

厚生労働科学研究費補助金【医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業】
輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全確保と安定供給のための新興・再興感染症の
研究
(総合)研究報告書

新興感染症発生時の献血対応に関する研究

研究分担者 平 力造（日本赤十字社 血液事業本部）
研究協力者 篠原 直也、蕎麦田 理英子、大和田 尚、松林 圭二
（日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所）
橘川 薫、小島 牧子（関東甲信越ブロック血液センター）

研究要旨

輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症（ジカウイルス、デングウイルス及びチクングニアウイルス）への対策として、リスク分析等を行い、その安全対策を検討し国内感染等が発生した場合の対応の手引きを作成し、日赤血液センターへ情報共有をした。その中でジカウイルス（ZIKV）については、感染した場合に胎児へのリスクのある妊婦の輸血実態調査を行い、陰性血液の供給にかかる手順書（案）を作成した。

ZIKVの国内感染を想定して、献血血液のスクリーニング検査試薬（Procleix Zika Virus Assay, Grifols Diagnostic Solutions, Inc.）の評価を行った。95%検出感度は14.98 IU/mL（WHO標準品）であった。特異性試験および、同時再現性・日差再現性試験においても良好な結果が得られた。

また、その他の新興・再興感染症の検査系の準備と、ZIKVおよびUSUVの輸血用血液製剤における動態評価を行った。ZIKVは赤血球製剤および血小板製剤においては、DENVで報告されているような増殖は認められなかった。USUVは献血者血清中では感染性が中和される事が示唆された。

A. 研究目的

輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症への対策のための各ウイルスについて疫学、症状、感染経路、輸血感染、海外措置及び国内の対応について取りまとめた。さらには、国内感染を想定した対応手引き（案）等を作成し、日赤血液センターへ情報共有した。また、妊婦のジカウイルス（ZIKV）感染が母子感染による小頭症等の先天異常の原因になると結論付けられた

ことから、日本における妊婦輸血の現状調査を実施し安全対策について検討した。

献血血液のスクリーニング検査試薬の精度を評価し、ZIKVの国内感染発生時（蔓延時）の輸血用血液製剤の安全性確保対策の一つの手段になり得るか検証した。さらに、その他の新興・再興感染症の検査系の準備を行った。ZIKVおよびウスツウイルス（USUV）の輸血用血液製剤における動態評価を行い、これらウイルスが日本へ侵入した場合の輸

血感染等のリスクを推定する一助とした。

B. 研究方法

1. 輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症への対策

(1) 対応手引き(案)の作成等

ア ファクトシートの作成

デング熱、ジカウイルス感染症、チクングニア熱及び麻疹(はしか)について、疫学、症状、感染経路、輸血感染、海外措置及び国内の対応について、WHOのガイダンスやAABBのファクトシートを参考に作成する。

イ 対応手引き(案)の作成

蚊媒介ウイルス感染症の発生状況別に分類し、「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」を参考し、分類ごとにとりまとめ対応手引き(案)を作成する。

ウ その他

- ・ 献血会場における掲示物の掲示、献血者への対応及び献血後情報への対応等については、同感染症の国内外の発生状況等を確認したうえで、リーフレット(案)等を作成する。
- ・ 蚊媒介ウイルス感染症の問い合わせ用 Q&A(案)を作成する。
- ・ ZIKV の国内感染発生時の「ZIKV 陰性血液の供給手順(案)」を作成する。

(2) 日本における妊婦輸血の現状調査

妊婦のZIKV感染が母子感染による小頭症等の先天異常の原因になると結論付けられたことから、日本にお

ける妊婦輸血(出産時の輸血を除く)の実施状況について、厚生労働省委託事業「平成29年度血液製剤使用実態調査(輸血業務に関する総合的調査)」にて、新規項目を作成し調査依頼を行った。

2. Grifols社製ZIKV検出用スクリーニング用試薬(Procleix Zika Virus Assay)の精度評価と検査手順の策定

(1) Procleix Zika Virus Assayの精度評価

ア. 感度試験

ZIKV3 株: PF13/251013-18 株(WHO 標準品)、MR766 株(アフリカ由来株)、PRVABC-59 株(アジア由来株)について献血者陰性血漿にて多段階希釈調製した試料(a、b、c、d、...IU/mL)を各 Y 重測定し、JMP ver.13 を使用したロジスティック回帰分析により 95%検出感度を算出した。

イ. 特異性試験

ALT 検査不適献血者血漿 500 検体を使用し評価した。近縁の日本脳炎ウイルス(JEV)との交差性について、日本に侵淫している JEV 遺伝子 1 型(Mie41 株)と遺伝子 3 型(JaGar01 株)で評価した。

ウ. 同時再現性・日差再現性試験

ア. 感度試験において PF13/251013-18 株の 95%検出感度以上の 3 濃度(270、90、30 IU/mL)を各濃度 8 回測定/日で 3 日間測定した。同じ日にち内で測定したさいの S/CO および、日にちを変えて測定したさいの同

じ測定回ごとの S/CO の変動係数 (CV) を算出し評価した。

(2) 検査手順の策定

国内感染事例の発症に備えて、同試薬による検査手順を策定した。

3. その他のウイルスの検査系の準備

(1) 風疹ウイルス

国立感染症研究所より分与された風疹参照RNAについて、滅菌蒸留水 (DW) を使用した多段階希釈法により検出感度の評価を行った。方法は国立感染症研究所の検査マニュアルを参考に実施した。

(2) 麻疹ウイルス

国立感染症研究所より分与された麻疹参照RNAと弱毒性麻疹ウイルスワクチン (シュワルツFF-8株) について、DW を使用した多段階希釈法により検出感度の評価を行った。方法は国立感染症研究所の検査マニュアルを参考に実施した。

(3) USUV

USUV の遺伝子情報や、論文で報告されている方法を参考にし、TaqMan 法による核酸検出系を構築した。合成遺伝子を用いて増幅効率を算出した。培養・増殖させた USUV について、献血者陰性血漿を使用した多段階希釈法により検出感度を算出した。また、近縁の JEV および、ウエストナイルウイルス (WNV) との非特異的増幅反応について評価した。

4. ZIKV の輸血用血液製剤の保存期間に

おける動態評価

血小板製剤 (N=3) と赤血球製剤 (N=3) に ZIKV ($7.34 \text{ Log}_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ を約 2mL) を添加し、それぞれの保存期間中の影響について、ウイルス RNA 濃度 (リアルタイム RT-PCR: TaqMan プローブ法) と感染力価 (プラークアッセイ) から評価した。なお、対照として生理食塩液を用いた。

5. 献血者血清による ZIKV および USUV の感染中和能の評価

Vero 細胞を用いた感染中和実験 (We gene Borena et al., 2017) により、献血者血清 (N=12) の JEV に対する感染中和能を算出した。同様に、同じ血清を用いて ZIKV および、USUV に対する感染中和能も算出した。算出された JEV に対する感染中和能と、ZIKV、USUV に対する感染中和能の相関関係を解析し、各々のウイルスの抗体交差性について評価した。

(倫理面への配慮)

日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会の倫理審査を受け、血液製剤の使用についての承認を得ている。(倫理審査番号: 2018-017・2019-044)

C. 研究結果

1. 輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症への対策

(1) 対応手引き (案) の作成等

ア ファクトシートの作成

最新の情報を収集して「蚊媒介ウイルス感染症にかかるファクト

シート」を作成した。

イ 対応手引き(案)の作成

上記ファクトシートを参考として蚊媒介ウイルス感染症の国外及び国内の発生状況を、発生状況別に5つのレベルに分類し、それぞれの分類に応じて「蚊媒介ウイルス感染症への対応」(別添)のとおり対応する。

レベル分類

レベル1 (平常時)	国外流行情報 なし
レベル2	国外流行情報 あり
レベル3	国内感染発生 あり (地域未特定)
レベル4	国内感染発生 あり (地域特定)
レベル5	国内感染発生 あり (パンデミック)

なお、国外(海外)の感染症流行情報は、海外感染症発生情報(厚生労働省検疫所 FORTH) <https://www.forth.go.jp/topics/fragment1.html>、海外安全ホームページ(感染症危険情報) <https://www.anzen.mofa.go.jp/>、感染症発生動向調査週報(IDWR)国立感染症研究所) <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html> より入手する。

ウ その他

- ・献血会場における掲示物の掲示、献血者への対応及び献血後情報への対応等については、同感染症の国内外の発生状況等を確認したうえ、リーフレット(案)等を作成した。
- ・蚊媒介ウイルス感染症の問い合わせ用 Q&A(案)を作成した。
- ・ZIKV の国内感染発生時の「ZIKV 陰性血液の供給手順(案)」を作成した。

(2) 日本における妊婦輸血の現状調査

平成29年に妊婦(分娩時以外)への輸血経験のある医療機関は、8,357施設中88施設(1.05%)で、実患者数は667名であった。本調査の病床別の回収率とそれぞれの質問項目の回答率から補正した結果、妊婦(分娩時以外)への輸血経験のある医療機関は1年間に約100施設で、実患者数は約700人と計算された。製剤別の輸血本数は、赤血球製剤は約900本、血小板製剤は約200本及び血漿製剤は約600本であり合計約1,700本と試算されたが、血漿製剤の使用数が多く、一部分娩時輸血が含まれていることが推測された。そのため、本調査の詳細データの入手依頼を行ったがデータ開示不能であった。輸血業務管理システムでは、妊婦輸血について、分娩時等に区分することができないことから実態よりは多く報告されていることが推測された。

2. Grifols社製ZIKV検出用スクリーニング用試薬(Procleix Zika Virus Assay)の精度評価と検査手順の策定

(1) Procleix Zika Virus Assayの精度
評価

ア．感度試験

ZIKV 3 株の算出された 95%検
出感度は各々以下のとおりであ
った。

・ PF13/251013-18 株 : 14.98
IU/mL (95%信頼区間[CI] 0.90 ~
46.50 IU/mL)

・ MR766 株 : 12.10 IU/mL
(95%CI 10.01 ~ * - IU/mL)

*算出不能であった。

・ PRVABC-59 株 : 77.34 IU/mL
(95%CI 28.63 ~ 106.76 IU/mL)

イ．特異性試験

測定した ALT 検査不適献血者
血漿 500 検体は、全て陰性であり
非特異的の反応は認められなかつた。
また、同様に測定した JEV(Mie41
株 と JaGar01 株 : 各 4×10^6
TCID₅₀/mL) も全て陰性であり、
JEV との交差反応も確認されなかつた。

ウ．同時再現性・日差再現性試験

同時再現性および日差再現性試
験における CV は各々以下のとお
りであった。

・ 同時再現性 : 中央値 2.81%
(1.98 ~ 3.52%の範囲)

・ 日差再現性 : 中央値 2.07%
(0.24 ~ 4.78%の範囲)

共に高い再現性が示された。

(2) 検査手順の策定

「血液製剤及び献血血の安全性
確保と安定供給の維持のための新
興・再興感染症に関する総合的研

究」にて、平成28年度に作成したW
NVの検査手順を参考に作成した。

3．その他のウイルスの検査系の準備

(1) 風疹ウイルス

風疹参照RNAについて、算出さ
れた95%検出感度は : 66.0 copies/
mL (95% CI 33.8 ~ 391.8 copies
/mL)であった。

(2) 麻疹ウイルス

麻疹参照RNAおよび弱毒性麻疹
ウイルスワクチンについて、算出
された95%検出感度は以下のとお
りであった。

・ 麻疹参照RNA : 23.1 copies/m
L (95% CI 5.8 ~ 92.2 copies/m
L)

・ 弱毒性麻疹ウイルスワクチン :
59.7copies/mL (95%CI 24.5 ~ 5
32.8 copies/mL)

(3) USUV

Silvia C Barros et al., 2013の
論文を参考にした検査系が良好で
あった。当系で合成遺伝子を用い
て検量線を作成したところ、増幅
効率は89%であった。ヒト血漿中
に添加したUSUVにおいては、12.
4 copies/mLまで100%の検出率で
あった。また、JEV (Mie41株とJa
Gar01株)および、WNV(NY99株)
との非特異的増幅反応は認められ
なかつた。

4．ZIKV輸血用血液製剤の保存期間にお
ける動態評価

血小板製剤の保存期間(0日目 ~ 7日

目)のZIKV-RNA濃度と感染力価は、共に減少していた。しかしながら、対照(生理食塩水)と比較すると、減少率が低い傾向であった。

赤血球製剤の保存期間(0日目～42日目)のZIKV-RNA濃度と感染力価は、共に減少していた。対照(生理食塩水)と比較しても大きな差はなかった。

5. 献血者血清によるZIKVおよび、USUVの感染中和能の評価

献血者血清は、ZIKVに対して感染中和能は認められなかったが、USUVに対しては5倍～10倍の血清希釈下まで感染中和能が認められた。このUSUVの感染中和能は血清中のJEVの感染中和能と相関があり(スピアマンの順位相関係数, $r = 0.858$)、抗JEV抗体との交差性が示唆された。

D. 考察

輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症(ZIKV、デングウイルス及びチクングニアウイルス)への対策として、ファクトシートを作成し、リスク分析等を行い、その安全対策を検討し国外及び国内の発生状況を考慮した、安全対策について日赤に対応手引き案として作成した。その対応手引き案として、国外における当該ウイルスによる流行情報の有無、国内での感染状況が確認された場合の感染地域の特定状況別を考慮した「蚊媒介ウイルス感染症への対応(案)」(献血者への対応、献血血液の対応及び医療機関への対応)を策定した。これらの作成した対応手引きについては、国内感染等が発生した場合の迅速な対応に

資するために日赤血液センターへ情報共有した。

妊婦への輸血の実態調査から、年間約700名の患者に約1,700本の輸血用血液製剤が使用されていることが推定された。このため、ZIKVの国内感染が確認された場合の対策として、ZIKV陰性血液の確保について、安定的かつ効率的に供給可能となるように日本輸血・細胞治療学会等と情報共有しZIKV陰性血液ストック又は予約注文による対応手順(案)を作成した。また、厚生労働省委託事業「平成29年度血液製剤使用実態調査(輸血業務に関する総合的調査)」からは、輸血管理システムでの区分が困難なことから一部分娩時輸血が含まれている可能性があり、その実態は、少なくなることが推測された。

Grifols社製ZIKV検出用スクリーニング用試薬の精度評価を行った結果、WHO標準品を用いた感度試験では、95%検出感度は14.98 IU/mLであった。アジア由来株、アフリカ由来株ともに十分な感度で検出出来ることも確認された。特異性試験において、献血者血漿500検体が全て陰性と判定されたこと、およびJEVとの交差反応がなかったことから、高い特異度であることが確認された。また、同時再現性・日差再現性試験においても良好な結果が得られた。これらのことから、ZIKVの国内感染が発生した場合の、輸血用血液の安全性確保の観点から、当該試薬は一つ的手段として使用可能であると考えられた。同試薬を使用する検査手順については、WNV試薬の手順と同様に作成しているが、日赤基幹システムとの連携はなく、GMPの観点からシステム連携の検討が必要である。

また、今回評価した麻疹ウイルス、風疹ウイルスの核酸検出系の感度等は十分であったことから、これらウイルスに対する検査の準備は行えたと考えられる。同様に、今回構築した USUV の核酸検出系も、感度は十分であり、かつ日本土着の JEV および、近縁の WNV との非特異的増幅反応もなかったことから、検査の準備を行えたと考えられる。

ZIKV は、血小板製剤および赤血球製剤の保存期間中において、近縁の DENV のようなウイルスの増殖は認められなかった。よって、これら製剤を保存することが、ZIKV 輸血感染のリスク増加には繋がらないと考えられた。

献血者血清は、ZIKV に対して感染中和能は認められなかったが、USUV に対しては少なからず感染中和能が認められた。USUV に対する感染中和能は、血清中の JEV 感染中和能と相関があり、JEV ワクチン接種等によって得られた抗 JEV 抗体と交差していることが示唆された。USUV のみ感染中和能が認められた要因として、ZIKV より USUV の方が JEV と分子系統樹的に近縁であるためと考えられた。よって、USUV が日本へ侵入した場合の輸血感染リスクは、他のウイルスよりも低い可能性が予想された。

E . 結論

輸血用血液製剤の安全性確保に係る蚊媒介ウイルス感染症 (ZIKV、DENV 及びチングニアウイルス) への対策として、今後見込まれる観光目的や東京オリンピック・パラリンピック競技大会に向けての様々な国からの訪日客の増加及び同感染症の輸入例の増加に対して、国内感染発生時等における

2.学会発表

対応について万全を期すため対応手引き等を作成し、日赤血液センターへ情報共有を行った。

妊婦への輸血の実態調査から、年間約 700 名の患者に約 1,700 本の輸血用血液製剤が使用されていることが推定されたが、再評価の結果、その実態は、さらに少なくなることが予測され、国内感染が確認された場合の対策として、ZIKV 陰性血液の供給にかかる手順書 (案) を作成した。

Grifols 社製 ZIKV 検出用スクリーニング用試薬 (Procleix Zika Virus Assay) の検査精度は良好であることが確認された。さらに、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、USUV において、高い検出感度の検査系が準備できた。

また、ZIKV は赤血球製剤および血小板製剤の保存期間中に、ウイルスの増殖は認められなかった。USUV は献血者血清中では、JEV ワクチン接種等から得られる抗 JEV 抗体の存在により感染性が中和される事が示唆された。よって、これらウイルスが血液製剤中で輸血感染リスクが高まるような事象は生じず、USUV においては寧ろ、感染性が中和されることで輸血感染リスクが低くなる可能性が予想された。

F . 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1.論文発表

なし

篠原直也、橘川薫、小島牧子ら。ジカウ
イルス核酸検出用試薬の精度評価。第
42 回日本血液事業学会総会、10 月 2-4
日、2018 年。

特になし

実用新案登録

特になし

G . 知的所有権の取得状況

特許取得

その他

特になし