

分担研究報告書

マレーシアにおける Dengue 熱患者血清中の Dengue ウイルス感染増強抗体

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）

モイ・メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部研究員）

研究要旨：マレーシアにおける Dengue 熱患者血清における Dengue ウイルスに対する中和抗体価と 10 倍希釈における感染増強活性を検討した。いずれの血清も Dengue ウイルス感染を 10 倍希釈で増強させた。感染増強が見られた Dengue ウイルスの型は使用した血清によって異なっていた。

いずれの血清も、高い中和活性を示す Dengue ウイルスの型には感染増強活性を示さなかったが、中和活性を有しない型に対して感染増強活性が観察された。この結果は、Dengue ウイルス抗体が中和と感染増強という相反する生物活性を生体内でも示す可能性を示唆している。今後、希釈なしの状態においても感染増強活性が認められること、さらに、中和活性と感染増強活性の関連をさらに詳細に検討する必要がある。

A. 研究目的

Dengue 熱は東南アジアにおいて最も重要な蚊媒介性感染症といえる。世界的には毎年数千万人の Dengue 熱患者と数十万人の Dengue 出血熱患者が発生していると推察されている。日本には Dengue ウイルスは侵入しておらず国内感染はないが、年間 100 人を超える輸入例が報告されている。Dengue ウイルス 1-4 型は、4 つの血清型とも呼ばれる。いずれの型の Dengue ウイルスも同様の症状をおこす。ヒトが一つの型の Dengue ウイルスに感染した場合、同じ型

の Dengue ウイルスに対しては一生防御免疫が成立するため、感染によって再度症状が起こることはない。他の型の Dengue ウイルスに対する防御免疫は短期間で消失するため他の型の Dengue ウイルスには感染し発症する。しかし、3 度目以後の感染による発症はまれである。1-4 型間の抗体反応は複雑であり、中和反応と、逆に Dengue ウイルスの感染を増強させる Dengue ウイルス感染増強（antibody-dependent enhancement, ADE）を示す場合がある。Dengue ウイルス感染増強反応は Dengue ウィ

ルス感染による致死的な病態であるデング出血熱の病態形成の重要な免疫機序と考えられている。本研究においては、

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、マレーシアのデング熱患者血清における中和能とデングウイルス感染増強能の関連を検討した。

B. 研究方法

1) ウイルスと培養細胞: デングウイルス 1 型 01-44-1HuNIID 株、デングウイルス 2 型 D2/Hu/OPD030NIID/2005 株、デングウイルス 3 型 CH53962 株、デングウイルス 4 型 TVP-360 strain 株を用いた。細胞としては BHK 細胞と、Fcγレセプター陽性 BHK 細胞 (FcγR-BHK 細胞) を用いた。

2) 中和抗体価: デングウイルス中和試験は BHK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し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。

3) デングウイルス感染増強: 5倍希釈したデング熱患者血清50μlと50μlのデングウイルス1-4型それぞれと反応させた。コントロールとして培地とウイルスを50μlずつ反応させた。Fcγレセプター陽性BHK細胞

(FcγR-BHK細胞)においてプラーク数をカウントし、患者血清によるプラーク数の増加を算出した。

C. 研究結果

マレーシアにおけるデング熱患者血清 11 検体を用いた (表 1)。うち 5 検体はデングウイルス 1 型、6 検体はデングウイルス 3 型感染者からの者であった。いずれの血清もデングウイルス感染を 10 倍希釈で増強させた。感染増強が見られたデングウイルスの型は血清によって異なっていた。一方、これらの血清はデングウイルス中和活性を有していた。

いずれの血清も、高い中和活性を示すデングウイルスの血清型には感染増強活性を示さなかったが、中和活性を有しない血清型に対して感染増強活性が観察された。

D. 考察

Fcγレセプター陽性 BHK 細胞 (FcγR-BHK 細胞) を用いたデングウイルス感染増強アッセイを確立した。マレーシアにおけるデング熱患者血清を用いて、10 倍希釈という低い希釈においても感染増強活性が認められることを示した。実際の生体における反応をより正確に反映するためには、血清が希釈なしの状況でも感染増強活性を有することを示す必要がある。

一方、中和活性と感染増強活性には、逆の関係が見られ、高い中和活性を示す血清型に対しては感染増強活性が認められない。一方、感染増強活性が認められる血清型に対しては中和抗体が認められない。デングウイルス感染増強反応は、デングウイルスによる致死的な病態である、デング出

血熱の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている。今回用いた患者の感染履歴(初感染、再感染)等については分かっていない。今後、FcγR-BHK細胞と感染履歴の明らかな血清を用いた感染増強活性の詳細な検討が必要となる。

E. 結論

マレーシアのデング熱患者血清は、10倍希釈においてもデングウイルス感染増強作用を有していた。一つの血清型に対する感染増強作用と中和活性には逆の関係が認められた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Ito, M., Mukai, RZ., Takasaki, T., Kotaki, A. and Kurane, I.: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro by undiluted sera from monkeys infected with heterotypic dengue virus. Archives of Virology. 155(10): 1617-1624, 2010.

Moi, M. I., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Lim, C. K., Sakamoto, M., Iwagoe, H., Kobayashi, K. and Kurane, I.: Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Cote d' Ivoire. Emerging Infectious Diseases. 16(11): 1770-1772, 2010.

H. 学会発表

なし

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1 表1. デングウイルス1型及び3型感染患者血清の中和活性と感染増強活性。

| Infecting serotype | Neutralizing titer (PRNT ₅₀) | | | | Fold enhancement | | | |
|--------------------|--|--------|--------|--------|------------------|--------|--------|--------|
| | DENV-1 | DENV-2 | DENV-3 | DENV-4 | DENV-1 | DENV-2 | DENV-3 | DENV-4 |
| DENV-1 | | | | | | | | |
| M47 | <10 | 20 | <10 | <10 | 5.63 | 2.14 | 4.90 | 1.08 |
| M48 | <10 | 10 | <10 | <10 | 4.71 | 2.07 | 4.38 | 4.72 |
| M56 | 10 | 10 | <10 | <10 | 2.76 | 1.59 | 3.74 | 7.02 |
| M57 | <10 | 40 | <10 | <10 | 1.23 | <0.03 | 1.52 | 4.66 |
| M58 | <10 | 320 | <10 | <10 | 5.38 | <0.03 | 4.77 | 6.22 |
| DENV-3 | | | | | | | | |
| M39 | 80 | <10 | 10 | <10 | <0.02 | 2.33 | 1.48 | 6.41 |
| M40 | 20 | 160 | 20 | <10 | 1.89 | <0.03 | 1.16 | 5.02 |
| M41 | <10 | 80 | <10 | <10 | 5.48 | <0.03 | 4.39 | 6.44 |
| M44 | 10 | 320 | 10 | <10 | 1.49 | 0.03 | 1.13 | 7.22 |
| M52 | 20 | 20 | 10 | <10 | 1.48 | <0.03 | 1.39 | 4.33 |
| M53 | <10 | 160 | <10 | <10 | 5.23 | 0.20 | 6.84 | 7.22 |

2 5倍希釈したデング熱患者血清50μlと50μlのデングウイルス1-4型それぞれと反応させ
3 た。Fcγレセプター陽性BHK細胞 (FcγR-BHK細胞) においてプラーク数をカウントし、患
4 者血清によるプラーク数の増加を算出した。

5

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）
分担研究報告書（H22年度）

日本脳炎実験室診断ネットワークの構築と IgM 抗体検査用パネル血清の評価

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部・室長）

協力研究者 倉根一郎（国立感染症研究所・副所長）

研究要旨 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、米国 CDC と共に各地域レファレンスセンターを指導する立場にある Global Specialized Laboratory（GSL）に WHO から指定されている。昨年から引き続き米国 CDC と協力して日本脳炎 IgM 抗体診断用パネル血清・髄液を選定、作製した。WHO が各国に呼びかけて収集した血清 253 サンプル、髄液 153 サンプルを検査した。これらサンプルの中には、日本脳炎だけでなくデング熱患者の血清および髄液も含まれている。そのうち、血清 6、髄液 5 本を選定し WHO 西太平洋域内で多施設盲検査を実施し良好な結果を得た。

A. 研究目的

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 2009 年開始し、2010 年に引き続きパネル候補サンプルを評価し、選択したものをアジア各国で評価した。

B. 研究方法

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 253 サンプルおよび髄液 153 サンプルを収集し、IgM 捕捉 ELISA 用の第 2 回目パネルとして 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(プラーク減少法による) 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 バスツール研究所(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、2010 年 11 月に香港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 倍希釈で実施した。また、我々の *in house* キットでは、抗デングウイルスと抗日本脳炎ウイルス IgM 抗体の鑑別には、2 倍階段希釈法による抗体価比較法を用いた。

C. 研究結果および考察

パネル血清に関しては、6 検体中 3 検体が抗日本脳炎 IgM 抗体陽性を示した(#1、4、6)。また、抗デングウイルス IgM 抗体陽性を示した検体も 3 検体(#1、#2、#5)。#1 に関しては OD 値からも日本脳炎であることが明らかであった。しかし、我々の IgM 抗体価測定法を用いることにより、抗日本脳炎抗体価>6400 倍、抗デングウイルス抗体価 100 倍と明確に鑑別することが可能であった。デング熱患者血清である#2、#5 の

血清に関しても IgM 抗体価測定を実施したところ、表 1A に示す如くデングウイルスに対して有意に高い抗体価を示した。

パネル髄液に関しては、日本脳炎(#C01,C05)は日本脳炎に陽性、デング熱(髄膜炎;#03)はデングウイルスに弱陽性を示し、陰性血清(#C02、C04)は双方に陰性を示し、血清より鑑別が容易であった。デングウイルス IgM 抗体陽性血清に関して、抗体希釈法を実施したところ抗日本脳炎抗体価:<40x、デングウイルス抗体価:80x と鑑別された。

D. 結論

日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA 法のためのパネル血清・髄液(血清 253 サンプル、髄液 153 サンプル)をそれぞれ評価した。昨年度選定したパネル血清・髄液第一版に引き続き、第 2 版を選定した。

このパネルにより評価したところ、デングウイルスと日本脳炎ウイルスの鑑別法として、血清希釈法による抗体価希釈法は非常に優れていることが確認された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

論文発表(英文)

なし

学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 血清希釈法による日本脳炎、デング熱鑑別法

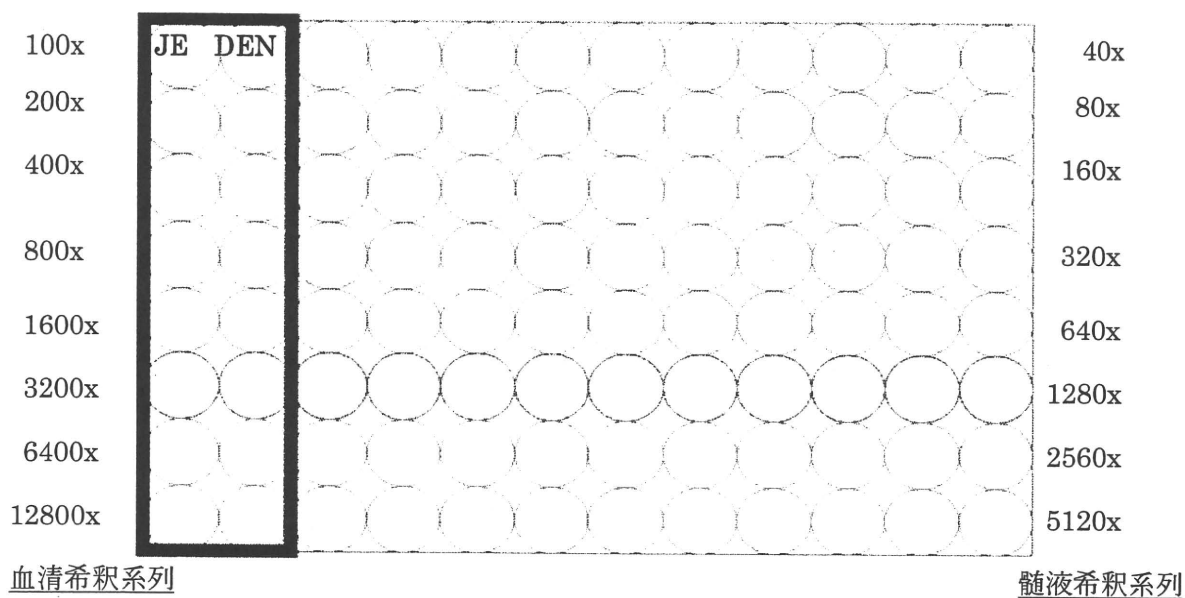


表1

A.血清

| JE IgM ELISA | | | Dengue IgM ELISA | | by Focus | JE titer | DEN titer |
|--------------|--------------|---------|------------------|-------------|-------------|----------|-----------|
| JES01 | 12.82 | JE posi | JES01 | 1.50 | Dengue posi | >6400x | 100x |
| JES02 | 1.69 | neg | JES02 | 1.96 | Dengue posi | <100x | 3200x |
| JES03 | 1.03 | neg | JES03 | 1.08 | Equivocal | - | - |
| JES04 | 8.66 | JE posi | JES04 | 1.36 | Dengue posi | - | - |
| JES05 | 1.52 | neg | JES05 | 7.33 | Dengue posi | <100x | 6400x |
| JES06 | 13.88 | JE posi | JES06 | 0.80 | nega | - | - |

B.髄液

| JE IgM ELISA | | | Dengue IgM ELISA | | | | |
|--------------|--------------|---------|------------------|-------------|-------------|------|-----|
| JEC01 | 5.37 | JE posi | JEC01 | 0.57 | nega | - | - |
| JEC02 | 0.98 | neg | JEC02 | 0.35 | nega | - | - |
| JEC03 | 1.80 | neg | JEC03 | 1.37 | Dengue posi | <40x | 80x |
| JEC04 | 1.09 | neg | JEC04 | 0.49 | nega | - | - |
| JEC05 | 18.31 | JE posi | JEC05 | NA | NA | - | - |

平成 22 年度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 2010 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）
モイ・メイリン（ウイルス第一部第二室・研究官）
倉根一郎（副所長）

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・亜熱帯地域に広がっており、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。2010 年に当研究室で実験室診断された陽性検体数は 122 例（12 月中旬現在）に達したものの、過去最多を記録した一昨年（67 例）の約 2 倍と大きく上回った。増加理由の詳細は不明だが、デング感染症が例年以上に流行していた可能性や、国内医療機関でのデング感染症に対する認識が高まったことが考えられる。年代別では 20 代から 40 代が多かった。渡航先別ではインドネシアが 42 例と最も高く、さらにそのうちの 4 分の 3 がバリ島に滞在歴があった。近年インドでの感染者が増加傾向にあるが、今年も 23 例とインドネシアに次ぐ多さであった。またアフリカ（タンザニアおよびベナン）での感染例も 3 例確認された。

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。血清中の抗デングウイルス 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。さらに血清中のウイルス抗原 (NS1 蛋白) を NS1 抗原検出 ELISA 法により検出した。

C. 研究結果および考察

国内の医療機関よりデング熱疑いで当研究室に送付された患者検体数は、2010 年は 181 例 (12 月中旬現在) であった。このうち陽性のものは 122 例 (68%) に達し、過去最多を記録した一昨年 (67 例) および昨年 (45 例) を大きく超え過去最多記録を更新した。理由としては、比較的多くの日本人が渡航する地域でデング感染症が例年以上に流行していた可能性や、国内医療機関でのデング感染症に対する認識が高まったことなどが考えられる。陽性率は例年が約半数であるのに比べ 68% と高かった。陽性患者は男性が 66% であった。年代分布は 20 代が 31% と最も多く、次いで 30 代が 20%、40 代が 18%、10 代が 11% 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、2010 年もこれに当てはまるものの特に 8 月～10 月に陽性例が多く、例年の 2 倍以上であった。陽性患者の多い渡航先は、1 位がインドネシア (42 例)、2 位がインド (23 例)、3 位がフィリピン (15 例)、4 位がタ

イ (11 例) であった。このように 2010 年はインドネシアが著しく多く、さらにこのうちの 32 例がバリ島に滞在歴のある患者であった。インドネシアは例年前期に大きな流行があり輸入感染症例も多いが、2010 年は例年よりも長期間にわたり患者発生がみられた。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。2010 年も例外でなく、インドからの輸入感染症例はインドネシアに次ぐ多さであった。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、デング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。2010 年も 9 月だけで 12 例であった。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。また本年は、タンザニア (2 例) およびベナン (1 例) からの輸入感染症例も確認された。

最近東南アジアおよび南アジア地域では、デング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が、2010 年は 4 例 (2%) であった。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。

我々は輸入デング熱患者血清よりウイルス分離し遺伝子解析をして成果を挙げてき

た。2010年もタンザニア帰りの患者血清からデング3型ウイルスの分離に成功し、塩基配列を決定することができた(Moi et al., 2010)。アフリカでデング感染症が流行しているのは周知の事実であるが、ウイルスに関する情報はあまり蓄積されておらず、我々の成果は有益な情報を提供できたと考えている。

D. 結論

年間約500万の日本人が熱帯地域に旅行し、約200万の人達が熱帯地域から日本に入国している現状を考え合わせると、帰国時での検疫所での検査およびその後の確定診断等、輸入感染症としてのデング熱、デング出血熱の把握は益々重要であり、今後もサーベイランスは継続すべきである。これらの地域では近年毎年のように大流行が起こっている。蔓延地域への渡航者にデングウイルスに感染するリスク等について注意を徹底する必要がある。デング感染症は北上しつつあり、現在台湾南部は蔓延地域である。この原因として、地球温暖化によるデング熱感染蚊の越冬が示唆されている。沖縄など南西諸島では、この点についても今後注意を払う必要がある。また近年デングウイルスゲノムに特徴的な変異が観察されてきたが、その理由は不明である。今後とも注意深くこのウイルスゲノム領域の変化を追跡する必要がある。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定着しつつある。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だけでなく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。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

論文発表(英文)

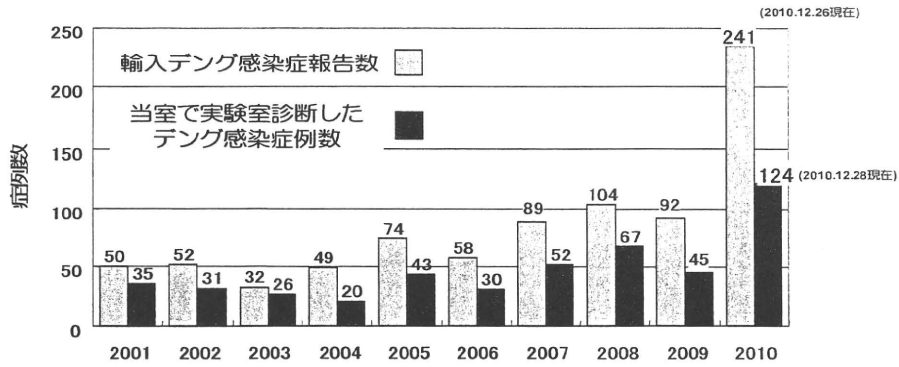
- 1) Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Yuwono, D., Rimal, H.S., dos Santos, F., de Jesus, M.D., Lina B.B., Tsuda, Y., Lim, C.K., Nerome, R., Caleres, A., Shindo, N., Drager, R.D., Andjaparidze, A., and Kurane, I. Molecular and virological analyses of dengue virus responsible for dengue outbreak in East Timor in 2005. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 63: 181-184, 2010.
- 2) Moi, M.L., Takasaki, T., Kotaki, A., Tajima, S., Lim, C.K., Sakamoto, M., Iwagoe, H., Kobayashi, K., and Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Cote d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases* 16: 1770-1772, 2010.
- 3) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Restoration of replication-defective dengue type 1 virus bearing mutations in the N-terminal cytoplasmic portion of NS4A by the additional mutations in the NS4B. *Archives of Virology* 156: 63-69, 2011..

学会発表

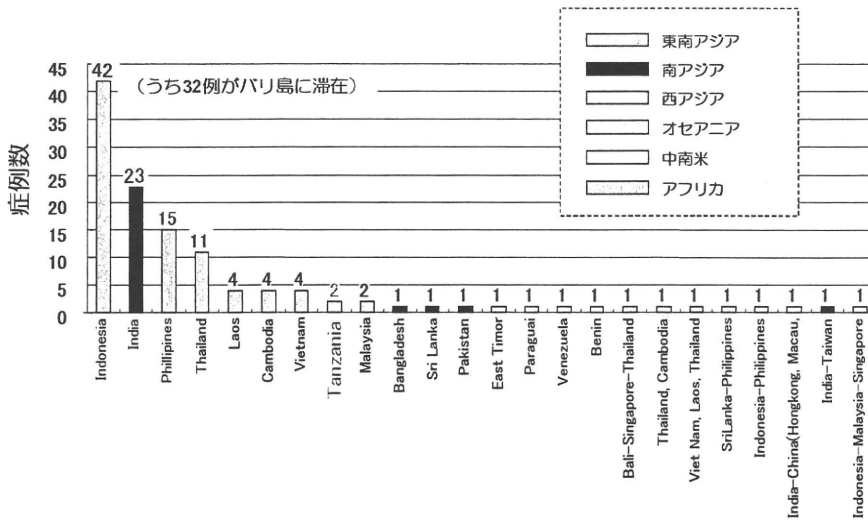
- 1) 加藤文博、田島茂、山口幸恵、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3'NTR内に変異を有する日本脳炎ウイルス変異体のin vitroにおける増殖性お

- よび病原性解析 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月
- 2) 山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルスE蛋白質の1アミノ酸置換（S123N）がウイルス増殖に及ぼす影響 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月
- 3) Tajima, S., Yamaguchi, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. Effects of single amino acid substitutions at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein on its growth rate in vitro and pathogenicity in mice. 1st Asia Pacific Workshop on Neurovirology. Seoul, South Korea. July 15-17, 2010.
- 4) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：in vitro におけるデング1型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスの増殖性および感染細胞側応答の比較 第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
- 5) 加藤文博、田島茂、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：フラビウイルスレポーターレプリコンの構築 第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
- 6) 山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状における日本脳炎ウイルスE蛋白質の1アミノ酸置換の影響 第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
- 7) 小滝徹、林昌宏、田島茂、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルス国内分離株の遺伝子解析(2005～2009)第58回日本ウイルス学会学術集会 徳島 2010年11月
- G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

国内輸入デング感染症報告数

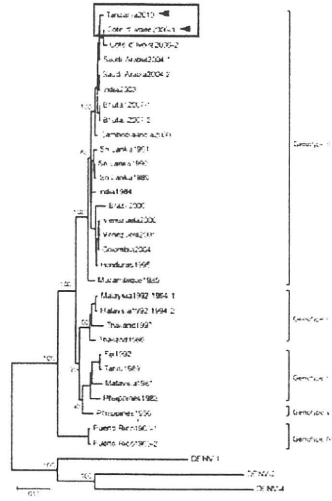


渡航国別輸入デング感染症例数2010



Importation of Dengue Virus Type 3 to Japan from Tanzania and Côte d'Ivoire

Meng Ling Moi, Tomohiko Takasaki, Akira Kotaki, Shigeru Tajima, Chang-Kweng Lim, Mitsuo Sakamoto, Hajime Iwagoe, Kenichiro Kobayashi, and Ichiro Kurane



分担研究報告書

近年のチクングニア熱輸入症例における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（国立感染症研究所副所長）

研究要旨

チクングニアウイルス（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。チクングニアウイルスはネッタイシマ蚊、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。チクングニア熱は発熱・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2011年1月までに計19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チクングニアウイルスの検査体制を用いて国内輸入症例の実験室診断を行いその性状を解析した。

A. 研究目的

チクングニア熱は、発熱・関節炎・発疹の3主徴を特徴とする、時に出血傾向を呈する疾患であり、その症状からデング熱・出血熱の重要な鑑別疾患である。チクングニアウイルスは、トガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の（+）RNA ウイルスであり、チクングニア熱の原因ウイルスである。チクングニアウイルスには東・中央アフリカ型、アジア型、西アフリカ型の3つの遺伝子型が存在する。チクングニアウイルスは蚊によって媒介され、その主たる媒介蚊はネッタイシマカや日本にも分布するヒトスジシマカである。2004年にはケニア沿岸のラム島にて流行が発生し、2005年にはインド洋諸島で流行が確認された。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、インド等でチクングニア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年にかけてチクングニアウイルス感染症例が推計57,000人報告された。さらにチクングニア熱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例以上のチクングニア熱が報告されている。またマレーシアでも2010年までに11,000症例以上の患者が報告された。タイでは2010年までに約60,000

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、2011年1月までに19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。チクングニア熱は、2011年2月に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」で4類感染症に指定されたため、当該患者を診断した医師はただちに保健所を經由して都道府県知事に届け出ることが求められている。そこでこれまでに確立した検査体制を用いて輸入症例の解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

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

合成チクングニアウイルス RNA を用いた患者血清中の RNA コピー数の検討：チクングニアウイルスの 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：中和試験においてはチクングニアウイルス S27株を用いた。ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来のVero細胞を用いた (American Type

Culture Collection)。

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

C. 研究結果

症例 15. 患者は76歳男性で、2009年12月1日からミャンマーに5日間滞在し、シンガポールに1日滞在した。12月6日にランジット先のシンガポールにて発症し、食欲不振、嘔吐、全身の関節痛を呈した。関節痛は特に激しくベッドに手を付こうとすると痛みで力が入らない状態であった。その後12月8日に車椅子で帰国した。12月11日には発熱(38.6℃)し、12日に入院した。入院時は膝下及び手に浮腫を呈し、膝下は赤黒く腫れていた。また全身の関節痛(特に指関節、膝関節)を認めた。患者は12月18日に退院し、退院時は浮腫もかなり引き皮膚の色も正常、関節痛も改善していた。退院後次第に膝下の浮腫と全身の関節痛(特に両手首、右肩)が再燃し、腕で身体を支えられない状態であった。12月25日ころから足の甲、膝下手の指の皮が細かく剥け、脚に力が戻った。2010年1月6日にも依然関節痛の改善が認められず再受診した。実験室診断の結果は特異的IgM抗体陽性、中和抗体価160倍であった。

日本におけるチクングニア熱輸入症例：これまで我々の確立した実験室診断法により 2007 年 1 月から 2011 年 2 月までの間に 19 例のチクングニア熱輸入症例を確認した (表 1)。発症年は 2006 年 2 人, 2008 年 3 人, 2009 年 10 人, 2010 年 3 人, 2011 年 1 人であった。男女比は 42.1%:57.9%であり, 年代別では 30 代が最も多く 9 人, 続いて 40 代, 50 代がそれぞれ 4 人, 60 代, 70 代が各 1 人であった。渡航先はインドネシアが最も多く 10 人, 続いてインド 3 人, スリランカ 2 人, マレーシア 2 人, タイ 1 人, ミャンマー 1 人であった。

ウイルス分離と遺伝子解析: 実験室診断の結果, 症例 2, 4 および 13 においてチクングニアウイルス RNA が検出された。それぞれの RNA コピー数は 1.8×10^9 RNA copies/ml, 6.7×10^7 RNA copies/ml, 1.0×10^8 RNA copies/ml であった。それぞれのチクングニアウイルス RNA 陽性患者血清から Vero 細胞を用いてウイルス分離を行った結果, 接種した細胞において激しい細胞変性効果が観察され, 3 株のウイルスが分離された。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症例 2 の患者血清から分離された SL10571 株および 症例 4 から分離された MAL09 株の両ウイルス株は近年インド洋諸島・インドで流行している東アフリカ・中央アフリカ型のウイルス株とクラスターを形成した (data not shown)。症例 13 から分離された RI09 株は以前よりアジアで流行しているアジア型のウイルスとクラスターを形成した (data not shown)。

D. 考察

これまで我々は 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ア熱疑い輸入症例患者血清に対する実験室診断を行った。鑑別診断としてデング熱に対する解析も同時に行ったが, 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アウイルスとデングウイルスが分離・検出された症例はなかった。臨床サンプルのなかでも症例 15 においては激しい関節痛が報告された。近年のチクングニア熱の流行では高齢者に特に激しい臨床症状が報告されているため, 今後とも本疾病の流行状況を注視する必要がある。患者血清を用いたウイルス分離によりこれまでに 3 株のチクングニア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, スリランカからの輸入症例患者血清からの分離株 SL10571 株およびマレーシアからの輸入症例患者血清からの分離株 MAL09 株は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。インドネシアからの輸入症例 13 からの分離株 RI 株は 1950 年代よりアジアを中心に確認されているアジア型の遺伝子型に分類されていることが示唆された。

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ア熱は今後も流行が続くことが予想される。

さらに 2011 年 1 月までに日本において 19 例の輸入症例が確認されている。輸入症例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が検出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あると示された。チクングニア熱の治療法は確立されておらず、チクングニアウイルスの動向にはヒト、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チクングニアウイルス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ア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

2011 年 1 月までに日本において 19 例の輸入症例が確認されている。温帯地方であるイタリアでは 2007 年に、フランスでは 2010 年にそれぞれチクングニア熱の国内流行が報告されており、このときの媒介蚊は日本にも生息するヒトスジシマカであったため、日本においてもチクングニアウイルスの侵淫の可能性は否定できない。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ア熱の流行は拡大しており、早期の防疫体制の確立が求められる。

G. 研究発表

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, 高崎智彦. 近年のチクングニア熱の流行状況. 公衆衛生, 75 (1) : 39-42, 2011.

H. 学会発表

Lim, C. K., Takasaki, T., Moi, M. L., Omatsu, T., Kotaki, A., Chua, K. B., Kurane, I. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus in Malaysia. 第 8 回日中国際ウイルス学会. ハルピン, 中国, 2010.

Takasaki, T., Moi, M. L., Lim, C. K., Kurane, I. Imported Chikungunya fever and dengue fever in JAPAN. 第 7 回日台ワクチンおよび旅行医学シンポジウム. 台北, 台湾, 2010.

Lim, C. K., Takasaki, T., Moi, M. L., Omatsu, T., Kotaki, A., Chua, K. B., Kurane, I. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus in Malaysia. 第 9 回国際プラス鎖 RNA ウイルス学会, アトランタ, アメリカ, 2010.

林 昌宏, 藤本嗣人, 小長谷昌美, モイメンリン, 小滝 徹, 倉根一郎, 高崎智彦. 近年のチクングニア熱の流行と迅速診断法の検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.

青山幾子, 弓指孝博, 加瀬哲男, 高橋和郎, 高崎智彦, 林 昌宏, 倉根一郎. 大阪府における Dengue 熱・チクングニア熱の検査体制. 衛生微生物技術協議会第 31 回研究会, 鹿児島, 2010.

高崎智彦, 小滝 徹, 田島 茂, 林 昌宏, モイ メンリン, 倉根一郎. 輸入デング熱・チクングニア熱 検査・診断状況 (2008-2010). 衛生微生物技術協議会第31回研究会, 鹿児島, 2010.

林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎. チクングニア熱の流行状況と実験室診断法. 衛生微生物技術協議会第31回研究会, 鹿児島, 2010.

林 昌宏, 高崎智彦, モイ メンリン, 大松 勉, 倉根一郎. 近年のチクングニア熱流行におけるチクングニア熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第84回日本感染症学会総会・学術講演会, 京都, 2010.

江下優樹, 高崎智彦, 林 昌宏, Srisawat, R., Komalamisra, N., Rongsriyam, Y., 湯偉峰, 青野裕士, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, 倉根一郎. タイ国産ネッタイシマカのチクングニアウイルス感受性. 第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島, 2010.

高崎智彦, 林 昌宏. 拡大するチクングニア熱の現状と臨床. 平成21年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2010.

林 昌宏. チクングニア感染症の診断法. 平成21年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2010.

I. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

表 1:日本におけるチクングニア熱輸入症例

| 症例数 | 渡航先 | 年齢 | 性別 | 発症年月 | 確認県※ |
|-----|--------|----|----|----------|------|
| 1 | スリランカ | 36 | 女性 | 2006年11月 | 東京都 |
| 2 | スリランカ | 59 | 女性 | 2006年12月 | 新潟県 |
| 3 | インド | 37 | 男性 | 2008年8月 | 大阪府 |
| 4 | マレーシア | 41 | 女性 | 2009年1月 | 兵庫県 |
| 5 | インドネシア | 48 | 女性 | 2008年9月 | 東京都 |
| 6 | インドネシア | 52 | 男性 | 2009年3月 | 東京都 |
| 7 | インド | 46 | 女性 | 2008年10月 | 東京都 |
| 8 | インドネシア | 30 | 男性 | 2009年5月 | 東京都 |
| 9 | インドネシア | 36 | 女性 | 2009年5月 | 千葉県 |
| 10 | インドネシア | 43 | 女性 | 2009年5月 | 東京都 |
| 11 | マレーシア | 39 | 女性 | 2009年5月 | 東京都 |
| 12 | インド | 30 | 男性 | 2009年7月 | 長崎県 |
| 13 | インドネシア | 35 | 男性 | 2009年9月 | 東京都 |
| 14 | タイ | 56 | 女性 | 2009年9月 | 東京都 |
| 15 | ミャンマー | 76 | 男性 | 2009年12月 | 神奈川県 |
| 16 | インドネシア | 66 | 男性 | 2010年3月 | 京都府 |
| 17 | インドネシア | 39 | 女性 | 2010年2月 | 東京都 |
| 18 | インドネシア | 50 | 女性 | 2010年9月 | 東京都 |
| 19 | インドネシア | 34 | 男性 | 2011年1月 | 香川県 |

※確認県は受診医療機関の所在する都道府県を示している。

日本脳炎ワクチン接種により獲得され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
並びに デング熱・チクングニヤ熱実験室診断の国内ネットワーク確立

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:

昨年度日本脳炎ウイルス(JEV)ワクチン被接種者の約 20%がウエストナイルウイルス(WNV)に対する交差中和抗体を保有していることを報告した。本研究では、日本脳炎ワクチンの追加接種により、WNV に対する中和抗体を獲得できるか否かを明らかにするために、一般健常人に日本脳炎ワクチンを接種し、日本脳炎ワクチンの有効性を評価するとともに、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。その結果、ワクチン被接種者の 89%に JEV 中和抗体価の上昇がみられ、新しい日本脳炎ワクチンは成人に対する追加接種にも有効であると考えられた。また、JEV 中和抗体価が上昇した対象者の 39%が WNV に対する 10 倍以上の交差中和を示した。これらのことから、日本脳炎ワクチン追加接種によっても 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。

また、アルボウイルスの検査ネットワークを確立するため、デング熱やチクングニヤ熱の実験室診断法について研修を実施し、地方衛生研究所間の技術連携を図った。

A. 研究目的

我が国にはウエストナイルウイルス(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。

昨年度、過去の日本脳炎ワクチン免疫により JEV 中和抗体を保有する集団の 1/4 に WNV に対する交差中和抗体がみられること、また、JEV 中和抗体価が 160 倍以上あれば 1/3 に交差中和抗体がみられることを報告した。今回我々は、日本脳炎ワクチンの追加接種により、WNV に対する中和抗体を獲得できるか否かを明らかにするため

に、一般健常人に日本脳炎ワクチンを接種し、日本脳炎ワクチンの有効性を評価するとともに、WNV に対する中和抗体価の上昇について検討した。

また、近年、デング熱やチクングニヤ熱の検査需要が増加しているため、これら疾患の実験室診断法について研修を実施し、地方衛生研究所間の技術連携を図ることを目的とした。

B. 研究方法

1) 血清

本研究に同意を得た一般健常人 80 名(20~66 歳、平均 43 歳)に、採血後乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン(ジェービック V)を接種し、約 1 ヶ月後