

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

総括研究報告書

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

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 准教授)

研究要旨

1. フラビウイルスを検出できる共通プライマーを開発し、実証実験としてブタ血清から野生型の日本脳炎ウイルス1型を検出できることを確認した。
2. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの高感度核酸増幅法を開発し、特異性や感度を評価した。最終的に3セットのプライマーとプローブのセットを作成し、感度や特異性に問題がないことを確認出来た。
3. これまで適当な培養系がなかったHBVの培養系を改良し、HBV陽性血漿から感染する細胞クローンを得た。さらに遺伝子改組技術を用いてインターフェロン産生を抑制し、DNAウイルスに高感受性株を分離した。得られた細胞株はHBVに対しても高感受性を示した。また、クロロフィル由来の化学物質と赤色光照射を組み合わせた光学的不活化法の細胞増殖性に与える影響を解析し、B細胞株に著明な増殖抑制作用があることが明らかとなった。
4. SARS-COV2の武漢株、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。胃癌由来の細胞にSec14L2を高発現させた細胞をクローニングし、HCV陽性血漿を感染させたところ、はじめてHCV RNAの増殖を検出出来た。
5. ダニ媒介のウイルスの感染リスクを減少させるため、渡り鳥の飛来地のマダニからウイルスの解析を行った。鳥を介してウイルスを保有したマダニが広い地域に点在していることを明らかに出来た。渡り鳥の渡来地に情報提供することで地域の安全性と献血の安全性確保に役立つと考えられた。
6. アルブミン製剤に対するエタノール分画工程によるHEVの除去効果とフィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱処理によるHEVの不活化効果を評価し、それぞれエタノール分画では対数減少率(LRV)で1.8~3.3、乾燥加熱ではLRVは2程度であることを実ウイルスで評価できた。

分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所
室長

大隈 和 国立感染症研究所
室長

野島 清子 国立感染症研究所
主任研究官

比嘉 由紀子 国立感染症研究所
室長

前野 英毅 日本血液製剤機構
中央研究所 室長

A. 研究目的

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

な B 型肝炎ウイルスや C 型肝炎ウイルス (HCV) は、未だ特殊な株以外に培養系がないので不活化法の評価には動物由来のモデルウイルスが使用されている。また、血液の病原体のスクリーニングは、安全性確保に有効であるが限界もある。感染リスクを小さくするためには血液製剤に有効な病原体不活化法の開発も重要である。本研究班では、これらの病原体を検出する検査法の開発と標準化、スクリーニング法の開発とその評価を行う。新規病原体不活化法の開発も行う。

B. 研究方法と結果

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

これまでに開発したデングウイルス、ウエストナイルウイルスを含むフラビウイルス共通プライマーを用いた迅速診断法のデング患者検体に対する反応性を検討したところ、デング 1 型から 4 型までの検体中のウイルス遺伝子を検出することを確認した。また本共通プライマーはアフリカ型の遺伝子型であるジカウイルス MR766 株およびアジア型である PRVABC59 株も検出した。またブタ血清より分離された日本脳炎ウイルス遺伝子型

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

2) 血液からの重症熱性血小板減少症候群ウイルス等の検出法確立に関する研究

SFTSV に対する新規の高感度核酸検査法を開発するために、SFTSV のデータベースを基に作製したプライマー 350 セットについて、SFTSV のゲノム RNA を用いてリアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (SYBR) を実施し、増幅効率の良い 15 セットを選定した。これらのセットに対してプローブを検討後作製し、再度リアルタイム RT-PCR によりスクリーニング (TaqMan) を実施し、増幅効率が最良のプライマー・プローブを 2 セット選定した。これらのセットをマルチプレックス化し、幅広い株の高感度検出を可能とした。またこれらのセットについて、検出感度や特異性を検討し、最良の S 分節 1 セットを選択した。S 分節が最終的に 1 セットしか残らなかったため、M 分節と L 分節のセットも再検討することとした。これらのセットのうちで最も増幅効率の良いセットを各分節 1 セット選定することにより、合計 3 セットのマルチプレックス検査系とした。この系において、感度・特異性とも問

題ないことを確認した。

3) 赤血球製剤の病原体不活化法の開発
クロロフィルの分解産物である「Pheophorbide a」を用いて赤血球液における不活化効果を検討したが、臨床に使用されて赤血球液に近い条件としてヘマトクリット 55%、液深 10mm においては、濃度が 40 μ g/mL が必要であることが判明している。細胞毒性を評価する必要があった。譲渡された赤血球液の MAP 液を細胞培養液に置換し、「Pheophorbide a」による不活化法を実施した。処理した上清の細胞株を用いて細胞増殖性について検討し、T 細胞や単球に比べて B 細胞への増殖抑制が著明であった。また、血液製剤の HBV の不活化法開発のために HBV 陽性血漿を用いて細胞に感染させることは困難であったことからクローニングによって陽性血漿から感染する細胞株を分離した。さらに高感受性にするため各種の遺伝子を改変し、最終的に 10~20 倍 HBV に高感受性を示す 2 つのクローンを得ることが出来た。また、感染性の HBV を得るために HBV の全長がタンデムに結合した遺伝子を増幅し、培養上清に HBV を産生する細胞株も樹立できた。

4) 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

SARS-CoV-2 感染症の知見としては、症状のある感染者の 15%において血液から SARS-CoV-2 の RNA が検出される (RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-CoV-2 RNA が検出された事例が報告されている。しかし、ウイルス量は低くウイルス

分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異によりウイルスの性状が変化する可能性は否定できない。無症候感染者が献血ドナーになる可能性があることから、血液の安全性を確保するためには、新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性などを明らかにした。SARS-COV2 の武漢株、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が確認できた。

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

5) マダニの生態から考察する血液製剤を介するダニ媒介感染症の予防

マダニの吸血源動物種の検出でユニバーサルプローブにより吸血源動物の分類群をスクリーニングし、次いで NGS 解析による動物種を同定する効率的な検出系の構築を試み、本検出系で多様な動物種の検出が可能であることが確認された。しかし、環境中のヒト DNA のコンタミが課題として残った。また、2020 年 10 月までに採集されたマダニのサンプルはウイルス分離を行い、これまで、2014 年に中

国でヒトへの感染例が確認されている **Jingmen tick virus** が本州から初めて、国内では 3 例目が発見された。

6) 感染症の E 型肝炎ウイルスの不活化に関する研究（高濃度 E 型肝炎ウイルス (HEV) の産生と性状解析）

血漿分画製剤製造工程における HEV の除去・不活化効果を適切に評価することを目的に、リバースジェネティクス法により約 9 Log copies/mL の高濃度の HEV (RG-HEV) を取得した。また、血漿由来の HEV も合わせて用いた。今回はアルブミン製剤に対するエタノール分画工程による HEV の除去効果とフィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱処理による HEV の不活化効果を評価した。

アルブミン製剤に対するエタノール分画工程の評価では、ヒト血漿に由来する Genotype 3 と 4 の HEV、さらにリバースジェネティクス法を用いて培養細胞から産生した Genotype 3 の HEV (RG-HEV G3) の計 3 種の異なる HEV を用いた。結果として、原料血漿からアルブミン製剤に使用される分画 IV の上清に至る過程での HEV 除去効果は、対数減少率 (LRV) で 1.8 ~3.3 であった。

フィブリノゲン製剤の製造工程中の乾燥加熱工程については、S/D 処理有り、または無しの高濃度 RG-HEV G3 を用いて評価を行った。その結果、S/D 処理の有無は、乾燥加熱工程による HEV の不活化効果に大きな違いを与えず、LRV は 2 程度であった。

いずれの工程も、一般的にウイルス除去/不活化効果に「有効」とされる LRV=4 に満たなかったことから、LRV \geq 4 の達成が可能なウイルス除去膜工程や他の工程を組み合わせ、総合的に HEV の除去/不活化効果を評価する必要があると考えられた。

D. 考察

中国で発生した SARS-COV-2 の世界的なパンデミックによって国内外のヒトの移

動は激減したが、これまで問題になっていた感染症が減少したわけではない。新型コロナウイルスは血中から検出される頻度が低いことや検出されても低濃度であることから発症前の供血者からの血液製剤で感染する可能性は少ないと考えられているが、本研究班は、新興・再興感染症が発生した場合に血液製剤へのリスクが予想される際には、すぐに対応できる感染症の各分野からの研究者から構成されている。今回も原料血漿に新型コロナウイルスが混入した場合の製剤の安全性を確認するために液状加熱による感受性を評価した。その一方で、国内に既に常在している病原体やそのベクターも放棄された農地などの拡大や野生動物の増加、更には温暖化等の要因などによって生存する地域が拡大し、従来よりもヒトが感染し易くなる可能性もある。このような状況の中で流行が生ずる前に病原体の性状や検出法の開発、さらには発生時の対応法を検討しておくことは、血液製剤の安全性確保や安定供給に重要である。また、B型やC型肝炎ウイルスは感染系がなく、そのためにモデルウイルスを用いて安全性の評価を行なっている。HEVも *in vitro* の感染系はあるものの、安全性試験に必要な高力価の感染性を有する血漿ウイルスを十分に得ることは困難であった。この研究班では、効率的な培養系を確立するために分子生物学的手法を取り入れ高力価のウイルスを作成することに成功した。これまでのウイルス除去膜による除去に加えて今年度はエタノール分画による HEV の除去効率やフィブ

リノゲンの乾燥加熱による不活化の評価を行った。これらはより安全な血漿分画製剤の製造に貢献すると考えられた。

E. 結論

新興・再興感染症等の脅威から血液製剤の安全性確保と安定供給のために蚊媒介ウイルス、SFTS ウイルス等の検出法の開発を行った。ダニ媒介感染症の予防のためにダニの吸血源の同定法開発や渡り鳥の飛来地でのダニの調査を行なった。また、分画製剤の安全性向上のために HEV 産生系の構築による不活化効率の検討や HBV や HCV 感染系の開発、血球製剤の不活化法の研究の行い、新しい知見を得ることが出来た。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

- 1) 岡田義昭：赤血球製剤の病原体不活化法の開発、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年
- 2) 山麻衣子、鈴木雅之、加藤由佳、内野富子、山田攻、池淵研二、岡田義昭：
幼少期に自己免疫疾患を発症し、増悪寛解を繰り返すうちに自己抗体の特異性が変化した一症例、第68回日本輸血・細胞治療学会総会、北海道、2020年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし