

## 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 室長  
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 センター長

#### 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。本研究では、モデルウイルスではなく M ポックスウイルスの実ウイルスを用いて除去・不活化について評価を行った。M ポックスウイルス病原性の強い、MPXV/Zr599 クレード 1a、MPXV\_Liberia クレード 2a、MPXV\_JPN2022\_YK006 クレード 2b (2022 年に日本で分離された)、およびモデルウイルスであるワクシニアウイルス (LC16m8) を使い、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。また、低 pH 処理へも感受性があり、4log 以上の不活化効果が認められた。仮にエムポックスウイルスが感染性を保ったまま分画用血漿に混入した場合であっても、製造工程の加熱処理や酸処理により十分に不活化され安全性が担保できることが示された。

## 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、海外渡航者の4週間の献血延期をしても無症候感染者が献血ドナーとなる可能性があり、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。エムポックスウイルスは、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。またタイでは献血後にエムポックスを発症し、献血時の血液からMPXV DNAが検出された事例も報告され、幸い輸血感染症事例とはならなかったことが報告されている(Emerg Infect

Dis 2024; 30(3): 603-605)。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エムポックスウイルス(MPXV\_JPN2022\_YK006)クレード2b、MPXV\_Liberiaクレード2a、病原性の強いMPXV/Zr599クレード1aを、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。また、3.3%酢酸処理に対する感受性について検討した。

## B 研究方法

### B-1 ウイルス

M痘ウイルス(MPXV)としては、MPXV/Zr599(クレード1a)、MPXV\_Liberia(クレード2a) 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(クレード2b)、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150cm<sup>2</sup> T フラスコ1本当たり2x10<sup>7</sup>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、FBS2%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 およびエムポックスウイルス(3 株)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、FBS2%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)が見られた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  $1 \times 10^5$  cells/mL/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 2%FBS DMEM を 350uL ずつ各 well に添加し、予め 10 倍段階希釈した MPXV/ Zr599, MPXV\_Liberia, MPXV\_JPN2022\_YK006, ワクシニアウイルス LC16m8 の各ウイルスを各 well に 50uL ずつ添加した。37°C 5%CO<sub>2</sub> 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 不活化処理および感染価の測定

新たに融解した MPXV/ Zr599, MPXV\_Liberia, MPXV\_JPN2022\_YK006, ワクシニアウイルス LC16m8 のウイルスを 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十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。

各ウイルスは、5%または 2%FBS 入り DMEM メディウム、PBS, 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ジップロックに入れて空気を十分に抜き、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 分反応後に回収した。実験は独立して 3 回実施した。

酸処理は、3.3v/v%となるように酢酸を培地に添加し、ウイルスを 1:9 の割合で酸性培地にスパイクし、15 分処理した。処理後 1N NaOH を添加して pH を中性に戻した。酸処理済みウイルス溶液中のウイルス力価は、加熱処理溶液と同様に、プラークアッセイ法により確認した。

## C. 研究結果

各ウイルスを 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 5log 以上の不活化が認められ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。

15 分の酸処理後中性に戻した **MPXV\_JPN2022\_YK006**、**MPXV/Zr599**、**MPXV/Liberia** 液のウイルス力価を測定した結果、いずれのウイルスも感染性が検出限界以下となり、5log 以上の不活化が認められた（図 3）。

## D 考察

エンベロープを有するウイルスは加熱や酸処理に感受性があると言われている。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、エムポックスウイルス株 **MPXV/Zr599** クレード **1a**、**MPXV/Liberia** クレード **2b**、**MPXV\_JPN2022\_YK006** クレード **2b**、モデルウイルスであるワクシニアウイルス **LC16m8** はいずれの条件かでも、60°C 加熱処理 10 分で検出限界以下となった。また酸処理でも同様に検出限界以下と

なり、クレードの違いによる病原性の強弱に関わらず、5log 以上の不活化効果が認められた。また同じくエンベロープを持つ SARS-COV-2 では同様の酸処理では 1log 程度の不活化効果しか認められないことから（未発表データ）エンベロープウイルスでも感受性の強弱に差があることがわかった。また、本研究とは別に、リアルタイム PCR による **MPXV** 核酸 DNA 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したが、酸処理、加熱処理は核酸検出には影響なく、処理しても十分に核酸は回収されることが明らかとなった。本研究での不活化評価は、核酸検査のための不活化ウイルス由来参照品の作製にも貢献した。また、仮にエムポックスウイルスが感染性を保ったまま分画用血漿に混入した場合であっても、製造工程の加熱処理や酸処理により十分に不活化され安全性が担保できることが示された。

## E 結論

いずれのクレードのエムポックスウイルスが分画用血漿に混入した場合であっても、製造工程の加熱処理や酸処理により十分に不活化され安全性が担保できることが実ウイルスを用いて示された。

## 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. S aturation 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) 岡田義昭、小川清子、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2報) グロブリンの中和活性の測定 (第2報) , 日本輸血細胞治療学会 2023年5月
- 2) 関洋平, 野島清子, 百瀬暖佳, 福士秀悦, 森山彩野, 石井美枝子, 今井恵子, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 水上拓郎, 吉原愛雄, 濱口功 武漢型及びオミクロン対応型 2 価ワクチンブースター接種 (4 回目) 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.

70 回日本ウイルス学会学術集会  
2023 年 9 月.

- 3) 水上拓郎, 野島清子, 関洋平, 百瀬暖佳, 福士秀悦, 森山彩野, 石井美枝子, 今井恵子, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 吉原愛雄, 濱口 功武漢型, BA.1 及び BA.4-5 対応型 SARS-CoV-2 mRNA ワクチン (コミナティ筋注) ブースター接種 (4 回目) による SARS-CoV-2 オミクロン変異株に対する有効性及び安全性に

関する研究第 27 回日本ワクチン学会・第 64 回日本臨床ウイルス学会合同学術集会

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

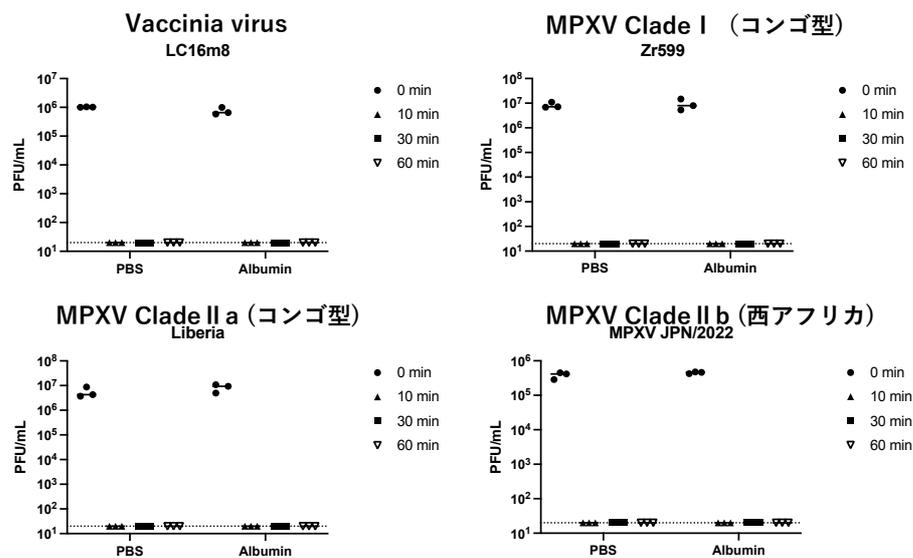


図 1 エムポックスウイルスの 60 度加熱処理による不活化

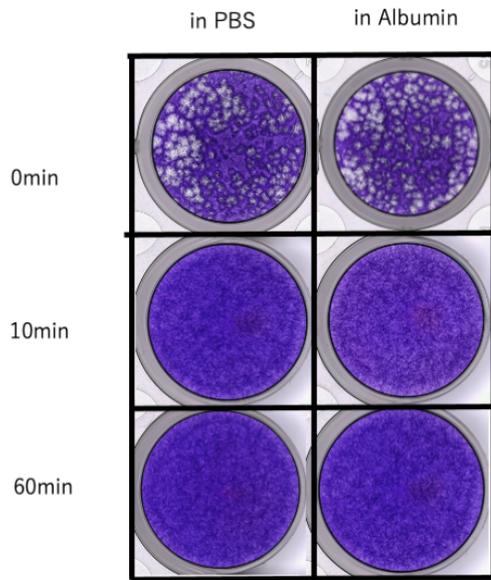


図 2 M痘ウイルスの60度加熱処理による不活化 (プラークアッセイ)

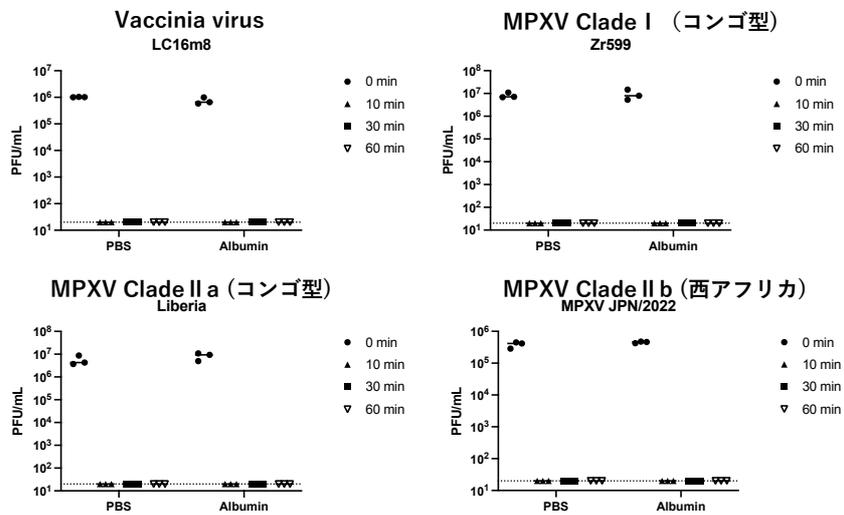


図 3 エムポックスウイルスの酸処理による不活化