

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

B 型肝炎ウイルスやパルボウイルス B19 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

先行研究で高感度に B 型肝炎ウイルス（以下 HBV）の感染性を評価できる系を作成したのでこれを用いて下記の研究を行った。

1. 研究に用いる HBV 陽性血漿は、採血から実験に使用するまで少なくとも 3 回以上の凍結・融解が行われるのでその影響を解析した。少なくとも 5 回まで感染性への影響は認められなかった。不活化等に用いる陽性血漿の管理に有用な情報が得られた。
2. HBV は安定性が高いウイルスと言われているが、確認されているとは言い難い。血漿、5%アルブミン、PBS にそれぞれ添加した HBV は 4℃で少なくとも 4 週間の保管では感染性に影響はないことが確認できた。これは赤血球製剤に混入した場合、保管期間に失活することなく感染性を保持することが示唆された。

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法の評価に用いてきた。我々は、血液製剤の不活化法等に応用できる HBV の感染系の確立を目指した。また、感染性の評価には HBs-RNA の検出が高感度で特異性が高いことも示してきた。今年度は、この系を用い

てこれまで余り検討されてなかった HBV の感染性に関する安定性について研究を行った。HBV は非常に安定性が高いとの報告があるが、感染系がなかったため十分な検討はされていない。また、パルボウイルス（PB19V）は、感染の評価系はあるものの二次感染が生じないため不活化等の評価するためには、陽性血漿を確保する必要がある。PB19V の流行は 4 年周期で起こるとされたためウイルスを産生する培養系の開発が必要である。我々が分離した PB19V に高感受性の細胞株にさらに遺伝子編集を行うことによって感染性ウイルスを産生する細胞株の樹立も目指した。

B. 研究方法

1. 感染方法

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、感染当日に最終濃度 2 % の DMSO を添加した 10 % FCS—DMEM で 37°C、5 % CO₂ で培養した。HBV は種々の処理後に 100 μ L ずつ細胞に添加した。感染 2 日目に細胞を PBS で 5 回洗浄し、最終濃度 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。2 ~ 3 日毎に PEG と DMSO を添加した培養液で培養し、感染 9 ~ 10 日後に細胞を回収した。

2. HBV 陽性血漿

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を用いた。

3. 感染性の評価法

RNA は RNeasy mini kit (DNase 処理) を用いて抽出し、Nuriya ら (J. Clin Microbiol. 48: 3843-51. 2010) の方法で HBs-RNA を核酸増幅法で定量し、各群の HBs-RNA の量をコントロールと比較することで感染性を評価した。

4. 凍結融解が感染性に与える影響

凍結された HBV 陽性血漿を室温で融解し、100 μ L ずつ分注し、直ちに -80°C で凍結した。翌日以降に分注した検体を室温で融解し、氷中で 1 時間保持後に再度凍結した (凍結 1 回目)。翌日以降に凍結 1 回の検体を同様に融解凍結 (融解 2 回目) し、同様に融解と凍結を 5 回繰り返した。これらの検体を同時に融解し、PBS にて 100 倍希釈して細胞に感染させた。感染 9 ~ 10 日目に回収し、HBs-RNA を定量した。

5. 保存温度による感染性への影響

5 % アルブミン、PBS、血漿に HBV 陽性血漿を

添加し、4°C、室温、37°C で 1 ~ 4 週間保管後に細胞に感染させた。感染性を HBs-RNA 定量で評価することで HBV の安定性を評価した。5 % アルブミン と PBS は 10 倍希釈になるように陽性血漿を添加した。

C. 研究結果

1. 凍結融解が感染性に与える影響

凍結融解を最大 5 回繰り返したが、コントロールの検体を感染させた細胞から得られた HBs-RNA 量と 4 回、又は 5 回凍結融解を繰り返した検体を感染させた細胞からの HBs-RNA 量に差は認められなかった (図 1)。

2. 保存温度による感染性への影響

4°C では、血漿、PBS、5 % アルブミン のいずれにおいて、検討した 4 週間までは感染性の低下は認められなかった。室温保存では、1 週間まで著明な減少は認められなかった。しかし 2 週以降はアルブミン 以外では著明な減少が認められた。また、37°C では 1 週間以内に各溶媒において著明な感染性の減少が認められた (図 2)。

D. 考察

HBV は 4°C において溶媒に依らず長期間感染性を維持していることが明らかになった。核酸増幅検査で感度以下の極微量な HBV の混入した赤血球製剤 (4°C 保存) によって感染した症例が報告されているが、それを裏付ける結果となった。また、-80°C のフリーザーが故障しても 4°C の冷蔵庫で保存すれば 1 ヶ月は対応できることも示された。HBV 陽性血漿は、採血から

我々に供給されるまでに少なくとも2回の凍結融解を経ている。凍結融解による感染性の影響を解析することは、血液製剤の不活化等の評価をする上で重要である。今回の研究によって少なくとも5回の凍結融解は感染性に影響がないことが証明できた。これは、感染実験に使用する陽性血漿の管理に有用な知見となる。また、HBV の輸血用血液製剤による感染を防止する上でHBV の保管温度による感染性への影響を明らかにすることも重要である。これまでいくつか報告があるが、チンパンジーへの接種による感染の有無で評価されており、十分な検討等はいない。今回の評価でアルブミンだけでなくPBS においても4℃では4週間以上感染性が低下しないことが明らかとなった。HBV が極めて安定化したウイルスであることを明らかにできた。これは、核酸増幅検査の感度以下の極少量のHBV でも4℃保存の赤血球液であれば製剤の有効期間内で感染性を保持できることを示している。また、高濃度のウイルスを含有するHBV 陽性血漿は大変貴重であるが、フリーザー等の故障で低温保存できない場合においても通常の冷蔵庫で数週間の保存が可能あることも示唆され、研究者にとっては、貴重な情報と

なると考えられた。

今年度は、収集したHBV 陽性血漿の感染力価や遺伝子型も解析した。これらの解析結果を用いて来年度は、遺伝子型による不活化効率や中和抗体の活性の相違を解析する予定である。。

E. 結論

確立したHBV 感染評価系を用いて凍結融解や保存温度による感染性の影響について解析し、HBV が極めて安定した感染性を保持したウイルスであることを明らかとした。

F. 健康危機情報

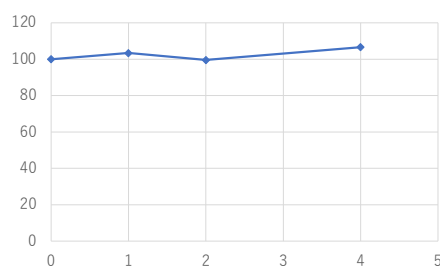
なし

G. 研究発表

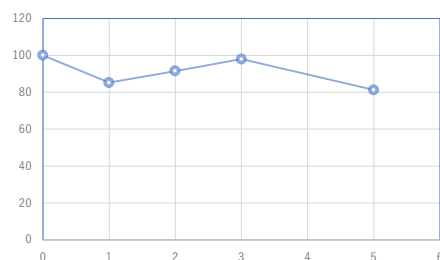
1. 岡田義昭、小林清子、野島清子：B型肝炎ウイルスのin vitro培養系を用いた血液製剤における不活化法の評価 第72回日本輸血・細胞治療学会総会, 東京, 2024.
2. 岡田義昭、野島清子：In vitro感染系を用いたB型肝炎ウイルスの安定性の解析 第71回日本ウイルス学会総会、名古屋、2024.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



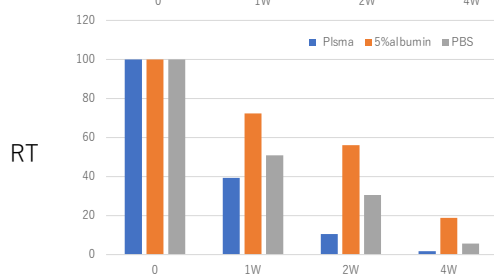
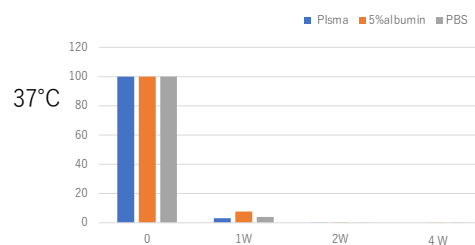
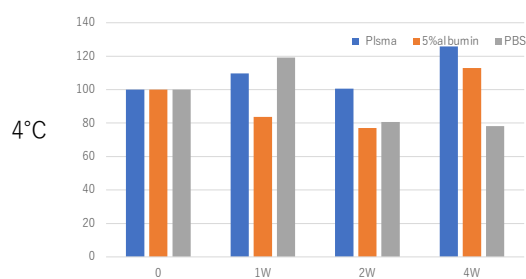
凍結・融解 4 回 N=2



凍結・融解 5 回 N=2

コントロール検体を感染させた時のHBs-RNAの定量値を100%として各凍結融解検体を感染させた時のHBs-RNA定量値を比較した。

図1 HBVの凍結融解処理の感染性に及ぼす影響



4°Cでは、感染性は4週間後でも保たれていた。

n=2

図2 溶媒と温度が及ぼすHBVの感染性の影響