

Table 2. The incidence of JE cases by month in 1996-2005

Month	Year										Total (%)
	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
JAN	20	17	43	24	16	10	25	18	7	2	182 (0.20)
FEB	9	6	20	10	7	12	20	10	11	2	107 (0.12)
MAR	21	37	40	18	15	21	45	30	27	12	266 (0.30)
APR	36	43	69	43	35	39	49	33	34	6	387 (0.43)
MAY	119	154	214	130	131	121	213	268	118	67	1,535 (1.70)
JUN	639	584	797	826	520	498	874	956	430	696	6,820 (7.57)
JUL	2,915	2,654	4,245	2,438	3,029	3,193	4,485	2,888	1,745	2,225	29,817 (33.08)
AUG	4,109	4,419	5,079	3,413	5,817	4,210	2,510	3,157	2,575	1,796	37,085 (41.14)
SEP	1,818	1,540	1,469	1,278	1,723	1,241	404	407	393	238	10,511 (11.66)
OCT	439	427	373	267	355	331	92	62	60	45	2,451 (2.72)
NOV	127	106	101	76	88	90	42	25	16	6	677 (0.75)
DEC	56	73	40	33	43	29	10	6	6	2	298 (0.33)
Total	10,308	10,060	12,490	8,556	11,779	9,795	8,769	7,860	5,422	5,097	90,136 (100.00)

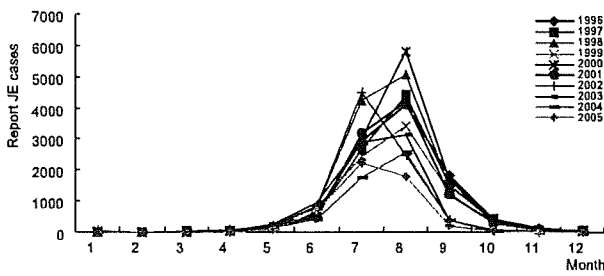


Fig. 2. Seasonal distribution of JE case in China.

following seven provinces: Shanxi Province, Henan Province, Anhui Province, Hubei Province, Hunan Province, Jiangxi Province, and Guangxi Province. Between 2000 and 2002, the number of morbidities accounted for 20% of the

cases nationwide (10,11,17-19).

The five provinces with an incidence >1/100,000 are located in southwest and middle China and lie adjacent to each other. The seven provinces with incidence between 0.5/100,000 and 1/100,000 are located on the eastern periphery of the abovementioned five provinces and are closely adjacent to them. The combined JE morbidities of these 12 provinces account for 80% of the total cases nationwide, whereas their combined population constitutes only 40% of the national population. In addition, the total number of JE morbidities in mainland China has decreased significantly in recent years compared to those reported in historical records, and the 5,097 cases reported in 2005 was the lowest annual figure to date. However, despite this downward trend, the ratio of the number of morbidities in the 12 high- and moderate-incidence provinces as a percentage of the national total cases is in-

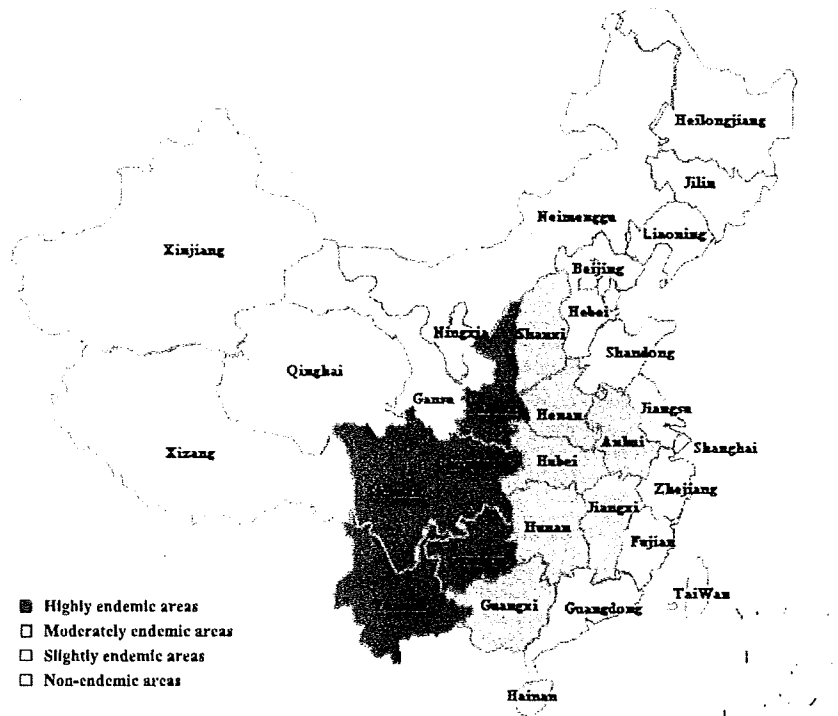


Fig. 3. Geographic distribution of JE in China.

creasing—from 82.7% in 1998 to 91.4% in 2002, and to 88.85% in 2005—demonstrating that the onset of JE is becoming more prevalent in these areas.

#### 4-3. Slightly endemic areas

The average incidence in the slightly endemic areas is considered to be between 0.1/100,000 and 0.5/100,000. The areas include the following seven provinces: Shanxi Province, Gansu Province, Jiangsu Province, Shandong Province, Fujian Province, Guangdong Province, and Zhejiang Province. In addition, there are a further 10 provinces and areas with an incidence <0.1/100,000: Hebei Province, Ningxia Province, Shanghai City, Liaoning Province, Inner Mongolia Province, Hainan Province, Tianjin Province, Beijing City, Jilin Province, and Heilongjiang Province (10,11,20-22).

#### 4-4. Non-endemic areas

There have been no JE cases reported from three provinces: Qinghai Province, Xinjiang Uygur Autonomous, and Tibet. Although individual imported cases might be recorded from these areas, they can still be regarded as non-endemic (10,11,23).

According to the analysis of the annual incidence of JE cases in each province, before the 1970s, the JE cases mainly appeared in localities in the north of China, including Beijing City, Tianjin City, Shandong Province, Shanghai City, Zhejiang Province, Jiangxi Province, Fujian Province, and Guangdong Province, and also from coastal areas in the east (10). However, the incidence in these areas has undergone a significant recent decline, and at present the average incidence is approximately 0.1/100,000. This reveals that the endemic areas of JE have shifted from the eastern coastal areas to the southwest and middle provinces. The current low incidence of JE in the eastern coastal areas is mainly attributed to the rapidly developing economy of this region that has resulted in a relatively high coverage of JE vaccination (10).

### 5. Age and gender distribution

In terms of the age distribution of JE morbidity, JE cases have been recorded in subjects in infancy to those over 75 years old (Figure 4). The proportion of 2-, 3-, and 4-year-olds is relatively high, accounting for 10.88, 12.88, and 12.33% of all cases, respectively. Young patients under 6 years of age accounted for 68.10% of the total cases. In the years between 2000 and 2005, young patients under 15 years of age accounted for 91.19, 91.26, 91.06, 90.14, 89.80, and 90.6% of the total cases nationwide, respectively (11).

The age distribution of JE deaths is similar to that of morbidities. Death cases have been recorded in all age groups, with the highest proportion in 2-, 3-, and 4-year-olds, accounting for 10.69, 11.95, and 10.84% of total JE death cases, respectively. JE deaths in patients under 15 years of age account

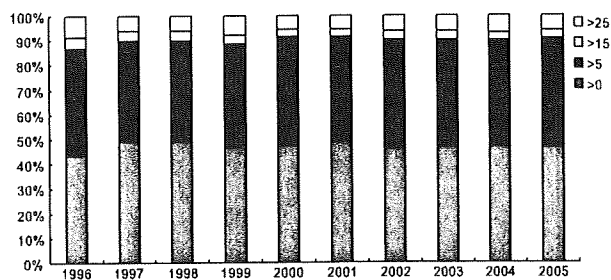


Fig. 4. The proportion of JE cases by age 1996-2005, China.

for 83.7% of total deaths, and among these, deaths in patients under 6 years of age account for 65.22% of JE fatalities.

The number of males among JE patients has exceeded that of females, with a ratio of 1.3:1 in recent years (11).

### 6. Occupational distribution

The data on the occupational distribution of JE cases between 1996 and 2005 reveals that diaspora children account for 54.51% of total morbidities and 54.72% of total mortalities. According to reports in 2005, the occupation of morbid patients is mainly diaspora children, students, and kindergarten children, accounting for 88.5% of the total morbidities. Among these, diaspora children accounted for 53.6%, students for 23.4%, and kindergarten children for 11.5%, while farmers accounted for 8.3% of all morbid patients. Mortalities occurred mainly in diaspora children (50.3%), followed by students (21.1%), farmers (15.8%), and kindergarten children (7.0%) (11).

### 7. Prevalence of JEV isolates

JEV, a *Flavivirus* belonging to the family *Flaviviridae*, was first isolated in Japan. JEV was first isolated in China in the 1940s (24-27). An inactivated form of the P-3 strain has been used to develop a JE vaccine. Since its first discovery in China, multiple strains of JEV have been isolated in the country. Strain SA14 was isolated from mosquitoes in China and has been used to develop a live attenuated JE vaccine.

In recent years, multiple strains of JEV have been isolated from the cerebrospinal fluid (CSF) and blood of Chinese JE patients, as well as from mosquitoes and midges collected in areas including Shanghai City, Yunnan Province, Guizhou Province, Henan Province, Sichuan Province, Fujian Province, Liaoning Province, and Heilongjiang Province. Moreover, a molecular biological study of JEV has been launched (28-38).

By tissue culture methods, seven strains of JEV have been isolated from *Culex tritaeniorhynchus* collected in the suburban area of Shanghai City. All seven newly isolated strains exhibit a positive reaction with standard JEV antibodies. A molecular biological study has demonstrated that each of these strains belongs to genotype 1 of JEV (30). This is the first report of the isolation of genotype 1 JEV in China.

Genotypic analysis of 100 JE strains isolated in mainland China revealed that they possessed two JEV genotypes (genotypes 1 and 3). JEV genotype 3 strains are primary epidemic strains. JEV genotype 1 has been known since 1979 (37). Two JEV genotypes were detected in specimens from JE patients and from mosquitoes simultaneous with a JE outbreak in Yuncheng Prefecture, Shanxi Province, in 2006 (38). The genome analysis of two JEVs from bats in Yunnan, China in 1980 showed both virus isolates belonging to genotype 3. The viruses have a close relationship with JEVs isolated between mosquitoes and humans in the same region over 2 decades (39).

### 8. Control and prevention of JE

#### 8-1. JE vaccine

Inoculation with an inactivated vaccine (P-3 strain) was developed and has been used in China for vaccination since the beginning of the 1970s. A JE live attenuated vaccine (SA14-14-2) has been used since the beginning of the 1990s,

and its safety and efficacy have been evaluated (40,41). A total of 300,000,000 people have been vaccinated with this attenuated vaccine. Prior to 2006, a total of 16 provinces had used JE vaccination as part of their immunization program: local governments provide the population with free JE vaccination (42). Beginning in 2006, prevention and control of JE in China has advanced with the integration of JE immunization into the Expanded Programme of Immunization (EPI) in mainland China, especially in rural and underdeveloped areas.

### 8-2. Surveillance of JE

In recent years, the government has paid great attention to the prevention and treatment of JE. In 2004, the Ministry of Health, China (MOH, China) advocated an increase in the research on JE, and in 2006 announced a national surveillance program for JE (43). At present, 22 surveillance sites have been established in 13 provinces nationwide in order to monitor JE epidemics, generally in areas with a high incidence of JE. The surveillance includes case reports, close monitoring of the nature of transmission media, pathogen monitoring, and JE antibody monitoring among humans and swine (43).

In recent years, the international society has augmented the support to JE prevention in China. Since 2001, a program of The Japan Health Science Foundation has supported research in the "molecular epidemiological study of Japanese encephalitis virus in China". In 2005, the Program for Appropriate Technology in Health (PATH) in America launched a JE surveillance project in the highly endemic area of Shaanxi Province, for which sera and CSF samples of local JE cases have been collected for laboratory diagnosis. The WHO, together with MOH, China, has launched an acute meningitis and encephalitis surveillance (AMES) program in four provinces (Hubei, Shandong, Guangxi, and Hebei).

## 9. Conclusion

The data indicate that the incidence of JE has been decreasing substantially; in 2008 for example, there were only 2,975 reported JE cases and 142 deaths in 25 provinces in mainland China. The overall incidence of JE should decrease even more due to the introduction of the JE vaccine into the EPI system; nevertheless, JE currently remains also a high-importance public health problem in China. Recently, the tendency of the age distribution in JE morbidity has swung toward teenage patients. The genotype of JEV has changed from G3 only to G1 and G3, which means two genotypes are circulating in China. Although the vaccine has been used in newborns, the vaccine strategy should be adjusted according to changes in the characteristics of the disease, especially in terms of the local outbreaks of JE. Strengthening the sensitivity of the surveillance system should also be an effective way to control the disease.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ministry of Science and Technology of China (No. 2003BA712A08-01) and the Japan Health Science Foundation.

### REFERENCES

- Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (ed.) (2001): *Flaviridae: the virus and their replication*. p. 991-1029. *In* *Fields Virology*. 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Tsai, F.T. (2000): New initiatives for the control of Japanese encephalitis by vaccination: minutes of a WHO/CVI meeting, Bangkok, Thailand, 13-15 October 1998. *Vaccine*, 26 (Suppl. 2), 1-25.
- Erlanger, T.E., Weiss, S., Keiser, J., et al. (2009): Past, present, and future of Japanese encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.*, 15, 1-7.
- Parida, M., Paban, K.D., Nagesh, K.T., et al. (2006): Japanese encephalitis outbreak, India. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1427-1430.
- Jeffrey, N.H., Scott, A.R., Debra, A.P., et al. (1995): An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia. *Med. J. Aust.*, 165, 256-260.
- Hanna, J.N., Ritchie, S.A., Phillops, D.A., et al. (1999): Japanese encephalitis in north Queensland, Australia, 1998. *Med. J. Aust.*, 170, 533-536.
- Liang, G.D. (1997): Arboviruses in China. *Chin. J. Zoonoses*, 13, 61-64 (in Chinese).
- Wang, Y.M., Ge, J.X., Liang, X.J., et al. (1985): The surveillance of Japanese encephalitis in China. *Chin. J. Med.*, 65, 648-652 (in Chinese).
- Ze, W.Y. (ed.) (2001): *Vaccine and Immunology*. p. 478-490. 2nd ed. Shanghai Publishing House of Science and Technological Literature, Shanghai (in Chinese).
- Wang, X.J., Zhang, Y.P., Zhang, R.Z., et al. (2004): Analysis on epidemic trend of Japanese encephalitis during 1998-2002 in China. *Chin. J. Vaccines Immun.*, 10, 215-217 (in Chinese).
- Chen, Y.S., Liang, X.F., Wang, X.J., et al. (2006): Epidemiological analysis of the Japanese encephalitis in China during 2000-2004. *Chin. J. Vaccines Immun.*, 12, 196-198 (in Chinese).
- Center for Public Health Surveillance and Information Service, Chinese Center for Disease Control and Prevention (2006): National Data of Class A and B Infectious Disease in December, 2005. *Disease Surveillance*, 21, 1-4 (in Chinese).
- Zhang, J.K., Chen, D.L., Liu, X.C., et al. (2003): The surveillance of Japanese encephalitis in Sichuan province in 2002. *Chin. J. Vaccines Immun.*, 9, 215-217 (in Chinese).
- Zhang, S.B., Xia, X.Q., Xu, Y., et al. (2006): Analysis of the epidemic characteristics of Japanese encephalitis in Shaanxi province during 1960-2004. *Chin. J. Vaccines Immun.*, 12, 199-200 (in Chinese).
- Li, Q., Lin, L.Y., Yu Z.Y., et al. (2006): Epidemiologic analysis of Japanese encephalitis in Zhejiang province during 1995-2004. *Chin. J. Vaccines Immun.*, 12, 201-202 (in Chinese).
- Song, C.F., Tao, Q., Yu, C., et al. (2006): Preventive control strategy and epidemiological analysis on Japanese encephalitis in Guizhou province during 1997-2004. *Chin. J. Vector Bio. Control*, 17, 90-92 (in Chinese).
- Hao, Z.Y., Zhang, A.M., Li, L.H., et al. (2005): Current situation and countermeasures of Japanese encephalitis epidemic in Henan Province. *Henan J. Prev. Med.*, 16, 129-132 (in Chinese).
- Wang, X.Y., Dong, B.Q., Wu, X.L., et al. (2004): Epidemiological analysis of Japanese encephalitis epidemic 1990-2003 in Guangxi Province. *Guangxi J. Prev. Med.*, 10, 147-149 (in Chinese).
- Guo, S.H. and Li, J.H. (2002): Epidemiological analysis of epidemic encephalitis B in Hunan province during the past 50 years. *J. Dis. Control Prev.*, 6, 81-82 (in Chinese).
- Luo, Y.X. and Li, J.J. (2001): Epidemiological analysis of Japanese encephalitis epidemic 1990-2000 in Guangdong Province. *Guangdong J. Health Epi. Prev.*, 27, 45-47 (in Chinese).
- Han, Z.Y., Zhang, Y.B., Xu, Y.G., et al. (2005): Analysis on Japanese B encephalitis in Hebei province during 2000-2004. *Chin. J. Vaccines Immun.*, 12, 201-202 (in Chinese).
- Zeng, X.X., Sun, L.Y., Deng, H.Y., et al. (2005): Evaluation of establishment of epidemic encephalitis B case monitoring system and epidemiological survey. *Chin. Trop. Med.*, 5, 423-425 (in Chinese).
- Ma, S.J., Lu, D.M., Zhang, Y.J., et al. (1997): Serological surveillance of JEV IgG antibody in Linzhi area, Tibet. *Chin. J. Public Health*, 16, 32 (in Chinese).
- Huang, C.H. (1941): Neutralization of encephalitis virus by serum. *Chin. Med. J.*, 59, 24-29.
- Huang, C.H. and Wang, Y.M. (1951): Epidemic encephalitis virus isolation and identification in Beijing. *Chin. Med. J.*, 37, 280-285 (in Chinese).
- Huang, C.H. (1982): Studies of Japanese encephalitis in China. *Adv. Virus Res.*, 27, 71-101.
- Wang, Y.M. and Zhang, M.B. (1988): Studies on virulence and antigenicity of Japanese encephalitis virus strains isolated in China. *Chin. J. Virol.*, 4, 213-217 (in Chinese).
- Wang, H.Y. and Liang, G.D. (2003): Progression of arbovirus research recent ten years in China. *Chin. J. Public Health*, 19, 473-479 (in Chinese).
- Li, X.Y., Song, H., Fu, S.H., et al. (2004): The molecular biology of Japanese encephalitis viruses isolated in China. *Chin. J. Virol.*, 20, 200-209 (in Chinese).

30. Wang, H.Y., Fu, S.H., Li, X.Y., et al. (2004): Isolation and identification of genotype I Japanese encephalitis virus in China. *Chin. J. Microbiol. Immunol.*, 24, 843-849 (in Chinese).
31. Chen, D., Wang, H.Y., Fu, S.H., et al. (2005): Molecular characteristics of three new isolated of Japanese encephalitis viruses in Fujian Province. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 19, 5-8 (in Chinese).
32. Wang, H.Y., Fu, S.H., Wang, J.W., et al. (2005): Arbovirus survey in some regions in Heilongjiang province. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 19, 312-318 (in Chinese).
33. Sun, X.H., Fu, S.H., Zhang, H.L., et al. (2005): Isolation and identification of arboviruses from mosquito pools in Yunnan Province, China. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 19, 312-318 (in Chinese).
34. Wang, J.W., Fu, S.H., Wang, H.Y., et al. (2006): Isolation and identification of Japanese encephalitis virus in Liaoning Province. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 20, 61-65 (in Chinese).
35. Wang, H.Y., Pan, X.L., Fu, S.H., et al. (2006): Molecular characterization of full-length genome of Japanese encephalitis virus (FJ02-76) newly isolated in China. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 20, 203-208 (in Chinese).
36. Wang, H.Y. and Liang, G.D. (2006): Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequence of E gene of the new isolated Japanese encephalitis virus strains and P3 strain. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.*, 20, 56-59 (in Chinese).
37. Wang, H.Y., Takasaki, T., Fu, S.H., et al. (2007): Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *J. Gen. Virol.*, 88, 885-894.
38. Wang, L.H., Fu, S.H., Wang, H.Y., et al. (2007): Japanese encephalitis outbreak, Yuncheng, China, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1123-1125.
39. Wang, J.L., Pan, X.L., Zhang, H.L., et al. (2009): Japanese encephalitis viruses from bats in Yunnan, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 15, 939-942.
40. Xin, Y.Y., Ming, Z.G., Peng, G.Y., et al. (1988): Safety of a live attenuated Japanese encephalitis virus vaccine (SA14-14-2) for children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39, 214-217.
41. Hennessy, S., Strom, B.L., Bilker, W.B., et al. (1996): Effectiveness of live-attenuated Japanese encephalitis vaccine (SA14-14-2): a case-control study. *Lancet*, 347, 1583-1586.
42. World Health Organization (2005): Safety of SA 14-14-2 Japanese encephalitis vaccine. *Global Advisory Committee on Vaccine Safety*, 9-10 June 2005. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 80, 242-243.
43. Ministry of Health (2006): Guidelines for Japanese Encephalitis Surveillance Programs in People's Republic of China (in Chinese).

## Short Communication

# A Case of Chikungunya Fever Imported from India to Japan, Follow-Up of Specific IgM and IgG Antibodies over a 6-Month Period

Ikuko Aoyama\*, Kenji Uno<sup>1</sup>, Takahiro Yumisashi, Tomohiko Takasaki<sup>2</sup>,  
Chang-Kweng Lim<sup>2</sup>, Ichiro Kurane<sup>2</sup>, Tetsuo Kase, and Kazuo Takahashi

*Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka 537-0025; <sup>1</sup>Nara Medical University Hospital  
Center for Infectious Diseases, Nara 634-8521; and <sup>2</sup>Department of Virology 1,  
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan*

(Received November 5, 2009. Accepted December 15, 2009)

**SUMMARY:** Chikungunya fever is an arboviral disease caused by chikungunya virus. A 37-year-old Japanese male visited India and developed fever, myalgia, rash, and persisting systemic arthralgia, the latter of which persisted for more than 2 months. The patient was diagnosed with chikungunya fever by virological and serological examinations. In the present study, we followed specific antibody responses over a 6-month period after the onset of the disease. IgM antibody was detected on days 58 and 108, but not on day 137, by enzyme-linked immunosorbent assay. Specific IgG and neutralizing antibodies were detected as late as day 192. The results indicate that specific IgM lasts for 3 to 4 months from the onset of the disease, and that IgG lasts more than 6 months.

Chikungunya (CHIK) fever is an acute febrile illness caused by mosquito-borne chikungunya virus (CHIKV) that belongs to the genus alphavirus of the family *Togaviridae*. The main symptoms of CHIK fever are high temperature, arthralgia, headache and myalgia, and occasional rash. Polyarthralgias or arthritis may last for months to years (1). CHIKV was first isolated in Tanzania in 1952 (2). CHIKV is currently distributed in Africa and in South and Southeast Asia (3). Outbreaks have occurred periodically in these regions for the past 50 years at 7- to 20-year intervals (4). In 2004–2006, a large CHIKV outbreak occurred in islands in the western Indian Ocean: Comoros, Mayotte, Mauritius, the Seychelles, and Réunion Island (5). Outbreaks of CHIK fever have recently occurred in India (3), Sri Lanka, and then in the Southeast Asian countries of Singapore, Malaysia (6), Indonesia, and Thailand. Another important issue has been in the spread of CHIK fever cases from epidemic areas to Europe (7), Canada, the Caribbean, South America, and the United States (8). Further, an outbreak occurred in Italy, originating from a patient returning from India. Approximately 300 patients with one fatality were reported in this outbreak (9). There have been imported CHIK fever cases in Japan. In the present study, we followed antibody responses in a CHIK fever patient who had just returned from India.

A 37-year-old male visited India on business from July 16 to August 8, 2008. On July 26, he developed a high fever (39.0°C), headache, and generalized arthralgia, and was admitted to a hospital. He was treated with antibiotics for 4 days. The fever had subsided by July 29. The next day, a generalized spotted rash developed on his entire body except for his face, and lasted for several days. He was diagnosed with CHIK fever based on the clinical symptoms. He tested negative for CHIKV-specific antibodies. He was discharged

from the hospital on August 1 and returned to Japan on August 8. His arthralgia became exacerbated in the middle of August. The patient visited the Osaka City General Hospital on September 22.

The chief complaint at the consultation was a sense of incongruity at the right wrist, proximal interphalangeal joints, the right knee, and the joints in his left foot. On physical examination, swelling and deformity were not present in the systemic joint. The results of the blood test on September 22 were hemoglobin 17.8 g/dl, total leukocyte count 11,200/ $\mu$ l, platelet count 250,000/ $\mu$ l, aspartate aminotransferase (AST)/alanine aminotransferase (ALT) 52/89.

Virological examinations were performed using the serum specimen collected on September 22 (day 58 after onset of the disease) (Table 1). CHIKV-specific IgM and IgG antibodies were positive by indirect immunofluorescence assay (IFA). CHIKV-specific IgM was also positive by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (P/N ratio was 3.88 [ $>2.0$  to be positive]). Neutralizing antibody titers to CHIKV were 1:160 by the plaque-reduction neutralization test (50% PRNT). IgM and IgG antibodies to dengue and Japanese encephalitis viruses were negative, determined by IFA and ELISA. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with CHIKV-specific primer (CHIKnsp1-S/nsp2-C, CHIK/E1-S/E1-C [10], and Chik10294s/10573c), and flavivirus-specific primer (YF1/YF3) (11). The viral RNAs were negative by RT-PCR. The diagnosis of CHIK fever was confirmed on the basis of these laboratory data, the presence of CHIKV-specific IgM and IgG antibodies in the convalescent phase of the disease, and the absence of CHIKV-specific antibody in the acute phase of the disease in India.

To follow the duration of IgM and IgG antibodies to CHIKV, blood specimens were collected every other month, on days 108, 137, 164, and 192, and examined for the presence of IgM and IgG antibodies by ELISA, IFA, and 50% PRNT (Table 2). CHIKV-specific IgM antibody was positive on day 108 but negative on day 137. Neutralizing and IFA IgG antibodies were positive at the same titers throughout the examined period.

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Infectious Disease, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Higashinari-ku, Osaka City, Osaka 537-0025, Japan. Tel: +81-6-6972-1321, Fax: +81-6-6972-2393, E-mail: aoyama@iph.pref.osaka.jp

Table 1. Results of the virological examinations of the patient serum collected on September 22 (58 days after onset of the disease)

Virus	Test item	Method	Result
Chikungunya virus	IgM	IFA	20
	IgM	ELISA	positive
	IgG	IFA	160
	Neutralizing antibody	NT	160
	nsP1–nsP2, E1 gene	RT-PCR	negative
Dengue virus	IgM, IgG	IFA	negative
	IgM, IgG	ELISA	negative
Japanese encephalitis virus	IgM, IgG	IFA	negative
Flavivirus	NS5-3'UTR gene	RT-PCR	negative

RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFA, immunofluorescent assay; NT, 50% plaque-reduction neutralization test.

Table 2. Change of antibody titer to CHIKV of the patient

Days after onset of the disease	ELISA	IFA		NT
	IgM	IgM	IgG	
58	positive	20	160	160
108	positive	<10	160	320
137	negative	<10	160	320
164	nt	nt	160	320
192	nt	nt	160	320

Abbreviations are in Table 1.

It should be noted that the CHIKV-specific IgM was positive by ELISA for 108 days. This suggests that CHIKV-specific IgM antibody can be used to diagnose CHIKV infection even 3 to 4 months after the onset of the disease, especially for those who do not receive confirmatory diagnoses in the endemic countries. A recent report demonstrated that IgM antibody lasted for 1 year in the CHIK fever patients with cryoglobulinemia (12). On the other hand, these results suggest that the presence of IgM to both dengue virus and CHIKV does not directly support dual infection.

The first and second imported CHIK fever cases were confirmed in November 2006 among returnees from Sri Lanka (13,14). The patient in the present report is the third imported CHIK fever case in Japan. Another 11 imported cases have been subsequently confirmed; 2 from India, 6 from Indonesia, 2 from Malaysia, and 1 from Thailand (Takasaki et al., personal communication. Online at <<http://www.nih.go.jp/vir1/NVL/Aiphavirus/Chikungunyahtml.htm>> [in Japanese]). The main vector mosquito of CHIKV is *Aedes albopictus*, which inhabits most regions of Japan (15–17). Thus, there is a possibility that an outbreak of CHIK fever originated from these imported cases in Japan, which was the same situation in Italy.

CHIK fever is not designated as a reportable disease in the Infectious Disease Control Law or in the Quarantine Act at present in Japan. CHIK fever has symptoms similar to those of other mosquito-borne diseases such as dengue fever and West Nile fever. CHIK fever should be included as a differential diagnosis for patients returning from South and Southeast Asian countries, and from islands and countries located on the Indian Ocean. Detection of IgM is a key laboratory diagnostic technique for CHIK fever.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Part of this article appeared in the Infectious Agents Surveillance Report

(IASR), vol. 29 p. 345–346, 2008 in Japanese.

This work was supported partly by grants for Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H19-Shinko-ippan-003 and H20-Shinkou-ippan-013).

#### REFERENCES

- Brighton, S.W., Prozesky, O.W. and de la Harpe, A.L. (1983): Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. *S. Afr. Med. J.* 63, 313–315.
- Ross, R.W. (1956): The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg.*, 54, 177–191.
- Sudeep, A.B. and Parashar, D. (2008): Chikungunya: an overview. *J. Biosci.*, 33, 443–449.
- Schuffenecker, I., Itman, I., Michault, A., et al. (2006): Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.*, 3, 1058–1070.
- Josseran, L., Paquet, C., Zehgnoun, A., et al. (2006): Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1994–1995.
- AbuBakar, S., Sam, I.C., Wong, P.F., et al. (2007): Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 147–149.
- Pfeffer, M. and Löescher, T. (2006): Cases of Chikungunya imported into Europe. *Euro Surveill.*, 11, E060316.2.
- World Health Organization (2007): Outbreak and spread of chikungunya. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, 82, 409–415.
- Liubruno, G.M., Calteri, D., Petropoulos, K., et al. (2008): The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood Transfus.*, 6, 199–210.
- Hasebe, F., Parquet, M.C., Pandye, B.D., et al. (2002): Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*, 67, 370–374.
- Morita, K., Tanaka, M. and Igarashi, A. (1990): Detection of flavivirus genome RNA using polymerase chain reaction. *Clin. Virol.*, 18, 322–325 (in Japanese).
- Oliver, M., Grandadam, M. and Marinoutou, C. (2009): Persisting mixed cryoglobulinemia in Chikungunya infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3, e374.
- Mizuno, Y., Kato, Y., Kudo, K., et al. (2007): First case of Chikungunya fever in Japan with persistent arthralgia. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 81, 600–601 (in Japanese).
- Lim, C.K., Nishibori, T., Watanabe, K., et al. (2009): Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 81, 865–868.
- Aoyama, I., Yumisashi, T., Saito, K., et al. (2006): Surveillance of West Nile virus in mosquitoes in Osaka Prefecture (Fiscal 2005 Report). *Bull. Osaka Pref. Inst. Public Health*, 44, 1–8 (in Japanese).
- Yumisashi, T., Hiroi, S., Aoyama, I., et al. (2008): West Nile virus surveillance in mosquitoes in Osaka Prefecture (Fiscal 2007 Report). *Bull. Osaka Pref. Inst. Public Health*, 46, 9–15 (in Japanese).
- Kobayashi, M., Nihei, N. and Kurihara, T. (2002): Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *J. Med. Entomol.*, 39, 4–11.

プロジェクト 3 : ウイルス

高病原性 H5N1 鳥インフルエンザ

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

東アジア諸国との連携による季節性および新型インフルエンザ流行株の性状に関する研究

研究分担者	田代真人	国立感染症研究所・インフルエンザウイルス研究センター
研究協力者	小田切孝人	国立感染症研究所・ 同 第一室 室長
	影山 努	国立感染症研究所・ 同 第二室 室長
	岸田典子	国立感染症研究所・ 同 第一室 研究員
	徐 紅	国立感染症研究所・ 同 第一室 主任研究官
	高下恵美	国立感染症研究所・ 同 第一室 主任研究官
	小淵正次	国立感染症研究所・ 同 第一室 主任研究官
	氏家 誠	国立感染症研究所・ 同 第一室 主任研究官
	中内美名	国立感染症研究所・ 同 第二室 研究員

**研究要旨** 韓国、中国、台湾、ミャンマー、ラオス、モンゴルおよびシンガポールなど東アジア諸国のインフルエンザセンターとの連携により、当該地域での季節性インフルエンザ流行株を入手した。これら流行株の抗原性、遺伝子性状の解析、およびノイラミニダーゼ阻害剤（オセルタミビルおよびザナミビル）感受性試験を実施し、流行株および薬剤耐性株の性状と流行状況を調べた。これらの成績をウイルス提供国とタイムリーに情報共有し、それぞれの国のインフルエンザ対策に貢献した。また、アジア地域の流行株の解析成績をもとにワクチン候補株の検索を行った。一方、2009年5月から世界的な大流行を起こしたブタ由来の新型A/H1N1インフルエンザ流行株（A/H1N1pdm）についても、近隣諸国からウイルスを収集し、季節性インフルエンザウイルスと同様の実態調査を行った。その結果、A/H1N1pdm ウイルス流行以降は、本ウイルスが流行株の99%を占め、抗原性、遺伝子性状ともにワクチン株A/California/7/2009と極めて類似していることが明らかになった。また、新型ウイルスの殆どはオセルタミビルおよびザナミビルに感受性であり、耐性株はオセルタミビルの予防投与または治療投与からまれに散見される程度であった。これらの情報は、WHO グローバルインフルエンザサーベイランス参加国とも共有され、世界の新型インフルエンザ対策に貢献できた。

#### A. 研究目的

インフルエンザは簡単に国境を越えて地球規模で健康被害を出す疾患であることから、近隣諸国との連携による株サーベイランス、診断検査協力、タイムリーな情報交換がスムーズにできる体制構築がインフルエンザ対策上きわめて重要である。そのためには、日頃から近隣諸国との信頼関係を築き、臨床検体や分離株を必要に応じて迅速に供給してもらえる体制作りと継続的な技術協力を進

めて行かなければならない。

本研究では、1) 近隣諸国との連携により、季節性および新型インフルエンザ流行株の性状や薬剤耐性株の発生状況を詳細に調査し、その情報を連携国およびWHOと共有することで、それぞれの国、さらには世界のインフルエンザ対策に貢献する。2) 感染研からウイルスサーベイランスに必要な標準抗血清、培養細胞および研究技術を提供し、東アジア諸国のサーベイランス水準を欧米レベルまで



に高める。3) 東アジア地域から分離されるインフルエンザウイルスから適正なワクチン株を供給できる協力ネットワークを維持する、などを目的としている。本研究に協力した国との連携網の概略を図1に示した。

## B. 研究方法

1. 本研究プロジェクトに協力した国は、韓国、中国、ラオス、ミャンマー、モンゴル、シンガポール、ベトナムである。
2. これらの国で採取した臨床検体、分離株を国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターへ送付してもらった。
3. 分離株について、抗原性解析、赤血球凝集素 (HA) 遺伝子の進化系統樹解析、およびオセルタミビル、ザナミビル耐性株検出試験を実施した。

## C. 研究結果

1. 国内外からの季節性インフルエンザ流行株および新型 A/H1N1pdm 流行株の入手。

2008/09 インフルエンザシーズン (2008 年 9 月から 2009 年 8 月) に国内および協力近隣諸国 (韓国、中国、ラオス、ミャンマー、モンゴル、シンガポール、ベトナム) から月毎に入手したインフルエンザ流行株の内訳を表1に示した。季節性 A/H1N1 ウイルスは 340 株、A/H3N2 ウイルスは 203 株、B 型ウイルスは 130 株であった。また、2009 年の 5 月から発生した新型 A/H1N1 ウイルスについては、100 株を収集した。

2. 抗インフルエンザ薬耐性株の検出。

各型、亜型ウイルスについて、オセルタミビルおよびザナミビルに対する耐性株の検出を行った。その結果、季節性 A/H1N1 ウイルスについては、中国を除く殆どの国の分離株は、オセルタミビル耐性であることが分かった (表2)。一方、中国で分離される季節性 A/H1N1 ウイルスの約 50% は、オセルタミビ

ル感受性であった。これは、中国の季節性 A/H1N1 ウイルスは耐性株が主流を占める系統クレード 2B とは異なるクレード 2A に分類されるためであることが分かった (図2)。しかし、中国においてもシーズンが後半になるに従って、クレード 2A の流行株が減少し、徐々にオセルタミビル耐性のクレード 2B 株が増える傾向が見られた (図2)。このことから、2009/10 シーズンには、中国でもオセルタミビル耐性が主流となることが予想された。

A/H3N2 および B 型インフルエンザウイルスについては、国内外ともオセルタミビル、ザナミビル耐性株は検出されなかった (表2)。今後、我が国を含む近隣諸国で耐性株がどのような動向を示すか、連携を強めて継続的な監視が必要である。

3. 季節性インフルエンザウイルスの解析。  
季節性 A/H1N1 インフルエンザウイルスは、新型ウイルスの登場以降は、どの国でも殆ど分離されていない。少数ながら分離された株は、ワクチン株 A/Brisbane/59 類似株で、大きな変化はみられていない。

一方、A/H3N2 ウイルスの流行は、シーズン前半はワクチン株 A/Brisbane/10 類似株が主流であったが、後半からは抗原性の変化した A/Perth/16/2009 で代表されるものが主流となった。これにより、ワクチン株の変更が必要であることが明確に示された。

B 型ウイルスでは、東南アジア諸国を含めて、世界的に Victoria/87 系統が主流で、抗原性ではワクチン株 B/Brisbane/60 類似株が大半であった。

4. 新型 A/H1N1 流行株の性状。

2009 年 5 月から世界各国でインフルエンザ流行株の 90% 以上は新型 A/H1N1 ウイルスが占めるようになり、季節性インフルエンザウイルスは殆ど検出されなくなった。このため、流行株の解析はもっぱら、新型 A/H1N1 ウイルスについて行われ、国内分離株に加えて、ラオスから入手した株について、抗原性および HA 遺

伝子系統樹解析が行われた (表 3、図 3)。解析した分離株の大半は抗原的にも遺伝的にも均一で、代表株でワクチン株に採用された A/California/7/2009 と極めて類似していた。一方、これら新型ウイルスは季節性 A/H1N1 ウイルスとは抗原性は大きく異なり、ワクチン株 A/Brisbane/59 に対する抗血清とは全く反応性が見られなかった。この成績は、季節性インフルエンザワクチンは新型インフルエンザには効かないことを意味し、新型インフルエンザには、A/California/7/2009 株から作製したワクチンの接種が必要であることが示された。

#### D. 考察

東アジア地域の近隣諸国との協力により、インフルエンザ株サーベイランス網が構築された。このネットワークを駆使して、連携国で採取された臨床検体や分離株を共有することで、流行状況をタイムリーに把握し、その情報は逐一還元することで、それぞれの国でのインフルエンザ対策に貢献することができた。今後は、連携国と共同でインフルエンザ診断検査キットの開発を進めていくことが期待される。また、より広範な地域からのサーベイランス情報収集を可能にするためには、さらに多くの近隣諸国との協力関係を構築しなければならない。このためには、近隣諸国からの研修生の受け入れや研究スタッフを現地へ派遣するなど、技術支援をベースにした積極的な交流をしていくことが重要である。

#### E. 結論

韓国、中国、ラオス、ミャンマー、モンゴル、シンガポール、ベトナムなど連携国からインフルエンザ流行株を収集し、季節性および新型インフルエンザウイルスの性状を明確にした。また、オセルタミビル耐性株の流行状況を把握し、国内外ともに季節性 A/H1N1 ウ

イルスは、耐性であることが分かった。中国では、依然感受性株が分離株の半数を占めていたが、耐性株が急速に増加していることが分かった。新型イオンフルエンザウイルスでは、オセルタミビル耐性株は散発的にしか発生していないことが分かった。

今後も近隣諸国と連携、協力したインフルエンザ株サーベイランスの継続が重要である。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawakami, C., Obuchi, M., Saikusa, M., Noguchi, Y., Ujike, M., Odagiri, T., Tashiro, M. :Outbreaks of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 virus in an elementary school and a family in Yokohama City, Japan during the 2007-2008 season. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62: 83-86, 2009.

Takahashi, Y., Hasegawa, H., Hara, Y., Ato, N., Ninomiya, A., Takagi, H., Odagiri, T., Sata, T., Tashiro, M., Kobayashi, M. :Protective immunity afforded by H5N1 (NIBRG-14) - inactivated vaccine requires both antibodies against hemagglutinin and neuraminidase in mice. *J. Infect. Dis.* 199; 1629-1637, 2009

Wada, T., Morishima, T., Okumura, A., Tashiro, M., Hosoya, M., Shiomi, M., Okuno, Y. :Differences in clinical manifestations of influenza-associated encephalopathy by age. *Microbiol. Immunol.* 53: 83-88, 2009

Ikeno, D., Kimachi, K., Kudo, Y., Goto, S., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Kino, Y. :The prime-boost vaccination of H5N1 heterologous

strains in a mouse model *Vaccine*: 27, 3121-3125, 2009.

Akiyama, M., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Taira, K., Mizuta, K., Saitoh, M., Nagano, M., Sutoh, A., Noda, M., Morita, Y., Sakatsume, O., Okabe, N., Tashiro, M. :Development of assay for the detection and quantitation of measles virus nucleoprotein (N) gene using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) *J. Med. Microbiol.* 58: 638-643, 2009.

Thongratsaku, S., Songserm, T., Poolkhet, C., Kondo, S., Yagi, H., Hiramatsu, H., Tashiro, M., Okada, H., Kato, K., Suzuki, Y. :Determination of *N*-linked sialyl-sugar chains in the lungs of domestic cats and dogs in Thailand susceptible to the highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Open Glycoscience* , 2: 28-36, 2009.  
Ichinohe, T., Tashiro, M., Sata, T., Hasegawa, H. :PolyI:PolyC<sub>12</sub>U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* 27; 6276-6279, 2009

Tashiro, M., McKimm-Breschkin, J., Saito, T., Klimov, A., Macken, C., Zambon, M., Hayden, F. :Surveillance for neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses in Japan, 1996-2007. *Antiviral Therapy* 14: 751-761, 2009

WHO/OIE/FAO H5N1 Evolution Working Group; Brown, I. H., Capua, I., Cattoli, G., Chen, H., Cox, N., Davis, T., Donis, R. O., Fouchier, R. A. M., Garten, R., Guan, Y., Kawaoka, Y., Mackenzie, J., McCauley, J., Mumford, E., Olsen, C., Perdue, M., Russell, C. A., Smith, C., Smith, D., Smith, G. J. D., Shu, Y., Tashiro, M.,

Vijaykrishna, D., Webster, R. :Continuing progress towards a unified nomenclature for the highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses: divergence of clade 2.2 viruses. *J. Influenza. Resp. Viral Infect.* 3: 59-62, 2009.

Hishinuma-Igarashi, I., Mizuta, K., Saito, Y., Ohuchi, Y., Noda, M., Akihama, M., Sato, H., Tsukagoshi, H., Okabe, N., Tashiro, M., Kimura, H. :Phylogenetic analysis of human bocavirus (HBoV) detected from children with acute respiratory infection in Japan *J. Infection.* 58: 311-313, 2009.

Sriwilajaroen, N., Wilairat, P., Hiramatsu, H., Takahashi, T., Suzuki, T., Ito, M., Ito, Y., Tashiro, M., Suzuki, Y. :Mechanisms of the action of povidone-iodine against human and avian I influenza A viruses: its effects on hemagglutination and sialidase activities. *Virology Journal.* 6:124, 2009

Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.-H., Bray, M., Jones, S., Tashiro, M., Kato, A., Ozato, K. Ebola virus VP35 interacts with the cytoplasmic dynein light chain 8. *J. Virol.* 83: 6952-6956, 2009.

Bertozi, S., Kelso, A., Tashiro, M., Savy, V., Farrar, J., Osterholm, M., Jameel, S., Muller, C.P. :Pandemic flu: from front lines. *Nature* 461; 20-21, 2009

Mizuta, K., Hirata, A., Suto, A., Aoki, Y., Ahiko, T., Itagaki, T., Tsukagoshi, T., Morita, Y., Obuchi, M., Akiyama, M., Okabe, N., Noda, M., Tashiro, M., Kimura, H. :Phylogenetic and cluster analysis of human rhinovirus species A (HRV-A) isolated from children with acute respiratory infections in Yamagata, Japan. *Virus Research* 147: 265-274, 2009

Ichinohe, T., Ainai, A., Nakamura, T., Akiyama, Y., Maeyama, J., Odagiri, T., Tashiro, M., Takahashi, H., Sawa, H., Tamura, S., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., Hasegawa, H.: Induction of cross-protective immunity against influenza A virus H5N1 by an intranasal vaccine with extracts of mushroom mycelia J. Med. Virol. 82: 128-137, 2010.

Nakajima, N., Hata, S., Sato, Y., Tobiume, M., Katano, H., Kaneko, K., Nagata, N., Kataoka, M., Ainai, A., Hasegawa, H., Tashiro, M., Odai, T., Urasawa, N., Ogino, T., Hanaoka, H., Watanabe, M., Sata, T.: First autopsy case with pandemic influenza (A/H1N1pdm) virus infection in Japan: Detection of high copy number of the virus in type II alveolar epithelial cells by pathological and virological examination. Jpn. J. Infect. Dis. 63; 67-71, 2010.

2. 学会発表  
なし

#### G. 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得   なし  
2. その他     なし

# プロジェクト4：ウイルス

## 風疹と CRS

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

アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

ラオスにおける風疹の状況ならびに風疹ウイルスゲノム検出用 LAMP 法の確立

分担研究者	駒瀬勝啓	国立感染症研究所・ウイルス第3部・室長
研究協力者	牛島廣治	藍野大学 藍野健康科学センター・教授
研究協力者	山本久美	国立感染症研究所・感染症情報センター・ 研究員
研究協力者	阿保均	国立感染症研究所・ウイルス第3部

**研究要旨** ラオスでの風疹の流行状況、抗体保有状況等の情報は少ない。本研究は、ラオスでの風疹診断に利用できる方法を提案することで、ラオスの風疹対策の一助となることを目的としている。LAMP 法は特殊な機器が不要で、目視でも結果が確認でき、感度がすぐれていることから、診断法としてすぐれているが、従来報告されていた方法では様々な風疹ウイルス、特に東南アジアで流行している clade B のウイルスの検出が不可能であった。今回は Clade A, B の風疹ウイルスにかかわらず高感度に検出できる LAMP 法を開発した。今後はラオス等の臨床検体を用いて診断法として利用できるかを検討していく

A. 研究目的

人口約 580 万人のラオスは、国民一人あたりの GDP 約 576 ドル (2007 年) の東南アジアの最貧国の一つである。感染症の予防として WHO が推進する EPI (Expanded Programme on Immunization) ワクチン (麻疹、ポリオ、BCG、破傷風、ジフテリア、百日咳、HepB) の接種は行われているが、風疹ワクチンは導入されていない。昨年度から風疹の流行が続いているとの情報はあがるが、風疹診断体制が不十分なこともあり、流行の規模等の詳細は不明である。風疹は発熱を主症状とする比較的軽微な感染症だが妊娠初期の女性が感染すると、先天性風疹症候群 (Congenital rubella syndrome; CRS) と総称される障害を持つ子供が生まれる事が知られている。風疹感染の診断法としては抗体検査が一般的であるが、IgM 抗体価は発症初期には検出されないことや、HHV6 やパ

ルボ B19 ウイルス等の感染にも反応する事があるなどの問題がある。一方、ウイルスゲノム検出も診断に汎用されている技術であるが、風疹ウイルスゲノムは GC rich な構造をしており、遺伝子増幅が比較的困難であり、また、ウイルスの遺伝子型によって増幅効率が大きく異なる事がわかっている。本研究は、機器、施設等が不十分なラオスでも、ラオス周辺で流行するウイルスも検出できる様な、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を確立し、ラオス、並びにその周辺国での風疹診断技術の向上を図ることを目的としている。

B. 方法

1. ラオスの National Laboratory (NL) である National Center for laboratory and epidemiology (NCLE) と連絡をとり、ラオスにおける風疹の流行状況を把握

した。

2. 風疹ウイルスのゲノム情報を収集し、保存性の高い部位から LAMP 法用のプライマーを設計し、様々なウイルスを用いて至適な反応条件を検討した。特に南アジア、中国南部、東南アジア等で流行している clade 2 の風疹ウイルスを検出できる LAMP 法の検討をおこなった。

#### C. 研究結果

1. ラオスの NCLE では、麻疹サーベイランスの一環として、2007 年から風疹の IgM 検査を実施している。2007 年には 1 件のみが風疹と診断されたが、2008 年は 4 つの県から 45 件、2009 年 8 月までに 7 県から 42 件が報告されていた(表 1)。また CRS が疑われる白内障の子供も非公式ながら確認されていた。
2. 風疹ウイルスに対する LAMP 法は Mori らによって 2006 年にすでに報告されている。この方法で東南アジアに多い Clade B に属する風疹ウイルスの検出を試みたところゲノムの検出はできなかった(図 1)。様々なウイルスの風疹ウイルスゲノム情報を収集し、従来法のプライマーを検討したところ、1 部のプライマーが clade B のウイルスゲノムに、機能しないことがわかった。
3. 現在利用できる風疹遺伝子ライブラリーから遺伝子型にかかわらずゲノムを検出できるような LAMP プライマーを設計し、様々な風疹ウイルスに対する条件を検討したところ、Clade A, B のウイルスともに 1-10 pfu/test の感度で検出できる LAMP 法が確立できた(表 2)。この LAMP 法を用いて、最近のベトナムの風疹検体も検出が可能であった。

#### D. 考察

1. 近年、東南アジアにおいて風疹の流行が報告されていたが、2008 年頃からラオスにおいても流行があることが明らかになった。また、CRS も出現しているとの非公式の報告もあった。風疹はワクチン予防可能疾患であることから、ワクチンの導入によって、CRS を排除することが可能と考えられている。早期に適切な投与時期、方法を検討し、ワクチンを導入する必要であると考えられた。ワクチン導入には、適切な検査診断による流行状況の把握と住民の抗体保有状況の情報が必要であり、ユニバーサル LAMP 法は有用な手段になる可能性がある。
2. LAMP 法は 1) 等温で反応させるため特殊な機器が不要、2) 反応時間が 1 時間程度、3) 増幅効率が高い、4) ピロリン酸マグネシウムの添加で遺伝子の増幅が濁度で確認できるので、反応チューブを開放する必要がなく、実験室内のコンタミの可能性が低い、等の特長があり、ラオスのように施設、機器が十分ではところで実施するウイルスゲノム検出による感染症診断の手法としては優れている。風疹ウイルスゲノムは GC rich な構造をしており、RT-PCR 法においても必ずしもすべての遺伝子型のウイルスに対して高い感度を示す訳ではない。また、すでに報告されている LAMP 法は、ワクチン株や一部の clade A のウイルスに対しては、すぐれた感度を示すが、Clade B のウイルスを検出できず汎用性が低かった。今回は clade A, B のウイルスを問わずに検出可能なユニバーサル LAMP 法を確立できた。新法では検討したすべてのウイルスで 1-10 pfu/test の感度で検出できており、ラオス等の東南アジアでも利

用可能と期待された。今後、NCLE 等と協力して実際にラオスの検体を入手し、実用性をふくめた検出感度を検討していく。

#### 文献

Mori, N. et al, Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 44 (9):3268-3273.

#### E. 結論

様々な遺伝子型の風疹ウイルスゲノムの検出が可能な LAMP 法を確立した。この方法は開発途上国等の環境が整っていないところでは有効な診断技術となる可能性がある。今後はラオスでの検体をもちいた解析を行う予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Dong JB, Saito A, Mine Y, Sakuraba Y, Nibe K, Goto Y, Komase K, Nakayama T, Miyata H, Iwata H, Haga T. Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. *Virus Genes.* 2009 Oct 14. [Epub ahead of print]
2. Ninomiya K, Kanayama T, Fujieda N, Nakayama T, Komase K, Nagata K,

Takeuchi K. (2009) Amino acid substitution at position 464 in the haemagglutinin-neuraminidase protein of a mumps virus Urabe strain enhanced the virus growth in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Vaccine.* 27:6160-5.

3. Kato S, Ohgimoto S, Sharma LB, Kurazono S, Ayata M, Komase K, Takeda M, Takeuchi K, Ihara T, Ogura H. (2009) Reduced ability of hemagglutinin of the CAM-70 measles virus vaccine strain to use receptors CD46 and SLAM. *Vaccine.* 27:3838-48.

##### 2. 学会発表

1. 駒瀬勝啓、大槻紀之、フックス虹彩萎縮性虹彩毛様体炎患者から検出された風疹ウイルスゲノムの解析、第 50 回日本臨床ウイルス学会 高知、平成 21 年 6 月
2. 風疹ウイルス、野生株が温度感受性を獲得する必要条件、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009 年 10 月
3. 岡本貴世子、大槻紀之、駒瀬勝啓、風疹ウイルス遺伝子検出 Real time PCR 法の作製、第 57 回日本ウイルス学会学術集会 東京 2009 年 10 月

##### 3. シンポジウム、講演等

1. 駒瀬勝啓 麻疹排除にむけた WHO の取り組みと日本の麻疹サーベイランス体制について、シンポジウム麻疹 衛生微生物技術協議会第 30 回研究会 境市 平成 21 年 7 月 9 日~10 日
2. 駒瀬勝啓、麻疹排除の現状と麻疹サーベイランス体制について、地衛研フォーラム、麻疹排除(2012 年)計画に



向けた保健所、地衛研、感染研の果たす役割、第 68 回日本公衆衛生学会  
総会 奈良 平成 21 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況  
1. 特許取得 なし  
2. その他 なし

表 1. ラオスにおける風疹の発生数 (NCLE より)

Province	2007	2008	2009
Vientiane C			19
Phongsaly			
Luangnamtha			1
Oudomxay			
Bokeo			
Luangprabang	1	4	4
Houaphanh			
Xayabouly			
Xiengkhuang			
Vientiane P			
Borikhamxay			3
Khammouane			
Savannakhet		33	2
Saravanh		7	11
Sekong			
Champasak		1	2
Attapeu			
Total	1	45	42

表 2. LAMP 法と RT-PCR 法の感度の比較

### LAMP法(新規法と従来法)ならびにRT-PCR法の感度の比較

ウイルス株 (遺伝子型)	LAMP法		RT-PCR (E1領域)	
	新規法	従来法 (Mori et al)	1st PCR	Nested PCR
To-336 (1a)	1	0.1	0.1	0.1
BRD2 (2A)	1	10	-	10
Osaka' 07 (2B)	1	-	10	10

pfu/test

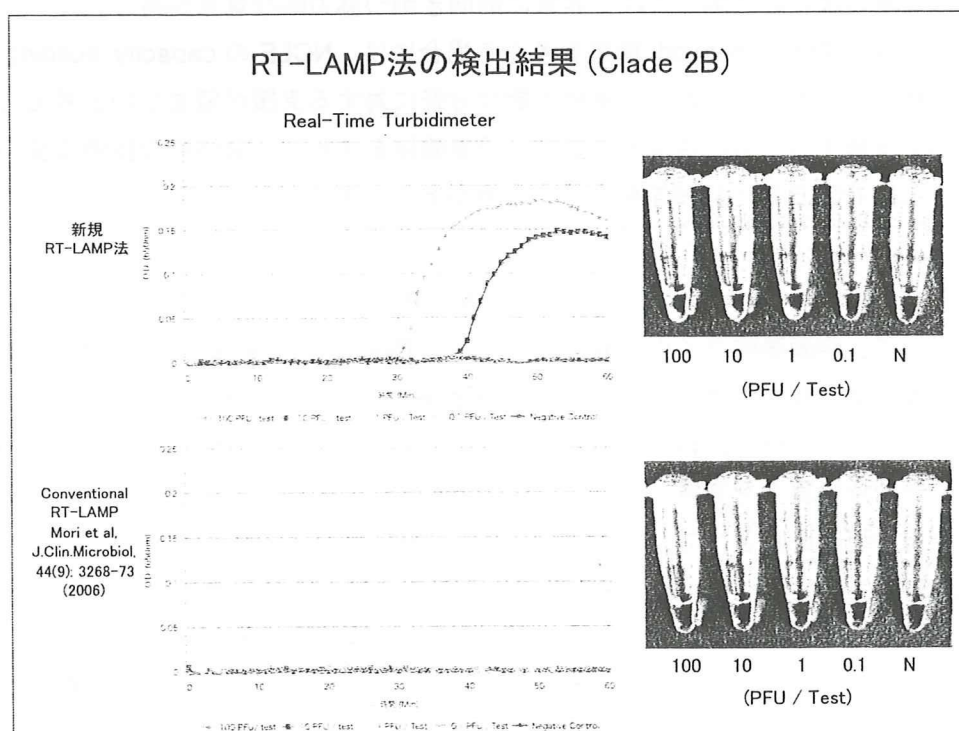


図 1. 新規 LAMP 法と従来法の Clade B のウイルスに対する検出感度の比較

## アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

### ラオス National Center of Laboratory and Epidemiology との麻疹風疹における 実験室的ネットワーク構築実現に向けた取り組み

研究分担者 山本 久美 (国立感染症研究所 感染症情報センター)  
駒瀬 勝啓 (国立感染症研究所 ウイルス 3 部)

**研究要旨** ラオスにおける麻疹風疹の公衆衛生上の重要性、その対策をめぐるラオスの現状を知るとともに、ラオス NCLE との麻疹風疹をめぐる Laboratory network 構築の可能性を探り、今後の活動計画を立てる目的で、現地を訪問の上、担当者と直接議論した。

WHO が提唱するサーベイランスに関しては、NCLE の Lab 部門、Epi 部門ともに、WPR LaoPDR Office のサポートの下、精度を保ちながら、継続的に実施されていると考えられた。定期接種、および補足的予防接種キャンペーン等、予防接種政策に関しても、WHO のサポートの下、保健省予防接種担当が中心となって、現状や課題を十分に把握し、課題の克服に向けて前向きに取り組んでいると考えられた。

こちらから提案した先天性風疹症候群(CRS)発生の危険性を鑑みた妊婦に対する麻疹風疹等の血清疫学調査と、“rash and fever” 症例に対する Dry Blood Sample の使用に関する検討については、NCLE 側からは残念ながら積極的かつ前向きな意見は聞かれなかったが、WPR LaoPDR Office との意見交換の中では、その公衆衛生上の重要性、およびラオスにおける capacity building への貢献の度合いに関しては、非常に前向きかつ協力的な意見が得られた。今後、ラオス NCLE との中長期的な network 構築を考える場合には、NCLE の capacity building に貢献でき、検討が終了しても自国において継続可能な分野に対する支援が望ましいと考えられる。今後、本検討を実施するための現実的な費用・予算確保を含めて、具体的な技術支援の方法を明確にし、さらに NCLE 側と詳細を検討する必要があると考えられた。

#### A. 研究目的

本研究班において、駒瀬勝啓ウイルス第三部第一室長を代表とする我々のグループでは、昨年、ラオス/ビエンチャン市内における小学生の麻疹風疹の血清疫学調査を実施した。これに次いで、今後の研究計画として、先天性風疹症候群(CRS)発生の危険性を含めて検討するために、妊婦に対する麻疹風疹等の血清疫学調査の実施を検討しているところである。この研究を実施する意義として、ラオスの麻疹風疹をめぐる公衆衛生の改善に重要な情報を与えることができるのはもちろんのこと、

本研究を通して、ラオスの国立検査疫学センター(National Center for Laboratory and Epidemiology: NCLE)に対する国際的な技術協力を行うことで、NCLE の Lab. capacity building を図ることも視野に入れており、同じ WHO 西太平洋地域に所属する国として、今後の中長期的な連携体制を構築することも大きな目標の一つと言える。

今回我々は、今年の調査の結果を含めて、麻疹風疹における公衆衛生および感染症対策をめぐるラオスの現状を知るとともに、ラオス NCLE との Laboratory network 構築の可能

性を探り、今後の活動計画を立てる目的で、現地を訪問の上、担当者と直接議論し、実態を調査、情報を収集したので報告する。

## B. 研究方法

2010年1月にラオス/ビエンチャン市のNCLE、保健省予防接種担当及び、WHO西太平洋事務局ラオスオフィスを訪問し、関係者との意見交換および情報収集を行った。以下は面談した担当者名である。

### NCLE

Dr. Phengta VONGPHRACHANH

Dr. Darouny PHONEKEO

その他スタッフ

### Ministry of Health (MoH), National Immunization Program (NIP)

Dr. Chansay PATHAMMAVONG

その他スタッフ

### WHO, West Pacific Region, Lao PDR Office

Dr. Manilay PHENGXAY

Dr. Reiko TSUYUOKA

Dr. Keith FELDON

Dr. Justin DENNY

その他スタッフ

(倫理面への配慮について)

本調査は個人情報扱わないため、倫理委員会等による承認を必要とするものではない。

## C. 研究結果

ラオスはインドシナ半島中央部に位置し、国の中央部をメコン川が流れ、17のprovinceからなる。メコン川に沿った平地と高地・山岳地帯からなる人口586万人(2006年)、GDP/capitaはUS\$500(2008年)で、世界最貧国のひとつである。

### 1. NCLE

NCLEは、唯一の感染症における国立の研究所として公衆衛生上重要な機能を果

たしている。

### (1) 部署およびスタッフ数

NCLEは大きくLaboratory(Lab)部門、Epidemiology(Epi)部門、Administration部門の3つからなる。Lab部門(17名)はさらに細菌部門とウイルス部門の二つに分かれる。麻疹風疹に大きくかかわるウイルス部門では、全スタッフ数6名で、病原体サーベイランス該当疾患のうち、インフルエンザ、デング熱、麻疹等、すべてのウイルス性感染症の検査にあたっている。一方、Epi部門のスタッフ数も6名で、患者発生に関わる全疾患のサーベイランスやoutbreakの検出を担当している。

### (2) Laboratory surveillance

NCLEは、2008年1月よりWHO/Western Pacific Region Office(WPRO) measles/rubella laboratory networkに参加していた。麻疹風疹に関しては、WPROの定めた症例定義に従い、“rash and fever”を呈した患者はすべて麻疹疑い例として患者サーベイランスにより把握され、outbreakであることが確認された場合のみ、発生から1週間以内に8-10検体/outbreakの血清検体が採取され、まず麻疹のIgM抗体検査がELISAで実施される。陰性であった場合は、風疹IgM抗体の検査が同じくELISAで実施される。

2007年は麻疹の全国的な流行があり、採取された102検体中79検体が麻疹IgM陽性であった(麻疹IgM陰性23検体中、風疹IgM陽性は1検体のみ)。このときに全国的な麻疹予防接種キャンペーンが実施され、9か月から15歳未満の小児を対象に96%の接種率を記録している。そのため、2008年は麻疹疑い例として採取された検体129検体のうち麻疹IgM陽性は0で、風疹IgM陽性が129検体中45検体であった。さらに2009年は223検体の麻疹