

分担研究報告書

献血血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解析

研究分担者	国立感染症研究所	ウイルス第一部	林 昌宏
研究協力者	国立感染症研究所	ウイルス第一部	西山 祥子
	国立感染症研究所	ウイルス第一部	田島 茂
	国立感染症研究所	ウイルス第一部	海老原秀喜

研究要旨 輸血用血液製剤の安全性に関わる節足動物媒介性ウイルスの流行地においては、これらウイルスによる輸血感染症が問題となっている。そこで節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染症の事例について文献探索を行いその実態を調査した。その結果、輸血によるデングウイルス感染例および血小板輸血によるジカウイルスの報告例を確認した。ところで、近年ヨーロッパではウスツウイルスが流行しており、献血血からもウイルス遺伝子が検出されている。そこで我々はウスツウイルスの検出系を検討するために、その病原性をC3H/Heマウスを用いて検討した。その結果ウスツウイルスは脳内接種において毒性を示したが、腹腔内接種においては病原性を示さなかった。今後さらにウスツウイルスの性状解析を進める必要が示された。

A. 研究目的

輸血によるウイルス感染症の原因として、ドナーが献血血スクリーニング検査の実施されていないウイルスに感染しており、かつ不顕性感染である場合が挙げられる。節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）は、不顕性例が多いこと、ウイルス血症が疾病の発症に先行することから、献血血が感染源となる可能性がこれまでも報告されてきた。わが国において輸血による感染が確認された症例中にアルボウイルス感染症は含まれていないが、海外ではデングウイルス（DENV）、チクングニアウイルス（CHIKV）、ウエストナイルウイルス（WNV）、ジカウイルス（ZIKV）等の輸血感染例が報告されている。近年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おり、わが国においてもDEN熱の輸入症例はコロナ禍後再び増加傾向にある。ところでヨーロッパではウスツウイルス（USUV）の流行が問題となっている。USUVはフラビウイルス科に分類される一本鎖（+）RNAウイルスであり、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た。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。USUVのヒトに対する病原性は高くないが、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ている。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WNVの核酸増幅検査（NAT）検査において、USUV遺伝子が検出されている。したがって献血血におけるアルボウイルスの検出事例と輸血によるレシピエントへの臨床的影響に関するデータの収集は献血血の安全確保において重要である。これまでにわれわれは、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。

そこで本研究ではUSUVの性状を解析し、検査系を評価するための動物モデルの開発を行う。また、アルボウイルスの輸血リスクを分析するためにDENV、CHIKV、ZIKV等のアルボウイルスによる輸血感染症の事例について文献探索を行いその実態を調査する。

B. 研究方法 ウイルスの準備

サル腎細胞由来Vero細胞を 2×10^5 /mlで播種し、5%CO₂、37°Cで培養した。翌日、SAAR-1776株およびKo208/2018株をそれぞれmoi 0.01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。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。

マウス

一群 5 匹の 3 週齢 C3H/He マウスに対して USUV SAAR-1776 株および Ko208/2018 株 (10^1 PFU/ml) をそれぞれ $20 \mu\text{l}$ 脳内接種した。また同様に 3 週齢 C3H/He マウスに対して SAAR-1776 株および Ko208/2018 株 (10^6 PFU/ml) をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ 腹腔内接種した。ウイルス接種を行なったマウスを 21 日間観察した。

節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染症の事例の文献調査

過去 20 年間に報告された節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染の事例について PubMed を用いて文献調査を行なった。

(倫理面への配慮) 本研究で実施した研究は国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て実施した。

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 SAAR-1776 株および Ko208/2018 株をそれぞれ moi 0.01 接種した。細胞を顕微鏡下で毎日観察し、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。

マウスのウスツウウイルス感受性

一群 5 匹の 3 週齢 C3H/He マウスに対して SAAR-1776 株および Ko208/2018 株 (10^1 PFU/ml) をそれぞれ $20 \mu\text{l}$ 脳内接種した。その結果接種 14 日以内に Ko208/2018 株では 3 匹のマウスが死亡し、SAAR-1776 株では 1 匹のマウスが死亡した。しかしながら SAAR-1776 株および Ko208/2018 株 (10^6 PFU/ml) をそれぞれ $100 \mu\text{l}$ 腹腔内接種したマウスにおいては、21 日の観察期間中、ウイルス感染による症状を示した個体あるいは死亡した個体は認められなかった。

節足動物媒介性ウイルスによる輸血感染症の事例の文献調査

過去 20 年間に報告された節足動物媒介性ウイルスによる主な献血血の汚染例および輸血による感染例について PubMed を活用して文献調査を行なった。その結果 2005 年にレユニオン島において献血血より CHIKV RNA が検出された事例の報告があった。その他にも 2005 年にプエルトリコの献血血より DENV RNA が検出、2009 年

にタイの献血血より CHIKV RNA の検出、2012 年にはブラジルの献血血より DENV RNA が検出された事例報告があった。2013-2015 年にかけてのフランス領ポリネシアで行われた調査では 2.8% が ZIKV RNA 陽性であった。プエルトリコにおける 2014 年の調査では、1.9% が CHIKV 陽性であった。2017 年の報告ではサウジアラビアのドナーの 5.5% が DENV RNA 陽性であった。2018-2020 年にブラジル北部で行われた調査では、献血血 36,133,000 件のうちアルボウイルスが検出されたケースは、DENV 陽性および CHIKV 陽性それぞれ 1 件であった (陽性率 0.002%)。さらに輸血による感染事例として、2012 年にブラジルにおいて少なくとも 5 例の輸血による DENV の感染例が発生した。また 2016 年にはブラジルにおいて 2 例の血小板輸血による ZIKV 感染例も報告されている。DENV, CHIKV, ZIKV はヒトにおいて高いウイルス血症を示すため、献血血を介してヒトに感染する事例が報告されている。したがって今後もこれら事例について情報収集が必要であることが示された。

D. 考察

血液製剤の安全性を確保するうえで問題となっているアルボウイルスには DENV, CHIKV, WNV, USUV, ZIKV 等がある。近年デング熱の流行が世界的に拡大しており、2023 年の東南アジアにおけるデング熱の患者数は、ベトナム 166,619 人 (死者 42 名)、フィリピン 195,603 人 (死者 657 名)、マレーシア 120,418 人 (死者 96 名)、シンガポール 9,663 人、ラオス 31,997 人 (死者 20 名)、カンボジア 31,567 人 (死者 39 名)、タイ 158,705 人 (死者 181 名) であった。コロナ禍による世界的な移動制限が 2022 年に解除され、ヒトの交流が再開されると、再びわが国におけるデング熱輸入症例の増加が認められた。したがって DENV をはじめとしたアルボウイルス感染症に対する情報収集と検査体制の強化が重要である。

本研究においては、献血血から検出されたアルボウイルスの情報について文献調査を行い、アルボウイルスの流行地域では献血血からアルボウイルスが検出された事例がいくつか報告されていることを確認した。例えば 2005 年にフランス海外島のレユニオン島での CHIK 熱流行時には献血血より CHIKV が検出されており、2016 年のブラジルにおける ZIKV 感染症流行時には ZIKV の血小板輸血を介した感染例が報告されている。また近年のブラジルでの DEN 熱および CHIK 熱の流行においても献血血

よりそれぞれのウイルスが検出されている。わが国においては、海外からの帰国日（入国日）当日から4週間以内の献血は、基本的に実施されておらず、これらアルボウイルスのウイルス血症の期間は長くて10日ほどであるとされているため、直ちにアルボウイルスによる献血血へのリスクがあるわけではない。しかしながら、2016年および2019年にはDEN熱の国内流行も発生しており、引き続きその情報収集と検査体制の整備することにより、アルボウイルスの国内流行に備えることが求められる。

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。本研究においてEVE-gより導入した2株のUSUVのうち、SAAR-1776株は、1959年に南アフリカで分離されたレファレンス株であり、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ウイルス株である。これら2株の病原性についてマウスを用いて検討したところ、脳内接種により病原性を示したが、腹腔内接種においては病原性を示した個体は観察されないことが示された。USUVの体内動態モデルを構築し、検査系の評価を実施するため、引き続きその開発を実施する必要がある。

E. 結論

これまでに報告された献血血からのアルボウイルスの検出に対する調査を行い、アルボウイルスの流行においては、献血血においてアルボウイルスが検出される事例が報告されていることが示された。したがって、血液製剤の安全性を確保するためには、今後もこれら情報を収集する必要性が示された。また今後もアルボウイルスの動向に注視するとともに、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

1. 特記事項なし

学会発表

1. 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