

## 感染症安全対策体制整備事業（令和4年度）実績報告

事業代表者

事業代表者 濱口 功 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター 元センター長

報告者 水上 拓郎 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター センター長

## 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常に存在しており、日本では HIV, HCV, HBV や梅毒, パルボウイルス B19 等に関しては、血清学的検査、核酸増幅検査が実施されており、極めて高い安全性が保持されてきた。しかし、グローバル化が進む現代においては国内ではほとんど発生例のないような感染症、特に海外での新興・再興感染症が国内に輸入され、問題となることが少なくない。そこで平成 25 年（2013 年）4 月より新たな病原体が移入した場合に備えて国立感染症研究所と厚生労働省血液対策課、日本赤十字社とが連携し「感染症安全対策体制整備事業」を開始した。

本事業では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、高感度の核酸検査法の開発や標準品・参照品パネルを整備し、将来的な血液の安全性対策に資することを目的としている（図 A, 表 A）。令和 4 年度は輸入感染症のリスクのあるチクングニアウイルス、ジカウイルスの核酸検査のための国内参照品を整備し、多施設により値付けのための共同測定を行なった。両ウイルスの国際標準品を並行して測定し、相対的に評価することにより IU/mL 単位の値付け値を付与した。

## 2. 実施内容

**課題 1. チクングニアウイルス核酸検査のための国内参照品の整備**

グローバル化が進み訪日外国人数、出国日本人数が年々増加している。新型コロナウイルス感染症のパンデミックにより人流が一時抑制されたが、WHO による「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」（PHEIC）の宣言終了及び国内においては感染症法上の分類が5類感染症に移行後に様々な規制が緩和され、急速に人流が回復しているところであり、日本には存在しない病原体が旅行者や帰国者から持ち込まれる可能性も同時に増えて来ていると考えられる。

チクングニア熱はトガウイルス科アルファウイルス属の RNA ウイルスであるチクングニアウイルス（CHIKV）によって引き起こされるウイルス性疾患で、蚊を介してチクングニアウイルス（CHIKV）が感染することで発症する。2004 年以降、チクングニアウイルスの流行は頻繁かつ広範囲に及び、アジア、アフリカ、ヨーロッパ、アメリカ大陸の 110 カ国以上で確認され、未感染の国では、依然として伝播が続いている。媒介する蚊はネッタイシマカ、ヒトスジシマカであり、日本にはヒトスジシマカが生息することから、2014 年のデング熱のように、蚊-ヒト-蚊の経路で海外渡航歴のない人へ感染が拡大するリスクがある。また 10-25%が不顕性感染で潜伏期は 3~12 日であり、不顕性ウイルス血症があり、発症すると特に  $10^{10}$  コピー/mL と高値となることもあり、感染者が献血をするリスクを否定できないため、国内でのアウトブレイクの際には献血血液中にウイルスが混入するリスクを想定し対策を講じておく必要がある。検査センターや血液センターなど多施設で CHIKV の核酸検査を実施する場合には、国際標準品と同様に作製され、国内でも利用やすく、核酸量を IU/mL 単位で付与された国内参照品があれば、試験法キャリブレーションや性能調査、感度比較が実施可能となる。本事業においては、令和 4 年度は CHIKV の参照品を整備した。

## 課題 2. ジカウイルス核酸検査のための国内参照品の整備

ジカウイルス (ZIKV) はフラビウイルス科フラビウイルス属の単一血清型の RNA ウイルスであり、ウイルス感染を媒介するヒトシマカが日本に生息することから、CHIKV と同様に蚊-ヒト-蚊の経路で感染が拡大するリスクがある。1960～1980 年代にかけては散発的なヒトへの感染が認められたが、2007 年以降、アフリカ地域、アメリカ地域、アジア地域、太平洋地域でジカウイルス感染症の発生が拡大した。2016 年 2 月に WHO は PHEIC を宣言し、ジカウイルスと先天奇形の因果関係が確認された。また、ジカウイルス感染とギラン・バレー症候群の発症率上昇との関連も示唆されている。ジカウイルス感染症はネッタイシマカが生息しているその他の地域でも確認され、また流行地域からの旅行者にも感染が確認され、ジカウイルス感染症の経路として性感染も確認されている。80%が不顕性感染で、無症候でも  $10^{10}$  コピー/mL と高値のウイルス血症となる。米国でのアウトブレイク時は FDA のガイドラインに従い献血ドナーの NAT screening が実施された。流行地域での試験的 NAT における、献血ドナーのプール NAT の陽性率は 1%程度と高いが、輸血での感染事例は報告されているものの数は少ない。ZIKV についても国際標準品と同様に作製された国内参照品の整備の有用性は高いため、ZIKAV の参照品を整備した。

### 研究方法および結果

#### CHIKV 国内参照品の作製

CHIKV は遺伝子型が Asian、East/Central/South Africa (ECSA)、West Africa、Indian Ocean lineages の 4 つの型あるが、日本での海外輸入例の多くは ECSA であることから、国立感染症研究所ウイルス 1 部 ECSA 型ウイルス 3 株 (CHIKV SL11131、CHIKV Mal 09-02、CHIKV DOM14.73) の分与を受けた。国際標準品と同様の方法で、酸処理 15 分および  $60^{\circ}\text{C}$  1 時間の加熱処理によりウイルスを不活化し、血漿由来ベースマトリックス (市販品) で希釈し 400 本ずつ参照品を作製した。これらの不活化処理により核酸量に影響がないことを予め確認した (図 1-1)。

#### ZIKV 国内参照品の作製

ZIKV は遺伝子型が Asia と Africa の 2 つの型種類あるが、最も代表的で世界で用いられている Asian/American 型の PRVABC599 株ウイルスを、国立感染症研究所ウイルス 1 部から分与を受けた。国際標準品と同様の方法で、酸処理 15 分および  $60^{\circ}\text{C}$  1 時間の加熱処理によりウイルスを不活化し、アミコン (ミリポア社) による限外ろ過で溶媒を培養メEDIUM に置換したものを血漿ベースマトリックス (市販品) で希釈し 400 本ずつ参照品を作製した。これらの不活化処理により核酸量に影響がないことを予め確認した (図 1-2)。

#### 値付けのための共同測定

日本赤十字社、および国立感染症研究所を含む 4 施設において、定性法 4 施設、定量用 2 施設で共同測定を実施した。国立感染症研究所は国立感染症研究所病原体検出マニュアルに従って測定を実施した。1 施設は自社製品を、残り 2 施設は in-house 法によるリアルタイム RT-PCR 法により測定した。CHIKV は国内参照品 3 種類 (CHIKV SL11131、CHIKV Mal 09-02、CHIKV DOM14.73) と CHIKV 国際標準品 (PEI code11785/16) の合計 4 種類、ZIKV は国内参照品 (ZIKV PRVABC599) と ZIKV 国際標準品 (PEI code11168/16) の合計 2 種類の検体を並行して測定した。定性法では、はじめに予備試験を実施して希釈用血漿マトリックスで  $10^{-1}$  から  $10^{-7}$  希釈 10 倍段階希釈した各検体から RNA をそれぞれ抽出後、リアルタイム RT-PCR で検出されるエンドポイントを定め、本試験ではエンドポイントの両側にハーフロブで 2 点ずつ、

合計 5 点で希釈し日を変えて3回測定した。定量法は定性法測定時に、核酸量既知のスタンダード DNA(国立感染症研究所ウイルス 1 部より分与)または in-house スタンダードを用いて定量した。

[参加施設: 日本赤十字社、北里環境科学センター、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社]

### 値付け値の算出

CHIKV、ZIKV とも定性法では、国内参照品と国際標準品測定時の log 希釈倍率を横軸、logCt 値を縦軸にプロットし、平行線定量法により国際標準品を 1 とした時の相対力価として国内参照品の核酸量を算出した(表 1 下段、表 2)。定量法では、国内参照品と国際標準品測定時の log 希釈倍率を横軸、log コピー数を縦軸にプロットし、平行線定量法により国際標準品を 1 とした時の相対力価として国内参照品の核酸量を算出した(表 1 上段、表 2)。定性法と定量法の幾何平均値を値付け値とし(表 3、表 4)、国内参照品 3 種類(CHIKV SL11131、CHIKV Mal 09-02、CHIKV DOM14.73)それぞれ、6.523 Log<sub>10</sub> IU/mL、7.20 Log<sub>10</sub> IU/mL 及び 6.99 Log<sub>10</sub> IU/mL であった。また、ZIKV は国内参照品(ZIKV PRVABC599)は 6.99 Log<sub>10</sub> IU/mL であった。絶対値としては、プロビット法を用いた最尤推定法により 63%が陽性となる時の希釈倍率を算出し、測定に用いた検体量、抽出容量、PCR 反応に用いた容量を考慮した換算係数を考慮して NAT detectable units/mL として算出した(定性法を用いた国際標準品の値付け方法に準じている)(図 2)。参加施設が少なかったため、相対評価による施設間差の減少は認められなかった。

## 3. 考察と課題

### チングニアウイルス、ジカウイルスの核酸検査のための国内参照品の整備

本事業において、今年度は蚊媒介性ウイルスであるチングニアウイルス、ジカウイルスの国内参照品を整備した。2014 年のデングウイルスの国内発生のように、チングニアウイルスおよびジカウイルスに感染して日本へ渡航または帰国して蚊にさされた場合、ヒト-蚊-ヒトのサイクルでアウトブレイクが起きる可能性は否定できない。感染症のアウトブレイクの際には、新型コロナ感染症の時のように複数の施設で PCR を実施する可能性があり、アッセイごとに検出できる核酸量は技術的に大きな差はないと考えられるが、測定キットにより測定に必要な検体量、抽出量、PCR 反応に用いる検体量が異なるため、採取検体のウイルス量がどこまで薄くても検出できるかに当たる検体ごとの検出感度は測定施設ごとに異なると考えられる。今回の共同測定においても表 3 に示すように 63%の確率で検出できる検体の希釈倍率は 4 施設で約 100 倍異なった。しかしながら、測定に必要な検体量、抽出量、PCR 反応に用いる検体量を考慮して換算すると、表 1、表 2 に示すように施設間差はハーフログ程度に狭まることが確認でき、抽出効率を考慮した国内参照品を整備しておくことの有用性が改めて示唆された。

今後は必要に応じて、国立感染症研究所への依頼により次世代生物学的製剤研究センターより参照品を提供できるしくみを整える予定である。また、本参照品の力価は IU/mL 単位で表示されているため、世界で使用されている核酸検査キットの感度とも比較でき、血液の安全性の確保や公衆衛生の維持に有用であることが示唆された。

## 4. 海外における血液安全に関する情報の収集および交換

WHO の血液安全に関するカンファレンスに定期的に参加し、感染症リスクの早期察知およ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。

## 5. 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必要に応じて国内参照品を整備しアウトブレイクに備えた体制整備に貢献する。世界規模でのコロナ収束と社会活動の活発化に合わせて、サル痘をはじめ、その他の新興・再興感染症の流行が起きている。引き続き、新たな感染症リスクの早期把握と評価及び対策を実施し、血液を介して感染する新たな病原体等について常に注視・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。

## 6. 令和5年度の実施予定内容

1. エムボックスウイルスに対する国内標準品の整備（現在共同測定中）
2. 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

図 A: 感染症安全対策体制整備事業の概要

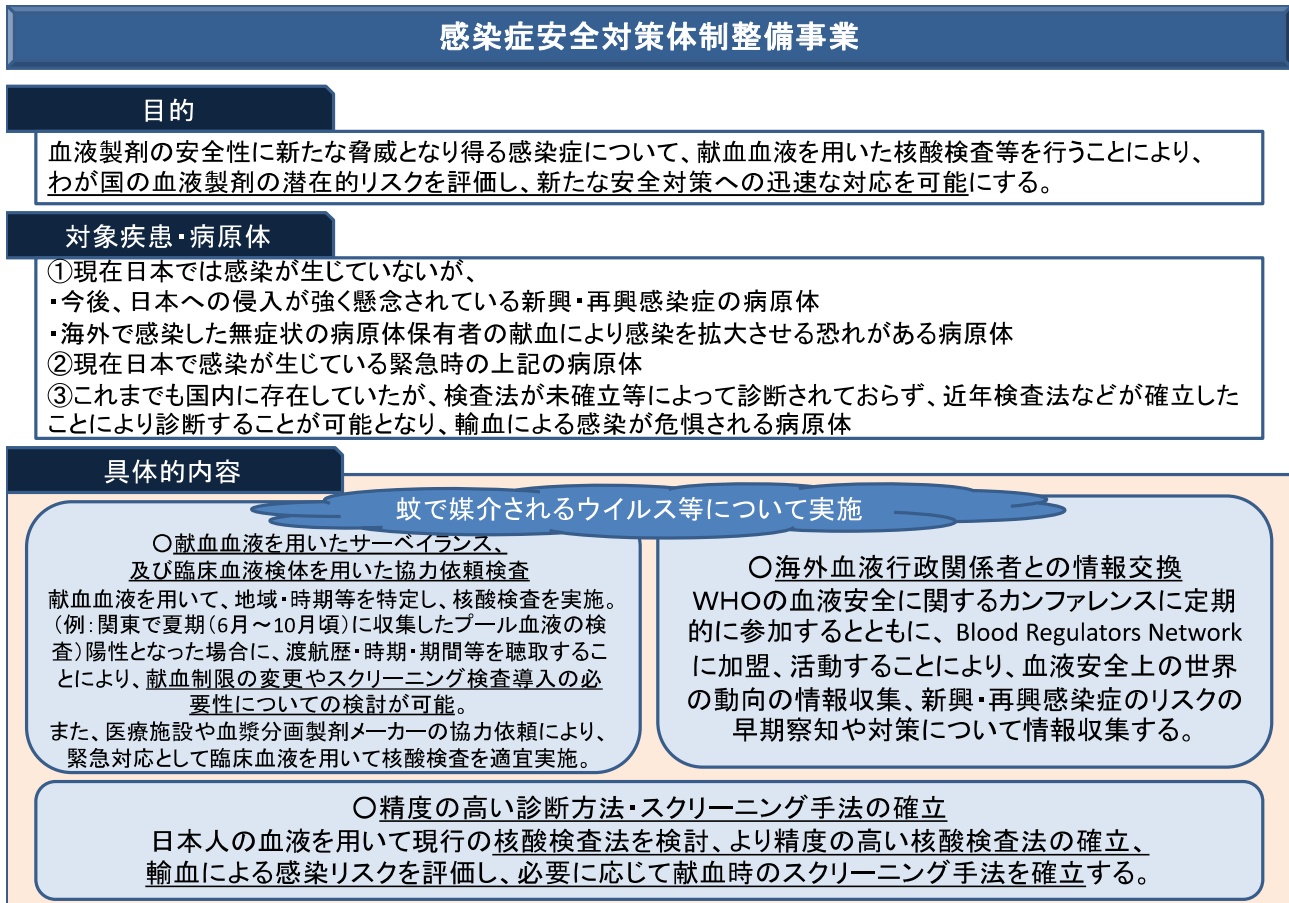


表 A. 感染症安全対策体制整備事業で実施・対応した課題

西暦	和暦	事業内容
2013年	H25	事業開始 : 日本赤十字社・血漿分画メーカーとの協力体制構築
		事業開始 : プール血漿の分与準備。メーカーの血漿プール(10,000人以上プール)を年間155-200ロット収集予定
2014年	H26	検出系開発: DENV高感度検出法の開発(DENV-1~4のマルチプレックス)
		検証事業 : ALT高値による検査落ち検体(20人プールX80)においてDENV-RNA陰性を確認。 検証事業 : 輸血後発熱のあった検体23検体のDENV-RNA陰性確認
2015年	H27	検出系開発: CHIKV高感度検出法の開発
		検証事業 : 検査落ち検体2,000検体(20人プールx100)を用いてDENV-RNA陰性を確認
2016年	H28	検出系開発: ZIKV高感度検出法の開発
		検証事業 : 検査落ち検体2,000検体(20人プールx100)を用いてCHIKV, DENV-RNA陰性を確認。
2017年	H29	検出系開発: ZIKVとCHIKVの高感度マルチプレックス検出法の開発
		検証事業 : 検査落ち検体2,000検体(20人プールx100)を用いてCHIKV, ZIKV, DENV-RNA陰性を確認。
2018年	H30	検出系開発: YFVの高感度マルチプレックス検出法の開発
		検証事業 : 検査落ち検体2,000検体(20人プールx100)のCHIKV/ZIKV(マルチプレックス)、DENV-RNA、YFVの陰性を確認
2019年	R元	検出系開発: CHIKV, ZIKV, YFV 高感度マルチプレックス検出法の開発
		検証事業 : 検査落ち検体2,000検体(20人プールx100)のCHIKV/ZIKV/YFV(マルチプレックス)、DENV 陰性を確認)
2020年	R2	検出系開発: SARS-CoV-2 高感度検出法の開発
		検証事業 : NCMJ回復期血漿210検体、血漿採取時の安全性確認検体69検体のSARS-CoV-2 陰性確認。
		参照品制定: SARS-CoV-2 国内参照品制定
2021年	R3	参照品制定: SARS-COV-2 変異株パネル制定
2022年	R4	参照品制定: CHIKV・ZIKV国内標準品制定
2023年	R5	参照品制定: M-pox国内標準品制定(予定)
備考		DENV: デングウイルス, CHIKV: チクングニヤウイルス, ZIKV: ジカウイルス, YFV: 黄熱ウイルス, SARS-CoV-2: 新型コロナウイルス, M-pox: エムボックス, NCGM: 国立国際医療センター

図 1-1 酸処理、加熱処理による核酸回収に対する影響 (CHIKV)

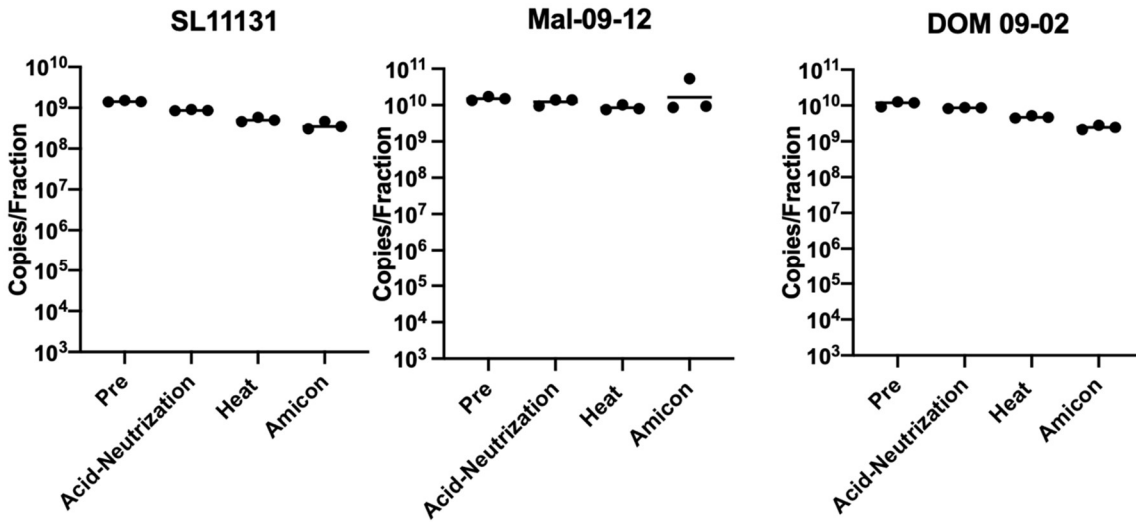


図 1-2 酸処理、加熱処理による核酸回収に対する影響 (ZIKV)

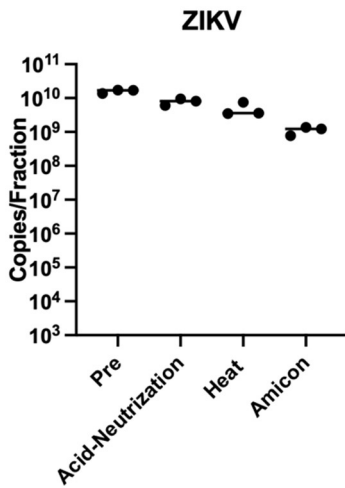
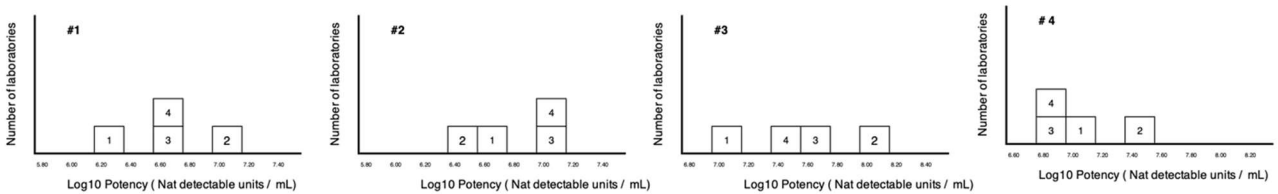


図 2. 絶対評価と相対評価の施設間差比較

絶対評価



相対的に算出

相対評価

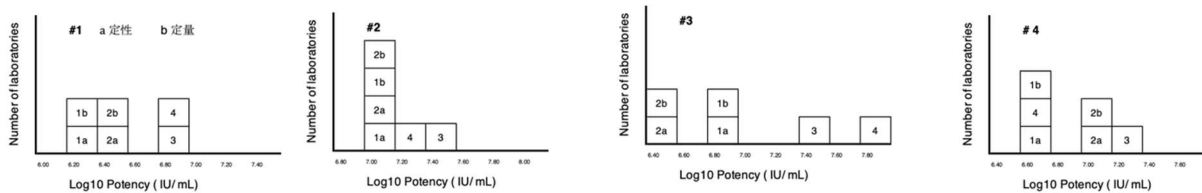


表 1. CHIKV 測定結果 (IS に対する相対値)

定量法(Copy)

施設	#1 CK_SL			GCV (%)	#2 CK_Mal			GCV (%)	#3 CK_DOM			備考 N	
	相対力価	95%信頼区間			相対力価	95%信頼区間			相対力価	95%信頼区間			
		下限	上限			下限	上限			下限	上限		
1	6.350	6.167	6.534	17.2	7.034	6.799	7.270	22.1	6.938	6.722	7.154	20.3	4 (#1のみ3)
2	6.487	6.288	6.686	18.6	7.188	6.808	7.567	36.3	6.576	6.500	6.651	7.0	3
<b>Combined (施設ごと)</b>	<b>6.419</b>	<b>5.480</b>	<b>7.220</b>	<b>22.6</b>	<b>7.111</b>	<b>6.059</b>	<b>8.010</b>	<b>25.4</b>	<b>6.757</b>	<b>4.637</b>	<b>9.239</b>	<b>64.5</b>	<b>2</b>
Combined (全測定)	6.419	6.312	6.526	23.8	7.100	6.973	7.227	32.6	6.783	6.594	6.971	49.7	7 (#1のみ6)

定性法 (Ct)

施設	#1 CK_SL			GCV (%)	#2 CK_Mal			GCV (%)	#3 CK_DOM			備考 N	
	相対力価	95%信頼区間			相対力価	95%信頼区間			相対力価	95%信頼区間			
		下限	上限			下限	上限			下限	上限		
1	6.330	6.254	6.406	—	7.051	6.969	7.133	—	6.924	6.839	7.008	—	8
2	6.470	6.395	6.545	—	7.161	7.082	7.242	—	6.595	6.499	6.687	—	6
3	6.864	6.752	6.984	—	7.575	7.446	7.716	—	7.585	7.415	7.734	—	6
4	6.848	6.719	6.977	—	7.389	7.276	7.508	—	7.820	7.685	7.954	—	6
<b>Combined (施設ごと)</b>	<b>6.628</b>	<b>6.199</b>	<b>7.057</b>	<b>68.5</b>	<b>7.294</b>	<b>6.921</b>	<b>7.666</b>	<b>58.1</b>	<b>7.231</b>	<b>6.326</b>	<b>8.137</b>	<b>213.7</b>	<b>4</b>

表 2. ZIKV 測定結果 (IS に対する相対値)

定量法 (Copy)						定性法 (Ct)					
施設	相対力価	95%信頼区間		GCV (%)	備考 N	施設	相対力価	95%信頼区間		GCV (%)	備考 N
		下限	上限					下限	上限		
		1	6.757					6.455	7.059		
2	7.130	6.699	7.561	41.6	3	2	7.133	7.021	7.244	—	6
<b>Combined (施設ごと)</b>	<b>6.944</b>	4.387	9.127	66.8	2	3	7.446	7.328	7.555	—	6
Combined (全測定)	6.944	6.687	7.200	61.0	6	4	6.816	6.655	6.986	—	6
						<b>Combined (施設ごと)</b>	7.037	6.529	7.545	84.7	4

表 3. CHIKV 値付け値

Log10 IU/mL

測定法	定量法	定性法	Combined	値付け値
Chikungunya virus CHIKV SL11131 核酸検査用参照品 Lot001/2022	6.419	6.628	<b>6.523</b>	<b>6.52 Log 10 IU/mL</b>
Chikungunya virus CHIKV MaI 09-02 核酸検査用参照品 Lot002/2022	7.111	7.294	<b>7.202</b>	<b>7.20 Log 10 IU/mL</b>
Chikungunya virus CHIKV DOM 14-73 核酸検査用参照品 Lot003/2022	6.757	7.231	<b>6.994</b>	<b>6.99 Log 10 IU/mL</b>

表 4. ZIKV 値付け値

測定法	定量法	定性法	Combined	値付け値
Zika virus PRVABC59株 V7D3 核酸検査用参照品 Lot004/2022	6.944	7.037	<b>6.990</b>	<b>6.99 Log 10 IU/mL</b>

表 5. 63%の確率で陽性となる希釈倍率

施設	#1 CK_SL	#2 CK_MaI	#3 CK_DOM	#5 CK_IS	#4 ZK	#6 ZK_IS
1	-4.282	-4.865	-5.258	-4.625	-5.209	-6.167
2	-5.129	-5.561	-6.070	-4.816	-5.483	-6.400
3	-6.230	-6.517	<u>-7.114</u>	-5.944	-6.399	-6.730
4	-5.280	<b>-5.736</b>	-6.172	<b>-5.011</b>	-5.525	-6.137

赤字は補正が必要であった箇所

以上