

分担研究総合報告書

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重要である。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 例の輸入症例が 5 年ぶりに報告された。いずれのウイルスも輸血を介した感染がこれまでに報告されており、血液製剤の安全性を確保するうえで重要な疾患である。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、ジカウイルス、デングウイルス等を検出できることを示した。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、フラビウイルス共通プライマーは TaqMan RT-PCR 法と同程度の感度を示すことを各病日において示した。さらに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検討を行ったところ、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

ジカウイルス (ZV) およびデングウイルス (DENV) は黄熱ウイルスや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る。いずれもエンベロープを被った直径約 50nm の (+) RNA ウイルスであり、これまでに 70 種類のウイルスが知られている。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。

都市部においてジカウイルスおよびデング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。これらの媒介蚊は重要

な鑑別疾患であるチクングニア熱 (CHIKF) や黄熱 (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。

ZV 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が、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ウ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、世界保健機関(WHO)の推計では全世界で年間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。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)、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。

本研究で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、その評価をおこ

なった。

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、High pure viral RNA kit (Roche)を使用した。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。

ジカウイルスに対するTaqMan RT-PCR法

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: TTG 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。

デングウイルスに対する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TaqMan 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。

抗 Dengue ウイルス IgM 補足 ELISA 法, 抗 IgG ELISA 法, NS1 ELISA 法

Dengue IgM 補足 ELISA (Focus 社), 抗 Dengue ウイルス IgG ELISA 法 (vircell 社), Dengue 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

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 2018 年までに 20 例の ZVD 輸入症例が報告されていることが示された。また 2019 年には 3 例の ZVD 輸入症例が報告された。

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 ZV 特異的 TaqMan 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 ZDV 患者検体から ZV 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。DENV 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、ZV 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。分離されたウイルスの遺伝子配列を検討した結果、遺伝子型がアジア型であるウイルス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。

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 DF 患者の血清 65 検体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 Dengue IgM 補足 ELISA 法、抗 Dengue ウイルス IgG ELISA 法、Dengue 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。また抗 Dengue IgM 補足 ELISA 法、抗 Dengue ウイルス IgG ELISA 法では第 1 病日、第 2 病日ではそれぞれ Dengue 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。Dengue 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。

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) ($\kappa = 63\%$ ， $P < 0.00001$) 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) ($\kappa = 49\%$ ， $P < 0.01$) 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

ZDV と DF は重要な鑑別疾患である。これら感染症はその流行域，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．

日本では 2019 年までに 23 例の ZVD 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、ZV と共通の媒介蚊であるヒトスジシマカによる DENV の国内流行が 2014 年および 2019 年に発生しており、ZV 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。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。

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されておらず，その予防対策が重要である．したがってZVDおよびDF流行時にはそれぞれ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．ZDVおよびDVI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