

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

総合研究報告書

輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性と安定供給を確保するための
新興・再興感染症の研究の開発

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

1. フラビウイルスを検出できる共通プライマーを開発し、1～4型のデングウイルス、ジカウイルス、ウスツウイルスの核酸を検出できることが確認出来た。
2. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの高感度核酸増幅法を開発し、特異性や感度を評価した。最終的に3セットのプライマーとプローブのセットを作成し、感度や特異性に問題がないことを確認出来た。
3. HBV の培養系と感染性の評価方法を改良し、HBV に高感受性の細胞株を樹立した。その細胞株と HBV 陽性血漿を用いて HBV の液状加熱による不活化効果と抗 HBs グロブリン製剤の中和活性が *in vitro* で評価できるようになった。
4. 血漿中から SARS-COV2 の RNA が稀に検出されることから原料血漿にウイルスが混入した場合を想定し、武漢株、アルファ変異、ガンマー型変異、ベータ型変異、デルタ型変異、オミクロン株等の 60℃液上加熱処理における不活化効果を評価したところ、全てのウイルス株が 30 分で不活化されることを確認した。また、血清中に抗体や補体以外の感染を抑制する「因子」の存在が示唆された。
5. ダニ媒介のウイルスの感染リスクを減少させるため、渡り鳥の飛来地のマダニが吸血している動物種とウイルスの解析を行った。特にキチマダニは、鳥やヒトへの嗜好性があり、渡り鳥を介したウイルス の拡散に重要なマダニであることが確認出来た。北陸地域の渡り鳥飛来地を中心としたダニ媒介ウイルスの調査において、当該地域のキチマダニから複数年に渡って Kabuto mountain virus (KAMV) が計 5 株分離されており、これら分離株の配列情報を活用して、プローブ法によるリアルタイム PCR に基づく高感度 KAMV 検出系を今回新たに確立した。
6. アンチトロンビン製剤とグロブリン製剤の液状加熱処理による HEV の不活化効果を評価した。それぞれ対数減少率 (LRV) で 1Log、及び 2Log 程度であることが明らかとなり液状加熱処理は HEV に対しては有効な工程ではないことが判明した。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長

大隈 和 関西医科大学
教授

野島 清子 国立感染症研究所
主任研究官

比嘉 由紀子 国立感染症研究所
室長

前野 英毅 日本血液製剤機構
中央研究所 室長

A. 研究目的

ヒトや物質の国際的な移動の急速な増加や地球温暖化のためにデングウイルスやチクングニアウイルスなどの蚊媒介性ウイルス感染症が東南アジアや中南米諸国において流行し、毎年輸入感染例が報告されている。これらのウイルスを媒介する蚊が国内に存在しているため国内でも発生する可能性がある。また、新型コロナウイルスが中国で発生し、世界的なパンデミックとなっている。更にE型肝炎ウイルス(HEV)に加えて重症熱性血小板減少症やダニ媒介脳炎などダニ媒介のウイルス感染症も広く国内に存在していることも明らかになっている。これらの病原体は、いずれもウイルス血症を起こすことから血液製剤を介して感染する可能性がある。新興・再興感染症は血液製剤の安全性の脅威になるだけでなく、献血者の減少を招き安定供給に重大な支障をきたす。一方、血液製剤の安全対策上重要なB型・C型肝炎ウイ

ルスは、適当な培養系が開発されていないために不活化法の評価には動物由来のモデルウイルスが使用されている。培養法を改良し、実際のHBVやHCVを用いた不活化法の評価を目指した。本研究班では、これらの病原体の検出法やスクリーニング法の開発とその評価を行った。また、新規病原体であるコロナウイルスが血中からも検出されることから輸血製剤や血漿分画製剤におけるリスクの評価も目指した。

B. 研究方法と結果

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

これまでに開発したデングウイルス、ウエストナイルウイルスを含むフラビウイルス共通プライマーを用いた迅速診断法のデング患者検体に対する反応性を検討したところ、デング1型から4型までの検体中のウイルス遺伝子を検出することを確認した。また本共通プライマーは

アフリカ型の遺伝子型であるジカウイルス MR766 株およびアジア型である PRVABC59 株も検出した。またブタ血清より分離された日本脳炎ウイルス遺伝子型 I 型の野生株に対する反応性を検討したところ、本共通プライマーは野生型の日本脳炎ウイルス遺伝子についても問題なく検出することを確認した。さらに本共通プライマーとデングウイルス血清型特異的 TaqMan RT-PCR 法を比較検討したところ、統計学的に高い一致度が認められ、特に急性期血清においてウイルス遺伝子を高感度に検出することが示唆された。2019 年には多くのデング熱の輸入症例が報告され、わが国におけるデング熱の患者数は初めて 450 例を超えた。また 5 年ぶりにデング熱の国内流行が 3 例発生し、これら患者の実験室診断を実施した。2019 年には多くのチクングニア熱の輸入症例も報告され、わが国におけるチクングニア熱の患者は初めて 45 例に達した。しかしながら 2020 年はデング熱の輸入症例が前年の 1/10 以下に激減し、チクングニア熱の輸入症例数も 1/15 に減少した。この原因の 1 つとして、コロナ禍による入国制限により人的交流が減少した影響が考えられた。

2) 血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

研究要旨：血液製剤は、ヒトの血液を原料とすることからウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。そのため血液製剤の安全性を担保する上で、血液への病原体の混入をいち早く検出、防止し製造過程より病原体を排除することは極めて

重要な課題である。近年我が国ではデングウイルスの国内感染例の発生や海外での重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) の同定に伴う国内感染例の確認等がなされ、国際的な人の移動や新たな病原体の発見等に伴う新興・再興感染症病原体の献血血液等への混入リスクは益々認知されている。そこで本研究では、血液製剤の安全性確保と安定供給に貢献することを目的に、既に国内感染が認められ献血血液等におけるスクリーニング法の整備が急がれる SFTSV の高感度核酸検査法の確立を目指す。本年度はこれまでに同定したプライマー・プローブセットを用いたリアルタイム RT-PCR 法のマルチプレックス化に向けた検討を行った。

3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発

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

性を測定が可能であった。

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

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

4) 実ウイルスを用いたエタノール分画による血漿の分画とウイルスの不活化・除去と安全性の評価

SARS-CoV-2 感染症の知見としては、症状のある感染者の 15%において血液中から SARS-COV-2 の RNA が検出される (RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性

などを明らかにした。武漢株、アルファ変異、ガンマー型変異、ベーター型変異、デルタ型変異、オミクロン株等を用いて、血漿分画製剤で用いる 60℃液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることが確認できた。

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

5) マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

マダニ媒介感染症の予防には、マダニの生態や生理的な知見を得ることが重要であるが、野外における情報は限られている。主に大型の哺乳動物がマダニの重要な吸血源となるため、その移動は基本的には宿主である野生動物の移動範囲となり、比較的狭いと考えられている。一方で、鳥類に寄生するマダニが海外から運ばれる可能性も指摘されていることから、本研究では渡り鳥の飛来地に生息する植生マダニからウイルス検出を行なうと同時に、それらマダニの吸血履歴を調査することで、マダニが保有する病原体の感染環を明らかにしようと考えた。2021 年は、これまで得られた植生マダニのサンプルを用いて、吸血源動物の探索、ウイルス検出と検査系の確立を中心に研究を進

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

6) 感染症の E 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究

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

HEV の熱感受性の調査については、リバースジェネティクス法により培養細胞から産生した HEV (以下、RG-HEV) を用いて、

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

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

D. 考察

中国で発生した SARS-COV-2 の世界的なパンデミックによって国内外のヒトの移動は激減したが、これまで問題になっていた感染症が減少したわけではない。新本研究班は、新興・再興感染症が発生した場合に血液製剤へのリスクを評価し、リスクが予想される際には、すぐに対応できる感染症の各分野からの研究者から構成されている。今回も原料血漿に新型コロナウイルスが混入した場合の製剤の安全性を確認するために液状加熱による感受性を評価した。その一方で、国内に既に常在している病原体やそのベクターも放棄された農地などの要因などによって生存する地域が拡大し、従来よりもヒトが感染し易くなる可能性もある。このような状況の中で流行が生ずる前に病原体の性状や検出法の開発、さらには発生時の対応法を検討しておくことは、血液製剤の安全性確保や安定供給に重要である。また、スクリーニング法の進歩によって安全性が高くなった HBV はこれまで有用な感染系がなかったが、拡大や野生動物の増加、更には温暖化等の高感受性株の樹立でモデルウイルスと同等に不活化されることを明らかにした。HEV も *in vitro* の感染系はあるものの、安全性試験に必要な高力価の感染性を有する血漿由来のウイルスを十分に得ることは困難であったが、分子生物学的手法を取り入れ高力価のウイルスを作成することに成功した。

E. 結論

新興・再興感染症等の脅威から血液製剤の

安全性確保と安定供給のために蚊媒介ウイルス、SFTS ウイルス等の検出法の開発を行った。ダニ媒介感染症の予防のためにダニの吸血源の嗜好性を解析し、渡り鳥の飛来地でのダニの調査も行なった。また、分画製剤の安全性向上のため、HBV や HEV の不活化の検討に加えて新型コロナウイルスの不活化法も検討した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録

状況なし

以上