

**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)**

**令和元年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 網田 義昭**

**(埼玉医科大学)**

**令和 2 (2020) 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 7-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-P14

3. 赤血球製剤の新規不活化法の開発

岡田 義昭 P15-P17

4. 感染者由来 C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

下池 貴志 P18-P23

5. 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

平 力造 P24-P27

6. 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 P28-P34

7. 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

比嘉 由紀子 P35-P40

8.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 P41-P47

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P48

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

総括研究報告書

輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための

新興・再興感染症の研究の開発

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

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

## 分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所  
室長

大隈 和 国立感染症研究所  
室長

前野 英毅 日本血液製剤機構  
中央研究所 室長

比嘉 由紀子 国立感染症研究所  
室長

下池 貴志 国立感染症研究所  
主任研究官

平 力造 日本赤十字社血液事業本部  
課長

野島 清子 国立感染症研究所  
主任研究官

## A. 研究目的

ヒトや物資の国際的な移動の急速な増加や地球温暖化のためにデング熱やジカ熱などの蚊媒介ウイルス感染症が東南アジアや中南米諸国で流行し、毎年輸入感染例が報告されている。これらのウイルスを媒介する蚊が国内に存在しているため国内でも発生する可能性があるが、5年ぶりに3例のデングウイルスの国内感染例が確認された。また、中国武漢で発生した新型コロナウイルス SARS-CoV-2 は、瞬く間に世界に拡散し多数の感染者が報告され、血液からのウイルス遺伝子が検出されたとの報告もあった。新興・再興感染症は血液製剤の安全性の脅威になるだけでなく、献血者の減少を招き安定供給に重大な支障をきたす。更にE型肝炎ウイルスに加えて重症熱性血小板減少症やダニ媒介脳炎などダニ媒介のウイルス感染症も広く国内に存在していることも明らかになっている。これらの病原体

は、いずれもウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。一方、血液製剤の安全対策上重要なC型肝炎ウイルス(HCV)は、未だ特殊な株以外に培養系がないので不活化法の評価には動物由来のモデルウイルスが使用されている。また、血液の病原体のスクリーニングは、安全性確保に有効であるが限界もある。感染リスクを小さくするためには血液製剤に有効な病原体不活化法の開発も重要である。本研究班では、これらの病原体を検出する検査法の開発と標準化、スクリーニング法の開発とその評価、赤血球製剤における病原体不活化、さらにHCVやE型肝炎ウイルス(HEV)の効率良い培養系の開発を実施し、血液製剤の安全性の向上と安定供給を目指す。

## B. 研究方法と結果

### 1) 血液製剤の安全性を確保するための蚊媒介性ウイルスのウイルス学的特性の解析

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

### 2) 血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

SFTSV に対する新規の高感度核酸検査法を開発するために、SFTSV のデータベースを基に大規模スクリーニング用のプライマーとプローブのセットをデザイン・作製した。プライマー-350 セットについて、SFTSV のゲノム RNA を用いてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (SYBR) を実施し、増幅効率の良い 12 セットを選定した。これらのセットを用いて健常者血漿由来の RNA を用いて非特異的増幅反応の有無を検索した。さらに一本鎖 RNA を合成し、低コピー段階希釈検体を作製し、PCR 系の絶対感度を評価した。また、日本由来と中国由来のウイルス株を用いてその感度を測定した。その結果、S-60 セットは、PCR 鑄型量を段階的に希釈し (100, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 cp/rxn)、感度を評価した結果、鑄型量 100, 20, 10 cp/rxn において検出率は 100%であった (8 重測定中 8 検出)。一方、鑄型量 5, 2.5, 1.25 cp/rxn においては、それぞれ検出率 88%, 75%, 38%であった。

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

### 3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

昨年度、クロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いてヘマトクリット 40%の赤血球液において仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies virus 以下 PRV) を用いて不活化効果を検討したが、今年度は臨床に使用されて赤血球液に近い条件としてヘマトクリット 55%、液深 10mm におけるシンドビスウイルスの不活化を検討した。濃度 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 2.3Log、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では 4.1Log の不活化効果が認められた。一方、5~40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までの濃度では細胞の増殖性に差は認められなかった。この物質

は、赤色光によって活性を示す性質があり、そのため赤血球に吸収され難いのでより深部まで到達でき、更に赤血球への障害が少ないものと考えられた。

### 4) 感染症の E 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究 (高濃度 E 型肝炎ウイルス (HEV) の産生と性状解析)

血漿分画製剤製造工程における HEV の除去・不活化効果を適切に評価することを目的に、リバースジェネティクス法により約 9 Log copies/mL の高濃度の HEV (RG-HEV) を取得した (2017 年度報告)。2019 年度はこの RG-HEV を用いて液状加熱工程における HEV の不活化動態を検証した。有機溶媒 / 界面活性剤 (S/D) 処理等で RG-HEV から脂質を除去すると、熱安定性はヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) と同様に低下し、RG-HEV も脂質の結合した状態が液状加熱処理のワーストケースであることが確認できた。

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

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

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

#### 5) マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

マダニ媒介感染症の予防には、マダニの生態や生理的な知見を得ることが重要であるが、野外における情報は限られている。主に大型の哺乳動物がマダニの重要な吸血源となるため、その移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられている。一方で、鳥類に寄生するマダニが海外から運ばれる可能性も指摘されていることから、本研究では渡り鳥の飛来地に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。2019 年は、北陸 3 県 ( 富山県・石川県・福井県 ) の渡り鳥飛来地の計 7 地点において、4 月～11 月に実施したフランネル法により、合計で 4 属 9 種 724 頭の植生マダニを採取した (2020 年 4～8 月時点)。キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、ヤマアラシチマダニの順に多く採取された傾向は、2018 年と同じであった。採取された植生マダニはウイルス分離および次世代シーケンサー (NGS) 解析に供した結果、KAMV、TarTV の既知のウイルス以外に 3 種類の新規マダニ媒介ウイルスが分離・検出された。国内の SFTS 浸淫地におけるマダニ相を比較した結果、地域によってマダニ相が異なることが明らかになり、SFTS のベクターは環境によって異なる可能性が高く、国内

の広範な地域に同一ウイルスが点在することも明らかになった。

#### 6) C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

血液製剤における C 型肝炎ウイルス (HCV) の不活化効率を明らかにするため、培養細胞で増殖させた HCV を血液製剤に添加して様々な条件で不活化の検討を行ってきた。これまで用いた HCV は唯一培養細胞で増殖出来る JFH-1 株であった。我々は、感染者由来の HCV 株の不活化法に対する感受性を評価するために HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 を様々な細胞株に発現させ、HCV の増殖性を検討してきた。今年度は、HCV の増殖に重要と報告されている肝臓細胞特異的に発現する miR122 (micro RNA 122) を発現し

ている FU97 細胞に Sec14L2 遺伝子産物を発現する細胞株

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

#### 7) 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症への対策のための各ウイルスについてリスク分析等を行い、国内感染が生じた場合の対応手引きを作成

し、日赤血液センターへの情報共有を行った。また、ウツスウイルスの高感度核酸検出系を構築した。さらに献血者由来の血清を用いてZIKAウイルスやウツスウイルスに対する感染中和能を評価し、国内発生した場合の血液製剤による感染リスクを推定する基礎資料とした。また、ジカウイルス感染によって小頭症等の異常が生じることが判明したので国内で妊婦輸血の現状を調査した。年間約700名の妊婦に約1,700本の輸血が使用されていることが判明したが、一部は分娩時に使用されている可能性があった。

#### ）実ウイルスを用いたエタノール分画法による血漿の分画とウイルスの不活化・除去と安全性の評価

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

グロブリン分画における移行について確認し、グロブリン製剤でのHCV等の感染の報告がこれまでにない理由について、科学的に考察している。今年度は日本赤十字社からHCV抗体陽性血漿の譲渡を受け、これらドナー血漿から精製したグロブリン画分がCLEIA法の力価と一致しないがHCV JFH-1株の新規感染を抑制する効果を有するかを確認した。これを用いてHCVの除去効率に与える影響について解析する予定である。

#### D. 考察

年間4000万人が日本を訪れるようにする政府の計画があり、海外から訪日する人数は毎年増加している。更に2020年のオリンピック・パラリンピックの開催、外国人労働者の受け入れなどが予定されている。そのような状況の中、中国で発生したSARS-CoV-2から血液製剤の安全性確保と安定供給のために急遽、血液のスクリーニング検査に応用できる高感度核酸増幅検査法の開発を行なった。本研究班は、新興・再興感染症が発生した場合に血液製剤へのリスクが予想される際には、すぐに対応できる感染症の各分野からの研究者から構成されている。今回も迅速に対応できたものと考えている。その一方で、国内に既に常在している病原体やそのベクターも放棄された農地などの拡大や野生動物の増加、更には温暖化等の要因などによって生存する地域が拡大し、従来よりもヒトが感染し易くなる可能性もある。このような状況の中で流行が生ずる前に病原体の性状や検出法の開発、さらには発生時の対応法を検討しておくことは、血液製剤の安全



性確保や安定供給に重要である。また、B型やC型肝炎ウイルスは感染系がなく、そのためにモデルウイルスを用いて安全性の評価を行なっている。HEVも *in vitro* の感染系はあるものの、安全性試験に必要な高力価の感染性を有する血漿ウイルスを十分に得ることは困難であった。この研究班では、効率的な培養系を確立するために分子生物学的手法を取り入れ高力価のウイルスを作成することに成功し、昨年のウイルス除去膜による除去に加えて今年度は液状化熱による不活化の評価を行い、血漿由来のHEVと相違がないことが確認できた。

#### E. 結論

新興・再興感染症等の脅威から血液製剤の安全性確保と安定供給のために蚊媒介ウイルス、SFTSウイルス、SARS-COV-2の検出法の開発を行い、国内発生を想定した対策手引書も作成した。ダニ媒介感染症の予防のために渡り鳥の飛来地でのダニの調査を行なった。また、分画製剤の安全性向上のためにHEV産生系の構築やHCV感染系の開発、血血球製剤の不活化法の研究を行い、新しい知見を得ることが出来た。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

近年南米だけでなく、東南アジアにおいても先天性ジカウイルス症候群が報告されており、今後ともジカウイルス対策は必要である。また 2019 年にはデング熱が南アジア、東南アジアにおいて大流行しており、我が国においても 3 例の国内感染例が 5 年ぶりに報告されたため、デングウイルス対策が求められる。血液製剤の安全性を確保するうえで問題となる蚊媒介性のフラビウイルスは複数存在するが、これらを迅速に検出することを目的としてこれまでにフラビウイルス共通プライマーを開発した。本研究では、フラビウイルス共通プライマーの TaqMan RT-PCR 法およびデングウイルス NS1 ELISA 法に対するそれぞれの比較検討をデング熱の患者検体を用いて行った。その結果、フラビウイルス共通プライマーのデングウイルス血清型特異的 RT-PCR 法に対する感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率はそれぞれ 94% (29/31), 71% (24/34), 74% (29/39) および 92% (24/26) であった。またデングウイルス NS1 ELISA 法に対してはそれぞれ 72% (34/47), 72% (13/18), 87% (34/39) および 50% (13/26) であった。フラビウイルス共通プライマーはジカウイルスおよびデングウイルスを含むフラビウイルス感染ドナー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

近年のグローバル化における人的交流および物流の活発化により、節足動物媒介性ウイルス(アルボウイルス)感染症の流行域の拡大が認められ、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。特に近年ではデング熱、ジカ熱、チクングニア熱、ウエストナイル熱等の流行域の拡大が問題となっている。

デングウイルス(DENV)は黄熱ウイルスやジカウイルス(ZIKV)、ウエストナイルウイルス(WNV)と同じ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であり、

DENV 血清型群に分類されるエンベロープを被った直径約 50nm の (+) RNA ウイルスである。ウイルス RNA には 3 種類の構造蛋白質(C, prM/M および E)と 7 種の非構造蛋白質(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B および NS5)がコードされている。

都市部における DENV の主な媒介蚊はネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)およびヒトスジシマカ(*A. albopictus*)である。これらの媒介蚊はデング熱(DF)の重要な鑑別疾患であるチクングニア熱(CHIKF)、ジカウイルス感染症(ZVD)、黄熱(YF)も媒介する。ヒトスジシマカはわが国にも生息す

る蚊で、世界の広い地域に分布しており、近年ではアメリカ、ヨーロッパ等においてもその生息域を拡大している。わが国においてもその分布域は北上しており、近年は青森県においてもその生息が確認されている。

世界保健機関(WHO)の推計では全世界で30億人がDF流行地域で生活しており、年間3億9千万人がDENVに感染し、9千6百万人が発症、うち2万4千人が死亡していると推計されている。DFの報告数も年々増加傾向にあり、世界におけるDF症例数は2008年には120万例、2010年は220万例、2016年には334万例を超えている。

DFは発熱、筋肉痛、発疹等を特徴とする熱性疾患である。発熱は6~7日間持続する。主な血液所見は血小板減少および白血球減少であり、ターニケット(駆血帯)テスト陽性、CRPは正常範囲内であることが特徴的所見である。感染者の20%~80%が不顕性感染である。重症デング熱(SDF)に移行すると、重度の皮下出血(点状出血、斑状出血)、血便、血尿、重度の血漿漏出、呼吸窮迫、肺水腫、肝障害、心機能障害、多臓器障害、脳炎、意識障害を呈し、ショック、消化管からの大量出血、脳内出血等により死に至る。

DFの流行地では、輸血や腎移植を介したドナーからレシピアントへのDENVの感染およびDFの発症がこれまでに報告されており、その対策が求められる。したがってDF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DFの鑑別疾患としてZVDが挙げられる。

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。そして蚊によって媒介されるDENV、ZV、WNV、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎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。また、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急性期においてTaq-Man RT-PCR法と同程度の検出率を示した。そこで本研究では、フラビウイルス共通プライマーのTaqMan RT-PCR法およびデングウイルスNS1 ELISA法に対するそれぞれの感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率をデング熱の患者検体を用いて検討した。

## 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。( ) 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。( ) 上清を捨て、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。( ) 上清を捨て、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。( ) 上清を捨て、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

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 で保管した．

#### TaqMan RT-PCR 法

Dengue 熱疑い患者血清から RNA を抽出した． Dengue 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 Dengue 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  $\mu$ 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．また得られた増幅産物は塩基配列解析により DENV 由来であることを確認した．

#### Dengue ウイルス NS1 抗原 ELISA 法

Dengue ウイルス NS1 ELISA 法 (BioRad 社) のマニュアルに従って実施した．

### C . 研究結果

#### フラビウイルス共通プライマーの TaqMan RT-PCR 法との比較検討

フラビウイルス共通プライマーの感度を検討するために DF 患者の血清 65 検体を用いて DENV 血清型特異的 Taq-Man RT-PCR 法に

対するフラビウイルス共通プライマーの感度，特異度，陽性的中率，陰性的中率を検討した．その結果，フラビウイルス共通プライマーの Dengue ウイルス血清型特異的 RT-PCR 法に対する感度，特異度，陽性的中率および陰性的中率はそれぞれ 94% (29/31)，71% (24/34)，74% (29/39) および 92% (24/26) ( $\kappa$  = 63%， $P < 0.00001$ ) であった．カッパ係数より統計学的に 2 つの検査法はかなり一致した．

#### フラビウイルス共通プライマーの Dengue ウイルス NS1 抗原 ELISA 法との比較検討

次にフラビウイルス共通プライマーの感度を検討するために DF 患者の血清 65 検体を用いて Dengue ウイルス NS1 抗原 ELISA 法に対するフラビウイルス共通プライマーの感度，特異度，陽性的中率，陰性的中率をそれぞれ検討した．その結果，フラビ共通プライマーの Dengue ウイルス NS1 ELISA 法に対する感度，特異度，陽性的中率および陰性的中率はそれぞれ 72% (34/47)，72% (13/18)，87% (34/39) および 50% (13/26) ( $\kappa$  = 49%， $P < 0.01$ ) であった．カッパ係数は 49% であり，2 つの検査法は適度に一致した．

これらの結果より，フラビウイルス共通プライマーは急性期の患者検体中の DENV 遺伝子を十分に検出可能であることが示唆された．

### D . 考察

感染症法により DF 症例の調査が 1999 年 4 月より開始され，1999 年に報告された DF 輸入症例はわずか 9 名であったが，その後国内の検査体制が整備されたこともあり，その輸入症例数は年々増加し，2019 年度は初めて 450 例を超えた．世界的にも Dengue ウイルス

の流行は拡大しており、特に2019年はフィリピンで約4229万人（死者1,565人）、マレーシアで約129万7千人（死者176人）、ベトナムで約312万人（死者54人）、ラオスで約3万8千人（死者70人）、シンガポールでは約1万5千人の患者が報告されている。こうした流行地域で、日本からの渡航者がDENVに感染するケースが増加傾向にある。また、2019年9月には、5年ぶりに国内において3例の国内流行が発生した。患者は京都と奈良を修学旅行で訪問した東京都内の生徒であった。患者がDENVに感染したと推定される期間に行動を共にした場所は、学校と修学旅行のみであり、修学旅行においては同一班で行動していた。今後も引き続き国内発生のリスクが存在するため、DFの国内流行について注意が必要である。

#### E．結論

これまでにDFあるいは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DF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。また国内流行

を速やかに検出する体制も重要となる。DFおよびZDVIは、感染症法上の4類感染症に指定されており、これらの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

論文発表

特記事項なし

学会発表

特記事項なし

#### H．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1．特許取得

特記事項なし

##### 2．実用新案登録

特記事項なし

##### 3．その他

特記事項なし

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 Dengue 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。本年度はこれまでに同定したプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム RT-PCR 法の性能評価（検出感度、検出特異性）を実施した。また、いくつかの SFTSV 特異的リアルタイム RT-PCR 法との比較検討も実施した。さらに新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) の国内での感染拡大を踏まえ、血液への混入リスク対策として血中ウイルスを検出可能な SARS-CoV-2 核酸検査法の開発を急遽検討した。

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 主任研究官

浜口 功 同上 部長

（本研究は、国立感染症研究所 ウイルス第1部、日本赤十字社 [JRC] 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、国内では西日本を中心に存在していることが近年分かっており、一部の発症者では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 等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・プローブセットの特異性評価

これまでの本研究課題の成果として、SFTSV の新規高感度プライマーおよび TaqMan プローブのセットを同定している。良好な性能を示すと考えられる12セットについて、健常者血漿由来のRNAを用いて非特異的増幅反応の有無を評価した。

### ・合成ssRNAを用いた絶対感度の評価

特に性能が優れていると考えられるプライマー・プローブセットに対して合成ssRNAを作製した。これを用いて、低コピー段階希釈検体を作製し、PCR系の絶対感度を評価した。

### ・SFTSV Japanese株およびChinese株を用いた低コピーウイルスパネルの作製

SFTSV Japanese株 (J1:4株、J2:2株、J3:2株)およびChinese株 (C3:1株、C4:2株、C5:2株) 由来RNAに対して、S-60セットを用いたSFTSV S-segmentコピー数の絶対定量を実施した。定量結果より各株のRNAを希釈し、低いコピー (10コピー/ $\mu$ L) のウイルスパネルを作製した。

### ・低コピーウイルスパネルを用いたSFTSV核酸検査系の性能評価

低コピーウイルスパネルを鋳型として、本研究課題により開発したS-60セットと、既に明らかになっている他の研究グループによる核酸検査系との検出感度の比較検討を実施した。

### ・SARS-CoV-2核酸検査法開発のための大規模プライマーセットの作製

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

### ・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプライマー・プローブセットの特異性評価

これまでに同定したプライマー・プローブセットの特異性評価のため、健常者プール血漿由来RNAを鋳型としてPCRを実施した結果、12セット中11セットでは全く増幅シグナルは認められなかった。一方、12セット中1セットでは全てのPCR反応で増幅シグナルが確認され、非特異的な増幅反応が高率で引き起こされることが示された。

### ・合成ssRNAを用いた絶対感度の評価

S-60セットに対する合成ssRNAを用いて、PCR鋳型量を段階的に希釈し (100, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 cp/rxn) 、感度を評価した結果、鋳型量100, 20, 10 cp/rxn において検出率は100%であった(8重測定中8検出)。一方、鋳型量5, 2.5, 1.25 cp/rxn においては、それぞれ検出率88%, 75%, 38%であった。

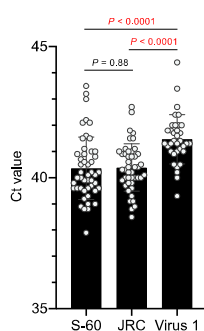
### ・SFTSV Japanese株およびChinese株を用いた低コピーウイルスパネルの作製

S-60セットはssRNAを鋳型量10 cp/rxnにおいて100%検出することから、SFTSV臨床分離株由来RNAを用いた同様の感度評価が求められた。臨床分離株の低コピーウイルスパネルを作製するために、S-60セットを用いたRNA溶液の絶対定量を実施した。その結果、全ての株の定量結果に基づき、低いコピー数（10コピー/ $\mu$ L）のウイルスパネル作製に成功した。

#### ・低コピーウイルスパネルを用いたSFTSV核酸検査系の性能評価

臨床分離株低コピーウイルスパネルを鋳型として、S-60セット、および他の2つの研究グループ（JRCおよびウイルス第1部）の核酸検査系を評価した。全ての株に対して8重測定を実施し、得られたCt値と検出率を評価した。その結果、総検出数はS-60セット、JRCセット、ウイルス第1部セットにおいてそれぞれ48、45、35であった。また、

		Positive / 8 replicates		
J1	SPL030	5	8	7
	SPL067	3	3	1
	SPL070	6	3	3
	SPL120	4	3	3
J2	SPL057	4	4	2
	SPL100	3	4	1
J3	SPL004	4	3	5
	SPL230	4	3	2
C3	HB29	3	4	2
C4	SPL179	3	3	2
C5	SPL087	5	3	4
	SPL238	4	4	3
		48	45	35



Ct値の比較ではS-60セットとJRCセットは同等であったが、両セットはウイルス第1部セットと比較して有意に低いCt値を示した。

#### 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。本年度までに他の研究グループによる核酸検査系と同等以上の検査系の開発に成功したと考えられる。

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・登録業況（  
予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

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の検討を行った。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、クロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いてシンドビスウイルスや仮性狂犬病ウイルスの不活化を検討してきたが、今年度は臨床に使用されて赤血球液に近い条件としてヘマトクリット 55%、液深 10mm におけるシンドビスウイルスの不活化を検討した。濃度 20  $\mu\text{g/mL}$  では 2.3Log、40  $\mu\text{g/mL}$  では 4.1Log の不活化が認められた。5~40  $\mu\text{g/mL}$  までの濃度では細胞の増殖性に差は認められなかった。この物質は、赤色光によって活性を示す性質があり、そのため赤血球に吸収され難いのでより深部まで到達でき、更に赤血球への障害が少ないものと考えられた。

#### 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。また、新興・再興感染症のアウトブレイク時など検査体制が構築されるまでの対応など、更なる輸血用血液製剤の安全性を向上させるために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。我々は、赤血球製剤に応用できる新しい病原体不活化法として腫瘍の治療に用いられている光化学治療法を応用した新しい方法の開発を目指した。これまで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。今年度は実用化を見据えてより臨床に使用されている赤血球液と同様な条件で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

シンドビスの感染価は Vero 細胞株を用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに  $1 \times 10^4/\text{well}$  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  $\text{TCID}_{50}$  を求めた。

##### 2. ウイルスの不活化の評価

譲渡血として日本赤十字社から提供され

た赤血球液を生理食塩水で2回洗浄し、洗浄前と同様のヘマトクリット値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 $\mu$ g/mL及び40 $\mu$ g/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穴ウェルに液深が10mmになるように9mL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、30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。

### 3. Pheophorbide-aの毒性に関する評価

赤芽球に分化傾向があるヒト由来白血病細胞株であるAS-E2とKU821、さらにアフリカミドリザル由来Vero細胞をそれぞれ24穴プレートに $1 \times 10^5$ /well 蒔き、Pheophorbide-aを最終濃度5、10、20、及び40 $\mu$ g/mLになるようにそれぞれ2ウェルずつ添加、3日間培養し細胞数を測定した。2ウェルの細胞数を平均し、添加していないウェルの細胞数と比較した。AS-E2細胞は長崎大学血液内科：宮崎泰司教授から供与していただいた。

## C. 研究結果

### 1. Pheophorbide-aによる不活化の評価

濃度20 $\mu$ g/mL、30分間の照射では2.3Logの不活化が認められた。濃度40 $\mu$ g/mLでは4.1Logの不活化が認められた(図1)。また、赤血球への影響は、僅かな溶血が認められる程度であった。

### 3. Pheophorbide-aの毒性に関する評価

Pheophorbide-aの5、10、20、及び40 $\mu$ g/mLでの細胞数は、無添加のコントロールを100%とした場合、AS-E2:117.0、106.4、

114.9

114.9%、KU812:118.0、124.7、116.9、92.1% Vero細胞:95.2 119.0 100.3 101.6%であった。

40 $\mu$ g/mLにおいても評価に用いた細胞の増殖に影響は認められなかった。また、Pheophorbide-aに赤色光を30分照射した後に5、10、20、及び40 $\mu$ g/mLの濃度に各細胞株に添加して細胞の増殖を評価したが、各濃度で差は認められなかった。

## D. 考察

昨年度までは、赤血球製剤をヘマトクリット40%、液深4mmでシンドビスウイルスや仮性狂犬病ウイルスの不活化を評価してきた。4mmに設定したのは、濃厚血小板製剤のバッグの厚さが約8mmであることからバッグの両面に可視光を照射することが可能なことからその半分の4mmでの評価を行った。しかし、赤血球液のヘマトクリットは約55%、バッグの厚さは2cmであることから実用化を考えると赤血球液のヘマトクリットを55%、液深10mmの条件で不活化効果を評価する必要がある。また、これまでPheophorbide-aの濃度は20 $\mu$ g/mLに設定したがどの程度までPheophorbide-aの濃度を高くすることができるのか検討したことがなかった。今回、少なくとも40 $\mu$ g/mLでも評価に用いた細胞の増殖性に影響を与えないことが確認出来た。その結果、20 $\mu$ g/mLでは2.3Logの不活化効率であったものが4.1Logまで高めることができた。これは昨年度までの研究で濃度が20 $\mu$ g/mLと30 $\mu$ g/mLとでは不活化効率が劇的に変わることを明らかにしていたためである。

## E. 結論

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。今年度は、臨床に使用されている赤血球液と同じ条件下で不活化効果を検討したところ、シンドビスウイルスを約 4Log 不活化することができた。また、検討した範囲内での Pheophorbide-a の濃度では、白血病等の細胞株において非添加と比較して増殖性に差は生じなかった。

F. 健康危機情報  
なし

G. 研究発表

- 1) 岡田義昭：血液製剤を介する E型肝炎ウイルスの感染リスクとその対策、医学のあゆみ、268巻 514—515、2019年
- 2) 加藤由佳、山田攻、鈴木雅之、内野富子

山麻衣子、本田優未、岡田義昭、

池淵研二：エルトロンボバグ服用中

患者の自己血血漿の色調変化、

日本輸血細胞治療学会誌65巻

6号、845 846、2019年

3) 岡田義昭、山田攻、鈴木雅之、

内野富子、山麻衣子、加藤由佳、

本田優未、池淵研二：交通外傷に

よる敗血症から汎血球凝集反応を呈

した1症例、日本輸血細胞治療学会誌

65巻3号、595 599、2019年

H. 知的財産権の出願・登録状況  
ない

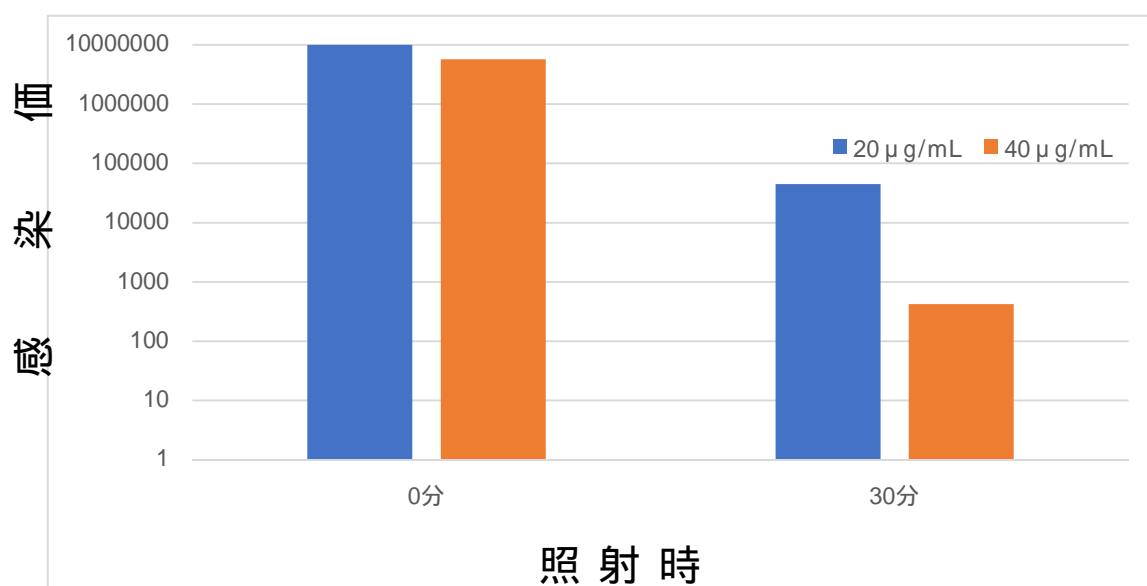


図 1. クロロフィル誘導体による Sindbis virus の不活

## 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 は培養細胞で増殖出来る JFH-1 株であった。しかし、2015 年、JFH-1 以外の HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 の同定が報告された。今年度は JFH-2 株が増殖できる FU97 細胞に Sec14L2 が発現する FU97-sec14L2 細胞を作製し、感染者由来の HCV 陽性血漿を感染させた。しかし、現在のところこの細胞を用いて 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 1 因子製剤、第 2 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの人々が 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ウイルスの不活化を評価する系を構築した。

本研究は、JFH-1 以外の HCV、特に患者由来の HCV の不活化を調べることが目的であり、過去二年間、様々な培養細胞に HCV の増殖に重要な宿主因子 Sec14L2（参考：Saeed M. et al. 524 471-490, 2015 Nature）を高発現させ、これら培養細胞に患者由来 HCV を感染させ、その HCV が増殖できる系の構築の検討を行って来た。今年度は JFH-1 とは別の株の JFH-2（遺伝子型は JFH-1 と同じく 2a）が増殖出来る FU97 細胞を用いる。FU97 細胞は、HCV の増殖に重要な、肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子マイクロ RNA; miR122 が高発現し、且つ、HCV の増殖に重要な、これも肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子 -fetoprotein も高発現している（参考：Shiokawa M. et al. 88 5578-5594, 2014 J. of Virol.）。この FU97 細胞に Sec14L2 を高発現する培養細胞を作

製し、感染者由来 HCV を感染させた。

## B. 研究方法

### 1 . Sec14L2 が発現する、FU97 培養細胞の作製

H29 年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 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。詳しくは H29 年度の同研究費報告書参照) し、これを胃がん由来 FU97 細胞に感染させ、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。その結果、tGFP の発現は全体の細胞の 73%であった (図 1)。

### 3 .作製した培養細胞への患者由来 HCV の感染

作製した Sec14L2 が組み込まれた FU97 培養細胞 (FU97-sec14L2 と命名) ( $1 \times 10^5$ /well) に HCV 感染者由来血漿 A, B の 2 種類、HCV RNA コピー数: A:  $8.3 \times 10^7$ , B:  $6.9 \times 10^7$  IU/mL 野島清子氏により測定) をそれぞれ 5 $\mu$ l (培地に対して 1/100 の体積) ずつ加え、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 株を m.o.i.=1.1 でこの細胞に感染させた。

感染 1, 2 及び 3 日後の細胞を用いた。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 594( #A11032 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 の感染 1, 2 及び 3 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、逆転写反応とそれに続く cDNA の増幅を PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TAKARA Bio, Shiga) を用いて行った。反応条件は、50 30min, 94 2min の後、[94 15s, 55 15s, 72 60s] を 32 回繰り返す、その後、72 3min で行った。用いた二種類の HCV 特異的 primers は、sense: nt 45-64 と 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 ) である。この反応により増幅された cDNA 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 発現 FU97 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、FU97 細胞に感染させ、sec14L2 が組み込まれた FU97 (FU97-sec14L2) を得た。tGFP の発現は、全体の細胞の 73% であった ( 図 1 ) 。

### 2. FU97-sec14L2 細胞への患者由来血漿の HCV の感染

FU97-sec14L2 細胞に HCV 感染者由来血漿 A, 及び B ( HCV RNA コピー数 : A:  $8.3 \times 10^7$ , B:  $6.9 \times 10^7$  IU/mL 野島清子氏により測定 )、及びコントロールとして JFH-1 ( 感染価  $5.6 \times 10^6$  ) を感染させ、1, 2, 及び 3 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。HCV 感染者由来血漿 A, 及び B の感染では、コア蛋白質の発現は認められなかった ( 図 2 ) 。

そこでこの感染細胞の HCV RNA 量を調べたが、患者血漿 A, B 共に HCV RNA 量の増加は認められなかった ( 図 3 ) 。

### 3. FU97-sec14L2 細胞へのコントロール JFH-1 の感染

上記 2 の実験で、コントロールとして用いた JFH-1 は、FU97-sec14L2 細胞に感

染 2 , 及び 3 日後、コア蛋白質が検出された(図 3)。また、感染 3 日後に、JFH-1 の HCV ゲノム RNA の増加が見られた(図 2)。なお、感染 4 日後以降では、返って JFH-1 のゲノム RNA 量が減少した (data not shown)。

#### D. 考察

1 . 前年度は、培養細胞に HCV の増殖に重要な Sec14L2、及び miR122 を組換えレンチウイルスの感染により発現させ、そこに HCV 感染者由来 HCV を感染させ、その増殖を調べたが、このとき Sec14L2 と miR122 とが同時に発現している細胞数は、わずか全細胞の 6.5%であった。

今年度は既に miR122 が高発現し、その上、HCV の増殖に重要である他の宿主因子 -fetoprotein も高発現する細胞 FU97 に sec14L2 を導入したので、Sec14L2 が発現する細胞には、理論的には、miR122 と -fetoprotein が同時に高発現することになり、HCV が増殖出来ると考えられる細胞の割合を増加 (全細胞の 73% ) させることが出来た。しかしながら、感染者由来 HCV の増殖はウイルス蛋白質、ウイルス RNA 共に検出出来なかった。

これまで多くの、しかも長年にわたる研究を振り返ると、培養細胞で患者由来 HCV を増殖させるには、HCV、細胞の両方の変異が必要だと考えられる。今後、患者由来 HCV を FU97-sec14L2 細胞に感染させ、長期にわたり培養し、HCV、細

胞に変異が入り、その HCV が増殖出来るようになったら、その細胞から Ribavirin などの薬剤で感染した HCV を取り除いた cured 細胞を得て、変異前の感染者由来 HCV を再感染させ、その HCV が増殖出来るかを調べる予定である。

2 . 図 2 で、感染 1 日後、JFH-1 のゲノム RNA が検出されたのは、感染させたときの HCV が細胞に吸着して、残存していたためと考えられる。一方、同じく感染 1 日後、感染者由来血漿 A、及び B では、HCV RNA が検出されなかったのは、JFH-1 の量に比べ、RNA コピー数で、患者血漿 A、B は約 1/20 であったためと考えられる。感染させる感染者由来血漿 A、及び B の量を増加させると、これら血漿に含まれる成分のため、細胞の培地がゲル状になり、細胞に悪影響を与えてしまうので、これらの血漿の量を増加させることが難しい。

3 . FU97-sec14L2 細胞で、JFH-1 株の増殖が見られたが、そのウイルスゲノム RNA の検出とコア蛋白質の検出とに時間的な一致が見られなかった (感染後 2 日目の図 2 と図 3 とを比較)。これは、発現した HCV コア蛋白質 (或いは、ウイルス粒子) が細胞内で分解せずにしばらく (1 , 2 日) の間存在しているためだと考えられる。

4 . JFH-1 の FU97-sec14L2 細胞への感染 4 日以降では、検出されるゲノム RNA の



量が減少したのは、生細胞の減少に加え、この細胞での再感染効率が悪いためだからかもしれない。

られた細胞から感染した HCV を薬剤で排除した cured 細胞の作製を試みる予定である。

#### E. 結論

感染者由来 HCV を培養細胞で増殖するために、miR122 RNA と  $\alpha$ -fetoprotein とを高発現する FU97 細胞に、Sec14L2 蛋白質を高発現する培養細胞を作製し、その結果、73%の FU97-sec14L2 細胞が、miR122,  $\alpha$ -fetoprotein, Sec14L2 を同時に発現するが、現在のところ、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。HCV 患者由来血漿をこの細胞に感染させ、HCV が増殖するまで長期に培養し、そこで得

#### G. 研究発表

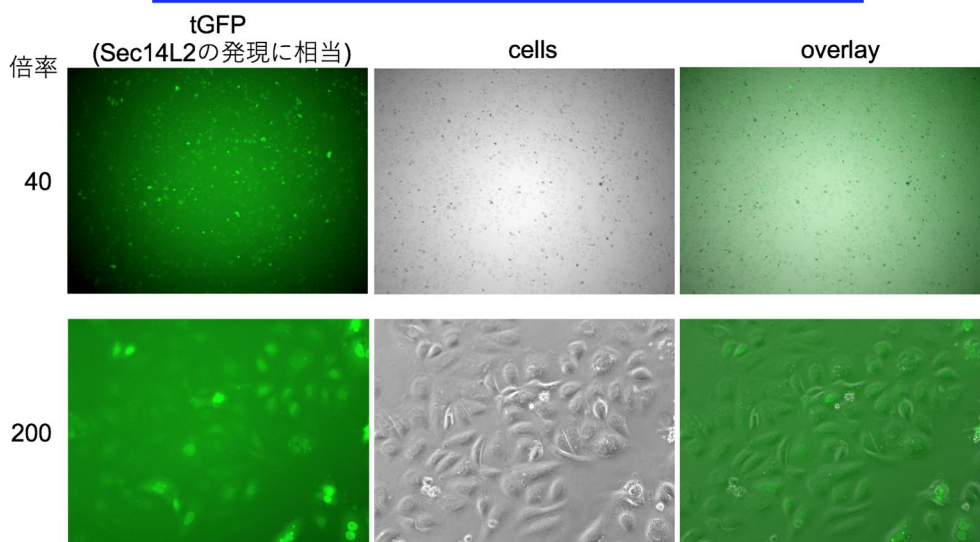
(ア) 論文発表：Suzuki, R., Matsuda M., Shimoike, T., Watashi, K., Aizaki H., Kato T., Suzuki T., Muramatsu M., Wakita, T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 2019 Virology, 529 226-233.

(イ) 学会発表：なし

#### H. 知的所有権の取得状況

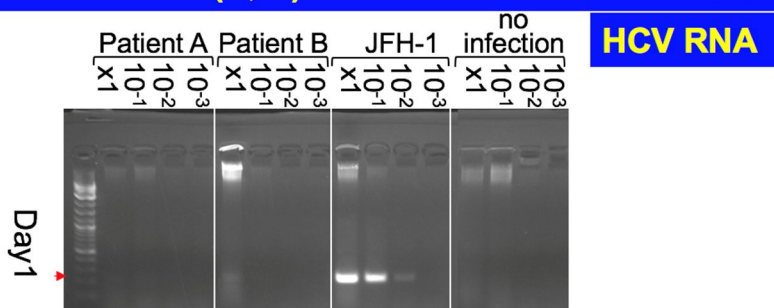
1. 特許申請：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

**図1. FU97-sec14L2細胞のtGFPの発現**

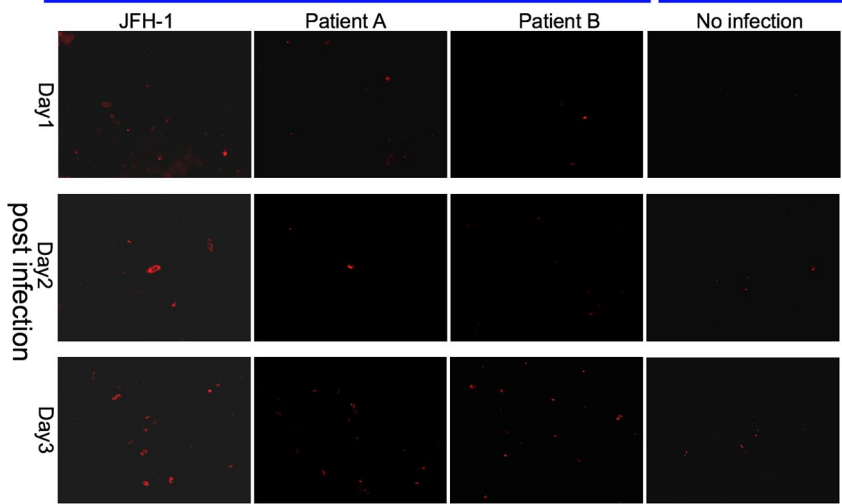


(顕微鏡：倍率40, 及び200倍の図)

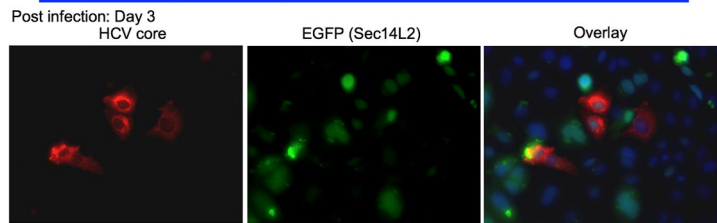
**図2. 患者由来HCV (A, B)のFU97-sec14L2細胞での増殖**



**図3A. 患者由来HCV (A, B)のFU97-sec14L2細胞での増殖 HCV コア蛋白質**



**図3B. FU97 (+Sec14L2)で増殖したJFH-1 コア蛋白質 (拡大)**



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確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究  
研究報告書

## 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、蕎麦田 理英子、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、国内感染等が発生した場合の対応の手引き等を作成し、日赤血液センターへ情報共有をした。昨年度の日本における妊婦輸血の実態調査結果を臨床医による検証を行った結果、実態はさらに少なくなることが推定された。

さらには、ウスツウイルス（USUV）の国内侵入時に備え、高感度な核酸検出系を構築した。また、献血者血清によるZIKVおよび、USUVの感染中和能を評価し、日本へ侵入した場合の輸血感染等のリスクを推定する一助とした。

### 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）による国内感染が発生した場合に備え、事前にリスク分析等を行い、その安全対策について日赤血液センターに情報共有を行い、迅速な対応に資することとした。その中でジカウイルス（ZIKV）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について、昨年度の調査結果を再評価しリスクの把握の一助とした。さらには、ウスツウイルス（USUV）の検査系の準備を行った。

また、ZIKVおよび、USUVは日本脳炎ウイルス（JEV）と同じフラビウイルス属である。日本人の多くは、JEVワクチン接種によって抗JEV抗体を保有しており、これらウイルスに対して感染中和することも期待される。よって、献血者血清によるZIKVおよび、USUVの感染中和能を評価し、日本へ侵入した場合の輸血感染等のリスクを推定する一助とした。

### 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)対応手引き等の日赤血液センターへ

の情報提供

作成した対応手引き等について、日赤血液センターへ情報共有を行う。

ア ファクトシート

イ 対応手引きの作成

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
- ・蚊媒介ウイルス感染症の問い合わせ用 Q&A(案)
- ・ZIKV の国内感染発生時の

「ZIKV 陰性血液の供給手順(案)」

(2)日本における妊輸血の現状調査結果にかかる再評価

妊婦のZIKV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、日本における妊婦輸血(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)」にて調査した結果を再評価する。

(3)USUVの検査系の準備

USUVの遺伝子情報や、論文で報告されている方法を参考に、遺伝子保存性が高く、効率良く増幅される遺伝子領域を選択し、TaqMan法による核酸検出系を構築した。合成遺伝子を用いて増幅効率を算出した。培養・増殖させたUSUVを献血者血漿に添加し、多段階希釈法により検出感度を算出した。また、近縁の日本脳炎ウイルス(JEV)および、ウエストナイルウイルス(WNV)との

非特異的増幅反応について評価した。

2. 献血者血清によるZIKVおよび、USUVの感染中和能の評価

Vero細胞を用いた感染中和実験(We gene Borena et al., 2017)により、献血者血清(N=12)のJEVに対する感染中和能を算出した。同様に、同じ血清を用いてZIKVおよび、USUVに対する感染中和能も算出した。算出されたJEVに対する感染中和能と、ZIKV、USUVに対する感染中和能の相関関係を解析し、各々のウイルスの抗体交差性について評価した。

(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:2019-044)

## 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)対応手引き等の日赤血液センターへの情報提供

対応手引き等について、日赤血液センターへ通知し情報共有を行った。

(2)日本における妊婦輸血の現状調査結果にかかる再評価

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)」にて調査した結果から、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本と試算されが、血漿製剤の使用数が多く、一部分娩時輸血が含まれていることが推測された。そのため、本調査の詳細データの入手依頼を行ったがデータ開示不能であった。輸血業務管理システムでは、妊婦輸血について、分娩時等に区分することができないことから多く報告されていることが推測された。

### (3)USUVの検査系の準備

Silvia C Barros et al., 2013の論文を参考にした検査系が良好であった。当系で合成遺伝子を用いた検量線を作製したところ、増幅効率は89%であった。ヒト血漿中に添加したUSUVにおいては、12.4 copies/mLまで100%の検出率であった。また、JEV (Mie41株とJa Gar01株)および、WNV (NY99株)との非特異的増幅反応は認められなかった。

## 2. 献血者血清によるZIKVおよび、USUVの感染中和能の評価

献血者血清は、ZIKV に対して感染中和能は認められなかったが、USUV に対しては5倍～10倍の血清希釈下まで感染中和能が認められた。このUSUVの感染中和能は血清中のJEVの感染中和能と相関があり(スピアマンの順位相関係数,  $r = 0.858$ )、抗JEV抗体との交差性が示唆された。

## 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(ZIKV、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として作成し、国内感染等が発生した場合の迅速な対応に資するために日赤血液センターへ情報共有した。

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が、日本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り、また、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)」からは、輸血管理システムでの区分が困難なことから一部分娩時輸血が含まれている可能性があり、その実態は、少なくなることが推測された。

今回構築したUSUVの核酸検査系の感度は十分であり、かつ日本土着のJEVおよび、近縁のWNVとの非特異的増幅反応もなかったことから、検査の準備を行うことは出来た。今後は、これらウイルスは症状等類似する場合もあるため、輸血感染事例等が生じたさい簡易判別出来る様に、JEVおよび、WNVとのマルチプレックス化を検討していきたい。

献血者血清は、ZIKV に対して感染中和能は認められなかったが、USUV に対しては少なからず感染中和能が認められた。USUV に対する感染中和能は、血清中のJEV 感染中和能と相関があり、JEV ワクチン接種等によって得られた抗JEV抗体と交差していることが示唆された。

USUV のみ感染中和能が認められた要因として、ZIKV より USUV の方が JEV と分子系統樹的に近縁であるためと考えられた。よって、USUV が日本へ侵入した場合の輸血感染リスクは、他のウイルスよりも低い可能性が予想された。

なし

## 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（ZIKV、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、今後見込まれる観光目的や東京オリンピック・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対応手引き等を作成し、日赤血液センターへ情報共有を行った。

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が、再評価の結果、その実態は、さらに少なくなることが予測された。

USUV の国内侵入時に備え、高感度な核酸検出系を構築した。また、USUV が日本へ侵入した場合の輸血感染リスクは、JEV ワクチン接種等から得られる抗 JEV 抗体の存在により他のウイルスよりも低い可能性が予想された。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

## G . 知的所有権の取得状況

特許取得

特になし

実用新案登録

特になし

その他

特になし

## 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 因子製剤、第 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの方がC型肝炎に感染した経緯がある。グロブリン製剤が原因のHCV感染は海外から何例か報告があり、感染原因となった期間や製造ロットが特定されているが日本での報告は一例もなく、グロブリン製剤の製造工程中でHCVが不活化・除去され安全性が確保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。我々はこれまでに血液製剤の製造法であるコーンのエタノール分画の17%エタノール分画工程により、血漿にスパイクした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きた。さらに、献血におけるドナースクリーニングでHCV抗体陽性となったドナー血漿から精製した抗HCV抗体を含むグロブリンが、HCVウイルスJFH-1株のHuh.7細胞への新たな感染を抑制することを明らかにしてきた。本年度はドナー由来のHCV抗体共存下で、HCVウイルス粒子が17%エタノール分画でどのように移行するかを検討した。

A.目的

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・除去され安全性が確保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。我々はこれまでに血液製剤の製造法であるコーンのエタノール分画の 17%エタノール分画工程により、血漿にスパイクした 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きた。さらに、献血におけるドナースクリーニングで HCV 抗体陽性となったドナー血漿から精製した抗 HCV 抗体を含むグロブリンが、HCV ウイルス JFH-1 株の Huh.7 細胞への新たな感染を抑制することを明らかにしてきた。本年度はドナー由来の HCV 抗体共存下で、HCV ウイルス粒子が 17%エタノール分画でどのように移行するかを検討する。我々の研究では、モデルウイルスではなく、実ウイルスを用いて血液製剤の安全生確保における科学的な根拠を提言するものである。

## 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 ウエル

プレートの 1 ウエル)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  $4.2 \times 10^6$  CCID<sub>50</sub>/mL のものを実験に用いた。

### 2. HCV 抗体陽性ドナー血漿の性状

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。本研究では、主に、H30 年度に譲渡された genotype 既知の HCV 抗体力価高値の検体を 5 検体を用いた (表 1)。

### 3. HCV 抗体陽性血漿からの 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 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 (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 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)。次に、8%エタノール上清画分であるS1画分を低温化で撹拌しながら、pHが6.75付近になるように調整した。-5で撹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で撹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で撹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。

S画分中に含まれるエタノールは、Slide-A-Lyzer G2 カセット (20K) を用いて限界を過により除去した。

#### 4. 17%エタノール分画における HCV スパイク試験

表 1,2 示す抗 HCV 中和抗体価 32~1024 倍の5種のグロブリンを等量ずつ混合し抗体混合液とした。コントロールとして、100分の1希釈した HCV 抗体混合液、ノーマル人免疫グロブリン 4.5mg/mL、生理食塩水についても以下同様に操作した。

各 HCV 抗体混合液およびコントロール抗体と、HCV JFH-1 株 (1x10<sup>5</sup> CCID50/mL) または window 由来 HCV 核酸陽性血漿検体を 1:1 の容量で混合し室温 25 で2時間培養してウイルス/抗体反応液とした。

日本赤十字社より譲渡された感染症マーカー陰性血漿から、コーンエタノール分画により20%沈澱画分を精製し、実験まで-30で保管した。氷上で融解した20%沈澱画分は、10mM リン酸緩衝液 pH6.25で溶解後 pH5.4に調整して17%エタノール分画に用いた。

ウイルス/抗体反応液は、1:9の割合で血漿溶液にスパイクし、最終エタノール濃度が17%となるようにエタノールを添加し、15分撹拌後10,000xgで20分遠心して上清画分と

沈澱画分を回収した。沈澱画分は 5mM リン酸緩衝液 pH6.25 に懸濁した。実験はすべて非依存的に 3 検体ずつ実施した。

#### 5. 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。

### C.研究結果

#### 1. 17%エタノール分画における抗 HCV 抗体存在化での HCV RNA の移行

コーンエタノール分画における 17% エタノール分画工程において、抗 HCV 抗体が共存しない場合（コントロールとしてノーマル人免疫グロブリン共存化、及び生食添加）と抗 HCV 抗体が存在する場合 とでは、分画後の各画分への HCV の移行は、実験に使用するウイルス株に寄らず（JFH-1 株 or window 期由来の HCV）大きく変わらないことを確認した(図 1)。しかし、window 期由来の HCV を用いた場合において、抗 HCV 抗体(1x)が共存した場合は、100 倍に

希釈した抗 HCV 抗体やコントロール抗体(ノーマル人免疫グロブリン、生食)が共存した場合と比較し、上清画分への HCV RNA の移行率が高い傾向を認め、それぞれ、0.87%, 0.38%,0.41%, 0.34% であった(図 1A、表 3)。

### D.考察

17%エタノール工程前にスパイクしたウイルスは、99%以上沈澱に移行し、上清への移行は僅かであったことは、これまでに分かっていることに矛盾しない。これまでの研究で、17%エタノール分画において、HCV ウイルスは沈澱に移行し、グロブリンの原料となる上清への核酸 RNA の移行は僅かであり、17%エタノール処理前に高力価のウイルスをスパイクした場合であっても、グロブリン画分である上清画分の感染性は検出限界以下であることを確認している。

本年での研究において、抗 HCV 抗体共存化で HCV-JFH-1 株をスパイクした場合、99.98%のウイルスが沈澱に移行したが、window 期血漿由来の HCV をスパイクした場合は抗 HCV 抗体の共存により沈澱に移行するウイルス RNA が独立して実施した 3 回の試験において、JFH-1 と比較すると若干多く上清に移行する傾向が認められその移行率はそれぞれ 0.13%と 0.06%

であった。上清に抗した HCV が抗体と結合しているかどうかは大変興味深い。グロブリンが分画される挙動に引きずられて、ウイルス粒子が沈澱に落ちずに上清に移行する可能性が考えられるが量は非常に僅かであった。

残念ながら、JFH-1 株以外の HCV ウイルス株は培養系が存在しないため、抗 HCV 抗体共存化で上清に移行した画分に感染性がないことを確認することはできないが、HCV 抗体陽性者の血漿から精製した 17%上清画分に含まれるグロブリンは 32 倍から 1032 倍の力価の中和抗体を含み、高力価の JFH-1 と混合しても感染性を有さないことを昨年度確認しているため、window 期由来の HCV ウイルスであっても感染性を示さない可能性が高いと考えている。今後、JFH-1 株以外の感染評価系の開発が期待される（下池分担研究者）。

実験に用いた 5 種類の抗 HCV 抗体のエピトープは定かではないが、これらの抗体は、第 3 世代のスクリーニング抗 HCV 血清学的検査で陽性となり輸血に用いられなかった献血ドナー由来の血漿から精製した抗体のため、少なくとも第 3 世代の血清学的検査の抗原である core, NS3, NS4, NS5 のいずれかを認識する抗体が含まれていると考えられる。

Env は第三世代の抗原に含まれていないが、いずれの 5 種類の精製抗体も、HCV-JFH-1 株が HUh/7.5.1 細胞に新たに感染するのを 32 倍から 1032 倍の力価で抑制しているため、Env に対する抗体を含んでいる可能性は高いと考えられる。

17%エタノール分画は、HCV を除去するには有効な工程であり、工程中に混入するウイルス粒子は抗 HCV 抗体が共存しても概ね同じように移行し、感染性は沈澱に落ち、グロブリンが製造される上流へは移行しないことが示され、血液製剤の原料に HCV が混入していた時代であっても、日本においてグロブリン製剤による HCV 感染事例がなかった理由の一つは、17%エタノール処理が有効に機能していたことが理由の一つとして考えられる。また、特に第 1 世代の血清学的検査を行っていた時代は、第 2, 3 世代の検査法と比較すると、抗体陽性ドナーを完全には排除できていなかったことから、有効な中和抗体を含むドナー血漿が排除されずに原料に混入が可能であったとも考えられ、結果として最終製品の安全性が確保できていた可能性が高いと考えられる。現在は、加熱処理、低 pH 処理、S/D 処理、ウイルス除去膜等さらなるウイルス除去・不活性化工程が

必ず工程中に含まれており安全性が担保されている。

E.結論

17%エタノール分画は、HCV を除去するのには有効な工程であり、抗 HCV 抗体が共存しても原料に混入した HCV は沈澱へ移行し、上清へは移行しないことが示された。実ウイルスを用いて実験によっても、17%エタノール処理は HCV の除去には非常に有効な製造工程であると考えられた。

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

検体#	genotype	CLIEA (C.O.I.)	日赤測定 (IU/mL)	精製グロブリンタンパク濃度 mg/mL	中和抗体価
#1	gt1b	79.3	3.54E+04	4.217	1024/2048
#2	gt1b	84.0	1.92E+05	4.464	64/128
#3	gt2a	79.1	2.84E+05	6.203	32/128
#4	gt2b	84.0	6.06E+06	4.500	64/64
#5	gt2b	76.6	3.49E+05	3.138	64/128

表 1. 日本赤十字社より譲渡された HCV 抗体陽性血漿

\* 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

沈澱への移行率

使用ウイルス：JFH-1

	+Anti0HCV (x1)	+Anti0HCV (x100)	+Venoglobulin	Saline
n1	99.98	99.99	99.99	99.97
n2	99.98	99.99	99.99	99.99
n3	99.98	99.96	99.98	99.98
mean	99.98	99.98	99.99	99.98
sd	0.00	0.01	0.00	0.01

使用ウイルス：2009A

	+Anti0HCV (x1)	+Anti0HCV (x100)	+Venoglobulin	Saline
n1	99.27	99.64	99.55	99.61
n2	99.01	99.59	99.64	99.72
n3	99.11	N.T.	N.T.	99.64
mean	99.13	99.62	99.59	99.66
sd	0.13	0.03	0.06	0.06

への移行率

使用ウイルス：JFH-1

	+Anti0HCV (x1)	+Anti0HCV (x100)	+Venoglobulin	Saline
n1	0.02	0.01	0.01	0.03
n2	0.02	0.01	0.01	0.01
n3	0.02	0.04	0.02	0.02
mean	0.02	0.02	0.01	0.02
sd	0.00	0.01	0.00	0.01

使用ウイルス：2009A

	+Anti0HCV (x1)	+Anti0HCV (x100)	+Venoglobulin	Saline
n1	0.73	0.36	0.45	0.39
n2	0.99	0.41	0.36	0.28
n3	0.89	N.T.	N.T.	0.36
mean	0.87	0.38	0.41	0.34
sd	0.13	0.03	0.06	0.06

N.T.: not tested (サンプリングミス)

表2. 17%エタノール分画における核酸移行率

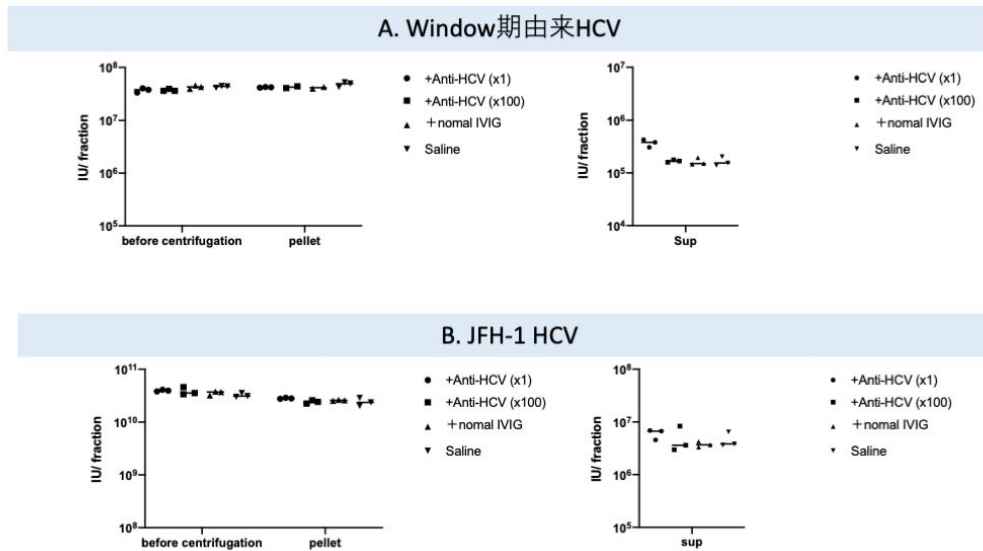


図1. 17%エタノール分画における抗HCV抗体存在化でのHCV RNA の移行

## 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	比嘉 由紀子	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
	林 利彦	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
	駒形 修	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
	沢辺 京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	小林 大介	日本医療開発機構（AMED）
	小林 望	日本科学未来館

### 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に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。

2019年は、北陸3県（富山県・石川県・福井県）の渡り鳥飛来地の計7地点において、4月～11月に実施したフランネル法により、合計で4属9種724頭の植生マダニを採取した（2020年4～8月時点）。キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、ヤマアラシチマダニの順に多く採取された傾向は、2018年と同じであった。採取された植生マダニはウイルス分離および次世代シーケンサー（NGS）解析に供した結果、KAMV、TarTVの既知のウイルス以外に3種類の新規マダニ媒介ウイルスが分離・検出された。国内のSFTS浸淫地におけるマダニ相を比較した結果、地域によってマダニ相が異なることが明らかになり、SFTSのベクターは環境によって異なる可能性が高く、国内の広範な地域に同一ウイルスが点在することも明らかになった。

### 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。2019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り (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。

## 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7地点 (片野鴨池、北潟湖、河北郡津幡町、輪島市門前町・猿山岬、輪島市舳倉島、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。2019年は4~11月の間、原則月に1回、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)により各地点30分間、3名で植生マダニを採取した (台風の影響で10月のみ1名)。

鹿児島県、愛媛県および兵庫県のSFTS浸淫地において、上記フランネル法により採取された植生マダニの種構成を比較した。

### 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種、発育ステージ、雌雄、採取地、採取日に分けて乳剤を調整し、主にシリアンハムスター腎臓由来BHK-21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

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 4 属 9 種 724 頭の植生マダニを採取した。キチマダニ(57.9%)、フタトゲチマダニ(27.3%)、ヤマトマダニ(8.3%)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。

#### 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)からも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。

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することができた。

## E. 結論

1) 富山県、石川県、福井県の渡り鳥飛来地の計 7 地点でマダニ相の調査を行い、季節消長、種構成を把握した。

2) 採取された植生マダニをウイルス分離および NGS 解析に供した結果、KAMV と TarTV 以外に 3 種類の新規ウイルスが分離・検出された。

3) マダニは複数のウイルスを保有しており、SFTS のベクターは環境によって異なる可能性が高く、国内の広範な地域に同一ウイルスが点在することが明らかになった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kobayashi D., Murota K., Itokawa K., Ejiri H., Amoa-Bosompem M., Faizah AN., Watanabe M., Maekawa Y., Hayashi T., Noda S., Yamauchi T., Komagata O., Sawabe K., Isawa H. RNA virome analysis of questing ticks from Hokuriku District, Japan, and the evolutionary dynamics of tick-borne phleboviruses. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(2): 101364, 2020.

### 2. 学会発表

沢辺京子, 比嘉由紀子, 小林大介, 前川秀, 今西望, 林利彦, 伊澤晴彦, 渡辺護. 北陸三県の渡り鳥飛来地におけるマダニ相調査. 第 71 回日本衛生動物学会大会, 2019 年 4 月, 山口市

小林大介, Astri Nur Faizah, Michael Amoa-bosompem, 室田勝功, 糸川健太郎, 渡辺護, 比嘉由紀子, 前川芳秀, 沢辺京子, 伊澤晴彦. 次世代シーケンサーを用いたマダニ保有ウイルスのサーベイランス. 第 71 回日本衛生動物学会大会, 2019 年 4 月, 山口市

## 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

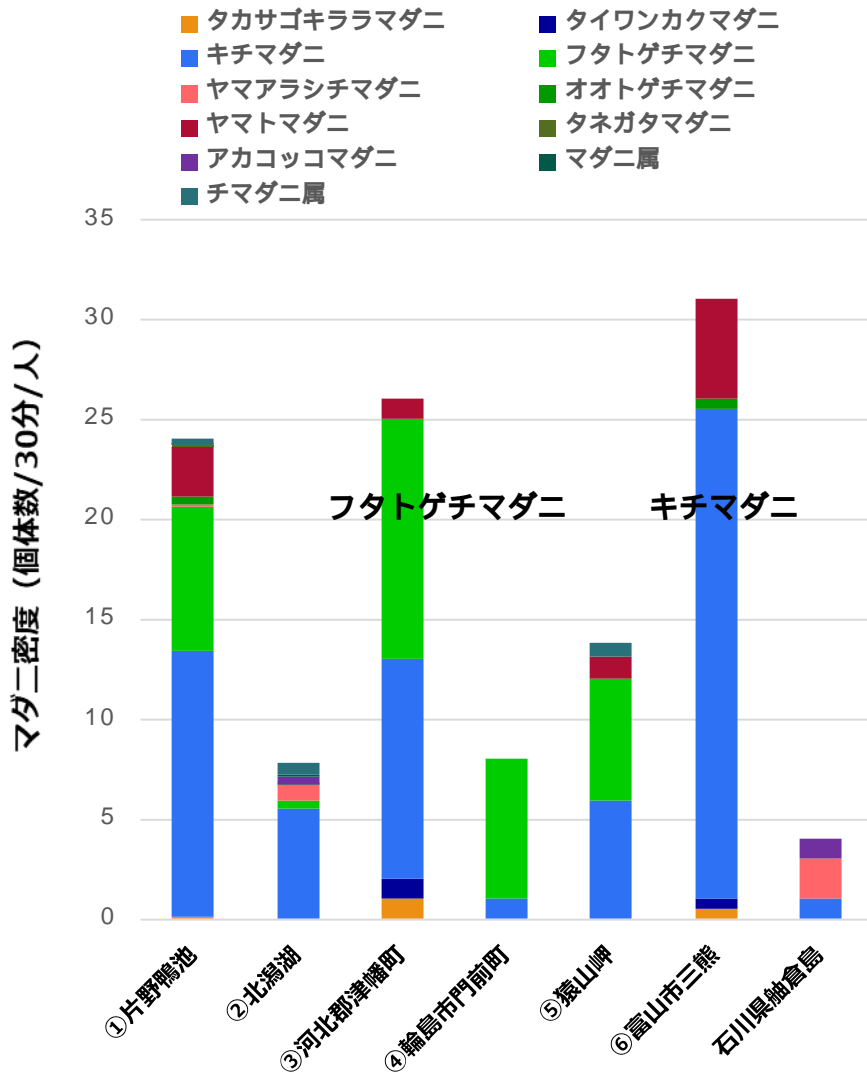


図1 2019年北陸3県の渡り鳥飛来地のマダニ相

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	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	レオウイルス科・コルチウイルス属	17TYM-T2	分離	キチマダニ	富山県富山市	2017年10月
		18EH1	分離	タカサゴチマダニ	愛媛県大洲市	2018年9月
		18EH6	分離	キチマダニ	愛媛県大洲市	2018年9月
		18EH8	分離	キチマダニ	愛媛県大洲市	2018年9月
		18EH14	分離	キチマダニ	愛媛県大洲市	2018年9月
		18EH48	分離	キチマダニ	愛媛県大洲市	2018年12月
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-1	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
新規ナイロウイルス-2	ナイロウイルス科・未帰属	19HGR4	分離	アカコッコマダニ	石川県輪島市	2019年5月
Jingmen tick virus	未分類	同定中	遺伝子検出	解析中	愛媛県大洲市	2018年9月

## 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 - 液状加熱工程における HEV の不活化効果の検証 - 』

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）

支援研究者 井上隆昌、井手野祥次、服部眞次、浦山健、高橋一恵（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、リバースジェネティクス法により高濃度の HEV (RG-HEV) を取得したが、2019 年度はこの RG-HEV を用いて液状加熱工程における HEV の不活化動態を検証した。

有機溶媒 / 界面活性剤 (S/D) 処理等で RG-HEV から脂質を除去すると、熱安定性はヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) と同様に低下し、RG-HEV も脂質の結合した状態が液状加熱処理のワーストケースであることが確認できた。

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

アルブミン製造工程にはアルコール分画工程が含まれ、最大のエタノール濃度が 40% に達することから、pd-HEV の脂質が除去されることが予想される。そこで、40% エタノールで前処理した RG-HEV を 25% アルブミン溶液へ添加し、液状加熱処理 ( $59.0 \pm 1.0$ ℃、10 時間) を行った。その結果、10 時間後の LRV は非処理の RG-HEV と同程度であったが、不活化動態は異なっていた。以上のことから、実製造工程を模した前処理を施した RG-HEV を使用することで、実製造での液状加熱中の pd-HEV の不活化動態を推測できると考えられた。

略語； HEV: Hepatitis E virus. NaDCA: Deoxycholic acid sodium salt. TBS: Tris-Buffered Saline. LRV: Log Reduction Value. TNBP: Tri(n-butyl)phosphate.

## A. 研究目的

東京都の献血者における HEV ゲノム陽性者は、1,367 人に 1 人であり<sup>1)</sup>、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、NAT スクリーニングによる HEV 陽性血漿の排除に加えて製造工程における HEV 除去・不活化効果の検証が重要となる。

HEV はノンエンベロープウイルスに分類されるが、ヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) の粒子表面には脂質が結合する。これまで、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)、ネズミ脳心筋炎ウイルス (EMCV) 及びブタ糞便由来 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>。さらに、血漿分画製剤の製造過程で、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 pd-HEV より脂質が除去され、その物理化学的性質が変化することが予想されている。これより、HEV の除去・不活化の評価には、ワーストケースまたは実態を反映したモデルウイルスを選択することが必要となる。実際に混入リスクがある pd-HEV を用いてウイルス除去・不活化効果を検証することが望ましいが、高濃度の pd-HEV を確保することは困難である。血漿分画製剤製造工程における HEV 除去・不活化工程を適切に評価するため、pd-HEV の代替品を探索し、リバースジェネティクス法により培養細胞から約 9 Log copies/mL の高濃度で脂質の結合する HEV (RG-HEV) を取得する方法を確立した (2017 年度分担研究報告書参照)。さらに、RG-HEV のウイルス除去膜工程でのろ過特性は pd-HEV と同等であり、高濃度の RG-HEV を用いて血液凝固第 VIII 因子製剤・クロスエイト MC のプラノバ 20N のろ過工程が感染価 LRV で 4 以上の有効な HEV 除去工程であることを確認した (2018 年度分担研究報告書参照)。

本年度は、液状加熱工程において RG-HEV が pd-HEV の代替品として妥当であるのか検証した。また、アルブミン製造工程のアルコール分画工程に

おいて pd-HEV が 40%のエタノールと接触するため、40%エタノールで処理した RG-HEV を用いて液状加熱工程条件での不活化動態を検証した。

## 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 は献血血漿からスクリーニングした HEV ゲノム陽性血漿を用いた。

### 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<sup>4)</sup>に従って HEV ゲノム濃度を測定した。

### 3. RG-HEV の 40%エタノール処理

RG-HEV を含む培養上清を超遠心分離して沈殿を 50 mM Tris 緩衝液, pH7.6 で懸濁し、エタノールを最終濃度 40%となるよう添加して-6℃で 2 時間インキュベーションした。

### 4. 液状加熱処理 (60.0±1.0℃、120 分)

RG-HEV を含む培養上清を超遠心分離 (150,000 × g、4℃、3 時間) し、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液, pH7.6 で懸濁、氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。このろ液に NaDCA を最終濃度 1%、Trypsin を最終濃度 0.1%となるよう各々加え、37℃で 2 時間インキュベーション (NaDCA/T 処理) した。インキュベーション後、再度超遠心分離 (150,000 × g、4℃、3 時間) し、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液, pH7.6、

注射用水及び TBS の混合液( 8:1:1 の割合 )に懸濁し、氷上で超音波処理後、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過し、NaDCA/T 処理サンプルとした。NaDCA/T 処理の代わりに注射用水と TBS を各々最終容量の 1/10 量 (v/v)加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間 インキュベーションした RG-HEV を、コントロール処理サンプルとした。また、RG-HEV を含む培養上清に Tween80 を終濃度 0.3%、TNBP を終濃度 1%となるよう各々加え 30 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベーション (S/D 処理) した後、超遠心分離 (150,000  $\times$  g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 時間) し、沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6、注射用水及び TBS の混合液 ( 8:1:1 の割合 )に懸濁し氷上で超音波処理後、0.22  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過し、S/D 処理サンプルとした。これらの処理サンプルを加熱前及び加熱処理サンプルとしてチューブへ分注した。加熱前サンプルは感染価測定まで-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザー中に保存した。加熱処理サンプルは、液温 60.0 $\pm$ 1.0 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽内中に浸漬し 120 分間加熱処理を行った。浸漬開始 15、30、60、120 分後、各サンプルを取り出し急冷し、感染価測定まで-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザーに保存した。

#### 5. 液状加熱処理 ( 59.0 $\pm$ 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 、10 時間 )

培養上清中の RG-HEV、Tris 緩衝液、pH7.6 で懸濁した RG-HEV、40% エタノールで処理した RG-HEV を超遠心分離し( 150,000  $\times$  g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 時間 )沈殿画分をアルブミン安定化液 ( 20 mM アセチルトリプトファン、20 mM カプリル酸ナトリウム、60 mM 塩化ナトリウム )または 25% アルブミン溶液 ( 実製工程より採取された 25% アルブミン液状加熱処理直前液 )により懸濁した。各懸濁液を氷上で超音波処理後、加熱前及び加熱処理サンプルとしてチューブへ分注した。加熱前サンプルは感染価測定まで、-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザー中に保存した。加熱処理サンプルを

恒温槽により加温し、59.0 $\pm$ 1.0 $^{\circ}\text{C}$ で 10 時間加熱処理を行った。加熱開始 0.5、1、5、及び 10 時間後にそれぞれのチューブを取り出し急冷し、感染価測定まで、-80 $^{\circ}\text{C}$ フリーザー中に保存した。

#### 6. 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。液状加熱処理の不活化効果は加熱処理前サンプルのウイルス感染価を加熱処理後サンプルの感染価で除した値の Log<sub>10</sub> 価を LRV として算出した。

#### 7. RG-HEV と pd-HEV の熱安定性比較

RG-HEV と pd-HEV の熱安定性の比較には、2019 年度以前に日本血液製剤機構において取得された液状加熱処理 ( 59.0 $\pm$ 1.0 $^{\circ}\text{C}$ 、10 時間 )による pd-HEV の不活化データを使用した。これらのデータは、血液事業 第 36 巻 第 3 号、2013;11:679-85 及び Biologicals. 2016; Sep; 44(5): 403-11.において発表している。

( 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おいて承認されている。

#### C. 研究結果

1. RG-HEV に結合する脂質の熱安定性への寄与  
pd-HEV に結合する脂質は熱安定性へ寄与する<sup>2,3)</sup>。このことが RG-HEV でもあてはまるか確認するため、RG-HEV を S/D 処理、NaDCA/T 処理、又はいずれの試薬も加えずインキュベーション（コントロール処理）した。次に、各 RG-HEV を液状加熱処理（ $60.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、120 分）し、不活化カイネティクスを比較した。NaDCA/T 処理した RG-HEV は速やかに不活化され、加熱開始 30 分後に LRV は 4 に達した（図 1、緑線）。S/D 処理した RG-HEV は NaDCA/T 処理と比較し不活化速度は遅く、加熱開始 120 分後で LRV は 3 であった（図 1、赤線）。これらに対して脂質が除去されていないコントロール処理 RG-HEV は 120 分間の加熱に渡って安定であり、加熱開始 120 分後でも LRV は 1 未満であった（図 1、青線）。密度勾配遠心による解析から RG-HEV の脂質は NaDCA/T 処理でほとんどが、また S/D 処理で部分的に除去されると推察される（2017 年度分担研究報告書参照）。以上より RG-HEV でも pd-HEV と同様に結合する脂質は熱安定性に寄与することが確認できた。

## 2. RG-HEV と pd-HEV の熱安定性比較

RG-HEV の熱安定性を pd-HEV と比較するため、脂質の結合する RG-HEV をアルブミン非存在下（アルブミン安定化液）またはアルブミン存在下（25% アルブミン溶液）に添加し、液状加熱処理（ $59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10 時間）を行い、pd-HEV の不活化カイネティクスと比較した<sup>2,3)</sup>。アルブミン安定化液中では、RG-HEV と pd-HEV は類似するカイネティクスで不活化され、加熱開始 10 時間後の LRV は RG-HEV で

4.6、pd-HEV で 3.6 であった。（図 2、青線と赤線）。一方 25% アルブミン溶液中では、pd-HEV は安

定化することが分かっている<sup>2,3)</sup>。RG-HEV も同様に安定化し、加熱開始 1 時間後まで不活化されなかった。加熱開始 1 時間から 5 時間後にかけてゆっくり不活化され両 HEV の LRV は 1 程度であった（図 2、緑線と紫線）。加熱開始 10 時間後には pd-HEV の LRV は 1.5 の検出限界であったが、加熱開始 1~5 時間までのカイネティクスをもとにすると大きな不活化は起こらないと考えられた。RG-HEV の LRV は 1 程度のみであり不活化の進行は僅かであった。（図 2、緑線）。このように、アルブミン安定化液及び 25% アルブミン溶液中で RG-HEV の不活化カイネティクスは pd-HEV に類似しており、RG-HEV の熱安定性は pd-HEV とほぼ同程度であった。

## 3. 40% エタノールで前処理を行った RG-HEV の不活化動態

製造工程中使用されるエタノールや S/D 試薬により pd-HEV から脂質が除去される（2018 年度分担研究報告書参照）ため、実製造工程の pd-HEV の状態を反映した HEV を用いて、不活化動態を把握することが必要となる。本研究では、アルブミン製造のアルコール分画工程でエタノール濃度が最大 40% となることから、40% エタノールで前処理した RG-HEV を 25% アルブミン溶液に添加し、液状加熱試験（ $59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10 時間）を行った。40% エタノールで前処理した RG-HEV は、加熱開始直後から不活化され、加熱開始 1 時間後には感染価 LRV は 1 程度に達した。一方、それ以降の不活化に進行は無く、加熱開始 10 時間後の感染価 LRV は 1 程度のみであり、最終的な LRV は非処理の RG-HEV や pd-HEV と同程度であった（図 3）。

## D. 考察

RG-HEV でも pd-HEV と同様に、ウイルス粒子表面

に結合する脂質を有する方が、その熱安定性は高いことから、脂質を有する HEV を用いて液状加熱処理工程の HEV 不活化効果を評価することはワーストケースとなる。また、アルブミン安定化液及び 25%アルブミン溶液中での液状加熱における非処理の RG-HEV と pd-HEV の不活化動態は同様であったことから、液状加熱工程における HEV の不活化効果を評価する際に非処理 RG-HEV を使用することが可能であろう。さらに、非処理 RG-HEV は液状加熱工程の評価においてワーストケースであるが、アルブミンのアルコール分画工程を経た HEV を考慮する時には、40%エタノールで前処理した RG-HEV を用いる方が実態を反映しているであろう。このように RG-HEV に実態を反映した前処理を施すことにより、加熱工程における pd-HEV の不活化動態を適切に評価できると考えられる。

#### E. 結論

RG-HEV と pd-HEV の熱安定性は同程度であり、液状加熱処理の pd-HEV の不活化を評価する上で RG-HEV は有用である。また、実製造を反映させる前処理した RG-HEV を使用することで、万が一実製造に pd-HEV が混入した場合の液状加熱中の不活化動態を確度高く推測することが可能である。

(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) 東京地域における HEV 感染実態調査  
薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会資料 (平成 28 年 8 月 3 日開催)

<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-11121000-Iyakushokuhinkyoku-Soumuka/0000138834.pdf>

- 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

Practical Approach to Evaluating the Removal of Hepatitis E Virus, a Membrane-Associated Non-Enveloped Virus by Nanofiltration Membrane., 22nd Planova™ Workshop, Portugal, 2019/10/10

#### 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



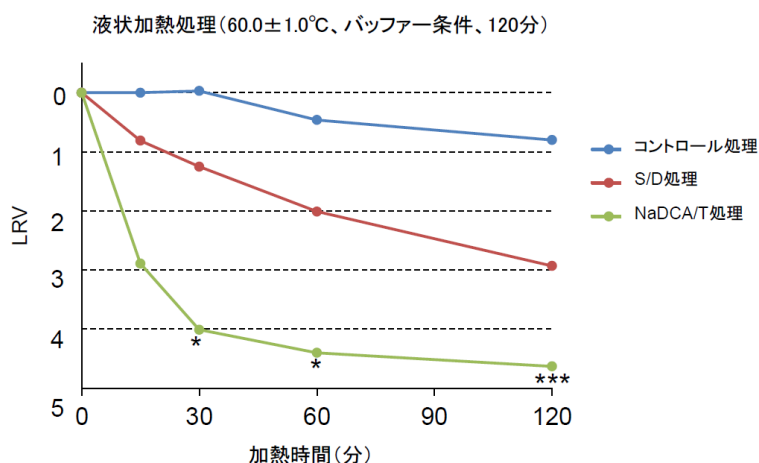


図1 各処理を行ったRG-HEVの不活化動態

コントロール処理、S/D処理、NaDCA/T処理したRG-HEVを液状加熱処理(60.0±1.0°C、120分)した。加熱時間とLRVの関係を示した。\*は3回の感染価測定のうち1回が検出限界以下、\*\*\*は3回の感染価測定のうち3回全てが検出限界以下であることを示す。

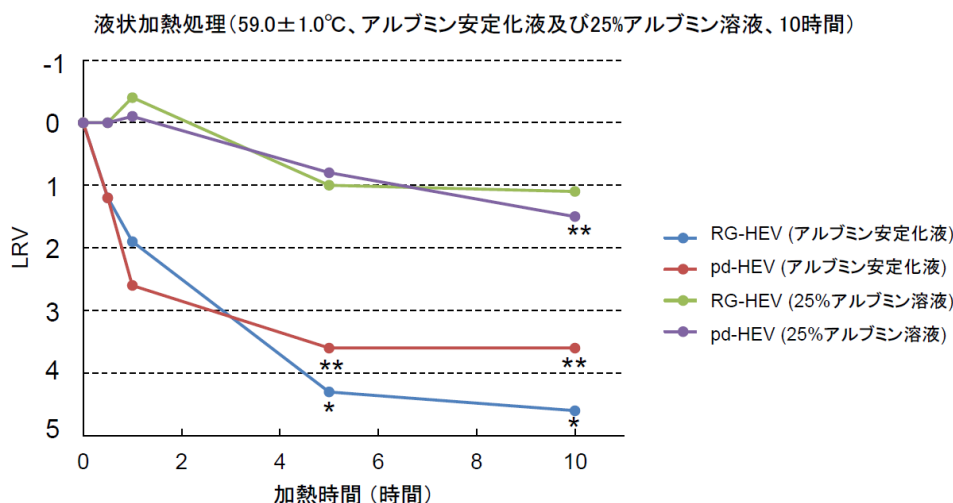


図2 RG-HEVとpd-HEVの不活化動態比較

RG-HEVをアルブミン安定化液及び25%アルブミン溶液に添加し(それぞれRG-HEV(アルブミン安定化液)及びRG-HEV(25%アルブミン溶液)と表記)、液状加熱処理(59.0±1.0°C、10時間)を行った。本研究以前に同様の試験を行い取得したアルブミン安定化液中のpd-HEV及び25%アルブミン溶液中のpd-HEV(それぞれpd-HEV(アルブミン安定化液)及びpd-HEV(25%アルブミン溶液)と表記)の不活化動態も示した。\*は2回の感染価測定のうち1回が検出限界以下、\*\*は2回の感染価測定のうちいずれも検出限界以下であることを示す。

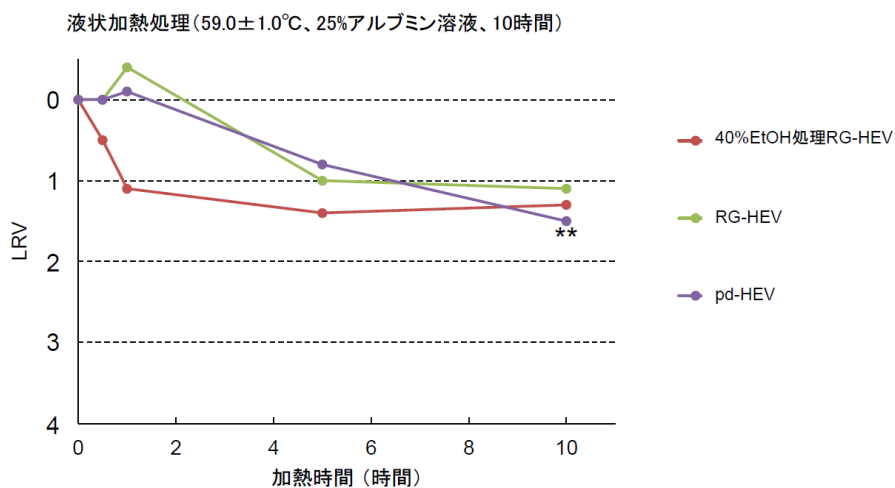


図3 40%エタノールで前処理したRG-HEVの不活化動態

40%エタノールで処理したRG-HEV(40%EtOH処理RG-HEV)を25%アルブミン溶液に添加し液状加熱処理( $59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10時間)を行った。図2と同様に加熱時間とLRVの関係を示した。比較のため、図2のRG-HEV(25%アルブミン溶液)とpd-HEV(25%アルブミン溶液)の不活化動態も示した。

研究成果の刊行に関する一覧表

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

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
Kobayashi D., Murota K., Itokawa K., Ejiri H., Amoa-Bosot, Mpem M., Faizah AN., Watanabe M., Maekawa Y., Hayashi T., Noda S., Yamauchi T., Komagata O., Sawabe K., Isawa H.	RNA virome analysis of questing ticks from Hokuriku District, Japan, and the evolutionary dynamics of tick-borne phlebotomus viruses.	Ticks and Tick-borne Diseases	11	101364	2020

令和 2年 4 月 14 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 印

次の職員の令和元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) ・該当する口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。

令和2年4月17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 隆字

次の職員の令和元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用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・第一室 室長  
(氏名・フリガナ) 比嘉 由紀子 ・ ヒガ ユキコ

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 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。

令和2年5月31日

厚生労働大臣 殿

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

次の職員の令和元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 品質保証課長  
(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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	日本赤十字社血液事業 研究倫理審査委員会	<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。

厚生労働大臣 殿

令和2年4月17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 隆吉

次の職員の令和元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  
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。

令和2年4月17日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆

次の職員の令和元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) 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。



「厚生労働科学研究費における倫理審査及び利益相反の管理の状況に関する報告について  
(平成26年4月14日科発0414第5号)」の別紙に定める様式(参考)

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)

2020年 5月 11日

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 中央研究所長

氏名 坂井 薫

次の職員の令和1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) 中央研究所 感染性病原体研究室 前野英毅  
(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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	一般社団法人 日本血液製剤機構	<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)

血漿分画製剤製造販売事業者であるため、「血液製剤の有効性・安全性又は献血の安全性の向上を目的とした研究」として包括審査・承認済である。

(※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。

令和2年4月17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 隆守

次の職員の令和元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。

令和2年4月17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 隆三

次の職員の令和元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 type="checkbox"/> (有の場合はその内容: )

(留意事項) ・該当する口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。

1/2