

アジアにおける近年のチクングニアウイルス流行株の解析

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）

松本泰治（小樽検疫所検疫衛生課試験検査室長）

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。CHIK 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 2 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熱の実験室診断法により流行地域であるタイ患者血清と日本における輸入症例患者血清を用いて現在流行しているチクングニアウイルス株の性状を解析した。

A. 研究目的

チクングニア熱（Chikungunya fever）はアフリカ、南アジア、東南アジアで近年流行している人獣共通感染症であり、時に激しい関節痛、発疹、悪寒、頭痛、悪心、嘔吐、筋肉痛を伴うウイルス性急性熱性疾患である。チクングニア熱の病因ウイルスであるチクングニアウイルス（Chikungunya virus）はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される RNA ウイルスで、ネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ（*A. albopictus*）などのヤブカ属の力によって媒介される。自然界では霊長類、げっ歯類、翼手類からチクングニアウイルスが分離されている。近年のチクングニア熱の流行は 2004 年にケニア沿岸において確認され、インド洋諸島、インド、東南アジアに急速にその流行域を拡大した。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。インドでの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 57,000 例以上報告された。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、これまでに 900 例以上の CHIK 症例が報告されている。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 2008 年にマレーシアとの国境に位置するナラティワート県、ソクラー県、パッタニー県、ヤラー県等の南部地方を中心にチクングニア熱が報告されたが 2009 年には流行地域が北部 11 県、東北部 15 県、中部 17 県、

南部 14 県とタイのほぼ全土に拡大し 2010 年までに 60,000 症例以上の患者が報告されている。また 2007 年には温帯地域における初めての流行がイタリアで、さらに 2010 年にはフランスで国内流行が発生した。イタリア、フランスでの国内流行は日本にも生息するヒトスジシマカにより媒介されたと考えられており、日本国内への侵淫の可能性は否定できない。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ている。したがってチクングニア熱の流行地域に渡航する場合はカに吸血されにくい服装や忌避剤の使用等の予防対策が必須である。チクングニア熱は平成 23 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」(感染症法)において 4 類感染症に指定されており、今後ともその動向の把握が求められる。ところでこれまでに我々はチクングニア熱の検査体制を確立した。そこでこれまでに確立した実験室診断法を用いて流行地域であるタイの流行状況を把握するため、タイのチクングニア熱患者検体を解析し、これまでの流行株との比較検討した。さらに日本におけるチクングニア熱輸入症例の解析も同時に行なったので報告する。

B. 研究方法

実験室内診断：病原体診断法として RT-PCR 法及びリアルタイム PCR 法によるウイルス遺伝子検出を行い、遺伝子解析を行った(図 1)。また血清学的診断として IgM 捕捉 ELISA 法を行った。

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：チクングニアウイルス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後 37°C 1 時間中和反応を行った。各血清-ウイルス反応液を 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。

C. 研究結果

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

RNA copies/ml であった。

ウイルス分離と遺伝子解析: Vero 細胞を用いたウイルス分離の結果、8 例のチクングニアウイルス RNA 陽性患者血清中 3 例の患者血清を接種した細胞において激しい細胞変性効果が 4 日後に観察された。分離した 3 株のウイルスの遺伝子解析および系統樹解析を行ったところ両ウイルスは近年インド・マレーシアで流行している東・中央アフリカ型のウイルス株とクラスターを形成した (図 2)。従って現在タイで流行している株はインド・マレーシアで流行している株と関連性があることが示唆された。

日本におけるチクングニア熱輸入症例: これまでに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, チクングニア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 SL11131 株, 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 (図 2)。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 (図 2)。

D. 考察

これまでに我々は RT-PCR 法, リアルタイム RT-PCR 法を用いた遺伝子検出法, IgM 捕捉 ELISA 法, 50%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した。そこでこれら診断法を用いてチクングニア熱疑いタイ患者血清に対する実験室内診断を行った。鑑別診断として Dengue 熱に対する解析も同時に行った。その結果ウイルス分離及び遺伝子診断において同一の患者から同時にチクングニアウイルスと Dengue ウイルスは分離・検出されなかった。タイ患者血清を用いたウイルス分離によりこれまでに 3 株のチクングニ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的解析の結果いずれの分離株も現在アフリカおよびアジア地域で流行域を拡大している東・中央アフリカ型の遺伝子型に分類されることが示唆された。タイの流行地域はマレーシアとの国境沿いを中心に発生しており, 統計学的

解析においても両国の分離株は同一クラスターを形成した。

次に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。患者血清より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 SL11131 株、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より分離された 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。また流行地であるタイの患者血清より分離したウイルスを解析した結果、現在アフリカおよびアジア地域で流行地域を急速に拡大している東・中央アフリカ型の遺伝子型のウイルスであることが示唆されたことから今後も引き続きチクングニア熱の流行動向を解析する必要が示された。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アジアを含む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。温帯地域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襲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., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Tanaka, K., Kurane, I., Takasaki, T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from Sri Lanka: Isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2009. 81(5):865-868.

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

Viruses. Transworld Research Network., Kerala, India.

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

林 昌宏, 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

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

林 昌宏. チクングニア熱. 化学療法の領域, 24 (11):1606-1613, 2008

青山幾子, 弓指孝博, 加瀬哲男, 高橋和郎, 宇野健司, 後藤哲志, 片山智香子, 中村匡宏, 塩見正司, 仁科展子, 齋藤武志, 森登志子, 穴瀬文也, 吉田英樹, 高崎智彦, 林 昌宏, 倉根一郎. チクングニア熱と確定診断されたインドからの輸入感染症症例. 病原体微生物検出情報 29 (12): 345-346, 2008.

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.

Lim, C. K., Takasaki, T., Nishibori, T., Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 第42回日米医学ウイルス性疾患専門部会, 長崎, 2008.

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. 2009年米国ウエストナイルウイルス会議, サバンナ, アメリカ, 2009.

Lim, C. K., Kotaki, A., Takasaki, T., Kurane, I. Development of Universal Primers for Rapid Detection of Flavivirus. 第2回国際 Dengue 熱・Dengue 出血熱学会, プーケット, タイ, 2008.

Lim, C. K., Takasaki, T., Nishibori, T.,

Watanabe, K., Ito, M., Kotaki, A., Kurane, I. Two Chikungunya Virus Strains with Different Characteristics isolated from One Patient Who Returned to Japan from Sri Lanka. 第14回国際ウイルス学会, イスタンブール, トルコ, 2008.

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. 大阪府におけるデング熱・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.

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ア熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第57回日本ウイルス学会, 東京都, 2009.

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ア熱の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.

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.

林 昌宏. チクングニア熱検査法. 平成20年度希少感染症診断技術研修会, 東京都, 2009.

柴田伸一郎, 伊藤公一, 林 昌宏, 高崎智彦,
倉根一郎. チクングニアウイルス検出法の
検討. 第56回日本ウイルス学会学術集会, 岡
山, 2008.

林 昌宏, 西堀武明, 渡辺香奈子, 小滝 徹,
伊藤美佳子, 倉根一郎, 高崎智彦. チクング
ニア熱輸入症例患者血清より分離されたチ
クングニアウイルスの性状解析. 第56回日

本ウイルス学会学術集会, 岡山, 2008.

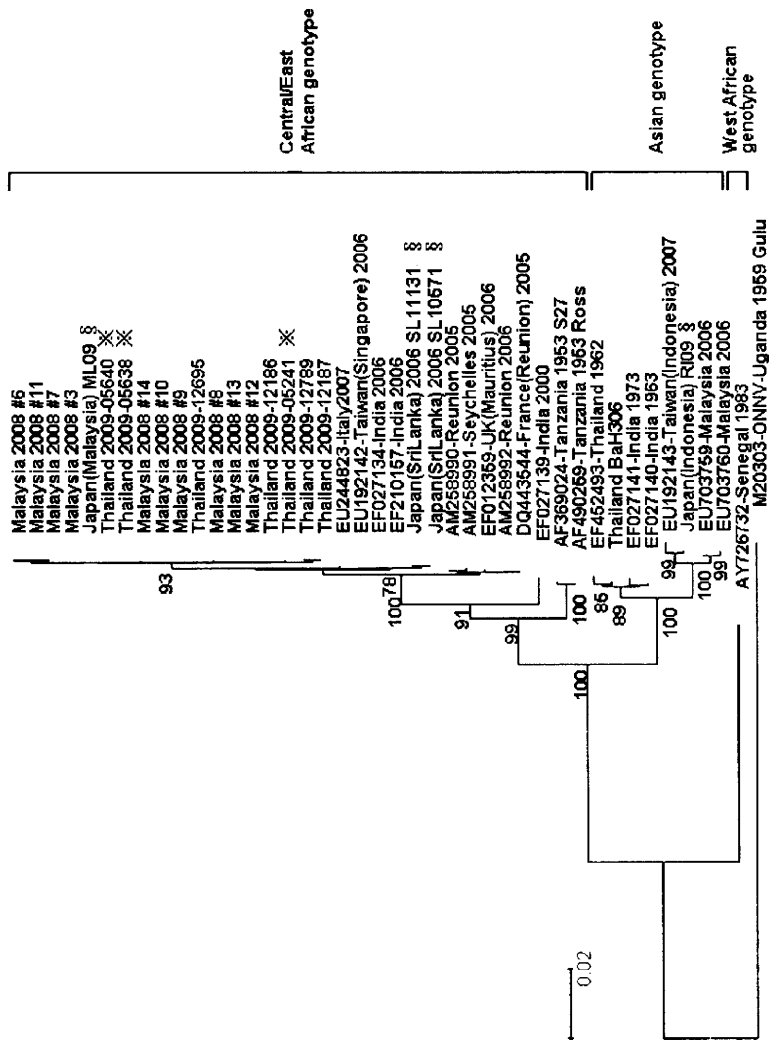
林 昌宏. チクングニア熱の疫学と実験室
診断法. 衛生微生物技術協議会第29回研究
会, 東京, 2008.

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。



図の症的な行た
 2 患者よ解で R I 0 9 株が
 分離清分し東株
 子よ離た株
 クりさ結株・
 ン分れ果、中
 グ離た、央
 ニさウタア
 ヤれイイフ型
 ウたル患株の
 イウス者おカ
 イル株由よ型
 スル(§)のウ
 遺ス株の ML 0 9
 伝株の 3
 子配(※ E 1 株
 列領よ株と
 のお域び近
 のよ輸年ク
 統よ入のラ
 計び塩入の
 学日基症南
 的本配例ア
 的国列よジ
 解内をりで
 析の系分形
 : の系分形
 タ輸統離成
 イ入学さ流し

アルボウイルスに関する研究 並びに 実験室診断検査ネットワークの確立

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:

1. チクングニヤ熱の疫学に関する研究

チクングニヤ熱は蚊によって媒介されるウイルス性の熱性疾患であり、近年輸入症例が増加している。チクングニヤウイルス(CHIKV)に対する抗体検査において特異的 IgM 抗体の検出は最近罹患した証拠となり診断材料として重要であるため、IgM 抗体の持続期間について検討した。その結果感染後少なくとも 3～4 ヶ月まで検出できることが示された。

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

日本脳炎ウイルス(JEV)ワクチン免疫により、ウエストナイルウイルス(WNV)に対する交差中和抗体が誘導されるか否かについて、感染防御の観点から検討した。JEV ワクチン被接種者と日本脳炎患者の血清について、WNV に対する交差中和抗体の有無を測定した。その結果、JEV ワクチン被接種者の約 20%が WNV に対して 10 倍以上の交差中和抗体を有し、JEV と WNV に対する中和抗体価には相関性がみられた($r=0.437$ 、 $P<0.001$)。また、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。

3. 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

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

チクングニヤ熱は蚊によって媒介される熱性疾患で、発熱・関節炎・発疹の 3 主徴を呈し、ときに出血傾向が認められる。同じく蚊媒介性感染症であるデング熱やウエストナイル熱などと流行地域が部分的に重なっており、症状も類似しているた

め、海外から帰国した発熱患者では、これら疾患の鑑別診断を適切に行うことが必要となる。アルボウイルスの実験室診断には、ウイルス分離・遺伝子検査・抗体検査などが行われるが、急性期を過ぎたサンプルではウイルス分離や遺伝子検査が陰性となる場合があり、抗体検査の結果が重要

である。なかでもウイルス特異的 IgM 抗体の検出は最近の感染を示すため重視される。そのため、チクングニヤウイルス(CHIKV)感染後の特異的 IgM 抗体が検出される期間について検討した。

また、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。本研究では、日本脳炎ワクチン被接種者が WNV 感染に対して防御免疫能を有するか否かを明らかにするために、ワクチン被接種者の血清について、WNV に対する交差中和抗体の有無を検討した。また、日本脳炎患者血清とワクチン被接種者血清では、WNV に対する交差中和活性に違いがあるか否かについて検討した。さらに、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. CHIKV 特異的 IgM 抗体の持続性の検討

当所に搬入されたチクングニヤ熱症例のウイルス学的検査を行い、経時的に血清を採取して抗体価の推移を調査し、IgM 抗体の持続期間について検討した。

1) 症例の概要

患者は 37 歳男性、大阪府在住。2008 年 7 月 16 日にインドへ赴任し、同月 26 日から 39.0°C の発熱、頭痛、全身の関節痛を認め、現地にて入院。4 日間抗菌薬を内服し、7 月 29 日に解熱した。翌日から顔以外にまだら模様の発疹が出現したが、数日で軽快し 8 月 1 日に退院した。入院中、

医師は典型的なチクングニヤ熱であると診断しており、急性期採血での抗 CHIKV 抗体は陰性であった。その後 8 月 8 日に帰国したが、全身の関節痛が 8 月中旬より悪化したため、9 月 8 日に近医を受診し、精査加療目的にて 9 月 22 日大阪市立総合医療センターを受診した。

受診時の主訴は、右手首・左右近位指節間関節・右膝・左足関節に違和感であった。体温 36.6°C、意識清明、理学的所見は異常なく、全身の関節には明らかな腫脹・疼痛・変型を認めなかった。血液検査は、(9 月 8 日)WBC 11200/ μ l、Hb 17.8g/dl、Plt 25.0 万/ μ l、CRP 0.0mg/dl、AST/ALT 52/89、(9 月 22 日)WBC 9,810/ μ l、Hb 17.0 g/dl、Plt 20.8 万/ μ l、AST/ALT 60/106 であった。

2) 実験室診断

本症例の第 58 病日(9 月 22 日)血清についてウイルス学的検査(ウイルス分離、遺伝子検査、抗体検査)を実施した。鑑別診断のためデング熱についても検査を実施した。また上記の検査でチクングニヤ熱による感染症と確定診断された後、主治医より患者の同意を得て毎月採血を行い、抗体検査を継続した。採血日は 2008 年 11 月 11 日、12 月 9 日、2009 年 1 月 6 日、2 月 3 日で、それぞれ発症してから 108、137、164、192 病日であった。

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

1) 血清

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

また、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 ヶ月後に再度採血を実施してワクチン接種前後

の中和抗体価を比較した。

2) 中和抗体価測定

各血清について、JEV (Beijing-1株) と、WNV (NY 株) に対する中和抗体価を、50%フォーカス減少法 (FRNT₅₀) を用いて測定した。このとき、血清希釈 10 倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。幾何平均抗体価は、中和抗体価 10 倍未満を 0.5 として算出した。

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

3. 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の確立

近畿ブロック地方衛生研究所のアルボウイルス担当者研修会を開催し、リアルタイム PCR と各種血清診断法について参加型実習を実施した。

C. 研究結果

1. CHIKV 特異的 IgM 抗体の持続性の検討

第 58 病日の血清におけるウイルス学的検査について表 1 に示した。CHIKV とフラビウイルスの遺伝子検査は陰性であった。また DENV に対する IgM、IgG 抗体は陰性判定となり、デング熱の感染は否定された。CHIKV に対する特異的 IgM、IgG 抗体、中和抗体が陽性となったことから、この症例はチクングニヤ熱感染症と確定された。

また、経時的に採取した血清の抗体価について表 2 に示した。血清中の CHIKV に対する特異的 IgM 抗体は間接蛍光抗体法で第 58 病日まで、ELISA 法で 108 病日まで陽性となり、約 3~4 ヶ月間検出可能であることが判明した。

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

1) ワクチン被接種者と日本脳炎患者の比較

JEV に対する中和抗体価が認められたマウス脳由来ワクチン被接種者 (91 名) と日本脳炎患者 (83 名) の JEV に対する幾何平均抗体価はワクチン

被接種者 236 倍、日本脳炎患者 260 倍であった。そのうち WNV に対して交差中和抗体を保有していたものは、ワクチン被接種者 22 名 (24.7%)、日本脳炎患者 41 例 (49.4%) であり、陽性率は日本脳炎患者の方が高かった (表 3、4)。

JEV と WNV に対する中和抗体価の相関性は両群ともに認められたが、日本脳炎患者のほうが相関性は高く、日本脳炎に対する中和抗体価が 2560 倍の場合は全て交差中和を示した (図 1)。また、2 群において、JEV に対する中和抗体価が同じ場合、日本脳炎患者のほうが WNV に対する抗体陽性率は高い傾向がみられた。交差中和を認めた JEV ワクチン接種者と日本脳炎患者の WNV に対する幾何平均抗体価はそれぞれ 1.1 倍、3.5 倍となり、日本脳炎患者の方が約 3 倍高い値であった。

2) 日本脳炎ワクチンの効果

新しい乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン追加接種者 80 名のうち、29 名はワクチン接種前より JEV に対する中和抗体を保有しており、そのうち 2 名は WNV 中和抗体も保有していた (表 5、6)。ワクチン接種により JEV 中和抗体価が上昇したのは 71 名 (88.8%) で、JEV に対する幾何平均抗体価は接種前 2.1 倍、接種後 49.3 倍と約 23 倍抗体価の上昇が認められた (図 2)。ワクチン接種前より抗体を保有していた 29 名は、接種により全員抗体価が上昇した。ワクチン接種によって抗体価が上昇しなかった 9 名のうち、3 名について追加接種を実施したところ、抗体価の上昇がみられた。ワクチン接種による副反応は、2 人から報告された (38°C の発熱、強い倦怠感: どちらも接種当日から約 2 日間、20 代女性)。

3) WNV に対する交差中和抗体の獲得

ワクチン接種により、WNV に対する中和抗体価が上昇したのは 28 名で、JEV 抗体陽性者の 39.4% (28/71) が WNV に対して抗体価 10 倍以上の交差中和を示し、WNV に対する幾何平均抗体価は接種前 0.6 倍、接種後 2.1 倍と約 3.9 倍上昇した。JEV に対する中和抗体価が 40 倍以上ある場合、51.9% (27/52) に交差中和が見られた。JEV

と WNV に対する中和抗体価の相関性はワクチン接種後に見られ、JEV に対する中和抗体価が高いほど WNV 交差中和抗体価が高い値となった(図 3)。日本脳炎ワクチン接種による WNV 交差中和抗体の獲得には、年齢による傾向は認められなかった(表 7)。

3. 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の確立

研修会に参加した 11 衛生研究所 16 名に対し、実験室診断法の実習を行い国立感染症研究所より分与されたポジティブコントロールを配布した。また地方衛生研究所、検疫所、保健所、大阪府医師会を対象としてアルボウイルスに関する講演会を開催した。

D. 考察

1. CHIKV 特異的 IgM 抗体の持続性の検討

本症例の血清学的検査において発症後 2 か月を経過してもウイルス特異的 IgM 抗体が検出されたことは特記すべき点であり、初感染と診断する診断的有用性は大きい。また、IgM 抗体が発症後約 3~4 ヶ月まで検出可能であることは、実験室診断において有益な情報となる。遺伝子検査が陰性となった理由は、検体が 58 病日の血清で、チクングニヤ熱のウイルス血症の時期は過ぎており、血中のウイルス量が検出限界以下であったためと考えられる。

なお、本症例の患者は、関節痛が発症後約半年間継続した。チクングニヤ熱の後遺症として関節痛が数ヶ月から数年継続する場合があることが知られているため、国内で感染が拡大した場合は、急性期の症状だけでなく、予後の健康被害も考慮しなくてはならない。また、チクングニヤ熱は母子感染や輸血による感染リスクがあることが報告されているので、それらの対応も必要となると考えられる。

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

WNV に対する感染を防御するために必要な中和抗体価を JEV と同様 10 倍以上と推論すると、日本脳炎ワクチン(マウス脳由来)被接種者全体では約 2 割(22/109)が WNV 中和抗体を有しており、WNV の感染を防御できる可能性があることが示唆された。日本脳炎患者とワクチン被接種者を比較すると、同じ JEV 中和抗体価を保有している場合、日本脳炎患者の方が WNV に対する中和抗体保有率および中和抗体価が高かった。この理由の一つとして、ワクチンの製造過程におけるウイルスの不活化時に、WNV を交差中和する抗体が認識する一部のエピトープに変性を受けたために、WNV に対する中和抗体が誘導されなかった可能性が考えられる。

また、日本脳炎ワクチンの追加接種後に JEV 中和抗体価が上昇した対象者の 4 割が WNV に対して交差中和を示し、JEV に対する中和抗体価が 40 倍以上の場合約半数に WNV に対する交差中和抗体が見られたことから、日本脳炎ワクチン免疫によっても、JEV に対する中和抗体価を高く維持すれば、WNV を感染防御できる可能性が示唆された。

日本脳炎ワクチン接種により、有意な JEV 中和抗体価の上昇が見られたことから、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。ただし、一度の接種では抗体価が上昇しない場合が 1 割ほどあることが想定された。

3. 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の確立

近畿ブロックにおいてデング熱、チクングニヤ熱、ウエストナイル熱に関する実験室診断法についての知見を深めることができた。今後このネットワークを持続することが必要だと考えられる。

E. 結論

1. CHIKV 特異的 IgM 抗体の持続性の検討

今回の症例は、チクングニヤ熱の輸入症例と確定診断された。本研究で、血中のウイルス特異

的 IgM 抗体が発症後3～4ヶ月まで検出されたことから、今後急性期を過ぎた検体でも、ウイルス特異的IgM抗体の検出によって最近の感染であることを示すことができると考えられる。

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

本研究結果から、日本脳炎ワクチン免疫により、WNV に対する交差中和抗体が誘導されることが示された。また、ワクチン追加接種後の JEV に対する中和抗体価が 40 倍以上の場合、約半数に WNV に対する交差中和が見られたこと、JEV と WNV に対する中和抗体価には相関性がみられたことから、日本脳炎ワクチン免疫により、JEV に対する中和抗体価を高く維持すれば、WNV を感染防御できる可能性があることが示唆された。

3. 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の確立

デング熱、チクングニヤ熱、ウエストナイル熱などの輸入感染症は、症例数の少ない地方衛生研究所では検査を実施していない場合があるが、今後検査需要が増す可能性がある。今回実施した研修などにより、担当者間の検査法に関する情報交流を促し、今後ともネットワークを維持することが必要である。

F. 健康危機情報

感染症媒介ベクターの研究などで、我が国には広くヒトスジシマカが分布していることが知られている。ヒトスジシマカはデング熱やチクングニヤウイルスを媒介することが知られており、今後これらの疾患の侵入と流行が懸念される。

G. 研究発表

1. 論文発表

Aoyama, I., Uno K., Yumisashi T., Takasaki T., Lim CK., 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., 63,65-66 (2010)

2. 学会発表

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

2) 青山幾子、弓指孝博、高崎智彦、加瀬哲男、高橋和郎. チクングニヤ熱において IgM 抗体が持続した 1 症例, 第 51 回日本臨床ウイルス学会 2010 年 6 月(香川)

3) 青山幾子、弓指孝博、高崎智彦、林昌宏、加瀬哲男、高橋和郎. 日本脳炎ワクチン接種によって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の検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会 2010 年 10 月(徳島)

3. その他

青山幾子、弓指孝博、加瀬哲男、高橋和郎、宇野健司、高崎智彦ら: 病原微生物検出情報 (IASR), vol.29 p.345-346, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表 1 第 58 病日血清におけるウイルス学的検査.

検査法	検出ウイルス	検査結果
RT-PCR	フラビウイルス	陰性
	チクングニヤウイルス	陰性
ELISA	デングウイルス	IgM, IgG 陰性
	チクングニヤウイルス	IgM 陽性
IFA test	日本脳炎ウイルス	IgM, IgG 陰性
	デングウイルス	IgM, IgG 陰性
	チクングニヤウイルス	IgM 陽性(1:20) IgG 陽性(1:160)
PRNT	チクングニヤウイルス	陽性(1:160)

RT-PCR, reverse-transcription polymerase chain reaction; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFA test, indirect fluorescent antibody test; PRNT, 50% plaque-reduction neutralization test;

表 2 チクングニヤ熱発症後の抗体価の推移

病日	ELISA	IFA		PRNT
	IgM	IgM	IgG	
58	陽性	1 :20	1 :160	1 :160
108	陽性	陰性	1 :160	1 :320
137	陰性	陰性	1 :160	1 :320
164	—	—	1 :160	1 :320
192	—	—	1 :160	1 :320

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IFA, indirect fluorescent antibody test; PRNT, neutralizing antibody tested by 50% plaque-reduction neutralization test; —, not tested.

表3 日本脳炎ワクチン被接種者の JEV と WNV に対する中和抗体価

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

JEV-NT : JEV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

WNV-NT : WNV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

*値は血清の希釈倍率

表4 日本脳炎患者の JEV と WNV に対する中和抗体価

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

JEV-NT : JEV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

WNV-NT : WNV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

*値は血清の希釈倍率

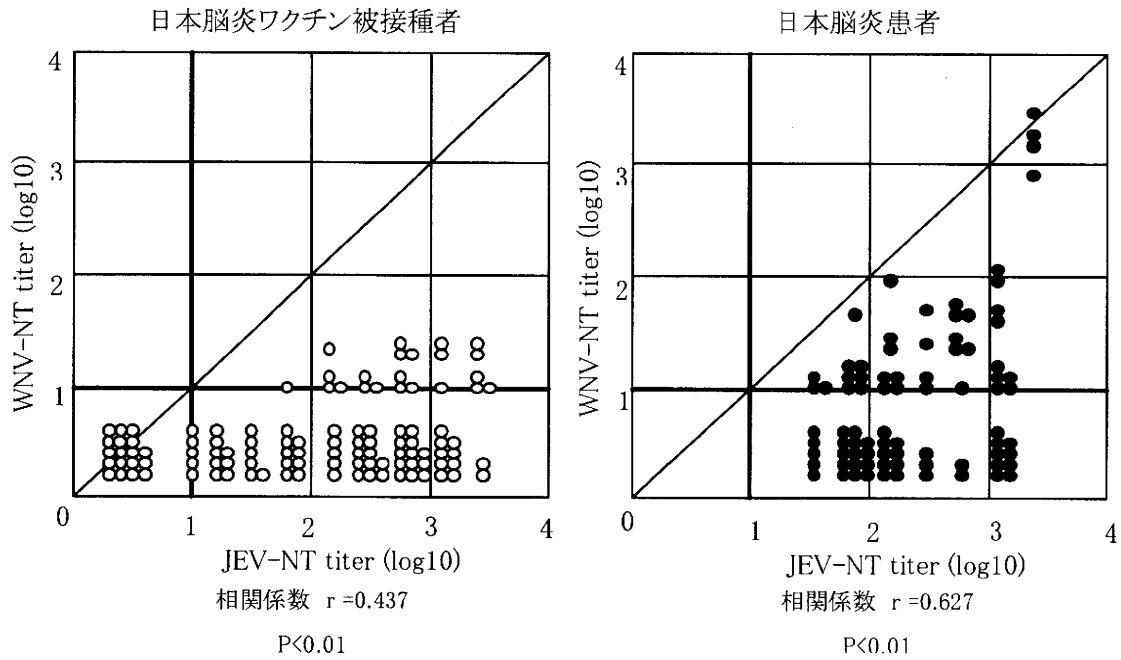


図1 日脳ワクチン被接種者と日本脳炎患者のJEVとWNVに対する中和抗体価の比較

表5 ワクチン接種前後のJEVに対する年齢別中和抗体価

Age	all	pre JEV-NT						positive	post JEV-NT											positive	
		<10	10	20	40	80	160	320	%	<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	%
20-29	14	2	3	4			4	1	85.7				1	3	3	3		1	1	2	100
30-39	18	13		4	1				27.8	1		2	1	5	5	3		1			94.4
40-49	19	12	2	2	1	2			58.3	3	3	3	1	4	2	1	1	1			84.2
50-59	22	20	2						9.1	4	3	6	4	2	2		1				81.8
60-69	7	4	2	1					42.9	1		2	2		2						85.7
all	80 (人)	51	9	11	2	2	4	1	36.3	9	6	13	9	14	14	7	2	3	1	2	88.8

pre: ワクチン接種前血清 post: ワクチン接種御血清

JEV-NT: JEV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

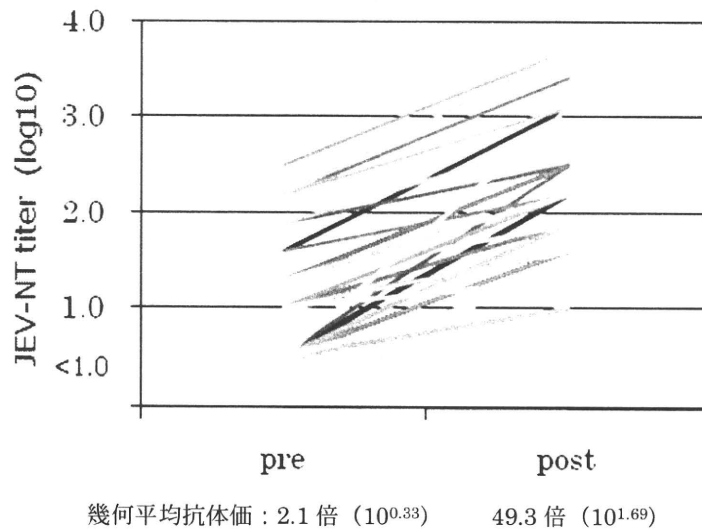


図2 ワクチン接種前後の JEV に対する中和抗体価の推移

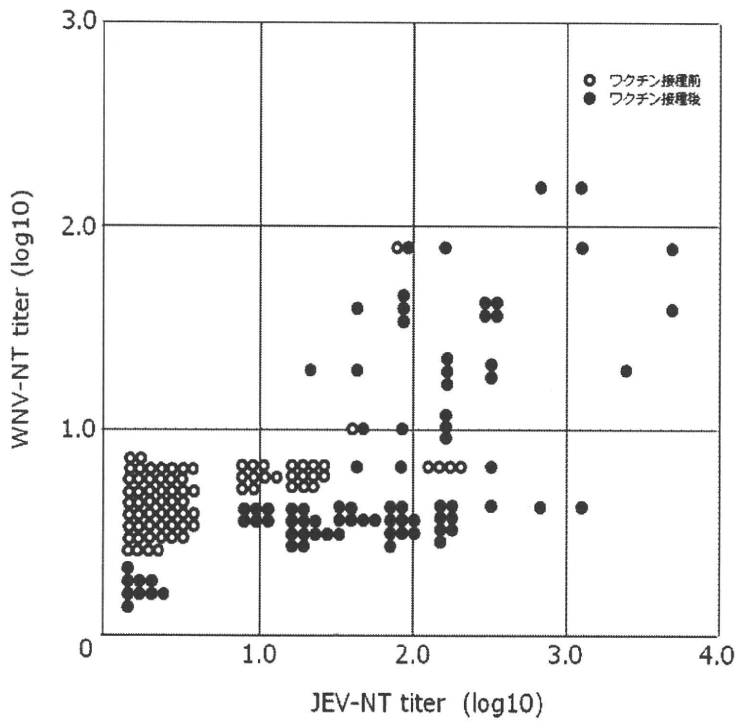


図3 ワクチン接種前後の JEV と WNV に対する中和抗体価の比較

表6 ワクチン接種前後の JEV と WNV に対する中和抗体価の比較

a) ワクチン接種前

JEV-NT		WNV-NT			positive
	all	<10	10	80	%
<10	51	51			0.0
10	9	9			0.0
20	11	11			0.0
40	2	1	1		50.0
80	2	1		1	50.0
160	4	4			0.0
320	1	1			0.0
all	80(人)	78	1	1	2.5

b) ワクチン接種後

JEV-NT		WNV-NT						positive
	all	<10	10	20	40	80	160	%
<10	9	9						0.0
10	6	6						0.0
20	13	12		1				7.7
40	9	6	1	1	1			33.3
80	14	9	1		3	1		35.7
160	14	7	3	3		1		50.0
320	7	1		2	4			85.7
640	2	1					1	50.0
1280	3	1				1	1	66.7
2560	1			1				100.0
5120	2				1	1		100.0
all	80(人)	52	5	8	9	4	2	35.0

表7 ワクチン接種前後における幾何平均抗体価の年代別比較

年齢	人数	JEV-NT			WNV-NT		
		幾何平均抗体価		抗体価上昇率	幾何平均抗体価		抗体価上昇率
		pre	post	post/pre	pre	post	post/pre
20代	14	22.5	336.2*	15.0	0.5	5.3*	10.5
30代	18	1.4	88.7*	61.3	0.5	3.8*	7.7
40代	19	2.3	30.4*	12.9	0.7	2.7*	3.6
50代	22	0.7	16.9*	25.8	0.5	0.6	1.3
60代	7	1.5	24.3*	15.9	0.5	1.7	3.4
ALL	80(人)	2.1	49.3*	23.1(倍)	0.6	2.1*	3.8(倍)

*P<0.05 Wilcoxon signed-rank test