

コミュニケーション・プランの欠如または不備が挙げられていた。

医療機関内部のコミュニケーションにおいても、公衆衛生部局が一般市民との間で行うコミュニケーションと同様の原則があてはまる。担当者は、メッセージを伝えるべき相手に確実に伝えられる複数のチャンネルを通じて同一のメッセージを発信する必要がある。また、メッセージの発信者は特定の職員または部署に統一しておく方が、内容の一貫性が保たれ、混乱が生じにくい。

複数の部署で同一の情報を共有しておくことも重要であり、また緊急時に備えて施設内でコミュニケーションの計画を作成しておくことが望ましい。施設内の広報を行う上で必要となる承認のプロセスも、通常の方法だと時間を要する可能性があるため、迅速に承認し、必要な者に速やかにメッセージが伝わるようなプロセスを準備しておくことも重要である。

2) 国内外専門機関の視察・情報収集

①厚生労働省結核感染症課

VHFの公衆衛生対応の第1段階となる、感染症法上の医師からの届出の現状と、届出があった場合の厚生労働省をはじめとする公衆衛生行政の対応方針などについて、感染症行政を所管する厚生労働省結核感染症課の担当官にヒアリングを行った(2012年8月9日)。主な内容は以下の通り。

- 一類感染症であるVHFについては疑似症でも届出の必要があるが、この場合の疑似症については、専門家にコンサルトした上でなおVHFの可能性が高いと判断された症例をイメージしている。現状では、明文化された疑似症の判断基準や患者のリスク評価のアルゴリズムは存在しない。
- VHFの検査が必要となるケースでは、国立感染症研究所や結核感染症課などの関連機関の間で連絡を取り実施するため、検査が行われる場合は、法的な届出の有無に関わらず、結核感染症課においても既に情報が共有されている。
- 届出がなされた場合(あるいは検査結果でVHF陽性となった場合)は、「感染症健康危機管理実施要領(厚生労働省健康局)」の「感染症発生時のレベル別対応表」に準じ

て健康危機管理事例としての対応がとられる。

②米国CDC

他の分担研究者とともに、CDCの関連部署を視察し、情報交換を行った(2013年1月14日-18日)。リスクコミュニケーションに関連する情報交換は以下の通りである。その他の視察内容については分担研究者(中島)の報告書を参照。

- CDCでは、感染症のアウトブレイク等の健康危機事例が発生した場合、必要に応じて担当部署の責任者とともにEmergency Operation Center (EOC)を立ち上げて、発生現場への指示および情報提供を行う。健康危機事例に関する警告や勧告は、主として保健福祉省が発令し、CDCは専門機関としてこれらの内容に関して助言する。
- 健康危機全般に対応する部署であるOPHPRでは、3-4人でmedia evaluation teamを組織し、ソーシャルメディア、ブログ、メディア情報等を継続的にチェックし、市民やメディア、関係組織等の関心の状況を把握している。また、風評・流言等に対してもFacebookなどのソーシャルメディアを通じて早いタイミングで情報提供を行うように努めている。
- リスクコミュニケーションの担当者は、ジャーナリストなど関係者との日頃から交流し、新たにマニュアルを作成した場合や訓練を実施した場合などは積極的に対外的に情報発信する姿勢が大切である。また、リスクメッセージを発信する場合は、talking points(メッセージの論点を箇条書きのような形でまとめたもの)を速やかに作成することが重要であり、1日に1回など適切なタイミングで内容を更新するとともに、関連機関や担当者間で現状認識を共有しておくことが必須である。
- 危険病原体や患者を扱う医療機関や研究所等が近隣住民へのリスクコミュニケーションを行う場合、戸別訪問による説明など、草の根的な活動が有効であることもある(モンタナ州のBSL-4研究所の新設に際し、この方法が用いられた)。

③英国 HPA(当時)および RFH

英国で感染症危機管理に対応する組織であり、VHF の reference laboratory になっている HPA(当時)-Porton と、国内唯一の高度安全感染症病棟 (HSIDU) を有する RFH を視察した (2013 年 2 月 5-7 日)。詳細な報告については「英国健康保護局・ロイヤルフリー病院視察報告書」を参照。なお、HPA は、2013 年 4 月に他の 70 の公衆衛生の専門組織とともに、Public Health England (PHE) に統合された。

- リスク評価を重視している。ACDP ガイダンスのリスク評価アルゴリズムは、患者および接触者、医療従事者のリスクを適切に判断する上で非常に有用である。また、HPA の Rare and Imported Pathogens Laboratory (RIPL) が、NHS とリバプール大学熱帯医学校の支援の下で 2012 年 6 月より運営を開始した Imported Fever Service (IFS) は、一般の医療従事者向けの感染症の専門家による電話相談サービスであり、より効率的なリスク評価が可能となる。
- RFH の HSIDU では、内部および外部に対する運営指針が作成されていた。この中には、実際に患者の受け入れ依頼があった場合の対応を示した職種ごとのアクションカードが含まれており、連絡事項や連絡先、また緊急時の対応等について、詳細に文書化されていた。また、関連するスタッフ全員が消防など外部の組織と合同で年 2 回のペースでトレーニングをしており 2012 年 10 月の CCHF 患者についても、問題なく受け入れ・診療が行われたとのことであった。指針などの文書については 2 年ごとに更新することが定められていた。
- メディア対応については、病院内のコミュニケーション担当チームが所管しており、すべてのメディア対応はこのチームを通じて実施される。CCHF 患者の搬送の際は、ちょうど外来の診療開始時間と重なったため、一部の出入口が VHF 患者の搬送のため封鎖されている旨を Twitter により一般向けにアナウンスした。チームの責任者によると、Proactive な広報活動（あえて情報を流して危機感をあおるようなことはせず、何か反応や問い合わせがあることを

想定し、事実を整理しておくこと）が重要とのことであった。

D. 考察

文献レビューおよび国内外の専門家へのインタビューにより、VHF に関するリスクコミュニケーションのポイントが明らかになった。

特に重視すべき点として、事前の準備の重要性が挙げられる。公衆衛生部局や感染症指定医療機関においては、緊急時のコミュニケーションの手順を事前に備えておくことが望ましい。感染症危機管理においては、病原体の種別に関わらず共通する内容も多いため、基本的な対応を整理しておくといえよう。

VHF のリスク評価アルゴリズムを作成し、リスクに応じた患者対応を行うことも重要である。これにより、患者の早期診断、治療が可能となるとともに、医療従事者の適切な安全対策や、必要以上の不安の解消にもつながる。コミュニケーションに関するマニュアル作成を行う一方で、国レベルで感染症法上の届出基準も意識したリスク評価アルゴリズムを作成することが必要と考える。VHF が疑われる患者を最初に診療する医師が必ずしも感染症の専門家とは限らないため、英国の IFS に相当するような専門家による相談サービスの構築も望まれる。

医療機関の対応としては、感染のリスクについて正しい知識を共有するとともに、緊急時の連絡体制を含め感染症病棟の運営体制を再確認することが必要となる。この場合、医療機関内の執行部、事務、広報、看護、検査、薬剤、栄養、施設、関連する診療科など、すべての関係者を交えて、方針を確認することが重要である。また、平時から当該地域の保健部局や警察、消防、医師会、外部の関連組織とも連携を確認しておくことが望ましい。

「マニュアル」の存在に加えて重要となるのが、医療機関や公衆衛生担当部局が一般市民に対して信頼を構築することである。情報の発信者の信頼性は、コミュニケーション成功のための必要条件として多くの文献で挙げられており、CDC や RFH の担当者も、その重要性を指摘していた。信頼は一種のブランドイメージであり、構築には時間を要する。公衆衛生部局においては、平時からタイムリーで誠実な情報発信を心

がけ、医療機関や専門機関では、専門とするあらゆる診療科・分野での質の高い医療や専門知識を提供し、患者や一般市民に積極的に有用な情報を発信して行く努力も必要であろう。

E. 結論

VHFをはじめとする一類感染症の発生に備えて、医療機関や公衆衛生部局ではリスクコミュニケーションの計画を事前に策定しておくことが望ましい。計画は、感染症担当者のみならず、執行部や広報担当者など、内外の関係者の参加の下に策定することが重要である。コミュニケーションの手順を定めると同時に、リスク評価体制の整備、組織の信頼性向上のための努力も必要である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

英国健康保護局・ロイヤルフリー病院視察報告書

研究分担者 富尾 淳 東京大学医学部附属病院災害医療マネジメント部 講師

研究要旨 英国は歴史・文化的背景からウイルス性出血熱(viral haemorrhagic fever; VHF)の流行地であるアフリカ諸国などとの人的交流が多いことから、先進国の中でも VHF 患者の輸入例が多い。また、同国危険病原体諮問委員会(Advisory Committee on Dangerous Pathogens; ACDP)は、2012年7月に16年ぶりにVHF対応のガイダンスを改訂し、さらに同年10月にはアフガニスタンから帰国したクリミア・コンゴ出血熱患者への対応を行った。本視察では、健康保護局(当時)の担当部署と、ロイヤルフリー病院の高度安全感染症病棟を訪問し、ACDPの委員および、実際に患者の検査、診療を担当した研究者や医療従事者との情報交換を通じて、我が国のVHF対応の手引きを作成する上で有用な知見を得たので報告する。

A. 目的

英国は歴史・文化的背景からウイルス性出血熱(viral haemorrhagic fever; VHF)の流行地であるアフリカ諸国などとの人的交流が多いことから、先進国の中でもVHF患者の輸入例が多い。また、同国危険病原体諮問委員会(Advisory Committee on Dangerous Pathogens; ACDP)は、2012年7月に16年ぶりにVHF対応のガイダンスを改訂し、同年10月にはアフガニスタンから帰国したクリミア・コンゴ出血熱患者への対応を行った。本視察の主な目的は、1)英国のVHF対応における管轄部署である健康保護局¹(Health Protection Agency; HPA)の微生物サービス部を訪問し、VHFスクリーニング検査の体制について情報収集を行うこと、2)英国内で唯一の高度安全感染症病棟(HSIDU)を有し、上述のクリミア・コンゴ出血熱患者の診療を实际に行ったロイヤルフリー病院(Royal Free Hospital; RFH)を訪問し、我が国の「手引き」作成を行う上で有用な知見を得ることである。

¹ 健康保護局(HPA)は、2013年4月に他の70の公衆衛生の専門組織とともに、Public Health England (PHE)に統合された。PHEは英国保健省の執行機関の1つであり、政府、地方行政、企業、国民保健サービス(NHS)と協働し、国民の健康保護・増進およびより健康的な生活を可能にするための支援を主な目的とする。本報告書におけるHPA関連の部署名、役職名等はすべて視察日当時のものである。

また、本研究班で実施するACDPの改訂ガイダンスの日本語訳の作成にあたり、訳語や医療体制などの詳細の確認をあわせて行った。

B. 研究方法

【視察先機関】

1. 健康保護局微生物サービス部 (Porton Down, Salisbury)
2. 健康保護局 (Colindale, London)
3. ロイヤルフリー病院 (Hampstead, London)

【期間】 2013年2月5日(火) - 2月7日(木)

【視察日程】

- | | |
|------|--|
| 2月5日 | 健康保護局微生物サービス部視察・情報交換 |
| 2月6日 | ロイヤルフリー病院感染症科高度安全感染症病棟視察・情報交換
健康保護局(ACDP担当)情報交換 |
| 2月7日 | ロイヤルフリー病院コミュニケーションチーム視察・情報交換 |

C. 研究結果

1. 健康保護局微生物サービス部視察・情報交換

担当者:

Dr. Tim Brooks

Centre for Emergency Preparedness and Response
Rare and Imported Pathogens Laboratory

Dr. Roger Hewson

Scientific Leader-Highly Pathogenic Viruses &
Emerging Disease

Virology & Pathogenesis Group Leader

WHO Collaborative Centre for Virus Reference and
Research (Arboviruses & VHF)

HPA Portonにある英国のVHFのreference laboratoryである微生物サービス部を訪れ、VHS患者および疑い患者発生時の検査対応についての情報収集、施設の視察、また、当部署において2012年6月から開始されたImported Fever Serviceについての情報収集を行った。あわせて、ACDPのメンバーでもあるDr. Tim Brooksにインタビューし改訂ガイダンスの詳細、課題について意見交換を行った。主な内容は以下の通り。

VHFスクリーニングについて

- Containment level 4 (biosafety level 4に相当)のreference laboratoryにおいて、VHFの迅速スクリーニングを実施している。
- VHFスクリーニングは24時間のオンコール体制で実施しており、PCRの結果は検体を受理してから3時間で明らかになる(2012年10月のクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)の症例の場合、午前3時に検体を受理し、検査を行った)。
- 現在は週3件程度の頻度でVHFスクリーニングを実施している(ほとんどは陰性である)。

VHF対応について

- VHFの流行国(ウガンダなど)での現地支援を実施している。ウガンダでは米国CDCのViral Special Pathogen Branch(当時)と協働で支援している。

Imported Fever Service (IFS)について

- 2012年6月にHPAのRare and Imported Pathogens Laboratory (RIPL)により開始された、医療従事者向けのVHFをはじめとする輸入感染

症の電話相談サービスである。リバプール熱帯医学大学院、リバプールおよびロンドンのNHSの熱帯医学専門医療機関のサポートにより運営されている。

- 24時間体制の専門家による感染症の患者管理、感染対策、公衆衛生対応などの電話相談サービスであり、料金は無料である。
- VHFについては24時間体制でオンコールで迅速検査を実施し、それ以外の感染症についても、翌営業日に検査診断を行う。
- 月に約60件の連絡があり、うち10件ぐらいがVHF関連である。
- 感染症の専門家ではなく、非専門家の医師からの相談が多い。
- 2012年10月のCCHF症例については、IFSは利用されなかった(迅速検査は実施した)。
- http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317135713895 に詳細が記載されている。

ACDPガイダンスについて

- 全体としては実態に即して良くできているガイダンスであるが、一部修正が必要な部分もある。
- Appendix 6の検査法における、検体の不活化処理は、望ましくないのではないかと。
- 従来原則とされている、高度安全感染症病棟(HSIDU)での診療については、ガイダンスに記載されているように必ずしも必須ではないだろう。仮に患者を診療している医療機関が、「安全に診療可能」と判断し行う場合は、HSIDUに搬送しなくても構わないだろう。

2. 健康保護局(危険病原体諮問委員会関係者)訪問
担当者

Dr. Julia Granerod

National Scientific Coordinator, Centre for
Infections/Immunisation Department

Dr. Mandy Walsh

Senior Scientist, Emerging Infections and Zoonoses

ACDP に関連する HPA の上記2名の担当者を訪問し、研究班で作成する ACDP ガイドランスの日本語訳に関連して、著作権の詳細や事務手続き、ガイドランス中の用語や内容の確認を行った。

3. ロイヤルフリー病院視察・情報交換

担当者:

- 高度安全感染症病棟 High Security Infectious Disease Unit (HSIDU), Infectious Diseases Department

Dr. Michael Jacobs (Clinical Lead for HSIDU)

Dr. Barbara Bannister (前 Clinical Lead for HSIDU)

Dr. Rob Shroten (Lead Clinical Scientist for HSIDU)

Ms. Breda Athan (Senior Matron for Specialist Services)

- コミュニケーション担当チーム Communication Team, Executive Offices

Ms. Philippa Hutchinson (Head of Communications)

世界有数の VHF 患者受け入れ病院である、ロイヤルフリー病院 (RFH) の高度安全感染症病棟 (HSIDU) を訪れ、特に、ACDP ガイドランス改訂後の診療のあり方、2012 年 10 月の CCHF 患者の搬送と診療、ACDP ガイドランスの改訂内容の課題などを中心に、専門家にインタビューを行った。主な内容は以下の通り。

HSIDU の概要・役割

HSIDU は VHF をはじめとする、ハザードグループ 4 に分類される感染性病原体 (詳細は ACDP ガイドランスを参照) による感染症の患者を安全に管理する目的で設置された施設である。

RFH の HSIDU は 2003 年から稼働しており、それ以前は近郊の Coppetts Wood Hospital が HSIDU として機能していた。RFH では、病院の 11 階北ウイング (RFH の入院病棟は各階が十字形の対照的な形状となっており、東西南北の各ウイングにそれぞれ病棟が配置されている) のほぼすべてが HSIDU となっており、2つの隔離個室、観察エリア、検査室、薬局、配膳室、オートクレーブ、スタッフルーム等を備えた自己完結型の入院施設とな

っている。なお、英国内の HSIDU は RFH の他に、イングランド北部の Newcastle upon Tyne に設置されているが、後者は視察日現在稼働していないため、RFH の HSIDU が実質的に英国内で唯一の HSIDU であり、国内各地から患者を受け入れる体制ができています。

なお、英国では 1970 年代半ば以降、VHF としては 15 例 (ラッサ熱 12 例、ラッサ熱疑い 1 例、エボラ出血熱 1 例、クリミア・コンゴ出血熱 1 例) が確認されており、このうち 5 例が死亡している。15 例中、13 例は RFH の HSIDU で治療を行っている。

HSIDU のすべての手順やプロトコルは安全衛生庁 Health and Safety Executive (HSE) に承認されたものであり、様々な法規、感染症対策のガイドライン等に準拠している。また運用については、外部指針、内部指針がそれぞれ定められており、2年おきに見直されている。

HSIDU の構造

概要: HSIDU 内は感染性物質への曝露リスクに応じて、Clean、Sub-Clean、Dirty の3つのゾーンからなり、それぞれ床の色が黄、緑、青に塗り分けられるとともに、一部ドアをロック構造 (入口のドアを閉めないで出口が開かない、Dirty ゾーンから Clean ゾーン方向には自動施錠される、など) とするなど安全に配慮したレイアウトとなっている。ドアは、すべてドアノブのある手動ドアであった。診療スタッフは専用の更衣室 (Clean ゾーン) で、業務内容に応じた所定の PPE を装着し、配置につく。なお、更衣室については、Dirty ゾーンから Clean ゾーンへの動線をよりシンプルにするために、改築予定である。

隔離個室: ほぼ同じ仕様・面積の隔離個室が、共通の観察室を挟んで 2 室設置されている。病室はそれぞれ陰圧となっており、中央に Trexler 呼ばれる大型のアイソレーターが設置されている。アイソレーターは無色透明の厚手のビニールテントと金属性の骨組み、換気構造からなり、中にベッドが 1 台収納されている。ベッドの両脇にはハーフスーツと呼ばれるビニール製のガウンとアイソレーターの内側方向へのアームホールが付属し

ており、すべての処置はアイソレーターの外部から行われることになる。アイソレーター内は隔離個室内圧に対してさらに陰圧に設定され、HEPA フィルターを用いて換気される。

HSIDUで使用されるアイソレーターは英国のメーカーによる特注であり、価格は1セット約 25,000 ポンド(日本円で約 400 万円)であり、一度患者に使用したものは、ベッド、骨組みを除き、すべて焼却処分される。2012年10月に入院したクリミアコンゴ出血熱患者が入院した室内には、レイアウトを改良した新しいアイソレーターが設置されていた。未使用の場合のアイソレーターの耐用年数は10年以上とのことであった。病室内と観察室はインターコムにより音声でのやり取りが可能であり、診療録等の紙の記録用紙は Fax で観察室に送信される。

一時保管室:病室の隣(Dirty ゾーン内)には、一時保管室があり、患者退室後の大型の廃棄物などが一時的に保管される。病室の同程度の十分な面積があり、視察時を含め平時は全くの空室となっているが、この保管室は退室後の作業を効率的に行う上で不可欠とのことであった。

オートクレーブ室: Dirty ゾーン内の1室には大型のオートクレーブが 3 機設置され、アイソレーターの骨組みやベッドなど一部を除き、使用した物品はすべてオートクレーブ処理される。患者入室時には使用頻度が高くなるため、オートクレーブの故障が発生しやすく、3 機設置しているとのことであった。実際 2012 年の患者受け入れ時も故障が発生したため、結局 3 機すべてを使用したとのことであった。

高度安全検査室: Dirty ゾーンから扉を隔てた Sub-Clean ゾーン内に HSIDU 専用の高度安全検査室 High Security Pathology Unit (HSPU) がある。血液、尿の一般検査の他、血液ガス測定、細菌培養などが可能である。HSPU は Containment Level (CL) 3 の施設として指定されている。VHF の診断に関する検査は行わない(診断は Porton Down の reference laboratory で行う)。

RFH 内の検査技師のうち、特別に訓練を受けた技師のみが入室可能であり、その者のみが電子錠を解錠できるように管理されている(入室可能者の氏名がドアに記載されている)。室内は他の部屋に対して陰圧に設定されており、中央にビニール製のアイソレーターが1台設置されている。アイソレーター内は検査室内圧に対してさらに陰圧に設置されている。検体の取り扱いは、アイソレーター内部で行われる。

指定の検査技師がアイソレーターの設備について、毎週1回点検を行っている。

HSPU の前室には1m 四方程度に床面が赤く塗られた Emergency エリアと除染用の緊急キットが用意されており、万が一検査技師が検体に曝露した場合には、緊急アラームを鳴らし、他のスタッフが駆けつけて除染を行うことになる。

HSIDU の運営・診療

HSIDU への患者受け入れの判断は、HSIDU の主任医師が行う。主任医師、看護師長など、役割に応じた一連の手順がアクションカードとして整備されている。外部から患者を受け入れる場合、あらかじめ定められた院内の経路を通じて、最終的には Sub-Clean ゾーンを経由して、HSIDU 内に移送され、アイソレーター内に隔離される。

HSIDU 内では、患者がアイソレーター内に収容されている場合は、個人用保護具(PPE)として、使い捨て下着、綿製の上下の作業服とソックス、ゴム長靴、ビニール手袋を基本とする。患者の搬入時他、患者がアイソレーター内に収容されていない場合は、防水のガウン、帽子、バイザー、FFP3 防護マスクが追加される。

看護体制は隔離病室2名、外回り2名の4名体制の3交代制が基本である。患者を担当したスタッフについては、上級看護師により記録され、毎日体温の報告が求められる。38℃以上の発熱がみられたばあいは、HSIDU の主任医師の診察を受ける必要がある。

看護師は平時より週1回 HSIDU にて業務の確認を行う。また、HSIDU での診療、検査に従事する医療従事

者は、年2回のトレーニングを実施することが定められている。

患者の死後の対応

患者は HSIDU 内の霊安室に運ばれて専門の業者が処理をする。処理に当たっては患者の宗教上の特性も考慮して行われる。

2012年10月のクリミア・コンゴ出血熱患者の対応について

概要： RFH では、2012年10月にクリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) 患者の治療を行った。本症例は、英国籍の男性であり、アフガニスタンの親戚のもとを訪れた後、10月2日、空路にてスコットランド・グラスゴーに帰国した。帰国直後にグラスゴーの医療機関を受診し、地方の感染症専門病院である Gartnavel General Hospital の Brownlee Unit に入院となった。健康保護局 (HPA, 当時) の reference laboratory にて緊急 VHF スクリーニングを実施し、CCHF 陽性と判明し、RFH の HSIDU に搬送となった。本症例は英国で確認された最初の CCHF 症例であるとともに、ACDP ガイダンス改訂後の最初(かつ視察日時点で唯一)の VHF 症例である。

搬送決定までの経緯： グラスゴーの病院の担当医師から RFH の医師に早い段階で個別に相談があったが、症状と滞在先(アフガニスタン)の情報から容易に CCHF を疑うことができた。その時点で、急ぎ HPA に検体を送り緊急スクリーニング検査を進めることと、リバピリンの投与を指示して待機していた。

スクリーニング検査の結果 CCHF 陽性であった。当初患者の症状は安定していたため、グラスゴーからロンドンという遠距離ではあったが、ACDP ガイダンスに準拠し、HSIDU に搬送することになった。

搬送： 遠距離であったため、英国空軍 (Royal Air Force, RAF) のサポートのもと、空路搬送とした(ロンドン郊外の Brize Norton 基地から出発し、RFH に比較的近い Norholt 基地に到着した)。搬送は、10月5日の深夜から早朝にかけて行われた。RAF の緊急医療チーム 9 人と RFH からは Dr. Jacobs、パイロット 2 名で搬送した。

患者搬送用の小型アイソレーターをロンドンから搬送した。

当初の予定では、持参した搬送用アイソレーターをグラスゴーの救急車に搬入し搬送元の病院に向かい、患者をその中に隔離した上で病院から移送する予定であったが、グラスゴーの救急車が小さく、搬送用アイソレーターを収容できなかったため、アイソレーターへの患者収容は断念し、救急隊員と同行医師が PPE を装着し、搬送した。グラスゴーの空港に到着後、滑走路で患者を搬送用アイソレーターに隔離して、離陸となった。搬送直前の患者の状態は、意識レベルの低下がみられ、軽度の出血傾向があったが、血行動態は安定していたため、最終的にロンドンまで搬送することとした。

気圧の変化を最小限とするため、低空飛行にてロンドンの空軍の基地まで搬送した。搬送中の患者の状態は安定しており、アイソレーター隔離前に濃厚赤血球 2 単位を輸血した他は特に処置は行わなかった。

基地にて大型の救急車(通称 Jambulance)にアイソレーターごと収容し、警察のエスコートのもと、RFH まで搬送した。RFH 到着は午前8時ごろでラッシュの最中であった。院内へは裏(大学側)の出入口から搬入し、搬入経路は立ち入り禁止とした。搬送完了までの約15分間は病院の玄関を一時的に封鎖した。規定の経路を通じて HSIDU 内に移送し、HSIDU 内のアイソレーター (Trexler) に患者を隔離した。

HSIDU での診療： リバピリンの継続と血小板の輸血(到着時の血小板数 $1.9 \text{ 万}/\text{mm}^3$)の他は、酸素投与、輸液のみで保存的に経過観察した。バイタルサインが徐々に悪化し、到着から約24時間後(10月6日)に死亡した。心肺蘇生は行わなかった。

死後の処置など： 遺体は HSIDU 内の霊安室にて、専門の葬儀業者により、患者の宗教に対応して適切に処理された。HSIDU 内の設備についてはオートクレーブ処理後必要に応じて廃棄された。

今回の対応と ACDP ガイダンスとの関連など： 基本的に ACDP ガイダンスに従って対応が行われた。改訂ガイ

ダンスでは、必ずしも HSIDU での診療が必須とはされておらず、HSIDU などアイソレーター設備のない施設での診療の可能性についての記載もある。本患者は血行動態が安定していたものの意識レベルの低下があり、結果的に RFH 到着後24時間で死亡したことから、ある程度重症であったことが予想される。搬送せずにグラスゴーの病院でそのまま診療を行うという選択肢もあったが、1つには、感染予防の立場から二次感染者を極力出さないようにすることが大切であり、グラスゴーの病院では VHF 患者の診療を実施する上での安全対策が必ずしも十分であるといえなかったこと、また、患者の状態も搬送ができないほど不安定ではなかったことから、HSIDU への搬送を決定した。

また、ACDP ガイダンスのリスク評価アルゴリズムでは、CCHF については、流行地域においてダニ咬傷またはダニを素手でつぶしたことがある場合に「可能性が高い」と分類される。ところが、本患者には明らかなダニ咬傷の既往がなく、アルゴリズム上は「可能性がある」レベルにとどまることになることになった。以下は推測だが、本患者の携帯電話に保存されていた写真に結婚式の儀式で牛をと殺したところを間近で撮影したものがあり、本患者は牛の血液に直接曝露した可能性がある。「動物の血液への曝露」についてもリスク評価の項目に加えるべきであるという視点から、現在ガイダンスの改訂が行われている。

なお、本症例に関連したスタッフへの対応は既存の方針で行われ、改訂ガイダンスのリスク評価アルゴリズムに従った医療スタッフのリスク分類とそれに応じた対応は特に実施されなかった。

HSPU における検体の扱いでは、ガイダンスの Appendix 6 に記載されている検体の不活化処理は特に行わず、従来通りの方法で実施した。検体の不活化については、測定結果に影響が出る可能性もあり、必ずしも推奨できないという意見が聴取された。

コミュニケーション担当者のインタビュー

VHF 患者をはじめとする HSIDU を使用する症例に関

する広報、メディア対応は、すべて RFH のコミュニケーション担当チームを通じて行われる。本視察では、2012 年 10 月の CCHF 患者の対応を中心に、リスクコミュニケーションの実際について担当者にインタビューした。主な内容は以下の通り。

- コミュニケーション担当チームは、Ms. Hutchinson を含め 5 名であり、メディアリレーションなどのバックグラウンドの担当者が中心となっている。
- CCHF 患者については、病院搬送時と死亡時の 2 回、プレスリリースを行った。プレスリリースに際しては、HPA との情報共有を行い、NHS の組織内でも周知された。
- プレスリリースの内容には患者の詳細な情報は含めないことになっている。一部新聞、ニュースの報道で利用した航空機の便名などが明らかになっているが、これはマスメディアが家族等に確認して公表している情報だと考えられる。
- 今回、特にメディアや住民からの反応は多くなかった。
- 病院搬送時、当初は診療開始前の早朝到着の予定であったが、実際は平日の 8 時頃と通常の外来診療が開始する時間に重なった。一部入口の封鎖を行ったため、当日は事前に twitter で、患者搬送に伴う入口封鎖について情報提供を行った。
- Proactive な広報活動(あえて情報を流して危機感をあおるようなことはせず、何か反応や問い合わせがあることを想定し、事実を整理しておく)が重要である。
- 通常から交流のあるメディア関係者は、必ずしも大手ではなく、地域の新聞などが多い。

D. 考察

今回の視察は、ACDP ガイダンスの改訂を含めた英国における VHF 対応の現状を把握し、また、その下で実際に診療や対応にあたった医療従事者から詳細な情報収集を行う貴重な機会であった。今回の ACDP ガイ

ダグスの改訂の主なポイントは、新たなリスク評価アルゴリズムによる患者・疑い患者および接触者の分類と、HSIDU 以外の施設における患者対応の可能性に言及している点にある。患者のリスク評価は、特に輸入症例が主体となる我が国をはじめとする非流行地域の初期対応としては非常に重要であるが、VHF のように、発生が稀であるが致命率が高い疾患の場合は、分類する上で感度や特異度を適切に設定することが難しい。この点、ACDP ガイダグスのアルゴリズムは、過去の知見の蓄積を下に、聴取すべき情報、除外すべき診断(主にマラリア)などが明確に記載されており、我が国をはじめ多くの国でも有用であると考えられた。我が国では、一類感染症に分類される VHF については疑似症も届出の対象となり、患者同様の公衆衛生対応がとられることになる。しかし、疑似症の定義や届出のタイミング、さらには VHF スクリーニング検査の実施のタイミング等、臨床現場において判断に困る場合が少なくない。リスク評価アルゴリズムは上記の判断を自信を持って行い、安全な医療を提供する上で非常に有用である。我が国でも、本研究班により、ラッサ熱のリスク評価アルゴリズムが作成されているが、ACDP ガイダグスのアルゴリズムとの比較分析を行った上で、今後他の疾患も含めて必要に応じて追加、改訂を行っていく予定である。

ガイダグスの改訂に加え、ウイルス学的診断体制の整備、および IFS の導入による国レベルでの専門家による支援体制も、注目すべきである。Reference laboratory における24時間対応の検査体制と、数時間以内に検査結果が判明する技術的な進歩により、患者が「疑い例」として分類される期間は短縮され、より速やかな対応が可能になる。2012 年 10 月の CCHF 患者でも、初診から診断確定まで 72 時間以内に行われている。今後 IFS が普及し、全国の初療医から感染症の専門家へのアクセスが容易になれば、リスク評価にかかる時間も短縮され、より診断・治療がスムーズに進むことが期待される。英国のように流行国との人的交流が盛んな国に比べれば、我が国では VHF の輸入症例が発生するリスク

は低い、海外での企業活動の活発化など今後リスクは上昇する傾向にあると考えられるため、IFS のようなサービスは我が国においても有用であろうと考えられる。

HSIDU 以外の施設での患者や疑い患者の診療については、症例数が限定されていることもあり、具体的に増加しているかどうかは定かではないが、スタッフ等の安全が確保できれば、HSIDU 以外の施設でも対応可能であるという専門家の意見であった。ただし、実際の臨床経験やスタッフの経験、マンパワー、設備等を考慮すると、RFH の HSIDU は非常に充実しており、過去においても、満床のため患者を受け入れられない事態が発生したことがないことから、今後も基本的には RFH で診療が行われるだろうと考えられる。我が国においては、全国に 41 の第一種感染症指定医療機関があるが、患者発生の場合の診療体制、搬送基準などについて、発生リスクや各医療機関の実態を考慮した上で現実に即した対応を考えて行く必要があるだろう。

医療機関の対策としては、平時からの他の関連部局と連携した上でのスタッフのトレーニング、運用規定やアクションカードの整備とこれらの定期的な見直しが行われている点が重要であると考えられた。担当科のスタッフだけでなく、検査技師、設備関連の担当者、病院のコミュニケーション対応チームなど院内各部署、および HPA(当時)や警察、救急搬送サービス、英国空軍などの外部の組織とも密に連携をとっており、受け入れの決定から搬送、患者の収容、診療、患者退室後の手続き、さらに事故発生時などのリスク管理の方針など、一連の手順が文書として整理されており、かつ、年2回のペースでトレーニングが行い、定期的な文書の見直しも行われていた。HSIDU の主任医師である Dr.Jacobs は、このようなペーパーワークを含む平時からの地道な努力があるため、各スタッフが自信を持って患者の診療にあたれると述べていた。英国では、医療機関が基本的に NHS による国営であり、我が国と比べて公的機関との連携がとりやすい状況にあるかもしれないが、我が国においても、医療機関の内部、外部との連携を再検討し、効

率的な対応体制を構築して行く必要があるだろう。

E. 結論

保健医療制度や隔離施設の設計、指定医療機関の
数など、我が国の現状と異なる部分も多々あるが、英国
における、リスク評価にもとづいた患者や接触者への対
応、各分野の専門家による国家レベルでの迅速な診断
やサポート体制、医療機関におけるアクションカードの
整備をはじめとする事前の備えのあり方など、我が国の
感染症対策行政、医療機関において今後積極的に考
慮すべき点は多いと考えられた。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, <u>Kato Y</u> , Takasaki T, Kanagawa S	Dengue virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan	J Travel Med	19	255-7	2012
Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, <u>Saijo M</u> , <u>Morikawa S</u>	Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers.	Viruses	4	2097-114	2012
Taniguchi S, Sayama Y, Nagata N, Ikegami T, Miranda ME, Watanabe S, Iizuka I, Fukushi S, Mizutani T, Ishii Y, <u>Saijo M</u> , Akashi H, Yoshikawa Y, Kyuwa S, <u>Morikawa S</u>	Analysis of the humoral immune responses among cynomolgus macaque naturally infected with Reston virus during the 1996 outbreak in the Philippines	BMC Vet Res	8	189	2012
Sayama Y, Demetria C, Saito M, Azul RR, Taniguchi S, Fukushi S, Yoshikawa T, Iizuka I, Mizutani T, Kurane I, Malbas FF Jr, Lupisan S, Catbagan DP, Animas SB, Morales RG, Lopez EL, Dazo KR, Cruz MS, Olveda R, <u>Saijo M</u> , Oshitani H, <u>Morikawa S</u>	A seroepidemiologic study of Reston ebolavirus in swine in the Philippines	BMC Vet Res	8	82	2012
Lihoradova O, Kalveram B, Indran SV, Lokugamage N, Juelich TL, Hill TE, Tseng CT, Gong B, Fukushi S, <u>Morikawa S</u> , Freiberg AN, Ikegami T	The dominant-negative inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR increases the efficacy of Rift Valley fever virus MP-12 vaccine	J Virol	86	7650-61	2012

Arai S, Gu SH, Baek LJ, Tabara K, Bennett SN, Oh HS, Takada N, Kang HJ, Tanaka-Taya K, <u>Morikawa S</u> , Okabe N, Yanagihara R, Song JW	Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea	Virology	424	99-105	2012
Sakai K, Nagata N, Ami Y, Seki F, Suzaki Y, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Fukushi S, Mizutani T, Yoshikawa T, Otsuki N, Kurane I, Komase K, Yamaguchi R, Hasegawa H, <u>Saijo M</u> , Takeda M, <u>Morikawa S</u>	Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008	J Virol	87	1105-14	2013
加藤康幸	新興・再興・輸入感染症	臨床画像	28	20-9	2012
吉川徹	電動ファン付き呼吸用保護具 (PAPR) の普及と型式検定	労働の科学	67	668-74	2012



Dengue Virus Type-3 Infection in a Traveler Returning From Benin to Japan

Mugen Ujiie, MD, MTM,* Meng Ling Moi, BSc (Hons), MSc, PhD,[†] Taiichiro Kobayashi, MD,* Nozomi Takeshita, MD,* Yasuyuki Kato, MD, MPH,* Tomohiko Takasaki, MD, PhD,[†] and Shuzo Kanagawa, MD*

*Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan; [†]Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

DOI: 10.1111/j.1708-8305.2012.00617.x

Dengue virus (DENV) infection is a major health threat for travelers. We describe here a case of dengue virus serotype-3 (DENV-3) infection in a traveler returning to Japan from the Republic of Benin. The isolated DENV-3 genotype 3 strain exhibited high sequence similarity to those from neighboring regions.

Dengue virus (DENV) is widely distributed in tropical and subtropical countries and is transmitted by *Aedes* mosquito. The global incidence of DENV infection has increased rapidly in recent years. In addition, disease prevalence has widely expanded geographically, leading to dengue emergence in nonendemic countries¹ or re-emergence elsewhere. Although DENV infection has been reported sporadically in travelers returning from Africa,²⁻⁷ the extent of DENV transmission in Africa has not been clearly defined. There is limited availability of epidemiological and clinical data on dengue infection in Africa. Hence, improved clinical and molecular epidemiological data on DENV infection in travelers could contribute to better understanding of the clinical features associated with dengue infection from Africa, as well as the extent of disease prevalence in the region.

Although Japan has no endemic cases of dengue, the number of imported cases has increased steadily in recent years with some 245 cases reported in 2010.⁸ Of these cases, three travelers from the African continent (two travelers from Tanzania and one from Benin) developed dengue fever (DF). In this study, we describe the clinical and molecular characteristic of a dengue virus serotype-3 (DENV-3) isolated from a traveler returning to Japan from the Republic of Benin in 2010.

Case Report

A 28-year-old Japanese female presented to the emergency department of the National Center for Global Health and Medicine (NCGM) Hospital (August 6, 2010) one day after onset of high fever and headache. She had visited Cotonou, Dassa-Zoume, Parakou, Natitingou, and Porto-Novo in Benin between July 24 and August 3, 2010. She returned to Japan on August 4, 2010 and developed sudden fever the next day.

The patient visited our hospital complaining of headache, sore throat, nausea, diarrhea, bilateral myalgia of her thighs, and bilateral arthralgia over her knees, shoulders, and elbows. On examination, her body temperature was 39°C, blood pressure was 88/52 mmHg, and pulse was 92/minute. Systemic examinations revealed pharyngeal erythema, bilateral inguinal lymphadenopathy, and mild tenderness over her thighs and knees. Many mosquito bite marks were apparent on her lower limbs. A full blood count conducted on day 2 after onset of disease revealed the following: hemoglobin count (13.2 mg/dL), hematocrit concentration (39.2%), white blood cell count ($6.76 \times 10^9/L$), and platelet count ($227 \times 10^9/L$), all of which were within normal ranges.

Serum sample obtained on day 2 after onset of disease was negative for malaria antigen by a rapid malaria antigen diagnostic test (BinaxNOW, Inverness Medical, Ireland), and, was positive for dengue NS1 antigen by using a rapid DENV NS1 antigen immunochromatographic test (SD BIOLINE, Korea). The patient was, therefore, admitted to our hospital for treatment, given intravenous infusions and observed for dengue warning signs. The patient's platelet count was

Corresponding Author: Mugen Ujiie, MD, MTM, Disease Control and Prevention Center, National Center for Global Health and Medicine, 1-21-1 Toyama, Shinjuku, Tokyo 162-8655, Japan. E-mail: infinite_u@hotmail.com

at its lowest on day 7 after onset of disease ($48 \times 10^9/L$) and her fever subsided on day 8 after onset. She was discharged after hospitalization for a total of 7 days.

DENV-3 genome was detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR, Applied Biosystems, USA) and virus isolated using the *Aedes albopictus* mosquito cell line C6/36.³ Although tests for anti-dengue IgM (Focus Diagnostics, USA), and IgG (Panbio, Australia) antibodies were negative on day 2 after onset of disease, tests using serum sample from day 8 after onset of disease was positive. Both day 2 and day 8 serum samples were positive for dengue NS1 antigen (Platelia, Bio-Rad, France). Serum samples were de-identified prior to being used in the experiments and thus, ethical approval was not required for this study. The nucleotide sequence of the envelope protein (E-protein) of the isolated virus (GenBank accession number AB690858) was compared to selected sequences of DENV-3. The isolated DENV-3 strain from Benin belonged to DENV-3, genotype III (Figure 1) and had the following characteristics: an E-protein sequence similarity of 99% to the DENV-3 D3/Hu/Côte d'Ivoire/NIID48/2008 strain, 99% to a DENV-3 strain isolated in Senegal in 2009, and 98% to a DENV-3 D3/Hu/Tanzania/NIID08/2010 strain isolated in Tanzania in 2010 (GenBank accession numbers: AB447989, GU189386, and AB549332, respectively).

Discussion

Sporadic cases or outbreaks of DENV infection have been reported in 34 countries in the African region. It is estimated that 2.4% of global dengue hemorrhagic fever (DHF) cases (100,000 cases) and up to 1 million cases of DF may occur in Africa.² Among travel-associated dengue cases in travelers returning to Europe, 2 to 8% had visited Africa.^{2,5} In comparison, most of the travelers returning to Europe with dengue had traveled to Asia (54–61%) and Latin America (25–31%). Febrile illness was, however, more frequently reported in 41% of travelers to sub-Saharan Africa (2,559 patients) as compared to other regions (Southeast Asia, 33%, 1,218 patients; Caribbean and Central and South America, 18%, 1,044 patients).⁹ Although dengue is frequently reported in travelers to Southeast Asia and South America as compared to Africa, the disease may be underreported in Africa due to limited awareness of the disease, and, limited availability of diagnostic tests and routine surveillance system.²

Imported cases of DENV type-3 infection from West Africa have been previously reported in European travelers.^{2–6} The first possibility of DENV circulation in Benin was suggested by a seroprevalence study conducted in asymptomatic Germans working overseas from 1987 to 1993.^{5,10} Although there have been four serologically confirmed cases of DENV infection in travelers returning from Benin to France in 2006 and 2010, the serotypes were not identified. As the isolated

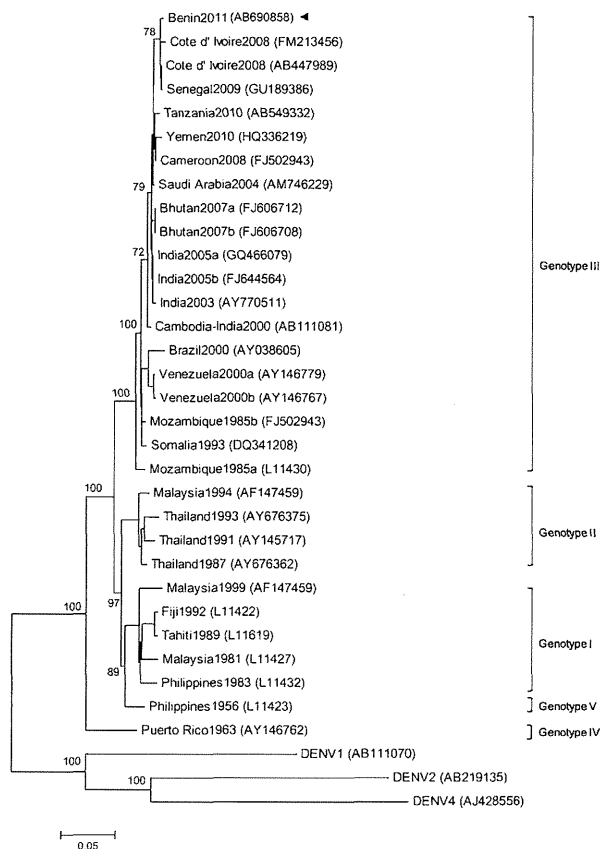


Figure 1 Phylogenetic tree based on the nucleotide sequence of the envelope (E) protein gene of DENV-3 strains. The tree was rooted to DENV-1, DENV-2, and DENV-4 outgroups. Multiple sequence alignments were performed. The tree was constructed using the neighbor joining method (Genetyx, Japan) and successful bootstrap replication is indicated at the nodes. The isolated strain from Benin (AB690858) was indicated with a closed triangle (▲). Scale bar (0.05) indicates nucleotide substitutions per site.

DENV-3 strain possesses high sequence similarity to DENV-3 strains in neighboring regions, the data suggests local transmission of the virus in the African continent. However, further epidemiological studies would be needed to identify DENV outbreaks and ascertain the virus strains causing local outbreaks.

Although close monitoring of febrile travelers provides data on DENV outbreaks in endemic regions, improved disease surveillance and a higher priority in dengue laboratory diagnosis in Africa is vital to reflect the true incidence of the disease. Identification of genotypes and strains along with disease prevalence in endemic areas is of importance because some DENV strains have been associated with increased disease severity and may possess higher epidemic potential.^{3,4}

Currently, there are no effective drugs or vaccines against DENV infection. Transmission of DENV within Africa presents challenges for diagnosis and effective disease management of febrile travelers

returning from the continent. Additionally, there is a need for higher awareness toward the increasing risk of DENV infection in travelers among health care personnel in both endemic and non-endemic regions. Thus, rapid and accurate diagnosis of DENV is particularly important for travelers returning from West Africa in which other viral hemorrhagic fevers, including yellow fever and Lassa fever are endemic.

Acknowledgments

This work was supported by funding from Research on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases by the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan (H21-shinkou-ippan-005, H23-shinkou-ippan-006, and H23-shinkou-ippan-010).

Declaration of Interests

The authors state that they have no conflicts of interest.

References

1. TDR/WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, Switzerland: TDR/WHO, 2009.
2. Amarasinghe A, Kuritsk JN, Letson GW, Margolis HS. Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:1349–1354.
3. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, et al. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:1770–1772.
4. Franco L, Di Caro A, Carletti F, et al. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. *Euro Surveill* 2010; 15. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19490>
5. Jelinek T, Mühlberger N, Harms G, et al. Epidemiology and clinical features of imported dengue fever in Europe: sentinel surveillance data from TropNetEurop. *Clin Infect Dis* 2002; 35:1047–1052.
6. Domingo C, Niedrig M, Gascón J, et al. Molecular surveillance of circulating dengue genotypes through European travelers. *J Travel Med* 2011; 18:183–190.
7. Schwartz E, Weld LH, Wilder-Smith A, et al. Seasonality, annual trends, and characteristics of dengue among ill returned travelers, 1997–2006. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1081–1088.
8. Infectious Disease Surveillance Center. Dengue fever, dengue hemorrhagic fever and chikungunya fever importation in Japan, as of May 2011. *Infectious Agents Surveillance Report* 32: 159–160, June 2011. Available at: <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/32/376/tpc376.html>.
9. Wilson ME, Weld LH, Boggild A, et al. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1560–1568.
10. Eisenhut M, Schwarz TF, Hegenscheid B. Seroprevalence of dengue, chikungunya and Sindbis virus infections in German aid workers. *Infection* 1999; 27:82–85.



This is a warning sign at the entrance of the aviary located in Hong Kong Park, Hong Kong Island, Hong Kong. It stresses the risk of two arboviral diseases transmitted by mosquitoes: dengue fever is transmitted by *Aedes albopictus* and Japanese encephalitis is transmitted by *Culex tritaeniorhynchus*. These two diseases may affect travelers in this part of the world. *Photocredit: Eric Caumes (Location: Hong Kong Park, Hong Kong)*

Review

Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers

Shuetsu Fukushi *, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Masayuki Saijo and Shigeru Morikawa

Department of Virology, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan; E-Mails: htani@nih.go.jp (H.T.); ytomoki@nih.go.jp (T.Y.); msaijo@nih.go.jp (M.S.); morikawa@nih.go.jp (S.M.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: fukushi@nih.go.jp; Tel.: +81-42-561-0771; Fax: +81-42-561-2039.

Received: 1 August 2012; in revised form: 19 September 2012 / Accepted: 25 September 2012 / Published: 12 October 2012

Abstract: The family *Arenaviridae*, genus *Arenavirus*, consists of two phylogenetically independent groups: Old World (OW) and New World (NW) complexes. The Lassa and Lujo viruses in the OW complex and the Guanarito, Junin, Machupo, Sabia, and Chapare viruses in the NW complex cause viral hemorrhagic fever (VHF) in humans, leading to serious public health concerns. These viruses are also considered potential bioterrorism agents. Therefore, it is of great importance to detect these pathogens rapidly and specifically in order to minimize the risk and scale of arenavirus outbreaks. However, these arenaviruses are classified as BSL-4 pathogens, thus making it difficult to develop diagnostic techniques for these virus infections in institutes without BSL-4 facilities. To overcome these difficulties, antibody detection systems in the form of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and an indirect immunofluorescence assay were developed using recombinant nucleoproteins (rNPs) derived from these viruses. Furthermore, several antigen-detection assays were developed. For example, novel monoclonal antibodies (mAbs) to the rNPs of Lassa and Junin viruses were generated. Sandwich antigen-capture (Ag-capture) ELISAs using these mAbs as capture antibodies were developed and confirmed to be sensitive and specific for detecting the respective arenavirus NPs. These rNP-based assays were proposed to be useful not only for an etiological diagnosis of VHFs, but also for seroepidemiological studies on VHFs. We recently developed arenavirus neutralization assays using vesicular stomatitis virus (VSV)-based pseudotypes bearing arenavirus recombinant glycoproteins. The goal of this article is to review the recent advances in developing laboratory diagnostic assays based on recombinant viral

proteins for the diagnosis of VHFs and epidemiological studies on the VHFs caused by arenaviruses.

Keywords: arenavirus; viral hemorrhagic fever; diagnosis; recombinant protein

1. Introduction

The virus family *Arenaviridae* consists of only one genus, but most viruses within this genus can be divided into two different groups: the Old World arenaviruses and the New World arenaviruses (also known as the Tacaribe complex) [1,2]. The differences between the two groups have been established through the use of serological assays. Most of the arenaviruses cause persistent infection in rodents without any symptoms, and humans acquire a variety of diseases when zoonotically infected. Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) is the only arenavirus to exhibit a worldwide distribution, and causes illnesses such as meningitis [3,4]. Congenital LCMV infections have also been reported [4,5]. Most importantly, viral hemorrhagic fever (VHF) can be caused by several arenaviruses. Lassa fever, caused by the Lassa virus (LASV), an Old World arenavirus, is one of the most devastating VHFs in humans [6]. Hemorrhaging and organ failure occur in a subset of patients infected with this virus, and it is associated with high mortality. Many cases of Lassa fever occur in Western Africa in countries such as Guinea, Sierra Leone, and Nigeria [7–13]. Tacaribe complex lineage B of the New World arenaviruses consists of the Junin virus (JUNV), Guanarito virus (GUNV), Sabia virus (SABV) and Machupo virus (MACV), the etiological agents of Argentine, Venezuelan, Brazilian, and Bolivian hemorrhagic fevers, respectively [14,15]. Although genetically distinct from one another, they appear to produce similar symptoms, accompanied by hemorrhaging in humans [14,15]. These pathogenic New World arenavirus species are closely associated with a specific rodent species [6].

Humans are usually infected with pathogenic arenaviruses through direct contact with tissue or blood, or after inhaling aerosolized particles from urine, feces, and saliva of infected rodents. After an incubation period of 1–3 weeks, infected individuals abruptly develop fever, retrosternal pain, sore throat, back pain, cough, abdominal pain, vomiting, diarrhea, conjunctivitis, facial swelling, proteinuria, and mucosal bleeding. Neurological problems have also been described, including hearing loss, tremors, and encephalitis. Because the symptoms of pathogenic arenavirus-related illness are varied and nonspecific, the clinical diagnosis is often difficult [14,16]. Human-to-human transmission may occur via mucosal or cutaneous contact, or through nosocomial contamination [14,16]. These viruses are also considered to be potential bioterrorism agents [2].

A number of arenavirus species have been recently discovered as a result of both rodent surveys and disease outbreaks [17–26]. A novel pathogenic New World arenavirus, Chapare virus (CHPV), has been isolated from a fatal case of VHF in Bolivia [20]. In addition, five cases of VHF have been reported in South Africa, and a novel arenavirus, named Lujo virus, was isolated from a patient [17]. The Lujo virus is most distantly related to the other Old World arenaviruses [17]. To date, there is no information concerning the vertebrate host for the Chapare and Lujo viruses.

There is some evidence of endemicity of the Lassa virus in neighboring countries [27,28]. However, as the magnitude of international trade and travel is continuously increasing, and the perturbation of the environment (due either to human activity or natural ecological changes) may result in behavioral changes of reservoir rodents, highly pathogenic arenaviruses could be introduced to virus-free countries from endemic areas. In fact, more than twenty cases of Lassa fever have been reported outside of the endemic region in areas such as the USA, Canada, Europe, and Japan [29–33]. It is of great importance to detect these pathogens rapidly and specifically in order to minimize the risk and scale of outbreaks of VHFs caused by arenaviruses. However, these arenaviruses are classified as biosafety level (BSL)-4 pathogens, making it difficult to develop diagnostic techniques for these virus infections in laboratories without BSL-4 facilities. To overcome these difficulties, we have established recombinant viral nucleoproteins (rNPs)-based serological assays, such as IgG-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence assay (IFA), and antigen (Ag)-capture ELISA for the diagnosis of VHFs caused by highly pathogenic arenaviruses. Furthermore, virus neutralization assays using pseudotype virus-bearing arenavirus GPs have been developed. In this review, we describe the usefulness of such recombinant protein-based diagnostic assays for diagnosing VHFs caused by arenaviruses.

2. Currently Used Diagnostic Techniques for VHFs

In outbreaks of VHFs, infections are confirmed by various laboratory diagnostic methods. Virus detection is performed by virus isolation, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and antigen-capture ELISA. It has been shown that monoclonal antibody panels against pathogenic arenaviruses are useful for detecting viral antigens on the virus-infected cells as well as for investigating of antigenic relationships of arenaviruses [34–36]. Detection of the virus genome is suitable for a rapid and sensitive diagnosis of VHF patients in the early stage of illness, and extensive reviews of such RT-PCR assays have been described [37,38]. More recently, progress in the RT-PCR method covering genetic variations of the hemorrhagic fever viruses (HFVs) [39,40] and a multiplexed oligonucleotide microarray for the differential diagnosis of VHFs have also been reported [41]. On the other hand, antibodies against these viruses can be detected by the indirect immunofluorescence assay (IFA), or IgG- and IgM-ELISA. An IFA detects the antibody in the serum, which is able to bind to the fixed monolayer of the virus-infected cells. Although the interpretation of immunofluorescence results requires experience, the assay has advantages over other methods, since each virus generates a characteristic fluorescence pattern that adds specificity to the assay compared to a simple ELISA readout. A serological diagnosis by the detection of specific IgM and IgG antibodies to the HFVs must be sensitive, specific and reliable, because a misdiagnosis can lead to panic in the general population. An IgM-specific ELISA is suitable for detecting recent infection, but the relevance of IgM testing for acute VHF depends on the virus and the duration of illness; specific IgM is not often present in the very early stage of illness, and patients who die of VHF often fail to seroconvert at all. An IgG-specific ELISA is efficacious, not only in the diagnosis of a large number of VHF cases, especially during convalescence, but also for epidemiological studies in the endemic regions. The detailed methods used for the IFA and IgG- and IgM-ELISAs for the diagnosis of VHF using authentic virus-antigens have been described in detail [42–45].

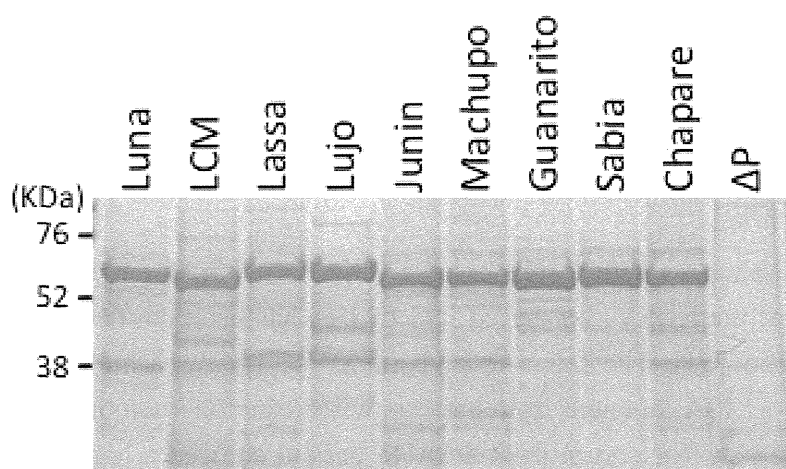
3. Recombinant Protein-Based ELISA for Detecting Antibodies against Arenaviruses

Arenaviruses have a bisegmented, negative-sense, single stranded RNA genome with a unique ambisense coding strategy that produces just four known proteins: a glycoprotein, a nucleoprotein (NP), a matrix protein (Z), and a polymerase (L) [46]. Of these proteins, the NP is the most abundant in virus-infected cells. Recombinant protein technology could meet the demand for a simple and reliable VHF test system, and recombinant NP (rNP) has been shown to be useful for serological surveys of IgM- and IgG antibodies against arenaviruses [47–50].

3.1. Antibody Detection-ELISA

Recombinant baculoviruses that express the full-length rNP of arenaviruses have been generated [48,50,51]. The method used for the purification of arenavirus rNP from insect *Tn5* cells infected with recombinant baculoviruses is effective and simple compared to those for Ebola, Marburg, and Crimean-Congo hemorrhagic fever virus rNPs [51–55]. Most of the arenavirus rNPs expressed in insect cells using the recombinant baculoviruses are crystallized [56] and are solubilized in PBS containing 8M urea. Since the majority of *Tn5* cellular proteins are solubilized in PBS containing 2M urea, the arenavirus rNPs in the insoluble fraction in PBS containing 2M urea can be solubilized by sonication in PBS containing 8M urea. After a simple centrifugation of the lysates in PBS containing 8M urea, the supernatant fractions can be used as purified rNP antigens without further purification steps [51]. The control antigen is produced from *Tn5* cells infected with baculovirus lacking the polyhedrin gene (ΔP) in the same manner as the arenavirus rNPs (Figure 1).

Figure 1. Purified rNPs. The expression and purification efficiency of arenavirus rNP were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) after staining the gels with Coomassie blue. Purified NP antigens with approximate molecular weights of 62 kDa from Luna, LCM, Lassa, Lujo, Junin, Machupo, Guanarito, Sabia, and Chapare viruses and the purified negative control antigen (ΔP) are shown.



As described above, recombinant baculoviruses allow the delivery of rNP antigens without using infectious live arenaviruses. An ELISA plate coated with the predetermined optimal quantity of purified rNPs (approximately 100 ng/well) is used for the IgG-antibody detection assay. An advantage