

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業）

分担研究報告書（H24 年度）

日本および台湾におけるデング熱輸入症例からのデングウイルス遺伝子解析

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 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）

倉根一郎

（国立感染症研究所・副所長）

舒佩芸、鄧華眞

（台湾行政院衛生署疾病管制局）

研究要旨 デング熱の流行地域および流行は年々拡大増加する傾向にある。台湾では毎年、デング熱が流行しているが、わが国同様海外からの輸入症例も多い。我が国の 2010 年のデング熱輸入症例数は 245 であり、台湾では 300 例を超えた。そこで、フィリピンおよびインドネシアからの輸入症例から、ウイルスを分離し、配列を決定したウイルス遺伝子情報を交換し解析した。2012 年の我が国へのフィリピンからの輸入症例は 34 例、インドネシア 16 例であった。そのうちウイルス遺伝子を検出した症例は、フィリピンが 20 例、インドネシアが 8 例であった。このうちウイルスが分離できた株は 10 株、台湾の分離株は 5 株であった。その結果、フィリピンではデングウイルス 1 型が主流株であったが、2 型、3 型、4 型すべてが活動していたことが明らかになった。これは 2012 年フィリピンのデング熱患者報告数が 178,644 例で死者数が 872 例（死亡率 0.5%）であったことと関係する可能性が示唆される。

A．研究目的

台湾と日本における主たる昆虫媒介性ウイルスは日本脳炎ウイルスとデングウイルスである。輸入症例を含めた患者報告数としては、デング熱が日本脳炎より多いため本年度はデング熱を対象とした。台湾ではデング熱が毎年流行しているが、日本では国内発生がない。そこで、デング熱輸入症例を対象を絞った。デング熱の輸入症例のなかでも、島国を対象にすることによって各島で異なるウイルスによる流行が存在する可能性が

高いと考え、島国であるインドネシア、フィリピンからの輸入症例に関してウイルス遺伝子情報を交換した。

B．研究方法

フィリピン、インドネシアからの発熱患者をウイルス遺伝子検査、デングウイルス非構造抗原（NS1）検査およびデングウイルス IgM 抗体検査（ELISA 法）を実施し、デング熱であることが確認された症例に関して、急性期血清からウイルス

分離を実施した。ウイルス遺伝子解析は、患者血清からのダイレクトシーケンスと分離ウイルスからのシーケンスを実施し、患者血清からのシーケンスが得られた場合はその配列を優先して採用した。遺伝子解析は、E領域をダイレクトシーケンスにより、ABI prism Avant 7100(ABI社)によりプロトコールに従い塩基配列を決定した。決定した塩基配列はそれぞれデングウイルス型別にソフトウェア(MEGA4)により系統樹解析を行った。

C. 研究結果

2012年のフィリピン、インドネシア輸入症例から日本側14株、台湾側5株のデングウイルス遺伝子解析データが得られた(H25年2月22日現在)。インドネシアからはデングウイルス1型; 5株、フィリピンからはデングウイルス1型: 10株(台湾: 5株、日本: 5株)、2型は2株(日本: 2株)、3型は1株(日本: 1株)、4型は1株(日本: 1株)であった。

フィリピンからの輸入症例のデングウイルス1型を台湾および日本のものを含めて系統樹解析したところ、フィリピンの1型ウイルスはいずれも相同性が高かったが、PH1207a(台湾)と12-19(日本)は100%一致した。また最も離れたウイルスの相同性は96%であった(表1)。全体として基準とした分離株に対して変異が認められるウイルス株は、ほぼ同様の部分に変異を示していた。すなわち大きく2種類のウイルス群に大別できるといえる(図1)。またフィリピンから日本への輸入症例はD2感染2例、D3感染1例、D4感染1例が確認された。D2感染の1例はセブ島、D3感染例はダバオ島が渡航先であった。

インドネシアの2型ウイルスは、D2/12-11とD2/12-19が100%一致した(表2)。この2人の患者の渡航先はどちらもBali島であった。インド

ネシア由来の5株は相同性が97%以上と非常に近いウイルスであり、D2主流株は同一ウイルスである可能性が示唆された(表2、図3)。

D. 考察

日本と台湾のデング熱輸入症例報告数は、例年台湾の方がやや多い。これは検疫所が台湾CDCに属し、空港におけるフィーバーサーベイランス体制が厳しいことによると考えられている。フィリピンの2012年のデング熱患者数は、178,644例で死亡数872例(CFR=0.5%)であったことから、流行規模が大きく主流株はD1であったが、さまざまなウイルスが流行していたと考えられる。しかし、フィリピンからの輸入症例からは2型、3型、4型ウイルスも分離されているので、この状況が、多くの2度目の感染を引き起こし死亡数872人という状況を惹起した可能性は高いと考えられる。しかし、ウイルスが強毒化した可能性も考えられるので、日台双方の分離株に関して全ゲノム解析を実施し、比較解析する必要がある。

一方、日本人のインドネシアへの観光は、バリ島が多く、ジャカルタなど比較的渡航先が限定されているため、台湾のデータ整理を待って詳細に解析したい。

D. 結論

日本および台湾のフィリピン、インドネシアからのデング熱輸入症例からの分離ウイルスは、近似なウイルスであることが多く、構造遺伝子部分で100%一致した株も存在した。しかし、近似でないウイルスも分離されている。フィリピン、インドネシア共に島の多い国であることから今後は詳しい旅行歴をデータに組み入れる必要がある。特に2012年のフィリピンの流行では致死率0.5%と高かったこともあり、さらなるウイルス学的解析、検討が必要である。

E . 健康危機情報

なし。

F . 研究発表

論文発表 (英文)

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 R expressing cells. American Society of Tropical Medicine & Hygiene. 2012/Nov/11-15. (Atlanta, 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 . デング熱、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 - 我が国の日本脳炎の現状 - 特に小児において - . 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 . 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病態解析 . 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、中村紳一郎、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 . デング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 . デング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 . デング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)

G . 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1 デングウイルス1型(フィリピン)のホモロジー

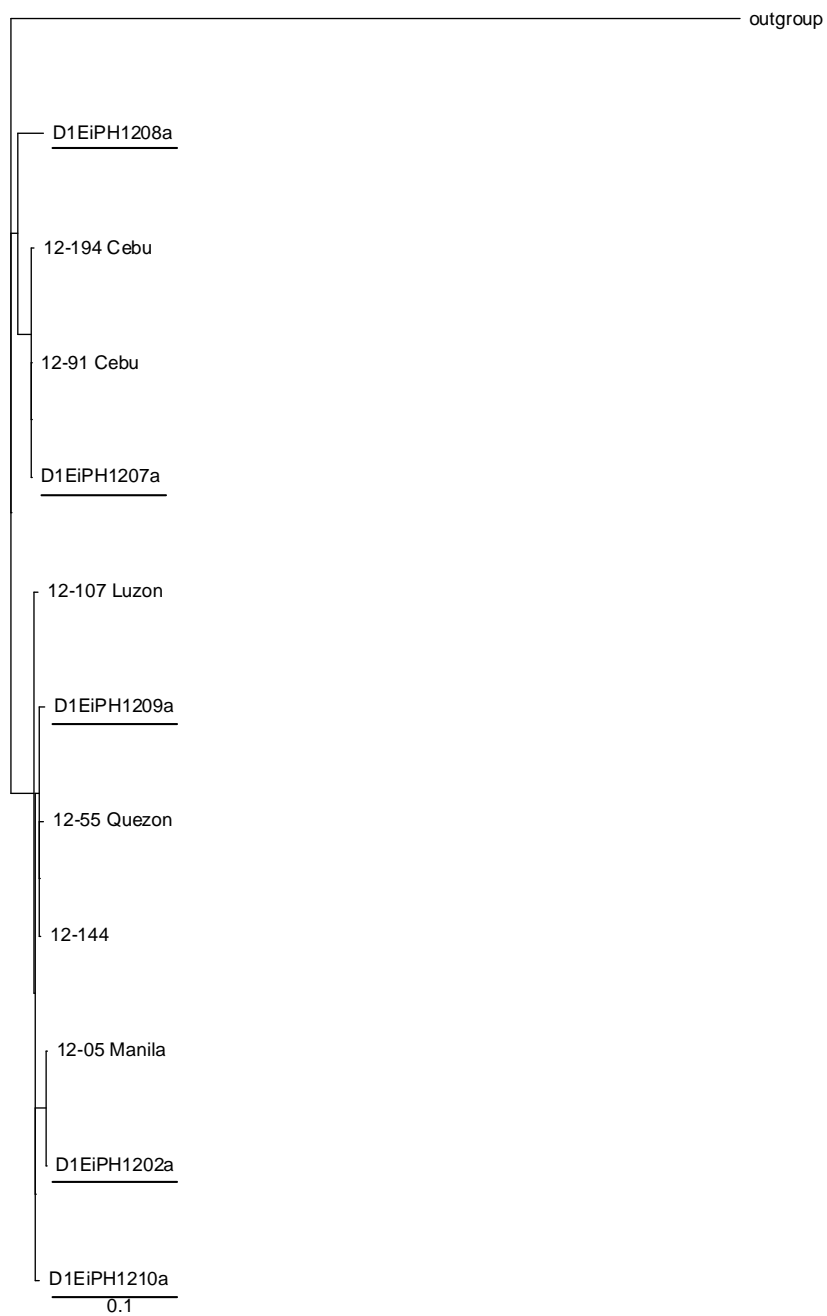
	12-55	12-91	12-107	12-144	12-194	PH1202a	PH1207a	PH1208a	PH1209a	PH1210a
12-05	1471/1485 (99%)	1448/1485 (97%)	1474/1485 (99%)	1473/1485 (99%)	1446/1485 (97%)	1484/1485 (99%)	1448/1485 (97%)	1437/1485 (96%)	1470/1485 (98%)	1474/1485 (99%)
12-55		1449/1485 (97%)	1476/1485 (99%)	1481/1485 (99%)	1447/1485 (97%)	1472/1485 (99%)	1449/1485 (97%)	1441/1485 (97%)	1478/1485 (99%)	1476/1485 (99%)
12-91			1454/1485 (97%)	1451/1485 (97%)	1483/1485 (99%)	1449/1485 (97%)	1485/1485 (100%)	1457/1485 (97%)	1448/1485 (97%)	1452/1485 (97%)
12-107				1478/1485 (99%)	1452/1485 (97%)	1475/1485 (99%)	1454/1485 (97%)	1446/1485 (97%)	1475/1485 (99%)	1479/1485 (99%)
12-144					1449/1485 (97%)	1474/1485 (99%)	1451/1485 (97%)	1441/1485 (97%)	1480/1485 (99%)	1478/1485 (99%)
12-194						1447/1485 (97%)	1483/1485 (99%)	1455/1485 (97%)	1446/1485 (97%)	1450/1485 (97%)
PH1202a							1449/1485 (97%)	1438/1485 (96%)	1471/1485 (99%)	1475/1485 (99%)
PH1207a								1457/1485 (98%)	1448/1485 (97%)	1452/1485 (97%)
PH1208a									1438/1485 (96%)	1442/1485 (97%)
PH1209a										1475/1485 (99%)

表2 デングウイルス2型(インドネシア)のホモロジー

	12-19	12-22	12-26	12-42	12-62
12-11	1485/1485 (100%)	1451/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)
12-19		1451/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)	1450/1485 (97%)
12-22			1484/1485 (99%)	1484/1485 (99%)	1484/1485 (99%)
12-26				1483/1485 (99%)	1483/1485 (99%)
12-42					1483/1485 (99%)



図 2



下線；台湾の分離株、他は日本の分離株

