

図4. CD62P、GPIb複合体の変化

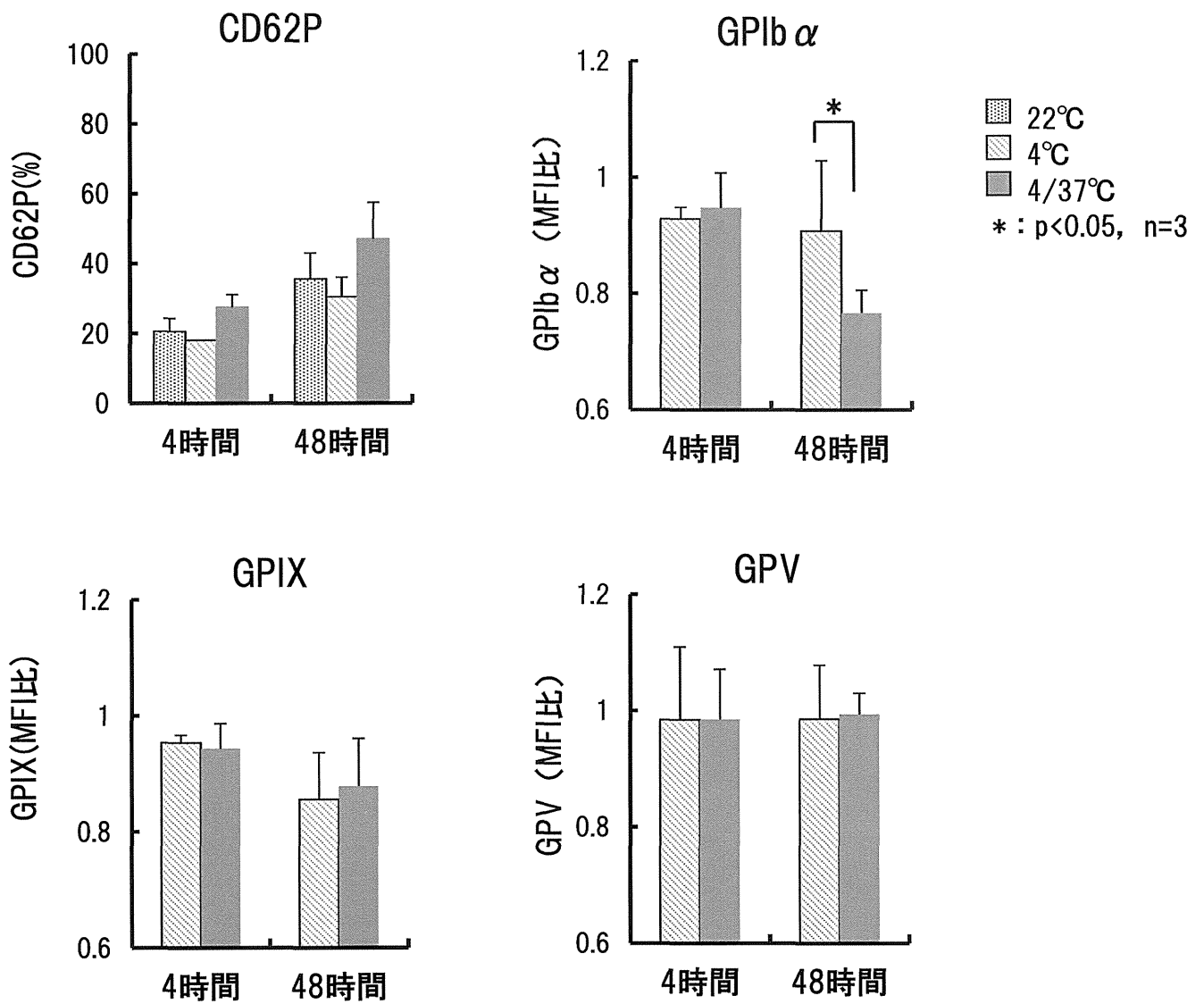


図5. イムノブロッティングによる上清中のGPIb α の検出

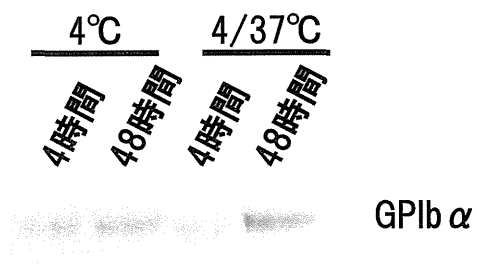
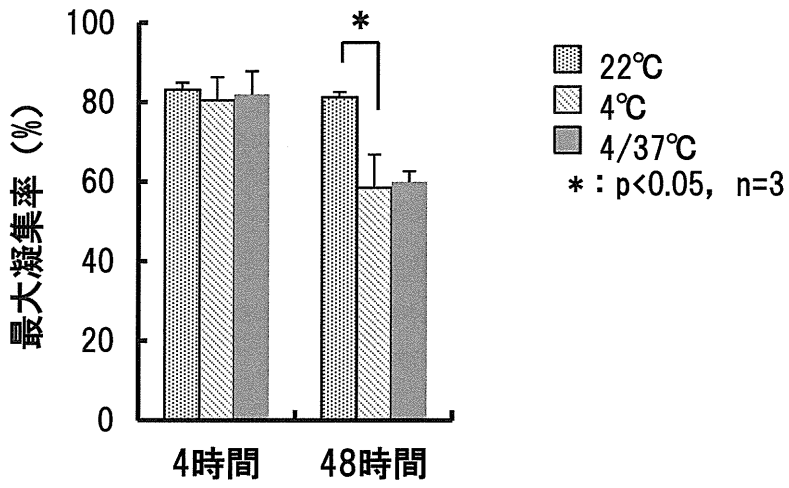


図6. リストセチン刺激による血小板凝集



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)

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

分担研究報告書

赤血球製剤における病原体不活化法の開発

研究代表者 岡田義昭 埼玉医科大学病院 輸血・細胞移植部 部長

研究要旨

1) 実用的な赤血球製剤の病原体不活化法は未だ開発されていないが、昨年度の研究によってメチレンブルー（以下MB）存在下に可視光を照射するとヘマトクリット値40%の赤血球において牛下痢症ウイルスやシンドビスウイルスなどシングル鎖のRNAウイルスは3Log以上不活化されることを明らかにした。今年度は、より効率を高めるために単波長の可視光を検討した。白色光よりも赤色光では、深さ4mmの赤血球において10分の照射（約0.6J）で約3Log不活化効率が向上した。さらに深さ10mmの同様の赤血球では、20分の照射（約1.2J）で白色光よりも約1.5Log効率が良くなり、コントロールに比較して約3Logシンドビスウイルスを不活化することが可能であった。赤色光は、赤血球に吸収しにくいことから深部まで到達し、ウイルスを不活化させるものと考えられた。

2) MB誘導体と赤色光を用いてシンドビスウイルスと仮性狂犬病ウイルスに対する不活化効果を検討した。MBよりも低濃度でウイルスに対して強い不活化活性が認められたが、細胞毒性もあった。細胞毒性が認められない濃度では、MBの約10倍程度の不活化効果が認められた。

A. 研究目的

輸血用血液は、スクリーニング検査の進歩に感染症の発生頻度は激減した。しかし、地球の温暖化や国際間のヒトや物の移動などで新興・再興感染症のアウトブレイクが毎年のように発生している。全ての病原体をスクリーニングすることは困難であり、更なる輸血用血液製剤の安全性を向上させるためには、病原体不活化技術の開発は不

可欠である。我々は、赤血球製剤に使用できる新しい病原体の不活化技術の開発を目指し、本研究を行っている。昨年度は、メチレンブルー（MB）を添加した赤血球液に可視光を照射することによって病原体が不活化できること（これは既に知られていることだが）を示した。今年度は、より効率良く赤血球液で病原体を不活化できる方法を検討した。蛍光灯の光は多種類の波長を

持つ光の集合体であるが、赤血球に吸収し難い波長の光であれば、深くまで到達し、不活化効率が向上するだろうと推定し、以下の実験を実施した。

B. 研究方法

1. ウイルスの感染価測定法

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

光源として蛍光灯、赤色LEDランプ、青色LEDランプを用いた。可視光の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、約20000Luxで10分(約1.75J相当)と20分(約3.5J相当)それぞれ照射した。

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1mMに溶解し、濾過滅菌後4℃に保存した。シンドビスウイルス及び仮性狂犬病ウイルスをヘマトクリット値40%の赤血球液にそれぞれ添加し、よく混ぜた後に最終濃度 $10 \mu\text{M}$ になるようにMBを遮光下に添加し、照射0分(コントロール)とした。6穴プレートに4mL(深さ4mm)分注、又は10mL(深さ10mm)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工夫した。照射後は遮光し水中に保存した。不活化処理された各赤血球は、遠心分離され上清を集め、直ちに感染価測定、又は-80度に保存した。なお、セーフティキャビネット内での希釈作業中に蛍光灯の光でウイルスが不活化されてしまうため蛍光灯を消した状態で希釈し、細胞に感染させた。

5. MB誘導体によるウイルスの不活化効果

シンドビスウイルスと仮性狂犬病ウイルスを添加したヘマトクリット40%の赤血球液にMBの誘導体を最終濃度 $0.03 \mu\text{M}$ 、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \mu\text{M}$ になるように添加し、深さ4mm及び10mmに調整したウエルに

20000Lux 照射し、不活化効率を検討した。

C. 研究結果

1. 赤色光照射によるシンドビスウイルス不活化効率の向上

深さ 4 mm の赤血球液では、照射 5 分では白色光と赤色光では著明な差は認められなかった。照射 10 分では白色光照射で約 1Log、赤色光では約 4Log、それぞれ不活化された。照射 20 分では、白色光で約 3Log、赤色光で約 4.5Log それぞれ不活化された。10 分照射で波長の差が不活化効率に大きく影響した (図 1)。

深さ 10mm においても赤色光を照射することで約 3Log の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 (図 2)。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. MB 誘導体によるウイルスの不活化効果

MB と同量の濃度では細胞毒性が認められたので 0.03 μ M、0.1 μ M、0.3 μ M の各濃度で不活化効率を検討した。0.03 μ M では 10 分の照射で 3Log、0.1 μ M では 5Log、0.3 μ M では感染性は認められなくなった。また、1 μ M では仮性狂犬病ウイルスを 10 分の照射で約 3Log 不活化できた。しかし、誘導体による直接的な細胞障害性も認められた。一方、MB では 10 μ M、10 分間の照射では全く仮性狂犬病ウイルスは不活化されなかった。

D. 考察

昨年度、MB と白色光との組み合わせによってウイルスが不活化されることを報告した。今年度は、さらに不活化効率を高める方法を考案した。白色光には、多種の波長の光が混在している。その中には赤血球に吸収し難い波長もあれば、吸収し易い波長もある。そこで赤血球に吸収し難い波長として赤色光を選択した。赤血球は赤色であるためその波長を反射していることから吸収難いと考えた。その結果、白色光よりも深部まで到達すると推定した。結果は、予想どおり 深さ 4mm では 4Log と白色光の 1000 倍もの不活化効果を示した。さらに深さ 10mm でも約 3Log の不活化が確認できた。現在使用されている 2 単位の赤血球液バッグは約 30mm の厚さがあるので両面から照射しても 15mm の深さで病原体が不活化できる能力が必要とされる。実験装置の関係で限度が 10mm であるため装置を改良して 15mm の深さの評価を予定している。

MB は赤血球内に浸透し難いことは、遠心によって MB を取り除ける長所もあるが同時に赤血球内部に存在するマラリア等の原虫や二重鎖 DNA をもつウイルスに対して不活化効果が欠点を有している。そこで MB の誘導体を用いてシンドビスウイルスの不活化効率を検討した。本誘導体は、細胞膜の透過性を有している。MB に比べて低濃度で同等の不活化効果を有していることを明らかにできたが、細胞毒性もあ

ることが明らかになった。照射後にどの程度赤血球中に残存しているのか更なる検討が必要である。また、MB は細胞内で代謝されることはわかっているがこの誘導體も MB ト同じように代謝され無毒化されるのかは不明である。

研究計画では B 型肝炎ウイルス (HBV) の不活化を検討する予定であったが、検討に用いた HBV 陽性血漿が十分な感染性を有していなかったため成果は報告できなかった。

E. 結論

メチレンブルーに赤色光を照射することによって白色光よりも効率良くシンドビスウイルスを不活化することができた。さらに赤色光は赤血球に吸収し難いことから MB よりも深い赤血球まで不活化することが可能であった。MB の誘導體は、MB よりも低濃度でウイルスを不活化することができたが細胞毒性があり、更なる至適濃度の検討が必要であった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 鈴木雅之、青木麻衣子、加藤光洋、玉栄建次、内野富美子、山田攻、

小林清子、池淵研二、岡田義昭：同種骨移植のための骨保管支援業務の現状、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良

2. 岡田義昭、小林清子、池淵研二：リアルタイム RT-PCR を用いた B19-RNA 定量による B19 感染評価系の開発、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良

3. 山田攻、加藤光洋、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭：当院における産婦人科緊急輸血症例の分析とその対策、第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 26 年 5 月、奈良

4. 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機構の解明」第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

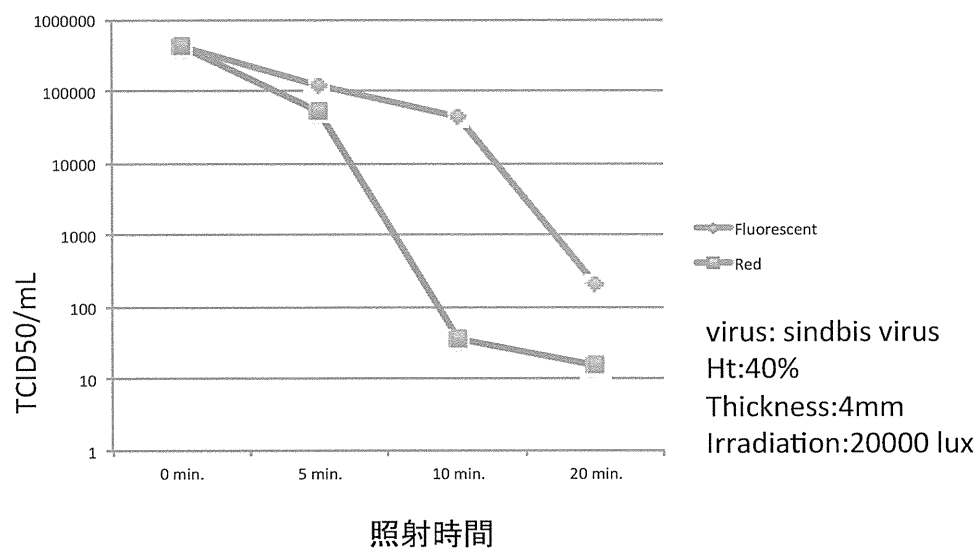


図1.メチレンブルーにおける白色光と単色光(赤)による
 ウイルス不活化効果の解析

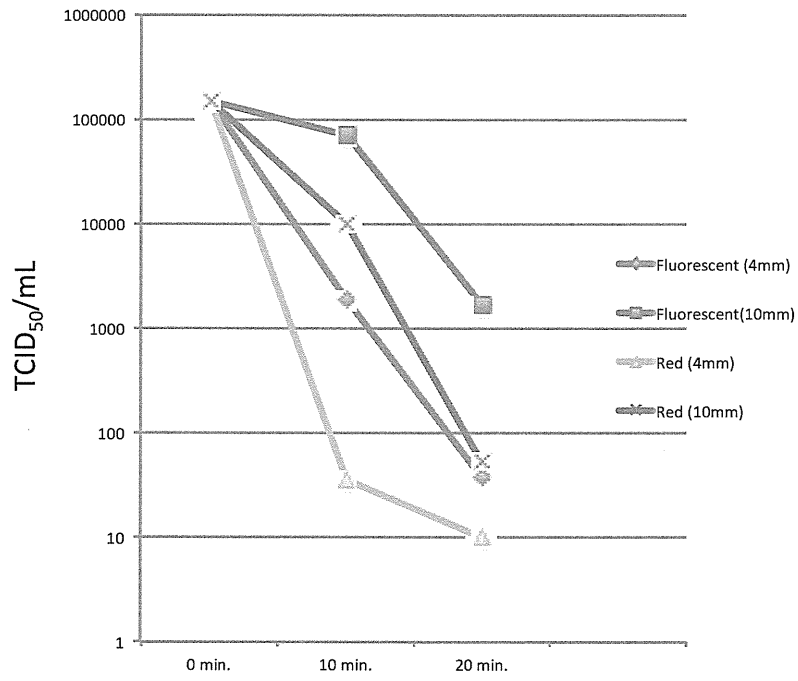


図2.赤色光による不活化効率の増強

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
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

分担研究報告書

分担課題：血液製剤におけるC型肝炎ウイルスの加熱による不活化機構の解明

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。これまでHCVはアルブミン中、60°C液状加熱で効率良く(TCID₅₀/mlが5.7Log低下)不活化されることを示した。本年度はこの液状加熱でHCVの不活化(感染性の喪失)の理由を明らかにするため実験を行った。HCVをアルブミン中で60°C、10時間液状加熱したとき、HCV中に存在するHCV RNA量は、60°C加熱前と10時間液状加熱後で殆ど変化がなかった。この60°C、10時間加熱後のHCV RNAをnaïve Huh7.5.1細胞にトランスフェクションしたとき、感染性HCVを得ることが出来た。その感染価(1.3×10² TCID₅₀/ml)は、氷中、10時間保存したHCVから抽出、精製したHCV RNAの場合(1.8×10³ TCID₅₀/ml)に比べて約1Log低かった。また、この60°C、10時間液状加熱後のHCVは、60°C加熱前のHCVに比べて、naïve Huh7.5.1細胞への吸着、或いは侵入効率が少なくとも3Log低下することが明らかとなった。以上の結果より、HCVのアルブミン中での60°C、10時間液状加熱による感染性の5.7Logの低下は、HCV RNAの分解によるよりも、HCVの細胞への吸着、侵入課程の阻害によることが主たる原因であることが示唆された。

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。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らないが、ここ数年、数種類の阻害剤(HCVウイルスタンパク質であるプロテアーゼ、及びポリメラーゼに対する阻害剤)が開発され、使用が開始され、その効果が期待されている。しかし、HCV

に対するワクチンは未だに確立されていない。また、HCV感染のモデルは未だに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。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。

本年度はこれまで示した、HCVを効率よく不活化させることの出来る60°C液状加熱で、HCVの不活化(感染性の喪失)の原因を明らかにするため実験を行った。

B. 研究方法

1. HCVの準備

実験に用いるHCVは、JFH-1クローンを培養細胞上清から得、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 1x10⁶/ml) HCVを用いた。

2. 60°C、10時間液状加熱HCVの準備

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、60°C 10時間加熱、或いは、氷中10時間保存した。

3. HCV RNAの測定法

60°C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°C、30minで行い、生成されたcDNAを10倍ずつ段階希釈(10⁻²-10⁻⁵)し、二種類のHCV特異的primers (1. 5'UTR: sense: nt 45-64, antisense: nt 265-246、或いは2. NS5B: sense: nt 8319-8339, antisense: nt 8700-8680; 数字はHCV JFH-1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。

4. HCVの感染価の測定法

60°C、10時間加熱(或いは氷中、10時間保存)後のサンプルを段階希釈し、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、それぞれの液量を積算し、総ウイルス量TCID₅₀で示した。

5. HCV RNAの細胞へのトランスフェクション

60°C、10時間加熱(或いは、氷中、10時間保存)したHCVから抽出、精製したHCV RNAをトランスフェクション試薬TransIT-mRNA, OptiMEMと混合し、前日に準備したnaïve Huh7.5.1細胞にト

ランスフェクションし、4, 7日後、上清を回収し、上清中の HCV 感染価を測定した。また、ランスフェクション後、4,7日後の細胞を HCV コアタンパク質の抗体 (MA1-080) で免疫染色し、コアタンパク質の発現を蛍光顕微鏡で検出した。

(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. 60°C、10時間液状加熱後の HCV RNA の安定性

これまでに示したようにアルブミン中の HCV の感染価は、加熱後 30 分、1 時間で HCV の感染価がそれぞれ 3.3 Log、4.0 Log 減少し、2 時間後には少なくとも 5.7 Log 減少した (図 1)。感染価の減少の原因を調べるため、加熱後 0 (加熱前)、1、及び 10 時間後の HCV RNA 量を測定した。その結果、HCV RNA 量は加熱後 0 時間、に比べて殆ど減少しなかった。比較として氷中に 10 時間保存した HCV から抽出、精製した HCV RNA も氷中 10 時間保存の場合に比べ、殆ど減少していなかった (図 2)。

2. 60°C、10 時間液状加熱後の HCV RNA の感染性

60°C、10 時間液状加熱により HCV 中

の HCV RNA 量は殆ど減少しないことを、RT-PCR で示したが、HCV RNA 全長が分解せずに存在するかは示せないため、この HCV RNA の感染性を調べた。その結果、60°C、10 時間液状加熱後の HCV から抽出、精製した HCV RNA を naïve Huh7.5.1 細胞にランスフェクションしたとき、免疫染色法で、HCV コアタンパク質の発現が認められた (図 3)。この細胞上清の感染価を測定した結果、 1.3×10^2 TCID₅₀/ml であった (図 3)。この値は、氷中、10 時間保存した HCV から抽出、精製した HCV RNA の場合の、 1.8×10^3 TCID₅₀/ml よりも、感染価が約 1 Log 低かった。60°C、10 時間加熱による HCV の感染価は少なくとも 5.7 Log 減少することと、この結果とを考え合わせると、60°C、10 時間加熱による HCV 感染価の減少の主たる原因は、HCV RNA の分解による以外の可能性が考えられる。その一つの可能性として、HCV の細胞への吸着、侵入について以下で調べた。

3. 60°C、10 時間液状加熱後の HCV の細胞への吸着、侵入

60°C、10 時間液状加熱後の HCV を naïve Huh7.5.1 細胞に感染させた。感染 1 時間後、細胞上清を捨て、PBS で 2 回細胞を洗浄後、細胞から抽出、精製した HCV RNA を段階希釈し、RT-PCR により細胞に存在する HCV RNA 量を測定した。その結果、感染 1 時間後、細胞に吸着、或いは侵入した HCV 量は、培養前の HCV

RNA量と比べると、少なくとも3Log減少した。

D. 考察

60°C、10時間液状加熱によるHCVの不活化は、HCV RNAの分解によってHCVの感染性が減少(HCV RNAの感染価が約1Log減少)することによるよりも、HCVが細胞へ吸着、侵入する課程が阻害される(少なくとも3Logの低下)ことによると考えられる。即ち、60°C、10時間液状加熱により、HCVのウイルスタンパク質に変化(変性、構造変化)が起きるためと考えることが出来る。

1. 60°C、10時間液状加熱後のHCV RNAの安定性

アルブミン中HCVを60°C、10時間液状加熱することによってはHCV RNAは殆ど分解されないことが明らかとなった。一方、HCVから抽出、精製したHCV RNAを培養細胞上清に加え60°C、10時間加熱した場合は、氷中、10時間保存した場合(面白いことに、氷中、10時間保存の場合、HCV RNA量は殆ど減少しなかった)に比べ、HCV RNAは、1/10-1/100に減少した(データは示さず)。以上のことより、HCV RNAはHCV粒子内に存在し、分解から保護されていると考えられる。

2. 60°C、10時間液状加熱後のHCV RNAの感染性

RT-PCRでは、全長のHCV RNAの分

解について明らかにするのが困難であるが、HCV RNAを細胞にトランスフェクションすることにより、HCV RNAの感染性を見ることで、HCV RNAの状態を知ることが出来た。RT-PCRではHCV RNAの分解は殆ど見られないが、HCV RNAの感染性では感染価が約1Log低下することが明らかとなった。従って、60°C、10時間液状加熱によって、HCVが不活化(感染価が5.7Log低下)する理由はHCV RNAの分解が主たる理由ではないと考えられる。

3. 60°C、10時間液状加熱後のHCVの細胞への吸着、侵入

図4の結果より、60°C、10時間加熱後のHCVをnaïve Huh7.5.1細胞に1時間感染させた場合、培養前に比べ少なくとも3Log減少したことより、60°C、10時間加熱によるHCVの感染価の減少はHCVが細胞に吸着、或いは侵入課程に起こった問題が主たる原因であると考えられる。

なお、60°C、10時間加熱により、HCVの細胞への吸着、侵入効率が4Log減少したのであれば(実験では 10^1 希釈の場合を調べていないので、3Log以上の違いは不明)、HCV RNA量の減少分(1Log)と合わせた減少分が5Logとなり、HCVの感染価の減少5.7Logと一致する。

今後Real time PCRを行えることにより、HCV RNAの分解、HCV感染性に関してより定量的に調べ、より正確な結果を出す予定である。

E. 結論

60°C、10 時間の液状加熱により HCV RNA の感染価が約 1Log 減少し、HCV の細胞への吸着、侵入効率が少なくとも 3Log 低下することが明らかとなった。従って、HCV の感染価が 5.7Log 減少する原因は、HCV の細胞への吸着、侵入の障害が主な原因であると示唆された。

G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表：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機構の解明」第 62 回日本ウイルス学会学術集会 2014 年 11 月 横浜

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

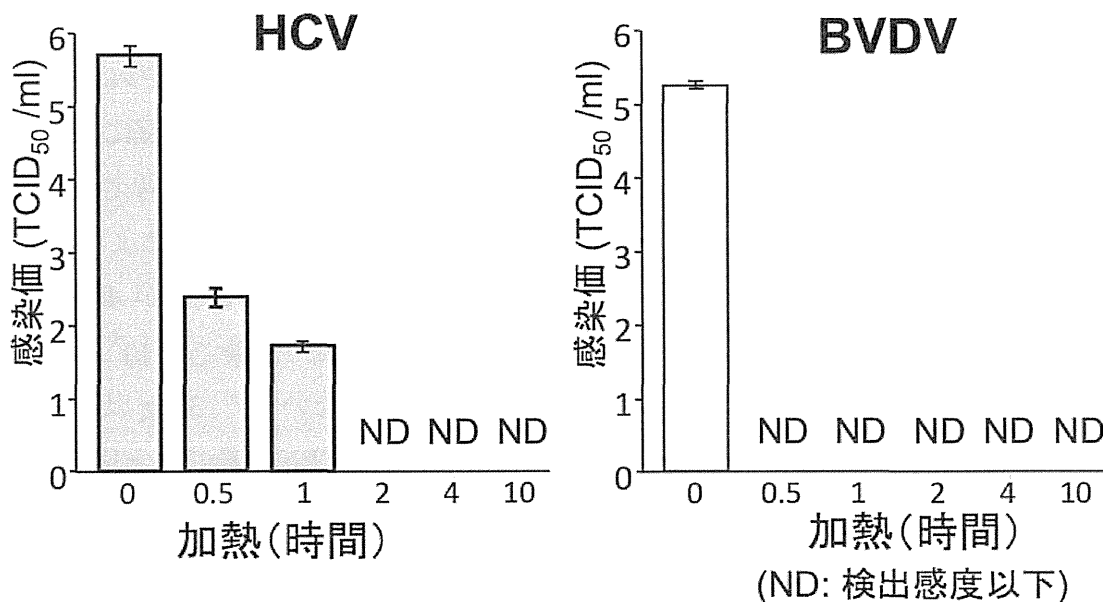


図1. 60°C液状加熱

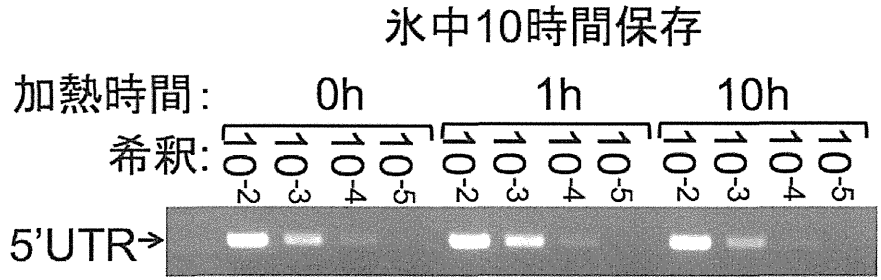
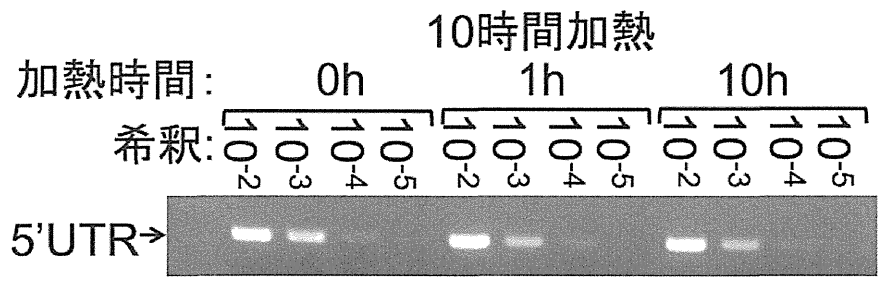


図2. 60°C液状加熱でのHCV RNA量

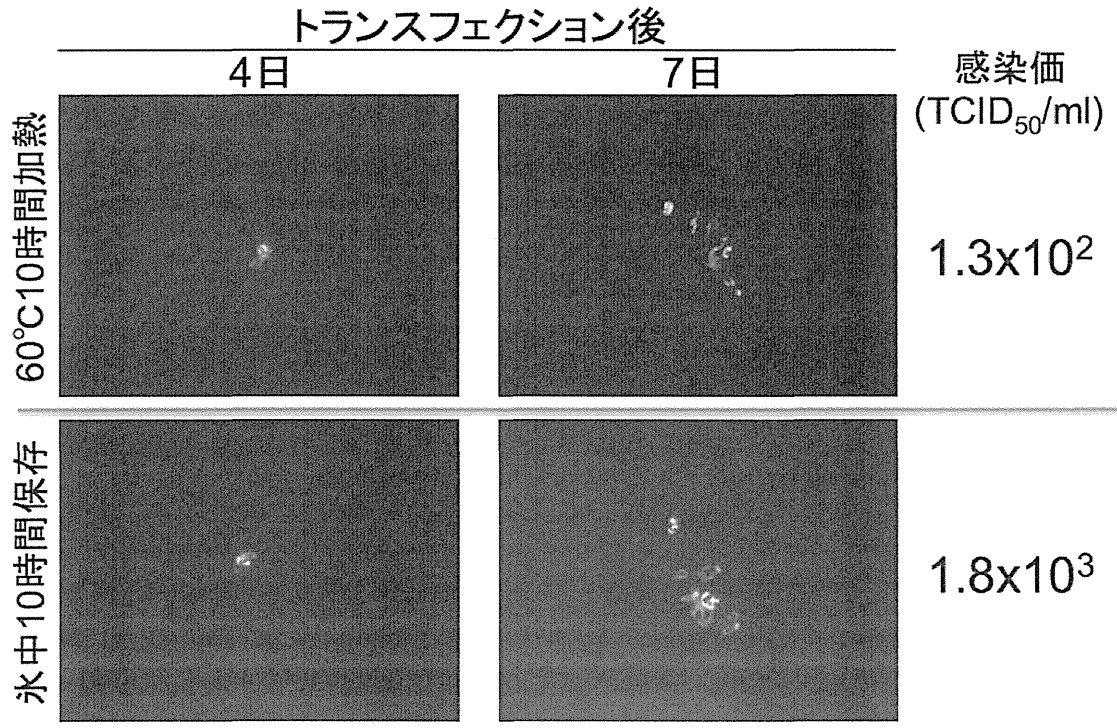


図3. 60°C液状加熱後のHCV RNAの感染性

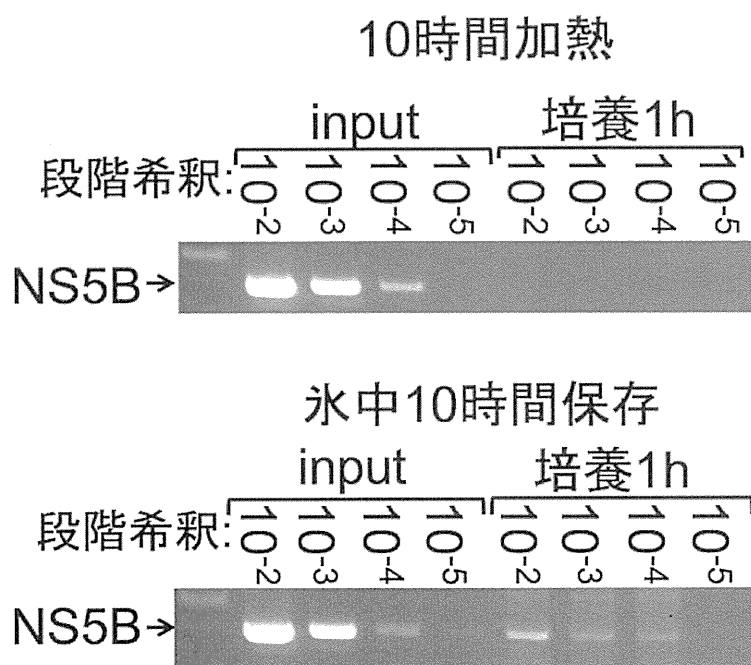


図4. 60°C液状加熱後のHCVの細胞への吸着、侵入

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
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

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 野島清子 (国立感染症研究所)

分担研究者 下池貴志 (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 JFH-1株をスパイクし、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、昨年度のクリオ/脱クリオ分画、8%EtOHに引き続き、25%分画を行い、上清のFra.(II+III)Sのアルブミン分画と、沈殿のFra.(II+III)Pのグロブリン分画とに分け、HCVの感染性がどの画分に移行するのかを調べた。更にモデルウイルスであるBVDVを用いて同様に分画し、その感染性の移行および核酸の移行についてHCV JFH-1株と比較した。更に、HCV陽性血漿(genotype-1)を同様にスパイクして分画を行い、RNAの移行を確認した。その結果、コーンの血漿分画においてHCVの核酸は、BVDV、JFH-1と同じように移行することが分かった。また、凝固因子製剤、グロブリン製剤、アルブミン製剤の原料となるすべての原料画分においてHCV JFH-1株の感染性が確認され、血漿分画製剤の分画工程中でのウイルス不活性化工程の重要性が示された。また、BVDVとHCV JFH-1株の感染性は同じような挙動を示したことより、BVDVはHCVのモデルウイルスとなることを実証した。

A. 研究目的

C型肝炎ウイルスは血液を汚染する可能性のある病原体であり、1964年から1987年かけて海外の血漿を原料に製造された第IX因子製剤、第VIII因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの方がC型肝炎に感染した経緯がある。スクリーニング検査の導入と度重なる検査法改良等の数多くの対策により血液製剤の安全性は格段に向上したが、H25年には輸血によるC型肝炎感染が1例報告された。HCV等の血液製剤を汚染しうる病原体の不活化法の開発、不活化評価系の開発は血液製剤の安全性向上のために非常に重要である。

これまでC型肝炎の治療には、ペグインターフェロンとビバビリンの併用療法が行われ、治療効果を上げて来たが日本人感染者に多い遺伝子型1bの治療効果は低い等の問題があった。2014年末にC型肝炎治療ガイドラインが改訂され、新規経口薬に期待が寄せられているところである。

C型肝炎ウイルスは、治療薬の開発に必須な培養細胞を用いた感染系が長らくなかったため、チンパンジーを用いて感染性の評価を行っていたが、価格の高さ、扱い難さ、また動物愛護の観点からも治療薬開発等の研究がなかなか進展しなかった。血液製剤中のHCV不活化の評価は、モデルウイルスとして培養可能なウシ下痢症ウイルス(BVDV)が用いられて

きた。しかし、最近、培養細胞でHCVを増殖させることが可能な系が開発され、研究が急速に進展した。本研究ではこの系を用いてHCV JFH-1株(遺伝子型2a)を増殖させ、増殖したHCV JFH-1ウイルスを血液製剤にスパイクしウイルス不活化を評価する系を構築した。

本研究では、まず実験室レベルでのコーンのエタノール血漿分画を立ち上げ、JFH-1を血漿にスパイクし、コーンのエタノール分画により第VIII因子製剤、第IX因子製剤、フィブリノゲン製剤、アルブミン製剤、グロブリン製剤等の原料となる画分に分画し、どのフラクションに感染性とウイルス粒子が分配されるかを確認することを目的とした。またさらに、これまでモデルウイルスとして用いられて来たBVDVと比較することにより、これまでのウイルスバリデーションの正当性を評価し、今後の血液製剤の安全性をさらに向上することが目的である。

本年度は、昨年度のクリオ/脱クリオ分画、8%EtOHに引き続き、25%分画を行い、上清のFra.(II+III)Sのアルブミン分画と、沈殿のFra.(II+III)Pのグロブリン分画とに分け、HCVの感染性がどの画分に移行するのかを調べた。更にモデルウイルスであるBVDVを用いて同様に分画し、その感染性の移行および核酸の移行についてHCV JFH-1株と比較した。さらにHCV陽性血漿を同様にスパイクして分画を行い、RNAの移行を確認した。

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 でゆっくり融解し、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/S.1 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 を添加して調整し、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(⑤)。-3°C で攪拌しながら、最終濃度が 8% となるように約 15 μ L/秒の速度でエタノールを添加し(⑥)、15 分間反応させた(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. I フィブリノゲン画分⑧）と上清（S.1 ⑨）画分とに分画した（Fra. I /S. I 分画）。Fra. I /S. I 分画分画の効率、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 分析）により評価した。各分画のサンプリングは図 1~3 の通り行った。

iii) Fra.(II + III)/S(II + III) 分画

8%エタノール上清画分である S I 画分を低温化で攪拌しながら、pH が 6.75 付近になるように調整した(⑩)。-5°C で攪拌しながら最終濃度が 25% となるように約 15 μ L/秒の速度でエタノールを添加し

た後(⑪)、15 分間反応させた(⑫)。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. II + III: グロブリン画分⑬）と上清（S. II + III : アルブミン画分⑭）とに分画した。

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、ウィンドウ期 HCV、HCVJFH-1、BVDV を含む血漿の分画

i) クリオ/脱クリオ分画

18mL~39mL の HCV 陰性血漿を 4°C で融解し、1~2mL のウィンドウ期 HCV、JFH-1、BVDV をそれぞれ加えたものを出発原料とした。また、融解した陰性血漿を 37°C に加温した状態で各ウイルスウィンドウ期 HCV、JFH-1、BVDV を添加して混和した後、-80°C で凍結し、4°C で融解したものを出発原料とした。1.Cohn エタノール分画法に従い分画を行った。

ii) Fra.1/S.1 分画

Cohn エタノール分画法(1.)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。⑥⑦⑨のサンプルはエタノールの最終濃度が 1~2% 以下となるよう蒸留水で希釈し、-80°C で保管した。いずれのサンプルも採取後すぐに -80 度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。

iii) Fra.(II + III)/ S (II+III) 分画⑩⑪⑫⑬⑭のサンプルはエタノールの最終濃度が⑪ 1~2%以下となるよう蒸留水で希釈し、-8 0℃で保管した。Fra. II+III 画分⑬は最終濃度が 2.5 mM となるようにリン酸緩衝液 pH6.25 を加え、沈殿を溶解した。

3.HCV JFH-1am ウイルス感染性の評価

用いる HCV は、JFH-1am 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 の感染価は各サンプルを 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。それぞれの体積を積算し、総ウイルス量 TCID₅₀ で示した。

4. BVDV ウイルス感染性の評価

-8 0℃で保管した各サンプルを融解し、DMEM (10%FBS を含む) 培地で段階希釈し、96 ウェルプレート上の MDBK-SY 細胞に添加して感染させ、培養 5 日後の細胞を観察し細胞変性効果のあったウェル数を計測し、50% 細胞変性効果のあった濃度 (TCID₅₀/mL) をリードミンチ法により計算し、各画分を中に含まれる BVDV 感染性を感染価 (TCID₅₀) で示した。

5. JFH-1am ウイルス RNA、BVDV RNA、ウィンドウ期由来 HCV RNA (genotype1) の定量

各フラクションに含まれる HCV JFH-1 ウイルス RNA を定量した。各フラクション 100uL に含まれる核酸を SMITEST EXR&D を用いて精製した。HCV および JFH-1am ウイルス RNA は、QuantiTech Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用い、BVDV RNA については one step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (Qiagen) を用いて定量 RT-PCR を行った。HCV および JFH-1am の核酸量は、HCV 国内標準品を用いて定量し、国際単位 IU/mL で表した。BVDV の核酸量については、予め限外希釈によるエンドポイント法により最小検出希釈倍率を求めて自家標準品を製作し、単位 U/mL で表した。

(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。ウィンドウ期由来 HCV 血漿は海外で採血されたものであり、購入したものである。

C. 研究結果

1. 核酸 RNA の分布

陰性血漿に、JFH-1、ウィンドウ期由来 HCV、BVDV をスパイクしてコーンの血漿分画を行い、各フラクション中 (①～⑭) の核酸の分布を確認した結果、JFH-1am、HCV、BVDV ウイルス核酸はいずれのウイルスにおいても同じような挙動を示した。

2 感染性の分布

・ JFH-1 の感染性は 25%エタノール分画を行った後のグロブリンの原料である P(II+III)、アルブミンの原料である S(II+III)の両方で認められた。

・ JFH-1 の感染性は、主に、クリオ/脱クリオ分画、Fra.1/S.1 分画の上清画分の方に多く分布する傾向が認められた。これらは脱クリオ、S I 画分であり、それぞれ、第IX因子、グロブリン/アルブミン原料となる画分に相当する。

・ 各分画における沈殿の画分であるクリオ (第VIII因子)、P I (フィブリノゲン) にも感染性は認められた。

・ BVDV はこれらの分画の遠心操作により、上清と沈殿の両方に均等に分布する傾向が認められた。

D. 考察

・ JFH-1 は HCV のウイルスバリデーションに有用であることが示された。

・ これまで薬害による HCV 感染が報告されてきた第IX因子、フィブリノゲン、第VIII因子の原料となる画分から感染性が確認された。凝固因子製剤製造工程中のウイルス不活性化工程の重要性が再確認された。

・ 25%エタノール処理をしても、HCV JFH-1 の感染性は残存することが確認された。これまでアルブミン、グロブリン製剤から HCV 感染事例の報告はほとんどないが (海外で 2 件の報告があるのみである)、原料となる P II + III 分画には感染性が認められたことから、グロブリン、アルブミン製剤の製造工程中の不活性化工程も重要であることが再確認された。特に筋注用グロブリンは工程ステップも少ないことから特にウイルスバリデーション重要であると考えられる。

・ クリオ、脱クリオ、8%エタノール、25%エタノール分画における JFH-1 のウイルスリダクション指数 (LRV) はそれぞれ、24、0.6、2.7、1.5 であった。