

バイオテロに使用される可能性のある病原体等の新規検出法の確立，  
及び細胞培養痘そうワクチンの有効性，安全性に関する研究

分担報告書

蚊媒介性ウイルスの鑑別検査法の開発：  
アルファウイルスに属する馬脳炎ウイルスの遺伝子検出法の開発

所 属 国立感染症研究所ウイルス第一部  
研究分担者 田島茂

研究要旨：ベネズエラ馬脳炎，東部馬脳炎，西部馬脳炎はそれぞれ，ベネズエラ馬脳炎ウイルス，東部馬脳炎ウイルス，西部馬脳炎ウイルスにより引き起こされる蚊媒介性感染症であり，致死率は 5-35%と推定されている．これらのウイルスはいずれもトガウイルス科アルファウイルス属に属し，アメリカ大陸でのみ生息が確認されている．これらの感染症に対するワクチンはすでに存在するが，一般には使用されていない．これらのウイルスはエアロゾル化しても感染力を維持していることが知られており，またベネズエラ馬脳炎ウイルスは米国において生物兵器として研究されていたとされる．このような性状を有するウイルスであることから，バイオテロなどに利用される可能性も否定できない．そこで本年度はこれらのウイルスを高感度に検出する系の確立を目指した．2010 年以降に報告された論文を参考に，これらのウイルスゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 用プライマーおよびプローブを作製した．ウイルス粒子から精製したウイルスゲノムを陽性コントロールとしてゲノムの増幅性および特異性を検討した．各々のプライマー・プローブセットが特異的に標的遺伝子を増幅することができた．これより，新たに作製したプライマー・プローブセットが適切に機能することが確認された．

研究協力者

氏名・所属研究機関名・職名

藤間大貴・国立感染症研究所・研究生

A. 研究目的

ベネズエラ馬脳炎，東部馬脳炎，西部馬脳炎はそれぞれ，ベネズエラ馬脳炎ウイルス，東部馬脳炎ウイルス，西部馬脳炎ウイルスにより引き起こされる蚊媒介性感染症である．

ベネズエラ馬脳炎ウイルス（VEEV）は北～南米大陸に広く分布しており，通常はイエカとげっ歯類の間で感染環が維持されて，ヒトやウマは終宿主に当たる．ヒトが感染した場合の発症率は高いとされるが，その多くが発熱等の急性熱性疾患であり，脳炎にまで至るのは 5%以下とされる．脳炎患者の致死率は 20%前後であるが，小児で高くなる傾向がある．ベネズエラ馬脳炎に対しては生ワクチンと不活化ワクチンが存在するが，一般には使用されていない．ウイルスには I-VI 型のサブタイプがあり，I 型にはさらに 5 亜種に分類される．ヒトへの強い病原性を示すのは IAB 型と IC 型の 2 亜種である．1995

年にはコロンビアとベネズエラで大きな流行があり，約 3000 人が神経症状を呈しうち約 300 人が死亡した．

東部馬脳炎ウイルス（WEEV）は米国のミシシッピ川以東で主に患者が発生するが，カナダの東部州やメキシコでもウイルスが確認されている．米国での患者数は年間数例から多くても 20 例程度である．通常は蚊と鳥との間で感染環を形成している．ヒトが感染してもほとんどが不顕性であるが，脳炎を発症した場合の致死率は約 35%と高い．東部馬脳炎に対する不活化ワクチンがあるが，一般には使用されていない．

西部馬脳炎ウイルス（WEEV）は米国の中央部から西部，カナダ西部やアルゼンチンにまで分布している．通常はイエカと鳥で感染環を形成している．東部馬脳炎と同様不顕性感染率が高いとされる．脳炎を発症した場合の致死率は 5~15%である．西部馬脳炎に対する不活化ワクチンがあるが，やはり一般には使用されていない．

上記 3 種のウイルスはエアロゾル化しても感

染力を維持していることが知られている。またベネズエラ馬脳炎ウイルスは米国において生物兵器として研究されていた経緯もある。そこで本研究では、これらのウイルスが何らかの原因により拡散した場合に迅速に同定できるよう、高感度の遺伝子検出系の確立を目指した。

## B. 研究方法

遺伝子検出系は、他のウイルス検出など広範囲で使用され、信頼度も高い TaqMan 系で構成することとした。また、比較的最近（2010 年以降）に発表された論文を基に、プライマーおよびプローブを作製した（VEEV: Qian et al. Chin. J. Virol. 31: 107-113, 2015, WEEV および EEEV: Kang et al. Virology J. 7: 284, 2010）。本研究で使用したプライマー・プローブを表 1 に示す。陽性コントロール用のウイルス RNA は所属研究室で保有する株から抽出・精製したものを使用した（VEEV: TC-83/P1, WEEV および EEEV については株名不明）。ワンステップリアルタイム RT-PCR 反応には東洋紡のキット RNA-direct Realtime PCR Master Mix を使用した。反応条件はキットの推奨プロトコルに従った。ゲノムの複製・検出・解析は StepOne Plus (Thermo 社) を使用した。

### 【倫理面への配慮】

倫理面に配慮する状況なし

## C. 研究結果

上述の論文を参考にして、VEEV, WEEV, および EEEV ゲノム検出用プライマーおよびプローブを作製した。これらと、鋳型用ウイルスゲノム RNA を使用して増幅可能か調べた(図 1)。特異性を確認するために、標的 RNA でない他の 2 種類についても同時に反応を行った。VEEV セットでは VEEV RNA に対して特異的な増幅が確認された。またわずかだが EEEV に対しても反応がみられた。WEEV セットでは WEEV RNA

に対して特異的な増幅が確認され、一方他の 2 種類の RNA には反応しなかった。EEEV セットでは EEEV RNA に対して特異的な増幅が確認された。一方他の 2 種類の RNA には反応しなかった。

## D. 考察

今回 VEEV, WEEV, EEEV のゲノム検出用 TaqMan 系を構築した。3 種類ともに標的 RNA を特異的に増幅できることが確認できた。ただし、今回鋳型として用いた RNA はそのコピー数は不明であり、今回構築した系がどの程度の検出感度であるのかは不明である。今後は合成 RNA を作製して検出限界コピー数を明らかにすることにより、これらの系の能力を明確にする必要がある。

## E. 結論

VEEV, WEEV, EEEV のゲノム検出用 TaqMan 系を構築し、これらが各標的 RNA を特異的に増幅できることを確認した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

1. 論文発表  
特になし
2. 学会発表  
特になし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

表1 本研究で使用したプライマー・プローブセット

Virus	Primer	Probe	Length
VEEV	VEE-F: CAG TTT GAG GTA GAA GC	VEEV-Probe: FAM-AGC AGG TCA CNG AYA AYG ACC ATG C-TAMRA	113
	VEE-R: ATC GTV TCG GAT GGD TC		
WEEV	WEE-F: AGG GAT ACC CCC GAA GGT T	WEE-Probe: FAM-CTT TCG AAT GTC ACG TTC CCA TGC G-TAMRA	103
	WEE-R: GTG AAT AGC ACA CGG GTG GTT		
EEEV	EEE-F: TGT GCG TAC CTC CTC ATC GTT	EEE-Probe: HEX-AGC AGC CTA CCT TTC CGA CAA TGG TTG TC-TAMRA	80
	EEE-R: GAC TGG CGT GAA TCT CTG CTT		

Probe set	VEEV genome (TC-83/P1)	EEEV genome	WEEV genome
VEEV 140pFT	22 . 7	ND (35 . 8)	ND
EEEV 364pFT	ND	15 . 3	ND
WEEV 8274pFT	ND	ND	26 . 7

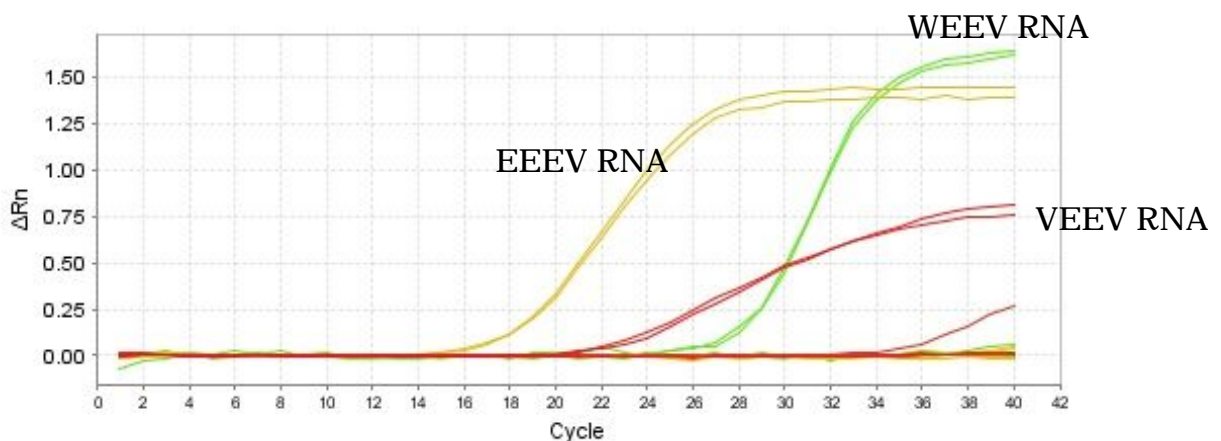


図1 ウィルスゲノムを用いた Taqman 法の検出結果

平成 28 年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）