

平成 26 年度～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)

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：

ウエストナイルウイルスおよびアルファウイルス属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：近年熱帯亜熱帯地域を中心にデングウイルスやジカウイルス，チクングニアウイルスなどの蚊媒介性ウイルスが猛威をふるっている．デングウイルスやジカウイルスと同じフラビウイルス属に属するウエストナイルウイルスは，今なお米国で毎年流行しており，ウエストナイルウイルス感染症患者数は年間千人を超えている．ウエストナイルウイルス感染症に対する人用のワクチンおよび薬剤は存在しない．一方，チクングニアウイルスと同じアルファウイルス属に属するベネズエラ馬脳炎ウイルス，東部馬脳炎ウイルス，および西部馬脳炎ウイルスはヒトに対しても重篤な脳炎を引き起こす．これらのウイルス性疾患に対する薬剤も存在せず，ワクチンは一般には使用されていない．本研究では上記 4 種類のウイルスに対する高感度検出法の開発を行った．従来使用されてきたウエストナイルゲノム検出法では，すべての lineage には対応できなかったが，今回新たに作製したものはすべての lineage を高感度に検出可能なことが明らかとなった．アルファウイルス属馬脳炎ウイルスそれぞれに対する特異的遺伝子検出系を今回初めて構築し，それらが特異的にウイルスゲノムを増幅可能であることを確認した．

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

近年熱帯亜熱帯地域を中心にデングウイルスやジカウイルス，チクングニアウイルスなどの蚊媒介性ウイルスが猛威をふるっている．ウエストナイルウイルス感染症（ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎）は北米，ヨーロッパ，北・中央アフリカ，インドなどで患者が発生している蚊媒介性ウイルス感染症である．米国では 1999 年にウイルスが侵入後何度かの大流行が発生し，15 年以上経った 2016 年でも 1000 人を超える患者が発生している．ヒトのウエストナイルウイルス感染症に対するワクチンや薬剤はない．幸い日本国内への侵入は確認されていないが，諸要因により侵入した場

合に備え，万全の検査体制を整えておく必要がある．ウエストナイルウイルスには lineage が 6 種類（L1a, L1b, L1c/5, L2, L3, L4）存在する．北米で蔓延しているのは L1a である．これまでヒトへの病原性が比較的強いものは 2 種類（L1a, L1c/5）に限られると考えられてきた．しかし近年，L2 でも重篤な中枢神経症状を引き起こす株が同定され，さらに L1c/5 の分離株が以前よりも強毒性を示すとの報告がなされている．一方 L3 と L4 はヒトからは同定されていないが，今後どのように変異するかわからない．このような状況から，ウエストナイルウイルスの侵入に備え，すべての lineage に対応できるようにしなければならない．

そこでまずは現在私たちが使用している，L1a 用に設計されたウエストナイルウイルスゲノム検出系（リアルタイム RT-PCR）が他の lineage に対応可能かを調べた．また比較的最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出系がどの程度広範の lineage に対応できるか検証した．さらに全 lineage をカバーできる新たなリアルタイム RT-PCR 系の開発を試みた．

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．これら 3 種の馬脳炎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

RT-PCR によるウエストナイルウイルスゲノム検出のための鑄型には，NY99 株（L1a），Egy101 株（L1a），g2266 株（L1c/5），FCG 株（L2）を使用した．これらを用いてアフリカミドリザル由来株化腎細胞 Vero 細胞に感染させたのち，その培養上清からウイルス RNA を精製し使用した．新規 TaqMan プライマー・プローブセットの特異性および感度を調べるために，ウイルスゲノムの NS2A 領域（500 ヌクレオチド）の DNA を受託合成し，それを鑄型に mMESSAGING mMACHINE kit（Ambion）を使用して *in vitro* で RNA を合成した．合成 RNA は精製後 260nm での吸光度より濃度を算出し，適当に希釈し使用した．使用したプライマー・プローブを表 1 に示す．リアルタイム RT-PCR 反応は，RNA-direct Realyime PCR Master Mix（Toyobo）を使用して行った．ゲノムの増幅・検出・解析は StepOnePlus（Thermo）を使用した．また，SYBR Green I で検出する場合は，反応キットとして SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit（Thermo）を使用し，増幅・検出・解析は LightCycler 2.0（Roche）を使用した．馬脳炎ウイルスの検出系については，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）．使用したプライマー・プローブを表 2 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・解析は前述のキットおよび機器を使
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

1. 現行のウエストナイルウイルスゲノム
検出用プライマー・プローブセットの
評価: 4 種類のウエストナイルウイル
ス株ゲノム RNA を使用して現行の 3 セ
ット (5NCR, Env, 3NCR) ですべての株
の検出が可能か調べた. すべてのセッ
トで L1a 株ゲノムを検出できた. しか
しいずれのセットでも L1c/5 株ゲノム
を検出できなかった L2 株については,
5NCR でのみ検出できたが感度は非常に
低かった. 上記のセットの他に, 日本
脳炎ウイルスゲノム検出用のプライマ
ー・プローブセット (NS5) を使用した
ところ, 4 種類のウエストナイルウイル
スすべてのゲノムを検出できた.
2. 最近報告されたウエストナイルウイル
スゲノム検出法の評価: 2013 年に発表
された 2 論文 (J. Virol. Methods 189:
321-327, J. Virol. Methods 193:
554-557) に示されているプライマー・
プローブセット (WN-LCV, NS2A) を使
用し, 4 種類のウエストナイル株のゲ
ノム検出を試みた. L1a 株の検出感度
は WN-LCV が優っていたが, L2 株につ
いては NS2A の方が高感度であった. し
かし共に L1c/5 株を検出できなかった.
3. 新規ウエストナイルウイルスゲノム検
出用プライマー・プローブセットの開
発: 全ての lineage のゲノムを増幅可
能なプライマー・プローブセットを設
計した. 塩基配列を比較したところ,
非構造蛋白質 NS2A 領域が lineage 間で
相同性が高かったため, この領域を選
択した. 前述の 4 種類のウエストナ
イルウイルスゲノムを用い, 様々なプ
ライマーを試み, 最終的に 1 セット
(3538p-3490r) に絞り込んだ. この新
規のセットは, すでに発表されている
NS2A セットと標的部位が近接してい
るが, 新規セットは L1c/5 株の増幅も可

能であった. しかしわずかに日本脳炎
ウイルスゲノムにも反応した. 次に,
全ての lineage から 1 株選択し, 各々
の NS2A 領域の合成 RNA を作製した. それ
らを鋳型に使用し, 新規セットの検
出能を調べた. 高コピー数で鋳型に用
いた場合, 全ての lineage の RNA を検
出することができた. しかしわずかな
がら日本脳炎ウイルスと Usutu ウイル
スにも反応することがわかった. 一方
NS2A セットは L1a, L1b 以外の lineage
に対しては反応性が非常に低く, L1c/5
と L4 の RNA を検出することが出来な
かった. 各合成 RNA を段階希釈し, 検出
感度を調べた. 全ての lineage におい
て, 少なくとも 5 コピー/反応までは検
出できることが確認された. 一方日本
脳炎ウイルスと Usutu ウイルスにつ
いてはそれぞれ 5×10^5 コピー/反応, 5×10^4
コピー/反応以下では検出されないこ
とが確認された. 新規セットと合成 RNA
を使用して検量線を作成することによ
り, 3 種類のウエストナイルウイルス
株のコピー数の算出をした (図 1).

4. 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 (図 2).

D. 考察

平成 27 年度は, ウエストナイルウイル
スの全 lineage のゲノムを網羅的に検出
可能な TaqMan プライマー・プローブセ
ットの開発を試みた. その前に現行およ
びすでに公表されている検出系が全
lineage に対応できるのかを調べた.
すると, ほとんどがアメリカ大陸で流行

している L1a やそれに近縁の L1b には反応するものの、他の lineage には反応しないか、反応しても非常に感度が悪いことが明らかとなった。しかし、L1a 以外の株によるウエストナイル感染症の流行がヨーロッパやインドで起こっていることから、これらの lineage への対応も疎かにすることはできない。今回私たちが開発したセットは、これまでのものと比べ高感度かつ広範のウイルスに対応できることが示され、非常に有用であると考えられる。ただ一つの欠点は、上記の優れた点があるがゆえに、ウエストナイルウイルスに近縁なウイルスも時に増幅してしまう点である。しかし、検出感度の差異は 10^4 - 10^5 もあり、注意すればあまり問題にならないと思われる。今後この新規セットが国内で広く用いられることを期待する。

平成 28 年度は、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

1. 本研究により、現行のウエストナイルウイルス用プライマー・プローブセッ

トでは、lineage によっては検出不能であることが明らかとなった。2) 最近報告されたウエストナイルウイルスゲノム検出法(TaqMan 法)の有用性について検討したが、現行セットと同様検出不能な lineage があることがわかった。

2. すべての lineage に対応可能な新規 TaqMan プライマー・プローブセットを開発した。本セットはすべての lineage のゲノムを高い感度で検出することができた。
3. 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. ウエストナイルウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセット

Primer	Sequence	Probe
WN5 ' NCR - f	CAGGAGGGCCCGGYAARA	WNV5 ' NCR-p: FAM-CCGGGCTGTCAATATGCTAAAACGCG-TAMRA
WN5 ' NCR - r	ATCAAGGACAAYMCGCGG	
WNENV - f	TCAGCGATCTCTCCAAAG	WNENV-p: FAM-TGCCCGACC ATGGGAGAAGCT-TAMRA
WNENV - r	GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG	
WN3 ' NC - f	CAGACCACGCTACGGCG	WN3 ' NC-p: FAM-TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT-TAMRA
WN3 ' NC - r	CTAGGGCCCGGTGGG	
*WN-LCV-F1	GTGATCCATGTAAGCCCTCAGAA	S1: FAM-AGGACC CCACATGTT-MGB S2: VIC-AGGACCC CACGTGCT-MGB
*WN-LCV-R1	GTCTGACATTGGGCTTTGAAGTTA	
**NS2A-F	CCTTTTCAGYGGGCCTTCTG	WNVpNS2A-3612: FAM-AGCCAAGATCA GCATGCCAGC-TAMRA
**NS2A-3R	CAGTGTAAGTVATRCCCCCAA	
WNVcommon.345 1f	GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNVcom 3538p: FAM-ATGATTGAYCCTTTTCAGYGGGCCTTCTG-TAMRA
WNVcommon.359 Or	TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	

表 2. 馬脳炎ウイルスゲノム検出用プライマー・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		

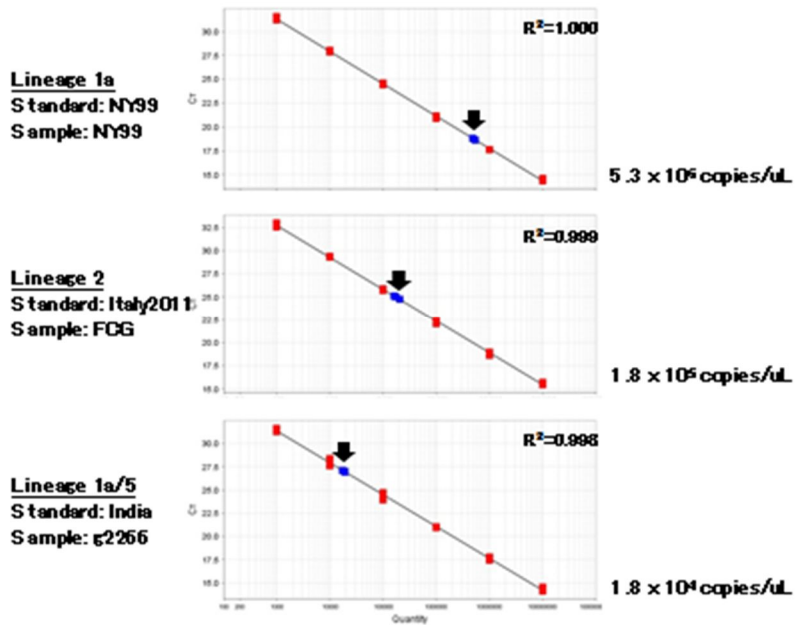


図1 新規プライマー・プローブセットを用いたウエストナイルウイルス培養上清サンプル中のゲノムコピー数の算出

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

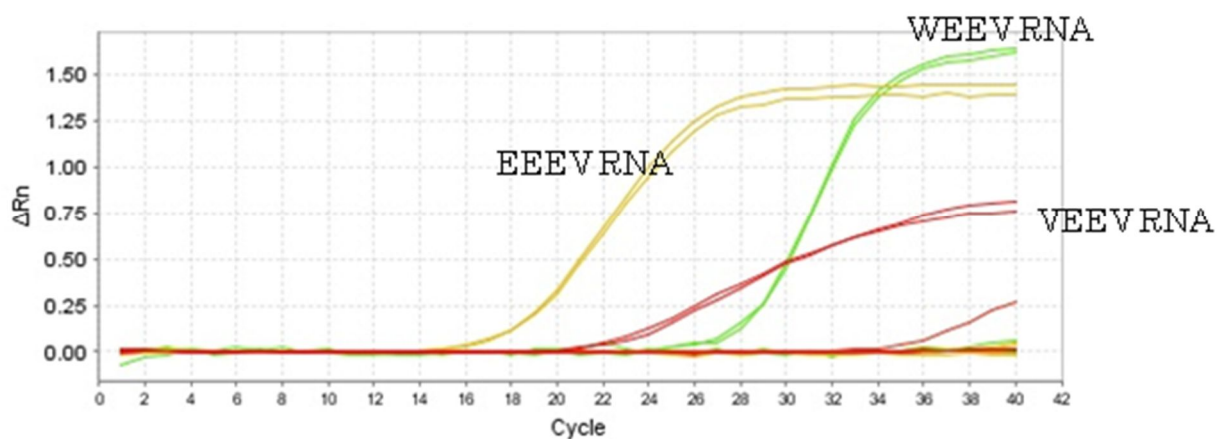


図2 馬脳炎ウイルスゲノムを用いた TaqMan 法の検討