

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班  
分担研究報告書

アルボウイルス検査法の開発・改良と情報提供

～黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法の改良と情報提供～

研究分担者 国立感染症研究所 ウイルス第一部 田島茂  
研究協力者 国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 林昌宏  
国立感染症研究所 ウイルス第一部 前木孝洋  
国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 谷口怜  
国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 加藤文博

研究要旨 黄熱はアフリカ中央部およびブラジルを中心とした南米地域に常在する蚊媒介性フラビウイルス黄熱ウイルスによる疾患である。すでに長年使用されてきた生ワクチンが存在するものの、近年でも流行が散発している。一方、同じフラビウイルスに属するダニ媒介性脳炎ウイルスによるダニ媒介性脳炎の患者が、最近北海道で相次いで発生した。これらの疾患は、国内での患者発生がないあるいは非常に少ないため、国内での検査体制が十分とは言えない。そこで本年度は、これらの検査体制の確立を目的とし、検査法の検討およびその結果の地方衛生研究所等検査機関に情報提供した。

A．研究目的

節足動物媒介性ウイルスが世界の熱帯・亜熱帯地域を中心に猛威をふるっている。その代表的なものはデングウイルスであり、年間数億人が感染していると推測されている。日本でも2014年にデングウイルスが侵入し、東京の代々木公園を中心に国内感染が起こり、160人以上の患者が発生した。米国では今でも毎年千人以上のウエストナイルウイルス感染症患者が発生している。デング熱と似た症状を引き起こすチクングニアウイルスも生息域を拡大し、2013年にはアメリカ大陸に上陸し、流行を引き起こしている。さらに最近ではジカウイルス感染症が世界的に大きな問題となった。ジカウイルスは比較的軽度の発熱および発疹を主症状とするジカ熱の原因として、アフリカ

や東南アジアに常在することが知られていたが、2015年には南米大陸など急速に生息域を拡大した。さらにこのウイルスが胎児に経胎盤感染し小頭症など先天性中枢神経系発育不良を引き起こすことが明らかとなり、世界的な脅威と認識された。日本脳炎ウイルスはワクチンにより患者発生をコントロール可能になったウイルスではあるが、現在でも免疫力の低下した高齢者を中心に国内で年間10例程度の患者が発生している。デングウイルスや日本脳炎ウイルスと同じフラビウイルス科に属する黄熱ウイルスは、アフリカ中央部やブラジルを中心とする南米に常在している。すでに長年にわたって使用されてきた生ワクチンがあるが、流行地での接種の徹底は困難であり、現在でも患者は発生し続けている。さらに近年では、

流行地域の拡大が懸念されている。これまで南米での流行は主に森林地域であったが、徐々に都市地域に拡大しつつあり、ついには大西洋側海岸地域にまで達している。それに伴い、都市部に近い地域で患者が発生している。

ダニによって媒介されるダニ媒介性脳炎ウイルスにより引き起こされるダニ媒介性脳炎は、国内では1993年に初めて患者が確認されたがそれ以降患者発生は確認されなかった。しかし2016年夏に23年ぶりに北海道で患者が発生し、さらに2017年にもやはり北海道で2例患者が確認された。またダニや動物の調査から、北海道中部以南にはダニ媒介性脳炎ウイルスが常在していることも確認されており、今後も患者の発生が危惧されている。さらに北海道以南にもこのウイルスが生息している可能性も示唆されている。

黄熱の実験室診断法については、すでにマニュアル化されているが、遺伝子診断法については改良が必要な状況であった。一方ダニ媒介性脳炎については、マニュアルが整備されていない状況である。そこで本研究では、黄熱およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法の改良・確立を目的とし、改良・確立した方法については協議会や講習会等で紹介し、地方衛生研究所や保健所への技術の伝搬に務めることとした。

## B．研究方法

1.「黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan リアルタイム PCR 法の確立」黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan プローブ・プライマー Set A から Set C までは US CDC からの情報に従い作製した(表 1)。また Set D は Set B の配列を改変して作製した。増幅評価用の鋳型 RNA は黄熱ワクチン(17D 株)および、増幅

部のみの合成 RNA、およびコピー数測定済みの市販のゲノム RNA(17D 株)を使用した。ワンステップリアルタイム RT-PCR 反応キットには、Thermo 社の TaqMan Fast Virus 1-step Master mix を使用した。

## 2.「ダニ媒介性脳炎の実験室診断法の確立」

ダニ媒介性ウイルスゲノム検出のための TaqMan プローブ・プライマーは、文献(Schwaiger et al. JCV 27:136-145, 2003)より引用した(表 2)。TaqMan 法は上記黄熱ウイルスの場合と同様に行った。また、抗ダニ媒介性ウイルス IgM および IgG ELISA 法は、各々 TestLine 社製のキットを使用した。中和試験は Vero 細胞を使用し、50% ブラーク減少法により行った。

## C．研究結果

### 1.「黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan リアルタイム PCR 法の確立」

US CDC からの情報を基に、3 セットの TaqMan プライマー・プローブセットを作製し、増幅能を調べた(図 1)。Set A は西アフリカ株に特異的、Set C は南米株に特異的に反応することが確認された。一方 Set B は西アフリカ型に特異的との情報であったが、実際には西アフリカ型と南米型の両方に反応することが確認された。黄熱ウイルスには、これら 2 つの型以外に、東・中央アフリカ型が知られており、この株にも対応できなければならない。しかし、3 つのセットの配列をみると、Set A, C では東・中央アフリカ型には対応が困難であり、また Set B に関しても改良が必要と考えられた(図 2)。そこで、いずれの型にも対応できるよう、Set B を基に新たなセット Set D を作製した(表 1)。東・中央アフリカ型の鋳型 RNA の入手が困難なため、ひとまず現在保有する鋳型 RNA を使用して Set D を評価した。Set B でみられた、

南米型への低い反応性が著しく改善されたが、西アフリカ型に対する反応性は若干低下した(図3)。また、西アフリカ型のゲノム RNA を用いて検出感度を比較したところ、Set A, B に比べ、Set D では感度が数倍低下していることが明らかとなった(図4)。

## 2. 「ダニ媒介性脳炎の実験室診断法の確立」

今後増加することが予想されるダニ媒介性脳炎の実験室診断法を確立するため、はじめに遺伝子検出系として TaqMan リアルタイム RT-PCR 法の確立を目指した。Schwaigar らの論文(Schwaigar et al. JCV 27:136-145, 2003)よりプローブ・プライマーを増幅し、ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム RNA を鋳型にリアルタイム RT-PCR 反応を行った。ウイルスゲノムの増幅が確認され、リアルタイム RT-PCR 系が機能することが確認された(図5)。次にダニ媒介性ウイルスに対する抗体検出系の確立を目指した。TestLine 社の IgM および IgG ELISA キットを用い、2016 年に北海道で発生した患者の血清について抗体価を調べた。キットの取扱説明書に従い、Index が 0.9 未満を陰性、0.9 から 1.1 を判定保留、1.1 以上を陽性とした。患者検体について、IgM は 5.73、IgG は 3.25 であり、いずれも陽性と判断された。また、同時にフラビウイルス感染症疑い患者の血清について試験したところ、IgM が 0.36-0.40、IgG が 0.09 といずれも陰性と判断された。また、上記陽性検体について、中和試験を行なったところ、中和力価は 2560 倍と明らかな陽性を示した。一方、上記陰性血清については 10 倍以下と中和抗体陰性と判断された。

## D . 考察

1. 「黄熱ウイルスゲノム検出用 TaqMan リアルタイム PCR 法の確立」近年、黄熱の流行

がアフリカや南米でたびたび発生している。日本での流行は考えにくい、渡航者による輸入感染症例が発生する可能性はおおいにある。そのためにも、黄熱の実験室診断法を再確認・再評価しておく必要がある。病原体検出マニュアルにある遺伝子検査法がコンベンショナル RT-PCR 法と古典的手法であったため、改訂も考慮し、TaqMan 法の確立を目指した。今回、4 種類のプローブ・プライマーセットを試したが、2 つは遺伝子型に特異的であること、もう 2 つは型共通セットとして使用可能であることが確認された。これらのうち、我々が新規にデザインしたセットは、より広範囲の黄熱ウイルスに対し適用可能であると思われる。ただし、今後黄熱疑い患者が発生した場合には、捕り逃しを防ぐために複数のセットを使用した方が良いと思われる。

## 2. 「ダニ媒介性脳炎の実験室診断法の確立」

2016 年に 20 年以上ぶりに国内で患者が確認されたダニ媒介性脳炎であるが、北海道にダニ媒介性脳炎ウイルスが蔓延しているのは確かであり、今後患者が増加する可能性がある。そのためにも実験室診断法の確立は急務であった。今回我々は、遺伝子検出法、抗体検出法および中和試験法を確立し、検査体制を万全にすることができた。今後は、今回示してきた検査法を各地方衛生研究所や保健所、検疫所でも実践できるようにするため、病原体検出マニュアルの改訂および作成を進める必要がある。

## E . 結論

黄熱の遺伝子検査法の改良およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法を確立した。

## F . 健康危険情報

該当なし

## G . 研究発表

### 論文発表

1. Taira M, Ogawa T, Nishijima H, Yamamoto K, Hotta C, Akita M, Tajima S, Saijo M. The first isolation of Zika virus from a Japanese patient who returned to Japan from Fiji in 2016. *Jpn J Infect Dis* 70:586-589, 2017.
2. Hashimoto T, Kutsuna S, Tajima S, Nakayama E, Maeki T, Taniguchi S, Lim C-K, Katanami Y, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Ohmagari N. Importation of Zika virus from Vietnam to Japan, November 2016. *Emerg Infect Dis* 23:1223-1225, 2017.
3. Katanami Y, Kutsuna S, Taniguchi S, Tajima S, Takaya S, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Kato Y, Ohmagari N. Detection of Zika virus in a traveler from Vietnam to Japan. *J Travel Med* 24:tax031, 2017.
4. Suzuki T, Kutsuna S, Taniguchi S, Tajima S, Maeki T, Kato F, Lim C-K, Saijo M, Tsuboi M, Yamamoto K, Morioka S, Ishikane M, Hayakawa K, Kato Y, Ohmagari N. Dengue virus exported from Cote d'Ivoire to Japan, June 2017. *Emerg Infect Dis* 23:1758-1760, 2017.
5. Tsuboi M, Kutsuna S, Maeki T, Taniguchi S, Tajima S, Kato F, Lim C-K, Saijo M, Takaya S, Katanami Y, Kato Y, Ohmagari N. Dengue virus type 2 in travelers returning to

Japan from Sri Lanka, 2017. *Emerg Infect Dis* 23:1931-1933, 2017.

6. Hashimoto T, Kutsuna S, Maeki T, Tajima S, Takaya S, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N. A case of dengue fever imported from Burkina Faso to Japan in October 2016. *Jpn J Infect Dis* 70:675-677, 2017.

### 学会発表

該当なし

## H . 知的財産権の出願・登録状況

### 1 . 特許取得

該当なし

### 2 . 実用新案登録

該当なし

### 3 . その他

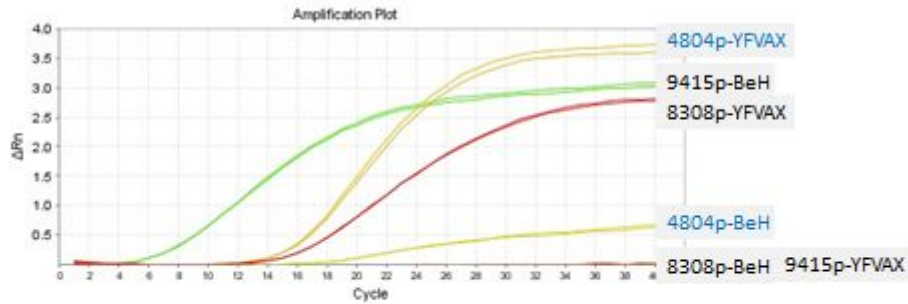
該当なし

表1 黄熱ウイルスゲノム検出用TaqManプライマー・プローブセット

Primer	Name	Sequence
Set A	YF-8280F	TCCACTCATGAAATGTACTACGTGTCT
	YF-8354C	GGAGGCGGGATGTTTGGT
Set B	YF-4769F	TTGATTCCATCTTGGGCTTC
	YF-4862C	GGACCTCTTCCTCTCCATCC
Set C	YF-9393F	CAGGTGGGAAAGCTTACATGG
	YF-9453C	CACCTGCCCCGGATCCTCT
Set D	YFcom-4769F	TTGRTTCCATCYTGGGCYTC
	YFcom-4862C	GGACCTCYTCYTCHCCATCC
Probe		
Set A	YF-8308FAM	AGCCCGCAGCAATGTACATTTACTGT
Set B	YF-4804FAM	TGTCGCCTATGGTGGCTCATGGAAG
Set C	YF-9415FAM	TGTCATAAGCCGGCGGGACCA
Set D	YFcom-4803FAM	TKGTBGCCTATGGTGGCTCATGGAAGCTG

表2 ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム検出用TaqManプライマー・プローブセット

Primer	Sequence	Probe	Sequence
F-TBE 1	GGG CGG TTC TTG TTC	TBE-Probe-WT	FAM-TGA GCC ACC ATC
	TCC		ACC CAG ACA CA-TAMRA
R-TBE 1	ACA CAT CAC CTC CTT		
	GTC AGA CT		



\*Thermo  
Fast Virus 1-Step  
Master Mix  
使用

Primer-Probe set	YF-VAX (17D)	BeH655417
A (8308p)	14.3	ND
B (4804p)	13.4	19.0
C (9415p)	ND	5.5

図1 黄熱ウイルスゲノム検出系の検討 ( 1 )

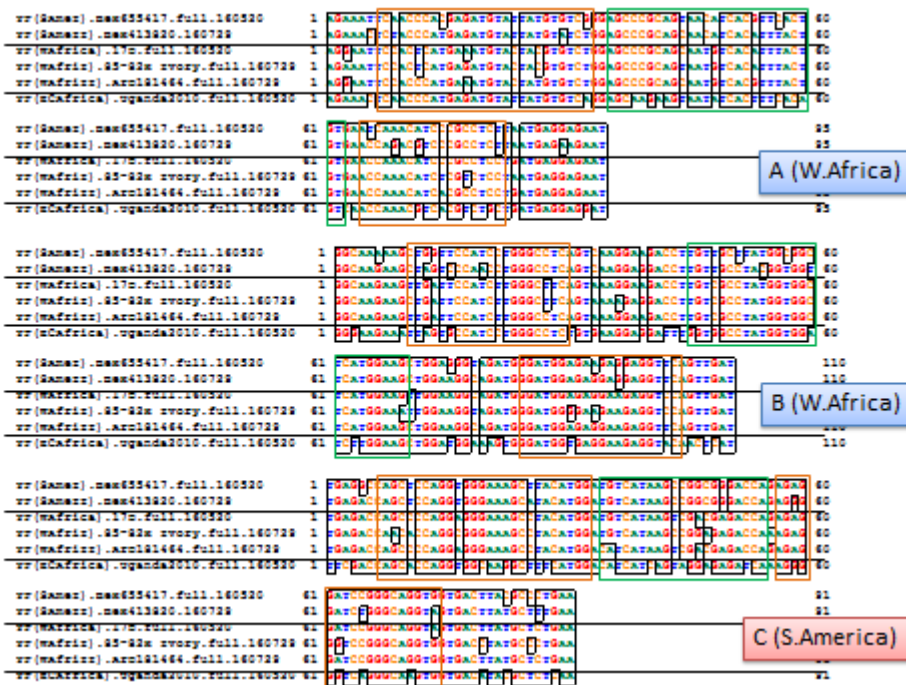


図2 黄熱ウイルスゲノムのプライマー・プローブ部位の配列比較

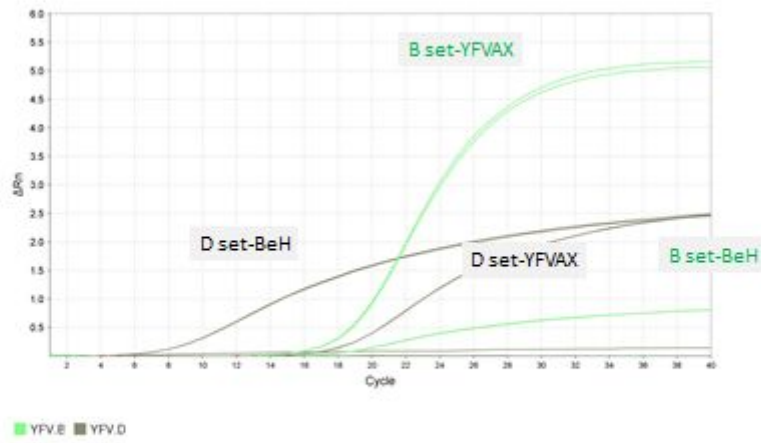


図3 黄熱ウイルスゲノム検出系の検討 ( 2 )

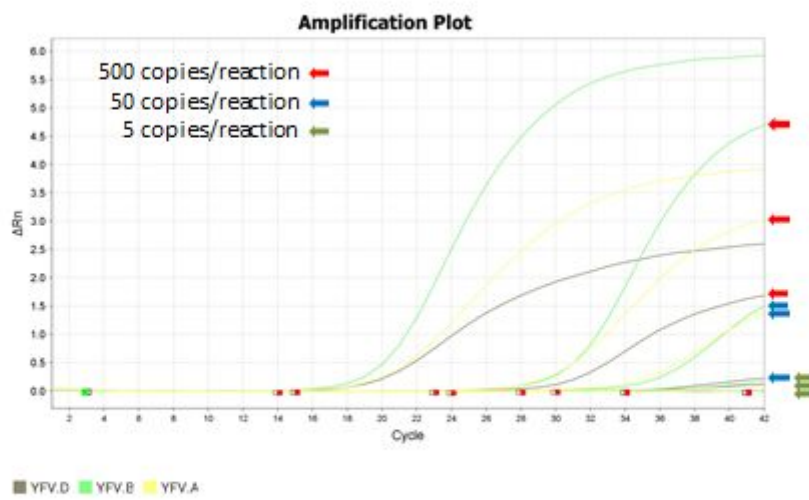


図4 黄熱ウイルスゲノム検出系の検討 ( 3 )

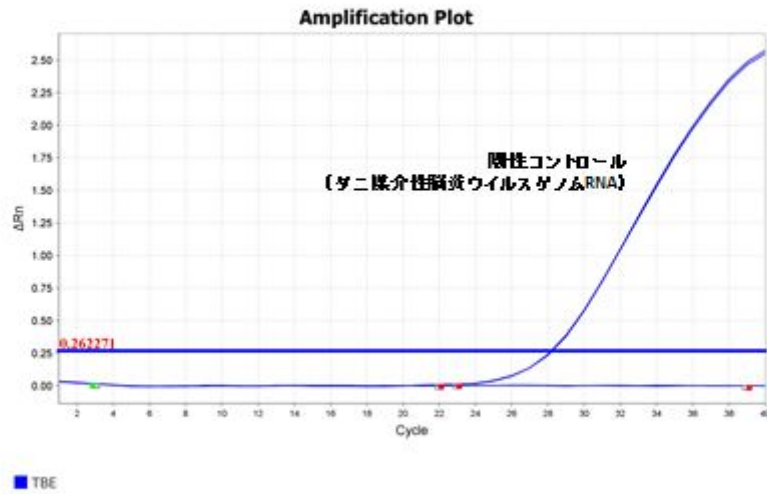


図5 ダニ媒介性脳炎ウイルスゲノム検出系の検討