

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラーサイエンス政策研究事業)「輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」分担研究報告書

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

研究分担者 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 野島清子

研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス2部 下池貴志

研究要旨

2020年末以降、新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクが起こり現在も継続している。血液の安全性確保の観点から得られる今までの知見としては、症状のある感染者の15%において血液中からSARS-COV-2のRNAが検出される(RNAemia)事例や中国のドナースクリーニングで4名のドナーでSARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性を明らかにするとともに、ウイルスの性状が変化しないことを確認する必要がある。本研究では、武漢株、イギリス型変異(B.1.1.7, D614G, N501Y)、ブラジル型変異(P.1, D614G, N501Y, E484K)を用いて、血漿分画製剤で用いる60℃液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても30分で不活化されることを確認した。

血液製剤に混入する可能性があるC型肝炎ウイルス(HCV)の実ウイルスを用いた不活化条件を明らかにするため、培養細胞で増殖させたHCVを血液製剤に加え、様々な条件で不活化の検討を行っている。これまで用いたHCVは培養細胞で増殖出来るJFH-1株であった。2015年JFH-1以外のHCV株の増殖に重要な宿主蛋白質Sec14L2の同定が報告され、JFH-2株が増殖できるFU97細胞にSec14L2が発現する細胞(FU97-sec14L2)を作製しHCV陽性ドナー血漿由来のウイルスを感染させたが、これまでHCVの増殖は見られなかった。今回、Sec14L2の発現が多い細胞をクローニングし、HCV陽性ドナー血漿由来のウイルスを感染させたところ、HCV RNAの増殖を検出出来た。

A. 目的

A-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

2020 年末以降、新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクが起り現在も継続している。血液の安全性確保の観点から得られる今までの知見としては、症状のある感染者の 15%において血液中から SARS-COV-2 の RNA が検出される(RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性などを明らかにするとともに、ウイルスの性状が変化しないことを確認する必要がある。本研究では、武漢株、イギリス型変異(B. 1. 1. 7, D614G 変異)、ブラジル型変異(P. 1, N501Y)を用いて、血漿分画製剤で用いる 60℃液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることを確認した。

A-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

C 型肝炎ウイルスは血液を汚染する可能性のある病原体であり、1964 年から 1987 年かけて海外の血漿を原料に製造された第 IX

因子製剤、第 VIII 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの人が C 型肝炎に感染した経緯がある。

C 型肝炎の治療法はリバビリンとペグインターフェロンとの併用療法 (PEG-IFN/ribavirin) により治療効果 (それでも約 50%) が上がるようになった。しかし、日本人の感染者で多い遺伝子型(遺伝子型 1b) の HCV では治療効果が上がらなかった。しかしここ数年、数種類の阻害剤 (Grazoprevir, Ledipasvir, Sofosbuvir ; それぞれ HCV プロテアーゼ (NS3/NS4A) 、ポリメラーゼ (NS5A) 、及び NS5AB タンパク質に対する阻害剤で、これらをまとめて **Direct acting antivirals (DAA)** と呼ばれている)が開発、使用が開始され、1b 型も含めその療効果が上がり、今や HCV は治療可能な感染症と言っても過言ではない。これらの成果は約 30 年に渡る世界中の研究者の努力の賜で、昨年ノーベル賞受賞と言う形で評価されたのは同じ HCV の研究者として嬉しい限りである。

C 型肝炎ウイルスには、治療薬の開発に必要な培養細胞を用いた感染系が長らくなかったため、チンパンジーを用いて感染性の評価を行っていたが、価格の高さ、扱い難さ、また動物愛護の観点からも治療薬開発等の研究がなかなか進展しなかった。血液製剤中の HCV 不活化の評価は、モデルウイルスとして培養可能なウシ下痢症ウイルス (BVDV) が用いられてきた。こうした中、2005 年に培養細胞で HCV を増殖させることが可能な系が発表され研究が急速に進展した。

本研究でもこの HCV JFH-1 株 (遺伝子型 2a) を増殖させ、増殖した HCV JFH-1 を血液製剤にスパイクしウイルスの不活化を評価する系を構築した。

本研究は JFH-1 以外の HCV、特に HCV 陽性ドナー血漿由来の HCV の不活化を調べることが目的であり、過去 3 年間、様々な培養細胞に HCV の増殖に重要な宿主因子 Sec14L2 (参考: Saeed M. et al. 524 471-490, 2015 Nature) を高発現させ、これら培養細胞に患者由来 HCV を感染させ、その HCV が増殖できる系の構築の検討を行って来た。昨年度は JFH-1 とは別の株の JFH-2 (遺伝子型は JFH-1 と同じく 2a) が増殖出来る FU97 細胞に Sec14L2 を発現する培養細胞 (FU97-sec14L2 と命名) を作製し、患者由来 HCV を感染させた。FU97 細胞は HCV の増殖に重要な、肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子マイクロ RNA; miR122 が高発現し、且つ、HCV の増殖に重要な、これも肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子 α -fetoprotein も高発現している (参考: Shiokawa M. et al. 88 5578-5594, 2014 J. of Virol.)。しかしながら患者由来 HCV の増殖は見られなかった。今年度は、FU97+sec14L2 が高発現する細胞をクローニングし、これらの細胞に感染者由来 HCV を感染させ、その増殖を調べた。

B 研究方法

B-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

B-I-1 ウイルスおよび細胞: 新型コロナ

ウイルス SARS-CoV-2 としては、武漢株 hCoV-19/Japan/TY-WK-521/2020 (A)、イギリス型変異 QHN002, TY7-302 (B. 1. 1. 7)、ブラジル型変異 hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 (P. 1) を用いた (イギリス型は D416G 変異、ブラジル型は D416G, N501Y 変異を含む)。すべて国立感染症研究所が分離したものであり、当研究のために増やして実験に用いた。細胞は veroE6/TMPRSS2 は JCRB 細胞バンク由来のものを使用した。通常の細胞継代時は 10% FBS/ DMDM low glucose, G4181mg/mL (含ペニシリン/ストレプトマイシン)、ウイルス感染時は 2%FBS/DMDM low glucose (含ペニシリン/ストレプトマイシン) を用いた。

B-I-2 : 加熱処理

各ウイルスは、5%または 2%FBS 入り DMEM メディウム、PBS, 5% アルブミン製剤 (日本血液製剤機構) に 1:9 の割合でスパイクし、チューブを密閉後にジップロックに入れて空気を十分に抜き、60°C に設定したウォーターバスに沈めて (チューブが完全に隠れるまで)、10, 30, 60 分反応後に回収した。実験は独立して 3 回実施した。

B-I-2 : 感染性評価

加熱処理が終わった直後に、メディウムで 10 倍段階希釈を行い (N=6 または N=8)、予め前日から 96well plate で培養している veroE6/TMPRSS2 細胞 (1×10^4 個 / 100uL / well) に、希釈したウイルス液を 100uL ずつ添加し、37°C 5%CO₂ のインキュベーターで 2 日から 4 日培養し、細胞変性効果 (cytopathogenic effect : CPE) の有無を顕

顕微鏡化で観察し感染性の有無を評価した。各処理後のウイルス感染価は Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価 (tissue culture infectious dose :TCID₅₀/mL) として算出した。

B-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価 当研究

B-II-1 :Sec14L2 が発現する、FU97 培養細胞の作製及びクローニング

H29 年度報告した方法により sec14L2 を発現する組換えレンチウイルスを作製(プラスミド pSEC14L2/BlastR, pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pMD2.G を 293T 細胞に同時トランスフェクションすることにより得た。詳しくは H29 年度の同研究費報告書参照)し、これを胃がん由来 FU97 細胞に感染させ、Blasticidin でセクションすることにより、Sec14L2 が発現する細胞を得た。得られた細胞を限界希釈することにより、1 ウェルに数個の細胞を増殖させ、その中で、この組換えレンチウイルスに sec14L2 と一緒に組み込まれた tGFP の発現の指標として、蛍光顕微鏡で緑色に光る細胞が多く存在するウェルを選択する作業を繰り返し、更に Sec14L2 の発現の多い細胞を免疫染色し、Sec14L2 が高発現する細胞を 8 クローンクローニングした。その中で特に Sec14L2 が高発現し、かつ血漿に対する抵抗性の高い細胞 2 クローン (#25, #34 と命名) を今回の実験に用いた。これら細胞クローン #25、#34 の Sec14L2 の発現を免疫染色、及びウエスタンブロッティングで調べた。(図 1)。なお、免疫染色による Sec14L2 の検出には、

一次抗体 (anti-Rabbit Sec14L2; #GTX115716, GTX、1000 倍希釈)、二次抗体 (Alexa Fluor 594 (#A11032 Thermo Scientific、1000 倍希釈) を、ウエスタンブロッティングによる Sec14L2 の検出には、一次抗体 (anti-Rabbit Sec14L2; #GTX115716, GTX、1000 倍希釈)、二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP-conjugated (Bio Rad、30000 倍希釈) を用いた。

B-II-3 :作製した培養細胞 Fu97-sec14L2 #25, 及び #34 への感染者由来 HCV の感染

作製した Sec14L2 が組み込まれた FU97 培養細胞 (FU97-sec14L2 と命名) (1x10⁵/well) に、新たに得た 5 種類の HCV 感染者由来血漿 (R1-1, -2, -3, -4, -5 : 各 HCV RNA コピー数は、R1-1: 2.2x10⁹, R1-2: 2.1x10⁹, R1-3: 7.0x10⁹, R1-4: 2.2x10⁹, R1-5: 7.1x10⁹ IU/mL : 野島清子氏により測定) をそれぞれ 50μl (培地に対して 1/10 の体積) ずつ加え、HCV が増殖するかを HCV コア蛋白質の免疫染色法と HCV ゲノム RNA の検出により確かめた。なおコントロールとして JFH-1 株を m. o. i. =1.1 (HCV RNA コピー数: 6.9x10⁷ IU/mL) でこの細胞に感染させた。

HCV ゲノム RNA の検出には、感染者由来 HCV 血漿感染 1, 及び 3 日後の細胞を RNA 抽出キット (RNA purification kit; EX-R&D) により HCV RNA を精製し、10 倍ずつ段階希釈 (10⁻¹-10⁻⁴) し、逆転写反応とそれに続く cDNA の増幅を PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TAKARA Bio) を用いて行った。反応条件は、50°C 30min, 94°C 2min

の後、[94°C 15s, 55°C 15s, 72°C 60s]を32回繰り返す、その後、72°C 3minで行った。用いた二種類のHCV特異的primersは、sense: nt 45-64とantisense: nt 265-246(数字はHCV JFH-1ゲノムRNAの5'末端からの塩基番号)である。この反応により増幅されたcDNA産物を2% agarose gelにて分離した。更に、この各サンプルを10倍ずつ段階希釈(10⁰-10⁻³)し、EX-Taq DNA polymerase (AKARA Bio)、及び特異的primers (sense nt 63-82とantisense nt 207-188)を用いてnested PCRを行った。反応条件は、[98°C 10s, 55°C 30s, 72°C 60s]を30回繰り返した。この反応により増幅されたcDNA産物も2% agarose gelにて分離した。

また、免疫染色に用いた抗体はanti-HCV core antigen monoclonal antibody (MA-080, Thermo Scientific)、蛍光二次抗体にはAlexa Fluor 594 (#A11032 Thermo Scientific)を用いた。核の染色にはDAPI (#340-07971, 和光純薬)を用いた。

(倫理面への配慮)

この培養細胞でウイルスが増殖させる系は、実験動物を用いる必要がないため、研究のやりやすさのみでなく、倫理面においても優れた系である。この研究に関して国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査」で承認を受けた(受付番号851「血液製剤における病原体不活化に関する研究」)。

C.研究結果

C-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

用いたウイルスを1:9の割合でメディウム、PBS、5%アルブミン製剤にスパイクした直後の感染性を評価したところ、図1にあるようにスパイクしたことによるウイルス力価への影響は認められなかった。次に、スパイクしたウイルス検体をウォーターバスに水没させて60°Cで加熱処理を実施し、10, 30, 60分後のウイルス力価を検討した。その結果、いずれのウイルスも10分の加熱処理では感染性が残存したが30分、60分後は感染性が認められず、検出限界以下であった(<3.2 TCID₅₀/mL)。

武漢株における60°C10分加熱処理時のLRVは、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、5.4, 5.9であり、イギリス変異ウイルスにおける60°C10分加熱処理時のLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、4.3, 5.3, 5.1であり、ブラジル変異ウイルスにおける60°C10分加熱処理時のLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、5.6, 5.5, 4.2であった。

加熱処理30分及1時間処理時の武漢株におけるLRVは、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、5.4, 5.9であった。イギリス変異ウイルスにおけるLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、PBS下でそれぞれ、4.3, 5.3, 5.1であった。ブラジル変異ウイルスにおける60°C10分加熱処理時のLRVは、メディウム下、5%アルブミン製剤下、

PBS 下でそれぞれ、5.8, 5.9, 5.8 であった。武漢型ウイルス、イギリス変異ウイルス、ブラジル変異ウイルスそれぞれの LRV は平均すると、5.7、5.9、4.9 であった。この違いはストックウイルスの力価による違いと考えられた。また、通常たん白質濃度が濃い程不活化に抵抗性であると言われていたが、そのような傾向は認められなかった。

C-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

C-II-1: Sec14L2 発現FU97(FU97-sec14L2)

細胞#25, #34 の Sec14L2 の発現

免疫染色により、FU97+sec14L2 #25、及び#34 細胞では、Sec14L2 が全細胞の 15、及び 24%で発現していることが明らかとなった。また、ウエスタンブロッティングで、#25、及び#34 細胞で Sec14L2 が発現していることが明らかとなった。Sec14L2 の発現量は#34の方が、#25 細胞よりも 2 倍多いことも明らかとなった。一方、FU97 細胞では、免疫染色、及びウエスタンブロッティング共に Sec14L2 の発現は発現していない、或いは検出限界以下であるということが明らかとなった (図 3)。

C-II-2: FU97-sec14L2 細胞への感染者由来血漿の HCV の感染

FU97-sec14L2 細胞に新たに得た 5 種類の HCV 感染者由来血漿 (R1-1, -2, -3, -4, -5: 各 HCV RNA コピー数は、R1-1: 2.2×10^9 , R1-2: 2.1×10^9 , R1-3: 7.0×10^9 , R1-4: 2.2×10^9 , R1-5: 7.1×10^9 , 及びコントロールとして JFH-1 (HCV RNA コピー数 6.9×10^7 IU/mL、感染価 5.6×10^6) を感染させ、

1、及び 3 日後に細胞内の HCV コア蛋白質の発現を免疫染色法で調べた。JFH-1 感染の場合コア蛋白質の発現を認められたが、5 種類の HCV 感染者由来血漿の感染では、コア蛋白質の発現は認められなかった (data not known)。

そこで各感染細胞の HCV RNA 量を調べたところ、#25、#34 の両方の細胞で感染者血漿 R1-2 の HCV RNA 量の増加が認められた (図 4)。

D. 考察

D-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

1. エンベロープを有するウイルスは多くの不活化処理に対して感受性であり、新型コロナウイルスも同様な傾向を示すと考えられる。今回の研究では、武漢オリジナル株とその後国内で分離された変異株を用いて、加熱による不活化と変異による影響を確認した。60°C30 分の加熱処理でウイルスの感染性は検出限界以下となり感染性は認められなかったが、10 分の処理では僅かな感染性の残存を認めた。今回の実験で 12 分の処理では感染性を認めない事例があったこと (data not shown)、およびヒートブロックでの 56°C30 分処理で僅かに感染性が残存する事例も報告されていることから、中心温度が 60°Cに達すること、蓋の内側についたウイルスが不活化されずに残存する可能性を考慮して不活化処理を行うことが重要であると考えられた。尚、本研究ではウォーターバスに沈めることで検体温度を一

定に保つように処理を行なった。

2. 60°C 30分位以上の処理により、約10の5乗の不活化、LRV5、が期待できることが分かり、今回用いたいずれの変異株でも同様な不活化効果が認められた。変異ウイルスのスパイク領域の変異箇所を「参考」に示した。変異によりレセプターとの親和性の変化やレセプター結合部位の構造変化などが論文で報告されているが、今回用いた変異ウイルスの変異は加熱の抵抗性には影響がないことが確認できた。また、LRV5という値は、仮に献血血液に新型コロナウイルスがわずかに混入した場合でも、液状加熱処理により感染性を除去できることが示唆された。

D-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

1. 前年度に HCV の増殖に重要な宿主因子である α -fetoprotein、miR122 を発現し、HCV JFH-2 株が増殖できる FU97 細胞に、HCV の増殖に重要な宿主因子である Sec14L2 も発現する細胞を作製した。今年度、この細胞で、Sec14L2 が高発現し、しかも血漿に対して耐性な細胞をクローニングした（クローン#25、及び#34）。これら2クローン細胞に HCV 陽性血漿を感染させたが、その増殖はウイルス蛋白質では確認できなかったが、陽性血漿 R1-2 を感染させた時、今回初めてウイルス RNA の増幅を検出することが出来た。Sec14L2 が多く発現する細胞クローンをクローニングしたこと、及び新たな感染者血漿を用いたことに起因していると考えられる。

2. 今回始めて感染者由来血漿の HCV ゲノ

ム RNA の増殖を検出することが出来たが、患者由来 HCV の不活化を調べるためには、HCV ゲノム RNA の更に大きな増幅が見られないといけない。

感染者由来 HCV を更に大きく増幅させる方法として、i) 感染者由来 HCV を FU97-sec14L2 細胞に感染させ、長期にわたり培養し、細胞に変異が入り、その HCV が増殖出来るようになったら、その細胞から Ribavirin などの薬剤で感染した HCV を取り除いた cured 細胞を得て、変異前の感染者由来 HCV を再感染させ、その HCV が増殖出来るかを調べる方法。或いは、ii) 感染させる血漿の量を増やすことが考えられるが、感染させる血漿量を増加させると血漿中に含まれる成分のため細胞の培地がゲル化し、細胞の増殖を阻害するようなので、何らかの方法で血漿中の HCV のみを精製、濃縮し、細胞に感染させる方法を見いだすことなどが考えられる。

3. 今回クローニングした FU97-sec14L2 #25、及び#34 細胞で HCV 感染者由来血漿 R1-2 が増殖したが、#34の方が#25に比べ10倍増幅しやすいことが明らかとなり、細胞の種類の違いのことを考えると、今回感染者由来 HCV 血漿の増幅を調べていない残り6クローン細胞についても調べる必要性がある。

4. 図2で、感染1日後、JFH-1のゲノムRNAが検出され、3日後には検出限界以下になったのは、感染させたときのHCVが細胞に吸着して残存していたためと考えられ、この細胞クローンではJFH-1は増殖しない

(しにくい)と考えられる。ただ、JFH-1 感染の場合、コア蛋白質の発現が見られたのに、その RNA が検出出来なかったので、今後その理由を解明する必要がある。

E. 結論

新型コロナウイルス武漢株、イギリス型変異(B. 1. 1. 7, D614G, N501Y)、ブラジル型変異(P. 1, D614G, N501Y, E484K)を用いて、血漿分画製剤で用いる 60°C 液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることを確認した。HCV 陽性ドナー検体由来の HCV を培養細胞で増殖させるために、miR122 RNA と α -fetoprotein とを高発現する FU97 細胞に、Sec14L2 蛋白質を高発現する培養細胞を作製し、その細胞で、Sec14L2 が高発現し、血漿に対する抵抗性の高いクローン#25, #34 をクローニングすることにより、ゲノム RNA レベルではあるが、今回初めて HCV 感染者由来血漿 (R1-2) の増幅を検出することが出来た。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(ア) 論文発表

1. Suzuki, R., Matsuda M., **Shimoike, T.**, Watashi, K., Aizaki H., Kato T., Suzuki T., Muramatsu M., Wakita, T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 2019 *Virology*, 529 226-233.

2. Takagi, H., Oka T., **Shimoike, T.**, Saito, H., Kobayashi, T., Takahashi, T., Tatsumi, C., Kataoka, M., Wang, Q., Saifh, L. J., and Nodai, M. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. 2020 *PNAS*, 117 :32078-32085

(イ) 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

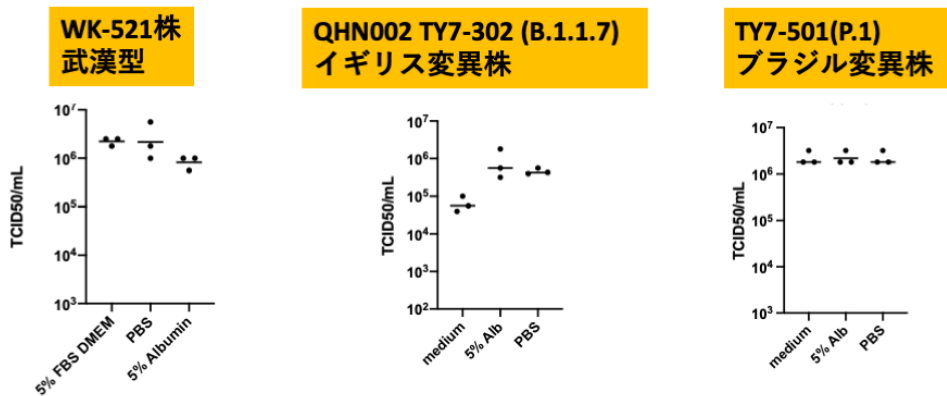


図 1. SARS-CoV-2 ウイルス株の力価 (スパイク直後の感染性の確認)

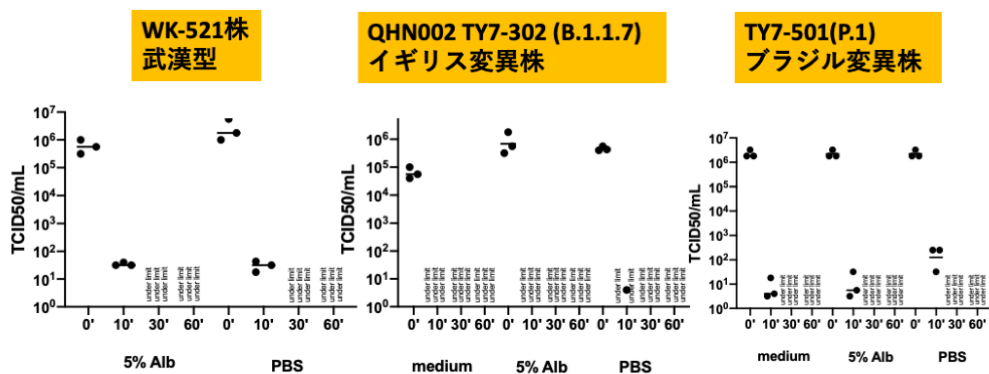


図 2. SARS-CoV-2 の60°C液状加熱処理による不活化

変異ウイルス	スパイク領域における武漢株からの変異箇所
QHN002, TY7-302 (B.1.1.7)	N501Y, A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H
hCoV-19/Japan/TY7-501/2021(P.1)	K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, V1176F

参考：用いたウイルス株の変異箇所

FU97-sec14L2 #25, #34クローン細胞でのSec14L2の発現

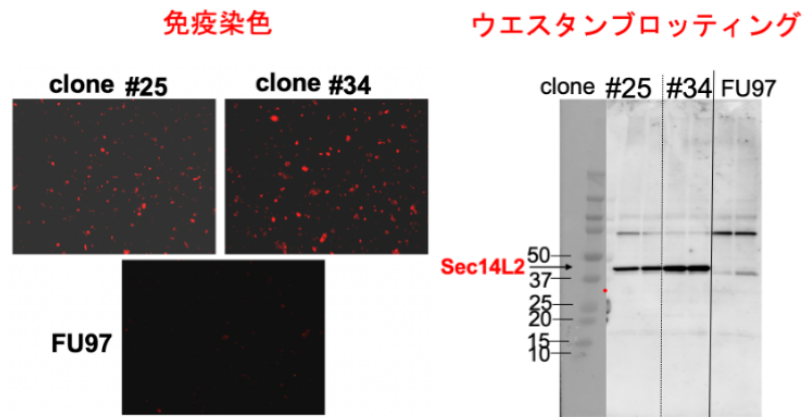


図3. FU97-sec14L2 #25, #34クローン細胞でのSec14L2の発現

FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅

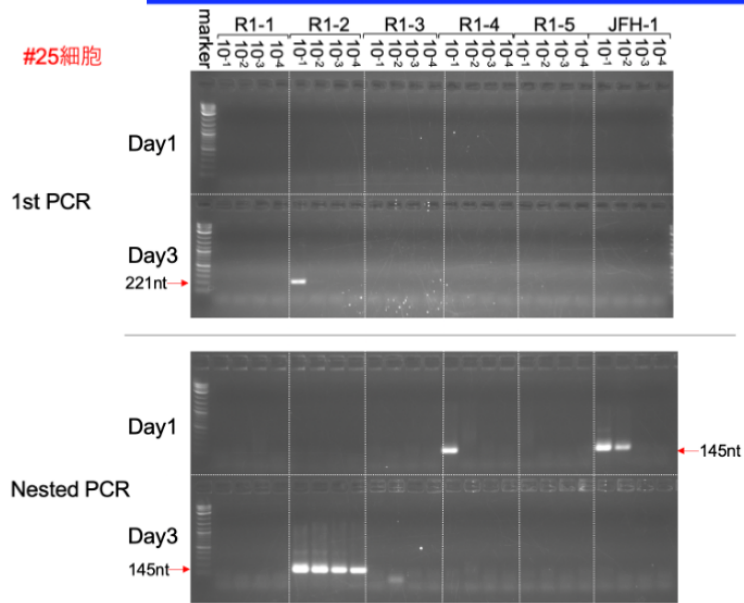


図4-1 FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅

FU97-sec14L2 #34細胞での患者由来HCVの増幅

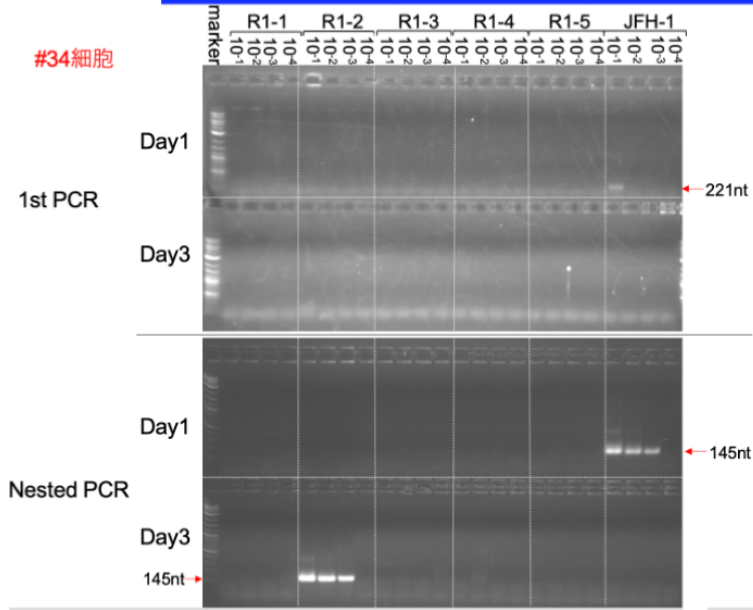


図4-2. FU97-sec14L2 #34細胞での患者由来HCVの増幅