

## 感染症安全対策体制整備事業（平成30年度）実績報告

事業代表者 浜口 功 国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長

報告者 倉光 球 国立感染症研究所血液・安全性研究部 主任研究官

## 1. 事業の目的

輸血用血液製剤を含む血液製剤は、ヒト血液を原料とするためウイルス等の病原体混入のリスクが存在する。本邦では血液製剤の安全性確保のため高感度なスクリーニング検査が行われ、HBV, HCV, HIV 等に対する安全性は極めて高いレベルで管理されている。しかしながら、グローバル化が進む現代では、国内に存在しなかったその他の病原体の輸入例、国内発生例が増加し、例えば平成26年8月には約70年ぶりのデング熱の国内発生例が確認された。また海外では、平成27年から南米やアメリカのフロリダ州でジカ熱が大流行し、また同時期にアフリカや南米で黄熱の大流行が発生している。アフリカの黄熱は過去20年における最大のアウトブレイクとなり、平成28年3月には中国でアジア初の輸入症例が報告された。

このような世界の一部の地域に限局的に発生していた感染症の病原体の日本への移入を想定し、平成25年度より新たな病原体の国内移入に備え、実効性の高い対策として厚生労働省血液対策課、日本赤十字社との連携のもと感染症リスク管理体制の整備を行ってきた。本事業では国内に侵入し日本の献血血液への混入のリスクのある病原体について、血中ウイルス量の低い無症候感染者が献血する場合を想定し、高感度の核酸検査法を整備し、将来的な血液の安全性対策に資することを目的とする。平成30年度は黄熱ウイルス核酸検査系の開発と共に新たなリスクの早期把握と評価を実施した。

## 2. 実施内容

## (1) 黄熱ウイルス高感度核酸検査法の開発

## (2) 献血で検査落ちとなった血液検体におけるデングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス、及び黄熱ウイルス核酸検査の実施

## (3) 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

(1) 黄熱ウイルス高感度核酸検査法の開発

これまで本事業において、デングウイルス1~4型、チクングニアウイルス、ジカウイルスの高感度核酸検査法の開発、及びその一部のウイルスのマルチプレックスPCR化を行った。平成30年度は、アフリカや南米でアウトブレイクが発生している黄熱の対策として、黄熱ウイルス(Yellow fever virus, YFV)が血液に微量に混入した場合を想定し、このウイルスに対する高感度核酸検査法の開発を進めた。

1-1) 高感度 primer のスクリーニング方法の検討：YFV の遺伝子型(genotype)は7種類存在し、相互の遺伝的相同性は低く (Identity 78%)、1セットの primer-probe セットで全 genotype の検出は困難と考えた。Genotype 間で比較的相同性の高いグループ (Identity 84%~95%) をまとめ、3グループ (グループ1：West Africa I/II, グループ2：South America I/II, 及びグループ3：East Africa/East-Central Africa/Angola) に分け、それぞれの高感度法を構築し、

合計 3 セットの高感度法を組み合わせることにした。

#### 1-2) グループ 1 のスクリーニング用の鋳型 RNA 合成 :

グループ 1 について、ワクチン株(17D)、JX898869 株を選択した。ワクチン株(17D)のウイルスゲノム RNA は、国立感染症研究所ウイルス第一部より供与された。JX898869 株は、全長を 5 断片化して人工遺伝子合成した DNA から PCR の鋳型 RNA を *in vitro* 転写した。

#### 1-3) Primer 及び probe のスクリーニング :

533 セットの forward primer と reverse primer を設計し、登録配列のアライメント上で相同性が高い 139 セットを primer 合成した。SYBR Green 系の RT-qPCR キットで極めて増幅効率の良い primer セットをスクリーニングしたところ、19 セットを得た。これらのセットの増幅遺伝子領域に TaqMan probe を設計し、TaqMan RT-qPCR キットで PCR の増幅効率を指標にスクリーニングした。その結果、9 セットが高感度検査法として使用可能であると考えられた (図 1)。よって 139 primer セットから 9 セットの高感度 Primer-probe 候補を同定することができた (図 2)。

1-4) YFV 核酸検査法の感度確認: YFV の WHO 国際標準品 (NIBSC コード:99/616, 17D-204 株, 104.5 IU/ml、注: この国際単位 (IU) はプラーク形成能 (Plaque forming unit, PFU) 由来でコピー数ではない。) を用いて、100 IU/ml~0.1 IU/ml までヒト陰性血漿 (日本赤十字社譲渡血液) で希釈系列から抽出した RNA を用いて、同定した 9 セットのうち、特に増幅効率の良い YFV-B,E,I の 3 セットの感度確認を行った。その結果、3 セット全て 0.1 IU/ml を検出できた (図 3)。また、ヒト末梢血細胞のゲノム DNA, ヒト血漿 RNA, キャリアの polyA RNA では非特異反応は無かった。

1-5) YFV-B について: 高感度核酸検査 primer-probe 9 セットのうち、YFV-B の塩基配列は、アライメント上で 1 genotype 以外は、極めて相同性が高かったことから、YFV-B は広範囲の genotype の YFV 株を高感度に検出できる可能性あると考えられた。

### (2) 献血で検査落ちとなった血液検体におけるデングウイルス、チクングニアウイルス及びジカウイルス核酸検査の実施

日本赤十字社の協力のもと、平成 30 年度 (6 月以降) に関東圏内で収集された献血血液のうち、検査落ちとなった血漿の 20 人プール 100 検体 (合計 2,000 人分) を得た。これらの検体について、デングウイルス 1~4 型、チクングニアウイルス/ジカウイルス、黄熱ウイルスの核酸が検出されるか否かを検討した結果、全ての検体において、いずれのウイルス核酸も検出されず、すべて陰性と判定された (図 4)。また、陽性コントロール検体は全て陽性、陰性コントロール検体 (希釈に用いた健常者由来血漿) は全て陰性を示したことから、検出系として問題無く機能していたことも確認された。

### (3) 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

WHO の血液安全に関するカンファレンスに定期的に参加するとともに、各国の血液行政に携わるネットワーク会議 (Blood Regulators Network) に加盟し活動することにより、感染症リスクの早期察知及び評価に基づく安全対策の検討を行った。また、国立感染症研究所の病原体関連部署と連携し、情報の収集や交換を行った。

### 3. 考察と課題

平成 30 年度は、南米やアフリカで大流行している黄熱の病原体 YFV について、血液に微量に混入した場合を想定し、YFV 高感度核酸検査法の開発、整備を進めた。3 グループのうち、West Africa I/II グループに設計し合成した 139 セットの primer セットから最終的に 9 セットの TaqMan primer-probe 候補を同定でき、そのうちの 3 セット(B,E,I)は 0.1 IU/ml まで検出可能であった。しかしながら、YFV 国際標準品の IU は PFU を元に設定され、コピー数ではないことから、YFV の IU と実際の遺伝子コピー数の間には、ある程度の大きな乖離があると考えられるため、今後は人工合成した RNA 等を準備し、絶対値に近いコピー数で 100 コピー/ml 以下の検出感度を確認する必要がある。

また、YFV の遺伝子型は 7 genotype あり、当初は相同性の解析から 3 グループ 3 セットの高感度 primer-probe を同定する必要があると考えられたが、最初の West Africa I/II グループのスクリーニングにおいて、6 genotype を高感度検出できる可能性が高い 1 セットを同定できた。この候補については、残り 1 genotype 含めて感度を確認する必要があるが、極めて優れた検査法を構築できた可能性があり、今後期待できる。

また、これまでに確立した核酸検査系を用いて、日本赤十字社の協力の下、検査落ちとなった献血血液を用いて各ウイルスのスクリーニングを実施した。その結果、検査を行った 2,000 人分の血液においてデングウイルス、チクングニアウイルス及びジカウイルスは全て陰性であった。これらのウイルスの国内でのアウトブレイクは起こっていないが、実際に献血された血液を用いてモニタリングを実施して、陰性を確認するとともに、偽陽性等の不具合が発生しないことを確認する等の、検出システムの確認を継続出来ていることには意義があると考えられる。これらの病原体が国内に移入した際の血液の安全性確保の緊急対策法として有用な手法の 1 つであることが示唆された。

### 4. 結論

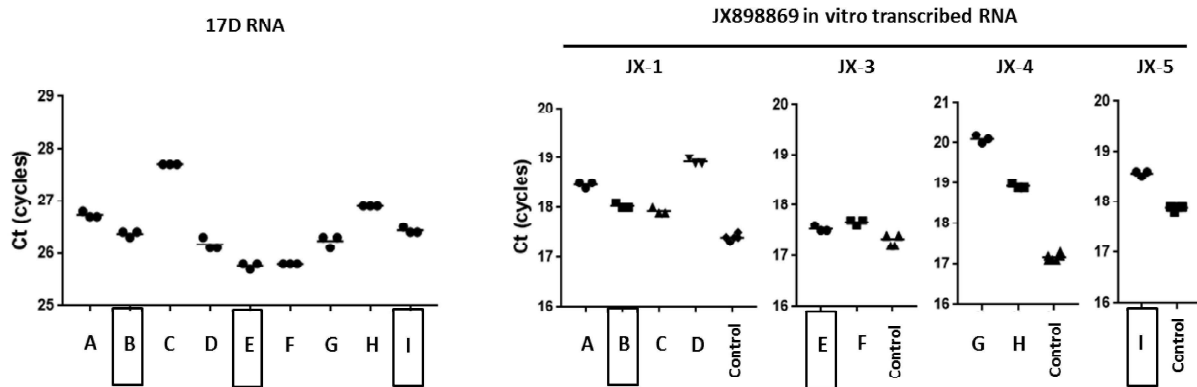
本事業では、血液を介して感染し得る病原体に関する情報を継続して収集し、日本にリスクのある病原体については高感度核酸検査法を開発して小規模モニタリングを継続しており、我が国への感染症リスクの早期察知およびアウトブレイクに備えた体制整備に貢献している。

### 5. 本年度（令和元年度）実施予定内容

- (1) 黄熱ウイルスに対する高感度核酸検査法の開発（全遺伝子型の検出確認）
- (2) チクングニアウイルス、ジカウイルス、黄熱ウイルスの各ウイルスの高感度核酸検査法のマルチプレックス化
- (3) 検査落ちとなった献血血液検体を用いた核酸検査の実施
- (4) 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

以上

図1 YFV高感度核酸検査法候補の9セットの増幅効率



合成した19セットの内、高効率のPCR増幅を示した9セットを選択した。この内、YFV-B,E,I(枠)を国際標準品を使った検出感度の検討に使用した。

図2 YFV高感度核酸検査法 スクリーニングの要約

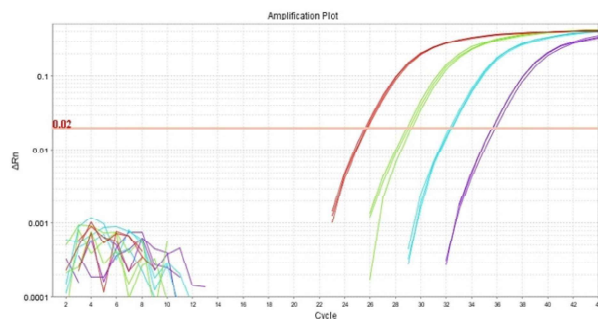
設計(セット)	Primer 合成	Probe 合成	高感度同定
533	139	19	9

図3A. YFV国際標準品 検出感度の確認 (3測定中の陽性well数)

Titer/mL	YFV-B	YFV-E	YFV-I
100IU	3/3	3/3	3/3
30IU	3/3	3/3	3/3
10IU	3/3	3/3	3/3
3IU	3/3	3/3	3/3
1IU	3/3	3/3	3/3
0.3IU	3/3	3/3	3/3
0.1IU	3/3	3/3	3/3
N.C.	0/3	0/3	0/3

N.C.: Negative control. Normal human plasma RNA

B. YFV-Bの増幅曲線



左から100, 10, 1, 0.1 IU/mlの増幅曲線を示す。

図4 献血で検査落ちとなった20人プール血漿100検体 (計2,000人分) のデングウイルス(DENV-1~4)、チクングニアウイルス(CHIKV)、ジカウイルス(ZIKV)、及び黄熱ウイルス(YFV)の核酸検査の結果

Pool ID	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	CHIKV	ZIKV	YFV	Pool ID	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	CHIKV	ZIKV	YFV
001	-	-	-	-	-	-	-	061	-	-	-	-	-	-	-
002	-	-	-	-	-	-	-	062	-	-	-	-	-	-	-
003	-	-	-	-	-	-	-	063	-	-	-	-	-	-	-
004	-	-	-	-	-	-	-	064	-	-	-	-	-	-	-
005	-	-	-	-	-	-	-	065	-	-	-	-	-	-	-
006	-	-	-	-	-	-	-	066	-	-	-	-	-	-	-
007	-	-	-	-	-	-	-	067	-	-	-	-	-	-	-
008	-	-	-	-	-	-	-	068	-	-	-	-	-	-	-
009	-	-	-	-	-	-	-	069	-	-	-	-	-	-	-
010	-	-	-	-	-	-	-	070	-	-	-	-	-	-	-
011	-	-	-	-	-	-	-	071	-	-	-	-	-	-	-
012	-	-	-	-	-	-	-	072	-	-	-	-	-	-	-
013	-	-	-	-	-	-	-	073	-	-	-	-	-	-	-
014	-	-	-	-	-	-	-	074	-	-	-	-	-	-	-
015	-	-	-	-	-	-	-	075	-	-	-	-	-	-	-
016	-	-	-	-	-	-	-	076	-	-	-	-	-	-	-
017	-	-	-	-	-	-	-	077	-	-	-	-	-	-	-
018	-	-	-	-	-	-	-	078	-	-	-	-	-	-	-
019	-	-	-	-	-	-	-	079	-	-	-	-	-	-	-
020	-	-	-	-	-	-	-	080	-	-	-	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-	-	-	-
021	-	-	-	-	-	-	-	081	-	-	-	-	-	-	-
022	-	-	-	-	-	-	-	082	-	-	-	-	-	-	-
023	-	-	-	-	-	-	-	083	-	-	-	-	-	-	-
024	-	-	-	-	-	-	-	084	-	-	-	-	-	-	-
025	-	-	-	-	-	-	-	085	-	-	-	-	-	-	-
026	-	-	-	-	-	-	-	086	-	-	-	-	-	-	-
027	-	-	-	-	-	-	-	087	-	-	-	-	-	-	-
028	-	-	-	-	-	-	-	088	-	-	-	-	-	-	-
029	-	-	-	-	-	-	-	089	-	-	-	-	-	-	-
030	-	-	-	-	-	-	-	090	-	-	-	-	-	-	-
031	-	-	-	-	-	-	-	091	-	-	-	-	-	-	-
032	-	-	-	-	-	-	-	092	-	-	-	-	-	-	-
033	-	-	-	-	-	-	-	093	-	-	-	-	-	-	-
034	-	-	-	-	-	-	-	094	-	-	-	-	-	-	-
035	-	-	-	-	-	-	-	095	-	-	-	-	-	-	-
036	-	-	-	-	-	-	-	096	-	-	-	-	-	-	-
037	-	-	-	-	-	-	-	097	-	-	-	-	-	-	-
038	-	-	-	-	-	-	-	098	-	-	-	-	-	-	-
039	-	-	-	-	-	-	-	099	-	-	-	-	-	-	-
040	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-	-	-	-
041	-	-	-	-	-	-	-								
042	-	-	-	-	-	-	-								
043	-	-	-	-	-	-	-								
044	-	-	-	-	-	-	-								
045	-	-	-	-	-	-	-								
046	-	-	-	-	-	-	-								
047	-	-	-	-	-	-	-								
048	-	-	-	-	-	-	-								
049	-	-	-	-	-	-	-								
050	-	-	-	-	-	-	-								
051	-	-	-	-	-	-	-								
052	-	-	-	-	-	-	-								
053	-	-	-	-	-	-	-								
054	-	-	-	-	-	-	-								
055	-	-	-	-	-	-	-								
056	-	-	-	-	-	-	-								
057	-	-	-	-	-	-	-								
058	-	-	-	-	-	-	-								
059	-	-	-	-	-	-	-								
060	-	-	-	-	-	-	-								
Positive	+	+	+	+	+	+	+								
Negative	-	-	-	-	-	-	-								