

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

1. フラビウイルスを検出できる共通プライマーを開発し、デングウイルスの各血清型やジカウイルスを検出できることを確認した。
2. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの高感度核酸増幅法を開発し、日本株や中国株など幅広くウイルス株の検出が可能になった。
3. クロロフィル由来の化学物質と赤色光照射を組み合わせることで光学的不活化法では抵抗性を示す環状二本鎖 DNA ウイルスを検出感度以下に不活化できた。
4. リバーシジェネティクス法により得られた E 型肝炎ウイルスを用いてウイルス除去膜の評価を行い、血漿由来の HEV との同等性が証明できた。
5. ダニ媒介のウイルスの感染リスクを減少させるため、渡り鳥の飛来地のマダニからウイルスの解析を行った。また、吸血する動物種の嗜好性を解析する方法を改良した。
6. 蚊媒介ウイルス感染症のアウトブレイクが生じた場合に備えて各ウイルスの特性からリスクを分析し、対応手引き (案) を作成した。
7. C 型肝炎ウイルスの *in vitro* 感染系を構築するために Sec14L2 と miR122 の遺伝子導入に加えて RIG-I を遺伝子改変した細胞株を作成した。
8. 抗体の存在が Cohn 分画でのウイルス挙動に与える影響を解析するために HCV 抗体陽性血漿からグロブリンを精製し、HCV 感染を抑制する活性等を明らかにした。

分担研究者

部長

林 昌宏	国立感染症研究所 室長	下池 貴志	国立感染症研究所 主任研究官
大隈 和	国立感染症研究所 室長	平 力造	日本赤十字社血液事業本部 課長
前野 英毅	日本血液製剤機構 中央研究所 室長	野島 清子	国立感染症研究所 研究員
沢辺 京子	国立感染症研究所		

## 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。また、血液の病原体のスクリーニングは、安全性確保に有効であるが限界もある。感染リスクを小さくするためには血液製剤に有効な病原体不活化法の開発も重要である。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、赤血球製剤における病原体不活化、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

これまでに我々はジカウイルスの高感度検出法を確立し、迅速診断への応用を検討した。また、デングウイルス、ウエストナイルウ

イルスを含むフラビウイルス共通プライマーを用いた迅速診断法を確立した。フラビウイルス共通プライマーを用いた迅速診断法を用いたデング患者検体に対する反応性を検討したところ、デング1型から4型までの検体中のウイルス遺伝子を検出することを確認した。また本共通プライマーはアフリカ型の遺伝子型であるジカウイルス MR766 株も検出することも確認できた。

### 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 に対する新規の高感度核酸検査法を開発するために、SFTSV のデータベースを基に大規模スクリーニング用のプライマーとプローブのセットをデザイン・作製した。プライマー350セットについて、SFTSV のゲノム RNA を用いてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング(SYBR)を実施し、増幅効率の良い15セットを選定した。これらのオリゴセットをリアルタイム RT-PCR (SYBR 及び TaqMan) によりスクリーニングし、最も増幅効率の良好な2セットを選別した。これらのセットをマルチプレックス化し、日本・中国株の幅広い株を高感度に検出可能な核酸検査法を開発した。

### 3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

昨年度、クロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いてヘマトクリット40%の赤血球液においてシンドビスウイルスの不活化を報告したが、今年度はより安定なDNAウイルスである仮性狂犬病ウイルス(Pseudorabies virus 以下 PRV) を用いて不活化効果を検討した。20分の照射で検出感度以下まで不活化することができた。この物質は、赤色光によって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、更に赤血球への障害が少ないものと考えられる。また、白色光を同量照射しても PRV への不活化効果は認められなかった。これは、本化合物で処理した赤血球を輸血した患者が日

光に暴露されても皮膚障害が生じにくいことを示唆するデータだと考えられた。

#### 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)

血漿分画製剤製造工程における HEV の除去・不活化効果を適切に評価することを目的に、リバースジェネティクス法により約 9 Log copies/mL の高濃度の HEV (RG-HEV) を取得した (2017 年度報告)。2018 年度は RG-HEV を用い、ウイルス除去膜ろ過工程における HEV の除去効果を検証した。

まず、RG-HEV を血漿由来 HEV (pd-HEV) の代わりとして使用することが妥当であるのか確認するために、pd-HEV 又は RG-HEV を TBS にスパイクし、プラノバ 20N と 35N (平均孔径はそれぞれ 19 nm と 35 nm) でろ過した。いずれの HEV もろ液には検出されず、35 nm 以上の大きさであることが推測できた。本来 pd-HEV や RG-HEV には、ブタ糞便由来 HEV と異なり脂質が結合しているが、血漿分画製剤の製造ではアルコール分画や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理工程において脂質が除かれて粒子径が小さくなることが予想された。そこで、ワーストケースを想定し、RG-HEV と pd-HEV をデオキシコール酸ナトリウム/トリプシン (NaDCA/T) 処理し、プラノバ 20N と 35N の除去効果を検証した。プラノバ 20N ではいずれの HEV もろ液には検出されなかった。一方、プラノバ 35N では、いずれの HEV もろ液で同程度検出されたことから、NaDCA/T 処理した RG-HEV と pd-HEV は同程度の大きさであることが推測できた。血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC のプラノバ 20N ろ過工

程における HEV の除去効果を検証するにあたり、製造フロー上流に S/D 処理工程が含まれることからワーストケースである NaDCA/T 処理した RG-HEV を用いた。その結果、LRV はゲノム濃度測定で  $\geq 5.3/\geq 5.3$ 、感染価測定で  $\geq 4.7/\geq 4.3$  となり、プラノバ 20N ろ過工程は HEV の除去に有効な工程であると確認された。

#### 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ている。一方で、鳥類に寄生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ことから、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からウイルス検出を行なった。また、マダニの吸血履歴を調査し、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにする目的で、鳥類および哺乳類を対象にした吸血源動物種を特定する Reverse Line Blot (RLB) 法の改良を進めた。2018 年は、北陸 3 県の渡り鳥飛来地において 4 月～11 月の間、月に 1 回フランネル法によりマダニ相を調査し、3 属 8 種 1,600 頭の植生マダニを採取した。キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、ヤマアラシチマダニの順に多く採取されたが、特に前 2 種は、鳥類寄生例が多い種類であった。上記マダニをウイルス分離および次世代シーケンサー (NGS) 解析に供した結果、既知ウイルス 3 種以外に、新規および未分類のウイルス遺伝子が複数検出された。以上の結果から、マダニは複数のウイルスを保有していること、国内の広範な地域に同一ウイルスが点在すること、半数以上のマダニが鳥類を吸血した履歴があることが明らかになった。また、従来の RLB 法に鳥類検出用プローブを加え、本邦産の哺乳類 18 種および鳥類 15 種の検出が可

能になり、予備的に試験した広島県産の植生マダニの多くに鳥類を吸血した履歴があることが確認された。

#### 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) の不活化効率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の検討を行ってきた。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、昨年感染者由来の HCV 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。更に本年度は HCV の増殖に重要と報告されている肝臓細胞特異的に発現する miR122 (micro RNA 122) も同時に発現する培養細胞を作製した。さらにインターフェロン産生を抑制するために RIG-I を欠損させた培養細胞を作製し、感染者由来の HCV を感染させた。作製した細胞で感染者由来 HCV は、ウイルスタンパク質が検出できるレベルでの増殖を見ることは出来なかったが、HCV RNA レベルではわずかな増殖が見られた。

#### 7) 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症への対策のための各ウイルスについて疫学、症状、感染経路、輸血感染、海外措置及び国内の対応について発生状況によって分類し、分類ごとに対応手引き (案) を作成した。検査法に関しては、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、ウツスウイルスの各ウイ

ルスの検査法の評価を実施した。また、ジカウイルス感染によって小頭症等の異常が生じることが判明したので国内で妊婦輸血の現状を調査した。年間約 700 名の妊婦に約 1,700 本の輸血が使用されていることが判明した。

#### 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

C 型肝炎ウイルスは血液を汚染する可能性のある病原体であり、病原体の不活化工程が充分でなかった時代に製造された第 IX 因子製剤、第 VIII 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの方が C 型肝炎に感染した経緯がある。グロブリン製剤が原因の HCV 感染は海外から何例か報告があり、感染原因となった期間や製造ロットが特定されているが日本での報告は一例もなく、グロブリン製剤の製造工程中で HCV が不活化・除去されていたと推察されるが、HCV 実ウイルスを用いて不活化除去の評価を行いその理由について言及した報告はこれまでにない。我々はこれまでに 17%エタノール分画により HCV JFH-1am 株 (遺伝子型 2a) の感染性が除かれることを明らかにして来た。本研究では、抗 HCV 抗体共存下での感染性やウイルスの移行および、HCV 以外の DNA ウイルスのグロブリン分画における移行について確認し、グロブリン製剤での HCV 等の感染の報告がこれまでにない理由について、科学的に考察している。今年度は日本赤十字社から HCV 抗体陽性血漿の譲渡を受け、これらドナー血漿から精製したグロブリン画分が CLEIA 法

の力価と一致しないが HCV JFH-1 株の新規感染を抑制する効果を有するかを確認した。これを用いて HCV の除去効率に与える影響について解析する予定である。

#### 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、海外から訪日する人数は毎年増加している。更に 2020 年のオリンピック・パラリンピックの開催、外国人労働者の受け入れなどが予定されている。そのため様々な病原体が国内に持ち込まれ、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可能性も危惧されている。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 では昨年度確立した方法で高力価のウイルスを作成し、ウイルス除去膜による除去効率の評価に用いた。HCV においても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す。

#### 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蚊媒介ウイルスや SFTS ウイルスの検出法、ダニ媒介感染症の予防のためにダニの吸血動物の嗜好性を解析する方法を行なった。更に国内発生を想定した対策（案）も作成した。また、分画製剤の安全性向上のために HEV 産生系の構築や HCV 感染系の開発も行なった。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

松岡佐保子、水沢左衛子、落合雅樹、草川茂、百瀬暖佳、池辺詠美、宮川恵子、五反田裕子、長谷川隆、富樫謙一、中里見哲也、塚原美由紀、前田豊、福田修久、古田美玲、内田絵里子、川村利江子、岡田義昭、山口照英、浜口功：血液製剤の安全性確保のためのウイルス核酸増幅検索 (NAT) 国内標準品の再評価：日本輸血細胞治療学会誌 2018 年、64 巻、502-509.

#### 2. 学会発表

1. 岡田義昭、池淵研二：RCA (Rolling Circular Amplification) 法を用いた血液からの簡便な感染性ウイルスの作製法とその応用、第 66 回日本輸血細胞治療学会学術集会、2018/5/24、
2. 鈴木雅之、本田優未、山麻衣子、加藤由佳、玉栄建次、内野富美子、山田攻、池淵研二、岡田義昭：Daratumumab 投与患者の 1 例、

66 回日本輸血細胞治療学会学術集会、  
2018/5/26

3. 井手野 祥次、高橋一恵、浦山健、竹内薫、  
岡田義昭、前野英毅:細胞培養による E 型肝炎  
ウイルス (HEV) の高濃度産生とヒト血漿由来

HEV との性状比較、第 42 回日本血液事業学会  
総会、 2018/10/5

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし