

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 西山祥子（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）
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ツウイルス（USUV）の流行が問題となっている。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 遺伝子が検出された。そこでヨーロッパウイルスアーカイブグローバル（EVA-g）より USUV の実験室診断法の確立及び性状解析のため、USUV 2 株、UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 (SAAR-1776) 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 (Ko208/2018) 株を導入した。本研究では、導入した 2 株の遺伝子解析を次世代シーケンサー（NGS）により解析し、系統樹解析を行なった。その結果 SAAR-1776 株はアフリカ 2 型、Ko208/2018 株はヨーロッパ 2 型の遺伝子型にそれぞれ分類されることが示された。またこれら 2 株の相同性は 96.6%であった。

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。特に近年ヨーロッパではウツウイルス（USUV）の流行が認められる。USUV はフラビウイルスウイルス科に分類される一本差（+）RNA ウィルスである。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、ヨーロッパでは鳥類の血清学的サンプルに対する回顧的調査により遅くとも 1996 年には USUV が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。さらにドイツ、イタリアおよびオーストリアにおいては、献血血に対するウエストナイルウイルス（WNV）の NAT 検査において、USUV 遺伝子が検出されている。したがって、USUV による輸血感染症が問題となっている。

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), 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. またこれまでに我々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 UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 (SAAR-1776)株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 (Ko208/2018) 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確認した. ところで, SAAR-1776 株は 1959 年に南アフリカで *Culex neavei* より分離されたウイルス株でありフランスから導入した. Ko208/2018 株は 2018 年にスロベニアで蚊より分離された近年のヨーロッパ流行株であり, スロベニアから導入した. SAAR-1776 株 (GenBank Accession no. AY453412) についてはすでにその塩基配列が報告されているが, Ko208/2018 株については未だその報告がない. そこでわれわれは SAAR-1776 株および Ko208/2018 株について次世代シーケンサー (NGS) 解析を実施し, その塩基配列を決定した.

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%CO₂, 37°C で培養した. 翌日, EVA-g より導入した SAAR-1776 株および Ko208/2018 株をそれぞれ 50 μl 接種した. 細胞を顕微鏡下で観察し, 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, Hight

pure viral RNA kit (Roche 社) を使用した. i) 200 μL の検体を 1.5ml マイクロチューブに入れ, Working solution 400 μL 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 μL を注いだ. iii) 10,000 回転, 15 秒間遠心した. iv) 上液を捨て, 新しい回収チューブを連結させ, 500 μL の Inhibitor removal buffer を加え, 8,000 回転, 1 分間遠心し, 上液を捨て, 新しい回収チューブを連結させ, DNase 処理を行った. v) 450 μL の Wash buffer を加え, 8,000 回転, 1 分間遠心した. vi) 上液を捨て, 新しい回収チューブを連結させ, 再度, 450 μL 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 1.5 mL チューブにフィルターチューブを連結させ, 50 μL 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.

NGS 解析のためのサンプル調整と NGS 解析

NGS 解析のためのサンプル調整は, NEB Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs 社) を用いて, 取扱説明書に沿って実施した. NGS 解析は iSeq 100 システム (Illumina 社) を用いて行なった.

シーケンス解析

得られた NGS データにおけるウイルス遺伝子配列の構築には, CLC Genomics Workbench (QIAGEN 社) を用いた. 得られたウイルス配列の系統樹解析は, MEGA X (<http://megasoftware.net>) を用いて行な

った。

C. 研究結果

ウスツウウイルスの培養

Vero 細胞を播種し一晩静置後，USUV UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株をそれぞれ 50 μ 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°C の超低温下に保存した。

次世代シーケンサーによるウスツウウイルス遺伝子の配列解析

次に SAAR-1776 株および Ko208/2018 株の NGS 解析を行なった。その結果 2 株それぞれの塩基配列は 5'-および 3'-末端 UTR 領域の 10 塩基を除き決定された。SAAR-1776 株はこれまでに報告されている塩基配列 (AY453412) との比較において数塩基の変異が認められた。また系統樹解析の結果 SAAR-1776 株の遺伝子型は，アフリカ 2 型であることが示された。さらに，スロベニアで分離された Ko208/2018 株はヨーロッパ 2 型の遺伝子型に分類されることが示された。SAAR-1776 株および Ko208/2018 株の同一性は 96.6%であった。

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。さらに欧州ではUSUV感染症が

鳥類において流行しており，これまでに24のヨーロッパ諸国で遺伝子学的あるいは血清学的にその存在が示された。2001年にはオーストリアで数百羽のユーラシアクロウタドリ (*Turdus merula*) の大量死が確認されている。また2005年にはハンガリーで，2006年にはスイス，そして2009年にはイタリアで，USUV感染症の流行が鳥類において発生している。またドイツでは，2010年に蚊のプール (*Culex pipiens pipiens*) からUSUVが分離され，さらに2011年には，鳥類（特にユーラシアクロウタドリ）の大量死が報告されている。クロウタドリはわが国にも飛来する渡り鳥であり，わが国においてもUSUVの侵淫に備える必要性は否定できない。

本研究ではEVE-gより導入した2株のUSUVに対するNGS遺伝子解析を実施した。SAAR-1776株は，1959年に南アフリカで *Culex neavei* より分離されたUSUVのレファレンス株であるが，われわれの解析においてもその配列が比較的良く保存されていることが確認された。またスロベニアで分離されたKo208/2018株は，現在ヨーロッパで流行している遺伝子型ヨーロッパ2型に分類されることが明らかとなった。両ウイルスの同一性は96.6%であり，これらの塩基配列の差と病原性の関係について今後の調査の必要性が示唆された。

E. 結論

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USUVが検出されており，USUVの分布する地域においては，USUVは重要なウイルスの1つである。USUVにはいくつかの遺伝子型が存在し，ヨーロッパ型のUSUVは温暖地域であるヨ

ヨーロッパの鳥類において広く流行していることから、今後もUSUVの動向にも注視するとともに、その性状解析を進める必要がある。

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

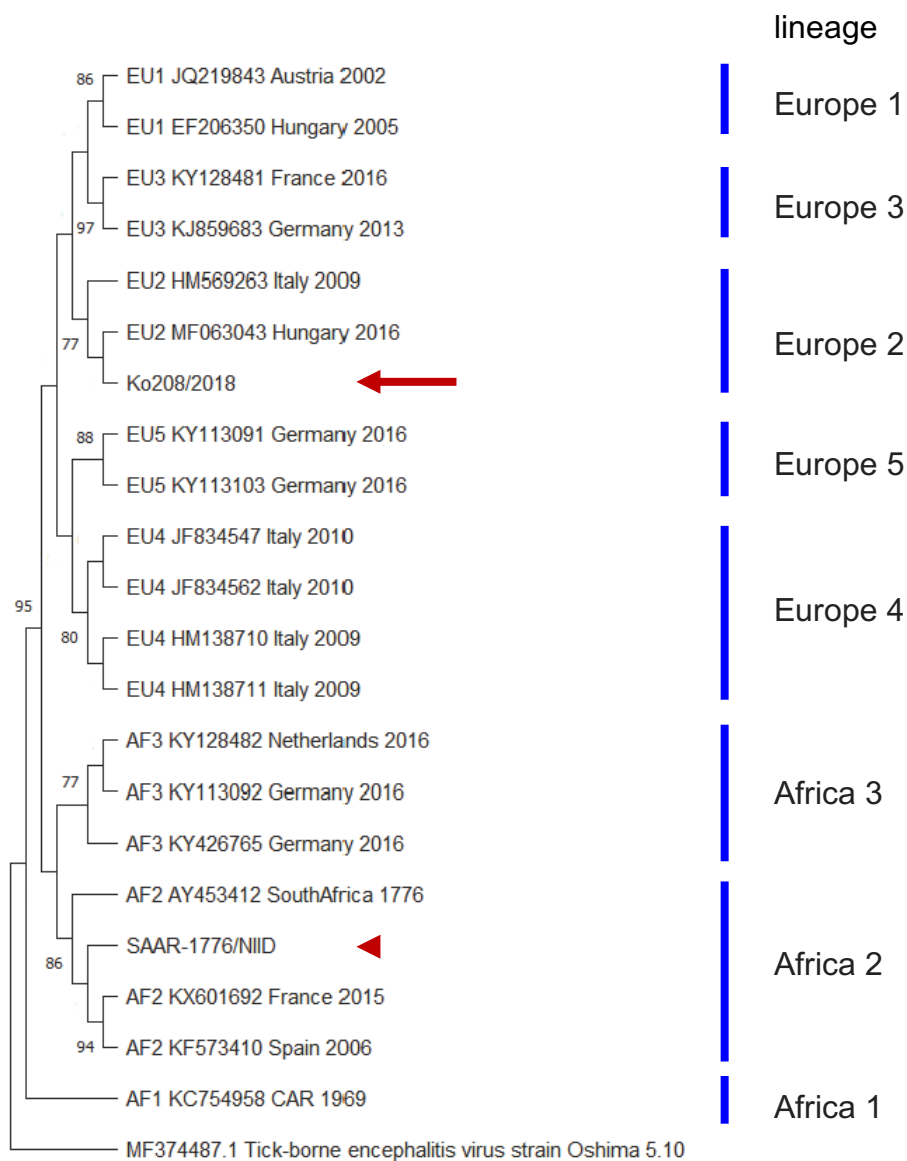


図. ウスツウイルス (USUV) の系統樹解析.

非構造蛋白質 5 (NS5) 遺伝子の一部配列に基づく USUV の系統樹を、近傍結合法を用いて構築した。最大合成尤度法を用い、サイト間の率は均一とした。ブートストラップ値は 500 個の複製で計算し、類似度 > 75% を系統群の基準として使用した。本研究で解析した SAAR-1776 株を矢印で、そして Ko208/2018 株を矢印でそれぞれ示した。その結果 SAAR-1776 株はアフリカ 2 型、Ko208/2018 株はヨーロッパ 2 型の遺伝子型にそれぞれ分類されることが示された。外群にはダニ媒介脳炎ウイルス Oshima 株を用いた。