

## 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. 欧州で検出されたウツウイルスの病原性を解析し、マウスでは脳内接種での病原性は確認できたが、腹腔内では確認できなかった。また、世界各地での蚊媒介ウイルスの流行状況の情報を収集した。
2. 国内採血の原料血漿プール及びグロブリン製剤中の抗パルボウイルス B19V 抗体による中和活性を測定したところ、FDA 基準である  $4\text{Log}_{10}\text{IU/mL}$  を十分に中和可能な値であった。また、新型コロナウイルスのスパイクタンパク質に対する抗体価は、ワクチン接種数や流行によって上昇するが、維持できず暫時下降するウェーブ状の傾向が観察された。
3. HBV の *in vitro* 培養系を用いて有機溶媒/界面活性剤(S/D)処理による不活化の効率を評価した。1時間では感染性が残存するも3時間では検出限度以下にまで不活化できた。モデルウイルスである仮性狂犬病と同様な挙動を示すことが確認できた。
4. BSL2 での新型コロナウイルス感染等の解析を可能にする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たが、新型コロナウイルスの S タンパク遺伝子に存在する ER retention signal のため代理ウイルスの産生は認められなかった。
5. 3種類の Mpox を用いて PBS や生食、アルブミン での液状化熱に対する不活化効果や酸処理による効果を検討し、いずれも効率よく不活化できる HO や CDC 等から新興再興感染症の情報を集め、リスクを検討した。また、Mpox の核酸増幅試薬の精度を確認した。ことを明らかにした。
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。新型コロナウイルス感染の収束に伴い種々の感染症が確認されたが、特にデングウイルスの流行が世界各地で発生している。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、標準品・参照品を用いて国内で市販されている核酸検査キットの精度管理を行い十分な検出感度があることを確認した。

## 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  
センター長

### 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。更に新型コロナウイルスの流行によって途上国の感染対策が疎かになったことに加えて、新型コロナウイルスの流行が収束したことによって国際間の人的交流が活性化されている。このような状況下では様々な新興・再興感染症が国際的に流行する危険性が高いと言わざるを得ない。本研究班では新興・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 WHO や CDC、EU 等から感染症の情報を集め、デング熱やチクングニア熱等のリスクを評価することで血液製剤の安全性の脅威となるような感染症を早期に対応できることを目的とした。また、収束に向かっているとは言え新型コロナの動向は今だ重要であり、そのために血漿分画製剤を製造するプール血漿を用いて新型コロナウイルスの抗体価の推移やバルボウイルス B 19 のウイルス量や抗体価を検索した。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か検討した。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。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感染系を開発した。これらから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した。

### 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鳥類の大量死や献血者からウスツウイルス (USUV) が確認されている。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ており、今回、2 種のウイルス株の病原性をマウスを用いて解析した。2 種のウイルスとも脳内接種では死亡や症状が確認できたが、腹腔内投与では認められなかった。また、世界各地から

蚊媒介ウイルスの流行状況の情報を集めたところ、東南アジアでのデングウイルス感染が非常に多かった。蚊媒介ウイルスのウイルス血症の期間は10日であることから帰国者からの献血では予防できるが、蚊を媒介する二次感染の可能性はある。

## 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、スパイクタンパクに対する抗体価は、接種によって上昇するが、その後、維持できず減少するウェーブ様のトレンドが観察された。

## 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。SARS-CoV-2 (オリジナル株、アルファ株、オミクロン株) よりスパイクタンパク遺伝子をクローニングし、野生型 VSV の G タンパク遺伝子と置換した組換えウイルスを作成したが、ウイルス産生は認められなかった。これは、スパイクタンパク質に存在する ER retention signal のためと考えた。そこで C 末の 18 アミノ酸を欠損させたスパイクタンパク質を発現させ、ウイルスが産生されるか検討している。

## 4) HBV等培養が困難なウイルスの培養法の改良と法の開発と不活化の評価

HBs-RNA 定量による感染性評価法を用い界面活性剤 (S/D) 処理による不活法の効果を検討した。1 時間では感染性は残存することもあったが、3 時間処理ではいずれも検出感度以下になるまで不活化された。HBV のモデルウイルスである仮性狂犬病ウイルスも同様な挙動をとった。また、感染後の HBs-RNA の挙動を解析したところ、感染 4 日頃より急速に転写量が増加し、11 日前後でピークになることが明らかとなった。そこで 60 度-10 時間液状加熱したアルブミン製剤での不活化を継続的な HBs-RNA 量で検討したところ、HBs-

RNA は検出されるも増加は認められず不活化されていたと考えられた。また、培養法を変更し、感染 2 日までポリエチレングリコールを添加しない培養液を用いることで非特異的に細胞に HBV が吸着を阻害することができた。

#### 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Mポックスウイルス

MPXV\_JPN2022\_YK006 クレード2b

（2022年に日本で分離された）に加え、病原性の強いMPXV/Zr599クレード1aと、MPXV\_Liberia クレード 2a を加えて、PBS 下、およびウイルスを安定化する蛋白共存下（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。また、低 pH 処理への感受性についても比較し、15 分の処理でいずれのウイルスも検出限界以下となり、5log 以上の不活化が認められた。

#### 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。特に新型コロナウイルスの感染の収束に伴う国際的な人的交流の活性化によって世界各地でデングウイルスの流行が発生している。また、エムポックス(Mpox)の流行では世界的な流行は収束に向かっている傾向にあるが、アジアでの感染者数の増加が報告されている。発症者の血液中から Mpox-DNA が検出されたとの報告があるが、発症前の供血者由来の血小板（核酸陽性）輸血症例が報告されている。幸い感染は生じなかったが潜伏期の血中にウイルスが混入する可能性がある。そこで国内で市販されている 5 つの核酸検出キットの感度の評価を行ったが、良好な感度を有していることが確認できた。

#### D. 考察

新型コロナウイルス感染症の収束に伴い開発途上国を中心に新興・再興が流行している。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。また、パルボウイルスの研究では、抗体価と混入するパルボウイルス量を原料血漿プールや免疫グロブリン製剤で解析し、抗原スクリーニングをすり抜けたウイルスは抗体によって十分に不活化できること明らかにした。これはスクリーニング検査として NAT を導入しなくても血漿分画製剤のパルボウイルスに対する安全性は十分に確保されていることを示している。また、HBV の *in vitro* 感染系と感染検出系の改良によって液状加熱や界面活性剤による不活化の評価が可能にした。

#### 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、献血由来原料血漿プールを用いた抗体の解析、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. 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72回日本輸血・細胞治療学会総会, 千葉, 2023

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72回日本輸血・細胞治療学会総会, 千葉, 2023 著書

岡田義昭：血液製剤から見たプリオン バムサジャーナル 35 (3) 144-151, 2023

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし