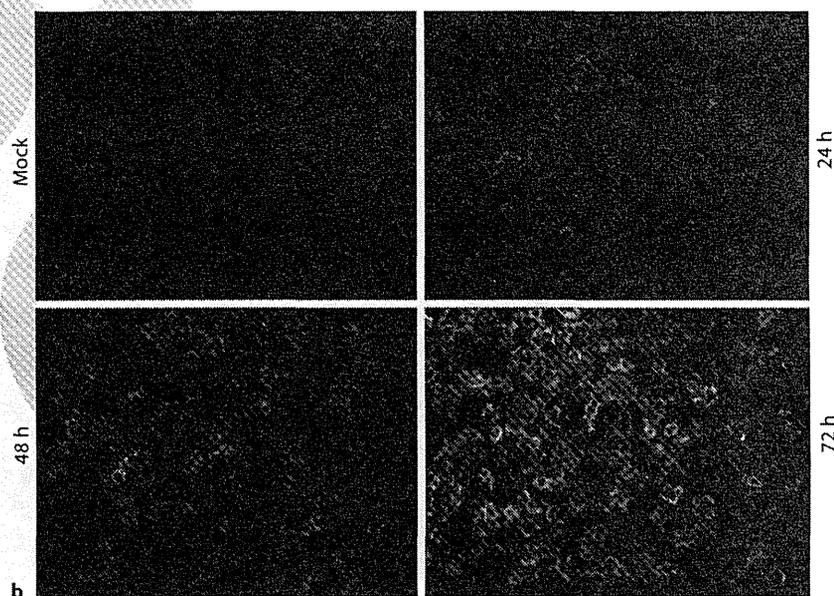


Fig. 1. a CPE of C6/36 and Vero cells infected with CHIKV. C6/36 and Vero cells were seeded in 12-well plates, infected with CHIKV at MOI 1 and incubated at 32°. CPE was observed under a microscope at 24, 48, 72 and 96 h p.i. Mock infection was shown at 96 h p.i. The morphology of the infected cells was photographed. $\times 400$. **b** Immunofluorescence staining of CHIKV-infected C6/36 cells. The cells were incubated with a monoclonal antibody against CHIKV E2 protein and labeled with FITC at 24, 48 and 72 h p.i. $\times 400$.



Results

CHIKV Induced Moderate CPEs in C6/36 and Strong CPEs in Vero Cells

Vero cells and C6/36 cells were infected with CHIKV at MOI 1. After 24, 48, 72, and 96 h p.i., the CPE was observed directly under a light microscope. In the primary experiment, we performed the experiment under different temperatures at 28, 32, and 37°. No effect was observed at 32° on the viability of Vero cells after 48 h (data not shown), and both Vero and C6/36 cells were incubated at 32° to avoid the effectiveness of the temperature.

The Vero cells showed apparent CPE at 48 h p.i., and nearly 90% of the cells died at 96 h p.i. In contrast, C6/36 showed minute CPE at 96 h p.i. (fig. 1a). To examine the expression of the viral E2 protein in C6/36 cells, an immunofluorescence assay was carried out at 24, 48, and 72 h p.i. The C6/36 cells were nearly 80% positive at 48 h p.i., and 100% at 72 h p.i. (fig. 1b). The Vero cells were 80% positive at 24 h p.i. (data not shown). These results indicated that the C6/36 cells showed moderate CPE under the condition in which the virus replication occurred in all of the infected cells.

Fig. 2. Virus titers in the supernatant of CHIKV-infected C6/36 and Vero cells. C6/36 and Vero cells were infected with CHIKV at MOI 1 and incubated at 32°. After 24, 48, 72, and 96 h p.i., the virus titers in the medium were determined by a plaque assay. The mean titers from three replicates are shown with the standard deviations. Statistical significance between the virus titers from the C6/36 and Vero cells at different time points ($p < 0.01$) are marked with an asterisk.

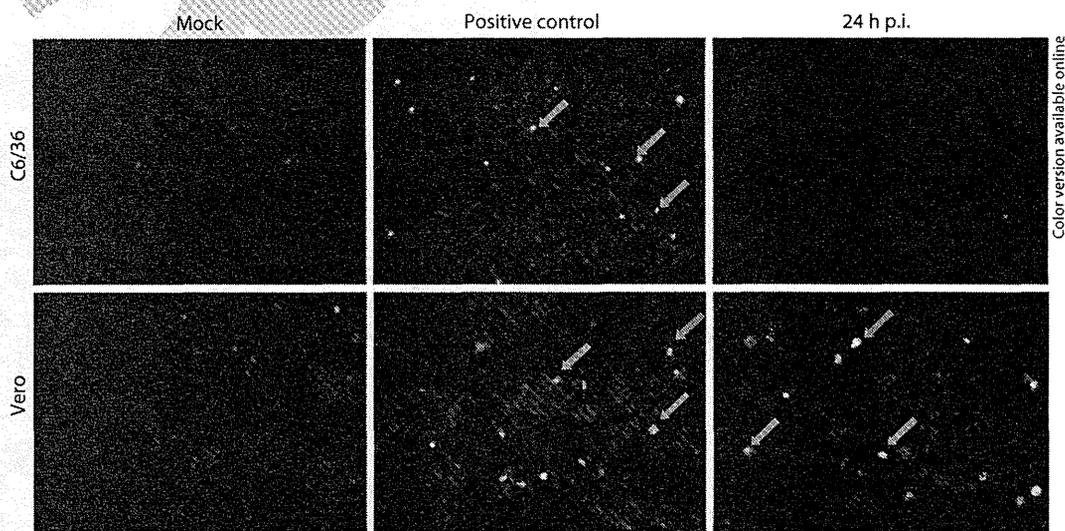
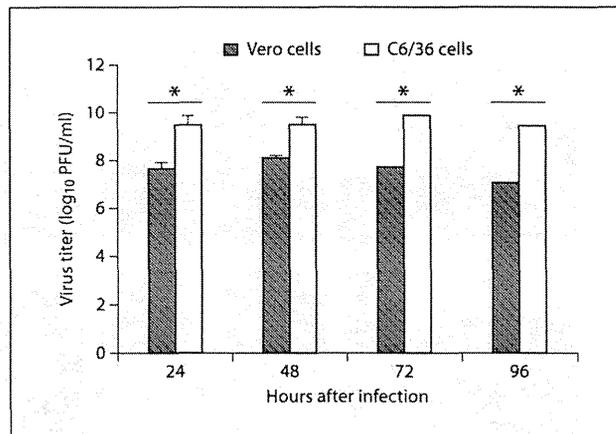


Fig. 3. TUNEL assay with CHIKV-infected C6/36 and Vero cells at 24 h p.i. at 32°. Cells with the arrows indicate apoptotic cells (green). Propidium iodide was used to stain the nuclei (red). The positive controls were cells treated with a protein synthesis inhibitor, anisomycin.

Virus Titers in Infected Vero and C6/36 Cells

The Vero and C6/36 cells were infected with CHIKV at MOI 1, and the virus titers in the culture medium were measured by a plaque assay as described in 'Materials and Methods'. The mean virus titers produced in the C6/36 cells were 8.5×10^9 , 1.8×10^{10} , 1.7×10^{10} and 3×10^9 PFU/ml at 24, 48, 72 and 96 h p.i., whereas those in the Vero cells were 9×10^7 , 1×10^8 , 7×10^7 , and 1.5×10^7 PFU/ml (fig. 2), indicating that the C6/36 cells produced

higher viral titers than the Vero cells. The C6/36 cells produced a viral titer that was more than 100 times higher than the Vero cells. More than 100 times viruses were produced in the C6/36 cells. Although the Vero cells showed strong CPE, the levels of virus replication were not efficient. These results coincided with those in a previous report obtained from SINV, in which CPE did not affect the virus titer that much [21].

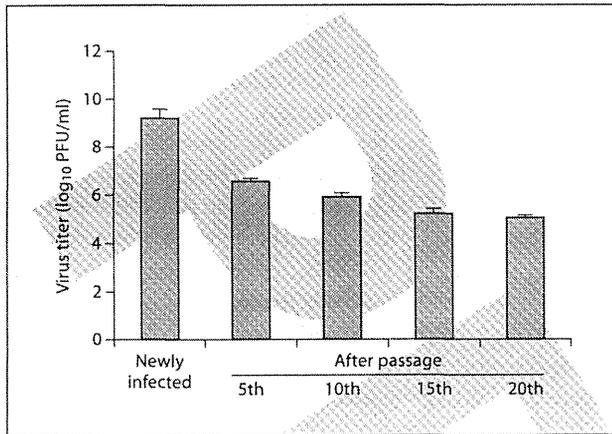


Fig. 4. Virus titers in the supernatant from CHIKV-infected C6/36 cells measured by a plaque assay. C6/36 cells were newly seeded every 3 days, and passaged 20 times at 32°.

Apoptosis of Vero and C6/36 Cells after Infection with CHIKV

In order to explore the mechanism of CHIKV-induced CPE in Vero cells, we analyzed apoptosis. Following infection or mock infection, the cells were fixed and subjected to TUNEL analysis as described in 'Materials and Methods'. As depicted in figure 3, the Vero cells at 24 h p.i. showed several apoptotic cells (green), but very few apoptotic cells were found in the CHIKV-infected C6/36 cells, suggesting that apoptosis may be one of the reasons why strong CPE was induced in the Vero cells.

CHIKV Caused Persistent Infection in C6/36 Cells

To examine whether CHIKV causes persistent infection in the mosquito cells, C6/36 cells were infected with CHIKV at MOI 1, incubated for 5 days at 32°, and then passaged 20 times every 3 days using 1×10^6 cells for each passage. The medium was collected on day 3 in every passage, and the virus titers were determined and compared. The virus titers were 4.5×10^6 , 1.25×10^6 , 2.5×10^5 and 1.5×10^5 in the 5th, 10th, 15th, and 20th passages, respectively, showing a decreasing trend, although the titers were not significantly different between each passage (fig. 4). After 20 passages, the expression of the viral antigen was examined by immunofluorescence assay, and nearly 100% of the cells were infected (data not shown). These results indicated that CHIKV had established a persistent infection in the C6/36 cells.

Discussion

Alphaviruses are generally thought to cause a lytic infection (apoptosis) in many mammalian cells, while they cause a persistent infection in mosquito cells exhibiting moderate CPE. For example, SINV causes acute cell death in most types of mammalian cells, and the infected cells display typical characteristics of apoptosis [21]. SINV is generally thought to cause only moderate CPE in mosquito cells with a persistent infection [16]. Similarly, dengue virus, a member of the flavivirus family, does not cause deleterious effects in mosquito cells and may result in persistent infection [22], suggesting that the cellular response to some of the members of the alphavirus and flavivirus families is highly related to the cell type. The reasons why SINV infection does not cause apoptosis in mosquito cells are still obscure.

CHIKV is a member of the alphavirus family, and causes a re-emerging mosquito-borne infection. In this study, we observed the same phenomenon in CHIKV as in SINV, in which CHIKV induced strong CPE and apoptosis in Vero cells, but light CPE and apoptosis in C6/36 mosquito cells. Apoptosis in HeLa cells induced by CHIKV was recently characterized, and this virus was found to trigger apoptosis through an early caspase-9-dependent intrinsic mitochondrial pathway followed by an extrinsic caspase-8-dependent pathway [23]. CHIKV also exerts cytopathic activity through standard apoptosis machinery, in which it was shown that CHIKV releases viral proteins such as E1 and capsid, which shield into membrane vesicles. Engulfment of these CHIKV apoptotic blebs promotes the infection to the neighboring cells [23].

The cell and species specificity of SINV-induced cell death implies that cellular and viral regulators of apoptosis play important roles in determining the outcome of SINV infection. Nearly all vertebrate cell lines infected with SINVs do not survive after the infection. The mechanism by which CHIKV induced strong CPE in mammalian cells and weak CPE in mosquito cells is still not known. Apoptosis may be one of the reasons why CHIKV leads to cell death through strong CPE, because CHIKV induced strong apoptosis in Vero cells compared to C6/36 cells. Mosquito cells may carry apoptotic inhibitory genes.

Recently, virus-induced apoptosis mediated by an unfolded protein response (UPR) was hypothesized to be a crucial pathogenic event in viral infection: it creates conditions beneficial for an eventual viral infection. In general, newly synthesized secretory or membrane-bound

proteins are unable to fold properly in the endoplasmic reticulum (ER), leading to induction of ER stress and subsequent elicitation of UPR [24]. Dengue virus-infected mosquito cells continued growing, implying that an anti-ER stress factor might be involved in the process of viral replication in mosquito cells [25]. Mosquito cells trigger a pathway that protects infected cells from death, which might be how *Aedes* mosquitoes resist dengue virus infection [26]. Activation of the UPR to cope with ER stress in the early phase of viral infection was shown in various vertebrate cells [27, 28]. However, flavivirus-infected mammalian cells ultimately face apoptosis through the effects of ER stress [29].

In this paper, we reported that CHIKV induced strong CPE in Vero cells but light CPE in mosquito cells, which may be one of the reasons why mosquito can be a natural host of CHIKV without being killed. In the mosquito body, the genetic factors that govern susceptibility to CHIKV infection contribute to the weak CPE. Most of the C6/36 cells did not die after infection with CHIKV and became persistent, even after being passaged 20 times. The CHIKV virus could make adaptation in C6/36

cells, or mutant viruses might be released during the passages, which made the virus titers show a decreasing trend during passages. C6/36 cells can produce a higher titer of CHIKV than Vero cells.

Apoptosis is another attractive candidate antiviral response in mosquitoes, given its importance in other virus-host systems [30]. Therefore, the mosquito cell may carry some host factors against apoptosis. It would be interesting to clarify the differences in apoptosis mechanisms between Vero and C6/36 cells in CHIKV infection, as this may help us to understand the mechanisms of CHIKV-induced diseases in humans. Further study is needed to clarify the mechanisms.

Acknowledgements

This study was supported, in part, by the program of the Founding Research Center for Emerging and Reemerging Infectious Diseases, which was launched through a project commissioned by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

References

- Robinson MC: An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952–1953. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1955;49:28–32.
- McIntosh BM, JPGA/DSI: Rural epidemic of chikungunya in South Africa with involvement of *Aedes (Diceromyia) furcifer* (Edwards) and baboons. *S Afr J Sci* 1977;73:267–269.
- Diallo M, Thonnon J, Traore-Lamizana M, Fontenille D: Vectors of chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:281–286.
- Munasinghe DR, Amarasekera PJ, Fernando CF: An epidemic of dengue-like fever in Ceylon (chikungunya) – a clinical and haematological study. *Ceylon Med J* 1966;11:129–142.
- Pavri K: Disappearance of chikungunya virus from India and south east Asia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80:491.
- Schwartz O, Albert ML: Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:491–500.
- Lumsden WH: An epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952–1953. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1955;49:33–57.
- Pongsiri P, Auksornkitti V, Theamboonlers A, Luplertlop N, Rianthavorn P, Poovorawan Y: Entire genome characterization of chikungunya virus from the 2008–2009 outbreaks in Thailand. *Trop Biomed* 2010;27:167–176.
- Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, Le Roux K, Prevost MC, Fsihi H, Frenkiel MP, Blanchet F, Afonso PV, Ceccaldi PE, Ozden S, Gessain A, Schuffenecker I, Verhasselt B, Zamborlini A, Saib A, Rey FA, Arenzana-Seisdedos F, Despres P, Michault A, Albert ML, Schwartz O: Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog* 2007;3:e89.
- Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C: Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* 2009;393:183–197.
- Her Z, Malleret B, Chan M, Ong EK, Wong SC, Kwek DJ, Tolou H, Lin RT, Tambyah PA, Renia L, Ng LF: Active infection of human blood monocytes by chikungunya virus triggers an innate immune response. *J Immunol* 2010;184:5903–5913.
- Karpf AR, Lenches E, Strauss EG, Strauss JH, Brown DT: Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with Sindbis virus. *J Virol* 1997;71:7119–7123.
- Karpf AR, Blake JM, Brown DT: Characterization of the infection of *Aedes albopictus* cell clones by Sindbis virus. *Virus Res* 1997;50:1–13.
- Brown DT: Alphavirus growth in cultured vertebrate and invertebrate cells; in Mayo MA, Herrop KA (eds): *Vectors in Virus Biology*. New York, Academic Press, 1984, pp 113–133.
- Irusta PM, Lamos E, Galonek HL, Vander Maten MA, Boersma MC, Chen YB, Hardwick JM: Regulation of apoptosis by viruses that infect insects. *Arch Virol Suppl* 2004;171–178.
- Karpf AR, Brown DT: Comparison of Sindbis virus-induced pathology in mosquito and vertebrate cell cultures. *Virology* 1998;240:193–201.
- Wang H, Blair CD, Olson KE, Clem RJ: Effects of inducing or inhibiting apoptosis on Sindbis virus replication in mosquito cells. *J Gen Virol* 2008;89:2651–2661.
- Dash PK, Tiwari M, Santhosh SR, Parida M, Lakshmana Rao PV: RNA interference mediated inhibition of chikungunya virus replication in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:718–722.

- 19 Lin CC, Yang CF, Tu CH, Huang CG, Shih YT, Chuang CK, Chen WJ: A novel tetraspanin C189 upregulated in C6/36 mosquito cells following dengue 2 virus infection. *Virus Res* 2007;124:176-183.
- 20 Brehin AC, Rubrecht L, Navarro-Sanchez ME, Marechal V, Frenkiel MP, Lapalud P, Laune D, Sall AA, Despres P: Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to chikungunya envelope E2 glycoprotein. *Virology* 2008;371:185-195.
- 21 Nava VE, Rosen A, Veluona MA, Clem RJ, Levine B, Hardwick JM: Sindbis virus induces apoptosis through a caspase-dependent, CrmA-sensitive pathway. *J Virol* 1998;72:452-459.
- 22 Chen WJ, Chen SL, Fang AH: Phenotypic characteristics of dengue 2 virus persistently infected in a C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells. *Intervirol* 1994;37:25-30.
- 23 Krejbich-Trotot P, Denizot M, Hoarau JJ, Jaffar-Bandjee MC, Das I, Gasque P: Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *FASEB J* 2011;25:314-325.
- 24 Yoshida H: ER stress response, peroxisome proliferation, mitochondrial unfolded protein response and Golgi stress response. *IUBMB Life* 2009;61:871-879.
- 25 Boya P, Cohen I, Zamzami N, Vieira HL, Kroemer G: Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ* 2002;9:465-467.
- 26 Chen TH, Tang P, Yang CF, Kao LH, Lo YP, Chuang CK, Shih YT, Chen WJ: Antioxidant defense is one of the mechanisms by which mosquito cells survive dengue 2 viral infection. *Virology* 2011;410:410-417.
- 27 Jindadamrongwech S, Thepparit C, Smith DR: Identification of GRP 78 (BiP) as a liver cell expressed receptor element for dengue virus serotype 2. *Arch Virol* 2004;149:915-927.
- 28 Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F: Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response. *Virol J* 2007;4:91.
- 29 Yu CY, Hsu YW, Liao CL, Lin YL: Flavivirus infection activates the XBP1 pathway of the unfolded protein response to cope with endoplasmic reticulum stress. *J Virol* 2006;80:11868-11880.
- 30 Hay S, Kannourakis G: A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 2002;83:1547-1564.

話題の感染症

血液製剤の安全対策 — プリオン除去の現状 —

Current Situation of Prion Risks on Blood Products

かとうもり ゆのきみきひろ いくたかずよし はぎわらかつろう
 加藤(森)ゆうこ¹⁾ : 柚木幹弘^{1,2,3)} : 生田和良²⁾ : 萩原克郎¹⁾
 Yuko KATO-MORI Mikihiro YUNOKI Kazuyoshi IKUTA Katsuro HAGIWARA

はじめに

新たなプリオン病である変異型クロイツフェルトヤコブ病 (Variant Creutzfeldt-Jakob Disease, vCJD) の発生は 1996 年に報告された。そして、二次・三次感染による感染者の増加や全世界への蔓延が危惧され、大きな社会問題となった。また、その原因がウシ海綿状脳症 (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) に罹患したウシの危険部位の摂取によることが疑われ、畜産、食品衛生、ならびに医療分野において安全対策が講じられるとともに、ヒトにおける疾患モニタリングが実施された。幸いな事に、vCJD 患者数は予測を大きく下回り、当時危惧されたような数万人規模の発生には至らなかった。これは危険因子とされたウシおよびウシ由来の食肉やゼラチン等の原材料におけるリスク低減措置が効果的に機能した結果、ヒトへのプリオン伝播リスク低減に功を奏したものと考えられた。一方、食肉以外の感染ルートとして、手術、輸血、血漿分画製剤、生体成分由来製剤、バイオ医薬品などが理論的に考えられるが、これらについてもさまざまなリスク低減策が各分野で施されており、プリオン伝播の可能性は低い。しかしながら、プリオンは不活化や除去が極めて困難であること、その性状については不明な点が多いこと、輸血によるプリオン伝播事例が報告されていること等から、今後も警戒すべき感染症として認識しておく必要がある。ヒト由来の医薬品等については、さまざまな課題が存在し、今後も研究と対策が必要であろう。そこで本稿では、プリオン

病のこれまでの状況とともに、ヒト血液から製造される血漿分画製剤を中心とした現状について紹介する。

I. 家畜におけるプリオン病

1986 年、英国でこれまでに確認されていない神経症状を呈するウシの疾患の流行が報告された。その後、この疾患は狂牛病 (Mad Cow Disease) と一般的に報道されたが、学術的には伝染性海綿状脳症 (Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE) のひとつであり、ウシ海綿状脳症 (BSE) と名付けられた。この BSE 発生の原因が、ヒツジの TSE であるスクレイピー (PrP^{sc}) に感染した個体を含む肉骨粉の摂取によることが指摘され、BSE は羊の TSE の原因物質による感染によって生じることが疑われた。英国の公衆衛生当局は、英国内の家畜飼料からこの肉骨粉を排除する決定と、ウシ全頭モニタリング制度を導入することにより、更なる流行の拡大防止策を講じた。その結果、全世界的に流行する事が懸念された BSE は、そのほとんどが英国内での発生にとどまり、1992 年をピーク (年間発生頭数約 37,000 頭) にその発生は減少した (図 1)^{1,2)}。近年の評価対象国における BSE 発生頭数は、2011 年および 2012 年で 29 例と 21 例となっており、ピーク時の 1992 年の 37,000 頭余り (ほとんどが英国で発生) と比べてその数は劇的に減少している。日本においては 2001 年に BSE の発生が初めて確認され、その後、英国と同様の全頭モニタリング制度の導入と全頭検査が導入された。日本では 2008 年の 1 例

1) 酪農学園大学 獣医学群

☎069-0836 北海道江別市文京台緑町582

2) 大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野

☎565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1

3) 日本血液製剤機構 研究開発本部

☎105-6107 東京都港区浜松町2-4-1

世界貿易センタービル7階

1) School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University.

(582 Midorimachi, Bunkyo-dai, Ebetsu-shi, Hokkaido)

2) Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University.

(3-1 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka)

3) Research and Development Division, Japan Blood Products Organization. (7th Fl. WTC building, 2-4-1 Hamamatsu-cho, Minato-ku Tokyo)

を最後にそれ以降の発生はなく(総計 36 例の発生)、2013 年 5 月に国際獣疫事務局により日本は国際的な安全性格付け (BSE status) の最上位である「無視できる BSE リスク国」の認定を受けた³⁾。

Ⅱ. プリオン蛋白

プリオン (Prion) とは蛋白性の感染性粒子という意味である Proteinaceous Infectious Particle の短縮形造語であり、この感染性病原体はウイルス等と異なり遺伝情報を持たない蛋白質そのものである。ヒトの正常型プリオン蛋白 (Cellular Prion protein, PrP^C) は CD230 と同義で、第 20 番染色体に PRNP 遺伝子としてコードされている⁴⁾。病原体としての感染性プリオン蛋白質は、ウイルス等の外来性物質ではなく、もともと宿主に存在する α ヘリックス構造に富んだプロテアーゼ感受性の PrP^C が、 β シートリッチな構造に変換した異常型プリオン蛋白質であり、プロテアーゼ抵抗性である (Proteinase resistance prion protein, PrP^{Sc})。この構造変換した PrP^{Sc} の存在により正常の PrP^C が次々に PrP^{Sc} に構造変換して細胞内で結合・集積する。しかしながら、プロテアーゼ感受性の PrP^C にも感染性を有する事が報告され、プロテアーゼ感受性は病原性有無の指標にはならない事が示唆された⁵⁾。また、感染性プリオン蛋白は単量体ではなく重合体として存在していると考えられ、その感染性については粒子径 10nm 以下の重合体は感染性がなく、粒子径 20 ~ 25nm が最

も感染性が高いとの報告がある⁶⁾。一方で、15nm の孔径を有するウイルスろ過膜のろ過液の超遠心上清に感染性が認められるとの報告がある事から⁷⁾、異常型プリオン蛋白は非常に小さな分子でも感染性を有し、感染因子としてさまざまな存在様式があることが明らかになりつつある。

Ⅲ. ヒトにおけるプリオン病

1996 年、英国においてこれまでに確認されていない病態を呈するクロイツフェルトヤコブ病 (Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD) が報告された。この新しいヒトの疾患はこれまでの CJD とは違い若年性であることが特徴であるとされ、変異型 CJD (Variant CJD, vCJD) と命名された。この vCJD 発症例は、BSE 同様主として英国で確認され、その発症パターンが BSE のそれと相関関係にあることから、vCJD の原因が BSE 発症ウシ由来の原料の摂取によるものと疑われた。この vCJD は BSE 同様に世界的に流行・拡大することが懸念されたが大流行には至らず、2012 年 6 月時点における総発生数は 227 名 (全世界) となっている⁸⁾。発症患者数の最も多い国は英国であり、現時点までの総計は 176 名、次いでフランスの総計 27 名であった。vCJD の二次感染と考えられる輸血による感染事例は英国で 3 例報告されているが、2008 年以降報告はない⁸⁻¹⁰⁾。

CJD は主に、弧発性 CJD (Sporadic CJD, sCJD)、家族 (遺伝) 性 CJD (Familial CJD, fCJD)、医原性

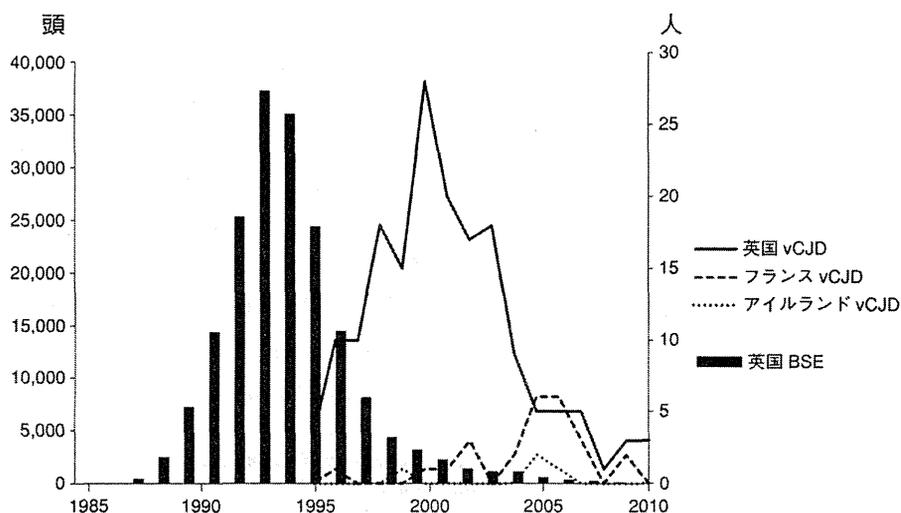


図 1 BSE と vCJD の流行経過

CJD (iatrogenic CJD, iCJD)、そして vCJD の 4 種類に分類される。sCJD は 55 歳以上のヒトに約 100 万人に 1 人の割合で発症する CJD であるが、輸血などを通じてのヒト-ヒト間における感染の報告はない。医薬品への感染性プリオン蛋白の混入リスクが高いもののひとつに、血液を原料とする血液製剤がある。感染事例については、献血後に vCJD に感染していることが判明したドナー由来の血液製剤を輸血された事例が英国で確認され、現時点で受血者 3 名が vCJD に感染したと認識されている¹¹⁾。2010 年の WHO 見解では、ヒト血液は低感染性のカテゴリーに分類されているが、vCJD は感染性あり、一方で CJD は感染性なしと位置付けられている¹²⁾。また、血友病患者は欠損している凝固因子を補うために血漿や血漿分画製剤の投与を定期的に受けていることから、英国では血友病患者に対してモニタリングが実施され、2009 年には生前に神経症状を発症していない血友病患者の脾臓から異常型プリオン蛋白が発見された¹³⁾。この事例は、輸血製剤だけではなく血漿分画製剤でも感染リスクが残存することを示すことになった。また、他の医原性感染として硬膜移植、ヒト脳下垂体由来製剤(成長ホルモンなど)、角膜移植や手術器具を介しての感染も確認されている^{14, 15)}。

日本では CJD のサーベイランスが実施されており、1999 年から 2010 年までの間に確認された 1421 例の CJD は、sCJD が 1088 例(76.6%)、fCJD が 245 例(17.2%)、iCJD(全例硬膜移植)が 80 例(5.6%)、vCJD が 1 例(0.1%)、分類できない CJD が 7 例(0.5%)であった¹⁶⁾。この中で実際に輸血による感染リスクとなり得るドナーは iCJD と vCJD 患者であるが、手術歴などの確認により iCJD 患者が献血する機会を排除する事は可能である。日本における vCJD 発症例は、これまでに 1 例であるが、日本人の感染リスクは、英国渡航して vCJD に感染するリスクと、vCJD 感染者が献血し、輸血を通して国内で感染が拡大するリスクが想定されている¹⁷⁾。輸血による感染モデル予測では、感染者数は 2003 年ごろにピークを迎え、発症者の増加は 2010 年代の前半でほぼ横ばいとなり、累積発症者は 0.563 人になるという結果が報告されている¹⁷⁾。このことは、現在の BSE/vCJD の疫学状況が大きく変化しない限り、2010 年以降の日本における輸血を介した vCJD 感染者の発

生可能性が極めて低いことを示している。

一方、英国での vCJD 発生については 2000 年の 28 例をピークとして減少し、2008 年は 2 例となったが、その後、2009 年、2010 年、ならびに 2011 年の発生はそれぞれ 3 例、3 例、5 例となっている(図 1)¹⁸⁾。これらの発症が示す明確な要因は現時点では不明であるため、今後も vCJD の動向については慎重に見極める必要があるものと思われる。

IV. 社会と行政の対応

BSE と vCJD の関連性が指摘された問題は、畜産分野を中心とした食品安全における BSE 問題を再考する事となった。日本では 1996 年からウシ飼料の動物性成分使用制限を開始した。また、ウシ由来のヒトに対する vCJD 伝播リスクを低減する目的で 2001 年から、と畜牛全頭検査、陽性牛の焼却処分、特定危険部位(Specified Risk Materials; SRMs、頭部、脊髄、扁桃遠位部)の除去を開始(2004 年から脊柱を追加指定)、さらに臨床症状のモニタリング、個体番号による全頭管理、と畜場での解体処理方法や交差汚染の管理など、多くの対策を組み合わせることによって高い安全性を確保してきた。その結果 BSE 対策は見直され、2013 年 7 月以降、国内と畜場におけるウシの BSE 全頭検査を廃止し、48 カ月齢超を検査対象とすることになった¹⁹⁾。この対策措置法の改正については内閣府食品安全委員会にてその妥当性が評価されている²⁰⁾。現在日本では 30 カ月齢以下のウシは扁桃・回腸遠位部、30 カ月齢以上のウシは舌と頬肉を除く頭部・脊髄・脊柱・回腸遠位部が特定危険部位に指定されている^{21, 22)}。

さらに、感染性プリオン蛋白は、プロテアーゼ抵抗性のみならず、121℃のオートクレーブ滅菌にも耐性があるなど不活化が困難であることから、動物由来の医薬品領域においても大きな問題を惹起した。医薬品の中には、ゼラチンカプセルなどウシ由来の原材料が数多く使用されていることから、日欧米の規制当局はプリオンに関するガイダンスの制定や行政指導を実施した。厚生労働省も、1996 年に製薬メーカーに対してウシ由来原材料の使用実態と原産国の把握を求め²³⁾、2000 年にはプリオンに対するリスク評価を求めた²⁴⁾。各メーカーはこの BSE 問題に対応するとともに、可能なものについてはウ

シ以外の原料への切り替え対策を実施した。ヒトや動物組織を原料とする蛋白医薬製剤は、その製剤化工程で強力な蛋白変性操作は導入されていない。そこで、ヨーロッパの規制当局は1998年、2003年、2004年、2009年ならびに2010年にプリオンのリスク評価に関する見解を発出した²⁵⁻²⁷⁾。また米国規制当局もメーカーが実施する製剤のリスクアセスメントに関するガイダンスを2010年に発表した²⁸⁾。日本においても2003年に厚生労働省よりプリオン対策強化が通知された²⁹⁾。これを受け、各製薬メーカーはウシ組織抽出物由来の医薬品や血液製剤等、蛋白医薬製剤の製造工程におけるプリオン除去能力の評価を行うとともに、感染性プリオンに対する感染リスク低減を目的として、原材料の原産国の変更やプリオン除去膜の導入や製造条件の変更などを試みている。

V. 血液成分のリスク

血液は主に赤血球、血小板、白血球、血漿の画分に分けることができる。プリオン蛋白は細胞膜上に存在するので、血液細胞が輸血製剤における主なプリオン伝播リスクであると考えられる。マウスを用いた血液成分のvCJD感染性を調べた知見では、buffy coatや血漿、血小板は感染性が認められたが、赤血球には感染性は認められなかった³⁰⁾。これらの事から輸血は感染リスクを伴い、輸血によるvCJD感染リスクの低減策を講じる必要がある。効果的なリスク低減策は、問診によるドナー選抜と原料血液のスクリーニング検査により感染源を排除することである。日本の献血基準には問診項目として英国などの滞在歴などを設定し、ドナーの適格性を確保している³¹⁾。また、採血後の血液中の白血球除去フィルターにプリオン除去効果が確認されているものもある³²⁾。日本では血漿分画製剤の原料となる血漿については、6カ月の貯留保管を行った後に日本赤十字社から製薬メーカーに出荷されることにより、採血と製造に時間差を設定して感染リスク低減対策が講じられている。さらに、血漿分画製剤の製造工程においてプリオン除去能を有する工程が導入されて

VI. プリオン蛋白除去の対策

上述の様に、原料血漿に異常型プリオン蛋白が混入する可能性は極めてまれであるが、医薬品の安全性を担保する上で感染性プリオン蛋白除去に対する対策は必要であり、製薬メーカーにおいていくつかの研究とそれに基づく対策が応用実施されている。実際、これまでの多くの研究成果から異常型プリオン蛋白を除去可能な工程や手法が明らかになってきている³³⁾。その中で今後の除去効果が期待されているのは15nmの平均膜孔径を有するウイルス除去膜による除去である。ヒツジのスクレイピー株(Hamster adopted scrapie ハムスター 263K)に感染したハムスター脳由来の超音波処理したマイクロソマル画分(膜画分)をプリオン材料として、試験的に血漿分画製剤の製造工程に添加してウイルス除去膜(平均膜孔径15nm)によるプリオン蛋白の除去性能を評価した。この15nmのろ過膜はバイオ医薬品分野に産業応用可能な世界で最も公称膜孔径の小さなウイルス除去膜である。この膜処理により、ろ液中の異常型プリオン蛋白はウエスタンブロッティング(WB)法の検出限界以下にまで除去され、3.5Log以上の除去指数を示した。同処理プリオン蛋白の動物への接種実験では、ろ液中の感染性プリオン蛋白は4.0Log以上の除去指数を示したが、一部のサンプルで感染性を認めた(表1)^{7,34)}。さらにvCJD感染マウス脳由来の超音波処理プリオン材料を用いて15nmろ過膜による除去効果をWB法で評価した結果、2.8Logの除去指数を示したが、ろ液中に異常型プリオン蛋白を認めた(表2)。この結果は、15nmろ過膜は微粒子となった異常型プリオン蛋白分子に

表1 15nmろ過による異常型プリオン蛋白(Scrapie 263K)の除去

	定量試験		定性試験	
	WB	BA	WB	BA
ろ過前	6.1/6.1	7.97/8.30	3.6	発症
ろ過後	<2.6/<2.6	<3.25/4.30	<0.8	発症
除去係数	≥3.5/3.5	≥4.72/4.00	≥2.8	NA
超遠心沈殿	NA	NA	<1.0	発症
超遠心上清	NA	NA	<1.0	発症

WB: ウエスタンブロッティングによる評価。

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log₁₀値。

BA: 動物接種試験(n=6頭/群)による定量又は定性評価。

定量評価は階段希釈サンプルを用いた結果から、Karberの式により求めた総ID₅₀(Log₁₀)。

NA: Not applicable

表2 15nm ウイルス除去膜による 263K および vCJD 除去の比較

Sample solution	Scrapie 263K	mo-vCJD
PBS	≥3.2/≥3.2	2.8
	≥2.5/≥3.2	NT
Antithrombin	≥2.8	≥3.5/≥3.5
	≥3.5/≥3.5	NT

数値はウェスタンブロットによる Non-detectable endpoint 法によって求めた総 Log₁₀ 値。
NT: Not tested

対して、一定の除去効果を発揮し、感染性リスク低減に有用である事を示している。その一方で、微小な異常型プリオン蛋白が多く存在すると除去工程からリークする可能性も示唆された。

ウイルス除去膜の原理は、膜の孔径とウイルス粒子の大きさの差を利用して、目的の蛋白質を通過させ膜層で捕捉する事により除去することであり、プリオン蛋白に対しても同じ原理が適応される。一方、異なるプリオン蛋白除去方法として静電相互作用による吸着作用を応用したプリオン蛋白除去が考えられる。その候補として、溶液中の不純物を吸着させる目的で使用されるデプスフィルターがある。実際に、平均膜孔径 100 - 500nm のデプスフィルター (Depth filter ZP 90LA) を用いて上述のウイルス除去膜と同様の評価を実施した結果、効果的にプリオンを除去できるが、動物実験や一部の製剤ではろ液にプリオン蛋白が検出されるという結果を得た。膜孔径 220nm のエンドトキシン除去フィルター (Mustang E) も条件により除去能力に差が認められた (表3)³⁵⁾。陰イオン交換能を有するフィルター (Qyu speed D) を用いたプリオン蛋白吸着能 (除去能) 評価では、条件によりろ液にプリオン蛋白が検出されるものの、効果的な除去能力を示した (表3)³⁶⁾。アフィニティーカラムを用いてプリオン蛋白を吸着するカラムも評価されており、3.9Log 以上の効

果的な除去能力を有する事が確認されている³⁷⁾。

これらの結果から、サイズ依存的もしくは静電相互作用でプリオン蛋白を除去するフィルターはその除去効果を示すものの、条件によっては感染性プリオン蛋白を完全に除去できないことが明らかとなった。したがって、血漿分画製剤のプリオン蛋白に対する安全性を堅牢にするためには、これら機作の異なる除去ステップを複数組み合わせ合わせたセーフティーネットを構成することにより、より高い除去効果が期待されるであろう³⁸⁾。

VII. プリオン蛋白除去の問題点と今後の対策

血漿分画製剤の製造工程に導入可能と思われるデバイスは、採血時の白血球除去フィルターの他に、ウイルス除去フィルター、荷電された除菌・清澄ろ過フィルター等があり、蛋白質の精製工程としては、エタノール分画、硫酸分画、ポリエチレングリコール分画、クロマトグラフィー等が考えられる。

プリオン蛋白除去に関する血液製剤の製造工程におけるプリオン除去能力を評価する場合、感染動物の脳を材料としたマイクロソーム画分が用いられている。これは血漿中に異常型プリオン蛋白が十分に得られない事から脳を使用しているのであるが、現在はできるだけ血中に存在し得る状態に近づけるために、超音波や有機溶媒、界面活性剤処理などにより、プリオン蛋白の粒子径を極力小さくする処理が加えられている。この事は逆に、同じ工程やデバイスを評価する時にプリオン蛋白材料の調製法の違いにより評価結果が異なるという問題を有する。また、評価は一般的にヒツジのスクレイパーをハムスターに馴化した 263K 株が使用されるが、血液製剤

表3 静電相互作用を持つフィルターによる溶媒組成の異なる蛋白液中のプリオン除去

Sample Solution	Depth filter ZP 90LA	Mustang E	Qyu speed D
PBS	≥2.8	Effective (定性)	3.5
IVIG	≥2.8/≥3.5	NT	NT
Albumin 25%	≥3.1/≥3.1/≥3.6	NT	NT
	3.8 (Animal study)		
Albumin 5%	≥2.8/≥2.8	NT	NT
Fibrinogen	2.1	Ineffective (定性)	≥3.5

数値はウェスタンブロットによる Non-detectable endpoint 法によって求めた総 Log₁₀ 値。
NT: Not tested

領域で考慮すべきは vCJD であり、スクレイパーと vCJD ではその原因プリオン蛋白の性状が異なる。したがって、製造工程評価で使用したプリオン蛋白の由来とその性状の違い、評価手法も注意が必要である。プリオン蛋白除去能力の評価は WB 法が一般的に採用されるが、WB 法は蛋白を検出する手法であって感染性を検出するものではない。また、動物実験に比べて検出感度も低い。実際に、WB 法で検出限界以下のサンプルにおいて動物実験では感染性が認められる知見をこれまでに得ている⁷⁾。このことから、プリオンを対象とした評価において、目標とする数値の妥当性やとるべき安全係数について慎重な議論が必要であり、得られた数値(除去指数)だけで安全性を判断するのは適切ではないと考えられる。

今後、私たちを取り巻く食料・医療はさまざまな形で変化・多様化して行く事が予想される。日本におけるプリオン問題は、行政を始め多くの関係機関の努力により、食品由来の感染リスクは、極めて低いレベルにまで到達した。今後の医療分野の発展を踏まえて次に検討すべき課題は、バイオ医薬品における安全対策であり、その研究が求められるであろう。バイオ医薬品は安全であることは当然のことであるが、その安全を担保するためには複合的で地道な研究を継続する以外にないといえる。

謝 辞

本研究の一部は大阪大学微生物病研究所、酪農学園大学獣医学群、米国赤十字、日本血液製剤機構(旧ベネシス)間の共同研究として実施された。また、本研究の一部は厚生労働省科学研究として実施された。柚木幹弘は日本血液製剤機構の職員である。

文 献

- 1) BSEに関する情報.[cited 29 th June 2013]; Available from : http://www.fsc.go.jp/sonota/bse/bse_kiso_1305.pdf
- 2) BSE situation in the world and annual incidence rate. . [cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/bse-specific-data/cases-in-imported-animals-only/>
- 3) 我が国のBSEステータス認定について.[cited 29th June 2013]; Available from : http://www.maff.go.jp/j/syuan/douei/bse/b_status/
- 4) Robakis N, Devine-Gage EA, Jenkins EC, Kascsak RJ, Brown WT, Krawczun MS, Silverman WP. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p ARM of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. *BBRC*, 1986. **140**(2): p. 758-765.
- 5) Sajjani G, Silva CJ, Ramos A, Pastrana MA, Onisko BC, Erickson ML, Antaki EM, Dynin I, Vázquez-Fernández E, Sigurdson CJ, Carter JM, Requena JR. PK-sensitive PrP^{Sc} Is Infectious and Shares Basic Structural Features with PK-resistant PrP^{Sc}. *PLoSOne Pathogens*, 2012. **8**(3): p. e1002547.
- 6) Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B. The most infectious prion protein particles. *Nature*, 2005. **437** : p. 257-261.
- 7) Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals*, 2010. **38** : p. 311-313.
- 8) vCJD cases Worldwide.[cited 29h June 2013]; Available from : <http://www.eurocjd.ed.ac.uk/surveillance%20data%204.htm>
- 9) VARIANT CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE CURRENT DATA(JUNE 2013).[cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.cjd.ed.ac.uk/documents/worldfigs.pdf>
- 10) First case of vCJD reported in a Japanese patient. *Euro-surveillance*. 10 February 2005 ; **10**(6).[cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2640>
- 11) TRANSFUSION MEDICINE EPIDEMIOLOGY REVIEW (TMER).[cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.cjd.ed.ac.uk/TMER/TMER.htm>
- 12) Tables on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies Updated 2010, WHO/EMP/QSM/2010.1.[cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf>
- 13) Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, Keeling DM, Millar CM, Hill FG, Ironside JW. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia*, 2010. **16**(2): p. 296-304.
- 14) 萩原健一、山河芳夫、花田賢太郎、ヒト・プリオン病ー感染症としての変遷と新たな課題. *ウイルス*. **59**(2): p.155-166.
- 15) 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」, ed. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 病原性クロイツフェルト・ヤコブ病, ed. 児玉南海雄、齋藤延人、秋野公造、太組一朗. 金原出版. 150-159, 2010.
- 16) 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「プリオン病及び遅発性ウイルス感染症に関する調査研究班」, ed. プリオン病と遅発性ウイルス感染症. 日本におけるヒト・プリオン病のサーベイランスと疫学的実態, ed. 山田正仁、篠原もえ子、浜口毅、野崎一朗、坂井

- 健二. 金原出版. 16-21, 2010.
- 17) 英国渡航に由来するvCJD感染リスクの評価と献血制限のあり方について. [cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8o.pdf>
 - 18) vCJD cases Worldwide. [cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.euocjd.ed.ac.uk/surveillance%20data%204.htm>.
 - 19) 厚生労働省関係牛海綿状脳症対策特別措置法施行規則の一部を改正する省令について(平成25年6月3日付け食安発0603第5号食品安全部長通知). [cited 1st July, 2013]; Available from : http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/gyousei/dl/130603_1.pdf.
 - 20) プリオン評価書牛海綿状脳症(BSE)対策の見直しに係る食品健康影響評価②. [cited 29th June 2013]; Available from : http://www.fsc.go.jp/sonota/bse/bse_hyoka_1305.pdf
 - 21) BSEに関する情報. [cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.fsc.go.jp/sonota/bse1601.html>
 - 22) 政策について—健康・医療、牛海綿状脳症(BSE)について. [cited 29th June 2013]; Available from : http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/bse/index.html
 - 23) ウシ由来物を用いた医薬品等に関する調査依頼について, 厚生省薬務局審査課・薬務局医療機器開発課.
 - 24) ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について, 厚生省医薬安全課長.
 - 25) CHMP position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products. EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 2. [cited 29th June 2013]; Available from : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Position_statement/2011/06/WC500108071.pdf.
 - 26) Concept Paper on the Need To Update the CHMP Position Statement on CJD and Plasma-Derived and Urine-Derived Medicinal Products. EMEA/CHMP/BWP/253246/2009. 23 July 2009. [cited 29th June 2013]; Available from : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003742.pdf
 - 27) CHMP/CAT position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and advanced therapy medicinal products. Draft, EMEA/CHMP/CAT/BWP/353632/2010. [cited 29th June 2013]; Available from : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500095069.pdf
 - 28) A 2010 Update of the Draft Quantitative Risk Assessment of vCJD Risk Potentially Associated with the Use of Human Plasma-Derived Factor VIII Manufactured Under United States(US) License From Plasma Collected in the US. October 6, 2010. Center for Biologics Evaluation and Research US Food and Drug Administration. [cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231018.pdf>
 - 29) ウシ等由来物及び人由来物を原料として製造される医薬品、医療器具等の品質及び安全性確保の強化について, 厚生労働省医薬局長.
 - 30) Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, Kolchinsky S, McShane L, Drohan WN, Brown P. Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion*, 2003. 43 : p. 1687-1694.
 - 31) 献血をご遠慮いただく場合. [cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.jrc.or.jp/donation/refrain/detail/detail09.html>
 - 32) Informational Issue Summary, FDA's Currently-Recommended Policies to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committee 22nd Meeting October 28-29, 2010. [cited 29th June 2013]; Available from : <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231179.pdf>
 - 33) Yunoki M, Urayama T, Ikuta K. Possible removal of prion agents from blood products during the manufacturing process. *Future Virol*, 2006. 1(5) : p. 659-674. Corrigenda in : *Future Virol*. 2007 ; 2(1) : 117.
 - 34) Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori S, Ohtani M, Narita Y, Kawabata Y, Miyatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, Wilson E, MacLean C, Ikuta K. Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. *Biologicals*, 2008. 36 : p. 27-36.
 - 35) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. TSE removal by filtration. 2011 PDA European Virus & TSE Safety Forum. 2011. Barcelona, Spain., 2011.
 - 36) 久保純、上平崇、大久保祐士、坂井薫、ラリサセルベナコバ、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良、バイオ医薬品の製造工程におけるマウス馴化型vCJD株とハムスター馴化型Scrapie株の挙動 第60回日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, p. 457, 2012.
 - 37) Heger A. Optimization studies for the removal of prion infectivity by affinity ligand chromatography during octaplasLG manufacturing. 2013 PDA European Virus & TSE Safety Forum. 2013. Berlin, Germany., 2013.
 - 38) 柚木幹弘、萩原克郎、生田和良、バイオ医薬品におけるプリオンの問題—ヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題—。人工血液, 8 : p. 142-150, 2010.

[原著]

由来の異なるE型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて

一般社団法人日本血液製剤機構¹⁾, 酪農学園大学獣医学群²⁾,大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野³⁾高橋一恵¹⁾, 大久保祐士¹⁾, 古木理恵¹⁾, 服部眞次¹⁾, 浦山 健^{1), 2)}, 坂井 薫¹⁾,柚木幹弘^{1*), 2), 3)}, 萩原克郎²⁾, 生田和良³⁾

Difference in inactivation kinetics of HEV strains derived from swine feces and human plasma during heat treatment in liquid

*Japan Blood Products Organization*¹⁾,*School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University*²⁾,*Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University*³⁾Kadue Takahashi¹⁾, Yuji Okubo¹⁾, Rie Furuki¹⁾, Shinji Hattori¹⁾, Takeru Urayama^{1), 2)},Kaoru Sakai¹⁾, Mikihiro Yunoki^{1*), 2), 3)}, Katsuro Hagiwara²⁾ and Kazuyoshi Ikuta³⁾

抄 録

液状加熱処理工程 (60°C・10時間) は、ヒト血漿を原料とした血漿分画製剤に導入されている効果的なウイルス不活性化工程の一つである。本研究では、液状加熱処理によるE型肝炎ウイルス (以下HEV) の不活性化効果について検討するとともに、その由来 (ブタ糞便, ヒト血漿) や共存するタンパク濃度の違いが熱感受性に及ぼす影響についても検討を行った。その結果、液状加熱処理によりHEVは有効に不活性化されることが確認できた。またタンパク濃度がHEVの熱感受性に影響する重要な因子であることが明らかとなった。ただし、ヒト血漿由来HEVとブタ糞便由来HEVは異なる熱感受性を示し、HEVの由来によって性状に違いがあることが示唆された。したがって工程評価に用いるHEVは慎重に選択し、ウイルスの挙動をよく理解することが重要である。また工程によりさまざまな変動因子がウイルスの挙動に影響する可能性があることも考慮する必要がある。

Key words: HEV, plasma, inactivation, liquid-heating

序 文

E型肝炎ウイルス (以下HEV) は、ヘペウイルス科 (Hepeviridae), ヘペウイルス属 (Hepevirus) に属する非エンベロープウイルスであり、E型肝炎の原因ウイルスである¹⁾。このウイルスは他のヒト肝炎ウイルスと異なり、ヒトだけでなくブタやイノシシなどの動物にも感染する人獣共通感染症

ウイルスであることが大きな特徴である²⁾。本邦におけるE型肝炎は衛生状態の良くない発展途上国からの輸入感染症と長く考えられてきたが、近年の調査で日本のみならず欧米を始めとする先進国においても、古くから土着していることが明らかとなった³⁾。また国内の養豚施設においても、ブタ糞便中から高頻度でHEVゲノムが検出され、

* Corresponding author: yunoki-mikihiro@jbpo.or.jp

論文受付日: 2013年3月6日

掲載決定日: 2013年7月24日

その遺伝子配列を解析したところ、日本で分離されたヒトHEVとほぼ同じであることが明らかとなっている^{4), 5)}。HEVの感染ルートは、発展途上国においては水系感染であるが、先進国においては加熱不十分なブタ・イノシシ等の内臓肉の摂取による経口感染であると考えられている²⁾。一方で、輸血によるヒト-ヒト間の感染事例が日本国内で報告されている^{6), 7)}。これらのことからE型肝炎の感染リスクは食品媒介性および医原性の両面において留意する必要がある。

血漿分画製剤は数万人分のヒト血漿を混合したプール血漿から製造されるため、個別の血漿に病原体が混入していた場合、その影響はプール血漿から製造されるすべての製剤に及ぶ。現在ではさまざまなリスク軽減対策が講じられており、とくにヒト免疫不全ウイルス(HIV)、B型肝炎ウイルス(HBV)および、C型肝炎ウイルス(HCV)などの重要な病原体に対しては抗原・抗体検査や遺伝子増幅検査が採血時に導入されており、その混入リスクは極めて低いレベルに抑えられている。加えて、血漿分画製剤にはその製造過程で複数のウイルス除去・不活化能力を有する工程が導入されており、それら工程が既知/未知の病原体に対する製剤の安全性確保に寄与している。60℃・10時間で加熱を行う液状加熱処理工程も、古くから血漿分画製剤に導入されている効果的な不活化工程の一つである⁸⁾。しかし液状加熱処理による不活化効果は、ウイルスの種類によって大きく異なり、また同じウイルスであっても加熱処理時の工程検体の溶液組成によってその効果に差が認められることが明らかになっている。さらには同じ条件でも使用するウイルス株が異なると、熱感受性が大きく異なることも明らかとなっている^{9), 10), 11)}。

我々はこれまでにGenotype 3型と4型に属するブタ糞便由来HEVを用いて液状加熱処理(60℃・5時間)を行った。その結果、いずれも熱抵抗性を示し、ウイルスの遺伝子型による熱感受性の違いはほとんどないことを明らかにした¹²⁾。本研究では、液状加熱処理が導入されている各種製剤の加熱処理時の工程検体を用いて、60℃・10時間の処理によるHEV不活化効果について検討する

とともに、HEVの由来(ブタ糞便、ヒト血漿)や共存するタンパクの濃度の違いが不活化効果に及ぼす影響についても検討を行った。

材料および方法

1. ウイルス

本研究ではヒト血漿およびブタ糞便由来のHEVを使用した。ヒト血漿由来HEVは、抗HEV抗体陰性、HEV-RNA陽性(Genotype 3型、ゲノム量 $7.22\text{Log}_{10}\text{copies/mL}$)の血漿を血清化して用いた。ブタ糞便由来HEVは、実験的にGenotype 3型に属するswJR-P5株(subgenotype 3b)^{5), 13)}を感染させたブタ糞便より調製した¹²⁾。

ヒト血漿の利用については(株)ベネシス(現一般社団法人日本血液製剤機構)のヒト組織研究倫理審査委員会、ブタへの感染実験については酪農学園大学 動物実験倫理委員会の承認のもとに行った。

2. ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの液状加熱処理

ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVストックを超遠心(150,000g, 4℃または25℃, 3時間)し、得られた沈殿をアルブミン安定化剤(0.02mol/Lアセチルトリプトファン, 0.02mol/Lカプリル酸ナトリウム, 0.06mol/L塩化ナトリウム組成)により等倍置換・懸濁したものを加熱処理前液として一部採取した。残りのウイルス含有液を0.5mLずつチューブに分注し、恒温水槽内にて加温した。チューブ内の液が58℃に達してから時間計測を開始し、0.5時間, 1時間, 5時間および10時間(対照として37℃恒温水槽内で10時間)後にチューブを取り出して急速冷却した後、ウイルス感染価の測定を行った。なお、加熱開始から規定温度到達までの時間は3分以内であった。

また、ヒト血漿由来HEVストックを界面活性剤(Tween80, 終濃度1%)と有機溶剤(TNBP: tri-n-butyl phosphate, 終濃度0.3%)で30℃・1時間処理した(以下SD処理)。これを超遠心(150,000g, 25℃, 3時間)し、沈殿をアルブミン安定化剤にて等倍置換することで界面活性剤・有機溶剤を除去し、これを加熱処理前液とした。そ

の後、上述の通り加熱処理し、加熱前後のウイルス感染価を測定した。

3. 工程検体

アルブミン〔献血アルブミン25%静注12.5g/50mL, (株)ベネシス製〕, ハプトグロビン〔ハプトグロビン静注2,000単位, (株)ベネシス製〕, グロブリン〔献血ヴェノグロブリンIH5%静注2.5g/50mL, (株)ベネシス製〕およびアンチトロピン〔ノイアート静注用500単位, (株)ベネシス製〕の60°C・10時間液状加熱処理工程直前液を実製造工程より採取した。5%, 1%, 0.1%および0.01%アルブミンは、25%アルブミンをアルブミン安定化剤により希釈し調製した。

4. 工程検体の液状加熱処理

ブタ糞便由来HEVストックを上述の通り超遠心し、得られた沈殿を各工程検体およびPBSにより等倍置換した。このウイルス含有液を加熱処理前液として一部採取した。残りのウイルス含有液を0.5mLずつチューブに分注し、上述の通り加熱処理を行い、残存するウイルス感染価の測定を行った。

5. ウイルス感染価の測定

ウイルス感染価測定法はYunokiらの方法¹²⁾を一部改変し、96ウェルプレートを用いて行った。また加熱処理前および加熱処理後液の10倍段階希釈液を、1希釈当たり5ウェルA549細胞に感染させた。感染後7日間培養し、培養液を取り除いた96ウェルプレートを凍結融解した。自動核酸抽出装置ABI PRISM 6100のプロトコールにしたがってA549細胞中のRNAを抽出し、Applied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステムによりHEV RNAを検出した。PCRに用いたプライマー、プローブはJothikumarらの報告¹⁴⁾、また反応条件はYunokiらの報告¹²⁾に従った。判定は定性的に行い、HEV RNA陽性と判定されたウェル数からウイルス感染価(TCID₅₀)をKärber法¹⁵⁾により算出した。

ウイルス不活化能はウイルス添加後液のウイルス感染価を加熱後サンプルのウイルス感染価で除

しそのLog₁₀値を対数減衰率として算出した。

結 果

1. ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの熱感受性

アルブミン安定化剤にヒト血漿およびブタ糞便由来HEVを懸濁し、加熱前のウイルス感染価を測定したところ、4.92Log₁₀ TCID₅₀/mL, 5.12Log₁₀ TCID₅₀/mL (n=2の平均値)とほぼ同じであった。両者に対して60°C・10時間の液状加熱処理を行った結果、ブタ糞便由来HEVは加熱開始から1時間目で検出限界以下まで不活化されたが、ヒト血漿由来HEVは加熱開始から5時間目で検出限界以下になった(図1a)。

ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの熱感受性に違いが生じる原因として脂質成分の関与を疑ったため、SD処理により脂質成分を除去することでHEVの熱感受性が変化するか検討した。その結果、SD処理したヒト血漿由来HEVは加熱開始から30分で検出限界以下まで不活化され、ブタ糞便由来HEVに近い挙動を示した(図1b)。

ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVを用いて25%、5%アルブミン存在下で液状加熱処理を行った。その結果、ブタ糞便由来HEVは加熱開始から10時間目まで緩やかに不活化される傾向を示した。ヒト血漿由来HEVは加熱開始から1時間目まではほとんど不活化されないが、それ以降は10時間目まで緩やかに不活化され、ブタ糞便由来HEVよりも傾きが緩やかであった(図2)。

ブタ糞便由来HEVの10時間目の対数減衰率は、わずかに感染性が検出されたものの2.8Log₁₀, 3.1Log₁₀ (n=2の平均値)まで不活化された。一方、ヒト血漿由来HEVは $\geq 1.5\text{Log}_{10}$, $\geq 2.8\text{Log}_{10}$ (n=2の平均値)であり、検出限界以下まで不活化された。

2. タンパク濃度の違いによる熱感受性への影響

タンパク濃度が熱感受性に影響するか否かを確認するために、25%、5%、1%、0.1%および0.01%アルブミンおよびアルブミン安定化剤存在下でのブタ糞便由来HEVの熱感受性を検討した。その結果、アルブミン濃度が高くなる程HEVの

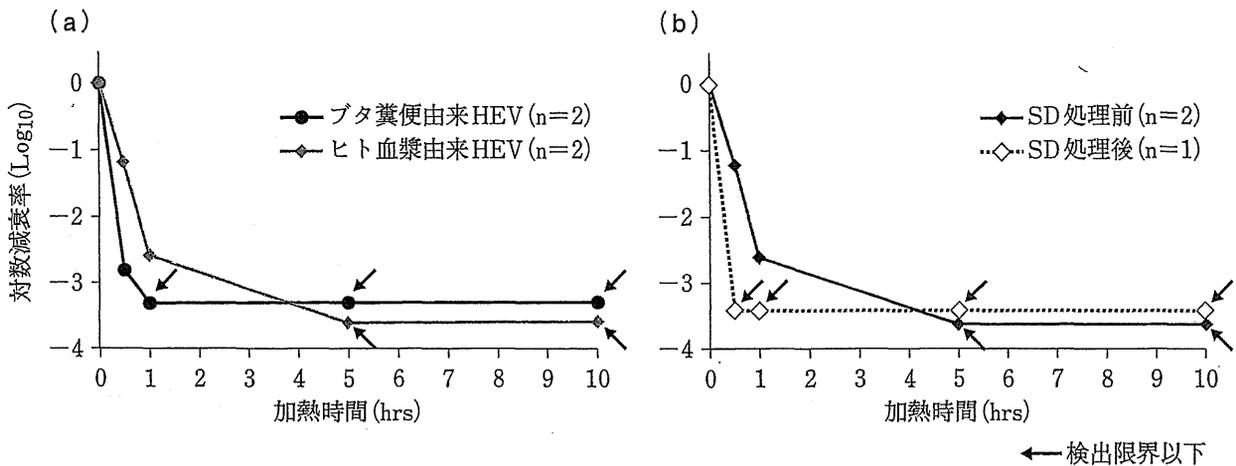


図1 a アルブミン安定化剤存在下におけるヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの不活化曲線の比較
 b SD処理によるヒト血漿由来HEVの熱感受性の変化

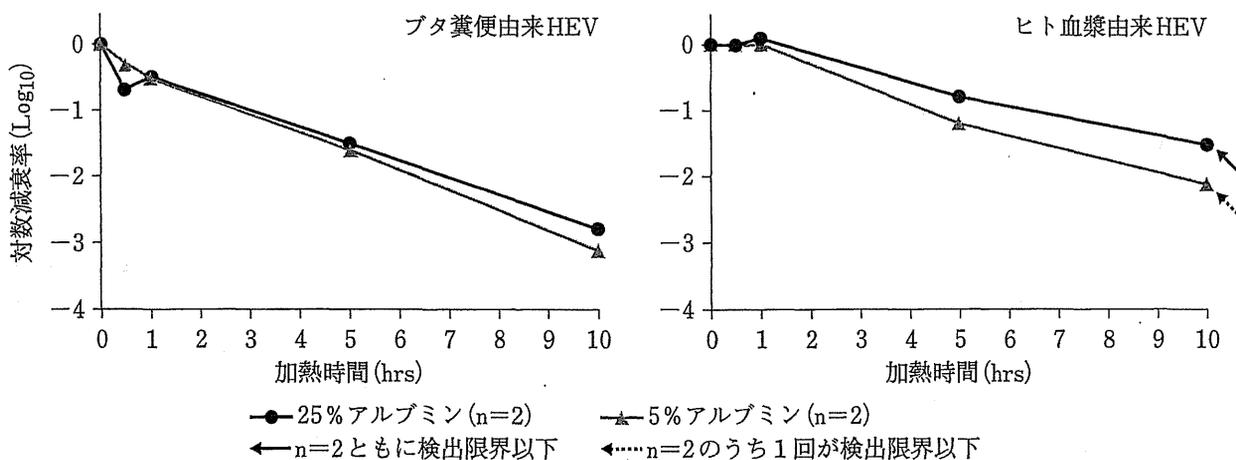


図2 25%, 5%アルブミン存在下におけるヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの不活化曲線の比較

熱感受性は低くなり、とくに濃度が1%を超えると不活化されにくくなる傾向が顕著となった(図3)。

3. さまざまな製剤の工程検体におけるブタ糞便由来HEVの不活化

ハプトグロビン、グロブリン、アンチトロンビンの工程検体およびPBSにHEVを懸濁し液状加熱処理を行った結果、グロブリン以外は加熱開始から10時間で検出限界以下まで不活化された。また不活化初期段階をみると、工程検体によって不

活化曲線に違いが認められた(図4)。

考 察

これまで我々は、25%アルブミン存在下において、60℃・5時間の液状加熱処理ではHEVが不活化されにくい傾向があること、そして遺伝子型が異なってもその傾向に差がないことを明らかにした¹²⁾。この検討で用いたHEVはブタ糞便由来であることから、血漿分画製剤に混入する可能性があるヒト血漿由来HEVとの性状の違いを確認する必要があった。今回、本検討に用いること

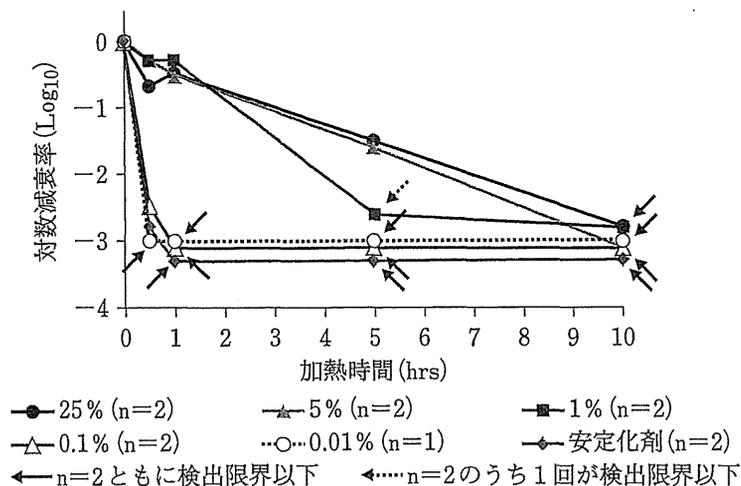


図3 アルブミン濃度によるブタ糞便由来HEVの熱感受性の違い

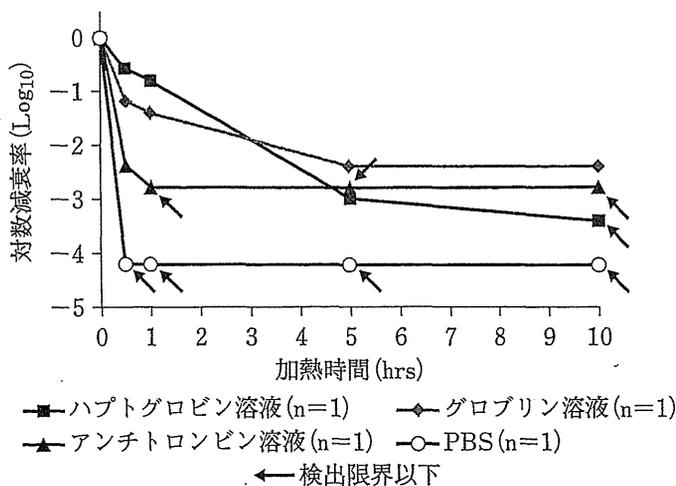


図4 各種工程検体存在下におけるブタ糞便由来HEVの不活化曲線の比較

が可能なHEV陽性ヒト血漿を確保できたため、比較検討を行った。その結果、いずれに由来するHEVも25%アルブミン存在下において緩やかに不活化され、加熱開始から10時間目ではほぼ検出限界以下まで不活化された。しかしながら、ヒト血漿およびブタ糞便由来HEVの不活化曲線を比較すると、その傾きに違いが認められ、ウイルスの性状に違いがあることが強く示唆された。

一部の血漿分画製剤の製造工程には、エンベロップウイルスの不活化を目的としてSD処理が導入されている。SD処理とは有機溶剤 (Solvent) と界面活性剤 (Detergent) を用いて、脂質エンベロ

ープを破壊・除去することにより感染性をなくす方法である。ヒト血漿由来HEVに対してSD処理を行ったところ、ブタ糞便由来HEVと同様の熱感受性にその性状が変化した。この結果は、ヒト血漿由来HEVのウイルス表面に付着している脂質成分がSD処理により除去されたためと考えられ、岡本らのヒト血漿由来HEVのウイルス表面に脂質成分が付着しているという報告と一致している¹⁶⁾。同じHEVでも由来や性状の違いによって熱感受性が異なることは注目すべき点である。

ヒト血漿を原料とする血漿分画製剤の工程評価では、由来の同じヒト血漿由来HEVを用いるこ

とが望ましい。しかしHEV陽性者における血中ゲノム濃度は低く、評価に十分な高感染力価のヒト血漿由来HEVを入手することは非常に困難である。そのため我々は一部の試験においてブタ糞便由来HEVをヒト血漿由来HEVの代用として用いた。血漿分画製剤の安全性評価を行う場合は、このようにウイルスの性状の違いが工程評価に与える影響に留意しなければならない。ウイルスの性状については今後更なる研究の進捗が望まれる。

またアルブミンを用いた検討から、共存するアルブミンの濃度がHEVの熱感受性に影響することが明らかになった。これはアルブミンがHEVを加熱から保護する作用を有することを示している。また種々の製剤の工程検体を用いて検討したところ、不活化曲線に差が認められ、タンパク濃度のみならず、タンパクの種類や溶液組成も60℃・10時間におけるウイルスの不活化曲線に影響していることが示唆された。なお、国内の献血者の3.4%が抗HEV抗体陽性であるとの報告もあり¹⁷⁾、グロブリンには抗HEV抗体が含まれている可能性がある。しかし、対照として行った37℃・10時間の加温でHEV感染性はほとんど変化しなかったことから、中和抗体による干渉作用はわずかであると判断した。

献血ドナーには一定の頻度でHEV RNA陽性者が存在することが報告されている¹⁸⁾。これは、プール血漿にHEVが混入する可能性を強く示唆している。欧米においてはHEVが検出される事例が報告されており¹⁹⁾、またプール血漿製剤による感染事例も報告されている²⁰⁾。しかしながら、こ

れまで血漿分画製剤を投与されたことによって、HEVに感染したという事例は報告されていない。その理由の一つとして、液状加熱処理などのウイルス不活化工程が導入されていることが考えられる。今回の結果から、液状加熱処理によってHEVは有効に不活化されることが明らかとなったが、一部製剤の液状加熱処理において感染性がわずかに残存することが確認された。このことは、二つ以上のウイルス不活化・除去工程を組み合わせることがHEVに対する安全性を確保する上で重要であることを示している。製造工程中には、加熱処理工程だけでなくHEVが除去されていると考えられるウイルス除去工程や精製工程が存在する。ウイルス除去膜処理は効果的にウイルスを除去する工程として知られており、HEVに対しては19nmよりも小さな孔径の膜であれば、検出限界以下にまで除去することが確認されている¹²⁾。ウイルス不活化工程と除去工程の組み合わせは、HEVをはじめとした既知／未知のウイルス混入に対する安全性を堅固なものにしていると考えられる。HEVに関してはいまだ十分な情報が得られていないので、ウイルスの性状解析や他の工程でのウイルス除去・不活化能力の評価等さらなる研究が必要である。

謝 辞

本研究の実施および論文作成にあたり温かいご指導を頂いた井手野祥次氏、田中宏幸氏に謝意を表します。高橋一恵、大久保祐士、古木理恵、服部眞次、浦山健、坂井薫、柚木幹弘は一般社団法人日本血液製剤機構の職員である。

文 献

- 1) Meng, X.J. *et al.*: Hepeviridae. In *Virus Taxonomy*, King AMQ, M.J. Adams, E.B. Carstens, and E.J. Lefkowitz (eds), 9th Report of the 245 ICTV, 1021-1028, Elsevier Academic Press, London, 2011
- 2) Okamoto H.: Genetic variability and evolution of hepatitis E virus, *Virus Research*, 127: 216-228, 2007
- 3) Okamoto H. *et al.*: Features of hepatitis E virus infection in Japan, *Internal Medicine*, 42 (11): 1065-1071, 2003
- 4) Takahashi M. *et al.*: Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus, *Journal of General Virology*, 84: 851-862, 2003
- 5) Sapsutthipas S. *et al.*: Sequence variation in

- hepatitis E virus Genotypes 3 and 4 from swine fecal samples in Japan, *The Open Veterinary Science Journal*, 3: 68-75, 2009
- 6) Matsubayashi K. *et al.*: A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route, *Transfusion*, 48: 1368-1375, 2008
- 7) 薬事・食品衛生審議会 平成17年度第4回血液事業部会運営委員会議事次第 資料D-2, 7: 「輸血用血液製剤によるHEV (E型肝炎ウイルス) 感染が疑われた事例 (12月3日報告) について」, 平成17年11月1日
URL : <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2005/11/s1101-4f07.html> (last accessed 2012.02.25)
- 8) McClelland D.B.L.: Safety of human albumin as a constituent of biologic therapeutic products, *Transfusion*, 38: 690-699, 1998
- 9) Hattori S. *et al.*: Variability of parvovirus B19 to inactivation by liquid heating in plasma products, *Vox Sanguinis*, 92: 121-124, 2007
- 10) Shimasaki N. *et al.*: Inactivation of hepatitis A virus by heat and high hydrostatic pressure: variation among laboratory strains, *Vox Sanguinis*, 96: 14-19, 2009
- 11) Farcet Maria R. *et al.*: Inactivation of hepatitis A variants during heat treatment (pasteurization) of human serum albumin, *Transfusion*, 52: 181-187, 2012
- 12) Yunoki M. *et al.*: Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters, *Vox Sanguinis*, 95: 94-100, 2008
- 13) Urayama T. *et al.*: Full-length sequences of one Genotype 4 and three Genotype 3 hepatitis E viruses in fecal samples from domestic swine in Japan, *The Open Veterinary Science Journal*, 4: 11-19, 2010
- 14) Jothikumar N. *et al.*: A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus, *Journal of Virological Methods*, 131: 65-71, 2006
- 15) 国立予防衛生研究所学友会編, ウイルス実験学 総論, 改訂2版: 480~481頁, 丸善株式会社, 東京都, 1973
- 16) Okamoto H.: Efficient cell culture systems for hepatitis E virus strains in feces and circulating blood, *Rev. Med. Virol.* 21: 18-31, 2011
- 17) Takeda H. *et al.*: A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan, *Vox Sanguinis*, 99: 307-313, 2010
- 18) 薬事・食品衛生審議会 平成24年度第3回血液事業部会運営委員会 資料3-2, 「試行的HEV 20プールNAT実施状況について (輸血後HEV感染の予防対策)」, 23頁, 平成24年12月19日
URL : <http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002rsqs-att/2r9852000002rt4i.pdf> (last accessed 2012.02.25)
- 19) Baylis S.A. *et al.*: Widespread distribution of hepatitis E virus in plasma fractionation pools, *Vox Sanguinis*, 102: 182-183, 2012
- 20) Andonov A. *et al.*: Serologic and molecular evidence of a plausible transmission of hepatitis E virus (HEV) through pooled plasma, 32nd International Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), P-367, 2012

Short Communications

Mycoplasma species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows

H. Higuchi, S. Gondaira, H. Iwano, K. Hirose, K. Nakajima, K. Kawai, K. Hagiwara, Y. Tamura, H. Nagahata

MYCOPLASMA species are highly contagious pathogens, and intramammary *Mycoplasma* infection is a serious issue for the dairy industry (Nicholas and Ayling 2003). Clinical *Mycoplasma* mastitis presents with clinical signs including fever, swelling and udder induration (Bushnell 1984). Milk from an infected quarter usually appears abnormal, with flaky sediments in watery or serous fluid. Because the cure rate of clinical *Mycoplasma* mastitis is very low due to a poor response to antimicrobial treatment, cows infected with *Mycoplasma* species must be culled to prevent outbreaks of *Mycoplasma* mastitis in dairy herds (Jasper 1982, Kirk and Lauerman 1994, Nicholas and Ayling 2003). We previously reported a 1.29 per cent prevalence of *Mycoplasma* species in bulk tank milk from 1241 Japanese dairy farms (Higuchi and others 2011a, b). However, little is known about the relationship between *Mycoplasma* species and somatic cell count (SCC) in milk. Here, we identified the *Mycoplasma* species isolated from quarter milk samples and their relationship with SCC, and clinical signs of the udder.

A total of 1310 commercial dairy farms in Hokkaido, Kyushu and Honshu (main island) in Japan were randomly selected for bulk tank milk screening. Each bulk tank contained two days of milk production. Milk samples were aseptically collected into 50 ml tubes, and 100 µl of bulk tank milk samples were inoculated into 3.0 ml of

Mycoplasma broth (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan), and then incubated at 37°C for 72 hours. *Mycoplasma*-enriched culture broth (100 µl) was spread onto *Mycoplasma* agar plates (Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan) and incubated under a 5 per cent CO₂ atmosphere at 37°C for one month to develop typical *Mycoplasma* colonies (Nicholas and Ayling 2003). We detected *Mycoplasma* species in culture broth as described by Higuchi and others (2011a, b). Quarter milk samples were collected from 3346 cows at 22 dairy farms (n=45–328 cows/farm) that were identified as being *Mycoplasma*-positive based on the results of bulk tank milk screening (Table 1). Briefly, the first three to four streaks of milk were discarded, and the distal end of each teat was disinfected with a cotton swab soaked in 70 per cent alcohol. Approximately 5–8 ml of quarter milk was aseptically collected into 10 ml sterile culture tubes. *Mycoplasma* species were detected by culture and PCR (Cica genus Bovine *Mycoplasma* HI screening and Cica genus *Mycoplasma bovis*, *Mycoplasma bovigenitalium* and *Mycoplasma californicum* detection, Kanto Chemical Co. Inc., Tokyo, Japan). Clinical signs were defined as visible udder swelling and/or induration, or milk from a quarter with abnormal viscosity (watery, thicker than normal), colour (yellow, blood-tinged) or consistency (flakes or clots) (Bushnell 1984). The SCC was determined in quarter milk samples using a Fossomatic 90 (Foss Electric, Hillerød, Denmark). An SCC threshold of 200,000 cells/ml of milk was established as the cut-off to distinguish between cows with and without mastitis (Schepers and others 1997, Schukken and others 2003). Geometric SCC was compared between quarters infected with different *Mycoplasma* species using analysis of variance. Statistical significance was determined at P value of 0.05.

Mycoplasma species was isolated from 208 quarters, of which 184 (89 per cent) and 24 (12 per cent) were infected with one (single infection) or with two to three (multiple infections) *Mycoplasma* species. Among the 184 quarters infected with a single *Mycoplasma* species, 157 (85 per cent) of them had SCC of $\geq 200,000$ cells/ml (geometric mean, $628,000 \pm 576,000$ cells/ml), and clinical signs were apparent in 149 (81 per cent) (Table 2). The most frequently isolated pathogen was *M bovis* and the SCC of quarters infected with this species in 115 (93 per cent) of 124 infected quarters was $\geq 200,000$ cells/ml (geometric mean, $982,000 \pm 421,000$ cells/ml) and clinical signs were clear. *M bovis* is highly pathogenic, causing contagious *Mycoplasma* mastitis with an extreme inflammatory response (Bushnell 1984). It is considered the main causative species of clinical *Mycoplasma* mastitis (Jasper and others 1979, Nicholas and Ayling 2003). Our results also indicate that *M bovis* is the most frequently found causative pathogen of *Mycoplasma* mastitis in Japan, and that it induces subclinical and clinical mastitis. The SCC in nine of the quarters infected with *M bovis* was $< 200,000$ cells/ml (geometric mean, $82,000 \pm 75,000$ cells/ml), and clinical signs were notably absent in all quarters. An experimental infusion of *M bovis* into quarters resulted in an initial SCC increase in milk for over 66 hour (Kauf and others 2007). We speculate that these samples were collected during the early stage of *M bovis* infection.

M californicum can cause clinical *Mycoplasma* mastitis (Infante-Martínez and others 1999). The SCC in 28 (88 per cent) of 32 quarter milk samples infected with *M californicum* was $\geq 200,000$ cells/ml (geometric mean, $853,000 \pm 294,000$ cells/ml), which was similar to that of milk infected with *M bovis*. *M californicum* has been isolated from pneumonia as well as arthritic specimens obtained from calves (Hewicker-Trautwein and others 2002), and chronic mastitis has been induced after experimental infection with *M californicum* (Reilly and others 1993). Our results indicated that *M californicum* is of secondary importance for the control of *Mycoplasma* mastitis in the Japanese dairy industry.

In quarters infected with multiple *Mycoplasma* species, over two, including *M bovis*, *M californicum*, *M bovigenitalium*, *M canadense* or *M arginine*, were isolated from 24 quarter milk samples. All samples had SCC of $\geq 200,000$ cells/ml (geometric mean, $1,867,000 \pm 1,426,000$ cells/ml), and clinical signs were clear in all infected quarters (Table 2). Our results suggested that multiple *Mycoplasma* species infection induces a more extreme inflammatory

Veterinary Record (2013)

doi: 10.1136/vr.1011228

H. Higuchi, DVM, PhD

S. Gondaira, DVM

H. Nagahata, DVM, PhD

Animal Health Laboratory, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Animal Health Lab, Bunkyo-dai Midori 582, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

H. Iwano, DVM, PhD

Department of Veterinary Biochemistry, School of Veterinary Medicine, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

K. Hirose, DVM, PhD

Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo Japan

K. Nakajima, PhD

National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, National Agriculture and Food Research Organization, Sapporo, Hokkaido, Japan

K. Kawai, DVM, PhD

Department of Animal Health 1, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara, Kanagawa 252-5201, Japan

K. Hagiwara, DVM, PhD

Department of Veterinary Virology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai, Ebetsu, Hokkaido 0698501, Japan

Y. Tamura, DVM, PhD

Department of Food Microbiology and Food Safety, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Hokkaido, Ebetsu, Japan;

Email for correspondence: higuchi@rakuno.ac.jp

Provenance: Not commissioned; externally peer reviewed

Accepted 24 January 2013