

**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

**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**

(H29-医薬-一般-002)

**平成 29 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 岡田 義昭**

**(埼玉医科大学)**

**平成 30 (2018) 年 3 月**

## 目次

### I. 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

研究代表者 岡田 義昭 P 1-P 5

### II. 分担研究報告

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

林 昌宏 P 6-P10

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

大隈 和 P11-P12

3. 赤血球製剤の新規不活化法の開発

岡田 義昭 P13-P15

4. 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 -

坂井 薫 P16-P26

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

沢辺 京子 P27-P31

6. 感染者由来 C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

下池 貴志 P32-P36

7. 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

平 力造 P37-P39

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

野島 清子 P40-P44

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

P45

## 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



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

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

分担研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室室長）  
協力研究者 田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）  
中山絵里（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）  
前木孝洋（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）  
谷口 玲（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室研究員）  
加藤文博（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室研究員）  
西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）

研究要旨

これまでに我々はジカウイルスの 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示した。このとき全血サンプル中のウイルス遺伝子量はわずかであり、血清中からは検出されなかったことから、ウイルス血症はピーク期を超えていたことが示唆された。これまでの研究からジカウイルス感染症におけるウイルス血症は発症直前から発症初期にかけてピークを示すことが報告されており、またジカウイルス感染症の多くは不顕性に耐過することが知られている。したがって、ジカウイルスの流行時においては血液製剤の製造過程においてドナースクリーニングが重要であることが示唆された。またジカウイルス感染症の国内流行を迅速に検出するための検査体制の整備および維持の必要性が示された。

A . 研究目的

ジカウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるエンベロープを有する直径 40-50nm の一本鎖 RNA ウイルスである。フラビウイルスには日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルスなど約 70 種類のウイルスが分類されている。

ジカウイルスはウガンダで 1947 年に初めて分離されたウイルスである。ジカウイルスはアフリカから南アジア、東南アジアにかけて分布していたが、2007 年にミクロネシア連邦のヤップ島で、2013 年にはフランス領ポリネシアで発生し、2015 年にはブラジルでその流行が発生し、その後、南米の多くの国々にその流行が拡大した。ジカウイルスはネッタイシマカや日本

にも生息するヒトスジシマカ等のシマカ属の蚊によって媒介される。ジカウイルスにヒトが感染してもほとんどが不顕性で、発症しても比較的穏やかに経過することからこれまで大きな問題とはされてこなかった。しかしながらジカウイルスがブラジルに侵入すると、2015年～2016年の間に小頭症例の増加とジカウイルスの関連が報告され、その対策が急務になった。また流行地における調査により、ジカウイルス感染症では潜伏期から急性期の高いうイルス血症を呈することが報告された。米国FDAは、ジカウイルスの輸血感染を米国内において防ぐためにドナースクリーニング、輸血制限、生産管理について2016年2月に勧告を行った。ジカウイルスの流行地であるプエルトリコでは2016年4月から6月までの間にスクリーニングを行った12,777人の検体から68人(0.5%)のジカウイルス遺伝子陽性ドナーが検出されている。したがってジカウイルス流行時には血液製剤の製造においてドナースクリーニングが急務である。

ジカウイルスは国内には分布しないが、2014年にはヒトスジシマカによって媒介されるデングウイルスの流行が東京において発生した。したがってジカウイルスが国内で発生する可能性は否定できない。そこで本研究ではジカウイルス感染症の国内発生時において血液製剤の安全性確保に必要な献血制限や問診等に役立てるためにジカウイルス感染症疑い輸入症例の血清を持って、ジカウイルスのウイルス学的特性を解析した。

## B. 研究方法

### ウイルス分離

患者検体10 $\mu$ lをサル腎由来Vero細胞あるいは蚊由来C6/36細胞に接種し、細胞変性効果を観察した。細胞変性効果が観察されるまで、培養上清を3継代行った。

### ウイルスRNAの抽出と精製

ウイルスRNAの抽出と精製は、Hight pure viral RNA kit (Roche)を使用した。 ) 200 $\mu$ Lの検体を1.5mlマイクロチューブに入れ、Working solution 400 $\mu$ Lを加え、ピペティングでよく混和した。 ) フィルターチューブと回収チューブを連結させ、反応液600 $\mu$ Lを注いだ。 ) 10,000回転、15秒間遠心した。 ) 上液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500 $\mu$ LのInhibitor removal bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。 ) 上液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、450 $\mu$ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。 ) 上液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450 $\mu$ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。 ) 回収チューブを外し、空のチューブを連結し、12,000回転、10秒遠心した。 ) 回収チューブを捨て、新しい1.5mLチューブにフィルターチューブを連結させ、50 $\mu$ LのElution bufferを加え、10,000回転、1分間遠心した。 ) 得られた精製RNAはすぐに使用しない場合は-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

### リアルタイムRT-PCR反応

リアルタイムRT-PCR反応は米国CDCによって発表されたジカウイルスTaqmanプライマー、プローブ ZIKV 835: TTT GTC ATG ATA CTG CTG ATT GC 、 ZIKV 911c: CCT TCC ACA

AAG TCC CTA TTG C、ZIKV 860-FAM: CGG CAT ACA GCA TCA GGT GCA TAG GAG あるいは ZIKV 1086: CCG CTG CCC AAC ACA AG, ZIKV 1162c: CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT, ZIKV 1107-FAM: AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA Aを用いて実施した。

## C. 研究結果

### 国内におけるジカ感染症

平成29年12月までの国内におけるジカ感染症の調査を行った。その結果、国内ではこれまでに20例のジカ輸入症例が報告されていることが示された。輸入症例における渡航先はフランス領ポリネシア2例、タイ2例、ブラジル3例、ドミニカ共和国3例、フィジー1例、ジャマイカ1例、ベトナム4例、キューバ3例、メキシコ1例であった。

### ジカウイルス検査

国立感染症研究所で検査を実施したジカ疑い患者検体についてウイルス分離およびリアルタイム RT-PCR 法を実施した。その結果ベトナムから 2016 年末に帰国した急性期ジカ熱患者検体からジカウイルスを分離した。患者はベトナムに 1 週間滞在した 40 代男性で、ベトナムからの帰国翌日に発症した。その症状は発熱(38)、発疹、結膜充血であった。デングウイルスに対しては NS1(-), IgM(-), IgG(-)であった。発症 4 日後の尿検体をサル腎細胞由来の Vero 細胞に接種し、観察したところ弱い細胞変性効果を観察し、ジカウイルスを分離した。また発症 4 日後の尿 (Ct 値 32.0) 全血 (38.1)、唾液 (39.1) からウイルス遺伝子を検出したが、血清サンプル

および発症 6 日後の精液からはウイルスは検出されなかった(表)。分離されたウイルスの遺伝子配列を検討した結果、アジア型のウイルスであることが示された(図)。

## D. 考察

ジカウイルスに感染すると感染者の多くが無症状に終わり、発症しても比較的穏やかに経過する。その主な症状は発熱、発疹、関節痛、関節炎、結膜充血、筋肉痛、頭痛、後眼窩痛である。しかしながらポリネシアやブラジルの流行では、ギラン・バレー症候群や神経症状を認める症例が報告され、ブラジルでは妊婦がジカウイルスに感染することで胎児が感染し、ジカウイルス感染症と小頭症児との関連が報告されている。

日本では2017年までに20例の輸入症例が報告された。媒介蚊であるヒトスジシマカは本州以南に広く分布していることが疫学的調査から明らかとなっており、ジカウイルスと共通の媒介蚊であるヒトスジシマカによるデングウイルスの国内流行が2014年に発生している。したがってジカウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。

本研究においては急性期から回復期の患者血清を用いてジカウイルス遺伝子の検出を実施した。その結果、急性期においてウイルスゲノムが検出された。しかしながらすべての急性期血清からウイルスゲノムが検出されたわけではなかった。回復期血清からはウイルス遺伝子は検出されなかった。また本研究では無症候例の検体

や潜伏期の検体を用いた検討は行われておらず、これら無症候のドナー検体からのジカウイルスゲノム検出の検討は今後の課題である。

特記事項なし

## E．結 語

先天性ジカウイルス感染症はブラジルを中心とした南米の流行地域において大きな問題となっており、小頭症を発症した場合、その治療法は確立されていないので、その予防対策が重要である。またジカウイルスに感染した場合、そのウイルス血症は潜伏期から発症期にかけて上昇し、回復期にかけて、抗体の上昇とともに急速に消失する。したがって血液製剤の安全性を確保するためには潜伏期から発症期にかけてウイルス遺伝子を検出する必要がある。したがってひとたび国内で流行が発生した場合、ジカウイルス流行時には血液製剤の製造においてドナースクリーニングが重要な対策の1つとなりうる。そのためにはまず国内流行を速やかに検出する体制が重要となる。ジカウイルス感染症は、感染症法上の4類感染症に指定されており、ジカウイルス感染症を診断した医師は直ちに保健所を通して都道府県知事に報告しなければならない。

## F．健康危険情報

特記事項なし

## G．研究発表

### 1．論文発表

特記事項なし

### 2．学会発表

表. ベトナムからの輸入ジカ熱症例におけるジカウイルス実験室検査

サンプル	病日	遺伝子検査 (Ct値)	ウイルス分離
血清	4	—	—
尿	4	+ (32.0)	+
唾液	4	+ (39.1)	—
全血	4	+ (38.1)	—
精液	6	—	—

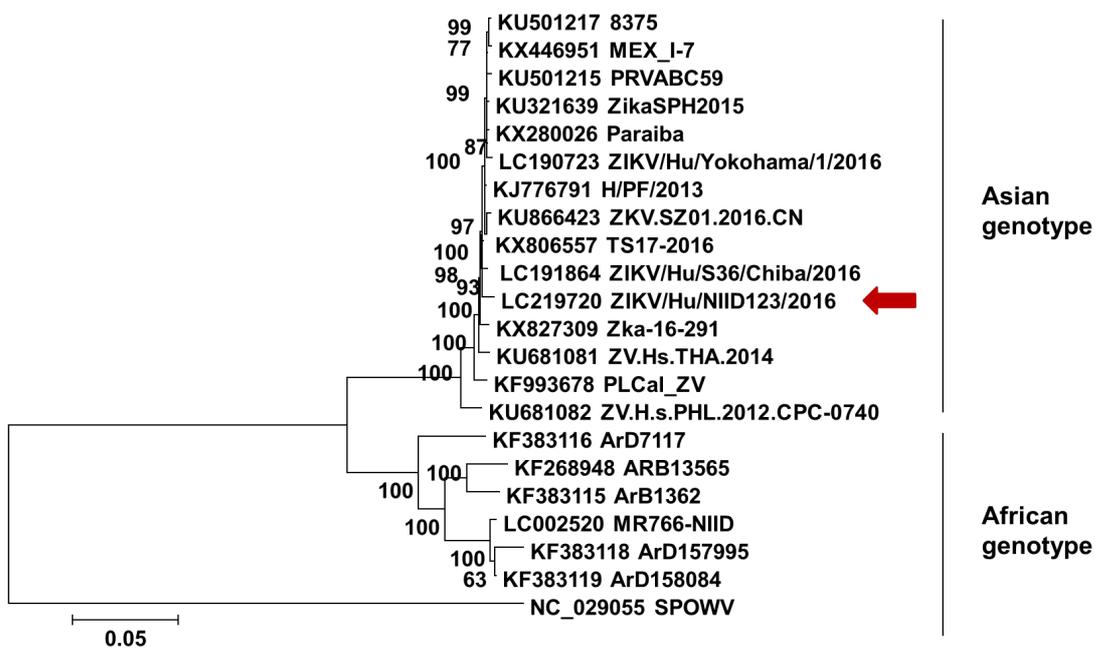


図. ベトナムからの輸入症例から分離されたジカウイルス塩基配列の系統樹解析

ベトナムからの輸入症例より分離されたジカウイルス分離株 ZIKV/Hu/NIID123/2016 の系統樹解析を実施した結果、ZIKV/Hu/NIID123/2016 株はアジア型の遺伝子型を示した (矢印)。



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

研究分担者 大隈 和 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 室長

研究要旨:近年我が国ではデングウイルスの国内感染例の発生や海外での重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)の同定に伴う国内感染例の確認等がなされ、国際的な人の移動や新たな病原体の発見等に伴う新興・再興感染症病原体の献血血液等への混入リスクは益々認知されている。そのため、血液への混入状況をいち早く察知し血液製剤のリスクを低減化する必要がある。そこで本研究では、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献することを目的に、既に国内感染が認められ献血血液等におけるスクリーニング法の整備が急がれるSFTSVの高感度核酸検査法の確立を目指す。本年度はこの核酸検査法の開発に向けて、大規模スクリーニング用のプライマーセットをデザインして作製した。今後作製するプローブと併せてリアルタイムRT-PCRによりスクリーニングし、増幅効率が最良のオリゴセットを最終的に同定して本検査法を確立する。

研究協力者

手塚健太 国立感染症研究所 血液・安全性研究部  
研究員

浜口 功 同上 部長

(本研究は、国立感染症研究所 ウイルス第一部、  
日本赤十字社との共同研究である。)

A. 研究目的

輸血用血液を含む血液製剤は、ヒトの血液を原料とすることからウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。そのため血液製剤の安全性を担保する上で、血液への病原体の混入をいち早く検出、防止し製造過程より病原体を排除することは極めて重要な課題である。本邦で製造される血液製剤は、抗体検査や NAT 等極めて精度の高い方法によって病原体スクリーニングが実施され、その安全性が担保されてきた。しかしながら、新興・再興感染症の原因ウイルス等に対する検査体制については十分な整備がなされておらず、日本国内への移入に備え早急な対応が求められている。

ダニ媒介性のウイルス感染症である重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は、国内(西日本を中心に)に存在していることが近年分かってきた。しかも、感染報告は少ないものの重篤化することが知られている。原因ウイルスである重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)は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。現在既に感染者診断のための検査法は確立されているが、SFTSVが血液に微量に混入した場合に検出が可能な、より高感度の検出法はまだ確立されていない。

そこで本研究では、血液製剤の安全性強化に向けた、SFTSV に対する新規高感度マルチプレックス核酸検査法を開発することを目的とした。具体的には、核酸検査用の高感度プライマー・プローブセットをデザイン後作製し、大規模スクリーニングすること

により、新規に高感度プライマー・プローブセット

を複数同定し、新規マルチプレックス PCR 法を確立することを目指す。

B. 研究方法

・既存のSFTSV核酸検査法の応用可能性に関する検討

SFTSVが血液に微量に混入した場合に検出が可能な高感度の検出法を開発を目指して、先ずは国内外で既に開発されている診断用のSFTSV核酸検査法を網羅的にサーチし応用可能か検討した。

・新規SFTSV核酸検査法開発のための大規模スクリーニング用プライマーセットの作製

新規SFTSV核酸検査法の開発に向けて、SFTSV J1株のRNAゲノム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セットを設計し作製した。

C. 研究結果

・既存のSFTSV核酸検査法の応用可能性に関する検討

国内外で既に開発されているSFTSVの核酸検査法を網羅的にサーチし応用可能か検討した。しかし、これまでの検出系では不十分と考えられた。そのため、新規の核酸検査法を別途開発することとし、そのためのプライマーのデザインと作製を検討した。

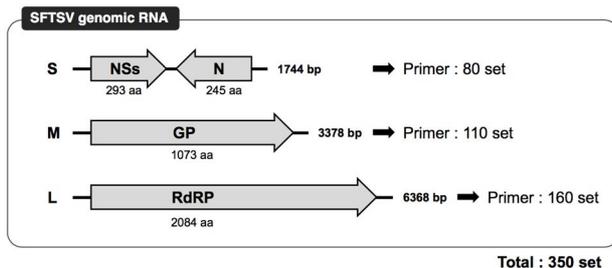
・新規SFTSV核酸検査法開発のための大規模スクリーニング用プライマーセットの作製

上記の検討の結果、新規高感度マルチプレックス核酸検査法を開発のために、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。

今後は、これらのオリゴセットをリアルタイム

RT-PCRによりスクリーニング(SYBR)し、最も増幅効率の良いセットを選別する。選別されたプライマーをもとにプローブも作製し、再度リアルタイムRT-PCRによるスクリーニング(TaqMan)を実施し、最終的に最も増幅効率の良いプライマー・プローブセットを選択する。それによりSFTSVに対する新規核酸検査法を確立する。

#### SFTSVのゲノム構造と核酸検出用プライマーの設計



H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### D. 考察

SFTSVの国内感染は毎年報告されており、報告数は少ないものの重篤化することが知られている。SFTSVはウイルス血症を引き起こすため、血液への混入状況をいち早く察知し血液製剤のリスクを低減化する必要がある。しかしながら、SFTSVに対する核酸検査法は、診断用には確立されているものの、血液スクリーニング用としては整備されていない。そのため、SFTSVが血液に僅かに混入した場合でも検出が可能な高感度の検出法の開発を早急に行う必要がある。

本研究で行う大規模スクリーニングにより選別するプライマー・プローブセットは、極めて増幅効率の優れたオリゴセットが同定されることが考えられることから、開発される本検査法は今後の血液スクリーニング用の核酸検査法の1つとして活用が期待される。

#### E. 結論

本研究により開発されるSFTSVの高感度検出系は、献血血液等のスクリーニングに活用でき、供血者の感染(ウイルス血症)を高感度に検出することで、受血者の感染リスクを軽減することが可能と考えられる。本開発は、SFTSVに関する血液安全対策の準備・整備の一環となり、この活用は血液製剤の安全性強化と安定供給の確保に繋がることが期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし



## 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

赤血球製剤の病原体不活化法として化学物質と可視光の照射を組み合わせることで新しい不活化法を検討してきた。これまでの検討から赤血球の病原体不活化において、赤血球に可視光が吸収され難い波長によって活性を有する化学物質が候補となると考えられた。今回、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を 3 Log 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。

#### A. 研究目的

輸血用血液は、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、全ての病原体をスクリーニングすることは困難である。更なる輸血用血液製剤の安全性を向上させるためには、病原体不活化技術の開発は重要である。新鮮凍結血漿や血小板においては既に病原体不活化技術が臨床に導入されているが、赤血球製剤には実用化されている方法はない。赤血球製剤の場合、赤血球によって光線が吸収され深部まで達しないため不活化効率が悪くなると考えられている。一方、腫瘍に取り込まれ易い化学物質からレーザーや可視光を照射すると発光する化学物質や活性酸素を産生する物質を選択し、腫瘍の治療に応用する光化学治療法が開発されている。それらの候補物質から赤血球製剤の病原体不活化に応用できる物質を検索した。

赤血球に応用する場合、赤色光によって候補物質が活性化することが必要である。赤血球は赤色光を吸収しないから深部まで到達できるからである。この条件に適合する物質としてクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いて不活化効率を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. ウイルスの感染価測定法

シンドビスウイルスの感染価は Vero 細胞を用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに  $1 \times 10^4$ /well 蒔いた。ウイルスを含む検体は、10 倍ずつの 10 の各々独立した希釈系列を作製し、100  $\mu$ L ずつ Vero 細胞に感染させた。感染 5 日後に CPE の有無を観察し、Reed-Munch の計算式に従って TCID<sub>50</sub> を求めた。

##### 2. ウイルスの不活化の評価

Pheophorbide-a を PBS で溶解し、5%アルブ

ミン液とヘマトクリット 40%の赤血球液にそれぞれ最終濃度が 10mg/mL と 30mg/mL になるように添加した。また、シンドビスウイルスは、それぞれの検体量の 1/10 以下になるように添加した。6 穴ウエルに深さが 4mm になるようにそれぞれの検体を入れ、液表面が 20,000 ルクス の照度になるように赤色光を調製し、10~20 分間照射した。また、照射中は、スターラーを用いてゆっくり攪拌した。

## C. 研究結果

### 1. 5%アルブミン製剤における不活化

シンドビスウイルスは、10mg/mL と 30mg/mL とともに 10 分間の照射後にはウイルスは検出感度以下まで不活化された (図 1)。

### 2. 赤血球における不活化

シンドビスウイルスは、10mg/mL では 20 分間の照射で 1Log 程度の不活化効果が認められた。30mg/mL では、10 分間照射後で約 2Log、20 分照射で約 3Log のシンドビスウイルスの不活化効果が確認できた。

## D. 考察

今回検討したクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」は、これまで黄色ブドウ球菌を不活化できることが報告されているが、ウイルスにも不活化効果があることを確認できたのは初めてだと思われる。予想通り全血に近いヘマトクリット値においても 3Log の不活化効果が確認された。アルブミンでは僅か 10 分でシンドビスウイルスは検出感度以下まで不活化された。今回はエンベロープを保有する RNA ウイルスだけの評価であり、最も不活化し

やすいウイルスでの評価である。紫外線等光を用いた病原体の不活化では、二重鎖 DNA を有するウイルスが抵抗性を示すことがこれまでの実験で報告されており、次年度に検討を予定している。

なお、赤血球液での不活化効率が 3 Log だが、バッグを上下から照射することによって不活化効率は改善することが期待で記、これも次年度に実施したい。

## E. 結論

赤血球製剤の安全性向上のためにクロロフィル由来の化学物質を用いて病原体の不活化法を検討した。この物質は、赤色光の照射によって活性化されるため赤血球に可視光が吸収されることなくウイルスを不活化できた。

## 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

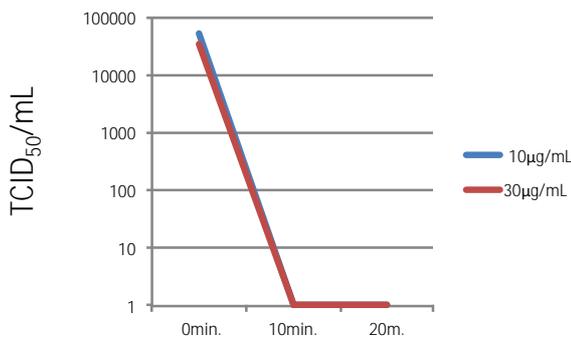
3) 山田攻、青木麻衣子、玉栄建次、鈴木雅之、内野富美子、池淵研二、岡田義昭：当院輸血部における電子カルテオーダー・照合システムとリンクしたアルブミン製剤の一元化運用について、第 65 回日本輸血・細胞治療学会、2017 年 6

月、千葉

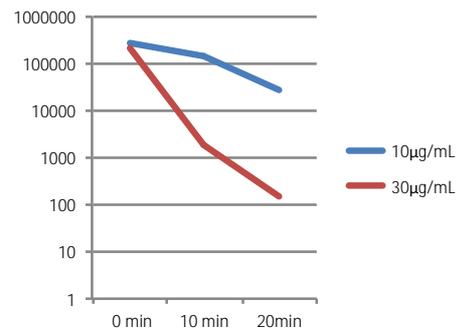
4) 下池貴志、野島清子、脇田隆字、濱口功  
岡田義昭：エタノール法における 17%エタノール処理による HCV の変化の解析、第 65 回日本ウイルス学会、2017 年 10 月、大阪

5) 野島清子、下池貴志、脇田隆字、濱口功、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



5% albumin  
4mm in depth  
20,000ルクス



Ht. 40% RBC  
4mmL in depth  
20000ルクス照射

図 1. フェオホルビド a による Sindbis virusの不活化



## 分担研究報告書

分担する研究項目：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 -

分担研究者 坂井薫（一般社団法人 日本血液製剤機構 中央研究所）

支援研究者 高橋一恵、井手野祥次、服部眞次、前野英毅（一般社団法人 日本血液製剤機構 中央研究所 感染性病原体研究室）

## [研究要旨]

血漿分画製剤製造工程での HEV の除去・不活化効果評価に適したウイルス株を探索する目的で高濃度の HEV 取得方法を検討し、得られた HEV について血漿由来 HEV (pd-HEV) との比較を行った。PLC/PRF/5 細胞にブタ糞便由来 HEV swJR-P5 株 (sw-HEV) の合成ゲノムをトランスフェクションするリバースジェネティクス法で、培養上清中に約 9 Log copies/mL の高濃度 HEV (RG-HEV-PLC) を得ることができた。得られた RG-HEV-PLC は、SD 処理やウイルス表面の脂質膜が除去されると報告されている NaDCA+Trypsin 処理で浮上密度が pd-HEV と同様に高密度側に変化し、NaDCA+Trypsin 処理では RG-HEV-PLC と pd-HEV は共に sw-HEV と同様の高い浮上密度 (1.171-1.185 g/mL) となった。また非処理ではほとんど認められない ORF2 抗体との結合性が上昇する点で両者はよく似た性状を示した。一方、非処理の RG-HEV-PLC は浮上密度 (1.121 g/mL) が pd-HEV (1.102-1.108 g/mL) よりやや高く、アルコール分画で沈殿に多く分配される点で pd-HEV と異なる性状を示した。40%エタノール処理では RG-HEV-PLC の浮上密度は変化せず、ORF2 抗体との結合性の上昇もほとんど認められなかったのに対し、pd-HEV は高密度への変化又はピーク形状の変化が観察され抗 ORF2 抗体との結合性も上昇した。両者の性状の差異は表面に結合した宿主由来の脂質に起因している可能性が示唆された。今回取得した高濃度 RG-HEV-PLC を製造工程におけるウイルス安全性評価に用いるためには、両者の性状の類似点と相違点に着目したさらなる検討が必要と考えられる。今後は、ウイルス除去・不活化工程として有用性が報告されているウイルス除去膜ろ過と液状加熱について、除去・不活化効果を比較し、本研究で得た RG-HEV-PLC の特性を明らかにする予定である。

## A. 研究目的

略語： HEV; Hepatitis E virus. NaDCA; Deoxycholic acid sodium salt. SD; Solvent/detergent. TNBP; Tri(n-butyl)phosphate. TEN; Tris-EDTA- NaCl(150mM) buffer (pH7.4). TBS; Tris-Buffered Saline

献血者における HEV ゲノム陽性者は、8173 ~ 15075 人に 1 人である<sup>1)</sup>が、HEV-NAT は現在北海道ブロックでしか実施されていない。数万人の血漿をプールして製造する血漿分画製剤については、製造工程で HEV が除去・不活化されているのか検証

することが重要となる。血漿由来 HEV (pd-HEV) LC131066、pd-HEV-27 : GenBank 登録予定、  
を製造工程液に添加し、ウイルス除去・不活化効果 pd-HEV-40 : GenBank 登録予定)、  
を検証することが望ましいが、高タイターの  
pd-HEV は稀であり、十分量を確保することが非常  
に困難であった。

そこで、日本血液製剤機構では pd-HEV のモデル  
ウイルスとしてブタパルボウイルス (PPV) 及びネ  
ズミ脳心筋炎ウイルス (EMCV) あるいはブタ糞便  
由来 HEV (sw-HEV) を用いて血漿分画製剤の製造工  
程における除去・不活化効果を検証してきたが、こ  
れらのウイルスの除去・不活化の挙動は pd-HEV と  
は異なっていた<sup>2,3)</sup>。

pd-HEV や培養上清由来 HEV は、界面活性剤処  
理をすると浮上密度が高くなり、HEV 抗体への結  
合性が高くなることが報告されている<sup>4)</sup>。これは、  
ウイルスに結合した脂質膜が、界面活性剤により解  
離したためと考えられている<sup>4)</sup>。また、昨年度、  
pd-HEV をデオキシコール酸 Na (NaDCA)、40%エタ  
ノール又は SD 処理することにより、エタノール分  
画 + での分配が sw-HEV やモデルウイルス様に  
変化することを報告した。

本年度は、pd-HEV と性状が同じで高濃度の 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 (RG-HEV) の調製を試みた。RG-HEV  
を除去不活化検討に用いた報告<sup>5)</sup>はあるが、その性  
状についての解析は不十分と考え、得られた  
RG-HEV の性状について pd-HEV と比較した。

## B. 研究方法

### (1) ウイルス

sw-HEV は swJR-P5 株 (GenBank AB481229.1) を、  
pd-HEV は 3 人のドナー由来の HEV ゲノム陽性血漿  
をウイルス材料とした (pd-HEV-1 : GenBank

### (2) HEV ゲノム濃度の測定

QIAamp Viral RNA Mini QIAcube Kit (Qiagen)  
を用いて核酸を抽出し、QuantiTect Probe RT-PCR  
Kit (Qiagen) を用いて Jothikumar らの方法<sup>6)</sup>に  
従って HEV ゲノム濃度を測定した。

### (3) HEV 感染価の測定

96 well plate で培養した A549 細胞に、培地で段階  
希釈した HEV サンプルを添加し 7 日間培養した後、  
上清を除き細胞より RNeasy 96 kit (Qiagen) を用い  
て Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA 中の  
HEV ゲノムを測定し、Karber 法により感染価  
(TCID<sub>50</sub>/mL) を算出した。

### (4) RG-HEV の産生

sw-HEV 及び pd-HEV-1 ゲノム配列の DNA を合成  
し、プラスミドベクター pSP64 に挿入した。組み換  
えベクターを大腸菌 DH5 でクローニングし、制限  
酵素消化により直鎖状とし、これを鋳型として  
CUGA in vitro Transcription Kit (ニッポンジーン) に  
より RNA 合成を行った。ScriptCap mG Capping  
System (Epicentre) を用いて 5' 末端のキャッピング  
を行った。TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus) を  
用いて、sw-HEV 由来の合成 RNA は PLC/PRF/5 細  
胞に、pd-HEV-1 由来の合成 RNA は PLC/PRF/5、  
Hep3B、HepG2 細胞にトランスフェクションした。6  
well plate 又は T-75 フラスコで培養し 2~3 日毎に半  
量培地交換を行い、培地交換時に採取した培養上清  
中の HEV ゲノム濃度を測定した。また一部の上清  
については ORF2 抗体によるウェスタンブロッティ

ングを行った。

### (5) HEV の処理

各由来の HEV を超遠心分離し (150,000 × g、3 時間、4 )、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6 で懸濁した。これらの HEV 懸濁液に対して以下の 4 つの処理を施した； エタノールを終濃度 40% 加え -6 で 2 時間 (pH 6.8)、又は終濃度 25% 加え -6 で 21 時間 (pH 6.8) インキュベーション、 Tween80 を終濃度 0.3%、TNBP を終濃度 1% 加え 30 で 2 時間 インキュベーション (SD 処理)、陽性コントロールとして NaDCA を終濃度 1%、 Trypsin を終濃度 0.1% 加え、37 で 2 時間 インキュベーション (NaDCA+Trypsin 処理)、陰性コントロールとして、50mM Tris 緩衝液のみを加え 37 で 2 時間 インキュベーション。各処理後液を TBS で約 10 倍に希釈後、超遠心分離し (150,000 × g、3 時間、4 )、沈殿画分を TBS で懸濁して各処理後 HEV とした。

### (6) 密度勾配遠心による HEV の浮上密度測定

遠心チューブに 4.9 mL の 8~50 w/v % OptiPrep™ (AXIS-SHIELD)/TEN の密度勾配を作製し、各処理後 HEV を 100 μL 重層して超遠心分離 (120,000 × g、18 時間、4 ) を行った。超遠心分離後、表面より 200 μL ずつ回収し、各フラクションの屈折率 (nD) と HEV ゲノム濃度を測定した。浮上密度 (g/mL) は別途作成した検量線を用いて屈折率から算出し、HEV の浮上密度を求めた。

### (7) ORF2 抗体の結合性

4~5 Log copies/mL の HEV 100 μL と、1000 倍希釈した ORF 抗体 (ウサギ血清) 100 μL を混合し、

37 で 2 時間静置した。TBS で 1 mg/mL に溶解したウサギ IgG 20 μL 及び 20% (v/v) に懸濁した Protein-G Sepharose 4FF 100 μL を添加し、室温で 1 時間振とうし、マイクロバイオスピカラムで遠心分離した。分離した Protein-G Sepharose 4FF を TBS で 3 回洗浄後、0.1 M Glycine-HCl Buffer pH2.5 180 μL で吸着画分を溶出し、1M Tris-HCl Buffer pH9.0 を 20 μL 加えたチューブに回収し、HEV ゲノム濃度を測定した。また非免疫ウサギ血清で同様に操作し陰性コントロールとした。

### (8) エタノール分画 II+III における HEV の分配

エタノール分画の上清 I に、各由来の HEV をそれぞれ 1/10 量添加した。また一部の HEV についてはヒト血漿と混合し、超遠心分離 (150,000 × g、3 時間、4 ) 後、上清 I に 64 mM 酢酸を含む 95% エタノールを添加してエタノール終濃度 21%、pH6.8 とし、-6~-7 で 1 時間 インキュベーション後 -7 で 3,000 × g、30 分間遠心分離した。上清は 0.45 μm フィルターでろ過し、沈殿は分画前の液量と等量の DPBS で懸濁し、各画分の HEV ゲノム濃度を測定した。

### (倫理面への配慮)

研究対象としてヒト血漿 (HEV 陽性血漿) を用いている。この血漿の使用については、「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律」に従い、一般社団法人日本血液製剤機構ヒト組織研究倫理審査委員会にて承認されている。

### C. 研究結果

#### (1) RG-HEV の産生

3 種の細胞 (PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2) にブタ

糞便あるいはヒト血漿由来の HEV 合成ゲノムをトランスフェクションあるいは産生された RG-HEV を感染させた (表 1)。PLC/PRF/5 細胞に sw-HEV 合成 RNA をトランスフェクションし、T-75 Flask で培養したものは、33 日目以降に培養上清中の HEV ゲノム濃度が約 9 Log copies/mL に達したが、6well plate で培養したものは、約 8 Log copies/mL に留まった (図 1A)。T-75 Flask で培養した培養上清からは、トランスフェクション後 12~15 日目に ORF2 抗原の発現が確認できた (産生された HEV を以下 RG-HEV-PLC と称す) (図 1B)。

PLC/PRF/5 細胞よりもりが蛋白質合成能が高いと報告されている Hep3B 細胞<sup>7)</sup>に RG-HEV-PLC を感染させた場合、培養上清中の HEV ゲノムは約 7 Log copies/mL であった (図 1A、産生された HEV を RG-HEV-Hep3B 称す)。

一方、pd-HEV-1 合成 RNA を PLC/PRF/5、Hep3B または HepG2 細胞にトランスフェクションした場合、培養上清中の HEV ゲノム濃度はいずれも経時的に低下し、5~6 Log copies/mL の濃度のものしか得られなかった (図 1C)。

以上の結果から、最も高濃度となった RG-HEV-PLC についての性状解析を主に行った。

## (2) RG-HEV の浮上密度

由来の異なる HEV の浮上密度を密度勾配遠心により調べたところ、pd-HEV 3Lot が 1.102-1.108 g/mL にピークを示したのに対し、RG-HEV-PLC のピークは 1.121 g/mL と、わずかに高密度であったが、sw-HEV よりは低密度であった (図 2A)。なお、RG-HEV-Hep3B の浮上密度は、RG-HEV-PLC と同様であった (Data not shown)。また、pd-HEV 及び RG-HEV-PLC を NaDCA+Trypsin 処理すると浮上密

度は、いずれも 1.225-1.234 g/mL にピークを示し sw-HEV と同様の密度となった (図 2B)。このことから、RG-HEV-PLC と pd-HEV は性状は若干異なるが、NaDCA+Trypsin 処理により同様の性状になる事が示唆された。

## (3) 感染価と HEV ゲノム濃度

各 HEV のゲノムあたりの感染価を測定したところ、sw-HEV (-2.4 Log TCID<sub>50</sub>/copy) 以外は -3.4 ~ -3.9 Log TCID<sub>50</sub>/copy であった (表 2)。この結果は、RG-HEV が、pd-HEV と同様に、脂質膜に覆われているためにゲノムあたりの感染価が sw-HEV より低下している為と推察された。

## (4) 各処理による浮上密度の変化

RG-HEV-PLC と pd-HEV に 25% エタノール、40% エタノール及び SD の各処理を行い、浮上密度の変化を観察した。25% エタノール処理ではいずれの HEV も浮上密度の変化は認められなかったが (図 3A)、40% エタノール処理では pd-HEV-1 と pd-HEV-40 において高密度への変化が観察され、また pd-HEV-27 もピークがややブロードとなった。このように 40% エタノール処理で pd-HEV はロットにより異なる変化を示した (図 3B)。一方、40% エタノール処理でも RG-HEV-PLC の浮上密度に変化は認められなかった (図 3B)。

また、SD 処理では全ての HEV が 1.171-1.185 g/mL の高密度へピークが変化した (図 3C)。

## (5) 各処理による抗体結合性の変化

RG-HEV-PLC 及び pd-HEV-1 の ORF2 抗体との結合性の変化を、ORF2 抗体を用いた Immuno Capture PCR により検証した。非処理ではいずれの HEV も

ORF2 抗体との明確な結合は認められなかったが、pd-HEV は 25%エタノール処理でやや結合が認められるようになった。更に、40% エタノール処理では明確な結合が認められるようになった。一方、RG-HEV-PLC は 25%及び40%エタノール処理のいずれにおいても明確な結合は認められなかった。SD 処理ではいずれの HEV も明確な結合が認められるようになった(表3)。

### (6) エタノール分画 II+III での分配

エタノール分画 II+III において pd-HEV は上清に分配されるのに対し、RG-HEV-PLC や RG-HEV-Hep3B は sw-HEV と同様に主に沈殿に分配された(図4)。pd-HEV のみ分画 II+III における挙動が異なるのは、血漿由来の成分がウイルスに結合しているためかもしれないと考え、RG-HEV-PLC、sw-HEV を各々ヒト血漿に懸濁(懸濁後 150,000g で 4、3 時間超遠心分離)してからエタノール分画 + を実施した。しかし、いずれのウイルスについても、沈殿に多く分配し、pd-HEV のような分配パターンとはならなかった(図4)。

### D. 考察

今回得られた RG-HEV-PLC は高濃度であり、NaDCA+Trypsin 処理や SD 処理後の性状(浮上密度、抗体結合性)が pd-HEV と同様であったことから脂質膜を完全にまたは部分的に除去した場合、pd-HEV の性状を反映することが期待される。特に NaDCA+Trypsin 処理で脂質膜を完全に除去した RG-HEV-PLC はウイルス除去膜ろ過など大ききで分離する工程のワーストケースとしての評価に有用であることが期待され、今後 pd-HEV との比較を進める予定である。

一方、非処理における浮上密度やエタノール分画 + の分配、エタノール処理における浮上密度変化や抗体結合性変化が、RG-HEV-PLC と pd-HEV では異なっており、高濃度 RG-HEV-PLC を製造工程におけるウイルス安全性評価に用いるためには、加熱に対する安定性などで両者の性状の異同について更に検討が必要と考えられる。

HCV では血漿由来と培養由来で結合する脂質組成が異なるとの報告もあり<sup>8)</sup>、HEV についても脂質組成が両者で異なる可能性がある。今後、pd-HEV の性状をより反映した HEV の産生が望まれる。

### E. 結論

血漿分画製剤の製造工程における HEV の除去・不活化効果を検証するにあたり、リバースジェネティクス法を用い約 9 Log copies/mL の HEV (RG-HEV-PLC) を得ることができた。結合している脂質膜を完全に除去した RG-HEV-PLC はウイルスの大ききで分離するウイルス除去膜ろ過工程のワーストケースとしての評価に有用であると期待されるが、非処理では pd-HEV と性状が異なったことから工程評価に用いるには注意が必要である。両者の異同について更なる検討が必要である。

(謝辞)

本研究の一部は筑波大学医学医療系消化器外科学 大河内信弘先生、大城幸雄先生、環境微生物学 竹内薫先生との共同研究の成果です。厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Minagi T, Okamoto H, Ikegawa M, Ideno S, Takahashi K, Sakai K, Hagiwara K, Yunoki M, Wakisaka A. Hepatitis E virus in donor

- plasma collected in Japan. *Vox Sang.* 2016; 111(3):242-246.
- 2) 高橋一恵ら「由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて」*血液事業* 第 36 巻 第 3 号 2013.11 679-685
  - 3) Yunoki M, Tanaka H, Takahashi K, Urayama T, Hattori S, Ideno S, Furuki R, Sakai K, Hagiwara K, Ikuta K. Hepatitis E virus derived from different sources exhibits different behaviour in virus inactivation and/or removal studies with plasma derivatives. *Biologicals*. 2016 Sep;44(5):403-11.
  - 4) Takahashi M, Tanaka T, Takahashi H, Hoshino Y, Nagashima S, Mizuno H, Yazaki Y, Takagi T, Azuma M, Kusano E, Isoda N, Sugano K, Okamoto H. Hepatitis E Virus (HEV) Strains in Serum Samples Can Replicate Efficiently in Cultured Cells Despite the Coexistence of HEV Antibodies: Characterization of HEV Virions in Blood Circulation. *J. Clin. Microbiol.*, 2010; 48:1112-25.
  - 5) Farcet MR, Lackner C, Antoine G, Rabel PO, Wieser A, Flicker A, Unger U, Modrof J, Kreil TR. Hepatitis E virus and the safety of plasma products: investigations into the reduction capacity of manufacturing processes. *Transfusion.* 2016 Feb;56(2): 383-91.
  - 6) Jothikumar N, Cromeans T, Robertson B, Meng X, Hill V. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Meth.* 2006;131:65-71.
  - 7) Forte TM1, McCall MR, Knowles BB, Shore VG. Isolation and characterization of lipoproteins produced by human hepatoma-derived cell lines other than HepG2. *J Lipid Res.* 1989 Jun;30(6):817-29.
  - 8) Piver E, Boyer A, Gaillard J, Bull A, Beaumont E, Roingeard P, Meunier JC. Ultrastructural organisation of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture. *Gut.* 2017;66(8):1487-1495.
  - 1) Yunoki M, Sakai K, Totsuka A, Wakisaka A. Transfusion. Hepatitis A virus strain KRM238 resistant at heat inactivation. *Transfusion.* 2013 53(9):2103-42.
  - 2) 高橋一恵、大久保祐土、古木理恵、服部眞次、浦山健、坂井薫、柚木幹弘、萩原克郎、生田和良 . 由来の異なる E 型肝炎ウイルスの熱感受性の違いについて . *血液事業* , 2013; 36(3): 679-685.
  - 3) Ideno S, Sakai K, Yunoki M, Kubota-Koketsu R, Inoue Y, Nakamura S, Yasunaga T, Okuno Y, Ikuta K. Immunization of rabbits with synthetic peptides derived from a highly conserved  $\beta$ -sheet epitope region underneath the receptor binding site of influenza A virus. *Biologicals.* 2013;7:233-41
  - 4) Minagi T, Okamoto H, Ikegawa M, Ideno S, Takahashi K, Sakai K, Hagiwara K, Yunoki M, Wakisaka A. Hepatitis E virus in donor plasma collected in Japan. *Vox Sang.* 2016; 111(3):242-246.
  - 5) Yunoki M, Tanaka H, Takahashi K, Urayama T, Hattori S, Ideno S, Furuki R, Sakai K, Hagiwara K, Ikuta K. Hepatitis E virus derived from different sources exhibits different behaviour in virus inactivation and/or removal studies with plasma derivatives. *Biologicals.* 2016; 44(5):403-11.
  - 6) Urayama T, Takahashi K, Ideno S, Yunoki M, Saito M, Numakura K, Inoue T, Satoh S, Sakai K. BK polyomavirus neutralizing activity of intravenous immunoglobulin products derived from donated blood in Japan. *ISBT Science Series.* 2016; 11:146–152.
  - 7) Yunoki M, Kurosu T, Koketsu KR, Takahashi K, Okuno Y, Ikuta K. Neutralizing activities of human immunoglobulin derived from donors in Japan against mosquito-borne flaviviruses, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, and dengue virus. *Biologicals: Targets and Therapy.* 2016; 10: 99-102.
  - 8) Onodera H, Urayama T, Hirota K, Maeda K, Koketsu RK, Takahashi K, Hagiwara K, Okuno Y, Ikuta K, Yunoki M. Neutralizing activities against seasonal influenza viruses in human intravenous immunoglobulin. *Biologicals: Biologicals.* 2017; 10;11:23-30.

## F. 研究発表

### 1 . 論文発表

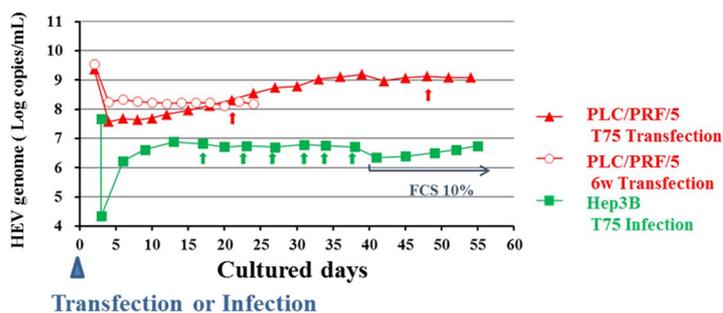
## 2 . 学会発表

- 1) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. Pathogen inactivation in plasma derivatives – Significant differences of properties between model viruses and target viruses (wild type) in HAV, HEV and B19 during liquid heating steps of plasma derivatives. 21<sup>st</sup> IPFA/PEI Workshop ( 21-22 May 2014), Rome.
- 2) Yunoki M, Hagiwara K, Ikuta K. Experiences of HEV elimination during the manufacturing process steps and the suitable model viruses. EMA workshop ( 28-29 October 2014), London.
- 3) 池川礎令、皆木隆男、井手野祥次、坂井薫、柚木幹弘、宮本尚、大場徹也、川浪雅好: 日本血液製剤機構における原料血漿の HEV 陽性率. 第 38 回日本血液事業学会 (2014.10.29-31) 広島.
- 4) Maeno H, Adachi M, Takahashi K, Ideno S, Sakai K, Takeuchi K, Oshiro Y, Ohkohchi N, Okada Y. Treatment of Hepatitis E virus (HEV) particles with ethanol or detergent alters their physical behavior during Chon's ethanol fractionation. Plasma Product Biological Meeting 2017, Malta.

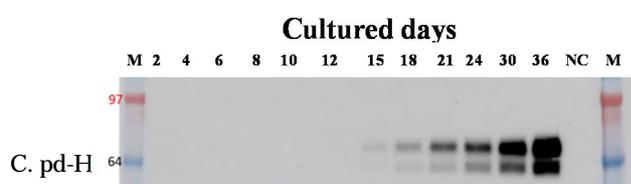
## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## A. sw-HEV 合成ゲノム RNA を用いた RG-HEV 産生



## B. PLC/PRF/5 T75 Transfection 培養上清の ORF2 抗体ウェスタンブロット



## C. pd-H

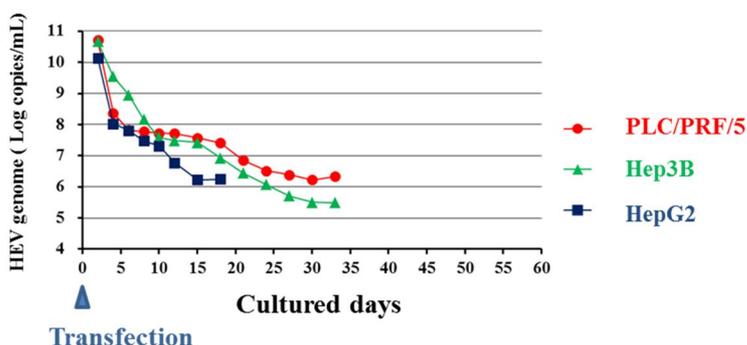


図 1 RG-HEV の産生

A. PLC/PRF/5 T75 Transfection ; sw-HEV 合成ゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に T-75Flask で Transfection した。PLC/PRF/5 6W Transfection ; sw-HEV 合成ゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に 6 well plate で Transfection した。Hep3B T75 Infection ; PLC/PRF/5 T75 Transfection で得られた培養上清プールを Hep3B 細胞に感染させた。Hep3B T75 Infection の FCS 10% と示した培養期間以外は全て FCS 2% で培養を行った。また図中の矢印はいずれの細胞についても非感染細胞を追加したことを示す。

B. PLC/PRF/5 T75 Transfection の経時的に採取した培養上清を還元条件で Nu-PAGE 後 ORF2 抗体 (ウサギ抗血清) と反応させ化学発光でバンドを検出した。

C. T-75 Flask で培養した PLC/PRF/5、Hep3B、HepG2 の各細胞に pd-HEV-1 合成ゲノム RNA を Transfection した。各ポイントは培養上清の HEV ゲノム濃度を示している。

表 1 RG-HEV の産生条件の検討

細胞	HEV			
	swJR-P5株(ブタ糞便由来)		LC131066株(ヒト血漿由来)	
	Transfection	Infection	Transfection	Infection
PLC/PRF/5	○	NT	○	NT
Hep3B	NT	○	○	NT
HepG2	NT	NT	○	NT

○は実施したことを示す。NT: Not tested

表 2 各種由来 HEV のゲノム当たりの感染価

HEV	感染価/ゲノム濃度 (Log TCID50/copy)	
sw-HEV	-2.40±0.32	n=7
pd-HEV-1	-3.92±0.37	n=5
RG-HEV-PLC	-3.40±0.14	n=3
RG-HEV-Hep3B	-3.42	n=1
HEV-A549	-3.62	n=1

n=3 以上の測定については平均値 ± SD で表示した。

- A. 非処理 HEV-A549 は A549 細胞 (ヒト肺がん細胞株) にブタ糞便由来 HEV Genotype sp を感染させて得た培養上清の HEV を示す。

B. 1% NaDCA+0.1%Trypsin 処理

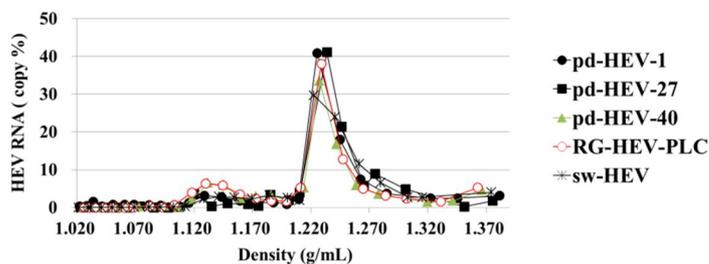
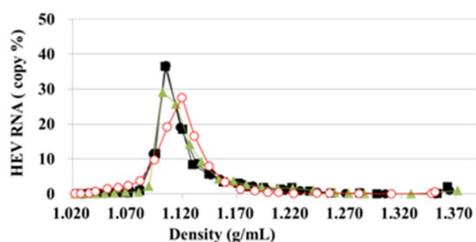


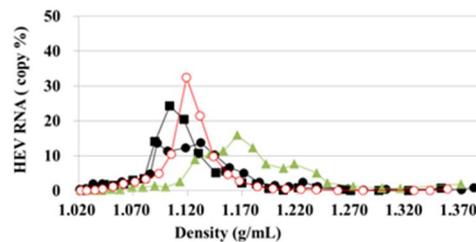
図2 由来の異なる HEV の密度勾配遠心分析-非処理又は 1% NaDCA+0.1%Trypsin 処理-

pd-HEV-1、pd-HEV-27、pd-HEV-40 は各々異なるドナー血漿由来の HEV を示す。縦軸は全フラクションの HEV ゲノム量の総和に対する各フラクションの割合を示す。

A. 25% エタノール



B. 40% エタノール



C. SD

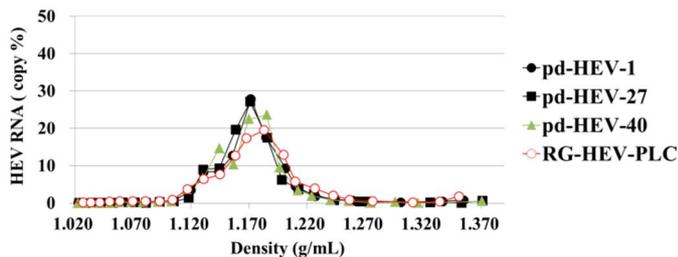


図3 pd-HEV 及び RG-HEV の密度勾配遠心分析-エタノール又は SD 処理-

縦軸は全フラクションの HEV ゲノム量の総和に対する各フラクションの割合を示す。

表 3 RG-HEV の性状解析 - 化学処理による密度勾配遠心の浮上密度と ORF2 抗体反応性変化 -

HEV	非処理	25% Ethanol		40% Ethanol		SD	
	抗体結合性 n=3	浮上密度変化 n=1	抗体結合性 n=3	浮上密度変化 n=1	抗体結合性 n=3	浮上密度変化 n=1	抗体結合性 n=3
pd-HEV-1	±/±/±	-	+ / ± / ±	+	+ / + / +	+	+ / + / +
pd-HEV-27	± / + / ±	-	+ / - / +	±	+ / + / +	+	+ / + / +
pd-HEV-40	± / ± / ±	-	+ / + / +	+	+ / + / +	+	+ / + / +
RG-HEV-PLC	± / ± / ±	-	± / ± / ±	-	± / ± / -	+	+ / + / +

浮上密度変化：-；非処理に対して変化無し、±；ピーク的位置は変化無いが形状変化、+；ピーク位置が変化

抗体結合性(ORF2抗体による免疫沈降)：-；沈降画分のHEVが検出限界未満、±；沈降画分のHEVが陽性対照の10%未満、+；沈降画分のHEVが陽性対照の10%以上。陽性対照：NaDCA+Trypsin処理HEV

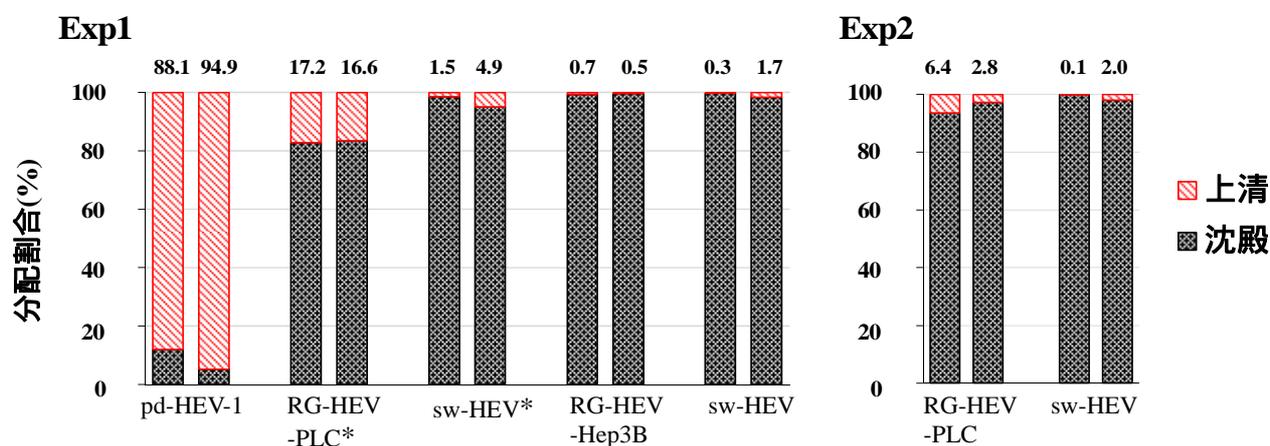


図 4 各種由来 HEV のエタノール分画 + での分配

グラフ上の数字は上清に分配された HEV ゲノム量の割合(%)を示す。

\*：エタノール分画前にヒト血漿にウイルスを懸濁し、150,000g, 4 3 時間超遠心分離を行った。

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研究事業）  
（分担）研究報告書

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

研究分担者 沢辺 京子 国立感染症研究所・昆虫医科学部  
研究協力者 伊澤 晴彦 国立感染症研究所・昆虫医科学部

**研究要旨**

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を選び、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は検出されていない。今後さらにプローブの配列、検出条件等を検討し、RLB法を改良する。

**A. 研究目的**

国内では、2012年秋に渡航歴のない山口県在住の女性が重症熱性血小板減少症候群(SFTS)により死亡したことが、翌2013年1月に国内1例目として報道された。その後も西日本を中心に患者が発生し、2017年までに西日本の23県から合計300名を超える患者(うち60名が死亡)が報告されている。一方で患者が発生していない東日本の地域からもウイルス抗

体陽性の野生動物が確認されており、また、複数のマダニ種からSFTSウイルス遺伝子が検出されるなど、今後の流行拡大も危惧されている。国内でのSFTSウイルス媒介ダニの種類は明らかになっていないが、中国ではフタトゲチマダニとオウシマダニから遺伝子が検出され、韓国のフタトゲチマダニからはウイルスが分離されている。

一方、ダニ脳炎は1993年に北海道で初

めての感染例が報告され、その後の疫学調査で道南地域のヤマトマダニからウイルスが分離され、野鼠とイヌに抗体陽性の個体が確認された。しかし、抗体陽性の野鼠は北海道以外に本州からも見つかり、ダニ脳炎が国内に常在していると推察された。近年では、2016年、2017年と感染例が相次いで報告された。

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。近年、山歩きを趣味とする人が増え、また、シカやイノシシなどの野生動物の個体数も増加し、人がマダニに吸血される機会が増えている。幸い、これまでダニ媒介ウイルス感染症が輸血によって感染した報告はないが、これらの感染症は、重篤になることからリスクは無視できない。マダニの生態や吸血する対象動物の嗜好性を調査解析することによって献血者への注意喚起や問診等へ反映させ、感染リスクを減少させる努力が必要である。

ダニ媒介感染症は、病原体も媒介ダニも従来より国内に常在している場合が多い。国内には5属49種のマダニ類が様々な環境に広く生息しているが、大型の哺乳動物が重要な吸血源となるため、マダニ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、鳥類に咬着するマダニは海外から運ばれるなど、広域に移動する可能性も指摘されている。事実、中国のマダニから検出された Jingmen tick virus (JMTV) (Qin et al., 2014) は、長崎県でも見つかり (Fujita et al., 投稿準備中)、オルビウイルス属 Muko virus (MUV) は長崎県 (Hayasaka et al., 2016) と兵庫県 (Ejiri et al., 2015) から、コルチウイルス属 Tarumizu tick virus (TarTV) は、鹿児島県、鳥取県、福島県 (Fujita et

al., 2017) で、それぞれスポット的に定着していることが明らかになった。いずれのウイルスも、鳥類寄生性の高いとされるアカコッコマダニやキチマダニ等から分離・検出されている。

マダニ媒介性感染症の予防にはマダニの生態や生理的知見を得ることが重要であるが、自然界での情報はあまり得られていない。そこで本研究では、渡り鳥の飛来地周辺で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、鳥類を加えた吸血源動物種を特定し、これらマダニの吸血履歴を明らかにすることを目的とした。

本年度は、渡り鳥飛来地で採取した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。

## B. 研究方法

### マダニの採取

石川県および富山県内の渡り鳥飛来地を選定し、合計6地点でマダニ相の調査を行った (輪島市、珠洲市、能登町、片野鴨池、津幡市および富山市)。調査は2017年10月に実施し、フランネル法 (約70 cm×100 cmの白い布で地面および植生の上を引きずる方法) により植生マダニを採取した。

### 吸血源動物の探索 (RLB法の改良)

これまで我々は、Reverse Line Blot (RLB) 法 (Pichon et al., 2003, Estrada-Pena et al., 2005) を本邦産マダニに応用し、微量な動物血液由来DNAの検出を可能にした。まず、マダニからDNAを抽出し、ミトコンドリアDNA内の12Sリボ

ソーム DNA 領域に設計した共通プライマーを用いて PCR で増幅、次いで各種動物種に特異的なプローブと反応させた。本法により、国内で一般的な野生動物の十数種類を同定できるようになったが、本研究においては、鳥類も対象にするために、新たに鳥類のプローブを試作した。

#### マダニからのウイルス分離・検出

採取されたマダニを採取地、種類に分けて乳剤を調整し、各種培養細胞に接種しウイルス分離を行った。分離されたウイルスについてはゲノム配列を解析し、ウイルス種や遺伝子型の解析、病原性等の性状解析を行った。また、マダニの破砕物あるいはウイルス分離作業後の細胞培養上清からウイルス核酸を選択的に回収し増幅後、次世代シーケンサー(NGS)により配列を解析した。次いでパイオインフォマティクス解析により保有ウイルスを網羅的に探索し、種を同定した。

#### C. 研究結果

石川県および富山県の渡り鳥飛来地周辺ではキチマダニが多数採取された。その他には、片野鴨池周辺でタカサゴチマダニの雄が1頭、輪島市でフタトゲチマダニの若虫1頭が採取されただけであった(表1)。それら植生マダニからウイルス分離を行ったところ、キチマダニからフレボウイルス属の Kabuto Mountain virus (KAMV)、TarTV (図1) 未分類の Picorna-like virus、同じく未分類のフレボウイルスが分離、あるいはNGS解析によりウイルス遺伝子が検出された。

これまでに、欧米の野生動物を検出するために報告されたプローブ(Scott et al., 2012, Harmon et al., 2015)を国内の各調査地周辺に生息すると予想される野生動物を検出するために、新たにプローブを設

計し、現在までに国内の十数種類の哺乳類動物種を検出できるようになった。そこで本研究では、山内健生「日本産鳥類とマダニ類との宿主-寄生関係に関する文献的検索」(2001)を参考に、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)を検出する種特異的なプローブを試作した。予備的に実施した愛媛県下の調査で得られたマダニを供したが、これまでにそれらマダニから鳥類種は検出されてきていない。

#### D. 考察

一般的に、ダニ媒介感染症にはホットスポットと呼ばれる比較的狭い範囲での流行が特徴として挙げられる。一方で、渡り鳥を介して海外からマダニが侵入する可能性も指摘されており、その場合はかなりの距離を病原体が運ばれることになる。本研究で得られた KAMV(石川県)および TarTV(富山県)は、いずれもキチマダニから分離された。上述した山内の著書(2001)によると、キチマダニは36種類の鳥類への寄生例が報告されており、本邦産マダニの中で最も鳥類嗜好性が高い種類であると言える。これまでも KAMV は、兵庫県南部で捕獲されたイノシシに寄生していたマダニ、およびイノシシの生息地周辺の植生マダニからも分離され(Ejiri et al., 2018)。また、長崎県からの分離報告もある(Hayasaka et al., 2016)。他方 TarTV は、地理的な連続性がない地域(鹿児島県、鳥取県、福島県)の植生マダニからそれぞれ分離されている(Fujita et al., 2017)。これらの結果から、石川県に分布する KAMV は、イノシシの移動で運ばれたとも考えられるが、長崎県との地理的な関係や TarTV の国内分布の特徴、宿主であるキチマダニの鳥類寄

生性が高い特徴等を考慮すると、両ウイルスの分布に鳥類の移動が関係している可能性は高いと考えられる。

次に鳥類寄生例が多い種類はアカコッコマダニで、山内(2001)によると27種類の鳥類への寄生例が報告されている。本種マダニからはMUVが分離されており(Ejiri et al., 2015)、今後はMUVにも注目したい。

今回、10種類の鳥類から種特異的なプローブを作製し、RLB法の改良を試みたが、これまでのところ鳥類種は植生マダニからは検出されてきていない。供したマダニが実際に鳥類を吸血していなかった可能性はあるものの、鳥類プローブが機能しなかった可能性も否定できない。今後は、鳥類共通のプローブを用いた検出も視野に入れ、共通および種特異的プローブの作製、検出条件等を再度検討する。RLB法により、実際に鳥類を吸血した履歴を持つマダニ集団の存在を把握することができれば、鳥類とマダニの接点の両方を考慮し、マダニが保有する病原体の自然生態、ならびにその移動を解析することが可能になる。

本年度の調査は、10月に一回行っただけであり、採取されたマダニの種類も数も非常に少なかった。来年度も同じ地点で継続してマダニ相の調査を行う予定である。できるだけ多くのマダニ種と数を採取することに努める。

## E. 結論

1) 石川県および富山県の渡り鳥飛来地周辺で採取されたキチマダニからKAMV、TarTV、未分類のPicorna-like virus、未分類のフレボウイルスが分離、あるいはウイルス遺伝子が検出された。

2) 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)を検出する種特異的なプローブを試作し、RLB法での検出を試みた。

## G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

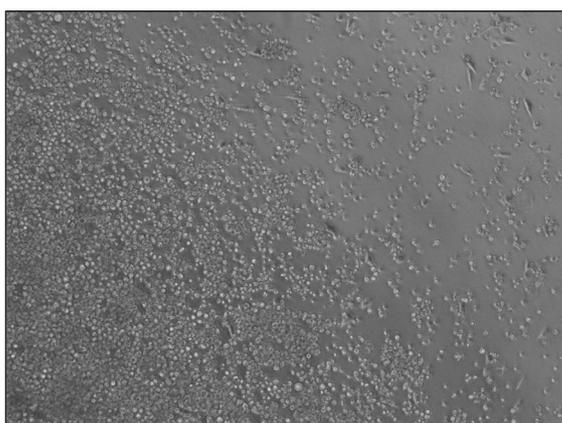
## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表1 石川県および富山県の渡り鳥飛来地周辺のマダニ相

和名	学名		石川県					富山県	合計
			輪島市	珠洲市 狼煙町	能登町	片野鴨池	津播町	富山市 三熊	
キチマダニ	<i>H. flava</i>	N	17	0	0	42	9	11	79
			5	0	2	5	2	11	25
			13	1	2	8	2	5	31
タカサゴチマダニ	<i>H. formosensis</i>	L	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	1	0	0	1
			0	0	0	0	0	0	0
フタトゲチマダニ	<i>H. longicornis</i>	N	1	0	0	0	0	0	1
			0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0
合計			36	1	4	56	13	27	137

17TYM-T2  
BHK-21細胞 3<sup>rd</sup> (接種6日後)



Negative control

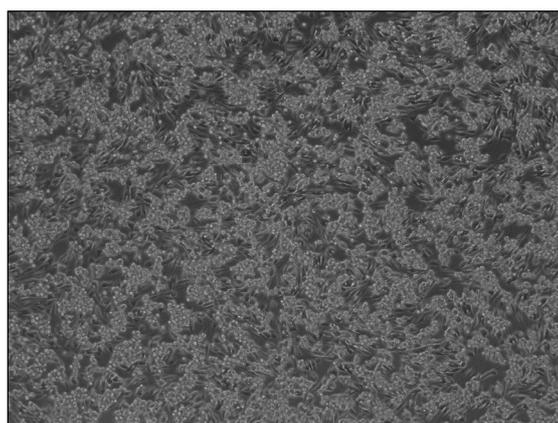


図1 2017年富山市内で採取したキチマダニ若虫(17TYM-T2)より分離された Tarumizu tick virus (TarTV) の BHK-21 細胞に見られた CPE (細胞変性効果)

## 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総合研究事業)

### 分担研究報告書

分担課題：感染者由来C型肝炎ウイルスの不活化の評価

分担研究者 下池貴志 (国立感染症研究所)

#### 研究要旨

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 の増殖は見られていない。

#### A. 研究目的

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、1964 年から 1987 年かけて海外の血漿を原料に製造された第 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。

C 型肝炎の治療法はリバビリンとペグインターフェロンとの併用療法 (PEG-IFN/ribavirin) により治療効果 (それでも約 50%) が上がるようになった。しかし、日本人の感染者で多い遺伝子型 (1b 型) の HCV では治療効果が未だ上がらなかったが、ここ数年、数種類の阻害剤 (HCV ウイルスタンパク質であるプ

ロテアーゼ (NS3/NS4A)、ポリメラーゼ (NS5B)、及び NS5A タンパク質に対する阻害剤 (これらをまとめて **Direct acting antivirals (DAA)** と呼ばれている)) が開発、使用が開始され、1b 型も含めその療効果が上がっている。しかも、副作用の多い PEG-IFN/ribavirin の併用なしの DAA のみの治療法も開発され、今や HCV は治療可能な感染症となりつつある。実際、2014 年末に C 型肝炎治療ガイドラインが改訂され、新規経口薬 (DAA) に期待が寄せられているところである。

C 型肝炎ウイルスは、治療薬の開発に必須な培養細胞を用いた感染系が長らくなかったため、チンパンジーを用いて感

染性の評価を行っていたが、価格の高さ、扱い難さ、また動物愛護の観点からも治療薬開発等の研究がなかなか進展しなかった。血液製剤中の HCV 不活化の評価は、モデルウイルスとして培養可能なウシ下痢症ウイルス(BVDV)が用いられてきた。こうした中、2015年に培養細胞で HCV を増殖させることが可能な系が発表され研究が急速に進展した。本研究でもこの HCV JFH-1 株(遺伝子型 2a)を増殖させ、増殖した HCV JFH-1 を血液製剤にスパイクウイルス不活化を評価する系を構築した。

更に最近、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、感染者由来 HCV の増殖する系を構築する。

## B. 研究方法

### 1. sec14L2 が組み込まれた組換えレンチウイルスの作製

宿主因子である sec14L2 が CMV プロモーターにクローニングされたレンチウイルスベクター pSEC14L2/BlastR (pLOC plasmid, Thermo Fisher Scientific) に sec14L2 がクローニングされている。この plasmid は Saeed M 氏から供与を受けた(参考: Saeed M. et al. 524 471-490, 2015 Nature)。この plasmid と pMDLg/pRRE (HIV-1 の gag, pol 遺伝子、及び REE 配

列を持つ, Addgene 社), pRSV-Rev( HIV-1 Rev 遺伝子を持つ, Addgene 社)、及び pMD2.G (VSV の Glycoprotein の遺伝子を持つ, Addgene 社) の合計 4 種類の plasmids を同時に 293T 細胞にトランスフェクションすることにより、この細胞上清から sec14L2 が組み込まれた組換えレンチウイルスを得た。

### 2. Sec14L2 を発現する培養細胞の作製

作製した sec14L2 組換えレンチウイルスを培養細胞 Huh7.5.1 に感染させ、1 日後、Blasticidin (最終濃度 10 $\mu$ g/mL) を加え、薬剤によるセレクションを行なった。また、セレクションされた細胞は tGFP が発現しているかを確認した(図 1)(以降、Huh7.5.1 (sec14L2)と表記)。なお、pSEC14L2/BlastR は sec14L2 遺伝子意外に、tGFP (GFP の一種)、及び Blasticidin 耐性遺伝子を持つ。

### 3. 培養細胞 Huh7.5.1 (sec14L2) の Sec14L2 の発現の確認

作製した Sec14L2 を発現する培養細胞をウエスタンブロッティング(図 2)、及び免疫染色法(図 3)により、抗体 anti-Sec14L( #GTX115716, GeneTex, Inc. CA) を用いて、Sec14L2 の発現を調べた。ウエスタンブロッティングには、2 次抗体 HRP を結合させたヤギ抗マウスモノクローナル抗体 (#170-5047, BioRad, CA)、及び SuperSignal West Femto (#34094,

Thermo Scientific, Tokyo)による発光により検出した。また、免疫染色には蛍光二次抗体 Alexa Fluor 488、及び Alexa Fluor 594 (それぞれ#A11001, A11037, Thermo Scientific, Tokyo)を用いた。核の染色には DAPI (#340-07971, 和光純薬、Osaka)

4 .作製した Huh7.5.1 (sec14L2) 2 に米国で HCV 感染者由来血漿 (市販されている window 期血漿) を加え、この HCV が増殖するかを HCV コア蛋白質の免疫染色法で確かめた。用いた抗体は anti-HCV core antigen monoclonal antibody (MA-080, Thermo Scientific, IL)、蛍光二次抗体 Alexa Fluor 488 を用いた。

#### (倫理面への配慮)

この培養細胞でウイルスが増殖させる系は、実験動物を用いる必要がないため、研究のやりやすさのみでなく、倫理面においても優れた系である。この研究に関して、国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査」で承認を受けた(受付番号 8 5 1「血液製剤における病原体不活化に関する研究」)。

### C. 研究結果

#### 1 . Huh7.5.1 (sec14L2) 細胞の Sec14L2、及び tGFP の発現

sec14L2 が組み込まれた組換えレンチウイルスを作製し、Huh7.5.1 細胞に感染させ、sec14L2 が組み込まれた Huh7.5.1 細胞

( Huh7.5.1 (sec14L2) と表記 ) を得た。この Huh7.5.1 (sec14L2) 細胞を蛍光顕微鏡で観察し、tGFP の発現を調べた結果、全細胞の約 30% が tGFP を発現していることが分かった ( 図 1 ) 。

Huh7.5.1 (sec14L2) 細胞の lysate を用い、ウエスタンブロッティングを、Sec14L2 を特異的に検出する anti-Sec14L 抗体を用いて行なった結果、Huh7.5.1 (sec14L2) の細胞 lysate には、SDS PAGE 上、約 46kDa のバンドが特異的に検出された。一方、Huh7.5.1 細胞の lysate にはこのバンドは検出されなかった。よって、Huh7.5.1 (sec14L2) には Sec14L2 蛋白質が発現していると考えられる ( 図 2 ) 。

#### 2 . Huh7.5.1 (sec14L2) への HCV 患者さん由来血漿に含まれる HCV の感染

Huh7.5.1 (sec14L2) に HCV 患者さん由来血漿 ( HCV RNA コピー数 :  $2 \times 10^7$  IU/mL ) を感染させ、4-5 日培養して、細胞内の HCV コア蛋白質の発現を免疫染色法で調べたが、コア蛋白質の発現は認められなかった。

### D. 考察

1 . ウエスタンブロッティングによる Sec14L2 の発現を、SDS-PAGE 上、約 46kDa の泳動度を示し、計算上の分子量約 46kDa と一致しており、このバンドが Sec14L2 と考えることが出来る。

2 . sec14L2 が組み込まれた Huh7.5.1 細胞

(Huh7.5.1 (sec14L2)) を作製し、sec14L2 がクローニングされている plasmid に存在する tGFP の発現を確認したが、全細胞の約 30% であり、このため、患者さん由来 HCV の増殖効率が悪く、HCV コア蛋白質を検出できなかったのかも知れない。

3 .Sec14L2 以外に、HCV の増殖には培地が還元状態である方が良く、また、micro RNA の一つである mi122RNA が重要であるという報告があるので、今後これらの条件で患者さん由来の HCV の増殖を調べてゆく予定である。

#### E. 結論

患者さん由来の HCV を培養細胞で増殖するために、Sec14L2 蛋白質を発現す

る培養細胞を作製したが、今のところ、患者さん由来 HCV の増殖は見られていない。今後、Sec14L2 蛋白質が発現する細胞の率を増加させるために、細胞のクローニングを行い、また、還元条件で、かつ、mi122 RNA を過剰発現させた条件で患者さん由来 HCV の増殖を試みる予定である。

#### G. 研究発表

(ア) 論文発表 なし

(イ) 学会発表 :

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許申請 : なし

2. 実用新案登録 : なし

3. その他 : なし

図 1 . 組換えレンチウイルスを用いて Huh7.5.1 細胞に sec14L2、tGFP を導入した細胞の tGFP の発現

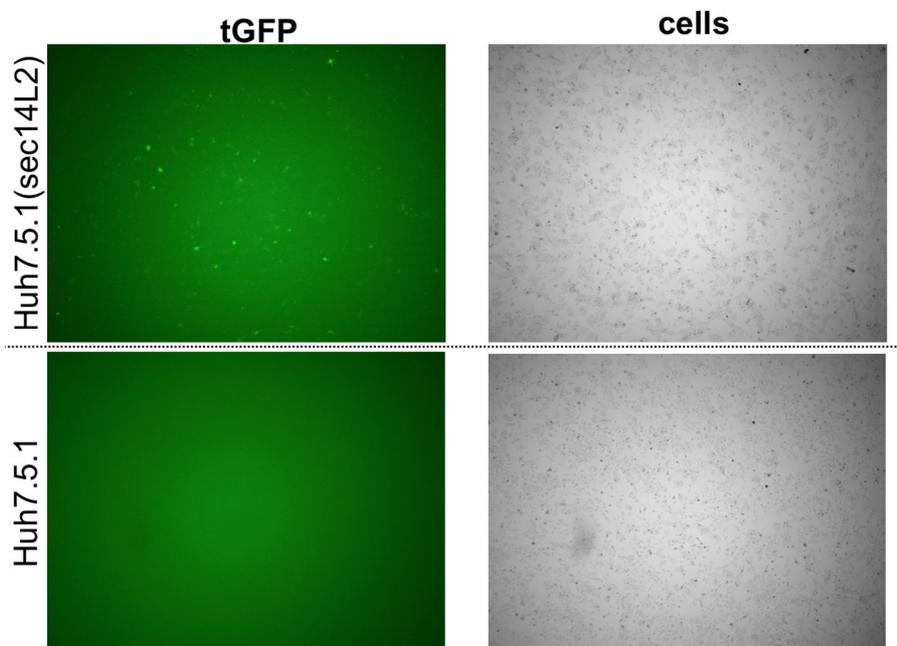


図2 . Huh7.5.1 (sec14L2)細胞 lysate 中の Sec14L2 蛋白質の発現をウエスタンブロッティングで調べた

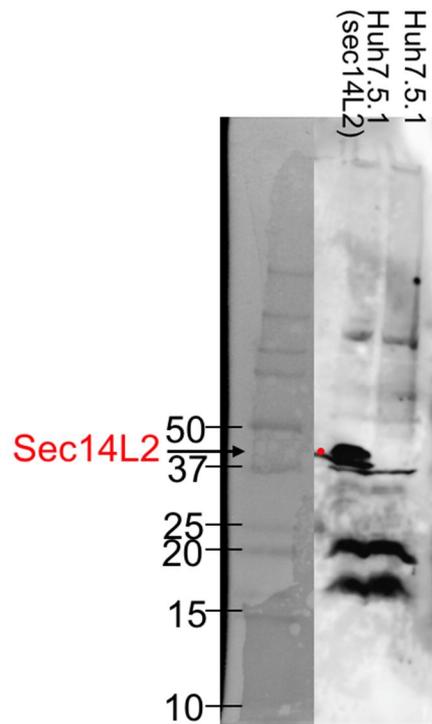
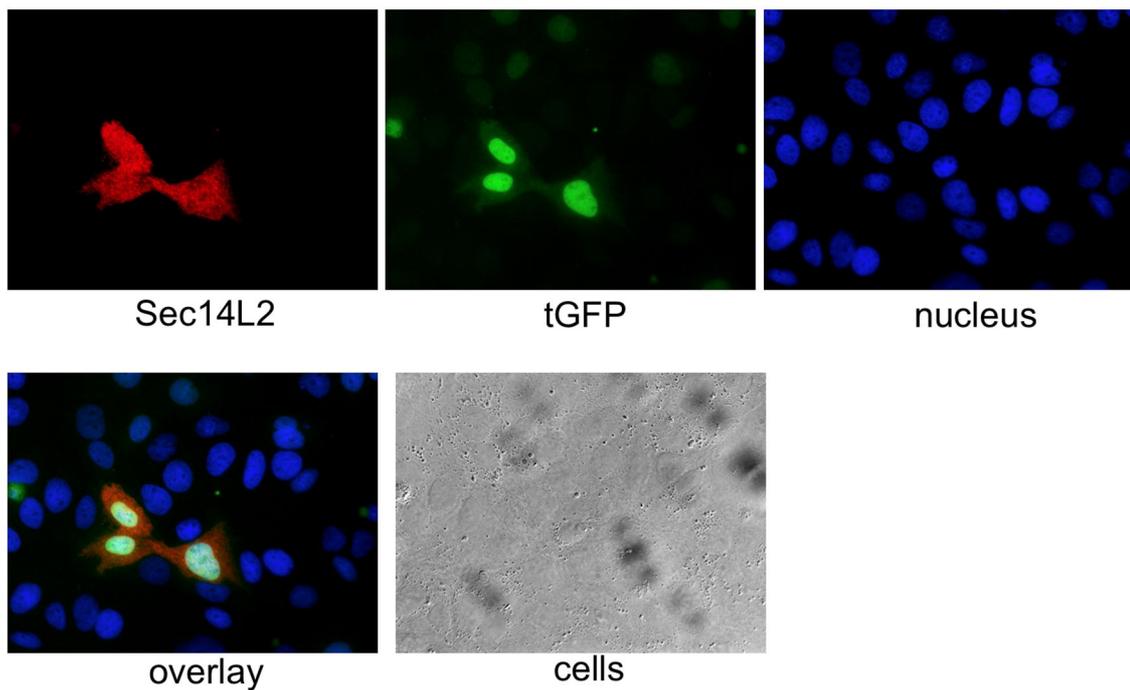


図3. 免疫染色による Sec14L2, 及び tGFP の Huh7.5.1 (sec14L2)細胞内の発現、及び局在



## 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

#### 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

分担研究者 平 力造 (日本赤十字社 血液事業本部 技術部 安全管理課長)

#### 研究要旨

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。

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。

#### A. 研究目的

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) の精度を評価し、ジカウイルスの国内感染発生時 (蔓延時) の輸血用血液製剤の安全性確保対策の一つの手段になり得るか検証し、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。

スクリーニング用試薬 (Procleix Zika Virus Assay) の精度評価と検査手順の策定

(1) Procleix Zika Virus Assay の精度評価

ア. 感度試験

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)) について献血者陰性血漿を使用して、段階希釈法により 95% 検出限界を算出する。

なお、検出感度の算出は、JMP (ジャンプ) ver. 13 を使用したロジスティック回帰分析で行った。

イ. 特異性試験

ALT 検査不適献血者検体 500 本を使用し評価

#### B. 研究方法

1. Grifolis 社製ジカウイルス検出用スクリ

する。さらに、近縁の日本脳炎ウイルス (JEV) との交差性を評価するために、日本に侵淫している JEV 遺伝子 1 型 (Mie41 株) と遺伝子 3 型 (JaGar01 株) を各々  $4 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL (患者での高ウイルス血症の値を参考に設定した。)\*

\* Jau-Ling Huang et al., 2004

#### ウ．同時再現性・日差再現性試験

感度試験において 95% 検出限界以上の各濃度の S/Co を、同じ日にち内及び各日の同じ測定回ごとに比較し、変動係数 (CV) を算出し評価する。

#### (2) 検査手順の策定

国内感染事例の発症に備えて、同試薬による検査手順を策定する。

#### 2. 妊婦輸血の現状調査

妊婦のジカウイルス感染が母子感染による小頭症等の先天異常の原因になると結論付けられたことから、本邦における妊婦輸血 (出産時の輸血を除く。) に実施状況について、厚生労働省委託所業「平成 29 年度血液製剤使用実態調査 (輸血業務に関する総合的調査)」にて調査依頼を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 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) の精度評価と検査手順の策定

##### (1) Procleix Zika Virus Assay の精度評価

###### ア．感度試験

ジカウイルス 3 株 (WHO 標準品 PF13/25013-18 株)

95% 検出感度 : 14.98 IU/mL (95%CI 0.90 ~ 46.50 IU/mL)

・ Uganda 1947 (アフリカ株 : MR766 株)

95% 検出感度 : 12.10 IU/mL (95%CI 10.01 ~ IU/mL)

・ Polynesia 2013 (アジア株 : PRVABC-59 株)

95% 検出感度 : 77.34 IU/mL (95%CI 28.63 ~ 106.76 IU/mL)

なお、生ウイルスである、Uganda 1947 と Polynesia 2013 株については、培養細胞で産生させたウイルスを血漿へスパイクして評価を行った、また、同ウイルス濃度の決定については、WHO 標準品を STD とした qRT-PCR から決定した。

#### イ．特異性試験

・ ALT 検査不適献血者検体 500 本を使用した評価

全て陰性で、非特異的反応はなかった。

・ 近縁の日本脳炎ウイルス (JEV) との交差性  
日本に侵淫している JEV 遺伝子 1 型 (Mie41 株) と遺伝子 3 型 (JaGar01 株) の各々  $4 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL のサンプルを 8 重測定した結果、全て陰性で、交差反応は確認されなかった。

#### ウ．同時再現性・日差再現性試験

感度試験において 95% 検出限界以上の各濃度の S/Co を、同じ日にち内及び各日の同じ測定回ごとに評価し、変動係数を算出した結果、同時再現性では 1.98 ~ 3.52%、日差再現性試験では 0.24 ~ 4.78% であった。

#### (2) 検査手順の策定

「血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の維持のための新興・再興感染症に関する総合的研究」にて、平成 28 年度の作成した WNV の検査手順を参考に作成した。

#### 2. 妊婦輸血の現状調査

平成 30 年中に、厚生労働省委託所業「平成

29年度血液製剤使用実態調査(輸血業務に関する総合的調査)」の調査結果が報告される予定となっている。

#### D. 考察

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)の精度評価を行った結果、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。

同試薬を使用する検査手順については、WNV試薬の手順と同様に作成しているが、日赤基幹システムとの連携はなく、GMPの観点からシステム連携の検討が必要である。

ジカウイルス感染によるリスクのある受血者は妊婦であるが、日本の医療においては、

妊婦への輸血は、可能な限り行わないこととされており、そのリスクを明確にするために現在妊婦輸血(出産時を除く。)の実態調査を依頼中であり、今後の安全対策の基礎データとなることを目的としている。待したい。

#### E. 結論

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)を評価した結果、検査精度は良好であることが確認された。

今後は、ジカウイルスの国内感染に備えた輸血用血液製剤の安全対策について、そのリスクを評価し、事前にシミュレーションすることが重要であると考えられた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



医薬品・医療機器等レギュラリーサイエンス政策研究事業  
「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」

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

研究分担者 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 野島清子  
研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス2部 下池貴志

#### A. 研究目的

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、1964年から1987年かけて海外の血漿を原料に製造された第Ⅰ因子製剤、第Ⅱ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。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・除去され安全性が高いと推察されるが、HCVを用いて不活化除去の評価を行いその原因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抗体共存化での感染性や核酸の移行および、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等の薬害の報告がこれまでにない理由について、科学的に考察することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1. HBV陽性血漿

国際試薬株式会社より購入した  
ものを使用した。

##### 2. HCV JFH-1am株の調製

HCV JFH1 クローンの細胞  
(Huh7.5.1細胞)に試薬 PEI-  
Max (Polyscience社)を用いて

HCV JFH1 クローンをHuh7.5.1  
細胞(6ウエルプレートの1ウ  
エル)にトランスフェクション  
した。5日間培養した細胞上清  
に含まれるHCVの感染価と、  
細胞内で発現したHCVを測定  
した。細胞上清に発現したHCV  
を限外ろ過カラム Vivaspin

turbo(10k, Sartorius社)を用いて濃縮した。

3. HCV,HBV 陽性ドナー譲渡血液の申請

HBs 抗原陽性、HBV DNA、HCV 抗体陽性血漿について本研究班で使用可能となるよう、日本赤十字社へ献血血液等の研究開発等への指針に基づく研究実施申請を行った。

4. Cohn エタノール分画法による血漿の分画

健康人血漿 20mL を 4 でゆっくり融解し、4、16000xg で 25 分間遠心し、沈殿(cryoprecipitate, クリオ)と上清(cryosupernatant, 脱クリオ)とに分画した(クリオ/脱クリオ分画)。脱クリオ画分の pH は低温下で攪拌しながら pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加して調整し、最終的には一部を採取し室温で pH7.5 付近となるよう調整した。-3 で攪拌しながら、最終濃度が 8%となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加し、15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を-1、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿(Fra. フィブリノゲン画分)と上清(S1)画分とに分画した(Fra. /S1 分画)。Fra. /S1 分画の効率は、ゲル濾過カラム G3000SWXL カラムを用いたサイ

ズ排除クロマトグラフィー(SEC 分析)により評価した。各分画のサンプリングは図1の通り行った。8%エタノール上清画分である S1 画分を低温化で攪拌しながら、pH が 6.75 付近になるように調整した。-5 で攪拌しながら最終濃度が 25%となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加した後、15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を-1、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 Fra. (+)P と上清 S (+)とに分画した。沈殿 Fra. (+)P に pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加して調整し、最終的には一部を採取し室温で pH6.61 付近となるよう調製した。その後 -5 で攪拌しながら最終濃度が 20%となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加した後、15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を-1、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 P (II+)w と上清 S (II+)w とに分画した。沈殿 P (II+)w に pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加して調整し、最終的には一部を採取し室温で pH5.4 付近となるよう調製した。その後 -5 で攪拌しながら最終濃度が 17%となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加した後、15

分間反応させた。エタノール処理後の溶液を-1、10,000xgで15分間遠心し、沈殿(P)と上清(S)とに分画した。

#### 5. HBV DNA の定量

各フラクションに含まれる HCV JFH-1amRNA を定量した。各フラクション 100uL に含まれる核酸を SMITEST EX R&D を用いて精製した。HBV DNA は、Thunderbird probe qPCR kit (TOYOBO)を用い定量した。HBV の核酸量は、HBV 国内標準品を用いて定量し、国際単位 IU/mL で表した。

#### C. 研究結果

血漿にスパイクした HBV ウィルス核酸は、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。2 回実施した実験のうち、1 回は上清中に核酸は確認されなかった

(figure1)。

#### D. 考察

血漿にスパイクした HBV ウィルス核酸は、クリオ/脱クリオ分画および、8%エタノール分画では除去できず、第 1 因子、第 2 因子、フィブリノゲン製剤の原料となる画分に移行した。分画製剤における、加熱やウィルス除去膜等の不活化処理工程の重要性が示唆された。また、血友病患者の HBV 抗体陽性率が高いという古い論文の報告とも一致する。

さらに、HBV DNA は、25%エタノール分画の上清、および沈殿の双方に移行したことから、アルブミン製剤の製造においても、加熱やウィルス除去膜等の不活化処理工程の重要性が示唆された。8%、25%、20%のエタノール分画では、主に HBV DNA は上清に移行したのに対して、17%エタノール分画の際には、その多くが沈殿へ移行し、上清画分への除去効率は 3log 以上であった。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、凝集体と一緒にウィ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。

HBV は 42nm の DNA ウィルスであり、比重は 1.3 とされ、HCV は

40-50nm の RNA ウイルスで比重は 1.1 とされている。性状が異なるウイルスであっても、17%エタノール処理は、これらのウイルスを効率良く除去できる工程であり、加熱、ウイルス除去膜等の不活化処理が導入されていなかった時代においても製剤の安全性向上に貢献して来たと考えられた。

HBV ウイルスの培養系が今度開発されれば、核酸だけでなく、その感染性についても同時に評価可能となることが期待される。

#### E. 結論

血液製剤の製造工程における 17%エタノール処理は、HCV や HBV ウイルスの除去に有効な工程であり、製剤の安全性向上に貢献してきたと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Analysis of HCV in the fractions with Cohn ethanol method in a laboratory scale, 第 64 回ウイルス学会、神戸、Kiyoko Nojima, Takashi Shimoike, Takaji Wakita, Isao Hamaguchi, and 1Yoshiaki Okada

Analysis of the states of HCV with 17% ethanol-treatment in Cohn ethanol method, 第 64 回ウイルス学会、神戸、Takashi Shimoike, Kiyoko Nojima, Takaji Wakita, Isao Hamaguchi, and 1Yoshiaki Okada

##### 3. 特許取得

なし

##### 4. 実用新案登録

なし

##### 5. その他

なし

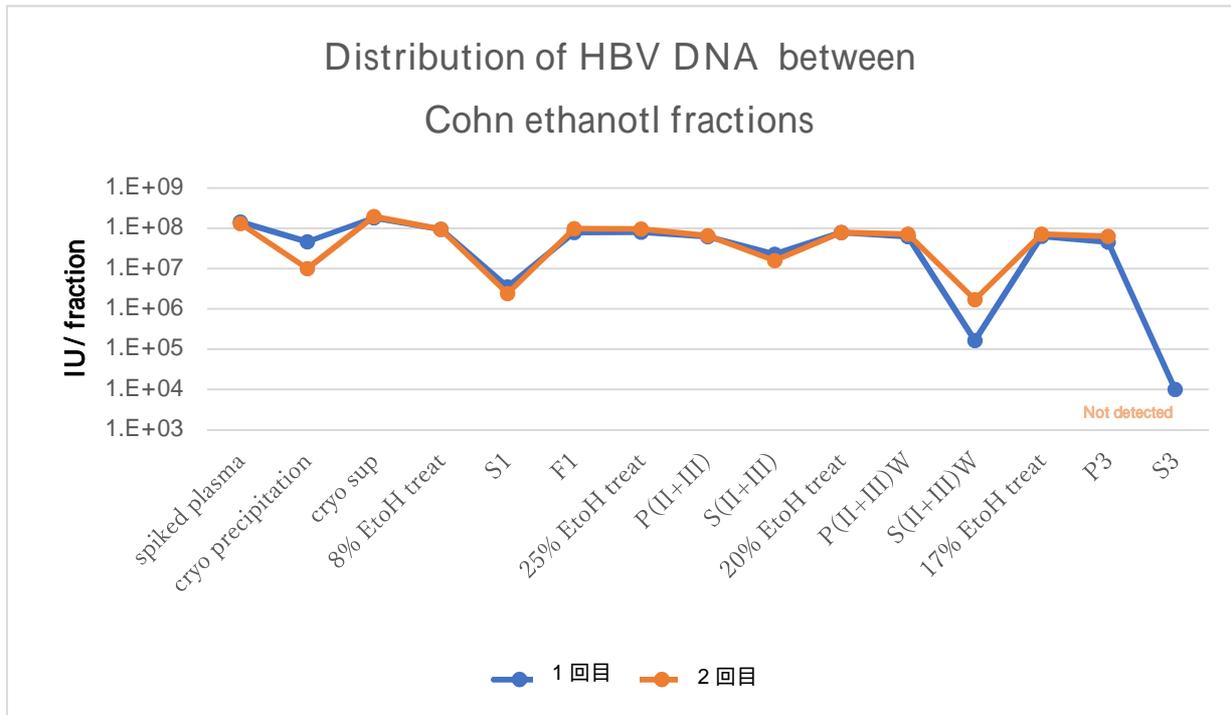


図1 コーンエタノール分画における HBV DNA の移行

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					