

201523610A

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政策研究事業

血液製剤の病原体不活化法の評価法開発と実ウイルスと
モデルウイルスとの相違に関する研究

(H27-医薬A-一般-007)

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成 28 (2016) 年 3 月

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政策研究事業

血液製剤の病原体不活化法の評価法開発と実ウイルスと
モデルウイルスとの相違に関する研究

(H27-医薬 A-一般-007)

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成 28 (2016) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

血液製剤の病原体不活化法の評価法開発と実ウイルスとモデルウイルスとの相違に関する研究

研究代表者 岡田 義昭 P1-P5

II. 分担研究報告

1. Cohn の血漿分画法による C 型肝炎ウイルスの不活化法の評価

野島 清子、下池 貴志 P6-P13

2. E 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究-エタノール処理した血漿由来 E 型肝炎ウイルス (HEV) の挙動-

坂井 薫 P14-P18

3. 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

岡田 義昭 P19-P22

4. 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

下池 貴志 P23-P28

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P29

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政策研究事業

総括研究報告書

血液製剤の病原体不活化法の評価法開発と実ウイルスとモデルウイルスとの
相違に関する研究

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. Fra. (II+III) P のグロブリン分画に JFH-1、HCV window 期血漿、HCV のモデルウイルスである牛下痢症ウイルス (BVDV) をそれぞれ添加し、Cohn 血漿分画法に従って 20%及び 17% エタノール処理を行なった。17%エタノール処理によってグロブリン製剤になる分画での JFH と BVDV の感染価は検出限界以下に減少した。交雑物を除去するために実施されてきた 17%エタノール処理工程が同時に HCV 除去にも非常に有効であったことが実ウイルスを用いて明らかにすることができた。
2. 血漿由来の HEV を SD やデオキシコール酸を用いて処理し、エタノール分画 (II+III) を行なった。未処理ではエンベロープを有さないウイルスとは明らかに異なる挙動を示したが、処理によって類似した挙動をとるように変化した。ウイルス密度も 40%処理によって変化した。以上から HEV には何らかの細胞由来成分が結合し、分画の挙動がエンベロープなしのウイルスとは、処理条件によって異なる可能性が示唆された。
3. 赤血球製剤の病原体不活化効率を高める目的で細胞透過性が高いメチレンブルー (MB) の誘導体を用いてシンドビスウイルスに対する不活化効率を検討した。MB の約 1/30 の濃度で 0.88J 相当の可視光を照射することによって感染価は検出感度以下に減少した。MB では 2Log 減少しただけだったが誘導体では少なくとも 6Log 感染価は減少した。
4. 高感染価の C 型肝炎ウイルスを調整するために効率良い遺伝子導入試薬と限外濾過法、さらにウイルス濃縮試薬を組み合わせることによって、従来法に比べて約 500 倍の感染価を有する HCV を調整することができた。

分担研究者

| | | |
|-------|----------|-------------|
| 坂井 薫 | 日本血液製剤機構 | 中央研究所 室長 |
| 野島 清子 | 国立感染症研究所 | 研究員 |
| 下池 貴志 | 国立感染症研究所 | 主任研究官 |

A. 研究目的

これまで血漿分画製剤は培養が困難なウイルスに対して、動物由来の性状や分類が類似し培養が容易なウイルスをモデルウイルスとして病原体の不活化・除去試験のバリデーションに用いてきた。原料血漿の各ウイルスの

血清学的検査や NAT 検査の導入と共に血漿分画製剤の安全性確保のために大きな貢献をしてきた。しかし、本当にモデルウイルスは実ウイルスを反映しているのか疑問が残る。ウイルス学の進歩によってこれまで培養が困難だった C 型肝炎ウイルス (JFH-1 株) の培養が可能になり、ヒトパルボウイルス B19 も感染価が測定できるようになった。さらに B 型肝炎ウイルスもそのリセプターが同定され、感染性が評価できるようになった。実ウイルスがモデルウイルスよりも種々の不活化・除去法に抵抗を示す可能性が否定できないため実ウイルスとモデルウイルスの相違を明らかにすることは、血漿分画製剤の安全性を確認し、さらに安全を高めるために重要である。特に HCV に関しては、20%エタノール処理に対して不活化されないがグロブリン製剤による HCV 感染の事例は世界で 2 製剤のみである。どのような機序で HCV 感染が生じなかったのか実ウイルスを用いて検証する必要がある。さらに、最近、HEV が欧米や日本において国内に常在していることが明らかになり、輸血や血漿分画製剤の安全性の議論がされるようになった。HEV は、エンベロープを持たないウイルスだが、血漿中での性状と糞便中の性状とが異なる可能性が指摘されている。不活化法に抵抗を示す可能性があり、適切な不活化・除去の評価のために血漿中の性状解析と簡便なウイルス培養法が必要とされている。さらに赤血球製剤の病原体不活化技術は、今だ実用化されている方法はなく、我々は光感受性物質を用いてその可能性を検索している。

以上の目的のために実施した平成 27 年度

の研究成果を紹介する。

B. 研究方法と結果

1. 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

本年度は、血漿を Cohn エタノール法で分画した沈殿画分 Fra.(II+III)P に HCV JFH-1am 株をスパイクし、実際にグロブリン製剤の製法に従い 20%エタノール、17%エタノールで分画を行い、各画分に含まれる HCV (感染性、RNA 量) を調べた。更にモデルウイルスである BVDV、および HCV ウィンドウ期血漿を用いて同様に分画し、その感染性、およびウイルス粒子 (感染者由来の HCV は感染性を評価できないので核酸量で評価) の挙動について HCV JFH-1am 株と比較した。その結果、17%エタノール処理により、HCV の感染性および HCV ウイルス粒子は主に沈殿画分に移動し、グロブリン画分である上清の感染性は検出限界以下になった。

以上のことより、本来は交雑物を取り除くために実施されてきた 17%エタノール処理工程は、グロブリン分画から HCV を除去するためにも非常に重要な工程であることが実ウイルスを用いて明らかになった。なお、HCV のモデルウイルスとして使用されてきた BVDV も 17%エタノール処理によって HCV と同様にグロブリン分画から取り除かれ検出感度以下にまで感染性は減少していた。

2. E 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究

E 型肝炎ウイルスは、エンベロープを有さない RNA ウイルスだが、糞便中に存在するウイルス (エンベロープを持たない) と血液中に存在

するウイルス（宿主細胞の膜成分が結合？）とは性状が異なる可能性を示唆する報告がある。そこで血漿分画製剤の製造工程で結合している膜成分によってどのような影響が出るのかエタノール分画（II+III）工程で検討した。血漿由来のHEVを有機溶媒/界面活性剤（SD）、40%エタノール、デオキシコール酸等で処理し、エタノール分画（II+III）工程を実施した。HEV-RNAが沈殿と上清に分かれる比率を各処理毎に解析した。コントロールとしてエンベロップを有さない脳心筋炎ウイルス（EMC）とイヌパルボウイルス（CPV）を用いた。無処理の血漿由来HEVでは、沈殿：上清の比率が15.8%：84.2%であったがSD処理、デオキシコール酸処理、40%エタノール処理では、84.8%：15.2%、99.9%：0.1%、84.4%：15.6%、と沈殿に移行する割合が増加した。エンベロップを有さないウイルスは沈殿に移行していた。また、超遠心法から求めたHEVの密度は、ヒト血中のHEVよりもブタ糞便由来の方が大きく、ヒト血漿由来HEVを40%エタノール処理したところ密度が大きくなる傾向が認められた。

以上からHEVエンベロップを有さないウイルスであるが血漿中では、何らかの成分と結合している可能性が強く示唆された。また、ウイルスに結合している成分が乖離している場合と乖離していない場合とでは、同じ分画工程を行なってもHEVの沈殿と上清に分かれる比率が異なることを明らかにできた。

3. 赤血球製剤における病原体不活化法の開発

MB及びMB誘導体は精製水を用いて10mMに溶解し、濾過滅菌後4℃に保存した。シンドビスウイルスをヘマトクリット値40%の赤血球液

に添加し、よく混ぜた後に最終濃度10 μ 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）分注し、5分（約0.88J）及び10分間（約1.75J）可視光を照射した。MB誘導体は同様の赤血球液に最終濃度0.3 μ M及び1.0 μ Mになるようにそれぞれ添加し、5分及び10分間可視光を照射した。MB10 μ Mでは、5分間の照射で約2Log、10分間の照射で約3Logシンドビスウイルスは不活化された。一方、MB誘導体では最終濃度0.3 μ M及び1.0 μ Mの各濃度では、5分間の照射によってシンドビスウイルスの感染性は検出感度以下になり、少なくとも6Log以上の不活化効率が得られた。MBよりも低濃度で強い不活化活性が認められたが、細胞毒性も認められた。

4. C型肝炎ウイルスの加熱による不活化

機構の解明

HCVの不活化・除去を評価するためには高い感染価を有するウイルス液を調整することが重要である。そこでHCV JFH1 クローンの細胞（Huh7.5.1細胞）への導入効率を高めるために試薬PEI-Max（Polyscience社）を用いた。従来法に比べて遺伝子導入した細胞の上清中には約10倍高い感染価を含有するウイルス液が得られた。この上清を限外濾過カラムとエキソソーム濃縮試薬を組み合わせることによって更に50倍濃縮することができた。これらの方法を組み合わせることによって従来法に比べて約500倍感染価が高いHCV液を調整することができた。

C. 考察

Cohn のフラクションによるグロブリン製剤の分画法では、20～25%エタノール処理では HCV は不活化されないことはこれまでに明らかにしてきた。それでは、なぜグロブリン製剤によって HCV 感染が成立しなかったのか大きな疑問があった。1990 代前半にグロブリン製剤と HCV 感染について国際的に検討されたが、因果関係があると認められた製剤は 2 種有り、その 1 つは Cohn 分画法以外の方法で製造されたものであった。今回の研究により 17%エタノール処理が HCV を除去するために非常に有効であったことを明らかにできた。本来は、夾雑物を取り除く目的の工程だが、HCV 除去にも有効であった。この工程がグロブリン製剤による HCV 感染がなかった理由の可能性はある。なお、40%エタノール処理では HCV は短時間で不活化されるためこの工程以後の製剤による HCV 感染の可能性は極めて低いと考えられる。

HEV 不活化に関しては、HEV に細胞由来の成分が結合している可能性が高くなった。密度が糞便と血漿中の HEV では異なることや、各種細胞成分をウイルスから乖離させる処理を実施した後に分画 (II+III) を行なうとエンベロープを持たないウイルスのパターンに変化するなどが明らかになった。結合成分を乖離させるような処理が実施されている場合は、エンベロープなしのウイルスと類似した挙動を取り、結合した状態ではエンベロープなしのウイルスとは異なる挙動をとる可能性が明らかとなった。HEV では、評価する工程までの各工程の影響を考慮して当該工程のウイルス除去効率を評価する必要があると考えられた。

赤血球の病原体不活化法の開発では、膜透過性

を有する MB 誘導体を用いることで不活化効率は飛躍的に改善した。エンベロープ陽性のウイルスは脂質を含む膜で覆われており、誘導体が細胞だけではなくウイルス内部まで浸透している可能性が実験結果から推定できる。

HCV の除去・不活化法を評価するためには高力価のウイルスを用いた方が評価可能範囲が広がり正確な評価が可能になる。今回、導入効率の改善と濃縮法の改良によってこれまでの約 500 倍の感染価を有する HCV 液を調整できるようになった。今後の評価で大いに役立つものと考えている。

D. 結論

1. Cohn の血漿分画法のグロブリン分画を得る工程に従って培養可能な HCV 株、window 期の HCV 血漿、BVDV をそれぞれ添加し、20%と 17%のエタノール処理を行なったところ、17%処理工程はこれらのウイルスを除去ために有効な工程であることを明らかにすることができた。

2. HEV を添加した分画 (II+III) 工程での沈殿：上清の分離比率は、未処理ではエンベロープを有さないウイルスのパターンと異なっていたが、SD やデオキシコール酸処理によってエンベロープなしのウイルスの挙動に類似するようになった。HEV は必ずしもエンベロープなしのウイルスと同じ挙動をとるとは限らない可能性が示唆された。

3. 細胞透過性の良いメチレンブルー誘導体を使用することによって一本鎖 RNA を有するウイルスに対する赤血球製剤の病原体不活化効率が飛躍的に向上した。

4. HCV の不活化・除去法評価に必要な高感染価

ウイルス液調整のために従来よりも高効率の遺伝子導入試薬と濃縮技術を組み合わせることによって従来法よりも約 500 倍も高感染価を有するウイルス液の調整が可能になった。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

岩尾 憲明、加藤 栄史、小高 千加子、高本 滋、佐川 公矯、藤井 康彦、米村 雄士、田中 朝志、岡崎 仁、岡田 義昭、他 10 名：輸血副作用サーベイランスにおける underreporting、日本輸血細胞治療学会誌、61 巻、561-566、2015 年

2. 学会発表

1) 山田攻、鈴木雅之、内野富美子、小林清子、池淵研二、岡田義昭：Polyagglutination が一過性に認められた交通外傷の一症例、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

3) 池淵研二、武内信一、山田攻、小林清子、岡田義昭：血液保冷庫・冷凍庫用温度管理システムの提案、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

4) 岡田義昭、小林清子、池淵研二：パルボウイルス B19 の *in vitro* 感染系を用いた中和活性の測定と血漿分画製剤の原料血漿規格への応用、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

5) 内田理恵子、水沢左衛子、岡田義昭、皆木隆男、高倉明子、他 6 名：血液製剤のウイ

ルス安全性確保；パルボウイルス B19 DNA 参照パネルの樹立に関する共同研究、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

6) 水沢左衛子、落合雅樹、内田茂治、高倉明子、内田理恵子、山口照英、浜口功、岡田義昭：パルボウイルス B19 DNA 国内標準品作製のための共同研究、第 63 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 27 年 4 月、東京

7) 岡田 義昭：輸血医療における新興・再興感染症の現状と対策、第 140 回日本輸血・細胞治療学会関東甲信越支部例会、教育講演、平成 27 年 9 月、埼玉

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

血漿分画製剤はプール血漿を Cohn の血漿分画法 (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 感染事例が報告されて来た。一方、グロブリンによる HCV 感染事故は 1980 年代後半から 1990 年前半に海外での報告がわずかにあるものの、日本で製造されたグロブリン製剤からの報告はない。この理由を科学的に明らかにするために、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、それを用いて血漿に HCV JFH-1am 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ている。本年度は、血漿を Cohn エタノール法で分画した沈殿画分 Fra.(II+III) P に HCV JFH-1am 株をスパイクし、実際にグロブリン製剤の製法に従い 20%エタノール、17%エタノールで分画を行い、各画分に含まれる HCV (感染性、RNA 量) を調べた。更にモデルウイルスである BVDV、および HCV RNA を含むウィンドウ期血漿を用いて同様に分画し、その感染性、および核酸の移行について HCV JFH-1am 株と比較した。その結果、17%エタノール処理により、HCV の感染性および核酸は主に沈殿画分に移動し、グロブリン画分である上清の感染性は検出限界以下であった。

以上のことより、17%エタノール処理はグロブリン製剤に HCV を混入させない上で非常に重要な工程であることが実ウイルスを用いて明らかとなった。また、これまでに報告があるグロブリン製剤投与による HCV 感染事例の原因は、製造工程において感染性を低減できる 17%エタノール処理工程が含まれていなかった可能性を示唆することが出来た。

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。その一方、グロブリン製剤が原因のHCV感染は海外からの報告があった2製剤のみであり、グロブリン製剤はHCVに対して安全だと考えられている。しかし、これまでHCVを用いた解析の報告はなく、我々は科学的に上記の理由を解析することにした。

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(PEG-IFN/ribavirin)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らなかったが、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(NS3/NS4A)、ポリメラーゼ(NS5B)、及びNS5Aタンパク質に対する阻害剤)が開発、使用が開始され、1b型も含め、その療効果が上がっている。しかも、副作用の多いPEG-IFN/ribavirinの併用なしの治療薬も開発され、HCVは治療可能な感染症という考えが現実味を帯びてきた。実際、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-1am株(遺伝子型2a)を増殖させ、増殖したHCV JFH-1am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。更に、実験室レベルでのCohnエタノール分画法を確立した。これらの系を用いて、血漿にJFH-1amをスパイクし、Cohnエタノール分画法により第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、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の有無を評価し、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。

これまでに、実際の製造手順に従い、クリオ/脱クリオ分画、8%エタノール処理、25%エタノール処理におけるHCVの挙動を確認している。本研究において、初年度は、Cohnエタノール血漿分画法の後半部分である沈殿Fra.(II+III)P画分を得、そこにHCVをスパイクし、その後引き続きCohnエタノール分画法で分画を行い、Fra.(II+III)P画分以降

の HCV の感染性、及びウイルスゲノム RNA 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-1am 株と比較した。

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

健康人血漿 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/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 15uL/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 (S1 ⑨) 画分とに分画した (Fra. I /S1 分画)。Fra. I /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 分析) により評価した。各分画のサンプリングは図 1 の通り行った。

iii) Fra.(II+III)P/S(II+III)分画

8%エタノール上清画分である S1 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 15uL/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)P:⑬) と上清 (S(II+III):⑭) とに分画した。

iv) P(II+III)w/S(II+III)w 分画

沈殿 (Fra. (II+III)P:⑬) に 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 pH6.61 付近となるよう調製した (⑮)。その後 -5°C で攪拌しながら最終濃度が 20% となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加した後 (⑯)、15 分間反応させた (⑰)。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 P (II+III)w:⑱) と上清 (S(II+III)w:⑲) とに分画した。

v) P III/S III 分画

沈殿 P (II+III)w に 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 pH5.4 付近となるよう調製した (⑳)。その後 -5°C で攪拌しながら最終濃度が 17% となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加した後 (㉑)、15 分間反応させた (㉒)。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 (P III:㉓) と上清 (S III:㉔) とに分画した。

2. 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 turbo 10k ; Sartorius 社) を用いて濃縮することにより、感染価の高い (TCID₅₀ 1.3x10⁵/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。

3. BVDV ウイルス感染性の評価

-8 0 °C 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。

4. JFH-1am ウイルス RNA、BVDV RNA、の定量

各フラクションに含まれる HCV JFH-1am 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 EX R&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 HCV 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作製し、単位 U/mL で表した。

(倫理面への配慮)

HCV JFH-1am 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。

C. 研究結果

1. 核酸 RNA の分布

・20%エタノール分画における HCV JFH-1am の核酸 RNA の移行は、グロブリンの移行と同じであり、この傾向は BVDV-RNA、HCV ウィンドウ期由来 RNA の移行と同じであった。

・17%エタノール分画において HCV JFH-1 の核酸 RNA は主に沈殿へ移行し、10%程度はグロブリン分画である上清へも移行した。こ

の核酸の移行傾向は BVDV-RNA、HCV ウィンドウ期由来 RNA の移行と同じであるが移行比率は若干異なることが示された。

2 感染性の分布

・HCV JFH-1am をスパイクした Fra.(II+III)P 画分を 20%エタノールで分画を行ったとき、JFH-1am の感染性は沈殿画分 P(II+III)w: ⑱、及び上清画分 S(II+III)w: ⑲の両方で認められたが、S(II+III)w: ⑲の感染価は、P(II+III)w よりも 1xLog 低くなった。

・P(II+III)w 画分を 17%エタノールで分画を行ったとき、JFH-1am の感染性は沈殿画分 P III: ⑳に移行し、グロブリン製剤である上清画分 SIII画分㉔では検出限界以下に減少した。

・BVDV のウイルス核酸も同様に、20%エタノール処理の沈殿画分に主に移行した。

・17%エタノール処理後、BVDV の感染性は沈殿画分 PIIIに移行し、グロブリン製剤である上清画分 SIII画分では検出限界以下に減少した。

D. 考察

・沈殿分画 P(II+III)w を交雑物の除去目的で実施されている 17%エタノール処理によってグロブリン製剤の原分画となる上清 SIII 画分に混入する HCV が少なくとも 4xLog 減少した。一方、グロブリン製剤から HCV 感染事例の報告（2件、海外）は、この感染事例のいずれの場合も、P(II+III)w を分画するとき、17%エタノール処理がされなかったことが分かっている。これらのことより、この 17%エタノール処理がグロブリン製剤に HCV が混

入を防ぐに非常に重要な工程であると言える。

・17%上清のグロブリン画分では、いずれの HCV JFH-1am をスパイクした場合でも、感染価当たりの核酸量が高い傾向が示された。これまでに、感染性の強いウイルスは感染価当たりの核酸量が低い報告もあり、本研究結果、つまり、17%上清の感染性が検出限界以下であることと一致して興味深い。この理由は今後検討する。

・P(II+III)w 画分を 17%エタノールで分画したとき、上清画分（グロブリン画分㉔）の HCV JFH-1am の感染性は、検出限界以下となったが、その RNA は 17%エタノール分画前の約 2xLog の減少であった。このことは、HCV RNA のダメージ（分解、変性）以外の効果（ウイルス蛋白質の分解、変性など）が影響していることが推測される。

E. 結論

実験室レベルの Cohn エタノール分画法の系を確立し、血液製剤に培養細胞で増殖できる HCV を用いてグロブリン製剤の各分画における HCV の移行を解析したところ 17%エタノール処理が HCV を除去するために非常に有効な工程であることを明らかにできた。

G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表：

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

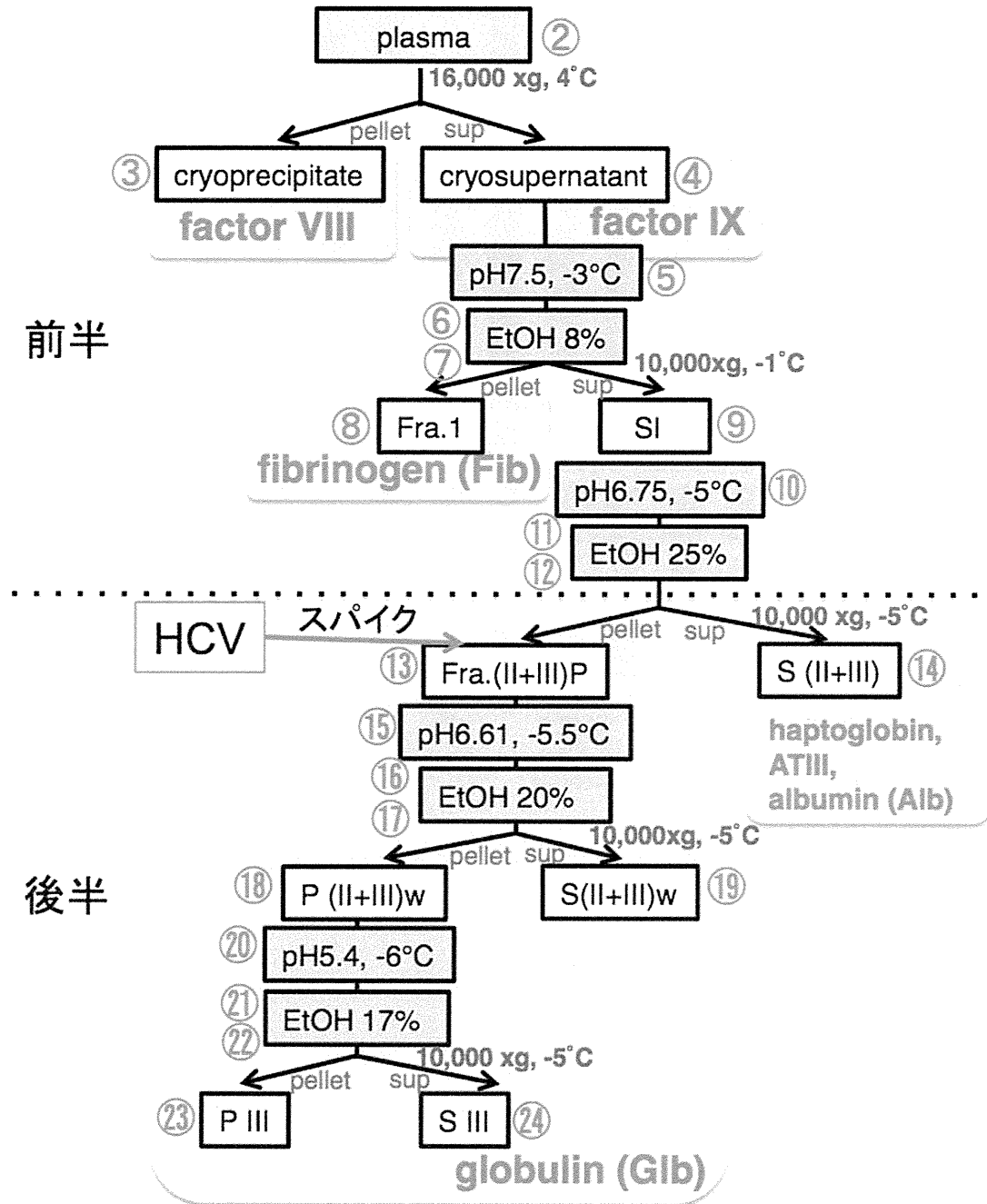


図1. 血漿のCohn エタノール分画法 (⑬にHCVをスパイクした)

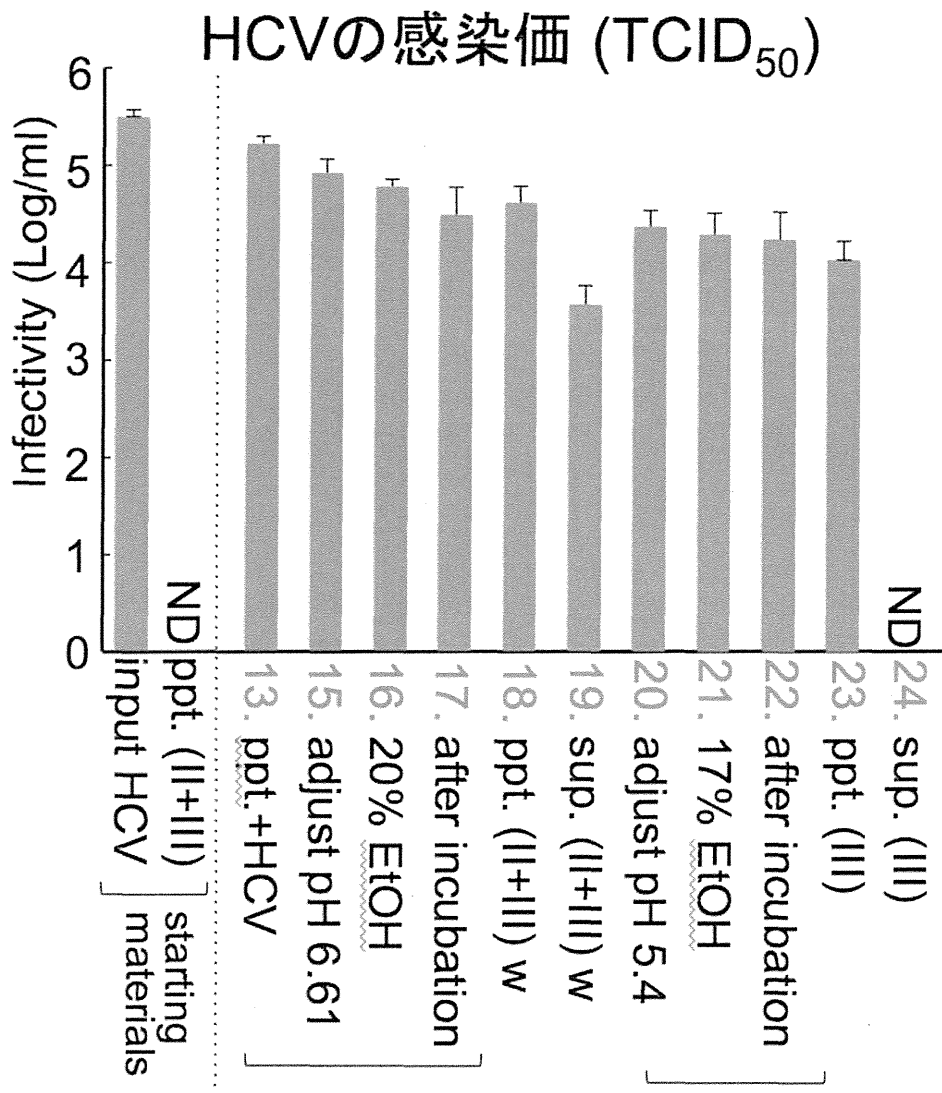


図2. 血漿の Cohn エタノール分画法による HCV の感染性の分配

HCV (JFH-1 株)のRNA分布

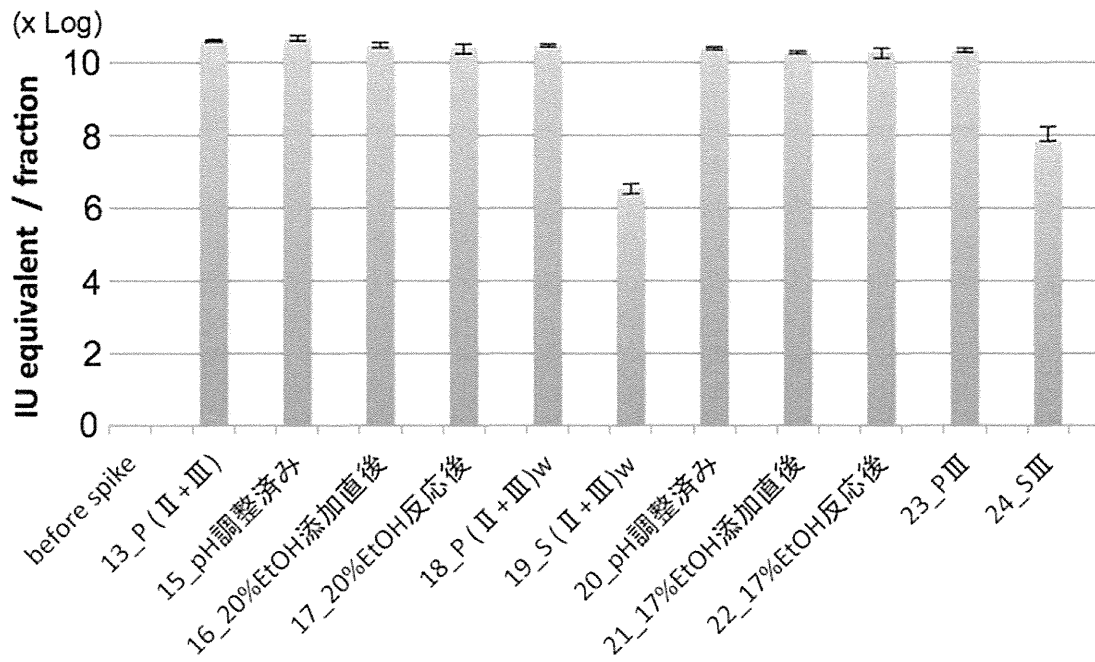


図3. 血漿のCohn エタノール分画法による HCV RNA の分配

厚生労働科学研究委託費（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

分担研究項目：『E型肝炎ウイルスの不活化に関する研究－エタノール処理をした血漿由来E型肝炎ウイルス（HEV）の挙動－』

分担研究者 坂井 薫（日本血液製剤機構 中央研究所 感染性病原体研究室）
支援研究者 前野英毅、高橋一恵、井手野祥次、宇野滝子、古木理恵、大下昌利、服部眞次、大久保祐士（日本血液製剤機構 中央研究所 感染性病原体研究室）

[研究要旨]

血漿由来のE型肝炎ウイルス（HEV）は、糞便由来のHEVとは異なり、宿主細胞の膜成分が結合していると考えられている。この膜成分は、有機溶媒/界面活性剤（SD）処理や胆汁酸に含まれるデオキシコール酸ナトリウム（NaDCA）処理により除去され、HEVの浮遊密度は高い方へ移行する。一方、血漿分画製剤の多くは複数のエタノール分画工程を経て製造されるが、その中のエタノール分画II+III工程は、HEVの膜成分の有無により上清と沈殿への分配比率に差がみられる特徴ある工程である。これまでにこの分画II+III工程において血漿由来HEVは上清に約80%分配されるのに対し、SDやNaDCA処理すると上清に20%以下しか分配されないという結果を得ている。

我々の最終目的は、各アルコール分画工程において血漿由来HEVがどのような形態なのか（膜成分の有無）、どのような挙動を示すのか正しく把握することである。本試験は、第1段階の予備的な検討として、エタノール濃度40%（v/v% 血漿分画製剤のアルコール分画工程において最も高いエタノール濃度）で前処理した血漿由来HEVの膜成分の有無（浮遊密度の変化）、および分画II+IIIでの分配パターンについて検証した。その結果、血漿由来HEVの浮遊密度のピークは1.14~1.15g/mLであったが、40%エタノール処理をした血漿由来HEVのピークは1.14~1.15g/mLには認められなかった。40%エタノール処理により、血漿由来HEVの膜成分がHEVから除去されたものと考えられた。また、エタノール非処理のHEVは、分画II+IIIにおいて上清により多く分配された（沈殿に15.8%、上清に84.2%）が、40%エタノール処理（2時間、-6℃）により沈殿により多く分配された（沈殿に84.4%、上清に15.6%）。

以上の事から、血漿由来HEVに結合した膜成分は40%エタノール処理により除去され、分画II+IIIの分配に影響を及ぼすことが示唆された。

A. 研究目的

血漿由来HEVあるいは細胞培養HEVには宿主細胞の膜成分が結合していると考えられている。界面活性剤処理により膜成分はHEVから解離し、HEVの浮遊密度は高くなる¹⁾。一方、エタノール分画II+IIIは、血漿由来HEVと、SD処理や1%NaDCA処理をした血漿由来HEVの分配パターンが異なる工程である（自社データ）。分画II+IIIにおいて血漿由来HEVは上清により多く分配され、SD処理血漿由来HEVや1%NaDCA処理血漿由来HEVは上清より沈殿に分配される。

血漿分画製剤の製造工程には様々なエタノール

ル濃度の分画工程が含まれるが、これらのエタノールによって血漿由来HEVの膜成分が除去され、HEVの分配パターンに影響を受ける可能性がある。本試験は、まず第1段階の予備的な検討として、エタノール濃度40%（v/v% 血漿分画製剤のアルコール分画工程において最も高いエタノール濃度）で前処理した血漿由来HEVの浮遊密度は高くなるのか、また、分画II+III（エタノール濃度20~25%）での分配パターンが変わるのか検証した。

B. 研究方法

(1) 血漿由来HEVの処理

HEV陽性血漿を遠心分離し（3000rpm、10min）、その上清を超遠心分離した（150,000×g、3hr、25℃）。沈殿を超遠心分離前の液量と等量のDPBSで懸濁した。超音波処理（4min×2回）後、0.45μmフィルターでろ過したものを精製HEVとした。精製HEVにエタノールを最終濃度が40%となるように添加し、-6℃で2時間

略語：HEV; Hepatitis E virus. NaDCA; Sodium deoxycholate. SD; Solvent/detergent. DPBS; Dulbecco's phosphate-buffered saline. TE; Tris-EDTA. TNBP; Tri(n-butyl)phosphate. EMC; Encephalomyocarditis virus. CPV; Canine parvovirus.

静置した。一方、対照として 40%エタノールの代わりに注射用水を等量加え、4℃で 2 時間静置したものを非処理血漿由来 HEV とした。

(2) ショ糖密度勾配遠心による HEV の分析

遠心チューブの内壁にウイルスが付着するのを抑制するために、密度勾配作製前に遠心チューブに 5%スキムミルクを 4.0~5.0 mL 加え一晩以上静置した。遠心チューブに 20~70 w/v %のグラジエントショ糖密度勾配 (TEN Buffer: TE buffer (pH7.4)/150mM NaCl) を作製した。40%エタノール処理血漿由来 HEV、非処理血漿由来 HEV、あるいは膜成分が解離しているとされるブタ糞便由来 HEV をそれぞれ TEN Buffer で 1/5 に希釈し、20~70 w/v %のグラジエントショ糖密度勾配溶液に 350 μ L を重層した。179,000 \times g, 10℃で 17 時間超遠心分離を行った後、200 μ L ずつ回収し、各フラクションの屈折率(nD)を測定した。別途作成した検量線から浮遊密度(g/mL)を求めた。各フラクションは一旦-80℃で保存し、後日 HEV ゲノム濃度を測定した。

(3) HEV ゲノム濃度の測定

QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit を用いて核酸を抽出し、QuantiTect Probe RT-PCR Kit を用い、Jothikumar らの方法²⁾に従って HEV ゲノム濃度を測定した。

(4) エタノール分画 II+III における HEV の分配

分画 II+III のスタートマテリアルである上清 I に、40%エタノール処理血漿由来 HEV あるいは非処理血漿由来 HEV をそれぞれ 1/10 量添加し、ロードサンプルを採取した。95%エタノールを添加し最終濃度を 20~25%とした。酢酸バッファーで pH を 6.0~7.0 とし、-6~-7℃で 1 時間静置した。3,000 \times g, -7℃で 30 分遠心分離後、上清を回収した。沈殿は DPBS で懸濁した。上清と沈殿は-80℃で保存し、後日 HEV ゲノム数を測定した。

(倫理面への配慮)

研究対象としてヒト血漿 (HEV 陽性血漿) を用いている。この血漿の使用については、「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律」に従い、一般社団法人日本血液製剤機構ヒト組織研究倫理審査委員会にて承認されている。

C. 研究結果

(1) HEV の浮遊密度の比較

非処理血漿由来 HEV の浮遊密度のピークは、

1.14~1.15g/mL であった。40%エタノール処理血漿由来 HEV の浮遊密度のピークは 1.14~1.15g/mL に認められず、1.27g/mL より高い密度にピークがあることが推測された (図 1)。一方、胆汁酸や蛋白質分解酵素等で膜成分が解離していると考えられているブタ糞便由来 HEV の浮遊密度のピークは 1.25g/mL であった。40%エタノール処理をすることで血漿由来 HEV の膜成分が HEV から解離し、糞便由来 HEV と同様の密度になったと考えられた。なお、Takahashi らは、血漿由来 HEV の密度は 1.15~1.16g/mL、糞便由来 HEV の密度は 1.27~1.28g/mL と報告しており¹⁾、本試験の結果それと同様であった。

(2) エタノール分画 II+III における HEV の分配

非処理血漿由来 HEV は上清に 84.2%、沈殿に 15.8%分配された (図 2A)。一方、40%エタノール処理血漿由来 HEV は、上清に 15.6%、沈殿に 84.4%分配され、40%エタノール処理により沈殿へより多く分配されるようになった。

D. 考察

(1) エタノール分画 II+III における HEV の除去効果について

本試験結果をこれまで得られた自社データと比較すると、非処理血漿由来 HEV は上清に 77.7%、沈殿に 22.3%分配され、再現性が認められた (図 2A、2B)。また、40%エタノール処理血漿由来 HEV の分画 II+III における分配は、SD (1%Tween80/0.3%TNBP, 30℃, 6 時間) 処理 (上清に 15.2%、沈殿に約 84.8%) と同等であった。一方、1%NaDCA 処理血漿由来 HEV、モデルウイルスである EMC や CPV は、40%エタノール処理血漿由来 HEV や SD 処理血漿由来 HEV より沈殿への移行度が大きく、ほぼ 100%が沈殿に認められた。

上清のウイルス除去率 (LRV) について注目すると、非処理血漿由来 HEV、40%エタノール処理血漿由来 HEV、および SD 処理血漿由来 HEV は、いずれも LRV が 1Log₁₀ 以下であり、各処理の有無による LRV の差はなかった。一方、1%NaDCA 処理血漿由来 HEV、EMC、CPV の LRV は 2~4Log₁₀ であり (Data not shown)、これらのウイルスについてはウイルス除去効果が認められた。従って、分画 II+III の上清における血漿由来 HEV のウイルス除去効果を評価する場合には、適切なウイルスを選択する必要があると考えられた。

なお、40%エタノールや SD 処理血漿由来 HEV と、1%NaDCA 処理を施した血漿由来 HEV の挙

動の差は、HEV に結合している膜成分の種類や膜成分の量が関係しているのかもしれない。

(2) HEV における膜成分の有無の判定方法

本試験のように HEV における膜成分の有無を確認するには、密度勾配遠心が有効であり、一般的である。しかし、密度勾配遠心は、密度勾配の作製、超遠心、多数のフラクション採取、多数の検体における HEV ゲノム濃度測定と、操作が非常に煩雑であり数日間にわたる。今後、血漿由来 HEV の挙動を示すウイルスの検索が課題となるが、密度勾配遠心を指標に検索することは困難であろう。

一方、本試験で評価した分画 II+III は、上清と沈殿の分配割合から膜成分の有無を判定できる特徴がある。分画 II+III 操作と HEV ゲノム濃度測定を合わせて 2 日間で実施でき、測定検体も上清と沈殿の 2 検体である。今後、HEV に膜成分が結合しているのか簡易的に判定する場合や、HEV のモデルウイルスをスクリーニングする際に、分画 II+III における分配パターンの確認試験が有効な指標となるであろう。

(3) アルコール分画工程における適切なウイルスの選定について

Cohn/Oncley のアルコール分画では、分画 I (エタノール濃度 8%)、分画 II+III (エタノール濃度 20~25%)、分画 IV-1 (エタノール濃度 18%)、分画 IV-2 (エタノール濃度 40%) の順に分画され、分画 IV-2 が最大のエタノール濃度となる。エタノール濃度が 8%~25% でも同様の現象が見られるのか検証する必要がある。血漿由来 HEV の膜成分が解離する工程前後の HEV に対する安全性を評価するには適切なウイルスを用いることが重要となる。その場合、HEV が膜成分を有していると考えられる工程では、血漿由来あるいは培養上清由来 HEV (膜成分が結合した HEV) を用いることになるだろう。一方、上流工程で膜成分が失われていると考えられる工程では、エタノールや SD 処理した血漿由来 HEV などが候補となるだろう。これらの可能性については更に検討する予定である。

E. 結論

血漿由来 HEV の浮遊密度のピークは 1.14~1.15g/mL であったが、40%エタノール処理を施すことで、1.14~1.15g/mL にピークは認められなくなった。40%エタノール処理をすることで、血漿由来 HEV の膜成分が HEV から除去されたものと考えられた。

また、エタノール非処理の場合、以前の結果と同様に分画 II+III の上清により多く分配された (沈殿に 15.8%、上清に 84.2%)。一方、40%エタノール処理 (2 時間, -6°C) をすることで、沈殿へより多く分配されるようになった (沈殿に 84.4%、上清に 15.6%)。

以上の事から、血漿由来 HEV に結合した膜成分が 40%エタノール処理により除去され、分画 II+III の分配パターンが変化した可能性が示唆された。

(引用文献)

- 1) Takahashi et. al., J. Clin. Microbiol., 2010, 48:1112-1125.
- 2) Jothikumar et. al., J. Virol. Meth., 2006, 131:65-71.

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

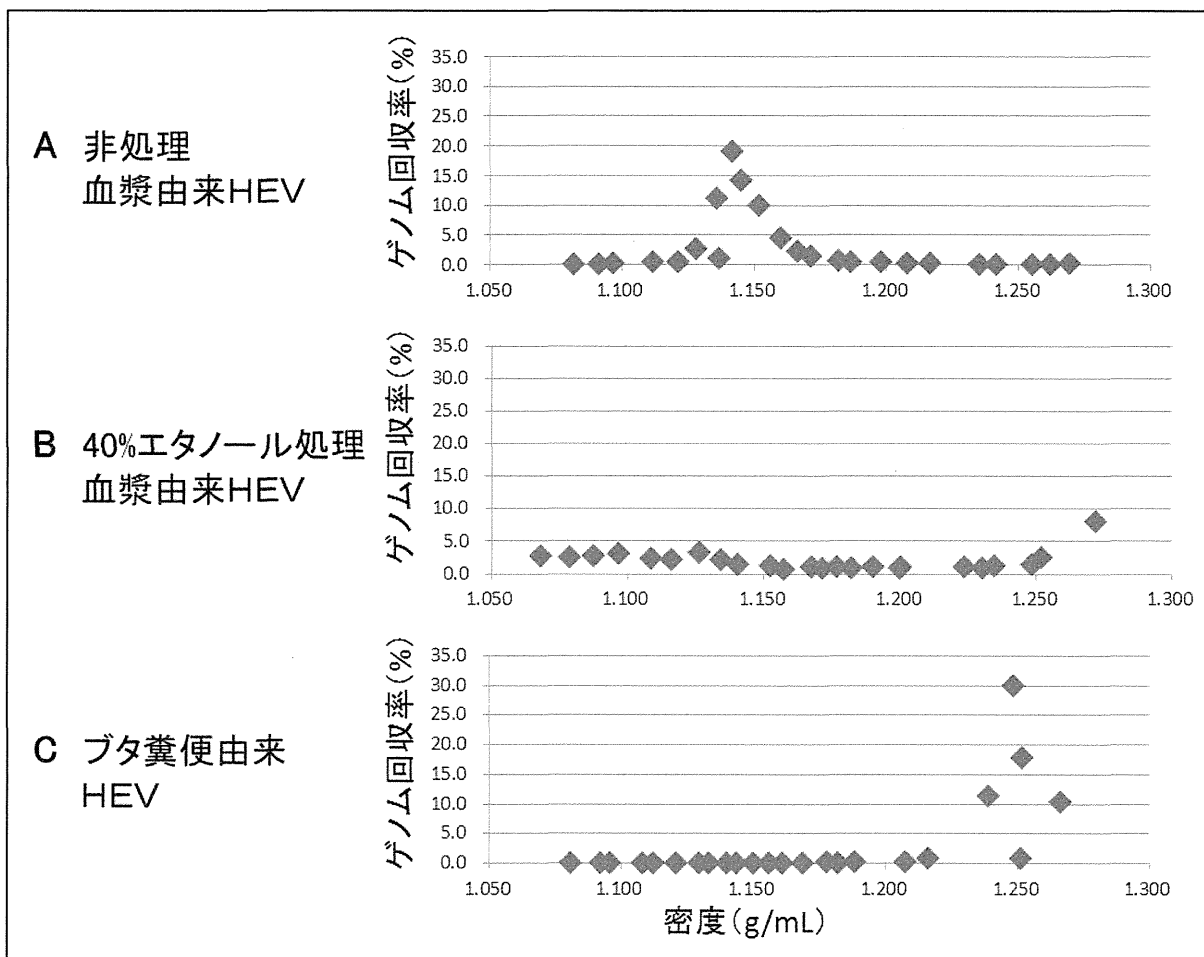


図1 ショ糖密度勾配遠心による HEV の浮遊密度解析結果

非処理血漿由来 HEV (A)、40%エタノール処理血漿由来 HEV (B)、および非処理ブタ糞便由来 HEV (C) を 20~70 w/v %のショ糖密度勾配遠心を行い、各フラクションの密度と HEV ゲノム回収率をプロットした。非処理の血漿由来 HEV のピークは 1.14~1.15g/mL で認められたが、40%エタノール処理血漿由来 HEV のピークは 1.14~1.15g/mL には認められなかった。なお、ブタ糞便由来 HEV のピークは 1.25g/mL であった。