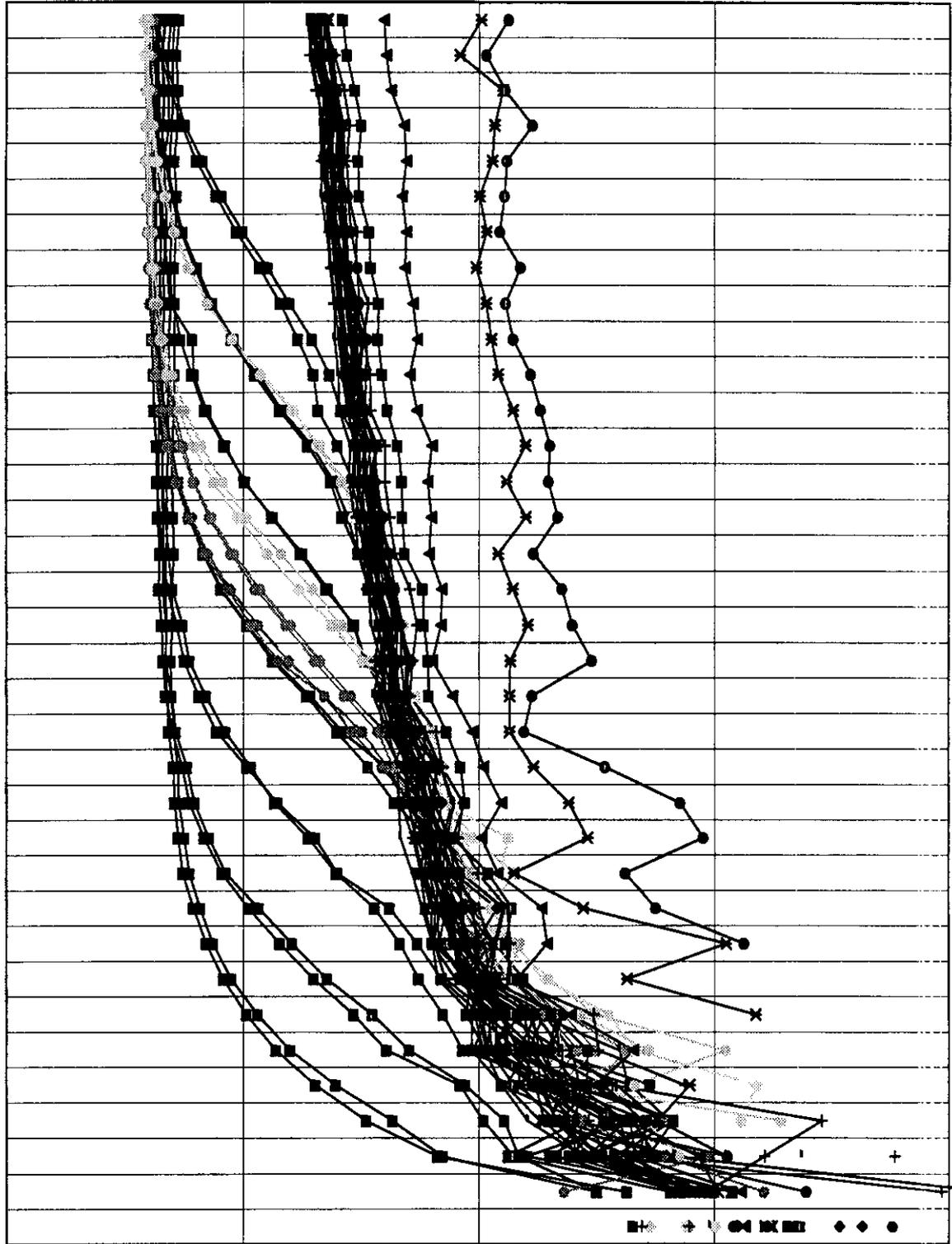




8 1.0E+01



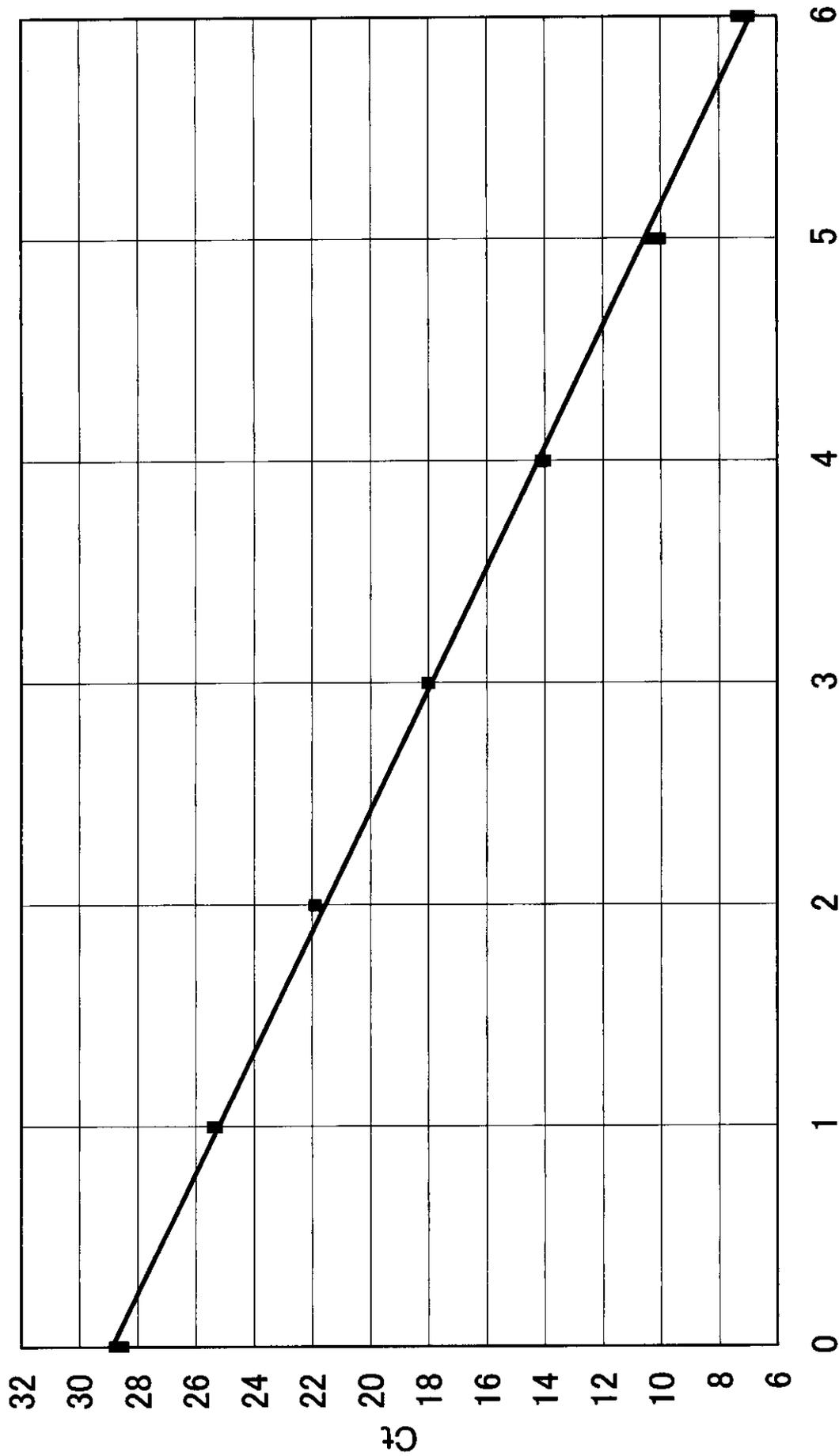
PS

- WNV 10-1 Lux.WNV FAM
- WNV 10-1 Lux.WNV FAM
- WNV 10-2 Lux.WNV FAM
- WNV 10-2 Lux.WNV FAM
- WNV 10-3 Lux.WNV FAM
- WNV 10-3 Lux.WNV FAM
- WNV 10-4 Lux.WNV FAM
- WNV 10-4 Lux.WNV FAM
- WNV 10-5 Lux.WNV FAM
- WNV 10-5 Lux.WNV FAM
- WNV 10-6 Lux.WNV FAM
- WNV 10-6 Lux.WNV FAM
- WNV 10-7 Lux.WNV FAM
- WNV 10-7 Lux.WNV FAM
- WNV 10-7 Lux.WNV FAM
- NY Lux.WNV FAM
- NY Lux.WNV FAM
- Eg 101 Lux.WNV FAM
- Eg 101 Lux.WNV FAM
- g2266 Lux.WNV FAM
- g2266 Lux.WNV FAM
- FCG Lux.WNV FAM
- FCG Lux.WNV FAM
- Beijing Lux.WNV FAM
- Beijing Lux.WNV FAM
- china-Yac Lux.WNV FAM
- china-Yac Lux.WNV FAM
- china-Yac Lux.WNV FAM
- JaGaV Lux.WNV FAM
- JaGaV Lux.WNV FAM
- ApoI Lux.WNV FAM
- ApoI Lux.WNV FAM
- Yokose Lux.WNV FAM
- Yokose Lux.WNV FAM
- YF Lux.WNV FAM
- YF Lux.WNV FAM
- YF Lux.WNV FAM
- Mir-41 Lux.WNV FAM
- Mir-41 Lux.WNV FAM
- Mir-41 Lux.WNV FAM
- Shizuoka-38 Lux.WNV FAM
- Shizuoka-38 Lux.WNV FAM
- Shizuoka-38 Lux.WNV FAM
- Kagawa-27 Lux.WNV FAM
- Kagawa-27 Lux.WNV FAM
- Kagawa-27 Lux.WNV FAM
- VEE Lux.WNV FAM
- VEE Lux.WNV FAM
- D1 Lux.WNV FAM
- D1 Lux.WNV FAM
- D1 Lux.WNV FAM
- D2 Lux.WNV FAM
- D2 Lux.WNV FAM
- D2 Lux.WNV FAM
- D3 Lux.WNV FAM
- D3 Lux.WNV FAM
- D3 Lux.WNV FAM
- D4 Lux.WNV FAM

Cycle

9

Standard Curve



$$y = -3.6657x + 28.885$$

$$R^2 = 0.9986$$

分担研究報告書

輸血用血液におけるウエストナイルウイルス検出方法の確立に関する研究

分担研究者 岡田義昭 国立感染症研究所室長

研究要旨 輸血用血液を含めた血液製剤の安全性向上のために Taq-Man PCR を用いたウエストナイルウイルス（以下 WNV と略す）の検出系を作成した。我々が作成した系は New York から分離されたウイルス株に対して、ウイルスから作成した cDNA やウイルスの 1 部を組み込んだプラスミドを標的にした反応では効率良く検出することが可能である。ウイルスの一部を組み込んだプラスミドを用いた場合の感度は少なくとも反応液中に 10 分子あれば検出可能であった。しかし、WNV は流行地域間でウイルスの塩基配列が異なり、さらに日本脳炎ウイルスとのホモロジーが高く、これらを克服して全ての WNV 株を検出可能な検出系の構築にはさらなる研究が必要である。

A. 研究目的

これまでアフリカやヨーロッパの特定の地域やイスラエルなどで流行が記録されていた WNV が突然米国のニューヨークで流行し、カナダの南部を含めた北米に感染地域が拡大した。米国ではそれに伴い、発症者が急増し 2002 年は 4000 名を超えた。ヒトからヒトへは感染しないが、輸血や臓器移植などによって感染する危険性が理論的にはある、と考えられていたが、実際に感染例が報告され、血液や移植臓器の安全性確保が急務となるに至った。我国においても米国とのヒトや物資の移動が活発なことから国内に持ち込まれ、感染が拡大、定着する可能性がある。本研究では血液を介した WNV 感染を防止し、輸血用血液を含めた

血液製剤の安全性向上のために血液からの WNV 検出系を確立することを目的とした。

B. 研究方法

WNV の感染者の 80% が不顕性感染であることやウイルス血症が短期間であることなどから、血清学スクリーニングではなく、核酸増幅法による検出系の確立を目指した。ウイルス 1 部倉根部長・高崎室長から供与された不活化されたウイルスを含む培養上清より RNA を精製し、cDNA を合成した。検出は Taq-Man PCR にて検討した。WNV の流行期には、日本においては日本脳炎ウイルスが検出され、さらに 2 つのウイルスは非常に塩基配列が似ていることから、日本脳炎ウイル

スと異なる塩基配列を持つ部分にプライマーと検出用のプローブを設計した。また、プローブは New York 株の他、Kunjin ウイルスや Nigeria 株を検出するものも作製し感度を検討した (Fig.1 にプライマーと Taq-Man プローブの組み合わせを示す)。また、WNV は取り扱う上で制限がある (P3 レベル) ので、検出系の検討のために日本脳炎ウイルスとホモロジーの低い塩基配列を含む 6795 から 8802 までの 2008 塩基をロング PCR 用キットを用いて増幅し、増幅産物は Topo-XL のプラスミドを用いてクローニングした。塩基配列を確認後、Taq-Man PCR を用いて感度や特異性の検討をおこなった。

C. 研究結果

WNV の New York のカラスから分離されたウイルスの塩基配列 AF404756 の 6795 番から 8802 番までの 2008 塩基を増幅し、プラスミドにクローニング (WNV-NY-XL-6795-8802) し、塩基配列を確認した。その結果、fig.1 に示したプライマーやプローブの塩基配列は確保されていることが確認できた。次に、ウイルスから合成した cDNA と WNV-NY-XL-6795-8802 を鋳型に用いて Taq-Man PCR を行った。New York 株に一致するように作成したプローブはウイルス由来の cDNA やプラスミドにクローニングした WNV を検出することができた。しかし、Nigeria 株や Kunjin ウイルスに特異的なプローブでは検出することはできなかった。また、プラスミドを希釈し、1 反応当り 10 分子、100 分子、 10^3 分子、 10^4 分子、 10^5 分子のプラスミドを含む条件で Taq-Man PCR を行い、感度を評価した (fig.2)。10 分子まで検出可能であったことから、少なくとも 10^3 分子/ml までは検出

可能であることが示された。

D. 考察

日本において WNV の検出の際に日本脳炎ウイルスの存在に注意を払わなければならない。同じフラビウイルスに属するため塩基配列のホモロジーが高く、また、抗体がクロスするために日本脳炎ウイルスを WNV と誤診する可能性がある。我々は日本脳炎ウイルスと異なる塩基配列の部分にプライマーを作り、さらにプローブも WNV 特異的 (New York 株) なものを作製し、誤診を避ける工夫をした。この組み合わせが本当に日本脳炎ウイルスを検出しないか今後確認を予定している。また、WNV は世界各地から分離されたウイルスの解析によっていくつかの株が存在していることが報告されている。塩基配列の変異もあり、各株に共通した塩基配列の部分は日本脳炎ウイルスにもホモロジーが高い傾向があり、逆に日本脳炎ウイルスとホモロジーが低いところは WNV の株間で変異が多く存在する部位であることから、ユニバーサルに WNV を検出する Taq-Man PCR の系の確立は困難かもしれない。これを克服するためには複数のプライマーとプローブのセットを反応系に投入することやプローブの特性の解析とアニーリング温度の工夫によって、ある程度の塩基配列の違いが存在していても検出できる系の構築が必要である。一方、感度に関しては 10 分子以下での評価を実施していないので詳細は不明であるが、少なくとも 10^3 分子/ml のウイルス核酸が存在すれば検出可能と考えられる。現在、日本の献血は 50 人のドナーの血漿を集めて 1 つの検査用検体を作り、HBV HCV、HIV の 3 つのウイルスに対して

核酸増幅法を実施している。これに当てはめれば、1人の血漿中に 5×10^4 /mlのウイルスが存在すれば50人のドナーの血液をミックスしてもウイルスは検出可能である。実際には潜伏期や不顕性感染でのウイルス量が不明なことから50人でのプールが有効かの判断は難しい。今後の解析結果を待たなければならない。一方、日本に存在していない現時点での対策としては、海外で感染してきたヒトからの採血や臓器提供を一定期間禁止することによって阻止できる。その意味で海外からの帰国者からの3週間の献血自粛措置は有効な対策だと評価できる。

E. 結論我々が設計したプライマーとプローブを用いたTaq-Man PCRによってWNVのNew York株は検出可能になった。この系での感度は少なくとも 10^3 /mlであった。一方、Nigeria株やKunjin

ウイルス特異的なプローブではNew York株は検出できなかった。

F. 健康危機情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

岡田義昭、奥山堅司、水沢左衛子：パルボウイルスB19の感染系の確立とその応用。
第50回日本ウイルス学会。2002年。

H. 知的所有権の取得状況
なし

Sense primer	TgT AAA CTT ggg AAg Tgg AA
Antisense primer	CgT TCA ATC CTg TTC TTg AT
Probe (N.Y.株)	CCC TgC TCA ACT CAg ACA CCA gTAA
Probe (Nigeria株)	C CTC TCC TCA ATT CTg ATA CTA gCA
Probe (Kunjin株)	C CTC TAC TCA ACT CAg ACA CCA gCA

Fig.1 Sequences of primers and probes for detection of West Nile virus

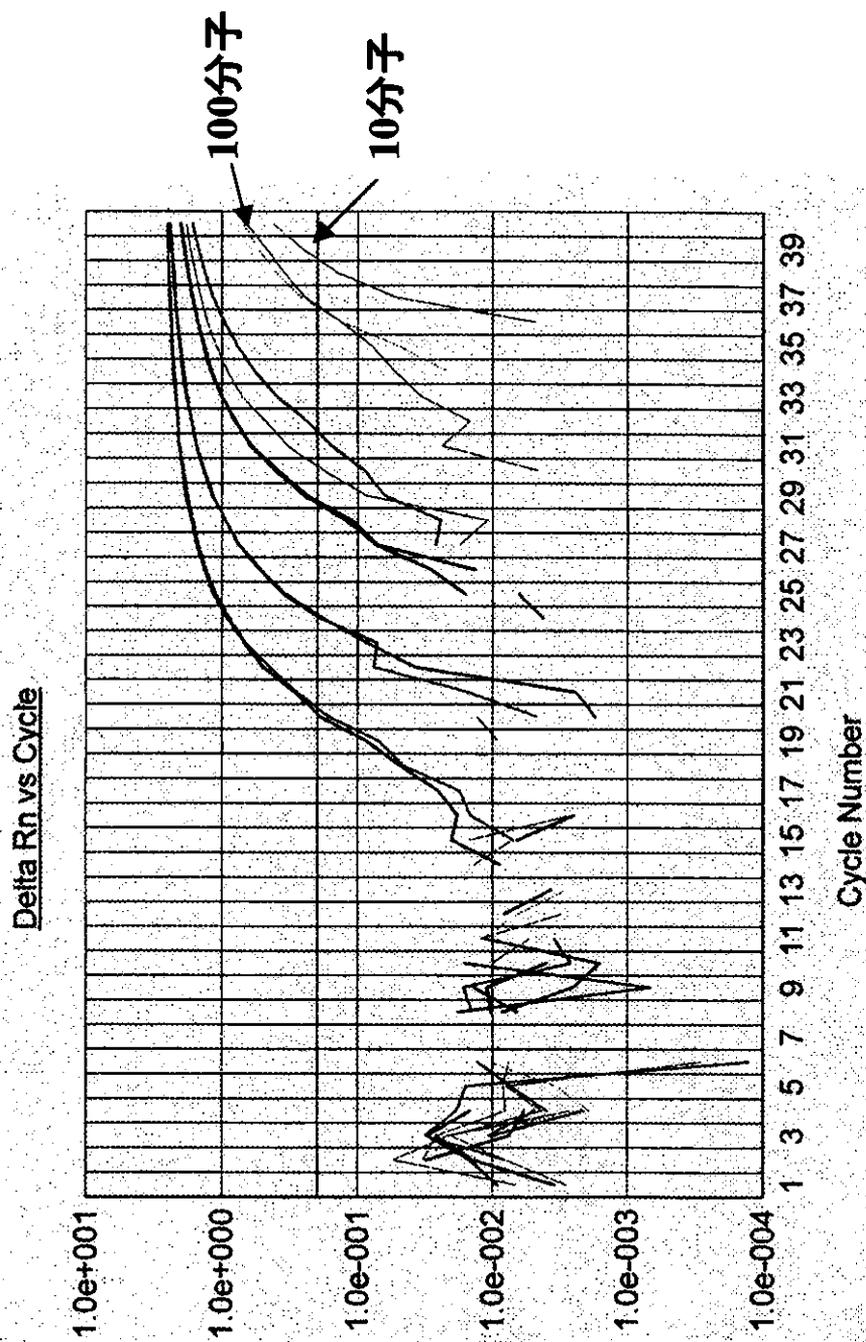


Fig.2 Sensitivity of Taq-Man PCR for WNV detection

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					