

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、SAAR-1776株およびKo208/2018株を導入し、導入した2株の遺伝子解析を次世代シーケンサー (NGS) により解析した。ウイルスの遺伝子配列について系統樹解析を行なったところ、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。さらにその病原性を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

近年の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。さらに世界的な人的交流の再開により、わが国におけるデング熱の輸入症例は再び増加傾向にある。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、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。ヨーロッパでは 2009 年にイタリアで初めてウスツウイルス (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、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 NAT 検

査において、USUV 遺伝子が検出されており、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 DENV, ZIKV, 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。

ところで、USUV/Slovenia/Ko208/2018 (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。UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 (SAAR-1776) 株 (GenBank Accession no. AY453412) は、南アフリカで 1959 年に分離された株である。SAAR-1776 株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。また、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った。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した。

B. 研究方法

ウイルス

サル腎細胞由来Vero細胞を2 x 10⁵/ml培養フラスコに播種し、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にて接種した。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) を用いて取り扱い説明書に沿って実施した。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。

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。

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(10¹ PFU/ml)をそれぞれ20 μl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(10⁶ PFU/ml)をそれぞれ100 μl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50 μl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。

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(10¹ PFU/ml)をそれぞれ20 μl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(10⁶ PFU/ml)をそれぞれ100 μl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の検出、2017年には、オーストリアの輸血血液に対するWNVスクリーニング検査において12,047検体中6検体からUSUVの遺伝子が検出された。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

DENV, ZIKV, CHIKV は+鎖の一本 RNA ウイルス (1-3) であり、宿主に幅広い臨床症状を引き起こす。これらのウイルスは蚊によって媒介される。これらのアルボウイルス感染症は、不顕性感染率が高く、高いウイルス血症を呈するため、献血血中に検出されることが明らかとなっている。これらアルボウイルスは、献血血においてスクリーニングされていないため、感染した無症状のドナーの血液成分が輸血される可能性は否定できない。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も 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、これらアルボウイルスを媒介する媒介蚊は生息しており、特に夏季から秋季にかけてこれら疾患が国内流行する可能性が否定できない。2016 年および 2019 年には DEN 熱の国内流行も発生している。したがって、引き続きその情報収集と検査体制の整備が求められる。

さらにヨーロッパでは USUV 感染症が鳥類において流行しており、これまでに 24 の国々で遺伝子学的あるいは血清学的にその

分布が明らかとなっている。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。さらに、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

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 の流行地域ではウイルス RNA が検出されているため USUV の検査体制の整備を行なった。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特に流行期に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し、検査体制の整備を行う必要性が示された。

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