

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～28 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成29 (2017) 年3月

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～28 年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

平成29 (2017) 年3月

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

総合研究報告書

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) グロブリン製剤による HCV 感染は日本では報告例がないが、グロブリン製剤に使用する 20%エタノールでは不活化されなかったことが判明した。しかし、その後の凝集物を取り除く工程である 17%のエタノール処理によって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。これらの結果は、HCV のモデルウイルスである牛下痢症ウイルスと同様であり、HCV のモデルウイルスとして牛下痢症ウイルスは、適していることが実験的に示すことができた。

さらに処理前後の HCV の性状について詳細に解析したところ、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、主に感染性を有する HCV は高密度であり、廃棄される分画の方に分画された。一方、グロブリン製剤となる分画は感染性が検出感度以下であり、HCV そのものが 3Log 除去され、性状も低密度の HCV が存在していた。この結果から 17%エタノール処理はグロブリン製剤の HCV 感染を未然に防止していたと考えられた。

2) HEV の研究では、血漿由来の HEV を界面活性剤、デオキシコール酸、20%及び 40%エタノール処理した後に 25%エタノール分画を行い、その挙動をエンベロップを持たないウイルスと比較した。界面活性剤、デオキシコール酸、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。分画 II+III において非処理または 25%エタノール前処理の血漿由来 HEV は、上清に 84~95%分配されたが、界面活性剤や 40%エタノール前処理では沈殿により多く分配された。処理条件によってアルコール分画での挙動が影響を受けることを実験的に明らかにした。さらに不活化法や除去法に必要な高い感染価を有する HEV 陽性血漿を充分量得ることは困難であることからリバーシジェネティクス法を用いて、肝がん細胞株に全長の HEV-RNA を遺伝子導入することで高いウイルス液を得ることができた。安定して高感染価の HEV を産生する細胞株の樹立できる可能性が見いだされた。

3) 赤血球の病原体不活化法の開発では、細胞膜の透過性が高いメチレンブルーの誘導体は、高い不活化効果を発揮したが、ウイルス種によっては抵抗性を示した。赤血球製剤の安全性確保のために病原体の除去法を検討した。一般的にウイルスは、陰性に荷電していることから陽性に荷電している物質を添加すればウイルスを吸着できるものと考えた。表面積の大きい陽性荷電ビーズを添加して血液中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。また、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や輸血用血液の病原体の不活化・除去法の評価には、動物由来の性状や分類が類似し、培養も容易なウイルスがモデルウイルスとして用いられてきた。特に、B型肝炎ウイルスやC型肝炎ウイルスなど培養が困難なウイルスはモデルウイルスを用いた評価が実施されてきた。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。実ウイルスが、同じように不活化・除去法されているのか確認する方法がなかったためである。最近、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。実ウイルスとモデルウイルスを用いて種々の不活化・除去法を検討し、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討する必要がある。

最近、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可能性が指摘されている。そのため、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あり、血漿分画製剤で用いられているCohn分画法による分画での挙動が異なっている可能性がある。血漿分画製剤の安全性確保のために実際の血漿由来のHEVと糞便由来のHEVを用いてアルコール分画を実施してその挙動を比較検討する必要がある。また、適切な不活化・除去の評価のために高感染価を有するHEVを確保することは重要である。一般的に血漿中に存在する

HEVのウイルス量が少ないことから高感染価ウイルスを産生する細胞株の樹立も必要である。

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、効果的な不活化法と共に不活化法に上乗せできるような方法として除去法の検討も行なった。

また、ウイルスの不活化・除去法の評価は、感染性の減少を指標に評価されることから高感染価を有するウイルス液の調整が必要である。超遠心法では、感染性

が減少するウイルスもいることから簡便なウイルス濃縮法も検討した。

B. 研究方法と結果

1. Cohn エタノール分画法による C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

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。どのような機序で感染性の HCV が除去されるのか 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 の性状を解析した。20%エタノール分画 P (II+III) 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ョ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 (グ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。

また、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。

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）、デオキシコール酸、40%エタノール、25%エタノール等で処理し、エタノール分画（II+III）工程を実施した。コントロールとしてエンベロープを有さない脳心筋炎ウイルス（EMC）とイヌバルボウイルス（CPV）を用いた。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%）。これは、コントロールとして用いた EMC や CPV の挙動に類似していた。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 IIIjp (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

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°C 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 4 mm）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。MB 10 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。ウイルス種によっては、抵抗性を示すものも存在したことから不活化を補う方法として血液製剤からのウイルス除去を考えた。方法は、一般的にウイルスは陰性に荷電していることから市販されている陽性荷電のビーズ 100mg (約 51cm²相当) を添加して、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。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 減少しただけであった。

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 μL 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 のフラクション法によるグロブリン製剤の分画法に用いられる 20~25%エタノール処理では HCV は不活化されないことをこれまでに明らかにしてきた。過去のグロブリン製剤による HCV 感染が確認された製剤は世界で 2 製剤のためどのような機序で HCV の感染が防止できたのか、長い間大きな疑問であった。20~25%エタノール処理で沈殿した分画から凝集物を取り除く工程として 17%エタノール処理が実施されてきたが、この工程が HCV を除去するために非常に効果的であることを HCV を用い

て明らかにできた。この工程によってグロブリン製剤による HCV 感染は生じなかったと考えられた。また、HCV のモデルウイルスである牛下痢症ウイルスと同様な結果が得られたことは、牛下痢症ウイルスが HCV のモデルウイルスとして適したことを証明することになった。さらに HCV が除去される機序を 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障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 はプロブリン分画から除去された。HCV の性状を解析すると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 をリバースジェネティ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. メチレンブルーの誘導体は可視光と組み合わせることによってウイルスに対して高い不活化効果を発揮した。

4. 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。

5. 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

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

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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

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-complementary activity 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, Sakai 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, 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.	2) Biologics: Targets and Therapy.		E-Pub ahead.	2017