

治療薬として臨床で使用され、新鮮凍結血漿の病原体不活化法として臨床応用されている物質である。

一方、1つの病原体不活化法では処理能力に限界があり、病原体の「低減化」はできても「完全な不活化」は困難である。細菌では数を低減化することによってショック等を予防できるので意味があるが、ウイルスや原虫では感染性を有した病原体が残存すれば、発症までの時間は延長するかもしれないが感染してしまう。我々が求めているゴールは感染の予防である。それを達成するためには、異なる原理の病原体の不活化・除去法の導入である。この方法によって血漿分画製剤は、感染リスクを非常に低いものにすることに成功した。赤血球は細胞であるので複数の病原体不活化処理をすることは困難である。一方、除去であれば、赤血球へのダメージは少ない物と考えられる。そこで赤血球製剤に導入できる除去法を検討した。

B. 研究方法

1. ウイルスの感染価測定法

牛下痢症ウイルス (BVDV) は、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。ウシ下痢症ウイルス (BVDV) を含む検体は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、 $100 \mu\text{L}$ 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。

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蒔いた。シンドビスウイルスを含む検体は、10倍ずつの10の各々独立した希釈系列を作製し、 $100 \mu\text{L}$ ずつVero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。

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、仮性狂犬病ウイルスを含む検体は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、 $100 \mu\text{L}$ 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。

各ウイルスともMBが添加されている場合、希釈時には安全キャビネット内の蛍光灯は消して希釈した。

2. 赤血球の調整

全血を遠心し、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。これらに最大容量の10%相当のウイルス液を添加した。

3. 可視光の測定

市販されている卓上の蛍光灯スタンドから照射される可視光を用いた。エネルギーは照度計を用いて検体表面の照度 (ルクス) を測定し、エネルギー量 (J) を計算した。実験は、検体表面の照度を約6000ルクスに調整したので1Jは約17分、2Jは約34

分の照射をおこなった。

4. メチレンブルーの調整とウイルスの不活化法

メチレンブルーは精製水を用いて1 mMに溶解し、濾過滅菌後 4°Cに保存した。牛下痢症ウイルス、シンドビスウイルス、仮性狂犬病をヘマトクリット値40%の赤血球液にそれぞれ添加し、よく混ぜた後に一部を採取してコントロールとした。次に、遮光下に最終濃度1 μ M、又は10 μ MになるようにMBを添加し、照射0Jとした。それぞれを可視光の透過性が良いバッグに10 mL (厚さ4 mm) ずつ分注し、所定の可視光を照射した。照射中は可視光が効率良く照射されるようにした。不活化処理された各赤血球は、遠心分離され、上清を集め、直ちに測定、又は-80度に保存した。

5. ゼータ電位によるウイルス除去法の開発

FCS10%を含む培養液にシンドビスウイルス、又は仮性狂犬病ウイルスを約1%相当容量を添加した。1部の検体を採取し、除去前のコントロールとした。ゼータ電位を原理としたフィルターに添加し濾過した。回収した培養液中のウイルス量を測定し、液量とウイルス濃度からどれくらいウイルスが除去されたか、検討した。

C. 研究結果

1. MBによる各種ウイルスの赤血球での不活化

シンドビスウイルスは、MB1 μ Mでは、

1Jで2Log、2Jで3Log、10 μ Mでは、1Jで3Log、2Jで4Log、30 μ Mでは、1Jで3Log、2Jで5Log不活化された。なお、MB添加だけではシンドビスウイルスの不活化は認められなかった(図1)。牛下痢症ウイルスもMB10 μ Mで2Jの可視光の照射によって3~4Logのウイルス不活化がヘマトクリット40%の赤血球溶液においても認められた。一方、仮性狂犬病ウイルスは、全く不活化効果は確認できなかった。

2. ゼータ電位によるウイルス除去法の開発

シンドビスウイルス及び仮性狂犬病ウイルスは、濾過することによって感染ウイルスは1Log減少した(図2)。

D. 考察

紫外線照射による赤血球のダメージを少なくするために抗酸化剤のビタミンCの前処理等を行ってその効果を検討していた。ヘモグロビンが酸化されて生じるメトキシヘモグロビン血症の治療薬として臨床で使用されているメチレンブルー(MB)も候補薬の1つとして検討した。その際に安全キャビネット内でMBを添加しただけのコントロールが、著明にウイルス感染価が低下したことを偶然認めた。そこで、原因として安全キャビネットの蛍光灯の照射によってウイルスが不活化されることがわかった。既に血漿製剤の不活化法として欧州では実績があるが、赤血球製剤での報告はない。紫外線照射と同様に均一に可視光が照射さ

れるように工夫して実験を実施したところ、ヘマトクリット 40%とほぼ全血の濃度でもウイルスを不活化できることが判明した。濃度を 30 μ M まで高くしたが 1 J での不活化能は、10 μ M と著明な違いは認められなかった。MB の利点は、赤血球に添加しても遠心の操作で容易に除去できる点にある。また、臨床では既に使用経験があり毒性も低い。

一方、赤血球製剤の不活化を完全にするためには 1 つの方法だけでは精々 3~4Log ウイルスを不活化できるに過ぎず限界がある。しかし、別の不活化処理を実施することは赤血球へのダメージが強く、製剤の劣化を招くことが想像できる。そこで、不活化ではなく除去であれば、赤血球への影響が少ない可能性がある。除去法として、血液中には多量なタンパクが存在するが、ウイルスは粒子として存在しているので粒子を除去できる方法が適している。粒子の多くが陰性なのでその回りが、陽性荷電で覆われていることからゼータ電位も用いたフィルターであれば、血漿タンパクが多くてもウイルス粒子のみを吸着・除去できる可能性がある。今回、培養液で除去効率を評価したところ 1/10 にウイルスは減少した。条件を検討して 2~3Log ウイルスが減少できれば、不活化法と除去法を組み合わせることで赤血球からの病原体除去・不活化法が確立される可能性がある。

E. 結論

メチレンブルーに可視光を照射することによってヘマトクリット 40%の赤血球溶液に含まれるシンドビスウイルスや牛下痢症ウイルスを不活化することができた。また、ゼータ電位によって粒子をトラップできるフィルターによって培養液ではあるがウイルスを 1/10 に減少させることができた。これらは、赤血球製剤の病原体の不活化・除去に貢献できると考えられた。

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)Baylis SA,Blumel J,Mizusawa S, Matsubayashi K, SakataH, OkadaY, NublingCM, 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)

3)岡田 義昭、輸血用血液における病原体 第61回日本ウイルス学会、神戸、2013年
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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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、

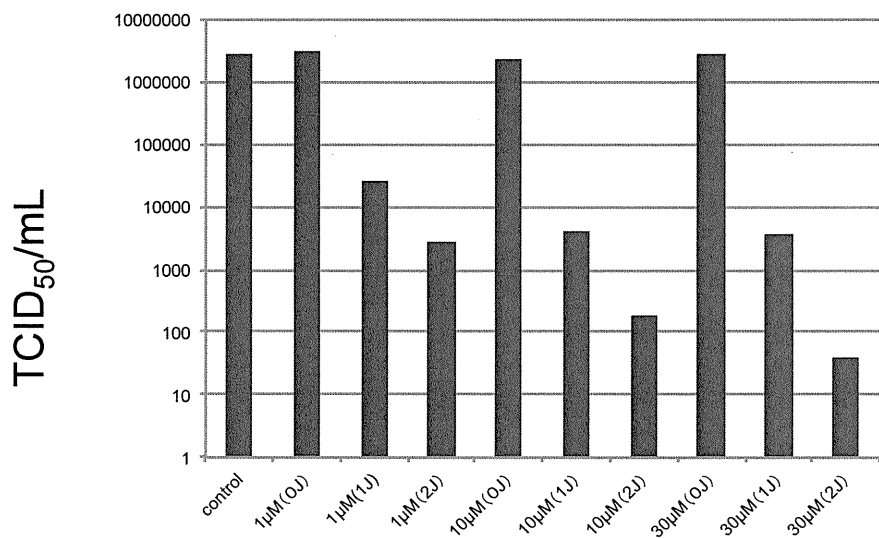


図1 MBによるシンドビスウイルスの不活化

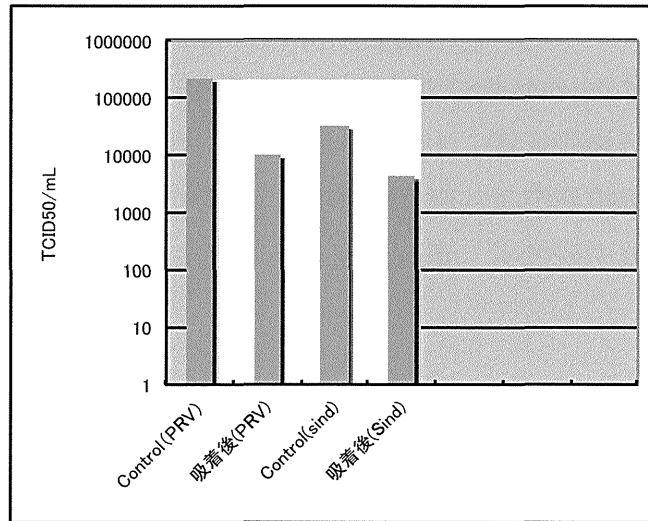


図2 Zeta電位を利用したウイルス除去

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)

大規模自然災害等に備えた血液製剤の保存法と不活化法の開発に関する研究

分担研究報告書

分担課題：Cohnの血漿分画法によるC型肝炎ウイルスの不活化の評価

分担研究者 下池貴志 (国立感染症研究所)

分担研究者 野島清子 (国立感染症研究所)

協力研究者 齋賀菊江 (国立感染症研究所)

研究要旨

血漿分画製剤は献血血を原料としたプール血漿を Cohn エタノール法により分画して製造される。これまでに、C型肝炎ウイルス (HCV) に汚染された第IX因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与による HCV 感染事例 (薬害) が報告されて来た。一方、グロブリン、アルブミン製剤における HCV 感染事故はほとんどない。この理由を科学的に明らかにするために、まず、実験室レベルで Cohn エタノール法により分画する系を確立した。次に、血漿に HCV をスパイクし、Cohn エタノール分画法により分画し、HCV 感染性がどの画分に移行するかを検討した。本年度は、血漿をクリオと脱クリオ画分に分画するクリオ/脱クリオ分画、さらに 8%EtOH を添加しフィブリノゲン沈殿画分であるフラクション I (Fra.1 画分) とそれ以外の上清 S1 画分とに分ける Fra.1/S1 分画を行い、HCV の感染性がどの画分にどれだけ存在するかを調べた。その結果、クリオ/脱クリオ分画では 99.9% の HCV が脱クリオ画分に分画され、Fra.1/S1 分画では 0.7% の HCV が Fra.1 であるフィブリノゲン沈殿画分に分画され、99.3% の HCV が S1 上清画分に分画され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型肝炎の治療法はリ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 HCV の不活化条件と不活化の評価法の開発を行ってきた。

本年度はその評価法を用いて、過去に起こった HCV の血液製剤への混入を再現すべく、1. 実際の血漿分画製剤の製造と同じ Cohn エタノール分画法を実験室レベルで再現する系を確立し、血漿を原料として各画分への分画を行った。次に、2. 血漿に HCV をスパイクし、Cohn エタノール分画を行った。本年度は Cohn エタノール法のうち、クリオ/脱クリオ分画と次の 8% エタノールによる Fra.1/S1 分画を行い、HCV の感染性がどの画分にどれだけ存在するかを HCV の感染価を指標にして調べた。

B. 研究方法

1. Cohn エタノール分画法による血漿の分画

i) クリオ/脱クリオ分画

健常人血漿 20mL を 4°C、16000xg で 25 分間遠心し、沈殿(クリオ③)と上清(脱

クリオ④) とに分画した(クリオ/脱クリオ分画)。

ii) Fra.1/S1 分画

脱クリオ画分の pH は低温下で攪拌しながら pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加し、最終的には一部を採取し室温で pH7.5 付近となるよう調整した(画分⑤)。-3°C で攪拌しながら、最終濃度が 8% となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加(エタノール添加終了直後の一部を取り、画分⑥とした)し 15 分間-3°C で攪拌した(画分⑦)。エタノール処理後の溶液を-1°C、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿(Fra.1 フィブリノゲン画分⑧)と上清(S1)画分⑨とに分画した(Fra.1/S1 分画)。Fra.1/S1 分画の効率は、ゲル濾過カラム G3000SWXL カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により評価した。各分画のサンプリングは図 1、2 の通り行った。尚、Cohn のエタノール分画は、Biologicals (1994) 22,13-19 に準じて行った。

2. Cohn エタノール分画法による、HCV を含む血漿の分画

i) クリオ/脱クリオ分画

HCV 陰性血漿 19mL に 1mL の HCV を加えたものを出発原料とし、1.Cohn エタノール分画法に従い分画を行った。クリオ画分③は最終濃度が 50mM となるようにリン酸緩衝液 pH7.2 を加えて、沈殿を溶解した。各段階でサンプリングを行い、

採取後すぐに -80°C で凍結し保管した。

ii) Fra.1/S.1 分画

1.Cohn エタノール分画法に従い分画を行った。各分画のサンプリングは図1、2の通り行った。エタノール 8%を含む⑥⑦⑨のサンプルはエタノール最終濃度が4%以下となるよう希釈し、 -80°C で保管した。いずれのサンプルも採取後すぐに -80°C で凍結して保管した。Fra.1 画分⑨は最終濃度が50mMとなるようにリン酸緩衝液 pH7.2 を加え、沈殿を溶解した。

3.HCV ウイルス感染性の評価

用いる HCV は、JFH-1 クローンを培養細胞で増殖させ、その後、限外濾過カラム (Vivaspin 30k ; GEヘルスケア) を用いて濃縮することにより、感染価の高い (TCID₅₀ 7.6x10⁵/ml) HCV を準備した。各画分の HCV の存在量を各画分に存在する HCV の感染価 (TCID₅₀) で示した。HCV の感染価の測定法: ②~⑨の各サンプルを 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ナール抗体 (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。それぞれの液量を積算し、総ウイルス量 TCID₅₀ で示した。

(倫理面への配慮)

HCV JFH-1 クローン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. Cohn エタノール分画法による血漿の分画

血漿分画製剤の製造で用いられている Cohn エタノール分画法を実験室レベルで再現する系を確立した。SEC 解析の結果、Fra.1⑧の72%は、静注用フィブリノゲン製剤と同じ溶出位置に溶出された。S.1⑨のSEC 解析により、およそ24~27%はグロブリン、45-47%はアルブミンであると考えられた。クリオ中に存在する血漿中の第VIII因子、脱クリオ中に存在する第IX因子は濃度が低いためピークとしては確認出来なかった。

2. Cohn エタノール分画法による HCV を含む血漿の分画 (図1、2)

i) 血漿に HCV をスパイクした画分を遠心により、クリオ画分③、脱クリオ画分④に分画したとき、それぞれの画分に存在する HCV の量は、 3.6×10^2 、 2.5×10^5 TCID₅₀であった。

ii) その後の pH 調整後⑤、エタノール添加⑥、攪拌後⑦、遠心後の沈殿（フィブリノゲン）画分⑧、上清画分⑨の各サンプル中の HCV 量は、それぞれ 4.2×10^6 、 5.4×10^6 、 2.1×10^6 、 2.3×10^6 、 3.1×10^6 TCID₅₀ であった。

D. 考察

血漿分画製剤の製造で用いられている Cohn エタノール分画法を実験室レベルで再現する系を確立することが出来た。本年は、HCV をスパイクした血漿の Cohn エタノール分画法のうち、最初のステップであるクリオ/脱クリオ分画、8%エタノールを添加し遠心する Fra.1/S1 分画における HCV の感染性の分配に関して検討を行った。血漿分画製剤のウイルス除去・不活化のバリデーションにはこれまでモデルウイルスである BVDV を用いて評価を行ってきた。最近になって HCV の培養系、感染性評価系が確立され、モデルウイルスを用いることなく HCV のウイルスバリデーションが可能となった。本研究は、モデルウイルスではなく HCV ウイルスを用いて、Cohn のエタノール分画によるウイルスバリデーションを実施した最初の報告である。クリオ/脱クリオ分画および Fra.1/S1 分画によって、血漿にスパイクした HCV の 87%が回収されることが明らかとなった。この回収率は十分効率よく Cohn エタノール法による分画が効率よく行わ

れていることを示している。

クリオ/脱クリオ分画により、わずか 0.1% (3.6×10^2 TCID₅₀ の感染価) の HCV がクリオ画分に分画され、血漿中の殆どの HCV (99.9%) は、感染性を維持したまま脱クリオへ移行することが明らかとなった。これらのことは脱クリオから製造された第 IX 因子製剤からの過去の血友病 B 患者の HCV 感染事例と一致した。一方、クリオから製造された非加熱第 VIII 因子製剤による血友病 A 患者の HCV 感染事例も過去に報告されている。約 1 万人分の血漿を集めた原料プール数千 L を原料として血液製剤は製造されるが、本研究の結果より原料プール中の HCV もクリオへ分配されることが明らかとなった。

次に、HCV は Fra.1/S1 分画の遠心後、沈殿⑨（フィブリノゲン）画分にへも移行するが、多くの HCV は⑧の S1 画分へと分配された。

Fra.1 からはフィブリノゲン製剤が作られるが、これは SEC 解析により Fra.1⑨の約 72%はフィブリノゲンの溶出位置に溶出されたことと一致した。

原料プールに混入した HCV は脱クリオへ移行し、さらにフィブリノゲンを含む Fra.1 へ移行するのはその 0.7%程度であることが明らかとなった。しかし、薬害を引き起こした 1984~1987 年当時は、1999 年に開始した HCV 核酸増幅検査を導入前、および、1989 年に開始した HCV

抗体検査導入前であり、ウイルス陽性血漿由来の献血血が血漿分画製剤の原料プールに混入していたと考えられ、各製造所のウイルス除去・不活化工程もその当時はまだ十分に評価することが困難だったと考えられる。キメラマウスを用いた実験から、HCV粒子が10個あると感染が成立することが分かっており、フィブリノゲン分画であるFra.1へもHCVが分配されても、その当時の技術ではHCVを不活化することが出来なかったと推察する。

今回の研究により、原料プールに混入したHCVのほとんどがそのままS1分画へ移行することが明らかとなった。しかし、S1からさらに複数の工程を経て製造されるグロブリン製剤、アルブミン製剤でのHCV感染事例は、海外でも2つの報告例以外明らかなHCV感染の報告はない。本年度実施した分画の次のステップでエタノールを最終濃度25%とし、遠心した沈殿からグロブリン製剤が製造されるが、今後はCohnエタノール分画法を進め、HCVがどの画分に移行し、不活化されて行くのかを確認する予定である。本年は、HCVの感染性を指標にHCVの各画分への移行の様子を調べたが、今後HCV RNAを検出/定量し、このHCV RNAを指標にしたとき、HCVの各分画への移行の様子を調べ、HCV感染性の様子と比較し、それらの関係を明らかにする。またモデルウイルスであるBVDVを

血漿にスパイクし、Cohnエタノール法で同様に分画したとき、BVDVの挙動および各画分への感染性の移行は、HCVの場合と比べてどうなるかを調べる予定である。

E. 結論

1. 血漿分画製剤の製造で用いられているCohnエタノール分画法を実験室レベルで再現する系を確立することが出来た。

2. Cohnエタノール分画法によるHCVを含む血漿の分画の実験では、

i) 血漿にスパイクしたHCVは回収率87%と、十分効率よく分画されることが明らかとなった。

ii) Cohnエタノール分画法により多くのHCVがクリオ分画、S1分画へ移行することが示された。

今後は、Cohnエタノール分画を進めてHCVの感染性とRNAを指標にHCVの挙動を検討する。またHCVの挙動がモデルウイルスであるBVDVの感染性の移行と一致するかを確認する予定である。これらの研究によりHCVによる感染事故が起きた科学的根拠を明らかにすることが出来れば、血液製剤の安全性の確保に貢献出来ると考えられる。

G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表： Kiyoko Nojima, Takuo Mizukami, Madoka Kuramitsu, Chieko

Matsumoto, Rieko Sobata, Kazu Okuma,
 Masahiro Satake, Kenji Tadokoro, Kazunari
 Yamaguchi, and Isao Hamaguchi Development
 of effective prevention method of HTLV-1
 infection by using HTLV-1 sero-positive
 serum in vitro. 2013 AABB ;Denver, USA

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. クリオ/脱クリオ分画

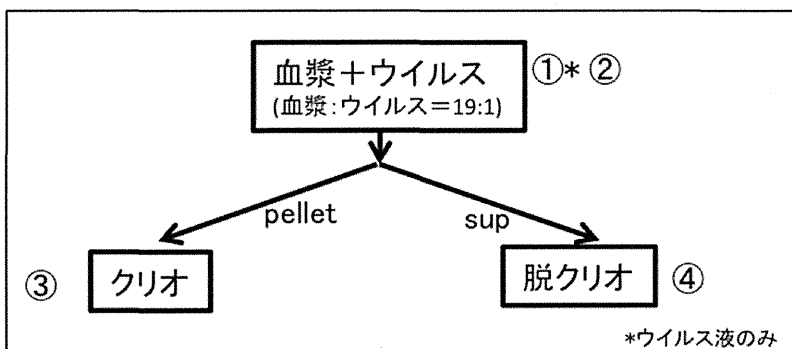
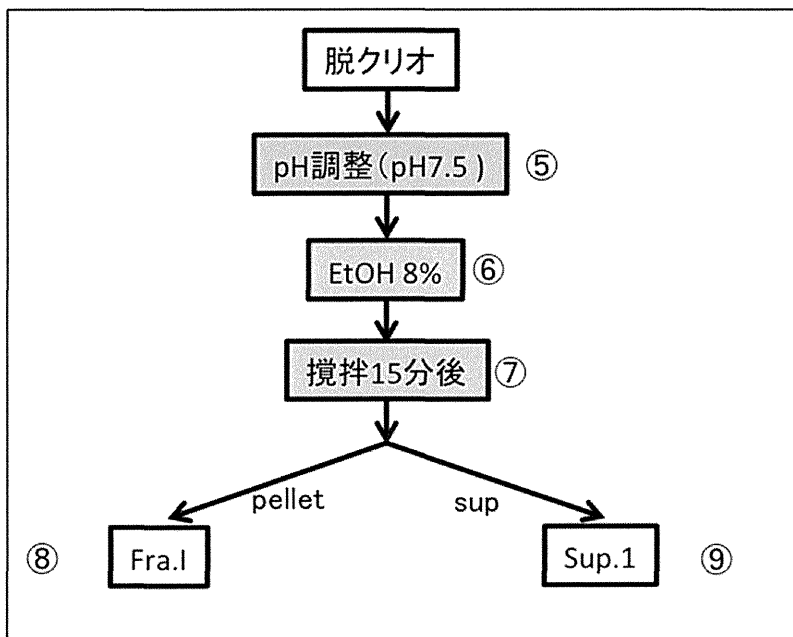


図2. Fra.1 /S1分画



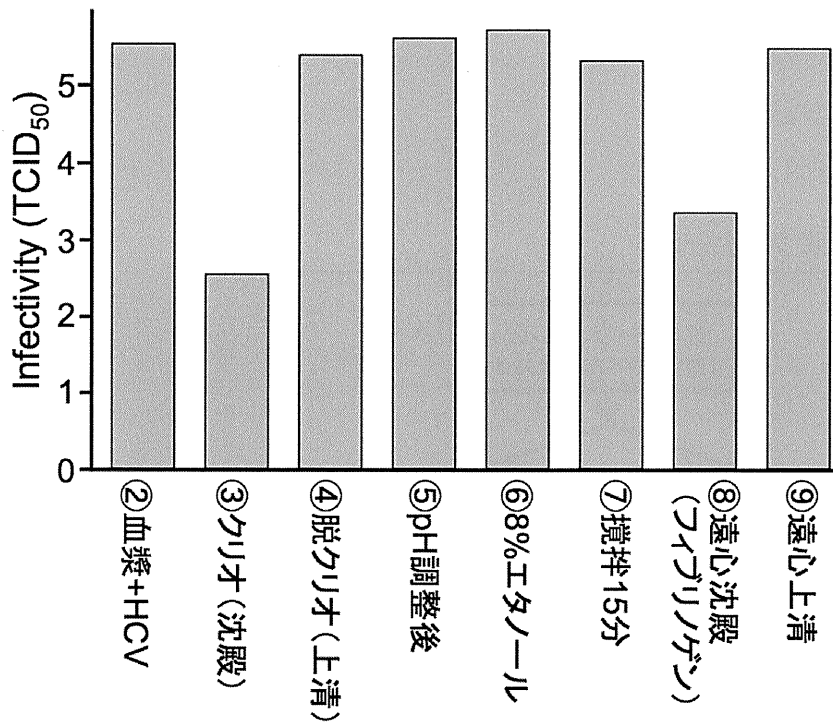


図3. Cohnエタノール法による血漿の各画分に含まれるHCVの量

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

