

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

新興・再興感染症等の感染症から献血由来の血液製剤の安全性を確保するための研究
分担研究報告書

分担課題：血漿分画製剤における実ウイルスを用いたウイルス除去・不活化および安全性
の評価に関する研究

研究分担者 野島 清子 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 主任研究官
研究協力者 関 洋平 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 研究員
研究協力者 水上 拓郎 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 室長

研究要旨

グローバル化が進む現代においては国内ではほとんど発生例のないような感染症、特に海外での新興・再興感染症のアウトブレイクが国内に輸入されて問題となることが少なくない。海外で感染して帰国した場合であっても4週間の献血延期により献血血液の安全性が担保されるが、2020年の新型コロナウイルスアウトブレイクや、2022年のM痘感染のように国内でヒト-ヒト感染が起きた場合、またはデング熱のようにヒト-蚊-ヒト感染が生じた場合は、4週間の献血延期では無症候感染者が献血ドナーとなり得るため、ウイルス混入のリスクが残存する。献血血液に仮に病原体が混入した場合を想定し、特に血漿分画製剤の安全性を確保するために、血漿分画製剤の製造工程に含まれる、エタノール分画や加熱処理等の処理により、ウイルスがどの程度除去・不活化されるかは通常モデルウイルスを用いて評価されている。本研究では、モデルウイルスではなく実ウイルスを用いて除去・不活化について評価を行う。今年度は、2022年に日本で分離されたMポックスウイルス(MPXV_JPN2022_YK006)およびモデルウイルスであるワクシニアウイルス(LC16m8)を用いて、PBS下、およびウイルスを安定化しうる蛋白共存下(アルブミン)において、60度加熱による不活化処理による影響を評価した。その結果、PBS条件下およびアルブミン共存下の両方において、60度10分の加熱処理によりウイルスの感染性は検出限界以下となり、4log 以上の不活化効果が認められた。

A. 目的

グローバル化が進む現代においては国内ではほとんど発生例のないような感染症、特に海外での新興・再興感染症のアウトブレイクが国内に輸入されて問題となることが少なくない。海外で感染して帰国した場合であっても4週間の献血延期により献血血液の安全性が担保されるが、2020年の新型コロナウイルス感染症アウトブレイクや、2022年のM痘感染のように国内でヒト-ヒト感染が起きた場合、またはデング熱のようにヒト-蚊-ヒト感染が生じた場合は、4週間の献血延期では無症候感染者が献血ドナーとなり得るため、ウイルス混入のリスクが残存する。献血血液に仮に病原体が混入した場合を想定し、特に血漿分画製剤の安全性を確保するために、血漿分画製剤の製造工程に含まれる、エタノール分画や加熱処理等の処理により、ウイルスがどの程度除去・不活化されるかは通常モデルウイルスを用いて評価されている。Mポックス(M痘)ウイルスは、Lancet Infectious Diseases (2022年5月26日付)によると、2018-2021年に英国で発生した7症例の解析より皮膚病変より7例、血液から6例からウイルスDNAが検出されており、無症候感染者が献血ドナーとなった場合には献血血液へのウイルス混入のリスクが否定できない。

そこで、本研究では、モデルウイルスではなく実ウイルスを用いて除去・不活化について評価を行うことを目的として、2022年に日本で分離されたM痘ウイルス

(MPXV_JPN2022_ YK006)およびモデルウイルスであるワクシニアウイルス

(LC16m8)を用いて、PBS下、およびウイルスを安定化しうる蛋白共存下(アルブミン)において、60度加熱による不活化処理による影響を評価した。

B 研究方法

B-1 ウイルス

M痘ウイルス(MPXV)としては、2022年の日本での第一例目の感染者より分離されたMPXV_JPN2022_YK006を国立感染症研究所ウイルス1部より譲渡を受け、バイオセーフティレベルBSL3実験室内でウイルスを増やし実験に用いた。モデルウイルスとしてはワクシニアウイルスLC16m8を国立感染症研究所ウイルス1部より譲渡を受け、バイオセーフティレベルBSL2実験室内でウイルスを増やし実験に用いた。

B-2 細胞培養およびウイルスストックの作製

感染前日に、ウサギ腎由来細胞株RK-13細胞を150cm²Tフラスコ1本当たり2x10⁷個細胞となるようにFBS10%を含むDMDM (high glucose)に懸濁させて撒き、感染直前に培地を取り除き、FBS5%を含むDMDM培地で細胞を一度洗浄した。ワクシニアウイルスLC16m8およびM痘ウイルスMPXV_JPN2022_YK006をそれぞれBSL3、BSL2管理区域の実験室において、MOI=0.02~0.1で感染させ、FBS5%を含むDMDM培地中で2~3日培養した。半分以上の細胞に細胞変性効果(CPE)が見られ段階

で培養を停止し、細胞内で増えたウイルスを回収する目的で、培養フラスコをディープフリーザー (-80 度) 内で1日静置した。室温で融解後、細胞懸濁液を 500xg で10分遠心分離し、回収した上清をウイルス液として 500uL ずつ分注したものを-80 度で保管してウイルスストックとして実験に用いた。

B-3 感染価の測定 (プラークアッセイ法)

感染前日に 1×10^5 cells/1mL/well となるように RK13 細胞を 24well 培養プレートに撒き、90%コンフルエントの状態に細胞を調整した。感染直前に培地を取り除く、新鮮な培地 5%FBS DMEM を 350uL ずつ各 well に添加し、予め 10 倍段階希釈した LC16m8 および MPXV_JPN2022_YK006 ウイルスを各 well に 50uL ずつ添加した。37°C 5%CO₂ のインキュベーターで 3~4 日間培養し、CPE が顕微鏡化で十分に確認できるようになったら各 well に 10%ホルマリン溶液を 1~2mL ずつ添加して 1 時間以上反応させてウイルスを不活化した。反応後のホルマリン液はホルマリン廃液として廃棄し、細胞を水で十分に洗浄後、クリスタルバイオレットを各 well に 200uL ずつ添加して細胞を染色し CPE を可視化した。各 well 中の CPE 数を計測し、感染価 PFU/mL を算出した。

B-4 加熱処理

新たに融解した LC16m8 および MPXV_JPN2022_YK006 ウイルスを PBS または 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ハイブリバックに入れて空気を充

分に抜きシーリングして、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 分反応後に反応液を回収した。それぞれのウイルス液の力価をプラークアッセイ法により確認した。実験は独立して N=3 で実施した。

C.研究結果

モデルウイルスである LC16m8 および実ウイルス MPXV_JPN2022_YK006 を 1:9 の割合で PBS、5%アルブミン製剤にスパイクし、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検出限界以下となり、30 分、60 分後においても感染性が認められなかった(検出限界は 20 PFU/mL)(図 1.2 参照、図 1 内点線は検出限界を示す)。また、PBS にスパイクしても蛋白濃度の高いアルブミン溶液にスパイクしてもウイルス力価に影響はなかった。

D 考察

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、エムポックスウイルスもワクシニアウイルスと同様に加熱感受性傾向を示すと考えられ、実際に日本国内で分離された MPXV_JPN2022_YK006 株を用いて 60°C加熱処理による不活化効果を検討した。通常、ウイルス不活化処理は PBS 下では感受性が高く、タンパクが共存するとウイルスが安定化されて不

活化処理に抵抗性を示す傾向があるが、MPXV_JPN2022_YK006 ウイルス株は、5%アルブミン存在下であっても加熱処理に感受性を持ち、10分の処理により検出限界以下となった。通常のエンベロープウイルスは、60度10分の加熱処理では中真温度がうまく上昇しない場合など、若干感染性が残存する傾向があるが、ワクシニアウイルスとエムポックスウイルスは特に10分の加熱処理でも感染性の残存がないことが示され、加熱への感受性がより強い可能性がある。これらのことから、仮に感染性を有したウイルスが原料血漿に混入した場合でも工程中の加熱工程で不活化され安全性が確保されることが示された。

今後はリアルタイムPCRによるMPXV_JPN2022_YK006の核酸定量系を立ち上げ、不活化と核酸残存の関連性についても評価を追加する。

F.健康危機情報

なし

G.研究発表

(ア) 論文発表

- 1) Miyamoto S, Kuroda Y, Kanno T, Ueno A, Shiwa-Sudo N, Iwata-Yoshikawa N, Sakai Y, Nagata N, Arashiro T, Ainai A, Moriyama S, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, Mizukami T, Hasegawa H, Ebihara H, Fukushi S, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T. Saturation time of exposure interval for cross-neutralization response to SARS-CoV-2: Implications for vaccine dose interval. *iScience*. 2023; 26: 106694.
- 2) Seki Y, Yoshihara Y, Nojima K, Momose H, Fukushi S, Moriyama S, Wagatsuma A, Numata N, Sasaki K, Kuzuoka T, Yato Y, Takahashi Y, Maeda K, Suzuki T, Mizukami T, Hamaguchi I. Safety and immunogenicity of the Pfizer/BioNTech SARS-CoV-2 mRNA third booster vaccine dose against the BA.1 and BA.2 Omicron variants. *Med*. 2022; 3: 406-421.e4.
- 3) Miyamoto S, Arashiro T, Adachi Y, Moriyama S, Kinoshita H, Kanno T, Saito S, Katano H, Iida S, Ainai A, Kotaki R, Yamada S, Kuroda Y, Yamamoto T, Ishijima K, Park ES, Inoue Y, Kaku Y, Tobiume M, Iwata-Yoshikawa N, Shiwa-Sudo N, Tokunaga K, Ozono S, Hemmi T, Ueno A, Kishida N, Watanabe S, Nojima K, Seki Y, Mizukami T, Hasegawa H, Ebihara H, Maeda K, Fukushi S, Takahashi Y, Suzuki T. Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. *Med*. 2022; 3: 249-261.
- 4) Reiko Shimbashi, Teiichiro Shiino, Akira Ainai, Saya Moriyama, Satoru Arai, Saeko Morino, Sayaka Takanashi, Takeshi Arashiro, Motoi Suzuki, Yukimasa Matsuzawa, Kenichiro Kato, Mitsuru Hasegawa, Rie Koshida, Masami Kitaoka, Takafumi Ueno, Hidefumi Shimizu, Hiroyoshi Yuki, Tomoko Takeda, Fukumi Nakamura-Uchiyama, Kashiya Takasugi, Shun Iida, Tomoe Shimada, Hirofumi Kato, Tsuguto Fujimoto, Naoko Iwata-Yoshikawa, Kaori Sano, Souichi Yamada, Yudai Kuroda, Kazu Okuma, Kiyoko

Nojima, Noriyo Nagata, Shuetsu Fukushi, Ken Maeda, Yoshimasa Takahashi, Tadaki Suzuki, Makoto Ohnishi, Keiko Tanaka-Taya Specific COVID-19 risk behaviors and the preventive effect of personal protective equipment among healthcare workers in Japan . Glob Health Med. 2023 Feb 28;5(1):5-14

(イ) 学会発表

- 1) 水上 拓郎, 野島清子, 関洋平, 石井美枝子, 今井恵子, 森内浩幸, 内丸薫, 明里宏文, 蕎麦田理英子, 佐竹正博, 浜口功. ヒト化マウスを用いた HTLV-1 母子感染モデルにおける感染クローン解析, 第 8 回日本 HTLV-1 学会 2022 年 11 月 4 日
- 2) 関洋平, 水上拓郎, 平舘裕希, 永田幸, 手塚健太, 野島清子, 村田めぐみ, 兼子明久, 森本 真弓, 長谷川ゆり, 淵直樹, 三浦清徳, 明里宏文, 浜口功. STLV-1 自然感染ニホンザルモデルを用いた水平感染に寄与する HTLV-1 の新たな標的細胞の同定, 第 8 回日本 HTLV-1 学会 2022 年 11 月 4 日
- 3) 関洋平, 野島清子, 百瀬暖佳, 福士秀悦, 森山彩野, 高橋宜聖, 前田健,

鈴木忠樹, 水上拓郎, 吉原愛雄, 濱口功, SARS-CoV-2 mRNA ワクチン(コミナティ筋注)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中和能及び安全性の評価, 第 69 回 日本ウイルス学会 2022 年 11 月長崎

- 4) 野島清子, 水上拓郎, 関洋平, 濱口功, 岡田義昭 血液製剤の安全性確保のための SARS-CoV-2 不活化の検討. 第 69 回 日本ウイルス学会 2022 年 11 月長崎
- 5) 岡田義昭, 渡士幸一, 野島清子. In vitro 感染系と B 型肝炎ウイルス陽性血漿を用いた血漿分画製剤における液状加熱による不活化と抗 HBs 免疫グロブリン製剤による中和活性の評価, 第 69 回 日本ウイルス学会 2022 年 11 月長崎

6)

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

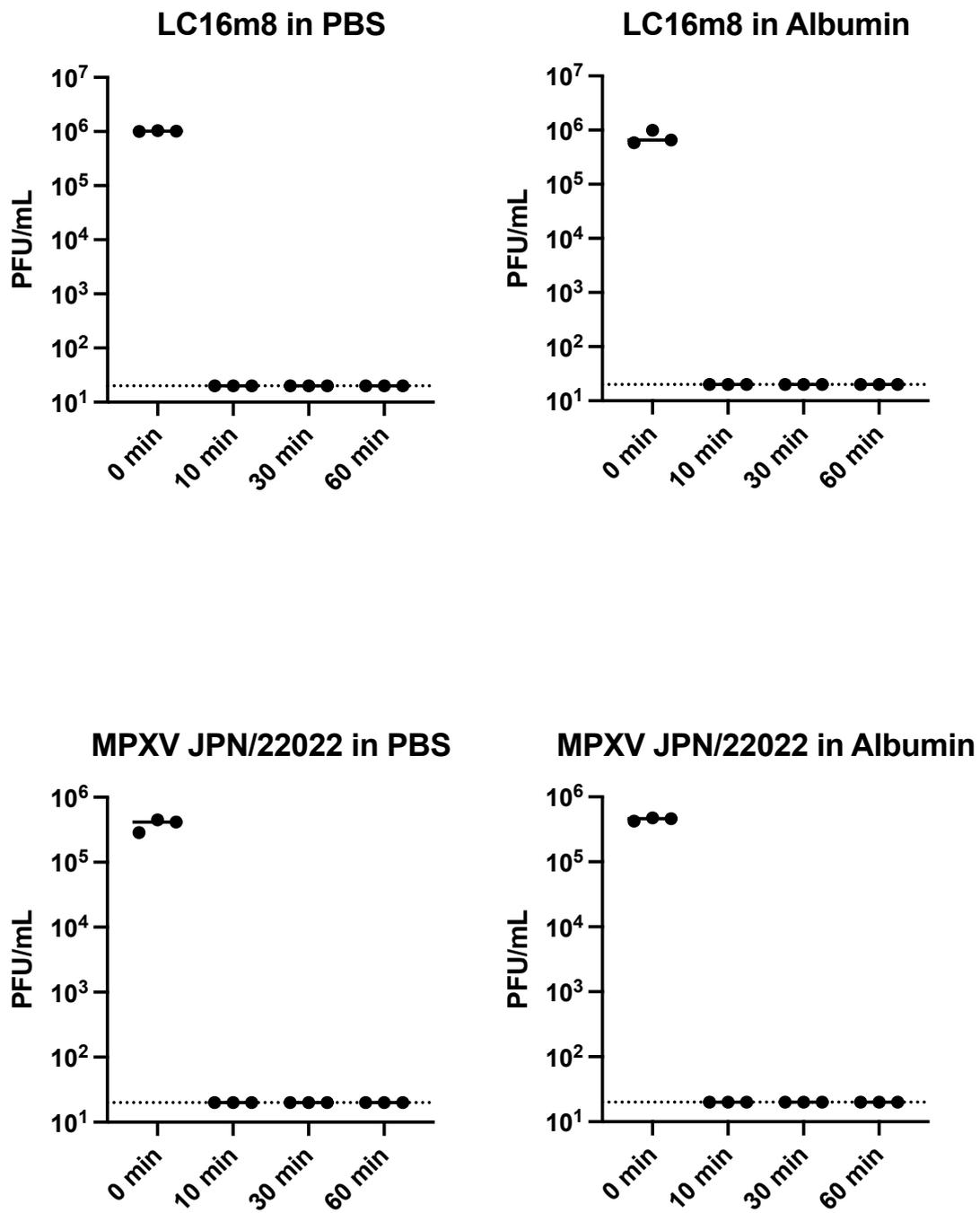


図1 ワクシニアウイルスおよびM痘ウイルスの60度加熱処理による不活化

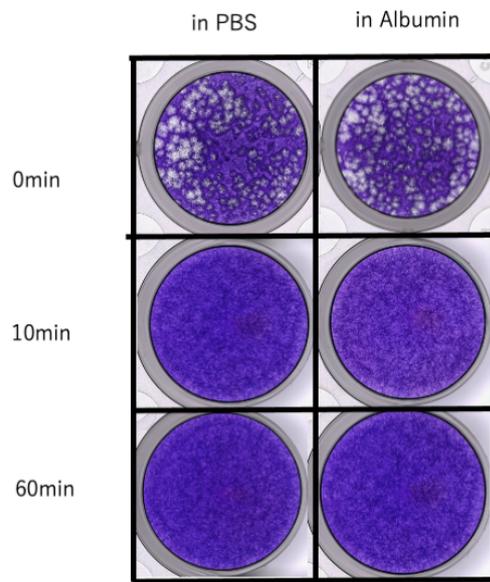


図 2 M 痘ウイルスの 60 度加熱処理による不活化 (プラークアッセイ)