HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒトパルボウイルスB19およびE型肝炎ウイルスによる輸血感染のリスク低減化および献血者における感染実態の解明に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	坂田, 秀勝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第7022号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65278
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Hidekatsu_Sakata_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　　氏　名　　坂田　秀勝

学 位 論 文 題 名

ヒトパルボウイルス B19 および E 型肝炎ウイルスによる輸血感染のリスク低減化
および献血者における感染実態の解明に関する研究

献血者から得られた血液は、血清学的検査および核酸増幅検査の各種感染症検査を経て、「輸血用血液製剤」、または「血漿分画製剤」用原料血漿となる。各種感染症に対する検査法の開発および検査精度の向上がこれまで血液の安全性に大きく貢献してきた。

ヒトパルボウイルス B19（B19V）は、小児の伝染性紅斑の原因ウイルスとして広く知られており、更に免疫不全患者や妊婦などに感染した場合には、造血不全や胎児水腫を引き起こすことも報告されている。B19V の主な感染経路は飛沫感染であり、日本ではほぼ 4〜6 年ごとに伝染性紅斑の流行がみられる。B19V 感染者ではウイルス血症を呈するため、献血によって輸血用血液や血漿分画製剤用原料に B19V が混入する可能性がある。また B19V はノンエンベロープウイルスで有機溶剤／界面活性剤処理等の不活化技術に抵抗性を示すため、血漿分画製剤原料に大量に混入すると除去や不活化が困難であり、感染リスクが増加する。2009 年、米国 FDA はすべての分画血漿プール中の B19V 混入量が 4 log IU/mL 未満であること、さらに新たに 3 種類（1 型、2 型および 3 型）に分類された B19V 遺伝子型を分画製剤製造工程検査ですべて検出できるよう勧告した。

E 型肝炎は、E 型肝炎ウイルス（HEV）によって引き起こされる肝炎であり、日本では HEV に感染したシカの生肉を摂取したことにより E 型急性肝炎を発症した事例が報告されている。その他にもイノシシやブタの生肉を食べたことによって感染したと考えられる症例も報告され、現在、「食物感染」は国内の E 型肝炎発症例の主要な感染経路と考えられている。また、北海道では 2002 年と 2004 年に輸血後 E 型肝炎発症例を確認したが、HEV の疫学的背景や感染経路等は未だ不明な部分が多い。

本研究では、輸血による感染リスクを有する B19V および HEV に着目し、B19V に関しては輸血感染のリスク低減化を目的とした新規高感度検出系を構築および製造し、多数検体スクリーニングにより評価した。さらに北海道陽性献血者由来 B19V の系統樹解析を行った。HEV に関しては、全国的な献血者の感染実態を調査し、疫学的解析を行った。

第 1 章では、B19V 輸血感染のリスク低減化対策とその効果、さらに B19V 陽性献血者由来の B19V 株の分子系統樹解析を行い、疫学的背景について論述した。献血者における B19V 抗原検査の必要性が高まったため、まず B19V レセプター（グロボシド）を介して B19V と赤血球が凝集する性質を利用した簡便で安価な Receptor-mediated Hemagglutination Assay（RHA）試薬を作製し、これを用いた B19V 抗原検査を導入した。733,306 例の北海道献血者検体について RHA 試薬を用いて調べた結果、106 例（0.01%）で B19V が検出された。RHA の導入に伴い 1 バッチ当たりおよそ 5,000〜10,000 バッグから構成される分画原料血漿プールの各ロット中の B19V の混入量は明らかに減少した。しかし、RHA による検査では FDA の基準を満たす結果は得られなかったため、2008 年からはさらに高感度の化学発光酵素免疫測定法（Chemiluminescence Enzyme Immune Assay, CLEIA）による B19V 抗原検査（CLEIA-B19）を導入し、検証した。その結果、CLEIA-B19 導入前後の分画血漿プール中の B19V 混入量は、導入後のすべてのバッチが

FDA の基準である 4 log IU/mL 未満であった。さらに 1〜3 型のすべての WHO B19V genotype パネルを用いて、CLEIA-B19 が遺伝子型に関わらずほぼ同等な感度・特異性で検出可能であることも併せて示した。また、B19V ゲノムの可変領域である NS1-VP1u junction 部分の約 700 塩基をターゲットとして、遺伝子型解析用にユニバーサルなプライマーセットをデザインし、B19V 陽性献血者由来 198 株の遺伝子配列を解析した。Neighbor-joining 法による分子系統樹から遺伝子型を決定した結果、北海道内の献血者では 1 型のみが流行していた。また 1 型の各株をさらに大きく 3 つのグループに分類した（サブグループ A、B および C とした）結果、サブグループ A は 1990 年代の終わり以降ほぼ検出されなくなり、現在はサブグループ B が感染循環していることが示唆された。また 2007 年と 2011 年の流行期に献血者から得られた株は、どちらもサブグループ B に属していたが、異なるクラスターを形成していた。過去の北海道内における B19V の流行は 1 型によるものであるが、その感染株はわずかに変異しながら感染循環していることを示した。

第 2 章では、全国の肝機能（ALT）高値献血者を対象に、各種 HEV マーカーを指標として HEV 感染実態について論じた。2003 年 4 月から 1 年間、ALT 高値（200 IU/L 以上）献血者検体 1,389 例（年齢 32±11、男女比 5.5:1）について HEV RNA と抗 HEV 抗体（IgM, IgG）を検査した。各マーカーの全国の陽性率は HEV RNA: l.1%、IgM: l.0%、IgG: 3.2%であったが、地域別にみると、HEV RNA の陽性率は「東高西低」の傾向を認め、北海道が最も高く 4.6%であった。以上の調査から、HEV 感染者は全国各地に存在するものの、北海道を含む東側の地域では HEV 感染が頻発している事が示唆された。また、HEV RNA 陽性例は男性優位で、3 型が多かった。一方、既往感染を示す IgG クラスの抗体保有者は加齢とともに上昇し、過去にも HEV 感染が起きていたことが示唆された。検出された HEV ゲノムについては ORF2 領域の 412 塩基での系統解析を行った結果、国内のブタまたは市販ブタレバー由来の HEV 株と高い類似性を示した。総務省統計局調査より、東日本では豚肉の消費量が牛肉より高く、HEV の感染経路として経口感染が疑わしいことから、食肉の流通や食肉文化の差が、HEV 陽性率の「東高西低」の一因である可能性が示唆された。

本研究において、新規に B19V 抗原検出系を構築、製造し、献血血液スクリーニング検査に導入した。その結果、献血者集団に含まれる B19V 陽性例を約 0.01%の頻度で検出し、除外することで、輸血用血液製剤および血漿分画製剤の安全性を高めた。さらに CLEIA-B19 が分画製剤原料血漿における FDA の B19V に関する品質基準を満たす代替法となり得ることも示した。北海道における B19V の主な遺伝子型は 1 型であるが、将来的に 2 型、3 型が輸入感染症として侵入してくる可能性を考慮し、すべての遺伝子型を検出できる CLEIA-B19 検査の構築は意義の大きいことである。HEV については、献血者における HEV の感染実態を調査し、国内での HEV 感染が、過去においても発生しており、3 型を中心に全国的に「東高西低」で蔓延していることを明らかにした。また、一部の感染者はブタの内臓肉の摂取により感染した可能性を示した。今後も未知の HEV 感染経路の解明や感染動向に注目していく必要がある。