

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

- 1) エキソソーム精製試薬を用いて異常プリオンが感染している細胞株の培養上清から異常プリオンを濃縮することができ、ウエスタンブロット法で検出することができた。
- 2) 白血球除去フィルターで異常プリオン感染細胞株の培養上清を濾過したところ 2Log 以上除去できることが示唆された。
- 3) エキソソーム精製試薬を用いて 5%アルブミン製剤 10mL に添加した C 型肝炎ウイルスを効率良く回収・濃縮することができた。
- 4) 10%牛胎児血清入りの細胞培養上清から牛下痢症ウイルス、仮性狂犬病ウイルス シンドビスウイルスなどのウイルスを感染性を保持した状態で濃縮することができた。
- 5) 牛血清やヒト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。
- 6) 濃縮効果は非常に微量なウイルスも効果的に濃縮することができた。
- 7) 保存前白血球除去によってショックを含むアレルギー反応が減少した。
- 8) 初流血除去により日本の血小板製剤の細菌混入率は 減少している。

A. 研究目的

ウシ海綿状脳症の対策が功を奏し、狂牛病を発生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 年をピークとして以後減少し、2012 年の英国の死亡例は 0 となった。しかし、ニューギニアの Kuru の追跡調査から感染してから発症するまで 50 年以上を要した例があることや英国の切除された虫垂を用いた疫学調査から未発症の感染者が、存在していることも明らかとなり、今後も長期にわたり対策を取り続ける必要がある。これまで英国において輸血を介

した vCJD 感染例が 4 例報告されているが、白血球除去フィルター導入後、輸血による受血者の vCJD 発症例は報告されていない。白血球除去フィルターは羊の vCJD 感染モデルを用いた輸血による感染の解析から完全ではないが、異常プリオンを除去できることが証明されている。これは白血球除去フィルターが、感染細胞だけではなく血中の異常プリオンを除去している可能性を示唆するものである。そこで、異常プリオン感染細胞株の培養上清を用いて白血球除去フィルターから実際に異常プリオンが除去できるか検討をした。

さらに輸血による副作用について保存前白血球除去の効果を解析した。併せて、初流血除去の効果も情報を集め解析した。

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・検出できるのか検討した。また、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ることによってウイルスも異常プリオンと同様に濃縮できるか検討した。予想通り濃縮できたのでさらに 10mL という大容量からウイルスの検出が困難な血清やヒト血漿からもウイルスを濃縮できるか検討した。さらに血清や血漿に極微量なウイルスが混入した場合においてもウイルスを効率良く濃縮できる稼働が検討した。

## B. 研究方法と結果

### (1) 白血球除去フィルターによる異常プリオンの除去

ウシ海綿状脳症を発症したウシの脳乳剤を用いて異常プリオンを感染させたヒト glioma 細胞株の培養上清にキレート剤を添加後、0.5mL を 5% アルブミン 200mL に加えた。これを白血球除去フィルターのバッグに注入しよく混合した。1部を除去前の検体として採取した。仕様書に従って白血球除去フィルターで濾過した。フィル

ターを通した溶液は処理後の検体として採取した。フィルターによる除去前後の検体は、それぞれ 10 倍ずつの段階希釈を行い、 $1 \times 10^5$ /well に撒いた異常プリオン非感染ヒト glioma 細胞株に感染させた。感染させた細胞は、2 回/週の頻度で継代し、サンプリングし、異常プリオンの感染の有無は感染 30 日後ウエスタンブロット法で解析した。異常プリオンを 5% アルブミンに添加し、白血球除去フィルターを通した検体からは、 $10^{-3}$  に希釈して感染させた細胞からも異常プリオンは検出されなかった。一方、濾過前の検体からは  $10^{-4}$  倍希釈した検体まで異常プリオンが検出でき 2Log 以上除去できたと考えられた。

### (2) エキソソームの精製法と異常プリオンの検出

マウス白血病ウイルスと異常プリオンが重感染したヒト腎癌細胞株の培養液を 10mL 取り、3000g で 15 分遠心し、上清に ExoQuick-TC (System Biosciences 社) 2mL を添加した。混合し 4 にて 14 時間以上静置後、1500g で 30 分遠心し沈殿を得た。この沈殿 Proteinase K 処理し、異常プリオンを抽出したところ培養上清から異常プリオンを検出することができた。

### (3) 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  $\mu$ 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  $\mu$ L の PBS で溶解しウイルス濃縮液とした。濃縮前後の総ウイルス量を比較すると効率良く濃縮されていた。また、ウイルスの濃縮できる至適条件を解析するため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に含まれるウイルス量を測定したところ 2mL よりも少量で充分ウイルスは濃縮することが可能であった。

一方、牛胎児血清とヒト血漿では、2mL の精製試薬を添加したところ溶解不可能な程の沈殿が生じたが、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に含まれるウイルス量を測定したところ 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くなる（溶解可能）ことが明らかになった。

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 0.3mL エキソソーム精製試薬を添加し、同様の処理を行い、回収効率を検討した。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。

#### (4) 保存前白血球除去の効果の解析

日本赤十字社に報告されている輸血による副作用の種類とそれぞれの件数を導入前後で調べた。また、海外の文献等から情報を集めた。2007 年から赤血球製剤の貯留前白血球除去が導入された。各副作用の報告件数をみると最も変

化が認められたのは、アナフィラキシー（アナフィラキシー反応とアナフィラキシーショックを併せて集計）の発生件数が半減したことである。また、発熱の報告件数も減少傾向が認められた。海外からの報告では、これまでに幾つかのランダムイズされた治験が実施されているが、貯留前白血球除去が有効か、無効かの一致した結論は得られていない。

#### (5) 初流血除去の効果の解析

2001 年に Bruneau らは、採血した最初の血液 15mL とその次の 15mL をそれぞれ細菌培養し、最初の血液からの方が細菌培養が陽性になる率が高い事を報告した。日本においても名雲らが、初流血除去しない群 2967 検体と除去した群 2890 検体の細菌培養を行ない、除去なし群では 0.24% が陽性になったのに対し除去群では 0.07% だったことを報告した。同様に、Satake らは血小板採血時に初流血除去を行なったところ実施前の陽性率 0.17% が実施後 0.05% になったことを報告した。

#### D. 考察

白血球除去フィルターによって 5% アルブミンに添加した異常プリオンを 2Log 以上除去できることを実験的に示すことができた。輸血後に vCJD を発症した供血者とその血液の受血者における vCJD 感染症例の解析から、血液製剤中に存在する異常プリオンの量は極めて少ないことが統計学的に示されているため、白血球除去フィルターは完全とは言えないまでも感染予防に効果を発揮していると考えられる。2011 年に McCutcheon らによって PLoS ONE に発表されたヒツジの輸血を介したプリオン感染モデルでは、無処理の赤血球製剤におけるプリオン感染率

18.9%が白血球除去フィルター処理によって6.9%、血小板が24.3%から3.4%、血漿が13.2%から3.4にそれぞれ1/3~1/4に減少していた。効果的なスクリーニング法がない現状では、白血球を除去することによって輸血の副作用の発生も抑制する事が期待できることから、白血球除去フィルターの導入は適切な判断だと言える。

また、初流血除去の効果では、多くの報告が細菌感染の率が減少しているとその効果を認めている。無症候性の菌血症には無効であるが、穿刺部からの細菌の混入防止には効果的だと考えられた。

また、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は、PMCA法と組み合わせることによって検出感度が大幅に向上する可能性がある。

その一方でエキソソーム精製試薬によってウイルスが濃縮することを発見した。当初は、5%アルブミン製剤や細胞培養上清に添加したウイルスを濃縮できる程度であり、血清や血漿の濃縮は不可能であった。しかし、添加する試薬の量を適正化することによって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になった。しかも検討した3つのウイルスは何れも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。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。1mL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

白血球除去フィルターは輸血のアレルギー反応に関する副作用を減少させた。また、実験的には異常プリオンをある程度除去できることが示された。

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): 104-10.

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