

医薬品・医療機器等レギュラリーサイエンス政策研究事業
「輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための
新興・再興感染症の研究」

実ウイルスを用いたエタノール分画法による血漿の分画とウイルスの不活化・
除去と安全性の評価

研究分担者 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 野島清子
研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス2部 下池貴志

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年かけて海外の血漿を原料に製造された第Ⅰ因子製剤、第Ⅱ因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの方がC型肝炎に感染した経緯がある。グロブリン製剤が原因のHCV感染は海外から何例か報告があり、感染原因となった期間や製造ロットが特定されている。日本での報告は一例もなく、グロブリン製剤の製造工程中でHCVが不活化・除去され安全性が高いと推察されるが、HCVを用いて不活化除去の評価を行いその原因について言及した報告はこれまでにない。我々はこれまでに17%エタノール分画によりHCV JFH-1am株（遺伝子型2a）の感染性が除かれることを明らかにして来た。本研究では、抗HCV抗体共存化での感染性や核酸の移行および、HCV以外のDNAウイルスのグロブリン分画における移行について確認し、グロブリン製剤でのHCV等の薬害の報告がこれまでにない理由について、科学的に考察することを目的とした。

B. 研究方法

1. HBV陽性血漿

国際試薬株式会社より購入した
ものを使用した。

2. HCV JFH-1am株の調製

HCV JFH1 クローンの細胞
(Huh7.5.1細胞)に試薬 PEI-
Max (Polyscience社)を用いて

HCV JFH1 クローンをHuh7.5.1
細胞(6ウエルプレートの1ウ
エル)にトランスフェクション
した。5日間培養した細胞上清
に含まれるHCVの感染価と、
細胞内で発現したHCVを測定
した。細胞上清に発現したHCV
を限外ろ過カラム Vivaspin

turbo(10k, Sartorius社)を用いて濃縮した。

3. HCV, HBV 陽性ドナー譲渡血液の申請

HBs 抗原陽性、HBV DNA、HCV 抗体陽性血漿について本研究班で使用可能となるよう、日本赤十字社へ献血血液等の研究開発等への指針に基づく研究実施申請を行った。

4. Cohn エタノール分画法による血漿の分画

健康人血漿 20mL を 4 でゆっくり融解し、4、16000xg で 25 分間遠心し、沈殿(cryoprecipitate, クリオ)と上清(cryosupernatant, 脱クリオ)とに分画した(クリオ/脱クリオ分画)。脱クリオ画分の pH は低温下で攪拌しながら pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加して調整し、最終的には一部を採取し室温で pH7.5 付近となるよう調整した。-3 で攪拌しながら、最終濃度が 8%となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加し、15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を-1、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿(Fra. フィブリノゲン画分)と上清(S1)画分とに分画した(Fra. /S1 分画)。Fra. /S1 分画の効率は、ゲル濾過カラム G3000SWXL カラムを用いたサイ

ズ排除クロマトグラフィー(SEC 分析)により評価した。各分画のサンプリングは図1の通り行った。8%エタノール上清画分である S1 画分を低温化で攪拌しながら、pH が 6.75 付近になるように調整した。-5 で攪拌しながら最終濃度が 25%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。エタノール処理後の溶液を-1、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 Fra. (+)P と上清 S (+)とに分画した。沈殿 Fra. (+)P に pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加して調整し、最終的には一部を採取し室温で pH6.61 付近となるよう調製した。その後 -5 で攪拌しながら最終濃度が 20%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。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 (II+)w と上清 S (II+)w とに分画した。沈殿 P (II+)w に pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加して調整し、最終的には一部を採取し室温で pH5.4 付近となるよう調製した。その後 -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。エタノール処理後の溶液を $-10,000\times g$ で15分間遠心し、沈殿(P)と上清(S)とに分画した。

5. HBV DNA の定量

各フラクションに含まれる HCV JFH-1amRNA を定量した。各フラクション 100 μ L に含まれる核酸を SMITEST EX R&D を用いて精製した。HBV DNA は、Thunderbird probe qPCR kit (TOYOBO)を用い定量した。HBV の核酸量は、HBV 国内標準品を用いて定量し、国際単位 IU/mL で表した。

C. 研究結果

血漿にスパイクした HBV ウィルス核酸は、クリオ/脱クリオ分画において、除去することは出来ず、クリオ、脱クリオ両方に移行した。その後 8%エタノール分画においては、沈殿より上清に多く HBV-DNA が移行した。25%、20%エタノール分画においては HBV DNA は沈殿と上清のいずれの画分へも移行した。17%エタノール分画においては、ほとんどが沈殿に HBV DNA が移行し、グロブリン原料となる上清へは 3log 以上の除去効果が認められた。2 回実施した実験のうち、1 回は上清中に核酸は確認されなかった

(figure1)。

D. 考察

血漿にスパイクした HBV ウィルス核酸は、クリオ/脱クリオ分画および、8%エタノール分画では除去できず、第 1 因子、第 2 因子、フィブリノゲン製剤の原料となる画分に移行した。分画製剤における、加熱やウィルス除去膜等の不活化処理工程の重要性が示唆された。また、血友病患者の HBV 抗体陽性率が高いという古い論文の報告とも一致する。

さらに、HBV DNA は、25%エタノール分画の上清、および沈殿の双方に移行したことから、アルブミン製剤の製造においても、加熱やウィルス除去膜等の不活化処理工程の重要性が示唆された。8%、25%、20%のエタノール分画では、主に HBV DNA は上清に移行したのに対して、17%エタノール分画の際には、その多くが沈殿へ移行し、上清画分への除去効率は 3log 以上であった。17%エタノール処理は、グロブリンの凝集体を除くための工程であるが、凝集体と一緒にウィルス等の感染性粒子も一緒に沈殿へ移行している可能性が考えられた。

HBV は 42nm の DNA ウィルスであり、比重は 1.3 とされ、HCV は

40-50nm の RNA ウイルスで比重は 1.1 とされている。性状が異なるウイルスであっても、17%エタノール処理は、これらのウイルスを効率良く除去できる工程であり、加熱、ウイルス除去膜等の不活化処理が導入されていなかった時代においても製剤の安全性向上に貢献して来たと考えられた。

HBV ウイルスの培養系が今度開発されれば、核酸だけでなく、その感染性についても同時に評価可能となることが期待される。

E. 結論

血液製剤の製造工程における 17%エタノール処理は、HCV や HBV ウイルスの除去に有効な工程であり、製剤の安全性向上に貢献してきたと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Analysis of HCV in the fractions with Cohn ethanol method in a laboratory scale, 第 64 回ウイルス学会、神戸、Kiyoko Nojima, Takashi Shimoike, Takaji Wakita, Isao Hamaguchi, and 1Yoshiaki Okada

Analysis of the states of HCV with 17% ethanol-treatment in Cohn ethanol method, 第 64 回ウイルス学会、神戸、Takashi Shimoike, Kiyoko Nojima, Takaji Wakita, Isao Hamaguchi, and 1Yoshiaki Okada

3. 特許取得

なし

4. 実用新案登録

なし

5. その他

なし

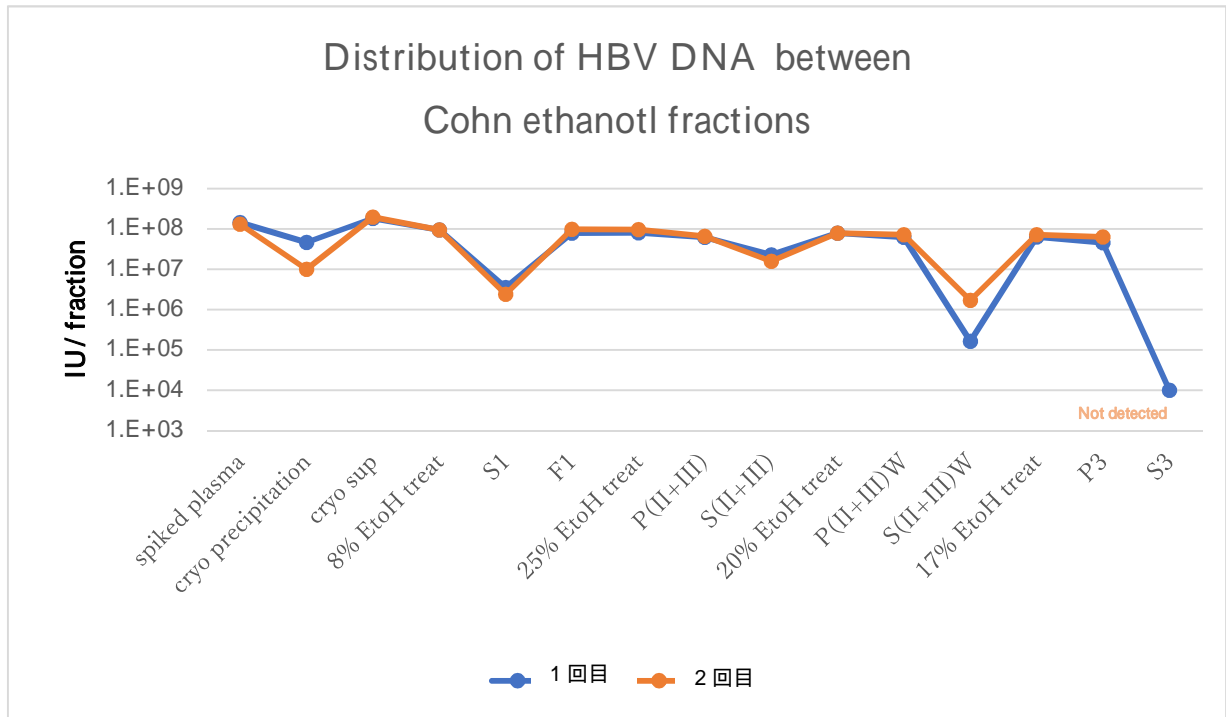


図1 コーンエタノール分画における HBV DNA の移行