

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 HBV 陽性血漿から感染が成立するクローンを選択し、さらに遺伝子改編を行うことで親株より約 20 倍感受性が高い細胞株を樹立することができた。

また、「Pheophorbide a」の各種細胞株における増殖性に与える影響を検討したところ、赤血球液での病原体不活化に必要な $40 \mu\text{g/mL}$ において B 細胞の増殖性に著明な抑制が生じることが明らかとなった。

A. 研究目的

輸血用血液は、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、全ての病原体をスクリーニングすることは困難である。また、新興・再興感染症のアウトブレイク時など検査体制が構築されるまでの対応など、更なる輸血用血液製剤の安全性を向上させるために病原体不活化技術の開発は重要である。これまで我々は、赤血球製剤に応用できる新しい病原体不活化法として腫瘍の治療に用いられている光化学治療法を応用した新しい方法の開発を目指している。これまでにクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」が有望な赤血球の病原体不活化法であることを報告した。その一方で不活化法の評価に用いる B 型肝炎ウイルスの培養系がなく、モデルウイルスとして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 の *In vitro* 感染系の開発が必要となっている。また、診断法やスクリーニング検査の評価・開発のために感染者から多量の採血をすることは倫理的に困難である。これらを解決するために感染性を有する HBV 産生細胞株の樹立も目指した。

B. 研究方法

1. HBV 産生細胞株の樹立

これまで報告された方法はプラスミドに HBV の全長に全長の 0.3 倍分の HBV を結合させた HBV をクローニングし、それを肝癌細胞に遺伝子導入してその上清を濃縮して感染に使用した。我々は Phi29 DNA ポリメラーゼがプライマー存在下に環状二重鎖 DNA に作用させるとプライマーから DNA を複製し、複製起点に達しても合成された DNA を剥がして DNA 合成が続

く点に注目して RCA (Rolling Circular Amplification) 法によって HBV の全長がタンデムに結合した DNA を *in vitro* で作成した。そのために 5 末をリン酸化したプライマーを用いて通常の PCR によって HBV の全長を増幅し、self-ligation によって環状二重鎖の DNA を作成した。4 箇所をプライマーを合成し、30 度にて 16 時間 RCA (関東化学社) を行った。RCA 産物は精製し、ネオマイシン、又はピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれたプラスミドと共に肝癌細胞株 HepG2-NTCP (国立感染症研究所渡士博士より譲渡)、又は胃癌由来 FU-97 株に遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後から薬剤による選択を行い、96 穴プレート 5 枚にクローニングした。増殖してきた細胞株は上清をエスプライン (富士レビオ社) にて HBs 抗原の有無をスクリーニングした。抗原陽性細胞は、さらにその上清の HBV-DNA 量を定量して HBV 産生株を選択した。

2. HBV 高感受株の樹立

肝癌細胞株 HepG2-NTCP を 5 枚の 96 穴プレートに 1 穴当たり 1/3 個になるように蒔き、50 個の形態的に特徴のある細胞クローンを選択した。これらに日本赤十字社から供給された HBV 陽性血漿を 1,000 倍に希釈して感染させ 21 日間培養した。培養は 10%FCS-DMEM に最終濃度 4% になるようにポリエチレングリコールと同 2% になるように DMSO を添加した。培養上清の HBV-DNA を定量 PCR で測定し、HBV 産生株 4-3 株と 6-3 を選択した。さらに高感受性株を作るために薬剤耐性遺伝子と Cas9 が組み込まれたプラスミドを用いて DNA センサーである STING 遺伝子を改変した。ネオマイシンやピュ

ロマイシンでクローンを選択した。各クローンは、仮性狂犬病ウイルス (以下 PRV) を添加しウイルスに対する感受性を評価した (図 2)。高感受性株に対しては 100 倍と 1000 倍に希釈した HBV 陽性血漿を添加し、3~4 日間隔で培養液を交換した。感染 12 日目に培養上清と細胞の HBV-DNA 定量を行い高感受性細胞を選択した。

3. Pheophorbide-a の毒性に関する評価

毒性を検討するために赤血球液を遠心し、MAP 液を取り除き、代わりに 10%FCS-RPMI で置換した。これに Pheophorbide-a を最終濃度 30 $\mu\text{g/mL}$ 、又は 40 $\mu\text{g/mL}$ になるように添加した赤血球液 10mL を 6 穴プレートに移し、150 rpm/m で攪拌しながら 2 万ルクスの赤色光照射を 15 分、30 分それぞれ行った。照射した赤血球液は遠心し、上清を回収した。これを 1 mL ずつ分注し、CEM 細胞 (T 細胞株)、TPH 細胞 (単球株)、RAJI 細胞 (B 細胞株) を $2 \times 10^5/\text{well}$ 添加し、4 日間培養した。2 日目と 4 日目に細胞数を測定し、細胞の増殖に与える影響を評価した。

C. 研究結果

1. HBV 産生細胞株の樹立

全長を増幅した HBV 遺伝子の 5 末、3 末とも blunt であるため self-ligation の効率が悪かった。そこで HBV には一ヶ所 BamH1 サイトがあることから BamH1 を含むセンスとアンチセンスのプライマーを作成し全長を増幅した。BamH1 で消化し self-ligation した。これによって RCA が効率よく増幅され多数のクローンを得ることが出来た。クローンは培養上清中の HBs 抗原の有無でスクリーニングを

かけ、最終的に HBV を産生する細胞株を樹立することが出来た。

2. HBV 高感受株の樹立

HBV 陽性血漿を感染させた約 50 クローンから培養上清中に最も高い HBV-DNA 濃度を呈した細胞株 4-3 株と 6-1 株を分離した。さらに 4-3 株は、STING 遺伝子の改変を行い、PRV に対する感受性を検討したところ 4-3 株に比べて 2Log~4Log 感受性が高い細胞株が得られた (図 1)。それらの細胞株に 100 倍と 1000 倍に希釈した HBV 陽性血漿を添加し、12 日目の HBV-DNA 量を定量したところオリジナルの HepG2-NTCP 細胞に比べて HBV の量が上清と細胞で最大 20 倍増加していた。

3. Pheophorbide-a の毒性に関する評価

毒性として細胞の増殖性に与える影響を検討した。コントロールとして赤血球液を 10% -FCS-RPMI で置換し、遠心して得られた上清を用いた。Pheophorbide-a 40 μ g/mL—30 分照射では、コントロールを 100%とした場合、2 日目では CEM 細胞 79.6%、TPH 細胞 90.5%、RAJI 細胞 27.5%、4 日目では CEM 細胞 78.9%、TPH 細胞 90.2%、RAJI 細胞 13.0%、30 μ g/mL—30 分照射では、2 日目では CEM 細胞 89.8%、TPH 細胞 100%、RAJI 細胞 37.5%、4 日目では CEM 細胞 72.2%、TPH 細胞 85.4%、RAJI 細胞 15.2%であった。B 細胞系に著名な増殖性への影響が認められた。

D. 考察

これまで HBV の血液製剤における不活化は適当な培養法がないために不可能であったが、

HBV のリセプターを発現する細胞株から HBV 陽性血漿から感染が成立する細胞株を分離、さらに遺伝子改編によって 20 倍感受性が高い細胞株を得ることができた。今後、不活化の評価にどの様に応用できるか検討したい。また、これまでの研究から診療で実際に使用されている赤血球液と同一の条件で病原体を不活するには 40 μ g/mL で 30 分間照射する増殖性に影響はなかったが、今回検討したところ B 細胞株に著名な細胞増殖抑制があることが明らかとなった。

E. 結論

HBV に感染する高感受性細胞株を樹立した。また、Pheophorbide-a は、B 細胞株の増殖性に著明な影響を与えることが判明した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- 1) 岡田義昭：赤血球製剤の病原体不活化法の開発、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年
- 2) 山麻衣子、鈴木雅之、加藤由佳、内野富子、山田攻、池淵研二、岡田義昭：幼少期に自己免疫疾患を発症し、増悪寛解を繰り返すうちに自己抗体の特異性が変化した一症例、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

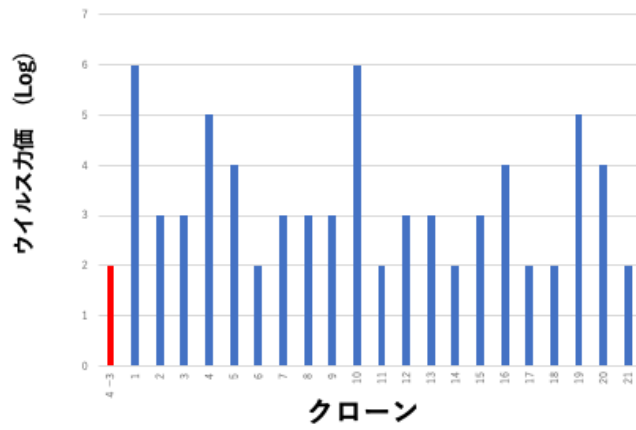


図1 仮性狂犬病ウイルスに対する感受性評価

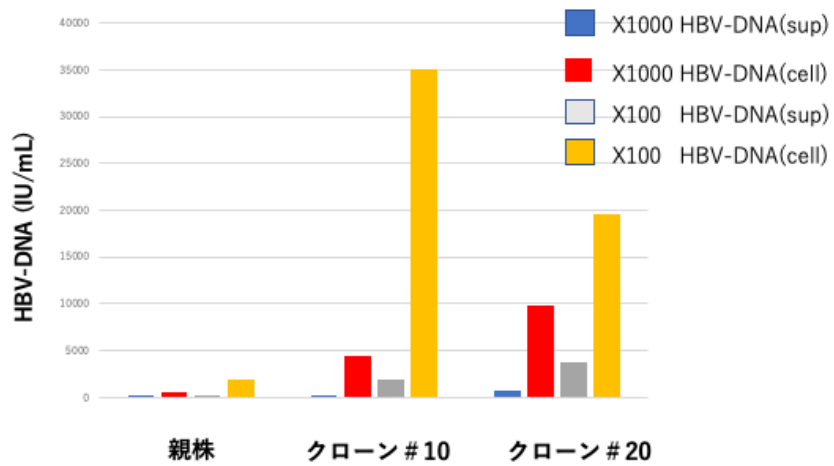


図2 親株とクローン株におけるHBVに対する感受性の比較