

(2) 調査・事例

- 1) ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの同時鑑別について29

ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの同時鑑別について

小河正雄、藤岡尚文*

*大分臨床検査技師専門学校

Concurrent differential diagnosis of West Nile virus and Japanese encephalitis virus

Masao Ogawa, Naofumi Fujioka

Key words : ウエストナイルウイルス West Nile virus、日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus、PCR

要旨

ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスを同時に鑑別する目的で開発されたプライマーを用いて、ウエストナイルウイルス2株と日本脳炎ウイルス3株の遺伝子の検出を行なったところ、良好に検出され、同時鑑別も可能であった。

はじめに

ウエストナイルウイルス感染症は、アフリカ、ヨーロッパ、西アジアなどで流行していたが、1999年にアメリカ合衆国のニューヨーク市で患者が発生した。その後、東海岸から西海岸に向けて感染地が拡大し、カリブ海諸国へも拡大しつつある。2005年10月には日本で初めて患者が確認された。患者はアメリカ合衆国で感染し、帰国して日本で発症したと推定された¹⁾。蚊が媒介する感染症で、野鳥に感染してウイルスが増殖し、このウイルスを含んだ血液を蚊が吸って他の野鳥に感染する感染環がある。いったん日本にウイルスが侵入すると、野鳥の感染防止は不可能なので、日本に定着すると考えられる。ヒトや馬などは、このウイルスに感受性はあるが最終宿主であり、蚊を通じて他のヒトやウマへの感染源となる可能性は少ない。ウエストナイルウイルスはフラビウイルス科で、日本脳炎ウイルスと近縁のウイルスである。ウエストナイル熱やウエストナイル脳炎は発生時期や、潜伏期、脳炎などの臨床症状が日本脳炎と類似し、また、抗原性も類似しているため血清反応で交差反応があり、判別が困難である。

2003年度厚生労働省科学研究事業「地域における地方衛生研究所の健康危機管理のあり方」の中の「健康危機管理のための試験検査の開発と標準化に関する研究」成果の一環として、名古屋市衛生研究所で開発された「ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウ

イルスを区別して検出できる検査用プライマー」が全国の地方衛生研究所あて配布された。我々は、配布されたプライマーとウエストナイルウイルスの代表株、日本脳炎ウイルスの代表株及び大分県分離株を用いて、RT-PCR反応を検討したので報告する。

材料及び方法

1 検査材料

検査材料は、ウエストナイルウイルス (g2266株、FCG株)、日本脳炎ウイルス (JaGAr 01株、大分県分離株 JEV/OITA/53/1998、JEV/OITA/76/1998) を用いた。

2 RNAの抽出及びRT-PCR反応

RNAの抽出は、QIAamp Viral RNA mini Kit (QIAGEN) を用いた。逆転写反応は、酵素にSuper Script RT (Invitrogen)、プライマーにRandom Primer (Invitrogen) を用い、42 30分反応させた後、99 で5分間加熱し、氷冷した。PCR反応は、酵素にEx Taq (Takara) を用いた。プライマーは、WN OuterS (3' - tggatwgargaraatg aatggat - 5')、OuterC (3' - tccgaracrgtwyygagg gctt - 5') を1stPCRに、WN InnerS (3' - gargaca tytggtygg - 5')、InnerC (3' - caggcagcaccgtmtr cyca - 5') を2nd PCRに用いた。1st PCRの条件は、(1)denature 95 9分、(2)denature 95 30秒、an nealing 50 30秒、extension 68 60秒 (45サイク

ル)、(3)extension 70 10分、(4)保存 4 で行なった。2nd PCRの条件は、(1)denature 95 9分、(2)denature 95 30秒、annealing 52 30秒、extension 68 60秒 (45サイクル)、(3)extension 70 10分、(4)保存 4 で行なった。PCR反応後、3.5%アガロースで電気泳動を行い、PCR産物の有無とサイズを確認した。

3 PCR産物の遺伝子解析

PCR産物は、MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (AB) でサイクルシーケンス反応を行なった。反応産物をCENTRI-SEP (PRINCETON) で精製後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (AB) により塩基配列を決定し、DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) のBLASTを用いて、遺伝子の相同性検索を行った。

結 果

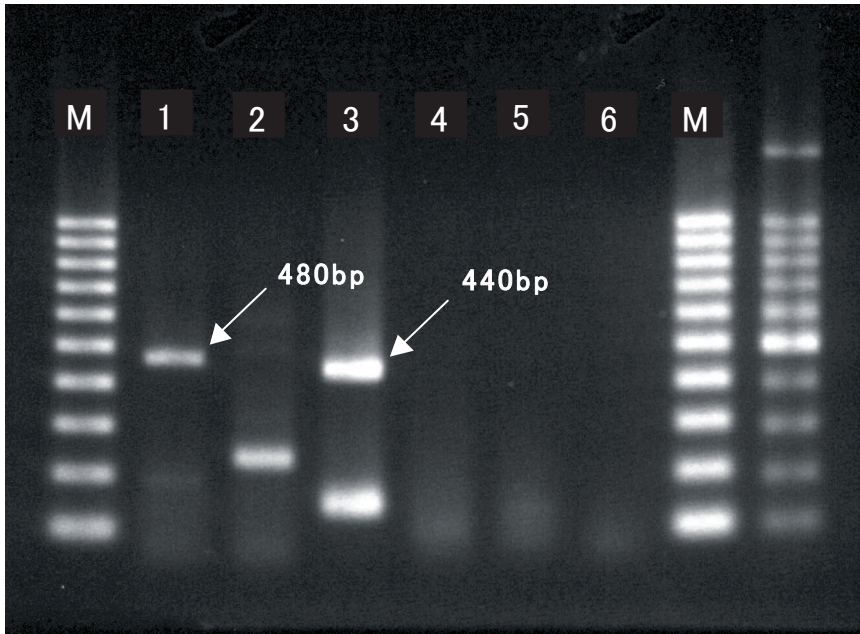
1st PCR産物を電気泳動したところ、WNV g2266株とJEV JaGAr O1株で予定の大きさのバンドが検出され、それぞれ480bp (予定:480~490bp)と440bp (予定:440~450bp)であった(図1)。2nd PCR産物を電気泳動したところ、全ての検体で予定の大きさのバンドが検出された(図2)。バンドの大きさは、WNV g2266株とWNV FCG株が335bpで、JEV JaGAr O1株、JEV/OITA/53/1998株及びJEV/OITA/76/1998株が280bpであった。増幅したPCR産物の遺伝子配列を決定しBLASTで検索したところ、それぞれ目的としたウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルスの遺伝子と94%以上の高い相同性を示した(表1)。

考 察

国内でウエストナイル熱が疑われる患者が発生した際、患者の血液または髄液からのウイルス分離、PCR法による遺伝子の検出、IgM抗体の検出などが届出に必要な基準となっている。PCR法による遺伝子検出法として国立感染症研究所ウイルス第一部が「ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル 第3版」を発行し、この中でE領域を増幅するWNNY514とWNNY904のプライマーセット及びNS3領域を増幅するFla-U5004とFla-U5457のプライマーセットが紹介されている²⁾。E領域のプライマーはウエストナイルウイルスのみ検出するが、NS3領域のプライマーはウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスを検出する。NS3領域のプライマーは、感度は良いがウエストナイルウイルスと日本脳炎を区別できず、さらに遺伝子配列を調べる必要がある。今回、ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの同時鑑別を目的としたプライマーを用いてネステッドPCRを実施したところ、ウエストナイルウイルス2株、日本脳炎ウイルス3株を全て検出し、増幅された遺伝子の大きさから、ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスを鑑別できた。さらに、増幅された遺伝子の配列を調べたところ、ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの遺伝子を増幅したことが確認された。日本脳炎ウイルスの分布地域である日本において、ウエストナイルウイルスの検出を行なうには、感度や検査時間短縮の点で有用なプライマーであると思われる。

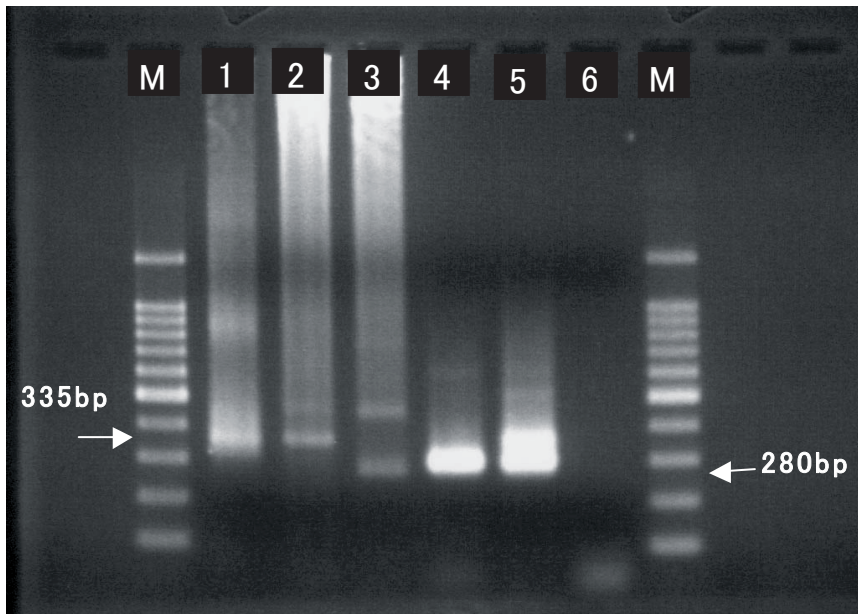
参 考 文 献

- 1) 小泉加奈子、中島由紀子、松崎真和、小井戸則彦、大曾根康夫、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎、秋月哲史：本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例, 感染症学雑誌, 80, 56 - 57 (2006)
- 2) 国立感染症研究所ウイルス第一部 高崎智彦、倉根一郎：「ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル 第3版」, p.6 - 9 (2005)



M: サイズマーカー
 1 : WNV g2266
 2 : WNV FCG
 3 : JEV JaGAr O1
 4 : JEV/OITA/53/1998
 5 : JEV/OITA/76/1998
 6 : 陰性対照

図1 1st PCR産物の電気泳動



M: サイズマーカー
 1 : WNV g2266
 2 : WNV FCG
 3 : JEV JaGAr O1
 4 : JEV/OITA/53/1998
 5 : JEV/OITA/76/1998
 6 : 陰性対照

図2 2ndPCR産物の電気泳動

表1 PCR産物の相同性

ウイルス	株	相同性	比較対照
ウエストナイル	g2266	250/250 (100%)	WNV g2266
ウエストナイル	FCG	296/298 (99%)	WNV ArD76104
ウエストナイル	JaGArO1	328/336 (97%)	JEV JaGAr O1
日本脳炎	JEV/OITA/53/1998	225/228 (98%)	JEV JaGAr O1
日本脳炎	JEV/OITA/76/1998	189/200 (94%)	JEV JaGAr O1

