

[Med. Entomol. Zool. Vol. 57 No. 4 p. 279-286 2006]

日本国内における蚊からのウエストナイルウイルス検出法の検討

澤邊京子¹⁾ 佐々木年則¹⁾ 星野啓太¹⁾ 伊澤晴彦¹⁾ 小滝 徹²⁾
伊藤美佳子²⁾ 高崎智彦²⁾ 江下優樹³⁾ 小林睦生¹⁾

¹⁾ 国立感染症研究所昆虫医科学部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1)

²⁾ 国立感染症研究所ウイルス第一部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1)

³⁾ 大分大学医学部感染分子病態制御講座 (〒879-5593 大分県由布市狭間町医大ヶ丘 1-1)

(受領: 2006年7月7日; 掲載決定: 2006年10月6日)

Evaluation of the assays for detection of West Nile virus from mosquitoes in Japan

Kyoko SAWABE¹⁾, Toshinori SASAKI¹⁾, Keita HOSHINO¹⁾, Haruhiko ISAWA¹⁾,
Akira KOTAKI²⁾, Mikako ITOH²⁾, Tomohiko TAKASAKI²⁾,
Yuki ESHITA³⁾ and Mutsuo KOBAYASHI¹⁾

¹⁾ *Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases,
Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640 Japan*

²⁾ *Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1,
Shinjuku-ku, Tokyo, 162-8640 Japan*

³⁾ *Department of Infectious Disease Control, Faculty of Medicine, Oita University,
Idaigaoka 1-1, Hasama-machi, Yufu City, Oita, 879-5593 Japan*

(Received: 7 July 2006; Accepted: 6 October 2006)

Abstract: In Japan, the invasion of the West Nile virus (WNV) has not been reported. However, in order to develop a rapid- and sensitive-detection system for WNV, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), TaqMan RT-PCR, and VecTest™ WNV assays were evaluated. VecTest™ produced results within 1 hour and no specialized training was required. However it showed the lowest sensitivity to detect WNV ($> 10^5$ plaque-forming units; PFU/tube) and was costly. The TaqMan RT-PCR assay was the highest sensitive assay (> 0.25 PFU/tube) and was followed by the RT-PCR assay (> 20 PFU/tube), although it took 10 hours for investigators to get the results of both assays and their protocols are more complex than that of the VecTest™. In addition, TaqMan RT-PCR is simpler than RT-PCR. These results suggest that the TaqMan RT-PCR assay may be the most effective for WNV survey at present in Japan. We hereby recommend one of the most preferable WNV surveillance systems at present in Japan as follows. First, the mosquito pool supernatants are screened for the presence of WN viral RNA by using the TaqMan RT-PCR assay with WNV primer-probe sets. Second, the viral RNA-positive pools are used for the virus isolation using cell culture assay. Finally, the isolated viruses are characterized for the viral genome by using molecular biological techniques.

Key words: West Nile virus, VecTest™, RT-PCR assay, TaqMan RT-PCR assay, virus detection and isolation

はじめに

1999年、米国ニューヨーク市において突如として流行したウエストナイル(WN)熱は年々西へと流行域を拡大し、これまでに60種類以上の蚊および、280種類以上の野鳥からウイルスが検出されている(CDC, 2006)。2005年6月現在で、蚊、馬、人のいずれにも感染例が報告されていない州はアラスカ州とハワイ州のみである。また、WN熱の小規模な流行は、北米大陸のみならず、ヨーロッパ諸国、ロシア、極東地域においても散発的に起こっており(Dauphin et al., 2004)、WNウイルス(WNV)のわが国への侵入に対するリスクは年々増してきている。2005年には、米国から帰国後に日本国内でWN熱を発症した事例が報告されたが(小泉ら, 2006)、現在までのところ、国内において感染蚊の検出には至っていない。このような状況において、わが国へは、強毒タイプとされる1999年ニューヨーク市で流行したウイルス株(WNV-NY99)のみならず、それ以外の地域からも異なったタイプのWNVの侵入が想定されることから、変異株の検出にも広く対応でき、かつ、迅速で精度の高い、蚊からの検出法の確立が求められている。

米国では、逆転写-polymerase chain reaction (RT-PCR)法(Shi et al., 2001; Hadfield et al., 2001)、TaqMan RT-PCR法(Lanciotti, 2000; Papin et al., 2004)、nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)法(Lanciotti and Kerst, 2001)などによるウイルス遺伝子の検出、あるいはenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法(Ebel et al., 2002; Godhardt et al., 2006)、VecTest™ イムノクロマトグラフィ法(Ryan et al., 2003; Henson and Hicock, 2004)などによるウイルス抗原に対する免疫学的検出などの方法が、患者血清に対する診断のみならず、野鳥類、哺乳動物、蚊など、あらゆる種類の検体からのウイルス検出に試みられている。しかし、わが国におけるWNVの流行事情は米国とは大きく異なり、まだウイルスの侵入は確認されておらず、特に蚊からのウイルス検出法が検討されることはなかった。そこで本研究では、実験的にWNV感染蚊を作製、あるいはウイルス抗原を蚊ホモジネートに添加したサンプルを調製し、VecTest、RT-PCR法、TaqMan RT-PCR法を用いて、蚊からのWNV検出を想定した際の経済性、検出限界力価、迅速性、および煩雑性を比較した。

材料と方法

ウイルス抗原および培養細胞

実験に用いたWNVは、当研究所ウイルス第一部に保存されているNY99株(lineage 1, GenBank accession number AF196835)およびFCG株(lineage 2, GenBank accession number M12294)である。NY99株は、哺乳動物由来Vero細胞(アフリカミドリザル肝臓由来Vero 9013株, ヒューマンサイエンス細胞資源バンクより購入)への細胞接種系で継代、馴化されたウイルス株である。FCG株は、ヒトスジシマカ*Aedes albopictus* (Skuse)由来細胞系C6/36細胞(同バンクより購入)への接種後、5%CO₂, 28°C条件下で7~10日間培養し、その上清をウイルスストック液として感染蚊の作製に用いた。各培養上清中のウイルス力価は、Vero細胞を用いたブランクアッセイ法(Beatty et al., 1989; 国立感染症研究所, 2006)により、NY99株 4×10^6 plaque-forming units (PFU) / ml, FCG株 10^7 PFU/mlと推定された(以下、ウイルス力価の推定は同様に行った)。比較実験に用いた日本脳炎ウイルス(JEV) JaGAR 01株(GenBank accession number AF069076)のウイルス力価は、上記アッセイ法により $> 10^8$ PFU/mlと推定された。

WNV感染蚊の作製

WNV感染蚊は、アカイエカ*Culex pipiens pallens* (Coquillett) (大阪府豊中市庄内産)、およびヒトスジシマカ(福岡県久留米市旭町産)のそれぞれ羽化4~5日目の雌成虫胸部側板に、FCG株ウイルス抗原培養液0.17 μ l/mosquito (蚊1頭当たり 10^3 PFUと推定)を注射し、ウイルス接種後29~30°C温度条件下で約4%の砂糖水を与えて約14日間飼育し作製した(江下, 1982; 林ら, 2003)。感染14日目における感染蚊1頭当たりのウイルス力価は、両種ともに約 10^6 PFU/mosquito (アカイエカ平均 2.1×10^6 , $n=3$; ヒトスジシマカ平均 7.5×10^6 , $n=3$)と推定された。野外捕集蚊プールからのウイルス検出法を検討するためには、上記ウイルス抗原培養液あるいはWNV感染蚊が、常に蚊体液ならびに蚊組織が存在する蚊ホモジネートから検出される必要がある。したがって、力価を調整したNY99株あるいはJEV JaGAR 01株の各ウイルス抗原培養液をWNV非感染蚊50頭に加えた蚊ホモジネートを作製し、あるいはFCG株感染蚊1頭をWNV非感染蚊49頭に混入した蚊ホモジネートを作製し、それぞれを段階希釈したサンプルを各種ウイルス検出法の比較実験に用いた。

VecTest™ 抗原検出法

VecTest™ WNV Antigen Assay (Medical Analysis Systems, Inc., CA) 付属のプラスチックチューブに雌成虫 50 頭を入れ, 2.5 ml の Grinding Solution と銅製のビーズ 4 個を入れた後, 高速で約 1 分間のボルテックスで虫体を破碎した. 5,000 rpm の低速度で約 5 分間遠心し (トミー精工, 東京), 回収した上清 250 μ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し, 付属のイムノクロマト用ストリップをマイクロチューブの中に入れ, 室温で約 15~30 分間静置し判定を行った.

RT-PCR 法

蚊プールは MEM 培養液 (MEM; Eagle's Minimum Essential Medium に streptomycin 200 μ g/ml, penicillin 200U/ml, gentamicin 50 μ l/ml, fungizone 0.5 μ g/ml, Invitrogen, Corp., Carlsbad, CA) 中で, 細胞破碎機 MM300 (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) を用いて破碎した. 10,000 rpm で約 5 分間遠心 (トミー精工) し, 回収した上清からウイルス RNA を High pure viral RNA kit (Roche, Mannheim, Germany) あるいは RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した. RT-PCR は AccessQuick RT-PCR System (Promega, Madison, WI) あるいは Takara RNA PCR Kit (AMV) (タカラバイオ, 滋賀) により, 53°C 30 分, 92°C 2 分をそれぞれ 1 サイクル, 92°C 1 分, 53°C 1 分と 72°C 1 分の組み合わせで 40 サイクル行い, その後 72°C 10 分を行った. 用いたプライマーは, WNV のエンベロープ (E) 領域, および非構造タンパク質 (NS3) 領域に設計された WNNY514 と WNNY904, および Fla-U5004 と Fla-L5457 (国立感染症研究所, 2006) である.

TaqMan RT-PCR 法

TaqMan RT-PCR に用いたプライマー・プローブセットは, E 領域の遺伝子断片を検出するために設計された WNENV-forward (1160-1180), WNENV-reverse (1209-1229), WNENV-probe (1186-1207) (Lanciotti, 2000) である. 反応条件は, 48°C 30 分, 95°C 10 分をそれぞれ 1 サイクル行い, 95°C 15 秒と 60°C 1 分の組み合わせを 45 サイクル行った (iCycler, 日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ, 東京). ウィルス力価をあらかじめ決定した NY99 株ウイルス抗原培養液を用いてスタンダードとなる検量線を作成し, 実験から得られた増幅サイクル数をもとに, 蚊 1 頭当たりのウィルス力価に換算した.

Loop-mediated isothermal amplification (Lamp) 法

Lamp 法は, Loopamp® プライマーセット WNV (栄研化学, 東京) を用いてリアルタイムに WNV 遺伝子断片を検出し, 目視あるいは濁度計により結果判定を行う方法である. 本研究では実際に本法によるウィルス検出は行わなかったが, その検出限界値および操作に関する詳細は Parida et al. (2004), および栄研化学 News Release (2004) を引用した.

結 果

WNV-FCG 株接種により作製したアカイエカおよびヒトスジシマカの各感染蚊 1 頭を, それぞれの種の非感染蚊 49 頭に混入し, VecTest WNV でウィルス抗原

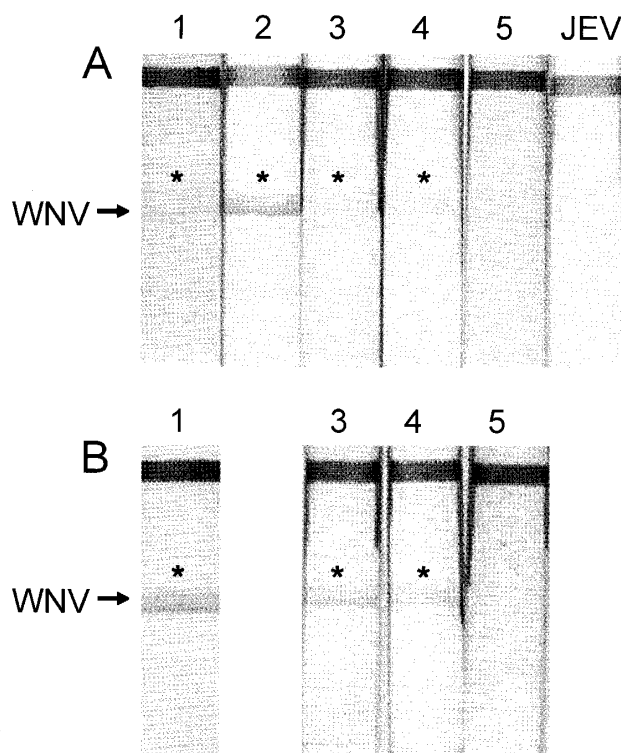


Fig. 1. VecTest™ WNV assay using the homogenates from *Culex pipiens pallens* (A) and *Aedes albopictus* (B). Strip 1, a West Nile virus (WNV)-infected mosquito (1.6×10^4 PFU/tube in *Cx. p. pallens* and 2.3×10^5 PFU/tube in *Ae. albopictus* calculated by Vero cell plaque assay) was homogenized with 49 of virus negative specimens; 2, 2.5×10^7 PFU/tube of WNV antigen with 50 of virus negative specimens; 3, 9.3×10^5 PFU/tube; 4, 4.8×10^5 PFU/tube; 5, 4.8×10^4 PFU/tube; JEV, 9.6×10^6 PFU/tube of Japanese encephalitis virus (JEV) antigen was homogenized with 50 of virus negative specimens. Positive results were marked with asterisks (*) on the strips.

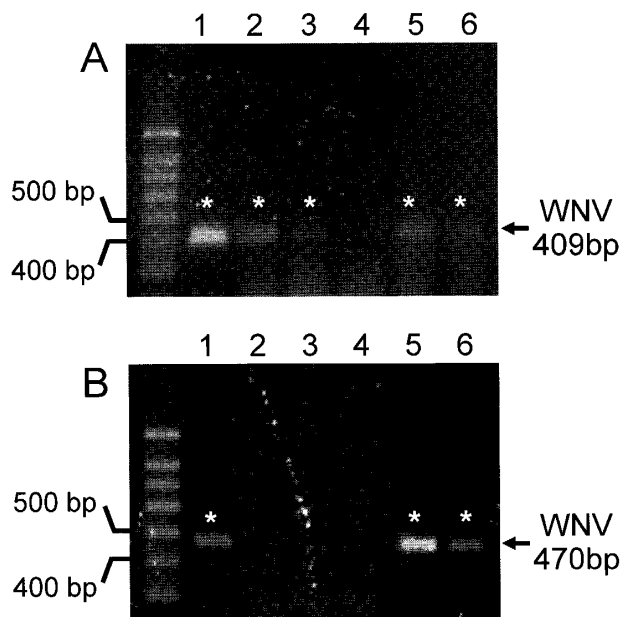


Fig. 2. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. RT-PCR was performed by using specific primers for detection of West Nile virus (WNV)-NY99 strain, WNNY514 and WNNY 904 (A), and the flavivirus universal primers for almost all flaviviruses, Fla-U5004 and Fla-L5457 (B). Lane 1, 2.0×10^3 PFU/tube of WNV antigen was homogenized with 50 of virus negative *Culex pipiens pallens*; 2, 2.0×10^2 PFU/tube; 3, 20 PFU/tube; 4, 2 PFU/tube; 5, a WNV-infected *Aedes albopictus* (2.3×10^3 PFU/tube calculated by Vero cell plaque assay) was homogenized with 49 of virus negative *Ae. albopictus*; 6, a WNV-infected *Cx. p. pallens* (1.5×10^2 PFU/tube by Vero cell plaque assay) was homogenized with 49 of virus negative *Cx. p. pallens*. Positive results were marked with asterisks (*) on the lanes.

を検出した。アカイエカでは 10^4 PFU (1.6×10^4 PFU/tube, Vero 細胞ブランクアッセイ法により推定し tube 当たりに換算, 以下 tube 当たりの力価を PFU, 値は 10^4 のみ示す) (Fig. 1, A1), ヒトスジシマカでは 10^5 PFU (2.3×10^5) (Fig. 1, B1) のウイルス力価までが検出可能であった。次いで, WNV 非感染アカイエカおよびヒトスジシマカの各 50 頭に, NY99 株ウイルス抗原培養液を添加した蚊ホモジネートを用いて, 同様にウイルス抗原を検出した結果, アカイエカ, ヒトスジシマカともにその検出限界値は 10^5 PFU (4.8×10^5) であった (Fig. 1, A4 および B4)。比較のために作製した JEV JaGAr 01 株ウイルス抗原培養液を添加した WNV 非感染アカイエカ 50 頭の蚊ホモジネート (9.6×10^6 PFU, Vero 細胞ブランクアッセイ法により推定) を

VecTest WNV によるウイルス抗原検出に供したが, 陽性バンドは現れなかった (Fig. 1A)。以上の結果から, VecTest WNV の特徴のひとつである WNV のみを検出する特異性が確認され, VecTest の検出限界値は $> 10^5$ PFU と推定された。

RT-PCR 法では, NY99 株ウイルス液を, WNV 非感染アカイエカ 50 頭から作製した蚊ホモジネートに添加した場合, NY99 株特異的プライマー (WNNY514 および WNNY 904) で 20 PFU 以上 (Fig. 2, A3), フラビウイルス共通プライマー (Fla-U5004 および Fla-L5457) で 10^3 PFU (2×10^3) (Fig. 2, B1) 以上の力価で検出された。FCG 株感染蚊 1 頭を非感染 49 頭に混入させた蚊ホモジネートでは, いずれのプライマーを用いてもヒトスジシマカで 10^3 PFU (2.3×10^3), アカイエカで 10^2 PFU (1.5×10^2) まで検出された (Fig. 2)。本結果から, RT-PCR 法 ($20\text{--}10^3$ PFU) が VecTest ($10^4\text{--}10^5$ PFU) に比べて検出感度に優れることが明らかになり, 検出するウイルス株とプライマーがよくマッチしていれば検出感度は高まった (20 PFU)。

次に, NY99 株ウイルス液を, WNV 非感染アカイエカ 1 頭のホモジネートに添加し, TaqMan RT-PCR 法によりウイルス遺伝子を検出した (Fig. 3)。段階希釈した蚊ホモジネートから NY99 株特異的プライマー・プローブセット (WNENV) により遺伝子の検出を行った結果, 2.5 PFU (検量線より推定) では 25-28 サイクル辺りから遺伝子増幅が認められた。次いで 10 倍希釈した蚊ホモジネート (ウイルス力価は 0.25 PFU と推定) では, 前者より増幅開始は遅れたが 35-42 サイクルで上昇し始めた。これ以上に希釈した蚊ホモジネートでは遺伝子の増幅は認められなかった。以上の結果から, TaqMan RT-PCR 法による検出限界値は 0.25 PFU と推定された。

Table 1 に WNV 検出法 4 種類の, 検出に要する時間, 検出感度, ならびにプール当たりの必要経費を比較した。VecTest は近年 WNV 検出に対応して米国で開発された抗原検出キットであるが, 操作が簡単で, しかも検査結果が得られるまでの時間が 1 時間以内と短く, 結果の判定が容易であること, 特別な設備がなくても実施できることが長所である。反面, キットの値段は高く, 検出感度は RT-PCR 法や TaqMan RT-PCR 法に比べて低かった。一方, RT-PCR および TaqMan RT-PCR は, ウイルス遺伝子の検出法として一般的に用いられる検査法であり, 試薬類およびその他消耗品にかかる費用は VecTest よりも安価で, 抽出した RNA は検出用プライマーを選択するだけで, WNV 以外のウイルス遺伝子の検出にも適用できるという利点もある。

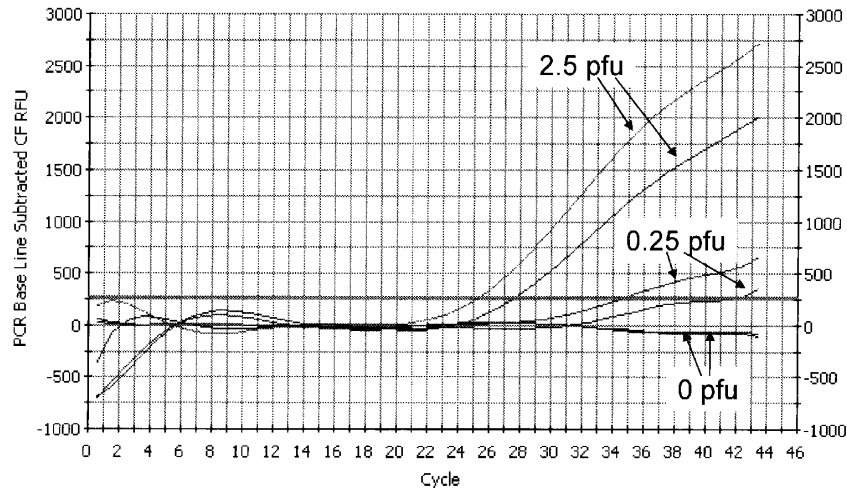


Fig. 3. Amplification profile from real-time TaqMan reverse transcription-polymerase chain reaction (TaqMan RT-PCR) assay. A West Nile virus (WNV) antigen was homogenized with one of virus negative *Culex pipiens pallens*. The amplification plot was obtained from the TaqMan RT-PCR assay testing of the previously titrated WNV dilutions (2.5 and 0.25 PFU/tube were performed in duplicate) with the WNENV primer-probe set, WNENV-forward (1160–1180), WNENV-reverse (1209–1229), WNENV-probe (1186–1207) (Lanciotti, 2000).

Table 1. Comparison of equipment, chemicals, time commitments, sensitivities and costs required in West Nile virus laboratory assay.

Assays	Equipment and chemicals	Time (h)	Sensitivity (PFU/tube)	Cost per pool (¥) ^a
VecTest™ antigen assay	VecTest™ kit Vortex	1	>10 ⁵	2,000
RT-PCR assay	RNA extraction kit One step RT-PCR kit Primer set PCR machine Electrophoresis Gel staining, UV Transilluminator	12	>20 ^b	1,000
TaqMan RT-PCR assay	RNA extraction kit TaqMan one-step RT-PCR master mix Probe & Primer set Real time PCR machine	8	>0.25 ^c	1,200
*Loop-mediated isothermal amplification (Lamp) assay	Loopamp® RNA amplification kit (RT-PCR) Loopamp primer set WNV Spectrofluorophotometer Water bath	6	>0.1	1,400

* Lamp assay, see website (<http://www.eiken.co.jp/news/pdf/20040726-1.pdf#search='Lamp%20WNV'>), and Parida et al., 2004.

^a Costs were for specific supplies only and do not reflect costs for equipment, personnel, or general laboratory supplies and services.

^{b, c} Sensitivities were obtained from each assay using NY-strain specific primers and primer & probe set, respectively.

他のウイルス検出などの経験のある施設であれば実施は容易であるが、これら遺伝子検出法の欠点は、RNAの抽出からRT-PCRに至る過程で使用する試薬類ならびに器具類などが多岐にわたり複雑で、それらの取り扱いには熟練を要することであろう。また、結果が得られるまでに8-12時間もの時間を要するため、迅速診断には不向きである。しかし、ウイルス株に特異的なプライマーを用いた場合 (NY99株 WNVを WNNYプライマーで検出)、RT-PCR法の検出感度はVecTestよりも1,000倍以上高くなり、TaqMan RT-PCR法 (NY99株 WNVを WNENVプライマー・プローブセットで検出) では、RT-PCR法よりもさらに100倍感度が高まることが示唆された。

Lamp法についての比較実験は行わなかったが、Parida et al. (2004) は、RNAを抽出するまでは他の遺伝子検出法と同じであるが、検出に要する時間はRT-PCR法よりも短く、NY99株に対する検出限界値0.1 PFUは、TaqMan RT-PCR法の検出感度とほぼ同等であると報告している。また、検出に際しては、同時に3種類のプライマーセットを用いるため、他のフラビウイルスに対して陽性判定を示すことはほとんどなく、WNVのそれぞれのウイルス株を特異的に検出する特異性に優れると言う。Lamp法で行う操作は全般に他の遺伝子検出法に比べて簡便であるが、判定には濁度計などの専用の装置を必要とするため、検出に要する費用はRT-PCRならびにTaqMan RT-PCR法よりも高価である (栄研化学 News Release, 2004)。判定を濁度計を使わずに蛍光目視で行うことも可能であるが、より正確に、またリアルタイムに判定を得るためには各種濁度計が必要とされるであろう。今後、濁度計が安価で普及すれば、検出感度の点で一考に値すると思われる。

考 察

2006年現在のわが国において、帰国後にWN熱を発症した輸入症例の報告 (小泉ら, 2006) はあるものの、WNVの動物への感染、感染蚊の検出、増幅動物である野鳥類の死亡などはこれまでのところ報告されていない。これらの情報だけで国内にWNVが存在しないとは断定できないが、いずれの動物種からもウイルスが検出されていないことは、わが国へのWNVの侵入は未だ起こっていないことを示唆している。したがって、国内におけるWNVサーベイランスの実施に際して選択される検査法には、第一に高い検出感度が求められるであろう。米国においては、キットの取り扱いや結果判定が簡便であることから、VecTestがWNVの一次スクリーニングとして汎用されている。本研究においてもそ

の利便性は高く評価されたが、その検出限界値はRT-PCR法やTaqMan RT-PCR法などの遺伝子検出法に比べて100倍から1,000倍も高かった。つまり、ウイルス量が多ければVecTestでも検出することができるが、少なければ見逃してしまう可能性が高いと思われる。

実際に、2000年ニューヨーク州Staten Island (Richmond County) で実施されたWNVサーベイランスにおいて、採集された蚊からのTaqMan RT-PCR法とVecTestによる検出結果を比較したところ (Nasci et al., 2002)、前者の方法では801プール中34プールが陽性であった (プール陽性率4.2%) のに対し、後者では18プールのみが陽性 (2.2%) と判定された。TaqMan RT-PCR法で陽性であった蚊プールの約半数をVecTestでは陰性と判定したことになる。2000年WNVが流行して2年目の米国では、WN患者数21名、死亡鳥数4,139羽、陽性蚊470プールが記録され、まだ全米にその流行域は拡大していないものの、種々の動物からウイルスが検出される状況であった (CDC, 2001)。特にニューヨーク州からの報告が最も多く、患者数14名、死亡した馬24頭、その他の哺乳類の死亡25頭、死亡した野鳥類1,263羽、合計352の蚊プールからウイルスが検出されている (CDC, 2001)。このようなウイルスの流行状況下にあってもVecTestの検出感度がTaqMan RT-PCR法の5割程度でしかなかったことから、WNVの流行が未だ顕在化していないわが国においてVecTestによる検出を実施した場合、多くの蚊プールが陰性と判定される可能性が危惧される。

ウイルス抗原培養液を用いてTaqMan RT-PCR法の検出限界値を求めた実験 (国立感染症研究所, 2006) から、ウイルス株特異的なプライマー・プローブセットを用いた場合 (NY99株をWNENVあるいはWN3'NCで検出)、0.1-1.0 PFUまでが検出可能であった。蚊ホモジネートからウイルス遺伝子検出を試みた我々の結果 (NY99株をWNENVで検出) から得られた検出限界値は0.25 PFUであり、上述したウイルス培養液からの検出値とほぼ同じ値であった。蚊体液および組織内には、蚊本来のRNAや、ある種の阻害因子が存在し、それらの影響で逆転写反応やPCRが阻害される場合もあり、また非特異的なバンドが出現する可能性も知られている (林ら, 2003)。しかしながら、本結果は、蚊ホモジネートをウイルス検出の材料とした場合にもTaqMan RT-PCR法が有用であることを示唆しており、他の検出法との比較においても最も検出感度に優れた方法であることが確認された。

しかし、FCG株をNY99株特異的なプライマー・プ

ローブセットで検出した場合の検出感度は上述した値よりも10倍から100倍低くなり、その限界値は10 PFUであった(国立感染症研究所, 2006)。NY99株特異的プライマー・プローブセット(WNENVおよびWN3'NC)は、いずれも現在米国で流行しているNY99株に対しては感度が高く特異的であり、わが国において米国からのウイルス侵入に備えるためには極めて有用である。しかし、それ以外の地域で検出に用いる場合、あるいはNY99株以外のウイルス株を検出対象とする場合には、検出不可能な場合が出てくることも予想される。近年、Usuku et al. (2004)は、ヌクレオカプシド(nucleocapsid)領域に設計したcapプライマー・プローブセットによって、WNVに近縁なKunjinウイルス(OR393株)も含むWNVのlineage 1(NY99株, Eg101株, g2266株)およびlineage 2(FCG株)に分類される変異株に対しても検出が可能であることを報告した。また、Tang et al. (2006)は、3'非翻訳領域(3'UTR)にプライマー・プローブセットを設計し、同様にlineage 1(NY385-99株, Eg101株)およびlineage 2(B956株)のいずれに対しても有用であることを確認した。このように、さらに広範囲に使用できるプライマー・プローブセットの開発は今後も進展するであろうが、現時点においては上述した2種類のプライマー・プローブセット(Usuku et al., 2004; Tang et al., 2006)の有用性は高いと考えられる。

さらに範囲を広げ、フラビウイルス全般を検出可能な共通プライマー(Kuno et al., 1998)を用いてRT-PCRを行い、得られたPCR産物の遺伝子解析結果からウイルス株の遺伝子型同定を行う方法も推奨できる。この場合は、基本的にフラビウイルス共通プライマーを使用し、必要に応じてNY99株検出用プライマーなどの各ウイルス型に特異的なプライマーを併用するとよいであろう。しかしながら、RT-PCR法による検出においては、その検出感度が問題になる。本結果でも示したように、RT-PCR法の検出感度はTaqMan RT-PCR法に比べて100倍低かった。このような場合には、細胞接種系により遺伝子検出が可能レベルまでウイルス量を増やし、RT-PCR法で遺伝子検出を行うと効果的である。一般的にウイルス量が少ない場合は、適した培養細胞への接種によりウイルス力価を増加させることによって検出感度が増すことが知られている。本研究では細胞培養系に対して検討しなかったが、米国でのWNVの検出において、死亡した野鳥の脳組織からRT-PCR法によりWNV遺伝子検出を行った結果と、Vero細胞接種系を経た後の検出結果を比較したところ、細胞接種後のプール陽性率はRT-PCR法に比べて1.4倍高かった

(Siirin et al., 2004)。米国におけるWNVの分離には、主に哺乳動物由来のVero細胞が使用されているが(Kauffman et al., 2003; Nasci et al., 2002)、JEVの場合、昆虫由来細胞系C6/36細胞を用いたウイルス分離法は、他の蚊由来細胞系、あるいは乳のみマウス脳内接種による方法と比較して同等以上の効率であるとの報告もある(Igarashi et al., 1973, 1981)。WNVの分離にどの細胞接種系が適しているかについては今後検討を加えたい。

野外捕集蚊からのウイルス検出に効果的な細胞接種系であるが、動物組織からWNVを検出する際の細胞変性効果(CPE)の判定には10日間の培養(Nasci et al., 2002)、あるいは7日後にCPEが見られなかった培養細胞は新鮮な細胞に接種し再度7日間の培養を行う(Miller et al., 2003)など、細胞培養にはある程度の日数が必要である。正確に結果判定を行うために14日以上(少なくとも2回以上のblind-passage)の日数を必要とするならば、本細胞接種系は迅速診断には向かないウイルス検査法と言える。しかし、細胞接種系を経ることは、培養細胞に感染性のある、つまり力価のあるウイルスを選択的に増殖させ、結果的にウイルス分離が可能になることから、ウイルス分離をも視野に入れた検査法として重要な意味を持つ。さらに、得られたウイルス分離株の遺伝子構造解析を行うことによって、ウイルスの侵入経路や病原性に関する情報が得られることも期待される。

以上の結果を踏まえて、わが国において推奨されるWNV検査法を次のように考えた。蚊ホモジネートはTaqMan RT-PCR法によりWNV遺伝子を検出する。この場合に選択するプライマー・プローブセットは、現時点ではNY99株特異的プライマー・プローブセットが優先されるであろうが、広範囲にWNVの変異株に対応できるプライマー・プローブセットなどの併用が望ましい。次いで、TaqMan RT-PCRの結果で陽性判定を得た蚊プールホモジネートは、培養細胞に接種しウイルス分離を試みる。継代培養後の細胞上清からRNAを抽出し、RT-PCR法により得られたPCR産物の遺伝子解析を行うことでウイルス学的な考察を行う。このような計画の下にWNVサーベイランスが進められることを期待したい。

謝 辞

本研究遂行にあたり、ご配慮ならびにご協力いただいた昆虫医科学部部員に深謝する。この研究の一部は、厚生労働科学研究費(H17-新興一般-018, H18-新興一般-009)からの助成により実施された。

引用文献

- Beaty, B. J., Calisher, C. H. and Shope, R. S. 1989. Arboviruses. *In: Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections* (ed., Schmidt, N. J. and Emmons, R. W.), pp. 797-856. American Public Health Association, Washington, D.C.
- CDC, 2001. Update: West Nile Virus Activity—Eastern United States, 2000, Available at: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4946a2.htm>
- CDC. 2006. West Nile Virus Home, Entomology and Vertebrate Ecology. Available at: <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/mosSpecies/htm> and <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/birdspecies.htm>
- Dauphin, Z., Zientara, S., Zeller, H. and Murgue, B. 2004. West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 27: 343-355.
- Ebel, G. D., Dupuis, A. P., Nicholas, D., Young, D., Maffei, J. and Kramer, L. D. 2002. Detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to West Nile virus in birds. *Emerg. Infect. Dis.*, 8: 979-982.
- 栄研化学 News Release. 2004. 基礎研究用 LoopampR プライマーセット第一弾: プライマーセット WNV (West Nile Virus). Available at: <http://www.eiken.co.jp/news/pdf/20040726-1.pdf>
- 江下優樹. 1982. 日本産の蚊諸種のデングウイルス媒介能に関する実験的研究. 帝京医学雑誌, 5: 17-27.
- Godhardt, J. A., Beheler, K., O'Connor, M. J., Whyte, T. J., Reisdorf, E. S., Ubl, S. J., Bochsler, P. N. and Toohey-Kurth, K. L. 2006. Evaluation of antigen-capture ELISA and immunohistochemical methods for avian surveillance of West Nile virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18: 85-89.
- Hadfield, T. L., Turell, M., Dempsey, M. P., David, J. and Park, E. J. 2001. Detection of West Nile virus in mosquitoes by RT-PCR. *Mol. Cell Probes*, 15: 147-150.
- 林 昭宏, 鎌倉和政, 多賀賢一郎, 森 英人, 井村俊郎, 江下優樹, 内田幸憲. 2003. One step RT-PCR 法による媒介蚊からのフラビウイルス RNA の検出条件の検討. 感染症学雑誌, 77: 822-829.
- Henson, G. and Hicoock, P. 2004. Rapid detection of West Nile Virus in birds using the VecTest WNV Antigen Assay. *Clin. Lab. Sci.*, 17: 218-220.
- Igarashi, A., Buei, K., Ueba, N., Yoshida, M., Ito, S., Nakamura, H., Sasao, F. and Fukai, K. 1981. Isolation of viruses from female *Culex tritaeniorhynchus* in *Aedes albopictus* cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30: 449-460.
- Igarashi, A., Sasao, F., Wungkobkiat, S. and Fukai, K. 1973. Growth of Japanese encephalitis virus in established lines of mosquito cells. *Biken J.*, 16: 17-23.
- Kauffman, E. B., Jones, S. A., Dupuis, A. P. 2nd, Ngo, K. A., Bernard, K. A. and Kramer, L. D. 2003. Virus detection protocols for west nile virus in vertebrate and mosquito specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 3661-3667.
- 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. 2006. 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.
- 国立感染症研究所. 2006. West Nile Virus, ウエストナイルウイルス感染症検査法, Ver.4.0. Available at: <http://www.nih.go.jp/vir1/NVL/WNVhomepage/WN.html>
- Kuno, G., Gwong-Jen, J., Chang, K., Tsuchiya, R. and Karabatsos, N. 1998. Phylogeny of the genus Flavivirus. *Virology*, 72: 73-83.
- Lanciotti, R. S. 2000. Rapid detection of WNV from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4066-4071.
- Lanciotti, R. S. and Kerst, A. J. 2001. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 4506-4513.
- Miller, D. L., Mael, M. J., Baldwin, C., Burtle, G., Ingram, D., Hines II, M. E. and Frazier, K. S. 2003. West Nile virus in farmed alligators. *Emerg. Infect. Dis.*, 9: 794-799.
- Nasci, R. S., Gottfried, K. L., Burkhalter, K. L., Kulasekera, V. L., Lambert, A. J., Lanciotti, R. S., Hunt, A. R. and Ryan, J. R. 2002. Comparison of vero cell plaque assay, TaqMan reverse transcriptase polymerase chain reaction RNA assay, and VecTest antigen assay for detection of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 18: 294-300.
- Papin, J. F., Vahrson, W. and Dittmer, D. P. 2004. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 1511-1518.
- Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 257-263.
- Ryan, J., Dave, K., Emmerich, E., Fernandez, B., Turell, M., Johnson, J., Gottfried, K., Burkhalter, K., Kerst, A., Hunt, A., Wirtz, R. and Nasci, R. 2003. Wicking assays for the rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viral antigens in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 40: 95-99.
- Shi, P. Y., Kauffman, E. B., Ren, P., Felton, A., Tai, J. H., Dupuis, II, A. P., Jones, S. A., Ngo, K. A., Nicholas, D. C., Maffei, J. G., Ebel, G. D., Bernard, K. A. and Kramer, L. D. 2001. High throughput detection of West Nile virus RNA. *J. Clin. Microbiol.*, 39: 1264-1271.
- Siirin, M., Sargent, C., Langer, R. C., Parsons, R., Vanlandingham, D. L., Higgs, S. and Tesh, R. B. 2004. Comparative sensitivity of the VecTest antigen-capture assay, reverse transcriptase-PCR, and cell culture for detection of West Nile virus in dead birds. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 4: 204-209.
- Tang, Y., Anne Hapip, C., Liu, B. and Fang, C. T. 2006. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J. Clin. Virol.*, 36: 177-182.
- Usuku, S., Noguci, Y. and Takasaki, T. 2004. Newly developed TaqMan assay to detect West Nile viruses in a wide range of viral strains. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57: 129-130.