

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

研究分担者 国立感染症研究所 ウイルス第一部第二室 林 昌宏

研究協力者 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 前木 孝洋  
国立感染症研究所 ウイルス第一部 谷口 怜

研究要旨 日本脳炎をはじめとする蚊媒介性疾患対策およびダニ媒介脳炎をはじめとするダニ媒介疾患対策は全国8つの各都府県および政令指定都市に設置されたアルボウイルス感染症レファレンスセンターと国立感染症研究所ウイルス第一部を中心に実施されている。近年北海道ではダニ媒介脳炎が2016年に再興し1993年以来国内では5例の患者が報告されている。また2014年にはデング熱の国内流行もあり、輸入感染症対策が急務となっている。国外ではデング熱、ジカ熱およびチクングニア熱が依然流行しており、さらに黄熱が南米およびアフリカ諸国で流行を繰り返している。近年、韓国ではこれまでと異なる遺伝子型の日本脳炎ウイルスの流行が発生し、日本国内への侵入が危惧される。本研究では、これらのアルボウイルスに対する遺伝子検査法の再検討を実施し、各アルボウイルス感染症レファレンスセンターおよびその他の地方衛生研究所との情報の共有を実施した。

A．研究目的

近年のグローバル化における人的交流および物流の活発化により、節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）感染症の流行域の拡大が認められ、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。古くは黄熱の流行域の拡大に始まり、近年ではデング熱、ジカ熱、チクングニア熱、ウエストナイル熱等の流行域の拡大が問題となっている。黄熱はもともとアフリカで流行していた疾病であるが、大航海時代にアメリカ大陸へ侵入したとされる。わが国ではこ

れまでにデング熱、ジカ熱、チクングニア熱、ウエストナイル熱等の蚊媒介性ウイルスによるヒトの輸入症例が報告されている。また2014年には国内のヒトスジシマカの媒介によるデング熱の国内流行が発生した。媒介蚊であるヒトスジシマカは本州以南に生息し、デングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルス等を媒介する可能性があるため、今後も蚊媒介性ウイルス浸淫の可能性は否定できない。さらにわが国は日本脳炎およびダニ媒介脳炎の流行地である。現在、日本脳炎の大規模な患者発生は

日本脳炎ワクチンの定期接種等により予防されているが、現在も国内における日本脳炎ウイルスの分布状況には変化がないことが疫学的調査により示されている。また近年、中国および韓国においてわが国では確認されていない遺伝子型V型（GV）の日本脳炎ウイルス遺伝子がコガタアカイエカ（Genbank accession #KM496503、JF915894）、ハマダライエカ（#KM496505）、カラツイエカ（#JN587243）から検出されている。また韓国ではGVのウイルスによる日本脳炎患者も発生している。よって韓国におけるGVの動向は今後も注視してゆく必要がある。

ダニ媒介脳炎は北海道からロシア、中国、ヨーロッパ諸国に分布するマダニ属のダニによって媒介されるウイルス性急性脳炎である。近年ダニ媒介脳炎の患者が道南から道北にかけて報告されており、疫学的調査により、北海道においてその流行巢の存在が報告されている。

これまでにわれわれは、ウエストナイル熱、ジカウイルス感染症、黄熱およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法の改良・確立を実施してきた。本年度の研究の目的は、近年中国および韓国においてその存在が確認された日本脳炎ウイルスGVの日本への侵入の可能性に対応するために、日本脳炎ウイルスGVを検出可能な日本脳炎の実験室診断法の改良・確立を行うことである。またこれまでに改良・確立を行ったウエストナイル脳炎、ジカウイルス感染症、黄熱およびダニ媒介性脳炎の実験室診断法について各種の協議会および講習会等をとおして地方衛生研究所や保健所との情報共有を実施するとともに各診断法のレファレンスを準備し共有することにより、各衛生研究所のアルボウイルスに対する検査環境を整備

することである。

## B．研究方法

### 1. 日本脳炎ウイルス遺伝子型V型のゲノム検出法の確立と情報共有

これまで検査用に使用してきた日本脳炎ウイルスゲノム検出用プライマー・プローブ3セット（GI-III common, GI-specific, GIII-specific）、に加え、広範日本脳炎ウイルスゲノム検出用3NCR セット、広範ウエストナイルウイルスゲノム検出用 WNV com セットを使用し、TaqMan法により各種日本脳炎ウイルスに対する検出感度を検討した(表1)。また、鋳型RNAとしては、当室で所有する日本脳炎ウイルスから精製したウイルスゲノムを使用した。

### 2. ウイルス遺伝子の抽出とRT-PCR

検体からのRNA抽出にはRoche社のHigh Pure Viral RNA purification kitを使用した。ワンステップリアルタイムRT-PCR反応キットとしては、Thermo社のTaqMan Fast Virus 1-step Master mixとToyobo社のRNA-direct Realtime PCR Master mixを使用した。

### 3. これまでに確立した実験室診断法の共有

協議会および講習会等をとおして地方衛生研究所や保健所との情報共有するための資料作成を実施した。またレファレンスとして各ウイルス遺伝子の陽性対照を調整し、RNastable (Biomatrix社)にて真空乾燥、保存した。

## C．研究結果

### 「遺伝子型V型日本脳炎ウイルスのゲノム検出法の確立」

はじめに、現在使用している、遺伝子型I型(GI)およびIII型(GIII)の各々および両方のゲノムを検出可能なTaqManプライマー・プローブセット3セットを用いて、GI、GIIIおよびGV

の日本脳炎ウイルス株ゲノムに対する反応性を調べた。3セットいずれもGVウイルスを検出することが出来なかった(表2)。次に上記とは異なるセット3NCRを作製し、同様に反応性を調べたところ、3NCRはGI、GIII、GVいずれのウイルスゲノムも検出可能であることが明らかとなった(表2)。また、3NCRはデングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルスゲノムには反応しないことが確かめられた。一方で、日本脳炎ウイルスに近縁なウエストナイルウイルスゲノムに反応することがわかった。この交差反応性による誤審を回避する方法として、広範なウエストナイルウイルスゲノム検出用セットWNV comを用いることを考えた。そこで、WNV comの日本脳炎ウイルスゲノムに対する反応性を調べた。WNV comも日本脳炎ウイルスゲノムに反応するが、その検出感度はウエストナイルウイルスゲノムに比べ顕著に低いことがわかった。

レファレンスとして各ウイルス遺伝子の陽性対照を調整し、RNAstableにて真空乾燥し、室温保存した。本年度は陽性対照の分与希望が宮城県、仙台市、新潟県、熊本県、静岡市、長崎市、浜松市、富山県、福岡県、千葉県地方衛生研究所からあり、各施設に陽性対照を分与した。

#### D. 考察

2010年以降、韓国では、それまで主に検出されていた遺伝子型とは異なるGVの日本脳炎ウイルスが検出されるようになり、さらにGVウイルスに感染した日本脳炎患者も発生している。GVウイルスについては、これまで大きな流行もなく、分布域が限られてきたこと、分離株も少ないなどから、その性状も不明な点が多い。現在までに日本国内で、GVウイルスは確認されていないが、国内に侵入する可能性は否定できない。そこで本研究では、国内への

GVウイルスの侵入に備え、GVウイルス検出法の確立を目指した。GVは他の遺伝子型とは進化的にやや遠い関係にあり、従来のゲノム検出系で検出可能かは不明であった。しかし本研究により、従来のGI、GIIIゲノム検出系ではGVゲノムは検出できないことが明らかとなった。そこで新たなプライマー・プローブセット3NCRを作製し、検討したところ、GI、GIIIだけでなく、GVゲノムも検出可能であった。しかし一方で、近縁ウイルスであるウエストナイルウイルスのゲノムとも交差反応することが分かった。そこで、3NCR単独で用いるのではなく、ウエストナイルウイルスゲノム用のセットWNV comも共用することにより、同定することとした。これにより日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスを識別することは可能と考えるが、WNV comも弱いながら日本脳炎ウイルスに交差反応を示すことから、今後より特異性の高いセットの構築を検討する。

これまでに確立したアルボウイルスに対するジカウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルスに対する遺伝子検査法の見直しを行い、情報提供した。また分与を希望した各地衛研にレファレンスとして実験室検査用陽性対照を配布し、アルボウイルスに対する検査体制の整備を進めることができた。

#### E. 結論

これまでにアルボウイルスに対する遺伝子検査法の見直しを行い、情報提供を行った。また分与を希望した各地衛研に遺伝子検査用陽性対照を配布した。今後もアルボウイルス感染症レファレンスセンターを中心にアルボウイルス感染症の検査などについて情報共有を実施し、国内のアルボウイルスに対する検査体制の整備に努める。また、本研究において開発改良を進めてきた検査

法の共有を各地方衛生研究所や保健所あるいは検疫所とさらに進めるため、病原体検出マニュアルの改訂および作成を進める予定である。

F．健康危険情報

特記事項なし

G．研究発表

論文発表

1. Maeki T, Tajima S, Kyaw AK, Matsumoto F, Miura K, Yamashita A, Yoshikawa A, Negishi K, Noguchi Y, Tadokoro K, Abe K, Taruya J, Koh J, Ito H, Ikegaya A, Abe F, Wada M, Nishigata T, Ikeda M, Kato F, Taniguchi S, Nakayama E, Takasaki T, Morita K, Lim C.K., Saijo M. Comparison of Neutralizing Antibody Titers against Japanese Encephalitis Virus Genotype V Strain with Those against Genotype I and III Strains in the Sera of Japanese Encephalitis Patients in Japan in 2016. *Jpn J Infect Dis* 71:360-364,2018.
2. Tadokoro K, Ohta Y, Sato K, Maeki T, Sasaki R, Takahashi Y, Shang J, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Lim C.K., Tajima S, Abe K. A Japanese Encephalitis Patient Presenting with Parkinsonism with Corresponding Laterality of Magnetic Resonance and Dopamine Transporter Imaging Findings. *Internal Med.* 57: 2243-2246,2018

学会発表

特記事項なし

H．知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1．特許取得

特記事項なし

2．実用新案登録

特記事項なし

3．その他

特記事項なし

表1 日本脳炎ウイルスゲノムおよびウエストナイルウイルスゲノム検出用  
TaqManプライマー・プローブセット

Set	Primer	Probe
GI	JE1.3en1052s-1082: ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE1en1082pb: FAM-CTC AAG CAG CAA A-MGB
	JE1.3en1119c-1082: GGG AGC GTT TGG AGT TAC AGT AA	
GIII	JE1.3en1052s-1082: ATG GGA ATT AYT CAG CGC AAG T	JE3en1082pb: FAM-CCC AGG CGG CAA A-MGB
	JE3en1119c-1082 AGG AGC ATT GGG TGT TAC TGT AAA	
GI-III	JEen562-585: CTG GAY TGT GAR CCA AGG A	JEen585pb: FAM-ACT RAA CAC TG A AGC GT-MGB
	JEen623-585: GAH CCC ACG GTC ATG A	
3NCR	JENS5s269: GCC ACC GGA TAC TGG GTA GA	JENS5p294: FAM-CTG CCT GCG TC T CA-MGB
	JENS5r330.2: TGT TAA CCC AGT CCT CCT GG	
WNV com	WNVcommon.3451f: GGH TGT TGG TAT GGH ATG GA	WNV3538p: FAM-ATG ATT GAY CC T TTT CAG YTG GGC CTT CTG-TAMRA
	WNVcommon.3590r: TC CTG GGT GGC CAA GAA CAC	

表2 日本脳炎ウイルスゲノム検出用プライマー・プローブセットの検討結果

Virus/ genotype	Strain	Primer-probe set			
		GI	GIII	GI-GIII	3NCR
JEV/GI	Hiroshima/46 /1998	+	-	+	+
	Mie/41/2002	+	-	+	+
	Mie/51/2005	+	-	+	+
JEV/GIII	JaTH160	-	+	+	+
	JaTAn1/75	-	+	+	+
	JaTAn1/90	-	+	+	+
JEV/GV	Muar	-	-	-	+
	rJEV-E <sup>XZ0934</sup> - M41	-	-	-	+
DENV1,2,3,4		NT	NT	NT	-
ZIKV		NT	NT	NT	-
WNV		NT	NT	NT	+
CHIKV		NT	NT	NT	-

+: 検出可、 -: 検出不能、NT: 未試験