

Table 1 Determination of optimum concentrate of protamine sulfate by virus HA activity

Protamine conc. mg/ml	HAU per 50ul
2	4096
1	4096
0.5	4096
0.25	4096
0.12	4096
0.06	4096
0.03	4096
0 (PBS)	4096

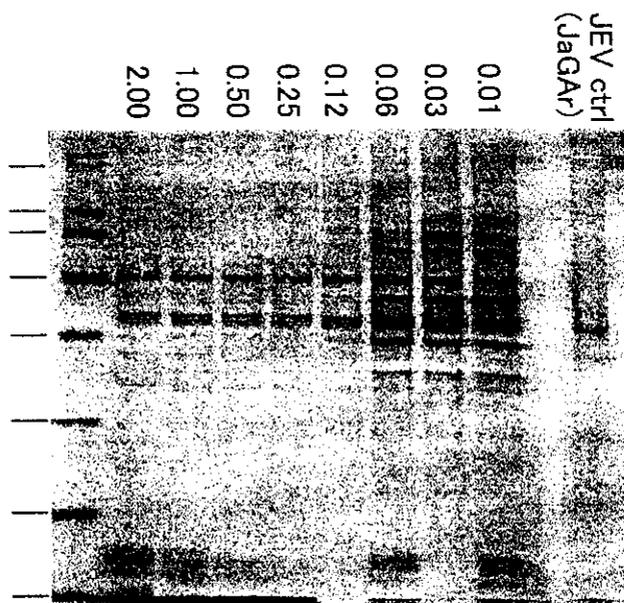


Fig. 3 Determination of optimum concentrate of protamine sulfate by SDS-PAGE

Table 2 Recovery of JEV activities by hemagglutinin activity assay and plaque forming activity assay in the fractionated-eluate from ceramic hydroxyapatite column by step-wise elution with sodium phosphate buffer.

Fraction number (concentration of NaPO ₄)	Protein conc. [μg/ml]	HAU per 50ul	PFU per 1ml	Volume [ml]	PFU total
loaded sample	490	4096	6.5 x 10 ⁷	60	3.9 x 10 ⁹
#0-1(void) ¹⁾	30	<4		50	
#0-2(void) ¹⁾	14	<4		50	
#1(150mM)	40	128	2.1 x 10 ⁶	50	1.0 x 10 ⁸
#2(150mM)	150	512	7.2x 10 ⁶	50	3.6 x 10 ⁸
#3(150mM)	44	128	2.9 x 10 ⁶	30	8.7 x 10 ⁷
#4(400mM)	460	8192	5.8 x 10 ⁷	50	2.9 x 10 ⁹
#5(400mM)	23	256	5.3 x 10 ⁶	20	1.0 x 10 ⁸
Total (recovery %)					3.5x10 ⁹ P.F.U. in 200ml (89.7%)

1)Unbound fractions

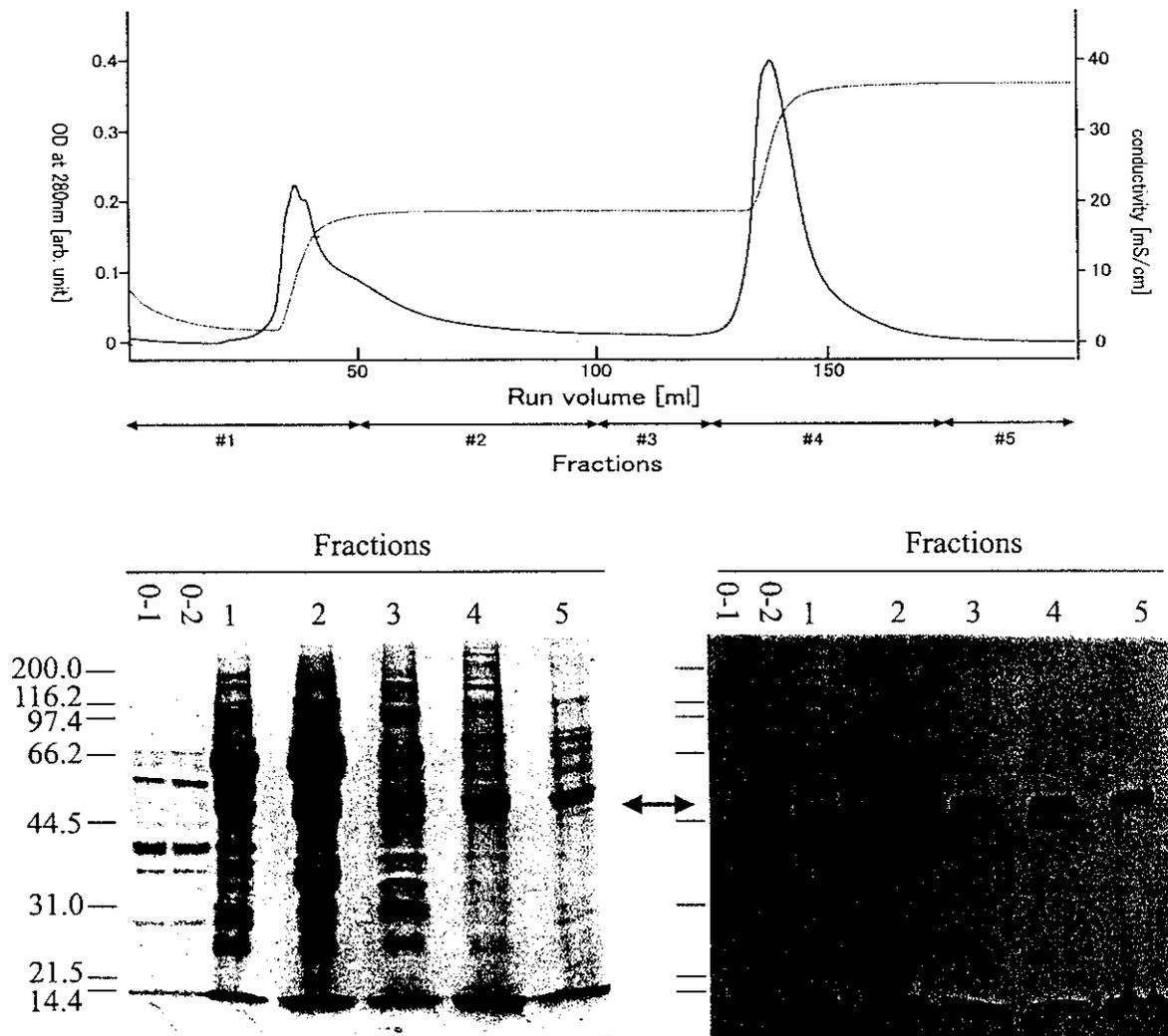


Fig. 4 Chromatogram of JEV containing sample(Top). SDS-PAGE(left) analysis and western blotting analysis(right) of the fractionated-eluate from ceramic hydroxyapatite column by step-wise elution with sodium phosphate buffer. Samples for SDS-PAGE and western blotting analysis were desalted and 10-times concentrated by ultrafiltration except for fraction-numbered 4. The fraction-numbered 4 was applied on the gel at 1:10 diluted with SDS-PAGE sample buffer after desaltration. JEV-derived peptides were detected with anti-JEV infectious rabbit serum, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG goat antibody and VIP peroxidase substrate kit(Vector inc.).

According to SDS-PAGE analysis, fraction-numbered 4 contained mainly envelop protein of JEV, though it was detected in each fractions except for void fractions by western blotting analysis.

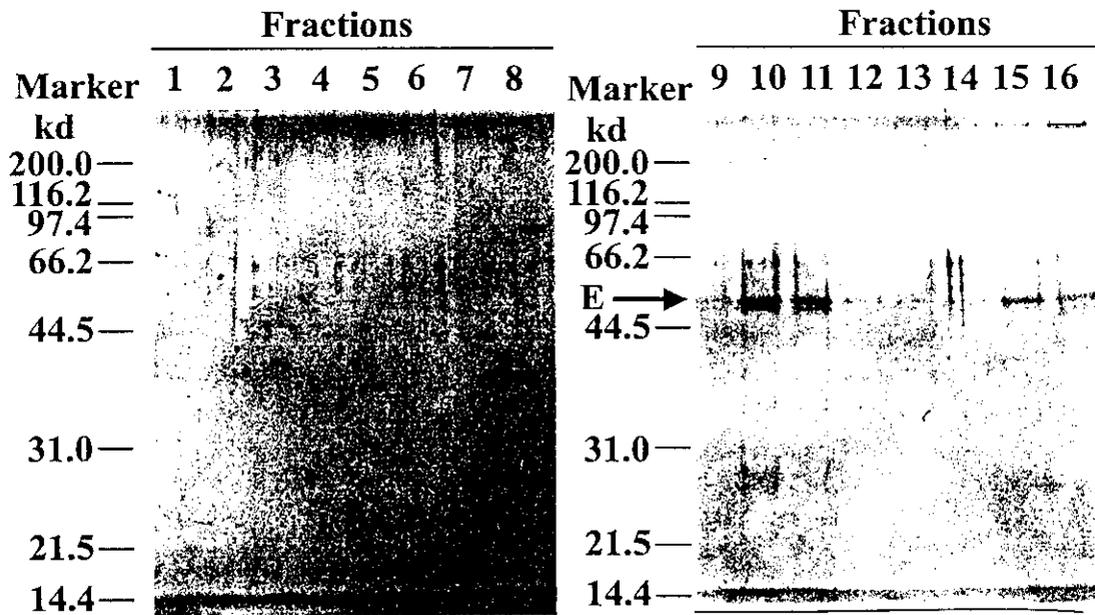


Fig. 5 SDS-PAGE (10%) analysis of the ultra-centrifugal fractions from 20-50% (w/w) sucrose density gradient. The polypeptide bands were visualized by C.B.B. staining. Envelope protein of JEV (marked as E) was found in fractions numbered-10, 11, 15 and 16. The fraction numberd-10 and 11 gave more higher infectious activity and hemagglutinin activity than fractions numbered-15 and 16.

Table 3 Hemagglutinin activity and plaque forming activity in the fractions in ultra centrifugal separation in 20-50% sucrose density gradient .

Fractions ¹⁾	Sucrose %	OD at 280nm	HAU /50ul at pH6.4	PFU/1ml
Sample for ultracentrifuge	-	0.520	10,240	-
ppt	-		<4	
1	49.5	0.125	<4	
2	49.2	0.118	<4	
3	48.3	0.147	<4	
4	46.5	0.147	<4	
5	44.8	0.112	<4	
6	43.5	0.118	<4	
7	42.0	0.171	<4	
8	40.0	0.157	<4	
9	38.5	0.156	32	3 x 10 ⁵
10	36.4	0.377	256	4.5 x 10 ⁷
11	35.4	0.377	256	1 x 10 ⁷
12	33.7	0.212	64	1 x 10 ⁶
13	32.0	0.139	64	5 x 10 ⁵
14	30.2	0.183	256	2 x 10 ⁶
15	28.2	0.119	128	1 x 10 ⁶
16	26.9	0.108	128	1 x 10 ⁶
17	24.0	0.134	16	5 x 10 ⁵
18	8.6	0.112	8	5 x 10 ⁵
19	12.0	0.085	8	
20	6.3	0.037	4	
21	4.0		4	
22	3.3		8	
Total			9.27x10 ⁷ PFU in 15ml	2.3% of was recovered as P.F.U. titer

1) The supernatant was fractionated in 1.5ml aliquots.

3) Sixty milliliters of JEV solution having 3.9x10⁷P.F.U. activity was ultra-centrifuged at 28,000 rpm for 4hours. Obtained pellet was re-suspended in 3ml of PBS(-) and it was placed on to sucrose solution.


```

751 CAGTCCGTTGTTGCTCTTGGGTCACAGGAAGGAGGCCTCCATCAGGCGTT      800
   |||
751 CAGTCCGTTGTTGCTCTTGGGTCACAGGAAGGAGGCCTCCATCAGGCGTT      800

801 GGCAGGAGCCATCGTGGTGGAGTACTCAAACCTCAGTGAAGTTAACATCAG      850
   |||
801 GGCAGGAGCCATCGTGGTGGAGTACTCAAACCTCAGTGAAGTTAACATCAG      850

851 GCCACCTAAAATGCAGGCTGAGAATGGACAAACTGGCTCTGAAAGGCACA      900
   |||
851 GCCACCTAAAATGCAGGCTGAGAATGGACAAACTGGCTCTGAAAGGCACA      900

901 ACCTATGGCATGTGCACAGAAAAATTCTCGTTCGCGAAAAATCCGGCGGA      950
   |||
901 ACCTATGGCATGTGCACAGAAAAATTCTCGTTCGCGAAAAATCCGGCGGA      950

951 CACTGGTCACGGAACAGTTGTCATTGAACTTTCCTACTCTGGGAGTGATG     1000
   |||
951 CACTGGTCACGGAACAGTTGTCATTGAACTTTCCTACTCTGGGAGTGATG     1000

1001 GCCCTTGCAAAATTCGGATTGTCTCCGTTGCGAGCCTCAATGACATGACC     1050
   |||
1001 GCCCTTGCAAAATTCGGATTGTCTCCGTTGCGAGCCTCAATGACATGACC     1050

1051 CCCGTCGGGCGGCTGGTGACAGTGAACCCCTTCGTCGCGACTTCCAGCGC     1100
   |||
1051 CCCGTCGGGCGGCTGGTGACAGTGAACCCCTTCGTCGCGACTTCCAGCGC     1100

1101 CAACTCAAAGGTGCTAGTCGAGATGGAACCCCCCTTCGGAGACTCCTACA     1150
   |||
1101 CAACTCAAAGGTGCTAGTCGAGATGGAACCCCCCTTCGGAGACTCCTACA     1150

1151 TCGTAGTTGGAAGGGGAGACAAGCAGATTAACCACCATTGGCACAAGGCT     1200
   |||
1151 TCGTAGTTGGAAGGGGAGACAAGCAGATTAACCACCATTGGCACAAGGCT     1200

1201 GGAAGCAGCTGGGCAAAGCCTTTTCAACGACTTTGAAGGGAGCTCAAAG     1250
   |||
1201 GGAAGCAGCTGGGCAAAGCCTTTTCAACGACTTTGAAGGGAGCTCAAAG     1250

1251 ACTGGTAGCGTTGGGTGACACAGCCTGGGACTTTGGCTCTATTGGAGGGG     1300
   |||
1251 ACTGGTAGCGTTGGGTGACACAGCCTGGGACTTTGGCTCTATTGGAGGGG     1300

1301 TTTTCAACTCCATAGGGAAAGCCGTTACCAAGTGTGGTGGTGCCTTC     1350
   |||
1301 TTTTCAACTCCATAGGGAAAGCCGTTACCAAGTGTGGTGGTGCCTTC     1350

1351 AGAACACTCTTCGGGGGAATGTCTTGGATCACACAAGGGCTAATGGGGGC     1400
   |||
1351 AGAACACTCTTCGGGGGAATGTCTTGGATCACACAAGGGCTAATGGGGGC     1400

1401 CCTACTACTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGG     1450
   |||
1401 CCTACTACTCTGGATGGGCGTCAACGCACGAGACCGATCAATTGCTTTGG     1450

1451 CTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTCTTAGCGACCAATGTGCAT     1500
   |||
1451 CTTCTTAGCCACAGGAGGTGTGCTCGTGTCTTAGCGACCAATGTGCAT     1500

```

Fig. 2

DNASIS
Maximum Matching [JEV/Beijing01-Clone6 VS JEV/Beijing01-Verol]

デングウイルス感染症の診断法の確立（3）

分担研究者 山田堅一郎（国立感染症研究所ウイルス第1部）

研究要旨 デングウイルス感染症は東南アジアを中心として広がっており、re-emerging infectious disease（再興感染症）の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国では国内感染のない感染症であるが、近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例がみられる。そこで、これら不明熱疾患についての検査、診断体制を確立し、厚生行政に資することを目的とした。輸入デングウイルス感染症では、PCRによるウイルス遺伝子とIgM-ELISAによるIgM抗体の両検出法により、初感染のデング熱の診断は可能であると思われる。いくつかの地方衛生研究所並びに検疫所との連携システムが構築されたが、さらに全国的な検査・診断体制を整備する必要がある。

A. 研究目的

デングウイルス感染症は熱帯地域では流行域が拡大しており、再興感染症の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国では国内感染のない感染症であるが、感染症新法の施行に伴い、4類感染症として全数届け出制となり、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例への対策が必要となった。そこで、本感染症に対する検査・診断体制を確立し、厚生行政に資することを目的とした。

B. 研究方法

供試ウイルスはプロトタイプデングウイルス（1型:Hawaii, 2型:New Guinea C, 3型:H83, 4型:H241）と患者検体からの分離株を蚊由来細胞株C6/36で増殖させた培養上清を用い

た。RT-PCRはMorita, K. et al (J. Clin. Microbiol. 29, 1991)の方法に基づいたone-tube法で行った。分離ウイルスはVero細胞によるプラーク法で確認した。IgM-capture ELISAによるIgM抗体の測定はデングウイルス1-4型を等量混合したものを抗原として行った。また、IgM抗体とIgG抗体の検出には市販キット（MRL, PanBio）も併用した。

C. 研究結果

1. 輸入デングウイルス感染症の状況

1985-1999年間に検査依頼のあった不明熱患者の検体について検査した結果はTable 1に示した。1996年から1999年に検査した検体の陽性率

はそれぞれ 43 % (15/35), 23 % (6/26), 47 % (42/90), 21 % (11/53)であった。感染患者の大半はタイ、インド、フィリピン、インドネシアなど東南アジアからの帰国者であるが、タヒチ、グアテマラ、ナイジェリア、コートジボアールなどオセアニア、中南米、アフリカからの帰国者からも陽性例が検出された。

2. デング熱症例のウイルス血症と抗体反応の解析

デング熱症例のうち、発熱日と解熱日 (37°Cになった日とする) のデータが明確な症例から得られた検体について、RT-PCR による特異的ウイルス遺伝子の検出と IgM と IgG 抗体価を調べた。尚、本法による PCR の検出感度は 0.5-5.0 pfu/tube であった。ウイルス遺伝子は解熱日を含み、それより以前の検体から検出された (Figure 1)。それに対し、IgM 抗体は解熱日の3日前から検出され、解熱日以降、陽性例は上昇した (Figure 2)。IgM 抗体が検出される日時を発熱日から計算すると発熱後 5-6 日目であった。患者の回復に伴って IgM 抗体価が上昇し、IgG 抗体も検出された。IgM 抗体は回復後 2-3 ヶ月続くものもみられた。感染検体からのウイルス分離は解熱日以前の検体のみから可能であった。これらの分離ウイルスおよび型は RT-PCR およびプラーク法で確認された。

患者の発熱日と解熱日から採取さ

れた検体の日数を算定して、ウイルス遺伝子と IgM 抗体の検出の関連性をみると、発熱期にはウイルス血症があり、PCR でウイルス遺伝子が検出され、ウイルス分離も可能であった。それに対し、回復期には抗体産生が高まり、IgM 抗体が検出され、その後 IgG 抗体の上昇もみられた (Figure 3)。

3. IgM-ELISA の条件設定

IgM-capture ELISA では検出用抗体として、デング熱流行地で採取したデング熱患者血清より IgG を精製し、パーオキシダーゼ標識したものをを用いているが、患者血清の入手の困難性など、いくつかの問題がある。そこで、検出用抗体としてフラビウイルスに共通なエピトープに対するモノクローナル抗体 (HB112) を精製し、パーオキシダーゼ標識したものを作成して、その有効性を検討した。IgM 抗体陽性と陰性は、デング熱の IgM 抗体陰性と推定された海外渡航歴のない日本人血清とデングウイルス抗原との反応で得られた平均吸光度+3・SD を cut off として判定した。その結果、HB112 はデング熱患者血清由来 IgG と比較して未感染ウイルス抗原との間の非特異的反応が低く、ウイルス抗原と IgM 抗体との検出感度が高かった。即ち、HB112 を使用すれば反応に関与するウイルス抗原濃度がすこし変動しても陽性が陰性と判定される危険性は低く、信頼性が向上すると考えられた。臨床的にデング熱と診断

された日本人血清を測定したところ、P/N ratioは常にHB112での検出で優れていた。

4. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法による検出

ペルオキシダーゼと抗ペルオキシダーゼの抗原抗体複合物をフォーカスとして捕らえて、ウイルス抗原を検出して感染価を測定する PAP 法は、96 well plate を使用して大量の検体を短時間に検査出来る利点がある。PAP 法を用いてウイルスの感染価を Vero 細胞によるブランク法と比較した結果、ブランク法で測定した方がやや高かったが、ほぼ同様の感染価が得られた。

D. 考 察

デングウイルス感染症の診断では病原学的検索と血清学的検索の両面からなされる。PCR によるウイルス遺伝子の検出は型別まで確定することができるが、ウイルス血症がある時期の検体から検出される可能性が高い。それに対して、IgM-ELISA による IgM 抗体は患者が解熱期に入り、回復してくる時期に検出される。即ち、PCR によるウイルス遺伝子と IgM-ELISA による IgM 抗体の検出の両検索により、初感染のデングウイルス感染症はかなりの精度で確定診断が可能であると考えられる。

近年、わが国の輸入デング感染症は

増加の傾向にあると思われるが、全国的な検査体制が確立していないので、その実数は把握できていない。感染患者の大半はタイ、インド、フィリピン、インドネシアなど東南アジアからの帰国者であるが、タヒチ、グアテマラ、ナイジェリア、コートジボアールなどオセアニア、中南米、アフリカからの帰国者からも陽性例が検出されており、今後、東南アジアからだけでなく、中南米、アフリカからの帰国者でもデング熱の疑いのある不明熱疾患の検体も検査を行うことが肝要と思われる。年間約 500 万の日本人が熱帯地域に旅行し、約 200 万の人達が熱帯地域から日本に入国している現状を考えると、輸入感染症としてのデング熱、デング出血熱の検査・診断体制の確立は益々重要であると考えられる。

E. 結 語

輸入デングウイルス感染症の診断では、PCR によるウイルス遺伝子と IgM-ELISA による IgM 抗体の検出の両検索を行えば、初感染のデング熱の場合では、診断が可能であると考えられる。検査体制の面では、いくつかの地方衛生研究所並びに検疫所との連携システムが構築されたが、さらに全国的な検査・診断体制を整備することが望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 五十嵐 章、森田公一、長谷部 太、井上真吾、山田堅一郎、中山幹男、名和 優、江下優樹、：媒介蚊内におけるデングウイルス遺伝子の検出と解析. 長崎大学熱帯医学研究所共同研究報告集 (平成10年度) : 8-13, 1998.
 - 2) Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M. and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of imported dengue cases. *Jap.J.Trop.Med.Hyg.* 27(1), 75-77, 1999.
 - 3) Yamada, K., Nawa, M., Takasaki, T., Yabe, S. and Kurane, I.: Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn.J.Infect. Dis.*, 52, 150-155, 1999.
 - 4) Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., Nakayama, M., Arai, Y.T., Yabe, S. and Kurane, I.: The features of imported dengue fever cases from 1996 to 1999. *Jpn.J.Infect. Dis.*, 52(6), 257-259, 1999.
 - 5) Nawa, M., Yamada, K., Takasaki, T., Akatsuka, T. and Kurane, I.: Serotype-cross-reactive IgM responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin.Diag.Lab.Immun.* (in press).
- ### 2. 学会発表
- 1) 江下優樹、長谷部 太、山田堅一郎、五十嵐 章：臨床症状の異なる患者から分離されたデングウイルスの媒介蚊体内での増殖. 第51回日本衛生動物学会大会、1999.
 - 2) 山田堅一郎：デング熱／デング出血熱に関する最近の研究. 第51回日本衛生動物学会大会、生理分子生物懇談会、1999.
 - 3) 山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和 優、倉根一郎：デングウイルス感染症の診断法について. 第34回日本脳炎ウイルス生態学研究会、1999.
 - 4) 山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和 優、倉根一郎：デングウイルス感染症の実験室診断—解熱日と各診断法との関連—. 第40回日本熱帯医学会、1999.
 - 5) 井戸田一朗、増田剛太、味澤 篤、今村顕史、根岸昌功、山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、倉根一郎：輸入デング感染症44例の検討. 第40回日本熱帯医学会、1999.
 - 6) 手登根 稔、平田晴男、徳山清之、山田堅一郎、倉根一郎：デングウイルス感染を契機に発症したと思われた VAHS の一症例. 第41回日本臨床血液学会総会、1999.
 - 7) 名和 優、山田堅一郎、倉根一郎、

保井孝太郎：日本脳炎ウイルスのベクターとして重要な蚊由来 C6/36 細胞におけるウイルス感染機構. 第 47 回ウイルス学会学術集会・総会、1999.

- 8) 山田堅一郎、高崎智彦、名和 優、倉根一郎：デング熱患者における

ウイルス血症と抗体反応の解析.
第 47 回ウイルス学会学術集会
・総会、1999.

Table 1 Number of imported dengue fever diagnosed
in NIID, 1985-1999

Year	Total number of tested cases	DF	DHF	DHF (Death)	Suspect	Before		Total
						DEN	Non DEN	
1985	8	4			1	4	3	3
1986	2				1	1	1	1
1987	13	4			1	4	8	8
1988	6	4				4	2	2
1989	6	1				1	5	5
1990	21	10		1	2	11	8	8
1991	11	5	1		1	6	4	4
1992	28	13			2	14	12	12
1993	15	7			1	7	7	7
1994	28	11			3	11	14	14
1995	35	16			2	16	17	17
1996	34	14			1	15	18	18
1997	26	6			1	6	19	19
1998	90	42			1	42	47	47
1999	40	11				11	29	29
Total	363	148	1	1	16	153	194	194

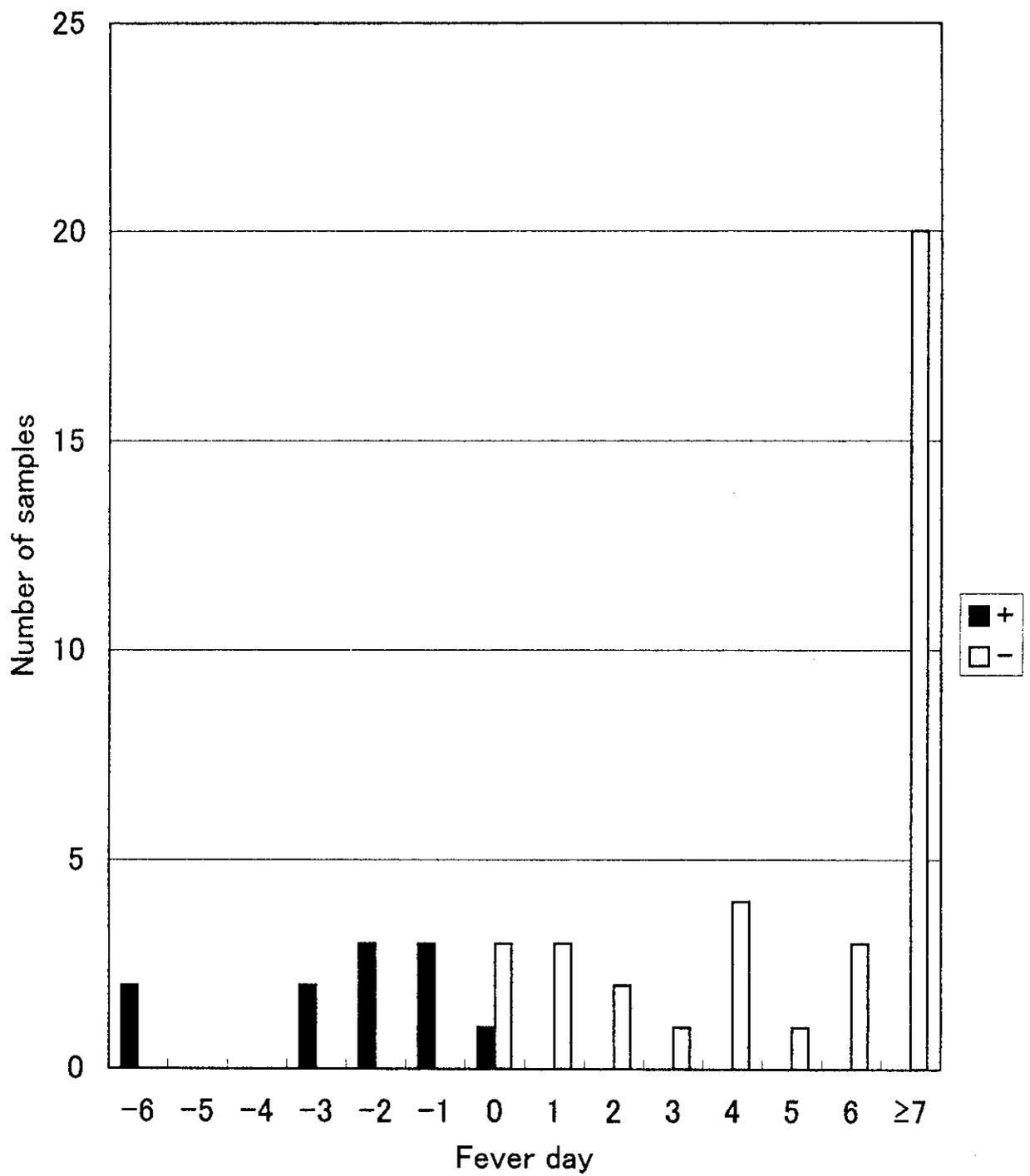


Figure 1 Detection of dengue viral genome by PCR

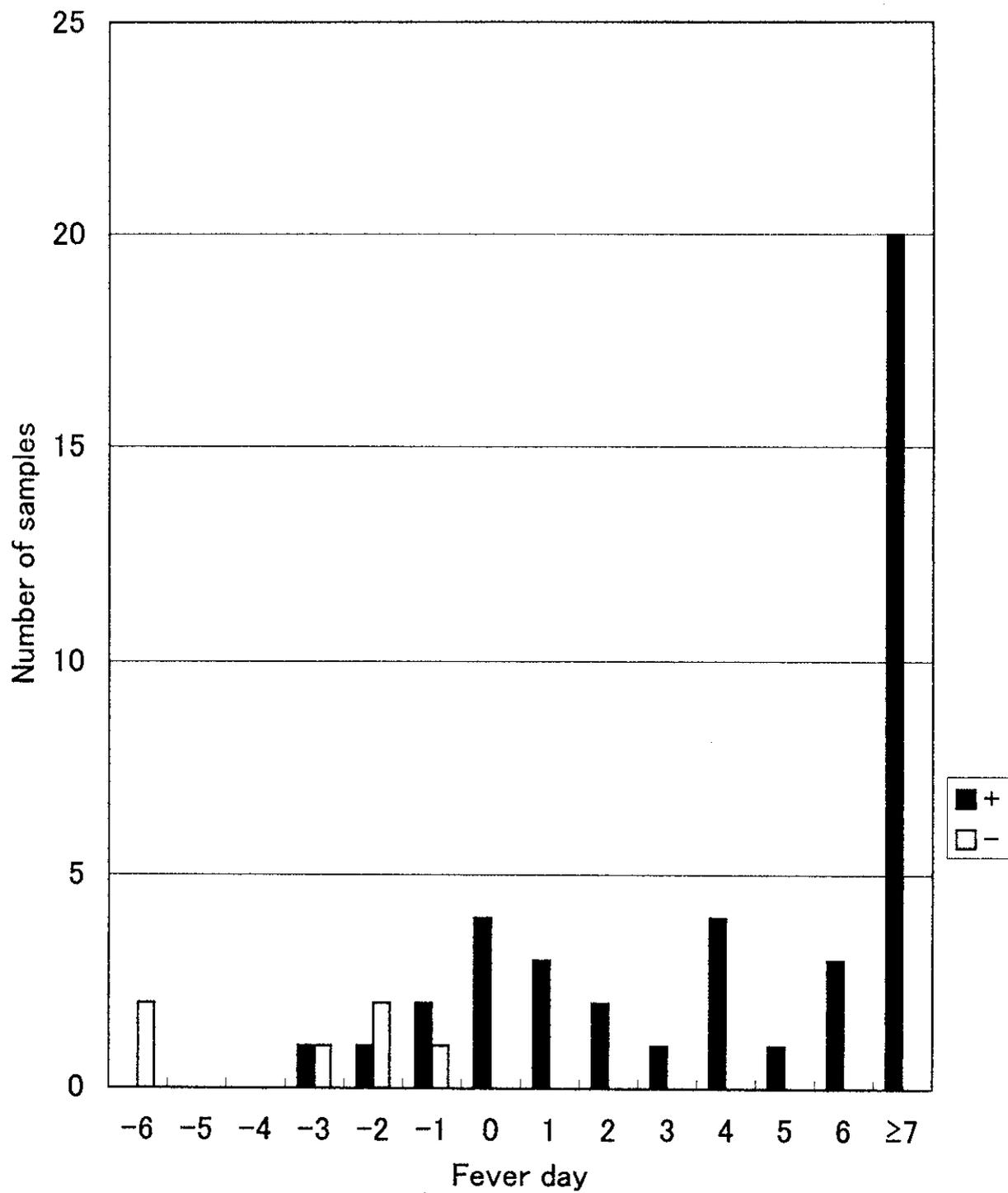


Figure 2 Detection of dengue virus-specific IgM

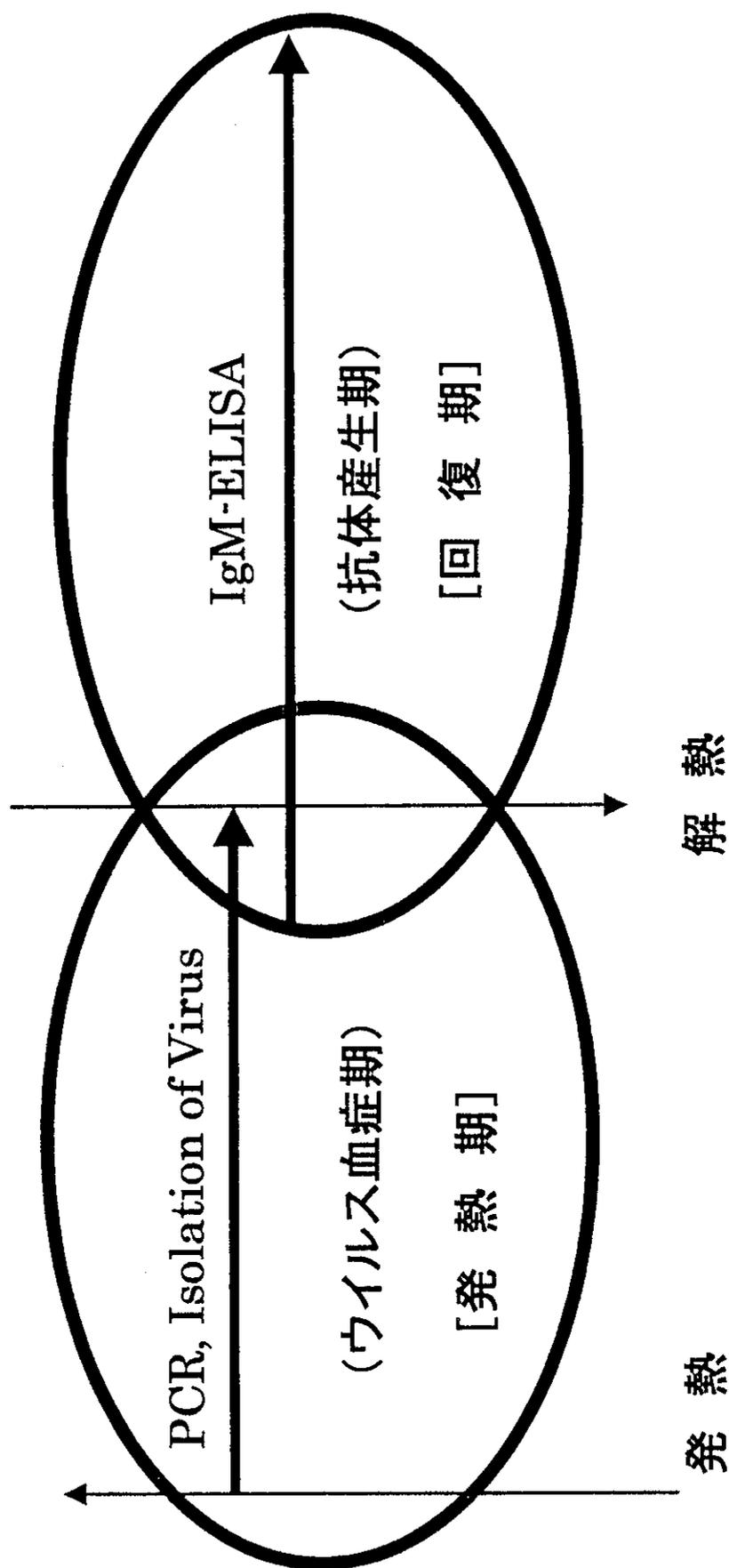


Figure 3 デングウイルス感染(初感染)におけるウイルス血症と抗体反応

分担研究報告書

黄熱ワクチン接種日本人における抗体上昇について

分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所）

フラビウイルス科に属するウイルス感染症においては、日本で現在使用されている代表的なワクチンは日本脳炎不活化ワクチンがある。一般にフラビウイルス科のウイルス間では抗体の交叉反応がある。同じフラビウイルス科に属するデングウイルスに対するワクチンや西ナイルウイルスに対するワクチンを新しく開発する場合、多くの日本人の場合すでに日本脳炎ワクチン接種者であることが多いため、これらの新型ワクチンを日本脳炎不活化ワクチン既接種者に接種した場合その後の抗体上昇に関するデータを収集し解析しておく必要がある。デングウイルスに対する新型ワクチンを日本脳炎ウイルスに対する抗体保有者に接種することになると考えられる。そこで今回は、同じフラビウイルスである黄熱ワクチンを日本脳炎抗体保有者に対して、接種した場合の抗体上昇について検査し解析した。その結果、比較的ウイルス特異的とされている IgM 抗体は、日本脳炎ウイルスに対する基礎免疫を有する集団においても接種後 10 日目以降に検出され、HI 抗体も経時的に採血することにより、日本脳炎と交叉反応を示しながらも黄熱に対して補助的データとして利用できることが確認された。

A.研究目的

一般にフラビウイルス科のウイルス間では抗体の交叉反応がある。同じフラビウイルス属である新しくデングウイルスに対するワクチンや西ナイルウイルスに対するワクチンを開発する場合、これらの新型ワクチンを日本脳炎ウイルスに対する抗体を持つヒトに接種した場合の抗体上昇に関するデータを収集し解析しておく必要がある。そのモデルとして日本

脳炎ウイルスに対する基礎免疫を持つと考えられる成人日本人に黄熱ワクチン（17D 株）を接種した場合、どのような抗体変化をきたすかを検討した。

B.研究方法

成人日本人 17 例に黄熱ワクチンを接種した。そのうち、6 例は十分な日本脳炎ウイルスに対する基礎免疫を有する集団であった。これらの黄熱ワクチン接種

者から経時的に採血・冷凍保存(-20°C)し、4週目採血後 IgM capture ELISA 法、HI 法、中和法を用いて 17 例について抗黄熱抗体を測定した。

C. 研究結果

ワクチン接種後 10 日目で黄熱に対する HI 抗体が上昇する例が存在するが、7 日目では上昇を認めなかった。日本脳炎に対する HI 抗体が上昇するが黄熱に対してはまだ上昇しなかった検体が 1 例存在した。

一方、抗黄熱ウイルス IgM 抗体検出は、抗原としてワクチン株 (17D) を C6/36 に接種し 7 日目上清 (5x10⁷ pfu/ml) を用いた。標識抗体としては抗黄熱ウイルスモノクローナル抗体を産生する hybridoma CRL1689 をマウスの腹腔に接種し精製した後、horseradish peroxidase を標識したものを、IgM capture ELISA を作製した。測定した結果は 7 日目・8 日目では陰性であったが、日本脳炎ウイルスに対してそれほど強い免疫の無い 11 例に関して、IgM 抗体は 10 日目では 11 例中 7 例で陽性であった。また、2 例において中和抗体価を 50%ブランク減少法により検討したところ、1 例は 8 日目で陽性であり、もう 1 例は 10 日目で陽性であった。

また、十分な日本脳炎に対する基礎免疫を有する 6 例について、IgM 抗体を測定したところ 7 日目では有意な上昇 (Index1.0 以上) を認めた症例は 1 例であったが、21 日目ではいずれも陽性となった (表 1)。また黄熱・日本脳炎それぞれに対して HI 抗体を測定したところ、交

叉反応を示したが、黄熱に対して有意な上昇を示した (表 2)。

また、副作用に関しては、表 2 の如く発熱・悪寒および局所の発赤・疼痛が認められた。

D. 考察

黄熱に対する IgM 抗体が認められるのが接種後 10 日目頃からであった。IgM 抗体陽性・陰性の基準をどこに置くかという点は、今後例数を増やしてまだ検討すべき問題であるが、黄熱の潜伏期間が、3-6 日間であり、発病後 3-4 日で IgM 抗体が出現することを考えると、妥当な結果とも考えられる。

また、中和抗体出現時期も IgM 抗体出現時期とほぼ一致する点は、中和抗体は主として抗親和性の IgG や IgA 抗体によるものとされているが、中和作用を有する IgM 抗体も存在すると考えられる。

十分な日本脳炎に対する基礎免疫を有する集団に黄熱ワクチンを接種したグループで黄熱・日本脳炎それぞれに対して、IgM 抗体は検出できることが確認された。また HI 抗体を測定した結果、黄熱に対して有意な上昇を認めた。このことは、黄熱ワクチンが生ワクチンであることから、強い免疫応答をきたすことによると考えられる。交叉反応が生じるとはいえ、ワクチン接種後、経時的に採血し検査すれば HI 法は補助的に利用できると思われる。

E. 結論

日本脳炎に対する抗体保有者に、黄熱ワクチンを接種した場合、接種後 10 日目

頃から、抗黄熱 IgM 抗体・中和抗体を検出できる。また、血清を経日的に集めることで HI 抗体価も補助的なデータとして利用できることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki
Dengue virus specific T lymphocyte responses and the role of T lymphocytes in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. J. Trop. Med. Hyg., 27(1): 81-83 (1999)

Ken-Ichiro Yamada, Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe, Ichiro Kurane: Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and IgM-capture ELISA. Jap. J. Infec. Dis., 52(4) 150-155 (1999)

中山幹男、高崎智彦：広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査(3)ーその数値をどう読むかー「日本脳炎ウイルスおよびその他のフラビウイルス」日本臨床 57(増刊) p294-297(1999)

ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Mikio Nakayama, Yoko Arai, Sadao Yabe, Ichiro Kurane: The feature of imported dengue fever cases from 1996 to 1999. Jap. J. Infec. Dis., 52(4) 150-155 (1999)

2. 学会発表

高崎智彦、山田堅一郎、矢部貞雄、名和優、岩崎恵美子、倉根一郎 “デングウイルス感染者に対する検査法の検討” 第 73 回日本感染症学会総会 (1999)

中山幹男、矢部貞雄、松野重夫、山本晃、高崎智彦、倉根一郎 “Vero 細胞を用いた不活化日本脳炎ワクチンの開発に関する研究” 第 34 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (1999)

山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和優、倉根一郎 “デングウイルス感染症の診断法について” 第 34 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (1999)

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe, Masaru Nawa, Ichiro Kurane Laboratory diagnosis of imported dengue cases in Japan. 第 11 回国際ウイルス学会議 (1999)

井戸田一郎、増田剛太、味澤篤、今村顕史、根岸昌功、山田堅一郎、矢部貞雄、高崎智彦、倉根一郎. “輸入デングウイルス感染症 44 例の検討” 第 40 回日本熱帯医学会 (1999)

山田堅一郎、高崎智彦、矢部貞雄、名和優、倉根一郎 “デングウイルス感染症の実験室内診断ー解熱日と各診断法との関連ー” 第 40 回日本熱帯医学会 (1999)

高崎智彦、矢部貞雄、中山幹夫、山田堅一郎、新井陽子、山本紀一、倉根一郎

田島章太郎、原田 誠、飯塚信二、多賀 賢一郎、井村俊郎、名和 優. “黄熱ワクチン接種日本人における抗体上昇について” 第 6 回トカプラヒベスチウイルス研究会 (1999)

表 1. 日本脳炎ウイルスに対する基礎免疫を有する黄熱ワクチン接種者の抗黄熱 IgM 抗体の上昇

	0 day	7 day	21 day	56 day
1	1	1.00	8.95	11.05
2	1	1.00	11.84	13.06
3	1	1.00	10.00	5.50
4	1	1.93	2.00	1.97
5	1	0.95	10.00	10.00
6	1	1.00	10.00	11.58

Index= sample OD/preOD

Index 1.5 以上を陽性と判定した。

表 2. 黄熱ワクチン接種後の抗黄熱 HI 抗体価および抗日脳 HI 抗体価の変動

	抗原	0 day	7 day	21 day	8 weeks	16 weeks	副作用
1	anti-YF	40	40	1280	640	320	発赤 (2d)
	anti-JE	10	10	80	80	NT	
2	anti-YF	10	40	320	320	160	疼痛
	anti-JE	20	20	20	20	NT	
3	anti-YF	80	80	640	1280	640	発熱、発赤
	anti-JE	320	320	1280	1280	NT	
4	anti-YF	160	160	160	160	320	悪寒
	anti-JE	160	160	160	160	NT	
5	anti-YF	40	40	1280	640	640	なし
	anti-JE	20	20	640	320	NT	
6	anti-YF	10	20	640	640	640	なし
	anti-JE	10	10	160	160	NT	

症例 4 以外は、抗黄熱 HI 抗体の有意な上昇を示した。