

厚生労働行政推進調査事業費補助金研究報告書
(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

フィブリノゲン投与による C 型肝炎感染、及び製法からみた感染リスクの研究
研究分担者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

昨年度に C 型肝炎ウイルス (以下 HCV) のモデルウイルスである牛下痢症ウイルスを用いてβ-プロピオラクトン (BPL) 処理による不活化効果を検討したところ、不活化が確認できた。今年度はヒト血漿由来の HCV を用いて不活化効果の検討を目指した。HCV の培養は困難であるとされていたが、肝癌細胞株や遺伝子改変した細胞株に HCV の持続感染が確認できた。BPL の評価までは到達できなかったが、HCV は二次感染することが報告され、継代によって高力価のウイルス液を得ることが期待できるのでさらに検討を継続したい。

A. 研究目的

これまでの調査によってフィブリノゲン製剤の製法は年代によって4つに分けられるが、1985年8月まではβ-プロピオラクトン (以下 BPL)/紫外線照射処理が実施され、1985年8月から1987年2月までは紫外線照射と抗 HBs 免疫グロブリンの添加による製造に変更された。変更後に HCV 感染件数が増加している傾向があることから BPL 処理は、HCV の不活化に効果があったと推定された。昨年度に HCV のモデルウイルスであるウシ下痢症ウイルスを用いて検討したところ不活化効果が確認できた。HCV の培養は困難であるが、HCV -RNA 陽性の血漿を直接細胞に添加しても感染が成立するとの報告や感染が成立すると二次感染によって細胞に適応した HCV が増殖し、高力価のウイルス液が得られたとの報告もある。そこで我々も今年度は、ヒト血漿由来の HCV を用いた BPL 処理による不活化効果の検討を目指した。

B. 研究方法

1. 感染に用いた細胞株について

肝癌細胞株である HuH7 細胞株、HepG2 細胞株、胃癌由来 FU97 細胞株、及び各細胞株から retinoic acid-inducible gene-1 (RIGI) を遺伝子改変したクローン細胞を用いた。RIG-1 を遺伝子改変することでシンドビスウイルスに対する各細胞の感受性は 1,000~10,000 倍増加した。培養液は、10% FCS — DMEM (high Glucose) に最終濃度 2% になるように DMSO を添加し、3~4 日毎に培地交換した。

2. HCV 感染方法

感染前日に 24 穴プレートに 1×10^5 の細胞を蒔き、感染当日から DMSO 入りの培養液で培養した。HCV-RNA 陽性血漿は精度管理のために米国から購入した血清学的 window 期にある 2 種類を用い、何も 1×10^5 IU/mL の濃度であった。各細胞に 100μL ずつ血漿を添加した。なお、凝固防止のために抗凝固剤

として 100 μ L 当り 5 単位のヘパリン を添加した。感染翌日に培地交換し、以後 3～4 日毎に培地交換した。残存する血漿の影響を無くなるように感染 3 週間以上継代した。感染の有無は細胞から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法にて確認した。

C. 研究結果

HepG2 細胞株と RIG-I を遺伝子改編した HepG2 細胞株に HCV が、持続感染していることが確認できた。また、2 種類の血漿のうち少なくとも 1 つは感染性を有する HCV が存在していることも確認できた。

D. 考察

目標であった HCV を用いた BPL の不活化効果の検討までは到達できなかったが、血漿中に存在する HCV が持続感染可能な細胞株を得ることができた。これまでの HCV の培養系は、HCV のウイルスタンパク質を発現した細胞株に全長の HCV-RNA を遺伝子導入し、上清に産生される感染性 HCV を用いる方法 subgenomic replicon System(SGR)であったが、遺伝子導入細胞株から産生される HCV は二次感染し、継代することによって培養系に適応したウイルスが増殖するようになった、と報告されている。その結果、高濃度のウイルス液が得られている。また、HCV 陽性血漿を用いても（血漿にもよるが）同様に感染が成立することも報告されるようになった。今回得られた持続感染細胞は継代することで細胞

に適応したウイルスが増殖し、高濃度のウイルス液を得られる可能性があり、継代を続けている。また、実験に用いた 1 つの血漿は感染性を有することが確認できた。

E. 結論

種々の細胞株に血清学的 window 期にある HCV 陽性血漿を感染させたところ、複数の細胞株が HCV に持続感染した。継代することで細胞株に適応した高力価の HCV が得られる可能性がある。

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