

## High Pressure Viral Inactivation and Its Application for Blood Preparations

# ウイルスの高圧不活化と血液製剤への利用

大竹 徹

Toru Otake

大阪府立公衆衛生研究所 ウイルス課  
 大阪市東成区中道1-3-69

Division of Virology, Osaka Prefectural Institute of Public Health  
 1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0026, Japan

### Summary

Attempts to inactivate viruses by high pressure treatment have recently attracted increasing attention. Although plant viruses, phages, influenza viruses and herpes viruses are inactivated under a high pressure of several hundred Mpa, it has been reported that polioviruses are not. We therefore here examined the effects of high pressure on HIV-1. While treatment with high hydrostatic pressure successfully inactivated the virus, sensitivity was found to differ with the viral strain, the required pressures ranging from 400 to 650 Mpa. In addition, we examined the effects of pressure generated in a pressure-tight container filled with

water by freezing (freeze pressure generation method, FPGM). As a result, it was revealed that many HIV strains were inactivated under a lower pressure of 200 to 250 Mpa than under high hydrostatic pressure, impairment of functions of viral envelop proteins and reduced reverse transcriptase activities being involved in the mechanism of viral inactivation by FPGM. To facilitate routine application of the high pressure viral inactivation method for detoxication of blood preparations, detailed investigations of the effects of high pressure on active ingredients, such as coagulation, are now necessary.

## 1. はじめに

数百MPa以上の高圧は種々の細菌を不活化する作用を持つことが古くから知られている。さらに高圧のウイルスへの影響を調べた研究も意外に古くからみられ、1930年代には植物ウイルスやファージが高圧により不活化されることが報告されている<sup>1)</sup>。1959年にはOvermanらが高圧によりインフルエンザウイルスの感染性が著しく低下すること<sup>2)</sup>、また1990年代に入りNakagamiらがヘルペスウイルス類が300~400MPaの高圧により完全に不活化することを報告している<sup>3)</sup>。また、Silvaらによって高圧によりウイルスが不活化されるだけでなくその抗原性が高まることが報告され<sup>4)</sup>、高圧のワクチン製造における有用性が示唆された。一方、非加熱の血液製剤の投与によりエイズウイルス (HIV) が感染したエイズ薬害、あ

るいは検査技術の進歩した現在でも献血時の検査をすり抜け、輸血時にB型肝炎やHIVの感染が起こっている例から分かるように、凝固因子など失活しやすい有効成分を損なうことなくウイルスを不活化する技術の発達が求められている。この総説では著者らが進めてきた高圧のHIVに及ぼす作用に関する研究を中心に、高圧による血液製剤無毒化の可能性について概観したいと思う。

## 2. 高圧による不活化とウイルスの構造との関連

いくつかのエンベロープを持ったウイルス、つまりインフルエンザウイルス<sup>5)</sup>、サイトメガロウイルス<sup>6)</sup>、水疱性口内炎ウイルス<sup>7)</sup>、ヒトヘルペス1型<sup>8)</sup>、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)<sup>5,9)</sup> などが高圧により不活化することが

知られており、エンベロープを持たないポリオウイルスが高圧による影響を受けない<sup>10)</sup>ことから、高圧によるウイルスの不活化にはエンベロープの障害が深く関与しているように思える。しかし、エンベロープを持たないタバコモザイクウイルスやある種のバクテリオファージも高圧によりその活性が減弱する<sup>11)</sup>ことから、エンベロープのみが高圧の標的ではなさそうである。さらにヘルペスウイルス類やHIVでは高圧処理によりエンベロープの構造や変化が見られるが、HIVでは後述するようにウイルス構造内部に持つ酵素（逆転写酵素）も高圧により大きな影響を受けることもあり、ウイルスの種類により高圧の作用点は異なるものと思われる。

### 3. HIVの増殖の様式

HIVへの高圧の影響を述べるにあたって、HIVの増殖の仕方について簡単に説明しておきたい。HIVが細胞に侵入するためには、まずHIVの表面にあるエンベロープ蛋白であるgp120が細胞表面に出ているCD4分子と結合することが必要である。さらに第2のレセプターであるCCR5（マクロファージ）、場合によってCXCR4（T細胞）との反応を経てgp120の構造変化が起こり、エンベロープのgp41が細胞膜に突き刺さることによりウイルスと細胞の融合がおこることが知られている。細胞質に侵入したHIVのRNA遺伝子はウイルスが持つ逆転写酵素によってDNAに変換され、さらにウイルスの持つインテグラーゼにより細胞核の宿主DNAの一部に組み込まれる。HIVが産生されるためにはこの組み込まれたHIV遺伝子が働き、HIVが作られ、細胞外へと放出される。

### 4. 高水圧によるHIV-1への影響<sup>5, 6)</sup>

HIV-1の実験室株を用い室温において高水圧による高圧処理を行った結果、処理時間10分では400MPa以上の圧力でウイルスの感染性は検出限界以下となり不活化された（図1）。また、より低い圧力である300MPaではHIV-1を完全に不活化させるのに200分を要した。250MPaでは感染性の低下はさらにゆるやかとなり1000分の高圧処理でのHIVの感染性は約1/300にまで低下した。さらに200MPaに圧力を下げると1000分の高圧処理

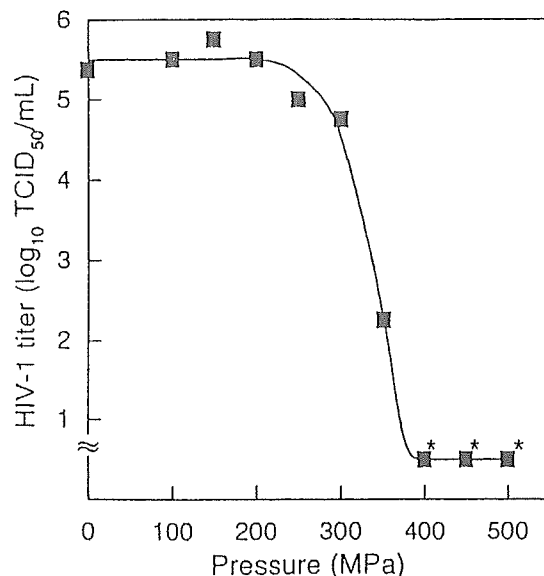


図1. 高圧のHIV-1実験室株の感染性に及ぼす影響  
★検出限界以下 (log TCID<sub>50</sub>/mL < 0.5)

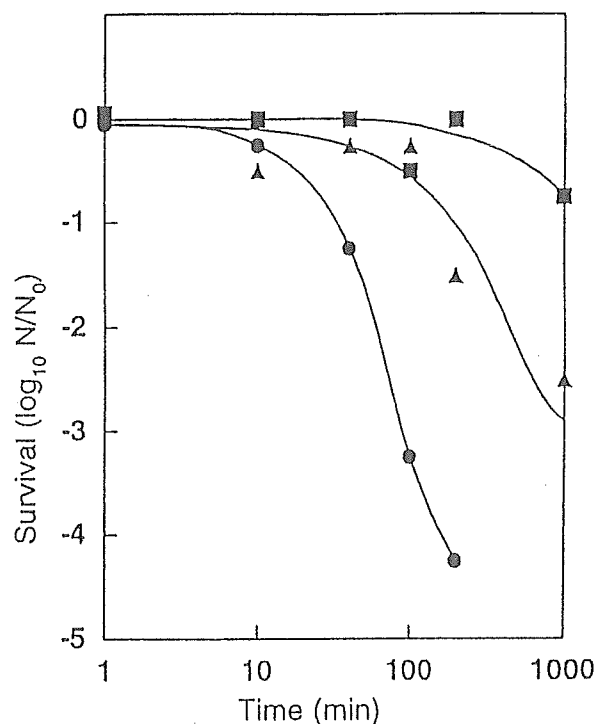


図2. 高圧のHIV-1実験室株の感染性に及ぼす影響  
■ 200MPa △ 250MPa ● 300MPa

においてもその感染性は約1/6に低下するにすぎなかった（図2）。

実験室株における結果から、高圧によるHIVへの影響が普遍的なものであるかどうかを確かめるためにHIV-1感染者のリンパ球を培養することにより取り出した臨床分離ウイルスについて高圧の影響を調べてみた。ところが興味深いことに、ウイルスの株間において高圧処理の

感受性に大きな差が見られたのである。図3に示すように、450MPaにて実験室株 (LAI株) は不活化されるのに対して、エイズ発症者および無症候のHIV感染者から分離された2種のウイルス (KK-1、KK-2) は550MPaにおいても完全には不活化されず、不活化にはおそらく650MPa以上の圧力が必要ではないかと推測された。この高圧に対するウイルス株間の感受性の違いがどこからくるのかを検討するために、ウイルスが細胞に侵入した後にウイルスの遺伝子RNAをDNAに変換する際に働く重要な酵素である逆転写酵素活性の測定を試みた。その結果、450MPaにて不活化される実験室株の逆転写酵素はこの圧力において不活化されたが、2種の臨床分離株の逆転写酵素活性はその活性を保っており、不活化されるためには600MPa以上の圧力が必要であろうと思われた。このように高圧によるHIVの感染性の低下はウイルスの増殖に重要な働きをする逆転写酵素活性の低下と深く関連しており、高圧による不活化の要因のひとつに逆転写酵素活性の低下が考えられた。

さらに形態学的にウイルスの変化を捉えるために、高圧処理したHIV-1を電子顕微鏡にて観察した。500MPa、10分間の処理はHIV (LAI株) のエンベロープ構造を断裂させ、またコア内容物を漏出させることが観察された。

これらのことから、高水圧によるHIVの不活化には逆転写活性の失活およびエンベロープ蛋白の変化が関与しているものと考えられた。

## 5. 凍結昇圧法の応用

コーラの瓶を急いで冷やそうと冷凍庫に入れて爆発させた経験を持つ方は少なからずおられると思う。瓶が割

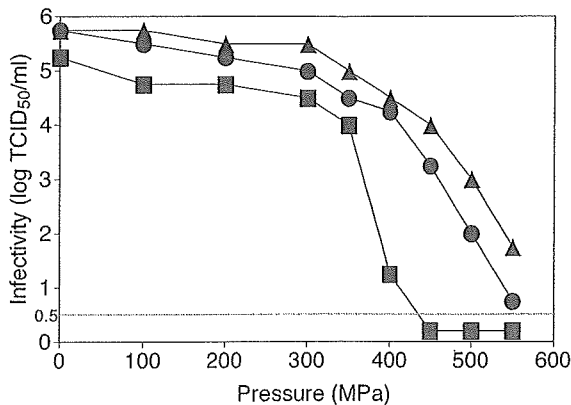


図3. 高圧の種々のHIV-1株の感染性に及ぼす影響 (■) 実験室株 (LAI株) (●) 臨床分離株 (KK-1株) (▲) 臨床分離株 (KK-2株)

れるのは内部の水が凍る時に体積が膨張するからである。もし丈夫な容器で水を凍らせたとしたら数千気圧 (数百MPa) の超高圧の発生が予測されるが、この圧力を微生物の不活化に応用する試みが早川らによってなされている。まず250MPa以上の圧力に耐える構造を持つ蓋に圧力計のついたステンレス製で肉厚の容器に水を満たし、空気を抜いた後冷凍庫に入れ冷却した。その結果、 $-22^{\circ}\text{C}$ までは圧力がほぼ直線的に上昇し、 $-10^{\circ}\text{C}$ で約100MPa、 $-22^{\circ}\text{C}$ では約200MPaに達した。これはBridgmanが示した水の相図 (水-氷の平衡曲線)<sup>7)</sup>に一致した。 $-22^{\circ}\text{C}$ 以下では膨張する氷Iと共に収縮する氷IIIが生成され、圧力の上昇は止まると予想されたが圧力は上がり続け、 $-30^{\circ}\text{C}$ では250MPaに達した<sup>8)</sup> (図4)。このことは、氷IIIが生成されずに氷Iが生成し続け過冷却現象が起こっていたことを示すものと思われた。早川らはこの現象を「凍結昇圧法」と名付け、酵母や各種細菌への影響を調べているが、 $-10^{\circ}\text{C}$ あるいは $-20^{\circ}\text{C}$ 処理

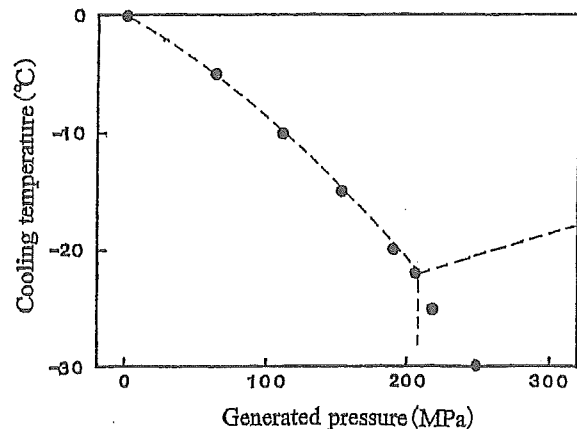


図4. 耐圧容器での凍結昇圧による圧力発生 (●) 実測値、破線はBridgmanが示した水の相図 (水-氷平衡曲線)

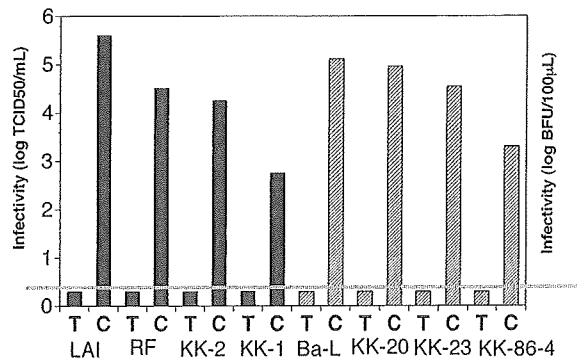


図5. 凍結昇圧法の種々のHIV-1株の感染性に及ぼす影響 (黒カラム) T細胞好性HIV-1株、(斜線カラム) マクロファージ好性HIV-1株、LAI、RF、Ba-Lは実験室株であり、KKシリーズは全て臨床分離株、Tは凍結昇圧処理検体、Cは凍結しただけの対照検体を示す。点線は検出限界を示す

で微生物の不活化が起こることを見出ししている<sup>9)</sup>。

著者らはこの凍結昇圧法によるHIV-1への影響を調べてみた<sup>10)</sup>。その結果、実験室株および臨床分離株、T細胞好性株およびマクロファージ好性株を含む種々のHIVが $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $-30^{\circ}\text{C}$ 、つまり200～250MPaの圧力にて完全に不活化することを見出した(図5)。前述の高水圧処理において、不活化に実験室株より高い圧力を要した臨床分離株も凍結昇圧法では完全に不活化されたことから、この方法が優れたウイルス不活化法であることが分かる。

さらに凍結昇圧法によるHIV-1の不活化にはどのような現象が関与しているかを検討した。まずHIV-1のコア蛋白への影響を免疫反応で調べたがコア蛋白の障害は認められなかった。つぎに逆転写酵素活性は $-10^{\circ}\text{C}$ ではほとんど影響は受けませんが、ウイルスが完全に不活化される $-20^{\circ}\text{C}$ および $-30^{\circ}\text{C}$ ではその活性は10%程度に低下することが分かった(図6)。

さらにHIV-1のエンベロップ蛋白の機能を調べるために、ウイルスを濃縮しCD4陽性T細胞と反応させウイルスが細胞に結合するかどうかをフローサイトメーターを用いて検討した結果、 $-10^{\circ}\text{C}$ では影響を受けませんが、 $-20^{\circ}\text{C}$ ではウイルスが細胞へ結合する機能が失われている。これらのことから、凍結昇圧法においても、HIVの不活化はウイルスのエンベロップ蛋白の障害および逆転写酵素活性の低下が深く関与していることがうかがわれた。

Hashizumeらは低温域で高圧をかけると微生物の死滅率が飛躍的に増大することを報告しており<sup>11)</sup>、凍結昇圧において、高水圧による高圧処理より低い圧力でウイルスの不活化が起こった理由としては低温域での高圧処理

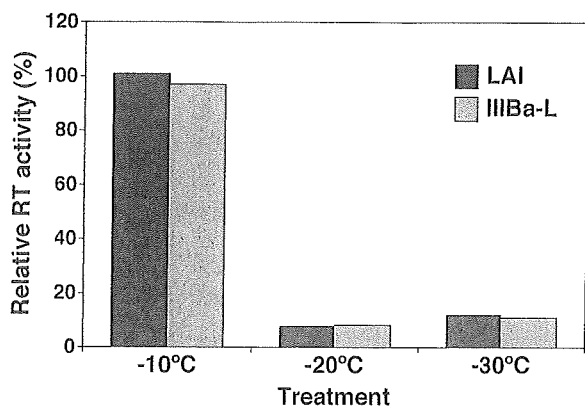


図6. 凍結昇圧法のHIV-1の逆転写酵素活性に及ぼす影響値は凍結昇圧処理を行ったサンプルと凍らせただけの対照サンプルとの酵素活性の比を示した。LAIはT細胞好性HIV-1株、IIIBa-Lはマクロファージ好性HIV-1株

による未知の影響が関与していることが示唆される。

## 6. 血液製剤への利用

いうまでもなく血液製剤には凝固因子などの生理活性物質が含まれ、高圧処理によってそれらが損なわれると治療薬という本来の目的を果たすことはできなくなる。血液中の有効成分に対する高圧の影響についてのデータはあまり多くないが、300MPa以上の高水圧処理により血液凝固因子Ⅻの活性が損なわれるが、antithrombinⅢは500MPaの高圧処理においても活性を保っていることが報告されている<sup>12)</sup>。また著者らの検討で免疫グロブリンの活性は凍結昇圧処理では失われなことが見出されている<sup>10)</sup>。これらのことから用途によっては高圧処理の血液製剤への応用が可能であることが示されている。

血液に混入する可能性があるウイルスとしてはHIV、B型およびC型肝炎ウイルス、ヒトT細胞性白血病ウイルス、ウエストナイルウイルスなどがあげられる。これらのウイルスへの高圧の影響はHIVを除いて未知のものであるが、すべて表面にエンベロップを持つウイルスであり、種々の研究報告から高圧により不活化される可能性が高いものと考えられる。

血液製剤の無毒化に高圧を産業ベースで利用するにあたっては、大型の高圧処理装置の開発が必要になってくる。この場合、600～700MPa程度の耐圧構造が必要とされる高水圧装置に比べ、250MPa前後という比較的低い圧力に耐える簡単な構造の装置で高圧を発生させることができる凍結昇圧法がより有利であると考えられる。

## 7. おわりに

血液製剤に混入する可能性の高いウイルスであるHIVについて、高圧による不活化研究を解説したが、さらに肝炎ウイルスなどへの影響についての研究が待たれるところである。現在、薬剤、フィルター、加熱などによって行われている血液製剤の無毒化技術に加えて高圧処理、特に不活化能力や設備の簡便さで利点が多いと思われる凍結昇圧法を検討してみる価値は高いものと考えられる。

本文で紹介したHIVに関する研究は、日本ハム中央研究所の重久 保先生、福寿園CHA研究センターの早川

潔先生、大阪府立公衆衛生研究所の森 治代先生、川畑拓也先生との共同研究である。

## 引用文献

- 1) F. Basset, A. Hase, P. Macheborref and P. Monil, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **38**, 248(1938).
- 2) J. R. Overman and A. M. J. Lewis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**, 329-333(1959).
- 3) T. Nakagami, T. Shigehisa, T. Ohmori, S. Taji, A. Hase, T. Kimura and K. Ymanishi, *J. Virol. Methods*, **38**, 255-262 (1992).
- 4) J. L. Silva, P. Luan, M. Glaser, E. W. Voss and G. Weber, *J. Virol.*, **66**, 2111-2117(1992).
- 5) T. Nakagami, H. Ohno, T. Shigehisa, T. Otake, H. Mori, T. Kawahata, M. Morimoto and N. Ueba, *Transfusion*, **36**, 475-476 (1996).
- 6) T. Otake, H. Mori, T. Kawahata, Y. Kojima, H. Nishimura, I. Oishi and T. Shigehisa, *Biocontrol. Sci.*, **5**, 127-129(2000).
- 7) P. W. Bridgman, *Proc. Am. Acad. Arts. Sci.*, **47**, 466-558 (1912).
- 8) 早川潔, 防菌妨礙, **29**, 319-326(2001).
- 9) K. Hayakawa, Y. Ueno, S. Kawamura, T. Kato and R. Hayashi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 415-418(1998).
- 10) T. Otake, T. Kawahata, H. Mori, Y. Kojima, I. Oishi and K. Hayakawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- 11) C. Hashizume, K. Kimura and R. Hayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1455-1458(1995).
- 12) 中上辰芳, 重久保, 大森丘, "高圧バイオサイエンス", 功刀滋, 嶋田昇二, 鈴木敦士, 林力丸編, さんえい出版, 1994, pp. 164-171.

## PROFILE



### 大竹 徹

大阪府立公衆衛生研究所ウイルス課  
ウイルス課長  
医学博士

1948年奈良県生まれ、1971年鳥取大学獣医学科卒、同年大阪府立公衆衛生研究所研究員、1984年同主任研究員、2002年同病理課長、2003年同ウイルス課長、現在に至る。