

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2～3年度 総合研究報告書

研究代表者 岡田 義昭

(埼玉医科大学)

令和4(2022)年3月

## 目 次

|   |        |          |
|---|--------|----------|
| I. 総合研究報告書  |        |          |
| 輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性と安定供給を確保するための<br>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<br>ウイルス学的特性の解析         | 林 昌宏   | P 7-P 11 |
| 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<br>関する研究           | 大隈 和   | P12-P14  |
| 3. 赤血球製剤の病原体不活化法の開発                                 | 岡田 義昭  | P15-P18  |
| 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<br>不活化・除去と安全性の評価 | 野島 清子  | P19-P32  |
| 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 | P33-P40  |
| 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<br>(HEV)の産生と性状解析－ | 前野 英毅  | P41-P50  |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                                 |        | P51-P54  |

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業)

総合研究報告書

輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性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、ジカウイルス、ウスツウイルスの核酸を検出できることが確認出来た。
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 に高感受性の細胞株を樹立した。その細胞株と 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 *in vitro* で評価できるようになった。
4. 血漿中から SARS-COV2 の RNA が稀に検出されることから原料血漿にウイルスが混入した場合を想定し、武漢株、アルファ変異、ガンマー型変異、ベータ型変異、デルタ型変異、オミクロン株等の 60℃液上加熱処理における不活化効果を評価したところ、全てのウイルス株が 30 分で不活化されることを確認した。また、血清中に抗体や補体以外の感染を抑制する「因子」の存在が示唆された。
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が吸血している動物種とウイルスの解析を行った。特にキチマダニは、鳥やヒトへの嗜好性があり、渡り鳥を介したウイルス の拡散に重要なマダニであることが確認出来た。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はないことが判明した。

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。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。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。一方、血液製剤の安全対策上重要なB型・C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。培養法を改良し、実際のHBVやHCVを用いた不活化法の評価を目指した。本研究班では、これらの病原体の検出法やスクリーニング法の開発とその評価を行った。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

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。

## 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  $5 \times 10^8$  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を明らかにした。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  $6.7 \times 10^4$  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。

また、感染性を有する HBV を得るためにリバーシジェネティック法として HBV 陽性血漿から HBV-DNA を抽出し、リガーゼによって環状二重鎖にした核酸を RCA(Rolling circle amplification)により全長がタンデムに結合した HBV 遺伝子を合成した。これを細胞に導入することで、培養上清に感染性 HBV を産生する細胞株を樹立することができた。

赤血球の不活化法の開発では、不活化のために添加する「Pheophorbide a」の細胞毒性について評価し、T 細胞や単球に比べて B 細胞への増殖抑制が著明であることを明らかにした。

#### 4) 実ウイルスを用いたエタノール分画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。武漢株、アルファ変異、ガンマー型変異、ベーター型変異、デルタ型変異、オミクロン株等を用いて、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 を高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°C, 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を評価し、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、スクリーニング法の進歩によって安全性が高くなった HBV はこれまで有用な感染系がなかったが、拡大や野生動物の増加、更には温暖化等の高感受性株の樹立でモデルウイルスと同等に不活化されることを明らかにした。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由来のウイルスを十分に得ることは困難であったが、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。

#### 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嗜好性を解析し、渡り鳥の飛来地でのダニの調査も行なった。また、分画製剤の安全性向上のため、HBV や HEV の不活化の検討に加えて新型コロナウイルスの不活化法も検討した。

#### 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、2021 年

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

以上

## 令和2-3年度

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」班

### 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

研究分担者 国立感染症研究所 ウイルス第一部 林 昌宏

研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス第一部 田島 茂

国立感染症研究所 ウイルス第一部 西條 政幸

国立感染症研究所 ウイルス第一部 海老原秀喜

**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）およびウツウイルス（USUV）の流行が問題となっている。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。また2017年にはオーストリアでの輸血血液に対するWNV遺伝子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。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および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現在国内に流行している日本脳炎ウイルスの野生株およびヨーロッパのUSUV流行株に対して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）やジカウイルス感染症（ZVD）等の流行域の拡大が顕著である。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）およびウツウイルス（USUV）の流行が問題となっている。

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，南米コロンビア，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．

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 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．また，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，血清中のウイルス検出モデルとして，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．またさらに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% CO<sub>2</sub>，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 $\mu\text{l}$  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．

### 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 $\mu\text{L}$  の検体を 1.5ml マイクロチューブに入れ，Working solution 400 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  を注いだ．iii) 10,000 回転，15 秒間遠心した．iv) 上液を捨て，新しい回収チューブを連結させ，500 $\mu\text{L}$  の Inhibitor removal buffer を加え，8,000 回転，1 分間遠心した．v) 上液を捨て，新しい回収チューブを連結させ，450 $\mu\text{L}$  の Wash buffer を加え，8,000 回転，1 分間遠心した．vi) 上液を捨て，新しい回収チューブを連結させ，再度，450 $\mu\text{L}$  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

ブにフィルターチューブを連結させ、50 $\mu$ L の Elution buffer を加え、10,000 回転、1 分間遠心した。ix) 得られた精製 RNA はすぐに使用しない場合は-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

#### 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 $\mu$ L を 2%アガロースゲル電気泳動 (100V, 約 30 分) を行い、エチジウムブロマイド溶液 (10mg/mL) に 20 分染色し、PCR によって増幅された DNA の断片を確認した。また得られた増幅産物は塩基配列解析により 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  $2 \times 10^5$ /ml に播種し、翌日ブタ血清を 50 $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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スクリーニング

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 $\mu$ l 接種し、細胞を鏡検下で毎日観察した。その結果血清 KO-44 および KO-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 KO-44 および KO-57 の培養上清を接種後 5 日後に回収し、-80 $^{\circ}$ 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 KO-44 株および KO-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、KO-44 株および KO-57 株において特異的増幅が認められた。

#### 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 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ C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

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。また近年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による輸入症例が問題となる可能性がある。本研究では血清中の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ブタ血清中のJEVを用いてフラビ共通プライマーの検討を行った。また、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。またいずれの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。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株を検出できていることから、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。したがって DF, ZVD, USUV 感染症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スクリーニングが重要な対策の1つとなりうる。また国内流行を速やかに検出する体制も重要となる。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。

#### 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 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。令和2～3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）やマルチプレックス化に向けた検討を実施した。

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  
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 ウイルス第一部、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/ $\mu$ 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。

#### ・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、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。

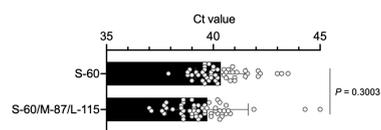
### ・合成ssRNAを用いた絶対感度の再評価

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/μL)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 |    |
|----|-------------------------|------|----|--------|----|
|    |                         | S    | M  | S      | M  |
| J1 | SPL030                  | 5    | 8  | 5      | 8  |
|    | SPL067                  | 3    | 4  | 3      | 4  |
|    | SPL070                  | 6    | 5  | 6      | 5  |
| J2 | SPL120                  | 4    | 4  | 4      | 4  |
|    | SPL057                  | 4    | 4  | 4      | 4  |
|    | SPL100                  | 3    | 4  | 3      | 4  |
| J3 | SPL004                  | 4    | 4  | 4      | 4  |
|    | SPL230                  | 4    | 5  | 4      | 5  |
| C3 | HB29                    | 3    | 3  | 3      | 3  |
| C4 | SPL170                  | 3    | 3  | 3      | 3  |
|    | SPL087                  | 5    | 8  | 5      | 8  |
| C5 | SPL238                  | 4    | 3  | 4      | 3  |
|    |                         |      | 48 |        | 55 |

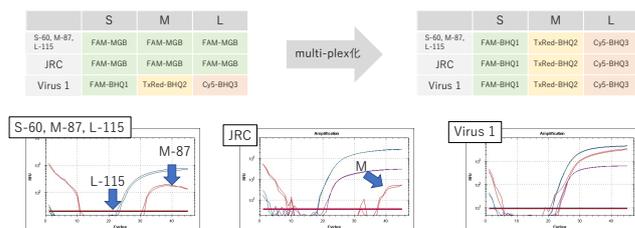


### ・SFTSVと近縁のウイルスRNAを用いた検出特異性の検討

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。

#### ・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。また、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。本研究では、親株より約 20 倍 HBV に対して感受性が高い細胞株 HepG2-NTCP#10 を樹立することができた。それを用いて 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を検討した。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 (筋注用製剤 1 本) 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、直接 HBV 陽性血漿を用いて感染性を評価することが可能であり、他にこのような培養系はなく血液製剤の安全性評価に大いに貢献できるものと考えている。

### 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. 研究方法と結果

#### 2. HBV 高感受株の樹立

肝癌細胞株 HepG2-NTCP (国立感染症研究所渡士博士より供与) 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、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、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 HepG2-NTCP#10 を選択した。

### 2. 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

細胞は、感染 1 日前に  $1 \times 10^5$  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  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  で培養した。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  $5 \times 10^8$  IU/mL の濃度であった。実験に使用するまで分注し、 $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した。液状加熱は、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、 $60^\circ\text{C}$  で 10 時間行なった。コントロールとして同じ HBV 陽性血漿を  $4^\circ\text{C}$  で 10 時間処理した。 $60^\circ\text{C}$  の液状加熱した検体は、PBS にて  $X 1 \sim X 10^3$  まで  $10^{0.5}$  ずつ段階希釈し、 $00 \mu\text{L}$  ずつ細胞に添加した。また、 $4^\circ\text{C}$  処理した検体は PBS にて  $X 1 \sim X 10^6$  まで段階希釈し、 $100 \mu\text{L}$  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。

$4^\circ\text{C}$ -10 時間処理では  $10^4$  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、感染性有りと判断した。一方、 $60^\circ\text{C}$ -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 4 Log 以上不活化されることが明らかになった。

### 3. 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 (200 IU/mL) を購入し、 $100 \mu\text{L}$  に 0.03、0.1、0.3、1.0、3.0 IU の抗 HBs 抗体を含有するように PBS にて希釈した。HBV は  $100 \mu\text{L}$  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、 $37^\circ\text{C}$  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、 $200 \mu\text{L}$  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。

10 感染価の HBV では 0.03～3 IU 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 0.1 IU において HBV-DNA の増加が認められ、0.3 IU 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 200 IU では  $6.7 \times 10^4$  感染価の HBV が中和できることを明らかにした。

### 4. HBV 産生株の樹立

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 箇所プライマーを合成

し、30度にて16時間RCA(Rolling Circular Amplification)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 と胃癌由来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。最終的に濃度は低いが、濃縮することで感染性を有するHBVを産生する株を得ることができた。

#### 5. 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 $\mu$ g/mL、又は40 $\mu$ 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、150rpm/分で攪拌しながら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1mL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<sup>5</sup>/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。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 $\mu$ 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

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。その結果、液状加熱によってモデルウイルスと同等にHBVは不活化されることを明らかにした。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

4) 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

5) 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



## 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ながらもゼロでなく、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。R02 年は武漢株、アルファ型変異、ガンマ型変異ウイルス株、R03 年度はベータ型変異、デルタ型変異、オミクロン (Ba. 1, BA. 1. 1, BA. 2) を用いて、血漿分画製剤で用いる 60℃加熱処理において、いずれの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。

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ながらも、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。

R02 年度には、武漢株 (hCoV-19/Japan/wk-521/2020)、アルファ型変異株 (hCoV-19/Japan/QHN002/2020)、ガンマ型変異株 (hCoV-19/Japan/TY7-501/2021)、令和 3 年度は、ベータ型変異株 (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ことを目的とした。

##### 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の不活化を調べるのが目的であり、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 $\alpha$ -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

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℃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 (1x10<sup>4</sup>個 /100uL/well) に、希釈したウイルス液を 100uL ずつ添加し、37℃ 5%CO<sub>2</sub> 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 :TCID<sub>50</sub>/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>

#### 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 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でセレ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ティングで調べた。(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、ウエスタンブロッティングによる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)( $1 \times 10^5$ /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:  $2.2 \times 10^9$ , R1-2:  $2.1 \times 10^9$ , R1-3:  $7.0 \times 10^9$ , R1-4:  $2.2 \times 10^9$ , R1-5:  $7.1 \times 10^9$  IU/mL: 野島清子氏により測定)をそれぞれ50 $\mu$ l(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:  $6.9 \times 10^7$  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回繰り返し、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( $10^0$ - $10^{-3}$ )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-1 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。

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 TCID<sub>50</sub>/mL) (図 2, 図 3)。

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依存していた。いず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 4)。

#### C-3 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 5)。

C-4: 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:  $2.2 \times 10^9$ , R1-2:  $2.1 \times 10^9$ , R1-3:  $7.0 \times 10^9$ , R1-4:  $2.2 \times 10^9$ , R1-5:  $7.1 \times 10^9$ , 及びコントロールとして JFH-1 (HCV RNA コピー数  $6.9 \times 10^7$  IU/mL、感染価  $5.6 \times 10^6$ ) 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 6)。

## D. 考察

### D-1 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

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°C 10 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。

### D-2 HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

HCV の増殖に重要な宿主因子である  $\alpha$ -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。R02 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。

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。

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。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もので、今後その理由を説明する必要がある。

## 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。

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  $\alpha$ -fetoprotein とを高発現する FU97 細胞に、Sec14L2 蛋白質を高発現する培養細胞を作製し、その細胞で、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
3. 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
4. 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
5. Yohei Seki <sup>1</sup>, Yasuo Yoshihara<sup>1</sup>, **Kiyoko Nojima<sup>1</sup>**, Haruka Momose, Shuetsu Fukushi, <sup>3</sup> Saya Moriyama, <sup>4</sup> 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    |
| なし       | 3.その他 |
| 2.実用新案登録 | なし    |

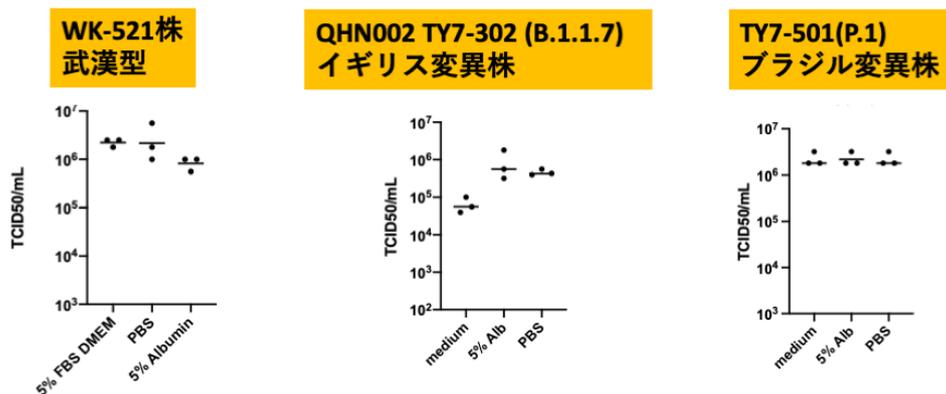


図 1. SARS-CoV-2 ウイルス株の力価 (スパイク直後の感染性の確認)

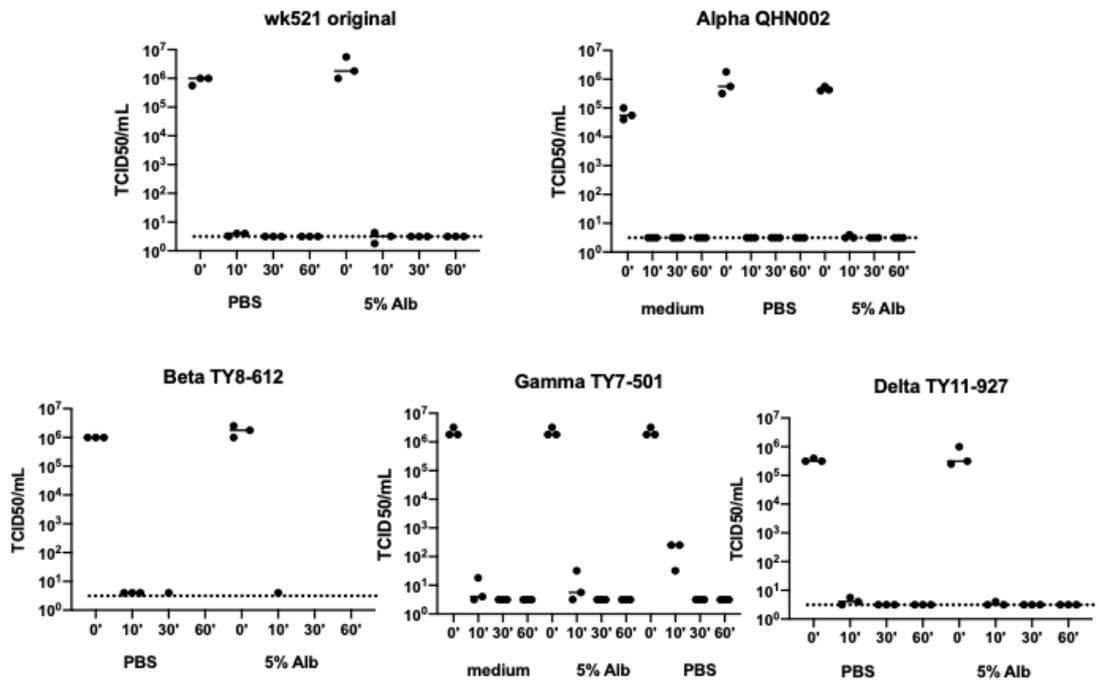


図2 60℃加熱による新型コロナウイルスの不活化

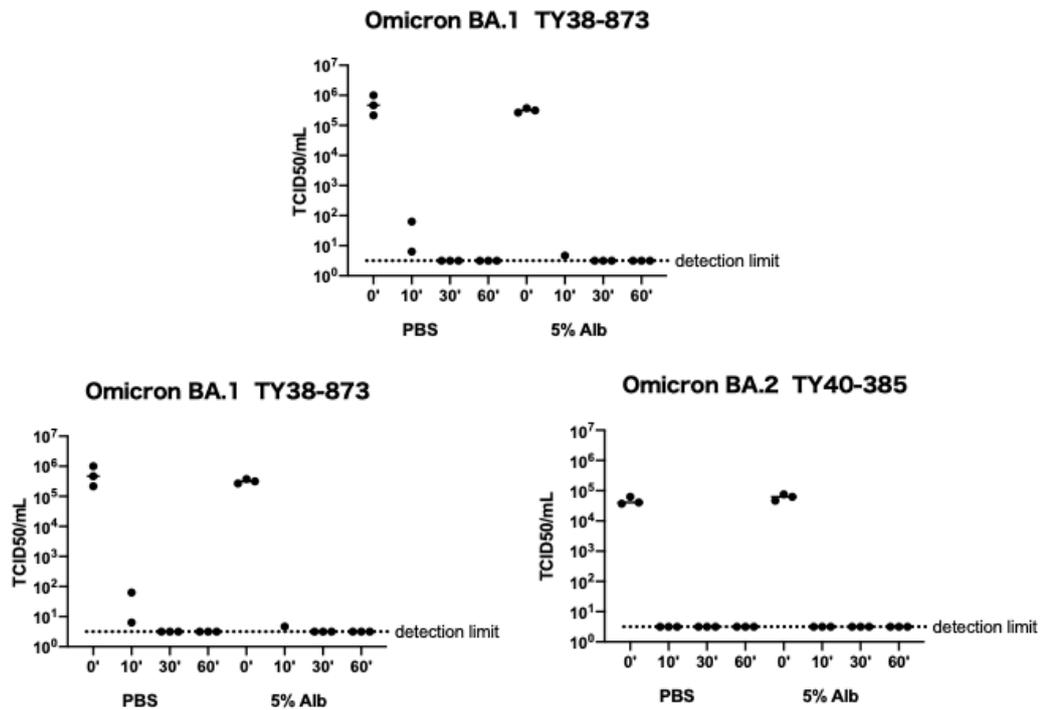


図3 60℃加熱による新型コロナウイルスオミクロン株の不活化

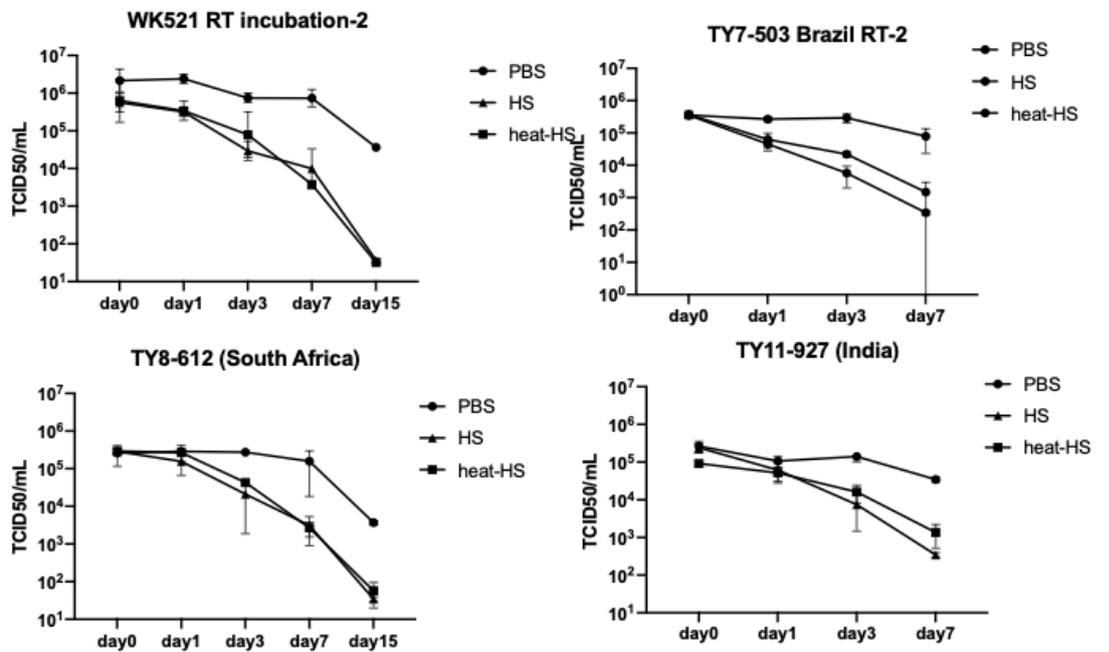


図4 新型コロナウイルスの血清存在下での安定性

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

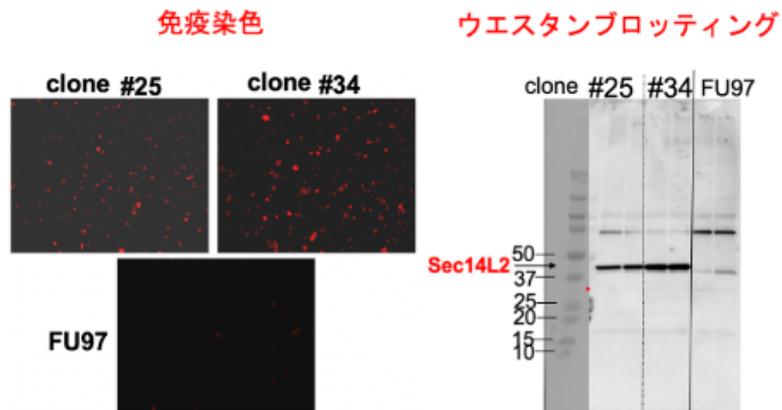


図5 FU97-sec14L2 #25, #34クローン細胞でのSec14L2の発現

**FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅**

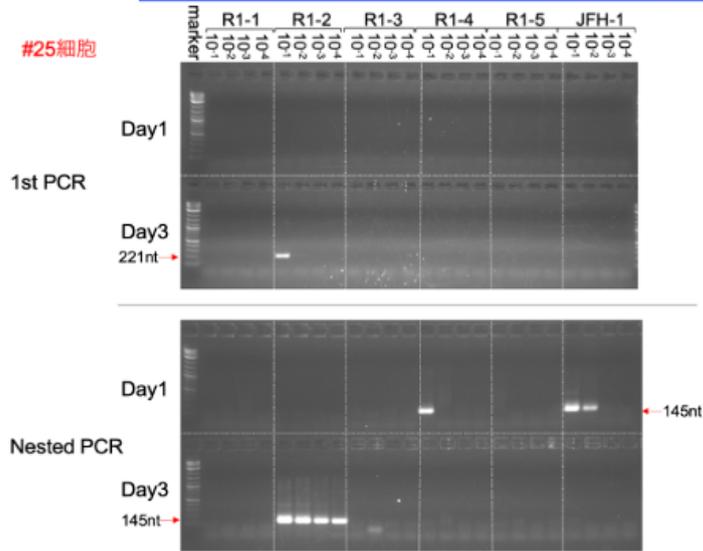


図6-1 FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅

**FU97-sec14L2 #34細胞での患者由来HCVの増幅**

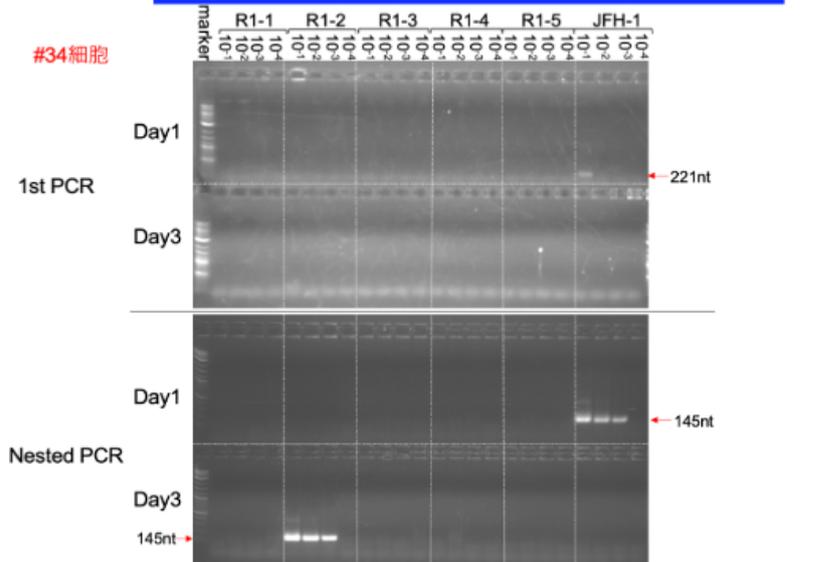


図6-2 FU97-sec14L2 #34細胞での患者由来HCVの増幅

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 | 国立感染症研究所・昆虫医科学部 |
|       | 谷口ひとみ            | 国立感染症研究所・昆虫医科学部 |

**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、過去の研究結果を踏まえ、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。加えて、SFTSV（重症熱性血小板減少症候群ウイルス）浸淫地である愛媛県のマダニサンプルも入手し、ウイルス解析を行った。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、Kabuto mountain virus（KAMV）（キチマダニ）やJingmen tick virus（タカサゴキララマダニ）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の分離・検出が確認された。

本研究の過程で収集されたKAMVの分離株を用いてウイルスゲノム配列の多様性を解析し、この情報を活用して、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）であった。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。SFTSウイルスを媒介するマダニの種類については、中国ではフタトゲチマダニとオウシマダニからウイルス遺伝子が検出され、フタトゲチマダニにおけるSFTSウイルス媒介性が実験的に証明されている。また、韓国においてもフタトゲチマダニからはウイルスが分離されている。そのため、日本国内に広く分布しているフタトゲチマダニをはじめとしたマダニ種が、SFTSウイルスの媒介に関与している可能性が考えられる。

ダニ脳炎は1993年に北海道で初めての感染例が報告され、その後の疫学調査で道南地域のヤマトマダニからウイルスが分離され、野鼠とイヌに抗体陽性の個体が確認された。しかし、抗体陽性の野鼠は北海道以外に本州からも見つかり、ダニ脳炎が国内に常在していると推察された。近年では、2016年、2017年と感染例が相次いで報告された。

これらの病原体は、いずれもウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。近年、山歩きを趣味とする人が増え、また、シカやイノシシなどの野生動物の個体数も増加し、人がマダニに吸血される機会が増えている。幸い、これまでダニ媒介ウイルス感染症が輸血によって感染した報告はないが、これらの感染症は、重篤になること

から、感染のリスクは無視できない。マダニの生態や吸血する対象動物の嗜好性を調査解析することによって献血者への注意喚起し、感染リスクを減少させる努力が必要である。

ダニ媒介感染症は、病原体も媒介マダニも従来国内に常在している場合が多い。国内には5属46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に依存するため、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、富山県、さらにKabuto mountain virus (KAMV) は、兵庫県ならびに石川県といった地理的に離れた地点で採集されたマダニからウイルスが分離されたことが報告されている。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から分離されているため、ウイルスの長距離拡散には、野鳥が介在している可能性が示唆されている。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、新興感染症を引き起こすことも懸念される上述のような新規に発見されたマダニ媒介ウイルスなどについては、効率的な予防対策を講じる上で必要となる自然界におけるウイルスの感染環などの基礎的な情報については、これまで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 cm×100 cmの白い布で地面および植生の上を引きずる方法）によ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。

愛媛県のSFTSウイルス浸淫地において、上記と同様のフランネル法により採集された植生マダニについても以降の実験に供試した。

### 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か所から採集されたマダニ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、次いで次世代シーケンス(NGS)解析により種の同定を行った。

### 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製し、主としてシリアンハムスター腎臓由来BHK-21細胞に接種することにより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、次世代シーケンサー(NGS)によりウイルス配列の網羅的探索を行った。

### 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、塩基配列の相同性比較解析を行った。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

RLB法は、種特異的プローブを利用して検出をするため特異性が高いという利点があるが、不特定多種の動物種の同定には向いていない。そこでNGS解析と併用して解析を行った。DNA抽出を行ったマダニ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。内、数の多かったキチマダニ61個体についてみたところ、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(図1)。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。実験に供試した全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キチマダニ61個体の内、35個体をNGS解析に用いた。11個体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、コジユケイ、ハツカネズミ、イノシシ、イエネコ、ニホンザル、トカゲ目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。ヒト由来のDNA断片がすべてのサンプルから検出された。

これまでに採集した植生マダニを用いて、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KAMVが新たに2株分離された(表1:ISK49株およびISK53株)。本ウイルスは2017年ならびに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、本調査地にはKAMVの病原巣あるいは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., 2021a)。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, Kobayashi et al., 2021a, b, 2022)。

本研究班で得られているKAMVの塩基配列の相同性比較解析を行った結果、これら株間の相同性は、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/ $\mu$ 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、本ウイルスの媒介マダニと目されるキチマダニは、これまで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鳥類嗜好性が高いマダニ種であると言える。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。2021 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)に關与している可能性が示唆された。

TarTV は、地理的な連続性がない地域(鹿児島県、鳥取県、福島県、富山)の植生マダニからそれぞれ分離されているが、本研究の成果によって、愛媛県からも、同一ウイルスが分離された。KAMV については兵庫県から石川県までイノシシの移動に伴ってウイルス保有キチマダニが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關与している可能性は高いと考えられる。さらに本研究において、国内では初めてとなるヒト病原性の新興マダニ媒介ウイルスとして注目される JMTV が、石川県および愛媛県のタカサゴキララマダニから検出された。本ウイルスは中国をはじめとして世界各地に分布することが報告されている。それらの地域とは海を隔てた日本列島に JMTV が分布することは、これら海外のウイルス分布地域から飛来する渡り鳥を介して、我が国へウイルス保有マダニが侵入している実態を反映しているものと推察される。このような海外からのマダニ媒介ウイルスの侵入実態に関しては、さらなる調査が必要であると思われる。

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い難い。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) 採集された植生マダニをウイルス分離および NGS 解析に供試した結果、KAMV ならびに TarTV 以外に、新規ウイルスを含め 7 種のマダニ媒介ウイルスが分離・検出された。

3) Kabuto mountain virus の高感度検出系を確立した。

4) 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, Faizah AN, Amoa-Bosompem M, Watanabe M, Maekawa 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, 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. 2021a. doi: 10.3390/v13122547.

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. 2021b. doi: 10.1007/s00705-021-05193-w.

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. 2021c.

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

木村俊也, 鎌田龍星, 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, 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, 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)。

## 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 本研究実施期間およびそれ以前に石川県の渡り鳥飛来地で採集されたマダニから分離された Kabuto mountain virus の株一覧

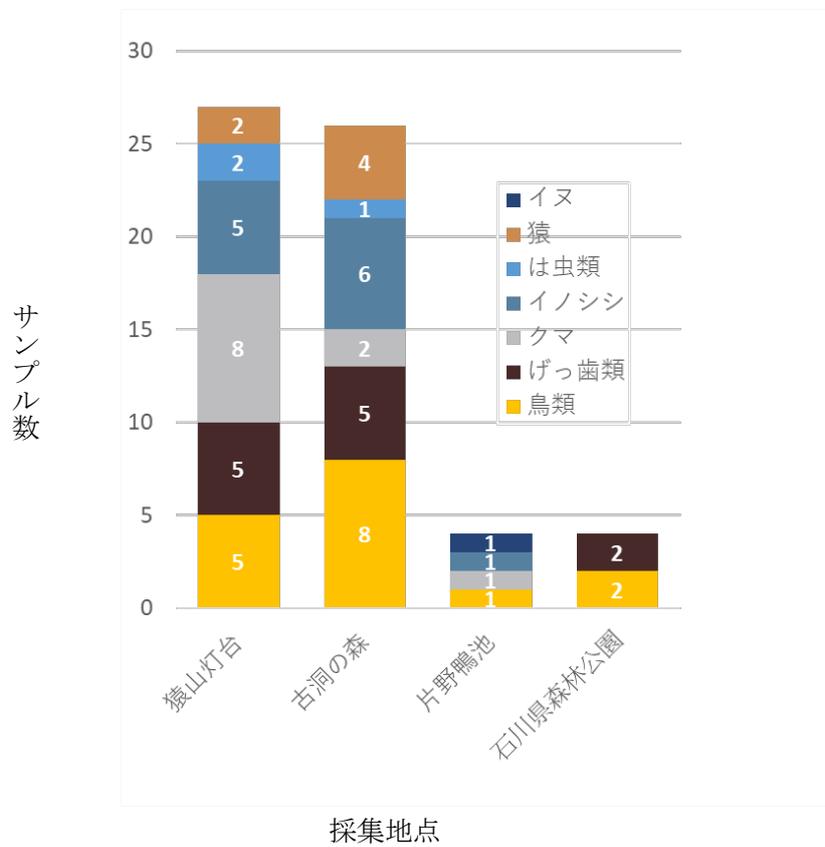


図 1 RLB 法により検出された DNA 断片から推定したキチマダニの吸血源動物種

|       | 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 |
|-------|---------------------|-------------------------|-------|-----------|------------|-----|
|       | Tarumizu tick virus | レオウイルス科<br>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<br>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   | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI36   | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI61   | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI89   | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
| 国内初確認 | Jingmen tick virus  | 未分類                     | 有     | 19EH-IM24 | タカサゴキララマダニ | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI2    | タカサゴキララマダニ | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI96   | タカサゴキララマダニ | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI108  | タカサゴキララマダニ | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI119  | タカサゴキララマダニ | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | ISK55     | タカサゴキララマダニ | 石川県 |
| 新規    | Toyo virus          | フェヌイウイルス科<br>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    | Takachi virus       | 未分類                     | 可能性有  | IM-OI32   | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI36   | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI60   | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI70   | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI110  | タカサゴチマダニ   | 愛媛県 |
| 新規    | Ohshima virus       | オルソミクソウイルス科<br>未帰属      | 不明    | IM-OI114  | ヤマアラシチマダニ  | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI115  | ヤマアラシチマダニ  | 愛媛県 |
|       |                     |                         |       | IM-OI125  | ヤマアラシチマダニ  | 愛媛県 |

表2 本研究実施期間に植生マダニから分離・検出され、ゲノム解析等の結果としてウイルス種が特定された Kabuto mountain virus 以外のマダニ媒介ウイルス株の一覧

## 分担研究報告書

分担する研究項目：『E 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究』

分担研究者 前野英毅（一般社団法人 日本血液製剤機構 中央研究所）

支援研究者 浦山健、井上隆昌、井手野祥次、服部眞次、高橋一恵、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（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、(1)リバーシ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）を用いた HEV 除去・不活化評価の確度確認、および(2)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。

## (1) RG-HEV を用いた HEV 除去・不活化評価の確度確認

一般に製造工程中のウイルス除去・不活化評価では、モデルウイルスを用いたウイルスクリランス試験に加え、疫学的に存在する性状・特性の臨床ウイルスを用いた評価実験も必要となる。ヒト血漿中の HEV（以下、Pd-HEV）は、評価実験に用いるウイルスソースとして十分量を確保する事が難しく、我々は、RG-HEV をそれに充当できないかこれまで検討を行ってきた。本分担研究では、RG-HEV を用いてエタノール分画、乾燥加熱処理および液状加熱処理工程での除去・不活化評価を行い、その妥当性を考察した。エタノール分画工程（分画 I、分画 II+III および分画 IV の積算値）は、Pd-HEV、RG-HEV とともに HEV 除去効果は約 2~3 Log reduction value（以下、LRV）であった。加熱処理は、乾燥加熱処理が 1~2 LRV（フィブリノゲン製剤）、液状加熱処理が 1~2 LRV（アンチトロンビン製剤）、および 2~3 LRV（グロブリン製剤）であった。RG-HEV を用いた除去・不活化の評価は、概ね Pd-HEV の特性を反映していると考えられるが、より正確に性状の違いを把握し、それが製造工程での挙動に及ぼす影響を見極めることが今後の課題である。尚、エタノール分画や加熱処理による HEV 除去・不活化効果はウイルス除去膜に劣るが、ウイルス除去膜に加えた HEV に対する安全性の向上に寄与していると考えられた。

## (2) 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

国内でヒトへ感染する HEV は主にブタ、イノシシ、シカに由来しており、NAT による検出やウイルス除去・不活化処理の評価では、これらの動物種に由来する HEV を対象としている。近年ヒトへの感染が報告されたラット HEV は、これまでの動物種由来のものとは異なる遺伝子型に属するため、NAT の有効性と現在のウイルス除去・不活化工程が機能するか調査した。その結果、ラット HEV は NAT をすり抜ける可能性が高いものの、ウイルス除去膜は有効に機能すると考えられた。総じて、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: Tris-Buffered Saline. .

## A. 研究目的

加熱の不十分なブタ、イノシシ、およ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、東京都の献血者における HEV ゲノム陽性者は、1,367 人に 1 人である<sup>1)</sup>。日本国内では 2002 年から 2020 年にかけて、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) の感染事例が計 45 件報告されている<sup>2)</sup>。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た<sup>2)</sup>。しかしながら、近年、ラットやラビットなど新し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<sup>3)</sup>、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と考えられる。

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評価することで、HEV 安全性の検証が可能となる。HEV はノンエンベロープウイルスに分類されるが、ヒト血漿由来 HEV (Pd-HEV) の粒子表面には脂質が結合する<sup>4)</sup>。さらに、血漿分画製剤の製造過程で、エタノール分画や 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<sup>5),6)</sup>。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 Pd-HEV を使用することが望ま

しい。しかしながら、除去・不活化評価実施に十分な濃度を有する Pd-HEV の確保は困難であることから、代替品としてリバースジェネティクス法により培養細胞から約  $9 \text{ Log}_{10} \text{ copies/mL}$  の高濃度で脂質の結合する HEV Genotype 3 (RG-HEV) を取得する方法を確立した。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、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<sup>5)</sup>。また、液状加熱における RG-HEV の熱感受性についても Pd-HEV に類似していることも確認している<sup>7)</sup>。

本分担研究では、血漿分画製剤の HEV に対するさらなる安全性の向上を目指し、RG-HEV を用いた HEV 除去・不活化評価と新たな動物種に由来する HEV のリスク評価を実施した。

RG-HEV を用いた HEV 除去・不活化評価では 2 工程の HEV 除去・不活化効果を評価した。一つ目は 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) を用いて定量 PCR 法により、HEV の除去効果を評価した。二つ目は加熱処理工程である。加熱処理の上流に存在する S/D 処理あるいはエタノール分画でのエタノールとの接触を考慮し、前もって各処理を施した RG-HEV を用いて、感染価により加熱処理工程の HEV 不活化効果を評価した。ヒトへの感染が報告された新たな動物種に由来する HEV のリスク評価では、NAT による検出の可能性および血漿分画製剤に導入しているウイルス除去膜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。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 RNA 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 RNA 陽性血漿、Pd-HEV G4 RNA 陽性血漿、あるいは HEV 陰性血漿を 4°C 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 6~7 Log<sub>10</sub> copies/mL となるよう RG-HEV を添加した。各 CDP (3 mL) から Cohn のエタノール分画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<sup>8)</sup>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 (Log<sub>10</sub> 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. RG-HEV の S/D 処理

RG-HEV を含む培養上清と 20 倍濃度の S/D 試薬を混合し、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。インキュベーション後、RG-HEV を含む溶液を超遠心分離 (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 処理済み RG-HEV 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。

#### 7. RG-HEV の 20%エタノール(v/v)処理

RG-HEV を含む培養上清を超遠心(150,000 × g、4°C、3 時間)し、超遠心後各チューブから上清を除去し、RG-HEV を含む沈殿画分を 20 mM MOPS buffer により懸濁し、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 95%エタノールを終濃度 20% (v/v)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。インキュベーション後、RG-HEV 溶液を超遠心(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 により懸濁した。

#### 8. 液状加熱試験

各 RG-HEV を 3.5 mL の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、10%となるよう添加し良く混合した。加熱前サンプルとして 0.5 mL、加熱処理サンプルとして 0.5 mL、Holding サンプルとして 0.5 mL ずつ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、あらかじめ計測したチューブ内の液温が 58.0°Cにまで達する時間が経過してから、時間計測を開始し、58.0~59.0°Cで加熱した。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のインキュベーター中で 10 時間静置後、氷上で急速冷却、A549 細胞用維持培地を加え希釈した後、-80°Cのフリーザー中で保管した。

#### 9. 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 (TCID<sub>50</sub>) 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。

#### 10. 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 ウィルス様粒子 (VLP) (PDB # 3HAG)<sup>9)</sup>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。

(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、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審査・承認されている。

### C. 研究結果

#### 1. アルブミン製剤の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、除去効果は確認されなかった。分画 II+III を経て上清 II+III に至る過程では、RG-HEV のみで除去効果が確認され、その LRV は 1.4 であった。一方、ヒト血漿に由来する HEV はほとんど除去されなかった。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 Pd-HEV

G4 及び RG-HEV と比較して LRV で 1 以上高かった。結果として CDP からの積算 LRV は 1.8~3.3 であった。

## 2. フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理による S/D 処理済み HEV 不活化効果の検証

フィブリノゲン製剤の乾燥加熱処理の上流に存在する S/D 処理による性状変化を考慮するため、前もって S/D 処理をした RG-HEV により不活化の検証を行った。凍結乾燥による HEV の LRV は 1 未満であったが (図 1A)、乾燥加熱処理により、S/D 処理済み RG-HEV は加熱開始から 72 時間後まで緩やかな不活化の進行が観察され (図 1B)、72 時間後の LRV は 1.6/1.8 (n1/n2) であった (表 2)。

## 3. アンチトロンビン製剤およびグロブリン製剤の液状加熱処理による 20%エタノール処理済み HEV 不活化効果の検証

エタノール分画時におけるエタノールとの接触による性状変化を考慮するため、前もって 20% (v/v) 中でインキュベーションした RG-HEV により不活化の検証を行った

アンチトロンビン製剤の液状加熱処理では、加熱後 30 分で 1 Log<sub>10</sub> 程度不活化されたが、以降の不活化の増大はほとんど観察されず、10 時間の液状加熱処理による LRV は、1.2/1.6 (n1/n2) であった (表 3, 図 2)。

グロブリン製剤の液状加熱処理では加熱後 5 時間まで、不活化効果は徐々に増大し、LRV は 2 程度に達し、以降、不活化の増大はほとんど観察されなかった。10 時間の液状加熱処理による LRV は  $\geq 2.2/2.2$  (n1/n2) であった (表 4, 図 3)。

## 4. ラット HEV のリスク評価

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とラット HEV のゲノム配列を比較すると、3' 末端部位を含む半分以上で一致せず (図 4)、本プライマー・プローブセットによる検出は困難と判断された。また、ラット HEV はブタ、イノシシ、およびシカ HEV とは遺伝学的距離が離れていること<sup>3)</sup>も考慮に入れば、日本赤十字社で導入された HEV-NAT でも検出されない可能性が高いと考えられた。

次にラット HEV に対してもウイルス除去膜が有効に機能するか検討するため、遺伝子型 4 に属する粒径 27 nm のヒト由来 HEV-VLP 構造 (PDB # 3HAG、参考文献) を鋳型にしてラット HEV-VLP モデルを構築し、そのサイズを推察した。構築されたラット HEV-VLP モデルは鋳型と比較して、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 (図 5)、そのサイズは 27 nm 程度と予想された。

## D. 考察

エタノール分画工程と加熱処理による HEV の除去・不活化効果を検証した。

エタノール分画では各工程を連続して実施し、血漿から上清 IV を取得した。分画 II+III では、ヒト血漿由来 HEV 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、除去効果に差が観察された。分画 IV における除去効果の違いが遺伝子型に起因するかどうかについては結論を出すことは出来なかったが、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。各 HEV の分配傾向は類似していたものの除去効果に差が観察されたことから、HEV の特性をより正確に把握し、製造工程での

挙動に及ぼす影響を見極めること今後の課題である。E. 結論

加熱処理では、各製剤の加熱処理の上流で起こり得る性状の変化を考慮にいれ RG-HEV をあらかじめ S/D 処理あるいはエタノールで処理した。フィブリノゲン製剤の凍結乾燥加熱処理による S/D 処理 RG-HEV の LRV は 1.6/1.8 (n1/n2) であった。ブタ糞便由来 HEV の LRV は 4 以上であったことから<sup>10)</sup>、血漿に混入する可能性のある HEV は S/D 処理後でも、フィブリノゲン製剤の凍結乾燥加熱処理に対してブタ糞便由来 HEV より安定であると考えられた。また、アンチトロンビン製剤の液状加熱処理による、エタノール処理 RG-HEV の LRV は 1.2/1.6 (n1/n2) であった。ブタ糞便由来 HEV を用いた場合では、LRV は最大で  $\geq 2.8$  に達したことから<sup>11)</sup>、血漿に混入する可能性のある HEV は 20% (v/v) 程度のエタノールと接触しても、アンチトロンビン製剤の液状加熱処理に対してブタ糞便由来 HEV より安定であると考えられた。一方、グロブリン製剤の液状加熱処理によるエタノール処理 RG-HEV の LRV は  $\geq 2.2/2.2$  (n1/n2) であり、ブタ糞便由来 HEV を用い場合とほぼ同じであった<sup>11)</sup>ことから、グロブリン製剤の液状加熱処理では HEV の性状が不活化効果に与える影響は軽微なのかもしれない。

近年、ヒトへの感染が報告されたラットに由来する HEV では遺伝子型 1~4 の HEV を検出可能なプライマー・プローブセット<sup>8)</sup>との配列比較をもとに、日本赤十字社で導入された HEV-NAT をすり抜けることと推測された。しかしながら、ホモロジーモデリングから構築されたラット HEV VLP のサイズは鋳型の HEV VLP とほぼ同じであったことから、ラット HEV に対しても、孔径 20 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。

エタノール分画や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 に満たないものの、ウイルス除去膜の除去効果と併せることで、HEV 安全性の向上に寄与すると考えられる。また、除去・不活化試験を通じ、RG-HEV は確保が困難な Pd-HEV を代替するモデルウイルスとなり得ることが示唆された。但し、適切な評価には、各 HEV の特性を把握し、製造工程での挙動に及ぼす影響を見極める必要がある。

新たにヒトへの感染が報告された動物種に由来する HEV には NAT をすり抜ける存在があるものの、ウイルス除去膜は有効に機能すると考えられ、現段階で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。

(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 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>
- 3) 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>
- 4) 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
- 5) 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

- 6) Kapsch AM *et al.* Antibody-enhanced hepatitis E virus nanofiltration during the manufacture of human immunoglobulin. *Transfusion*. 2020 Nov;60(11):2500-2507.
- 7) 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](https://mhlw-grants.niph.go.jp/system/files/2019/193041/201925001A_upload/201925001A0011.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) 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
- 10) Yunoki M *et al.* Extent of hepatitis E virus elimination is affected by stabilizers present in plasma products and pore size of nanofilters. *Vox Sang.* 2008 Aug;95(2):94-100.
- 11) 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.

## 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

無し

## 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

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(Log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>)を示す

| サンプル名              | 凍結乾燥前 | 凍結乾燥後 |
|--------------------|-------|-------|
| S/D処理<br>RG-HEV n1 | 4.50  | 4.52  |
| S/D処理<br>RG-HEV n2 | 4.90  | 4.32  |

B

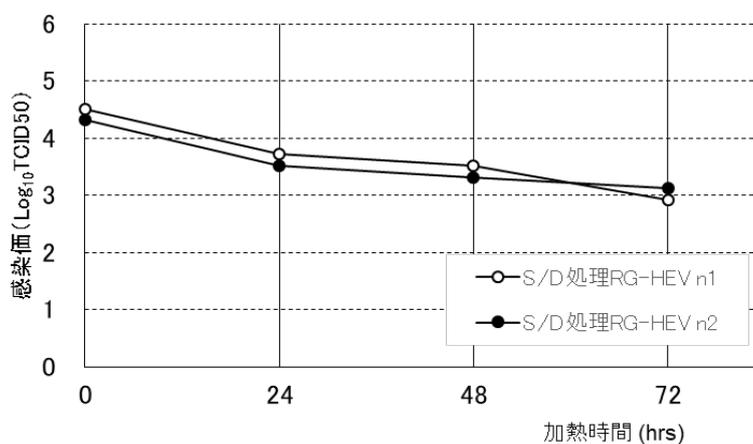


図1 フィブリノゲン製剤の製造工程中の凍結乾燥加熱工程によるHEVの不活化

A 凍結乾燥前後のRG-HEVの感染価(Log TCID<sub>50</sub>)

B 乾燥加熱処理によるHEVの不活化動態

S/D処理RG-HEVに対して、2回試験(n1、n2)を行い、測定した感染価(Log TCID<sub>50</sub>)を表した。

加熱時間(hrs)を除き数値はLRVを示す

| サンプル名              | 凍結乾燥前 | 加熱時間(hrs) |     |     |     |
|--------------------|-------|-----------|-----|-----|-----|
|                    |       | 0         | 24  | 48  | 72  |
| S/D処理<br>RG-HEV n1 | 0     | 0.0       | 0.8 | 1.0 | 1.6 |
| S/D処理<br>RG-HEV 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。

加熱時間 (hrs)を除き数値はLRVを示す

| サンプル名                | 加熱時間 (hrs) |     |     |     |     |
|----------------------|------------|-----|-----|-----|-----|
|                      | 0          | 0.5 | 1   | 5   | 10  |
| エタノール処理<br>RG-HEV n1 | 0          | 1.2 | 1.0 | 1.2 | 1.2 |
| エタノール処理<br>RG-HEV n2 | 0          | 1.4 | 1.0 | 1.2 | 1.6 |

表3 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RG-HEVに対して、2回試験(n1、n2)を実施した。

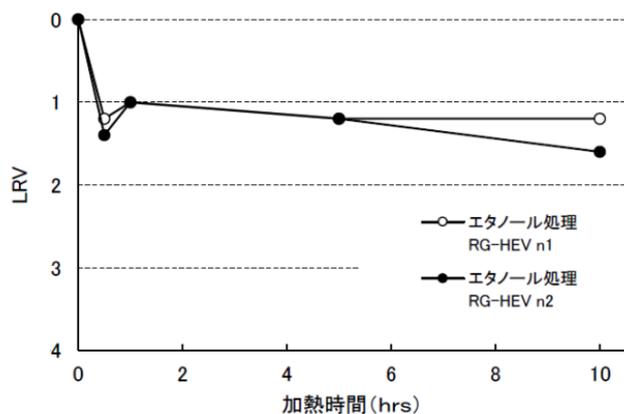


図2 アンチトロンビン製剤の液状加熱処理によるRG-HEVのLRV推移 (表3をグラフで示した)

加熱時間 (hrs)を除き数値はLRVを示す

| サンプル名                | 加熱時間 (hrs) |     |     |     |      |
|----------------------|------------|-----|-----|-----|------|
|                      | 0          | 0.5 | 1   | 5   | 10   |
| エタノール処理<br>RG-HEV n1 | 0          | 0.4 | 0.4 | 2.0 | ≥2.2 |
| エタノール処理<br>RG-HEV n2 | 0          | 0.0 | 1.2 | 2.4 | 2.2  |

表4 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RG-HEVに対して、2回試験(n1、n2)を実施した。

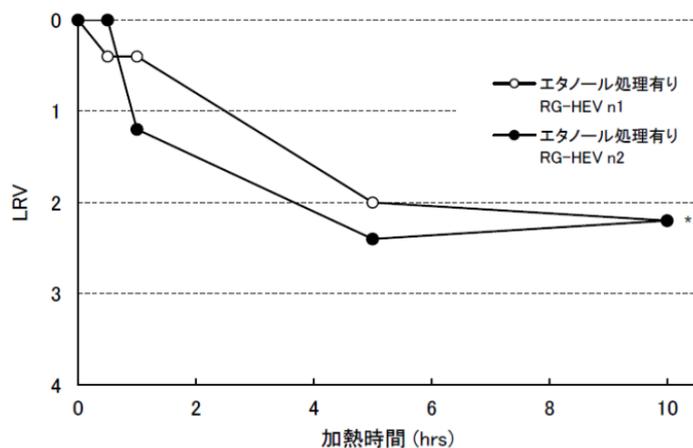


図3 グロブリン製剤の液状加熱処理によるRG-HEVのLRV推移  
表4をグラフで示した。

図4 ラビット HEV 及びラット HEV と遺伝子型 1~4HEV の検出用プライマー/プローブセットとの比較

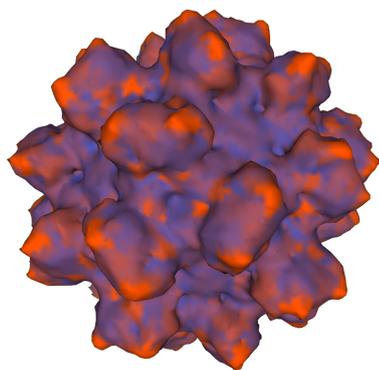


図5 ホモロジーモデリングより予想されるラット HEV VLP 構造

鋳型として設定した HEV VLP (PDB# 3HAG) と相動性が高く同一の構造を取り得る箇所を青色で示し、相動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 <sup>1</sup>, Yasuo Yoshihara<sup>1</sup>, <u>Kiyoko Nojima</u><sup>1</sup>, Haruka Momose, Shuetsu Fukushi, <sup>3</sup> Saya Moriyama, <sup>4</sup> Ayumi Wagatsuma, Noriaki Numata, Kyohei Sasaki, Tomoyo Kuzuo, 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 <i>Uukuvirus</i> (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 |
| 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., Amoah-Bosompem, M., Higa, Y., Tsuda, Y., Sawabe, K., and Iwawata, H. | Discovery of a novel flavivirus (Flaviviridae) from the house fly, <i>Tabanus rusticus</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 |
|--|--|-------------------------------|----|---------|------|