

バクテリオファージを用いたB型肝炎ウイルスの洗浄評価技術の開発

島田太一¹、○倉本恭行¹、山内朝夫² (¹太平化学産業(株)、²(地独)大阪産業技術研究所)

背景および目的

既報¹⁾ではB型肝炎ウイルス(HBV)とヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス)から分離したPXB-Cellsを使用し、洗浄液の抗HBV効果を確認した。しかし、ヒトがHBVを安全に取り扱って簡便に評価するのは難しい。そこで、我々はHBVと同じ膜形質でありながらヒトに感染しないバクテリオファージ(φ6)に注目し、プラーク形成法を用いて抗φ6活性値を求め、既報¹⁾の抗HBV活性値と相関性があるか検討し、HBV代替ウイルス(φ6)を用いた溶液条件での抗ウイルス性能評価試験方法の確立を目的とした。さらに、医療現場で検証可能なφ6を用いたウイルスの洗浄評価用インジケータの検討を行った。

1) 高橋ら 第54回日本肝臓学会総会 PXB-Cells®を用いた殺菌・洗浄液のB型肝炎ウイルス不活化能の *in vitro* 評価

評価法① φ6を用いた溶液条件での抗ウイルス性能評価試験方法の検討

予めφ6を各種濃度に調製した夾雑物(ウシ血清アルブミン(BSA)、ウシ胎児血清(FBS)または硫酸プロタミン含有ヒツジ全血液)と混合した溶液を、抗HBV効果が確認されている洗浄液¹⁾(タイフレッシュ・エースNEO:太平化学産業)に暴露した。27°Cで30分間後、得られた溶液をSCDLP液体培地で段階希釈を行った後、宿主菌(*Pseudomonas syringae*)と混合し、LB寒天培地にて培養することでプラークを形成させた。下記式を用いて、得られたプラーク数から算出される抗φ6活性値(Table 1)と、既報¹⁾の結果から算出される抗HBV活性値(Table 2)との相関性を評価した。

$$\text{抗}\phi 6\text{活性値} = \log_{10} \frac{\text{初期ファージ数(PFU/mL)}}{\text{洗浄液に暴露後のファージ数(PFU/mL)}}$$

$$\text{抗HBV活性値} = \log_{10} \frac{\text{洗浄液無添加の上清中HBsAg量(IU/mL)}}{\text{洗浄液添加の上清中HBsAg量(IU/mL)}}$$

Table 1. 各種夾雑物を用いた抗φ6活性値

夾雑物	暴露液中の夾雑物の濃度	暴露液中のタンパク質濃度(mg/mL)	タイフレッシュ・エースNEO	
			10倍希釈	100倍希釈
BSA	2 w/v %	40	>5.0	0.3
	3 w/v %	60	4.7	0.1
FBS	40 v/v %	53.1	>5.0	1.2
	45 v/v %	59.8	>5.0	0.5
硫酸プロタミン含有ヒツジ全血液	20 v/v %	52	4.5	0.1
	30 v/v %	78	4.5	0.3
	40 v/v %	104	4.7	0.2
	45 v/v %	117	4.7	0.2
なし	—	—	>5.0	>5.0

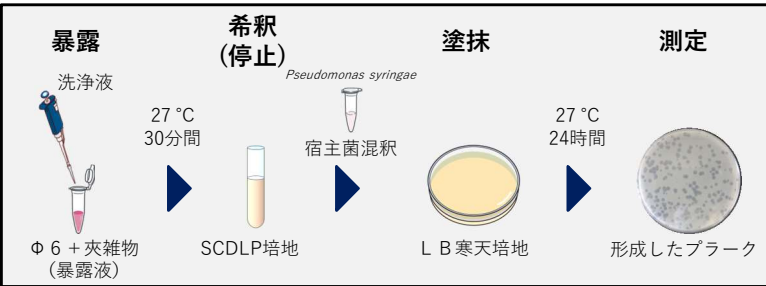


Table 2. 抗HBV活性値

タイフレッシュ・エースNEO	10倍希釈	100倍希釈
抗HBV活性値	3.1	0.1

夾雑物の種類により添加濃度は異なるものの、夾雑物の添加濃度を調節することで、既報¹⁾の抗HBV活性値と相関性のあるφ6を用いた溶液条件での抗ウイルス性能評価試験方法を確立することができた。このことは、φ6がHBVの代替候補として有効であることを示唆している。

評価法② φ6を用いたウイルスの洗浄評価用インジケータの検討

φ6を用いたウイルスの洗浄評価用インジケータの検討としてガイドライン²⁾を参考に、φ6と硫酸プロタミン含有ヒツジ全血液の混合液を塗布したSUS板を室温で乾燥し試験片(φ6 Cleaning Evaluation Indicator: φ6 CEI)を作製した。これをタイフレッシュ・エースNEOに27°Cで30分間浸漬後、スワブによる板表面のふき取りを行い、回収物をSCDLP液体培地中に溶出させた。この溶出液を上記の手順で培養しプラークを形成させた。下記式を用いて、得られたプラーク数から算出される抗φ6活性値(Table 3)と、既報¹⁾の結果から算出される抗HBV活性値(Table 2)の相関性を評価した。また、洗浄後の板上に残存するタンパク質量をBSA換算でBradford法により定量した(Table 4)。

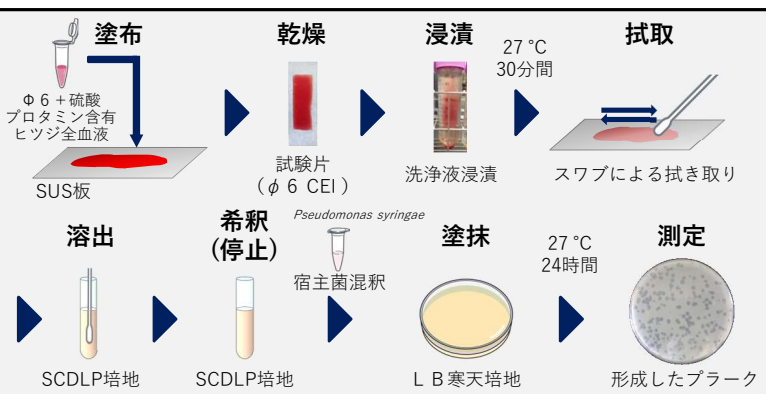
$$\text{抗}\phi 6\text{活性値} = \log_{10} \frac{\text{水に浸漬後の板上残存ファージ数(PFU/mL)}}{\text{洗浄液浸漬後の板上残存ファージ数(PFU/mL)}}$$

Table 3. φ6 CEIを用いた抗φ6活性値

	板上のφ6残存数(PFU)	浸漬液中のφ6数(PFU)	抗φ6活性値
初期(乾燥なし)	2.2×10 ⁶	—	—
2時間乾燥後	1.3×10 ⁶	—	—
水浸漬後	1.8×10 ⁵	1.2×10 ⁴	—
タイフレッシュ・エースNEO	10倍希釈	<10	<10
	100倍希釈	1.2×10 ⁴	<10
			1.2

Table 4. 板上タンパク質量および浸漬液に溶出したタンパク質量

	板上のタンパク質量(μg)	浸漬液中のタンパク質量(μg)	板上+浸漬液中のタンパク質量合計(μg)
初期(乾燥なし)	84.96±0.96	—	—
2時間乾燥後	80.31±2.81	—	—
水浸漬後	34.10±0.89	48.45±0.88	82.55
タイフレッシュ・エースNEO	10倍希釈	13.69±0.32	70.74±0.88
	100倍希釈	13.85±0.51	64.99±1.28



φ6 CEIをタイフレッシュ・エースNEO、10倍希釈、100倍希釈に浸漬したところ、溶液条件と同様に、抗φ6活性値が抗HBV活性値と相関性のある値を示した。このことから、φ6 CEIは、抗HBV効果を期待できる洗浄液の選定に有効であることがわかった。また、当該洗浄液の濃度を変化させても、SUS板上に残留するタンパク質は同程度であったことから、φ6とタンパク質の洗浄特性が異なることがわかった。このことは、抗ウイルス(HBVを含む)活性を示す洗浄液を選定する上で、疑似汚染物としてタンパク質の除去をもって評価する従来のインジケータでは不十分であることを示唆している。

2) (一社)日本医療機器学会: 医療現場における滅菌保証のガイドライン2015 p.29 (2015)

結論

洗浄液の抗HBV効果を安全かつ簡便に評価する方法として、φ6を用いた試験方法を確立した。これにより、効果の期待できる洗浄液を迅速に選定することができる。また、ヒトに感染しないφ6を塗布した試験片(φ6 CEI)は、実際の医療現場において、ウイルスの洗浄状況を把握するインジケータとして活用することができる。