

## 第7章 高圧処理がヒト免疫不全症ウイルス(HIV)および 血液細胞成分に及ぼす影響

重久 保：日本ハム㈱（中央研究所） 農博  
 大野広志：日本ハム㈱（中央研究所）  
 大竹 徹：大阪府立公衆衛生研究所 医博  
 森 治代：大阪府立公衆衛生研究所  
 川畠拓也：大阪府立公衆衛生研究所  
 泉本洋子：大阪府立公衆衛生研究所  
 大石 功：大阪府立公衆衛生研究所 医博

### 1 はじめに

著者らは、先に、食肉と食肉製品の保存性や微生物学的安全性を左右する細菌を対象として、高圧処理の影響を調べた。そして、①高圧処理はこれらの細菌を殺菌することができること、②ただし、供試細菌の種類によっては、高圧耐性が異なること、すなわち、グラム陰性菌はグラム陽性菌に比べて耐圧性が低いことを観察した。また、このようなグラム陰性菌とグラム陽性菌の高圧耐性の違いは、アクリジンオレンジによる染色性の違いや紫外外部吸収性物質の漏出の様相の違いから、これらの細菌の膜構造の違いに起因するのであろうと推察した<sup>1)</sup>。そして、このような推論を検討するためにウイルスに着目し、高圧処理がウイルスに及ぼす影響についても検討した<sup>2)</sup>。

ウイルスは、それが有する核酸の違い（ゲノムがDNAまたはRNAか、核酸の分子量の大きさ、核酸が1本鎖または2本鎖かなど）やウイルス粒子の形態の違い（粒子の直径、エンベロープの有無など）により分類されている。エンベロープを有するウイルスには、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)、単純ヘルペスウイルス(HSV)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV)、B型肝炎ウイルス(HBV)、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)などがあり、エンベロープを持たないウイルスには、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス(HAV)、口蹄疫ウイルス(FMDV)などが知られている<sup>3)</sup>。

著者らは、エンベロープを持たないウイルスの代表としてポリオウイルスを取り上げ、高圧処理がポリオウイルスの感染力に及ぼす影響を検討した。また、エンベロープを有するウイルスの代表としてはHSVとHCMVを取り上げ、同様に高圧処理がこれらのウイルスの感染力に及ぼす影響を検討した。その結果、エンベロープを持たないポリオウイルスは600MPaで処理されても不活化されないが、エンベロープを有するHSV-1は、①室温下、300から400 MPa、10分間の高圧処理により、 $10^7$  pfu/ml以上の割合で不活化されること、②エンベロープを持つウイルスのエンベロープは当該ウイルスが宿主細胞に接着し感染するのに不可欠な成分であることが知られているが、300 Mpaにて高圧処理されたHSV-1を電子顕微鏡により観察したところ、エンベロープの構造が乱れ、または破損し、宿主細胞への接着および感染が成立していなかったことを見い出した<sup>2)</sup>。

さらに、エンベロープを有し、ヒトに重篤な後天性免疫不全症（エイズ、AIDS）を起こすHIVについても高圧処理の影響を検討した。その結果、高圧処理はHIVを失活させるのに有效であることが分かったので、HIV感染者やエイズ患者の治療にも応用できる可能性を指摘した<sup>4, 5)</sup>。

すなわち、HIV-1 (IIIB株) を室温下で10分間高圧処理する時には、HIVは350 MPa程度から不活性化し始め、400から450 MPa以上で、 $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml以上の割合で不活性化すると共に、より低い処理圧力であっても、処理時間を延長することによって不活性化することを確認した（Fig. 1）。一方、血漿中の重要な成分である抗体や血液凝固因子（第VII因子を除く）は、このような高圧処理条件下でも失活しないことを確認した。

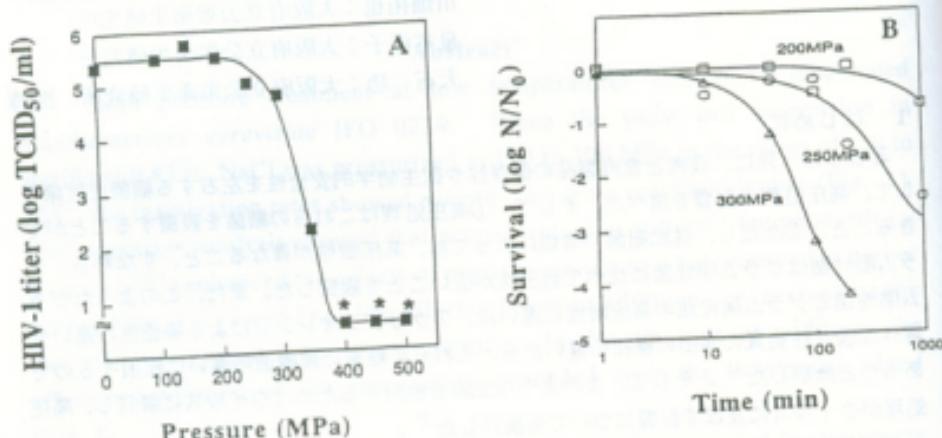


Fig. 1 Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Suspensions of the virus (a IIIB strain) containing 10% fetal calf serum were subjected to HHP at 100 to 500 MPa for 10 min (A) and for 10 to 1,000 min (B) at 25°C. The infective titers of HIV-1, calculated as a tissue culture infectious dose (TCID), were assessed in MT-4 cells. \* Below the lowest detectable titer of the assay ( $\log \text{TCID}_{50}/\text{ml} < 0.5$ ). N<sub>0</sub>, Infective titers of HIV-1 without the HHP treatment. N, Those after the HHP treatment at each plot. Reprinted from T. Nakagami et al., *Transfusion*, 36/5, 475-476 (1996).

エイズに対する治療剤としては、従来、HIVの細胞への接着・侵入阻害剤、逆転写酵素阻害剤、HIVプロテアーゼ阻害剤、グリコシダーゼ阻害剤、アンチセンス核酸誘導体、リボザイムなどが提案され、一部は臨床応用されている。これらの薬剤の中には、薬効が弱いものや、*in vitro*では有効であっても *in vivo*では効果を発現しないものがある。また、広く臨床応用されている薬剤である逆転写酵素阻害剤においては、HIVが容易に変異するため、耐性株が発現しやすく、治療剤としての薬効が持続しないこと、正常細胞の核酸代謝

にも作用するので、毒性が高いことなどの問題点も指摘されている<sup>6)</sup>。HIVプロテアーゼ阻害剤においても耐性株が発現しやすく、効果の持続性に問題があるとされている。

一方、高圧処理によるエンベロープを有するウイルスの不活化は、前述および下記に示すように、エンベロープの破壊という物理的な現象に伴って生じるので、各種の薬剤とは異なり、耐性株の出現は生じ難いと期待される。また、HIVの不活化に有効な高圧処理条件では、血漿中の重要な成分である抗体や血液凝固因子（第VII因子を除く）は失活しないことから、副作用も少ないのであると期待される。

本文は、Fig. 1に示した高圧処理によるHIVの不活化現象の再現性と普遍性を確認する目的で、ⅢB株の外にも、エイズ患者より分離されたKK-1株およびHIVのキャリアーから分離されたKK-2株を用いて行った試験の成績について記述する。

## 2 各種 HIV の高圧処理による不活化

### 2.1 高圧処理による各種 HIV の感染力の減少

高圧処理がHIVに及ぼす影響をⅢB株の外にも、エイズ患者より分離されたKK-1株およびHIVのキャリアーから分離されたKK-2株を用いて検討した。

Fig. 2に示すように、10分間の高圧処理は、処理圧力の増加に伴って、各供試HIV株を不活化し感染力を低下させることが観察された。このことから、高圧処理によるHIVの不活化の現象には再現性があり、かつ普遍性があると思われた。

しかし、HIVの高圧処理による感染力の低下の消長を詳細に検討すると、HIVの高圧処理の感受性には供試株間に若干の差異があることも観察された。すなわち、ⅢB株は400

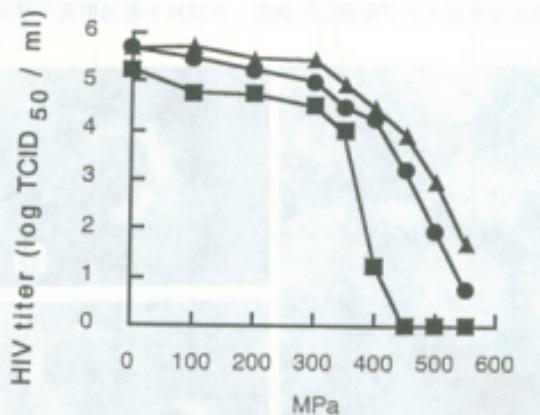


Fig. 2 Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on various strains of HIV-1. Each suspension of the viruses (a IIIB strain, ■; a KK-1 strain isolated from an AIDS patient, ●; a KK-2 strain from an HIV carrier, ▲) containing 10% fetal calf serum was subjected to HHP at 100 to 550 MPa for 10 min at 25°C. See Fig. 1 for other details.

および450 MPaでは、それぞれ $10^4$ および $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml以上の割合で不活化され、500 MPaでは完全に不活化された。一方、KK-1株およびKK-2株では感染力の失われる度合は緩やかであり、感染力の低下の度合は、400 MPaではそれぞれ $10^{1.5}$ および $10^{1.25}$  TCID<sub>50</sub>/ml、500 MPaではそれぞれ $10^{3.75}$ および $10^{2.75}$  TCID<sub>50</sub>/ml、また550 MPaではそれぞれ $10^{5.0}$ および $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub>/mlであった。なお、これらの臨床分離株にあっても、処理時間を延長すれば、不活化の程度を増加させることができると確認された(データー省略)。

今後の課題として、①今回供試した以外の分離株についても高圧処理の影響を検討し、高圧処理によるHIVの不活化の現象の普遍性と有用性を検証すること、②臨床の場面で実際に必要とされるHIVの不活化率の目標を設定すること、言い換えれば、実用上の治療効果を発揮させるためには、どの程度までにHIVのTCID<sub>50</sub>/ml値を減少させれば良いかを明らかにすること、③高圧処理を反復する場合に、供試HIVの高圧耐性が変化するか否か、言い換えれば、変異による高圧耐性の獲得が生じるか否か等の検討も必要であると思われる。

## 2.2 高圧処理によるHIV粒子の形態変化

エンベロープを有するウイルスであるHSV-1に300 MPaの高圧処理を施すと、HSV-1のエンベロープ構造に乱れを生じ、宿主細胞への感染が不可能になることを電子顕微鏡による観察により見い出してきた<sup>3)</sup>。

HIV-1のウイルス粒子の形態に及ぼす高圧処理の影響をくわしく観察するため電子顕微鏡観察を行った。すなわち、高圧処理したHIV(ⅢB株)粒子を2%グルタルアルデヒド液で固定化し、1.5%PTAでネガティブ染色して調製した試料を透過型電子顕微鏡により観

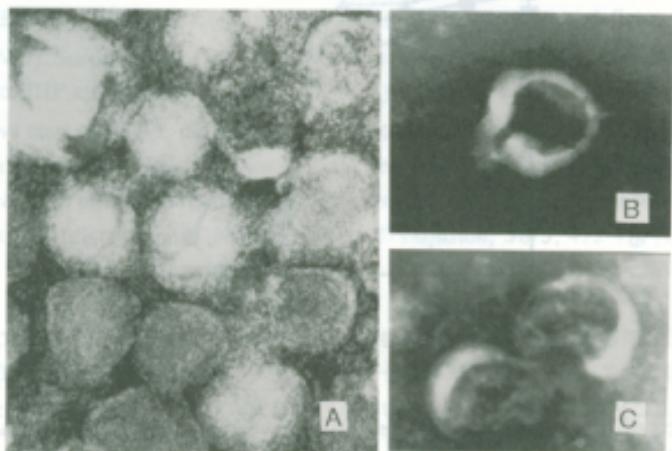


Fig. 3 Electron-microscopic observation of HIV-1 (a Ⅲ B strain) particles treated without (A) and with the high hydrostatic pressure treatment at 500 MPa for 10 min at 25°C (B and C).

察した。その結果、500 MPa、10分間の高圧処理はHIV（ⅢB株）のエンベロープ構造を断裂させるか（Fig. 3-B）、またはコア内容物を漏出させることが観察された（Fig. 3-C）。

### 2.3 高圧処理によるHIVの逆転写酵素（RT）の不活化

HIVはCD4を有するTリンパ球やマクロファージに感染し、免疫不全症（エイズ）を発症させる。HIVの宿主細胞への感染のメカニズムは、HIVがCD4を認識・接着し（CD4以外にも、Tリンパ球ではFusin<sup>7)</sup>、マクロファージではCC CKR5<sup>8)</sup>などの接着因子も関与していることが明らかにされつつある）、宿主細胞にRNAと逆転写酵素（RT）を注入し、非発現プロウイルスDNAとなり、宿主の細胞の核内に入りて感染が成立するとされている<sup>6)</sup>。

そこで、HIVの宿主細胞への感染に重要な役割を果たしているRTについて、高圧処理の影響を調べた。RT活性の測定は、Leeらの方法<sup>9)</sup>に準じて行った。すなわち、供試試料をサンプリングチューブに取り、RT反応用緩衝液と反応させ、その後にトリチウムチミジン三リン酸およびテンプレートプライマーと反応させた。トリクロロ酢酸を加えて反応を停止させた後に、DNAを集め、液体シンチレーションカウンターによりDNAに取り込まれた<sup>3</sup>H-dTTPの量を測定した（Fig. 4）。

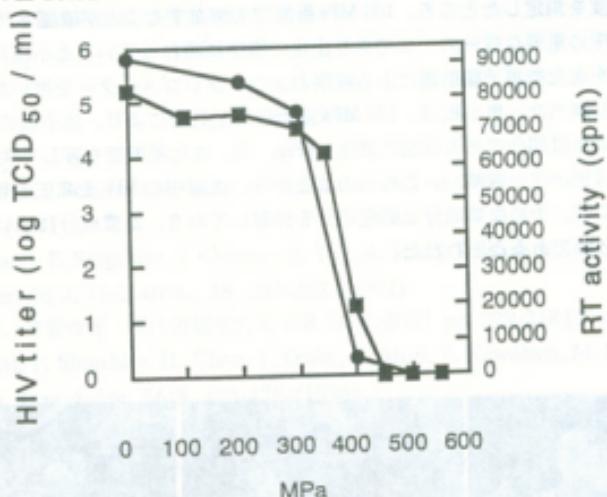


Fig. 4 Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the infective titers (■) and the reverse-transcriptase (RT) activities (●) of an HIV-1 IIIB strain. RT activities were determined with a modified method of Lee et al<sup>9)</sup>. See Fig. 1 for details.

その結果、10分間の高圧処理は、処理圧力の増加に伴って、供試HIV株のRT活性を失活することが観察された。また、その失活の様相は感染力低下のそれとよくシンクロナ

イズしていることも観察された。なお、Fig. 4はⅢB株のRT活性と感染力の変化を示したものであるが、RT活性と感染力がシンクロナイズして低下する傾向は他の供試2株についても観察された。言い換えれば、ⅢB株のRT活性は400 MPa以上の圧力によりほとんど失活したが、KK-1株およびKK-2株のRT活性は残存していた。特に、KK-2株のRT活性は、500 MPaで57%、550 MPaで20%残存していた。

供試株によって、そのRT活性の高圧耐性が異なる理由については、現段階では不明であるが、アミノ酸配列の変異の有無の検定、その変異と高圧耐性との相関などについても検討する必要があると思われる。HIVが高圧処理により不活化されるメカニズムの詳細は現時点では不明であるが、高圧処理により、①ウイルス粒子、特にエンベロープの構造が変化すること、および、②RTが失活することが関与していると想像される。

### 3 高圧処理による血液の細胞成分への影響

先に、著者らは、高圧処理は血漿中の重要な成分である抗体、血液凝固因子（第VII因子を除く）を失活させないことを確認したので<sup>4, 5)</sup>、今回は、高圧処理が血液中の細胞成分に及ぼす影響について調べた。

赤血球を等張緩衝液に浮遊させ、高圧処理し、その後に遠心分離し、その上清の540 nmに於ける吸光度を測定したところ、100 MPa程度でも溶血することが確認された。

次に、血液中の重要な成分の一つであり止血の機序に関わっている血小板について、高圧処理の影響を走査型電子顕微鏡による観察およびアグレゴメーターを用いた血小板凝集能の測定により調べた。血小板は、100 MPa以上の高圧処理により、血小板の形状が滑面状態から粗面または凹凸のある状態に変化し(Fig. 5)、また凝集能も著しく失われることが観察された（データー省略）。これらのことから、血液中のHIVを高圧処理により不活化させる場合には、予め血漿成分と細胞成分を分離しておき、血漿成分について高圧処理を施すことが必要であると思われた。

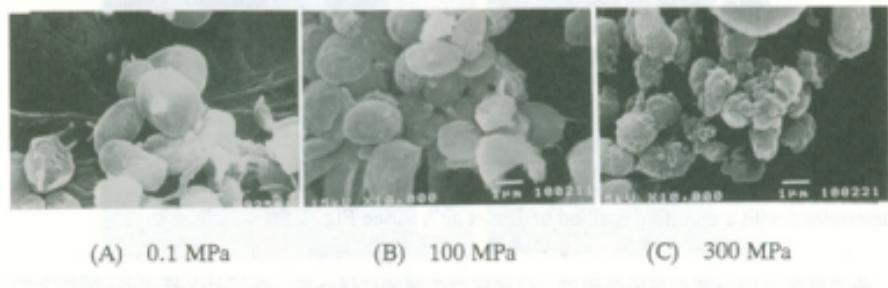


Fig. 5 Electron microscopic observation of rabbit platelets treated without (A) and with high hydrostatic pressure at 100 MPa (B) and 300 MPa (C) for 10 min at 25°C.

#### 4まとめ

著者らは、先に、高圧処理は①HIV-1(ⅢB株)を不活化すること、一方、②血漿中の重要な成分である抗体や血液凝固因子(第Ⅸ因子を除く)は失活させないことを確認していたので<sup>4, 5)</sup>、今回は、ⅢB株以外のHIV-1に及ぼす高圧処理の影響、および血液中の細胞成分に及ぼす高圧処理の影響について検討した。その結果、高圧処理は、①HIVを広く不活化させること(Fig. 2)、②HIVのエンベロープ構造を変化させ、場合によっては、ウイルス粒子を破壊し(Fig. 3-B)、または粒子内容物を漏出させること(Fig. 3-C)、③HIVの逆転写酵素を失活させることが観察された(Fig. 4)。また、高圧処理は、④血液中の細胞成分の構造および機能を変化させること(特に、赤血球については溶血、血小板については凝集能の低下)も観察された(Fig. 5)。

#### ★質疑応答★

(質問) これらの知見を基に、高圧処理をエイズ患者の治療に応用しようとする場合には、どのような装置が想定されるか？(鈴木、新潟大)

(答え) 現時点では、具体的な装置は開発されていないので今後の検討課題である。

バッチ的処理、または、腎臓病患者用の透析装置から連想される、連続的な体外循環処理装置が想定される。

#### 引用文献

- 1) T. Shigehisa, T. Ohmori, A. Saito, S. Taji and R. Hayashi, *Int. J. Food Microbiol.*, **12**, 207-216 (1991).
- 2) T. Nakagami, T. Shigehisa, T. Ohmori, S. Taji, A. Hase, T. Kimura and K. Yamanishi, *J. Virol. Meth.*, **38**, 255-262. (1992).
- 3) 山西弘一、奥野寿臣. 現代病理学大系10B(中山書店) pp. 229-258 (1990).
- 4) T. Nakagai, T. Shigehisa, H. Ohno, T. Otake, H. Mori, T. Kawahata, M. Morimoto and N. Ueba, *Transfusion*, **36/5**, 475-476. (1996).
- 5) T. Shigehisa, T. Nakagami, H. Ohno, T. Otake, H. Mori, T. Kawahata, M. Morimoto, and N. Ueba, In *High pressure Bioscience and Biotechnology*, (Eds) R. Hayashi and C. Balny, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 273-278 (1996).
- 6) 守屋多聞、大竹徹、松本和男. 化学と生物, **30**(5), 305-313 (1992).
- 7) Y. Feng, C. C. Broder, P. E. Kennedy and E.A. Bergery, *Science*, **272**, 872-877 (1996).
- 8) T. Dragic, V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Madden, R. A. Koup, J.P. Moore and W. A. Pastong, *Nature*, **381**, 667-673 (1996).
- 9) M. H. Lee, K. Sano, F. E. Morales and D. T. Imagawa, *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1717-1721 (1987).

## Effects of High Hydrostatic Pressure on HIV Infectivity and Blood Cells

Tamotsu Shigehisa, Hiroshi Ohno, Toru Otake\*, Haruyo Mori\*, Takuya Kawahata\*, Yoko Izumoto\* and Isao Oishi\*

Research and Development Center, Nippon Meat Packers, Inc., 3-3 Midorigahara, Tsukuba, Ibaraki 300-26, Japan and \*Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-Chome 3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan

### Abstract

We previously reported that high hydrostatic pressure (HHP) at 400 MPa or higher inactivated HIV-1 (an HTLV-IIIB strain) (Fig. 1) but that HHP did not alter the biological activities of such plasma proteins as antithrombin III,  $\gamma$ -globulin and blood coagulation factor IX except for factor VIII<sup>4,5)</sup>.

The present paper describes (1) HHP-induced decreases in infective titers of various strains of HIV-1 including a IIIB strain and clinical isolates of KK-1 strain derived from an AIDS patient and KK-2 strain from an asymptomatic carrier, (2) morphological changes of HIV particles induced by HHP, (3) HHP-induced decreases in reverse-transcriptase (RT) activities of HIV-1, and (4) morphological and functional changes in such blood cells as erythrocytes and platelets treated with HHP.

HHP inactivated HIV. Decreases in the infective titers were somewhat different among the strains tested; i.e., IIIB strain was more susceptible to HHP than the clinical isolates of KK-1 and KK-2 (Fig. 2).

Electron microscopic observation revealed that HHP ruptured HIV particles (Fig. 3-B) and induced leakage of their core protein (Fig. 3-C).

HHP inactivated RT activities. Decreasing patterns of RT activities were coincident with those of the infective titers (Fig. 4).

HHP at 100 MPa or higher destroyed such blood cells as erythrocytes and platelets (Fig. 5) and inactivated platelet-coagulation capabilities.

From these findings, inactivation of HIV by HHP may be associated with damage of HIV particles and/or reduction of RT activities. Since HHP did not alter the biological activities of such plasma proteins as blood coagulation factor IX, antithrombin III, and  $\gamma$ -globulin but destroyed such blood cells as erythrocytes and platelets, application of HHP may be restricted to inactivation of HIV in plasma fraction.