

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。

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

2J の紫外線照射によって赤血球製剤に添加した BVDV は約 3Log 不活化された。VC をそれぞれ 10mg と 20mg 添加し、2J の紫外線を照射すると不活化効率は著明に減少し照射しない検体と同じウイルス力価を示した。一方、VC の前処置を行なってから 2J の紫外線照射を行なった場合、不活化効率は回復し、VC 添加なしの不活化効率の 1/10 を示した (図 1)。なお、VC 単独では、BVDV の不活化効果は認められなかった。

2. エキソソーム精製試薬を用いた BVDV の濃縮の検討

エキソソーム精製試薬によって得られた沈殿にウイルスが濃縮され、しかも感染性を有したまま濃縮されることがわかった。4 回の独立した実験では、処理前の TCID₅₀ は、平均 3.7×10^3 、濃縮後の TCID₅₀ は、平均 4.9×10^6 であった。ウイルス量は約 1000 倍になり 10mL のウイルスをほぼ全量回収できたことになる。

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。新鮮凍結血漿や血小板では、化学物質の添

加と紫外線照射を組み合わせた病原体不活化法が実用化されているが、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不活化は困難であった。我々は、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。次のステップとして紫外線照射による赤血球の障害を予防する方法を開発する必要がある。我々のこれまでの研究では、2～3J の紫外線照射では溶血はほとんど生じないことはわかっているが、酸素運搬能などの解析は未実施である。今回、赤血球保護のために VC を添加したところ、不活化効果が消失し、紫外線照射による病原体不活化の機序として活性化酸素を介して不活化されることが判明した。VC の添加は、赤血球を保護することに有用であったが、不活化効率が低下するため使用できない。そこで、赤血球の中にだけ VC が存在していれば良いと考え、赤血球に VC を添加しその後、遠心で除去して紫外線照射を試みた。VC を 20mg/mL 添加した赤血球では、VC 非添加紫外線照射と比較して 1 Log 劣るところまで不活化効率は回復した。色調等は紫外線照射なしの赤血球と同等であった。VC は紫外線照射から赤血球を保護するために有用であることが明らかになった。

また、不活化法の評価法の改良では、高感染価のウイルス液を得ることは非常に重要である。我々は市販されているエキソソ

ーム精製試薬を用いたところ、1500G の遠心を 30 分間行なうだけで 10mL のアルブミン液からほぼ 100% のウイルスを回収することができた。5% アルブミン液 10mL から生じた沈殿を約 0.5mL に溶解したので 20 倍濃縮したことになる。20 倍濃縮で不活化効果の評価範囲は 1 Log 拡大することが期待できる。この方法の利点は、一般的な遠心機を用いるだけで特別な装置なしに感染性を有したままウイルスが濃縮できることである。

E. 結論

紫外線照射による赤血球製剤の病原体不活化法の機序は活性化酸素を介したものと考えられた。また、VC の前処置を行えば、病原体の不活化効率を維持しながら赤血球の損傷を予防できることが判明した。さらに、エキソソーム精製試薬を用いることによって感染性を有したままウイルスを効率良く濃縮できることを明らかにした。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.: Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. J. Biosci Bioeng. 2013.115(19):

104-10.

2) Miyauchi K, Urano E, Takeda S, Murakami T, Okada Y, Cheng K, Yin H, Kubo M, and Komano J. Toll-like receptor(TLR)3 as a surrogate sensor of retroviral infection in human cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012.424(3):519-23

3) Odaka C, Kato H, Ostubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneich m, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose S, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K, and Hamaguchi I.: Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan, A pilot study. Transfus Apher Sci. 2012 Sep.3

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、野島 清子、浜口 功：末梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパルボウイルス B19 に対する感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

2) 岡田 義昭：血液製剤のウイルス感染症対策、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 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の検討、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

4) 水澤 左衛子、岡田 義昭：核酸増幅試験法のための E 型肝炎ウイルスの WHO 国

際標準品の制定のための共同研究と日本の
国内標準品の作成について、第60回日本輸
血細胞治療学会、郡山、2012年

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

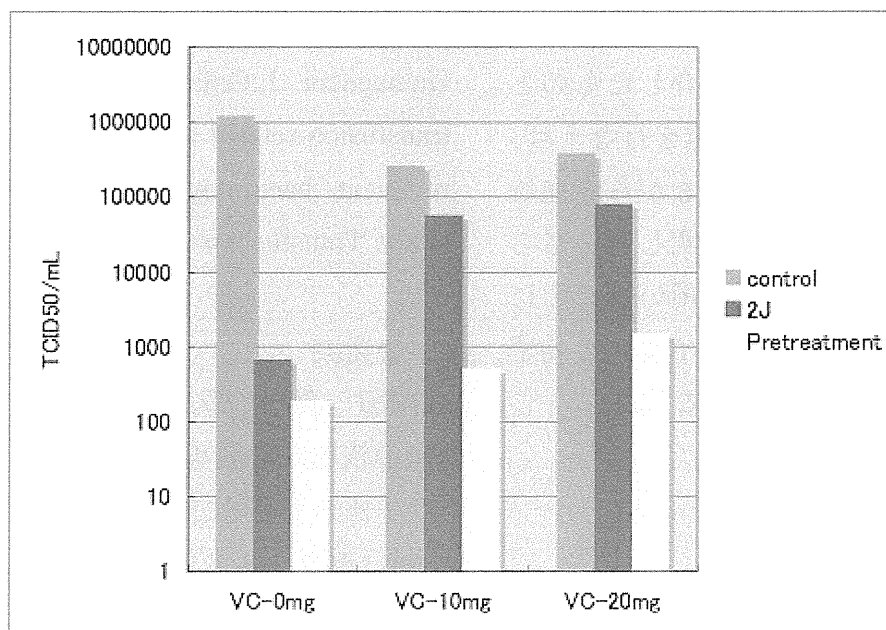


図1.赤血球製剤における紫外線照射による
病原体不活化効率に及ぼすビタミンCの解析

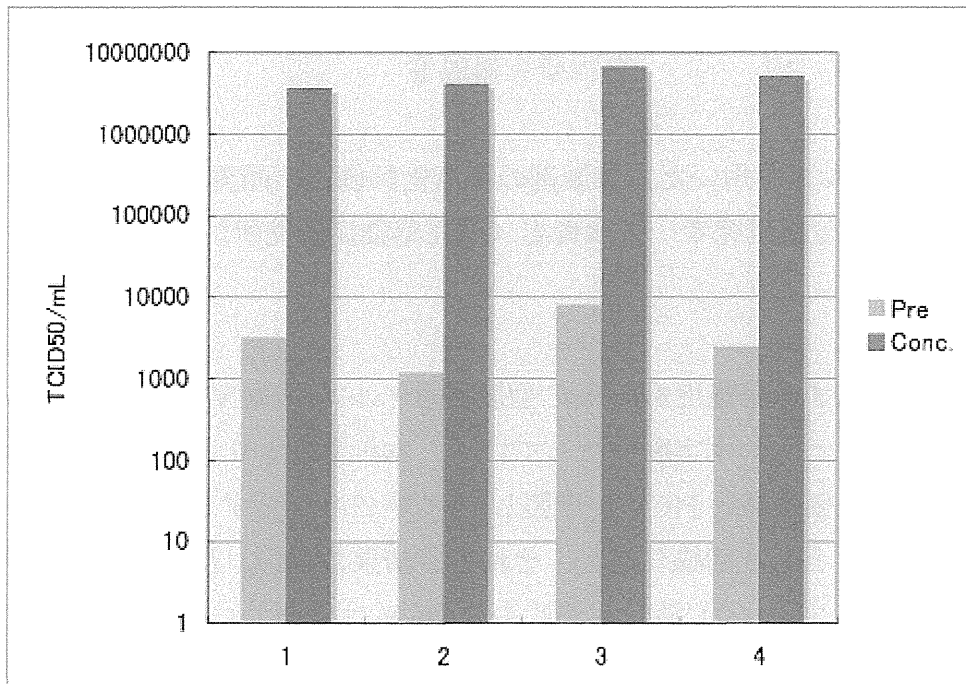


図2. Exosome精製試薬によるウシ下痢症ウイルスの濃縮

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型肝炎ウイルスを用いた血液製剤の不活化評価法の開発に関する研究
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) を不活化させる条件を明らかにするため本実験を行っている。本年度はより正確に不活化効率を知るため、感染価の高い HCV を作製し、HCV のみならず BVDV についても同じ実験を少なくとも 3 回繰り返す、それらの結果の平均、及び標準偏差を示した。1. アルブミン中の 60°C 液状加熱により HCV は効率よく不活化されることは、これまでに示したが、このときの HCV RNA の分解について調べた。2. 今まで、8%、及び 40% エタノール添加による HCV の不活化は 4°C で行ってきたが、今回、血液製剤作製時に用いられる温度である -5°C で行った。このとき 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、1. アルブミン中での 60°C 10 時間の液状加熱で HCV の感染性が 5.7Log 減少した場合でも、HCV RNA は全く分解されないことが明らかとなった。この結果より HCV の液状加熱による HCV の感染価の減少はゲノム RNA の分解ではなく、ウイルス蛋白質の変化 (変性、分解など) と考えられる。2. HCV は -5°C で、40% エタノール処理 5 時間で 5.9Log 感染性が得減少することが明らかとなった。エタノール処理において、BVDV も HCV と似た挙動であることが明らかとなった。ただ、40% エタノール処理時の温度を 4°C にした場合、HCV の感染性が -5°C の場合より、より速く減少す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ビ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、効果的な治療法が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 を血液製剤に混ぜ、これまでに検討してきた方法での HCV の不活化条件と不活化の評価法を開発する。

本年度は、より詳しく不活化効率を知るため感染価の高い HCV を作製し、HCV のみならず BVDV についても同じ実験を少なくとも 3 回繰り返し、それらの結果の平均、及び標準偏差を示した。実験は、1. アルブミン中の 60°C 液状加熱における HCV RNA の分解、2. 40% エタノール添加における、4°C、及び -5°C での 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。

B. 研究方法

ウイルスの不活化試験のとき用いられる方法に従い、体積で 10% のウイルス (HCV 或いは BVDV) と、90% のアルブミンを加え、以下の 2 種類の条件の実験

を行った。HCV は、JFH-1 クローンを培養細胞から得、その後、限外濾過カラム (Vivaspin 30k ; GE ヘルスケア) を用いて濃縮し、感染価の高い (TCID₅₀ 3x10⁶/ml) HCV を用いた。

1. 60°C での液状加熱

アルブミンに HCV を加え、60°C に加熱し、10 時間までの各時間に一部サンプリングし、各サンプルを -80°C で保管した。これらを培養細胞 (HCV は Huh7.5.1 細胞) に加え、HCV コア蛋白質の発現を見ることによりウイルスの時間経過による感染性の変化を調べた。また、BVDV の感染性の変化は Vero 細胞での細胞障害性を調べることにより行った。

HCV RNA の検出は、加えた、アルブミン中の HCV RNA を抽出、精製し、逆転写反応により cDNA を得、用いる cDNA の量を変え、PCR で増幅される DNA 量より、もとの RNA 量を調べた。

2. 最終濃度 40% エタノール処理

アルブミンに HCV 或いは、BVDV を加え、そこに最終濃度 8%、或いは 40% となるようにエタノールを加え、4°C、或いは -5°C (血液製剤作製時に用いられる温度) で最長 4 時間までの各時間にサンプリングし、DMEM (10% FBS を含む) 培地でそれぞれ 5 倍、10 倍に希釈し、-80°C で保管した。1. の場合と同じ方法で HCV、及び BVDV の時間経過による感染性の変化

を調べた。

HCVの感染価の測定法：各サンプルをDMEM（10%FBSを含む）培地で段階希釈し、Huh7.5.1細胞に感染させ、感染3日後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）する細胞の数を調べ、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、TCID₅₀/mlで表した。

BVDVの感染価の測定法：Vero細胞に感染3日後、各サンプルに含まれるBVDV感染による細胞障害性を観察し、細胞障害性の無くなるサンプルの希釈段階から感染価を計算し、TCID₅₀/mlで表した。

今回は、より正確な結果を得るために、HCVのみならず、BVDVに関しても、同じ実験を少なくとも3回行い、それらの平均、標準偏差を示した。

HCV RNAの測定法：60℃液状加熱で、サンプリングした各サンプルから、RNA抽出キット（RNA purification kit EX-R&D）によりHCV RNAを精製し、逆転写反応を50℃、30minで行い、生成されたcDNAを10倍ずつ段階希釈

（10³-10⁷）し、HCV特異的 primers（sense: nt 45-64, antisense: nt 265-246; 数字はHCVゲノムRNAの5'末端からの塩基番号）を用いてPCRにより増幅し、その産物を2% agarose gelにて分離した（図4. 参照）。

（倫理面への配慮）

HCVJFH-1クローン及び、BVDVは培養細胞でウイルスが増殖する系で、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. 60℃での液状加熱（図1）

加熱後30分、1時間でHCVの感染価がそれぞれ3.3Log、4.0Log減少し、2時間後には少なくとも5.7Log減少した。モデルウイルスであるBVDVの場合、加熱1時間後で検出限界以下となり、少なくとも5.6Log感染価が減少した。

2. 60℃での液状加熱時のHCV RNA（図2）

60℃液状加熱開始0時間、及び10時間でのHCV RNAの量には変化無かった。

3. 8%、及び40%エタノール処理（図3、4）

これまで示したように、8%エタノール処理4時間では、HCV、BVDV共に感染性は減少しなかった。5℃で、40%エタノール処理では、HCVの感染性は0時間に比べ、1時間で、2.1Log、2時間で2.5Log

減少し、5時間で少なくとも4.9Log減少した。BVDVは処理1時間で感染性は少なくとも6.0Log減少した。

一方、4°Cで、40%エタノール処理では、HCVの感染性は0時間に比べ、1時間で少なくとも4.5Log減少した。

D. 考察

1. 60°Cでの液状加熱

昨年度報告したように、HCVは60°Cの液状加熱で効率よく不活化されること

(1時間の加熱で、感染価が4.0 Log減少し、2時間の加熱で、少なくとも5.7 Log減少した)を明らかにしたが、今回、この場合、HCV RNAの分解は全く起こらないことが明らかになった。この結果よりHCVの液状加熱によるHCVの感染価の減少はゲノムRNAの分解ではなく、ウイルス蛋白質の変化(変性、分解など)と考えられる。

2. 最終濃度40%エタノール処理

これまでに、8%エタノールではHCV、BVDV共に殆ど不活化されないことを明らかにした(図3の上半分のグラフ参照)。以前Chonエタノール分画法によって得られたフィブリノゲンでHCVの感染事故が起こったが、この時のフィブリノゲンは8%エタノールで分画されたものであったので、この結果より、感染事故が起こった理由が推察される。そこで、今年度はより高濃度(40%)のエタノール処理でのHCVの不活化を検討した。そ

の結果、HCVは-5°Cで、0時間に比べ、1時間で、2.1Log、2時間で2.5Log減少し、5時間で少なくとも4.9Log減少した。この結果より、40%エタノール処理で、HCVは効率よく不活化されることが考えられる。また、BVDVは処理1時間で感染性は少なくとも6.0Log減少した。このことより、1時間、2時間の短時間では、HCVはBVDVよりも不活化されにくいことが明らかとなったが、処理5時間では、BVDVもHCVと似た挙動であることが明らかとなった。

一方、4°Cでの40%エタノール処理では、HCVの感染性は0時間に比べ、1時間で少なくとも4.5Log減少し、-5°Cでの40%エタノール処理の場合に比べ、2.4Log分より効果的に不活化されることが明らかとなり、40%エタノール処理によるHCVの不活化において、処理温度の影響が有ることが明らかとなった。

E. 結論

1. アルブミン中での60°C 2時間の液状加熱でHCVの感染価は少なくとも5.7 Log減少し、この方法でHCVは効率よく不活化されることを明らかにしたが、その感染価の減少はゲノムRNAの分解ではなく、ウイルス蛋白質の変化(変性、分解など)と考えられる。
2. 8%エタノール処理ではHCVは殆ど不活化されない(BVDVも同様、昨年度の報告参照)が、-5°Cで、40%エタノール

処理5時間で効率よく不活化（感染価が少なくとも4.9Log減少）できることが明らかとなった。

3. 4°Cでの40%エタノール処理では、HCVの感染性は、処理1時間で、-5°Cの場合に比べ、2.4Log分より効果的に不活化されることが明らかとなり、40%エタノール処理によるHCVの不活化において、処理温度の影響が有ることが明らかとなった。

4. これまでHCVのモデルウイルスとして用いられてきたBVDVは、-5°Cでの40%エタノールの短時間（1, 2時間）の処理では、HCVよりも不活化されやすいことが明らかとなったが、長時間（5時

間以上）での40%エタノール処理ではHCVと似た挙動であることが明らかとなった。

G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表： 血液製剤におけるC型肝炎ウイルスの不活化の検討
第60回日本ウイルス学会学術集会
2012年11月 大阪

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

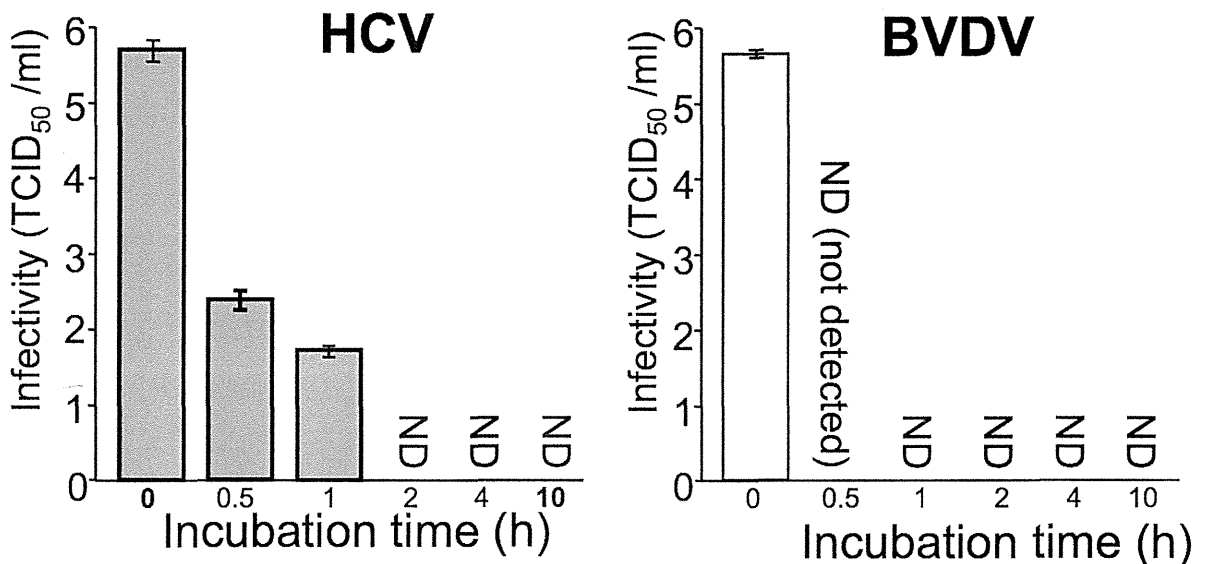
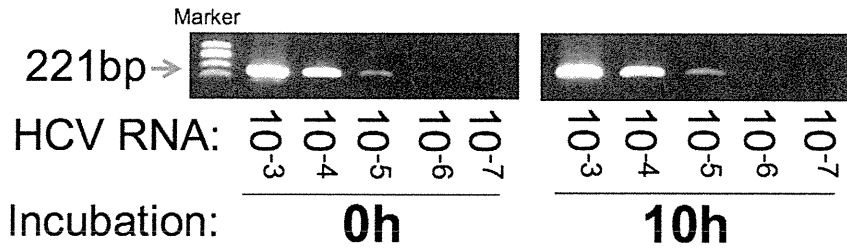


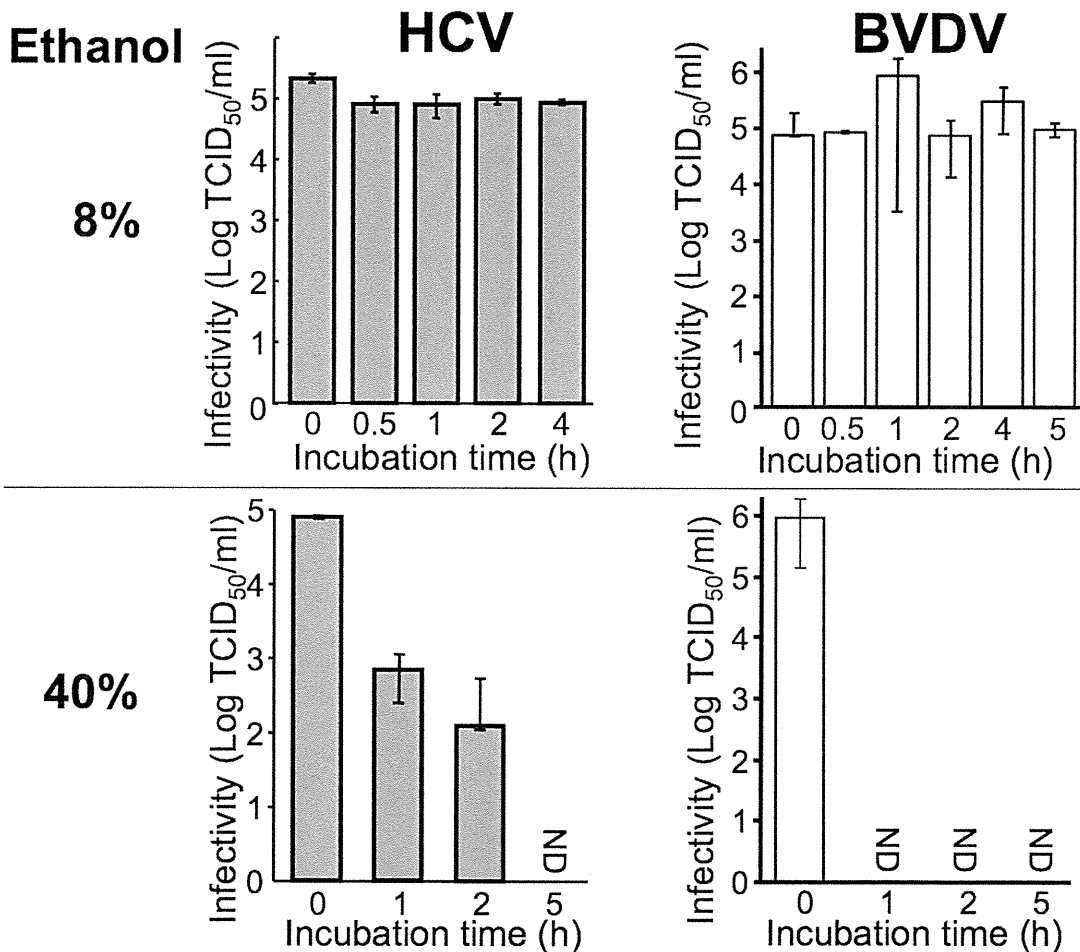
図1. 60°C液状加熱



Methods

1. Purification RNA (EX-R&D)
2. RT (50°C, 30min)
3. PCR
 - primers
 - sense: nt 45-64 from the 5'end
 - anti-sense: nt 265-246 from the 5'end
 - reaction
 - [94°C 30s
55°C 30s
72°C 60s] 32 cycles
 - [72°C 3min

図2. 60°C液状加熱時のHCV RNAの検出



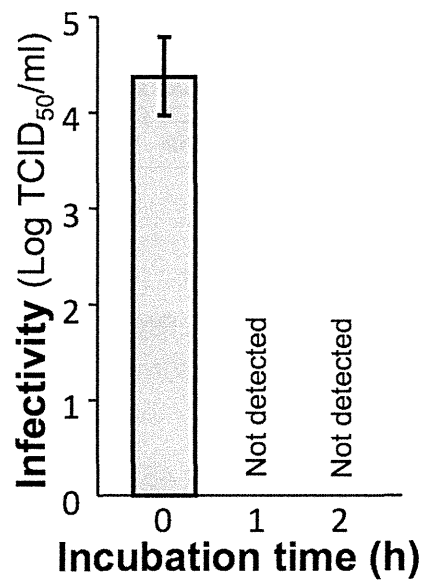


図4. 4°Cでの40%エタノールによるHCVの不活化

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

末梢単核球由来の赤芽球を用いた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

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、ヒト末梢血単核球から誘導した赤芽球細胞は、B19 に感受性を示し、感染細胞において B19-DNA の複製とウイルスタンパク質の発現が確認できた。従来の白血病細胞株を用いた感染系よりも実際の B19 感染を反映している系と考えられた。

A.研究目的

B19 は、in vitro で増殖しないウイルスであるためイヌ由来のイヌパルボウイルス (CPV) やブタ由来のブタパルボウイルス (PPV) がモデルウイルスとして病原体の除去・不活化の評価に用いられてきた。これら動物由来のパルボウイルスは、種々の病原体不活化法に対して極めて抵抗性を示したため B19 も同様に考えられてきた。ところが、B19 に感受性を示すヒト白血病細胞株を用いた解析から液状加熱や酸処理によって容易に不活化されることが報告された。この感染系ではウイルスタンパク質の発現や B19 - DNA の複製が認められない。そのため実際の B19 感染を反映する感染系の確立が求められている。そこで今年度は、ヒト由来 PBMC から誘導した赤芽球細胞を用いた B19 の感染系を検討した。

B.研究方法

1.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ッ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。1X10⁶/mL ずつ 24 穴プレートに撒き 5~6 日間培養した。5~6 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。

2.B19 の感染

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た。これに B19 陽性血漿を 100 倍に希釈したウイルス液 50 μ L を加え、室温で 1 時間吸着させた。吸

着後 5 回培養液で洗い吸着していない B19 を除いた。最後の洗浄液と細胞を採取した (感染 0 日)。感染 1 日目と 3 日目に細胞と培養上清を採取した。これらの検体から DNA を抽出し、10 倍ずつ希釈して PCR 法 (40 サイクル) を行ない、B19 遺伝子の検出可能な最大希釈倍率を求めた。また、感染 2 日目の細胞を採取し、蛍光抗体法によって B19 ウイルス抗原の発現の有無を検索した。

C. 研究結果

感染直後の細胞の DNA からは 10^6 希釈まで B19 遺伝子が検出されたが、感染 1 日目は 10^7 、感染 3 日目では 10^9 希釈まで B19 遺伝子の検出が可能であった (図 1)。一方、培養上清では、感染直後の上清からは 10^3 希釈で B19 遺伝子は検出できなかった。感染 1 日目は 10^7 、感染 3 日目では 10^7 希釈まで B19 遺伝子の検出が可能であった (図 1)。

また、感染 2 日目の細胞を抗 B19 抗体を用いて染めたところ、感染細胞特異的に強い陽性シグナルが多数認められた。

D. 考察

B19 感染は多くの場合、不顕性感染となるが一過性に非常に高いウイルス血症を生じる。さらに感染後 1 年間程度血中に抗体とウイルスとが共存することや供血者の約 50% が抗体陽性であることから取り扱い方は、B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルスのそれとは異なる。欧米での原料血漿の

B19 の規格値は、 10^4 IU/mL 以下である。そのため B19 の感染性を評価する系は重要であるが、一般的な評価系はない。かつては、B19 は HBV や HCV と同様に培養できないウイルスの 1 つに数えられていた。最近、白血病細胞株を用いて感染細胞内で B19 遺伝子が RNA に転写されることを持つて感染成立と定義した感染系が開発され、B19 の不活化評価系に用いられているようになった。しかし、この系では B19 のウイルスタンパク質の発現や DNA 複製は認められないため、更に実際の感染に近い感染系の確立が求められて来た。PBMC を用いた感染系は、採血の前に特別な処理をする必要がないので検体が容易に入手できる点においても優れているが、細胞株では確認できないウイルス抗原の発現や B19 の遺伝子複製が認められたことからより B19 の実際の感染を反映した感染系と考えられる。

E. 結論

ヒト PBMC から誘導した赤芽球細胞に B19 を感染させると細胞内で B19-DNA の複製とウイルス抗原の発現を確認することができた。これまでの腫瘍細胞を用いた感染系よりも実際の B19 感染を反映している系と考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, Hamaguchi I, and Fukui K.:

Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. J.Biosci Bioeng. 2013.115 (19: 104-10.)

2.学会発表

- 1) 岡田 義昭、野島 清子、浜口 功：末梢血単核球から誘導した赤芽球のヒトパルボウイルス B19 に対する感受性の解析、第 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 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 60 回日本ウイルス学会、大阪、2012 年

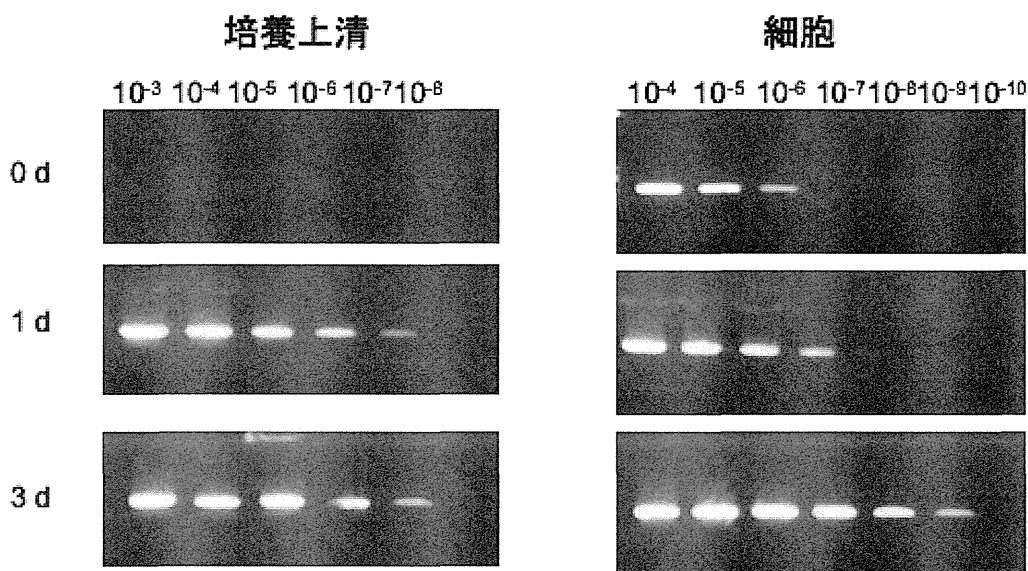


図1.赤芽球細胞におけるB19-DNA の複製

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

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
					2011

