

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

2. 研究課題名 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 次世代生物学的製剤センター・センター長

(氏名・フリガナ) 水上 拓郎 (ミズカミ タクオ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 感染病理部・室長
- (氏名・フリガナ) 相内 章 (アイナイ アキラ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☒	☐	☐		☒ (審査・修正中)
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 第三室長
(氏名・フリガナ) 堀場 千尋 (ホリバ カズヒロ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☒ ☐	☒	国立国際医療研究センター	☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ ☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ ☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐ ☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆宇

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) ウイルス第一部・室長
- (氏名・フリガナ) 林 昌宏・イム チャンガン

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☒	☐	☒	国立感染症研究所	☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☐	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆字

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業

2. 研究課題名 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 昆虫医科学部・主任研究官

(氏名・フリガナ) 小林大介・コバヤシダイスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立感染症研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 脇田 隆子

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 獣医科学部 研究員
- (氏名・フリガナ) 黒田 雄大 (クロダ ユウダイ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

厚生労働大臣 殿

機関名 埼玉医科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 竹内 勤

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス政策研究事業
2. 研究課題名 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 医学部 ・ 客員准教授
(氏名・フリガナ) 岡田 義昭 ・ オカダ ヨシアキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☒	☐	☒	埼玉医科大学	☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	☐	☒	☐		☐

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

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

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

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

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・再興感染症流行時の血液製剤の
安全性確保のための研究
(24KC1003)

令和6年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 水 上 拓 郎

(国立感染症研究所)

令和7年（2025） 5月

目 次

I. 総括研究報告

- 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究-----01
水上拓郎

II. 分担研究報告

1. 新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究-----11
水上 拓郎
2. B型肝炎ウイルスやパルボウイルス B19 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-----18
岡田 義昭
3. 中和抗体価測定系の改良と検証
(Mpox ウイルスに対する血清中和抗体価測定系の改良と検証) -----22
相内 章
4. 次世代シーケンス技術による血液中の病原体検出法の開発-----28
堀場千尋
5. 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
林昌宏 -----30
6. 蚊のウイルス保有実態と蚊媒介性ウイルスの感染・流行リスク解析-----33
小林大介
7. 動物におけるインフルエンザウイルスの簡易検査方法の確立-----37
黒田雄大

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----43

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

総括研究報告書

新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究

研究代表者 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
研究分担者 岡田 義昭 埼玉医科大学 医学部 客員准教授
研究分担者 相内 章 国立感染症研究所 感染病理部 室長
研究分担者 堀場 千尋 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長
研究分担者 林 昌宏 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長
研究分担者 小林 大介 国立感染症研究所 昆虫医科学部 主任研究官
研究分担者 黒田 雄大 国立感染症研究所 獣医科学部 研究員

研究要旨:

血液製剤における HIV, HCV, HBV 等の既知のウイルス安全性に関しては、日本赤十字社による献血血液における高感度な抗体・抗原検査、個別核酸増幅検査の導入や血漿分画メーカーにおける製造工程中における病原体の除去・不活化処理の導入により、感染リスクが低下し、高い安全性が確保されている。しかし血液製剤はヒトの血液を原材料としているため、未知の病原体の混入リスクがあり、また新興・再興感染症に関しては無症候ドナーからの献血・輸血により感染する可能性があるため、献血血液の安全性を確保するためには、情報収集・リスク分析・新規病原体検出法開発・血中動態解析・製造工程中での不活化評価に基づくリスク評価を迅速に行える体制の構築が必要である。

そこで本研究課題では、国立健康危機管理研究機構(JIHS) 国立感染症研究所(NIID)と日本赤十字社で協力体制を構築し、定期的な情報収集・リスク評価体制を構築し、2024 年度の情報に基づき、分析・リスク評価を行った。また献血血液における次世代シーケンス解析技術を用いた病原体検出法を開発する目的で、NGS の血液中の病原体検出法の確立のため、標準作業手順書、解析プログラムを整備し、NGS 解析の運用基盤の構築を進めた。また Mpox をモデルに血液中の中和抗体価測定系の改良と評価を行う目的で、より簡便で多検体の測定を可能とする感染細胞で形成されるフォーカスを標識抗体で検出するフォーカス減少法を用いた中和抗体価測定系を検討し、現時点において至適な測定系を構築した。血中動態・血液製剤の製造工程中での不活化評価による迅速リスク評価法をモデルウイルスを用いて立ち上げた。新興・再興感染症対策として哺乳類における動物由来感染症発生状況を明らかにするために、野生動物血清を用いた抗体スクリーニング法および HA 亜型の診断系を確立した。また HPAIV の主要なサブタイプである H5 および H7 亜型に着目し、HA 蛋白のみを外装させた VSV シュードウイルスの作製にも成功した。蚊等媒介性ウイルスの検査系の開発に関連し、デングウイルスの遺伝子診断系におけるプライマー・プローブセットを見直し関係機関と共有した。また南西諸島において、ウイルス媒介昆虫類の捕集を実施するとともに蚊由来培養細胞におけるウイルスの増殖動態を調査し、フコカウイルスの感染・増殖性が確認された。また HBV 陽性血漿の複数回凍結融解や保存温度が感染性に与える影響を解析し、極めて安定性が高いウイルスであることを明らかにした。

A. 研究目的

血液製剤における HIV, HCV, HBV 等の既知のウイルス安全性に関しては、日本赤十字社による献血血液における高感度な抗体・抗原検査、個別核酸増幅検査の導入や血漿分画メーカーにおける製造工程中における病原体の除去・不活化処理の導入により、感染リスクが低下し、高い安全性が確保されている。しかし血液製剤はヒトの血液を原材料としているため、未知の病原体の混入リスクがあり、また新興・再興感染症に関しては無症候ドナーからの献血・輸血により感染する可能性があるため、献血血液の安全性を確保するためには、情報収集・リスク分析・新規病原体検出法開発・血中動態解析・製造工程中での不活化評価に基づくリスク評価を迅速に行える体制の構築が必要である。

そこで本研究課題では、国立健康危機管理研究機構(JIHS) 国立感染症研究所(NIID)と日本赤十字社で協力体制を構築し、①定期的な情報収集・リスク評価体制を構築するとともに、②献血血液における次世代シーケンズ解析技術を用いた病原体検出法を開発する。また Mpox をモデルに③血液中の中和抗体価測定系の改良と評価を行うとともに、④血中動態・血液製剤の製造工程中での不活化評価による迅速リスク評価法を確立する。さらに、新興・再興感染症対策として⑤哺乳類における動物由来感染症発生状況や⑥蚊等媒介性ウイルスの検査系の開発及び⑦発生状況を調査する体制を構築する。また⑧HBV 等の培養が困難なウイルスの高感度 *in vitro* 不活化評価系の開発を行い、新興・再興感染症対策基盤を強化する。

B. 研究方法と結果

1. 情報収集・リスク評価体制構築及び新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

情報収集とリスク分析に関し 2024 年度は国内・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動向も注視し、国内で発生している感染症についても検討した。2024 年度は SARS-CoV-2 の5類移行に伴い、人流の流れが再開し、様々な新興・再興感染症のアウトブレイクが世界で確認された。Mpox の Clade 1b のアフリカ地域以外の欧州・アジアにおける輸入症例の増加に加え、デング熱の感染者数の増加、米国における乳牛の H5N1 感染事例の増加、麻疹の拡大、ブラジルにおけるオロプーシェ熱のアウトブレイクが確認された。特に、オロプーシェウイルスは垂直感染を示唆する論文報告に加え、米国・欧州への輸入症例もあり、FDA も注意情報を喚起し、米国輸血細胞治療学会 (AABB) も FACT SHEET を更新し、注視している。

血中動態に基づく迅速リスク評価法の開発に関しては、モデルウイルスとしてワクチニアウイルス(LC16m8 株)を用い、定量的評価のためのリアルタイム PCR を用いた核酸検査法の確立及びウイルス力価測定法を確立し、日本赤十字社より供与された全血を用いて予備実験を2回実施し、得られたデータの解析を進めている。

2. B 型肝炎ウイルスやパルボウイルス B19 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

先行研究で高感度に B 型肝炎ウイルス(以下 HBV)の感染性を評価できる系を作成したので

これを用いて下記の研究を行った。

1. 研究に用いる HBV 陽性血漿は、採血から実験に使用するまで少なくとも3回以上の凍結・融解が行われるのでその影響を解析した。少なくとも 5 回まで感染性への影響は認められなかった。不活化等に用いる陽性血漿の管理に有用な情報が得られた。

2. HBV は安定性が高いウイルスと言われているが、確認されているとは言い難い。血漿、5% アルブミン、PBS にそれぞれ添加した HBV は 4℃で少なくとも 4 週間の保管では感染性に影響はないことが確認できた。これは赤血球製剤に混入した場合、保管期間に失活することなく感染性を保持することが示唆された。

3. 中和抗体価測定系の改良と検証(Mpox ウイルスに対する血清中和抗体価測定系の改良と検証)

エムポックスに関しては、リアルタイム PCR による検査系は構築されているが、抗体検査は候補となる抗原が多種類存在することが影響し、標的とする抗原が明確に決まっていない。このような状況においては、機能的な抗体、つまりウイルス感染を阻害する中和抗体応答の評価が最適であると考えられる。古典的にはプラーク減少法を用いた中和抗体価測定が行われてきたが、作業が煩雑かつ血清希釈が限られてしまい、一回の測定で中和抗体価を確定できない場合があり、多検体の測定に応用できないという問題があった。本研究課題では、より簡便で多検体の測定を可能とする感染細胞で形成されるフォーカスを標識抗体で検出するフォーカス減少法を用いた中和抗体価測定系を検討し、現時点において至適な測定系を構築することに成功した。

4. 次世代シーケンス技術による血液中の病原体検出法の開発

本研究は、次世代シーケンス(NGS)を用いた献血血液中の病原体検出法の確立を目的とし、非感染血液からの標準データ取得と解析パイプラインの開発、感染血液を用いた検証と改良を行う。実験室内操作である WET とデータ解析である DRY 両面からの最適化を図り、信頼性の高い血液用メタゲノム解析法の確立を目指す。NGS の血液中の病原体検出法の確立のため、標準作業手順書、解析プログラムを整備し、NGS 解析の運用基盤の構築を進めた。

5. 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

近年の交通網の発達と人的・物的交流の活性化により節足動物媒介性ウイルス(アルボウイルス)感染症の流行域が急速に拡大し、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。2024 年は特にデング熱が世界的に流行していることが示され、国内でのデング熱輸入症例も 200 症例を超えた。また中南米においてオロブーシェ熱が再興し、ブラジルを中心に多くの患者が報告された。さらにデングウイルスの遺伝子診断系におけるプライマー・プローブセットを見直し関係機関と共有した。

6. 蚊のウイルス保有実態と蚊媒介性ウイルスの感染・流行リスク解析

本邦には、土着している可能性がありながら、詳しい生態が未解明な昆虫媒介性ウイルスが数多く存在し、そのなかには感染したヒトでウイルス血症を引き起こすもの、またはその可能性が高いものが複数存在している。本研究では、このようなウイルスに着目し、これらウイルスの

感染リスクならびにその流行実態を明らかにするにすることで、血液製剤の安全性確保に資する知見を得ることを目的とした。今年度は南西諸島において、ウイルス媒介昆虫類の捕集を実施し、蚊やヌカカ、サシチョウバエなど多種多様な吸血昆虫類が吸血のため牛舎に飛来していることが明らかとなった。また、フクオカウイルスを媒介する蚊種を特定するべく、複数種類の蚊由来培養細胞におけるウイルスの増殖動態を調査した。その結果、フクオカウイルスは実験に供試した 4 属 5 種の蚊に由来する 8 種類の培養細胞の全てにおいて、ウイルスの感染・増殖性が確認された。

7. 動物におけるインフルエンザウイルスの簡易検査方法の確立

近年、世界的に高病原性鳥インフルエンザウイルス (Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, HPAIV) の流行が拡大する中、その国内への浸潤状況およびヒトへの感染リスクを評価する必要性が高まっている。特に、感染野鳥との接触機会が多い野生動物における抗体疫学調査は、ウイルス浸潤の指標として有用である可能性がある。本研究では、野生動物血清を用いた抗体スクリーニング法および HA 亜型の診断系の確立を試みた。その結果、IDEXX 社製の汎 A 型インフルエンザウイルス抗体検出 ELISA キットを用いることで、アライグマ血清から IAV に対する抗体を検出することに成功した。また、HPAIV の主要なサブタイプである H5 および H7 亜型に着目し、HA 蛋白のみを外殻させた VSV シュードウイルスの作製にも成功した。今後は、調査対象地域の拡大および陽性検体の HA 亜型同定を進めることで、国内における HPAIV の浸潤状況の可視化と、それに基づく公衆衛生リスクの評価ならびに血液製剤の安

全性評価に資することが期待される。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 考察

1. 情報収集・リスク評価体制構築及び新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

2024 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。特に、海外でのデングやジカ熱の発生状況は、輸血による感染リスクがあるので、懸念されるところである。また、インフルエンザ対策等を鑑みると、本研究分担で進められている動物での実態調査を行い、適宜リスク評価することが望ましいと考えられる。またオロプーシェウイルスのような新興のウイルスも注視が必要である。

2. B 型肝炎ウイルスやパルボウイルス B19 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

HBV は 4℃ において溶媒に依らず長期間感染性を維持していることが明らかになった。核酸増幅検査で感度以下の極微量な HBV の混入した赤血球製剤 (4℃ 保存) によって感染した症例が報告されているが、それを裏付ける結果となった。また、-80℃ のフリーザーが故障しても 4℃ の冷蔵庫で保存すれば 1 ヶ月は対応できることも示された。HBV 陽性血漿は、採血から我々に供給されるまでに少なくとも 2 回の凍結融解を経ている。凍結融解による感染性の影響を解析することは、血液製剤の不活化等の評価をする上で重要である。今回の研究によって少なくとも 5 回の凍結融解は感染性に影響がないことが証明できた。これは、感染実験に使用する陽性血漿の管理に有用な知見となる。また、HBV の輸血用血液製剤による感染を防

止する上でHBVの保管温度による感染性への影響を明らかにすることも重要である。これまでいくつか報告があるが、チンパンジーへの接種による感染の有無で評価されており、十分な検討等は言い難い。今回の評価でアルブミンだけでなくPBSにおいても4℃では4週間以上感染性が低下しないことが明らかとなった。HBVが極めて安定化したウイルスであることを明らかにできた。これは、核酸増幅検査の感度以下の極少量のHBVでも4℃保存の赤血球液であれば製剤の有効期間内で感染性を保持できることを示している。また、高濃度のウイルスを含有するHBV陽性血漿は大変貴重であるが、フリーザー等の故障で低温保存できない場合においても通常の冷蔵庫で数週間の保存が可能であることも示唆され、研究者にとっては、貴重な情報となると考えられた。

3. 中和抗体価測定系の改良と検証(Mpoxウイルスに対する血清中和抗体価測定系の改良と検証)

FRNTに使用する細胞の検討と血清-ウイルス混合液を細胞に添加してからの培養時間を検討することで、1回のアッセイで中和抗体価の値をつけることが可能になった。LC16m8に関しては、血清濃度の高いところではフォーカスが完全に消失し、血清の希釈に伴いフォーカスが増現するために明瞭に中和抗体価を算出することが可能であった。これに対し、MPXVに関しては血清濃度が高くてもフォーカスが消失することではなく、血清の希釈に伴いなだらかにフォーカスが増加する傾向が認められた。これは、MPXVには主にEEV(Extracellular Enveloped Virus)とIMV(Intracellular Mature Virus)のウイルス形態が存在するためか、大小のサイズの異なるフォーカスが増現することが

原因であると考えられた。MPXVの表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いてフォーカスを検出することで改善する可能性もあり、系の改良は引き続き必要である。

4. 次世代シーケンス技術による血液中の病原体検出法の開発

NGSを用いた血液からの細菌検出法では血液培養法で培養される細菌を検出できない場合があることが示唆された。Multiplex PCRでも検出されなかったため、NGSの感度による検出限界未満の細菌量であったことも考えられたが、データ解析上の検出不良であるかを今後検証する必要がある。また、原因とする細菌以外の微生物ゲノム検出が、原因菌をマスクする可能性があり、その対策として実験室内で設定したネガティブコントロールからのコンタミネーション減算法が開発された。今後、このプログラムが病原体検出に有用であるか検証が必要であると考ええる。

5. 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

本研究においては、遺伝子検査に必要な陽性対照を提供することで、正確な検査結果が得られるようになった。よって献血血液の安全対策における感染症安全対策体制整備事業に対するデングウイルスおよびジカウイルス、チクングニアウイルス各RNAの参照品の整備はアルボウイルス感染症の実験室診断の向上およびアップデートに資するものである。

オロプーシェ熱の主な症状は、発熱、悪寒、激しい頭痛/眼窩後部痛、倦怠感、筋肉痛、関節痛、吐き気、嘔吐、羞明等を最大7日間伴い、稀に風疹様の発疹、髄膜炎、脳炎、めまい、食欲不振、その他の全身症状を呈す。その症状

からデング熱の重要な鑑別疾患である。患者の6割が寛解後に症状を再発することがある。イタリアにおけるキューバからの輸入症例では、血液、血清、尿および精液からオロプーシェウイルスが分離されているが、これまでのところ性行為による感染は確認されていない。献血血からのオロプーシェウイルスの検出例は報告されていないが、今後もその動向を注視する必要がある。

6. 蚊のウイルス保有実態と蚊媒介性ウイルスの感染・流行リスク解析

本研究では、我が国に常在するもしくはその可能性がありながらも、流行状態が詳しく判明していない蚊媒介性ウイルスの実態を明らかにするとともに、実験室内におけるウイルスの感染実験を行うことによって、それらウイルスの感染リスクを明らかにすることを目的としている。今年度は、野外における吸血性節足動物の採集調査ならびに、実験室において様々な蚊由来培養細胞を用いて、ウイルスの増殖動態解析を実施した。

我が国に土着している可能性がある蚊媒介ウイルスのなかで、ヒトでウイルス血症を引き起こしかつ病原性が報告されているウイルスはバタイウイルス[Batai virus (BATV)]のみである。国内ではBATVのヒト症例は未だ報告されていないものの、1994年および2001年にそれぞれ宮古島と与那国島のウシの血液からBATVが分離されている。この事例が示すように、南西諸島では何らかの蚊が現地のウシにBATVを媒介したと考えられるが、当該地域におけるBATV媒介蚊やその後の流行状況についての情報は無い。そこで今回、南西諸島の牛舎に飛来する吸血昆虫類の捕集調査を実施した。今回の調査では、吸血昆虫類として多数の蚊

およびヌカカが牛舎に設置したトラップで捕集され、これらの吸血昆虫がウシを吸血するために飛来していることが確認された。今後はこれら吸血昆虫種の分類同定を行うとともに、ウイルス分離等を行うことによって、BATVを含めた保有ウイルスの解析を実施する予定である。

今回の調査において、上述の牛舎に設置したトラップでサシチョウバエの一種の雌成虫も捕集された(図3)。今回の調査地である西表島には、イリオモテサシチョウバエ *Sergentomyia iriomotensis* の分布が報告されている。今回採集されたサシチョウバエについては、未だ種の同定は行われていないが、おそらく本種であることが推定される。イリオモテサシチョウバエは、自然界では専ら爬虫類などの冷血動物を吸血すると考えられており、ウシを含む哺乳動物を吸血源として利用することは報告されていない。また、これまで牛舎における採集記録も存在していない。本研究による牛舎での採集記録は、本種がウシを吸血するために牛舎に飛来した可能性を示すものであるかみしれず、本邦に分布するサシチョウバエ種の吸血生態を解明するうえで重要な一知見であると考えられる。本研究では、本邦に常在性でヒトに感染しウイルス血症を起こす可能性のある FUKV の媒介蚊を特定するべく、各種蚊由来培養細胞を用いたウイルスの増殖動態解析を実施した。その結果、FUKV は実験に用いた4属5種の蚊に由来する8種類の培養細胞の全てにおいて、感染・増殖性が確認されたことから、広範な蚊種の細胞に感染し増殖可能であることが明らかとなった。FUKV はこれまで本邦のコガタアカイエカから分離された報告があるものの、今回実験に用いた蚊由来培養細胞のうちで、当該蚊種の培養細胞上清中のウイルス RNA コピー数は最も低い結果であった。その一方で、ヒトスジシマカや

ステフェンスハマダラカに由来する培養細胞においては、コガタアカイエカ由来培養細胞よりも100倍程度高いFUKVの増殖性が観察されたことから、これらの蚊種がFUKVの好適な媒介蚊である可能性も考えられる。そのため今後は、これらの蚊種を含めた各種の蚊個体にFUKVを接種することによって、ウイルスの媒介性を解析することを予定している。

7. 動物におけるインフルエンザウイルスの簡易検査方法の確立

1. 抗 IAV 抗体のスクリーニング

本研究において、IAV に対する抗体が検出されたのはアライグマのみであり、他の野生動物種(イノシシ、シカ、タヌキ、ハクビシン、アナグマ)では陽性例は確認されなかった。アライグマの陽性率は1.74%と低率ではあるものの、感染野鳥の死骸などを摂取することによるウイルス暴露の可能性が示唆される。

また、陽性個体が冬季のみならず夏季に捕獲された事例からは、感染が冬季に起こり、その後数ヶ月にわたって抗体が持続していた可能性が示唆される。さらに、乳歯を有する若齢個体における抗体陽性例については、ウイルス曝露による感染というよりも、母獣からの移行抗体がELISAで検出された可能性が高いと考えられる。

2. VSV シュードタイプウイルスの構築

本研究では、H5 および H7 亜型由来の HA および NA を外套させた VSV シュードウイルスの作製に成功し、細胞侵入性の検出が可能であることをルシフェラーゼアッセイにより確認した。また、HA 単独の外套でも、外因性のノイラミニダーゼを添加することでウイルス粒子の萌芽が促進され、感染性を有するウイルスの構築

が可能であることを明らかにした。この手法は、NA 遺伝子の導入を必要としないため、シュードウイルス作製にかかるコストと時間を削減し、簡便なサブタイプ別抗体評価系の構築につながる。さらに、低病原性ウイルス(LPAIV)に関しては、細胞内のプロテアーゼ活性が不十分であることが原因と考えられ、アセチルトリプシンなど外因性プロテアーゼの添加が細胞侵入の鍵であることが実証された。この知見は、同様にトリプシン活性を必要とするヒト季節性インフルエンザウイルス(H1、H3 亜型)における応用も期待される。

D. 結論

国立健康危機管理研究機構(JIHS) 国立感染症研究所(NIID)と日本赤十字社で協力体制を構築した。①定期的な情報収集・リスク評価体制を構築し、②献血血液における次世代シーケンス解析技術を用いた病原体検出法の開発を進めた。また Mpox をモデルに③血液中の中和抗体価測定系の改良と評価を行うとともに、④血中動態・血液製剤の製造工程中での不活化評価による迅速リスク評価法の開発を進めた。⑤野生動物血清を用いた抗体スクリーニング法および HA 亜型の診断系の確立をし、⑥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を進めた。⑦蚊のウイルス保有実態と蚊媒介性ウイルスの感染・流行リスク解析、⑧動物におけるインフルエンザウイルスの簡易検査方法の確立した。⑨B 型肝炎ウイルスやパルボウイルス B19 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を行った。

E. 健康危険情報 特記事項なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Choi CW, Choi Y, Maryuningsih YS, Shin JH, Chantarasomchin P, **Mizukami T**, Ng SW, Thi DL, Ramondrana D, Dimapilis GN, Sohn KH, Roh HS, Koh HJ, Lee W, Kim YH. Report of the Ninth Asian National Control Laboratory Network meeting in 2024, with a focus on regional harmonization of regulatory systems to prepare for cross-border transfer of plasma. **Biologicals**. 2025; 90: 101823.
- 2) Hiraga K, Tezuka K, Nagata K, Koh KR, Nakamura H, Sagara Y, Sobata R, Satake M, Tanio M, Hasegawa H, Saito M, Miura K, **Mizukami T**, Hamaguchi I, Kuramitsu M. Development of a novel multiplex digital PCR-based method for the detection of HTLV-1 proviral deletion. **J Virol Methods**. 2025; 332: 115071.
- 3) Hiraga K, Kitamura T, Kuramitsu M, Murata M, Tezuka K, Okuma K, Hamaguchi I, Akari H, **Mizukami T**. Highly homologous simian T-cell leukemia virus type 1 genome in Japanese macaques: a large cohort study. **Virol J**. 2024; 21: 166.
- 4) Kidiga M, Murata M, Grover P, Ode H, Iwatani Y, Seki Y, Kuramitsu M, Morimoto M, Natsume T, Kaneko A, Hayashi S, Yasunaga JI, Matsuoka M, **Mizukami T**, Akari H. Identification of occult STLV-1 infection in Japanese

macaques. **J Infect Dis**. 2025: jiaf120.

- 5) Grover P, Murata M, Kidiga M, Hayashi S, Ode H, Iwatani Y, Morimoto M, Natsume T, Kaneko A, Yasunaga JI, Matsuoka M, Kuramitsu M, Seki Y, **Mizukami T**, Akari H. Identification of natural remission of mother-to-child retroviral transmission. **J Infect Dis**. 2025: jiaf064.
- 6) 野島清子, 関洋平, 水上拓郎. 人免疫グロブリン製剤の歴史と品質確保 ファルマシア 60 巻 6 号: 543-547, 2024
- 7) Okumura N, Morino E, Nomoto H, Yanagi M, Takahashi K, Iwasaki H, Uemura Y, Shimizu Y, Mizushima D, Fukushima K, Kinai E, Shiojiri D, Itoda I, Onoe Y, Kobori Y, Nakamura F, Tokita D, Sugiura W, Ueno S, **Ainai A**, Mine S, Suzuki T, Ohmagari N, Ujiie M. LC16m8 for Pre-exposure Prophylaxis against Mpox in a High-Risk Population: An Open-Label Randomized Trial. Clin Infect Dis. 2025 Feb 21:ciaf074. doi: 10.1093/cid/ciaf074. Epub ahead of print. PMID: 39982831.

2. 学会発表

1. **Mizukami T**. Recent Updates and Future Prospects for National Lot Release Systems in Japan. Asian National Control Laboratory Network Meeting 2024, Global Bio Conference (GBC) 2024, September 5th 2024, Seoul, Korea. 海外, 口演
2. Tanabe A, Takahashi Y, Yui A ,

- Nakakido M, Nasu T, Uchimar K, Tachikawa A, Matano T, **Mizukami T**, Watanabe T, Tsumoto K, Nakano K. Development of an antibody-drug conjugate targeting CADM1 in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. 第 86 回日本血液学会学術集会, 口頭
3. 中野和民, 田部亜季, 高橋良明, 由井杏奈, 中木戸誠, 那須智博, 内丸薫, 立川愛, 俣野哲朗, **水上拓郎**, 渡邊俊樹, 津本浩平. CADM1 を標的とした抗体医薬の可能性. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, シンポジウム・口頭
 4. 手塚健太, 平賀孔, 上村(鎌田) 麻実, 池辺詠美, 浜口功, **水上拓郎**. ヒト型感染受容体遺伝子導入マウスを用いた新規 HTLV-1 感染症モデル. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, 口頭
 5. 平賀孔, 手塚健太, 長谷川寛雄, 斎藤益満, **水上拓郎**, 浜口功, 倉光球. Multiplex-digital PCR 法による ATL 検体のプロウイルス欠失評価. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, 口頭
 6. キディガ モーリーン, Grover P, Hayashi S, Yanagawa Y, Kaneko A, Morimoto M, Natsume T, **Mizukami T**, Akari H. Evaluation of STLV-1 in semen of infected Japanese macaques (JMs). 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, 口頭
 7. 上村麻実, 手塚健太, 池辺詠美, 平賀孔, **水上拓郎**. ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の経胎盤移行モデル確立の試み. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, ポスター
 8. Tanabe A, Takahashi Y, Yui A, Nakakido M, Nasu T, Umemura M, Tezuka K, Uchimar K, Utsunomiya A, Matano T, **Mizukami T**, Watanabe T, Tsumoto K, Nakano K. Development of an Antibody-Drug Conjugate Targeting CADM1 in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. 66th ASH Annual Meeting & Exposition 2024, San Diego, CA, USA, 海外・口頭
 9. **水上拓郎**. 生物学的製剤の品質管理試験の見直しについて～血液製剤の検定のあり方と異常毒性否定試験の生物基からの削除～. 第 21 回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム. 2024 年 12 月 10 日, 東京, シンポジウム・口頭
 10. **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における不活化法の評価 第 72 回日本輸血・細胞治療学会総会, 東京, 2024.
 11. **岡田義昭**, 野島清子: In vitro 感染系を用いた B 型肝炎ウイルスの安定性の解析. 第 71 回日本ウイルス学会総会、名古屋、2024.
 12. 上野 栞, 佐高明子, 峰宗太郎, 小島朝人, 海老原秀喜, 森野英里子, 氏家無限, 鈴木忠樹, **相内 章**. フォーカス減少中和試験を用いたサル痘ウイルスに対する中和抗体価測定系の確立. 第 71 回日本ウイルス学会, 名古屋, 2024.11.
 13. **相内 章**, 上野 栞, 峰宗太郎, 佐高明子, 小島朝人, 海老原秀喜, 森野英里子, 氏家無限, 鈴木忠樹. サル痘ウイルスに対する効率的な新規中和抗体価測定系の構築. 第 28 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, 名古屋,
2024.10.

14. 堀場千尋. NGS 解析とデータ管理方法、
原因不明症例解析の実例を交えて. 令和
6 年度第 1 回 神戸市健康科学研究所 健
科研セミナー. 6 月 5 日, 2024 年, 神戸.
15. 堀場千尋. 原因不明感染症へのメタゲノム
アプローチ. 第 30 回分子寄生虫ワークシ
ョップ 第 20 回分子寄生虫・マラリアフォー
ラム合同大会. 8 月 28 日, 2024 年, 千葉.
16. 堀 場 千 尋. Clinical Metagenomic
Sequencing の感染症診断への活用. 第
25 回東海病原微生物研究会. 10 月 12 日,
2024 年, 名古屋.
17. 堀場千尋. 次世代シーケンスによる感染
症診断を通じて見る「臨床と WET と DRY
の連携」. 第 28 回日本ワクチン学会・第 65
回日本臨床ウイルス学会合同学術集会.
10 月 26-27 日, 2024 年, 名古屋.
18. 堀場千尋. 原因不明感染症へのメタゲノム
解析を用いた感染症診断. 第 1 回金沢臨
床感染症セミナー. 12 月 11 日, 2024 年,
金沢.
19. 堀場千尋. 感染症分野における NGS の
基礎的知識. 第 36 回日本臨床微生物学
会総会・学術集会. 1 月 25 日, 2024 年, 名
古屋.

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

新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究

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
研究協力者 栗林 和華子 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

研究要旨:

血液製剤における HIV, HCV, HBV 等の既知のウイルス安全性に関しては、日本赤十字社による献血血液における高感度な抗体・抗原検査、個別核酸増幅検査の導入や血漿分画メーカーにおける製造工程中における病原体の除去・不活化処理の導入により、感染リスクが低下し、高い安全性が確保されている。しかし血液製剤はヒトの血液を原材料としているため、未知の病原体の混入リスクがあり、また新興・再興感染症に関しては無症候ドナーからの献血・輸血により感染する可能性があるため、献血血液の安全性を確保するためには、情報収集・リスク分析・新規病原体検出法開発・血中動態解析・製造工程中での不活化評価に基づくリスク評価を迅速に行える体制の構築が必要である。

そこで本研究課題では、国立健康危機管理研究機構 (JIHS) 国立感染症研究所 (NIID) と日本赤十字社で協力体制を構築し、定期的な情報収集・リスク評価体制を構築するとともに、血中動態・血液製剤の製造工程中での不活化評価による迅速リスク評価法を確立することを目的とした

情報収集とリスク分析に関し 2024 年度は国内・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動向も注視し、国内で発生している感染症についても検討した。2024 年度は SARS-CoV-2 の 5 類移行に伴い、人流の流れが再開し、様々な新興・再興感染症のアウトブレイクが世界で確認された。Mpox の Clade 1b のアフリカ地域以外の欧州・アジアにおける輸入症例の増加に加え、デング熱の感染者数の増加、米国における乳牛の H5N1 感染事例の増加、麻疹の拡大、ブラジルにおけるオロプーシェ熱のアウトブレイクが確認された。特に、オロプーシェウイルスは垂直感染を示唆する論文報告に加え、米国・欧州への輸入症例もあり、FDA も注意情報を喚起し、米国輸血細胞治療学会 (AABB) も FACT SHEET を更新し、注視している。

血中動態に基づく迅速リスク評価法の開発に関しては、モデルウイルスとしてワクチニアウイルス (LC16m8 株) を用い、定量的評価のためのリアルタイム PCR を用いた核酸検査法の確立及びウイルス力価測定法を確立し、日本赤十字社より供与された全血を用いて予備実験を 2 回実施し、得られたデータの解析を進めている。

A. 研究目的

血液製剤における HIV, HCV, HBV 等の既

知のウイルス安全性に関しては、日本赤十字社による献血血液における高感度な抗体・抗

原検査、個別核酸増幅検査の導入や血漿分画メーカーにおける製造工程中における病原体の除去・不活化処理の導入により、感染リスクが低下し、高い安全性が確保されている。しかし血液製剤はヒトの血液を原材料としているため、未知の病原体の混入リスクがあり、また新興・再興感染症に関しては無症候ドナーからの献血・輸血により感染する可能性があるため、献血血液の安全性を確保するためには、情報収集・リスク分析・新規病原体検出法開発・血中動態解析・製造工程中での不活化評価に基づくリスク評価を迅速に行える体制の構築が必要である。特に国外で発生したパンデミックに対しては感染者由来検体を用いて評価することが困難であり、文献等に基づいたリスク評価が主体となるため、迅速性に欠けるという課題があった。

そこで本研究課題では、国立健康危機管理研究機構 (JIHS) 国立感染症研究所 (NIID) と日本赤十字社で協力体制を構築し、定期的な情報収集・リスク評価体制を構築するとともに、新興・再興感染症等によるパンデミック発生時に該当病原体の血中動態を明らかにし、血液製剤への混入リスクを定量的に評価する迅速リスク評価法の確立を行うこととした。

B. 研究方法

1. 情報収集・リスク評価体制構築

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。また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。

2. 新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

血液製剤の原料となるヒト由来の全血に標的ウイルスをスパイクし、その後の処理工程において得られる赤血球、血小板、白血球および白血球の各分画中におけるウイルスの分布を定量的に解析するとともに、感染性の有無の評価することで、各分画ごとのウイルス保持性および感染リスクを評価する手法の確立を行う。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

1. 情報収集・リスク評価体制構築

2024 年度 感染症動向

新型コロナウイルス

2024 年度も SARS-CoV-2 の様々な変異株が発生した。JN.1 系統とその亜系統が主流であったが KP.2 や KP.3 系統の感染者数が一過性に増加したが減少、亜系統のうち KP.3.1.1 と LB.1 系統の感染者が増加した。KP.3.1.1 と XEC の感染者が増加し主流となったが、KP.3.1.1 系統は減少し、新規に VUM に加わった LP.8.1 系統が増加している。JN.1 系統の亜系統である KP.1.1.3 から進化したウイルスで、スパイクタンパク質にある複数の変異の内、V445R 変異は、ウイルスの伝播性の増加に寄与する可能性が示唆されている。2025 年 3 月時点で WHO の指定する変異株

VOI は JN.1 , VUM は KP.3, KP.3.1.1, LB.1, XEC, LP.8.1 となっている。いずれも既存の亜系統と比較して公衆衛生的なリスクに変化はないと考えられ、献血血液に影響するような性状変化も認められなかった。

韓国におけるマラリアアウトブレイク

韓国ではマラリアの発生増加し、2024 年 1 月～5 月にかけて感染者 100 名を超え、5 月だけで 66 人が報告され、高陽市ではマラリア注意報が発出された。感染事例は三日熱マラリアが 8 割をしめ、兵隊の感染率が 19-49%と高かった。日本では 1955 年移行国内報告はなく、媒介蚊のサーベイランスでもマラリア原虫の保有は報告されていない。媒介蚊であるシナハマダラカも人口密集地では生息しておらず、日本で輸入例による感染する可能性は低いと考えられる。

エムボックス

Mpox に関してはコンゴ民主共和国東部で新たなクレード(Clade 1b)が急速に拡大し、これまで報告のなかった近隣諸国でも検知され、2024 年 8 月 14 日 WHO 事務局長より「国際的に懸念される世界的な公衆衛生上の緊急事態(PHEIC)」が宣言された。その後、8 月にスウェーデンとインドで、9 月にタイ、11 月に米国で Clade 1b の輸入症例が確認され、以降、欧州諸国、中国、アラブ首長国連邦で DRC やウガンダからの輸入症例と考えられるクレード 1b 感染事例が報告されている。渡航歴のない症例も確認されているが、ほぼ家庭内接触者あるいは初発症例者との接触者であり。

またタイでは 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、発症もしなかった事例が Emerg Infect Dis 誌に掲載され、Mpox 陽性者からの初の輸血事例が発生した。輸血による感染は起こっておらず、引き続き、輸血による感染リスクは低いと考えられるものの、無症候の方からの献血、そして輸血事例は起こりうるということが確認され、引き続き、体制強化が求められる。

我々は、昨年度、既に献血血液における検査体制を構築し、関連機関との連携体制を構築している。

ジカウイルス

2024 年 1 月～12 月末までに、インドのマハラシュトラ州で 140 例のジカウイルス病(ZVD)のアウトブレイク症例が報告されている。過去には数例程度であったが、2023 年に 18 例を報告し、増加している。

デング熱

全世界においてデング熱の発生報告数が増加している。2024 年度は WHO の Global Dengue Surveillance によると症例報告数は 532 万、死亡者は 8,000 名、重傷者は 45,000 例となっている。90 カ国から報告され、WHO のリスク評価でも High となり、緊急対応グレードも G3 となっている。2024 年は南米が最も多い(238 万例)が、インドネシア、バングラディッシュ、ネパールでも増加している。アフリカ地域でも 13 カ国から報告がある。欧州では輸入症例が大半で、イタリア、フランス、スペインが主要国となっている。

オロブーシェ熱

現在、ブラジルをはじめ南米でオロブーシェ熱の発生が増加し、問題となっている。オロブ

ーシェ熱は節足動物媒介性感染症で、発熱、頭痛、筋肉痛等を引き起こす。潜伏期間は吸血後 3 日から 8 日で、症状の持続期間は通常 2 日から 7 日で約 60%の感染者が軽快化する一方、臨床症状の再発が認められるのが特徴である。原因ウイルスは *Peribunyaviridae* 科 *Orthobunyavirus* 属 *Oropouche virus* (OROV)で、80 から 120nm のエンベロープを有したマイナス鎖 Single Strand RNA ウイルスである。1 型から 4 型までの遺伝型が存在し、現在ブラジルと南米で大量発生しているウイルス型は殆どが 1 型である。

以前より散発的な発生が報告されていたが、2023 年～2024 年にかけて感染者が増加し、特に 2024 年末から 2025 年にかけては流行国のブラジルで昨年度比 74%増と増加し続けている。2024 年度は 16,239 例で、死亡が 4 例報告されている。輸入症例が多数報告されており、米国で 108 例、カナダで 2 例、欧州で 30 例となっている。また、近年、垂直感染事例が報告され、確定例で 4 例、先天異常が 1 例となっており、調査中のものも数十件程ある。また、脳脊髄液から OROV ゲノムが検出されており、ZIKV との類似性も懸念されている。また発症 16 日目の精液からウイルスが分離、感染後 58 日目の精液からは RNA が検出された論文が 2024 年 12 月の EID 誌にて発表され、性感染の可能性も示唆されている。

このような状況を受け、FDA は 2024 年 9 月にオロブーシェ熱と輸血に関する重要情報、11 月にオロブーシェ熱と移植に関する重要情報を発出。また AABB は 8 月 20 日に暫定版の、11 月 4 日に最終版の Fact Sheet を発行した。

現時点では輸血による感染症は報告されていない。FDA 承認の体外診断薬等はないのが現状で、検査系の立ち上げが求められる。日本

でも感染症法における届出対象疾病ではないため、感染研の病原体検出マニュアルが整備されていない。

ただし、エンベロープウイルスですので、次亜塩素酸ナトリウムや、過酸化水素、過酢酸、エタノール、熱、ガンマ線照射などで不活化されることから、輸血用血液製剤や血漿分画製剤においては製造工程中の不活化により問題となることは低いと考えられる。

鳥インフルエンザ

H5N1 に関しては、ヒト感染例は 2025 年 1 月現在、2003 年以降累計で 967 例、死亡は 465 例となっており、H5N2 は 2024 年にはメキシコで感染死亡例が 1 件、H5N6 に関しては 37 例の死亡を含む 93 例のヒト感染事例が、H9N2 に関しては 1 例の死亡を含む 151 例が報告されている。基本は病死した鳥や H5N1 汚染環境での接触が原因であり、ヒト-ヒト感染は発生しておらず、感染の可能性は低いと考えられる。

その一方で鳥インフルエンザの哺乳類への感染事例は年々増加し、また発生地域も拡大しており、26 ヶ国で 48 種類以上の哺乳類で感染が報告されている。また 2024 年 2 月に米国で発生した乳牛への感染事例が拡大し、2025 年 1 月時点で 16 州、928 群のウシ、ヒトは 4 州で 40 例の感染が報告されている。ヒトでは目の症状、咳などの上気道症状が報告されている。ウシでの症状は軽いが、有症牛のミルクを摂取した猫が死亡するケースも報告され、ミルクと乳腺でウイルス RNA が大量に検出されている。ウシ以外の哺乳類への感染も増加しており、中にはネコやイエネズミを始め、キツネ、アライグマなど都市動物も多数含まれている。現状ではヒト-ヒト感染のリスクは低いですが、哺乳類から哺乳類への種を超えた伝播が示唆され、哺乳

類間でのウイルス伝播の可能性に関する懸念が生じるものと考えられる。

2. 新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

モデルウイルスとしてワクチニアウイルス (LC16m8 株) を用いた検討を進めている。これまでに定量的評価のためのリアルタイム PCR を用いた核酸検査法の確立及びウイルス力価測定法を確立し、日本赤十字社より供与された全血を用いて予備実験を 2 回実施し、得られたデータの解析を進めている。

D. 考察

1. 情報収集・リスク評価体制構築

2024 年度は SARS-CoV-2 に続き、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 Clade1b の輸入症例の増加、タイでの輸血事例をみると、引き続き監視・対策の強化が求められる。一方、ZIKA やデングに関しては既に対策が講じられており、スクリーニング体制が整備されているが、オロプーシェ熱に関しては、適切な対応が求められると想定される。

2. 新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

今後、この結果に基づいて評価方法の改善・向上を図り、次年度には Mpox ウイルスやデングウイルスなど、現在世界的な流行が見られるウイルスを対象とした応用実験へと展開する予定である。第二のアプローチとして、蛍光標識を施したシュードタイプウイルスを用いた追跡実験系の確立を計画している。パンデミック発生時に複製可能なウイルスの入手に時間を要する場合でも、配列情報はより早期に入手できると考えられる。そこで、GISAID 等から取得したウイルススパイクタンパクの配列情報を基にシュードタイプウイルスを作製し、これを用いて血液

の各分画に対する感染性を評価することで、原因ウイルスの血液製剤への混入リスクを迅速かつ安全にスクリーニングすることを目的としている。現在はレンチウイルスをベースとするシュードタイプウイルスの設計・構築を進めており、次年度には全血サンプルを用いた感染性評価を実施する予定である。

E. 結論

2024 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。特に、海外でのデングやジカ熱の発生状況は、輸血による感染リスクがあるので、懸念されるところである。また、インフルエンザ対策等を鑑みると、本研究分担で進められている動物での実態調査を行い、適宜リスク評価することが望ましいと考えられる。またオロプーシェウイルスのような新興のウイルスも注視が必要である。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Choi CW, Choi Y, Maryuningsih YS, Shin JH, Chantarasomchinn P, Mizukami T, Ng SW, Thi DL, Ramondrana D, Dimapilis GN, Sohn KH, Roh HS, Koh HJ, Lee W, Kim YH. Report of the Ninth Asian National Control Laboratory Network meeting in 2024, with a focus on regional harmonization of regulatory systems to prepare for cross-border transfer of plasma. *Biologicals*. 2025; 90: 101823.

- 2) Hiraga K, Tezuka K, Nagata K, Koh KR, Nakamura H, Sagara Y, Sobata R, Satake M, Tanio M, Hasegawa H, Saito M, Miura K, Mizukami T, Hamaguchi I, Kuramitsu M. Development of a novel multiplex digital PCR-based method for the detection of HTLV-1 proviral deletion. *J Virol Methods*. 2025; 332: 115071.
 - 3) Hiraga K, Kitamura T, Kuramitsu M, Murata M, Tezuka K, Okuma K, Hamaguchi I, Akari H, Mizukami T. Highly homologous simian T-cell leukemia virus type 1 genome in Japanese macaques: a large cohort study. *Virol J*. 2024; 21: 166.
 - 4) Kidiga M, Murata M, Grover P, Ode H, Iwatani Y, Seki Y, Kuramitsu M, Morimoto M, Natsume T, Kaneko A, Hayashi S, Yasunaga JI, Matsuoka M, Mizukami T, Akari H. Identification of occult STLV-1 infection in Japanese macaques. *J Infect Dis*. 2025: jiaf120.
 - 5) Grover P, Murata M, Kidiga M, Hayashi S, Ode H, Iwatani Y, Morimoto M, Natsume T, Kaneko A, Yasunaga JI, Matsuoka M, Kuramitsu M, Seki Y, Mizukami T, Akari H. Identification of natural remission of mother-to-child retroviral transmission. *J Infect Dis*. 2025: jiaf064.
 - 6) 野島清子, 関洋平, 水上拓郎. 人免疫グロブリン製剤の歴史と品質確保 ファルマシア 60 巻 6 号: 543-547, 2024
1. Mizukami T. Recent Updates and Future Prospects for National Lot Release Systems in Japan. Asian National Control Laboratory Network Meeting 2024, Global Bio Conference (GBC) 2024, September 5th 2024, Seoul, Korea. 海外, 口演
 2. Tanabe A, Takahashi Y, Yui A, Nakakido M, Nasu T, Uchimar K, Tachikawa A, Matano T, Mizukami T, Watanabe T, Tsumoto K, Nakano K. Development of an antibody-drug conjugate targeting CADM1 in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. 第 86 回日本血液学会学術集会, 口頭
 3. 中野和民, 田部亜季, 高橋良明, 由井杏奈, 中木戸誠, 那須智博, 内丸薫, 立川愛, 俣野哲朗, 水上拓郎, 渡邊俊樹, 津本浩平. CADM1 を標的とした抗体医薬の可能性. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, シンポジウム・口頭
 4. 手塚健太, 平賀孔, 上村(鎌田) 麻実, 池辺詠美, 浜口功, 水上拓郎. ヒト型感染受容体遺伝子導入マウスを用いた新規 HTLV-1 感染症モデル. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, 口頭
 5. 平賀孔, 手塚健太, 長谷川寛雄, 斎藤益満, 水上拓郎, 浜口功, 倉光球. Multiplex-digital PCR 法による ATL 検体のプロウイルス欠失評価. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, 口頭
 6. キディガ モーリーン, Grover P, Hayashi S, Yanagawa Y, Kaneko A, Morimoto M,
2. 学会発表

Natsume T, Mizukami T, Akari H.
Evaluation of STLV-1 in semen of
infected Japanese macaques (JMs).

2024 年 11 月 8 日-10 日, 東京, 口頭

7. 上村麻実, 手塚健太, 池辺詠美, 平賀孔,
水上拓郎. ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型
(HTLV-1) の経胎盤移行モデル確立の試
み. 第 11 回日本 HTLV-1 学会, 2024 年
11 月 8 日-10 日, 東京, ポスター
8. Tanabe A, Takahashi Y, Yui A ,
Nakakido M, Nasu T, Umemura M,
Tezuka K, Uchimaru K, Utsunomiya A,
Matano T, Mizukami T, Watanabe T,
Tsumoto K, Nakano K. Development
of an Antibody-Drug Conjugate
Targeting CADM1 in Adult T-Cell
Leukemia/Lymphoma. 66th ASH Annual
Meeting & Exposition 2024, San
Diego,CA.USA, 海外・口頭
9. 水上拓郎. 生物学的製剤の品質管理試験
の見直しについて～血液製剤の検定のあ
り方と異常毒性否定試験の生物基からの
削除～. 第 21 回医薬品レギュラトリーサイ
エンスフォーラム. 2024 年 12 月 10 日, 東
京, シンポジウム・口頭

H. 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

B 型肝炎ウイルスやパルボウイルス B19 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

先行研究で高感度に B 型肝炎ウイルス（以下 HBV）の感染性を評価できる系を作成したのでこれを用いて下記の研究を行った。

1. 研究に用いる HBV 陽性血漿は、採血から実験に使用するまで少なくとも 3 回以上の凍結・融解が行われるのでその影響を解析した。少なくとも 5 回まで感染性への影響は認められなかった。不活化等に用いる陽性血漿の管理に有用な情報が得られた。
2. HBV は安定性が高いウイルスと言われているが、確認されているとは言い難い。血漿、5%アルブミン、PBS にそれぞれ添加した HBV は 4℃で少なくとも 4 週間の保管では感染性に影響はないことが確認できた。これは赤血球製剤に混入した場合、保管期間に失活することなく感染性を保持することが示唆された。

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法の評価に用いてきた。我々は、血液製剤の不活化法等に応用できる HBV の感染系の確立を目指した。また、感染性の評価には HBs-RNA の検出が高感度で特異性が高いことも示してきた。今年度は、この系を用い

てこれまで余り検討されてなかった HBV の感染性に関する安定性について研究を行った。HBV は非常に安定性が高いとの報告があるが、感染系がなかったため十分な検討はされていない。また、パルボウイルス（PB19V）は、感染の評価系はあるものの二次感染が生じないため不活化等の評価するためには、陽性血漿を確保する必要がある。PB19V の流行は 4 年周期で起こるとされたためウイルスを産生する培養系の開発が必要である。我々が分離した PB19V に高感受性の細胞株にさらに遺伝子編集を行うことによって感染性ウイルスを産生する細胞株の樹立も目指した。

B. 研究方法

1. 感染方法

細胞株#4-11 は感染 1 日前に 1×10^5 ずつコーゲンコートした 24 穴プレートに蒔き、感染当日に最終濃度 2 % の DMSO を添加した 10 % FCS—DMEM で 37°C、5 % CO₂ で培養した。HBV は種々の処理後に 100 μ L ずつ細胞に添加した。感染 2 日目に細胞を PBS で 5 回洗浄し、最終濃度 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。2 ~ 3 日毎に PEG と DMSO を添加した培養液で培養し、感染 9 ~ 10 日後に細胞を回収した。

2. HBV 陽性血漿

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を用いた。

3. 感染性の評価法

RNA は RNeasy mini kit (DNase 処理) を用いて抽出し、Nuriya ら (J. Clin Microbiol. 48: 3843-51. 2010) の方法で HBs-RNA を核酸増幅法で定量し、各群の HBs-RNA の量をコントロールと比較することで感染性を評価した。

4. 凍結融解が感染性に与える影響

凍結された HBV 陽性血漿を室温で融解し、100 μ L ずつ分注し、直ちに -80°C で凍結した。翌日以降に分注した検体を室温で融解し、氷中で 1 時間保持後に再度凍結した (凍結 1 回目)。翌日以降に凍結 1 回の検体を同様に融解凍結 (融解 2 回目) し、同様に融解と凍結を 5 回繰り返した。これらの検体を同時に融解し、PBS にて 100 倍希釈して細胞に感染させた。感染 9 ~ 10 日目に回収し、HBs-RNA を定量した。

5. 保存温度による感染性への影響

5 % アルブミン、PBS、血漿に HBV 陽性血漿を

添加し、4°C、室温、37°C で 1 ~ 4 週間保管後に細胞に感染させた。感染性を HBs-RNA 定量で評価することで HBV の安定性を評価した。5 % アルブミン と PBS は 10 倍希釈になるように陽性血漿を添加した。

C. 研究結果

1. 凍結融解が感染性に与える影響

凍結融解を最大 5 回繰り返したが、コントロールの検体を感染させた細胞から得られた HBs-RNA 量と 4 回、又は 5 回凍結融解を繰り返した検体を感染させた細胞からの HBs-RNA 量に差は認められなかった (図 1)。

2. 保存温度による感染性への影響

4°C では、血漿、PBS、5 % アルブミン のいずれにおいて、検討した 4 週間までは感染性の低下は認められなかった。室温保存では、1 週間まで著明な減少は認められなかった。しかし 2 週以降はアルブミン 以外では著明な減少が認められた。また、37°C では 1 週間以内に各溶媒において著明な感染性の減少が認められた (図 2)。

D. 考察

HBV は 4°C において溶媒に依らず長期間感染性を維持していることが明らかになった。核酸増幅検査で感度以下の極微量な HBV の混入した赤血球製剤 (4°C 保存) によって感染した症例が報告されているが、それを裏付ける結果となった。また、-80°C のフリーザーが故障しても 4°C の冷蔵庫で保存すれば 1 ヶ月は対応できることも示された。HBV 陽性血漿は、採血から

我々に供給されるまでに少なくとも2回の凍結融解を経ている。凍結融解による感染性の影響を解析することは、血液製剤の不活化等の評価をする上で重要である。今回の研究によって少なくとも5回の凍結融解は感染性に影響がないことが証明できた。これは、感染実験に使用する陽性血漿の管理に有用な知見となる。また、HBV の輸血用血液製剤による感染を防止する上でHBV の保管温度による感染性への影響を明らかにすることも重要である。これまでいくつか報告があるが、チンパンジーへの接種による感染の有無で評価されており、十分な検討等はいない。今回の評価でアルブミンだけでなくPBS においても4℃では4週間以上感染性が低下しないことが明らかとなった。HBV が極めて安定化したウイルスであることを明らかにできた。これは、核酸増幅検査の感度以下の極少量のHBV でも4℃保存の赤血球液であれば製剤の有効期間内で感染性を保持できることを示している。また、高濃度のウイルスを含有するHBV 陽性血漿は大変貴重であるが、フリーザー等の故障で低温保存できない場合においても通常の冷蔵庫で数週間の保存が可能あることも示唆され、研究者にとっては、貴重な情報と

なると考えられた。

今年度は、収集したHBV 陽性血漿の感染力価や遺伝子型も解析した。これらの解析結果を用いて来年度は、遺伝子型による不活化効率や中和抗体の活性の相違を解析する予定である。。

E. 結論

確立したHBV 感染評価系を用いて凍結融解や保存温度による感染性の影響について解析し、HBV が極めて安定した感染性を保持したウイルスであることを明らかとした。

F. 健康危機情報

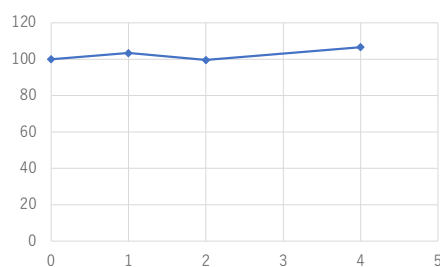
なし

G. 研究発表

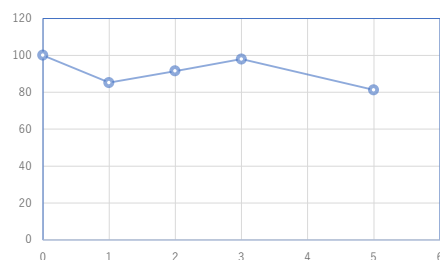
1. 岡田義昭、小林清子、野島清子：B型肝炎ウイルスのin vitro培養系を用いた血液製剤における不活化法の評価 第72回日本輸血・細胞治療学会総会, 東京, 2024.
2. 岡田義昭、野島清子：In vitro感染系を用いたB型肝炎ウイルスの安定性の解析 第71回日本ウイルス学会総会、名古屋、2024.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



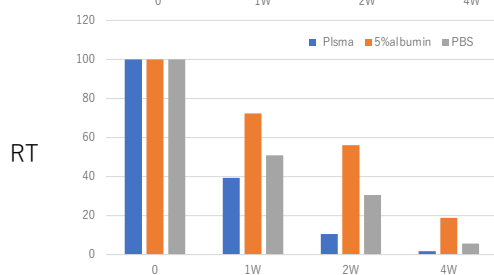
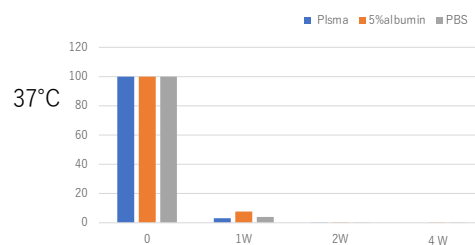
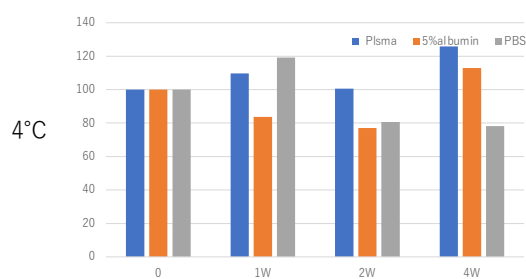
凍結・融解 4 回 N=2



凍結・融解 5 回 N=2

コントロール検体を感染させた時のHBs-RNAの定量値を100%として各凍結融解検体を感染させた時のHBs-RNA定量値を比較した。

図1 HBVの凍結融解処理の感染性に及ぼす影響



4°Cでは、感染性は4週間後でも保たれていた。

n=2

図2 溶媒と温度が及ぼすHBVの感染性の影響

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・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」

分担研究報告書
中和抗体価測定系の改良と検証
(Mpox ウイルスに対する血清中和抗体価測定系の改良と検証)

研究分担者： 相内 章（国立感染症研究所 感染病理部 室長）
研究協力者； 上野 栞（国立感染症研究所 感染病理部 任期付研究官）
鈴木忠樹（国立感染症研究所 感染病理部 部長）

研究要旨：エムボックスに関しては、リアルタイム PCR による検査系は構築されているが、抗体検査は候補となる抗原が多種類存在することが影響し、標的とする抗原が明確に決まっていない。このような状況においては、機能的な抗体、つまりウイルス感染を阻害する中和抗体応答の評価が最適であると考えられる。古典的にはプラーク減少法を用いた中和抗体価測定が行われてきたが、作業が煩雑かつ血清希釈が限られてしまい、一回の測定で中和抗体価を確定できない場合があり、多検体の測定に応用できないという問題があった。本研究課題では、より簡便で多検体の測定を可能とする感染細胞で形成されるフォーカスを標識抗体で検出するフォーカス減少法を用いた中和抗体価測定系を検討し、現時点において至適な測定系を構築することに成功した。

A. 研究目的

血液製剤はヒトの血液を原材料としている。血液製剤における既知ウイルスに関する安全性は、日本赤十字社による献血血液における高感度な抗体・抗原検査、個別核酸増幅検査の導入や血漿分画メーカーにおける製造工程中における病原体の除去・不活化処理の導入により、感染リスクが低下し、高い安全性が確保されている。未知の新興感染症あるいは検査系が構築されていない再興感染症に関しては、無症候ドナーからの献血・輸血により感染する可能性があるため、献血血液の安全性を確保するためには、高感度な抗体・抗原検査ならびに製造工程

中での不活化評価法を構築する必要性が生じる。

2022 年に世界的な流行のあったエムボックスは Clade IIb によるものであったが、現在アフリカにおいて Clade I ならびに Ib によるエムボックスが流行しており、海外では散発的な輸入症例の報告が続いている。エムボックスに関しては、リアルタイム PCR による検査系は構築されているが、抗体検査は候補となる抗原が多種類存在することが影響し、標的とする抗原が明確に決まっていない。このような状況においては、機能的な抗体、つまりウイルス感染を阻害する中和抗体応答の評価が最適であると考えられる。本研究課題では、より簡便で

多検体の測定を可能とする感染細胞で形成されるフォーカスを標識抗体で検出するフォーカス減少法を用いた中和抗体価測定系の構築を行うことを目的とした。

B. 研究方法

使用したウイルスとその調製

国内の痘そうワクチン株であるワクチニアウイルス LC16m8 株、ならびにエムボックスウイルス (MPXV) である SPL2A7 株 (Clade IIb) を使用した。これらウイルスは国立感染症研究所ウイルス第一部より頂いた。

本実験用として、LC16m8 はウサギ腎由来細胞株 RK-13 細胞を用いて、SPL2A7 株はアフリカミドリザル腎由来細胞株 Vero E6 細胞を用いてそれぞれウイルスを増やした。5% FBS を含む DMEM 培地に懸濁したそれぞれの細胞を 75 cm² T フラスコに播種・培養し、フルシート状になったところで、培地を 2% FBS を含む DMEM 培地 (以下、2% DMEM) に置換、その後 MOI = 0.01 でそれぞれのウイルスを感染させた。細胞の観察を行いながら培養を継続し、半分程度の細胞に細胞変性効果 CPE が認められた培養 3 日目にフラスコを回収した。回収したフラスコは -80℃ 冷凍庫にて凍結、その後融解することで細胞を破碎した。破碎細胞の懸濁液を回収して、遠心分離により得られた上清をそれぞれのウイルス液とし、小分け分注したのちに -80℃ で使用時まで保存した。なお、以下の実験を含め、ウイルスを使用する過程は全て BSL3 実験室で実施した。

ウイルス力価の測定

調製したウイルスの力価 (focus forming unit/mL) の算出は、RK-13 細胞と Vero E6 細胞それぞれに対して実施した。調製したウイル

スを、2% DMEM を用いて 10 倍希釈からの 2 倍希釈系列を調製した。96 ウェルプレートに細胞を播種しフルシート状になったところで BSL3 実験室に持ち込み、培養上清を完全に除いた後にウイルスの希釈液を 100 μL ずつ細胞に添加し、37℃ CO₂ インキュベーターに静置し 16-24 時間培養した。培養後 10% ホルマリン緩衝液を添加し、1 時間室温にて細胞を固定・不活化した。その後のフォーカス検出は、次項に示した方法で実施し、フォーカス数をカウントすることで力価を算出した。

フォーカス減少法 (Focus Reduction Neutralization Test, FRNT) の手順

FRNT 法は、基本的に以下の手順に従い実施した。試験血清ならびにフォーカス検出用の抗体として、当部に保存されていた LC16m8 感染ウサギ回復期血清から硫酸分画により粗精製した IgG 分画 (以下、ウサギ抗 LC16 IgG 分画) を使用した。このウサギ抗 LC16 IgG 分画の 2 倍段階希釈系列 (60 μL) を 2% DMEM を用いて調製した。ここに約 200 focus/50 μL となるように 2% DMEM で希釈した各ウイルスを 60 μL ずつ添加し (合計 120 μL)、その後 37℃ CO₂ インキュベーターに静置し 20-24 時間培養を行った。96 ウェルプレートに細胞を播種しフルシート状になったところで BSL3 実験室に持ち込み、培養上清を完全に除いた後に上述の血清・ウイルス混合液から 100 μL を細胞に添加し、37℃ CO₂ インキュベーターに静置し 16-24 時間培養した。培養後 10% ホルマリン緩衝液を添加し 1 時間室温にて細胞を固定・不活化した。ホルマリンを除き水道水でプレートを洗浄した後に、0.5% Triton X-100 を含む DPBS を添加し、固定細胞の透過処理を 15 分を行った。その後、希釈したウサギ抗 LC16 IgG 分画を添加し、室温にて 1 時間

培養を行った。PBS-Tween で各ウェルを洗浄後、2,000 倍に希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Promega) を添加し、室温にて 1 時間培養を行った。PBS-Tween で洗浄後、基質として TrueBlue Peroxi-dase Substrate (KPL) を添加し、フォーカスの染色を行った。プレートは超純水で洗浄したのちに乾燥させ、フォーカスのカウントは ELISpot アナライザー (CTL) を用いて行った。FRNT の測定は 3 点測定 (血清希釈は 1 検体に関して 3 列独立して実施) で実施した。ウイルスのみを添加したウェル 3 点の平均フォーカスカウントの 50% をカットオフ値とし、このカットオフ値を下回るフォーカスカウント数を有する血清の最大希釈倍率を列ごとの中和抗体価とし、列ごとに得られた 3 点の幾何平均地をその血清の中和抗体価とした。

FRNT における検討項目

- フォーカス検出に用いる抗体の検討
ウサギ抗 LC16 IgG 分画に加えて、ウサギ抗 LC16 IgG 分画調製の元になった LC16m8 感染ウサギ血清、ならびに LC16m8 の親株である LC16m0 感染ウサギ血清を検討した。
- FRNT に使用する細胞
RK-13 細胞あるいは Vero E6 細胞を用い、LC16m8 ならびに SPL2A7 それぞれのウイルスに関して上述の手順に則り、FRNT を実施した。
- FRNT において血清とウイルスの混合液を細胞に添加してからの培養時間の検討
調製した血清希釈系列とウイルスの混合液を細胞に添加してから、10%ホルマリン添加による感染細胞の固定・不活化するまでの培養時間を 16 時間、24 時間で検討した。

C. 研究結果

最初に、試験用に調製した各ウイルスの RK-13 細胞ならびに Vero E6 細胞に対する力価 (focus forming unit/mL) を実施した。この時、フォーカス検出に使用する抗体として、ウサギ抗 LC16 IgG 分画に加えて、ウサギ抗 LC16 IgG 分画調製の元になった LC16m8 感染ウサギ血清、ならびに LC16m8 の親株である LC16m0 感染ウサギ血清を検討した。LC16m8 あるいは LC16m0 感染ウサギ血清を用いた場合、十分なフォーカスを検出できる希釈倍率にしてしまうと、それに伴いバックグラウンドが高くなってしまい、ELISpot リーダーでのフォーカスカウントが難しくなることが明らかになった。このためフォーカス検出には、LC16m8 感染ウサギ血清から IgG を粗精製したウサギ抗 LC16 IgG 分画を使用することにした。

次に、LC16m8 および SPL2A7 の FRNT に共通して使用できる細胞として、RK-13 細胞と Vero E6 細胞の比較を行った (図 1)。LC16m8 は、ウイルス液を細胞に添加してから 16 時間培養で、ウイルスを増やす際に推奨される RK-13 細胞を用いた場合フォーカスは明瞭に認められるが、Vero E6 細胞を使用した場合は RK-13 細胞と比較してフォーカスサイズは小さくなるものの ELISpot アナライザーで十分にカウントできるサイズであった。SPL2A7 は、同じく 16 時間培養では RK-13 細胞では増殖が遅くフォーカスが小さくカウントが難しかったが、Vero E6 細胞では大小サイズの異なるフォーカスが存在するものの問題なくカウントすることができた。Vero E6 細胞を用いて 24 時間培養するとフォーカスが大きくなり融合してしまうため、逆にカウントが難しくなることが明らかとなった。以上から、

LC16m8ならびにSPL2A7のFRNTにはVero E6が適していると考えた。

最後に、ウサギ抗 LC16 IgG 分画を測定対象となる血清とみなした FRNT を実施した。使用する細胞と血清・ウイルス混合液を細胞に添加してからの培養時間を変えて評価を行った(図2)。LC16m8に対するFRNTでは、16時間の培養でRK13細胞あるいはVero E6細胞を使用した場合でも血清濃度に依存して傾きの大きいフォーカスの減少・増加が認められた。SPL2A7に対するFRNTでは、培養時間にかかわらず血清濃度に依存したフォーカス数の減・少・増加は緩やかであり、フォーカスカウントのカットオフ値を下回る血清倍率を見出すことができなかった。これに対しVero E6細胞を使用した場合、血清濃度に依存したフォーカス数の減少・増加の傾きは、RK13細胞の場合と比較して大きくなり、カットオフ値を下回る血清の最大希釈倍率つまり中和抗体価を得られるようになった。24時間培養の場合は、図1に示した通りフォーカスの融合が認められるせいか血清濃度に依存したフォーカス数の減少の傾きに凸凹が生じてしまい中和抗体価を得ることが難しくなった。

D. 考 察

FRNTに使用する細胞の検討と血清・ウイルス混合液を細胞に添加してからの培養時間を検討することで、1回のアッセイで中和抗体価の値をつけることが可能になった。LC16m8に関しては、血清濃度の高いところではフォーカスが完全に消失し、血清の希釈に伴いフォーカスが出現するために明瞭に中和抗体価を算出することが可能であった。これに対し、MPXVに関しては血清濃度が高くてもフォーカスが消失することはなく、血清の希釈に伴いなだらかにフォーカスが

増加する傾向が認められた。これは、MPXVには主にEEV(Extracellular Enveloped Virus)とIMV(Intracellular Mature Virus)のウイルス形態が存在するためか、大小のサイズの異なるフォーカスが出現することが原因であると考えられた。MPXVの表面抗原に対するモノクローナル抗体を用いてフォーカスを検出することで改善する可能性もあり、系の改良は引き続き必要である。

E. 結 論

ワクチニアウイルスであるLC16m8ならびにMPXVであるSPL2Aに対するFRNTを行うにあたり、Vero E6細胞を用いて16(～20)時間が適していた。フォーカスの検出には、ウサギ抗 LC16 IgG 分画が十分に使用可能であることが明らかとなった。また、プラーク減少法を用いた中和試験では血清の希釈範囲が狭く、一度のアッセイで中和抗体価が定まらない場合は、更に血清を高希釈倍率で希釈系列を調製し再度試験を行う必要があったが、FRNTでは血清希釈倍率が8～131,072倍の15点で1回の試験で値をつけることが可能である。以上から、現時点において至適なFRNTの構築はできたと判断できる。今後、更に改良を進める予定である。

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Okumura N, Morino E, Nomoto H, Yanagi M, Takahashi K, Iwasaki H, Uemura Y, Shimizu Y,

Mizushima D, Fukushima K, Kinai E, Shiojiri D, Itoda I, Onoe Y, Kobori Y, Nakamura F, Tokita D, Sugiura W, Ueno S, Ainai A, Mine S, Suzuki T, Ohmagari N, Ujiie M. LC16m8 for Pre-exposure Prophylaxis against Mpox in a High-Risk Population: An Open-Label Randomized Trial. Clin Infect Dis. 2025 Feb 21:ciaf074. doi: 10.1093/cid/ciaf074. Epub ahead of print. PMID: 39982831.

2. 学会発表

1. 上野 栞, 佐高明子, 峰宗太郎, 小島朝人, 海老原秀喜, 森野英里子, 氏家無限, 鈴木忠樹, 相内 章. フォーカス減少中和試験を用いたサル痘ウイルスに対する中和抗体価測定系の確立. 第 71 回日本ウイルス学会, 名古屋, 2024.11.
2. 相内 章, 上野 栞, 峰宗太郎, 佐高明

子, 小島朝人, 海老原秀喜, 森野英里子, 氏家無限, 鈴木忠樹. サル痘ウイルスに対する効率的な新規中和抗体価測定系の構築. 第 28 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, 名古屋, 2024.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得（出願）
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1. ウイルス接種後のフォーカス像

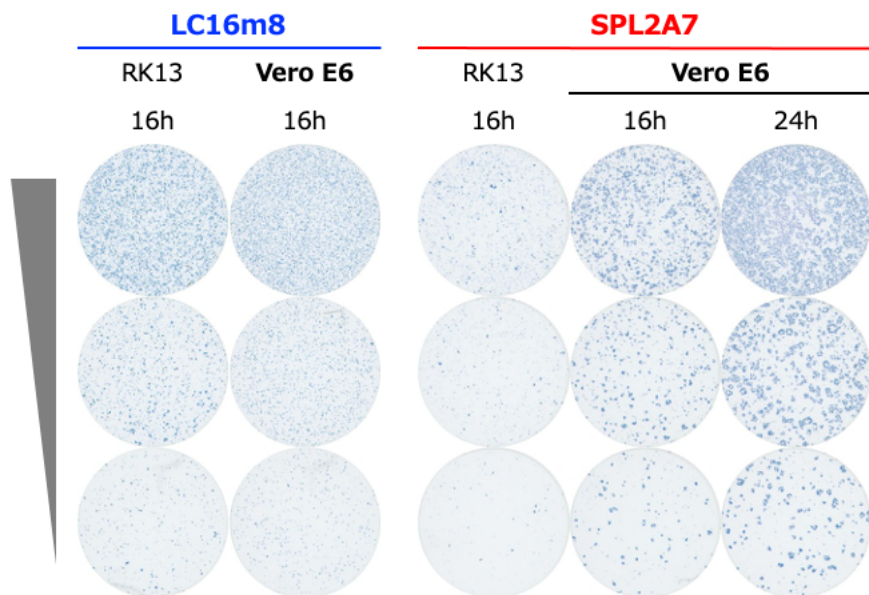
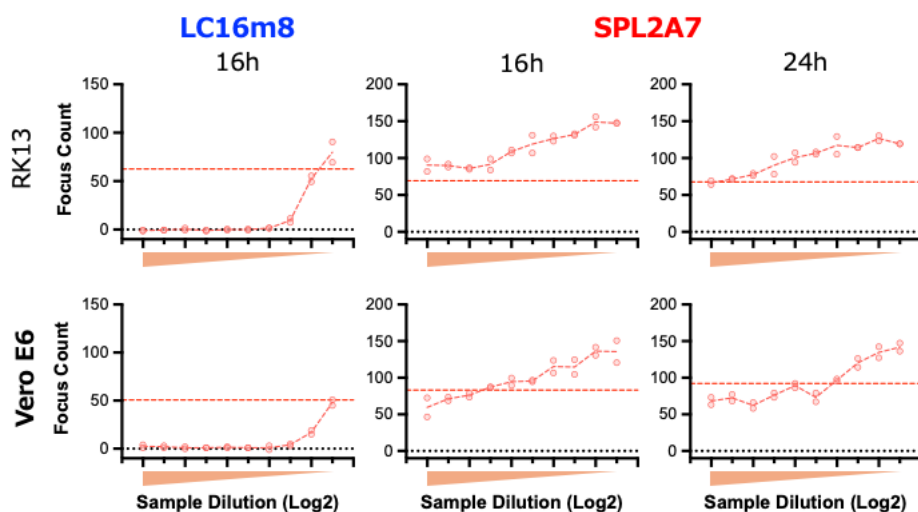


図2. 特異的血清の希釈系列とフォーカスの関係

LC16m8感染ウサギ血清から得たIgG分画を用いたFRNTによる中和試験



令和6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）
「新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」
分担研究報告書
次世代シーケンス技術による血液中の病原体検出法の開発

研究分担者 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 堀場千尋
研究協力者 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 橋野正紀

研究要旨

本研究は、次世代シーケンス（NGS）を用いた献血血液中の病原体検出法の確立を目的とし、非感染血液からの標準データ取得と解析パイプラインの開発、感染血液を用いた検証と改良を行う。実験室内操作であるWETとデータ解析であるDRY両面からの最適化を図り、信頼性の高い血液用メタゲノム解析法の確立を目指す。NGSの血液中の病原体検出法の確立のため、標準作業手順書、解析プログラムを整備し、NGS解析の運用基盤の構築を進めた。

A. 研究目的

次世代シーケンス（NGS）による臨床メタゲノム解析とは、患者から採取した検体中に含まれる微生物由来のDNAとRNAを包括的に分析する手法であり、感染症の診断や評価に利用されている。これは、献血血液の安全性を確保するための網羅的な病原体検出方法への応用も期待されている。一方で、血液検体における臨床メタゲノム解析は研究途上にあり、標準的な解析プロトコルはWETとDRYのいずれも定められていない。特にコンタミネーションの制御と管理については病原体検出の信頼性に大きく関わるため重要な課題である。本研究では、NGSを献血血液の安全性確保に利用することを目標に、信頼性の高い血液検体からの病原体検出法をWET、DRYの両面から開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. 血液メタゲノムレファレンスの構築

輸血用血液製剤には「赤血球製剤」「血漿製剤」「血小板製剤」「全血製剤」など様々な種類があり、各検体種に応じたコンタミネーションの制御・管理方法の策定が望ましい。本研究では、血液検体から検出される微生物由来配列を集積し陰性コントロールとしての血液メタゲノムレファレンスの構築の基礎データとする。

対象として、国立国際医療センター国際感染症センターで保管されていた血液培養陽性であった感染症患者 30 例の血液検体を用いた。全ての血液検体は国立国際医療センター内の臨床検査室で処理され、①全血（処理なし）、②血清（凝固後の上清）、③血漿（抗凝固剤処理後の上清）、④乾燥濾紙血液として国立感染症研究所で NGS 解析を進めた。検体処理用の濾紙として、従来の微生物検査法において病原体検出に利用されている QIAcard FTA Classic を

選択した。すべての検体中のウイルスを含む病原体由来の核酸の存在は NGS 解析の他に multiplex PCR（FilmArray 血液培養パネル）も用いて確認した。培養された細菌のゲノム情報を除くメタゲノムデータを用いて血液メタゲノムレファレンスの構築を目指した。

2. メタゲノム解析パイプラインの開発

検体の背景となるコンタミネーションの管理、宿主側はデータ解析上の偽陽性の制御を目的として、現在、原因不明感染症のために開発中であるメタゲノム解析パイプライン PATHDET に組み込み、血液検体に最適化した臨床メタゲノム解析パイプラインの開発を行った。

（倫理面への配慮）

「臨床メタゲノム解析に最適化した血液検体処理法の研究」（No 1850, 令和 6 年 10 月 10 日承認）として、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会にて承認を得た。

C. 研究結果

1. 血液メタゲノムレファレンスの構築

対象とした感染症患者 30 例の血液培養結果の内訳は、*Staphylococcus aureus* 4 例、*Staphylococcus caprae* 1 例、*Streptococcus dysgalactiae* 2 例、*Staphylococcus haemolyticus* 1 例、*Actinomyces naeslundii* 1 例、*Bacillus subtilis* 1 例、*Bacteroides uniformis* 1 例、*Candida albicans* 1 例、*Citrobacter koseri* 1 例、*Clostridium perfringens* 1 例、*Edwardsiella tarda* 1 例、*Escherichia coli* 8 例、*Klebsiella pneumoniae* 2 例、*Micrococcus luteus* 1 例、*Morganella morganii* 1 例、

Peptoniphilus species 1 例、*Phocaeicola(Bacteroides) vulgatus* 1 例、*Rothia(Kocuria) kristinae* 1 例であった。すべての血液検体は multiplex PCR も行い、病原体陰性であることが確認された。方法に記載に従い処理された血液検体は、NextSeq2000(Illumina)を用いて 150bp x2 の設定で NGS を行った。総出力として 105,615,240 reads が取得された。このうち、ヒトゲノム由来の配列を除去し、The National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide collection (nt) database に BLAST hit した配列は、59,080 reads であり、処理法にかかわらず血液培養で検出された細菌の読み取りの有意な検出は認められなかった。現在、BLAST hit しなかった配列情報の追加解析中である。すべてのシーケンスデータを確認した後、培養された細菌のゲノム情報を除くメタゲノムデータを血液メタゲノムレファレンスとして構築する予定である。

2. メタゲノム解析パイプラインの開発
不明症例の臨床検体を使用したメタゲノム解析結果から病原体候補を提案するパイプライン PATHDET を開発した。入力データとして Short-read sequencing の結果と Long-read sequencing の結果の両方を受付可能のプログラムとした。これまでの血液検体のメタゲノムデータを基に、実験中に設定したネガティブコントロールから自動的に内部コントロールとなる微生物を設定し、検査対象のメタゲノム解析結果をもとに標準化、コンタミネーションと推定される配列を減算するプログラミングを開発した。試験的に導入し、病原体検出における実用性を現在検証中である。

D. 考察

NGS を用いた血液からの細菌検出法では血液培養法で培養される細菌を検出できない場合があることが示唆された。Multiplex PCR でも検出されなかったため、NGS の感度による検出限界未満の細菌量であったことも考えられたが、データ解析上の検出不良であるかを今後検証する必要がある。また、原因とする細菌以外の微生物ゲノム検出が、原因菌をマスクする可能性があり、その対策として実験室内で設定したネガティブコントロールからのコンタミネーション減算法が開発された。今後、このプログラムが病原体検出に有用であるか検証が必要であると考ええる。

E. 結論

NGS は網羅的な病原体検出方法への応用も期待されている。引き続き技術面、プロトコル面、解析面での検証を行い、献血血液の安全性を確保するための網羅的な病原体検出方法へ応用できる検査系としての開発研究を行う必要がある。

F. 健康危険情報 特記事項なし

G. 研究発表 論文発表 該当なし

学会発表

1. 堀場千尋. NGS解析とデータ管理方法、原因不明症例解析の実例を交えて. 令和6年度第1回 神戸市健康科学研究所 健科研セミナー. 6月5日, 2024年, 神戸.
2. 堀場千尋. 原因不明感染症へのメタゲノムアプローチ. 第30回分子寄生虫ワークショップ 第20回分子寄生虫・マラリアフォーラム合同大会. 8月28日, 2024年, 千葉.
3. 堀場千尋. Clinical Metagenomic Sequencingの感染症診断への活用. 第25回東海病原微生物研究会. 10月12日, 2024年, 名古屋.
4. 堀場千尋. 次世代シーケンスによる感染症診断を通じて見る「臨床とWETとDRYの連携」. 第28回日本ワクチン学会・第65回日本臨床ウイルス学会合同学術集会. 10月26-27日, 2024年, 名古屋.
5. 堀場千尋. 原因不明感染症へのメタゲノム解析を用いた感染症診断. 第1回金沢臨床感染症セミナー. 12月11日, 2024年, 金沢.
6. 堀場千尋. 感染症分野におけるNGSの基礎的知識. 第36回日本臨床微生物学会総会・学術集会. 1月25日, 2024年, 名古屋.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

令和6年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」
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 近年の交通網の発達と人的・物的交流の活性化により節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）感染症の流行域が急速に拡大し、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。2024年は特にデング熱が世界的に流行していることが示され、国内でのデング熱輸入症例も200症例を超えた。また中南米においてオロプーシェ熱が再興し、ブラジルを中心に多くの患者が報告された。さらにデングウイルスの遺伝子診断系におけるプライマー・プローブセットを見直し関係機関と共有した。

A. 研究目的

わが国におけるデング熱の輸入症例は2022年以来再び増加傾向にある。デング熱はデングウイルスの感染によって発症する急性熱性疾患である。デングウイルスはフラビウイルス科オルソフラビウイルス属に分類される一本鎖（+）RNAウイルスであり、血清型1型～4型のウイルスが存在する。都市部ではネッタイシマカおよびヒトスジシマカ等のヤブカ族の蚊によって媒介される。またデング熱の鑑別疾患として同じオルソフラビウイルス属に分類されるジカウイルスによって発症するジカウイルス病およびアルファウイルス属に分類されるチクングニアウイルスの感染によって発症するチクングニア熱が挙げられる。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。

これまでにわれわれは地方衛生研究所とのアルボウイルスレファレンスネットワークを通して、アルボウイルス感染症の流行状況の共有、診断系の整備を実施してきた。特に遺伝子診断においては、デングウイルス血清型1型～4型の遺伝子検査に用いる陽性対照に実験室内キャリアオーバー汚染対策の一環として、既知の配列を人工的に導入した陽性対照を開発した。これら陽性対照を用いることにより、キャリアオーバー汚染を検知できるため、献血血のスクリーニングへの応用が期待される。

ところで、2023年末よりデング熱の重要な鑑別疾患として、オロプーシェ熱が中南米、特にブラジルにおいて、再興している。オロプーシェウイルス（Oropouche virus）はブニヤウイルス目ペリブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属シンプ血清

型群に分類される。ウイルスゲノムは、L、M、Sの3つの一本鎖（-）RNAセグメントからなる。オロプーシェ熱の主な症状は、発熱、頭痛、筋肉痛、関節痛、下痢、嘔吐、発疹、眼窩痛、腹痛等であり、デング熱の鑑別疾患である。

本研究の目的は、血液製剤の安全性を確保するために節足動物媒介性感染症の発生に備え、海外におけるデング熱、オロプーシェ熱等、その他アルボウイルス感染症の流行状況にかかる情報収集を行い、国内発生のリスクを評価することである。また、これまでに開発したデング熱、チクングニア熱、ジカウイルス病に対する遺伝子診断法について血液製剤のスクリーニングに応用・共有することである。

B. 研究方法

1. ウイルス遺伝子の抽出と RT-PCR

検体からの RNA 抽出には Roche 社の High Pure Viral RNA purification kit を使用した。ワンステップリアルタイム RT-PCR 反応キットとしては、Thermo 社の TaqMan Fast Virus 1-step Master mix と Toyobo 社の RNA-direct Realtime PCR Master mix を使用した。

2. デングウイルス 1 型～4 型、ジカウイルスおよびチクングニアウイルスのリアルタイム RT-PCR 法用キャリアオーバー防止対策陽性対照の検討

実験室内キャリアオーバー汚染対策として、デングウイルス 1 型～4 型、チクングニアウイルスおよびジカウイルスの陽性対照に既知の配列を人工的に導入した改良陽性対照を用いてその検討を行った。陽性対象の目的配列をプラスミドクローニングし、RNA を *in vitro* transcription 法により合

成後、精製した。各ウイルス RNA を 10^9 コピー/ μL に調製し、混合してカクテルとした。ストック液には、安定剤として 10 $\mu\text{g/mL}$ yeast tRNA を添加した。

3. アルボウイルス感染症実験室診断法の共有

献血血液の安全対策として、感染症安全対策体制整備事業を実施するにあたり、国立感染症研究所次世代生物学的製剤研究センターとアルボウイルス感染症実験室診断法について共有した。

細胞

サル腎細胞由来 Vero9013 細胞を 5% CO_2 , 37°C で培養した。細胞は $3 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、T-25 flask に播種して使用した。

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 社) を使用した。

i) 200 μL の検体を 1.5ml マイクロチューブに入れ、Working solution 400 μL を加え、ピペッティングでよく混和した。ii) フィルターチューブと回収チューブを連結させ、反応液 600 μL を注いだ。iii) 10,000 回転、15 秒間遠心した。iv) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500 μL の Inhibitor removal buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心し、ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、DNase 処理を行った。v) 450 μL の Wash buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。vi) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450 μL の Wash buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。vii) 回収チューブを外し、空のチューブを連結し、12,000 回転、10 秒遠心した。viii) 回収チューブを捨て、新しい 1.5 mL チューブにフィルターチューブを連結させ、50 μL の Elution buffer を加え、10,000 回転、1 分間遠心した。ix) 得られた精製 RNA はすぐに使用しない場合は -80°C で保管した。

オロプーシェ熱の流行状況調査

オロプーシェ熱の流行状況については、PubMed 文献検索、米国 CDC、ブラジル保健省オズワルドクルズ財団発表資料、世界保健機関の発表資料等からの情報収集を行い、その流行状況を解析した。

(倫理面への配慮)

特記事項なし

C. 研究結果

1. アルボウイルス感染症実験室診断法の共有

4 種類の Dengue virus 各血清型、チク

ングニヤウイルス、およびジカウイルスに対する遺伝子検査法のうち、TaqMan real-time RT-PCR 法において使用する陽性コントロールストック液 (各々について 10^9 コピー/ μL に調製した混合 RNA 溶液 1mL) を次世代生物学的製剤研究センターと共有した。さらに Dengue virus、Chikungunya virus、Zika virus の培養法についても情報共有した。

オロプーシェウイルスの流行状況

2024 年 5 月 27 日、キューバ保健省は、2 州から国内初となる症例 74 例の発生を報告し、11 月 25 日までに 15 州から計 603 例の確定症例が報告された。さらにイタリアでは、キューバに 2024 年 5 月下旬～6 月上旬頃に渡航歴のあったオロプーシェ熱の輸入症例が発生した。その後スペイン、ドイツ、およびカナダにおいてもキューバからの輸入症例が報告された。米国でも 94 例のキューバからの輸入症例が確認され (フロリダ州 (90 例)、カリフォルニア州 (1 例)、コロラド州 (1 例)、ケンタッキー州 (1 例)、ニューヨーク州 (1 例))、3 例が入院、うち 2 例は神経浸潤性疾患を呈した。

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ウエストナイルウイルス、ウスツウイルス、ジカウイルス、Dengue virus 等がある。献血血から検出されたアルボウイルス RNA としては、2005 年にレユニオン島の献血血より Chikungunya virus RNA の検出、2005 年にプエルトリコの献血血より Dengue virus RNA の検出、2009 年にタイの献血血より Chikungunya virus RNA の検出、2012 年にブラジルの献血血より Dengue virus RNA の検出、2012 年にブラジルにおいて少なくとも 5 例の輸血による Dengue virus 感染例、2014 年にプエルトリコの献血血より Chikungunya virus RNA の検出、2016 年にブラジルにおいて 2 例の血小板輸血によるジカウイルス感染例等が報告されている。2023 年には中国において 44,972 名の献血者のスクリーニングにおいて、6 名の献血血が Dengue virus 1 型陽性であった。

近年 Dengue 熱の流行が世界的に拡大しており、欧州疾病予防管理センター (ECDC) によると、2024 年の 1 月から 9 月にかけて、86 の国・地域から 1,300 万人を超える Dengue 熱患者と 8,500 人の Dengue 熱関連死が報告された。特に米州においては、大きな流行が報告されており、2024 年第 31 週までに、ラテンアメリカとカリブ海諸国を中

心とするアメリカ大陸で 1,132 万人のデング熱患者が報告され、このうち、15,461 例 (0.13%) 以上が重症デング熱症例であり、6,303 例 (死亡率 0.056%) が致死적であった。

わが国におけるデング熱輸入症例患者数は、2019 年 463 例をピークにコロナ禍による国際交流の低下により激減したが、2022 年 98 例、2023 年 176 例、2024 年 232 例と再び増加傾向にあり、デング熱をはじめとしたアルボウイルス感染症に対する検査体制の強化が重要である。本研究においては、遺伝子検査に必要な陽性対照を提供することで、正確な検査結果が得られるようになった。よって献血血液の安全対策における感染症安全対策体制整備事業に対するデングウイルスおよびジカウイルス、チクングニアウイルス各 RNA の参照品の整備はアルボウイルス感染症の実験室診断の向上およびアップデートに資するものである。

オロプーシェ熱の主な症状は、発熱、悪寒、激しい頭痛/眼窩後部痛、倦怠感、筋肉痛、関節痛、吐き気、嘔吐、羞明等を最大 7 日間伴い、稀に風疹様の発疹、髄膜炎、脳炎、めまい、食欲不振、その他の全身症状を呈す。その症状からデング熱の重要な鑑別疾患である。患者の 6 割が寛解後に症状を再発することがある。都市部よりも農村部での患者が多く、これまでブラジルでは主にアマゾナス州等のアマゾンの熱帯林を中心に発生していたが、2024 年の流行では、大西洋沿岸部に流行が拡大した。バイーア州においては初めての死亡例が 2 例報告 (既往歴のない女性) された。またブラジルでは垂直感染 3 例 (胎児死亡 2 例、先天異常 1 例) を確認している。キューバでも先天異常 3 例が確認され、このうち 1 症例では胎児の心臓の血液においてオロプーシェウイルス陽性であった。キューバではオロプーシェウイルス感染に関連したギラン・バレー症候群の 3 例 (51 歳、53 歳、64 歳の女性 2 例と男性 1 例) も報告されている。イタリアにおけるキューバからの輸入症例では、血液、血清、尿および精液からオロプーシェウイルスが分離されているが、これまでのところ性行為による感染は確認されていない。献血血からのオロプーシェウイルスの検出例は報告されていないが、今後もその動向を注視する必要がある。

E. 結論

デング熱・デング出血熱はデングウイルスによる蚊媒介性の急性熱性疾患である。2024 年には世界的にデング熱の大きな流行が発生した。またわが国では海外との人

的交流の再開によりデング熱の国内患者数は 2019 年以前の水準に増加傾向にある。これまでにアルボウイルスに対する遺伝子検査法の見直しを行い、特にデングウイルス 1 型から 4 型、ジカウイルス、チクングニアウイルスに対するプライマープローブセットを作製し、汚染対策としてマーカー配列を挿入した陽性コントロールを作製、関係機関・部署と共有した。

2024 年にはデング熱の重要な鑑別疾患であるオロプーシェ熱の流行が中南米で発生し、イタリア、スペイン、米国、カナダ等で輸入症例が報告されている。これらアルボウイルスの動向については引き続き注視し、今後その対策を引き続きアップデートする。

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

7. 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

令和 6 年度総括研究報告書
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・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」

分担研究報告書
蚊のウイルス保有実態と蚊媒介性ウイルスの感染・流行リスク解析

研究分担者	国立感染症研究所	昆虫医科学部	小林 大介
研究協力者	国立感染症研究所	昆虫医科学部	澤田 恵子
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	犬丸 瑞枝
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	比嘉由紀子
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	葛西 真治
	国立感染症研究所	昆虫医科学部	伊澤 晴彦

研究要旨 本邦には、土着している可能性がありながら、詳しい生態が未解明な昆虫媒介性ウイルスが数多く存在し、そのなかには感染したヒトでウイルス血症を引き起こすもの、またはその可能性が高いものが複数存在している。本研究では、このようなウイルスに着目し、これらウイルスの感染リスクならびにその流行実態を明らかにすることで、血液製剤の安全性確保に資する知見を得ることを目的とした。今年度は南西諸島において、ウイルス媒介昆虫類の捕集を実施し、蚊やヌカカ、サンショウバエなど多種多様な吸血昆虫類が吸血のため牛舎に飛来していることが明らかとなった。また、フクオカウイルスを媒介する蚊種を特定するべく、複数種類の蚊由来培養細胞におけるウイルスの増殖動態を調査した。その結果、フクオカウイルスは実験に供試した 4 属 5 種の蚊に由来する 8 種類の培養細胞の全てにおいて、ウイルスの感染・増殖性が確認された。

A. 研究目的

我が国では、これまでに十数種の蚊媒介性ウイルスが記録されている。そのうち、日本国内に土着して毎年流行していることが確認されているのは日本脳炎ウイルスのみである。それ以外のウイルスについては、例えばデングウイルスのように、国内には定着していないが、輸入症例などを感染源として国内流行が散発的に発生するものも知られている。しかしながら、国内に土着している可能性がありながら、ほとんど調査がされていないウイルスも数多く存在し、そのなかにはヒトでウイルス血症を引き起こすもの、またはその可能性が高いものも存在している。

本研究では、前述のような国内に土着している可能性があり、かつヒトでウイルス血症を引き起こす（またはその可能性が高い）ウイルス、具体的にはペリブニヤウイルス科やラブドウイルス科などに分類されるウイルスを研究の対象とする。これらのウイルスについて、日本国内で捕集された蚊からのウイルス遺伝子検出ならびに培養細胞を用いたウイルス分離を行い、国内に生息する蚊類における当該ウイルスの保有実態を調査する。さらに、ウイルスの分離株を用いた蚊への感染実験によって、ウイルス媒介可能性のある蚊種についても調査することで、我が国におけるこれらウイルスの感染と流行リスクを解析する。

B. 研究方法

南西諸島における吸血昆虫の採集

2024 年 10 月 18～21 日に沖縄県八重山郡竹富町西表島において、吸血昆虫類の捕集調査を行った。島内の複数の牛舎にブラックライトトラップ（John W. Hock 社）を設置し、午後 5 時前後から翌朝午前 6 時前後までブラックライトとファンを稼働させ、吸血のために飛来する昆虫類の捕集を実施した。

ウイルスの準備

本研究に使用したフクオカウイルス [Fukuoka virus (FUKV)] FUK-11 株は、HmLu-1 細胞（ハムスター肺由来）に接種し、細胞変性効果が認められた後に培養上清を回収し、以降の実験まで -80℃ で保存した。

蚊由来培養細胞

本研究には以下に示す 4 属 5 種の蚊に由来する 8 種類の蚊由来培養細胞を用いた；AeAe-GH98 細胞（ネッタイシマカ由来）、Ar-3（オオクロヤブカ由来）、C6/36 細胞（ヒトスジシマカ由来）[JCRB 細胞バンクおよび European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) 由来株]、CCL-126 細胞（ヒトスジシマカ由来）、MSQ43 細胞（ステフェンスハマダラカ由来）、NIAS-AeA1-2 細胞（ヒトスジシマカ由来）、NIID-CTR（コガタアカイエカ由来）細胞。C6/36 細胞、CCL-126 細胞、MSQ43 細胞はイーグル最少必須培地、NIAS-AeA1-2 細胞は IPL-41 昆虫培地、AeAe-GH98 細胞はシュナイダー培地、Ar-3 細胞、NIID-CTR 細胞は VP12 培地を用い、それぞれの培地に非働化したウシ胎児血清や抗生物質等を添加して、細胞維持培地とした。これらの培養細胞は、28℃ もしくは 25℃

にて維持・培養した。

FUKV RNA の定量的リアルタイム PCR 系の作製

FUKV ゲノムの L 遺伝子領域上に蛍光プローブおよび検出プライマーセットを設計した。スタンダード RNA は、この領域を含むように設計したプライマーセットにより合成した cDNA から、mMESSAGE mMACHINE™ T7 Transcription Kit (ThermoFisher Scientific 社) により作製した。

各種細胞における FUKV の増殖動態の観察

上述した 8 種類の蚊由来培養細胞および HmLu-1 細胞における FUKV の増殖動態を解析するため、 3.0×10^5 の各種細胞に対し、 3.0×10^7 RNA コピーの FUKV を接種した。接種 1 時間後に各種の細胞を、PBS で 2 回洗浄し、細胞培養液を添加した。その後すみやかに 150 μ L の培養上清を回収するとともに、接種 48 時間および 120 時間後にも同量の培養上清を回収し、以降の解析まで -80°C で保存した。

培養上清からのウイルス RNA の抽出は、NucleoSpin RNA Virus (タカラバイオ社) を用いて実施した。抽出された RNA は、上述の定量的リアルタイム PCR 系により Luna Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs 社) を用いて、FUKV RNA のコピー数を測定した。

C. 研究結果

南西諸島の畜舎に飛来する吸血昆虫類の発生状況

沖縄県八重山郡竹富町西表島内で選定した 4 つの畜舎 (牛舎) にブラックライトトラップを設置し、日没後から翌朝までに吸血に飛来する昆虫類の捕集を行った (図 1)。2024 年 10 月 18~21 日の調査期間内の 3 晩における調査によって、千頭以上の吸血昆虫類 (蚊、ヌカカ、サシチョウバエ等) が捕集された (図 2・3)。現在、これら昆虫類の分同定作業を実施しており、順次、保有ウイルスの解析を実施する予定である。

各種蚊由来培養細胞における FUKV の増殖動態解析

FUKV を接種した各種蚊由来培養細胞の培養上清を経時的にサンプリングし、そこに含まれるウイルス RNA 量を定量した。その結果、今回実験に用いたすべての蚊由来培養細胞の上清において、経時的な FUKV RNA 量の増加が観察された (図 4)。このことから、FUKV はこれら多様な蚊種の細胞に感染し、増殖可能であることが示された。また、これらの蚊由来培養細胞のいずれにおいても、顕著な細胞変性効果は観察されなかった。今回実験に使用した蚊由来培養細胞のうち、ウイルス接種 120 時間後において最も高いウイルス RNA コピー数が観察された

のは C6/36 細胞 (JCRB 細胞バンク由来) であり、次いで MSQ43 細胞であった (図 4)。

D. 考察

本研究では、我が国に常在するもしくはその可能性がありながらも、流行状態が詳しく判明していない蚊媒介性ウイルスの実態を明らかにするとともに、実験室内におけるウイルスの感染実験を行うことによって、それらウイルスの感染リスクを明らかにすることを目的としている。今年度は、野外における吸血性節足動物の採集調査ならびに、実験室において様々な蚊由来培養細胞を用いて、ウイルスの増殖動態解析を実施した。

我が国に土着している可能性がある蚊媒介ウイルスのなかで、ヒトでウイルス血症を引き起こしかつ病原性が報告されているウイルスはバタイウイルス [Batai virus (BATV)] のみである。国内では BATV のヒト症例は未だ報告されていないものの、1994 年および 2001 年にそれぞれ宮古島と与那国島のウシの血液から BATV が分離されている。この事例が示すように、南西諸島では何らかの蚊が現地のウシに BATV を媒介したと考えられるが、当該地域における BATV 媒介蚊やその後の流行状況についての情報はない。そこで今回、南西諸島の牛舎に飛来する吸血昆虫類の捕集調査を実施した。今回の調査では、吸血昆虫類として多数の蚊およびヌカカが牛舎に設置したトラップで捕集され、これらの吸血昆虫がウシを吸血するために飛来していることが確認された。今後はこれら吸血昆虫種の分類同定を行うとともに、ウイルス分離等を行うことによって、BATV を含めた保有ウイルスの解析を実施する予定である。

今回の調査において、上述の牛舎に設置したトラップでサシチョウバエの一種の雌成虫も捕集された (図 3)。今回の調査地である西表島には、イリオモテサシチョウバエ *Sergentomyia iriomotensis* の分布が報告されている。今回採集されたサシチョウバエについては、未だ種の同定は行われていないが、おそらく本種であることが推定される。イリオモテサシチョウバエは、自然界では専ら爬虫類などの冷血動物を吸血すると考えられており、ウシを含む哺乳動物を吸血源として利用することは報告されていない。また、これまで牛舎における採集記録も存在していない。本研究による牛舎での採集記録は、本種がウシを吸血するために牛舎に飛来した可能性を示すものであるかもしれない。本邦に分布するサシチョウバエ種の吸血生態を解明するうえで重要な一知見であると考えられる。

本研究では、本邦に常在性でヒトに感染

しウイルス血症を起こす可能性のある FUKV の媒介蚊を特定するべく、各種蚊由来培養細胞を用いたウイルスの増殖動態解析を実施した。その結果、FUKV は実験に用いた 4 属 5 種の蚊に由来する 8 種類の培養細胞の全てにおいて、感染・増殖性が確認されたことから、広範な蚊種の細胞に感染し増殖可能であることが明らかとなった。FUKV はこれまで本邦のコガタアカイエカから分離された報告があるものの、今回実験に用いた蚊由来培養細胞のうちで、当該蚊種の培養細胞上清中のウイルス RNA コピー数は最も低い結果であった。その一方で、ヒトスジシマカやステフェンスハマダラカに由来する培養細胞においては、コガタアカイエカ由来培養細胞よりも 100 倍程度高い FUKV の増殖性が観察されたことから、これらの蚊種が FUKV の好適な媒介蚊である可能性も考えられる。そのため今後は、これらの蚊種を含めた各種の蚊個体に FUKV を接種することによって、ウイルスの媒介性を解析することを予定している。

E. 結論

南西諸島では多数の吸血昆虫が吸血のため牛舎に飛来していることが確認された。また、FUKV は広範な蚊種由来の細胞に感染し増殖することが確認された。血液製剤の安全性を確保するためには、国内に土着するウイルスの流行実態ならびに感染リスクを把握することが重要であり、今回得られた結果を基に、さらなる研究を遂行する必要がある。

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



図 1：牛舎に設置したブラックライトトラップ



図 2：ブラックライトトラップで捕集された多数の吸血昆虫類

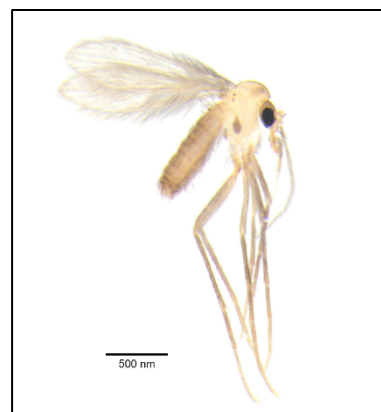


図 3：牛舎に設置したブラックライトトラップで捕集されたサシチョウバエの一種

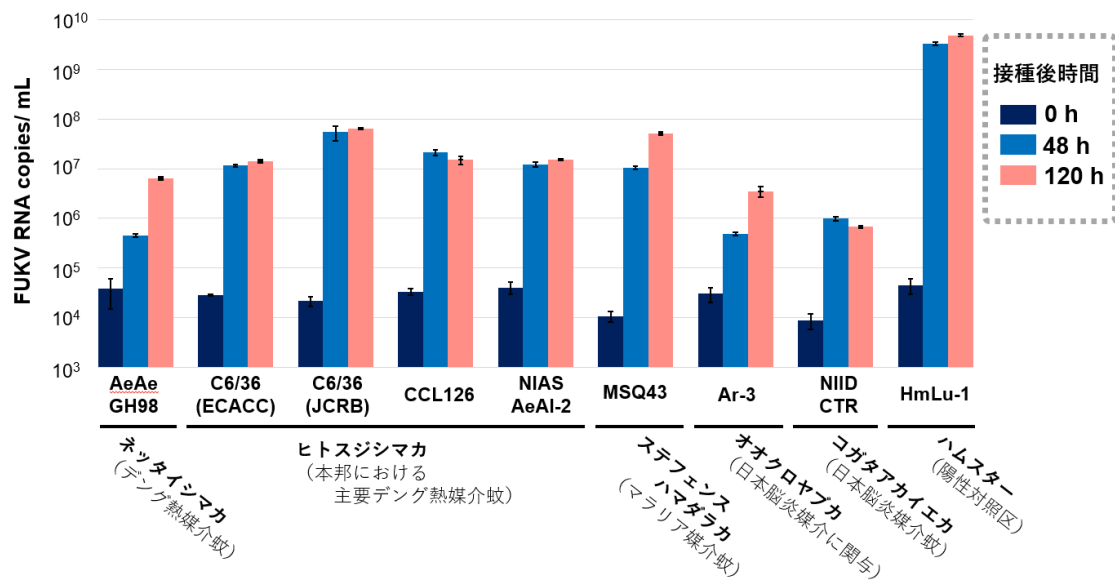


図4：各種蚊由来培養細胞におけるフクオカウイルスの増殖動態

令和 6 年度総括研究報告書

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・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」

分担研究報告書

動物におけるインフルエンザウイルスの簡易検査方法の確立

研究分担者 国立感染症研究所 獣医科学部 黒田 雄大

研究要旨 近年、世界的に高病原性鳥インフルエンザウイルス（Highly Pathogenic Avian Influenza Virus, HPAIV）の流行が拡大する中、その国内への浸潤状況およびヒトへの感染リスクを評価する必要性が高まっている。特に、感染野鳥との接触機会が多い野生動物における抗体疫学調査は、ウイルス浸潤の指標として有用である可能性がある。本研究では、野生動物血清を用いた抗体スクリーニング法および HA 亜型の診断系の確立を試みた。その結果、IDEXX 社製の汎 A 型インフルエンザウイルス抗体検出 ELISA キットを用いることで、アライグマ血清から IAV に対する抗体を検出することに成功した。また、HPAIV の主要なサブタイプである H5 および H7 亜型に着目し、HA 蛋白のみを外殻させた VSV シュードウイルスの作製にも成功した。今後は、調査対象地域の拡大および陽性検体の HA 亜型同定を進めることで、国内における HPAIV の浸潤状況の可視化と、それに基づく公衆衛生リスクの評価ならびに血液製剤の安全性評価に資することが期待される。

A. 研究目的

近年、分子診断技術や製造工程の進歩により、血液製剤の安全性はかつてない水準に達している。しかしながら、新型コロナウイルスやサル痘ウイルスのような新興感染症の出現が相次ぎ、未知あるいは再興感染症による献血血液へのウイルス混入リスクに対する監視体制の強化が、今なお喫緊の課題である。なかでも、高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）は、現在進行形で世界的な拡大を見せており、野生動物における大量死、酪農牛など家畜へのスピルオーバー、さらには畜産従事者を介したヒ

ト感染例が海外で報告されている。これらの状況を踏まえると、HPAIV は我が国においても近い将来、ヒトの健康に重大な影響を及ぼすリスクのあるウイルスとして位置付けられる。

本研究では、感染野鳥との接触頻度が高いとされる野生動物、とりわけアライグマを対象に、IAV 抗体のスクリーニング法および感染株の HA 亜型を同定可能な診断系の構築を試みた。これにより、国内における HPAIV の浸潤状況を把握し、将来的なヒト感染リスクの科学的評価と、献血血液の安全性確保に資する基礎データの取得を目的

とする。

B. 研究方法

1. 野生動物の血清サンプル

2023年1月から2024年12月にかけて、和歌山県内で捕獲された以下の野生動物を対象に全血を採取した：イノシシ 298 頭、シカ 273 頭、アライグマ 1032 頭、タヌキ 41 頭、ハクビシン 139 頭、アナグマ 124 頭。採取後、全血は 3500 rpm、4℃、5 分間の条件で遠心分離し、分離後の血清を-20℃で保存した。

2. 抗 IAV 抗体スクリーニング

抗 IAV 抗体のスクリーニングには、IDEXX 社製のインフルエンザ A 抗体検出 ELISA キットを用いた。一次抗体として、10 倍に希釈した野生動物血清を使用し、二次抗体および発色基質にはキット付属の試薬を用いた。Bio-Rad 社製の分光光度計を用いて各ウェルの吸光度を測定し、陰性コントロールの吸光度に対する比 (S/N 比) を算出した。判定基準は、イノシシ血清では $S/N < 0.6$ 、その他の動物血清では $S/N < 0.5$ を陽性とした。

3. VSV シュードウイルスの作製

・HA および NA を外套させた VSV シュードウイルス

H5 亜型 (A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022)、H7N9 高病原性株 (A/Chicken/Shanxi/1012/2021)、および H7N7 低病原性株 (A/duck/Tottori/NK12F18/2021) から得られた HA および NA 遺伝子を、それぞれ発現プラスミド pCAGGS にクローニング

した。これらの HA・NA 発現プラスミドを、HEK293T 細胞に TransIT-LT1 (Mirus Bio) を用いて単独または同時にトランスフェクションした。陽性コントロールには VSV-G 発現プラスミドを、陰性コントロールには空の pCAGGS ベクターを使用した。トランスフェクション後 48 時間で、G タンパク質を外套しルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ VSV 種ウイルスを $MOI=0.5$ で感染させ、37℃で 90 分間インキュベートした。その後、接種液を除去し PBS(-)で 3 回洗浄、維持培地に置換して培養を継続し、感染 24 時間後に上清を回収した。得られた上清は遠心 (3500 rpm、4℃、5 分) 後に分注し、-80℃で保存した。

・HA のみ外套させた VSV シュードウイルス

HA 発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に種ウイルス ($MOI=0.5$) を感染させた。PBS(-)で 3 回洗浄後、VSV の出芽を促進するため、コレラ菌由来ノイラミニダーゼ (Sigma-Aldrich) を 0~10 munit/ml 添加した維持培地を加え、37℃で培養した。感染 24 時間後に上清を回収し、同様に遠心・分注後、-80℃で保存した。

4. VSV シュードウイルスの感染実験

MDCK 細胞を 96 ウェルプレートに播種し、翌日に培地を除去後、10 倍段階希釈したウイルス液を各ウェルに 50 μ l ずつ接種した。24 時間後に Bright-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega) を添加し、GloMax® Discover Microplate Reader (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性

を測定した。アセチルトリプシン (Sigma) 添加実験では、ウイルスの細胞侵入に必要な HA の活性化を補助するために、ウイルス接種時にアセチルトリプシンを終濃度 0 ~10 µg/ml となるように同時添加した。

C. 研究結果

1. 抗 IAV 抗体のスクリーニング

IDEXX 社製の ELISA キットを用いた抗 IAV 抗体スクリーニングの結果、イノシシ、シカ、ハクビシン、タヌキ、アナグマの全検体は抗体陰性であった。一方、アライグマ 1032 頭のうち 18 頭が陽性となり、陽性率は 1.74%であった。これは、アライグマが過去に IAV に感染した可能性を示唆するものである。また、アライグマの陽性検体を捕獲時期別に分類したところ、インフルエンザウイルスの流行時期である冬季に限らず、夏季に捕獲された個体からも抗体陽性が検出された。年齢別では、0 歳齢が 6 頭、1 歳齢が 5 頭、2 歳齢が 1 頭、それ以上が 1 頭、年齢不明が 5 頭となった。陽性の 0 歳齢個体のうち、1 頭は体重が非常に軽く、乳歯が観察されたため、幼齢個体であることが明らかとなった。

2. VSV シュードタイプウイルスの構築と感染性評価

・HA および NA を外套したシュードウイルス

H5 亜型と H7 亜型ウイルス株の HA と NA 外套 VSV シュードウイルスをイヌ腎由来株化(MDCK)細胞に感染させ、ルシフェラーゼ活性により細胞侵入を評価した。その結果、HA のみ、もしくは NA のみ外套 VSV シュードウイルスでは細胞侵入を確認

できなかったが、HA と NA を外套させたものでは、細胞侵入が確認できた。しかし、H7N7 のシュードウイルスは細胞侵入効率が悪かった。これには、低病原性鳥インフルエンザウイルスの HA が培養細胞由来プロテアーゼによって活性化されにくいことに起因すると考えられたため、アセチルトリプシンを添加した条件下での細胞侵入を再評価した。その結果、10µg/ml を添加した場合に、H7N7 シュードウイルスの細胞侵入が明確に観察された。

・HA のみを外套させた VSV シュードウイルス

HA のみを外套させた VSV シュードウイルスについては、VSV 出芽促進のため外因性にコレラ菌由来ノイラミニダーゼを添加した条件で作製を行った。得られたウイルスを MDCK 細胞に感染させたところ、細胞侵入が確認され、HA 単独でも出芽および感染が可能であることが示唆された。ただし、LPAIV 由来の HA では感染効率が低かったが、アセチルトリプシンの添加により細胞侵入が確認可能となった。

D. 考察

1. 抗 IAV 抗体のスクリーニング

本研究において、IAV に対する抗体が検出されたのはアライグマのみであり、他の野生動物種 (イノシシ、シカ、タヌキ、ハクビシン、アナグマ) では陽性例は確認されなかった。アライグマの陽性率は 1.74%と低率ではあるものの、感染野鳥の死骸などを摂取することによるウイルス暴露の可能性が示唆される。

また、陽性個体が冬季のみならず夏季に

捕獲された事例からは、感染が冬季に起こり、その後数ヶ月にわたって抗体が持続していた可能性が示唆される。さらに、乳歯を有する若齢個体における抗体陽性例については、ウイルス曝露による感染というよりも、母獣からの移行抗体が ELISA で検出された可能性が高いと考えられる。

2. VSV シュードタイプウイルスの構築

本研究では、H5 および H7 亜型由来の HA および NA を外套させた VSV シュードウイルスの作製に成功し、細胞侵入性の検出が可能であることをルシフェラーゼアッセイにより確認した。また、HA 単独の外套でも、外因性のノイラミニダーゼを添加することでウイルス粒子の出芽が促進され、感染性を有するウイルスの構築が可能であることを明らかにした。この手法は、NA 遺伝子の導入を必要としないため、シュードウイルス作製にかかるコストと時間を削減し、簡便なサブタイプ別抗体評価系の構築につながる。さらに、低病原性ウイルス (LPAIV) に関しては、細胞内のプロテアーゼ活性が不十分であることが原因と考えられ、アセチルトリプシンなど外因性プロテアーゼの添加が細胞侵入の鍵であることが実証された。この知見は、同様にトリプシン活性を必要とするヒト季節性インフルエンザウイルス (H1、H3 亜型) における応用も期待される。

E. 結論

本研究により、アライグマが自然環境下でインフルエンザ A ウイルスに暴露される

機会があることが明らかとなり、アライグマ血清が IAV の環境中浸潤状況をモニタリングする上で有用な指標となる可能性が示唆された。今後は、他地域で捕獲されたアライグマ血清も含めた広域的な抗体疫学調査を進め、ヒトを含めた他動物への感染リスクの変動をモニタリングする予定である。

また、作製した VSV シュードウイルスは、迅速かつ低コストで HA 亜型別の抗体反応性を評価できる新たな実験系として有望である。本実験系を用いて、スクリーニング陽性となった野生動物検体中に含まれる抗 HA 抗体の型別診断を行うことで、国内に浸潤している亜型の同定が可能となると考えられる。

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

図 1 検査検体数と陽性数

	イノシシ	シカ	アライグマ	ハクビシン	タヌキ	アナグマ
2023年	178	153	449 (8)	59	23	52
2024年	120	120	583 (10)	80	18	72
合計	298	273	1032 (18)	139	41	124

図 2 アライグマ検体の時期別の内訳

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	合計
2023年	13	24 (1)	36 (2)	29 (2)	27	17	26 (1)	15	28 (1)	82	107 (1)	45	449 (8)
2024年	47 (1)	60 (1)	62 (1)	35 (1)	30	37	36 (1)	21 (2)	40 (1)	116	61 (2)	38	583 (10)

図 3 HA と NA 外套シュードウイルス構築

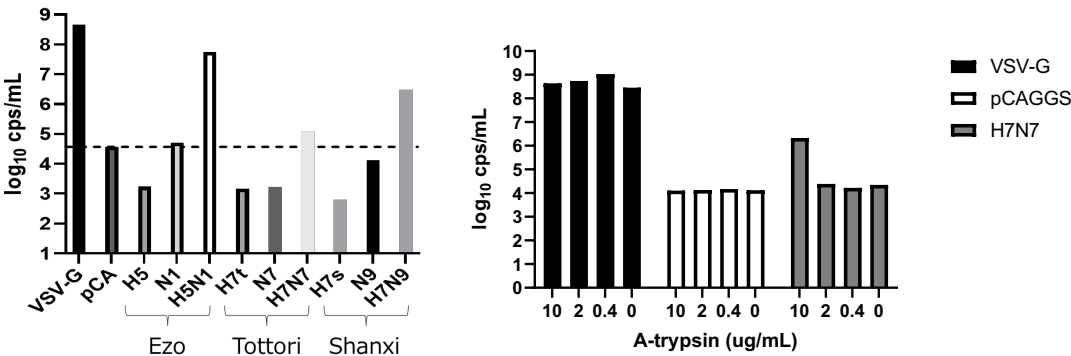
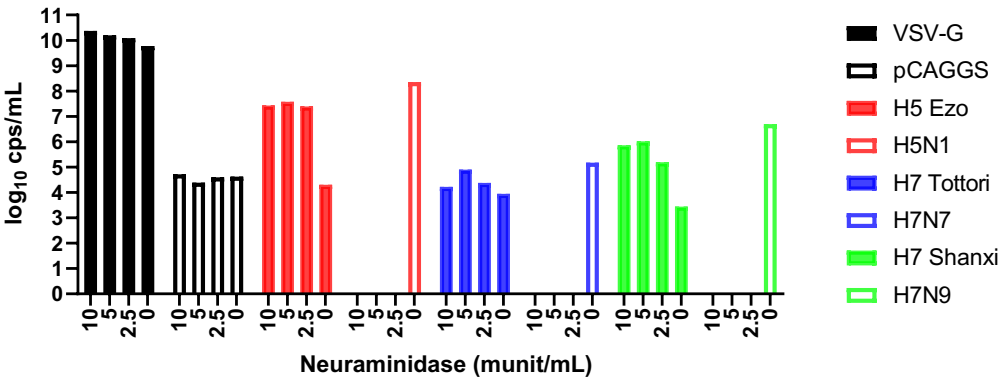
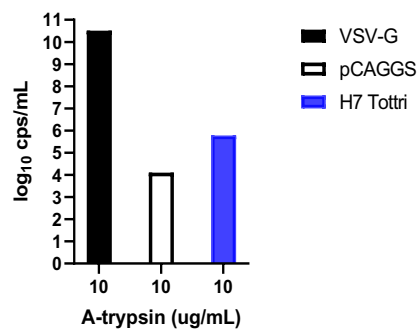


図 4 HA のみ外套シュードウイルス構築





別紙 4

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
Choi CW, Choi Y, Maryuningsih YS, Shin JH, Chantarasomchinn P, Mizukami T , Ng SW, Thi DL, Ramondrana D, Dimpilis GN, Sohn KH, Roh HS, Koh HJ, Lee W, Kim YH.	Report of the Ninth Asian National Control Laboratory Network meeting in 2024, with a focus on regional harmonization of regulatory systems to prepare for cross-border transfer of plasma.	Biologicals.	90	101823	2025
Hiraga K, Tezuka K, Nagata K, Koh KR, Nakamura H, Sagara Y, Sobata R, Satake M, Tanio M, Hasegawa H, Saito M, Miura K, Mizukami T , Hamaguchi I, Kuramitsu M.	Development of a novel multiplex digital PCR-based method for the detection of HTLV-1 proviral deletion.	J Virol Methods	332	115071	2024
Hiraga K, Kitamura T, Kuramitsu M, Murata M, Tezuka K, Okuma K, Hamaguchi I, Akari H, Mizukami T .	Highly homologous simian T-cell leukemia virus type 1 genome in Japanese macaques: a large cohort study.	Virol J.	21	166	2024
Kidiga M, Murata M, Grover P, Ode H, Iwatani Y, Seki Y, Kuramitsu M, Morimoto M, Natsume T, Kaneko A, Hayashi S, Yasunaga JI, Matsuoka M, Mizukami T , Akari H.	Identification of occult STLV-1 infection in Japanese macaques.	J Infect Dis.		jiaf120	2025
Grover P, Murata M, Kidiga M, Hayashi S, Ode H, Iwatani Y, Morimoto M, Natsume T, Kaneko A, Yasunaga JI, Matsuoka M, Kuramitsu M, Seki Y, Mizukami T , Akari H.	Identification of natural remission of mother-to-child retroviral transmission.	J Infect Dis.		jiaf064.	2025

Okumura N, Morino E, Nomoto H, Yanagi M, Takahashi K, Iwasaki H, Uemura Y, Shimizu Y, Mizushima D, Fukushima K, Kinai E, Shiojiri D, Itoda I, Onoe Y, Kobori Y, Nakamura F, Tokita D, Sugiura W, Ueno S, Ainai A , Mine S, Suzuki T, Ohmagari N, Ujiie M.	LC16m8 for Pre-exposure Prophylaxis against Mpox in a High-Risk Population: An Open-Label Randomized Trial.	<i>Clin Infect Dis.</i>		ciaf074.	2025
野島清子, 関洋平, <u>水上拓郎</u> .	人免疫グロブリン製剤の歴史と品質確保	ファルマシア	60	543-547	2024