

異常プリオンの不活化法の研究
—海外事例調査—

分担研究者： 太組一朗 日本医科大学武蔵小杉病院 脳神経外科

研究要旨

輸血用血液を含む血液製剤の感染症対策では病原不活化法の開発と不活化評価法の開発が必要である。これに関連して異常プリオンが血液製剤不活化管理上問題となる海外事例を調査した。なんら神経症状のない英国血友病患者の死後調査で CJD 獲得が明らかになった患者の詳細資料が明らかになり、英国原料の血液製剤が原因であると推定された。同様な外国事例が発生しないかについても継続的にモニターする必要性が示された。

A. 研究目的

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を実施していない病原体が血液に混入し、感染を生じる危険性は常に存在する。また、血小板製剤では細菌感染も問題となっている。血液製剤の安全性向上のためには、赤血球製剤にも導入可能な病原体の不活化法を開発する必要がある。本分担研究では異常プリオンに焦点をあて、①異常プリオン不活化法についての諸外国における情報を広く集め、さらにこれを血液製剤に応用できるか検討する②原料血漿に発症前のプリオン病感染者の血漿が混入した場合の製剤のリスク、及び製造ラインの除染法の研究・情報収集を行なう。これら情報を通じて本邦における血液製剤病原不活化対策に反映させることにより、医療現場における安全

性を担保するのが本研究の目的である。

B. 研究方法

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

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。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、vCJDをドナーに含む9000単位の第8因子製剤と、vCJDをドナーに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

英国では、1980年—2001年に英国原料の血液製剤投与を受けた血液凝固能障害患者はすべてvCJD感染のリスク対象であると勧告されており、さらに英国ではvCJD患者が170人(全世界で明らかになっているvCJD患者は約215人)に上る。したがって英国はプリオンに関する血液製剤不活化を、後方視的に検証するための一つの優れたモデルである。今年度の研究で判明した英国事例においては、あくまでもリスクアセスメントの結果としては当該英国血友病患者にvCJD陽性となった原因は英国原料血液製剤投与であるとされている。一方本邦においては難治性疾患克服研究事業『プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班』に設置されているCJDサーベイランス委員会の詳細な調査によっても未だvCJD発症が確認されているのは2005年に判明した1例のみであることから、英国を中心とした諸外国の事例に継続的に注目する一方、冷静な対応を継続する必要性があると考えられた。

次年度はさらに情報交換を活発にした動

向調査継続を行う予定である。また、必要に応じて情報を共有すべく学会発表等を行う。

E. 結論

輸血用血液を含む血液製剤の感染症対策では病原不活化法の開発と不活化評価法の開発が必要であるが、このために他国事例を継続的にモニターすることの重要性が再認識された。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

論文発表

1) 児玉南海雄, 太組一朗
プリオン病感染予防ガイドライン(2008年版), p11-13, p84-91

学会発表

1) 坂井健二¹、野崎一朗¹、浜口毅¹、篠原もえ子¹、中村好一^{2,6}、北本哲之^{3,6}、佐藤猛^{4,6}、水澤英洋^{5,6}、森若文雄⁶、志賀裕正⁶、三條伸夫^{5,6}、黒岩義之⁶、西澤正豊⁶、武田雅俊⁶、犬塚貴⁶、黒田重利⁶、村井弘之⁶、村山繁雄⁶、立石潤⁶、調漸⁶、太組一朗⁶、山田正仁^{1,6}

わが国におけるヒトのプリオン病の発症状況:最近10年間のサーベイランスデータプリオンシンポジウム2009. 20090829, 蔵王 宮城

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 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

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
分担研究者 下池貴志 (国立感染症研究所)

研究要旨

血液製剤に混入する可能性があるC型肝炎ウイルス(HCV)を不活化させるため本研究を行っている。最近HCVが増殖する培養細胞系が開発されたので、この系を用いてJFH-1 HCV cDNAがT7プロモータにクローニングされたプラスミドからin vitroでHCV RNAを合成し、このRNAをヒト肝臓癌由来Huh7.5.1培養細胞にトランスフェクションし、HCVを増殖させ、感染性HCV粒子を得た。この得られたHCV粒子の感染価を、HCVウイルス蛋白質の一つであるコア蛋白質の発現の効率から算出した。その結果、HCVの感染価は高いもので 5.0×10^4 /mlであることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究は血液製剤の安全性を向上させるため、血液製剤に混入する可能性があるC型肝炎ウイルス(HCV)の、血液製剤中での不活化法の確立と、その不活化の評価法を開発することが目的である。

C型肝炎の治療法はビバピリンとペグインターフェロンとの併用療法により治療効果(それでも約50%)が上がるようになった。しかし、日本人の感染者で多い遺伝子型(1b型)のHCVでは治療効果が未だ上がっていない。しかもHCVに対するワクチンも確立されていない。これまでHCV感染のモデルはチンパンジーのみで、その価格の高さ、扱い難さ

から研究がなかなか進展しなかった。そのため、HCVに対するワクチンや効果的な治療法は未だ確立されていない。しかし、最近、培養細胞でHCVの増殖をさせることが可能な系が開発された。本研究ではこの系を用いてHCVを増殖させ、増殖したHCVを血液製剤に添加し、HCVの不活化評価法を開発する。また、既に血液製剤で実施されている不活化法による不活化効率についても検討する。本年度はHCVのcDNAから培養細胞を用いて感染性HCV粒子を作製し、その感染価をHCVウイルス蛋白質の一つであるコア蛋白質の発現の効率から算出した。

B. 研究方法

1. JFH-1 クロンの 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。

2. これら (4、5、6 日間培養した細胞の上清に分泌した、及び 6 日間培養した細胞内の) HCV 粒子を naïve Huh7.5.1 細胞 (1x10⁴個/well; コラーゲン I でコートされた 96 well プレート) に、それぞれ 1、10、100 μ l ずつ感染させ 4 日間培養した。これらの HCV 粒子の感染価を調べるため、HCV の構造蛋白質の一つであるコア蛋白質の発現を、コア蛋白質に対するモノクローナル抗体 (マウス, MA1-080, Thermo Scientific, IL) と蛍光二次抗体 (Alexa Fluor 488, Invitrogen, OR) を用いて蛍光顕微鏡で検出し、励起波 (495nm) により蛍光 (519nm) する細胞の数をカウントした。また、トリプシン、EDTA 処理により細胞をプレートから剥がし、この時の各 well の全細胞数をカウントした。

(倫理面への配慮)

JFH-1 クローンは培養細胞で HCV が増殖する系で、実験動物を用いる必要がないため、研究のやりやすさのみでなく、倫理面においても優れた系である。

C. 研究結果

1. 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。

2. その感染価は培地上清に分泌した HCV 粒子では、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、5.0x10⁴/ml であった。また、HCV RNA トランスフェクション後、6 日目の細胞から回収された HCV 粒子の感染価は 2.5x10⁴/ml であった (図)。

3. 上清に分泌された HCV 粒子の感染価は、HCV RNA のトランスフェクション後、4 から 5 日の間増加したが、5 日と 6 日では変化はなかった。また、培養細胞内の HCV 粒子も感染性を保持することが明らかとなった。細胞内から回収された HCV 粒子の感染価は培地上清に分泌した HCV 粒子のそれと同等程度であることが明らかとなった (図)。

D. 考察

1. 得られた HCV 粒子を用いて血液製剤に混ぜ、液状加熱やエタノール処理などを行い HCV を不活化する条件を検討することが可能であることが明らかとなった。ただ、より正確な不活化の評価には

感染性において、約2倍高濃度の HCV が
必要なため、得られたウイルス液を濃縮
するか、増殖効率の良い JFH-1 変異体を用
いるか、或いは HCV RNA トランスフ
ェクション後の培養時間を長くすることで
解決されると考えられる。

2. 不活化の評価法としては本研究で用い
たウイルス蛋白質であるコア蛋白質の検
出方法を使えることが示唆された。これ
以外の方法として、HCV 感染により細胞
障害性 (CPE) の観察、高感度コア蛋白
質定量的測定法、real time PCR、LAMP
法などが考えられる。これら評価法は時
年次以降確立する予定である。また、今
回コア蛋白質が発現している細胞をカウ
ントすることにより HCV の感染価を求
めたが、今後、蛍光リーダを用いてもつ
と簡便に測定できる系を作製する予定で

ある。

E. 結論

本年度の研究で培養細胞を用いること
で感染性 HCV 粒子を得ることが出来た。
また、得られた HCV の感染価測定に用
いたコア蛋白質の検出法を本研究の不活
化条件の決定と、その評価法とに用いる
ことが可能であることが示唆された。

G. 研究発表

- (ア) 論文発表 なし
- (イ) 学会発表 なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

図 培養細胞 Huh7.5.1 を用いた JFH-1 HCV RNA からの HCV の増殖



