

201034028A

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 22 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 23 (2011) 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 22 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 23 (2011) 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 7

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 P 8-P13
岡田 義昭
2. 血漿における病原体の不活化法とパルボウイルス増殖系の開発 P14-P19
野島 清子
3. 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-P24
下池 貴志
4. E型肝炎ウイルス国内標準品の作製 P25-P27
水澤 左衛子
5. 献血血液血漿に由来する HEV を用いた in vitro 感染培養系の構築 P28-P30
鈴木 光
6. 血液製剤の安全性向上のために実施されるウイルスの
核酸増幅試験の精度管理評価に関する研究 P31-P45
水澤 左衛子
7. 異常プリオンの不活化法の研究 P46-P47
-----海外事例調査----- 太組 一郎

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

- 1.紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化のために製剤内部に紫外線が達する方法を考案し、80mJ/cm²の紫外線照射によって5Logのウシ下痢症ウイルス(BVDV)が検出感度以下にまで不活化された。
- 2.BVDVを添加した5%アルブミン製剤は、27mJ/cm²の紫外線のみ照射によって感染価は1/500に低下した。
- 3.ヒト末梢単核細胞から誘導された赤芽球細胞は、パルボウイルスB19に高感受性を示し、感染した骨髄に見られる巨細胞に類似した細胞がin vitroでも認められた。
- 4.C型肝炎ウイルスの培養系を用いて不活化を評価し、60°Cの液状加熱では1時間以内に検出感度以下にまで不活化された。8%エタノール処理では感染価の低下は認められなかった。これらはモデルウイルスのBVDVから得られた結果と一致した。
- 5.E型肝炎ウイルス(HEV)の国内標準品の作製を行った。
- 6.献血から検出されたHEVをin vitroで培養することに成功した。
- 7.NATの精度管理のためのサーベイランスを実施し、適切に精度管理がなされていることを確認した。
- 8.海外のvCJDの動向を解析し、今後も継続的モニターが必要であることを明らかにした。

講師

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
水澤 左衛子	国立感染症研究所 主任研究官
鈴木 光	日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所 課長
太組 一郎	日本医科大学小杉病院

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、血液の中に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、欧州の一部の地域で導入されている。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的に、本研究を行なっている。さらにC型肝炎ウイルスは、*in vitro*でウイルスが増殖可能な培養系がこれまでなく、性状が似ているウシ下痢症ウイルス (BVDV) を用いて不活化・除去が評価されてきた。しかし、本当にHCVを反映しているのか正確にはわからない。本研究班では確立されたHCVの培養系を用いて、血漿分画製剤で実施されている主な除去・不活化法を評価しBVDVとの相違を明らかにすることを目的にしている。

また、E型肝炎ウイルス(HEV)はこれまで開発途上国等からの輸入感染症と我が国を含めた欧米では考えられていたが、先進国でも国内に常在していることが明らかになった。WHOではHEV-NATの精度管理のための国際標準品の整備を行っているところだが、我が国でも原料血漿等の品質管理としてHEVのNATが実施されており、今回、国際標準品作製にあわせて国内標準品の作製を実施した。さらにHEV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。これまでブタ等の動物由来のHEV株はあったが、発症前のヒト由来のHEV株は分離されていない。血中のHEVの性状を正確に解析するために献血血からのHEV株の樹立をめざした。

さらに、輸血用血液や原料血漿の品質管理としてHBV、HCV、HIVのNATが実施されているが、精度管理が重要である。各施設において適正に精度管理がなされているのか確認することを目的にコントロールサーベイランスを実施した。

vCJDの新規発症者は激減したが、潜伏期が長いため、血液製剤の安全性確保のためには発生状況を把握しておくことが重要である。そのために海外を含めた広い範囲から情報を収集し、評価した。

B.研究方法と結果

(1) 不活化法の研究

1.紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化の研究

赤血球をヘマトクリット40%に生理食塩水で調整し、赤血球製剤とした。赤血球製剤の容量の1/10のBVDVを添加し、検体とした。照射する赤血球製剤は深さ1.5mmに調整し、以下の方法で照射した。静置した状態で照射(UV-C)、及び製剤の内部にも紫外線が達するように照射(UV-S)、の各方法で実施し、30分と60分間照射した。また、光活性化物質を赤血球製剤に添

加し、静置での照射 (UV-L-C) と内部照射 (UV-L-S) を 30 分間行い、それぞれの感染価を測定した。BVDV が添加された赤血球製剤では、静置状態で紫外線を 60 分間照射 ($80\text{mJ}/\text{cm}^2$) しても全く BVDV は不活化されなかった。一方、内部も含めて紫外線を照射した場合は、30 分間の照射 ($40\text{mJ}/\text{cm}^2$) で約 2 Log、60 分間の照射では BVDV は検出感度以下にまで不活化され 5 Log 以上不活化された。また、光活性化物質を添加すると不活化効果が増強され、添加しない場合の約 100 倍の不活化効果が認められた。

2. 紫外線照射によるアルブミン製剤の病原体不活化の研究

市販されているアルブミン製剤に容量の 10% 相当の BVDV を添加し、不活化の評価を行った。6 穴の細胞培養用のプレートに製剤の層が 1.5mm になるように BVDV 入りの 5% アルブミンを加えた。照射は、静置のまま行った。照射単独照射 (UV) とアルブミンに光活性化物質を添加し紫外線照射 (UV-L) の各方法で 3 分、10 分、20 分間の照射を実施し、それぞれの感染価を測定した。感染価はコントロールに比較して、10 分間照射で 1/60、20 分照射で約 1/500 に不活化された。光活性化物質を添加すると不活化効果が増強し、添加しない場合の約 10 倍の不活化効率の増強が認められた。

(2) 新規ウイルス培養法の研究

1. バルボウイルス B19 の培養法

ヒト全血から PBMC を分離し、培養は、

Filippone (PLoS one 2010.e9496) らの報告に従った。無血清培地に 最終濃度が ferrous sulfate 900ng/mL、ferric nitrate 90ng/mL、erythropoietine 3IU /mL、IL-3 5ng/mL、stem cell factor 100ng/mL となるように各種因子を添加し培養液とした。7~8 日目に増殖した細胞を回収し、B19 の感染実験に用いた。B19 の感染価は B19 陽性血漿を 10^{10} まで希釈したウイルス液 100 μL をそれぞれのチューブに加え、37°C で 2 時間吸着させた。感染 2 日目に細胞から RNA を抽出し、B19-DNA が転写される時に生じる spliced-RNA の有無を nested PCR で検出した。 10^8 希釈した 100 μL まで検出できた。また、100 倍希釈した B19 血漿を誘導した赤芽球細胞に加え、培養液中の B19-DNA の量と感染細胞の形態を経時的に観察した。感染後 2 日目から非感染細胞には認められない巨細胞が出現し、これらはやがて死ぬことから B19 感染による CPE と判断した。培養液中の B19-DNA に著明な増加は認められなかった。

2. C 型肝炎ウイルスの培養系を用いた不活化法の評価

5% アルブミンに容量の 10% 相当の HCV 培養液を添加し、60°C で 1 時間加熱、又は、最終濃度 8% になるようにエタノールを添加し、4°C で 4 時間反応させた。また、筋注用ヒト免疫グロブリンに HCV を添加し、4°C で 6 日間保存した。HCV のモデルウイルスであるウシ下痢症ウイルス (BVDV) も同様の処置を行った。HCV の感染価は、

Huh7.5.1 細胞に処理した検体を加え、感染3日後に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、各 well の全細胞数をカウントすることにより感染価を計算した。或いは、蛍光（519nm）する細胞が無くなるサンプルの希釈段階から感染価を計算した。BVDV の感染価は TCID₅₀ から求めた。60℃の液状加熱では加熱後 10 分で HCV の感染価が半分以下になり、60 分では検出限界以下となり、少なくとも 3 Log 感染価が減少した。BVDV では、加熱後 5 分で感染価が半分以下となり、60 分では検出限界以下となり、少なくとも 5 Log 不活化された。8%エタノール処理では、HCV と BVDV は不活化されなかった。また、筋注用免疫グロブリンに添加した HCV は 4℃で 6 日間の保存では感染価は保たれていた。BVDV も同様の結果が得られた。

3.血液由来の HEV を用いた培養系の構築

ヒト肝癌由来細胞株 (PLC/PRF/5) を単層培養し、コンフルエント状態で HEV を感染させた。オリジナル HEV として、HEV 陽性血漿 (遺伝子 3 型・4 型 / IgM 陽性・陰性 / IgG 陰性) を使用した。PLC/PRF/5 の培養上清を除去し、約 10⁶ コピー相当の HEV を一定時間作用させた。作用後 PBS(-) で

PLC/PRF/5 を洗浄し、5%CO₂37℃インキュベーターで培養を開始した。培養には 30mM Mg²⁺/2%FCS 含有培地 (維持培地) を用いた。培養中の一定期間ごとに維持培地を交換し、得られた培地中の HEV について、RNA を逆転写の後リアルタイム PCR を用いて定量し、感染成立の有無を調べた。HEV 作用約 3 週間経過後より、感染成立の証である 嬢 HEV が確認された。培養中は嬢ウイルス産生が継続的に確認され、得られる HEV 量も経時的に増大し、10⁷~10⁸ コピー/mL でプラトーとなった。HEV 産生は実験終了時 (210 日) まで継続的に認められた。本実験では、HEV 感染に伴う細胞変性効果 (CPE) は確認されなかった。嬢 HEV 産生までに要する時間に差はあったものの、HEV の遺伝子型や抗体の有無には関係なく、全ての HEV 陽性血漿について、感染性が確認された。

(3) 核酸増幅法の精度管理の研究

1.HEV 国内標準品作製に関する研究

従来、E 型肝炎は衛生状態の悪い発展途上国において EHV が経口感染して起こる疾患と考えられてきた。しかし、近年、先進国において海外渡航歴のない患者で食物や輸血が原因と疑われる症例が報告され、先進国においても定着していると考えられるようになった。このように、血液スクリーニングや診断における HEV-NAT の重要性が認識され、2009 年に WHO は HEV-RNA 国際標準品を作製することを決定した。一方、わが国においては日本赤十字

社が E 型肝炎の発生率が高い北海道において献血血液の HEV-NAT スクリーニングを実施しており、国内標準品の作製が求められていた。ドイツのポールエーリッヒ研究所が組織する HEV-RNA 国際標準品作製のための国際共同研究において、日本の国内標準品を同時に作製することになった。両方の標準品候補品を同一の ISO17511:2003 取得施設で製造した。分注量 0.5mL の凍結乾燥品を 2153 本製造し、200 本は国際共同研究用検体として PEI に送付し、残りの 1853 本が国内標準品となった。同社が分注誤差と含湿量を測定した。国際共同研究には世界中の実績のある多数の施設が参加し、日本からも 6 施設が参加して、候補品の力価を測定した。本共同研究によって国内標準品の正確な表示力価を決定することが可能になる。国際標準品は 2011 年に ECBS で承認を受ける予定であり、ほぼ同時に国際標準品と同等の高品質な国内標準品を制定することが期待できる。

2. ウイルスの核酸増幅試験の精度管理評価に関する研究

平成 22 年度第 1 回血液事業部会安全技術調査会において献血血液のスクリーニングで実施している NAT の感度が新たに定められ、個別検体当たり HCV と HBV は 2000 IU/mL、HIV は 4000 IU/mL のウイルスゲノムを検出できる感度の NAT を用いることになった。そこで、本研究においては新しい基準と新しい検査体制の下で実施されてい

る献血血液の NAT スクリーニングの精度管理の実情把握を目的として、HIV-NAT を対象とした第 4 回コントロールサーベイを実施した。HIV-RNA 国際標準品及び国内標準品を陰性血漿で希釈し、NAT ガイドラインで新たに定めた HIV-NAT の感度に基づいて、200IU/mL とその 3 倍の濃度の 600IU/mL の検体を調製し、強陽性と陰性血漿を加えた 8 本からなるブラインド化したパネルを作成した。また、血漿分画製剤製造所と献血血液の NAT スクリーニング施設で実施している HCV-NAT が HCV ゲノムを遺伝子型に係わらず検出できることの確認を目的として、第 5 回 NAT コントロールサーベイの実施計画を立て、検体パネルを作製中である。

(4) 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。2004 年以降、英国における vCJD 新規発症件数は一桁台を推移しているが、依然として発症がみられている現状が明らかとなった。全世界で明らかになっている 2010 年 vCJD 新規発症件数は 5 件であった。

C. 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紫外線照射が有効であることを見いだした。しかし、不活化に有効な紫外線の波長や量は、不明

である。また、紫外線照射によって赤血球や血漿タンパクに与える障害も明らかになっていない。これらを検討することによって赤血球製剤の病原体不活化法として実用化が可能なのかが明らかになると考えている。これまでの紫外線を用いた不活化法の報告では、HIV に対する不活化効果が低いということであったが我々がマウスレトロウイルスを用いた検討では、効果的な不活化が可能であった。レトロウイルスの種が異なるための感受性の差が可能性として否定できないが、用いた紫外線の波長も関係しているのかもしれない。

HCV の培養系を用いた不活化法の評価では、液状加熱に極めて感受性があることが判明した。過去の血漿分画製剤においても液状加熱した製剤の HCV に対する安全性を裏付ける結果となった。また、8%エタノール処理した製剤による HCV 感染例があることも本実験の結果と一致していた。予想外な結果として、HCV が血液製剤中で極めて安定であることが判明したことである。通常、感染実験に使用するウイルスは失活しないように-80°Cで保存されているが、4°Cで少なくとも6日間は安定であり、現在も検討を続けている。これらの結果は、HCV のモデルウイルスとして不活化・除去の評価に用いられてきたウシ下痢症ウイルスを極めて類似していた。今後、20%や40%エタノール処理による検討を予定しているが、過去の製剤の安全性を検討する時に貴重な資料となると思われる。

また、HEV に関し、我が国を含めた先進国にも常在し、これまで輸血による肝機能異常の原因の一部になっていた可能性もある。エンベロープがないウイルスであることから原料血漿等の品質管理として NAT が自主的に実施されているが、精度管理として標準品の整備が必要であった。また、血液製剤の安全性確保のために HEV の除去・不活化の評価が重要であるが、これまで発症する前（血液製剤に混入する可能性のある）のヒト由来の HEV の培養株はなく、ブタやイノシシ由来であった。発症前の培養可能な HEV を得られたことは、血液中の性状解析や不活化効果を評価する上で大いに役立つと考えられる。

D. 結論

紫外線照射による赤血球製剤の病原体の不活化の可能性が出てきた。また、HCV の感染系を用いた不活化の評価からモデルウイルスとして用いられてきたウシ下痢症ウイルスと極めて類似した挙動を示した。また、HEV の国内標準品の整備ができた。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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 ,2010.vol.411:605-606

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、
浜口 功：新規レトロウイルス XMRV の検
出法と性状解析、第 58 回日本ウイルス学会、
徳島、2010 年

2) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、
岡田 義昭：血液製剤における C 型肝炎ウ
イルスの不活化の検討、第 58 回日本ウイル
ス学会、徳島、2010 年

G. 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

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。今年度は、これまで効果が期待できないとされていた紫外線照射による赤血球製剤の不活化を検討した。ウシ下痢症ウイルスを添加した厚さ 1.5mm に調整した赤血球液に UV 照射 ($80\text{mJ}/\text{cm}^2$) しただけでは全く不活化は認められなかった。しかし、液面だけでなく内部にも UV が当たるように照射したところ、60 分の照射 ($80\text{mJ}/\text{cm}^2$) によって 3.7×10^5 の感染価が検出感度以下に不活化された。30 分間の照射 ($40\text{mJ}/\text{cm}^2$) でも 2 log 不活化された。さらに光活性物質を添加することによって不活化効果が増強され約 3log 不活化できた。著明な溶血は生じなかったが、赤血球に与える障害の解析が今後必要である。

E 型肝炎ウイルスの不活化評価系のために、E 型肝炎ウイルスに高感受性を示す細胞株を検索し、PLC/PRF/5 細胞より A549 細胞の方が約 10 倍感受性が高いことが判明した。

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、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

州の一部の地域で導入されている。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、本研究を行っている。昨年度は、酸性処理による赤血球製剤の不活化を検討した。溶血が生じない条件では仮性狂犬病ウイルスの不活化は可能であったが、C 型肝炎ウイルス (HCV) のモデルであるウシ下痢症ウイルス (BVDV) では不活化効果は認められなかった。今年度は、紫外線による赤血球製の病原体不活化に重

点をおいて研究を進めた。これまで、赤血球製剤は、照射する紫外線が赤血球に吸収されるために病原体の不活化は困難とされてきた。確かに予備実験では、全く不活化効果が認められなかったが、逆に多くの試みはこの段階で断念され本当に無理なのか充分検討されていなかった可能性があるかと推定した。そこで、赤血球全体に紫外線が照射することが可能であれば、病原体の不活化が可能になると考えた。

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。昨年度、E型肝炎ウイルスの *in vitro* 感染系を用いて不活化の評価を検討したが、培養液中のウイルス量は 10^7 コピー/mL にまで達したが、感染価は 10^3 /mL 程度であり E 型肝炎ウイルスの不活化の評価には不十分であった。今年度は不活化法の評価が容易になるように HEV 高感受性細胞株の検討を行った。

B. 研究方法

1. 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 μ 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。

2. 赤血球と 5% アルブミンの調整

日本赤十字社から譲渡された肝機能異常で輸血に使用できない濃厚赤血球液を遠心し、生理食塩水を用いてヘマトクリットが約 40% になるように調整し、評価用の赤血球製剤とした。これに容量の 10% 相当の BVDV を添加した。

3. 紫外線強度の測定

紫外線には A、B、C の 3 種類があり、最も核酸に障害を与える紫外線は UV-C である。紫外線ランプは紫外線 B と C を発生させているが、本実験では UV ライトメーター (UVC-254) を用いて UVC の強度を測定した。強度は W (ワット) /cm² で表示され、これに照射時間 (秒) を掛けるとエネルギー J (ジュール) となる。今回用いた紫外線ランプの紫外線強度は、照射面で測定し、0.022mW/cm² であることから 30 分間の照射では約 40mJ/cm²、60 分照射では約 80mJ/cm² となる。

4. 紫外線照射によるウシ下痢症ウイルスの不活化

6 穴の細胞培養用のプレートに製剤の層が 1.5mm になるように BVDV 入の赤血球製剤を加えた。紫外線のエネルギーは、短波長を選択的に測定する装置で測定した。照射は、プレートの蓋による吸収を避けるために蓋なしに直接紫外線照射した。静置した状態で照射 (UV-C)、及び製剤の内部にも紫外線が達するように照射 (UV-S) の各方法で実施し、赤血球製剤では 30 分と 60 分

間照射した。また、光活性化物質を赤血球製剤に添加し、静置での照射 (UV-L-C) と内部照射 (UV-L-S) を 30 分間行い、それぞれの感染価を測定した。

5. HEV の検出法

培養液 100 μ L から R&D を用いて RNA を抽出した。RNA は 10 μ L の水に溶解し、5 μ L 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。

6. HEV の感染価測定法

感染 1 日前に 2×10^5 の PLC 細胞を 24 穴プレートに蒔いた。培養液を除去し、100 μ L の培養液を加え、種々の濃度に希釈したウイルス液を 100 μ 添加し、2 時間吸着させた。吸着後、1 mL の 30 mM-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 μ L 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。

7. HEV 高感受性細胞の検討

肝由来細胞株 (PLC/PRF/5、HepG2、HuH7)、脳神経由来細胞株 (T-98g、ONS-76、SF-126、YKG-1)、腎由来細胞株 (KMRC-1、G-401)、肺由来細胞株 (H292、A549) に昨年調整した HEV を 10^3 に希釈してそれ

ぞれ 100 μ L 添加した。感染 3 週後に培養上清中の HEV-RNA の有無を nested PCR で検出した。

C. 研究結果

1. 紫外線照射によるウシ下痢症ウイルスの不活化

BVDV が添加された赤血球製剤では、静置状態で紫外線を 60 分間照射 (80 mJ/cm²) しても全く BVDV は不活化されなかった。一方、内部も含めて紫外線を照射した場合は、30 分間の照射 (40 mJ/cm²) で約 2 Log、60 分間の照射では BVDV は検出感度以下にまで不活化され 5 Log 以上不活化された。また、光活性化物質を添加すると不活化効果が増強され、添加しない場合の約 100 倍の不活化効果が認められた (図)。

2. HEV 高感受性細胞の検討

HEV を 10^3 に希釈してそれぞれ 100 μ L 添加し、感染 3 週後に培養上清中の HEV-RNA の有無を nested PCR で検出した。肺癌由来の A549 細胞のみ陽性となったが、検討した細胞株では著明に高感受性のものは見いだせなかった。

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。実用化されている新鮮凍結血漿や血小板での病原体不活化法は、核酸に結合する化学物質を添加し紫外線照射することによって不活化する方法である。赤血球製剤の場合、表面に紫外線は当たるものの製剤の内部ま

で到達できないため、この方法では不活化は困難と考えられていた。一方、これまで、紫外線単独照射による赤血球製剤の病原体不活化法も試みられていたが、成功例は報告されていない。また、新鮮凍結血漿や血小板製剤に紫外線単独の照射を行ない病原体の不活化が可能であったとの報告もある。今回、静置しての紫外線照射では従来の報告と同様に全く不活化は確認されなかった。そこで赤血球液製剤にまんべんなく紫外線照射が可能な工夫をして照射したところ、赤血球製剤に添加した BVDV を効果的に不活化することができた。また、新鮮凍結血漿や血小板の紫外線照射では人免疫不全ウイルス(HIV)に対しての不活化効果は劣ると報告されていたが、今回我々が用いた方法では、マウス白血病ウイルスを効果的に不活化できることも判明した。紫外線照射の問題点として照射量の測定である。Mohrら(transfusion:2009,vol,49.2144-51)は血漿に UVB (2.5J/cm²) と UVC (0.5J/cm²) をそれぞれ照射して不活化を評価しているが UVB にも不活化効果があり、我々が用いた紫外線ランプが UVC だけでなく UVB も発生している可能性があり、不活化に必要な正確なエネルギー量が決定し難いことである。我々が評価した 80mJ は Mohr のその 1/6 であることを反映しているのかもしれない。さらに、赤血球製剤に光活性化物質を添加したところ、不活化効果の増強が確認できた。添加することで紫外線の量を減少できれば赤血球への紫外線照射によ

るダメージを少なくすることも可能かもしれない。

今回、溶血は著明ではなかったが、赤血球が黒色になる傾向が認められた。これは不活化が認められなかった静置でも認められ、不活化効果と直接関係するものではないが赤血球に何らかの機能障害を与えていることが示唆された。解決策として、紫外線ランプから発生する紫外線の波長をブロードなものから均一の波長にすることによって、どの波長の紫外線に不活化効果と黒色変性とを分けられる可能性がある。今年度の研究で紫外線照射による赤血球の病原体不活化が可能であることが判明し、本研究班の課題を推進する上で大きな一歩となった。

HEV の不活化効果を評価するための高感受性の細胞株見いだせなかったが、A549 細胞が昨年度使用した細胞株に比べ 10 倍高感受性であることが判明し、僅かではあるが、HEV の不活化法の評価可能な範囲が拡大した。

E. 結論

紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化法を検討し、静置するだけでは全く効果がなかったが、赤血球製剤の内部まで紫外線が到達できる方法を考案したところ、紫外線照射だけで HCV のモデルウイルスである BVDV を効果的に不活化することができた。赤血球に与える影響は未解析だが、赤血球製剤に応用可能な不活化法開発が可

能であることが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 ,2010.vol.411:605-606

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、浜口 功：新規レトロウイルス XMRV の検出法と性状解析、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年

2) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭：血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

UV: 0.022mW/cm²

L: 光活性化物質

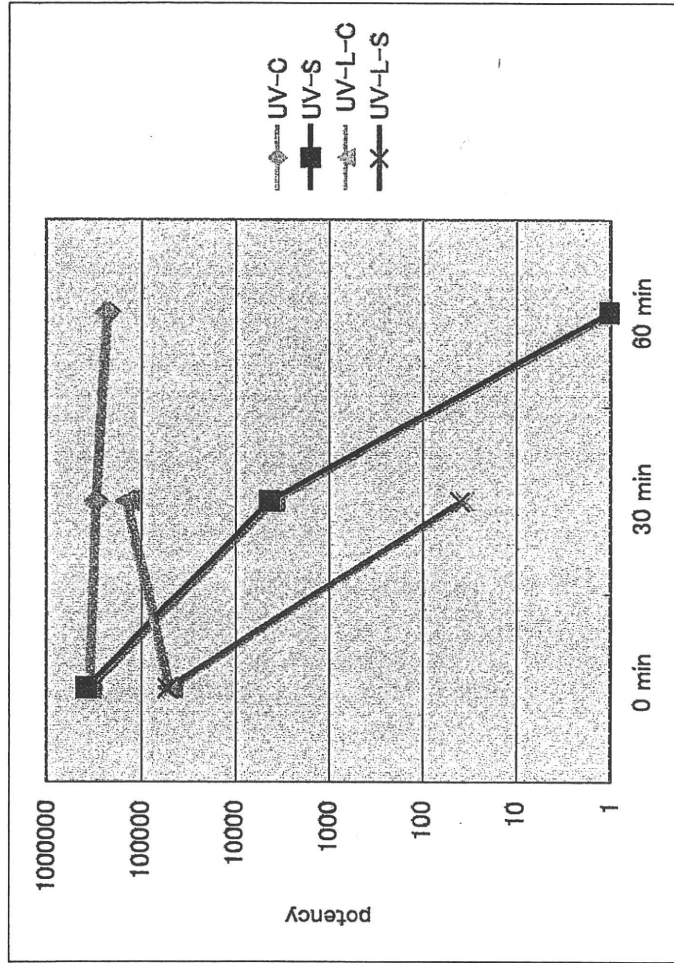


図 赤血球の紫外線照射によるBVDVの不活化

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)
分担研究報告書

血漿における病原体の不活化法とパルボウイルス増殖系の開発
研究分担者 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

1) 核酸に結合する性質を有する光活性化物質を血漿や血小板製剤に添加して紫外線照射を行なう病原体の不活化法は既に欧州の一部地域で臨床に導入されている。その一方で、添加する化学物質の毒性が危惧されることから紫外線照射のみの不活化法開発も行われている。今年度、我々は紫外線照射のみによる血液製剤の病原体不活化を検討した。ウシ下痢症ウイルス (BVDV) を添加し、厚さ 1.5mm に調整した 5%アルブミン液に UV 照射し、不活化の効率を検討した。20 分間の照射 ($27\text{mJ}/\text{cm}^2$) によって感染価は約 1/500 になった。また、光活性化物質を添加すると不活化効率は 10 倍増強され 1/5000 になった。

2) パルボウイルス B19 (以下 B19) は *in vitro* で増殖させることは困難であるが、ヒト末梢単核球を成長因子を用いて赤芽球細胞に分化させ B19 を感染させると感染が成立し、特徴的な巨細胞が認められた。これまで我々が最も感受性が高い細胞株と同等の感受性を示した。

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、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。一方、

添加する化学物質の安全性の問題から紫外線照射単独による不活化法も検討されている。それらの報告では、高エネルギーの紫外線を照射し、希釈した血漿を用いないと不活化効果が得られないという報告もある。我々は、ウイルスの不活化の評価に標準的に用いられている 5%アルブミンを用いて、紫外線単独照射の病原体の不活化効果と検討した。

また、紫外線照射による血漿の不活化では、興味あることに他の方法では非常に高い抵抗性を示す B19 が容易に不活化されるとの報告がある。B19 の不活化を評価する

ために我々は、既に細胞株を用いた感染評価系を確立しているが、この系では細胞内で RNA への転写までは進むが、ウイルスタンパクの発現やウイルス粒子の形成は確認できない。今年度は、より効果的な感染評価系構築のために、ヒト由来 PBMC から誘導した赤芽球が B19 の感染評価に用いることができるのか検討した。

B. 研究方法

1. 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 μ 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 TCID₅₀ を求めた。

2. ウシ下痢症ウイルスの調整

5% アルブミンは市販されているアルブミン製剤を購入し、容量の 10% 相当の BVDV を添加し、不活化の評価を行った。

3. 紫外線強度の測定

紫外線には A、B、C の 3 種類があり、最も核酸に障害を与える紫外線は UV-C である。紫外線ランプは紫外線 B と C を発生させているが、本実験では UV ライトメーター (UVC-254) を用いて UVC の強度を測定した。強度は W (ワット) /cm² で表示され、これに照射時間 (秒) を掛けるとエネルギー J (ジュール) となる。今回用いた紫外線ランプの紫外線強度は、照射面で測

定し、0.022mW/cm² であることから 20 分間の照射では約 27mJ/cm² であった。

4. 紫外線照射によるウシ下痢症ウイルスの不活化

6 穴の細胞培養用のプレートに製剤の層が 1.5mm になるように BVDV 入の 5% アルブミンを加えた。照射は、プレートの蓋による吸収を避けるために蓋なしに直接紫外線照射し、また、静置のまま行った。照射単独照射 (UV) とアルブミンに光活性化物質を添加し紫外線照射 (UV-L) の各方法で 3 分、10 分、20 分間の照射を実施し、それぞれの感染価を測定した。

5. PBMC からの赤芽球細胞の誘導

日本赤十字社から譲渡された量不足の全血からバツフィコートを分離した。培養は、Filippone (PLoS one 2010.e9496) らの報告に従って、無血清培地に最終濃度が ferrous sulfate 900ng/mL、ferric nitrate 90ng/mL、erythropoietine 3IU /mL、IL-3 5ng/mL、stem cell factor 100ng/mL となるように各種因子を添加し培養液とした。5X10⁵/mL ずつ 24 穴プレートに撒き 5 日間培養した。5 日目に培地を交換し、7~8 日目に増殖して来た細胞を回収し、B19 の感染実験に用いた。また、分離直後と 5 日目の細胞を回収し、凍結保護液を加えて -80 度に凍結保存した。凍結一ヶ月後に解凍し、上記の培養液で培養し、赤芽球細胞への分化を検討した。

6. B19 の感染実験

PBMC から培養開始 7~8 日目の増殖し

てきた細胞を集め 2X10⁵/穴ずつエッペン
ドルフチューブに分注し、遠心にてペレ
ットにした。これに B19 陽性血漿を 10⁻¹⁰ まで
希釈したウイルス液 100 μL をそれぞれの
チューブに加え、37 度 C で 2 時間吸着さ
せた。感染 2 日目に細胞から RNA を抽出
し、B19-DNA が転写される時に生じる
spliced-RNA の有無を nested PCR で検出
した。また、100 倍希釈した B19 血漿を同
様に誘導した赤芽球細胞に加え、培養液中
の B19-DNA の量と感染細胞の形態を経時
的に観察した。

C. 研究結果

1. 紫外線照射によるウシ下痢症ウイルス の不活化

BVDV が添加された 5% アルブミンを静
置した状態で照射したところ、感染価はコ
ントロールに比較して、10 分間照射で 1/60、
20 分照射で約 1/500 に不活化された。光
活性化物質を添加すると不活化効果が増強
し、添加しない場合の約 10 倍の不活化効
率の増強が認められた (図 1)。

2. PBMC から誘導した赤芽球細胞の B19 感染の検討

Filippone らの報告どおりに PBMC は誘導
され、B19 の感染実験に使用できた。また、
赤芽球への誘導前や 5 日後の細胞は凍結保
存が可能で、解凍後に実験に使用できた。
しかし、10 日を超えると成熟し、増殖も停
止した。培養 8 日目の細胞に B19 を感染さ
せたところ spliced-RNA が 10⁸ 希釈した 100

μL まで検出できた。また、感染後 2 日目
から非感染細胞には認められない巨細胞が
出現し (図 2)、これらはやがて死ぬことか
ら B19 感染による CPE と判断した。培養液
中の B19-DNA は著明な増加は認められな
かった。

D. 考察

新鮮凍結血漿や血小板製剤に光活性化物
質を添加して紫外線の照射を行なう病原体
不活化法は、既に実用化され、欧州の一部
地域で導入されている。一方、Mohr ら
(transfusion:2009,vol,49.2144-51) の報
告にあるように紫外線単独照射による不活
かも研究されている。我々のアルブミンで
の不活化効果が Mohr らに比べて小さいの
は照射したエネルギー量による可能性があ
る。彼らの照射した紫外線のエネルギーは
500mJ であるのに対し、我々は 27mJ であ
った。短波長の紫外線に不活化の活性が高
いことから、より高エネルギーの照射が必
要になる。一方で、血漿蛋白の失活も予想
されることから紫外線の波長を不活化効果
が期待できる波長のみにして必要以上の血
漿タンパクの失活を予防することが重要に
なると考えている。

一方、B19 感染系構築のためにヒト
PBMC から赤芽球を誘導し、B19 への感受
性を検討した。これまでの赤芽球の誘導系
は、GCS を投与して造血幹細胞を末梢に動
員する前処理が必要であったが、Mohr らの
方法は、無処理の PBMC から誘導できるこ

とから有効な方法である。誘導した赤芽球細胞は、我々がこれまで最も高感受性と考えていた細胞株と同等の感受性を示した。さらにこれまでの細胞株では、B19 が感染しても B19 のウイルスタンパクは確認できなかった。また、B19 に感染したヒト骨髓に見られる特徴的な巨細胞形成も認められなかったが、PBMC 由来の赤芽球細胞では容易に確認することができた。この系は、来年度に予定されている B19 の不活化法評価に大いに役立つと考えられた。

E. 結論

紫外線照射によるアルブミンの病原体不活化法を検討し、光活性化物質なしでもウシ下痢症ウイルスの不活化は求められた。また、ヒト PBMC から赤芽球細胞が誘導でき、感染実験に使用できる量の細胞数を確保することができた。B19 の感染が確認でき、感染によって巨細胞の出現を初めて確認できた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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 ,2010.vol.411:605-606

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、梅森 清子、浜口 功:新規レトロウイルス XMRV の検出法と性状解析、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年

2) 下池 貴志、野島 清子、脇田 隆字、岡田 義昭:血液製剤における C 型肝炎ウイルスの不活化の検討、第 58 回日本ウイルス学会、徳島、2010 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし