

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 30 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 31 (2019) 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 6
II. 分担研究報告		
1. 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	P 7-P 8
2. 赤血球製剤の新規不活化法の開発	岡田 義昭	P 9-P11
3. 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—	前野 英毅	P12-P16
4. 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	P17-P22
5. 感染者由来C型肝炎ウイルスの不活化の評価	下池 貴志	P23-P28
6. 新興感染症発生時の献血対応に関する研究	平 力造	P29-P33
7. 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	P34-P38
8. 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 39-P43
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		P44

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

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：我が国では近年、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がなされた。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。そのため、このウイルスの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、大規模スクリーニング用に作製したプライマーセットをリアルタイムRT-PCRによりスクリーニング(SYBR)し、増幅効率が良好なオリゴセットを同定した。これらの候補プライマーに対してTaqManプローブを検討後作製し、再度リアルタイムRT-PCRによりスクリーニング(TaqMan)を実施した。最終的に増幅効率が最良で検出範囲の最も広いオリゴセットを同定し、マルチプレックス核酸検査法として開発した。

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

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、国内では西日本を中心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

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

新規高感度マルチプレックス核酸検査法の開発のために、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。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、増幅効率の良好なセットを選別した。

・新規SFTSV核酸検査法開発のためのTaqManプローブのデザインと作成

SFTSVの新規高感度プライマーを大規模スクリーニングにより同定した。これらの同定した15セットのプライマーに対してTaqManプローブのデザインを試みた。

・SFTSV Japanese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

上記で作成したTaqManプローブと高感度プライマーを組み合わせ、SFTSV Japanese株由来RNAパネル (J1 : 4株、J2 : 2株、J3 : 2株) を鋳型としてreal-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した。

・SFTSV Chinese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

Japanese株と同様に、SFTSV Chinese株由来RNAパネル (C3 : 1株、C4 : 2株、C5 : 2株) を鋳型としてreal-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した。

・マルチプレックスPCRによるSFTSV高感度核酸検査系の確立

SFTSV Japanese株とChinese株を全て高感度に検

出する検査法の確立のため、これまでのスクリーニングで同定したオリゴセットを用いたマルチプレックスPCR法を検討した。

C. 研究結果

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

合成したプライマー合計 350 セットをリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング(SYBR)し、J1 株に対して増幅効率の良好な 96 セットを選別した。これらのオリゴセットを再度同様にスクリーニングし、J2 株及び J3 株に対して増幅効率の良好な 15 セットを選別した。

・新規SFTSV核酸検査法開発のためのTaqManプローブのデザインと作成

大規模スクリーニングにより同定した、15 セットのSFTSVの新規高感度プライマーに対してTaqManプローブをデザインしたところ、このうち12セットに対してプローブ作成に成功した。

・SFTSV Japanese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

SFTSV Japanese株由来RNAパネルを鋳型として real-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した結果、12セットのプライマー・プローブのうち、全てのSFTSV Japanese株に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを1セット (S-62) 同定した。

・SFTSV Chinese株を用いたTaqManスクリーニングによる高感度プローブの決定

Japanese株と同様に、SFTSV Chinese株由来RNAパネルを鋳型として real-time RT-PCRによるスクリーニングを実施した結果、12セットのプライマー・プローブのうち、C3株及びC4株に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを1セット (S-62)、C5株に対して極めて優れた増幅シグナルを示すものを1セット(S-60) それぞれ同定した。C3株及びC4株を高感度に検出するオリゴセットは、全てのJapanese株を高感度に検出するオリゴセットと同一であった。一方、C5株を高感度に検出するオリゴセットは他の株では十分な感度が得られなかった。

・マルチプレックスPCRによるSFTSV高感度核酸検査系の確立

これまでのスクリーニングで同定したオリゴセットを用いたマルチプレックスPCR法を検討した結果、S-60及びS-62オリゴセットによるマルチプレックスPCRは、全てのSFTSV株に対して、それぞれのシングルプレックスPCRと同等の感度を示し、阻害的な反応は見られなかった。さらに、このマルチプレックスPCR法はヒト血漿由来RNAに対して非特異的な反応を示さなかった。

スクリーニング最終結果

	Primer Design	SYBR Screening		Taqman screening	
		Strain J1	Strain J2 & J3		
S-segment	80	23	3	2	2
M-segment	110	28	3	2	0
L-segment	160	45	9	8	0

D. 考察

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。

本研究で実施する核酸検査法の確立手法は、網羅的な大規模プライマースクリーニングと、ウイルスパネルを用いた広範囲の検出域を示すプローブのスクリーニングから成り立っている。これらの多段階のスクリーニングを経ることで、高感度オリゴセットを同定し、極めて優れた核酸検査法の確立が可能であると考えられる。本研究において開発されるSFTSVの検査法は、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、供血者の血液へのウイルス混入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、献血血液等のスクリーニングへの活用が期待される。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と考えられる。

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

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

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。昨年度、ク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。

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となると考えられている。一方、腫瘍の治療に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そうな物質を検索した。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

PRV の感染価はネコ腎由来細胞の CRFK 細胞株を用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに 1×10^4 /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、 $100 \mu\text{L}$ ずつ CRFK 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_{50} を求めた。

2. ウイルスの不活化の評価

採血した血液は、生理食塩水で洗浄しヘマトクリット値が40%になるように調整した。これにPBSで溶解したPheophorbide-aを最終濃度 $20\mu\text{g/mL}$ 及び $30\mu\text{g/mL}$ になるように添加した。また、PRV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穴ウェルに深さが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、10~30分間照射した。コントロールとして白色光を30分間20,000ルクス照射した。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

PRVは、Pheophorbide-aの濃度 $30\mu\text{g/mL}$ に10分間の照射では1.8Log程度の不活化が認められたが、20分以上の照射ではPRVは検出感度以下にまで不活化された。5Log以上の不活化が認められた。一方、白色光では30分照射しても1Log未満の不活化効果でしかなかった(図1)。また、 $20\mu\text{g/mL}$ の濃度では20分照射で不活化効果は1Log未満であり、30分照射でも3.5Log程度の不活化しか認められなかった。赤血球への影響は、30分照射において僅かな溶血が認められる程度であった。

D. 考察

昨年度、シンドビスウイルスを用いてクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」と赤色光を組み合わせることでウイルスの不活化効果を確認した。全血に近いヘマトクリット値においても3Log程度の不活化が確認された。今年度は、シンドビスウイルスよりも安定に二重

鎖DNAウイルスであるPRVを検討し、シンドビスウイルス以上の不活化効果を確認出来た。光学的な病原体の不活化では、二重鎖DNAを有するウイルスに不活化効果が弱いことがこれまで報告されているが、この物質は従来にない不活化の活性を示した。また、濃度が $20\mu\text{g/mL}$ と $30\mu\text{g/mL}$ とでは不活化効率が劇的に変わることから細胞毒性の検討が、今後重要になると思われた。

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PRVを効率良く不活化することができた。

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

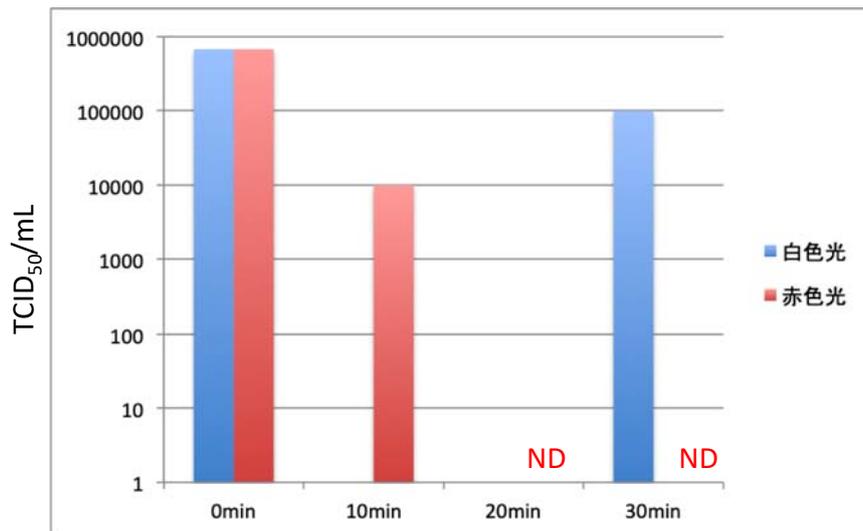
用、第 66 回日本輸血細胞治療学会学術集会、
2018/5/24、

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

フェオホルビド a による赤血球液における Pseudorabies virus の不活化



照射：20000 Lux
ヘマトクリット：40%
厚さ：4mm

ND: Not Detected

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ーウイルス除去膜ろ過工程における HEV の除去効果の検証ー』

分担研究者 前野英毅（一般社団法人 日本血液製剤機構 中央研究所）

研究協力者 高橋一恵、浦山健、井手野祥次、井上隆昌、服部眞次（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、リバーシ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。

A. 研究目的

略語； HEV: Hepatitis E virus. NaDCA: Deoxycholic acid sodium salt. TBS: Tris-Buffered Saline. LRV: Log Reduction Value.

献血者における HEV ゲノム陽性者は、8173～15075 人に 1 人である¹⁾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) を製造工程液に添加し、ウイルス除去・不活化効果を検証することが望ましいが、高濃度の 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る。

そこで、一般社団法人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^{2,3)}。

昨年度は pd-HEV と同様に脂質が結合した HEV をリバースジェネティクス法により培養上清中に約 9 Log copies/mL の高濃度で得られたこと、及び得られた HEV (RG-HEV) に各種の処理を行った場合の密度や抗体反応性から RG-HEV と pd-HEV は脂質の性状が異なる可能性があることを報告した。

本年度は、RG-HEV を用いてウイルス除去膜ろ過工程の除去効果を評価することの妥当性を検証し、血液凝固第 VIII 因子製剤・クロスエイト MC のプラノバ 20N

B. 研究方法

(1) ウイルス

RG-HEV は、PLC/PRF/5 細胞にブタ糞便由来の swJR-P5 株の合成ゲノムをトランスフェクションし、その培養上清中に産生された HEV を用いた (2017 年度分担研究報告書参照)。pd-HEV として HEV ゲノム陽性血漿、sw-HEV として swJR-P5 株をウイルス材料とした。

(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⁴⁾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 (TCID₅₀/mL) を算出した。

(4) HEV の NaDCA/T 処理

各 HEV を超遠心分離し (150,000×g、3 時間、4°C)、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6 で懸濁した。これらの懸濁液に対して NaDCA を終濃度 1%、Trypsin を終濃度 0.1% 加え、37°C で 2 時間インキュベーションした。また、陰性コントロールとして、50 mM Tris 緩衝液のみを加え 37°C で 2 時間インキュベーションした。

(5) ウイルス除去膜ろ過

各 HEV の大きさの比較

RG-HEV、pd-HEV 及び sw-HEV を氷冷下で 4 分間 2 回超音波処理後、0.22 µm フィルターでろ過した。これを終濃度約 5 Log copies/mL となるように TBS に添加し、その内 10 mL をプラノバ 20N (平均孔径 19 nm、膜面積 0.001 m²) 又はプラノバ 35N (平均孔径 35 nm、膜面積 0.001 m²) で室温、20 kPa でろ過を行い、ろ液 (Filtrate) を回収した。その後、10 mL の TBS で押し出し洗浄し、洗浄液 (Post wash) を回収した。ろ過前後の各サンプルを、2 U/mL の

Micrococcal Nuclease で 28°C 30 分間処理後、ゲノム濃度を測定した。

クロスエイト MC ・プラノバ 20N ろ過工程における HEV の除去効果

RG-HEV を氷冷下で 4 分間 2 回超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。これを最終約 8 Log copies/mL となるように血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC 製造工程中間液に添加し、0.22 μm フィルターでろ過後、その内 27 mL をプラノバ 20N でろ過した (室温、80 kPa)。ろ液を回収した後、実製造と同様に 10 mL の緩衝液で押し出し洗浄し、洗浄液 (Post wash) を回収した。ろ過前後の各サンプルの HEV 感染価を測定した。また、それぞれのサンプルを 0.8 U/mL の RNaseA で 37°C 30 分間処理後、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) 各 HEV の大きさ

RG-HEV を 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、RG-HEV 及び sw-HEV を TBS にスパイクし、プラノバ 20N と 35N でろ過した。その結果、sw-HEV はプラノバ 20N ろ液中からは検出されず、プラノバ 35N ろ液からは検出された。一方、pd-HEV と RG-HEV はいずれのろ液でも検出されず、それぞれ 35 nm 以上の大きさであることが推測できた (表 1、2)。pd-HEV や RG-HEV は、sw-HEV と異なり脂質が結

合しているが、血漿分画製剤製造工程であるアルコール分画や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理により、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、各 HEV を NaDCA/T 処理してプラノバ 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 もろ液では検出されず同様な除去効果であった (表 1)。また、プラノバ 35N では、pd-HEV と RG-HEV はろ液で同程度に漏れ出ていることから (表 2)、NaDCA/T 処理 RG-HEV は同処理 pd-HEV とほぼ同じ大きさであると推測され、ウイルス除去膜ろ過工程で pd-HEV の代わりとして使用することは妥当であると判断した。なお、sw-HEV は NaDCA/T 処理の有無に関わらず、プラノバ 35N ろ液に約 5 Log copies の HEV ゲノムが検出され、比較した HEV の中で一番小さいウイルスであると推測された。

(2) クロスエイト MC ・プラノバ 20N ろ過工程における HEV の除去効果

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。このウイルスをクロスエイト MC の実製造から抜き取った工程液に添加し、プラノバ 20N ろ過を行った (n=2) とし、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ことが確認された (表 3)。

D. 考察

血漿分画製剤製造工程に混入する可能性のある HEV は血漿由来で、場合によっては S/D 処理などに

より脂質が除去された状態となる。ただし、製造工程ではトリプシンによる消化を受ける可能性は低い
ため、NaDCA/T 処理した RG-HEV はウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果を評価するためのワーストケースのモデルウイルスとして適している。また RG-HEV は高濃度であり、血漿分画製剤のウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果を評価する上で有用である。

E. 結論

NaDCA/T 処理した RG-HEV はウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果を評価する上でワーストケースのウイルスとして有用であった。このウイルスを用い、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 ろ過工程を評価したところ、感染価で 4 Log 以上の有効な除去効果を確認することができた。

(謝辞)

本研究の一部は筑波大学医学医療系生命医科学域環境微生物学 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):242-6.

- 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;11:679-85
- 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) 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.

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

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 (2018.10.2~10.4) 千葉

H. 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

表 1 緩衝液系でのプラノバ 20N ろ過実験結果

Sample	Genome(Log copies)															
	NaDCA/T -							NaDCA/T +								
	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV		
				#1	#27	#40					#1	#27	#40			
Virus-spiked material	5.4	5.4	5.3	6.0	6.2	6.0	6.5	5.9	5.9	5.9	6.1	5.9	5.6	6.4	6.5	6.6
Filtrate	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.4	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.4	<3.5
Post wash	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5

NaDCA/T はデオキシコール酸ナトリウムとトリプシンによる脂質膜除去処理を示し、-は処理を行っていない場合、+は処理を行った場合を示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の対数を表している。

表 2 緩衝液系でのプラノバ 35N ろ過実験結果

Sample	Genome(Log copies)															
	NaDCA/T -							NaDCA/T +								
	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV	RG-HEV			pd-HEV			sw-HEV		
				#1	#27	#40					#1	#27	#40			
Virus-spiked material	5.5	5.2	5.3	6.0	6.2	6.0	6.5	6.0	5.9	5.8	6.1	5.8	5.5	6.4	6.6	6.6
Filtrate	<3.5	<3.4	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	5.1	3.0	<3.5	3.5	4.0	<3.5	<3.4	5.2	5.1	5.1
Post wash	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	<3.5	5.3	4.2	<3.5	<3.5	4.3	2.9	<3.4	5.2	5.3	5.4

NaDCA/T はデオキシコール酸ナトリウムとトリプシンによる脂質膜除去処理を示し、-は処理を行っていない場合、+は処理を行った場合を示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の対数を表している。

表 3 クロスエイト MC 実製造工程液でのプラノバ 20N ろ過実験結果

Sample	Genome (Log copies)		Infectivity (Log TCID ₅₀)	
Virus-spiked material	9.3	9.3	6.9	6.5
Filtrate	<3.9	<3.9	<2.1	<2.1
Post wash	<3.4	<3.4	<1.6	<1.6
Filtrate+ Post wash	<4.0	<4.0	<2.2	<2.2
LRV	≥5.3	≥5.3	≥4.7	≥4.3

LRV 以外の数値はゲノム濃度 (copies/mL) または感染価 (TCID₅₀/mL) に液量 (mL) を乗じた数値 (総ゲノム量又は総感染価) の対数を表している。LRV は Virus-spiked material の総ゲノム量又は総感染価を Filtrate+Post wash の総ゲノム量又は総感染価でそれぞれ除した値の対数を表している。

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
	比嘉 由紀子	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	渡辺 護	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	前川 芳秀	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	今西 望	長崎大学熱帯医学研究所大学院・歯薬総合研究科
	小林 大介	日本医療開発機構（AMED）

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を選び、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。

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、その後も西日本を中心に患者が発生して

いる。2018年の患者数は77名となり、西日本の県から合計で397名の患者（うち死亡例は65）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SFTSウイルス抗体陽性の野生動物が確認され、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 SFTS ウイルスを媒介するマダニの種類は特定できていないが、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。

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、感染の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し、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、病原体も媒介マ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するが、主に大型の哺乳動物がマダニの吸血源となることが多く、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* (Qin et al., 2014) は、長崎県対馬市でも見つかっている (Fujita et al., 投稿準備中)、*Muko virus* (MUV) は長崎県 (Hayasaka et al., 2016) と兵庫県 (Ejiri et al., 2015) から、*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。

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 (Pichon et al., 2003, Estrada-Pena et al., 2005) の改良を行った。

B. 研究方法

マダニの採取

福井、石川および富山県内の渡り鳥飛来地の合計 6 地点 (輪島市、珠洲市、能登町、片野鴨池、津幡市および富山市のそれぞれ複数カ所を選定) でマダニ相の調査を行った。2018 年は 4~11 月の間に 1 回、フランネル法 (約 70 cmX100 cm の白い布で地面および植生の上を引きず

る方法)により各地点 30 分間、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 RLB 法を本邦産マダニ検出用に改良し、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。昨年度までに哺乳類 18 種、鳥類 10 種の検出を可能にしたが、本年度はさらに 5 種類の鳥類を検出できるプローブを追加し、鳥類共通プローブと鳥類種に特異的なプローブを組み合わせ、植生マダニの吸血履歴を探索した。

マダニからのウイルス分離および遺伝子検出

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、バイオフィ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

福井県、石川県および富山県の北陸 3 県の渡り鳥飛来地から、合計で 3 属 8 種 1,600 頭の植生マダニを採取した。キチマダニ (76.3%)、フタトゲチマダニ (16.1%)、ヤマトマダニ (4.9%) の順に多く採集されたが (図 1)、特に前 2 種は、山内 (2001)

によると、鳥類寄生例が多い種類のダニであった。片野鴨池および北潟湖においては、月毎の定期調査によって、主要なマダニ 4 種 (キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニおよびヤマアラシチマダニ) の季節消長も把握することができた。また、非常に近い距離にある調査地であっても、種構成が大きく異なることも示唆された。

採取した植生マダニからウイルス分離を行い、石川県加賀市および輪島市で採取されたキチマダニからフレボウイルス属の Kabuto Mountain virus (KAMV) が合計 3 株分離された (表 1)。輪島市においては、キチマダニから Okutama tick virus (OKTV) および新規フラビウイルスの遺伝子が、フタトゲチマダニから新規のナイロウイルスの遺伝子がそれぞれ検出された。また、富山市採取のキチマダニからはコルチウイルス属の TarTV が分離された。NGS 解析により、この他にも新規のイフラウイルス、レオウイルス、ブニヤウイルス、ノダウイルス、パルチチウイルス、未分類のウイルス等、複数の新規および未分類のウイルス遺伝子を検出することができた。

我々はこれまでに、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に応用し、さらに、新たにプローブを設計し、昨年度までに哺乳類 18 種、鳥類 10 種の検出を可能にした。そこで、本年度はさらに 5 種類の鳥類を検出できるプローブを追加し、鳥類共通プローブと特異的プローブを組み合わせ、動物種由来の DNA を検出した。予備的に試験した広島県産のマダニ合計 124 頭の 61% (78/124 頭) が鳥類プローブに反応し、鳥類特異的プローブにより、

アカコッコマダニの若虫 1 頭がスズメ目のトリを吸血した履歴があることが示唆された (図 2)。哺乳類では、アナグマ、タヌキ、ニホンジカ、テンが吸血されていたと推察された。今後は、マダニ採集地の野生動物の生息状況と照合すると同時に、2017 年石川県採取のマダニの解析を順次進める。

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。KAMV、TarTV、OKTV は、北陸地方からは初報告であり、これらのウイルスは日本各地に広範囲に分布していることが示唆された。

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が、山内 (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)、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が (Fujita et al., 2017)、本結果では、さらに石川県の 2 地域 (加賀市、輪島市) から同一ウイルスが分離された。

本年、新たに石川県内のキチマダニから分離された 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

との地理的な関係が興味深い。また、TarTV においては、九州、山陰、北陸、東北地方に至る国内各地に点在するという分布の特徴、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。また、27 種類の鳥類への寄生例が報告されたアカコッコマダニ (山内, 2001) からは MUV が分離されており (Ejiri et al., 2015)、鳥類に関わるウイルスとして、今後注目すべきウイルスと考えられる。

本研究で導入した NGS 解析により、マダニは上記ウイルスに加え、複数の新規および未分類のウイルス遺伝子 (イフラウイルス、レオウイルス、ブニヤウイルス、ノダウイルス、パルチチウイルス等) を保有していることが明らかになった。野外のマダニが多数のウイルスを保有していることが示唆され、これまで使用してきた汎用性の高い培養細胞ではこれらウイルスを分離することが難しかったと推察された。今後、NGS 解析の利用はマダニ媒介性ウイルスを対象としたサーベイランスに貢献すると思われる。

今回、15 種類の鳥類を検出可能な共通プローブと種特異的なプローブをそれぞれ作製する等、RLB 法による検出法を改良し、広島県産のマダニではあったが、植生マダニが鳥類を吸血した履歴が確認された。今後は、鳥類と哺乳類の両者とマダニとの接点を考慮し、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。

本調査は、加賀市鴨池観察館のご理解とご協力により実施された。

E. 結論

1) 石川県および富山県の渡り鳥飛来地でマダニ相の調査を行い、季節消長、種

構成を把握した。

2) 採取されたマダニをウイルス分離および NGS 解析に供した結果、KAMV および TarTV、OKTV が分離されたが、それ以外にも複数の新規および未分類のウイルス遺伝子が検出された。

3) 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が明らかになった。

4) マダニの吸血源動物を推定するために、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った

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

小林大介, 伊澤晴彦, 室田勝功, 糸川健太郎, Astri Nur Faizan, Michael Amoa-Bosompem, 津田良夫, 林利彦, 金京純, 渡辺護, 岩永史朗, 沢辺京子. 重要疾病媒介蚊の RNA ウイルス叢およびその季節的・地理的变化に関する研究. 第 70 回日本衛生動物学大会, 2018 年 5 月, 帯広市

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

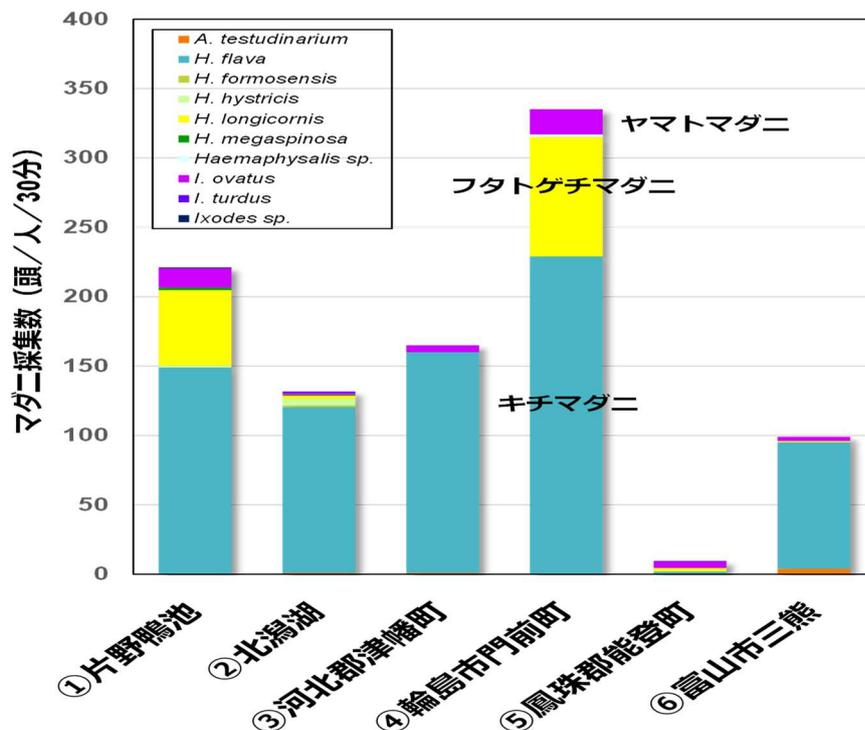


図 1 2018 年北陸 3 県の渡り鳥飛来地のマダニ相

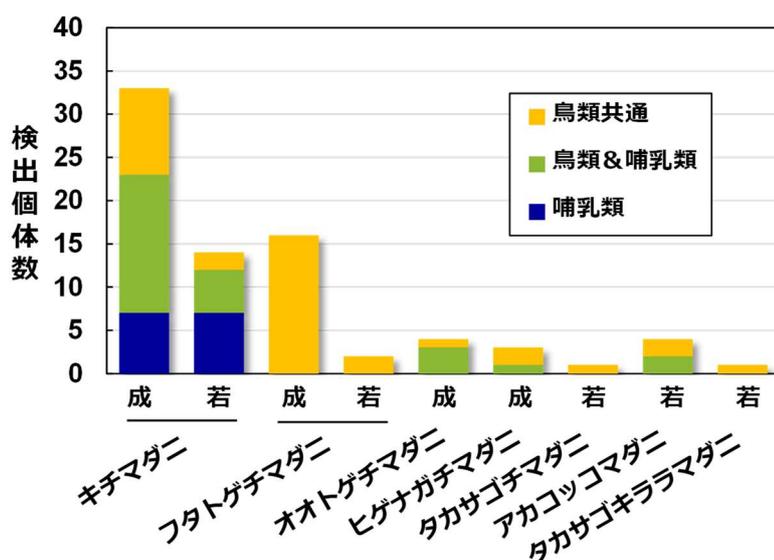


図2 RLB法によるマダニからの吸血源動物の探索

表1 渡り鳥飛来地で採集されたマダニから分離・検出されたウイルス

ウイルス	ウイルス科・属	株	ウイルス分離 / 遺伝子検出	マダニ種	マダニ採集地	マダニ採集日
Kabuto mountain virus (KAMV)	フェヌイウイルス科・ フレボウイルス属	17ISK-T11	分離	キチマダニ	石川県加賀市	2017年10月
		18HKR18	分離	キチマダニ	石川県加賀市	2018年5月
		18HKR66	分離	キチマダニ	石川県輪島市	2018年5月
Tarumizu tick virus (TarTV)	レオウイルス科・ コルチウイルス属	17TYM-T2	分離	キチマダニ	兵庫県西宮市	2009年10-12月
			¹⁾ 分離	キチマダニ	富山県富山市	2017年10月
			²⁾ 分離	キチマダニ	鹿児島県垂水市	2013年7月
			²⁾ 分離	キチマダニ	鳥取県米子市	2013年10月
			²⁾ 分離	キチマダニ	福島県相馬市	2013年11月
Okutama tick virus	フェヌイウイルス科・ フレボウイルス属	17ISK-T8	遺伝子検出	キチマダニ	石川県輪島市	2017年10月
			³⁾ 遺伝子検出	キチマダニ	東京都青梅市	2015-2016年
新規フラビウイルス	フラビウイルス科・ フラビウイルス属	18HKR14	遺伝子検出	キチマダニ	石川県輪島市	2018年5月
新規ナイロウイルス	ナイロウイルス科・ 未帰属	18HKR70	遺伝子検出	フタトゲチマダニ	石川県輪島市	2018年5月
新規イフラウイルス	イフラウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	キチマダニ	富山県富山市	2017年10月
新規イフラウイルス-2	イフラウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規レオウイルス	レオウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規ブニヤウイルス	未分類		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規ノダウイルス様 ウイルス	未分類		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
新規バルチチウイルス	バルチチウイルス科・ 未帰属		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年
Ixodes scapularis associated virus 2 様ウイルス	未分類		遺伝子検出	未同定	石川県	2018年

これらのウイルスは ¹⁾Ejiri et al. (Virus Res., 2018), ²⁾Fujita et al. (Virus Res., 2017), ³⁾Matsumoto et al. (J. Vet. Med. Sci., 2018) で報告されている。

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：患者由来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 主任研究官)

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) の不活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、様々な条件下で不活化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、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 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。しかし、現在のところこの細胞を用いて HCV 感染者の HCV の顕著な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、十分な不活化工程が導入されてい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。

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 (遺伝子型 1b) の HCV では治療効果が上がらなかったが、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 型肝炎ウイルスには、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、2005 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レウイルスの不活化を評価する系を構築した。

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。また、これまでに肝臓細胞特異的に発現しているマイクロ RNA122 (miR122) は HCV の増殖に重要であることが知られている。更に、HCV 感染により活性化される宿主因子 RIG-I は HCV の感染防御に働くことが知られている。これらのことを考慮し、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 に加え、miR122 も発現し、かつ RIG-I が欠損した培養細胞を作製し、感染者由来の HCV が増殖する系を構築する。

B. 研究方法

1. RIG-I 欠損細胞の作製

種々の培養細胞 (ヒト肺がん細胞由来 NCI-H1915、ヒト絨毛癌細胞由来 JAR、及び胎児性がん細胞由来 NEC-8) に RIG-I 欠損用ガイド RNA (RIG-I Exon1, Dharmacon 社, #CM-012511-01-0002) と Cas9 発現 plasmid (Edit-R CRISPR-Cas9 Nuclease Expression Plasmid (Dharmacon 社, #U001000-120) をトランスフェクションし、Blasticidin でセレクションすることにより、RIG-I 欠損細胞を得た。それぞれ NCI-H1915 (Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I)、NEC-8 (Δ RIG-I) と命名。(研究代表者 岡田義昭氏により作製)

2. Sec14L2 が発現する、種々の RIG-I 欠損培養細胞の作製

昨年 (H29) 度報告した方法により Sec14L2 を発現する組換えレンチウイルスを作製(pSEC14L2/BlastR、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev、pMD2.G [各 plasmid に関しては以下参照] を 293T 細胞に同時トランスフェクションすることにより得た) し、これを 1 で作製した RIG-I 欠損培養細胞 (NCI-H1915 (Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I)、NEC-8 (Δ RIG-I)) に感染させ、Blasticidin でセレクションすることにより、sec14L2 が発現する細胞を得た。なお、この組換えレンチウイルスには tGFP も組み込まれており、tGFP の発現が sec14L2 の発現の指標として用いることが出来る。各細胞の tGFP の発現を調べた (図 1)。

その結果、tGFP の発現は、NCI-H1915 (Δ

RIG-I)、JAR (Δ RIG-I) では、それぞれ全体の細胞の 44、及び 3.7%であった。また、tGFP 高発現の NEC -8 (Δ RIG-I) 細胞は数代しか継代出来なかった。

従って、以降の実験では NCI-H1915 (Δ RIG-I) に Sec14L2 が発現する細胞 (NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2 と命名) にのみに miR122 を導入した。

3. miR122 RNA の前駆体遺伝子が組み込まれた組換えレンチウイルスの作製

レンチウイルスベクター plasmid: pLV [has-miR-122] (BIOSETTIA 社) には、EF1 α promoter 下に pre-miR122 遺伝子と赤色蛍光を発する fluorescent puromycin 耐性タンパク質をコードする遺伝子とがクローニングされている。この plasmid から miR122: UGGAGUGUGACAAUGGU GUUUGU 遺伝子が発現される。この plasmid, pLV [has-miR-122] 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、細胞上清から pre-miR122 が組み込まれた組換えレンチウイルスを得た。なお、この組換えレンチウイルスは HIV-1 のゲノム遺伝子が 4 種類の plasmids に別々にクローニングされているため、一回のみの細胞

への感染が可能である。

4. miR122 が発現する、NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2 細胞の作製

作製した miR122 発現組換えレンチウイルスを、これまでに得た NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2 細胞に感染させ、1 日後、puromycin (最終濃度 1.0 μ g/mL) を加え、薬剤によるセレクションを行なった (Blasticidin (最終濃度 10 μ g/mL) も常時添加)。また、得られた細胞は tGFP、及び Fluorescent puromycin 耐性タンパク質が発現しているかを蛍光により確認した (図 2)。作製した培養細胞を NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 と命名。

5. 作製した培養細胞への感染者由来 HCV の感染

作製した NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 培養細胞に HCV 感染者由来血漿 (A, B の 2 種類、HCV RNA コピー数: 2×10^7 IU/mL) を加え、HCV が増殖するかを HCV コア蛋白質の免疫染色法と HCV ゲノム RNA の検出により確かめた。なおコントロールとして JFH-1 株もこの細胞に感染させた。

免疫染色に用いた抗体は anti-HCV core antigen monoclonal antibody (MA-080, Thermo Scientific, IL)、蛍光二次抗体には Alexa Fluor 488 (#A11001, Thermo Scientific, Tokyo) を用いた。核の染色には DAPI

(#340-07971, 和光純薬、Osaka)を用いた。

また、HCV ゲノム RNA の検出には、患者由来 HCV を感染後、4、及び6 日後の細胞を RNA 抽出キット (RNA purification kit; EX-R&D) により HCV RNA を精製し、10 倍ずつ段階希釈 (10^0 - 10^{-3}) し、逆転写反応を 50°C、30min で行い、生成された cDNA を二種類の HCV 特異的 primers (sense: nt 45-64, antisense: nt 265-246; 数字は HCV JFH-1 ゲノム RNA の 5'末端からの塩基番号)を用いて PCR により増幅し、その産物を 2% agarose gel にて分離した。

(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. Sec14L2 -miR122 発現細胞の 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 NCI-H1915

(Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I)、及び NEC-8 (Δ RIG-I) 細胞 (それぞれ NCI-H1915 (Δ RIG-I)-Sec14L2、JAR (Δ RIG-I)-Sec14L2、及び NEC-8 (Δ RIG-I)-Sec14L2 と命名) を得た。tGFP の発現は、NCI-H1915 (Δ RIG-I)、JAR (Δ RIG-I) では、それぞれ全体の細胞の 44、及び 3.7%であった (図 1)。また、NEC-8 (Δ RIG-I)-Sec14L2 細胞 tGFP の発現は 55%であったが、数代しか継代出来なかった (data not shown)。なお、昨年度報告した Huh7.5.1-Sec14L2 での tGFP の発現は 30%であった (図 1、昨年度の結果)。

2. NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞での tGFP、fluorescent puromycin の発現

作製した RIG-I 欠損、Sec14L2 かつ miR122 発現 NCI-H1915 細胞での tGFP (Sec14L2 発現の指標) と fluorescent puromycin (miR122 発現の指標) とを調べた結果、それぞれ細胞全体の 50%の細胞でそれぞれ発現していた。その細胞で、tGFP と fluorescent puromycin が同時に発現している細胞は 6.5%であった (図 2)。

3. NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞への感染者由来 HCV の感染

NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞に HCV 感染者由来血漿 A、及び B (共に HCV RNA コピー数として 2×10^6 IU)、

及びコントロールとして JFH-1 (感染価 2×10^4) を感染させ、4、及び6日後に細胞内の 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 (data not shown)。

そこでこの感染細胞の HCV RNA 量を調べた (図3) ところ、患者血漿 A においてわずかながらの HCV RNA 量の増加が認められた (図3)。

D. 考察

1. HCV の感染阻害に重要な働きをする RIG-I が欠損し、かつ HCV 感染に重要な宿主因子 Sec14L2、及び miR122 を発現する NCI-H1915 (Δ RIG-I) -Sec14L2-miR122 細胞を作製した。この細胞に HCV 感染者由来の血漿を感染させたが、HCV コアタンパク質の発現を確認出来るほどまでには HCV が増殖しなかった。しかし、感染者由来血漿 A では、HCV RNA がわずかながらの増加 (感染時の HCV RNA 量に比べ多くても 10 倍の増加) が見られた (図3)。作製した細胞の 6.5%が、tGFP (Sec14L2 発現の指標) と fluorescent puromycin (miR122 発現の指標) とが同時に発現するのみなので、今後、tGFP と miR122 が同時発現する細胞をクローニングすることにより、感染者由来血漿の HCV がより良く増殖させることが期待できる。

2. 作製した細胞では、JFH-1 の増殖が見られなかったが (図3)、JFH-1 は Sec14L2 の発現に依存しないという報告があり、そのことを示しているのかも知れない。実際、JFH-1 が効率よく増殖する Huh7.5.1 細胞では、Sec14L2 をウエスタンブロッティング法では検出出来なかった (data now shown、及び昨年度の報告書の図2参照)。

E. 結論

感染者由来 HCV を培養細胞で増殖するために、RIG-I 欠損、かつ Sec14L2 蛋白質と miR122 RNA を発現する培養細胞を作製したが、今のところ、ウイルスタンパク質の発現が確認できるレベルの HCV の増殖は見られていない。今後、tGFP と miR122 とが同時発現する細胞をクローニングし、その細胞を用いて感染者由来 HCV の増殖を試みる予定である。

G. 研究発表

(ア) 論文発表 : Suzuki, R, Matsuda M, **Shimoike, T.**, Watashi, K, Aizaki H, Kato T, Suzuki T, Muramatsu M, Wakita, T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 2019 *Virology*, 529 226-233.

(イ) 学会発表 : なし

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. Sec14L2が導入された細胞のtGFPの発現

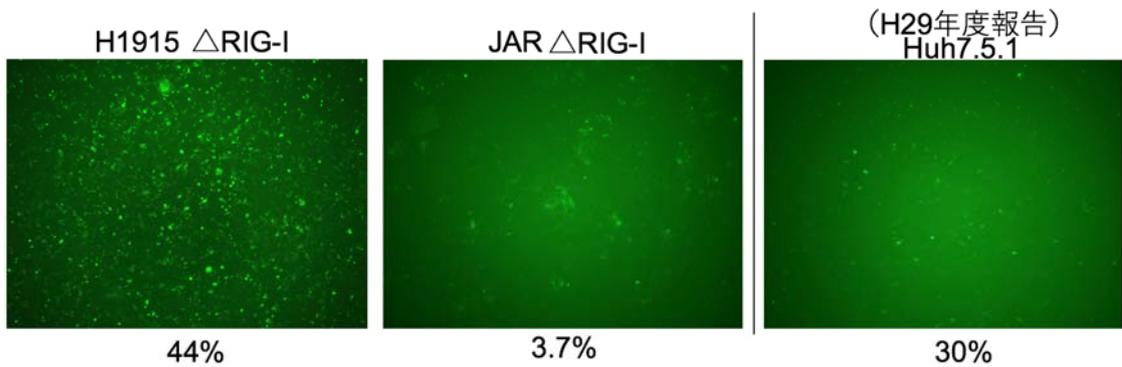


図2. NCI-H1915 (ΔRIG-I)-Sec14L2-miR122細胞

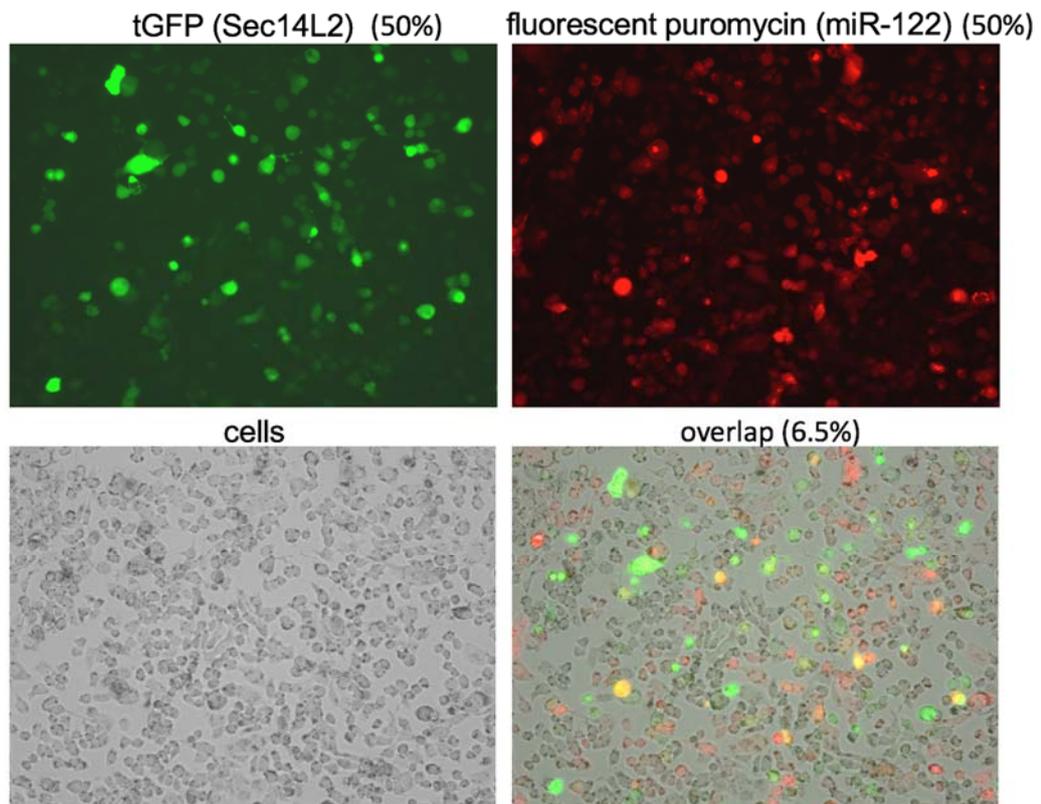


図3. 患者由来HCVの増殖



新興感染症発生時の献血対応に関する研究

研究分担者 平 力造（日本赤十字社 血液事業本部）

研究協力者 篠原 直也、蕎麥田 理恵子、大和田 尚、松林 圭二（日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所）

研究要旨

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（ジカウイルス、デングウイルス及びチクングニアウイルス）への対策として、リスク分析等を行い、その安全対策を検討した。その中でジカウイルスについては、感染した場合に胎児へのリスクのある妊婦の輸血実態調査を行った。さらには、その他の新興・再興感染症の検査系の準備を進めた。

また、輸血用血液製剤（赤血球製剤・血小板製剤）の保管期間中にデングウイルスが増殖することが報告されているため、近縁ウイルスであるジカウイルスの動態について評価を行った。

A. 研究目的

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（ジカウイルス、デングウイルス及びチクングニアウイルス）への対策として、リスク分析等を行い、その安全対策を検討した。その中でジカウイルスについては、感染した場合に胎児へのリスクのある妊婦の輸血実態調査を行った。さらには、その他の新興・再興感染症の検査系の準備を進めた。

また、輸血用血液製剤（赤血球製剤・血小板製剤）の保管期間中にデングウイルスが増殖することが報告されているため、近縁ウイルスであるジカウイルスの動態について評価を行った。

措置及び国内の対応について、WHOのガイドランスやAABBのファクトシートを参考に作成する。

イ 対応手引き（案）の作成

蚊媒介ウイルス感染症の発生状況別に分類し（「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」を参考）、分類ごとにとりまとめ対応手引き（案）を作成する。

ウ その他

・献血会場における掲示物の掲示、献血者への対応及び献血後情報への対応等については、同感染症の国内外の発生状況等を確認したうえ、リーフレット（案）等を作成する。

・蚊媒介ウイルス感染症の問い合わせ用Q&A（案）を作成する。

・ジカウイルスの国内感染発生時の「ZIKV 陰性血液の供給手順（案）」を作成する。

(2) 本邦における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

B. 研究方法

1. 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

(1) 対応手引き（案）の作成等

ア ファクトシートの作成

デング熱、ジカウイルス感染症、チクングニア熱及び麻疹（はしか）について、疫学、症状、感染経路、輸血感染、海外

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。）の実施状況について、厚生労働省委託事業「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、新規項目を作成し調査依頼を行った。

(3) その他のウイルスの検査系の準備

ア 風疹ウイルス

風疹参照RNA（国立感染研より分与）を用いて検出感度の評価を行った。方法は国立感染症研究所の検査マニュアルに従って実施した。

イ 麻疹ウイルス

麻疹参照RNA（国立感染研より分与）と弱毒性麻疹ウイルスワクチン（シュワルツFF-8株）を用いて検出感度の評価を行った。日赤中研法の評価を行った。方法は国立感染症研究所の検査マニュアルに従って実施した。

ウ ウツスウイルス

合成RNA（IDT社 Ultramer RNA）を用いて検出感度の評価を行った。方法はB. Nikolayらの論文を参考とした。

2. ジカウイルスの輸血用血液製剤中の動態評価

血小板製剤（N=3）と赤血球製剤（N=3）にジカウイルス（ $7.34 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ を 約2mL）をスパイクし、それぞれの保存期間中の影響について、ウイルスRNA濃度（リアルタイムRT-PCR：TaqManプローブ法）と感染力価（プラークアッセイ）から評価した。なお、対照として生理食塩液を用いた。

(倫理面への配慮)

倫理審査を受け、血液製剤の使用についての承認を得ている。（倫理審査番号：2018-017）

C. 研究結果

1. 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

(1) 対応手引き（案）の作成等

ア ファクトシートの作成

最新の情報を収集して「蚊媒介ウイルス感染症にかかるファクトシート」を作成した。

イ 対応手引き（案）の作成

上記ファクトシートを参考として蚊媒介ウイルス感染症の国外及び国内の発生状況を、発生状況別に5つのレベルに分類し、それぞれの分類に応じて「蚊媒介ウイルス感染症への対応」（別添）のとおり対応する。

※レベル分類

レベル1（平常時）	国外流行情報なし
レベル2	国外流行情報あり
レベル3	国内感染発生あり（地域未特定）
レベル4	国内感染発生あり（地域特定）
レベル5	国内感染発生あり（パンデミック）

なお、国外（海外）の感染症流行情報は、海外感染症発生情報（厚生労働省検疫所 FORTH）<https://www.forth.go.jp/topics/fragment1.html>、海外安全ホームページ（感染症危険情報）

<https://www.anzen.mofa.go.jp/>、感染症発生動向調査 週報（IDWR）（国立感染症研究所）

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>より入手する。

ウ その他

- ・ 献血会場における掲示物の掲示、献血者への対応及び献血後情報への対応

等については、同感染症の国内外の発生状況等を確認したうえで、リーフレット（案）等を作成した。

- ・蚊媒介ウイルス感染症の問い合わせ用Q&A（案）を作成した。
- ・ジカウイルスの国内感染発生時の「ZIKV 陰性血液の供給手順（案）」を作成した。

(2) 本邦における妊婦輸血の現状調査

平成29年に妊婦（分娩時以外）への輸血経験のある医療機関は、8,357施設中88施設（1.05%）で、実患者数は667名であった。本調査の病床別の回収率とそれぞれの質問項目の回答率から補正した結果、妊婦（分娩時以外）への輸血経験のある医療機関は1年間に約100施設で、実患者数は約700人と計算された。製剤別の輸血本数は、赤血球製剤は約900本、血小板製剤は約200本及び血漿製剤は約600本であり合計約1,700本と試算された。

(3) その他のウイルスの検査系の構築

ア 風疹ウイルス

風疹参照RNAをDWにより多段階希釈して、95%検出感度を算出したところ、35.7 copies/rxn (95% confidence interval, CI 15.8~369.7 copies/rxn)であった。

イ 麻疹ウイルス

麻疹参照RNAをDWにより多段階希釈して、95%検出感度を算出したところ、10.4 copies/rxn (95% CI 2.6~41.5 copies/mL)であった。弱毒性麻疹ウイルスワクチンをDWにより多段階希釈して、95%検出感度を算出したところ、26.9 copies/rxn (95% CI 11.0~240.1 copies/mL)であった。

ウ ウツスウイルス

合成RNAをDWにより多段階希釈して、95%検出感度を算出したところ、995.4 copies/rxn (95% CI 432.5~3,396.5 co

pies/rxn)であった。

2. ジカウイルスの輸血用血液製剤中の動態評価

血小板製剤の保存期間（0日目～7日目）のジカウイルスRNA濃度と感染力価を評価したところ、共に減少していた。しかしながら、対照（生理食塩水）と比較すると、減少率が低い傾向であった。

赤血球製剤の保存期間（0日目～42日目）のジカウイルスRNA濃度と感染力価を評価したところ、共に減少していた。生理食塩液（対照）と比較しても大きな差はなかった。

D. 考察

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（ジカウイルス、デングウイルス及びチクングニアウイルス）への対策として、ファクトシートを作成し、リスク分析等を行い、その安全対策を検討し国外及び国内の発生状況を考慮した、安全対策について日赤に対応手引き案として作成した。その対応手引き案として、国外における当該ウイルスによる流行情報の有無、国内での感染状況が確認された場合の感染地域の特定状況別を考慮した「蚊媒介ウイルス感染症への対応（案）」（献血者への対応、献血血液の対応及び医療機関への対応）を策定した。

妊婦への輸血の実態調査から、年間約700名の患者に約1,700本の輸血用血液製剤が使用されていることが推定された。このため、ジカウイルスの国内感染が確認された場合の対策として、ジカウイルス陰性血液の確保について、安定的かつ効率的に供給可能となるように日本輸血・細胞治療学会等と情報共有しジカウイルス陰性血液ストック又は予約注文による対応を検討中である。また、今回の調査では、日赤内部の医師への事前調査より、本邦における妊婦輸血については、極力行わないことが慣例となっており、経験がないとする医師が大多数であったこ

とから、その実態を正確に把握するために調査の在り方から検討する。

今回検討した風疹ウイルスと麻疹ウイルスの核酸検査系の感度は十分であったことから、両ウイルスに対する準備は行えた。ウスツウイルスに関しては、献血血液のスクリーニング NAT の検出感度と比較して十分な感度ではなかったため、さらなる高感度化の検討が必要であると考えられる。

ジカウイルスは、血小板製剤と赤血球製剤の保存期間中において、ウイルス RNA と感染力価共に、デングウイルスのような増殖は認められなかった。しかしながら、血小板製剤においては、生理食塩液(対照)と比較すると、ウイルス RNA と感染力価共に減少率が低い傾向であったため、少なからず製剤中でウイルスが維持されている可能性が考えられた。

E. 結論

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（ジカウイルス、デングウイルス及びチクングニアウイルス）への対策として、対应手引き案を作成した。今後見込まれる観光目的や2020年東京オリンピック・パラリンピック競技大会に向けての様々な国からの訪日客の増加及び同感染症の輸入例の増加に対して、国内感染発生時等における対応について万全を期すため、日赤内の血液センターに、対应手引き案を周知する予定である。

妊婦への輸血の実態調査から、年間約700名の患者に約1,700本の輸血用血液製剤が使用されていることが推定された。このため、ジカウイルスの国内感染が確認された場合の対策として、ジカウイルス陰性血液の確保について、検討を進める。

今回検討した風疹ウイルスと麻疹ウイルスの核酸検査系の感度は十分であったが、今後、ウスツウイルスに関しては、陽性検体の確保も含め検出感度の向上を検討していく必要がある。

F. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

① 特許取得

特になし

② 実用新案登録

特にナシ

③ その他

特にナシ

蚊媒介ウイルス感染症への対応

レベル	基本対応	追加対応	
		ジカウイルス	その他ウイルス（デング、チクングニヤ）
レベル1 （平常時） 国外流行情報なし	【問診】 ・「今日の体調は良好ですか。」（質問1） ・「海外から帰国（入国）して4週間以内ですか」（質問14） ・「1年以内に（ヨーロッパ・米国・カナダ以外）に滞在しましたか？」（質問15） ・「6カ月以内に次のいずれかに該当することがありましたか。」（質問20） 【献血者配布文「お願い」】 「ジカウイルス感染症（ジカ熱）と診断され、治癒後1カ月間を経過していない方」	【本部対応事項】 ・血液対策課への情報提供 ・日本輸血・細胞治療学会、関連学会への情報提供 ・医師会等への情報提供	【本部対応事項】 ・血液対策課への情報提供 ・日本輸血・細胞治療学会、関連学会への情報提供 ・医師会等への情報提供
レベル2 国外流行情報あり	・レベル1の対応を徹底	① 献血者への周知（掲示物：国内未発生用） ・ジカウイルス感染症と診断され治癒後1カ月を経過していない方との性的接触後4週間経過していない方 ⇒ 献血辞退 ② 医療機関への事前周知の検討 ・ジカウイルスに関する情報、日赤の安全確保対策、陰性血の供給など	
レベル3 国内感染発生地域特定なし		③ 献血者への周知（掲示物：国内発生用（地域特定なし）） ・上記①の対応 ④ 献血後情報への対応 ・献血後14日以内の発熱等症候に係る健康情報の入手 ⑤ ZIKV陰性血液の供給検討	① 献血者への周知（掲示物：国内発生用（地域特定なし）） ・発熱、発疹等の症状のある方 ⇒ 献血辞退 ② 献血後情報への対応 ・献血後14日以内の発熱等症候に係る健康情報の入手
レベル4 国内感染発生地域特定あり	・レベル1の対応を徹底 ・非接触式体温計の使用（受付時の申告に対して）	⑥ 献血者への周知（掲示物：国内発生用（地域特定あり）） ・上記① & 特定地域に立ち寄り4週間経過していない方 ⇒ 献血辞退 ⑦ 献血後情報への対応 ・献血後14日以内の発熱等症候に係る健康情報の入手 ⑧ ZIKV陰性血液の供給検討	③ 献血者への周知（掲示物：国内発生用（地域特定あり）） ・上記① & 発生地域に立ち寄った方 ⇒ 献血辞退 ④ 献血後情報への対応 ・献血後14日以内の発熱等症候に係る健康情報の入手
レベル5 国内感染発生パンデミック		レベル4の対応 及び 国と協議し対応する。	レベル4の対応 及び 国と協議し対応する。

厚生労働科学研究費補助金
(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」
分担研究報告書

分担課題：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

研究要旨

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、科学的に考察する。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 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。

A.目的

本研究では、抗 HCV 抗体共存下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

れまででない理由について、科学的に考察することを目的としている。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、抗体共存下で HCV ウイルスの感染性がどのように移行するかを確認することを目的とし、まず精製したグロブリン画分を用いて、HCV JFH-1 株の新規感染抑制効果を確認した。

B 研究方法

1. HCV JFH-1am 株の調製

HCV JFH-1 クローンが発現するプラスミドを細胞 (Huh7.5.1 細胞、6 ウェルプレートの 1 ウェル) に試薬 PEI-Max (Polyscience 社) を用いて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 4.2×10^6 CCID₅₀/mL のものを実験に用いた。

2. HCV 抗体陽性ドナー血漿の譲渡

HCV 抗体陽性血漿は、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針」に基づく研究実施申請により許可を受けて、日本赤十字社より譲渡を受けた。H30 年度は、genotype が既知の HCV 抗体力価高値の検体を 5 検体譲渡された(表 1)。

3. HCV 陽血漿からの Cohn エタノー

ル分画法によるグロブリンの精製

血漿 20mL を 4°C でゆっくり融解し、4°C、16000xg で 25 分間遠心し、沈殿 (cryoprecipitate, クリオ) と上清 (cryo-supernatant, 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°C 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°C、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 (Fra. I フィブリノゲン画分) と上清 (S1) 画分とに分画した (Fra. I /S1 分画)。

次に、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°C 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°C、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 Fra. (II + III)P と上清 S (II + III) とに分画した。沈殿 Fra. (II + III)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°C 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°C 、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 P (II+III)w と上清 S (II+III) w とに分画した。沈殿 P (II+III)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°C 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°C 、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿 (P III) と上清 (S III) とに分画した。精製度はゲル濾過カラム 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。

4. HCV RNA 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。Thunderbird probe one-step kit (TOYOBO) を用いて定量した。HCV の核酸量は、HCV 国内標準品 (JCV-1B NO.122)を用いて定量し、国際単位 IU/mL で表した。

5. HCV 抗体の力価の測定

精製したグロブリン画分に含まれる HCV 抗体の力価は、HCV JFH-1 株が Huh7.5.1 細胞への感染抑制能で評価

した。2 倍ずつ段階希釈した抗体溶液と JFH-1 (2.0×10^5 CCID/mL, 1 ウェル当たり 1.0×10^4 CCID50) を混合して 37°C 、3 時間後に Huh7.5.1 細胞を添加して 3 日間培養した。感染の有無については、HCV コアタンパクに対する抗体を添加し、免疫蛍光染色により判定した。

C. 研究結果

1. HCV 抗体陽性ドナー血漿の譲渡およびグロブリンの精製

H30 年度の日本赤十字社より譲渡を受けた HCV 抗体陽性血漿 5 検体の核酸 RNA 濃度は、他所の施設間差はあるものの概ね一致し、 3.6×10^4 IU/mL から 2.2×10^7 IU/mL であった (表 1)。精製グロブリン中のグロブリン単量体は、全体の 93.6%から 97.8% であった。アルブミン混入率が最大で 2%程度であり、概ね綺麗に精製されていた。

2. HCV JFH-1 株の感染阻止を指標とした抗体の力価

精製したいずれのグロブリン分画についても、ドナーが感染していた HCV の genotype に関係なく HCV JFH-1 (gt2a) を新たに感染阻止する能力を有し、その力価は 64 倍から 1024 であり、この感染抑制力価の強さは、精製後のグロブリン濃度、ドナー検体 HCV-RNA 濃度、CLEIA 法によ

る力価とはいずれも相関しなかった。

D.考察

HCV 抗体陽性ドナー由来の精製グロブリンの HCV 感染抑制能は、これまで E1 および E2 を発現した virus like particle 用いての評価、チンパンジーを用いた評価の報告があるが、HCV 実ウイルスの感染抑制効果を有することを *in vitro* 系で確認したのは今回が初めてのことである。

今後は、これらの抗体共存化での、コーンエタノール分画における HCV 感染性の移行、核酸の移行について検討する予定である。

また、当岡田班での下池分担研究者が進めている SEC14L2 発現細胞での HCV 感染評価系が開発されれば、ドナー由来 HCV 株を用いて、評価ができるようになり、その有用性は高いと考えられる。

精製したドナー由来グロブリン中には、ドナーが感染を受けていた genotype 1b,2a,2b に対する抗体が含まれていると考えられるが、いずれのグロブリンも JFH-1 株(genotype 2a)

の感染を阻止できたことは非常に興味深い。

E.結論

HCV 抗体陽性ドナー由来の精製グロブリンの HCV 感染抑制能を、モデルウイルスではなく実ウイルスを用いて確認した。これらの評価はこれまでの製剤の安全性の評価、これからの製剤の安全性向上に貢献できると考えられる。

F.健康機器情報

G.研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. 特許取得

H.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

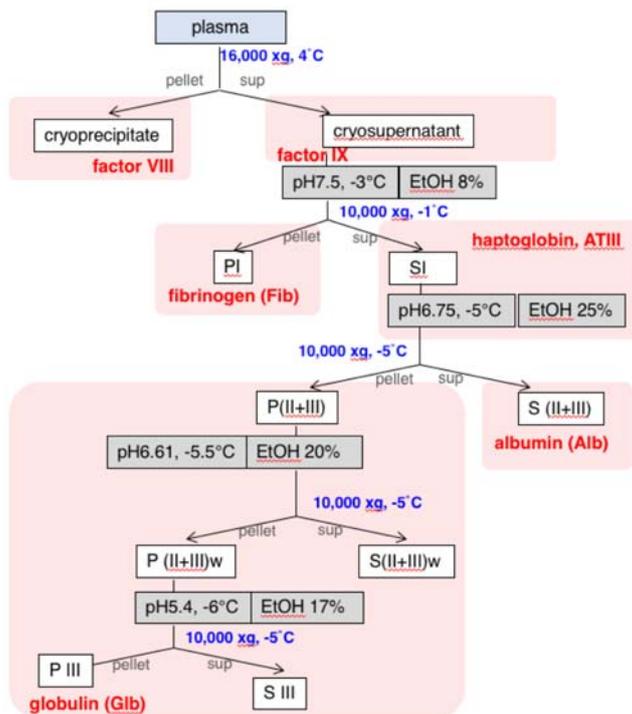


図1. グロブリンの分画

検体#	genotype	CLIEA (C.O.I.)	日赤測定 (IU/mL)	感染研測定 (IU/mL)	精製グロブリンタンパク濃度mg/mL
#1	gt1b	79.3	3.54E+04	3.64E+04	4.217
#2	gt1b	84.0	1.92E+05	6.70E+05	4.464
#3	gt2a	79.1	2.84E+05	7.01E+05	6.203
#4	gt2b	84.0	6.06E+06	2.15E+07	4.500
#5	gt2b	76.6	3.49E+05	1.19E+06	3.138

表 1. 日本赤十字社より譲渡された HCV 抗体陽性血漿

検体#	genotype	中和抗体価*
#1	gt1b	1024/2048
#2	gt1b	64/128
#3	gt2a	32/128
#4	gt2b	64/64
#5	gt2b	64/128

* HCV JFH-1 株の Huh7.5.1 細胞への感染を阻止できる最大希釈濃度

表 2. 精製グロブリンの力価

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）

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

近年東南アジアにおいても先天性ジカウイルス症候群の胎児が報告されており、タイおよびベトナムでは多くのジカウイルス感染症例が報告されている。したがって今後ともジカウイルス対策は必要である。これまでに我々はフラビウイルス共通プライマーを開発してきた。そこでジカウイルス感染症の重要な鑑別疾患であるデング熱の患者検体を用いてフラビウイルス共通プライマーとそのほかのデング熱実験室診断法をその病日ごとに比較検討した。その結果フラビウイルス共通プライマーは Taq-Mn RT-PCR 法と同程度の感度を各病日において示した。また抗デング IgM 補足 ELISA 法、抗デングウイルス IgG ELISA 法では第 1 病日、第 2 病日ではそれぞれデングウイルス特異的抗体は検出されなかったが、第 3 病日以降その検出率は上昇した。デングウイルス NS1 ELISA では第 1 病日よりその検出率は高く、その傾向は第 10 病日まで維持された。しかしながら NS1 ELISA の検出率は 50%~100% であり、他の検査法との併用が必要であることが示された。またフラビウイルス共通プライマーのジカウイルス MR766 株に対する反応性を検討したところ、フラビ共通プライマーによるジカウイルス遺伝子標的領域の増幅を確認した。フラビウイルス共通プライマーはジカウイルスを含むフラビ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に寄与することが示唆された。

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。フラビウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるウイルスの総称であり、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、デングウイルスなど約 70 種類のウイルスが

分類されている。その名称はラテン語で黄色を意味する flavus に由来し、その多くは節足動物により媒介されるアルボウイルスである。

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。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。ところでフラビウイルス感染症のうちジカ熱の鑑別疾患としてデング熱が挙げられる。デング熱はデングウイルスに感染することにより発症する蚊によって媒介される疾患である。デングウイルスはアフリカ、南アジア、東南アジア、中南米の熱帯、亜熱帯地域に分布するウイルスであり、1-4型の4つの異なるウイルス型が存在する。わが国では流行地からのデング輸入症例が年々増加傾向にある。また、2014年にはヒトスジシマカによって媒介されたデング熱の国内流行が発生した。

これまでに我々はフラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められるNS5領域にPCRプライマーを設計し、フラビウイルス遺伝子の増幅を検討した。その結果蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、デングウイルス、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス、さらにコウモリから分離されたフラビウイルスであるヨコセウイルスを検出することが可能なフラビウイルス共通プライマーを作

製した。しかしながらフラビウイルス共通プライマーを用いた検査法とその他の検査法についての比較は行われていない。またフラビウイルス共通プライマーのジカウイルスに対する反応性は不明である。そこでわれわれはフラビウイルス共通プライマーと他の検査法の比較をデング患者血清を用いて実施した。またフラビウイルス共通プライマーのジカウイルスに対する反応性を検討した。

B. 研究方法

ウイルスRNAの抽出と精製

ウイルスRNAの抽出と精製は、High pure viral RNA kit (Roche) を使用した。i) 200 μ Lの検体を1.5mlマイクロチューブに入れ、Working solution 400 μ Lを加え、ピペッティングでよく混和した。ii) 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 μ Lを注いだ。iii) 10,000回転、15秒間遠心した。iv) ろか液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500 μ LのInhibitor removal bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。v) ろか液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、450 μ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。vi) ろか液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450 μ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。vii) 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。viii) 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 μ LのElution bufferを加え、10,000回転、1分間遠心した。ix) 得られた精製RNAはすぐに使用しない場合は -80°C で保管した。

TaqMan RT-PCR 法

デング熱疑い患者血清から RNA を抽出した。デングウイルス特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法は伊藤ら (J. Clin. Microbiol. 42(12): 5935-5937, 2004) の方法により実施した。TaqMan RT-PCR 反応によるデングウイルス特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。

フラビウイルス共通プライマーを用いた RT-PCR 法

フラビウイルス共通プライマー-FVX7f および FVX12r を使用し RT-PCR キット, Access Quick RT-PCR System (Promega) にて行った。RT-PCR 終了後, 反応生成物 5 μ L を 2%アガロースゲル電気泳動 (100V, 約 30 分) を行い, エチジウムブロマイド溶液 (10mg/mL) に 20 分染色し, PCR によって増幅された DNA の断片を確認した。

抗デングウイルス IgM 補足 ELISA 法, 抗 IgG ELISA 法, NS1 ELISA 法

デング IgM 補足 ELISA (Focus 社), 抗デングウイルス IgG ELISA 法 (vircell 社), デングウイルス NS1 ELISA 法 (BioRad 社) をそれぞれマニュアルに従って実施した。

C. 研究結果

患者血清を用いた迅速診断法の評価

国立感染症研究所ウイルス第一部第二室で 2008 年から 2009 年にかけて実験室診断されたデング輸入症例患者血清を用いてフラビウイルス迅速診断法の評価を行った。患者血清を各病日ごとに分類し, フラビウイルス共通プライマーを用いた RT-PCR 法の結果と TaqMan RT-PCR 法, 抗デング IgM 補足 ELISA 法, 抗デングウイルス IgG ELISA 法, デングウイルス NS1 ELISA

法で得られた結果をそれぞれ比較検討した。その結果第 1 病日から 5 病日において, フラビウイルス共通 RT-PCR 法による検出率が高く, この傾向は TaqMan RT-PCR 法の結果と一致した (表)。また抗デング IgM 補足 ELISA 法, 抗デングウイルス IgG ELISA 法では第 1 病日, 第 2 病日ではそれぞれデングウイルス特異的抗体は検出されなかったが, 第 3 病日以降その検出率は上昇した。デングウイルス NS1 ELISA では第 1 病日検出率は 60%と高く, その傾向は第 10 病日まで維持された。しかしながら NS1 ELISA の検出率は病日により 50%~100%であり, 他の検査法との併用が必要であることが示された。

ジカウイルスに対するフラビ共通プライマーの反応性

ジカウイルス分離株 MR766 株より RNA を抽出し, フラビ共通プライマーの反応性を検討した結果, 目的増幅産物を観察し, フラビ共通プライマーによるジカウイルス遺伝子標的領域の増幅を確認した。

D. 考察

ジカウイルス感染症の鑑別診断として重要なウイルスにデングウイルスが挙げられる。これらウイルスはその分布域, 媒介蚊, およびその症状が同様であるため, その鑑別には実験室診断が必要である。これまでに我々はデングウイルスを含む様々なフラビウイルスを迅速に検出するためにフラビ共通迅速診断法を確立した。

本研究においては急性期から回復期のデング患者血清を用いてフラビ共通プライマーとその他のデングウイルスに対する実験室診断法を比較検討した。その結果

フラビ共通プライマーを用いた検査法とその他の実験室診断法を組み合わせることにより実験室検査の精度の向上が期待されることが示唆された。またフラビ共通プライマーのジカウイルスに対する反応性が確認されたため、今後本共通プライマーのジカウイルス実験室検査への適用を検討する。

E. 結 語

これまでに先天性ジカウイルス感染症の治療法は確立おらず、その予防対策が重要である。したがってジカウイルス流行時には血液製剤の安全性を確保するために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

特記事項なし

表. フライウイルス共通プライマーと各デングウイルス実験室診断法の検出率

病日	No. (%) of positive serum samples detected by:				
	フラビウイルス 共通プライマー	Taq-Man RT-PCR	IgM ELISA	IgG ELISA	NS1 ELISA
1	5/5 (100)	4/5 (80.0)	0/5 (0)	0/5 (0)	3/5 (60.0)
2	2/2 (100)	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)	2/2 (100)
3	6/9 (66.7)	7/9 (77.8)	5/9 (55.6)	6/9 (66.7)	7/9 (77.8)
4	7/9 (77.8)	4/9 (44.4)	9/9 (100)	4/9 (44.4)	8/9 (88.9)
5	6/12 (50.0)	4/12 (33.3)	10/12 (83.3)	9/12 (75.0)	11/12 (91.7)
6	2/4 (50.0)	0/4 (0)	2/4 (50.0)	1/4 (25.0)	2/4 (50.0)
7	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)	3/3 (100)	3/3 (100)
8—10	3/4 (75.0)	1/4 (25.0)	4/4 (100)	3/4 (75.0)	3/4 (75.0)
合計	33/48 (68.8)	24/48 (50.0)	32/48 (66.7)	26/48 (54.2)	39/48 (81.3)

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					

令和 元年 5 月 17 日

厚生労働大臣 殿

機関名 埼玉医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 別所 正美 印

次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医学部 准教授
(氏名・フリガナ) 岡田 義昭 (オカダ ヨシアキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	埼玉医科大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆子



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 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
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 昆虫医科学部・部長
(氏名・フリガナ) 沢辺 京子 ・ サワベ キョウコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
			審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口をチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

2019年4月3日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 日本赤十字社

所属研究機関長 職名 血液事業本部長

氏名 高橋 孝喜



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 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
- 研究課題名 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 日本赤十字社血液事業本部技術部安全管理課長
(氏名・フリガナ) 平 力造 (タイラ リキゾウ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

平成31年4月4日

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆宇



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) ウイルス第1部・室長
(氏名・フリガナ) 林 昌宏・イム チャンガン

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 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
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 国立感染症研究所・血液・安全性研究部・室長
(氏名・フリガナ) 大隈 和・オオクマ カズ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成 31 年 4 月 11 日

厚生労働大臣 殿

機関名 一般社団法人日本血液製剤機構

所属研究機関長 職名 理事、中央研究所長

氏名 脇坂 明美



次の職員の平成 30 年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 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
2. 研究課題名 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 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長
(氏名・フリガナ) 前野 英毅・マエノ ヒデキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年4月4日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆幸



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 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
- 研究課題名 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
- 研究者名 (所属部局・職名) ウイルス二部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 下池 貴志・シモイケ タカシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 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
- 2. 研究課題名 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
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 国立感染症研究所血液・安全性研究部 主任研究官
(氏名・フリガナ) 野島 清子 (ノジマキヨコ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。