

令和2-3年度

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）

「輸血用血液製剤と血漿分画製剤の安全性と安定供給を確保するための新興・再興感染症の研究」班

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

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 田島 茂

国立感染症研究所 ウイルス第一部 西條 政幸

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。また近年ヨーロッパではウエストナイルウイルス（WNV）およびウスツウイルス（USUV）の流行が問題となっている。2018年にはヨーロッパ15カ国で2,000例以上のWN熱患者が発生した。また2017年にはオーストリアでの輸血血液に対するWNV遺伝子スクリーニング検査においてUSUV遺伝子が検出され、問題となっている。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およびUSUV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およびヨーロッパのUSUV流行株に対して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 Dengue 熱（DF）やジカウイルス感染症（ZVD）等の流行域の拡大が顕著である。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。また近年ヨーロッパでは、ウエストナイルウイルス（WNV）およびウスツウイルス（USUV）の流行が問題となっている。

WNV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類され、1937年にウガンダで最初にその流行が確認された。以後、主にアフリカ、中東およびヨーロッパで散発していたが、2018年にはヨーロッパ15カ国で2,000例以上の患者が発生した。その後もその流行は継続し、2020年にはドイツで最初の死亡例が報告された。米国では1999年にニューヨークで患者が発見され、急速

にその流行域が米国，カナダ，メキシコ，カリブ海諸国，南米コロンビア，アルゼンチンなどに拡大した．米国における 2020 年までの患者数は 52,382 人，そのうち死者は 2,418 人であった．わが国では 2005 年 10 月に輸入症例が確認された．

USUV はフラビウイルス属に分類され，近年ヨーロッパにおいて特に注目されている．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，ヨーロッパでは回顧調査により遅くとも 1996 年には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．

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, 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，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，血清中のウイルス検出モデルとして，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．またさらに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検討した．

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 より導入したウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 株をそれぞれ 50 μl 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．

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 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 分間遠心した．v) 上液を捨て，新しい回収チューブを連結させ，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 1.5mL チューブ

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スクリーニング

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 KO-44 および KO-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 KO-44 および KO-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 KO-44 株および KO-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、KO-44 株および KO-57 株において特異的増幅が認められた。

ウスツウイルスの培養

Vero 細胞を播種し一晩静置後、ウスツウイルス 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。

フラビ共通プライマーによるウスツウイルス遺伝子の検討

次に UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 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、ウスツウイルス UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776 株および Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018 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, USUV, ZV 等がある。また近年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による輸入症例が問題となる可能性がある。本研究では血清中の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ブタ血清中のJEVを用いてフラビ共通プライマーの検討を行った。また、USUV遺伝子に対する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。またいずれのUSUV株についても増幅能を有していることが示された。UVE/USUV/1959/ZA/SAAR-1776株は、1959年に南アフリカで *Culex neavei* より分離されたウツウイルスのレファレンス株である。また、Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018株はスロベニアで分離された近年の流行株である。フラビウイルス共通プライマーを用いることにより、Usutu virus/Slovenia/Ko208/2018株を検出できていることから、当プライマーは近年のUSUVにも対応していることが示唆された。WNVはトリが自然宿主であり、トリと媒介昆虫である蚊の間で、感染環が形成・維持されている。これまでに感染が確認された鳥類の種類は220種以上におよぶ。特にカラス、イエスズメ、アオカケス等において血中のウイルス量が高いことが報告されている。USUVは蚊とトリの間で感染環を形成し、トリに対して高い致死率を示す。主な

媒介蚊はトビイロイエカ(*Cx. pipiens*)である。ヒトおよびげっ歯類は終末宿主である。USUVに感受性の高い主なトリはユーラシアクロウタドリ (Blackbird: *Turdus merula*) である。ユーラシアクロウタドリは渡り鳥としてヨーロッパからロシア、中国、台湾にも分布し、わが国にも飛来している。したがってこれらウイルスがわが国に侵入する可能性は否定できないため、今後のWNVおよびUSUVの動向に注目する必要がある。

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。また、USUV に対する検査体制も十分とは言えない。したがって DF, ZVD, USUV 感染症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ス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。

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