

令和6年度
厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）
「新興・再興感染症流行時の血液製剤の安全性確保のための研究」
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 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。2024年は特にデング熱が世界的に流行していることが示され、国内でのデング熱輸入症例も200症例を超えた。また中南米においてオロプーシェ熱が再興し、ブラジルを中心に多くの患者が報告された。さらにデングウイルスの遺伝子診断系におけるプライマー・プローブセットを見直し関係機関と共有した。

A. 研究目的

わが国におけるデング熱の輸入症例は2022年以来再び増加傾向にある。デング熱はデングウイルスの感染によって発症する急性熱性疾患である。デングウイルスはフラビウイルス科オルソフラビウイルス属に分類される一本鎖（+）RNAウイルスであり、血清型1型～4型のウイルスが存在する。都市部ではネッタイシマカおよびヒトスジシマカ等のヤブカ族の蚊によって媒介される。またデング熱の鑑別疾患として同じオルソフラビウイルス属に分類されるジカウイルスによって発症するジカウイルス病およびアルファウイルス属に分類されるチクングニアウイルスの感染によって発症するチクングニア熱が挙げられる。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。

これまでにわれわれは地方衛生研究所とのアルボウイルスレファレンスネットワークを通して、アルボウイルス感染症の流行状況の共有、診断系の整備を実施してきた。特に遺伝子診断においては、デングウイルス血清型1型～4型の遺伝子検査に用いる陽性対照に実験室内キャリアオーバー汚染対策の一環として、既知の配列を人工的に導入した陽性対照を開発した。これら陽性対照を用いることにより、キャリアオーバー汚染を検知できるため、献血血のスクリーニングへの応用が期待される。

ところで、2023年末よりデング熱の重要な鑑別疾患として、オロプーシェ熱が中南米、特にブラジルにおいて、再興している。オロプーシェウイルス（Oropouche virus）はブニヤウイルス目ペリブニヤウイルス科オルソブニヤウイルス属シンプ血清

型群に分類される。ウイルスゲノムは、L、M、Sの3つの一本鎖（-）RNAセグメントからなる。オロプーシェ熱の主な症状は、発熱、頭痛、筋肉痛、関節痛、下痢、嘔吐、発疹、眼窩痛、腹痛等であり、デング熱の鑑別疾患である。

本研究の目的は、血液製剤の安全性を確保するために節足動物媒介性感染症の発生に備え、海外におけるデング熱、オロプーシェ熱等、その他アルボウイルス感染症の流行状況にかかる情報収集を行い、国内発生のリスクを評価することである。また、これまでに開発したデング熱、チクングニア熱、ジカウイルス病に対する遺伝子診断法について血液製剤のスクリーニングに応用・共有することである。

B. 研究方法

1. ウイルス遺伝子の抽出と RT-PCR

検体からのRNA抽出にはRoche社のHigh Pure Viral RNA purification kitを使用した。ワンステップリアルタイム RT-PCR 反応キットとしては、Thermo社のTaqMan Fast Virus 1-step Master mixとToyobo社のRNA-direct Realtime PCR Master mixを使用した。

2. デングウイルス1型～4型、ジカウイルスおよびチクングニアウイルスのリアルタイム RT-PCR 法用キャリアオーバー防止対策陽性対照の検討

実験室内キャリアオーバー汚染対策として、デングウイルス1型～4型、チクングニアウイルスおよびジカウイルスの陽性対照に既知の配列を人工的に導入した改良陽性対照を用いてその検討を行った。陽性対象の目的配列をプラスミドクローニングし、RNAを*in vitro* transcription法により合

成後、精製した。各ウイルス RNA を 10^9 コピー/ μL に調製し、混合してカクテルとした。ストック液には、安定剤として 10 $\mu\text{g/mL}$ yeast tRNA を添加した。

3. アルボウイルス感染症実験室診断法の共有

献血血液の安全対策として、感染症安全対策体制整備事業を実施するにあたり、国立感染症研究所次世代生物学的製剤研究センターとアルボウイルス感染症実験室診断法について共有した。

細胞

サル腎細胞由来 Vero9013 細胞を 5% CO_2 , 37°C で培養した。細胞は $3 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、T-25 flask に播種して使用した。

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 μL 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 μL の Inhibitor removal buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心し、ろ液を捨て、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) ろ液を捨て、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。

オロプーシェ熱の流行状況調査

オロプーシェ熱の流行状況については、PubMed 文献検索、米国 CDC、ブラジル保健省オズワルドクルズ財団発表資料、世界保健機関の発表資料等からの情報収集を行い、その流行状況を解析した。

(倫理面への配慮)

特記事項なし

C. 研究結果

1. アルボウイルス感染症実験室診断法の共有

4 種類の Dengue virus 各血清型、チク

ングニヤウイルス、およびジカウイルスに対する遺伝子検査法のうち、TaqMan real-time RT-PCR 法において使用する陽性コントロールストック液 (各々について 10^9 コピー/ μL に調製した混合 RNA 溶液 1mL) を次世代生物学的製剤研究センターと共有した。さらに Dengue virus、Chikungunya virus、Zika virus の培養法についても情報共有した。

オロプーシェウイルスの流行状況

2024 年 5 月 27 日、キューバ保健省は、2 州から国内初となる症例 74 例の発生を報告し、11 月 25 日までに 15 州から計 603 例の確定症例が報告された。さらにイタリアでは、キューバに 2024 年 5 月下旬～6 月上旬頃に渡航歴のあったオロプーシェ熱の輸入症例が発生した。その後スペイン、ドイツ、およびカナダにおいてもキューバからの輸入症例が報告された。米国でも 94 例のキューバからの輸入症例が確認され (フロリダ州 (90 例)、カリフォルニア州 (1 例)、コロラド州 (1 例)、ケンタッキー州 (1 例)、ニューヨーク州 (1 例))、3 例が入院、うち 2 例は神経浸潤性疾患を呈した。

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ウエストナイルウイルス、ウスツウイルス、ジカウイルス、Dengue virus 等がある。献血血から検出されたアルボウイルス RNA としては、2005 年にレユニオン島の献血血より Chikungunya virus RNA の検出、2005 年にプエルトリコの献血血より Dengue virus RNA の検出、2009 年にタイの献血血より Chikungunya virus RNA の検出、2012 年にブラジルの献血血より Dengue virus RNA の検出、2012 年にブラジルにおいて少なくとも 5 例の輸血による Dengue virus 感染例、2014 年にプエルトリコの献血血より Chikungunya virus RNA の検出、2016 年にブラジルにおいて 2 例の血小板輸血によるジカウイルス感染例等が報告されている。2023 年には中国において 44,972 名の献血者のスクリーニングにおいて、6 名の献血血が Dengue virus 1 型陽性であった。

近年 Dengue 熱の流行が世界的に拡大しており、欧州疾病予防管理センター (ECDC) によると、2024 年の 1 月から 9 月にかけて、86 の国・地域から 1,300 万人を超える Dengue 熱患者と 8,500 人の Dengue 熱関連死が報告された。特に米州においては、大きな流行が報告されており、2024 年第 31 週までに、ラテンアメリカとカリブ海諸国を中

心とするアメリカ大陸で 1,132 万人のデング熱患者が報告され、このうち、15,461 例 (0.13%) 以上が重症デング熱症例であり、6,303 例 (死亡率 0.056%) が致死적であった。

わが国におけるデング熱輸入症例患者数は、2019 年 463 例をピークにコロナ禍による国際交流の低下により激減したが、2022 年 98 例、2023 年 176 例、2024 年 232 例と再び増加傾向にあり、デング熱をはじめとしたアルボウイルス感染症に対する検査体制の強化が重要である。本研究においては、遺伝子検査に必要な陽性対照を提供することで、正確な検査結果が得られるようになった。よって献血血液の安全対策における感染症安全対策体制整備事業に対するデングウイルスおよびジカウイルス、チクングニアウイルス各 RNA の参照品の整備はアルボウイルス感染症の実験室診断の向上およびアップデートに資するものである。

オロプーシェ熱の主な症状は、発熱、悪寒、激しい頭痛/眼窩後部痛、倦怠感、筋肉痛、関節痛、吐き気、嘔吐、羞明等を最大 7 日間伴い、稀に風疹様の発疹、髄膜炎、脳炎、めまい、食欲不振、その他の全身症状を呈す。その症状からデング熱の重要な鑑別疾患である。患者の 6 割が寛解後に症状を再発することがある。都市部よりも農村部での患者が多く、これまでブラジルでは主にアマゾナス州等のアマゾンの熱帯林を中心に発生していたが、2024 年の流行では、大西洋沿岸部に流行が拡大した。バイーア州においては初めての死亡例が 2 例報告 (既往歴のない女性) された。またブラジルでは垂直感染 3 例 (胎児死亡 2 例、先天異常 1 例) を確認している。キューバでも先天異常 3 例が確認され、このうち 1 症例では胎児の心臓の血液においてオロプーシェウイルス陽性であった。キューバではオロプーシェウイルス感染に関連したギラン・バレー症候群の 3 例 (51 歳、53 歳、64 歳の女性 2 例と男性 1 例) も報告されている。イタリアにおけるキューバからの輸入症例では、血液、血清、尿および精液からオロプーシェウイルスが分離されているが、これまでのところ性行為による感染は確認されていない。献血血からのオロプーシェウイルスの検出例は報告されていないが、今後もその動向を注視する必要がある。

E. 結論

デング熱・デング出血熱はデングウイルスによる蚊媒介性の急性熱性疾患である。2024 年には世界的にデング熱の大きな流行が発生した。またわが国では海外との人

的交流の再開によりデング熱の国内患者数は 2019 年以前の水準に増加傾向にある。これまでにアルボウイルスに対する遺伝子検査法の見直しを行い、特にデングウイルス 1 型から 4 型、ジカウイルス、チクングニアウイルスに対するプライマープローブセットを作製し、汚染対策としてマーカー配列を挿入した陽性コントロールを作製、関係機関・部署と共有した。

2024 年にはデング熱の重要な鑑別疾患であるオロプーシェ熱の流行が中南米で発生し、イタリア、スペイン、米国、カナダ等で輸入症例が報告されている。これらアルボウイルスの動向については引き続き注視し、今後その対策を引き続きアップデートする。

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

7. 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