

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を強化するための研究」  
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 中山 絵里  
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。2019年には5年ぶりにデング熱の国内流行があり、引き続き輸入感染症対策を実施することが重要である。また2020年には日本脳炎症例も4例報告されており、わが国は日本脳炎およびダニ媒介脳炎の流行地であるため、これら感染症は、引き続き重要な疾患である。本研究では、デング熱ウイルスの陽性対照の改良を行い、陽性対照と陽性検体を区別する検査系の検討を実施した。また、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アルボウイルス実験室診断法について情報共有を行った。

#### A. 研究目的

節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）の分布域は、近年のグローバル化における人的および物的交流の活発化により、その拡大が認められ、新興・再興感染症として世界的規模で問題となっている。特に近年ではデング熱、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である。わが国でも 2019 年には 5 年ぶりに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。デングウイルス、ジカウイルス、チクングニアウイルス等の媒介蚊であるヒトスジシマカは本州以南に生息するため、今後も蚊媒介性ウイルスがわが国に浸淫する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り、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。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、デング熱、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、アルボウイルス感染症レファレンスセンターネットワーク（アル

ボネットワーク）と共有してきた。ところで、これら検出系においては、陽性対照を用いるが、陽性対照を用いた際に検体に陽性対照が混入する可能性を完全に排除することは出来ない。そこで、本年度の研究の目的は、デング熱ウイルスの陽性対照の改良を行い、陽性対照と陽性検体を区別する検査系を検討することである。

#### B. 研究方法

##### 1. アルボウイルスネットワークの強化と実験室診断法の共有

アルボウイルスネットワークをとおして、2020 年度におけるアルボウイルスの流行状況について共有した。またレファレンス活動として各ウイルス遺伝子の陽性対照を調製し、RNAstable (Biomatrix 社) にて真空乾燥、保存した。

##### 2. 日本脳炎ウイルス遺伝子の抽出と RT-PCR および配列解析

Roche 社の High Pure Viral RNA purification kit を使用し検体からの RNA を抽出した。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 Takara 社の PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR kit を使用した。遺伝子配列の解析には BigDye Terminator 3.1 (Thermo 社) を使用した。

### 3. TaqMan real-time RT-PCR 用陽性対照への実験室内汚染コントロール配列の挿入

プラスミド pGEM-T の T7 プロモーター下流にデングウイルス 1 型、の RT-PCR 増幅目的領域約 300 塩基をクローニングした。次にクローニングした配列に TaqMan real-time RT-PCR 用陽性対照への実験室内汚染コントロール配列である Contamplicon 配列 (Atkinson *et. al.* 2012) を挿入した。

### C. 研究結果

#### 「アルボウイルスネットワークの強化と実験室診断法の共有」

アルボウイルス感染症レファレンスセンターを通して実験室診断法を共有した。また、レファレンス活動として各ウイルス遺伝子の陽性対照を調製し、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保健環境センター、横須賀市健康安全科学センターおよび宮崎大学からあり、各機関に陽性対照を分与した。2020 年のアルボウイルス発生状況をアルボウイルスネットワークと共有した。2020 年のデング熱輸入症例は 45 例であった。チクングニア熱の輸入症例は 3 例、ジカ熱は 1 例であった。2020 年の日本脳炎患者は 4 例であり、石川県 1 例、岡山県 2 例、和歌山県 1 例であった。

#### 「日本脳炎ウイルス遺伝子の抽出と RT-PCR および配列解析」

2020 年に発生した日本脳炎症例のうち、岡山県の 1 症例について確定診断としてリアルタイム RT-PCR 法を実施したところ、日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。検出したウイルス遺伝子の配列をサンガー法により解析した結果、得られた塩基配列は、日本脳炎ウイルス遺伝子型 I 型 (GI) であり、2019 年に広島県の日本脳炎患者検体より検出された日本脳炎ウイルス GI の塩基配列と 99.7% の相同性を示した。

#### 「TaqMan real-time RT-PCR 用陽性対照への実験室内汚染コントロール配列の挿入」

プラスミド pGEM-T にデングウイルス 1 型の RT-PCR 目的領域をクローニングし、TaqMan real-time RT-PCR 用陽性対照への実験室内汚染コントロール配列である Contamplicon 配列を挿入した。その結果、 $5 \times 10^1$  RNA コピー/reaction の感度でデングウイルス I 型遺伝子および実験室内汚染コントロール配列をそれぞれ検出した。Contamplicon 配列の挿入はデングウイルスの実験室内汚染コントロール配列として

使用可能であることが示唆された。

### D. 考察

2020 年はデング熱の輸入症例が前年の 1/10 以下に激減し、チクングニア熱の輸入症例数も 1/15 に減少した。これはコロナ禍による入国制限により、人的交流が減少した影響が考えられる。しかしながら、2020 年の 3 月以降もコロナ禍の中、14 例の輸入症例が確認されており、コロナ禍が収束し、人的交流が再開した場合、デング熱等の輸入症例数は再び増加する可能性が否定できない。

アルボウイルスに対する検査体制の整備を進めるため、2020 年は実験室検査用陽性対照の配布を希望した関係機関 3 件についてレファレンス活動として陽性対照の配布を行った。ところで、現在配布している陽性対照は、定性試験用であり、定量性は考慮していない。また陽性対照を用いた際に検体に陽性対照が混入する可能性を完全に排除することは難しい。そこでデングウイルス I 型の陽性対照の改良を行い、陽性対照と陽性検体を区別する検査系の検討を行った。リアルタイム RT-PCR の標的配列にすでに報告のある Contamplicon 配列を挿入したところ、デングウイルス I 型増幅用プライマープローブセットおよび Contamplicon 配列検出用プライマープローブセットの増幅感度は  $5 \times 10^1$  RNA コピー/reaction であり、Contamplicon 配列の挿入はデングウイルスに対しても陽性対照と陽性検体を区別する検査系の確立において有用であることが示唆された。今後は他のデングウイルス等のフラビウイルスおよびチクングニアウイルスの陽性対照においてもこれら検討を行い、陽性対照の改良を進める。

ところで、日本脳炎の症例数は 1992 年以降、10 例前後で推移している。2020 年も 4 例報告されており、近年の流行状況と比較して変化は認められなかった。したがって国内に分布する日本脳炎ウイルスに対する警戒は引き続き求められることが示唆された。特に 2020 年の岡山県の患者検体からは日本脳炎ウイルス GI 遺伝子が検出されており、この塩基配列は 2019 年の広島県の患者検体より検出された GI 遺伝子と 99.7% の相同性を示すことから、日本脳炎 GI が西日本において分布していることが示唆された。

デング熱等のアルボウイルス感染症の流行は世界的に引き続き継続しており、わが国においても日本脳炎およびダニ媒介脳炎が流行しているため、アルボウイルスネットワークの体制を引き続き維持・強化することが求められる。

#### 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、検査用陽性対照の改良を進めた。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。さらにアルボウイルス実験室診断医における陽性対照の再検討を行った。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。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

論文発表

特記事項なし

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