

感染症安全対策体制整備事業（平成28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

輸血用血液製剤を含む血液製剤は、ヒトの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。社会問題となった輸血後肝炎をはじめ、既存の感染症については、国内献血血液のスクリーニング検査の精度向上等により、安全性は高まってきた。しかしながら、ジカウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス等の世界の一部の地域に限局的に発生する新たな感染症の病原体についても、今後日本国内に移入されることが想定され、献血血液への混入のリスクは益々高まっており、血液の安全性の観点からも、新たな対策が必要とされている。

これに対応し、平成25年4月より新たな病原体（デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス等）が移入した場合に備えて、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、本事業により感染症リスク管理体制の構築を行ってきた。平成28年度は、本事業において以下を実施し、新たなリスクの早期把握と評価を行った。

2. 実施内容

- (1) ジカウイルスに対する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及びチクングニアウイルスに対する核酸検査の実施
- (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) ジカウイルスに対する高感度核酸検査法の開発

血液製剤の安全性を担保する上で病原体の血液混入を防止することは、極めて重要な課題である。しかしながら国内に輸入されるリスクのある病原体に対する高感度な検出法は、未整備の部分があり、将来の国内感染発生時に万全に対応できる体制には至っていない。本事業では、これまでに優れた感度で検出できることが十分に確認できていないそれらの病原体について高感度の核酸検査法を整備し、将来的な血液への混入に備えることを目的とする。

平成28年度は、最近海外で大きな流行が見られ血液への混入が懸念される、ジカ熱の原因病原体であるジカウイルスを対象とした。平成27年度にチクングニアウイルスの高感度核酸検査用プライマーを同定した方法と同様に、大規模プライマースクリーニングによってジカウイルスに対する高感度核酸検査法を開発した。具体的には以下を実施した（図1）。

①プライマー設計：ジカウイルスはアジア株とアフリカ株に大別される。まず、ジカウイルスのアジア株のゲノム全長に対して特異的プライマーを合計 510 セット設計した。設計したそれぞれのプライマー配列について NCBI 登録株情報との相同性を確認し、多くの登録株で相同性が高く良好な PCR 増幅が期待できる 192 セットを選定した。

②プライマースクリーニング：国内の海外渡航者から分離されたジカウイルス 2 株（アジア株、アフリカ株）を用いてゲノム RNA を抽出した。これを鋳型として、相同性の高いプライマー 192 セットについて、SYBR Green 法を用いたリアルタイム RT-PCR を実施した。その結果、43 セットのプライマーについてアジア株、アフリカ株ともに優れた PCR 増幅が確認された。

③プローブスクリーニング：同定した 43 セットについてプローブを設計し、NCBI 登録株との相同性を確認した。その結果 32 セットを選定し、アジア・アフリカ両株で塩基配列の異なる箇所については縮重塩基を用いた。続いて、プライマー・プローブセットの性能を評価するため TaqMan 法を用いたリアルタイム RT-PCR を実施したところ、アジア株、アフリカ株ともに高い増幅効率を示す 3 セットを最終的に同定した（図 2）。

④特異性・感度の検討：同定した 3 セットのプライマー・プローブについて、特異性の検討のために近縁ウイルスである、デングウイルス RNA、ウエストナイルウイルス RNA、黄熱ウイルス RNA、日本脳炎ウイルス RNA、及びヒト DNA を鋳型として交差反応性を確認した。その結果、ジカウイルス以外の核酸は検出されず、高い特異性を示した。また、ジカウイルス第一次国際標準品を用いて検出感度を検討したところ、10 IU/mL の高い感度を示した。

(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及びチクングニアウイルスに対する核酸検査の実施

血液検体は、平成 28 年 6 月以降に東京都内で得られた献血血液のうち、ALT 高値により検査落ちした血漿の 20 人プール 100 検体（合計 2,000 人分）が、「献血血液の研究開発等での使用に関する指針に基づく研究申請」により日本赤十字社から譲渡された。これらの臨床検体について、平成 26 年度に本事業で開発したデングウイルス 1～4 型マルチプレックス核酸検査法と、平成 27 年度に本事業で開発したチクングニアウイルス核酸検査法を用いて検査を行った。確認のため、日本赤十字社でも同検体を同方法により検査を実施した。

その結果、調べた全ての検体において、国立感染症研究所、日本赤十字社ともに、デングウイルス 1～4 型及びチクングニアウイルスの核酸は検出されなかった。また、陽性コントロール検体（各ウイルスのスパイク血漿検体：100 コピー/mL）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、検出系としては問題無く機能していたことも確認された。（表 1）

(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）で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、情報の収集や情報交換を行った。

3. 考察

血液製剤の安全性確保の観点から、蚊媒介性のウイルスに対する血液スクリーニングの重要性は年々増加している。平成26年度のデングウイルス核酸検査法の確立、平成27年度のチクングニアウイルス核酸検査法の確立に引き続き、平成28年度においてはデングウイルスと同様に本邦への移入が危惧されるジカウイルスについて核酸検査法の確立を進め、有用な候補検査法を開発した。本事業で開発したこれらの検査法は、高感度であり特異性も高く、特にこれまで困難であった血液中の微量なウイルスの検出に有用であり、献血血液等のスクリーニングに適していると考えられる。日本赤十字社の協力のもと、実際のドナー検体を用いてスクリーニング検査を実施できたことは意義がある。

本事業で確立された高感度核酸検出法は、今後の当該ウイルスの血液への混入をモニターする有力なツールになると期待される。他の新興・再興感染症等、検査法の十分な整備が進んでいない分野において、早急に対応できる高感度核酸検査法を提供することが課題である。

4. 平成29年度の実施計画

(1) デングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルスに対する

マルチプレックス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を用いたデングウイルス、チクングニア

ウイルス、ジカウイルスに対する核酸検査の実施

(3) 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

図 1. ジカウイルスに対する高感度核酸検査法の構築
核酸検出用プライマー・プローブセットの全体スクリーニングの結果

Primer設計	多重配列 アライメント解析	SYBR Screening	Probe合成	TaqMan Probe Screening
510	192	43	32	3

図 2. ジカウイルス核酸検出用プライマー・プローブセットの最終スクリーニングの結果

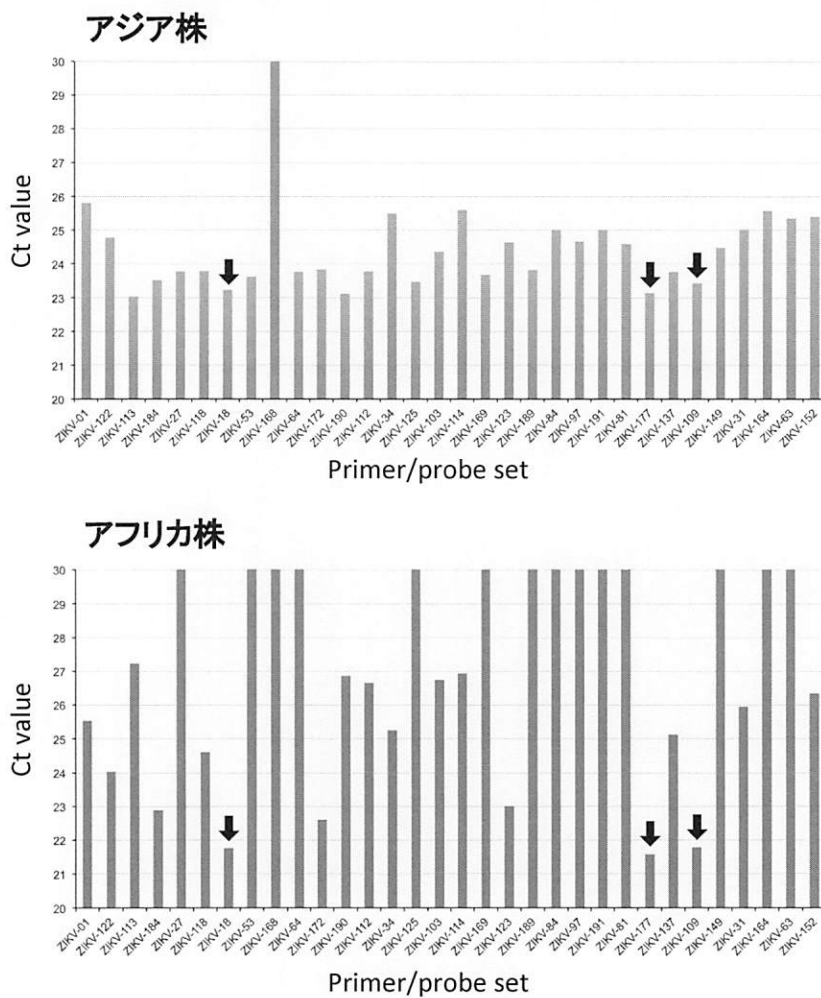


表 1. 献血で検査落ちとなった 20 人プール検体のデングウイルス (DENV-1~4) 及びチクングニアウイルス (CHIKV) に対する核酸検査の結果

Pool ID	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	CHIKV
001	-	-	-	-	-
002	-	-	-	-	-
003	-	-	-	-	-
004	-	-	-	-	-
005	-	-	-	-	-
006	-	-	-	-	-
007	-	-	-	-	-
008	-	-	-	-	-
009	-	-	-	-	-
010	-	-	-	-	-
011	-	-	-	-	-
012	-	-	-	-	-
013	-	-	-	-	-
014	-	-	-	-	-
015	-	-	-	-	-
016	-	-	-	-	-
017	-	-	-	-	-
018	-	-	-	-	-
019	-	-	-	-	-
020	-	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-
021	-	-	-	-	-
022	-	-	-	-	-
023	-	-	-	-	-
024	-	-	-	-	-
025	-	-	-	-	-
026	-	-	-	-	-
027	-	-	-	-	-
028	-	-	-	-	-
029	-	-	-	-	-
030	-	-	-	-	-
031	-	-	-	-	-
032	-	-	-	-	-
033	-	-	-	-	-
034	-	-	-	-	-
035	-	-	-	-	-
036	-	-	-	-	-
037	-	-	-	-	-
038	-	-	-	-	-
039	-	-	-	-	-
040	-	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-
041	-	-	-	-	-
042	-	-	-	-	-
043	-	-	-	-	-
044	-	-	-	-	-
045	-	-	-	-	-
046	-	-	-	-	-
047	-	-	-	-	-
048	-	-	-	-	-
049	-	-	-	-	-
050	-	-	-	-	-
051	-	-	-	-	-
052	-	-	-	-	-
053	-	-	-	-	-
054	-	-	-	-	-
055	-	-	-	-	-
056	-	-	-	-	-
057	-	-	-	-	-
058	-	-	-	-	-
059	-	-	-	-	-
060	-	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-

Pool ID	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	CHIKV
061	-	-	-	-	-
062	-	-	-	-	-
063	-	-	-	-	-
064	-	-	-	-	-
065	-	-	-	-	-
066	-	-	-	-	-
067	-	-	-	-	-
068	-	-	-	-	-
069	-	-	-	-	-
070	-	-	-	-	-
071	-	-	-	-	-
072	-	-	-	-	-
073	-	-	-	-	-
074	-	-	-	-	-
075	-	-	-	-	-
076	-	-	-	-	-
077	-	-	-	-	-
078	-	-	-	-	-
079	-	-	-	-	-
080	-	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-
081	-	-	-	-	-
082	-	-	-	-	-
083	-	-	-	-	-
084	-	-	-	-	-
085	-	-	-	-	-
086	-	-	-	-	-
087	-	-	-	-	-
088	-	-	-	-	-
089	-	-	-	-	-
090	-	-	-	-	-
091	-	-	-	-	-
092	-	-	-	-	-
093	-	-	-	-	-
094	-	-	-	-	-
095	-	-	-	-	-
096	-	-	-	-	-
097	-	-	-	-	-
098	-	-	-	-	-
099	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	-