

E 領域の合成 RNA は  $7.7 \times 10^{11}$  copies/ $\mu$ l であり、3'NC の合成 RNA は  $7.8 \times 10^{10}$  copies/ $\mu$ l の濃度の RNA が合成された。どちらも 100 copies/ $\mu$ l で確実に検出が保証でき、10 copies/ $\mu$ l が検出限界であった(図 1、図 2)。本合成 RNA は、臓器移植ネットワークと契約する予定の検査会社に供与し、国立感染症研究所ウイルス第一部との間で、同感度であることを確認した。

#### E. 結 論

本合成 RNA を用いることでウエストナイルウイルスの検査方法・技術が確立され、平成 15 年 6 月臓器移植ネットワークと検査会社 2 社との間に契約が成立し、検査体制が整備された。なお、本合成 RNA は、宮崎医科大学医学部附属病院検査部、静岡県環境衛生科学研究所、千葉市環境保健研究所、山口県環境保健研究センターに分与済みであり、今後も P3 施設を保有しない検査施設に供与する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文

Yuki Eshita, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane. Anthology of Biosafety: VI. Arthropod Borne Diseases. Editor: Jonathan Y. Richmond; Chapter 6: Isolation of Arboviruses from Field-collected mosquitoes. American Biological Safety Association. 63-71 (2003)

Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Shirato K, Kimura T, Ako Y, Miyoshi H, Takasaki T, Kurane I, Kariwa H, Umemura T, Takashima I. Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol Biol.* 2003 Oct;12(5):491-499.

Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe, Reiko Nerome, Mikako Ito, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane. Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice. *Vaccine* 21(31) 4514-4518, 2003

伊藤美佳子、高崎智彦. 新興輸血感染症「ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎」. 血液フロンティア 13(5) 613-617, 2003.

高崎智彦、伊藤美佳子. ウイルス性脳炎～ウエストナイル脳炎～. 化学療法の領域 19(5) 797-801, 2003.

高崎智彦. 感染症診療・投薬ガイド 第Ⅱ部 疾患各論 ウエストナイル熱. 総合臨床 52, 351-355, 2003

高崎智彦. ウエストナイル熱 (West Nile Fever). CURRENT CONCEPTS IN INFECTIOUS DISEASES 22(3) 18-19, 2003

高崎智彦. ウエストナイルウイルス感染症. 畜産技術. 581(10) 28-31, 2003

高崎智彦. ウエストナイル熱. 臨床医. 29(10) 1779-1782. 2003

高崎智彦. フラビウイルス感染症およびその流行における鳥類の役割. 鶏病研究会報. 39(増刊号) 1-6. 2003

高崎智彦. ウエストナイルウイルス感染症の動向. Medicament News 1759号. 4-6 (2003)

## 2. 学会発表

佐々木年則、澤邊京子、伊澤晴彦、江下優樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小林睦生. イムノクロマトグラフィーによる蚊からのウエストナイルウイルスの検出. 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会 5/15-16/2003 (小樽市)

佐藤利明、斎藤隆行、古屋由美子、今井光信、宮澤真紀、高崎智彦、倉根一郎. ウエストナイルウイルスの遺伝子検査—感染研マニュアルの死亡カラスへの応用事例— 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会 5/15-16/2003 (小樽市)

高崎智彦. 「ウエストナイルウイルス感染症」 新興疾病・人獣共通感染症に関する国際ワークショップ 6/19/2003 (東京都)

高崎智彦. 「ウエストナイルウイルス感染症について」 第2回関西感染症フォーラム 6/21/2003 (大阪市)

高崎智彦. フラビウイルス感染症およびその流行における鳥類の役割. 平成15年秋季全国鶏病技術研修会 (広島市) 11/6/2003

高崎智彦、倉根一郎. 第3回日本医薬品等ウイルス安全性研究会シンポジウム. (東京都) 12/19/2003

高崎智彦. 話題の感染症—ウエストナイル熱を中心に—. 第19回日本環境感染学会. (横浜市) 2/20/2004

図1

# WNV合成RNA (E領域)によるTaqMan RT-PCR

E領域はnt466-2,666の2201bp

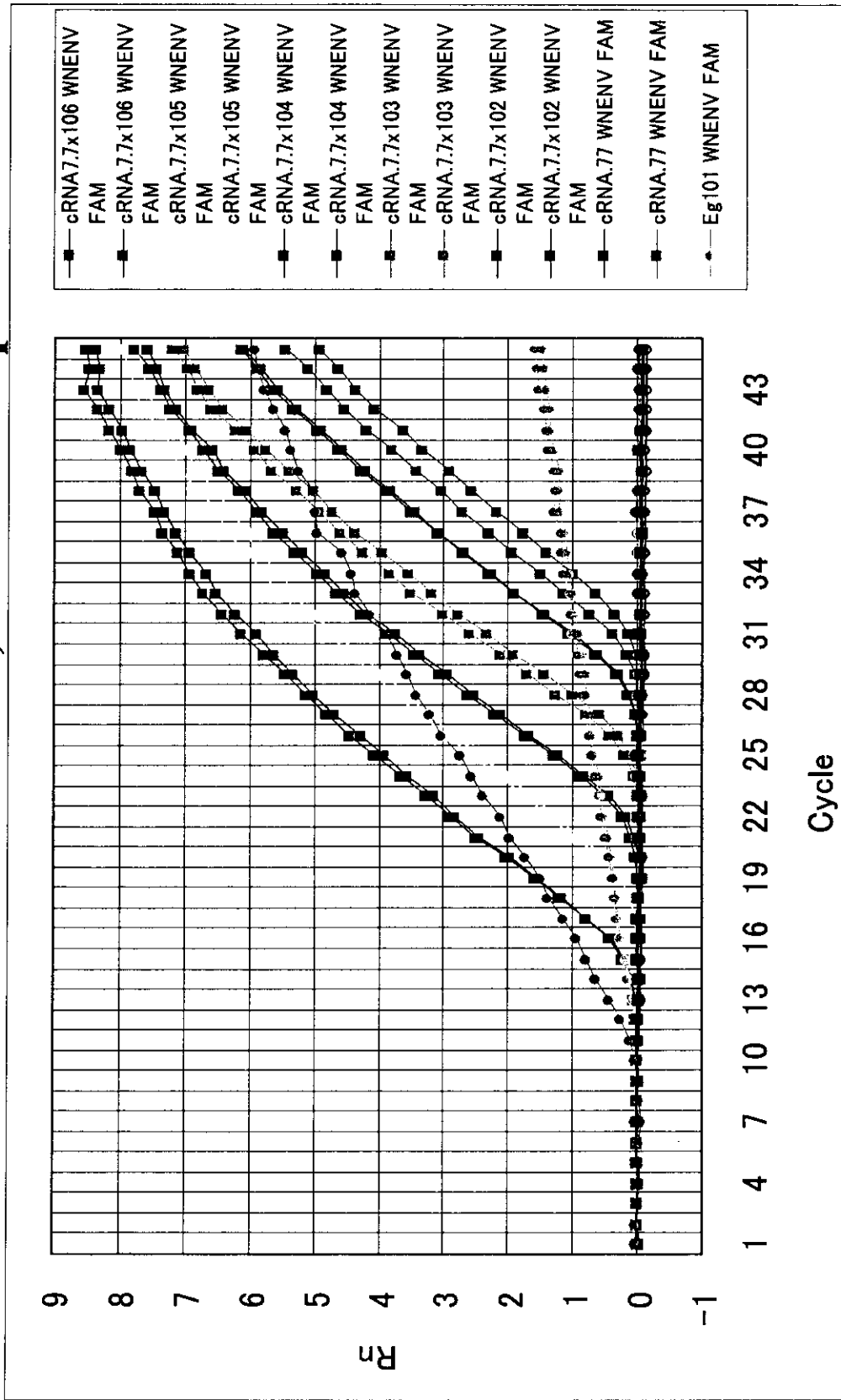
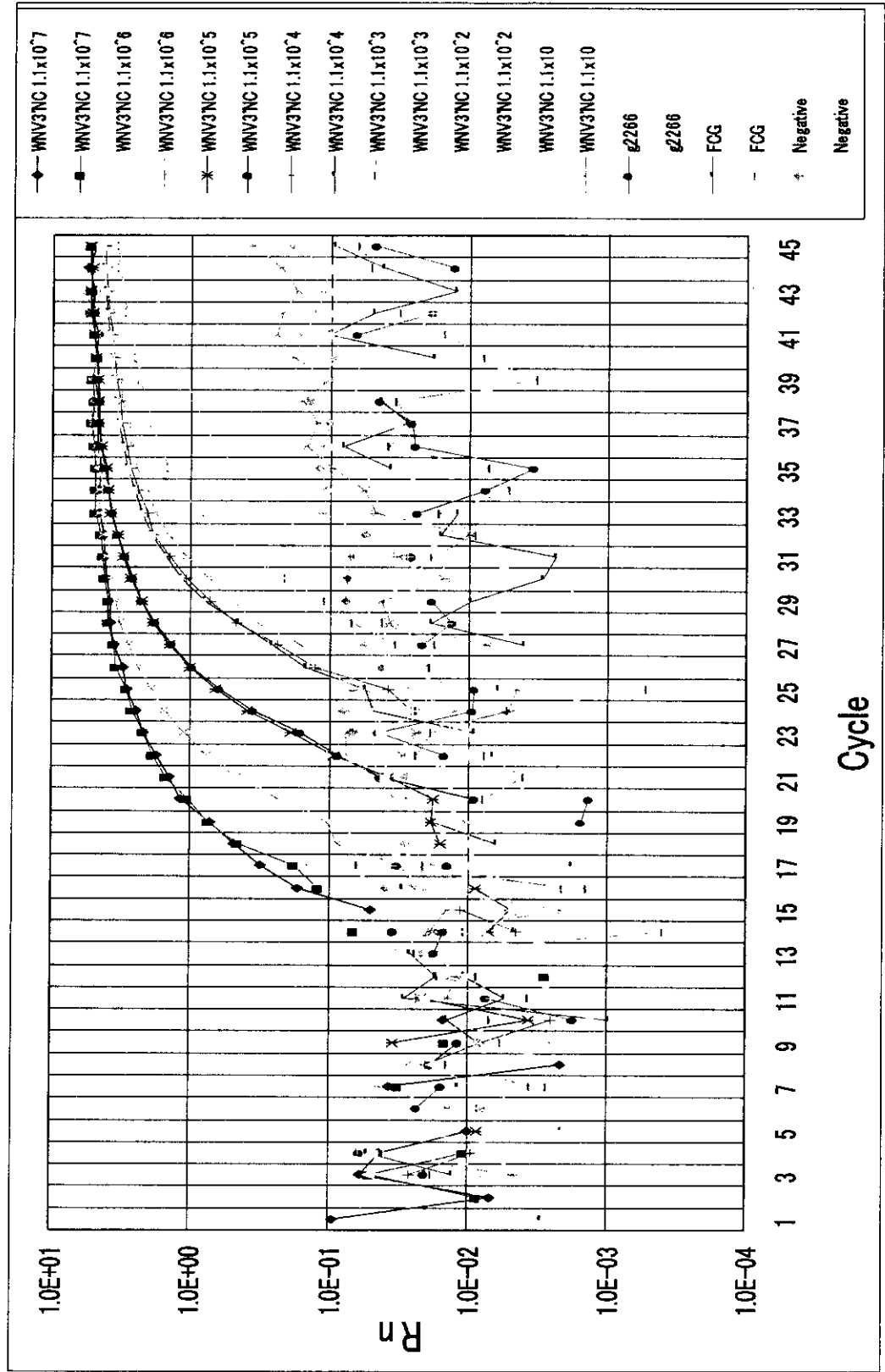


図2 3'NC領域の合成RNA検出  
 3'NC領域はnt9,942-10,867を含む926bp



厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：現在、米国本土において猛威をふるっている西ナイル（ウエストナイル）ウイルスの迅速診断法の基礎研究を実施した。迅速診断法の基礎技術には近年日本において発明された **Loop Mediated Amplification (LAMP)**法を採用した。この方法は、従来用いられている PCR 法と比較したばあい 1)特異性が高い、2)感度が高い、3)検出時間が半分以下である、4)特殊な温度管理を行う機械を必要としない、などの優れた特徴をもっている。今回この方法を利用する西ナイルウイルス遺伝子検出系を作製し従来の PCR 法と比較した結果、約 10 倍の感度をもち、日本脳炎ウイルス遺伝子やデングウイルス遺伝子と交叉反応を示さないことを確認した。また西ナイルウイルスを伝播する可能性のある日本の蚊にウイルスをスパイクしておこなった実験でもウイルス遺伝子を効率よく検出することが可能であった。以上のことから、今回作製した LAMP 法による西ナイルウイルス検出方法はわが国に西ナイルウイルスが侵入した場合、極めて有用なウイルス診断技術として応用可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

1999 年に米国のニューヨーク市に侵入した西ナイルウイルスは米国本土に土着し 2002 年には感染者 4156 名（内 284 名死亡）2003 年には感染者 9377 名（内 244 名死亡）という未曾有の健康被害を出している。また 2003 年にはカリフォルニアなど太平洋岸の地域にまでウイルス汚染地域が拡大した。この結果、西ナイルウイルスが米国からわが国へ侵入する可能性は平成 16 年の夏から飛躍的に増大したと考えられる。このため、西ナイルウイルスのわが国への侵入を早期に検出する方法の開発・実用化が急務である。この研究ではウイルス遺伝子を迅速かつ簡便・正確に患者や鳥、蚊のサンプルから高感度に検出する方法の確立を目的として、近年わが国で開発された遺伝子増幅技術（LAMP 法）を応用して、通常の臨床検査室で利用可能な方法を開発した。

B. 研究方法

- 1) 使用したウイルス株は以下とおりである。  
NY99(flammingo382-99) 株、Eg101 株、D2(ThNH7/93)株、JEV(JaOArS982)株、SLE(Prototype)これらのウイルスは蚊培養細胞クローン C6/36 細胞で一度増殖させたのちその感染培養上清を利用した。
- 2) プライマーの設計には基本ソフトとして Netlaboratory を利用した。また西ナイルウイルスの遺伝子塩基配列は N99(AF196835)を用いた。設計したプライマーの配列は以下とおりである。  
**F3 (TGGATTTGGTTCTCGAAGG),**  
**B3 (GGTCAGCACGTTTGTGATT),**  
**FIP (TTGGCCGCCTCCATATTCATCAT**  
**TTTCAGCTGCGTGAATCATGT),**  
**BIP (TGCTATTTGGCTACCGTCAGCG**  
**TTTTTGAGCTTCTCCCATGGTTCG),**  
**Loop F (CATCGATGGTAGGCTTGTC)**

### Loop B (TCTCCACCAAAGCTGCGT)

#### 3) RT-LAMP 法

RT-LAMP 増幅は 2) でデザインしたプライマーを用いて 栄研化学社の Loopamp DNA amplification キットを用い、25 μl の反応系で 63°C、60 分反応させ、反応産物をアガロース電気泳動と Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan) を用いて反応産物濁度を測定する方法で実施した。反応系の組成条件は FIP と BIP プライマー (50 pmol)、F3 と B3 プライマー (5 pmol)、F と loop B プライマー (25 pmol) 1400 μM 各 dNTP, 0.6 M betaine (Sigma, USA), 40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.125 U of AMV-RT (Invitrogen, USA), 8 U *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs) でありここに、ウイルス RNA を混合する方法で行った。

#### C. 結果

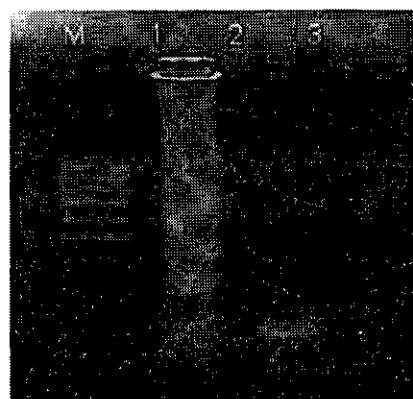
1) 西ナイルウイルス NY 株の RT-LAMP 法による遺伝子増幅と特異性。

図 1 にしめしたように、今回設計したプライマーにより西ナイルウイルス遺伝子は RT-LAMP 法により検出された (Lane 1)。ウイルス RNA を入れない反応では非特異的な産物は形成されなかった。この産物は制限酵素 (*AluI*) により切断され予想される大きさの断片となり、増幅された遺伝子が西ナイルウイルスに特異的であることが示唆された。また精製産物の DNA を直接塩基配列を解読したところやはり西ナイルウイルス遺伝子が増幅されていることが確認された。また他のフラビウイルスの遺伝子に対しては反応は認めなかった。

2) 西ナイルウイルス特異的 RT-LAMP 法と RT-PCR 法の感度比較。

図 2 に示すように従来から開発されていた RT-PCR 法と今回開発した RT-LAMP 法の西ナ

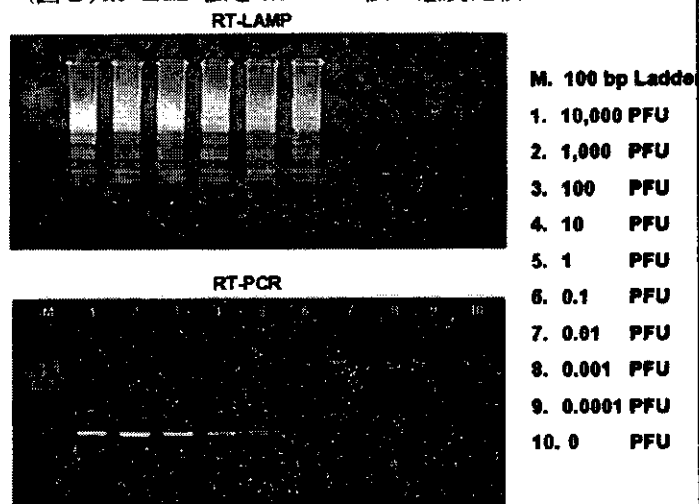
(図 1) RT-LAMP 反応精製物の特異性試験



(制限酵素 *AluI* による切断パターン)

Lane M - 100 bp DNA ladder, Lane 1 - RT-LAMP with WNV NY99, Lane 2 - RT-LAMP products digested with *AluI* (175 bp), Lane 3 - RT-LAMP without target RNA

(図 2) RT-LAMP 法と RT-PCR 法の感度比較

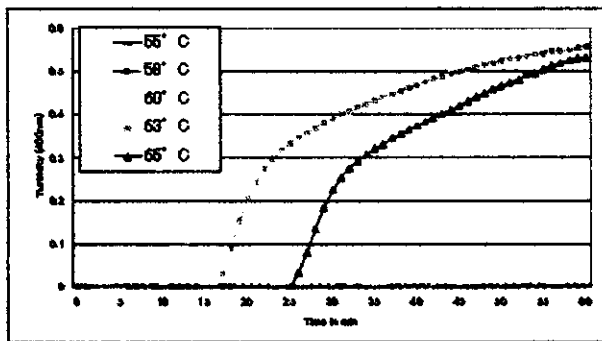


イルウイルス遺伝子検出における感度の比較を行った。図 2 にしめしたように、ウイルス RNA を 10 倍段階希釈して 2 つの方法によるウイルス遺伝子の検出を試みた。この結果、RT-LAMP 法は RT-PCR 法より約 10 倍の検出感度を示す事が確認された。

### 3) RT-LAMP 法の反応温度の評価

今回開発して西ナイルウイルス特異的 RT-LAMP 法における最適反応温度条件を決めるため、55℃、58℃、60℃、63℃、65℃の各温度で反応を比較した。この結果 (図3) に示すように 63℃において最も良好な結果が得られた。

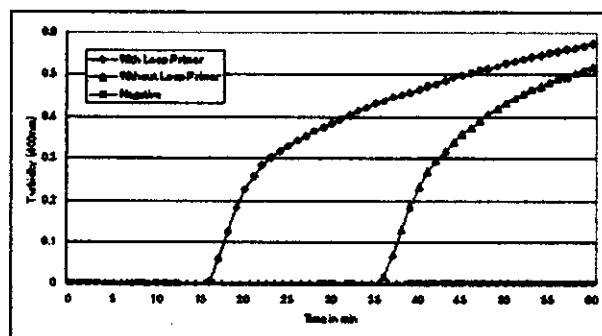
(図3) 温度条件の比較



### 4) Loop プライマーの有効性の検討

LAMP 法においては Loop プライマーと呼ばれる 1 対のプライマーが遺伝子の増幅感度を著しく改善することが報告されている。われわれも独自にこの Loop プライマーを設計してその有効性を検証した。結果を (図4) に示す。Loop プライマーを反応系に添加しない場合は検出開始時間が約 35 分であったのに対して、Loop プライマーを添加した場合は反応検出時間は 15 分まで短縮され、設計した Loop プライマーの有効性が確認された。

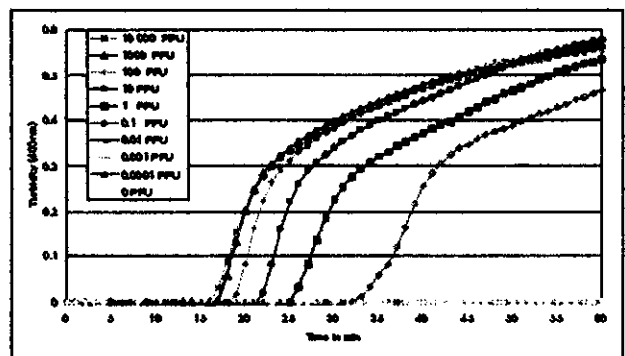
(図4) Loop プライマーの効果検討



### 5) リアルタイム RT-LAMP と定量性

63℃でのインキュベーションと濁度測定が同時に出来る Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan)を用いて RT-LAMP を用いたリアルタイムでの西ナイルウイルスの遺伝子検出について評価を行った。各濃度に希釈した西ナイルウイルス RNA を同時に RT-LAMP 法にかけ経時的にその濁度を測定した。その結果、アガロース電気泳動でみられた検出感度に相関して、濁度の検出が確認された。さらに、検出開始 (反応開始) 時間は鋳型ウイルス RNA の量に相関して、即ち RNA の量が多いほど検出開始時間が短くなった。このことは、本濁度計をもちいれればウイルス遺伝子の検出とその量の定量が可能であることを示していた。

(図5) リアルタイム RT-PCR



### D. 結論

- 1) RT-LAMP 法を用いた新しい西ナイルウイルス遺伝子検出系が確立された。
- 2) ウイルス検出感度は感染培養液のウイルス感染価で 0.1 PFU であり、従来の RT-PCR 法 (検出限界 1.0 PFU) と比較して 10 倍の検出感度であった。
- 3) RT-LAMP 法によする検出時間は 40 分以内であり、検出時間の短縮が図られた。
- 4) 今回設計した LAMP プライマーでは日本脳炎ウイルス、デングウイルス 2 型、セントルイス脳炎ウイルスなどの西ナイルウ

イルスと近縁のウイルスとの交叉は認められず極めて特異性の高い結果となった。

#### E. 考察

西ナイルウイルスの本邦への侵入にさいして行政レベルでも、市民レベルでも迅速な防疫を実施するなめには、ウイルスの侵入をいち早く検出する必要がある。従来、西ナイルウイルスに感染した動物のウイルスに対する特異抗体の検出あるいは、感染動物の血液、脳組織、あるいはウイルス感染蚊個体からのウイルス分離やPCR法によるウイルス遺伝子の検出が開発されていた。

今回、われわれが開発した方法はウイルス遺伝子の得的増幅によりウイルスの存在を検出する方法であるが、従来からのPCR法に比較して、より高感度、迅速、安価であるという利点がある。この方法は高度な解析器機がなくても利用できるという利点もある。また昨年のSARSの流行において、同じLAMP法によるSARSウイルス遺伝子検出試薬が開発されたため、この方法の手技と検出器機はすでに多くの検疫所、地方自治体の環境衛生研究所等に配備されている。

このような現状に鑑み、今回開発した西ナイルウイルスの遺伝子検出系は実際の保健行政レベルでの研究室での利用が可能であると思われる、極めて有用であると期待できる。

#### F. 健康危険情報

昨年アメリカ大陸では西ナイルウイルス汚染地域の拡大がつづきカナダ、メキシコ、カリブ海諸国でも鳥や蚊でのウイルス感染が確認された。とくに米国西海岸のカリフォルニアにウイルスが到達したことにより、本年7以降、高地域における西ナイル熱・脳炎の多発が予想され、渡航、あるいは現地在留邦人への啓蒙活動も重要である。さらに西海岸から空路あうりは海路の交通手段により、西ナイルウイルス感染蚊や鳥がわが国に持ち込まれる可能性が飛

躍的に増大したと考ええられ、本年7月以降、港湾、空港での警戒態勢をより厳重なものにする必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

Parida M., Posadas M., Inoue S., Hasebe F., and Morita K.. Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J.Clin.Microbiol.* Vol.42: 257-263, 2004.

Inoue S., Morita K., Matias R.R., Tuplano J.V., Resuello R.R.G., Candelario J.R., Cruz D.J.M., Mapua C.A., Hasebe F., Igarashi A. and Natividad F.F. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *J.Med.Primatol.* 32:89-94, 2003

Ohishi K., Inoue S., Cinco M., Diaano E., Alera M., Alfon J., Abanes F., Crus D., Matias R., Matsuura H., Hasebe F., Tanimura S., Kumatori A., Moirta K., Natividad F., Nagatake T: Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J.Med.Virol.* 71:259-264, 2003

Pandey B., Yamamoto A., Morita K., Kurosawa Y., Rai S., Adhikari S., Kandel P., and Kurane I.: Serodiagnosis of Japanese encephalitis among Nepalese patients by the particle agglutination assay. *Epidemiol. Infect.* 131:881-885, 2003.

Oishi K., Inoue A., Kuramoto T., Onizuka S., Saito M., Hasebe F., Morita K., Nagatake T:



Association of dengue virus type-specific IGG on platelets is specific for the acute phase in an imported Japanese patient with secondary dengue virus infection.

J.J.Trop.Med.Hygn. Vol.31:223-225, 2003.

森田公一：「ウエストナイル熱の脅威」、公衆衛生情報, Vol. 34:21-23, 2004

森田公一：西ナイルウイルスとその予防策：日本薬剤師会雑誌, 55:73-75, 2003

森田公一：一週一話『西ナイル熱への対策』、日本医事新報, p101, No. 4122:2003

森田公一：ウエストナイルウイルス脳炎、日本脳炎、臨床と微生物, 30:351-355, 2003

森田公一：「西ナイルウイルスなど、蚊由来のウイルス感染症」、健康な子ども Vol 369:42-43, 2003

森田公一：日本脳炎ワクチンの接種計画、日本医事新報, p145-146, No. 4135:2003

森田公一：注目すべき世界の感染症－西ナイルウイルス、成人病と生活習慣病, p1121-1124. Vol. 33:2003.

森田公一、Parida M. Mathenge EGM：RNA ウイルスの病原遺伝子探索：フラビウイルスを中心に。細胞工学 22:1178-1181:2003

## 2) 学会発表

Morita K.Pandey B., Kinney RM., Kumatori A., Hasebe F., Parquet MC. Inoue S., and Igarashi A: Single Arg-to-Ile mutation in the PrM Protein of dengue 2 virus associated with inversed infectivity and enhanced

cytokine production in human dendritic cells. 37<sup>th</sup> US-Japan Cooperative Medical Science Program. Houston, USA July 18-20, 2003

S. Inoue, MT Alonzo, DJM Cruz, F Tadena<sup>1</sup>, RR Matias, K. Morita and FF Natividad. Serological Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in the Philippines. 15<sup>th</sup> Annual Convention of The Philippine Academic Society for Microbiology and Parasitology, Manila, Philippines. December 6, 2003.

Parida M., Posadas G, Inoue S., Hasebe F. and Morita K. Real-time reverse transcription Loop Mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile. 6<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia December 7-10, 2003.

MT Alonzo, S. Inoue, DJM Cruz, F Tadena, RR Matias, K. Morita and Natividad FF Serological Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in the Philippines. 6<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Medical Virology, Kuala Lumpur, Malaysia December 7-10, 2003.

Inoue S., Alonzo MT, Cruz DJM, Tadena F, Matias RR, Morita K. and Natividad FF. Serological Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in the Philippines. 8<sup>th</sup> International Conference on Tropical Pathology, Quezon City, Philippines, December 12, 2003.

Morita K., Recent development of dengue research in WHO Collaborating Centre in Nagasaki University. WHO meeting for DengueNet Implementation in the Asia-Pacific Regions. Kuala Lumpur, Malaysia December, 11-13, 2003.

長谷部太、Parida M., Sophie B., Guillermo P., 井上真吾、森田公一：LAMP 法による西ナイルウイルス遺伝子診断の試み、第 38 回日本脳炎生態学研究会(平成 15 年 5 月 15～16 日、小樽)

Parquet C., 長谷部太、井上真吾、Nga TN, 森田公一：日本脳炎ウイルス Genotype I 型のベトナムへの侵入、第 38 回日本脳炎生態学研究会(平成 15 年 5 月 15～16 日、小樽)

Pandey B., 山本晃、森田公一、Rai.S., 倉根一郎：ネパールにおける日本脳炎の血清疫学。第 38 回日本脳炎生態学研究会(平成 15 年 5 月 15～16 日、小樽)

Morita K, Inoue S, Hasebe F, Ishikawa K, Fuke I, Mizuno T, Development and evaluation of newly developed WN vaccine. 第 3 回あわじしま感染症・免疫フォーラム(平成 15 年 8 月 25 日～28 日、あわじ夢舞台)

Mathenge EG, Parquet C, 長谷部太、井上真吾、森田公一：Elevated dengue antigen expression and host cell specificity in JE/Dengue chimeras. 第 51 回日本ウイルス学会(平成 15 年 10 月 27 日～29 日、京都、国立京都国際会議場)

青木千恵、左一八、森田公一、長谷部太、宮本大誠、鈴木隆、鈴木康夫：デング熱ウイルス結合性糖鎖分子の構造及びその性状解析。第 51 回日本ウイルス学会(平成 15 年 10 月 27 日～29 日、京都、国立京都国際会議場)

加根村和美、只野昌之、森田公一、倉根一郎、高島郁夫、森直樹：沖縄県住民の西ナイルウイルスに対する交差中和抗体測定。第 51 回日本ウイルス学会(平成 15 年 10 月 27 日～29 日、

京都、国立京都国際会議場)

Parquet C, Cuong VD, 長谷部太, Nga PT, 馬紹平、井上真吾、牧野芳大、森田公一：Emergence of Japanese encephalitis virus genotype 1 in Vietnam. 第 51 回日本ウイルス学会(平成 15 年 10 月 27 日～29 日、京都、国立京都国際会議場)

Manmohan P, Guillermo P, 井上真吾、長谷部太、森田公一：Real-time Reverse transcription Loop Mediated Isothermal Amplification for rapid detection of West Nile virus. 第 51 回日本ウイルス学会(平成 15 年 10 月 27 日～29 日、京都、国立京都国際会議場)

森田公一：東アジアにおける日本脳炎ウイルスの分子疫学。第 35 回九州微生物研究会(平成 15 年 12 月 19 日、福岡、ホテルセントラザ博多)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

西ナイルウイルスの LAMP 法を用いた検出方法として、現在特許申請中である。

研究成果の刊行に関する一覧表  
雑誌

発表者指名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
Parida M., Posadas M., Inoue S., Hasebe F., and Morita K.	Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus.	J.Clin.Microbiol.	42	257-263	2004
Inoue S., Morita K., Matias R.R., Tuplano J.V., Resuello R.R.G., Candelario J.R., Cruz D.J.M., Mapua C.A., Hasebe F., Igarashi A. and Natividad F.F.	Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys ( <i>Macaca fascicularis</i> ) in the Philippines.	J.Med.Primatol.	32	89-94	2003
Ohishi K., Inoue S., Cinco M., Diaano E., Alera M., Alfon J., Abanes F., Crus D., Matias R., Matsuura H., Hasebe F., Tanimura S., Kumatori A., Moirita K., Natividad F., Nagatake T.	Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections.	J.Med.Virol.	71	259-264	2003
Pandey B., Yamamoto A., Morita K., Kurosawa Y., Rai S., Adhikari S., Kandel P., and Kurane I.:	Serodiagnosis of Japanese encephalitis among Nepalese patients by the particle agglutination assay.	Epidemiol.Infect.	131	881-885	2003
Oishi K., Inoue A., Kuramoto T., Onizuka S., Saito M., Hasebe F., Morita K., Nagatake T.:	Association of dengue virus type-specific IGG on platelets is specific for the acute phase in an imported Japanese patient with secondary dengue virus infection.	J.J.Trop.Med.Hygn.	31	223-225	2003
森田公一	ウエストナイル熱の脅威	公衆衛生情報	34	21-23	2004
森田公一	西ナイルウイルスとその予防策	日本薬剤師会雑誌	55	73-75	2003
森田公一	西ナイル熱への対策	日本医事新報、	4122	101	2003

森田公一	ウエストナイルウイルス脳炎、日本脳炎	臨床と微生物	30	351-355	2003
森田公一	西ナイルウイルスなど、蚊由来のウイルス感染症	健康な子ども、	369	42-43	2003
森田公一	日本脳炎ワクチンの接種計画	日本医事新報	4135	145-146	2003
森田公一	注目すべき世界の感染症－西ナイルウイルス、	成人病と生活習慣病	33	1121-1124	2003
森田公一、Parida M. Mathenge EGM	RNA ウイルスの病原遺伝子探索：フラビウイルスを中心に、	細胞工学	22	1178-1181	2003

分担研究報告書

日本脳炎ウイルス侵淫地域住民および非侵淫地域住民の西ナイルウイルス  
に対する交差中和抗体保有率

分担研究者 只野昌之（琉球大学大学院医学研究科）

研究要旨：日本脳炎ウイルス高侵淫地域（沖縄島）および非侵淫地域（石垣島）に居住する住民の血清について日本脳炎ウイルス二株（ワクチン株、沖縄株）および西ナイルウイルス二株（FGC 株、NY 株）を用いた中和試験を実施し、日本脳炎ウイルスに対するワクチン免疫および感染免疫の西ナイルウイルスに対する交差中和能を検討した。いずれの地域住民の血清も抗日本脳炎ウイルス中和抗体陰性の血清が西ナイルウイルスを中和することはなかったことから、住民は西ナイルウイルスの感染を受けていないと考えられた。

両地域の抗日本脳炎ウイルス中和抗体陽性血清について、西ナイルウイルス・FGC 株に対する交差中和抗体陽性率を検討したところ、日本脳炎ウイルス侵淫地域住民血清の陽性率が非侵淫地域のそれよりも有意に高かった。一方、西ナイルウイルス・NY 株に対する両地域住民血清の交差中和抗体陽性率の間には有意差が認められず、FGC 株に対するそれよりも有意に低かった。

A. 研究目的

米国では、西ナイルウイルス（WNV）感染症が新興感染症として大きな問題となっている。日本でも WNV が侵入すれば米国と同様に流行が起こることのみならず、WNV が土着してしまうことも危惧される。しかし、日本では WNV と同じ抗原グループに属する日本脳炎ウイルス（JEV）に対するワクチンが普及していることに加えて、JEV の侵淫地域では住民が自然感染していることが考

えられる。WNV に有効なワクチンは開発途上にあることから、住民が保有する JE 抗体が WNV も交差中和するか否かは興味深い。さらに、JEV 感染と日本脳炎（JE）ワクチンによる免疫の WNV に対する交差中和の態度についても興味を持たれる。

1985 年から 1991 年に行った沖縄県における JEV の疫学的・生態学的調査で、沖縄島では JEV が活発に循環しているのに対して、石垣島では活動していないことが示

唆された。住民の血清疫学的調査でも、沖縄島の住民は JEV の自然感染を受けているが、石垣島の住民は受けていないと考えられた。

本研究では JEV の侵淫度が異なる両島に居住する住民の血清について、JEV と WNV に対する中和試験を実施し、主にワクチン免疫の場合と、それに加えて感染免疫もある集団で JEV に対する免疫の WNV (FGC 株および NY 株) に対する交差中和の違いがあるか否かを検討した。

## B. 研究方法

### 【被検血清】

1989 年から 1990 年に沖縄島と石垣島の住民から年齢階層別に採取された血清（表-1）を用いた。

表 1 沖縄島および石垣島の年齢階層別住民血清検体数

年齢階層	地域	
	沖縄島	石垣島
0-5	13	20
6-10	14	23
11-15	13	22
16-20	17	19
21-30	18	18
31-40	16	20
41-50	20	20
51 以上	17	40
合計	128	182

### 【中和抗体価測定方法】

96 ウェルマイクロプレートを用いた 50% フォーカス減少法で行った。10 倍希釈以上でフォーカスを 50%以上減少した血清を陽性検体とした。フォーカスを 50%減少する最高希釈倍数を中和抗体価とした。

### 【ウイルスおよび細胞】

通常の方法で継代および培養されたハムスター腎由来 BHK-21 細胞を中和試験に用いた。下記ウイルスの増殖に用いるヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞の培養には 10%FBS および 1mM 非必須アミノ酸を添加したイーグル MEM 培養液を用い、28℃で継代培養した。住民血清を採集した当時に用いられていた日本脳炎ワクチンの製造株である日本脳炎ウイルス (JEV)、中山株と沖縄島で野外蚊から分離された JEV、C307 株が抗 JEV 中和抗体の測定に用いられた。1999 年にアメリカでフラミンゴから分離された西ナイルウイルス (WNV)、NY 株 (長崎大熱研保存) と当教室で保存されている WNV (FGC 株) を抗 WNV 中和抗体の測定に用いた。

### 【統計処理】

$\chi^2$  検定 (Fisher's exact test) にて有意差検定を行った。

## C. 研究結果

### 【抗 JEV 中和抗体陽性検体】

1:10 に希釈された沖縄島および石垣島住民血清について 2 株の JEV を用いた中和試験を行い、抗 JEV 中和抗体陽性検体をスクリーニングした。このスクリーニングで、沖縄本島住民血清 128 検体中 126 検体

(98.4%)、石垣島住民血清 182 検体中 129 検体(70.9%)が用いた JEV 株のいずれかを中和した。

#### 【交差 WNV 中和抗体陽性検体】

1:10 に希釈された沖縄島住民血清 128 検体および石垣島住民血清 182 検体について 2 株の WNV を用いた中和試験で交差中和抗体のスクリーニングを行った。

表 2 沖縄島および石垣島住民血清の抗 WNV 中和抗体陽性率

	FGC 株	NY 株
沖縄島	53.9*(69/128)**	9.4(12/128)
石垣島	18.7(34/182)	9.3(17/182)

\*パーセンテージ、\*\*中和陽性数/実施数

表 2 に示された結果から、いずれの島の住民血清も NY 株より FGC 株を高率に中和した(沖縄島： $p<0.01$ 、石垣島： $p=0.0257$ )。また、FGC 株を中和する率は石垣島住民血清より沖縄島住民血清の方が有意に高かった( $p<0.01$ )。結果には示さないが、いずれの地域住民血清でも抗 JEV 中和抗体陰性血清が、用いた WNV 株を中和することはなかった。このことから、両島に WNV が存在しないことは明かで、この実験で認められる WNV の中和は抗 JE 抗体による交差中和と考えられる。

次に、両島住民血清の抗 JEV 中和抗体陽性血清検体中の WNV 交差中和率を表 3 に示した。

表 3 抗 JEV 中和抗体陽性検体中の抗 WNV 交差中和抗体陽性率

	FGC 株	NY 株
沖縄島	54.8*(69/126)**	9.5(12/126)
石垣島	26.4(34/129)	13.2(17/129)

\*パーセンテージ、

\*\*WNV 中和陽性検体数/JEV 中和陽性検体数

表 3 の結果から、JEV を中和する石垣島住民血清の WNV・FGC 株に対する交差中和陽性率は沖縄島住民血清のそれより有意に低かった( $p<0.01$ )。一方、WNV・NY 株に対する交差中和抗体陽性率の間には有意な差が認められなかった。

#### D. 考察

本研究では JEV の侵淫度が異なる地域住民の血清について WNV の中和試験を実施し、JEV に対する液性免疫が WNV に対して交差中和するか否かを確認した。抗 JEV 中和抗体陽性血清の WNV・FGC 株に対する交差中和抗体陽性率は JEV の侵淫度が高い沖縄島の方が石垣島より高かった。この事ことから、JEV の自然感染による免疫は JEV ワクチンによるそれよりも WNV・FGC 株に対する交差中和能が強いということが示唆された。一方、WNV・NY 株に対する交差中和抗体陽性率は両地域間で有意な差が認められなかったことから、WNV でも株によって交差中和されやすい株とそうでないものがあると思われる。NY 株と FGC 株

は遺伝子塩基配列の比較から異なった遺伝子型に分類されているが、抗原性においても大きく異なっていることが考えられ、この事が JEV に対する免疫による交差中和の違いに結びついているのかも知れない。また、NY 株は分離されてから継代歴が浅いが、FGC 株は実験室内で数限りなく継代されており、継代歴の違いが交差中和されやすさに反映しているかも知れない。これらのことを明らかにするには更に詳細な検討が必要である。

#### E. 結論

通常の JE ワクチン接種スケジュールによる免疫では WNV を高い頻度で交差中和できないが、JE ワクチンに加えて JEV の自然感染による強い免疫も加わることで WNV・FGC 株は交差中和されやすくなる。しかし、WNV の株によっては JEV に対する免疫による交差中和の態度が異なる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

A major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan.

Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, Tadano M, Ono T, Ogawa M. Am J Trop Med Hyg. 2003 Aug; 69(2): 151-4.

##### 2. 学会発表

沖縄県住民血清の西ナイルウイルスに対す

る交差中和抗体測定。加根村和美、只野昌之、森田公一、倉根一郎、高島郁夫、森直樹。第51回日本ウイルス学会（京都）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし



厚生科学研究費補助金（厚生労働科学 新興・再興感染症事業）  
分担研究報告書

デングウイルス感染症の新規病原体診断法の開発

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)  
協力研究者 伊藤美佳子、倉根一郎（国立感染症研究所）

研究要旨

デングウイルス感染症は東南アジアを中心として広がっており、re-emerging infectious disease（再興感染症）の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国では国内感染のない感染症であるが、近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例がみられる。輸入デングウイルス感染症は、RT-PCRによるウイルス遺伝子とIgM-ELISAによるIgM抗体の両検出法により、初感染のデング熱の診断が可能であるが、さらに簡便で迅速にデングウイルス遺伝子を検出するTaqMan Real Time RT-PCRを用いた検出法を開発した。

A. 研究目的

わが国では国内感染のない感染症であるが、2003年11月5日に改正された感染症新法の施行に伴い、4類感染症として診断後直ちに届出が必要となった。そのため、流行地からの入・帰国者などによる輸入感染症として、わが国に持ち込まれる症例への対策が必要となった。デングウイルスには1-4型があり、一つの地域において複数の型のデングウイルスが同時期に存在していることが多い。また、熱帯・亜熱帯地域において大きな問題となっており、特に東南アジア、南アジア、中南米、カリブ海諸国において患者の報告が多く、アフリカ、オーストラリア、中国、台湾においても発生している。そのため、ウイルスの多様化に対応した特異的な検出法を確立する必要がある。そこで、特異性に優れ、高感受性、簡便、迅速な検査、診断体制を確立することを目的としてTaqMan Real Time RT-PCRを用いた検出法を開発した。

B. 研究方法

TaqMan Real Time RT-PCRのプライマーおよびプローブは、世界の分離株を比

較・検討し、各血清型間において相同性が低く、なおかつ各血清型内において保存された部位を選択し、作製した。TaqMan Real Time RT-PCRの評価には国立感染症研究所ウイルス第一部において1994年から2003年にHI試験、IgM-ELISA、RT-PCRなどにより初感染のデング熱感染を診断した検体を用いた。

さらに、TaqMan Real Time RT-PCR結果は従来のRT-PCR法およびVero細胞によるブランク法で確認したウイルス力価とその検出感度を比較した。供された患者血清はデングウイルス1型が18検体、デングウイルス2型が8検体、デングウイルス3型が5検体、デングウイルス4型が3検体の合計35検体を用いた。感染患者の大半はタイ、インド、フィリピン、インドネシアなど東南アジアからの帰国者であった。

C. 研究結果

1. デングウイルス1-4型プライマーおよびプローブの特異性  
デングウイルス1-4型の標準ウイルスについて、各血清型に対する特異性が確認

された(図1)。また、Vero 細胞によるブ  
ラーク法で確認したウイルス力価を基準に  
希釈して検出限界をもとめたところ、デ  
ングウイルス1型は $1.4 \times 100$  PFU/ml 以上、  
デングウイルス2型は0.5PFU/ml、デング  
ウイルス3型は $1.4 \times 100$  PFU/ml 以上、デ  
ングウイルス4型は0.5PFU/ml 以上であ  
った。

## 2. 日本脳炎血清型群に対する特異性

デングウイルス1-4型に対するそれぞ  
れのプライマーおよびプローブは西ナイル  
ウイルス(New York 株および Eg101 株)、  
クンジンウイルス(K47382 株および OR393  
株) 黄熱ウイルス(17D 株)、日本脳炎ウイ  
ルス(Gar01 株)と反応せず、デングウイ  
ルスに対する特異性が確認された。

## 3. TaqMan Real Time RT-PCR による患 者血清中のデングウイルス遺伝子の検出

デングウイルス1-4型に特異的なプ  
ライマーおよびプローブを用いた TaqMan  
Real Time RT-PCR により、患者血清中のデ  
ングウイルス遺伝子が100%検出された。一  
方、従来行われてきた RT-PCR 法では、デ  
ングウイルス型特異プライマーを用いた場  
合は検出率 87.1%、デングウイルス共通プ  
ライマーを用いた場合は検出率 78.8%であ  
った。TaqMan Real Time RT-PCR においてデ  
ングウイルス遺伝子が検出されたが、従来  
の RT-PCR 法で検出されなかった患者血清  
においては、血清中ウイルス力価が低かつ  
た。血清中ウイルス力価と TaqMan Real  
Time RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出  
値(Ct 値)に相関性が認められた。

## D. 考察

デングウイルス感染症の診断では病原学  
的検索と血清学的検索の両面からなされる。  
通常の RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の  
検出は型別まで確定することができるが、  
感度は TaqMan Real Time RT-PCR に比較  
すると劣る。TaqMan Real Time RT-PCR は  
リアルタイムに結果が検索でき、特異性お  
よび感受性が高い。

ウイルス遺伝子はウイルス血症がある時  
期の検体から検出される可能性が高いが、  
それに対して、IgM-ELISA による IgM 抗体

は患者が解熱期に入り、回復してくる時期  
に検出される。即ち、PCR によるウイルス  
遺伝子と IgM-ELISA による IgM 抗体の検出  
の両検索により、初感染のデングウイルス  
感染症は確定診断が可能であると考えられ  
る。しかし、本 TaqMan Real Time RT-PCR  
を用いることにより、有熱から解熱の移行  
時期などのウイルス消失時期の患者血清に  
おいてより詳細な結果を得ることができる  
と考えられる。

## E. 結論

TaqMan Real Time RT-PCR はリアルタ  
イムで定量的にウイルス遺伝子量を推定で  
きるため、患者のデングウイルス感染に対  
するデータを簡便で迅速に得ることができ  
る。患者血清中のウイルス遺伝子を検出す  
るために TaqMan Real Time RT-PCR は従  
来行われてきた RT-PCR と比較して感度が  
高く、今後本法を診断法として活用してい  
くことが有用であると考えられる。IgM-ELISA による IgM 抗体の検出の両検索  
を行えば、初感染のデング熱の場合では、  
かなりの精度で確定診断が可能であると考  
えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ken-ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki,  
Masaru Nawa, Sadao Yabe, Ichiro  
Kurane. Antibody responses determined  
for Japanese dengue fever patients by  
neutralization and hemagglutination  
inhibition assays demonstrate  
cross-reactivity between dengue and  
Japanese encephalitis viruses. *Clinical  
and Diagnostic Laboratory Immunology*  
10(4) 725-728, 2003.

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki,  
Ken-ichiro Yamada, Ichiro Kurane,

Toshitaka Akatsuka. Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *Journal of General Virology* 84: 1737-1741, 2003.

高崎智彦、倉根一郎. 世界におけるデング熱・デング出血熱. *病原微生物検出情報* 25(2)33-34 (2004)

## 2. 学会発表

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、野村秀和、Beti Ernawati Dewi, 倉根一郎. Real Time PCRによる Dengue virus の血清型分類. 第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 5/15-16/2003 (小樽)

名和 優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎. デングウイルス血清型特異的 IgM 検出のためのタンパク変性試薬 (チオシアン酸ナトリウム) を用いた ELISA.

第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会  
5/15-16/2003 (小樽)

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、田島 茂、野村秀和、Ernawati Dewi Beti, 倉根一郎. Real time PCR による Dengue virus の血清型分類. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

Beti Ernawatti, 高崎智彦、倉根一郎. PBL induce increase in the permeability on dengue virus infected-endothelial cells associated with down regulation of VE-cadherin. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

名和 優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎. デングウイルス血清型特異的 IgM 検出のためのタンパク変性試薬 (チオシアン酸ナトリウム) を用いた ELISA. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

図1 デングウイルス1-4型特異的プライマーおよびプローブを用いたデングウイルス遺伝子の検出

