

## 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)

### 総合研究報告書

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. 種々のフラビウイルス科ウイルスを検出できるフラビウイルス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、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を開発した。細胞増殖に影響がない濃度においてヘマトクリット 55%、液深 10mm の赤血球液に添加したシンドビスウイルスを約 4Log 不活化できた。
4. E 型肝炎ウイルスの除去・不活化法の評価のためにリバースジェネティクス法により高濃度の E 型肝炎ウイルスを取得することに成功し、ウイルス除去膜と液状加熱による不活化を評価し、血漿由来の HEV と同等であることが証明できた。
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検出を行った。新規ウイルスを含む多数のウイルスが検出できた。また、リスク評価のためにマダニが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国内で生じた場合に備えて対応手引き書を作成した。また、風疹、麻疹、ウスツ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 感染系構築のために Sec14L2 遺伝子の導入やインターフェロン産生関連の遺伝子を編集したが C 型肝炎ウイルスの増殖は確認できなかった。
8. ウイルス除去に重要な 17%エタノール分画において HCV 抗体の存在は HCV の除去に著名な影響を与えないことを明らかにした。また、同分画は B 型肝炎ウイルスの除去にも有用である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ウイルスやチクングニアウイルス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、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

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科のウイルスを幅広く検出するフラビウイルス共通プライマーを開発し、それを用いた迅速診断法を確立した ( RT-PCR 法)。この方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に特化した核酸増幅検査法と比較検討した。デング 1 型から 4 型までのウイルス遺伝子を検出でき、感度や特異性もほぼ同等であった。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 株も検出することが確認できた。この方法では、幅広くフラビウイルスを検出でき、その遺伝子産物の塩基配列を決定することでウイルスを同定する事ができる。何らかのフラビウイルスが国内で流行しているか監視するために有用な方法が開発できた。

### 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

赤血球製剤に病原体不活化のためにクロロフィル由来の「Pheophorbide a」と赤色光照射を組み合わせた光学的不活化法を開発した。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) やシンドビスウイルスの不活化効果を検討し、効果的なウイルス不活化が確認できた。赤色光は赤血球に吸収されないので深部まで到達できるとの予想の基に臨床に使用され

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  $\mu$ g/mL では約 2Log、40  $\mu$ g/mL では約 4Log の不活化効果が認められた。「Pheophorbide a」は 5~40  $\mu$ 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、赤色であることから光が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）

E 型肝炎ウイルスは血液中と糞便中と

では性状が異なることが知られている。

そのため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ためには、高い感染性を有する血漿由来の E 型肝炎ウイルスが必要であるが、そのような血漿を評価に必要な量を確保することは困難である。そのためリバーシジェネティクス法により高力化のウイルス産生系を構築し、約 9 Log copies/mL の高濃度の HEV (RG-HEV) を取得できた。このウイルスは血漿由来のものと同様にウイルスに脂質が結合しているが、血漿由来の HEV の代用になるのか確認するためにそれぞれのウイルスをデオキシコール酸ナトリウム/トリプシン

(NaDCA/T) 処理や有機溶媒/界面活性

剤 (S/D) 処理等を行い、ウイルス除去膜による

HEV の除去効率や液状加熱工程における HEV の不活化動態を検証した。その結果、血漿由来の HEV と同等であることが確認できた。

#### 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、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。北陸 3 県（富山県、石川県、福井県）の渡り鳥飛来地の合計 7 地点において、4 月~11 月の間、月に 1 回フランネル法により植生マダニを採取した。2017~2019 年の調査で、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生息数が多い傾向が認められた。さらに、愛媛県内の SFTS 浸淫地において採取したマダニも加えてウイルス分離および次世代シーケンス (NGS) 解析を行った結果、Kabuto mountain virus (KAMV)、Tarumizu tick virus (TarTV) が分離され、Okutama tick virus (OKTV) の遺伝子が検出され、その全ゲノム配列を解析することができた。NGS 解析により、その他にも複数の新規・未分類のウイルスの遺伝子が検出された。さらにマダニの吸血源動物種の推定に用い

る Reverse line blot hybridization (RLB) 法を改良し、国内の哺乳類 18 種、鳥類 15 種の特定を可能にした。

これらの結果を渡鳥の飛来地に提供することによって地域の住民や献血者への注意喚起を促し、マダニ媒介感染症の感染リスクを減少させることに貢献できる。

#### 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 miR122 (micro RNA 122)、宿主蛋白質 Sec14L2 遺伝子の導入、インターフェロン産生をコントロールしている 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なった。また、ウスツウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルスの高感度核酸検出系

を構築した。検査法に関しては、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、ウスツウイルスの各ウイルスの検査法の評価を実施した。また、ジカウさらには献血者由来の血清を用いて ZIKA ウイルスやウスツ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。

#### 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 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。また、HCV 抗体陽性血漿から精製したグロブ

リンが培養可能な JFH-1 株の感染を抑制する活性があることを明らかにした。更にグロブリン製剤の分画工程でウイルス除去に重要な 17%エタノール分画において HCV 抗体の存在が HCV の除去にどのような影響を与えるのか検証した。window 期の HCV 陽性血漿に HCV 抗体陽性血漿から精製したグロブリンを添加して 17%エタノール分画を行い、沈殿分画と上清分画に存在する HCV ウイルスをコントロールと比較検討した。HCV 抗体存在下の方が上清に僅かにウイルスの量が多い傾向にあったが著名な差は認められなかった。これによって抗体の存在は、ウイルス除去効率に影響は少ないことがわかった。また、17%エタノール分画によって B 型肝炎ウイルスも除去できることを明らかにできた。本来は、グロブリン製剤の副反応の原因となる凝集物を除く皇帝であるが、ウイルスも除去できる工程であることを明らかにできた。

#### D. 考察

海外から訪日する人数は毎年増加している。更に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 は日本を始め瞬く間に世界に感染が拡大していった。そのため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、ウイルス除去膜による除去と液状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。これらによってリバースジェネティクス法によって血液製剤のウイルス除去・不活化法の評価に十分な量を確保することが可能になった。

また、病原体は多種類存在することからスクリーニング検査には限界があり、輸血用血液製剤に混入する病原体をユニバーサルに不活化できる技術の開発は必要である。本研究班で開発したクロロフィル誘導体と赤色光を組み合わせた方法は、赤血球製剤の特性に合致し、有望な不活化法に発展する可能性がある。

#### 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、赤血球製剤の不活化法の研究の行い、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、岡田義昭、池淵研二：エルトロン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