

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 2025 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。

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 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、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ボックスウイルス (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

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) 血小板が供された。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）はフエヌウイルス科の 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、1,093 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。

現状ではヒトー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°C 及び 37°C 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°C 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、オロプ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な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

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 Cladelb 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**
1. 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.
 2. 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
 3. 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.
 4. 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
 5. 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

6. 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
7. グロヴェル プーナム, キディガ モーリン, 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
8. 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

特許取得

なし。

実用新案登録

なし。

その他

なし。

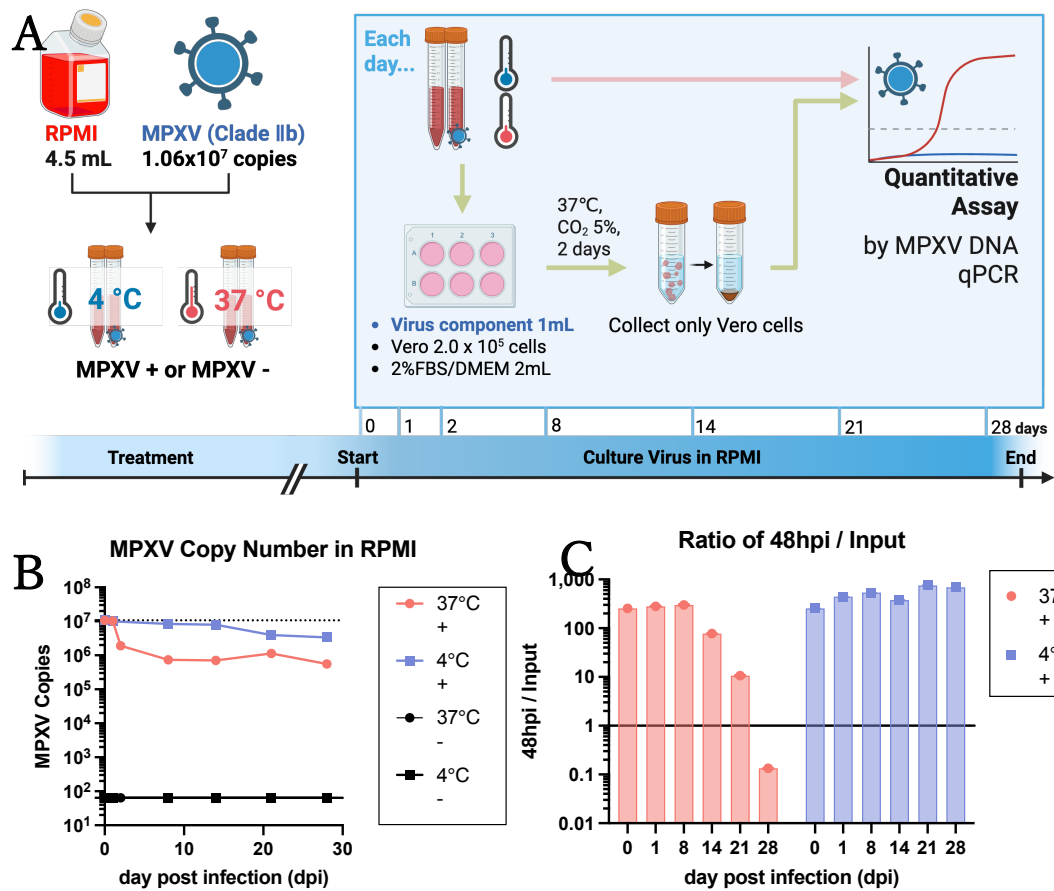


図 1. MPXV が長期間にわたり感染性を維持し得るかの検証

(A)実験概要 (B) RPMI 中における MPXV DNA 総量。点線：添加した MPXV 総量 (1.06×10^7 copies), 直線：検出限界 (64 copies), Mean with SEM (qPCR duplicate). (C) Vero 細胞に添加した MPXV DNA の増減比。Mean with SEM (qPCR duplicate).

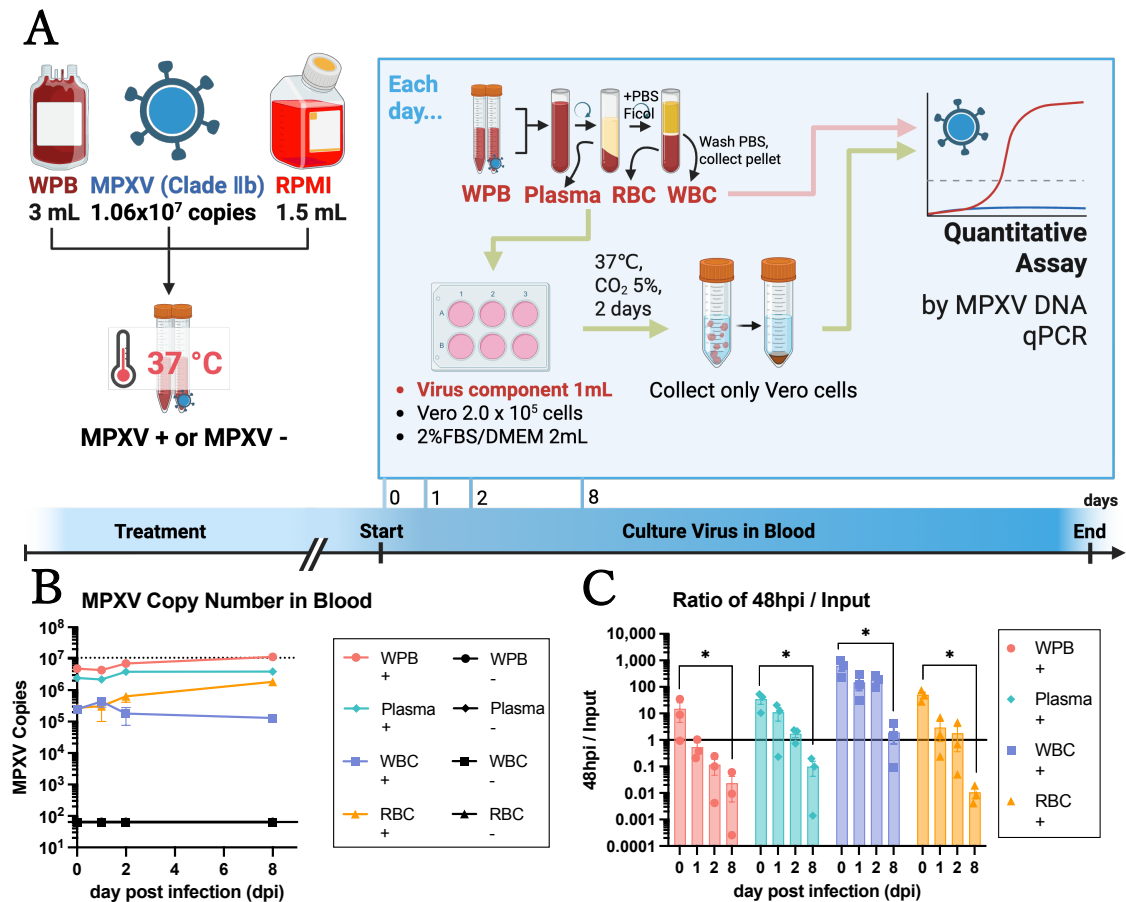


図2. 血液中のどの分画に、MPXVが感染性を保持した状態で存在するかの検証

(A)実験概要 (B) 血液中におけるMPXV DNA総量。点線：添加したMPXV総量 (1.06×10^7 copies), 直線：検出限界 (64 copies), Mean with SEM (qPCR duplicate, n=3)。 (C) Vero細胞に添加したMPXV DNAの増減比。Mean with SEM (qPCR duplicate, n=3), Friedman test with Dunn's post hoc test. *P < 0.05 vs Day 0.

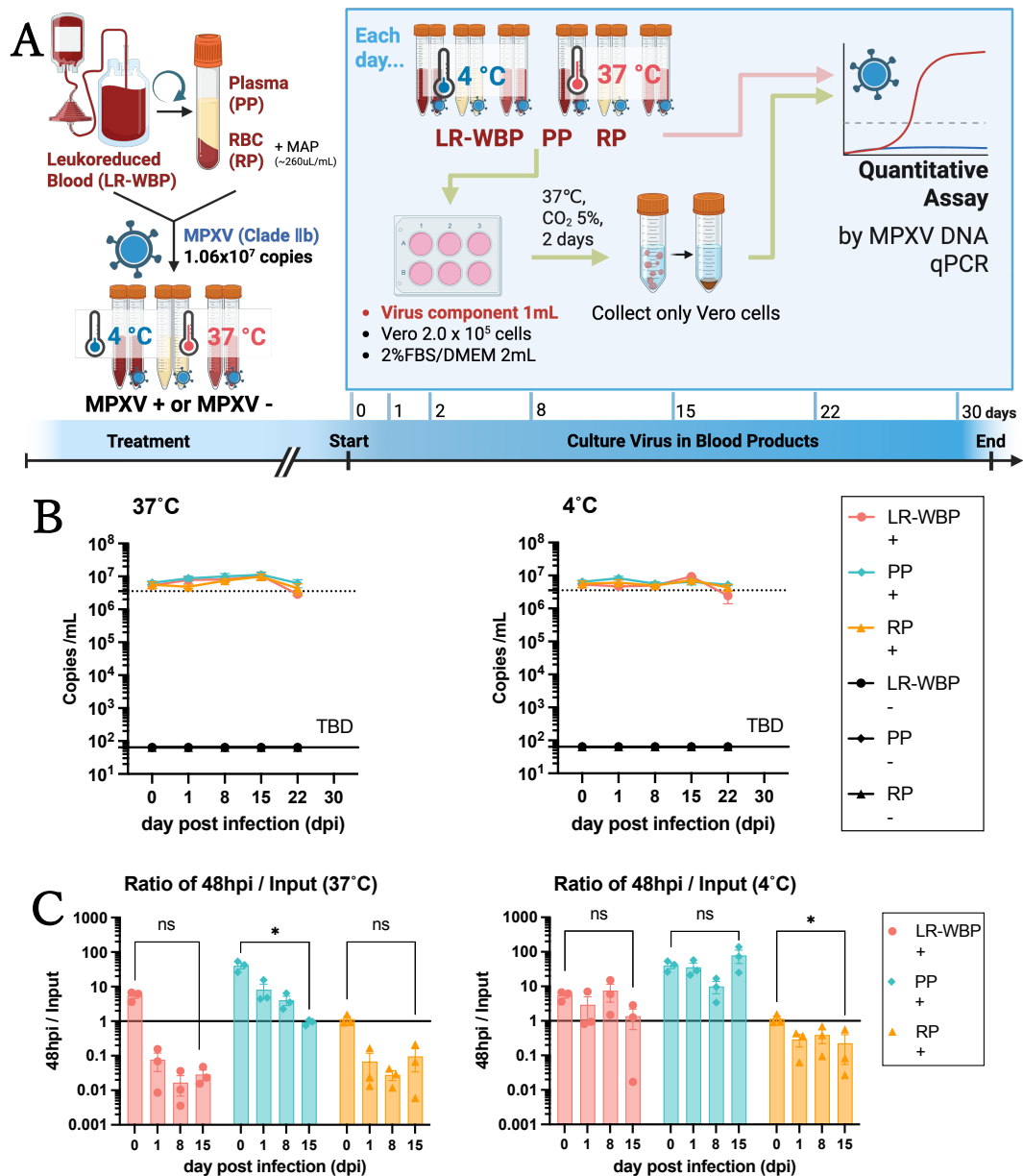


図3. 血液製剤に添加したMPXVの、製剤有効期間内の感染性保持に関する検証
 (A)実験概要 (B) 血液製剤中におけるMPXV DNA総量。点線：添加したMPXV総量 (1.06×10^7 copies), 直線：検出限界 (64 copies), Mean with SEM (qPCR duplicate, n=3)。 (C) Vero細胞に添加したMPXV DNAの増減比。Mean with SEM (qPCR duplicate, n=3), Friedman test with Dunn's post hoc test. *P < 0.05 vs Day 0

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

1. *In vitro* 感染系を用いて国内、及び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, に対する中和活性を測定した。遺伝子型 A と C では差が認められなかったが, 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ので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。
2. 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が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いる。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を示すことがで

きたので今年度は、HBs 免疫グロブリンを用いて中和活性の評価を目指した。特に HBV は 8 つ以上の遺伝子型があり、同様に中和可能なのか検討されたことはなかったので、この系を用いて検討する。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.HBV の感染方法

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 % CO_2 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。100 μL 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、100 μL 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°C で 2 時間反応させ 200 μL 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。また、遺伝子型は制限酵素の違いによって判断した。

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、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。

4.B19V の培養法

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。

5.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 gRNA を導入した。同日にピュロマイシン 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した培地で培養し、2 日後にクローニングした。

6.B19V の感染

$2 \times 10^5/\text{mL}$ に調整した細胞に 100 倍希釈した 100 μL の B19V (約 10^6 感染価) を添加し、継続的にサンプリングした。

7.HBV 陽性血漿

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。

8.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 β 19 V-DNA を求めた。

C.研究結果

1.HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性

各遺伝子型の血漿 2 件体ずつを用いて中和活性を評価した。3 回試験を繰り返したが、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するために多くの抗体が必要であった（図 1）。

2.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。更に 3 週間後も量は激減しただ検出することができた（図 2）。

（考察）

これまで HBV の抗体価は、HBs 抗原に結合する抗体量で評価されてきたが、中和活性を反映しているのか確認する方法が一般的には無かったからである。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、簡便で安い費用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。

B19V では、遺伝子改変によって従来よりも中間感染し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更に細胞株を改良する必要がある。

D.結論

確立した HBV 感染評価系を用いて HBs 免疫グロブリン製剤の中和活性を評価し、遺伝子型 B を中和する活性が弱いことを明らかにした。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。

E.健康危機情報

なし

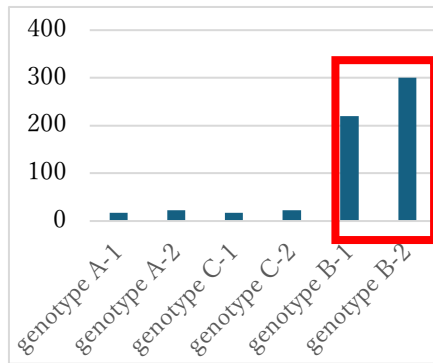
F.研究発表

- 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.

G.知的財産権の出願・登録状況
なし

製剤 A



製剤 B

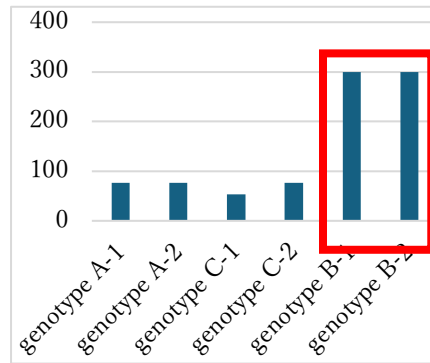


図 1.30 感染価の HBV を中和するために必要な HBs 抗体量

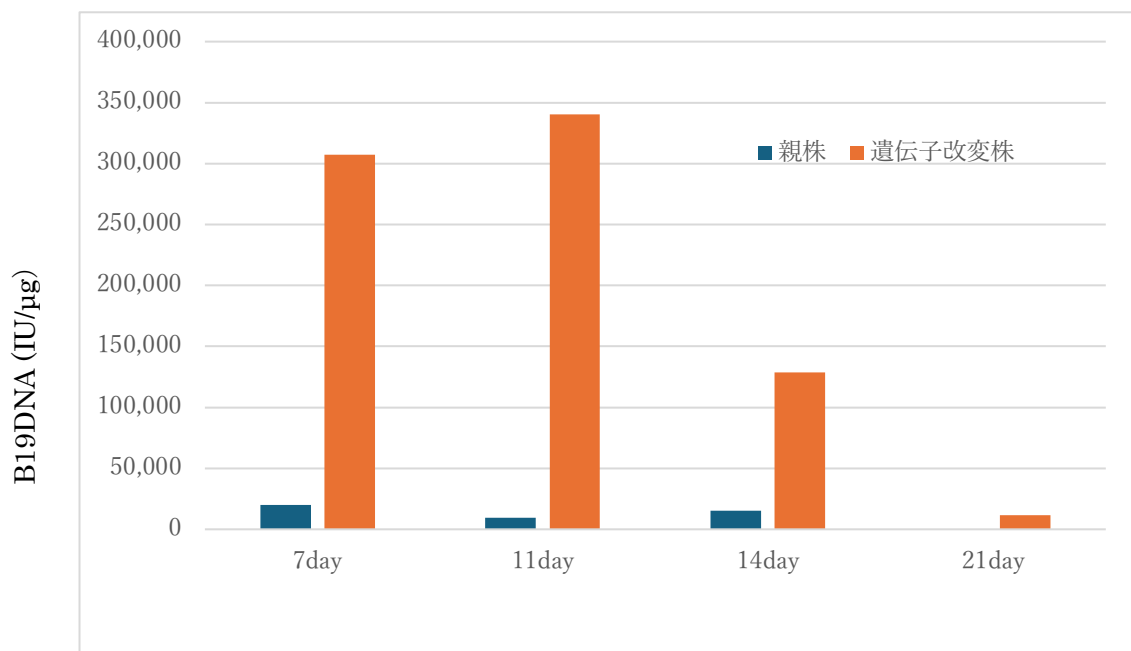


図 2. 遺伝子改編による B19 感染

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

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 任期付研究員）
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決まっていない。そこで、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候補となる。古典的なプラーク減少法を用いた中和抗体価測定法は、作業が煩雑、測定域が狭い、多検体の処理が困難という課題がある。これを解決するために、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の構築した。Mpox ウイルス (MPXV) の特性と思われるが、ワクシニアウイルス (VACV) と比較して感度が低く得られた値のばらつきが大きいことが課題となった。本研究では、検出に蛍光抗体を用いることで感度が向上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、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

要が生じる。

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。昨年度、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 (Focus Reduction Neutralization Test, FRNT) を構築した。

しかしながら、発色法を用いた系では得ら

れる値のばらつきが大きく、これは発色法の感度の低さが原因であることが疑われた。そこで、蛍光抗体法により感度が向上するか検討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、ならびにエムポックスウイルス (MPXV) である Liberia 株 (Clade IIa) 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。また国立感染症研究所獣医科学部より頂いた LC16m8 の親株である LC16m0 株も検討に用いた。

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 μ L ずつ細胞に添加し、37°C 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。

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) と細胞外外皮ウイルス (EEV)

の二つの形態を取る。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, 並びに VACV のオルソログ抗原 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 検出に使用した。またこれらの抗体は、Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Promega) で検出した。

FRNT

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。

中和試験は、以下の手順により実施した。上述のウサギ抗 LC16 IgG 分画の 2 倍段階希釈系列に各ウイルスを添加し、その後 37°C CO₂ インキュベーターに静置し 20-24 時間培養を行った。96 穴プレートに播種した細胞に、上述の血清-ウイルス混合液 100 μ L を細胞に添加し、37°C 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、その後 0.5% Triton X-100 DPBS を用いて透過処理を行った。検出用のウサギ抗 LC16 IgG 分画の反応に続き、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を反応させ、基質として TrueBlue Peroxi-dase 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、ウサギ抗 LC16 IgG 分画の反応に続く Alexa 488 標識抗ウサギ IgG 抗体による検出、先に述べたモノクローナル抗体を蛍光抗体で検出して得られたフォーカスも、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 点の幾何平均値をその血清の中和抗体価とした。

C. 研究結果

最初に、購入した 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, 並びに VACV のオルソログ抗原 L1R, D8L, A27L, B5R, A33R に対するモノクローナル抗体の反応性を評価した。痘そうワクチンとして使用される LC16m8 ならびにその親株である LC16m0 を検討に使用した。LC16m8 は、LC16m0 を培養細胞で継代する過程で得られた B5R 遺伝子の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 は MPXV とほぼ同様の性状を示すと考えられるため、モノクローナル抗体の評価は MPXV ではなく LC16m0 を用いて実施した。

非感染細胞、LC16m8 感染細胞、LC16m0 感染細胞を用いて、抗 VACV 抗体での検出を試みたところ、EEV 特異的表面抗原の一つである A33R と IMV 特異的表面抗原の一つである D8L に対するモノクローナル抗体で明瞭な蛍光シグナルが得られた（図 1）。また、同条件の細胞を用いて抗 MPXV 抗体の評価を行ったところ、VACV D8L のオルソログ抗原である E8L に対するモノクローナル抗体で明瞭な蛍光シグナルが得られた（図 1）。

次に、これまでフォーカスの検出に使用してきたウサギ抗 LC16 IgG 分画（ウイルス増殖

の全段階を検出できる）で得られる蛍光シグナルと上記で明瞭なシグナルが認められたモノクローナル抗体の蛍光シグナルを重ねて評価したところ、抗 E8L モノクローナル抗体で染まる感染細胞はフォーカスの内側に存在することから感染後期過程を検出していると考えられ、逆に抗 A33R モノクローナル抗体で染まる感染細胞はフォーカスの中盤から外側に存在することから感染初期～中期過程を検出していると考えられた。以上の結果より、反応性の異なる抗 E8L ならびに抗 A33R モノクローナル抗体を用い、FRNT におけるフォーカスの検出を比較・評価することとした。

LC16m8 株に対する FRNT では、従来のウサギ抗 LC16 IgG 分画、抗 E8L あるいは抗 A33R モノクローナル抗体を用いた蛍光検出でも検体の希釈に伴いほぼ同等のフォーカスの増減が認められた（図 2 左上）。これに対し、MPXV である Liberia 株に対する FRNT では、従来のウサギ抗 LC16 IgG 分画でははなだかな増減が認められたのに対し、抗 E8L あるいは抗 A33R モノクローナル抗体を用いた蛍光検出ではフォーカスカウントの増減幅が大きくなり感度が改善することが明らかとなった（図 2 左上）。用いた二つのモノクローナル抗体間では有意な差は認められなかった。実際に、得られた中和抗体価を評価したところ、LC16m8 株（図 2 左下）ならびに Liberia 株（図 2 右下）の両者に対して、従来の発色法と比較して、今回新たにためして 3 種類の蛍光検出法の間には有意な差は認められなかった。

D. 考 察

昨年度の検討において、従来のプラーク減少法を用いた中和抗体価測定系（Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT）に替わ

る, **FRNT** を構築した。この **FRNT** を用いたこれまでの中和試験結果を見直したところ, **VACV** と比較すると **MPXV** に対しては感度が低く, 1 サンプルあたり独立した 3 列で得られる各中和抗体価のばらつきが大きいことが明らかになってきた。

今年度は **MPXV** に対する感度ならびに中和抗体価のばらつきを改善する一つの対策として, 従来の発色法による検出から, 蛍光検出法の導入を検討した。反応性の異なる抗 **E8L** ならびに抗 **A33R** モノクローナル抗体を用いた蛍光検出法により, **MPXV** に対する **FRNT** の感度は大幅に改善された。その一方で, 得られる中和抗体価の値には影響がなかった。今回はウサギ抗 **LC16 IgG** 分画を被験サンプルとしてみなした **FRNT** の評価であるため, 実サンプルを用いた蛍光検出による **FRNT** でどのような結果が得られるは不明であり, 今後の課題として残された。

また, 今回は被験サンプルの希釈系列とウイルスの混合液を細胞に添加してからの培養時間は **18-20** 時間とほぼ固定した状態での比較によるものである。**VACV** や **MPXV** は **IMV** と **EEV** を主に二つの形態からなり, これらは細胞に感染してからの時間で変わることが想定される。今後, ウイルス学的な解析により **FRNT** に適した培養時間がウイルスごとに決まる可能性も否定できない。今後の検討課題として研究を継続する必要がある。

E. 結 論

昨年度構築した発色法を用いた **FRNT** では **MPXV** に関しては感度が低く, 得られる値の

ばらつきが大きくなる傾向が認められた。**MPXV** に対し反応性の異なる抗 **E8L** あるいは抗 **A33R** モノクローナル抗体を用いた蛍光検出法により, 感度が大きく改善することを明らかにした。しかしながら, ウイルス生活環の中に主に **IMV** と **EEV** という二つの形態が存在すオルソボックスウイルスに対する中和抗体価測定には, 未だに明らかにされていない部分が多く存在することから, 改善のためには詳細なウイルス学的な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
なし
2. 学会発表
なし

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. mAbの反応性の確認・評価

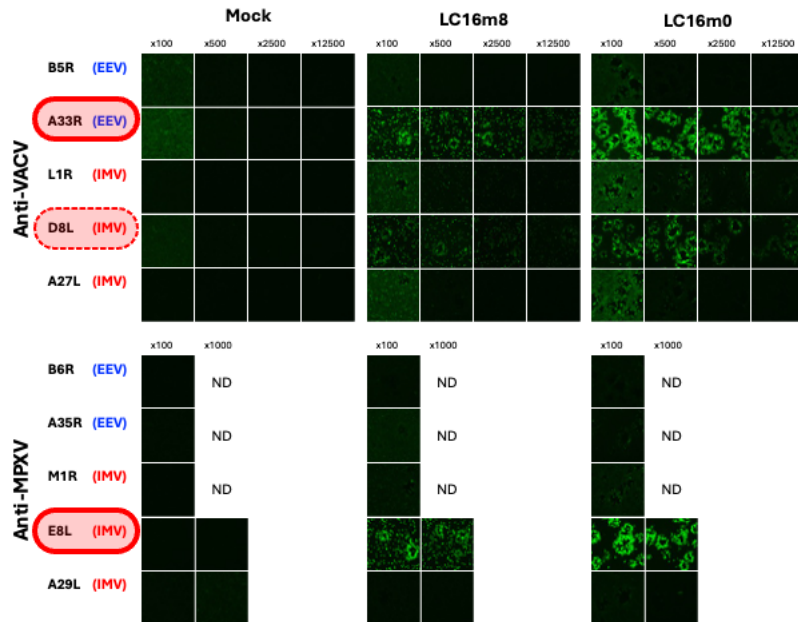
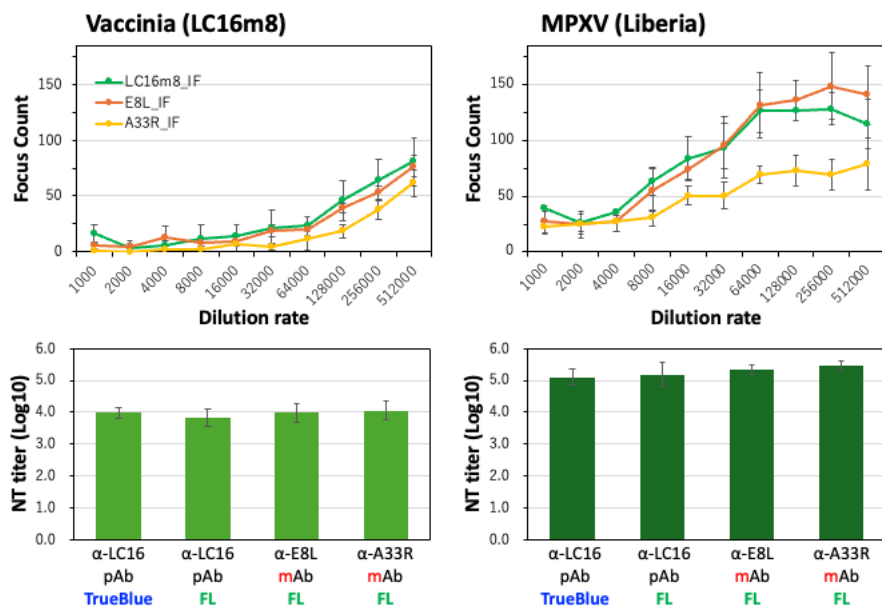


図2. 蛍光による検出により感度は改善する



厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリ-サイエンス政策研究事業)
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. メタゲノム解析パイプラインの検証
国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターで使用されてい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. メタゲノム解析パイプラインの検証
対象とした Microbial Community DNA Standard (#D6306) (Zymo Research) の内訳は、*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Lactobacillus fermentum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* であった。方法に記載に従い処理された核酸混合物は、NextSeq2000(Illumina)を用いて 150bp x2 の設定で NGS を行った。総出力として 12,622,464 reads が取得された。このうち、低品質および宿主類似配列を除去し、The National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide collection (nt) database に 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。BLAST hit しなかった配列情報の追加解析中である。

D. 考察

メタゲノム解析を目的に開発された PATHDET パイプラインを昨年度の血液検体データを使用した参照配列を用いること

で、血液検体により適した解析パイプラインに改良した。改良後の **PATHDET** パイプラインは、従来の解析パイプライン **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ことが示唆された。今後、より広範な病原体を原因とした感染症患者検体を用いて、病原体検出の評価を行う予定である。さらに原因不明感染症に対しての病原体検出の可能性を調査する必要がある。

該当なし
3. その他
該当なし

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. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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

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。2025年の国内でのデング熱輸入症例数は、162例であった。また中南米においてブラジルを中心にデング熱の流行が確認しており、ブラジルでの献血血においては多くのデングウイルス遺伝子が検出されていることが示された。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 (DENV) 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 (ZIKV) によって発症するジカウイルス病およびトガウイルス科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 (CHIKV) 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。

これらウイルスはヒトにおいて高いウイルス血症を呈するため、輸血、造血幹細胞・骨髄移植、および臓器移植により DENV, ZIKV および CHIKV がドナーからレシピエントに感染する可能性がある。これら感染症は、いずれも発熱、発疹、関節痛等の同様の臨床像を示すため、実験室内診断による鑑別が不可欠であり、急性期においては RT-PCR 法による実験室内診断が推奨される。

これまでにわれわれは献血血において重要な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、WHO の推計によれば世界では毎年 3.9 億人のデングウイルス感染が発生し、その内約 9600 万人がデング熱を発症しているとされている。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、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。

B. 研究方法

1. 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 法の検討と共有

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。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 μ g/mL yeast tRNA を添加した。

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。

3. ブラジルにおけるデング熱の流行状況と献血血におけるデングウイルス調査

ブラジルにおけるデング熱の流行状況については、PubMed 文献検索、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 (WHO, PAHO) 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、チクングニアウイルス、ジカウイルスの培養法についても情報共有した。また WNV 遺伝子型 2 型株である FCG 株の共有を行った。

2. ブラジルにおけるデング熱の流行状況と献血血におけるデングウイルス調査

DENV の主な感染経路は蚊による刺咬であるが、輸血を介した感染に関する情報は限られている。我々は、PubMed を用いた輸血関連デング熱に関する文献検索、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 (WHO, PAHO) の発表資料等よりその知見をまとめた。

WHO によれば世界におけるデング熱の患者報告数は増加傾向にあり、特に南米におけるデング熱の報告数はブラジルを中心に増加している。世界では 2024 年にデング熱の報告数が 1,442 万人、2025 年には 541 万人であったが、その内ブラジルでは 2024 年に 1,026 万人、2025 年に 383 万人以上の患者がそれぞれ報告された。

南米において献血血から検出された

DENV RNA について調査したところ、2003 年にブラジルの献血血より DENV RNA が検出 (4,858 検体中、3 検体陽性)、2004 年にはホンジュラスの献血血より DENV RNA が検出 (2,994 検体中、9 検体陽性) されている。2005 年にプエルトリコの献血血よりデングウイルス RNA が検出され、2012 年にはブラジルの献血血より DENV3 の RNA が献血血より検出 (500 検体中、2 検体陽性) されている。最もブラジルでデング熱患者数の多かった 2024 年にも献血血より多くの DENV RNA が検出 (9,463 検体中、40 検体 DENV1 陽性、39 検体 DENV2 陽性、5 検体 DENV3 陽性、1 検体 DENV4 陽性、1 検体 DENV1 および DENV2 陽性) されている。

次に献血血によるレシピエントの DENV 感染例では、2012 年には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が報告されている。また、2014 年にはブラジルにおいて 1 例の血小板輸血による DENV 感染例が報告されている。2014 年の症例では、定期的に成分献血 (血小板) を行っていたドナーから、献血の数日後にデング熱と診断されたとの連絡が血液銀行にあった。献血時のドナー検体は、DENV 特異的 IgG 抗体、IgM 抗体、および RT-PCR 検査すべて DEN 陰性であったが、20 日後のドナーに対する検査では血清学的に DENV 感染が確認された。DENV 陽性ドナーからの血小板製剤を輸血された 2 名のレシピエントの内、1 名は輸血 3 日後に発熱し、高いウイルス血症を呈した。このレシピエントの輸血前検体は IgG 抗体、IgM 抗体、DENV RNA すべて陰性であった。もう 1 名のレシピエントについては、DENV 感染を示す症状は認められず、全ての検査でも陰性であった。本症例は、デング熱が実際に輸血によって感染すること、そして実際に臨床症状を発症することを示唆している。

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アルボウイルスにはウエストナイルウイルスの他にウツウイルス、ジカウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルス等がある。

本研究においては、遺伝子検査に必要なデングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルスの陽性対照を調整し、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。特にウエストナイルウイルス、遺伝子型 2 型である FCG 株を共有した。また DENV1-4 型および CHIKV に対する検査法を共有した。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に対する献血血スクリーニング法の標準化に寄与することが期待される。

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。特に **DENV** の国内流行が発生した場合は、**DENV** 感染ドナーより献血血が提供される可能性は否定できない。また、ブラジルでの献血血からの **DENV** 感染事例は、抗 **DENV** 特異的抗体陰性のヒトにおいては、**DENV** 混入献血血より **DENV** に感染するリスクがあることを示唆しており、近年デング熱の国内流行がほとんどない日本においては、国内流行からの献血血を介した **DENV** 感染の可能性は否定できない。

ブラジルにおいては、問診により健康とされた多くの献血ドナーが **DENV** に感染していたことが明らかとなっており、こうしたドナーの献血血を介してレシピエントが **DENV** に感染した可能性が示唆された。**DENV** に感染してもその多くは不顕性のため、問診段階でこのような **DENV** 感染者を除外することは難しいため、非流行地域においても、国内流行発生時には、安全な血液供給を確保するために信頼性の高いスクリーニング検査導入を検討することが望まれる。

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。したがって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

(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 7 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	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リスク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て、今回、フクオカウイルス（FUKV）に焦点を当てた蚊個体を用いた感染実験と、野外捕集蚊のウイルス保有調査を実施した。その結果、FUKV がステフェンスハマダラカによって媒介可能であることが実験的に証明された。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

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（JEV）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、ラブドウイルス科レダンテウイルス属に分類され、本邦において潜在的な流行とヒトへの曝露リスクが懸念されるフクオカウイルス（FUKV）を対象とする。FUKV は過去にコガタアカイエカ（*Culex tritaeniorhynchus*）やホシヌカカ（*Culicoides punctatus*）から分離されているが、前年度に実施した各種蚊由来培養細胞を用いた増殖実験において、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*）由来細胞で極めて高い増殖効率を示した一方、コガタアカイエカ由来細胞では上述 2 蚊種の細胞に比べ増殖効率が低いことが判明している。

そこで令和 7 年度は、これら細胞レベルでの感受性の知見を個体レベルで検証するため、ヒトスジシマカおよびステフェンス

ハマダラカを用いたウイルス感染実験による媒介能の検証を実施した。併せて、野外捕集蚊からのウイルス RNA の検出を行い、現在の我が国における FUKV の流行活動性を評価した。

B. 研究方法 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。

蚊個体でのウイルス感染・増殖性の観察

実験室飼育蚊系統であるヒトスジシマカおよびステフェンスハマダラカを用い、FUKV を混合したウサギ脱繊維血（ウイルス濃度： 1.5×10^7 RNA copies/ml）を人工吸血させた。吸血後、飽血蚊のみを回収し、28℃ の条件下で 14 日間飼育した。

FUKV の体内動態および媒介能の検証

飼育後の蚊の翅・脚を切除し、1%ピロカルピンおよび 0.1% Tween 20 を含む PBS を用いた蚊の強制唾液回収法により、個体から唾液を採取した。その後、蚊の胸部・腹部（中腸での感染を評価）、および頭部・翅・脚（血体腔への移行による全身感染を評価）に分割して回収し、それぞれ NucleoSpin RNA（タカラバイオ社）を用いて全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA から、THUNDERBIRD® Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix（TOYOBO 社）を用いた RT-qPCR 法により FUKV RNA コピー数を

定量した。頭部・翅・脚サンプルで FUKV RNA 陽性と判定された個体の唾液を HmLu-1 細胞に接種し、37°C・5% CO₂ インキュベーター内で培養した。培養開始から経時的 (Day 0, Day 3, Day 6) に培養上清を一部回収し、NucleoSpin RNA Virus (タカラバイオ社) を用いたウイルス RNA の抽出後、上述と同様の RT-qPCR 法により FUKV RNA 量を定量した。

野外捕集蚊のウイルス保有状況調査

長崎県諫早市の畜舎周辺等で捕集した野外蚊 (主にコガタアカイエカ等のプール) の破碎液またはフィルターろ過液から全 RNA を抽出した。レダンテウイルス属ヌクレオプロテイン遺伝子領域を標的として独自に設計したユニバーサルプライマー (FNB-N1: 5'-CAGARGATGAYTGTGGATGTGCTT-3', FNB-N2: 5'-TGTTVTCATTRAARATCCACATCAT-3', 増幅サイズ 362 bp) を用い、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (タカラバイオ社) によるコンベンショナル RT-PCR 法によってウイルス RNA の検出を実施した。

C. 研究結果

蚊体内における FUKV の経口感染と全身感染の成立

人工吸血後の胸部・腹部における FUKV RNA の検出結果から、ステフェンスハマダラカでは約 68%、ヒトスジシマカでは約 38% の個体で感染が成立しており、ステフェンスハマダラカにおいて有意に高い感染率が認められた ($p < 0.05$) (図 1)。次に、頭部・翅・脚から抽出した RNA の定量結果をもとに全身への拡散率を評価した結果、両群間に統計学的な有意差は認められなかった (ns) もの、ステフェンスハマダラカで約 55%、ヒトスジシマカで約 40% の個体で全身感染していることが判明した (図 2)。このことから、FUKV は両蚊種ともに中腸エスケープバリアを突破し、全身感染を引き起こす能力を有することが確認された。しかしながら、ステフェンスハマダラカの頭部・翅・脚における RNA コピー数 (Log10) の分布は概ね 1~2 程度に留まる個体が多く (図 2)、一次感染部位 (中腸上皮細胞) と比較して二次感染組織 (脂肪体やマルピーギ管等) での増殖効率が低いことが示唆された。

蚊の唾液からの感染性ウイルスの検出

ステフェンスハマダラカおよびヒトスジシマカから回収した唾液を HmLu-1 細胞に接種し、上清中のウイルス RNA 量の推移を評価した。その結果、ステフェンスハマダラカ 1 個体由来の唾液を接種した細胞の培養上清において、接種直後 (0 dpi) から 6 日目 (6 dpi) にかけて顕著な FUKV RNA 量の増加が観察され、唾液中に感染性 FUKV が

存在することが確認された。これにより、ステフェンスハマダラカにおける FUKV の媒介が可能であることが証明され、これはレダンテウイルス属において初めてとなる節足動物媒介性の証明となった。

FUKV の野外流行実態

2022 年および 2023 年に長崎県で捕集された野外蚊、計 3958 頭 (149 プール、うちコガタアカイエカが 3017 頭を占める) を対象に遺伝子検出を行った。その結果、JEV は合計 9 プールから分離されたのに対し、FUKV RNA は全プールにおいて陰性であった (表 1)。

D. 考察

本研究により、FUKV がステフェンスハマダラカによって媒介可能であることが世界で初めて実験的に証明された。これはレダンテウイルス属における節足動物媒介性の初の実証例であり、ウイルス学的に極めて重要な知見である。FUKV は 1982 年に福岡県のコガタアカイエカおよびホシヌカカから分離され、その後 1980 年代後半には広島県のウシ血液からも分離されている。この歴史的事実と、本実験における「ステフェンスハマダラカおよびヒトスジシマカにおける経口感染の成立」という結果を併せて考えると、FUKV は野外において多様な吸血性節足動物を介して伝播している可能性が高い。

特に、感染実験においてステフェンスハマダラカがヒトスジシマカよりも有意に高い感染率 (約 68%) を示した点は注目に値する。ステフェンスハマダラカは現在我が国には分布しないが、本邦の畜舎環境ではシナハマダラカ (*Anopheles sinensis*) が優占種である。本実験においてハマダラカ属が高いウイルス感受性を示したことから、国内ではシナハマダラカが主要な媒介蚊として機能している可能性が示唆される。一方で、蚊体内のウイルス動態の精査によれば、ステフェンスハマダラカにおける全身への拡散率は、胸部・腹部でウイルス RNA が陽性だった個体の約 55% であり、かつ二次感染組織での FUKV RNA コピー数は胸部・腹部のそれと比較して低値に留まる傾向が見られた。これは、本ウイルスが蚊の体内において「中腸エスケープバリア」を突破するものの、その後の増殖効率には一定の制限があることを示唆している。この制限が、野外における流行規模を規定する要因の一つとなっている可能性がある。

疫学的観点からは、近年のウガンダにおける調査で、同じレダンテウイルス属のルダンテックウイルス (LDV) に対し、ヒト集団 (15~48 歳の女性) が広範に曝露されている (高い血清抗体保有率を示す) という報告がある。FUKV についても、過去に国内の畜舎周辺で活発に分離された経緯がある以上、現在も潜在的に維持・増幅サイクルが

循環している可能性は否定できない。しかし、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、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かった。この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。また、日本国内には FUKV の他、2 種のレダンテウイルス（ニシムロウイルスおよびオオイタウイルス）の分布が確認されていると同時に、本属にはヒトに病原性を示す種（LDV 等）が含まれるため、潜在的なリスク評価を継続することは公衆衛生上重要であると考えられる。

E. 結論

本研究により、FUKV がステフェンスハマダラカによって媒介可能であることが明らかとなった。長崎県における野外調査の結果から、現時点での FUKV のヒトへの感染リスクは比較的低いと考えられるが、今後は本邦の優占種であるシナハマダラカを用いた媒介能調査や、家畜等を対象とした血清疫学調査を実施し、国内における流行動態の全容を解明する必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

1. 小林大介. ス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プ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

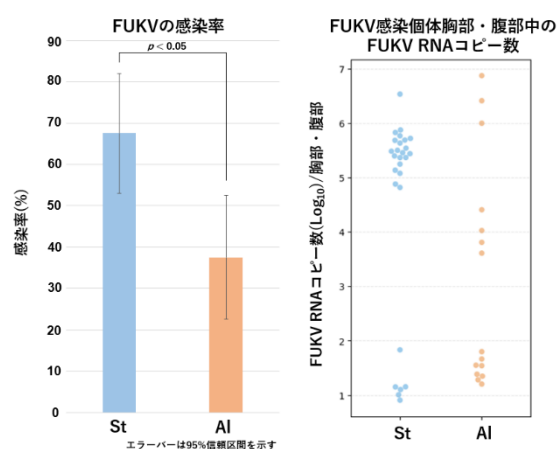


図1：ステフェンスハマダラカ（St）およびヒトスジシマカ（AI）におけるフクオカウイルス（FUKV）の感染率および感染個体の胸部・腹部中の FUKV RNA コピー数のプロット

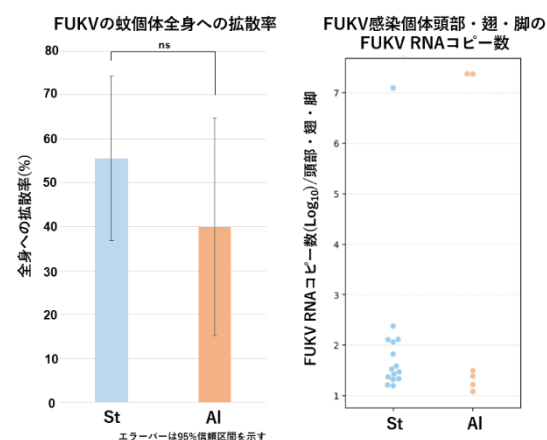


図2：ステフェンスハマダラカ（St）およびヒトスジシマカ（AI）におけるフクオカウイルス（FUKV）の全身への拡散率および感染個体の頭部・翅・脚中の FUKV RNA コピー数のプロット

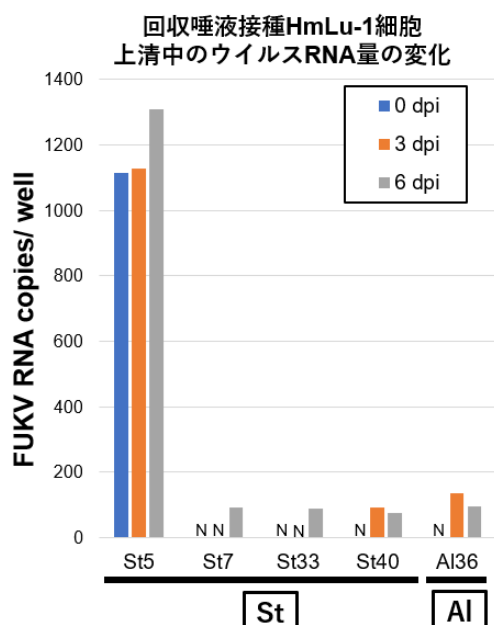


図3：ステフェンスハマダラカ（St）およびヒトスジシマカ（Al）から回収した唾液を接種した HmLu-1 細胞上清中のフクオカウイルス（FUKV）RNA 量の経時的変化。培養上清は FUKV 接種直後（0 dpi）および3日後（3 dpi），6 日後（6 dpi）に回収し，それぞれの時点における FUKV RNA 量を示す。

採集年	蚊種	個体数	プール数 (1-40 ♀/pool)	FUKV 陽性プール数	日本脳炎 ウイルス 陽性プール数
2022年	コガタアカイエカ	1079	27	0	2
	シロハシイエカ	345	9	0	0
2023年	コガタアカイエカ	1938	80	0	5
	シロハシイエカ	276	12	0	1
	vishnui subgroup	287	12	0	0
	アカイエカ種群蚊	7	2	0	0
	カラツイエカ	1	1	0	0
	イエカ属蚊	21	2	0	1
	ヒトスジシマカ	2	2	0	0
	アカエゾヤブカ	1	1	0	0
	ヤブカ属蚊	1	1	0	0
total		3958	149	0	9

表1：長崎県諫早市畜舎で採集された各種蚊からのフクオカウイルス（FUKV）RNA の検出結果

令和7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 国立健康危機管理研究機構(JIHS)

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、簡易キットにより抗インフルエンザウイルス抗体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亜型の特定方法の確立を試みた。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の侵入状況の可視化と、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エムボックス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な

どへの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, 遠心により血清を回収し, 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, 遠心により血清を回収し, -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 $S/N < 0.6$, その他の動物血清では $S/N < 0.5$ を陽性とした。

3. 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-ストレプトマイシン (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-ストレプト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% CO₂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 µg/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 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. 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 1)。

2. 和歌山県の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の亜型で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)。

3. 東京都内アライグマの抗体疫学調査

ELISA キット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 3)。

D. 考察

1. 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。

2. 和歌山県の野生動物における HA 亜型型別診断

抗インフルエンザウイルス抗体陽性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。

3. 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。東京都内では 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, 継続的に動物における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。

3. その他

特記事項なし

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

1. 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

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

図1 HA外套シュードウイルスの力価測定

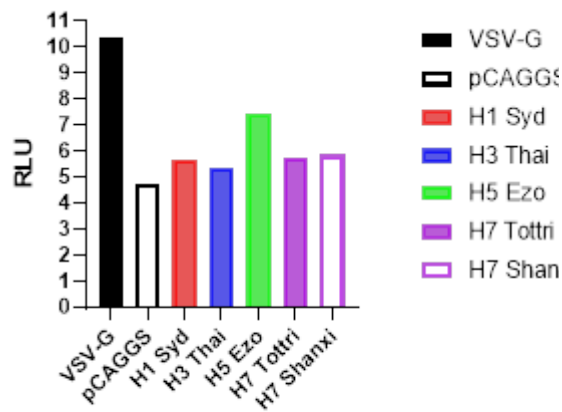


図3 抗体スクリーニング・WHO ワクチン候補株を用いた中和試験（東京都のアライグマ）

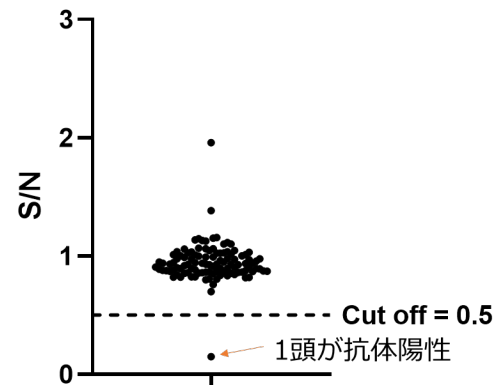


図2 WHO ワクチン候補株を用いた中和試験（和歌山県の野生動物）

個体番号	IDEXX	中和抗体価			
		H1	H3	H5	H7
アライグマ-1	0.21	<20	<20	640	<20
アライグマ-2	0.16	<20	<20	10240	<20
アライグマ-3	0.13	<20	<20	10240	<20
アライグマ-4	0.14	<20	<20	5120	<20
アライグマ-5	0.18	<20	<20	5120	<20
アライグマ-6	0.27	<20	<20	2560	<20
アライグマ-7	0.14	<20	<20	10240	<20
アライグマ-8	0.26	<20	<20	320	<20
アライグマ-9	0.06	<20	<20	5120	<20
アライグマ-10	0.34	<20	<20	5120	<20
アライグマ-11	0.20	<20	<20	5120	<20
アライグマ-12	0.11	20	20	2560	<20
アライグマ-13	0.21	20	<20	5120	<20
アライグマ-14	0.13	<20	<20	2560	<20
アライグマ-15	0.20	<20	<20	2560	<20
アライグマ-16	0.20	<20	<20	640	<20
アライグマ-17	0.16	<20	<20	2560	<20
アライグマ-18	0.13	<20	<20	1280	<20
アライグマ-19	0.35	<20	<20	1280	<20
陰性アライグマ-2	0.98	<20	<20	<20	<20
陰性アライグマ-3	1.08	<20	<20	<20	<20
シカ-1	0.46	80	40	80	40
イノシシ-1	0.43	80	80	80	80
陰性シカ-1	1.04	40	80	40	40
陰性イノシシ-1	0.94	40	20	40	20
ウサギ抗H1血清	未実施	1280≦	未実施	未実施	未実施
ウサギ抗H3血清	未実施	未実施	1280≦	未実施	未実施
フェレット抗H5血清	未実施	未実施	未実施	40960	未実施
フェレット抗H7血清	未実施	未実施	未実施	未実施	1280≦

HA亜型	H1	H3	H5	H7
中和抗体価	<20	<20	5120	<20