

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、引き続き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、ブタ血清中の日本脳炎ウイルス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現在国内に流行している日本脳炎ウイルスの野生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。特にデング熱（DF）、チクングニア熱（CHIKV）、ジカウイルス感染症（ZVD）等の流行域の拡大が顕著であり、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、そのうち 2 万 4 千人が死亡しているとされている。DF の報告数は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。特に 2016 年および 2019 年は、世界的に大規模な DF の流行が報告された。2016 年は南北アメリカ地域で 238 万例、西太平

洋地域で 37 万 5 千例が報告され、そのうちフィリピンでは 17 万 6 千例、マレーシアでは 1 万例が報告された。そして 2019 年は南北アメリカ地域で 313 万 9 千例（うち重症デング熱（severe dengue fever: SDF）28,169 人、死者 1,538 人）と記録上最悪の患者数が報告された。西太平洋地域ではフィリピンで 42 万人、マレーシアで 12 万人、ベトナムで 32 万人、そしてシンガポールにおいて約 1 万 5 千人の患者が報告されている。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。またわが国では主にコガタアカイエカによって媒介される日本脳炎が現在も流行しており、毎年夏から秋にかけて患者が発生している。

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デングウイルス (DENV)、ジカウイルス (ZV)、ウエストナイルウイルス (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。また、の DF 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 DF 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、ブタ血清中の日本脳炎ウイルス (JEV) の野生株を用いてわが国に分布している JEV 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 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 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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。

日本脳炎ウイルス特異的 RT-PCR 法

高知県のブタ血清から JEV RNA を抽出した。JEV 特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR 法により JEV 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 JEV 由来であることを確認した。

ウイルス分離

サル腎細胞由来 Vero 細胞を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に播種し、翌日ブタ血清を 50 μ 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。JEV 特異的プライマーを用いた RT-PCR 法によりウイルスの同定を行った。

C. 研究結果

ブタ血清中における日本脳炎ウイルスの

クリーニング

高知県で採取されたブタ血清 20 検体について JEV 遺伝子の検出を JEV 特異的 RT-PCR 法を用いて実施した。その結果 20 検体のブタ血清のうち、5 検体より目的産物と同じ 250bp 付近に増幅産物が得られた。

日本脳炎ウイルスの分離

JEV 特異的ウイルスによって増幅産物の得られたブタ血清 5 検体についてウイルス分離を実施した。24 穴プレートに Vero 細胞を播種し一晩静置後、増幅産物が得られたブタ血清 5 検体をそれぞれ 50 μ l 接種し、細胞を鏡検下で毎日観察した。その結果血清 K0-44 および K0-57 を接種した培養細胞において接種 4 日後から細胞変性効果が観察された。そこで細胞変性効果の観察された K0-44 および K0-57 の培養上清を接種後 5 日後に回収し、-80°C の超低温下に保存した。

フラビ共通プライマーによるブタ血清中の日本脳炎ウイルス遺伝子の検討

次に分離された JEV K0-44 株および K0-57 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、K0-44 株および K0-57 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、ウスツウイルス (USUV)、ジカウイルス (ZV) 等がある。また近年デングウイルス (DENV) の血液製剤への安全性への影響についても指摘されている。これらウイルスはわが国には分布していないためこれらウイルスの輸入症例が問題となる可能性がある。本研究ではこれらウイルス遺伝子を検出するモデルとしてわが国にも分布する JEV を用い

て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 JEV の野生株についても増幅能を有していることが示された。今後は USUV を海外の研究機関より導入して、USUV に対するフラビウイルス共通プライマーの増幅能を検証し、フラビウイルスの迅速な検出法を検討する。

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。したがって DF や ZVD の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。よって今後も血液製剤の安全性を確保するために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。DF、ZVD、WNE および JE 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。これらアルボウイルス感染症に対する検査体制を整備することは、わが国の血液製剤の安全性を確保する目的に寄与するものである。

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

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