

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政策研究事業）  
分担研究報告書

ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス\_マルチ遺伝子高感度検出法の評価

研究分担者 高崎 智彦（神奈川県衛生研究所 所長）  
研究協力者 鈴木 理恵子（神奈川県衛生研究所 微生物部）

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した。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。また、2014年の6月にタイからのジカ熱輸入症例を確認した。その後ジカ熱流行は、2015年に太平洋島嶼国から中南米へと拡大した。世界的なデング熱、チクングニア熱流行にジカ熱が加わったことで、血液製剤及び献血血液における蚊媒介性ウイルス感染症のウイルス遺伝子検査が極めて煩雑になった。そこで、ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルスのマルチプレックス遺伝子検出法に関して検討、評価した。

A. 研究目的

ジカウイルス、デングウイルス、チクングニアウイルスはヤブカによって媒介され、その臨床像は類似している。2015年に入りジカウイルス感染症はブラジルなど中南米において流行し、妊婦がジカウイルスに感染すると新生児に障害をきたす先天性ジカ症候群を引き起こすことが明らかとなった。蚊媒介性ウイルス感染症の再興とともに、デングウイルス1型、2型、3型、4型に加えてチクングニアウイルス、ジカウイルスその検査は煩雑になる。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、チクングニア熱流行の可能性も考慮し、血液製剤及び献血血液にジカウイルス、チクングニアウイルスが混入する可能性を想定しておく必要がある。

B. 研究方法

ジカウイルス、チクングニアウイルス、デングウイルスを同時に検出できる TaqMan Zika Virus Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV)（以下3点の参考文献に基づいて構築されたものであるが詳細は非公表； Dumoulin A, Marti H, Panning M, Hatz C, Hirsch HH. 2008. Pandengue virus detection by PCR for travelers returning from the tropics. *J. Clin. Microbiol.* 46:3104. Yap G, Pok KY, Lai YL, Hapuarachchi HC, Chow A, Leo YS, Evaluation of chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e753.

Alyssa T Pyke, Michelle T Daly, Jane N Cameron, Peter R Moore, Carmel T Taylor, Glen R Hewitson, Jan L Humphreys, Richard Gair Imported zika virus infection from the cook islands into australia, 2014. PLoS Curr: 2014, 6.) を、評価した。それぞれのウイルスおよびインナーコントロールは以下に如く 5 つの蛍光色素で検出される。 Zika (FAM), Pan Dengue (VIC), Chikungunya (ABY), & PPIA-endogenous control (JUN) plus 1step RT-PCR component with a passive ref (MP) である。評価の材料としては、デングウイルス感染細胞上清、デング熱患者急性期血清、ジカウイルス感染細胞上清、チクングニアウイルス感染細胞上清から RNA を抽出し、感度および特異性を検討した。

#### C. 研究結果

デングウイルス 1 ~ 4 型 (感染研標準株) は検出された。ジカウイルス (PRVABC59 株; アジア型) は検出されたが、アフリカ株 (MR766 株) は検出できない判定であった。ただしそのリアルタイム PCR の増幅カーブを目視するとなだらかな上昇は存在した。チクングニアウイルスも検出された。

また、デング熱臨床検体での評価は、従来法 RT-PCR あるいはリアルタイム PCR と比べてその感度は同等以上であった。

内在性コントロール (PPIA Cyclophilin 遺伝子) は、検体として血清を用いると内在性コントロールの上昇が低く検出されない場合があった。

#### D. 考 察

評価したキット TaqMan Zika Virus

Triplex Vector Screening Kit (ZIKV/DENV/CHIKV) は、検査系の反応をモニターするため、内在性コントロールを用いている。このコントロールは、血清のような細胞成分の極めて少ない材料を用いた場合は機能しないので注意が必要である。デングウイルス型別遺伝子検出は、患者本人にとってあるいはサーベイランス上は重要であるが、輸血や血液製剤に関するチェックとしては必ずしも必要ではなく Pan Dengue すなわちデングウイルス共通の検出系で十分である。そうすることで検査の煩雑さを解消できるよいアイデアであると考えられる。プライマー、プローブを含む反応試薬を Lyophilized することで有効期間が長くすることが可能である。

#### E. 結 論

ジカウイルス/デングウイルス/チクングニアウイルス\_マルチ遺伝子検出系は、血液や血液製剤のようなデングウイルスの血清型別が重要ではなくウイルスの有無を判定する場合には、検査は煩雑でなく有用である。また、患者の診断においても治療上は血清型は急いで明らかにする必要はないので、まずこの検査を実施した後、デングウイルス血清型を決定すればよいのであるから、有用な検査法であると考えられる。

#### 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  
なし
2. 学会発表  
なし

表

	Sample	過去の記載 Data		2016.6 実施					2016.11 実施
		RT - PCR	NS1	RT-PCR	リアルタイム PCR	Multiplex		NS1	Multiplex
						[1回目]	[2回目]		[Triplex]
1	14D011	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
2	14D022	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
3	14D024	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
4	14D025	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
5	14D032	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
6	14D033	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
7	14D036	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
8	14D037	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
9	14D038	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
10	14D039	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
11	14D040	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	+	+
12	14D041	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
13	14D042	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
14	14D043	<b>D2</b>	+	NT	+	-	+	±	+
15	15D001	<b>Dus</b>	+	-	-	-	+	+*	+
16	15D002	<b>D4</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
17	15D003	<b>D1</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
18	15D004	<b>D2</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
19	15D005	<b>D2</b>	+	NT	+	+	NT	NT	+
20	15D006	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
21	15D007	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
22	15D008	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
23	15D009	-	-	NT	-	-	NT	NT	-
24	15D010	-	-	NT	-	-	NT	NT	-