

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）

海老原秀喜（国立感染症研究所ウイルス第一部部長）

研究要旨 近年ヨーロッパではウエストナイルウイルス（WNV）およびウスツウウイルス（USUV）の流行が問題となっている。WNV および USUV は共にフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される。2018 年にはヨーロッパ 15 カ国で 2,000 例以上の WN 熱患者が発生した。その後もその流行は継続し、2020 年にはドイツで最初の WNV 感染症による死亡例が報告された。また、2009 年にはイタリアで初めて USUV 感染による免疫不全患者の髄膜脳炎症例が報告された。さらに 2017 年にはオーストリアにおける輸血血液中の WNV 遺伝子に対するスクリーニング検査において USUV 遺伝子が検出され、問題となっている。そこで本研究では、ヨーロッパウイルスアーカイブグローバル(EVA-g)より導入した USUV 2 株を用いて USUV に対するフラビウイルス共通プライマーの反応性を検討した。その結果フラビウイルス共通プライマーはいずれの USUV 株に対してもその検出に有用であることが示された。

**A. 研究目的**

近年の交通網の発達と人的・物的交流の活性化により節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）感染症の流行域が急速に拡大し、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。特にヨーロッパではウエストナイルウイルス（WNV）およびウスツウウイルス（USUV）の流行が認められる。WNV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類され、1937 年にウガンダで最初にその流行が確認された。以後、主にアフリカ、中東およびヨーロッパで散発していたが、2018 年にはヨーロッパ 15 カ国で 2,000 例以上の患者が発生した。その後もその流行は継続し、2020 年にはドイツで最初の死亡例が報告された。米国では 1999

年にニューヨークで患者が発見され、急速にその流行域が米国、カナダ、メキシコ、カリブ海諸国、コロンビア、アルゼンチンなどに拡大した。米国における 2020 年までの患者数は 52,382 人、そのうち死者は 2,418 人であった。わが国では 2005 年 10 月に輸入症例が確認された。中国では新疆ウイグル自治区においてその流行が報告されている。オーストラリアには WNV に近縁のクンジンウイルスが分布する。

USUV はフラビウイルス属に分類され、近年ヨーロッパにおいて特に注目されている。USUV は 1959 年に南アフリカでイエカ属の蚊 (*Culex neavei*) より初めて分離され、ヨーロッパでは回顧調査により遅くとも 1996 年には存在したことが示されている。

これまでのところ USUV のヒトに対する病原性は高くないが、ヨーロッパでは 2009 年にイタリアで初めて USUV 感染による免疫不全患者の髄膜脳炎症例が報告された。また 2009 年にはイタリアで肝移植を受けた女性の血液からも USUV が分離された。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。そして蚊によって媒介されるデングウイルス (DENV)、ジカウイルス (ZV)、WNV、ダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス (TBE) 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。そこで本研究では、ヨーロッパウイルスアーカイブグローバル (EVA-g) より導入した USUV 2 株を用いて USUV に対するフラビウイルス共通プライマーの反応性を検討した。

## B. 研究方法

### ウイルス

サル腎細胞由来 Vero 細胞を  $2 \times 10^5/\text{ml}$  に播種し、5%  $\text{CO}_2$ , 37°C で培養した。翌日、EVA-g より導入したウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株をそれぞれ 50 $\mu\text{l}$  接種した。細胞を毎日顕微鏡下で観察し、細胞変性効果の認められた培養上清を回収し、-80°C の超低温下で保存した。

### 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。i) 200 $\mu\text{L}$  の検体を 1.5ml マイクロチューブに入れ、Working solution 400 $\mu\text{L}$  を加え、ピペ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 $\mu\text{L}$  を注いだ。iii) 10,000 回転、15 秒間遠心した。iv) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、500 $\mu\text{L}$  の Inhibitor removal buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。v) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、450 $\mu\text{L}$  の Wash buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心した。vi) ろ液を捨て、新しい回収チューブを連結させ、再度、450 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$  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°C で保管した。**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 $\mu\text{L}$  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 JEV 由来であることを確認した。

## C. 研究結果

### ウスツウイルスの培養

Vero 細胞を播種し一晩静置後、ウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株をそれぞれ 50 $\mu\text{l}$  接種した。細胞を鏡検下

で毎日観察し、接種 4 日後に細胞変性効果が観察された。培養上清を接種後 4 日後に回収し、-80℃の超低温下に保存した。

#### フラビ共通プライマーによるウスツウイルス遺伝子の検討

次に UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株に対してフラビ共通プライマーによる RT-PCR を実施したところ、ウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株 KO-44 株において特異的増幅が認められた。

#### D. 考察

血液製剤の安全性を確保するうえで近年問題となっているフラビウイルスには WNV, USUV, ZV 等がある。特に USUV は、2017 年にオーストリアにおける輸血血液に対する WNV 遺伝子に対するスクリーニング検査において 12,047 検体中 6 検体からその遺伝子が検出されており、問題となっている。本研究ではこれら USUV 遺伝子に対するフラビ共通プライマーの検討を行った。その結果フラビウイルス共通プライマーはいずれの USUV 株についても増幅能を有していることが示された。 UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株は、1959 年に南アフリカで *Culex neavei* より分離されたウスツウイルスのレファレンス株である。また、Usutu virus/Slovenia /Ko208/2018 株はスロベニアで分離された近年の流行株である。特にフラビウイルス共通プライマーを用いることにより、Usutu virus/Slovenia /Ko208 /2018 株を検出できたことから、当プライマーは近年の USUV にも対応していることが示唆された。

WNV はトリが自然宿主であり、トリと媒介昆虫である蚊の間で、感染環が形成・維持されている。これまでに感染が確認された鳥類の種類は 220 種以上におよぶ。特にカラス、イエスズメ、アオカケス等において血中のウイルス量が高いことが報告されている。USUV は蚊とトリの間で感染環を形成し、トリに対して高い致死率を示す。主な媒介蚊はトビイロイエカ (*Cx. pipiens*) である。ヒトおよびげっ歯類は終末宿主である。USUV に感受性の高い主なトリはユーラシアクロウタドリ (Blackbird: *Turdus merula*) である。ユーラシアクロウタドリは渡り鳥としてヨーロッパからロシア、中国、台湾にも分布し、わが国にも飛来している。したがってこれらウイルスがわが国に侵入する可能性は否定できないため、今後の WNV および USUV の動向に注目する必要がある。

#### E. 結論

これまでに DF, ZVD, WNE および JE 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。また、USUV に対する検査体制も十分とは言えない。血液製剤の安全性を確保するためのドナースクリーニングにおいて蚊媒介性ウイルスのウイルス学的特性の解析を行い、迅速で高い感度と特異度を示す検査系の開発をすすめ、その成果について情報共有に努める。

#### 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
特記事項なし	2. 実用新案登録
	特記事項なし
H. 知的財産権の出願・登録状況	3. その他
(予定を含む.)	特記事項なし
1. 特許取得	