

## 厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラーサイエンス政策研究事業)「輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」分担研究報告書

分担課題：実ウイルスを用いたエタノール分画法による血漿の分画とウイルスの不活化・除去と安全性の評価

研究分担者 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 野島清子

研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス2部 下池貴志

### 研究要旨

2020 年末以降、新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクが起り 2022 年 5 月現在も継続している。血液の安全性確保の観点から得られる今までの知見としては、アウトブレイク初期に症状のある感染者の 15%において血液中から SARS-COV-2 の RNA が検出される (RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されたが、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、変異や組み替え等によりウイルスの性状が突如として変化する可能性は否定できない。無症候ウイルス血漿ドナーが存在するリスクは低いがゼロでなく、無症候感染者が献血ドナーになり得ることから、血液の安全性を確保するためには新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性などを明らかにするとともに、変異により不活化処理感受性などのウイルスの性状が変化しないことを確認する必要がある。R02 年は武漢株、アルファ型変異、ガンマ型変異ウイルス株、R03 年度はベータ型変異、デルタ型変異、オミクロン (Ba. 1, BA. 1. 1, BA. 2) を用いて、血漿分画製剤で用いる 60℃加熱処理において、いずれの変異ウイルス株においても 30 分で不活化されることを確認した。この加熱感受性はいずれの変異ウイルスにおいても、5%アルブミン共存条件下でも維持された。また SARS-CoV-2 ウイルスの室温保存下で安定性を確認した結果、PBS にスパイクした場合は 3 日程度感染性が保たれるのに対し、ヒト血清 (SARS-Cov-2 抗体陰性) にスパイクした場合は非働化処理に関係なく経時的に感染性を失うことが確認され、血中 RNAemia の報告がある中で感染性が報告されていない事象との関連が示唆され今後の検討が期待される。

血液製剤に混入する可能性がある C 型肝炎ウイルス (HCV) の実ウイルスを用いた不活化条件を明らかにするため、培養細胞で増殖させた HCV を血液製剤に加え、様々な条件で不

活化の検討を行っている。これまで用いた HCV は培養細胞で増殖出来る JFH-1 株であった。2015 年 JFH-1 以外の HCV 株の増殖に重要な宿主蛋白質 Sec14L2 の同定が報告され、JFH-2 株が増殖できる FU97 細胞に Sec14L2 が発現する細胞 (FU97-sec14L2) を作製し HCV 陽性ドナー血漿由来のウイルスを感染させたが、これまで HCV の増殖は見られなかった。今回、Sec14L2 の発現が多い細胞をクローニングし、HCV 陽性ドナー血漿由来のウイルスを感染させたところ、HCV RNA の増殖を検出出来た。

#### A. 目的

##### A-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

2020 年末以降、新型コロナウイルス感染症のアウトブレイクが起こり 2022 年 5 月現在も継続している。血液の安全性確保の観点から得られる今までの知見としては、アウトブレイク初期に症状のある感染者の 15% において血液中から SARS-COV-2 の RNA が検出される (RNAemia) 事例や中国のドナースクリーニングで 4 名のドナーで SARS-COV-2 RNA が検出された事例が報告されたが、ウイルス量は低くウイルス分離された事例、輸血により感染した事例はない。しかし、一方で、世界中で次々と変異型ウイルスが出現し、回復者やワクチン接種者の有するウイルス中和活性に影響を及ぼす可能性があり、変異や組み替え等によりウイルスの性状が突如として変化する可能性は否定できない。無症候ウイルス血漿ドナーが存在するリスクは低いながらも、無症候感染者が献血ドナーになり得ることから、血液の安全性を確保するためには新型コロナウイルスの不活化処理等への抵抗性などを明らかにするとともに、変異により不活化処理感受性などのウイルスの性状が変化し

ないことを確認する必要がある。

R02 年度には、武漢株 (hCoV-19/Japan/wk-521/2020)、アルファ型変異株 (hCoV-19/Japan/QHN002/2020)、ガンマ型変異株 (hCoV-19/Japan/TY7-501/2021)、令和 3 年度は、ベータ型変異株 (B. 1. 351, hCoV-19/Japan/TY8-612/2021)、デルタ型変異ウイルス株 (B. 1. 617. 2, hCoV-19/Japan/TY11-927/2021)、オミクロン BA. 1 型 (hCoV-19/Japan/TY38-873/2021)、BA. 2 (hCoV-19/Japan/TY40-385/2022)、BA. 1. 1 (hCoV-19/Japan/TY38-871/2021) を加えて血漿分画製剤で用いる 60°C 液上加熱処理において、いずれも変異ウイルス株においても血漿分画製剤の製造工程中で用いられる 60°C 液上加熱処理に対する感受性が維持されているか確認し、血液製剤の安全性確保に資する。また、血液にウイルスをスパイクした際の室温条件下での安定性について確認することを目的とした。

##### A-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

C 型肝炎ウイルスは血液を汚染する可能性のある病原体であり、1964 年から 1987 年かけて海外の血漿を原料に製造された第 IX 因子製剤、第 VIII 因子製剤、フィブリノゲン製剤の投与により多くの人が C 型肝炎に感

染した経緯がある。

C型肝炎の治療法はリバビリンとペグインターフェロンとの併用療法（PEG-IFN/ribavirin）により治療効果（それでも約50%）が上がるようになった。しかし、日本人の感染者で多い遺伝子型（遺伝子型1b）のHCVでは治療効果が上がらなかった。しかしここ数年、数種類の阻害剤（Grazoprevir, Ledipasvir, Sofosbuvir；それぞれHCVプロテアーゼ（NS3/NS4A）、ポリメラーゼ（NS5A）、及びNS5ABタンパク質に対する阻害剤で、これらをまとめて**Direct acting antivirals (DAA)**と呼ばれる）が開発、使用が開始され、1b型も含めその療効果が上がり、今やHCVは治療可能な感染症と言っても過言ではない。これらの成果は約30年に渡る世界中の研究者の努力の賜で、昨年ノーベル賞受賞と言う形で評価されたのは同じHCVの研究者として嬉しい限りである。

C型肝炎ウイルスには、治療薬の開発に必要な培養細胞を用いた感染系が長らくなかったため、チンパンジーを用いて感染性の評価を行っていたが、価格の高さ、扱い難さ、また動物愛護の観点からも治療薬開発等の研究がなかなか進展しなかった。血液製剤中のHCV不活化の評価は、モデルウイルスとして培養可能なウシ下痢症ウイルス（BVDV）が用いられてきた。こうした中、2005年に培養細胞でHCVを増殖させることが可能な系が発表され研究が急速に進展した。本研究でもこのHCV JFH-1株（遺伝子型2a）を増殖させ、増殖したHCV JFH-1を血液製

剤にスパイクウイルスの不活化を評価する系を構築した。

本研究はJFH-1以外のHCV、特にHCV陽性ドナー血漿由来のHCVの不活化を調べるのが目的であり、過去3年間、様々な培養細胞にHCVの増殖に必要な宿主因子Sec14L2（参考：Saeed M. et al. 524 471-490, 2015 Nature）を高発現させ、これら培養細胞に患者由来HCVを感染させ、そのHCVが増殖できる系の構築の検討を行って来た。昨年度はJFH-1とは別の株のJFH-2（遺伝子型はJFH-1と同じく2a）が増殖出来るFU97細胞にSec14L2を発現する培養細胞（FU97-sec14L2と命名）を作製し、患者由来HCVを感染させた。FU97細胞はHCVの増殖に必要な、肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子マイクロRNA；miR122が高発現し、且つ、HCVの増殖に必要な、これも肝臓細胞で特異的に発現する宿主因子 $\alpha$ -fetoproteinも高発現している（参考：Shiokawa M. et al. 88 5578-5594, 2014 J. of Virol.）。しかしながら患者由来HCVの増殖は見られなかった。今年度は、FU97+sec14L2が高発現する細胞をクローニングし、これらの細胞に感染者由来HCVを感染させ、その増殖を調べた。

## B 研究方法

### B-I 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

新型コロナウイルス SARS-CoV-2としては、武漢株 hCoV-19/Japan/WK-521/2020 (A)、アルファ型変異ウイルス株 hCoV-

19/Japan/TQHN001/2020 (B. 1. 1. 7,)、ベータ型変異ウイルス株 (hCoV-19/Japan/TY8-612/2021 (B. 1. 351,))、ガンマ型変異ウイルス株 hCoV-19/Japan/TY7-501/2021 (P. 1)、デルタ型変異ウイルス株 hCoV-19/Japan/TY11-927/2021 (B. 1. 617. 2,)、オミクロン型変異ウイルス株 hCoV-19/Japan/TY38-873/2021 (BA. 1), hCoV-19/Japan/TY38-871/2021 (BA. 1. 1), hCoV-19/Japan/TY40-385/2022 (BA. 2) はすべて国立感染症研究所が分離したものであり、P1 から増やした P2 を当研究の実験に用いた (遺伝子配列に変異が無いことを確認して用いた (data not shown)。細胞は veroE6/TMPRSS2 は JCRB 細胞バンク由来のものを使用した。通常の細胞継代時は 10% FBS/ DMDM low glucose , G4181mg/mL (含ペニシリン/ストレプトマイシン)、ウイルス感染時は 2%FBS/DMDM low glucose (含ペニシリン/ストレプトマイシン) を用いた。

B-2 : 加熱処理

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℃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。

#### B-3 : 感染性評価

加熱処理が終わった直後に、メディウムで 10 倍段階希釈を行い(N=6 または N=8)、予め前日から 96well plate で培養している

veroE6/TMPRSS2 細胞 (1x10<sup>4</sup>個 /100uL/well) に、希釈したウイルス液を 100uL ずつ添加し、37℃ 5%CO<sub>2</sub> のインキュベーターで 3 日から 5 日培養し、細胞変性効果 (cytopathogenic effect :CPE) の有無を顕微鏡化で観察し感染性の有無を評価した。各処理後のウイルス感染価は Reed-Muench 法を用いてウイルス感染価 (tissue culture infectious dose :TCID<sub>50</sub>/mL) として算出した。

#### B-4: 安定性評価

各ウイルスを血清、非働化済血清、PBS に 1:9 の割合でスパイクし、室温下で 0, 1, 3, 7, 15 日反応させ、各日において検体採取直後に B-3 と同様の方法で veroE6/TMPRSS2 細胞を用いて感染価を評価した。血清は予め、SARS-COV-2 中和陰性、RMA 陰性を確認済みのものを使用した。リアルタイム PCR、および中和試験法は、国立感染症研究所 HP で公開されている方法を用いて実施した。

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/lab-manual-m/9559-2020-04-14-10-09-54.html>

#### B-II HCV 実ウイルスを用いた不活化評価 当研究

B-II-1 : Sec14L2 が発現する、FU97 培養細胞の作製及びクローニング

H29 度報告した方法により sec14L2 を発現する組換えレンチウイルスを作製(プラスミド pSEC14L2/BlastR, pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pMD2.G を 293T 細胞に同時トランスフェクションすることにより得た。詳しくは

H29 年度の同研究費報告書参照) し、これを胃がん由来 FU97 細胞に感染させ、Blasticidin でセレクションすることにより、Sec14L2 が発現する細胞を得た。得られた細胞を限界希釈することにより、1 ウェルに数個の細胞を増殖させ、その中で、この組換えレンチウイルスに sec14L2 と一緒に組み込まれた tGFP の発現の指標として、蛍光顕微鏡で緑色に光る細胞が多く存在するウェルを選択する作業を繰り返し、更に Sec14L2 の発現の多い細胞を免疫染色し、Sec14L2 が高発現する細胞を 8 クローンクローニングした。その中で特に Sec14L2 が高発現し、かつ血漿に対する抵抗性の高い細胞 2 クローン (#25, #34 と命名) を今回の実験に用いた。これら細胞クローン #25、#34 の Sec14L2 の発現を免疫染色、及びウエスタンブロッティングで調べた。(図 1)。なお、免疫染色による Sec14L2 の検出には、一次抗体 (anti-Rabbit Sec14L2; #GTX115716, GTX, 1000 倍希釈)、二次抗体 (Alexa Fluor 594 (#A11032 Thermo Scientific, 1000 倍希釈) を、ウエスタンブロッティングによる Sec14L2 の検出には、一次抗体 (anti-Rabbit Sec14L2; #GTX115716, GTX, 1000 倍希釈)、二次抗体 (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) HRP-conjugated (Bio Rad, 30000 倍希釈) を用いた。

B-II-3 : 作製した培養細胞 Fu97-sec14L2 #25, 及び #34 への感染者由来 HCV の感染

作製した Sec14L2 が組み込まれた FU97 培養細胞 (FU97-sec14L2 と命名) ( $1 \times 10^5$ /well)

に、新たに得た 5 種類の HCV 感染者由来血漿 (R1-1, -2, -3, -4, -5 : 各 HCV RNA コピー数は、R1-1:  $2.2 \times 10^9$ , R1-2:  $2.1 \times 10^9$ , R1-3:  $7.0 \times 10^9$ , R1-4:  $2.2 \times 10^9$ , R1-5:  $7.1 \times 10^9$  IU/mL : 野島清子氏により測定) をそれぞれ 50 $\mu$ l (培地に対して 1/10 の体積) ずつ加え、HCV が増殖するかを HCV コア蛋白質の免疫染色法と HCV ゲノム RNA の検出により確かめた。なおコントロールとして JFH-1 株を m. o. i. = 1.1 (HCV RNA コピー数:  $6.9 \times 10^7$  IU/mL) でこの細胞に感染させた。

HCV ゲノム RNA の検出には、感染者由来 HCV 血漿感染 1, 及び 3 日後の細胞を RNA 抽出キット (RNA purification kit; EX-R&D) により HCV RNA を精製し、10 倍ずつ段階希釈 ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) し、逆転写反応とそれに続く cDNA の増幅を PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (TAKARA Bio) を用いて行った。反応条件は、50 $^{\circ}$ C 30min, 94 $^{\circ}$ C 2min の後、[94 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C 15s, 72 $^{\circ}$ C 60s] を 32 回繰り返し、その後、72 $^{\circ}$ C 3min で行った。用いた二種類の HCV 特異的 primers は、sense: nt 45-64 と antisense: nt 265-246 (数字は HCV JFH-1 ゲノム RNA の 5' 末端からの塩基番号) である。この反応により増幅された cDNA 産物を 2% agarose gel にて分離した。更に、この各サンプルを 10 倍ずつ段階希釈 ( $10^0$ - $10^{-3}$ ) し、EX-Taq DNA polymerase (AKARA Bio)、及び特異的 primers (sense nt 63-82 と antisense nt 207-188) を用いて nested PCR を行った。反応条件は、[98 $^{\circ}$ C 10s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s] を 30 回繰り返した。この反応により増

幅された cDNA 産物も 2% agarose gel にて分離した。

また、免疫染色に用いた抗体は anti-HCV core antigen monoclonal antibody (MA-080, Thermo Scientific)、蛍光二次抗体には Alexa Fluor 594 (#A11032 Thermo Scientific) を用いた。核の染色には DAPI (#340-07971, 和光純薬) を用いた。

(倫理面への配慮)

この培養細胞でウイルスが増殖させる系は、実験動物を用いる必要がないため、研究のやりやすさのみでなく、倫理面においても優れた系である。この研究に関して国立感染症研究所の「ヒトを対象とする医学研究倫理審査」で承認を受けた(受付番号 851「血液製剤における病原体不活化に関する研究」)。

## C. 研究結果

### C-1 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

用いたウイルスを 1:9 の割合でメディウム、PBS、5%アルブミン製剤にスパイクした直後の感染性を評価したところ、図 1 にあるようにスパイクしたことによるウイルス力価への影響は認められなかった。

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 分の加熱処理では感染性が残存したが 30 分、60 分後は感染性が認め

られず、検出限界以下であった(検出限界は 3.2 TCID<sub>50</sub>/mL) (図 2, 図 3)。

武漢株における 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、5.4, 5.9 (R02 年度データ) であり、アルファ型変異ウイルスにおける 60°C10 分加熱処理時の LRV は、メディウム下、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、4.3, 5.3, 5.1 であり (R02 年度データ)、ガンマ型変異ウイルスにおける 60°C10 分加熱処理時の LRV は、メディウム下、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、5.6, 5.5, 4.2 (R02 年度データ) であった。これに加えて R03 年度に市中で確認された変異ウイルスとして、ベータ型変異ウイルスにおける 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 5.4, 4.2 であり、デルタ型変異ウイルスにおける 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 4.2, 5.1 であった。オミクロン変異ウイルス BA.1, BA.1.1, BA.2 における 60°C10 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 4.6, 4.7, 4.1 (PBS), 4.9, 4.6, 4.2 (5% アルブミン) であった。いずれの変異ウイルスにおいても 60°C30 分および 60 分の加熱処理により検出限界以下となり、武漢株における 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS、5%アルブミン製剤下とも 5.8 (R02 年度データ) であり、アルファ型変異ウイルスにおける 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ、5.3, 5.2 であり (R02 年度データ)、ガンマ型変異ウイルスにおける

60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5% アルブミン製剤下でそれぞれ、5.8, 5.8 (R02 年度データ)であった。これに加えて R03 年度に市中で確認された変異ウイルスとして、ベータ型変異ウイルスにおける 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 5.5, 5.7 であり、デルタ型変異ウイルスにおける 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5%アルブミン製剤下でそれぞれ 5.0, 5.1 であった。オミクロン変異ウイルス BA.1, BA.1.1, BA.2 における 60°C60 分加熱処理時の LRV は、PBS 下、5% アルブミン製剤下でそれぞれ 5.1, 4.8, 4.1 (PBS), 5.0, 4.7, 4.3 (5% アルブミン) であった。いずれも検出限界以下となっており、LRV 数値の差は、ウイルスストックの力価が高いかどうか依存していた。いずれの変異ウイルス株においてもタンパク存在下でも PBS と同等の LRV を示した。

#### C-2 新型コロナウイルスを用いた安定性評価

新型コロナウイルス (wk-521, TY-501, TY8-612, TY11-927) を 1:9 の割合でヒト血清および非働化済みヒト血清に添加し、室温下で 0, 1, 3, 7, 15 日反応させ、各日において検体採取直後に細胞に作用させウイルス感染価を測定した。ヒト血清コロナ渦以前に採血された市販品であり、感染研法で SARS-COV-2 中和陰性、RNA 陰性である。PBS 下では 7 日間ウイルス力価が保たれ大幅な低下は認められなかったが、血清にスパイクしたウイルスは、添加直後は感染性を有したがいずれのウイルス株でも非働化の有

無に関わらず経時的に感染性の低下が認められた (図 4)。

#### C-3 HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

C-II-1: Sec14L2 発現 FU97 (FU97-sec14L2) 細胞#25, #34 の Sec14L2 の発現

免疫染色により、FU97+sec14L2 #25、及び#34 細胞では、Sec14L2 が全細胞の 15、及び 24%で発現していることが明らかとなった。また、ウエスタンブロッティングで、#25、及び#34 細胞で Sec14L2 が発現していることが明らかとなった。Sec14L2 の発現量は#34の方が、#25 細胞よりも 2 倍多いことも明らかとなった。一方、FU97 細胞では、免疫染色、及びウエスタンブロッティング共に Sec14L2 の発現は発現していない、或いは検出限界以下であるということが明らかとなった (図 5)。

C-4: FU97-sec14L2 細胞への感染者由来血漿の HCV の感染

FU97-sec14L2 細胞に新たに得た 5 種類の HCV 感染者由来血漿 (R1-1, -2, -3, -4, -5: 各 HCV RNA コピー数は、R1-1:  $2.2 \times 10^9$ , R1-2:  $2.1 \times 10^9$ , R1-3:  $7.0 \times 10^9$ , R1-4:  $2.2 \times 10^9$ , R1-5:  $7.1 \times 10^9$ , 及びコントロールとして JFH-1 (HCV RNA コピー数  $6.9 \times 10^7$  IU/mL、感染価  $5.6 \times 10^6$ ) を感染させ、1、及び 3 日後に細胞内の HCV コア蛋白質の発現を免疫染色法で調べた。JFH-1 感染の場合コア蛋白質の発現を認められたが、5 種類の HCV 感染者由来血漿の感染では、コア蛋白質の発現は認められなかった (data not known)。

そこで各感染細胞の HCV RNA 量を調べたと

ころ、#25、#34 の両方の細胞で感染者血漿 R1-2 の HCV RNA 量の増加が認められた (図 6)。

## D. 考察

### D-1 新型コロナウイルスを用いた不活化評価

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、新型コロナウイルスも同様な傾向を示すと考えられ、市中で確認された変異ウイルス株を用いて 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、SARS-CoV-2 のいずれのウイルス株においても 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、60°C 30-60 分で検出限界以下となった。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。

ウイルス株により 60°C 10 分処理で感染性の残存が示されたが、本研究の中で数分でも長く加熱処理をした場合に感染性の残存がなくなる現象が確認されており (例えば武漢株の 60°C 加熱処理 12 分)、溶液の中心温度が確実に 60°C に達するかどうか等の実験誤差が影響していると考えられた。

献血血液 (全血) は採血後に一定期間室温下に置かれることがあることを想定し室温での安定性を評価した。SARS-CoV-2 は PBS 下では非常に安定性が高く、室温に放置し

ても 7 日間は感染性を保った。この現象は 4°C でも同様であった (data not shown)。しかし血清に添加した場合は経時的に感染性を失い、非働化が影響しなかったことから感染性の低下に補体の関与はないと考えられた。コロナ禍以前の献血由来の血漿にスパイクして同様な現象を確認しており (data not shown)、血中から RNA が検出されるにも関わらず、ウイルスが分離されないこととの関連性に興味を持たれる。

### D-2 HCV 実ウイルスを用いた不活化評価

HCV の増殖に重要な宿主因子である  $\alpha$ -fetoprotein、miR122 を発現し、HCV JFH-2 株が増殖できる FU97 細胞に、HCV の増殖に重要な宿主因子である Sec14L2 も発現する細胞を作製した。R02 年度、この細胞で、Sec14L2 が高発現し、しかも血漿に対して耐性な細胞をクローニングした (クローン #25、及び #34)。これら 2 クローン細胞に HCV 陽性血漿を感染させたが、その増殖はウイルス蛋白質では確認できなかったが、陽性血漿 R1-2 を感染させた時、今回初めてウイルス RNA の増幅を検出することが出来た。Sec14L2 が多く発現する細胞クローンをクローニングしたこと、及び新たな感染者血漿を用いたことに起因していると考えられる。

今回始めて感染者由来血漿の HCV ゲノム RNA の増殖を検出することが出来たが、患者由来 HCV の不活化を調べるためには、HCV ゲノム RNA の更に大きな増幅が見られないといけない。



感染者由来 HCV を更に大きく増幅させる方法として、i) 感染者由来 HCV を FU97-sec14L2 細胞に感染させ、長期にわたり培養し、細胞に変異が入り、その HCV が増殖出来るようになったら、その細胞から Ribavirin などの薬剤で感染した HCV を取り除いた cured 細胞を得て、変異前の感染者由来 HCV を再感染させ、その HCV が増殖出来るかを調べる方法。或いは、ii) 感染させる血漿の量を増やすことが考えられるが、感染させる血漿量を増加させると血漿中に含まれる成分のため細胞の培地がゲル化し、細胞の増殖を阻害するようなので、何らかの方法で血漿中の HCV のみを精製、濃縮し、細胞に感染させる方法を見いだすことなどが考えられる。

今回クローニングした FU97-sec14L2 #25, 及び#34 細胞で HCV 感染者由来血漿 R1-2 が増殖したが、#34 の方が#25 に比べ 10 倍増幅しやすいことが明らかとなり、細胞の種類の違いのことを考えると、今回感染者由来 HCV 血漿の増幅を調べていない残り 6 クローン細胞についても調べる必要性がある。感染 1 日後、JFH-1 のゲノム RNA が検出され、3 日後には検出限界以下になったのは、感染させたときの HCV が細胞に吸着して残存していたためと考えられ、この細胞クローンでは JFH-1 は増殖しない（しにくい）と考えられる。ただ、JFH-1 感染の場合、コア蛋白質の発現が見られたのに、その RNA が検出出来なかったのもので、今後その理由を説明する必要がある。

## E.結論

新型コロナウイルス武漢株、アルファ型変異、ガンマ型変異ウイルス株に加えて、ベータ型変異ウイルス株 (B. 1. 351, hCoV-19/Japan/TY8-612/2021)、デルタ型変異ウイルス株 (B. 1. 617. 2, hCoV-19/Japan/TY11-927/2021)、オミクロン BA. 1 型 (hCoV-19/Japan/TY38-873/2021)、BA. 2 (hCoV-19/Japan/TY40-385/2022)、BA. 1. 1 (hCoV-19/Japan/TY38-871/2021) のすべての変異ウイルスにおいて血漿分画製剤で用いる 60°C 加熱処理に感受性を有することが示され、仮に感染性を有したウイルスが混入した場合でも製造工程中の加熱処理により安全性が確保されることが示された。また血清中ではウイルスの感染性が低下することが示され、今後血液中から RNA が検出される一方でウイルスが分離されないこととの関連性を検討する。

HCV 陽性ドナー検体由来の HCV を培養細胞で増殖させるために、miR122 RNA と  $\alpha$ -fetoprotein とを高発現する FU97 細胞に、Sec14L2 蛋白質を高発現する培養細胞を作製し、その細胞で、Sec14L2 が高発現し、血漿に対する抵抗性の高いクローン#25, #34 をクローニングすることにより、ゲノム RNA レベルではあるが、今回初めて HCV 感染者由来血漿 (R1-2) の増幅を検出することが出来た。

## F.健康危機情報

なし

## G.研究発表

### (ア) 論文発表

1. Suzuki, R., Matsuda M., Shimoike, T., Watashi, K., Aizaki H., Kato T., Suzuki T., Muramatsu M., Wakita, T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. 2019 *Virology*, 529 226-233.
2. Takagi, H., Oka T., Shimoike, T., Saito, H., Kobayashi, T., Takahashi, T., Tatsumi, C., Kataoka, M., Wang, Q., Saifh, L. J., and Nodai, M. Human sapovirus propagation in human cell lines supplemented with bile acids. 2020 *PNAS*, 117 :32078-32085
3. Moriyama S, Adachi Y, Sato T, Tonouchi K, Sun L, Fukushi S, Yamada S, Kinoshita H, Nojima K, Kanno T, Tobiume M, Ishijima K, Kuroda Y, Park ES, Onodera T, Matsumura T, Takano T, Terahara K, Isogawa M, Nishiyama A, Kawana-Tachikawa A, Shinkai M, Tachikawa N, Nakamura S, Okai T, Okuma K, Matano T, Fujimoto T, Maeda K, Ohnishi M, Wakita T, Suzuki T, Takahashi Y. Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants. *Immunity*10:54(8)1841-1852, 2021
4. Sho Miyamoto, Takeshi Arashiro, Yu Adachi, Saya Moriyama, Hitomi Kinoshita, Takayuki Kanno, Shinji Saito, Harutaka Katano, Shun Iida, Akira Aina, Ryutaro Kotaki, Souichi Yamada, Yudai Kuroda, Tsukasa Yamamoto, Keita Ishijima, Eun-Sil Park, Yusuke Inoue, Yoshihiro Kaku, Minoru Tobiume, Naoko Iwata-Yoshikawa, Nozomi Shiwa-Sudo, Kenzo Tokunaga, Seiya Ozono, Takuya Hemmi, Akira Ueno, Noriko Kishida, Shinji Watanabe, Kiyoko Nojima, Yohei Seki, Takuo Mizukami, Hideki Hasegawa, Hideki Ebihara, Maeda Ken, Shuetsu Fukushi, Yoshimasa Takahashi, Tadaki Suzuki Vaccination-infection interval determines cross-neutralization potency to SARS-CoV-2 Omicron after breakthrough infection by other variants. *Med (N Y.)*2022 Apr8;3(4):249-261
5. Yohei Seki <sup>1</sup>, Yasuo Yoshihara<sup>1</sup>, Kiyoko Nojima<sup>1</sup>, Haruka Momose, Shuetsu Fukushi, <sup>3</sup> Saya Moriyama, <sup>4</sup> Ayumi Wagatsuma, Narumi Numata, Kyohei Sasaki, Tomoyo Kuzuoka, Yoshiyuki Yato, Yoshimasa Takahashi, Ken Maeda, Tadaki Suzuki, Takuo Mizukami,, and Isao

Hamaguchi. 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 (N Y.)* in press , **1: equally contributed**

### (イ) 学会発表

1. Development of in vitro culture system for Parvovirus B19 パルボウイルスB 19のinvitro培養系の開発  
岡田 義昭, 野島 清子 日本ウイルス学会 2021年11月
  2. Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants by SARS-CoV-2 mRNA vaccine (Pfizer/BioNTech) in Japan SARS-CoV-2 mRNA ワクチン (コミナティ筋注®) 接種者血清を用いた SARS-CoV-2変異株 に対する中和能の検討 関洋平, 野島清子, 水上拓郎, 福士秀悦, 森山彩野, 高橋宜聖, 前田健, 鈴木忠樹, 吉原愛雄, 濱口功 日本ウイルス学会 2021年11月
  3. SARS-CoV-2 mRNA ワクチン (コミナティ筋注®) 接種者血清パネルを用いた mRNA ワクチンの有効性・安全性に関する研究 水上 拓郎、野島清子、関 洋平、福士 秀悦、森山 彩野、高橋 宜聖、前田 健、鈴木 忠樹、吉原愛雄、濱口 功, 日本ワクチン学会 2021 年 12 月
- ### H.知的財産権の出願・登録状況

- |          |       |
|----------|-------|
| 1.特許取得   | なし    |
| なし       | 3.その他 |
| 2.実用新案登録 | なし    |

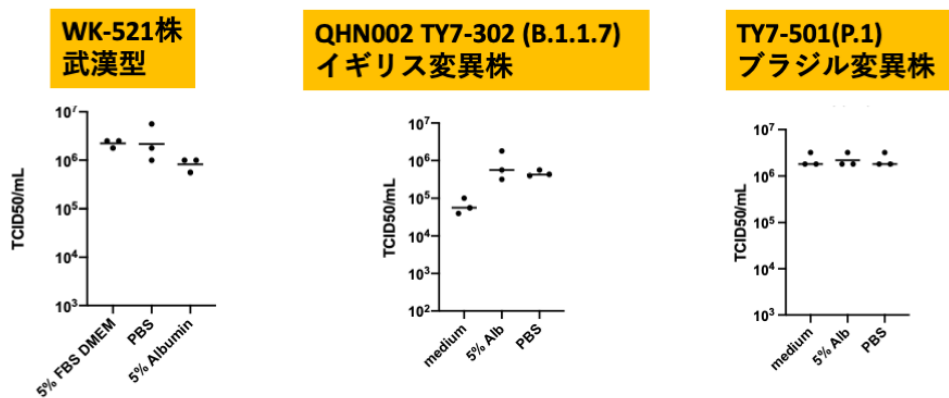


図 1. SARS-CoV-2 ウイルス株の力価 (スパイク直後の感染性の確認)

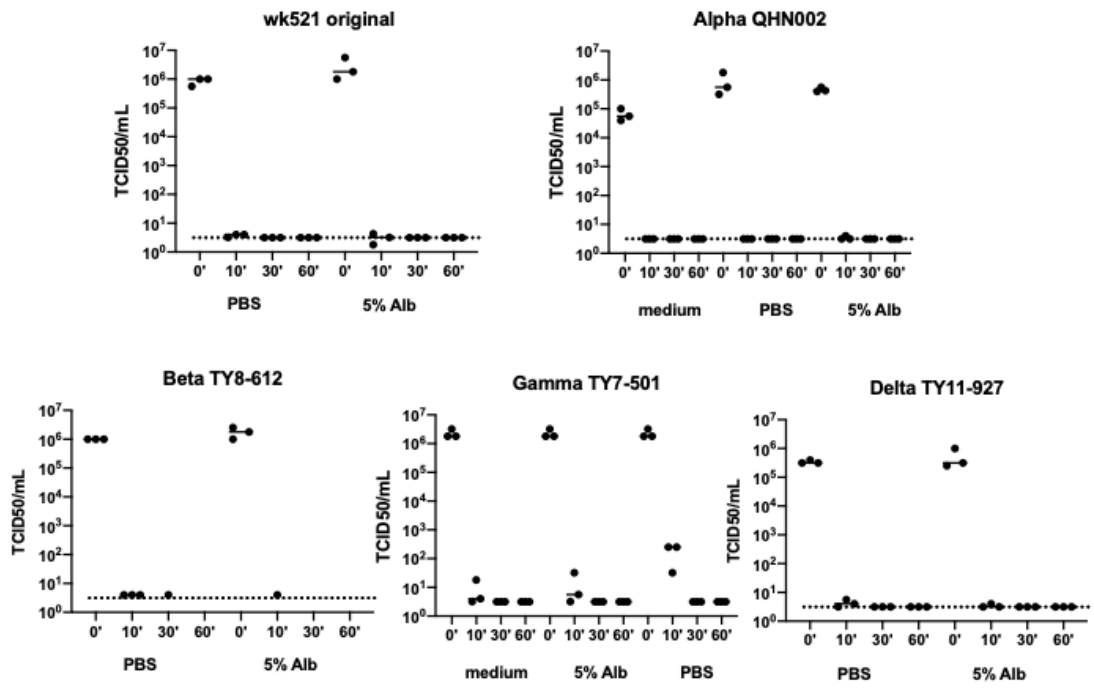


図2 60℃加熱による新型コロナウイルスの不活化

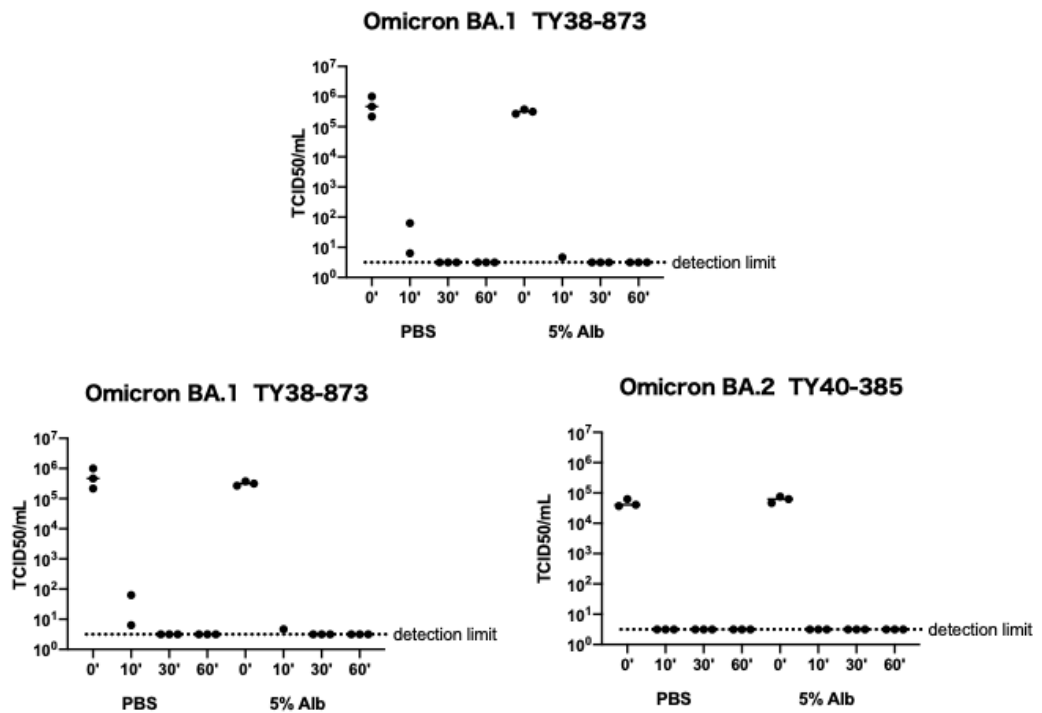


図3 60℃加熱による新型コロナウイルスオミクロン株の不活化

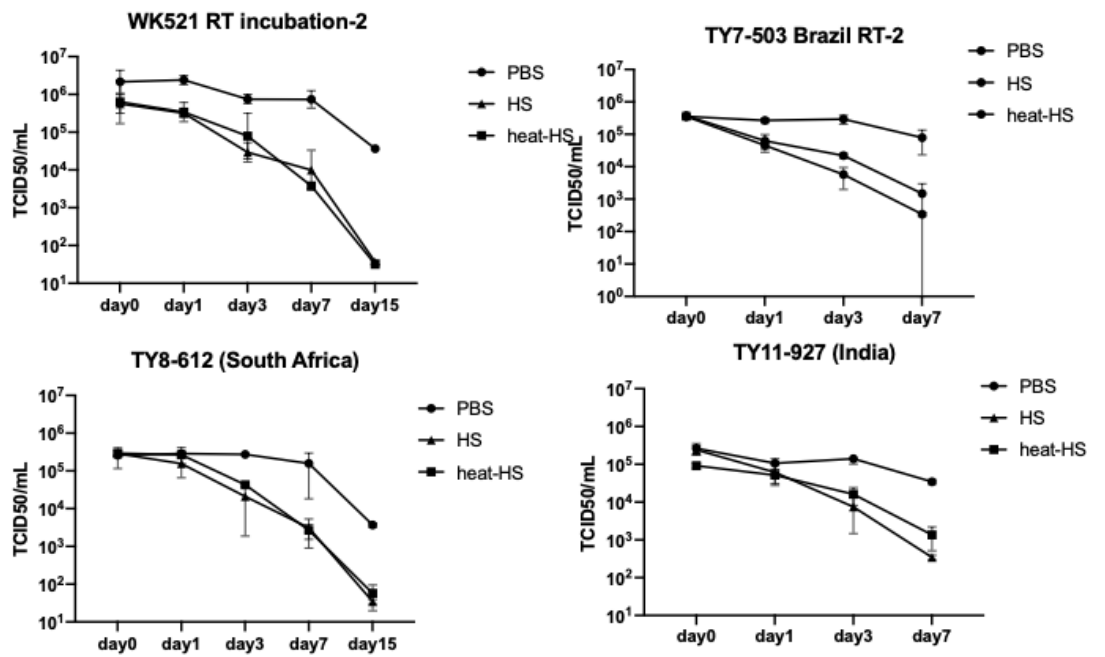


図4 新型コロナウイルスの血清存在下での安定性

**FU97-sec14L2 #25, #34クローン細胞でのSec14L2の発現**

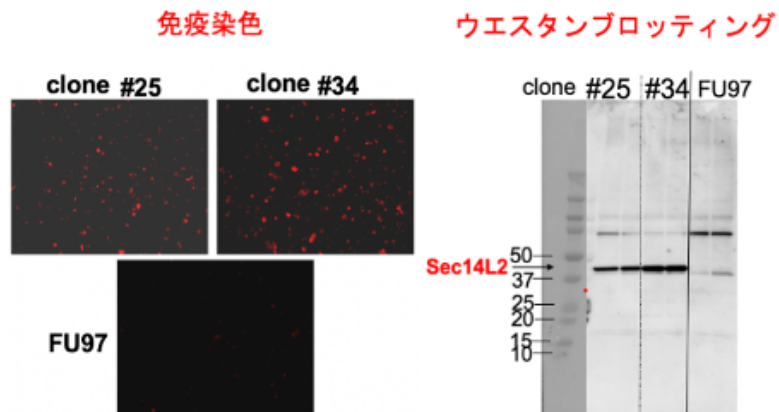


図5 FU97-sec14L2 #25, #34クローン細胞でのSec14L2の発現

**FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅**

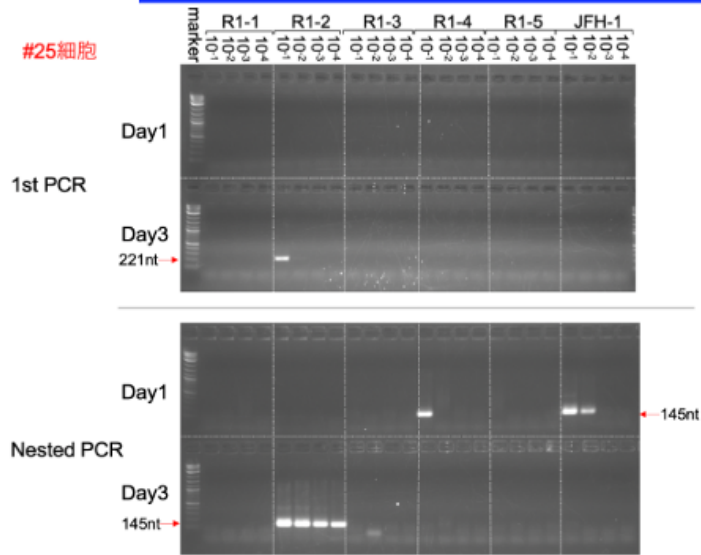


図6-1 FU97-sec14L2 #25細胞での患者由来HCVの増幅

**FU97-sec14L2 #34細胞での患者由来HCVの増幅**

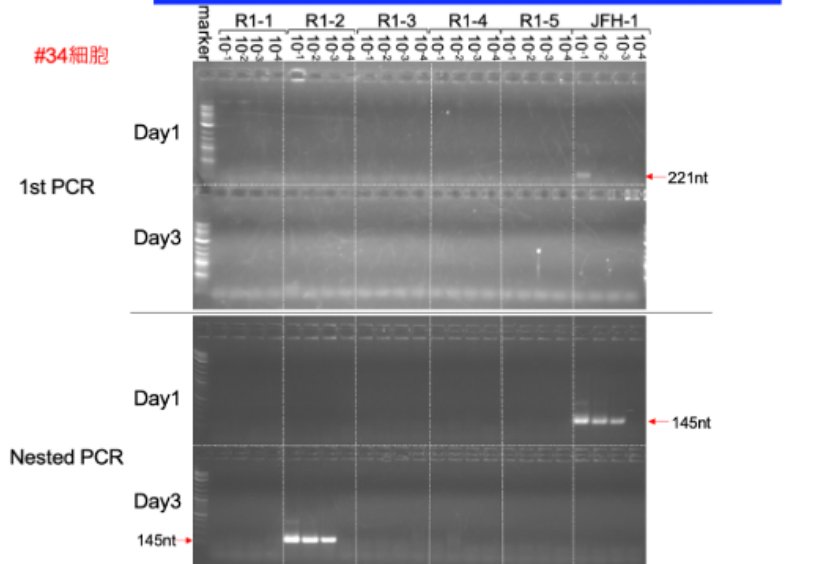


図6-2 FU97-sec14L2 #34細胞での患者由来HCVの増幅