

平成28-30年度

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 ジカウイルス感染症は今世紀に入ってから太平洋地域で流行が発生するようになり、2015-16年には中南米で大流行した。また妊娠期のジカウイルス感染が小頭症などの先天性異常の原因となることが確認され、公衆衛生上の重大な問題となった。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。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。日本脳炎は近年、韓国でこれまでと異なるタイプのウイルスが拡大し、日本国内への侵入が危惧される。これらのアルボウイルス感染症は、国内での患者発生がないあるいは非常に少ないため、国内での実験室検査体制が十分とは言えない。本研究では、これらのアルボウイルス感染症に対する実験室診断法の確立・改良を進めた。確立したプロトコールは、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。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。

東南アジアやアフリカで生息するジカウイルスは、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以前から知られていたが、症状が軽いことや患者数が少ないことなどからこれまであまり注目されてこなかった。しかし今世紀に入ってからたびたび流行が確認されるようになり、2015年には南米大陸に上陸するなど急速に生息域を拡大した。しかしそれ以上に注目された理由は、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ったためである。ジカウイルスは急激に生息地域が拡大し、患者数も急増したため、輸入感染

症例の増加と国内への侵入が危惧されるようになった。

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。

日本脳炎は1960年代までは国内患者数が千人を超える大流行がたびたび発生していたものの、以降はワクチンの品質向上や定期接種化により患者数は激減し、近年では10例を超えることはまれな状況にある。しかし韓国では、2010年以降これまでと異なる遺伝子型V型(GV)のウイルスが検出されるようになり、この遺伝子型のウイルスによる日本脳炎患者も発生している。

本研究では、ジカウイルス感染症、黄熱、ダニ媒介性脳炎、および日本脳炎の実験室診断法の改良・確立を目的とし研究を進めた。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. 「ジカウイルス病実験室診断法の確立と情報提供」

ジカウイルスの遺伝子検出法としてはTaqMan法によるリアルタイムRT-PCR法を採用した。プライマー・プローブ情報は米国CDCからの論文(Lanciotti et al. Emerging Infectious Diseases 14: 1232-1239, 2008)を参考に作製した(表1)。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。検出感度の算出には、Thermo社から分与された2種類の合成RNA(アフリカ型MR766株由来およびアジア型SPH2015株由来)を使用した。

抗体検査法については、抗ジカウイルスIgM捕捉ELISA法はデングIgMキットであるFocus社のDengue Virus IgM Capture DxSelectを利用する方法を採用した。本キットは、2次抗体(検出用抗体)が広範のフラビウイルスに対する反応性を有している。デングウイルス抗原をジカウイルス抗原に変えることで利用可能であることはすでに検証済みである。抗ジカウイルスIgG検出のための間接蛍光抗体法(IFA法)の確立を試みた。IFA用スライド作製のため、Vero細胞にジカウイルスMR766株あるいはPRVABC59株を感染させ、4日後に専用スライドに塗布しアセトンにより固定した。血清との反応は37℃で1時間行った。PBS(-)で洗浄後、希釈した2次抗体(Alexa 488 anti-human IgGあるいはanti-mouse IgG)を添加し37℃で1時間反応させた。PBS(-)で洗浄

後、蛍光顕微鏡で観察した。方法を検討するため、ddY 系統マウスに 2~3 週間隔でジカウイルス MR766 株あるいは PRVABC59 株を 4 回接種することにより得られた高度免疫マウス血清を使用した(別の研究費で作製された抗血清の一部を使用)。

2. 「黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法の改良」

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 までは米国 CDC からの情報に従い作製した(表2)。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 のみを使用した。

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(Schwaigar et al. JCV 27:136-145, 2003)より引用した(表3)。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。

3. 「遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルスのゲノム検出法の確立」

これまで検査用に使っ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4)。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。

C. 研究結果

1. 「ジカウイルス病実験室診断法の確立と情報提供」

論文を参考にジカウイルスゲノム検出 TaqMan 用プライマーおよびプローブを作製した(表1)。参考にした論文には 2 種類のセット(セット1およびセット2)があり、両方作製した。2 種類の合成 RNA を用い、2 種類の RT-PCR キットでウイルス RNA を増幅させた。セット1ではアジア型が高感度かつ高増幅量を示した。しかし Toyobo キットを使用するとアフリカ型に比べ顕著に感度が低下した。同様の低下はセット2でも確認された。Thermo キットでもセット1ではわずかに感度低下はみられたが、セット2では低下はほとんどみられなかった。Toyobo キットでのアフリカ型に対する感度低下は、逆転写反応時の温度が高いことによるものであったが、温度を下げることにより非特異的な増幅も確認されるようになった。以上の結果から、検査は Thermo 社のキットを使用することとし、プライマー・プローブは通常セット2を使用することとした。本研究により確立したジカウイルス遺伝子検出法については、衛生微生物技術協議会等で情報公開した。

抗ジカウイルス IgM-ELISA 法については検討済であったが、感染後数か月経過した後の検体については抗ジカウイルス IgG の検出が必要となる。そこで間接蛍光抗体法による抗ジカウイルス IgG 検出法を検討した。はじめに高度免疫マウス血清を用いて作製したスライドが使用可能であることを確認した。このスライドを使用し、実際に患者血清で抗体が検出できることを確認した(図1)。

2. 「黄熱およびダニ媒介性脳炎実験室診断法の改良」

米国 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(表2)。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。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。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。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。

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(表3)。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。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 社の抗ダニ媒介性ウイルス 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。

3. 「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5)。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5)。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。

D. 考察

2015 年から 2016 年に中南米で大きな流行を引き起こしたジカウイルスの遺伝子を検出する方法を確立した。デング熱に比べ、ジカウイルス感染症では患者血中のウイルス量は低く、検出が困難な場合が多い。一方、尿で血中よりも多くのウイルスゲノムが検出される場合が多い。実際我々が検査した検体で比較すると、すべてで尿の方が、ゲノム量が多かった。ジカウイルス感染症を疑う場合は、必ず尿検体を依頼すべきである。血清に比べ全血の方が、

ウイルスゲノムが多いとの報告もあるが、我々が調べた検体では、多い場合もあるが少ない場合もあり、一概に全血の方が血清よりも検査に適しているとは言えない。我々は唾液からも遺伝子を検出しているが、この場合も血清では検出されなかった。患者負担が多くなるとの問題もあるが、なるべく多くの箇所から検体を採取できれば検査の確実性が増すであろう。

すでに多くの報告があるが、抗体検査を行う場合、他のフラビウイルスとの交差反応が起こることを我々も経験した。遺伝子検査もそうであるが、他のウイルスとの鑑別は非常に重要である。さらに中和試験まで行っても判別が困難な場合もある。そのような場合、米国 CDC では「最近にフラビウイルスに感染した」との判断に留めている場合もある。このように判定困難な場合もあることを認識し検査する必要がある。

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。

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。

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型の日本脳炎ウイルスが検出されるようになり、さらにこの遺伝子型 (GV) に感染した日本脳炎患者も発生している。GV については、これまで大きな流行もなく、生息地が限られていること、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 のウイルスは確認されていないが、侵入する可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、国内への GV 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、従来ゲノム検出系で検出可能かはわからなかった。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 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が望まれる。

E. 結論

ジカウイルスゲノムを検出するリアルタイム RT-PCR 法を確立した。本法を用いて現在検査を行っている。また本法についてはすでに各地の衛生研究所等の検査機関に情報提供されている。今回新たに抗ジカウイルス IgG 検出のための IFA 法を確立した。

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。

日本脳炎ウイルス GV のゲノム検出系を確立したが、今後改善の余地がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Tsuboi, M., Kutsuna, S., Kato, Y., Nakayama, E., Shibasaki, K., Tajima, S., Takasaki, T., Katanami, Y., Yamamoto, K., Takeshita, N., Hayakawa, K., Kanagawa, S., Ohmagari, N. Autochthonous Chikungunya fever in traveler returning to Japan from Cuba. *Emerging Infectious Diseases* 22:1683-1685, 2016.
2. Takaya S, Kutsuna S, Nakayama E, Taniguchi S, Tajima S, Katanami Y, Yamamoto K, Takeshita N, Hayakawa K, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N. Chikungunya fever in traveler from Angola to Japan, 2016. *Emerging Infectious Diseases* 23:156-158, 2016.
3. 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.
4. 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.
5. Katanami Y, Kutsuna 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.

該当なし

3. その他

該当なし

9. 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.
10. 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

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

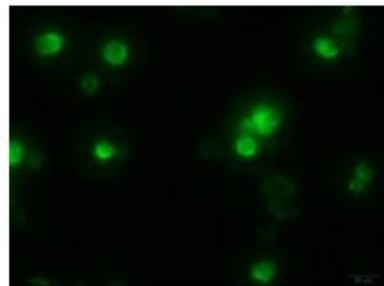
2. 実用新案登録

表1 ジカ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	Sequence	Probe	Sequence
Set 1	ZIKV835	TTGGTCATGATACT GCTGATTGC	ZIKV 860-FAM	FAM- CGGCATACAGCATCAGGTGCAT AGGAG-TAMRA
	ZIKV911c	CCTTCCACAAAGT CCCTATTGC		
Set 2	ZIKV1086	CCGCTGCCCAACA CAAG	ZIKV 1107-FAM	FAM- AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAG ACACTCAA-TAMRA
	ZIKV1162 c	CCACTAACGTTCTT TTGCAGACAT		



患者14-89 急性期血清
(320倍希釈)



患者14-89 回復期血清
(320倍希釈)

図1 間接蛍光抗体法(IFA)による抗ジカウイルスIgG抗体の検出

表2 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

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

表3 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 TCC	TBE-Probe- WT	FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA
R-TBE 1	ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT		

表4 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5 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 ^{XZ0934} - 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