

## 感染症安全対策体制整備事業(令和2年度)実績報告

事業代表者 濱口 功 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長

報告者 水上 拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部 1室 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いる。日本では、血液製剤の安全性確保のため、血液を介して感染する主要な病原体である 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。平成 26 年(2014 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、平成 27 年(2015 年) には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が大流行し、平成 28 年(2016 年) 3 月には中国でアジア初の輸入症例として報告された。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 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等を想定し、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している。現在までに、新規病原体に対する高感度核酸検査法の開発およびモニタリングを実施し、新たな感染症リスクの早期把握と評価を実施しており、特に、デングウイルス、チクングニアウイルス、ジカウイルス、黄熱ウイルスの高感度核酸検出系を開発してきた。

令和2年度は 2019 年末より発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に関し、高感度核酸検査法を開発し、臨床血液検体を用いて高感度核酸検査を実施した。さらに、COVID-19 核酸検査のための国内参照品を作製し、共同測定を実施し、国内参照品を値付けし、試験法の標準化を可能とした。

## 2. 実施内容

### 1) SARS-CoV-2 に対する高感度核酸検査法の開発

2019 年末から中国の武漢で SARS-CoV-2 の大規模なアウトブレイクが発生し、2020 年には日本のみならず他の多くの国々に瞬く間に感染が拡大し世界的な大流行(パンデミック)となっている。WHO は 2020 年 1 月末には国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態を宣言した。SARS-CoV-2 は気道から侵入し肺炎を引き起こすが、一部の患者の血液からも核酸検査 (PCR) によりウイルス RNA が検出されることが報告された。無症候性感染者

(不顕性感染)も存在するが、血液中にウイルス(RNA)が存在するケースがあるかは不明であったため、無症候性感染者からの献血を想定し、その血液にウイルスが存在するリスクに至急備える必要があった。開発開始時点での国内の SARS-CoV-2 に対する核酸検査(定量 PCR)は、口腔スワブ等を対象としており(合成 RNA を用いた感度は約 50 コピー/reaction)、血液を用いた検出感度は不明であった。そこで、献血血液に微量に混入したウイルスを検出可能な高感度核酸検査系を別途開発し準備することを目的とした。

### 研究方法および結果

**高感度 primer スクリーニング:** SARS-CoV-2 (NC\_045512 Wuhan-Hu-1)の約 30Kb の核酸配列に対して、Primer 設計ソフトで網羅的に Forward および Reverse primer を 299 セット設計した。武漢帰国便の陽性者から分離された LC521975 株 (2019-nCoV/JPN/AI/I-004/2020)の培養上清から精製したウイルス RNA を鋳型にして、SYBR Green 系の RT-qPCR キットにて 299 セットの RT-qPCR の増幅効率を検討した。RT-qPCR の Ct 値を基にして評価し、極めて増幅効率の良かった 62 セットを高感度候補として選出した。

**高感度 probe スクリーニング:**次に、選出した primer セットの PCR 増幅領域に TaqMan MGB probe を設計し、24 セットの primer-probe について TaqMan RT-PCR キットにて、ウイルス RNA を鋳型にして増幅効率を評価した。その結果、11 セットについては、極めて増幅効率が良く、これらの primer-probe セットを SARS-CoV-2 高感度核酸検査法の候補とした(図 1)。11 セットの内、NCBI 登録株約 4,000 株に対して相同性を評価し、登録株と 100%一致する率が 99%以上の primer-probe を、変異によるミスマッチの生じにくい高感度 primer-probe として 3 セット選出した(S2-A, B, C)。これら 3 セットに関し、RT-qPCR における増幅効率を確認した結果、それぞれ 100 コピー/ well で 37.8, 36.7, 35.7 サイクルであった(Table.1)。

## 2) 臨床血液検体を用いた高感度核酸検査体制の構築と実施

COVID-19 の治療法開発のため、国立国際医療研究センター(NCGM)が中心となり、日本赤十字社、国立感染症研究所が協力する形で、COVID-19 回復者血漿療法の臨床研究がスタートした。また、同様に慶應義塾大学においても同様のプロジェクトがスタートした。その中で国立感染症研究所では、本事業において NCGM の回復者血漿の適合者のスクリーニングおよび血漿採取時の SARS-CoV-2 に対する安全性確認のため、採血した血漿に対して、高感度 SARS-CoV-2 核酸検査を実施した。

### 研究方法および結果

開始した当時は、WHO 国際標準品が存在しなかったため、暫定的に SARS-CoV-2 が

100 コピー/mL で血液に混入した場合においても、確実に検出できるような核酸検出の感度を目指した。そこで、SARS-CoV-2 に対する核酸検査法の CDC\_N2 および NIID\_N2 法について、合成 RNA を使った検出感度を暫定的に評価したところ、約 30 コピー/reaction であったことから、100 コピー/mL のウイルス液から 30 コピー以上のウイルス RNA を PCR1well 中に持ち込める方法でセットアップすることとした。そこで、RNA 抽出効率を仮に 100%とした場合に条件を計算したところ、全自動核酸抽出機 QIASymphony の 2mL 抽出プロトコルで核酸抽出、90 $\mu$ L で核酸溶出、qPCR に抽出液を 25 $\mu$ L 添加(60 $\mu$ L 反応系)したとき、100 コピー/mL のウイルス液から 55 コピーのウイルス RNA を PCR 1well 中に持ち込める計算となることから、この条件で検査を実施した。

#### **回復者血漿の SARS-CoV-2 に対する安全性確認のための核酸検査**

設定した核酸抽出・検出条件下で 2020 年 9 月末までに CDC\_N2 および NIID\_N2 法にて NCGM の回復者血漿のスクリーニング検体 210 件、採取した回復者血漿 69 件について、全 55 回の SARS-CoV-2 の核酸検査を実施した。その結果、全ての検体から、SARS-CoV-2 の RNA は検出されなかった。

### **3) COVID-19 核酸検査のための国内参照品の作製と値付け**

SARS-CoV-2 に関しては、抽出効率を反映させた生ウイルス由来の核酸検査用標準品は日本にはなく、一般に、国際標準品も現在のところ入手が困難であることから、核酸検査用に使用できる国内参照品候補品2種類を10施設で測定し、値付けを実施した。また国際標準品の入手が可能であった日本赤十字社と国立感染症研究所の2施設のデータを元に、国内参照品に対して国際単位 IU/mL の表示値を付与した。

#### **研究方法および結果**

血液用 (NIID\_001/2020) および一般用 (NIID\_002/2020) の参照品候補品として、武漢由来の SARS-CoV-2 である JPN/ty/wk-521 を 60 $^{\circ}$ C 60 分の加熱により不活化し、感染性がないことを確認した上で、それぞれ血漿ベースマトリックス、ユニバーサルバッファーで希釈したものを 1,000 本ずつ作製した。臨床検査薬協会の協力を得て、臨床検査薬会社を含む 10 施設で値付けを実施した。定性法ではエンドポイント法で力価を算出し、定量法では各参加施設の定量 PCR の定量値を用いて算出し、双方の値を考慮して算出した値を値付け値とした。相対評価での力価算出の際は、平行線定量法により算出した。一般用 (NIID\_002/2020) を国内参照品とし、その力価を 6.92 log<sub>10</sub> Units/mL (7.08 log<sub>10</sub> IU/mL)、また国内参照品に対する相対力価として血液用 (NIID\_001/2020) の力価を 6.73 log<sub>10</sub> Units/mL (6.88 log<sub>10</sub> IU/mL)とした。

### **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するとともに、各国の血液事業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。

### 3. 考察と課題

#### 1) SARS-CoV-2 に対する高感度核酸検査法の開発

SARS-CoV-2 は RNA ウイルスの特徴として、当初より変異が多く導入されることが明らかであったため、変異対策として複数の高感度 primer-probe を multiplex 化して、多くの変異株を包括的に検出できる核酸検出系が望まれる。

#### 2) 臨床血液検体を用いた高感度核酸検査体制の構築と実施

回復者血漿を用いた治療法の開発は慶應義塾大学においても開始されており、NCGM と同じ方法を用いて、検査協力を開始した。現在までにスクリーニング検体 20 件、および採取した CP2件について、全 6 回の SARS-CoV-2 の核酸検査を実施している。

#### 3) COVID-19 核酸検査のための国内参照品の作製と値付け

国内参照品 NIID\_002/2020 と血液用 NIID\_001/2020 は依頼があれば国立感染症研究所から交付可能であり、本参照品の整備により、国内で実施される新型コロナウイルスの核酸検査において、感度評価、試験法キャリブレーション、試験法ハーモナイゼーション等に使用できると考えられ、また IU/mL 表示された力価が与えられたことにより、世界各国の核酸検査とも評価・比較が可能となると考えられる。

#### 4) 新型コロナウイルス感染症対策として

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、重症化する患者におけるウイルス RNA 血症 (RNAemia) が報告されたほか、血液のドナーからも確率は低いですが、新型コロナウイルス RNA が検出されたという報告もあった。その後の他施設での献血センターにおける大規模調査が実施され、RNAemia の頻度は極めて少ないことも明らかになりつつある。その一方で、ワクチンエスケープを含めた様々な変異株が出現しており、引き続き、病原性の変化による血中移行の可能性も含めて注視が必要であると考えられる。また変異株の流行により、現状の検査系では感度の低下等も懸念されるので、WHO が定める「懸念される変異株(Variants of Concern; VOC)」や「注目すべき変異株 (Variants of Interest; VOI )」などに関しては高感度 multiplex PCR 検出法の開発とともに、参照品として準備しておくことも重要であると考えられる。

#### 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。

令和 2 年度は、新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の高感度核酸検査法を開発し、臨床血液検体を用いて高感度核酸検査を実施し、結果を病院等へ提供した。また、COVID-19 核酸検査のために国内参照品を作製し、共同測定を実施した上で、国内参照品を値付けしたので、今後、核酸検査に関しては、標準化が可能となり、信頼性が向上した。今後も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。

#### 5. 令和3年度の実施予定内容

1. SARS-CoV-2 変異対策としての高感度 multiplex RT-PCR 法の構築
2. 血液関連ウイルス、類似コロナウイルスを用いた高感度 multiplex RT-PCR 法の検証
3. 高感度 multiplex RT-PCR 法による臨床血液検体を用いた核酸検査の実施
4. SARS-CoV-2 変異対策としての変異株の参照品の作製と値付け
5. 海外における血液安全に関する情報の収集および交換

図 1. SARS-CoV-2 高感度核酸検査法の構築のスクリーニングの要約

Primer 設計	Primer 選定	Probe 合成	Probe 選定
299	62	24	11

Table 1. 各 Primer セットにおける Ct scores (cycles) 比較.

	Copies/well	Single-plex
S2-A	1000	34.2
	100	37.8
S2-B	1000	33.3
	100	36.7
S2-C	1000	32.3
	100	35.7

Ct, cycle threshold