

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政策研究事業  
分担研究報告書

日本脳炎ウイルス・ウエストナイルウイルス共通遺伝子高感度検出法の開発と評価

高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

田島 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究要旨：2009年に中国で、2010年に韓国で日本脳炎ウイルス遺伝子5型ウイルスが検出された。現在国内では日本脳炎ウイルス血清型群のウイルス遺伝子検査法は、日本脳炎ウイルス、型およびウエストナイルウイルスに対するリアルタイム RT-PCR（TaqMan法）が使われており、日本脳炎ウイルスV型には対応していない。そこで、今年度は日本脳炎ウイルス遺伝子～型に対応し、かつウエストナイルウイルスにも対応できるTaqMan系を開発した。

#### A. 研究目的

わが国では1990年代前半に、日本脳炎ウイルスの遺伝子型が型から型にシフトした歴史がある。ここ数年、韓国では日本脳炎ウイルス遺伝子型ウイルスの蚊からの検出が目立っていることから、わが国でも型から型へのシフトに備えておく必要がある。血液製剤及び献血血液の検査ではより広範囲に検出できる系が望まれることから日本脳炎ウイルスおよびウエストナイルウイルスを共通で検出できる系を開発することを目的とした。

#### B. 研究方法

リアルタイム RT-PCRによるJEVゲノム検出のための鋳型には、I型株としてHiroshima/46/1998株、Mie/41/2002株、Mie/51/2005株を、III型株としてJaTH160株、JaTAn1/75株、JaTAn1/90株を、V型株

としてMuar株およびE領域組換えJEV rJEV-E<sup>XZ0934</sup>-M41株を使用した。またGenBankから日本脳炎ウイルス、、、型遺伝子配列情報を取得し、の塩基配列を収集し、ウエストナイルウイルスも検出できる配列のプライマーおよびプローブを設計した。PrimersはJENS5s269とJENS5r330で、ProbeはJENS5p294である（表1）。

日本脳炎ウイルスの検出感度の評価は、型3株、型3株、型2株を用いて評価した。ウエストナイルウイルスの検出の評価は、NY99株（Lineage 1a）、Eg101株（Lineage 1a）、g2266株（Lineage 1c）、FCG株（Lineage 2）を用いて評価した。

#### C. 研究結果

日本脳炎ウイルスの検出感度は、目標としたct値20～25の範囲内に入り、十分な

感度を示した。一方ウエストナイルウイルスに関しては、NY99 株と Eg101 株は、日本脳炎ウイルス群と同等の感度を示したが、Lineage 1c に分類される g2266 株は ct=36.8、Lineage 2 に分類される FCG 株は ct=29.9 と感度はやや低かった。

#### D. 考 察

日本脳炎、ウエストナイル熱/脳炎の患者あるいは不顕性感染者では血液中のウイルスが少なく感染蚊が成立することはない。しかし、輸血や血液製剤においては感染細胞がヒトの体内でしばらく生存することから、感染リスクは高い。今回作製した遺伝子検出系は、日本脳炎の5つの遺伝子型を検出できるだけでなく、現在世界で流行している Lineage 1a に属するウエストナイルウイルス株は、日本脳炎ウイルスと同程度の感度で検出できた。感度がやや劣るが Lineage 2 のウエストナイルウイルスも検出可能である。日本脳炎ウイルス遺伝子 ~ 型に対応し、かつウエストナイルウイルスにも対応できるリアルタイム RT-PCR 系を用いることで血液およびその関連製剤

のスクリーニングをより効率化できると考えられる。

#### E. 結 論

新たに設計した TaqMan プライマーを用いることにより、GI、GIII 株に加え、現行の検出系では検出不可能であった GV 株のゲノムも増幅可能となった。また配列の相同性から、今回調べていない GII、GIV 株にも対応可能と考えられる。

一方、今回設計した検出系ではいくつかの lineage のウエストナイルウイルスゲノムも増幅可能なことが明らかとなった。

#### F . 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G . 研究発表

- 1 . 学会発表  
関連するものなし
- 2 . 論文発表  
関連するものなし

表1 プライマー&プローブセット

リアルタイム逆転写-PCR (TaqMan) 法 ; 遺伝子 1 型・3 型共通検出用(NS5)

GIGIIIGV common	プライマー	増幅領域 : NS1
	JENS5s269 GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA JENS5r330 TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG	
	プローブ	
	JENS5p294 FAM-CTG CCT GCG TCT CA-MGB	

表 2

		Ct value
GI	Hiroshima/46/1998	21.6
	Mie/41/2002	20.5
	Mie/51/2005	23.2
GIII	JaTH160	24.8
	JaTAn1/75	22.7
	JaTAn1/90	21.7
GV (E)	Muar	20.2
	rJEV-EXZ0934-M41	21.3
D1-4, CHIK		ND
WNV(NY99)		23.9
ZKV		ND

ND : 検出されない

