

201132013A

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 23 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 24 (2012) 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 23 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 24 (2012) 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

P 7-P12

岡田 義昭

2. 血漿における病原体不活化法

P13-P17

野島 清子

3. C型肝炎ウイルスの不活化評価法の開発

P18-P24

下池 貴志

4. E型肝炎ウイルス国内標準品の作製

P25-P45

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

P46-P49

鈴木 光

6. 異常プリオンの不活化法の研究

P50-P52

太組 一郎

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P53

IV. 研究成果の刊行物・別冊

P54-P85

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不活化効果に影響を与える因子について解析し、紫外線量、赤血球溶液の液層の厚さ、ヘマトクリット値、混合する速度の4つが重要であることが明らかとなった。
2. 各種のヒト免疫グロブリン製剤に1〜2Jの紫外線を照射したところ、液状製剤は2Jまで著明な変化は認められなかったが、乾燥製剤においては2Jの照射によってオリゴマーや重合物の増加が認められた。
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℃の液状加熱、40%エタノール処理、紫外線照射によって不活化することができた。さらにヒト免疫グロブリン中では、4℃で極めて安定であることも明らかにした。これらはHCVのモデルウイルスであるBVDVの結果と一致した。
5. WHOのE型肝炎ウイルス(HEV)の国際標準品と一緒に国内標準品を作製し、国内製造メーカーを含む多施設参加の国際共同研究によって力価を決定した。国際標準品と国内標準品の力価は、共に250,000IU/mLに決定した。
6. 献血由来の2つ異なる血漿から2株の*in vitro*で増殖するHEV株の培養に成功し、電顕によってHEVに相当する大きさの粒子が確認できた。血漿のウイルスと培養系に馴化したウイルスの塩基配列を比較したところ変異は極僅かであった。
8. トルコからのvCJD症例を精査した結果、懐疑的であることが判明した。今後ともEU以外の国や地域を含めたvCJD発生状況を把握する必要がある。

分担研究者

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

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。本研究班では、最も重要な赤血球製剤の病原体不活化法の開発を目指し研究を実施しているが、昨年度の研究によって紫外線照射による病原体の不活化が可能であることを明らかにすることができた。今年度は、効率良く不活化するために不活化効率に影響する因子について解析した。また、紫外線照射の製剤に与える影響を評価するためにヒト免疫グロブリンに紫外線照射し、HPLCを用いて性状の変化を解析した。C型肝炎ウイルスの不活化評価法の研究では、液状加熱、40%エタノール処理によるHCVの不活化について解析し、ウシ下痢症ウイルス (BVDV) と比較検討した。また、HCVの安定性の評価実験を行い、HCVのヒト免疫グロブリン製剤中での安定性をBVDVと比較検討した。

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

かになった。WHOでは血液の安全性向上のためにHEV-NATのための国際標準品を作製したが、本研究班では国際標準品作製に協力し、同時に国内標準品の候補品を作製した。本年度は、力価決定のための共同研究の結果をまとめそれぞれの力価を決定した。

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、ヒトとブタ由来のウイルス株の相違が十分に解析されていない現時点では、不活化法の評価に使用するウイルスはヒト由来が必要である。ヒト血中のHEVの性状を正確に解析するために献血血からのHEV株の樹立と性状解析を実施した。

vCJDの新規発症者は激減したが、潜伏期が長いこと、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. 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、赤血球溶液とした。赤血球製剤の容量の1/10のBVDVを添加し、検体とした。照射する赤血球溶液の液層の厚さは4.1mmに調整し、製剤の内部にも紫外線が

達するように照射した。コントロールとして紫外線照射のみによる不活化の評価を行った。照射は紫外線 C を主に発生させるランプを使用し、照射線量は紫外線 C のみ測定する線量計を用いて測定した。紫外線単独では BVDV の不活化効果は全く認められなかったが、混合することによって効果的に不活化が可能になった。不活化の条件を変えて検討したところ、照射量が多い程ウイルスを不活化することができた。また、ヘマトクリットが低いこと及び液層が薄いことによって指数的に不活化効率は上昇した。さらに、混合する頻度を高くしても不活化効果は高くなった。一方、紫外線の照射量と溶血傾向は、照射量が増加する程溶血は増加したが、著明な増加は確認できなかった、

2. 血漿における病原体不活化法

全血製剤に紫外線照射した場合の血漿由来タンパクに与える影響を検討した。市販されているヒト免疫グロブリン製剤に 1~2J/cm²の紫外線 C を照射し、照射前との比較をサイズ排除クロマトグラフによって解析した。検討した製剤において、1J/cm²照射では凝集体およびオリゴマーは産生されるものの静注可能な量であることが確認できた。2J/cm²の照射では、液状製剤においては現行の生物学的製剤基準を満たしたが、乾燥製剤では製剤によって白濁が認められ、凝集体の産生が顕著となるものも確認できた。さらにサイズ排除クロマトグラフにおいても現行の生物学的製剤基準を満たして

いないことが確認できた。

3. C型肝炎ウイルスの不活化評価法の開発

不活化効率を詳細に解析するためにウイルスを濃縮し感染価の高い HCV を作製し、以下の検討を行った。1) 5%アルブミン製剤及びヒト免疫グロブリン製剤での 60°C液状加熱、2) 40%エタノール処理による不活化、3) ヒト免疫グロブリン製剤中での安定性、4) UV 照射により HCV の不活化、を調べた。またこれまで HCV のモデルウイルスとして用いられてきたウシウイルス性下痢症ウイルス (BVDV) の場合と比較した。その結果、5%アルブミン製剤やヒト免疫グロブリン製剤中では 60°Cの液状加熱によって検出感度以下にまで不活化された。また、HCV は 40%エタノール処理 1 時間で効率よく不活化されることも明らかにした。さらに紫外線 C の照射によっても不活化されることを確認できた。一方、ヒト免疫グロブリン製剤中では、4°Cに保存した場合、28 日間その感染価は変化なく極めて安定であることが判明した。これらの特徴は、これまで HCV のモデルとして用いられてきたウシ下痢症ウイルス (BVDV) と同じであった。従って、BVDV は HCV のモデルウイルスとして非常に適したウイルスであることも明らかにできた。

4. HEV 国内標準品作製に関する研究

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、候補品の力価を定量法、又は定性法を用いて測定した。その結果、国際標準品の力価は 5.26 Log NAT detectable units/mL、国内標準品は 5.39LogNAT detectable units/mL となったが統計学的に両者の測定値の差は無視しできる程度に小さいことから国際標準品と国内標準品は共に 250,000 IU/mL に決定した。今後、調査会等の審議を経て、国内標準品として承認され、国立感染症研究所から交付されることになる予定である。

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

ヒト培養細胞株（肝癌由来細胞株 PLC/PRF/5、肺癌細胞株 A549）を単層培養し、コンフルエント状態で HEV を感染させた。HEV 陽性血漿の HEV JRC-HE3 と HEV UA-1 から由来する 2 つの HEV 培養株が得られた。2 つのウイルス株は、感染細胞に CPE を誘導しなかった。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た。UA-1 株では $10^3 \sim 10^4$ コピー/mL で、JRC-HE3 では $10^7 \sim 10^8$ コピー/mL で、それぞれプラトーとなった。HEV 産生は実験終了時(112日)まで継続的に認められた。また、JRC-HE3 株については、ウイルス固定後透過電子顕微鏡観察を行ったところ、約 30nm の小型球形粒子が確認された。免疫学的手法によって、これらが HEV 粒子であることが確認された。

6. 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。トルコから vCJD の症例報告がなされたが、精査した結果、懐疑的であることが判明した。今後とも EU 以外の国や地域を含めた vCJD 発生状況を把握する必要がある。

7. パルボウイルス B19 の国内標準品の作製

国内標準品作製のための、B19 陽性血漿、及び希釈用血漿の準備を行った。さらに、国内に感染性の血漿を分注してくれる受託

業者がないために 0.5mL ずつガラスバイアルに分注するための装置の評価と購入、 -80°C 凍結に耐えられるガラスバイアルの選択と購入、 -80°C に凍結してもバイアルから剥がれないラベルの評価と購入を行った。

C. 考察

本研究班のメインテーマである「赤血球製剤の病原体不活化法の開発」は、いろいろな不活化法を検討したが、これまで効果がないと考えられていた紫外線 C による不活化法が有効であることを見いだした。紫外線の照射だけでは病原体の不活化はできなかつたが、赤血球溶液の内部まで紫外線が達するように照射法を改良したためである。より効果的に病原体を不活化するために不活化効率に影響を及ぼす因子を解析し、紫外線の照射量、ヘマトクリット値、赤血球溶液の厚さ、混合する速度、が重要であることを明らかにすることができた。特に、ヘマトクリット値と赤血球溶液の厚さは重要な因子であり、これらの値を 1/2 にすることによって Log スケールで不活化効率が増加した。しかも検討した範囲内では、赤血球の不活化処理によって溶血はほとんど生じなかつた。しかし、溶血は問題ないにしろ紫外線照射によって赤血球や血漿タンパクにどのような障害を与えるのか慎重に検討する必要がある。

HCV の培養系を用いた不活化法の評価では、液状加熱、40%エタノール処理、紫外線照射の 3 つの不活化法を用いて HCV の不活化効果を評価し、併せて BVDV と比較検討

した。結論として、これらの 3 つの方法によって容易に HCV が不活化されることを初めて示すことができた。驚くべきことに BVDV と全く同じ結果となり、BVDV が HCV のモデルとして非常に適していることを証明することができた。血漿分画製剤のウイルスバリデーションでは、HCV の代わりに BVDV が使用されてきた歴史があり、BVDV を使用した莫大なデータが HCV の評価として使用できると考えられる。一方、ウイルスを我々が保存する場合、 -80°C に凍結保存するのが一般的であるが、HCV と BVDV においては、 4°C のヒト免疫グロブリン製剤中で少なくとも 28 日間感染性が変化しなかつた。グロブリン製剤中では極めて安定であることが明らかになった。過去の文献に免疫グロブリンにおける BVDV の安定性を記載した報告があるが、これを追試した結果となった。

また、HEV に関し、我が国を含めた先進国にも常在していることが明らかになった。抗体陽性率が高いことから多くの場合、不顕性感染となっていることが推定される。エンベロープがないウイルスであることから種々の不活化法に抵抗性である可能性もあり、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。精度管理のための標準品の整備が必要であった。国際標準品と国内標準品を同時に作製することができ、しかも国内製造メーカーも参加した国際共同研究によって国内標準品の力価を決定することができた。一方、ヒト血液由来の HEV の培養株はなかつたが、2 つの異なる

る株を得ることができた。血液製剤の安全性確保のためにHEVの除去・不活化の評価にこれらのウイルス株は有用であると考えられた。

D. 結論

紫外線照射による赤血球製剤の病原体の不活化法を開発した。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の国内標準品の力価を決定し、*in vitro*で増殖する2つのヒト由来のHEV株を樹立した。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Sally A. Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, Kay-Martin O. Hanschmann:
Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT)-Based Assays. WHO/BS/2011.2175
EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION Geneva, 17-21 October 2011

2. 学会発表

1) Sally Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, C. Micha Nubling, Kay-Martin

Hanschmann: Laboratory performance for hepatitis E virus RNA detection and development of a WHO International Standard. 14th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira, September 2011.

2) 梅森 清子、岡田 義昭、浜口 功: 過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法によるHCV遺伝子検査について、第59回日本ウイルス学会、札幌、2011年

3) 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、第59回日本ウイルス学会、札幌、2011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不活化法の開発

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の開発を目指した。昨年度の研究によって紫外線照射による赤血球製剤の不活化が可能なが判明したので、効率良く病原体を不活化できる条件を検討した。

- 1) ヘマトクリット（以下 Ht.）40%、赤血球の液層 4.1mm の条件で紫外線を赤血球全体に均一に照射する（Star method）方法によって 2J では 2Log 以上、3J では 4Log 以上の効率でウシ下痢症ウイルス（BVDV：bovine viral diarrhea virus）を不活化することができた。
- 2) 5J まで照射する紫外線量を増加させ、赤血球の溶血を解析したが、著明な溶血は生じなかった。
- 3) 紫外線照射による不活化の効率に影響する因子は、ヘマトクリット値、液層の厚さ、紫外線照射量、混合速度であった。

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、本研究を行ってきた。昨年度に短波長の紫外線（UV-C）照射によって赤血球製中の病原体の不活化に成功した。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が、赤血球を均一に照射することによって病原体の不活化に成功した。今年度は、UV-C の照射量を正確

に測定し、病原体の不活化効率に影響を与える因子を明らかにして、効果的な照射方法を検討した。

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 5×10^4 /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 ずつ細胞に感染させた。感染 10~14 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. 赤血球の調整

日本赤十字社から譲渡された肝機能異常のために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 10~40% になるようにそれぞれ調整し、評価用の赤血球製剤とした。これらに容量の 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。紫外線ランプは〇〇を使用した。紫外線 C の照射量は UV ライトメーター (UVC-254) を用いて測定した。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。今回検討した主な紫外線照射量は、1~3J である。なお、実験毎に照射面での

紫外線量を測定し、目的の線量に必要な照射時間を計算した。

4. 紫外線照射によるウシ下痢症ウイルスの不活化

紫外線の透過性が良い素材を用いて照射用の実験バッグを作製した。10mL の赤血球製剤を実験用バッグに入れると液層の厚さは約 4.1mm となった。添加する赤血球の容量を変えることによって液層の厚さを 1.5mm と 8.2mm に調整した。照射方法は、BVDV を添加した赤血球を照射用バッグに入れ、バッグの赤血球が良く混合できるように工夫した装置の上に乗せ赤血球全体に照射 (Star method と名付けた) した。紫外線照射のみによっても不活化されるので、それを評価するために静置した状態で照射し、混合した場合と不活化効率を比較した。照射後の検体は、3000rpm で 10 分間遠心し、上清を集め BVDV の感染価を測定した。

また、ヘマトクリット 40% に調整した赤血球溶液に 2J/cm²、3J/cm²、4J/cm²、5J/cm² それぞれ照射し、遠心後の上清を集め OD を測定して溶血を評価した。

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

1) 混合による不活化効率

ヘマトクリット約 40% に調整した赤血球溶液に BVDV が添加し、静置状態で紫外線を 3J/cm² 照射しても全く BVDV は不活化されなかった。一方、混合しながら紫

外線を照射した場合は、 $2\text{J}/\text{cm}^2$ で 2 Log、 $3\text{J}/\text{cm}^2$ で 4Log BVDV を不活化することができた (図 1)。また、照射する赤血球溶液の液層の厚さを 1.5mm、4.1mm、8.2mm にそれぞれ調整し、紫外線照射したところ、1.5mm の液層の赤血球溶液は、 $1\text{J}/\text{cm}^2$ で約 4 Log BVDV を不活化することができた。一方、8.2mm では $3\text{J}/\text{cm}^2$ の照射で 1 Log 程度しか不活化できなかった (図 2)。また、ヘマトクリットの値が 10%では $1\text{J}/\text{cm}^2$ で 5 Log、20%では $1\text{J}/\text{cm}^2$ で約 4 Log と効率良く BVDV を不活化することが可能であった (図 3)。

2) 紫外線照射による溶血

静置よりも混合しながら紫外線照射した方が溶血の割合は高かった。照射量が多くなると未照射よりも溶血度は高いが、線量が多くなるに従って増加するとはかぎらなかった (図 4)。また、照射終了後、遠心し、新たな生食で浮遊させ溶血を確認したが、著しい溶血は認められなかった。

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における病原体不活化法は、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である。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。我々は、昨年度の研究によって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が、赤血球液製剤にまんべんなく紫外線照射することによって赤血球製剤に添加した BVDV を効果的に不活化することに成功した。今年度は、紫外線照射による病原体の不活化効率に影響する因子の解析を行った。紫外線照射による不活化の効率に影響する因子は、ヘマトクリット値、液層の厚さ、紫外線照射量、混合速度であることを示すことができた。特にヘマトクリット値が 1/2 になると不活化効果は Log スケールで増加した。この効果は、実用化を考慮すると重要な因子と考えられた。また、通常の不活化試験において液層の厚さを 4.1mm としたのは、血小板で実用化されている紫外線のみによる病原体不活化法において、血小板製剤の厚さが 4.1mm であることからである。液層の厚さを 2 倍にすると不活化効率は約 2 Log 低下し、逆に厚さを 1/2 にすると 2Log 効率は増加した。これらのことから、不活化効果は少しの不活化条件の変更によって指数的に変わることが示唆された。また、赤血球への影響を反映する指標として溶血性を評価したが、紫外線照射では著明な溶血は生じなかった。

今年度は、照射量を正確に測定するために紫外線 C を照射する装置を用い、線量は紫外線 C の波長 246~260nm のみを測定する線量計を用いて照射線量を測定した。こ

これらの装置によって照射した紫外線の質や線量の精度を高めた状態で全ての不活化実験を実施した。

一方、紫外線照射による赤血球製剤の不活化は、実例がなく、照射によってどのような影響が赤血球に生じるのか慎重に検討することが必要であると考えられた。

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、不活化の効率に影響する因子はヘマトクリット値、液層の厚さ、紫外線照射量、混合速度であった。また、紫外線照射によって著明な溶血は生じなかった。以上から、赤血球製剤の病原体不活化法として有用なことが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sally A. Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, Kay-Martin O. Hanschmann:
Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis E Virus RNA for Nucleic Acid

Amplification Technology (NAT)-Based Assays. WHO/BS/2011.2175

EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION Geneva, 17-21 October 2011

2. 学会発表

1) Sally Baylis, Saeko Mizusawa, Yoshiaki Okada, C. Micha Nubling, Kay-Martin Hanshmann: Laboratory performance for hepatitis E virus RNA detection and development of a WHO International Standard. 14th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology, Madeira, September 2011.

2) 梅森 清子、岡田 義昭、浜口 功：過去の血漿分画製剤に対する核酸増幅法によるHCV遺伝子検査について、第59回日本ウイルス学会、札幌、2011年

3) 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、第59回日本ウイルス学会、札幌、2011年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

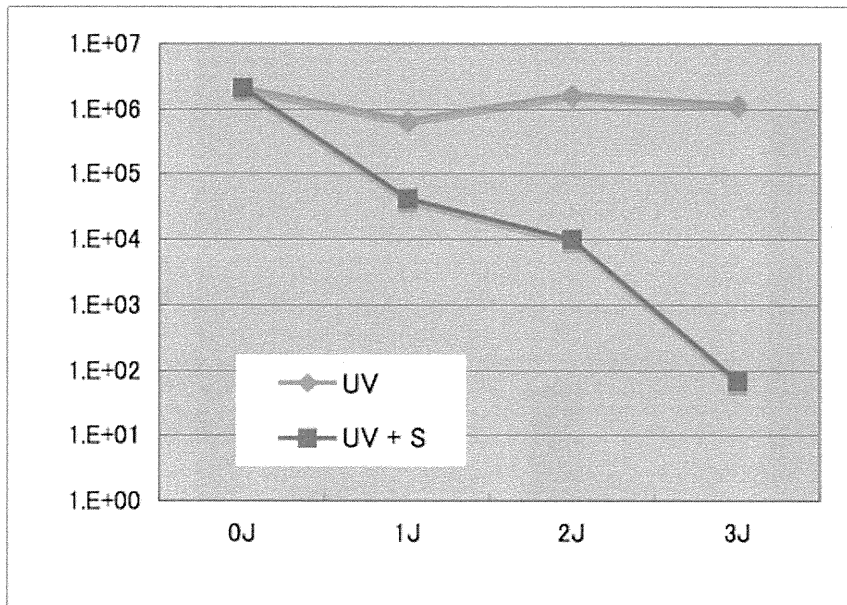


図1 紫外線照射による赤血球製剤におけるBVDVの不活化

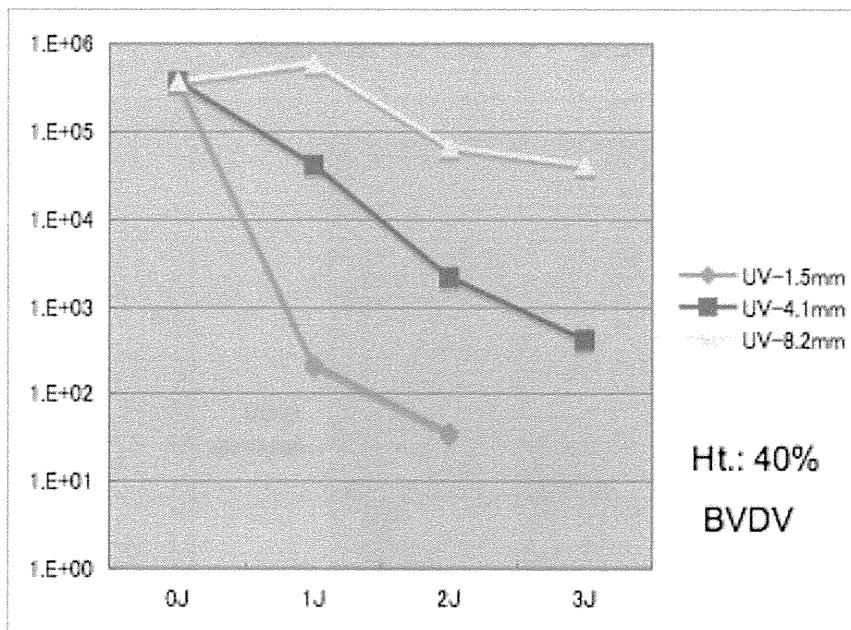


図2 赤血球製剤の液層の厚さと不活化効率

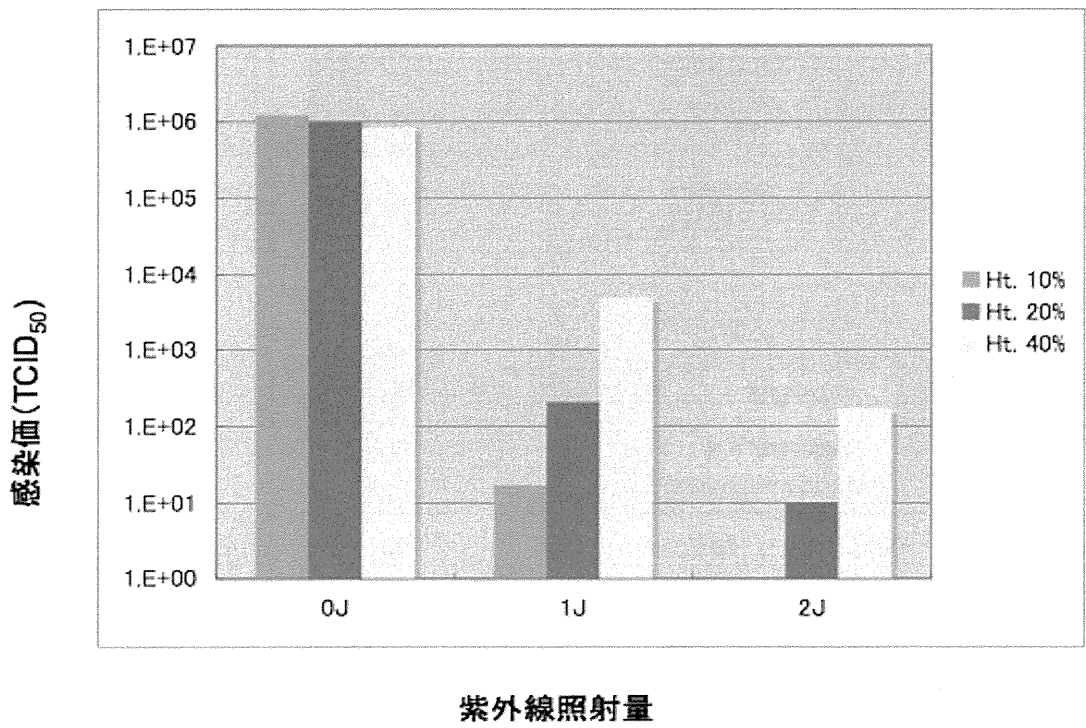


図3 BVDV不活化効果に与えるヘマトクリット値の影響

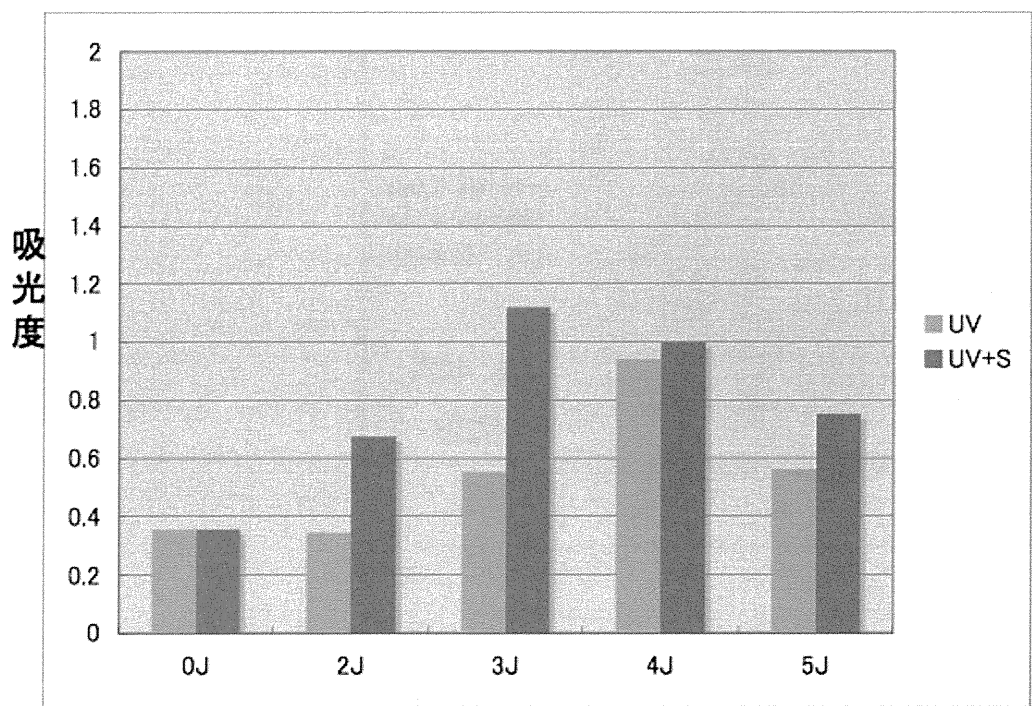


図4 紫外線照射による赤血球の溶血

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：血漿における病原体不活化法

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

血液を汚染する多くの病原体は紫外線に感受性である。核酸に結合する光増感物質等を添加し紫外線照射を行なう病原体不活化法が血漿、血小板製剤に対して欧州の一部地域で導入されている。一方で日本では、安全性の観点から不活化導入には慎重であり、現時点で輸血用血液製剤の不活化処理は導入されていない。安全性の観点から紫外線照射単独での不活化法も検討されている。赤血球製剤の不活化は非常に難しく、これは製剤中に含まれるヘモグロビンが近紫外領域に吸収極大を持つことに起因し、赤血球製剤に紫外線を照射したとしても、ほぼすべてがヘモグロビンに吸収され、病原体まで紫外線が届かずに不活化効果を全く示さない。赤血球製剤の不活化処理はまだいずれの国でも導入されていない。そのため赤血球製剤、血小板製剤、血漿のすべての製剤、および全血に対して有効な不活化法は開発されていない。我々は、本研究において 4.1mm の薄層バッグ中の赤血球に含まれるウイルスを UV 単独で不活化する方法を開発している。照射した UV が直接病原体に届くような特殊処理を施し、赤血球存在下でもウイルスに UV が当たるように工夫した方法である（岡田義昭主任研究者分担分参照）。そこで、本分担研究においては、この特殊 UV 照射法を全血に応用可能であるかを検討する事を目的とし、その機能維持について、特にグロブリンの凝集体産生に着目して検討した。UV 照射量はウイルスの不活化が認められるエネルギー量を使用した。グロブリンは非常に不安定であり、物理的刺激、化学的刺激により容易に凝集し、産生された微量凝集体は非特異的に補体系を活性化し、アナフィラキシーショック等の副作用を引き起こす可能性がある。グロブリン製剤に 1or 2J/cm² の UVC を照射し、その際の製剤中の凝集体量をサイズ排除クロマトグラフにより検出を試みた。その結果、用いたいずれに製剤においても 1J/cm² 照射までは凝集体およびオリゴマーは産生されるものの静注可能な量であることが確認できた。2J/cm² の照射では、製剤によっては白濁が認められ、凝集体の産生が顕著となることが確認できた。これらの結果から、

BVDV ウイルスの不活化効果が認められる（岡田義昭主任研究者分担分）1J/cm²の照射においては、副作用が問題となるような量のグロブリンの凝集体は産生されない事が示唆された。

A.研究目的

血液を汚染する多くの病原体は紫外線に感受性である。核酸に結合する光増感物質等を添加し紫外線照射を行なう病原体不活化法が血漿、血小板製剤に対して欧州の一部地域で導入されている。一方で日本では、安全性の観点から不活化導入には慎重であり、現時点で輸血用血液製剤の不活化処理は導入されていない。安全性の観点から紫外線照射単独での不活化法も検討されている。赤血球製剤の不活化は非常に難しく、これは製剤中に含まれるヘモグロビンが近紫外領域に吸収極大を持つことに起因し、赤血球製剤に紫外線を照射したとしても、ほぼすべてがヘモグロビンに吸収され、病原体まで紫外線が届かずに不活化効果を全く示さない。赤血球製剤の不活化処理はまだいずれの国でも導入されていない。そのため赤血球製剤、血小板製剤、血漿のすべての製剤、および全血に対して有効な不活化法は開発されていない。我々は、本研究において4.1mmの薄層バッグ中の赤血球に含まれるウイルスをUV単独で不活化する方法を開発している。照射したUVが直接病原体に届くような特殊処理を施し、赤血球存在下でもウイルスにUVが当たるように工夫した方法である（岡田義昭主任研究者分担分参照）。そこで、本分担研究に

においては、この特殊UV照射法を全血に応用可能であるかを検討する事を目的とし、その機能維持について、特にグロブリンの凝集体産生に着目して検討した。

B.研究方法

1.グロブリン製剤

市販されている静注用人免疫グロブリン製剤（グロブリン製剤）のうち、本研究においては、完全分子型の製剤を選択した。完全分子型のグロブリン製剤は、その製造工程中においてグロブリン凝集体の産生を抑制する又は除する目的で、pH4処理、ポリエチレングリコール処理、イオン交換樹脂処理を行なっている。本研究においては、これらの製剤のうち、中性付近のpHの原料を凍結乾燥して採取製品とした乾燥イオン樹脂処理人免疫グロブリン、乾燥pH4処理人免疫グロブリン、乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリンを用いた。また、低pH（pH3.7-4.1）のグロブリンを液状のまま最終製品としたポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン、pH4処理酸性人免疫グロブリンを用いた。

2.サイズ排除クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィーとして日立-2000シリーズ（Column Oven L-2350, Diode Array Detector L-2455, Autosampler L-2200, Pump L-2130）

を用いて分析を実施した。サイズ排除クロマトカラム (ゲルろ過カラム) としては東ソー G3000SWXL (2本) を用いた。流速は 0.5 mL/min で行った。溶離液組成は 0.1M Na₂SO₄ , 0.05% NaN₃ in 1/7.5M Phosphate buffer pH7.0 とした。

5) 紫外線照射

UVC 領域の紫外線照射装置を用いた。紫外線透過性粗材のバッグ中に 10mL のグロブリン製剤を入れ、厚さ 4.1mm となるようにシールした。UV 照射面が常に入れ替わるような工夫を施した装置を用いて、0 から 2J/cm² のエネルギー量の UVC を照射した。

C. 研究結果

1. 液状製剤

最終製品の pH が酸性に保たれているグロブリン製剤 2 種類、pH 4 処理人免疫グロブ

リン、ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリンの UVC 照射に体する凝集体の産生をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析した。その結果、2J/cm² の処理によって新たなオリゴマーの産生が若干認められた。凝集体の含量はほとんど変化がなかった。オリゴマーと凝集体を足した重合物含量はいずれの製剤も 1.0%以下であり、現在の生物学的製剤基準における規格値以内であった。2J/cm² の照射によりモノマーが減少し、ダイマーが増加する傾向が認められた。凝集体の産生抑制を目的に最終製品の pH を酸性にし、最終製品の性状を液状としている製剤においては 2J/cm² の紫外線を照射しても、グロブリンの凝集体量に関しては現在の生物学的製剤基準の規制値内の変化であった。

2. 凍結乾燥製剤

最終製品の形状を凍結乾燥品とした 3 製剤、乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン、乾燥イオン交換人免疫グロブリン、乾燥 pH4 処理人免疫グロブリン製剤の UVC 照射に体する凝集体の産生をサイズ排除クロマトグラフィーにより分析し

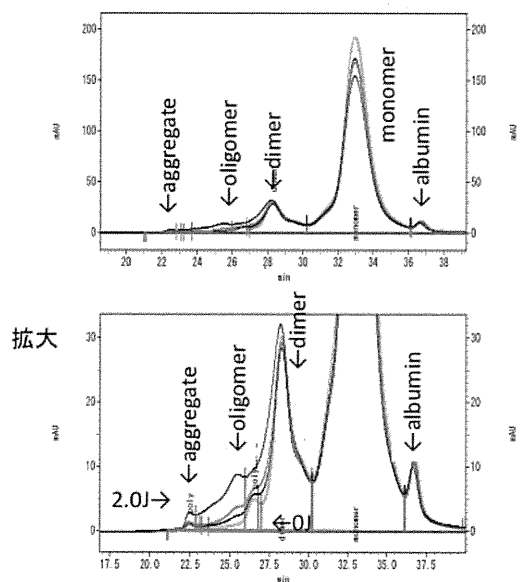


図1.凍結乾燥グロブリン製剤の紫外線照射による凝集体産生

た。その結果、製剤によっては、 $2\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線照射により目視で確認可能な白濁を生じた。著明な白濁を生じた製剤に関しては、ゲル濾過カラムの劣化を考慮して、サイズ排除クロマトグラフィーは実施しなかった。 $2\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線照射により著明な白濁を生じなかった製剤のオリゴマー、凝集体の総和は 6.1% であった。照射量が $0.5, 1\text{J}/\text{cm}^2$ の場合は、オリゴマーおよび凝集体の総和は現在市販されているグロブリン製剤のその値より低い値を示した(図 1)。また、 $2\text{J}/\text{cm}^2$ 照射時のモノマーの減少およびダイマーの増加は液状製剤と比較して顕著であり、その変化は 10% 程度であった。 $2\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線照射を行ったグロブリン製剤は、そのままでは静注不可能であると考えられた。

D. 考察

1J および $2\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線照射は効率のよりウイルス不活化を示す(岡田主任研究者参照)。この照射量におけるグロブリン製剤の変化について、凝集体産生に着目して検討した。凝集体産生を抑制する目的で、最終製品を $3.7\text{-}4.2$ の低い pH として形状を液状としている製剤に関しては、 $2\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線を照射しても著明なオリゴマー、凝集体の認められなかったことから、グロブリン製剤は $2\text{J}/\text{cm}^2$ の照射までは静注に耐えうると考えられた。しかし、最終製品が凍結乾燥品である製剤は紫外線照射に感受性であり、 $2\text{J}/\text{cm}^2$ の紫外線を照射した場合は、白濁を生じやすくそのままでは静

注不可能であり、凝集体を除去する工程が必要であると考えられた。そのまま静注すると凝集体による補体の非特異的活性化によるアナフィラキシーショック等が引き起こされると考えられる。 $1\text{J}/\text{cm}^2$ までの照射量であれば、現在市販されている静注用グロブリン製剤の重合体含量と同程度の含量であると考えられた。また、紫外線照射によるモノマーの減少およびダイマーの増加は凍結乾燥品の方が顕著であった。現在市販されている静注用グロブリン中のモノマーおよびダイマーはゆっくりとした解離会合により平衡を保っており、分析する pH 等によりその比率が変化する。紫外線照射により生じたダイマーの増加が、可逆的な変化であることを、リクロマトを行ってさらに検討すべきであると考えられる。また、これまで加熱処理、および加圧処理等の不活化処理におけるグロブリン製剤の凝集体産生についても検討を実施してきたが、凍結乾燥グロブリン製剤中のオリゴマーの増加が認められるのは紫外線処理のみであることから、紫外線照射がグロブリンに与える構造変化のメカニズムは明らかに加熱、加圧処理とは異なると考えられた。本研究では紫外線処理によるグロブリン製剤の機能維持の指標のひとつとして凝集体の変化に着目したが、抗体の特異性の変化についても検討すべきと考える。

E. 結論

多くのウイルスは紫外線照射に感受性である。紫外線照射によるグロブリンの機能維

持のひとつの一つとして凝集体の産生に着目して検討した。その結果、ウイルス不活化効果が認められる 1J/cm² の紫外線をグロブリンに照射しても、凝集体の産生は静注に耐え得る範囲であった。2J/cm² 以上の照射を行う場合は、凝集体の除去工程が必須であると考えられた。凝集体の産生抑制が目的で低 pH で液状に保っている製剤は紫外線照射によっても著明な凝集体の産生は認められなかった。

なし

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

F. 健康危機情報