

## 感染症安全対策体制整備事業（平成 29 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

### 1. 事業の目的

輸血用血液製剤を含む血液製剤は、ヒトの組織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。血液製剤の安全性確保のため、HBV, HCV, HIV 等々の様々な病原体に対して高感度なスクリーニング検査が実施されており、本邦における血液製剤のこれらの病原体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、平成 26 年 8 月にはデング熱の国内発生例が約 70 年ぶりに確認されたように、これまで国内に存在しなかった病原体の輸入例、国内発生例が近年増加しており、新規感染症の本邦での定着の可能性が危惧されている。

また、チクングニア熱、ウエストナイル熱、ジカ熱等の世界の一部の地域に限局的に発生していた感染症についても今後日本国内に移入されることも想定され、対応策の事前の整備は重要である。最近では平成 27 年にブラジル、平成 28 年にアメリカ・フロリダ州でのジカウイルス大流行が発生しており、特に対策が必要な病原体の一つであると考えられる。

平成 25 年度より上記を含む新たな病原体が国内へ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感染症リスク管理体制の整備を行ってきた。平成 29 年度は以下を実施し、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) チクングニアウイルス・ジカウイルスの高感度マルチプレックス核酸検査法の開発
- (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及びジカ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・ジカウイルスの高感度マルチプレックス核酸検査法の開発

これまで本事業において、デングウイルス 1～4 型の核酸を高感度で検出するための核酸検査系を大規模な高感度プライマー・プローブスクリーニングを実施して確立した。また同様に、一昨年度はチクングニアウイルスに対して、昨年度はジカウイルスに対して高感度核酸検査系を確立した。この中で、デングウイルスの核酸検査系においてはマルチプレックス PCR による全血清型の同時検出法を確立している。

そこで本年度においては、より検査の利便性の高くするため、チクングニアウイルスとジカウイルスを 1 チューブで同時検出可能な新規マルチプレックス PCR 系の確立を目指した。これまでに同定したチクングニアウイルスに対する高感度プライマー・プローブセット（CHIKV-027, CHIKV-117）および同じくジカウイルスのセット（ZIKA-018, ZIKA-109, ZIKA-177）を用いて、マルチプレックス PCR 化するために最適な組み合わせ

を検討した。その結果、すべての組み合わせで優れた検出感度を確認したが、一部 (CHIK-117 と ZIKA-018、CHIK-027 と ZIKA-109) を組み合わせた際にジカウイルスの検出感度が僅かに低下する可能性が示唆された (図 1)。さらに各ウイルスの登録配列情報の多重比較により、CHIK-117 と ZIKA-177 が最も遺伝子変異の少ない領域を標的としていた。よって、これら 2 セットを選択しマルチプレックス PCR 系とした。

次に、構築した系の特異性の検討のために様々な近縁ウイルス (デングウイルス : DENV-1~4, ウェストナイルウイルス : WNV, 黄熱ウイルス : YFEV, 日本脳炎ウイルス : JEV) 由来 RNA、及びヒト DNA/RNA を鋳型として PCR を実施した。その結果、チクングニアウイルスとジカウイルス以外の核酸は検出されず、かつシングルプレックス PCR と同等の Ct 値を示した (表 1)。

さらに、チクングニアウイルスとジカウイルスのウイルス濃度既知検体を用いて検出感度を確認した。段階希釈した濃度既知検体より RNA を抽出し、マルチプレックス PCR を実施したところ、チクングニアおよびジカウイルスに対してそれぞれ 100 copies/ml、100 IU/ml の濃度を 100% 検出した (n=8, 表 2)。ジカウイルスについては、マルチプレックス PCR 系で 10 IU/ml の検体も 8 重測定中 7 回 (87.5%) で検出可能であった (表 2)。

以上の検討より、構築したマルチプレックス PCR 系は、それぞれのシングルプレックス PCR 系と同等の感度・特異性を有し、より利便性の高い検査系であることが示唆された。

## (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 29 年度内 (6 月以降) に東京都内で得ら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) について、これまでに開発したデングウイルス核酸検査系と本年度構築したチクングニアウイルス・ジカウイルスの同時核酸検査系を用いて核酸検査を実施した。

検査の結果、全ての検体において、デングウイルス 1~4 型及びチクングニアウイルスとジカウイルスの核酸は陰性と判定された (図 2)。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 cp/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、検出系として問題無く機能していたことも確認された。また、新規構築系については、確認のため日本赤十字社においても同検体を同じ方法で測定し、同じ結果 (全検体で陰性) となった。

## (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

血液製剤の安全性確保の観点から、デングウイルスを初めとする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。本事業において一昨年度はチク

ングニアウイルス、昨年度はジカウイルスに対する高感度核酸検査系を確立した。本年度はこれらの検査系を組み合わせ、2ウイルス同時検査系の確立に成功し、利便性の向上を達成した。今後もこのような成果を積み重ね、検査手法のさらなる向上を目指していく。

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、臨床検体でスクリーニングを実施し、本年度の2,000人分の血液においても検査法として機能することを確認し、デングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス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つであると考えられた。

本事業で確立した高感度核酸検査法の構築手法は、新興・再興感染症など、他の病原体に対しても応用可能であることから、国内侵入の危険があるが検査法が未整備の病原体に対して、同時検出法の確立などを通じ、対策を構築することが望ましいと考えられる。

#### 4. 結論

本年度は、これまでに本事業で開発したチクングニアウイルス及びジカウイルスの高感度核酸検査系を組み合わせ、両ウイルスの同時検査系を確立した。これらの検査系は、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、献血血液などのスクリーニングに適していると考えられる。本検査系は今後の血液製剤の安全性確保に繋がることが期待される。

#### 5. 来年度（平成30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
- (2) 黄熱ウイルスの感染状況について国際的な情勢と対応をまとめる。
- (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. 各ウイルス核酸検出用オリゴセットの組み合わせの検討結果

① チクングニアウイルス検出に対する影響 (Ct value)

Sample	CHIK-027			CHIK-117		
	ZIKA-018	ZIKA-109	ZIKA-177	ZIKA-018	ZIKA-109	ZIKA-177
A	33.96	33.61	33.50	33.90	34.36	34.51
B	33.63	36.60	33.69	36.20	35.67	33.93
C	34.37	34.28	33.79	35.68	34.06	34.76
D	33.81	34.76	34.19	35.00	33.68	33.41
E	35.28	35.37	35.22	34.68	33.61	35.99
F	34.39	34.23	33.94	34.15	33.63	34.83
<b>AVE</b>	<b>34.24</b>	<b>34.81</b>	<b>34.06</b>	<b>34.94</b>	<b>34.17</b>	<b>34.57</b>

② ジカウイルス検出に対する影響 (Ct value)

Sample	ZIKA-018		ZIKA-109		ZIKA-177	
	CHIK-027	CHIK-117	CHIK-027	CHIK-117	CHIK-027	CHIK-117
A	35.67	ND	36.22	35.74	35.63	36.15
B	38.48	36.98	38.29	36.32	36.94	35.50
C	35.83	37.71	ND	36.05	35.54	35.83
D	36.99	37.72	35.56	37.27	35.65	35.71
E	36.95	36.81	36.01	36.21	35.50	36.23
F	37.00	37.43	36.64	36.18	35.84	34.92
G	36.16	36.71	36.71	36.32	35.57	35.25
H	35.68	36.04	37.06	35.45	37.00	36.69
<b>AVE</b>	<b>36.60</b>	<b>37.06</b>	<b>36.64</b>	<b>36.19</b>	<b>35.96</b>	<b>35.79</b>

表1. マルチプレックスPCR系の検出特異性の検討結果

Specimen	Template	Primer/probe set		
		CHIK-117 (Single-plex)	ZIKA-177 (Single-plex)	CHIK/ZIKA (Multiplex)
DENV-1	viral RNA	ND	ND	ND
DENV-2	viral RNA	ND	ND	ND
DENV-3	viral RNA	ND	ND	ND
DENV-4	viral RNA	ND	ND	ND
WNV	viral RNA	ND	ND	ND
YFV	viral RNA	ND	ND	ND
JEV	viral RNA	ND	ND	ND
ZIKV (A株)	viral RNA	ND	24.21	24.22
ZIKV (B株)	viral RNA	ND	22.38	22.51
CHIKV (A株)	viral RNA	13.35	ND	13.10
CHIKV (B株)	viral RNA	14.14	ND	14.01
CHIKV (C株)	viral RNA	15.74	ND	15.64
健康人由来血漿	total RNA	ND	ND	ND
健康人由来末梢血単核球	human gDNA	ND	ND	ND
ddw	-	ND	ND	ND

ND = not detected

表2. マルチプレックスPCR系の検出感度の検討結果

Primer/ probe Set	Assay	Cp or IU / mL	Ct value (replicate)								Detection	Positive Rate
			1	2	3	4	5	6	7	8		
CHIK-117	Single-plex	1000	33.82	34.67	34.16	34.69	34.98	34.17	34.29	34.41	8/8	100%
		100	37.45	37.28	38.03	37.31	36.25	36.55	39.09	36.10	8/8	100%
		10	ND	38.95	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1/8	12.5%
		Negative	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/8	0%
ZIKA-177	Single-plex	1000	33.12	33.02	33.09	32.73	32.96	32.73	32.93	32.85	8/8	100%
		100	35.70	35.76	37.43	35.46	35.59	34.82	35.69	35.91	8/8	100%
		10	38.52	ND	ND	37.03	ND	ND	36.69	ND	3/8	37.5%
		Negative	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/8	0%
CHIK-117	Multiplex	1000	34.26	34.52	34.58	34.16	33.98	34.70	34.43	34.26	8/8	100%
		100	35.98	36.92	36.50	36.77	35.91	36.47	36.15	37.55	8/8	100%
		10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/8	0%
		Negative	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/8	0%
ZIKA-177	Multiplex	1000	32.89	32.94	32.99	33.41	33.07	33.03	33.09	33.14	8/8	100%
		100	35.91	35.49	36.09	36.34	36.45	35.43	35.27	35.62	8/8	100%
		10	37.58	38.51	38.47	ND	37.67	38.42	38.48	36.95	7/8	87.5%
		Negative	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0/8	0%

ND = not detected

図2. 献血で検査落ちとなった20人プール血漿検体のデングウイルス(DENV-1~4)、チクングニアウイルス(CHIKV)及びジカウイルス(ZIKV)核酸検査の結果

Pool ID	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	CHIKV	ZIKV
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	ZIKV
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	-	-	-	-	-	-