

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

蚊媒介ウイルス高感度検出法の開発と評価

（ジカウイルス遺伝子高感度検出法、ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス_マルチ遺伝子高感度検出法の評価、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（神奈川県衛生研究所、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）

鈴木 理恵子（神奈川県衛生研究所微生物部）

研究要旨：蚊媒介ウイルス感染症が世界的に問題になっている。2014年に国内流行したデング熱、関節炎を引き起こすチクングニア熱、妊婦が感染すると先天性ジカ症候群を引き起こすジカ熱（ジカウイルス病）は臨床的によく似た症状をきたす。鑑別のためには高感度なウイルス遺伝子検出法は重要である。そこでブラジルでのジカ熱流行に先駆けてリアルタイム RT-PCR 法（TaqMan 法）を確立した。ただし、血液製剤及び献血血液における蚊媒介性ウイルス感染症のウイルス遺伝子検査が極めて煩雑になった。そこで、ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルスのマルチプレックス遺伝子検出法に関して検討、評価した。日本国内で夏季にはウイルスが活動している日本脳炎ウイルスについては、2009年に中国で、2010年に韓国で日本脳炎ウイルス遺伝子 V 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。またジカウイルス、チクングニアウイルス、デングウイルスを同時に検出できる Trio-plex real-time RT-PCR assay を評価した。

A. 研究目的

近年、蚊が媒介するウイルス感染症が再興し流行を拡大している。ヤブカが媒介するデングウイルス、チクングニアウイルスそしてジカウイルスである。これらのウイルスの血液および血液製剤からの遺伝子検出法を検討した。また日本脳炎ウイルスに関しても、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、ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス

を同時に検出できる系を検討した。

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^{XZ0934}-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。

ジカウイルスに関しては H26 年度にリアルタイム RT-PCR 系を GenBank からジカウイルスの塩基配列を収集し、アライメントした後、塩基配列 835 - 911 と 1086 - 1162 の位置にプライマーおよびプローブセット (ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set) 構築した。H28 年度には TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) の簡便性、感度および特異性を評価した。

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。

ジカウイルスのリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set とともに ZIKV 遺伝子を増幅した。11 人の Dengue 熱患者血清を検査した結果、どちらのセット (Set) とも非特異的な反応を示さなかった。また、TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) の評価では、Dengue ウイルス 1 ~ 4 型 (感染研標準株) は検出された。ジカウイルス (PRVABC59 株; アジア型) は検出されたが、アフリカ株 (MR766 株) は検出できない判定であった。チクングニアウイルスも検出された。また、Dengue 熱臨床検体での評価は、従来法 RT-PCR あるいはリアルタイム PCR と比べてその感度は同等以上であった。

内在性コントロール (PPIA Cyclophilin 遺伝子) は、検体として血清を用いると内在性コントロールの上昇が低く検出されない場合があった。

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。

一方、ジカウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルスの効率的な検査法として解析した TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) は、検査系の反応をモニターするため、内在性コントロールを用いている。このコントロールは、血清のような細胞成分の極めて少ない材料を用いた場合は機能しないので注意が必要である。デングウイルス型別遺伝子検出は、患者本人にとってあるいはサーベイランス上は重要であるが、輸血や血液製剤に関するチェックとしては必ずしも必要ではなく Pan Dengue すなわちデングウイルス共通の検出系で十分である。そうすることで検査の煩雑さを解消できるよいアイデアであると考えられる。

E. 結 論

新たに設計した日本脳炎ウイルス用 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、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である。

ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス_マルチ遺伝子検出系は、血液や血液製剤のようなデングウイルスの血清型別が重要ではなくウイルスの有無を判定する場合には、検査は煩雑でなく有用である。また、患者の診断においても治療上は血清型は急いで明らかにする必要はないので、まずこの検査を実施した後、デングウイルス血清型を決定すればよいのであるから、有用な検査法であると考えられる。

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