

新しいウイルス性肺炎：SARS，鳥インフルエンザ

大石和徳*

要 旨

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) は、新種の SARS corona virus (Co V) による新興ウイルス感染症であり、重症肺炎を惹起する。症例の 10～20% に ARDS の合併がみられ、致命率は約 10% に及ぶ。主に飛沫および接触感染によるヒト-ヒト感染が発生する。診断には SARS 患者との曝露歴が重要で、この場合に 38°C 以上の発熱を伴う呼吸器症状や肺炎に合致する所見があればそれぞれ疑い例、可能性例となる。咽頭洗浄液などの検体で RT-PCR 法、RT-LAMP 法でウイルス学的な迅速診断を実施し、蛍光抗体法や ELISA 法で確定する。確立された治療法はないが、抗 HIV 薬のカレトラ® が有効とする報告がある。

これまで家禽類に高病原性を示してきた A 型鳥インフルエンザ H5N1 がヒトに感染する事例が 1997 年の香港、2004 年のベトナム、タイで発生している。臨床像は、インフルエンザ様の初期症状から重症肺炎に進展し、ARDS や多臓器不全を合併する。ほとんどの症例で家禽との接触歴があるが、ヒト-ヒト感染はない。致命率は 60～70% と極めて高い。診断はインフルエンザ A 抗原キット、H5N1 に対する RT-PCR が迅速診断として有用である。治療薬としてノイラミニダーゼ阻害薬が有効とされる。

SARS

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) は、新種の SARS corona virus (Co V) による新興ウイルス感染症であり、2003 年 2 月には広東省におけるアウトブレイクへと発展した。さらに、2 月下旬には広東省の医師が香港のホテルで 12 人の宿泊客に感染させ、ここから国際的な感染拡散に発展した。2003 年 7 月に入って、全世界で 8,422 人に及ぶ SARS Co V 感染の連鎖は一応終息した。

その後、2003 年末から 2004 年 1 月にかけて、再び広東省において発生源の不明な 4 例の SARS 患者の発生が確認されている。このことは、SARS が冬期にこの地域で特異的に発生するウイルス性疾患であることを示唆している。

1. 臨床像

高熱（ほぼ 100%）と全身倦怠感（19～70%）、筋肉痛（45～68%）などの症状で発症する¹⁻⁴⁾。上気道の症状は 20～25% 以下と比較的低く、咳嗽も高率（29～75%）に認めている。一方、入院時における呼吸困難の頻度は低い（4%）。また、下痢の頻度は 25～73% と報告によりかなり異なる。初発症状からは SARS とインフルエンザとの鑑別は困難である。発症初期には感染性は低い、発病 4 日以降に主に飛沫感染、接触感染によるヒト-ヒト感染伝播が起こる。

病初期の 38°C を超える高熱はいったん平熱化し、第 14 病日頃まで 37°C 台の微熱となる¹⁾。この解熱傾向には、ほとんどの症例で投与されている副腎皮質ステロイドの影響も考えられる。胸部 X 線上の肺炎陰影は、入院時には大半の症例（78.3%）において認められる⁵⁾。入院時に肺炎陰影が認

* OISHI Kazunori 長崎大学 熱帯医学研究所 感染症予防治療分野 [〒 852-8523 長崎市坂本 1-12-4]

められない場合にも、その後平均3.1日に胸部X線上に浸潤影が出現している。病初期には低酸素血症の頻度は少ないが、その1週間後には低酸素血症が高率に認められ¹⁾、肺炎の広がりも第10日病日前後にピークがある⁶⁾。

この肺炎陰影のピークは、前述の気道におけるウイルス量のピーク時期とほぼ一致していると考えられる。その後に急性呼吸不全が進展し、10～20%の患者は急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) を合併する。致死率は約10%とされている。SARS患者の胸部X線所見として辺縁の不鮮明なスリガラス状陰影が特徴的で (図1, 2)、網状陰影, 空洞陰影, 胸水貯留は認められない。マイコプラズマ肺炎などの非定型肺炎との画像上の鑑別は困難である。

発熱期に一致して20～70%の頻度で1～6日続く水様性下痢が認められ、第7病日以降は5%以下の頻度となる⁷⁾。下痢は血性, 粘液性となることはないとしている。Chengらの検討では、下痢の頻度は1日平均5回 (3～24回) であり、下痢症状の有無は致死率には関連しなかった⁴⁾。

SARS患者の末梢血所見では、一般にリンパ球減少が認められる⁸⁾。1,000/ μ l以下のリンパ球減少が病初期から約60%程度に認められ、第10～14日頃には80～90%に達するとしている。感染4～5週後でも30%程度にリンパ球減少が認められている。リンパ球分画ではCD4細胞 (平均286/ μ l) とCD8細胞 (平均242/ μ l) の双方が第5～14日頃に減少し、B細胞の変化は認められていない。したがって、SARS Co V感染の急性期には、細胞性免疫が一過性に低下することが考えられる。また、軽度の血小板減少も55%に認められている。

2. ウイルス学的診断と鑑別診断

遺伝子診断としてのRT-PCR法は、簡便さや迅速性においては有用な検査であるが、感度は必ずしも高くない。さらに高感度, かつより迅速な遺伝子検出方法として、RT-LAMP法が開発された⁹⁾。このRT-LAMP法の検出感度が0.01 PFUであるのに対し、RT-PCR法では1.0 PFUであった。この結果からRT-LAMP法はRT-PCR法に比較して約100倍感度が高いといえる。

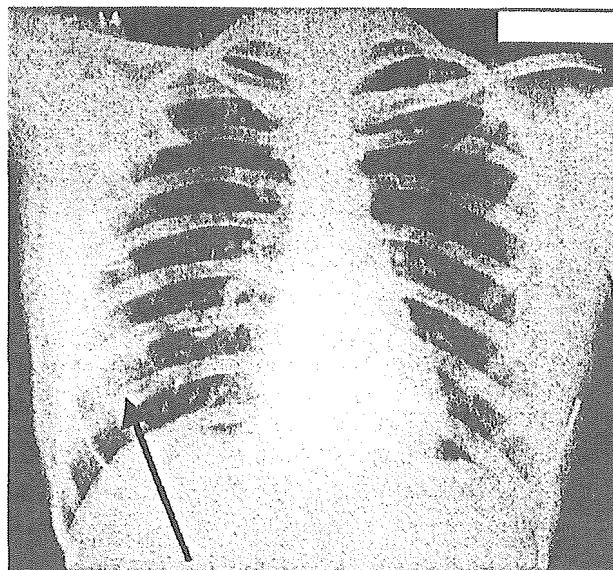


図1 SARS可能性例, 発症初期の胸部X線所見

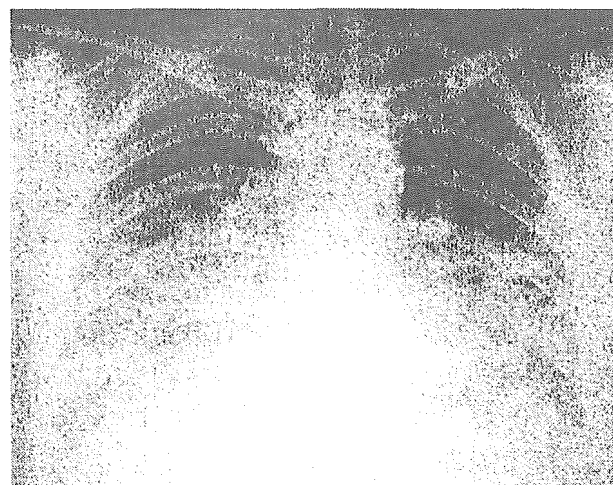


図2 SARS可能性例, ARDS合併例の胸部X線所見

一方、血清学的診断系としては、中和試験およびSARS Co Vを抗原としたIFA法, ELISA法が利用できる。これらの血清学的検査により、発症後15日から血清中特異IgG抗体が検出されるが、発症20日後においても感染者の抗体陽性率は95%にとどまっている¹⁾。したがって、IFA法, ELISA法は迅速診断としての有用性は低い。

世界におけるSARS流行の連鎖が終息した今、SARS再流行の疫学的情報がない状況下では、本邦で発生したインフルエンザ様疾患あるいは肺炎例に対して積極的にSARSを疑う必要はない。SARS再流行の疫学的情報がある場合には、WHOの診断・症例分類が適応される (表1)。した

表1 診断・症例分類

SARS 疑い例 (5月1日改訂)	
1.	2002年11月1日以降に38°C以上の発熱があった人で咳あるいは呼吸困難と以下の発症に先行する10日間のうちに以下の曝露歴がある場合
a)	SARS可能性例あるいは疑い例と密接な接触
b)	SARS流行地への渡航歴
c)	SARS流行地の居住者
SARS可能性例	
1.	SARS疑い例に肺炎に合致する胸部X線上の浸潤陰影あるいは呼吸窮迫症候群(RDS)の証拠を伴う あるいは
2.	SARS疑い例に一つもしくは二つのSARS coronavirusの陽性所見を伴う あるいは
3.	SARS疑い例に明らかな原因のないRDSの病理学的所見と一致する解剖所見を伴う 病態を説明できる明らかな他の診断で説明できる場合は除外できる

がって、SARS患者との曝露歴を有する急性熱性呼吸器疾患はすべてSARS疑いとなる(表2)。SARS可能性例あるいは疑い例と密接な接触がある場合に発熱を伴う咳、呼吸困難が認められればSARSを強く疑う。

しかしながら、このようなSARS可能性例は、決して確定例ではないことを認識すべきであり、SARS CoVに対するウイルス学的診断が必要である。鑑別診断のためには、必要に応じて、喀痰グラム染色・細菌培養、インフルエンザウイルス抗原検査、血清マイコプラズマ抗体やクラミジア抗体検査(ペア血清)、気管支肺胞洗浄(BAL)などの検査を実施する。

3. 治療

2003年3月には香港やトロントでSARS患者にリバビリンが頻繁に使用された。トロントにおいては4g/日の投与にもかかわらず、明らかな臨床的効果は得られなかった¹⁰⁾。むしろ、溶血性貧血や肝機能障害などの副作用が認められた。

一方、香港のグループは抗HIVプロテアーゼ阻害薬であるlopinavir/ritonavir(カレトラ®)のSARSに対する有効性を報告している¹¹⁾。この研究においては、2003年4月16日以前にカレトラ®を含まない治療を実施された111症例を対照群として、その後の41症例にカレトラ®の1.2

表2 疫学的情報がある場合のSARSの鑑別診断

曝露歴ありの場合	
1.	SARS可能性例もしくは疑い例と密接な接触
2.	SARS流行地への旅行、もしくは流行地の居住者
すべての急性発熱性呼吸器疾患はSARS疑い例	
ウイルス性上気道炎、インフルエンザなどが鑑別疾患(7日以内に肺炎陰影が認められなければSARSは除外)	
+肺炎陰影もしくはRDSあり、あるいはSARS CoV検査陽性の場合にはSARS可能性例	
すべての発熱を伴う急性肺炎(細菌性肺炎、非定型肺炎、アレルギー性肺炎など)が鑑別疾患	

g, 1日3回を14日間内服投与した。本研究において、lopinavirの試験管内の抗SARSウイルス活性はリバビリンのそれより優れていた。21日間の両群における治療結果として、ARDSを発症するか死亡した症例は対照群では28.8%であったのに対し、カレトラ®治療群では2.4%と有意に少なかった。また、カレトラ®治療では6人中5人の患者において、鼻咽頭スワブにおけるウイルス量は速やかに検出感度以下まで減少することが確認されている。今後、SARSに対するカレトラ®の有効性の検証が必要である。

香港におけるSARSアウトブレイクの初期において、Soらはメチルプレドニソロン投与を3mg/kg/日から始めて21日間かけて減量する方法を推奨した¹²⁾。その後、HoらはSARS患者に対するメチルプレドニソロンのパルス療法(500mg/日の5~7日間)が非パルス療法(500mg/日以下)と比較して、患者の酸素吸入期間を短縮し、14~21病日における胸部X線所見上の浸潤陰影の広がりを軽減することを報告している⁹⁾。さらに、筆者らはパルス療法では非パルスに比較して副作用としての過血糖の頻度も少なかったとしている。

高病原性鳥インフルエンザ

これまで鳥類に高病原性を示してきたA型鳥インフルエンザが、ついにヒトに集団感染する事

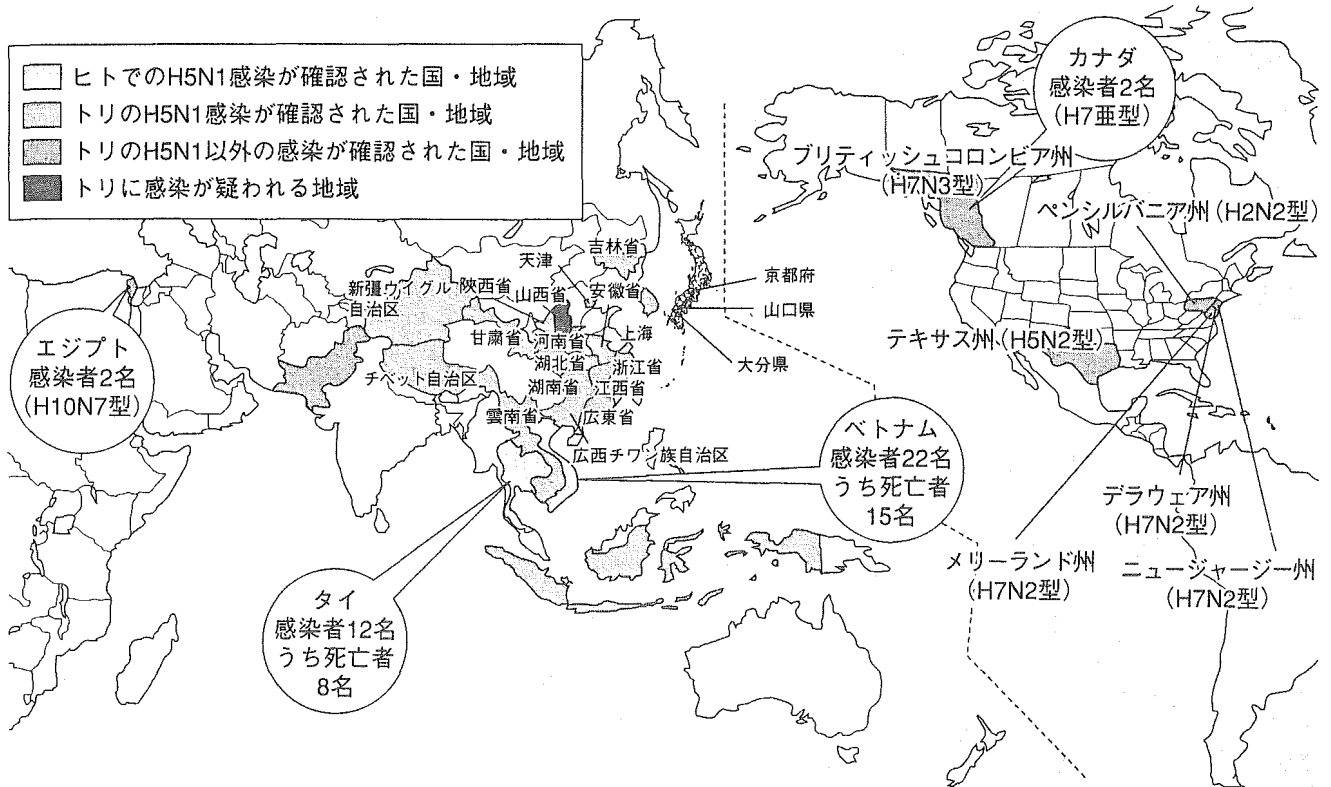


図3 2004年における鳥インフルエンザの分布

(WHO と OIE および他の政府機関公表情報をもとに感染症情報センターが作製：更新日 2004/5/26)

例が発生した。1997年5～12月にかけて香港で発生したA型インフルエンザH5N1によるアウトブレイクにおいて18名が感染し、うち6名が死亡した¹³⁾。その後1999年に香港において、A型H9N2鳥インフルエンザウイルスが2名の軽症のインフルエンザ症状を呈した小児から分離されている。さらに、2003年にはオランダでH7N7によるアウトブレイクが発生した¹⁴⁾。

2003年12月からアジア諸国(韓国、ベトナム、日本、タイ、カンボジア、中国、ラオス、インドネシア、台湾)で鶏をはじめとした鳥類におけるH5N1高病原性鳥インフルエンザの発生が報告された¹⁵⁾(図3)。その後、2004年4月上旬までにベトナムでは22名の感染者(うち15名死亡)、タイでは12名の感染者(うち8名死亡)を確認している(図3)。さらに、2004年4月には、カナダでは2名のA型インフルエンザH7による結膜炎症例が確認されている。その後、ベトナムでは、2004年8月にも鳥インフルエンザによる3例の死亡例が報告されている。

表3 インフルエンザA(H5N1)感染患者の臨床像

	軽症 (n=7)	重症 (n=11)
平均年齢	2.8	26.3
基礎疾患あり	2	4
入院時平均体温(°C)	38.9	39.2
上気道症状	7	10
下気道症状	0	11
消化器症状	2	8
入院時平均白血球数	11,200	3,900
リンパ球減少	0	11
汎血球減少	0	2
ALT上昇	1	10
腎機能異常	0	4

(文献¹²⁾より引用し改変)

1. 臨床像

1997年の香港におけるA型鳥インフルエンザH5N1 18例中7例は軽症、11例は重症であった¹³⁾。重症度によりその臨床経過はさまざまであるが、その経過は三つの相に分けられる。第1相は発熱と軽度の上気道症状。第2相はこれに重症肺炎、血液像の変化、肝機能や腎機能異常が加わ

る。第3相はARDSや多臓器不全をきたして、結果的に死亡する。

軽症の7例は低年齢であるのに対して、重症の11例では平均年齢26.3歳であった(表3)。すべての重症例では下気道感染症状を示し、末梢白血球数(リンパ球数も)は低下する傾向を示した。重症例において肝機能障害、腎機能障害、肺炎の合併頻度も高い傾向にあった。結果的に重症11例中6例が死亡している。6例中2例の剖検所見では骨髓像における反応性の血球貪食症候群の所見が顕著で、線維化を伴う急性肺障害も認められている¹⁶⁾。

さらに、最近になって2004年のベトナムでのA型鳥インフルエンザH5N1によるアウトブレイクにおける10症例の臨床像が報告されている¹⁷⁾。10例の患者の平均年齢は13.7歳(5~24歳)で、10例中8例において発症前に家禽と直接接触したエピソードがあった。ヒト-ヒト感染の証拠はなかったとされている。潜伏期間は3日(2~4日)で、発症から入院までの期間は5.9日(3~8日)であった。臨床症状としては全例に発熱、咳嗽、息切れが認められ、喀痰は50%に認められた。また、下痢が70%に認められている。末梢血検査では白血球数減少(平均 $2,100/\mu l$)、リンパ球減少(平均 $700/\mu l$)のほかに、血小板減少(平均 $75,500/\mu l$)も認められている。胸部X線では、全例において肺炎所見が認められている。肺炎の所見は、SARSの場合と同様の辺縁の不鮮明なスリガラス陰影、広範な浸潤影が認められている¹⁷⁾。この報告では10例中8例が死亡している。2004年のベトナムのH5N1アウトブレイクが1997年の香港のアウトブレイクと異なる点は、小児においても成人と同様に致命率が高い点である。

一方、2003年にオランダで発生したH7N7によるアウトブレイクでは、89名の患者のうち78名が結膜炎を呈し、5名は結膜炎とインフルエンザ様症状、2名はインフルエンザ様症状、4名は症例定義に合致しなかった¹⁴⁾。7名に認められたインフルエンザ様症状は軽度であった。インフルエンザ様症状を呈した57歳の獣医師1名が肺炎を発症し、さらにARDSに陥り死亡している。

2. ウイルス学的診断と鑑別診断

インフルエンザ様症状の患者の咽頭吸引液、咽頭スワブなどの検体を用いて鳥インフルエンザA抗原の迅速診断キットが有用である¹⁸⁾。これで、陽性であればH5N1特異的なRT-PCR法でウイルス遺伝子を検出する。一方、同じ検体でH5モノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法でH5ウイルスか否かを決定できる。一方では、MDCK細胞を用いたウイルス分離が可能である。ウイルス培養陽性であれば、同様にRT-PCR法、間接蛍光抗体法が実施できる。

鳥インフルエンザと通常のヒトインフルエンザの臨床的鑑別は困難である。ベトナムの事例のように、多くの場合は鶏との接触歴があることから、まず鳥インフルエンザが国内の家禽類の中で流行している場合、さらには家禽類との接触歴がある場合にその可能性は高くなる。このような場合には、ウイルス学的診断のアプローチを試み、速やかに診断を確定させる。

3. 治療

発症48時間以内にオセルタミビル、ザナミビルをはじめとするノイラミニダーゼ阻害薬を投与することが推奨される¹⁹⁾。アマンタジンも理論的にインフルエンザAには有効であるが、最近分離されたインフルエンザA(H5N1)はアマンタジン耐性であったとされている。ベトナムのH5N1症例に対して、オセルタミビルが使用されているが、投与時期が発症から数日経過していることもあり、臨床効果は明らかでなかった。

..... 文 献

- 1) Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC, et al : Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia : a prospective study. *Lancet* **361** : 1767-1772, 2003
- 2) Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, et al : A cluster of severe respiratory syndrome in Hong Kong. *N Engl J Med* **348** : 1977-1985, 2003
- 3) Hsu L-Y, Lee C-C, Green JA, et al : Severe respiratory syndrome (SARS) in Singapore : clinical features of index patient and initial contacts. *Emerg Infect Dis* **9** : 713-717, 2003
- 4) Cheng VC, Hung IF, Tang BS, et al : Viral replication in the nasopharynx is associated with diarrhea in patients with severe acute respiratory syndrome.

- Clin Infect Dis **38** : 467-475, 2004
- 5) Wong KT, Antonio GE, Hui DS, et al : Severe acute respiratory syndrome : Radiographic appearances and pattern of progression in 138 patients. *Radiology* **228** : 401-406, 2003
 - 6) Ho JC, Ooi GC, Mok TY, et al : High dose pulse versus non-pulse corticosteroid regimens in severe acute respiratory syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **168** : 1449-1456, 2003
 - 7) Leung WK, To KF, Chan PK, et al : Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome—associated coronavirus infection. *Gastroenterology* **125** : 1011-1017, 2003
 - 8) Wong RSM, Wu A, To KF, et al : Haematological manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome : retrospective analysis. *BMJ* **326** : 1358-1362, 2003
 - 9) Hong TCT, Mai QL, Cuong DV, et al : Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microb* **42** : 1956-1961, 2004
 - 10) Booth CM, Matukas LM, Tomlinson GA, et al : Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the Great Toronto area. *JAMA* **289** : 2801-2809, 2003
 - 11) Chu CM, Cheng VC, Hung IF, et al : Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS : initial virological and clinical findings. *Thorax* **59** : 252-256, 2004
 - 12) So L K-Y, Lau ACW, Yam LYC, et al : Development of a standard treatment protocol for severe acute respiratory syndrome. *Lancet* **361** : 1615-1617, 2003
 - 13) Tam JS : Influenza A (H5N1) in Hong Kong : an overview. *Vaccine* **20** : S 77-81, 2002
 - 14) Fouchier RAM, Schneeberger PM, Rozendaal FW, et al : Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Pro Natl Acad Sci USA* **101** : 1356-1361, 2004
 - 15) 国立感染症研究所, 感染症情報センター : 鳥インフルエンザについて. <http://idsc.nih.go.jp/others/topics/flu/toriinf.html>
 - 16) To K-F, Chan PKS, Chan K-F, et al : Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol* **63** : 242-246, 2001
 - 17) Hien TTH, Liem NT, Dung NT, et al : Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* **350** : 1179-1188, 2004
 - 18) Yuen KY, Chan PKS, Peiris M, et al : Clinical features and viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* **351** : 467-471, 1998
 - 19) WHO interim guidelines on clinical management of humans infected by influenza A (H5N1). http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/clinicalmanage/en/

特 別 講 演

新興呼吸器ウイルス感染症とその対応

大石和徳

長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療分野

要旨 近年, 新興呼吸器ウイルス感染症である SARS, 高病原性鳥インフルエンザ H5N1 がアジア地域を中心に流行し, この地域における今後の健康危機管理の必要性が指摘されている。このような感染症アウトブレイクを速やかに察知し, 原因を究明する共通のサーベイランス情報ネットワークとしてグローバル感染症警報・対応ネットワーク (GOARN) が構築されている。GOARN の目的は, 感染症の国際的拡散の防止, 迅速かつ適切な技術支援の提供, 長期間の感染流行に対する備えと能力構築に貢献することである。感染症アウトブレイクに対する速やかな対応を可能にするためには, WHO を中心とした人材支援ネットワークを構築する必要がある。すなわち, 国別に感染症コントロール医師・看護婦を事前登録し, WHO 主導の研修後に国際感染症対策に備える。感染症アウトブレイク発生時には, これらの登録メンバーは現地に速やかに派遣され, WHO の適切な調整のもとに感染症対策を実行する。このような感染症アウトブレイクに対する準備は, 地域レベルにおける感染症アウトブレイクの国際的な拡散を防止し, 国際感染症の危機管理に重要な役割を果たすものと期待される。

キーワード: 重症急性呼吸不全症候群, 高病原性鳥インフルエンザ, グローバル感染症警報・対応ネットワーク, 国際健康危機, 世界保健機構

I. はじめに

Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), 高病原性鳥インフルエンザがアジアを火元として世界を脅かす国際感染症へ発展し, これらの新興呼吸器ウイルス感染症に対する早急な対応が望まれている。本稿では, SARS と高病原性鳥インフルエンザとその感染対策について概説する。さらに, 中国における SARS アウトブレイクに対する対応の問題点をあげ, 今後の WHO や日本の国際感染症アウ

トブレイクへの対応の在り方について述べる。

II. SARS

1. SARS コロナウイルス

SARS 患者から新種のコロナウイルス, SARS corona virus (SARS Co V) がその原因ウイルスとして同定された¹⁾。この SARS Co V のゲノムは 29,727塩基からなる一本鎖 RNA から成っている²⁾。これまでに, (1)感染患者からの本ウイルスの分離, (2)宿主細胞におけるウイルス培養, (3)病原体のフィルター通過性が確認された。さらにはサルでの感染実験において, (4)同ウイルスの再分離, (5)同ウイルスに対する特異免疫応答, (6)ヒトに相当する病態が確認された³⁾。これらの所見はウイルス疾患のために改訂されたコッホの 6 原則を満たしている。

別刷請求: 〒852-8523 長崎市坂本1-12-4

長崎大学熱帯医学研究所感染症予防治療
分野
大石和徳

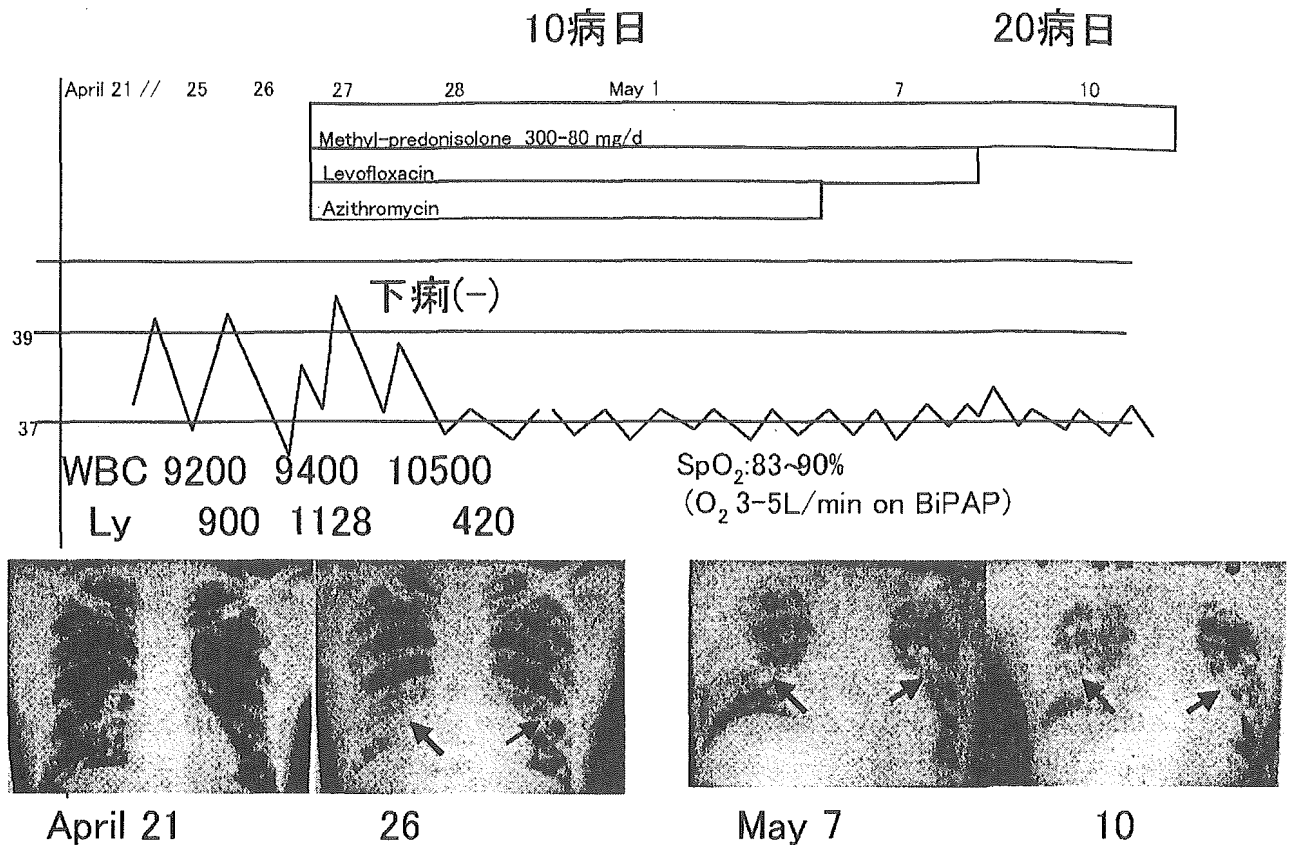


Fig. 1 25歳・男性, SARS 可能性例

Guanらによると、広東省の動物市場における調査において、ハクビシンをはじめとする野生動物から SARS Co V 類似のウイルスが分離された⁴⁾。これらの分離ウイルスには、ヒト由来の SARS Co V の ORF 10 にヒトコロナウイルスには認められない29塩基の挿入が確認されていた。さらに、CDCは広東省の動物取り扱い業者において、一般人に比較してより高率に SARS Co V に対する IgG 抗体が検出されたことを報告した⁵⁾。これらの調査結果は、SARS Co V が動物由来である可能性を示唆している。しかしながら、SARS Co V の自然界における宿主については未だ結論が出ていない。

2. SARS Co V の感染性と感染様式

潜伏期および発病初期における SARS Co V の感染性は一般に低いとされる。発病4日以降に下気道症状が加わると、その感染性は高まるとされている⁶⁾。発病後2週目に最もその感染力は高まるとされている⁶⁾。解熱して10日以降に、感染伝播した事例は報告されていない。この事実から、WHOは隔離期間を解熱後10日間としている。

SARS の感染伝播様式は飛沫感染と接触感染が主

体とされている⁷⁾。最近になって、香港のアモイガーデンにおけるアウトブレイクには空気感染が関与する証拠が報告されている⁸⁾。しかしながら、空気感染は特殊な状況下における感染様式と理解される。

3. SARS の臨床症状

患者は高熱(ほぼ100%)と全身倦怠感(19~70%)、筋肉痛(45~68%)などの症状で発症する⁹⁻¹¹⁾。上気道の症状は20~25%以下と比較的低く、咳嗽も高率(29~75%)に認めている。一方、入院時における呼吸困難の頻度は低い(4%)。初発症状からは SARS とインフルエンザとの鑑別は困難である。病初期の38°Cを超える高熱は一端解熱し、第14病日頃まで37°C台の微熱となる⁹⁾。この解熱傾向にはほとんどの症例で投与されている副腎皮質ステロイドの影響も考えられる。胸部X線上の肺炎陰影は、入院時には大半の症例(78.3%)において認められる¹²⁾。入院時に肺炎陰影が認められない場合にも、その後平均3.1日に胸部X線上に浸潤影が出現するとされる。

また、発熱期に一致して20~70%の頻度で1~6

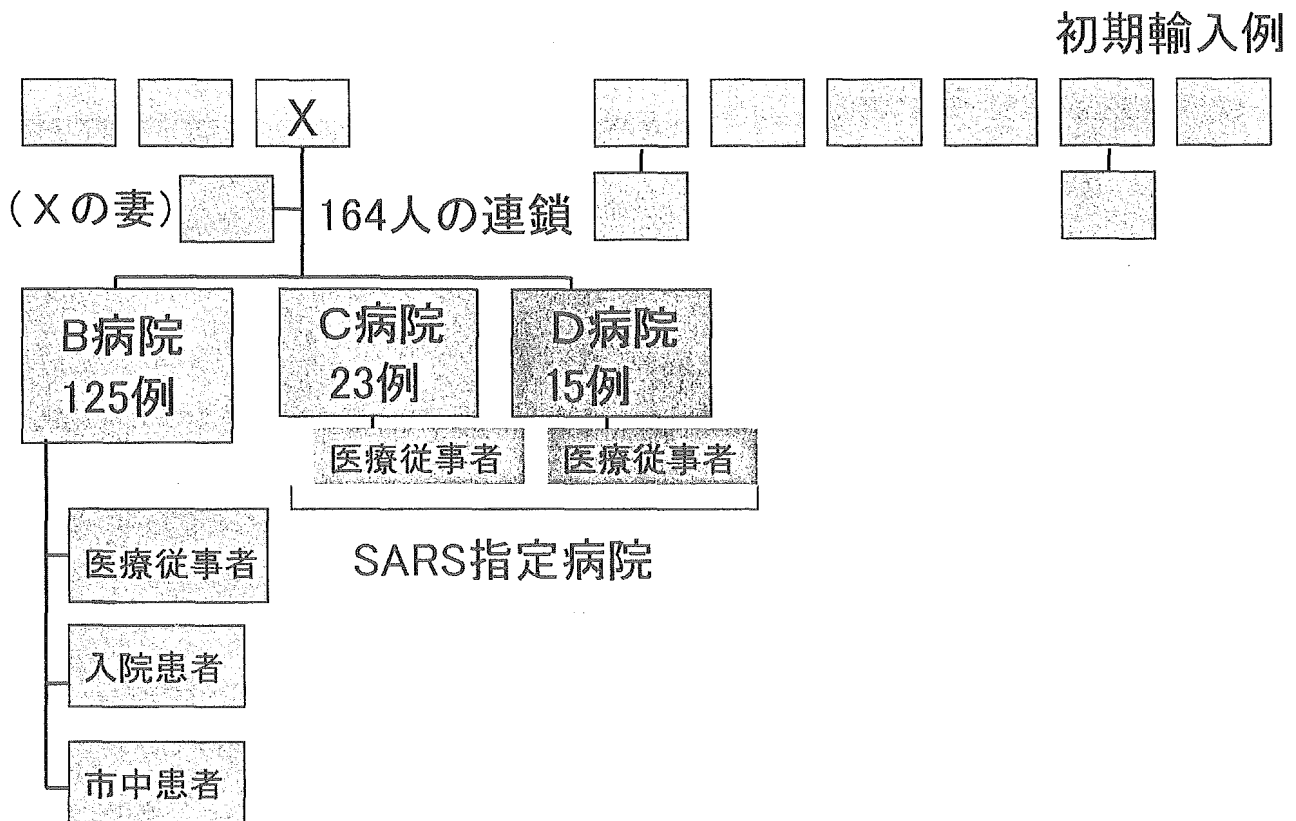


Fig. 2 A市における SARS アウトブレイク

日続く水様性下痢が認められ、第7病日以降は5%以下の頻度となる¹³⁾。下痢は血性、粘液性となることはない。

Fig. 1には SARS 可能性例の一例の経過を示している。患者は北京市内の病院に勤務歴のある25歳男性。本症例でも発症時には肺炎像は認められず、その5日後の胸部X線で右下肺と左下肺に淡いスリガラス陰影の出現(矢印)を認めた。WHO 診断基準により、SARS 可能性例とされた後にステロイド剤が投与され、解熱傾向を示した。しかしながら、その後も肺炎像は両肺野に拡大し、急性呼吸不全に陥った。このため、非侵襲性陽圧呼吸が開始され、急性呼吸不全は回復した。なお、本症例では下痢は認められていない。

4. 中国における SARS とその対応

1) 2002~2003年における中国本土における感染拡大

2002年11月に始まった広東省における SARS の流行は2003年の1月にはさらに拡大傾向を示し、2月3日になって中国 MOH は305例の異型肺炎の発生として WHO に公式報告した。一方、2月下旬にはこの異型肺炎を診療していた広東省の医師が香

港のホテル9階で12人の宿泊客に感染させ、ここからベトナム、シンガポール、トロントへの感染拡散に発展した。WHO はベトナムでの異型肺炎の報告を受けて、3月12日には異型肺炎に関する Global Alert を発令するに至った。

北京市内への SARS の流入もこの時期に始まっていた。山西省から広東へ旅行した女性が SARS を発症し、山西省の病院に入院した。重症化したこの患者は3月1日に北京市内の病院へ移送され、その後に院内感染が拡大しはじめた。しかしながら、4月の中旬まで北京市内における SARS の実態は公表されていなかった。4月20日以降、北京市内のみならず中国本土の患者数は急激に増加し、北京市内のアウトブレイクは本格化していった。4月15日に北京市内の感染拡大の事実が明らかになり、4月20日に中国衛生部は SARS 対策を国家最優先課題として取り組むことを発表した。

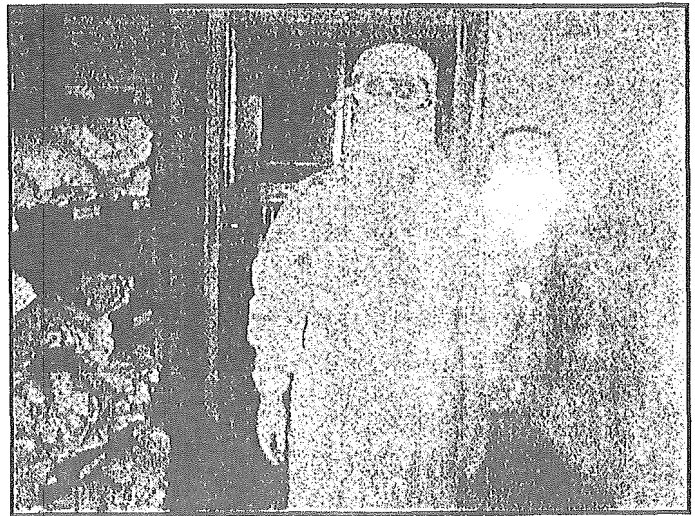
2) 中国本土における院内感染対策とその問題点
入院患者のマネージメントには手袋、ガウン、N95 マスク、ゴーグルなどの個人防衛装具(Personal protective equipment : PPE) を装着し、標準予防策に加えて飛沫感染予防策が必要となる。しかしな

A. WHO推奨



- キャップ、ガウン
- N-95 マスク
- 手袋、ゴーグル
- シューカバー

B. 北京市E病院



PPE: 上着、パンツ、上下ガウン
サージカルマスク、12層マスク、
長靴キャップ、フルフェイス
マスク+帽子、手袋2枚、ゴーグル

Fig. 3 Personal protective equipment (PPE).

がら、アウトブレイクの初期（3月～4月）には SARS 患者がその地域に発生しているという疫学的情報がありながら、院内感染対策の基本的知識が医療従事者に十分に浸透していなかったことが指摘できる。

Fig. 2 にはA市における175症例に及ぶアウトブレイクの推移について示している。Super spreader Xが事前情報なしに市中病院Bに入院し125例に及ぶ院内感染および市中感染へと進展した。Super spreader XはSARS指定病院C、さらにD病院と移送された。その結果、C病院とD病院では入院患者や市中への感染拡大はなかったものの、やはり医療従事者の感染が発生した。結果的にSuper spreader Xを発端として164人の感染連鎖が認められた。この事実は、SARS患者は一般病院に収容すべきではなく、SARS専用病院に収容すべきであることを支持している。

その後、中国衛生部の院内感染対策ガイドラインに従った厳重な院内感染対策が実施され、6月上旬には新規発生の報告は急速に減少した。この頃の北京市内のSARS指定病院Eにおける隔離病室入室

のためのPPEは重装備であり、上半身、下半身、手袋を含めてすべて3層構造となっている（Fig. 3）。WHOの推奨するPPEとの差は明瞭である。PPEの着脱には30分以上の時間を要し、この状態での隔離病棟内での医療業務は過酷であった。WHOの推奨する手袋、ガウン、N95マスク、ゴーグルによる軽装のPPEと比較すると、北京市内のE病院におけるPPEは過度のPPEと言わざるを得ない。

このように、中国本土における2003年3～4月のアウトブレイク初期段階での市中病院、SARS指定病院における院内感染対策の指導が不十分であった点が指摘できる。

3) WHOの対応と問題点

WHO北京オフィスには、中国本土全域へのSARS拡散防止のために、多数の短期専門家を派遣した。専門家の業務はオフィスワーク、疫学担当、感染コントロール・臨床担当（医師、看護婦）、検査担当、メディア担当等であった。また、WHO中国オフィス全体の任務としては、WHO西太平洋事務局（WPRO）との連携、中国衛生部や北京市衛

Table 1 2003年北京における SARS に対するリスク因子と予防因子
(文献14) より改変)

	Matched OR	p value
リスク因子		
病院受診	3.6	<0.001
Fever clinic 受診	13.4	<0.001
慢性疾患合併	4.1	<0.001
週に複数回の外食	2.3	<0.01
週に複数回のタクシー乗車	3.2	<0.01
予防因子		
常に外出時にはマスク着用	0.3	<0.001
常に帰宅時に手を洗う	0.3	<0.003

OR: オッズ比

生部との対応策のコーディネーション, 中国各地への衛生部-WHO の合同視察団, 北京市の疫学調査, 北京市内の院内感染対策など広範な内容であった。筆者は日本からの2人目の WHO 短期専門家として5月12日に北京入りした。この時には, 北京オフィスには約20名ほどの WHO 短期専門家が投入されており, 毎朝新しい情報をもとに, オフィス全体の行動方針について議論が続いた。インフルエンザの専門家が CDC から派遣されてはいるが, どの専門家にとっても SARS は新たな問題であった。会議の中ではなかなか中国オフィス全体の方針が見えてこない。実質的なリーダーが不在のチームもあり, それぞれのチームがスムーズに活動できたとは言いがたい状況であった。その中で北京市内の疫学調査と中国各地への衛生部-WHO の合同視察は順調に遂行されていた。5月下旬になり, 感染コントロールチームにも展開があった。英国, オーストラリアから感染対策としての病院内換気の専門家が招聘され, 北京市内の院内換気についての問題点が検討評価された。

4) 北京市内の疫学的調査結果

2003年4~5月の北京市内において, 曝露歴の明らかでない SARS 可能性例は42%にも及び, さらに5~6月には65%にも及んだ。このような背景から, 市中や医療施設での知られざる感染源を明らかに, その予防法を知ることは重要である。Wuらは2003年4~6月の北京市内において, SARS 発症2週間前の感染リスク因子と, 感染予防因子に関する調査結果を報告している (Table 1)¹⁴⁾。すなわち,

病院やフィーバークリニックへの受診, 慢性疾患の罹患, 週に複数回の外食やタクシー使用などが感染リスクの高い因子として示された。また, 常に外出時にマスクを着用することは感染リスクを低下させることが示された。この結果から, 筆者らは北京市がとった, 院内感染対策が不十分な診療施設を閉鎖したことは妥当であったとしている。また, SARS 感染リスクを減じる対策として市中でのマスク使用が推奨されている。

5. SARS その後

2003年7月5日には世界32カ国8,422人の感染者と916人の死者を数えた SARS の世界的感染連鎖は終息した。症例の95.5%は西太平洋地域に集中していた。その後, 2003年12月~2004年12月に再び中国広東省において, 4例の SARS 症例が報告された。このことは, SARS がこの地に発生する風土病的ウイルス疾患であることを示唆している。これ以外には, 台湾, シンガポール (2003年9月), 中国 (2004年3~4月) における実験室感染が報告されている。2004~2005年シーズンには SARS の再来は認められていない。

III. 高病原性鳥インフルエンザ

1. 高病原性鳥インフルエンザの発生

インフルエンザウイルスは A, B, C 型に分類されるが, すべての鳥インフルエンザは A 型である。水鳥はインフルエンザウイルスの自然宿主と考えられている。A 型鳥インフルエンザには15の HA 亜型と9の NA 亜型が維持されており, ウイルスは

その腸管で増殖し、大量のウイルスがその糞便中に排泄される¹⁵⁾。このため、水鳥の間ではこの汚染された水から感染が伝播する。

高病原性鳥インフルエンザは1902年にイタリアで発見されて以来、しばしばそのアウトブレイクが報告されていた。近年の事例としては、1993年の10月にメキシコで鶏に軽症の呼吸器症状を引き起こすH5N2鳥インフルエンザが流行した¹⁵⁾。経済的な理由などから家禽の殺処分が遅れたために、その1年後の1994年の末には鶏に中等度の呼吸器症状を引き起こすインフルエンザウイルスHAの開裂性を高めた変異ウイルスが出現した。さらに、その数カ月後にはより高病原性ウイルスが出現した。これら中等度の病原性を示すウイルス株、高病原性を示すウイルス株のいずれにおいても、そのHA結合ペプチド部位には複数の塩基配列の挿入が見出された。この結果から、A型インフルエンザウイルスのHA開裂部位に強毒化を起こす突然変異が発生することが明らかになった。

その後、2003年12月からアジアの広範な地域（韓国、ベトナム、日本、タイ、カンボジア、中国、ラオス、インドネシア、台湾）で、鶏をはじめとした鳥類におけるH5N1高病原性鳥インフルエンザの発生が報告されたことは記憶に新しい。

2. ヒトにおけるA型鳥インフルエンザH5N1の発生

A型鳥インフルエンザがついにヒトに集団感染する事例が発生した。1997年5月から12月にかけて香港で発生したA型インフルエンザH5N1によるアウトブレイクにおいて、18名が感染し、うち6名が死亡した¹⁶⁾。重症度によりその臨床経過はさまざまであるが、その経過は3つの相に分けられる。第1相は発熱と、軽度の上気道症状。第2相にはこれに重症肺炎、血液像の変化、肝機能や腎機能異常が加わる。第3相にはARDSや多臓器不全をきたして、結果的に死亡する。軽症の7例は低年齢であるのに対して、重症の11例では平均年齢26.3歳であった。すべての重症例では下気道感染症状を示し、末梢白血球数(リンパ球数も)は低下する傾向を示した。重症例において肝機能障害、腎機能障害、肺炎の合併頻度も高い傾向にあった。

さらに、2004年のベトナムでのA型鳥インフルエンザH5N1によるアウトブレイクにおける10症例の臨床像が報告されている¹⁷⁾。10例の患者の平均年

齢は13.7歳(5~24歳)で、10例中8例において発症前に家禽と直接接触したエピソードがあった。ヒト-ヒト感染の証拠はなかったとされている。潜伏期間は3日(2~4日)で、発症から入院までの期間は5.9日(3~8日)であった。臨床症状としては全例に発熱、咳嗽、息切れが認められ、喀痰は50%に認められた。また、下痢が70%に認められている。末梢血検査では白血球数減少(平均2,100/ μ l)、リンパ球減少(平均700/ μ l)の他に、血小板減少(平均75,500/ μ l)も認められている。胸部X線では全例において肺炎所見が認められている。肺炎の所見はSARSの場合と同様の辺縁の不鮮明なスリガラス陰影、広範な浸潤影が認められている¹⁷⁾。この報告では10例中8例が死亡している。2004年のベトナムのH5N1アウトブレイクが1997年、香港のアウトブレイクと異なる点は、小児においても成人と同様に致死率が高い点である。

その後、2004年8月以降もベトナム、タイにおいて感染者の報告が続いており、2005年2月上旬までにベトナムでは37名の感染者(うち29名死亡)、タイでは17名の感染者(うち12名死亡)を確認している。さらに、カンボジアでも2005年1月にも鳥インフルエンザH5N1による1例の死亡例が報告されている。

3. 鳥インフルエンザとインフルエンザパンデミックの関連性

過去100年間に人類が経験したインフルエンザパンデミックのうち、1918年のスペインカゼの原因ウイルスは鳥由来のH1N1であることが明らかになった¹⁸⁾。一方、1957年のアジアカゼと1968年の香港カゼにおける流行株はヒトと鳥ウイルスの再集合体形成(reassortment)により生まれたと考えられている(Fig. 2)¹⁵⁾。すなわち、1957年アジアカゼ流行ウイルスは8つの遺伝子のうち3つは鳥H2N2由来で、他の5つは当時流行していたヒトのH1N1由来であった。その後出現した1968年の香港カゼの流行株は2つの遺伝子が鳥H3ウイルス由来であとの6つの遺伝子はヒトH2N2由来の再集合体形成株であったとされている。これらの再集合体形成株はヒトインフルエンザ、鳥インフルエンザ双方に親和性のあるブタの気道上皮で産生されると考えられている。

WHOは今後パンデミックを起こしうるインフルエンザウイルスの発生する機序として以下の2つを

あげている¹⁹⁾。1つはヒトあるいはブタの体内において高病原性鳥インフルエンザとヒトインフルエンザが同時に感染し、両者の再集合体ウイルスが形成される場合である。もう1つの機序は、ヒトに高病原性鳥インフルエンザウイルスが感染している間にウイルスが突然変異を起こす場合が想定されている。

4. 高病原性鳥インフルエンザ対策

A型H5N1をはじめとする高病原性鳥インフルエンザが家禽に蔓延すると、今回のベトナム、タイの事例のようにヒトにおける世界的流行のリスクが高くなる。このため、WHOはまず感染リスクを減じるためにウイルス保有動物を排除することを奨めている²⁰⁾。しかしながら、これまでも大量の家禽を殺処分することにより生ずる経済的問題から、速やかな対策が講じられない事態も経験されている。

次に重要な対策は動物とヒトのレベルのサーベイランスの強化である。この高病原性鳥インフルエンザのインパクトを最小限に抑える最良の方法は家禽における流行を迅速に封じ込め、また制圧することである。このことは一般人の健康を守るためにも、細心の注意をもって実行されなければならない。

IV. 新興呼吸器ウイルス感染症 に対する今後の対応

1. サーベイランス情報ネットワークの構築

中国広東省におけるSARSアウトブレイク初期の事例からも理解できるように、国際感染症のアウトブレイクの発生を速やかに察知し、原因究明をする国際的な情報ネットワークが必要である。現在、WHOはグローバル感染症警報・対応ネットワーク(GOARN: Global outbreak alert & response network)を、技術や人材を支援できる既存の研究施設を中心に構築している。GOARNの目的は、感染症の国際的拡散の防止、迅速かつ適切な技術支援の提供、長期間の感染流行に対する備えと能力構築に貢献することである。

2. 人的支援体制の構築

上記に加えて、感染症アウトブレイクに対応する国際的な人材支援ネットワークも必要である。WHOは中国本土におけるSARS対策の構築において、適切な人材派遣に困難を感じていた。感染性の高い感染症の対応は一刻を争う。中国のSARS対応についても、新興ウイルス感染症をより早く察

知し、より早期に熟練した感染コントロール医師・看護婦が現場に投入されていれば、感染者数を減少させることができたかもしれない。アウトブレイク時に必要な人材は、感染コントロールチーム、疫学チーム、検査診断チームなどである。筆者は中国におけるSARSアウトブレイクの経験から、このような緊急時の対応に協力できる人材の各国における事前登録が必要であると考えている。さらには、派遣されたWHO専門家がWHOスタッフや他国からの専門家と協調して行動できるためにも、WHO主導による事前研修の実施が望ましい。

3. アウトブレイク時のWHOの役割

アウトブレイク発生に際して、まずWHOは当該国との協力体制を構築することが重要である。次に、WHOカントリーオフィスにおいて各国から集まった専門家チームが編成される。ここでは、国際感染症を熟知したリーダー的人材が専門家達の活動をコーディネートすることが望まれる。WHOの活動は病因決定、診断法の確立、感染対策ガイドライン作成とその実地指導、疫学調査、公報など多方面に渡る。速やかに明確な目的のもとに行動できる体制を構築することが重要である。

V. おわりに

新興ウイルス感染症のアウトブレイク発生に際して、国際的感染症サーベイランスシステムによりその病原微生物を速やかにキャッチし、同定することが可能になった。次の段階で、WHOはこの微生物感染症の制御に向けた戦略を練り、現場に登録された専門家を迅速に派遣する。このような新興ウイルス感染症対応策が構築できれば、感染症アウトブレイクの国際感染症への進展防止が期待できる。

文 献

- 1) Doresten, C., Gunther, S., Preiser, W., et al.: Identification of a novel corona virus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1967-1976, 2003.
- 2) Rota, P.A., Oberste, M.S., Monroe, S.S., et al.: Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 300: 1394-1399, 2003.
- 3) Fouchier, R.M., Kuiken, T., Schutten, M., et al.: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature*, 423: 240, 2003.

- 4) Guan, Y., Zheng, B.J., He, Y.Q., et al. : Isolation and characterization of virus related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science*, 302 : 276-278, 2003.
- 5) CDC : Prevalence of IgG antibody to SARS-associated coronavirus in animal traders — Guangdong Province, China, 2003. *MMWR*, 52 : 986-987, 2003.
- 6) WHO : Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS). 2003.11.
- 7) Seto, W.H., Tsang, D., Yung, R.W.H., et al. : Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Lancet*, 361 : 1519-1520, 2003.
- 8) Yu, I.T.S., Li, Y., Wong, T.W., et al. : Evidence of airborne transmission of the severe acute respiratory syndrome virus. *N. Engl. J. Med.*, 359 : 1731-1739, 2004.
- 9) Peiris, J.S.M., Chu, C.M., Chan, K.S., et al. : Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia : a prospective study. *Lancet*, 361 : 1767-1772, 2003.
- 10) Hsu, L.-Y., Lee, C.-C., Green, J.A., et al. : Severe respiratory syndrome (SARS) in Singapore : clinical features of index patient and initial contacts. *Emerg. Infect. Dis.*, 9 : 713-717, 2003.
- 11) Tsang, K.W., Ho, P.L., Ooi, G.C., et al. : A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.*, 348 : 1977-1985, 2003.
- 12) Wong, K.T., Antonio, G.E., Hui, D.S., et al. : Severe acute respiratory syndrome : Radiographic appearances and pattern of progression in 138 patients. *Radiology*, 228 : 401-406, 2003.
- 13) Leung, W.K., To, K.-F., Chan, P.K.S., et al. : Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*, 125 : 1011-1017, 2003.
- 14) Wu, J., Xu, F., Zhou, W., et al. : Risk factors for SARS among persons without known contact with SARS patients, Beijing, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 10 : 210-216, 2004.
- 15) Horimoto, T., and Kawaoka, Y. : Pandemic threat posed by avian influenza A virus. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 : 129-149, 2001.
- 16) Tam, J.S. : Influenza A (H5N1) in Hong Kong : an overview. *Vaccine*, 20 : S 77-S 81, 2002.
- 17) Hien, T.T.H., Liem, N.T., Dung, N.T., et al. : Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.*, 350 : 1179-1188, 2004.
- 18) Stevens, J., Corper, A.L., Basler, C.F., et al. : Structure of uncleaved human H1 hemagglutinin from the extinct 1918 influenza virus. *Science*, 303 : 1866-1870, 2004.
- 19) WHO : WHO consultation on priority public health interventions executive summary. http://www.wpro.who.int/csr/disease/avian_influenza/executivesummary/en/
- 20) WHO : Public health considerations in the application of measures to contain and control highly pathogenic avian influenza (HPAI) outbreaks in poultry. <http://www.wpro.who.int/avian/docs/public>

Preparedness against Newly Emerging Viral Respiratory Infections

Kazunori Oishi, M.D.

*Department of Internal Medicine, Institute of Tropical Medicine,
Nagasaki University, Nagasaki*

Severe respiratory viral infectious diseases, such as SARS and highly pathogenic avian influenza H5N1, have recently emerged mainly in the Asian countries. Measures for preventing health crises in this region are now required. The Global Outbreak Alert and Response Network (GOARN) has been organized as a common surveillance network system to detect the outbreak of infectious diseases rapidly, and to identify their causes. GOARN involves a technical collaboration among existing institutions and networks whereby human and technical resources are pooled for rapid identification, confirmation and response to outbreaks of international importance. The objectives of GOARN are to combat the international spread of such outbreaks, ensure that appropriate technical assistance reaches affected states rapidly, and contribute to long-term epidemic preparedness and capacity building. A network system for supplying skilled personnel to the affected area is required to respond swiftly to outbreaks of infectious diseases. The author proposes pre-registration of doctors and nurses skilled in infection control after training by WHO in each country before the occurrence of any outbreak of infectious disease. In case of an outbreak, the registered members will be rapidly sent to the affected area, and will be able to develop necessary preventive measures in coordination with WHO. Preparedness for the outbreak of infectious diseases as described above will minimize the spread of international infectious diseases in each region, and can play an important role in health crises in the future.

Key words : SARS, highly pathogenic avian influenza, GOARN, international health crisis, WHO

Association of increased platelet-associated immunoglobulins with thrombocytopenia and the severity of disease in secondary dengue virus infections

M. SATTO*, K. OISHI*, S. INOUE†, E. M. DIMAANO‡, M. T. P. ALERA‡, A. M. P. ROBLES‡, B. D. ESTRELLA JR‡, A. KUMATORI§, K. MOJI††, M. T. ALONZO¶, C. C. BUERANO¶¶, R. R. MATIAS¶¶, K. MORITA†, F. F. NATIVIDAD¶¶ & T. NAGATAKE* *Departments of *Internal Medicine, †Virology and ‡Biochemistry, ††Research Center for Tropical Infectious Diseases, Institute of Tropical Medicine Nagasaki University, Japan, ‡Department of Blood Borne Diseases, San Lazaro Hospital, Manila, ¶Research and Biotechnology Division, St Luke's Medical Center, Quezon City, and ¶¶Institute of Biology, University of the Philippines, Diliman, Quezon City, Philippines*

(Accepted for publication 23 August 2004)

SUMMARY

Severe thrombocytopenia and increased vascular permeability are two major characteristics of dengue haemorrhagic fever (DHF). To develop a better understanding of the roles of platelet-associated IgG (PAIgG) and IgM (PAIgM) in inducing thrombocytopenia and its severity of disease in patients with secondary dengue virus infection, the relationship between the PAIgG or PAIgM levels and disease severity as well as thrombocytopenia was examined in 78 patients with acute phase secondary infection in a prospective hospital-based study. The decrease in platelet count during the acute phase recovered significantly during the convalescent phase. In contrast, the increased levels of PAIgG or PAIgM that occurred during the acute phase of these patients decreased significantly during the convalescent phase. An inverse correlation between platelet count and PAIgG or PAIgM levels was found in these patients. Anti-dengue virus IgG and IgM activity was found in platelet eluates from 10 patients in an acute phase of secondary infection. Increased levels of PAIgG or PAIgM were significantly higher in DHF than those in dengue fever (DF). An increased level of PAIgM was associated independently with the development of DHF, representing a possible predictor of DHF with a high specificity. Our present data suggest that platelet-associated immunoglobulins involving antidengue virus activity play a pivotal role in the induction of thrombocytopenia and the severity of the disease in secondary dengue virus infections.

Keywords dengue haemorrhagic fever PAIgG PAIgM secondary infection thrombocytopenia

INTRODUCTION

The dengue virus, a mosquito-borne human viral pathogen, is recognized increasingly as a major public health issue in tropical and subtropical countries, particularly in urban and peri-urban areas [1]. Approximately 2.5 billion people in more than 100 countries are currently at risk of infection, with an estimated 50 million infections per year [2]. The four serotypes of dengue virus induce a wide spectrum of clinical manifestations, which are associated frequently with haemorrhagic diathesis [3]. While dengue fever (DF) is a self-limited febrile illness, dengue haemorrhagic fever (DHF) is characterized by prominent haemorrhagic manifestations associated with thrombocytopenia and an increased vascular permeability. Secondary infections, which are observed

commonly in the dengue-endemic areas, are more likely to constitute a risk factor for DHF [4–6].

While dengue virus-induced bone marrow suppression decreases platelet synthesis [7], an immune mechanism of thrombocytopenia due to increased platelet destruction appears to be operative in patients with DHF [8,9]. An increased level of PAIgG is observed frequently in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), but is also found in a variety of diseases [10–12]. Although virus-associated ITP such as human herpesvirus 6 infection has also been recognized [13–15], the association of increased levels of PAIgG and the mechanisms of PAIgG-mediated thrombocytopenia has been poorly examined in these viral infections.

We demonstrated recently an inverse correlation between the levels of platelet-associated IgG (PAIgG) and platelet count during the acute phase of secondary dengue infections [16]. The circulating antiplatelet autoantibody was rarely detected in this study. We speculated that immune complexes of the dengue virus with antidengue virus IgG antibodies are located on the platelet

Correspondence: K. Oishi, Department of Internal Medicine, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852–8523, Japan.

E-mail: oishi-k@net.nagasaki-u.ac.jp

via the direct binding of the dengue virus to platelets [17]. The findings shown in this study suggest that PAIgG formation involving antidengue virus IgG plays an important role in inducing thrombocytopenia in secondary infections.

Because thrombocytopenia is more prominent in DHF than in DF [3], we hypothesized that the increased level of PAIgG might be associated with the severity of the disease as well as thrombocytopenia. In addition, the role of platelet-associated IgM (PAIgM) remains uncertain in this disease, although the level of antidengue virus IgM is also elevated in the sera of patients with secondary infections [18]. In this study, we therefore report on a prospective hospital-based study to examine whether the levels of PAIgG or PAIgM correlated with the disease severity as well as thrombocytopenia in patients with secondary infections. We demonstrate here the possible role of platelet-associated immunoglobulins in the development of thrombocytopenia and disease severity in secondary dengue virus infections.

MATERIALS AND METHODS

Patients and study design

One hundred and thirty-five patients clinically suspected of having a dengue virus infection were enrolled at San Lazaro Hospital between September 2002 and November 2003. Of these subjects, 102 patients were diagnosed with the acute phase of dengue virus infection (3–7 days after the onset of illness) as evidenced by IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) [19,20]. Of these patients, 97 were diagnosed with the acute phase of a secondary dengue infection (3–7 days after the onset of illness) by a haemagglutination inhibition (HI) test. Five were diagnosed as having a primary dengue infections by the HI test. Among 97 patients with a secondary dengue infection, we evaluated 78 patients who were examined for platelet count and PAIgG and PAIgM levels at the time of enrolment (acute phase) and 4 days after the first test (convalescent phase) in this study. The levels of PAIgM were not determined in three samples in the acute phase and one sample in the convalescent phase because of the insufficient volume obtained. Forty-three age-matched healthy volunteers were also enrolled as control subjects at St Luke's Medical Center during the same period, and were examined for the IgM capture ELISA for the dengue virus, platelet count, PAIgG and PAIgM levels at the time of enrolment. EDTA blood was drawn from patients and healthy volunteers for these tests. The platelet count was determined with an automatic haemocytometer. DHF was diagnosed by World Health Organization (WHO) criteria; a platelet count nadir of less than 100 000/ μ l, haemorrhagic manifestations and an increase in haematocrit equal to or greater than 20% above the average of age group or the presence of pleural effusion or ascites fluid [21]. Cases of DHF were further graded as I–IV. DF was defined as an increase in haematocrit of less than 20% and no detectable pleural effusion on the right lateral decubitus chest radiograph [22].

The study protocol was approved by the Bioethics Committee of San Lazaro Hospital and the St Luke's Medical Center. Parents or guardians of all patients and healthy volunteers provided written informed consent.

HI test

An HI test was performed using a paired plasma sample with an interval longer than 7 days by the method of Clarke and Casals

[23]. Four haemagglutinating units of dengue-1 (99 St-12 A strain), dengue 2 (00St-22 A strain), dengue-3 (SLMC 50 strain) and dengue-4 (SLMC 318 strain) acetone-extracted antigens were used in this test. When an HI titre $\geq 1:2560$ in plasma from the patient with acute or convalescent phase was found, the case was considered to be a secondary infection [21].

Competitive ELISA for PAIgG and PAIgM

The wells of flat-bottomed 96-well microtitre polystyrene plates were coated previously with 400 ng/well of standard human IgG (Inter-Cell Technologies, Inc., NJ, USA) or human IgM (Chemicon International, CA, USA). Fifty μ l of a platelet sample at an appropriate concentration ($5\text{--}20 \times 10^4$ cells/ μ l) or standard human IgG or human IgM, and 50 μ l of 1:10 000 diluted horseradish peroxidase conjugated antihuman IgG Fc antibody (goat IgG, F(ab) $_2$ fraction, ICN Pharmaceuticals, OH, USA) or 1:3750 diluted horseradish peroxidase conjugated antihuman IgM Fc antibody (goat IgM, F(ab) $_2$ fraction, ICN Pharmaceuticals) was added to the wells of flat-bottomed 96-well microtitre polystyrene plates, and then incubated at 37°C for 2 h. Substrate solution (*o*-phenylenediamine dihydrochloride) was added, followed by a 15-min incubation. After adding 2 N H $_2$ SO $_4$, the optical density (OD) at 492 nm was read. PAIgG or PAIgM values were recorded as the IgG or the IgM values per 10^7 platelet counts (ng/ 10^7 platelets).

Anti-dengue virus IgG or IgM activity in the eluted platelet samples

Platelets were separated from plasma samples from 10 patients during the acute phase of a secondary infection (eight patients with DF and two patients with DHF) and six healthy volunteers, who were enrolled at San Lazaro Hospital and St Luke's Medical Center on October, 2001, respectively [16], and antibodies were eluted from the separated platelets as described previously [24]. The eluate was dialysed against phosphate buffered saline (PBS) at 4°C overnight, and concentrated to a final volume of 1 ml containing 3×10^9 platelets by a concentrator. These samples were stored at -80°C until used. The IgG or IgM indirect ELISA for detecting antidengue virus antigens in the eluates of platelet samples was carried out using 96-well flat-bottomed microplates that had been coated previously with 100 μ l of a dengue virus antigen mixture (2.5 μ g/ml) [16]. The dengue virus antigen mixture consisting of dengue virus types 1, 2, 3 and 4 antigen (each 0.625 μ g/ml) was provided by Kurosawa Y (Pentax Co., Ltd, Japan). Dengue type 1 (Hawaii strain), type 2 (ThNH7/93 strain), type 3 (PhNH4/84) and type 4 (CT93-158) viruses were used for antigen preparation. After washing the plate, 50 μ l of the undiluted eluates were added to duplicate wells, followed by incubation at room temperature for 30 min. The plate was washed, and then reacted with 100 μ l of alkaline phosphatase-conjugated antihuman IgG goat serum (1:5000 dilution; Biosource International, Camarillo, CA, USA) or antihuman IgM goat serum (1:2500 dilution, Biosource International). Finally, the OD at 405 nm was then measured.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm s.d. Platelet counts, PAIgG and PAIgM levels during the period between the acute and convalescent phase were tested by the Wilcoxon signed-rank test. The levels of PAIgG, PAIgM and the platelet count between healthy volunteers and patients with dengue virus infections and between patients with DF and DHF were analysed by the Mann-Whitney

Table 1. Laboratory data on patients with acute phase of secondary dengue virus infection and healthy volunteers

Diagnosis (n)	Age (years)	Days after onset	% increase in haematocrit	Platelet count, $\times 10^3/\mu\text{l}$	PAIgG, $\text{ng}/10^7$ platelets	PAIgM, $\text{ng}/10^7$ platelets
HV (43)	17.3	–	–	273.0 (53.4)	6.4 (4.2)	4.2 (3.8)
DV infection (78)	18.2 (5.9)	5.9 (1.0)	19.6 (9.8)	47.9 (34.6)*	30.9 (23.1)*	17.5 (20.4)*
DF (40)	17.6 (5.3)	6.1 (1.1)	12.4 (6.2)	51.1 (37.2)	25.0 (18.4)	10.3 (11.9)
DHF (38)	18.9 (6.4)	5.7 (0.9)	27.3 (6.6)**	44.7 (31.8)	37.1 (26.0)***	24.8 (24.5)****

HV: healthy volunteer; DF: dengue fever; DHF: dengue haemorrhagic fever. Data represent the mean (s.d.). * $P < 0.001$ (versus HV); ** $P < 0.001$ (versus DF); *** $P < 0.01$ (versus DF); **** $P < 0.001$ (versus DF).

U-test. A multivariate logistic regression was used to assess the association of PAIgG, PAIgM and the platelet count on the severity of the disease. The significance of the correlations was estimated using Spearman's rank correlation. $P < 0.05$ was considered to be significant. Statistical software, SPSS version 10.0 (SPSS Inc., IL, USA) was used for the data analysis.

RESULTS

Of the 78 patients with secondary dengue virus infections, 40 and 38, respectively, were diagnosed as DF and DHF. Thirty-eight patients with DHF were classified further into DHF I ($n = 9$) and DHF II ($n = 29$). These patients with DHF were therefore free of shock. A significant difference was found in platelet count, PAIgG and PAIgM levels ($P < 0.001$) between patients in the acute phase of a secondary infection and age-matched healthy volunteers (Table 1). A significant difference in the maximum percentage of haematocrit increase ($P < 0.001$), PAIgG level ($P < 0.01$) and PAIgM level ($P < 0.001$) was found between patients with DF and DHF, while no significant difference was found in age, days after onset and platelet count between these two groups. A weak but a significant correlation was found between the platelet count and the level of PAIgG among the total 78 patients with a secondary dengue virus infection at the time of enrolment, consistent with our findings ($r = -0.256$, $P = 0.023$, Fig. 1a) [16]. A weak correlation was also found between the platelet count and PAIgM levels among these patients at the time of enrolment ($r = -0.231$, $P = 0.046$; Fig. 1b). The changes in platelet counts and PAIgG or PAIgM were compared in 78 patients with a secondary infection in the period between the acute and convalescent phases. The low baseline platelet counts during the acute phase ($47.9 \pm 34.6 \times 10^3/\mu\text{l}$) increased significantly and recovered to a normal range during the convalescent phase ($259.5 \pm 112.7 \times 10^3/\mu\text{l}$; $P < 0.001$, Fig. 2a) in these patients. In contrast, the increased baseline PAIgG ($30.9 \pm 23.1 \text{ ng}/10^7$ platelet) or PAIgM levels ($17.5 \pm 20.4 \text{ ng}/10^7$ platelet) during the acute phase decreased significantly, and returned to a normal level ($13.3 \pm 7.7 \text{ ng}/10^7$ platelet for PAIgG, $9.7 \pm 7.6 \text{ ng}/10^7$ platelet for PAIgM) during the convalescent phase in the same subjects ($P < 0.001$ for PAIgG, Fig. 2b; $P < 0.001$ for PAIgM, Fig. 2c).

The levels of antidengue virus IgG or IgM were determined in eluates of the platelet samples. The OD at 405 nm for the antidengue virus IgG and IgM in eluates from six healthy volunteers were 0.20 ± 0.10 and 0.09 ± 0.05 , respectively. In contrast, an increased activity of antidengue virus IgG or IgM was found in eluates from patients in the acute phase of a secondary infection

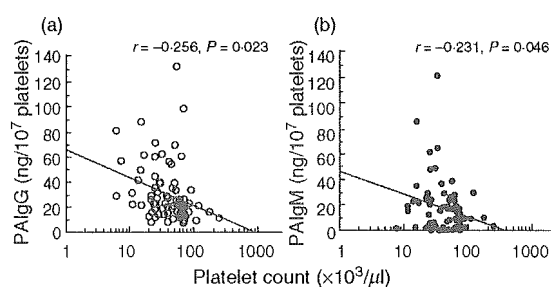


Fig. 1. Relationship between peripheral platelet count and PAIgG (a, $n = 78$; open circles) or PAIgM (b, $n = 75$; closed circles) levels in patients in the acute phase of a secondary dengue virus infection.

(OD at 405 nm; 1.54 ± 0.35 for antidengue virus IgG, 0.35 ± 0.20 for antidengue virus IgM).

We next examined whether the level of PAIgG or PAIgM correlated directly with the haematocrit increase, which is a critical indicator of vascular permeability, in patients in the acute phase of a secondary infection. No significant correlation was found between the level of PAIgG and the percentage increase in haematocrit ($n = 78$, $r = 0.057$, $P > 0.05$). Although a weak correlation was found between the level of PAIgM and the percentage increase in haematocrit ($n = 75$, $r = 0.23$, $P = 0.045$), no significant correlation was found between these two parameters in patients with DF ($n = 38$, $r = -0.13$, $P > 0.05$) and in patients with DHF ($n = 37$, $r = -0.31$, $P > 0.05$). A logistic regression, however, demonstrated that the PAIgM was associated independently with DHF among the parameters of PAIgG, PAIgM and platelet count ($P < 0.01$). A level of PAIgM higher than $20 \text{ ng}/10^7$ platelets during the acute phase of a secondary infection was a predictor of the subsequent development of DHF with a sensitivity of 48.6% (18/37) and a specificity of 92.1% (35/38) (Fig. 3).

DISCUSSION

In this paper, we have demonstrated that the levels of PAIgM as well as PAIgG are correlated significantly with platelet count in the acute phase of secondary dengue virus infections. PAIgG and PAIgM levels were both significantly higher in the acute phase than in the convalescent phase. The changes in PAIgM levels were found to be similar to the levels of PAIgG during the acute and convalescent phases. We also found an increased activity of antidengue virus IgM as well as antidengue virus IgG in eluates from patients in the acute phase of a secondary infection, although the

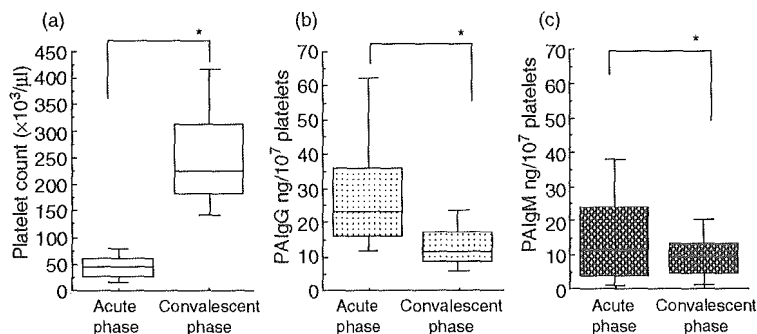


Fig. 2. Comparisons of peripheral platelet count (a, $n = 78$), PAIgG (b, $n = 78$) and PAIgM (c, $n = 75$) levels between the acute (the first test) and convalescent phase (4 days after the first test) of secondary dengue virus infections. * $P < 0.001$.

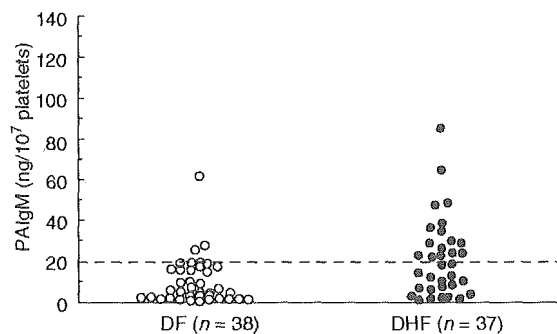


Fig. 3. Comparison of the levels of PAIgM between patients with DF ($n = 38$; open circles) and DHF ($n = 37$; closed circles) during the acute phase of a secondary dengue virus infection. The horizontal broken line represents the cut-off value (20 ng/ 10^7 platelets) for the prediction of DHF.

antidengue virus IgM activities were relatively lower than that of antidengue virus IgG in the eluate samples. These data suggest that PAIgM formation involving antidengue virus IgM may also contribute to the induction of thrombocytopenia in patients in the acute phase of a secondary infection. As we have previously suggested a possible explanation for thrombocytopenia by the transient formation of PAIgG [16], PAIgM formation may also contribute to the induction of thrombocytopenia during the acute phase of secondary infection. While PAIgG formation may induce thrombocytopenia through both Fc receptor- and complement receptor-mediated platelet clearance by macrophage and/or complement-mediated platelet lysis [9,25], PAIgM formation may also result in thrombocytopenia by the same mechanisms except via the use of Fc receptors, based on the function of the IgM pentamer.

A previous *in vitro* study reported that dengue-2 virus binds to platelets in the presence of a virus-specific antibody [17]. In our preliminary study of dengue virus RNA detection by RT-PCR among 21 patients with a secondary infection, a high positive rate (42.8%) was found in the purified platelet samples (data not shown). These data suggest that the dengue virus is located on the circulating platelets, and support our hypothesis of a mechanism of thrombocytopenia involving the formation of PAIgG and PAIgM in patients with secondary infections. However, we cannot rule out that the dengue virus other than type 2 forms the immune

complex with virus-specific IgG antibody, which subsequently binds to platelet via the Fc receptor. While a significant increase in the levels of PAIgG or PAIgM and a weak but significant correlation between platelet count and the level of PAIgG or PAIgM was found in patients with the acute phase of secondary infection, the levels of PAIgG in 15 patients (19.2%) and the levels of PAIgM in 38 patients (50.7%) remained within the normal range (0–14.8 ng/ 10^7 platelets for PAIgG, 0–11.8 ng/ 10^7 platelets for PAIgM). These data indicate that mechanisms involved in the development of thrombocytopenia other than PAIgG or PAIgM may also be operative in these patients. In addition, the contribution of PAIgG to the induction of thrombocytopenia appears to be much greater than that of PAIgM.

As predictors of DHF, previous studies have proposed certain host factors such as soluble tumour necrosis factor receptors and soluble vascular cell adhesion molecule-1 and dengue virus non-structural protein NS1 [26–28]. An increased level of PAIgM during the acute phase of a secondary infection was highly specific for the development of DHF (92.1%) in this study, although its sensitivity was relatively low (48.6%). PAIgM, therefore, would be a specific predictor of DHF in cases accompanied by a virological diagnosis. Interpretation of our data, however, is limited, because the study subjects involved cases of DF and DHF with no shock in this study. More importantly, it is possible that the formation of PAIgM could be linked to the increased vascular permeability, which is characteristic of DHF. A recent *in vitro* study has reported on the adhesion of platelets to dengue virus-infected endothelial cells [29]. Activated platelets associated with dengue virus and antidengue virus IgM as well as dengue virus-infected endothelial cells may be involved in the mechanism of the increased vascular permeability associated with DHF [30,31].

In summary, we have demonstrated that the increased levels of PAIgG and PAIgM, involving antidengue virus IgG and IgM, were associated closely with thrombocytopenia during the acute phase of secondary dengue virus infections. An increased level of PAIgM during the acute phase of secondary infection was associated independently with the development of DHF, and highly specific for DHF. The formation of platelet-associated immunoglobulins may play a critical role in the mechanisms of thrombocytopenia and the accompanying increased vascular permeability. Further elucidation of the involvement of platelet-associated immunoglobulins on the mechanisms of thrombocytopenia and the increased vascular permeability is required.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Arturo B. Cabanban MD and the staff in Pavilion 1, San Lazaro Hospital and the Research and Biotechnology Division, St Luke's Medical Center. This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B: 14406019) from the Ministry of Education, Science and Culture, Japan and a grant from St Luke's Medical Center (01-018).

REFERENCES

- Igarashi A. Impact of dengue virus infection and its control. *FEMS Immunol Med M/C* 1997; **18**:291-300.
- Guzman MG, Kouri G. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**:33-42.
- Srichaikul T, Nimmannitya S. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Bailliere's Clin Haematol* 2000; **13**:261-76.
- Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* 1988; **38**:172-80.
- Halstead SB. Pathogenesis of dengue: challenges of molecular biology. *Science* 1988; **239**:476-81.
- Guzman MG, Kouri GP, Bravo J, Soler M, Vazquez S, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: a retrospective seroepidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg* 1990; **42**:179-84.
- La Russa VF, Innis BL. Mechanism of dengue virus-induced bone marrow suppression. *Bailliere's Clin Haematol* 1995; **8**:249-70.
- Mitrakul C, Poshayachinda M, Futralul P, Sangkawibha N, Ahandrik S. Hemostatic and platelet kinetic studies in dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1977; **26**:975-84.
- Boonpucknavig S, Vuttiviroj O, Bunnag C, Bhamarapravati N, Nimmannitya S. Demonstration of dengue antibody complexes on the surface of platelets from patients with dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg* 1979; **28**:881-4.
- McMillian R. Chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1981; **304**:1135-47.
- Cines DB, Blanchette VS, Chir B. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002; **346**:995-1008.
- Muller-Eckhardt C, Kayser W, Mersch-Baumert K *et al.* The clinical significance of platelet-associated IgG: a study on 298 patients with various disorders. *Br J Haematol* 1980; **46**:123-31.
- Rand ML, Wright JF. Virus-associated idiopathic thrombocytopenic purpura. *Transfus Sci* 1998; **19**:253-9.
- Kitamura K, Ohta H, Ihara T *et al.* Idiopathic thrombocytopenic purpura after human herpesvirus 6 infection. *Lancet* 1994; **344**:830.
- Toyoshige M, Takahashi H. Increase of platelet-associated IgG (PA-IgG) and hemophagocytosis of neutrophils and platelets in parvovirus B19 infection. *Int J Hematol* 1998; **67**:205-6.
- Oishi K, Inoue S, Cinco MTDD *et al.* Correlation between increased platelet-associated IgG and thrombocytopenia in secondary dengue virus infections. *J Med Virol* 2003; **71**:259-64.
- Wang S, He R, Patarapotikul J, Innis BL, Anderson R. Antibody-enhanced binding of dengue-2 virus to human platelet. *Virology* 1995; **213**:254-7.
- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; **40**:418-27.
- Bundo K, Igarashi A. Antibody-captured ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J Virol Meth* 1985; **11**:15-22.
- Morita K, Tanaka M, Igarashi A. Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; **29**:2107-10.
- World Health Organization (WHO). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd edn. Geneva: WHO, 1997.
- Libraty DH, Endy TP, Hough HH *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infection. *J Infect Dis* 2002; **185**:1213-21.
- Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958; **7**:561-73.
- Helmerhorst FM, van Oss CJ, Bruynes ECE, von Engelfriet CP, dem Borne AEGKr. Elution of granulocyte and platelet antibodies. *Vox Sang* 1982; **43**:196-204.
- Bokisch VA, Top FH Jr, Russell PK, Dixon FJ, Muller-Eberhard HJ. The potential pathogenic role of complement in dengue hemorrhagic shock syndrome. *N Engl J Med* 1973; **289**:996-1000.
- Green S, Vaughn DW, Kalayanarooj S *et al.* Early immune activation in acute dengue illness is related to development of plasma leakage and disease severity. 1999; **179**:755-62.
- Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *J Med Virol* 2001; **65**:97-104.
- Libraty DH, Young PR, Pickering D *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 2002; **186**:1165-8.
- Krishnamurti C, Peat RA, Cutting MA, Rothwell SW. Platelet adhesion to dengue-2 virus-infected endothelial cells. *Am J Trop Med Hyg* 2002; **66**:435-41.
- Krishnamurti C, Kalayanarooj S, Cutting MA *et al.* Mechanisms of hemorrhage in dengue without circulatory collapse. *Am J Trop Med Hyg* 2001; **65**:840-7.
- Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol* 1998; **161**:6338-46.