

江下優樹、安西三郎、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2003) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (5) 異なる温度で飼育したアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカのウエストナイルウイルス感受性. 第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) : 42, 2003.

江下優樹、安西三郎、牧野芳大、福田昌子、高岡宏行、Disla, M., Solis M. A. T., Cesn, A. J., Castro, M., 板倉英世、竹下正純 (2003) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (6) ドミニカ共和国におけるデングウイルス媒介蚊. 第 55 回日本衛生動物学会大会。2003 年 3 月 31 日-4 月 2 日、大分医科大学医学部、Med. Entomol. Zool., 54 (大会特集号) : 42, 2003.

小林睦生、二瓶直子、佐々木年則、栗原毅 : メッシュ気候図による東北地方のヒトスジシマカの分布解析 第 54 回日本衛生動物学会、14 年 4 月 1 - 3 日、東京

小林睦生、Sudipta Roychoudhury, 二瓶直子、佐々木年則 : デング熱媒介蚊に防除に応用するための *Ascogregarina* 原虫に関する予備的研究

小林睦生、二瓶直子、栗原毅 : 北海道北東部の能取湖で採集されたセスジヤブカの産卵について 第 54 回日本衛生動物学会東日本支部大会、14 年 9 月 28 日

小林睦生 : 東北地方のヒトスジシマカの分布拡大にういて : 山形市を中心に 日米医学協力研究会、15 年 1 月 24 - 25 日

小林睦生 : 米国におけるウエストナイル熱の現状と我が国での媒介蚊対策 大阪府立公衆衛生研究所第 150 回セミナー 15 年 2 月 7 日

山岡政興、小西英二 : 日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2002)

石川知弘、小西英二 : 哺乳類細胞と蚊細胞から放出される日本脳炎ウイルス粒子の比較および粒子形成過程の形態学的解析。第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2002)。

矢川京子、小西英二 : 日本脳炎ウイルス prM/E 発現 Vero 細胞において NS1 が誘導する融合促進。第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2002)。

寺澤文、藤井敦子、小西英二 : デング 1 型ウイルス望月株の prM および E 遺伝子を組み込んだプラスミドのマウスにおける中和抗体誘導能。第 37 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2002)。

山岡政興、小西英二 : 日本脳炎及びデング DNA ワクチンの中和抗体誘導能を増強する針無し注射器接種法。第 50 回日本ウイルス学会学術集会・総会 (2002)。

小西英二 : 日本脳炎 DNA ワクチンおよびサブ

ユニットワクチンの同時投与による中和抗体誘導能の相乗的上昇。第50回日本ウイルス学会学術集会・総会（2002）。

小西英二：日本脳炎から西ナイル脳炎へ。第 39 回近畿地区ウイルス疾患協議会研究会（2003）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許

1. 日本脳炎ワクチンによる西ナイルウイルスの感染に対する交叉防御。発明者：只野昌之ほか、国内特許出願中、特願 2002-117980

2. 不活化日本脳炎ウイルスおよびウイルス由来の組換えタンパク質の経粘膜投与方法による全身性免疫応答（systemic immune response）の誘導ならびに感染防御効果。発明者：新川武ほか、国内特許出願中、特願 2001-316859

3. DNAワクチンの中和抗体誘導能を増強するタンパク・DNA同時投与方法。発明者：小西英二（2003年、特許出願予定）

2) 実用新案

なし

3) その他

なし

研究成果に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻	ページ	出版年
Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane	Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases	Journal of Virological Methods	102	61-66	2002
Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane	Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection	Journal of Clinical Virology	24	203-209	2002
Akira Yamamoto, Mikio Nakayama, Yae Kurosawa, Ken Sugo, Hideharu Karasawa, Tetsuro Ogawa, Tomohiko Takasaki, Masato Tashiro, Ichiro Kurane	Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads	J Virol Methods	104	195-201	2002
Masaki Takahashi, Toshiki Miwa, Ken-Ichi Yamada, Yukiyo Sato, Keikin Ikawa, Yasuharu Matsumoto, Tomoaki Sano, Tomohiko Takasaki, Reiko Nerome, Mikako Ito, Ichiro Kurane	Detection of dengue virus-infected patients among passengers at the quarantine station of the New Tokyo International Airport	Jpn. J. Infect. Dis.	55	215-216	2002
Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Prehaud C, Morikawa S.	Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	Journal of Clinical Microbiology	40	372-375	2002
Morikawa S, Qing T, Xinqin Z, Saijo M, Kurane, I.	Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China.	Virology	296	159-164	2002

Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Morikawa S.	Recombinant nucleoprotein based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus	Journal of Clinical Microbiology	40	1587-1591	2002
Tang Q, Saijo M, Lei H, Maeda A, Ikegami T, Xinjung W, Kurane I, Morikawa S.	Detection of immuno-globulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in sheep sera by nucleoprotein-based enzyme-linked immunosorbent and immuno-fluorescence assays	Journal of Virological Methods	108	111-116	2003
Tang Q, Saijo M, Zhang Y, Asiguma M, Dong T, Han L, Shimayi B, Maeda A, Kurane I, Morikawa S.	A patient with Crimean-Congo hemorrhagic fever diagnosed with recombinant nucleo-protein-based antibody detection systems.	Clinical and Diagnostic Laboratory immunology.		In press	2003
Vargas R.E.M., Morita K., Eshita Y., Tsuda Y., Fukuma T. and Takagi M.	Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severity in orally infected Aedes aegypti from different geographic origin.	Journal of Medical Entomology and Zoology	53	21-27	2002
Hasebe F., Parquet M.C., Pandey B. D, Mathenge E.G.M., Morita K., V. Balasubramaniam V., Saat Z., Yusop A., Sinniah, M., Natkunam S. and Igarashi K.	Combined Detection and Genotyping of Chikungunya Virus by a Specific Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction.	J. Med. Virol.	67	370-374	2002
Parquet M.C., Kumatori A., Hasebe F., Edward G.M. Mathenge E.G.M. and Morita K.	Saint Louis Encephalitis Virus induced pathology in culture cells	Archives of Virology	147	1105-1119	2002

Afjal Hossain Khan, Kouichi Morita, Maria del Carmen Parquet, Futoshi Hasebe, Edward G. M. Mathenge and Akira Igarash.	Complete Nucleotide Sequence of Chikungunya Virus and Evidence of an Internal Polyadenylation site.	J.Gen.Virol	83	3075-308 4	2002
Eshita Y, Takasaki T, Yamada K and Kurane I.	Isolation of arboviruses from field-collected mosquitoes.	Anthology in Biosafety	4	87-98	2003
Oda, T., Eshita, Y., Uchida, K., Mine, M., Kurokawa, K., Ogawa, Y., Kato, K. and Tahara, H.	Reproductive activity and survival of <i>Culex pipiens</i> <i>pallens</i> and <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i> (Diptera: Culicidae) in Japan at high temperature.	J. Med. Entomol.	39	185-190	2002
Mizutani T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Inanami, O., Yamamori, T., Goto, A., Ako, Y., Miyoshi, H., Miyamoto, H., Kariwa, H., Kuwabara, M., and Takashima I.	Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36	Insect Mol. Biol.	12	61-66	2003
Eiji Konishi and Tomoyuki Suzuki	Ratios of subclinical to clinical Japanese encephalitis (JE) virus infections in vaccinated populations: evaluation of an inactivated JE vaccine by comparing the ratios with those in unvaccinated populations	Vaccine	21	98-107	2002
Tanabayashi, K., Mukai R., Yamada, A., Takasaki, T., Kurane, I., Yamaoka, M., Terazawa, A., and Konishi, E.	Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys.	Vaccine		In press	2003

Kurane I.	Immune responses to Japanese encephalitis virus.	Current Topics in Immunology and Microbiology	267	91-103	2002
森田公一	デング熱ワクチン	臨床と微生物	29	137-141	2002
森田公一	日本脳炎	小児内科	34	1084-1086	2002
森田公一	デング熱・デング、in 出血熱新世紀の感染症学上	日本臨床	61	302-305	2003
森田公一	西ナイルウイルスとその予防策	日本薬剤師会雑誌	55	73-75	2003

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

ウエストナイルウイルス感染症に対する実験室診断法の確立と 日本におけるウエストナイルウイルスサーベイランス

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)
協力研究者 松本泰治、河合誠義、太田周司、横田勉、田中義枝
(成田空港検疫所)
倉根一郎(国立感染症研究所)

研究要旨

ウエストナイルウイルスは、フラビウイルス科日本脳炎ウイルス血清型群に属し、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。そのため両ウイルス間には抗体の交叉反応がある。本ウイルスはアフリカ・ヨーロッパ・西アジアなど広い範囲で見つかっている。しかし、1999年、ニューヨークに出現するまで、アメリカ大陸での報告は無かった。米国ではその後、ウエストナイルウイルスが定着し2000年、2001年の夏も流行し、東部諸州全域に拡大し、2002年の侵淫地域は44州に拡大し、患者数4000人以上、死亡277例におよぶ大流行をきたした。このまま流行が続けばアメリカ合衆国との人的あるいは物的交流が盛んである日本国内への侵入の可能性もあり、日本脳炎ウイルスの常在する本邦においては、侵入を防止する対策が必要である。そこで我々の確立したウエストナイルウイルスに関する実験室診断法を用いて、日本でのウエストナイルウイルスのサーベイランスを実施した。

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。ウエストナイルウイルスは、日本脳炎ウイルスとその抗原性が極めて類似している。また近年輸入感染症として日本人の症例数が増加しているデング熱の原因ウイルスであるデングウイルスとも近縁である。

ウエストナイルウイルスは、フラビウイルス科日本脳炎血清型群に属し、アフリカ・ヨーロッパ・西アジアなど広い範囲で見つかっている。しかし、1999年、ニューヨークに出現するまで、アメリカ大陸での報告は無かった。米国ではその後、ウエストナイルウイルス(WNV)が定着し2000年、2001年の夏も流行した。2002年には、患者数4000人以上、死者277人におよぶ大流行を来たした。しかし、その侵入ルート

は明らかではない。侵入ルートの特定は感染症対策にとって重要であるが、そのためには侵入前のデータが不可欠である。そこで我々の確立した診断法を用いて、日本でのヒトに関して西ナイルウイルスのサーベイランスを実施した。

B. 研究方法

1. 診断法

IgM 捕捉 ELISA 法

Vero 細胞に接種し、細胞変性効果が十分出現した5日目の培養液を3000rpmで遠沈し、その上清をウイルス抗原とした。

- (1) 抗ヒトIgM抗体(μ鎖特異的)をコーティングしたプレートでウエストナイル患者血清中のIgMを捕捉する。
- (2) ウエストナイルウイルス抗原を反応させる。
- (3) ヒト血清中のウエストナイルウイルス

スに対する IgM と反応したウイルス抗原を、酵素標識した抗フラビウイルス抗体 (IgG 抗体 : D1-4G2-4-15) で検出する。

- (4) 酵素に対する発色基質を加え、抗体のウイルス抗原との反応を発色により検出する。(抗体の結合量は発色の程度 : OD 値として表現される。)

今年度は、米国疾病管理予防センター (CDC) より分与していただいたウエストナイルウイルス感染者血清 20 検体を用いて、我々の IgM 抗体検出法の評価を実施した。

RT-PCR 法

- (1) プライマーの設計

フラミンゴから分離した WNV (NY strain) の配列から、Oligo™ Primer Analysis Software (Molecular Biology Insight, Inc.) を用いて以下のプライマーを設計した。

① WNNY514/904

CggCgCCTTCATACACW/
gCCTTTgAACAgACgCCATA

また、NS3 領域の

② Fla - U5004/Fla - L5457 (T. Briese et al. Lancet 354, 1261-1262, 1999)

5' -ggAACDTCMggHTCNCCHAT-3'

5' -gTgAARTgDgCYTCRTCCAT-3' も併用した。

2. サーベイランス

上記の診断法を用いて米国からの帰国者に対して、2,000 年より夏季に成田空港にて、熱等の症状の有る方や蚊にさされた記憶があり心配な方に血液検査 (PCR による遺伝子検出、特異的 IgM 抗体検査) を実施する旨を呼びかけており、2002 年度も健康相談の上、検査希望者には病原体検査・血清診断を実施した。

C. 研究結果

1. ヒトウエストナイルウイルス感染者血清を用いた IgM 捕捉 ELISA 法の評価

CDC より分与されたウエストナイル熱/脳炎患者血清を用いて、我々の確立した IgM 捕捉 ELISA 法を評価した。その結果、我々が陽性の基準としている Positive/Negative ratio (P/N ratio)

2.0 以上を陽性とする基準にすべて該当し、陽性と判断された。また、ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルス間の交差反応による擬陽性を防止する基準として W/J ratio (West Nile virus/Japanese encephalitis virus ratio) を設定し、ウエストナイルウイルスに対して陽性でかつ W/N ratio 1.5 以上の場合をウエストナイル特異的 IgM 抗体陽性と判定できることが確認された。

(表 1) 但し、症例 4 のように日本脳炎ウイルスおよびウエストナイルウイルス双方に OD 値が異常に高値を示した場合は、血清をさらに希釈し、再検査することにより、判定が可能であった (表 2)。

2. サーベイランス

米国からの帰国者に関しては、18 名の申し出があり、ウイルス分離、PCR 法による遺伝子診断および IgM 抗体による血清診断を実施したが、いずれも陰性であった (表 3)。

D. 考察

ウエストナイルウイルスが日本に侵入した場合、日本には近縁の日本脳炎ウイルスが存在するため診断上混乱が生じることが想定される。そのため、まず実験室診断法を確立した。血清診断法としては、中和抗体測定以外に、IgM 捕捉 ELISA 法が、日本脳炎との鑑別診断として使えることが昨年度日本脳炎患者血清を用いて確認されていたが、本年度は米国のウエストナイル熱/脳炎患者の血清を用いて確認できた。基準として Positive/Negative ratio (P/N ratio) 2.0 以上を陽性とし、ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルス間の交差反応による擬陽性を防止する基準として W/J ratio (West Nile virus/Japanese encephalitis virus ratio) を設定し、ウエストナイルウイルスに対して陽性でかつ W/N ratio 1.5 以上の場合をウエストナイル特異的 IgM 抗体陽性と判定することを日本にウエストナイルウイルスが侵入していない現状での診断基準とした。

これらの方法を用いて、検査を希望する米国からの帰国者の血清から、RT-PCR 法による病原体診断、IgM 捕捉 ELISA 法による

血清学的検査を 18 人について実施したところ全例で陰性であった。

E. 結論

2002 年は、米国において 4000 人を超すウエストナイル熱/脳炎患者が発生したが、米国渡航者からの輸入感染症は確認されなかった。

F. 健康危険情報

2002 年の米国の大流行下で、輸血・臓器移植によるウエストナイルウイルス感染例が発生した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane: Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *Journal of Virological Methods* 102, 61-66. 2002

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane: Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology* 24(3):203-209. 2002

高崎智彦. 黄熱, その他のアルボウイルス感染症. *小児科診療* 65:2077-2081 (2002)

Yuuji Yamamoto, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Mikio Kimura, Kazushige Washizaki, Hiroki Yoshikawa, Akihiro Hitani, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamoto. A Case of acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. *Journal of Infection and chemotherapy* 8:175-177, 2002

Arai YT, Kimura M, Sakaue Y, Hamada A, Yamada K, Nakayama M, Takasaki T, Kurane I. Antibody responses induced by immunization with a Japanese rabies vaccine determined by neutralization test and enzyme-linked immunosorbent

assay. *Vaccine*. 20(19-20):2448-2453, 2002

Akira Yamamoto, Mikio Nakayama, Yae Kurosawa, Ken Sugo, Hideharu Karasawa, Tetsuro Ogawa, Tomohiko Takasaki, Masato Tashiro, Ichiro Kurane. Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. *J Virol Methods*. 104:195-201, 2002

多賀賢一郎、井村俊郎、林 昭宏、鎌倉和政、橋本 智、高崎智彦、倉根一郎、内田幸憲. 日本人における黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する検討. *感染症学雑誌* 76(9):738-746, 2002

徳田敦子、多部田弘士、杉戸一寿、高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎: フィリピンへの団体旅行で感染した Dengue 熱の 3 症例. *感染症学雑誌* 76(11)953-957, 2002

高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *東獣ジャーナル* 441(12)14-16 (2002)

高崎智彦. 日本脳炎、その他の脳炎ウイルス. *今日の治療指針* 2003 年版. 医学書院 143-144. 2003

高崎智彦. 新世紀の感染症学「ウエストナイル熱/脳炎」*日本臨床* 61(増刊号 2)288-291. 2003

高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *Modern Media* 49(2) 1-6. 2003

2. 学会発表

K. I. Yamada, T. Takasaki, M. Nawa, I. Kurane: The future of dengue fever cases during 1998-2001 at National Institute of Infectious Diseases, Japan. XIIth International Congress of Virology (Paris) July. 2002

根路銘令子、高崎智彦、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎. フラビウイルス科、フ

ラビウイルス属、日本脳炎ウイルス種の命名法に関する提案. 第37回日本脳炎ウイルス生態学研究会. (大分) 7月. 2002年

中山幹男、松野重雄、吉田靖子、山西重機、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルス分離株の遺伝学的変異と、その抗原性解析. 第50回日本ウイルス学会. (札幌) 10月. 2002年

高崎智彦、倉根一郎. シンポジウム: 新興・再興節足動物媒介ウイルス感染症の現状. 第43回日本熱帯医学会大会 (高知) 11月. 2002年

中山幹男、松野重夫、高崎智彦、倉根一郎. 組織培養不活化日本脳炎ワクチンに関する研究—Vero細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的検討—. 第6回日本ワクチン学会 (千葉) 11月. 2002年

新井 智、高崎智彦、多屋馨子、松永康子、倉根一郎、岡部信彦. 2000年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況. 第6回日本ワクチン学会 (千葉) 11月. 2002年

Table 1

Patients	WNV Ag OD	JEV Ag OD	P/N Ratio	W/J Ratio
WN-1	1.582	0.663	5.28	2.39
WN-2	2.906	0.368	9.69	7.90
WN-3	3.037	1.549	10.1	1.96
WN-4	3.485	3.466	11.6	1.01*
WN-5	0.811	0.514	2.70	1.58
WN-6	1.845	1.113	6.27	1.66
WN-7	1.447	0.285	4.80	5.08
WN-8	3.357	1.544	11.2	2.17
WN-9	2.140	1.069	7.10	2.00
WN-10	1.349	0.541	4.50	2.49
WN-11	1.650	0.257	5.50	6.42
WN-12	3.968	0.902	13.2	4.40
WN-13	2.214	0.884	7.38	2.50
WN-14	3.241	0.908	10.8	3.57
WN-15	0.542	0.113	1.75	4.80
WN-16	>4.0	0.340	>12.9	>11.8
WN-17	3.513	1.584	11.3	2.22
WN-18	1.698	0.307	5.48	5.53
WN-19	3.445	1.638	11.1	2.10
WN-20	2.032	0.677	6.55	3.00

Numbers show optical density (OD).

WN-4 showed same range of O.D. at 100 times dilution (A), then more diluted sera were applied to the assay (B).

Table 2

Serum dilution	WNV Ag	JEV Ag	P/N ratio	W/J ratio
200 x	3.43	2.22	11.4	1.55
400 x	3.33	2.03	11.1	1.64
800 x	2.81	1.40	9.3	2.01

WN-4 was serially diluted

表3

	渡航先	渡航目的	予防接種歴	症状	発症日	帰国日	蚊に刺された記憶	IgM ELISA		RT-PCR	
								O.D.	P/N ratio W/J ratio		
成田	N02-W01 USA	ブラジル アルゼンチン	黄熱	発熱	8月16日	8月19日	無し	0.17	1.12	0.74	Negative
成田	N02-W02 USA(NY)	観光	—	—	—	8月25日	無し	0.09	0.90	0.53	Negative
成田	N02-W03 USA(DC)	会議	—	—	8月27日	8月28日	無し	0.17	1.73	1.62	Negative
成田	N02-W04 USA(セントポール)	ビジネス	—	微熱・咽頭痛	9月12日	9月14日	9月7日	0.18	1.14	1.07	Negative
成田	N02-W05 USA(LA,Hawaii)	観光	—	—	—	9月14日	無し	0.20	1.94	0.73	Negative
成田	N02-W06 USA(LA,Hawaii)	観光	—	—	—	9月14日	9月7日	0.25	0.98	0.60	Negative
成田	N02-W07 USA(シアトル、NY、シカゴ)	観光	—	発熱・頭痛	9月12日	9月13日	9月11日	0.23	1.44	1.31	Negative
成田	N02-W08 USA(NY)	観光	—	—	—	9月18日	無し	0.14	0.82	1.20	Negative
成田	N02-W09 USA(NY)	観光	—	発熱・頭痛・悪寒・関節痛	9月29日	9月29日	無し	0.28	1.24	0.98	Negative
成田	N02-W10 USA(LA,LasVegas)	観光	—	—	—	9月29日	無し	0.06	1.24	0.83	Negative
成田	N02-W11 USA(ミネソタ)	観光	—	微熱	9月29日	10月1日	無し	0.26	0.99	0.67	Negative
成田	N02-W12 USA(LA,Hawaii)	ビジネス	—	発熱	10月10日	10月11日	無し	0.25	1.27	1.41	Negative
成田	N02-W13 メキシコ	インド USA(ラスベガス)	—	発熱	10月11日	10月13日	無し	0.16	1.04	0.83	Negative
成田	N02-W14 USA(D.C., LA)	ビジネス	—	—	—	10月20日	無し	0.27	1.31	0.76	Negative
成田	N02-W15 USA(全米)	10/11~11/9	—	頭痛、倦怠感	10月24日	11月9日	無し	0.09	1.33	1.04	Negative
成田	N02-W16 USA(D.C., ノースカロライナ,ダラス,ニューオーリンズ,ワシントン)	観光	—	微熱、悪寒、頭痛	11月6日	11月9日	無し	0.18	1.35	0.85	Negative
成田	N02-W17 メキシコ	観光	—	嘔吐、下痢、発熱	11月25日	11月27日	無し	0.13	0.97	1.1	Negative
成田	N02-W18 USA(フロリダ)	観光	—	微熱	12月31日	2003/1/4	無し	0.38	1.33	0.79	Negative

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

2002 年度輸入デングウイルス感染症の検査・診断

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所）

協力研究者 三輪俊樹、高橋 正樹、横田 勉、田中絹枝
（成田空港検疫所）

山田堅一郎、倉根一郎（国立感染症研究所）

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世界的規模で熱帯・亜熱帯地域に拡がっており、**re-emerging infectious disease**（再興感染症）の一つとして、極めて重要な感染症になっている。わが国では過去 60 年間国内流行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、診断を行い、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、流行地域からの帰国者で初感染のデング熱の確定診断が可能であった。

A. 研究目的

デングウイルス感染症はわが国では過去 60 年間国内感染のない感染症であるが、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。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重要となった。そこで、本感染症に対する検査・診断を成田空港検疫所と国立感染症研究所で行い、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 C6/36 株で増殖させた培養

上清を用いた。RT-PCR は森田ら（*J.Clin.Microbiol.*29,1991）の方法に基づいた One-step 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。血清での抗体検査には Immunochromatographic test kit (PanBio, East Brisbane, Australia)、IgM-capture ELISA kit (Cypress, CA, USA) および IgG-ELISA kit(PanBio)により IgM および IgG 抗体を測定した。

C. 研究結果

1. 輸入デング感染症の状況

1) 成田空港検疫所での検査成績

熱帯地域から成田空港に帰国した時に不明熱があり、デング感染症の検査依頼があった総数は 132 症例であった。これらの検体を特異遺伝子および IgM 抗体の検出により検査・診断した結果、22 症例（16%）

が陽性（男性：13、女性：9）であった。その内、2症例がデングウイルス1型と判定された。これらの患者の多くは東南アジア・南アジア（タイ、フィリピン、マレーシア、インドネシア、ミャンマー、ベトナム、ネパール、インドなど）からの帰国者であったが、デング熱の大きな流行のあったブラジルからの帰国者も2症例含まれていた（表1）。これらの検体は国立感染症研究所で再検査され、確定診断された。この結果はすでに論文として発表済みである。

2) 国立感染症研究所での検査成績

各地の医療機関、衛生研究所から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表2に示した。検査総数46症例中31症例（67%）がデング熱（男性：19、女性：12）と診断された。この31症例中13症例がPCRで型別が確定された（1型：10例、2型：2例、3型：0例、4型：1例）。感染者の大半はインドネシア（11例）・タイ（9例）・フィリピン（5例）など東南アジアからの帰国者であったが、昨年と異なりタイよりもインドネシア特にバリ島で感染した症例が多かった。

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℃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法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、それ以前の検体から検出された。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。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。これらの型別および分離ウイルスはRT-PCR法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法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。

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、ウイルス血症が存在す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捕捉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を組み合わせることにより、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、その実数は正確には把握できていない。感染患者の大半はインドネシア、タイ、フィリピンなど東南アジアからの帰国者であるが、ホンデュラス、パプアニューギニアなど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、南太平洋諸島、中南米など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合わせると、帰国時での検疫所での検査およびその後の確定診断等、輸入感染症としてのデング熱、デング出血熱の把握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捕捉ELISAによるIgM抗体の検出の両検索を行えば、初感染のデング熱症例では、診断が可能であると考えられる。近年、輸入デ

ング症例は確実に増加傾向にあり、重症例も発生している。今後は成田空港検疫所など主要国際空港での帰国時での初検査と国立感染症研究所での確定診断および各地方衛生研究所並びに各検疫所との連携システムを構築し、全国的な検査・診断体制を整備することが望まれる。

F. 健康危険情報

2001年から2002年にかけて、米国ハワイ州で60年ぶりにデング熱が流行した。マウイ島を中心に、オアフ島・カウアイ島で患者が発生し、合計117症例の流行となった。デングウイルスはタヒチより持ち込まれたものであることが、CDCによる遺伝子解析の結果明らかとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane: Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *Journal of Virological Methods* 102, 61-66. 2002

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane: Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology* 24(3):203-209. 2002

高崎智彦. 黄熱, その他のアルボウイルス感染症. *小児科診療* 65:2077-2081 (2002)

Yuuji Yamamoto, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Mikio Kimura, Kazushige Washizaki, Hiroki Yoshikawa, Akihiro Hitani, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamoto. A Case of acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. *Journal of Infection and chemotherapy* 8:175-177, 2002

Arai YT, Kimura M, Sakaue Y, Hamada A, Yamada K, Nakayama M, Takasaki T, Kurane I. Antibody responses induced by immunization with a Japanese rabies vaccine determined by neutralization test

and enzyme-linked immunosorbent assay. *Vaccine*. 20(19-20):2448-2453, 2002

Akira Yamamoto, Mikio Nakayama, Yae Kurosawa, Ken Sugo, Hideharu Karasawa, Tetsuro Ogawa, Tomohiko Takasaki, Masato Tashiro, Ichiro Kurane. Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. *J Virol Methods*. 104:195-201, 2002

多賀賢一郎、井村俊郎、林 昭宏、鎌倉和政、橋本 智、高崎智彦、倉根一郎、内田幸憲. 日本人における黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する検討. *感染症学雑誌* 76(9):738-746, 2002

徳田敦子、多部田弘士、杉戸一寿、高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎: フィリピンへの団体旅行で感染したデング熱の3症例. *感染症学雑誌* 76(11):953-957, 2002

Masaki Takahashi, Toshiki Miwa, Ken-Ichi Yamada, Yukiyoshi Sato, Keikin Ikawa, Yasuharu Matsumoto, Tomoaki Sano, Tomohiko Takasaki, Reiko Nerome, Mikako Ito, Ichiro Kurane. Detection of dengue virus-infected patients among passengers at the quarantine station of the New Tokyo International Airport. *Jpn.J.Infect.Dis.*,55:215-216. 2002.

高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *東獣ジャーナル* 441(12):14-16 (2002)

高崎智彦. 日本脳炎、その他の脳炎ウイルス. *今日の治療指針* 2003年版. 医学書院 143-144. 2003

高崎智彦. 新世紀の感染症学「ウエストナイル熱/脳炎」*日本臨床* 61(増刊号2):288-291. 2003

高崎智彦. ウエストナイル熱/脳炎. *Modern Media* 49(2) 1-6. 2003

2. 学会発表

K. I. Yamada, T. Takasaki, M. Nawa, I. Kurene: The future of dengue fever cases during 1998-2001 at National Institute of Infectious Diseases, Japan. XIIth International Congress of Virology (Paris) July. 2002

根路銘令子、高崎智彦、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎. フラビウイルス科、フラビウイルス属、日本脳炎ウイルス種の命名法に関する提案. 第37回日本脳炎ウイルス生態学研究会. (大分) 7月. 2002年

中山幹男、松野重雄、吉田靖子、山西重機、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルス分離株の遺伝学的変異と、その抗原性解析. 第50回日本ウイルス学会. (札幌) 10月. 2002年

高崎智彦、倉根一郎. シンポジウム：新興・再興節足動物媒介ウイルス感染症の現状. 第43回日本熱帯医学会大会 (高知) 11月. 2002年

中山幹男、松野重夫、高崎智彦、倉根一郎. 組織培養不活化日本脳炎ワクチンに関する研究—Vero細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的検討—. 第6回日本ワクチン学会 (千葉) 11月. 2002年

新井 智、高崎智彦、多屋馨子、松永康子、倉根一郎、岡部信彦. 2000年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況. 第6回日本ワクチン学会 (千葉) 11月. 2002年

表 1 The countries visited by dengue patients

2002					
N02-01	32, F	Nepal	India	Thailand	
N02-03	25, M	Guinea	Mali	Burkina F Mali	
N02-07	20, F	Indonesia			
N02-12	37, M	Brazil			
N02-19	20, M	Venezuela	Brazil	French G	Surinam Trinidad Tobago
N02-23	28, M	Thailand			
N02-39	26, F	Thailand			
N02-40	49, M	Thailand			
N02-44	33, F	Myanmar			
N02-49	18, F	Philippines			
N02-58	33, M	Philippines			
N02-59*	8, F	Thailand			
N02-62	22, M	Thailand			
N02-65	9, M	Malaysia			
N02-80	22, M	Thailand			
N02-81	21, M	Singapore	Indonesia		
N02-86	23, M	Thailand			
N02-91	19, F	China	Nepal	India	
N02-93	28, F	India			
N02-127	26, M	Sri Lanka			
N02-128	25, M	Thailand	Cambodia	Viet Nam	
N02-135	32, F	Nepal	India	Nepal	Thailand

表 2

Demographic information of 31 dengue cases

No.	Age, Sex	Dis. day	PCR(dir.) DEN	IgM-ELISA (FOCUS)	IgG-ELISA (PanBio)	Country
02-01	22, F					Indonesia
/1		9	-	+(7.7)	+(7.4)	Thailand
/2		34		+(2.7)	+(9.0)	
02-03	29, F					Indonesia
/1			-	+(7.2)	+(6.5)	
02-05	25, F					East Timor
/1		7	D2	+(10.7)	-(0.1)	
/2		8		+(13.9)	-(0.2)	
/3		29		+(8.2)	+(1.4)	
02-06	22, F					Indonesia
/1		10	-	+(3.2)	-(0.1)	
/2		15		+(1.5)	-(0.1)	
02-07	44, M					Indonesia
/1		5	D1	+(1.6)	-(0.1)	
/2		6		+(3.4)	-(0.2)	
/3		7		+(8.4)	-(0.3)	
/4		8		+(11.5)	-(0.6)	
/5		14		+(14.3)	+(2.0)	
02-08	24, M					Indonesia
/1		4	D2	+(1.2)	-(0.4)	
02-09	20, M					Indonesia
/1		5	D1	-(0.9)	-(0.2)	
02-11	20, M					Indonesia
/1		13	-	+(12.7)	+(1.9)	
02-12	54, M					Indonesia
/1		6	-	+(2.0)	-(1.0)	
/2		13		+(9.1)	+(1.9)	
02-13	40, M					Philippines
/1		5	D1	+(1.2)	-(0.1)	
/2		19		+(18.4)	+(1.6)	
02-14	22, F					Thailand
/1		14	-	+(5.9)	+(2.0)	Vietnam
/2		21		+(5.0)	+(2.1)	
02-16	26, M					Thailand
/1		6	D1	+(4.2)	+(1.5)	
/2		13		+(7.2)	+(2.1)	
02-17	50, M					Indonesia
/1		4	D1	-(0.6)	-(0.4)	
/2		22		+(7.6)	+(2.1)	
02-18	42, M					Indonesia
/1		21	-	+(3.3)	+(1.7)	
/1csf			-	+(6.0)	+(1.5)	
/2		34		+(1.6)	+(1.4)	
/2csf				+(1.6)	+(1.3)	
/3		47		+(1.1)	+(1.2)	
/3csf				-(0.8)	-(0.8)	
/4		61		-(0.7)	-(0.6)	
/4csf				-(0.3)	-(0.3)	
/5		117		-(0.4)	-(0.9)	
/5csf				-(0.3)	-(0.1)	
02-19	29, M					Thailand
/1		8	-	+(5.3)	+(2.0)	
/2		11		+(6.7)	+(2.2)	
02-20	54, M					Thailand
/1		2	D1	+(1.1)	-(0.4)	
/2		8	-	+(13.9)	+(2.0)	

02-21	30, F					Cambodia
/1		3	D4	-(0.7)	-(0.9)	Thailand
/2		19		+(1.8)	+(2.3)	
02-23	24, F					Indonesia
/1		29	-	+(2.2)	+(2.3)	
02-25	38, M					Sri Lanka, Philippines
/1		14	-	+(1.3)	+(1.9)	
/2		16		+(1.2)	+(1.8)	
/3		18		-(1.0)	+(1.7)	
02-26	25, F					Honduras
/1		29	-	+(6.1)	+(2.4)	
/2		77				
02-27	63, M					Myanmar
/1		14	-	+(6.4)	+(2.0)	
/2		23		+(5.9)	+(2.1)	
02-32	12, F					Philippines
/1		6	-	+(1.5)	+(2.7)(2.0)	
/2		14		+(1.2)	+(2.0)	
02-33	25, M					Thailand
/1		4	D1	-(0.3)	-(0.2)	
/2		9		+(4.3)	+(1.5)	
/3		15		+(10.3)	+(1.4)	
02-34	8, F					Thailand
/1		9	-	+(1.6)	+(1.4)	
02-36	47, M					Myanmar
/1		9	-	+(6.0)	-(0.3)	
/2		24		+(5.9)	+(1.2)	
02-37	23, M					Bangladesh
/1		5	-	-(0.9)	+(1.92)	
/2		16		+(2.0)	+(1.98)	
02-38	22, F					Thailand
/1		5	D1	+(1.30)	NT	
02-43	28, M					Laos
/1		10	-	+(4.7)	NT	
02-44	32, M					Philippines
/1		3	D1	+(1.2)	NT	
/2		6	-	+(6.8)	NT	
/3		14		+(9.5)	NT	
02-45	32, F					Philippines
/1		5	D1	-(0.8)	NT	
/2		7	-	+(1.6)	NT	
/3		8		+(2.1)	NT	
/4		11		+(3.0)	NT	
02-46	29, M					Papua New Guinea
/1		33	-	+(8.5)	NT	
/2		55				