

の検討課題である。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

本研究結果から、成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が <10 である群の陰転化率は37.5%であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群(高齢者が多数を占める)では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。

F. 健康危機情報

近年、40～50代の日本脳炎患者報告も増加し、2011年には日本脳炎の輸入症例が報告された。今後、抗体保有率の低い年代については、ワクチンの追加接種を考慮することが必要だと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし(予定あり)

2. 学会発表

青山幾子、弓指孝博、加瀬哲男、高橋和郎:成人における日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果.第60回日本ウイルス学会学術集会2012年11月(大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 ワクチン接種前後の日本脳炎ウイルスに対する年齢別中和抗体価

Age	n*	FRNT ₅₀ titer Before Vaccination (pre)										positive	FRNT ₅₀ titer After Vaccination (post)										positive	
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	rate(%)	<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	<5120	rate(%)
20-29	51	7	8	5	5	5	10	2	3	4	2	86.3		2	1	3	4	9	7	2	9	5	9	100.0
30-39	57	37	6	8	2	4						35.1	1	4	5	6	12	19	6	2	2			98.2
40-49	73	48	8	7	5	4	1					34.2	8	10	11	9	15	11	2	5	2			89.0
50-59	78	68	6	3		1						12.8	21	12	19	12	6	6	1	1				73.1
60-	13	8	3	1		1						38.5	3		2	1	1	4	2					76.9
total	272	168	31	24	12	15	11	2	3	4	2	38.2	33	28	38	31	38	49	18	10	13	5	9	87.9

n*=number

表2 ワクチン接種後と1年後の中和抗体価の比較

FRNT ₅₀ titer	n*	FRNT50 titer after 1 year from vaccination									negative rate(%)
after vaccination		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280-	
10	20	18	2								90.0
20	25	10	9	6							40.0
40	21	2	4	6	9						9.5
80	33	3	3	9	12	6					9.1
160	20	0		2	7	10	1				0.0
320	12	0			2	5	4	1			0.0
640	8	0			2	1	2	2	1		0.0
1280-	15	0					1	1	4	9	0.0
	154	33	18	23	32	22	8	4	5	9	21.4

n*=number

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)
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策
の確立に関する研究」(H23-新興-一般-010)

分担研究報告書

チクングニアウイルスのコモンマーモセットモデルにおける病理学的解析

研究分担者 倉根一郎 (国立感染症研究所副所長)
研究協力者 林 昌宏 (国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長)
高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長)
鈴木隆二 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室長)
網 康至 (国立感染症研究所動物管理室主任研究官)
藤井克樹 (国立感染症研究所ウイルス第二部研究員)
モイ メンリン (国立感染症研究所ウイルス第一部研究員)
北浦一 孝 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室流動研究員)
白井顕治 (筑波大学大学院人間総合科学研究科ウイルス医学)
森川 茂 (国立感染症研究所獣医科学部長)
西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部長)

研究要旨

チクングニア熱が近年アフリカ東岸から南アジア、東南アジアにかけて大流行している。また温帯地域における初めての国内流行がイタリア (2007 年)、フランス (2010 年) に 7 報告された。したがって媒介蚊の生息する日本国内へのチクングニアウイルス (CHIKV) の侵淫の可能性は否定できない。これまでに我々はコモンマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討を行った。その結果、CHIKV の接種により高いウイルス血症と迅速な特異的抗体の上昇を観察した。そこで本研究において CHIKV 接種マーモセットに対する病理学的解析を行った。その結果 CHIKV 接種 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出された。また肝臓および脾臓において特異的抗原が検出され、肝臓においては肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤、脾臓においては二次濾胞の形成および starry sky 像が観察された。これらの結果からマーモセットにおいて CHIKV の感染が成立した可能性が示唆されたため今後さらなるウイルス学および病理学的解析を行う必要がある。

A. 研究目的

近年チクングニアウイルス (Chikungunya virus: CHIKV) がアフリカ東岸からインド、東南アジアにかけて再興している。我が国においても 2007 年より 2012 年末までに 35 例の輸入症例が報告された。CHIKV 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。CHIKV は昆虫媒介性ウイルスであり、その媒介蚊はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ (*A. albopictus*) などのヤブカ属のカである。チクングニア熱は日本周辺で大流行して

おり日本においても媒介蚊が存在するため国内侵淫の可能性は否定できない。また2005年のレユニオン島でのチクングニア熱の流行においては発熱、発疹、関節痛などのこれまでに知られているチクングニア熱の症状とは別に、呼吸器不全、心代償不全、髄膜脳炎、劇症肝炎、腎不全等の症状と219人の死者が報告された。したがってチクングニア熱の病態はいまだ不明である。ところで近年コモンマーモセット（マーモセット）が新たな霊長類モデルとして注目されている。マーモセットは、南米の熱帯雨林に生息する霊長目オマキザル科マーモセット属の新世界ザルであり、繁殖効率が高く、小型で実験上取り扱いが容易である。実験動物としてのコロニーが存在するため、性別、年齢、体重などをコントロール群、実験群で複数匹揃え、繰り返し実験を行う事が可能である。

これまでに我々はマーモセットを用いたCHIKV感染モデルの検討を行った。その結果、CHIKVの接種により高いウイルス血症と迅速な特異的抗体の上昇を観察した。そこで本研究の目的はCHIKV接種マーモセットに対する病理学的解析を行うことである。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞：感染実験にはCHIKV SL10571株を供試した。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）。

動物：体重300g～379gのコモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）を用いた。麻酔は塩酸ケタミン＋塩酸キシラジン混合麻酔法により導入した。

感染実験1：マーモセット6頭に対して、SL10571株（500ul； 10^8 pfu/animal）を背側頸部に皮下接種した。感染4日後（#5013）、7日後（#5014）、10日後（#5015）、21日後（#5016）に安楽殺を行い各組織を採取した。またマーモセット1頭を対照個体（#5017）として供試した。

ウイルス学的解析：採取した組織よりウイルス遺伝子を抽出し、TaqManリアルタイムRT-PCR法により組織中のウイルス遺伝子量を検出した。

病理学的解析：採取した組織は10%ホルマリンにて固定し、組織標本を作製した。作製した組織標本はHE染色および抗CHIKVマウス腹水を用いて免疫染色を行った。

C. 研究結果

組織中のCHIKV RNA量の検討：採取した組織よりRNAを抽出し、各組織におけるCHIKVのRNAコピー数をTaqMan RT-PCR法により計測した。その結果脾臓、腋窩リンパ節においてウイルスRNAが検出された（表1）。脊髄、大腿筋、心筋、大脳、小脳、肺からはウイルスRNAは検出されなかった。また対照個体である#5017からはウイルスRNAは検出されなかった。

病理学的解析：採取した各組織の病理解析を行った結果、#5013のマーモセットの肝臓において、細胞浸潤、肝のシングルセルネクロシスが認められ、肝細胞、肝管上皮細胞およびkupper細胞に特異的抗原が観察された（図1）。#5014の肝臓においては肝細胞、kupper細胞に特異的抗原が観察された。また

脾臓においては二次濾胞の形成が観察された(図2)。#5015の肝臓においては類洞内への細胞浸潤が観察され、kupper細胞に特異的抗原が観察された。また脾臓においては二次濾胞においてstarry sky像が観察された。#5016の肝臓においても細胞浸潤が観察されたが、特異的抗原は認められなかった。対照個体である#5017の肝臓および脾臓において病理学的変化は認められなかった(図1, 2)。

D. 考察

CHIKV 接種 3, 7, 10, 21 日後に安楽殺を行いコモンマームセットの各臓器を採取しウイルス学および病理学的解析を行った。その結果CHIKV 接種4~21日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出されたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。さらに肝臓および脾臓において特異的抗原が検出され、肝臓においては肝細胞における特異的抗原の観察、肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤が観察され、さらに脾臓においては二次濾胞の形成および二次濾胞内に starry sky 像が観察されたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。したがって今後さらなるウイルス学および病理学的詳細を解析する必要がある。

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。したがって日本においても将来のワクチン開発、特異的治療法の開発は重要な課題であり、早

期のチクングニア熱の動物実験モデルの開発はその病態解明および将来のワクチン開発、病態生理に基づく新治療法の開発に資する。

F. 健康危険情報
特記事項なし

G. 研究発表
(論文)

特記事項なし

(学会発表)

C. K. Lim, M. L. Moi, A. Kotaki, M. Saijo, I. Kurane, T. Takasaki. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan. June 12-13, 2012.

C. K. Lim, A. Kotaki, T. Omatu, M. L. Moi, I. Kurane, M. Saijo, T. Takasaki. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.

中道 一生, 井上直樹, 倉根一郎, 林 昌宏, 西條政幸: 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘル

ペスウイルスの出現プロファイルの解析, 第 17 回日本神経感染症学会総会(京都市) 2012 年 10 月 19-20 日.

林 昌宏, 網 康至, 藤井克樹, 北浦一孝, モイ メンリン, 白井顕治, 小滝 徹, 須崎百合子, 森川 茂, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦: マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.

伊藤 (高山) 睦代, 中道一生, 林 昌宏, 山口 (木下) 一美, 垣内 五月, 王 麗欣, 倉根 一郎, 西條政幸: 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における 3Rs の導入, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会(大阪市)2012 年 11 月 13-15 日.

山口 (木下) 一美, 中道一生, 伊藤 (高山) 睦代, 林 昌宏, 倉根 一郎, 西條 政

幸: LAMP 法を用いた PML 患者の脳脊髄液中の JC ウイルスの検出および定量試験, 第 60 回日本ウイルス学会学術集会 (大阪市) 2012 年 11 月 13-15 日.

M.L. Moi, C.K. Lim, M. Saijo, T. Takasaki, I. Kurane. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc γ R-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. Atlanta, Georgia USA. November 11-15, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

表 1 . コモンマーモセット臓器中のチクングニアウイルス RNA の検討

臓器	Days post inoculation				control
	4 (5013)	7 (5014)	10 (5015)	21 (5016)	
脾臓	+	+	+	+	ND
腋窩リンパ節	+	+	ND	+	ND
脊髄	ND	-	-	-	-

ND: not detected, -, Not done

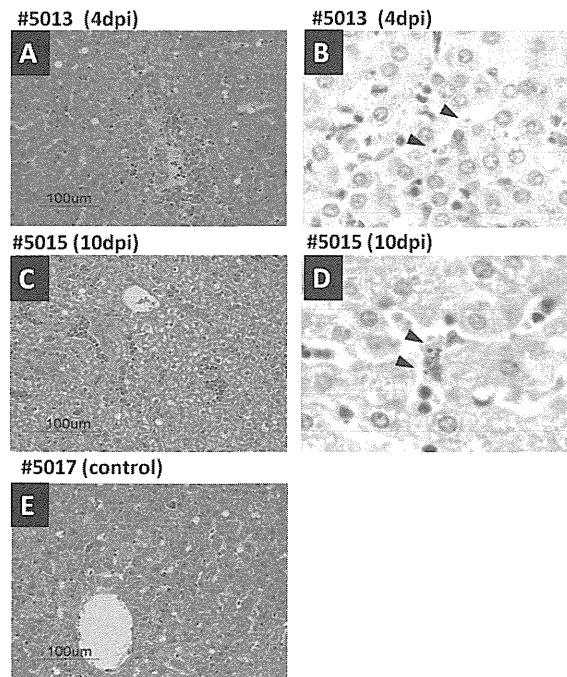


図 1 . コモンマーモセットの肝臓における病理像：マーモセット 4 頭に対して、SL10571 株を背側頸部に皮下接種した。その結果接種 4 日後の HE 像 (A) において細胞浸潤，免疫染色像 (B) において特異的ウイルス抗原が観察された。また 10 日後の HE 像 (C) においても細胞浸潤像，免疫染色像 (D) において特異的抗原が観察された。対照個体 (E) においては病理学的変化が観察されなかった。

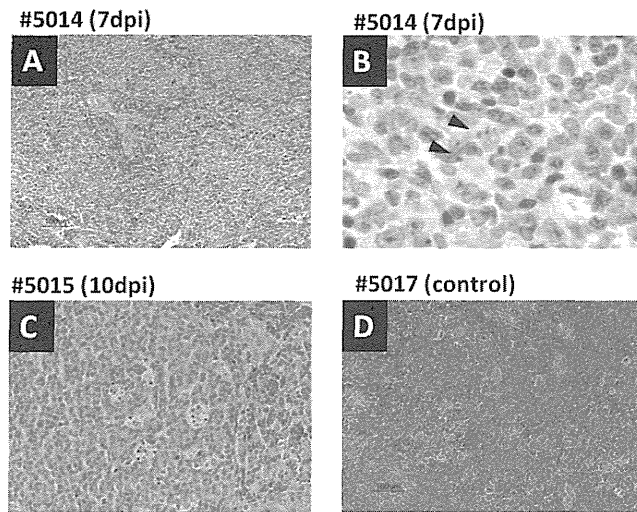


図 2 . コモンマーモセットの脾臓における病理像 : マーモセット 4 頭に対して , SL10571 株を背側頸部に皮下接種した . その結果接種 7 日後の HE 像 (A) において二次濾胞の形成 , 免疫染色像 (B) において特異的ウイルス抗原が観察された . また 10 日後の HE 像 (C) においては二次濾胞内に starry sky 像が観察された . 対照個体 (D) においては病理学的変化が観察されなかった .

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）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する
総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書

蚊媒介性ウイルス RNA 安定室温保存に関する研究

研究代表者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究協力者 小滝 徹、モイ メンリン、田島 茂

（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨

蚊媒介性ウイルスには、デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス以外にも、ウマ脳炎ウイルス、黄熱ウイルスなど多種類のウイルスが存在する。しかし、これらのウイルスはすべて RNA 遺伝子を有する RNA ウイルスである。RNA は DNA と異なり非常に不安定であり、保存管理および輸送法を考慮する必要がある。最近、ウイルス RNA を安定させる器材（チューブ）が市販されたことから、その使用に当たって、有効な安定期間等をデングウイルス 1 型、2 型、3 型、4 型を用いてさらに詳細に評価した。

その結果、室温で 5 ヶ月間非常に安定であり、30℃、40℃といった苛酷な温度下でも 4 週間は安定であることが確認された。この手法を用いることで地方衛生研究所、検疫所等でウイルス遺伝子検査の陽性コントロール（ウイルス RNA 遺伝子）を常温で輸送が可能であることが確認された。

A. 目的

蚊媒介性ウイルスには、デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス以外にも、ウマ脳炎ウイルス、黄熱ウイルスなど多種類のウイルスが存在する。1999 年のニューヨークでのウエストナイル熱の流行、2005 年のインド洋島嶼国での突然のチクングニア熱流行とその後のイタリア、フランス南部、中国南部、フィリピンミンダナオ島でのチクング

ニア熱の流行発生事例をみても予期せずに突然勃発することが多い。そこで、そのような場合に、遺伝子診断のための陽性コントロールを迅速に地方衛生研究所、検疫所等に送付できるように室温保存・常温輸送の方法を詳細に検討した。

B. 方法

RNA 抽出キットを用いて抽出したチクングニアウイルス RNA 遺伝子を、RNA stable tube (RNA stable 1.5ml

Screw-Cap Tube) に入れ、蓋を緩めた状態で真空遠心機により乾燥させる。サンプル量が、10-20 μ l の場合は 30 分、20-30 μ l では 1 時間、30-100 μ l は 1.5 時間かけて乾燥させる。乾燥させたチューブを室温 (15-25°C) で 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月、5 ヶ月間保存してリアルタイム逆転写 PCR (TaqMan) 法により、デングウイルス遺伝子の安定保存について検討した。デングウイルス 1 型 (Hawaii)、2 型 (New Guinea C)、3 型 (H87)、4 型 (H241) からウイルス RNA を抽出した。また、30°C、40°C 下に 3 日間、1 週間、2 週間、3 週間、4 週間保存して、同様にウイルス RNA の安定性を検討した。乾燥チューブの溶解は乾燥前の RNA 量と等量の RNase(-) 蒸留水を加えて溶解した。

C. 結果

デングウイルス遺伝子の長期保存安定性に関する検討

デングウイルス 1 型 (D1)、2 型 (D2)、3 型 (D3)、4 型 (D4) それぞれについて、-80°C凍結保存した RNA と stable チューブに保存した RNA を比較したところほとんどの場合、測定誤差範囲内であった (表 1)。D1 のように経時的に Ct (Cycle threshold) 値が 23 から 28 まで低下するものもあったが、凍結保存も stable チューブ保存も同じ低下を示した。D2 ~D3 に関しては大きな低下を示さなかった。

高温保存における安定性に関する検討

デングウイルス 1 型 (D1)、2 型 (D2)、

3 型 (D3)、4 型 (D4) それぞれについて、-80°C凍結保存した RNA と stable チューブにて 30°C、40°C下に 4 週間保存した RNA を経時的に比較した結果 (表 2)、大きな差を認めなかった。40°C保存ではやや低下を認めた RNA も存在したが、有意な低下ではなかった。

D. 考察

RNA は DNA と比較すると不安定な遺伝子であり、長期保存には-80°C保存が必要であった。したがって、RNA ウイルス遺伝子検査の陽性コントロールとして送付する際も、ドライアイスに梱包し凍結状態を維持する必要があった。今回検討した RNA stable チューブを使用することでデングウイルス 1 型、2 型、3 型、4 型それぞれについて、室温保存 5 ヶ月間安定であることが確認できた。したがって、本方法を使うことで国内衛生研究所、検疫所等の検査機関との間で輸送する際に、ドライアイスを使用する必要がなく、新たな RNA ウイルス感染症の検査体制構築に極めて有用である。一方、デング熱やチクングニア熱の流行地は、熱帯・亜熱帯であることから、30°C保存および 40°C保存での苛酷度試験を実施した。その結果、4 週間の検討で 40°C保存でも特に RNA 検出の減衰は認められなかった。したがって、海外で分離されたウイルス遺伝子の輸送に関しても有用であることが確認された。

蚊媒介性ウイルスは、フラビウイルス属、トガウイルス属、ブニヤウイルス属など多種に及ぶことから、現在世界的にも大きな流行を起こしていないウイル

スについてもあらかじめウイルス RNA を抽出の上、保存しておくことで、一旦流行が発生した場合に迅速な対応が可能となる。

E. 結 論

RNA stable チューブにウイルス RNA を乾燥保存することで、室温保存が少なくとも 8 ヶ月は可能であることが確認された。したがって、ウイルス RNA を常温輸送することが可能であることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Kaw Bing Chua, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Dengue Virus Infection-Enhancing Activity in Serum Samples with Neutralizing Activity as Determined by Using FcγR-Expressing Cells. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 6(2):e1536. 2012

2. Yasutaka Mizuno, Yasuyuki Kato, Shigeyuki Kano, Tomohiko Takasaki. Imported malaria and dengue fever in returned travelers in Japan from 2005 to 2010. *Travel Medicine and Infectious Diseases*. 10:86-91. 2012.

3. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K,

Kurane I, **Takasaki T**. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol*. 2012 Jun;50(6):2047-2052

4. Tsutomu Omatsu, Meng Ling Moi, **Tomohiko Takasaki**, Shinichiro Nakamura, Yuko Katakai, Shigeru Tajima, Mikako Ito, Tomoyuki Yoshida, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari & Ichiro Kurane. Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *J Med Primatol* (2012) 1–8.

5. Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, **Takasaki T**, Kanagawa S. Dengue virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan. *J Travel Med*. 2012 Jul;19(4):255-257.

6. Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, **Takasaki T**, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate

- hybridization assay. *J Immunol Methods*. 384(1-2):81-91 2012
7. Yamaguchi Y, Nukui Y, Kotaki A, Sawabe K, Saijo M, Watanabe H, Kurane I, **Takasaki T**, Tajima S. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *J Gen Virol*. :94(1):90-96. 2013.
8. Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, **Takasaki T**, Rerkamnuaychoke W, Maeda K. Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs. *J Virol Methods*. 187(1):85-89. 2013
9. Kazuo Nakamichi, Hidehiro Mizusawa, Masahito Yamada, Shuji Kishida, Yoshiharu Miura, Toshio Shimokawa, **Tomohiko Takasaki**, Chang-Kweng Lim, Ichiro Kurane and Masayuki Saijo. Characteristics of progressive multifocal leuko-encephalopathy clarified through internet-assisted laboratory surveillance in Japan. *BMC Neurology*. 12:121. 2012
10. Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, **Takasaki T**, Ogasawara Y, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K. Severe murine typhus with shock and acute respiratory failure in a Japanese traveler after returning from Thailand. *J Travel Med*. 20(1):50-53. 2013
11. Moi ML, **Takasaki T**, Saijo M, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity of undiluted sera obtained from patients with secondary dengue virus infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 107(1):51-58. 2013.
2. 学会発表
1) 国際学会
Meng Ling MOI, Chang - Kweng Lim, Masayuki Saijo, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Re - assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using Fc γ R - expressing cells. American Society of Tropical Medicine & Hygiene. 2012/Nov/11-15. (Atranta, USA)
- Ujiie M, Moi ML, Kotaki A, Takeshita N., Kanagawa S., Takasaki T., Ohmagari N. Dengue fever outbreak among Japanese construction workers returning from India. American Society of Tropical Medicine & Hygiene. 2012/Nov/11-15 (Atlanta, USA)
- Tomohiko Takasaki. Development of an animal model for evaluation of vaccine and therapeutics against dengue virus infection. 第9回日台シンポジウム 2012年9月20-21日 (台北)

Tomohiko Takasaki. Dengue vaccine development in the world: overview and status update. Scientific Meeting on Infectious Diseases, Advance Update on Pathogenesis of Viral Infection: Hepatitis, Dengue, Coxsackie, Epstein Barr, and HIV. 2012/Oct/24th. FMUI (Jakarta, Indonesia)

M.L. Moi, T.Omatsu, S.Tajima, C.-K.Lim, M.Saijo, I.Kurane, T.Takasaki. Application of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in traveler. 9th Asia Pacific Travel Health Conference. 2-5th May 2012 (Singapore).

2) 国内発表

小滝徹、モイメンリン、田島茂、高崎智彦。ウイルスRNA安定保存キットの評価。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日（大阪）

高崎智彦。 Dengue熱、チクングニア熱など昆虫媒介性ウイルス感染症の現状と今後。平成24年度新興再興感染症講演会。2012年10月16日（名古屋市）

高崎智彦。教育講演ー我が国の日本脳炎の現状ー特に小児においてー。第44回小児感染症学会総会・学術集会。2012年11月24-25日（北九州市）

林昌宏、網 康至、藤井克樹、北浦和孝、モイメンリン、白井頭治、小滝 徹、須崎百合子、森川 茂、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦。マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日（大阪）

高崎智彦。マーモセットを用いたチクングニアウイルス、デングウイルス感染症態解析。シンポジウム2 熱帯感染症。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日（大阪）

モイメンリン、大松勉、高崎智彦、中村紳一朗、網 康至、片貝祐子、須崎百合子、倉根一郎。Role of antibodies in dengue protective immunity and infection during secondary infection of marmosets. 第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月13-15日（大阪）

高崎智彦。チクングニアウイルスの生態と病原性。第53回日本臨床ウイルス学会。2012年6月16-17日（大阪府豊中市）

高崎智彦。 Dengue熱など昆虫媒介ウイルス感染症。第111回日本皮膚科学会総会。2012年6月1-3日（京都市）

モイメンリン、林 昌宏、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦。 Dengue熱診断サーベイランスのためのNS1抗原検出キットの有用性。第86回日本感染症学会総会学術講演会。2012年4月25-26日（長崎市）

駒瀬勝啓、高崎智彦、竹田誠。 Dengue熱患者血清における麻疹IgM抗体の検出。第86回日本感染症学会総会学術講演会。2012年4月25-26日（長崎市）

竹下望、水野泰孝、Lim Chang-Kweng、
小滝徹、氏家無限、大曲貴夫、加藤康幸、
金川修三、高崎智彦。日本脳炎ワクチン
による持続効果とブースター効果に関
する研究。第 86 回日本感染症学会総会
学術講演会。2012 年 4 月 25-26 日（長
崎市）

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

表1 デングウイルスを用いた長期保存安定性の評価

保存期間	凍結保存 (-80℃)	安定化チューブ 室温保存
1ヶ月		
D1	23.1	23.4
D2	19.9	19.8
D3	16.6	17.1
D4	20.7	20.8
2ヶ月		
D1	24.6	25.6
D2	19.5	19.8
D3	16.8	16.0
D4	19.6	17.0
3ヶ月		
D1	27.5	29.5
D2	17.8	21.2
D3	21.6	22.8
D4	16.3	18.3
4ヶ月		
D1	27.8	29.1
D2	20.8	21.2
D3	NT	22.3
D4	18.6	18.9
5ヶ月		
D1	28.6	28.4
D2	20.9	21.2
D3	NT	17.6
D4	19.0	19.3

表2 デングウイルスを用いた苛酷度試験

保存期間	凍結保存 (-80℃)	安定化チューブ 30℃保存	安定化チューブ 40℃保存
3 日目			
D1	23.8	24.2	26.2
D2	17.2	18.7	19.6
D3	19.8	19.5	19.9
D4	20.9	20.8	21.4
1 週間			
D1	26.0	27.0	28.1
D2	20.0	20.0	23.0
D3	19.7	19.8	21.2
D4	21.7	21.2	21.4
2 週間			
D1	27.6	26.1	28.1
D2	20.9	19.9	19.4
D3	21.8	18.7	19.0
D4	21.1	20.8	20.7
3 週間			
D1	23.5	21.6	24.5
D2	18.2	18.0	17.8
D3	22.6	19.7	19.8
D4	16.9	17.0	17.3
4 週間			
D1	23.1	23.0	24.9
D2	19.9	19.9	19.8
D3	16.6	16.5	17.2
D4	20.7	20.4	20.8

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）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する
総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書

海外渡航者を対象にした蚊媒介性ウイルス感染症の情報提供

研究分担者 濱田篤郎 東京医科大学病院 渡航者医療センター
研究協力者 水野泰孝 東京医科大学病院 感染制御部
福島慎二 東京医科大学病院 渡航者医療センター
廣幡智子 東京医科大学病院 渡航者医療センター
山口佳子 東京医科大学病院 総合診療部
倉林英彦 財団法人 海外邦人医療基金

研究要旨

海外渡航者や海外派遣企業の健康管理担当者を対象に、蚊媒介感染症のうちでもデング熱に関する意識調査や知識レベルの調査を行った。「流行地域の在留邦人」や「海外派遣企業の健康管理担当者」についてはデング熱への関心が高いが、媒介蚊の対策など予防面での知識が不足しており、この面での情報提供が必要であると考えられた。一方、「海外旅行に興味のある者」についてはデング熱への関心が低く、基本的な知識に乏しいことが明らかになった。こうした調査結果にもとづき、ホームページ、パンフレット、ポスターなどによる情報提供を開始しているが、今後は各集団別の情報提供や、情報提供による予防効果の判定などを行う予定である。

A. 研究目的

海外渡航者にとって蚊媒介性ウイルス感染症は重要な健康問題の一つである。とりわけデング熱は患者数が多く、2010年には国内で診断された患者数が238人にもものぼった。さらに、日本脳炎、黄熱、チクングニア熱なども海外渡航者にリスクのある蚊媒介性ウイルス感染症にあげられる。こうした感染症については国民に情報が広く浸透しておらず、海外渡航時に効果的な予防対策がとられていないのが現状である。そこで本研究では海外渡航者に必要とされる

蚊媒介性ウイルス感染症の情報内容を調査し、その提供を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 必要とされる情報内容の調査

海外渡航者に必要とされる情報内容についてデング熱を中心にアンケート調査を行う。調査対象は海外在留邦人、海外旅行者、海外派遣企業の担当者などとする。調査方法としてはインターネット上のアンケートへの回答方式、アンケート用紙の郵送方式、講演会場での配布方式などを用いる。調査項目は、海外でかかる感染症への関心や情

報入手の方法、デング熱など蚊媒介性ウイルス感染症の知識レベルや予防対策の実施状況である。

2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

日本国内で診断されたデング熱患者数は厚生労働省より毎年報告されているが、海外で罹患した日本人患者数についてはその実態が不明である。そこで、東南アジアの医療機関と連携し、日本人患者でデング熱と診断された患者数を明らかにする。この調査結果をもとに地域的なニーズに応じた情報提供の方法を検討する。

3. 海外渡航者への情報提供

以上の調査結果をもとに海外渡航者への効果的な情報提供を行う。提供方法として当初はホームページを開設し、情報内容を順次更新する。ある程度の情報量が蓄積された段階で、パンフレットやポスターなど印刷物の作成を行う。最終的にはDVDなどの映像手段での情報提供を計画する。

(倫理面への配慮)

原則的には、ヘルシンキ宣言における臨床研究の基準を遵守する。アンケート調査や問診用紙の調査においては匿名とし、番号のみで登録する。

C. 研究結果

1. 必要とされる情報内容の調査

・「海外旅行に興味のある者」への意識調査

本調査はロングステイ財団の旅行モニター6,827人（海外旅行に興味のある成人）を対象にインターネット上のアンケートへの回答を依頼した。質問内容は海外旅行中の健康問題の発生状況、感染症に関する認識などである。調査は2012年4月に行い、

1,648人から回答を得ることができた。このうち海外旅行の経験があると回答した者は1,222人で、旅行中に罹患した疾病としては「時差ぼけ」(375人)、「下痢」(278人)、「感冒」(216人)が頻度の高いものだった。「旅先での健康問題に関心がある」と回答した者は1,319人(79.7%)で、関心のある健康問題の種類は「旅先での医療費」(919人)、「旅先の医療機関」(824人)、「感染症」(816人)、「環境変化による疾病(高山病など)」(668人)の順だった。感染症の中で関心のある疾患(回答数:816人)は、下痢症(664人)、マラリア(458人)、ウイルス肝炎(434人)の順で、デング熱は275人(33.7%)と少なかった。デング熱の知識状況を聴取したところ、「全く知らない」と「あまり知らない」の合計が1,219人(73.9%)で大多数を占めた。

・「海外派遣企業の健康管理担当者」への意識調査

本調査は、2013年2月6日に東京医科大学病院で開催した講演会「海外勤務者の感染症対策」の会場で、参加者を対象にアンケートを配布し、回答を依頼した。質問内容は海外渡航中の感染症に関する認識や対策などである。この結果、104人から回答を得ることができた。回答者の所属は海外派遣企業が80%を占めており、職種は医療職が半数以上だった。海外渡航者の健康問題として感染症の重要度を質問したところ、「大変に重要」との回答が92人にのぼった。感染症の中で関心のある疾患はデング熱(83人)、下痢症(78人)、ウイルス肝炎(77人)、マラリア(73人)の順に多かった。海外の感染症情報の入手元としては、厚生労働省検疫所HP(92人)、外務省HP(73

人)など公的機関のHPが多くあげられた。海外渡航時の感染症対策として最も重要な対策を聴取したところ、予防接種(54人)と衛生教育(49人)がほぼ同数だった。

・「デング熱の知識レベル」に関する調査

平成23年度は東南アジアの在留邦人を対象に「デング熱の知識レベル」に関する調査を行ったが、平成24年度は同様の質問紙を用いて、「海外派遣企業の健康管理担当者」や「海外旅行に興味のある者」を対象に調査を実施した(表1)。

「海外派遣企業の担当者」を対象にした調査は、前述の東京医科大学病院で開催した講演会の参加者を対象に行った。回答者104人のうち、「命にかかわる病気か? (正解:はい)」、「昼間、蚊に刺されない対策が有効か? (正解:はい)」の質問の正解率は60%台と低かった。後者については東南アジアの在留邦人を対象にした調査でも正解率が低く、同様の傾向になった。

「海外旅行に興味のある者」を対象にした調査は、我々がインターネット上に開設した「デング熱のe-learning」(HP「海外旅行と病気」に掲載)の回答者を対象に行った。このe-learningは海外旅行に興味のある者が回答しており、2012年はデータ使用に同意した回答者が424人だった。この対象で解析した結果、「日本国内でも流行しているか? (正解:いいえ)」、「ワクチンで予防できるか? (正解:いいえ)」といった基本的な質問への正解率は70%台とやや低かった。一方、「昼間、蚊に刺されない対策が有効か?」の正解率は90%と高く、他の調査対象とは異なる結果になった。

2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

フィリピン・マニラの日本人会診療所において、日本人のデング熱患者数の調査を行った。診断法は抗原検出キット(Dengue DX NS1 Antigen Rapid Test)、抗体検出キット(Dengue DX IgG/IgM Rapid Test)を医療機関側に提供し、それによる検査を依頼した。その結果、2012年は1年間で55名の患者が確認された(表2)。このうち成人(16歳以上)は41名、小児は14名だった。入院を要する重症例は16名(29.1%)で、うち小児は5名(35.7%)だった。患者の発生する時期はマニラの雨季にあたる6月~8月に多かった。

3. 海外渡航者への情報提供

・ホームページの作成

インターネット上にホームページ「海外旅行と病気」(<http://www.tra-dis.org>)を作成し、デング熱など海外渡航に関連する病気の情報提供を開始した(図1)。平成24年度は最新の感染症情報の掲載を毎月行うとともに、海外の感染症対策に関するe-learning教材を追加した。この結果、2013年1月のアクセス件数は一日平均66件に増加した。今後、最新の医療情報や本研究班の調査成果などを掲載し、アクセス件数をさらに増やしていく予定である。

・デング熱に関するポスターの作成

東南アジア在留邦人の「デング熱の知識レベル」に関する調査(平成23年度実施)で、デング熱を媒介するネッタイシマカの吸血時間帯(昼間)に関する情報が不足していることが明らかになった。この点を改善するため「昼の吸血鬼にご用心」というポスターを300枚作成した(図2)。このポスターは昼間の蚊対策の必要性を説明したもので、国内のトラベルクリニックや海外

派遣企業の健康管理室に配布した。今後、東南アジアの医療機関などにも配布する予定である。

・医療講演会の開催

2012年2月6日に東京医科大学病院で講演会「海外勤務者の感染症対策～デング熱などの最新情報を含めて」を開催した。この講演会は財団法人海外邦人医療基金、東京医科大学病院渡航者医療センターも共催した。演者は本研究班の高崎班長（演題：海外で蚊に媒介されるウイルス感染症）、分担研究者の濱田（演題：海外勤務者の感染症対策 ABC）、三菱重工業長崎造船所病院の宮城医長（演題：企業での海外感染症対策の実例）の3名で、本研究班の研究結果などを発表した。参加者数は海外派遣企業の健康管理担当者を中心に111名にのぼった。

D. 考察

「海外旅行に興味のある者」（ロングステイ財団の旅行モニター）を対象にした意識調査では、海外旅行中に「下痢」や「感冒」など感染症に罹患する者が数多くみられた。しかし、海外旅行中に関心のある健康問題として「感染症」をあげる者は回答者の半数以下だった。関心のある感染症としては「下痢症」「マラリア」「ウイルス肝炎」などが多く、「デング熱」は少なかった。国内の輸入症例数で比較すれば、デング熱はマラリアやウイルス肝炎に比べて頻度が高く、今後は海外旅行者にデング熱への関心を高める必要があるものと考え。また、デング熱という病気については、回答者の70%以上が「全く知らない」か「あまり知らない」と回答していた。今後、海外旅行者を

対象に病気の基本的な情報を提供する必要があるだろう。

「海外派遣企業の担当者」を対象にした意識調査では、「感染症」が海外渡航者の健康問題として「大変に重要」と回答する者が多かった。ただし、このアンケートは海外の感染症をテーマにした講演会の参加者を対象に実施されており、その影響も大きいものとする。関心のある感染症としては「デング熱」「下痢症」「ウイルス肝炎」「マラリア」が多く、この集団ではデング熱への関心の高さがみられた。海外の感染症情報の入手元については、厚生労働省検疫所や外務省のHPなど国内公的機関のHPをあげる者が多かった。この結果は、平成23年度に東南アジアの在留邦人を対象に行った同様の調査結果（現地日本人組織HPや新聞などが上位に挙げられた）と異なるものだった。今後の海外渡航者への情報提供にあたり、国内向け（海外派遣企業など）と海外の在留邦人向けでは、提供方法を変えることも検討しなければならない。

今年度の「デング熱の知識レベル」に関する調査は、「海外派遣企業の健康管理担当者」と「海外旅行に興味のある者」（デング熱のe-learning回答者）を対象に行った。「海外派遣企業の担当者」の知識レベルは「東南アジア在留邦人」を対象に行った調査結果と近似しており、媒介蚊の吸血時間帯に関する質問の正解率が低かった。その一方で、「海外旅行に興味のある者」については、基本的な知識レベルが他の集団よりも低かったが、媒介蚊の吸血時間帯に関する質問は正解率が高かった。これは、吸血時間帯を知らなくても、単に蚊の対策で防