

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

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

研究代表者 岡田義昭 (埼玉医科大学 医学部 客員准教授)

研究要旨

1. 蚊媒介性ウイルスのウイルス学的特性の解析のためにウツウイルスを2種導入し、次世代シーケンサー (NGS) により遺伝子の系統樹解析を行なった。
2. 国内採血の原料血漿プールから抗パルボウイルス B19V 抗体による中和活性を測定したところ B19V 抗原スクリーニング検査をすり抜けた B19V を十分に中和可能であった。また、新型コロナウイルスに対する抗体価の推移は、ワクチン接種人数や回数を非常によく反映していた。
3. HBV の *in vitro* 培養系を用いて感染性の評価法を改良したところ、精度良く評価ができた。その結果、アルブミン製剤の液状加熱では 3Log 以上の不活化、200 単位の抗 HBs 抗体によって  $2 \times 10^4$  の感染価を有する HBV が中和できた。
4. BSL2 での新型コロナウイルス感染等の解析のために水疱性口内炎ウイルスを用いた代理ウイルス系作成を目指し、変異株を含む新型コロナウイルスの S タンパク遺伝子をクローニングした。
5. M (サル) 痘ウイルスの検出系を整備して液状加熱に対する不活化効果を検討し、60 度 10 分間の加熱で検出感度以下にまで不活化されることを確認した。
6. 献血血液に影響する可能性のある人畜共通感染症等の情報収集とリスク評価及びその検査法の開発のために WHO、CDC、ECDC、国内の感染症発生状況、等から報告を集め精査した。M (サル) 痘に関しては、血中からウイルスが検出されることがあり、また、国内での散発的な感染例があることから検出試薬の標準品・参照品の整備等による精度管理の必要性を明らかにした。

## 分担研究者

林 昌宏 国立感染症研究所  
室長

浦山 健 日本血液製剤機構  
中央研究所 室長

大隈 和 関西医科大学  
教授

野島 清子 国立感染症研究所  
主任研究官

水上 拓郎 国立感染症研究所  
部長

## A. 研究目的

血液製剤は、検査法の進歩によって輸血後感染症は激減し、安全性は飛躍的に向上した。その一方で気候の温暖化や森林等の開発によって新興・再興感染症が生じ易い環境にある。本研究は新興・再興感染症から献血由来の血液製剤の安全性を確保することを目的に研究を実施した。特に新型コロナウイルスの国内外での流行によって献血血液の安全性確保が課題となっている。そのため新型コロナウイルスが混入した場合を想定して中和抗体や抗体以外の血漿成分による抗ウイルス活性等の有無を実験的に解析し、安全性の評価を行う。さらに原料血漿プールの新興・再興感染症の抗体価を経時的に測定することによって感染の流行予測等に役立てる。特にスパイクタンパクに対する抗体価や中和抗体価をモニターし、流行拡大の有無やワクチン接種の影響が解析できると期待している。また、デング熱やチクングニア熱等の流行地域において新型コロナウイルス対策が優先されたことによって蚊媒介の感染症（特にフラビウイルス属）や他の新興・再興感染症の対策が疎かになっていると推定される。経済活動の再開と共にこれらの感染症がパンデミックとなり、国内に持ち込まれる可能性が危惧され

る。また、Q熱など人畜共通感染症はこれまで血液を介する感染リスクについて検討されてこなかったが、最近のペットブームによって犬や猫との濃厚接触が生じていることからリスクを検討する必要があると考えられる。それに対応するためにWHOやCDC、各地域の感染症研究組織や論文等から新興・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い、特にリスクが高いと判断された感染症に対しては、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も研究目的としている。さらにB型肝炎ウイルス等、適当な培養系が開発されていないために実ウイルスを用いた評価がされていないウイルスに対して培養法や感染性の評価法を改良し、輸血製剤や血漿分画製剤の安全性を向上させることも目指す。

## 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

近年ヨーロッパではウスツウイルス(USUV)の流行が問題となっている。2009年にはイタリアで初めてUSUV感染による

免疫不全患者の髄膜脳炎症例が報告された。さらに2017年にはオーストリアにおける輸血血液中のWNV遺伝子に対するスクリーニング検査においてUSUV遺伝子が検出された。そこでヨーロッパウイルスアーカイブグローバル (EVA-g) よりUSUVの実験室診断法の確立及び性状解析のため、USUV 2株、UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 (SAAR-1776) 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018

(Ko208/2018) 株を導入した。本研究では、導入した2株の遺伝子解析を次世代シーケンサー (NGS) により解析し、系統樹解析を行なった。その結果 SAAR-1776 株はアフリカ2型、Ko208/2018 株はヨーロッパ2型の遺伝子型にそれぞれ分類されることが示された。またこれら2株の相同性は96.6%であった。

## 2) グロブリン製剤の原料血漿中に存在する新興・再興ウイルスに対する中和抗体に関する研究

献血由来の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、グロブリン製剤や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。今年度はヒトパルボウイルス B19 (以下、B19) と 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ることを明らかにできた。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。5類になり全数把握はできないが、献血者の抗体価の動向を経時的に測定することによってレトロスペクティブに流行状態を把握できる可能性や健常人の抗体保有率や変異株に対する抗体の防御効果なども評価できる可能性がある。

## 3) 新型コロナウイルスの代理ウイルス感染系の確立と中和活性解析系への応用

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染後の回復者やワクチン接種者の献血血液中には種々の抗ウイルス活性物質等が存在すると考えられるが、その安全性の評価は十分ではない。その評価には SARS-CoV-2 感染実験が必要であるが、本来 BSL3 レベルで行う必要があるため実施可能施設等の制限がある。そこで、BSL2 レベルで取り扱い可能な水疱性口内炎ウイルス (VSV) を用いた代理ウイルスを開発し、SARS-CoV-2 を用いたウイルス感染系との比較を行い、BSL2 レベルで実施可能な感染評価系構築を目指した。

SARS-CoV-2 は株によりスパイクタンパク質の性質が大きく異なるため、各変異株のスパイクタンパク質を有する代理ウイルスが必要となる。国立感染症研究所から分与された各種 SARS-CoV-2 (Wuhan 株, Alpha 株, Delta 株, Omicron BA.5.2.1 株) および臨床検体由来 Omicron BA.1.1.2 株 (2検体) から抽出したウイルス RNA を用いてスパイク遺伝子を増幅

し電気泳動した結果、いずれのウイルス RNA から予想された 3.8kbp 付近にバンドが検出された。

これを用いて BSL2 レベルでの取り扱いが可能な水疱性口内炎ウイルス (VSV) のエンベロープタンパク質 (G タンパク質) を SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に置き換えた代理ウイルスを開発する予定である。

#### 4) HBV培養法の開発と液状加熱による HBVの不活化や抗体による中和活性の評価

先行研究による HBV の感染性評価法の課題を HBs-RNA を用いることによって大幅に改善することができた。この評価法を用いてアルブミン製剤の液状加熱による HBV の不活化法の効果や抗体による中和活性を抗 HBs 人免疫グロブリン製剤を用いて、より正確に評価できるようになった。これまで HBs-DNA の定量を用いて感染性を評価していたが、非特異的に細胞に吸着する HBV 等の影響で微量な感染性を評価できなかった。そこで感染がよって転写される HBs-RNA に注目し、感染細胞から RNA を抽出し、定量性 RT-PCR を行ったところバックグラウンドが大幅に減少した。また、HBs-RNA は感染後 2 週間後にピークになることも発見し、感染 2 週間後の 1 点のみの評価で良いことも判明した。その結果、液状加熱により 3 Log 以上 HBV が不活化されること、200 単位の抗 HBs ヒト免疫グロブリン製剤によって少なくとも  $2 \times 10^4$  の感染価を持つ HBV が中和できることを明らかにできた。

#### 5) 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の評価に関する研究

2022 年に M (サル) 痘感染者が欧州で急増し、血液中からウイルスが検出されたことに加えて我が国でも感染例が報告されたことから検出法の整備と液状加熱に対する感受性を検討した。日本で分離

された (MPXV\_JPN2022\_YK006) 株とモデルウイルスであるワクシニアウイルス (LC16m8) を入手し、プラーク法による検出法を立ち上げた。この系を用いて PBS やアルブミン製剤にこれらのウイルスを添加し、60 度で 10、30、60 分加熱してそれぞれの感染価を測定したところ、液状加熱に対して非常に感受性が高く、60 度 10 分の加熱で検出限界以下にまで不活化できた。また、同じ属のワクシニアウイルスも検討したが差は認められなかった。

#### 6) 献血血液に影響する可能性のある人畜共通感染症等の情報収集とリスク評価及びその検査法の開発

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。今年度は国内・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。その結果、2022 年度は SARS-CoV-2 の感染拡大 (第 7 波・第 8 波) の中で、様々な新興・再興感染症のアウトブレイクが確認された。中でも 2022 年 7 月 25 日に WHO が緊急事態 (PHEIC) に該当すると宣言したサル痘に関しては、体制整備が完全ではない可能性がある。そこで、今後はサル痘に絞り、標準品・参照品を

用いて国内で市販されている核酸検査法の評価を行い、必要に応じ、献血血液での検査法を確立すべきであると考えられた。

#### D. 考察

気候変動や森林開発等で新興・再興が発生しやすくなっている。さらにヒトや物の移動によって驚くほどのスピードで世界に拡散している。これらから血液製剤の安全性確保するためには、常に海外や国内の感染症情報を集め・リスク評価を行うことが必要である。今年度、2波に渡る新型コロナウイルスの流行が生じた中に欧州でのM（サル）痘のアウトブレイクが発生した。幸い流行は収まっているが我が国では、いまだ散発的な感染例が報告されている。M痘は、ウイルス血症が認められることがあり、混入した場合のリスクを今後評価する必要があると考えている。今年度の成果として原料血漿の新型コロナウイルスの抗体価や中和活性を経時的に調べるとワクチン接種人数や回数が良く反映していることが明らかとなった。1回目の接種によって生じた抗体価が経時的に低下し、追加接種によって再度増加したことまで原料血漿プールに反映していた。5類になることで全数把握はできなくなるが、原料血漿をモニターすることでレトロスペクティブに流行状況や抗体保有状況の把握に有用と考えられた。また、HBVの感染性評価の改良によってこれまでHBs抗原と抗体の結合でしか評価で

きなかった中和活性が測定可能になった。過去にチンパンジーを用いた報告があるが詳細な解析は不可能であった。今後、異なる遺伝子型のHBVに対する中和活性の相違などの解析が待たれる。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・再興感染症等の感染症から献血血液の安全性確保と安定供給を目指し、蚊媒介ウイルス、新型コロナウイルス解析のための代理ウイルスの開発、献血由来血漿中抗体の解析、HBVのin vitro感染系の改良、M痘の不活化評価、人畜共通感染症の情報を含めた新興・再興感染症等の情報収集と評価を行った。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

- 1) 山麻衣子、玉栄建次、加藤由佳、鈴木雅之、内野富美子、山田攻、小原祥、天野博明、小林清子、岡田浩一、岡田義昭: カラム凝集法で検出感度以下であった不規則抗体による遅発性溶血性副反応の一例、第70回日本輸血・細胞治療学会総会、名古屋、2022.
- 2) 岡田義昭、小林清子、野島清子: B型肝炎ウイルスのin vitro培養系を用いた血液製剤の不活化効果の評価と抗HBs免疫グロブリンの中和活性の測定 第70回日本輸血・細胞治療学会総会、名古屋、2022.
- 3) 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  
イルス学会学術総会、長崎、2022.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし