

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

**輸血用血液製剤と血漿分画製剤の
安全性確保と安定供給のための
新興・再興感染症の研究**

(H29-医薬-一般-002)

平成 29 年度～令和元年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

令和 2 (2020) 年 3 月

目次

1. 総合研究報告書

輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための

新興・再興感染症の研究

研究代表者 岡田 義昭 P 1-P 6

(資料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-P11

(資料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 P12-P16

(資料3) 赤血球製剤の新規不活化法の開発

岡田 義昭 P17-P20

(資料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 P21-P30

(資料5) 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

平 力造 P31-P38

(資料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 P39-P47

(資料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

沢辺 京子、 比嘉 由紀子 P48-P53

(資料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 P54-P63

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

P64-P65

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

総合研究報告書

輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための

新興・再興感染症の研究の開発

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

1. 種々のフラビウイルス科ウイルスを検出できるフラビウイルス共通プライマーを開発し、デングウイルスの各血清型やジカウイルスを検出できることを確認した。
2. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの高感度核酸増幅法を開発し、特異性や感度を評価した。また、日本株や中国株の低濃度ウイルス核酸パネルを作製した。また、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 からの血液製剤の安全性確保のために高感度核酸検査法の構築のためにプライマー セットを設計し、作製した。
3. クロロフィル由来の化学物質と赤色光照射を組み合わせた光学的不活化法を開発した。細胞増殖に影響がない濃度においてヘマトクリット 55%、液深 10mm の赤血球液に添加したシンドビスウイルスを約 4Log 不活化できた。
4. E 型肝炎ウイルスの除去・不活化法の評価のためにリバースジェネティクス法により高濃度の E 型肝炎ウイルスを取得することに成功し、ウイルス除去膜と液状加熱による不活化を評価し、血漿由来の HEV と同等であることが証明できた。
5. ダニ媒介のウイルスの感染リスクを減少させるため、渡り鳥の飛来地のマダニからウイルスの検出を行った。新規ウイルスを含む多数のウイルスが検出できた。また、リスク評価のためにマダニが吸血する動物種の嗜好性を解析する方法を改良した。
6. 蚊媒介ウイルス感染症のアウトブレイクが国内で生じた場合に備えて対応手引き書を作成した。また、風疹、麻疹、ウスツウイルスの高感度核酸検出系を構築した。
7. C 型肝炎ウイルスの in vitro 感染系構築のために Sec14L2 遺伝子の導入やインターフェロン産生関連の遺伝子を編集したが C 型肝炎ウイルスの増殖は確認できなかった。
8. ウイルス除去に重要な 17%エタノール分画において HCV 抗体の存在は HCV の除去に著名な影響を与えないことを明らかにした。また、同分画は B 型肝炎ウイルスの除去にも有用であることを明らかにした。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長
大隈 和 国立感染症研究所
室長
前野 英毅 日本血液製剤機構
中央研究所 室長
比嘉 由紀子 国立感染症研究所
室長
下池 貴志 国立感染症研究所
主任研究官
平 力造 日本赤十字社血液事業本部
課長
野島 清子 国立感染症研究所
主任研究官

A.研究目的

ヒトや物資の国際的な移動の急速な増加や地球温暖化のためにデングウイルスやチクングニアウイルスなどの蚊媒介ウイルス感染症が東南アジアや中南米諸国で流行し、毎年輸入感染例が報告されている。これらのウイルスを媒介する蚊が国内に存在しているため国内でも発生する可能性がある。また、中国武漢で発生した新型コロナウイルス SARS-CoV-2 は、瞬く間に世界に拡散し多数の感染者が報告さ

れ、血液からのウイルス遺伝子が検出されたとの報告もあった。新興・再興感染症は血液製剤の安全性の脅威になるだけでなく、献血者の減少を招き安定供給に重大な支障をきたす。更に E 型肝炎ウイルスに加えて重症熱性血小板減少症やダニ媒介脳炎などダニ媒介のウイルス感染症も広く国内に存在していることも明らかになっている。これらの病原体は、いずれもウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。一方、血液製剤の安全対策上重要な C 型肝炎ウイルス (HCV) は、未だ特殊な株以外に培養系がないので不活化法の評価には動物由来のモデルウイルスが使用されている。また、血液の病原体のスクリーニングは、安全性確保に有効であるが限界もある。感染リスクを小さくするためには血液製剤に有効な病原体不活化法の開発も重要である。本研究班では、これらの病原体

を検出する検査法の開発と標準化、スクリーニング法の開発とその評価、赤血球製剤における病原体不活化、さらに HCV や E 型肝炎ウイルス(HEV)の効率良い培養系の開発を実施し、血液製剤の安全性の向上と安定供給を目指す。

B. 研究方法と結果

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

デングウイルス、ウエストナイルウイルスを含むフラビウイルス科のウイルスを幅広く検出するフラビウイルス共通プライマーを開発し、それを用いた迅速診断法を確立した (RT-PCR 法)。この方法を用いてデング患者検体に対する反応性をデングウイルスに特化した核酸増幅検査法と比較検討した。デング 1 型から 4 型までのウイルス遺伝子を検出でき、感度や特異性もほぼ同等であった。また本共通プライマーはアフリカ型の遺伝子型であるジカウイルス MR766 株も検出することが確認できた。この方法では、幅広くフラビウイルスを検出でき、その遺伝子産物の塩基配列を決定することでウイルスを同定する事ができる。何らかのフラビウイルスが国内で流行しているか監視するために有用な方法が開発できた。

2) 血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

SFTSV に対する新規の高感度核酸検査法を開発するために、SFTSV のデータベースを基に大規模スクリーニング用のプライマーとプローブのセットをデザイン・作製した。

プライマー-350 セットについて、SFTSV のゲノム RNA を用いてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (SYBR) を実施し、増幅効率の良い 12 セットを選定した。これらのセットを用いて健常者血漿由来の RNA を用いて非特異的増幅反応の有無を検索した。さらに一本鎖 RNA を合成し、低コピー段階希釈検体を作製し、PCR 系の絶対感度を評価した。また、日本由来と中国由来のウイルス株を用いてその感度を測定した。その結果、S-60 セットは、PCR 鑄型量を段階的に希釈し (100, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 cp/rxn) 、感度を評価した結果、鑄型量 100, 20, 10 cp/rxn において検出率は 100%であった (8 重測定中 8 検出)。一方、鑄型量 5, 2.5, 1.25 cp/rxn においては、それぞれ検出率 88%, 75%, 38%であった。

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

3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

赤血球製剤に病原体不活化のためにクロロフィル由来の「Pheophorbide a」と赤色光照射を組み合わせた光学的不活化法を開発した。ヘマトクリット 40%の赤血球液において仮性狂犬病ウイルス (Pseudorabies virus 以下 PRV) やシンドビスウイルスの不活化効果を検討し、効果的なウイルス不活化が確認できた。赤色光は赤血球に吸収されないので深部まで到達できるとの予想の基に臨床に使用され

て赤血球液に近い条件としてヘマトクリット 55%、液深 10mm におけるシンドビスウイルスの不活化を検討した。濃度 20 μ g/mL では約 2Log、40 μ g/mL では約 4Log の不活化効果が認められた。「Pheophorbide a」は 5~40 μ g/mL までの濃度では細胞の増殖性に差は認められなかった。この物質は、赤色光によって活性を示す性質があり、赤色であることから光が赤血球に吸収され難いのでより深部まで到達でき、更に赤血球への障害が少ないものと考えられた。

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

E 型肝炎ウイルスは血液中と糞便中と

では性状が異なることが知られている。

そのため血漿分画製剤製造工程における

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

(NaDCA/T) 処理や有機溶媒/界面活性

剤 (S/D) 処理等を行い、ウイルス除去膜による

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

5) マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

マダニ媒介感染症の予防には、マダニの生態や生理的な知見を得ることが重要であるが、野外における情報は限られている。主に大型の哺乳動物がマダニの重要な吸血源となるため、その移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられている。一方で、鳥類に寄生するマダニが海外から運ばれる可能性も指摘されていることから、渡り鳥の飛来地に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。北陸 3 県（富山県、石川県、福井県）の渡り鳥飛来地の合計 7 地点において、4 月~11 月の間、月に 1 回フランネル法により植生マダニを採取した。2017~2019 年の調査で、キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、ヤマアラシチマダニの順に生息数が多い傾向が認められた。さらに、愛媛県内の SFTS 浸淫地において採取したマダニも加えてウイルス分離および次世代シーケンス (NGS) 解析を行った結果、Kabuto mountain virus (KAMV)、Tarumizu tick virus (TarTV) が分離され、Okutama tick virus (OKTV) の遺伝子が検出され、その全ゲノム配列を解析することができた。NGS 解析により、その他にも複数の新規・未分類のウイルスの遺伝子が検出された。さらにマダニの吸血源動物種の推定に用い

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

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

6) C 型肝炎ウイルスの不活化の評価

血液製剤における C 型肝炎ウイルス (HCV) の不活化効率を明らかにするため、培養細胞で増殖させた HCV を血液製剤に添加して様々な条件で不活化の検討を行ってきた。これまで用いた HCV は唯一培養細胞で増殖出来る JFH-1 株であった。

我々は、感染者由来の HCV 株の不活化法に対する感受性を評価するために HCV 株の増殖に重要な miR122 (micro RNA 122)、宿主蛋白質 Sec14L2 遺伝子の導入、インターフェロン産生をコントロールしている RIG-I を欠損させた培養細胞を作製し、感染者由来の HCV を感染させたが、現在の

ところこの細胞を用いて HCV 感染者の

HCV の増殖は見られなかった。

7) 新興感染症発生時の献血対応に関する研究

輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症への対策のための各ウイルスについてリスク分析等を行い、国内感染が生じた場合の対応手引きを作成し、日赤血液センターへの情報共有を行なった。また、ウスツウイルス、風疹ウイルス、麻疹ウイルスの高感度核酸検出系

を構築した。検査法に関しては、風疹ウイルス、麻疹ウイルス、ウスツウイルスの各ウイルスの検査法の評価を実施した。また、ジカウさらには献血者由来の血清を用いて ZIKA ウイルスやウスツウイルスに対する感染中和能を評価し、国内発生した場合の血液製剤による感染リスクを推定する基礎資料とした。また、ジカウイルス感染によって小頭症等の異常が生じることが判明したので国内で妊婦輸血の現状を調査した。年間約 700 名の妊婦に約 1,700 本の輸血が使用されていることが判明したが、一部は分娩時に使用されている可能性があった。

8) 実ウイルスを用いたエタノール分画法による血漿の分画とウイルスの不活化

・除去と安全性の評価

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

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

D. 考察

海外から訪日する人数は毎年増加している。更に外国人労働者の受け入れなどが予定されている。そのような状況の中、中国で発生した SARS-COV-2 は日本を始め瞬く間に世界に感染が拡大していった。そのため血液製剤の安全性確保と安定供給のために急遽、血液のスクリーニング検査に応用できる高感度核酸増幅検査法の開発を行なった。本研究班は、新興・再興感染症が発生した場合に血液製剤へのリスクが予想される際には、すぐに対応できる感染症の各分野からの研究者から構成されている。今回も迅速に対応できたものと考

えている。その一方で、国内に既に常在している病原体やそのベクターも放棄された農地などの拡大や野生動物の増加、更には温暖化等の要因などによって生存する地域が拡大し、従来よりもヒトが感染し易くなる可能性もある。このような状況の中で流行が生ずる前に病原体の性状や検出法の開発、さらには発生時の対応法を検討しておくことは、血液製剤の安全性確保や安定供給に重要である。また、B 型や C 型肝炎ウイルスは感染系がなく、そのためにモデルウイルスを用いて安全性の評価を行なっている。HEV も *in vitro* の感染系はあるものの、安全性試験に必要な高力価の感染性を有する血漿ウイルスを十分に得ることは困難であった。この研究班では、効率的な培養系を確立するために分子生物学的手法を取り入れ高力価のウイルスを作成することに成功し、ウイルス除去膜による除去と液状加熱による不活化の評価を行い、血漿由来の HEV と相違がないことが確認できた。これらによってリバースジェネティクス法によって血液製剤のウイルス除去・不活化法の評価に十分な量を確保することが可能になった。

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

E. 結論

新興・再興感染症等の脅威から血液製剤の安全性確保と安定供給のために蚊媒介

ウイルス、SFTS ウイルス、SARS-COV-2 の検出法の開発を行い、国内発生を想定した対策手引書も作成した。ダニ媒介感染症の予防のために渡り鳥の飛来地でのダニの調査を行なった。また、分画製剤の安全性向上のために HEV 産生系の構築や HCV 感染系の開発、赤血球製剤の不活化法の研究の行い、新しい知見を得ることが出来た。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究総合報告書

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重要である。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 例の輸入症例が 5 年ぶりに報告された。いずれのウイルスも輸血を介した感染がこれまでに報告されており、血液製剤の安全性を確保するうえで重要な疾患である。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、ジカウイルス、デングウイルス等を検出できることを示した。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、フラビウイルス共通プライマーは TaqMan RT-PCR 法と同程度の感度を示すことを各病日において示した。さらに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検討を行ったところ、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

ジカウイルス (ZV) およびデングウイルス (DENV) は黄熱ウイルスや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る。いずれもエンベロープを被った直径約 50nm の (+) RNA ウイルスであり、これまでに 70 種類のウイルスが知られている。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。

都市部においてジカウイルスおよびデング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。これらの媒介蚊は重要

な鑑別疾患であるチクングニア熱 (CHIKF) や黄熱 (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。

ZV 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が、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ウ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、世界保健機関(WHO)の推計では全世界で年間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。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)、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。

本研究で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、その評価をおこ

なった。

B. 研究方法

ウイルス分離

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

ウイルス RNA の抽出と精製

ウイルス RNA の抽出と精製は、High pure viral RNA kit (Roche)を使用した。得られた精製 RNA はすぐに使用しない場合は-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

ジカウイルスに対するTaqMan RT-PCR法

リアルタイムRT-PCR反応は米国CDCによって発表されたジカウイルスTaqmanプライマー、プローブ ZIKV 835: TTG GTC ATG ATA CTG CTG ATT GC、ZIKV 911c: CCT TCC ACA AAG TCC CTA TTG C、ZIKV 860-FAM: CGG CAT ACA GCA TCA GGT GCA TAG GAG あるいは ZIKV 1086: CCG CTG CCC AAC ACA AG、ZIKV 1162c: CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT、ZIKV 1107-FAM: AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA Aを用いて実施した。

デングウイルスに対する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TaqMan 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。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。

抗 Dengue ウイルス IgM 補足 ELISA 法, 抗 IgG ELISA 法, NS1 ELISA 法

Dengue IgM 補足 ELISA (Focus 社), 抗 Dengue ウイルス IgG ELISA 法 (vircell 社), Dengue 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

国内におけるジカ感染症

平成29年12月までの国内におけるジカ感染症の調査を行った。その結果、国内では2018年までに20例のZVD輸入症例が報告されていることが示された。また2019年には3例のZVD輸入症例が報告された。

ジカウイルス検査

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

症 6 日後の精液からはウイルスは検出されなかった。分離されたウイルスの遺伝子配列を検討した結果、遺伝子型がアジア型であるウイルス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。

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 DF 患者の血清 65 検体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 Dengue IgM 補足 ELISA 法、抗 Dengue ウイルス IgG ELISA 法、Dengue 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。また抗 Dengue IgM 補足 ELISA 法、抗 Dengue ウイルス IgG ELISA 法では第 1 病日、第 2 病日ではそれぞれ Dengue 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。Dengue 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。

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デングウイルス 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 検体を用いてデングウイルス 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デングウイルス 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

ZDV と DF は重要な鑑別疾患である。これら感染症はその流行域，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．

日本では 2019 年までに 23 例の ZVD 輸入症例が報告された。媒介蚊であるヒトスジシマカは本州以南に広く分布していることが疫学的調査から明らかとなっており、ZV と共通の媒介蚊であるヒトスジシマカによる DENV の国内流行が 2014 年および 2019 年に発生しており、ZV が日本に侵入する可能性は否定できない。

本研究においては急性期から回復期の患者血清を用いてジカウイルス遺伝子の検出を実施した。その結果、急性期においてウイルスゲノムが検出された。しかしながらすべての急性期血清からウイルスゲノムが検出されたわけではなかった。回復期血清からはウイルス遺伝子は検出されなかった。また本研究では無症候例の検体や潜伏期の検体を用いた検討は行われておらず、これら無症候のドナー検体からのジカウイルスゲノム検出の検討は今後の課題である。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。

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。世界的にもデング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されておらず，その予防対策が重要である．したがってZVDおよびDF流行時にはそれぞれ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．ZDVおよびDVI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）
総合研究報告書

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した。これまでに大規模スクリーニング用のプライマーセットをデザインして作製し、プローブと併せてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニングした。その結果、増幅効率が最良のオリゴセットを最終的に同定した。このプライマー・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、またいくつかの SFTSV 特異的リアルタイム RT-PCR 法との比較検討も行った。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した。

B. 研究方法

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

Primer Express ver3ソフトウェア(Life Technologies)を使い、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。これらのオリゴセットをリアルタイムRT-PCRによりスクリーニング(SYBR)し、最も増幅効率の良好なセットを選別した。

・SFTSV Japanese株・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

選別されたプライマーをもとにプローブを作製し、SFTSV Japanese株由来RNAパネル (J1 : 4株、J2 : 2株、J3 : 2株)、Chinese株由来RNAパネル (C3 : 1株、C4 : 2株、C5 : 2株)を鋳型として再度リアルタイムRT-PCRによるスクリーニング(TaqMan)を実施し、最終的に最も増幅効率の良好なプライマー・プローブセットを選択した。

・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SFTSVの新規高感度プライマーおよびTaqManプローブのセットの中で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(S-60)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/ μ 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。

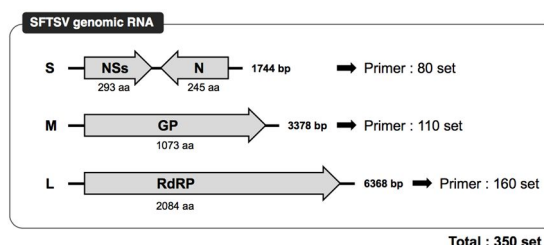
C. 研究結果

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

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 J1 株を鋳型にしてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (SYBR) したところ、最も増幅効率の良好な S 分節を 23 セット、M 分節を 28 セット、L 分節を 45 セット (合計 96 セット) 選別した。また、J2 株・J3 株を鋳型にしてさらに同様にスクリーニング (SYBR) したところ、最も増幅効率の良好な S 分節を 3 セット、M 分節を 3 セット、L 分節を 9 セット (合計 15 セット) 選別した。

SFTSV のゲノム構造と核酸検出用プライマーの設計



・SFTSV Japanese 株・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

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 セットのプローブ作製に成功した。

そこで、SFTSV Japanese 株由来 RNA パネルを鋳型として real-time 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・プローブの内、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。

また、SFTSV Chinese 株由来 RNA パネルを鋳型として real-time 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・プローブの内、C3 および C4 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 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 および 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。

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

・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 (S-62) 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。

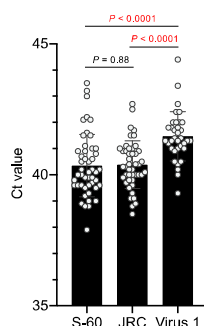
・ SFTSV Japanese株およびChinese株を用いた低コピーウイルスパネルの作製

S-60セットはssRNAを鑄型量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/μL）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鑄型として、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

		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



においてそれぞれ48、45、35であった。また、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．研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G．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によって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 (PRV) の不活化を検討してきた。当初は赤血球液の状態を液深 4 mm、ヘマトクリット値 40% に調整して不活化を検討したが、最終的に臨床に使用されて赤血球液に近い条件として液深 10 mm、ヘマトクリット 55% 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 $\mu\text{g/mL}$ では約 2Log、40 $\mu\text{g/mL}$ では約 4Log 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、そのため赤血球に赤色光が吸収され難いのでより深部まで到達できると考えられる。更に赤血球は赤色光を吸収しないので赤血球内部で活性化が生じにくいいため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。赤血球製剤の場合、赤血球によって光線が吸収され深部まで達しないため不活化効率が悪くなると考えら

れている。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ロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いて不活化効率を検討した。

B. 研究方法

1. ウイルスの感染価測定法

シンドビスの感染価は Vero 細胞株を用いた。細胞を感染 1 日前に 96 穴プレートに 1×10^4 /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 μ 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 TCID₅₀ を求めた。

仮性狂犬病ウイルス (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 μ 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 TCID₅₀ を求めた。

2. ウイルスの不活化の評価

液深 4mm、Ht 40%の場合

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 μ g/mL 及び 30 μ g/mL になるように添加した。また、シンドビスウイルスと 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 穴ウエルに深さが 4mm になるようにそれぞれの検体を入れ、液表面が 20,000 ルクスの照度になるように赤色光を調製し、10~30 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。

液深 10mm、Ht 55%の場合

赤血球液を生理食塩水で 2 回洗浄し、洗浄前と同じ Ht 55% 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 μ g/mL 及び 40 μ 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 穴ウエルに液深が 10mm になるように 9 mL 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 1×10^5 /well 蒔き、Pheophorbide-a を最終濃度 5、10、20、及び 40 μ g/mL になるようにそれぞれ 2 ウエルずつ添加、3 日間培養し細胞数を測定した。2 ウエルの細胞数を平均し、添加していないウエ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

PRV は、Pheophorbide-a の濃度 30 μ 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 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。また、20 μ 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。また、シンドビスウイル

すは、10 µg/mL では 20 分間の照射で 1Log、30 µg/mL では、10 分間照射後で約 2Log、20 分照射で約 3Log の不活化効果が認められた。

一方、液深 10mm、Ht 55% の場合のシンドビスウイルスでは、濃度 20 µg/mL、30 分間の照射では 2.3Log の不活化が認められた。濃度 40 µg/mL では 4.1Log の不活化が認められた。

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 µg/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 µg/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 µg/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

赤血球製剤のための病原体不活化法としてクロロフィル分解産物である「Pheophorbide a」と赤色光を組み合わせることで、少なくともシンドビスウイルスと PRV を不活化できることを明らかにした。特に PRV においても不活化効果が得られたことは、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対する不活化効果が弱いことが報告されているが、この物質は従来にない不活化の活性を示すこと

を明らかにできた。することが効果昨年度までは、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 µg/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 µg/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 µg/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 µg/mL と 30 µg/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。

結論

赤血球製剤の病原体不活化法としてクロロフィル由来の化学物質と赤色光を組合わせた新しい不活化法を開発した。最終的に臨床に使用されている赤血球液と類似した条件下でも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、生体に与える毒性の検討では不活化を検討した範囲内の濃度では、白血病等の細胞株において増殖性に差は認められなかつ

た。

6号、845 846、2019年

F. 健康危機情報

なし

3) 岡田義昭、山田攻、鈴木雅之、

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

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

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

学会誌65巻3号、595 599、2019年

ラグ服用中患者の自己血血漿の色調

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

変化、日本輸血細胞治療学会誌65巻

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。様々な細胞に Sec14L2 が発現する細胞を樹立し HCV 患者由来血漿を感染させた。しかし、現在のところ HCV ウイルス蛋白質レベルでの検出は出来ていないが、HCV ゲノム RNA レベルではわずかながらの増殖が見られた。

A. 研究目的

C 型肝炎ウイルスは血液を汚染する可能性のある病原体であり、1964 年から 1987 年かけて海外の血漿を原料に製造された第 因子製剤、第 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの人々が 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。

この 3 年間の本研究の目的は、JFH-1 以外の HCV、特に患者由来 HCV の不活化を調べることであり、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することである。

B. 研究方法

1. sec14L2 が組み込まれた組換えレンチウイルスの作製

レンチウイルスベクター-plasmid: pLOC (Thermo Fisher Scientific) の CMV プロモーター下に宿主因子である sec14L2 がクローニングされた plasmid: pSEC14L2/BlastR は Saeed Moshan 氏から供与を受けた（参考：Saeed M. et al. 524 471-490, 2015 Nature）。この plasmid と

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

2. 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、ヒト繊毛癌細胞由来 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 (RIG-I)、JAR (RIG-I)、NEC-8 (RIG-I) と命名。（研究代表者岡田義昭氏により作製）

3. Sec14L2 を発現する培養細胞の作製 作製した sec14L2 組換えレンチウイル

スを各種培養細胞 (Huh7.5.1, FU97)、及び 2. で作製した RIG-I 欠損培養細胞 (NCI-H1915 (RIG-I)、JAR (RIG-I)、NEC-8(RIG-I)) に感染させ、Blasticidin でセレクションすることにより、Sec14L2 が発現する各種細胞を得た。それぞれ

- i) Huh7.5.1-sec14L2
 - ii) NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2
 - iii) JAR (RIG-I)-sec14L2
 - iv) NEC-8 (RIG-I)-sec14L2
 - v) FU97-sec14L2
- と命名した。

4. 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 [hsa-miR-122] (BiOSETTIA 社) には、EF1 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] と前述の pMDLg/pRRE, pRSV-Rev、及び pMD2.G 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も前述同様、一回のみの細胞への感染が可能である。

5. miR122 が組み込まれた培養細胞の作製

作製した miR122 発現組換えレンチウイルスを、tGFP の発現細胞数が多い、即ち、Sec14L2 の発現細胞数が多いと考えられる NCI-H1915 (RIG-I)-Sec14L2 細胞に感染させ、1 日後、puromycin (最終濃度 1.0µg/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 10µg/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 (RIG-I)-Sec14L2-miR122 と命名した。

なお、tGFP を発現する細胞数の多い NEC-8 (RIG-I)-sec14L2 は、数代しか継代することが出来なかったため、miR122 の導入は行えなかった。

6. Sec14L2 が組み込まれた培養細胞の Sec14L2 の発現の確認

- i) tGFP の蛍光の検出による方法

この組換えレンチウイルスには sec14L2 以外にマーカーとして 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)。

- ii) Huh7.5.1-sec14L2 細胞のウエスタンブロッティング、及び免疫染色法による Sec14L2 の検出

作製した、sec14L2 が組み込まれた細胞の中で、代表として Huh7.5.1 細胞の Sec14L2 の発現を、一次抗体 anti-Sec14L (#GTX115716, GeneTex, Inc. CA) を用いて調べた。ウエスタンブロッティングでの 2 次抗体には HRP を結合させたヤギ抗マウスモノクローナル抗体 (#170-5047, BioRad, CA) を用い、SuperSignal West Femto (#34094, Thermo Scientific, Tokyo) による発光により検出した。また、免疫染色での二次抗体には、Alexa Fluor 488、及び Alexa Fluor 594 (それぞれ #A11001, A11037, Thermo Scientific, Tokyo) を用いた。核の染色には DAPI (#340-07971, 和光純薬、Osaka) を用いた。

7. 作製した培養細胞への患者由来 HCV の感染

作製した Sec14L2 が組み込まれた各培養細胞 (1×10^5 /well) に HCV 感染者由来血漿 (A, B の 2 種類、HCV RNA コピー数: A: 8.3×10^7 , B: 6.9×10^7 IU/mL 野島清子氏により測定) をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ 、或いは $5 \mu\text{l}$ ずつ加え、HCV の増殖を 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 $\text{m.o.i.}=1.1$ でこの細胞に感染させた。

感染 1, 2, 3 日後、或いは 4, 6 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、或いは 4, 6 日の細胞を 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。この研究に關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 851 「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 が組み込まれた各培養細胞の 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、各細胞に感染させ、sec14L2 が組み込まれた以下の細胞を得た。各細胞での全細胞に対する tGFP が発現する細胞の割合は以下であった (図 1)。

- i) Huh7.5.1-sec14L2: 30%
- ii) NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2: 44%
- iii) JAR (RIG-I)-sec14L2: 3.7%
- iv) NEC-8 (RIG-I)-sec14L2: 55%
- v) FU97-sec14L2: 73%

2. Sec14L2 が組み込まれた培養細胞の Sec14L2 の発現の確認

Sec14L2 の細胞内での発現の様子を Huh7.5.1-sec14L2 細胞を代表として用いて調べた。Huh7.5.1-sec14L2 細胞の lysate を用い、ウエスタンブロッティングを、Sec14L2 を特異的に検出する anti-Sec14L2 抗体を用いて行なった結果、Huh7.5.1-sec14L2 の細胞には、SDS PAGE で、約 46kDa の泳動度の蛋白質が特異的に発現することが明らかとなった。一方、Huh7.5.1 細胞にはこの蛋白質は検出されなかった。よって、Huh7.5.1-sec14L2 には Sec14L2 蛋白質が発現していると考えられる (図 2)。

更に、Huh7.5.1-sec14L2 細胞中での Sec14L2 の局在を調べるために、上記の

anti-Sec14L2 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、Sec14L2 は細胞内全体に局在することが明らかとなった。一方、tGFP は、主に核に存在することが明らかとなった (図 2)。

3. miR122 が組み込まれた NCI-H1915-sec14L2 培養細胞の Sec14L2 と miR122 の発現の確認

NCI-H1915 (RIG-I)-Sec14L2-miR122 細胞の Sec14L2 の発現の指標となる tGFP の発現 (全細胞の 50%) と miR122 の発現 (全細胞の 50%) の指標となる fluorescent puromycin のとが同時に発現する細胞は全細胞数の 6.5% であった (図 3)。

以上、3 年間の研究で作製した細胞

- i) Huh7.5.1-sec14L2
- ii) NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2-miR122
- iii) FU97-sec14L2

の HCV の増殖に重要な遺伝子発現について、表 1 にまとめた。

4. 各細胞への患者由来血漿の HCV の感染

上記 3. で述べた 3 種類の細胞に HCV 感染者由来血漿 A、及び B (遺伝子型: 1 型、HCV RNA コピー数: A: 8.3×10^7 , B: 6.9×10^7 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 5.6×10^6) を感染させ、JFH-1-sec14L2、及び NCI-H1915 (RIG-I)-sec14L2-miR122 細胞の場合は、4、6 日後、FU97-sec14L2 細

胞の場合は、1, 2, 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。その結果、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 4A; FU97-sec14L2 細胞の場合のみ示した)。

更に感染細胞の HCV RNA 量を調べた結果、NCI-H1915(RIG-I)-sec14L2-miR122 細胞の場合は患者血漿 A で、HCV RNA 量の増加が認められた(図 5)。一方、JFH-1-sec14L2、及び FU97-sec14L2 細胞の場合は、HCV RNA の増殖は見られなかった(図 5; FU97-sec14L2 細胞の場合のみ示した)。

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 4A, 4B)。更に、感染 3 日後に、JFH-1 の HCV ゲノム RNA の増加が見られた(図 5)。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. 患者由来 HCV を培養細胞で増殖させるため、この 3 年間の研究で以下に述べる 3 種類の細胞を樹立した。

i) Huh7.5.1-sec14L2

まず、研究機関の一年目に、Huh7.5.1

細胞は、JFH-1 が増殖できる細胞なので、この細胞に HCV の増殖に重要な sec14L2 を導入した細胞を樹立した。

ii) NCI-H1915(RIG-I)-sec14L2-miR122

二年目には、患者由来 HCV が増殖できる細胞の可能性を広げるため、肝臓由来の Huh7.5.1 とは違った臓器由来の 3 種類の細胞 (NCI-H1915: ヒト肺がん細胞由来、JAR: ヒト繊維毛癌細胞由来、NEC-8: 胎児性癌細胞由来) に sec14L2 を導入した。更に HCV の増殖に重要な肝臓細胞特異的に発現する miR122 も導入した。更に、HCV の感染を阻害する RIG-I の遺伝子を破壊した。

iii) FU97-sec14L2

二年目では、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 患者由来 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。

この点を改善するため、研究の三年目には、FU97 細胞を用いた。この細胞は Huh7.5.1 と同じく、肝臓癌由来の細胞で、JFH-1 とは違う JFH-2 (遺伝子型は JFH-1 と同じ 2a) が増殖できる。

また、この細胞では、肝臓細胞特異的に発現する miR122 が既に高発現している。それに加え HCV の増殖に重要な -fetoprotein も高発現している。従って、sec14L2 をこの細胞に挿入して、tGFP の

発現する細胞を選択すれば、理論上、sec14L2, miR122, α -fetoprotein が同時に100%発現する細胞を選択することが出来る。

これら3種類の細胞を用いて患者由来 HCV の増殖を調べたが、HCV ウイルス蛋白質が検出されるレベルの HCV の増殖は今のところ見られていない。しかし、NCI-H1915(RIG-I)-sec14L2-miR122 細胞で、HCV ゲノム RNA レベルでは僅かに HCV の増殖が検出された。

2. 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、この研究で樹立した3種類の細胞に感染させ、長期にわたり培養し、HCV と細胞に変異が入り、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、変異前の患者由来 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。

E. 結論

感染者由来 HCV を培養細胞で増殖させるために、HCV の増殖に重要な sec14L2, miR122、及び α -fetoprotein とを同時に高発現させ、更に RIG-I を欠損させたりしたが、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。しかし、HCV RNA レベルでは HCV の増殖が僅かながら検出できた。

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. 各細胞のtGFPの発現

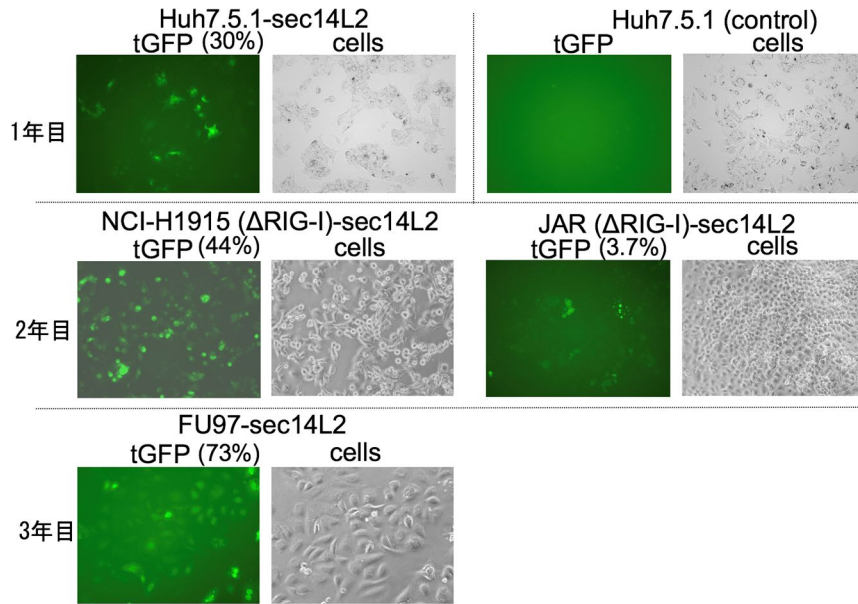


図2. Huh7.5.1-Sec14L2細胞のSec14L2, tGFPの発現、局在

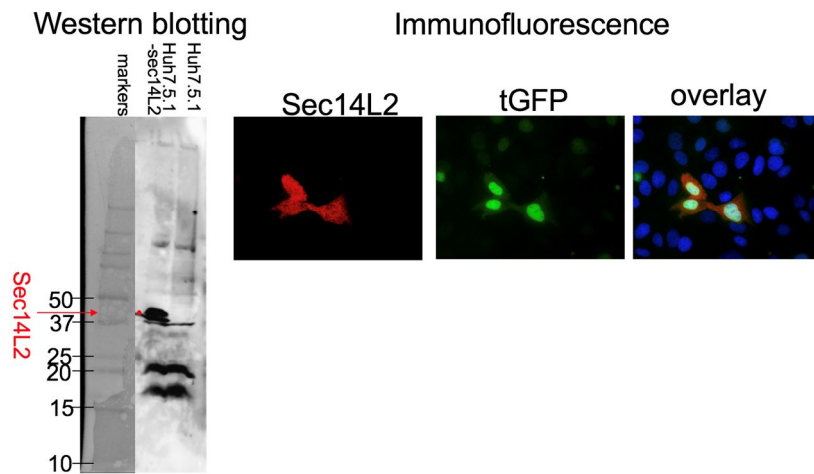


図3. NCI-H1915 (ΔRIG-I)-sec14L2へのmiR122の導入

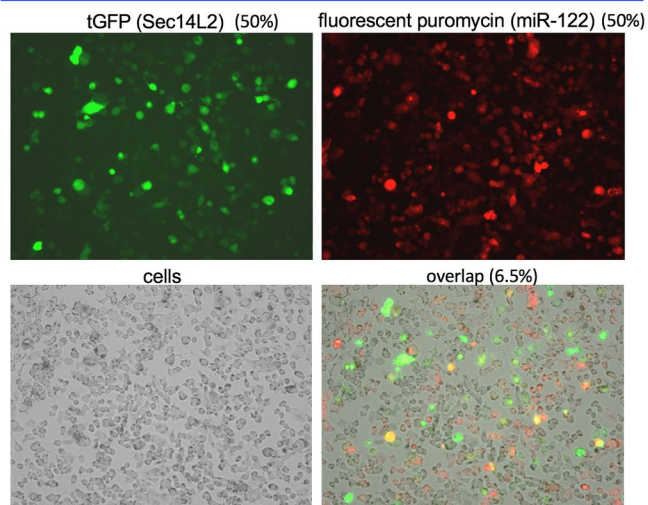


表1. 作製した各細胞のHCV増殖に重要な遺伝子発現

細胞	sec14L2	miR122	RIG-I	α -fetoprotein
Huh7.5.1-sec14L2	導入	高発現	機能的に欠損	高発現
NCI-H1915 (Δ RIG-I)-sec14L2-miR122	導入	導入	欠損させた	未確認
FU97-sec14L2	導入	高発現	未確認	高発現

図4A. 患者由来HCV (A, B)のFU97-sec14L2細胞での増殖 HCV コア蛋白質

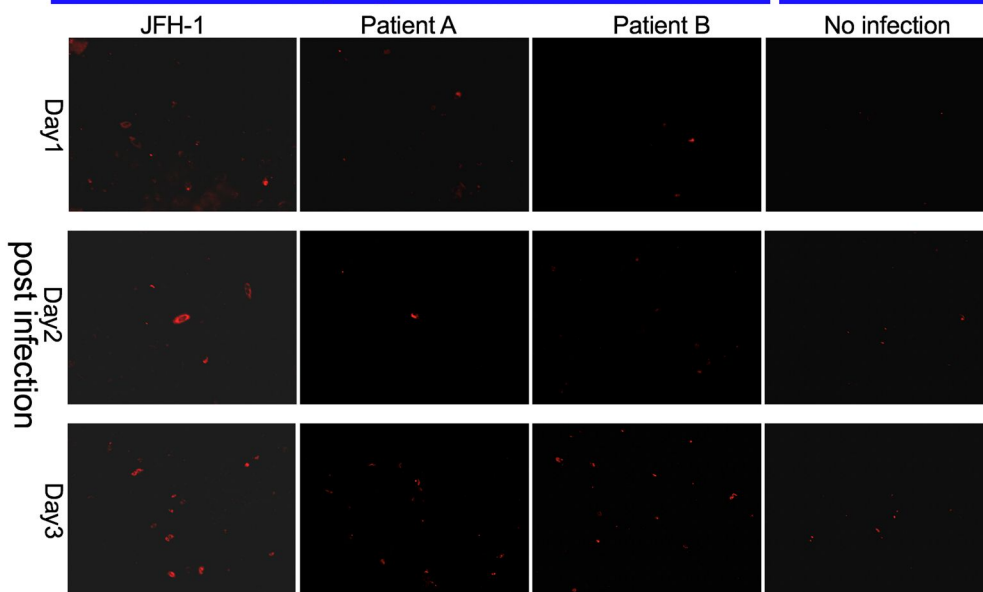


図4B. FU97 (+Sec14L2)で増殖したJFH-1 コア蛋白質 (拡大)

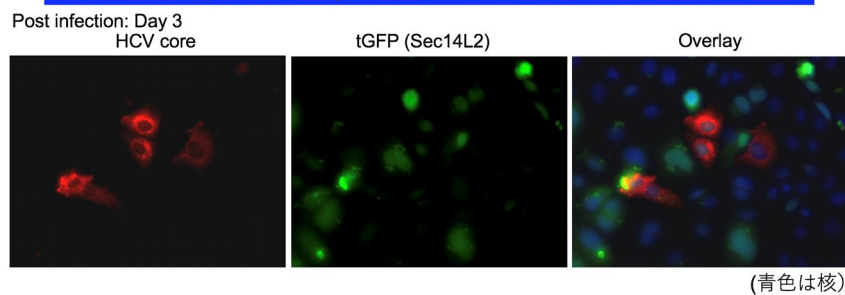
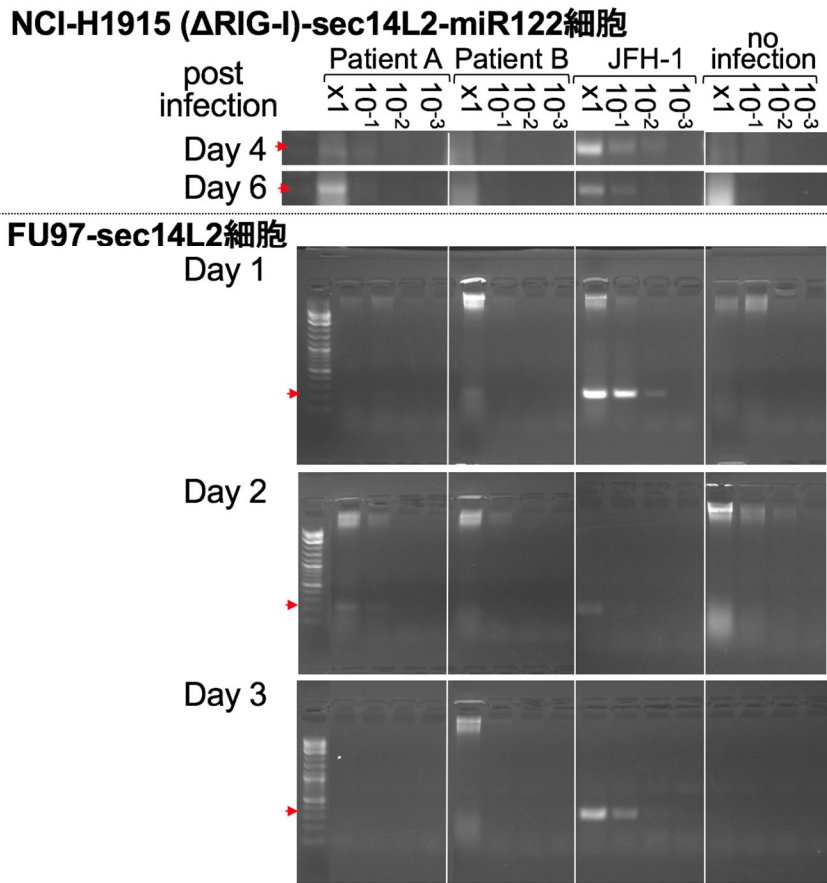


図5. 患者由来HCV (A, B)の各細胞での増殖 HCV RNA



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
(総合)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）
橘川 薫、小島 牧子（関東甲信越ブロック血液センター）

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国内感染等が発生した場合の対応の手引きを作成し、日赤血液センターへ情報共有をした。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実態調査を行い、陰性血液の供給にかかる手順書（案）を作成した。

ZIKVの国内感染を想定して、献血血液のスクリーニング検査試薬（Procleix Zika Virus Assay, Grifols Diagnostic Solutions, Inc.）の評価を行った。95%検出感度は14.98 IU/mL（WHO標準品）であった。特異性試験および、同時再現性・日差再現性試験においても良好な結果が得られた。

また、その他の新興・再興感染症の検査系の準備と、ZIKVおよびUSUVの輸血用血液製剤における動態評価を行った。ZIKVは赤血球製剤および血小板製剤においては、DENVで報告されているような増殖は認められなかった。USUVは献血者血清中では感染性が中和される事が示唆された。

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取りまとめた。さらには、国内感染を想定した対応手引き（案）等を作成し、日赤血液センターへ情報共有した。また、妊婦のジカウイルス（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の現状調査を実施し安全対策について検討した。

献血血液のスクリーニング検査試薬の精度を評価し、ZIKVの国内感染発生時（蔓延時）の輸血用血液製剤の安全性確保対策の一つの手段になり得るか検証した。さらに、その他の新興・再興感染症の検査系の準備を行った。ZIKVおよびウスツウイルス（USUV）の輸血用血液製剤における動態評価を行い、これらウイルスが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(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、海外措置及び国内の対応について、WHOのガイダンスや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」を参考し、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で、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。
- ・ ZIKV 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) 日本における妊婦輸血の現状調査

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、新規項目を作成し調査依頼を行った。

2. Grifols社製ZIKV検出用スクリーニング用試薬(Procleix Zika Virus Assay)の精度評価と検査手順の策定

(1) Procleix Zika Virus Assayの精度評価

ア. 感度試験

ZIKV3 株: PF13/251013-18 株(WHO 標準品)、MR766 株(アフリカ由来株)、PRVABC-59 株(アジア由来株)について献血者陰性血漿にて多段階希釈調製した試料(a、b、c、d、...IU/mL)を各 Y 重測定し、JMP ver.13 を使用したロジスティック回帰分析により 95%検出感度を算出した。

イ. 特異性試験

ALT 検査不適献血者血漿 500 検体を使用し評価した。近縁の日本脳炎ウイルス(JEV)との交差性について、日本に侵淫している JEV 遺伝子 1 型(Mie41 株)と遺伝子 3 型(JaGar01 株)で評価した。

ウ. 同時再現性・日差再現性試験

ア. 感度試験において PF13/251013-18 株の 95%検出感度以上の 3 濃度(270、90、30 IU/mL)を各濃度 8 回測定/日で 3 日間測定した。同じ日にち内で測定したさいの S/CO および、日にちを変えて測定したさいの同

じ測定回ごとの S/CO の変動係数 (CV) を算出し評価した。

(2) 検査手順の策定

国内感染事例の発症に備えて、同試薬による検査手順を策定した。

3. その他のウイルスの検査系の準備

(1) 風疹ウイルス

国立感染症研究所より分与された風疹参照RNAについて、滅菌蒸留水 (DW) を使用した多段階希釈法により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を参考に実施した。

(2) 麻疹ウイルス

国立感染症研究所より分与された麻疹参照RNAと弱毒性麻疹ウイルスワクチン (シュワルツFF-8株) について、DW を使用した多段階希釈法により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を参考に実施した。

(3) USUV

USUV の遺伝子情報や、論文で報告されている方法を参考にし、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 について、献血者陰性血漿を使用した多段階希釈法により検出感度を算出した。また、近縁の 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。

4. ZIKV の輸血用血液製剤の保存期間に

おける動態評価

血小板製剤 (N=3) と赤血球製剤 (N=3) に ZIKV ($7.34 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ を約 2mL) を添加し、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。

5. 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)

日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会の倫理審査を受け、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・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 (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、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。
- ・ZIKV 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) 日本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実態よりは多く報告されていることが推測された。

2. Grifols社製ZIKV検出用スクリーニング用試薬(Procleix Zika Virus Assay)の精度評価と検査手順の策定

(1) Procleix Zika Virus Assayの精度
評価

ア．感度試験

ZIKV 3 株の算出された 95%検出感度は各々以下のとおりであった。

- ・ PF13/251013-18 株 : 14.98 IU/mL (95%信頼区間[CI] 0.90 ~ 46.50 IU/mL)
- ・ MR766 株 : 12.10 IU/mL (95%CI 10.01 ~ * - IU/mL)
*算出不能であった。
- ・ PRVABC-59 株 : 77.34 IU/mL (95%CI 28.63 ~ 106.76 IU/mL)

イ．特異性試験

測定した ALT 検査不適献血者血漿 500 検体は、全て陰性であり非特異的の反応は認められなかった。また、同様に測定した JEV(Mie41 株 と JaGar01 株 : 各 4×10^6 TCID₅₀/mL) も全て陰性であり、JEV との交差反応も確認されなかった。

ウ．同時再現性・日差再現性試験

同時再現性および日差再現性試験における CV は各々以下のとおりであった。

- ・ 同時再現性 : 中央値 2.81% (1.98 ~ 3.52%の範囲)
- ・ 日差再現性 : 中央値 2.07% (0.24 ~ 4.78%の範囲)

共に高い再現性が示された。

(2) 検査手順の策定

「血液製剤及び献血血の安全性確保と安定供給の維持のための新興・再興感染症に関する総合的研

究」にて、平成28年度に作成したWNVの検査手順を参考に作成した。

3．その他のウイルスの検査系の準備

(1) 風疹ウイルス

風疹参照RNAについて、算出された95%検出感度は : 66.0 copies/mL (95% CI 33.8 ~ 391.8 copies/mL)であった。

(2) 麻疹ウイルス

麻疹参照RNAおよび弱毒性麻疹ウイルスワクチンについて、算出された95%検出感度は以下のとおりであった。

- ・ 麻疹参照RNA : 23.1 copies/mL (95% CI 5.8 ~ 92.2 copies/mL)
- ・ 弱毒性麻疹ウイルスワクチン : 59.7copies/mL (95%CI 24.5 ~ 532.8 copies/mL)

(3) USUV

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て検量線を作成したところ、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JaGar01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。

4．ZIKV輸血用血液製剤の保存期間における動態評価

血小板製剤の保存期間(0日目 ~ 7日

目)のZIKV-RNA濃度と感染力価は、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ZIKV-RNA濃度と感染力価は、共に減少していた。対照(生理食塩水)と比較しても大きな差はなかった。

5. 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。これらの作成した対応手引きについては、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。このため、ZIKVの国内感染が確認された場合の対策として、ZIKV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ZIKV陰性血液ストック又は予約注文による対応手順(案)を作成した。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。

Grifols社製ZIKV検出用スクリーニング用試薬の精度評価を行った結果、WHO標準品を用いた感度試験では、95%検出感度は14.98 IU/mLであった。アジア由来株、アフリカ由来株ともに十分な感度で検出出来ることも確認された。特異性試験において、献血者血漿500検体が全て陰性と判定されたこと、およびJEVとの交差反応がなかったことから、高い特異度であることが確認された。また、同時再現性・日差再現性試験においても良好な結果が得られた。これらのことから、ZIKVの国内感染が発生した場合の、輸血用血液の安全性確保の観点から、当該試薬は一つの手段として使用可能であると考えられた。同試薬を使用する検査手順については、WNV試薬の手順と同様に作成しているが、日赤基幹システムとの連携はなく、GMPの観点からシステム連携の検討が必要である。

また、今回評価した麻疹ウイルス、風疹ウイルスの核酸検出系の感度等は十分であったことから、これらウイルスに対する検査の準備は行えたと考えられる。同様に、今回構築した USUV の核酸検出系も、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、検査の準備を行えたと考えられる。

ZIKV は、血小板製剤および赤血球製剤の保存期間中において、近縁の DENV のようなウイルスの増殖は認められなかった。よって、これら製剤を保存することが、ZIKV 輸血感染のリスク増加には繋がらないと考えられた。

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。

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、DENV 及びチングニアウイルス) 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

2.学会発表

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、国内感染が確認された場合の対策として、ZIKV 陰性血液の供給にかかる手順書 (案) を作成した。

Grifols 社製 ZIKV 検出用スクリーニング用試薬 (Procleix Zika Virus Assay) の検査精度は良好であることが確認された。さらに、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、USUV において、高い検出感度の検査系が準備できた。

また、ZIKV は赤血球製剤および血小板製剤の保存期間中に、ウイルスの増殖は認められなかった。USUV は献血者血清中では、JEV ワクチン接種等から得られる抗 JEV 抗体の存在により感染性が中和される事が示唆された。よって、これらウイルスが血液製剤中で輸血感染リスクが高まるような事象は生じず、USUV においては寧ろ、感染性が中和されることで輸血感染リスクが低くなる可能性が予想された。

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

篠原直也、橘川薫、小島牧子ら。ジカウ
イルス核酸検出用試薬の精度評価。第
42 回日本血液事業学会総会、10 月 2-4
日、2018 年。

特になし

実用新案登録

特になし

G . 知的所有権の取得状況

特許取得

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(HCV)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来た。本研究では、HCV以外のDNAウイルスもHCVと同様に移行すること、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は、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、さらにこれらの抗HCV精製抗体共存化での感染性や核酸の移行について確認した。グロブリン製剤でのHCV等の薬害の報告がこれまでにない理由について、科学的に考察することを目的とした。

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。

本研究では、この現象は HCV に特化したことであるかを HCV 以外の DNA ウイルスである B 型肝炎ウイルス(HBV)を用いて確認する。

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かを検討する。さらにこれらの抗 HCV 精製抗体共存化での感染性や核酸の移行について確認し、グロブリン製剤での HCV 等の薬害の報告がこれまでにない理由について、科学的に考

察することを目的とした。

我々の研究では、モデルウイルスではなく、実ウイルス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 4.2×10^6 CCID₅₀/mL のものを実験に用いた。

2. HBV 陽性血漿

国際試薬株式会社より購入したものを使用した。

3. HCV, HBV 抗体陽性ドナー血漿の性状

HBs 抗原陽性、HBV DNA、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)。

4. 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 は低温下で撹拌しながら 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 で撹拌しながら、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。

コーンエタノール分画における HBV 核酸の移行の検討のためには、HBV をス 1:9 の割合で陰性血漿にスパイクし、左記と同様に S3 まで分画し、各フラクションを回収して解析に用いた。

5. 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 (1×10^5 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分攪拌後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。

6. 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。

7. HBV DNA の定量

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

8. 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 CCID₅₀/mL, 1ウェル当たり 1.0×10^4 CCID₅₀)を混合して37℃、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. 血漿にスパイクしたHBVウイルス核酸の移行

血漿にスパイクしたHBVウイルス核酸は、クリオ/脱クリオ分画において、除去することは出来ず、クリオ、

脱クリオ両方に移行した。その後 8% エタノール分画においては、沈殿より上清に多く HBV-DNA が移行した。25%、20%エタノール分画においては HBV DNA は沈殿と上清のいずれの画分へも移行した。17%エタノール分画においては、ほとんどが沈殿に HBV DNA が移行し、グロブリン原料となる上清へは 3log 以上の除去効果が認められた(図 1)。2 回実施した実験のうち、1 回は上清中に核酸は確認されなかった。

2. 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 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。

3 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(表 1)。

3. 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 2)。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 2A、表 2)。

D. 考察

血漿にスパイクした HBV ウイルス核酸は、クリオ/脱クリオ分画および、8%エタノール分画では除去できず、第 因子、第 因子、フィブリノゲン製剤の原料となる画分に移行した。分画製剤における、加熱やウイルス除去

膜等の不活化処理工程の重要性が示唆された。17%エタノール分画の際には、その多くが沈殿へ移行し、上清画分への除去効率は3log以上であった。17%エタノール処理は、グロブリンの凝集体を除くための工程であるが、凝集体と一緒にウイルス等の感染性粒子も一緒に沈殿へ移行している可能性が考えられた。HBVは42nmのDNAウイルスであり、比重は1.3とされ、HCVは40-50nmのRNAウイルスで比重は1.1とされている。性状が異なるウイルスであっても、17%エタノール処理は、これらのウイルスを効率良く除去できる工程であり、加熱、ウイルス除去膜等の不活化処理が導入されていなかった時代においても製剤の安全性向上に貢献して来たと考えられた。

17%エタノール分画について、抗HCV抗体が共存した場合、HCV核酸がどのように移行するかを検討し、HCV-JFH-1核酸は99.98%沈殿に移行したが、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殿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。上清に移行した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、ウイルス粒子が沈殿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ウイルスが上清に僅かに移行した場合でも同時に中和抗体が共存するために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、結果として僅かなHCVがグロブリン分画へ移行した場合でも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、ウイルス除去膜等の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
 - i. Analysis of HCV in the fractions with Cohn ethanol method in a laboratory scale, 第64回ウイルス学会、神戸、Kiyoko Nojima, Takashi Shimoike, Takaji Wakita, Isao Hamaguchi, and 1Yoshiaki Okada
 - ii. Analysis of the states of HCV with 17% ethanol-treatment in Cohn ethanol method, 第64回ウイルス学会、神戸、Takashi Shimoike, Kiyoko Nojima, Takaji Wakita, Isao

Hamaguchi, and 1Yoshiaki
Okada

3. 特許取得

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 抗体陽性血漿由来グロブリン

* 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

沈殿への移行率

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

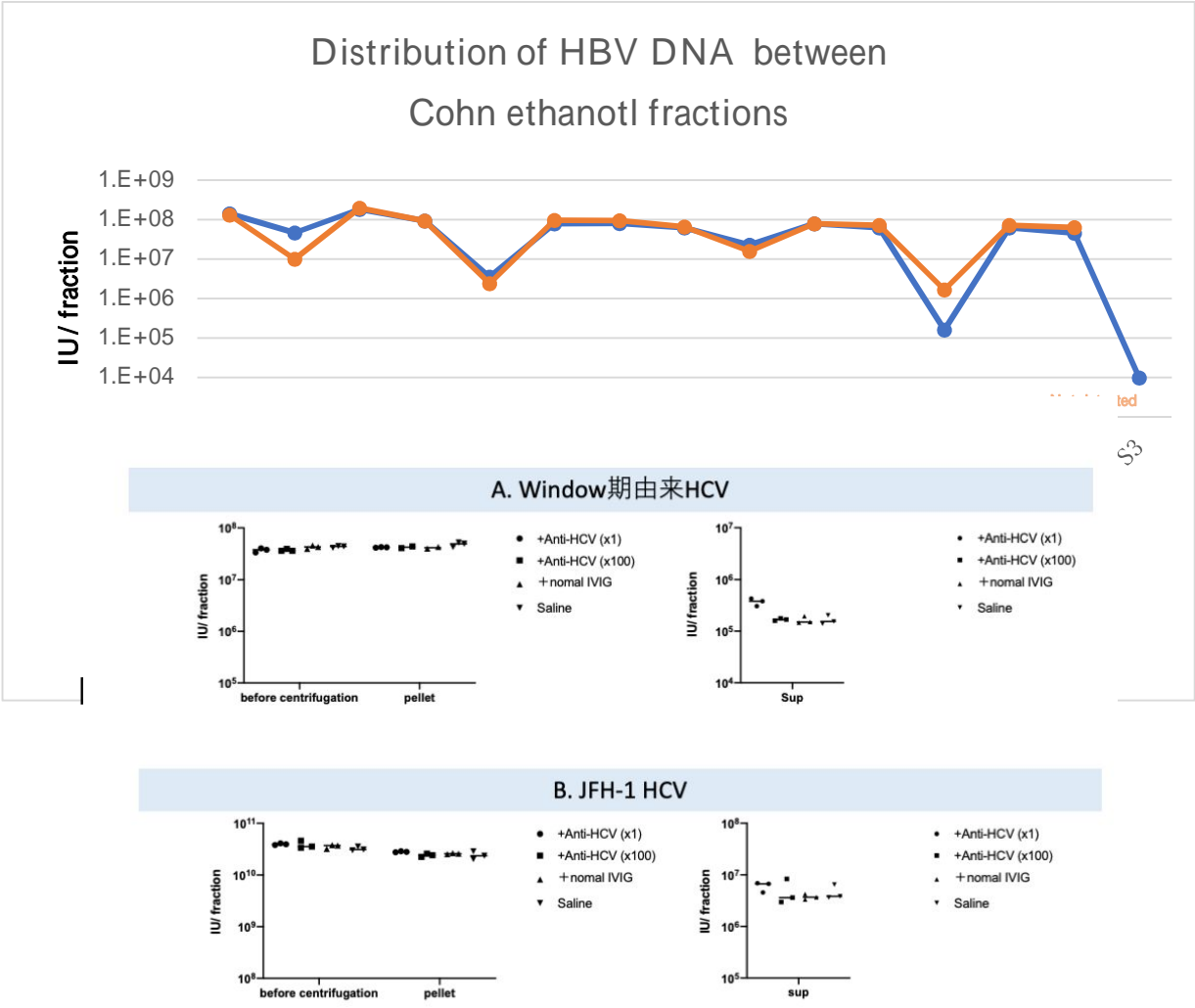


図 2. コーンエタノール分画における HBV DNA の移行

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）
	今西 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、渡り鳥の飛来地でマダニ相を調査し、採取された植生マダニからウイルス検出を行なった。さらに、植生マダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有するウイルスの感染環を明らかにすることを目的とした。

北陸3県（富山県、石川県、福井県）の渡り鳥飛来地の合計7地点において、4月～11月の間、月に1回フランネル法により植生マダニを採取した。2017～2019年の調査で、キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、ヤマアラシチマダニの順に生息数が多い傾向が認められた。さらに、愛媛県内のSFTS浸淫地において採取したマダニも加えてウイルス分離および次世代シーケンス（NGS）解析を行った結果、Kabuto mountain virus（KAMV）、Tarumizu tick virus（TarTV）が分離され、Okutama tick virus（OKTV）の遺伝子が検出され、その全ゲノム配列を解析することができた。NGS解析により、その他にも複数の新規・未分類のウイルスの遺伝子が検出された。次いで、マダニの吸血源動物種の推定に用いるReverse line blot hybridization（RLB）法を改良し、国内の哺乳類18種、鳥類15種の特定を可能にした。予備的に試験として用いた広島県および愛媛県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。

本研究により、マダニは複数のウイルスを保有していること、SFTSのベクターは環境によって異なる可能性が高いこと、国内外の広範な地域に同一ウイルスが点在することが示唆され、NGS解析がダニ媒介病原体を対象とするサーベイランスに有用であることが確認された。マダニ媒介感染症の海外からの侵入を監視すると同時に、国内での媒介マダニの生息域の拡大等に関する情報を収集し、提供することによって献血者への注意喚起を促し、マダニ媒介感染症の感染リスクを減少させる努力が必要である。

A. 研究目的

国内では、2012 年秋に渡航歴のない山口県在住の女性が重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) により死亡したことが、翌 2013 年 1 月に国内 1 例目として報道され、その後も西日本を中心に患者が発生している。2019 年の患者数は過去最高の 102 名となり、これまで西日本を中心に 1 都 2 府 21 県から合計で 498 名の患者数 (うち死亡例は 70) が報告されている。当初は 20% 以上と非常に高い致死率を記録したが、2017 年以降は 10% を下回るようになった。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ており、今後、東日本へ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。

他方、1993 年に北海道で初めての感染例が報告されたダニ脳炎は、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っており、ダニ脳炎が国内に常在していると推察されている。近年では、2016 年から 2018 年まで 3 年連続で感染例が報告されている。

これらダニ媒介性の病原体は、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、これまでは輸血によってダニ媒介ウイルス感染症に罹患した報告はないが、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を喚起し、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。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知られていない。

本研究では、渡り鳥の飛来地および SFTS 浸淫地のマダニ相を調査し、マダニが保有するウイルスの網羅的検出を行った。また、マダニの吸血源動物種を特定するために、欧州で開発された Reverse line blot hybridization (RLB) 法 (Pichon et al., 2003, Estrada-Pena et al., 2005) を国内の野生動物検出用にプローブを改良した。本研究では、特に SFTS ウイルスを媒介すると推定されるフタトゲチマダニ、キチマダニ等に注目し、それら植生マダニの吸血履歴を明らかにすることで、SFTS ウイルスの感染環を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) マダニ相の調査

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 (各地点で

複数カ所を選定)でマダニ相の調査を行った。2017年から2019年の3年間、4~11月の間に原則月に1回、フランネル法(約70cm×100cm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。

愛媛県のSFTS浸淫地においても上記同様に、フランネル法により植生マダニを採取した。

2) 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、マダニの破碎液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、ウイルス種を同定した。

3) マダニの吸血源動物の探索

RLB法を本邦産の野生動物検出用に改良し、微量な動物血液由来DNAからマダニが利用した動物種を推定した。まず、植生マダニから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、各種動物種に特異的なプローブと反応させた。

C. 研究結果

1) マダニ相の調査

2017年~2019年に福井、石川および富

山県の北陸3県の渡り鳥飛来地周辺でマダニを採取し、これまでに合計4属9種約2,300頭の植生マダニを同定した。3年間の傾向として、キチマダニ、フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、ヤマアラシチマダニの順に生息数が多いと推察された。特に前2種は、鳥類寄生例が多い種類のダニである(山内, 2001)。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)の季節消長が明らかになった。

2) マダニからのウイルス分離および遺伝子検出

北陸2県および愛媛県で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)が分離された。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、フタトゲチマダニとアカコッコマダニからはそれぞれ新規の異なるナイロウイルスの遺伝子が検出された。また、富山市では、キチマダニからコルチウイルス属のTarumizu tick virus(TarTV)が分離された。

本研究で初めてマダニに試みたNGS解析により、Jingmen tick virus(JMTV)、新規のイフラウイルス、レオウイルス、プニヤウイルス、ノダウイルス等、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。

3) マダニの吸血源動物の探索

我々はこれまでに、欧米の野生動物を検出するために設計されたRLBのプローブ(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、新たにプローブを設計し、合計で哺乳類 18 種、鳥類 15 種の検出を可能にすることができた。また、鳥類共通プローブと特異的プローブを組み合わせた方法の併用も検討した。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 頭がスズメ目の鳥を吸血した履歴があることが示唆された。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ことが明らかになり、これら野生動物は、調査地点の周辺での目撃情報ともほぼ一致していた。

D. 考察

本研究において、兵庫県で初めて確認された KAMV、鹿児島、鳥取、福島県の国内に広く分布している TarTV、東京都下で検出された OKTV を北陸地方から初めて分離し、これらのウイルスが日本各地に広範囲に分布していることが明らかになった。これらのウイルスは、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 5 目 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と考えられる。

KAMV は、これまでに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分離されているが (Ejiri et al., 2018) 長崎県内の植生マダニから分離された報告もある (Hayasaka et al., 2016)。今回の調査で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距離を説明する上で、鳥類が

関与している可能性は否定できない。TarTV は、国内の地理的な連続性がない地域 (鹿児島、鳥取、福島県) の植生マダニからそれぞれ分離されたが (Fujita et al., 2017) 本研究では、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ている。OKTV は、2015 年に東京都青梅市の植生マダニからウイルス遺伝子が検出されたが (Matsumoto et al., 2018) 今回マダニに対して初めて導入した NGS 解析により、輪島市のキチマダニから検出された OKTV の全ゲノムを初めて決定することができた。詳細な配列解析から、OKTV は M セグメントが欠損しているが (M セグメント欠損ウイルス、M segment-deficient phlebovirus : MdPV と命名) 各セグメントの末端にフレボウイルスに共通する保存配列があることが確認された。これらの結果から、マダニ媒介フレボウイルスの一群にみられる新たな進化のメカニズムを提唱するに至った (Kobayashi et al., 2020)。上述した KAMV、TarTV、OKTV は、国内各地に点在するという特徴や宿主であるキチマダニの鳥類寄生性が高いことから、鳥類の移動に伴い、ウイルスが拡散した可能性が高いと考えられた。

鳥類に咬着するマダニは海外から運ばれる可能性が高いことが指摘されている。例えば、中国のマダニから遺伝子が検出された JMTV は、長崎県対馬市のツシマヤマネコに咬着していたタカサゴキラマダニから見つか (Fujita et al., 投稿準備中) 近年、ロシアやトルコからも確認されている。本研究では新たに愛媛県のマダニからも JMTV の存在が NGS 解析により明らかになったが、中国では JMTV により熱性疾患の患者発生が報告されており (Qin et al., 2014) 海外との関連性ならびに人への病原性が危惧されている。

さらに、輪島市のアカコッコマダニとフタトゲチマダニからは、それぞれ異なる未分類のナイロウイルスの遺伝子が検出され、国内で初めての報告となった。アカコッコマダニは、キチマダニに次いで鳥類寄生例が多く、27 種類の鳥類への寄生が報告されている(山内, 2001)。また、フタトゲチマダニもスズメ目 7 種の鳥類への寄生が確認されており、両種ともに鳥類寄生性が高いマダニと言える。このことから、輪島市由来の未分類ナイロウイルスは鳥類が関わるウイルスである可能性が高いと考えられた。ナイロウイルス属には人への病原性の高いクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)ウイルスが属することから、輪島産ナイロウイルスの病原性の確認を急ぐとともに、海外からのウイルスの侵入監視必要である。

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、プニヤウイルス、ノダウイルス等)を保有していることも明らかになった。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ことが示唆された。NGS 解析の利用は、今後のマダニ媒介病原体を対象としたサーベイランスに有用であると結論した(Kobayashi et al., 2020)。

本研究期間内に、合計 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することができた。予備的な試験ではあったが、広島県産の植生マダニの多くに鳥類を吸血した履歴が確認されたことから、マダニの移動は、哺乳類のみならず、鳥類の移動をも考慮する必要があることが示唆された。これ

らの結果は、直接、輸血制限範囲を拡大することには繋がらないが、マダニ媒介病原体はすでに国内に分布しているものだけでなく、海外から侵入する病原体があることも事実である。マダニ媒介感染症の海外からの侵入を監視すると同時に、国内での媒介マダニの生息域の拡大等に関する情報を収集し、提供することによって献血者への注意喚起を促し、マダニ媒介感染症の感染リスクを減少させる努力が必要である。

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。ここに御礼を申し上げます。

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、TarTV、OKTV、JMTV 以外に複数の新規および未分類のウイルスが分離・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。

4) NGS 解析がマダニ媒介病原体を対象とするサーベイランスに有用であることが確認された。

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, 前川芳秀, 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, Faizah AN, Amoa-Bosompem M, 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

小林大介, 伊澤晴彦, 室田勝功, 糸川健太郎, Faizan AN, Amoa-Bosompem M, 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

厚生労働科学研究補助費（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

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』

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]

本分担研究では血漿分画製剤製造工程における HEV の除去・不活化を適切に評価する方法の確立を目指した。

1年目は確保が困難なヒト血漿由来 HEV (pd-HEV) を代替するモデルウイルスを探索し、リバースジェネティクス法を用いて培養細胞より約 9 Log copies/mL の高濃度 HEV (RG-HEV) を産生する方法を確立した。RG-HEV の粒子表面には pd-HEV と同様に脂質が結合しており、有機溶媒 / 界面活性剤 (S/D) 処理によって部分的に、またデオキシコール酸ナトリウム/トリプシン (NaDCA/T) 処理によりほぼ全て除去されることを確認した。

2年目は RG-HEV を用いたウイルス除去膜ろ過工程による HEV 除去効果を検証した。脂質の除去により HEV の粒径は小さくなり、NaDCA/T 処理した場合がウイルス除去膜ろ過工程のワーストケースとして想定された。NaDCA/T 処理した pd-HEV と RG-HEV のろ過特性は同等であり、NaDCA/T 処理 RG-HEV を用いたウイルス除去膜ろ過工程の評価は妥当であった。NaDCA/T 処理 RG-HEV を用いて血液凝固第 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が確認できた。

3年目は RG-HEV を用いた液状加熱工程による HEV 不活化動態を検証した。RG-HEV でも pd-HEV と同様に、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った。両 HEV の熱安定性は同程度であったことから、脂質が結合する 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であった。

以上のように、高濃度で取得可能な RG-HEV を用い、血漿分画製剤製造工程でのウイルス除去膜ろ過工程による除去効果及び液状加熱による不活化効果の評価法を確立した。

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¹⁾、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 陽性血漿の排除や製造工程での 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プタ
 バルボウイルス (PPV)、ネズミ脳心筋炎ウイルス
 (EMCV) 及びプタ糞便由来 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)}。実際
 に混入するリスクがある 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った。さ
 らに、血漿分画製剤の製造過程で用いられるアルコ
 ール分画や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理により
 pd-HEV から脂質が除去され、その物理化学的性質
 の変化が予想される。そのため、HEV の除去・不活
 化効果を評価する際には、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必要がある。
 このように既存のモデルウイルスとは異なる特性を
 有する pd-HEV を代替するモデルウイルスを探索し、
 候補となるモデルウイルスを用いて、血漿分画製剤
 製造工程における HEV の除去・不活化評価法を確
 立することが本研究の目的である。

B. 研究方法

1. ウイルス

sw-HEV は swJR-P5 株 (GenBank AB481229.1) を、
 pd-HEV は 3 人のドナー由来の HEV ゲノム陽性血漿
 をウイルス材料とした (pd-HEV-1 : GenBank
 LC131066、pd-HEV-27 : GenBank LC386856、
 pd-HEV-40 : GenBank LC386855)。

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. リバースジェネティクス法を用いた培養細胞か らの HEV 産生

sw-HEV ゲノム配列の DNA を合成し、プラスミド
 ベクター pSP64 に挿入した。組み換えベクターを大
 腸菌 DH5α でクローニングし、制限酵素消化により
 直鎖状とし、これを鋳型として CUGA in vitro
 Transcription Kit (ニッポンジーン) により RNA 合成
 を行った。合成された RNA に対し ScriptCap mG
 Capping System (Epicentre) を用いて 5' 末端のキャッ
 ピングを行い、TransIT-mRNA Transfection Kit (Mirus)
 を用いて PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクションし
 た。2~3 日毎に培地の半量を交換し、この培地交換
 時に採取した培養上清中に含まれる HEV を
 RG-HEV として本研究に使用した。

5. HEV の処理

各 HEV を超遠心分離し (150,000 × g, 4℃, 3 時間)、
 沈殿画分を 50 mM Tris 緩衝液, pH7.6 で懸濁した。こ
 れらの HEV 懸濁液に対して以下 2 つの処理を施し
 た; Tween80 を終濃度 0.3%、TNBP を終濃度 1%
 となるよう各々加え 30℃ で 2 時間インキュベーショ
 ン (S/D 処理)、NaDCA を終濃度 1%、Trypsin を
 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)。各処理後液を TBS で約 10 倍に希釈後、超遠心分離し (150,000 × g、4□、3 時間)、沈殿画分を TBS で懸濁して各処理後 HEV とした。

6. 密度勾配遠心による HEV の浮上密度測定

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

7. ウイルス除去膜による HEV の大きさ比較

RG-HEV、pd-HEV を氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。HEV の終濃度約 5 Log copies/mL となるよう各ろ液を TBS へ添加した (Virus-spiked material)。このうち 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) によりろ過し (室温、20 kPa) 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 Nuclease で 28□ 30 分間処理後、ゲノム濃度を測定した。

8. 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

NaDCA/T 処理 RG-HEV を氷上で超音波処理後、0.22 μm フィルターでろ過した。RG-HEV が終濃度約 8 Log copies/mL となるよう、このろ液を血液凝固第 VIII 因子製剤であるクロスエイト MC 製造工程中

間液に添加した (Virus-spiked material)。再度 0.22 μm フィルターでろ過し、このうち 27 mL をプラノバ 20N でろ過した (室温、80 kPa)。ろ液 (Filtrate) を回収した後、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。

9. 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し (150,000 × g、4□、3 時間) 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。このろ液を NaDCA/T 処理後、再度超遠心分離し (150,000 × g、4□、3 時間)、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、氷上で超音波処理後、0.22 μm 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) を加え、37□ 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 を含む培養上清を S/D 処理後、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 μm 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□フリーザー中に保存した。加熱処理サンプルは、液温 60.0±1.0□ 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□フリーザーに保存した。

10. 液状加熱処理 (59.0±1.0℃、10 時間)

RG-HEV を含んだ培養上清及び 50 mM Tris 緩衝液、pH7.6 に懸濁された RG-HEV を超遠心分離し (150,000 × g、4℃、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 (実製造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℃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±1.0℃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℃フリーザー中に保存した。なお比較のため示した pd-HEV の不活化データは、2017 年度以前に取得し、論文誌に発表済み^{2,3)}である。

(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. リバースジェネティクス法を用いた培養細胞からの HEV 産生

sw-HEV をもとに合成された HEV ゲノムを PLC/PRF/5 細胞にトランスフェクションし、約 60 日間培養した。培養上清中の HEV RNA を定量すると、約 30 日目に培養上清中の HEV RNA 濃度は約 9

Log copies/mL に達し、その後も同程度の HEV RNA が検出された (図 1A)。トランスフェクション 4、24、及び 54 日後に回収した培養上清中の HEV 感染価を測定したところ、検出される HEV RNA 量に応じて感染価は上昇し、感染性を有した HEV (RG-HEV) が高濃度で産生されていることが確認された (図 1B)。

2. 密度勾配遠心による RG-HEV の評価

RG-HEV の浮上密度を、ドナーの異なる 3 種の pd-HEV (-1, -27, -40) 及び sw-HEV と比較した。RG-HEV のピークは 1.121 g/mL であり、脂質の結合する pd-HEV のピーク (1.102-1.108 g/mL) より僅かに高く、脂質を有さない sw-HEV のピーク (1.239 g/mL) より低かった (図 1C)。RG-HEV 及び pd-HEV を NaDCA/T 処理すると 1.225-1.234 g/mL にピークを示し、sw-HEV とほぼ同じになった (図 1D)。また NaDCA/T 処理に比べてその程度は小さいが、S/D 処理によっても高密度 (1.171-1.185 g/mL) へピークが変化した (図 1E)。これより、RG-HEV には pd-HEV と同様に脂質が結合し、この脂質は NaDCA/T 処理によりほぼ全てが、S/D 処理により部分的に除去されることが確認された。

3. HEV の大きさ

RG-HEV または pd-HEV を TBS に添加し、プラノバ 20N と 35N でろ過したところ、いずれのろ液でも HEV は検出されず、各 HEV は 35 nm 以上の大きさであることが推測できた (表 1, 2)。脂質の結合する HEV は、血漿分画製剤製造工程中のアルコール分画や S/D 処理によりその脂質が除去され、粒子径が小さくなると予想される。そこで、ワーストケースを想定し、NaDCA/T 処理した HEV のプラノバ 20N

と 35N による除去効果を検証した。プラノバ 20N の液中には、いずれの HEV も検出されなかったが (表 2) プラノバ 35N では、pd-HEV と RG-HEV は液中に同程度に漏れ出し (表 1) NaDCA/T 処理後の pd-HEV と RG-HEV はほぼ同じ大きさと推測された。これより、ウイルス除去膜ろ過工程の HEV 除去効果の検証に pd-HEV の代わりとして RG-HEV を使用することは妥当と判断した。

4. 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 の実製造から採取し工程液に添加し、プラノバ 20N ろ過を行った (n=2) と、LRV は、感染価測定で 4.7/ 4.3 となり (表 3)、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。

5. RG-HEV に結合する脂質の熱安定性への寄与

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 RG-HEV の液状加熱処理 (60.0±1.0℃、120 分) を行い、感染価を測定した。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、120 分後の LRV は 1 未満であった (図 2A 青線)。一方、NaDCA/T 処理により脂質が除去された RG-HEV は速やかに不活化され、30 分後の LRV は 4 に達した (図 2A 緑線)。S/D 処理により脂質が部分的に除去された RG-HEV も不活化された

が、そのカイネティクスは NaDCA/T 処理より遅かった (図 2A 赤線)。以上より、過去に報告した pd-HEV^{2, 3)}と同様、RG-HEV でも脂質の結合した状態の熱安定性は高いことが確認された。

6. 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 をアルブミン安定化液または 25% アルブミン溶液に添加し、液状加熱処理 (59.0±1.0℃、10 時間) し、加熱開始 0.5、1、5、及び 10 時間後の感染価を測定し、過去に同条件で処理を行った pd-HEV と比較した^{2, 3)}。アルブミン安定化液中で、RG-HEV は pd-HEV と類似するカイネティクスで不活化され、10 時間後の LRV は 4 以上であった (図 2B 赤と青線)。一方 25% アルブミン溶液中では、pd-HEV と同様に、RG-HEV は安定化し、1 時間後まで不活化されなかった。その後、RG-HEV はゆっくり不活化され 10 時間後の LRV は 1 を僅かに超え (図 2B 緑線)、その不活化カイネティクスは pd-HEV に類似していた (図 2B 緑と紫線)。以上より、両 HEV の熱安定性はほぼ同程度と推察され、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した

D. 考察

リバースジェネティクス法を用いて培養細胞 PLC/PRF/5 より産生される RG-HEV の濃度は 9 Log copies/mL (およそ 6 Log TCID₅₀/mL 相当) であり、血漿分画製剤の HEV 除去・不活化工程を感染価で評価することが可能である。

RG-HEV には pd-HEV と同様に脂質が結合しているが、NaDCA/T 処理により脂質が除去され RG-HEV の粒径は同処理した pd-HEV と同様な大きさとなっ

た。血漿分画製剤の製造工程に用いられるエタノール分画や S/D 処理によっても pd-HEV から脂質は除去されたが、その効果は NaDCA/T 処理よりも低く、ウイルス粒子表面の脂質が残存していると推察された(図 1D と E、及び 2017 年度分担研究報告書参照)。そのため、NaDCA/T 処理により脂質を除去した RG-HEV は血漿分画製剤工程中の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に適するだろう。

また、RG-HEV は、pd-HEV と同様に脂質を除去すると熱安定性が同程度に低下した。このことから、脂質が結合した非処理 RG-HEV を用いて、液状加熱工程における HEV 不活化効果を評価することがワーストケースとなるだろう。

本研究より製造工程において HEV から脂質が除去されることが予想されている(2017 年度分担研究報告書参照)。この実態を反映する前処理を施した RG-HEV を使用することにより、ウイルス除去・不活化工程における pd-HEV の動態を確度高く推測することもできるだろう。

E. 結論

リバースジェネティクス法により得られた高濃度の RG-HEV を用い、血漿分画製剤製造工程でのウイルス除去膜ろ過工程における HEV 除去効果及び液状加熱工程における HEV 不活化効果を評価できるようになった。

(謝辞)

本研究の一部は筑波大学医学医療系消化器外科学 大河内信弘先生(現・水戸中央病院長)、大城幸雄先生(現・東京医科大学茨城医療センター消化器外科所属)、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

Maeno H, Adachi M, Takahashi K, Ideno S, Sakai K, Takeuchi K, Oshiro Y, Ohkohchi N, Okada Y. Treatment of Hepatitis E virus (HEV) particles with ethanol or detergent alters their physical behavior during Chon's ethanol fractionation. *Plasma Product Biological Meeting 2017, Malta.*

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

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

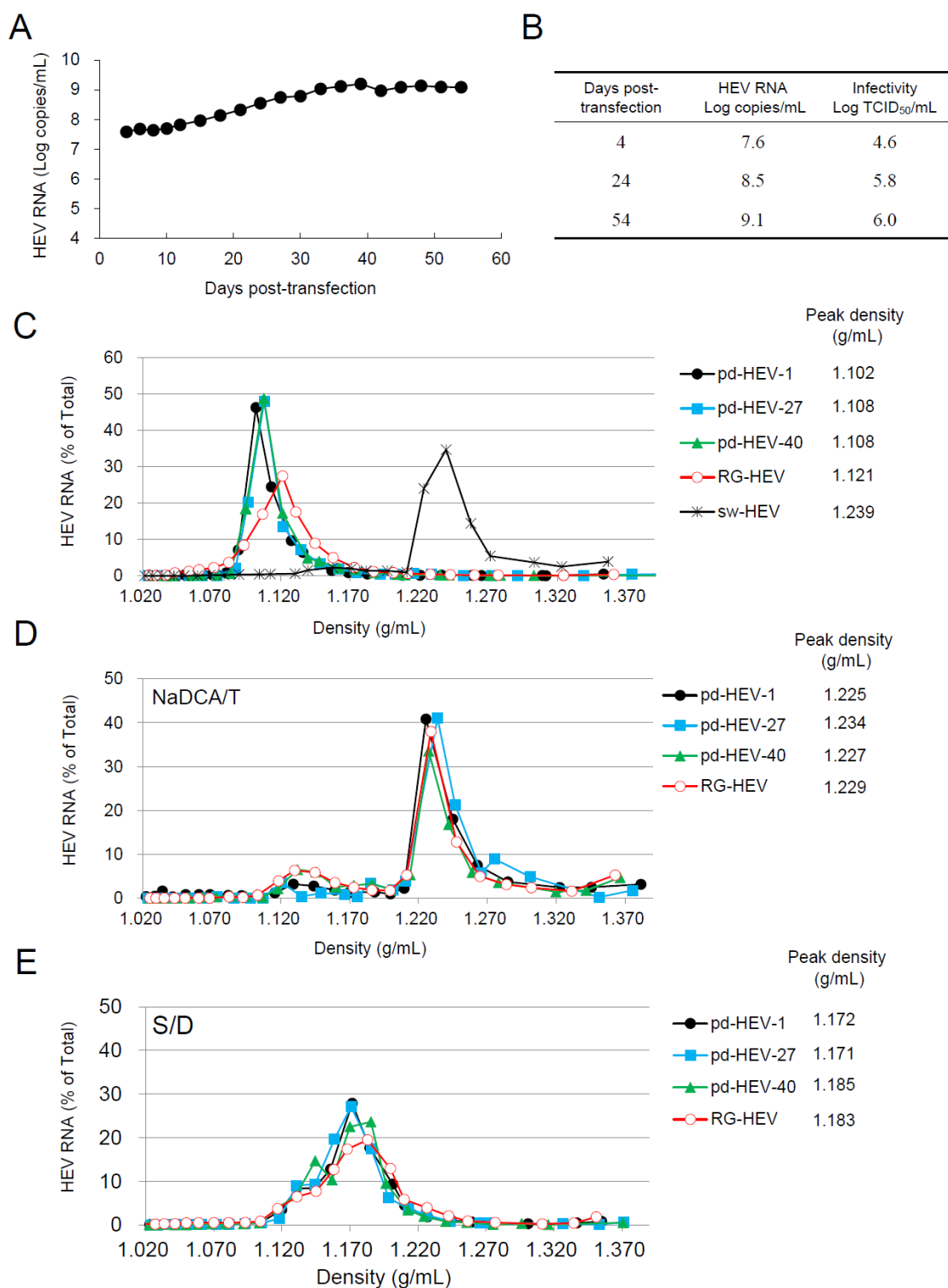


図1 RG-HEV の産生と密度勾配遠心による解析

A. sw-HEV のゲノムを鋳型に合成したゲノム RNA を PLC/PRF/5 細胞に Transfection し、培養上清中の HEV RNA を経時的に定量した。B. 示された日に回収した培養上清中の HEV RNA を定量し、感染価 (HEV infectivity) を測定した。C. RG-HEV、3 種の異なるドナー血漿由来の HEV (pd-HEV-1、pd-HEV-27、pd-HEV-40) 及び sw-HEV を密度勾配遠心により分析した。縦軸は全フラクションの HEV RNA 量の総和に対する各フラクションの割合を示す。D. NaDCA/T 処理後の RG-HEV、pd-HEV-1、pd-HEV-27、及び pd-HEV-40 を密度勾配遠心により分析した。E. S/D 処理後の RG-HEV、pd-HEV-1、pd-HEV-27、及び pd-HEV-40 を密度勾配遠心により分析した。

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

表1 TBS に添加した HEV のプラノバ 35N ろ過実験結果

(-)は NaDCA/T 処理を行っていないこと、(+)は処理を行ったことを示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の常用対数を表す。

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

表2 TBS に添加した HEV のプラノバ 20N ろ過実験結果

(-)は NaDCA/T 処理を行っていないこと、(+)は処理を行ったことを示す。数値はゲノム濃度 (copies/mL) に液量 (mL) を乗じた値の常用対数を表す。

Sample	Infectivity	
	Log TCID ₅₀	
Virus-spiked material	6.9	6.5
Filtrate	<2.1	<2.1
Post wash	<1.6	<1.6
Filtrate+ Post wash	<2.2	<2.2
Virus LRV	4.7	4.3

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

各 Sample の感染価 (TCID₅₀/mL) に液量 (mL) を乗じた数値 (総感染価) の常用対数を Infectivity LogTCID₅₀ とした。Virus-spiked material の総感染価を Filtrate と Post wash の総感染価の和で除した値の常用対数を LRV とした。

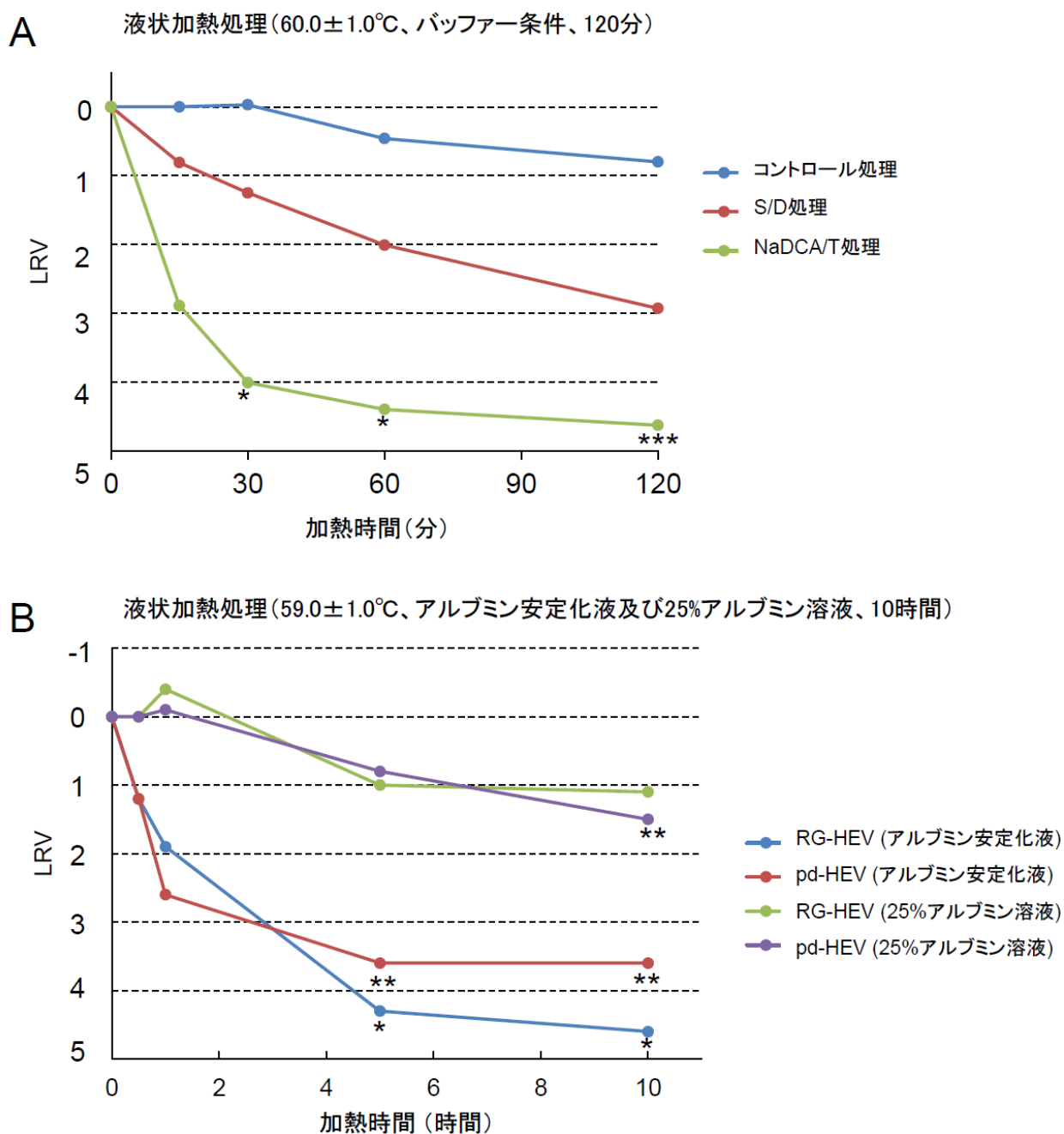


図2 液状加熱処理によるRG-HEVの不活化動態

A. 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 ($60.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、120分) 処理した。加熱処理前サンプルのウイルス感染価を示された時間の加熱処理後サンプルの感染価で除した値の常用対数をLRVとし、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。

B. 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 ($59.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、10時間)を行った。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常用対数をLRVとし、加熱時間とLRVの関係を示した。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。

研究成果の刊行に関する一覧表

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-Bosompem M., Faizah A.N., 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
Ejiri H., Lim C.K., Isawa H., Yamaguchi Y., Fujita R., Takayama-Ito M., Kuwata R., Kobayashi D., Horiya M., Posadas-Herrera G., Iizuka-Shiota I., Kakiuchi S., Katayama Y., Hayashi T., Sasaki T., Kobayashi M., Morikawa S., Maeda K., Mizutani T., Kaku K., Saijo M., Sawabe K.	Isolation and characterization of Kabuto Mountain virus, a new tick-borne phlebovirus from <i>Haemaphysalis flava</i> ticks in Japan.	Virus Research	244	252-281	2018
Ejiri H., Lim C.K., Isawa H., Fujita R., Murota K., Sato T., Kobayashi D., Maeda K., Hattori M., Kimura T., Yamaguchi Y., Takayama-Ito M., Horiya M., Posadas-Herrera G., Minami S., Kuwata R., Shimoda H., Maeda K., Katayama Y., Mizutani T., Saijo M., Kaku K., Shinomiya H., Sawabe K.	Characterization of a novel thogotovirus isolated from <i>Amblyomma</i> <i>testudinarium</i> ticks in Ehime, Japan: A significant phylogenetic relationship to Bourbon virus.	Virus Research	249	57-65	2018

<p>Fujita R., Ejiri H., Lim C.K., Noda S., Yamauchi T., Watanabe M., Kobayashi D., Takayama-Ito M., Murota K., Posadas-Herrera G., Minami S., Kuwata R., Yamaguchi Y., Horiya M., Katayama Y., Shimoda H., Saijo M., Maeda K., Mizutani T., Isawa H., <u>Sawabe K.</u></p>	<p>Isolation and characterization of Tarumizu tick virus: a new coltivirus from <i>Haemaphysalis flava</i> ticks in Japan.</p>	<p>Virus Research</p>	<p>242</p>	<p>131-140</p>	<p>2017</p>
<p>Suzuki, R., Matsuda M., <u>Shimoike</u>, T., Watashi, K., Aizaki H., Kato T., Suzuki T., Muramatsu M., Wakita, T.</p>	<p>Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase.</p>	<p>Virology</p>	<p>529</p>	<p>226-233</p>	<p>2019</p>