不活化法を開発することが重要である。我々は、これまでに加工食品を無毒化するために開発された高圧処理技術を用いて、ウイルスおよびバクテリアの不活化を検討してきた。これまでに、室温条件下で 300MPa の加圧処理を行うとヒトパルボウイルス B19、日本脳炎ウイルス、麻疹ウイルス、マウスレトロウイルス等のウイルスが不活化され、かつ第 9 因子、フィブリノゲン、グロブリン、アンチトロンビン III 等の血液凝固／繊維溶解因子の活性が維持されること、また第 8 因子の活性が著しく低下することを確認している。さらに、第 8 因子活性低下は圧力処理を 4°C の低温で行うことにより抑制することが可能であるが、低温加圧処理では日本脳炎ウイルス等の不活化効率が著しく低下すること、また赤血球製剤は溶血し易くなることを確認している。

そこで本研究では、より低い圧力処理で効率よく病原体を不活化でき、かつ血漿蛋白機能が維持される圧力処理法を見つけることを目的として、電荷を付加する物質を添加して圧力処理を行い、不活化効果を検討した。その結果、260MPa の加圧処理、または 0.05M アルギニン添加のみでは B19 の不活化効果は全く認められなかったが、0.05M アルギニン存在下で、260MPa の加圧処理を行ったところ、5log10 の不活化効果が認められた。これらの結果より、B19 を十分に不活化出来る圧力条件を 40MPa 程度低くすることができ、これにより第 8 因子の活性低下は 20% 程度軽減することが可能であると予想される。詳細な血漿蛋白の機能維持については今後検討する予定である。

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ッ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、可能であれば赤血球製剤へも適用す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、アンチトロンビン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などのエンベロップを持たないウイルスは、エンベロッ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、エンベロッ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、エンベロッ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 응용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 응용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。本研究では、より低い圧力処理で効率よく病原体を不活化でき、かつ血漿蛋白機能が維持される高圧処理法を見つけることを目的として、電荷を付加する物質を添加して圧力処理を行い、不活化効果を検討した。

B. 研究方法

1. 高圧処理

アルギニンおよび塩酸アルギニンは 0～0.4M の濃度となるように 5%アルブミン

液に溶解した。ヒトパルボウイルス B19 陽性血漿を予めアルギニンを添加した 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、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。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で行った。本装置は 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る。非加圧(大気圧) および 100 ~300MPa で加圧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

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 24 穴プレートに巻き 1 日培養した。加圧処理したウイルス液および非加圧処理ウイルス液は、10% FCS を含む RPMI で段階希釈しウイルス液とした。培養上清を取り除いた後ウイルス液を添加し、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 μ g/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 2 時間培養しウイルスを細胞へ吸着させた。その後 1mL の 10%FCS-RPMI1640 培養液を加え 2 日間培養した。感染細胞を

回収し、RNA を抽出した。RNA は 15 μ L に溶解し、そのうちの 5 μ L を用いて nested RT-PCR を行い、感染することで生じる spliced RNA 由来のバンドが検出された最大希釈倍率の逆数を感染価とした。

C. 研究結果

1. アルギニンによる不活化効果

L-アルギニンおよび L-塩酸アルギニンの B19 ウイルスへの抗ウイルス効果を検討したところ、0M, 0.05M, 0.1M, 0.2M のいずれの濃度においても抗ウイルス効果は認められなかった。0.4M の L-アルギニンは B19 ウイルスの感染価を 2log₁₀ 低下させた。

2. アルギニン存在下での加圧処理による B19 の不活化効果

B19 ウイルスに対して 260MPa で加圧処理を行ったところ、抗ウイルス効果は認められなかったが、0.05M~0.4M L-アルギニン存在下で 260MPa の加圧処理を行ったところ、いずれの L-アルギニン濃度においても B19 ウイルスの感染価は 5log₁₀ 低下した。処理する圧力を下げて、0.05M L-アルギニン存在下で 100MPa の加圧処理を行ったが、B19 ウイルスの感染価の低下は認められなかった。

3. 塩酸アルギニン存在下での加圧処理による B19 不活化効果

0.05~0.4M 塩酸アルギニン存在下で 260MPa の加圧処理を行ったが、いずれの濃度においても B19 ウイルスの不活化効果は認められなかった。

4. pH の測定

L-アルギニン 0.05M, 0.4M を5%アルブミンに溶解した時のpHはそれぞれ9.5, 11であり、塩酸 L-アルギニン 0.05M, 0.4M を5%アルブミンに溶解した時のpHはそれぞれ7, 6.8であった。

D. 考察

アルギニンは変性や会合を抑制するため安定化剤として医薬品に使用されている。またアルギニンはpH4.2の条件下でヘルペスウイルスを不活化することが知られている。ヒトパルボウイルスB19はエンベロープを持たず、アルコールや界面活性剤等の多くの不活化処理に対して耐性を示すが、今回、0.05M L-アルギニン存在下で260MPaの加圧処理を行ったところ、5log₁₀の不活化が認められた。また0.05Mのアルギニン処理および、260MPaの加圧処理のみでは不活化効果は認められなかったことから、この不活化効果は、アルギニンを加えることによりウイルス構造に何らかのゆがみをもたらし、圧力への抵抗性を低下させたことによると推察される。しかし不活化効果が認められた条件のpHはpH9.5でアルカリ性であり、中性条件下での効果を見るために塩酸アルギニンを用いて検討を行ったが、B19ウイルスの不活化効果は認められなかった。pH9.5では高次構造の変化や加水分解による蛋白機能の低下が認められると予想されるため、さらなる条件検討が必要であると考えられる。アルギニンのように分子間相互作用に影響を及ぼす物質を添加した条件下で低い圧力で加圧処理を行い、ウ

イルスを物理的に破壊させる方法によりウイルスが不活化出来る可能性が示唆された。蛋白が変性する圧力は400MPa以上であり、より低い圧力で処理して病原体のみを不活化し、蛋白の機能低下を最小限に留めることが重要である。今後は添加物の種類やpH等を至適化し、適当な条件を検討する予定でいる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

1) 野島清子、影山努、中内美名、魚住利樹、藤間昭勝、岡田清美、和山行正、田代真人、浜口功 第57回日本ウイルス学会 2010年 非対称PCR-核酸クロマト法による新型インフルエンザ(H1N1)pdm 簡便診断法の開発

2) 岡田義昭、水澤祐子、野島清子 第57回日本ウイルス学会 2010年 プリオン感染細胞から培養液中に産生される異常プリオンの性状と除去

H. 知的所有権の取得状況

なし