

4. Periodic review of the status of current APLs and update of new APLs membership
 - a. The APL shall provide an annual report using the format provided, on the activities in its functions as an APL, through the NLCP, to the APL Steering Committee.
 - b. The Steering Committee shall evaluate the APLs based on the documents submitted, with options for on-site evaluation.

5. Periodic Meetings
 - a. APLs are encouraged to host a periodic scientific and operational meeting of APLs to strengthen regional infectious disease laboratory diagnostics, networking, collaboration in research and development of new diagnostic tests.
 - b. A regional operational meeting of APLs shall be conducted at least once every two years facilitated by the Programme Facilitation Section of the ASEAN Secretariat, overseen by the APL Steering Committee.

6. Fund Mobilisation
 - a. APLs shall be responsible for mobilising funds for their own activities.
 - b. Each ASEAN Plus Three government is encouraged to mobilise funding for regional APL activities, including trainings and hosting of meetings, etc.
 - c. APLs may seek external funding for its activities as an APL.
 - d. ASEAN Secretariat may facilitate funding from external sources for regional APL activities.

XXXXXXXXXX

Note: a potential APL should consider the 13 pathogens under the Regional Laboratory Based Surveillance, but are not limited to them.

ASEAN Plus Three EID Programme Phase II

ASEAN Regional Workshop on Development of Laboratory Based Surveillance and Strengthening Regional Laboratory Networking

11-13 August 2008, Kuala Lumpur, Malaysia

**OPENING REMARKS by Dr. Bounpheng Philavong
Assistant Director, Head of Health and Population Unit
ASEAN Secretariat**

Dr. Zainudin bin Abdul Wahab, Deputy Director, Disease Control Division and Head of Surveillance Unit representing Director General of Health (Public Health), Ministry of Health of Malaysia.

Dr. Hj Salleh bin Mat Jais, Director, National Public Health Laboratory, Ministry of Health of Malaysia

Dr. Takeshi Kasai, Regional Adviser, Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific (WPRO)

Distinguished delegates,

Colleagues,

Ladies and gentlemen.

On behalf of the ASEAN Secretariat let me also extend a very warm welcome to all of you to this ASEAN Regional Workshop on Development of Laboratory Based Surveillance and Strengthening Regional Laboratory Networking of ASEAN Plus Three EID Programme Phase II held in this beautiful City of Kuala Lumpur, Malaysia. I would like to take this opportunity to express our sincere thanks to the Government of Malaysia, particularly the National Public Health Laboratory, Ministry of Health of Malaysia for hosting this important workshop and for warm hospitality extended to all of us. I also wish to thank the government of Australia and AusAID for funding this programme, the government of Japan for co-sponsoring this workshop and WHO for technical assistance. I also thank delegates of the ASEAN Plus three countries and representatives of WHO for your kind participation at this workshop.

Ladies and gentlemen,

This is already a year and half since we started the second phase of ASEAN Plus Three EID Programme Phase 2, in January 2007. Since then, a lot of developments have happened in our ASEAN Plus Three EID Programme, particularly in ASEAN. Last month, on 21-23 July 2008, we held First Meeting of ASEAN Technical Working Group on Pandemic Preparedness and Response in Medan, Indonesia. The meeting agreed on key activities addressing pandemic preparedness and response, including the Development of indicators for monitoring national pandemic preparedness and response plan formulation, Assessments on national multi-sectoral pandemic preparedness and response based on the ASEAN indicators, Capacity building in doing advocacy to non-health sectors, Capacity building in multi-sectoral operational continuity and contingency planning for pandemic, Strengthening on-scene command and response system in pandemics through the use of Incident Command System, and Development of an ASEAN Regional Pandemic Preparedness and Cross-border and Resource Sharing Response Plan. We are now in the process of preparing the implementation of these activities.

Last week, on 4-6 August 2008, we convened the Second Meeting of the Programme Coordination Group (PCG) in Siem Reap, Cambodia. In that meeting, we discussed the achievements of the projects implemented in year 1 (July 2007-June 2008), the results of the programme mid-term review and decided on the recommendations of the mid-term-review

team, reviewed and approved the projects to be implemented in Year 2 (July 2008-June 2009) and the Year 1 consolidated Programme Action Plan, and had agreed on key programme decision points.

More than 10 project proposals were discussed and endorsed by the PCG meeting. The project on strengthening ASEAN capacity and partnership in Laboratory is an on going activity that started even before the phase 1 of this programme in 2004, as informed by Dato Dr. Ramlee bin Rahmat. I would like to take this opportunity to express our sincere thanks to Malaysia for taking the leading role in coordinating this activity.

Ladies and gentlemen,

Last week, we also had a meeting with partners organizations back to back with the 2nd PCG meeting, with whom we had shared the programme's accomplishments and plans for year 2 (July 2008-June 2009) implementation. We also shared with them EID concerns and initiatives in the ASEAN region, and had explored possible areas for collaboration and complementation.

We are very pleased to inform you that the collaboration and partnership with partner organizations, such as WHO, OIC, FAO, UNSIC, UNOCHA, AusAID, USAID, has become stronger and stronger, particularly with WHO. The ASEAN-WHO collaboration is based on the comparative advantage of both organisations, and has helped tremendously ASEAN in realising priorities identified by ASEAN Health Ministers and their senior officials to realise a Healthy ASEAN by 2020 in addressing disease surveillance and control, and the achievement of health-related Millennium Development Goals in ASEAN Member States.

ASEAN and WHO collaboration had made good progress. It has helped further intensifying responses to emerging threats from communicable diseases, environment degradation and increasing demands from the health system. We strongly support the WHO Asia Pacific Strategy for Emerging Diseases (APSED), which ASEAN could complement a lot of its activities, including our Laboratory networking and Laboratory-based surveillance.

We are very pleased that the implementation of our ASEAN Plus Three EID Programme and our collaboration with partner organisations are in line with Vientiane Action Programme (2004-2010) and one of the Strategic objectives of the ASEAN Socio-Cultural Community (ASCC) Blue Print (2009-2013), which aims to enhance regional preparedness and capacity through integrated approaches to prevention, surveillance and timely response to communicable and emerging infectious diseases.

Ladies and Gentlemen,

I sincerely hope that during this three days meeting, we will be able to share invaluable information, agree and identify areas for collaboration and complementation with partners, and come out with decision points in strengthening ASEAN Plus three laboratory partnership and networking.

I also strongly believe that the meeting will also provide a good opportunity for us to strengthen networking and partnership with partner organisations in addressing Emerging infectious diseases, as well as pandemic preparedness and response.

In closing, I wish to thank Malaysia again for hosting this very important workshop. We are very happy to come back to Kuala Lumpur, the venue of several ASEAN Meetings/workshops this year, including the ASEAN workshop on IDU and HIV and AIDS, Risk Communication, Pandemic Preparedness and Response Planning workshop, and this

laboratory networking workshop. Next week, we will come back to Malaysia again for the meeting on development of ASEAN indicators for monitoring national pandemic preparedness and response plan formulation. Next year, Malaysia had also agreed to host the 4th Meeting of AEGCD and the 3rd meeting of PCG of ASEAN Plus three EID programme.

I wish you all a successful deliberation.

Thank you for your kind attention.

プロジェクト2：ウイルス

デング熱

チクングニヤ熱輸入症例の診断と検討

研究代表者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者 高崎智彦、小滝 徹、林 昌宏

（国立感染症研究所ウイルス第一部）

三浦彰子、鎌倉和政、佐川宏明、井村俊郎（関西空港検疫所）

成田空港検疫所

研究要旨：

チクングニヤウイルス（CHIKV）感染症はアフリカ、インド洋諸島、インド、東南アジアの熱帯・亜熱帯地域を中心として流行地域が拡大しており、再興感染症の一つとして重要な感染症である。CHIKV はネッタイシマ蚊、日本にも生息するヒトスジシマ蚊等によって媒介されるトガウイルス科アルファウイルス属の一本鎖(+)RNA ウイルスである。CHIK 熱は発熱・関節炎・発疹の 3 主徴を呈し、時に出血傾向が認められるためデングウイルス感染症の鑑別疾患としても重要である。日本では 2007 年に初めてスリランカからの輸入症例が 2 例確認され、2008 年にインドから 1 例、2009 年にはマレーシア、インドネシアから各 1 例と、2009 年までに合計 5 例の輸入症例が確認されている。2009 年に入り、第 8 週現在でシンガポールでは 211 人、マレーシアでは 964 人であった。また、2008 年秋の段階ですでにタイ南部にウイルスが侵入し流行を起こしたことが報告されている。

この感染症は、わが国では現在のところ感染症法あるいは検疫法において定められていない感染症であるが、ヨーロッパ・インド・東南アジア諸国では非常に警戒されているウイルス感染症である。

A. 研究目的

チクングニヤウイルス（CHIKV）はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖(+)RNA ウイルスで、直径 70nm のエンベロープを有する球状粒子であり、蚊によって媒介される。チクングニヤ（CHIK）熱の特徴は発熱・関節炎・発疹の 3 主徴であり、時に出血傾向を呈する。

近年の流行は 2005 年にインド洋に位置するコモロ諸島、モーリシャス島等の島々で発生し、2006 年にはスリランカ、インド西部に流行が拡大、さらに 2007 年にはイタリア、シンガポールで流行が報告された。またフランス、米国、オーストラリア、香港、台湾等で輸入症例が報告されている。本邦では 2007 年に初めて 2 例の

スリランカからの輸入症例が確認された。本研究の目的は CHIKV に対する適切な検査体制を整えると共に法的に整備されていない現状で迅速かつ的確に CHIK 輸入症例を診断し国内防疫体制を整備することである。

B. 研究方法

実験室内診断：血清診断法として In house IgM 捕捉 ELISA 法を用いて特異的 IgM 抗体の検出を行った。さらに病原体診断法として RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法によるウイルス遺伝子検出を行い、遺伝子解析を行った。

ウイルスと培養細胞：CHIKV 中和試験においては CHIKV S27 株を用いた。ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

ウイルス中和試験：ウイルス中和試験は Vero 細胞を用いた 50% フォーカス減少法にて検討した。得られた患者血清を非動化し、10 倍希釈後 2 倍階段希釈を行った。希釈した患者血清とウイルスを等量混合後 37°C 1 時間中和反応を行った。各血清-ウイルス反応液を Vero 細胞に接種し、37°C で 90 分吸着後 1% メチルセルロースを重層し 37°C にて培養した。10% ホルマリンにて固定後メチレンブルーにて感染細胞を染色しウイルス中和抗体価を算出した。

C. 研究結果

症例 1。患者は 37 歳男性、大阪府堺市在住。2008 年 7 月 16 日にインドへ赴任し、同月 26 日から 39.0°C の発熱、頭痛、全身の関節痛を認め、13 日後に解熱した。翌日から顔以外に

まだら模様の発疹が出現したが、数日で軽快した。その後帰国し、発熱はみられず食欲もあったが、全身の関節痛が 8 月中旬より特に強くなったため、9 月 8 日に近医を受診し、精査加療目的にて 9 月 22 日大阪市立総合医療センターを受診した。受診時の主訴は、右手首・左右近位指節間関節・右膝・左足関節に違和感(突っ張るような感じがする)であった。チクングニヤウイルス特異的 IgM 抗体陽性、中和抗体陽性であり、抗 Dengue ウイルス抗体は陰性であった。

症例 2。患者は、神戸在住 3 年のマレーシア人主婦、41 歳である。H20 年、12 月 19 日より、クアラルンプールに滞在、1 月 3 日に帰国した。H21 年 1 月 5 日晚より発熱と全身の関節痛が出現、近医を受診した。第 2 および 3 病日の血清からチクングニヤウイルス遺伝子を検出し、ウイルスも分離された。第 9 病日の血清でチクングニヤウイルス IgM 抗体および中和抗体陽性が確認された。急性期の末梢血液検査では血小板減少を認めなかった。本症例は ProMed に報告した (Archive Number:20090204.0494)。

症例 3。患者はインドネシア在住の 48 歳女性で、9 月 26 日より発熱、翌日発疹、28 日には全身の痛みが出現し、足関節痛で起立困難となった。急性症状は約一週間程度で軽快したが、足関節痛は 11 月末まで持続した。1 月に帰国した際東京都立駒込病院を受診し、チクングニヤウイルス IgM 抗体および中和抗体陽性が確認された。急性期の血液検査では、血小板減少は約 16 万と軽度であった。

成田空港検疫所および関西空港検疫所におけるサーベイランス検査では、陽性症例は確認されなかった。

D. 考察

2005年にコモロ諸島で始まったチクングニヤ熱流行は、2006年に西インド洋諸国で流行し、インド・スリランカに波及した。2006年にスリランカからのチクングニヤ熱輸入症例2例を確認したが、その後世界のチクングニヤ熱流行状況は拡大を続け、2007年にはインドからの輸入症例をきっかけに北イタリアで300人規模の流行を起こした。2008年には、シンガポール、マレーシア、タイに流行が拡大した。2008年から2009年にかけて我々はRT-PCR法、リアルタイムRT-PCR法を用いた遺伝子検出法、IgM捕捉ELISA法、50%ブランク減少法を用いた中和法による診断法を確立し、あらたに3例の輸入症例を診断した。我々の実験室診断法は、十分に機能することが確認された。日本人海外渡航者の多い東南アジアに流行が波及した現在、法的規定を伴った防疫体制の確立が早急に必要である。

今回の3症例のうち2症例では急性期の検査データが得られた。その結果、チクングニヤ熱では、デング熱に比べて血小板減少が著名でなかった。この点が急性期以後も関節痛が持続する場合と合わせてデング熱との鑑別点となりうるかもしれない。

E. 結論

日本では2007年に初めてスリランカからの輸入症例が2例確認され、2008年に

インドから1例、2009年にはマレーシア、インドネシアから各1例と、2009年までに合計5例の輸入症例が確認された。

F. 健康危険情報

2009年に入り、第8週現在でシンガポールでは211人、マレーシアでは964人が報告されている。

G. 研究発表

1. 論文発表

青山幾子、弓指孝博、加瀬哲男、高橋和郎、宇野健司、後藤哲志、片山智香子、中村匡宏、塩見正司、仁科展子、齊藤武志、森登志子、穴瀬文也、吉田英樹、高崎智彦、林昌宏、倉根一郎、チクングニヤ熱と確定診断されたインドからの輸入感染症症例. *Infectious Agent Surveillance Reports*. 29:345-346(2008)

2. 学会発表

C. Lim, T. Takasaki, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 42nd Joint Working Conference on Viral Diseases, Japan-US Cooperative Medical Science Program (Nagasaki, Japan) 2008/5/27-28.

C. Lim, T. Takasaki, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from

Sri Lanka. XIV. International Congress of Virology (Istanbul, Turkey) 2008/8/10-15.

林 昌宏、西堀武明、渡辺香奈子、小滝 徹、伊藤美佳子、倉根一郎、高崎智彦. チクングニヤ熱輸入症例患者血清より分離された CHIKV の性状解析. 第 56 回日本ウイルス学会 (岡山県) 2008 年 10 月 26-28 日

柴田紳一郎、伊藤公一、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎. チクングニヤウイルス検出法の検討. 第 56 回日本ウイルス学会学術集会. Oct. 26-28. 2009(岡山市)

高崎智彦. 昆虫媒介感染症～デング熱を中

心に～. 第 23 回 Transfusion Medicine Conference. 2009 年 1 月 31 日 (神奈川県葉山町)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



Archive Number 20090204.0494

Published Date 04-FEB-2009

Subject PRO/EDR> Chikungunya: Japan ex Malaysia

CHIKUNGUNYA: JAPAN ex MALAYSIA

A ProMED-mail post

<<http://www.promedmail.org>>

ProMED-mail is a program of the

International Society for Infectious Diseases

<<http://www.isid.org>>

Date: Wed 4 Feb 2009

From: Kouta Yamamoto <dffgd201@kcc.zaq.ne.jp>

An adult female Malaysian, a resident of Kobe in Japan for 3 years, visited us to be evaluated for dengue fever like symptoms including high fever, malaise and arthritis on 6 Jan 2009. She visited Malaysia (Kuala Lumpur) from 19 Dec 2008-3 Jan 2009 (in the rainy season, which is from December to February) and developed a high fever and polyarthritis, predominately in both hands, feet and ankles on 5 Jan [2009]. Large joints were less severely affected. Laboratory tests on 6 Jan [2009] showed negative results for IgM antibody for dengue fever (PanBio Dengue), rapid influenza antigen test, malaria smear and blood culture for salmonella typhi but positive IgG-dengue fever.

The serum was submitted for PCR assay to the National Institute of Infectious Diseases in Tokyo, where it was determined to be positive for chikungunya virus (CHKV) RNA. The titer of viral RNA was 6.7×10^7 copies/ml in the serum. IgM antibody against CHKV was negative on 6 Jan [2009] and sero-converted to be positive on 15 Jan [2009]. IgM antibodies against dengue virus (DENV) were negative in both sera, and IgG antibodies against DENV were positive in both sera, indicating she was infected with DENV previously.

Her fever, up to 40 C, subsided in 6 days; itchy skin rash appeared on her extremities between the 6th day and 10th day, but arthralgia has been persisting. No febrile illness manifested in other family members, including spouse and 2 infants for 14 days after arrival in Japan.

Chikungunya fever is not a reportable infectious disease in Japan. Since diagnostic tests for chikungunya are not available commercially, diagnosis using PCR assay is made by arranged submission of specimens to the limited institutes by clinicians. Recently, several reports have warned that increased travel associated with globalization may have led to the introduction of chikungunya fever into non-endemic areas by travelers with viremia, because of resident [populations of] *Aedes* species [that are chikungunya virus vectors. - Mod.TY]. Therefore, a reportable system, announcements to clinicians, and easy access to the diagnostic tests for febrile diseases should be promptly established in Japan.

--

Kouta Yamamoto, Kentaro Matumoto, Tomohiko Takasaki
International Division of Internal Medicine,
Kobe Kaisei Hospital and Institute of Infectious Disease
Japan
<dffgd201@kcc.zaq.ne.jp>
<matsukenidfp@google.com>
<takasaki@nih.go.jp>

[The last report of chikungunya virus infection in Malaysia was 17 Dec 2008 (see ProMED archive no. [20081217.3963](#)). The above report indicates that the outbreak continues. Dr. Yamamoto and colleagues make an important point about the risk of chikungunya virus-infected individuals introducing this virus into areas, even in subtropical and more temperate zone localities, where competent vectors, such as *Ae. albopictus*, are established, as happened in Italy (see ProMED archive no. [20071210.3980](#)). ProMED thanks Dr. Kouta Yamamoto and colleagues for sending in this report. Firsthand reports from individual and group health providers dealing with these cases are especially valuable. - Mod.TY]

デングウイルス NS1 抗原検出 ELISA キット
(PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA®) 評価

研究分担者 高崎智彦

研究協力者 大松 勉、小滝 徹、田島 茂、倉根一郎

研究要旨

デングウイルスは急性熱性疾患であるデング熱を引き起こすウイルスであり、蚊によってヒトからヒトへ感染が拡大する。近年の地球温暖化に伴い、媒介蚊の生息地域の拡大とデング熱流行地域の拡大が懸念されている。しかし、デング熱に対するワクチンや有効な治療薬はないため、適切な治療を行うための正確な診断が重要となっている。本研究では、新たなデング熱に対する実験室診断法として NS1 抗原検出 ELISA の評価を行った。その結果、PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA においてはデング熱患者 113 名中 101 名 (89.4%) の血中より NS1 抗原が検出され、リアルタイム PCR 法に比較して十分な感度を有することを確認した。さらに一部の患者ではデングウイルス遺伝子およびデングウイルス特異的 IgM 抗体が共に検出されない時期の血中より NS1 抗原が検出された検体があった。従って、デング熱診断の一つとして NS1 抗原の検出は有用であり、患者血清を対象とした NS1 抗原検出をこれまでの診断法と共に用いることにより、より迅速で正確な診断が可能になることが明らかになった。

A. 研究目的

デングウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属するウイルスであり、急性熱性疾患であるデング熱を引き起こす。デング熱は予後の良い疾患であるが、一部の感染患者では重篤で時に死に至るデング出血熱を発症することがある。デング熱患者数は 1950 年代以降熱帯・亜熱帯地方を中心として年々増加傾向にあり、現在では年間数千万人もの患者が報告されている。デングウイルスは蚊の吸血によって媒介され、ヒトからヒトへと感染する節足動物媒介性

ウイルスである。主な媒介蚊はネッタイシマカであるがヒトスジシマカも媒介能力を有しており、温暖化に伴う媒介蚊の生息域拡大も指摘され、デングウイルス流行地域拡大の可能性も示唆される。このような背景からデング熱は世界的にも重要な節足動物媒介性感染症の一つとなっている。また、我が国へのデング熱輸入症例も感染症法施行後、年々増加傾向にあり 2008 年には 104 例が報告されている。デング熱の確定診断には実験室診断が不可欠である。実験室診断としては PCR 法を基にしたウイルス遺

伝子検出もしくは培養細胞を用いた病原体分離による病原体診断と、デングウイルス特異的 IgM 抗体検出もしくはベア血清を用いた中和抗体価上昇による血清診断が行われている。近年、新たな迅速診断法の対象としてデングウイルスの非構造蛋白質の一つである NS1 が着目されている。NS1 抗原はデングウイルスに感染した細胞から細胞外に放出される非構造蛋白質である。デングウイルスは 4 つの型に分類されるが NS1 は型間で高度に保存されているタンパク質である。NS1 蛋白は患者血中においても認められる。そこで、本研究では NS1 抗原検出 ELISA (PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA[®]) を用いて NS1 抗原検出の診断における有用性を評価した。

B. 研究方法

2007 年 1 月から 2008 年 11 月までの間に国立感染症研究所ウイルス第一部で、病原体診断 (遺伝子検出、ウイルス分離) および血清学的診断 (抗体検査) が実施されたデング熱と診断された患者 113 名の血清 208 検体を対象として、血中のデングウイルス NS1 抗原の検出の有無を検討した。NS1 抗原の検出には PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA[®] (BIORAD) の ELISA kit を用い、その使用方法に準拠して評価を行った。

また、ウイルス遺伝子検査 (リアルタイム RT-PCR) は伊藤ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004) の方法に基づいて実施した。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。抗体検査は 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

PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA を用いた NS1 蛋白の検出

113 名中 101 名 (89.4%) のデング熱患者において血中から NS1 抗原が検出された。検出は発症後 21 日目の検体においても可能な症例があった。TaqMan RT-PCR 法を用いた病原体診断の結果からウイルス型が明らかになった 77 名について型別に評価した結果、1 型では 24 名中 22 名 (91.7%)、2 型では 14 名中 13 名 (92.9%)、3 型では 31 名中 28 名 (90.3%)、4 型では 8 名中 8 名 (100%) でいずれかの時期の血清中から NS1 抗原が検出された。本キットの感度はウイルス型別にかかわらず 90% 以上であった。また、208 検体中、NS1 蛋白 (+)・ウイルス遺伝子 (-)・特異的 IgM 抗体 (-) となったものが 4 検体、NS1 蛋白 (+)・ウイルス遺伝子 (-)・特異的 IgM 抗体 (+) となったものが 52 検体認められた。

D. 考察

NS1 抗原は非構造蛋白質であるにもかかわらずデングウイルス感染細胞から放出されるため、病原体診断法としての有用性が示唆されていた。本研究結果から、ELISA 法を用いた NS1 抗原の検出はデング熱患者の診断法として有用であることが明らかとなった。NS1 抗原は、発症後 21 日目の患者血中からも検出されていた。TaqMan RT-PCR 法を用いたウイルス遺伝子の検出は発症後 11 日後まで可能であったことから、NS1 抗原検出はウイルス遺伝子検出と

比較するとほぼ同期間かより長期間の血清を対象とした検索が可能な場合があることが明らかになり、またウイルス型（1-4型）においてもほぼ同等の感度を示したことから実用性が確認された。

また、ウイルス血症後期からデングウイルス特異的 IgM 抗体の上昇が起こるため、多くのデング熱患者においてはその血中からウイルス遺伝子もしくはIgM抗体が検出されるが、採血時期によっては共に認められない場合もある。今回の検索においては、ウイルス遺伝子およびIgM抗体陰性検体のうち PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA を用いた場合は4検体においてNS1抗原が認められた。この結果は、NS1抗原の検出が早急で確実な診断が重要となるデング熱に対して有用であり、これまでの病原体診断および血清診断と組み合わせることにより、より確実な実験室診断が可能になることが示唆された。今後、空港検疫所での実用性の評価、臨床検体に対する前向き評価を実施したい。

E. 結論

ELISA法を用いたNS1蛋白検出法は有用であり、TaqMan RT-PCR法による病原体診断およびELISA法による血清診断と共に用いることでより正確で迅速な診断が可能になることを明らかにした。

F. 健康危険情報

2008年は、我が国へのデング熱輸入症例が、1999年の感染症法施行後、初めて100例を超え、104例報告された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

表1 NS1 抗原 ELISA (BIORAD)の他の検査法との比較(病日との関係)
各検査法における陽性件数 (陽性検体数/検査検体数)

	病 日														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
検体数	14	11	23	22	30	20	20	14	7	9	12	6	3	6	3
PCR 法	14/14	10/11	16/17	12/16	14/22	4/14	4/8	5/10	1/4	0/5	1/7	0/3	0/3	0/4	0/0
IgM	5/14	5/11	12/23	15/22	28/30	19/20	19/20	13/14	7/7	9/9	11/12	6/6	3/3	6/6	3/3
IgG	3/14	1/11	11/23	15/22	19/30	15/20	16/20	6/12	5/7	8/9	10/12	6/6	3/3	6/6	3/3
NS1 抗原 (BIORAD)	11/12	8/9	19/23	20/22	27/29	15/18	18/20	14/14	5/7	6/8	7/12	2/6	1/3	2/6	1/3

NS1 抗原 ELISA 法は、ウイルス抗原 (非構造蛋白) を検出するものであり、比較の対象としてはウイルス遺伝子検出 (PCR 法) である。PCR でウイルス遺伝子が検出できなくなる 10 病日以降も NS1 抗原蛋白が検出できた検体があり、10 病日、11 病日までは半数以上の検体で検出が可能であった。

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

国立感染症研究所における2008年輸入デングウイルス感染症の検査・診断状況

分担研究者 田島茂（ウイルス第一部・主任研究官）
協力研究者 高崎智彦（ウイルス第一部第二室・室長）
小滝徹（ウイルス第一部第二室・非常勤職員）
林昌宏（ウイルス第一部・主任研究官）
大松勉（ウイルス第一部第二室・研究官）
倉根一郎（ウイルス第一部・部長）

研究要旨 デングウイルス感染症は東南アジアを中心として世界的規模で熱帯・亜熱帯地域に拡がっており、re-emerging infectious disease（再興感染症）の一つとして、極めて重要な感染症になっている。わが国では終戦後以降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は年間数十例みられる。2008年に当研究室で実験室診断された陽性検体数は67例に達し、過去最多を記録した昨年（52例）を大きく上回った。このことは、近年デング熱蔓延地域で頻発する大流行と、国内の医療現場におけるデング熱認知度の向上の両方によるものと推測される。年代別では例年と同様20代が最も多かった。渡航先別ではタイ、インド、インドネシアの順で多く、例年に比べインドでの感染者が多かった。陽性患者数は9月を中心に多数みられたことから、夏期休暇でデング熱流行地域に渡航する旅行者に対し注意を徹底する必要がある。

A. 研究目的

デングウイルス感染症はわが国では過去60年間国内感染のない感染症であるが、熱帯地域では流行域が拡大しており、再興感染症の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。感染症新法の施行に伴い、4類感染症として全数届け出制となり、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例への対策が重要となった。そこで、本感染症に対する検査・診断、さらにはウイルス分離

を行い、厚生行政に資することを目的とした。また本研究で得られた情報は、世界におけるデング感染症の現状（トレンド）を把握する上でも有益である。

B. 研究方法

国内の医療機関よりデングウイルス感染症疑いで当研究室に送付された患者検体（血液）より血清を分離し、以下の検査・診断および解析に使用した。一部の血清については蚊由来細胞 C6/36 株に接種しウイ

ルスの増殖・分離を試みた。ウイルス RNA は血清および接種した C6/36 株の培養上清より回収した。リアルタイム RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出は、伊藤らの方法 (J.Clin.Microbiol.42:5935-5937,2004) により行った。一部の分離ウイルスについてはゲノム全長の塩基配列を決定した。血清中の抗 Dengue ウイルス IgM および IgG 抗体はそれぞれ IgM・捕捉 ELISA 法および IgG・ELISA 法により測定した。

C. 研究結果および考察

国内の医療機関より Dengue 熱疑いで当研究室に送付された患者検体数は、2008 年は 125 例 (12 月初旬現在) であった。このうち陽性のものは 67 例に達し、過去最多であった。これは昨年に続き東南アジアおよび南米等で Dengue 感染症が大流行したことが主要因と考えられるが、一方で日本国内の医療現場における Dengue 熱の認知度の向上も関係していると考えられる。陽性患者は男性が 59% であった。年代分布は 20 代が 34% と最も多く、次いで 30 代が 22%、40 代、50 代、60 代がいずれも 12~3% であった。陽性例は例年春期休暇および夏期休暇付近で多いが、2008 年は 2 月に小さなピークがあり、その後は 9 月をピークに 5 月から 11 月まで例年以上の陽性患者数を維持していた。陽性患者の多い渡航先は、1 位がタイ (13 例)、2 位がインド (11 例)、3 位がインドネシア (9 例)、4 位がフィリピン (6 例)、5 位がベトナム (5 例) であった。67 例中 8 例は 2 カ国以上渡航した患者であったが、そのうち 4 例はタイを含んでいた。例年に比ベインドが多いのが特徴的であった。例年通りインドネシアからの輸

入症例は上半期に多く、また 9 例中 6 例が有名な観光地であるバリ島に滞在歴のある方であった。毎年複数名バリ島に滞在歴のある患者が発生することから、上半期にバリ島へ渡航する者には Dengue 感染症に対する注意を特に促す必要がある。一方タイ、インドおよびフィリピンからの輸入症例の多くは 7 月以降に発生した。地域別では、約 7 割強が東南アジアであり、例年よりもやや低めであった。これはインド等の南アジアからの輸入症例数が例年以上であったためである。2008 年はブラジルで Dengue 熱の大流行が起こったものの、中南米からの輸入症例は 2 例と例年以下であった。2008 年は渡航先がアフリカ (コートジボアール) の Dengue 熱患者が出た。渡航先がアフリカの Dengue 熱患者は本国では非常にまれである。Dengue ウイルスには 4 種 (1 型~4 型) の血清型が存在する。67 例中 49 例で型が特定され、それらの割合は、1 型が約 35% と最も高く、次いで 3 型が約 33%、2 型が 18% と続き、4 型は 14% であった。4 型が例年よりも多く観察された。コートジボアールの血清型は 3 型であった。バリ島からの輸入症例では 2 型と 3 型の両方が同定されたが、2 型は 2 月および 3 月の症例 (3 例)、3 型は 5 月の症例 (2 例) と時期が異なっていた。バリ島では異なる時期に異なるウイルスが流行していたのかも知れない。我々は有熱期の Dengue 熱患者血清からウイルス分離も試みており、今後これらの分離されたウイルスの解析も進めてゆく予定である。

D. 結論

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り、今後もサーベイランスは継続すべきである。これらの地域では近年毎年のように大流行が起こっている。蔓延地域への渡航者にデングウイルスに感染するリスク等について注意を徹底する必要がある。デング感染症は北上しつつあり、現在台湾南部は蔓延地域である。この原因として、地球温暖化によるデング熱感染蚊の越冬が示唆されている。沖縄など南西諸島では、この点についても今後注意を払う必要がある。また近年デングウイルスゲノムに特徴的な変異が観察されてきたが、その理由は不明である。今後とも注意深くこのウイルスゲノム領域の変化を追跡する必要がある。

E. 健康危機情報
特になし

F. 研究発表
論文発表 (英文)

- 1) Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R., and Kurane, I.

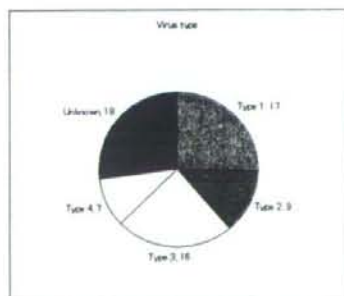
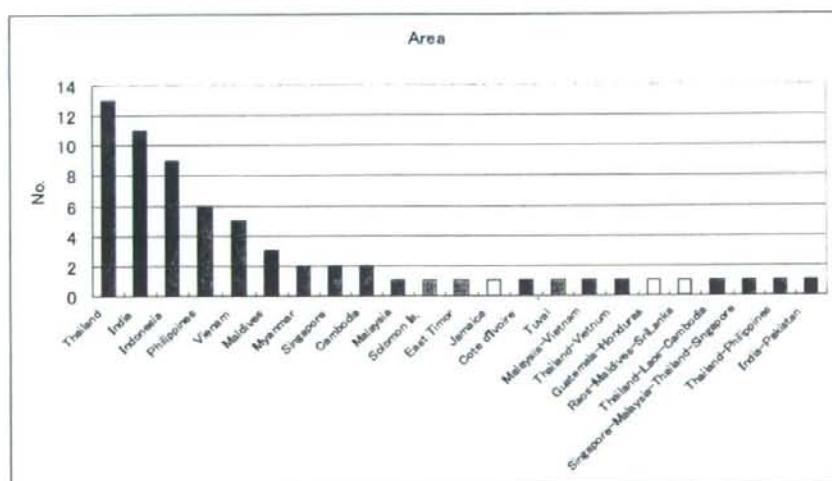
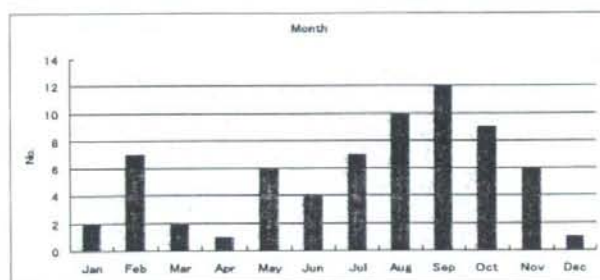
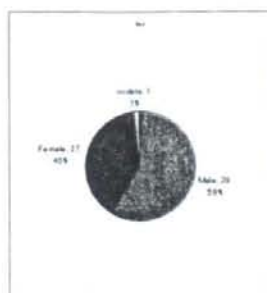
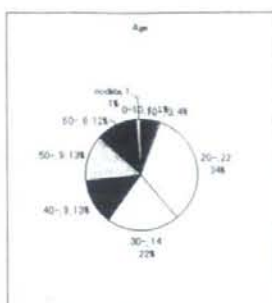
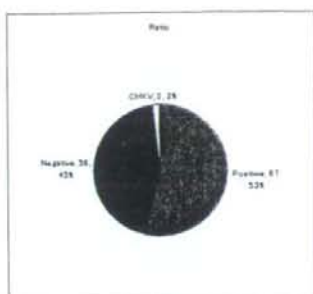
Dengue virus type 1 isolated from an imported dengue patient in Japan: first isolation of dengue virus from Nepal. *Journal of Travel Medicine*, 15: 46-49, 2008.

- 2) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes*, 36: 323-329, 2008.

学会発表

- 1) 田島茂、加藤文博、小滝徹、貫井陽子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスゲノム 3'非翻訳領域上の欠失・挿入変異体の性状解析。第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 20 年 10 月)
- 2) 貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS4A の 1 アミノ酸変異は IFN β の誘導を低下させることにより病原性を高める。第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (平成 20 年 10 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし



分担研究報告書

フラビウイルス共通プライマーを用いた小樽検疫所における蚊族成虫のフラビウイルス検査の実施

分担研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）

協力研究者 松本 泰治（小樽検疫所検疫衛生課試験検査室長）

高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）

倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究要旨

これまでに我々はフラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められる NS5 領域にフラビウイルス共通 PCR プライマーを設計した結果、蚊媒介性およびダニ媒介性フラビウイルスさらにコウモリから分離されたフラビウイルスであるヨコセウイルスを検出することが可能なフラビウイルス共通プライマーを作製することに成功した。そこで我々は本プライマーをフラビウイルス感染症の迅速診断に応用し、近年その動態が明らかでない北海道における蚊のフラビウイルス保有状況の調査を行った。

A. 研究目的

フラビウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるウイルスの総称であり、エンベロープを有する直径 40-50nm の一本鎖 RNA ウイルスである。フラビウイルスには日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルスなど約 70 種類のウイルスが分類されている。その名称はラテン語で黄色を意味する flavus に由来し、その多くは節足動物により媒介されるアルボウイルスである。特に日本では脳炎を発症するフラビウイルスが問題となっている。フラビウイルス脳炎の原因ウイルスとしては蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、クンジンウイルス、マレー渓谷脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルスなどの日本脳炎血清型群のウ

イルスとダニによって媒介されるロシア春夏脳炎ウイルス、中欧ダニ脳炎ウイルス、北米ポワッサン脳炎ウイルスなどのダニ媒介性脳炎群のウイルスが挙げられる。本邦におけるフラビウイルス脳炎はこれまで主に日本脳炎およびダニ媒介性脳炎が問題であった。加えて現在は北米で流行している再興感染症のウエストナイルウイルス脳炎に対する警戒が必要となっている。我々はこれまでにブタを用いた日本脳炎流行予測調査を毎年行い、現在も日本脳炎が北海道を含む全国に分布していることを明らかにしてきた。しかしながら近年の北海道における蚊のフラビウイルス保有状況は明らかとなっていない。

ところで、これまでに我々はフラビウイルス間で比較的共通した塩基配列の認められる NS5 領域に PCR プライマーを設計し、