

図2 エタノール分画 II+III における HEV ゲノムの分配割合

本試験結果 (A) と過去の自社データ (B) を記した。非処理血漿由来 HEV は上清に 84.2%、沈殿に 15.8% 分配された。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多く分配されるようになった。

*デオキシコール酸ナトリウム (Sodium deoxycholate)

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

赤血球製剤の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

赤血球製剤の病原体不活化法としてこれまでメチレンブルー (MB) を検討してきたが、より不活化効率を高める目的で細胞透過性が高いMB誘導体を用いて不活化効率を評価した。シンドビスウイルスに対してMBよりも約1/30の低濃度の誘導体をヘマトクリット40%の赤血球に添加し、20000Lux、5分の照射(0.88J相当)によって感染価は検出感度以下に減少した。少なくとも6Log以上シンドビスウイルスに対して強い不活化活性が認められた。不活化処理によって赤血球の溶血は認められなかったが、感染価測定の際の標的細胞に細胞毒性が認められた。

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、全ての病原体をスクリーニングすることは困難であり、地球の温暖化や国際間のヒトや物の移動などでデングウイルスやジカ熱ウイルスなど新興・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。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。新鮮凍結血漿や血小板においては既に病原体不活化技術が臨床に導入されているが、赤血球製剤には実用化されている病原体不活化技術はない。我々は、メチレンブルー (MB) を用いた赤血球液の病原体が不活化法 (これは既に知られていることだが) の改良をこれまで行なってきた。この方法の最大の問題点は、MBが細胞に透過し難いことである。今年度は、細胞への透過性が認められてい

るMB誘導体を用いてより赤血球液での病原体不活化の効率を検討した。

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 μ 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。なお、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5分（約0.88J相当）、10分（約1.75J相当）それぞれ照射した。

4. メチレンブルーとMB誘導体の調整とウイルスの不活化法

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分及び10分間可視光を照射した。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、6穴プレートに4mL（深さ4mm）分注し、5分及び10分間可視光を照射した。照射中は可視光が効率良く照射されるように工夫した。照射後は遮光し氷中に保存した。不活化処理された各赤血球は、遠心分離して上清を集め、直ちに感染価測定を行なった。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。

C. 研究結果

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、20000Lux5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（図1）。しかし、1.0 μ Mでは1倍希釈において細胞障害性が認められた。

D. 考察

MBは細胞膜を浸透し難いので赤血球内部に存在するマラリアやバベシア等の原虫に対して不活化効果が得られ難い欠点を有している。そこでMBの誘導体で細胞膜を透過することができる試薬を用いてシンドビスウイルスの不活化効率を検討した。MBに比べて低濃度で優れた不活化効果を有していた。細胞膜への透過性が高いMB誘導体がウイルスの不活化効果が良くなる理由として、ウイルスのエンベロープは脂質を有していることから細胞だけでなくウイルス内部にも浸透し活性化酸素によってウイルス核酸を破壊し易くなったためだと推定している。感染性を評価する細胞に対して細胞毒性が認められたが、赤血球に対して評価した範囲では溶血は確認できなかった。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。

E. 結論

細胞への透過性が高いMBの誘導体は、MBよりも低濃度でウイルスを効率良く不活化することができた。その一方で細胞毒性があり、更なる至適濃度の検討が必要である。

F. 健康危機情報

なし

G. 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

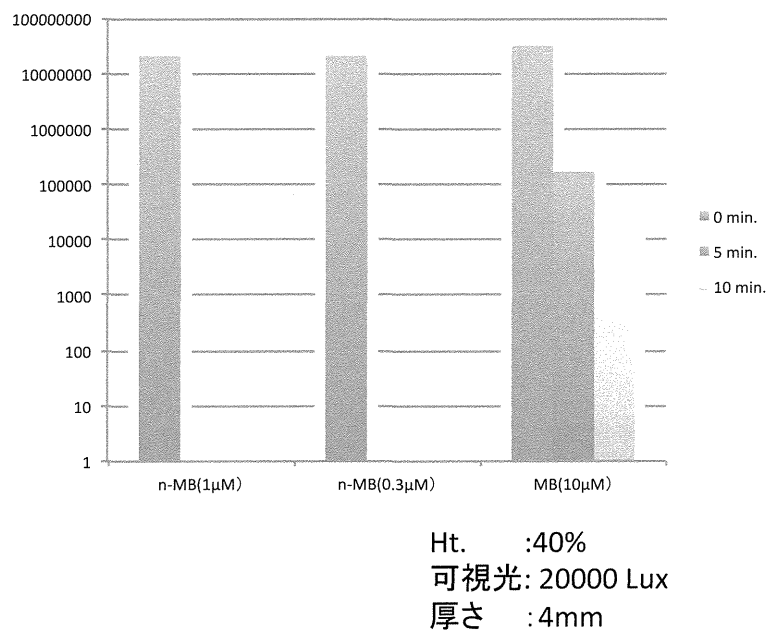


図1 MB誘導体と可視光照射による Sindbis virusの不活化効果

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：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、培養細胞で増殖させた HCV を血液製剤に加え、様々な条件で不活化条件の検討を行っている。不活化の条件を調べるに当たり、加える HCV の感染価が高ければ高いほどその不活化をより詳しく調べることが出来る。今回、1. HCV クローンの細胞に導入するときに用いるトランスフェクション試薬に PEI-max を用い、2. HCV の濃縮に Exosome isolation kit を用いると、従来に比べ約 500 倍の感染価の HCV を準備でき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 (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。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。一方、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、今では培養細胞で HCV の増殖をさせることが可能な系を用いることが出来る。本研究ではこの系を用いて HCV を増殖させ、増殖した HCV を血液製剤に添加し、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。不活化評価法は、体積で血液製剤 9 : 病原体 1 (ここでは HCV) の比率で行うこととなっており、開始時点で病原体の濃度 (感染価) が既に 1/10 となる。最初に添加する病原体 (HCV) の感染価 (濃度) が高ければ高いほど、不活化処理に於ける効果をより詳しく調べる事が (より大きなダイナミックレンジ

をとることが)出来る。

本年度は出発材料として、高感染価の HCV を得ることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. トランスフェクション試薬

HCV JFH1 クローンの細胞 (Huh7.5.1 細胞) への導入効率を上昇させるため、これまで用いていたトランスフェクション試薬 A と、今回新たに、トランスフェクション効率が高いと言われている試薬 PEI-Max (Polyscience 社) とを用いて HCV JFH1 クローンを Huh7.5.1 細胞 (6 ウエルプレート の 1 ウエル) にトランスフェクションする。5 日間培養した細胞上清に含まれる HCV の感染価と、細胞内で発現した HCV を調べる。

2. HCV の濃縮

i) まず、これまで行ってきたように、HCV JFH1 クローンの細胞へのトランスフェクションにより、細胞上清に発現した HCV を限外ろ過カラム Vivaspin turbo (10k, Sartorius 社) を用いて濃縮する。

ii) 次に、HCV は脂質二重膜をもった粒子として存在しており、同じような構造を持つ膜小胞は Exosome isolation kit (EXIQON 社) によって濃縮できると考えられるので、このキットを用いて HCV を濃縮する。

3. HCV の感染価の測定法

上記 1, 及び 2 で得られた HCV を段階希釈し、新たに準備した naïve 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た。

4. 培養細胞で発現した HCV の検出

研究方法 1 で HCV JFH1 クローンを Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションし、5 日間培養した後、細胞上清を回収後の細胞を 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 JFH1 クローン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. トランスフェクション試薬

HCV JFH1 クローン 0.5µg, 1.0µg, 及び 5.0µg に対して、各トランスフェクション試薬 (PEI-max: 5.0µg, 10µg, 試薬 A: 7.5µg, 10µg) を用いて Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションした。

i) HCV コアタンパク質の免疫染色 (図 1)

HCV JFH1 クローンを各トランスフェクション試薬で導入した Huh7.5.1 細胞での HCV の発現は、用いた HCV JFH1 クローンの量依

的に増加し、また、用いたトランスフェクション試薬 (PEI-max, 試薬 A の場合共に) の量依存的に増加した。トランスフェクション試薬の比較では、どの場合も PEI-max の方が試薬 A の場合よりも、HCV の発現が高かった。

ii) HCV の感染価 (図 2)

各トランスフェクション試薬を用いて得られた Huh7.5.1 細胞 (図 1 の各細胞) 上清中の HCV の感染価を調べた結果、用いた HCV JFH1 クロンの量依存的に、感染価が増加し、また、用いたトランスフェクション試薬の量依存的に感染価が増加した。

いずれの場合も、PEI-max の方が試薬 A に比べて感染価が約 10 倍高かった。

2. HCV の濃縮

これまで行ってきたように、培養細胞で得られた HCV を Vivaspin で約 20 倍に濃縮 (約 120mL から約 6mL) した。その感染価を測定した結果、 1.3×10^5 /mL であった。この HCV 5mL を Exosome isolation kit を用いて HCV をペレットとして回収した。沈殿したペレットを 100 μ l の培地 (DMEM, 10%FBS) に溶かした。この感染価を測定した結果、 7.4×10^6 /mL であった。この方法により、HCV は約 50 倍濃縮された。このときの濃縮効率は $7.4 \times 10^6 \times 0.1 \text{mL} / (1.3 \times 10^5 \times 5 \text{mL}) \times 100 = 114\%$ となり、濃縮による損失がほとんど無いことが明らかとなった。

3. トランスフェクション試薬の価格

6well プレーートの 1well に対し、PEI-max (1 μ g/ μ l)、或いは試薬 A を 10 μ l 用いると

き、調べた条件中、一番高濃度の感染性 HCV を得ることが出来た。このとき、PEI-max、及び試薬 A の 10 μ l の価格は、それぞれ 0.25 円、及び 500 円である。PEI-max は試薬 A に比べ、2000 倍安価である (図 3)。

D. 考察

1. トランスフェクション試薬

i) 6well プレーートの 1well の場合、新たなトランスフェクション試薬 PEI-max を 10 μ g、HCV JFH1 クロンを 5.0 μ g 用いるとき HCV の収量が一番多くなった。

ii) PEI-max を用いることにより、今までよりも約 10 倍の感染価 (約 1.0×10^5 /mL) の HCV を得ることが出来た。

2. HCV の濃縮

Exosome isolation kit を用いると HCV は約 50 倍濃縮出来ることができ、しかも濃縮による損失は殆ど無いことが明らかとなった。

以上をまとめると、まず、PEI-max を用いて、感染価で約 1.0×10^5 /mL の HCV が得られ、この HCV を限外ろ過カラム Vivaspin turbo を用いて、約 20 倍に濃縮 (感染価 2.0×10^6 /mL) でき、更に Exosome isolation kit を用いて約 50 倍に濃縮 (感染価 1.0×10^7 /mL) に濃縮できると考えられる。

例えば血液製剤に HCV を加え、Cohn 分画法によって HCV がどの画分に分画されて行くかを調べるとき、分画ごとに、各画分に存在する HCV の感染価が減少して行くので、最初に加える HCV の濃度 (感染価) が高い

ほど、HCV がどこの画分に分画するかをより詳しく調べることが出来き、こうした試験に高濃度（高感染価）HCV は有用である。

E. 結論

今までの方法よりも、今回用いたトランスフェクション試薬 PEI-max で 10 倍の感染価の HCV を得ることが出来た。また、Exosome isolation kit により、約 50 倍 HCV を濃縮できることが明らかとなった。これらを合わせ、今までに比べ、約 500 倍 ($10 \times 50 = 500$) の感染価の HCV が得られると考えられる。

G. 研究発表

- (ア) 論文発表 なし
- (イ) 学会発表： なし

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

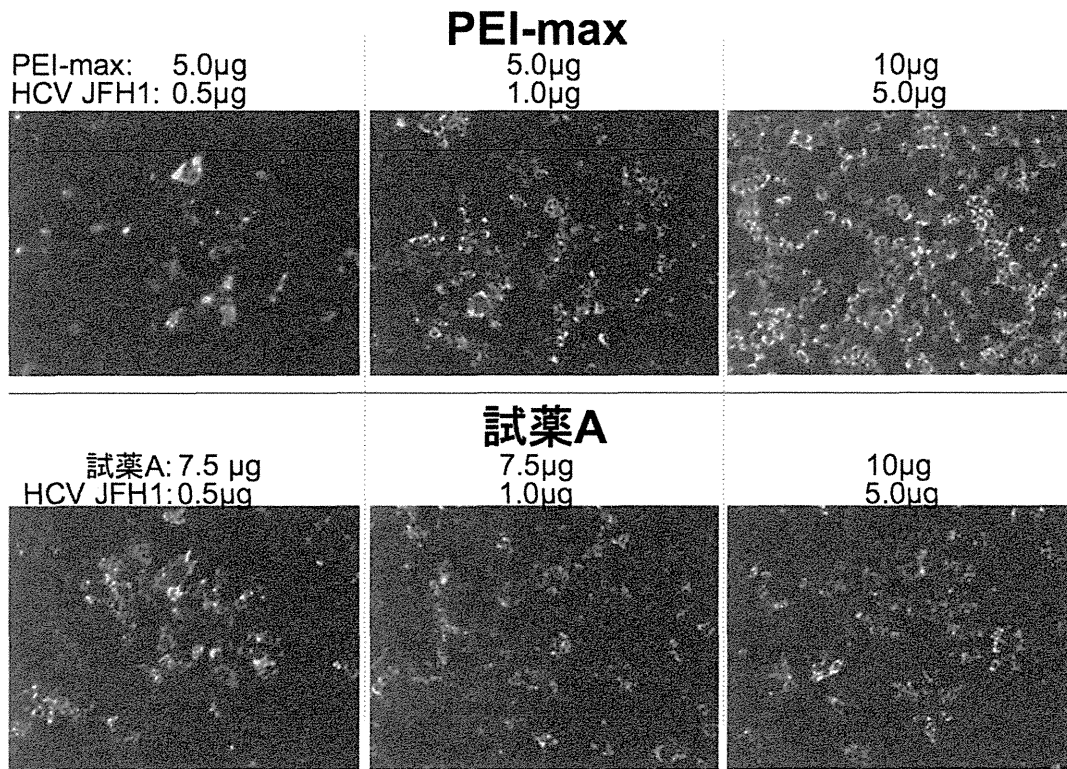


図1. PEI-maxによるHCV JFH1クローンのHuh7.5.1細胞への導入

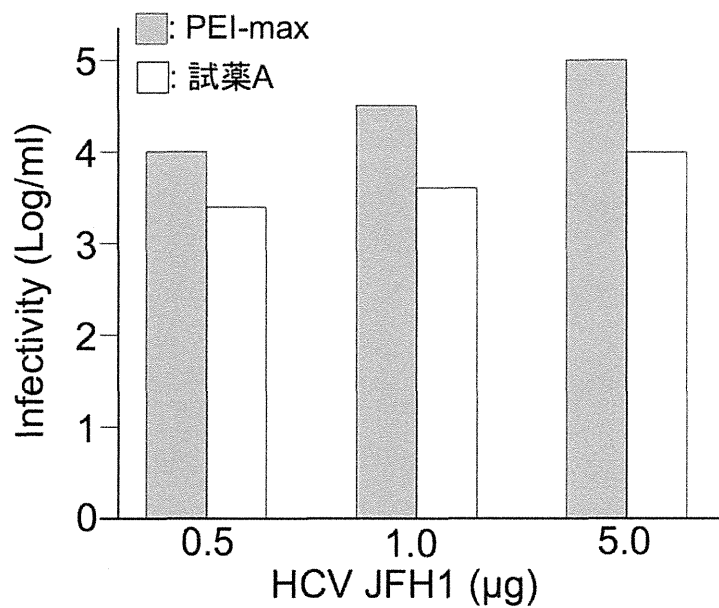


図2. PEI-maxを用いたトランスフェクションにより得たHCVの感染価

試薬	10 μ l (円)
PEI-max	0.25
試薬A	500

6ウェルプレートの1ウェルには10 μ l使用

図3. 6 wellプレートの1 wellに用いるPEI-maxの価格

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

