

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 28 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29 (2017) 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-P6

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 P7-P15

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 P16-P21

3. 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

岡田 義昭 P22-P25

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P26-P27

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 51cm^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 μ 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 μ 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

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)

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 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。培養可能な HCV の JFH-1am 株は、20%エタノールで不活化されないことからグロブリン製剤で感染が生じなかった理由を科学的に明らかにすることを目的とした。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た。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が、ゲノム RNA は依然存在することが明らかとなった。

今年度は Cohn エタノール法の 20%エタノール画分 P (II+III) w に HCV JFH-1am をスパイクし、17%エタノール分画を行い、沈殿、上清、及び 17%エタノール分画前の画分をそれぞれシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、各分画のゲノム RNA、感染性、及びウイルス構造タンパク質 (コアタンパク質) を検出した。その結果、各画分には、RNA に関してはそれぞれ 1 つのピークの分布を示したが、感染性、及びコアタンパク質は、複数のピークの分布を示し、密度の違う HCV 粒子が存在することが示唆された。RNA、感染性、コアタンパク質のピークはいずれの場合も 17%エタノール処理前に比べて、沈殿画分はより高密度へシフトし、一方、上清画分はより低密度へシフトすることが明らかとなった。

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

けて製造された第 因子製剤、第 因子製剤、フィブリノゲン製剤等の投与により多くの人々が C 型肝炎に感染した。その一方、グロ

プリン製剤が原因の 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 1 因子製剤、第 2 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。

これまでの研究で、血漿を Cohn エタノール法で分画した沈殿画分 Fra.(+) 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が、ゲノム RNA は依然存在することが明らかとなった。

今年度は、この 17%エタノール分画による各画分の HCV の性状を知るため、Cohn エ

タノール血漿分画法の最終段階であるグロブリン製剤製造法と同様に、20%エタノールによる沈殿 P (+) w 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 (17%エタノール処理) で分画を行い、P (+) w 画分以降の HCV の感染性、ウイルスゲノム RNA、及び HCV 構造タンパク質であるコアタンパク質がどの画分に移行するかを調べた。

B. 研究方法

1 . Cohn エタノール分画法による血漿の分画

血漿からコーンエタノール分画法(平成 27 年度 当研究報告書参照)により、沈殿 P (II+III) w 画分を準備し、ここに HCV JFH-1 am をスパイクし、-5 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、15 分間反応させた (②)。エタノール処理後の溶液を-1 、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 (P III : ③) と上清 (S : ④) とに分画した。

2 . シヨ糖密度勾配遠心法

分画した各画分 (②、③、及び④) 1mL をシヨ糖勾配 (5-50% w/v) を作製した 11mL 緩衝液 (50mM TrisHCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1mMEDTA) の上に載せ、14300xg, 16h, 4 で遠心し (rotor: sw41Ti, Beckman)、遠心チューブの底から 700μl ずつ分画した。各画分 100μl の重量を測定することにより、各画分の比重を求めた。

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 turbo 10k ; Sartorius 社) を用いて濃縮することにより、感染価の高い (TCID₅₀ 5.6x10⁶/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、それぞれの体積を積算し、総ウイルス量 TCID₅₀ で示した。

4 . JFH-1am ウイルス 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、QuiantiTech Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用い、BVDV RNA については one step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Qiagen)

を用いて定量 RT-PCR を行った。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 IU/fraction で表した。

5 . HCV コアタンパク質の検出

シヨ糖勾配遠心後の各分画に含まれる HCV コアタンパク質の検出は western blotting 法を用いた。各画分 30 μ l を用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写し、1 抗体：コア蛋白質に対するモノクロナール抗体（前述）と、2 次抗体：HRP を結合させたヤギ抗マウスモノクロナール抗体（#170-5047, BioRad, CA）、及び SuperSignal West Femto (#34094, Thermo Scientific, Tokyo)による発光により検出した。

（倫理面への配慮）

HCV JFH-1am 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 . HCV RNA の分布

i) 遠心前の 17%エタノール画分 (22) ; 図 1 参照) 中の HCV JFH-1am の RNA は、fraction No.6 (F6, 密度：約 1.11g/ml) を 1 つのピークとして持つ分布を示した (図 2)、

ii) 遠心後の沈殿画分中の HCV RNA は、F6 (密度：約 1.13 g/ml) を 1 つのピークとして持つ分布を示した (図 3)、

iii) 遠心後の上清画分 (24) 中の HCV RNA は、F9 (密度：約 1.08 g/ml) を 1 つのピークとして持つ分布を示した (図 4)、

iv) 遠心前の 17%エタノール画分 (22) には約 7×10^9 IU/fraction の HCV RNA が存在し、遠心により、約 7×10^9 IU/fraction の RNA は沈殿画分に移行した。遠心後の上清画分 (24) には、少ないながらも約 7×10^6 IU/fraction の HCV RNA が含まれることが明らかとなった。

v) 各画分の RNA のピークの密度は、遠心前の 17%エタノール画分 (22) では、約 1.11 g/ml で、遠心後の沈殿画分 (23) では、約 1.13 g/ml となり、遠心前の画分の比重から約 0.02 g/ml 重い方へシフトしている。また、遠心後の上清画分 (24) では、約 1.09 g/ml となり、遠心前の画分 (22) より、約 0.02 g/ml 軽い方へ比重がシフトしている (図 5)、

2 . HCV の感染性の分布

i) 遠心前の 17%エタノール画分 (22) 中の HCV JFH-1am の感染性には 3 つのピークを取る分布で、それぞれのピークは F7 (密度：約 1.10 g/ml)、F11, 12 (約 1.05 g/ml)、及び F14, 16 (約 1.00 g/ml) であった。

ii) 遠心後の沈殿画分 (23) 中の HCV の感染性は、同じく 3 つのピークを取る分布で、それぞれのピークは F5 (密度：約 1.14 g/ml)、F8 (約 1.10 g/ml)、及び F15 (約 1.04 g/ml) で

あった。

iii) 遠心後の上清画分 (④) 中の HCV の感染性は検出されなかった。

iv) 遠心前の 17%エタノール画分 (②) には約 1×10^4 IU/fraction の感染性 HCV が存在し、遠心により、約 1×10^4 IU/fraction の RNA は、沈殿画分に移行した。遠心後の上清画分 (④) には感染性は検出されなかった。

v) 17%エタノール処理前の画分 (②) の 3 つの感染性のピーク (密度が約 1.00, 1.05, 及び 1.10 g/ml) は、遠心後の沈殿画分 (③) の 3 つのピーク (密度が約 1.04, 1.10, 及び 1.14 g/ml) に移行し、いずれの場合も密度約 0.04-0.05 g/ml の重い方へのシフトとなっている (図 6)。

3. HCV のコアタンパク質の分布

i) 遠心前の 17%エタノール分画 (②) 中のコアタンパク質は、F10 (約 1.05 g/ml), と F15-16 (約 1.00 g/ml) の 2 つのピークをもつ分布を示した。

ii) 遠心後の沈殿画分 (③) 中のコアタンパク質は、F5 (約 1.14 g/ml), F8 (約 1.10 g/ml), F15-16 (約 1.00 g/ml) の 2 つのピークをもつ分布を示した。

iii) 遠心後の上清画分 (④) 中のコアタンパク質は、F15 (約 1.00 g/ml) に 1 つのピークをもつ分布を示した。

iv) 各画分のコアタンパク質のピークの比重は、遠心前の 17%エタノール画分 (②) では、約 1.00, 及び 1.05 g/ml で、遠心後の沈殿画分 (③) では、約 1.04, 及び 1.10 g/ml

となり、遠心前の画分の比重から約 0.04-0.05 g/ml 重い方へシフトしている。また、遠心後の上清画分 (④) では、約 1.00 g/ml のみとなり、遠心前の画分 (②) に存在した約 1.05 g/ml のピークが消失したか、或いは、遠心前の約 1.05 g/ml のピークが遠心後の約 1.00 g/ml にシフトし、遠心前の約 1.00 のピークが消失したと考えられる (図 2, 3, 4 の各ウエスタンの図参照)。

D. 考察

1. これまでに報告があるように、HCV RNA のピークと、感染性のピークとは一致しなかった。このことはウイルス RNA は、ウイルス粒子の密度には影響を及ぼさないことを示唆しているのかも分からない。

2. Cohn エタノール分画法で、17%エタノール処理で、HCV は 3 つの密度 (1.00, 1.05, 及び 1.10 g/ml) を持つ感染性粒子が存在することを示唆する結果を得た。

3. 17%エタノール処理後、遠心することにより、沈殿画分に分画された感染性ウイルス粒子は、感染前の 3 つのピークを保ったまま、遠心前よりも感染性で密度が約 0.04g/ml, RNA のピークでは約 0.02g/ml 重くなることが明らかとなった。これは 17%エタノール処理により、HCV 粒子を形成しているエンベロープ蛋白質 E1, E2、或いは宿主由来の脂質に何らかの構造の変化を引き起こさせ、その結果、粒子の密度がより高くなったためかも知れない。

一方、この遠心により得られる上清画分は、

感染性がなく（或いは検出限界以下）RNAのピークは、遠心前よりも約 0.02 g/ml 軽くなった。このことは、上清の軽くなった画分には、HCV RNA とウイルスのコアタンパク質がもはや粒子を形成しておらず、ばらばらになったためと考えられる。このことは、17%エタノール処理後の上清画分には、より密度の高い（約 1.04~1.05, 及び 1.10g/ml）コアタンパク質が消失していることから示唆される（図4参照）。

今後、Cohn エタノール法で、17%エタノール処理による HCV の性状の変化を明らかにするためには、宿主の脂質を含めた、HCV エンベロープ蛋白質 E1, E2 の解析が必要と考えられる。

E. 結論

Cohn エタノール法において、血漿中に混入した HCV が、17%エタノール処理により沈殿画分に移行するのは、この処理により、感染性 HCV の密度が高くなり、沈殿画分に分画されるためであると考えられる。

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

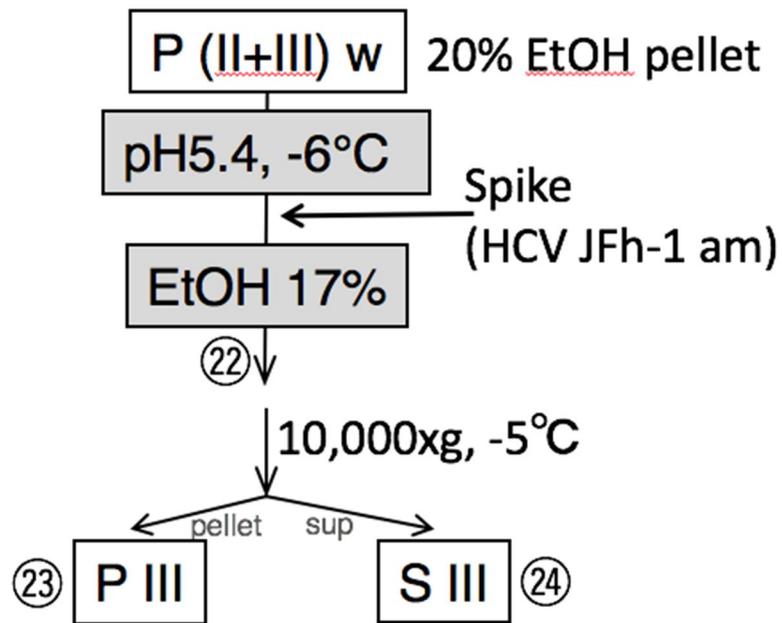


図 1 . 血漿の Cohn エタノール分画法 (P (II+III) w フラクシオンに HCV を spike した)

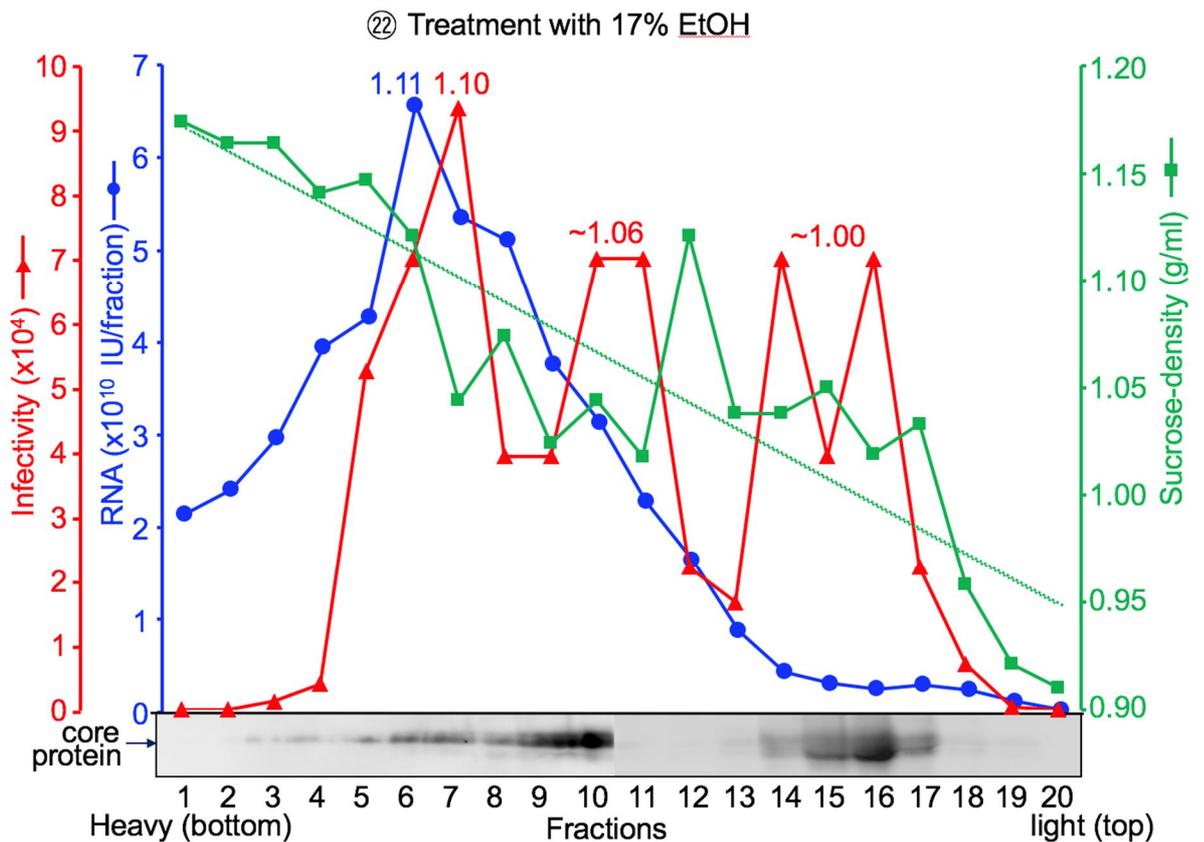


図 2 . ②のシヨ糖密度勾配 (5-50%) による分画

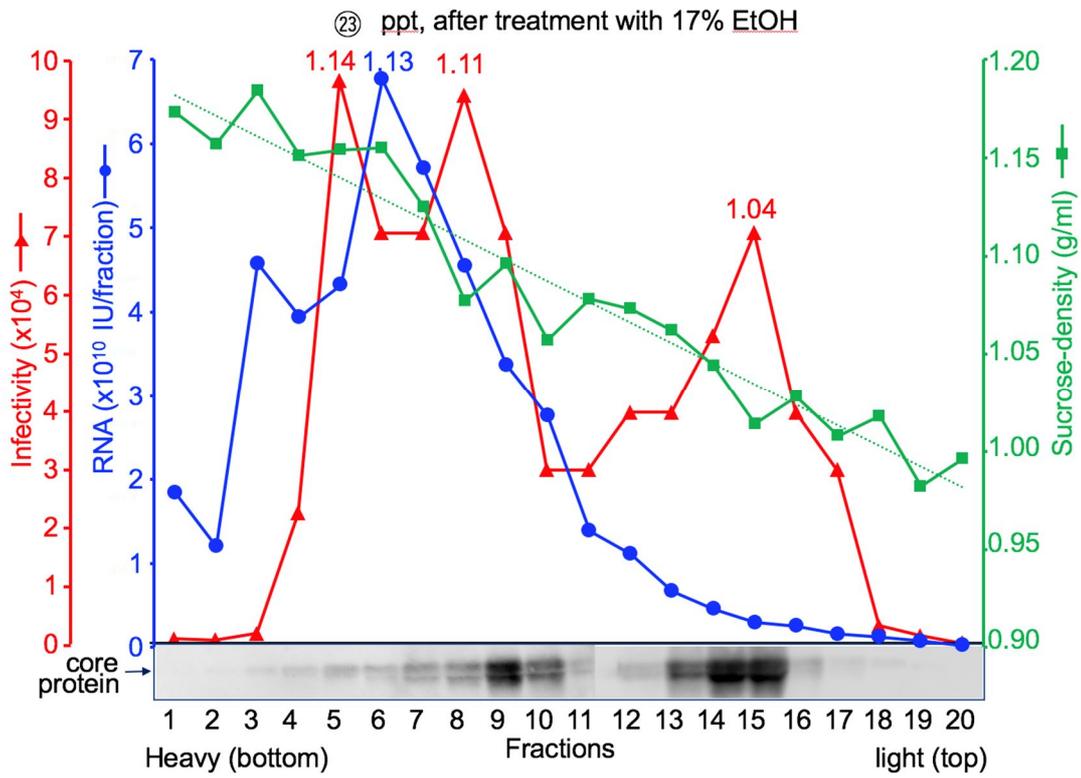


図 3. ⑳のシヨ糖密度勾配 (5-50%) による分画

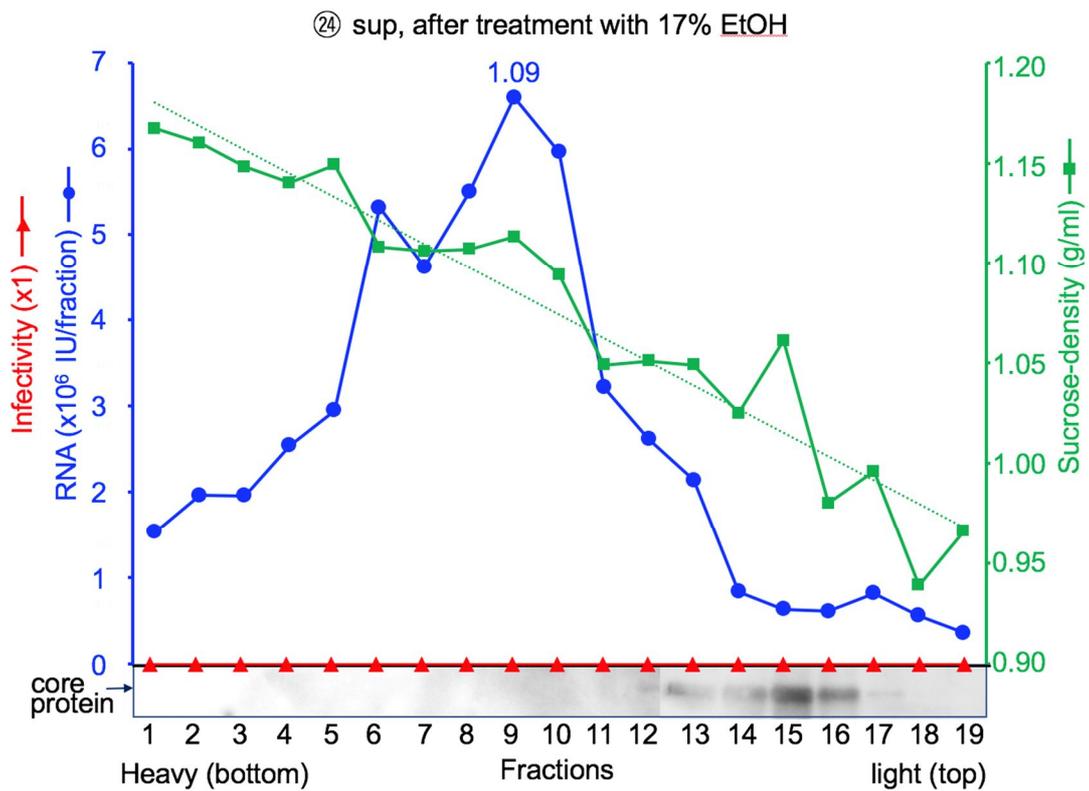


図 4. ㉑のシヨ糖密度勾配 (5-50%) による分画

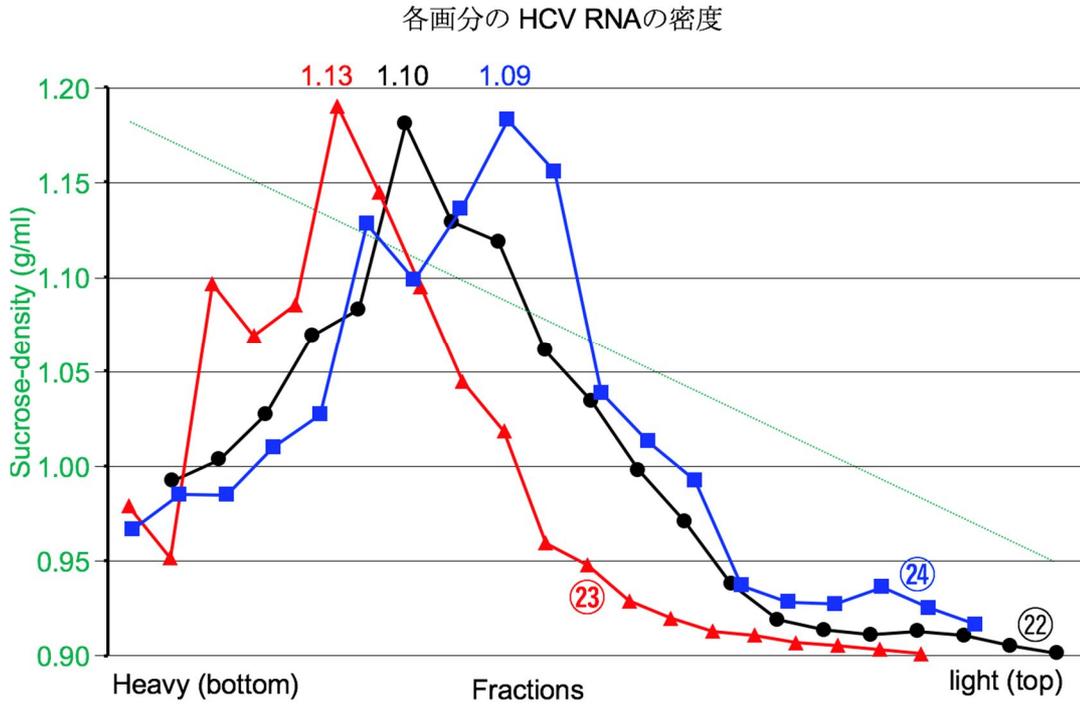


図 5. ②、③、④のショ糖密度勾配 (5-50%) による分画による HCV RNA の分布の比較

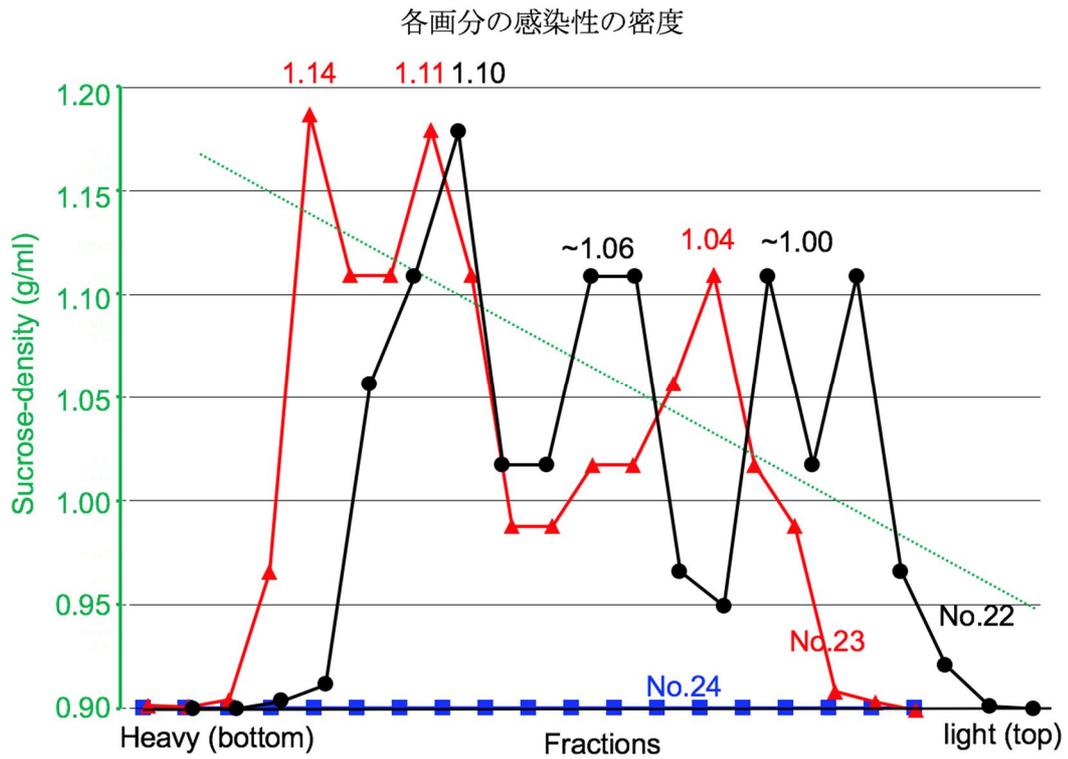


図 6. ②、③、④のショ糖密度勾配 (5-50%) による分画による HCV の感染性の分布の比較

厚生労働科学研究補助費（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

分担する研究項目：『E型肝炎ウイルスの不活化に関する研究 - エタノール前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

協力研究者 前野英毅、高橋一恵、井手野祥次、足立美保子、宇野滝子、服部眞次
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）あるいは培養上清由来の HEV は、糞便由来の HEV とは異なり、宿主由来の脂質膜が結合していると報告されている。血漿由来や培養上清由来の HEV を有機溶媒や胆汁酸に含まれるデオキシコール酸ナトリウム（NaDOCA）で処理すると、浮上密度が高い方へ移行するため、これらの処理により脂質膜が解離しているのではないかと考えられている¹⁾。

今年度は、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（脂質膜の有無）どのような挙動を示すのか正しく把握するためにエタノール濃度 40%（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）あるいは 25%エタノールで前処理した血漿由来 HEV の浮上密度の変化（脂質膜の解離）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、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 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%）。以上のことから、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、評価用の高力価の HEV を得るためにリバースジェネテクスを用いて HEV を安定的に産生する細胞株の樹立し、HEV 遺伝子（mRNA 型）を直接導入することにより、約 10⁸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。

A. 研究目的

血漿由来 HEV あるいは培養上清由来 HEV には宿主由来の脂質膜が結合していると報告されており、これらの HEV を界面活性剤処理すると浮上密度が高くなる¹⁾。また、同様の処理をすることで抗体の結合性が高くなることから、血漿由来 HEV あるいは培養上清由来 HEV から脂質膜が解離すると考えられている¹⁾。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、上清と沈殿への分配比率に関して、血漿由来 HEV とブタ糞便由来 HEV の間に差がみられる特徴ある工程である（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 処理した血漿由来 HEV や 1%NaDOCA 処理した血漿由来 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濃度の分画工程が含まれるが、これらの工程におけるエタノールによって血漿由来 HEV の脂質膜が解離し、HEV の分配パターンに影響を受ける可能性が考えられる。本試験は、エタノール濃度 25%および 40%（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 の浮上密度が変化するのか、また、分画 II+III での分配パターンが変化するのか検証することを目的とした。

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

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（970 × g、10 分）その上清を超遠心分離した（150,000 × g、3 時間、25 °C）。沈殿を超遠心分離前の液量と等量の DPBS

で懸濁したものを精製 HEV とした。精製 HEV にエタノールを最終濃度 25%あるいは 40%として -6 で静置した(25%エタノール前処理 21 時間、40%エタノール前処理 2 時間)。一方、対照としてエタノールの代わりに注射用水を加え、4 で 2 時間静置したものを非処理の血漿由来 HEV とした。なお、これらの前処理を 2 ロットのヒト血漿で実施した。

(2) 密度勾配遠心による HEV の浮上密度分析

遠心チューブに 8~50 w/v % の OptiPrep (AXIS-SHIELD) 密度勾配 (TEN Buffer : TE buffer (pH7.4) /150mM NaCl) を作製した。エタノール前処理血漿由来 HEV、非処理血漿由来 HEV、あるいはブタ糞便由来 HEV を密度勾配に重層した。120,000 × g, 4 で 18 時間超遠心分離を行った後、140~500 μL 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上密度 (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

エタノール分画 II+III のスタート材料である上清 I に、25%あるいは 40%エタノール前処理した血漿由来 HEV、もしくは非処理の血漿由来 HEV をそれぞれ 1/10 量添加し、ロードサンプルを採取した。規定量の 95%エタノールを添加し、酢酸バッファで pH を 6.0~7.0 とした。-6~-7 で 1 時間静置し、3,000 × g, -7 で 30 分遠心分離後、上清を回収した。沈殿は分画前の液量と等量の 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。

(5) リバースジェネティクスによる HEV 産生

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 ゲノムを後述の方法で定量した。

(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 の浮上密度の比較

非処理の血漿由来 HEV (血漿 B) の浮上密度のピークは、1.104g/mL であった。25%エタノール前処理をすると浮上密度は 1.111 g/mL となり、40%エタノール前処理で 1.128 g/mL までシフトした。非処理のブタ糞便由来 HEV の浮上密度は、1.244 g/mL であり、血漿由来 HEV の 40%エタノール前処理では、ブタ糞便の浮上密度まで高くないことが確認できた (図 1)。なお、血漿由来 HEV の 40%エタノール前処理による浮上密度のシフトは他の HEV 陽性血漿 (血漿 A) でも見られ、血漿由来 HEV に共通して起こる事象であろうと推測できた (Data not shown)。また、ブタ糞便由来 HEV を 40%エタノール前処理しても浮上密度に変化がなかった (Data not shown)。なお、Yin らは、トランスフェクション後の培養上清中の HEV の密度は 1.10g/mL、糞便由来 HEV の密度は 1.25g/mL 程度と報告しており³⁾、本試験の結果と同様であった。

(2) エタノール分画 II+III における HEV の分配

2 ロットの HEV 陽性血漿 (血漿 A、血漿 B) について、エタノール分画 II+III における分配パターンを検証した。非処理の血漿由来 HEV は上清に 84% (血漿 A) あるいは 95% (血漿 B) 分配された (図 2 (A))。25%エタノール前処理は、血漿 B についてのみ実施した。94%が上清に分配され、非処理と同様であった。一方、40%エタノール前処理した血漿由来 HEV は、逆に沈殿側に多く分配された (血漿 A 84%、血漿 B 59%)。40%エタノール前処理により、沈殿へ分配された現象は一般的であることが推測できた。

(3) リバースジェネティクスによる HEV の産生

ヒト樹立肝細胞 PLC/PRF/5 樹立細胞系に HEV 遺伝子 (mRNA 型) を直接導入することにより、約 10⁸ 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。

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、非処理の血漿由来 HEV は上清により多く分配される再現性が認められた (図 2 (B))。また、40%エタノール前処理した血漿由来 HEV の分画 II+III における分配は、SD (1%Tween80/0.3%TNBP,

30 , 6 時間) 処理と同等であった。一方、1%NaDOCA 処理した血漿由来 HEV、モデルウイルスである脳筋炎ウイルス (EMC) (ノンエンベロープ、RNA ウイルス) は、40%エタノール前処理した血漿由来 HEV や SD 処理した血漿由来 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。

アルブミンは分画 II+III の上清画分から精製されるが、この工程はウイルス除去効果が認められる工程である。一方、免疫グロブリンはこの工程の沈殿画分から精製され、ウイルス除去効果が低い工程である。したがって、分画 II+III における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%エタノール前処理した血漿由来 HEV、および SD 処理した血漿由来 HEV は、いずれも LRV が 1Log_{10} 以下と、除去効果が見られなかった。一方、1%NaDOCA 処理した血漿由来 HEV、EMC は、 $2\sim 3\text{Log}_{10}$ のウイルス除去効果が認められた。したがって、分画 II+III による血漿由来 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。

(2) エタノ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。血漿由来 HEV の脂質膜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 が脂質膜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 (脂質膜が結合した HEV) を用いることになるだろう。一方、脂質膜が上流工程で失われている工程では、エタノールや SD 処理した血漿由来 HEV、ブタ糞便由来 HEV などが候補となるだろう。これらのウイルスが、各工程の HEV に対する安全性評価においてどのくらい妥当であるかについて更に検討する予定である。

(3) リバースジェネティクスによる HEV の産生

リバースジェネティクスによる、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。今後、リバースジェネティクスで作製した HEV についても浮上密度と分画 II+III の挙動を明らかにして、ウイルスクリアランス試験に応用可能か検証する予定である。

E. 結論

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 1.128g/mL ヘシフトした。ブタ糞便由来 HEV の浮上密度は 1.244g/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%)。以上のことから、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。さらに遺伝子操作手法により高感染価で工程応用可能な HEV を安定して供給できる可能性を見出した。

(引用文献)

- 1) Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuno H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E Virus (HEV) Strains in Serum Samples Can Replicate Efficiently in Cultured Cells Despite the Coexistence of HEV Antibodies: Characterization of HEV Virions in Blood Circulation. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48:1112-25.
 - 2) Jothikumar N, Cromeans T, Robertson B, Meng X, Hill V. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Meth.* 2006;131:65-71.
 - 3) Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Freg Z. Distinct Entry Mechanisms for Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J. Virol.* 2016; 90(8):4232-42.
- ## F. 研究発表
1. 論文発表
 - 1) Minagi T, Okamoto H, Ikegawa M, Ideno S, Takahashi K, Sakai K, Hagiwara K, Yunoki M, Wakisaka A. Hepatitis E virus in donor plasma collected in Japan. *Vox Sang.* 2016; 111(3):242-246.
 - 2) Yunoki M, Tanaka H, Takahashi K, Urayama T, Hattori S, Ideno S, Furuki R, Sakai K, Hagiwara K, Ikuta K. Hepatitis E virus derived from different sources exhibits different behaviour in virus inactivation and/or removal studies with plasma derivatives. *Biologicals.* 2016; 44(5):403-11.

- 3) Urayama T, Takahashi K, Ideno S, Yunoki M, Saito M, Numakura K, Inoue T, Satoh S, Sakai K. BK polyomavirus neutralizing activity of intravenous immunoglobulin products derived from donated blood in Japan. ISBT Science Series. 2016; 11:146–152.
- 4) Yunoki M, Kurosu T, Koketsu KR, Takahashi K, Okuno Y, Ikuta K. Neutralizing activities of human immunoglobulin derived from donors in Japan against mosquito-borne flaviviruses, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, and dengue virus. Biologics: Targets and Therapy. 2016; 10: 99-102.
- 5) Onodera H, Urayama T, Hirota K, Maeda K, Koketsu RK, Takahashi K, Hagiwara K, Okuno Y, Ikuta K, Yunoki M. Neutralizing activities against seasonal influenza viruses in human intravenous immunoglobulin. Biologics: Targets and Therapy. 2017; E-Pub ahead.

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

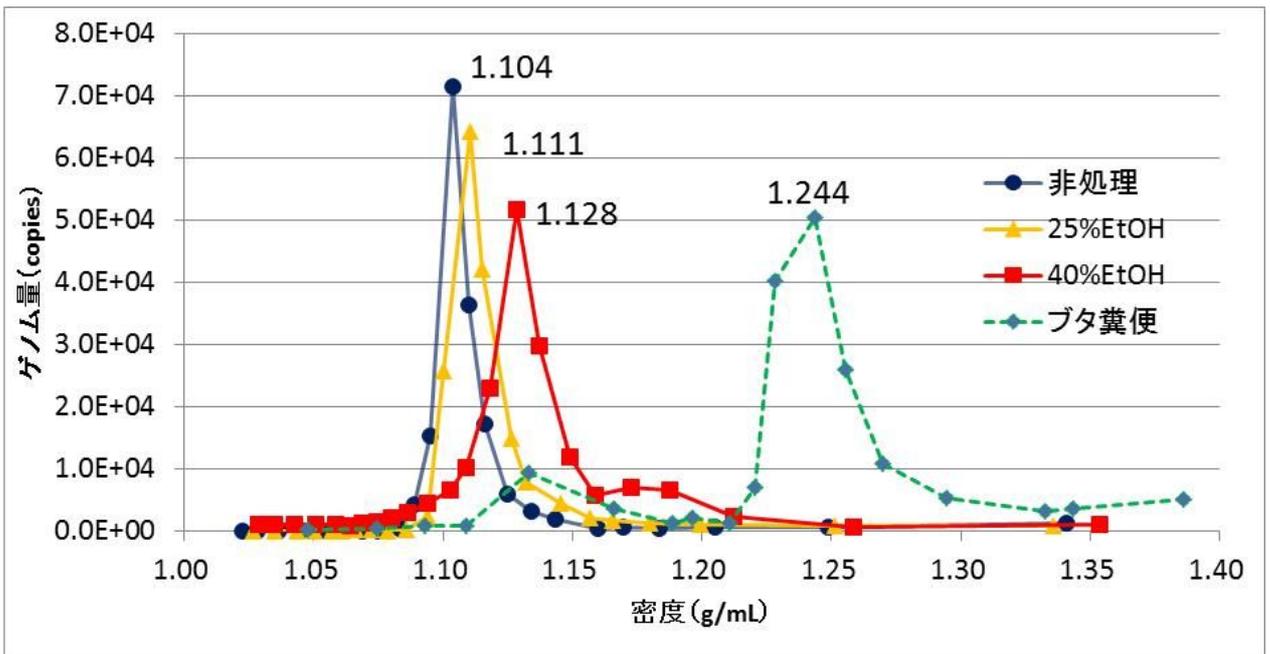
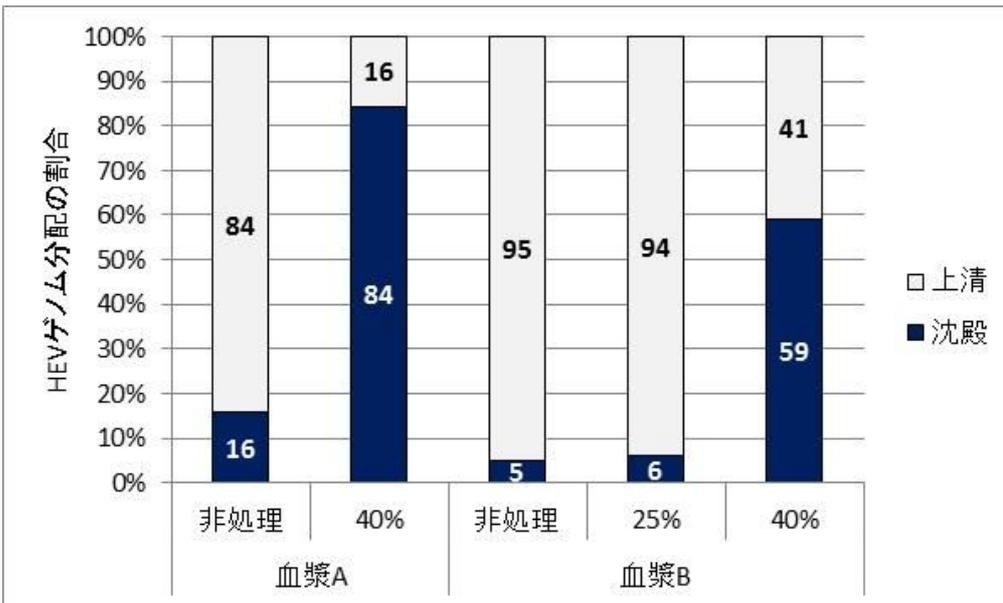


図1 OptiPrep 密度勾配遠心による HEV の浮上密度解析結果

(A) 本試験結果



(B) 過去の自社データ

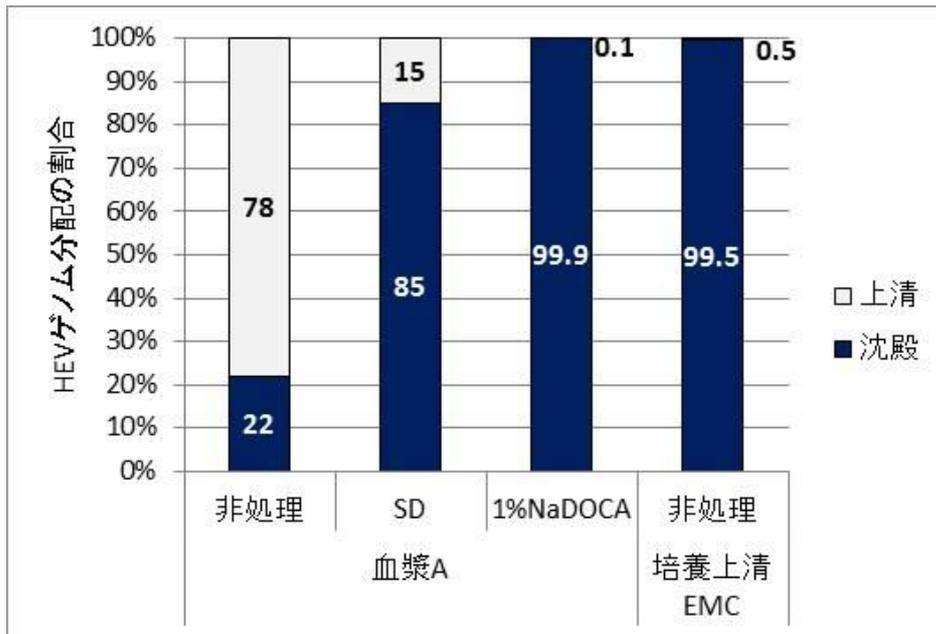


図2 エタノール分画 II+III における HEV ゲノムの分配割合

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 医学部 准教授)

研究要旨

赤血球製剤の病原体不活化法として化学物質と可視光の照射を組み合わせることで新しい不活化法を検討してきたが、不活化法だけでは限界があることから今年度は除去法の検討を行った。ウイルスが一般的に陰性荷電していることから陽性荷電のビーズを用いて除去効果を検討した。4時間の吸着で感染価は僅か 1/10 に低下しただけだった。しかもウイルス種によっては、全く除去効果を確認できなかった。pH 等の至適条件を探求する必要がある。

また、不活化法評価のために高感染価のウイルス液を調整する必要があるため、10mL 以上の培養液から簡単に感染性ウイルスを濃縮する方法を検討し、20～100 倍濃縮することができた。

A. 研究目的

輸血用血液は、スクリーニング検査の進歩によって感染症の発生頻度は激減したが、全ての病原体をスクリーニングすることは困難である。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と考えられる。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

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ってきたが、全ての病原体を均等に不活化できるわけではない。そこで不活化法の限界を打ち破るために病原体を除去する方法を今年

度は検討した。また、デングウイルスやチクングニアウイルスの様に血漿中にウイルス量が高いウイルスに対して不活化法の効果を検討する場合、評価に用いるウイルスの感染価も高い必要がある。超遠心による濃縮が一般的だが、操作によって感染価が失われることもある。そこで今年度は、市販されている試薬と低速遠心機を用いて 10mL 以上の培養液から感染性ウイルスを濃縮できる方法を検討した。

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、仮性狂犬病ウイルス (PRV) は CRFK 細胞、牛下痢症ウイルス (BVDV) は MDBK 細胞をそれぞれ用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに

1 X10⁴/well 蒔いた。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 μL ずつ Vero 細胞に感染させた。シンドビスウイルスと PRV は感染5日後、BVDV は7日後にそれぞれ 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。

2. ウイルスの除去

試験的に市販されている陽性荷電のビーズとして Positive charge microcarrier (コーニング) を用いた。生食又は PBS にシンドビスウイルスと PRV をそれぞれ添加し、3 mL にビーズ 100mg (約 51cm² 相当) を加え緩やかに撈拌しながら 1、2、4 時間ウイルスを吸着させた。

3. 培養液からのウイルス濃縮

市販の exosome 精製試薬 (タカラ) を用いてウイルス培養液 10mL に説明書に従って 4mL の試薬を加え、一晚反応させた。3200G で 30 分遠心し、上清を取り除いてから更に 5 分遠心し培養液を除いた。沈殿は、約 70 μL の生食に溶解し、濃縮液とした。

C. 研究結果

1. ウイルスの除去

シンドビスウイルスは、生食、PBS 共に 4 時間後もウイルス力価に全く減少は認められなかった。PRV は、生食と PBS 共に 4 時間吸着させることによって感染価が約 1/10 に減少した。

3. 培養液からのウイルス濃縮

3 種のウイルス培養液 10mL を 100 μL に濃縮することができた。感染価は 20~150 倍に増加した (図 1)。

D. 考察

我々が検討してきた化学物質に可視光を照射する方法は、活性化酸素を介して病原体を不活化する機序であるために赤血球内のヘモグロビンが酸化される欠点がある。そのため酸化されたヘモグロビンを還元するような方法が必要である。その一方で、不活化単独では様々な病原体を不活化することに限界があり、不活化に抵抗性を示す病原体も存在する。更に新たな化学処理を行えば、肝心の赤血球が傷つき使用できなくなる恐れもある。そこで別の機序による病原体処理法を考案する必要がある。我々は、血漿分画製剤と同様に病原体の除去法を考えた。一般にウイルスは陰性に荷電していることから除去が容易な物質でできた陽性荷電のものと反応させれば、ウイルスとその物質が結合し除去できると想像した。市販の陽性荷電ビーズは、100mg で 51cm² と広い表面積を有することから効果的な除去ができると期待したが、僅か 1/10 に減少しただけであった。今回は pH7 の条件であったが、効果的な吸着条件を求める必要がある。

ウイルスの除去効率の評価に必要な高感染価のウイルス液の調整は、超遠心によることが多かったが、ウイルスによっては感染性が低下することもあり、簡便な方法が望まれていた。小我々が使用した試薬は本来の目的とは異なる簡便に感染性を有したまま濃縮できる方法である。

E. 結論

赤血球製剤の安全性向上のために病原体の不活化法だけでなく除去法も検討した。ウイルスの多くが陰性に荷電していることから陽性荷電のビーズを用いた方法を検討したが有効

ではなかった。また、市販されている exosome 精製試薬を用いることで高感染価なウイルスを調整することができた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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

図1 高感染価ウイルス液の調整

Virus		Pre	Post
Sindbis	Exp.1	3.2×10^8	6.2×10^9
	Exp.2	1.0×10^8	1.5×10^{10}
PRV	Exp.1	1.0×10^8	1.5×10^{10}
	Exp.2	2.4×10^8	2.4×10^{10}
BVDV	Exp.1	3.2×10^6	3.7×10^8
	Exp.2	1.2×10^7	2.1×10^8

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
Kiyoko Nojima, Kazu Okumaa, Masaki Ochiai, Madoka Kuramitsu, Kenta Tezuka, Mieko Ishii, Sadao Ueda, Takashi Miyamoto, Koichiro , Kamimura, Enki Koue, Sanae Uchida, Yoshiharu Watanabe, Yoshia ki Okada, Isao Hamaguchi	Establishment of a reference material for standardization of the anti-hepatitis E virus (anti-HEV) enzyme immunoassay test in intravenous immunoglobulin products used in Japan: A collaborative study.	Biologicals	Vol.46	68-73	2017
Minagi T, Okamoto H, Ikegawa M, Ideno S, Takahashi K, Sakai K, Hagiwara K, Yunoki M, Wakisaka A.	Hepatitis E virus in donor plasma collected in Japan.	Vox Sang.	Vol 111(3)	242-246	2016
Yunoki M, Tanaka H, Takahashi K, Urayama T, Hattori S, Ideno S, Furuki R, Sakai K, Hagiwara K, Ikuta K.	Hepatitis E virus derived from different sources exhibits different behaviour in virus inactivation and/or removal studies with plasma derivatives.	Biologicals	44(5)	403-411	2016

Urayama T, Takahashi K, Ideno S, Yunoki M, Saito M, Numakura K, Inoue T, Satoh S, Saokai K.	BK polyomavirus neutralizing activity of intravenous immunoglobulin products derived from donated blood in Japan.	ISBT Science Series.	Vol.11	146-152	2016
Yunoki M, Kurusu T, Koketsu KR, Takahashi K, Okuno Y, Ikuta K.	Neutralizing activities of human immunoglobulin derived from donors in Japan against mosquito-borne flaviviruses, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, and dengue virus.	Biologics: Targets and Therapy	Vol.10	99-102	2016
Onodera H, Urayama T, Hirotsu K, Maeda K, Koketsu RK, Takahashi K, Hagiwara K, Okuno Y, Ikuta K, Yunoki M.	Neutralizing activities against seasonal influenza viruses in human intravenous immunoglobulin.	2) Biologics: Targets and Therapy.		E-Pub ahead.	2017

