

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）

分担研究報告書

血液製剤の安全性を確保するための蚊媒介性ウイルスのウイルス学的特性の解析

分担研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室室長）
協力研究者 田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）
中山絵里（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）
前木孝洋（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）
谷口 玲（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室研究員）
加藤文博（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室研究員）
西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）

研究要旨

これまでに我々はジカウイルスの E 蛋白質領域をターゲットとしたリアルタイム RT-PCR 法により輸入症例におけるジカウイルスの実験室検査を実施した。その結果 2013 年から 2017 年 12 月までの間に 20 例のジカ熱輸入症例が国内において報告された。特にベトナムから帰国した 40 代の男性の発症 4 日後の尿サンプルからジカウイルスを分離し、これがアジア型のジカウイルスであることを示した。このとき全血サンプル中のウイルス遺伝子量はわずかであり、血清中からは検出されなかったことから、ウイルス血症はピーク期を超えていたことが示唆された。これまでの研究からジカウイルス感染症におけるウイルス血症は発症直前から発症初期にかけてピークを示すことが報告されており、またジカウイルス感染症の多くは不顕性に耐過することが知られている。したがって、ジカウイルスの流行時には血液製剤の製造過程においてドナースクリーニングが重要であることが示唆された。またジカウイルス感染症の国内流行を迅速に検出するための検査体制の整備および維持の必要性が示された。

A . 研究目的

ジカウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるエンベロープを有する直径 40-50nm の一本鎖 RNA ウイルスである。フラビウイルスには日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルスなど約 70 種類のウイルスが分類されている。

ジカウイルスはウガンダで 1947 年に初めて分離されたウイルスである。ジカウイルスはアフリカから南アジア、東南アジアにかけて分布していたが、2007 年にミクロネシア連邦のヤップ島で、2013 年にはフランス領ポリネシアで発生し、2015 年にはブラジルでその流行が発生し、その後、南米の多くの国々にその流行が拡大した。ジカウイルスはネッタイシマカや日本

にも生息するヒトスジシマカ等のシマカ属の蚊によって媒介される。ジカウイルスにヒトが感染してもほとんどが不顕性で、発症しても比較的穏やかに経過することからこれまで大きな問題とはされてこなかった。しかしながらジカウイルスがブラジルに侵入すると、2015年～2016年の間に小頭症例の増加とジカウイルスの関連が報告され、その対策が急務になった。また流行地における調査により、ジカウイルス感染症では潜伏期から急性期の高いうイルス血症を呈することが報告された。米国FDAは、ジカウイルスの輸血感染を米国内において防ぐためにドナースクリーニング、輸血制限、生産管理について2016年2月に勧告を行った。ジカウイルスの流行地であるプエルトリコでは2016年4月から6月までの間にスクリーニングを行った12,777人の検体から68人(0.5%)のジカウイルス遺伝子陽性ドナーが検出されている。したがってジカウイルス流行時には血液製剤の製造においてドナースクリーニングが急務である。

ジカウイルスは国内には分布しないが、2014年にはヒトスジシマカによって媒介されるデングウイルスの流行が東京において発生した。したがってジカウイルスが国内で発生する可能性は否定できない。そこで本研究ではジカウイルス感染症の国内発生時において血液製剤の安全性確保に必要な献血制限や問診等に役立てるためにジカウイルス感染症疑い輸入症例の血清を持って、ジカウイルスのウイルス学的特性を解析した。

B. 研究方法

ウイルス分離

患者検体10 μ lをサル腎由来Vero細胞あるいは蚊由来C6/36細胞に接種し、細胞変性効果を観察した。細胞変性効果が観察されるまで、培養上清を3継代行った。

ウイルスRNAの抽出と精製

ウイルスRNAの抽出と精製は、Hight pure viral RNA kit (Roche)を使用した。) 200 μ Lの検体を1.5mlマイクロチューブに入れ、Working solution 400 μ Lを加え、ピペティングでよく混和した。) フィルターチューブと回収チューブを連結させ、反応液600 μ Lを注いだ。) 10,000回転、15秒間遠心した。) 上液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500 μ LのInhibitor removal bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。) 上液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、450 μ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。) 上液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450 μ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。) 回収チューブを外し、空のチューブを連結し、12,000回転、10秒遠心した。) 回収チューブを捨て、新しい1.5mLチューブにフィルターチューブを連結させ、50 μ LのElution bufferを加え、10,000回転、1分間遠心した。) 得られた精製RNAはすぐに使用しない場合は-80 $^{\circ}$ Cで保管した。

リアルタイムRT-PCR反応

リアルタイムRT-PCR反応は米国CDCによって発表されたジカウイルスTaqmanプライマー、プローブ ZIKV 835: TTT GTC ATG ATA CTG CTG ATT GC 、 ZIKV 911c: CCT TCC ACA

AAG TCC CTA TTG C、ZIKV 860-FAM: CGG CAT ACA GCA TCA GGT GCA TAG GAG あるいは ZIKV 1086: CCG CTG CCC AAC ACA AG, ZIKV 1162c: CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT, ZIKV 1107-FAM: AGC CTA CCT TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA Aを用いて実施した。

C . 研究結果

国内におけるジカ感染症

平成29年12月までの国内におけるジカ感染症の調査を行った。その結果、国内ではこれまでに20例のジカ輸入症例が報告されていることが示された。輸入症例における渡航先はフランス領ポリネシア2例、タイ2例、ブラジル3例、ドミニカ共和国3例、フィジー1例、ジャマイカ1例、ベトナム4例、キューバ3例、メキシコ1例であった。

ジカウイルス検査

国立感染症研究所で検査を実施したジカ疑い患者検体についてウイルス分離およびリアルタイム RT-PCR 法を実施した。その結果ベトナムから 2016 年末に帰国した急性期ジカ熱患者検体からジカウイルスを分離した。患者はベトナムに 1 週間滞在した 40 代男性で、ベトナムからの帰国翌日に発症した。その症状は発熱(38)、発疹、結膜充血であった。デングウイルスに対しては NS1(-), IgM(-), IgG(-)であった。発症 4 日後の尿検体をサル腎細胞由来の Vero 細胞に接種し、観察したところ弱い細胞変性効果を観察し、ジカウイルスを分離した。また発症 4 日後の尿 (Ct 値 32.0) 全血 (38.1) 唾液 (39.1) からウイルス遺伝子を検出したが、血清サンプル

および発症 6 日後の精液からはウイルスは検出されなかった(表)。分離されたウイルスの遺伝子配列を検討した結果、アジア型のウイルスであることが示された(図)。

D . 考 察

ジカウイルスに感染すると感染者の多くが無症状に終わり、発症しても比較的穏やかに経過する。その主な症状は発熱、発疹、関節痛、関節炎、結膜充血、筋肉痛、頭痛、後眼窩痛である。しかしながらポリネシアやブラジルの流行では、ギラン・バレー症候群や神経症状を認める症例が報告され、ブラジルでは妊婦がジカウイルスに感染することで胎児が感染し、ジカウイルス感染症と小頭症児との関連が報告されている。

日本では2017年までに20例の輸入症例が報告された。媒介蚊であるヒトスジシマカは本州以南に広く分布していることが疫学的調査から明らかとなっており、ジカウイルスと共通の媒介蚊であるヒトスジシマカによるデングウイルスの国内流行が2014年に発生している。したがってジカウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。

本研究においては急性期から回復期の患者血清を用いてジカウイルス遺伝子の検出を実施した。その結果、急性期においてウイルスゲノムが検出された。しかしながらすべての急性期血清からウイルスゲノムが検出されたわけではなかった。回復期血清からはウイルス遺伝子は検出されなかった。また本研究では無症候例の検体

や潜伏期の検体を用いた検討は行われておらず、これら無症候のドナー検体からのジカウイルスゲノム検出の検討は今後の課題である。

特記事項なし

E．結 語

先天性ジカウイルス感染症はブラジルを中心とした南米の流行地域において大きな問題となっており、小頭症を発症した場合、その治療法は確立されていないので、その予防対策が重要である。またジカウイルスに感染した場合、そのウイルス血症は潜伏期から発症期にかけて上昇し、回復期にかけて、抗体の上昇とともに急速に消失する。したがって血液製剤の安全性を確保するためには潜伏期から発症期にかけてウイルス遺伝子を検出する必要がある。したがってひとたび国内で流行が発生した場合、ジカウイルス流行時には血液製剤の製造においてドナースクリーニングが重要な対策の1つとなりうる。そのためにはまず国内流行を速やかに検出する体制が重要となる。ジカウイルス感染症は、感染症法上の4類感染症に指定されており、ジカウイルス感染症を診断した医師は直ちに保健所を通して都道府県知事に報告しなければならない。

F．健康危険情報

特記事項なし

G．研究発表

1．論文発表

特記事項なし

2．学会発表

表. ベトナムからの輸入ジカ熱症例におけるジカウイルス実験室検査

サンプル	病日	遺伝子検査 (Ct値)	ウイルス分離
血清	4	—	—
尿	4	+ (32.0)	+
唾液	4	+ (39.1)	—
全血	4	+ (38.1)	—
精液	6	—	—

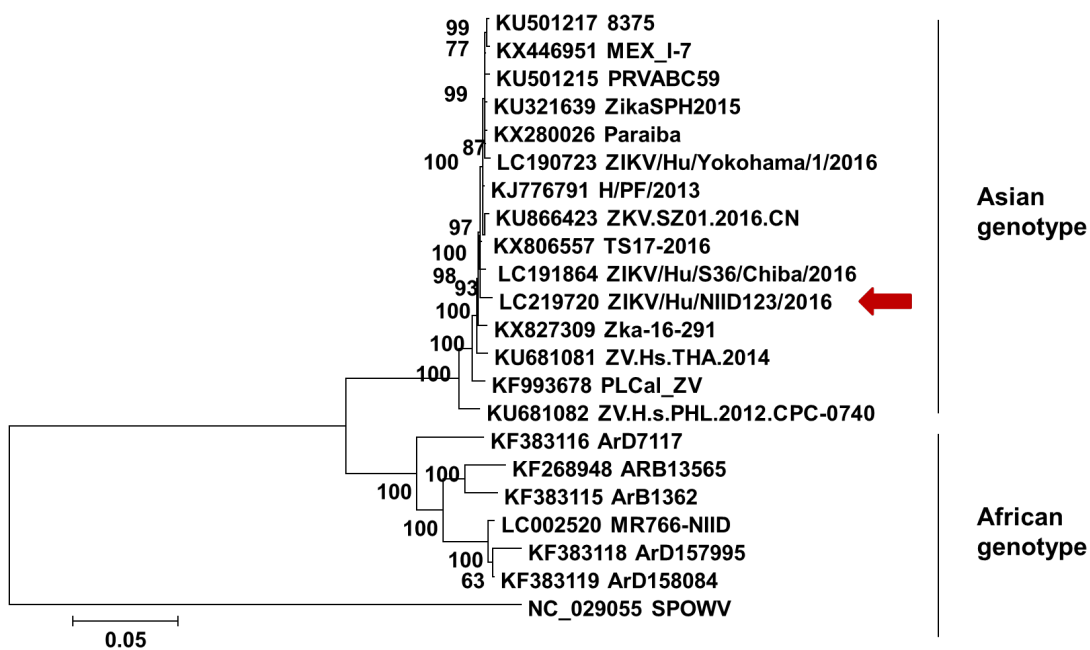


図. ベトナムからの輸入症例から分離されたジカウイルス塩基配列の系統樹解析

ベトナムからの輸入症例より分離されたジカウイルス分離株 ZIKV/Hu/NIID123/2016 の系統樹解析を実施した結果、ZIKV/Hu/NIID123/2016 株はアジア型の遺伝子型を示した (矢印)。

