

感染症安全対策体制整備事業（平成26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、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る。

これに対応し、平成25年4月より新たな病原体（特にデングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス）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26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) 国内感染報告が相次いだデング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及びコールバック検体におけるデング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) 国内感染報告が相次いだデング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。ところが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、未整備の部分が多く、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。

対象となるデングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルスの中で、まずはデングウイルスの検出系に注目した。従来のデングウイルス核酸検査では、献血血液や血液製剤の原料血漿等に極めて低濃度で混入したデングウイルスを検出可能であるかについてはこれまで十分に検討されていなかった。そこで、デングウイルスの各血清型

(DENV-1~4) について RT-PCR 用の Primer セットを大規模スクリーニング後、新規 Primer セットを同定し、効率よく検出するための高感度核酸検査法を構築した (表 1)。

① デングウイルス検出のための Primer セットの大規模スクリーニング

DENV-1~4 について、Forward および Reverse の Primer セットをそれぞれ 108, 80, 72, 71 セット (合計約 330 セット) を設計した。SYBR Green RT-PCR master mix を用いて国立感染症研究所ウイルス第一部で分離された臨床分離株 (日本赤十字社より DENV-1~4 それぞれの不活化検体が提供) について RT-PCR を行い、極めて増幅効率の優れた Primer セットを選別した。その結果、各血清型についてそれぞれ 17, 14, 18, 18 セットの優良な Primer セットを同定した。

② デングウイルス検出のための Taqman RT-PCR 用の Primer セットおよび Probe のスクリーニング

同定した Primer セットについて、Taqman RT-PCR 用の Probe を設計した。それぞれの血清型について 11~13 種類の Probe を準備し、同じ分離株を用いて Taqman RT-PCR を行った。その結果、各血清型について 3~4 セットの Taqman RT-PCR 用の Primer セットおよび Probe が極めて優れた増幅効率を示した。

③ スクリーニング後の Taqman RT-PCR 用の Primer セットおよび Probe の臨床検体を用いた感度の確認

同定した高感度の Primer セットおよび Probe 候補について、国立感染症研究所ウイルス第一部で解析した輸入感染例のデングウイルス核酸 (全 52 株) を用いて感度の確認を行った。その結果、いくつかの候補では Taqman RT-PCR で増幅できない、または十分な感度が得られない Primer セットおよび Probe が存在したが、DENV-2, 3 では多くの株で高感度に核酸増幅が可能な Primer セットおよび Probe が存在し、DENV-1, 4 については国立感染症研究所ウイルス第一部で既に公表されているものと同等に良好な Primer セットおよび Probe が存在することが確認された。以上により、最終的な Primer セットおよび Probe を決定した。

(2) 献血で検査落ちとなった血液検体及びコールバック検体における核酸検査の実施

日本赤十字社の協力のもと、平成 26 年度内 (6 月以降) に東京都内で得られた献血血液のうち、以下の臨床検体について(1)で開発した核酸検査法を用いて小規模スクリーニング検査を行った (確認のため日本赤十字社でも同検体を同方法で測定)。

① 検査落ちした血漿の 20 人プール 100 検体 (計 2,000 人)

② 9~11 月の期間に献血後の発熱やデング熱の疑いがあると申し出があったコールバック検体 23 検体

検査結果は、調べた全ての検体において、DENV-1~4 の核酸は陰性と判定された。また

陽性コントロール検体はすべて陽性、陰性コントロール検体はすべて陰性を示し、検出系として問題ないことも確認された。(表2)

(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、情報の収集や情報交換を行った。

3. 考察

デングウイルスは平成26年度の8月に約50年ぶりに国内感染が発生し、当該ウイルスに対する血液製剤の安全性確保は喫緊の課題となった。本事業にて行った高感度Primerの大規模スクリーニングによって、優れた候補を得ることができた。臨床分離株の検討により、これまでの検査法に比べて高感度の検出法が構築できたと考えられる。

また、日本赤十字社の臨床検体を用いて小規模(約2,000人)ながら実際に検査を行い、結果を判定できたことは意義深いと考えられる。

一般的にNATに求められる感度は100 IU/mLであるが、デングウイルスの国際標準品は制定されておらず国際基準に基づいた正確な感度の測定は不可能である。しかしながら*in vitro*で合成したRNAの絶対値の検量線を使用して感度を測定したところ、これまで国立感染症研究所の依頼検査で使用されてきた検出法では血漿にスパイクした100コピーのDENV-1~4の検出は可能であった。このことから、新規検出系は100コピー以下の検出感度があると予想される。

本事業で確立された高感度デングウイルス核酸検査法は、今後のデング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。

4. 平成27年度の実施計画

- (1) 献血で検査落ちとなった血液検体及びコールバック検体における高感度デングウイルス核酸検査の実施
- (2) 国内移入が危惧されるチクングニアウイルスに対する高感度核酸検査法の開発
- (3) 海外における血液安全に関する情報の収集及び交換

表 1

血清型	合成セット数	SYBR Green screening 同定セット数	Taqman screening 同定セット数	最終 セット数
DENV-1	108	17	3	1
DENV-2	80	14	4	1
DENV-3	72	18	4	2
DENV-4	71	18	4	1

表 2 A. 献血血液で検査落ちとなった 20 人プール検体のデングウイルス核酸検査の結果

Pool ID	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	Pool ID	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	Pool ID	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	Pool ID	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4
2-1	-	-	-	-	4-11	-	-	-	-	4-41	-	-	-	-	4-71	-	-	-	-
2-2	-	-	-	-	4-12	-	-	-	-	4-42	-	-	-	-	4-72	-	-	-	-
2-3	-	-	-	-	4-13	-	-	-	-	4-43	-	-	-	-	4-73	-	-	-	-
2-4	-	-	-	-	4-14	-	-	-	-	4-44	-	-	-	-	4-74	-	-	-	-
2-5	-	-	-	-	4-15	-	-	-	-	4-45	-	-	-	-	4-75	-	-	-	-
2-6	-	-	-	-	4-16	-	-	-	-	4-46	-	-	-	-	4-76	-	-	-	-
2-7	-	-	-	-	4-17	-	-	-	-	4-47	-	-	-	-	4-77	-	-	-	-
2-8	-	-	-	-	4-18	-	-	-	-	4-48	-	-	-	-	4-78	-	-	-	-
2-9	-	-	-	-	4-19	-	-	-	-	4-49	-	-	-	-	4-79	-	-	-	-
2-10	-	-	-	-	4-20	-	-	-	-	4-50	-	-	-	-	4-80	-	-	-	-
Positive	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+
Negative	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-
2-11	-	-	-	-	4-21	-	-	-	-	4-51	-	-	-	-					
2-12	-	-	-	-	4-22	-	-	-	-	4-52	-	-	-	-					
2-13	-	-	-	-	4-23	-	-	-	-	4-53	-	-	-	-					
2-14	-	-	-	-	4-24	-	-	-	-	4-54	-	-	-	-					
2-15	-	-	-	-	4-25	-	-	-	-	4-55	-	-	-	-					
2-16	-	-	-	-	4-26	-	-	-	-	4-56	-	-	-	-					
2-17	-	-	-	-	4-27	-	-	-	-	4-57	-	-	-	-					
2-18	-	-	-	-	4-28	-	-	-	-	4-58	-	-	-	-					
2-19	-	-	-	-	4-29	-	-	-	-	4-59	-	-	-	-					
2-20	-	-	-	-	4-30	-	-	-	-	4-60	-	-	-	-					
Positive	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+					
Negative	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-					
4-1	-	-	-	-	4-31	-	-	-	-	4-61	-	-	-	-					
4-2	-	-	-	-	4-32	-	-	-	-	4-62	-	-	-	-					
4-3	-	-	-	-	4-33	-	-	-	-	4-63	-	-	-	-					
4-4	-	-	-	-	4-34	-	-	-	-	4-64	-	-	-	-					
4-5	-	-	-	-	4-35	-	-	-	-	4-65	-	-	-	-					
4-6	-	-	-	-	4-36	-	-	-	-	4-66	-	-	-	-					
4-7	-	-	-	-	4-37	-	-	-	-	4-67	-	-	-	-					
4-8	-	-	-	-	4-38	-	-	-	-	4-68	-	-	-	-					
4-9	-	-	-	-	4-39	-	-	-	-	4-69	-	-	-	-					
4-10	-	-	-	-	4-40	-	-	-	-	4-70	-	-	-	-					
Positive	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+	Positive	+	+	+	+					
Negative	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-	Negative	-	-	-	-					

B. コールバック検体のデングウイルス核酸検査の結果

ID	採血地	採血日	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	ID	採血地	採血日	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4	ID	採血地	採血日	DENV 1	DENV 2	DENV 3	DENV 4
1	東京	2014/9/2	-	-	-	-	11	大阪	2014/9/27	-	-	-	-	21	大阪	2014/10/31	-	-	-	-
2	岡山	2014/9/6	-	-	-	-	12	静岡	2014/10/9	-	-	-	-	22	神奈川	2014/11/6	-	-	-	-
3	東京	2014/9/21	-	-	-	-	13	栃木	2014/10/14	-	-	-	-	23	群馬	2014/10/28	-	-	-	-
4	広島	2014/9/21	-	-	-	-	14	北海道	2014/10/7	-	-	-	-				+	+	+	+
5	神奈川	2014/9/24	-	-	-	-	15	東京	2014/9/16	-	-	-	-				-	-	-	-
6	群馬	2014/9/24	-	-	-	-	16	北海道	2014/10/1	-	-	-	-							
7	神奈川	2014/9/12	-	-	-	-	17	静岡	2014/10/19	-	-	-	-							
8	北海道	2014/9/14	-	-	-	-	18	北海道	2014/10/27	-	-	-	-							
9	神奈川	2014/9/21	-	-	-	-	19	埼玉	2014/10/24	-	-	-	-							
10	埼玉	2014/9/14	-	-	-	-	20	茨城	2014/11/3	-	-	-	-							
Positive			+	+	+	+	Positive			+	+	+	+							
Negative			-	-	-	-	Negative			-	-	-	-							

Positive: 1x10⁴ コピー/ml に調整したデングウイルス陽性検体、Negative: 陰性血漿