

Table 1. Primers, labeling dyes and multiplex PCR combinations.

Multiplex PCR	Locus (alias)	Primer sequence (5' to 3') ^a	Final conc. (μM)	T _m (°C)	Dye labeled
1	ST16	TGCCACACAAGACGAAATTA	0.15	F : 58	PET
		TCTATGCAAACCAGCAATGA		R : 59	
	ST17	CGAAGCACTTAGCAAGAACG	0.1	F : 59	VIC
		GAGTCCAACAGGAAACCGTAA		R : 59	
ST35	GGATGCGCTGTTAGAACGTC	0.15	F : 61	NED	
	CCACGGTGTAACCCGTTAG		R : 60		
ST36	CTCCCCCTTTTTCAGGGTAT	0.4	F : 59	FAM	
	GCCATGCAGTCCGCTATTAT		R : 60		
2	ST01 (STTR7)	CCGAGTCAACGCCTGTTTCAG	0.1	F : 61	NED
		ACGCTGTAATGGACGGCTGTC		R : 61	
	ST22	GGTCATTGAGGACGTGTGAT	0.1	F : 59	VIC
		GACGGGAATACCCTGGAATA		R : 59	
ST28	GCGGCAGTTGATTTATGACT	0.1	F : 58	FAM	
	CTTCAAGGCAAAAAGAGGTG		R : 58		
ST30	CATCGGGAAAGATGTAATCC	0.2	F : 58	PET	
	ATGCTGGATCGAACTGAAAA		R : 59		
3	ST25 (STTR5)	ATGGCGAGGCGAGCAGCAGT	0.2	F : 66	VIC
		GGTCAGGCCGAATAGCAGGAT		R : 61	
	ST26 (STTR9)	AGAGGCGCTGCGATTGACGATA	0.1	F : 65	NED
		CATTTTCCAACAGCGGCAGTTTTTC		R : 65	
ST38	CCGCACACTAAGGAGAGACT	0.1	F : 58	FAM	
	TGGCTAACATCCTGAAGCTC		R : 59		
ST40 (STTR10)	CGGGCGCGGCTGGAGTATTTG	0.2	F : 69	PET	
	GAAGGGGCCGGGCAGAGACAGC		R : 70		
4	ST06 (STTR3)	CCCCCTAAGCCCGATAATGG	0.4	F : 64	FAM
		TGACGCCGTTGCTGAAGGTAATAA		R : 66	
	ST19 (STTR6)	TCGGGCATGCGTTGAAA	0.1	F : 64	NED
		CTGGTGGGGAGAATGACTGG		R : 63	
	ST20	GCGGGAGGATCTTTTATGG	0.1	F : 60	VIC
ACGAAGCGCCCTGATAAGTA		R : 60			
ST23	GCGGTACTGACGTCAAGTCTAA	0.2	F : 60	PET	
	CATAGGGCGCATACGTGATA		R : 60		

^aPrimers for STTR3, STTR5, STTR6, STTR9 and STTR10 were described previously (Lindstedt et al., 2004)

Table 2. Thirty-nine VNTRs and their repeat-unit sizes, locations in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain LT2, copy number of repeats in five sequenced strains and the repeat sequence matches and indels.

Locus (alias) ^a	Size of repeat (bp)	Location in LT2	Number of repeats in strain ^b					Match/Indels %
			LT2	DT104	SL1344	DT2	D23580	
ST01 (STTR7)*	39	1039570–1 039883	8 (+6) [318]	8 (+6) [318]	9 (-3) [348]	9 (-3) [348]	9 (-3) [348]	95/0
ST02	7	1068740–1 068755	2	2	2	1	2	100/0
ST03	15	1129917–1 129946	2	1	1	1	1	100/0
ST04	184	1224141–1 224760	3	2	2	2	2	98/0
ST05	6	1227883–1 227894	2	2	2	2	4	100/0
ST06 (STTR3)*	27/33	1227533–1 227864	2/11 [417]	3/11 [444]	2/12 [450]	2/12 [450]	2/10 [384]	93/0
ST08	8	1427644–1 427660	2	2	2	1	2	100/0
ST09	93	1531617–1 532114	5	4	5	5	5	92/0
ST10	3	1599216–1 599231	5	5	5	4	3	100/0
ST11	61	1762210–1 762299	1	2	2	1	0	100/0
ST12	174	1852925–1 853649	4	3	4	4	4	95/0
ST13	9	1958279–1 958306	3	3	3	4	0	100/0
ST14	12	2053194–2 053227	3	3	3	3	2	100/0
ST15	9	2078424–2 078447	2	2	2	2	3	93/0
ST16*	9	2332010–2 332035	2	2	2	2	3	100/0

ST17*	7	2332558-2 332573	2	1	2	1	2	100/0
ST18	9	0-0	0	1	2	1	1	100/0
ST19 (STTR6)*	6	2730867-2 730948	13	17	8	6	9	100/0
ST20*	6	2750702-2 750722	2	3	2	2	2	100/0
ST21	4	282139-28 2154	4	3	3	3	3	100/0
ST22*	12	2804204-2 804239	3	3	3	3	2	100/0
ST23*	8	29673-296 90	1	3	2	2	2	100/0
ST24	15	3058600-3 058630	2	2	1	2	2	87/0
ST25 (STTR5)*	6	3184543-3 184622	13	13	8	17	7	100/0
ST26 (STTR9)*	9	3246675-3 246714	4	3	2	2	2	100/0
ST27	3	3314480-3 314494	5	5	5	4	5	100/0
ST28*	15	3381836-3 381850	1	2	1	1	1	100/0
ST29	27	3629474-3 629562	3	4	3	3	3	98/0
ST30*	200	3682911-3 683315	2	1	1	1	1	100/0
ST31	3	36988-369 99	4	4	3	4	4	100/0
ST32	3	3762698-3 762709	4	5	5	5	5	100/0
ST33	6	3965616-3 965629	2	2	3	2	2	100/0
ST34	10	40921-409 40	2	2	2	2	1	100/0
ST35*	12	4210906-4 210930	2	2	2	2	1	96/0

ST36*	4	758696–75 8708	3	3	2	3	3	100/0
ST37	155	819457–82 0015	3	2	2	2	2	96/0
ST38*	12	83274–833 01	2	2	2	2	1	100/0
ST39	6	891800–89 1814	2	2	3	2	2	100/0
ST40 (STTR10)*	6	53711–537 71	10	24	7	NA	9	100/0

^aLoci that were polymorphic among a panel of 40 diverse isolates are marked with an asterisk (*). The copy number of STTR10 for strain LT2 was examined from plasmid pSLT (accession no. NC_003277).

^bSTTR7 bears eight copies of repeats with a 6-bp insertion (+6) and nine copies of repeats with a 3-bp deletion (-3). STTR3 is presented in terms of the copy number of 27-bp repeats/33-bp repeats. The number in [] for both VNTRs is the size (in bp) of the repeat array.

Table 3. Allelic diversity of 16 VNTRs in a panel of 183 diverse isolates and a panel of 203 closely related isolates

Locus (alias)	Size of repeat (bp)	No. alleles in P386	Range of repeat units in P386*	Allelic diversity in P183	Allelic diversity in P203
ST01 (STTR7)	39	5	a	0.302	0.009
ST06 (STTR3)	27/33	7	b	0.681	0.028
ST16	9	3	2-4	0.437	0.000
ST17	7	3	1-3	0.469	0.096
ST19 (STTR6)	6	19	5-23	0.908	0.721
ST20	6	3	2-4	0.504	0.036
ST22	12	2	2-3	0.132	0.010
ST23	8	4	1-4	0.518	0.042
ST25 (STTR5)	6	20	4-27	0.922	0.447
ST26 (STTR9)	9	5	1-6	0.373	0.087
ST28	15	2	1-2	0.484	0.000
ST30	200	2	1-2	0.084	0.000
ST35	12	2	1-2	0.011	0.000
ST36	4	2	2-3	0.032	0.000
ST38	12	2	2-3	0.043	0.000
ST40 (STTR10)	6	22	0, 6-26	0.911	0.549

* Five alleles of STTR7 by repeat array: 240, 300, 318, 339 and 357-bp; b, seven alleles of STTR3 by repeat array: 276, 363, 390, 396, 417, 444 and 450-bp.

Table 4. Discriminatory power of PFGE and various MLVAs based on various combinations of VNTRs for a panel of 183 diverse isolates and a panel of 203 closely related isolates.

Method	Diverse isolates (P183)			Closely related isolates (P203)		
	No. genotypes	DI	CI	No. genotypes	DI	CI
PFGE	147	0.9956	0.9929-0.9983	8	0.8464	0.8259-0.8668
MLVA4 ^a	157	0.9975	0.9958-0.9992	108	0.9763	0.9669-0.9857
MLVA5 ^b	159	0.9977	0.9960-0.9994	108	0.9772	0.9682-0.9863
MLVA8 ^c	160	0.9978	0.9962-0.9994	117	0.9803	0.9721-0.9886
MLVA16	161	0.9979	0.9963-0.9995	118	0.9811	0.9731-0.9890

^aSTTR3, STTR5, STTR6 and STTR10 for P183; ST17, STTR5, STTR6 and STTR10 for P203

^bSTTR3, STTR5, STTR6, STTR9, and STTR10

^cST17, ST20, ST23, STTR3, STTR5, STTR6, STTR9 and STTR10 for P183 and P203

Table 5. PFGE and MLVA genotypes for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates recovered from seven foodborne disease outbreaks

Outbreak	Date occurrence	No. isolates	PFGE type (No. isolates)	MLVA type
1	1998/10/2	10	JPX.0001 (9) JPX.0005 (1)	SM16.130
2	1999/12/27	12	JPX.0001 (10) JPX.0004 (2)	SM16.130
3	2000/1/7	5	JPX.0001 (5)	SM16.130
4	2001/4/4	13	JPX.0001 (13)	SM16.130
5	2001/12/4	7	JPX.0013 (7)	SM16.284
6	2002/1/11	3	JPX.0071 (3)	SM16.285
7	2003/7/7	4	JPX.0070 (4)	SM16.283

プロジェクト2：ウイルス

デング熱

分担研究報告書

マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者の血清学的解析

研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究協力者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）

林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）

研究要旨：マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者血清を用い、これまでに確立した血清学的検査法が流行地域の患者血清に使用可能であるかを検討した。マレーシアはチクングニア熱とともにデング熱の流行地域であるため、デングウイルスに対する IgM 抗体、中和抗体も検討した。80 人中血清学的に 14 人はチクングニア熱患者と判定されたが、13 人はデング熱と判定された。3 血清は両ウイルスに対する IgM 抗体抗体を有し、確定が困難であった。これまでに確立した中和法、IgM 捕捉 ELISA 法によりチクングニア熱の実験室診断が可能であることが示された。また、東南アジアの患者においてはチクングニアウイルス、デングウイルスに対する検査を同時に行うことが重要であることが示された。

A. 研究目的

チクングニア熱は 2005 年初頭にインド洋諸島で流行が発生し、その流行はインド、スリランカ、イタリア、マレーシア、タイ、シンガポールに拡大するとともに欧州、米国、アジア、オセアニア諸国において多くの輸入症例が報告されている。アジア諸国では近年シンガポール、マレーシア、タイでの流行が確認されている。マレーシアでは 2009 年までに 10,000 症例以上の患者が報告された。チクングニア熱は、我が国では感染症法や検査法に定められていない疾患であるため、検査可能な機関が少ない。本研究では、マレー

シアの K.B. Chua 博士 (Malaysia, The National Public Health Lab) と共同研究体制を確立し、これまでに確立した血清学的検査法が流行地域の患者血清に使用可能であるかを検討した。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞：チクングニアウイルス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)。

抗体検出：チクングニアウイルスおよびデ

ング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°C1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。チクングニアウイルスIgM抗体、デングウイルスIgM抗体はIgM捕捉ELISA法で検出した。

C. 研究結果

マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者血清80検体を検査した (Table1)。

17検体においてはチクングニアウイルスIgM抗体が検出され急性期のチクングニアウイルス感染が示唆された。このうち15血清では同時に中和抗体も検出された。

マレーシアはチクングニア熱とともにデング熱の流行地域であるため、デングウイルスに対するIgM抗体、中和抗体も検討した。多くは中和抗体を有し16検体はデングウイルスに対するIgM抗体陽性であった。特に、検体38、66、73はチクングニアウイルスIgM抗体、デングウイルスIgM抗体がいずれも陽性であった。従って、血清学的には14人はチクングニア熱患者と判定されたが、13人はデング熱と判定される。両ウイルスに対するIgM抗体を有する患者は、確定が困難であった。

D. 考察

我々はIgM捕捉ELISA法、50%プラーク減少法を用いた中和法を確立した。これら診断

法を用いてチクングニア熱疑いマレーシア患者血清を検査した。鑑別診断としてデング熱に対する解析も同時に行った。その結果、チクングニア疑い患者80例、14例はチクングニア熱、13例はデング熱であった。興味深いことに、3例は両ウイルスに対するIgM抗体が陽性であり、いずれとも判定できなかった。両ウイルスに同時に感染した可能性もあるが、更なる検討が必要である。一般に、IgM抗体が検出されれば、1検体によっても感染を確定できるといわれているが、特に複数のウイルスが流行している地域においてはIgM抗体であっても、急性期と回復期でその上昇を確認する必要があることが示された。

E. 結論

マレーシアのチクングニア疑い患者血清を用いて、これまでに確立した中和法、IgM捕捉ELISA法により実験室診断が可能であることが示された。また、チクングニア疑い患者の中にはデング熱患者も多く含まれていることから、東南アジアの患者においてはチクングニアウイルス、デングウイルスに対する検査を同時に行うことが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Tanaka, K., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: Isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am. J. Trop.*

Med. Hyg., 2009. 81(5):865-868.

Lim, C.K., Kurane, I., and Takasaki, T. (2010) Re-emergence of chikungunya virus, pp. 1-22. In Maeda, A. (ed), *Animal Viruses*. Transworld Research Network., Kerala, India.

Aoyama, I., Uno, K., Yumisashi, T., Takasaki, T., Lim, C.K., Kurane, I., Kase, T., Takahashi, K. A Case of Chikungunya Fever Imported from India to Japan, Follow-Up of Specific IgM and IgG Antibodies over a 6-Month Period. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2010. 63(1):65-66.

H. 学会発表

C. Lim, T. Nishibori, K. Watanabe, M. Ito, A. Kotaki, I. Kurane., T. Takasaki. Chikungunya Virus Isolated from a Patient Who Came Back to Japan from Sri Lanka: Isolation of two strains with different characteristics. The West Nile virus 2009 National Conference (Savannah, GA, USA) 2009/2/19-20.

林 昌宏, 高崎智彦, モイ メンリン, 大松 勉, 小滝 徹, 倉根一郎: 東南アジアにおけるチクングニヤ熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第 56 回日本ウイルス学会 (東京都) 2009 年 10 月 25-27 日

水野泰孝、氏家無限、竹下望、加藤康幸、金川修造、工藤宏一郎、高崎智彦、林 昌宏、倉根一郎: 遅延する関節痛を主訴に来院したチクングニヤ熱の 3 症例. 第 58 回日本感染

症学会東日本地方会学術集会 (東京都) 2009 年 10 月 30-31 日

林 昌宏、小滝 徹、高崎智彦、倉根一郎. フラビウイルス感染症迅速診断のための共通プライマーの開発. 第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (北海道) 2009 年 6 月 19-20 日

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table1:マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者血清の血清学的検査

ID	Date	CHIK		DENV			中和 D1	中和 D2
		中和抗体	IgM	IgM	NS1 Ag			
1	OB48/08/21	09/25/08	<10	-	+	-	>10	<10
2	OB48/08/36	ND	1:10	-	-	-	>10	<10
3	OB48/08/51	09/28/08	<10	-	-	-	>10	>10
4	OB48/08/52	09/28/08	<10	-	+	-	>10	>10
5	OB48/08/73	09/30/08	<10	-	-	-	>10	>10
6	OB48/08/80	09/30/08	<10	-	-	-	<10	<10
7	OB48/08/109	10/02/08	<10	-	-	-	>10	<10
8	OB48/08/145	10/05/08	<10	-	-	-	>10	>10
9	OB48/08/147	10/05/08	<10	-	-	-	>10	<10
10	OB48/08/211	10/06/08	<10	-	-	-	<10	<10
11	OB48/08/221	10/06/08	<10	-	-	-	>10	>10
12	OB48/08/403	10/12/08	<10	-	+	-	>10	>10
13	OB48/08/489	ND	<10	-	-	-	<10	>10
14	OB48/08/490	10/13/08	<10	-	-	-	>10	>10
15	OB48/08/494	10/14/08	<10	-	-	-	>10	<10
16	OB48/08/499	10/14/08	<10	-	+	-	>10	>10
17	OB48/08/567	10/15/08	<10	-	-	-	>10	>10
18	OB48/08/574	10/16/08	<10	-	-	-	>10	>10
19	OB48/08/60	09/29/08	<10	-	-	-	<10	<10
20	OB48/08/589	10/15/08	<10	-	-	-	>10	>10
21	OB48/08/12	09/25/08	<10	-	-	-	>10	>10
22	OB48/08/62	09/29/08	<10	-	-	-	<10	<10
23	OB48/08/64	09/29/08	<10	-	-	-	>10	>10
24	OB48/08/65	09/29/08	<10	-	+	-	>10	>10
25	OB48/08/68	ND	<10	-	-	-	<10	<10
26	OB48/08/124	10/01/08	<10	-	+	-	>10	>10
27	OB48/08/148	ND	<10	-	-	-	<10	<10
28	OB48/08/156	10/04/08	<10	-	-	-	>10	<10
29	OB48/08/199	10/06/08	<10	-	+	-	>10	>10
30	OB48/08/200	10/03/08	<10	-	-	-	>10	>10
31	OB48/08/201	10/06/08	<10	-	-	-	<10	<10
32	OB48/08/205	10/06/08	<10	-	-	-	<10	<10

33	OB48/08/206	10/06/08	<10	+	-	-	<10	<10
34	OB48/08/207	10/07/08	<10	-	+	+	>10	<10
35	OB48/08/209	10/07/08	<10	-	-	-	>10	<10
36	OB48/08/215	10/06/08	<10	-	-	-	>10	>10
37	OB48/08/216	10/06/08	<10	-	-	-	<10	<10
38	OB48/08/223	10/06/08	<10	+	+	-	<10	>10
39	OB48/08/150	10/03/08	<10	-	-	+	>10	<10
40	OB48/08/176	10/04/08	<10	-	-	+	>10	>10
41	OB48/08/195	10/04/08	<10	-	-	+	<10	>10
42	OB48/08/204	10/07/08	<10	-	+	+	>10	>10
43	OB48/08/284	10/29/08	<10	-	-	+	>10	>10
44	OB48/08/501	10/13/08	<10	-	-	+	>10	>10
45	OB48/08/592	10/16/08	<10	-	+	+	>10	>10
46	OB48/08/50	09/28/08	<10	-	-	+	>10	>10
47	OB48/08/203	10/06/08	<10	-	+	+	<10	>10
48	OB48/08/388	11/10/08	<10	-	-	+	<10	>10
49	OB48/08/571	10/15/08	<10	-	-	+	>10	>10
50	OB48/08/125	10/01/08	<10	-	-	+	<10	<10
51	OB48/08/153	10/04/08	<10	-	-	+	<10	<10
52	OB48/08/157	10/03/08	<10	-	-	+	>10	<10
53	OB48/08/164	10/03/08	<10	-	-	+	>10	>10
54	OB48/08/166	10/06/08	<10	-	-	-	>10	>10
55	OB48/08/496	10/14/08	<10	-	-	+	<10	>10
56	OB48/08/07	09/25/08	<10	-	+	+	>10	>10
57	OB48/08/18	09/26/08	<10	-	-	-	>10	>10
58	OB48/08/146	10/05/08	<10	-	-	+	<10	>10
59	OB48/08/385	11/10/08	<10	-	-	+	>10	<10
60	OB48/08/386	11/10/08	<10	-	+	+	>10	<10
61	OB48/08/414	10/13/08	<10	-	-	+	<10	<10
62	OB48/08/500	10/14/08	<10	-	-	+	<10	>10
63	OB48/08/587	10/17/08	<10	-	-	+	>10	<10
64	OB48/08/973	10/28/08	1:40	+	-	-	>10	>10
65	OB48/08/988	ND	1:40	+	-	-	>10	>10
66	OB48/08/992	10/21/08	1:40	+	+	-	>10	>10
67	OB48/08/994	10/29/08	<10	-	-	-	<10	<10
68	OB48/08/1003	10/28/08	1:10	+	-	-	<10	<10

69	OB48/08/1004	10/28/08	1:10	+	-	-	<10	<10
70	OB48/08/1005	10/28/08	1:20	+	-	-	>10	>10
71	OB48/08/1006	10/28/08	1:10	+	+/-	-	>10	>10
72	OB48/08/1007	10/28/08	1:10	+	-	-	>10	>10
73	OB48/08/1008	10/28/08	1:10	+	+	-	>10	<10
74	OB48/08/1010	10/28/08	1:20	+	-	-	>10	<10
75	OB48/08/1035	ND	1:10	+	-	-	>10	>10
76	OB48/08/1156	11/04/08	1:40	+	-	-	>10	>10
77	OB48/08/1159	11/06/08	1:20	+	-	-	>10	>10
78	OB48/08/1160	11/06/08	1:20	+	-	-	>10	>10
79	OB48/08/1163	11/07/08	1:10	+	-	-	>10	>10
80	OB48/08/1167	11/07/08	<10	-	-	-	<10	<10

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

日本脳炎実験室診断ネットワークの構築と IgM キット評価

分担研究者 高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)

協力研究者 田島茂、林 昌宏、大松 勉、小滝 徹、倉根一郎

(国立感染症研究所ウイルス第一部)

世界保健機関 (WHO) のワクチンによる防御可能な感染症に日本脳炎が加えられたことから、我が国は日本脳炎実験室診断に関して各地域レファレンスセンターを指導する立場である Global Specialized Laboratory (GSL) に WHO から指定された。WHO 西太平洋地域内の域内レファレンスセンター (Regional Reference center) として、中国 CDC と韓国 CDC が選定された。現在、米国 CDC と協力して日本脳炎血清診断用パネル血清・髄液を作製中である。今回は米国 CDC が選定したパネル 13 検体 (髄液 5 検体、血清 6 検体) を評価したところ、髄液で 1 検体不一致であったが、再確認の結果、われわれの検査結果が正しいと結論された。またこのパネルを用いて市販されているキットを評価したところ市販キットの感度、特異性は、米国 CDC、ベトナム NIHE、ベトナムパスツール研究所および我々の *in house* キットに劣ることが明らかとなった。

A. 目的 世界保健機関 (WHO) のワクチンによる防御可能な感染症としてポリオ、麻疹、風疹に日本脳炎を加えた。日本脳炎の流行地域にワクチンを普及しその効果を評価するためには、正確な実験室診断にもとづくサーベイランス情報が重要である。実験室診断法としては、病原体診断法 (ウイルス遺伝子検出: PCR 法、ウイルス分離など) と血清学的診断法がある。各国におけるサンプルの輸送時の保存状態や保管状況を考慮すると、サーベイランスの実験室診断法として中心となるのは血清学的診断であり、各施設の診断能力の均一性を評価するためには国際的なパネル血清・髄液を

用意する必要がある。そこで、日本脳炎実験室診断に関する Global Specialized Laboratory (GSL) である国立感染症研究所と米国 CDC が協力してパネル血清・髄液の作製を開始した。

B. 方法 東南アジア、南アジア、中国など日本脳炎流行国の日本脳炎患者血清および髄液を収集し、IgM 捕捉 ELISA 用の初回パネルとして 11 検体を選定した。その内訳は血清 6 検体、髄液 5 検体であった。パネルには日本脳炎ウイルスと近縁で交差反応を起こすデング熱患者の検体も加えた。パネルの実験室診断は米国 CDC が中和試験

(ブランク減少法による) および IgM 捕捉 ELISA 法により確認した。パネルはそれぞれ *in house* のキットを有する日本 (国立感染症研究所)・米国 CDC・中国 CDC (実際には Commercial 化されている)・ベトナム NIHE・ベトナムパスツール研究所 (ホーチミン) で評価し、また独自の *in house* キットを持たない国 7 施設では、panbio 社の日本脳炎・デングウイルスコンボ IgM ELISA キットを用いて、作製したパネル血清および panbio 社のキットを評価した。panbio 社のキットは日本脳炎ウイルスとデングウイルス感染を鑑別できると標榜しているキットである。panbio 社のキットの使用法は、2009 年 6 月にソウルで開催された日本脳炎実験室診断トレーニングコースで習熟したものが実施した。IgM 捕捉 ELISA における。各検体の使用量は、血清は 100 倍希釈、髄液は 10 倍希釈 (感染研は 20 倍希釈を適用) で実施した。

C. 結果

panbio 社のキットの検査結果は、7 施設中 5 施設で結果が一致した。その 5 施設で一致した検査結果は、表 1 の No.5 列に示したごとく、実際の結果とは 3 検体で正しくなく正解率は 73%であった。

表 1 に示す如く *in house* キットによるパネルの評価では、No.1 と No.3 の髄液および No.11 の血清で不一致が認められた。しかし、当初の米国 CDC と感染研の結果の不一致は、No.3 のみであった。この No.3 の髄液は米国 CDC の再検査結果から、感染研および他の 3 施設の結果と一致した。最終診断との一致率は、感染研が 100%、他の施設の *in house* キットでは、それぞれ 82%、

91%、82%であった。

D. 考察

in house キットを用いた評価では、No.1 の髄液は感染研および米国 CDC のキットと比べて他施設のキットの感度が劣ることが示唆された。No.3 の髄液は日本脳炎とデング熱の鑑別が難しくパネルとしては適切でないと考えられる。しかし、髄液を用いた検査において各施設間で 5 検体中 2 検体が不一致であったことから、検査に用いる髄液の使用量なども再検討する必要があると考えられる。また、No.11 の血清はデング熱患者の血清であるが、IgM 抗体力価が高すぎることで、デング熱と日本脳炎の鑑別が困難であったと考えられた。したがって、パネル作製の血清・髄液をさらに集めるより適切な検体を選ぶ必要がある。そのため我が国においても患者血清および髄液の供出等で協力する必要がある。

一方 panbio 社のキットは、いずれの *in house* キットと比較しても正解率が低く、ラボネットワークとして各施設において共通に使用するキットとしては推薦できないと考えられる。

さらに、IgM 捕捉 ELISA の感度と特異性の向上には、(1) 抗ヒト IgM 抗体コーティングプレートの質的および保存性の向上。

(2) 日本脳炎ウイルス抗原の抗原性の保持と精製度の向上。(3) 反応性のよい 2 次抗体 (抗原検出抗体) の 3 要素が重要である。この 3 つの要素を少なくとも GSL (感染研、米国 CDC) および RRL (中国 CDC、韓国 CDC) では早急に統一する必要がある。

また、デングウイルスによる脳炎の症例報告はあるが、その発生率はそれ程高くな

く、どこまで IgM 抗体検査により鑑別する必要があるのかも、急性脳炎症候サーベイランス (Acute encephalitis syndrome) の実施方法とも合わせて議論する必要がある。

E. 結 論

日本脳炎 IgM 抗体検査用のパネル(血清、髄液)を 11 検体選択した。髄液の検体選択は慎重でなければならない。また、髄液を検査する場合に何倍希釈を用いるかも再検討する必要がある。panbio 社の日本脳炎・デングウイルスコンボ IgM ELISA キットは、感度および特異性が低く共通に使用するキットとして適当でないと考えられた。今後は GSL (感染研、米国 CDC) および RRL (中国 CDC、韓国 CDC) では統一する方向で進めていきたい。

F. 健康危険情報

な し

G. 研究発表

な し

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Tomohiko Takasaki, Johnson Barbara. Approaches for improving the accuracy of JE IgM assays. 2nd Workshop on Laboratory surveillance for Vaccine Preventable Diseases in the Western Pacific Region, WHO. 22-26 Feb. 2010 (Manila)

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. Results of the 2009 WPR JE Labnet proficiency testing: In-house and non-Panbio commercial kits

Sample #	Type	CDC		Laboratory Number/results of IgM ELISA				
		ELISA and PRNT results		1; 感染研	2*	3*	4*	5*
		US.CDC	CDC updated results (2/17/10)					
1	CSF	JE PRESUMPTIVE	JE PRESUMPTIVE	JE	NEG	NEG	NEG	DEN
2	CSF	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
3	CSF	NEG	JE PRESUMPTIVE	difficult to distinguish	JE	JE	JE	NEG
4	CSF	JE PRESUMPTIVE	JE PRESUMPTIVE	JE	JE	JE	JE	JE
5	CSF	JE PRESUMPTIVE	JE PRESUMPTIVE	JE suspected	JE	JE	JE	NEG
6	serum	DEN POSITIVE	DEN POSITIVE	DEN	NEG	DEN	NEG	DEN
7	serum	JE POSITIVE	JE POSITIVE	JE	JE	JE	JE	JE
8	serum	JE PRESUMPTIVE	JE PRESUMPTIVE	JE	JE	JE	JE	JE
9	serum	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
10	serum	DEN PRESUMPTIVE	DEN PRESUMPTIVE	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
11	serum	DEN POSITIVE	DEN POSITIVE	DEN	JE	DEN	JE	DEN
		Kit used		In-house	Non panbio Commercial	In-house	In-house	panbio
		Reporting date		2-Jul	2-Jul	5-Jul	6-Jul	25-Jun
		%Agreement with CDC results		100	82	91	82	73

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2009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。2009年に当研究室で実験室診断された陽性検体数は42例に達したものの、過去最多を記録した昨年（67例）および一昨年（52例）よりは下回った。理由として、流行が比較的少なかったというよりも、新型インフルエンザの流行や経済不況による海外渡航者の減少によるものと考えられる。年代別では20代および30代が多かった。渡航先別ではインド、インドネシア、ベトナムの順で多く、昨年同様インドでの感染者が多かった。陽性患者数は秋を中心に多数みられ、特に10月にはインドからの帰国者が9例と多くみられた。また本年は全検査数中の13%がチクングニヤウイルス感染陽性であった。

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、2009 年は 80 例 (12 月中旬現在) であった。このうち陽性のは 42 例 (52%) に達したものの、過去最多を記録した昨年 (67 例) および一昨年 (52 例) には及ばなかった。理由として、流行が比較的少なかったというよりも、新型インフルエンザの流行や経済不況による海外渡航者の減少によるものと考えられる。陽性率は例年通りであった。陽性患者は男性が 57% であった。年代分布は 30 代が 36% と最も多く、次いで 20 代が 33%、40 代が 14%、50 代が 7% と続いた。陽性例は例年春期休暇および夏期休暇付近が多いが、2009 年は春一初夏でのピークが見られなかった。これは新型インフルエンザ流行の影響と考えられる。ただし 8 月以降は例年通りに陽性患者数が増加した。陽性患者の多い渡航先は、1 位がインド (9 例)、2 位がインドネシア (6 例)、3 位がベトナム (4 例)、4 位がフィリピン (3 例) であった。近年の特徴としてインド等の南アジアからの帰国者の割合が増加傾向にある。特に 2009 年 10 月の Dengue 熱陽性 10 例中 9 例がインドからの帰国者であった。例年インドで感染する渡航者は 8 月以降に増加す

る傾向がある。この時期はインドの雨季にあたり、Dengue ウイルス媒介蚊が大量発生し感染リスクが増加するものと考えられる。この時期にインドへ渡航する旅行者への注意喚起が必要である。

最近東南アジアおよび南アジア地域では、Dengue ウイルスと同じ媒介蚊によってヒトに感染するトガウイルス科に属するチクングニヤウイルスが流行しており、渡航者にとっても新たな脅威となっている。実際 2009 年の全検査数 80 例のうち 10 例 (13%) がチクングニヤ熱であった。2008 年が 125 例中 2 例 (2%) であり、増加傾向にある。チクングニヤウイルスは北東北以南で広く生息するヒトスジシマカでも媒介することが知られている。さらに感染患者血液中のウイルス量も非常に高いことから、本ウイルス感染者から国内に感染が拡大する可能性もある。今後はチクングニヤウイルス感染症にも注意を払う必要がある。

我々は輸入 Dengue 熱患者血清よりウイルス分離を継続的に試みている。その成果として、2003 年、2004 年および 2006 年にウイルスゲノム上の 3' 非翻訳領域にそれぞれ異なる小規模の欠失を有する Dengue 1 型ウイルスを先駆けて分離した。本領域は他の血清型の Dengue ウイルスでも見出されているがその意義は不明である。そこで我々は輸入 Dengue 熱患者の血清あるいは分離ウイルスについて、本領域の遺伝子解析を行なった。Dengue 2 型および 3 型ウイルス計 3 検体について解析を行なったが、新規の欠失を有するものは見出されなかった。

D. 結論

年間約 500 万の日本人が熱帯地域に旅行