

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プ

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) ウエ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

いた。また部分的 nsP1 領域や E2 領域で比べた際にも類似した結果が得られた。GenBank には登録されていないものの、部分的に塩基配列が決定されている株が 7 株 (1960 年代 1 株、1970 年代 3 株、1980 年代 3 株) 見つかった (Wekesa et al. 2001)。これらの配列も含めて部分的 nsP1 配列の分子系統樹解析を行ったところ、70~80 年代の株と今回の株が比較的近縁であることがわかった。継代過程で、Kochi/01/2005 液に含まれるゲタウイルスと日本脳炎ウイルスがどのように変化してきたかを調べるため、2 継代目から 5 継代目までのウイルス液についてリアルタイム RT-PCR 法でウイルスゲノム数を、プラーク形成法により感染力価を調べた。継代が進むにつれて日本脳炎ウイルスゲノム数が顕著に減少するのに対し、ゲタウイルスゲノム数は増加傾向にあった。また感染力価はゲタウイルスではやはり増加傾向が見られたが、日本脳炎ウイルスは 3 継代目までは測定できたが、それ以降ではプラークが検出されなかった。以上より、Kochi/01/2005 には日本脳炎ウイルスとゲタウイルスの両方が混ざっており、継代により日本脳炎ウイルスが排除される傾向にあることがわかった。また両ウイルスがブタに接種される生ワクチン株とは異なることも確認した。

(3) ウエストナイルウイルス NS1 cDNA と Flag 配列を組み込んだ pCAGCS を 293T 細胞にトランスフェクトし、72 時間後の上清を回収した。上清より 3xFlag アフィニティーカラムにより NS1 を精製した。精製後に抗 Flag 抗体により発現を確認した。現在精製産物を蓄積させており、近いうちにマウスへの免疫ができるよう予定を立てている。

D. 考察

(1) 迅速かつ高感度な病原体検出法は、血液製剤の安全性確保と安定供給のために非常に有用である。本年度は昨年に続き、現行の RT-PCR 法をさらに高感度にする可能性のある Flap RT-PCR 法を試みた。昨年は Dengue ウイルス特異的プライマーに適用したが効果が認められなかった。そこで今回は幅広いウイルスを検知可能である共通プライマーに焦点を絞り、Flap 配列の有効性を検討した。フラビウイルス、アルファウイルス合わせて 3 種類のプライマーセットに適用したが、すべてにおいて改善効果が確認された。しかし改善効果は同じ属のウイルスであっても異なる場合もあった。フラビウイルス共通プライマーについては、NS3 領域を標的にしたものでは今回使用した 3 種のフラビウイルスのいずれにおいても改善効果がみられたが、NS5 領域のものでは、1 種では効果的であったが他の 2 種では変化なしかむしろ悪化した。アルファウイルス共通プライマーについてもウイルス種によって効果があるもの、ほとんどないものと分かれた。このように Flap 配列の効果は同じプライマーでも標的のウイルス種によって結果が異なることが明らかとなった。今後今回の共通プライマーを用いる際には、「Flap あり」と「Flap なし」の両方を用いるのが良いかと思う。

(2) 今回の実験で、これまで日本脳炎ウイルス液と認識していた Kochi/01/2005 が、すでに日本脳炎ウイルスはマイノリティーであり、ゲタウイルスがマジョリティーであることが明らかとなった。両ウイルスの遺伝子配列から、これらのウイルスは生ワクチン

に由来するものでなく、各々これまでに報告のない株であることが確認された。よって、ブタ血清より日本脳炎ウイルスを分離する際、そのブタが日本脳炎ウイルスとゲタウイルスに共感染していた可能性が高い。ゲタウイルスは日本脳炎ウイルスと非常に似た感染サイクルを有し、また過去にブタ血清から分離された事例もある。ブタ血清から日本脳炎ウイルスを分離する際、細胞変性効果と遺伝子検出だけで日本脳炎ウイルスと判断するのは危険であることがわかった。今後はプラーク形態や、アルファウイルス共通プライマーによるアルファウイルス存否の確認が必要であろう。

(3) これまでに哺乳動物培養細胞からのウエストナイルウイルス NS1 の発現と分泌を確認し、その培養上清から NS1 を分離精製することが可能であることを示してきた。今後精製した NS1 を用いてモノクローナル抗体の作製、さらには検出系の開発と進めていきたいと考えている。

E . 結論

(1) Flap 配列をフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーに連結することにより検出感度および増幅量が改善される例が多く見出された。

(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溶液にゲタウイルスも存在することが確認された。このウイルスの完全長ゲノムの塩基配列を決定し、分子系統学的解析を行った（論文投稿中）。

(3) ウエストナイルウイルス感染症の診断ツール開発のため、同ウイルスの NS1 の大量調製を行った。

F . 健康危険情報

特になし

G . 研究発表

論文発表（英文）

1. Tajima, S., Kotaki, A., Yagasaki, K., Taniwaki, T., Moi, M.L., Nakayama, E., Saijo, M., Kurane, I., and Takasaki, T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getahvirs propagated from a single porcine serum sample: a case of coinfection (submitted).

日本語総説

1. 白鳥（田島）茂、高崎智彦。「わが国と世界の日本脳炎の現状と問題点」小児内科予防接種 Q&A 改訂第 3 版 第 45 巻増刊号 432 - 437、2013 .

学会発表

国内学会

1. 田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、小林大介、谷脇妙、沢辺京子、高崎智彦 . Flap 配列を付加したフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーの評価とゲタウイルス検出の実例について . 第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、神戸、2013 年 11 月

2. 田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、林昌宏、西條政幸、高崎智彦 . 製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析 . 第 61 回日本ウイルス学会 学術集会、神戸、2013 年 11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし.

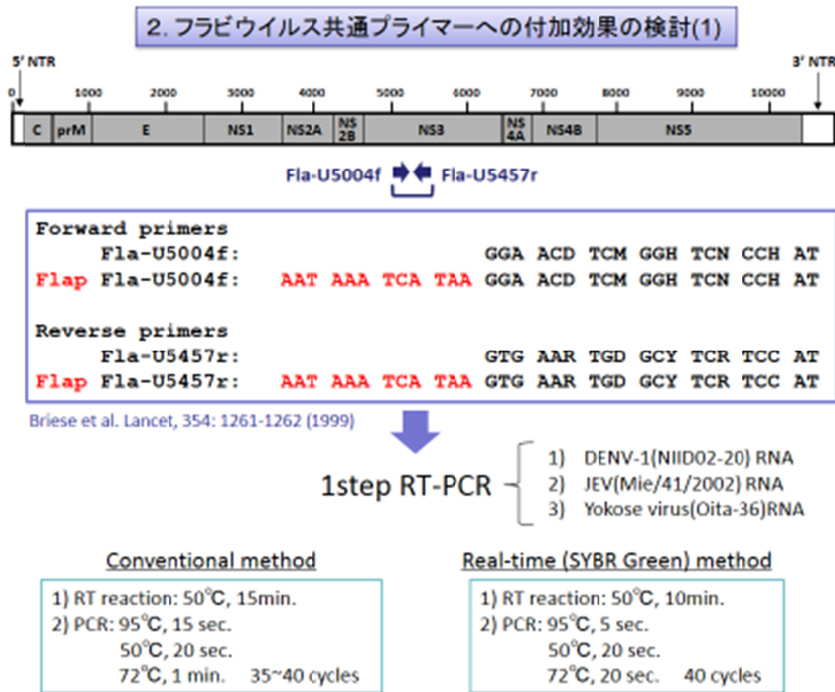


図1 フラビウイルス共通 NS3 プライマーへの Flap 配列付加

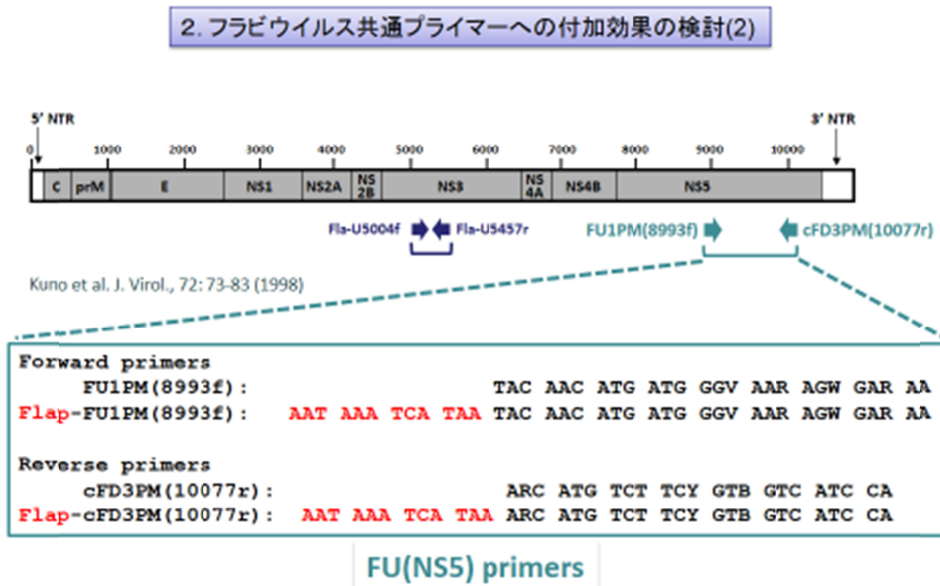


図2 フラビウイルス共通 NS5 プライマーへの Flap 配列付加

Summary
(Flavivirus-consensus primer sets)

	NS3	Flap-NS3	NS5	Flap-NS5
Dengue type 1 virus	++	+++	++	+++
Japanese encephalitis virus	++	+++	++	+
Yokose virus	±	++	++	++ or +

図3 (表) Flap 配列付加フラビウイルス共通プライマーの検討結果

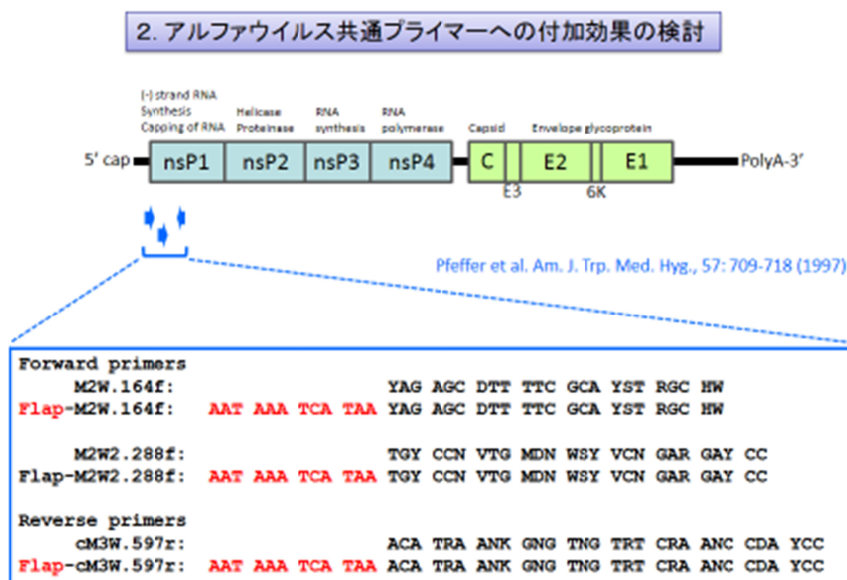


図4 アルファウイルス共通プライマーへの Flap 配列付加

Summary
(Alphavirus-consensus nsP1 primer set)

	L	Flap-L	C	S	Flap-S
GETV	+	+++	+++	++	++
SINV	+	+++	+++	+	++
VEEV	+	+++	+++	+	++
CHIKV	+	++	++	++	++

Effect of the flap sequence on RT-PCR may depend on the nucleotide sequence of the template RNA

図5 (表) Flap 配列付加アルファウイルス共通プライマーの検討結果

Phylogenetic analysis of getah viruses (1)

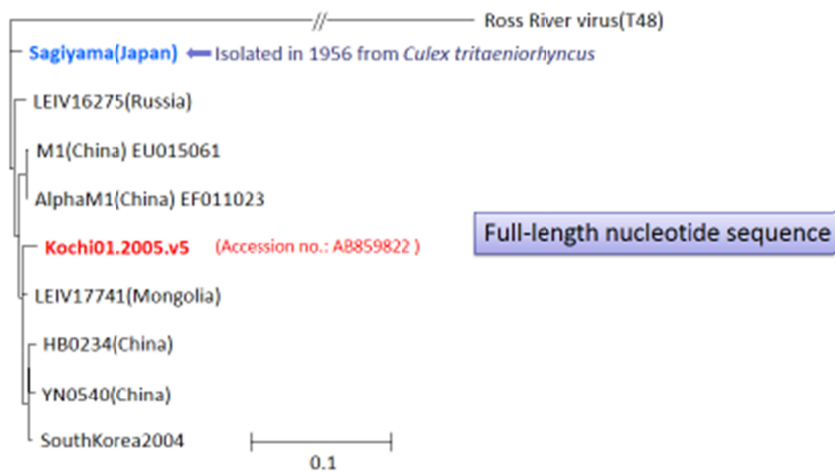
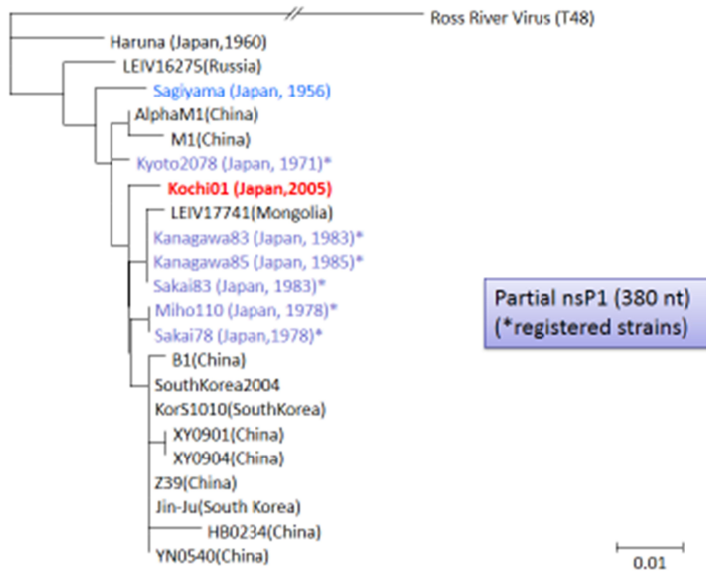


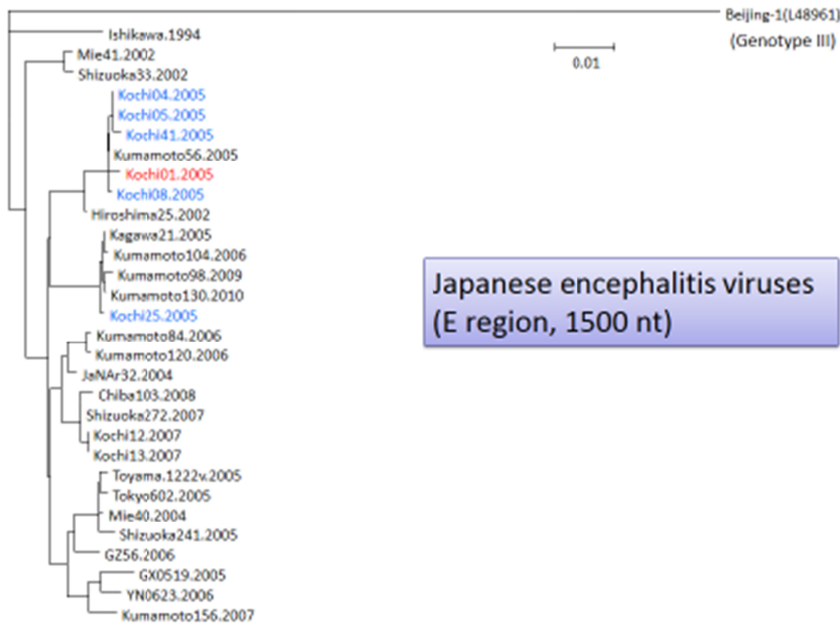
図6 GETV/Kochi/01/2005 の完全長配列を使用した分子系統樹解析

Phylogenetic analyses of getah viruses (4)



*Wekesa et al., Veterinary Microbiology 83: 137-146 (2001)

図7 GETV/Kochi/01/2005 の部分的 nsP1 配列を使用した分子系統樹解析



No JEV strain with nucleotide sequence identical to JEV/Kochi/01/2005 was found

図8 JEV/Kochi/01/2005 の E 領域配列を使用した分子系統樹解析

The relative amount of viral genome in 2 times- to 5 times-passaged Kochi/01/2005

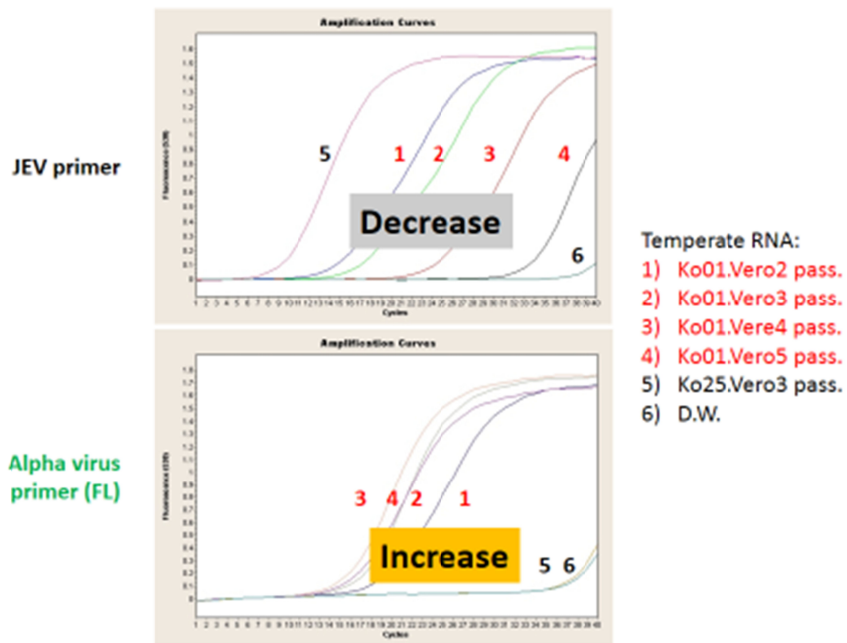


図9 各継代数の Kochi/01/2005 の JEV および GETV ゲノムコピー相対数の変化

ウエストナイルウイルスNS1蛋白質の発現と精製

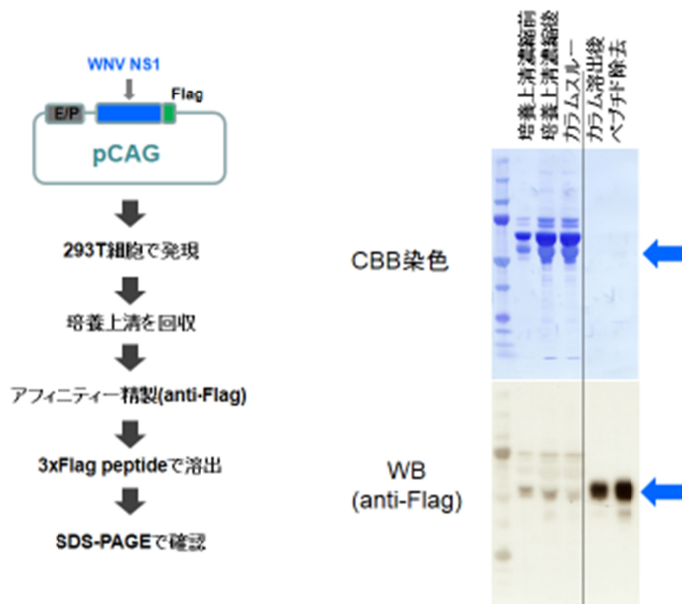


図10 ウエストナイルウイルス NS1 の発現と精製