

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

2004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 鈴木尚文、西村聖美、佐藤之義、古川徹也、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・中南米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、我々の開発したリアルタイム RT-PCR（TaqMan 法）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。2004年8月に発生したミクロネシアからの集団感染事例は、日本へのデングウイルスの侵入の危険性を示唆した。また、現地に先駆けたミクロネシアの流行株、ネパールのデングウイルスの分離、遺伝子解析などの情報公開事例は、我々のサーベイランス事業が、厚生行政だけでなく国際貢献の面でも有用であることを示した。

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・亜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: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。リアルタイム RT-PCR は伊藤ら（J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004）の方法に基づいて行った。分離ウイルスは Vero 細胞によるプラーク法、PCR 産物による遺伝子解析法で確認した。血清での抗体検査には 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。

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、デング感染症検査を実施した総数は128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、7症例が陽性（男性：5、女性：2）であった。その内、2004年で重要な事例は、インドネシアでの大流行時に輸入症例からデングウイルス2型を検出・分離したこと、初めてデング熱の流行が確認されたネパールからの輸入症例から初めてウイルスを分離した（図1）。

2) 国内医療機関からの依頼検査成績

国内医療機関からのデングウイルス感染に関する検査依頼件数は、2004年は54件であった。このうち、デングウイルス感染が確認された症例は20例であった（表1）。本年の検査依頼の特徴として、感染研ホームページ（図2）を見ての依頼が増えたことである。本年特記すべき事例は、ミクロネシアヤップ島における日本人渡航者の集団感染事例（7例）であった（表2）。その後も9月、10月とミクロネシアからの輸入症例が続いた（表3）。我々の分離したウイルスからヤップ島の流行株が1型ウイルスであること、その遺伝子解析情報を最初に現地保健省、WHOに報告した。

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、ミクロネシア、スリランカ、ネパール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、南アジア、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

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。本年はミクロネシア（ヤップ島）からの集団輸入感染症例からウイルスを分離し現地に先駆けてミクロネシアの流行株の型別および遺伝子解析情報を、WHOを通じて現地に報告した。ネパールからの輸入症例からの現地流行ウイルスを世界で初めて分離し、その情報をネパールに伝えた。本年度はわれわれの診断技術と診断体制が、国際貢献にも寄与した。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

Ernawati Dewi Beti, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and

dengue virus infection. *J. Virological Methods*. 121: 171-180. 2004

Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Reiko Nerome, Shigeru Tajima and Ichiro Kurane. Development and Evaluation of Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan RT-PCR) Assays for Dengue Virus Types 1-4. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5935-5937, 2004

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Mikako Ito, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka. Detection of Dengue Virus Serotype-specific IgM by IgM capture ELISA in the presence of sodium thiocyanate (NaSCN). *Dengue Bulletin WHO* 2004.

Kunishige M, Mitsui T, Leong HN, Takasaki T, Kurane I, Mihara A, Matsumoto T. Preferential gray matter involvement in dengue myelitis. *Neurology* 63(10):1980-1981.2004

Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Shigeo Matsuno, Mikio Nakayama, Ichiro Kurane. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332:38-44, 2005

田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美、村田以和夫、諸角 聖、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎。 Dengueウイルス初感染例における中和抗体測定による血清型判定が可能な病日期間の検討。 *臨床とウイルス*. 32(1). 30-35, 2004

2. 学会発表

Tomohiko Takasaki. Newly developed method for dengue diagnosis. 5th Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

Mika Shigematsu, Tomohiko Takasaki, Kazuyo Yamashita, Mikio Kimura, Nobuhiko Okabe. Imported dengue fever cases in

Japan. 5th Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

K. Kishiro, Y Kurosawa, A Yamamoto, M Nakayama, T Ogawa, S Inoue, T Takasaki, R R Matias, F Filipinas Natividad, K Morita, I Kurane. Detection of anti-dengue virus IgM by a particle agglutination assay system using hydroxyapatite-coated nylon beads. 5th Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

伊藤美佳子、高崎智彦、向井 三郎、倉根一郎。 サルにおける Dengueウイルス感染増強抗体の解析。 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

田島 茂、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎。 Dengueウイルス 1 型完全長 cDNA クローンの作成およびウイルス産生系の確立。 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

名和優、高崎智彦、赤塚俊隆、伊藤美佳子、倉根一郎。 Dengue血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討。 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

Tajima Shigeru, Tomohiko Takasaki, Yuki Eshita, Ichiro Kurane. Characterization of Yokose virus, a Flavivirus, which was isolated from the Bat in Japan. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

Yuki Eshita, Tomohiko Takasaki, Shunro Imura, Yukinori Uchida, Ikuo Takashima, Ichiro Kurane. Diagnostics dengue and West Nile viruses in mosquitoes. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

高崎智彦。 わが国におけるアルボウイルス感染症の現状。 第 7 回近畿熱帯医学研究

会（京都市；京都大学東南アジア研究センター） 2004/12/4

表1

渡航先	年齢	性別	ウイルス型
Haiti(Port Au Prince)	39	M	D4
Thailand(Mae Hong Son)	25	M	D2
Indonesia	59	M	-
Sri Lanka	32	M	D2
Philippines(Palawan Is.)	33	M	D2
Micronesia(Yap island)	41	F	D1
Micronesia(Yap island)	50	M	-
Micronesia(Yap island)	20	F	-
Philippines(Manila)	35	F	-
Micronesia(Yap island)	22	F	D1
Myanmar	35	F	-
Micronesia(Yap island)	17	M	-
Philippines	12	F	-
Thailand	21	M	-
Philippines	4	M	D4
Malaysia(Sarawak)	28	M	D1
Micronesia(Yap island)	31	M	D1
Philippines	34	M	D1
Micronesia(Yap island)	37	F	D1
Nepal	32	M	D2

表2

Yap島からのデング熱集団発生(2004年8月)

ID	Age	Sex	Residence	診断根拠
1	41	F	東京都	ウイルス分離 D1(+), IgM(+)
2	50	M	東京都	IgM(+)
3	20	F	東京都	IgM(+)
4	22	F	広島県	ウイルス分離 D1(+), IgM(+)
5	17	M	栃木県	IgM(+)
6	NA	NA	滋賀県	抗体検査(熱研)
7	NA	NA	千葉県	聞き取りのみ

表3

Yap島からのデング熱輸入症例 (2004年9月)

ID	Age	Sex	Residence	診断根拠
8	37	F	長野県	IgM、ウイルス分離(D1)
9	31	M	東京都	IgM、ウイルス遺伝子(D1)

図1

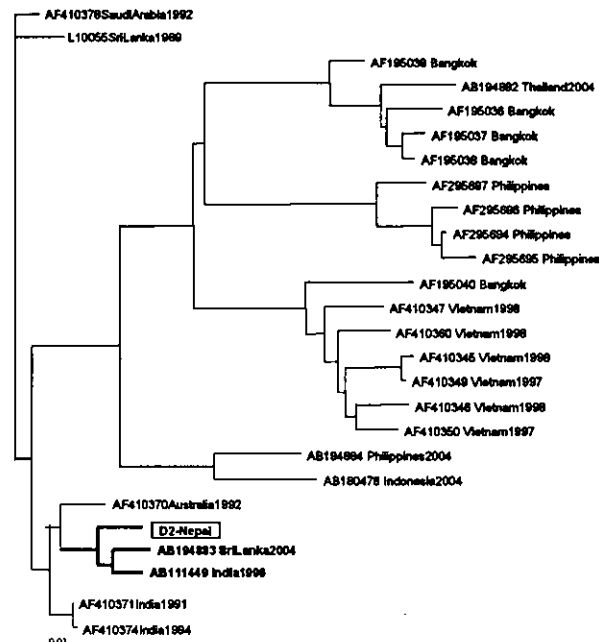


図2

図2は、国立感染症研究所ウイルス第一部のホームページ「デング熱に関する国立感染症研究所ウイルス第一部のホームページ」のスクリーンショットを示している。このページは「デングウイルス感染症の現状」をテーマとして、2005年と2004年のデング熱の発生状況について報告している。

ページのタイトルは「デングウイルス感染症の現状」である。本文は、2005年の発生状況を最初に紹介している。2005年、当室で検査した輸入デング熱/出血熱症例数は以下の通りである。

月	渡航先	患者数	ウイルス型
1	インドネシア	1	3型
1	シンガポール	1	3型
1	インドネシア	2	3型

月別検体を受けた月です。
 ・は遺伝子解析の結果、インドネシアの株であると考えられます。

＜海外流行情報＞2005年3月
 インドネシア、マレーシア、東チモール、タイでデング熱が流行しています。台湾南部でも患者が報告されています。現在、当室の伊藤研究室がWHOの要請で東チモールに派遣中です。

＜注＞東チモールの主たる流行株は3型ですが、2型も小流行していることが判明しました。

次に2004年の発生状況を紹介します。

月	渡航先	患者数
1	ハイチ	1
7	タイ	1
7	インドネシア	1
7	スリランカ	1
8	フィリピン	3
8	インドネシア	5

このスクリーンショットは、ウェブブラウザの表示領域に収められており、アドレスバーには「http://www.niid.go.jp/niid/IDU/IDUmain.htm」と表示されています。また、ページの下部には「デング熱に関する国立感染症研究所ウイルス第一部のホームページ」というリンクが記載されています。

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討

分担研究者 名和 優(埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス1部)

伊藤美佳子(国立感染症研究所ウイルス1部)

倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス1部)

研究要旨 デング感染における患者血清中の IgA 抗体を検出し、デング血清診断への応用を検討した。デング流行地へ旅行し、帰国後にデングウイルス感染を疑われた日本人 62 症例、94 血清検体を用いて、血清中の IgA 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法(IgA-ELISA)を確立した。対照として用いた日本脳炎患者血清中の IgA 抗体は日本脳炎ウイルス特異的に反応したが、日本人デング患者血清中の IgA 抗体は、デングウイルス抗原および日本脳炎ウイルス抗原に反応した。デング患者血清中の IgM 抗体は 50 日後まで検出されたが、IgA 抗体は発熱 23 日以後検出されなかった。抗デングウイルス IgA 抗体陽性検体は、すべて抗デングウイルス IgM 抗体陽性であった。デングを疑われた日本人患者血清中の IgA 抗体検出は、検査時点に近い時期におけるデングウイルス感染を示すと考えられた。

A. 研究目的

デングは熱帯・亜熱帯地域に流行するウイルス感染症で、世界保健機関によれば年間数百万人の患者発生と、数万人規模の死亡があると推計されている。本研究事業の実施により、1999 年以後毎年 50 例以上の日本人海外旅行者のデングが診断され、新興感染症あるいは輸入感染症としての重要性が認識されている。

本研究の目的は、デングの血清診断に応用する目的で開発された抗デングウイルス IgA 抗体検出のための酵素免疫吸着測定法(IgA-ELISA)を確立し、その有用性の検討であった。一般にデングの診断は、発熱後 5 日間程度の急性期では血清中よりウイルス遺伝子 RNA の検出により確定診断および感染ウイルスの同定が可能である。それ以後の回復期では、主とし

て血清中のデングウイルス特異的 IgM 抗体検出で診断可能であった。

これまでの我々の研究より、日本人のデング感染症例ではシングル血清検体を用いた診断が中心的であって、ウイルス遺伝子検出の不可能な時期に採血された症例では血清中の IgM 抗体検出による血清診断を実施した。しかしながら、血清中のデングウイルス特異的 IgM 抗体は、発熱 50 日後まで検出された例があり、感染時期の推察が必要とされる場合には困難であった。

本研究の目的は、日本人デングウイルス感染症例の血清学的診断方法の確立を目的とし、患者血清中の IgA 抗体応答を観察し、もって診断基準の設定に寄与する。

B. 研究方法

IgA-ELISA は、本研究事業による補助金を得て開発され、既に論文発表された方法を応用した(Nawa et al. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 2000; Nawa et al. *Journal of Virological Methods*, 92, 2001; Takasaki et al. *Journal of Virological Methods*, 102, 2002)。

1型~4型のプロトタイプデングウイルスおよび日本脳炎ウイルス JaGAr01 株は蚊由来 C6/36 cell へ感染し、4~5 日後の感染培養上清をベータプロピオラクトン不活化 4 価抗原として用いた。研究に用いた血清検体は、国立感染症研究所ウイルス 1 部にてデング感染の診断に供された日本人海外旅行者血清の 62 症例(94 検体)であった。

(倫理面への配慮)

ヒト血清検体の使用に際しては、予め研究目的で使用されることが同意されたもので、かつ、2重盲験法で個人情報の漏洩を防止した。

C. 研究結果

1) IgA-ELISA の測定条件の設定(図 1)

IgA-ELISA の反応原理は、被検血清中のデングウイルスに対する IgA 抗体を抗ヒト IgA ヤギ抗体(IgG)で捕捉する。抗ヒト IgA ヤギ IgG を 1.0 μ g/ml に濃度調整し、反应用 96 ウェル ELISA プレートに分注(0.1 ml/well)した。プレートを洗滌後、固相表面を 10%仔ウシ血清加 PBS でブロッキングした。

デングウイルス特異的 IgM 抗体陽性、

および陰性の患者血清を 1:50 より 1:6400 まで 2 倍階段希釈し、0.1 ml/well に分注し反応した。固相に捕捉された被検血清中の IgA 抗体と、不活化デングウイルス抗原とを反応させた。最後にヒト IgA 抗体と反応したウイルス抗原を、酵素標識したフラビウイルス特異的単クローン抗体 4G2 IgG で検出し、吸光度を測定した。

A は IgM 抗体陽性血清で得られた結果を、B は IgM 抗体陰性血清で得られた結果を示す。A、B ともに●はウイルス抗原、○は未感染コントロール抗原との反応で得られた吸光度(A492)を示す。IgM 抗体陽性血清(図 1 A)では、血清の希釈率に比例して IgA 抗体とウイルス抗原との反応で得られた吸光度が低下した。吸光度は 1:50 ~ 1:400 までプラトーを示した。一方 IgM 抗体陰性血清(図 1 B)では、血清希釈に比例した吸光度変化は観られたものの、未感染コントロール抗原と同程度で、IgA 抗体とデングウイルス抗原との特異的反応は観察されなかった。

以上の測定結果より、IgA-ELISA における被検血清の希釈率を 1:400 とした。

2) IgA-ELISA スクリーニングテストにおける Cut off 値の決定(図 2)。

IgA-ELISA スクリーニングテストでは、被検血清希釈 1:400 における吸光度を基に、ウイルス抗原および未感染コントロール抗原で得られた吸光度比(P/N ratio)で表示する。デング流行地へ旅行歴のない日本人のうち、日本脳炎ウイルスに対

する HI 抗体陽性者および陰性者の各 16 名、およびデング常在地の台湾人 16 名の血清を用いて、IgA-ELISA を行った。血清希釈 1:400 で得られた吸光度の P/N ratio を表示した。

日本人血清では、日本脳炎ウイルス HI 抗体の保有と無関係に、デングウイルス抗原に対する IgA-ELISA 結果は P/N ratio 2 未満であった。一方台湾人血清では、P/N ratio は 6 以上を示した。測定結果より IgA-ELISA スクリーニングテストの Cut off 値を P/N ratio+2SD として、2.0 と決定した。

3) 94 血清検体における IgA-ELISA 測定結果(表 1)。

62 症例 94 検体の血清を用いて、IgA-ELISA (1:400)および IgM-ELISA (1:100)のスクリーニング結果を示す。血清希釈率 1:400 における IgA 抗体陽性検体数は 23 件で、IgA 抗体陰性は 71 件であった。他方、同一検体を血清希釈率 1:100 で IgM-ELISA を行ったときの IgM 抗体陽性および陰性検体数は、それぞれ 73 件と 21 件であった。IgA および IgM ともに陽性を示した検体数は 94 件中 23 件であった。IgA-ELISA での抗体検出率は 24.5% (23/94)、IgM-ELISA での抗体検出率は 77.6% (73/94)であった。日本人デング患者血清における IgA 抗体検出率は、IgM 抗体の検出率と比較して 1/3 と低かった。しかしながら、IgA 抗体陽性検体がすべて IgM 抗体陽性であったこと。および IgA

抗体陽性で IgM 抗体陰性と判定された検体数が 0 であったことから、IgA-ELISA を IgM-ELISA の補助的診断法として応用できると考えられた。

4) 日本人デング患者血清の IgA および IgM 抗体の消長(図 3)。

採血時の発熱後日数(病日)の判明した 73 件の被検血清を用いて、IgA 抗体および IgM 抗体検出結果を示した。対照として測定した IgM 抗体は 6 病日以後検出され、50 病日まで検出された検体があった。IgA 抗体は 6 病日以後に検出されたが、陽性検体の出現のピークは 9~14 病日にあつて、23 病日以降に検出された検体はなかった。

観察結果より、患者血清中の IgA 抗体産生は IgM 抗体と同時期に検出レベルに達するものの、血中における持続期間は IgM 抗体より短期間で、おおよそ 2 週間程度で検出限界以下に低下するものと考えられた。表 1 の結果と合わせて、デング患者血清中より IgA 抗体が検出された場合、発熱後 3 週間程度の期間内に感染を受けた可能性が高いと考えられた。

5) デングウイルスに対する IgA および IgM 抗体の抗原特異的反応性(図 4)。

日本は日本脳炎の常在地域であり、患者発生は年間 10 名以下であるものの、日本人の日本脳炎ウイルス抗体の保有率はワクチン接種と自然感染を合わせて全年齢平均 70%以上ある(神戸大、小西、未発

表成績、2005)。したがって日本人のデングウイルス感染では、抗原交差反応性を有する日本脳炎ウイルスに対する二次免疫応答の出現が否定できない。デングウイルス感染診断法として IgA-ELISA を採用するに際し、血清中の IgA 抗体のウイルス特異的反応性を観察した。

対照として真性日本脳炎患者(日本人)血清 22 検体(22 症例)を用いて、デングウイルス抗原および日本脳炎ウイルス抗原と反応させた。

A は真性日本脳炎患者血清および日本人デング患者血清中の IgA 抗体と、日本脳炎ウイルスおよびデングウイルス抗原との反応を示す。日本脳炎患者血清中の IgA 抗体は日本脳炎ウイルス特異的であったが、日本人デング患者血清中の IgA 抗体は日本脳炎ウイルスおよびデングウイルスに交差反応性を示した(図 4 A)。

B は患者血清中の IgM 抗体とウイルス抗原に対する特異的反応性を示す。検体数はそれぞれ 22 例であった。日本脳炎患者およびデング患者の IgM 抗体は、日本脳炎ウイルスおよびデングウイルスに対してそれぞれ感染ウイルス特異的に反応した(図 4 B)。

以上の結果より、日本人デング患者血清中 IgA 抗体の応答は、日本脳炎ウイルスに対する二次免疫応答と考えられた。

D. 考察

デングの診断は感染症診断の一般法則にならない、患者体内よりデングウイルス

を分離同定する。ウイルスの検出可能な時期を過ぎた場合、IgM 抗体の検出でデングの診断が可能であることはすでに公表した。今回、日本人のデングウイルス感染の血清診断を目的として、血清中の IgA 抗体を ELISA で検出した。患者血清中の IgA 抗体消長の観察では、発熱 23 日以後に検出限界以下に低下した。これに比較して、発熱 50 日の血清検体中に IgM 抗体の検出された例があった。

デング血清診断における IgA 抗体検出意義は、血清中に検出される期間(日数)が IgM と比較して短期間であることと言える。デング常在地における感染後の血清疫学的解析に有用な方法となると考えられる。

E. 結論

デングの血清診断を目的に確立した IgA-ELISA は、感染時期の推定に役立つと言えた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

本研究内容は、第 52 回日本ウイルス学会総会〔平成 16 年 11 月、横浜市〕において発表された。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

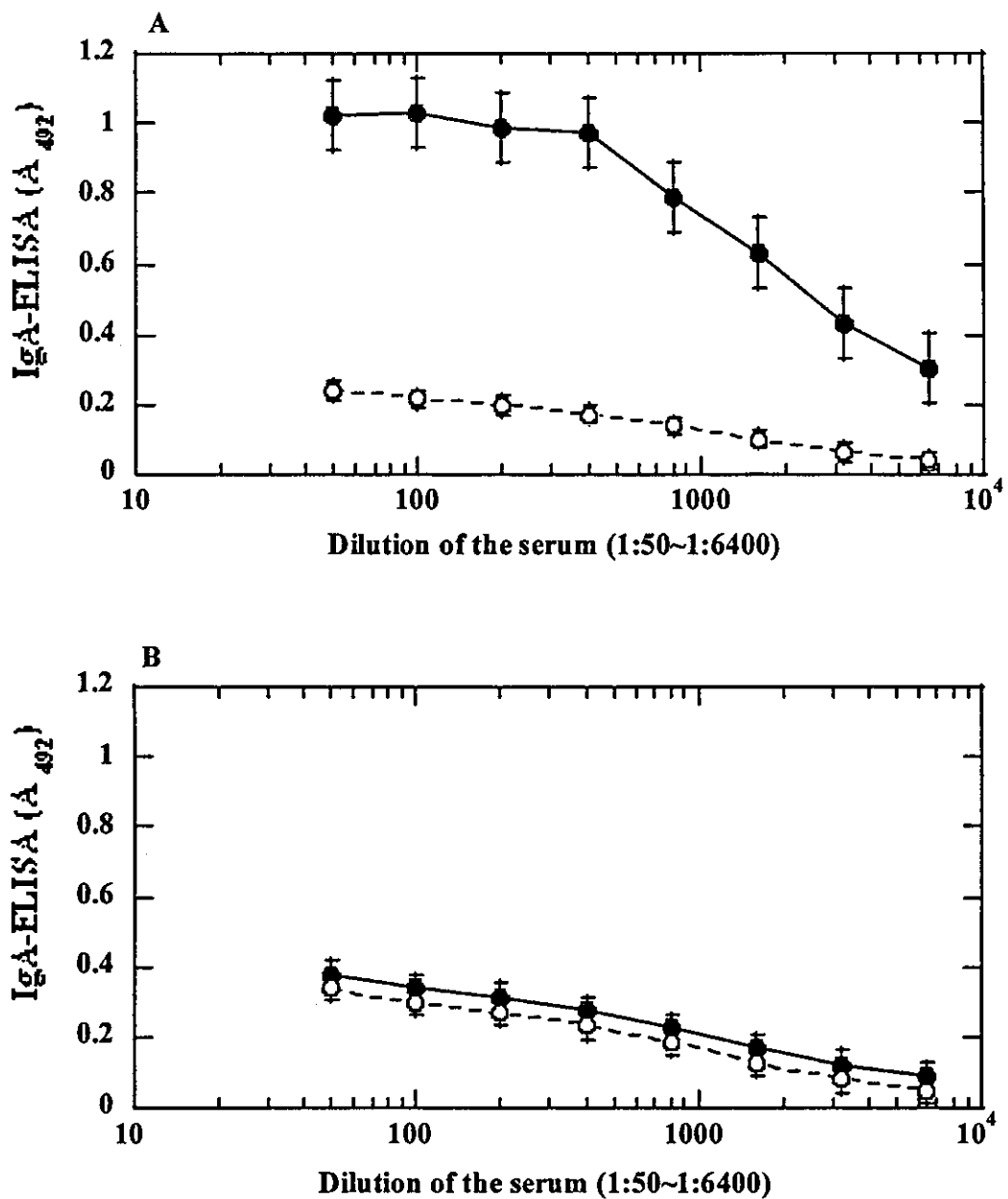


図1 IgA-ELISAの測定条件の設定

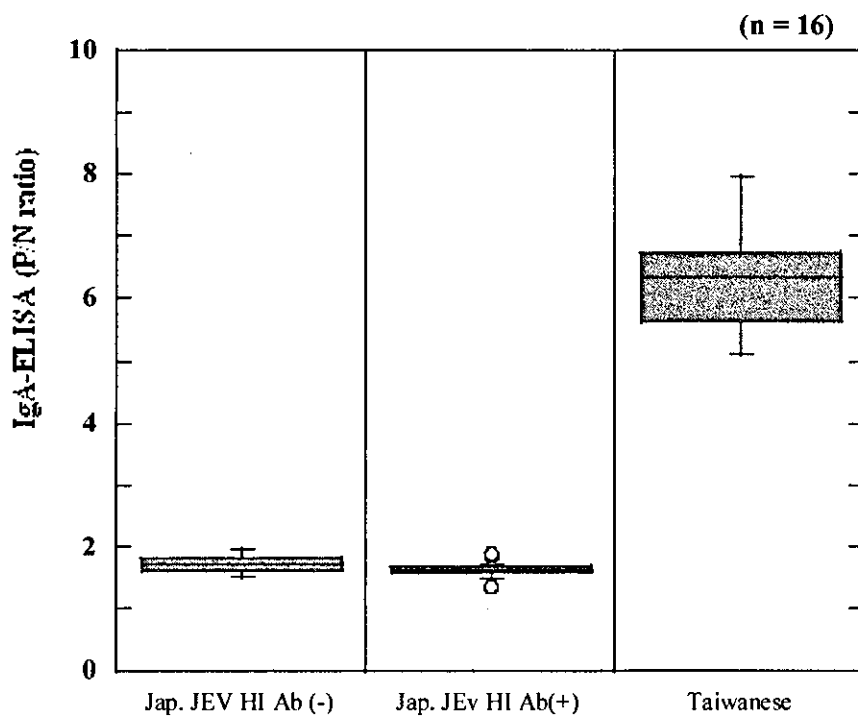


図2 IgA-ELISAスクリーニングテストにおけるCut off値の決定

表 1 94 血清検体における IgA-ELISA 測定結果

IgA-ELISA	IgM-ELISA		Total
	Positive	Negative	
Positive	23	0	23
Negative	50	21	71
Total	73	21	

Data indicate as number of serum samples.

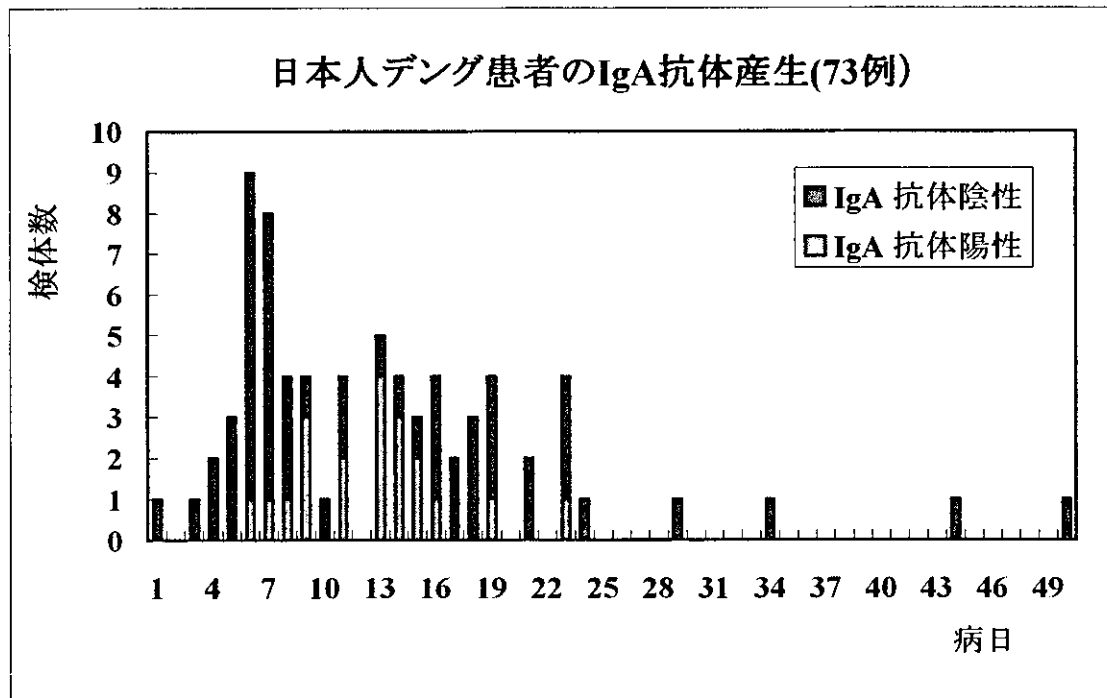
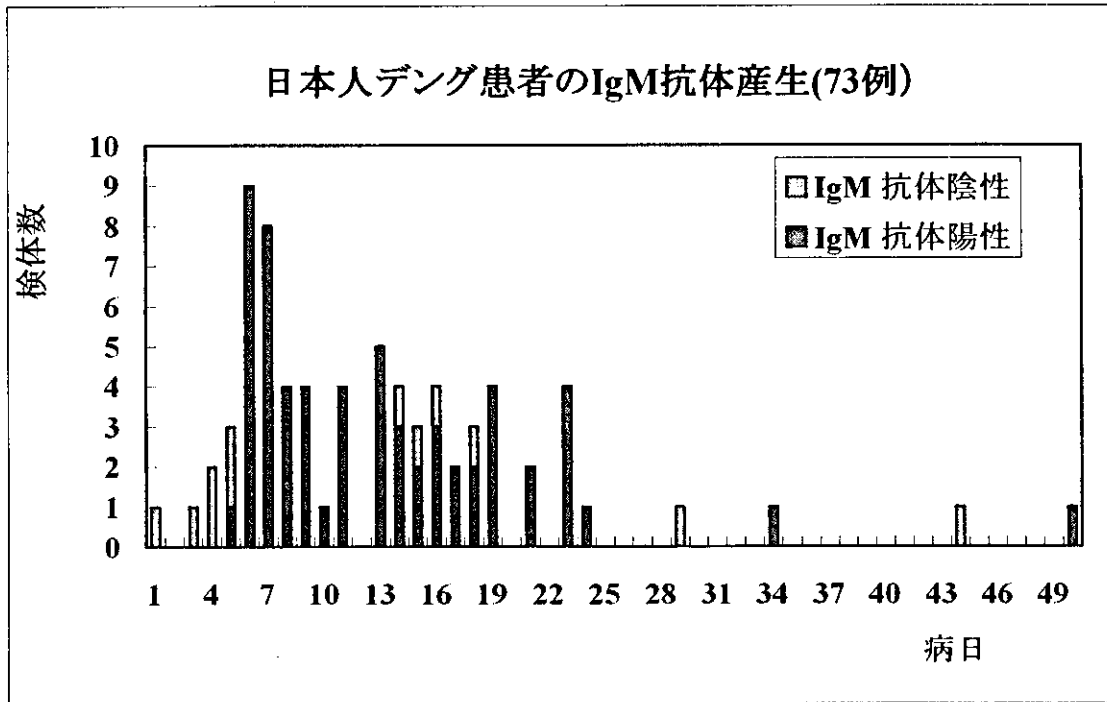


図3 日本人 Dengue 患者血清の IgA および IgM 抗体の消長

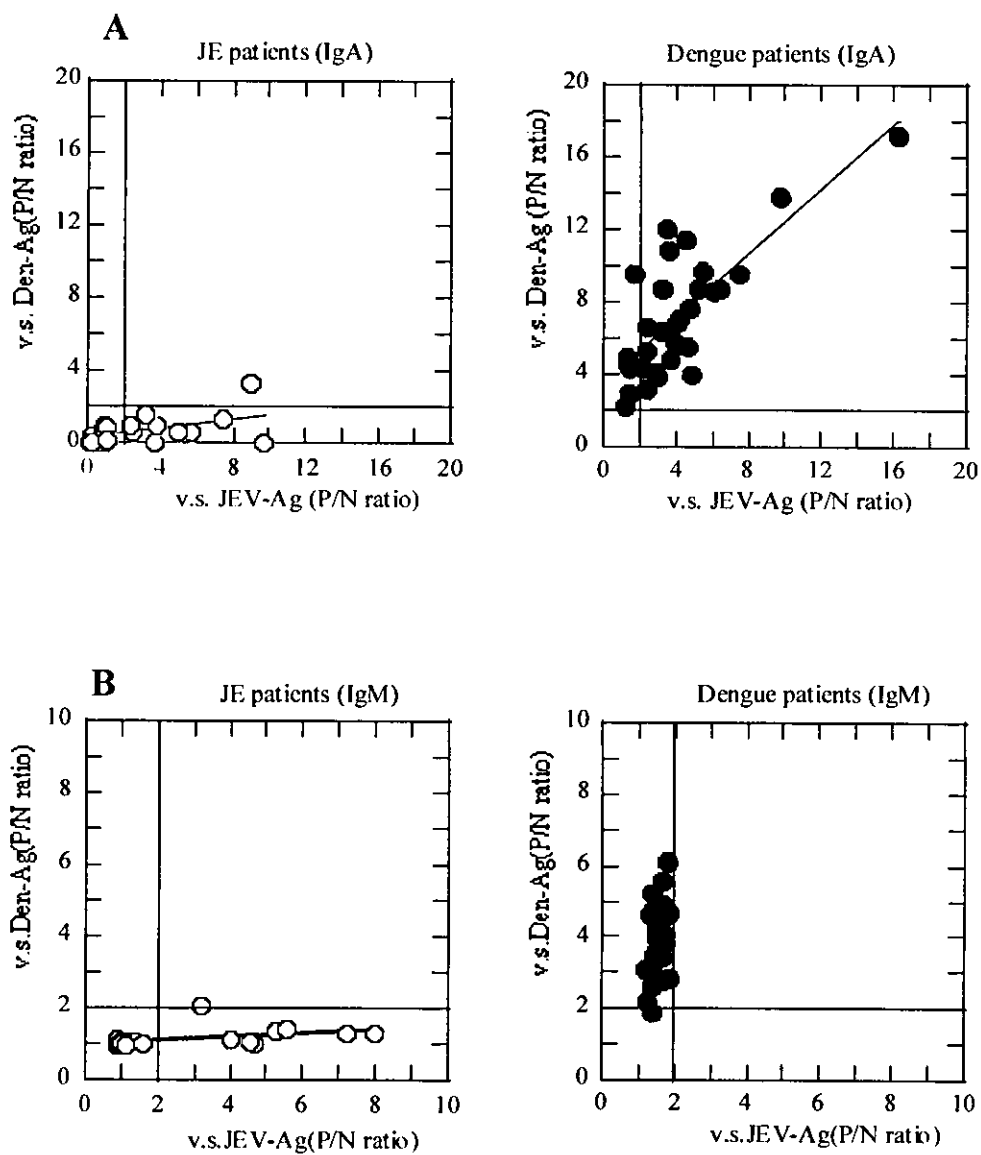


図4 デングウイルスに対する IgA および IgM 抗体の抗原特異的反応性

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：現在、熱帯地域において猛威をふるっており我が国にとっては輸入伝染病として重要な Dengue 熱の迅速診断法の開発を実施した。今回用いた技術は近年日本において発明された Loop Mediated Amplification (LAMP)法を採用した。この方法は従来用いられている病原体遺伝子検出方法である PCR 法と比較して 1)特異性が高い、2)感度が高い、3)検出時間が半分以下である、4)特殊な機械を必要としない、などの優れた特徴をもっている。今回この方法を用いて Dengue ウイルス遺伝子検出系を試作し従来の PCR 法と比較した結果、4 つある Dengue ウイルス血清型のそれぞれ特異性を持ち、日本脳炎ウイルス遺伝子や西ナイルウイルスと交叉反応を示さない検出系が作成できた。また蛍光発色による検出も可能であった。以上のことから、今回作製した RT-LAMP 法による Dengue ウイルス検出方法は開発途上国でも利用可能なウイルス診断技術として有用であることが示唆された。

A. 研究目的

現在 Dengue ウイルス感染症はアジア、中南米の熱帯地域において猛威をふるっており世界保健機関は全世界では年間約 2000 万人の人々が Dengue ウイルスに感染していると見積もっている。これに伴って我が国でも熱帯地域からの旅行者に Dengue 感染が輸入感染症としてしばしば観察される。また熱帯地域においては従来型の病型である比較的軽症の Dengue 熱に加えて極めて重症でときには致死的な Dengue 出血熱が増加傾向にある。この熱帯地域最大の蚊媒介性ウイルス感染症の迅速診断を改良して開発途上国でも利用可能な手法を確立することは重要である。また、地球温暖化にともない現在 Dengue 流行地域は増大傾向にある。わが国の近隣諸国では、ここ数年、台湾、香港、マカオ、中国の広東省まで流行が拡大してきており、我が国も末端の病院レベルの検査室で迅速診断可能なシステムが必要である。本研究では開発途上国や我が国においては一般病院で利用可能な迅速 Dengue 遺伝子検出系を確立することを目的としている。

B. 研究方法

1) プライマーの設計には基本ソフトとして Netlaboratory を利用した。プライマーの配列は表 1 に一括して示した。プライマーは HPLC 精製した物を用いた。

2) RT-LAMP 法

RT-LAMP 増幅は 1)でデザインしたプライマーを用いて 栄研化学社の Loopamp DNA amplification キットを用い、25 μ l の反応系で 63°C、60 分反応させ、反応産物をアガロース電気泳動と Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan)を用いて反応産物濁度を測定する方法で実施した。反応系の組成条件は FIP と BIP プライマー (50 pmol)、F3 と B3 プライマー (5 pmol)、F と loop B プライマー (25 pmol) 1400 μ M 各 dNTP, 0.6 M betaine (Sigma, USA), 40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 8mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 0.125 U of AMV-RT (Invitrogen, USA), 8 U *Bst* DNA polymerase large

(表1) デングRT-LAMPプライマー一覧表

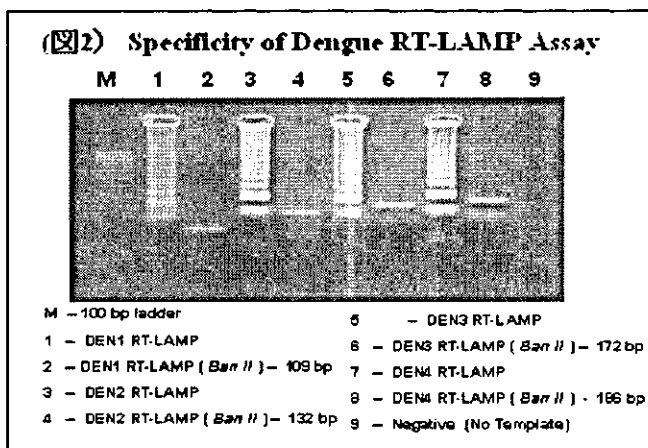
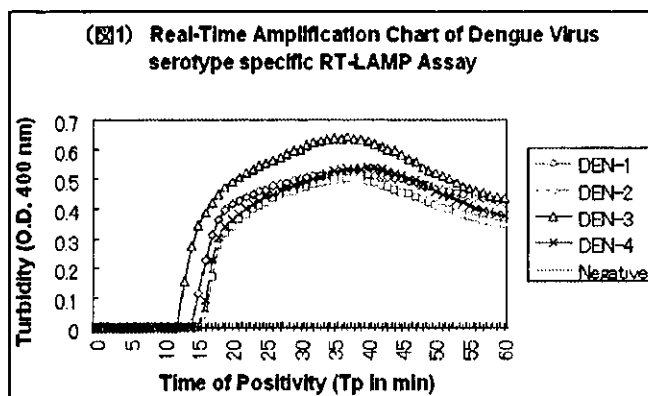
Name of the Primer	Genome Position (3' UTR)			
	DEN-1 (10,463-10,567) 199bp	DEN-2 (10,443-10,553) 211bp	DEN-3 (10,289-10,506) 218bp	DEN-4 (10,289-10,517) 229bp
Forward Outer (F3)	10,463-10,487	10,443-10,466	10,289-10,307	10,289-10,306
Backward Outer (B3)	10,667-10,648	10,653-10,642	10,506-10,490	10,517-10,500
Forward Internal primer (FIP) [F1c+TTTT+F2]	F1c 10,552-10,531	10,530-10,511	10,376-10,355	10,375-10,353
	F2 10,489-10,506	10,470-10,489	10,310-10,328	10,312-10,329
Backward Internal primer (BIP) [B1+TTTT+B2c]	B1 10,557-10,576	10,568-10,588	10,399-10,418	10,424-10,443
	B2c 10,629-10,612	10,640-10,621	10,475-10,457	10,491-10,474
Forward Loop Primer (FLP)	10,525-10,508	10,509-10,493	10,354-10,331	10,349-10,333
Backward Loop primer (BLP)	10,583-10,600	10,600-10,616	10,450-10,446	10,445-10,441

fragment (New England Biolabs) でありここに、ウイルス RNA を混合する方法で行った。

C. 結果

1) デングウイルス遺伝子の RT-LAMP 法による遺伝子増幅。

今回設計したプライマーにより 4 つの血清型のデングウイルスの遺伝子は RT-LAMP 法により検出された (図1)。ウイルス RNA を入れない反応では非特異的な産物は形成されなかった。精製産物の DNA を直接塩基配列を解読したところそれぞれのデングウイルス遺伝子が増幅されていることが確認された。また簡便法として特異的制限酵素 (BanII) で分解すると増幅産物はすべて 1 本もバンドとなった。このことから本デング RT-LAMP 法はデングウイルス遺伝子を増幅していることを証明した (図2)。さらにデングウイルス相互および他のフラビウイルス (JEV: 日本脳炎ウイルス、WNV: ウェストナイルウイルス、SLE: セントルイス脳炎ウイルス) の遺伝子に対して非特異反応も認めなかった。その結果を表 2 に示す。



(表2) Specificity of Dengue RT-LAMP Assay

Virus Type	Dengue RT-LAMP Primer Sets			
	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4
DEN-1	+	-	-	-
DEN-2	-	+	-	-
DEN-3	-	-	+	-
DEN-4	-	-	-	+
JEV	-	-	-	-
WNV	-	-	-	-
SLE	-	-	-	-

(それぞれのプライマーはそれぞれの型のデングウイルス遺伝子のみ増幅している)

2) デングウイルス特異的 RT-LAMP 法と RT-PCR 法の感度比較。

従来から開発されていた RT-PCR 法と今回開発した RT-LAMP 法のデングウイルス遺伝子検出法、および培養細胞を用いてのウイルス分離法によるウイルス検出をフィリピンおよびバングラデシュ、インドの患者サンプルを用いて比較検討した。その結果を表3に示す。今回開発した RT-LAMP 法は感度、特異性ともに良好な結果が得られた。

(表3) Comparison of RT-LAMP, RT-PCR and virus isolation

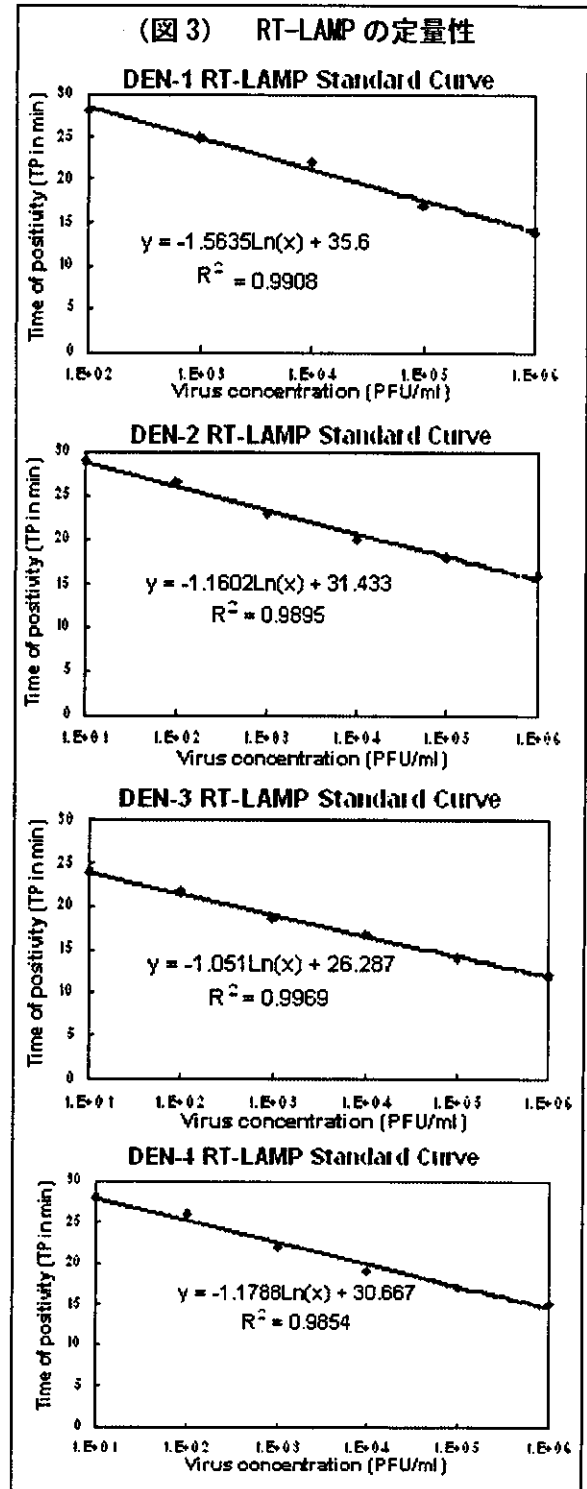
Type of cases	Virus Serotype	No. of Samples	Number of Positive samples			
			RT-LAMP	RT-PCR	Nested PCR	Isolation
Confirmed ^a	DEN-1	5	5	5	NA	4
	DEN-2	13	13	13	NA	12
	DEN-3	6	6	6	NA	4
	DEN-4	1	1	1	NA	1
Suspected ^c	-	38	6	2	4	4
Healthy	-	20	0	0	NA	NA
Total Positive		83	31 37%	27 33%		25 30%

Concordance - 100%, Sensitivity - 100%, Specificity - 93%

3) リアルタイム RT-LAMP と定量性

63°Cでのインキュベーションと濁度測定が同時に出来る Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan)を用いて RT-LAMP を用いたリアルタイムでのデングウイルスの遺伝子検出について評価を行った。各濃度に希釈したデングウイルス RNA を同時に RT-LAMP 法にかけ経時的にその濁

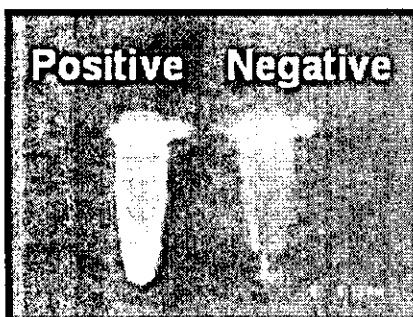
度を測定した。その結果、検出開始(反応開始)時間は鋳型ウイルス RNA の量に相関して、即ち RNA の量が多いほど検出開始時間が短くなり図3のように立ち上がり時間を測定することで極めて良好な定量的検査が可能であることが示された。



4) 蛍光物質を使った簡易診断法

より簡便な RT-LAMP 法による Dengue ウイルス検出方法として増幅 DNA を蛍光発色させて観察する手技を検討した。その結果、RT-LAMP 法では増幅産物が極めて多量であるために 63°C で反応後のチューブにサイバークリーンを添加して UV 照射下に観察した。結果を (図 4) に示す。このことから本 RT-LAMP 法は恒温水槽さえあれば感度の高い遺伝子検出系として利用できることが示された。

(図 4) 蛍光による遺伝子増幅産物の確認



D. 結論

- 1) RT-LAMP 法を用いた新しい Dengue ウイルス遺伝子検出系が確立された。
- 2) RT-LAMP 法による検出時間は 40 分以内であり、検出時間の短縮が図られた。
- 3) 今回設計した LAMP プライマーでは日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、西ナイルウイルスなどの Dengue ウイルスと近縁なフラビウイルスとの交叉は認められず極めて特異性の高い結果となった。
- 4) 本遺伝子増幅方法は Dengue ウイルス血清型特異的な検出系であることが確認できた。
- 5) 本遺伝子増幅方法は蛍光観察による反応産物の確認が可能であった。

E. 考察

熱帯地域には Dengue ウイルス感染と同様な症状を示す感染症が多いことからその確定診断は容易ではない。しかし、急性期の患者を正確に診断することは治療のみならず輸入伝染病対策を実施のために保健行政上も重要である。また臨床的には近年、日本人でも重症型の Dengue 出血熱患者の発生が見られ発熱、血小板減少を示す輸入感染症例ですばやく原因となる病原体を同定できるか否かは予後を大きく左右する因子ともなる。

今回、開発した手法の最も重要な点はこの方法が高価な検出機器がなくとも利用可能な点である。従って、この方法が普及すれば開発途上国の検査室でも、あるいは日本など先進国でも末端の病院の検査室レベルで Dengue 感染の一次検査が可能となる。今後、実用化に向けての種々の安定性試験、Dengue ウイルス流行地域の Dengue ウイルス株間の塩基配列の差異による検出効率の差異などを検討する必要がある。

F. 研究発表

1) 論文発表

Edward Gitau Matumbi Mathenge, Maria del Carmen Parquet, Yasutomo Funakoshi, Seiji Houhara, Pooi Fong Wong, Akitoyo Ichinose, Futoshi Hasebe, Shingo Inoue, Kouichi Morita. Fusion PCR generated Japanese encephalitis virus/dengue 4 virus chimera exhibits lack of neuroinvasiveness, attenuated neurovirulence, and a dual-flavi immune response in mice. *Journal of General Virology*. Vol. 85: 2503-2513, 2004.

Nga PT., Parquet MC, Cuong VD, Ma S-P., Hasebe F, Inoue S, Makino Y, Takagi M, Nam VS and Morita K. Shift in JEV genotype circulating in northern Vietnam: Implication for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia.