

## 感染症安全対策体制整備事業（令和元年度）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 大隈 和 国立感染症研究所血液・安全性研究部 室長

### 1. 事業の目的

日本では、血液製剤の安全性確保のため、献血ドナーに対して様々な病原体に対する血清学的検査および核酸増幅検査が実施されており、これらの病原体に対する安全性は極めて高い。しかしながら、近年世界各国で新興感染症の報告が後を絶たず、海外への渡航者及び日本への渡航者などを介して、本来は国内に存在しなかった病原体が輸入感染症として侵入するリスクがあり、新興感染症の本邦での定着および献血血液への混入が危惧されている。令和元年の年末には中国武漢で新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が報告され、短期間のうちに本邦を含め全世界に広がった。これまでもジカ熱、デング熱、チクングニア熱、ウエストナイル熱、黄熱など、世界でアウトブレイクした新たな感染症についても今後日本に移入されることが想定され、血液の安全性確保のために迅速かつ的確な対応が求められる。

そこで、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性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。令和元年度は、これまでに本事業で開発したチクングニアウイルス、ジカウイルス、黄熱ウイルスの3種類のウイルスを一度に検出できるマルチプレックス高感度核酸検出系を開発し、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) これまでに本事業で開発したチクングニアウイルス、ジカウイルス、黄熱ウイルスの3種類のウイルスを一度に検出できるマルチプレックス高感度核酸検出系の開発
- (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) チクングニアウイルス・ジカウイルス・黄熱ウイルスの3ウイルス同時検出高感度核酸検査法の開発

これまで本事業において、チクングニアウイルス、ジカウイルス、黄熱ウイルスの高感度核酸検査法を開発してきた。令和元年度は、それぞれのウイルスに至適化したプライマー、プローブ配列を用いて、オリゴDNA濃度や標識色素を至適化することにより、チクングニアウイルス・ジカウイルス・黄熱ウイルスの3ウイルスを検出するマルチプレックスPCR法による高感度核酸検出系(CHIKV/ZIKV/YFV 3-plex)を開発した。

#### 1-1) 国際標準品の核酸量の評価

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検査用に国際標準品が制定されて

いるが、それぞれの国際標準品であるチクングニアウイルス国際標準品 R91064 株 ( $2.5 \times 10^6$  国際単位/mL)、ジカウイルス国際標準品 PF13/251013-18 株 ( $5 \times 10^7$  国際単位/mL)、黄熱ウイルス国際標準品 17D-204 株 ( $3.16 \times 10^4$  国際単位/mL) の 1 国際単位 (IU) がおよそ何コピーのウイルス RNA 量に相当するかについて情報が公開されていない。そこで、マルチプレックス核酸検出系を開発するに当たり、NAT ガイドラインで求められる 100 IU/mL がどの程度の核酸量に相当するのか検討した。それぞれのウイルスについての増幅配列に対して人工 ssRNA を合成して核酸量を決定し、定量 PCR の標準品として用いて、各ウイルスの国際標準品希釈液を定量した。マルチプレックス PCR の反応は、 $50^\circ\text{C}$ 20 分、 $95^\circ\text{C}$ 15 分、 $94^\circ\text{C}$ 45 秒→ $60^\circ\text{C}$ 45 秒を 45 サイクルとした。

その結果、チクングニアウイルス国際標準品 R91064 株の 1 IU は 8.54 コピー、ジカウイルス国際標準品 PF13/251013-18 株の 1 IU は 0.84 コピー、黄熱ウイルス国際標準品 17D-204 株の 1 IU は 6436.4 コピーに相当した。

### 1-2) マルチプレックス核酸検出系の検出感度の評価

各ウイルスの増幅配列に対して人工 ssRNA を合成して核酸濃度を決定した後、1 反応あたり 100, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 コピーとなるように希釈し、マルチプレックス核酸検出系とこれまでに各ウイルスに対して開発した核酸検出系 (シングルプレックス) とで、各核酸量における検出率を 8 重測定法で比較した。反応は  $20 \mu\text{L}$  の系で実施した。

チクングニアウイルスについては、CHIKV-シングルプレックスとマルチプレックスの検出感度はほぼ同等であり、5 コピー/反応以上 (100, 20, 10, 5 コピー/反応) の検出率はともに全て 100% であった。より低濃度の 2.5 および 1.25 コピー/反応において、CHIKV-シングルプレックスの検出率は 63%、13% であり、マルチプレックスでは検出しなかった。

ジカウイルスについては、ZIKV-シングルプレックスとマルチプレックスの検出感度はほぼ同等であり、5 コピー/反応以上 (100, 20, 10, 5 コピー/反応) の検出率はともに全て 100% であった。より低濃度の 2.5 および 1.25 コピー/反応において、ZIKV-シングルプレックスの検出率は 88%、13% であり、マルチプレックスはそれぞれ 63%、0% であった。

黄熱ウイルスについては、YFV-シングルプレックスとマルチプレックスの検出感度はほぼ同等であり、5 コピー/反応以上 (100, 20, 10, 5 コピー/反応) の検出率はともに全て 100% であった。より低濃度の 2.5 および 1.25 コピー/反応において、YFV-シングルプレックスの検出率は 88%、50% であり、マルチプレックスはそれぞれ 75%、0% であった。

### 1-3) マルチプレックス核酸検出系の特異性の評価

各種ウイルス核酸、及びヒト末梢血由来 DNA 3 ロット、ヒト血漿由来 RNA 3 ロットについて、マルチプレックスの交差反応性について確認し、シングルプレックスで検出した場合と Ct 値を比較した (表 1)。マルチプレックスはデングウイルスの 4 種の血清型 (DENV-1~4)、日本脳炎ウイルス (JEV)、ウエストナイルウイルス (WNV)、ヒト末梢血由来 DNA、ヒト血漿由来 RNA とは非特異的な交差反応を示さなかった。また、マルチプレックスは標的とする 3 種類のウイルスと特異的に反応し、CHIKV-シングルプレックス、ZIKV-シングルプレックス、YFV-シングルプレックスと同等の Ct 値を示し  $\Delta\text{Ct}$  は 0.09-0.34 までの範囲であった。

## (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、ジカウイルス、及び黄熱ウイルス核酸検査の実施

日本赤十字社の協力のもと、令和元年度(6月以降)に関東圏内で収集された献血血液のうち、検査落ちした血漿の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。デングウイルスは、これまでと同様に1～3型の血清型について同時に検出するマルチプレックス検出系、および4型を特異的に検出する検出系を組み合わせた。チクングニアウイルス、ジカウイルス、黄熱ウイルスについては、令和元年度新たに開発したマルチプレックス核酸検出系 CHIKV/ZIKV/YFV 3-plex で評価した。20人プール100検体については、血漿1 mL から RNA を抽出して 90  $\mu$ L に溶出し、そのうち 22  $\mu$ L を用いて 50  $\mu$ L の系でリアルタイム PCR を行った。DENV1～4 の陽性コントロールは、自家標準品(1.140～8.103 $\times 10^6$  コピー/mL)を健常人プール血漿で 100 コピー/mL に希釈したものをを用いた。マルチプレックス核酸検出系の陽性コントロールはチクングニアウイルス国際標準品 R91064 株、ジカウイルス国際標準品 PF13/251013-18 株、黄熱ウイルス国際標準品 17D-204 株をそれぞれ、100 IU/mL、100 IU/mL、0.01 IU/mL となるように健常人血にスパイクしたものをを用いた。陰性コントロールは健常人プール血漿を用いた。

その結果、全ての検体において、いずれのウイルス核酸(デングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス、および黄熱ウイルス)も検出されず(表2)、陽性コントロールは全て陽性、陰性コントロールは全て陰性であった。

## (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

令和元年度開発したマルチプレックス核酸検出系 CHIKV/ZIKV/YFV 3-plex は、PCR 1 反応中に 5 コピーあれば、いずれのウイルスに対しても 100% 検出でき、高感度で特異性も高いものである。ドナーの血漿 1 mL から抽出し、90  $\mu$ L に溶出し、そのうち 22  $\mu$ L を使用して核酸増幅検査を行う場合であれば、検出可能な血漿中のウイルス核酸コピー濃度は 20.5 コピー/mL と算出される。

本事業により、蚊を媒介するデングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス、黄熱ウイルスを高感度に検出できるシングルプレックスとマルチプレックスの核酸増幅検査が用意された。ウイルスを媒介する蚊の活動期に複数の国から本国を訪れる可能性がある場合など(東京オリンピックなど)は、複数の蚊媒介性のウイルスが健常献血ドナーの血液に混入するリスクが否定できず、リスクモニタリングをシングルプレックスとするかマルチプレックスとするかは状況に応じて選択できる体制を整えることができ、広く日本のドナー血液の安全性の確保に貢献できると思われる。また、これらの核酸検査系を用いて、日本赤十字社の協力のもと、検査落ちとなった献血血液において各ウイルスのスクリーニングを実施した。その結果、検査した 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、ジカウイルス、及び黄熱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、偽陽性などの不具合が発生しないことを確認し、これを毎年継続でき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。

2019年末より、新たなリスクとして新型コロナウイルス感染症(COVID-19)が報告され、重症化する患者のウイルス血症が報告され、中国の血液ドナーからも確率は低いながらも新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)RNAが検出されたという報告もある。今後はSARS-CoV-2 RNAの高感度検出法についても整備する必要があると考えられる。

#### 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。

令和元年度開発したCHIKV/ZIKV/YFV 3-plex高感度核酸検査法は、一度に高い感度と特異性で検出できる極めて有用な検査法であると考えられた。今後も血液に混入しうる新たなウイルス感染症などについて常に注視・情報収集し、血液の安全性確保のために適宜対応していくことが必要である。

#### 5. 令和2年度実施予定内容

- (1) SARS-CoV-2に対する高感度核酸検査法の開発
- (2) 検査落ちとなった献血血液検体や臨床血液検体を用いた核酸検査の実施
- (3) 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

以上

表 1

**Single-plexと3-plex PCRの特異性評価**

Virus	Serotype	Strain	Single-plex			Multiplex	$\Delta Ct$
			CHIKV117	ZIKV177	YFV005		
Chikungunya virus	-	SL11131	18.0	ND	ND	18.2	0.22
	-	Mal09-02	15.2	ND	ND	15.3	0.09
	-	DOM14-73	16.3	ND	ND	16.4	0.11
Zika virus	-	PRVABC59	ND	27.2	ND	27.4	0.15
	-	MR766	ND	25.4	ND	25.7	0.30
Yellow Fever Virus	-	17D-204	ND	ND	27.9	28.3	0.34
	-	Vircell	ND	ND	29.6	29.9	0.29
Dengue virus	DENV-1	01-44	ND	ND	ND	ND	NA
		Vircell	ND	ND	ND	ND	NA
	DENV-2	01-46	ND	ND	ND	ND	NA
		Vircell	ND	ND	ND	ND	NA
	DENV-3	00-40	ND	ND	ND	ND	NA
		Vircell	ND	ND	ND	ND	NA
	DENV-4	08-11	ND	ND	ND	ND	NA
		Vircell	ND	ND	ND	ND	NA
Japanese Encephalitis Virus	-	Beijing-1	ND	ND	ND	ND	NA
West Nile Virus	-	Vircell	ND	ND	ND	ND	NA

  

Sample	Type	Lot	Single-plex			Multiplex	$\Delta Ct$
			CHIKV117	ZIKV177	YFV005		
human PBMC	DNA	A	ND	ND	ND	ND	-
		B	ND	ND	ND	ND	-
		C	ND	ND	ND	ND	-
human plasma	RNA	A	ND	ND	ND	ND	-
		B	ND	ND	ND	ND	-
		C	ND	ND	ND	ND	-
ddw	-	-	ND	ND	ND	ND	-

表 2

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	-	-	-	-	-	-	-								