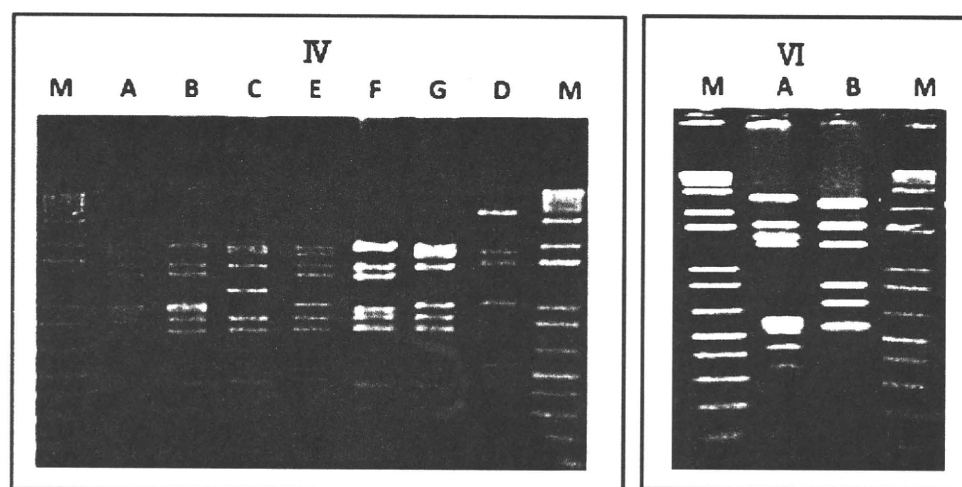


Table 1. RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR, VCR-PCR の性能比較表

	分類力	再現性	安定性
RAPD-PCR	0.88	0.90 (39 strains)	0.6 (2/3)
ERIC-PCR	0.93	1.00 (43 strains)	1.00 (3/3)
REP-PCR	0.81	0.95 (41 strains)	0.6 (2/3)
VCR-PCR	0.72	1.00 (43 strains)	1.00 (3/3)



株数 64 1 1 2 1 1 18
(O139株) (0) (0) (0) (0) (0) (0) (18)

30 58
(0) (18)

Fig. 4. 88株総てに対して行ったIntegron Island分割 IVおよびVI領域の代表PCR-RFLPパターンと菌株の分布

ン、1983年～1994年の分離株では両パターンが混在し、1995年以後の分離株では総てがBパターンを示した。0139株は総てBパターンを示した。なお、上記のRFLPパターンと菌株の分離地との関連はまったく認められなかった。

④ VI領域における追補PCRによってBパターンを示す株はこの領域の一部を含む約20 kbが欠失していることが確認された。

D. 考察

本研究に先立ち我々が行ったゲノムサブトラクション法を用いた解析より、Integron Islandが可変異部位であると考えられたため、Integron Islandの相同性解析を行った。その結果、本領域が菌株ごとに多様である可能性が示唆された。そこで本領域に多数存在するVCRを標的としたPCR法に基づく手法の確立を試みた。VCRの5'末端及び3'末端の配列を用いて設計したプライマーセットを用いてPCRを行ったところ、どのような条件でPCRを行ってもスメアパターンとなった。我々はこの原因がプライマーのアニール箇所が多過ぎるためではないかと考え、各プライマーに任意の塩基を一塩基付加したプライマーを設計し、様々な組み合わせで再度条件検討を行った。その結果、目視可能な泳動図が得られ、その中でもVCR5とVCR3'のプライマーセットによるPCRが最も優れた識別能を示すことが明らかとなった。そこで、このプライマーセッ

トを用いて供試菌株37株における多様性を確認したところ、01は1990年を境に系統的な違いが確認され、異なる6つのグループに分類することが可能となった。一方0139は、独自のグループを形成するものの、1990年以後分離された01と酷似するパターンを示し、01との系統的関連性を示唆する結果となった。

近年マレーシアでは、大規模なコレラの発生はないが、散发事例は、毎年報告があり、死者も発生している。また、マレーシアには多数の日本人が渡り、さらに我が国はマレーシアから大量の魚介類を輸入している。このような状況において、コレラ菌の迅速・簡易なDNAフィンガープリンティングは、少なくとも両国でのコレラの発生を回避、あるいは最小限に食い止めるために大変重要であると思われる。そこで、我々はVCR-PCRのアジア圏内でのラボラトリーにおける本法の有用性検討する目的で、マレーシアのマラヤ大学と連携して、マレーシア国内で分離されたコレラ菌株について本法と既知のPCRを用いた3つのDNAフィンガープリンティング法の性能比較を行った。その結果、フィンガープリントの結果より、43株のマレーシア分離の*V. cholerae*が遺伝子的に多様であることが明らかとなった。

RAPD-PCR, ERIC-PCR, REP-PCRの結果から作成したデンドログラムから、0139は、non-01/non-0139に近縁種であることが示された。しかしながら、VCR-PCRでは、0139は、01や

non-01/non-0139 と区別され、01 株により近い関係にあったことから、海水等から分離されたある 0139 株は、01 El Tor 株の 01 抗原合成遺伝子やハウスキーパー遺伝子が non-01/non-0139 の環境分離株へ水平伝播した可能性が考えられた。

上記のごとく、RAPD-PCR と REP-PCR は高い菌株識別力を持っているが、成績の安定性や再現性が低いために、*V. cholerae* のフィンガープリンティング法としては不適であった。ERIC-PCR の菌株識別力、成績の安定性、再現性も高いが、異なる血清型が同一系統と判定されてしまうようなバンドパターンを示すため、疫学的系統解析は困難であった。一方、VCR-PCR は、菌株識別力は ERIC-PCR に劣るものの、成績の安定性、再現性が高く、さらに血清型と整合性のある系統分けが可能であった。

以上の所見より、*V. cholerae* の疫学的情報と整合性を保った菌株レベルの DNA フィンガープリンティングは 1 つの手法によって行うのではなく、ERIC-PCR と VCR-PCR を併せて使用することが適当であることが示された。ERIC-PCR と VCR-PCR は PCR に基づく手法であり、PFGE や MLST などのように高価な機器を必要とせず、簡便かつ迅速に結果が得られるため、一日に大量サンプルを供試することも可能である。したがって、上記 2 つの PCR を組み合わせたフィンガープリンティングは我が国を含め広くアジア圏内のラボラトリーでの *V. cholerae* の系統

解析に有用であると考えられる。

VCR-PCR による系統解析により国立感染症研究所に保存されている *V. cholerae* の 37 株について行われた Integron Island を標的とした DNA フィンガープリンティングによって、1990 年を境に系統的な違いが確認され、この時期に Integron Island に何らかの変異が起ったことが示唆された。そこで我々は上記の 37 菌株の DNA 試料に加え、大阪府立公衆衛生研究所より提供された 51 株の DNA 試料について、Integron Island を 11 に分割した領域について RFLP 解析を行い「変異」箇所を特定を試みた。その結果上記分割された 6 番目の領域、VI 領域に RFLP パターンの変異 (A→B) が認められた。この変異は 1983 年から 1993 年の 10 年間で漸次 A から B に「変遷」するかたちで認められ、前述の VCR-PCR による系統解析の結果と一致していた。

そこで我々は、上記の VI 領域で何が起こったのかを明らかにすべく、この領域の基配列の比較を行った。その結果、1990 年以前に分離された N16961 株を含む毒素産生性 *V. cholerae* 01 El Tor 株に特異的な領域が判明した。VI 領域においてみられた 1994 年以降に分離された PCR-RFLP パターンの違いは、約 20 kb の「欠失」によるものであることが明らかとなった。Genbank のデータベースによると当該の約 20kb には 4 つの acetyltransferase putative gene と 1 つの lipoprotein 構築に係る gene を含む 42 の open reading frame が存

在するとされているが、残り 37 個の orf は機能未知の hypothetical protein である。これらの hypothetical protein 群に *V. cholerae* の病原性や生態的に有利となるように働く遺伝子を抑制する遺伝子が含まれていれば、その欠失は新たな病原性の発現につながり、それによって 1990 年以降の世界的流行を説明できるかもしれない。今後は、約 20 kb 領域にコードされる遺伝子の欠失による表現型（薬剤耐性、ファージ感受性等）や病原性（接着性、毒素産生性等）への影響について検証することが必要であろう。

E. 結論

アジア圏のラボラトリーでも実施可能な PCR を使った迅速かつ簡易なコレラ菌の新規 DNA フィンガープリンティング法、VCR-PCR、を開発した。コレラ菌の包括的な系統解析には、まず疫学的な付帯情報と整合性のある VCR-PCR を行った上で、同じ系統に属する菌株群について ERIC-PCR を行い菌株レベルでの系統識別を行うことが適当である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Tokunaga, A., Yamaguchi, H., Morita, M., Arakawa, E., Izumiya, H., Watanabe, H., Osawa, R. (2010): Novel PCR-based genotyping method, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic

Vibrio cholerae 01 El Tor and 0139. Mol. Cell. Probes. 24 (2):99-103.

2) Teh CS, Thong KL, Osawa R, Chua, KH (in press) Comparative PCR-based fingerprinting of Malaysian *Vibrio cholerae*. J. Gen. Appl. Microbiol.

2. 学会発表

1) 徳永暁彦, 大澤朗, 森田昌知, 荒川英二, 渡辺治雄: *Vibrio cholerae* の可変 DNA 領域を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発、第 42 腸炎ビブリオシンポジウム (2008. 10)

2) 徳永暁彦, 大澤朗, 森田昌知, 荒川英二, 渡辺治雄: *Vibrio cholerae* の可変 DNA 領域を標的とした新規 DNA フィンガープリンティング法の開発」第 43 回日米コレラ・細菌性腸管感染症専門部会 (2008. 11).

3) Osawa, R.: Novel PCR-based DNA fingerprinting, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139 strains, The 13th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, in Kolkata, India (2009. 4).

4) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron Island を標的とした PCR-RFLP 解析、日米コレラ関西支部会 (2009. 7).

5) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢

戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron Island を標的とした PCR-RFLP 解析」, 第 43 腸炎ビブリオシンポジウム (2009. 11).

6) 山口博史, 井口純, 森田昌知, 勢戸和子, 渡辺治雄, 大澤朗: コレラ毒素産生性 *Vibrio cholerae* エルトール 01, 0139 株の Integron island を標的とした PCR-RFLP 解析, 第 83 回日本細菌学会総会 (2010. 3).

7) Osawa R: Novel PCR-based DNA fingerprinting, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139 strains. The International Conference on Food Security during Challenging Times, University Putra in Malaysia (2009. 4).

G. 参考文献

1) Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A. K., Bhadra, R. K., Ghosh, A. N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S. M., Takeda, Y., Colwell, R. R., Nair, G. B. (2000): Virulence

genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol., 66: 4022-4028.

2) Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and applications to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res., 19: 6823-6831.

3) Navia, M. M., Capitang, L., Ruiz, J., Vargas, M., Urassa, H., Schelleberg, D. (1999): Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. J. Clin. Microbiol., 37: 3113-3117.

4) Tokunaga, A., Yamaguchi, H., Morita, M., Arakawa, E., Izumiya, H., Watanabe, H., Osawa, R. (2010): Novel PCR-based genotyping, using genomic variability between repetitive sequences of toxigenic *Vibrio cholerae* 01 El Tor and 0139. Mol. Cell. Probes, 24: 99-103.

プロジェクト 2 : ウイルス

デング熱

分担総合研究報告書

血清学的検査法によるアジアのチクングニア熱疑い患者血清の解析

研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究協力者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）

林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）

モイ・メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室研究員）

研究要旨：確立したチクングニア熱血清学的検査法が流行地域の患者血清に使用可能であることを、マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者血清を用いて検討した。マレーシアはチクングニア熱とともにデング熱の流行地域であることから、デングウイルスに対するIgM抗体、中和抗体も検討した。80人のチクングニア熱疑い患者中、血清学的に14人はチクングニア熱患者と確定された。一方13人はデング熱と判定された。また、3血清は両ウイルスに対するIgM抗体を有し、確定が困難であった。これまでに確立した中和法、IgM捕捉ELISA法によりチクングニア熱の確定診断が可能であることが示された。また、東南アジアにおいてはチクングニアウイルス、デングウイルスに対する検査を同時に行うことが重要であることが示された。

A. 研究目的

チクングニア熱は2005年初頭インド洋諸島で流行が発生した。その後流行はインド、スリランカ、イタリア、マレーシア、タイ、シンガポールに拡大するとともに欧州、米国、アジア、オセアニア諸国において多くの輸入症例が報告されている。アジア諸国では近年シンガポール、マレーシア、タイでの流行が確認されている。マレーシアでは2009年までに10,000症例以上の患者が報告された。本研究では、マレーシアのK. B. Chua博士

(Malaysia, The National Public Health Lab)と共同研究のもとに、これまでに確立した血清学的検査法が流行地域の患者血清に使用可能であるかを検討した。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞：チクングニアウイルス中和試験においてはCHIKV S27株を用いた。ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来のVero細胞を用いた。

抗体検出：チクングニアウイルスおよびデングウイルス中和試験はVero細胞を用いた50%フォーカス減少法にて検討した。得られた患者血清を非動化し、10倍希釈後2倍階段希釈を行った。希釈した患者血清とウイルスを等量混合後37℃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。チクングニアウイルスIgM抗体、デングウイルスIgM抗体はIgM捕捉ELISA法で検出した。

C. 研究結果

マレーシアにおけるチクングニア熱疑い患者血清80検体を検査した。17検体においてはチクングニアウイルスIgM抗体が検出され急性期のチクングニアウイルス感染が示唆された。そのうち15血清では同時に中和抗体も検出された。

マレーシアにおいてはチクングニア熱とともにデング熱も流行していることから、デングウイルスに対するIgM抗体、中和抗体も検討した。多くは中和抗体を有し16検体はデングウイルスに対するIgM抗体陽性であった。特に、3検体についてはチクングニアウイルスIgM抗体、デングウイルスIgM抗体がいずれも陽性であった。従って、血清学的には14人はチクングニア熱、13人はデング熱と判定された。両ウイルスに対するIgM抗体を有する患者は、いずれの感染症であるか確定が困難であった。

D. 考察

IgM捕捉ELISA法、50%プラーク減少法を

用いた中和法を確立した。これらの検査法を用いてチクングニア熱疑いマレーシア患者血清を検査した。鑑別診断としてデング熱に対する解析も同時に行った。その結果、チクングニア疑い患者80例のうち14例はチクングニア熱、13例はデング熱と確定された。興味深いことに、3例は両ウイルスに対するIgM抗体が陽性であり、いずれとも判定できなかった。両ウイルスに同時に感染した可能性もあるが、今後更なる検討が必要である。一般に、IgM抗体が検出されれば一つの検体によっても感染を確定できるといわれているが、特に複数のウイルスが流行している地域においてはIgM抗体であっても、急性期と回復期でその上昇を確認する必要があることが示された。

E. 結論

マレーシアにおけるチクングニア疑い患者血清を用いて、これまでに確立した中和法、IgM捕捉ELISA法により確定診断が可能であることを示した。また、チクングニア疑い患者の中にはデング熱と確定された患者も含まれていることから、東南アジアの患者においてはチクングニアウイルス、デングウイルスに対する検査を同時に行うことが必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Moi, M.L., Lim, C.K., Kotaki, A., Takasaki, T. and Kurane, I.: Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell

lines expressing FcγRIIA. *Journal of Virological Methods*. 91(1): 103-111, 2009.

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.

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T. and Kurane, I.: Involvement of the Fcγ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of General Virology* 91(1): 103-111, 2010.

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.

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(11): 1770-1772, 2010.

H. 学会発表

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

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

水野泰孝, 氏家無限, 竹下望, 加藤康幸, 金川修造, 工藤宏一郎, 高崎智彦, 林 昌宏, 倉根一郎: 遅延する関節痛を主訴に来院したチクングニヤ熱の 3 症例. 第 58 回日本感染症学会東日本地方会学術集会 (東京都) 2009 年 10 月 30-31 日

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

I. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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）
分担研究総合報告書（H20-22 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 2009 年に第 1 次パネル、2010 年に第 2 次パネルとして選定し 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

2008 年開始し、血清 6、髄液 5 本を 2009 年に第 1 次パネル、2010 年に第 2 次パネルとして選定し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

パスツール研究所(ホーチミン)で評価し、また独自の in house キットを持たない国7施設では、panbio 社の日本脳炎・デングウイルスコンボ IgM ELISA キットを用いて、作製したパネル血清および panbio 社のキットを評価した。panbio 社のキットは日本脳炎ウイルスとデングウイルス感染を鑑別できると標榜しているキットである。panbio 社のキットの使用法は、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

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

第2次パネルに関しては、第一次パネルの評価時よりソウル、香港における実習コースを経て各施設の能力向上による部分もあるが、多施設正答率は 100%と一致し、第一次パネルと比較してより明確なパネルであった。第2次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。また、抗デングウイルス IgM 抗体陽性を示した検体も 3 検体であった。我々の IgM 抗体価測定法を用いることにより、

明確に鑑別することが可能であった。デング熱患者血清 2 検体(血清)に関しても IgM 抗体価測定を実施したところ、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、2 検体が日本脳炎に陽性、デング熱 1 検体はデングウイルスに弱陽性を示し、他 2 検体は陰性血清で、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。選定した第一次パネル(血清・髄液)および第2次パネルを選定した。

これら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

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

総合分担研究報告書

（平成 20～22 年度）

国立感染症研究所における輸入デングウイルス感染症の検査・診断状況

（2008－2010）

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・亜熱帯地域に拡がっており、新興再興感染症の一つとして、極めて重要な感染症になっている。わが国では終戦後以降 60 年間国内流行のない感染症であるが、近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例は年間数十例みられる。2008～2010 年に当研究室で実験室診断された陽性検体数は 236 例（2010 年 12 月中旬現在）であり、2005～2007 年の 125 例の約 2 倍に達した。特に 2010 年は 124 例で例年の 2～3 倍に増加した。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。渡航先別ではインドネシア、インド、タイ、フィリピンが目立った。インドネシアの多くはバリ島に滞在歴のある患者であった。また近年、インドをはじめとする南アジアからの帰国者が増加している。この 3 年間でアフリカ（コートジボアール、タンザニアおよびベナン）での感染例も 4 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 Dengue ウイルス IgM および IgG 抗体はそれぞれ IgM-捕捉 ELISA 法および IgG-ELISA 法により測定した。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 Dengue 熱疑いで当研究室に送付された患者検体数は、2008 年は 125 例、2009 年は 87 例、2010 年は 181 例 (2010 年 12 月中旬現在) であった。このうち陽性のものはそれぞれ 67 例、45 例、122 例であった。2008 年および 2010 年はそれぞれその時点で過去最高を記録した。近年の患者数の増加理由としては、比較的多くの日本人が渡航する地域で Dengue 感染症が流行していた可能性や、国内医療機関での Dengue 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 2008 年、2009 年が約 50% に対し、2010 年は 68% と高かった。陽性患者は例年通り約 6 割が男性であった。年代分布は 20 代と 30 代で 5 割を超え、次いで 40 代、50 代、10 代、60 代と続いた。Dengue ウイルスには 4 つの血清型が存在するが、今回同定された Dengue

ウイルスの血清型分布は 1~3 型がおおよそ同程度であり、4 型がやや少ない傾向であった。患者の渡航地域は 3 年間を通じてアジア・オセアニアが 90% 以上であった。一方、この 3 年間でアフリカからの輸入感染症例 (2008 年にコートジボアール 1 例、2010 年にタンザニア 2 例およびベナン 1 例) も確認された。3 年間の合計を国別で見ると 1 位がインドネシアで 58 例、2 位がインドで 44 例、3 位がタイで 26 例、4 位がフィリピンで 25 例、5 位がベトナムで 13 例と続いた。特に 2010 年はインドネシアが多く 42 例に上り、このうちの 32 例がバリ島に滞在歴のある患者であった。また近年、インドでの感染症例が目立っており、3 年連続で 10 例を超え、2010 年は 23 例であった。月別にみていくと、インドネシアは例年 1 月から夏期に症例が集中する傾向にある。一方インドは 8 月から 12 月に集中する。タイは 5 月から 11 月、フィリピンは 8 月から翌年 2 月に輸入症例が多い傾向にある。これらは現地の気候、つまり媒介蚊の多く発生する雨季とほぼ一致する。

すでに述べたとおりアフリカからの帰国者で Dengue 感染が確認された。アフリカが Dengue 感染症蔓延地域であることは既知のことであるが、現地の状況やウイルスに関する情報は非常に限られている。我々はこれらアフリカで Dengue ウイルスに感染した患者の血清から Dengue ウイルスの分離を試み、2008 年のコートジボアール株および 2010 年タンザニア株をそれぞれ 1 株ずつ増幅させることに成功した (Moi et al., 2010)。遺伝子解析の結果、共に Dengue 3 型ウイルスであることが確認され、両者は進化的に非常に近縁であることが明らかとなった。

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2008年は2例(2%)、2009年は10例(13%)、2010年は4例(2%)がチクングニヤ陽性であった。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。今後はデングウイルス感染症と同様に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。

D. 結論

本研究により、我々は2008年から2010年までの3年間の輸入デングウイルス感染症の実態を把握することができた。我々のデータより、年間を通じたデングウイルス感染症の流行地域および流行期間などがおおよそ予測できることから、今後海外渡航者へ注意を促す等、行政施策にも役立てることが可能であろう。国内への情報提供のみならず、我々のデータはWHOへも提供され、国際的にも貢献している。

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) Takasaki, T., Kotaki, A., Nishimura, K., Sato, Y., Tokuda, A., Lim, C.K., Ito, M., Tajima, S., Nerome, R., and Kurane, I. Dengue virus type 1 isolated from an imported dengue patient in Japan: first isolation of dengue virus from Nepal. *Journal of Travel Medicine*, 15: 46-49, 2008.
- 2) Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes*, 36: 323-329, 2008.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.

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.

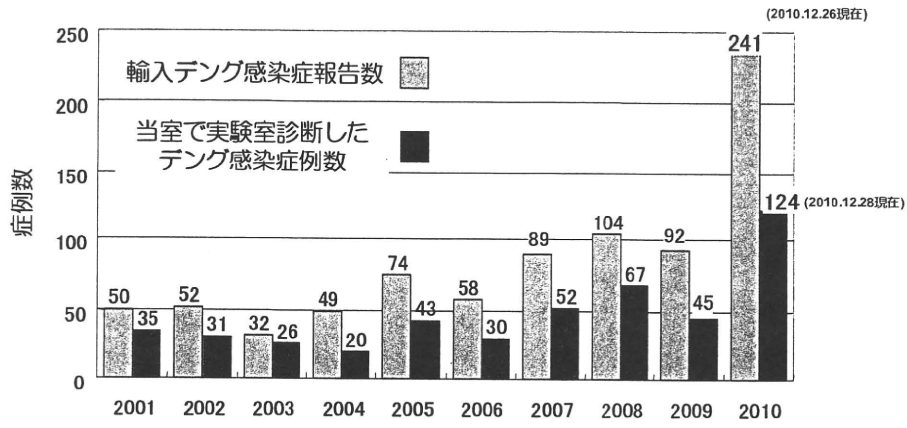
学会発表

- 1) 田島茂、加藤文博、小滝徹、貫井陽子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスゲノム 3'非翻訳領域上の欠失・挿入変異体の性状解析。第56回日本ウイルス学会学術集会 (平成20年10月)
- 2) 貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白 NS4A の1アミノ酸変異は IFN β の誘導を低下させることにより病原性を高める。第56回日本ウイルス学会学術集会 (平成20年10月)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎： Dengue 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)

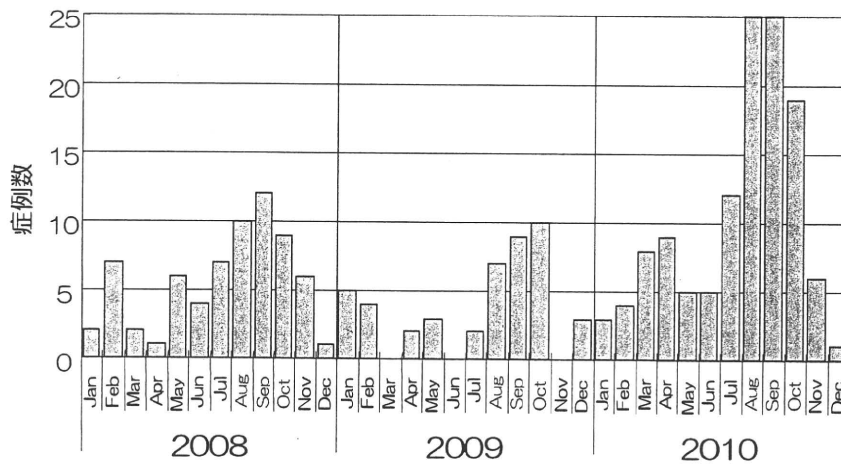
- 7) 高崎智彦、小滝徹、田島茂、大松勉、林昌宏、倉根一郎：イノシシ末梢血からの日本脳炎ウイルスの分離と性状解析。第57回日本ウイルス学会学術集会（平成21年10月）
- 8) 加藤文博、田島茂、山口幸恵、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3'NTR 内に変異を有する日本脳炎ウイルス変異体の *in vitro* における増殖性および病原性解析 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月
- 9) 山口幸恵、田島茂、小滝徹、澤辺京子、渡邊治雄、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルス E 蛋白質の1アミノ酸置換（S123N）がウイルス増殖に及ぼす影響 第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会 東京 2010年5月
- 10) 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.
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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

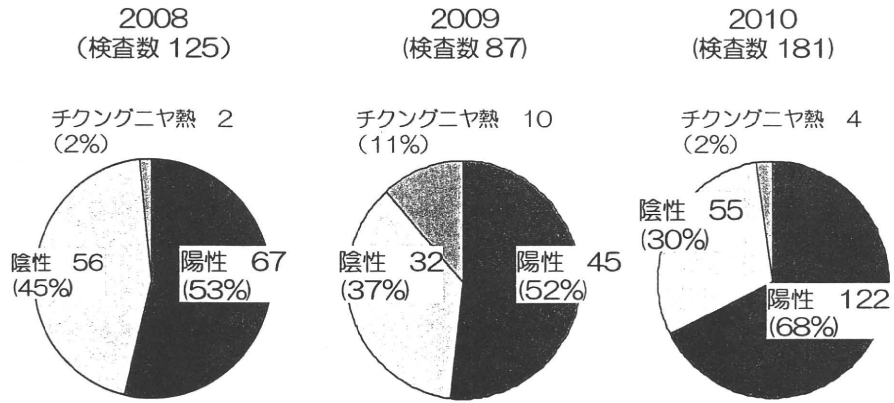
国内輸入デング感染症報告数



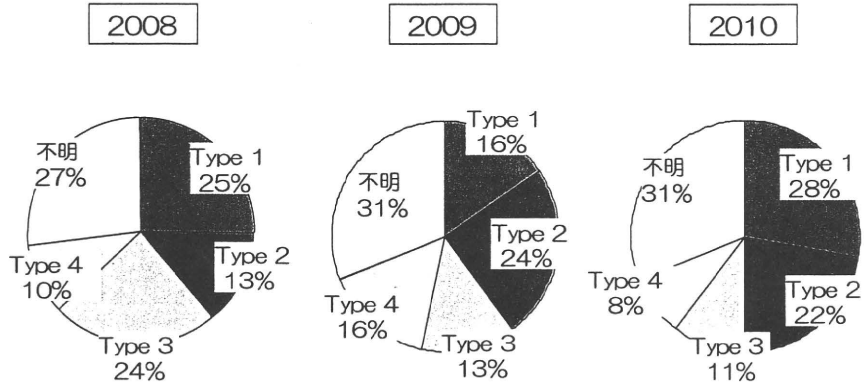
月別輸入デング熱症例数



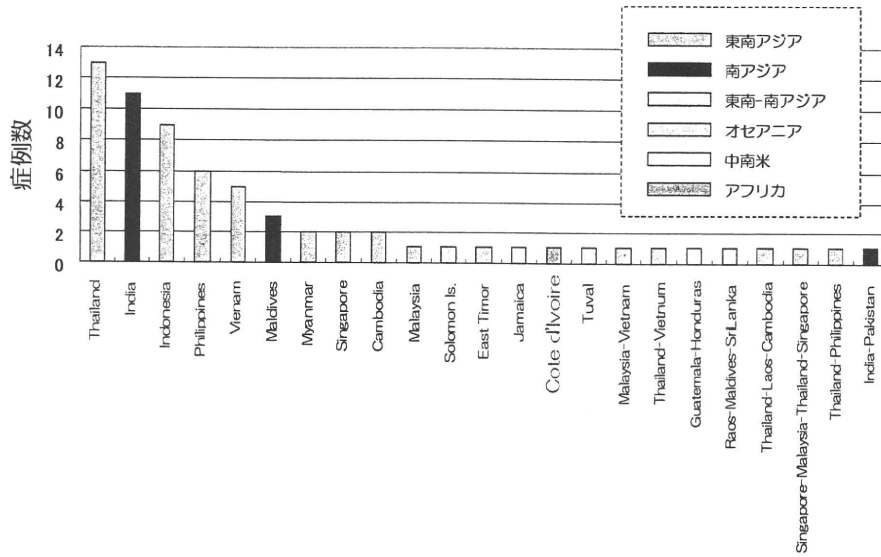
全検査検体に占める陽性検体数と割合



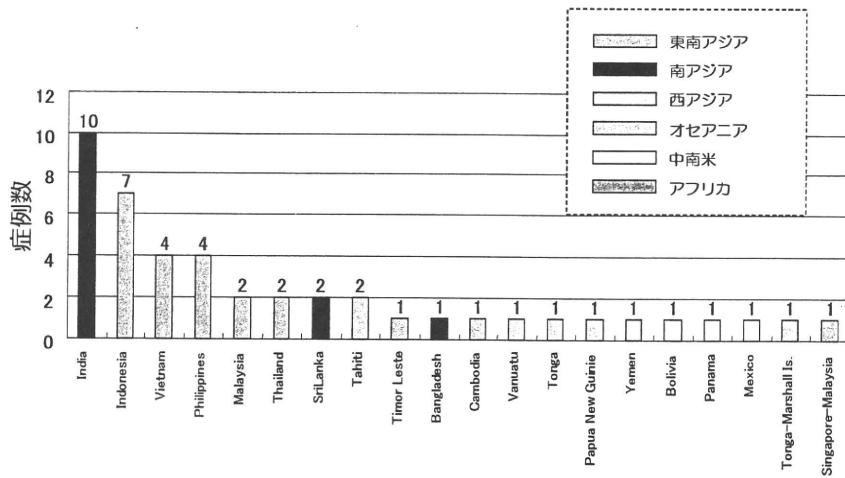
患者検体から同定された各デングウイルス型の割合



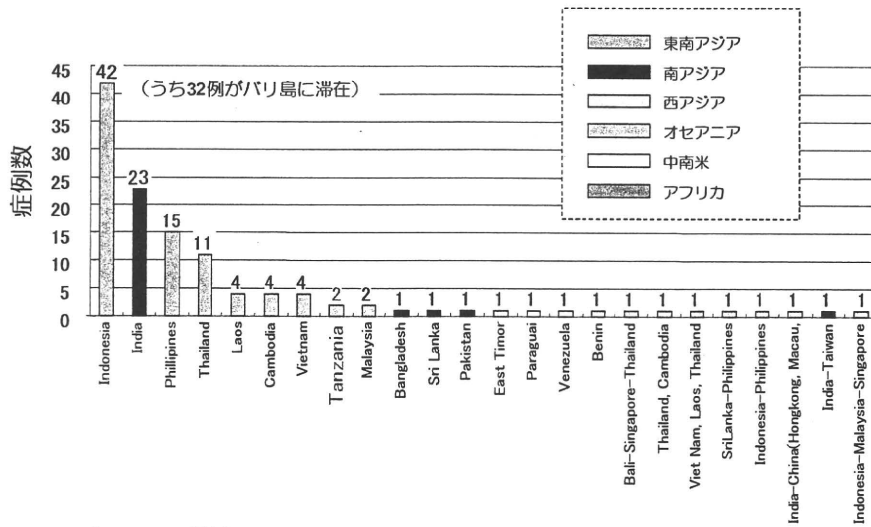
渡航国別輸入デング感染症例数2008



渡航国別輸入デング感染症例数2009



渡航国別輸入デング感染症例数2010



(2010.12.20現在)

国別輸入デング熱症例数の年間推移

