

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。さらにデングウイルス感染症蔓延地域では近年チクングニヤウイルス感染症も急速に広がりつつある（とういよりも、すでに東南アジアおよび南アジアに定着しつつある）。実際 2009 年度の輸入チクングニヤ熱患者数は輸入デング熱患者数の 4 分の 1 にまで増加した。日本国内で夏期に一般的に見られる蚊がチクングニヤウイルスを伝播可能であることから、今後はデングウイルス感染症以上にチクングニヤウイルス感染症に注意を払う必要がある。

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., Lim, C.-K., Tajima, S., Ohmatsu, T., Moi, M.-L., and Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.* 4: 322-328, 2009.
- 2) Tajima, S., Nerome, R., Nukui, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice. *Virology*, 396: 298-304, 2010.

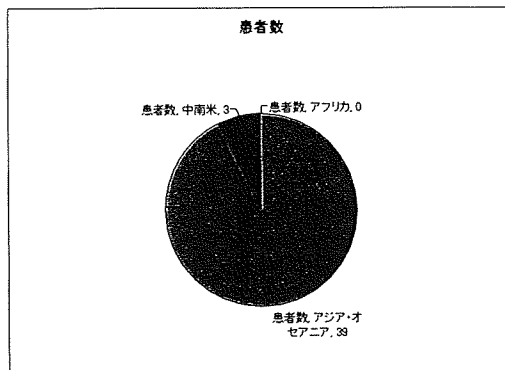
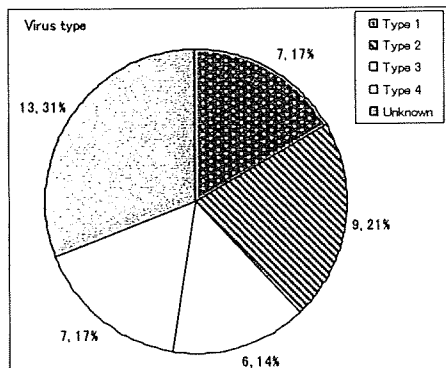
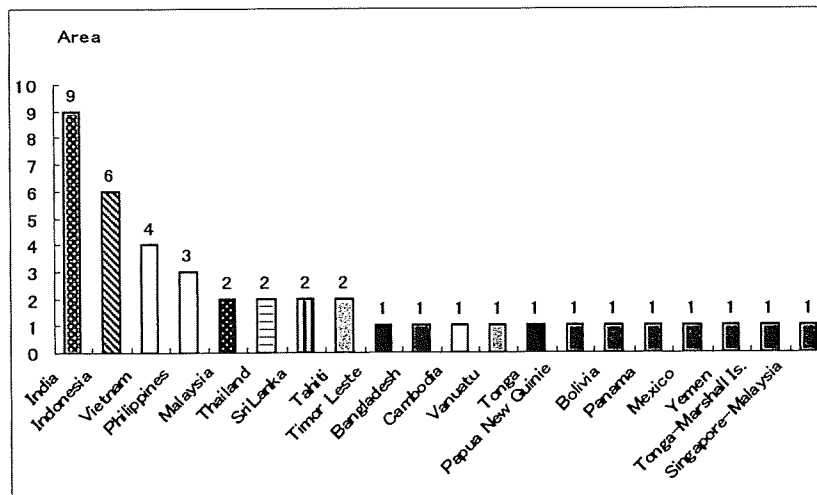
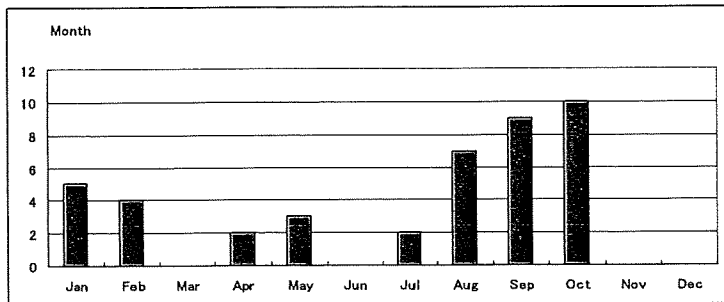
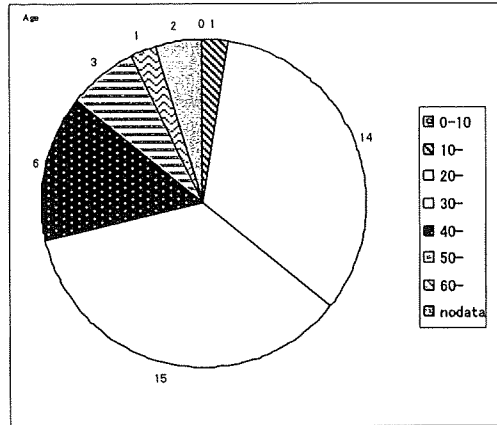
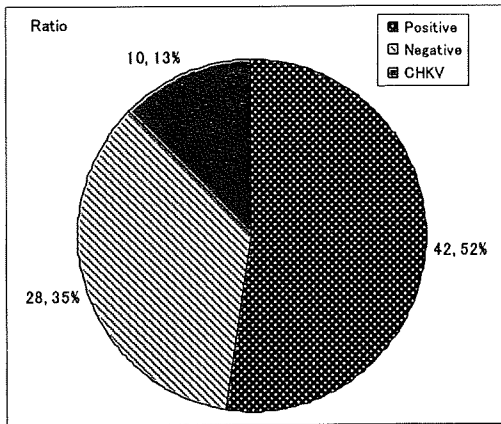
論文発表（和文）

- 1) 田島茂、高崎智彦。日本脳炎。診断と診療、97（10）2097-2100, 2009.

学会発表

- 1) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの性状解析。第 44 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（平成 21 年 6 月）
- 2) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの増殖性および病原性解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（平成 21 年 10 月）
- 3) 田島茂、加藤文博、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状を左右する日本脳炎ウイルス E 蛋白質上のアミノ酸置換。第 57

- 回日本ウイルス学会学術集会（平成 21 年 10 月）
- 4) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：デング 1 型ウイルス非構造蛋白質 NS4A の N 末端側領域の解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（平成 21 年 10 月）
- 5) 高崎智彦、小滝徹、田島茂、大松勉、林昌宏、倉根一郎：イノシシ末梢血からの日本脳炎ウイルスの分離と性状解析。第 57 回日本ウイルス学会学術集会（平成 21 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

タイ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

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 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

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。CHIKV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2010年1月までに計15例の輸入症例が確認されている。本研究ではこれまでに確立したCHIKVの検査体制を用いて流行地域であるタイ患者血清の実験室内診断を行いその性状を詳細に解析した。

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RNAウイルスで、蚊によって媒介され、その主たる媒介蚊はネッタイシマ蚊や日本にも分布するヒトスジシマ蚊である。チクングニヤ熱は、発熱・関節炎・発疹の3主徴が特徴であり時に出血傾向を呈するため、鑑別疾患としてデング熱・出血熱、ウエストナイル熱が挙げられる。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1954年以来フィリピン、タイ、カンボジア、ベトナム、ラオス、マレーシア、インドネシア、ミャンマー、スリランカ、インド等でCHIKV熱が散発していたが、近年再び大流行している。イ

ンドでは2005-2009年に少なくとも160万人の症例が報告されている。流行はスリランカに拡大し2006年から2009年にかけてCHIKV感染症例が推計57,000人報告された。さらにCHIKVの流行は東南アジアに拡散し、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。シンガポールでは2007年12月まで主にインドからの輸入症例が散発していたが、2008年1月に国内症例が初めて報告され、2009年までに900例以上のCHIKV症例が報告されている。またマレーシアでも2009年までに10,000症例以上の患者が報告された。タイでは2008年にマレーシアとの国境に位置するナラティワート県、ソクラー県、パッターニー県、ヤラー県等の南部地方を中心に2233症例が報告されたが2009年には流行地域が北部11県、東北部15県、中部17県、南部14県とタイのほぼ全土に拡大し47797の症例が報告されている。

日本においては2006年12月にいずれもスリランカで感染した日本人輸入症例2例が確認されて以来、2010年1月までに15例の輸入症例が報告されたため、本ウイルスの日本への侵淫の可能性が現在も存在することが示唆された。チクングニヤ熱は、現在のところ我が国では感染症法や検疫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。そこでこれまでに確立した検査体制を用いて流行地域であるタイの流行状況を把握するため、タイ National Institute of Health の Surapee Anantapreecha 博士および Atchareeya A-nuegoonpipat 氏と共同研究体制を確立した。チクングニヤ熱の流行地域であるタイのチクングニヤ熱患者検体を解析し、これまでの流行株との比較検討することにより、今後の予防法等の検討が可能となる。

B. 研究方法

実験室内診断：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(図1)。

合成 CHIKV RNA を用いた患者血清中の RNA コピー数の検討：CHIKV の E1 蛋白質領域をプラスミドベクターにクローニングし、目的 RNA を得た。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した。得られた検量線から血清中のウイルス RNA コピー数をリアルタイム PCR 法の結果より算出した。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 Ver

o 細胞を用いた (American Type Culture Col

lection)。

ウイルス中和試験：ウイルス中和試験は Ver o 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 Ver o 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

実験室内診断：タイの CHIK 熱疑い急性期患者血清 11 例について CHIKV 中和抗体価を解析したところいずれの血清中の中和抗体価も 20 であった。さらに RT-PCR、リアルタイム RT-PCR によりウイルス遺伝子の検出を行った結果 8 例の急性期患者血清において CHIKV が検出された。患者血清中の CHIKV RNA コピー数は 1.6×10^4 -- 9.1×10^7 RNA copies/ml であった(図2)。

ウイルス分離と遺伝子解析：Ver o 細胞を用いたウイルス分離の結果、8 例の CHIKV RNA 陽性患者血清中 3 例の患者血清を接種した細胞において激しい細胞変性効果が 4 日後に観察された。分離した 3 株のウイルスの遺伝子解析および系統樹解析を行ったところ両ウイルスは近年インド・マレーシアで流行しているウイルス株とクラスターを形成した(図3)。従って現在タイで流行している株はインド・マレーシアで流行している株と関連性があることが示唆された。

D. 考察

これまでに我々は 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%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した。そこでこれら診断法を用いてチクングニヤ熱疑いタイ患者血清に対する実験室内診断を行った。鑑別診断としてデング熱に対する解析も同時に行った。その結果ウイルス分離及び遺伝子診断において同一の患者から同時にチクングニヤウイルスとデングウイルスは分離・検出されなかった。タイ患者血清を用いたウイルス分離によりこれまでに 3 株のチクングニヤウイルスを分離した。ウイルスの分離された血清中のウイルス RNA コピー数はいずれも $>10^7$ copies RNA/ml の高いウイルス血症を示した。これら分離ウイルスの系統学的解析の結果いずれの分離株も現在アフリカおよびアジア地域で流行域を拡大している東・中央アフリカ型の遺伝子型に分類されることが示唆された。タイの流行地域はマレーシアとの国境沿いを中心に発生しており、統計学的解析においても両国の分離株は同一クラスターを形成した。

E. 結論

急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニヤ熱は今後も流行が続くことが予想される。さらに 2010 年 1 月までに日本において 15 例の輸入症例が確認されている。また流行地であるタイの患者血清より分離したウイルスを解析した結果、現在アフリカおよびアジア地域で流行地域を急速に拡大している東・中央アフリカ型の遺伝子型のウイル

スであることが示唆されたことから今後も引き続き流行動向を解析する必要が示された。チクングニヤ熱の治療法は確立されておらず、CHIKV の動向にはヒト、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であり、日本においても媒介蚊であるヒジシマカが生息することから CHIKV の我が国への侵入は予断を許さない。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニヤ熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、行政、研究機関の一層の協力体制を確立するために今後も関係各機関にこれまでの成果を提供する。

F. 健康危険情報

2007 年初頭に 2 例のスリランカからの輸入症例が日本で初めて確認された。2010 年 1 月までに日本において 15 例の輸入症例が確認されている。現在もインドおよび東南アジア地域を中心にチクングニヤ熱は流行が拡大しており、本邦にも媒介蚊であるヒトスジシマ蚊が生息するため早期の防疫体制の確立が求められる。

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.

林 昌宏. チクングニヤウイルス。臨床と微生物、36(3): 211-216, 2009

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. チクングニヤ感染症の診断法. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2010 年 2 月 25-26 日

高崎智彦, 林 昌宏. 拡大するチクングニヤ熱の現状と臨床. 平成 21 年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2010 年 2 月 25-26 日

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

林 昌宏. チクングニヤ熱検査法. 平成 20 年度希少感染症診断技術研修会 (東京都) 2009 年 2 月 24-25 日

I. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし

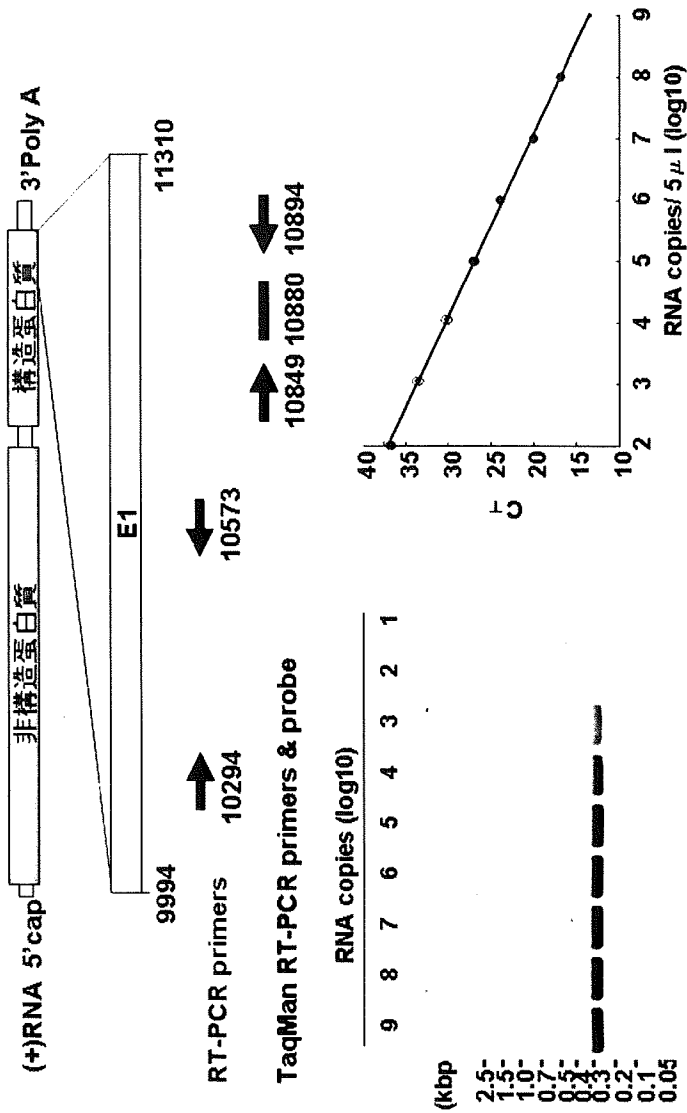


図1は、ウーイグニヤウイイルス検出プラマイマの設計：チクンPCRの領域に、E1蛋白質領域にRT-PCRのプライマーを設計し、CHIK RNAの検出に用いた。矢印は検量線における患者の血中RNA量を示す。

ウーイグニヤウイイルス検出プラマイマの設計：チクンPCRの領域に、E1蛋白質領域にRT-PCRのプライマーを設計し、CHIK RNAの検出に用いた。矢印は検量線における患者の血中RNA量を示す。

検体番号	性別	年齢	発症日	採血日	中和抗体価	Real Time RT-PCR (RNA copies/ml)
05236	F	40	09/2/5	09/2/7	<20	9.3x10 ⁶
★ 05241	F	44	09/2/4	09/2/7	<20	2.1x10 ⁷
06672	M	14	09/2/19	09/2/20	<20	8.4x10 ⁴
06674	M	13	09/2/20	09/2/20	<20	—
05521	F	2	09/2/9	09/2/11	<20	4.1x10 ⁶
★ 05638	F	62	09/2/9	09/2/12	<20	1.3x10 ⁷
06007	F	34	09/2/15	09/2/17	<20	1.6x10 ⁴
06664	M	14	09/2/20	09/2/20	<20	—
05426	F	27	09/2/6	09/2/7	<20	—
★ 05640	F	24	09/2/16	09/2/17	<20	9.1x10 ⁷
05425	M	40	09/2/10	09/2/11	<20	2.0x10 ⁵

★CHIKVが分離された症例.

図 2 . チクソングニグニヤ熱疑いのタクウイング患者血清に対する Real Time RT-PCR および中和試験の結果：チヤウイング患者血清に検出された RNA 量は >10⁷ に 3 例からはウイルスが分離された。RNA copies/ml であった。

日本脳炎ワクチンによるウエストナイルウイルスに対する交差中和抗体反応性の解析

分担研究者 高橋 和郎 (大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長)

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博、加瀬 哲男

(大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課)

研究要旨:

日本脳炎ウイルス(JEV)ワクチン免疫により、ウエストナイルウイルス(WNV)に対する交差中和抗体が誘導されるか否かについて、感染防御の観点から検討した。本研究では、JEV ワクチン被接種者の血清について、WNV に対する交差中和抗体の有無を測定した。その結果、JEV ワクチン被接種者の約 20%が WNV に対して 10 倍以上の交差中和抗体を有していた。また、交差中和抗体は JEV に対する中和抗体価が 80 倍以上のワクチン被接種者でみられ、JEV と WNV に対する中和抗体価には相関性がみられた($r=0.437$ 、 $P<0.001$)。これらのことから、日本脳炎ワクチン接種によっても WNV の交差中和抗体が誘導され、WNV の感染を防御できる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

ウエストナイル熱は、我が国への侵入が危惧されている蚊媒介性のウイルス性疾患である。しかし、現時点ではヒトに使用可能なウエストナイルウイルス(WNV)ワクチンはない。我が国にはWNVと同じフラビウイルス科に属する日本脳炎ウイルス(JEV)が存在し、ワクチンも普及している。この日本脳炎ワクチンによる、WNV 中和抗体の存在の有無は、感染防御を考えるうえで、重要な知見となると考えられる。

日本脳炎ワクチン接種者や日本脳炎患者にWNV に対する交差中和抗体は認められないという報告もあるが、動物実験では日本脳炎ワクチン免疫によって致死性のWNV感染を部分的に防御できることが示されている。

本研究では、日本脳炎ワクチン被接種者がWNV 感染に対して防御免疫能を有するか否かを明らかにするために、ワクチン被接種者の血清について、WNV に対する交差中和抗体の有無を検討した。また、日本脳炎患者血清とワクチン被接種者血清では、WNV に対する交差中

和活性に違いがあるか否かについて検討した。

B. 研究方法

1) 血清

材料として、2006～2008 年に採血した日本脳炎ワクチン被接種者血清 109 検体(0～43 歳、平均 19 歳)と1965～1978年に採取された日本脳炎患者血清 83 検体(年齢不明)を用いた。ワクチン被接種者については、中和抗体価が高いと考えられる年齢層を多く対象に含めた。

2) 中和抗体価測定

両血清について、JEV(Beijing-1 株)と、WNV(NY 株)に対する中和抗体価を、50%フォーカス減少法(FRNT₅₀)を用いて測定した。このとき、血清希釈 10 倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。

なお、本研究は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会で承認を受けており、検体提供者へはインフォームドコンセント及び検体の匿名化など倫理面への配慮がなされている。

C. 研究結果

ワクチン被接種者血清のうち、18名はJEVに対する中和抗体が陰性であった(以後中和抗体が陽性のワクチン被接種者をJEVワクチン接種者とする)。JEVに対する平均抗体価はJEVワクチン接種者582倍、日本脳炎患者552倍であった(表1)。

WNV交差中和抗体陽性者は、JEVワクチン接種者では91例中22例(24.7%)、日本脳炎患者では83例中41例(49.4%)であり、陽性率は日本脳炎患者の方が高かった(表2、3)。JEVワクチン接種者では、日本脳炎に対する中和抗体価が40倍よりも低い場合はWNVに対する中和抗体は認められなかったが、日本脳炎患者では40倍でも3/8に交差中和抗体が認められた。また、JEVに対する中和抗体価が320倍以上あるワクチン接種者では32%にWNV交差中和抗体が認められた。

JEVとWNVに対する中和抗体価の相関性は両群ともに認められたが、日本脳炎患者のほうが相関性は高く、日本脳炎に対する中和抗体価が2560倍の場合は全て交差中和を示した(図1、表3)。また、2群において、JEVに対する中和抗体価が同じ場合、日本脳炎患者のほうがWNVに対する抗体陽性率は高い傾向がみられた。交差中和を認めたJEVワクチン接種者と日本脳炎患者のWNVに対する幾何平均抗体価はそれぞれ12.9倍、26.2倍となり、日本脳炎患者の方が約2倍高い値であった。

D. 考察

WNVに対する感染を防御するために必要な中和抗体価をJEVと同様10倍以上と推論すると、日本脳炎ワクチン被接種者全体では約20%(22/109)がWNV中和抗体を有しており、WNVの感染を防御できる可能性があることが示唆される。さらに、一般健常人に対して日本脳炎ワクチンを追加接種することにより、WNVに対する中和抗体が獲得できれば、感染防御できる可能性が高まることが推定される。

日本脳炎患者とワクチン被接種者を比較すると、同じJEV中和抗体価を保有している場合、日本脳炎患者の方がWNVに対する中和抗体保有率および中和抗体価が高かった。この理由の一つとして、ワクチンの製造過程におけるウイルスの不活化時に、WNVを交差中和する抗体が認識する一部のエピトープに変性を受けたために、WNVに対する中和抗体が誘導されなかった可能性が考えられる。

今後、日本脳炎ワクチンの追加接種によりJEVに対する中和抗体価が上昇した場合、WNVに対する交差中和抗体の保有率の変化について検討することが必要と考えられる。また、本結果はマウス脳由来の日本脳炎ワクチン被接種者による交差反応であるため、今後は新しく認可された乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンの被接種者血清を用いた検討が必要と考えられる。

E. 結論

本研究結果から、日本脳炎ワクチン免疫により、WNVに対する交差中和抗体が誘導されることが示された。また、交差中和抗体はJEVに対する中和抗体価が80倍以上のワクチン被接種者でみられたこと、JEVとWNVに対する中和抗体価には相関性がみられたことから、日本脳炎ワクチン免疫により、JEVに対する中和抗体価を高く維持すれば、よりWNVを感染防御できる可能性があることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし(予定あり)

2. 学会発表

青山幾子、弓指孝博、高崎智彦、林昌宏、加瀬哲男、高橋和郎。日本脳炎患者および日本脳炎ワクチン接種者血清のウエストナイルウイルスに対する中和抗体の交差反応性。第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月(東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 日本脳炎ワクチン被接種者および日本脳炎患者の JEV に対する中和抗体価

	年齢区分 (歳)	人数 (人)	JEV-NT									
			<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560*
ワクチン 接種者	0-4	6					3	1		1	1	
	5-9	10					1	1	1	5	1	1
	10-14	6						1	3	1		1
	15-19	64	9	3	4	5	2	4	11	12	7	7
	20-29	11	2	1	1		1	1	1	1	3	
	30-	12	7	1	3		1					
	合計	109	18	5	8	5	8	8	16	20	12	9
日本脳 炎患者	合計	83				8	21	16	7	9	18	4

JEV-NT : JEV neutralizing antibody titer (人)

*値は血清の希釈倍率

表2 日本脳炎ワクチン被接種者の JEV と WNV に対する中和抗体価

JEV-NT	人数	WNV-NT			抗体陽性者 合計(人)	抗体保有率 (%)
		<10	10	20*		
<10*	18	18			0	0.0
10	5	5			0	0.0
20	8	8			0	0.0
40	6	6			0	0.0
80	10	9	1		1	10.0
160	9	5	3	1	4	44.4
320	15	12	3		3	20.0
640	19	13	3	3	6	31.6
1280	12	9	1	2	3	25.0
2560	7	2	3	2	5	71.4
計(人)	109	87	14	8	22	
抗体陽性者 合計(人)	91		14	8	22	24.7

JEV-NT : JEV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

WNV-NT : WNV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

*値は血清の希釈倍率

表3 日本脳炎患者のJEVとWNVに対する中和抗体価

JEV-NT	人数	WNV-NT										抗体陽性者 合計(人)	抗体保有率 (%)
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560*		
40*	8	5	3									3	37.5
80	21	14	6		1							7	33.3
160	16	9	4	2		1						7	43.8
320	7	3	2	1	1							4	57.1
640	9	2	1	3	3							7	77.8
1280	18	9	5		2	2						9	50.0
2560	4							1	2	1		4	100.0
合計(人)	83	42	21	6	7	3	0	0	1	2	1	41	49.4

JEV-NT : JEV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

WNV-NT : WNV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

*値は血清の希釈倍率

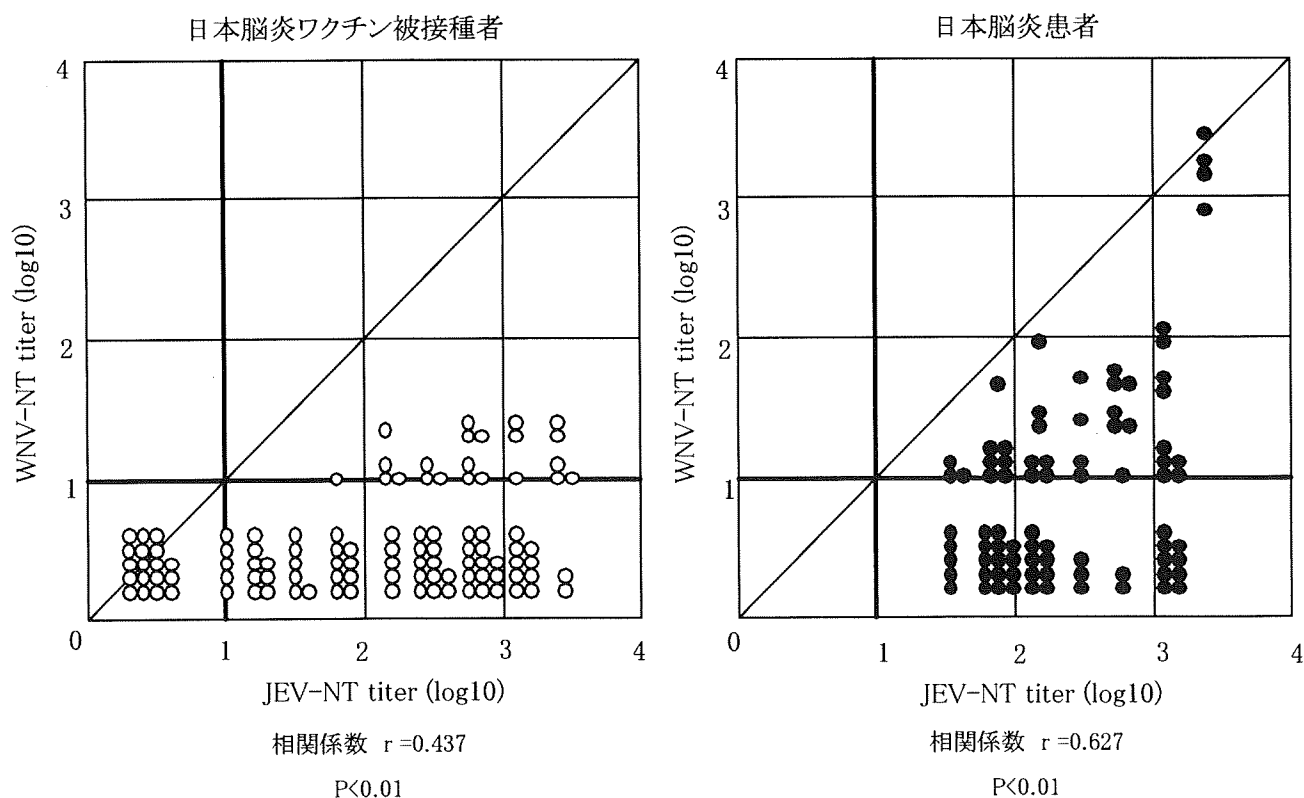


図1 日脳ワクチン被接種者と日本脳炎患者のJEVとWNVに対する中和抗体価の比較

**Characterization of dengue virus prevalence in Taiwan for
establishment of the laboratory network for molecular epidemiology
of dengue and other mosquito-borne viruses prevalent in Asia, 2009**

Name of researcher: Wen-Yi Shih, Jyh-Hsiung Huang, Pei-Yun Shu

Affiliation: Centers for Disease Control, Taiwan

Summary:

We conducted laboratory-based surveillance on mosquito-borne viral diseases in Taiwan. In 2009, a total of 205 imported dengue cases and 9 imported chikungunya cases were identified. From the acute phase serum samples of all imported dengue cases, 43 DENV-1, 33 DENV-2, 21 DENV-3, and 10 DENV-4 strains were isolated. Local dengue outbreaks were circulated mainly in Kaohsiung City, Kaohsiung County, Pingtung City, and Changhua County with 886 laboratory confirmed indigenous dengue cases including 11 dengue hemorrhagic fever. Sequence analyses from more than 109 DENV isolates obtained from acute phase serum samples of indigenous cases showed that major dengue local outbreaks were caused by 3 dengue virus strains, 1 DENV-3, 1 DENV-2, and 1 DENV-1, which were imported from the Philippines, Vietnam, and Thailand, respectively. Surveillance results of Japanese encephalitis virus in Taiwan during 2005-2009 showed that although most of JEV strains belong to Genotype III, Genotype I strains were isolated from the mosquitoes caught in Kuantu Nature Park, Taipei City and in pig farm in the Wujie Township of Yilan County in 2008, and in Kuantu Nature Park, Taipei City and pig farm in Wufeng Township, Taichung County in 2009. The results suggested that Genotype I strains of Japanese encephalitis virus were continuously introduced into Taiwan. Phylogenetic analyses of isolated chikungunya viruses (CHIKVs) showed that all CHIKV strains from Malaysia (2 strains), Singapore (1 strain), and Thailand (2 strains) belong to East/Central/South African genotype, whereas 3 Indonesia strains belong to Asian genotype and 1 strain belongs to East/Central/South African genotype. In addition, all African genotype strains were found to have E1-A226V mutations.

Purpose:

Emergence of pathogenic microorganisms is an increasing concern. Infection by mosquito-borne viruses is a foremost problem in Asia. Understanding the epidemiological situations of the diseases and the phenotypic and genotypic characteristics of viruses contributes to the development of new strategies for control and prevention. In order to promote communication and exchange of the information

of dengue and other mosquito-borne viruses, laboratory network between Asia and Pacific Rim should be developed and strengthened.

Methods:

1. Dengue and Chikungunya surveillance

Human serum samples from clinically suspected DENV and other arbovirus infections were submitted to the Vector-Borne Viral and Rickettsial Diseases Laboratory, Research and Diagnostic Center, Centers for Disease Control, Taiwan (Taiwan CDC), Department of Health, for laboratory diagnosis. A confirmed dengue or chikungunya case was defined as febrile illness associated with a positive real-time reverse transcription (RT)-PCR test (1-5), isolation of DENV or CHIKV, or the detection of DENV- or CHIKV-specific IgM and IgG antibodies (7-9). A multiplex one-step real-time RT-PCR was developed to simultaneously detect and differentiate various flaviviruses and alphaviruses in the acute-phase serum samples using group-specific and virus-specific primers. In addition, a flavivirus/alphavirus-specific capture ELISA was developed to detect and differentiate various flavivirus/alphavirus infections.

2. Japanese encephalitis virus surveillance

To understand the genetic variation of JEV strains currently transmitted in Taiwan, a surveillance program was conducted in areas covering north (Taipei, Taoyuan and Yilan Counties and Taipei City), central (Taichung and Changhua Counties), south (Tainan and Kaohsiung Counties) and east (Hualien County) parts of Taiwan during 2005-2009. Real-time RT-PCR assay was used to screen JEV in mosquito pools, pig sera and human cerebrospinal fluid (CSF). Mosquitoes were pooled by species, location, and collection date in groups of 30 to 50 mosquitoes. Mosquito pools were homogenized and the supernatant fraction was used for real-time RT-PCR and virus isolation. Three sets of primer including flavivirus-specific (FL-F1: 5'-GCCATATGG TACATGTGGCTGGGAGC-3'; FL-R3: 5'-GTKATTCTTGTGTCCCAWCCGGCTGTGTCATC-3'; FL-R4: 5'-GTGATGCGRGTGTCCCAGCCRGCKGTGTCATC-3'), JEV-specific (JE3F1: 5'-CCCTCAGAACCGTCTCGGAA-3' and JE3R1: 5'-CTATTCCCAGGTGTCAATATGCTGT-3') and JEV GIII-specific primers (E12F: 5'-CTGGGAATGGGCAATCGTG-3' and E325R: 5'-TGTC AATGCTTCCCTTCCC-3') were used for real-time RT-PCR (10). Samples with positive RT-PCR were subjected to virus isolation using a mosquito cell line (clone C6/36 of *Aedes albopictus* cells).

3. Virus isolation and identification

DENVs and CHIKVs were isolated from the acute phase serum samples of confirmed cases. The virus isolation was performed using mosquito cell line

C6/36. For each acute phase serum, 4 μ l of serum sample was diluted in 200 μ l cultured medium (RPMI, Gibco/BRL, Life Technologies, containing 1% FCS) and added to a 96-well microtiter plate, 50 μ l/well in quadruplicate. Then, 10^5 cells/100 μ l/well of C6/36 cell line were added into the microtiter plate and incubated at 37°C for 2-7 days. Cells were harvested and virus isolates were identified by the indirect fluorescent antibody test with virus group-specific and serotype-specific monoclonal antibodies.

3. Primers used for RT-PCR and nucleotide sequencing of DENV

The diagnostic tests for flavivirus infection from febrile patients on the basis of the results of one-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR and envelope/membrane-specific capture IgM and IgG ELISA had been described previously (9). To screen viremic fever patients with alphavirus infection, a multiplex one-step SYBR Green I-based real-time RT-PCR was developed (6-7). A cocktail consisted with three sets of primers were mixed and used for RT-PCR screening. The alphavirus-specific primer set (AL-2: 5'-AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA AG-3' and AL-3: 5'-GTG GTG TCA AAC CCT ATC CA-3') targeted a consensus region of the nonstructural protein 1 (nsP1) genes to detect all alphaviruses. The CHIKV-specific primer set (F-CHIK: 5'-AAG CTY CGC GTC CTT TAC CAA AG-3' and R-CHIK: 5'-CCA AAT TGT CCY GGT CTT CCT-3') targeted a region of the envelope protein 1 (E1) gene of CHIKVs (7). The Ross River virus-specific primer set (RRV-1: 5'-GGG TAG AGA GAA GTT YGT GGT YAG-3' and RRV-2: 5'-CGG TAT ATC TGG YGG TGT RTG C-3') targeted a region of the envelope protein 2 (E2) gene of Ross River virus. Positive results were then confirmed by gene sequence analysis, virus isolation, and serological test.

4. Preparation of viral RNA, RT-PCR amplification and nucleotide sequencing

Viral RNAs were extracted from either acute phase serum samples or culture supernatant of C6/36 cell line infected with each of the isolated DENV or CHIKV strains using the QIAamp viral RNA mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of partial NS5 gene fragment of DENV were determined directly from acute phase serum samples using RT-PCR product of one-step SYBR Green I quantitative RT-PCR (3-4). Partial NS5 gene sequencing was routinely performed to detect and differentiate serotype and genotype of the newly identified DENVs. For full-length structure gene sequencing, extracted viral RNA from culture supernatant of C6/36 cell line infected with each of the isolated DENV strains was used as a template for cDNA synthesis, which subsequently was used for PCR amplification. Two overlapping PCR products spanning the full-length

structure gene were purified from agarose gels and directly sequenced in both directions using ABI Prism automated DNA sequencing kit and ABI Prism 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Overlapping nucleotide sequences were combined for analysis and edited with the Laser software package (DNASTAR Inc, Madison, WI).

5. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were conducted using PHYLIP version 3.6 or MEGA version 4.0 software package. Genetic distances were calculated by using Kimura 2-parameter distance algorithm with 1,000 bootstrap replicates. Neighbor-Joining method was used to generate the phylogenetic trees.

Results:

1. Imported dengue cases in Taiwan, 2009

A total of 205 imported dengue cases were identified in Taiwan, 2009. The majority of these imported cases were infected in Southeast Asian countries with exceptions of India, Bangladesh, and Pakistan. Similar to our previous report during 2002-2008, Indonesia, Vietnam, the Philippines and Thailand are on the top list of importing countries (4). From acute phase serum samples of these imported dengue cases, a total of 107 DENV strains were isolated including 43 DENV-1, 33 DENV-2, 21 DENV-3, and 10 DENV-4 strains. The nucleotide sequences of partial NS5 gene fragment and full-length structure gene region of DENV strains isolated were determined and deposited in Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database for molecular epidemiological analysis. Table 1 showed the summary of serotype and genotype distributions of these DENV isolates. The data reveals that strains of DENV-1 genotype I and DENV-2 cosmopolitan genotype were the most epidemic strains circulating in Southeast Asian countries.

2. Multiple dengue epidemics in southern Taiwan, 2009

For local dengue outbreaks in Taiwan, a total of 886 indigenous dengue cases were laboratory confirmed in 2009. The nucleotide sequences of partial NS5 gene fragment were routinely determined from the acute phase serum samples of confirmed cases. The full-length structure genes of DENV strains isolated from representative indigenous cases were determined. Representative indigenous cases were selected based on the information of epidemiological investigation and preliminary results of partial NS5 gene sequences showing different infection time, infection place, and DENV serotypes and genotypes of these patients. Sequence analyses from more than 109 DENV isolates obtained from acute phase serum samples of indigenous cases showed that major dengue local outbreaks were caused by 3 dengue virus strains (1 DENV-3, 1 DENV-2, and 1 DENV-1) transmitted mainly in Kaohsiung City, Kaohsiung County, Pingtung City, and Changhua County.

Phylogenetic analysis showed that these DENVs were imported from the Philippines, Vietnam, and Thailand.

3. Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis

The main local dengue outbreak in 2009 was caused by a DENV-3 strain imported from the Philippines. There were more than 750 confirmed dengue cases in Kaohsiung City. Figure 1 showed the phylogenetic trees derived from full-length E gene sequences of DENV-3 strains isolated from confirmed cases in Taiwan and sequences available from GenBank. Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining and the DENV strains isolated from Taiwan in 2009 were color-marked.

4. Surveillance of Japanese encephalitis virus

To understand the genetic variation of JEV strains currently circulating in Taiwan, a surveillance program was conducted in areas covering north (Taipei, Taoyuan and Yilan Counties and Taipei City), central (Taichung and Changhua Counties), south (Tainan and Kaohsiung Counties) and east (Hualien County) parts of Taiwan during 2005-2009. Real-time RT-PCR assay was used to screen JEV in mosquito pools, pig sera and human cerebrospinal fluid. Samples with positive RT-PCR were subjected to virus isolation using a mosquito C6/36 cell line. Figure 2 shows the phylogenetic tree based on the E gene sequences of representative JEV sequences in Taiwan and other sequences retrieved from GenBank. The results show that Taiwanese isolates fell into 2 genotypes, GIII and GI. Although most of JEV strains isolated in Taiwan during 2005-2009 belong to Genotype III, Genotype I strains were isolated from the mosquitoes in Kuantu Nature Park in Taipei City and in pig farm in the Wujie Township of Ilan County in 2008 (10), and in Kuantu Nature Park, Taipei City and pig farm in Wufeng Township, Taichung County in 2009.

5. CHIKV identification and characterization

For other arboviruses, we identified 9 imported chikungunya cases in 2009. Table 2 showed the summary of isolated viruses, importing countries, virus genotypes and E1-226 sequence. These travelers were returned from Indonesia (4 cases), Malaysia (2 cases), Thailand (2 cases), and Singapore (1 case). The CHIKVs were isolated from the acute phase serum samples and the partial nucleotide sequences of envelope protein 1 (E1) gene (1044 bp) were determined. The results showed that 3 CHIKV strains from Indonesia belong to Asian genotype, whereas 1 strain belongs to African genotype. Phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method using sequences of CHIKV strains isolated in Taiwan and other sequences retrieved from GenBank. O'nyong-nyong (ONN) virus sequence was used as the outgroup virus (Figure 3).

Discussion:

Studies on returned travelers have provided valuable information regarding the geographic distribution and global movement of DENV strains. Mainly through fever screening surveillance at airports, we identified 205 imported dengue cases and 9 imported chikungunya cases in Taiwan, 2009. The results witness the growing global threat of dengue and chikungunya in the past 5 years. Therefore, co-circulation of dengue and chikungunya had been demonstrated in many Southeast Asian countries, such as Indonesia, Malaysia, Singapore, and Thailand. Vietnam is an exception without evidence of chikungunya epidemic. The genetic database generated from these isolated virus strains provides useful information for the understanding of global distributions and movements of various DENV and CHIKV serotypes and genotypes. Understanding the genetic changes and the mode of transmission of these viruses is important toward the development of effective control measures.

Japanese encephalitis is endemic in Taiwan. There have been very limited reports on the molecular epidemiology of JEV in Taiwan. Although most of JEV strains isolated in Taiwan during 2005-2009 belong to Genotype III, Genotype I strains were isolated from the mosquitoes in Kuantu Nature Park in Taipei City and in pig farm in the Wujie Township of Yilan County in 2008 and in Kuantu Nature Park, Taipei City and pig farm in Wufeng Township, Taichung County in 2009. The results suggested that Genotype I strains of Japanese encephalitis virus were continuously introduced into Taiwan. Their local adaptation and spread should be closely monitored to evaluate the potential impact of genotype shift on vaccine efficiency in the future.

Reference list:

1. Pei-Yun Shu, Shu-Fen Chang, Yu-Chung Kuo, Yi-Yun Yueh, Ling Chow, Li-Jung Chien, Chien-Lin Sue, Ting-Hsiang Lin and Jyh-Hsiung Huang. 2003. Development of Group- and Serotype-specific one-step SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay for Dengue Virus. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2408-2416.
2. Pei-Yun Shu, Li-Jung Chien, Shu-Fen Chang, Chien-Ling Su, Yu-Chung Kuo, Tsai-Ling Liao, Mei-Shang Ho, Ting-Hsiang Lin and Jyh-Hsiung Huang. 2005. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg. Infect. Dis.* 11:460-2.
3. Jyh-Hsiung Huang, Tsai-Ling Liao, Shu-Fen Chang, Chien-Ling Su, Li-Jung Chien, Yu-Chung Kuo, Cheng-Fen Yang, Chien-Chou Lin, and Pei-Yun Shu 2007. Laboratory-based dengue surveillance in Taiwan, 2005: a molecular epidemiologic study. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 77:903-909.
4. Pei-Yun Shu, Chien-Ling Su, Tsai-Ling Liao, Cheng-Fen Yang, Shu-Fen Chang, Chien-Chou Lin, Mei-Chun Chang, Huai-Chin Hu and Jyh-Hsiung Huang. 2009. Molecular Characterization of Dengue Viruses Imported into