

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. フラビウイルスに属するウイルスを迅速に検出するためにフラビウイルス共通プライマーを開発し、その評価を行った。デングウイルスの各血清型特異的核酸増幅法と同程度の感度であることが確認できた。
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、特異性や感度を評価した。また、日本株や中国株の低濃度ウイルス核酸パネルを作製した。また、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 からの血液製剤の安全性確保のために高感度核酸検査法の構築のためにプライマー セットを設計し、作製した。
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た光学的不活化法によって臨床に用いられている赤血球液に近い条件でもシンドビスウイルスを 4Log 不活化できた。該当する濃度では細胞株の増殖能に影響は与えなかった。
4. リバース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液状化熱によるウイルス不活化を評価し、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。3 種の新規マダニ媒介ウイルスが検出できた。
6. 蚊媒介ウイルス感染症のアウトブレイクが国内で生じた場合に備えて対応手引き書を作成し、日本赤十字社血液センターへの情報共有を行なった。また、ウツスウイルスの高感度核酸検出系を構築した。
7. C 型肝炎ウイルスの *in vitro* 感染系を構築するために miR122 が発現している細胞株に Sec14L2 遺伝子を導入した細胞株を作成したが、C 型肝炎ウイルスの増殖は確認できなかった。
8. HCV 感染を抑制する活性を有する HCV 抗体の存在化に 17%エタノール分画での HCV の挙動を解析し、HCV 抗体の存在はウイルスの挙動に著名な影響を与えないことを明らかにした。

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

前野 英毅 日本血液製剤機構
中央研究所 室長

比嘉 由紀子 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

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
主任研究官

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が、5年ぶりに3例のデングウイルスの国内感染例が確認された。また、中国武漢で発生した新型コロナウイルス SARS-CoV-2 は、瞬く間に世界に拡散し多数の感染者が報告され、血液からのウイルス遺伝子が検出されたとの報告もあった。新興・再興感染症は血液製剤の安全性の脅威になるだけでなく、献血者の減少を招き安定供給に重大な支障をきたす。更に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

フラビウイルスは多種類のウイルスが属することからデングウイルスや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開発すれば、ウイルスの種は特定できなくてもフラビウイルスに感染していることを迅速診断法できる。開発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てデング患者検体に対する反応性をデングウイルスの各血清型特異性核酸増幅法と感度や特異性を実際の感染者由来の検体で検討した。検出感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率においてデングウイルスの各血清型特異的核酸増幅法と同等であることが確認できた。

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 12 セットを選定した。これらのセットを用いて健常者血漿由来の RNA を用いて非特異的増幅反応の有無を検索した。さらに一本鎖 RNA を合成し、低コピー段階希釈検体を作製し、PCR 系の絶対感度を評価した。また、日本由来と中国由来のウイルス株を用いてその感度を測定した。その結果、S-60 セットは、PCR 鑄型量を段階的に希釈し (100, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 cp/rxn)、感度を評価した結果、鑄型量 100, 20, 10 cp/rxn において検出率は 100%であった (8 重測定中 8 検出)。一方、鑄型量 5, 2.5, 1.25 cp/rxn においては、それぞれ検出率 88%, 75%, 38%であった。

また、2019 年 12 月に中国武漢でアウトブレイクした新型コロナウイルス SARS-CoV-2 からの血液製剤の安全性確保のために高感度核酸検査用に大規模スクリーニング用のプライマー セットを設計し、作製した。

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が、今年度は臨床に使用されて赤血球液に近い条件としてヘマトクリット 55%、液深 10mm におけるシンドビスウイルスの不活化を検討した。濃度 20 μ g/mL では 2.3Log、40 μ g/mL では 4.1Log の不活化効果が認められた。一方、5~40 μ g/mL までの濃度では細胞の増殖性に差は認められなかった。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)。2019 年度はこの RG-HEV を用いて液状加熱工程における HEV の不活化動態を検証した。有機溶媒 / 界面活性剤 (S/D) 処理等で RG-HEV から脂質を除去すると、熱安定性はヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) と同様に低下し、RG-HEV も脂質の結合した状態が液状加熱処理のワーストケースであることが確認できた。

アルブミン非存在下で液状加熱処理 (59.0 \pm 1.0、10 時間) を行った場合、RG-HEV は pd-HEV と同様な不活化動態で、10 時間後の LRV は 4 以上であった。一方、アルブミン存在下 (アルブミン濃度 25%) では、RG-HEV は pd-HEV と同様に安定化し、10 時間後の LRV は 1.10 であった。RG-HEV と pd-HEV の熱安定性は同程度であったことから、脂質の結合する RG-HEV を pd-HEV の代替として液状加熱処理の評価を行うことは妥当と判断された。

アルブミン製造工程にはアルコール分画工程が含まれ、最大のエタノール濃度が 40%に達することから、pd-HEV の脂質が除去されることが予想される。そこ

で、40%エタノールで前処理した RG-HEV を 25%アルブミン溶液へ添加し、液状加熱処理 (59.0±1.0、10 時間) を行った。その結果、10 時間後の LRV は非処理の RG-HEV と同程度であったが、不活化動態は異なっていた。以上のことから、実製造工程を模した前処理を施した RG-HEV を使用することで、実製造での液状加熱中の pd-HEV の不活化動態を推測できると考えられた。

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に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。2019 年は、北陸 3 県 (富山県・石川県・福井県) の渡り鳥飛来地の計 7 地点において、4 月～11 月に実施したフランネル法により、合計で 4 属 9 種 724 頭の植生マダニを採取した (2020 年 4～8 月時点)。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傾向は、2018 年と同じであった。採取された植生マダニは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、KAMV、TarTV の既知のウイルス以外に 3 種類の新規マダニ媒介ウイルスが分離・検出された。国内の SFTS 浸淫地におけるマダニ相を比較した結果、地域によってマダニ相が異なることが明らかになり、SFTS のベクターは環境によって異なる可能性が高く、国内

の広範な地域に同一ウイルスが点在することも明らかになった。

6) C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

血液製剤における 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 を血液製剤に添加して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。我々は、感染者由来の HCV 株の不活化法に対する感受性を評価するために HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 を様々な細胞株に発現させ、HCV の増殖性を検討してきた。今年度は、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) を発現し

ている FU97 細胞に Sec14L2 遺伝子産物を発現する細胞株

FU97-sec14L2 を作製した。感染者由来の HCV 血漿を感染させたが、現在のところこの細胞を用いて HCV 感染者の HCV の増殖は見られなかった。

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リスク分析等を行い、国内感染が生じた場合の対応手引きを作成

し、日赤血液センターへの情報共有を行った。また、ウツスウイルスの高感度核酸検出系を構築した。さらに献血者由来の血清を用いてZIKAウイルスやウツスウイルスに対する感染中和能を評価し、国内発生した場合の血液製剤による感染リスクを推定する基礎資料とした。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が、一部は分娩時に使用されている可能性があった。

）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 因子製剤、第 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。そのような状況の中、中国で発生したSARS-CoV-2から血液製剤の安全性確保と安定供給のために急遽、血液のスクリーニング検査に応用できる高感度核酸増幅検査法の開発を行なった。本研究班は、新興・再興感染症が発生した場合に血液製剤へのリスクが予想される際には、すぐに対応できる感染症の各分野からの研究者から構成されている。今回も迅速に対応できたものと考えている。その一方で、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を有する血漿ウイルスを十分に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を取り入れ高力価のウイルスを作成することに成功し、昨年のウイルス除去膜による除去に加えて今年度は液化加熱による不活化の評価を行い、血漿由来のHEVと相違がないことが確認できた。

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、SFTSウイルス、SARS-COV-2の検出法の開発を行い、国内発生を想定した対策手引書も作成した。ダニ媒介感染症の予防のために渡り鳥の飛来地でのダニの調査を行なった。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、血血球製剤の不活化法の研究を行い、新しい知見を得ることが出来た。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- 1) 岡田義昭：血液製剤を介するE型肝炎ウイルスの感染リスクとその対策、医学のあゆみ、268巻 514-515、2019年
- 2) 加藤由佳、山田攻、鈴木雅之、内野富子、山麻衣子、本田優未、エルترونボバグ服用中患者の自己血血漿の色調変化、日本輸血細胞治療学会誌65巻 6号、845-846、2019年
- 3) 岡田義昭、山田攻、鈴木雅之、内野富子、山麻衣子、加藤由佳、本田優未、池淵研二：交通外傷による敗血症から汎血球凝集反応を呈した1症例、日本輸血細胞治療学会誌65巻3号、595-599、2019年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし