

厚生労働科学研究委託費（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）  
委託業務成果報告（業務項目）

蚊媒介性ウイルス高感度検出法開発に関する研究

担当責任者 高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨 2014年8月に1945年以来、日本国内で流行のなかったデング熱が、東京都で国内発生した。多くの感染者は代々木公園でデングウイルス感染蚊に刺されており、代々木公園が感染地であった。代々木公園では多くの行事が行われていたことから、他府県からの訪問者が、地元に戻って発病し、東京都以外に9道府県で患者が報告された。地方の衛生研究所においては、デングウイルス型別リアルタイム RT-PCR は4つの型に関して実施する必要もあり、従来の PCR を使用しているところも多かった。そこで、我々の設計したデングウイルス1型～4型を1つのチューブで検査できるように Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay の構築を試みた。その結果、94.6%の一致率を示したが、デングウイルス2型に関して誤判定が発生していた。今後、改良し海外の研究機関でも評価してもらう予定である。

A. 研究目的

デングウイルスには4つの血清型があり、型別リアルタイム逆転写 PCR 法を実施するには4つの反応系で実施しなければならない。したがって、検査系としては煩雑である。そのため、デングウイルス1～4型のウイルス遺伝子検出を一つの反応系（One tube アッセイ系）を開発した。

B. 研究方法

リアルタイム RT-PCR は伊藤ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004) のプライマーおよびプローブの配列により、Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay 法を構築し、7500 リアルタイム PCR シス

テム（ABI 社）を用いて検討した。本論文内の各血清型別 TaqMan による結果と比較解析した。

C. 研究結果

過去に国立感染症研究所ウイルス第一部で診断した輸入デング熱患者37検体（血清）を用いた。その内訳はデングウイルス血清型1型が8、2型が10、3型が8、4型が9検体、非デング熱発熱患者血清2検体であった。37検体中2検体が後判定であった。一致率は94.6%であった。2検体ともデングウイルス2型を3型、4型に誤判定したものであった。判定に間違いはなかったが、他の血清型に対しても非特異的にカーブが

上昇した検体がデング熱陽性 35 検体中 17 検体 (48.6%) であった。

#### D. 考 察

リアルタイム逆転写 PCR 法 TaqMan 法は、増幅された遺伝子産物に蛍光標識したプローブが結合することによって遺伝子産物を検出する高感度ウイルス遺伝子検出法である。デングウイルスの場合、4 つの血清型があるため検査が煩雑となり、デング熱検査件数が少ない施設には普及していないのが現状である。そこで One tube で 4 つの型が検出できる Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay 法を構築したが、tube あたりのプライマープローブが増えると非特異反応がでることが確認された。しかし、判定結果の一致率は 94.6%であり、誤判定をきたした 2 型のプローブ配列を改良すれば型特異性の向上が期待できる。そのうえで次年度以降、台湾 CDC にも協力を依頼して評価してもらう予定である。

#### E. 結 語

One tube で 4 つの型が検出できる Multiplex real-time PCR (TaqMan) assay 法を構築した結果、94.6%の一致率をみた。ただし、個別に詳細を検討すると 48.6%で非特異的な反応を示していた。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8<sup>th</sup> Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Local Transmission of Dengue in Japan, August to October 2014. NIID International Seminar on Infectious Diseases. 22-23<sup>rd</sup>, January, 2015 (Tokyo)
3. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17<sup>th</sup> International Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27-29 Jun 2015)

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「デング熱 - 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 . 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 . 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)
- H . 知的財産権の出願・登録状況  
特になし