

## 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

新興・再興感染症の情報収集とリスクの評価,及びB型肝炎ウイルス等培養が困難な  
ウイルスの培養法の改良と不活化法の評価

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 客員准教授)

研究協力者 小林清子 (埼玉医科大学 医学部 講師)

#### 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。先行研究によって樹立した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簡便で正確な方法を検討した。感染2週間後のHBs-RNA量を測定することでHBs-DNAよりもバックグラウンドが激減し、より正確な感染性の評価が可能になった。液状加熱では10時間加熱で3log以上の不活化されたが、3時間加熱で3LogされたことからHBVは加熱に高感受性であることが実験で明らかにできた。また、抗HBs免疫グロブリン製剤による中和活性では、200単位(1バイアル)で少なくとも約 $2 \times 10^4$ 感染価のHBVを中和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。先行研究によって樹立した細胞株を用いてHBs-DNAの経時的増加を指標に感染性を評価したが、非特異的な細胞へのHBVの吸着等が課題となっていた。本研究ではウイ

ルスの複製で合成されるHBs-RNAを定量的に測定することで簡便でより正確な感染性の評価を目指した。

#### 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 $1 \times 10^5$ 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%CO<sub>2</sub>で培養した。

##### 2. HBV陽性血漿

実験に用いた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 genotype A、ウイルス量は約  $5 \times 10^8$  IU/mL であった。凍結融解を少なくするために少量ずつ分注し、全ての実験に使用した血漿は融解した回数は同じにした。分注した血漿は  $-80^\circ\text{C}$  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 陽性血漿を添加した。検体を 2 分割し、1 つは 4 度で 10 時間反応させた。もう一方は  $60^\circ\text{C}$  で 3、6、10 時間の液状加熱を行なった。 $60^\circ\text{C}$  加熱検体は、PBS にて  $X 1 \sim X 10^{2.5}$  まで  $10^{0.5}$  ずつ段階希釈し、 $100 \mu\text{L}$  ずつ細胞に添加した。また、 $4^\circ\text{C}$  処理した検体は PBS にて  $X 1 \sim X 10^{4.5}$  まで段階希釈し、 $100 \mu\text{L}$  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養し、感染 1～3 週後に細胞を回収した。回収した細胞から DNA と RNA を抽出し、定量 PCR と定量 RT-PCR にて HBs-DNA と RNA 量をそれぞれ測定した。

### 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 ( $200\text{U}/\text{mL}$ ) を購入し、 $100 \mu\text{L}$  に 0.03、0.1、0.3、1.0、3.0U の抗 HBs 抗体を含有するように PBS にて希釈した。HBV は  $100 \mu\text{L}$  に 10 感染価と 30 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、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間反応させた。感染価は PBS を用いてウイルスを希釈して細胞に感染させ、HBs-RNA が陽性となる最大希釈倍率を定義した。反応後、 $200 \mu\text{L}$  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 2～3 週後に細胞を回収した。回収した細胞から RNA を抽出し、定量 RT-PCR にて HBs-RNA 量をそれぞれ測定した。

## 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

$4^\circ\text{C}$ -10 時間処理では  $10^4$  希釈まで経時的に 3 週目まで HBs-DNA 量が増加した。一方、おり、感染性有りと判断した。一方、HBs-RNA は感染 2 週までは HBs-DNA よりも高値だったが、3 週目には感染 2 週よりも低下した。一方、 $60^\circ\text{C}$ -10 時間の加熱では HBs-DNA は希釈倍率の小さい検体では減少しているも倍率によっては増加してものもあり、感染価の評価は困難であった。HBs-RNA は 1 倍希釈でも検出されず、感度以下にまで不活化されていた (図 1)。従って 3Log 以上不活化されたことが明らかになった。また、3 時間での加熱処理では 3Log、6 時間では検出感度以下にまで不活化されていた。

### 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 との中和では、コントロールにおいて感染が成立したが、0.03 単位の抗体存在下では HBs-RNA は感度以下となり全て中和されたと判断した。30 感染価の HBV では 0.1 単位において HBs-RNA が検出され、0.3 単位以上の抗体では中和された。以上の結果から皮下注射用の抗 HBs 免疫グロブリン 200 単位 (1 バイアル) では少なくとも  $2 \times 10^4$  感染価の HBV が中和できることを明らかにした。

#### D. 考察

先行研究で感染性評価の問題点を HBs-RNA を測定することによって解決することができた。しかも HBs-DNA による感染性評価では増減見るために経時的にサンプリングする必要があったが、HBs-RNA では感染 2 週後にピークとなるためワンポイントでの検体採取で良いことになり、評価が簡便になった。また、加熱時間による不活化効率を検討したが、3 時間で 3Log 不活化、6 時間では検出感度以下にまで不活化されたことが明らかとなり、HBV は血漿分画製剤の製造工程でよく用いられている液状加熱によって不活化し易いことが確認できた。また、中和活性をこれまで抗原と抗体の結合から評価されていたが、本測定法によってウイルスの感染性を中和する活性を直接的に評価することができるため genotype A 以外の遺伝子型に対する中和活性も測定可能であり、暴露した場合の感染予防や抗 HBs 免疫グロブリン製剤の品質管理に役立つものと考えられた。を HBV-RNA は HBV 粒子に混入することもあるが、我々の感染系では粒子由来の HBs-RNA は問題とならないと考えられた。

#### E. 結論

HBV の感染性の有無を HBs-RNA を定量することで検討し、60°C 液状加熱による不活化効果や抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性の評価に有用であることが確認できた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

1) 山麻衣子、玉栄建次、加藤由佳、鈴木雅之、内野富美子、山田攻、小原祥、天野博明、小林清子、岡田浩一、岡田義昭: カラム凝集法で検出感度以下であった不規則抗体による遅発性溶血性副反応の一例、第70回日本輸血・細胞治療学会総会、名古屋、2022.

2) 岡田義昭、小林清子、野島清子: B型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系を用いた血液製剤の不活化効果の評価と抗HBs免疫グロブリンの中和活性の測定 第70回日本輸血・細胞治療学会総会、名古屋、2022.

3) 岡田義昭、渡士幸一、野島清子: *In vitro* 感染系とB型肝炎ウイルス陽性血漿を用いた血漿分画製剤における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の評価 第69回日本ウイルス学会学術総会、長崎、2022.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

4°C -10時間 HBs-DNA	希釈倍率	X1	X10	X10 <sup>2</sup>	X10 <sup>3</sup>	X10 <sup>4</sup>	X10 <sup>4.5</sup>	N=2
	1w	10,947	361.6	24.0	2.0	0	0	
	2w	88,706	3,657.0	196.2	12.6	7.8	0.6	
	3W	216,592.3	12,452.6	647.3	28.5	9.8	1.1	
4°C -10時間 HBs-RNA	希釈倍率	X1	X10	X10 <sup>2</sup>	X10 <sup>3</sup>	X10 <sup>4</sup>	X10 <sup>4.5</sup>	
	1w	36,385.8	2,388.5	195.4	0.0	0.0	0.0	
	2w	90,231.1	6,790.1	345.4	28.1	0.0	0.0	
	3W	83,189.3	4,480.1	295.5	0.0	0.0	0.0	
60°C -10時間 HBs-DNA	希釈倍率	X1	X3	X10	X30	X10 <sup>2</sup>	X10 <sup>2.5</sup>	
	2w	1,046.4	195.7	48.2	14.3	3.5	2.2	
	3w	790.9	177.4	54.9	14.5	7.0	0.8	
60°C -10時間 HBs-RNA	希釈倍率	X1	X3	X10	X30	X10 <sup>2</sup>	X10 <sup>2.5</sup>	
	2w	0	0	0	0	0	0	
	3w	0	0	0	0	0	0	

図1 60°C-10時間の液状加熱によるHBVの不活化