

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業  
（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業））

分担研究報告書

「ウイルス性出血熱の検査に関する研究」

研究分担者 西條政幸 国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究協力者 福士秀悦，谷口怜，谷英樹，吉河智城，下島昌幸 国立感染症研究所第一部

研究要旨：2014年，西アフリカ地域でエボラ出血熱が制御できずに流行拡大した。2015年2月現在，流行は終息のめどが付いていない。西アフリカで流行しているエボラウイルス「西アフリカ型」は分子系統上ザイールエボラウイルスに近縁であるものの，ザイールエボラウイルスそのものとは塩基配列の違いがある。本研究では，これまで国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー，プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した。塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用プライマーは「西アフリカ型」を検出できると考えられた。一方，L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマー，プローブにいくつかの塩基配列の違いが認められた。「西アフリカ型」に完全に一致した配列のプローブを用いたリアルタイム PCR と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR は同等の感度で「西アフリカ型」を検出可能であった。これらの結果から，従来のコンベンショナル PCR，リアルタイム PCR の両方で行うエボラウイルス検査で「西アフリカ型」の検出に対応できると考えられた。

A. 研究目的

2014年，西アフリカ地域でエボラ出血熱が制御できずに流行拡大した WHO の発表（2015年1月14日付け）によると西アフリカ3カ国（ギニア，リベリア，シエラレオネ）ではエボラウイルス感染疑い例を含めて累積患者数が21,296人（うち死亡者8,429人）に達している。西アフリカで流行しているエボラウイルス「西アフリカ型」は分子系統上ザイールエボラウイルスに近縁であるものの，ザイールエボラウイルスそのものとは塩基配列の違いがある（*N Engl J Med.* 2014;371(15):1418-1425）。これまで国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス

検出用 PCR プライマー，プローブはすべてのエボラウイルス株を検出できるようにデザインされている（図1および図2）。しかし，これらは「西アフリカ型」が流行する以前に設計されたものである。本研究では，エボラウイルス検出用 PCR プライマー，プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した。

B. 研究方法

1) 西アフリカで流行しているエボラウイルス塩基配列を入手し，現在，国立感染症研究所で使用されているエボラウイルス検出用プライマー，プローブとアライメ

ントを行った。

- 2) 「西アフリカ型」の L 遺伝子のリアルタイム PCR 領域を合成し,リアルタイム PCR 検討用鋳型 DNA スタンダードとした。
- 3) 「西アフリカ型」に完全に一致する配列の蛍光プローブ (5' CCGAAATCATCACTTGTGTG GTGCCA-3') を作製し,リアルタイム PCR に用いた。

#### C. 研究結果

- 1) 塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用 1st プライマーは混合塩基 D (G or A or T), Y (T or C) を含み, 2<sup>nd</sup> プライマーも同様に混合塩基 Y (T or C), R (G or A) を含んでいるため,「西アフリカ型」にみられる塩基配列の変異に対応できると考えられた (図 3 および 図 4)。
- 2) 塩基配列の比較から L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマーのうち, Forward プライマー F1lo-A2-4 は「西アフリカ型」に完全に一致し, Reverse プライマー F1li-B は 5' 側に 2 塩基のミスマッチがあることが判った (図 5)。一方, FAM-EBOSud は完全には一致していないもののイノシンを導入しているため,「西アフリカ型」を検出可能であると考えられた (図 6)。
- 3) 蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR 法はプローブのミスマッチが検出感度を低下させる大きな要因となりうる。そこで,「西アフリカ型」に完全に一致する配列の蛍光プローブ (5' CCGAAATCATCACTTGTGTG GTGCCA-3') を作製し,リアルタイム PCR に用いた。西アフリカ型プローブを用いたリアルタイム PCR により「西アフリカ型」が検出可能であり,その感度は従来のプローブを用いたリアルタイム PCR と同等であったことから,この結果から,従来のプローブを用いても感度の低下することなく

「西アフリカ型」を検出できると考えられた (図 7)。

#### D. 考察

これまで国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー, プローブが「西アフリカ型」に対応できるかどうか検討した。塩基配列の比較から NP 遺伝子をターゲットにしたコンベンショナル PCR 用プライマーは「西アフリカ型」を検出できると考えられた (図 3 および 4)。一方, L 遺伝子をターゲットにしたリアルタイム PCR 用プライマー, プローブにいくつかの塩基配列の違いが認められた (図 5 および 6)。「西アフリカ型」に完全に一致した配列のプローブを用いたリアルタイム PCR と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR は同等の感度で「西アフリカ型」を検出可能であった (図 7)。これらの結果から,従来のコンベンショナル PCR,リアルタイム PCR の両方で行うエボラウイルス検査で「西アフリカ型」の検出に対応できると考えられた。リアルタイム PCR 用のプローブのうち, Reverse プライマーの 5' 側に 2 塩基のミスマッチが見られた。一般的にプライマーの 5' 側のミスマッチは PCR に影響を及ぼすことは少ないと考えられるが,これが「西アフリカ型」の検出感度に影響を及ぼすかどうか,今後詳細な検討が必要である。

#### E. 結論

国立感染症研究所で整備されてきたエボラウイルス検出用 PCR プライマー, プローブによって「西アフリカ型」エボラウイルスを検出できることが確認された。

#### F. 健康危険情報

2014 年から 2015 年にかけて西アフリカにおいてかつてない規模のエボラ出血熱が流行した。米国および英国ではエボラ出血熱の輸入感染事例が発生し,米国では輸入感染患

者が入院治療を受けた病院内で医療従事者の院内感染が発生した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9):3325-3333, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 福間藍子, 福士秀悦, 吉河智城, 鈴木忠樹, 谷英樹, 谷口怜, 下島昌幸, 西條政幸. SFTS

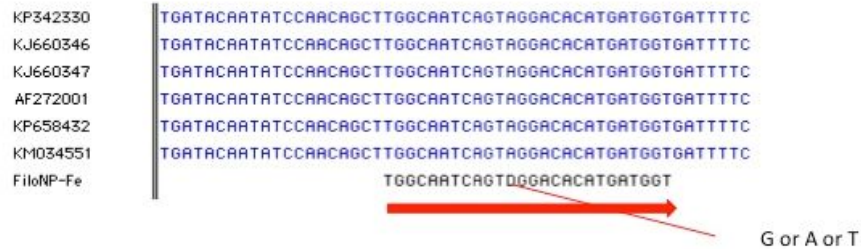
ウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出ELISAへの応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11)

- 2) 西條政幸, 吉河智城, 福士秀悦, 谷英樹, 福間藍子, 谷口怜, 須田遊人, Harpal Singh, 前田健, 高橋徹, 森川茂, 下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11) ..
- 3) Fukuma A, Fukushi S, Taniguchi S, Tani H, Yoshikawa T, Suzuki T, Hasegawa H, Saijo M, Shimojima M. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



FiloNP-Fe



FiloNP-Re

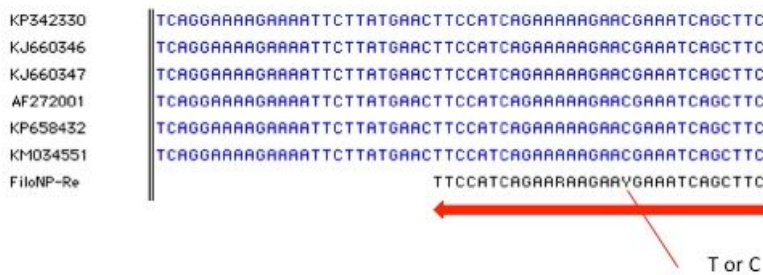


図 3 . NP 遺伝子を標的にしたコンベンショナル PCR 用 1st プライマーのエボラウイルス西  
アフリカ株への相同性 .

Sudan Zaire 2<sup>nd</sup> F1



Sudan Zaire 2<sup>nd</sup> R1

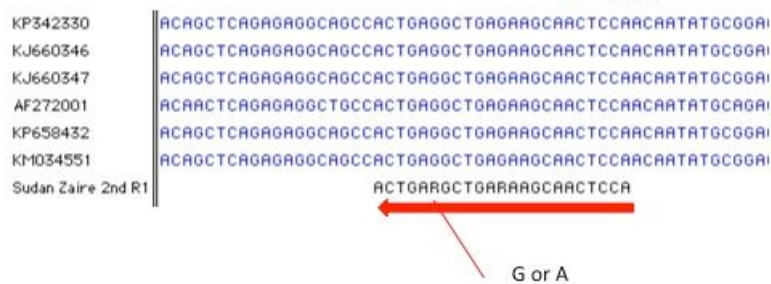


図 4 . NP 遺伝子を標的にしたコンベンショナル PCR 用 2ndPCR におけるプライマーのエボラ  
ウイルス西アフリカ株への相同性 .

Filo-A2\_4, Filo-A2\_3, Filo-A2-2

```

KP342330 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660346 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660347 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
AF272001 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KP658432 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KM034551 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
Filo-A2_4 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_3 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_2 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
    
```

Filo-B, FiloB-BI

```

KP342330 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660346 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660347 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
AF272001 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KP658432 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KM034551 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
Filo-B | CATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCAT
Filo-B-BI primer | CATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCAT
    
```

図5. L 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR 用プライマーにおける Forward プライマー Filo-A2-4 と Reverse プライマー Filo-B の西アフリカ型エボラウイルスの遺伝子標的部位との相同性. Forward プライマー Filo-A2-4 は「西アフリカ型」に完全に一致し, Reverse プライマー Filo-B は 5' 側に 2 塩基のミスマッチが認められる.

Filo-A2\_4, Filo-A2\_3, Filo-A2-2

```

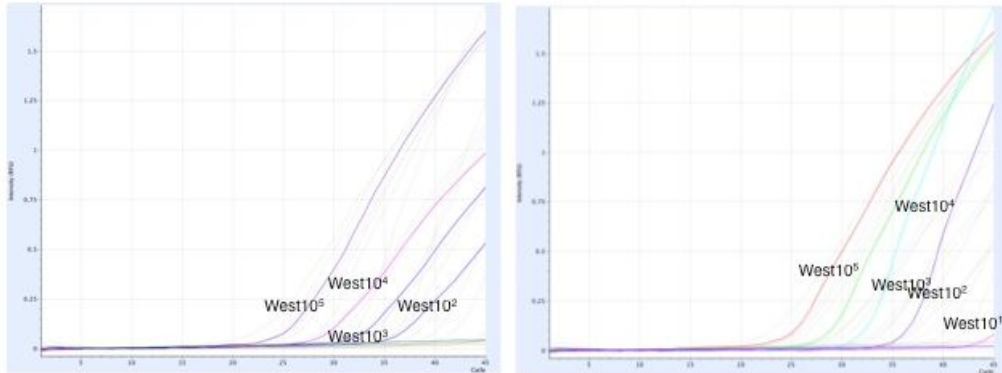
KP342330 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660346 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KJ660347 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
AF272001 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KP658432 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
KM034551 | CTGATGGTCTTGCTAARGCATTTCCTAGCAATATGATGGTAGTTACGGARCGTGA
Filo-A2_4 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_3 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
Filo-A2_2 | ARGCAATTCCTAGCAATATGATGGT
    
```

Filo-B, FiloB-BI

```

KP342330 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660346 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KJ660347 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
AF272001 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KP658432 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
KM034551 | TCCCACAGTGTTATATGCATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCATACCTCACACT
Filo-B | CATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCAT
Filo-B-BI primer | CATGTCAGTGATTATTATATCCACCSCAT
    
```

図6. L 遺伝子を標的にしたリアルタイム PCR 用プライマーにおけるプローブ FAM-EBOSud の標的遺伝配列との相同性. 「西アフリカ型」を検出可能であると考えられる.



鋳型DNA: 西アフリカ型エボラウイルス L遺伝子		
	従来のプローブ	西アフリカ型プローブ
10 <sup>5</sup>	25.61722027	24.94538461
10 <sup>4</sup>	30.39735545	28.35831422
10 <sup>3</sup>	33.88288273	31.47739283
10 <sup>2</sup>	37.8660777	35.65336026
10 <sup>1</sup>	ND	ND
10 <sup>0</sup>	ND	ND

図7. 定量的リアルタイム RT-PCR において、西アフリカ型プローブを用いた場合と従来のプローブを用いたリアルタイム PCR における検出限界の比較。従来のプローブを用いても感度の低下することなく「西アフリカ型」を検出できると考えられた。

