

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を用いて令和4～5年度にHBVの培養法や感染評価法の開発と改良を行った。それを用いて1.液状加熱によるHBVの不活化の評価、2.市販されている抗HBs免疫グロブリン製剤によるHBV中和活性の測定、3.界面活性剤(S/D)処理によるHBVの不活化、等の評価を行った。感染性の評価は当初、HBs-DNAで判断していたが、非特異的な吸着がありHBs-RNAの定量がより優れていることが判明した。更にポリエチレングリコールの添加する時期等も検討し、より正確に不活化が評価できるように系を改良した。その結果、液状加熱やS/D処理がHBVの不活化に有効であることを*in vitro*実験系で明らかにすることができた。また、これまでのHBs抗原と抗HBs抗体の結合によって中和活性を評価してきたが、本感染系を用いることでHBVの感染性を中和する活性を*in vitro*で評価できることも可能になった。

#### 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B19ウイルス等も不活化等を評価するた

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らかにすると共に、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。

#### B. 研究方法

##### 1. 細胞株の培養

細胞株#4-11は感染1日前に $1 \times 10^5$ ずつコラ

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%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。

## 3. 感染価の評価

DNA は QIAamp DNA mmini 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。

## 4. 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。

## 5. 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<sup>2.5</sup> まで 10<sup>0.5</sup> 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<sup>4.5</sup> 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。

## 6. 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。

## C. 研究結果

### 1. 感染性の評価と培養法

当初、HBs-DNA 量を継時的に 3 週間測定し、増加した希釈倍率の逆数を感染価としたが、プロテオグリカンを介する非特異的な結合等があった。そこで感染 2 週目の HBs-RNA の有無で感染価を評価したが、感染の促進のために添加している PEG による HBV の吸着もあることから感染 2 日目までは 2%-DMSO のみで培養し、2 日目から 4%PEG を添加するように改良した。添加前に十分に洗浄することでバックを減少させることに成功した。また、HBs-RNA 量の推移を解析したところ、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り。約 20~40 倍に増加した。増加率は添加した感染価による差は認められなかった。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。

## 2. 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。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。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程度の不活化出会ったが、3時間では検出感度以下になった。

## 3. 液状加熱によるHBVの不活化

4種類のHBV陽性血漿を用いて60°C-10時間の液状加熱による不活化の効果を2年間検討した。HBs-RNAの転写量の測定を用いて検討したところ60°C-10時間処理でも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。しかし、感染後のHBs-RNA量の継時的推移のデータから10倍に希釈した検体を培養しても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。

## 4. 抗HBs免疫グロブリンの中和活性測定

高感受性細胞株を用いて各血漿の感染価の測定が可能となり、感染価を30~100に調整したHBVと種々の濃度に希釈した抗HBs免疫グロブリンと37°Cで1時間反応させ、感染の有無から中和活性の測定が可能となった。

## D. 考察

遺伝子改変により親株よりもHBVに高感受性を示す細胞株を作成することができた。更にポリエチレングリコールの添加する時期や感染2日目に感染細胞を洗浄することで非特異的な吸着を抑制することができた。また、感染性評価の指標としてHBs-RNAの定量が有用であるこ

とが判明した。それを用いて液状加熱やS/D処理によるHBVの不活化の評価が可能になった。

液状加熱によるHBVの不活化では、60°C-10時間加熱によってもHBs-RNAは検出されたが、継時的な推移を測定したところ、HBs-RNAは感染後、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り、この研究で使用した血漿からも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が非特異的な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。また、本感染系のHBs-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。

パルボウイルスの培養系では、パルボウイルスDNAを合成する細胞株を得たが、感染拡大する細胞株は得られなかった。

## E. 結論

この2年間で細胞の遺伝子改編と培養法の改良によって液状加熱と界面活性剤によるHBVの不活化法と抗HBs免疫グロブリンによる中和活性の測定が可能になった。

## 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、渡土幸一、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

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.

4) 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.

5) 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

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.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし