

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

近年南米だけでなく、東南アジアにおいても先天性ジカウイルス症候群が報告されており、今後ともジカウイルス対策は必要である。また 2019 年にはデング熱が南アジア、東南アジアにおいて大流行しており、我が国においても 3 例の国内感染例が 5 年ぶりに報告されたため、デングウイルス対策が求められる。血液製剤の安全性を確保するうえで問題となる蚊媒介性のフラビウイルスは複数存在するが、これらを迅速に検出することを目的としてこれまでにフラビウイルス共通プライマーを開発した。本研究では、フラビウイルス共通プライマーの TaqMan RT-PCR 法およびデングウイルス NS1 ELISA 法に対するそれぞれの比較検討をデング熱の患者検体を用いて行った。その結果、フラビウイルス共通プライマーのデングウイルス血清型特異的 RT-PCR 法に対する感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率はそれぞれ 94% (29/31), 71% (24/34), 74% (29/39) および 92% (24/26) であった。またデングウイルス NS1 ELISA 法に対してはそれぞれ 72% (34/47), 72% (13/18), 87% (34/39) および 50% (13/26) であった。フラビウイルス共通プライマーはジカウイルスおよびデングウイルスを含むフラビウイルス感染ドナー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

近年のグローバル化における人的交流および物流の活発化により、節足動物媒介性ウイルス(アルボウイルス)感染症の流行域の拡大が認められ、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。特に近年ではデング熱、ジカ熱、チクングニア熱、ウエストナイル熱等の流行域の拡大が問題となっている。

デングウイルス(DENV)は黄熱ウイルスやジカウイルス(ZIKV)、ウエストナイルウイルス(WNV)と同じ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であり、

DENV 血清型群に分類されるエンベロープを被った直径約 50nm の (+) RNA ウイルスである。ウイルス RNA には 3 種類の構造蛋白質(C, prM/M および E)と 7 種の非構造蛋白質(NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B および NS5)がコードされている。

都市部における DENV の主な媒介蚊はネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)およびヒトスジシマカ(*A. albopictus*)である。これらの媒介蚊はデング熱(DF)の重要な鑑別疾患であるチクングニア熱(CHIKF)、ジカウイルス感染症(ZVD)、黄熱(YF)も媒介する。ヒトスジシマカはわが国にも生息す

る蚊で、世界の広い地域に分布しており、近年ではアメリカ、ヨーロッパ等においてもその生息域を拡大している。わが国においてもその分布域は北上しており、近年は青森県においてもその生息が確認されている。

世界保健機関(WHO)の推計では全世界で30億人がDF流行地域で生活しており、年間3億9千万人がDENVに感染し、9千6百万人が発症、うち2万4千人が死亡していると推計されている。DFの報告数も年々増加傾向にあり、世界におけるDF症例数は2008年には120万例、2010年は220万例、2016年には334万例を超えている。

DFは発熱、筋肉痛、発疹等を特徴とする熱性疾患である。発熱は6~7日間持続する。主な血液所見は血小板減少および白血球減少であり、ターニケット(駆血帯)テスト陽性、CRPは正常範囲内であることが特徴的所見である。感染者の20%~80%が不顕性感染である。重症デング熱(SDF)に移行すると、重度の皮下出血(点状出血、斑状出血)、血便、血尿、重度の血漿漏出、呼吸窮迫、肺水腫、肝障害、心機能障害、多臓器障害、脳炎、意識障害を呈し、ショック、消化管からの大量出血、脳内出血等により死に至る。

DFの流行地では、輸血や腎移植を介したドナーからレシピアントへのDENVの感染およびDFの発症がこれまでに報告されており、その対策が求められる。したがってDF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DFの鑑別疾患としてZVDが挙げられる。

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。そして蚊によって媒介されるDENV、ZV、WNV、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎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。また、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急性期においてTaq-Man RT-PCR法と同程度の検出率を示した。そこで本研究では、フラビウイルス共通プライマーのTaqMan RT-PCR法およびデングウイルスNS1 ELISA法に対するそれぞれの感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率をデング熱の患者検体を用いて検討した。

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。() 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 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 μ 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．また得られた増幅産物は塩基配列解析により DENV 由来であることを確認した．

デングウイルス NS1 抗原 ELISA 法

デングウイルス NS1 ELISA 法 (BioRad 社) のマニュアルに従って実施した．

C . 研究結果

フラビウイルス共通プライマーの TaqMan RT-PCR 法との比較検討

フラビウイルス共通プライマーの感度を検討するために DF 患者の血清 65 検体を用いて DENV 血清型特異的 Taq-Man RT-PCR 法に

対するフラビウイルス共通プライマーの感度，特異度，陽性的中率，陰性的中率を検討した．その結果，フラビウイルス共通プライマーのデングウイルス血清型特異的 RT-PCR 法に対する感度，特異度，陽性的中率および陰性的中率はそれぞれ 94% (29/31)，71% (24/34)，74% (29/39) および 92% (24/26) (κ = 63%， $P < 0.00001$) であった．カッパ係数より統計学的に 2 つの検査法はかなり一致した．

フラビウイルス共通プライマーのデングウイルス NS1 抗原 ELISA 法との比較検討

次にフラビウイルス共通プライマーの感度を検討するために DF 患者の血清 65 検体を用いてデングウイルス NS1 抗原 ELISA 法に対するフラビウイルス共通プライマーの感度，特異度，陽性的中率，陰性的中率をそれぞれ検討した．その結果，フラビ共通プライマーのデングウイルス NS1 ELISA 法に対する感度，特異度，陽性的中率および陰性的中率はそれぞれ 72% (34/47)，72% (13/18)，87% (34/39) および 50% (13/26) (κ = 49%， $P < 0.01$) であった．カッパ係数は 49% であり，2 つの検査法は適度に一致した．

これらの結果より，フラビウイルス共通プライマーは急性期の患者検体中の DENV 遺伝子を十分に検出可能であることが示唆された．

D . 考察

感染症法により DF 症例の調査が 1999 年 4 月より開始され，1999 年に報告された DF 輸入症例はわずか 9 名であったが，その後国内の検査体制が整備されたこともあり，その輸入症例数は年々増加し，2019 年度は初めて 450 例を超えた．世界的にもデングウイルス

の流行は拡大しており，特に2019年はフィリピンで約4229万人（死者1,565人），マレーシアで約129万7千人（死者176人），ベトナムで約312万人（死者54人），ラオスで約3万8千人（死者70人），シンガポールでは約1万5千人の患者が報告されている．こうした流行地域で，日本からの渡航者がDENVに感染するケースが増加傾向にある．また，2019年9月には，5年ぶりに国内において3例の国内流行が発生した．患者は京都と奈良を修学旅行で訪問した東京都内の生徒であった．患者がDENVに感染したと推定される期間に行動を共にした場所は，学校と修学旅行のみであり，修学旅行においては同一班で行動していた．今後も引き続き国内発生リスクが存在するため，DFの国内流行について注意が必要である．

E．結論

これまでにDFあるいは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DF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．また国内流行

を速やかに検出する体制も重要となる．DFおよびZDVIは，感染症法上の4類感染症に指定されており，これらの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

論文発表

特記事項なし

学会発表

特記事項なし

H．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む．）

1．特許取得

特記事項なし

2．実用新案登録

特記事項なし

3．その他

特記事項なし