

厚生労働科学研究補助費（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

分担する研究項目：『グロブリン製剤の原料血漿中の新興・再興ウイルスに対する中和抗体に関する研究』

研究分担者 浦山健（一般社団法人日本血液製剤機構 研究開発本部 中央研究所 感染性病原体研究室）

研究協力者 塩田達雄（大阪大学微生物病研究所）

研究協力者 柚木幹弘（一般社団法人日本血液製剤機構 研究開発本部 研究開発推進部）

井上隆昌、西口優吾、澁谷明美（一般社団法人日本血液製剤機構 研究開発本部 中央研究所 感染性病原体研究室）

研究協力者 デンカ株式会社

[研究要旨]

本邦献血由来人免疫グロブリン製剤は数千人以上の国内献血者の血漿を混合した原料プール血漿より製造されるため、国内献血者集団の感染症既往歴およびワクチン接種歴を反映した抗体が含まれる。したがって、グロブリン製剤と原料プール血漿をモニタリングすることにより、国内献血者における各種病原体に対する血清疫学の概観を把握することができる。また、抗体の一部は病原体等と結合して感染を阻害（中和）するため、原料プール血漿の安全性に関する考察が可能である。

本分担研究では輸血による感染が報告されているヒトパルボウイルス B19（以下、B19）と近年の世界的パンデミックを引き起こした SARS-CoV-2 に着目して、原料プール血漿中のこれらウイルスに対する抗体を評価した。B19 については、原料プール血漿中は中和抗体が存在し、その抗体価は FDA 勧告基準である $4 \text{ Log}_{10} \text{ IU/mL}$ の B19 を中和するのに十分であった。一方、SARS-CoV-2 については、2021 年度以降に採血された原料プール血漿中の結合抗体価と中和抗体価を測定したところ、抗体価が上昇後に一旦下降し、さらに再上昇するウェーブ様のトレンドが観察された。

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

TCID₅₀: 50% Tissue Culture Infectious Dose

qPCR: quantitative PCR

B19: Human parvovirus B19

EIA: Enzyme Immuno Assay

A. 研究目的

数千人以上の国内献血者の血漿をプールして製造される原料プール血漿中ならびに分画産物である本邦献血由来人免疫グロブリン製剤中には、献血者の感染症既往歴やワクチン接種歴を反映する多様な抗体が含まれる。これらの抗体の中には病原体の抗原と結合することで、病原体の感染を阻害する中和抗体が存在する。国内献血由来の原料プール血漿なら

びにグロブリン製剤中の中和抗体について評価することにより、原料プール血漿の安全性に関する考察が可能となる。血清学・核酸の各種検査により病原体の混入した献血血液は排除されているが、検出限界値未満で存在する病原体、あるいは検査の対象となっていない病原体が原料プール血漿中に混入する可能性は否定できない。これらの病原体に対する中和抗体価を解析することで、原料プール血漿中で病原体が感染性を維持しているかどうかの観点から安全性を考察できる。また、国内献血者における各種病原体に対する血清疫学の概観についても把握できる。2019 年末に中国武漢市で発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、その後世界的なパンデミックを引き起こし、3 年以上経過した 2023 年 3 月現在でも完全には収束していない。このように、パンデミックが発生すると、病原体によっては、その影響が数年にわたって続く可能性がある。この期間中に、対象病原体に対する中和抗体をモニタリングすることで、献血者集団を代表とする疫学的な情報を取得することも可能である。

本分担研究では、原料プール血漿中の B19 と SARS-CoV-2 に対する結合・中和抗体について評価した。

B19 は、小児の伝染性紅斑の原因ウイルスである。一方、成人に対しては、関節炎症、妊婦胎児水腫、重篤な溶血性貧血等を引き起こすことがある¹⁾。輸血による感染も報告されていることから²⁾、血液製剤の安全性確保の観点から注視を必要とするウイルスである。FDA は、界面活性剤処理された血漿の投与によって感染が生じなかったウイルス量をもとに³⁾、4 Log₁₀ IU/mL を原料プール血漿に対する最大許容値として定めている⁴⁾。日本赤十字社では、2019 年 4 月から化学発光免疫測定法による抗原検

査を全献血血液に対し導入しており、この検査により抗原陽性血液を排除することで、原料プール血漿が FDA 勧告基準を満たすとの考えを示している⁵⁾。また、一般社団法人 日本血液製剤機構でも原料プール血漿が FDA 勧告基準を満たすことを核酸検査により確認している⁶⁾。本年度は、*In Vitro* ウイルス中和実験により、原料プール血漿中の B19 に対する中和抗体価を評価し、4 Log₁₀ IU/mL の B19 が存在した場合に、B19 が実質的に感染性を消失しているかどうか考察した。

SARS-CoV-2 については、米国では 2020 年の 9 月に製造されたグロブリン製剤から、SARS-CoV-2 に対する抗体が含まれ始めた⁷⁾。米国における採血から製剤化までのリードタイムは約半年であることを考慮すると、2020 年 3 月頃に SARS-CoV-2 既感染者から採血されていたと推測できる⁷⁾。日本と米国では、SARS-CoV-2 の感染者数を含めた疫学的背景や採血システムに違いがあることから、国内献血者に由来する原料プール血漿中の SARS-CoV-2 に対する結合・中和抗体についてモニタリングを実施した。

B. 研究方法

1. ウイルス

12.2 Log₁₀ IU/mL の B19 を含む B19 陽性血清を、抗 B19 抗体陰性ヒト血漿により希釈し、原料プール血漿中の中和抗体価の評価に用いた。

国立感染症研究所より提供を受けた SARS-CoV-2 起源株 (2019-nCoV/Japan/TY/WK-521/2020)、オミクロン BA.1 株 (hCoV-19/Japan/TY38-873/2021, NIID)、オミクロン BA.2 株 (hCoV-19/Japan/TY40-385/2022, NIID)、オミクロン BA.5 株 (hCoV-19/Japan/TY41-702/2022,

NIID)、および研究協力者である塩田教授の研究室で分離された SARS-CoV-2 デルタ株 (hCoV-19/Japan/RIMD-DVI-16/2021) を用いて原料プール血漿の中和抗体価の評価に用いた。

2. B19 に対する中和抗体の評価

過去に報告した方法⁸⁾に基づき、次のように評価した。原料プール血漿を抗 B19 抗体陰性ヒト血漿で希釈して 2 倍希釈系列サンプルを調製した。12.2 Log₁₀ IU/mL の B19 を含む陽性血漿を抗 B19 抗体陰性ヒト血漿により 5,000 倍希釈して、8.5 Log₁₀ IU/mL の B19 を含む中和抗体価測定用サンプルを調製した。原料プール血漿の 2 倍希釈系列サンプルと中和抗体価測定用の B19 サンプルを等量混合し、37°C で 1 時間インキュベーションした後、混合液を細胞用培地で 10 倍希釈した。96 ウェルプレートにあらかじめ播種された KU812 細胞に、希釈済み混合液を 10 μL/well 添加して、37°C で 4 日間培養した。培養後、細胞から Total RNA を抽出し、B19 ゲノム由来のスプライシングされた mRNA を qPCR により定性的に検出し、検出されたウェルを感染成立と判断した。各希釈系列につき 5 回測定を行い、Karber 法により、50% の確率で B19 の感染を阻害する原料プール血漿の希釈倍数を算出し、本研究での中和抗体価とした。

3. 原料プール血漿中の SARS-CoV-2 抗原に対する結合抗体の評価

原料プール血漿中の SARS-CoV-2 のスパイクプロテインとヌクレオキャプシドに対する結合抗体は EIA 抗体測定キット (DK20-CoV4E、デンカ株式会社) を用いて評価した

4. SARS-CoV-2 各種株に対する中和抗体の評価

原料プール血漿を細胞用培地で希釈した 2 倍希釈系列サンプルと、100 TCID₅₀/ 50 μL の濃度に調製した SARS-CoV-2 サンプルを等量混合し、37°C で 1 時間インキュベーションした。あらかじめ 96 ウェルプレートに播種された Vero-E6 細胞に、30 μL/well の混合液を添加し、37°C で、起源株とデルタ株を評価する際には 2 日間、オミクロン株を評価する際には 3 日間培養した。培養後、各ウェルの細胞変性効果の有無を観察し、細胞変性効果を表すウェルの割合が 50% 以下となった希釈倍数のうち、最も小さい希釈倍数を本研究での中和抗体価とした。

(倫理面への配慮)

ヒト血漿を含むヒト組織の使用については、一般社団法人 日本血液製剤機構のヒト組織研究倫理審査委員会にて承認されている。

C. 研究結果

1. B19 感染効率の確認

中和抗体価を測定するための最適な B19 濃度を決定するため、B19 陽性血清を抗 B19 抗体陰性血漿により希釈し、4.2~10.2 Log₁₀ IU/mL の 10 倍希釈系列を調製した。各濃度の B19 を計 10 ウェルに添加し、B19 の感染が成立しているか否か評価した (表 1)。B19 の濃度が 7.2 Log₁₀ IU/mL に達して初めて感染が成立するウェルが確認され、以降の濃度では B19 を添加したすべてのウェルで感染が成立した。すべてのウェルで B19 が感染した濃度のうち、最も低い 8.2 Log₁₀ IU/mL を、中和抗体価測定用の B19 濃度に設定した。

2. 原料プール血漿中の B19 中和抗体価

2 ロットの原料プール血漿（ロット A と B）を抗 B19 抗体陰性血漿により希釈し、1～64 倍の 2 倍希釈系列を調製した。原料プール血漿の各希釈系列と中和抗体測定用 B19 サンプルを等量混合し、37°C で 1 時間インキュベーションした後、混合溶液を計 5 ウェルに添加し、B19 の感染が成立しているか評価した（表 2）。いずれの原料プール血漿でも 8 倍希釈に達して初めて感染が成立するウェルが確認され、以降の希釈倍数ではすべてのウェルで感染が成立した。ロット A と B の中和抗体価はそれぞれ 7.5 と 13.0 倍であり、感染を 100% 中和するエンドポイント希釈倍数はいずれも 4 倍であった（表 3）。

3. 原料プール血漿中の SARS-CoV-2 結合抗体価

プール血漿を構成する個別血漿の中で最も遅い採血日を原料プール血漿の採血日として便宜上設定し、2021 年の 1 月頃から 2022 年 4 月頃までに採血された原料プール血漿中の SARS-CoV-2 の 2 種のウイルスタンパク質であるスパイクプロテインとヌクレオキャプシドに対する結合抗体価を EIA 法により評価した。スパイクプロテインに対する結合抗体価は初回ワクチン接種者の増加に応じて、2021 年 8 月頃から上昇し、2021 年 11 月頃から一旦減少に転じた。その後、3 回目のワクチン接種者の増加に応じて、2022 年 2 月頃から抗体価が再上昇した（図 1）。また、ヌクレオキャプシドに対する結合抗体価は全評価期間で陽性と判断されるカットオフ値（15 BAU/mL）より低い値であった（図 2）。

4 原料プール血漿中の各種 SARS-CoV-2 株に対する中和抗体価

原料プール血漿中の各種 SARS-CoV-2 株に対する中和抗体価についても経時的に評価した。起源株

とデルタ株に対する中和抗体価は初回ワクチン接種者の増加に応じて、2021 年 8 月頃から中和抗体価が大きく上昇した。その後の 2021 年 11 月頃から、起源株に対する中和抗体価は減少に転じたものの、デルタ株に対してはほぼ一定の値で推移した（図 3、黒と紫線）。2022 年 2～3 月頃から、起源株とデルタ株に対する中和抗体価が再上昇した（図 3、黒と紫線）。起源株とデルタ株と異なり、初回ワクチン接種者が増加しても、オミクロン BA.1 株とオミクロン BA.2 株に対する中和抗体は低いままであった。しかしながら、2022 年 2～3 月頃から、オミクロン BA.5 も含めた 3 種のオミクロン株に対する中和抗体価が上昇した（図 3、青、赤および緑線）。

D. 考察

私達は、国内献血由来の原料プール血漿は B19 に対する FDA 勧告基準を満たすこと⁵⁻⁶⁾、血漿分画製剤の製造工程に導入されるウイルス除去・不活性化工程が B19 に対しても有効に機能することをこれまで報告している⁸⁻¹¹⁾。しかしながら、FDA 勧告基準⁴⁾は、国外で界面活性剤処理された血漿の投与により感染が生じなかった B19 量に基づいており³⁾、国内献血に由来する原料プール血漿中の B19 に対する中和抗体価は反映されていない。本研究では、*In Vitro* 中和実験により抗 B19 中和抗体価を評価し、B19 に対する安全性を考察した。

In Vitro 中和実験では 8.2 Log₁₀ IU/mL の B19 を用いた。FDA 勧告基準より 4 Log 以上高い濃度でありながら、4 倍希釈した原料プール血漿でも B19 の感染は 100% 阻害されたことから、国内献血由来の原料プール血漿中には FDA 勧告基準相当の 4 Log₁₀ IU/mL の B19 を中和するのに十分な中和抗体を備えていると推測された。

2019年に中国 武漢市で発生した SARS-CoV-2 は瞬く間に世界に広がり、2020 年には世界的なパンデミックを引き起こした。日本と比較し、多数の感染者が報告された米国では、2020 年 3 月頃には SARS-CoV-2 に感染歴をもつ供血者が存在していたことが推測されている⁷⁾。しかしながら、疫学的背景や施策は地域ごとに異なり、SARS-CoV-2 パンデミックが国内献血者集団に与えた影響については十分に検証されていない。本研究では 2021 年 1 月から採血された献血血液に由来する原料プール血漿中の SARS-CoV-2 の結合・中和抗体を測定し、献血者集団の血清疫学に与えた影響について考察した。パンデミック発生からオミクロン株の報告まで、欧米と比較し国内感染者は比較的少なかったこと¹²⁾、さらには既感染者の献血は制限されていたこと¹³⁾、を反映し、2021 年 6 月頃までスパイクプロテインに対する結合抗体は検出されなかった。その後は、2021 年 5 月 14 日に mRNA ワクチン接種 48 時間経過後の献血が解禁されたことを反映し¹⁴⁾、2021 年 11 月頃まで抗体価は上昇した (図 1)。ワクチン中の抗原として含まれず、自然感染にのみ由来するヌクレオキャプシドに対する結合抗体価はカットオフ値未満であったことから (図 2)、2021 年 6~11 月に観察されたスパイクプロテインに対する結合抗体価の上昇は、SARS-CoV-2 のワクチン接種を受けた献血者に由来すると考えられた。スパイクプロテインに対する結合抗体価の上昇に一致して、起源株とデルタ株に対する中和抗体価は上昇した (図 3 黒と紫線)。その一方で、スパイクプロテインに変異が蓄積したオミクロン株に対する中和抗体価は、起源株とデルタ株のように大きく上昇することはなかった。(図 3 青と赤線)。また、2021 年 11 月頃から観察された抗体価の低下については、初回ワクチン

接種で誘導される抗体は数週間かけて上昇した後、減少に転じるという報告¹⁵⁻¹⁶⁾に一致していた。その後の 2022 年 2~3 月頃から、スパイクプロテインに対する結合抗体価は再上昇しており (図 1)、追加ワクチン接種者の増加が一要因と考えられるが、起源株とデルタ株のみならず 3 種のオミクロン株に対する中和抗体価についても上昇していた (図 3)。初回接種で誘導される抗体はオミクロン株に対する中和効果は弱かったことから (図 3 青と赤線)、追加ワクチン接種以外の要因、具体的には献血者集団中の既感染者が増加した可能性が考えられた。献血者集団に自然感染者が増加すれば、ヌクレオキャプシドに対する結合抗体価が上昇するはずであるが、上昇は観察されなかった (図 2)。ヌクレオキャプシドの結合抗体の測定に利用した EIA キットがオミクロン株の感染により誘導される抗体を認識できない可能性も有ることから、2022 年以降の献血者集団中の新型コロナウイルス既感染者を推定するためには他の方法が必要と考えられた。

E. 結論

B19 については、調査したロットは限定的ではあるが、国内献血由来の原料プール血漿中の B19 の中和抗体を確認し、*In Vitro* 中和実験を基にすれば FDA 勧告基準である 4 Log₁₀ IU/mL の B19 を中和するのに十分であることが推測された。この結果から、原料プール血漿中含まれ得る B19 は、実質的に感染性が消失して存在していると考えられた。但し、原料プール血漿中の抗体濃度について年差変動があるか、今後明らかにしていく予定である。

SARS-CoV-2 については、国内献血者集団が SARS-CoV-2 に対する抗体を保持し始めたのはワクチン接種経過後 48 時間の献血が解禁された 2021

年 5 月以降であり、米国と比較して 1 年以上遅かった。抗体価の推移は上昇後に一旦下降し、再上昇するウェーブ様のトレンドが観察された。興味深いことに、2022 年 3 月以降ではオミクロン株に対しても中和抗体価が上昇していた。起源株に基づくワクチン接種だけでは説明できないことから、更なる解析・考察が必要と考えられた。

引用文献

- 1) 伝染性紅斑（ヒトパルボウイルス B19 感染症）IASR Vol. 37 p. 1-3: 2016 年 1 月号
<https://www.niid.go.jp/niid/images/idsc/iasr/37/431j160303.pdf>
 - 2) Satake M, et al. Symptomatic parvovirus B19 infection caused by blood component transfusion. *Transfusion*. 2011 Sep;51(9):1887-95.
 - 3) Brown KE, et al. Summary of a workshop. *Transfusion*. 2001 Jan;41(1):130-5.
 - 4) Guidance for Industry:Nucleic Acid Testing (NAT) to Reduce the Possible Risk of HumanParvovirus B19 Transmission by Plasma-Derived Products U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research July 2009
<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nucleic-acid-testing-reduce-possible-risk-parvovirus-b19-transmission-plasma-derived-products>
 - 5) 岸本ら、献血者における化学発光免疫測定法を用いた新ヒトパルボウイルス B19 抗原スクリーニングの遺伝子型検出に関する性能評価
Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, Vol. 67. No. 1 67 (1) : 21–26, 2021
 - 6) Ikegawa M, et al. Screening for parvovirus B19 antigen through chemiluminescent enzyme immunoassay is equivalent to B19 nucleic acid amplification test-based screening of pooled plasma. *Transfusion*. 2021 Aug;61(8):2240-2244.
 - 7) Farcet MR, et al. Rapidly Increasing Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Neutralization by Intravenous Immunoglobulins Produced From Plasma Collected During the 2020 Pandemic. *J Infect Dis*. 2022 Oct 17;226(8):1357-1361.
 - 8) Hattori S, et al. Variability of parvovirus B19 to inactivation by liquid heating in plasma products. *Vox Sang*. 2007 Feb;92(2):121-4.
 - 9) Yunoki M, et al. Inactivation of parvovirus B19 by liquid heating incorporated in the manufacturing process of human intravenous immunoglobulin preparations. *Br J Haematol*. 2005 Feb;128(3):401-4.
 - 10) Tsujikawa M, et al. Variability of parvovirus B19 genotype 2 in plasma products with different compositions in the inactivation sensitivity by liquid-heating. *Vox Sang*. 2012 Feb;102(2):93-9
 - 11) Adan-Kubo J, et al. Microscopic visualization of virus removal by dedicated filters used in biopharmaceutical processing: Impact of membrane structure and localization of captured virus particles. *Biotechnol Prog*. 2019 Nov;35(6):e2875.
 - 12) WHO Coronavirus (CoVID-19) Dashboard
<https://covid19.who.int/>
 - 13) https://www.jrc.or.jp/donation/blood/news/2021/0825_020453.html
 - 14) https://www.jrc.or.jp/donation/blood/news/2021/0428_017376.html
 - 15) Canetti M, et al. Six-Month Follow-up after a Fourth BNT162b2 Vaccine Dose. *N Engl J Med*. 2022 Dec 1;387(22):2092-2094.
 - 16) Doria-Rose N, et al. mRNA-1273 Study Group. Antibody Persistence through 6 Months after the Second Dose of mRNA-1273 Vaccine for CoVid-19. *N Engl J Med*. 2021 Jun 10;384(23):2259-2261.
- F. 健康危険情報
なし
- G. 研究発表
1. 論文発表
なし
 2. 学会発表
柚木 幹弘、瀬瀬 律子、塩田 達雄
人免疫グロブリン製剤の原料プール血漿中の抗 SARS-CoV-2 抗体価の変化と製剤への影響
第 63 回日本臨床ウイルス学会 東京
- 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

表 1 B19 感染効率の確認

B19濃度 (Log ₁₀ IU/mL)	感染 / 添加ウェル数, (%)
10.2	10/10, (100%)
9.2	10/10, (100%)
8.2	10/10, (100%)
7.2	7/10, (70%)
6.2	0/10, (0%)
5.2	0/10, (0%)
4.2	0/10, (0%)

B19 陽性血清を抗 B19 抗体陰性血漿により表に示される濃度となるよう希釈して、各濃度あたり 10 ウェルの KU812 細胞に播種し、感染性を評価した。

表 2 8.2 Log₁₀ IU/mL の B19 に対する原料プール血漿 (2 ロット) の中和抗体価測定

原料プール血漿 の希釈率	ロットA	ロットB
	感染 / 添加ウェル数, (%)	感染 / 添加ウェル数, (%)
1	0/5, (0%)	0/5, (0%)
2	0/5, (0%)	0/5, (0%)
4	0/5, (0%)	0/5, (0%)
8	3/5, (60%)	2/5, (40%)
16	5/5, (100%)	3/5, (60%)
32	5/5, (100%)	4/5, (80%)
64	5/5, (100%)	ND

中和反応時に 8.2 Log₁₀ IU/mL となるようあらかじめ希釈した B19 陽性血清と 1~64 倍までの 2 倍希釈系列の原料プール血漿 (2 ロット) を等量混合して 37°C で 1 時間インキュベーションした後、5 ウェルの KU812 細胞に播種し、感染性を評価した。

表 3 原料プール血漿 (2 ロット) 中の B19 に対する中和抗体価とエンドポイント
エンドポイントについては感染を 100%抑制する最大希釈倍数を表した。

測定検体	中和抗体価 (D ₅₀) (倍)	エンドポイント (倍)
原料プール血漿 (ロットA)	7.5	4
原料プール血漿 (ロットB)	13.0	4

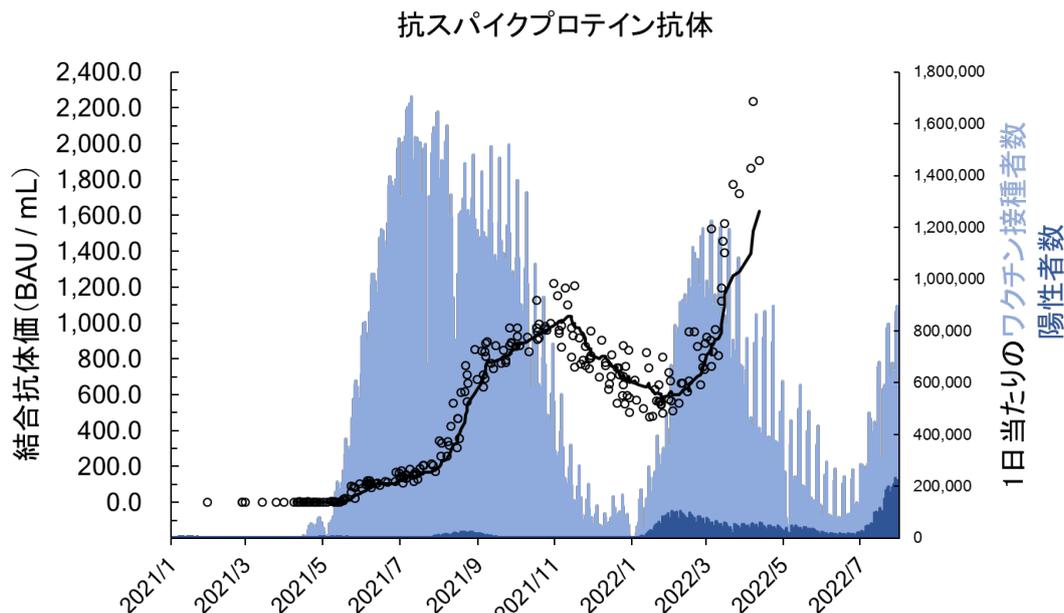


図1 原料プール血漿中の SARS-CoV-2 スパイクプロテインに対する結合抗体価の経時的変遷

構成する個別血漿の最終採血日を原料プール血漿の採血日として、2021 年より経時的に原料プール血漿中の SARS-CoV-2 スパイクプロテインに対する結合抗体を EIA 抗体測定キット (DK20-CoV4E、デンカ株式会社) により測定した。白丸は抗 SARS-CoV-2 スパイクプロテイン IgG の結合抗体価を示し、黒線は直近 10 ロットの移動平均線を示している。背景の薄青棒は一日当たりの SARS-CoV-2 ワクチン接種者数を、濃青棒は一日当たりの SARS-CoV-2 陽性者数をそれぞれ示している。

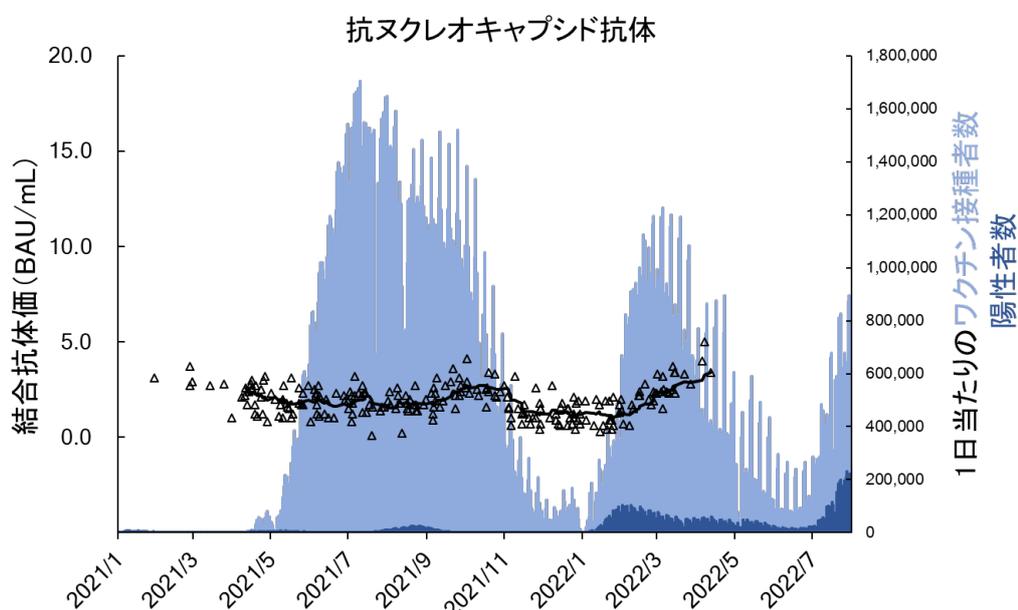


図2 原料プール血漿中の SARS-CoV-2 ヌクレオキャプシドに対する結合抗体価の経時的変遷

図1と同様にして、原料プール血漿中の SARS-CoV-2 ヌクレオキャプシドに対する結合抗体を評価した。△が抗 SARS-CoV-2 ヌクレオキャプシド IgG の結合抗体価を示す。なお、15 BAU/mL 未満は陰性となす。

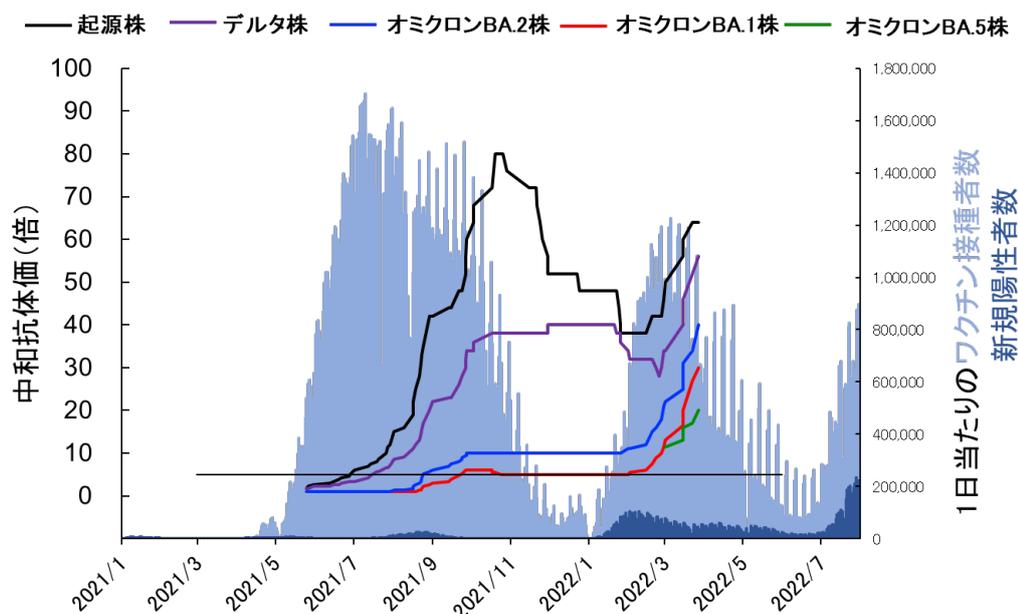


図3 原料プール血漿中の SARS-CoV-2 各種株に対する中和抗体価の評価

図1で使用した原料プール血漿の代表ロット中の5種のSARS-CoV-2株に対する中和抗体を測定した。黒線が起源株、紫線がデルタ株、青線がオミクロン株 BA.2 株、赤線がオミクロン株 BA.1 株、緑線がオミクロン株 BA.5 株をそれぞれ示している。背景の棒グラフは図1と同様。