

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

赤血球製剤の病原体不活化法の開発
研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

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。本研究では、親株より約 20 倍 HBV に対して感受性が高い細胞株 HepG2-NTCP#10 を樹立することができた。それを用いて 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を検討した。液状加熱では 4 log 以上の不活化、抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性では、200 国際単位 (筋注用製剤 1 本) で少なくとも約 67,000 IU の HBV を中和することができた。本細胞株は、直接 HBV 陽性血漿を用いて感染性を評価することが可能であり、他にこのような培養系はなく血液製剤の安全性評価に大いに貢献できるものと考えている。

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。HBV のモデルウイルスとしてブタの仮性狂犬病ウイルス (以下 PRV) が用いられてきたが、PRV はヘルペスウイルス科に属し大きさや遺伝子構造が異なっているため HBV と同様の不活化法に対する感受性を示すのか不明であった。昨年度の研究によって樹立した細胞株を用いて HBV の液状加熱による不活化と抗 HBs 免疫グロブリン製剤に

よる中和活性を解析した。

B. 研究方法と結果

2. HBV 高感受株の樹立

肝癌細胞株 HepG2-NTCP (国立感染症研究所渡士博士より供与) を 5 枚の 96 穴プレートに 1 穴当たり 1/3 個になるように蒔き、50 個の形態的に特徴のある細胞クローンを選択した。これらに日本赤十字社から供給された HBV 陽性血漿を 1,000 倍に希釈して感染させ 21 日間培養した。培養は 10% FCS-DMEM に最終濃度 4% になるようにポリエチレングリコールと同 2% になるように DMSO を添加した。培養上清の HBV-DNA を定量 PCR で測定し、HBV 産生株 4-3 株と 6-3 を選択した。さらに高感受性株を作るために薬剤耐性遺伝子と Cas9 が組み込まれたプラスミドを用いて DNA センサーである STING 遺伝子を改変した。ネオマイシンや

ピュロマイシンでクローンを選択した。各クローンは、仮性狂犬病ウイルス（以下 PRV）を添加しウイルスに対する感受性を評価し、高感受性株に対しては 100 倍と 1000 倍に希釈した HBV 陽性血漿を添加し、感染 12 日目に培養上清と細胞の HBV-DNA 定量を行い高感受性細胞 HepG2-NTCP#10 を選択した。

2. 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

細胞は、感染 1 日前に 1×10^5 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_2 で培養した。実験に用いた 2 つの 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約 5×10^8 IU/mL の濃度であった。実験に使用するまで分注し、 -80°C で凍結保存した。液状加熱は、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、 60°C で 10 時間行なった。コントロールとして同じ HBV 陽性血漿を 4°C で 10 時間処理した。 60°C の液状加熱した検体は、PBS にて $X 1 \sim X 10^3$ まで $10^{0.5}$ ずつ段階希釈し、 $00 \mu\text{L}$ ずつ細胞に添加した。また、 4°C 処理した検体は PBS にて $X 1 \sim X 10^6$ 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地交換し、感染 2 週、3 週、4 週後に細胞を回収した。回収した細胞から DNA を抽出し、定量 PCR にて HBV-DNA 量を測定した。

4°C -10 時間処理では 10^4 希釈まで 2 週目

より 4 週目の方が HBV-DNA 量が増加しており、感染性有りと判断した。一方、 60°C -10 時間の加熱では 1 倍希釈でも増加が認められず不活化されたと判断した。従って 4 Log 以上不活化されたことが明らかになった。

3. 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 (200IU/mL) を購入し、 $100 \mu\text{L}$ に 0.03、0.1、0.3、1.0、3.0 IU 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 100 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°C で 2 時間中和させた。コントロールとして PBS と各感染価のウイルスを混合した。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 週、3 週、4 週後に細胞を回収した。回収した細胞から DNA を抽出し、定量 PCR にて HBV-DNA 量を測定した。

10 感染価の HBV では 0.03～3 IU まで感染性は認められず全て中和されたと判断した。100 感染価の HBV では 0.03 と 0.1 IU において HBV-DNA の増加が認められ、0.3 IU 以上の抗体濃度では中和された。以上の結果から抗 HBs 免疫グロブリン 200 IU では 6.7×10^4 感染価の HBV が中和できることを明らかにした。

4. HBV 産生株の樹立

5'末をリン酸化したプライマーを用いて通常の PCR によって HBV の全長を増幅し、self-ligation によって環状二重鎖の DNA を作成した。4 箇所にプライマー を合成

し、30度にて16時間RCA(Rolling Circular Amplification)を行った。RCA産物は精製し、ネオマイシン、又はピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれたプラスミドと共に肝癌細胞株 HepG2-NTCP と胃癌由来FU-97 株に遺伝子導入した。遺伝子導入2日後から薬剤による選択を行い、96穴プレート5枚にクローニングした。増殖してきた細胞株は上清をエスプライン(富士レビオ社)にてHBs抗原の有無をスクリーニングした。抗原陽性細胞は、さらにその上清のHBV-DNA量を定量してHBV産生株を選択した。最終的に濃度は低いが、濃縮することで感染性を有するHBVを産生する株を得ることができた。

5. Pheophorbide-aの毒性に関する評価

毒性を検討するために赤血球液を遠心し、MAP液を取り除き、代わりに10%FCS-RPMIで置換した。これにPheophorbide-aを最終濃度30 μ g/mL、又は40 μ g/mLになるように添加した赤血球液10mLを6穴プレートに移し、150rpm/分で攪拌しながら2万ルクスの赤色光照射を15分、30分それぞれ行った。照射した赤血球液は遠心し、上清を回収した。これを1mLずつ分注し、CEM細胞(T細胞株)、TPH細胞(単球株)、RAJI細胞(B細胞株)を2 \times 10⁵/well添加し、4日間培養した。2日目と4日目に細胞数を測定し、細胞の増殖に与える影響を評価した。2日目ではCEM細胞79.6%、TPH細胞90.5%、RAJI細胞27.5%、4日目ではCEM細胞78.9%、TPH細胞90.2%、RAJI細胞13.0%、30 μ g/mL—30分照射では、2日目ではCEM細胞89.8%、TPH細胞100%、RAJI細胞37.5%、4日目ではCEM細胞72.2%、TPH細胞85.4%、RAJI細胞

15.2%であった。B細胞系に著名な増殖性への影響が認められた。

D. 考察

昨年度に得られたHBVの高感受性株とHBV陽性血漿を用いて液状加熱によるHBV不活化効果や抗HBs免疫グロブリン製剤の中和活性の評価の可能を検討した。これまでHBV遺伝子を導入した細胞株の上清を超遠心によって濃縮したHBVが治療薬等の評価に用いられてきたが、今回の研究によって高濃度の陽性血漿が必要ではあるが、直接評価できた事は、血液製剤の安全性を確保するために大きな前進だと考えられた。ただし、より正確な評価のためには感染細胞から二次感染が生じるようなより高感受性を有する細胞株の樹立が必要である。

E. 結論

HBVの高感受性株とHBV陽性血漿を用いて液状加熱によるHBV不活化効果や抗HBs免疫グロブリン製剤の中和活性の評価が可能であった。その結果、液状加熱によってモデルウイルスと同等にHBVは不活化されることを明らかにした。また、他の不活化法の評価にも本法は応用可能であると考えられた。

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

4) 岡田義昭：赤血球製剤の病原体不活化法の開発、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年

5) 山麻衣子、鈴木雅之、加藤由佳、内野富子、山田攻、池淵研二、岡田義昭：

幼少期に自己免疫疾患を発症し、増悪寛解を繰り返すうちに自己抗体の特異性が変化した一症例、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

