

感染症安全対策体制整備事業（令和6年度）実績報告

事業代表者： 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

報告者： 関 洋平 国立感染症研究所 次世代生物学的製剤研究センター第一室 室長

1. 事業概要

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。病原体スクリーニング検査の精度向上等により既存の感染症のリスクは低下したが、海外で発生する新興・再興感染症については日本国内に移入され、病原体が血液に混入することが想定されるため、新たなリスクが生じた場合の迅速かつ的確な対応ができる体制について検討し続ける必要がある。そのため、我々は平成25年度より厚生労働省血液対策課および日本赤十字社と連携し新たな病原体の移入に備えるべく「感染症安全対策体制整備事業」を継続して実施している。本事業は将来的な血液の安全性対策に資することを目的としており、これまで精度の高いスクリーニング手法の確立を目指し、高感度の核酸検査法の開発や試験精度管理のための標準品・参照品の整備を進めてきた(図A, 表A)。令和6年度は、2023年から現在にかけて世界的に激増しているデング熱の原因ウイルスであるデングウイルス1, 2, 3, 4型に対する核酸検査の精度管理のための国内参照品を整備し、多施設共同測定により値付けを行なった。さらに、新たな取り組みとして、血液製剤の血清学的背景を明らかにすることを目的とした献血血液を用いたサーベイランス体制の構築や献血検体においてBSL3病原体が陽性となった際の検査体制の構築を推進した。

2. 実施内容

2-1. デングウイルス1, 2, 3, 4型に対する高感度核酸検査法の精度管理のための国内参照品の整備

現在、COVID-19パンデミックにより一時抑制されていた人流が回復し、訪日外国人数も増加している。これにより、世界の一部地域で限局的に発生していた感染症が旅行者や帰国者から持ち込まれるリスクが増加すると考えられる。デング熱は2023年以降急速に増加しており、2024年には感染率が過去最高となり、112か国・地域で発生が確認され、1,430万件を超える症例と1万576人の死亡例がWHOより報告された。特にアジアにおいて感染が拡大しており、ラテンアメリカやアフリカにも感染が広がっている。また、2025年上半年期においても、94か国・地域から360万件の症例と1,900人以上のデング熱関連死亡例がECDCより報告されている。本邦では2020年以降国内感染例は確認されていないが、輸入症例数は2021年8例、2022年99例、2023年175例、2024年232例と増加傾向にある。デング熱は、ネッタイシマカ等の蚊によって媒介されるデングウイルスの感染症であるが、約80%は不顕性感染であるため、無症候感染者が献血ドナーとなる可能性は否定できず、血液の安全性確保のためには検出感度の向上や検査精度の管理が求められる。我々は、本事業においてこれまでにデングウイルスに対するマルチプレックス核酸検査法の開発を行なっていることから、令和6年度は核酸検査法の精度管理に用いる国内参照品を整備した。

研究方法および結果

デングウイルス国内参照品の作製

デングウイルス(DENV)は、フラビウイルス科に属するウイルスで4つの血清型(DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4)に分類される。国内参照品作製に使用したDENV4株(DENV-1 01-44株、DENV-2

01-46 株、DENV-3 00-40 株、DENV-4 08-11 株)は、国立健康危機管理研究機構国立感染症研究所ウイルス第一部より分与を受けた。ウイルスは国際標準品の不活化法と同様の方法で、酸処理 15 分および 60℃ 1 時間の加熱処理を組み合わせることで不活化した(図 1、2)。不活化処理後にアミコン限外濾過による濃縮により酸処理に用いた酢酸と NaOH を取り除き、その後血漿由来ベースマトリックス(市販品)を用いて希釈し、それぞれ 400 本ずつ参照品を作製した。また、作製した参照品が本不活化処理により十分に不活化されていることを確認するため、参照品を DENV 感受性細胞であるアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 Vero9013 に添加し、3 継代(13 日間)培養し細胞変性効果(CPE)が認められないことおよび核酸レベルでのウイルス増殖も認められないことを確認した。さらに、これらの酸処理、加熱処理、アミコンでの濃縮操作、ベースマトリックスによる希釈操作後の各ステップにおいて検体を採取し、ウイルス核酸量を比較した結果、これらの操作は核酸量に大きな影響を及ぼさないことを確認した。

共同測定および値付け値の算出

日本赤十字社および国立感染症研究所を含む 7 施設(栄研化学株式会社、タカラバイオ株式会社、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社、日本ロシュ株式会社、グリフォルス株式会社)において、定性法(7 施設)および定量法(1 施設)による核酸量の値付けを実施した。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。各参加施設においては、自社製品または in-house 法にて測定が行われた。

定性法では、はじめに予備試験を実施した。各参照品をベースマトリックスで 10^{-1} から 10^{-7} まで 10 倍段階希釈し、各希釈液からウイルス RNA を抽出後、リアルタイム RT-PCR 法による検出を行い、結果が陽性となる最大希釈倍率(エンドポイント)を定めた。本試験では、エンドポイントの両側にハーフログで少なくとも 2 希釈分を追加し、合計 5 点以上で独立して 3 回測定を行った。測定結果として、各施設から各希釈濃度の陽性/陰性の結果および Ct 値を収集した。核酸量の絶対値は、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 NAT detectable units/mL (U/mL)として算出した。定量法では、さらに高濃度側にハーフログで 2 希釈分を追加し、核酸量既知のスタンダード RNA(国立感染症研究所ウイルス第一部より分与)を用いて定量した。また、同時に DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4 の国際標準品を測定し、定性法では希釈倍率と Ct 値を、定量法では希釈倍率とコピー数を用いた平行線定量法によって、国際標準品に対する国内参照品の相対値を算出し、International unit/mL (IU/mL)を付与した(表 1)。DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4 の国内参照品の値付け値は、それぞれ、6.92 Log₁₀ IU/mL、6.99 Log₁₀ IU/mL、7.23 Log₁₀ IU/mL、および 6.63 Log₁₀ IU/mL であった。

国内参照品を用いた相対評価による施設間差の改善

共同測定に参加した各施設における DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4 の国内参照品の核酸量の絶対値を図 3 左側のヒストグラムに示し、国際標準品の核酸量の絶対値を図 3 中央のヒストグラムに示した(数値は施設番号を示す)。さらに、国際標準品の値をもとに相対的に算出した国内参照品の核酸量を図 3 右側のヒストグラムに示した。グレー塗りの施設のデータは相対力価を算出できなかったため棄却した。すべての国内参照品(DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4)において相対評価によりヒストグラムの横幅が縮小し、施設間差の改善が認められ、参照品整備の有用性が示された。

考察

DENV の核酸検査のための国内参照品の整備

本事業において、2023 年から現在にかけて世界的に流行しているデング熱の原因ウイルスである DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4 の国内参照品を整備し 国際単位 (IU/mL) での核酸量を付与した。DENV 感染者では無症候でのウイルス血症があり、血中濃度も高く、輸血での感染事例が海外において報告されている。本邦でも 2014 年に海外から国内に持ち込まれたウイルスがヒト→蚊→ヒト感染により広がり、多くの国内感染例が報告されたことから、無症候感染者が献血するリスクを否定することは出来ない。そのため、大規模なアウトブレイク発生に備え、検査体制の構築や試験精度管理に使用可能な不活化ウイルス由来の参照品を整備しておくことは血液の安全性確保において重要である。

DENV-1～4 の国際標準品は FDA により作製され、2016 年に WHO の Expert committee on Biological Standardization (ECBS) により報告されたものの、購入先に関する情報がなく、配布体制が整っていなかった。そのため、今回の共同測定に用いた国際標準品は FDA の Center for Biologics Evaluation and Research (CEBR) に直接依頼し、分与していただいた (DENV-1: Hawaii 株, GenBank# KM204119, 13,500 IU/mL), DENV-2: New Guinea C 株, GenBank # KM204118, 69,200 IU/mL, DENV-3: H87 株, GenBank# KU050695, 23,400 IU/mL, DENV-4: H241 株, GenBank# KR011349, 33,900 IU/mL)。しかし、国際標準品の測定を行ったところ、表示力価と感染研法での定量値に乖離が見られたことに加え、今回共同測定に参加頂いた施設においても、国際標準品を増幅できないまたは濃度依存的な増幅が認められない事例が見られ、該当する測定結果については国際標準品に対する相対値を算出することができないため、解析から除外した。

図 3 に示すように、国内参照品 4 株と国際標準品 4 株の各施設における測定値 (絶対値) には 2～4 乗の差が認められたが、国際標準品に対する相対的値の算出により、補正後の国内参照品の施設間のばらつきは、ハーフログから 1.5 ログ程度にまで縮小されることが分かった。このことから、共通の指標として参照品を整備しておくことの有用性が示唆され、血液の安全性の確保や公衆衛生の維持に有用であると考えられた。値付けのため共同測定は感度評価を目的とはしていないが、濃度依存的な増幅が認められない等の事例が見られた施設については、その旨をお伝えした。

今回整備した DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4 の国内参照品は国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所より送付負担にて分与する予定である。

2-2. プール血漿、人免疫グロブリン製剤などを用いた血清疫学の評価に向けた体制整備

血液製剤の製造に用いられるプール血漿は数千から数万人の血漿を混合したものであり、人免疫グロブリン製剤は複数のプール血漿から人免疫グロブリン IgG を精製したものである。SARS-CoV-2 の流行に伴い、プール血漿中の抗 SARS-CoV-2 抗体価を評価したところ、プール血漿は採血時期の血清疫学的状況を反映していることが明らかになった (Yunoki M. et al., J Infect Dis. 2023)。そのため、献血血液を対象としたサーベイランスとして、プール血漿や人免疫グロブリン製剤を用いて様々な病原体に対する抗体価を継続的に評価することにより、採血地域や時期の違いによる血清疫学的状況を把握し、グロブリン製剤の質的違いの評価や感染症の流行予測につなげることができると期待される。そこで、令和 6 年度は血清疫学の評価に向けた体制構築に向け、一般社団法人日本血液製剤機構 (JB) およびデンカ株式会社 (Denka) と協議を行い、JB よりプール血漿および外観検査不合格となった製剤の代表ロットを継続的にご提供頂き、感染研において分注保管することで、プール血漿および人免疫グロブリン製剤のバンク構築を目指すと共に、体制が整えば Denka の協力を得て、バンク検体を用いた様々な血清疫

学調査を実施することで合意し、共同研究契約を取り交わした。2025 年 3 月末時点において、COVID-19 発生前からの期間を含む 2018 年～2025 年初頭までに製造されたプール血漿 282 バッチおよび製剤 5 ロット受領し、分注保管を行った。今後、収集したプール血漿検体の中から採血期間情報をもとに各月を代表するロットを選定し、種々の病原体に対する抗体調査を進める予定である。

2-3. BSL3 病原体が陽性となった際の検査体制を構築

2022 年 5 月以降、欧米を中心に男性間の性交渉を行う者の間でエムボックス(Mpox)が流行し、これまでウイルスが確認されていなかった国々にも急速に広がったことから、WHO は 2022 年 7 月に「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」(PHEIC)を宣言した。この PHEIC は、症例数が世界的に減少した後の 2023 年 5 月に一旦は終息が宣言されたものの、2024 年に入りコンゴ民主共和国およびアフリカ諸国で感染者が急増し 2024 年 8 月に再び PHEIC が宣言された。しかしながら、その後も状況の改善は見られず PHEIC は 2025 年 8 月時点でも維持されている。本邦では、2022 年 7 月 25 日に国内 1 例目の患者が報告されて以降、2025 年 8 月 15 日時点までに 254 例の症例が確認されており、現在も散発的な患者の発生が報告されている。現時点では輸血による感染事例は報告されていないが、今後無症候感染者が献血ドナーとなる可能性は否定できない。そのため、献血血液がエムボックスウイルス(MPXV)陽性となった際に迅速に対応できるように、日本赤十字社との協力体制の構築を進めた。両者での協議により、陽性疑い検体が発生した際には検体を感染研に輸送し検査できる体制を整えることになった。そこで、より高感度に検出できる体制を整えるため、令和 5 年度の本事業において整備した MPXV 核酸検査用の国内参照品を用いて、NIID 法「国立感染症研究所病原体検出マニュアル エムボックスウイルス 第 4 版 令和 5 年 6 月」および CDC 法「Test Procedure: Monkeypox virus Generic Real-Time PCR Test, Doc. No. CDC-007-00217」の 2 法による検出感度評価を実施した。また、検出感度を高めるため、核酸抽出には QIASymphony (QIAGEN)を用い、試料 1mL を投入し、60 μ L で溶出する系を用いた。上述の参照品値付け時(項目 2-1)と同様の測定方法を用いて最尤推定法により 63%が陽性となる時の希釈倍率を算出したところ、NIID 法は 33.2 U/mL、CDC 法は 8.23 U/mL の感度で検出できることが示された。いずれの検査方法も高感度に検出できているものの、CDC 法の方がより高感度であったことから、CDC 法を採用することとし、検査体制を整えた。今後も、リスクとなる新たな病原体が出現した際には、同様に日本赤十字社と協力し検査体制を整備していきたいと考えている。

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 の血液製剤に関する各種会合に定期的に参加すると共に、ポールエリッヒ研究所が主催する IPFA (international plasma fractionation association) (血液を介する病原体のサーベイランスおよびスクリーニングに関する国際会議)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。

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必要に応じて核酸検査のための国内参照品を整備し、我が国での新興・再興感染症の流行やアウトブレイクに備えた体制整備に貢献する。令和 6 年度は、DENV-1, -2, -3, -4 の国内参照品を整備し、共同測定により核酸量(IU/mL)を付与した。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を用いて検出感度を比較できる体制が整った。今後も血液を介して感染する新たな病原体等について

常に注視して情報収集し、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。また、新たな取組として 2 つの新規テーマに取り組み、血液製剤の血清学的背景を明らかにすることを目的とした献血血液を用いたサーベイランス体制を構築すると共に、献血検体において BSL3 病原体である MPXV 陽性疑い検体が発生した際の検査体制を構築することができた。これらについては令和7年度以降も継続して取り組んでいく予定である。

5. 令和7年度の実施予定内容

【精度の高い診断方法・スクリーニング手法の確立】

① 新興・再興感染症の病原体ウイルスに対する高感度核酸検査法の精度管理のための国内標準品の整備（ウエストナイルウイルス等）

【献血血液を用いたサーベイランス、および臨床血液検体を用いた協力依頼検査】

② プール血漿、人免疫グロブリン製剤などを用いた血清疫学の評価に向けた体制整備

③ BSL3 病原体が陽性となった際の検査体制を構築

④ 血液製剤の安全性確保のための緊急検査

⑤ 血液製剤における不活化技術の導入における調査・情報整理

【海外血液行政関係者との情報交換】

⑥ 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 A. 感染症安全対策体制整備事業の概要

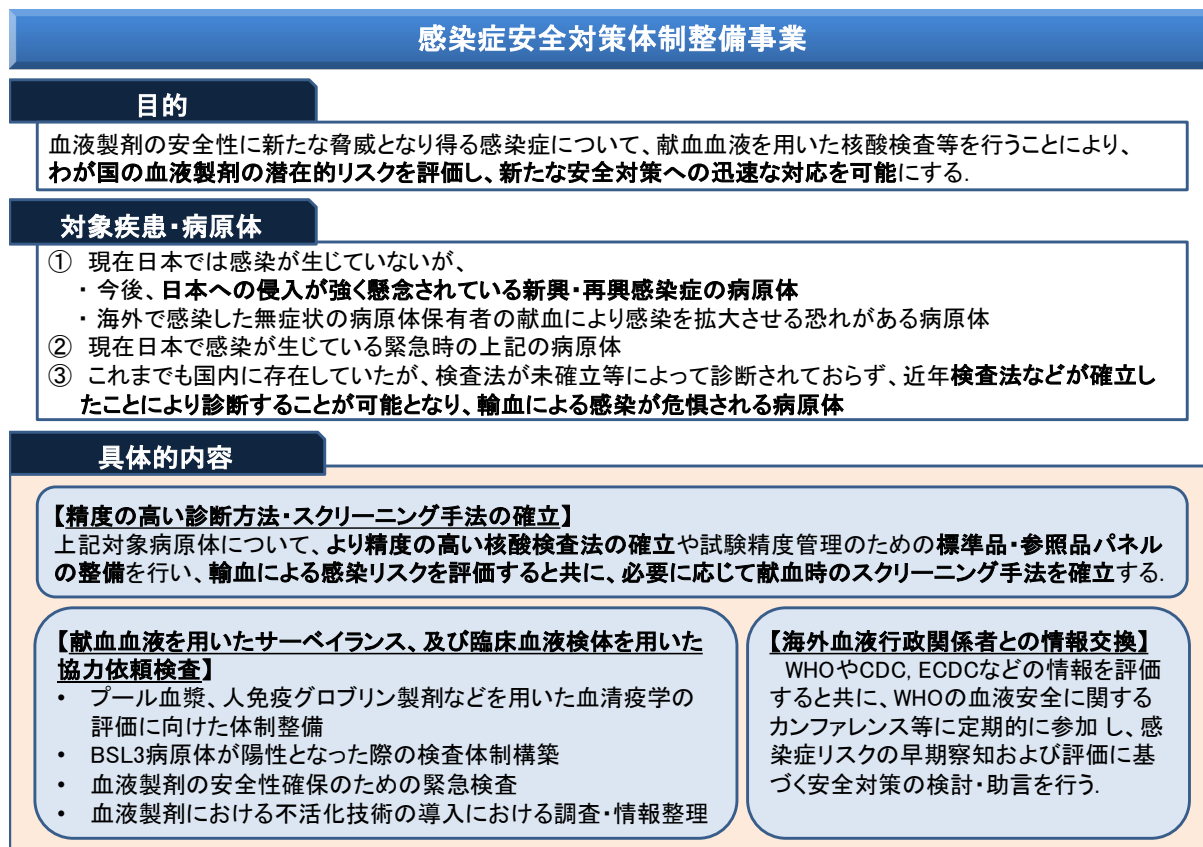


表 A. 感染症安全対策体制整備事業で実施・対応した課題

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×80）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×100）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×100）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×100）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×100）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×100）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：NCGM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：MPXV国内参照品制定
2024年	R6	参照品制定：DENV 国内標準品制定 血清疫学評価：（一社）日本血液製剤機構およびデンカ（株）と共同研究体制を構築 検体体制構築：MPXV検査体制の構築
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, MPXV: エムボックスウイルス, NCGM: 国立国際医療センター

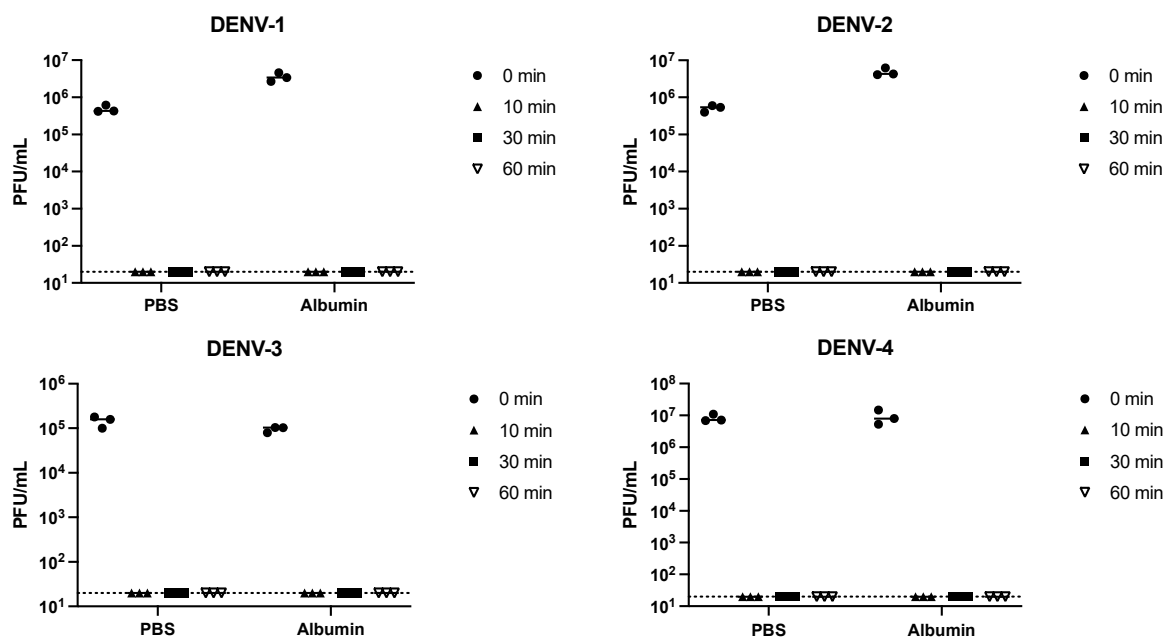


図 1. 60℃ 加熱処理による DENV の不活化

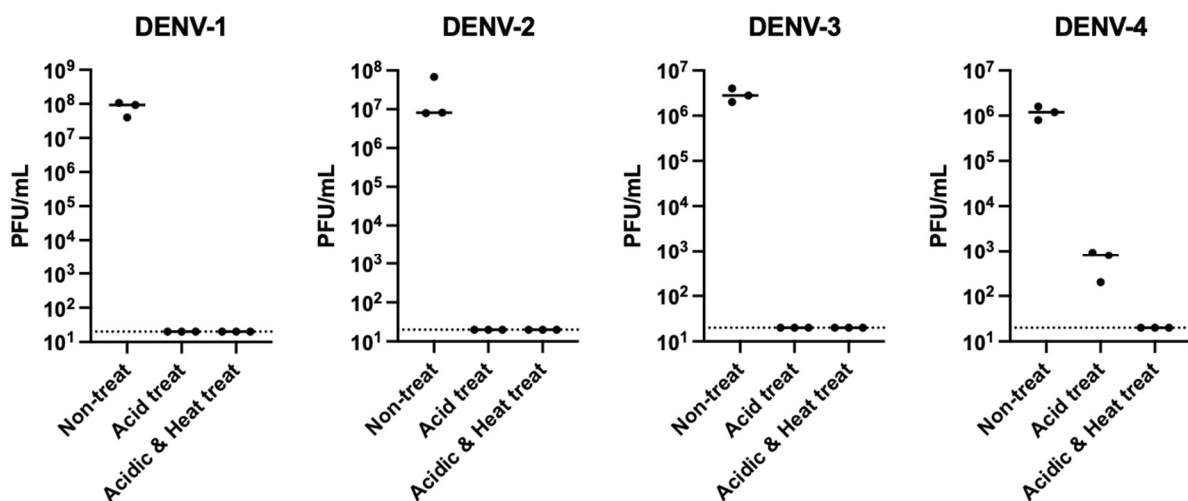


図 2. 参照品作製における酸処理および加熱処理による不活化処理

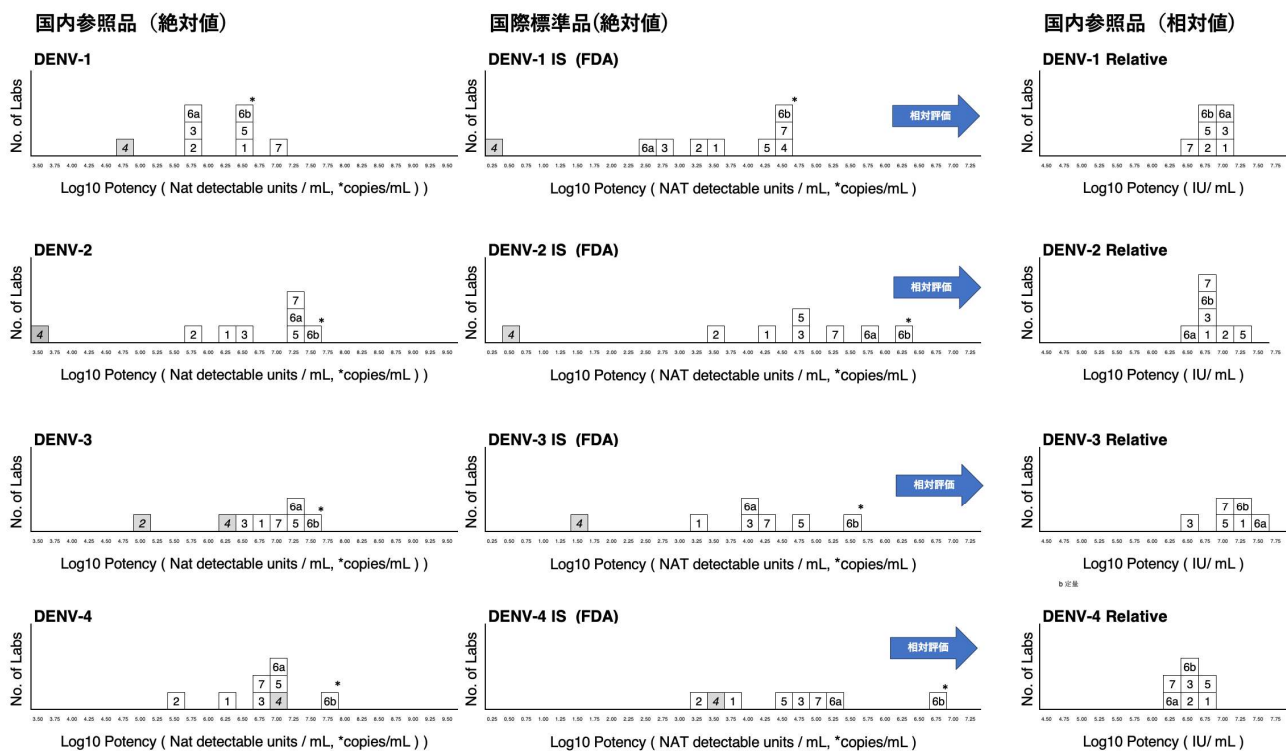


図 3. 国内参照品 (IU/mL) の整備による施設間差の縮小

表 1. 国内参照品の核酸量 (Log10 IU/mL)

	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4
平行線定量法 (Ct値* ¹ , Copies* ²)	6.881	7.108	7.151	6.581
プロビット法* ³ (最尤推定法)	6.952	6.866	7.308	6.671
Combined	6.92	6.99	7.23	6.63

*1 定性法, *2 定量法, *3 定性法

以上