

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総合研究事業)

分担研究報告書

分担課題：Cohnの血漿分画法によるC型肝炎ウイルスの不活化の評価

分担研究者 野島清子 (国立感染症研究所)

分担研究者 下池貴志 (国立感染症研究所)

研究要旨

血漿分画製剤はプール血漿を Cohn の血漿分画法 (Cohn エタノール法) により分画して製造される。これまでに C 型肝炎ウイルス (HCV) に汚染された第 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与による HCV 感染事例が報告されて来た。一方、グロブリンによる HCV 感染事故は 1980 年代後半から 1990 年前半に海外での報告がわずかにあるものの、日本で製造されたグロブリン製剤からの報告はない。培養可能な HCV の JFH-1am 株は、20%エタノールで不活化されないことからグロブリン製剤で感染が生じなかった理由を科学的に明らかにすることを目的とした。血漿に HCV JFH-1am 株をスパイクし、Cohn エタノール分画法により分画した。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) を調べた結果、17%エタノール処理により HCV の感染性および核酸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であったが、ゲノム RNA は依然存在することが明らかとなった。

今年度は Cohn エタノール法の 20%エタノール画分 P (II+III) w に HCV JFH-1am をスパイクし、17%エタノール分画を行い、沈殿、上清、及び 17%エタノール分画前の画分をそれぞれシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、各分画のゲノム RNA、感染性、及びウイルス構造タンパク質 (コアタンパク質) を検出した。その結果、各画分には、RNA に関してはそれぞれ 1 つのピークの分布を示したが、感染性、及びコアタンパク質は、複数のピークの分布を示し、密度の違う HCV 粒子が存在することが示唆された。RNA、感染性、コアタンパク質のピークはいずれの場合も 17%エタノール処理前に比べて、沈殿画分はより高密度へシフトし、一方、上清画分はより低密度へシフトすることが明らかとなった。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスは血液を汚染する可能性のある病原体であり、1964 年から 1987 年か

けて製造された第 因子製剤、第 因子製剤、フィブリノゲン製剤等の投与により多くの人々が C 型肝炎に感染した。その一方、グロ

プリン製剤が原因の HCV 感染は海外からの報告があった 2 製剤のみであり、グロブリン製剤は HCV に対して安全だと考えられている。しかし、これまで HCV を用いた解析の報告はなく我々は、科学的に上記の理由を解析した。

C 型肝炎の治療法はリバビリンとペグインターフェロンとの併用療法 (PEG-IFN/ribavirin) により治療効果 (それでも約 50%) が上がるようになった。しかし、日本人の感染者で多い遺伝子型 (1b 型) の HCV では治療効果が未だ上がらなかったが、ここ数年、数種類の阻害剤 (HCV ウイルスタンパク質であるプロテアーゼ (NS3/NS4A)、ポリメラーゼ (NS5B)、及び NS5A タンパク質に対する阻害剤) が開発、使用が開始され、1b 型も含め、その療効果が上がっている。しかも、副作用の多い PEG-IFN/ribavirin の併用なしの治療薬も開発され、HCV は治療可能な感染症という考えが現実味を帯びてきた。実際、2014 年末に C 型肝炎治療ガイドラインが改訂され、新規経口薬に期待が寄せられているところである。

C 型肝炎ウイルスは、治療薬の開発に必須な培養細胞を用いた感染系が長らくなかったため、チンパンジーを用いて感染性の評価を行っていたが、価格の高さ、扱い難さ、また動物愛護の観点からも治療薬開発等の研究がなかなか進展しなかった。血液製剤中の HCV 不活化の評価は、モデルウイルスとして培養可能なウシ下痢症ウイルス (BVDV) が用いられてきた。しかし、最近、培養細胞で HCV

を増殖させることが可能な系が開発され、研究が急速に進展した。本研究ではこの系を用いて HCV JFH-1am 株 (遺伝子型 2a) を増殖させ、増殖した HCV JFH-1am ウイルスを血液製剤にスパイクしウイルス不活化を評価する系を構築した。更に、実験室レベルでの Cohn エタノール分画法を確立した。これらの系を用いて、血漿に JFH-1am をスパイクし、Cohn エタノール分画法により第 1 因子製剤、第 2 因子製剤、フィブリノゲン製剤、アルブミン製剤、グロブリン製剤等の原料となる画分に分画し、どのフラクションに感染性とウイルス粒子が分配されるかを確認することを目的とした。また、これまでモデルウイルスとして用いられて来た BVDV と比較することにより、これまでのウイルスバリデーションの正当性の有無を評価し、今後の血液製剤の安全性をさらに向上することが目的である。

これまでの研究で、血漿を Cohn エタノール法で分画した沈殿画分 Fra.(+) 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) を調べた結果、17%エタノール処理により HCV の感染性および核酸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であったが、ゲノム RNA は依然存在することが明らかとなった。

今年度は、この 17%エタノール分画による各画分の HCV の性状を知るため、Cohn エ

タノール血漿分画法の最終段階であるグロブリン製剤製造法と同様に、20%エタノールによる沈殿 P (+) w 画分を得、そこに HCV をスパイクし、その後引き続き Cohn エタノール分画法 (17%エタノール処理) で分画を行い、P (+) w 画分以降の HCV の感染性、ウイルスゲノム RNA、及び HCV 構造タンパク質であるコアタンパク質がどの画分に移行するかを調べた。

B. 研究方法

1 . Cohn エタノール分画法による血漿の分画

血漿からコーンエタノール分画法(平成 27 年度 当研究報告書参照)により、沈殿 P (II+III) w 画分を準備し、ここに HCV JFH-1 am をスパイクし、-5 で攪拌しながら最終濃度が 17%となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加した後、15 分間反応させた (②)。エタノール処理後の溶液を-1 、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 (P III : ③) と上清 (S : ④) とに分画した。

2 . ショ糖密度勾配遠心法

分画した各画分 (②、③、及び④) 1mL を ショ糖勾配 (5-50% w/v) を作製した 11mL 緩衝液 (50mM TrisHCl pH7.5, 150mM NaCl, 0.1mMEDTA) の上に載せ、14300xg, 16h, 4 で遠心し (rotor: sw41Ti, Beckman)、遠心チューブの底から 700μl ずつ分画した。各画分 100μl の重量を測定することにより、各画分の比重を求めた。

3 . HCV JFH-1am ウイルス感染性の評価

用いる HCV は、JFH-1am クローンを培養細胞で増殖させ、その後、限外濾過カラム (Vivaspin turbo 10k ; Sartorius 社) を用いて濃縮することにより、感染価の高い (TCID₅₀ 5.6x10⁶/ml) HCV を準備した。各画分の HCV の存在量を各画分に存在する HCV の感染価 (TCID₅₀) で示した。HCV の感染価は各サンプルを DMEM (10%FBS を含む) 培地で段階希釈し、Huh7.5.1 細胞に感染させ、感染 3 日後 HCV の構造蛋白質の一つであるコア蛋白質の発現を、コア蛋白質に対するモノクローナル抗体 (マウス, MA1-080, Thermo Scientific, IL) と蛍光二次抗体 (Alexa Fluor 488, Invitrogen, OR) を用いて蛍光顕微鏡で検出し、励起波 (495nm) により蛍光 (519nm) する細胞の数を調べ、蛍光 (519nm) する細胞が無くなるサンプルの希釈段階から感染価を計算し、TCID₅₀/ml で表し、それぞれの体積を積算し、総ウイルス量 TCID₅₀ で示した。

4 . JFH-1am ウイルス RNA の定量

各フラクションに含まれる HCV JFH-1am ウイルス RNA を定量した。各フラクション 100uL に含まれる核酸を SMITEST EX R&D を用いて精製した。HCV および JFH-1am ウイルス RNA は、QuiantiTech Probe RT-PCR Kit (Qiagen) を用い、BVDV RNA については one step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Qiagen)

を用いて定量 RT-PCR を行った。HCV JFH-1am の核酸量は、HCV 国内標準品を用いて定量し、国際単位 IU/mL で表した。BVDV の核酸量については、予め限外希釈によるエンドポイント法により最小検出希釈倍率を求めて自家標準品を作製し、単位 IU/fraction で表した。

5 . HCV コアタンパク質の検出

シヨ糖勾配遠心後の各分画に含まれる HCV コアタンパク質の検出は western blotting 法を用いた。各画分 30 μ l を用いて SDS-PAGE を行い、PVDF 膜に転写し、1 抗体：コア蛋白質に対するモノクロナール抗体（前述）と、2 次抗体：HRP を結合させたヤギ抗マウスモノクロナール抗体（#170-5047, BioRad, CA）、及び SuperSignal West Femto (#34094, Thermo Scientific, Tokyo)による発光により検出した。

（倫理面への配慮）

HCV JFH-1am クローンは培養細胞でウイルスが増殖する系で、実験動物を用いる必要がないため、研究のやりやすさのみでなく、倫理面においても優れた系である。

C. 研究結果

1 . HCV RNA の分布

i) 遠心前の 17%エタノール画分 (22) ; 図 1 参照) 中の HCV JFH-1am の RNA は、fraction No.6 (F6, 密度：約 1.11g/ml) を 1 つのピークとして持つ分布を示した (図 2)、

ii) 遠心後の沈殿画分中の HCV RNA は、F6 (密度：約 1.13 g/ml) を 1 つのピークとして持つ分布を示した (図 3)、

iii) 遠心後の上清画分 (24) 中の HCV RNA は、F9 (密度：約 1.08 g/ml) を 1 つのピークとして持つ分布を示した (図 4)、

iv) 遠心前の 17%エタノール画分 (22) には約 7×10^9 IU/fraction の HCV RNA が存在し、遠心により、約 7×10^9 IU/fraction の RNA は沈殿画分に移行した。遠心後の上清画分 (24) には、少ないながらも約 7×10^6 IU/fraction の HCV RNA が含まれることが明らかとなった。

v) 各画分の RNA のピークの密度は、遠心前の 17%エタノール画分 (22) では、約 1.11 g/ml で、遠心後の沈殿画分 (23) では、約 1.13 g/ml となり、遠心前の画分の比重から約 0.02 g/ml 重い方へシフトしている。また、遠心後の上清画分 (24) では、約 1.09 g/ml となり、遠心前の画分 (22) より、約 0.02 g/ml 軽い方へ比重がシフトしている (図 5)、

2 . HCV の感染性の分布

i) 遠心前の 17%エタノール画分 (22) 中の HCV JFH-1am の感染性には 3 つのピークを取る分布で、それぞれのピークは F7 (密度：約 1.10 g/ml)、F11, 12 (約 1.05 g/ml)、及び F14, 16 (約 1.00 g/ml) であった。

ii) 遠心後の沈殿画分 (23) 中の HCV の感染性は、同じく 3 つのピークを取る分布で、それぞれのピークは F5 (密度：約 1.14 g/ml)、F8 (約 1.10 g/ml)、及び F15 (約 1.04 g/ml) で

あった。

iii) 遠心後の上清画分 (④) 中の HCV の感染性は検出されなかった。

iv) 遠心前の 17%エタノール画分 (②) には約 1×10^4 IU/fraction の感染性 HCV が存在し、遠心により、約 1×10^4 IU/fraction の RNA は、沈殿画分に移行した。遠心後の上清画分 (④) には感染性は検出されなかった。

v) 17%エタノール処理前の画分 (②) の 3 つの感染性のピーク (密度が約 1.00, 1.05, 及び 1.10 g/ml) は、遠心後の沈殿画分 (③) の 3 つのピーク (密度が約 1.04, 1.10, 及び 1.14 g/ml) に移行し、いずれの場合も密度約 0.04-0.05 g/ml の重い方へのシフトとなっている (図 6)。

3. HCV のコアタンパク質の分布

i) 遠心前の 17%エタノール分画 (②) 中のコアタンパク質は、F10 (約 1.05 g/ml), と F15-16 (約 1.00 g/ml) の 2 つのピークをもつ分布を示した。

ii) 遠心後の沈殿画分 (③) 中のコアタンパク質は、F5 (約 1.14 g/ml), F8 (約 1.10 g/ml), F15-16 (約 1.00 g/ml) の 2 つのピークをもつ分布を示した。

iii) 遠心後の上清画分 (④) 中のコアタンパク質は、F15 (約 1.00 g/ml) に 1 つのピークをもつ分布を示した。

iv) 各画分のコアタンパク質のピークの比重は、遠心前の 17%エタノール画分 (②) では、約 1.00, 及び 1.05 g/ml で、遠心後の沈殿画分 (③) では、約 1.04, 及び 1.10 g/ml

となり、遠心前の画分の比重から約 0.04-0.05 g/ml 重い方へシフトしている。また、遠心後の上清画分 (④) では、約 1.00 g/ml のみとなり、遠心前の画分 (②) に存在した約 1.05 g/ml のピークが消失したか、或いは、遠心前の約 1.05 g/ml のピークが遠心後の約 1.00 g/ml にシフトし、遠心前の約 1.00 のピークが消失したと考えられる (図 2, 3, 4 の各ウエスタンの図参照)。

D. 考察

1. これまでに報告があるように、HCV RNA のピークと、感染性のピークとは一致しなかった。このことはウイルス RNA は、ウイルス粒子の密度には影響を及ぼさないことを示唆しているのかも分からない。

2. Cohn エタノール分画法で、17%エタノール処理で、HCV は 3 つの密度 (1.00, 1.05, 及び 1.10 g/ml) を持つ感染性粒子が存在することを示唆する結果を得た。

3. 17%エタノール処理後、遠心することにより、沈殿画分に分画された感染性ウイルス粒子は、感染前の 3 つのピークを保ったまま、遠心前よりも感染性で密度が約 0.04g/ml, RNA のピークでは約 0.02g/ml 重くなることが明らかとなった。これは 17%エタノール処理により、HCV 粒子を形成しているエンベロープ蛋白質 E1, E2、或いは宿主由来の脂質に何らかの構造の変化を引き起こさせ、その結果、粒子の密度がより高くなったためかも知れない。

一方、この遠心により得られる上清画分は、

感染性がなく（或いは検出限界以下）RNAのピークは、遠心前よりも約0.02 g/ml軽くなった。このことは、上清の軽くなった画分には、HCV RNAとウイルスのコアタンパク質がもはや粒子を形成しておらず、ばらばらになったためと考えられる。このことは、17%エタノール処理後の上清画分には、より密度の高い（約1.04~1.05, 及び1.10g/ml）コアタンパク質が消失していることから示唆される（図4参照）。

今後、Cohn エタノール法で、17%エタノール処理によるHCVの性状の変化を明らかにするためには、宿主の脂質を含めた、HCVエンベロープ蛋白質E1, E2の解析が必要と考えられる。

E. 結論

Cohn エタノール法において、血漿中に混入したHCVが、17%エタノール処理により沈殿画分に移行するのは、この処理により、感染性HCVの密度が高くなり、沈殿画分に分画されるためであると考えられる。

G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表：

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

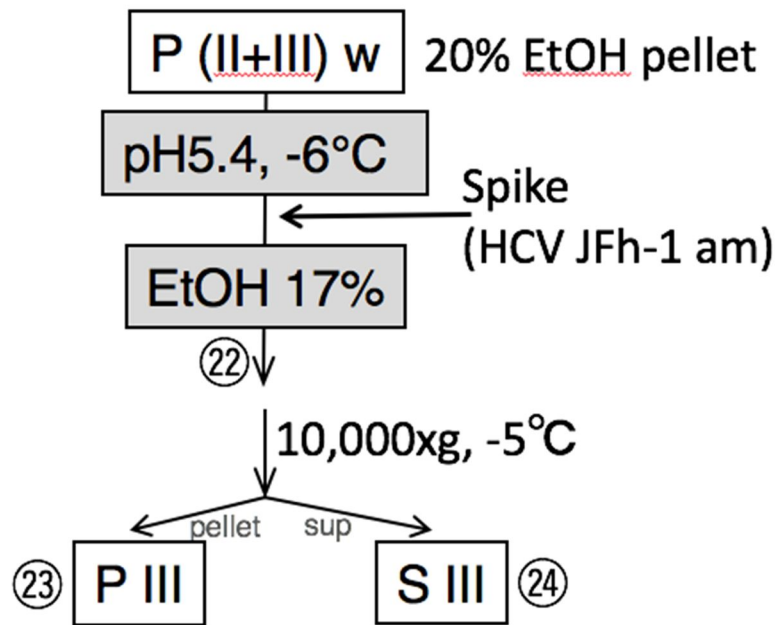


図 1 . 血漿の Cohn エタノール分画法 (P (II+III) w フラクシオンに HCV を spike した)

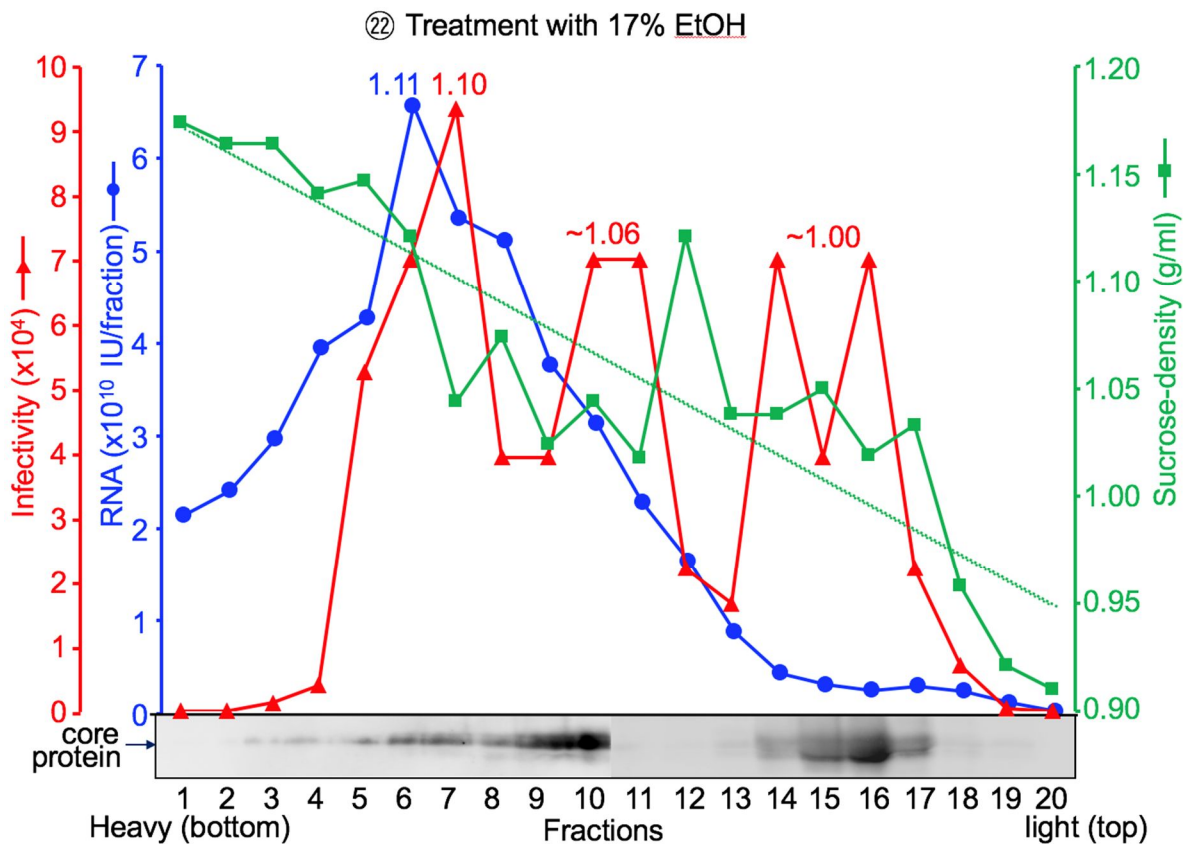


図 2 . ②のシヨ糖密度勾配 (5-50%) による分画

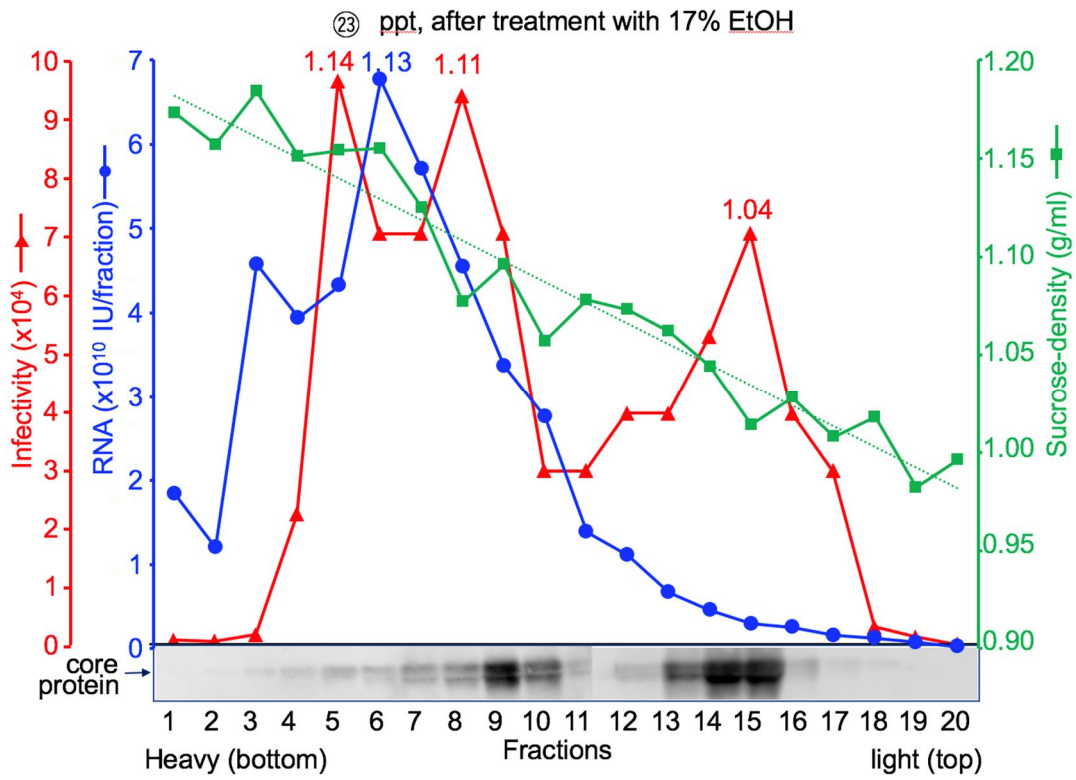


図 3. ⑳のシヨ糖密度勾配 (5-50%) による分画

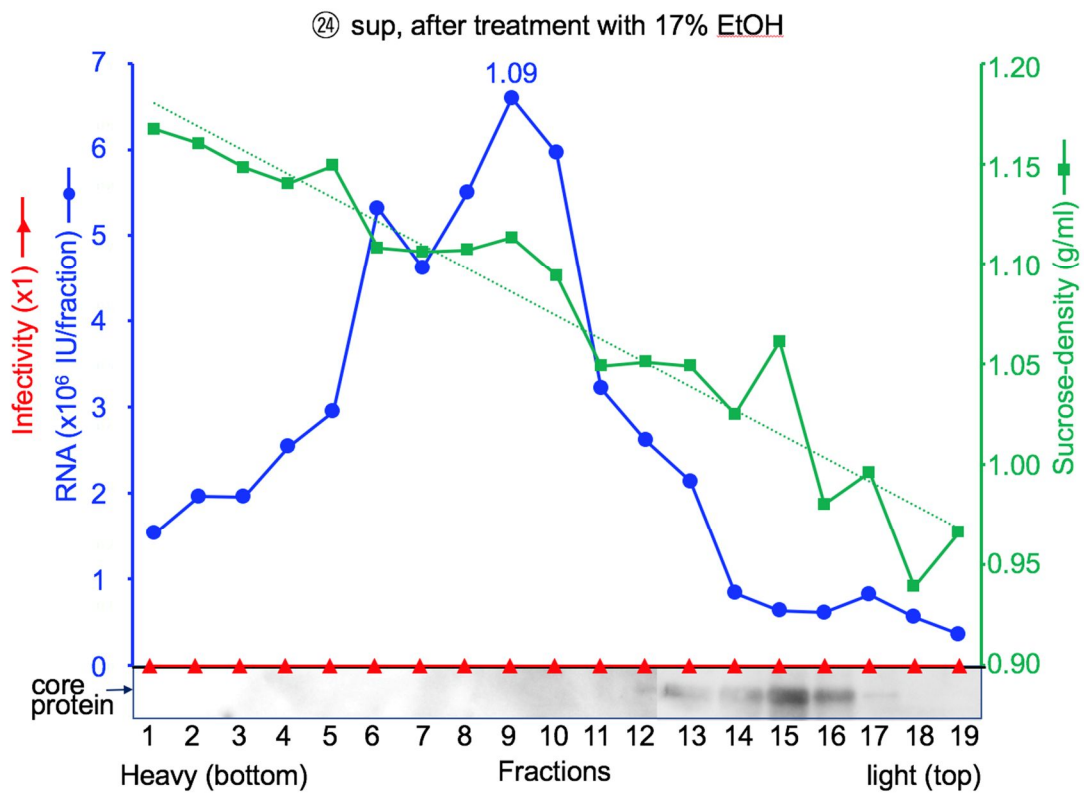


図 4. ㉑のシヨ糖密度勾配 (5-50%) による分画

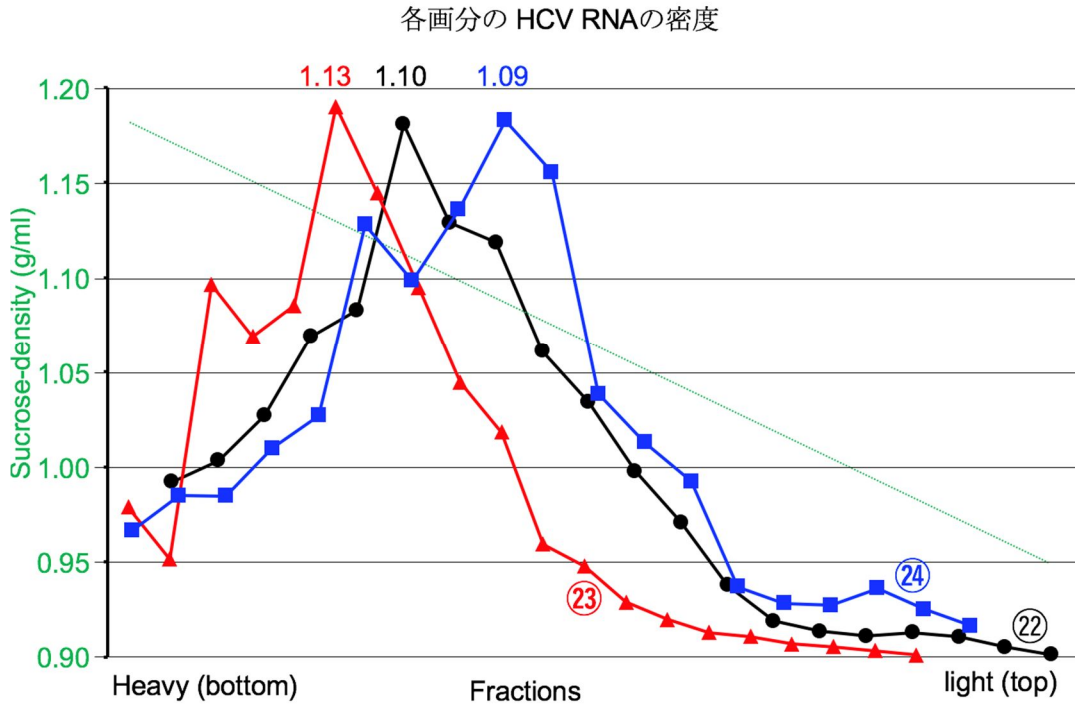


図 5. ②、③、④のショ糖密度勾配 (5-50%) による分画による HCV RNA の分布の比較

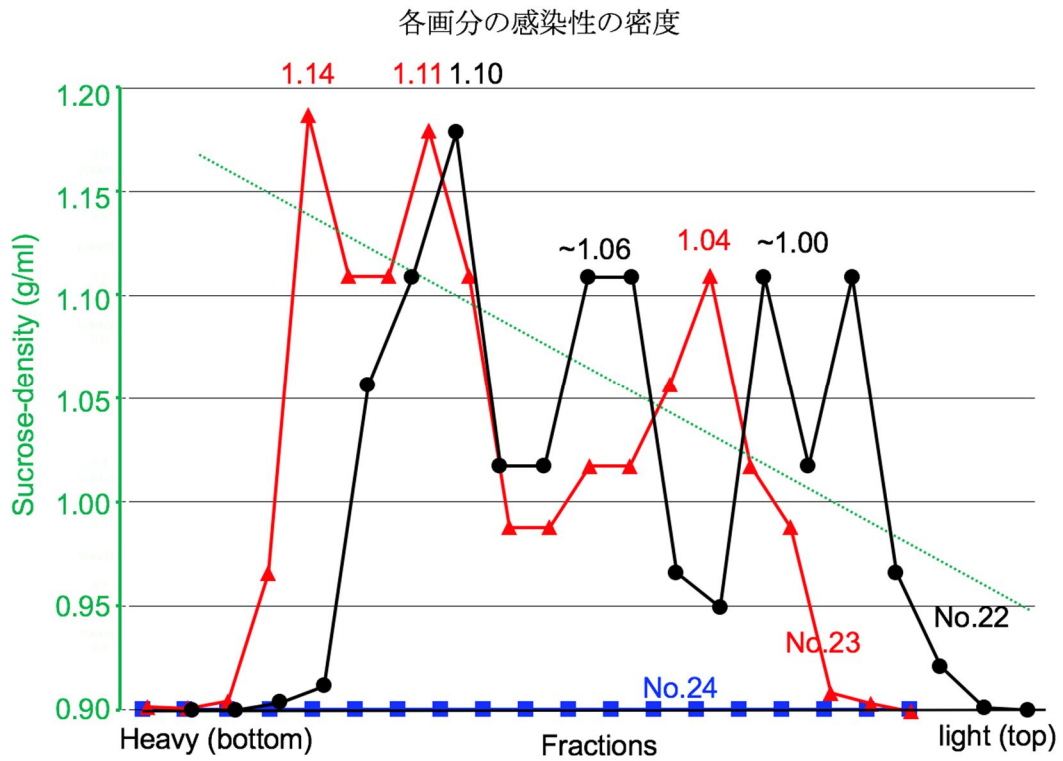


図 6. ②、③、④のショ糖密度勾配 (5-50%) による分画による HCV の感染性の分布の比較