

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラ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」  
分担研究報告書

分担課題：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

研究要旨

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IX因子製剤、第VIII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が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・除去されていたと推察されるが、HCV 実ウイルスを用いて不活化除去の評価を行いその理由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 抗体共存下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 等の感染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。今年度は日本赤十字社から HCV 抗体陽性血漿の譲渡を受け、これらドナー血漿から精製したグロブリン画分が HCV JFH-1 株の新規感染を抑制する効果を有するかを確認した。

A.目的

本研究では、抗 HCV 抗体共存下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

れまででない理由について、科学的に考察することを目的としている。今年度は日本赤十字社から HCV 抗体陽性血漿の譲渡を受け、抗体共存下で HCV ウイルスの感染性がどのように移行するかを確認することを目的とし、まず精製したグロブリン画分を用いて、HCV JFH-1 株の新規感染抑制効果を確認した。

## B 研究方法

### 1. HCV JFH-1am 株の調製

HCV JFH-1 クローンが発現するプラスミドを細胞 (Huh7.5.1 細胞、6 ウエルプレートの 1 ウエル) に試薬 PEI-Max (Polyscience 社) を用いて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  $4.2 \times 10^6$  CCID<sub>50</sub>/mL のものを実験に用いた。

### 2. HCV 抗体陽性ドナー血漿の譲渡

HCV 抗体陽性血漿は、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく研究実施申請により許可を受けて、日本赤十字社より譲渡を受けた。H30 年度は、genotype が既知の HCV 抗体力価高値の検体を 5 検体譲渡された(表 1)。

### 3. HCV 陽血漿からの Cohn エタノー

### ル分画法によるグロブリンの精製

血漿 20mL を 4°C でゆっくり融解し、4°C、16000xg で 25 分間遠心し、沈殿 (cryoprecipitate, クリオ) と上清 (cryo-supernatant, 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°C 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°C、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 (Fra. I フィブリノゲン画分) と上清 (S1) 画分とに分画した (Fra. I /S1 分画)。

次に、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°C 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°C、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 Fra. (II + III)P と上清 S (II + III) とに分画した。沈殿 Fra. (II + III)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°C 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 $-1^{\circ}\text{C}$ 、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 P (II+III)w と上清 S (II+III) w とに分画した。沈殿 P (II+III)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 $-5^{\circ}\text{C}$ 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 $-1^{\circ}\text{C}$ 、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 (P III) と上清 (S III) とに分画した。精製度はゲル濾過カラム 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。

#### 4. HCV RNA 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 100uL に含まれる核酸を SMITEST EX R&D を用いて精製した。Thunderbird probe one-step kit (TOYOBO) を用いて定量した。HCV の核酸量は、HCV 国内標準品 (JCV-1B NO.122) を用いて定量し、国際単位 IU/mL で表した。

#### 5. HCV 抗体の力価の測定

精製したグロブリン画分に含まれる HCV 抗体の力価は、HCV JFH-1 株が Huh7.5.1 細胞への感染抑制能で評価

した。2 倍ずつ段階希釈した抗体溶液と JFH-1 ( $2.0 \times 10^5$  CCID/mL, 1 ウェル当たり  $1.0 \times 10^4$  CCID50) を混合して  $37^{\circ}\text{C}$ 、3 時間後に Huh7.5.1 細胞を添加して 3 日間培養した。感染の有無については、HCV コアタンパクに対する抗体を添加し、免疫蛍光染色により判定した。

### C. 研究結果

#### 1. HCV 抗体陽性ドナー血漿の譲渡およびグロブリンの精製

H30 年度の日本赤十字社より譲渡を受けた HCV 抗体陽性血漿 5 検体の核酸 RNA 濃度は、他所の施設間差はあるものの概ね一致し、 $3.6 \times 10^4$  IU/mL から  $2.2 \times 10^7$  IU/mL であった (表 1)。精製グロブリン中のグロブリン単量体は、全体の 93.6%から 97.8%であった。アルブミン混入率が最大で 2%程度であり、概ね綺麗に精製されていた。

#### 2. HCV JFH-1 株の感染阻止を指標とした抗体の力価

精製したいずれのグロブリン分画についても、ドナーが感染していた HCV の genotype に関係なく HCV JFH-1 (gt2a) を新たに感染阻止する能力を有し、その力価は 64 倍から 1024 であり、この感染抑制力価の強さは、精製後のグロブリン濃度、ドナー検体 HCV-RNA 濃度、CLEIA 法によ

る力価とはいずれも相関しなかった。

#### D.考察

HCV 抗体陽性ドナー由来の精製グロブリンの HCV 感染抑制能は、これまで E1 および E2 を発現した virus like particle 用いての評価、チンパンジーを用いた評価の報告があるが、HCV 実ウイルスの感染抑制効果を有することを *in vitro* 系で確認したのは今回が初めてのことである。

今後は、これらの抗体共存化での、コーンエタノール分画における HCV 感染性の移行、核酸の移行について検討する予定である。

また、当岡田班での下池分担研究者が進めている SEC14L2 発現細胞での HCV 感染評価系が開発されれば、ドナー由来 HCV 株を用いて、評価ができるようになり、その有用性は高いと考えられる。

精製したドナー由来グロブリン中には、ドナーが感染を受けていた genotype 1b,2a,2b に対する抗体が含まれていると考えられるが、いずれのグロブリンも JFH-1 株(genotype 2a)

の感染を阻止できたことは非常に興味深い。

#### E.結論

HCV 抗体陽性ドナー由来の精製グロブリンの HCV 感染抑制能を、モデルウイルスではなく実ウイルスを用いて確認した。これらの評価はこれまでの製剤の安全性の評価、これからの製剤の安全性向上に貢献できると考えられる。

#### F.健康機器情報

#### G.研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

###### 1. 特許取得

#### H.知的財産権の出願・登録状況

##### 1.特許取得

なし

##### 2.実用新案登録

なし

##### 3.その他

なし

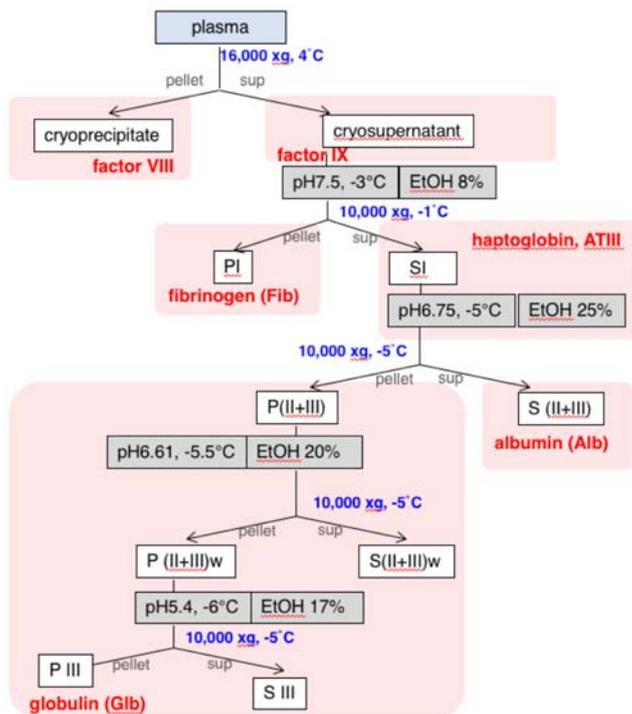


図1. グロブリンの分画

検体#	genotype	CLIEA (C.O.I.)	日赤測定 (IU/mL)	感染研測定 (IU/mL)	精製グロブリンタンパク濃度mg/mL
#1	gt1b	79.3	3.54E+04	3.64E+04	4.217
#2	gt1b	84.0	1.92E+05	6.70E+05	4.464
#3	gt2a	79.1	2.84E+05	7.01E+05	6.203
#4	gt2b	84.0	6.06E+06	2.15E+07	4.500
#5	gt2b	76.6	3.49E+05	1.19E+06	3.138

表 1. 日本赤十字社より譲渡された HCV 抗体陽性血漿

検体#	genotype	中和抗体価*
#1	gt1b	1024/2048
#2	gt1b	64/128
#3	gt2a	32/128
#4	gt2b	64/64
#5	gt2b	64/128

\* HCV JFH-1 株の Huh7.5.1 細胞への感染を阻止できる最大希釈濃度

表 2. 精製グロブリンの力価