

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業））

分担研究報告書

ジカウイルス遺伝子高感度検出法の開発と評価

研究分担者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究協力者 モイ メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部、長崎大学熱帯医学研究所）

研究要旨：2014年夏に69年ぶりに国内流行したデング熱とよく似た臨床症状を呈するジカ熱（Zika fever）が2013年の11月から太平洋島嶼国において流行が始まった。2013年12月に別々にフランス領ポリネシアのボラボラ島を旅行した熱発患者に関して、デングウイルスおよびジカウイルスに関する実験室診断を実施したところ、尿からのウイルス遺伝子検査、特異的IgM抗体検査によりジカ熱と確定診断した。その後、2014年の6月にタイからのジカ熱輸入症例を確認した。タイは毎年大きなデング熱流行が発生している国である。したがって、ジカ熱がデング熱同様日本国内で発生し、デング熱流行と誤判断される場合も想定される。そのような状況で血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性を考慮し、高感度遺伝子検出法を開発し評価した。

A. 研究目的

ジカ熱はヤブカによって媒介され、その臨床像はデング熱と類似している。デング熱流行国では、ジカ熱がデング熱と診断されて流行が発生してもデング熱流行に紛れている可能性がある。2014年8月にデング熱国内流行が発生した我が国において、ジカ熱流行の可能性も考慮し、血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性を想定しておく必要がある。ジカウイルス遺伝子検出リアルタイムRT-PCR法は、準備しておくべき検査法である。

B. 研究方法

GenBankからジカウイルスの塩基配列を収集し、アライメントした後、塩基配列

835 - 911 と 1086 - 1162 の位置にプライマーおよびプローブセット（ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set）を選択した（表1）。これらは、我々の保有するジカウイルスおよびデング熱輸入症例（11症例）のデングウイルスおよびデング熱を疑った発熱患者の検体（18症例）を用いて評価した。

C. 研究結果

ZIKV860 Set, ZIKV1107 Set とともに ZIKV 遺伝子を増幅した。11人のデング熱患者血清を検査した結果、どちらのセット（Set）とも非特異的な反応を示さなかった。しかし18の非デング発熱患者の検体のうち1検体で ZIKV860 セットによる増幅に際して 37 サイクルでカーブの上昇があ

り判定保留となった。当該検体は溶血した検体であったため患者由来の遺伝子が非特異的に反応した可能性が考えられた。

D. 考 察

ジカウイルスはデングウイルスと同じくフラビウイルス科フラビウイルス属のウイルスでヤブカによって媒介されるウイルスである。臨床症状は発熱・痛み・発疹を3主徴とするデング熱と類似の発熱性疾患である。日本国内に生息するデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカは、ジカウイルスにも感受性があると推測されているが、詳細は現在検討中である。2014年の夏にデング熱が国内流行したことから、ジカ熱の流行の可能性も考慮しておく必要がある。そのためそのような状況で血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性もあり、血液製剤及び献血血におけるジカウイルス遺伝子検出に関しても準備を進めるべきである。

E. 結 論

ジカ熱がデング熱同様日本国内で発生し、デング熱流行と誤判断される場合を想定し、血液製剤及び献血血にジカウイルスが混入する可能性を考慮し、高感度遺伝子検出法を確立した。

F . 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

1. Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzuki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of General Virology*, 95(Pt 3):591-600, 2014.
2. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Archives of Virology*, 159(1):103-16, 2014.
3. Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: A case of coinfection. *Archives of Virology*. 159(11): 2969-75, 2014.
4. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, Matono T, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveillance*, 19(4). pii: 20683, 2014

5. 朽谷健太郎、清水恒弘、篠原 浩、土戸康弘、モイ メンリン、高崎智彦 . オーストラリア渡航中に発症したロスリバーウイルス感染症の本邦発報告 . 感染症学雑誌 . 88(2):155-159 (2014)

2 . 学会発表

国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8th Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)
3. Moi ML, Rattanamahaphoom J, Lim CK, Sirivichayakul C, Saijo M, Sabchareon A, Takasaki T, Kurane I. Neutralizing antibody titers as a surrogate for protection against dengue: a revisit of neutralizing antibody titers of dengue virus using FcγR-expressing cells. Joint International Tropical Meeting (JITMM) (Bangkok), December, 2014.
4. Moi ML, Shirai K, Ami Y, Lim CK, Suzuki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Development of a non-human primate model for primary and

secondary dengue virus infection using marmosets (Callithrix jacchus). The 63rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (New Orleans, Louisiana, USA) November, 2014

国内学会

1. 高崎智彦 .黄熱ワクチンとデングワクチン .第 25 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会 .平成 26 年 2 月 22 日 (東京都)
- 2 . 高崎智彦 . 黄熱ワクチンとデング熱ワクチン . 第 11 回渡航医学実用セミナー「海外赴任前健康ガイダンス」平成 26 年 6 月 30 日 (東京)
3. 高崎智彦 .デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか .日本記者クラブ .平成 26 年 9 月 12 日 (東京都、日本プレスセンタービル)
4. 高崎智彦 .海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行 (特別講演). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
5. 高崎智彦 .デング熱国内発生への対応 - デング熱の基礎と疫学 - .第 46 回日本小児感染症学会 .平成 26 年 10 月 18 - 19 日 (東京)
6. 高崎智彦 . 緊急企画 : 70 年を経ての再来 ~ デング熱国内流行 2014 . 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会 .平成 26 年 10 月 23 - 25 日 (岡山市)

7. 高崎智彦 . 緊急報告「 Dengue 熱 - 今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
8. MoiMeng Ling, 白井顕治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦 . Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
9. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二 . Dengue 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影響 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦 . Fc R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者における Dengue ウイルスに対する中和・感染増強能の検討 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 . 平成 26 年 11 月 10~12 日 (横浜市)
11. 高崎智彦 . 「 Dengue 熱から身を守るために ~ 忍び寄る地球温暖化 ~ 」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催 . 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)
12. 高崎智彦 . - 市民公開講座 - Dengue 熱 これからどうなる ? . 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催 . 平成 26 年 12 月 1 日 (東京、日本獣医生命科学大学)
13. 高崎智彦 . 「 Dengue 熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー . 平成 26 年 12 月 13 日 (東京 東医健保会館)
14. 高崎智彦 . Dengue 熱国内流行 ~ 70 年の時を経て ~ (特別講演) . 第 21 回リケッチア研究会 . 平成 26 年 12 月 20 - 21 日 (東京 国立感染症研究所)
15. 高崎智彦 . Dengue 熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症 . 平成 26 年度阪神地区感染症懇話会 平成 27 年 1 月 26 日 (大阪市 大阪府病院年金会館)

表 1

プライマー&プローブセット

Name	sequence (5' to 3')	genome position
ZIKV860 Set		
ZIKV 835F	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	835–857
ZIKV 860-FAM	FAM-CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG-TAMRA	860–886
ZIKV 911c	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	911–890
ZIKV1107 Set		
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG	1086–1102
ZIKV 1107-FAM	FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-TAMRA	1107–1137
ZIKV 1162c	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	1162–1139