

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

新興・再興感染症等の感染症から
献血由来の血液製剤の安全性を
確保するための研究
(202KC1001)

令和4年度～5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6(2024)年3月

目 次

I. 総合研究報告書

新興・再興感染症等の感染症から献血由来の血液製剤の安全性を確保
するための研究

研究代表者 岡田 義昭 P 1-P 6

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

林 昌宏 P 7-P11

資料2 グロブリン製剤の原料血漿中に存在する新興・再興感染症ウイルス
に対する中和抗体に関する研究

浦山 健 P12-P21

資料3 新型コロナウイルスの代理ウイルス感染系の確立と中和活性解析系
への応用

大隈 和 P22-P23

資料4 新興・再興感染症の情報収集とリスクの評価、及びB型肝炎
ウイルス等培養が困難なウイルスの培養法の改良と不活化法の評価

岡田 義昭 P24-P27

資料5 血漿分画製剤における実ウイルスを用いたウイルス除去・不活化
および安全性の評価に関する研究

野島 清子 P28-P34

資料6 献血血液に影響する可能性のある人畜共通感染症等の情報収集と
リスク評価及びその検査法の開発

水上 拓郎 P35-P41

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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)

総合研究報告書

新興・再興感染症等の感染症から献血由来の血液製剤の安全性を確保するための研究

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 客員准教授)

研究要旨

1. 欧州で検出されたウエストナイルウイルス類似のウツウイルスを2種の遺伝子系統樹解析を行なった。また、マウスに接種したところ脳内接種では病原性を確認できたが、腹腔内では認められなかった。
2. 国内採血の原料血漿プール及びグロブリン製剤中の抗パルボウイルス B19V 抗体による中和活性を測定したところ、FDA 基準である $4\text{Log}_{10}\text{IU/mL}$ を十分に中和可能な値であった。また、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質に対する抗体価は、ワクチン接種数や流行によって上昇するが、維持できず暫時下降するウェーブ状の傾向が観察された。
3. HBV の *in vitro* 培養系を用いて有機溶媒/界面活性剤(S/D)処理による不活化の効率を評価した。1時間では感染性が残存するも3時間では検出限度以下にまで不活化できた。モデルウイルスである仮性狂犬病と同様な挙動を示すことが確認できた。また、HBs-RNA 量を継時的に測定することで液状化熱による HBV の不活化をより正確に評価した。
4. BSL2 での新型コロナウイルス感染等の解析を可能にするために水疱性口内炎ウイルスを用いた代理ウイルス系作成を目指したが、新型コロナウイルスの S タンパク遺伝子に存在する ER retention signal のためを代理ウイルスの産生は認められなかった。
5. 3種類の Mpox を用いて PBS や生食、アルブミン での液状化熱に対する不活化効果や酸処理による効果を検討し、いずれも効率よく不活化できることを明らかにした。また、Mpox の核酸増幅試薬の精度を確認した。ことを明らかにした。
6. 献血血液に影響する可能性のある人畜共通感染症等の情報収集とリスク評価及びその検査法の開発のために WHO、CDC、ECDC、国内の感染症発生状況、等から報告を集め精査した。新型コロナウイルス感染の収束に伴い種々の感染症が確認されたが、特にデングウイルスの流行が世界各地で発生している。M (サル) 痘に関しては、血中からウイルスが検出されることがあり、標準品・参照品を用いて国内で市販されている核酸検査キットの精度管理を行い十分な検出感度があることを確認した。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長

浦山 健 日本血液製剤機構
中央研究所 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

水上 拓郎 国立感染症研究所
センター長

A. 研究目的

血液製剤は、検査法の進歩によって輸血後感染症は激減し、安全性は飛躍的に向上した。その一方で気候の温暖化や森林等の開発によって新興・再興感染症が生じ易い環境にある。更に新型コロナウイルスの流行によって途上国の感染対策が疎かになったことに加えて、新型コロナウイルスの流行が収束したことによって国際間の人的交流が活性化されている。このような状況下では様々な新興・再興感染症が国際的に流行する危険性が高いと言わざるを得ない。本研究班では新興・再興感染症から献血由来の血液製剤の安全性を確保することを目的に研究を実施した。特に WHO や CDC、EU 等から感染症の情報を集め、デング熱やチクングニア熱等のリスクを評価することで血液製剤の安全性の脅威となるような感染症を早期に対応できることを目的とした。また、収束に向かっているとは言え新型コロナの動向は今だ重要であり、そのために血漿分画製剤を製造するプール血漿を用いて新型コロナウイルスの抗体価の推移やバルボウイルス B 19 のウイルス量や抗体価を検索した。析し、安全性の評価を行う。さらに原料血漿プールの新興・再興感染症の抗体価を経時的に測定することによって感染の

流行予測等に役立てるか検討した。また、Q 熱など人畜共通感染症はこれまで血液を介する感染リスクについて検討されてこなかったが、最近のペットブームによって犬や猫との濃厚接触が生じていることからリスクを検討する必要があると考えられる。さらに B 型肝炎ウイルス等、適当な培養系が開発されていないために実ウイルスを用いた評価がされていないウイルスに対して感染系を開発した。これらから輸血製剤や血漿分画製剤の安全性を向上させることも目指した。

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

近年ヨーロッパではウスツウイルス (USUV) の流行が問題となっている。USUV の実験室診断法の確立及び性状解析のため、USUV 2 株、UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 (SAAR-1776) 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 (Ko208/2018) 株を導入し系統樹解析を行なった。その結果 SAAR-1776 株はアフリカ 2 型、Ko208/2018 株はヨーロッパ 2 型の遺伝子型にそれぞれ

れ分類されることが示された。またこれら2株の相同性は96.6%であった。2種のウイルス株の病原性をマウスを用いて解析した。2種のウイルスとも脳内接種では死亡や症状が確認できたが、腹腔内投与では認められなかった。

2) グロブリン製剤の原料血漿中に存在する新興・再興ウイルスに対する中和抗体に関する研究

献血由来の人免疫グロブリン製剤は数千人以上の国内献血者の血漿を混合した原料プール血漿より製造されるため、国内献血者集団の感染症既往歴およびワクチン接種歴を反映した抗体が含まれる。したがって、グロブリン製剤や原料プール血漿をモニタリングすることにより、国内献血者における各種病原体に対する血清疫学の概観を把握することができる。今年度はヒトパルボウイルス B19（以下、B19）と SARS-CoV-2 に着目して、原料プール血漿中のこれらウイルスに対する抗体を評価した。B19 については、原料プール血漿中は中和抗体が存在し、その抗体価は FDA 勧告基準である $4 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ の B19 を中和するのに十分であることを明らかにできた。一方、SARS-CoV-2 については、2021 年度以降に採血された原料プール血漿中の結合抗体価と中和抗体価を測定したところ、スパイクタンパクに対する抗体価は、接種によって上昇するが、その後、維持できず減少するウェーブ様のトレンドが観察された。

3) 新型コロナウイルスの代理ウイルス感染系の確立と中和活性解析系への応用

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液中には種々の抗ウイルス活性物質等が存在すると考えられるが、その安全性の評価は十分ではない。その評価には SARS-CoV-2 感染実験が必要であるが、本来 BSL3 レベルで行う必要があるため実施可能施設等の制限がある。そこで、BSL2 レベルで取り扱い可能な水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いた代理ウイルスを開発し、SARS-CoV-2 を用いたウイルス感染系との比較を行い、BSL2 レベルで実施可能な感染評価系構築を目指した。SARS-CoV-2 は株によりスパイクタンパク質の性質が大きく異なるため、各変異株のスパイクタンパク質を有する代理ウイルスが必要となる。SARS-CoV-2 (オリジナル株、アルファ株、オミクロン株) よりスパイクタンパク遺伝子をクローニングし、野生型 VSV の G タンパク遺伝子と置換した組換えウイルスを作成したが、ウイルス産生は認められなかった。これは、スパイクタンパク質に存在する ER retention signal のためと考えた。そこで C 末の 18 アミノ酸を欠損させたスパイクタンパク質を発現させ、ウイルスが産生されるか検討している。

4) HBV等培養が困難なウイルスの培養法の改良と法の開発と不活化の評価

HBs-RNA 定量による感染性評価法を用い有機溶剤/界面活性剤 (S/D) 処理による不活法の効果を検討した。1 時間では感染性は残存することもあったが、3 時間処理ではいずれも検出感度以下になるまで不活化された。HBV のモデルウイルスである仮性狂犬病ウイルスも同様な挙動をとった。また、感染後の HBs-RNA の挙動を解析したところ、感染 4 日頃より急速に転写量が増加し、11 日前後でピークになることが明らかとなった。そこで 60 度-10 時間液状加熱したアルブミン製剤での不活化を継時的な HBs-RNA 量で検討したところ、HBs-RNA は検出されるも増加は認めら

れず不活化されていたと考えられた。また、培養法を変更し、感染 2 日までポリエチレングリコールを添加しない培養液を用いることで非特異的に細胞に HBV が吸着を阻害することができた。

5) 血漿分画製剤における実ウイルスを用いたウイルス除去・不活化および安全性の評価に関する研究

2022年にM（サル）痘感染者が欧州で急増し、血液中からウイルスが検出されたことに加えて我が国でも感染例が報告されたことからMポックスウイルス MPXV_JPN2022_YK006 クレード2b

（2022年に日本で分離された）に加え、病原性の強いMPXV/Zr599クレード1aと、MPXV_Liberia クレード 2a を加えて、PBS 下、およびウイルスを安定化しうる蛋白共存下（アルブミン）において、60 度加熱による不活化処理による影響を評価した。その結果、PBS 条件下およびアルブミン共存下の両方において、60 度 10 分の加熱処理によりウイルスの感染性は検出限界以下となり、4log 以上の不活化効果が認められた。また、低 pH 処理への感受性についても比較し、15 分の処理でいずれのウイルスも検出限界以下となり、5log 以上の不活化が認められた。以上から血漿分画製剤の原料血漿に混入した場合でも現在導入されている加熱処理や酸処理によって十分に不活化されることが明らかになった。

6) 献血血液に影響する可能性のある人畜共通感染症等の情報収集とリスク評価及びその検査法の開発

WHO や CDC, 各地域の感染症研究組織等や論文等から新興・再興感染症等の情報を集め、リスクを評価し、関係行政機関に

情報提供を行うと共にリスクが高い感染症に対しては、市販されている検査法の評価を行うとともに、必要に応じ、血液から高感度に病原体遺伝子を検出できる方法を開発することを目的とした。特に新型コロナウイルスの感染の収束に伴う国際的な人的交流の活性化によって世界各地でデングウイルスの流行が発生している。また、エムポックス(Mpox)の流行では世界的な流行は収束に向かっている傾向にあるが、アジアでの感染者数の増加が報告されている。発症者の血液中から Mpox-DNA が検出されたとの報告があるが、発症前の供血者由来の血小板（核酸陽性）輸血症例が報告されている。幸い感染は生じなかったが潜伏期の血中にウイルスが混入する可能性がある。そこで国内で市販されている 5 つの核酸検出キットの感度の評価を行ったが、良好な感度を有していることが確認できた。

D. 考察

気候変動や森林開発等で新興・再興が発生しやすくなっている。さらにヒトや物の移動によって驚くほどのスピードで世界に拡散している。これらから血液製剤の安全性確保するためには、常に海外や国内の感染症情報を集め・リスク評価を行うことが必要である。新型コロナウイルスの流行が世界中に流行し、各国はその対策に苦勞したが、その収束とともに国際的なヒトの交流が活性化され、欧州での M（サル）痘のアウトブレイクが発生した。幸い流行は収まっているが我が国では、いまだ散発的な感染例が報告されている。また、開発途上国ではデングウイルス

のアウトブレイクが発生している。デングウイルスは、不顕性感染の割合が高い上に高濃度のウイルス血症となる。更に媒介する蚊が国内に存在することから国内に持ち込まれ流行する可能性があり、インフルエンザや新型コロナウイルスのような呼吸器感染症を除けば、最も注意する必要があるウイルスである。そのため、海外の流行を把握し、空港や港、外国人が多く訪れる公園等の蚊のサーベイも重要である。また、原料血漿の新型コロナウイルスの抗体価や中和活性を経時的に調べるとワクチン接種人数や回数が良く反映していることが明らかとなった。1回目の接種によって生じた抗体価が経時的に低下し、追加接種によって再度増加したことまで原料血漿プールに反映していた。また、パルボウイルスの研究では、抗体価と混入するパルボウイルス量を原料血漿プールや免疫グロブリン製剤で解析し、抗原スクリーニングをすり抜けたウイルスは抗体によって十分に不活化できること明らかにした。これはスクリーニング検査として NAT を導入しなくても血漿分画製剤のパルボウイルスに対する安全性は十分に確保されていることを示している。また、HBV の *in vitro* 感染系と感染検出系の改良によって液状加熱や界面活性剤による不活化の評価が動物由来のモデルウイルスではなく実ウイルスを用いて行うことを可能にした。

E. 結論

新興・再興感染症等の感染症から献血血液の安全性確保と安定供給を目指し、蚊媒介ウイルス、新型コロナウイルス解析のための代理ウイルスの開発、献血由来原料血漿プールを用いた抗体の解析、HBV の *in vitro* 感染系の改良、M 痘の不活化評価、人畜共通感染症の情報を含めた新興・再興感染症等の情報収集と評価を行った。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 岡田義昭、小林清子、野島清子：B型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系を用いた血液製剤の不活化効果の評価と抗HBs免疫グロブリンの中和活性の測定 第72回日本輸血・細胞治療学会総会, 千葉, 2023

2. 岡田義昭、小林清子、野島清子：B型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系を用いた血液製剤の不活化効果の評価と抗HBs免疫グロブリンの中和活性の測定 第72回日本輸血・細胞治療学会総会, 千葉, 2023 著書

岡田義昭：血液製剤から見たプリオン
バムサジャーナル 35 (3) 144-151, 2023

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

分担研究報告書

献血血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	西山 祥子
	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	海老原秀喜

研究要旨 輸血用血液製剤の安全性に関わる節足動物媒介性ウイルスの流行地においては、これらウイルスによる輸血感染症が問題となっている。そこで節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染症の事例について文献探索を行いその実態を調査した。その結果、輸血によるデングウイルス感染例および血小板輸血によるジカウイルスの報告例を確認した。ところで、近年ヨーロッパではウスツウイルスが流行しており、献血血からもウイルス遺伝子が検出されている。そこでヨーロッパウイルスアーカイブグローバル (EVA-g) よりUSUVの実験室診断法の確立及び性状解析のため、USUV 2株、SAAR-1776株およびKo208/2018株を導入し、導入した2株の遺伝子解析を次世代シーケンサー (NGS) により解析した。ウイルスの遺伝子配列について系統樹解析を行なったところ、SAAR-1776株はアフリカ2型、Ko208/2018株はヨーロッパ2型の遺伝子型にそれぞれ分類されることが示された。またこれら2株の相同性は96.6%であった。さらにその病原性をC3H/Heマウスを用いて検討した。その結果ウスツウイルスは脳内接種において毒性を示したが、腹腔内接種においては病原性を示さなかった。今後さらにウスツウイルスの性状解析を進める必要が示された。

A. 研究目的

近年の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。さらに世界的な人的交流の再開により、わが国におけるデング熱の輸入症例は再び増加傾向にある。輸血によるウイルス感染症の原因として、ドナーが献血血スクリーニング検査の実施されていないウイルスに感染し、かつ不顕性感染である場合が挙げられる。節足動物媒介性ウイルス (アルボウイルス) は、不顕性例が多いこと、ウイルス血症が疾病の発症に先行することから、献血血が感染源となる可能性がこれまでも報告されてきた。わが国において輸血による感染が確認された症例中にアルボウイルス感染症は含まれていないが、海外ではデングウイルス (DENV)、チクングニアウイルス (CHIKV)、ウエストナイルウイルス (WNV)、ジカウイルス (ZIKV) 等の輸血感染例が報告されている。ヨーロッパでは 2009 年にイタリアで初めてウスツウイルス (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、さらにドイツ、イタリアおよびオーストリアにおいては、献血血に対する WNV の NAT 検

査において、USUV 遺伝子が検出されており、USUV による輸血感染症が問題となっている。

これまでに我々はフラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められる NS5 領域に PCR プライマーを設計し、フラビウイルス遺伝子の増幅を検討した。そして蚊によって媒介される DENV, ZIKV, 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。

ところで、USUV/Slovenia/Ko208/2018 (Ko208/2018) 株は 2018 年にスロベニアで蚊より分離された近年のヨーロッパ流行株であり、スロベニアから導入した。UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 (SAAR-1776) 株 (GenBank Accession no. AY453412) は、南アフリカで 1959 年に分離された株である。SAAR-1776 株についてはすでにその塩基配列が報告されているが、Ko208/2018 株については未だその報告がない。そこでわれわれは SAAR-1776 株および Ko208/2018 株について次世代シーケンサー (NGS) 解析を実施し、その塩基配列を決定した。また、USUV の性状を解析し、検査系を評価するための動物モデルの開発を行った。また、アルボウイルスの輸血リスクを分析するために DENV, CHIKV,

ZIKV 等のアルボウイルスによる輸血感染症の事例について文献探索を行いその実態を調査した。

B. 研究方法

ウイルス

サル腎細胞由来Vero細胞を 2×10^5 /ml培養フラスコに播種し、5%CO₂、37°Cで培養した。翌日SAAR-1776株およびKo208/2018株をそれぞれmoi 0.01にて接種した。細胞を顕微鏡下で観察し、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、Hight pure viral RNA kit (Roche) を用いて取り扱い説明書に沿って実施した。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。

NGS解析のためのサンプル調整とNGS解析

NGS解析のためのサンプル調整は、NEB Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs社) を用いて、取扱説明書に沿って実施した。NGS解析はiSeq 100システム (Illumina社) を用いて行なった。

シーケンス解析

得られたNGSデータにおけるウイルス遺伝子配列の構築には、CLC Genomics Workbench (QIAGEN社) を用いた。得られたウイルス配列の系統樹解析は、MEGA X (<http://megasoftware.net>) を用いて行なった。

マウス

一群5匹の3週齢C3H/Heマウスに対してUSUV SAAR-1776株およびKo208/2018株 (10^1 PFU/ml) をそれぞれ20 μ l 脳内接種した。また同様に3週齢C3H/Heマウスに対してSAAR-1776株およびKo208/2018株 (10^6 PFU/ml) をそれぞれ100 μ l 腹腔内接種した。ウイルス接種を行なったマウスを21日間観察した。

節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染症の事例の文献調査

過去20年間に報告された節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染の事例についてPubMedを用いて文献調査を行なった。

(倫理面への配慮) 本研究で実施した研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て実施した。

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、USUV

SAAR-1776株およびKo208/2018株をそれぞれ50 μ 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°Cの超低温下に保存した。

次世代シーケンサーによるウスツウイルス遺伝子の配列解析

次にSAAR-1776株およびKo208/2018株のNGS解析を行なった。その結果2株それぞれの塩基配列は5'-および3'-末端UTR領域の10塩基を除き決定された。SAAR-1776株はこれまでに報告されている塩基配列 (AY453412) との比較において数塩基の変異が認められた。また系統樹解析の結果SAAR-1776株の遺伝子型は、アフリカ2型であることが示された。さらに、スロベニアで分離されたKo208/2018株はヨーロッパ2型の遺伝子型に分類されることが示された。SAAR-1776株およびKo208/2018株の同一性は96.6%であった。

マウスのウスツウイルス感受性

一群5匹の3週齢C3H/Heマウスに対してSAAR-1776株およびKo208/2018株 (10^1 PFU/ml) をそれぞれ20 μ l 脳内接種した。その結果接種14日以内にKo208/2018株では3匹のマウスが死亡し、SAAR-1776株では1匹のマウスが死亡した。しかしながらSAAR-1776株およびKo208/2018株 (10^6 PFU/ml) をそれぞれ100 μ l 腹腔内接種したマウスにおいては、21日の観察期間中、ウイルス感染による症状を示した個体あるいは死亡した個体は認められなかった。

節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染症の事例の文献調査

過去20年間に報告された節足動物媒介性ウイルスによる主な献血血の汚染例および輸血による感染例についてPubMedを活用して文献調査を行なった。その結果2005年にレユニオン島において献血血よりCHIKV RNAが検出された事例の報告があった。その他にも2005年にプエルトリコの献血血よりDENV RNAが検出、2009年にタイの献血血よりCHIKV RNAの検出、2012年にはブラジルの献血血よりDENV RNAの検出、2017年には、オーストリアの輸血血液に対するWNVスクリーニング検査において12,047検体中6検体からUSUVの遺伝子が検出された。2013-2015年にかけてのフランス領ポリネシアで行われた調査では2.8%がZIKV RNA陽性であった。プエルトリコにおける2014年の調査では、1.9%がCHIKV陽性であった。2017年の報告ではサウジアラビアのドナーの5.5%がDENV RNA陽性であった。2018-2020年にブラジル北部で行われた調査で

は、献血血 36,133,000 件のうちアルボウイルスが検出されたケースは、DENV 陽性および CHIKV 陽性それぞれ 1 件であった(陽性率 0.002%)。さらに輸血による感染事例として、2012 年にブラジルにおいて少なくとも 5 例の輸血による DENV の感染例が発生した。また 2016 年にはブラジルにおいて 2 例の血小板輸血による ZIKV 感染例も報告されている。DENV, CHIKV, ZIKV はヒトにおいて高いウイルス血症を示すため、献血血を介してヒトに感染する事例が報告されている。したがって今後もこれら事例について情報収集が必要であることが示された。

D. 考察

DENV, ZIKV, CHIKV は+鎖の一本 RNA ウイルス (1-3) であり、宿主に幅広い臨床症状を引き起こす。これらのウイルスは蚊によって媒介される。これらのアルボウイルス感染症は、不顕性感染率が高く、高いウイルス血症を呈するため、献血血中に検出されることが明らかとなっている。これらアルボウイルスは、献血血においてスクリーニングされていないため、感染した無症状のドナーの血液成分が輸血される可能性は否定できない。本研究においては、献血血から検出されたアルボウイルスの情報について文献調査を行い、アルボウイルスの流行地域では献血血からアルボウイルスが検出された事例がいくつか報告されていることを確認した。例えば 2005 年にフランス海外島のレユニオン島での CHIK 熱流行時には献血血より CHIKV が検出されており、2016 年のブラジルにおける ZIKV 感染症流行時には ZIKV の血小板輸血を介した感染例が報告されている。また近年のブラジルでの DEN 熱および CHIK 熱の流行においても献血血よりそれぞれのウイルスが検出されている。わが国においては、海外からの帰国日 (入国日) 当日から 4 週間以内の献血は、基本的に実施されておらず、これらアルボウイルスのウイルス血症の期間は長くても 10 日ほどであるとされているため、直ちにアルボウイルスによる献血血へのリスクがあるわけではない。しかしながら、これらアルボウイルスを媒介する媒介蚊は生息しており、特に夏季から秋季にかけてこれら疾患が国内流行する可能性が否定できない。2016 年および 2019 年には DEN 熱の国内流行も発生している。したがって、引き続きその情報収集と検査体制の整備が求められる。

さらにヨーロッパでは USUV 感染症が鳥類において流行しており、これまでに 24 の国々で遺伝子学的あるいは血清学的にその

分布が明らかとなっている。2001 年にはオーストリアで数百羽のユーラシアクロウタドリ (*Turdus merula*) の大量死が確認されている。また 2005 年にはハンガリーで、2006 年にはスイス、そして 2009 年にはイタリアで、USUV 感染症の流行が鳥類において発生している。またドイツでは、2010 年に蚊のプール (*Culex pipiens pipiens*) から USUV が分離され、さらに 2011 年には、鳥類 (特にユーラシアクロウタドリ) の大量死が報告されている。クロウタドリはわが国にも飛来する渡り鳥であり、わが国においても USUV の侵淫に備える必要性は否定できない。

本研究では EVE-g より導入した 2 株の USUV に対する NGS 遺伝子解析を実施した。SAAR-1776 株は、1959 年に南アフリカで *Culex neavei* より分離された USUV のレファレンス株であるが、われわれの解析においてもその配列が比較的良く保存されていることが確認された。またスロベニアで分離された Ko208/2018 株は、現在ヨーロッパで流行している遺伝子型ヨーロッパ 2 型に分類されることが明らかとなった。両ウイルスの同一性は 96.6% であり、これらの塩基配列の差と病原性の関係について今後の調査の必要性が示唆された。さらに、これら 2 株の病原性についてマウスを用いて検討したところ、脳内接種により病原性を示したが、腹腔内接種においては病原性を示した個体は観察されないことが示された。USUV の体内動態モデルを構築し、検査系の評価を実施するため、引き続きその開発を実施する必要がある。

E. 結論

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 USUV の流行地域ではウイルス RNA が検出されているため USUV の検査体制の整備を行なった。これまでに報告された献血血からのアルボウイルスの検出に対する調査を行い、アルボウイルスの流行においては、献血血においてアルボウイルスが検出される事例が特に流行期に報告されていることが示された。したがって、血液製剤の安全性を確保するためには、今後もこれら情報を収集し、検査体制の整備を行う必要性が示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 特記事項なし

学会発表

1. 特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

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

総合研究報告書

分担する研究項目：『グロブリン製剤の原料血漿中の新興・再興ウイルスに対する中和抗体に関する研究』

研究分担者 浦山健（一般社団法人 日本血液製剤機構 研究開発本部 中央研究所 感染性病原体研究室 室長）

研究協力者 塩田達雄（大阪大学 微生物病研究所）

柚木幹弘（一般社団法人 日本血液製剤機構 研究開発本部 研究開発推進部）

井上隆昌、西口優吾、澁谷明美（一般社団法人 日本血液製剤機構 研究開発本部 中央研究所 感染性病原体研究室）

研究協力者 デンカ株式会社

[研究要旨]

本邦献血血液に由来するプール血漿には、献血者集団の感染症既往歴やワクチン接種歴を反映した多様な抗体が含まれており、その抗体価を測定する事により、血清疫学の概観を把握する一助となる。加えて、プール血漿を原料とする血液製剤については、これらの抗体により、迷入し得る病原体等の感染性を低減（中和）する事も考えられる。本研究では、周期的な流行が繰り返されるヒトパルボウイルス B19（以下、B19）と、世界的なパンデミックを引き起こした SARS-CoV-2、疫学的特徴が異なる2種類のウイルスについて、プール血漿中の抗体価の経時的推移を調査し、これら抗体が血液製剤の安全性に寄与し得る可能性を考察した。

B19 については、ヒト血漿中の中和活性を定量化するための中和抗体価測定法を確立し、プール血漿中の抗 B19 中和抗体価を測定した。その結果、FDA 勧告基準の上限量である $4 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ の B19 を中和し得る抗体価が、長期間にわたって維持されている事を確認した。また 2011 年以降、B19 の流行期に関わらず、プール血漿中の B19 DNA 量が $4 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ を超える事はなかった。これらの事から、仮に B19 がプール血漿へ迷入したとしても、その感染性は消失していると考えられた。

一方、SARS-CoV-2 については、2021 年の 1 月頃から 2023 年 4 月頃に採血された献血血液から成るプール血漿中の抗 SARS-CoV-2 抗体価をモニタリングした。その結果、ワクチン接種やコロナ流行を反映してスパイクプロテインに対する結合活性は上昇するが、その後は抗体価を維持できず、暫時下降するウェーブ状の傾向が観察された。すなわち SARS-CoV-2 は B19 と異なり、コロナ流行の疫学的背景を反映してプール血漿中の抗体価は大きく変動している。但し、第 6 波（2022 年 1～3 月）以降、流行に追従して中和抗体価は上昇しており、血液製剤の安全性に一定の効果はあると推測された。さらに長期にわたって抗体価の推移を調査する必要があると考える。

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

TCID₅₀: 50% Tissue Culture Infectious Dose

qPCR: quantitative PCR

B19: Human parvovirus B19

EIA: Enzyme ImmunoAssay

A. 研究目的

数千人以上の本邦献血血漿を集合したプール血漿中には、献血者集団の感染症の既往歴やワクチン接種歴を反映した多様な抗体が含まれる。これら抗体の中には、病原体等の抗原と結合することにより、病原体等の感染を阻害する中和抗体も含まれる。すなわち、プール血漿（もしくはその精製品であるグロブリン製剤）中の中和活性を評価することにより、対象とする病原体等に対する血液製剤の安全性の考察が可能である。加えて、中和活性の結果から、本邦献血者の各種病原体等に対する血清疫学の概観についても把握も可能となる。例として、周期的な流行が繰り返されてきた B19 や、新興感染症としてパンデミックを引き起こした新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のように、病原体等によっては、その影響が数年にわたって続く場合がある。この期間中の対象病原体等に対する結合活性および中和活性をモニタリングすることで、献血者集団を代表とする有用な疫学的な情報を取得することが可能と考えられる。

B19 は、小児の伝染性紅斑の原因ウイルスである。一方、成人に対しては、関節炎症、妊婦胎児水腫、重篤な溶血性貧血等を引き起こすことがある¹⁾。輸血による感染事例も報告されており²⁾、血液製剤の安全性確保の観点から、注視する必要があるウイルスの一つである。FDA は、界面活性剤処理された血漿の投与によって感染が生じなかった B19 DNA 量をもとに³⁾、4 Log₁₀ IU/mL をプール血漿に対する最

大許容値として定めている⁴⁾。日本赤十字社では、2019年4月から化学発光免疫測定法による抗原検査を全献血血液に対し導入しており、この検査により抗原陽性血液を排除することで、プール血漿が FDA 勧告基準を満たすとの考えを示している⁵⁾。実際に、池川らは血漿分画製剤のプール血漿中の核酸検査を行い、ウイルス量が FDA 勧告基準を下回っていたことを報告した⁶⁾。

本分担研究では、血液製剤における病原体に対する安全性の考察と血清疫学の概観把握を目的として、原料となるプール血漿中の B19 と SARS-CoV-2 に対する抗体価を評価した。

具体的には、血液製剤の B19 に対する安全性を中和活性の観点から考察するため、プール血漿が FDA 勧告基準の上限量である 4 Log₁₀ IU/mL の B19 を中和するかどうか評価し、プール血漿中の中和抗体価と B19 DNA 量の経時的推移についても調査した。

SARS-CoV-2 については、新興ウイルスに対する血液製剤の安全性考察と、ワクチン接種およびコロナ流行を含む血清疫学的な概観の把握を目的とし、2021年1月頃～2023年4月頃に献血された献血血液から成るプール血漿中の結合抗体価、および SARS-CoV-2 各株に対する中和抗体価をモニタリングした。

B. 研究方法

1. ウイルス

12.2 Log₁₀ IU/mL の B19 を含む B19 陽性血清を、抗 B19 抗体陰性ヒト血漿により希釈し、プール血漿およびグロブリン製剤中の中和抗体価の測定に用いた。

SARS-CoV-2 各株については、以下の株を用いてプール血漿中の中和抗体価を評価した

起源株 (2019-nCoV/Japan/TY/WK-521/2020)
 デルタ株 (hCoV-19/Japan/RIMD-DVI-16/2021)
 以下オミクロン株
 BA.1 株 (hCoV-19/Japan/TY38-873/2021)
 BA.2 株 (hCoV-19/Japan/TY40-385/2022)
 BA.5 株 (hCoV-19/Japan/TY41-702/2022)
 XBB 株 (hCoV-19/Japan/TY41-795/2022)

2. B19 に対する中和抗体価測定系の確立と経時的推移評価

中和抗体価の測定に最適な B19 濃度を決定するため、抗 B19 抗体陰性ヒト血漿により希釈した各 B19 陽性血清を 10 ウェルに添加し、B19 感染が 10 ウェル全てで成立した濃度の内、最も低い 8.2 Log₁₀ IU/mL を、中和抗体価測定用の B19 濃度に設定した。

中和抗体価は、過去に報告した方法⁷⁾に基づき、次のように測定した。プール血漿を抗 B19 抗体陰性ヒト血漿で、グロブリン製剤はプール血漿と IgG 濃度を揃えるため IgG 濃度 1% に調整した後 PBS で、各々希釈したサンプルの 2 倍希釈系列を測定用サンプルとした。12.2 Log₁₀ IU/mL の B19 を含む陽性血清を抗 B19 抗体陰性ヒト血漿により 5,000 倍希釈して、8.5 Log₁₀ IU/mL の B19 を含む抗体価測定用の B19 サンプルを調製した。プール血漿またはグロブリン製剤の測定サンプルと、抗体価測定用 B19 サンプルを等量混合し、37°C で 1 時間インキュベーションした後、混合液を細胞用培地で 10 倍希釈した。96 ウェルプレートに予め播種された KU812 細胞に、希釈済み混合液を 10 μL/well 添加して、37°C で 4 日間培養した。培養後、細胞から Total RNA を抽出し、B19 ゲノム由来のスプライシングされた mRNA を qPCR により定性的に検出し、検出されたウェルを

感染成立と判断した。各希釈系列につき 3 回測定を行い、Karber 法により、50% の確率で B19 の感染を阻害する希釈倍数を算出し、本研究での中和抗体価とした。

3. B19 疫学背景とプール血漿中の B19 DNA 量の相関調査

伝染性紅斑については、国立感染症研究所より公表されている感染症発生動向調査事業年報⁸⁾ および速報の表における伝染性紅斑の週別報告総数を参照し、グラフを作成した。プール血漿中の B19 DNA 量は過去の報告⁶⁾ と、一般社団法人 日本血液製剤機構で実施しているプール血漿の検査記録からプロットを作成し、前述の報告総数グラフに重ね合わせた。

4. プール血漿中の SARS-CoV-2 に対する抗体価の測定法

プール血漿を構成する個別血漿の中で最も遅い採血日をプール血漿の採血日として便宜上設定し、2021 年の 1 月頃から 2023 年 4 月頃までに採血されたプール血漿の抗 SARS-CoV-2 抗体価を測定した。SARS-CoV-2 のスパイクプロテインに対する結合抗体価は、EIA 抗体測定キット (DK20-CoV4E、デンカ株式会社) を用いて測定した。

SARS-CoV-2 各株に対する中和抗体価測定は、次の通りに実施した。プール血漿を細胞用培地で段階希釈した 2 倍希釈系列サンプルと、100 TCID₅₀ / 50 μL の濃度に調製した SARS-CoV-2 サンプルを等量混合し、37°C で 1 時間インキュベーションした。予め 96 ウェルプレートに播種された Vero-E6 細胞に、30 μL/well の混合液を添加した。起源株とデルタ株を評価する際は 37°C で 2 日間、オミクロン株を評価する際は 37°C で 3 日間培養した。培養後、感染成立

または不成立を判断し、感染不成立を示すウェルの割合が 50%以上となった希釈倍数の内、最大の希釈倍数を本研究での中和抗体価とした。

(倫理面への配慮)

ヒト血漿を含むヒト組織の使用については、一般社団法人 日本血液製剤機構のヒト組織研究倫理審査委員会にて承認されている。

C. 研究結果

1. プール血漿中の抗 B19 中和抗体価の試行的評価

プール血漿の代表ロット (ロット A) を抗 B19 抗体陰性ヒト血漿で希釈した 2 倍希釈系列サンプルを用いて、B19 の感染成立率を評価した。その結果、8 倍希釈に達して初めて感染が成立したウェルが確認され、以降の希釈倍数では全てのウェルで感染が成立した (図 1)。また、他の代表ロット (ロット B) についても同様に評価したところ、ロット A と B の中和抗体価はそれぞれ 7.5 と 13.0 倍であり、感染を 100%中和するエンドポイントの希釈倍数はいずれも 4 倍であった (表 1)。

2. プール血漿中の抗 B19 中和抗体価の推移評価

構成する個別血漿の採血期間が 2021 年度の各月内に収まるプール血漿 (計 12 ロット) を用いて、プール血漿中の抗 B19 中和抗体価の推移を評価した。また過去に遡り、プール血漿中の中和抗体価の推移を評価する際は、プール血漿中の IgG 濃度が 1%に相当することから、2011~2015 年及び 2022 年に製造されたグロブリン製剤を IgG 濃度 1%に調整して測定した。プール血漿を用いた 2021 年度 (図 2) とグロブリン製剤を用いた 2011~2015 年及び 2022 年 (図 3) の両推移評価において、測定サンプル間の差

が小さく、共に中央値の±1 管差以内で安定的に推移していた。

3. 伝染性紅斑報告総数とプール血漿中の B19 DNA 量の相関調査

B19 の疫学状況とプール血漿中の B19 DNA 量との相関があるかどうか調査するため、伝染性紅斑報告総数とプール血漿中の B19 DNA 量 (2011 年 1 月~2023 年 6 月製造) を比較した (図 4)。過去に報告したように⁶⁾、プール血漿中の B19 DNA 量は、伝染性紅斑報告総数の増加すなわち B19 流行期に準じて増加していた。また、2020 年のコロナ禍以降、伝染性紅斑報告総数が減少しており、これと一致してプール血漿中の B19 DNA 量は検出限界未満となるロットが大半であった。なお、本調査期間 (2011 年 1 月~2023 年 6 月) において、B19 流行期に準じてプール血漿中の B19 DNA 量が上昇するものの、その数値は FDA 勧告基準の 4 Log₁₀ IU/mL 未満であった。

4. プール血漿中の SARS-CoV-2 に対する抗体価の経時的変動評価

2021 年の 1 月頃から 2023 年 4 月頃までに採血された個別血漿に由来するプール血漿を用いて抗 SARS-CoV-2 抗体価の経時的変動を評価した。評価の際は、プール血漿中の SARS-CoV-2 スパイクプロテインに対する結合抗体価と、各種 SARS-CoV-2 株に対する中和抗体価を評価した (図 5)。

結合抗体価はワクチン接種数の増加に応じて、2021 年 8 月頃から顕著に上昇するものの抗体価を維持できず減少に転じた。その後、ワクチン接種数の増加に応じて、2022 年 2 月頃から上昇し、2022 年 5 月頃ピークに達した後、減少に転じた。その後の

2022 年 8 月以降は、ワクチン接種数および流行に応じて上昇し、2023 年 2 月頃ピークに達した後、減少に転じた。

SARS-CoV-2 の各株に対する中和抗体価については、2022 年の第 6 波 (1-3 月) 以降に採血された血漿から、中和抗体価が上昇し、第 7 波 (7-9 月) 流行によりさらに増加した。中和抗体価の上昇は株により違いがあり、起源株 / デルタ株、BA.1 株 / BA.5 株、BA.2 株、XBB 株の順であった。

D. 考察

本邦献血由来のプール血漿は B19 に対する FDA 勧告基準を下回っており^{5,6)}、また血漿分画製剤の製造工程に導入されるウイルス除去・不活化工程が B19 に対して有効に機能することも報告されている^{7,9-11)}。しかしながら、FDA 勧告基準⁴⁾は、海外由来の血漿を界面活性剤で処理し投与後、感染が成立しなかった B19 DNA 量に基づいている³⁾。本邦の献血に由来するプール血漿中の B19 に対する中和活性は反映されていない。本研究では、中和抗体価測定系を確立し、製造年毎の中和抗体価の経時的推移を調査、B19 疫学背景とプール血漿中の B19 DNA 量の情報を加味して、血液製剤の B19 に対する安全性を考察した。

In vitro 中和試験には、 $8.2 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ の B19 を用いているが、4 倍希釈したプール血漿でも B19 を検出限界以下まで中和した。これは FDA 勧告基準上限より 4 Log 以上高いことから、本邦献血由来のプール血漿中には、B19 の感染性を消失し得る十分な中和抗体が含まれていると判断された。また中和抗体価の推移の結果から、抗体価はほとんど変動が無く安定的であった。

B19 疫学状況と B19 DNA 量の相関を調査した結

果、伝染性紅斑報告総数の増加に追従して、プール血漿中の B19 DNA 量も増加していた。両者間の時間差には、採血からプール血漿製造までのリードタイムによるものと考えられた。評価対象期間 (2011 年 1 月～2023 年 6 月) 中の B19 流行においても、プール血漿中の B19 DNA 量は $4 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ 未満に留まっていたことから、今後も同様の傾向を維持すると予測された。

2019 年に中国 武漢市で発生した SARS-CoV-2 は、瞬く間に世界中に広がり、2020 年には世界的なパンデミックを引き起こした。一方、当時の疫学的背景や施策は地域ごとに異なり、SARS-CoV-2 パンデミックが本邦献血者集団に与えた影響については、本研究開始時には、十分に検証されていなかった。

プール血漿中の SARS-CoV-2 スパイクプロテインに対する結合活性については、2021 年 8 月頃から、ワクチン接種数や流行に応じて上昇するものの、抗体価を維持できず、暫時下降するウェーブ状の傾向が観察された。2021 年 8 月頃の抗体価の上昇は、主にワクチン接種した献血者に起因すると推測された一方で、オミクロン株が出現・流行した 2022 年 2～3 月以降は、SARS-CoV-2 に自然感染した献血者に由来する抗体も含まれると推測された。

プール血漿中の SARS-CoV-2 各株に対する中和活性については、株間で中和抗体価の差が観察された。2021 年に接種されたワクチンは起源株に基づいており、起源株とデルタ株に対する中和抗体価の上昇は他の株と比較して高かった。オミクロン株については、BA.1 株は第 6 波以降、BA.5 株は第 7 波以降に顕著に増加していることから、各株の自然感染者に由来する可能性が高いと考えられた。一方で、mRNA ワクチンで誘導される抗体は BA.1 株と BA.2 株に対し同程度の中和活性を示すと報告¹²⁾された

ものの、BA.2 株に対する中和抗体は低値のままであった。当該事象の正確な理由は不明である。なお、評価対象としたプール血漿の採血期間は、BA.2 株の派生株である XBB 株の流行前であったことから、モニタリングを継続することで BA.2 株及びその派生株に対する血清疫学についても把握できると考えられた。抗 SARS-CoV-2 抗体価は新型コロナ流行やワクチン接種数等の疫学状況に追従して、変動する。一方で、中和活性は第 6 波以降も上昇していることから、プール血漿中の抗体は、SARS-CoV-2 に対する血液製剤の安全性に寄与すると考えられた。

E. 結論

B19 については、8.2 Log₁₀ IU/mL の B19 を用いた *in vitro* 中和抗体価測定系を確立した。本法を用いた調査の結果、プール血漿中には FDA 勧告基準の上限 (4 Log₁₀ IU/mL) を上回る B19 の感染性を消失させるに十分な中和抗体が、長期に渡って安定的に含まれていることを確認した。さらに、プール血漿中の B19 DNA 量は、疫学状況に関わらず 4 Log₁₀ IU/mL 未満を維持していたことから、プール血漿中に迷入する可能性のある B19 は、中和抗体によって実質的に感染性を消失した状態で存在すると考えられ、プール血漿中の中和抗体は B19 に対する安全性に寄与していると結論した。

SARS-CoV-2 については、2021 年 1 月頃から 2023 年 4 月頃までに採血された個別血漿に由来するプール血漿のモニタリングを行った。調査の結果、スパイクプロテインに対する結合抗体価については、ワクチン接種数や流行に応じて抗体価が上昇するものの、その後暫時下降するウェーブ状の傾向を観察した。一方、中和抗体価については、第 6 波 (2022 年 1-3 月) 以降の流行に追従して、起源株、デルタ株、オ

ミクロン株の全 6 株に対する抗体価の上昇を観察した。このモニタリング結果を通して、パンデミック発生時において、本邦献血者集団に由来するプール血漿は血清疫学の概観を把握するのに有用であることを改めて確認した。なお、SARS-CoV-2 に対する血清疫学は今後も変化すると予想され、モニタリングを継続することは重要と考えられた。

引用文献

- 1) 伝染性紅斑 (ヒトパルボウイルス B19 感染症) IASR Vol. 37 p. 1-4: 2016 年 1 月号
<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/37/431j160303.pdf>
- 2) Satake M *et al.*, Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion. *Transfusion.* 2011 Sep;51(9):1887-95.
- 3) Brown KE *et al.*, Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion.* 2001 Jan;41(1):130-5.
- 4) Guidance for Industry: Nucleic Acid Testing (NAT) to Reduce the Possible Risk of Human Parvovirus B19 Transmission by Plasma-Derived Products U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research July 2009
<https://www.fda.gov/media/72156/download>
- 5) 岸本ら「献血者における化学発光免疫測定法を用いた新ヒトパルボウイルス B19 抗原スクリーニングの遺伝子型検出に関する性能評価」*Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy*, Vol. 67, No. 1 67 (1) : 21-26, 2021
- 6) Ikegawa M *et al.*, Screening for parvovirus B19 antigen through chemiluminescent enzyme immunoassay is equivalent to B19 nucleic acid amplification test-based screening of pooled plasma. *Transfusion.* 2021 Aug;61(8):2240-2244.
- 7) Hattori S *et al.*, Variability of parvovirus B19 to inactivation by liquid heating in plasma products. *Vox Sang.* 2007 Feb;92(2):121-4.
- 8) 感染症発生動向調査事業年報 (IDWR), 2021 年 (令和 3 年) 確定報告データ、集計表一覧、第 22-3 表: 報告数・定点当たり報告数, 経年・性

別・週・週報定点把握対象疾患別、2023年2月
3日

https://www.niid.go.jp/niid/images/idwr/ydata/2021/Syuukei/Syu_22_3.xlsx

- 9) Yunoki M *et al.*, Inactivation of parvovirus B19 by liquid heating incorporated in the manufacturing process of human intravenous immunoglobulin preparations. *Br J Haematol.* 2005 Feb;128(3):401-4.
- 10) Tsujikawa M *et al.*, Variability of parvovirus B19 genotype 2 in plasma products with different compositions in the inactivation sensitivity by liquid-heating. *Vox Sang.* 2012 Feb;102(2):93-9
- 11) Adan-Kubo J *et al.*, Microscopic visualization of virus removal by dedicated filters used in biopharmaceutical processing: Impact of membrane structure and localization of captured virus particles. *Biotechnol Prog.* 2019 Nov;35(6):e2875.
- 12) Uraki R *et al.*, Characterization and antiviral susceptibility of SARS-CoV-2 Omicron/BA.2. *Nature.* 2022 Jul 16;607(7917):119-127

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
1. 論文発表
なし

2. 学会発表

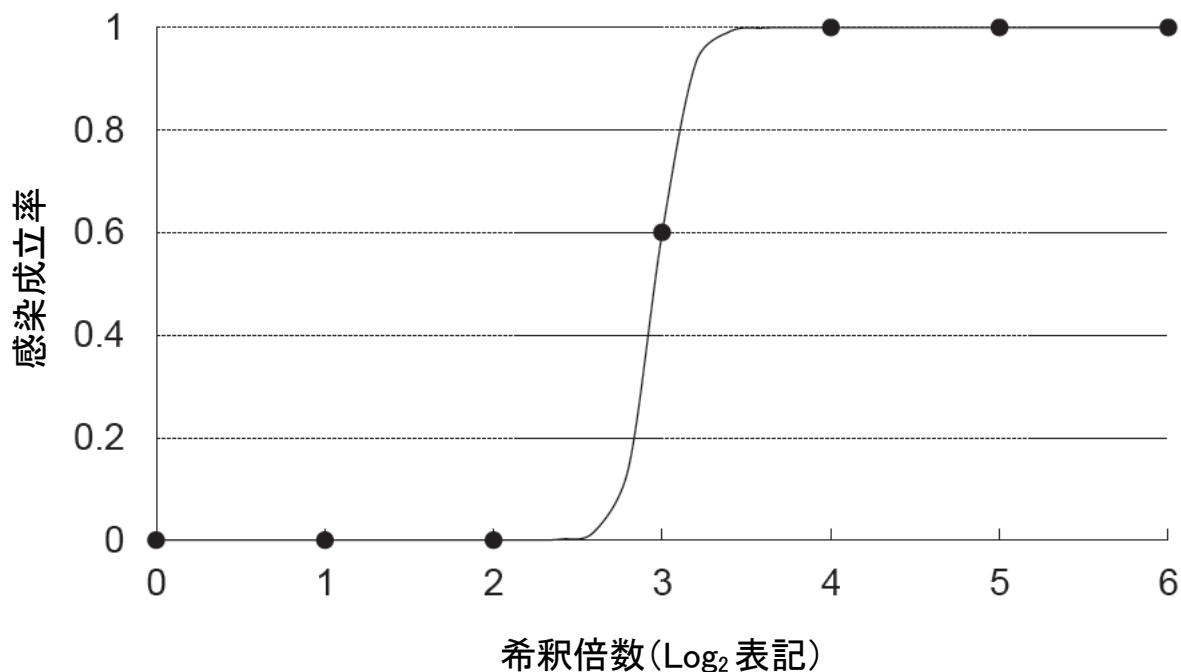
柚木 幹弘、瀨瀬 律子、塩田 達雄
人免疫グロブリン製剤の原料プール血漿中の抗 SARS-CoV-2 抗体価の変化と製剤への影響
第 63 回日本臨床ウイルス学会 (2022 年 6 月)、
東京

柚木 幹弘、瀨瀬 律子、塩田 達雄
人免疫グロブリン製剤の原料プール血漿中の抗 SARS-CoV-2 抗体価の変化と製剤への影響 (第 2 報)
第 64 回日本臨床ウイルス学会 (2023 年 10 月)、
静岡

井上 隆昌、西口 優吾、澁谷 明美、柚木幹弘、
浦山 健
ヒトパルボウイルス B19 に対する本邦献血プー
ル血漿の血清疫学的評価と安全性の考察
第 64 回日本臨床ウイルス学会 (2023 年 10 月)、
静岡

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



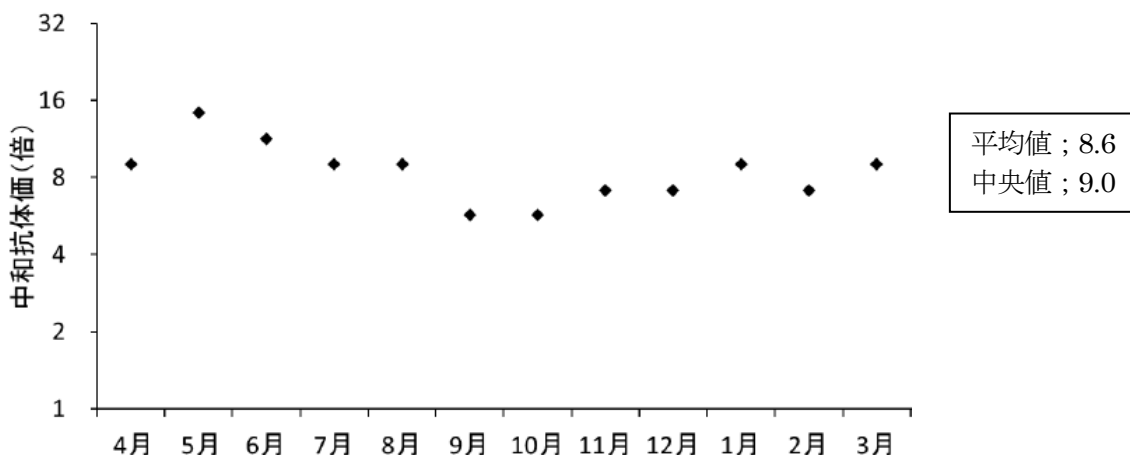
<図 1> プール血漿代表ロットの希釈系列における感染成立率

In vitro 中和実験に使用するプール血漿の希釈条件を決定するため、代表ロットとなるプール血漿の希釈点毎の感染成立率を評価した。グラフはプール血漿代表ロット A の希釈サンプル毎の感染成立率曲線を示しており、プール血漿の希釈倍数 (Log₂ 表記) を横軸に、混合時における B19 の感染確率を縦軸に示した。

<表 1> プール血漿代表ロットの B19 に対する中和抗体価およびエンドポイント

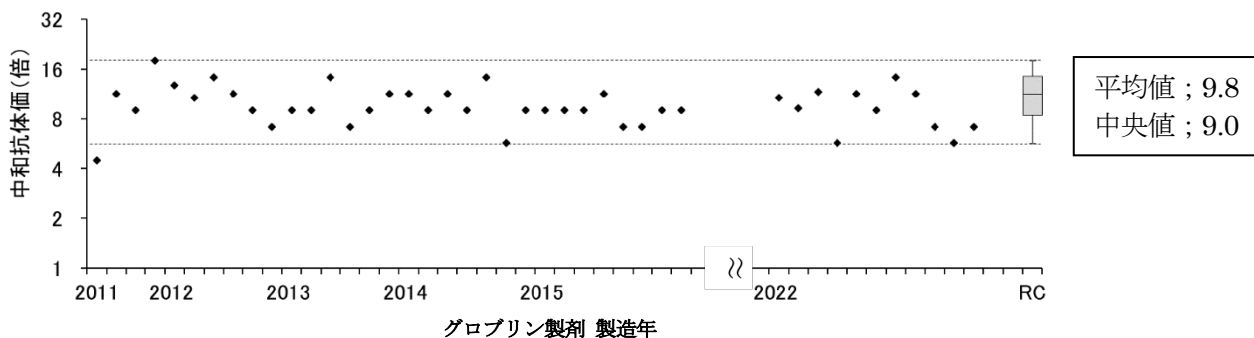
プール血漿代表 2 ロットの中和抗体価とエンドポイント (100%感染不成立となった最大の希釈倍数) を記載した。

測定検体	中和抗体価 (D ₅₀) (倍)	エンドポイント (倍)
原料プール血漿 (ロットA)	7.5	4
原料プール血漿 (ロットB)	13.0	4



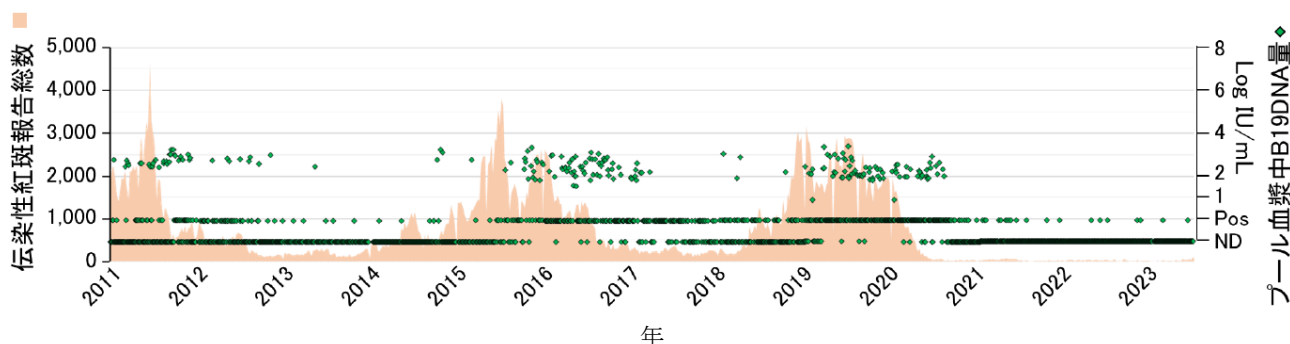
＜図 2＞ プール血漿中の抗 B19 中和抗体価の推移評価
(2021 年 4 月～2022 年 3 月採血)

2021 年度の月毎に採血されたプール血漿の中和抗体価を対数軸で示した。構成する個別血漿の採血期間が 2021 年度の各月内に収まるプール血漿を用い、抗 B19 中和抗体価を測定した。縦軸に中和抗体価（倍）を、横軸に各採血月を表示した。



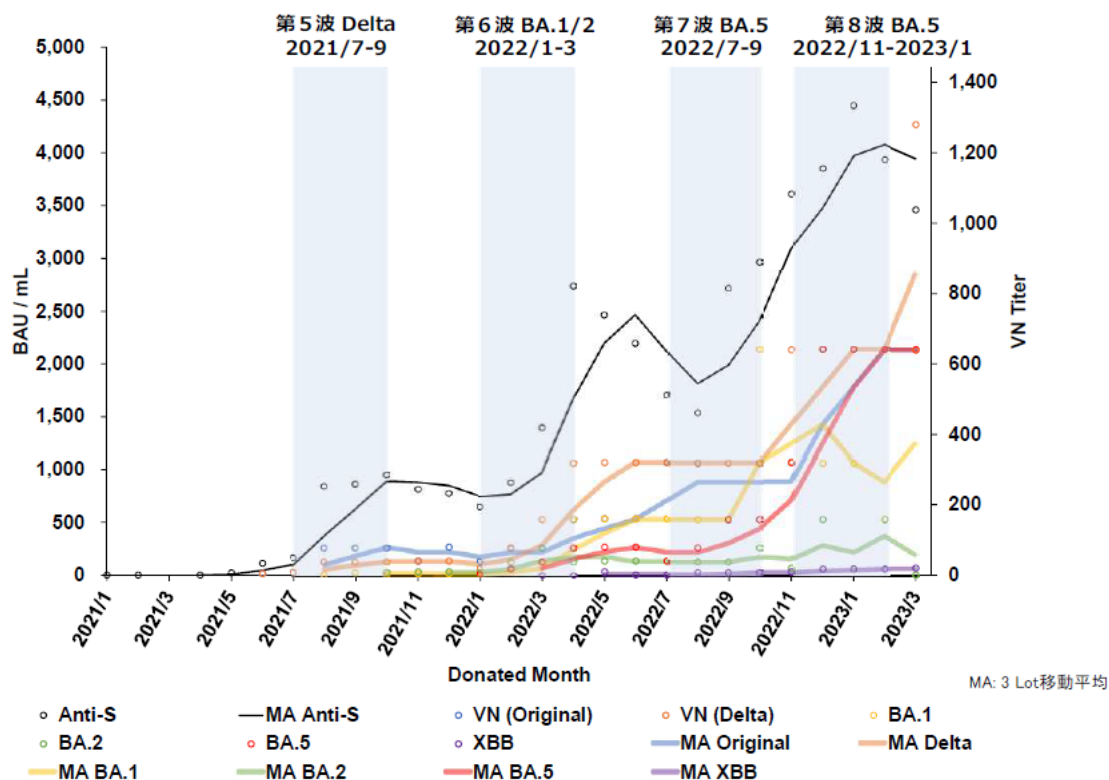
＜図 3＞ グロブリン製剤中（IgG 濃度 1%）の抗 B19 中和抗体価の推移評価
(2011 年～2015 年及び 2022 年製造ロット)

2011 年～2015 及び 2022 年に製造されたグロブリン製剤（IgG 濃度 1%）の抗 B19 中和抗体価を対数軸で示した。2011 年～2015 年及び 2022 年に製造されたグロブリン製剤代表ロットと試験成立の判断基準とした Run Control（RC；n=24 回測定）の抗 B19 中和抗体価を測定した。縦軸に中和抗体価（倍）を、横軸に製造年を表示した。なお、同一年に製造されたグロブリン製剤はロット順に表示した。点線は、RC の中和抗体価の最大値および最小値であり、測定間変動の参考とした。



＜図 4＞ 伝染性紅斑の報告総数およびプール血漿中の B19 DNA 量の経時的変遷

2011 年 1 月～2023 年 6 月の伝染性紅斑報告総数（棒グラフ；橙色）と同時期に製造されたプール血漿中の B19 DNA 量（菱形プロット；緑色）を示した。左縦軸に伝染性紅斑報告総数を、右縦軸にプール血漿中の B19 DNA 量（Log₁₀ IU/mL）を、横軸に年（報告総数；報告週、B19 DNA 量；プール血漿製造年で各々対応）を表示した。ND；検出限界未満、Pos；定量限界以下



＜図5＞ プール血漿中のスパイクタンパクに対する結合抗体価
および SARS-CoV-2 各株に対する中和抗体価の評価

プール血漿中の結合抗体価および中和抗体価を示した。黒丸および黒線は、各々スパイクタンパクに対する結合抗体価 (Anti-S)、およびこれら直近のプール血漿 10 ロットの移動平均線を示しており、左軸 (単位 ; BAU/mL) に対応している。また、代表ロット中の SARS-CoV-2 株 (6 種) に対する中和抗体価も併記した。青丸が起源株、橙丸がデルタ株、黄丸が BA.1 株、緑丸が BA.2 株、赤丸が BA.5 株、紫丸が XBB 株に対する中和抗体価 (VN Titer) を示しており、右軸 (単位 ; 倍) に対応している。また、これら各株に対応した各色線は、直近のプール血漿 3 ロットの移動平均線を示している。なお、背景の薄青部は流行期を示している。

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

新型コロナウイルスの代理ウイルス感染系の確立と中和活性解析系への応用

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：新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液中には SARS-CoV-2に対する中和抗体をはじめ種々の抗ウイルス活性物質等が存在すると考えられるが、その安全性の評価は十分ではない。その評価にはSARS-CoV-2感染実験が必要であるが、本来BSL3レベルで行う必要があるため実施可能施設等の制限がある。そこで、BSL2レベルで取り扱い可能な水疱性口内炎ウイルス(VSV)を用いた代理ウイルスを開発し、SARS-CoV-2を用いたウイルス感染系との比較を行い、BSL2レベルで実施可能な感染評価系の構築を目指す。具体的には、SARS-CoV-2臨床分離変異株等からスパイクタンパク遺伝子をクローニングした後、スパイクタンパク質発現組換えVSVの産生を試みた。SARS-CoV-2の代理ウイルス感染系を確立することで、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献する。

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

A. 研究目的

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)について、感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液にはSARS-CoV-2に対する中和抗体をはじめ種々の抗ウイルス活性物質が含まれると考えられるが、現状ではそれらの安全性が十分に評価されているとは言えない。この安全性評価のためには、SARS-CoV-2の感染実験による評価系が必要であるが、SARS-CoV-2はBSL3レベルでの取り扱いが求められるため、実施可能施設に限られる等の様々な制約があり、生ウイルスの使用は容易ではない。

そこで本研究では、BSL2レベルでの取り扱いが可能な水疱性口内炎ウイルス(VSV)のエンベロープタンパク質（Gタンパク質）をSARS-CoV-2スパイクタンパク質に置き換えた代理ウイルスを開発する。この代理ウイルスによる*in vitro*感染系は、血液中の中和抗体の検出等に有用であり、これらの性状を解析することで血液の安全性確保に貢献できる。

B. 研究方法

・SARS-CoV-2スパイク遺伝子のクローニング

各種SARS-CoV-2から抽出したウイルスRNAを用いて逆転写反応によりcDNAを合成した後、特異的PCRにてSARS-CoV-2スパイク遺伝子を増幅した。

・組換えVSV感染性クローンのプラスミドの作成
SARS-CoV-2（オリジナル株、アルファ株、オミクロン株）よりスパイクタンパク遺伝子をクローニン

グし、野生型VSVのGタンパク遺伝子と置換した。

・組換えVSVの産生

293T細胞あるいはVeroE6/TMPRSS2細胞にT7発現ワクシニアウイルスを感染させたのち、組換えVSVプラスミドおよびVSV-N, P, G, L発現ヘルパープラスミドをトランスフェクションし、組換えVSVを含む上清を回収した。

・プラークアッセイ

VSVあるいはSARS-CoV-2を感染させた後、メチルセルロース含有培地を添加して2日間培養し、メタノール固定してクリスタルバイオレットで染色した。

C. 研究結果

SARS-CoV-2は株によりスパイクタンパク質の性質が大きく異なるため、各変異株のスパイクタンパク質を有する代理ウイルスが必要となる。臨床分離株の各種SARS-CoV-2（オリジナル株、アルファ株、デルタ株、オミクロン株）から抽出したウイルスRNAを用いてスパイク遺伝子を増幅し電気泳動した結果、いずれのウイルスRNAからも予想された3.8kbp付近にバンドが検出された。

SARS-CoV-2各株よりスパイクタンパク遺伝子をクローニングし、VSV感染性クローンプラスミドへのサブクローニングを行った。これらを用いて組換えVSV産生実験を施行したところ、対照の野生型VSVおよびEGFP発現組換えVSV(VSV-EGFP)に関してはVSV特有のコメットサインあるいはEGFP発現が目視あるいは蛍光顕微鏡で観察され、ウイルス産生が確認できた。（図1、図2）

しかし、スパイクタンパク質発現組換えVSVに関してはウイルス産生が確認できなかった。この原因として、VSV粒子は細胞表面でエンベロープタンパ

ク質を纏うが、SARS-CoV-2スパイクタンパク質のC末にER retention signalが存在するために、ウイルス粒子へのスパイクタンパク質の供給がうまくいかない可能性が考えられた。そこでER retention signal を含むC末の18アミノ酸を欠失したスパイクタンパク遺伝子をサブクローニングした。さらにウイルス感染を可視化し、観察を容易にするためにEGFP発現ユニットをスパイク発現組換えVSVプラスミドに組み込んだ。現在、ウイルス産生の可否を検討中である。

(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

D. 考察

VSVはスパイクタンパク質に相当するGタンパク質を細胞表面でウイルス粒子に取り込んだ後に細胞外へ放出されるが、SARS-CoV-2は主にER-Golgi周辺でウイルス粒子にスパイクタンパク質を取り込み、エクソサイトーシスにより細胞外へ放出される。従って、SARS-CoV-2スパイクタンパク質をVSV粒子により効率良く取り込ませるためには、スパイクタンパク質を細胞表面に発現させる必要がある。そのためスパイクタンパク質のC末に存在するER retention signalを欠失させることで、VSV粒子への取り込み効率が上がると考えられる。

SARS-CoV-2およびスパイクタンパク質発現VSVは細胞変性効果(CPE)あるいは感染細胞死を観察することで感染を確認するが、EGFP発現組換えVSVを用いることでCPE等の細胞の変化が生じる以前からウイルス感染の存在を確認可能で、感染細胞死の誘導およびその広がりを観察できるようになる。

E. 結論

SARS-CoV-2スパイクタンパク質を発現する組換えVSVを作成中である。尚、スパイクタンパク質全長にはC末にER retention signalが存在するため、細胞表面でエンベロープ（スパイク）を受け取るVSV粒子にスパイクタンパク質をより効率良く供給するために、ER retention signalを含む領域を欠失させたスパイクタンパク質を作成した。

この改善により、VSVを用いたSARS-CoV-2代理ウイルス感染系が確立され、様々なSARS-CoV-2変異株においても、抗ウイルス活性物質を含む可能性のある血液について安全性を検証できるようになると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

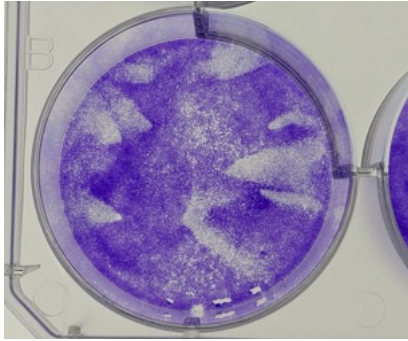


図1 .野生型VSV感染による
コメットサイン

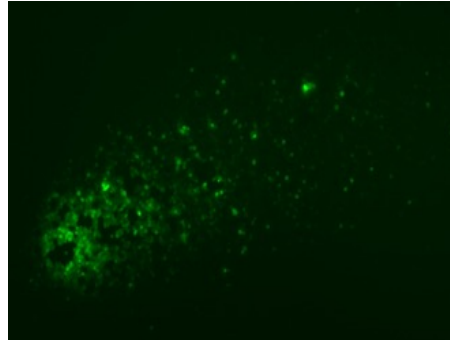


図2 .VSV-EGFP感染細胞に
おけるEGFP発現

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

新興・再興感染症の情報収集とリスクの評価,及び B 型肝炎ウイルス等培養が困難な
ウイルスの培養法の改良と不活化法の評価

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 客員准教授)
研究協力者 小林清子 (埼玉医科大学 医学部 講師)

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。先行研究によって樹立した HBV に対して感受性が高い細胞株を用いて令和 4～5 年度に HBV の培養法や感染評価法の開発と改良を行った。それを用いて 1. 液状加熱による HBV の不活化の評価、2. 市販されている抗 HBs 免疫グロブリン製剤による HBV 中和活性の測定、3. 界面活性剤 (S/D) 処理による HBV の不活化、等の評価を行った。感染性の評価は当初、HBs-DNA で判断していたが、非特異的な吸着があり HBs-RNA の定量がより優れていることが判明した。更にポリエチレングリコールの添加する時期等も検討し、より正確に不活化が評価できるように系を改良した。その結果、液状加熱や S/D 処理が HBV の不活化に有効であることを *in vitro* 実験系で明らかにすることができた。また、これまでの HBs 抗原と抗 HBs 抗体の結合によって中和活性を評価してきたが、本感染系を用いることで HBV の感染性を中和する活性を *in vitro* で評価できることも可能になった。

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てきた。また、将来的に上記肝炎ウイルスに加えパルボウイルス B 19 ウイルス等も不活化等を評価するた

めに高濃度の陽性血漿を必要量確保することは、倫理的に困難になると推定される。そこでは、ウイルス学的進歩によって実験的に培養が可能になった HBV や HCV 陽性血漿を用いて血漿分画製剤の製造工程で使用されているウイルス不活化法の不活化効果を明らかにすると共に、これらのウイルスを *in vitro* で容易に増殖できる培養法も目指した。

B. 研究方法

1. 細胞株の培養

細胞株#4-11 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、最終濃度 2% の DMSO を添加した 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 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ある。Genotype は、A と C であった。凍結融解を少なくするために少量ずつ分注し、全ての実験に使用した血漿は融解した回数は同じにした。分注した血漿は-80°C で凍結保存した。

3. 感染価の評価

DNA は QIAamp DNA mmini kit、RNA は RNeasy mini kit (DNase 処理) を用いて抽出し、Nuriyara (J. Clin Microbiol. 48:3843-51. 2010) の方法で HBs-RNA と HBs-DNA を核酸増幅法で定量した。陽性となった最大希釈倍率の逆数を感染価とした。

4. 界面活性剤 (S/D) 処理による HBV の不活化

5% アルブミン製剤で 10 倍希釈した HBV に最終濃度 1.0%、及び 0.3% となるように Tween80 と n-butylphosphate を添加し、添加直後、1 時間後、3 時間後に検体を採取した。直ちに段階希釈し、100 μL ずつ細胞に感染させた。感染 2 日目に細胞を PBS で 5 回洗浄し、2%DMSO と 4% ポリエチレングリコール (PEG:分子量 8000) を含む培養液で培養した。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養交換した。感染 14 日後に細胞を回収した。

5. 液状加熱による HBV の不活化

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 陽性血漿を添加した。検体を 2 分割し、1 つは 4 度で 10

時間反応させた。もう一方は 60°C で 3、6、10 時間の液状加熱を行なった。60°C 加熱検体は、PBS にて X 1 ~ X 10^{2.5} まで 10^{0.5} ずつ段階希釈し、100 μL ずつ細胞に添加した。また、4°C 処理した検体は PBS にて X 1 ~ X 10^{4.5} まで段階希釈し、100 μL ずつ細胞に添加した。感染後は S/D 処理と同様に培養し 14 日後に細胞を回収した。

6. 感染後の HBs-RNA 転写量の継時的測定

約 1000 感染価と 100 感染価に希釈した HBV 陽性血漿を細胞に感染は PBS を用いてウイルスを希釈して 100 μL ずつ細胞に感染させた。感染後は S/D 処理と同様に培養し、HBs-RNA 測定の場合は、2、4、7、11、14 日後に細胞を回収した。DNA では更に 18 日と 23 日間培養した。

C. 研究結果

1. 感染性の評価と培養法

当初、HBs-DNA 量を継時的に 3 週間測定し、増加した希釈倍率の逆数を感染価としたが、プロテオグリカンを介する非特異的な結合等があった。そこで感染 2 週目の HBs-RNA の有無で感染価を評価したが、感染の促進のために添加している PEG による HBV の吸着もあることから感染 2 日目までは 2%-DMSO のみで培養し、2 日目から 4%PEG を添加するように改良した。添加前に十分に洗浄することでバックを減少させることに成功した。また、HBs-RNA 量の推移を解析したところ、感染 2 日目の HBs-RNA 量を 1 とすると感染 4 日目から増加し、11 日前後でピークとなり。約 20~40 倍に増加した。増加率は添加した感染価による差は認められなかった。一方、HBs-DNA 量は感染初期には増加は認められず 23 日目頃になって増加が認められた。

2. 界面活性剤(S/D)処理によるHBVの不活化

3種類のHBV陽性血漿を用いて評価した。1時間の処理では感染性が検出されることもあったが、3時間後には全て検出限度以下にまで不活化された。また、HBVのモデルウイルスとして用いられてきた仮性狂犬病ウイルスも検討したが、1時間の処理では2Log程度の不活化出会ったが、3時間では検出感度以下になった。

3. 液状加熱によるHBVの不活化

4種類のHBV陽性血漿を用いて60°C-10時間の液状加熱による不活化の効果を2年間検討した。HBs-RNAの転写量の測定を用いて検討したところ60°C-10時間処理でもHBs-RNAが検出されたことから完全には不活化されないことが示唆された。しかし、感染後のHBs-RNA量の継時的推移のデータから10倍に希釈した検体を培養しても11日まで増加は認められなかった。少なくとも10倍希釈以上までは不活化されていると思われた。

4. 抗HBs免疫グロブリンの中和活性測定

高感受性細胞株を用いて各血漿の感染価の測定が可能となり、感染価を30~100に調整したHBVと種々の濃度に希釈した抗HBs免疫グロブリンと37°Cで1時間反応させ、感染の有無から中和活性の測定が可能となった。

D. 考察

遺伝子改変により親株よりもHBVに高感受性を示す細胞株を作成することができた。更にポリエチレングリコールの添加する時期や感染2日目に感染細胞を洗浄することで非特異的な吸着を抑制することができた。また、感染性評価の指標としてHBs-RNAの定量が有用であるこ

とが判明した。それを用いて液状加熱やS/D処理によるHBVの不活化の評価が可能になった。

液状加熱によるHBVの不活化では、60°C-10時間加熱によってもHBs-RNAは検出されたが、継時的な推移を測定したところ、HBs-RNAは感染後、減少するだけで増加は確認できなかった。そのためHBs-RNAが検出できたのは、感染していたのではなくウイルス粒子が細胞に接着しているだけの可能性がある。最近、HBV粒子の中にHBV-RNA(多種の長さがあるが)が存在することが知られるようになり、この研究で使用した血漿からもHBs-RNAが容易に検出できたことから裏付ける結果となった。更に感染効率を高めるために培養液に添加したPEGが非特異的な付着を促進している可能性がある。今年度から感染2日後まではPEG添加しないで培養し、十分洗浄後に添加する培養法に変更したのは適切であった。また、本感染系のHBs-DNAの継時的な推移を確認したところ、HBs-RNAは感染早期に急速に増加したが、DNAの増加は微量でしかも時間を要した。本研究を含めHBVの感染系では二次感染が生じ難いことが知られているが、今回、明らかになったHBV-DNAの合成が少ないことが反映していると考えられた。

パルボウイルスの培養系では、パルボウイルスDNAを合成する細胞株を得たが、感染拡大する細胞株は得られなかった。

E. 結論

この2年間で細胞の遺伝子改編と培養法の改良によって液状加熱と界面活性剤によるHBVの不活化法と抗HBs免疫グロブリンによる中和活性の測定が可能になった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- 1) 山麻衣子、玉栄建次、加藤由佳、鈴木雅之、内野富美子、山田攻、小原祥、天野博明、小林清子、岡田浩一、岡田義昭: カラム凝集法で検出感度以下であった不規則抗体による遅発性溶血性副反応の一例、第70回日本輸血・細胞治療学会総会、名古屋、2022.
 - 2) 岡田義昭、小林清子、野島清子: B型肝炎ウイルスのin vitro培養系を用いた血液製剤の不活化効果の評価と抗HBs免疫グロブリンの中和活性の測定 第70回日本輸血・細胞治療学会総会、名古屋、2022.
 - 3) 岡田義昭、渡土幸一、野島清子: In vitro感染系とB型肝炎ウイルス陽性血漿を用いた果と抗HBs免疫グロブリン製剤の中和活性の評価(第2報) 第70回日本ウイルス学会学術総会、仙台、2023.
- 著書

血漿分画製剤における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の評価 第69回日本ウイルス学会学術総会、長崎、2022.

4) 岡田義昭、小林清子、野島清子: B型肝炎ウイルスのin vitro培養系を用いた血液製剤の不活化効果の評価と抗HBs免疫グロブリンの中和活性の測定 第72回日本輸血・細胞治療学会総会、千葉、2023.

5) 岡田義昭、野島清子: B型肝炎ウイルスのIn vitro感染系を用いた血液製剤の不活化効

岡田義昭 血液製剤から見たプリオン、バムサジャーナル35(3) 144-151, 2023.

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リーサイエンス政策研究事業)

新興・再興感染症等の感染症から献血由来の血液製剤の安全性を確保するための研究

分担研究報告書

分担課題：血漿分画製剤における実ウイルスを用いたウイルス除去・不活化および安全性
の評価に関する研究

研究分担者 野島 清子 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 主任研究官
研究協力者 関 洋平 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 室長
研究協力者 水上 拓郎 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター センター長

研究要旨

グローバル化が進む現代においては国内ではほとんど発生例のないような感染症、特に海外での新興・再興感染症のアウトブレイクが国内に輸入されて問題となることが少なくない。海外で感染して帰国した場合であっても 4 週間の献血延期により献血血液の安全性が担保されるが、2020 年の新型コロナ感染症アウトブレイクや、2022 年の M 痘感染のように国内でヒト-ヒト感染が起きた場合、またはデング熱のようにヒト-蚊-ヒト感染が生じた場合は、4 週間の献血延期では無症候感染者が献血ドナーとなり得るため、ウイルス混入のリスクが残存する。献血血液に仮に病原体が混入した場合を想定し、特に血漿分画製剤の安全性を確保するために、血漿分画製剤の製造工程に含まれる、エタノール分画や加熱処理等の処理により、ウイルスがどの程度除去・不活化されるかは通常モデルウイルスを用いて評価されている。本研究では、モデルウイルスではなく M ポックスウイルスの実ウイルスを用いて除去・不活化について評価を行った。M ポックスウイルス病原性の強い、MPXV/Zr599 クレード 1a、MPXV_Liberia クレード 2a、MPXV_JPN2022_YK006 クレード 2b (2022 年に日本で分離された)、およびモデルウイルスであるワクシニアウイルス (LC16m8) を用い、PBS 下、およびウイルスを安定化しうる蛋白共存下 (アルブミン) において、60 度加熱による不活化処理による影響を評価した。その結果、PBS 条件下およびアルブミン共存下の両方において、60 度 10 分の加熱処理によりウイルスの感染性は検出限界以下となり、4log 以上の不活化効果が認められた。また、低 pH 処理へも感受性があり、4log 以上の不活化効果が認められた。仮にエムポックスウイルスが感染性を保ったまま分画用血漿に混入した場合であっても、製造工程の加熱処理や酸処理により十分に不活化され安全性が担保できることが示された。

A. 目的

グローバル化が進む現代においては国内ではほとんど発生例のないような感染症、特に海外での新興・再興感染症のアウトブレイクが国内に輸入されて問題となることが少なくない。海外で感染して帰国した場合であっても4週間の献血延期により献血血液の安全性が担保されるが、2020年の新型コロナウイルス感染症アウトブレイクや、2022年のM痘感染のように国内でヒト-ヒト感染が起きた場合、またはデング熱のようにヒト-蚊-ヒト感染が生じた場合は、海外渡航者の4週間の献血延期をしても無症候感染者が献血ドナーとなる可能性があり、ウイルス混入のリスクが残存する。献血血液に仮に病原体が混入した場合を想定し、特に血漿分画製剤の安全性を確保するために、血漿分画製剤の製造工程に含まれる、エタノール分画や加熱処理等の処理により、ウイルスがどの程度除去・不活化されるかは、通常モデルウイルスを用いて評価されている。エムポックスウイルスは、Lancet Infectious Diseases(2022年5月26日付)によると、2018-2021年に英国で発生した7症例の解析より皮膚病変より7例、血液から6例からウイルスDNAが検出されており、無症候感染者が献血ドナーとなった場合には献血血液へのウイルス混入のリスクが否定できない。またタイでは献血後にエムポックスを発症し、献血時の血液からMPXV DNAが検出された事例も報告され、幸い輸血感染症事例とはならなかったことが報告されている(Emerg Infect

Dis 2024; 30(3): 603-605)。そこで、本研究では、モデルウイルスではなく実ウイルスを用いて除去・不活化について評価を行うことを目的として、2022年に日本で分離されたエムポックスウイルス(MPXV_JPN2022_YK006)クレード2b、MPXV_Liberiaクレード2a、病原性の強いMPXV/Zr599クレード1aを、PBS下、およびウイルスを安定化しうる蛋白共存下(アルブミン)において、60度加熱による不活化処理による影響を評価した。また、3.3%酢酸処理に対する感受性について検討した。

B 研究方法

B-1 ウイルス

M痘ウイルス(MPXV)としては、MPXV/Zr599(クレード1a)、MPXV_Liberia(クレード2a)2022年の日本での第一例目の感染者より分離されたMPXV_JPN2022_YK006(クレード2b)、を国立感染症研究所ウイルス1部より譲渡を受け、バイオセーフティレベルBSL3実験室内でウイルスを増やし実験に用いた。モデルウイルスとしてはワクシニアウイルスLC16m8を国立感染症研究所ウイルス1部より譲渡を受け、バイオセーフティレベルBSL2実験室内でウイルスを増やし実験に用いた。

B-2 細胞培養およびウイルスストックの作製

感染前日に、ウサギ腎由来細胞株RK-13細胞を150cm²Tフラスコ1本当たり2x10⁷個細胞となるようにFBS10%を含むDMDM

(high glucose) に懸濁させて撒き、感染直前に培地を取り除き、FBS2%を含む DMDM 培地で細胞を一度洗浄した。ワクシニアウイルス LC16m8 およびエムポックスウイルス(3 株)をそれぞれ BSL3、BSL2 管理区域の実験室において、MOI=0.02~0.1 で感染させ、FBS2%を含む DMDM 培地中で 2~3 日培養した。半分以上の細胞に細胞変性効果 (CPE) が見られた段階で培養を停止し、細胞内で増えたウイルスを回収する目的で、培養フラスコをディープフリーザー (-80 度) 内で 1 日静置した。室温で融解後、細胞懸濁液を 500xg で 10 分遠心分離し、回収した上清をウイルス液として 500uL ずつ分注したものを -80 度で保管してウイルスストックとして実験に用いた。

B-3 感染価の測定 (プラークアッセイ法)

感染前日に 1×10^5 cells/mL/well となるように RK13 細胞を 24well 培養プレートに撒き、90%コンフルエントの状態に細胞を調整した。感染直前に培地を取り除く、新鮮な培地 2%FBS DMEM を 350uL ずつ各 well に添加し、予め 10 倍段階希釈した MPXV/ Zr599, MPXV_Liberia, MPXV_JPN2022_YK006, ワクシニアウイルス LC16m8 の各ウイルスを各 well に 50uL ずつ添加した。37°C 5%CO₂ のインキュベーターで 3~4 日間培養し、CPE が顕微鏡化で十分に確認できるようになったら各 well に 10%ホルマリン溶液を 1~2mL ずつ添加して 1 時間以上反応させてウイルスを不活化した。反応後のホルマリン液はホルマリン廃液として廃棄し、細胞を水で十分に洗浄後、クリスタ

ルバイオレットを各 well に 200uL ずつ添加して細胞を染色し CPE を可視化した。各 well 中の CPE 数を計測し、感染価 PFU/mL を算出した。

B-4 不活化処理および感染価の測定

新たに融解した MPXV/ Zr599, MPXV_Liberia, MPXV_JPN2022_YK006, ワクシニアウイルス LC16m8 のウイルスを PBS または 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ハイブリバックに入れて空気を十分に抜きシーリングして、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 分反応後に反応液を回収した。それぞれのウイルス液の力価をプラークアッセイ法により確認した。実験は独立して N=3 で実施した。

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。

酸処理は、3.3v/v%となるように酢酸を培地に添加し、ウイルスを 1:9 の割合で酸性培地にスパイクし、15 分処理した。処理後 1N NaOH を添加して pH を中性に戻した。酸処理済みウイルス溶液中のウイルス力価は、加熱処理溶液と同様に、プラークアッセイ法により確認した。

C.研究結果

各ウイルスを 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 5log 以上の不活化が認められ感染性が検出限界以下となり、30 分、60 分後においても感染性が認められなかった（検出限界は 20 PFU/mL）（図 1.2 参照，図 1 内点線は検出限界を示す）。また、PBS にスパイクしても蛋白濃度の高いアルブミン溶液にスパイクしてもウイルス力価に影響はなかった。

15 分の酸処理後中性に戻した **MPXV_JPN2022_YK006**、**MPXV/Zr599**、**MPXV/Liberia** 液のウイルス力価を測定した結果、いずれのウイルスも感染性が検出限界以下となり、5log 以上の不活化が認められた（図 3）。

D 考察

エンベロープを有するウイルスは加熱や酸処理に感受性があると言われている。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、エムポックスウイルス株 **MPXV/Zr599** クレード **1a**、**MPXV/Liberia** クレード **2b**、**MPXV_JPN2022_YK006** クレード **2b**、モデルウイルスであるワクシニアウイルス **LC16m8** はいずれの条件かでも、60°C加熱処理 10 分で検出限界以下となった。また酸処理でも同様に検出限界以下と

なり、クレードの違いによる病原性の強弱に関わらず、5log 以上の不活化効果が認められた。また同じくエンベロープを持つ SARS-COV-2 では同様の酸処理では 1log 程度の不活化効果しか認められないことから（未発表データ）エンベロープウイルスでも感受性の強弱に差があることがわかった。また、本研究とは別に、リアルタイム PCR による **MPXV** 核酸 DNA 定量系を立ち上げ、不活化と核酸残存の関連性についても評価したが、酸処理、加熱処理は核酸検出には影響なく、処理しても十分に核酸は回収されることが明らかとなった。本研究での不活化評価は、核酸検査のための不活化ウイルス由来参照品の作製にも貢献した。また、仮にエムポックスウイルスが感染性を保ったまま分画用血漿に混入した場合であっても、製造工程の加熱処理や酸処理により十分に不活化され安全性が担保できることが示された。

E 結論

いずれのクレードのエムポックスウイルスが分画用血漿に混入した場合であっても、製造工程の加熱処理や酸処理により十分に不活化され安全性が担保できることが実ウイルスを用いて示された。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

(ア) 論文発表

- 1) Miyamoto S, Kuroda Y, Kanno T, Ueno A, Shiwa-Sudo N, Iwata-Yoshikawa N, Sakai Y, Nagata N, Arashiro T, Ainai A, Moriyama S, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, Mizukami T, Hasegawa H, Ebihara H, Fukushi S, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T. Saturation time of exposure interval for cross-neutralization response to SARS-CoV-2: Implications for vaccine dose interval. *iScience*. 2023; 26: 106694.
- 2) Seki Y, Yoshihara Y, Nojima K, Momose H, Fukushi S, Moriyama S, Wagatsuma A, Numata N, Sasaki K, Kuzuoka T, Yato Y, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T, Mizukami T, Hamaguchi I. 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*. 2022; 3: 406-421.e4.
- 3) Miyamoto S, Arashiro T, Adachi Y, Moriyama S, Kinoshita H, Kanno T, Saito S, Katano H, Iida S, Ainai A, Kotaki R, Yamada S, Kuroda Y, Yamamoto T, Ishijima K, Park ES, Inoue Y, Kaku Y, Tobiume M, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa-Sudo N, Tokunaga K, Ozono S, Hemmi T, Ueno A, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, Mizukami T, Hasegawa H, Ebihara H, Maeda K, Fukushi S, Takahashi Y, Suzuki T. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. *Med*. 2022; 3: 249-261.
- 4) Reiko Shimbashi, Teiichiro Shiino, Akira Ainai, Saya Moriyama, Satoru Arai, Saeko Morino,

Sayaka Takanashi, Takeshi Arashiro, Motoi Suzuki, Yukimasa Matsuzawa, Kenichiro Kato, Mitsuru Hasegawa, Rie Koshida, Masami Kitaoka, Takafumi Ueno, Hidefumi Shimizu, Hiroyoshi Yuki, Tomoko Takeda, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Kashiya Takasugi, Shun Iida, Tomoe Shimada, Hirofumi Kato, Tsuguto Fujimoto, Naoko Iwata-Yoshikawa, Kaori Sano, Souichi Yamada, Yudai Kuroda, Kazu Okuma, Kiyoko Nojima, Noriyo Nagata, Shuetsu Fukushi, Ken Maeda, Yoshimasa Takahashi, Tadaki Suzuki, Makoto Ohnishi, Keiko Tanaka-Taya. Specific COVID-19 risk behaviors and the preventive effect of personal protective equipment among healthcare workers in Japan. *Glob Health Med*. 2023 Feb 28;5(1):5-14

(イ) 学会発表

- 1) 岡田義昭、小川清子、野島清子. B型肝炎ウイルスの *in vitro* 培養系を用いた血液製剤の不活化効果の評価と抗HBs免疫グロブリンの中和活性の測定(第2報) グロブリンの中和活性の測定(第2報), 日本輸血細胞治療学会 2023年5月
- 2) 関洋平, 野島清子, 百瀬暖佳, 福士秀悦, 森山彩野, 石井美枝子, 今井恵子, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 水上拓郎, 吉原愛雄, 濱口功 武漢型及びオミクロン対応型2価ワクチンブースター接種(4回目)によるSARS-CoV-2 オミクロン変異株に対する中和能及び安全性の評価.

70 回日本ウイルス学会学術集会
2023 年 9 月.

- 3) 水上拓郎, 野島清子, 関洋平, 百瀬暖佳, 福士秀悦, 森山彩野, 石井美枝子, 今井恵子, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 吉原愛雄, 濱口 功武漢型, BA.1 及び BA.4-5 対応型 SARS-CoV-2 mRNA ワクチン (コミナティ筋注) ブースター接種 (4 回目) による SARS-CoV-2 オミクロン変異株に対する有効性及び安全性に

関する研究第 27 回日本ワクチン学会・第 64 回日本臨床ウイルス学会合同学術集会

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

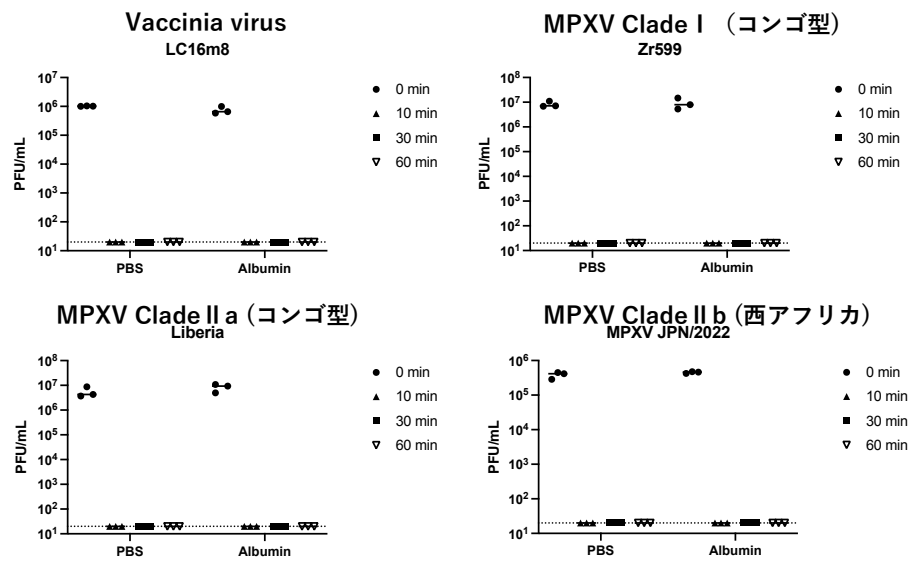


図 1 エムポックスウイルスの 60 度加熱処理による不活化

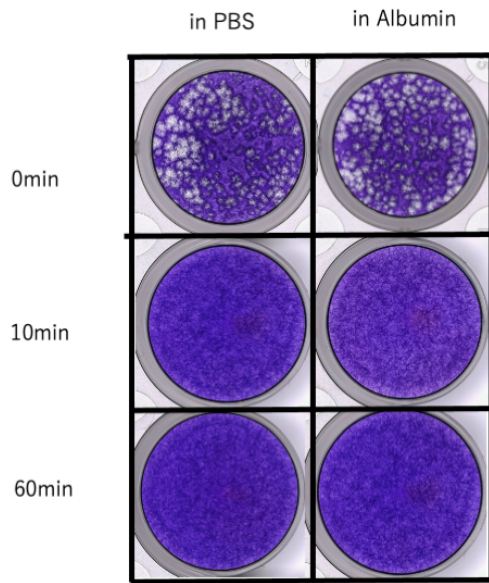


図 2 M 痘ウイルスの 60 度加熱処理による不活化 (プラークアッセイ)

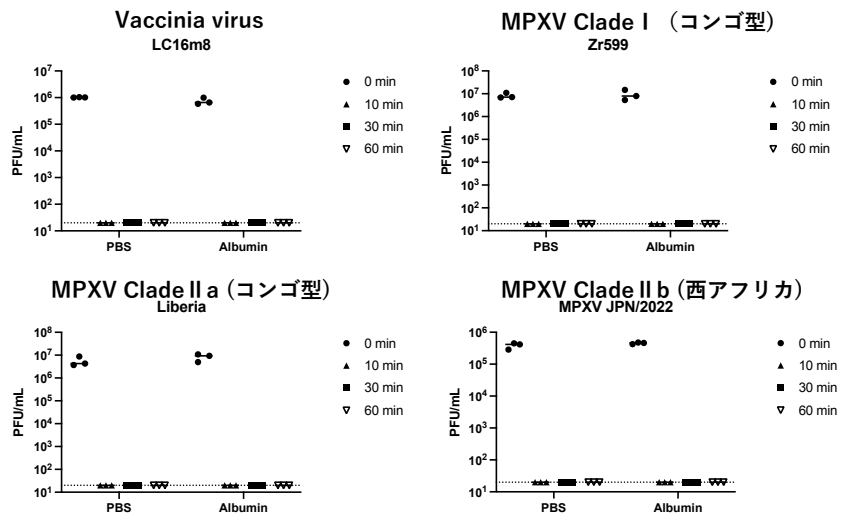


図 3 エムポックスウイルスの酸処理による不活化

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

新興・再興感染症等の感染症から献血由来の血液製剤の安全性を確保するための研究

2022年度～2023年 総合研究報告書

献血血液に影響する可能性のある人畜共通感染症等の
情報収集とリスク評価及びその検査法の開発

研究分担者 水上 拓郎 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター センター長
研究協力者 関 洋平 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 室長
研究協力者 野島 清子 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 主任研究官
研究協力者 櫻木 小百合 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 主任研究官

研究要旨：献血血液のスクリーニング法の改良・進歩や製造工程中の不活化処理等の技術進歩により、血液製剤による輸血後感染症は減少し、血液製剤の安全性は飛躍的に向上した。2019年末に発生した新型コロナウイルスの国内外でのパンデミックにより、新型コロナウイルスの献血血液への混入が懸念され、献血血液の安全性確保及びコロナ対策が課題となった一方で、デング熱やチクングニア熱等の流行地域において蚊媒介の感染症や他の新興・再興感染症の対策が疎かになっている可能性がある。また地球規模の気候変動と、コロナ終息による経済活動の再開と共にこれらの感染症がパンデミックとなり国内に持ち込まれる可能性も引き続き危惧される。また伴侶動物としてペットとの濃厚接触が生じており、人畜共通感染症が血液を介して感染するリスクも評価する必要がある。

そこで、本研究班ではWHOやCDC、各地域の感染症研究組織等や論文等から新興・再興感染症等の情報を集め、リスクを評価し、関係行政機関に情報提供を行うと共にリスクが高い感染症に対しては、市販されている検査法の評価を行うとともに、必要に応じ、血液から高感度に病原体遺伝子を検出できる方法を開発することを目的とした。

ProMED Mail等の情報に基づき、WHOのサイト、CDC、ECDC、各保健機関のサイトを適宜確認し、また論文報告されているものに関しては、内容を精査した。また国内感染症発生动向も注視し、国内で発生している感染症についても検討した。

その結果、SARS-CoV-2の感染拡大（第7波・第8波）の中で、様々な新興・再興感染症のアウトブレイクが確認された。デング熱の発生はバングラディッシュ、ペルー、台湾、チャドでもアウトブレイクが確認された。中でもエムボックスに関しては、体制整備が完全ではない可能性がある。そこで、エムボックスに関し、標準品・参照品を用いて国内で市販されている核酸検査法の評価を行い、必要に応じ、献血血液での検査法を確立することとした。その結果、現状で準備されている感染研法を用いることで10 copy/反応レベルで検出可能であることが示された。

A. 研究目的

献血血液のスクリーニング法の改良・進歩
や製造工程中の不活化処理等の技術進歩に

より、血液製剤による輸血後感染症は激減
し、血液製剤の安全性は飛躍的に向上した
といえる。2019年末に発生した新型コロナ

ウイルスの国内外でのパンデミックにより、新型コロナウイルスの献血血液への混入が懸念され献血血液の安全性確保が課題となったが、その一方でデング熱やチクングニア熱等の流行地域において新型コロナウイルス対策が優先されたことによって蚊媒介の感染症や他の新興・再興感染症の対策が疎かになっている可能性がある。また地球規模の気候変動とコロナ終息に伴う経済活動の再開により、これらの感染症が国内に持ち込まれ、パンデミックとなる可能性も引き続き危惧される。また伴侶動物としてペットとの濃厚接触が生じており、動物由来感染症が血液を介して感染するリスクも評価する必要があると考えられる。

そこで本研究班では WHO や CDC, 各地域の感染症研究組織等や論文等から新興・再興感染症等の情報を集め、リスクを評価し、関係行政機関に情報提供を行うと共にリスクが高い感染症に対しては、市販されている検査法の評価を行うとともに、必要に応じ、血液から高感度に病原体遺伝子を検出できる方法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

WHO や CDC, 各地域の感染症研究組織等や論文等から新興・再興感染症等の情報を集め、リスクを評価し、関係行政機関に情報提供を行うと共にリスクが高い感染症に対しては、市販されている検査法の評価を行うとともに、必要に応じ、血液から高感度に病原体遺伝子を検出できる方法を開発することを目的とした。

情報収集とリスクアセスメント

研究開始と同時に国内・国外で発生してい

る感染症に関し、ProMED Mail 等の情報に基づき、WHO のサイト、CDC, ECDC, 各保健機関のサイトを確認し、また論文報告されているものに関しては、内容を確認した。また、国内感染症発生動向も確認し、国内で発生している感染症についても検討した。

PCR 検査キットの性能調査

感染症安全対策体制整備事業において作製されたエムボックスウイルス 3 株 (JPN/2022_YK006, Liberia, Zr599)由来の不活化ウイルス国内参照品(核酸量既知)を用いて、国立感染症研究所「病原体検出マニュアル M 痘ウイルス」に従い primer 及び probe を準備し、スタンダード DNA を用いて real-time PCR による核酸検出法を立ち上げた。

参照品を用いて、国内で販売されている 5 つのエムボックス検出キットについて性能評価を実施した。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

2022 年度-2023 年度 海外の感染症動向

2022 年は原因不明の小児重症肝炎が 4 月以降発生した。5 月にイギリスでエムボックスが発生した。2022 年 9 月、ウガンダで Ebola ウイルスのアウトブレイクが発生した。また英国では 10 月以降、多数の H5N1 の高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) の発生を確認し、イギリスでの警戒レベルを 3 に引き上げた。人から人への感染は報告されていないが、哺乳類への感染に有利となる遺伝子変異が確認されている。2023 年には

ポーランドや韓国で猫に H5N1 の感染事例が報告され、餌に含まれていた H5N1 感染鳥の影響と考えられている。2024 年にはカンボジアやベトナムで HPAI H5N1 の人への感染・死亡例が報告されたが、ヒトヒト感染は生じていなかった。

2023 年 2 月に赤道ギニアでマールブルグ病が発生した。最終的に 17 例の感染、12 例の死亡が報告され、5 月末に終息したが、タンザニアなどのへの感染が拡大した。2023 年 8 月には北マケドニアでクリミアコンゴ出血熱の患者が発生し、医療従事者への感染も報告された。

デング熱に関しては世界的な流行が認められ、バングラディッシュ、ペルー、台湾、チャドでもアウトブレイクが確認された。特に、アメリカ大陸でもアウトブレイクが確認された。

9 月にはインドのケララ州でニパウイルスのアウトブレイクが確認され、感染確定した 6 名のうち、2 名が死亡した。最初の 1 例目の感染源は不明だが、残り 5 名は家族や医療従事者など、1 例目の接触者である。

2023 年度末より、中国で未知の病原体による未診断肺炎が流行した。同時期、米国でも小児の肺炎が流行した。また欧州では引き続き、麻疹のアウトブレイクが続いている。

2022 年度の国内動向

国内の発生動向では、SFTS の発生が 5 月 13 日に富山県で初めて確認され、当初の発生地域であった西日本から中日本、東日本地域へと拡大していることが明らかとなった。

2023 年 6 月に、2022 年初夏に茨城県内で亡くなられた方がオズウイルス感染による

ものだったことが報告された。日本国内では 2018 年にタカサゴキララマダニより分離されており、千葉県や岐阜県、三重県などの野生動物から抗 OZV 抗体が検出されていた。また、山口県の狩猟者の血清を用いた検査でも 24 名中 2 名の方が抗体を保有していたが、OZV 感染による死亡例は初めてであり、今後の注意が必要である。

5 月に名称変更したエムポックス (旧サル痘) に関しては、12 月に本邦初となる死亡例が発生したが、感染者数は減少傾向にある。

病原体ごとの情報収集結果とアセスメント エムポックス

2022 年 5 月以降、欧米を中心に発生し、WHO は 7 月 23 日に事務局長によりは緊急事態 (PHEIC) に該当すると宣言した。本邦でも 7 月に東京でエムポックス患者が初確認されて以後、月 1～2 例報告されていたが、9 月以降渡航歴のない事例が発生し、2023 年 1 月より関東近郊でエムポックス患者が急増し、最終的に 2024 年 5 月 17 日現在、日本国内では 246 例となっている。また、2023 年 12 月には初の死亡例が発生している。

世界的には 2023 年 12 月 22 日付の WHO の report では、171 例の死亡例を含む、92,783 例が 116 カ国から報告されている。2023 年 5 月に WHO は PHEIC を終了したが、アジアでの増加が報告され、2023 年 8 月ではタイにおいて大規模な流行が発生し、8 月 31 日時点で 316 例の感染者、1 例の死亡例が報告されている。主に 10 代が多いのも特徴である。

輸血に関するリスク評価

Mpox 感染者において血中 Mpox DNA の検出事例は多数報告されているが、ウイルス分離の報告なく、また現在までに輸血による感染事例の報告はない。欧米では Mpox の感染者が増加した時期のプール血漿を用いた検証がされ、米国 (4636 検体及び HIV 感染者 465 検体)、英国(10896 人で構成される 454 個の 24 人ミニプール)ともに、すべて陰性であり、無症候者による献血はなかったと考えられており (Transfusion. 2023; 63: 690-695, Transfusion. 2023; 63: 1797-1802.), 輸血による感染リスクは低いと考えられている。

日本においては、献血の際に過去 6 ヶ月以内の新規パートナーや男性同士の性交渉をされている方の献血をお断りしていることもあり、現状で無症候の方が献血されることは考えにくい。本邦でも 2022 年 7 月 29 日付 薬生発 0729 第 1 号でのエムボックス患者等からの採血制限の対策が公示されているが、現時点での対応としては問題ないと言える。

2024 年 3 月の Emerg Infect Dis 誌に、Mpox 発症前のドナー血液から MPXV DNA が検出され、ドナー由来の血小板製剤を輸血されたレシピエント (11 歳、女兒、デング感染治療中)からは輸血後 1 ヶ月間、MPXV DNA は検出されず、発症もしなかったという報告がされた (Emerg Infect Dis. 2024; 30: 603-605.)。診断した医師から Thai の保健当局に報告があり、そこから血液センターに連携され、赤血球製剤等の回収がなされ、4 人プールによる血小板輸血のみにとどまった事例といえる。

この報告からも、輸血による感染リスクは低いことが再度、確認されたが、無症候の

感染者から献血された場合、輸血される可能性があることが確認された。本邦においても、診断時に献血の有無を確認するなどし、必要に応じ日本赤十字社と連携が行えるのか、再確認する必要はあると考える。

Mpox PCR 検査キットの性能調査

感染症安全対策体制整備事業で作成された Mpox 参照品を用い、現行の核酸検査法の性能調査を行った。その結果、感染研法により、10 copies/assay 程度の感度で測定ができていたことがわかった。続いて、市販されているキットに関し、検証を行った。その結果、いずれのキットも感染研法と同等以上を有していることが明らかとなった。

D. 考察

2023 年度は SARS-CoV-2 に続いて、さまざまな感染症アウトブレイクが確認された。特にエムボックスは本分担研究課題として動物由来感染症であることを鑑みると、重要であり、またタイでの献血血液への混入事例からも、引き続き、注視が必要である。しかし、標準品の作成や検査法の確定により、国内発生時に対応できる状況ができつつあると言える。

リアルタイム PCR の検出感度について現状の感度でも大きな問題はなく、新たな Primer/Probe の構築を検討する必要性は低いと考えられる。より高感度な検出を行うためには、1 アッセイあたりにアプライできる核酸量を増やすことの方が重要であると考えられる。

E. 結論

2023 年度は SARS-CoV-2 が 5 類感染症に

移行した中で、様々な感染症が流行した。エムボックスに関し、情報分析を行い、輸血リスク評価を行い、エムボックスが輸血によって感染するリスクは極めて低いことが推測された。一方で、タイでの事例等からも無症候の感染者は確実にいるので、献血後に陽性診断された際に、献血の有無の確認と、厚生労働省や日本赤十字社と連携が可能なか、再確認する必要があると考えられた。

また、検出系に関しては臨床分離株等より作成された標準品を用い、検証を行い、検出感度、特異度に問題がないことが確認された。引き続き、臨床分離株等のゲノム情報を確認し、問題がないか注視する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Choi CW, Choi Y, Maryuningsih YS, Wibisono B, Kim JW, Ramondrana D, **Mizukami T**, Ochiai M, Samat AA, Mangorangca C, Thi DL, Van HP, Shim SB, Seong SK, Shin IS. Report for the Eighth Asian National Control Laboratory Network meeting in 2023: Self-sufficiency strategy of plasma-derived medicinal products and regulatory harmonisation. *Biologicals*. 2024; 85: 101754.
- 2) Miyamoto S, Kuroda Y, Kanno T, Ueno A, Shiwa-Sudo N, Iwata-Yoshikawa N, Sakai Y, Nagata N, Arashiro T, Ainai A, Moriyama S, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, **Mizukami T**, Hasegawa H, Ebihara H, Fukushi S, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T.S

aturation time of exposure interval for cross-neutralization response to SARS-CoV-2: Implications for vaccine dose interval. *iScience*. 26(5):106694

- 3) Specific COVID-19 risk behaviors and the preventive effect of personal protective equipment among healthcare workers in Japan. Shimbashi R, Shiino T, Ainai A, Moriyama S, Arai S, Morino S, Takanashi S, Arashiro T, Suzuki M, Matsuzawa Y, Kato K, Hasegawa M, Koshida R, Kitaoka M, Ueno T, Shimizu H, Yuki H, Takeda T, Nakamura-Uchiyama F, Takasugi K, Iida S, Shimada T, Kato H, Fujimoto T, Iwata-Yoshikawa N, Sano K, Yamada S, Kuroda Y, Okuma K, **Nojima K**, Nagata N, Fukushi S, Maeda K, Takahashi Y, Suzuki T, Ohnishi M, Tanaka-Taya K. *Glob Health Med*. 2023; 5: 5-14.
- 4) Zhuo SH, Noda N, Hioki K, Jin S, Hayashi T, Hiraga K, Momose H, Li WH, Zhao L, **Mizukami T**, Ishii KJ, Li YM, Uesugi M. Identification of a Self-Assembling Small-Molecule Cancer Vaccine Adjuvant with an Improved Toxicity Profile. *J Med Chem*. 2023; 66:13266-13279.
- 5) Matsuoka S, Facchini R, Luis TC, Carrelha J, Woll PS, **Mizukami T**, Wu B, Boukarabila H, Buono M, Norfo R, Arai F, Suda T, Mead AJ, Nerlov C, Jacobsen SEW. Loss of endothelial membrane KIT ligand affects systemic KIT ligand levels but not bone marrow hematopoietic stem cells. *Blood*. 2023

- Nov 9;142(19):1622-1632.
- 6) Sasaki E, Asanuma H, Momose H, Furuhata K, Mizukami T, Matsumura T, Takahashi Y, Hamaguchi I. Systemically inoculated adjuvants stimulate pDC-dependent IgA response in local site. ***Mucosal Immunol.*** 2023; S1933-0219 (23) 00018-1.
- 7) 平賀 孔, 関 洋平, 野島 清子, 吉原 愛雄, 水上拓郎. mRNA ワクチン等の次世代生物学的製剤の新規安全性評価法の開発. 細胞 (1346-7557)55 巻 11 号 Page930-934(2023.10)
- 8) Sasaki E, Furuhata K, Mizukami T, Hamaguchi I. An investigation and assessment of the muscle damage and inflammation at injection site of aluminum-adjuvanted vaccines in guinea pigs. ***J Toxicol Sci.*** 2022;47: 439-451.
- 9) Seki Y, Yoshihara Y, Nojima K, Momose H, Fukushi S, Moriyama S, Wagatsuma A, Numata N, Sasaki K, Kuzuoka T, Yato Y, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T, Mizukami T, Hamaguchi I. 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.*** 2022; 3: 406-421.e4.
- 10) Miyamoto S, Arashiro T, Adachi Y, Moriyama S, Kinoshita H, Kanno T, Saito S, Katano H, Iida S, Ainai A, Kotaki R, Yamada S, Kuroda Y, Yamamoto T, Ishijima K, Park ES, Inoue Y, Kaku Y, Tobiume M, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa-Sudo N, Tokunaga K, Ozono S, Hemmi T, Ueno A, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, Mizukami T, Hasegawa H, Ebihara H, Maeda K, Fukushi S, Takahashi Y, Suzuki T. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. ***Med.*** 2022; 3: 249-261.
- 11) Viviani L, Reid K, Gastineau T, Milne C, Smith D, Levis R, Lei D, van Ooij M, Gilbert PA, Vandeputte J, Xie J, Madhuri L, Shaid S, Kubiak V, Suri R, Mizukami T, Shirasaki Y, Li X, Zhou YY, Trapkova A, Goel S, Prakash J, Subagio AA, Suwarni E, Jung KJ, Sanyal G, Das P, Coppens E, Wright D, Peng Z, Northeved H, Jungbäck C, Kirpitchenok T, Del Pace L, Seo B, Poojary B, Ottoni A. Accelerating Global Deletion of the Abnormal Toxicity Test for vaccines and biologicals. Planning common next steps. A workshop Report. ***Biologicals.*** 2022; 78: 17-26.
2. 学会発表
1. 水上拓郎、抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンによる感染予防法の開発, 第 27 回 神経感染症学会 教育講演 2023 年 11 月 13-14 日
2. Poonam Grover, Megumi Murata, Maureen Kidiga, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Mayumi Morimoto, Takayoshi Natsume, Akihisa Kaneko, Yuiko Kubota, Jun-ichirou Yasunaga, Masao Matsuoka, Madoka Kuramitsu, Yohei Seki, Takuo Mizukami, Hirofumi Akari. Identification of natural remission of mother-to-child retroviral transmission. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting:

Retroviruses, May 22 - 27, 2023

3. 平賀 孔、手塚 健太、永田 幸、高 起良、中村 仁美、相良 康子、蕎麦田 理英子、佐竹 正博、谷生 道一、三浦 清徳、水上 拓郎、浜口 功、倉光 球. Digital PCR を用いた HTLV-1 プロウイルス欠失の簡易検出法の開発. 第 9 回日本 HTLV-1 学会, 2023 年 11 月 10-12 日 京都
4. 水上 拓郎, 野島 清子, 関 洋平, 百瀬 暖佳, 福士 秀悦, 森山 彩野, 石井 美枝, 今井 恵子, 高橋 宜聖, 前田 健, 鈴木 忠樹, 吉原 愛雄, 濱口 功. 武漢型、BA.1 及び BA.4-5 対応型 SARS-CoV-2 mRNA ワクチンブースター接種によるオミクロン変異株に対する有効性及び安全性に関する研究. 日本ワクチン学会, 2023 年 10 月 21 日-22 日 静岡
5. 関 洋平, 野島 清子, 百瀬 暖佳, 福士 秀悦, 森山 彩野, 石井 美枝子, 今井 恵子, 高橋 宜聖, 前田 健, 鈴木 忠樹, 水上 拓郎, 吉原 愛雄, 濱口 功. 武漢型及びオミクロン対応型 2 価ワクチンブースター接種(4 回目)による SARS-CoV-2 オミクロン変異株に対する中和能及び安全性の評価. 第 70 回 日本ウイルス学会, 2023 年 9 月 26 日-28 日、宮城県仙台市
6. 水上 拓郎, 野島清子, 関洋平, 石井美枝子, 今井恵子, 森内浩幸, 内丸薫, 明里宏文, 蕎麦田理英子, 佐竹正博, 浜口功. ヒト化マウスを用いた HTLV-1 母子感染モデルにおける感染クローン解析, 第 8 回日本 HTLV-1 学会 2022 年 11 月 4 日
7. 関洋平, 水上拓郎, 平舘裕希, 永田幸, 手塚健太, 野島清子, 村田めぐみ, 兼子明久, 森本 真弓, 長谷川ゆり, 淵直樹, 三浦清徳, 明里宏文, 浜口功. STLV-1 自然感染ニホンザルモデルを用いた水平感染に寄与する HTLV-1 の新たな標的細胞の同定, 第 8 回日本 HTLV-1 学会 2022 年 11 月 4 日
8. Maureen Kidiga, Megumi Murata, Poonam Grover, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Ayaka Washizaki, Yohei Seki, Mayumi Morimoto, Yakayoshi Natsume, Akihisa Kaneko, Madoka Kuramitsu, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka, Takuo Mizukami, Hirofumi Akari. Occult STLV-1 infection: persistent STLV-1 infection without seroconversion. 第 8 回日本 HTLV-1 学会 2022 年 11 月 4 日
9. Poonam Grover, Megumi Murata, Maureen Kidiga, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Ayaka Washizaki, Mayumi Morimoto, Takayoshi Natsume, Akihisa Kaneko, Kubota Yuiko, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka, Madoka Kuramitsu, Yohei Seki, Takuo Mizukami, Hirofumi Akari. STLV-1 remission in infants of Japanese macaques: New insight into mechanism of retroviral MTCT. 第 8 回日本 HTLV-1 学会 2022 年 11 月 4 日
10. Maureen Inyangu Kidiga, Megumi Murata, Poonam Grover, Ayaka Washizaki, Yohei Seki, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Mayumi Morimoto, Takayoshi Natsume, Akihisa Kaneko, Madoka Kuramitsu, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka, Takuo Mizukami, Hirofumi Akari. Occult STLV-1 infection: persistent de novo STLV-1 infection without seroconversion. 第 69 回

- 日本ウイルス学会, 11月14日, 長崎
11. Poonam Grover, Megumi Murata, Maureen Kidiga, Hiroataka Ode, Yasumasa Iwatani, Ayaka Washizaki, Mayumi Morimoto, Takayoshi Natsume, Akihisa Kaneko, Yuiko Kubota, Jun-ichirou Yasunaga, Masao Matsuoka, Madoka Kuramitsu, Yohei Seki, Takuo Mizukami, Hirofumi Akari. STLV-1 remission in infants of Japanese macaques: New insight into mechanism of delta retroviruses transmission. 第69回日本ウイルス学会, 11月14日, 長崎
 12. 関洋平, 野島清子, 百瀬暖佳, 福士秀悦, 森山彩野, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 水上拓郎, 吉原愛雄, 濱口功. SARS-CoV-2 mRNA ワクチン(コミナティ筋注)ブースター接種による SARS-CoV-2 オミクロン変異株に対する中和能及び安全性の評価, 第69回日本ウイルス学会, 11月14日, 長崎
なし。
 13. 水上拓郎, 野島清子, 関洋平, 百瀬暖佳, 福士秀悦, 森山彩野, 石井美枝子, 今井恵子, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 吉原愛雄, 濱口功. SARS-CoV-2 mRNA ワクチン(コミナティ筋注)ブースター接種による SARS-CoV-2 オミクロン変異株に対する中和能及び安全性に関する研究. 第29回日本ワクチン学会学術集会, 11月26日, 香川
 14. 水上拓郎 ワクチン・アジュバントの次世代安全性評価法の開発. 第1回近未来ワクチンフォーラム. 2023年1月17日
大阪

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。

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
なし							

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
Sasaki E, Furuhata K, Mizukami T, Hamaguchi I.	An investigation and assessment of the muscle damage and inflammation at injection site of aluminum-adjuvanted vaccines in guinea pigs.	J Toxicol Sci.	47	439-451	2022
Seki Y, Yoshihara Y, Nojima K, Momose H, Fukushi S, Moriyama S, Wagatsuma A, Numata N, Sasaki K, Kuzuoka T, Yato Y, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T, Mizukami T, Hamaguchi I.	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.	3	406-421	2022

Miyamoto S, Arashiro T, Adachi Y, Moriyama S, Kinoshita H, Kanno T, Saito S, Katano H, Iida S, Ainai A, Kotaki R, Yamada S, Kuroda Y, Yamamoto T, Ishijima K, Park ES, Inoue Y, Kaku Y, Tobiume M, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa-Sudo N, Tokunaga K, Ozono S, Hemmi T, Ueno A, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, Mizukami T, Hasegawa H, Ebihara H, Maeda K, Fukushi S, Takahashi Y, Suzuki T.	Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants.	Med.	3	249-261	2022
Viviani L, Reid K, Gastineau T, Milne C, Smith D, Levis R, Lei D, van Ooij M, Gilbert PA, Vandeputte J, Xie J, Madhuri L, Shaid S, Kubiak V, Suri R, Mizukami T, Shirasaki Y, Li X, Zhou YY, Trapkova A, Goel S, Prakash J, Subagio A, Suwarni E, Jung K J, Sanyal G, Das P, Coppens E, Wright D, Peng Z, Northeved H, Jungbäck C, Kirpitchenok T, Del Pace L, Seo B, Poojary B, Ottoni A.	Accelerating Global Deletion of the Abnormal Toxicity Test for vaccines and biologicals. Planning common next steps. A workshop Report.	Biologicals.	78	17-26	2022
Choi CW, Choi Y, Maryuningsih YS, Wibisono B, Kim JW, Ramondrana D, Mizukami T, Ochiai M, Samat AA, Mangorangca C, Thi DL, Van HP,	Report for the Eighth Asian National Control Laboratory Network meeting in 2023:	Biologicals.	85	101754	2024

Miyamoto S, Kuroda Y, Kanno T, Ueno A, Shiwa-Sudo N, Iwata-Yoshikawa N, Sakai Y, Nagata N, Arashiro T, Ainai A, Moriyama S, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, Mizukami T, Hasegawa H, Ebihara H, Fukushi S, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T	Saturation time of exposure interval for or cross-neutralization response to SARS-CoV-2: Implications for vaccine dose interval.	iScience.	26(5)	106694	
Shimbashi R, Shiino T, Ainai A, Moriyama S, Arai S, Morino S, Takanashi S, Arashiro T, Suzuki M, Matsuzawa Y, Kato K, Hasegawa M, Koshida R.	Specific COVID-19 risk behaviors and the preventive effect of personal protective equipment among healthcare workers	Glob Health Med.	5	5-14	2023
Zhuo SH, Noda N, Hioki K, Jin S, Hayashi T, Hiraga K, Momose H, Li WH, Zhao L, Mizukami T, Ishii KJ, Li YM, Uesugi M.	Identification of a Self-Assembling Small-Molecule Cancer Vaccine Adjuvant with an Improved Toxicity Profile.	J Med Chem.	66	13266-13279	2023
Matsuoka S, Facchini R, Luis TC, Carrelha J, Woll PS, Mizukami T, Wu B, Boukarabila H, Buono M, Norfo R, Arai F, Suda T, Mead AJ, Nerlov C, Jacobsen SEW.	Loss of endothelial membrane KIT ligand affects systemic KIT ligand levels but not bone marrow hematopoietic stem cells.	Blood.	142(19)	1622-1632	2023
Sasaki E, Asanuma H, Momose H, Furuhashi K, Mizukami T, Matsumura T, Takahashi Y, Hamaguchi I.	Systemically inoculated adjuvants stimulate pDC-dependent IgA response in local site.	Mucosal Immunol.	S1933-0219 (2023)	00018-1	2023

平賀 孔, 関 洋平, 野 島 清子, 吉原 愛雄, 水上拓郎.	mRNAワクチン等細胞 の次世代生物学的 製剤の新規安全性 評価法の開発		55巻	930-934	2023