

蚊からのウエストナイルウイルスの検出。  
第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会  
5/15-16/2003 (小樽市)

佐藤利明、斎藤隆行、古屋由美子、今井光  
信、宮澤真紀、高崎智彦、倉根一郎。ウエ  
ストナイルウイルスの遺伝子検査—感染研  
マニュアルの死亡カラスへの応用事例—  
第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会  
5/15-16/2003 (小樽市)

高崎智彦。「ウエストナイルウイルス感染  
症」 新興疾病・人獣共通感染症に関する  
国際ワークショップ 6/19/2003 (東京都)

高崎智彦。「ウエストナイルウイルス感染  
症について」 第 2 回関西感染症フォーラ  
ム 6/21/2003 (大阪市)

高崎智彦。フラビウイルス感染症およびそ  
の流行における鳥類の役割。平成 15 年秋  
季全国鶏病技術研修会 (広島市) 11/6/2003

高崎智彦、倉根一郎。第 3 回日本医薬品等  
ウイルス安全性研究会シンポジウム。(東  
京都) 12/19/2003

高崎智彦。話題の感染症—ウエストナイ  
ル熱を中心に—。第 19 回日本環境感染学  
会。(横浜市) 2/20/2004

長谷部太、Parida M., Sophie B.,  
Guillermo P., 井上真吾、森田公一：LAMP  
法による西ナイルウイルス遺伝子診断の試  
み、第 38 回日本脳炎生態学研究会 (平成  
15 年 5 月 15~16 日、小樽)

Parquet C., 長谷部太、井上真吾、NgaTN,  
森田公一：日本脳炎ウイルス Genotype I 型  
のベトナムへの侵入、第 38 回日本脳炎生  
態学研究会 (平成 15 年 5 月 15~16 日、小  
樽)

Pandey B., 山本晃、森田公一、Rai. S., 倉  
根一郎：ネパールにおける日本脳炎の血清  
疫学。第 38 回日本脳炎生態学研究会 (平  
成 15 年 5 月 15~16 日、小樽)

Morita K, Inoue S, Hasebe F, Ishikawa K,  
Fuke I, Mizuno T, Development and  
evaluation of newly developed WN vaccine.  
第 3 回あわじしま感染症・免疫フォーラム  
(平成 15 年 8 月 25 日~28 日、あわじ夢舞  
台)

Mathenge EG, Parquet C, 長谷部太、井上  
真吾、森田公一：Elevated dengue antigen  
expression and host cell specificity in  
JE/Dengue chimeras. 第 51 回日本ウイルス  
学会 (平成 15 年 10 月 27 日~29 日、京都、  
国立京都国際会議場)

青木千恵、左一八、森田公一、長谷部太、  
宮本大誠、鈴木隆、鈴木康夫：デング熱ウ  
イルス結合性糖鎖分子の構造及びその性状  
解析。第 51 回日本ウイルス学会 (平成 15  
年 10 月 27 日~29 日、京都、国立京都国際  
会議場)

加根村和美、只野昌之、森田公一、倉根一  
郎、高島郁夫、森直樹：沖縄県住民の西ナ  
イルウイルスに対する交差中和抗体測定。  
第 51 回日本ウイルス学会 (平成 15 年 10 月  
27 日~29 日、京都、国立京都国際会議場)

Parquet C, Cuong VD, 長谷部太, Nga PT, 馬紹平、井上真吾、牧野芳大、森田公一 : Emergence of Japanese encephalitis virus genotype 1 in Vietnam. 第 51 回日本ウイルス学会 (平成 15 年 10 月 27 日~29 日、京都、国立京都国際会議場)

Manmohan P, Guillermo P, 井上真吾、長谷部太、森田公一 : Real-time Reverse transcription Loop Mediated Isothermal Amplification for rapid detection of West Nile virus. 第 51 回日本ウイルス学会 (平成 15 年 10 月 27 日~29 日、京都、国立京都国際会議場)

森田公一 : 東アジアにおける日本脳炎ウイルスの分子疫学. 第 35 回九州微生物研究会 (平成 15 年 12 月 19 日、福岡、ホテルセントラザ博多)

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、野村秀和、Beti Ernawati Dewi, 倉根一郎. Real Time PCR による Dengue virus の血清型分類. 第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 5/15-16/2003 (小樽)

名和 優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎. デングウイルス血清型特異的 IgM 検出のためのタンパク変性試薬 (チオシアン酸ナトリウム) を用いた ELISA. 第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 5/15-16/2003 (小樽)

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、田島 茂、野村秀和、Ernawati Dewi Beti, 倉根一郎. Real time PCR による

Dengue virus の血清型分類. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

Beti Ernawatti, 高崎智彦、倉根一郎. PBL induce increase in the permeability on dengue virus infected-endothelial cells associated with down regulation of VE-cadherin. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

名和 優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎. デングウイルス血清型特異的 IgM 検出のためのタンパク変性試薬 (チオシアン酸ナトリウム) を用いた ELISA. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランスブタ血清からのウイルス分離とその解析および日本脳炎を疑われる患者検体からのウイルス分離. 第 38 回日本脳炎生態学研究会 2003 年 5 月 (小樽)

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランス : ブタ血清からのウイルス分離とその解析. 第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年 10 月 27 日-29 日 (京都)

西條政幸、唐青、森川茂、前田秋彦、倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱に対するリバビリンによる治療経験. 第 13 回抗ウイルス化学療法研究会, 2003 年 1 月, 津田沼

西條政幸、森川茂、前田秋彦、倉根一郎.

急性期クリミア・コンゴ出血熱患者におけるウイルス血症と液性免疫応答. 第51回日本ウイルス学会学術集会・総会, 2003年10月, 京都.

田島茂、高崎智彦、松野重夫、中山幹男、倉根一郎. Yokose ウイルスの全塩基配列の決定および他のフラビウイルスとの相同性の比較. 第51回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2004

水谷哲也、小林正之、江下優樹、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、荻和宏明、高島郁夫 (2003) : ヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞におけるウエストナイルウイルスの感染防御 - ウイルス感染における JNK シグナル伝達の役割. 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) :24, 2003.

佐々木年則、沢辺京子、江下優樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小林睦生 (2003) : VecTest による蚊からのウエストナイルウイルスの検出. 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) : 41, 2003.

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.

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) : 日本の蚊のウエストナイルウイルス媒介能 (シンポジウム). 2003年5月15・16日、第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会、マリンヒルホテル小樽. 第38回日本脳炎ウイルス生態学研究会講演抄録・プログラム :

赤穂芳彦、水谷哲也、三好洋嗣、小林正之、白戸憲也、江下優樹、木村享史、稲波修、荻和宏明、高島郁夫 (2003) : 西ナイルウイルスの感染における JNK の役割. 136 回日本獣医学会大会. 2003年10月3日-5日 青森市、北里大学.

江下優樹 (2003) : 日本における疾病媒介蚊対策を考える。一米国におけるウエストナイル熱蔓延から学ぶこと一講演2 : 日本に生息する蚊とそのウエストナイルウイルス媒介能について. 第47回全国環境衛生大会 第一分科会「生活衛生」。2003年10月15-16日、岐阜市、長良川国際会議場・大会議場、第47回全国環境衛生大会 抄録集、74-75, 2003.

江下優樹、安西三郎、Srisawat Raweewan、多森直樹、高崎智彦、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 (7) 日本産アカイエカのウエストナイルウイルス媒介試験. 第 56 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 53 回日本衛生動物学会南日本支部大会 2003 年 10 月 25-26 日、鹿児島市、鹿児島大学稲盛会館 (郡元キャンパス)、Med. Entomol. Zool., 54 : 2003.

水谷哲也、小林正之、江下優樹、白戸憲也、赤穂芳彦、三好洋嗣、木村淳史、高崎智彦、梅村孝司、荻和宏明倉根一郎、高島郁夫 (2003) : 蚊の細胞へのウエストナイルウイルスの侵入における活性化 JNK の重要性。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会。2003 年 10 月 27, 28, 29 日、京都市、国立京都国際会館、(プログラム・抄録集) : 156, 2003.

江下優樹 (2003) : ウエストナイルウイルスとその媒介蚊。第 21 回九州実験動物研究会総会・第 23 回日本実験動物技術者協会九州支部会研究発表会 共同開催、2003 年 11 月 9 日、大分市、大分大学医学部看護学科講義棟、特別講演 (13:00-14:00)。九州実験動物雑誌、No. 19: 64, 2003.

江下優樹 (2004) : 蚊媒介性疾患としてのアルボウイルス症。第 28 回日本熱帯医学会九州支部大会。2004 年 1 月 31 日 (土) -2 月 1 日 (日)。大分大学医学部看護学科棟、大分。

江下優樹、Srisawat Raweewan、安西三郎、

多森直樹、Narumon Komalamisra、Somjai Leemingsawat、Yupha Rongsriyam、牛島廣治 (2004) : タイ国の Dengue 熱流行地域で採集した媒介蚊からの Dengue ウイルスゲノム検出。第 19 回日本国際保健医療学会東日本地方会。2004 年 2 月 28 日 (土)。東京大学医学部図書館、東京。

石川知弘、小西英二 : 日本脳炎ウイルスに対する自然抗体の基礎的研究。第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2003)。

正田瑞恵、石川知弘、近藤高志、小西英二 : 日本脳炎ウイルスに対するウマ血清中 NS1 抗体測定法の確立及び疫学調査への応用。第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2003)。

井本淳一、寺澤文、小西英二 : フラビウイルス DNA ワクチン及び蛋白ワクチンの同時投与による中和抗体誘導能の上昇。第 38 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2003)。

小西英二 : フラビウイルス病に対する DNA ワクチンの開発。第 1 回 DNA 及び新型ワクチン研究会 (2003)。

正田瑞恵、近藤高志、小西英二 : 日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定の ELISA について。第 10 回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会 (2003)。

山中敦史、小西英二 : 日本脳炎ウイルス prM/E 発現 Vero 細胞において中性 pH で誘導される融合現象について。第 10 回トガ、フラビ、ペスチウイルス研究会 (2003)。

正田瑞恵、石川知弘、近藤高志、小西英二：  
日本脳炎ウイルスに対するウマ血清中  
NS1 抗体測定法の確立及び疫学調査への  
応用。第 51 回日本ウイルス学会学術集会・  
総会（2003）。

井本淳一、小西英二：日本脳炎DNAワクチン  
および蛋白ワクチンの針無注射器を用いた  
混合投与がマウスに誘導する中和抗体レベ  
ルの上昇。第51回日本ウイルス学会学術集  
会・総会（2003）。

小西英二：フラビウイルス DNA ワクチンの  
抗原産生能とマウスにおける中和抗体誘導  
能との関係。第 51 回日本ウイルス学会学術  
集会・総会（2003）。

矢川京子、石川知弘、小西英二：Vero 細胞  
を用いたフラビウイルス持続感染系の確立  
と特性解析。第 51 回日本ウイルス学会学術  
集会・総会（2003）。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### （1）特許

1) 「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

2) 「西ナイルウイルスの LAMP 法を用いた  
検出方法」（現在特許申請中）

発明者：森田公一

##### （2）実用新案

なし

##### （3）その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamada, K., Takasaki, T., Nawa, M., Yabe, S., and Kurane, I	Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses	Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.	10	725-728	2003
Takasaki, T., Yabe, S., Nerome, R., Ito, M., Yamada, K., and Kurane, I	Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice.	Vaccine.	7	4514-4518	2003
Eiji Konishi, Aya Terazawa and Jun-ichi Imoto	Simultaneous immunization with DNA and protein vaccines against Japanese encephalitis or dengue synergistically increases their own abilities to induce neutralizing antibody in mice	Vaccine	21	1826-1832	2003
Kiyoshi Tanabayashi, Ryozaburo Mukai, Akio Yamada, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Masaoki Yamaoka, Aya Terazawa, and Eiji Konishi	Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys	Vaccine	21	2338-2345	2003
Chiyoko Nukuzuma, Naoko Ajiro, Carl J. Wheeler, and Eiji Konishi	Enhancing effect of Vaxfectin on the ability of a Japanese encephalitis DNA vaccine to induce neutralizing antibody in mice	Viral Immunology	16	183-189	2003
Eiji Konishi, Naoko Ajiro, Chiyoko Nukuzuma, Peter W. Mason, and Ichiro Kurane	Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing	Vaccine	21	3675-3683	2003

	antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice				
Eiji Konishi, Aya Terazawa and Atsuko Fujii	Evidence for antigen production in muscles by dengue and Japanese encephalitis DNA vaccines and a relation to their immunogenicity in mice	Vaccine	21	3713-3720	2003
Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo	Prevalence of antibody to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein among racehorses in Japan: indication of natural infection and need for continuous vaccination	Vaccine	22	1097-1103	2004
Parida M., Posadas M., Inoue S., Hasebe F., and Morita K.	Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus.	J. Clin. Microbiol.	42	257-263	2004
Inoue S., Morita K., Matias R.R., Tuplano J.V., Resuello R.R.G., Candelario J.R., Cruz D.J.M., Mapua C.A., Hasebe F., Igarashi A. and Natividad F.F.	Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys ( <i>Macaca fascicularis</i> ) in the Philippines.	J. Med. Primatol.	32	89-94	2003
Ohishi K., Inoue S., Cinco M., Diaano E., Alera M., Alfon J., Abanes F., Crus D., Matias R., Matsuura H., Hasebe F., Tanimura S., Kumatori A., Moirta K., Natividad F., Nagatake T:	Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections.	J. Med. Virol.	71	259-264	2003
Pandey B., Yamamoto A., Morita K., Kurosawa Y., Rai S., Adhikari S.,	Serodiagnosis of Japanese encephalitis among Nepalese patients by the particle agglutination assay.	Epidemiol. Infect.	131	881-885	2003

Kandel P., and Kurane I.:					
Eshita Y, Takasaki T, Yamada K and Kurane I.	Isolation of arboviruses from field-collected mosquitoes.	Anthology: Arthropod Borne Diseases	4	63-71	2003
Mizutani T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Inanami, O., Yamamori, T., Goto, A., Aki, 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
Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Aki, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H., Umemura T. and Takashima I.	Involvement of the JNK-like protein of the Aedes albopictus mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus	Insect Mol. Biol.	12	491-499	2003
森田公一	ウエストナイル熱の脅威	公衆衛生情報	34	21-23	2004
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
森田公一	ウエストナイルウイルス脳炎、日本脳炎	臨床と微生物	30	351-355	2003
森田公一	注目すべき世界の感染症ー西ナイルウイルス、	成人病と生活習慣病	33	1121-1124	2003
林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森英人、井村俊郎、江下優樹、内田幸憲	One step RT-PCR 法による媒介蚊からのフラビウイルス RNA の検出条件の検討	感染症学雑誌	77	822-829	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

#### 2003 年度輸入デングウイルス感染症、ウエストナイル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、松本泰治、横田 勉、河合 誠義  
（成田空港検疫所）

伊藤美佳子、小滝 徹、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 年間に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検出とウイルス分離および IgM-捕捉 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。本年はまた、インドからカナダに帰国する旅行者が、機中で熱発し成田空港検疫所にて診察・検査した結果、デング熱であることが判明した症例があった。また、米国ではウエストナイル熱が、2003 年は 2002 年の大流行を上回る流行をきたした。1999 年に初めてニューヨークに侵入して以来、毎年夏期に流行しており、日本人渡航者でウエストナイル熱が疑われる症例の検査依頼が合計 4 件あった。このうち、1 例は約 100 年ぶりにウエストナイル熱が流行したチュニジアからの帰国者であったが、ウエストナイル熱は否定された。

#### A. 研究目的

デングウイルス感染症はわが国では過去 60 年間に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および国

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。また、米国で流行しているウエストナイル熱についても同様の体制をとった。

#### 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:H87, 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 社, East Brisbane, Australia)、IgM-捕捉 ELISA kit (Focus 社, CA, USA) および IgG-ELISA kit (PanBio 社) により IgM および IgG 抗体を測定した。

また、本年度からは新たに開発した Dengue ウイルス 1-4 型に特異的なプライマーおよびプローブを用いた TaqMan Real Time RT-PCR 法も併用した。

## C. 研究結果

### 1. 輸入 Dengue 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、Dengue 感染症の検査依頼があった総数は 155 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 (14.2%) が陽性 (男性: 14、女性: 8) であった。その内、RT-PCR およびリアルタイム PCR

(TaqMan 法) 9 症例でウイルス血清型が判明した。その内訳は、Dengue ウイルス 1 型が 3 例、2 型が 5 例、3 型が 1 例であった。これらの患者の多くは東南アジア・南アジア (タイ、インドネシア、ラオス、インド、パキスタン) からの帰国者であったが、ニューカレドニア、オーストラリア、コロンビアなどからの帰国者も含まれる (表 1)。

また、ウエストナイルウイルス感染に関しては、サンフランシスコで蚊に刺された添乗員の成田空港検疫所からの依頼が 1 検体あったが、病原体診断、血清学的検査いずれも陰性であった。

#### 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図 2 に示した。検査総数 34 症例中 23 症例 (67.6%) が Dengue 熱と診断された。この 23 症例中 14 症例が PCR で型別が確定された (1 型: 3 例、2 型: 8 例、3 型: 4 例、4 型: 0 例)。感染者の大半はインドネシア (5 例)・タイ (6 例)、インド

(3 例) など東南アジアからの帰国者であった。しかし、セイシェル、フィジー、ニューカレドニアなどインド洋や南太平洋などの島国からの帰国者もいた。また、フィジーで海外青年協力隊員の感染例があったが、23 症例には含めていない。ただし、図 2 中には含めている。

一方、東京都内の病院からの検査依頼が 3 件あったが、病原体診断、血清学的検査いずれも陰性であった。

### 2. インドで感染した症例から分離した Dengue ウイルスの遺伝子解析

2003 年 11 月 11 日にインドからカナダに向かう旅行者が、機中で熱発し成田空港検疫所にて診察・検査した結果、Dengue 熱であることが判明した症例があった。本症例では、Dengue ウイルス 1 型が分離され、その遺伝子解析から、ウイルスは南米の分離株に近いことが判明した。なお、このウイルスの RT-PCR では、従来我々が使用している Dengue 共通プライマーでは、増幅可能であったが、1 型特異的プライマーでは増幅できなかった。図 2 に遺伝子解析結果とプライマー配列を示すが、20 ヌクレオチドのセンスプライマーと mismatches が、5 ヌクレオチドあった。

## D. 考察

Dengue 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により、初感染の Dengue 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 Dengue 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、南太平洋地域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。

また、インドからの旅行者症例では、患者は11月11日、デリー発バンコク経由、成田空港はトランジットでカナダに帰国する途中の発熱であり、潜伏期間を考えるとバンコクで感染したことは考えられない。当時インドで流行していた株は3型であったが、1型も流行していたという貴重な情報がもたらされた。また、本ウイルスは、遺伝子解析の結果、従来我々が用いてきたデング1型用のプライマーでは、センスプライマーの配列が5ヌクレオチドで合わないため増幅できないことが確認された。早急にプライマー設計をやり直す必要があることが判明した貴重な症例で、平成15年11月に改正され、デング熱が検疫感染症となり、検疫法第13条において検疫時にデング熱が疑われる患者を診察および病原体・血清診断が行えるようになったことが、機能した最初の症例となった。

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抗体の検出の両検査を行えば、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 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Sadao Yabe, Ichiro Kurane. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10(4) 725-728, 2003.

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka. Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *Journal of General Virology* 84: 1737-1741, 2003.

高崎智彦、倉根一郎. 世界におけるデング熱・デング出血熱. 病原微生物検出情報 25(2)33-34 (2004)

##### 2. 学会発表

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、田島 茂、野村秀和、Ernawati Dewi Beti, 倉根一郎. Real time PCRによるDengue virusの血清型分類. 第51回日本ウイルス学会(京都) 10/27-29/2003

Beti Ernawatti, 高崎智彦、倉根一郎. PBL induce increase in the permeability on dengue virus infected-endothelial cells associated with down regulation of VE-cadherin. 第51回日本ウイルス学会(京都) 10/27-29/2003

名和 優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎. デングウイルス血清型特異的IgM検出のためのタンパク変性試薬(チオシアン酸ナトリウム)を用いたELISA. 第51回日本ウイルス学会(京都) 10/27-29/2003

表1

デングウイルス感染症例の情報  
(成田空港検疫所)

No.	TaqMan PCR	渡航先	IgM抗体	性別
1		Indonesia	+	F
2		India	+	M
3		Cambodia	+	F
4	D2	Thailand(Bangkok)		M
5		Thailand(Bangkok)	+	M
6		New caledonia	+	M
7		Pakistan-Afghanistan-India	+	M
8		Colombia	+	M
9		Laos	+	M
10	D2	India	+	M
11		India	+	F
12	D1	New caledonia		F
13		Australia(Cairns)	+	F
14	D2	Thailand		M
15	D2	Thailand		M
16	D2	Thailand		M
17	D1	Nicaragua-U.S(Dallas,Texas)		F
18		India	+	F
19	D3	Bari		M
20		Thailand	+	M
21		India - Nepal	+	M
22	D1	India		F

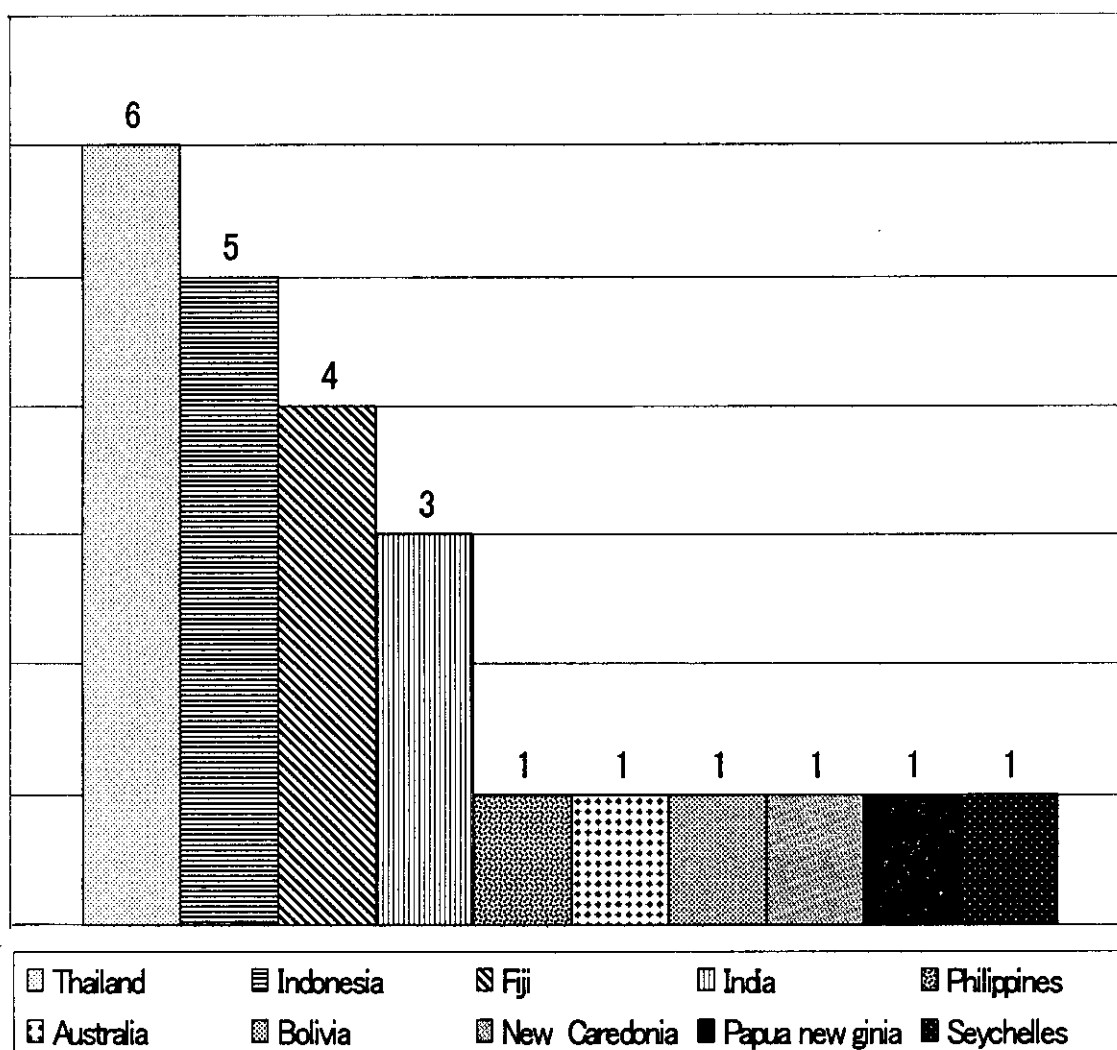
表2

## デングウイルス感染症例の情報 (国内医療機関等からの検査依頼分)

症例番号	TaqMan PCR	渡航先	年齢・性別
03-02	D1	Indonesia(Bali)	39, F
03-03	D1	Indonesia	21, F
03-04	Undetermined	Thailand(Bangkok)	32, M
03-06	Undetermined	Fiji	21, F
03-07	Undetermined	Philippines	
03-08	D2	Australia,KearzParamata Park	18, F
03-09	D2	Thailand,Bali,New Caredonia	36.M
03-13	D2	ポリビア	30.F
03-14	Undetermined	Fiji	34.M
03-16	D2	兵庫県衛生研究所より確認依頼	
03-17	Undetermined	New Caredonia	34F
03-18	D3	Thailand(都市)、Myanmar(比較的田舎)	48M
03-21	D3	Indonesia(7/5-7/13)	30M
03-22	Undetermined	Indonesia(トレス島、ケンダリ)(4/22-7/22)	29M
03-23	D3	Thailand(Feb.02-July03)	24F
03-30	Undetermined	Thailand(Bangkok)	61M
03-32	D2	India(Delhi,Mumbai)	35F
03-33	Undetermined	Indonesia	40F
03-34	D2	India(Calcutta,Bombay)	19M
03-35	D3	Papua new ginia	35M
03-36	D2	India	27M
03-37	D2	Thailand(Bangkok)	30F
03-41	D1	Seychelles	35M

図1

デング熱患者の渡航先(国内医療機関からの検査依頼分)



フィジーの症例は、海外青年協力隊員でJICAからの検査依頼が含まれている。  
棒グラフの上の数字は症例数を表す。

## ☒ 2

[ GENETYX : Nucleotide Sequence Homology Data ]

Date : 2004.03.24

### 1st Nucleotide Sequence

File Name : N140 45-3404.txt

Sequence Size : 3358

17' AAGCTTGCTT ACGTAGTTCT TACAGTTTTT  
47' TATTAGAGAG CAGATCTCTG ATGAACAACC AACGGAAAAA GACGGGTCGA CCGTCTTTCA  
107' ATATGCTGAA ACGCGCGAGA AACCGCGTGT CAACTGGTTC ACAGTTGGCG AAGAGATTCT  
167' CAAAAGGATT GCTTTCAGGC CAAGGACCCA TGAAATTGGT GATGGCTTTC ATAGCATTTC  
227' TAAGATTTCT AGCCATACCT CCAACAGCAG GAATTTTGGC TAGATGGAGC TCATTCAAGA  
287' AGAATGGAGC GATCAAAGTG TTACGGGGTT TCAAAAAGA GATCTCAAGC ATGTTGAACA  
347' TAATGAACAG GAGGAAAAGA TCCGTGACTA TGCTCCTCAT GCTGCTGCCT ACTGCCCTGG  
407' CGTTCCACTT GACCACACGA GGGGGAGAGC CACACATGAT AGTTAGTAAG CAGGAAAGAG  
467' GAAAGTCACT CTTGTTCAAG ACCTCTGTAG GTGTCAATAT GTGCACTCTC ATTGCGATGG  
527' ATTTGGGAGA GTTGTGTGAG GACACAATGA CCTACAAATG CCCCCGATC ACTGAGGCAG  
587' AACCAGATGA TGTTGACTGT TGGTGCAATG CCACAGACAC ATGGGTGACC TATGGGACGT  
647' GTTCTCAAACCGGCGAACAC CGACGAGACA AACGTTCCGT CGCACTGGCC CCACACGTGG

707' GACTTGGTCT AGAAACAAGA ACCGAAACGT GGATGTCCTC TGAAGGTGCC TGGAAACAAA  
767' TACAAAGAGT GGAGACTTGG GCCTTGGCAG ACCCAGGATT CACGGTGATA GCCCTTTTCT  
827' TGGCACATGC CATAGGAACA TCCATCACTC AGAAAGGGAT CATTTCATT TTGCTGATGC  
897' TGGTAACACC ATCAATGGCC ATGCGATGCG TGGGAATAGG CAACAGAGAC TTCGTTGAAG  
947' GACTGTCAGGAGCAACGTGG GTGGACGTGG TACTGGAGCA TGGAAGCTGC GTCACCACCA  
1007' TGGCAAAAAA TAAACCAACA TTGGACATTG AACTCTTGAA AACGGAGGTC ACGAACCCCTG  
1067' CCGTCCCTGCG CAAACTGTGC ATTGAAGCTA AAATATCAAA CACCACCACC GATTCAAGAT  
1127' GTCCAACACA AGGAGAAGCT ACACTGGTGG AAGAACTAAG ACGCGAACTT TGTGTTTGG A  
1187' CGAACGCTCGTGGACAGAGG CTGGGGCAAT GGCTGCGGAC TATTTGGAAA AGGAAGCCTA  
1247' CTGACGTGTG CTAAGTTCAA GTGTGTGACA AAATTAGAAG GAAAGGTAGT ACAATATGAA  
1307' AACTTAAAAT ATTCAGTGAT AGTCACTGTC CACACTGGGG ACCAGCATCA GGTGGGAAAC  
1367' GAGACCACAG AACATGGAAC AATTGCAACC ATAACACCTC AAGCTCCTAC GTCGGAAATA  
1427' CAGCTGACCG ACTACGGAGC CCTCACATTG GACTGCTCAC CTAGAACTGG GCTGGACTTT  
1487' AATGAGATGG TGCTATTGAC AATGAAAGAA AAATCATGGC TTGTCCACAA ACAATGGTTT  
1547' CTAGACTTAC CACTGCCTTG GACTTCGGGG GCTTCAACAT COCAAGAGAC CTGGAACAGA  
1607' CAGGACTTGC TGGTCACATT CAAGACAGCT CATGCAAAGA AGCAGGAAGT AGTCGTA CTG  
1667' GGATCACAGGAAGGAGCAAT GCACACTGCG TTGACTGGGG CGACAGAAAT CCAAACGTCA  
1727' GGAACGACAA CAATCTTTG CAGGACACCTG AAATGCAGAC TAAAAATGGA TAAACTGACT



1797' TTAAAAGGGA TGTCATATGT GATGTGCACA GGCTCATTTA AGTTAGAGAA GGAAGTGGCT

1847' GAGACCCAGC ATGGAAGTGT TTTAGTGCAG GTTAAATACG AAGGAACAGA TGCACCATGC

1907' AAGATCCCCT TTTGATCCA AGATGAGAAA GGAGTGACCC AGAATGGGAG ATTGATAACA

1967' GCCAATCCTA TAGTTACTGA CAAAGAAAAA CCAGTCAACA TTGAGACAGA ACCACCTTTT

2027' GGTGAGAGCTACATCGTGGT AGGGGCAGGT GAAAAAGCTT TGAAACTAAG CTGGTTCAAG

2087' AAAGGAAGCAGCATAGGGAA AATGTTTCGAA GCAACCGCCC GAGGAGCACG AAGGATGGCT

2147' ATCCTGGGAG ACACCGCATG GGA~~CT~~TCGGT TCTATAGGAG GAGTGT~~TT~~TAC GTCTGTGGGA

2207' AA~~CT~~GATAC ATCAGG~~TTTT~~ TGG~~A~~ACCGCA TATGGG~~GGTTCT~~GTTTCAGCGG TGTTTCTTGG  
 センス' ライマ- GGACTGCGTATGGAGTTTTG

2267' ACCATGAAAA TAGGAATAGG GAT~~TCT~~GTCTG ACATGGTTGG GATTAAATTC AAGGAGCACG

2327' TCATTTTTCGA TGACGTGCAT TACAGTTGGC ATGGTCACAC TGTACCTAGG AGTCATGGTT

2387' CAAGCGGATTCGGGATGTGT AATCAACTGG AAGGGCAGAG AACTCAAATG TGGAAGTGGC

2447' ATTTTGTCA CTAATGAAGT CCACACCTGG ACAGAGCAAT ACAAATCCA GGCTGACTCC

2507' CAAAAAAGACTGTCAGCAGC CAT~~TG~~GAAAG GCATGGGAGG AGGGCGTGTG TGGAATTCGA

2567' TCAGCCACGC GTCTTGAGAA CATCATGTGG AAGCAAATAT CAAATGAATT GAACTACATC

2627' TTA~~CT~~TGAAA ATGACATAAA ATTCACAGTGGTTGTAGGAG ATGCTAATGGAATTTTGGCC  
 TACTAATCTGGTGT~~T~~GGGTA

2687' CAAGGAAAAA AAATGATTAG~~A~~CCACAACCCATGGAACACA AATACTCATG GAAAAGCTGG  
 アンチセンス' ライマ- TACTAATCCGGTGTGGGTA

2747' GGAAAAGCCA AAATCATAGG AGCAGACATA CAGAACACCA CCTTCATCAT TGACGGCCCA

2807' GATACTCCAG AATGTCCCGA TGACCAGAGA GCATGGAACA TCTGGGAAGT TGAGGACTAT

2867' GGATTCGGAA TTTTCACGAC AAACATATGG CTGAAATTGC GTGACTCCTA CACCCAAATG

2927' TGTGACCACC GGCTAATGTC AGCTGCCATC AAGGACAGCA AGGCAGTCCA TGCTGATATG

2987' GGGTACTGGA TAGAAAGTGA AAAGAACGAG ACCTGGAAGC TAGCGAGAGC CTCCTTTATA

3047' GAAGTCAAGA CATGCATCTG GCCGAAATCC CACACTCTAT GGAGTAATGG AGTTTTGGAA

3107' AGTGAAATGA TAATTCCTAAA GATATATGGA GGACCAATAT CTCAGCACAA CTACAGACCA

3167' GGGTATTTCA CACAAACAGC AGGGCCATGG CACCTAGGCA AGTTGGAATT GGATTTTGAT

3227' TTGTGTGAAG GTACCACAGT CGTTGTGGAT GAACATTGTG GAAATCGAGG TCCATCTCTC

3287' AGAACTACAA CAGTTACAGG AAAGATAATC CATGAATGGT GTTGCAGATC CTGCACGTTA

3347' CCCCCCTTAC GCTTCAGAGG AGAAGACG

厚生科学研究費補助金（厚生労働科学 新興・再興感染症事業）  
分担研究報告書

多施設 Quality control のための WNV (NY 株) 合成 RNA の作製

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)

協力研究者：奴久妻聡一（神戸市環境保健研究所）

2003年から検査依頼事例が生じている骨髄移植、臓器移植に関するウエストナイルウイルス感染の有無の検査を検査会社2社が実施するうえで、感染研との3施設間で検査の感度・特異性を統一するために、TaqMan RT-PCR用の増幅領域であるE領域と3'NC領域の合成RNAを作製した。クローン化したウエストナイルウイルスのプラスミド（クローン2）をテンプレートにして、CDCが作製したプライマーを用いてそれぞれのシークセンスをし、プラスミドのインサートにEタンパクが存在することが確認した。このウエストナイルウイルスのプラスミドを用いてT7 RiboMax Express Large Scale RNA Production SystemsによりRNAを合成した。E領域の合成RNAは $7.7 \times 10^{11}$  copies/ulであり、3'NCの合成RNAは $7.8 \times 10^{10}$  copies/ulの濃度のRNAが合成された。どちらも10 copies/ulが検出限界であった。

研究目的

特殊な感染経路として、2002年のアメリカ合衆国の流行では輸血や血液製剤での感染例や、臓器移植により感染した症例も報告されている。感染源となったドナーは、2002年8月14日事故にあい、IgM抗体陰性・PCR陰性であったが、63人からの輸血（8月20-21日に輸血は実施された）により感染し、IgM抗体陽性、PCR陽性となった。発病は9月2日であった。このドナーから心臓・肝臓・腎臓（2人）の移植をうけた4人のレシピエントが相次いで発病した。

また、CDCの報告によれば輸血によるウエストナイルウイルス感染を疑われる症例が2002年8月から2003年3月1日に61例報告され、このうち21例が確認された。このうち凍結血漿からも1例感染し、血小板輸血でも1

例感染例があった。さらに、母乳により感染した可能性がある新生児、経胎盤感染を疑われる新生児症例も報告されている。

現在、骨髄移植は国際的なネットワークに基づきドナー検索がなされている。そのため、ドナーが米国人であった場合、ウエストナイルウイルス感染を否定する必要がある。また、臓器移植に関しても、ドナーがたまたまウエストナイル熱の流行地から帰国したばかりである場合も考えられる。従って、ドナーが流行地域の住民、その地域からの帰国者であった場合は、ウエストナイルウイルスの感染を否定する必要がある。より確実にウエストナイルウイルス感染を否定するためには、より感度の高いリアルタイム逆転写 (RT-) PCR法を用い、また、検査施設間の検査感度も統

一する必要があった。このため、我々は逆転写段階から検査感度をモニター出来るように、TaqMan RT-PCR 用の増幅領域である E 領域と 3'NCR の合成 RNA を作製し、合成 RNA のコピー数を用いて、リアルタイム逆転写 PCR 法の検出限界を検討した。

## 研究方法

### 1. Template linearization

RNA を合成するために Template linearization を行う。WNV の preM と E を組み込んだ plasmid (pGEM-preM-E) は BamHI で、3'-NC を組み込んだ plasmid (pGEM-3'-NC) は Hind III で 1 時間消化し plasmid を linear にした。なお、消化する plasmid は 10  $\mu$ g とした。制限酵素で消化したサンプルを常法に従い、フェノール・クロロフォルム抽出しエタノール沈殿した。

### 2. RNA 合成

1 で処理した linear DNA template を 1  $\mu$ g を用いて RNA 合成を行う。linear DNA template 1  $\mu$ g に RiboMAX Express T7 2 X Buffer 10  $\mu$ l、Enzyme Mix, T7 Express 2  $\mu$ l、さらに DW を加えて total volume を 20  $\mu$ l とした。この液を穏和に混合した後、37°C で 30 分間インキュベートした。

### 3. DNA template と Unincorporated rNTPs の除去

反応液に template DNA 1  $\mu$ g に対して、RQ1 RNase-Free DNase を加えて 37°C で 15 分間インキュベートすることにより template DNA を分解した。等量のフェノール・クロロフォルム (pH 4.5) を加えて混合後、1,500 rpm で 2 分遠心した。回収した水

層に等量のフェノールを加え 1,500 rpm で 2 分遠心した後、再度水層を回収した。さらに、この液に 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 0.1 倍量、95%エタノールを 2.5 倍量加え、氷中で 5 分放置した。1,500 rpm で 10 分遠心後、70%エタノールで洗って 10 分乾燥させ沈殿を DW に溶解し合成 RNA として用いる。キットの計算式により、RNA コピー数を算出した。

### 4. TaqMan RT-PCR 法

#### ① TaqMan PCR 法

プライマーとプローブ

WN3'NC-forward (10,688-10,684)

CAGACCACGCTACGGCG

WN3'NC-reverse (10,770-10,756)

CTAGGGCCGCGTGGG

WN3'NC-probe (10,691-10714)

TCTGCGGAGAGTGCAGTCTGCGAT

WNENV-forward (1160-1180)

TCAGCGATCTCTCCACCAAAG

WNENV-reverse (1209-1229)

GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG

WNENV-probe (1186-1207)

TGCCCGACCATGGGAGAAGCTC

5  $\mu$ l のサンプルを用いて、50 pmol の各プライマーと 10 pmol のプローブを TaqMan RT-PCR Ready-Mix Kit (PE Applied Biosystems) を用いて総量 50  $\mu$ l で増幅した。検出には、ABI Prism 7000 を使用した。48°C:30min、95°C 10min. のあと 95°C:15sec. と 60°C 1min. を 45 サイクル繰り返した。

## C. 研究結果