

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クローン株# 4-11 を用いて今年度は、界面活性剤(S/D)処理による HBV の不活化効率の評価と昨年実施した液状加熱による不活化の評価をより正確に行なった。S/D 処理では 3 時間で検出感度以下に不活化された。これは HBV のモデルウイルスとして用いられている仮性狂犬病ウイルスと同等であった。また、感染後の HBs-RNA の転写量を継時的に測定したところ感染 4~5 日後より急速に増加し 10 日頃にピークになることが明らかになった。これを 60°C-10 時間液状加熱された検体の転写量に応用したところ増加は全く認められなかった。以上から液状加熱により約 3 log 以上不活化されたと考えられた。

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てきた。また、将来的に上記肝炎ウイルスに加えパルボウイルス B 19 ウイルス等も不活化等々を評価するために高濃度の陽性血漿を必要量確保することは、倫理的に困難になると推定される。そこで

ウイルス学的進歩によって実験的に培養が可能になった HBV や HCV 陽性血漿を用いて血漿分画製剤の製造工程で使用されているウイルス不活化法の不活化効果を明かにすると共に、これらのウイルスを *in vitro* で容易に増殖できる培養法も目指した。今年度は界面活性剤(S/D)処理による HBV の不活化の評価や液状加熱による不活化の評価をより正確に行なった。

B. 研究方法

1. 細胞株の培養

細胞株#4-11 は感染 1 日前に 1×10^5 ずつコーゲンコートした 24 穴プレートに蒔き、最終

濃度 2% の DMSO を添加した 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 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ある。Genotype は、A と C 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°C で凍結保存した。

2. 界面活性剤(S/D)処理による HBV の不活化

5%アルブミン製剤で 10 倍希釈した HBV に最終濃度 1.0%、及び 0.3%となるように Tween80 と n-butylphosphate を添加し、添加直後、1 時間後、3 時間後に検体を採取した。直ちに段階希釈し、100 μL ずつ細胞に感染させた。感染 2 日目に細胞を PBS で 5 回洗浄し、2%DMSO と 4% ポリエチレングリコール (PEG:分子量 8000) を含む培養液で培養した。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交換した。感染 14 日後に細胞を回収した。

3. 感染後の HBs-RNA 転写量の継時的測定

約 1000 感染価と 100 感染価に希釈した HBV 陽性血漿を細胞に感染は PBS を用いてウイルスを希釈して 100 μL ずつ細胞に感染させた。感染後は S/D 処理と同様に培養し、HBs-RNA 測定の場合は、2、4、7、11、14 日後に細胞を回収した。DNA では更に 18 日と 23 日間培養した。

4. 液状加熱による HBV の不活化

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°C で 3、6、10

時間の液状加熱を行なった。60°C 加熱検体は、PBS にて X 1 ~ X 10^{2.5} まで 10^{0.5} ずつ段階希釈し、100 μL ずつ細胞に添加した。また、4°C 処理した検体は PBS にて X 1 ~ X 10^{4.5} まで段階希釈し、100 μL ずつ細胞に添加した。感染後は S/D 処理と同様に培養し 14 日後に細胞を回収した。

5. 感染価の評価

DNA は QIAamp DNA mini kit、RNA は RNeasy mini kit (DNase 処理) を用いて抽出し、Nuriyara (J. Clin Microbiol. 48:3843-51. 2010) の方法で HBs-RNA と HBs-DNA を核酸増幅法で定量した。陽性となった最大希釈倍率の逆数を感染価とした。

C. 研究結果

1. 界面活性剤(S/D)処理による HBV の不活化

3 種類の HBV 陽性血漿を用いて評価したが、1 時間の処理では感染性が検出されることもあったが、3 時間後には全て検出限度以下にまで不活化された (表 1)。また、HBV のモデルウイルスとして用いられてきた仮性狂犬病ウイルスも検討したが、1 時間の処理では 2Log 程度の不活化しかされなかったが、3 時間では検出感度以下になった (図 1)。

2. 感染後の HBs-RNA 転写量の継時的測定

感染 2 日目の HBs-RNA 量を 1 とすると感染 4 日目から増加し、11 日前後でピークとなった。約 20 倍増加した。一方、HBs-DNA 量は感染初期には増加は認められず 23 日目頃になって増加が認められた。添加した感染価による差は認められなかった。

3. 液状加熱による HBV の不活化

60°C-10 時間の液状加熱処理によっても HBs-

RNA が検出されたことから完全には不活化されないことが示唆されたが、感染後の HBs-RNA 量の推移のデータからより正確に液状加熱の効果解析するために継時的(感染 2 日～11 日間)に HBs-RNA 量を測定した。10 倍に希釈した検体を細胞に感染させ S/D 処理と同様に培養し、継時的な HBs-RNA 量を測定したところ 11 日まで増加は認められなかった。少なくとも 10 倍希釈以上までは不活化されていると思われた。

D. 考察

先行研究で感染性評価の指標として HBs-RNA の定量が、有用であることを示したので今年度は S/D 処理による HBV の不活化を評価した。文献では 30 分程度で不活化されるとの報告もあったが、実際は 1 時間の処理では感染性は残存することもあるが、3 時間では感染性は検出以下にまで不活化された。モデルウイルスの仮性狂犬病ウイルスも同様に評価したが、1 時間では 2Log 程度しか不活化されなかった。3 時間では HBV と同様に検出感度以下に不活化された。一般的にエンベロープを有するウイルスに対し、S/D 処理は有効であるが、今回、HBV に対しても有効であること初めて証明することができた。

また、本感染系の HBs-RNA と DNA の継時的な推移を確認したところ、HBs-RNA は感染早期に急速に増加したが、DNA の増加までは微量でしかも時間を要した。本研究を含め HBV の感染系では二次感染が生じ難いことが知られているが、今回、明らかになった HBV-DNA の合成が少ないことが反映していると考えられた。

昨年度評価した液状加熱によるウイルス不

活化では、10 時間加熱によっても HBs-RNA が検出されたため感染性が残存すると考えたが、より正確に不活化を評価するために継時的に HBs-RNA 量を測定したところ、減少するだけで増加は確認できなかった。そのため HBs-RNA が検出できたのは、感染していたのではなくウイルス粒子が細胞に接着しているだけの可能性がある。最近、HBV 粒子の中に HBV-RNA(多種の長さがあるが)が存在することが知られるようになった。この研究で使用した血漿から HBs-RNA が容易に検出できたことから裏付ける結果となった。更に感染効率を高めるために培養液に添加した PEG が付着を促進している可能性がある。今年度から感染 2 日後までは PEG 添加しないで培養し、十分洗浄後に添加する培養法に変更したのは適切であった。

E. 結論

S/D 法による HBV の不活化法を評価し、容易に不活化できることが確認できた。また、HBs-RNA を継時的に定量することでより正確な不活化の評価が可能であることが明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 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 72 回日本輸血・細胞治療学会総会, 千葉, 2023.
2. 岡田義昭、野島清子：B型肝炎ウイルスの *In vitro* 感染系を用いた血液製剤の不活化効

果と抗HBs免疫グロブリン製剤の中和活性の評価（第2報） 第70回日本ウイルス学会学術総会、仙台、2023.

著書

岡田義昭 血液製剤から見たプリオン、バム
サジャーナル35（3） 144-151, 2023.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

	HBV血漿-A		HBV血漿-B		HBV血漿-C	PRV	
	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.1	Exp.2
0 h :	$10^{3.5}$	$10^{4.0}$	$10^{3.5}$	$10^{3.0}$	$10^{3.0}$	1.6×10^7	1.0×10^7
1 h :	<10	$10^{2.0}$	<10	<10	$10^{2.5}$	1.0×10^5	6.8×10^5
3 h :	<10	<10	<10	<10	<10	$<3.6 \times 10$	$<3.6 \times 10$
クリアランス	$>10^{2.5}$	$>10^3$	$>10^{2.5}$	$>10^2$	$>10^2$	$>4.4 \times 10^5$	$>4.4 \times 10^6$

PRV: 仮性狂犬病ウイルス

表1. 界面活性剤(S/D)処理によるHBV不活化

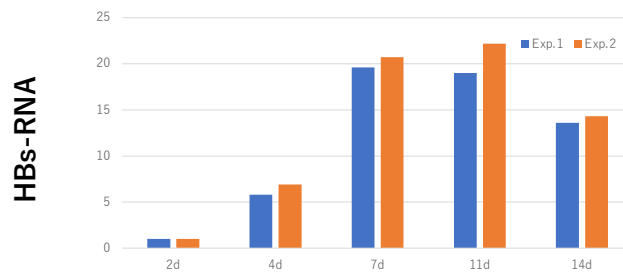


表2. HBVの感染後のHBs遺伝子の挙動