

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3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4(2022)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 6
II. 分担研究報告		
1. 血液製剤の安全性を確保するための蚊媒介性ウイルスの ウイルス学的特性の解析	林 昌宏	P 7-P10
2. 血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に 関する研究	大隈 和	P11-P12
3. 赤血球製剤の新規不活化法の開発	岡田 義昭	P13-P16
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	P17-P24
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	P25-P30
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	P31-P39
III. 研究成果の刊行に関する一覧表		P40-P42

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、1～4型のデングウイルス、チクングニアウイルス、ウスツ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。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. HBV の培養系と感染性の評価方法を改良し、HBV 陽性血漿を用いて HBV の液状加熱による不活化効果と抗 HBs グロブリン製剤の中和活性ができるようになった。
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°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。血清にウイルスをスパイクしたところ、PBS にスパイクする場合と比較し感染性の低下が認められた。血液から RNAemia が見つかるにも関わらず感染性のあるウイルスが分離されないという報告との関連性
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。北陸地域の渡り鳥飛来地を中心としたダニ媒介ウイルスの調査において、当該地域のキチマダニから複数年に渡って Kabuto mountain virus (KAMV) が計 5 株分離されており、これら分離株の配列情報を活用して、プローブ法によるリアルタイム PCR に基づく高感度 KAMV 検出系を今回新たに確立した。
6. アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理による HEV の不活化効果を評価した。それぞれ対数減少率 (LRV) で 1Log、及び 2Log 程度であることが明らかとなり液状加熱処理は HEV に対しては有効な工程であることが判明した。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長

大隈 和 関西医科大学
教授

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 型肝炎ウイルスは、適当な培養系が開発されていないために不活化法の評価には動物由来のモデルウイルスが使用されている。本研究班では、これらの病原体を検出する検査法の開発と標準化、スクリーニング法の開発とその評価を行う。また、新規病原体であるコロナウイルスが血中からも検出されることから輸血製剤や血漿分画製剤におけるリスクの評価も目指した。

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。またウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株や Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株も検出することが確認されたのでこの 2 株を用いて USUV の細胞培養系の整備および USUV の遺伝子検出系の整備を行った。

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

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 法のマルチプレックス化に向けた検討を行った。S

3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

昨年度に親株より HBV に対して 10~20 倍高感受性を示す 2 つのクローン株を得た。HBV 感染後にポリエチレングリコールと DMSO を添加して培養し、2 週目と 4 週目に細胞内の HBV-DNA を定量することで 4 週目の方が HBV-DNA 量が増加している場合に感染性ありとした。2 つの約 5×10^8 IU/mL の HBV 陽性血漿を用いて 5% アルブミン製剤での 60°C-10 時間の液状加熱による HBV 不活化効果を検討し、4Log 以上不活化されることが明らかとなった。また、10 感染価と 100 感染価の HBV を調整し、0.03~3IU に希釈した抗 HBs 免疫グロブリンと 37°C で 2 時間中和させたところ、200IU (筋注用抗 HBs 免疫グロブリン 1 本) の製剤で約 6.7×10^4 感染価の HBV の中和が可能であった。HBV 陽性血漿を用いて実際の HBV の液状加熱による不活化や中和活性を測定が可能であった。

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した。血漿分画製剤の原料血漿に混入した場合の安全性を評価するために武漢株、アルファ型変株、ベータ型変異ウイルス株、ガンマ型変異ウイルス株、デルタ型変異ウイルス株、オミクロン型変異ウイルス株等を血漿分画製剤で用いる 60℃液上加熱処理した。この不活化法によって全てのウイルス株が 30 分で不活化されることが確認できた。原料血漿に混入した場合に液状加熱や界面活性剤処理、20nm のウイルス除去膜によるウイルス除去等の工程が複数組み合わされていることから血漿分画製剤の安全性は高いと考えられた。また、血清中に抗体や補体以外の感染性を抑制する因子の存在を示唆する結果も得られた。

5) マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

マダニ媒介感染症の予防には、マダニの生態や生理的な知見を得ることが重要であるが、野外における情報は限られている。主に大型の哺乳動物がマダニの重要な吸血源となるため、その移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられている。一方で、鳥類に寄生するマダニが海外から運

ばれる可能性も指摘されていることから、本研究では渡り鳥の飛来地に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。2021 年は、これまで得られた植生マダニのサンプルを用いて、吸血源動物の探索、ウイルス検出と検査系の確立を中心に研究を進めた。マダニ媒介ウイルスの自然界における感染環を考える際、吸血源動物の特定が重要である。本研究では、植生マダニ（動物に咬着しておらず、マダニ体内に血液成分もほとんど認められないため吸血源動物を特定することが困難）に対して、RLB (Reverse Line Blot 法) と NGS (Next Generation Sequencing) を併用することで、体内にわずかに残る血液成分から様々な分類群に属する吸血源動物を種レベルで同定する検出系を構築した。ヒト刺咬例が多く、植生マダニの優占種であるキチマダニについて解析したところ、北陸の渡り鳥飛来地 4 地点すべてから鳥類を吸血した個体が検出された。また、コジュケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、サルの DNA 断片が検出され、これらの動物を吸血していることが示唆された。これまで北陸地域の渡り鳥飛来地を中心としたダニ媒介ウイルスの調査において、当該地域のキチマダニから複数年に渡って Kabuto mountain virus (KAMV) が計 5 株分離されており、これら分離株の配列情報を活用して、プローブ法によるリアルタイム PCR に基づく高

感度 KAMV 検出系を今回新たに確立した。

6) 感染症のE型肝炎ウイルスの不活化に関する研究

E型肝炎ウイルス（以下、HEV）に対する血漿分画製剤のさらなる安全性の向上を目指し、HEVの熱感受性の調査、及び新たにヒトへの感染が報告された動物種由来HEVのリスク評価を実施した。

HEVの熱感受性の調査については、リバーズジェネティクス法により培養細胞から産生したHEV（以下、RG-HEV）を用いて、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理（60℃、10時間）での不活化効果を評価した。その結果、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の不活化効果はそれぞれ、1 Log reduction value（以下、LRV）、及び2 LRV程度であることが明らかとなった。これらの結果はヒト血液由来のHEVを用いた実験結果とも類似しており、液状加熱処理におけるRG-HEVのモデルウイルスとしての適正の一端を示唆するものである。また、これらの結果から、液状加熱処理はHEVに対して有効な工程ではないものの、ウイルス除去膜処理による除去効果と併せることで、HEVに対する安全性の向上に寄与し得ると考えられた。

動物種由来HEVのリスク評価については、新たにヒトへの感染が報告されたウサギ、及びラットHEVの2種類について実施した。ウサギHEVは、これまでヒトへの感染の報告がある動物種（イノシシ、シカ、ブタ）のHEVと遺伝学的に近縁であり、構造タンパク質の相同性も高いこ

とから、これまで対象としてきたHEVと同様、NATによる検出やウイルス除去・不活化処理は有効に機能する可能性が高いと考えられた。一方、ラットHEVについては、これまで報告のあるHEVと異なる遺伝子型に分類されるためNATをすり抜ける可能性が高いものの、粒子サイズは他のHEVと変わらないことから、ウイルス除去膜は有効に機能すると考えられた。総じて、新たな動物種由来のHEVに対して、注視は必要なものの血漿分画製剤のウイルス安全性に対する追加の施策は必要ないと考察した。

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アンチトロンビン製剤と免疫グロブリン製剤のHEVに対する液状加熱による不活化を検討し、効果的な方法でないことを明らかにした。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解析や渡り鳥の飛来地でのダニの調査を行なった。

また、分画製剤の安全性の評価のためにHBVやHEVの不活化に加え新型コロナウイルスの不活化を検討した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 岡田義昭、野島清子、血液製剤の安全性向上を目指したB型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系の開発、第69回日本輸血・細胞治療学会総会、2021年 東京

2) 山麻衣子、鈴木雅之、玉栄建次、内野富美子、加藤由佳、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭、輸血副反応報告の実態調査とその重要性の啓発活動、第69回日本輸血・細胞治療学会総会、2021年 東京

3) 岡田義昭、野島清子、Parvovirus B19 培養系の開発、第69回日本ウイルス学会総会、2021年 神戸

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）

海老原秀喜（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）

研究要旨 近年ヨーロッパではウエストナイルウイルス（WNV）およびウスツウウイルス（USUV）の流行が問題となっている。WNV および USUV は共にフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される。2018 年にはヨーロッパ 15 カ国で 2,000 例以上の WN 熱患者が発生した。その後もその流行は継続し、2020 年にはドイツで最初の WNV 感染症による死亡例が報告された。また、2009 年にはイタリアで初めて USUV 感染による免疫不全患者の髄膜脳炎症例が報告された。さらに 2017 年にはオーストリアにおける輸血血液中の WNV 遺伝子に対するスクリーニング検査において USUV 遺伝子が検出され、問題となっている。そこで本研究では、ヨーロッパウイルスアーカイブグローバル(EVA-g)より導入した USUV 2 株を用いて USUV 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いずれの USUV 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

近年の交通網の発達と人的・物的交流の活性化により節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）感染症の流行域が急速に拡大し、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。特にヨーロッパではウエストナイルウイルス（WNV）およびウスツウウイルス（USUV）の流行が認められる。WNV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類され、1937 年にウガンダで最初にその流行が確認された。以後、主にアフリカ、中東およびヨーロッパで散発していたが、2018 年にはヨーロッパ 15 カ国で 2,000 例以上の患者が発生した。その後もその流行は継続し、2020 年にはドイツで最初の死亡例が報告された。米国では 1999

年にニューヨークで患者が発見され、急速にその流行域が米国、カナダ、メキシコ、カリブ海諸国、コロンビア、アルゼンチンなどに拡大した。米国における 2020 年までの患者数は 52,382 人、そのうち死者は 2,418 人であった。わが国では 2005 年 10 月に輸入症例が確認された。中国では新疆ウイグル自治区においてその流行が報告されている。オーストラリアには WNV に近縁のクンジンウイルスが分布する。

USUV はフラビウイルス属に分類され、近年ヨーロッパにおいて特に注目されている。USUV は 1959 年に南アフリカでイエカ属の蚊 (*Culex neavei*) より初めて分離され、ヨーロッパでは回顧調査により遅くとも 1996 年には存在したことが示されている。

これまでのところ USUV のヒトに対する病原性は高くないが、ヨーロッパでは 2009 年にイタリアで初めて USUV 感染による免疫不全患者の髄膜脳炎症例が報告された。また 2009 年にはイタリアで肝移植を受けた女性の血液からも USUV が分離された。これまでに我々はフラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められる NS5 領域に PCR プライマーを設計し、フラビウイルス遺伝子の増幅を検討した。そ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)、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。そこで本研究では、ヨーロッパウイルスアーカイブグローバル (EVA-g) より導入した USUV 2 株を用いて USUV 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

サル腎細胞由来 Vero 細胞を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に播種し、5% CO₂, 37°C で培養した。翌日、EVA-g より導入したウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株をそれぞれ 50 μl 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。

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 μL の検体を 1.5ml マイクロチューブに入れ、Working solution 400 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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 μL 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。**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 μL 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。

C. 研究結果

ウスツウイルスの培養

Vero 細胞を播種し一晩静置後、ウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株をそれぞれ 50 μl 接種した。細胞を鏡検下

で毎日観察し、接種 4 日後に細胞変性効果が観察された。培養上清を接種後 4 日後に回収し、-80℃の超低温下に保存した。

フラビ共通プライマーによるウスツウイルス遺伝子の検討

次に UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 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、ウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株 KO-44 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, USUV, ZV 等がある。特に USUV は、2017 年にオーストリアにおける輸血血液に対する WNV 遺伝子に対するスクリーニング検査において 12,047 検体中 6 検体からその遺伝子が検出されており、問題となっている。本研究ではこれら USUV 遺伝子に対する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いずれの USUV 株についても増幅能を有していることが示された。 UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株は、1959 年に南アフリカで *Culex neavei* より分離されたウスツウイルスのレファレンス株である。また、Usutu virus/Slovenia /Ko208/2018 株はスロベニアで分離された近年の流行株である。特にフラビウイルス共通プライマーを用いることにより、Usutu virus/Slovenia /Ko208 /2018 株を検出できたことから、当プライマーは近年の USUV にも対応していることが示唆された。

WNV はトリが自然宿主であり、トリと媒介昆虫である蚊の間で、感染環が形成・維持されている。これまでに感染が確認された鳥類の種類は 220 種以上におよぶ。特にカラス、イエスズメ、アオカケス等において血中のウイルス量が高いことが報告されている。USUV は蚊とトリの間で感染環を形成し、トリに対して高い致死率を示す。主な媒介蚊はトビイロイエカ (*Cx. pipiens*) である。ヒトおよびげっ歯類は終末宿主である。USUV に感受性の高い主なトリはユーラシアクロウタドリ (Blackbird: *Turdus merula*) である。ユーラシアクロウタドリは渡り鳥としてヨーロッパからロシア、中国、台湾にも分布し、わが国にも飛来している。したがってこれらウイルスがわが国に侵入する可能性は否定できないため、今後の WNV および USUV の動向に注目する必要がある。

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。また、USUV に対する検査体制も十分とは言えない。血液製剤の安全性を確保するためのドナースクリーニングにおいて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。

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
特記事項なし	2. 実用新案登録
	特記事項なし
H. 知的財産権の出願・登録状況	3. その他
(予定を含む.)	特記事項なし
1. 特許取得	

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 関西医科大学医学部 微生物学講座 教授

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法のマルチプレックス化に向けた検討を行った。

研究協力者

上野孝治 関西医科大学医学部 微生物学講座
助教

（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し追加した。これらのセットのマルチプレックス化に向けて、選択したプローブについて標識蛍光種およびクエンチャーを再検討した。

・選択したセットのマルチプレックス化の検討

既報の検出系との性能比較評価のために、上記で選択した各フラグメントに対するプローブを既報の国立感染症研究所ウイルス第一部が樹立した検出系に合わせて標識蛍光種およびクエンチャーを変更して設計・合成した。また日本赤十字社が設計したプローブに関しても同様に合成した。これらを用いたマルチプレックス化の検討を行った。

C. 研究結果

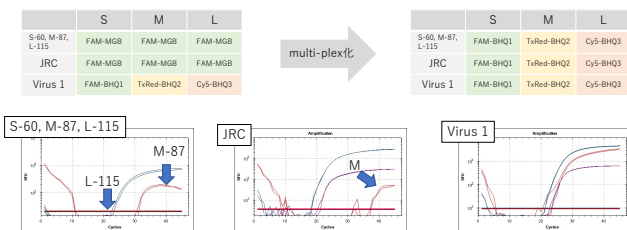
・新規SFTSV核酸検査法開発のためのプライマー・プローブセットの再検討

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、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セットとした。これらのセット

トのマルチプレックス化 (3-plex核酸検査系) に向けて、既報の検出系との性能比較評価の必要性から、選択したプローブについて標識蛍光種およびクエンチャーを既報の検出系に合わせることにした。

・選択したセットのマルチプレックス化の検討

選択したプローブを既報の国立感染症研究所ウイルス第一部が樹立した検出系に合わせて3種類の標識蛍光に変更して設計・合成したが、プローブの一部が機能しなかった(下図)。既存の条件と揃えるためにスクリーニング時に付加していたMinor Groove Binder (MGB)を除去したことにより、Tm値が低下したことが原因であると考えられた。MGBを付加できる標識蛍光の種類に制限があるため標識蛍光種を変更する必要があるが、異なる蛍光種で蛍光強度に差があることから直接比較することは困難であった。そこで各プライマー・プローブセットの配列優位性を検討するために、全プローブの標識蛍光をFAMで統一して、クエンチャーおよびMGBに関しては論文およびスクリーニング時の設計に合わせて再合成して、分節ごとに個別に比較することが必要となった。



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。本研究のスクリーニングで選択したプライマー・プローブの各セットは配列優位性が高いことが予想され、さらに同一の標識蛍光種で検出することで、3種類の標識蛍光で SFTSV の分節を個別に検出する既存の検出系よりもさらに感度の高い検出系を確立できると期待される。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

繋がると思われる。

E. 結論

今回新たに開発される 3-plex PCR は、SFTSV の全ての分節に対するセットを有しており、既存の検出法との配列優位性を比較し、標識蛍光の組み合わせを検討することでより高感度の検出系を確立できると期待される。

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、昨年度に樹立した親株より約 20 倍 HBV に対して感受性が高い細胞株 HepG2-NTCP#10 を用いて 5% アルブミン製剤における 60°C-10 時間の液状加熱による HBV の不活化効率と抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性について検討した。液状加熱では 4 log 以上の不活化、抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性では、200 国際単位で少なくとも約 67,000 IU の HBV を中和することができた。本細胞株は、4 週間培養する必要があるが HBV 陽性血漿を用いて感染性を評価することが可能であった。

A. 研究目的

輸血用血液や血漿分画製剤は、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、安全対策の上で重要なウイルスである B型肝炎ウイルス (以下 HBV) や C型肝炎ウイルスは未だ有用な培養系がないため、培養が可能でウイルス学的に性状が類似した動物由来のウイルスをモデルウイルスとして不活化や除去方の評価に用いられてきた。HBV のモデルウイルスとしてブタの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 と同様の不活化法に対する感受性を示すのか不明であった。昨年度の研究によって樹立した細胞株を用いて HBV の液状加熱による不活化と抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性を解析した。

B. 研究方法

1. 細胞株の培養

細胞株 HepG2-NTCP#10 は感染 1 日前に 1×10^5 ずつコラーゲンコートした 24 穴プレートに蒔き、分子量 8000 のポリエチレングリコール (以下 PEG) と DMSO をそれぞれ最終濃度 4%、2% になるように添加した 10% FCS—DMEM (high glucose) を用いて 37°C、5% CO₂ で培養した。

2. HBV 陽性血漿

実験に用いた 2 つの HBV 陽性血漿は、日本赤十字社より譲渡された献血者由来の血漿で約 5×10^8 IU/mL の濃度であった。実験に使用するまで分注し、-80°C で凍結保存した。

3. 5% アルブミン 製剤における液状加熱による HBV の不活化効率の評価

血漿分画製剤の指針に従って 5% アルブミン 製剤 10 容量に対し、1 容量の HBV 陽

性血漿を添加し、60℃で10時間の液状加熱を行なった。コントロールとして同じHBV陽性血漿を4℃で10時間処理した。60℃の液状加熱した検体は、PBSにてX1～X10³まで10^{0.5}ずつ段階希釈し、100μLずつ細胞に添加した。また、4℃処理した検体はPBSにてX1～X10⁶まで段階希釈し、100μLずつ細胞に添加した。感染させた細胞は、3～4日毎にPEGとDMSOを添加した培養液で培地交換し、感染2週、3週、4週後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、定量PCRにてHBV-DNA量を測定した。

4. 抗HBs免疫グロブリン製剤におけるHBVの中和活性の評価

市販の抗HBs免疫グロブリン製剤(200IU/mL)を購入し、100μLに0.03、0.1、0.3、1.0、3.0IUの抗HBs抗体を含有するようにPBSにて希釈した。HBVは100μLに10感染価と100感染価を有するように5%アルブミン製剤で希釈し、それぞれの濃度の抗体とウイルス液を等量ずつ混合し、37℃で2時間中和させた。コントロールとしてPBSと各感染価のウイルスを混合した。反応後、200μLずつ細胞に添加し、感染させ3～4日毎にPEGとDMSOを添加した培養液で培地交換し、感染2週、3週、4週後に細胞を回収した。回収した細胞からDNAを抽出し、定量PCRにてHBV-DNA量を測定した。

5. 感染性の評価

実験に用いた細胞株HepG2-NTCP#10は、親株と同様に二次感染は生じないので最初に感染した細胞内から周囲の細胞に感染は拡大しない。そのためHBVが細胞に付着しているのか、増殖しているのか、判断

は重要である。我々は、経時的にHBVを定量することによって感染2週目と4週目のHBV-DNA量を比較し、増加していれば、感染性ありと判断した。また、増加しない場合は感染3週間目の細胞を定量し、2週目より増加していれば感染性ありと判断した。

C. 研究結果

1. 5%アルブミン製剤における液状加熱によるHBVの不活化効率の評価

4℃-10時間処理では10⁴希釈まで2週目より4週目の方がHBV-DNA量が増加しており、感染性ありと判断した。一方、60℃-10時間の加熱では1倍希釈でも増加が認められず不活化されたと判断した。従って4Log以上不活化されたことが明らかになった(図1)。

2. 抗HBs免疫グロブリン製剤におけるHBVの中和活性の評価

10感染価のHBVでは0.03～3IUまで感染性は認められず全て中和されたと判断した。100感染価のHBVでは0.03と0.1IUにおいてHBV-DNAの増加が認められ、0.3IU以上の抗体濃度では中和された。以上の結果から抗HBs免疫グロブリン200IUでは6.7×10⁴感染価のHBVが中和できることを明らかにした。

D. 考察

昨年度に得られたHBVの高感受性株とHBV陽性血漿を用いて液状加熱によるHBV不活化効果や抗HBs免疫グロブリン製剤の中和活性の評価の可能を検討した。これまでHBV遺伝子を導入した細胞株の上清を超遠心によって濃縮したHBVが治療薬等の評価に用いられてきたが、今回の研究によって高濃度の陽性血漿が必要ではあるが、直

接評価できた事は、血液製剤の安全性を確保するために大きな前進だと考えられた。ただし、より正確な評価のためには感染細胞から二次感染が生じるようなより高感受性を有する細胞株の樹立が必要である。

E. 結論

HBV の高感受性株と HBV 陽性血漿を用いて液状加熱による HBV 不活化効果や抗 HBs 免疫グロブリン製剤の中和活性の評価が可能であった。また、他の不活化法の評価にも本法は応用可能であると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1) 岡田義昭、野島清子、血液製剤の安全性向上を目指した B 型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系の開発、第 69 回日本輸血・細胞治療学会総会、2021 年 東京

2) 山麻衣子、鈴木雅之、玉栄建次、内野富美子、加藤由佳、山田攻、小林清子、池淵研二、岡田義昭、輸血副反応報告の実態調査とその重要性の啓発活動、第 69 回日本輸血・細胞治療学会総会、2021 年 東京

3) 岡田義昭、野島清子、Parvovirus B19 培養系の開発、第 69 回日本ウイルス学会総会、2021 年 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

60°C-10時間の液状加熱によるHBV不活化
(5%アルブミン)

HBV # 20

		X1	X10	X10 ²	X10 ³	X10 ⁴	X10 ^{4.5}
4°C -10時間 X10 ⁴ まで感染性あり	2w	126,255	5,073	190	25.2	2.3	0
	3w	280,660	10,474	143	25.0	2.0	0
	4W	366,077	17,931	217	30.4	5.5	0

N=2

		X1	X10	X10 ^{1.5}	X10 ²	X10 ^{2.5}	X10 ³
60°C -10時間 感染性は認められない	2w	159	40.0	27.8	4.8	1.6	0
	3w	88.0	20.0	9.5	2.6	0	0
	4W	53.0	26.0	9.7	4.3	1.7	0

N=2

4Log以上不活化された

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラ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2022年5月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、アウトブレイク初期に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たが、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、変異や組み替え等によりウイルスの性状が突如として変化する可能性は否定できない。無症候ウイルス血漿ドナーが存在するリスクは低いがゼロでなく、無症候感染者が献血ドナーになり得ることから、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、変異により不活化処理感受性などの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。本年度の研究では、昨年度の武漢株、アルファ型、ガンマ型変異ウイルス株に加えて、ベータ型変異ウイルス株 (B. 1. 351, hCoV-19/Japan/TY8-612/2021)、デルタ型変異ウイルス株 (B. 1. 617. 2, hCoV-19/Japan/TY11-927/2021)、オミクロンBA. 1型 (hCoV-19/Japan/TY38-873/2021)、BA. 2 (hCoV-19/Japan/TY40-385/2022)、BA. 1. 1 (hCoV-19/Japan/TY38-871/2021)を加え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。この加熱感受性はいずれの変異ウイルスにおいても、5%アルブミン共存条件下でも維持された。またSARS-CoV-2ウイルスの室温保存下で安定性を確認した結果、PBSにスパイクした場合は3日程度感染性が保たれるのに対し、ヒト血清(SARS-Cov-2抗体陰性)にスパイクした場合は非働化処理に関係なく経時的に感染性を失うことが確認され、血中RNAemia の報告がある中で感染性が報告されていない事象との関連が示唆され今後の検討が期待される。

A. 目的

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 2022 年 5 月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、アウトブレイク初期に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たが、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、変異や組み替え等によりウイルスの性状が突如として変化する可能性は否定できない。無症候ウイルス血漿ドナーが存在するリスクは低いがゼロでなく、無症候感染者が献血ドナーになり得ることから、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、変異により不活化処理感受性などの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。

本年度の研究では、昨年度の武漢株、アルファ型、ガンマ型変異ウイルス株に加えて、ベータ型変異ウイルス株 (B. 1. 351, hCoV-19/Japan/TY8-612/2021)、デルタ型変異ウイルス株 (B. 1. 617. 2, hCoV-19/Japan/TY11-927/2021)、オミクロン BA. 1 型 (hCoV-19/Japan/TY38-873/2021)、BA. 2 (hCoV-19/Japan/TY40-385/2022)、

BA. 1. 1 (hCoV-19/Japan/TY38-871/2021) を加え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血漿分画製剤の製造工程中で用いられる 60°C 液上加熱処理に対する感受性が維持されているか確認し、血液製剤の安全性確保に資する。また、血液にウイルスをスパイクした際の室温条件下での安定性について確認する。

B 研究方法

B-1 ウイルス調整および細胞

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 としては、武漢株 hCoV-19/Japan/WK-521/2020 (A)、アルファ型変異ウイルス株 hCoV-19/Japan/TQHN001/2020 (B. 1. 1. 7,)、ベータ型変異ウイルス株 (hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 (B. 1. 351,)), ガンマ型変異ウイルス株 hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 (P. 1)、デルタ型変異ウイルス株 hCoV-19/Japan/TY11-927/2021 (B. 1. 617. 2,)), オミクロン型変異ウイルス株 hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 (BA. 1), hCoV-19/Japan/TY38-871/2021 (BA. 1. 1), hCoV-19/Japan/TY40-385/2022 (BA. 2) はすべて国立感染症研究所が分離したものであり、P1 から増やした P2 を当研究の実験に用いた (遺伝子配列に変異が無いことを確認して用いた (data not shown))。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-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-3 :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 3 日から 5 日培養し、細胞変性効果 (cytopathogenic effect :CPE)の有無を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-4:安定性評価

各ウイルスを血清、非働化済血清、PBS に 1:9 の割合でスパイクし、室温下で 0, 1, 3, 7, 15 日反応させ、各日において検体採取直後に B-3 と同様の方法で veroE6/TMPRSS2 細胞を用いて感染価を評価した。血清は予め、SARS-COV-2 中和陰性、RMA 陰性を確認済みのものを使用した。リア

ルタイム PCR、および中和試験法は、国立感染症研究所 HP で公開されている方法を用いて実施した。

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>。

C.研究結果

C-1 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

ウイルスを 1:9 の割合で PBS、5%アルブミン製剤にスパイクし、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(検出限界は 3.2 TCID₅₀/mL) (図 1, 図 2)。

武漢株における 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、5.4, 5.9(R02 年度データ)であり、アルファ型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、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、4.3, 5.3, 5.1 であり(R02 年度データ)、ガンマ型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、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、5.6, 5.5, 4.2(R02 年度データ)であった。これに加えて R03 年度に市中で確認された変異ウイルスとして、ベータ型変異ウイルスにおける 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 5.4, 4.2 であり、デルタ

型変異ウイルスにおける 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 4.2, 5.1 であった。オミクロン変異ウイルス BA.1, BA.1.1, BA.2 における 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 4.6, 4.7, 4.1 (PBS), 4.9, 4.6, 4.2 (5% アルブミン) であった。いずれの変異ウイルスにおいても 60°C30 分および 60 分の加熱処理により検出限界以下となり、武漢株における 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS、5%アルブミン製剤下とも 5.8 (R02 年度データ) であり、アルファ型変異ウイルスにおける 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、5.3, 5.2 であり (R02 年度データ)、ガンマ型変異ウイルスにおける 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、5.8, 5.8 (R02 年度データ) であった。これに加えて R03 年度に市中で確認された変異ウイルスとして、ベータ型変異ウイルスにおける 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 5.5, 5.7 であり、デルタ型変異ウイルスにおける 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 5.0, 5.1 であった。オミクロン変異ウイルス BA.1, BA.1.1, BA.2 における 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 5.1, 4.8, 4.1 (PBS), 5.0, 4.7, 4.3 (5% アルブミン) であった。いずれも検出限界以下となっており、LRV 数値の差は、ウイルスストックの力価が高いかどうかによって依存していた。い

れの変異ウイルス株においてもタンパク存在下でも PBS と同等の LRV を示した。

C-2 新型コロナウイルスを用いた安定性評価

新型コロナウイルス (wk-521, TY-501, TY8-612, TY11-927) を 1:9 の割合でヒト血清および非働化済みヒト血清に添加し、室温下で 0, 1, 3, 7, 15 日反応させ、各日において検体採取直後に細胞に作用させウイルス感染価を測定した。ヒト血清コロナ渦以前に採血された市販品であり、感染研法で SARS-CoV-2 中和陰性、RNA 陰性である。PBS 下では 7 日間ウイルス力価が保たれ大幅な低下は認められなかったが、血清にスパイクしたウイルスは、添加直後は感染性を有したがいずれのウイルス株でも非働化の有無に関わらず経時的に感染性の低下が認められた (図 3)。

D 考察

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、市中で確認された変異ウイルス株を用いて 60°C加熱処理による不活化効果を検討した。通常、ウイルス不活化処理は PBS 下では感受性が高く、タンパクが共存するとウイルスが安定化されて不活化処理に抵抗性を示す傾向があるが、SARS-CoV-2 のいずれのウイルス株においても 5%アルブミン存在下であっても加熱処理に感受性を持ち、60°C 30-60 分で検出限界以下となった。仮に感染性を有したウイルスが原料血漿に混入した場合でも工程中の加熱工程で不活化され安

全性が確保されることが示された。

ウイルス株により 60°C10 分処理で感染性の残存が示されたが、本研究の中で数分でも長く加熱処理をした場合に感染性の残存がなくなる現象が確認されており(例えば武漢株の 60°C加熱処理 12 分)、溶液の中心温度が確実に 60°Cに達するかどうか等の実験誤差が影響していると考えられた。

献血血液(全血)は採血後に一定期間室温下に置かれることがあることを想定し室温での安定性を評価した。SARS-CoV-2 は PBS 下では非常に安定性が高く、室温に放置しても 7 日間は感染性を保った。この現象は 4°Cでも同様であった(data not shown)。しかし血清に添加した場合は経時的に感染性を失い、非働化が影響しなかったことから感染性の低下に補体の関与はないと考えられた。コロナ禍以前の献血由来の血漿にスパイクして同様な現象を確認しており(data not shown)、血中から RNA が検出されるにも関わらず、ウイルスが分離されないこととの関連性に興味を持たれる。

E. 結論

新型コロナウイルス武漢株、アルファ型変異、ガンマ型変異ウイルス株に加えて、ベータ型変異ウイルス株 (B. 1. 351, hCoV-19/Japan/TY8-612/2021)、デルタ型変異ウイルス株 (B. 1. 617. 2, hCoV-19/Japan/TY11-927/2021)、オミクロン BA. 1 型 (hCoV-19/Japan/TY38-873/2021)、BA. 2 (hCoV-19/Japan/TY40-385/2022)、BA. 1. 1 (hCoV-19/Japan/TY38-871/2021)

のすべての変異ウイルスにおいて血漿分画製剤で用いる 60°C加熱処理に感受性を有することが示され、仮に感染性を有したウイルスが混入した場合でも製造工程中の加熱処理により安全性が確保されることが示された。また血清中ではウイルスの感染性が低下することが示され、今後血液中から RNA が検出される一方でウイルスが分離されないこととの関連性を検討する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(ア) 論文発表

1. Moriyama S, Adachi Y, Sato T, Tonouchi K, Sun L, Fukushi S, Yamada S, Kinoshita H, Nojima K, Kanno T, Tobiume M, Ishijima K, Kuroda Y, Park ES, Onodera T, Matsumura T, Takano T, Terahara K, Isogawa M, Nishiyama A, Kawana-Tachikawa A, Shinkai M, Tachikawa N, Nakamura S, Okai T, Okuma K, Matano T, Fujimoto T, Maeda K, Ohnishi M, Wakita T, Suzuki T, Takahashi Y. Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants. *Immunity*10;54 (8)1841-1852, 2021

2. Sho Miyamoto, Takeshi Arashiro, Yu Adachi, Saya Moriyama, Hitomi Kinoshita, Takayuki Kanno, Shinji Saito, Harutaka Katano, Shun Iida, Akira Aina, Ryutaro Kotaki, Souichi Yamada, Yudai Kuroda, Tsukasa Yamamoto, Keita Ishijima, Eun-Sil Park, Yusuke Inoue, Yoshihiro Kaku, Minoru Tobiume, Naoko Iwata-Yoshikawa, Nozomi Shiwa-Sudo, Kenzo Tokunaga, Seiya Ozono, Takuya Hemmi, Akira Ueno, Noriko Kishida, Shinji Watanabe, Kiyoko Nojima, Yohei Seki, Takuo Mizukami, Hideki Hasegawa, Hideki Ebihara, Maeda Ken, Shuetsu Fukushi, Yoshimasa Takahashi, Tadaki Suzuki Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. *Med (N Y.)*2022 Apr8;3(4):249-261

3. Yohei Seki¹, Yasuo Yoshihara¹, Kiyoko Nojima¹, Haruka Momose, Shuetsu Fukushi,³ Saya Moriyama, 4 Ayumi Wagatsuma, Narumi Numata, Kyohei Sasaki, Tomoyo Kuzuoka, Yoshiyuki Yato, Yoshimasa Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Takuo Mizukami, and Isao Hamaguchi. Safety and immunogenicity of the Pfizer/BioNTech SARS-CoV-2 mRNA third booster vaccine dose against the BA.1 and BA.2 Omicron variants. Med (N Y.) in press , 1: equally contributed

(イ) 学会発表

1. Development of in vitro culture

system for Parvovirus B19 パルボウイルスB 19のinvitro培養系の開発
岡田 義昭, 野島 清子 日本ウイルス学会 2021年11月

2. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants by SARS-CoV-2 mRNA vaccine (Pfizer/BioNTech) in Japan SARS-CoV-2 mRNAワクチン (コミナティ筋注®) 接種者血清を用いた SARS-CoV-2変異株 に対する中和能の検討 関洋平, 野島清子, 水上拓郎, 福士秀悦, 森山彩野, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 吉原愛雄, 濱口功 日本ウイルス学会 2021年11月

3. SARS-CoV-2 mRNA ワクチン (コミナティ筋注®) 接種者血清パネルを用いた mRNA ワクチンの有効性・安全性に関する研究 水上 拓郎、野島清子、関 洋平、福士 秀悦、森山 彩野、高橋 宜聖、前田 健、鈴木 忠樹、吉原愛雄、濱口 功, 日本ワクチン学会 2021年12月

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

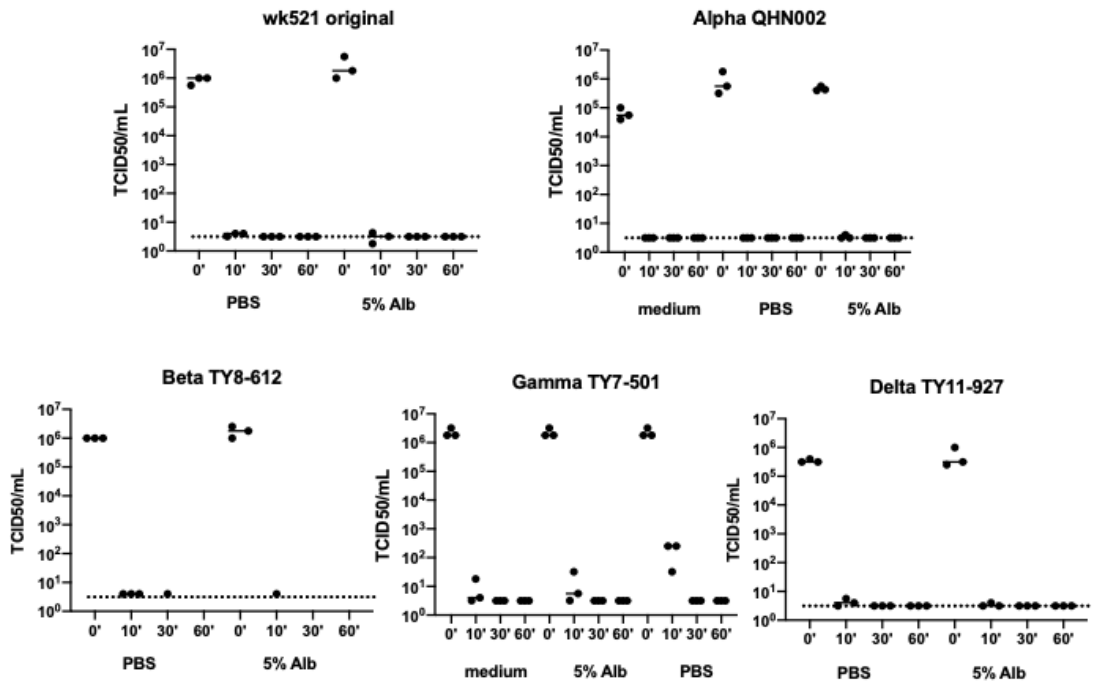


図1 60℃加熱による新型コロナウイルスの不活化

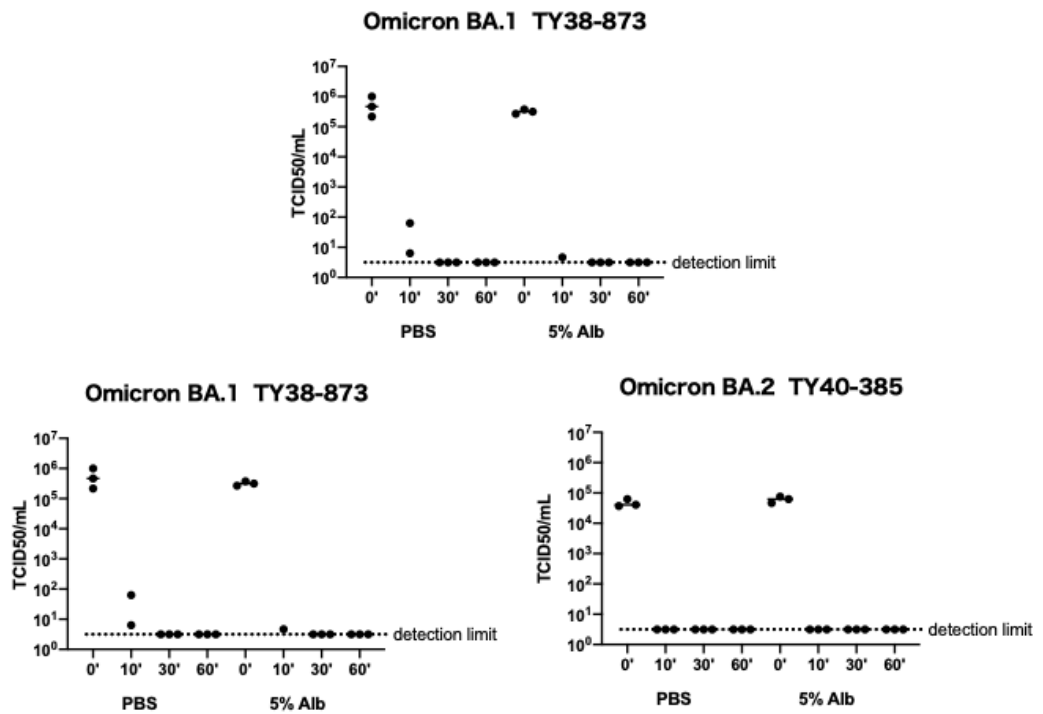


図2 60℃加熱による新型コロナウイルスオミクロン株の不活化

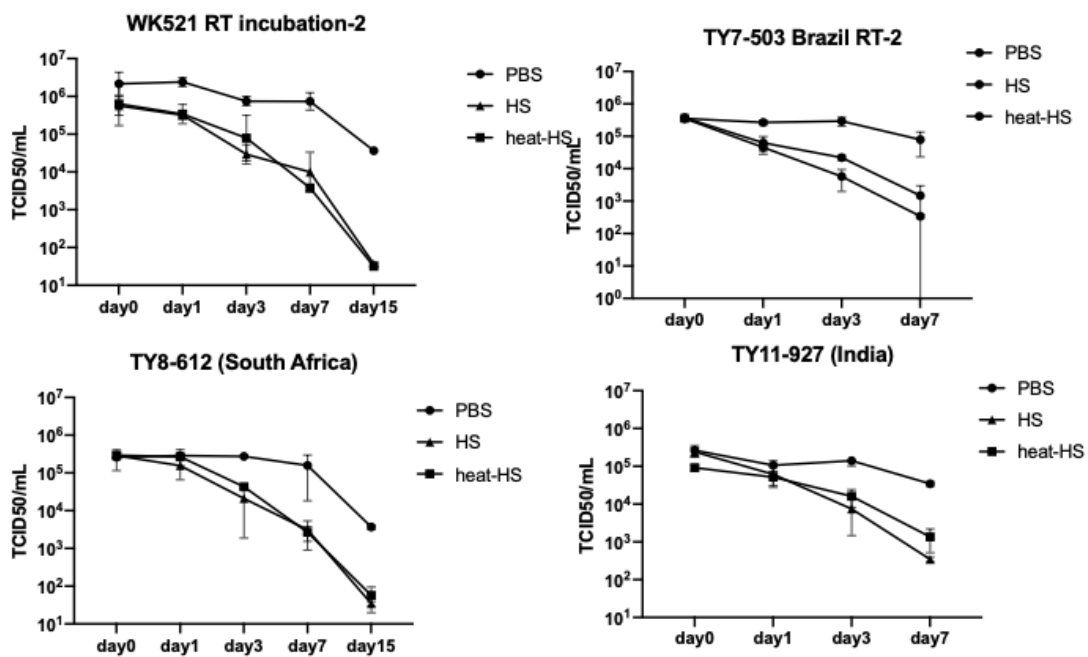


図3 新型コロナウイルスの血清存在下での安定性

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。

2021年は、これまで得られた植生マダニのサンプルを用いて、吸血源動物の探索、ウイルス検出と検査系の確立を中心に研究を進めた。マダニ媒介ウイルスの自然界における感染環を考える際、吸血源動物の特定が重要である。本研究では、植生マダニ（動物に咬着しておらず、マダニ体内に血液成分もほとんど認められないため吸血源動物を特定することが困難）に対して、RLB（Reverse Line Blot法）とNGS（Next Generation Sequencing）を併用することで、体内にわずかに残る血液成分から様々な分類群に属する吸血源動物を種レベルで同定する検出系を構築した。ヒト刺咬例が多く、植生マダニの優占種であるキチマダニについて解析したところ、北陸の渡り鳥飛来地4地点すべてから鳥類を吸血した個体が検出された。また、コジュケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、サルのDNA断片が検出され、これらの動物を吸血していることが示唆された。これまで北陸地域の渡り鳥飛来地を中心としたダニ媒介ウイルスの調査において、当該地域のキチマダニから複数年に渡ってKabuto mountain virus（KAMV）が計5株分離されており、これら分離株の配列情報を活用して、プローブ法によるリアルタイムPCRに基づく高感度KAMV検出系を今回新たに確立した。

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、2021年は68名（2021年7月28日現在）であつ

た。これまでの総患者数641名（2021年7月28日現在）のうち、西日本の府県から合計で638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) は長崎県と兵庫県から、Tarumizu tick virus (TarTV) は、鹿児島県、鳥取県、福島県で、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

マダニサンプル

2018～2020 年までに得られた石川県、富山県、福井県内の渡り鳥飛来地において、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) によって得られた植生マダニを吸血源動物種の同定及びウイルス分離に用いた。

吸血源動物種の同定

採集された植生マダニ若虫、成虫のうち、石川県及び富山県の渡り鳥飛来地 4 か所から採集され、優占種であるキチマダニ 167 頭から DNA を抽出し、Reverse Line Blot Hybridization (RLB) 法による吸血源同定を行った。これまでに改良した RLB 法により、国内に生息する主要な哺乳類 18 種は種特異的プローブによって検出が可能となっている。一方で、鳥類、爬虫類、げっ歯類については、種数が多く、多くの種に対応した種特異的プローブがない。そのため、吸血源動物が未知のサンプルに対してまず、各網共通プローブによる検出を行い、次いで次世代シ

削除:

ークエンズ (NGS) 解析により種の同定を行った。

Kabuto mountain virus 分離株の配列解析ならびにリアルタイム PCR 検出系の確立

これまでに北陸地域の渡り鳥飛来地において採集されたキチマダニから 5 株の Kabuto mountain virus (KAMV) が分離されている (表 1)。これら分離株の配列多様性を把握するため、ウイルス L 分節にコードされる L タンパク質のコーディング領域のほぼ全長配列 (6288 塩基) について、本研究により得られた 5 分離株および先行研究により報告されている T32 株 (GenBank accession no. LC153711; Ejiri et al., 2018) の配列情報を用いて、配列アラインメントを行い、塩基配列の相対比較解析を行った。その結果、得られた配列保存性の高い領域上にプローブおよびプライマーを設計し、当該領域をカバーするように *in vitro* 転写によって合成された RNA をスタンダードとして、絶対定量法に基づくリアルタイム PCR 検出系の確立を試みた。

C. 研究結果

DNA 抽出を行ったキチマダニ 167 個体の内、RLB 法では、77 個体 (46.1%) から吸血源動物由来の DNA 断片が検出された。イヌ、サル、爬虫類、イノシシ、クマ、げっ歯類、鳥類が吸血源動物として推定された。キチマダニの吸血源動物種構成は採集地で異なっていた。哺乳動物以外は種の特定はできなかった。実験に供した全 4 地点のキチマダニから鳥類由来の DNA が検出された。また、山間部に近くなるほど、大型の哺乳類を多く吸血しており、反対に都市部や建物が多い環境だと鳥類やげっ歯類など小型動物

の割合が高くなる傾向がみられた。

RLB 法で吸血源動物を推定できた 77 個体の内、48 個体を NGS 解析に用いた。12 個体 (25%) から吸血源動物由来の DNA 断片と推定される配列が検出された。解析の結果、キチマダニ 10 個体がコジュケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、ニホンザルから吸血したと推定された。RLB 法では鳥類と同定されたものの種同定に至らなかったサンプルにおいて、NGS 解析では鳥類種が特定できた。

これまでに得られている KAMV の塩基配列の相対比較解析を行った結果、これら株間の相対性は、94~100%であることが明らかとなった。またこれら分離株の配列アラインメントデータを用いて、6 株間において保存された塩基配列領域に、プローブ (KAMVLp, 5'-CTT CAA CAT CCT CCT CAG CTC TC-3') ならびにプライマー (KAMVL1, 5'-TTG CTC GCT GTC TGG AGT CA-3'; KAMVL2, 5'-TAC CGC CTG AAG TGT GGAGA-3') を設計した。本検出系を用いて KAMV 分離株から抽出した RNA をもとに試験的な検出を実施したところ、10 ウイルスゲノムコピー/ μ L 以下の微量なウイルス遺伝子についても検出可能であることが判明し、今回 KAMV の高感度検出系の確立に成功した。

D. 考察

一般的に、ダニ媒介感染症にはホットスポットと呼ばれる比較的狭い範囲での流行が特徴として挙げられる。一方で、渡り鳥を介して海外からマダニが侵入する可能性も指摘されており、その場合はかなりの距離を病原体が運ばれることになる。これまでの本研究班の研究によって、KAMV について、北陸地方における本ウイルスの分布を初めて報告し、日本

各地に広範囲に分布していることを指摘した。KAMV は、いずれもキチマダニから分離されており、36 種類の鳥類への寄生例が報告されている。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。また、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れている。今年度の植生キチマダニの吸血源動物種同定によって、鳥類（コジュケイ）やイノシシから吸血していることが示されており、キチマダニが鳥類を介した長距離移動及び移動先でのウイルスの維持（移動性の低い哺乳動物を吸血しその地域で繁殖）に関与している可能性が示唆された。

NGS を用いた吸血源同定は種の特定に有用と考えられるが、ヒト由来の DNA 断片が多く検出されること、解析の過程の PCR 反応で後の解析への悪影響も認められたことから、実験系の改善の余地がある。また、今回は動物分類群のスクリーニングとして RLB 法を用いたが、コストや時間がかかりスクリーニングに適しているとは言えない。RLB 法に代わるスクリーニング方法の検討が必要と考えられた。

KAMV はアルボウイルスの研究に汎用されるシリアンハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞において、効率的に増殖することが確認されているが、当該細胞に対しては、細胞変性効果を示さない、あるいは極めて微弱であるために、ウイルス分離のスクリーニング作業には、conventional な RT-PCR 検出系が主として用いられていた。そのため、今回確立されたリアルタイム PCR 検出系を活用することによって、スクリーニング作業の効率化を図ることが可能となった。

また最近行われた KAMV の疫学調査において、ヒト血清中に KAMV の中和抗体の存在が確認され、KAMV はヒトに対して感染性を示すことが明らかとなった。KAMV の媒介種と推定されるキチマダニは、ヒト刺咬例も多数知られる我が国に広く分布する普通種のマダニである。これまでのところ、ヒトにおける KAMV の病原性の有無は不明であるが、媒介マダニ種の上記のような特性を鑑みるに、KAMV のヒトへの暴露リスクは高いものと考察される。そのため、今回確立したリアルタイム PCR による検出系を、KAMV の検査や診断に用いることによって、今後、ヒトにおける KAMV 感染や流行実態を解明するべく、調査研究が促進されることが期待される。

E. 結論

- 1) マダニの吸血源動物の検出系を構築し、キチマダニの吸血源動物の一部を明らかにした。
- 2) Kabuto mountain virus の高感度検出系を確立した。
- 3) 渡り鳥飛来地に分布している植生マダニがヒトへの病原性を有す可能性のあるウイルスをはじめ様々なウイルスを保有していることが明らかになった。渡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。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Faizah AN, Higa Y, Hayashi T, Sawabe K, Isawa H. Toyo virus, a novel member of the Kaisodi group in the genus Uukuvirus (family

Phenuiviridae) found in *Haemaphysalis formosensis* ticks in Japan. Archives of Virology. 166(10):2751-2762. 2021. doi: 10.1007/s00705-021-05193-w.

Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Shimoda H, Fujita R, Faizah AN, Kai I, Matsumura R, Kuroda Y, Watanabe S, Kuniyoshi S, Yamauchi T, Watanabe M, Higa Y, Hayashi T, Shinomiya H, Maeda K, Kasai S, Sawabe K, Isawa H. Detection of Jingmenviruses in Japan with evidence of vertical transmission in ticks. Viruses. 13(12):2547. 2021. doi: 10.3390/v13122547.

Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Faizah AN, Higa Y, Hayashi T, Sawabe K, Isawa H. Detection of quaranjavirus-like sequences from *Haemaphysalis hystricis* ticks collected in Japan. Japanese Journal of Infectious Diseases. 75(2), 195-198. 2022. doi: 10.7883/yoken.JJID.2021.129.

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

株名	分離源	採集地	採集年月日
ISK49	キチマダニ 若虫 23 頭のプール	石川県加賀市片野	2019 年 10 月 15・16 日
ISK53	キチマダニ 若虫 39 頭のプール	石川県加賀市片野	2019 年 11 月 18 日
18HKR18	キチマダニ 雄成虫 1 頭	石川県加賀市片野	2018 年 5 月 16 日
18HKR66	キチマダニ 若虫 8 頭のプール	石川県輪島市猿山岬灯台	2018 年 5 月 6 日
17ISK-T11	キチマダニ 若虫 26 頭のプール	石川県加賀市片野	2017 年 10 月 24 日

表 1 これまでの研究で得られた Kabuto mountain virus の分離株一覧

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型肝炎ウイルスの除去/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 浦山健、井上隆昌、井手野祥次、西口優吾（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]

E型肝炎ウイルス（以下、HEV）に対する血漿分画製剤のさらなる安全性の向上を目指し、HEVの熱感受性の調査、及び新たにヒトへの感染が報告された動物種由来 HEV のリスク評価を実施した。

HEV の熱感受性の調査については、リバースジェネティクス法により培養細胞から産生した HEV（以下、RG-HEV）を用いて、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理（60℃, 10 時間）での不活化効果を評価した。その結果、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の不活化効果はそれぞれ、1 Log reduction value（以下、LRV）、及び 2 LRV 程度であることが明らかとなった。これらの結果はヒト血液由来の HEV を用いた実験結果とも類似しており、液状加熱処理における RG-HEV のモデルウイルスとしての適正の一端を示唆するものである。また、これらの結果から、液状加熱処理は HEV に対して有効な工程ではないものの、ウイルス除去膜処理による除去効果と併せることで、HEV に対する安全性の向上に寄与し得ると考えられた。

動物種由来 HEV のリスク評価については、新たにヒトへの感染が報告されたウサギ、及びラット HEV の 2 種類について実施した。ウサギ HEV は、これまでヒトへの感染の報告がある動物種（イノシシ、シカ、ブタ）の HEV と遺伝学的に近縁であり、構造タンパク質の相同性も高いことから、これまで対象としてきた HEV と同様、NAT による検出やウイルス除去・不活化処理は有効に機能する可能性が高いと考えられた。一方、ラット HEV については、これまで報告のある HEV と異なる遺伝子型に分類されるため NAT をすり抜ける可能性が高いものの、粒子サイズは他の HEV と変わらないことから、ウイルス除去膜は有効に機能すると考えられた。総じて、新たな動物種由来の HEV に対して、注視は必要なものの血漿分画製剤のウイルス安全性に対する追加の施策は必要ないと考察した。

略語； HEV: Hepatitis E virus

NAT: Nucleic acid amplification test

LRV: Log reduction value

S/D: Solvent/Detergent

A. 研究目的

加熱の不十分なブタ、イノシシ、及びシカの内臓肉の摂取が国内における HEV 感染の主たる原因と

考えられている¹⁾。ウイルス血症を起こしながらもほぼ無症状の HEV 感染者も多く存在することがわかっており、2016 年に行われた HEV 感染実態調査では東京都の献血者の 1,367 人に 1 人が HEV ゲノム陽性であった²⁾。2002 年から 2020 年にかけて輸血用血液製剤による HEV 感染は計 45 件報告されている³⁾。2020 年 8 月より HEV-NAT による献血者の全数スクリーニングが導入されて以来、輸血による HEV 感染事例は報告されておらず、輸血用血液製剤の安全性は向上している。しかしながら、近年、これまで知られていない動物種に由来する HEV のヒトへの感染事例が報告されており、動物種によっては NAT をすり抜ける可能性があり注視が必要である¹⁾。一方、数千～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調査することで、HEV に対する安全性の検証が可能となる。過去に厚生労働科学研究補助費をうけて実施した研究や論文報告から、ウイルス除去膜処理は HEV 除去に有効な工程であることが判明している^{4), 5)}。血漿分画製剤の製造工程中には、ウイルス除去膜処理の他にもウイルス不活化処理工程が導入されており、これらの工程での HEV 不活化能を適切に調査し、その不活化効果をウイルス除去膜処理による除去効果と合わせることで、HEV 安全性の向上が期待される。

血漿分画製剤中の HEV の除去・不活化の適切な評価には、ヒト血漿中の HEV (以下、Pd-HEV) を使用することが望ましい。しかしながら、評価に必要な高濃度の Pd-HEV を十分量確保できないことから、これまでそのような評価は困難であった。一般社団法人日本血液製剤機構では、リバースジェネ

ティクス法により培養細胞から高濃度で脂質の結合する HEV (以下、RG-HEV) を取得する方法を確立し、感染価で除去・不活化効果を評価している⁶⁾。RG-HEV のウイルス除去膜処理でのろ過特性は Pd-HEV と同等であり、評価の際のモデルウイルスとして適していることを確認した⁴⁾。一方、RG-HEV の熱感受性も Pd-HEV に類似していることを確認しているが、Pd-HEV の粒子表面には脂質が結合していることが報告されている⁶⁾。血漿分画製剤の製造過程では、エタノール分画におけるエタノールとの接触や有機溶媒/界面活性剤 (S/D) 処理により、Pd-HEV 表面の脂質が除去されるため、その物理化学的性質が変化する^{4), 5), 7), 8)}。そのため、HEV の性状の違いが工程での挙動に与える影響を把握しておくことも、HEV の除去・不活化効果を評価する上で重要である。

本分担研究では、HEV に対する血漿分画製剤のさらなる安全性の向上を目指し、HEV の熱感受性の解析及びヒトへの感染が新たに報告された動物種由来 HEV のリスク評価を実施した。熱感受性の解析では、RG-HEV を用いて、アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理による HEV 不活化効果を評価した。また、エタノールとの接触によって HEV の性状や特性が変化する可能性を踏まえて、20 vol%エタノール処理の有無が HEV の不活化効果へ与える影響も比較した。一方、ヒトへの感染が新たに報告された動物種由来 HEV のリスク評価では、ウサギ HEV とラット HEV について NAT による検出が可能であるか、血漿分画製剤に導入されているウイルス除去・不活化工程が機能するか調査した。

B. 研究方法

1. ウイルス

RG-HEV は、PLC/PRF/5 細胞にブタ糞便由来の swJR-P5 株の合成ゲノムをトランスフェクションし、その培養上清中に産生された HEV を用いた。

2. 液状加熱試験用 RG-HEV の調製

RG-HEV を含む培養上清を超速心分離 (150,000 × g, 4°C, 3 時間) し、RG-HEV を含む沈殿画分を 20 mM MOPS buffer により懸濁して得られた懸濁液を氷上で超音波処理 (4 分 × 2 回) した。次に RG-HEV を含む懸濁液にエタノールを最終濃度 20 vol% となるように加え、-6°C で 1 時間インキュベーションすることでエタノール処理を行った。またコントロールとして、エタノールの代わりに注射用水を加え、4°C で 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、RG-HEV 溶液を超速心分離 (150,000 × g, 4°C, 3 時間) し、RG-HEV を含む沈殿画分を製剤中間工程品あるいは 10 mM MES buffer により懸濁し、エタノール処理有り RG-HEV、及びエタノール処理無し RG-HEV とした。

3. 液状加熱試験

アンチトロンビン製剤またはグロブリン製剤の中間工程品に対して、1/10 液量の RG-HEV を添加しよく混合した。加熱前サンプル、加熱処理サンプル、及び Holding サンプルとしてチューブへ分注した。加熱処理サンプルを恒温槽内にて加温し、58.0°C に達した時間を 0 タイムとして、58.0~59.0°C で 10 時間加熱した。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氷上で急速冷却し、A549 細胞用維持培地を加えた後、-80°C のフリーザー中で感染価測定まで保管した。Holding サンプ

ルは 36~37°C で 10 時間静置後、氷上で急速冷却、A549 細胞用維持培地を加えた後、-80°C のフリーザー中で保管した。

4. 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。加熱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。

5. 各宿主由来 HEV の塩基/アミノ酸配列比較

Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 上に登録されるウサギ HEV (Accession # JQ013793) 及びラット HEV (Accession # MK050105) の全ゲノム、並びに ORF1、ORF2、及び ORF3 の塩基配列、さらにキャプシドタンパク質をコードする ORF2 についてはアミノ酸配列についても、リバースジェネティクス法の鑄型としても使用したブタ HEV (Accession # AB481229) と Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて比較した。また、ウサギ HEV とラット HEV ゲノム配列について、遺伝子型 1~4 に属する HEV を検出することが報告されたプライマー及びプローブ配列⁹⁾ と比較し、検出が可能であるか検討した。

6. ホモロジーモデリングによるラット HEV キャプシド構造予測

構造既知の遺伝子型 4 に属するヒト由来 HEV ウイ

ルス様粒子 (VLP) (PDB # 3HAG) を鋳型として
設 定 し、 SWISS-MODEL

(<https://swissmodel.expasy.org/>) のホモロジーモ
デリングによりラット HEV (Accession #
MG813927) の VLP モデルを構築した。

C. 研究結果

1. アンチトロンビン製剤の液状加熱処理による HEV 不活化効果の検証

すべてのサンプルは加熱処理開始後 30 分におい
て、1 LRV 程度不活化されたが、以降の不活化はほ
んど増大しなかった (表 1 と図 1)。10 時間の液
状加熱による不活化効果は、エタノール処理有り
RG-HEV では 1.2/1.6 LRV (n1/n2)、エタノール処
理無し RG-HEV では 1.0/≥1.8 LRV (n1/n2) であり、
エタノール処理により不活化効果が増大することは
なかった (表 1 と図 1)。

2. グロブリン製剤の液状加熱処理による HEV 不活 化効果の検証

すべてのサンプルで加熱開始後 5 時間まで、不活
化効果は徐々に増大し、2 LRV 程度に達した。以降
も、エタノール処理有り RG-HEV の n2 を除き、不
活化効果は増大し、それぞれの感染価は検出限界未
満となった。10 時間の液状加熱による不活化効果は、
エタノール処理有り RG-HEV では、≥2.2/2.2 LRV
(n1/n2)、エタノール処理無し RG-HEV は ≥2.6/≥
2.4 LRV (n1/n2) であり、エタノール処理により不
活化効果が増大することはなかった。

3. 各種 HEV の配列比較及び報告 HEV プライマー/ プローブセットによる検出可能性の評価

ウサギ HEV とラット HEV に対して、これまで

リバースジェネティクスの鋳型とした用いたブタ
HEV との塩基及びアミノ酸配列の比較を行った。

その結果、ウサギ HEV とブタ HEV では、全ゲノ
ムと ORF1-3 の塩基配列で 70-90%、ORF2 のアミ
ノ酸配列も 93% と相同性が非常に高かった (表 3)。

一方、ラット HEV とブタ HEV では、全ゲノム、
ORF1、ORF2 の塩基配列が 50-60%、ORF3 の塩基

配列では 7%、ORF2 アミノ酸配列では 57% と、ブ
タ HEV との相同性は低かった (表 3)。これらの相

同性比較に一致して、遺伝子型 1~4 の HEV を検出
することが可能なプライマー/プローブの全長配列

⁹⁾ はウサギ HEV ゲノムと完全に一致しており、検
出が可能と考えられた。一方、ラット HEV とは 3'
末端部位を含む半分以上で一致していなかったこと
から、検出されない可能性が高いと考えられた (図
3)。

4. ホモロジーモデリングによるラット HEV-VLP モデルの構築

遺伝子型 4 に属する直径 27 nm のヒト由来
HEV-VLP 構造 (PDB # 3HAG) ¹⁰⁾ を鋳型にしてラ
ット HEV-VLP モデルを構築した (図 4)。構築され
たラット HEV-VLP モデルは、表面の突起構造に違
いがある可能性が高いものの、外殻の中心構造は鋳
型とした HEV-VLP と類似しており、サイズの縮小
をもたらす差異は認められなかった。以上をもとに
ラット HEV-VLP サイズは 27 nm と予想された。

D. 考察

アンチトロンビン製剤及びグロブリン製剤の液状
加熱処理における RG-HEV の不活化効果は、LRV
でそれぞれ 1~2 LRV、2 LRV 程度と見積もられた。

製造工程中の HEV の性状変化を考慮し、20vol%エ

タノールで処理をした RG-HEV も評価したが、不活化効果の違いは観察されなかった。これは、25vol%エタノールで RG-HEV を処理しても RG-HEV と pd-HEV から脂質がほとんど除去されなかったとする過去の研究結果⁴⁾とも一致し、分画 II + III までに使用されるエタノール処理が pd-HEV の熱感受性に及ぼす影響は軽微と考えられた。これらのことから、液状加熱処理は HEV の不活化に有効な工程ではないが、ウイルス除去膜処理工程と合わせることで、HEV に対する安全性の向上に寄与し得ると考えられた。加えて、RG-HEV は Pd-HEV の挙動をよく反映しており、液状加熱処理における RG-HEV のモデルウイルスとしての適格性の一端を示唆するものである。

近年、ヒトへの感染が報告されたウサギとラットに由来する HEV のリスク評価をおこなった。ウサギ HEV については、ブタ、イノシシ、シカに由来する HEV の遺伝子型に近縁であるとの報告と一致し¹⁾、ブタ HEV と高い相同性を示した。遺伝子型 1 ~ 4 の HEV を検出することが可能なプライマーとプローブの全長配列がウサギ HEV ゲノムと完全に一致したことから、日本赤十字社で導入されている NAT でも検出される可能性が高いと考えられた。またキャプシドタンパク質をコードする ORF2 のアミノ酸配列でもブタ HEV と相同性が高いことから、除去・不活化特性もブタ HEV に類似すると推測された。

一方、ラット HEV は遺伝学的にブタ、イノシシ、シカ HEV から離れており¹⁾、配列解析の結果からも NAT をすり抜ける可能性が高いと推測された。ウイルス除去膜処理の有効性を検討するため、ホモロジーモデリングによりラット HEV VLP を構築したところ、鋳型の HEV VLP からそのサイズは変化

しないと予想された。この鋳型に使用した HEV VLP は 60 分子の ORF2 から構成され、そのサイズは 27 nm であるが、感染性を備える HEV 粒子は 180 分子の ORF2 から構成されると考えられていることから¹⁰⁾、実際のラット HEV のサイズは 27 nm より大きいと推測される。以上をもとに、ラット HEV に対しても、平均孔径 19 nm あるいはそれ以下のウイルス除去膜は有効に機能すると判断された。

E. 結論

液状加熱処理による HEV 不活化効果は一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる ≥ 4 LRV に満たなかった。しかしながら、その機序はウイルス除去膜処理とは異なることから、ウイルス除去膜処理による「有効」な除去効果に合わせることで、血漿分画製剤の総合的な HEV 安全性の向上に寄与すると考えられる。

ラット HEV は NAT をすり抜ける可能性があるが、平均孔径 19 nm あるいはそれ以下のウイルス除去膜は HEV 除去で有効に機能すると考えられる。

(引用文献)

- 1) 病原微生物検出情報 Vol. 42 No. 12 (2021. 12) <https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/42/502.pdf>
- 2) 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>
- 3) 日本赤十字社におけるヘモビジランス 2020 薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会資料 (令和 3 年 10 月 26 日開催) <https://www.mhlw.go.jp/content/11127000/000846771.pdf>
- 4) Ideno S *et al.* Phenotypic characterization of cell culture-derived hepatitis E virus subjected to different chemical treatments:

- Application in virus removal via nanofiltration. J Virol Methods. 2021 Oct;296:114244. なし
- 5) Kapsch AM *et al.* Antibody-enhanced hepatitis E virus nanofiltration during the manufacture of human immunoglobulin. Transfusion. 2020 Nov;60(11):2500-2507. 2. 実用新案登録
なし
- 6) Takahashi M *et al.* Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. J Clin Microbiol. 2010 Apr;48(4):1112-25 3. その他
なし
- 7) 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.
- 8) 2019年度 厚生労働科学研究補助費分担研究報告書
https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2019/193041/201925001A_upload/201925001A0011.pdf
- 9) 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
- 10) Guu TS *et al.* Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Aug 4;106(31):12992-7

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ideno S *et al.* Phenotypic characterization of cell culture-derived hepatitis E virus subjected to different chemical treatments: Application in virus removal via nanofiltration. J Virol Methods. 2021 Oct;296:114244.

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

サンプル名	加熱時間 (hrs)				
	0	0.5	1	5	10
エタノール処理有り RG-HEV n1	0	1.2	1.0	1.2	1.2
エタノール処理有り RG-HEV n2	0	1.4	1.0	1.2	1.6
エタノール処理無し RG-HEV n1	0	0.8	1.0	1.6	1.0
エタノール処理無し RG-HEV n2	0	1.0	0.8	1.2	≥1.8

加熱時間 (hrs)を除き数値は LRV を示す。

表 1 アンチトロンビン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移

エタノール処理有り RG-HEV とエタノール処理無し RG-HEV 対して、2 回試験 (n1、n2) を実施した

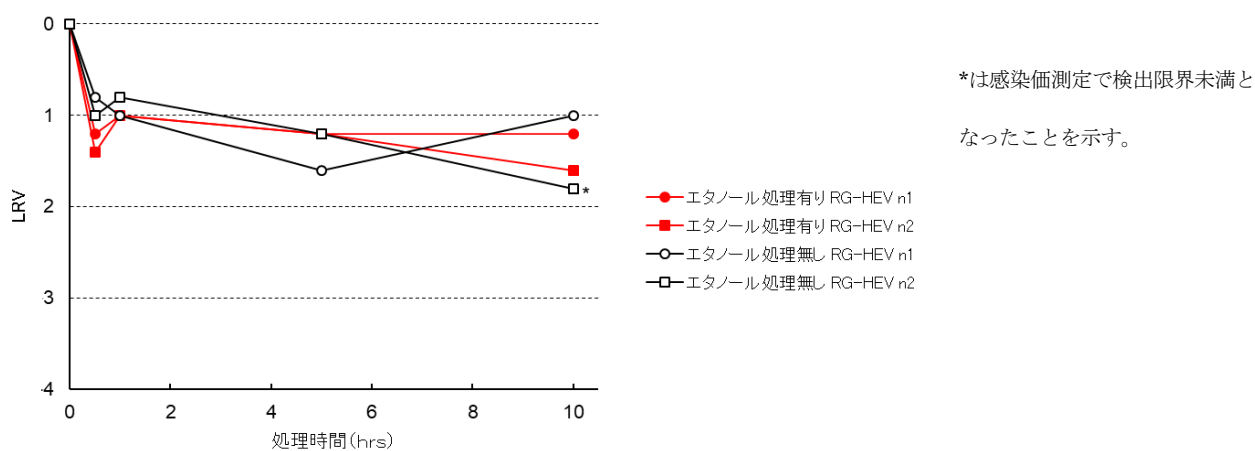


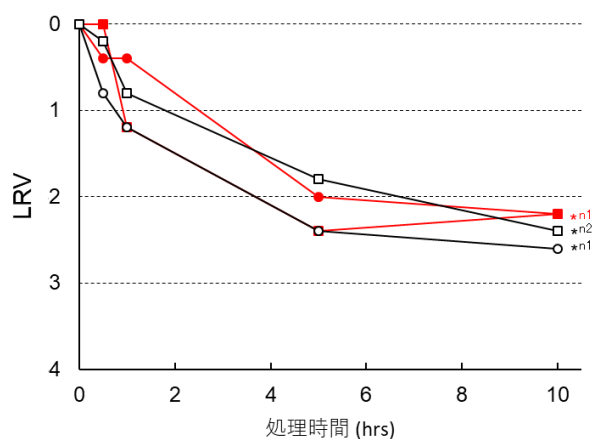
図 1 アンチトロンビン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移 (表 1 をグラフで示した)

サンプル名	加熱時間 (hrs)				
	0	0.5	1	5	10
エタノール処理有り RG-HEV n1	0	0.4	0.4	2.0	≥2.2
エタノール処理有り RG-HEV n2	0	0.0	1.2	2.4	2.2
エタノール処理無し RG-HEV n1	0	0.8	1.2	2.4	≥2.6
エタノール処理無し RG-HEV n2	0	0.2	0.8	1.8	≥2.4

加熱時間 (hrs)を除き数値は LRV を示す。

表 2 グロブリン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移

エタノール処理有り RG-HEV とエタノール処理無し RG-HEV 対して、2 回試験 (n1、n2) を実施した。



*n1 はエタノール処理有り
RG-HEV n1、
*n1 はエタノール処理無し
RG-HEV n1、及び
*n2 はエタノール処理無し
RG-HEV n2 の加熱処理開始 10 時
間後の感染価測定で検出限界未満
となったことを示す。

図 2 グロブリン製剤の液状加熱処理による RG-HEV の LRV 推移 (表 2 をグラフで示した)

HEV 種 (GenBank Accession#)	ブタ HEV (AB481229) との比較 (%)				
	塩基配列				アミノ酸配列
	全ゲノム	ORF1	ORF2	ORF3	ORF2
ウサギ HEV (JQ013793)	78	77	81	87	93
ラット HEV (MG813927)	60	57	54	7	57

表 3 ウサギ HEV とラット HEV のブタ HEV に対する相同性比較
完全一致時を 100% とする

図 3 ウサギ HEV とラット HEV の遺伝子型 1~4 HEV の検出用プライマー/プローブセットとの比較

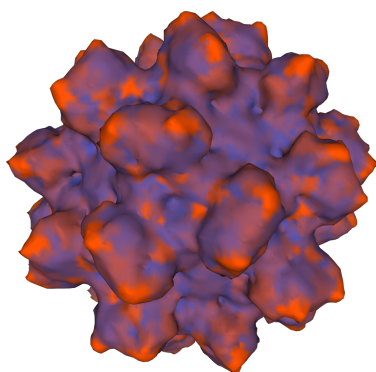


図 4 ホモロジーモデリングより予想されるラット HEV VLP 構造

鋳型として設定した HEV VLP (PDB # 3HAG) と相同性が高く同一の構造を取り得る箇所を青色で示し、相同性が低くアミノ酸配列から予測された構造については赤色で示している。

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
. Moriyama S, Adachi Y, Sato T, Tonouchi K, Sun L, Fukushima S, Yamada S, Kinoshita H, Nojima K, Kanno T, Tobiume M, Ishijima K, Kuroda Y, Park ES, Onodera T, Matsumura T, Takano T, Terahara K, Isogawa M, Nishiyama A, Kawana-Tachikawa A, Shinkai M, Tachikawa N, Nakamura	Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants.	Immunity	54(8)	1841-1852	2021

<p>Sho Miyamoto, Takeshi Arashiro, Yu Adachi, Saya Moriyama, Hitomi Kinoshita, Takayuki Kanno, Shinji Saito, Harutaka Katano, Shun Iida, Akira Ainao, Ryutaro Kotaki, Souichi Yamada, Yudai Kuroda, Tsukasa Yamamoto, Keita Ishijima, Eun-Sil Park, Yusuke Inoue, Yoshihiro Kaku, Minoru Tobiume, Naoko Iwata-Yoshikawa, Nozomi Shiwa-Sudo, Kenzo Tokunaga, Seiya Ozono, Takuya Hemmi, Akira Ueno, Noriko Kishida, Shinji Watanabe, <u>Kiyoko Nojima</u>, Yohei Seki, Takuo Mizukami, Hideki Hasegawa, Hideki Ebihara, Maeda Ken, Shuetsu Fukushi, Yoshimasa Takahashi, Tadaki Suzuki</p>	<p>Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants.</p>	<p>Med (N Y.)</p>	<p>3(4)</p>	<p>249-261</p>	<p>2022</p>
<p>Yohei Seki ¹, Yasuo Yoshihara¹, <u>Kiyoko Nojima</u>¹, Haruka Momose, Shuetsu Fukushi, ³ Saya Moriyama, ⁴ Ayumi Wagatsuma, Narumi Numata, Kyohei Sasaki, Tomoyo Kuzuoka, Yoshiyuki Yamoto, Yoshimasa Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Takuo Mizukami,, and Isao Hamaguchi.</p>	<p>Safety and immunogenicity of the Pfizer/BioNTech SARS-CoV-2 mRNA third booster vaccine dose against the BA.1 and BA.2 Omicron variants.</p>	<p>Med (N Y.)</p>	<p>In press</p>		

Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Faizah AN, Higa Y, Hayashi T, Sawabe K, Isawa H.	Toyo virus, a novel member of the Kaisodi group in the genus Uukuvirus (family Phenuiviridae) found in <i>Haemaphysalis formosensis</i> ticks in Japan.	Archives of Virology.	166(10)	2751-2762.	2021
Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Shimoda H, Fujita R, Faizah AN, Kai I, Matsumura R, Kuroda Y, Watanabe S, Kuniyoshi S, Yamachi T, Watanabe M, Higa Y, Hayashi T, Shinomiya H, Maeda K, Kasai S, Sawabe K, Isawa H.	Detection of Jingmenviruses in Japan with evidence of vertical transmission in ticks.	Viruses.	13(12)	2547	2021
Kobayashi D, Kuwata R, Kimura T, Faizah AN, Higa Y, Hayashi T, Sawabe K, Isawa H.	Detection of quarranvirus-like sequences from <i>Haemaphysalis hystericis</i> ticks collected in Japan.	Japanese Journal of Infectious Diseases	75(2)	195-198	2022
Ideno S <i>et al.</i>	Phenotypic characterization of cell culture-derived hepatitis E virus subjected to different chemical treatments: Application in virus removal via nanofiltration.	J Virol Methods	296	1142-44	2021

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 3 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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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：)

令和4年3月31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3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 (所属部署・職名) ウイルス第一部第二室・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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：)

令和4年3月25日

厚生労働大臣 殿

機関名 関西医科大学
所属研究機関長 職名 学長
氏名 友田 幸一

次の職員の令和3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 教授
(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"/>	関西医科大学	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

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

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

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

6. 利益相反の管理

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

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

令和 4 年 4 月 1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 3 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 (所属部署・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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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：)

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3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 (所属部署・職名) 国立感染症研究所 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)
人を対象とする生命科学・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"/>
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"/>
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」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系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：)

令和 4年 2月 24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 上園 昭人

次の職員の令和3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) 中央研究所 感染性病原体研究室 室長*

(氏名・フリガナ) 前野英毅・マエノヒデキ

*2021年10月1日付で技術開発部技術開発二課に異動

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	一般社団法人 日本血液製剤機構	<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

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

その他 (特記事項)

(※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。