

表2. WNV感度試験(TMA法)

日本赤十字社血液管理センター実施

回数	cps/mL	検査本数	TMA法 (WNV-USA)				TMA法(WNV-ITA)			
			陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)
1	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	5	6	6	0	0	100.0	3	3	0	50.0
	1	6	6	0	0	100.0	2	4	0	33.3
	0.5	6	3	3	0	50.0	0	6	0	0.0
	0	6					0	6	0	0.0
2	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	5	6	6	0	0	100.0	5	1	0	83.3
	1	6	6	0	0	100.0	3	3	0	50.0
	0.5	6	1	5	0	16.7	1	5	0	16.7
	0	6					0	6	0	0.0
3	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	5	6	6	0	0	100.0	4	2	0	66.7
	1	6	5	1	0	83.3	1	5	0	16.7
	0.5	6	5	1	0	83.3	0	6	0	0.0
	0	6					0	6	0	0.0
4	100	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	50	6	6	0	0	100.0	6	0	0	100.0
	10	6	6	0	0	100.0	5	1	0	83.3
	5	6	6	0	0	100.0	4	2	0	66.7
	1	6	6	0	0	100.0	1	5	0	16.7
	0.5	6	6	0	0	100.0	0	6	0	0.0
	0	6					0	6	0	0.0
合計	100	24	24	0	0	100.0	24	0	0	100.0
	50	24	24	0	0	100.0	24	0	0	100.0
	10	24	24	0	0	100.0	23	1	0	95.8
	5	24	24	0	0	100.0	16	8	0	66.7
	1	24	23	1	0	95.8	7	17	0	29.2
	0.5	24	15	9	0	62.5	1	23	0	4.2
	0	24					0	24	0	0.0

95%検出感度 (PROBIT分析): 1.2 copies/mL 13.3 copies/mL

95%検出感度 (ノバルティス社参考資料): Procleix® WNV Assay 8.2 copies/mL

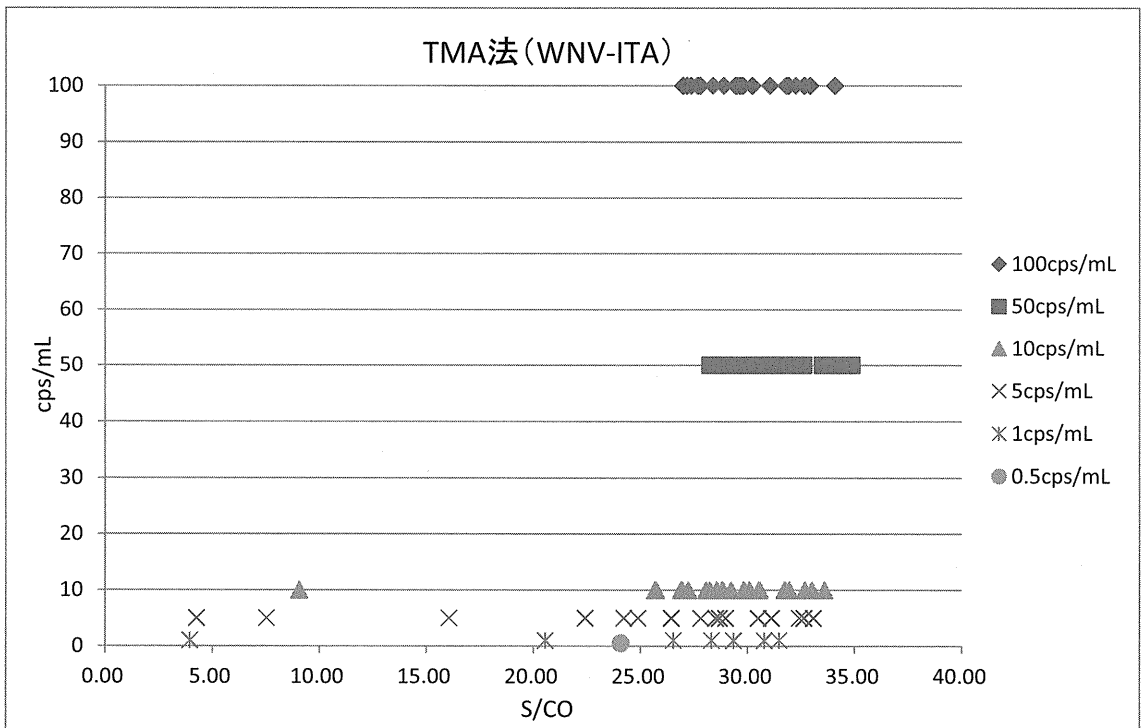
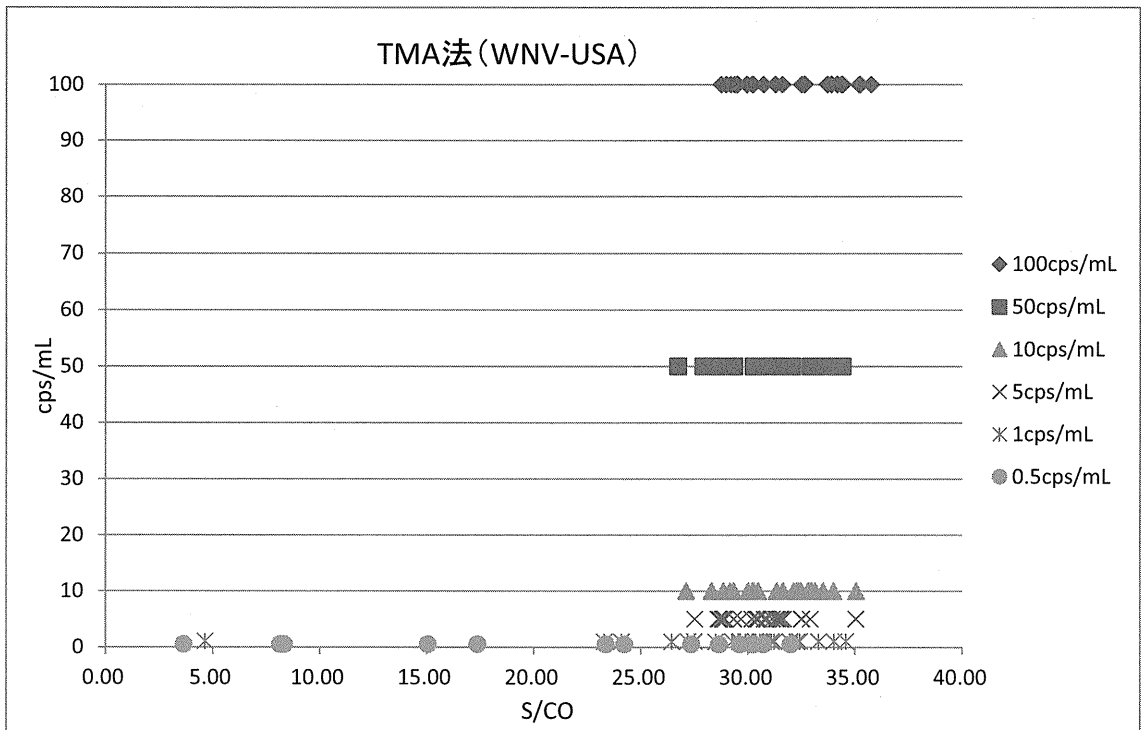
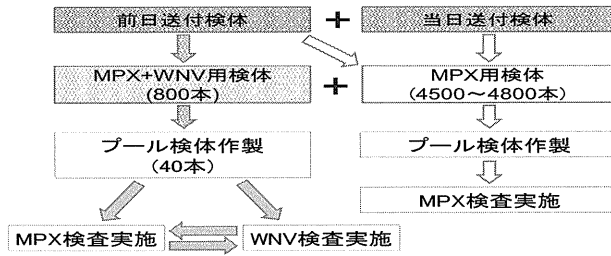


図3. WNV感度試験(TMA法)のS/CO値分布

表3. WNV-USA低濃度域の検討

cps/mL	検査 本数	TaqMan PCR法(WNV-USA)				TMA法(WNV-USA)			
		陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)	陽性	陰性	Invalid	陽性率 (%)
1	8	4	4	0	50.0	8	0	0	100.0
0.5	8	1	6	1	14.3	5	3	0	62.5
0.1	8	1	7	0	12.5	2	6	0	25.0
0.05	8	0	8	0	0.0	2	6	0	25.0
0	8	0	8	0	0.0	0	8	0	0.0

<シミュレーション実施方法>



プール検体作製～検査結果確定まで時間を算出

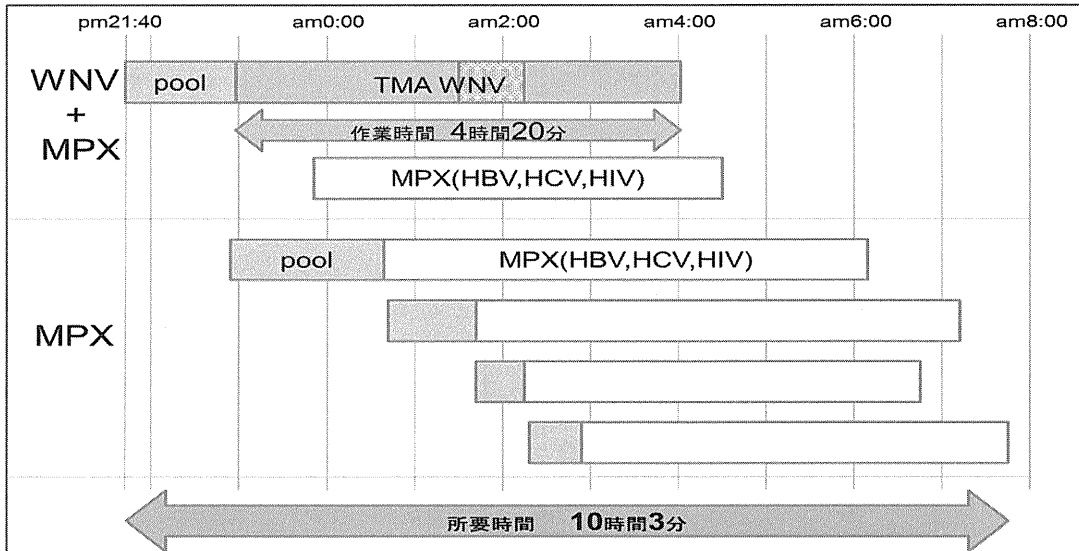
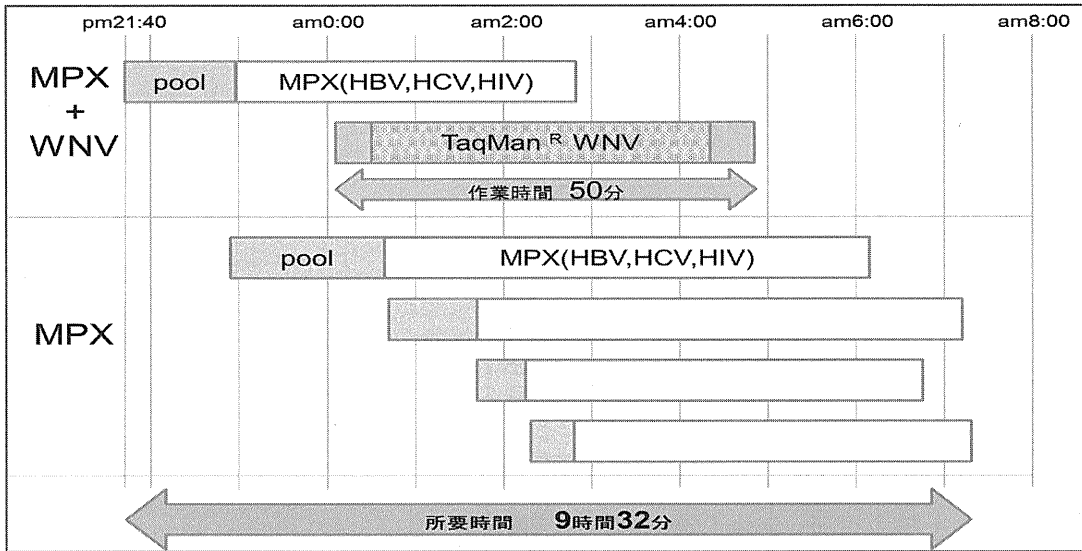
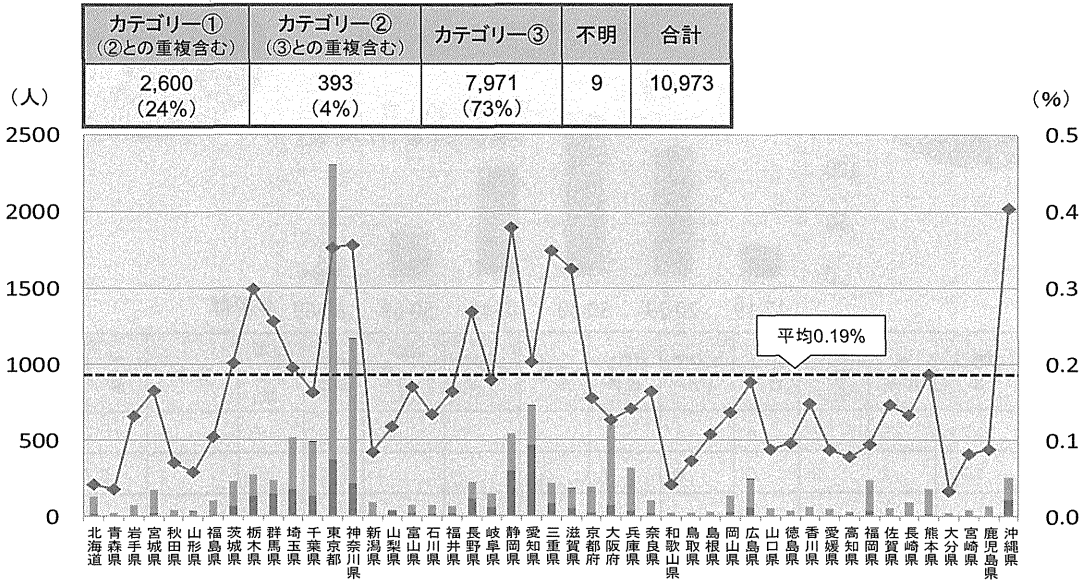


図4. 実検体を用いた検査シミュレーション

＜都道府県別中南米滞在歴等を有する受付者数＞

平成24年10月15日～平成25年10月14日(1年間)



＜都道府県別中南米滞在歴等を有する献血者数＞

平成24年10月15日～平成25年10月14日(1年間)

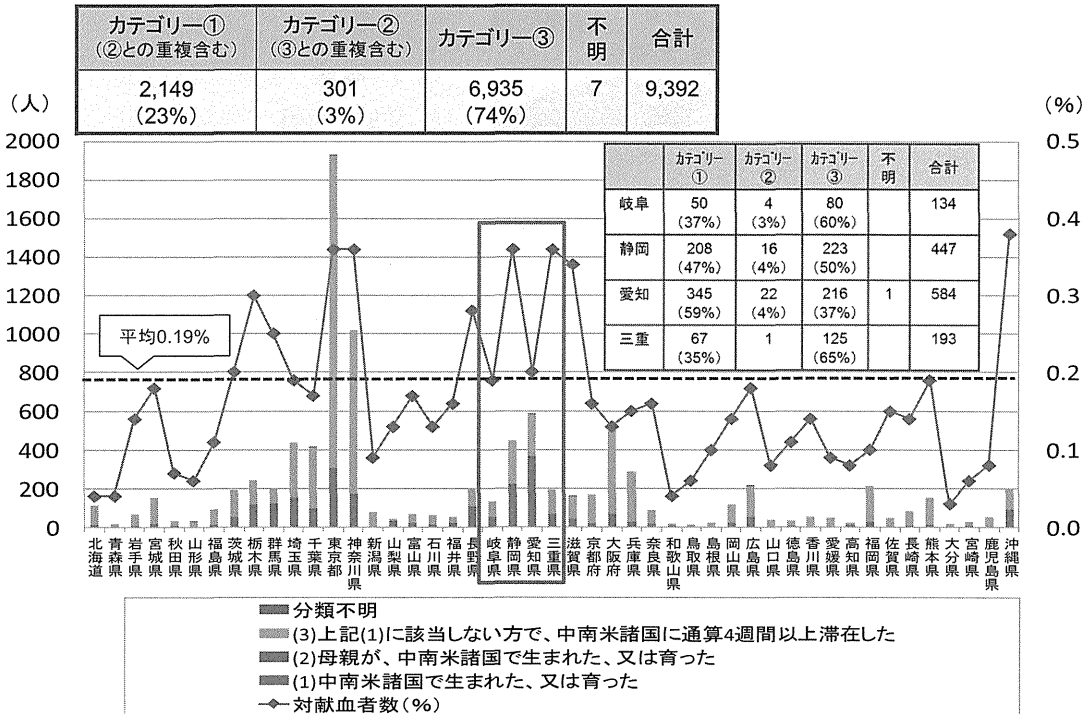
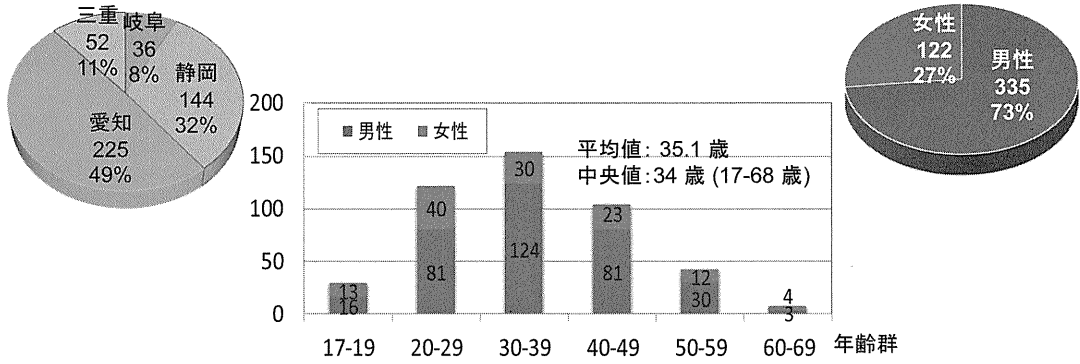


図5. 中南米滞在歴等を有する受付者数・献血者数

カテゴリー①対象者:457名



国籍	ブラジル	ペルー	アルゼンチン	ボリビア	エクアドル	コロンビア	チリ	パラグアイ	ホンジュラス	メキシコ	コスタリカ	日本	不明	合計
男	271	25	2	4	1	3	2	0	0	1	0	16	10	335
女	109	2	2	0	0	1	0	1	1	0	0	4	2	122
合計	380	27	4	4	1	4	2	1	1	1	0	20	12	457
出身国	401 (88%)	32 (7%)	4	4	1	5	3	1	2	1	1	複数国 2		457

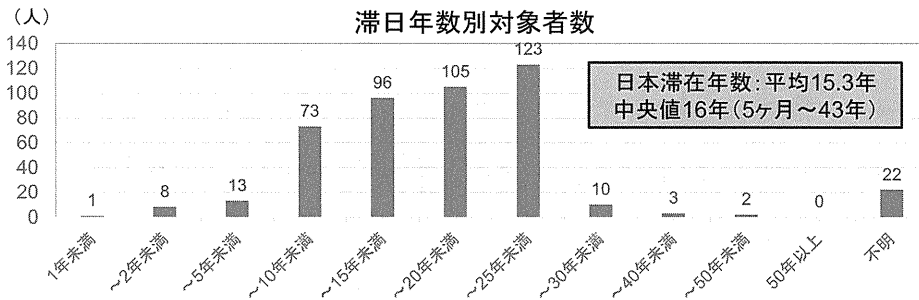
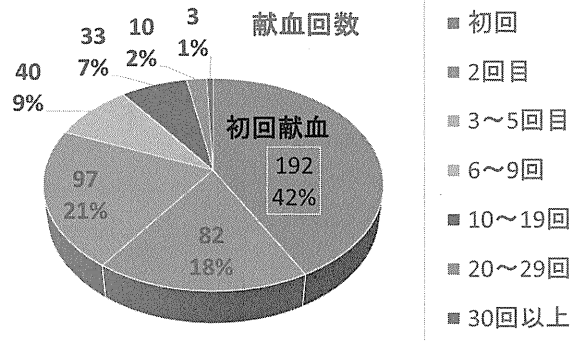


図6.東海4県におけるパイロットスタディ実施状況 (2013.1.8-11.30)

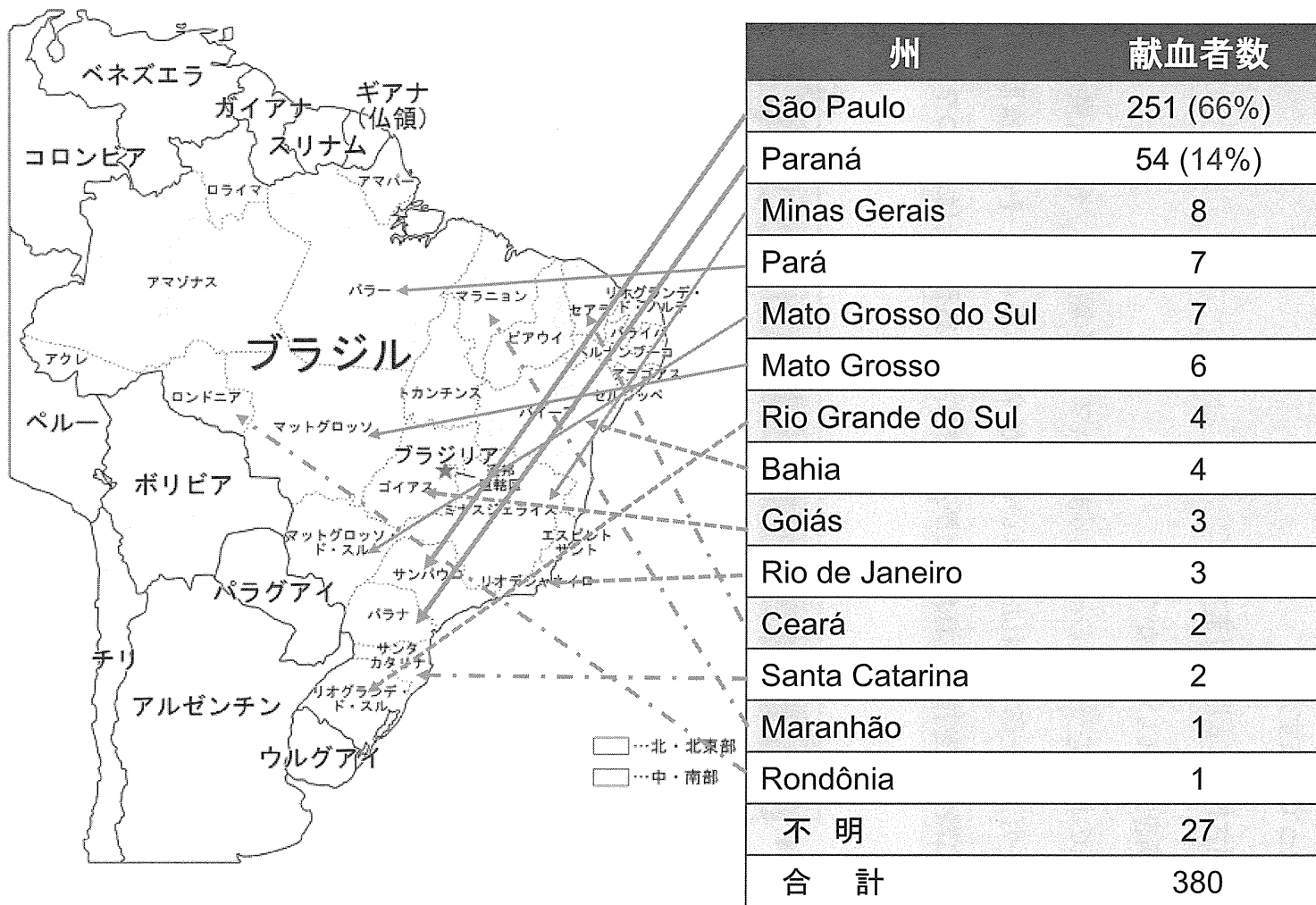


図7.ブラジル国籍献血者の出身州の分布(2013.1.8-11.30)

質問項目
1. 幼少時の家の構造(日本人:滞在時の家の構造)
2. サシガメを知っていますか？
3. サシガメに刺されたことはありますか？
4. シャーガス病を知っていますか？
5. シャーガス病の検査を受けたことがありますか？ ある場合は、その結果
6. 家族にシャーガス病と診断された人はいますか？いる場合は、その家族関係
7. 心疾患、消化器疾患を指摘されたことがありますか？ある場合は、いつ？

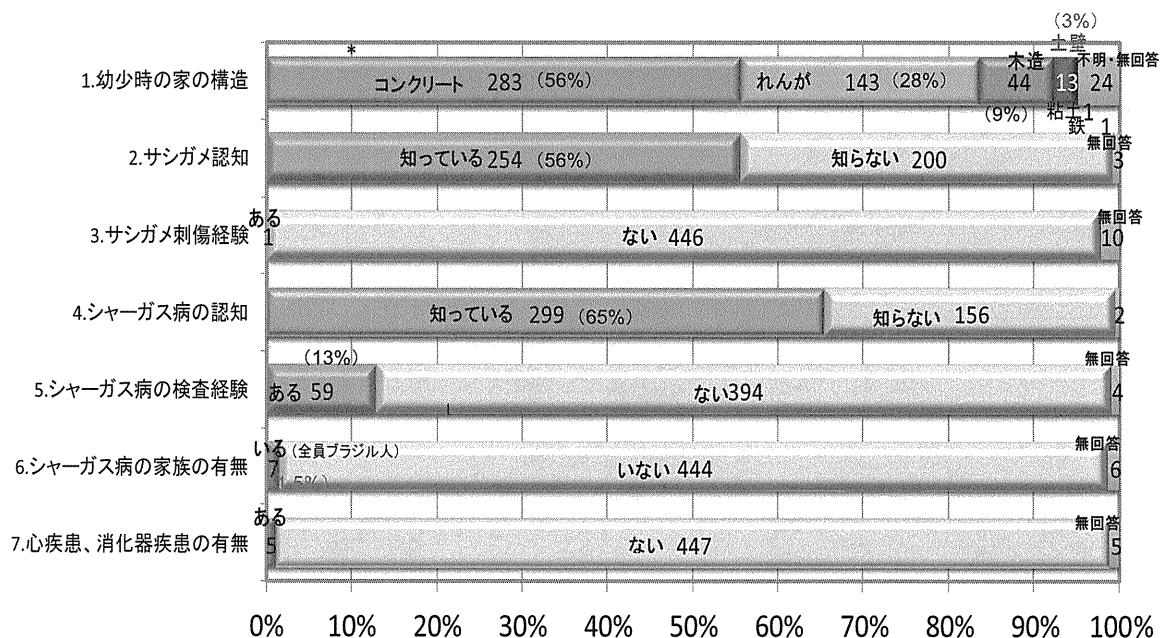


図8. 東海4県パイロットスタディ対象者に対するアンケート調査結果(2013.1.8-11.30)

ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発

研究者分担 横山直明 帯広畜産大学・原虫病研究センター教授

研究要旨：赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* によるバベシア症は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立している一方、人獣共通感染症としても重要であり、アメリカ北東部では地方病として知られている。近年、本症の世界的な感染拡大が報告されており、日本でも、1999年に神戸で輸血により本邦初の人感染例が発生した。そこで、本研究では“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的とした。平成25年度は、23年度および24年度にマウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法のLAMPおよび簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法（ICT）について、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。LAMPについては神戸医療大学から提供を受けた111検体の人血液よりDNAを抽出して検討を行った。その結果、抗体陽性を示した61検体中、LAMPで陽性を示した検体は5検体のみで、非常に検出率が低かった。また、IFATで陰性を示した50検体中、LAMPで陽性を示した検体が1例認められた。ICTについては、アメリカエール大学より人血清の提供を受けて実施予定であった。しかしながら、ヒト試料の使用について、エール大学並びに帯広畜産大学の倫理委員会の承認を得るのに時間を要し、最近エール大学より60検体の人血清を入手したところである。現在、これらの血清を用いて、検討中である。

A. 研究目的

赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立しているが、感染ダニによる刺咬やキャリアーからの輸血により人にも感染し、人獣共通感染症として重要視されている。ヒトバベシア症は、アメリカ北東部の離島や沿岸地帯では地方病として知られている。最近、米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、エジプト、南アフリカなどにおいても人感染例が報告され、その感染の拡大が懸念されている。日本でも、1999年神戸で輸血により本邦初の人感染例が報告され、血液製剤の安全性確保や更なる人への感染拡大防止のため、正確で迅速な血清並びに遺伝子診断法の開発が急務となっている。

本研究では、“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的としている。25年度は、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法のLAMPおよび簡易・迅速血清診断法であるICTについて、人血液試料を用いてその有用性を確認することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ヒト血液試料

神戸医療大学薬学部斎藤あつ子教授より111検体のヒト血液の提供を受けた。これらの試料は、インフォームドコンセントを実行して得られて採血されている。111検体中、IFAにより61検体が抗体陽性、50例が抗体陰性であることが確認されている。これらの血液25 μ mを用いて市販のDNA抽出キットによりDNAを精製した。

また、エール大学より、60検体の人血清の提供を受けた。これらの血清は、インフォームドコンセントを実行して得られている。

(2) LAMPの実施

B. microti の18s ribosomal DNA (rDNA) 遺伝子情報を基に設計したLAMP用のプライマー4種類（FIP、BIP、F3、及びB3）を用いて、63度で90分の反応条件で増幅を行った。本LAMP法は、マウス感染モデル系で特異性や感度が高いことが確認されている。さらに、日本で最初に輸血により感染が認められた患者並びに献血者のDNAを用いた実験で遺伝

子の増幅が確認されている。

(3) イムノクロマトストリップの作製

組換え BMN1-17 蛋白質の濃度が 200mg/ml、pH 5.0 の条件で金コロイド標識を標識し、ICT ストリップを作製した。ハムスターを用いた感染実験により、特異性ならびに IFAT と同等の感度を有していることが確認されている。また、輸血による *B. microti* 感染が日本で初めて確認されたヒト患者および献血者で、抗体が確認されている。

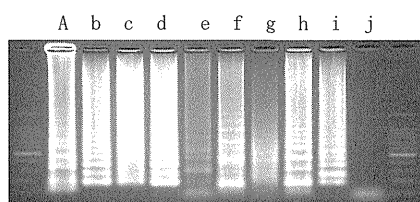
(倫理面への配慮)

人の血液材料を用いた実験については、帯広畜産大学、神戸医療大学、エール大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) ヒト DNA を用いた LAMP の検討

111 検体の人血液より得られた DNA を用いて LAMP を実施した。その結果、IFA で抗体陽性を示した 61 検体中、LAMP で陽性を示した検体は 5 検体のみであった。また、抗体陰性が確認されている 50 検体中 1 例で LAMP 陽性反応が確認された。また、*B. microti* の神戸株、ミュンヘン株、グレイ株の DNA でも遺伝子の増幅が認められた (下図)。



a: 神戸株、b: ミュンヘン株、c: グレイ株、
d: IFA 陽性、e: IFA 陽性、f: IFA 陽性、
g: IFA 陽性、h: IFA 陽性、i: IFA 陰性、j: 蒸留水

(2) ヒト DNA を用いた ICT の検討

24 年度に、ハムスター感染モデルで ICT による抗体検出の有用性が確認された。そこで、本年度は流行地でのヒト血清を用いて検討すべく、エール大学公衆衛生学部の P. Krause 博士にヒト血清の提供依頼を行ったところ、快く承諾を戴くことができた。しかしながら、帯広畜産大学ならびにエール大学

の倫理委員会の承認を得るのに、予想よりも長い時間を要した。その後 MTA を締結し、1 月下旬に 60 検体を入手したところである。今後、提供された 60 検体を用いて、早急に行う予定である。

D. 考察

B. microti 18s rDNA 遺伝子を標的とした LAMP 法は、マウス感染モデルにおいて、高い特異性と感度と示した。また、ヒト感染血液および献血者においても、LAMP 法により標的遺伝子が増幅されている。そこで、今回 100 例以上のヒト DNA サンプルを用いて、LAMP 法を実施した。しかしながら、61 例の抗体陽性者の DNA サンプルを用いた LAMP 法で、5 例より陽性反応が認められなかった。これは、採血された人はほとんど無症状であり、血液中の原虫数が極めて少ないと考えられる。そのため、少数の原虫により抗体産生系は刺激され、血清中に全血清中に抗体は認められるが、DNA 調整に使用された 25 μ m 中に原虫が含まれていなかったと推察される。

今回、3 株の *B. microti* から抽出された DNA を陽性対照として用いたところ、すべての DNA で遺伝子増幅が認められた。神戸株、ミュンヘン株、グレイ株はそれぞれ日本、ドイツ、アメリカと地理的に非常に隔だっているにも関わらず遺伝子増幅が認められたことは、本プライマーセットを用いた LAMP 法が世界的に使用可能であることを示唆している。

また、アメリカの流行地で採取された人血清を用いて、ICT の有用性の検討は残念ながら今回期限内に実施できなかった。しかしながら、ICT の作製に使用された BMN17 は、世界的に非常に良く保存されている原虫蛋白質である。組換え蛋白質をコードしている BMN17 の遺伝子情報は、ミュンヘン株から得られたものである。この遺伝子情報に基づいて作製され組換え蛋白質を用いた ICT により、地理的および遺伝的に遠い神戸の人血清で抗体を検出できたことから、本 ICT の汎用性は高いと考えられる。

E. 結論

本研究では、マウスモデル系を用いた開発された遺伝子診断法の LAMP および簡易・迅速血清診断法である ICT について、人血液試

料を用いてその有用性を確認することを目的とした。残念ながら、人試料を用いた検討では、マウスモデルで得られた高い感度が認められなかった。しかし、本研究で開発された、LAMP と ICT は国際的に使用可能な可能性を有しており、今後その実用化に向けて、更に検討する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Iseki H., Alhassan A., Kim C., Saito-Ito A., Inokuma H., Kawazu S., Masuzawa T., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Babesia microti* Infection. (準備中)
2. Iseki H., Kim C., Saito-Ito A., Minoda Y., Inokuma H., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of an immunochromatographic test for convenient serodiagnosis of human babesiosis. (準備中).

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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総合研究事業)
分担研究報告書

献血制限に関わる昆虫学的研究：個体識別マーキング法を用いた
ヒトスジシマカの移動分散に関する基礎研究

研究分担者 津田良夫 国立感染症研究所（昆虫医科学部 室長）

蚊の胸部背面の 5 ヶ所に塗料を塗って個体を識別するマーキング法を考案し、2013 年 3 月 18 日から 27 日の期間、石垣島の住宅街でヒトスジシマカとオオクロヤブカの移動分散に関する実験を行った。調査地の広さは 230m×250m で、調査地内には緑地、人家、商店、ビルが存在し、ヒトスジシマカの生息場所が点在していた。個体識別マーキングは初めの 7 日間行い、合計 232 頭のヒトスジシマカと 216 頭のオオクロヤブカをマークして、4 ヶ所から放逐した。ヒトスジシマカの再捕獲率は 0.21 (48/232) で、オオクロヤブカの 0.09 (20/216) よりも有意に高かった。またヒトスジシマカの再捕獲率を放逐場所間で比較したところ有意に異なっていた。放逐された蚊の動きを分析した結果、大きな緑地の内部はヒトスジシマカとオオクロヤブカの潜伏や吸血動物の探索に好適であり、雌成虫が周囲の生息場所から集まってくることを示唆された。

A.研究目的

ヒトスジシマカが一生の間に動き回る範囲は、この蚊によって媒介される病気が流行した際にその拡大速度や拡大範囲を知る上で最も基本的かつ重要な情報である。疾病媒介蚊の分散範囲を推定するためには、マークを付けた蚊を放逐してその後の分散過程を追跡するマーキング法が一般的に用いられてきた。ヒトスジシマカ成虫の分布に関してこれまで行われた研究では、成虫の分散行動が住宅街周辺の並木や住宅の庭木、公園や緑地などの植生と密接に関係していることが示されている。そのため、成虫の移動分散は一方向的に起こるのではなく、潜伏に適した茂みの間を転々と行き来するような短距離の動きを繰り返して起こ

っていると考えられる。このような動きの研究には、個体識別マーキングによって、同一個体の動きを追跡する手法が最も有効であるとされている。しかしながら、個体識別のためのマーキングを蚊に対して適用することは技術的に難しく、研究例は非常に少ない。

そこで、本研究ではヒトスジシマカの個体識別マーキング法を考案し、石垣島の住宅街で実際に生息しているヒトスジシマカにマークを施し、その動きについて分析を行った。

B.研究方法

個体識別マーキング法：成虫をクロロフォルムで軽く麻酔した。予め氷の塊の上に濾紙を乗せ、低温で湿った状態にしておき、

この上に麻酔した蚊を乗せた。胸部背面が上になるように位置を修正して、5ヶ所に塗料でマークを付けた(図1)。マークのために用いたペン是有頭の昆虫針で、竹串の柄をつけてごく少量の塗料を点刻するようにマークした。塗料には、修正液として市販されている水溶性ミスノンを適当な濃度に希釈して用いた。また、3種類の食品用色素(赤、青、黄色)を少量混ぜて、3種類の異なる塗料を作った。合計4色の塗料と5ヶ所のマーク箇所の組み合わせによって、 $5^5-1=3124$ 個体を区別できる。

野外調査：調査期間は2013年3月17日から3月27日の期間で、調査地としては石垣島の住宅街を選んだ。住宅や商店、公共のビル、2つの緑地がある約230m×250mの区画を設定し、その中に4ヶ所の採集場所を選んだ(図2)。採集場所Aは、調査のために滞在した民宿の庭先である。採集場所BとCは民宿の東にある大きな緑地で、Bは緑地の入り口付近、Cは緑地の奥に位置している。採集場所Dは大きな緑地から南東に約92m離れた小規模の緑地の入口である。

蚊の採集は毎日8:00と14:00の2回行った。各採集場所に採集者一人が10分間とどまり、吸血のために飛来する蚊を吸虫管で採集した。採集された蚊は、場所ごとに紙コップに入れて持ち帰った。カップから蚊を1個体ずつ吸虫管で取り出し、マークの有無をチェックした。マーク虫はマークを確認、採集された場所を記録して紙コップに戻し、その日のうちに採集された場所から放した。無マーク虫には識別マークをつけて、その日のうちに採集された場所から放逐した。マーキングは初めの7日間継続

して行い、その後の3日間は捕獲だけを行った。

C.研究結果

調査期間中にヒトスジシマカ309個体とオオクロヤブカ300個体が採集された(表1)。オオクロヤブカの密度が予想外に高く、また、この種類に関するマーキング実験はこれまでに報告がないため、オオクロヤブカにもマークを行うことにした。個体識別マークを行って放逐した個体数は、ヒトスジシマカが232個体、オオクロヤブカは216個体であった。このうち再捕獲されたのはヒトスジシマカが48個体で、再捕獲率は0.21(48/232)であった。これに対して、オオクロヤブカの再捕獲率は0.09(20/216)で、ヒトスジシマカよりも有意に低い値だった。

採集場所ごとに再捕獲率を求めて表2に示した。ヒトスジシマカの場合、採集場所Bの再捕獲率は0.4で、ほかの採集場所の再捕獲率よりも有意に高かった。オオクロヤブカの場合は、採集場所による再捕獲率の違いは有意ではなかった。

4ヶ所の採集場所間のヒトスジシマカの動きを表3aにまとめて示した。同一行に示された値は、例えば採集場所Aの場合、採集場所Aから放逐された個体のうち3,2,3,0個体が採集場所A,B,C,Dで再捕獲されたことを示している。つまり、採集場所Aで放逐された8個体のうち同じ場所Aで再捕獲された個体は3個体(37%)である。採集場所BとDの場合も採集場所Aと同様に、放逐された場所に留まりそこで再捕獲された個体の割合は低く、それぞれ30,25%であった。これに対して採集場所Cでは、放逐された26個体のうち放逐場所に留

まりその場所で再捕獲された個体の割合は88%と非常に高かった。

表3aの同一欄に示された値は、採集場所Aを例にすれば、採集場所Aで再捕獲された3, 0, 1, 1個体がそれぞれ、採集場所A, B, C, Dから放逐された個体であったことを示している。この結果は、採集場所C, Dから採集場所Aへ移動してきた個体があったことを示しているが、その頻度は低かったことを意味している。採集場所BとDへ移動してきた個体の数は表の第2, 4欄に示されているように少なく1あるいは2個体に過ぎなかった。これに対して、採集場所Cは本研究で再捕獲された48個体のうち35個体が再捕獲された場所であり、このうち34%に相当する12個体は他の場所からCへ移動してきたことがわかった。特に、表2で放逐された個体の再捕獲率が最も高かった採集場所Bの場合、この場所から放逐された10個体のうち7個体は採集場所Cで再捕獲されていたことがわかった。

4ヶ所の採集場所間のオオクロヤブカの動きを表3bにまとめて示した。放逐されたオオクロヤブカが再捕獲された場所は1ヶ所に集中しており、再捕獲された20個体のうち90%に相当する18個体が、採集場所Cで捕獲されていた。

D. 考察

本研究の採集場所の中では、採集場所Cから放逐された個体そのままとどまる可能性が高く、また、周辺の場所からCへ移入してくる個体も多いことがわかった。特にヒトスジシマカの場合、採集場所BからCへは方向性を持って移動している個体が

多いことが示唆される。これらの結果は、採集場所Cの周辺がヒトスジシマカやオオクロヤブカの潜伏や吸血飛来に適した場所であることを意味している。多くの住宅街には大小の茂みや緑地が存在することから、採集場所Cのように潜伏や吸血飛来に適した場所がどのように分布しており、それがヒトスジシマカの移動にどのように影響しているかを今後の研究で明らかにする必要がある。

E. 結論

本研究で検討した個体識別マーキングの手法は、住宅街におけるヒトスジシマカやオオクロヤブカの動きに関する分析的研究に有用であることがわかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

津田良夫. ヤブカの個体識別マーキング法の検討: 石垣島におけるヒトスジシマカとオオクロヤブカを用いた実験. 第65回日本衛生動物学会東日本支部大会、2013年10月25日、川口市.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

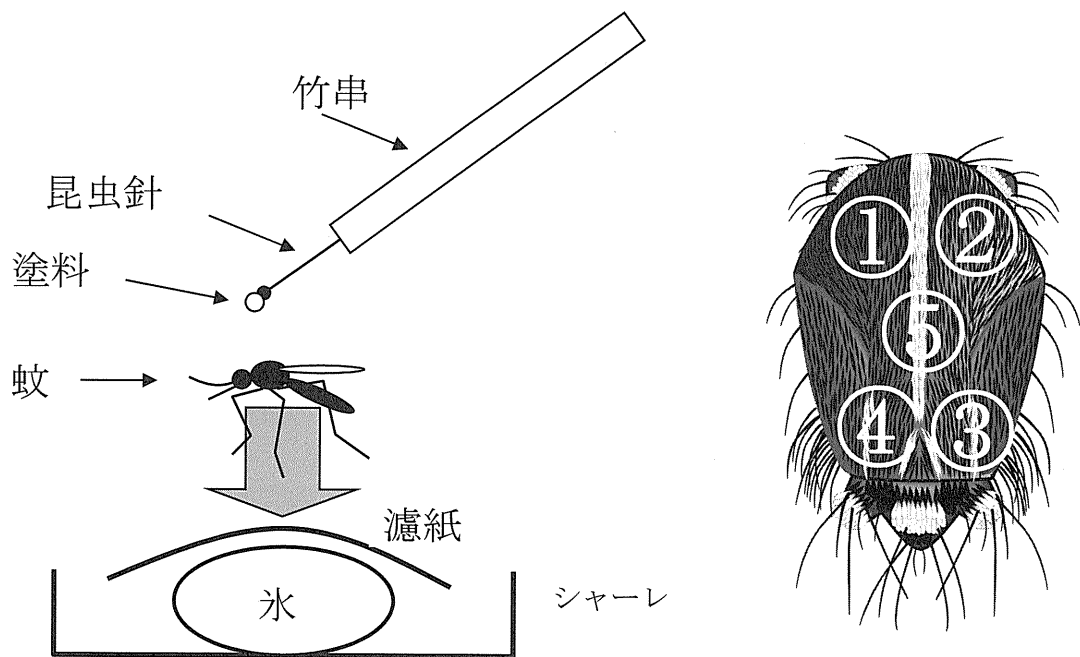


図 1. 個体識別マークの方法. 氷の塊によって冷やし湿らせた濾紙の上に麻醉した成虫を乗せる (左図). 昆虫針を使ってヒトスジシマカの胸部 5ヶ所に塗料を付ける (右図).

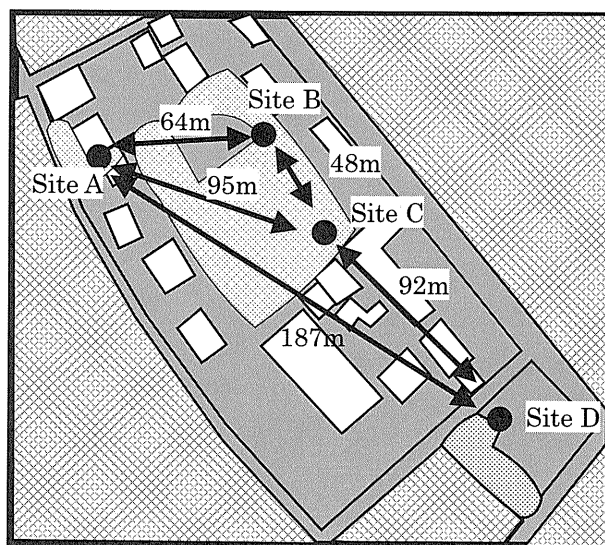


図 2. 石垣島の住宅街に設定した調査地の略図. 4つの採集場所 (A~D) の位置と互いの直線距離を示す.

表 1. 2013 年 3 月 17 日から 27 日に石垣島の調査地で採集された個体数、マーク放逐数、再捕獲数の記録.

日 付	ヒトスジシマカ			オオクロヤブカ		
	採集数	放逐数	再捕獲数	採集数	放逐数	再捕獲数
18 Mar 2013	17	17		19	19	
19 Mar	43	43	1	32	32	0
20 Mar	68	68	9	34	34	3
21 Mar	22	22	6	27	27	2
22 Mar	39	39	8	56	56	5
23 Mar	23	23	8	23	23	2
24 Mar	20	20	9	25	25	3
25 Mar	6	0	1	2	0	0
26 Mar	32	0	2	45	0	3
27 Mar	39	0	4	37	0	2
Total	309	232	48	300	216	20

表 2. マーク放逐されたヒトスジシマカとオオクロヤブカの放逐場所による再捕獲率の違い

採集場所	ヒトスジシマカ			オオクロヤブカ		
	再捕獲数	放逐数	再捕獲率	再捕獲数	放逐数	再捕獲率
Site A	8	54	0.15	0	15	0
Site B	10	25	0.40	2	33	0.06
Site C	26	125	0.21	16	129	0.12
Site D	4	28	0.14	2	40	0.05
Total	48	232	0.21	20	216	0.09

表 3. 4つの採集場所間で観察されたヒトスジシマカとオオクロヤブカの動き

(a) ヒトスジシマカ

放逐場所	再捕獲場所				合 計
	Site A	Site B	Site C	Site D	
Site A	3	2	3	0	8
Site B	0	3	7	0	10
Site C	1	1	23	1	26
Site D	1	0	2	1	4
合 計	5	6	35	2	48

(b) オオクロヤブカ

放逐場所	再捕獲場所				合 計
	Site A	Site B	Site C	Site D	
Site A	0	0	0	0	0
Site B	0	1	1	0	2
Site C	0	1	15	0	16
Site D	0	0	2	0	2
合 計	0	2	18	0	20

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総合研究事業）
分担研究報告書

高感度ウイルスゲノム検出法の検討
およびウエストナイルウイルス NS1 検出系開発のための基盤的研究

研究分担者 田島茂（国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官）

これまでに、PCR プライマーの 5'末端に 12 塩基からなる Flap 配列を付加することにより増幅感度あるいは増幅量が改善されるとの報告がある。昨年度我々はデングウイルス検出用プライマーに Flap を連結したが改善効果は見られなかった。そこで今回 Flap を 2 種類のフラビウイルス共通プライマーセットと 1 種類のアルファウイルス共通プライマーに付加し、その効果を検討した。NS3 領域に対応するフラビウイルス共通プライマーの場合、使用した 3 種類のウイルス（デング 1 型ウイルス、日本脳炎ウイルス、ヨコセウイルス）のすべてで増幅感度および増幅量が向上した。一方 NS5 領域に対応するプライマーではウイルス種によって結果が分かれた。4 種のアルファウイルス（チクングニヤウイルス、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、ゲタウイルス）について、Flap を付加したアルファウイルス共通プライマーを試したところ、いずれのウイルスに対しても Flap は効果的であったが、チクングニヤウイルスでの効果は弱かった。また Flap 付加アルファウイルス共通プライマーを使用して、本来日本脳炎ウイルスとして分離・増幅されたウイルス溶液からゲタウイルスゲノムを増幅した。国内で分離されたゲタウイルスに関する情報は非常に少ないことから、我々の解析結果は非常に貴重な情報を提供するものと思われる（論文投稿中）。

デングウイルス NS1 は患者血清中に大量に分泌されることから、本蛋白質を検出するキットが販売され、診断現場で活躍している。我々はウエストナイルウイルス NS1 検出系開発をめざし、抗 NS1 モノクローナル抗体を作製するための抗原の調製を行った。

A. 研究目的

(1) 節足動物媒介性ウイルスによる感染症は熱帯地方に限らず、世界中の様々な国・地域で毎年多数の患者を発生させている。またこれらの中には、突然流行が発生するものも少なくなく、我々が標的にしているフラビウイルス、アルファウイルスについ

ても同様である。これらの中には患者の症状は類似しているものの原因ウイルスが異なるため、ウイルス特異的な検出方法では見落としてしまう危険性がある。そのような危険性を回避するためには、フラビウイルスゲノムあるいはアルファウイルスゲノムを、ウイルス種を問わずに増幅可能なブ

ライマーが有効である。一方、PCR プライマーの 5'末端側に 12 塩基から成る AT リッチな配列(Flap)を付加することにより、PCR の増幅感度および増幅量が向上するとの報告が 2007 年になされた (Afonina, I. et al., *Biotechniques* 43: 770-774, 2007)。この情報を基に昨年度我々は本配列をデングウイルス検出用プライマーに付加し、その有効性を調べたが、付加することによる改善効果は見られなかった。そこで本年度はすでに報告されている 2 組 (NS1 領域および NS5 領域) のフラビウイルス共通プライマーと 1 組 (nsP1 領域) のアルファウイルス共通プライマーの 5'末端に Flap を付加し、複数のウイルス種のゲノム増幅における本配列の効果を複数のウイルスを用いて調べた。

(2) 以前より我々はブタ血清からの日本脳炎ウイルスの分離を行っている。そのうち、2005 年にブタ血清から分離され Vero 細胞で継代を続けた 1 株が、日本脳炎ウイルスとは明らかに異なる、むしろアルファウイルスに類似したプラークを形成した。そこで前述した Flap 付加アルファウイルス共通プライマーを使用し、アルファウイルスゲノムの存否を調べた。さらに得られた増幅産物の遺伝子解析を行った。

(3) デングウイルス感染症では、ウイルス側の非構造蛋白質の一つである NS1 が急性期の患者血中に大量に存在することから、NS1 を検出する診断キットが複数のメーカーから販売され、今では非常に有効な診断ツールとしてその有用性が確立している。一般にフラビウイルスは哺乳動物細胞に感染すると感染細胞から NS1 を分泌することが知られているが、診断ツールとしては、ウイルス血症レベルが高い症状でないと血

中 NS1 の検出は困難と思われる。一方、ウエストナイル熱ではウイルス血症が観察されるため、NS1 の検出は可能と推測される。実際 2008 年にそのことを示す報告もある (Chung and Diamond, 2008)。そこで今回我々は、ウエストナイルウイルス NS1 検出系の開発を目指し、ウエストナイルウイルス NS1 を認識するモノクローナル抗体を得るための NS1 抗原の大量調製を行った。

B. 研究方法

(1) Flap RT-PCR 法は Afonina らの報告を参考にした。具体的にはフラビウイルス共通 NS3 領域プライマー (Briese et al. 1999) および NS5 プライマー (Kuno et al. 1998) およびアルファウイルス共通プライマー (Pfeffer et al. 1997) の 5'末端側に非ウイルス由来ヌクレオチドを 12 塩基 (5'-AATAAATCATAA-3') 付加した。鋳型にはフラビウイルス代表としてデング 1 型ウイルス(NIID02-20 株)、日本脳炎ウイルス (Mie/41/2002 株) およびヨコセウイルス (Oita-36 株) を、アルファウイルス代表としてチクングニヤウイルス(NRTQ11-01 株)、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルス、およびゲタウイルス (GETV/Kochi/01/2005 株)を使用した。ウイルスゲノム RNA は Vero 細胞に各ウイルスを感染させた後の培養上清より調製した。また RT-PCR は SYBR Green I を用いた方法によりおこなった。

(2) 結果的にゲタウイルスが検出された Kochi/01/2005 株はもともと分離された日本脳炎ウイルスが増幅されているものとして得られたものである。決定されたゲタウイルス配列は分子系統学的解析に使用した。

比較解析に用いた他のゲタウイルス配列は GenBank データベースよりピックアップしてきた。また一部の配列は論文より直接引用した (Wekesa et al. 2001)。

(3) ウェストナイルウイルス NS1 遺伝子は NY99 株のものを使用した。RT-PCR で NS1 領域を増幅後、タンパク質精製時のタグとなる Flag ペプチドコード配列を連結して哺乳動物細胞発現ベクターである pCAGCS に導入した。こうして得られた NS1 発現プラスミドを 293T 細胞に導入し、72 時間後培養上清を回収した。培養上清を 3xFlag アフィニティーカラムに供し、Flag が結合している NS1 蛋白を精製した。

C. 研究結果

(1) はじめに、AT リッチな 12 塩基からなる Flap 配列をフラビウイルス共通 NS3 領域プライマーの両方に付加し、デング 1 型ウイルス、日本脳炎ウイルスおよびヨコセウイルスゲノム RNA を鋳型として RT-PCR 反応を行った。3 種類すべてのウイルスにおいて、通常のプライマーを用いた場合に比べ Flap 付加プライマーでの増幅量が上昇した。その傾向はヨコセウイルスで顕著であり、増幅量のみならず検出感度においても大幅な改善がみられた。

次に Flap 配列をフラビウイルス共通 NS5 領域プライマーの両方に付加し同様に検討した。結果はウイルスごとに異なっていた。デング 1 型ウイルスでは Flap により増幅量が増加したものの、日本脳炎ウイルスやヨコセウイルスでは変化なしかむしろ減少傾向であった。次にアルファウイルス共通 nsP1 プライマーに付加したときの効果を 4 種のウイルスを使用して調べた。またこの

際、フォワードプライマーは 2 種類を使用した。ゲタウイルス、シンドビスウイルス、ベネズエラ馬脳炎ウイルスを用いた場合、長断片増幅用のフォワードプライマーに付加すると増幅量および検出感度が顕著に改善された。一方短断片用では長断片に比べ効果が弱いもしくはほとんど効果はみられなかった。チクングニヤウイルスの場合も長断片用プライマーでのみ効果がみられたが、他の 3 種のアルファウイルスに比べ改善効果が低かった。

(2) 2005 年に高知県のブタ血清から分離された日本脳炎ウイルス遺伝子型 1 型株である Kochi/01/2005 株を Vero 細胞を用いて 4~5 継代したところ、他の日本脳炎ウイルス 1 型株とは明らかに形態の異なるプラークを形成した。また日本脳炎ウイルス特異的プライマーを用いてウイルスゲノムを増幅したが、プラーク数から算出した感染力価とは異常にかけ離れたコピー数であった。プラークの形態がアルファウイルスのものに類似していたことから、上記のアルファウイルス共通 Flap 付加プライマー等で増幅をこころみたところ、はっきりとした増幅断片が得られた。この断片の塩基配列を決定したところ、ゲタウイルスの Jin-Ju 株と最も高い相同性を示した。これにより本ウイルス溶液にはゲタウイルスが混入していることが明らかとなった (GETV/Kochi/01/2005)。次にゲノム全長の塩基配列を決定し、他のゲタウイルスと比較した。すでに完全長の明らかになっているゲタウイルス 8 株の中では、モンゴルで分離された LEIV17741 株と最も高い相同性を示した。日本で分離されたゲタウイルスの 1 種であるサギヤマウイルスとは異なって