

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政策研究事業)
分担研究報告書

赤血球製剤の病原体不活化法の開発
研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

B型肝炎ウイルス (以下 HBV) は、血液製剤の安全性確保のために重要なウイルスであるが、*in vitro* で効率よく増殖する培養系は確立されていない。今年度は、昨年度に樹立した親株より約 20 倍 HBV に対して感受性が高い細胞株 HepG2-NTCP#10 を用いて 5% アルブミン製剤における 60°C-10 時間の液状加熱による HBV の不活化効率と抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性について検討した。液状加熱では 4 log 以上の不活化、抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性では、200 国際単位で少なくとも約 67,000 IU の HBV を中和することができた。本細胞株は、4 週間培養する必要があるが HBV 陽性血漿を用いて感染性を評価することが可能であった。

A. 研究目的

輸血用血液や血漿分画製剤は、スクリーニング検査の進歩によって感染症の発生頻度は激減したが、安全対策の上で重要なウイルスである B 型肝炎ウイルス (以下 HBV) や C 型肝炎ウイルスは未だ有用な培養系がないため、培養が可能でウイルス学的に性状が類似した動物由来のウイルスをモデルウイルスとして不活化や除去方の評価に用いられてきた。HBV のモデルウイルスとしてブタの仮性狂犬病ウイルス (以下 PRV) が用いられてきたが、PRV はヘルペスウイルス科に属し大きさや遺伝子構造が異なっているため HBV と同様の不活化法に対する感受性を示すのか不明であった。昨年度の研究によって樹立した細胞株を用いて HBV の液状加熱による不活化と抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性を解析した。

B. 研究方法

1. 細胞株の培養

細胞株 HepG2-NTCP#10 は感染 1 日前に 1×10^5 ずつコラーゲンコートした 24 穴プレートに蒔き、分子量 8000 のポリエチレングリコール (以下 PEG) と DMSO をそれぞれ最終濃度 4%、2% になるように添加した 10% FCS—DMEM (high glucose) を用いて 37°C、5% CO₂ で培養した。

2. HBV 陽性血漿

実験に用いた 2 つの HBV 陽性血漿は、日本赤十字社より譲渡された献血者由来の血漿で約 5×10^8 IU/mL の濃度であった。実験に使用するまで分注し、-80°C で凍結保存した。

3. 5% アルブミン 製剤における液状加熱による HBV の不活化効率の評価

血漿分画製剤の指針に従って 5% アルブミン 製剤 10 容量に対し、1 容量の HBV 陽

性血漿を添加し、60℃で10時間の液状加熱を行なった。コントロールとして同じHBV陽性血漿を4℃で10時間処理した。60℃の液状加熱した検体は、PBSにてX1～X10³まで10^{0.5}ずつ段階希釈し、100μLずつ細胞に添加した。また、4℃処理した検体はPBSにてX1～X10⁶まで段階希釈し、100μLずつ細胞に添加した。感染させた細胞は、3～4日毎にPEGとDMSOを添加した培養液で培地交換し、感染2週、3週、4週後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、定量PCRにてHBV-DNA量を測定した。

4. 抗HBs免疫グロブリン製剤におけるHBVの中和活性の評価

市販の抗HBs免疫グロブリン製剤(200IU/mL)を購入し、100μLに0.03、0.1、0.3、1.0、3.0IUの抗HBs抗体を含有するようにPBSにて希釈した。HBVは100μLに10感染価と100感染価を有するように5%アルブミン製剤で希釈し、それぞれの濃度の抗体とウイルス液を等量ずつ混合し、37℃で2時間中和させた。コントロールとしてPBSと各感染価のウイルスを混合した。反応後、200μLずつ細胞に添加し、感染させ3～4日毎にPEGとDMSOを添加した培養液で培地交換し、感染2週、3週、4週後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、定量PCRにてHBV-DNA量を測定した。

5. 感染性の評価

実験に用いた細胞株HepG2-NTCP#10は、親株と同様に二次感染は生じないので最初に感染した細胞内から周囲の細胞に感染は拡大しない。そのためHBVが細胞に付着しているのか、増殖しているのか、判断

は重要である。我々は、経時的にHBVを定量することによって感染2週目と4週目のHBV-DNA量を比較し、増加していれば、感染性ありと判断した。また、増加しない場合は感染3週間目の細胞を定量し、2週目より増加していれば感染性ありと判断した。

C. 研究結果

1. 5%アルブミン製剤における液状加熱によるHBVの不活化効率の評価

4℃-10時間処理では10⁴希釈まで2週目より4週目の方がHBV-DNA量が増加しており、感染性ありと判断した。一方、60℃-10時間の加熱では1倍希釈でも増加が認められず不活化されたと判断した。従って4Log以上不活化されたことが明らかになった(図1)。

2. 抗HBs免疫グロブリン製剤におけるHBVの中和活性の評価

10感染価のHBVでは0.03～3IUまで感染性は認められず全て中和されたと判断した。100感染価のHBVでは0.03と0.1IUにおいてHBV-DNAの増加が認められ、0.3IU以上の抗体濃度では中和された。以上の結果から抗HBs免疫グロブリン200IUでは6.7×10⁴感染価のHBVが中和できることを明らかにした。

D. 考察

昨年度に得られたHBVの高感受性株とHBV陽性血漿を用いて液状加熱によるHBV不活化効果や抗HBs免疫グロブリン製剤の中和活性の評価の可能を検討した。これまでHBV遺伝子を導入した細胞株の上清を超遠心によって濃縮したHBVが治療薬等の評価に用いられてきたが、今回の研究によって高濃度の陽性血漿が必要ではあるが、直

接評価できた事は、血液製剤の安全性を確保するために大きな前進だと考えられた。ただし、より正確な評価のためには感染細胞から二次感染が生じるようなより高感受性を有する細胞株の樹立が必要である。

E. 結論

HBV の高感受性株と HBV 陽性血漿を用いて液状加熱による HBV 不活化効果や抗 HBs 免疫グロブリン製剤の中和活性の評価が可能であった。また、他の不活化法の評価にも本法は応用可能であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 岡田義昭、野島清子、血液製剤の安全性向上を目指した B 型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系の開発、第 69 回日本輸血・細胞治療学会総会、2021 年 東京

2) 山麻衣子、鈴木雅之、玉栄建次、内野富美子、加藤由佳、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭、輸血副反応報告の実態調査とその重要性の啓発活動、第 69 回日本輸血・細胞治療学会総会、2021 年 東京

3) 岡田義昭、野島清子、Parvovirus B19 培養系の開発、第 69 回日本ウイルス学会総会、2021 年 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

60°C-10時間の液状加熱によるHBV不活化
(5%アルブミン)

HBV # 20

		X1	X10	X10 ²	X10 ³	X10 ⁴	X10 ^{4.5}
4°C -10時間 X10 ⁴ まで感染性あり	2w	126,255	5,073	190	25.2	2.3	0
	3w	280,660	10,474	143	25.0	2.0	0
	4W	366,077	17,931	217	30.4	5.5	0

N=2

		X1	X10	X10 ^{1.5}	X10 ²	X10 ^{2.5}	X10 ³
60°C -10時間 感染性は認められない	2w	159	40.0	27.8	4.8	1.6	0
	3w	88.0	20.0	9.5	2.6	0	0
	4W	53.0	26.0	9.7	4.3	1.7	0



4Log以上不活化された

N=2