

分担研究報告書

血液からの異常プリオン除去法の開発

研究分担者 岡田義昭（埼玉医科大学病院 血液・細胞移植部 部長）

研究要旨

エキソソーム精製試薬を用いて細胞培養上清中の異常プリオンを濃縮できることをこれまで報告したが、同じ試薬を用いることによってウイルスも濃縮できることを昨年度報告した。今年度は、10%牛胎児血清入りの細胞培養上清や血清、さらに血漿からのウイルス濃縮が可能なのか検討した。血清や血漿では添加するエキソソーム精製試薬の量を適正化することによって10mLという大容量からウイルスを効果的に濃縮することが可能になった。濃縮したウイルスは感染性を有し、検出法としてだけでなく、ウイルスの不活化・除去法の評価用の高力価のウイルス調整法としても有用な方法であることが明らかになった。さらに濃縮効果は非常に微量なウイルスも同様に濃縮することができることも明らかにすることができた。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症の対策が功を奏し、狂牛病を発症したウシの数は激減した。それに伴い変異型CJD (vCJD) の報告は、2000年をピークとして減少し、2013年の英国の死亡例は0となった。我が国では、英国等の滞在歴を有する献血者からの採血を制限していることや白血球除去フィルターの導入によって血液製剤を介した変異型CJDの感染する可能性は非常に少ないものとなっている。また、異常プリオンを核酸増幅検査のように増幅させるPMCA(Protein Misfolding Cyclic Amplification)法の増幅効率が向上し、CJDと診断された患者の髄液からも異常プリオンが検出できるようになった。このような状況の中で、必要が生じたときに血液中からも異常プリオンを検出できる方法を開発しておくことが必要であ

り、エキソソーム精製試薬を用いることによって感染細胞の培養液から異常プリオンを濃縮・検出できることを報告してきた。さらに昨年度、ウイルスの粒子とエキソソームが細胞質から小胞に放出する場所が同じであることから両者の性状が類似していると推定し、エキソソーム精製試薬を用いてウイルスの濃縮を試みた。5%アルブミン製剤や免疫グロブリン製剤では10mLから効率良くウイルスを濃縮できることを明らかにしたが、血清や血漿では困難であった。今年度は、至適条件を検討し、血清や血漿からウイルスを効率良く濃縮できる方法を検索した。

B. 研究方法

(1) エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

10%牛胎児血清入りのDMEMと5%アルブミン

製剤 10mL に牛下痢症ウイルス (BVDV)、仮性狂犬病ウイルス (PRV)、シンドビスウイルスを添加し、よく混ぜた後に濃縮前検体として 10~100 μ L を採取した。採取後の約 10m のウイルス溶液に市販されているエキソソーム精製試薬 ExoQuick-TC (System Biosciences 社) を 2mL 添加し、4℃ にて 14 時間以上静置した。反応後、1500g で 30 分遠心して得られた沈殿を 500 μ L の PBS で溶解しウイルス濃縮液とした (図 1)。

牛胎児血清とヒト血漿では、それぞれ 10mL に添加するエキソソーム精製試薬の量を 0~2 mL に変化させ、それぞれから得られた沈殿を PBS に溶解後、含まれるウイルス量を測定した。

また、極微量のウイルスに対する回収率を評価するために仮性狂犬病ウイルスを牛胎児血清 1 mL 当たり約 10 感染価に調節した牛胎児血清にエキソソーム精製試薬を添加し、上記と同様の処理を行い、回収効率を検討した。

(2) ウイルスの感染価測定

牛下痢症ウイルスの感染価は、MDBK 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに 5×10^4 /well を蒔き、PBS で 500 μ L にした濃縮前後のウシ下痢症ウイルス (BVDV) を 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 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。

仮性狂犬病ウイルス (PRV) の感染価は、CRFK 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに 1×10^4 /well を蒔き、PBS で 500 μ L にした濃縮前後の仮性狂犬病ウイルスを 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 3~5 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。

シンドビスウイルスの感染価は、Vero 細胞を用いた。感染 1 日前に 96 穴プレートに 1×10^4 /well を蒔き、PBS で 500 μ L にした濃縮前後のシンドビスウイルスを 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 3~5 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。

(3) 微量ウイルスの回収効率の評価

牛胎児血清 11mL に 10 ビリオン/mL となるように仮性狂犬病ウイルスを添加し、濃縮前の検体 1 mL を採取した。残りの 10mL の検体に 0.3 mL のエキソソーム精製試薬を添加し濃縮した。濃縮前の検体に培養液 4.5mL を加え、前日に蒔いておいた CRFK 細胞に 100 μ L ずつ 48 穴に感染させた。濃縮したウイルスは、PBS 500 μ L で溶解後培養液を 10mL 添加し、前日に蒔いておいた CRFK 細胞に 100 μ L ずつ 96 穴に感染させた。感染 3~4 日後に CPE を生じたウエル数を数えた。実験は独立に 4 回行った。

C. 研究結果

(1) エキソソーム精製試薬を用いたウイルス濃縮法の開発

5% アルブミン製剤や 10% FCS 入りの細胞培養液では添付資料に記載されている 2 mL を添加して遠心することによって感染性を有した状態でウイルスを濃縮することができた。濃縮前の 10 μ L の溶液に含まれるウイルス量と同じ溶液 10mL から濃縮した沈殿のウイルス量を検討したところ、牛下痢症ウイルスでは、約 3Log 濃縮されていた。

また、10%FCS 入りの培養液を用いても同様な結果であった。さらに仮性狂犬病ウイルスやシンドビスウイルスも同様に効率良く感染性を有した状態で濃縮することができた(図2)。次に血清と血漿を検討したが、大量の沈殿が生じ溶解することは困難であった。これまで市販のエキソソーム精製試薬のプロトコールに従って添加する試薬の量は 10mL 当り 2 mL と決めていたが、ウイルスが沈殿する至適添加量を解析したところ、2 mL よりも少ない量で充分であることが判明した(図3)。そこで血漿でエキソソーム精製試薬の量を検討したところ、10mL 当り 0.3~0.5 mL 添加すれば、ウイルスは沈殿してくるが血漿タンパクの沈殿が少ないことが明らかになった(図4)。

(2)微量ウイルスの回収効率の評価

濃縮前の検体から 4 回平均で 4.5 個の感染性ウイルスが回収できた。一方、濃縮後の検体からは平均 37.5 個のウイルスが検出され、約 83% のウイルスが濃縮できたことになる。血清から非常に濃度の低いウイルスが効率良く、しかも感染性を保持しながら濃縮できることが明らかになった。

D. 考察

エキソソーム精製試薬によって異常プリオンが濃縮されたことから昨年度は、ウイルスも同じ試薬によって濃縮できる可能性を検討し、10mL の 5% アルブミン製剤からほぼ全量のウイルスを沈殿中に濃縮できる事を明らかにできた。しかし、血清や血漿では溶解が不可能な程の大量の沈殿が生じてしまい濃縮できなかった。今年度は、血清や血漿などタンパク質濃度の高い溶液でも濃縮可能な方法を検討した。用いた精

製試薬では検討した 3 つのウイルスが感染性を保持した状態で濃縮できることが明らかになったので容易にウイルスの感染価を指標に濃縮効率を評価することができた。そこで添加する試薬の量を変えてそれぞれの濃縮効率を解析した結果、10%FCS 入りの細胞培養液において 2 mL よりも少ない精製試薬によっても濃縮できることが明らかになった。この結果を基に牛血清とヒト血漿も同様に検討した結果、10mL 当り 0.3~0.5 mL の精製試薬を添加すれば、共沈してくる血漿タンパクを減少させウイルスが濃縮できることが判明した。培養液と同様に感染性も保持していた。また、検討したウイルス溶液はウイルス量が多いことから極めて少ない場合の濃縮効率も確認した。1 mL 当り数個のウイルスが混入した血清 10mL を濃縮したところ約 83% のウイルスを回収することができ、微量なウイルスにおいても充分濃縮できることを明らかにすることができた。10mL から濃縮できる本方法は、血漿分画製剤や原料血漿等に混入する極めて少量のウイルスを簡便に濃縮できることから血液製剤の安全性向上に有効だと考えられた。

E. 結論

エキソソーム精製試薬を用いる事によって異常プリオンだけでなくウイルスも血清や血漿から通常の実験室にあるような遠心機と冷蔵庫があれば、簡便に濃縮できることを明らかにした。極微量なウイルスも濃縮することで検出可能になることが期待でき、血液製剤の安全性向上に貢献すると考えられる。

F. 健康危険情報

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): 104-110.

2) Baylis SA, Blumel J, Mizusawa S, Matsubayashi K, Sakata H, Okada Y, Nubling CM, Hanschmann KM, HEV collaborative Study Group.: World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA.

Emerg. Infect. Dis. 2013. 19(5): 729-735.

3) 岡田 義昭、輸血用血液における病原体不活化技術の現状と新規技術の開発。

検査と技術、42巻、4～7ページ、2014年。

2. 学会発表

1) 岡田 義昭、水沢 左衛子、浜口 功：血漿分画製剤からの簡便なウイルスの濃縮法：第61回日本輸血・細胞治療学会、横浜、2013年

2) 岡田 義昭：血漿及び血漿分画製剤からの簡便なウイルス濃縮法とその応用、第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし