

## 感染症安全対策体制整備事業（令和5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 や、HCV、HBV、梅毒、パルボウイルス B19 等に関しては、血清学的検査や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、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 年度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感染者が献血する場合を想定し、高感度の核酸検査法の開発や標準品・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（図 A、表 A）。令和5年度は、2022年5月以降、欧米を中心として流行し、国内においても実際に輸入感染症例の発生が報告されたエムボックスについて、その原因ウイルスの核酸検査のための国内参照品を整備し、多施設により値付けのための共同測定を行なった。

## 2. 実施内容

### エムボックス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

グローバル化が進み訪日外国人数、出国日本人数が年々増加している。特に、新型コロナウイルス感染症のパンデミックにより人流が一時抑制されていたが、2023年5月のWHOによる「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」（PHEIC）の宣言終了や、国内における感染症法上の位置付けが「新型インフルエンザ等感染症」から「5類感染症」へ類型変更されたことに伴い様々な規制が緩和され、急速に人流が回復しているところであり、日本には存在しない病原体が旅行者や帰国者から持ち込まれるリスクが増大していると考えられる。

エムボックス（Mpox）は、ボックスウイルス科オルソボックスウイルス属のエムボックスウイルス（MPXV）による感染症で、齧歯類をはじめとする野生動物との接触によりヒトに感染する。ヒト-ヒト感染に関しては、濃厚接触者の感染や、リネン類を介した医療従事者への感染事例が報告されていたが、稀であった。しかし、2022年春にヒト-ヒト感染により Mpox が世界的に流行し、WHO は 2022 年 7 月 23 日に PHEIC に該当すると宣言した。2023 年 5 月に同宣言は解除されているが、本邦においても輸入感染症として 2022 年 7 月 25 日に国内 1 例目の患者が報告されて以降、2023 年 3 月初旬をピークに、以後も散発的な患者の発生が報告され、2024 年 8 月 2 日現在、248 名の症例が確認されている。症例の 99% は男性であり、その多くが男性同性間性的接触者（MSM）であったことから、特定の集まり等を介して世界的に広まったと推察されている。潜伏期間は 5～21 日（平均 12 日）とされ、無症候感染者からの感染事例も報告されていることから、無症候感染者が献血ドナーとなる可能性があり、実際に 2023 年、タイでの流行時に発症前の患者からの献血により輸血に至った事例も報告されている。現在のところ輸血による MPXV 感染事例は報告されていないが、無症候感染者を含む MPXV 感染者の血液からウイルス DNA が検出されていることや、2022 年に流行した MPXV は比較的症状が軽いクレード 2b に属していたが、コンゴにおいて 2023 年以降、より病原性の強いクレード 1a の感染者が数多く報告され、また、性交渉による感染事例も報告されていることから

も、引き続き、国内でのアウトブレイクに備え、献血血液中にウイルスが混入するリスクを想定し対策を講じておく必要がある。特に、検査センターや血液センターなど多施設でMPXVの核酸検査を実施する場合には、試験法キャリブレーションや性能調査、感度比較を実施するためのMPXVの核酸検査用標準品が必要となるが、国際標準品は整備されていない。そこで、本事業において令和5年度は、国内で容易に利用可能なMPXVの核酸検査用参照品を整備した。

### 3. 研究方法および結果

#### 3-1. MPXV 国内参照品の作製

MPXVにはクレード1とクレードの2種類があり、過去コンゴ盆地系統および西アフリカ系統群と呼ばれていた。MPXVの国内参照品を作製するにあたり、MPXV Zr-599株(クレード1a)、MPXV Liberia株(クレード2a)、及び2022年以降の世界的大流行時に日本で分離されたMPXV\_JPN2022\_TK006株(クレード2b)の3株を選定した。これら3株は、国立感染症研究所ウイルス第一部より分与を受けた。国際標準品の不活化法と同様な方法で、酸処理15分及び60℃1時間の加熱処理によりウイルスを不活化し、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、血漿由来ベースマトリックス(市販品)で希釈し、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確認するため、参照品をMPXV感受性細胞であるRK-13細胞(ウサギ腎臓由来細胞)に添加し、3継代(10日間)培養し細胞変性効果(CPE)が認められないこと、及び培養液中のウイルス核酸量を経時的に定量し、継代数に依存して核酸量が低下し、核酸の増加が確認されないことを確認した(図1)。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影響を及ぼさないことを確認した(図2)。

#### 3-2. 共同測定および値付け値の算出

日本赤十字社、及び国立感染症研究所を含む7施設(日本ロシュ株式会社、栄研化学株式会社、TOYOBO株式会社、タカラバイオ株式会社、北里環境科学センター)で、核酸量の値付けを定性法(7施設)及び定量法(2施設)で実施した。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法にて測定を行なった。

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段階希釈し、各希釈液からDNAを抽出後、リアルタイム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2段階の濃度を追加し、合計5点で日を変えて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/陰性の結果及び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、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DNA(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、定性法と定量法の幾何平均値を算出して核酸量とした(表1)。3株のうちMPXV\_JPN2022\_TK006株(クレード2b)を参照品として定め、他の2株の核酸量は、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て相対的に算出した(表2)。MPXV\_JPN2022\_TK006(国内参照品)、MPXV Zr-599、MPXV Liberiaの値付け値は、それぞれ、6.32 Log<sub>10</sub> U/mL、7.01 Log<sub>10</sub> U/mL、及び6.74 Log<sub>10</sub> U/mLであった。

### 3-3. 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 MPXV\_JPN2022\_TK006、MPXV Zr-599、MPXV Liberia の核酸量の絶対評価値を図 4 左側のヒストグラムに示した(数値は施設番号)。さらに、参照品に定めた MPXV\_JPN2022\_TK006 の値を元に相対的に算出した MPXV Zr-599、MPXV Liberia の核酸量を図 4 右側のヒストグラムに示した。いずれの検体においても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。

## 4. 考察と課題

### MPXV の核酸検査のための国内参照品の整備

本事業において、令和 5 年度は 2022 年に世界的で大流行した MPXV\_JPN2022\_TK006 株(クレード 2b)の国内参照品、および、参照パネルとして MPXV Zr-599 株(クレード 1a)と MPXV Liberia 株(クレード 2a)の計 3 種を整備した。Mpox の輸血感染リスクについては、(i) これまでに輸血による Mpox 感染事例の報告はないこと、(ii) ウイルス血症の持続期間については明らかになっておらず、血液からウイルス核酸が検出される場合でも感染性を有するウイルスは分離されていないこと、(iii) 日本では MSM の献血は出来ないこと、(iv) 新しいパートナーとの性的行為後 3 ヶ月の献血延期期間が設けられていること、(v) 海外から帰国された方の 4 週間の献血延期措置が設定されていることなどを総合的に考慮すると、現在のところ輸血による Mpox 感染のリスクは低いと考えられる。しかし、今後新たな株の出現等によりアウトブレイクが起こる可能性はあり、感染症のアウトブレイクの際には、新型コロナウイルス感染症の時のように複数の施設で PCR を実施することが考えられる。現在の技術レベルにおいて、アッセイごとに検出できる核酸量に大きな差はないと考えられるが、測定キット等により、測定に必要な検体量、抽出量、PCR 反応に用いる検体量が異なるため、採取検体中から検出できる最低ウイルス量も異なると考えられる。共同測定で算出した各施設の核酸絶対量は、図 3 左のヒストグラムに示すように約 100 倍の開きがあるが、図 3 右のヒストグラムに示すように、国内参照品として定めた MPXV\_JPN2022\_TK006 を用いて相対的に MPXV Zr-599 と MPXV Liberia の核酸量を算出すると、施設間差はハーフログ程度に縮小されることが認められた。このことから、国内参照品を整備しておくことの有用性が改めて示唆され、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。今後は必要に応じて、国立感染症研究所への依頼により次世代生物学的製剤研究センターから参照品を提供できるしくみを整えると共に、MPXV の国際標準品が出来た際には、再評価を実施して IU/mL の核酸量を付与し、他国とも比較できるように準備する予定である。

## 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

WHO の血液製剤に関する各種会合に定期的に参加し、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。

## 6. 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 5 年度は、MPXV の国内参照品を整備し、共同測定により核酸量(U/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。

## 7. 令和6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 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標準品の整備

### 【献血血液を用いたサーベイランス、及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 医療施設や血漿分画製剤メーカーの協力依頼への対応

⑤ 「国立健康危機管理研究機構」発足へ向けた体制整備

### 【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及び交換

図 A. 感染症安全対策体制整備事業の概要

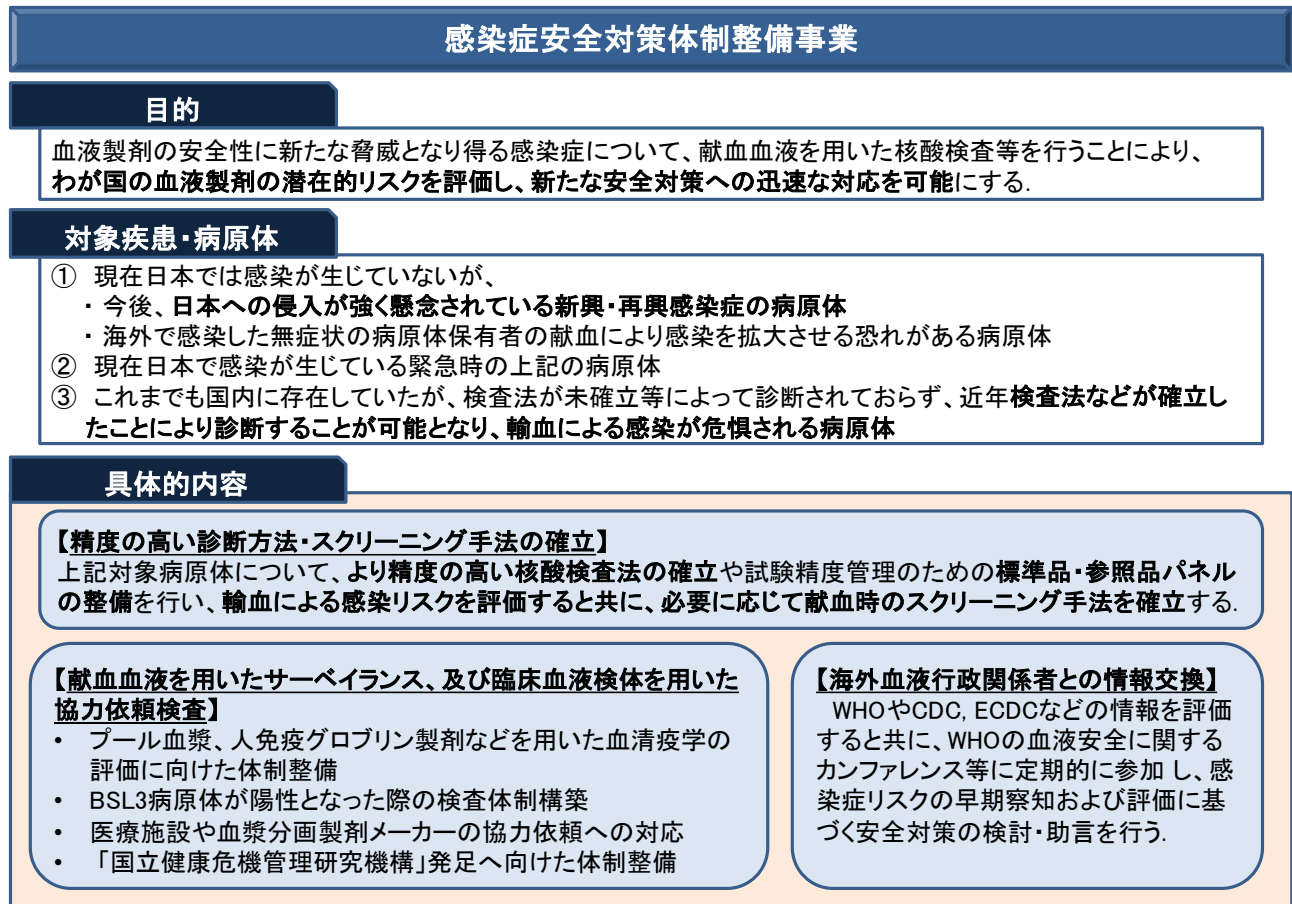


表 A. 感染症安全対策体制整備事業で実施・対応した課題

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x80)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x100)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x100)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x100)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x100)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x100)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 : NCMJ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
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, Mpox: エムボックス, NCGM: 国立国際医療センター

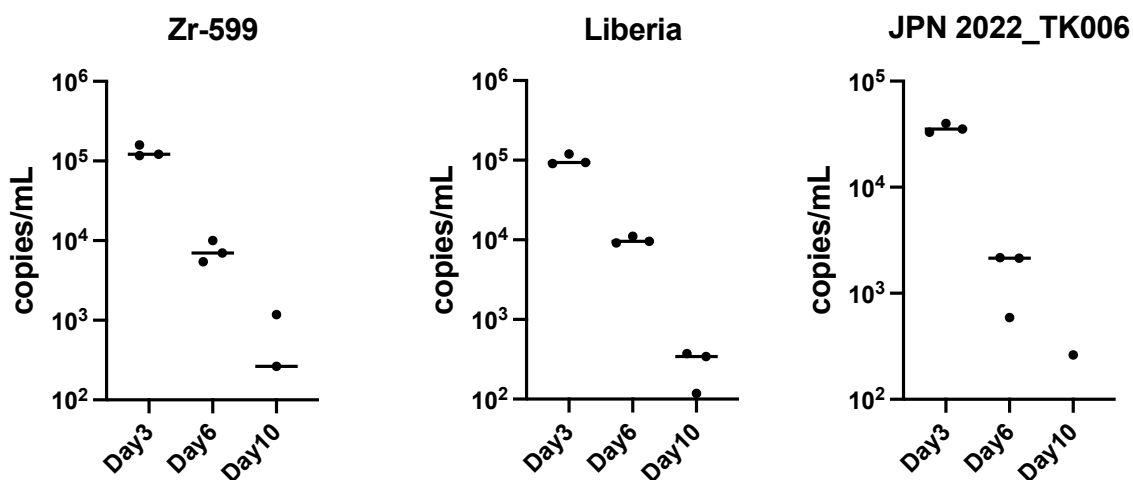


図 1. 参照品添加後の 3 継代 (10 日間) 培養時の核酸量の推移

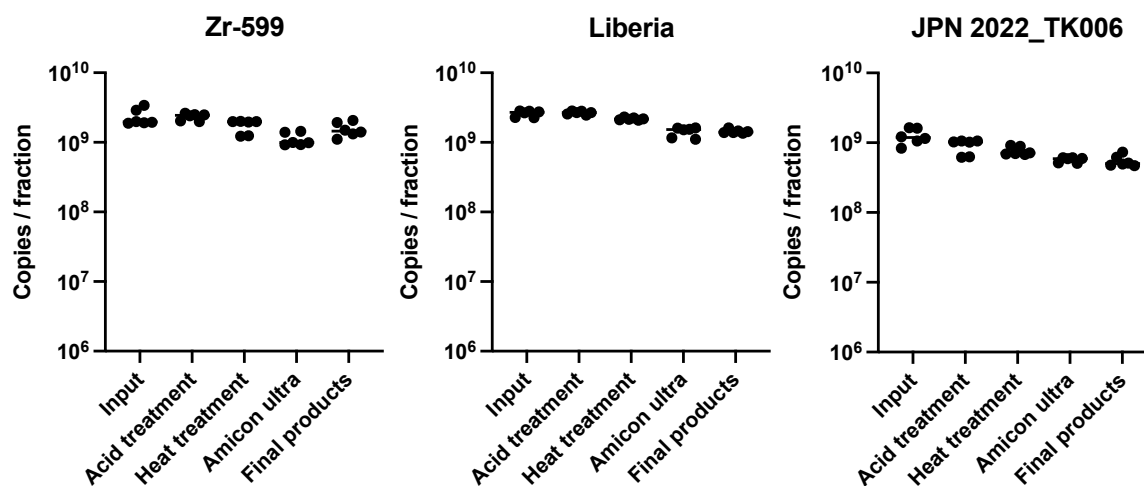


図 2. 酸処理及び加熱処理による核酸回収に対する影響

表 1. 各参照品検体の核酸量

単位: Log10 Units/mL

	MPXV Zr-599	MPXV Liberia	MPXV_JPN2022_TK006
定量法	7.094	6.855	6.378
定性法	6.974	6.574	6.263
<b>Combined</b>	<b>7.03</b>	<b>6.71</b>	<b>6.32</b>

表 2. 値付け値

単位 : Log10 Units/mL

	国内参照品 MPXV_JPN2022_TK006 Lot. 003/2023	MPXV Zr-599 Lot. 001/2023	MPXV Liberia Lot.002/2023
定量法	6.378	7.102	6.881
定性法	6.263	6.926	6.591
<b>Combined</b>	<b>6.32</b>	<b>7.01</b>	<b>6.74</b>
	絶対評価	相対評価 (relative to JPN2022_TK006)	相対評価 (relative to JPN2022_TK006)

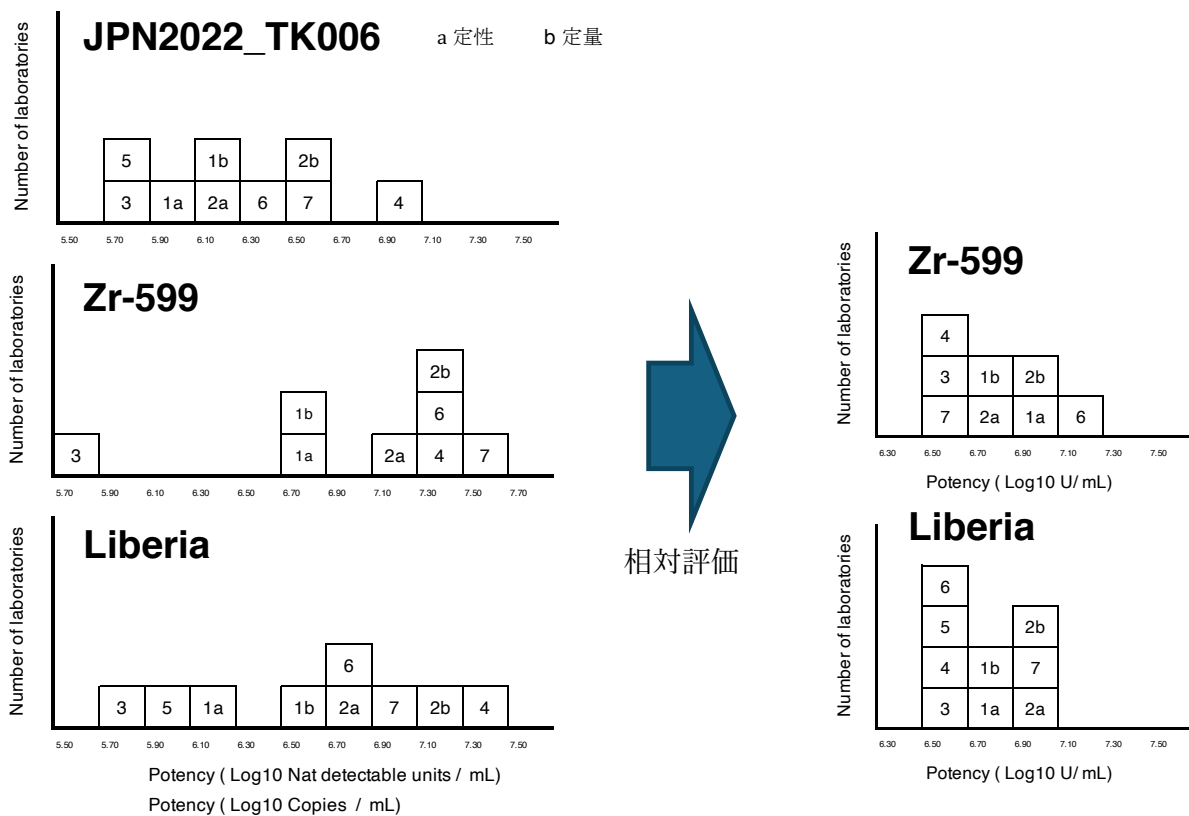


図 3. 絶対評価と相対評価の施設間差比較

以上