

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
安全性と安定供給を確保するための
新興・再興感染症の研究
(20KC1001)

令和2年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

令和3(2021)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と安定供給を確保するための 新興・再興感染症の研究	研究代表者	岡田 義昭
		P 1-P 5
II. 分担研究報告		
1. 血液製剤の安全性を確保するための蚊媒介性ウイルスの ウイルス学的特性の解析	林 昌宏	P 6-P 9
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	P10-P11
3. 赤血球製剤の新規不活化法の開発	岡田 義昭	P12-P15
4. 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	P16-P26
5. マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防	比嘉 由紀子	P27-P32
6. 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	P33-P38
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		P39

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と安定供給を確保するための

新興・再興感染症の研究の開発

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

1. フラビウイルスを検出できる共通プライマーを開発し、実証実験としてブタ血清から野生型の日本脳炎ウイルス1型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。最終的に3セットのプライマーとプローブのセットを作成し、感度や特異性に問題がないことを確認出来た。
3. これまで適当な培養系がなかったHBVの培養系を改良し、HBV陽性血漿から感染する細胞クローンを得た。さらに遺伝子改組技術を用いてインターフェロン産生を抑制し、DNAウイルスに高感受性株を分離した。得られた細胞株はHBVに対しても高感受性を示した。また、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の細胞増殖性に与える影響を解析し、B細胞株に著明な増殖抑制作用があることが明らかとなった。
4. SARS-CoV2の武漢株、イギリス型変異(B.1.1.7, D614G変異)、ブラジル型変異(P.1, N501Y)を用いて、血漿分画製剤で用いる60℃液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても30分で不活化されることを確認した。胃癌由来の細胞にSec14L2を高発現させた細胞をクローニングし、HCV陽性血漿を感染させたところ、はじめてHCV RNAの増殖を検出出来た。
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。鳥を介してウイルスを保有したマダニが広い地域に点在していることを明らかに出来た。渡り鳥の渡来地に情報提供することで地域の安全性と献血の安全性確保に役立つと考えられた。
6. アルブミン製剤に対するエタノール分画工程によるHEVの除去効果とフィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱処理によるHEVの不活化効果を評価し、それぞれエタノール分画では対数減少率(LRV)で1.8~3.3、乾燥加熱ではLRVは2程度であることを実ウイルスで評価できた。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長

大隈 和 国立感染症研究所
室長

野島 清子 国立感染症研究所
主任研究官

比嘉 由紀子 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

A. 研究目的

ヒトや物質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性ウイルス感染症が東南アジアや中南米諸国において流行し、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、新型コロナウイルスが中国で発生し、世界的なパンデミックとなっている。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(HEV)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 B 型肝炎ウイルスや 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を行う。新規病原体不活化法の開発も行う。

B. 研究方法と結果

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

これまでに開発したデングウイルス、ウエストナイルウイルスを含むフラビウイルス共通プライマーを用いた迅速診断法のデング患者検体に対する反応性を検討したところ、デング 1 型から 4 型までの検体中のウイルス遺伝子を検出することを確認した。また本共通プライマーはアフリカ型の遺伝子型であるジカウイルス MR766 株およびアジア型である PRVABC59 株も検出した。またブタ血清より分離された日本脳炎ウイルス遺伝子型

I 型の野生株に対する反応性を検討したところ、本共通プライマーは野生型の日本脳炎ウイルス遺伝子についても問題なく検出することを確認した。さらに本共通プライマーとデングウイルス血清型特異的 TaqMan RT-PCR 法を比較検討したところ、統計学的に高い一致度が認められ、特に急性期血清においてウイルス遺伝子を高感度に検出することが示唆された。2019年には多くのデング熱の輸入症例が報告され、わが国におけるデング熱の患者数は初めて 450 例を超えた。また 5 年ぶりにデング熱の国内流行が 3 例発生し、これら患者の実験室診断を実施した。2019年には多くのチクングニア熱の輸入症例も報告され、わが国におけるチクングニア熱の患者は初めて 45 例に達した。しかしながら 2020 年はデング熱の輸入症例が前年の 1/10 以下に激減し、チクングニア熱の輸入症例数も 1/15 に減少した。この原因の 1 つとして、コロナ禍による入国制限により人的交流が減少した影響が考えられた。

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作製したプライマー 350 セットについて、SFTSV のゲノム RNA を用いてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (SYBR) を実施し、増幅効率の良い 15 セットを選定した。これらのセットに対してプローブを検討後作製し、再度リアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (TaqMan) を実施し、増幅効率が最良のプライマー・プローブを 2 セット選定した。これらのセットをマルチプレックス化し、幅広い株の高感度検出を可能とした。またこれらのセットについて、検出感度や特異性を検討し、最良の S 分節 1 セットを選択した。S 分節が最終的に 1 セットしか残らなかったため、M 分節と L 分節のセットも再検討することとした。これらのセットのうちで最も増幅効率の良いセットを各分節 1 セット選定することにより、合計 3 セットのマルチプレックス検査系とした。この系において、感度・特異性とも問

題ないことを確認した。

3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発
クロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いて赤血球液における不活化効果を検討したが、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 においては、濃度が 40 μ g/mL が必要であることが判明している。細胞毒性を評価する必要があった。譲渡された赤血球液の MAP 液を細胞培養液に置換し、「Pheophorbide a」による不活化法を実施した。処理した上清の細胞株を用いて細胞増殖性について検討し、T 細胞や単球に比べて B 細胞への増殖抑制が著明であった。また、血液製剤の HBV の不活化法開発のために HBV 陽性血漿を用いて細胞に感染させることは困難であったことからクローニングによって陽性血漿から感染する細胞株を分離した。さらに高感受性にするため各種の遺伝子を改変し、最終的に 10~20 倍 HBV に高感受性を示す 2 つのクローンを得ることが出来た。また、感染性の HBV を得るために HBV の全長がタンデムに結合した遺伝子を増幅し、培養上清に HBV を産生する細胞株も樹立できた。

4) 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

SARS-CoV-2 感染症の知見としては、症状のある感染者の 15%において血液から SARS-CoV-2 の RNA が検出される (RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-CoV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス

分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性などを明らかにした。SARS-COV2 の武漢株、イギリス型変異(B. 1. 1. 7, D614G 変異)、ブラジル型変異(P. 1, N501Y)を用いて、血漿分画製剤で用いる 60℃液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることが確認できた。

また、HCV は今だ感染者由来の HCV が感染・増殖できる感染系はない。感染に重要な細胞因子として Sec14L2 が発見されたが感染は困難であった。今回、胃がん細胞ではあるが HCV が感染しやすいと推定される各種因子を有する細胞株を用いて見出し、Sec14L2 をこよう発現する細胞クローンを用いて感染の有無を検討し、今回、はじめて HCV RNA の増殖を検出できた。

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

マダニの吸血源動物種の検出でユニバーサルプローブにより吸血源動物の分類群をスクリーニングし、次いで NGS 解析による動物種を同定する効率的な検出系の構築を試み、本検出系で多様な動物種の検出が可能であることが確認された。しかし、環境中のヒト DNA のコンタミが課題として残った。また、2020 年 10 月までに採集されたマダニのサンプルはウイルス分離を行い、これまで、2014 年に中

国でヒトへの感染例が確認されている **Jingmen tick virus** が本州から初めて、国内では 3 例目が発見された。

6) 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、リバーシジェネティクス法により約 9 Log copies/mL の高濃度の HEV (RG-HEV) を取得した。また、血漿由来の HEV も合わせて用いた。今回はアルブミン製剤に対するエタノール分画工程による HEV の除去効果とフィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱処理による HEV の不活化効果を評価した。

アルブミン製剤に対するエタノール分画工程の評価では、ヒト血漿に由来する Genotype 3 と 4 の HEV、さらにリバーシジェネティクス法を用いて培養細胞から産生した Genotype 3 の HEV (RG-HEV G3) の計 3 種の異なる HEV を用いた。結果として、原料血漿からアルブミン製剤に使用される分画 IV の上清に至る過程での HEV 除去効果は、対数減少率 (LRV) で 1.8 ~3.3 であった。

フィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱処理については、S/D 処理有り、または無しの高濃度 RG-HEV G3 を用いて評価を行った。その結果、S/D 処理の有無は、乾燥加熱処理による HEV の不活化効果に大きな違いを与えず、LRV は 2 程度であった。

いずれの工程も、一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる LRV=4 に満たなかったことから、LRV \geq 4 の達成が可能なウイルス除去膜工程や他の工程を組み合わせ、総合的に HEV の除去/不活化効果を評価する必要があると考えられた。

D. 考察

中国で発生した SARS-COV-2 の世界的なパンデミックによって国内外のヒトの移

動は激減したが、これまで問題になっていた感染症が減少したわけではない。新型コロナウイルスは血中から検出される頻度が低いことや検出されても低濃度であることから発症前の供血者からの血液製剤で感染する可能性は少ないと考えられているが、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。今回も原料血漿に新型コロナウイルスが混入した場合の製剤の安全性を確認するために液状加熱による感受性を評価した。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た。これまでのウイルス除去膜による除去に加えて今年度はエタノール分画による HEV の除去効率やフィブ

リノゲンの乾燥加熱による不活化の評価を行った。これらはより安全な血漿分画製剤の製造に貢献すると考えられた。

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 ウイルス等の検出法の開発を行った。ダニ媒介感染症の予防のためにダニの吸血源の同定法開発や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 産生系の構築による不活化効率の検討や HBV や HCV 感染系の開発、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：赤血球製剤の病原体不活化法の開発、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年
- 2) 山麻衣子、鈴木雅之、加藤由佳、内野富子、山田攻、池淵研二、岡田義昭：
幼少期に自己免疫疾患を発症し、増悪寛解を繰り返すうちに自己抗体の特異性が変化した一症例、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020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、引き続き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、ブタ血清中の日本脳炎ウイルスに対するフラビウイルス共通プライマーの反応性を検討した。その結果フラビウイルス共通プライマーは現在国内に流行している日本脳炎ウイルスの野生株に対してもその検出に有用であることが示された。

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。特にデング熱（DF）、チクングニア熱（CHIKV）、ジカウイルス感染症（ZVD）等の流行域の拡大が顕著であり、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、そのうち 2 万 4 千人が死亡しているとされている。DF の報告数は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。特に 2016 年および 2019 年は、世界的に大規模な DF の流行が報告された。2016 年は南北アメリカ地域で 238 万例、西太平

洋地域で 37 万 5 千例が報告され、そのうちフィリピンでは 17 万 6 千例、マレーシアでは 1 万例が報告された。そして 2019 年は南北アメリカ地域で 313 万 9 千例（うち重症デング熱（severe dengue fever: SDF）28,169 人、死者 1,538 人）と記録上最悪の患者数が報告された。西太平洋地域ではフィリピンで 42 万人、マレーシアで 12 万人、ベトナムで 32 万人、そしてシンガポールにおいて約 1 万 5 千人の患者が報告されている。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。またわが国では主にコガタアカイエカによって媒介される日本脳炎が現在も流行しており、毎年夏から秋にかけて患者が発生している。

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デングウイルス (DENV)、ジカウイルス (ZV)、ウエストナイルウイルス (WNV)、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス (TBE) 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、の DF 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 DF 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、ブタ血清中の日本脳炎ウイルス (JEV) の野生株を用いてわが国に分布している JEV に対するフラビウイルス共通プライマーの反応性を検討した。

B. 研究方法

ウイルス RNA の抽出と精製

ウイルス RNA の抽出と精製は、High pure viral RNA kit (Roche) を使用した。i) 200 μ L の検体を 1.5ml マイクロチューブに入れ、Working solution 400 μ L を加え、ピペティングでよく混和した。ii) フィルターチューブと回収チューブを連結させ、反応液 600 μ L を注いだ。iii) 10,000 回転、15 秒間遠心した。iv) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500 μ L の Inhibitor removal buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。v) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、450 μ L の Wash buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。vi) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450 μ L の Wash

buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。vii) 回収チューブを外し、空のチューブを連結し、12,000 回転、10 秒遠心した。viii) 回収チューブを捨て、新しい 1.5ml チューブにフィルターチューブを連結させ、50 μ L の Elution buffer を加え、10,000 回転、1 分間遠心した。ix) 得られた精製 RNA はすぐに使用しない場合は -80°C で保管した。

日本脳炎ウイルス特異的 RT-PCR 法

高知県のブタ血清から JEV RNA を抽出した。JEV 特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法により JEV 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 JEV 由来であることを確認した。

ウイルス分離

サル腎細胞由来 Vero 細胞を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に播種し、翌日ブタ血清を 50 μ l 接種した。細胞を毎日顕微鏡下で観察し、細胞変性効果の認められた培養上清を回収し、 -80°C の超低温下で保存した。JEV 特異的プライマーを用いた RT-PCR 法によりウイルスの同定を行った。

C. 研究結果

ブタ血清中における日本脳炎ウイルスの

クリーニング

高知県で採取されたブタ血清 20 検体について JEV 遺伝子の検出を JEV 特異的 RT-PCR 法を用いて実施した。その結果 20 検体のブタ血清のうち、5 検体より目的産物と同じ 250bp 付近に増幅産物が得られた。

日本脳炎ウイルスの分離

JEV 特異的ウイルスによって増幅産物の得られたブタ血清 5 検体についてウイルス分離を実施した。24 穴プレートに Vero 細胞を播種し一晩静置後、増幅産物が得られたブタ血清 5 検体をそれぞれ 50 μ l 接種し、細胞を鏡検下で毎日観察した。その結果血清 K0-44 および K0-57 を接種した培養細胞において接種 4 日後から細胞変性効果が観察された。そこで細胞変性効果の観察された K0-44 および K0-57 の培養上清を接種後 5 日後に回収し、-80°C の超低温下に保存した。

フラビ共通プライマーによるブタ血清中の日本脳炎ウイルス遺伝子の検討

次に分離された JEV K0-44 株および K0-57 株に対してフラビ共通プライマーによる RT-PCR を実施したところ、K0-44 株および K0-57 株において特異的増幅が認められた。

D. 考察

血液製剤の安全性を確保するうえで近年問題となっているフラビウイルスには WNV、ウスツウイルス (USUV)、ジカウイルス (ZV) 等がある。また近年デングウイルス (DENV) の血液製剤への安全性への影響についても指摘されている。これらウイルスはわが国には分布していないためこれらウイルスの輸入症例が問題となる可能性がある。本研究ではこれらウイルス遺伝子を検出するモデルとしてわが国にも分布する JEV を用い

てフラビ共通プライマーの検討を行った。

その結果フラビウイルス共通プライマーは JEV の野生株についても増幅能を有していることが示された。今後は USUV を海外の研究機関より導入して、USUV に対するフラビウイルス共通プライマーの増幅能を検証し、フラビウイルスの迅速な検出法を検討する。

E. 結論

これまでに DF、ZVD、WNE および JE 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 DF や ZVD の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。よって今後も血液製剤の安全性を確保するために蚊媒介性ウイルスのウイルス学的特性の解析を行い、迅速で高い感度と特異度を示す検査系の開発をすすめ、その成果について情報共有に努める。DF、ZVD、WNE および JE 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。これらアルボウイルス感染症に対する検査体制を整備することは、わが国の血液製剤の安全性を確保する目的に寄与するものである。

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

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：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。近年我が国ではデングウイルスの国内感染例の発生や海外での重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)の同定に伴う国内感染例の確認等がなされ、国際的な人の移動や新たな病原体の発見等に伴う新興・再興感染症病原体の献血血液等への混入リスクは益々認知されている。そこで本研究では、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。

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・プローブセットの再検討

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。最終的な候補としてS分節1セット(S-60)しか残らなかったため、M分節とL分節のセットも再検討することとした。

・合成ssRNAを用いた絶対感度の再評価

選定したプライマー・プローブセットに対して合成ssRNAを作製した。これらを用いて、低コピー段階希釈検体を作製し、PCR系の絶対感度を改めて評価した。

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

SFTSV Japanese株 (J1 : 4株、J2 : 2株、J3 : 2株) およびChinese株 (C3 : 1株、C4 : 1株、C5 : 2株) 由来RNAに対して、S-60セットを用いたSFTSV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準備した。

・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、S-60セットと、今回新たにマルチプレックス化した核酸検査系との検出感度の比較検討を実施した。

・SFTSVと近縁のウイルスRNAを用いた検出特異性の検討

SFTSVと近縁のウイルスRNA（合計8種類）を用いて、今回新たにマルチプレックス化した核酸検査系の検出特異性を検討した。

C. 研究結果

・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプライマー・プローブセットの再検討

健常者プール血漿由来RNAを鋳型として、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を評価したところ、非特異的な増幅反応が高率で引き起こされるセットが一部に認められ、最終候補としてS分節1セット(S-60)しか残らなかった。そのため、M分節とL分節のセットも再検討し、これらのセットの中で最も増幅効率の良いM-87とL-115を改めて選定した。S-60にこれらを加え、合計3セットのマルチプレックス検査系(3-plex核酸検査系)とした。

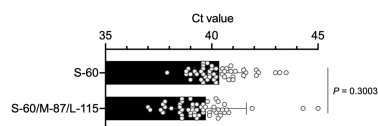
・合成ssRNAを用いた絶対感度の再評価

S-60とM-87の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、L-115セットに対する合成ssRNAを用いて、同様に感度を評価した結果、鋳型量100, 20, 10, 5 cp/rxnにおいて検出率は100%であった(8重測定中8検出)。

・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(10コピー/ μ L)を鋳型として、S-60セット、および今回の3-plex核酸検査系(S-60, M-87, L-115)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セットと3-plex核酸検査系においてそれぞれ48と55であった。また、Ct値の比較では両方ともほぼ同等であったが、3-plex核酸検査系はより低いCt値を示し、最終蛍光強度もより高い値を示した。

Positive / 8 replicates	S-60	3-plex
J1	SPL030 5 SPL067 3 SPL070 6 SPL120 4	8 4 5 4
J2	SPL067 4 SPL100 3 SPL004 4 SPL200 4	4 4 4 5
C3	HB29 3	3
C4	SPL179 3	3
C5	SPL087 5 SPL238 4	8 3
	48	55



・SFTSVと近縁のウイルスRNAを用いた検出特異性の検討

SFTSVと近縁のウイルスであるHazara virus, Nipah virus, Heartland virus, Mobala virus, Mopeia virus, Rift valley fever virus, Issyk-kul virus, Soft tick bunyavirusのRNA（合計8種類）を用いて、今回の3-plex核酸検査系の各セットS-60, M-87, L-115、および3-plexに対する検出特異性を検討

した。その結果、S-60, M-87, L-115, 3-plexの全てのセットにおいて、SFTSV以外のシグナルは見られず、非特異的な増幅は認められなかった。

D. 考察

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と考えられる。

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。本研究において開発されるSFTSVの検査法は、そのような血液スクリーニング用に今後の核酸検査法の1つとして活用が期待される。本研究開発は、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。

E. 結論

今回新たに開発された3-plex PCRは、SFTSVの全ての分節に対するセットを有しており、かつ近縁のウイルスに対して非特異的な増幅も見られないため、幅広い株に対して高感度で特異的な検出が可能と考えられる。

本研究により開発されるSFTSV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

B型肝炎ウイルス (以下 HBV) は、血液製剤の安全性確保のために重要なウイルスであるが、*in vitro* で効率よく増殖する培養系は確立されていない。今年度は HBV 陽性血漿から感染が成立するクローンを選択し、さらに遺伝子改編を行うことで親株より約 20 倍感受性が高い細胞株を樹立することができた。

また、「Pheophorbide a」の各種細胞株における増殖性に与える影響を検討したところ、赤血球液での病原体不活化に必要な $40 \mu\text{g/mL}$ において B 細胞の増殖性に著明な抑制が生じることが明らかとなった。

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。これまで我々は、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ている。これまでにクロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」が有望な赤血球の病原体不活化法であることを報告した。その一方で不活化法の評価に用いる B 型肝炎ウイルスの培養系がなく、モデルウイルスとして仮性狂犬病ウイルス (以下 PRV) が用いられてきたが PRV はヘルペスウイルス科に

属し大きさや遺伝子構造が異なっているため HBV の *In vitro* 感染系の開発が必要となっている。また、診断法やスクリーニング検査の評価・開発のために感染者から多量の採血をすることは倫理的に困難である。これらを解決するために感染性を有する HBV 産生細胞株の樹立も目指した。

B. 研究方法

1. HBV 産生細胞株の樹立

これまで報告された方法はプラスミドに HBV の全長に全長の 0.3 倍分の HBV を結合させた HBV をクローニングし、それを肝癌細胞に遺伝子導入してその上清を濃縮して感染に使用した。我々は Phi29 DNA ポリメラーゼがプライマー存在下に環状二重鎖 DNA に作用させるとプライマーから DNA を複製し、複製起点に達しても合成された DNA を剥がして DNA 合成が続

く点に注目して RCA (Rolling Circular Amplification) 法によって HBV の全長がタンデムに結合した DNA を *in vitro* で作成した。そのために 5 末をリン酸化したプライマーを用いて通常の PCR によって HBV の全長を増幅し、self-ligation によって環状二重鎖の DNA を作成した。4 箇所をプライマーを合成し、30 度にて 16 時間 RCA (関東化学社) を行った。RCA 産物は精製し、ネオマイシン、又はピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれたプラスミドと共に肝癌細胞株 HepG2-NTCP (国立感染症研究所渡士博士より譲渡)、又は胃癌由来 FU-97 株に遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後から薬剤による選択を行い、96 穴プレート 5 枚にクローニングした。増殖してきた細胞株は上清をエスプライン (富士レビオ社) にて HBs 抗原の有無をスクリーニングした。抗原陽性細胞は、さらにその上清の HBV-DNA 量を定量して HBV 産生株を選択した。

2. HBV 高感受株の樹立

肝癌細胞株 HepG2-NTCP を 5 枚の 96 穴プレートに 1 穴当たり 1/3 個になるように蒔き、50 個の形態的に特徴のある細胞クローンを選択した。これらに日本赤十字社から供給された HBV 陽性血漿を 1,000 倍に希釈して感染させ 21 日間培養した。培養は 10%FCS-DMEM に最終濃度 4% になるようにポリエチレングリコールと同 2% になるように DMSO を添加した。培養上清の HBV-DNA を定量 PCR で測定し、HBV 産生株 4-3 株と 6-3 を選択した。さらに高感受性株を作るために薬剤耐性遺伝子と Cas9 が組み込まれたプラスミドを用いて DNA センサーである STING 遺伝子を改変した。ネオマイシンやピュ

ロマイシンでクローンを選択した。各クローンは、仮性狂犬病ウイルス (以下 PRV) を添加しウイルスに対する感受性を評価した (図 2)。高感受性株に対しては 100 倍と 1000 倍に希釈した HBV 陽性血漿を添加し、3~4 日間隔で培養液を交換した。感染 12 日目に培養上清と細胞の HBV-DNA 定量を行い高感受性細胞を選択した。

3. Pheophorbide-a の毒性に関する評価

毒性を検討するために赤血球液を遠心し、MAP 液を取り除き、代わりに 10%FCS-RPMI で置換した。これに Pheophorbide-a を最終濃度 30 $\mu\text{g/mL}$ 、又は 40 $\mu\text{g/mL}$ になるように添加した赤血球液 10mL を 6 穴プレートに移し、150 rpm/m で攪拌しながら 2 万ルクスの赤色光照射を 15 分、30 分それぞれ行った。照射した赤血球液は遠心し、上清を回収した。これを 1 mL ずつ分注し、CEM 細胞 (T 細胞株)、TPH 細胞 (単球株)、RAJI 細胞 (B 細胞株) を $2 \times 10^5/\text{well}$ 添加し、4 日間培養した。2 日目と 4 日目に細胞数を測定し、細胞の増殖に与える影響を評価した。

C. 研究結果

1. HBV 産生細胞株の樹立

全長を増幅した HBV 遺伝子の 5 末、3 末とも blunt であるため self-ligation の効率が悪かった。そこで HBV には一ヶ所 BamH1 サイトがあることから BamH1 を含むセンスとアンチセンスのプライマーを作成し全長を増幅した。BamH1 で消化し self-ligation した。これによって RCA が効率よく増幅され多数のクローンを得ることが出来た。クローンは培養上清中の HBs 抗原の有無でスクリーニングを

かけ、最終的に HBV を産生する細胞株を樹立することが出来た。

2. HBV 高感受株の樹立

HBV 陽性血漿を感染させた約 50 クローンから培養上清中に最も高い HBV-DNA 濃度を呈した細胞株 4-3 株と 6-1 株を分離した。さらに 4-3 株は、STING 遺伝子の改変を行い、PRV に対する感受性を検討したところ 4-3 株に比べて 2Log~4Log 感受性が高い細胞株が得られた (図 1)。それらの細胞株に 100 倍と 1000 倍に希釈した HBV 陽性血漿を添加し、12 日目の HBV-DNA 量を定量したところオリジナルの HepG2-NTCP 細胞に比べて HBV の量が上清と細胞で最大 20 倍増加していた。

3. Pheophorbide-a の毒性に関する評価

毒性として細胞の増殖性に与える影響を検討した。コントロールとして赤血球液を 10% -FCS-RPMI で置換し、遠心して得られた上清を用いた。Pheophorbide-a 40 μ g/mL—30 分照射では、コントロールを 100%とした場合、2 日目では CEM 細胞 79.6%、TPH 細胞 90.5%、RAJI 細胞 27.5%、4 日目では CEM 細胞 78.9%、TPH 細胞 90.2%、RAJI 細胞 13.0%、30 μ g/mL—30 分照射では、2 日目では CEM 細胞 89.8%、TPH 細胞 100%、RAJI 細胞 37.5%、4 日目では CEM 細胞 72.2%、TPH 細胞 85.4%、RAJI 細胞 15.2%であった。B 細胞系に著名な増殖性への影響が認められた。

D. 考察

これまで HBV の血液製剤における不活化は適当な培養法がないために不可能であったが、

HBV のリセプターを発現する細胞株から HBV 陽性血漿から感染が成立する細胞株を分離、さらに遺伝子改編によって 20 倍感受性が高い細胞株を得ることができた。今後、不活化の評価にどの様に応用できるか検討したい。また、これまでの研究から診療で実際に使用されている赤血球液と同一の条件で病原体を不活するには 40 μ g/mL で 30 分間照射する増殖性に影響はなかったが、今回検討したところ B 細胞株に著名な細胞増殖抑制があることが明らかとなった。

E. 結論

HBV に感染する高感受性細胞株を樹立した。また、Pheophorbide-a は、B 細胞株の増殖性に著明な影響を与えることが判明した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- 1) 岡田義昭：赤血球製剤の病原体不活化法の開発、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年
- 2) 山麻衣子、鈴木雅之、加藤由佳、内野富子、山田攻、池淵研二、岡田義昭：幼少期に自己免疫疾患を発症し、増悪寛解を繰り返すうちに自己抗体の特異性が変化した一症例、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

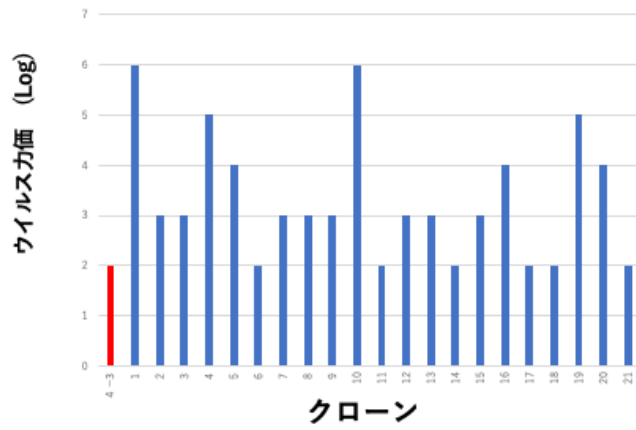


図1 仮性狂犬病ウイルスに対する感受性評価

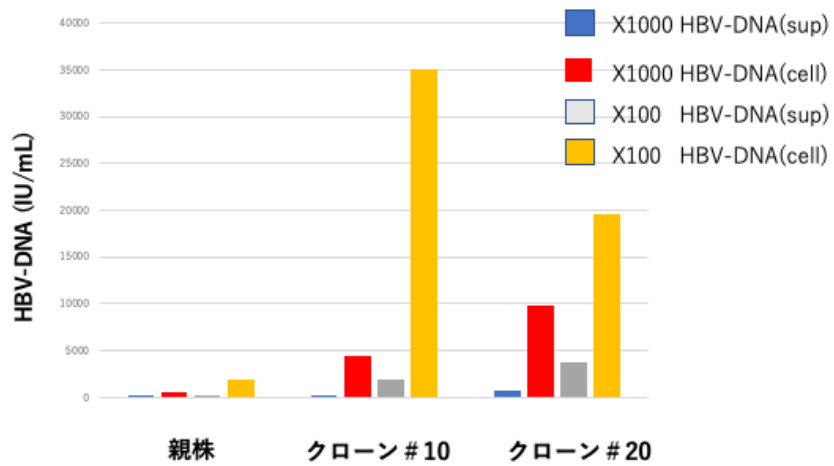


図2 親株とクローン株におけるHBVに対する感受性の比較

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

2020年末以降、新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクが起こり現在も継続している。血液の安全性確保の観点から得られる今までの知見としては、症状のある感染者の15%において血液中からSARS-COV-2のRNAが検出される(RNAemia)事例や中国のドナースクリーニングで4名のドナーでSARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性を明らかにするとともに、ウイルスの性状が変化しないことを確認する必要がある。本研究では、武漢株、イギリス型変異(B.1.1.7, D614G, N501Y)、ブラジル型変異(P.1, D614G, N501Y, E484K)を用いて、血漿分画製剤で用いる60℃液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても30分で不活化されることを確認した。

血液製剤に混入する可能性があるC型肝炎ウイルス(HCV)の実ウイルスを用いた不活化条件を明らかにするため、培養細胞で増殖させたHCVを血液製剤に加え、様々な条件で不活化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。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、JFH-2株が増殖できるFU97細胞にSec14L2が発現する細胞(FU97-sec14L2)を作製しHCV陽性ドナー血漿由来のウイルスを感染させたが、これまでHCVの増殖は見られなかった。今回、Sec14L2の発現が多い細胞をクローニングし、HCV陽性ドナー血漿由来のウイルスを感染させたところ、HCV RNAの増殖を検出出来た。

A. 目的

A-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

2020 年末以降、新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクが起り現在も継続している。血液の安全性確保の観点から得られる今までの知見としては、症状のある感染者の 15%において血液中から SARS-COV-2 の RNA が検出される (RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性などを明らかにするとともに、ウイルスの性状が変化しないことを確認する必要がある。本研究では、武漢株、イギリス型変異 (B. 1. 1. 7, D614G 変異)、ブラジル型変異 (P. 1, N501Y) を用いて、血漿分画製剤で用いる 60℃液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることを確認した。

A-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

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、1964 年から 1987 年かけて海外の血漿を原料に製造された第 IX

因子製剤、第 VIII 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの人が 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。しかしここ数年、数種類の阻害剤 (Grazoprevir, Ledipasvir, Sofosbuvir; それぞれ HCV プロテアーゼ (NS3/NS4A)、ポリメラーゼ (NS5A)、及び NS5AB タンパク質に対する阻害剤で、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り、今や HCV は治療可能な感染症と言っても過言ではない。これらの成果は約 30 年に渡る世界中の研究者の努力の賜で、昨年ノーベル賞受賞と言う形で評価されたのは同じ HCV の研究者として嬉しい限りである。

C 型肝炎ウイルスには、治療薬の開発に必要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し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 HCV 陽性ドナー血漿由来の HCV の不活化を調べることが目的であり、過去 3 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。昨年度は 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 細胞に Sec14L2 を発現する培養細胞 (FU97-sec14L2 と命名) を作製し、患者由来 HCV を感染させた。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 α -fetoprotein も高発現している (参考: Shiokawa M. et al. 88 5578-5594, 2014 J. of Virol.)。しかしながら患者由来 HCV の増殖は見られなかった。今年度は、FU97+sec14L2 が高発現する細胞をクローニングし、これらの細胞に感染者由来 HCV を感染させ、その増殖を調べた。

B 研究方法

B-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

B-I-1 ウイルスおよび細胞: 新型コロナ

ウイルス SARS-CoV-2 としては、武漢株 hCoV-19/Japan/TY-WK-521/2020 (A)、イギリス型変異 QHN002, TY7-302 (B. 1. 1. 7)、ブラジル型変異 hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 (P. 1) を用いた (イギリス型は D416G 変異、ブラジル型は D416G, N501Y 変異を含む)。すべて国立感染症研究所が分離したものであり、当研究のために増やして実験に用いた。細胞は veroE6/TMPRSS2 は JCRB 細胞バンク由来のものを使用した。通常の細胞継代時は 10% FBS/ DMDM low glucose, G4181mg/mL (含ペニシリン/ストレプトマイシン)、ウイルス感染時は 2%FBS/DMDM low glucose (含ペニシリン/ストレプトマイシン) を用いた。

B-I-2 : 加熱処理

各ウイルスは、5%または 2%FBS 入り DMEM メディウム、PBS, 5% アルブミン製剤 (日本血液製剤機構) に 1:9 の割合でスパイクし、チューブを密閉後にジップロックに入れて空気を十分に抜き、60°C に設定したウォーターバスに沈めて (チューブが完全に隠れるまで)、10, 30, 60 分反応後に回収した。実験は独立して 3 回実施した。

B-I-2 : 感染性評価

加熱処理が終わった直後に、メディウムで 10 倍段階希釈を行い (N=6 または N=8)、予め前日から 96well plate で培養している veroE6/TMPRSS2 細胞 (1×10^4 個 /100uL/well) に、希釈したウイルス液を 100uL ずつ添加し、37°C 5%CO₂ のインキュベーターで 2 日から 4 日培養し、細胞変性効果 (cytopathogenic effect :CPE) の有無を顕

顕微鏡化で観察し感染性の有無を評価した。各処理後のウイルス感染価は Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価 (tissue culture infectious dose :TCID₅₀/mL) として算出した。

B-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価 当研究

B-II-1 :Sec14L2 が発現する、FU97 培養細胞の作製及びクローニング

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(プラスミド 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 でセクションすることにより、Sec14L2 が発現する細胞を得た。得られた細胞を限界希釈することにより、1 ウェルに数個の細胞を増殖させ、その中で、この組換えレンチウイルスに sec14L2 と一緒に組み込まれた tGFP の発現の指標として、蛍光顕微鏡で緑色に光る細胞が多く存在するウェルを選択する作業を繰り返し、更に Sec14L2 の発現の多い細胞を免疫染色し、Sec14L2 が高発現する細胞を 8 クローンクローニングした。その中で特に Sec14L2 が高発現し、かつ血漿に対する抵抗性の高い細胞 2 クローン (#25, #34 と命名) を今回の実験に用いた。これら細胞クローン #25、#34 の Sec14L2 の発現を免疫染色、及びウエスタンブロットングで調べた。(図 1)。なお、免疫染色による Sec14L2 の検出には、

一次抗体 (anti-Rabbit Sec14L2; #GTX115716, GTX、1000 倍希釈)、二次抗体 (Alexa Fluor 594 (#A11032 Thermo Scientific、1000 倍希釈) を、ウエスタンブロットングによる Sec14L2 の検出には、一次抗体 (anti-Rabbit Sec14L2; #GTX115716, GTX、1000 倍希釈)、二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP-conjugated (Bio Rad、30000 倍希釈) を用いた。

B-II-3 :作製した培養細胞 Fu97-sec14L2 #25, 及び #34 への感染者由来 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) (1x10⁵/well) に、新たに得た 5 種類の HCV 感染者由来血漿 (R1-1, -2, -3, -4, -5 : 各 HCV RNA コピー数は、R1-1: 2.2x10⁹, R1-2: 2.1x10⁹, R1-3: 7.0x10⁹, R1-4: 2.2x10⁹, R1-5: 7.1x10⁹ IU/mL : 野島清子氏により測定) をそれぞれ 50μl (培地に対して 1/10 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 (HCV RNA コピー数: 6.9x10⁷ IU/mL) でこの細胞に感染させた。

HCV ゲノム RNA の検出には、感染者由来 HCV 血漿感染 1, 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 (10⁻¹-10⁻⁴) 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) を用いて行った。反応条件は、50°C 30min, 94°C 2min

の後、[94°C 15s, 55°C 15s, 72°C 60s]を32回繰り返す、その後、72°C 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。更に、この各サンプルを10倍ずつ段階希釈(10⁰-10⁻³)し、EX-Taq DNA polymerase (AKARA Bio)、及び特異的primers (sense nt 63-82とantisense nt 207-188)を用いてnested PCRを行った。反応条件は、[98°C 10s, 55°C 30s, 72°C 60s]を30回繰り返した。この反応により増幅されたcDNA産物も2% agarose gelにて分離した。

また、免疫染色に用いた抗体はanti-HCV core antigen monoclonal antibody (MA-080, Thermo Scientific)、蛍光二次抗体にはAlexa Fluor 594 (#A11032 Thermo Scientific)を用いた。核の染色にはDAPI (#340-07971, 和光純薬)を用いた。

(倫理面への配慮)

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

C-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

用いたウイルスを1:9の割合でメディウム、PBS、5%アルブミン製剤にスパイクした直後の感染性を評価したところ、図1にあるようにスパイクしたことによるウイルス力価への影響は認められなかった。次に、スパイクしたウイルス検体をウォーターバスに水没させて60°Cで加熱処理を実施し、10, 30, 60分後のウイルス力価を検討した。その結果、いずれのウイルスも10分の加熱処理では感染性が残存したが30分、60分後は感染性が認められず、検出限界以下であった(<3.2 TCID₅₀/mL)。

武漢株における60°C10分加熱処理時のLRVは、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、5.4, 5.9であり、イギリス変異ウイルスにおける60°C10分加熱処理時のLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、4.3, 5.3, 5.1であり、ブラジル変異ウイルスにおける60°C10分加熱処理時のLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、5.6, 5.5, 4.2であった。

加熱処理30分及1時間処理時の武漢株におけるLRVは、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、5.4, 5.9であった。イギリス変異ウイルスにおけるLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、4.3, 5.3, 5.1であった。ブラジル変異ウイルスにおける60°C10分加熱処理時のLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、

PBS 下でそれぞれ、5.8, 5.9, 5.8 であった。武漢型ウイルス、イギリス変異ウイルス、ブラジル変異ウイルスそれぞれの LRV は平均すると、5.7、5.9、4.9 であった。この違いはストックウイルスの力価による違いと考えられた。また、通常たん白質濃度が濃い程不活化に抵抗性であると言われていたが、そのような傾向は認められなかった。

C-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

C-II-1: Sec14L2 発現FU97(FU97-sec14L2)

細胞#25, #34 の Sec14L2 の発現

免疫染色により、FU97+sec14L2 #25、及び#34 細胞では、Sec14L2 が全細胞の 15、及び 24%で発現していることが明らかとなった。また、ウエスタンブロッティングで、#25、及び#34 細胞で Sec14L2 が発現していることが明らかとなった。Sec14L2 の発現量は#34の方が、#25 細胞よりも 2 倍多いことも明らかとなった。一方、FU97 細胞では、免疫染色、及びウエスタンブロッティング共に Sec14L2 の発現は発現していない、或いは検出限界以下であるということが明らかとなった (図 3)。

C-II-2: FU97-sec14L2 細胞への感染者由来血漿の HCV の感染

FU97-sec14L2 細胞に新たに得た 5 種類の HCV 感染者由来血漿 (R1-1, -2, -3, -4, -5: 各 HCV RNA コピー数は、R1-1: 2.2×10^9 , R1-2: 2.1×10^9 , R1-3: 7.0×10^9 , R1-4: 2.2×10^9 , R1-5: 7.1×10^9 , 及びコントロールとして JFH-1 (HCV RNA コピー数 6.9×10^7 IU/mL、感染価 5.6×10^6) を感染させ、

1、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。JFH-1 感染の場合コア蛋白質の発現を認められたが、5 種類の HCV 感染者由来血漿の感染では、コア蛋白質の発現は認められなかった (data not known)。

そこで各感染細胞の HCV RNA 量を調べたところ、#25、#34 の両方の細胞で感染者血漿 R1-2 の HCV RNA 量の増加が認められた (図 4)。

D. 考察

D-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

1. エンベロープを有するウイルスは多くの不活化処理に対して感受性であり、新型コロナウイルスも同様な傾向を示すと考えられる。今回の研究では、武漢オリジナル株とその後国内で分離された変異株を用いて、加熱による不活化と変異による影響を確認した。60°C30 分の加熱処理でウイルスの感染性は検出限界以下となり感染性は認められなかったが、10 分の処理では僅かな感染性の残存を認めた。今回の実験で 12 分の処理では感染性を認めない事例があったこと (data not shown)、およびヒートブロックでの 56°C30 分処理で僅かに感染性が残存する事例も報告されていることから、中心温度が 60°Cに達すること、蓋の内側についたウイルスが不活化されずに残存する可能性を考慮して不活化処理を行うことが重要であると考えられた。尚、本研究ではウォーターバスに沈めることで検体温度を一

定に保つように処理を行なった。

2. 60°C 30分位以上の処理により、約10の5乗の不活化、LRV5、が期待できることが分かり、今回用いたいずれの変異株でも同様な不活化効果が認められた。変異ウイルスのスパイク領域の変異箇所を「参考」に示した。変異によりレセプターとの親和性の変化やレセプター結合部位の構造変化などが論文で報告されているが、今回用いた変異ウイルスの変異は加熱の抵抗性には影響がないことが確認できた。また、LRV5という値は、仮に献血血液に新型コロナウイルスがわずかに混入した場合でも、液状加熱処理により感染性を除去できることが示唆された。

D-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

1. 前年度に HCV の増殖に重要な宿主因子である α -fetoprotein、miR122 を発現し、HCV JFH-2 株が増殖できる FU97 細胞に、HCV の増殖に重要な宿主因子である Sec14L2 も発現する細胞を作製した。今年度、この細胞で、Sec14L2 が高発現し、しかも血漿に対して耐性な細胞をクローニングした（クローン#25、及び#34）。これら2クローン細胞に HCV 陽性血漿を感染させたが、その増殖はウイルス蛋白質では確認できなかったが、陽性血漿 R1-2 を感染させた時、今回初めてウイルス RNA の増幅を検出することが出来た。Sec14L2 が多く発現する細胞クローンをクローニングしたこと、及び新たな感染者血漿を用いたことに起因していると考えられる。

2. 今回始めて感染者由来血漿の HCV ゲノ

ム RNA の増殖を検出することが出来たが、患者由来 HCV の不活化を調べるためには、HCV ゲノム RNA の更に大きな増幅が見られないといけない。

感染者由来 HCV を更に大きく増幅させる方法として、i) 感染者由来 HCV を FU97-sec14L2 細胞に感染させ、長期にわたり培養し、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方法。或いは、ii) 感染させる血漿の量を増やすことが考えられるが、感染させる血漿量を増加させると血漿中に含まれる成分のため細胞の培地がゲル化し、細胞の増殖を阻害するようなので、何らかの方法で血漿中の HCV のみを精製、濃縮し、細胞に感染させる方法を見いだすことなどが考えられる。

3. 今回クローニングした FU97-sec14L2 #25、及び#34 細胞で HCV 感染者由来血漿 R1-2 が増殖したが、#34の方が#25に比べ10倍増幅しやすいことが明らかとなり、細胞の種類の違いのことを考えると、今回感染者由来 HCV 血漿の増幅を調べていない残り6クローン細胞についても調べる必要性がある。

4. 図2で、感染1日後、JFH-1のゲノムRNAが検出され、3日後には検出限界以下になったのは、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、この細胞クローンではJFH-1は増殖しない

(しにくい)と考えられる。ただ、JFH-1 感染の場合、コア蛋白質の発現が見られたのに、その RNA が検出出来なかったので、今後その理由を解明する必要がある。

E. 結論

新型コロナウイルス武漢株、イギリス型変異(B. 1. 1. 7, D614G, N501Y)、ブラジル型変異(P. 1, D614G, N501Y, E484K)を用いて、血漿分画製剤で用いる 60°C 液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることを確認した。HCV 陽性ドナー検体由来の HCV を培養細胞で増殖させるために、miR122 RNA と α -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、その細胞で、Sec14L2 が高発現し、血漿に対する抵抗性の高いクローン#25, #34 をクローニングすることにより、ゲノム RNA レベルではあるが、今回初めて HCV 感染者由来血漿 (R1-2) の増幅を検出することが出来た。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(ア) 論文発表

1. 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.

2. Takagi, H., Oka T., **Shimoike, T.**, Saito, H., Kobayashi, T., Takahashi, T., Tatsumi, C., Kataoka, M., Wang, Q., Saifh, L. J., and Nodai, M. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. 2020 *PNAS*, 117 :32078-32085

(イ) 学会発表

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

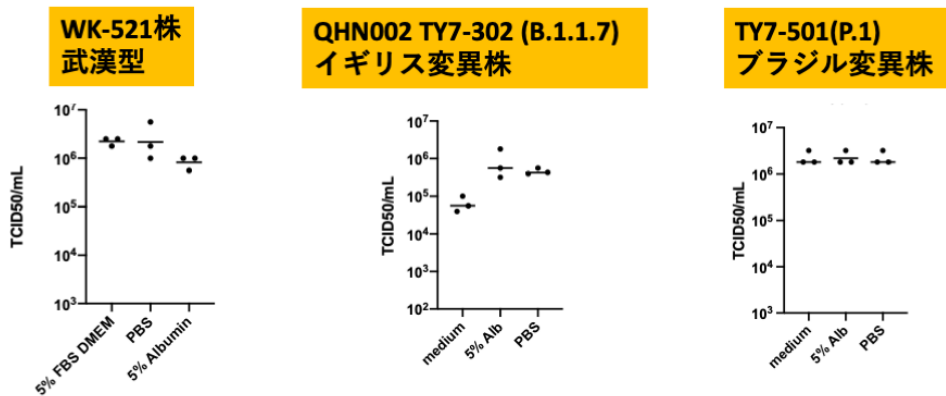


図 1. SARS-CoV-2 ウイルス株の力価 (スパイク直後の感染性の確認)

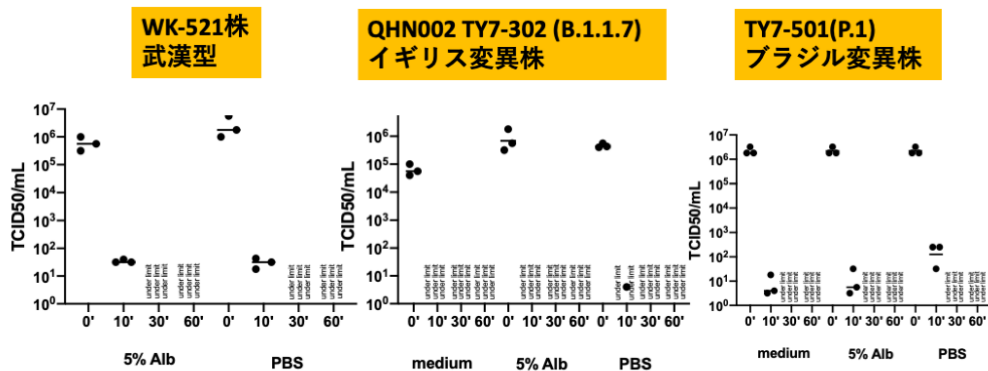


図 2. SARS-CoV-2 の60°C液状加熱処理による不活化

変異ウイルス	スパイク領域における武漢株からの変異箇所
QHN002, TY7-302 (B.1.1.7)	N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H
hCoV-19/Japan/TY7-501/2021(P.1)	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F

参考：用いたウイルス株の変異箇所

FU97-sec14L2 #25, #34クローン細胞でのSec14L2の発現

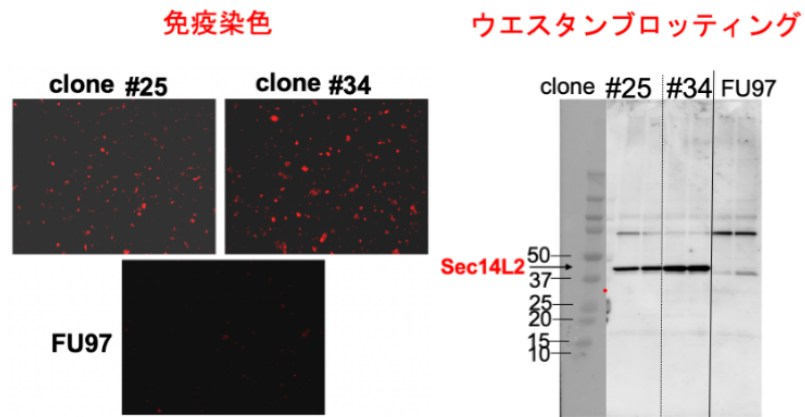


図3. FU97-sec14L2 #25, #34クローン細胞でのSec14L2の発現

FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅

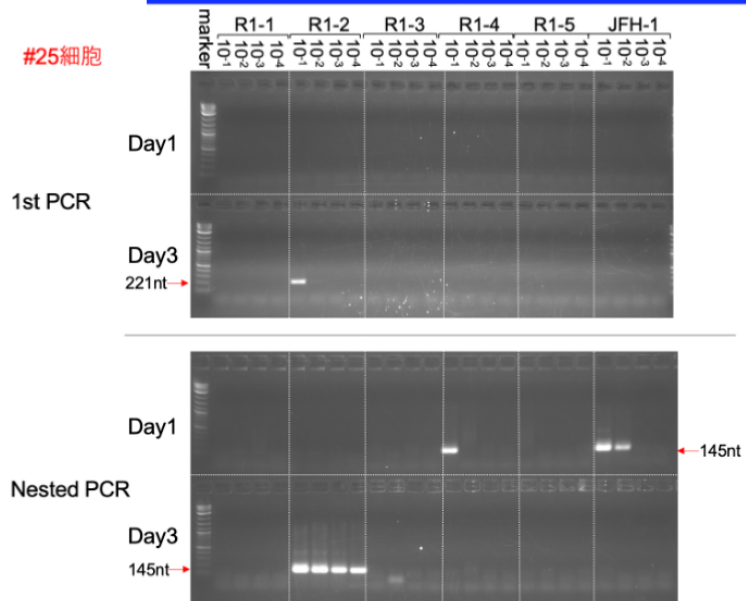


図4-1 FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅

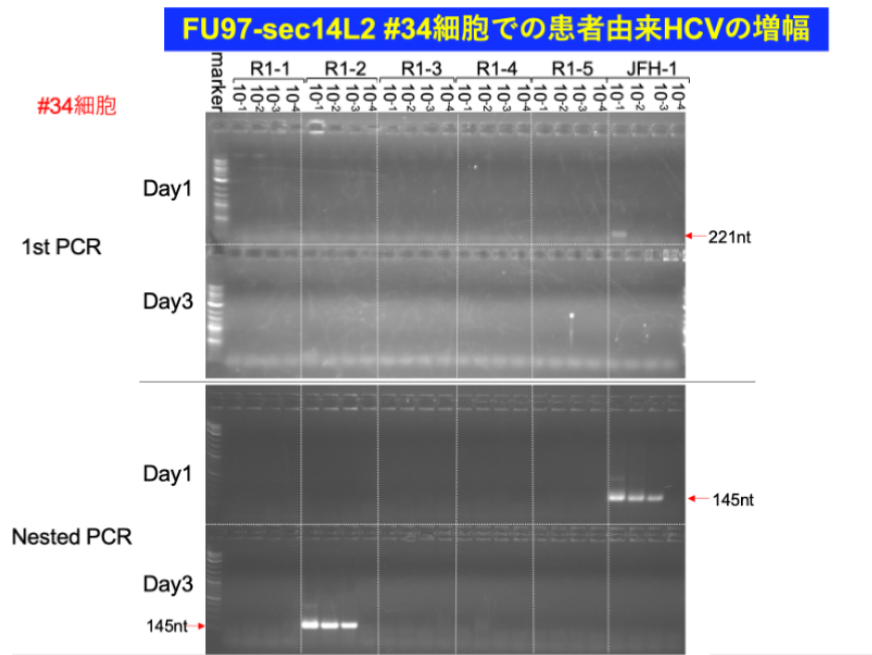


図4-2. FU97-sec14L2 #34細胞での患者由来HCVの増幅

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
	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	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	Astri Nur Faizah	東京大学

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。

2020年は、前年度の結果を踏まえ、より効率的にウイルス検出を行うため、北陸2県（富山県・石川県）の渡り鳥飛来地の計3地点において、重点的に調査を行った。愛媛県の渡り鳥飛来地で採集された植生マダニも本研究のためのウイルス検出に供した。4月～翌3月（積雪時を除く）に実施したフランネル法により、富山県、石川県において合計で3属8種329個体の植生マダニを採集した（2020年4～10月の積雪のない前半期集計）。キチマダニ（186個体）、フタトゲチマダニ（107個体）が多く、この2種で全体（329個体）の89.1%を占めた。採集された植生マダニの成虫は、マダニの吸血源動物種の検出に用いた。ユニバーサルプローブにより吸血源動物の分類群をスクリーニングし、次いでNGS解析による動物種を同定する効率的な検出系の構築を試み、本検出系で多様な動物種の検出が可能であることが確認された。若虫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、Kabuto mountain virus（キチマダニ）やJingmen tick virus（タカサゴキラマダニ）が検出・分離された。また、愛媛県のマダニからは3種の新規ウイルスを含め、6種のマダニ媒介ウイルスが分離・検出された。

A. 研究目的

国内では、2012 年秋に渡航歴のない山口県在住の女性が重症熱性血小板減少症候群（SFTS）により死亡したことが、翌2013年1月に国内1例目として報道され、その後も西日本を中心に患者が発生している。2020年の患者数は75名であった。これまでの総患者数573名（2020年12月30日現在）のうち、西日本の府県から合計で558名の患者が報告されてお

り、圧倒的に西日本からの報告が多い。一方で、患者の発生報告が少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っており、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。これまでの日本産マダニからのマダニ媒介ウイルスの調査において、我々は複数のマダニ媒介ウイルスを分離・発見してきた。それらウイルスのうち、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

マダニの採集

石川および富山県内の渡り鳥飛来地の合計3地点 (輪島市門前町・猿山岬、輪島市舳倉島、および富山市古洞の森の3地点を選定) でマダニ相の調査を行った。2020年は4~翌3月の間 (積雪時を除く)、原則月に1回、フランネル法 (約70 cmX100 cmの白い布で地面および植生の上を引きずる方法) により各地点30分間、3 (新型コロナウイルス感染症の発生状況に応じて1~4) 名で植生マダニを採集した。

愛媛県のSFTS浸淫地において、上記フランネル法により採集された植生マダニも以後の実験に供した。

マダニからのウイルス分離および遺伝子検出

採集されたマダニを種、発育ステージ、雌雄、採集地、採集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

削除:

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

石川県および富山県の北陸2 県の渡り鳥飛来地から、合計で3 属 8 種 329 個体の植生マダニを採集した（2020 年 4～10 月の積雪のない前半期集計）。キチマダニ（56.5%）、フタトゲチマダニ（32.5%）、ヤマトマダニ（3.6%）の順に多く採集されたが（表 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マダニであった。石川県舩倉島は日本で最も多くの鳥類が確認されており、渡り鳥飛来地として多くの種が往来していると考えられる。その舩倉島で 10 月に調査を行ったところ、4 名 3 時間の調査において、数こそ 21 個体で少ないもののキチマダニ（10 個体）、タカサゴチマダニ（8）、オオトゲチマダニ（2）、シェルツェマダニ（1）が採集された。特にタカサゴチマダニは南方系のマダニで石川県からこれまで記録がなく、渡り鳥によって持ち込まれた可能性が高いと考えられた。

採集された植生マダニ成虫を用いて吸血源動物種の検出系を構築した。ユニバーサルプローブにより吸血源動物の分類群をスクリーニングし、次いで NGS 解析による動物種を同定する効率的な検出系の構築を試み、本検出系で多様な動物種の検出が可能であることが確認された。一方で、環境中に大量に存在するコンタミのヒト遺伝子を検出してしまうことから、ヒトの吸血の確認は課題として残った。

これまでに採集した植生マダニをもちいて、それらが保有するウイルスの解析を行った結果、石川県で採集されたキチマ

ダニからフェヌイウイルス科の *Kabuto mountain virus*（KAMV）が新たに 2 株分離された（表 2）。本ウイルスは前年（2018 年）に同一調査地点で採集されたキチマダニからも分離されていることから、調査地には KAMV の安定的なウイルス伝播に関する要因が存在するものと考えられた。また、中国でヒトへの病原性が確認されている *Jingmen tick virus*（JMTV）が愛媛県や石川県で採集されたタカサゴキララマダニから検出された（表 2、Kobayashi et al. 投稿準備中）。さらに愛媛県において採集されたマダニ検体からは、TarTV や Tofla virus、その他、複数のウイルス分類群に属する新規ウイルスが分離あるいは検出された（表 2）。

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。前年度までの本研究班の研究成果として、KAMV ならびにカプトヤマウイルス、TarTV タルミズダニウイルスについては、北陸地方におけるこれらウイルスの分布を初めて報告し（Kobayashi et al., 2020）、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を指摘した。KAMV および TarTV 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キチマダニ、およびイノシシの生息地周辺の植生キチマダニからも分離さ

削除: 

れている (Ejiri et al., 2018)。その一方で 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)、本研究の成果によって、石川県および愛媛県からも、同一ウイルスが分離された。

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、TarTV は、九州、四国、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、および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、本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。

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たものの、これまで使用してきた汎用性の高い培養細胞では、一部のウイルスについては分離されなかった。この事実は、これまでのウイルス分離を中心としたマダニ媒介ウイルスのサーベイランス手法では、把握しきれない病原ウイルスが存在する可能性を示しているものと考えられる。それゆえ、NGS 解析を利用したマダニ媒介性ウイルスのサーベイランスは、本邦のマダニ媒介ウイルスの流行実態の解明に大きく貢献するものと思われる。

E. 結論

1) 富山県、石川県の渡り鳥飛来地の計 3 地点でマダニ相の調査を行い、種構成を把握した。

2) マダニの吸血源動物の検出系を構築した。

3) 採集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 ならびに TarTV 以外に、新規ウイルスを含め 5 種のマダニ媒介ウイルスが分離・検出された。

4) マダニは多様なウイルスを保有しており、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, Faizah AN, Amoa-Bosompem M, Watanabe M, Mackawa Y, Hayashi T, Higa Y, Sawabe K, and Isawa H. Analysis of Trypanosoma sequences from *Haemaphysalis flava* (Acari: Ixodidae) and *Tabanus rufidens* (Diptera: Tabanidae) collected in Ishikawa, Japan. *Medical Entomology and Zoology*, 71: 225-243. 2020.

- Kobayashi, D., Watanabe, M., Faizah, A. N., Amoa-Bosompem, M., Higa, Y., Tsuda, Y., Sawabe, K., and Isawa, H. Discovery of a novel flavivirus (Flaviviridae) from the horse fly, *Tabanus rufidens* (Diptera: Tabanidae): The possible coevolutionary relationships between the classical insect-specific flaviviruses and host dipteran insects. *Journal of Medical Entomology*, 58: 880-890. 2021

2. 学会発表

- SFTS 感染ネコの周辺環境におけるマダニ相および SFTS ウイルス調査, 木村俊也, 鉦田龍星, 南博文, 小林大介, 伊澤晴彦, 前川芳秀, 比嘉由紀子, 林利彦, 葛西真治, 沢辺京子, 第 71 回日本衛生動物学会大会, 2020/4/17-19, 東京, 口頭 (みなし開催).

- 吸血性節足動物の保有する多種多様なウイルスの世界, 小林大介, 第 71 回日本衛生動物学会大会シンポジウム, 2020/4/17-19, 東京, 口頭 (みなし開催).

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

種名	富山県古洞の森	石川県猿山岬	石川県舳倉島	合計
キチマダニ	83	93	10	186
フタトゲチマダニ	3	104		107
タカサゴキラマダニ	4			4
ヤマトマダニ	6	6		12
タカサゴチマダニ			8	8
ヤマアラシチマダニ	3	1		4
オオトゲチマダニ			2	2
シュルツェマダニ		2	1	3
チマダニ sp.	3			3
合計	102	206	21	329

表1 2020年に富山県および石川県で採集された植生マダニ

ウイルス名	ウイルス科・属	ヒト病原性	株名	検出・分離源マダニ種	採集地
Kabuto mountain virus	フェヌイウイルス科・ウウクウイルス属	不明	ISK49	キチマダニ	石川県
			ISK53	〃	〃
Tarumizu tick virus	レオウイルス科・コルチウイルス属	不明	IM-OI21	キチマダニ	愛媛県
Tofla virus	ナイロウイルス科・オルソナイロウイルス属	不明	IM-OI4	キチマダニ	愛媛県
			IM-OI31	タカサゴチマダニ	〃
			IM-OI36	〃	〃
			IM-OI61	〃	〃
			IM-OI89	〃	〃
Jingmen tick virus	未分類	有	19EH-IM24	タカサゴキラマダニ	愛媛県
			IM-OI2	〃	〃
			IM-OI96	〃	〃
			IM-OI108	〃	〃
			IM-OI119	〃	〃
			ISK55	〃	石川県
新規Uukuvirus	フェヌイウイルス科・ウウクウイルス属	不明	IM-OI100	タカサゴチマダニ	愛媛県
新規Jingmenvirus	未分類	可能性有*	IM-OI32	タカサゴチマダニ	愛媛県
			IM-OI36	〃	〃
			IM-OI60	〃	〃
			IM-OI70	〃	〃
			IM-OI110	〃	〃
新規Quarantavirus	オルソミクソウイルス科	不明	IM-OI114	ヤマアラシチマダニ	愛媛県
			IM-OI115	〃	〃
			IM-OI125	〃	〃

表2 2020年の解析によってマダニから分離・検出されたマダニ媒介ウイルスの一覧

削除: <オブジェクト>

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－血漿分画製剤の製造工程における HEV の除去/不活化効果の評価－』

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]

本分担研究の目的は血漿分画製剤の製造工程における HEV の除去/不活化効果を適切に評価することである。2020 年度は、アルブミン製剤のエタノール分画工程による除去効果とフィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程による不活化効果を評価した。

アルブミン製剤のエタノール分画工程の評価では、ヒト血漿に由来する Genotype 3 と 4 の HEV(Pd-HEV G3 と Pd-HEV G4)、さらにリバーズジェネティクス法を用いて培養細胞から産生した Genotype 3 の HEV(RG-HEV G3)の計 3 種の異なる HEV を用いた。アルブミン製剤のエタノール分画工程での総 HEV 除去効果は、対数減少率 (LRV) で 1.8~3.3 であった。

フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程の上流には有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理が存在することから、HEV に結合する脂質が除去され、乾燥加熱処理による HEV の不活化動態に影響を与えることが予想された。このため、S/D 処理有り、または無しの高濃度 RG-HEV G3 をフィブリノゲン製剤の中間工程品にスパイクし、それぞれの不活化動態を調査した。その結果、S/D 処理の有無は、乾燥加熱処理による HEV の不活化効果に大きな違いを与えず、LRV はいずれも 2 程度であった。

アルブミン製剤のエタノール分画、フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程とも、一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる LRV、4 に満たなかったことから、LRV 4 以上の達成が可能なウイルス除去膜工程やその他の工程を組み合わせ、総合的に HEV の除去/不活化効果を評価する必要があると考えられた。

A. 研究目的

略語； HEV: Hepatitis E virus

NAT: Nucleic acid amplification test

LRV: Log reduction value

S/D: Solvent/Detergent

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

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⁾、日本国内では輸血用血液製剤により二種の異なる遺伝子型の HEV、Genotype 3 と Genotype 4 (HEV G3 と HEV G4) の感染事例が報告されている²⁾。2020 年 8 月より国内すべての献血血液に対して、HEV 個別 NAT が導

入されたことから、一人のドナーに由来する献血血液から製造される輸血用血液製剤の HEV に対する安全性は向上すると期待される。一方、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、製造工程中での HEV 除去・不活化効果を適切に検証することでさらに高い HEV 安全性を達成することが期待される。また、国外で従来の NAT 検査では検出することのできない遺伝子型に属する HEV がヒトへ感染する事例が報告されていることから³⁾、HEV 除去・不活化効果の適切な検証は必要と考えられた。

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)、あるいはブタ糞便由来 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、これらのウイルス表面に脂質は結合しておらず除去・不活化の挙動は Pd-HEV とは異なっていた^{4,6)}。さらに、血漿分画製剤の製造過程で、エタノ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^{4, 5)}。これらのことより、HEV の除去・不活化の評価には、実ウイルスであるヒト血漿由来 HEV、あるいはワーストケースや製造工程の実態を正確に反映するモデルウイルスを選択することが重要である。しかしながら、高濃度の Pd-HEV を確保できないことから、定量 PCR 法による除去効果の評価しか行えず、感染価による除去・不活化効果を評価することが困難であった。この課題解決の為、リバースジェネティクス法によ

り培養細胞から約 9 Log₁₀ copies/mL の高濃度で脂質の結合する HEV Genotype 3 (RG-HEV G3) を取得する方法を確立し、感染価で除去・不活化効果を評価することが可能となった⁶⁾。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⁶⁾、液状加熱における熱安定性も Pd-HEV に類似していることを確認した (2019 年度 厚生労働科学研究補助費分担研究報告書参照)。

本分担研究では、二つの工程の HEV 除去・不活化効果を評価した。一つ目は、国内外問わず多数の血漿分画製剤メーカーで分画法として採用される Cohn のエタノール分画である。遺伝子型・由来の異なる 3 種の HEV (Pd-HEV G3、Pd-HEV G4、及び RG-HEV G3) を用いて定量 PCR 法により、HEV 除去効果を評価した。二つ目はフィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理工程である。S/D 処理有り、または無しの高濃度 RG-HEV を用いて、感染価により乾燥加熱処理工程の HEV 不活化効果を評価した。

B. 研究方法

1. ウイルス

RG-HEV G3 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。Pd-HEV G3 は献血血漿からスクリーニングした HEV G3 RNA 陽性血漿を使用し、Pd-HEV G4 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公募により日本赤十字社より受領した Pd-HEV G4 陽性血漿を使用した。

2. エタノール分画

凍結保存された Pd-HEV G3 陽性血漿、Pd-HEV G4 陽性血漿、あるいは HEV 陰性血漿を 4℃設定のクロマトチャンバー中にオーバーナイトで静置する

ことで緩慢融解した。各血漿を含んだチューブを遠心分離 (1,500 × g、25 分間) し、沈殿 (クリオプリシピテート) を分離し、脱クリオプリシピテート血漿 (CDP) とした。HEV 陰性血漿に由来する CDP には最終濃度が 6~7Log₁₀ copies/mL となるよう RG-HEV G3 を添加した。各 CDP (3 mL) から Cohn のエタノール分画 (概要は参考文献 7) 参照) をもとに変更を加えた条件で、分画 I 工程、分画 II+III、分画 IV 工程を連続して実施した。まず、CDP を分画 I に供し、遠心分離 (400 × g、20 分間) 後、デカンテーションにより上清 I を分画沈殿 I から分離した。取得した上清 I を分画 II+III に供し、遠心分離 (1,500 × g、30 分間) 後、デカンテーションにより上清 II+III を分画沈殿 II+III から分離した。次に上清 II+III を分画 IV (分画 IV-1 と分画 IV-4 を合わせた分画法) に供し、遠心分離 (1,500 × g、30 分間) 後、デカンテーションにより上清 IV を分画沈殿 IV から分離した。

3. HEV RNA 濃度の測定

各分画工程の前後で分取した CDP、上清 I、上清 II+III、上清 IV から 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 RNA 濃度を測定した。

4. HEV RNA の対数減少率 (LRV) の計算

分画 I で実際に使用した CDP 量と実際に回収した上清 I から想定される上清 II+III 量と上清 IV 量を算出した。次に、測定した HEV RNA 濃度 (Log₁₀ copies/mL) を実際の CDP 量、想定される上清 II+III 量と上清 IV 量に乘じ、各サンプルの総 HEV RNA コピー数を算出した。CDP の総 HEV RNA コピー数の常用対数から、上清 I、上清 II+III、または上

清 IV の HEV ゲノムコピー数の常用対数を減じた値を HEV RNA の LRV とした。

5. 乾燥加熱試験用 RG-HEV の調製

RG-HEV G3 を含む培養上清と 20 倍濃度の S/D 試薬、あるいは注射用水を 19:1 の割合で混合し、水温 28.5~29.5°C の恒温槽中で 1.5 時間インキュベーションした (前者を S/D 処理有り RG-HEV G3、後者を S/D 処理無し RG-HEV G3 とした)。インキュベーション後、各サンプル溶液を超遠心分離 (150,000 × g、3 時間) した。超遠心分離後、各チューブから上清を除去し、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。

6. 乾燥加熱処理 (77.0±1.0°C、72 時間)

11.5 mL の S/D 処理有り、または無し RG-HEV G3 を超遠心分離 (150,000 × g、3 時間) した。上清を除去後、沈殿画分を 2.0 mL のフィブリノゲン製剤の中間工程品 (凍結乾燥直前) により懸濁、懸濁液を氷冷しながら超音波処理してスパイクウイルスとした。13 mL のフィブリノゲン製剤の中間工程品 (凍結乾燥直前) に 1.3 mL のスパイクウイルスを添加し、バイアル瓶に 1 mL ずつ分注した。分注サンプルを凍結乾燥し、乾燥加熱処理まで冷蔵保存した。乾燥加熱処理時には、加熱庫が 76.0~78.0°C を維持していることを確認し、凍結乾燥後のサンプルを入れ、24、48、72 時間後に加熱庫よりサンプルを取り出し、氷上で急冷した。

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 RNA を測定し、Karber 法により感

染価 (TCID₅₀) を算出した。凍結乾燥前の感染価の常用対数から加熱後の感染価の常用対数を減じた値を LRV とした。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1. アルブミン製剤に対するエタノール分画による HEV 除去効果の検証

表 1 にエタノール分画による各種 HEV の LRV を示した。いずれの HEV も、分画 I で CDP から上清 I に至る過程では、ほとんど除去されなかった。分画 II+III を経て上清 II+III に至る過程では、ヒト血漿由来と培養細胞由来 HEV の間で除去程度に差が観察された。Pd-HEV G3 と Pd-HEV G4 に対する除去効果は LRV で 1 未満であったが、RG-HEV G3 は 1 以上除去された。分画 IV を経て上清 IV に至る過程では、いずれの HEV も LRV で 1 以上除去されていたが、Pd-HEV G3 の除去効果は HEV G4 及び RG-HEV G3 と比較して LRV で 1 以上高かった。結果として CDP からの総 LRV は 1.8~3.3 であった。

2. フィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱処理による HEV 不活化効果の検証

凍結乾燥による HEV の LRV は 1 未満であったが (図 2A)、乾燥加熱処理により、S/D 処理有り無し RG-HEV G3 の不活化が観察された (図 2B)。S/D 処理無し RG-HEV G3 では、24 時間までの加熱による LRV は 2 程度であり、それ以降は緩やかに不

活化された (図 2B)。一方、S/D 処理有り RG-HEV G3 では、24 時間までの加熱による不活化効果は、S/D 処理無しの場合と比較して遅く、それ以降は同程度であった (図 2B 中の傾き参照)。最終的な LRV は S/D 処理無し RG-HEV G3 で 2.6/2.4 (n=2)、S/D 処理有り RG-HEV G3 で 1.6/1.8 (n=2) であった (表 2)。

D. 考察

Cohn のエタノール分画は血漿タンパク質の分離のみならず、混入ウイルスに対する除去・不活化にも有することから、ウイルス安全性の観点からも重要な工程である。アルブミン製剤は原料血漿から複数のエタノール分画工程を経て製造されるが、これらの分画全工程を通じてどの程度の HEV が除去されるかは不明であった。本研究では、エタノール分画を連続して実施し、CDP から上清 IV を取得することで HEV の除去効果を検証した。連続分画中の分画 II+III では、ヒト血漿由来と培養細胞由来 HEV の間で挙動の違いが観察された。また、分画 IV ではヒト血漿由来の HEV であっても、除去効果の差が観察された。なお、分画 IV によるノンエンベロープウイルスの除去・不活化では、PPV 等のモデルウイルスでも LRV に差が生じ得ることが報告されている⁹⁾。以上より、アルブミン製剤におけるエタノール分画工程の HEV の除去効果は、Pd-HEV G4 の結果をもとに、LRV で 2 程度と推測された。

ヒト血漿中の HEV には脂質が結合しており、S/D 処理により脂質を除去すると、液状加熱による不活化効果が高くなることが報告されている⁴⁵⁾。しかしながら、フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理では S/D 処理により不活化が向上することはなかった。以上より、乾燥加熱処理工程の不活化効果を評価す

る際は、S/D 処理有り無しとの RG-HEV を使用し、実態に即した不活化効果を検証し、総合的に判断することが妥当と考えられた。

E. 結論

本研究で調査したエタノール分画とフィブリノゲン製剤の製造工程の乾燥加熱処理は、一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる 4 以上の LRV に満たなかった。このため、4 以上の LRV の達成が可能なウイルス除去膜処理工程とその他の工程(イオン交換クロマトグラフィ等)を組み合わせ、総合的に HEV の除去/不活化効果を評価することが必要である。

(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) 日本赤十字社におけるヘモビジランス 2017
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 30 年 7 月 18 日開催)
<https://www.mhlw.go.jp/content/11121000/000336638.Pdf>
- 3) Sridhar S *et al.* Transmission of Rat Hepatitis E Virus Infection to Humans in Hong Kong: A Clinical and Epidemiological Analysis. *Hepatology*. 2021 Jan;73(1):10-22. doi: 10.1002/hep.31138. Epub 2020 Oct 12. PMID: 31960460
- 4) 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
- 5) Yunoki M *et al.* 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.
- 6) Ideno S *et al.* Phenotypic characterization of cell culture-derived hepatitis E virus

subjected to different chemical treatments: application in virus removal via nanofiltration. (under review)

- 7) 平成 22 年版血液事業報告 血漿分画製剤の製造方法
<https://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/2q/Pdf/3-9.Pdf>
- 8) Jothikumar N *et al.* 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.
- 9) Dichtelmüller HO *et al.* Contribution to safety of immunoglobulin and albumin from virus partitioning and inactivation by cold ethanol fractionation: a data collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies. *Transfusion*. 2011 Jul;51(7):1412-30.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

数値はLRVを示す

	Pd-HEV G3	Pd-HEV G4	RG-HEV G3
上清I	0.2	-0.1	0.1
上清II+III	0.4	0.5	1.4
上清IV	3.3	1.8	3.0

表1 アルブミン製剤のエタノール分画工程（I、II+III、IV）における HEV 除去効果
各 HEV を含んだ CDP を出発原料として連続的にエタノール分画を行い、最終的に上清IVを取得した。各工程品（上清）の CDP に対する LRV を示した。

A

数値は感染価 (Log₁₀TCID₅₀) を示す

サンプル名	凍結乾燥前	凍結乾燥後
S/D処理無し n1	5.90	5.72
S/D処理無し n2	5.50	5.52
S/D処理有り n1	4.50	4.52
S/D処理有り n2	4.90	4.32

B

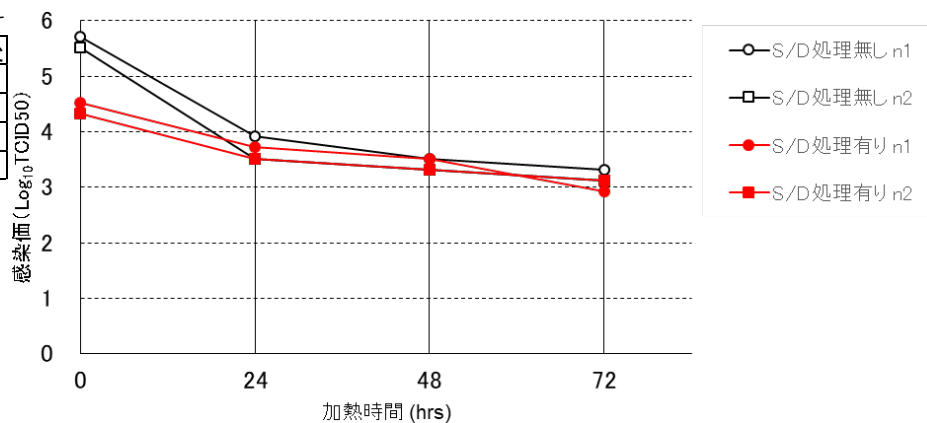


図2 フィブリノゲン製剤の製造工程中の凍結乾燥加熱工程による HEV の不活化

A 凍結乾燥前後の RG-HEV の感染価 (Log TCID₅₀)

B 乾燥加熱処理による HEV の不活化動態

S/D 処理無しと S/D 処理有り RG-HEV G3 に対して、2 回試験 (n1、n2) を行い、測定した感染価 (Log TCID₅₀) を表した。

サンプル名	凍結乾燥前	加熱時間 (hrs)			
		0	24	48	72
S/D処理無し n1	0	0.2	2.0	2.4	2.6
S/D処理無し n2	0	0.0	2.0	2.2	2.4
S/D処理有り n1	0	0.0	0.8	1.0	1.6
S/D処理有り n2	0	0.6	1.4	1.6	1.8

表2 凍結乾燥加熱工程による RG-HEV の LRV 推移

凍結乾燥前と各乾燥加熱時における感染価から算出した LRV を表した。

別紙4

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, Faizah AN, Amoa-Bosompem M, Watanabe M, Maekawa Y, Hayashi T, Higa Y, Sawabe K, and Isawa H.	Analysis of Trypanosoma sequences from <i>Haemaphysalis flava</i> (Acari: Ixodidae) and <i>Tabanus rufidens</i> (Diptera: Tabanidae) collected in Ishikawa, Japan.	Medical Entomology and Zoology	71	225-243	2020
Kobayashi, D., Watanabe, M., Faizah, A. N., Amoa-Bosompem, M., Higa, Y., Tsuda, Y., Sawabe, K., and Isawa, H.	Discovery of a novel flavivirus (Flaviviridae) from the horse fly, <i>Tabanus rufidens</i> (Diptera: Tabanidae): The possible coevolutionary relationships between the classical insect-specific flaviviruses and host dipteran insects.	Journal of Medical Entomology	58	880-890	2021

令和 3年 3 月 30 日

厚生労働大臣 殿

機関名 埼玉医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 別所 正美



次の職員の令和2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と安定供給を確保するための
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3年4月13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2年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) ウイルス第1部第2室・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) ・該当する口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3年4月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和2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を確保するための新興・再興感染症の研究
- 3. 研究者名 (所属部・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。

令和3年4月13日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 脇田 隆字



次の職員の令和2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と安定供給を確保するための新興・再興感染症の研究
- 3. 研究者名 (所属部・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 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3年4月13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 協田 隆字



次の職員の令和2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と安定供給を確保するための新興・再興感染症の研究

3. 研究者名 (所属部・職名) 昆虫医科学部・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 checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立感染症研究所	<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 3年 3月 25日

厚生労働大臣 殿

機関名 一般社団法人日本血液製剤機構

所属研究機関長 職 名 中央研究所長

氏 名 坂井 薫



次の職員の令和2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と安定供給を確保するための新興・再興感染症の研究
- 研究者名 (所属部局・職名) 一般社団法人日本血液製剤機構 中央研究所・感染性病原体研究室長
(氏名・フリガナ) 前野 英毅・マエノ ヒデキ

4. 倫理審査の状況

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