

# TaqMan PCR 法によるクリミア・コンゴ出血熱 高感度診断法

分担研究者 西條政幸(国立感染症研究所ウイルス第1部主任研究官)  
協力研究者 森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第1部第1室室長)  
倉根一郎 (国立感染症研究所ウイルス第1部部长)  
唐 青 (中国ウイルス性疾患予防対策センター)

研究要旨:クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの S-遺伝子の塩基配列に基づいて, TaqMan PCR 法のためのプライマーおよびプローブを設計し, 高感度にクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの遺伝子を定量的に測定するための TaqMan PCR システムを開発した. 今回開発された TaqMan PCR 法では, 高感度に, 定量的に, しかも, より迅速にクリミア・コンゴ出血熱患者血清中のクリミア・コンゴ出血熱ウイルス遺伝子を増幅し検出することが可能であった. しかし, nested RT-PCR 法に比較して若干感度が劣る. 本法はクリミア・コンゴ出血熱の診断のみならず, クリミア・コンゴ出血熱患者における病勢の判定に有用と考えられた.

## A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱 (Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF) は, ブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される CCHF ウイルスによる感染症で, 致死率の高いウイルス感染症の一つである. ヒトは感染ダニ (*Hyalomma* 属) に咬まれたり, ウイルス血症を伴う感染動物 (ヒツジなど) の血液や体液に接触したりして CCHF ウイルスに感染する. また, ヒトからヒトへの感染もまれではなく, CCHF 患者の治療にあたった医療関係者が患者から CCHF ウイルスに感染する院内感染例も報告されている. さらに, 抗 RNA ウイルス薬のひとつであるリバビリンが, CCHF の治療に有用であるとの報告もある.

CCHF はエボラウイルス感染症などとともに, 感染症新法 (感染症の予防及び感染症患者に対する医療に関する法律) で 1 類感染症に分類される. そのため, 高い感度と精度を有する診断法の開発が必要である. また, CCHF の迅速診断は, 感染拡大の防止や治療に重要である.

クリミア・コンゴ出血熱の遺伝子診断には, 一般的には S-遺伝子の部分遺伝子を, nested RT-PCR 法で増幅する方法が用いられている. つまり, PCR のステップが 2 回必要で, かつ, 疑陽性の成績を呈する可能性が高い方法と考えら

れる. そこで, 本研究ではより迅速にしかも定量的にクリミア・コンゴ出血熱ウイルス部分遺伝子を増幅するための TaqMan PCR 法を開発し, 診断における有用性を検討した.

## B. 方法

- 1) 血清. 2002年の4月から6月にかけて中国新疆ウイグル自治区において発生したクリミア・コンゴ出血熱の流行時に計12名のクリミア・コンゴ出血熱疑い患者から採取された血清を用いた.
- 2) TaqMan PCR: Forward プライマーには 5'-GCAGGAACCATTAATCTTG-3' を, reverse primer には 5'-TGCAITGACACGAAAACCTA-3' を用いた. また, TaqMan プローブには 5'-CTCCACTTGAGAGCAGCCTGTTGGT-3' を用いた. これらのプライマーおよびプローブは, S-遺伝子をターゲットとして設計された. 血清から Viral Nucleic Acid Purification Kit (Roche Diagnostics 社) を用いて RNA を抽出した. 抽出された RNA をテンプレートとして, random hexamer をプライマーとして ready-to-go RT-PCR キット

(Promega社)を用いて reverse transcription反応によりcDNAを作製した。作製されたcDNAが含まれる反応液5  $\mu$ lをサンプルに、LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probe および LightCycler-PCR システム (Roche Diagnostics社, Mannheim, ドイツ)を用いてサンプル中に含まれるクリミア・コンゴ出血熱遺伝子を定量的に検出した。ただし、遺伝子検出感度を決定するための標準遺伝子には、濃度が決定されているクリミア・コンゴ出血熱ウイルスS-遺伝子の挿入された pGEM-T-easyベクターを用いた。

- 3) RT-PCR法. RT-PCR: 血清中のCCHFウイルス部分S-遺伝子は、先の報告に従い検出した (Clin Diagn Lab Immunol 10:489-491, 2003).
- 4) CCHFウイルスに対する抗体検出: CCHFウイルスの組換え核蛋白を抗原とした抗体検出システムを用いてCCHFウイルスに対する抗体を検出した (J Clin Microbiol 40:1587-1591, 2001; J Med Virol 75:295-299, 2005).

#### C. 結果

- 1) 患者:患者 12名は、発熱、関節痛、歯肉などからの出血蛍光などでクリミア・コンゴ出血熱を疑われ、巴楚人民病院に入院した。死亡例はなかった。9名は女性、1名が男性、2名が性別に関する記述なしであった。
- 2) TaqMan PCRとnested RT-PCR. 12名の急性期患者のうち6名から採取された血液から、nested RT-PCRによりクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムが増幅され、クリミア・コンゴ出血熱と診断された(図1A)。また、nested RT-PCRが陰性であったが、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスに対するIgM抗体陽性が確認されクリミア・コンゴ出血熱と診断された者が1例認められた。つまり、12名中7名がクリミア・コンゴ出血熱と診断された。Nested RT-PCRでクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノム陽性を呈した血清サンプルのうち4検体が、TaqMan PCR法でクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノム陽性と診断された(図1B)。Nested RT-PCR陽性であり、

TaqMan PCRで陰性と判定された血清は、nested RT-PCR法においても他の血清に比較して増幅されたウイルスゲノム量が少ないと考えられた。TaqMan PCR法陽性の患者4名の血清中に、 $6 \times 10^4 \sim 5 \times 10^9$ コピー/mlのウイルスゲノムが存在することが明らかにされた。

#### D. 考察

本研究では、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス中国株のS-遺伝子において、株間で比較的保存されている領域に forward プライマーと reverse プライマーを設計し、両プライマーが相補的結合をする部位の間の reverse プライマー側の部位に結合する TaqMan プロブを設計した。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス 66019株のS-遺伝子 (GenBank accession number, AJ010648) において、forward プライマー、reverse プライマーおよび TaqMan プライマーが結合する部位は、5'ポジションがそれぞれ 353番、465番、432番に相当する。この部位は比較的保存されている領域であり、今回設計されたプライマーおよびプロブを用いた TaqMan PCR法では、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの中国株の検出は可能であると考えられる。クリミア・コンゴ出血熱ウイルス中国分離株の遺伝子情報をもとに、感度を向上するためにはプライマーおよびプロブの設計が重要と考えられる。

実際 nested RT-PCR で陽性を示した6サンプル中4サンプルのみ TaqMan PCR で陽性を呈した。Nested RT-PCR で薄いバンドが認められ陽性と判定された血清は TaqMan PCR では陰性であり、Nested RT-PCR に比較すると若干感度が劣ると言わざるを得ない。

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのゲノム配列には、株間により(特にS-遺伝子の場合、地域によって)比較的高い相違が認められる。そのため、PCR法や TaqMan PCR法におけるプライマーおよびプロブの設計には更なる改善が必要である。

本診断法は、クリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムを定量的に測定することが可能であることから、クリミア・コンゴ出血熱の診断のみならず、病勢や治療効果の判定にも有効と考えられる。また、血清からウイルスゲノムの抽出および

び TaqMan PCR の反応の終了まで、ほぼ 2 時間以内で成績を得ることができ、この迅速性も本診断法の利点のひとつであろう。

世界各国で分離されたクリミア・コンゴ出血熱ウイルスのゲノム塩基配列情報が明らかになりつつあることから、それらの情報をもとに、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス多くの株を検出するためのシステムを準備することが求められる。

#### E. 結語

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムを定量的に、しかも、迅速に検出するための TaqMan PCR 法を開発した。本法は診断および病勢の判定に有用と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Morikawa S, Fukushi S, Mizutani T, Hasegawa H, Nagata N, Iwata N, Kurane I. Inhibitory effect of mizoribine and ribavirin on the replication of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus. *Antiviral Research* 66:159-63, 2005
- 2) Saijo M, Niikura M, Maeda A, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Characterization of monoclonal antibodies to Marburg virus nucleoprotein (NP) that can be used for NP-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Medical Virology* 76:111-118, 2005
- 3) Saijo M, Ogino T, Taguchi F, Fukushi S, Mizutani T, Notomi T, Kanda H, Minekawa H, Matsuyama S, Long HT, Hanh NTH, Kurane I, Tashiro M, Morikawa S. Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS. *Journal of Virological Methods* 125:181-186, 2005
- 4) Hatakeyama S, Moriya K, Saijo M, Morisawa Y, Kurane I, Koike K, Kimura S, Morikawa S. Persisting humoral anti-smallpox immunity among the current Japanese population after the discontinuation in 1976 of

routine smallpox vaccinations. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12:520-524, 2005

- 5) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Miyajima N, Taguchi F, Itamura S, Kurane I, Morikawa S. Vesicular stomatitis virus pseudotyped with severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *Journal of General Virology* 86:2269-2274, 2005
  - 6) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. JNK and PI3K/Akt signaling pathways are required for establishing persistent SARS-CoV-infection in Vero E6 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1741:4-10, 2005
  - 7) Saijo M, Tang Q, Shimay B, Han L, Zhang Y, Asiguma M, Tianshu D, Maeda A, Kurane I, Morikawa S. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever using a novel monoclonal antibody. *Journal of Medical Virology* 77:83-88, 2005
  - 8) Morikawa S, Sakiyama T, Hasegawa H, Saijo M, Maeda A, Kurane I, Maeno G, Kimura C, Yoshida T, Asahi-Ozaki Y, Sata T, Kurata T, Kojima A. An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *Journal of Virology* 79:11873-11891, 2005
2. 知的財産権の出願・登録(予定を含む)  
特許取得:該当なし
  3. 学会発表
    - 1) Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S. Importance of JNK and PI3K/Akt signaling pathways for establishing persistent SARS-CoV infection in Vero E6 cells. Xth International Nidovirus Symposium. 2005 年6月, Colorado Springs, CO, USA
    - 2) Nagata N, Iwata N, Hasegawa H, Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Harashima A, Morikawa S, Saijo

- M, Itamura S, Saito T, Odagiri T, Tashiro M, Ami Y, Sata T. Pathological and virological analyses of SARS-CoV infections in experimental animals. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
- 3) Fukushi S, Mizutani T, Saijo M, Matsuyama S, Taguchi F, Kurane I, Morikawa S. Pseudotyped vesicular stomatitis virus for functional analysis of SARS-CoV spike protein. Xth International Nidovirus Symposium. 2005年6月, Colorado Springs, CO, USA
  - 4) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, protects monkeys from monkeypox. XIIIth International Congress of Virology. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
  - 5) Saijo M, Ami Y, Nagata N, Hasegawa H, Fukushi S, Mizutani T, Iwata N, Suzaki Y, Sata T, Kurane I, Morikawa S. Protection of non-human primates from monkeypox by highly attenuated vaccinia vaccine, LC16m8, that lacks expression of B5R membrane protein. US-Japan Cooperative Medical Science Program 39th Virology Panel Meeting. 2005年7月, San Francisco, CA, USA
  - 6) 西條政幸, 網康至, 永田典代, 緒方もも子, 福士秀悦, 水谷哲也, 長谷川秀樹, 岩田奈織子, 佐多徹太郎, 倉根一郎, 倉田毅, 森川茂. LC16m8痘そうワクチンによるカニクイザルにおけるサル痘発症予防効果(続報). 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 7) 水谷哲也, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. SARSコロナウイルス感染細胞におけるAktリン酸化の重要性. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 8) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 森川茂. VSVシュードタイプを用いたSARS-CoV感染の解析. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 9) 永田典代, 岩田奈織子, 長谷川秀樹, 福士秀悦, 西條政幸, 森川茂, 佐藤由子, 佐多徹太郎. マウス, ラットを用いた経代によるSARS-CoVの病原性の変化. 第53回日本ウイルス学会学術集会. 2005年11月, 横浜
  - 10) 福士秀悦, 水谷哲也, 西條政幸, 倉根一郎, 森川茂. SARS-CoVスパイクタンパク質とACE2の相互作用のVSVシュードタイプを用いた解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005年12月, 博多

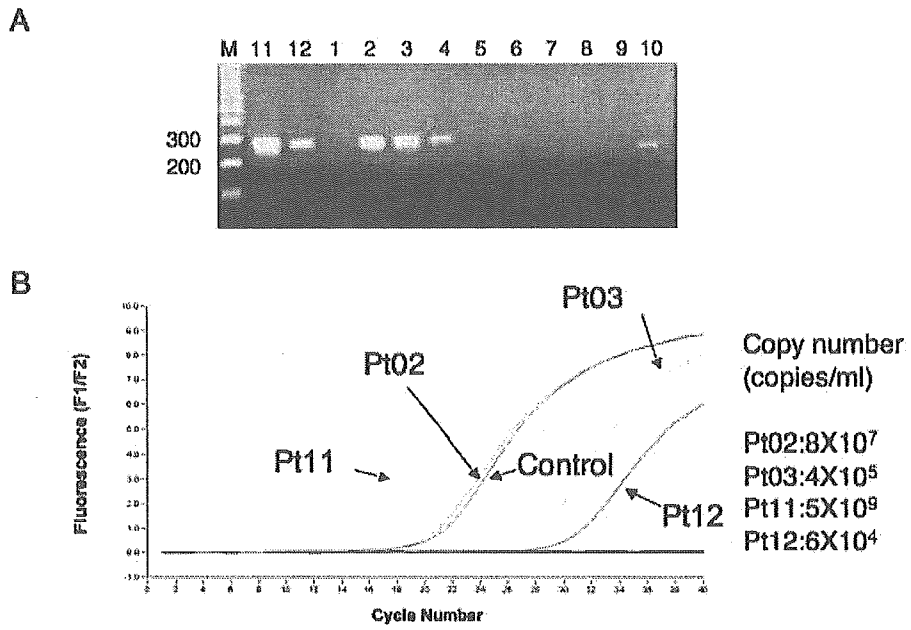


図1. Nested RT-PCR法とTaqMan PCR法によるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスゲノムの検出.

チクングニヤウイルス実験室診断法に関する研究

（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デング熱・デング出血熱（DF/DHF）と非常に症状の似通ったチクングニヤ熱の血清診断法の開発を実施した。今回用いた技術は IgM-capture ELISA 法および IgG-indirect ELISA 法を用いた。この方法は DF/DHF や日本脳炎の実験室診断に最もよく用いられている。今回これらの方法を用いて抗チクングニヤウイルス（CHIK）抗体および類症鑑別のため抗デングウイルス（DEN）抗体について東南アジアおよび太平洋州の 5 カ国で採集された有熱患者からの血清 305 検体（IgG については 422 検体）を測定した。その結果、全体で 4.9%の抗 CHIK-IgM 陽性患者ならびに 10.4%の抗 CHIK-IgG 陽性患者を検出できた。また、今回 CHIK の存在しないとされているフィジーからも IgM、IgG ともに陽性患者を検出したことから CHIK と同じ *Togaviridae*, *Alphavirus*, *Semliki Forest virus Antigen complex* に属す近縁種であるロスリバーウイルス(RRV)が常在している可能性が示唆された。以上のことから、今回作製した IgM-capture ELISA 法および IgG-indirect ELISA 法による抗 CHIK 抗体検出方法は DEN 並びに CHIK 常在地あるいは RRV 常在地からの帰国者にデングを疑う有熱患者が発生した場合、類症鑑別のための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

現在チクングニヤウイルス感染症はアジア、アフリカの熱帯地域に存在し、発熱、頭痛、関節痛、筋肉痛、軽度の出血とデングウイルス感染症と臨床症状が非常によく似ている。感染経路もデングウイルスと同じ *Aedes aegypti* の吸血によるため、その発生時期も重なっており、デングウイルス感染症としてしばしば誤診される。近年ウイルス感染症の血清診断法として確立された IgM-capture ELISA 法を用い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。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抗チクングニヤウイルス抗体検出系を確立することを目的としている。

B. 研究方法

1) ウイルス

チクングニヤウイルス（S-27 株）を用いてヒトスジシマカ由来細胞 C6/36 にてウイルス感染培養液を準備した。

2) 患者血清

フィリピン、インドネシア、バングラデシュ、スリランカ、フィジーの 5 カ国でそれぞれデング熱を疑う有熱患者より採血を行なった。

3) チクングニヤ IgM-capture ELISA

抗ヒト IgM ( $\mu$  chain 特異的) ヤギ IgG (CAPPEL) を補捉抗体として 96 穴プレートに 37°C、1 時間（あるいは 4°C、一晚）コートし、ブロックエース（あるいは BSA）にて

室温、一時間ブロッキングした。PBS-Tween20にてプレートを3回以上洗浄した。以下各試薬の反応後同様にプレートを洗浄した。サンプル血清およびコントロール血清はブロックエースを1/10量含むPBS-Tween20にて1:100希釈したものを37°C、1時間反応した。次に抗原(HA力価1:4)をのせ37°C、1時間反応し、抗CHIKウサギIgGを一次抗体としてのせ37°C、1時間反応した。二次抗体としてHRPO標識抗ウサギIgG抗体を用い37°C、1時間反応し、器質液として $\sigma$ -phenylene diamine (OPD)を用い室温30分暗所にて反応させた。1N硫酸にて反応を停止し、OD492nmにて測定した。サンプル並びに陽性コントロールのOD値を陰性コントロールのOD値で割り、2.0をカットオフ値として陰性陽性の判定を行なった。

#### 4) チクングニヤ IgG-indirect ELISA

チクングニヤウイルス精製抗原 500ng/100ulを96穴プレートに37°C、1時間(あるいは4°C、一晚)コートし、ブロックエース(あるいはBSA)にて室温、一時間ブロッキングした。PBS-Tween20にてプレートを3回以上洗浄した。以下各試薬の反応後同様にプレートを洗浄した。サンプル血清およびコントロール血清はブロックエースを1/10量含むPBS-Tween20にて1:1000希釈したものを37°C、1時間反応した。次にHRPO標識抗ヒトIgG抗体をのせ37°C、一時間反応した。器質液として $\sigma$ -phenylene diamine (OPD)を用い室温30分暗所にて反応させた。1N硫酸にて反応を停止し、OD492nmにて測定した。陽性標準血清(1:1000希釈から以後2倍階段希釈で2<sup>12</sup>まで希釈し、標準曲線を片対数グラフにプロットし、の陰性コントロールのOD値に最近似値の希釈の陽性標準血清OD値を1:1000として以下1:3000(陰性平均値+約3SD)をカットオフ値として陰性陽性の判定を行なった。

### C. 結果

#### 1) チクングニヤ IgM-capture ELISA

フィジー4例(6.6%)、フィリピン4例(11.2%)、インドネシア5例(5.6%)、バングラデシュ0例(0%)、スリランカ2例(6.8%)の陽性例が認められた。合計15例の内10例については Dengue IgM も陽性だったため、確実にチクングニヤといえるケースは5例(1.6%)であった。

#### 2) チクングニヤ IgG-indirect ELISA

フィジー3例(4.9%)、フィリピン8例(9.0%)、インドネシア22例(25.0%)、バングラデシュ9例(5.8%)、スリランカ2例(6.9%)の合計44例の陽性が認められた。

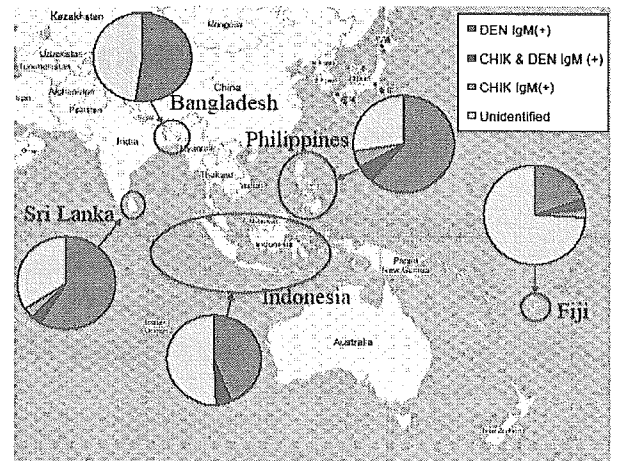
Table: CHIK & DEN IgM positives and CHIK IgG positives

Country Name	Sample No.	CHIK IgM(+)	CHIK & DEN IgM(+)	DEN IgM(+)	Unidentified	Sample No.	CHIK IgG(+)	CHIK IgG(-)
Fiji	61	2 (3.3%)	2 (3.3%)	12 (20.0%)	45 (73.8%)	61	3 (4.9%)	58 (95.1%)
Philippines	36	2 (5.6%)	2 (5.6%)	22 (61.1%)	10 (27.8%)	89	8 (9.0%)	81 (91.0%)
Indonesia	89	0 (0.0%)	5 (5.6%)	39 (43.8%)	45 (50.6%)	88	22 (25.0%)	66 (75.0%)
Bangladesh	90	0 (0.0%)	0 (0.0%)	47 (52.2%)	43 (47.8%)	155	9 (5.8%)	146 (94.2%)
Sri Lanka	29	1 (3.4%)	1 (3.4%)	17 (58.6%)	10 (34.5%)	29	2 (6.9%)	27 (93.1%)
Total	305	5 (1.6%)	10 (3.3%)	137 (44.9%)	153 (50.2%)	422	44 (10.4%)	378 (89.6%)

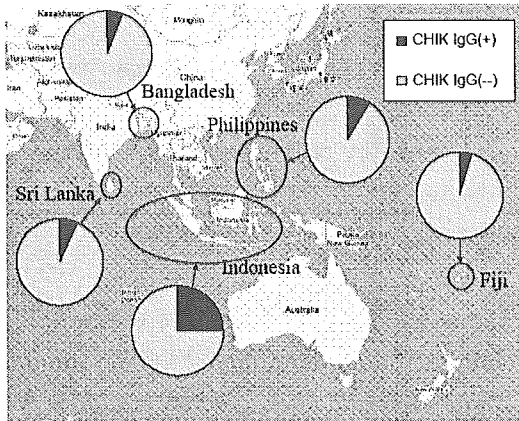
4.9%

10.4%

DEN and CHIK positive ratio among clinically DEN suspected cases.



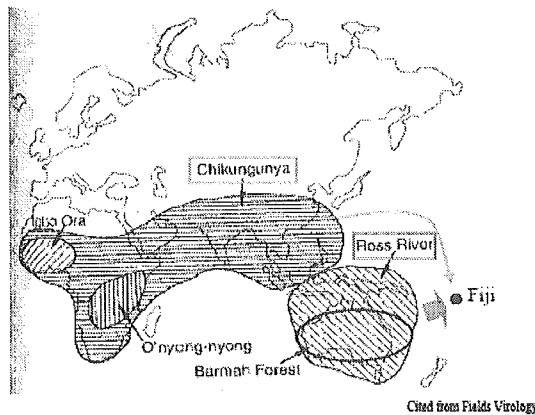
CHIK IgG positive ratio among clinically DEN suspected cases.



Individual case of Serological data

Patient ID	CHIK-IgM	CHIK-IgG	DEN-IgM
Fiji-4	+ (P/N: 2.230)	-- (<1:1000)	-- (P/N: 0.919)
Fiji-15	+ (P/N: 2.042)	-- (<1:1000)	+ (P/N: 2.132)
Fiji-46	+ (P/N: 2.904)	-- (<1:1000)	-- (P/N: 1.56)
Fiji-49	-- (P/N: 1.554)	+ (1: 4300)	-- (P/N: 1.904)
Fiji-54	-- (P/N: 1.501)	+ (1: 4500)	-- (P/N: 1.850)
Fiji-58	+ (P/N: 2.118)	+ (1: 128000)	+ (P/N: 11.731)

Geographical Distribution of *Toga-alphaviruses*



Serological Analyses of clinically dengue suspected cases in Fiji, 2004 and March, 2005.

	Positive	Negative	Total
Dengue IgM	14 (23.0%)	47 (77.0%)	61 (100%)
CHIK IgM	4 (6.6%)	57 (93.4%)	61 (100%)
CHIK IgG	3 (4.9%)	58 (95.1%)	61 (100%)

Dengue IgM----examined using dengue IgM-capture ELISA  
 CHIK IgM----examined using CHIK IgM-capture ELISA  
 CHIK IgG---- examined using CHIK IgG-indirect ELISA

D. 結論

- 1) チクングニヤ IgM および IgG を測定する系が確立された。
- 2) チクングニヤ熱は、大流行は認められないが、安定して広く東南アジアに存在している。
- 3) フィリピン、インドネシアといった島嶼部に若干チクングニアの分布が高いようである。
- 4) フィジーのチクングニヤ血清陽性は近縁種のロスリバーウイルスに対する抗体であると考えられるが、今後中和試験あるいはウイルス分離などによる確認が必要であろう。

E. 考察

近年、東南アジアや太平洋州の国々へビジネスあるいは観光で出かける人が増えている。こういった状況で、デングウイルス陰性例も無視できなくなってきている。チクングニヤウイルス感染症は臨床的には重度の出血熱あるいはショック症状を示さないとされているが、関節炎、関節痛はひどい痛みを伴う。したがってデングウイルス感染と同様確定診断のできる体制を整えておくことは適切な治療をするためにも大切である。また、ロスリバーウイルスの常在地であるオーストラリアだけでなく過去1979年に一度だけ大流行のあったフィジーにおいても最近毎年ロスリバーウイルスの症例



報告がある。今回の調査の結果、オーストラリアからの輸入例だけでなくフィジーに定着している可能性を探る事も大切ではなかろうか？増幅動物である有袋類のフィジーにおける代替動物は何なのか興味深いところである。

今後、海外での調査を広げていくと共に海外からの帰国者の調査にもチクングニヤウイルスおよびロスリバーウイルスをデングウイルスの診断と共に行なうことは大切であろう。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

Pareesh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita. Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17. *Vaccine* Vol.24 402- 411, 2006.

Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino. Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells. *Microbiol. Immunol.*, Vol.49:285-294, 2005.

Manmohan Parida, Kouhei Horioko, Hiroyuki Ishida, Paban Kumar Dash, Parag Saxena, Asha Mukul Jana, Mohammed Alimul Islam, Shingo Inoue, Norimitsu Hosaka, and Kouichi Morita. Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol.43: 2895-2903, 2005.

Celia C. Carlos, Kazunori Oishi,\* Maria T. D. D. Cinco, Cynthia A. Mapua, Shingo Inoue, Deu John M. Cruz, Mary Ann M. Pancho, Carol Z.

Tanig, Ronald R. Matias, Kouichi Morita, Filipinas F. Natividad, Akira Igarashi, And Tsuyoshi Nagatake. Comparison of Clinical Features and Hematologic Abnormalities Between Dengue Fever and Dengue Hemorrhagic Fever Among Children in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Vol.73, 435- 440,2005.

Fuxun Yu, Mai Quynh Le, Shingo Inoue, Hong Thi Cam Thai, Futoshi Hasebe, Maria del Carmen Parquet, Kouichi Morita. Evaluation of Inapparent Nosocomial Server Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Vietnam by use of Highly Specific Recombinant Truncated Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* Vol.12, 848-854, 2005.

Leonora T.D. Salda, Maria D.C.Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi, Kouichi Morita. Molecular Epidemiology of dengue 2 viruses in the Philippines: Genotype shift and local evolution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol. 73, 796-802, 2005

Nawa M., Takasaki T., Ito M., Inoue S., Morita K., and Kurane I. Immunoglobulin A Antibody Responses in Dengue Patients: a Useful Marker for Sero diagnosis of Dengue Virus Infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* Vol.12, 1235-1237, 2005.

森田公一:「デング熱、デング出血熱」、今日の治療指針 2005, p143, 2005.

森田公一:「国際感染症、日本脳炎」、臨床看護、Vol. 31, 169-172, 2005.

森田公一：「西ナイル熱・脳炎 — 最近の動向」、長崎市医師会報、Vol. 39, 14-16, 2005

森田公一：「バイオセーフティ」 in 標準微生物学 (第9版)、山西弘一 監修、医学書院、2005

森田公一：「ウエストナイル熱に対するワクチン」臨床とウイルス、Vol. 33, 28-32. 2005

森田公一：「ウエストナイル熱」モダン フィジシャン、Vol. 25, 523-526. 2005.

森田公一：「ウエストナイル熱とワクチン開発の現状」感染症、Vol. 35, 91-96. 2005.

森田公一：「フラビウイルスによる疾患 (ウエストナイル熱、デング熱を中心に)」カレントセラピー、Vol. 27, 722-724, 2005.

森田公一：「ウエストナイル脳炎」, Infectious Disease Report 2005, No28, 2005.

森田公一：「ウエストナイルウイルス」、Drug Delivery System. Vol. 20(5). 556-557, 2005.

森田公一：「西ナイル熱の現状」、Medical Science Digest Vol. 31(14). 548-549, 2005

## 2) 学会発表

国際会議における発表

Morita K.: Arboviral encephalitis infection in Asia: The Old and the New. German-Japanese Symposium on Emerging and re-emerging viruses (Toyama, Japan, May 14-17, 2005)

国内会議における発表

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊数, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会・神奈川県 箱根, 2005年5月26-27日

Maria del Carmen Parquet, Phan Thi Nga, Manmohan Parida, Nguyen Thanh Thuy, Pham Thi Suu, Afjal Hossain Khan, Leonora T. D. Salda, Fuxun Yu, Shingo Inoue, Takashi Ito, Kouichi Morita: Novel Arbovirus in Vietnam: Isolation, Identification and Molecular Characterization. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Afjal Hossain Khan, 福家 功, 石川 豊数, 井上 真吾, 森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Fuxun Yu, Nor Shahidah Khairullah, Shingo Inoue, Vijayamalar Balasubramaniam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: Expression of Nipah virus nucleocapsid protein in *Escherichia Coli* and its application in sero-diagnosis. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会・沖縄, 2005年7月8-9日

Salda Leonora Trinidad Demot, Maria Del Carmen Parquet, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, Nobuyuki Kobayashi, Kouichi Morita: Molecular epidemiology of dengue virus serotype 2 in the Philippines. 第46回日本熱帯医学会大会・京都, 2005年10月14-15日

井上真吾, Nemani Talemaitoga, Aryati,  
Mohammed A. Islam, Efren M. Dimaano,  
Ronald R. Matias, Wimal Abeyewickreme,  
大石和徳, Filipinas F. Natividad and 森田公  
一、第 12 回トガ・フラビ・ペスチ研究会（平  
成 18 年 1 月 20 日、東京）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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 抗体検出と有用性に関する研究、  
とくに IgM 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法との特異性および検出感度の比較

分担研究者 名和 優(埼玉医科大学微生物学教室)

協力研究者 町田早苗(埼玉医科大学微生物学教室)

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** デング血清診断への応用を目的とした血清中のデングウイルス特異的 IgA 抗体検出につき平成 16 年度に報告した。平成 17 年度は IgA 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法(IgA-ELISA)を用いたデング血清診断の有用性を検討する目的で、すでに確立されている IgM 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法(IgM-ELISA)との間で検出感度、特異性等につき比較観察した。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 48 症例、86 血清検体を用いた成績では、IgA-ELISA は IgM-ELISA に対して抗体検出の特異性は 100%であったが、検出感度は 90.1%であった。血清中のデングウイルス遺伝子検出(RT-PCR)陽性の 22 症例(39 血清検体)を用いた IgA-ELISA および IgM-ELISA では、症例を単位とした診断結果は一致した。患者血清中の抗デング IgA および IgM 抗体が陽性と判定される日数は、それぞれ発熱後 6.92 日、および 5.97 日と算定された。以上の結果より、デングを疑われた日本人患者血清中の IgA 抗体検出は適切な採血時期を選ぶことによって、IgM 抗体検出の代替測定法として有効であると結論できた。

#### 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。現行法の規定によれば、デングは第 4 類感染症として、国内での患者の発生を診断した医師は行政機関への報告が義務付けられている。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。

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 を検出して確定診断する。それ以後の回復期では、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る。

本研究の目的は、デング血清診断の精度を向上させるため、デングウイルス特異的 IgA 抗体検出を血清診断に応用することであった。これまでの我々の研究より、日本人のデング感染例ではシングル血清検体を用いた診断が中心であって、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。デングの血清診断の精度を向上させるため、IgM 抗体に加えて IgA 抗体の二つの指標を用いた診断基準の確定につき検討した。

## B. 研究方法

IgA-ELISA および IgM-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., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 7, 774 – 777, 2000; Nawa et al., *J. Virol. Methods*, vol.92, 65 – 70, 2001; Nawa et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 12 1235 – 1237, 2005)。IgA-ELISA は被検血清 1:400 希釈、IgM-ELISA は被検血清 1:100 希釈でそれぞれ測定した。

1 型~4 型のプロトタイプデングウイルスは蚊由来 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 48 症例の血清(86 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 および IgM-ELISA の比較 (図 1 および表 1)

図 1 は 48 症例、86 検体の IgA-ELISA

および IgM-ELISA で得られた測定結果を示す。●は 1 つの検体を表す。数値はウイルス抗原(P)および未感染コントロール抗原(N)との反応で得られた吸光度(A<sub>492</sub>)の比(P/N ratio)を示す。相関係数( $r^2$ ) = 0.24 であった。

表 1 に図 1 の結果を数値で示す。IgM-ELISA で抗体陽性と判定された 71 検体中 64 検体が IgA-ELISA で抗体陽性であった。IgA-ELISA の検出感度(Sensitivity)は、IgM-ELISA と比較して 90.1% (64/71) であった。また IgM-ELISA では 15 検体(15/86 = 17.4%)が、IgA-ELISA では 22 検体(22/86 = 25.6%)がそれぞれ抗体陰性と判定され、IgA-ELISA の抗体検出特異性(Specificity)は、IgM-ELISA と比較して 100% (22/15)となった。

以上の結果より、IgA-ELISA によるデング血清診断は IgM-ELISA と比較して、抗体検出の特異性(Specificity)は同等であったが、検出感度(Sensitivity)が 9.9%低かった。

デング感染における IgA 抗体と IgM 抗体の検出感度の差を観察する目的で、感染後経時的に採血された血清を用いて、血清中の IgA および IgM 抗体産生を観察した。

### 2) 経時的に採血された患者血清中の IgA 抗体および IgM 抗体の変動 (図 2, 3, および表 2)

図 1 は発熱初日を第 1 病日とし、第 2 病日より第 44 病日までの間に採血され、RT-PCR 陽性でデングウイルス感染の確

定診断された 22 症例、39 検体の IgA および IgM 抗体測定結果を示した。数値は IgA-ELISA(○)、IgM-ELISA (●)ともに吸光度比(P/N ratio)で表示し、それぞれ 1 検体を示す。P/N ratio < 2.0 を抗体陰性とした。また、39 検体の IgA および IgM 抗体測定結果より求められた血清中の抗体レスポンスを近似曲線として実線(IgM)および破線(IgA)で示した。

近似曲線をもとにした観察では、IgM 抗体の陽性レベル(実線)は第 2 病日に観察され、第 44 病日以降まで持続した。一方血中 IgA 抗体(破線)は第 6 病日以降に陽性レベルに達し、第 44 病日まで持続すると考えられた。IgM 抗体産生は IgA 抗体産生と比較して早期に、また、より長期間持続する傾向が観察された。

次に、図 2 で示された 22 症例より第 10 病日以内に採血された 25 検体を抽出し、より詳細に抗体の変動を観察した(図 3)。○(IgA)および●(IgM)はそれぞれ 1 検体を示す。実線で示された IgM 抗体レスポンスの近似曲線は第 4 病日以降陽性レベルに達し、その後第 10 病日まで直線的に上昇した。他方破線で示された IgA 抗体では第 6 病日以降陽性レベルに上昇した。観察の結果、デング患者の血清中 IgA 抗体の出現は、IgM 抗体と比較して 2 日間程度遅れた可能性があった。この結果は血清中の抗体測定をもとに判定する血清診断では重要で、特に感染ウイルスが分離されないか、あるいは遺伝子検出陰性の場合に判定を誤る可能性があった。

そこで、図 2 で示された成績をもとに 50%の確率で、あるいは 50%の検体で抗体が検出される病日を推定した(表 2)。

IgA 抗体、IgM 抗体ともに第 2 病日より第 10 病日までの抗体陽性と陰性のそれぞれの累積検体数より、IgA 抗体では 6.92 病日、IgM 抗体では 5.97 病日と算定された。表 2 の結果を図 3 にあてはめると、それぞれの近似曲線での抗体レベルは P/N ratio >2 となって、抗体検出の可能性が示された。

以上の観察結果をもとに、症例を単位として IgA-ELISA および IgM-ELISA による血清診断を比較する。

3) IgA-ELISA および IgM-ELISA による症例を単位とした血清診断への応用(表 3)。

デングウイルス感染が確定診断され、2 回以上採血された症例を含む 22 症例(39 検体)の血清を用いて、症例単位での IgA-ELISA (1: 400)および IgM-ELISA (1: 100)による診断結果を示す。

IgA-ELISA 陽性と判定された 20 症例のうち 1 例は、IgM-ELISA 陰性と判定された。この症例は第 4 病日に 1 回だけ採血されたものであった。また、IgM-ELISA 陽性と判定された 20 症例のうち 1 例は、IgA-ELISA 陰性と判定された。この症例は第 5 病日に 1 回だけ採血されたものであった。そして、IgA および IgM 抗体ともに陰性と判定された 1 症例は、第 5 病日に 1 回だけ採血されたものであった。

以上の結果、血清中よりウイルス遺伝

子の検出可能な急性期における抗体産生は症例により一定せず、擬陽性あるいは擬陰性と判定される可能性を示した。

このことから、血清中より確実に抗体を検出するためには、IgA では第7病日以降、IgM では第6病日以降に採血する必要があるといえる。

また症例単位で比較すると、IgA-ELISA と IgM-ELISA の検出感度 (Sensitivity, 20/20)、および検出の特異性 (Specificity, 2/2) はそれぞれ 100%であった。この結果は、デング患者の血清診断において発病後の適切な時期に採血された場合、IgA-ELISA が IgM-ELISA と同様の診断性能を有し、代替測定法となり得る可能性を示した。

#### 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。血中よりウイルスの検出可能な急性期を過ぎた場合、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。また、16年度にはデング患者血清中の IgA 抗体検出によっても感染を血清学的に診断可能であることを報告した。

今回、日本人のデングウイルス感染診断を目的として血清中の IgA 抗体を ELISA で検出するに際し、IgM-ELISA の代替測定法としての検出感度および特異性を検討した。

まず血清中の IgA 抗体検出法としての

有用性を IgM 抗体検出法と比較した場合、IgA-ELISA の検出感度は 10% (正確には 9.9%) 劣っていた。しかし検出の特異性は IgM-ELISA と一致した。

症例の診断を標的とし、2回以上の採血で得た血清中の IgA 抗体検出を目的とする場合、IgA-ELISA と IgM-ELISA の検出感度および特異性は一致した。この結果は IgA-ELISA のデングの血清診断への有用性を示す。血清検体を単位とする診断でも、複数回の採血による症例を単位とする診断でも、IgA 抗体を血清中に確実に検出するためには採血のタイミング、あるいは採血間隔が重要で、血中 IgA 抗体では第7病日、IgM 抗体では第6病日以降であった。

感染症の血清学的診断においては、急性期と回復期の2回以上の採血を行い、血清中の抗体反応の変動をもって初めて診断するとの教科書的記述を周知徹底させる努力が必要であった。

#### E. 結論

デング感染症例の血清診断に際し、IgA-ELISA は IgM-ELISA と同等の検出感度および特異性を有し、IgM-ELISA の代替測定法として実用可能であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし(未発表)

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 患者血清のIgA-ELISA およびIgM-ELISA 測定成績

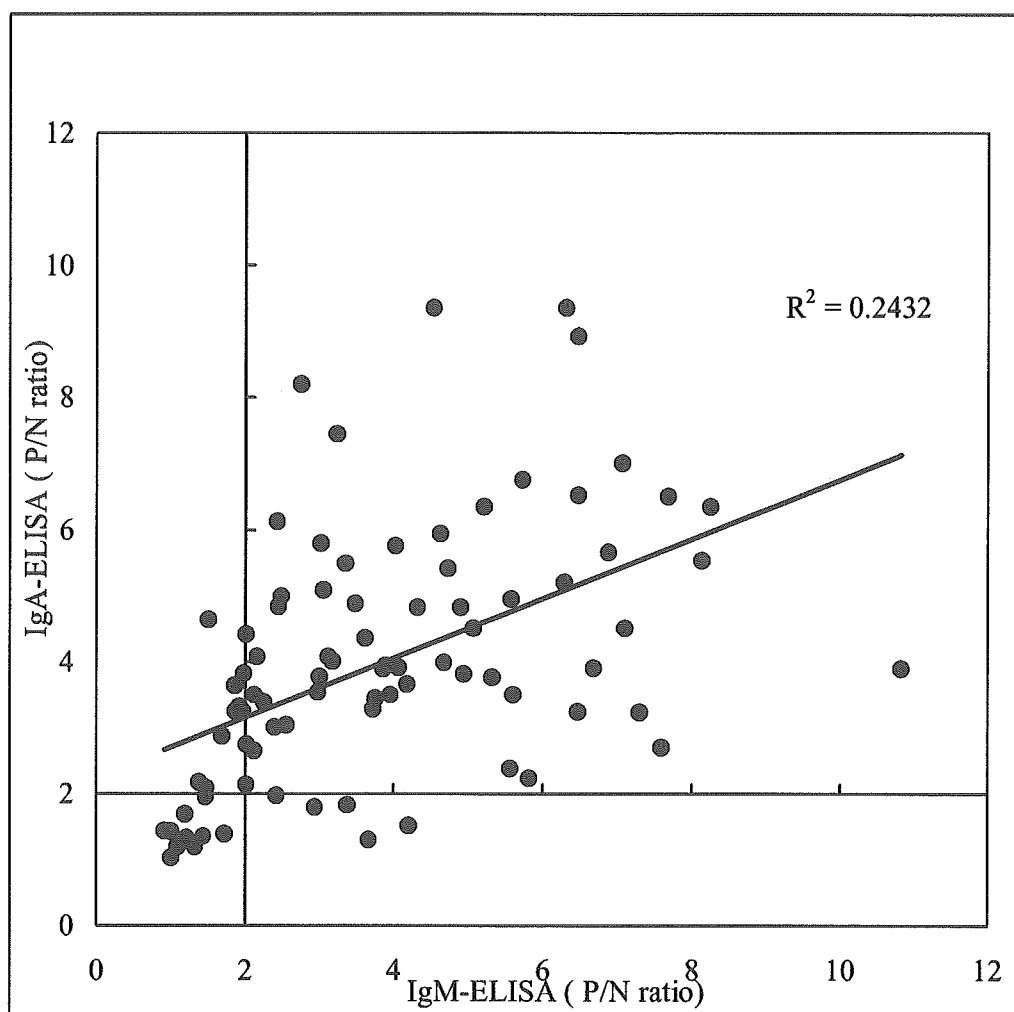


表 1 患者血清 IgA-ELISA および IgM-ELISA 測定結果のまとめ

IgA-ELISA (1:400)	IgM-ELISA (1:100)		Total
	Positive (> 2.0)	Negative ( $\leq 2.0$ )	
Positive (> 2.0)	60	4	64
Negative ( $\leq 2.0$ )	11	11	22
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>15</b>	<b>86</b>

数値は血清検体数を示す。

表 2 半数の血清検体において IgA および IgM 抗体が陽性となる病日

病日	IgA (1:400)		IgM (1:100)	
	(-)	(+)	(-)	(+)
1	0	0	0	0
2	1	0	1	0
3	1	0	1	0
4	3	0	3	0
5	3	0	2	1
6	3	3	2	4
7	2	2	0	4
8	0	4	0	4
9	0	2	0	2
10	0	1	0	1
total	13	12	9	16

図2 デング患者の示す血清IgA, IgM抗体レスポンス

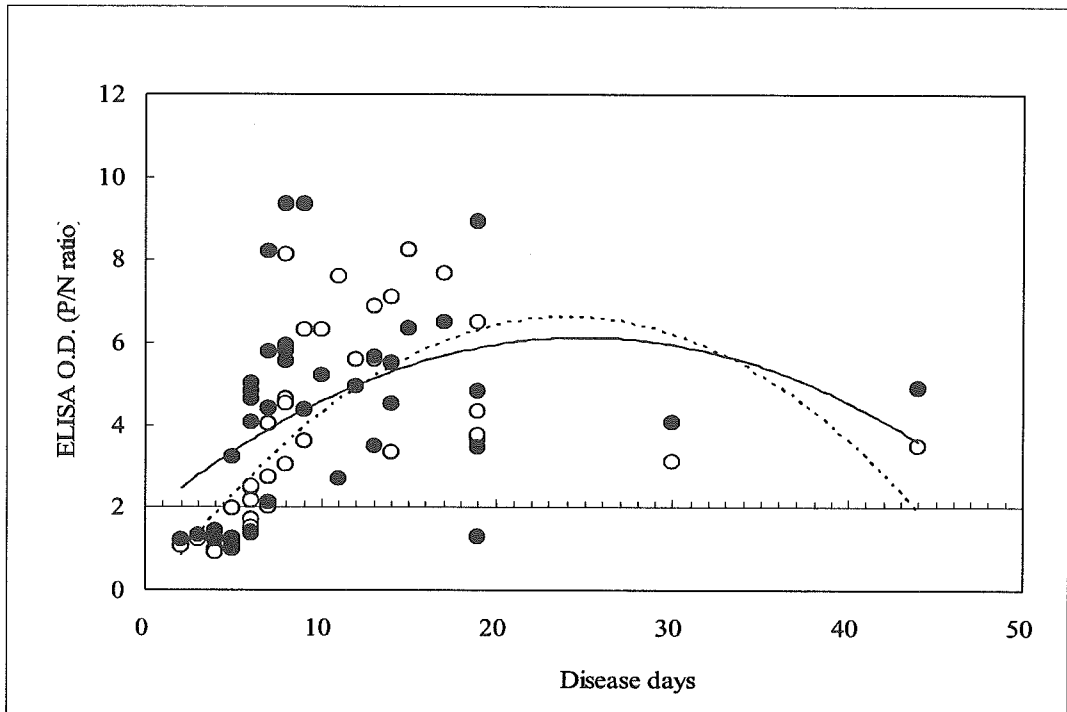


図3 2~10病日におけるIgA, IgM抗体レスポンス

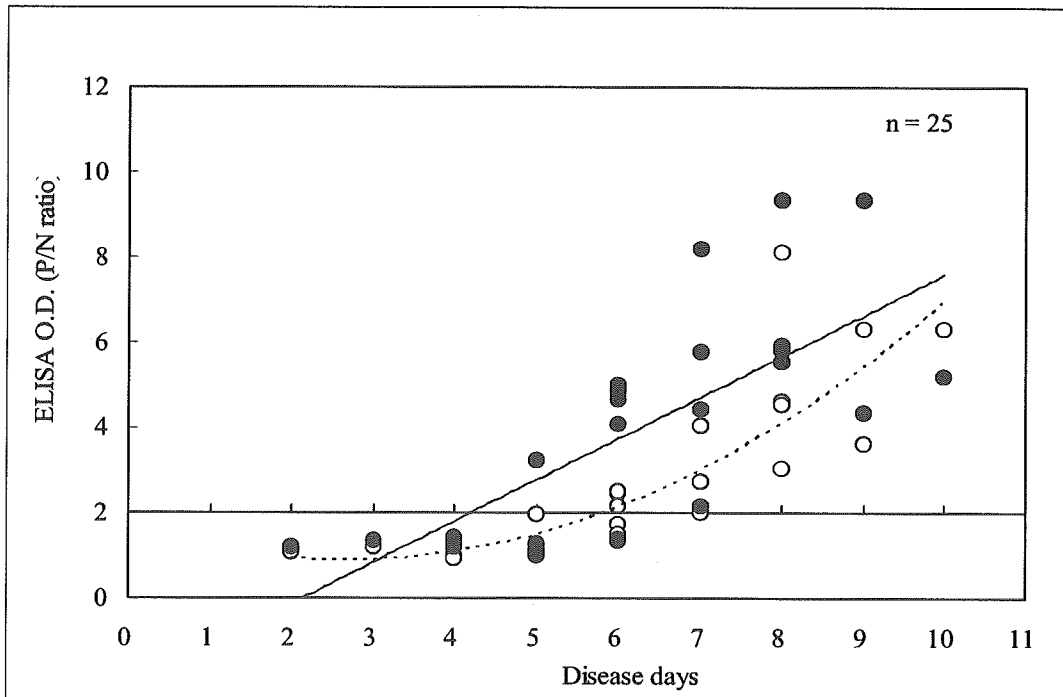


表3 IgA-ELISA および IgM-ELISA によるデング感染の血清診断

IgA-ELISA (1:400)	IgM-ELISA (1:100)		Total
	Positive (> 2.0)	Negative ( $\leq$ 2.0)	
Positive (> 2.0)	19	1	20
Negative ( $\leq$ 2.0)	1	1	2
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>22</b>

数値は症例数を示す。