

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 埼玉医科大学医学部 准教授

研究要旨

- 1) 昨年度に HCV は、20%エタノール処理では不活化されなかったが、17%のエタノール分画によってグロブリン製剤になる分画から効果的に除去されることが判明したので今年度は、ウイルスの性状について詳細に解析した。アルコール分画によって密度が異なる複数のウイルスが存在し、17%エタノール分画によって感染性を有する HCV は廃棄される分画に沈殿することを明らかにした。
- 2) HEV の研究では、血漿由来の HEV を 25%及び 40%エタノール処理を行い、ウイルス密度を詳細に測定した。40%エタノール処理では脂質が除去され HEV の密度は大きくなり、糞便由来の HEV の密度に近い値となった。また、非処理または 25%エタノール前処理の血漿由来 HEV は、分画 II+III において上清に 84~95%分配されたが、40%エタノール前処理では沈殿により多く分配された。
- 3) 高い感染価を有する HEV 陽性血漿を得ることは困難であることからリバースジェネティックス法により高いウイルス液を確保できた。
- 4) 赤血球の病原体不活化法の開発では、表面積の大きい陽性荷電ビーズによる血液からのウイルス除去を検討したが、僅か 1/10 に感染価が低下しただけで有効な方法とはならなかった。5) 不活化法や除去法の評価に必要な高感染価を有するウイルス液の簡便な調整法を開発し、培養液から約 100 倍高い感染価を有するウイルス液が得られた。

#### 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、感染価が測定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、輸血用血液を含めた血液製剤の安全性を高めるために重要である。特に HCV に関しては、グロブリン製剤による HCV 感染の事例は世界で 2 製剤のみであり、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、E 型肝炎ウイルス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、血漿中では脂質を有していることから性状が通常のエンベロープを持たないウイルスとは異なる可能性が指摘されている。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い。我々は、不活化法に上乗せできるような方法として除去法を検討した。

以上の目的のために実施した平成 28 年度の研究成果を紹介する。

#### B. 研究方法と結果

##### 1. Cohn エタノール分画法による 17%エタノール処理における HCV の性状解析

本年度は、Cohn エタノール法の 17%エタノール分画による各分画での HCV の性状を解析するために 20%エタノール分画 P( + ) w に HCV JFH-1am 株をスパイクし、17%エタノールで分画を行い、沈殿、上清、及び 17%分画前の各画をそれぞれシヨ糖密度勾配遠心法により各分画にの HCV (ゲノム RNA 量、感染性、コアタンパク質) を解析した。各分画でゲノム RNA が存在する密度は 1 つのピークだったが、感染性やコアタンパク

は密度から見ると複数のピークが存在していた。エタノール処理によって密度が異なる HCV に変化したと考えられる。17%の遠心によって沈殿（廃棄されるフラクション）に密度が大きい HCV が存在し、上清（プロブリン製剤になるフラクション）には密度が小さい HCV が存在していた。RNA 量からすると上清中に存在する RNA は沈殿よりも 3Log 少なかった。また、感染性は検出感度以下になっていた。

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。

## 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 40%エタノール、あるいは 25%エタノールを用いて前処理してからエタノール分画（II + III）工程を実施し、分画（II + III）での分配パターンを解析した。その結果、非処理の血漿由来 HEV の浮上密度は 1.104g/mL であったが、25%エタノール前処理で 1.111g/mL、40%

エタノール前処理では 1.128g/mL へシフトした。ブタ糞便由来 HEV の浮上密度は 1.244 g/mL であり、40%エタノール前処理ではブタ糞便由来 HEV の浮上密度まではシフトしなかった。また、非処理または 25%エタノール前処理の血漿由来 HEV は、分画 II+III において上清に 84~95%分配されたが、40%エタノール前処理では沈殿により多く分配された（沈殿への分配：59~84%）。以上の事から、血漿由来 HEV に結合した脂質膜は、40%エタノール前処理により解離し（解離の程度は不明）分画 II+III の分配に影響を及ぼすことが示唆された。

また、ゲノム全長配列が既知であるブタ糞便由来 HEVGeno type jp (swJR-PS) の全長ゲノム RNA を、合成 DNA から作成したプラスミドを鋳型として in vitro 合成し、ヒト樹立肝細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションした。培養後、培養上清中の HEV ゲノムを定量した。約  $10^8$  ゲノム/mL 以上の高いゲノム濃度を示す HEV 株を安定して確保できる可能性を見出した。

## 3. 赤血球製剤からの病原体除去法の開発

市販されている陽性荷電のビーズ 100 mg (約  $51\text{cm}^2$  相当) をシンドビスウイルス又は、PRV を添加した生食、及び PBS に加え、1、2、4 時間緩やかに攪拌しながらウイルスを吸着させた。それぞれの上清中に残存するウイルス量を測定した。シンドビスウイルスでは、4 時間吸着させても全くウイルス量は変化なかった。PRV は 4 時間吸着させることで僅かに 1log

減少した。

#### 4. 培養液からのウイルス濃縮法

市販の exosome 精製試薬 (miRCURY™ Exosome Isolation Kit) を用いて 10mL のウイルス液を約 100  $\mu$ L に濃縮できた。シンドビスウイルス、PRV、牛下痢症ウイルスをそれぞれ濃縮したところ、感染価は 20~150 倍に増加した。

#### 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。また、17%エタノール処理が HCV を除去するために非常に効果的であったことも明らかにしてきた。今年度は、17%エタノール処理前後の HCV の性状をショ糖密度勾配法を用いて詳細に解析した。17%エタノール処理によって感染性を有する HCV は沈殿に移行したが、密度が大きい傾向があった。一方、グロブリン製剤となる分画は、HCV の量も 3Log に減少していたが、密度は軽い傾向にあった。エタノール処理によってウイルスの密度が変化し、密度が大きい HCV が沈殿に移行したことで結果的には、グロブリン分画から除去されたと考えられた。

HEV 不活化に関しては、HEV に脂質膜が結合していると推定されていたが、40%エタノール処理によって密度が糞便の密度に違い値になることが実験的に明らかとなった。脂質が結合していることによって

分画 (II+III) における沈殿、及び上清に移行する率に影響を与えることも示すことができた。脂質が除去された状態では HEV 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。また、ヒトの血漿中に存在する HEV の濃度は一般的に低いため、評価用の高ウイルス量を有する血漿を確保することは困難であった。今回、リバースジェネティクス法を用いることで細胞株から高ウイルス量の HEV を産生することが確認できた。今後に安定に産生する細胞株が確保できる可能性が見いだされたことで評価に必要なウイルスが確保できる期待が出てきた。

病原体を不活化する方法はいくつかあるが、いろいろな種類の病原体を均等に不活化することはできない。効果的に不活化できるウイルスもあれば抵抗性を示すウイルスも存在する。いくつかの不活化法を組み合わせることも可能だが、赤血球製剤の場合では細胞膜の機能低下が生じる可能性が高い。そこで不活化法を補助する別の方法も必要である。血漿分画製剤では病原体を取り除く「除去法」が導入されている。赤血球の場合は、大きさの差で除去することは不可能なので荷電の差による除去を検討した。ウイルスは陰性に荷電しているため陽性荷電の物質に吸着する期待

があった、赤血球も吸着すると思われるがウイルスの方が非常に小さいので吸着の阻害にはならないと推定した。今回の実験では、期待した効果が出なかった。pH等の至適条件を探す必要があると考えた。

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、市販の試薬を用いることで 10mL の培養液を 100  $\mu$ L まで濃縮でき、感染価も変動があるものの効果的な濃縮法ができた。

#### D. 結論

1. Cohn の血漿分画法の 17%のエタノール処理によって HCV は感染性を有する密度が高いウイルスは沈殿に移行し、グロブリン分画へは軽い密度の HCV が移行することが判明した。

2. HEV に結合した脂質膜は、エタノール濃度によってウイルスから解離し、分画 (II+III) における沈殿、及び上清に移行する率に影響を与えることが示された。また、評価用に使用する HEV をリバーシジェネティックス法を用いて安定に産生する細胞株が確保できる可能性を見いだした。

3. 不活化法を補助する方法として陽性荷電ビーズによるウイルス除去を検討したが効果的な除去はできなかった。

4. 不活化・除去法評価に必要な高感染ウイルス液調整のために市販の exosome 試薬を使用して簡便に調整することが可能になった。

E. 健康危機情報  
なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kiyoko Nojima, Kazu Okumaa, Masaki Ochiai, Madoka Kuramitsu, Kenta Tezuka, Mieko Ishii, Sadao Ueda, Takashi Miyamoto, Koichiro, Kamimura, Enki Koue, Sanae Uchida, Yoshiharu Watanabe, Yoshiaki Okada, Isao Hamaguchi :Establishment of a reference material for standardization of the anti-complementary activity test in intravenous immunoglobulin products used in Japan: A collaborative study. *Biologicals*, vol.46. 68-73. 2017

##### 2. 学会発表

- 1) 岡田義昭、小林清子、池淵研二:輸血用血液製剤の保存温度や白血球除去による Leishmania 原虫の不活化及び除去効果に関する研究、第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 28 年 4 月、京都
- 2) 玉栄建次、青木麻衣子、鈴木雅之、内野富美子、山田攻、松本慎二、棚沢敬志、小林清子、池淵研二、斉藤妙子、岡田義昭: 当院における不規則性抗体陽性患者への不規則カード発行と今後の課題、第 64 回日本輸血・細胞治療学会総会、平成 28 年 4 月、京都
- 3) 山田攻、鈴木雅之、内野富美、小林清子、池淵研二、岡田義昭: Ko 解凍赤血球液輸

血を経験した抗 Ku 保有症例、第 64 回日本  
輸血・細胞治療学会総会、平成28年 4 月、  
京都

4)水沢左衛子、落合雅樹、草川茂、内田理  
恵子、川村恵理子、岡田 義昭、山口照英、  
浜口功:HIV-RNA 国内標準品の力価の再評  
価のための国内共同研究、第 64 回日本ウイ  
ルス学会総会、平成28年 10月、札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし