

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)

総括研究報告書

輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための

新興・再興感染症の研究の開発

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

ヒトや物資の国際的な移動の急速な増加や地球温暖化のために海外から持ち込まれる病原体がある一方、国内には E 型肝炎ウイルス(HEV)や重症熱性血小板減少症候群ウイルスなどが常在している。これらのウイルスから血液製剤の安全性確保と安定供給のために病原体の検出法の開発やウイルスの特性を解析した。特にジカウイルスのスクリーニング試薬の検討を行い、高感度にウイルスを検出でき、しかも国内に存在する日本脳炎ウイルスと交差反応をしないことを確認できた。さらに国内にダニ媒介のウイルスが存在することからダニの特性を通じて感染リスクを減少させるため、ダニの種類によって吸血する動物種の嗜好性を解析している。また、C型肝炎ウイルスや HEV は in vitro 培養系が充分とは言えないので効率の良い培養系の開発を行なっている。HEV では リバースジェネティクス法を用いて 9Log copy/mL の高力価のウイルス産生が可能になった。また、赤血球製剤の病原体不活化は実用化された方法がないのが現状であるが、光高感受性物質としてクロロフィル由来の化学物質と可視光照射を組み合わせることで 3 Log 程度の不活化が可能になった。Cohn の分画におけるグロブリン精製工程である 17%エタノール処理は、C型肝炎だけでなく B型肝炎ウイルスも除去できることが実験的に明らかにすることができた。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長
大隈 和 国立感染症研究所
室長
坂井 薫 日本血液製剤機構
中央研究所 室長
沢辺 京子 国立感染症研究所
部長
下池 貴志 国立感染症研究所

主任研究官

平 力造 日本赤十字社血液事業本部
課長
野島 清子 国立感染症研究所
研究員

A. 研究目的

ヒトや物資の国際的な移動の急速な増加や地球温暖化のためにデング熱やジカ熱などの蚊媒介ウイルス感染症が東南アジアや中南米諸国で流行し、毎年輸入感染例が報告されてい

る。これらのウイルスを媒介する蚊が国内に存在しているため国内でも発生する可能性がある。また、E型肝炎ウイルスに加えて重症熱性血小板減少症やダニ媒介脳炎などダニ媒介のウイルス感染症も広く国内に存在していることも明らかになっている。これらの病原体は、いずれもウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。一方、血液製剤の安全対策上重要なC型肝炎ウイルス(HCV)は、未だ特殊な株以外に培養系がないので不活化法の評価には動物由来のモデルウイルスが使用されている。本研究班では、これらの病原体を検出する検査法の開発と標準化、スクリーニング法の開発とその評価、さらにHCVやE型肝炎ウイルス(HEV)の効率良い培養系の開発を実施し、血液製剤の安全性の向上と安定供給を目指す。

B. 研究方法と結果

1) 血液製剤の安全性を確保するための蚊媒介性ウイルスのウイルス学的特性の解析

ジカウイルスのE蛋白質領域をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR法により輸入症例におけるジカウイルスの実験室検査を実施した。その結果2013年から2017年12月までの間に20例のジカ熱輸入症例が国内において報告された。特にベトナムから帰国した40代の男性の発症4日後の尿サンプルからジカウイルスを分離し、これがアジア型のジカウイルスであることを明らかにした。また、この症例は血漿陰性であったが全血や尿が陽性となり、どんな検体をスクリーニングに使用するのが良いか検討する必要がある。

2) 血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

SFTSVが血液に微量に混入した場合に検出

が可能な新規高感度マルチプレックス核酸検査法の確立に向けて、国内外で既に開発されているSFTSVの核酸検査法をサーチし応用可能か検討したが、これまでの検出系では不十分と考えられたため、新規に核酸検査法のためのプライマーとプローブの作製を開始した。本年度は大規模スクリーニング用のプライマーセットを、J1株に対し、S分節を80セット、M分節を110セット、L分節を160セット(合計350セット)デザインして合成した。

3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

血漿や血小板で使用されている病原体不活化のための化学物質は、紫外線を照射することで病原体の核酸と強固に結合し病原体の核酸の複製を阻害する機序であることが多い。今回検討したクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」は、細胞に取り込まれやすく水に解け易い性質を有している。用いてシンドビスウイルスの不活化効果を検討した。20000ルクスの赤色光を20分照射することで5%アルブミンでは10分間の照射で検出感度以下までウイルスを不活化できた。ヘマトクリット40%の赤血球液においても20分間の照射によって約3Log不活化することができた。この物質は、赤色光によって不活化の活性を示す性質があり、そのため赤血球に吸収され難いのでより深部まで到達できる。

4) 感染症のE型肝炎ウイルスの不活化に関する研究(高濃度E型肝炎ウイルス(HEV)の産生と性状解析)

血漿分画製剤の製造工程におけるE型肝炎ウイルス(HEV)の除去・不活化効果を検証する際に血漿由来のHEVを用いることが望ましいが、高濃度で十分量のHEV陽性血漿を確保することが困難である。そこで、本年度は血

漿由来の HEV と性状が同等で高タイターの HEV の入手を目的として、リバースジェネティクス法を用いた HEV の調製を試み、その性状を血漿由来 HEV と比較した。PLC/PRF/5 細胞にブタ由来 HEV 合成ゲノムをトランスフェクションすることで約 9 Log copies/mL の HEV (RG-HEV-PLC) を得ることができた。RG-HEV-PLC と血漿由来 HEV の性状 (浮上密度、抗体結合性) は、NaDCA+Trypsin や SD の脂質を強く解離させる処理により同様となった。

5) マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

マダニ媒介感染症の予防には、マダニの生態や生理的な知見を得ることが重要であるが、野外における情報は限られている。主に大型の哺乳動物がマダニの重要な吸血源となるため、その移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられるが、一方で、鳥類に咬着するマダニが海外から運ばれる可能性も指摘されている。本研究では渡り鳥の飛来地を調査地に選び、周辺環境に生息する植生マダニを採取しウイルス検出を行なった。また、SFTS ウイルスを媒介すると推定されているフタトゲチマダニとキチマダニに注目し、その国内サーベイランスを行い、ウイルス分離を試みると同時に、鳥類を含めた吸血源動物種を特定し、これらのマダニの吸血履歴を明らかにすることを計画した。

本年度は、渡り鳥飛来地で採取したマダニからのウイルス検出、ならびに吸血源動物を推定する Reverse Line Blot (RLB) 法の改良を行った。北陸地方の渡り鳥飛来地 (石川県および富山県) 周辺で採取されたキチマダニから Kabuto Mountain virus (KAMV)、Tarumizu tick virus (TarTV)、未分類の Picorna-like virus、未分類のフレボウイルスを分離、あるいは次世代シーケンス (NGS) 解析によりウイルス遺伝子を検出した。次いで、国内に生息する鳥類 10 種 (スズメ、ヤマドリ、キジバト、

シジュウカラ、ツグミ、フクロウ、カケス、ヒガラ、ホオジロ、キジ) を検出するために種特異的なプローブを作製した。実際に植生マダニからの検出を試みたが、これまでに鳥類由来 DNA は検出されなかった。今後、RLB 法を改良する必要がある。

6) C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

血液製剤に混入する可能性がある C 型肝炎ウイルス (HCV) を不活化させる条件を明らかにするため、培養細胞で増殖させた HCV を血液製剤に加え、様々な条件で不活化条件の検討を行っている。これまで用いた HCV は唯一培養細胞で増殖出来る JFH-1 株であった。しかし、最近 JFH-1 以外の HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 が同定された。本件研究では、感染者由来の HCV 株の不活化の評価を行うため、Sec14L2 を発現する培養細胞を作製したが、現在のところこの細胞を用いて感染者由来の HCV の増殖は確認できなかった。

7) 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

ジカウイルスの国内感染を想定して、輸血用血液製剤への安全対策としてスクリーニング検査試薬として販売されている Grifolis 社製ジカウイルス検出用スクリーニング用試薬 (Procleix Zika Virus

Assay) の精度評価を実施した結果、ジカウイルス 3 株 (WHO 標準品 (PF13/251013-18 株)、Uganda 1947 (アフリカ株: MR766 株)、Polynesia 2013 (アジア株: PRVABC-59 株)) について良好な結果が得られ、アジア株、アフリカ株ともに検出することが確認された。特異性試験において、献血者検体が全て陰性と判定されたこと、及び日本脳炎ウイルスとの交差反応がなかったことから、試薬の特異度が高いことが確認された。また、同時再現性・日差再現性試験においても良好な結果が得られた。これらのことから、ジカウイルス

の国内感染が発生した場合の、輸血用血液の安全性確保の観点から、一つの手段として使用可能であると考えられた。更にジカウイルス感染のリスクとなる妊婦輸血（出産時の輸血を除く）の実態調査を行い、安全対策の基礎データとする予定である。

8) 実ウイルスを用いたエタノール分画法による血漿の分画とウイルスの不活化・除去と安全性の評価

これまでC型肝炎ウイルスを用いてCohn分画法におけるウイルスの挙動を解析してきたが、今年度はB型肝炎ウイルス（HBV）について検討した。血漿にスパイクしたHBVウイルス核酸は、クリオ/脱クリオ分画において、除去することは出来ず、クリオ、脱クリオ両方に移行した。その後8%エタノール分画においては、沈殿より上清に多くHBV-DNAが移行した。25%、20%エタノール分画においてはHBV-DNAは沈殿と上清のいずれの画分へも移行した。17%エタノール分画においては、ほとんどが沈殿にHBV-DNAが移行し、グロブリン原料となる上清へは3log以上の除去効果が認められた。17%エタノール処理は、グロブリンの凝集体を除くための工程であるが、凝集体と一緒にウイルス等の感染性粒子も一緒に沈殿へ移行している可能性が考えられた。

D. 考察

年間4000万人が日本を訪れるようにする政府の計画があり、世界中の人々が来日する。そのため様々な病原体が持ち込まれ、局地的な流行から場合によっては大規模なアウトブレイクまで発生することも危惧されている。その一方では、国内に既に常在している病原体やそのベクターも放棄された農地などの拡大や野生動物の増加、更には温暖化等の要因などによって生存する地域が拡大し、従来よりもヒトが感染し易くなる可能性もある。このような状況の中で流行が生ずる前に病原体の性状や検出法

の開発、さらには発生時の対応法を検討しておくことは、血液製剤の安全性確保や安定供給に重要である。また、B型やC型肝炎ウイルスは感染系がなく、そのためにモデルウイルスを用いて安全性の評価を行なっている。HEVもin vitroの感染系はあるものの安全性試験に必要な高力価の感染性ウイルスを得ることは困難であった。この研究班では、効率的な培養系を確立するために分子生物学的手法も取り入れて検討しており、HEVでは本年度の研究で既に高力価のウイルスを産生することに成功した、それらを用いてモデルウイルスではなく実ウイルスを用いた不活化法の評価を目指している。

E. 結論

新興・再興感染症等の脅威から血液製剤の安全性確保と安定供給のためにジカウイルスとSFTSウイルスの検出法の研究を行った。また、ダニ媒介感染症の予防のためにダニの吸血動物に対する嗜好性を解析する方法の開発も行なっている。さらに高力価のHEV産生系の構築やHCV感染系の開発を行なっている。これらの研究は血液製剤の安全性と供給に貢献できる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

Kiyoko Nojima, Kazu Okumaa, Masaki Ochiai,
Madoka Kuramitsu, Kenta Tezuka, Mieko Ishii,
Sadao Ueda, Takashi Miyamoto, Koichiro,
Kamimura, Enki Koue, Sanae Uchida,

Yoshiharu Watanabe, Yoshiaki Okada, Isao Hamaguchi :Establishment of a reference material for standardization of the anti-complementary activity test in intravenous immunoglobulin products used in Japan: A collaborative study. *Biologicals*, vol.46. 68-73. 2017

2. 学会発表

- 1) 岡田 義昭：国内血液製剤における E 型肝炎ウイルス感染リスクの評価と規制、第 65 回日本輸血・細胞治療学会、2017 年 6 月、千葉
- 2) 岡田 義昭、小林 清子、池淵 研二：Exosome 精製試薬を用いたウイルス濃縮法とその応用（第 2 報）第 65 回日本輸血・細胞治療学会、2017 年 6 月、千葉
- 3) 山田攻、青木麻衣子、玉栄建次、鈴木雅

之、内野富美子、池淵研二、岡田義昭：
当院輸血部における電子カルテオーダー・照合システムとリンクしたアルブミン製剤の一元化運用について、第 65 回日本輸血・細胞治療学会、2017 年 6 月、千葉

4) 下池貴志、野島清子、脇田隆字、濱口

功 岡田義昭：エタノール法における 17% エタノール処理による HCV の変化の解析、第 65 回日本ウイルス学会、2017 年 10 月、大阪

5) 野島清子、下池貴志、脇田隆字、浜口功、岡田義昭：実験室レベルの Cohn エタノール法による血液製剤の各画分中の HCV の解析、第 65 回日本ウイルス学会、2017 年 10 月、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

