

## 感染症安全対策体制整備事業（令和3年度）実績報告

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 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 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。令和 3 年度は 2019 年末に発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) に関し、その後、発生してきた新規変異株に対応するため、複数の高感度 Primer を組み合わせた Multiplex 高感度核酸検査法を開発するとともに、アルファ、ベータ、ガンマ、オミクロンなどの新規変異株を不活化して作製した「変異株参照品パネル」を整備し、既に令和 2 年度に複数施設による共同測定で値付け・整備した国内参照品を元に、相対的な核酸量の参考値を付与することとした。

## 2. 実施内容

**課題 1. SARS-CoV-2 に対する高感度核酸検査法の開発**

SARS-CoV-2 感染に関し、一部の重症患者の血液から、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ため、無症候性感染者からの献血を想定し、献血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。また、様々な変異株が出現し、変異株の流行により、病原性の変化、検査系における感度の低下等も懸念されうるので、WHO が定める「懸念される変異株 (Variants of Concern; VOC)」などに関しては変異株等に対応可能な高感度 multiplex PCR 検出法の開発とともに、参照品及び変異株パネル参照が必要となった。

そこで、本事業では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。令和3年度は令和2年度に開発した高感度核酸検査法を発展させ、複数の高感度 Primer を組み合わせた Multiplex 高感度核酸検査法を開発することとした。

## 研究方法および結果

## 高感度 multiplex RT-PCR 法の構築

変異株対策として令和2年度に構築した複数の高感度 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とすることとした。構築した 11 セットの内、NCBI 登録株約 4000 株 (2020 年 5 月時点) 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 (Table.1)、Multiplex 化した。感度評価の結果、Single 系と 3plex 系で増幅効率が変わらないことを確認した (Table.2)。

## 高感度 multiplex RT-qPCR の感度確認

構築した NIID-S2 3plex 法の 95%検出感度を検討した。その結果、世界的に使用されている 2019-nCoV\_N2 法(米国 CDC で公開された検出系)が 28.7 copies/reaction であったのに対して、NIID-S2 3plex は、16.3 copies/reaction であったことから、現行法と比べても同等以上の検出感度があることが確認できた。SARS-CoV-1 に対する 95%検出感度は、37.6 copies/reaction であった(Table.3)

## 血液関連ウイルス、類似コロナウイルスに対する特異性の確認

輸血感染ウイルスとして、HIV-1, HBV, HCV, HEV, Parvovirus B19, 蚊媒介ウイルス:Dengue virus 1,2,3,4, Chikungunya virus, Zika virus, 日本脳炎ウイルス, West Nile virus, Yellow fever virus, 一般的な Human coronavirus として, 229E, NL63, OC43, HKU1 を対象として, それぞれの精製 RNA を鋳型として, RT-qPCR における増幅を検討した。その結果, これらのいずれのウイルスに対しても, 増幅を示さなかった(Table.4)。

## 課題 2. SARS-CoV-2 核酸検査法のための変異株参照パネルの構築

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, 国際標準品も令和3年頃までは入手が困難であった。我々は令和2年度に, 核酸検査用に行うことができる国内参照品候補品2種類を10施設で測定し, 値付けを実施し国内参照品に対して国際単位 IU/mL の表示値を付与した。そこで令和3年度は, 既存の検出法の評価に使用できるよう, 新規に発生した VOC などの変異株に対する参照品パネルを構築し, 複数施設で値付けを行った。

## 研究方法および結果

### SARS-CoV-2 変異ウイルス株の選定とウイルスの不活化処理

変異ウイルス株は 2021 年 12 月の時点で国立感染症研究所の分与株対象となっていた 5 株(アルファ, ベータ, ガンマ, デルタ, オミクロン)を対象とした。各変異ウイルス液は 60 分加熱処理を実施して不活化し, さらに 50%酢酸による酸処理(処理後アルカリで中和)し, 安全性マージンを追加した。不活化処理済みウイルス液をユニバーサルバッファーで適宜希釈し, 分注したものをパネルとした。パネルは veroE6/TMPRSS2 に作用させ 3 代継代し, 細胞変性効果 (CPE) が認められず, 感染性は認められないことを確認した。

### パネルの測定と核酸量の算出

日本赤十字社, 国立感染症研究所を含む 4 施設において, 核酸量の参考値付与のための共同測定を実施した。5 種類の参照品および国内参照品 (NIID\_002/2020), 国際標準品(NIBSC\_20/146) を 3 希釈 3 回測定し, 定量値, Ct 値を集計し解析した(Table.5)。その結果, 施設 1 のデータが他より低値で, 各変異ウイルス株定量値の変動係数 GCV%は 186~361%で乖離が認められた。

### パネル核酸量の相対評価による値付け

各パネルの核酸量参考値は, 国内参照品(NIID\_002/ 2020)の値付け値(6.92 log<sub>10</sub> Units/mL, 7.08 log<sub>10</sub> IU/mL)を元に平行線定量法にて相対的に算出した(Table.6)。各施設の相対定量値の幾何平均値をパネルの核酸量の参考値として定めた(Table.7)。その結果, 変動係数の低下が認められ, 各施設間差

は減少し、いずれの施設においても同等な定量値が得られた(Table.8)。

### **課題3：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)にて活動し、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。

## **3. 考察と課題**

### **1. 課題1：SARS-CoV-2 に対する高感度核酸検査法の開発**

本事業にて構築した SARS-CoV-2 に対する高感度核酸検査法 NIID-S2 3plex は、血液の SARS-CoV-2 に対する安全対策として、非常に優れた検出法であると考えられた。今後、WHO の国際規格で規定された標準品や我々の制定した参照品パネル等を用いて、感度を評価する予定である。

### **2. 課題2：SARS-CoV-2 核酸検査法のための変異株参照パネルの構築**

新型コロナウイルス SARS-CoV-2 の変異ウイルス株パネルが整備され、参考値が付与された。変異ウイルス株のパネルと国内参照品が整備されたことにより、いずれの施設で実施する核酸検査であっても国内外のキットの検出感度を比較でき、試験精度が管理できることが確認された。このような不活化ウイルス由来の参照品/パネルは現状では整備されていないため、今後希望があれば配布できる体制を整える。

今後も引き続き VOC 等の変異株が確認された場合は、必要に応じ変異株の追加を検討する。

## **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、日本において感染の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、アウトブレイクに備えた体制整備に貢献してきた。

令和3年度は、SARS-CoV-2 の multiplex 法による高感度核酸検査法を開発し、現在までに流行した変異株のパネルを構築し、参考値を付与した。令和3年度事業により、核酸検査に関しては、標準化が可能となり、信頼性が向上したといえる。

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こっている。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するとともに、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4年度の実施予定内容**

1. ジカウイルスに対する高感度核酸検査法の国内標準品の整備
2. チクングニアウイルスに対する高感度核酸検査法の国内標準品の整備
3. 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

**Table 1 Summary of primer and probe screening for SARS-CoV-2 nucleic acid amplification test**

Primer design	Primer selection	Test probes	Probe selection	Multiplex primer set
299	62	24	11	1

**Table 2. Comparison of Ct scores (cycles) between multiplex and single-plex reactions.**

	Copies/well	NIID-S2-3plex	Single-plex	Difference of Ct (3plex-single)
S2-A	1000	34.5	34.2	0.3
	100	38.0	37.8	0.2
S2-B	1000	33.9	33.3	0.6
	100	37.3	36.7	0.6
S2-C	1000	32.7	32.3	0.4
	100	35.9	35.7	0.2
S1-A	630	33.1	32.2	1.0
	63	36.3	35.5	0.8

Ct, cycle threshold

**Table 3. Concentration of viral RNA at 95% detection limit determined by logistic analysis**

Method	Concentration of detection limit (copies/reaction)	
	SARS-CoV-2	SARS-CoV
NIID-S2 3plex (95% confidence interval)	16.3 (10.9–33.1)	37.6 (24.9–74.9)
2019-nCoV_N2 (CDC) (95% confidence interval)	28.7 (24.9–74.9)	-
SS-GP (Nitsche et al.) (95% confidence interval)	-	15.6 (10.7–32.2)

SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome coronavirus; CDC, centers of Disease Control and Prevention

**Table 4. Test results of SARS-CoV-2 multiplex real-time RT-PCR with other viruses.**

Virus	Genotype or strain	Nucleic acid concentration/reaction		NIID-S2-3plex RT-PCR
Blood-borne virus		Genotype		
HIV-1	B	$2 \times 10^3$	IU	UD
HBV	C	$2 \times 10^4$	IU	UD
HCV	1b	$5 \times 10^3$	IU	UD
HEV	3b	$5 \times 10^3$	IU	UD
Parvovirus B19	1	$2 \times 10^4$	IU	UD
Mosquito-borne virus		Strain		
Chikungunya virus	SL11131	$4 \times 10^6$	copies	UD
	Mal09-02	$2 \times 10^8$	copies	UD
	DOM14-73	$3 \times 10^7$	copies	UD
Zika virus	PRVABC59	$2 \times 10^7$	copies	UD
	MR766	$2 \times 10^7$	copies	UD
Yellow Fever virus	17D-204	$1 \times 10^4$	copies	UD
Dengue virus 1	01-44	$1 \times 10^4$	copies	UD
Dengue virus 2	01-46	$1 \times 10^4$	copies	UD
Dengue virus 3	00-40	$1 \times 10^4$	copies	UD
Dengue virus 4	08-11	$1 \times 10^4$	copies	UD
Japanese encephalitis virus	smb37	not assigned		UD
West Nile virus	NY99-4132	$1 \times 10^4$	copies	UD
Human coronavirus		Strain		
229E	VR-740	$1 \times 10^8$	copies	UD
	Sendai-H/1121/04	$4 \times 10^5$	copies	UD
NL63	Amsterdam I	$2 \times 10^8$	copies	UD
OC43	VR-1558	$4 \times 10^9$	copies	UD
	Tokyo/SGH-36/2014	$6 \times 10^6$	copies	UD
	Tokyo/SGH-06/2015	$8 \times 10^6$	copies	UD
HKU1	Tokyo/SGH-15/2014	$1 \times 10^7$	copies	UD
	Tokyo/SGH-18/2016	$1 \times 10^8$	copies	UD

SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; IU, international unit; UD, undetermined; HIV, human immunodeficiency virus; HBV, hepatitis B virus; HCV, hepatitis C virus; HEV, hepatitis E virus.

**Table. 5 Reported Assay result of log<sub>10</sub> genome copies of reference material**

(Log10 copies/mL)

Facility code	n	#1 $\alpha$	#2 $\beta$	#3 $\gamma$	#4 $\delta$	#5 O	RM
4a	5	5.851	5.719	5.864	5.786	6.489	7.399
2	3	5.827	5.742	5.774	5.682	6.350	7.446
3	3	5.861	5.721	5.757	5.807	6.397	7.498
1a	3	4.843	4.631	4.666	4.696	5.165	6.294
1b	3	4.913	4.752	4.975	4.654	5.088	6.442
Average		5.459	5.313	5.407	5.325	5.898	7.016
95% CL	Lower	4.799	4.607	4.726	4.586	5.021	6.278
	Upper	6.118	6.019	6.088	6.065	6.775	7.754
GCV (%)		186.0	213.6	198.0	235.7	361.8	234.8
N		5	5	5	5	5	5

RM: Reference material, CL: confidence interval, GCV: % Geometric coefficient of variation

**Table. 6 Summary of laboratory reported mean log<sub>10</sub> unit (U) or international unit (IU) calculated relative to reference standard.**

(Log10 units/mL)

(Log10 IU/mL)

Facility Code	n	#1 $\alpha$	#2 $\beta$	#3 $\gamma$	#4 $\delta$	#5 O
4a	5	5.297	5.220	5.320	5.186	5.901
2	3	5.304	5.241	5.246	5.202	5.827
3	3	5.282	5.120	5.089	5.245	5.786
1a	3	5.264	5.117	5.219	5.138	5.643
1b	3	5.313	5.136	5.269	5.126	5.604
Reference Value (Average)		5.292	5.167	5.228	5.179	5.752
95% CI	Lower	5.268	5.094	5.121	5.119	5.597
	Upper	5.316	5.240	5.336	5.240	5.907
GCV(%)		4.5	13.6	20.1	11.3	29.4
N		5	5	5	5	5

Facility Code	n	#1 $\alpha$	#2 $\beta$	#3 $\gamma$	#4 $\delta$	#5 O
4a	5	5.457	5.380	5.480	5.346	6.061
2	3	5.464	5.401	5.406	5.362	5.987
3	3	5.442	5.280	5.249	5.405	5.946
1a	3	5.424	5.277	5.379	5.298	5.803
1b	3	5.473	5.296	5.429	5.286	5.764
Reference Value (Average)		5.452	5.327	5.388	5.339	5.912
95% CI	Lower	5.428	5.254	5.281	5.279	5.757
	Upper	5.476	5.400	5.496	5.400	6.067
GCV(%)		4.5	13.6	20.1	11.3	29.4
N		5	5	5	5	5

**Table.7 Specification of SARS-CoV-2 variants reference material**

Variant name	log <sub>10</sub> unit (U) or international unit (IU)/mL			
Alpha QHN001	5.292	log 10 Units/mL	5.452	log 10 IU/mL
Beta TY8-612 (B.1.351)	5.167	log 10 Units/mL	5.327	log 10 IU/mL
Gamma TY7-501(P.1)	5.228	log 10 Units/mL	5.388	log 10 IU/mL
Delta TY11-927(B.1.617.2)	5.179	log 10 Units/mL	5.339	log 10 IU/mL
Omicron TY38-873 (BA.1)	5.752	log 10 Units/mL	5.912	log 10 IU/mL

**Table.8 Histograms of reference panel log10 unit (U) or international unit (IU) estimates in assay from laboratory and calculated relative to reference material**

Histograms of each reference panel Log<sub>10</sub> genome copy estimates in assay from Laboratory reported result

Histograms of each reference panel Log<sub>10</sub> unit (U) or international unit (IU) estimates in assay from Laboratory reported result

