

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、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。本年度の研究では、昨年度の武漢株、アルファ型、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)を加えて血漿分画製剤で用いる60℃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。

A. 目的

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。

本年度の研究では、昨年度の武漢株、アルファ型、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) 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。

B 研究方法

B-1 ウイルス調整および細胞

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°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。

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 (1×10^4 個 /100uL/well) に、希釈したウイルス液を 100uL ずつ添加し、37°C 5%CO₂ 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 :TCID₅₀/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>。

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

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 TCID₅₀/mL) (図 1, 図 2)。

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によって依存していた。い

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 3)。

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、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°C10 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。

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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

(ア) 論文発表

1. 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

2. 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

3. Yohei Seki¹, Yasuo Yoshihara¹, Kiyoko Nojima¹, Haruka Momose, Shuetsu Fukushi,³ Saya Moriyama, 4 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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

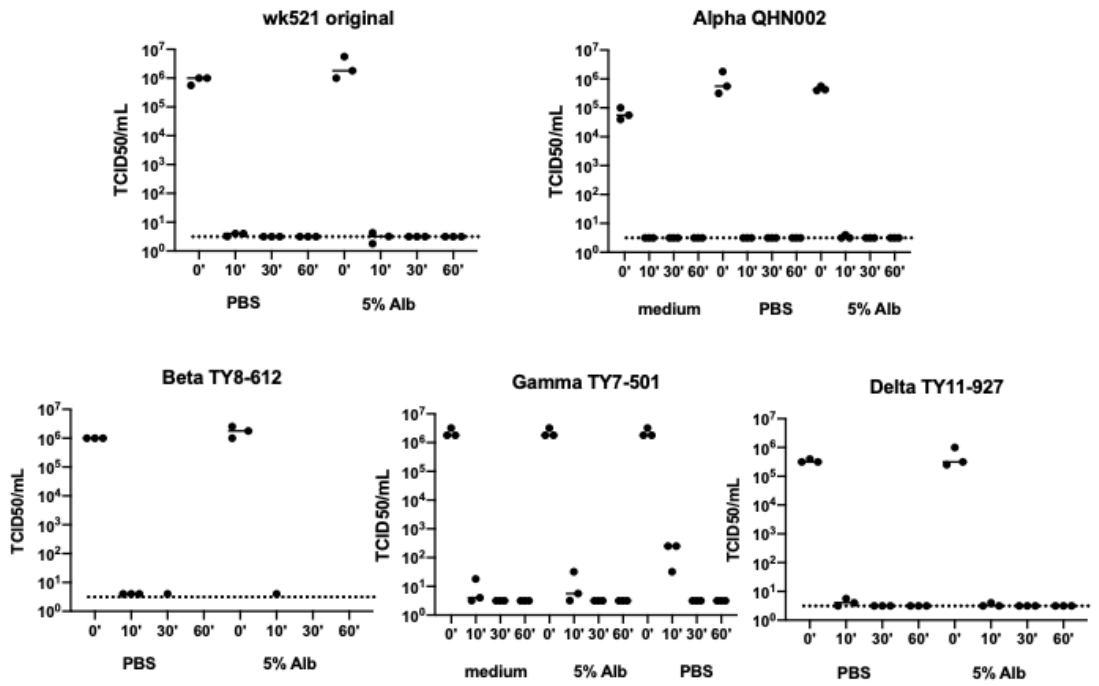


図1 60°C加熱による新型コロナウイルスの不活化

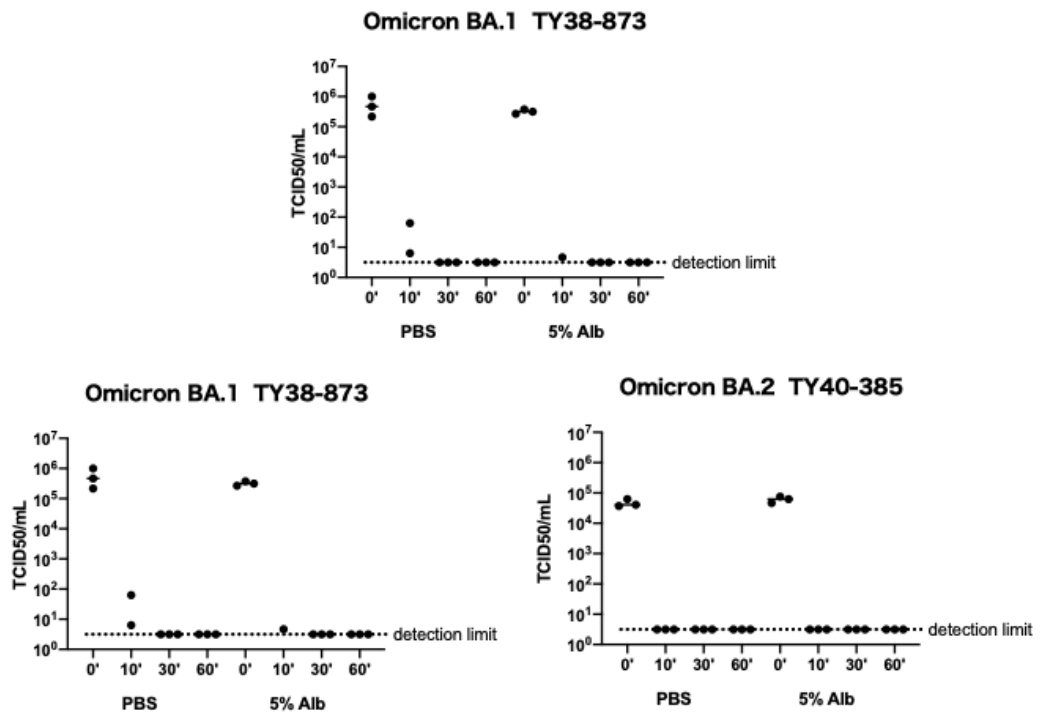


図2 60°C加熱による新型コロナウイルスオミクロン株の不活化

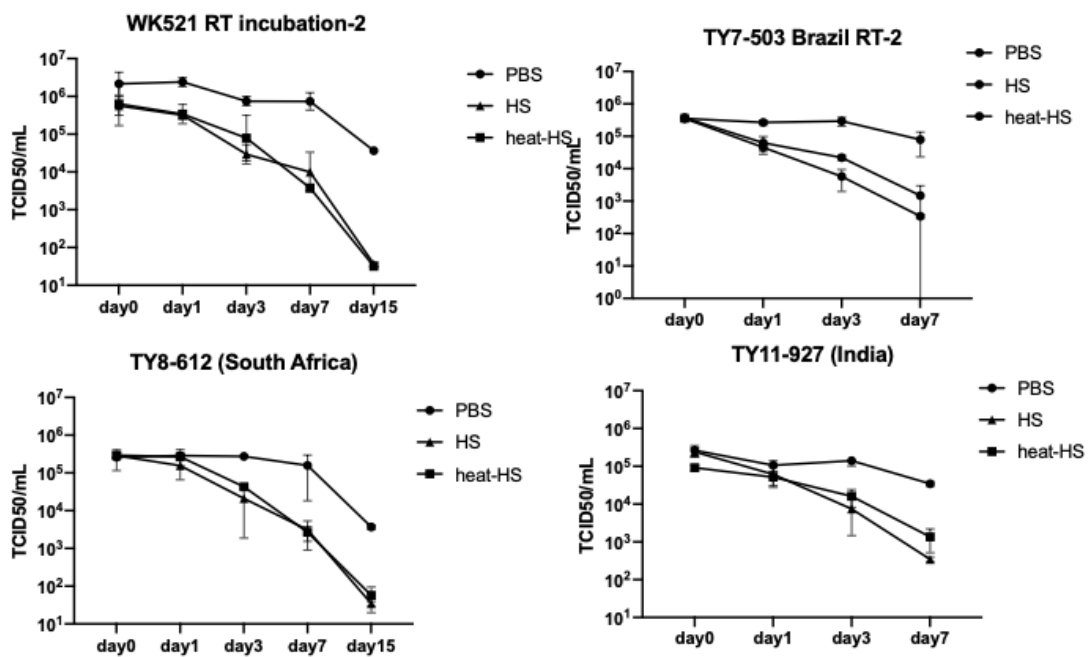


図3 新型コロナウイルスの血清存在下での安定性