

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）

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

近年東南アジアにおいても先天性ジカウイルス症候群の胎児が報告されており、タイおよびベトナムでは多くのジカウイルス感染症例が報告されている。したがって今後ともジカウイルス対策は必要である。これまでに我々はフラビウイルス共通プライマーを開発してきた。そこでジカウイルス感染症の重要な鑑別疾患であるデング熱の患者検体を用いてフラビウイルス共通プライマーとそのほかのデング熱実験室診断法をその病日ごとに比較検討した。その結果フラビウイルス共通プライマーは Taq-Mn RT-PCR 法と同程度の感度を各病日において示した。また抗デング IgM 補足 ELISA 法、抗デングウイルス IgG ELISA 法では第 1 病日、第 2 病日ではそれぞれデングウイルス特異的抗体は検出されなかったが、第 3 病日以降その検出率は上昇した。デングウイルス NS1 ELISA では第 1 病日よりその検出率は高く、その傾向は第 10 病日まで維持された。しかしながら NS1 ELISA の検出率は 50%~100% であり、他の検査法との併用が必要であることが示された。またフラビウイルス共通プライマーのジカウイルス MR766 株に対する反応性を検討したところ、フラビ共通プライマーによるジカウイルス遺伝子標的領域の増幅を確認した。フラビウイルス共通プライマーはジカウイルスを含むフラビ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に寄与することが示唆された。

#### 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。フラビウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるウイルスの総称であり、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、デングウイルスなど約 70 種類のウイルスが

分類されている。その名称はラテン語で黄色を意味する flavus に由来し、その多くは節足動物により媒介されるアルボウイルスである。

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。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。ところでフラビウイルス感染症のうちジカ熱の鑑別疾患としてデング熱が挙げられる。デング熱はデングウイルスに感染することにより発症する蚊によって媒介される疾患である。デングウイルスはアフリカ、南アジア、東南アジア、中南米の熱帯、亜熱帯地域に分布するウイルスであり、1-4型の4つの異なるウイルス型が存在する。わが国では流行地からのデング輸入症例が年々増加傾向にある。また、2014年にはヒトスジシマカによって媒介されたデング熱の国内流行が発生した。

これまでに我々はフラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められるNS5領域にPCRプライマーを設計し、フラビウイルス遺伝子の増幅を検討した。その結果蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、デングウイルス、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス、さらにコウモリから分離されたフラビウイルスであるヨコセウイルスを検出することが可能なフラビウイルス共通プライマーを作

製した。しかしながらフラビウイルス共通プライマーを用いた検査法とその他の検査法についての比較は行われていない。またフラビウイルス共通プライマーのジカウイルスに対する反応性は不明である。そこでわれわれはフラビウイルス共通プライマーと他の検査法の比較をデング患者血清を用いて実施した。またフラビウイルス共通プライマーのジカウイルスに対する反応性を検討した。

## B. 研究方法

### ウイルスRNAの抽出と精製

ウイルスRNAの抽出と精製は、High pure viral RNA kit (Roche)を使用した。i) 200  $\mu$ Lの検体を1.5mlマイクロチューブに入れ、Working solution 400  $\mu$ Lを加え、ピペッティングでよく混和した。ii) 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  $\mu$ Lを注いだ。iii) 10,000回転、15秒間遠心した。iv) ろか液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500  $\mu$ LのInhibitor removal bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。v) ろか液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、450  $\mu$ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。vi) ろか液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450  $\mu$ LのWash bufferを加え、8,000回転、1分間遠心した。vii) 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。viii) 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  $\mu$ LのElution bufferを加え、10,000回転、1分間遠心した。ix) 得られた精製RNAはすぐに使用しない場合は $-80^{\circ}\text{C}$ で保管した。

### TaqMan RT-PCR 法

デング熱疑い患者血清から RNA を抽出した。デングウイルス特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法は伊藤ら (J. Clin. Microbiol. 42(12): 5935-5937, 2004) の方法により実施した。TaqMan RT-PCR 反応によるデングウイルス特異的な遺伝子断片の増幅を観察した。

### フラビウイルス共通プライマーを用いた RT-PCR 法

フラビウイルス共通プライマー-FVX7f および FVX12r を使用し RT-PCR キット, Access Quick RT-PCR System (Promega) にて行った。RT-PCR 終了後, 反応生成物 5  $\mu$ L を 2%アガロースゲル電気泳動 (100V, 約 30 分) を行い, エチジウムブロマイド溶液 (10mg/mL) に 20 分染色し, PCR によって増幅された DNA の断片を確認した。

### 抗デングウイルス IgM 補足 ELISA 法, 抗 IgG ELISA 法, NS1 ELISA 法

デング IgM 補足 ELISA (Focus 社), 抗デングウイルス IgG ELISA 法 (vircell 社), デングウイルス NS1 ELISA 法 (BioRad 社) をそれぞれマニュアルに従って実施した。

## C. 研究結果

### 患者血清を用いた迅速診断法の評価

国立感染症研究所ウイルス第一部第二室で 2008 年から 2009 年にかけて実験室診断されたデング輸入症例患者血清を用いてフラビウイルス迅速診断法の評価を行った。患者血清を各病日ごとに分類し, フラビウイルス共通プライマーを用いた RT-PCR 法の結果と TaqMan RT-PCR 法, 抗デング IgM 補足 ELISA 法, 抗デングウイルス IgG ELISA 法, デングウイルス NS1 ELISA

法で得られた結果をそれぞれ比較検討した。その結果第 1 病日から 5 病日において, フラビウイルス共通 RT-PCR 法による検出率が高く, この傾向は TaqMan RT-PCR 法の結果と一致した (表)。また抗デング IgM 補足 ELISA 法, 抗デングウイルス IgG ELISA 法では第 1 病日, 第 2 病日ではそれぞれデングウイルス特異的抗体は検出されなかったが, 第 3 病日以降その検出率は上昇した。デングウイルス NS1 ELISA では第 1 病日検出率は 60%と高く, その傾向は第 10 病日まで維持された。しかしながら NS1 ELISA の検出率は病日により 50%~100%であり, 他の検査法との併用が必要であることが示された。

### ジカウイルスに対するフラビ共通プライマーの反応性

ジカウイルス分離株 MR766 株より RNA を抽出し, フラビ共通プライマーの反応性を検討した結果, 目的増幅産物を観察し, フラビ共通プライマーによるジカウイルス遺伝子標的領域の増幅を確認した。

## D. 考察

ジカウイルス感染症の鑑別診断として重要なウイルスにデングウイルスが挙げられる。これらウイルスはその分布域, 媒介蚊, およびその症状が同様であるため, その鑑別には実験室診断が必要である。これまでに我々はデングウイルスを含む様々なフラビウイルスを迅速に検出するためにフラビ共通迅速診断法を確立した。

本研究においては急性期から回復期のデング患者血清を用いてフラビ共通プライマーとその他のデングウイルスに対する実験室診断法を比較検討した。その結果

フラビ共通プライマーを用いた検査法とその他の実験室診断法を組み合わせることにより実験室検査の精度の向上が期待されることが示唆された。またフラビ共通プライマーのジカウイルスに対する反応性が確認されたため、今後本共通プライマーのジカウイルス実験室検査への適用を検討する。

#### **E. 結 語**

これまでに先天性ジカウイルス感染症の治療法は確立おらず、その予防対策が重要である。したがってジカウイルス流行時には血液製剤の安全性を確保するために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

特記事項なし

表. フライウイルス共通プライマーと各デングウイルス実験室診断法の検出率

病日	No. (%) of positive serum samples detected by:				
	フラビウイルス 共通プライマー	Taq-Man RT-PCR	IgM ELISA	IgG ELISA	NS1 ELISA
1	5/5 (100)	4/5 (80.0)	0/5 ( 0 )	0/5 ( 0 )	3/5 (60.0)
2	2/2 (100)	2/2 (100)	0/2 ( 0 )	0/2 ( 0 )	2/2 (100)
3	6/9 (66.7)	7/9 (77.8)	5/9 (55.6)	6/9 (66.7)	7/9 (77.8)
4	7/9 (77.8)	4/9 (44.4)	9/9 (100)	4/9 (44.4)	8/9 (88.9)
5	6/12 (50.0)	4/12 (33.3)	10/12 (83.3)	9/12 (75.0)	11/12 (91.7)
6	2/4 (50.0)	0/4 ( 0 )	2/4 (50.0)	1/4 (25.0)	2/4 (50.0)
7	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)	3/3 (100)	3/3 (100)
8—10	3/4 (75.0)	1/4 (25.0)	4/4 (100)	3/4 (75.0)	3/4 (75.0)
合計	33/48 (68.8)	24/48 (50.0)	32/48 (66.7)	26/48 (54.2)	39/48 (81.3)