

## 第Ⅷ因子製剤と人血清アルブミン製剤の製造工程における B型肝炎ウイルスの不活化/除去

室塚、奇木、木村、外山、阿部、泉、江村、武田、七川、勝林、竹内、伊藤、平川、光永、  
田所、金光、宮本、山中、西岡

### 要旨

背景と目的：日本赤十字社は過誤により1単位のB型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)陽性血漿の混入が製造5ヵ月後に判明したことから、この血漿を含む原料血漿から製造されたモノクローナル抗体精製第Ⅷ因子(FⅧ)1ロットと人血清アルブミン(HSA)2ロットを回収した。そこで我々はFⅧとHSAの実製造工程におけるウイルスの不活化/除去効果を評価した。

材料と方法：製造工程の保管検体中のHBV DNAはPCR法により測定した。有機溶媒-界面活性剤処理(S/D処理)によるウイルスの不活化速度はモデルウイルスを使用して行った。また、当該製剤をすでに投与された患者の遡及調査も行った。

結果：混入したHBV DNAはアルブミン製造工程ではSIV-1以降、FⅧ製造工程ではイムノアフィニティークロマトグラフィー以降でそれぞれ検出されなくなった。また、モデルウイルスはS/D処理5秒以内で不活化された。更に、当該製剤を投与された後に患者がHBVに感染した証拠は無かった。

結論：FⅧとHSAの実製造工程において、ウイルス不活化は十分効果的に達成されていることが確認された。

### はじめに

我国における血液は嘗て無く安全であり、それは無償献血の血液であること、B型肝炎ウイルス(HBV)、C型肝炎ウイルス(HCV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1、HIV-2)、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-I)など血液で感染を起こす主要なウイルスのスクリーニングの実施、併せてalanine aminotransferase(ALT)によるスクリーニングの実施によるものである。更に、第Ⅷ因子製剤や人血清アルブミン製剤などの血漿分画製剤については、スクリーニング後の安全対策として、例えばウイルス不活化/除去法が採用されている。

しかし、残存する危険性としてはウインドウ期の献血、ウイルスの変異、非応答献血者、スクリーニング対象外ウイルス、過誤などが挙げられる。

最近、我々は14,686単位の血漿プール中に過誤により1単位のHBsAg陽性血漿が混入した事例を経験した。このプール血漿からFⅧ製剤とHSA製剤が製造された5ヵ月後に、このプール血漿がHBsAg陽性であることが判明した。その時点までに、FⅧ製剤1ロッ

ト、HSA 製剤 2 ロットが医療機関へ供給済であり、一部は既に患者へ投与済であった。そこで、これら製剤を緊急に回収した。そして、まず第一に最終製品と製造工程の各段階の保管検体について PCR 法により HBV DNA の試験を行った。次に、S/D 処理によるウイルス不活化動態をエンベロープウイルスのモデルウイルスとして Sindbis virus(SIN)と Herpes simplex virus(HSV)を使用して試験を行った。更に、医療機関の協力を得て、これら製剤を投与された患者の遡及調査を行った。

この報告はこれらバリデーションと遡及調査の結果をまとめたものである。

## 材料と方法

### HSA と FVIII の製造に使用された原料血漿

血漿は日本赤十字社の血液センターにより問診に適合した献血者 14,685 人から採血されたもので、全ての献血血液は HBsAg、HBc 抗体、HBs 抗体[1]、HCV 抗体[2]、HIV-1,2 抗体[3]、HTLV-I 抗体[4]、梅毒、ALT[3]に関してスクリーニングされた。これら献血から得られた血漿は日本赤十字社血漿分画センターへ送付され、プールされた。不幸にもプール中に混入した 1 単位の HBsAg 陽性血漿以外は、全て上記スクリーニングに適合したものであった。

### HSA と FVIII の製造

クリオプレシベートを除去した後、HSA は Cohn のエタノール分画法[5]により精製された。図 1 に概略を示したように、溶解した PV-2 は限外濾過により濃縮され、最終調整後、最終バルクはウイルス不活化のため 60℃、10 時間加熱処理された。

FVIII については、溶解されたクリオプレシベートから得た脱フィブリン溶液を Horowitz らの方法[6]に従いウイルス不活化のため S/D 処理した。S/D 処理された液は FVIII 精製の為に抗 FVIII マウスモノクローナル抗体カラムクロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィー処理された。製造工程の概略は図 1 に示した。通常、製造の各工程で検体は採取され、-40℃に保管される。今回はこの検体を使用して PCR 法により HBV DNA の検査を行った[7,8]。

### HBV DNA の測定

検体 100 $\mu$ L を SDS/proteinase K で処理し、DNA は phenol/chloroform で抽出し、エタノール沈殿により精製した。PCR は Iizuka らの方法[7]に従って行なった。HBV DNA の定量は限界希釈法により行なった。この PCR 法の感度は branched DNA 法により求めたところ 2 copies/100 $\mu$ L であった。検体中の HBV DNA 量は 2 copies/100 $\mu$ L に DNA が検出された最大希釈倍率を掛けて算出した。

TaqMan Fluorogenic Detection System[8]を使用しての HBV DNA の定量も行なった。HBV DNA は EX-R&D 法 (住友金属工業、東京、日本) か、通常の SDS/proteinase K

法で抽出し、Prism7700 (Perkin Elmer Corp./Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA)

で増幅、検出を行なった。cloned HBV DNA を検量線作成に使用した。この濃度は260nm の吸光度から求めた。TaqMan PCR においては HBV コア領域を増幅し、その感度は最初に述べた方法と同等であった[Hirakawa ら、論文作成中]

#### S/D 処理によるウイルスの不活化

HSV、SIN のウイルス元液はこれらウイルスを感染させた Vero 細胞の培養上清から調製した。HSV または SIN のウイルス元液 1 を製造工程より分取したクリオ溶解液 9 に加えた。S/D 処理によるウイルス不活化は tri(n-butyl)phosphate(TNBP)と octoxynol 9(TX-100)をそれぞれ 0.3%と 1%となるように添加して行なった。一定時間(0秒、5秒、10秒、30秒、1分、10分、60分)後に一部を取り出し、前処理した octadecyl silica 樹脂(Wakosil 5C18、和光純薬工業、日本)と 3 分間混和することに不活化反応を停止した。

HSV 感染価はブランク法により求めた。10 倍段階希釈した検体を 24 穴プレートに培養した Vero 細胞に加え、1 時間吸着後、1%carboxymethyl cellulose を含む RPMI-1640 培地を加えた。3 日後に、Vero 細胞は Gentian violet B で染色し、ブランク数を測定した。ウイルス感染価は plaque-forming units (PFU/mL) として表した。SIN 感染価は end-point dilution assay により行なった。10 倍段階希釈した検体を培地(RPMI-1640)により作成し、各希釈検体は 96 穴プレートに培養した細胞の 5 穴に加えた。この測定でも Vero 細胞を指示細胞とした。72 時間培養後、ウイルスによる細胞障害を計測し、Reed-Muench 法により tissue culture infectious dose(TCID<sub>50</sub>)を算出した。

#### FVIIおよび HSA 投与患者の遡及調査

69 医療機関の協力を得て、当該 FVIIおよび HSA を投与された 126 人の患者の HBsAg、HBs 抗体、HBc 抗体について調査した。

#### 結果

##### FVII製造工程における HBV DNA の不活化/除去

クリオプレシビテート溶解液中の混入 HBV 量は  $2 \times 10^3$  copies/mL であり、脱フィブリン液中では  $2 \times 10^2$  copies/mL であった。HBV DNA は S/D 処理脱フィブリン液中にも検出された ( $2 \times 10^2$  copies/mL) が、イムノアフィニティークロマトグラフィーの溶出液および最終製品には検出されなかった(図 1)。この結果は HBV DNA がイムノアフィニティークロマトグラフィー洗浄工程で効果的に除去されていることを示していた。

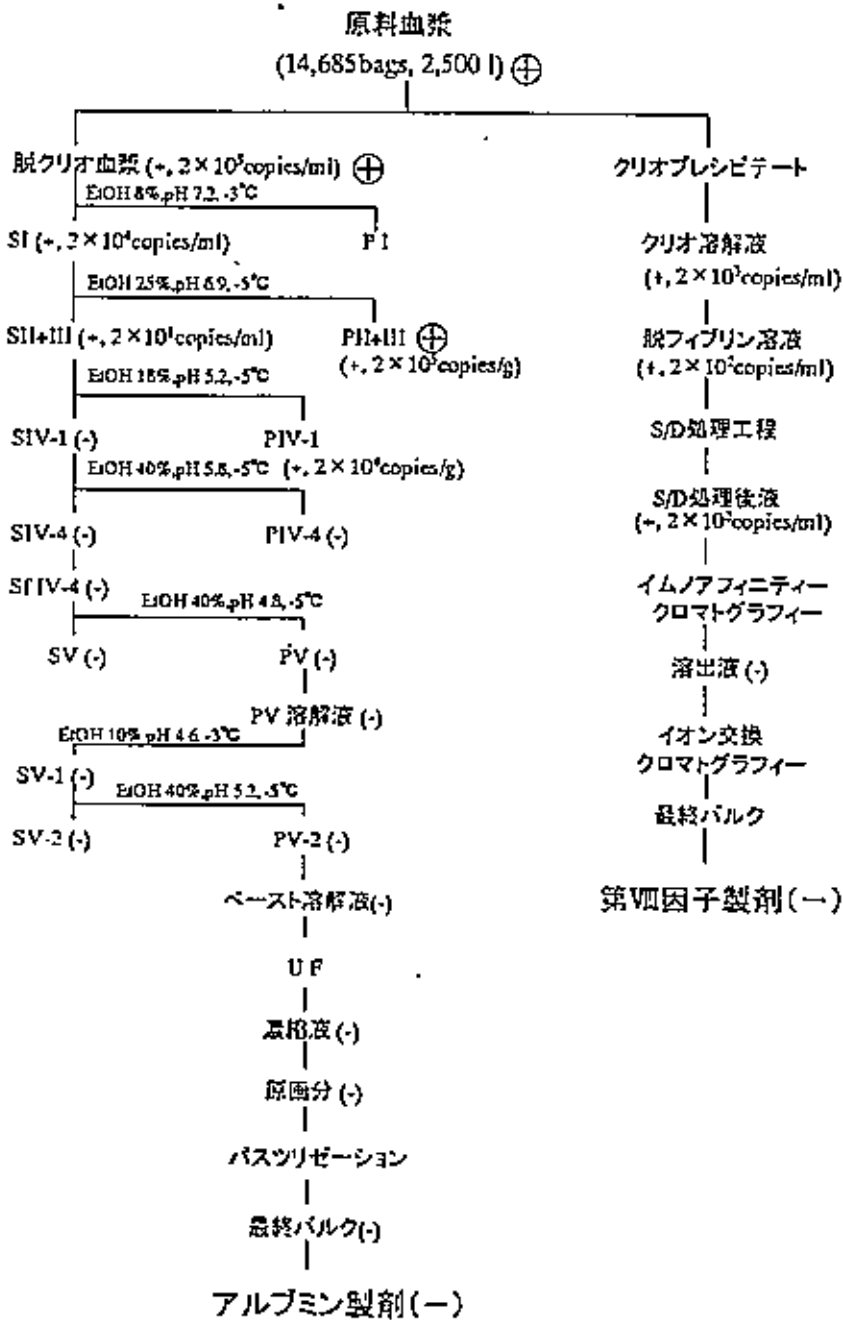


図1 アルブミン及び第Ⅷ因子製剤製造工程  
 (+): HBV DNA PCR陽性およびコピー数  
 (-): HBV DNA PCR陰性  
 ⊕: HBS抗原陽性 (EIA: Auszyme II ⊕, Abbott)

### HSA 製造工程における HBV DNA の除去

脱クリオ血漿と Cohn のエタノール分画工程の各段階における検体中の HBV DNA は

PCRにより測定した。PI、PII+III、PIV-1、PIV-4、PV、PV-2は3から10倍のPBSに溶解し、同液に透析した。SI、SII+III、SIV-1、SIV-4、SIV-4、SV、PV溶解液、SV-1、SV-2はPBSに透析した。透析後、検体はPCR測定に使用した。HBV DNA量は脱クリオ血漿中で $2 \times 10^5$  copies/mL、SIで $2 \times 10^4$  copies/mL、SII+IIIで20 copies/mL、PII+IIIで $2 \times 10^5$  copies/g、PIV-1で $2 \times 10^4$  copies/gであった。

しかし、SIV-1、SIV-4、PIV-4、SIV-4、SV、PV溶解液、SV-1、SV-2、PV-2、PV-2溶解液、限外濾過後の濃縮液、最終バルク液、60℃、10時間加熱処理後の液、最終製品ではHBV DNAは検出されなかった。

#### S/D処理によるモデルウイルスの不活化

S/D処理の不活化速度をエンベロープウイルスのモデルとしてSINとHSVを用いて行った。結果は図2に示したように、 $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/mLのSINおよび $10^{12}$  PFU/mLのHSVともに5秒以内で検出限界以下となった。

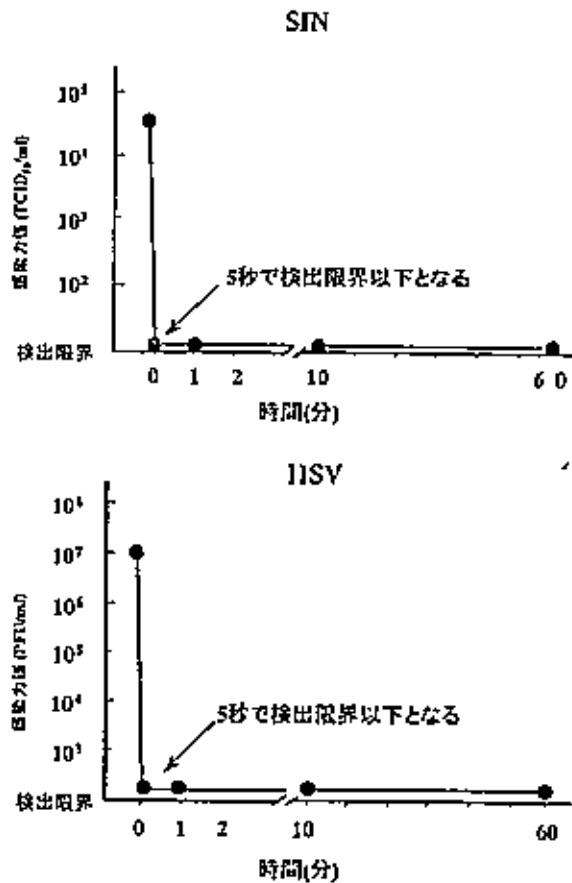


図2 SIN及びHSVのS/D処理による不活化動態  
SIN( $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>/mL)およびHSV( $10^{12}$  pfu/mL)をクリオ溶解液に添加して  
NEP (0.2%)、Octynol 9 (1%)を加え室温にて攪拌した。

### 遡及調査

HSA 当該ロットを投与された 115 人の患者と FⅧ当該ロットを投与された患者 11 人について国内の 69 医療機関の協力を得て遡及調査を行なった。対象となった全ての患者からの投与後平均 2.1 か月の血清については HBsAg 陰性であった。

HSA 当該ロットを投与された患者の内 33 人および FⅧ当該ロットを投与された患者の内 3 人については投与前の検体を入手出来た。これら検体を検査することにより、投与後の HBV マーカーの陽転と ALT の上昇について検討した。

表 1 に示したように、対象となった患者全てにおいて当該製剤投与前後の HBV の血清学的マーカーは陰性であった。HSA 当該ロットを投与された患者 28 人と FⅧ当該ロットを投与された患者 3 人について、ALT の上昇は認められなかった。我々は協力して頂いた 69 医療機関に対象となる患者に HBV 感染が起きたときには連絡をお願いしているが、これまでに医療機関からの HBV 感染報告はない。以上から、HSA と FⅧの当該ロットの投与による HBV 感染の証拠は無かった。

表 1 アルブミン及び第Ⅷ因子製剤の当該ロットの投与を受けた患者の陽転率と ALT 上昇頻度

	HBsAg 陽性率		HBs 抗体陽性率		HBc 抗体陽性率		ALT 上昇	
	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後	投与前	投与後
アルブミン	0/33	0/33	0/12	0/12	0/3	0/3	0/28	0/28
第Ⅷ因子	0/3	0/3	0/1	0/1	-	-	0/3	0/3

### 考察

作業過誤により、FⅧと HSA の製造に使用された 14,685 単位からなる血漿プール中に 1 単位の HBsAg 陽性血漿が混入した。対象となる血漿分画製剤は緊急に回収された。その後、我々は製造工程の各段階で保管していた検体を使用して PCR 法により HBV DNA の測定を行なった。

第一に、HBV DNA は Cohn 分画の PIV-1 と分離される SIV-1 以降の段階には検出されない。一方、グロブリン製剤の出発原料である PII+III には  $2 \times 10^5$  copies/g の HBV DNA が検出された[9-11]。

ELISA (AuszymeII, Abbott) による HBsAg の測定では、原血漿、脱クリオ血漿、PII+III は陽性であった。PIV-1 は検体不足の為測定しなかったが、これらの結果は Schroeder ら[9]、Berg ら[10]、Trepo ら[11]の報告と一致していた。更に興味深いことに、Trepo らの Dane 粒子が FI、FIII、FIV に分布するとする報告[11]と本報告での PCR による HBV DNA の分布 (図 1) が相関していた。

この結果から、我々は 1944 年に確立された Cohn のエタノール分画法がタンパク質の精製のみならず HBV の除去もできることを実際に確認した。Cohn 分画で HBV DNA は検

出されなくなり、さらに最終的に HSA は 60°C、10 時間の加熱処理をする。加熱処理したアルブミンは 1948 年以降使用されていて[12]、約 50 年間、HBV 感染の報告はない[13]。

第二に FVIII の製造工程では S/D 処理溶液で 200copies/mL あった HBV DNA がイムノアフィニティークロマトグラフィー後に検出限界以下となった。S/D 処理後に検出される DNA は HBV 由来であり、Hilfenhaus ら[14]が報告しているように、S/D 処理は PCR による HBV DNA の検出に影響を与えない。しかし、S/D 処理製剤は、アルゼンチン、オーストラリア、オーストリア、ベルギー、カナダ、チェコスロバキア、デンマーク、フィンランド、フランス、ドイツ、イスラエル、イタリア、日本、韓国、オランダ、ノルウェー、ポーランド、ポルトガル、サウジアラビア、南アフリカ、スペイン、スウェーデン、スイス、イギリス、アメリカ合衆国、ベネズエラなど多くの国で承認されている。380 万回投与されていて、平均投与量を 80,000IU/人・年とすると、45,000 人・年以上の治療がされたことになる。現在の使用傾向は北アメリカ、西ヨーロッパ、日本で使用される FVIII の約 2/3 が S/D 処理である。S/D 処理の導入後に HBV、HCV、HIV の感染報告は一例も無い[17]。これらのことから、S/D 処理後液中の HBV DNA は感染性を持たない不活化された HBV である。

Griffith はイムノアフィニティークロマトグラフィー工程でウイルスが除去されることを小規模のウイルス添加実験で確認している[15]。我々は実製造規模でこのことを確認した。イムノアフィニティークロマトグラフィー工程後、溶出液はイオン交換カラムにかける、そして当然の事ながら FVIII 最終製品中に HBV DNA は検出されない。よく知られている報告であるが、 $10^4$  チンパンジー感染価の HBV を FVIII に添加して、それを TNBP/sodium cholate で処理後、2 匹のチンパンジーに投与して 40 週以上観察したが、肝炎または HBV 感染の証拠は認められなかった[16]。また、S/D 処理 FVIII 導入後の 1985 年から 1993 年までの間、HBV、HCV、HIV 感染報告は一例も無い[17]。

S/D 処理の効果は SIN と HSV をモデルウイルスとして使用して検証した。 $10^{4.6}$ TCID<sub>50</sub>/mL SIN と  $10^{7.2}$ PFU/mL HSV は S/D 処理 5 秒以内に検出限界以下となった。Griffith[15]によれば、FVIII 中の VSV は S/D 処理で 3 分以内に不活化される。同様の条件で、SIN と HSV での我々の実験も行なわれている。モデルウイルスが S/D 処理 5 秒後には感染性を失うことは、エンベロープウイルスの不活化に対する S/D 処理の有効性を証明している。これらのデータは本事例における混入 HBV は S/D 処理により不活化されたとする主張を支持するものである。

遡及調査は投与後平均 2.1 ヵ月（最大は 4 ヵ月）の時点で行なった。もしこれが前向き調査であれば、我々が以前に行ったように[1]、HBV マーカーと ALT について 1,2 週間隔で 3 ヵ月以上の調査を行ったであろう。今回の事例の状況はそれとは異なり遡及調査も限られたものとなった。

投与後に検査を行った 141 人全てが、HBsAg 陰性であった。HSA を投与された 33 人と FVIII を投与された 3 人に関しては投与前の血清について HBV マーカーと ALT について検

査することが出来た。

HBV感染のウィンドウ期は平均59日[18]と推定されていること、及び当該製剤投与後、HBsAg陰性、HBs抗体、HBc抗体の陽転が無く、ALTレベルの上昇も無いことから、我々は調査を行った患者にはHBV感染が起こらなかったと結論付けた。臨床データは完全ではないが、医療機関からの情報では、HSAの当該ロットとFⅦ当該ロットの投与後にHBV感染の証拠は認められなかった。