

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)

令和6-7年度 総合研究報告書

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

研究代表者 水上 拓郎 国立健康危機管理研究機構 (JIHS) 国立感染症研究所 (NIID)
次世代生物学的製剤研究センター (CNBR) センター長

研究協力者 関 洋平 JIHS NIID CNBR 第一室長 室長

研究協力者 野島 清子 JIHS NIID CNBR 第一室長 主任研究員

研究協力者 櫻木 小百合 JIHS NIID CNBR 第一室長 主任研究員

研究協力者 栗林 和華子 JIHS NIID CNBR 第一室長 主任研究員

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、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等の体制の構築が必要である。

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。

2025 年度は、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。特にデング熱やチクングニア熱の発生が顕著で、チクングニア熱に関してはレユニオンで再度アウトブレイクが発生し、2025 年 5 月 4 日までに確定症例 4 万例以上が確認された。2024 年 12 月より ID-NAT (Arboplex, Grifols) が導入され、Pathogen Reduction 血小板も導入された。献血血液では 1.4% の陽性が確認され、輸血事例も確認されたが、輸血感染は認められていない。また本邦では重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) に関し、今まで西日本での感染事例がほとんどであったが、岐阜、神奈川、茨城そして北海道でも確認さ

れた。また Mpox に関しては、クレード Ib および IIb の組み換え株が英国及びインドで計 2 例報告され、引き続き、注意が必要であることが再確認された。

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た。さらに、血液製剤における MPXV clade IIb 感染リスクを定量評価する系を構築した。MPXV は血液中で感染性が低下するが、4°C では、MPXV の感染性は保持される傾向が見られた。今後、血小板製剤についても同様の実験を行い、幅広い種類の血液製剤における MPXV IIb 感染リスクについて評価を行う予定である。さらに、本研究で構築した迅速リスク評価モデルを用いて他の新興・再興感染症を起こすウイルスについても検討を行い、リスク評価を行うと共に評価モデルの最適化に務める。

A. 研究目的

1. 新興・再興感染症リスク分析・評価

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

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。

2. 新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

血液製剤の安全性確保及び安定供給において、COVID-19 に代表される性状が不明な新規病原体によるパンデミック発生時に、迅速に輸血用血液製剤や血漿分画製剤に対するリスク評価を行うことが重要となる。しかし、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、文献等に基づいた評価が主体となるため、迅速性に欠けるという課題がある。そこで、本研究課題では、新興・再興感染症等によるパンデミック発生時に病原体の血液製剤への混入リスクを短時間に評価するための迅速リスク評価法を確立することを目的とする。

本研究ではモデルウイルスとしてエムポックスウイルス (Monkeypox virus; MPXV) を用いた。Mpox は 2022 年に世界的なアウトブレイクが発生し、国内では、2022 年 7 月

25 日に国内 1 例目の患者が報告された。2023 年以降も、患者の発生が続いており、累計で 301 例の症例が確認されている (2026 年 3 月末時点)。特に、2025 年 9 月 16 日には、国内で初となる Clade Ib 株による感染事例も報告されている。

MPXV のウイルス DNA は、感染者由来血液において発症前の時点で $\sim 10^3$ copies/mL 検出されることが報告されており (Palich et al., The Lancet Infectious Diseases 2023), 発症前の患者の献血による輸血感染リスクは否定できない。一方、実際に Mpox 患者由来献血検体が輸血された事例では、受血者において MPXV DNA が検出されなかった (Puenpa et al., Emerging Infectious Diseases 2024)。しかし、輸血用血液製剤を含む血液製剤の製造・貯蔵期間において MPXV の感染性が維持されるのかについては十分なデータが蓄積されておらず、輸血による感染リスク評価は十分ではない。

そのため、MPXV clade IIb 株を用いて、血液の各分画や血液製剤における感染性の有無を評価した。

B. 研究方法

1. 新興・再興感染症リスク分析・評価

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

迅速リスク評価法の確立目指し、全血に標的ウイルス(MPXV clade IIb)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、血漿および白血球の各分画におけるウイルスの分布や、感染性の有無、感染持続性について評価を行った。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

1. 新興・再興感染症リスク分析・評価

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 Ib) 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 Ib 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。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。

オロプーシェ熱

現在、ブラジルをはじめ南米でオロプーシェ熱の発生が増加し、問題となっている。オロプ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 月にオロプーシェ熱と輸血に関する重要情報、11 月にオロプ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、その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。現状ではヒトーヒト感染のリスクは低い、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。

2025 年度 感染症動向

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 Ib) 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 16 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)」が宣言されたが、2025 年 9 月 5 日に解除された。この間、アフリカでは継続した感染が確認され、また欧州でも感染者の増加傾向が確認されている。PHEIC 解除後も、アフリカ地域以外での Clade Ib の報告が続いており、特にスペインやオランダでは増加している。Clade Ib 感染者の約半数が渡航歴のない人であった。また、クレード Ib および IIb の組み換え株が、英国及びインドで計 2 例報告された。臨床像は今までと同様でまた、二次感染例は確認されなかったが、WHO は結論を出すのは時期尚早であり、引き続き、注視すべきであるとしている。

国内では大きなアウトブレイクはないものの、2025 年 12 月時点で、累計 269 例が報告されている。2025 年 9 月には輸入症例ではあるが、国内初の clade Ib が分離・届出

された。

2025 年 8 月に MPXV の体外診断用医薬品が保険適用化され、12 月には厚労省より保険適用に伴う診断方法の追加の通知が発出された。これにより医療機関における Mpox の検査診断が可能となり、迅速な対応が可能となった。

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。また本年度は迅速リスク評価法の開発を行い、血中動態を含め明らかにしつつある。

チクングニアウイルス

2025 年 1 月～9 月末までに、世界 40 カ国から疑い例 263,592 例、確定例 181,679 例、死亡例 155 件が報告されている。世界各地でアウトブレイクを繰り返しており、WHO は地理的拡大の可能性が高いとしている。フランスのレユニオン島では、2014 年のアウトブレイク以来、再度のアウトブレイクが発生し、2024 年 8 月に 3 例発生して以降、2025 年 5 月 4 日までに確定症例 4 万例以上の感染事例が報告された。フランスでは ORSEC (国家災害対応計画) を発動した。献血対策として、2024 年 12 月 ID-NAT (Arboplex, Grifols) 開始、Pathogen Reduction (Amotosalen + UVA) 血小版が供された。1,0117 件のスクリーニング中、1.4% の陽性が確認され、輸血事例も報告されているが、輸血感染は報告されていない。

Convalescent plasma の準備の計画された。これに伴い、フランス本土やイタリアでも感染が増加。2025 年 10 月には米国ニューヨーク州で感染事例が報告。海外渡航歴のない人であったため、NY 州での感染が疑われている。米国では、2014 年にフロリダで 12 例、テキサスで 1 例報告され、2019 年まで散発的な報告が認められている。引き続き、注視が必要である。

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）

重症熱性血小板減少症候群（SFTS）はフェヌイウイルス科の SFTS ウイルスによる感染症である。マダニを介して感染し、西日本中心に年間約 100 例の患者発生届出、春～秋に多い感染症とされている。血中ウイルス量が多く、輸血による感染リスクが懸念されている。近年、獣医従事者での感染事例の報告も増え、西日本のみでなく、マダニや抗体陽性動物の分布から、東日本にも移動していることが疑われていた。そのような中、2025 年、岐阜、神奈川、茨城及び北海道で SFTS 事例が 4 件発生し、西日本に限らず患者が報告される可能性あることが示唆された。ウイルス遺伝子解析の結果、渡り鳥による移動が示唆されているが、注視する必要がある。

鳥インフルエンザ

H5N1 に関しては、ヒト感染例は 2025 年 12 月現在、2003 年以降累計で 992 例、死亡は 476 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、H5N9 は 2025 年に米国で世界初のヒト感染死亡例が報告されている。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 2 例の死亡を含む 149 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、感染の可能性は低く、リスク評価も変化はしていない。

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、2026 年 5 月時点で 20 州、1093 群の乳牛の感染が報告されているが、減少傾向にある。2025 年 12 月に H5N1 系統 2.3.4.4b, 遺伝子型 D1.1 が検出され、今までの遺伝子型 B3.13 とは異なることから、新たなスピルオーバーも懸念されている。また米国だけでなく、オランダでもウイルスは分離されていないが、HAPI 抗体陽性の乳牛が確認されている。

現状ではヒト-ヒト感染のリスクは低いが、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

はじめに、MPXV が長期間にわたり感染性を保持し得るのかを検討するため、RPMI 培地に MPXV を添加し、4℃及び 37℃で 1～28 日間インキュベートした後、Vero 細胞に感染させ 48 時間培養した (図 1A)。RPMI 中における MPXV DNA 総量を経時的に定量した結果、ウイルス DNA 量は 37℃で顕著な減少傾向を示した(図 1B)。しかし、ウイルス DNA 量の減少は、感染性の低下を必ずしも示すものではない。そこで、感染 48 時間後の Vero 細胞における MPXV DNA 総量を分

子に、添加した RPMI 中の MPXV DNA 量を分母にとり、MPXV DNA の増減比 (48hpi/Input) を算出することで、各タイムポイントにおける MPXV の感染性を評価した。その結果、37°C 培養した MPXV は 14 日目以降感染性が低下していた一方、4°C 培養した MPXV は感染性を 1 ヶ月以上保持することが明らかとなった (図 1C)。

次に、血液中のどの分画にウイルスが存在し、それらが感染性を保持するのかについて検討するため、MPXV を血液 (WPB) に添加し、37°C で 1～8 日間培養後、赤血球 (RBC)・白血球 (WBC)・血漿 (Plasma) を分離し、各分画を Vero 細胞に添加した (図 2A)。その結果、いずれの分画にもウイルスは存在することが分かった。また、各分画における MPXV DNA 総量に培養期間中明らかな変動は認められなかった一方 (図 2B)、WPB, RBC, Plasma では感染性を示す 48hpi/Input は経時的に低下し、培養 8 日目までに全て 1 未満となった (図 2C)。他方、WBC では 48hpi/Input は培養 2 日目までは大きな変動は見られず、培養 8 日目でも 1 以上であったことから感染性の保持能は他分画に比べやや高い可能性が示唆された。

最後に、血液製剤に添加した MPXV は、血液製剤の有効期間内において感染性を保持し続けるのかを検討するため、白血球除去フィルターを通した全血製剤 (LR-WBP)・血漿製剤 (PP)・赤血球製剤 (RP) に対して MPXV を添加・1～30 日間培養後、Vero 細胞に感染させた (図 3A)。現在 15 日間までの解析を終えており、全ての血液製剤における総ウイルス量は温度に依らず、15 日間ほとんど変動しないことが分かった (図 3B)。37°C 培養した全血製剤と血漿製剤において、

感染性を示す 48hpi/Input は経時的に低下する傾向があった (図 3C 左)。一方で、4°C 培養した全血製剤と血漿製剤は培養開始時と同等の感染性を 15 日間保っていた (図 3C 右)。また、赤血球製剤においては培養温度に依らず、MPXV の感染性は培養開始時から一貫してほとんど認められなかった。

D. 考察

1. 新興・再興感染症リスク分析・評価

2025 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 の感染拡大、日本での輸入症例、日本と交流のある地域での増加をみると、引き続き監視・対策の強化が求められる。一方、デング、チクングニア、オロブーシェ熱に関しては引き続き注視が必要である。

2. 新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

白血球分画における MPXV の感染性は他分画よりも高かったことから、血液中では白血球が MPXV の主要な感染先であることが推測された。実際、白血球除去フィルターを通した全血製剤の 48hpi/Input は 5.51 であるのに対し、未処理の全血は 14.9 であり、白血球除去によって感染性が大きく低下していた。Mpox 患者血液で MPXV が検出されているにも関わらず、MPXV 輸血感染事例が未だ無い理由として、①血中における MPXV ウイルス量は皮膚に比べて少ないこと、②日本では帰国後 4 週間の献血を制限していること、③血中環境下での MPXV の感染性は低下すること、④白血球を除去した上で血液製剤を作製していることが主要因で

あると推察される。

E. 結論

1. 新興・再興感染症リスク分析・評価

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。

2025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、チクングニア熱の発生状況は、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。Mpoxに関しては国内でも Clade Ib が同定され、また日本の周辺国での感染事例も増えている。発生数自体は減少傾向にあるが、引き続き、注視が必要である。

2. 新興・再興感染症迅速リスク評価法の開発

本研究では血液製剤における MPXV clade IIb 感染リスクを定量評価する系を構築した。MPXV は血液中で感染性が低下するが、4℃では、MPXV の感染性は保持される傾向が見られた。今後、血小板製剤についても同様の

実験を行い、幅広い種類の血液製剤における MPXV IIb 感染リスクについて評価を行う予定である。さらに、本研究で構築した迅速リスク評価モデルを用いて他の新興・再興感染症を起こすウイルスについても検討を行い、リスク評価を行うと共に評価モデルの最適化に務める。

F. 研究発表

論文発表

1. Seki Y, Uemura M, Tezuka K, Murata M, Kaneko A, Kidiga M, Grover P, Hayashi S, Hamaguchi I, Akari H, Mizukami T. Persistence and local maintenance of STLV-1 infection in the vaginal epithelium of postmenopausal Japanese macaques. *J Infect Dis* 2026, Accepted
2. 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 Simian T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection in Japanese Macaques. *J Infect Dis*. 2025; 232 :510-518.
3. 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; 232: 203-211.
4. 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.
5. 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.
 6. 天野 亮, 水上 拓郎, 楠 英樹. 核酸アプタマーの活用法 ウイルス検出と感染防御. *細胞* 57 巻 7 号 Page528-531, 2025
- 学会発表**
36. 関 洋平, 野島 清子, 櫻木 小百合, 百瀬 暖佳, 栗林 和華子, 宮川 敬, 松山 州徳, 長谷川 秀樹, 吉原 愛雄, 水上 拓郎. JN.1 型 mRNA ワクチン (コミナティ筋注) 及び組換えタンパクワクチン (ヌバキソビッド筋注) 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免疫原性の評価. 第 3 回新型コロナウイルス研究会, 東京, 2025 年 7 月, 国内, 口頭.
 37. Seki Y, Nojima K, Sakuragi S, Momose H, Kuribayashi W, Miyakawa K, Matsuyama S, Hiraga K, Hasegawa H, Hamaguchi I, Yoshihara Y, Mizukami T. Immunogenicity of 8th booster doses of SARS-CoV-2 JN.1 monovalent mRNA vaccine and recombinant spike protein with Matrix-M adjuvant vaccine against SARS-CoV-2 omicron sub-variants and evaluation of post-booster safety profile. 19th Vaccine Congress, Kyoto, Japan, September, 2025, Poster
 38. 関 洋平, 野島 清子, 櫻木 小百合, 百瀬 暖佳, 栗林 和華子, 宮川 敬, 松山 州徳, 長谷川 秀樹, 吉原 愛雄, 水上 拓郎. JN.1 型 mRNA ワクチン及び組換えタンパクワクチン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免疫原性の評価. 第 29 回日本ワクチン学会 第 66 回日本臨床ウイルス学会合同学術集会, 札幌, 2025 年 9 月, 国内, 口頭.
 39. 倉光 球, 中村 仁美, 相良 康子, 永田 幸, 水上 拓郎, 三浦 清徳. 妊婦 HTLV-1 確認検査 LIA 判定保留・陰性例における IgM 抗体検出の評価. 第 11 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 鹿児島, 2025 年 11 月
 40. 上村 麻実, 関 洋平, 手塚 健太, 村田 めぐみ, 兼子 明久, Maureen Kidiga, Poonam Grover, 林 咲良, 浜口 功, 明里 宏文, 水上 拓郎. STLV-1 感染ニホンザルの雌性生殖器上皮内の非リンパ組織における感染動態の解明 第 11 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 鹿児島, 2025 年 11 月
 41. 天野 亮, 手塚 健太, 篠崎 智弘, 平賀 孔, 坂本 泰一, 楠 英樹, 水上 拓郎. HTLV-1 エンベロープ蛋白質に対する核酸抗体「アプタマー」の創製 第 11 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 鹿児島, 2025 年 11 月

42. グロヴェル プーナム, キディガ モーリー
ーン, 大出 裕高, 岩谷 靖雅, 林 さくら,
森本 真弓, 夏目 尊好, 兼子 明久, 松岡
雅雄, 安永 純一郎, 関 洋平, 水上 拓郎,
明里 宏文. 自然感染した日本ザルの母
乳中の STLV-1 感染細胞の特性解析 第
11 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 鹿児島,
2025 年 11 月
43. Maureen Kidiga, Poonam Grover, Yojiro
Yanagawa, Sakura Hayashi, Hirotaka
Ode, Yasumasa Iwatani, Mayumi
Morimoto, Takayoshi Natsume, Akihisa
Kaneko, Takuo Mizukami, Hirofumi Akari.
Evaluation of STLV-1 in the semen of
infected Japanese macaques 第 11 回日
本 HTLV-1 学会学術集会, 鹿児島, 2025
年 11 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

4. 特許取得
なし。
5. 実用新案登録
なし。
6. 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)
令和6-7年度 総合研究報告書
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

1. HBV は保存環境によらず感染性が保持されているが、これを *in vitro* 感染系を用いて評価した。凍結・融解の影響では、少なくとも 5 回まで感染性に影響はなかった。また、保存温度の検討では、4 度で少なくとも 4 週間は、感染性の減少は認められなかった。以上から HBV の感染性は極めて保持されることが確認できた。
2. *In vitro* 感染系を用いて国内や海外で採漿された血漿から製造された HBs 免疫グロブリン製剤の遺伝子型 A, B, C に対する中和活性を評価した。同じ抗体量では遺伝子型 A と C を同等に中和できたが、B に対しての中和活性は採血国によらず低かった。血漿のドナーは通常、遺伝子型 A のワクチンで免疫されているためワクチンによって誘導される抗体は、遺伝子型 B への中和活性が低いことを示唆していると考えられた。
3. パルボウイルス B19 (19V) に感受性を示す細胞株は存在するが、一過性の感染となる。外来性 DNA を認識する分子を遺伝子改変することで親株よりも数十倍高いウイルス量と 10 日以上感染が持続する細胞株を作成することができた。

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。しかし感受性が同じなのか評価は、困難であった。我々は、血液製剤の不活化法の評価に応用できる高感度な HBV の感染系の確立を目指して研究を続けてきた。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がわかったのでこの 2 年間にこれまで不明であった HBV の安定性の解析と抗体によ

る中和活性の解析を行うことにした。また、パルボウイルス (B19V) は, *in vitro* 感染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の感染性を有するウイルスを得るためには, 感染者由来の陽性血漿を確保する必要がある。また, 標準品等の作成・維持のためには由来が同じ B19V を確保する必要があり, ウイルスを産生する培養系の開発が必要である。我々がこれまでに分離した B19V に高感受性の細胞株にさらに遺伝子改変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を目指した。

B.研究方法

1.凍結融解や保存温度が感染性に与える影響

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, 陽性血漿を室温で融解し, 100μL 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。保存温度による感染性への影響の解析では, 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 週間保管後に凍結し, 同時に溶解させ細胞に感染させた。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。

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, 凍結・凍結では 0 回の検体の HBs-RNA 量と比較した。また, 温度では調整した直後に凍結した検体の HBs-RNA 量と比較した。

2.HBV の中和活性の評価方法

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 は種々に希釈して細胞に感染させ, HBs-RNA 陽性となった最大希釈倍率を感染価とした。各遺伝子型の HBV を 100μL に約 30 感染価を有するように 5%アルブミンで希釈した。HBs 免疫グロブリン製剤は, 国内血漿由来の製剤と海外血漿由来製剤を購入し, 研究に用いた。製剤は, 製剤基準で 200 単位/mL 以上の抗体価を有しているが 200 単位/mL として研究に用いた。製剤は, 5%アルブミンで希釈し, 100μL に 0mU, 10mU, 30mU, 100mU, 300m の抗体が存在するように調整した。それぞれ調整した HBV と HBs 免疫グロブリンを等量ずつ混合し, 37 度で 2 時間反応させ 200μL 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。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, 陰性となった最小抗体価を中和抗体価と定義した。各製剤とも 3 回試験を繰り返した。

3.HBV 陽性血漿, 及び B19V 陽性血漿の由来

HBV 陽性血漿, 及び B19V 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。また, HBV の遺伝子型は制限酵素の違いによって判断した。

4.B19V の培養法

(1) 細胞は KU812 からクローニングで B19 に高感受性を示したものをを用いた。RPMI1640 にピルビン酸, グルタミン酸, ペリシリン・ストレプトマイシン, 非必須アミノ酸を添加し, 最終濃度 10%になるように牛胎児血清, 及びエリスロポエチンを 3 単位/mL を加えて培養した。

(2) 遺伝子改変の方法

市販されている Cas9 プラスミド (ピュロマイシン) を Transfectamine 6000CRISPR Transfection Reagent を用いてトランスフェクションし, 3 日後に同じ試薬を用いて合成したガイド RNA を導入した。同日にピュロマイシン 5 μ g/mL を添加した培地で培養し, 2 日後にクローニングした。

(3) B19V の感染方法

2x10⁵/mL に調整した細胞に 100 倍希釈した 100 μ L の B19V (約 10⁶ 感染価) を添加し, 継続的にサンプリングした。

(4) 感染性の評価法

細胞から NucleoSpin (タカラバイオ) を用いて DNA を抽出し, 定量 PCR にて B19V-DNA を求めた。

C.研究結果

1.凍結融解や保存温度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からの HBs-RNA 量に差は認められなかった。また, 温度の影響では 37 度や室温では時間と共に感染性は減少したが, 4 $^{\circ}$ 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 週間まで感染性の低下は認められなかった。

2.HBV の中和活性の評価方法

国内由来血漿及び海外由来血漿から製造された HBs 免疫グロブリン製剤は, 遺伝子型 A と C に対しては, 中和活性に差は認められなかった。一方, 遺伝子型 B に対しては, 国内・海外由来血漿のどちらも中和活性が弱い傾向にあった。

3.B19V に高感受性株の作成

親株に比べて感染細胞から多くの B19DNA が検出された。特に感染 11 日までその量は維持されていた。

(考察)

これまでの HBV ウイルスの安定性や中和活性について報告があるが, 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,

充分な解析とは言い難い。今回、解析に成功した抗体の中和活性では、これまで HBV の抗体価は、中和活性を反映しているのか確認する方法がなかったために HBs 抗原に結合する抗体量で評価されてきた。我々は、先行研究で外来性 DNA を認識する分子を遺伝子改変することで HBV に高感受性になることを見出し、更に HBs-RNA を検出して感染性を評価することでバックグラウンドを抑えることに成功した。この細胞株を用いて HBs 免疫グロブリン製剤の中和活性を解析したところ、我々の感染系は中和活性を評価するために有用であることがわかった。更に遺伝子型によって中和するために必要な抗体量が異なることを明らかにできた。HBs 免疫グロブリン製剤は、ワクチンでブ-スタ-をかけた供血者からの血漿が原料であることからワクチンによって誘導される抗体は、遺伝子型によって中和活性が低い抗体が誘導される可能性もあることも明らかにできた。我々の感染系は、簡便で安価で実施できることから今後、ワクチン開発や中和活性を指標にした標準品の制定などに使用できると考えられる。

また、HBV が極めて安定して感染性を保持していることが明らかになった。核酸増幅検査の感度以下の微量な HBV による赤血球液による感染事例が報告されており、本研究結果と合致していた

B19V では、遺伝子改変によって従来よりも高い B19-DNA を産生し、感染が続く細胞株が得られた。これによって現行よりも高感度で感染性を評価できると期待できる。しかし、最終的に感染が消失してしまうことから継代可能なウイルス産生細胞を得るためには更に改良する必要があった。

E. 結論

確立した HBV 感染評価系を用いてウイルスの安定性や中和活性の評価を可能にした。また、従来よりも B19V に対し、高感受性の細胞株を作成することができた。

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感染系を用いたHBs免疫グロブリン製剤のgenotype A及びCに対する中和活性の評価 (第3報). 第 73回日本輸血・細胞治療学会総会, 札幌, 2025.
- 2, 岡田義昭, 野島清子 : B型肝炎ウイルスワクチン接種によって有同されたHBs抗体 (HBs免疫グロブリン製剤) の遺伝子型A, B, Cに対する中和活性の解析. 第72回日本ウイルス学会総会, 浜松, 2025.

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」
令和6-7年度 総合研究報告書

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（国立健康危機管理研究機構（JIHS）
国立感染症研究所 感染病理部 室長）
研究協力者； 上野 栞（JIHS 国立感染症研究所 感染病理部 任期付研究官）
鈴木忠樹（JIHS 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定まっていない。そこで、機能的な抗体、すなわちウイルス感染を阻害する中和抗体応答の評価が候補となる。機能的な抗体の測定法として、プラーク減少法を用いた中和抗体価測定法があるが、作業が煩雑であること、測定域が狭いこと、多検体の処理が困難であることが課題として挙げられる。このため令和 6 年度は、これらの課題を解決するために、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構築した。しかしながら、エムボックスウイルス（MPXV）の特性によるものと考えられるが、ワクシニアウイルス（VACV）と比較して感度が低く、得られる値のばらつきが大きいことが課題となった。そこで令和 7 年度はフォーカスの検出法を検討した結果、蛍光抗体を用いた検出法に切り替えることで、MPXV に対する感度が改善することを明らかにした。

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・抗原検査および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での病原体の除去・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 **Clade 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定まっていない。このような状況においては、機能的な抗体、すなわち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・評価を行い、必要に応じて改善・改良することを目的とした。

B. 研究方法

使用したウイルス

国内の痘そうワクチン株として用いられるワクチニアウイルス (VACV) である **LC16m8** 株およびその親株である **LC16m0** 株、ならびにエムボックスウイルス (MPXV) である **Liberia** 株 (**Clade IIa**) を使用した。これらのウイルスは、国立感染症研究所ウイルス第一部ならびに同獣医科学部より分与された。**LC16m8** 株は、**LC16m0** 株を培養細胞で継代する過程で得られた **B5R** 遺伝子欠損株として樹立されている。**B5R** 遺伝子を本来の形で維持している **LC16m0** 株は、**MPXV** とほぼ同様の性状を示すと考えられる。

LC16m8 株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殖させた。**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**) に置換した。その後、**MOI = 0.01** でそれぞれのウイルスを感染させた。細胞を観察しながら培養を継続し、約半数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°C** 冷凍庫にて凍結後、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、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、小分け分注後、使用時まで **-80°C** にて保存した。なお、以下の実験を含め、ウイルスを使用するすべての工程は **BSL3** 実験室にて実施した。

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** 細胞および **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** 倍希釈後、**2** 倍段階希釈系列を作製した。**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去した後、ウイルス希釈液を各ウェルに **100 μ L** 添加し、**37°C CO₂** インキュベーターにて静置し **16–24** 時間培養した。培養後、**10% ホルマリン** 緩衝液を添加し、室温で **1** 時間細胞を固定・不活化した。フォーカスの検出は次項に示す方法により実施し、フォーカス数をカウントすることで力価を算出した。

MPXV ならびに VACV の膜抗原に対するモノクローナル抗体

オルソポックスウイルスは、主に細胞内成

熟ウイルス (IMV) および細胞外被ウイルス (EEV) の二つの形態を取る。MPXV の IMV 特異的表面抗原である M1R, E8L, A29L, および EEV 特異的表面抗原である B6R, A35R, ならびに VACV のオルソログ抗原である L1R, D8L, A27L, B5R, A33R に対する市販のモノクローナル抗体を, IMV および EEV の検出に使用した。これらの抗体は, Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Promega) を用いて検出した。

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

FRNT 法は, 以下の手順により実施した。試験血清ならびにフォーカス検出用抗体として, 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。

中和試験は, ウサギ抗 LC16 IgG 分画の 2 倍段階希釈系列に各ウイルスを添加し, 37°C CO₂ インキュベーターにて 20–24 時間静置培養した後, 96 穴プレートに播種した細胞へ血清-ウイルス混合液を各ウェル 100 μ L 添加し, さらに 37°C CO₂ インキュベーターにて 16–24 時間培養することで実施した。培養後, 10% ホルマリン緩衝液を添加し, 室温で 1 時間細胞を固定・不活化した。その後, 0.5% Triton X-100 含有 DPBS を用いて透過処理を行った。

検出用のウサギ抗 LC16 IgG 分画を反応させた後, HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を反応させ, 基質として TrueBlue Peroxidase Substrate (KPL) を添加しフォーカスを可視化した。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。また, Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体による蛍光

検出および, 前述のモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体検出により得られたフォーカスについても, 同様に ELISpot アナライザーを用いてカウントした。

FRNT の測定は 3 点測定 (血清希釈は 1 検体につき 3 列独立して実施) で行った。ウイルスのみを添加したウェル 3 点の平均フォーカス数の 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数を示す血清の最大希釈倍率を各列の中和抗体価とした。さらに, 列ごとに得られた 3 点の中和抗体価の幾何平均値を, その血清の中和抗体価とした。

C. 研究結果

本研究課題用に調製した各ウイルスについて, RK-13 細胞および Vero E6 細胞を用いて力価 (focus forming unit/mL) の測定を行った。まず, フォーカス検出に使用する抗体の選定を目的として, ウサギ抗 LC16 IgG 分画に加えて, 同 IgG 分画調製の元となった LC16m8 感染ウサギ血清, ならびに LC16m0 感染ウサギ血清について比較検討した。

その結果, LC16m8 または LC16m0 感染ウサギ血清をフォーカス検出に用いた場合, 十分なフォーカス数を得られる希釈倍率ではバックグラウンドが高くなり, ELISpot アナライザーによるフォーカスカウントが困難となることが明らかとなった。一方, LC16m8 感染ウサギ血清から IgG を粗精製したウサギ抗 LC16 IgG 分画では, バックグラウンドが低く, 安定したフォーカス検出が可能であった。このため, 以降のフォーカス検出にはウサギ抗 LC16 IgG 分画を使用することとした。

次に, LC16m8 および SPL2A7 の FRNT に共通して使用可能な細胞の検討を目的とし

て、RK-13 細胞と Vero E6 細胞を比較した。LC16m8 では、ウイルス液添加後 16 時間培養条件において、ウイルス増殖に推奨される RK-13 細胞で明瞭なフォーカスが形成された。一方、Vero E6 細胞では RK-13 細胞と比較してフォーカスサイズは小さいものの、ELISpot アナライザーによるカウントは可能であった。

一方、SPL2A7 については、同じく 16 時間培養条件では、RK-13 細胞において増殖が遅くフォーカスが小さく、カウントが困難であったのに対し、Vero E6 細胞ではサイズにばらつきはあるものの、問題なくフォーカスをカウントすることができた。さらに、Vero E6 細胞を用いて 24 時間培養した場合には、フォーカスの大型化および融合が認められ、カウントが困難となることが明らかとなった。以上より、LC16m8 および SPL2A7 の FRNT には Vero E6 細胞が適していると判断した。

続いて、Vero E6 細胞を用い、ウサギ抗 LC16 IgG 分画を測定対象血清とみなした FRNT を実施し、血清-ウイルス混合液添加後の培養時間について検討した。LC16m8 に対する FRNT では、16 時間培養において、血清濃度に依存した顕著なフォーカス数の減少および増加が認められた。SPL2A7 に対する FRNT では、RK-13 細胞を用いた場合と比較して、Vero E6 細胞を用いることで血清濃度依存的なフォーカス数変化の傾きが大きくなり、カットオフ値を下回る血清の最大希釈倍率、すなわち中和抗体価を算出することが可能となった。一方、24 時間培養ではフォーカスの融合が認められ、血清濃度に依存したフォーカス数減少の傾向が不明瞭となり、中和抗体価の算出が困難であった。

以上より、Vero E6 細胞を用いた 18~20 時間培養条件が、最も効率的に中和抗体価を得られる条件であると判断し、96 穴プレート

1 枚を用いた 1 回の試験で、中和抗体価測定域が 8~131,072 倍で 2 検体を同時測定可能な系を構築した (図 1)。

しかしながら、構築した本測定系では、MPXV に対して得られる中和抗体価のばらつきが大きいことが明らかとなり、発色法によるフォーカス検出感度の低さが要因である可能性が考えられた。そこで、蛍光抗体法による感度向上の有効性について検討した。

MPXV の IMV 特異的表面抗原 (M1R, E8L, A29L) および EEV 特異的表面抗原 (B6R, A35R) , ならびに VACV のオルソログ抗原 (L1R, D8L, A27L, B5R, A33R) に対する市販モノクローナル抗体の反応性を評価した。非感染細胞, LC16m8 感染細胞, LC16m0 感染細胞を用いて検討した結果、VACV の EEV 特異的抗原である A33R に対するモノクローナル抗体、および MPXV の IMV 特異的抗原である D8L に対するモノクローナル抗体において、明瞭な蛍光シグナルが得られた。そこで、これら 2 種のモノクローナル抗体を用いて、FRNT におけるフォーカス検出法の比較・評価を行った。

LC16m8 株に対する FRNT では、従来のウサギ抗 LC16 IgG 分画による発色検出および、抗 E8L または抗 A33R モノクローナル抗体を用いた蛍光検出のいずれにおいても、検体希釈に伴うフォーカス数の変化はほぼ同等であった (図 2 左上)。一方、MPXV である Liberia 株に対する FRNT では、従来法ではフォーカス数の変化が緩やかであったのに対し、蛍光抗体法ではフォーカスカウントの増減幅が大きくなり、感度の向上が確認された (図 2 左上)。なお、使用した 2 種のモノクローナル抗体間に有意な差は認められなかった。得られた中和抗体価を比較したところ、LC16m8 株 (図 2 左下) および Liberia 株 (図

2 右下) のいずれにおいても、従来の発色法と今回検討した 3 種類の蛍光検出法との間に有意な差は認められなかった。

D. 考 察

FRNT に使用する細胞種の検討および、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最適化することにより、1 回のアッセイで中和抗体価を算出することが可能となった。

LC16m8 に関しては、血清濃度が高い条件ではフォーカスが完全に消失し、血清の希釈に伴ってフォーカスが増えることから、中和抗体価を明瞭に算出することが可能であった。一方、MPXV に関しては、血清濃度が高い条件でもフォーカスが完全に消失することではなく、血清の希釈に伴いフォーカス数がなだらかに増加する傾向が認められた。この結果、VACV と比較して MPXV に対する FRNT の感度は低く、1 サンプルあたり独立した 3 列で算出される中和抗体価のばらつきが大きいことが明らかとなった。

この要因として、MPXV では細胞内成熟ウイルス (IMV) および細胞外被ウイルス (EEV) という主に 2 種類のウイルス形態が存在し、それぞれに由来する大小の異なるフォーカスが形成されることが影響している可能性が考えられた。

そこで、従来の発色法によるフォーカス検出に代えて、反応性の異なる抗 MPXV E8L モノクローナル抗体、あるいは抗 VACV A33R モノクローナル抗体を用いた蛍光検出法について検討した。その結果、MPXV に対する FRNT の感度は大幅に改善された。一方で、算出される中和抗体価そのものには大きな影響は認められなかった。

本検討は、ウサギ抗 LC16 IgG 分画を被験サンプルとみなした FRNT の評価であるため、実

際の検体を用いた蛍光検出 FRNT において同様の結果が得られるかどうかは現時点では不明であり、今後の検討課題として残された。

また、本研究では、被験サンプルの希釈系列および血清-ウイルス混合液を細胞に添加してからの培養時間を 18~20 時間にほぼ固定した条件で比較を行った。VACV および MPXV は IMV と EEV という二つの形態を主に取り、これらの割合は細胞感染後の経過時間によって変化することが想定される。今後、ウイルス学的な詳細解析を行うことにより、FRNT に最適な培養時間がウイルスごとに異なる可能性も否定できない。これらの点については、今後の継続的な検討が必要である。

E. 結 論

従来の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、1 回のアッセイで中和抗体価が定まらない場合には、血清をさらに高希釈倍率まで希釈した系列を調製し、再度試験を行う必要があった。

本研究課題では、Vero E6 細胞を用い、血清-ウイルス混合液添加後 18~20 時間培養条件が最も効率的に中和抗体価を得られると判断した。この条件により、96 穴プレート 1 枚を用いた 1 回の試験で、中和抗体価測定域が 8~131,072 倍となり、2 検体を同時に測定可能な系の構築に成功した。また、フォーカスの検出法については、従来の発色法ではなく、蛍光抗体を用いた検出法へ切り替えることで、MPXV に対する感度が改善することを明らかにした。

一方で、オルソポックスウイルスはウイルス生活環の中で主に細胞内成熟ウイルス (IMV) および細胞外被ウイルス (EEV) という二つの形態を取ることから、これらの存在が中和

抗体価測定に与える影響については、未だ十分に明らかにされていない点が多く残されている。今後、測定系のさらなる改善を図るためには、これらウイルス形態の動態を含む詳細なウイルス学的検証が必要であると考えられた。

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, Sugiyura 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. 構築した中和抗体価測定系 FRNT

PRNTにおける問題を克服する中和抗体価測定系の構築 Focus Reduction Neutralization Test (FRNT) の検討

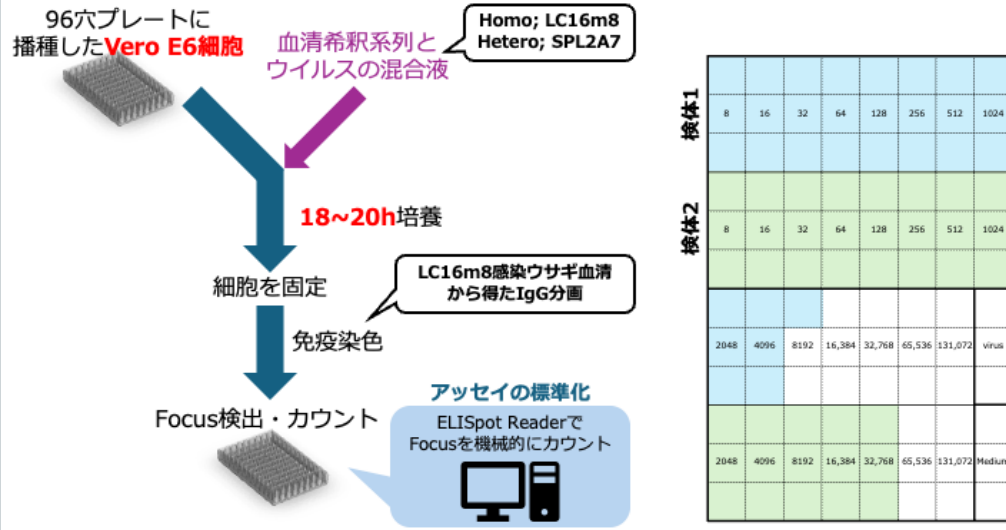
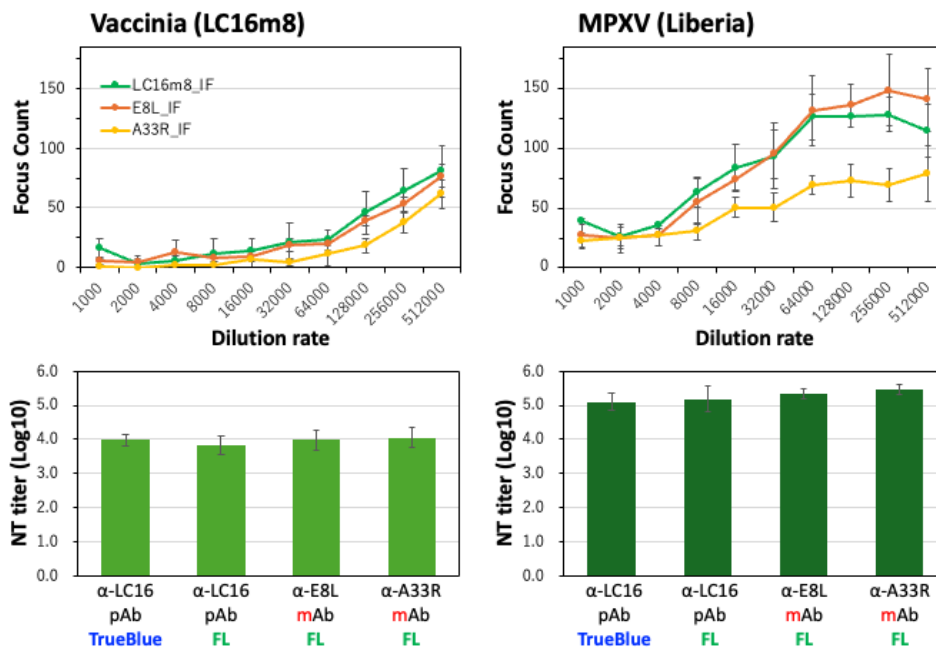


図2. 蛍光による検出により感度は改善する



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 国立健康危機管理研究機構 (JIHS)
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 JIHS 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

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。

2. 解析パイプラインの開発と検証

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 に血液検体から得られた非宿主メタゲノムデータを組み込み、血液検体に最適化した解析パイプラインの開発を行った。また、従来のメタゲノム解析パイプライン (MePIC) と新規パイプライン PATHDET の比較を行った。対象は既知の微生物ゲノムを規定量で混合した Microbial Community DNA Standard (#D6306) (Zymo Research) とし、病原体ゲノム解析研究センターの NGS 解析プロトコルに従いシーケンスを実施した。得られたシーケンス結果を MePIC と PATHDET で比較した。

(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 例に対してすべて NGS 解析を行った。同血液検体は 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。

2. 解析パイプラインの開発と検証

感染症患者の血液検体からの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。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。Microbial Community DNA Standard より得られたメタゲノムデータとして 12,622,464 reads が取得された。低品質および宿主類似配列を除去し、BLAST hit した配列読み取り数を MePIC と PATHDET で比較した。それぞれ、878,875 reads (MePIC) , 10,184,410 reads(PATHDET)であり、細菌に該当する読み取りは PATHDET の方がより多く得られた。また、PATHDET のメタゲノムデータの内容は理論的な各細菌へのシーケンス配分と近く、MePIC では存在しないが近縁の細菌種への miss-alignment が多く見られた。

D. 考察

NGS 解析では血液培養陽性例であっても病原細菌を検出できない可能性があることが示唆された。病原体以外の微生物ゲノム検出が、病原体をマスクする可能性があり、コンタミネーションの減算法が開発された。開発された PATHDET は、従来の解析法の MePIC と比較し、Microbial Community DNA Standard の理論値に近いメタゲノム結果を出力しており、血液検体からの病原体検出目的におけるメタゲノム解析に有用であると考えられた。

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. 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.
7. 堀場千尋. これからの遺伝子検査 (NGS・メタゲノム解析). 第34回医師・臨床検査技師・薬剤師・看護師のための感染症学セミナー. 9月11日, 2025年, オンライン.
8. 堀場千尋. メタゲノムの臨床応用. 第74回日本感染症学会東日本地方会学術集会. 9月26日, 2025年, 新潟.
9. Kazuhiro Horiba. Applying Clinical Metagenomics to Infectious Disease Diagnostics. A Joint Seminar of HU, NIID, and Fiocruz. 10月7日, 2025年, 札幌.
10. 堀場千尋. 臨床メタゲノム解析の感染症診断への応用. 第28回東海小児感染症研究会. 10月25日, 2025年, 名古屋.
11. 堀場千尋. 原因不明疾患に対応するゲノムサーベイランスに関する海外の動向と今後の課題. 地衛研Webセミナー第8回「原因不明疾患におけるNGSのアプローチ」. 11月6日, 2025年, オンライン.
12. 堀場千尋. 感染症に関するNGSの使い方. 令和7年度千葉県小児科医会第2回生涯教育講座. 2月25日, 2026年, オンライン.

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

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)
令和6-7年度 総合研究報告書
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 国立健康危機管理研究機構 (JIHS)
国立感染症研究所 ウイルス第一部 林 昌宏

研究協力者 JIHS 国立感染症研究所 ウイルス第一部 西山 祥子
JIHS 国立感染症研究所 ウイルス第一部 田島 茂
JIHS 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。2025年の輸入症例数は、162であった。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することで献血血の検査体制の整備に努めた。

A. 研究目的

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とヒトの間で感染環を形成する。またデングウイルスと同じ媒介蚊によって媒介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も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として重要である。

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/ μ L 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% CO₂, 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 μ L の検体を 1.5ml マイクロチューブに入れ、Working solution 400 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L 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 μ L の Wash buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。vii) 回収チューブを外し、空のチューブを連結し、12,000 回転、10 秒遠心した。viii) 回収チューブを捨て、新しい 1.5 mL チューブにフィルターチューブを連結させ、50 μ L の Elution buffer を加え、10,000 回転、1 分間遠心した。ix) 得られた精製 RNA はすぐに使用しない場合は -80°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 種類のデングウイルス各血清型、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/ μ L 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。さらにデングウイルス、チクングニヤウイルス、ジカウイルスの培養法についても情報共有した。

オロプーシェ熱の流行状況

オロプーシェ熱は 2024 年において、ブラジル、コロンビア、エクアドル、ギアナ、パナマ、ペルー、トリニダード・トバゴ、ハイチ、キューバ、ガイアナでアウトブレイクが発生した。特にブラジルでの報告数は、2023 年 (831 例) に比べ、2024 年は 10,940 例 (第 49 週) に増加した。

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、デングウイルス等がある。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チクングニヤウイルス RNA の検出、2005 年にプエルトリコの献血血よりデングウイルス RNA の検出、2009 年にタイの献血血よりチクングニヤウイルス RNA の検出、2012 年にブラジルの献血血よりデングウイルス RNA の検出、2012 年にブラジルにおいて少なくとも 5 例の輸血によるデングウイルス感染例、2014 年にプエルトリコの献血血よりチクングニヤウイルス 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 名の献血血がデングウイルス 1 型陽性であった。

近年デング熱の流行が世界的に拡大して

おり、世界保健機関 (WHO) によると、2024 年は世界で 1,502 万人を超えるデング熱患者と 11,789 人のデング熱関連死が報告された。また 2025 年は世界で 563 万人を超えるデング熱患者と 4,176 人のデング熱関連死が報告された。特にブラジルを中心に、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 1,360 万人のデング熱患者が報告された。このうち、24,104 例が重症デング熱症例であり、8,777 例が致死的であった。また 2025 年にはアメリカ大陸で 466 万人の患者が報告され、このうち 9,367 症例が重症デング熱であり、2,288 例は死亡例であった。

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、2025 年 162 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国立感染症研究所次世代生物学的製剤研究センターと共有した。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。またブラジルでは都市部よりも農村部での流行が発生している。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

特記事項なし

学会発表

特記事項なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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)
令和6-7年度 総合研究報告書
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 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 小林 大介
研究協力者 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 Astri Nur Faizah
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 松村 凌
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 澤田 恵子
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 犬丸 瑞枝
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 比嘉 由紀子
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 佐々木 年則
国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 昆虫医科学部 葛西 真治
国立健康危機管理研究機構 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、生態や流行動態が未解明でありながら、ヒトにおいてウイルス血症を引き起こす潜在的风险を内包する昆虫媒介性ウイルスが多数存在する。本研究は、これらウイルスの感染動態を解明し、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。過去に国内で分離実績があるバタイウイルス (BATV) およびフクオカウイルス (FUKV) を対象とし、初年度 (令和6年度) は南西諸島において BATV を対象とした吸血昆虫の捕集を実施し、多様な吸血昆虫の発生状況を確認した。それと並行して、FUKV に対する各種蚊由来細胞の感受性試験を実施し、ステフェンスハマダラカおよびヒトスジシマカ由来細胞における高い増殖能を確認した。これを受け、次年度 (令和7年度) には、これら蚊種の個体を用いた経口感染実験を遂行した。その結果、ステフェンスハマダラカにおいて FUKV 経口感染の成立と、唾液中への感染性ウイルス排出が認められ、世界で初めて同蚊種による FUKV 媒介能を実験的に証明した。一方で、長崎県での野外捕集蚊約 4,000 頭を対象とした疫学調査において FUKV RNA は不検出であった。しかし、捕集蚊の大半がイエカ属で占められていたため、ハマダラカ属を介した広範な曝露リスクは依然として否定できず、的を絞った継続的な監視体制の構築が今後の課題として考えられた。

A. 研究目的

現在、蚊媒介性ウイルスにおいて国内で定常的な監視対象となっているのは日本脳炎ウイルス (JEV) のみであるが、実際には国内に土着している可能性がありながら、その生態や流行動態が十分に解明されていない昆虫媒介性ウイルスが数多く存在する。これらのなかには、感染したヒトにおいてウイルス血症を呈し得る、あるいはその蓋然性が極めて高い病原体が複数含まれている。血液製剤の安全性を脅かす重大な要因は、ウイルスに感染しながらも無症状のまま献血を行う無症候性感染者の存在である。このような献血者の血液が製剤原料となった場合、製剤を介して受血者にウイルスが伝播するリスクが生じる。したがって、未知あるいは監視外の昆虫媒介性ウイルスについて、国内の流行活動性やヒトへの曝露リスクを事前に評価しておくことは、輸血伝播性感染症の発生を未然に防ぐための予防的対策として不可欠である。

本研究では、過去に国内のウシから分離実績があり、ヒト病原性が報告されているバタイウイルス (BATV) や、同じく国内の蚊やウシから分離されているラブドウイルス科レダンテウイルス属のフクオカウイルス (FUKV) を主要な対象とした。

以上の背景を踏まえ、本研究では以下の4項目を具体的な目的として設定した。1) 野外調査による流行実態の解明：南西諸島における BATV の媒介昆虫相の把握と、長崎県を中心とした FUKV の現在の流行活動性の疫学的評価。2) 培養細胞系を用いた感受性スクリーニング：各種蚊由来細胞における FUKV の増殖動態を解析し、潜在的な媒介蚊の候補を特定する。3) 個体レベルでの媒介能の証明：細胞レベルで高感受性が示唆された蚊種を用い、人工吸血実験を通じて FUKV が唾液腺を介して伝播し得る能力 (媒介能) を実験的に実証する。4) リスク評価に基づく知見の集積：得られた知見を統合し、国内土着ウイルスの感染リスクを定量的に評価することで、血液製剤のスクリーニング手法の検討や安全基準の策定に資する科学的根拠を構築する。

B. 研究方法

野外における吸血昆虫の捕集およびウイルス保有調査

BATV を対象とした調査として、令和6年度に沖縄県西表島の牛舎4カ所にてブラックライトトラップを用いた捕集を実施した。FUKV を対象とした調査として、令和4～5年に長崎県で捕集され

た野外蚊（計 3,958 頭）に対し、レダンテウイルス属を標的とした RT-PCR 法によりウイルス遺伝子の検出を試みた。

培養細胞系におけるウイルス増殖動態の定量的評価

FUKV (FUK-11 株) を供試ウイルスとし、4 属 5 種の蚊に由来する 8 種類の培養細胞、および陽性対照としてのハムスター由来 HmLu-1 細胞に接種した。培養上清中のウイルス RNA 量を定量的リアルタイム PCR 法にて経時的（接種直後および接種後 48 時間、120 時間）に測定した。

個体レベルにおける経口感染成立および媒介能の検証

培養細胞系での結果に基づき、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) およびステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の実験室飼育系統を供試した。FUKV (1.5×10^7 RNA copies/ml) を混合したウサギ脱繊維血を人工吸血法にて吸血させ、28°C 条件下で 14 日間維持した。その後、中腸での一次感染（胸部・腹部）および全身感染（頭部・翅・脚）への移行率を RT-qPCR 法により評価した。併せて、ピロカルピン溶液を用いた強制唾液回収法により唾液を採取し、HmLu-1 細胞への接種を通じて唾液中への感染性ウイルス排出の有無を検証した。

C. 研究結果

南西諸島における吸血昆虫の発生実態（令和 6 年度）

西表島での調査において、多数の蚊およびヌカカが牛舎に飛来していることが確認された。特筆すべき点として、畜舎における採集記録が無い、冷血動物を吸血源とすると認識されていたイリオモテサシチョウバエ (*Sergentomyia iriomotensis*) と推定される個体も今回牛舎で捕集され、微小吸血性昆虫に関する新たな知見が得られた。これら捕集された吸血昆虫類については順次、BATV を含めた保有ウイルスの解析を実施する予定である。

蚊由来培養細胞における FUKV の親和性（令和 6 年度）

供試したすべての蚊由来細胞において FUKV RNA 量の経時的な対数増殖が確認された。特に、ステフェンスハマダラカ由来細胞およびヒトスジシマカ由来細胞においては、過去に FUKV が分離されたコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) に由来する細胞と比較して約 100 倍高い増殖効率が観察された。ウイルスを接種した全蚊由来細胞株において顕著な細胞変性効果は認められなかった。

実験的感染系における媒介能の証明（令和 7 年度）

経口感染実験の結果、ステフェンスハマダラカにおける胸部・腹部での FUKV 感染率は約 68% に達し、ヒトスジシマカ（約 38%）と比較して有意な高値を示した。全身感染への移行率についても、ステフェンスハマダラカの約 55% において頭部・翅・脚における FUKV RNA の存在が確認された。さらに、ステフェンスハマダラカ由来の唾液を接種した HmLu-1 細胞の培養上清中においてウイルス RNA の増加が観察され、同蚊種が FUKV の媒介能を有することが実証された。

長崎県における野外流行動態の評価（令和 7 年度）

計 3,958 頭の野外捕集蚊を 149 プールに集約し、これらのプール検体から FUKV RNA の検出を実施した。その結果、JEV が計 9 プールから分離されたのに対し、FUKV RNA は全サンプルにおいて陰性であった。

D. 考察

本研究は、過去にウシからの分離例がある BATV を対象とした南西諸島での野外調査と、FUKV に対する培養細胞系から個体レベルに至る媒介能の実証、さらには野外捕集蚊からのウイルス RNA 検出結果を統合することで、本邦における蚊媒介性ウイルスの感染リスクを多角的に評価した。

BATV の調査拠点とした西表島においては、牛舎に多数の蚊やヌカカ、さらにイリオモテサシチョウバエと推定される個体が飛来していることが明らかとなった。哺乳動物が集積する環境でのサシチョウバエの捕集は、本邦に分布する同種の吸血生態を解明するうえで重要であり、今後のウイルス分離を通じて BATV の真の媒介者を特定する足がかりにもなった。

FUKV に関する本研究の主要な成果は、細胞レベルの解析で高感受性が示唆された 2 蚊種の個体を用いた感染実験により、ステフェンスハマダラカの唾液中に感染性ウイルスが排出されることを確認し、本蚊種が FUKV を媒介可能であることを実験的に証明した点にある。これはレダンテウイルス属における節足動物を介した感染性ウイルスの伝播を実証した初の結果であり、学術的意義は大きい。本邦の畜舎環境ではシナハマダラカ (*An. sinensis*) が優占種であることを鑑みると、国内における主要な媒介蚊は、過去に報告されたコガタアカイエカではなくシナハマダラカ等のハマダラカ属である可能性が示唆される。

今回の長崎県諫早市における野外蚊調査では、同一サンプル群から多数の JEV が分離される状況下においても FUKV は不検出であった。この結果は、当該地域における FUKV の流行活動性が JEV と比較して著しく低いか、あるいは極めて限定的な地域・季節に局在していることを示している可能性がある。しかしながら、ここで考慮すべき点として、今回の調査における解析対象はコガタアカイエカを中心とするイエカ属がその大半を占めており、実験的に高い媒介能が示されたハマダラカ属蚊が検出対象に含まれていないという事実が挙げられる。この野外捕集蚊種の構成上の偏りは、当該地域における実際の FUKV の流行活動性を正確に反映していない可能性を内包している。したがって、今回 FUKV が不検出であったという結果のみをもってヒトへの感染リスクが低いと断じることは早計であり、ハマダラカ属を標的とした集中的な野外調査を実施することが、流行実態を正しく把握するための最優先の検討課題であると考えられる。

E. 結論

本研究により、南西諸島における牛舎環境の吸血昆虫の飛来動態が明らかになるとともに、FUKV

がハマダラカ属を介して伝播され得る能力を有することが実験的に証明された。長崎県での野外調査では, FUKV は検出されなかったが, これは捕集蚊種構成の偏りに起因する可能性が高い。血液製剤の安全性確保に資する科学的知見を集積するため, 今後は国内優占種であるシナハマダラカを主眼とした野外流行調査や家畜の血清疫学調査, さらには近縁な国内分布レダンテウイルスへの展開を図り, 国内におけるこれらウイルスの流行動態の全容を解明する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 小林大介. ヌカカが媒介するヒト病原性ウイルスの概説と本邦におけるオロブーシェ熱流行可能性の考察. 殺虫剤研究班のしおり, 95: 11-18, 2025.

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

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 国立健康危機管理研究機構 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、HPAIV の国内への侵入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、ウイルス侵入の指標として有用である可能性がある。本研究では、抗インフルエンザ抗体のスクリーニング陽性となった野生動物血清を対象とした HA 亜型の診断系の確立を試みた。結果として、HA 外套 VSV シュードウイルスはウイルス力価が低いため、中和試験に用いるためには改良が必要であることが明らかとなった。代わりに、WHO のワクチン株を用いた中和試験系を構築し、和歌山県で捕獲されたアライグマの血清から抗 H5 抗体の検出に成功した。さらに、東京都内のアライグマにおいても抗体疫学調査を行い、108 頭中 1 頭から抗 H5 抗体を検出した。今後も継続的な調査を続けることで、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、抗体疫学調査に利用可能な抗インフルエンザ A ウイルス (IAV) 抗体のスクリーニング法および感染株のヘマグルチニン (HA) 亜型を同定可能な診断系の構築を試みた。これにより、野生動物における抗 IAV 抗体保有率から国内における 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、全血は遠心分離し、分離後

の血清を -20°C で保存した。2024 年 3 月から 2025 年 2 月にかけて、東京都西部で捕獲されたアライグマ 108 頭から全血を採取後、血清を分離し、 -20°C 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 $\text{S/N} < 0.6$ 、その他の動物血清では $\text{S/N} < 0.5$ を陽性とした。

3. 細胞

イヌ腎臓由来細胞である Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞は、10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, Cytiva) および 1% ペニシリン-ストربتマイシン (Thermo Fisher Scientific) を添加した最小必須培地 (Minimum essential medium; MEM, Nacalai Tesque) 中で維持した。ヒト胎児腎細胞である HEK-293T 細胞は、10% FBS および 1% ペニシリン-ストربتマイシンを添加した Dulbecco 改変 Eagle 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM, Nacalai Tesque) 中で維持した。細胞は、 37°C 、5% CO_2 を含む加湿環境下で培養した。

4. ウイルス

本研究で使用した WHO ワクチン候補株となる IAV は、H1 (A/Wisconsin/67/2022 [H1N1] pdm09),

H3 (A/Massachusetts/18/2022[H3N2]) , H5 (A/Ezo red fox/Hokkaido/1/2022[NIID-002; H5N1]) , および H7 (A/Guangdong/17SF003/2016[IDCDC-RG56N; H7N9]) である。これらのウイルスは WHO コラボレーションセンターから提供され、ウイルス中和試験に用いられた。H1 亜型および H3 亜型ウイルスは、ウシ膵臓由来アセチル化トリプシン (A-trypsin, Sigma-Aldrich) を 10 μ g/mL 添加した MEM 中で MDCK 細胞を用いて増殖させた。H5 亜型および H7 亜型ウイルスは、10 日齢の発育鶏卵で増殖させた。感染細胞の培養上清および接種卵の尿膜腔液は、4°C, 3,500 rpm で 5 分間遠心して回収し、使用時まで -80°C で保存した。ウイルス力価は、MDCK 細胞を用いたマイクロウェル法により測定した。

5. 水疱性口内炎ウイルス (VSV) シュードウイルスの作製

H1 亜型 (A/Sydney/5/2021), H3 亜型 (A/Thailand/8/2022), 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) の HA 遺伝子を、発現プラスミド pCAGGS にクローニングした。これらの HA 発現プラスミドを、HEK293T 細胞に TransIT-LT1 (Mirus Bio) を用いて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 Multiplicity of Infection (MOI)=0.5 で感染させ、37°C 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 10 munit/ml 添加した維持培地を加え、37°C で培養した。感染 24 時間後に上清を回収し、遠心 (3500 rpm, 4°C, 5 分) 後に分注して -80°C で保存した。

6. HA 外套 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、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA, Sigma) 添加 1xMEM (Sigma) で 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。H1 亜型、H3 亜型、低病原性 H7 亜型のシュードウイルスについては、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 10 μ g/ml となるように同時添加した。

7. WHO ワクチン株を用いた中和試験

検体として野生動物血清、陽性コントロールとして H1 亜型と H3 亜型プラスミド免疫ウサギ血清、H5 亜型と H7 亜型感染フェレット血清を用いた。血清は、生理食塩水 20mL に懸濁した 3 倍量の RDE II (デンカ生研) で 37°C 20 時間処理し、56°C 1 時間で非働化後に試験に供した。BSA 添加 1xMEM で 20 倍から 2 倍段階希釈した血清と BSA と A-trypsin (終濃度 10 μ g/ml) 添加 1xMEM で希釈したウイルス 100 TCID₅₀ を等量混ぜ、37°C 30 分でインキュベートした。その後、96 ウェルプレートに単層となった MDCK 細胞の上清を除去し、PBS(-) で洗浄後に中和反応液を 100 μ l 接種した。37°C で 4-5 日培養後に 10% 緩衝ホルマリン液で固定し、メチレンブルー溶液で染色した。50% の細胞で CPE が見られる最大血清希釈倍率を中和抗体価とした。

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、ハクビシン、タヌキ、アナグマの検体は抗体陰性であった。一方、イノシシ 298 頭中 1 頭、シカ 273 頭中 1 頭、アライグマ 1032 頭のうち 19 頭が陽性となり、陽性率はそれぞれ 0.3%, 0.4%, 1.8% であった (図 1)。この結果は、これら動物が過去に IAV に感染した可能性を示唆するものである。また、詳細な個体情報が得られている動物種であるアライグマについて、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 (図 2)。年齢別では、0 歳齢が 6 頭、1 歳齢が 9 頭、2 歳齢以上が 4 頭となった (図 3)。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. HA 外套 VSV シュードウイルス

作出した HA 外套 VSV シュードウイルスの力価を測定した結果、H5 亜型シュードウイルスの力価は 3.0×10^7 Relative Luminescence Unit (RLU) に到達したが、一方で、H1, 3, 7 亜型については 1.0×10^5 RLU 前後という低い力価であった (図 4)。

3. 野生動物における感染 HA 亜型型別診断

IDEXX 社製の ELISA キットを用いた抗 IAV 抗体スクリーニングで陽性となったイノシシ 1 頭、シカ 1 頭、アライグマ 19 頭について WHO のワクチン候補株を用いたウイルス中和試験により感染亜型の同定を試みた。陰性コントロールとして、スクリーニング陰性の血清を用いた。陽性コントロールとして、H1 亜型と H3 亜型はプラスミド免疫ウサギ血清、H5 亜型と H7 亜型は感染フェレット血清を用いた。アライグマに関して、スクリーニング

陰性となった検体はすべて検出限界となった一方で、スクリーニング陽性検体は全てが H5 亜型陽性となり、一部は H5 亜型に比べて抗体価は有意に低いものの H1 亜型と H3 亜型陽性となった。シカとイノシシはすべての亜型と反応し、非特異反応の可能性が示唆された（図 2）。

4. 東京都内アライグマの抗体疫学調査

アライグマに着目し、都市部における抗体疫学調査を実施した。ELISA によるスクリーニングの結果、108 頭中 1 頭が抗 IAV 抗体陽性となった。続いて、WHO ワクチン候補株を用いたウイルス中和試験を行った結果、抗 H5 抗体価が 5120 倍となり、一方で他亜型の抗体価は検出限界以下となった（図 6）。

D. 考察

1. 和歌山県の野生動物における抗 IAV 抗体スクリーニング

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、イノシシ、シカであり、アライグマの陽性率が 1.8% と他の動物種よりも高かった。アライグマは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た。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. HA 外套 VSV シュードウイルス作出

H5 亜型シュードウイルスについては、高力価が得られた一方で、H1, H3, H7 亜型シュードウイルスについては、高い力価が得られなかったため、中和試験の実施が困難であった。このウイルス力価の差については、ウイルス株ごとに受容体結合力、HA の発現量、VSV の膜タンパクとの相性などが異なる可能性が考えられる。今後は受容体強発現細胞を用いるなど改良の必要がある。

3. 和歌山県の野生動物における HA 亜型型別診断

アライグマ全頭から抗 H5 抗体が検出され、H5 亜型に感染していたことが示唆された。WHO ワクチン株を用いた中和試験は、アライグマ検体において有用であることが示唆された。一方で、イノシシ・シカについてはスクリーニングの結果に関わらず、H1, H3, H5, H7 亜型全てに対して抗体が検出されており、血清由来の非特異反応が排除できていない可能性が示唆された。今後は、非特異除去方法の変更や、より特異的なアッセイの検討が必要

と考えられた。

4. 東京都内アライグマの抗体疫学調査

東京都内で捕獲されたアライグマ検体についても 1 頭が抗 H5 抗体陽性となった。2023 年に野鳥で HAPIV 感染報告が 1 件あるが、それ以降は報告がない。当該陽性アライグマの感染時期は不明であるが、人口の多い都市部においても、アライグマにおける抗体疫学調査は鳥インフルエンザウイルスの侵入状況を把握するための良い手段となることが考えられた。

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 の環境中への侵入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、継続的に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をモニタリングする予定である。

また、WHO ワクチン候補株を用いたウイルス中和試験は、スクリーニング陽性となったアライグマ検体中に含まれる抗 HA 抗体の型別診断に有用であることが示唆された。イノシシ・シカなど他の動物種に対しても最適化することで、国内に浸潤している亜型の同定が可能となると期待される。

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

黒田 雄大, 相内 章, 石嶋慧多, ビルヘスメンドーサ ミラグロス, 井上雄介, 山本つかさ, 西野綾乃, 堀田明豊, 鈴木和男, 鈴木康司, 渡邊真治, 宇田晶彦, 長谷川秀樹, 前田 健 「2023-2024 年に和歌山県で捕獲された野生動物における抗 A 型インフルエンザウイルス抗体保有状況調査」

第 168 回 日本獣医学会学術集会 2025 年 9 月, 東京

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