

## 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(HCV)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・除去され安全性が確保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。

我々はこれまでに血液製剤の製造法であるコーンのエタノール分画の 17% エタノール分画工程により、血漿にスパイクした 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、HCV 以外の DNA ウイルスも HCV と同様に移行すること、献血におけるドナースクリーニングで HCV 抗体陽性となったドナー血漿から精製した抗 HCV 抗体を含むグロブリンは、HCV ウイルス JFH-1 株の Huh.7 細胞への新たな感染を抑制すること、さらにこれらの抗 HCV 精製抗体共存化での感染性や核酸の移行について確認した。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。

## A.目的

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・除去され安全性が確保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。我々はこれまでに血液製剤の製造法であるコーンのエタノール分画の 17%エタノール分画工程により、血漿にスパイクした 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、この現象は HCV に特化したことであるかを HCV 以外の DNA ウィルスである B 型肝炎ウィルス (HBV) を用いて確認する。

さらに、献血におけるドナースクリーニングで HCV 抗体陽性となったドナー血漿から精製した抗 HCV 抗体を含むグロブリンが、HCV ウィルス JFH-1 株の Huh.7 細胞への新たな感染を抑制するかを検討する。さらにこれらの抗 HCV 精製抗体共存化での感染性や核酸の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。

我々の研究では、モデルウィルスではなく、実ウィルス用いて血液製剤の安全生確保における科学的な根拠を提言するものである。

## 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. 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。

### 3. HCV, HBV 抗体陽性ドナー血漿の性状

HBs 抗原陽性、HBV DNA、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。本研究では、主に、H30 年度に譲渡された

genotype 既知の HCV 抗体価高値の検体を 5 検体を用いた (表 1)。

#### 4. HCV 抗体陽性血漿からの 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℃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 (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℃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. 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℃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. (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℃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+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℃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℃、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 (P III) と上清 (S III) とに分画した。

SIII画分中に含まれるエタノールは、Slide-A-Lyzer G2 カセット (20K) を用いて限界を過により除去した。

コーンエタノール分画における HBV 核酸の移行の検討のためには、HBV をス 1:9 の割合で陰性血漿にスパイクし、左記と同様に S3 まで分画し、各フラクションを回収して解析に用いた。

#### 5. 17%エタノール分画における HCV スパイク試験

表 1,2 示す抗 HCV 中和抗体価 32～1024 倍の 5 種のグロブリンを等量ずつ混合し抗体混合液とした。コントロ

ールとして、100 分の 1 希釈した HCV 抗体混合液、ノーマル人免疫グロブリン 4.5mg/mL、生理食塩水についても以下同様に操作した。

各 HCV 抗体混合液およびコントロール抗体と、HCV JFH-1 株 ( $1 \times 10^5$  CCID<sub>50</sub>/mL) または window 由来 HCV 核酸陽性血漿検体を 1:1 の容量で混合し室温 25°C で 2 時間培養してウイルス/抗体反応液とした。

日本赤十字社より譲渡された感染症マーカー陰性血漿から、コーンエタノール分画により 20%沈澱画分を精製し、実験まで-30°Cで保管した。氷上で融解した 20%沈澱画分は、10mM リン酸緩衝液 pH6.25 で溶解後 pH5.4 に調整して 17%エタノール分画に用いた。

ウイルス/抗体反応液は、1:9 の割合で血漿溶液にスパイクし、最終エタノール濃度が 17%となるようにエタノールを添加し、15 分攪拌後 10,000xg で 20 分遠心して上清画分と沈澱画分を回収した。沈澱画分は 5mM リン酸緩衝液 pH6.25 に懸濁した。実験はすべて非依存的に 3 検体ずつ実施した。

#### 6. 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。

#### 7. HBV DNA の定量

各フラクションに含まれる HBV DNA 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。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。

#### 8. 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<sub>50</sub>/mL, 1 ウェル当たり  $1.0 \times 10^4$  CCID<sub>50</sub>) を混合して 37°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.血漿にスパイクした HBV ウイルス核酸の移行

血漿にスパイクした HBV ウイルス核酸は、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(図 1)。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。

## 2. 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  $3.6 \times 10^4$  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。

## 3 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(表 1)。

## 3. 17%エタノール分画における抗 HCV 抗体存在化での HCV RNA の移行

コーンエタノール分画における 17% エタノール分画工程において、抗 HCV 抗体が共存しない場合(コントロールとしてノーマル人免疫グロブリン共存化、及び生食添加)と抗 HCV 抗体が存在する場合 とでは、分画後の各画分への HCV の移行は、実験に使用するウイルス株に寄らず (JFH-1 株 or window 期由来の HCV)大きく変わらないことを確認した(図 2)。しかし、window 期由来の HCV を用いた場合において、抗 HCV 抗体(1x)が共存した場合は、100 倍に希釈した抗 HCV 抗体やコントロール抗体(ノーマル人免疫グロブリン、生食)が共存した場合と比較し、上清画分への HCV RNA の移行率が高い傾向を認め、それぞれ、0.87%, 0.38%, 0.41%, 0.34% であった(図 2A、表 2)。

## D. 考察

血漿にスパイクした HBV ウイルス核酸は、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Ⅷ因子、第Ⅸ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、加熱やウイルス除去

膜等の不活化処理工程の重要性が示唆された。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 $3\log$ 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、凝集体と一緒にウイ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 ウイルスであり、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。

17%エタノール分画について、抗 HCV 抗体が共存した場合、HCV 核酸がどのように移行するかを検討し、HCV-JFH-1 核酸は 99.98%沈殿に移行したが、window 期血漿由来の HCV をスパイクした場合は抗 HCV 抗体の共存により沈殿に移行するウイルス RNA が独立して実施した 3 回の試験において、JFH-1 と比較すると若干多く上清に移行する傾向が認められその移行率はそれぞれ 0.13%と 0.06%であった。上清に移行した HCV が抗体と結合しているかどうかは大変興味深

い。グロブリンが分画される挙動に引きずられて、ウイルス粒子が沈殿に落ちずに上清に移行する可能性が考えられるが量は非常に僅かであった。残念ながら、JFH-1 株以外の HCV ウイルス株は培養系が存在しないため、抗 HCV 抗体共存化で上清に移行した画分に感染性がないことを確認することはできないが、HCV 抗体陽性者の血漿から精製した 17%上清画分に含まれるグロブリンは 32 倍から 1032 倍の力価の中和抗体を含み、高力価の JFH-1 と混合しても感染性を有さないことを昨年度確認しているため、window 期由来の HCV ウイルスが上清に僅かに移行した場合でも同時に中和抗体が共存するために感染性を示さない可能性が高いと考えている。今後、JFH-1 株以外の感染評価系の開発が期待される（下池分担研究者）。

実験に用いた 5 種類の抗 HCV 抗体のエピトープは定かではないが、これらの抗体は、第 3 世代のスクリーニング抗 HCV 血清学的検査で陽性となり輸血に用いられなかった献血ドナー由来の血漿から精製した抗体のため、少なくとも第 3 世代の血清学的検査の抗原である core, NS3, NS4, NS5 のいずれかを認識する抗体が含まれていると考えられる。

Env は第三世代の抗原に含まれていないが、いずれの 5 種類の精製抗体も、HCV-JFH-1 株が Huh/7.5.1 細胞に新たに感染するのを 32 倍から 1032 倍の力価で抑制しているため、Env に対する抗体を含んでいる可能性は高いと考えられる。

17%エタノール分画は、HCV を除去するのには有効な工程であり、工程中に混入するウイルス粒子は抗 HCV 抗体が共存しても概ね同じように移行し、感染性は沈澱に落ち、グロブリンが製造される上流へは移行しないことが示され、血液製剤の原料に HCV が混入していた時代であっても、日本においてグロブリン製剤による HCV 感染事例がなかった理由の一つは、17%エタノール処理が有効に機能していたことが理由の一つとして考えられる。また、特に第 1 世代の血清学的検査を行っていた時代は、第 2, 3 世代の検査法と比較すると、抗体陽性ドナーを完全には排除できていなかったことから、有効な中和抗体を含むドナー血漿が排除されずに原料に混入が可能であったとも考えられ、結果として僅かな HCV がグロブリン分画へ移行した場合でも最終製品の安全性が確保できていた可能性が高いと考えられる。現在は、加熱処理、低 pH 処理、S/D 処理、ウイルス除去膜等のさらなるウイルス除

去・不活性化工程が必ず工程中に含まれており安全性が担保されている。

#### E. 結論

17%エタノール分画は、HCV を除去するのには有効な工程であり、抗 HCV 抗体が共存しても原料に混入した HCV は沈澱へ移行し、上清へは移行しないことが示された。実ウイルスを用いて実験によっても、17%エタノール処理は HCV の除去には非常に有効な製造工程であると考えられた。

#### F. 健康機器情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
  - i. 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
  - ii. 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

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

| 検体# | genotype | CLIEA<br>(C.O.I.) | 日赤測定<br>(IU/mL) | 精製グロブリン<br>タンパク濃度<br>mg/mL | 中和抗体価*    |
|-----|----------|-------------------|-----------------|----------------------------|-----------|
| #1  | gt1b     | 79.3              | 3.54E+04        | 4.217                      | 1024/2048 |
| #2  | gt1b     | 84.0              | 1.92E+05        | 4.464                      | 64/128    |
| #3  | gt2a     | 79.1              | 2.84E+05        | 6.203                      | 32/128    |
| #4  | gt2b     | 84.0              | 6.06E+06        | 4.500                      | 64/64     |
| #5  | gt2b     | 76.6              | 3.49E+05        | 3.138                      | 64/128    |

表 1. 日本赤十字社より譲渡された HCV 抗体陽性血漿由来グロブリン

\* 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

沈澱への移行率

使用ウイルス：JFH-1

|      | +Anti0HCV<br>(x1) | +Anti0HCV<br>(x100) | +Venoglobulin | Saline |
|------|-------------------|---------------------|---------------|--------|
| n1   | 99.98             | 99.99               | 99.99         | 99.97  |
| n2   | 99.98             | 99.99               | 99.99         | 99.99  |
| n3   | 99.98             | 99.96               | 99.98         | 99.98  |
| mean | 99.98             | 99.98               | 99.99         | 99.98  |
| sd   | 0.00              | 0.01                | 0.00          | 0.01   |

への移行率

使用ウイルス：JFH-1

|      | +Anti0HCV<br>(x1) | +Anti0HCV<br>(x100) | +Venoglobulin | Saline |
|------|-------------------|---------------------|---------------|--------|
| n1   | 0.02              | 0.01                | 0.01          | 0.03   |
| n2   | 0.02              | 0.01                | 0.01          | 0.01   |
| n3   | 0.02              | 0.04                | 0.02          | 0.02   |
| mean | 0.02              | 0.02                | 0.01          | 0.02   |
| sd   | 0.00              | 0.01                | 0.00          | 0.01   |

使用ウイルス：2009A

|      | +Anti0HCV<br>(x1) | +Anti0HCV<br>(x100) | +Venoglobulin | Saline |
|------|-------------------|---------------------|---------------|--------|
| n1   | 99.27             | 99.64               | 99.55         | 99.61  |
| n2   | 99.01             | 99.59               | 99.64         | 99.72  |
| n3   | 99.11             | N.T.                | N.T.          | 99.64  |
| mean | 99.13             | 99.62               | 99.59         | 99.66  |
| sd   | 0.13              | 0.03                | 0.06          | 0.06   |

使用ウイルス：2009A

|      | +Anti0HCV<br>(x1) | +Anti0HCV<br>(x100) | +Venoglobulin | Saline |
|------|-------------------|---------------------|---------------|--------|
| n1   | 0.73              | 0.36                | 0.45          | 0.39   |
| n2   | 0.99              | 0.41                | 0.36          | 0.28   |
| n3   | 0.89              | N.T.                | N.T.          | 0.36   |
| mean | 0.87              | 0.38                | 0.41          | 0.34   |
| sd   | 0.13              | 0.03                | 0.06          | 0.06   |

N.T.:not tested (サンプリングミス)

表 2. 17%エタノール分画における核酸移行率



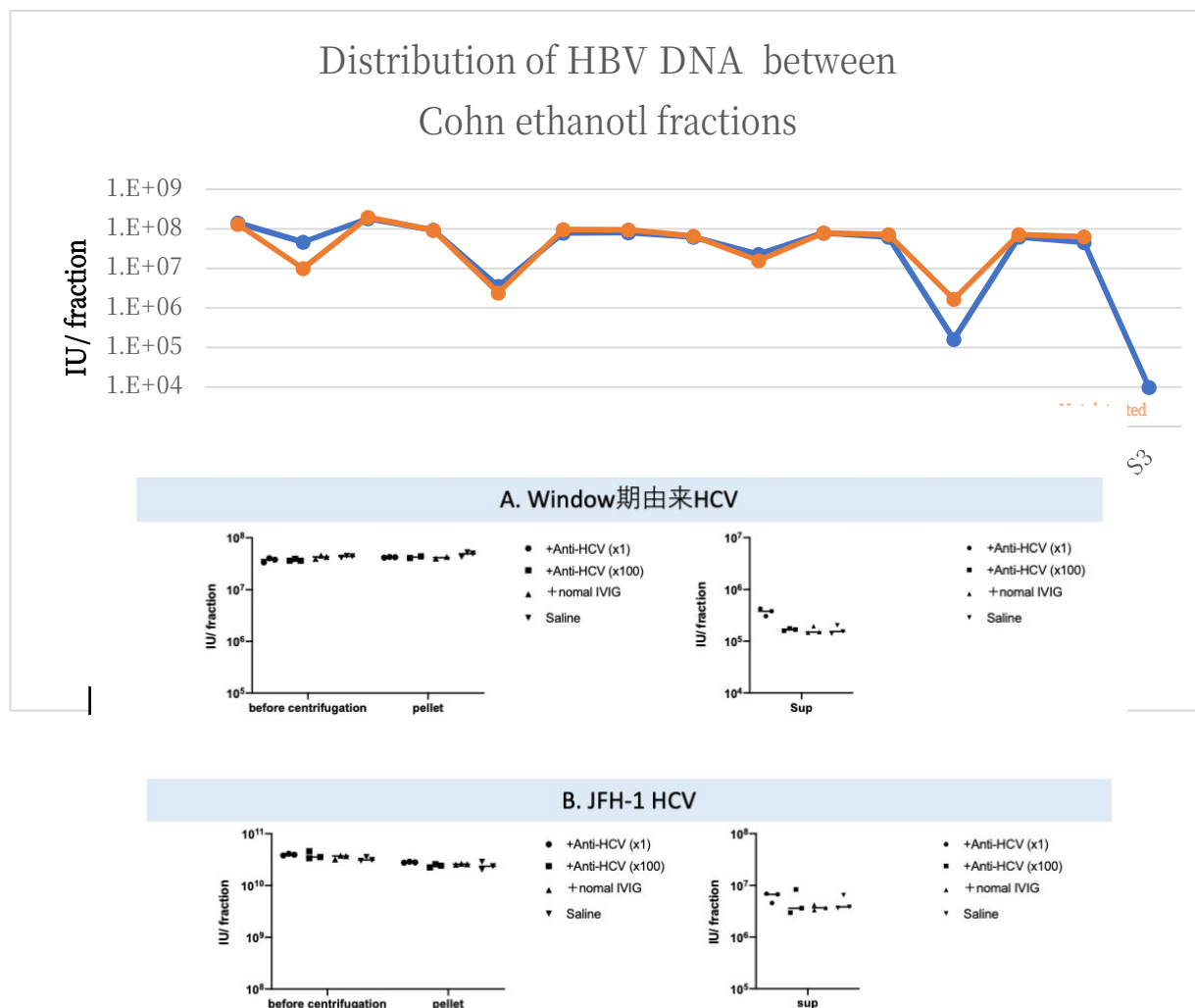


図 2. コーンエタノール分画における HBV DNA の移行