

別紙2

厚生科学研究研究費補助金

高度先端医療研究事業

臨床応用に向けた抗 HCV ヒト型抗体の開発に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松浦 善治

平成 13 (2001) 年 4 月

目次

| | |
|--|----|
| I. 総括研究報告書 | |
| 臨床応用に向けた抗 HCV ヒト型抗体の開発に関する研究 | 1 |
| 松浦 善治 | |
| II. 分担研究報告書 | |
| 1. ヒト型抗 HCV エンベロープ抗体の作製と性状解析に関する研究 | 6 |
| 森石 恆司 | |
| 2. HCV エンベロープ蛋白に対するヒト型モノクローナル抗体の エピトープマッピングに関する研究 | 9 |
| 鈴木 哲朗 | |
| 3. 諸外国における肝炎対策の状況調査に関する研究 | 14 |
| 宮村 達男 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 67 |
| IV. 研究成果の刊行物・別冊 | 別添 |

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
総括研究報告書

臨床応用に向けた抗 HCV ヒト型抗体の開発に関する研究

主任研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

慢性C型肝炎の自然治癒例の末梢リンパ球のライブラリーからファージディスプレイ法を用いて、また、ヒトの抗体遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和できるヒト型モノクローナル抗体 10 クロウンを取得し、その認識部位を解析した。さらに、これらの抗体の *in vivo* での活性評価の準備を開始した。また、諸外国における肝炎対策の状況調査を実施した。

分担研究者

森石 恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授
宮村 達男 国立感染症研究所 部長
鈴木 哲朗 国立感染症研究所 室長

A. 研究目的

HCV は輸血後感染症の最も大きな問題であったが、高感度抗体検出系の開発によりその感染者は激減した。しかしながら、我が国には二百万人以上もの HCV のキャリアが存在すると推定され、HCV 感染と肝癌発症の相関も血清学的に証明されている。HCV を増殖できる細胞培養系が存在しないため、これまでのウイルス感染症で用いられてきた感染の中和やウイルスの排除を担う液性及び細胞性免疫反応の解析は進んでいない。我々はこれまでに慢性C型肝炎からの自然治癒例に HCV の二つのエンベロープ蛋白 (E1 と E2) のうちの E2 蛋白が細胞表面の CD81 分子に結合するのを阻止できる抗体 (NOB 抗体) が高率に出現することを見出した。この成績を基にしてファージディスプレイ法を用いて、また、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えエンベロープ蛋白で免疫し、HCV のエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得し、その *in vitro* および *in vivo* での性状を解析し、将来の治療用抗体としての可能性を検討することを目的とした。

また、ワクチンの国際的な開発状況を把握するため、各国への電話及びメールによるヒアリング調査を実施し、対 HCV 措置に対する包括的・総合的な考察を試みる。この様な調査によって C 型肝炎に関する諸外国の現状

を明示することは、日本における対 C 型肝炎感染・及び感染者政策及び研究を推進させるものであると考えられる。

B. 研究方法

1) ヒト型抗体の作製

高い結合阻止抗体価を示し、慢性C型肝炎から自然治癒された方から既にインフォームドコンセントを得ており、彼らの末梢リンパ球から cDNA を作製しファージディスプレイ系を用いて、組換え抗体のライブラリーを作製した。その中から結合阻止活性を指標にして高い活性を示すものを選別した。また、ヒト抗体を作製できるトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白を発現させた細胞の膜画分を抗原として免疫して、HCV のエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体を作製した。抗体のアッセイは、これまでに開発した細胞融合活性測定系で行った。CHO 細胞に HCV にエンベロープ蛋白と T7 ポリメラーゼを発現させ、HepG2 細胞にリポーターとして T7 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを導入し、両者を混合培養する。もし両細胞間で融合が生じれば、T7 ポリメラーゼによってルシフェラーゼ遺伝子が発現される。この系を利用して、組換え抗体の細胞融合阻止活性を調べた。また、得られた抗体が認識しているエピトープを各種組換え抗原を用いて同定する。

2) ヒト型抗体の大量生産と *in vivo* での活性評価へ向けた検討

ヒト型抗 HCV エンベロープ抗体を HCV に持続感染しているチンパンジーに投与し、その抗ウイルス活性を検討できるよう、抗体の

大量培養と精製、さらに動物実験のプロトコールを作製する。

3) 諸外国における肝炎対策の状況調査

諸外国において行われている肝炎治療薬の開発状況等の肝炎対策を調査し、本研究で進めているヒト型抗 HCV 抗体の活用方法について検討を行う。

(倫理面への配慮)

一人の慢性 C 型肝炎から自然治癒された方、本研究の趣旨を説明し、本人から既にインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1) NOB 活性を持ったヒト型抗体の作製

慢性 C 型肝炎から自然治癒された方からインフォームドコンセントを得た後、末梢リンパ球を採取して NOB 活性を示す単鎖抗体を得た。これをもとに完全なヒト抗体を構築した。この抗体は NOB 活性だけでなく、細胞融合活性を中和した。

2) ヒト抗体遺伝子を持ったトランスジェニックマウスを用いた抗 HCV 抗体の作製

ヒト抗体を作るトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白を発現させた細胞膜画分を抗原として免疫し、中和活性を保持した HCV のエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体の作製を試みた。その結果、E1 に対する抗体が 6 種、E2 に対する抗体が 3 種得られた。いずれの抗体も NOB 活性およびシールドタイプウイルスの中和活性を示さなかったが、いくつかの抗体は HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。

3) エピトープマッピング

E1 蛋白のエクトドメインと VSV G 蛋白のシグナル配列、膜貫通領域、細胞質テールを発現する V340V を 293T 細胞にトランスフェクトし、その細胞のライセートについて、各 E1 抗体の反応性をウエスタンブロット法により解析した。7 種類の抗 E1 抗体のうち、E1 蛋白と特異的な反応を示したのは、No.80、No.81、No.82 の 3 クローンであった。またこの 3 クローンは E1 蛋白の N 末端側 69 アミノ酸領域を含む V260V を発現させた場合にも同様の反応性を示した。以上よりこの 3 種類のモノクローナル抗体は、E1 蛋白のアミノ酸 192 番から 260 番領域のリニアールエピトープを認識している事が示唆された。さらにエピトープ領域を絞り込むために、E1 蛋白の C 末端側欠損と GST との融合蛋白を大腸菌で発現するプラスミドを構築し、各抗体と発現産物

との反応性をウエスタンブロット法によって解析した。No.80 抗体は E1 の N 末端側 69 アミノ酸 (192 番から 260 番) を発現する E1-1 とは反応するものの、N 末端 49 アミノ酸 (192 番から 240 番) を発現する E1-2 あるいは N 末端 29 アミノ酸 (192 番から 220 番) を発現する E1-3 の場合は特異的なバンドを認めなかった。このため、No.80 抗体のエピトープは E1 蛋白のアミノ酸 241 番から 260 番付近であると推定された。また、No.81 および No.82 抗体は E1-1 に強く反応し、E1-2 に弱く反応したが、E1-3 には全く反応性を示さなかった。このためエピトープは E1 蛋白のアミノ酸 221 番から 240 番付近であると考えられた。他の 4 種類の抗 E1 抗体は、いずれのウエスタンブロット法でも E1 蛋白と反応しなかった事から、E1 蛋白のコンフォメーションなエピトープを認識する可能性が示唆された。

E2 抗体のエピトープマッピングも同様のストラテジーで行った。まず、E2 蛋白のエクトドメイン (アミノ酸 384 番から 711 番) を発現するプラスミド V711V を 293T 細胞にトランスフェクトし、その細胞のライセートについて、各抗体をプローブとしてウエスタンブロット法を行った。3 種類の抗 E2 抗体のうち、特異的な反応を示したのは No.70 抗体のみであった。また、この抗体はさらに C 末端側 50 アミノ酸を欠損させた V661V (アミノ酸 384 番から 661 番) の場合でも E2 蛋白との反応性を認めたことから、このモノクローナル抗体 No.70 は E2 蛋白の N 末端側 278 アミノ酸領域のリニアールエピトープを認識している事が示唆された。No.70 抗体についてエピトープ領域をさらに絞り込むために、E2 蛋白の N 末端側あるいは C 末端側の欠損体を GST との融合蛋白として大腸菌で発現させた。No.70 抗体は、E2 蛋白の N 末端側 150、100、50 アミノ酸をそれぞれ発現する E2-1、E2-2、E2-3 とは特異的な反応を示したが、N 末端側を欠損させアミノ酸 534 番から 661 番、または 584 番から 661 番をそれぞれ発現する E2-4、E2-5 とは反応しなかった。以上の結果より No.70 抗体のエピトープは E2 蛋白のアミノ酸 384 番から 433 番領域である事が推定された。この領域は、アミノ酸の変異が著しい超可変領域 (アミノ酸 386 番から 411 番) を含んでいる事から、No.70 抗体はこの領域を認識している可能性も考えられる。他の 2 種類の抗 E2 抗体は、いずれのウエスタンブロット法でも E2 蛋白を認識しなかった事から、E2 蛋白

のコンフォメーションなエピトープを認識する可能性が考えられた。

4) 動物実験の準備

HCV に唯一感受性を示す実験動物はチンパンジーしかない。チンパンジーはワシントン条約で保護されている稀少動物であるため、実験には細心の注意が必要となる。チンパンジーに投与できるヒト抗体の純度・安全性の調査を行った。ヒトの第一相試験レベルの抗体を準備できれば理想であるが、そのような精度の抗体をチンパンジーの投与量 (1—3g) 作製すると1クローンあたり数千万円必要であることから、現実的なレベルな抗体の生産法を検討する必要がある、委託先と検討を進めている。

5) 諸外国における肝炎対策の状況調査

ワクチンの国際的な開発状況、ワクチンの開発状況と各国の現場における普及状況、及び HCV 感染者に対する医療措置・行政措置・医療に関わる行政措置の現状、三点を包括的に把握し、今後の HCV 感染への医療、行政措置に対する提言を行うべく実施した。他国同様、日本において感染率が最も高いとされている集団は、未処理の輸血感染者である。1989年に HCV が同定されて以降、医療分野において HCV に対する検査方法や治療方法は精緻化の方向にあり、日本の対血液政策及び医学的予防対策は他国と比肩する。しかし、我が国の輸血での感染に対して行政措置は、国に対する訴訟例がほほないことから、見舞金、補償など既感染者に対する財政措置は行われていない。また予防対策として医学的対策のほか行政措置が求められるが、国単位のキャンペーン実施、HCV 感染防止のための HCV 検査の拡大化・一般化、HCV 知識の普及活動、ドナーの登録制度の強化等、対人行政措置においては、他国に比べて遅れている。今後の行政措置として、自覚症状のない患者をも目標に据えた措置が求められる。各国それぞれ様々な面からの措置が行われているが、1999年から2000年にかけてのワクチンの開発により、さらに多方面にわたる対策と HCV 啓発活動が求められる。

D. 考察

慢性C型肝炎からの自然治癒例のリンパ球からファージディスプレイ法を用いて、また、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを免疫し、HCV のエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取

得した。また、これらの抗体のエピトープマッピングを行った。さらに、得られたヒト型抗体の生体からのウイルス排除活性を HCV に持続感染しているチンパンジーを用いた活性評価に向けて準備を開始した。また、諸外国における肝炎対策の状況調査した。

E. 結論

- 1) HCV のエンベロープ蛋白を認識するヒト型抗体 10 クロウンを得た。
- 2) これらの抗体は HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。
- 3) 抗体の認識部位を決定した。
- 4) 動物実験の準備を開始した。
- 5) 諸外国における肝炎対策の状況調査した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y. Characterization of cell surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*, 279, 343-353 (2001).
- Suzuki R., Tamura K., Li J., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology*, 280, 301-309 (2001).
- Okuma K., Matsuura Y., Tatsuo H., Inagaki Y., Nakamura M., Yamamoto N., and Yanagi Y. Analysis of the molecules involved in human T-cell leukemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J.Gen. Virol.*, 82, 821-830 (2001).
- Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology*, 270, 229-236 (2000).
- Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Asakura H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 5066-5074 (2000).

- Tatsuo H., Okuma K., Tanaka K., Ono N., Minagawa H., Takeda A., Matsuura Y., and Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 4139-4145 (2000).
- Kamei A., Tamaki S., Taniyama H., Takamura S., Nishimura Y., Kagawa Y., Uno-Furuta S., Kaito M., Kim G., Toda M., Matsuura Y., Miyamura T., Adachi Y., and Yasutomi Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology*, 273, 120-126 (2000).
- Utama A., Shimizu H., Hasebe F., Morita K., Igarashi A., Shoji I., Matsuura Y., Hatsu M., Takamizawa K., Hagiwara A., and Miyamura T. Role of the DExH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities. *Virology*, 273, 316-3249 (2000).
- Aizaki H., Saito S., Ogino T., Miyajima N., Harada T., Matsuura Y., Miyamura T., and Kohase M. Suppression of interferon-induced antiviral activity in cells expressing hepatitis C virus proteins. *J. Interferon Cytokine Res.*, 20, 1111-1120 (2000).
- 2. 学会発表**
- Suzuki, T., Li T., Tani, H., Osawa, Y., Suzuki, R., Sakae, K., Hayashi, A., Ishiko, H., Matsuura, Y., Kikuchi, S., and Miyamura, T. Detection of antibody against ORF1 protein of TTV. The 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Atlanta, USA, April, 2000.
- Takikawa, S., Someya, T., Suzuki, R., Tani, H., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, T., M. A., Whitt, Matsuura, Y., and Miyamura, T. Biological functions of HCV envelope proteins. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Analysis of the genes differentially expressed in HCV core gene transgenic mice. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.
- Aizaki, H., Nagamori, S., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Propagation of hepatitis C virus in human liver cells grown in a three-dimensional radial flow culture. 7th International Meeting on Hepatitis and Related Viruses, Gold Coast, Australia, December, 2000.
- Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Characterization of ecdysone-inducible expression system of hepatitis C virus protein in human liver cells. *Ibid.*
- Suzuki, R., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Ubiquitin-mediated degradation of HCV core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Ibid.*
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Hepatitis C virus core protein binds to retinoid X receptor-alpha and modulates its transcriptional activity. *Ibid.*
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. HCV core protein modulates intrahepatic cytokine expression and activates AP-1 in transgenic mice. *Ibid.*
- Shimoike, T., Suzuki, T., Tanaka, Y., Matsuura, Y., Totsuka, A., and Miyamura, T. The stem-loop IIIId domain of the HCV 5'UTR is important to its translational repression by the core protein. *Ibid.*
- Takikawa, S., Suzuki, K., Someya, T., Tani, H., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Production of human monoclonal antibodies against HCV envelope proteins by transgenic mice with human immunoglobulin loci. *Ibid.*
- H. 知的所有権の出願・登録状況**
 発明の名称；C型肝炎治療薬
 ①発明者；松浦善治、宮村達男、伊丹清馬、
 渋井達郎、関 誠、四井能尚
 ②出願日；平成 13 年 2 月 13 日 国際出願
 番号；PCT/JP01/00967
 ③共同出願者；三菱東京製薬
 ④発明内容の概略；HCV のエンベロープ蛋白に結合する種々の物質に関し、詳細には HCV エンベロープ蛋白と結合することに

より HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する、抗体などの蛋白質、硫酸

化多糖類、低分子化合物に存する。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

ヒト型抗 HCV エンベロープ抗体の作製と性状解析に関する研究

分担研究者 松浦 善治 大阪大学微生物病研究所 教授
森石 恆司 大阪大学微生物病研究所 助教授

研究要旨

HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合および侵入機構の評価系を用いて、ファージディスプレイ法、あるいは、ヒトの抗体遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを用いて、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和できるヒト型モノクローナル抗体 10 クローンを取得した。これらの抗体の慢性 C 型肝炎患者への臨床応用へ向けての開発を進めるため、生体からのウイルス排除活性を HCV に持続感染しているチンパンジーを用いて検討するための準備を進めた。

A. 研究目的

HCV は輸血後感染症の最も大きな問題であったが、高感度抗体検出系の開発によりその感染者は激減した。しかしながら、我が国には二百万人以上もの HCV のキャリアーが存在すると推定され、HCV 感染と肝癌発症の相関も血清学的に証明されている。HCV を増殖できる細胞培養系が存在しないため、これまでのウイルス感染症で用いられてきた感染の中和やウイルスの排除を担う液性及び細胞性免疫反応の解析は進んでいない。我々はこれまでに慢性 C 型肝炎からの自然治癒例に HCV の二つのエンベロープ蛋白 (E1 と E2) のうちの E2 蛋白が細胞表面の CD81 分子に結合するのを阻止できる抗体 (NOB 抗体) が高率に出現することを見出した。この成績を基にしてファージディスプレイ法を用いて NOB 活性を示す一本鎖ヒト抗体の作製を試みた。また、HCV の細胞へ吸着以降のステップ (細胞融合とウイルス核酸の侵入) を解析できる系を構築し、さらに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えエンベロープ蛋白で免疫し、HCV のエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得することを目的とした。

B. 研究方法

ヒト型抗体の作製とスクリーニング

高い結合阻止抗体価を示し、慢性 C 型肝炎から自然治癒された方から既にインフォームドコンセントを得ており、彼らの末梢リンパ球から cDNA を作製しファージディスプレイ

系を用いて、組換え抗体のライブラリーを作製した。その中から結合阻止活性を指標にして高い活性を示すものを選別した。また、ヒト抗体を作製できるトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白を発現させた細胞の膜画分を抗原として免疫して、HCV のエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体を作製した。

抗体のアッセイは、これまでに開発した細胞融合活性測定系で行った。CHO 細胞に HCV にエンベロープ蛋白と T7 ポリメラーゼを発現させ、HepG2 細胞にリポーターとして T7 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを導入し、両者を混合培養する。もし両細胞間で融合が生じれば、T7 ポリメラーゼによってルシフェラーゼ遺伝子が発現される。この系を利用して、組換え抗体の細胞融合阻止活性を調べた。

(倫理面への配慮)

一人の慢性 C 型肝炎から自然治癒された方に、本研究の趣旨を説明し、本人から既にインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

1) NOB 活性を持ったヒト型抗体の作製

高い NOB 抗体価を持ち、慢性 C 型肝炎から自然治癒された方からインフォームドコンセントを得た後、末梢リンパ球を採取してヒト型抗体の選別を試みた。現在いくつかのクローンが得られその性状を解析している。

2) ヒト抗体遺伝子を持ったトランスジェニックマウスを用いた抗 HCV 抗体の作製

ヒト抗体を作るトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白を発現させた細胞膜画分を抗原として免疫し、中和活性を保持した HCV のエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体の作製を試みた。その結果、E1 に対する抗体が 6 種、E2 に対する抗体が 3 種得られた。いずれの抗体も NOB 活性およびシュードタイプウイルスの中和活性を示さなかったが、いくつかの抗体は HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。

D. 考察

高い NOB 抗体価を持った慢性 C 型肝炎からの自然治癒例のリンパ球からファージディスプレイ法を用いて NOB 活性を示す一本鎖ヒト抗体を得た。今後、これらの一本鎖ヒト抗体を完全なヒト型抗体に再構築し、より強い NOB 活性をもったヒト抗体の作製が必要と思われる。さらに、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウスを組換えエンベロープ蛋白で免役し、HCV のエンベロープ蛋白の細胞融合活性を阻害できるヒト型抗体を取得した。これまでに得られたヒト型抗体の生体からのウイルス排除活性を HCV に持続感染しているチンパンジーを用いた活性評価に向けて準備を進めている。

E. 結論

1) 慢性 C 型肝炎から自然治癒し、かつ高い NOB 抗体価を持ったヒトの末梢リンパ球から組換え抗体のライブラリーを作製し、NOB 活性を示す一本鎖抗体 2 クローンを得た。2) ヒトのイムノグロブリン 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを HCV のエンベロープ蛋白で免役し、HCV のエンベロープ蛋白を認識するヒト型抗体 10 クローンを得た。これらの抗体は結合阻止活性やシュードタイプウイルスの中和活性を示さなかったものの、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を中和した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tani H., Nishijima M., Ushijima H., Miyamura T., and Matsuura Y. Characterization of cell surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*, 279, 343-353 (2001).

Suzuki R., Tamura K., Li J., Matsuura Y., Miyamura T. and Suzuki T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology*, 280, 301-309 (2001).

Okuma K., Matsuura Y., Tatsuo H., Inagaki Y., Nakamura M., Yamamoto N., and Yanagi Y. Analysis of the molecules involved in human T-cell leukemia virus type 1 entry by a vesicular stomatitis virus pseudotype bearing its envelope glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, 82, 821-830 (2001).

Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., and Miyamura T. Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology*, 270, 229-236 (2000).

Takikawa S., Ishii K., Aizaki H., Asakura H., Suzuki T., Matsuura Y., and Miyamura T. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 5066-5074 (2000).

Tatsuo H., Okuma K., Tanaka K., Ono N., Minagawa H., Takeda A., Matsuura Y., and Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J. Virol.*, 74, 4139-4145 (2000).

Kamei A., Tamaki S., Taniyama H., Takamura S., Nishimura Y., Kagawa Y., Uno-Furuta S., Kaito M., Kim G., Toda M., Matsuura Y., Miyamura T., Adachi Y., and Yasutomi Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology*, 273, 120-126 (2000).

Utama A., Shimizu H., Hasebe F., Morita K., Igarashi A., Shoji I, Matsuura Y., Hatsu M, Takamizawa K., Hagiwara A., and Miyamura T. Role of the DExH motif of the Japanese encephalitis virus and hepatitis C virus NS3 proteins in the ATPase and RNA helicase activities. *Virology*, 273, 316-3249 (2000).

Aizaki H., Saito S., Ogino T., Miyajima N., Harada T., Matsuura Y., Miyamura T., and Kohase M. Suppression of interferon-induced

antiviral activity in cells expressing hepatitis C virus proteins. *J. Interferon Cytokine Res.*, 20, 1111-1120 (2000).

2. 学会発表

Suzuki, T., Li T., Tani, H., Osawa, Y., Suzuki, R., Sakae, K., Hayashi, A., Ishiko, H., Matsuura, Y., Kikuchi, S., and Miyamura, T. Detection of antibody against ORF1 protein of TTV. The 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Atlanta, USA, April, 2000.

Takikawa, S., Someya, T., Suzuki, R., Tani, H., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, T., M. A., Whitt, Matsuura, Y., and Miyamura, T. Biological functions of HCV envelope proteins. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.

Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Analysis of the genes differentially expressed in HCV core gene transgenic mice. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.

Aizaki, H., Nagamori, S., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Propagation of hepatitis C virus in human liver cells grown in a three-dimensional radial flow culture. 7th International Meeting on Hepatitis and Related Viruses, Gold Coast, Australia, December, 2000.

Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Characterization of ecdysone-inducible expression system of hepatitis C virus protein in human liver cells. *Ibid.*

Suzuki, R., Suzuki, T., Matsuura, Y., and

Miyamura, T. Ubiquitin-mediated degradation of HCV core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Ibid.*

Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Hepatitis C virus core protein binds to retinoid X receptor-alpha and modulates its transcriptional activity. *Ibid.*

Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. HCV core protein modulates intrahepatic cytokine expression and activates AP-1 in transgenic mice. *Ibid.*

Shimoike, T., Suzuki, T., Tanaka, Y., Matsuura, Y., Totsuka, A., and Miyamura, T. The stem-loop IIIId domain of the HCV 5'UTR is important to its translational repression by the core protein. *Ibid.*

Takikawa, S., Suzuki, K., Someya, T., Tani, H., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Production of human monoclonal antibodies against HCV envelope proteins by transgenic mice with human immunoglobulin loci. *Ibid.*

H. 知的所有権の出願・登録状況

発明の名称 C型肝炎治療薬

①発明者 松浦善治、宮村達男、伊丹清馬、渋谷達郎、関 誠、四井能尚

②出願日 平成 13 年 2 月 13 日 国際出願番号 PCT/JP01/00967

③共同出願者 三菱東京製薬

④発明内容の概略

HCV のエンベロープ蛋白に結合する種々の物質に関し、詳細には HCV エンベロープ蛋白と結合することにより HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する、抗体などの蛋白質、硫酸化多糖類、低分子化合物に存する。

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

分担研究報告書

HCV エンベロープ蛋白に対するヒト型モノクローナル抗体の
エピトープマッピングに関する研究

分担研究者 鈴木 哲朗 国立感染症研究所ウイルス第二部 室長
研究協力者 鈴木 亮介 国立感染症研究所ウイルス第二部

研究要旨

HCV エンベロープ蛋白 E1、E2 に対するヒト型モノクローナル抗体のエピトープマッピングを行った。抗 E1 抗体 No.80 のエピトープはアミノ酸 241 番から 260 番領域、また、No.81 および No.82 抗体はアミノ酸 221 番から 240 番領域であると推定された。抗 E2 抗体 No.70 のエピトープは超可変領域を含むアミノ酸 384 番から 433 番領域であると推定された。これ以外の 6 種類の抗体は、ウエスタンブロット法では E1 または E2 蛋白との反応が認められなかった事から、エンベロープ蛋白のコンフォメーションなエピトープを認識する可能性が示唆された。

A. 研究目的

細胞表面に HCV E1 及び E2 蛋白質 (type1b:NIHJ1) を発現する CHO 細胞の細胞膜分画をヒト抗体遺伝子を組み込んだゼノマウスに免疫し、E1 あるいは E2 蛋白質に対するヒト型モノクローナル抗体を作成した。そこでこれらの抗体のエピトープマッピングを行う。

B. 研究方法

E1 または E2 蛋白の哺乳動物細胞での発現には pCAV340V (以下 V340V)、pCAV260 (同 V260V)、pCAV711V (同 V711V) 及び pCAV661V (以下 V661V) を用いた。これらのプラスミドをヒト腎由来 293T 細胞へトランスフェクトし、48 時間後に細胞を回収してウエスタンブロット法を行った。一方、大腸菌発現ベクターは以下のように構築した。EcoRI 認識配列を含むプライマーを設計し、E1 および E2 領域の cDNA を PCR 法を用いて増幅させた。各 cDNA 断片を EcoRI で切断し、

pGEX-4T-1 (アマシャム・ファルマシア) の EcoRI サイトに挿入した。挿入部位の上流にグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) 遺伝子が含まれているため HCV エンベロープ蛋白は GST との融合蛋白として産生される。作製したプラスミドを、大腸菌 BL-21 codon plus (STRATAGENE) に導入し、IPTG 存在下で 37℃、4 時間培養を行い HCV-GST 融合蛋白の発現を誘導した。

C. 結果と考察

E1 蛋白のエクトドメイン (HCV アミノ酸 No.192 番から 340 番) と VSV G 蛋白のシグナル配列、膜貫通領域、細胞質テールを発現する V340V を 293T 細胞にトランスフェクトし、その細胞のライセートについて、各 E1 抗体の反応性をウエスタンブロット法により解析した。7 種類の抗 E1 抗体のうち、E1 蛋白と特異的な反応を示したのは、No.80、No.81、No.82 の 3 クローンであった。またこの 3 クローンは E1 蛋白質の N 末端側 69 アミノ酸領

域を含む V260V を発現させた場合にも同様の反応性を示した。以上よりこの3種類のモノクローナル抗体は、E1 蛋白のアミノ酸 192 番から 260 番領域のリニアエピトープを認識している事が示唆された。さらにエピトープ領域を絞り込むために、E1 蛋白の C 末端側欠損と GST との融合蛋白を大腸菌で発現するプラスミドを構築し、各抗体と発現産物との反応をウエスタンブロット法によって解析した。No.80 抗体は E1 の N 末端側 69 アミノ酸 (192 番から 260 番) を発現する E1-1 とは反応するものの、N 末端 49 アミノ酸 (192 番から 240 番) を発現する E1-2 あるいは N 末端 29 アミノ酸 (192 番から 220 番) を発現する E1-3 の場合は特異的なバンドを認めなかった。このため、No.80 抗体のエピトープは E1 蛋白のアミノ酸 241 番から 260 番付近であると推定された。また、No.81 および No.82 抗体は E1-1 に強く反応し、E1-2 に弱く反応したが、E1-3 には全く反応性を示さなかった。このためエピトープは E1 蛋白のアミノ酸 221 番から 240 番付近であると考えられた。他の 4 種類の抗 E1 抗体は、いずれのウエスタンブロット法でも E1 蛋白と反応しなかった事から、E1 蛋白のコンフォメーションなエピトープを認識する可能性が示唆された。

E2 抗体のエピトープマッピングも同様のストラテジーで行った。まず、E2 蛋白のエクトドメイン (アミノ酸 384 番から 711 番) を発現するプラスミド V711V を 293T 細胞にトランスフェクトし、その細胞のライセートについて、各抗体をプローブとしてウエスタンブロット法を行った。3 種類の抗 E2 抗体のうち、特異的な反応を示したのは No.70 抗体のみであった。また、この抗体はさらに C 末端側 50 アミノ酸を欠損させた V661V (アミノ酸 384 番から 661 番) の場合でも E2 蛋白との反応を認めたことから、このモノクローナル抗体 No.70 は E2 蛋白質の N 末端側 278 アミノ酸領域のリニアなエピトープを認識している

事が示唆された。No.70 抗体についてエピトープ領域をさらに絞り込むために、E2 蛋白の N 末端側あるいは C 末端側の欠損体を GST との融合蛋白質として大腸菌で発現させた。No.70 抗体は、E2 蛋白の N 末端側 150、100、50 アミノ酸をそれぞれ発現する E2-1、E2-2、E2-3 とは特異的な反応を示したが、N 末端側を欠損させアミノ酸 534 番から 661 番、または 584 番から 661 番をそれぞれ発現する E2-4、E2-5 とは反応しなかった。以上の結果より No.70 抗体のエピトープは E2 蛋白のアミノ酸 384 番から 433 番領域である事が推定された。この領域は、アミノ酸の変異が著しい超可変領域 (アミノ酸 386 番から 411 番) を含んでいる事から、No.70 抗体はこの領域を認識している可能性も考えられる。他の 2 種類の抗 E2 抗体は、いずれのウエスタンブロット法でも E2 蛋白を認識しなかった事から、E2 蛋白のコンフォメーションなエピトープを認識する可能性が考えられた。

D. 結論

HCV エンベロープ蛋白 E1、E2 に対するヒト型モノクローナル抗体のエピトープマッピングを行った。3 種類の抗 E1 抗体のリニアエピトープ 20 アミノ酸と 1 種類の抗 E2 抗体が認識する 50 アミノ酸領域をマップした。これ以外の 6 種類の抗体は、E1 または E2 蛋白のコンフォメーションなエピトープを認識すると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology* 270: 229-236, 2000.

Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., and Miyamura, T.

- Cell fusion activity of HCV envelope proteins. *J. Virol.* 74: 5066-5074, 2000.
- Suzuki, R., Tamura, K., Jin L., Ishii, K., Matsuura, Y., Miyamura, T., Suzuki, T. Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280: 301-309, 2001.
2. 学会発表 (国際)
- Suzuki, T., Li T., Tani, H., Osawa, Y., Suzuki, R., Sakae, K., Hayashi, A., Ishiko, H., Matsuura, Y., Kikuchi, S., and Miyamura, T. Detection of antibody against ORF1 protein of TTV. The 10 th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Atlanta, USA, April, 2000.
- Takikawa, S., Someya, T., Suzuki, R., Tani, H., Aizaki, H., Ishii, K., Suzuki, T., M. A., Whitt, Matsuura, Y., and Miyamura, T. Biological functions of HCV envelope proteins. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Analysis of the genes differentially expressed in HCV core gene transgenic mice. International Association for the Study of the Liver, Fukuoka, June, 2000.
- Aizaki, H., Nagamori, S., Kawada, M., Matsuura, T., Hasumura, S., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Propagation of hepatitis C virus in human liver cells grown in a three-dimensional radial flow culture. 7th International Meeting on Hepatitis and Related Viruses, Gold Coast, Australia, December, 2000.
- Sacco, R., Suzuki, R., Aizaki, H., Tsutsumi, T., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Characterization of ecdysone-inducible expression system of hepatitis C virus protein in human liver cells. *Ibid.*
- Suzuki, R., Suzuki, T., Matsuura, Y., and Miyamura, T. Ubiquitin-mediated degradation of HCV core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Ibid.*
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Shimoike, T., Suzuki, R., Moriya, K., Matsuura, Y., Koike, K., and Miyamura, T. Hepatitis C virus core protein binds to retinoid X receptor-alpha and modulates its transcriptional activity. *Ibid.*
- Tsutsumi, T., Suzuki, T., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Shintani, Y., Fujie, H., Koike, K., and Miyamura, T. HCV core protein modulates intrahepatic cytokine expression and activates AP-1 in transgenic mice. *Ibid.*
- Shimoike, T., Suzuki, T., Tanaka, Y., Matsuura, Y., Totsuka, A., and Miyamura, T. The stem-loop IIIId domain of the HCV 5'UTR is important to its translational repression by the core protein. *Ibid.*
- Takikawa, S., Suzuki, K., Someya, T., Tani, H., Suzuki, R., Suzuki, T., Miyamura, T., and Matsuura, Y. Production of human monoclonal antibodies against HCV envelope proteins by transgenic mice with human immunoglobulin loci. *Ibid.*

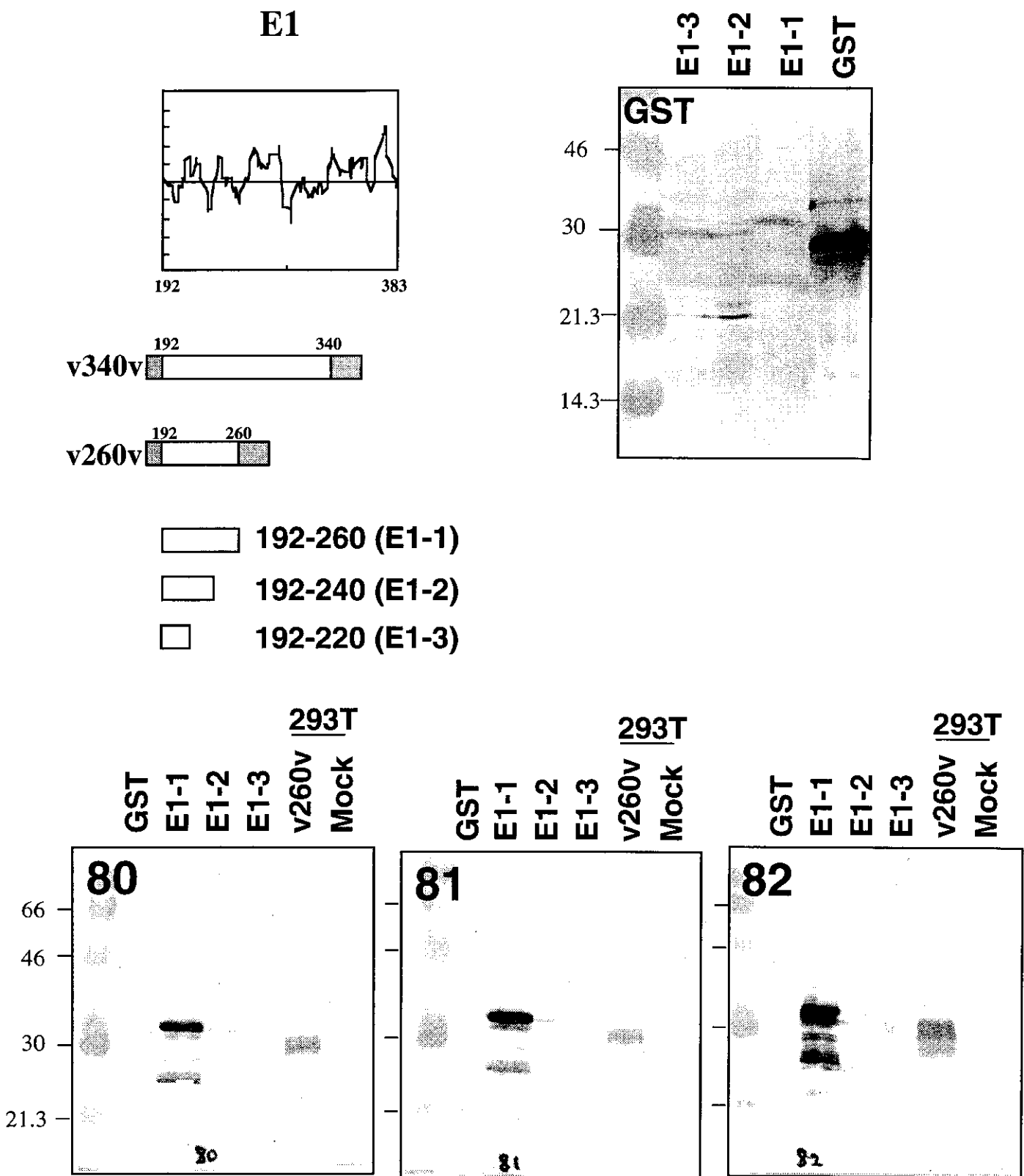


図 1. 抗E1抗体のエピトープマッピング

E2

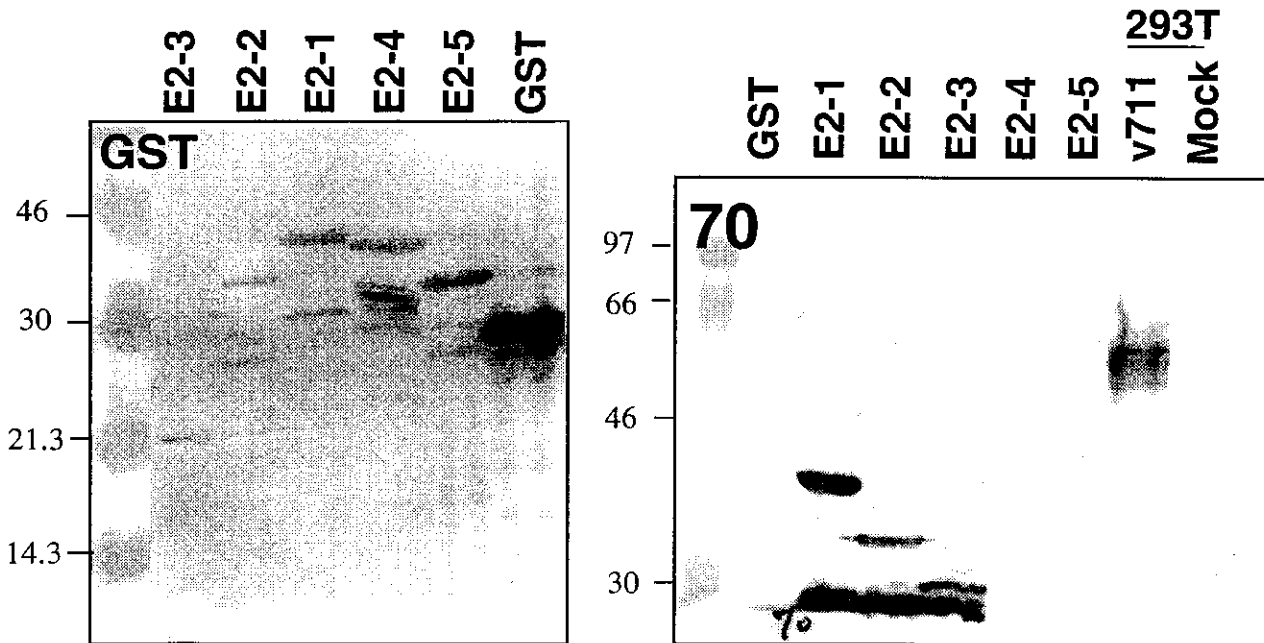
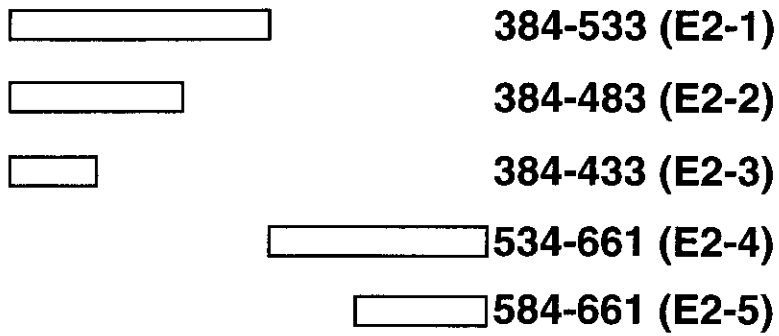
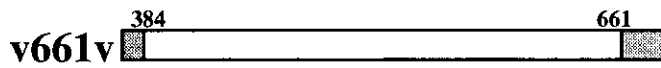
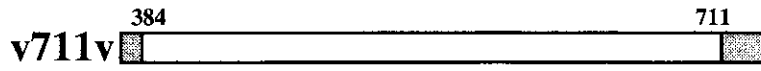
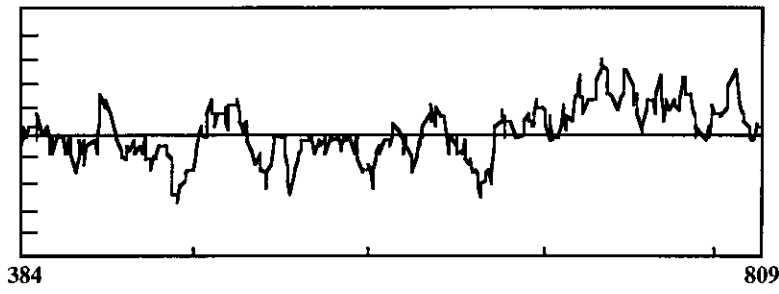


図 2 . 抗E2抗体のエピトープマッピング

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
分担研究報告書

諸外国における肝炎対策の状況調査に関する研究

分担研究者 宮村達男 国立感染症研究所ウイルス第二部 部長

研究要旨

我が国における C 型肝炎ウイルス（HCV）感染者は、自覚症状のない潜在的患者を含め、200 万人にのぼるといわれる。さらなる感染を防ぎ、顕在的及び潜在的感染者数を抑制、減少させるためには、医療措置のほか、適切な行政措置が求められている。本研究では、HCV ワクチンの医療開発の動向を踏まえた上で、HCV 感染の現状と各国の医療・行政両措置を明らかにし、HCV 感染に対する多方面の措置を考察することが目的である。我が国における HCV 感染措置及び研究は他国と比較して遅れていると言われているが、本研究により、我が国の HCV 対策措置を促進させるものと思われる。HCV 感染現状を感染者数、疫学的特徴などを調査することにより正確に把握した上で、その現状に対していかなる医療・行政措置が行われているかを、予防対策、検査方法、治療方法、医療費の負担、起訴、財政措置などあらゆる方面から調査を行うことにより明らかにした。その結果、年間新規患者数の把握、予防のための HCV 検査の拡大化・一般化キャンペーン実施など、医学的対策が行われた後の行政対策の持続的措置に関し、日本と諸外国との相違を顕著に示唆するデータを得た。また、血液供給者登録制度の有無、肝がんと関連、検査の普及啓発費用に対する政府負担等において、諸外国間の顕著な相違、及び日本と諸外国との相違を顕著に示唆するデータを得ることができた。研究成果として、各国における HCV 対策措置の時間的・地域的比較を可能とする画期的な資料を作成することが可能となったことにより、日本が他国よりも後れるとされる HCV 研究において、今後の研究のための大きな促進力になると考えられる。

A. 研究目的

我が国において顕在的的患者数・潜在的患者数合わせて 200 万人以上とされる C 型肝炎者に対し、さらなる医療・行政措置が求められている。しかし我が国の C 型肝炎感染者に対する実体調査や行政措置は、他国に比べて大きく後れをとっているといわれる。本研究は、HCV 感染者に対する医療措置・行政措置・医療に関わる行政措置の現状、ワクチンの国際的な開発状況という二点を包括的に把握し、今後の HCV 感染への医療、行政措置に対する提言を行うべく、また日本における対 HCV 感染研究への貢献を行うべく実施した。本研究は、ワクチンの国際的な開発状況を把握するための文献研究を踏まえたうえで、各国への電話及びメールによるヒアリング調査の実施、ヒアリング結果と文献から得た情報からの年表作成、ルックバックについての状況把握、という大きく四手順から成り立っている。ワクチン開発及び HCV 状況に対する文献研究の後、各

国に対するヒアリング調査を実施した。アメリカ、カナダ、イングランド及びウェールズ、フランス、イタリア 5 国の調査対象者へ質問項目を送付後、電話及び電子メールによるヒアリング調査を直接行うという手順をとり、精緻かつ時宜を得た情報を得ることに努めた。文献研究とヒアリング調査研究双方を行うことにより、対 HCV 措置に対する包括的・総合的な考察が可能になる。本調査によって C 型肝炎に関する諸外国の現状を明示することは、日本における対 C 型肝炎感染・及び感染者政策及び研究を推進させるものであると考えられる。

B. 研究方法

本研究は、ワクチンの国際的な開発状況、ワクチンの開発状況と各国の現場における普及状況、及び HCV 感染者に対する医療措置・行政措置・医療に関わる行政措置の現状、三点を包括的に把握し、今後の HCV 感染への医療、行政措置に対する提言を

行うべく実施した。本研究は、ワクチンの国際的な開発状況を把握するための文献研究を踏まえたうえで、各国への電話及びメールによるヒアリング調査の実施、ヒアリング結果と文献から得た情報からの年表作成、ルックバックについての状況把握、という大きく四手順から成り立っている。ワクチン開発における文献上の把握においては、松浦、滝川による医学的見地からのスウェーデン、アメリカにおけるワクチン開発状況報告がその基礎となっている。ヒアリング調査においては、アメリカ、カナダ、イングランド及びウェールズ、フランス、イタリア 5 国の調査対象者へ質問項目を送付後、電話及び電子メールによるヒアリング調査を直接行うという手順をとり、精緻かつ時宜を得た情報を得ることを第一の目標とした。共通の調査項目は大きく分けて血液事業、HCV 感染に関する措置の実施状況の二項とし、それぞれ医療面、行政面、訴訟状況、財政状況など各方面からの質問項目を作成し、ヒアリング調査を行った。各国において HCV 感染に対する措置に特徴がある場合は各国に関し、特徴的措置に対する詳細な聞き取りを行っている。ヒアリング調査の対象は以下である。米国は American Association of Blood Banks (AABB)、U.S. Food and Drug Administration (FDA)、カナダは Canadian Blood Services、イングランド及びウェールズは保健省血液政策課及び血液媒介性ウイルス課、肝臓財団、フランスは国立パスツール研究所、Etablissement de Transfusion Sanguine (ETS)、Hepatitis Info Service、Hepatitis SOS、イタリアは保健省、肝炎財団など。一部の調査項目については各国の Roche 社やアボット社など HCV 試験薬の製造メーカーに対しても調査を行なった。ヒアリング調査を行った結果、その解答をそれぞれ質問項目ごとにまとめ、各国の現状の比較を容易にした。文献を用いて作成した各国の HCV に関する年表と、各国の現状を比較可能とする文献資料の双方を作成することにより、各国の時系列的な比較と現状の比較という縦横の比較研究を可能にする。ワクチンの世界開発状況の把握、文献研究、各国へのヒアリング項目の作成、各国への電話及びメールによるヒアリング調査、という段階を経る研究を行うことにより、HCV 感染者に対する医療措置、行政措置、医療に関わる行政措置を包括的に把握することが可能となり、医療、行政双方の措置を顕著に示すことができると考えられる。

C. 研究結果

I. 世界のウイルス開発状況

これまでに NOB 活性を保持した抗 E2 ヒト型抗体の作製が、3 つの研究グループから報告されている。

イタリアの Burioni らは genotype 1a の慢性 C 型肝炎患者の骨髄リンパ球から抗体遺伝子のライブラリーを作成し、ファージディスプレイ法を用いて高い NOB 活性を示す 5 つの抗 E2 ヒト型 Fab 抗体を作製した。(Hepatology: 1998; 28: 810-814)

また、スウェーデンの Persson らは genotype 2b の C 型肝炎患者の骨髄から同様の手法で Fab 抗体を作製し、このクローンを基にして whole IgG1 抗体を作製し、CHO 細胞で発現させた。得られた Fab 抗体は genotype 1a および 1b の E2 蛋白に対して強い NOB 活性を有したが、whole 抗体は Fab 抗体よりも弱い NOB 活性を示した。(J. Gen. Virol: 2000; 81: 2451-2459)

米国スタンフォード大の Foug らは genotype 1b の C 型肝炎患者の末梢 B リンパ球からハイブリドーマを作製し、10 個の抗 E2 ヒト型モノクローナル抗体を作製した。これらの抗体は genotype 1a、1b、2a、そして 2b のいずれの E2 蛋白とも反応し、そのうちの 6 つは NOB 活性を有していた。

Burioni や Foug らが作製した抗 E2 ヒト型抗体を、我々が開発した細胞融合アッセイ、ならびに HCV のエンベロープをもったシュードタイプウイルスに対する中和活性で評価した。その結果、Foug 抗体の 2 つが細胞融合を、また、Burioni 抗体の 2 つがシュードタイプウイルスの感染を中和した。一方、我々がゼノマウスを免疫して作製した 10 個のヒト型モノクローナル抗体 (抗 E1 抗体 7 クローン、抗 E2 抗体 3 クローン) の内、6 つのクローンは HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合活性を中和した。これまでに報告されているヒト抗体は全て精製 E2 蛋白と CD81 との結合を阻害する活性、即ち NOB 活性を指標にして作製されたため、得られた抗体は全て抗 E2 抗体であった。一方、我々が作製したヒト型モノクローナル抗体の中には細胞融合を阻止できる抗 E1 抗体が 4 クローンも含まれていた。

NOB アッセイ以外に細胞融合阻止試験やシュードタイプウイルスの中和試験で活性を示す抗 HCV ヒト型抗体の存在が確認できた。今後これらヒト抗体の生体内でのウイルス排除活性を慢性 C 型肝炎のチンパンジーを用いて評価することが

急務であると思われる。

II. ヒアリングの結果

A. 米国

1. 調査の具体的内容

あらかじめ質問項目を送付し、電話によるヒアリング調査を行った。一部についてメールによる回答も得た。(調査実施：2000年12月、2001年1月2月及び3月)

a) ヒアリング調査の客体

American Association of Blood Banks (AABB)
U.S. Food and Drug Administration (FDA)
Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

b) 調査項目

<共通>

- (1) 血液事業について
- (2) HCVの感染について
- (3) その他

<米国>

- (4) FDAによるルックバック規則の評価について (2)-c)-7

1. 質問事項

a) (共通) 血液事業について

(1) 血液事業の実施主体はどこか

- 国ないしこれに準じる機関(国立研究所等)
- 国ないしこれに準じる機関(国立研究所等)の監督の下、財団法人、社団法人等の非営利法人
- 営利法人、企業等

※ 輸血用血液、血漿分画製剤、それぞれごとに。

(2) 血液事業の監督を行う行政機関はどこか

- 連邦政府
- 州政府
- 政府に準じる機関(国立研究所、大学研究所等)
- その他(具体的に)

(3) 供血(献血)血液へのHCV検査の導入の時期

- HCV抗体
- NAT(PCR)
- その他(ALT等)

b) (共通) HCVの感染について

(1) 血液事業を行うあるいは監督を行う行政機関を相手取って訴訟を提起されているか?

(2) 訴訟を提起されている場合

- (a) 原告団はどのようなグループ、個人か?
- (b) 被告は誰で、どのような内容の訴訟か?

- 連邦政府
- 州政府
- 政府に準じる機関(国立研究所、大学研究所等)
- 営利法人、企業等
- 上記の複数(具体的に)
- その他(具体的に)

(c) また、輸血、血液製剤のどのような部分に着目して訴訟が提起されているのか?

- 製造者責任
- 監督責任
- 責任はないが、広く国民の健康に影響があるという点で(結果責任)

(d) 輸血、血液製剤を受けた者のうち一定の時期の者に限定されているか?

(e) 限定されている場合、どのような時期の者か?

(f) その他訴訟の状況について(詳しく)

(3) 訴訟の結果(判決)が出ている場合

(a) 結果は?

- 原告勝訴
- 被告勝訴
- 和解
- その他(詳しく)

(b) この補償を行うこととなったか? なった場合その内容と額は?

- 慰謝料的支払い
- 補償金の支払い
- 訴訟費用
- その他(具体的に)

(c) この結果の影響で、被告は原告以外の者に対しても何らかの補償や施策を行うことになったか? なった場合その者はどのようなグループに属する者か、またその内容や額は?

- 原告とほぼ同様のリスクを負うグループ(具体的に)

- 原告よりは小さいが何らかのリスクを負うグループ (具体的に)
 - 一般国民
 - 慰謝料的支払い
 - 補償金の支払い
 - ターゲットを絞った啓発普及 (キャンペーン) 費の支出/一般的な～
 - 関連する研究費の支出
 - その他 (具体的に)
- (d) 補償や施策の一環としていわゆる“ルックバック”を行っている場合、その内容を具体的に。特にその中心となる対象者は?
- 非加熱製剤の投与患者
 - 一般的に呼びかけるだけか、(データ、カルテ等を元に) トラッキングして呼びかけるのか (その場合、特定方法についても具体的に)
 - 輸血用血液製剤 (1992 年以前: いつ頃からののかも示して欲しい。)
 - 一般的に呼びかけるだけか、(データ、カルテ等を元に) トラッキングして呼びかけるのか (その場合、特定方法についても具体的に)
 - 輸血用血液製剤 (1992 年以降)
 - 一般的に呼びかけるだけか、(データ、カルテ等を元に) トラッキングして呼びかけるのか (その場合、特定方法についても具体的に)
- (e) ルックバックを行うことになった背景について、又は、具体的なきっかけがあれば。
- 専門家からの指摘
 - 世論の高まり
 - 訴訟の提起
 - その他
- (f) ルックバックを行っている場合、政府は寝た子を起すように、積極的に呼びかけを行っているのか。
- (g) FDA によるルックバック規則(Federal Register, November 16, 2000, 21CFR Parts 606 and 610 [Docket No. 99N-2337]RIN 0910-AB76)の評価。この規則について、今後の予定等。
- 撤回される
 - 改訂される
 - その他
- (4) 今後
- (a) この問題は今後どのような方向に行くとみ
- ているか
- 既に沈静化
 - 近い将来に沈静化
 - 問題はますます広がる
 - その他 (具体的に)
- (b) 「既に沈静化」以外の答えの場合、具体的に何が問題となるか (複数回答可)
- 対象グループ・対象者の増加
 - 補償額等の増加
 - 研究費の増加
 - 社会的な責任追及の声の増加
 - 訴訟の増加
 - その他 (具体的に)
- (5) 普及啓発
- (a) どのような内容の普及啓発を行っているか、あるいは行おうとしているか?
- HCV の基礎知識 (ウイルス、予防から治療まで)
 - 行政サービスの受け方
 - 差別・いじめの防止
 - その他
- (b) その方法は? またその頻度は
- TV、ラジオ
 - 新聞・雑誌
 - 看板等屋外広告
 - ポスター、リーフレット、シンボルアイテム
 - その他 (具体的に)
- (c) その費用は誰が負担しているか
- 中央政府/連邦政府
 - 州政府/県政府
 - 政府に準じる機関 (国立研究所、大学研究所等)
 - 営利法人、企業等
 - その他 (具体的に)
- (d) それぞれごとの額は?
- (6) HCV 検査
- (a) どのような者を対象に、どのような検査を実施しているか (複数回答可)
- 訴訟の原告
 - ハイリスクグループ (具体的に)
 - 一般国民
 - HCV 抗体検査
 - PCR
 - ALT
 - その他 (具体的に)
- (b) その費用は誰が負担しているか

- 連邦政府
- 州政府
- 政府に準じる機関（国立研究所、大学研究所等）
- 営利法人、企業等
- 医療保険の主体（国営・民間）
- 自費（個人負担）
- その他（具体的に）

c) 検査の結果、HCV に感染していることが判明し治療が必要となった場合の医療費は誰が負担するか

- 連邦政府
- 州政府
- 政府に準じる機関（国立研究所、大学研究所等）
- 営利法人、企業等
- 医療保険の主体（国営・民間）
- 自費（個人負担）
- その他（具体的に）

c) (共通) 血液事業について

(1) 臓器移植、針刺し事故、透析由来 HCV 感染者又はその疑いのある者

- 血液（輸血、血液製剤等）由来患者と同様の対応かそれとも違うか？
- 訴訟が起こっているか？起こっている場合、「医療過誤」としてではなく、国や自治体等の監督責任を巡る訴訟があるか？
- ある場合、上記の質問票とほぼ同じ内容で...？

(2) HBV 対策

- 訴訟が起こっているか？
- 対策を特に実施しているか？（HCV と同じ質問票か？）

(3) その他の血液等由来感染症対策を特に実施しているか（CMV 等）

2. 調査の結果

電話によるヒアリングの結果を、質問項目ごとにまとめたものである。

a) (共通) 血液事業について

(1) 血液事業の実施主体はどこか

輸血用血液

- FDA、一部の州
- ARC (American Red Cross)、ABC (America s Blood Center)、AABB (American Association of Blood

Banks) 加盟団体はすべて（あるいはほとんどが）非営利である。

血漿分画製剤

- FDA、一部の州
- 営利目的の企業など。なかには非営利のところもある。

(2) 血液事業の監督を行う行政機関はどこか

- 連邦政府及び一部の州政府が行う。

(3) 供血（献血）血液への HCV 検査の導入の時期

HCV 抗体

- 第1世代 (EIA1.0) : 1990年5月
- 第2世代 (EIA2.0) : 1992年3月
- 第3世代 (EIA3.0) : 1996年5月

NAT (PCR)

- IND(Investigational New Drug) 下で 1998年9月
- 1999年3月に輸血用血液に対して導入。
- しかし、NAT 検査は「investigation=調査」として行なわれているに過ぎず、NAT 検査は未だ認可されていない。
- 恐らく1年以内に FDA から認可されるであろう。
- 全血の検査については、HCV 及び HIV 検出のために行なわれているが、調査手続きの下で、行なわれている。

その他 (ALT等)

- 1980年代半ば (1985年~1987年)、非A非B型肝炎(そのほとんどがC型肝炎)の代理検査として ALT および抗 HBc 検査を導入した。

b) (共通) HCV の感染について

(1) 血液事業を行うあるいは監督を行う行政機関を相手取って訴訟を提起されているか？

- YES

(2) 訴訟を提起されている場合

- (2)-1 原告の多くは個人だが、中には集団訴訟もある。
- (2)-2 原告は米国政府を訴えることはできないので被告はたいがい個々の血液センター、病院、医師など。専門機関 (Professional Associations) なども訴訟の対象となっている。AABB もかなり多くの訴訟を抱えている。
- (2)-3 主に製造者責任が問われている。