

200501403A

厚生労働科学研究費補助金
特別研究事業

平成17年度
総合研究報告書

献血血液におけるウエストナイルウイルス
スクリーニング法に関する研究

主任研究者 山口一成
平成18(2006)年3月

目 次

平成17年度

I. 総合研究報告書

献血血液におけるウエストナイルウイルススクリーニング法に関する研究

山口一成 水上拓郎 高崎智彦 日野学 柚木久雄 三根英子

協力研究者；水谷哲也 坂本達也 _____ P.1

献血血液におけるウエストナイルウイルススクリーニング法に関する研究
総合研究報告書

主任研究者 山口 一成（国立感染症研究所血液・安全性研究部）

研究要旨 ウエストナイル熱・脳炎はウエストナイルウイルス（WNV）が原因で引き起こされるウイルス感染症で、アフリカや西アジア、中東、ヨーロッパ等で流行し、1999年は米国において初めて認められ以来、2002年には患者数にして4,000人以上、死亡例として277例を数える大流行となった。さらに輸血による感染、臓器移植による感染などの死亡例が数十名に及んだことから、米国では血液のWNV NATスクリーニングが開始された。一方、本邦では米国で感染した患者の帰国後発症例があるものの、国内での感染例は報告されていない。しかし、米国のみならずロシアでもWNVの蔓延が報告されていることから、同ウイルスが本邦に輸入される危険性は高く、WNV NATスクリーニングの必要となる事態に即応できるよう、準備しておくことが急務である。

そこで本研究課題では、米国で使われているChiron社のWNV NATスクリーニング法(Procleix® WNV Assay)の機器・試薬を入手し、その特異性、感度、実用性等について検討する事を目的とした。まず、日本赤十字社のNAT検査合格（HIV, HBV, HCV陰性）の血漿からRNAを抽出し、RealtimePCR法によってWNV陰性を確認した。この血漿にウエストナイルウイルス(NY99株、g2266株)、日本脳炎ウイルス(Beijing-1株)、デングウイルス(1, 2, 3, 4血清型)を1000pfu～0.001pfu/mLの範囲で添加し、メーカーの指定する方法によりNAT検査を行った。

その結果、WNVのNY99株は、1000から0.05pfu/mLまで、g2266株は1000から0.005pfu/mLまでを100%検出する事ができた。デングウイルスについては4つの血清型ともに交差性は認められなかったが、日本脳炎ウイルスにおいては1000 pfu/mLという非常に高いウイルス量で陽性となった。

以上の結果より、Procleix® WNV Assayは日本においてもWNV スクリーニングにおいて有効に機能する事が明らかとなった。この一連の研究により、ウエストナイルウイルスの感染が日本で認められた場合の迅速な対応が、国立感染症研究所、日本赤十字社で連携して可能となった。

分担研究者

水上 拓郎 国立感染症研究所 血液・安全性研究部

高崎 智彦 国立感染症研究所 ウイルス1部

日野 学 日本赤十字社 血液事業本部

柚木 久雄 日本赤十字社 中央血液研究所

三根 英子 日本赤十字社 血液管理センター

協力研究者

水谷 哲也 国立感染症研究所 ウイルス1部

坂本 達也 日本赤十字社 血液管理センター

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス(WNV)は1937年にウガンダではじめて分離され、アフリカ、ヨーロッパ、中東、中央アジア、西アジア、オーストラリア(クンジンウイルス)など広範囲に分布しており、熱性疾患や日本脳炎に類似した脳炎を引き起こす節足動物媒介性ウイルスである。3つのPoly A領域を欠く、約11Kbの一本鎖RNAをもち、脂質エンベロープを有する直径約50nmの球形ウイルスである。セントルイス脳炎ウイルス(SLEV)などと共にフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、日本脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、クンジンウイルスと相同性が高い。また一方で抗原的に強い交差性を示す日本脳炎血清型群に分類されている。主に294種以上の鳥類が固有の宿主、増幅動物であり、終末宿主としてヒトやウマが感染する。ヒトにおける潜伏期は2-15日で、80%は不顕性感染に終わる。ヒトの発病前に1-5日間のウイルス血症期が存在し、平均6.2日である。中枢神経症状が認められた時期にはウイルス血症は終わっている事が多い。臨床症状としては、発熱、頭痛、背部痛、筋肉痛、食欲不振が3-6日間認められ、リンパ節の腫脹、発疹や筋力低下が

主因のギランバレー症候群様症状を示す事もある。

近年では、弛緩性麻痺(ポリオ様)の症状を呈する症例も多数報告されている。感染者の1%が重篤な症状を示すが、高齢者や何らかの疾患を有した患者である場合が多い。また、死亡率は脳炎患者の3-15%に相当する。

ヒトにおける媒介蚊はアカイエカやコガタアカイエカなどのイエカ属であるが、ヤブカなどにも媒介能があり、米国では40種以上の蚊が媒介することが明らかとなっている。日本においても媒介可能な蚊が存在することからも、一度日本にウエストナイルウイルスが流行すると感染が拡大する恐れがあると考えられる。

以前は散発的な流行をアフリカやイスラエル、ヨーロッパなどで繰り返していたが、1999年に米国大陸においてトリやウマの動物感染症として発生し、また一方でヒトの髄膜炎、脳炎の流行としてニューヨークで初めて報告された。これらのウエストナイルウイルスを保持した蚊は越冬できないと考えられていたため、次年度は終息すると予測されたが、2000年には越冬した事が明らかとなり、米国の約半分の地域に鳥類の感染が拡大した。2001年は蚊の活動がフロリダへ拡大し、鳥による急速な感染拡大がみとめられ、10州で約66例のWNV脳炎、髄膜炎の症例が報告された。2002年には患者数にして4,000人以上、死亡例として284例を数える大流行となった。2003年も9858例の患者、264人の死亡例が認められ、現在に至るまで依然、ウエストナイルウイルス感染が多数、報告されている。ウエストナイルウイルスの感染のリスクとして輸血が考えられる事は、かなり以前から指摘されていたが(Biggerstaff *et al*, *Transfusion* 42; 1019-1026,

2002)、2002年には実際に輸血や血液製剤による感染例が21例報告された (Pealer et al, *N. Eng. J. Med.* 349: 1236-1245, 2003)。また、臓器移植 (Iwamoto et al, *N. Eng. J. Med.* 348: 2196-2203) や授乳、子宮内感染が認められ、これらの死亡例が数10名に及んだことから、米国では血液の WNV NAT スクリーニング法が開発され、承認、開始された。当初は6-16検体のミニプールで WNV NAT が行われ、陽性が出た場合は個別 NAT が行われていたが、流行地域などで特別な理由がある場合は、個別 NAT が導入されていた。個別 NAT で陽性となった血液は輸血には利用せず、ドナーは供血を禁止された。2004年のスクリーニングの結果、少なくとも1017個のウイルス血症と推定される供血があり、除かれている。さらに、最初の PCR 陽性が明らかとなったから104日目も陽性 (5回のテストの1回が陽性) であったドナーの報告があった事から、FDA は2005年に禁止された供血者からの採血を120日間禁止するガイダンス案 [*Guidance for Industry Assessing Donor Suitability and Blood and Blood Product Safety in Cases of Known or Suspected West Nile Virus Infection, 2005 June*] を発表し、輸血血液におけるウエストナイルウイルス感染のリスクを大幅に軽減した。

本邦では米国で感染した患者の帰国後発症例があるものの、国内での感染例はまだない。厚生労働省と国立感染症研究所は2000年 (平成12年) に PCR 診断法に着手し、成田空港で米国東海岸からの帰国者へのウエストナイル熱の流行を告知し、希望者に検査をする体制を整えた。厚生労働省は「輸入感染症対策に係る問診の強化について」 (平成15年2月) によって海外からの帰国後3週間

の献血を禁止し、「ウエストナイルウイルス等の輸入感染症対策に係る採血禁止期間の変更」 (平成16年7月) においては海外からの帰国者の献血禁止期間をさらに4週間 (28日) に延長し、万全の体制を整えている。しかし米国では45日間ウイルス血症が続いた無症候性ドナーや、最初の PCR 陽性が明らかとなったから104日目も陽性であったドナーの報告がなされており、4週間の禁止期間で問題が完全に防げるとは言いがたい。また、2003年に WNV 感染が疑われた患者の追跡調査を行った結果、非常に低レベルのウイルス血症 (0.11pfu/mL) も認められている。さらに、2003年度のウイルス血症の患者のウイルス濃度 (0.06から0.5pfu/mL) が2002年のウイルス濃度 (0.87から75pfu/mL) より低い傾向にあるという報告もある。また感染地域として米国のみならずロシアでも WNV の流行が報告されていることから、同ウイルスが本邦に輸入される危険性は極めて高く、また海外からの帰国者からの献血血液から WNV が感染する危険性は未だに無視できない。そのため、WNV NAT スクリーニングの必要となる事態に即応できるよう準備しておくことが必要である。特に、(1) 低レベル (0.06pfu/mL) のウイルス血症を見つける事が可能である高感度あり、(2) なおかつ日本脳炎血清型群に分類されている他のウイルスとの交差性が認められない特異性の高い WNV NAT スクリーニング法の実施準備が急務であると考えられる。

そこで本研究課題では、米国で使われている NAT スクリーニング法の機器、試薬の中から、上述の (1)、(2) に該当する機種を選定・入手し、その特異性、感度、実用性等について検討する。この一連の研究により、ウエストナイルウイ

ルスの感染が日本で認められた場合の迅速でなおかつ正確な対応が、厚生労働省、国立感染症研究所、日本赤十字社で連携して可能となるといえる。

B. 研究方法

材料と方法

(1) 血漿中のWNVの否定試験

日本赤十字社でNAT血液検査(HIV, HCV, HBV)に合格している血漿に各種のウイルスを添加し検討する。まず、リアルタイムPCR(TaqMan PCR法)による血漿中のWNVの否定試験を行う。WNVの検出は、国立感染症研究所ウイルス1部が公開している「ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.3.0」を参考に行った。500 μ lの血漿をHigh Pure Viral RNA Kit(ロシュ・ダイアグノスティック株式会社)を用いてRNAを精製した。このRNAを用いて以下のプライマーでWNVの検出を行い、血漿中のWNVの存在を否定した。

Primer set 1

WN3'NC-forward (10668-10684)

CAG ACC ACG CTA CGG CG

WN3'NC-reverse (10770-10756)

CTA GGG CCG CGT GGG

WN3'NC-probe (10691-10714)

TCT GCG GAG AGT GCA GTC TGC GAT

Primer set 2

WNENV-forward (1160-1180)

TCA GCG ATC TCT CCA CCA AAG

WNENV-reverse (1209-1229)

GGG TCA GCA CGT TTG TCA TTG

WNENV-probe (1186-1207)

TGC CCG ACC ATG GGA GAA GCT C

上記二種類のプライマー・プローブセットを用いて、リアルタイムPCRを実施した。使用機種はABI Prism 7000を用いた。反応条件は下記の通り。

48°C 30min

95°C 10min.

95°C 15sec.

60°C 1min. (45cycle)

(2) 血漿に添加するウイルスの準備

バイオセーフティー指針に従いウエストナイルウイルスはBSL3の実験施設で、日本脳炎ウイルス、デングウイルスはBSL2の実験施設で準備した。最終濃度は下記の通り。

WNV NY99株	<u>1.9×10^8 pfu/mL</u>
G2266株	<u>2.0×10^6 pfu/mL</u>
JEV Beijing1smb37	<u>1.0×10^9 pfu/mL</u>
DEN 1 02-17/1c6#3 01 June4	<u>3.5×10^7 pfu/mL</u>
DEN 2 DHF0663c6#3 01 June4	<u>3.0×10^7 pfu/mL</u>
DEN 3 05-61/1c6#1,1 24Jan06	<u>3.2×10^6 pfu/mL</u>
DEN 4 05-40/1/1c6#2, 13Feb06	<u>3.2×10^6 pfu/mL</u>

これらのウイルスを条件(3)に従って希釈し、血漿に添加した。

(3) 添加ウイルス量

(2)で作成されたウイルスを下記の希釈率で血漿に添加して作成。これらのウイルスの血漿への添加は、BSL3の実験施設で行う。

10,000 pfu / mL 血漿
1,000 pfu / mL 血漿
100 pfu / mL 血漿
10 pfu / mL 血漿
1 pfu / mL 血漿
0.5 pfu / mL 血漿

0.1 pfu / mL 血漿
 0.05 pfu / mL 血漿
 0.01 pfu / mL 血漿
 0.005 pfu / mL 血漿
 0.001 pfu / mL 血漿

(4) Chiron社 Procleix® WNV Assay

1 : NAT 検査-1 (×2回)

まず、WNVについては1000から0.01pfu/mLの希釈を作成しNATを行う。JEV、DENGUEに関しては1000から100pfu/mLで希釈を作成し、陽性が確認された場合、低濃度のNATも行う。

2 : NAT 検査-2 (×2回)

NAT試験1で行った結果を参照し、WNVに関しては1から0.001pfu/mLの範囲で、日本脳炎ウイルスに関しては1000から10pfu/mL範囲で希釈を作成しNAT検査を行った。

3 : 評価

各試験に設定する3件のPositive calibrator値が、400,000 RLU以上、2,700,00以下であることを確認し、平均値を算出する。内部コントロールは500,000RLU以下とする。各試験に設定する3件のNegative calibrator値が、400,000 RLU以下であることを確認し、平均値を算出する。内部コントロールは400,000RLU以下とする。計算は以下の式を用いた。

- $PCx (Analyte) = Total\ Analyte\ RLU / 3$
- $NCx (Analyte) = Total\ Analyte\ RLU / 3$
- $Internal\ Control\ cutoff\ value = 0.5 \times [NCx (IC)]$
- $WNV\ Analyte\ Cutoff\ value = NCx (Analyte) + [0.03 \times PCx (Analyte)]$

これらの式によって算出された値を用いて、S/CO値を求める。評価は以下の通り。

Non Reactive Analyte S / CO < 1.00

IC ≥ IC cutoff

IC ≤ 500,000 RLU

Reactive Analyte S / CO ≥ 1.00

IC ≤ 500,000 RLU

Invalid IC > 500,000 RLU or

Analyte S / CO < 1.00

IC < IC cutoff

上記の判定に従い、NAT 検査1 および2のデータを統計学的に解析し、Procleix システムの評価を行う。

4 : NAT試験方法

[準備]

Target Capture Reagentにinternal Control液を混合する。この準備はBSL2レベルの実験施設で行う。ウイルスの血漿への添加、及びRNA抽出液の混合、60℃でのインキュベーション、ボルテックスはBSL3レベルの実験施設で行い、ウイルスの完全な不活化を行った。NAT検査は「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドライン(平成16年8月3日、薬食発第0803002号)」に従って以降の実験を行った。

[ウイルス不活化/RNA抽出](BSLレベル3施設)

TTU(Ten Tube Unit) ; 500 μL血漿 (ウイルス添加)

↓ ← 400 μl Target Capture Reagent

Vortex Mix with Seal

60℃ incubation 20min

store@RT 20min (この間にBSL3から2へ移動する)

[TMA法による核酸増幅](BSL2実験施設 増幅区域)

20min store@RT on Target Capture System

↓ ← *Washing Solution* 1ml

Vortex Mix with Seal

Store@RT on Target Capture System 4-10min

↓ ← add *Washing Solution* 1ml

Vortex Mix with Seal

↓

Store@RT on Target Capture System 4-10min

↓ ← *Amplification Reagent* 75 μ l

↓ ← *Oil* 200 μ l

Vortex Mix with Seal

Incubation @60°C 10min

Incubation @41.5°C 9-20min

↓ ← *Enzyme Reagent* 25 μ l

Vortex Mix with Seal

Incubation @41.5°C [TMA反応] 60分

↓ BSL2実験施設 検出区域へ移動

[HPA : Hybridization Protection Assay]

(BSL2実験施設 検出区域)

↓ ← add 100 μ l *Probe Reagent*

Vortex Mix with Seal

Incubation @60°C 10min

↓ ← add 250 μ l *Selection Reagent*

Vortex Mix with Seal

Incubation @60°C 10min

Incubation @19~27°C on WaterBath 10min

↓ ← *Auto Detect*

Luminometerで計測

(5) 実験施設とNATガイドライン

ウエストナイルウイルスはBSL3レベルであるので、国立感染症研究所のバイオセーフティー指針に従い扱う。また、日本脳炎ウイルス、デング熱ウイルスについても同様の指針に従い研究を行った。ウイルスは国立感染症研究所のウイルス1部高崎智彦先生により準備。これらの血漿へのウイルスの添加およびRNAの抽出 (Target Captureによる溶解) はBSL3の実験施設で協力研究者の水谷哲也先生によって行い、ウイルスの不活化・溶解した抽出液はBSLレベル2の施設で行う。NAT検査は「血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査 (NAT) の実施に関するガイドライン (平成16年8月3日、薬食発第0803002号)」に従って行い、核酸の増幅は「核酸増幅区域」で、検出は「検出区域」で行った。解析データはCSVファイルで保存し、Excel上で解析を行った。S/COの算出、cutoff値の算出はChiron社のWNV NATに付属するProcleix® WNV Assay Systemにおいて行った。

C. 研究結果

WNV NAT 導入の検討

現在までにFDAによって承認されて市販されている WNV NAT は Procleix® WNV Assay (Chron corp., Emeryville, CA) と TaqScreen WNV first generation assay (Roche Molecular System, Inc., Pleasanton, CA) である。Pierre Gallian らによると、95% hit rate (Probit analysis) は Procleix® WNV Assay で 10 から 34 copies/mL で、TaqScreen WNV first generation assay では 200copies/mL であり、感度は約 10 倍の差がある事が報告されている (Gallian *et al.*, *Transfusion* 45 ; 1540-1541)。これら

の報告等を総合的に判断し、本研究課題ではより高感度である Procleix® WNV Assay (Chron corp., Emeryville, CA) を採用し、解析に用いるものとした。

輸血血液における WNV NAT スクリーニング

Realtime PCR 法を用いて WNV 陰性を確認した原料血漿に WNV(NY99 および g2266 株)を 1000 pfu から 0.01pfu/mL まで添加し Chiron 社の Procleix® WNV Assay をメーカーマニュアルに従い 2 回行った。Positive calibrator と Negative Calibrator 値を用いて Cutoff 値を算出し、S/CO 値を算出し、1 以上を陽性、1 未満を陰性とし判定した。

その結果、NY99 株は 1000 から 0.1pfu までは 100% 陽性であった (図 1)。0.01pfu/mL では 50%陽性であった。一方、g2266 株は 1000-0.01pfu までは 100% 陽性であった (図 3)。そこで、さらに希釈率を変更して 2 回の NAT 検査を行った。希釈率は、1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001pfu/mL を作成した。

その結果、NY99 株は 1 から 0.05pfu/mL の範囲で 100%陽性であった (図 2)。0.01 から 0.005pfu/mL の範囲では 50%陽性であった。それ以下では陰性であった。一方、g2266 株においては、1 から 0.005pfu/mL の範囲で 100%陽性であった (図 4)。0.005 から 0.001pfu/mL の範囲では 50%陽性であった。それ以下では検討していない。以上の結果、Chiron 社の Procleix® WNV Assay は、NY99 では 1000 から 0.05pfu/mL、g2266 株では 1000 から 0.005pfu/mL の範囲で 100% 検出が可能である事が明らかとなった (図 7)。

JEV を用いた WNV NAT

日本脳炎ウイルス感染症は東南アジアから南アジアにかけて広く分布し、近年では報告の無かつ

た地域 (パプアニューギニア、オーストラリアのトレス海峡 Badu 島およびヨーク岬半島) での感染が多数認められている。本邦ではワクチンが有効に働き、毎年の日本脳炎ウイルス感染者が、1966 年のピーク (2017 人) を境に減少し、現在では年 10 人程度と報告されている。しかし、1999 年以降、比較的若年層におけるウイルス感染が報告されはじめており、抗体保持者の率も低下している。また、ブタの日本脳炎ウイルス抗体保有状況から鑑みると、国内での感染の機会が全くなくなつたわけではない事が推測される。日本脳炎ウイルスは WNV と同じフラビウイルス、日本脳炎血清型群に分類されることから、WNV との区別は非常に重要であると考えられる。そこで、Procleix® WNV Assay を用いて日本脳炎ウイルスとの交差性を検討した。

日本脳炎ウイルス (北京株) を準備し、1000 から 100pfu/mL のウイルスを血漿に添加し、WNV を用いた時と同様に NAT 検査を行った。

その結果、S/CO 値は 7.59, 1.27, 1.43, 1.61 と非常に低レベルであるが 4 回の検査で 4 回とも 1000pfu/mL では陽性反応が認められた (図 5、図 7))。一方、100pfu/mL 以下では全て陰性であった。

デングウイルスを用いた WNV NAT

デングウイルス感染症は熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジア、南アジア、中南米、カリブ海諸国で発生しているが、アフリカ、オーストラリア、中国および台湾においても流行している。全世界では約 1 億人が発症し、25 万人がデング出血熱を発症する。本邦での感染報告はないが、海外旅行中に感染し国内で発症する例が多数あり、2005 年は 71 例の感染が、一例の死亡が報告されている。フラビウイルス科に属し、日本脳炎やウエ

ストナイルウイルスと同様の血清型に属し、同様に蚊 (*Aedes aegypti*) によって感染する。4つの血清型が存在し、ウエストナイルウイルスのスクリーニングの際は区別が必要である。そこで、同キットを用いてデングウイルス (1、2、3、4血清型) が交差性を示すかどうかを同様に検討した。

WNV と同様に、血漿に 1000 から 100pfu/mL のウイルスを添加し、WNV NAT を行った。その結果、4回すべての試験において陰性であった (図6)。

以上の結果をまとめると、Chiron 社 Procleix® WNV Assay はウエストナイルウイルスの検査において、感度・特異性のレベルで優れている事が明らかとなった (図7、8)。しかし、非常に高い 1000 pfu/mL の日本脳炎ウイルスと非常に低いレベルで交差する事も明らかとなった。また、デングウイルスとは全く交差性が認められないことが明らかとなった。

D. 考察

WNV NAT の株による特異性の違い

Chiron 社の Procleix® WNV assay を用いてウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルスを添加した血漿の NAT スクリーニングを行った。その結果、NY99 は 1000 から 0.05pfu/mL の範囲で 100%検出、g2266 株は 1000pfu から 0.005pfu/mL の範囲で 100%検出可能であり (図7)、ともに高感度でウイルスを検出する事が可能であった。1pfu が約 100 コピー数であると想定すると、NY99 は 5 copy/mL、g2266 は 0.5 copy/mL のウイルスの検出が可能となり、メーカーの評価した値より約 10 倍の感度を有していると推測される。一般的なヒトのウイルス血漿が 1-130pfu/mL であるこ

とを考えれば、十分すぎる検出感度であるといえる。また、近年報告されている低レベルウイルス血症が長期に続いている患者に (0.11pfu/mL) や、極微量のウイルス血症患者 (0.06pfu/mL) 程度であっても十分に検出可能である事が明らかとなった。

また、インドで分離された g2266 株は、NY99 よりかなり遺伝距離が離れているウイルスである。日本で監視が必要であると考えられる Kunjin ウイルスの方が遺伝距離的に NY99 株に近い事を考えると、Chiron 社 Procleix® WNV Assay は様々な株の WNV を検出する事が可能であると推測される。

以上の事から、Procleix® WNV assay は本邦に WNV が輸入された際のスクリーニングに非常に有効であると考えられる。

WNV NAT における JEV との交差性の問題

日本脳炎ウイルスを用いた解析で、1000 pfu/mL が陽性になったが、日本脳炎ウイルスは非常に低レベルウイルス血症であり、その期間も短いことから、1000 pfu/mL というのは実際にはあり得ないと考えられる。実際に、WNV NAT で陽性となった場合は、ウイルスの同定以前に、そのような血液は供給されることがないために万が一日本脳炎ウイルスであったとしても、安全性は確保されている。また、本研究課題で用いた日本脳炎ウイルスは北京株 (日本におけるワクチン作成用) であるので、比較的近年に分離されたウイルスや、米国で用いられているワクチン用株ウイルスを用いての検討も今後の課題であると考えられる。

WNV NAT におけるデングウイルスの交差性

デングウイルスは輸入感染症として主に東南アジアや南米で感染した旅行者の発症が報告されて

いる。本研究課題において用いた WNV Assay では全く交差性が認められなかった。

輸血血液および血液製剤におけるフラビウイルス感染の危険性および今後の展望

現在、厚生労働省の指針に基づいて日本では海外から帰国して4週間の献血の禁止をしているので、輸血による感染の危険性は非常に低いと考えられる。また、ウエストナイルウイルスにおける報告は無いが、一般的に、フラビウイルス科のウイルスは血漿分画製剤の製造工程における熱処理や SD 処理によって不活化されるとされているので、血漿分画製剤における安全性は高いものと考えられる。

しかし、一方で、血液を除くヒト組織や細胞についての安全性の問題は未解明のままである。臓器移植を適用した患者がウエストナイルウイルスに感染する例が報告されており、もし日本にウエストナイルウイルスが輸入された場合、ヒト組織を扱う部門でも同様に NAT 検査を行う事が望ましいであろう。また、臓器ドナーが流行地に滞在していた場合は、その感染を否定する必要が有ると言える。同時に、マウスの感染モデル等を用いて、ウイルス血症の時期と各組織内のウイルス量の関係などを明らかにしておく必要が有ると考えられる。

また、ウエストナイル感染症が引き起こす病態は、日本脳年のそれと非常に似ている。その為、ウエストナイルウイルスによる病態と区別し、早期にウイルスの輸入・侵入を知るためには、夏季の原因不明の脊髄炎や無菌性髄膜炎に関して日本脳炎ウイルスの関与を検討する必要が有るといえる。また、ウエストナイルウイルスが侵入した

際は都市部に生息する蚊が媒介する可能性が高く、これらの生息域は全国にわたる。従って蚊の感受性や媒介能力、鳥の感受性に関する研究も重要である。特に、鳥類における感染の把握、カラスの死亡等はウイルスの活動を知る指標として重要であるので、対策を継続する必要が有るといえる。

E. 結論

Chiron 社の Procleix® WNV assay を用いてウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、デングウイルスを添加した血漿の NAT スクリーニングを行った結果、一部、日本脳炎ウイルスとの交差性が認められたがデングウイルスとの交差性は認められず、またウエストナイルウイルスに関しては非常に高感度に、そして種内においても広範囲に検出が可能であった。以上の事より、日本にウエストナイルウイルスが輸入された際の検出キットとして Chiron 社の Procleix® WNV Assay は有効であると考えられる。また、本邦にウエストナイルウイルスが輸入された際は、国立感染症研究所、厚生労働省、日本赤十字社の3つが協力体制をとって対策が可能となるものと考えられる。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

(1)論文発表

(1) Hamaguchi I, Morisada T, Azuma M, Murakami K, Kuramitsu M, Mizukami T, Ohbo K, Yamaguchi K, Oike Y, Dumont DJ, Suda T. Loss of Tie2 receptor compromises embryonic stem cell-derived endothelial but not hematopoietic cell survival. *Blood*. 2006; 107:

1207-1213

(2) M Ishii, TW Tay, T Matsui, T Kidokoro, T Mizukami, Y Kanai, Y Hayashi, M Kurohmaru
Expression pattern of avb3 and avb5 integrin mRNA in mouse fetal gonadogenesis *J Reprod Dev*. 2006, in press

(3) 水上 拓郎、大槻 紀之、布施 晃 PDA Viral & TSE Safety Conference、PDA Joournal of GMP and Validation in Japan 7: 68-73, 2005

(4) 水上拓郎、浜口 功、山口一成 血液製剤における病原体検査の現状 *感染症* 35; 29-34, 2005

(5) 高崎智彦、ウエストナイル熱の診断と検査、*臨床とウイルス*33(1),22-27. 2005

(2)学会発表

(国際学会)

なし

(国内学会)

(1) 水上拓郎、浜口功、倉光球、百瀬暖佳、滝沢和也、望月雅代、内藤誠之郎、益見厚子、野瀬俊明、山口一成 ニッチにおける生殖幹細胞と造血幹細胞の共通の幹細胞システムの解明 第141回 日本獣医学会 つくば 2006年3月

(2) 水上拓郎、今井順一、加藤博史、河村未佳、内藤誠之郎、前山順一、落合雅樹、山本明彦、堀内善信、浜口功、山口一成 トランスクリプトーム解析による百日咳ワクチンの新しい安全性評価法の開発 第35回日本免疫学会 横浜 2005年12月

(3) 水上拓郎、浜口功、内藤誠之郎、益見厚子、倉光球、野瀬俊明、山口一成 ニッチにおける生殖幹細胞と造血幹細胞の共通の幹細胞シ

ステムの解明 第67回 日本血液学会／第47回 日本臨床血液学会 横浜 2005年9月

(3)知的財産権の出願・登録状況

ワクチンの安全性評価のための遺伝子セット 特許申請中

図1. WNV(NY99)のNAT(1000-0.1pfu/mL)(N=2)

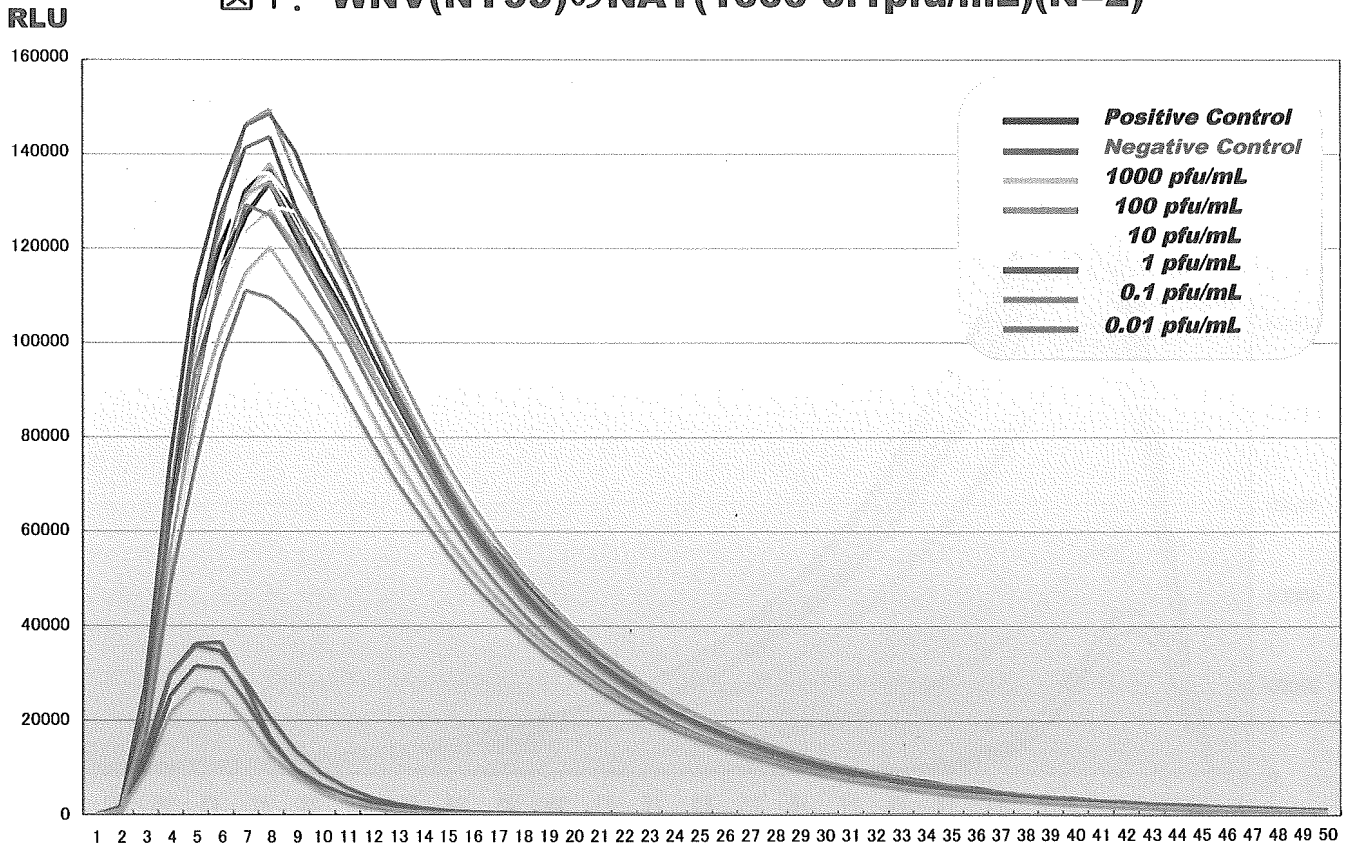


図2. WNV(NY99)のNAT(1-0.0001pfu/mL)(N=2)

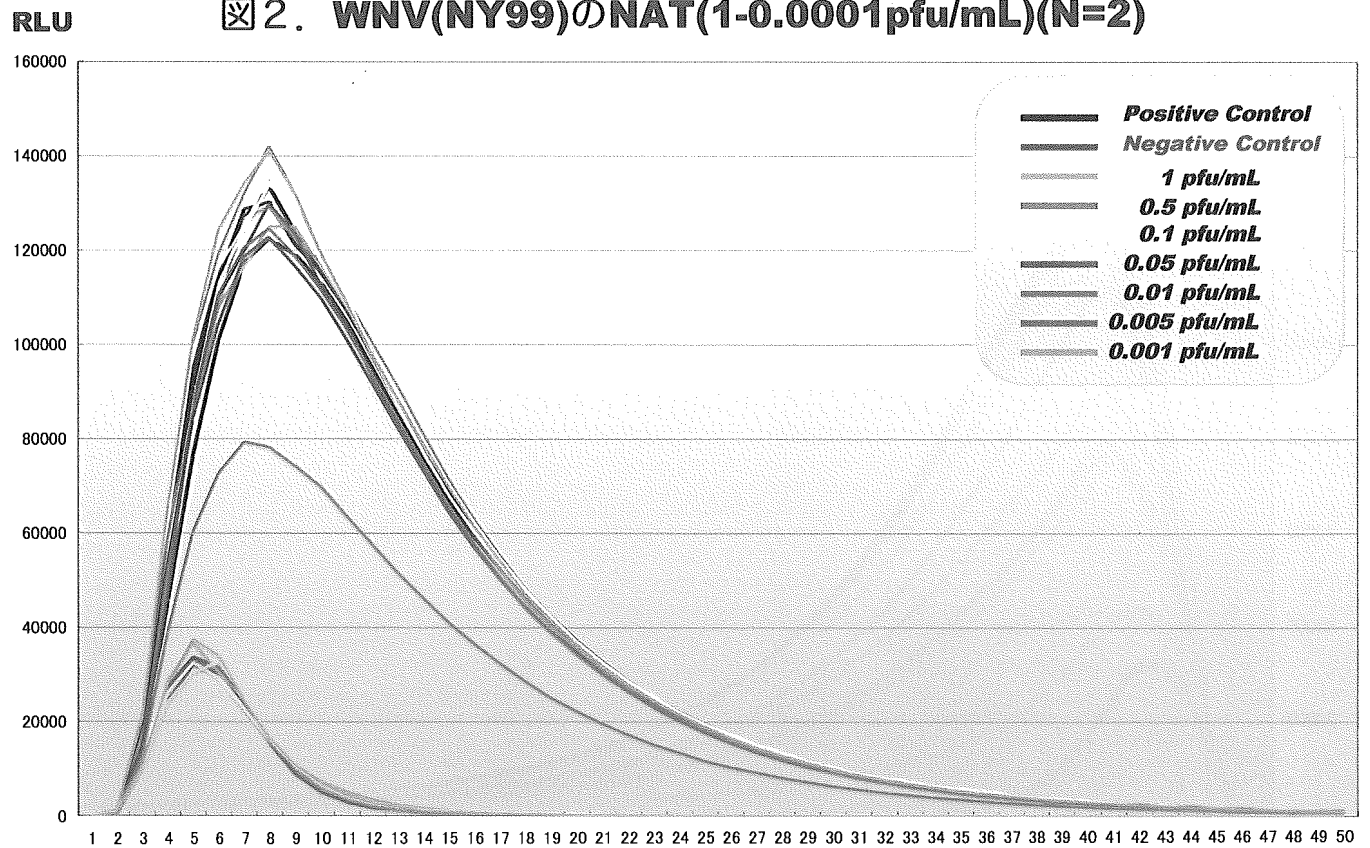


図 3. WNV(g2266)のNAT(1000-0.01pfu/mL)(N=2)

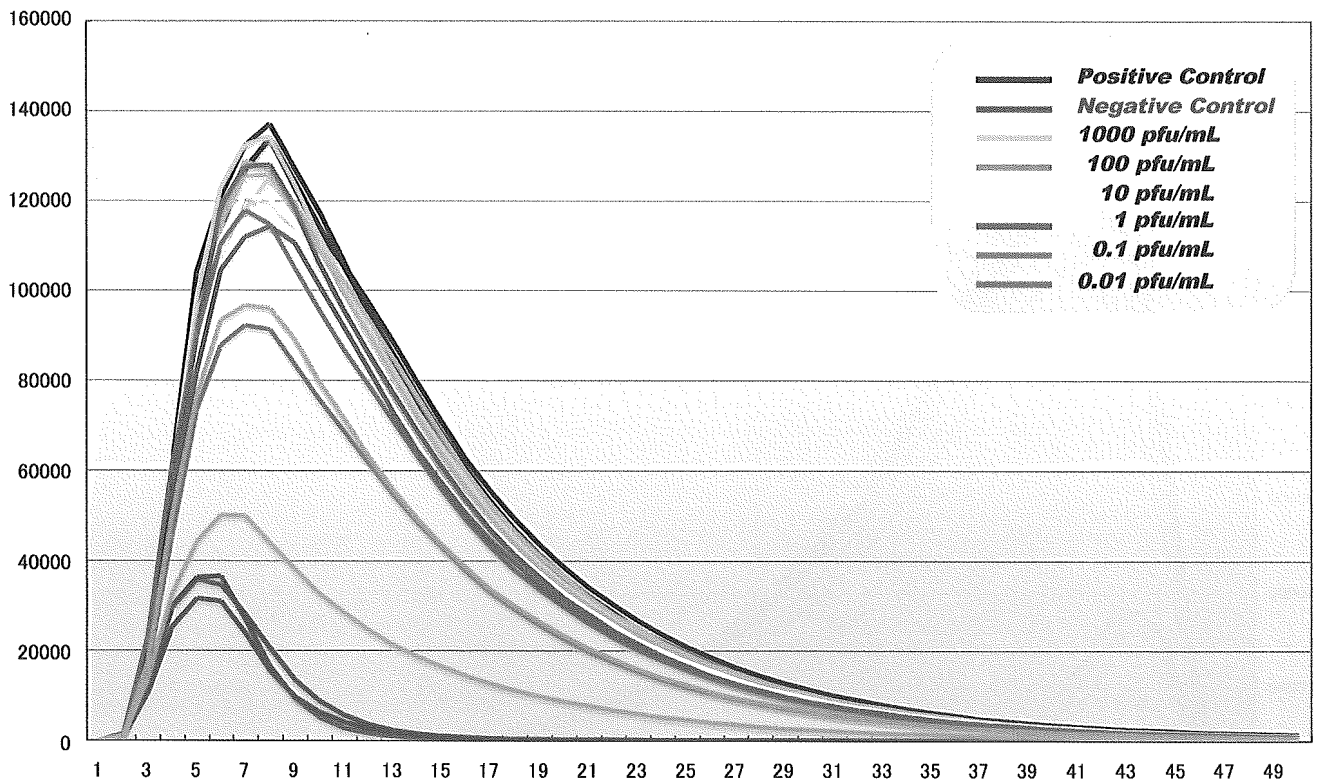
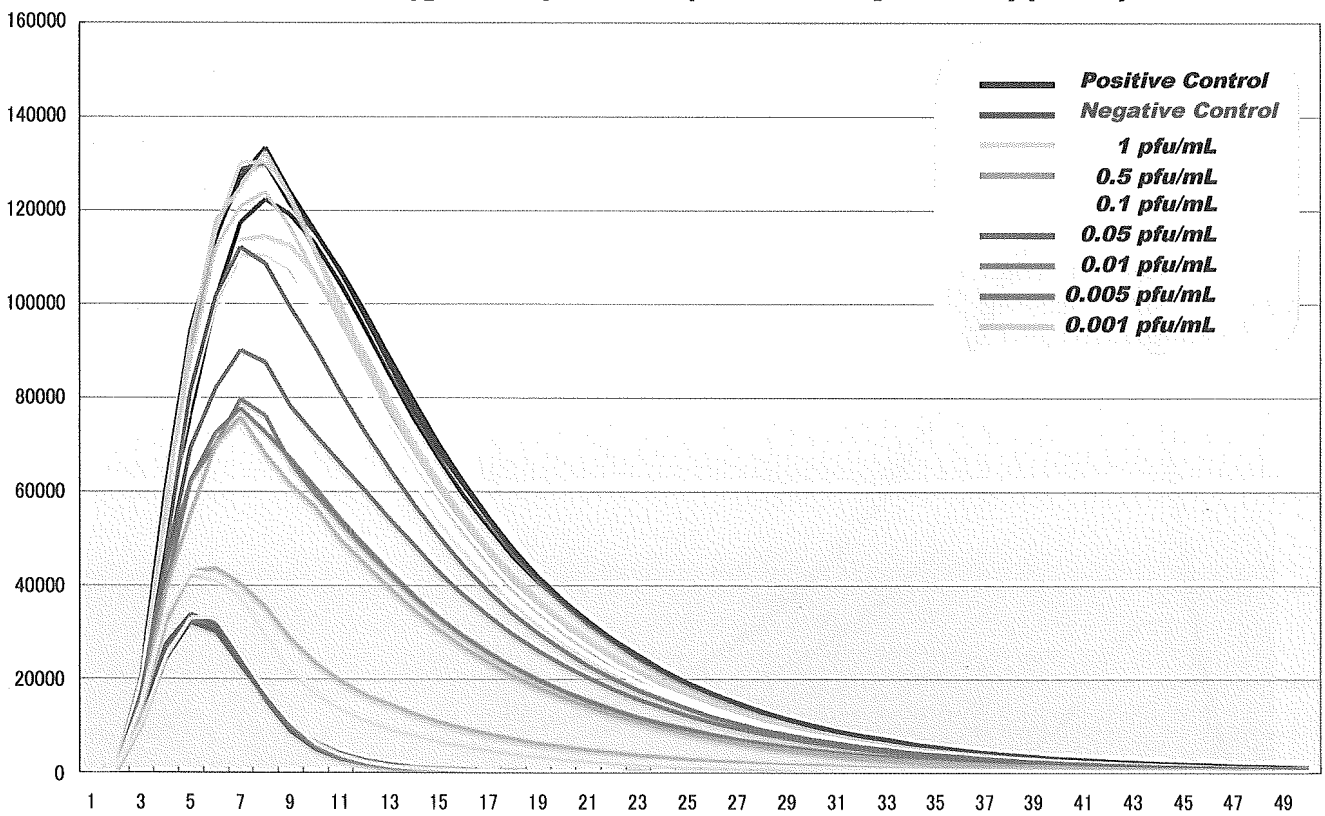
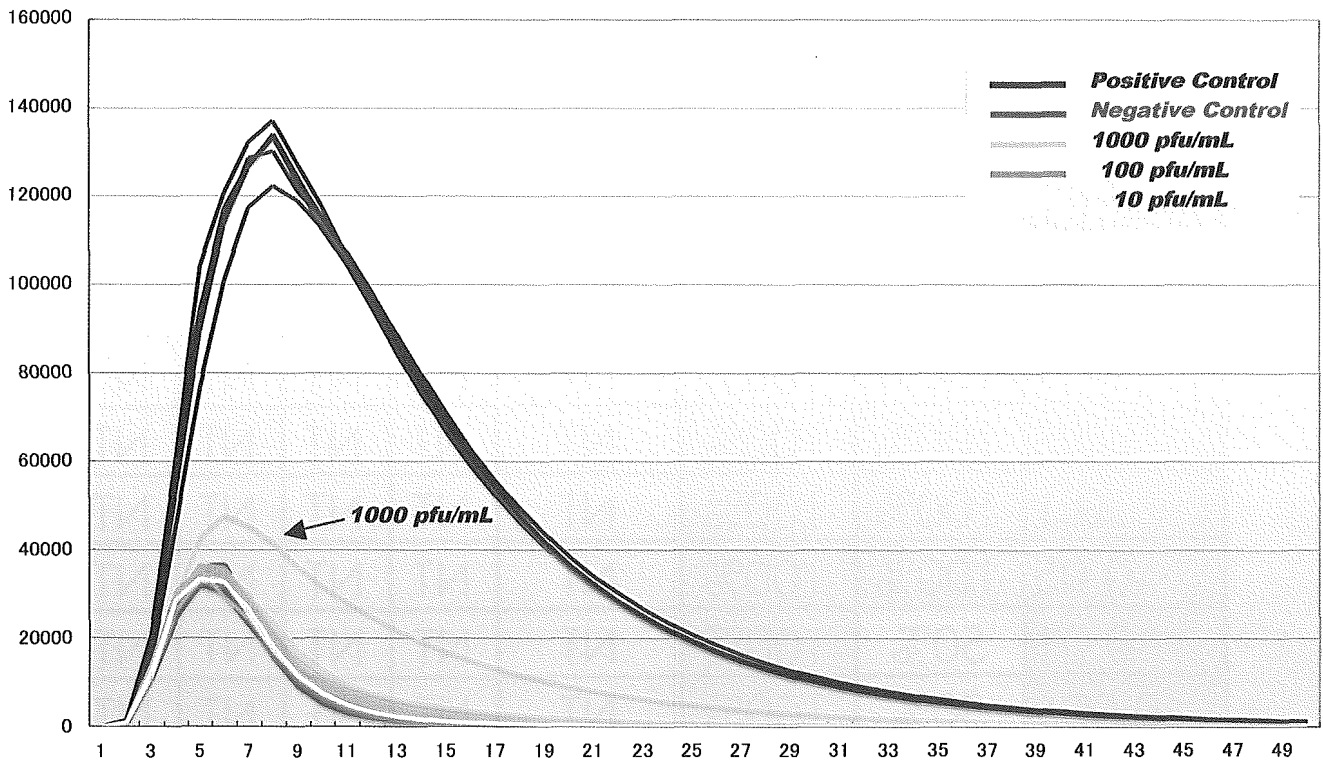


図 4. WNV(g2266)のNAT(1-0.0001pfu/mL)(N=2)



RLU

図5. JEV(Beijing株)のNAT(1-0.0001pfu/mL)(N=4)



RLU

図6. DENGUE(1,2,3,4)のNAT(1-0.0001pfu/mL)(N=4)

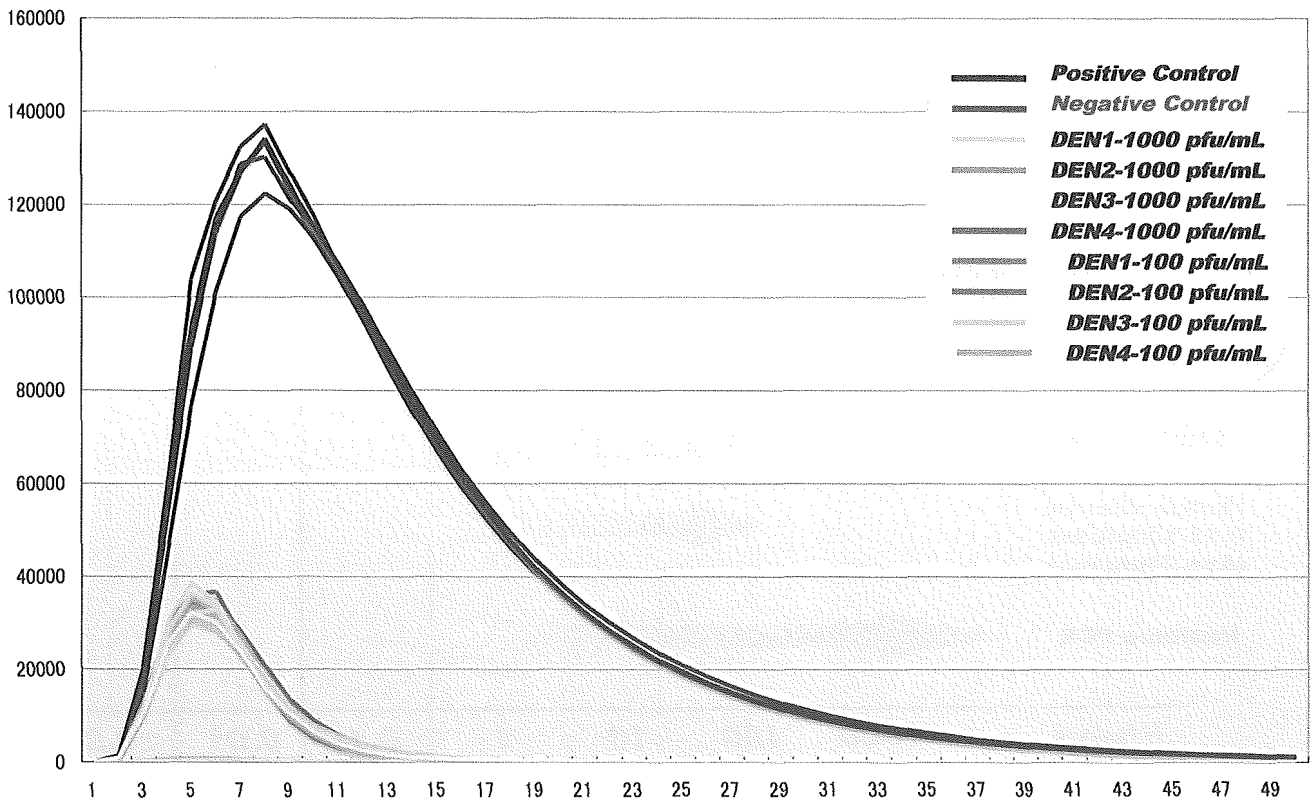


図7. 輸血血液におけるWNVのNAT結果

Virus	WNV		JEV	DENGUE			
	NY99	g2266		1	2	3	4
pfu/mL			Beijing				
1000	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
100	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%
10	100%	100%	0%	NT	NT	NT	NT
1	100%	100%	NT	NT	NT	NT	NT
0.5	100%	100%	NT	NT	NT	NT	NT
0.1	100%	100%	NT	NT	NT	NT	NT
0.05	100%	100%	NT	NT	NT	NT	NT
0.01	50%	100%	NT	NT	NT	NT	NT
0.005	50%	100%	NT	NT	NT	NT	NT
0.001	0%	50%	NT	NT	NT	NT	NT

図8. 輸血血液におけるWNVのNATスクリーニングの有効性

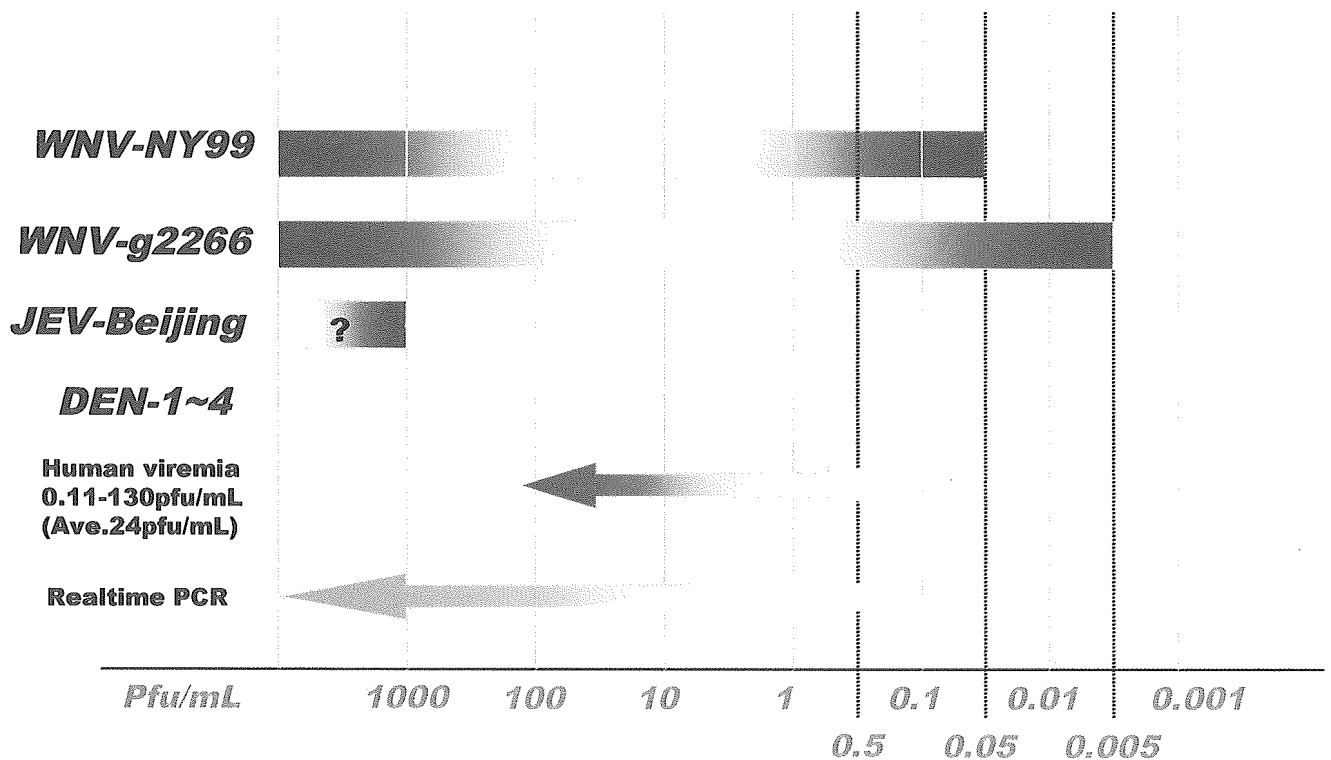


表1. 輸血血液におけるNATスクリーニング(Analyte RLU)

WNV-NY99 Analyte RLU										
pfu/mL	1000	100	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.0001
1	1574715	1491548	1575322	1585042		1255726		0		
2	1629707	1686471	1569331	1502455		1440622		1356926		
3				1554805	1629500	1541527	1507166	880959	1559176	2705
4				1483487	1585246	1459319	1444746	2996	2371	1888

WNV-g2266 Analyte RLU										
pfu/mL	1000	100	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.0001
1	1500107	1430084	1422308	1328690		1264569		356693		
2	1442824	1516989	1333389	1488388		1356926		1017220		
3				1418824	1279122	1383351	944342	720865	691143	1656
4				1431293	1367158	1253729	1092219	762193	220473	146910

JEV-Beijing Analyte RLU			
pfu/mL	1000	100	10
1	367689	29127	
2	61501	7865	
3	67450	29414	3618
4	75911	29221	4476

Analyte RLU

pfu/mL	DEN1		DEN2		DEN3		DEN4	
	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100
1	105	2904	793	2146	577	1634	738	2890
2	828	2976	1833	Invalid	1071	Invalid	1592	1483
3	NT	NT	NT	1167	NT	2023	NT	NT
4	NT	NT	NT	1984	NT	3631	NT	NT

	Test 1 & 2	Test 3 & 4
Negative calibrator average	1612	1296
Positive calibrator average	1560661	1530266
IC Cutoff	92347	84482
Analyte cutoff	48432	47204

表2. 輸血血液におけるNATスクリーニング(S/CO)

WNV-NY99 Analyte RLU										
pfu/mL	1000	100	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.0001
1	32.51	30.80	32.53	32.73		25.93		0.00		
2	33.65	34.82	32.40	31.02		29.75		28.02		
3				32.94	34.52	32.66	31.93	18.66	33.03	0.06
4				31.43	33.58	30.92	30.61	0.06	0.05	0.04

WNV-g2266 Analyte RLU										
pfu/mL	1000	100	10	1	0.5	0.1	0.05	0.01	0.005	0.0001
1	30.97	29.53	29.37	27.44		26.11		7.41		
2	29.79	31.32	27.53	30.73		28.02		21.00		
3				30.06	27.10	29.31	20.01	15.27	14.64	0.04
4				30.32	28.96	26.56	23.14	16.15	4.67	3.11

JEV-Beijing Analyte RLU			
pfu/mL	1000	100	10
1	7.59	0.60	
2	1.27	0.16	
3	1.43	0.62	0.08
4	1.61	0.62	0.09

赤字=陽性 1≤S/CO
 緑字=陰性 S/CO < 1

Analyte RLU

pfu/mL	DEN1		DEN2		DEN3		DEN4	
	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100
1	0.00	0.06	0.02	0.05	0.01	0.03	0.02	0.06
2	0.02	0.06	0.04	Invalid	0.02	Invalid	0.03	0.03
3	NT	NT	NT	0.02	NT	0.04	NT	NT
4	NT	NT	NT	0.04	NT	0.08	NT	NT