

分担研究報告

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
委託業務報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

黄熱ウイルス野生株（南米株対応、アフリカ株対応）検出用リアルタイム PCR 法の開発

高崎智彦（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）

小滝 徹（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：黄熱ウイルスのリアルタイム RT-PCR (TaqMan) 法はすでに感染症研究所において確立しているが、あくまでワクチン株 (17D) により評価しているに過ぎない。17D 株はアフリカの黄熱患者から分離された Asibi 株を弱毒化したものである。しかし、近年は経済的にも政治的にも重要であるアフリカ大陸および 2013 年サッカーワールドカップおよび 2014 年のオリンピックが開催される南アメリカ大陸野生株に対応した系およびアフリカ大陸野生株対応の遺伝子検出系を確立し、まず 17D 株で評価した結果、南米株対応型では検出できず、アフリカ株対応型でのみ検出できた。

A. 研究目的

現在、日本で使われている黄熱ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 法は、ワクチン株 (17D 株) を用いて評価されているのみである。特に 2013 年サッカーワールドカップおよび 2014 年のオリンピックがリオデジャネイロといった行事が続く南米への渡航者が今後増加する状況で、

B. 研究方法

GenBank に登録された黄熱ウイルスの塩基配列を収集し、アライメントした後、アフリカ株用、南米株用のリアルタイム逆転写 PCR (TaqMan 法) のプライマーおよびプローブセットを塩基配列部位 8280-

8354、4769-4862 に設計し、南米株用のセットは、9393-9453 に設計した。それらをまずはアフリカ株に由来する黄熱ワクチン株 (17D) により検出可能かどうかをリアルタイム PCR により評価した。

C. 研究結果

保有する黄熱ウイルス 17D 株は、アフリカ株であり、アフリカ株用 2 セット 8280/8308FAM/8354c と 4769/4804FAM/4862c で 0.08pfu/tube まで検出可能であった。しかし、南米株用の 9393/9415FAM/9453c では検出されなかった (表 1)。

D. 考 察

黄熱ウイルスのリアルタイム RT-PCR (TaqMan) 法により、南米株対応、アフリカ株対応セットを作ることが、可能であることが確認された。評価のためには、南米野生株およびアフリカ野生株のウイルス遺伝子 (RNA) を入手する必要がある。

E. 結 論

黄熱ウイルスアフリカ株および南アフリカ株に対応するリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) のプライマー、プローブを設計した。

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

FcyR-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
5. 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)
6. 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
7. 高崎智彦. デング熱国内発生への対応ーデング熱の基礎と疫学ー. 第 46 回日本小児感染症学会. 平成 26 年 10 月 18–19 日 (東京)
8. 高崎智彦. 緊急企画 : 70 年を経ての再来ーデング熱国内流行 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)
9. 高崎智彦. 緊急報告「デング熱ー今年の国内流行」. 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)
10. MoiMeng Ling, 白井颯治、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)
11. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. デング 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

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

- 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 γ 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デング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. 「デング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」デング熱 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. 「デング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. デング熱国内流行 ～70 年の時を経て～ (特別講演). 第 21 回リケッチャ研究会. 平成 26 年 12 月 20～21 日 (東京 国立感染症研究所)
15. 高崎智彦. デング熱・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 プライマー&プローブセット

8280/8308FAM/8354c	0.08 pfu	YF 17D/W. Africa
4769/4804FAM/4862c	0.08 pfu	YF 17D/W. Africa
9393/9415FAM/9453c	Not detectable	S. America 1 & 2

評価中であり配列は示さない。