

Total viral RNA was extracted from all of the specimens by using a commercial kit (QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA) according to manufacturer's instructions and eluted in a final volume of 40 µl of RNase-free water.

#### **Reverse Transcriptase and PCR Amplification of Viral Nucleic Acid**

Thermo RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit was used for cDNA Synthesis. After thawing, mix and briefly centrifuge the components of the kit. Store on ice. Add 8 µ L template RNA for each reaction then incubate 90 min at 37°C. Prepare a master mix of Seeplex RV15 ACE kit according to manufacturer's instructions. The master mix typically contains all the components required for PCR except the template cDNA. Mix the master mix thoroughly, and dispense appropriate volumes into PCR tubes. Add 5 µ L template cDNA to the individual PCR tubes. Program the thermal cycles according to manufacturer's instructions. Start the PCR program while PCR tubes are still on ice. After amplification, proceed with *Detection of Amplified Respiratory Viral* nucleic acid.

#### **Detection of Amplified Respiratory Viral Nucleic Acid**

Analyze the PCR products on the QIAcel Workstation using capillary electrophoresis. The results were determined as according to the position of the band of the PCR products.

### **III. Results:**

We tested 202 clinical respiratory tract samples from outpatients using a multiplex PCR method which can be used for the simultaneous detection of fifteen respiratory viruses. The results showed FluA was detected in 31 patients (15.3% of total samples). Adv was find in 14 patients (6.9% of total samples). RSV B was detected in 12 patients (5.9% of total samples). 135 patients were negative for 15 respiratory viruses tested (Table 1). 8 patients presented dual viral infection (4.0%)(Table2).

**Table1. Identification of the viruses in 202 respiratory tract samples from outpatients**

| <b>Viruses</b> | <b>Number of positive samples</b> |
|----------------|-----------------------------------|
| FluA           | 31                                |
| Adv            | 14                                |

|              |            |
|--------------|------------|
| RSV B        | 12         |
| MPV          | 5          |
| HEV          | 5          |
| HRV          | 3          |
| RSV A        | 2          |
| PIV2         | 1          |
| PIV3         | 1          |
| PIV4         | 1          |
| Co-infection | 8          |
| Negative     | 135        |
| <b>total</b> | <b>202</b> |

**Table2 Identification of the virus in 8 outpatients with co-infection**

| <b>Viruses</b> | <b>Number of positive samples</b> |
|----------------|-----------------------------------|
| RSV B+FluA     | 2                                 |
| Adv+FluA       | 1                                 |
| Adv+HEV        | 1                                 |
| FluA+HEV       | 1                                 |
| FluA+HRV       | 1                                 |
| RSV A+HEV      | 1                                 |
| RSV B+PIV4     | 1                                 |
| <b>total</b>   | <b>8</b>                          |

#### **IV. Discussion:**

Upper respiratory tract infection (URI) represents the most common acute illness evaluated in the outpatient setting. The accurate and rapid analysis of a broad range of viral agents is critical for etiological investigations. Viruses account for most URIs. In this study, we investigated 202 clinical specimens collected from ILI cases, 33.1% samples were identified to be positive one or more viruses. However, these results may underestimate the role of virus infection, because viral loads in throat swabs, as used in this study, are usually lower than those in aspirate or lavage.

Some limitation should be involved into this study. Firstly, the collection of samples could not cover all ages or years since we cannot exclude the possibility of outbreak samples. Furthermore, molecular investigation could miss some mutated pathogens. Additionally, to improve control and prevention for respiratory virus infection, the molecular investigation is far away of enough since novel pathogens is always a

concern in public health. Thirdly, a positive detection for a virus in throat swab by molecular techniques does not necessarily indicate respiratory disease, which is also mentioned in other studies[5].

**V. Reference list (if have):**

1. Mulholland K. Global burden of acute respiratory infections in children: implications for interventions. *Pediatr Pulmonol.* 2003;36:469-474.
2. van Woensel JB, van Aalderen WM, Kimpen JL. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. *BMJ.* 2003;327:36-40.
3. Denny FW Jr. The clinical impact of human respiratory virus infections. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(suppl, pt 2):S4-S12.
4. Taylor, L. et al. (2001). Risk factors for human disease emergence *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 356(1411):983-9.
5. Dubos F, Delebarre M, Martinot A. Predicting the risk of severe infection in children with chemotherapy-induced febrile neutropenia. *Curr Opin Hematol* 2012;19:39-43.

**VI. Publication list for this work:**

Hongtao Sui, Dayan Wang, Yuelong Shu. Development of Multi-Pathogen Detection Techniques for Respiratory Viruses. *Chinese Journal of Virology.* 2013, 9(2):238-244.

## **5. Study on the epidemiological and pathogenic characteristics of inpatients of severe acute respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae* in China**

**Study faculty:** Division for Infectious Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 155 Changbai road, Changping District, Beijing, 102206, China

**Name and official title of PI:** Hong-jie, Yu, MD, MPH, Prof., Deputy Director of Office for Disease Control and Emergency Response, China CDC

### **Summary:**

China CDC initiated a surveillance system targeting on detecting severe acute respiratory infection (SARI) inpatients with *streptococcus pneumoniae* (S.p) in Jingzhou City, Hubei province in 2010. The surveillance result showed low yield of blood cultures of SP (0.5%, 21/4,029). Therefore, we carried out another surveillance program for S.p in Kunming city, Yunnan province in 2013. However, no positive results were found. According to previous surveillance experience and awareness, the wide self-usage of antibiotics might be one important reason for such low culture positive rate, another reason should be that the standard operation procedure of blood draw, timely transfer to lab, and whole blood culture might not followed well. After pilot surveillance in two sites, we realize that whole blood culture might not yield good results at present time in China and propose to conduct more sensitive PCR method to evaluate S.p prevalence although s.p strain could not be obtained.

### **I. Background**

Under the financial support from Japan National Institute of Infectious Disease, China CDC have been conducting a surveillance program in hospitalized patients with severe acute respiratory infection (SARI) caused by *streptococcus pneumoniae* (S.p) for two years in Jingzhou city, Hubei province. The surveillance activities include enrollment and investigation of inpatients matching the SARI case definition, collection of blood and urine, and the whole blood culture and urine antigen for

S.p. The blood culture had always been a big issue for its low yield since the beginning. We organized a boosting training course and supported two lab staff to the national reference labs to receive more systematic training on blood culture. However, no obvious improvements have been seen. Therefore, we tried another site in Kunming city, Yunnan province to find out whether it is possible to conduct whole blood culture in surveillance program in China.

## **II. Purpose:**

1. To understand the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* (S.p) infection among inpatients cases with SARI in sentinel hospitals;
2. To figure out the pathogenic characteristics of S.p strain isolated from whole blood culture of inpatients with SARI.
3. To address the epidemiological and clinical features of inpatients with SARI caused by S.p infection.

## **II. Methods:**

### ***Setting and Patients Enrollment***

The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University was chosen after carefully considering capacities of surveillance and laboratory testing. A national surveillance protocol including patients enrollment, specimens collection and laboratory testing, case report form and information reporting, and related standard operation procedures (SOP) were developed by China CDC.

Patients admitted to the wards or intensive care unit (ICU) of departments of internal medicine, pediatrics or infectious diseases in each of these sentinel hospital were screened by nurses and physicians for ALRI. A patient was defined as having ALRI if they had: (1) at least one of listed manifestation of acute infection: measured fever ( $\geq 38$  °C), abnormal white blood cell (WBC) differential, leukocytosis (a WBC count increased to over 10,000/ $\mu$ L) or leukopenia (a WBC count decreased to less than 4,000/ $\mu$ L), and chill; (2) at least one of listed respiratory tract illness: cough, sputum, shortness of breath, lung auscultation abnormality (rale or wheeze), tachypnea, and

chest pain. Among the ALRI patients, those with a chest radiograph demonstrating punctate, patchy or uniform density shadow were defined as having pneumonia.

### ***Specimen Collection and Testing***

Each week or month, the first 2-5 ALRI patients were enrolled for specimen collection. After hospital admission, physicians obtained verbal consent from eligible ALRI case-patients or their parent/guardians, and then blood were collected. Collected blood samples were sent to Yunnan provincial CDC laboratory to conduct whole blood culture.

### **III. Results: (if necessary, figures and tables will be included)**

During the period from January, 2013 to September, 2013, we have seen that:

1. The total number of hospitalized patients within the surveillance wards was 298.
2. Epidemiological and clinical features:
  - 1) 298 CRFs had been completed.
  - 2) All of the CRFs were from Children cases age  $\leq 14$  years old and the majority (82.9%) were younger than 5 years old. 182 (61.1%) were male.
  - 3) As for body temperature, 121 (40.6%) in children cases were admitted to hospital with fever  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ . Cough was the most common symptom (57.4%).
3. Laboratory testing results:

All of Children cases have been collected blood samples. No samples had been cultured positive for S.p.

### **IV. Discussion:**

It has been well known that *Streptococcus pneumoniae* (S.p) is one of the major pathogens for respiratory infection throughout the world and 5% of all children deaths were attributed to S.p. As far as we know, there is no good data for S.p prevalence in China at community level. China lacks a continuous, high quality S.p surveillance system, which is needed to characterize the burden, distribution, trends, clinical outcomes, and subtypes of S.p among invasive S.p disease (IPD). This is why we initiated S.p surveillance program in Jingzhou.

During two years' operation, we found that in Jingzhou it was hard to improve the yield of bacterial confirmation through blood cultures. Through field evaluation, we realized that in addition to antibiotic usage prior to and during hospitalization, other factors contributing to the low yield included the timing of blood collection in the hospital, the method of blood draw, and the way blood cultures being processed. Although we had made several efforts to strengthen SOP of blood culture in Jingzhou, no big progress had been seen. So, we still decided to select another site in Yunnan province to try S.p surveillance.

As results showed that no positive were found among 298 whole blood samples, we have to reassessed our protocol. We should revise the protocol to call for collection of blood in a well-defined subset of SARI patients in whom bacterial pneumonia is more likely. According to current clinical practice and huge workload of diagnosis and treatment in China, it is hard to change to completely follow the SOPs in a short period. Furthermore, antibiotics overuse will be a long barrier for S.p detection in blood culture. Therefore, we would like to conduct more sensitive PCR test for sera or SCF. Shortage of PCR test is that we can identify its sera subtype but S.p isolate could not be available.

Total 26 S.p strains were isolated in blood culture in Jingzhou and Kunming sites. Too small number made it impossible to represent the real distribution of S.p in invasive pneumococcal diseases. Till now, no advanced laboratory testing, such as genotype, DNA sequencing, has been conducted for these isolates. We hope that we could get more funds to support it to move forward. A good platform and public health awareness in clinical departments have been gradually established. In addition, it provides experiences and lessons for hospital-based surveillance that need to be addressed in future practical implementation.

## プロジェクト 2 : 台湾



厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業  
「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と  
共同研究体制の強化に関する研究（H23-新興-指定-020）」  
平成 25 年度分担報告書

赤痢アメーバに関する研究

研究分担者 津久井 久美子 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官

**研究要旨：**赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 感染により起こるアメーバ症は近年日本においても報告が増加している重要な原虫感染症である。本研究では日本と赤痢アメーバ感染様式が類似している台湾と共同研究を行うことで、東アジアにおけるアメーバ症の分子疫学調査方法の確立と病原性を規定する遺伝子の発見を目指す。

#### A. 研究目的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 感染により発症するアメーバ症は全世界で毎年 10 万人の死者を出す重要な原虫感染症である。飲食物の衛生管理が行き届かない発展途上国での病気と考えられがちであるが、近年日本でも症例が増加している。途上国では赤痢アメーバ嚢子 (シスト) に汚染された飲食物の摂取が原因となる食中毒であるが、日本を含めた先進国では海外渡航者の他、自己の衛生環境を保てない障害者や老人施設での蔓延が重要である。さらに近年問題となっているのは性感染症としてのアメーバ症である。糞口感染の可能性のある男性同性愛者 (man sew with man: MSM) コミュニティーでのリスクの高さは以前から知られており、HIV キャリアーの下痢ではアメーバ症を可能性として考慮することが常識である。さらに近年多様な性サービスを提供

する風俗店に働く女性に赤痢アメーバ感染が増加していると考えられている。詳細な統計データは出ていないものの、2011 年まで 800 例程度で推移していたアメーバ症が 2012 年度では 900 例程度に増加したことは看過できない。

本研究では東アジアに位置し、人種や地理的条件、さらにもに先進国でありリスクグループを同じくする台湾 CDC と共同研究を行い、東アジアの赤痢アメーバ症の疫学調査方法と新たな病原因子の発見を目指す。

#### B. 研究方法

##### B-1. 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF の機能解析

これまで日本国内分離株の比較ゲノムから AIG1 family protein をコードする 3 つの ORF (EHI\_176580, EHI\_176590, EHI\_176700) が非

病原性株で欠損していること、この欠損は台湾由来日病原性株でも有意に欠損していたことを明らかにしてきた。そこでこの遺伝子産物の機能解析を行った。

見出された 30RF のうち、特に最初に見出された EHI\_176590 について解析を行った。以降この遺伝子を AIG1-17 とする。

B-1-1. AIG1-17 強発現株の作成。

*E. histolytica* HM1:c16 株に pEhExHA, pEhExHA-AIG1-17 プラスミドをリポフェクション法により導入し、G418 による薬剤選択を行い、AIG1-17-HA, HA 株を樹立した。

B-1-2. AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、形態を観察した。すると突起 (protrusion) が AIG1-17-HA 株で多く形成されているように観察された。そこで突起の幅 0.8 $\mu$ m 以上、突起の長さ 0.7 $\mu$ m 以上、さらに長さが幅の 1.5 倍以上という条件で各細胞種に付き 60 個の細胞を観察する実験を 3 回行った。

B-1-3. AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を CellTracker Green で染色し、共焦点顕微鏡 (LSM510META, Zeiss) で観察し、その運動の様子を画像データとして取得した。40 倍対物レンズを用い、1.57 秒/フレームの速度で一画像を撮り、5 秒ごとに 10 分、合計 120 フレームの画像としてデータを得た。この画像を ICY (Quantitative Image Analysis Unit, Institut Pasteur) の Active contours と Track Manager Plug In を用いて解析した。

B-1-4. AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株を通常の BIS 培地またはシ

ステインを除去した BIS 培地で培養し、増殖速度を検討した。各細胞 1x10<sup>3</sup>/mL を各培地に調製し、24 時間ごとにトリパンブルー染色にて生細胞のみ計測した。

B-2. 台湾での臨床分離株の確立と解析

台湾 CDC に送られてくる外国人労働者からの便検体は寄生虫調査のために採取されるためアメーバ症の症状がないシストキャリアーサンプルを見出すことが比較的容易である。日本では健康な人物から便検体の供与を受けることや、そこにシストキャリアーを見つけることはほぼ不可能であり、台湾 CDC の赤痢アメーバ検体は非病原性赤痢アメーバ株の研究に必須な材料である。よって台湾 CDC における臨床分離株の確立とその解析を行った。

B-2-1. 台湾での臨床分離株確立

日本からプロトコールの提供と YIMDAH 培地用の試薬 (Yeast Extract) の供与を行い、台湾 CDC での臨床分離株の確立を行った。

B-2-2. 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

2 種類の台湾由来非病原性臨床分離株 (TC1446 株, TC1198 株) について、ハムスターを用いた肝膿瘍形成実験を行い、病原性を検討した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

C-1. 比較ゲノミクスから見出された病原性に関連する ORF の機能解析

C-1-1. AIG1-17 強発現株の作成。

トランスフェクションと薬剤 (G418) 選択により 10 $\mu$ g/mL G418 に耐性の HA 株、AIG1-17-HA 株を確

立した。

C-1-2. AIG1-17 強発現株の形態変化の検討。

AIG17-HA 株には多くの protrusion が観察された (図 1)。

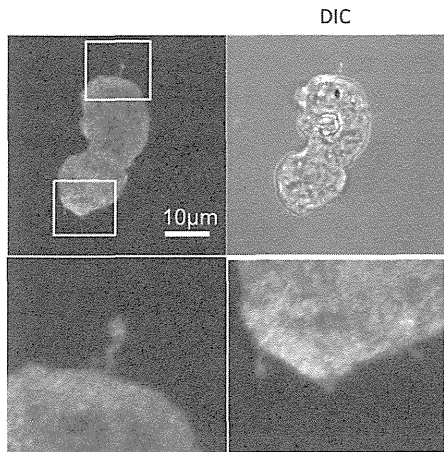


図 1. AIG1-17-HA の protrusion

そこでに研究方法に記述した基準に合った protrusion の数を 60 細胞について 3 回計測した。この結果、HA 株に比べ AIG1-17-HA 株で有意に protrusion の数が増していたことが明らかとなった ( $P < 0.01$ ) (図 2.)。よって AIG1-17-HA 発現は細胞骨格の制御に関与があると考えられた。

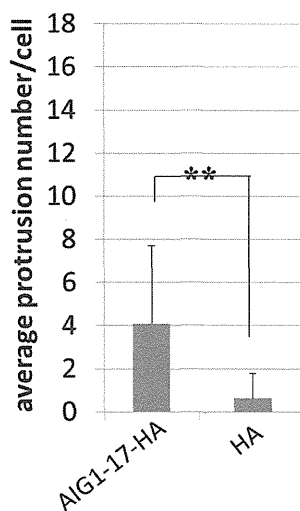


図 2. 一細胞当たりの protrusion 数

C-1-3. AIG1-17 強発現株の運動能力の検討。

AIG1-17-HA 株と HA 株の細胞運動を数値化し、20 細胞程度の観察を 4 回行い比較した。しかし HA, AIG1-17-HA 株どちらも  $0.6 \mu\text{m}/\text{sec}$  程度の移動能力を示し、有意差は見られなかった。よって AIG1-17 は最簿運動への関与は少ないと考えられた。

C-1-4. AIG1-17 強発現株の酸化ストレス条件下での増殖速度の検討。

通常培地とシステイン除去培地での細胞増殖を検討した。下に示すように通常培地で HA 株、AIG1-17-HA 株に差は見られなかったが、システイン除去培地で。時間の培養の後 AIG1-17-HA 発現株で HA 株より増殖が改善する傾向が見られた (図 3)

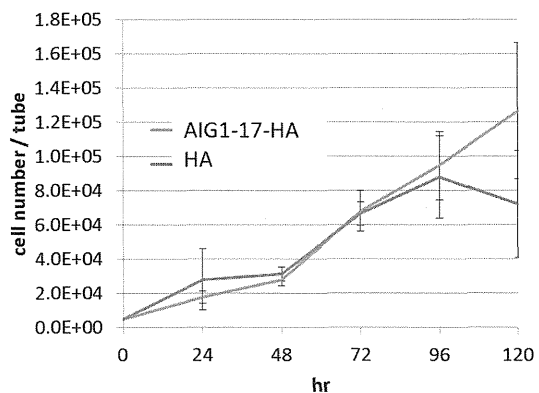
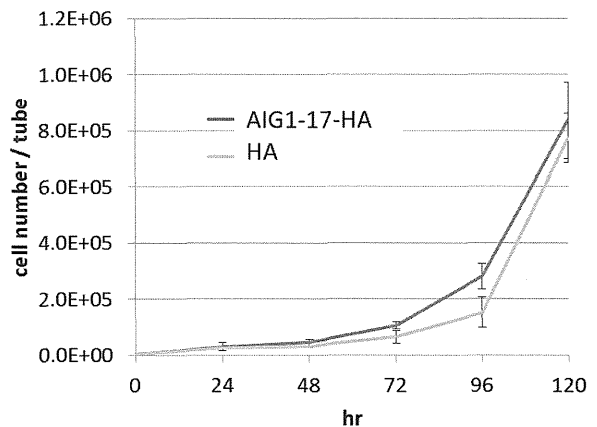


図 3. 通常培地 (上) とシステイン除去培地 (下) での増殖曲線

よって AIG1-17-HA 強発現により酸化ストレス条件下での増殖が改善する可能性が示された。

以上より、AIG1-17 の強発現は細胞運動に関与はないものの、protrusion 形成が促進されること、システイン除去培地での増殖が改善する傾向を示すことが明らかとなった。赤痢アメーバの病原性にはさまざまな表現型が関与することが知られている。AIG1-17 が全ての表現型を強く変化させるわけではないが、ストレスに強い傾向や細胞骨格の活性が強い傾向が協調的に働き、宿主組織内での生存に有利であったり、侵襲性を増す表現系へと向かわせることが考えられた。

## C-2. 台湾での臨床分離株の確立と解析

### C-2-1. 台湾での臨床分離株確立

2013 年 10 月、台湾で分離培養に成功した二株の供与を受けた。TC1146 株と TC1198 株。両者とも *Crithidia fasciculata* (Cf) と共培養されていた。日本での培養も順調に開始され、ゲノム解析に向け、Cf を除いた培養を確立すべく Cf 量を減らした培地での培養を開始している。

### C-2-2. 台湾株の動物モデルにおける病原性の評価。

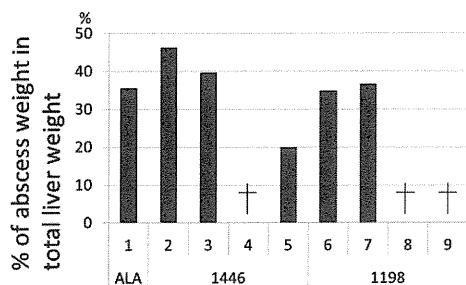


図 4. TC1146 株、TC1198 株の ALA 形成

TC1146 株と TC1189 株をシリアンハムスター肝臓に  $1 \times 10^6$  細胞/匹摂取し、7 日後のアメーバ肝膿瘍 (amoebic liver abscess: ALA) の大きさを評価し

た (図 4)。

陽性コントロールである ALA 株が肝臓の 35% 程度の大きさの膿瘍を形成した一方、二つの台湾株も TC1446 株の一つが 20% 程度であった以外、全ての動物で 35~45% 程度の ALA を形成した。図 4 で十字で示した動物は手術翌日に志望した個体であり、摂取した株の病原性が高かったことを示すと考えられる。

以上より、今回台湾より供与された非病原性株はハムスターに対して ALA 形成能を有していた。これはヒトへの病原性とハムスターへの病原性が異なる、または腸管と肝臓への病原性が異なるという二つの可能性があると考えている。今後 *in vitro* での病原性の評価方法を確立する必要がある。一つはマウスの盲腸へ接種して腸アメーバ症を模した病態を作らせるマウス腸管モデルでの評価、もう一つはまだ確立途中であるが、屠殺されたブタの大腸を用いた *ex-vivo* での評価系があり、これらを用いた検討を考えている。

台湾で無症候性患者からの赤痢アメーバ株が確立できるようになったことは大きな進歩であった。今後ヒトに症状を示さない赤痢アメーバ株の解析を、特に AIG1-17 に注目しながら展開していきたいと考えている。

## D. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表参照

### 2. 学会発表

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in comparative genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi Nozaki, The 10th Japan-Taiwan Symposium on Vaccine Preventable Diseases and Vector-Borne Diseases & Cooperative Project Report, September

12-13, 2013, Tokyo, Japan

Functional analysis of the AIG1 family proteins that were originally identified as virulence-related genes in comparative genomic analysis in *Entamoeba histolytica*. Kumiko Nakada-Tsukui, Emi Sato, Tomoyoshi Nozaki, 16th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim Antimicrobial Drug Resistance in Bacterial and P

arasitic Diseases, February, 9-13, Dhaka, Bangladesh

F. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

分担研究報告書（H25 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、中山絵里、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 2013 年のデング熱輸入症例数は 249 であり、台湾では 260 例であった。台湾中南部では国内流行もあり、デング熱の届け出総数は 851 例であった。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。2013 年の我が国へのフィリピンからの輸入症例は 20 例、インドネシア 40 例であった。そのうちウイルス遺伝子解析が出来たのは、フィリピンが 9 例、インドネシアが 10 例であった。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、4 型流行も発生していたことが明らかになった。これは 2013 年フィリピンのデング熱患者報告数が 166,107 例で死者数が 528 例（死亡率 0.32%）であったことと関係する可能性が示唆される。インドネシアからの 4 型感染輸入症例は日本、台湾ともになくインドネシアでは 4 型による流行は発生していなかったか、大きくなかったと考えられた。

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

2013 年に感染研に検査依頼があったフィリピン、インドネシアからの輸入症例は 21 症例、40 症例であった。そのうちウイルス遺伝子情報が得られたものが、フィリピン 9 株 (1 型 5 株、2 型 1 株、3 型 1 株、4 型 2 株)、インドネシア 10 株 (1 型 7 株、2 型 3 株) であった。台湾からはインドネシアからは 1 型; 12 株、フィリピンからは 1 型: 3 株、2 型はインドネシアから 9 株、フィリピン 2 株、3 型はインドネシアから 8 株、フィリピンから 1 株、4 型はフィリピンから 7 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、フィリピンとインドネシアの 1 型ウイルスはいずれも相同性が高いが、それぞれ国別にグループ分けが可能であった (図 1)。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、2 型ウイルスの流行株も国別に分類可能であった (図 2)。デングウイルス 3 型の流行はインドネシア、デングウイルス 4 型の流行はフィリピンで発生していることが明らかになった (図 3、図 4)

#### 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。今年度の患者報告数は、ほぼ同じ報告数であった。

フィリピンの 2013 年のデング熱患者数は、166,107 例で死亡数 528 例 (致死率 CFR=0.32%) であったことから、流行規模が大きく主流株は 1 型であったが、日本と台湾の輸入症例からも明らかのようにフィリピンでは 4 型が流行しており、4 型による 2 度目の感染が CFR を高めている可能性がある。ただし、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、インドネシア全国の傾向を必ずしも捉えているとは限らないが、2013 年は少なくとも 4 型ウイルスによる流行は発生していないか、大きくはないと考えられる。

#### 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のほとんどは、近似なウイルスであったフィリピンでは 1 型ウイルスによるデング熱流行に加え、4 型ウイルス流行が発生している。インドネシアでは 1 型、2 型、3 型による流行が生じているが、4 型による流行は発生していないか、大きくなかったと考えられた。

#### E. 健康危機情報

なし。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Presence of viral genome in urine and development of hematuria in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Pathogens*, 2,357-363,2013.
  2. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Efficacy of tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. *Lancet*, 381,9872,1094, 2013.
  3. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Kotaki A, Ikeda M, Harada F, Ito M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Detection of dengue virus non-structural protein 1 (NS1) by using ELISA as a useful laboratory diagnostic method for dengue virus infection of international travellers. *Journal of Travel Medicine*, 20,3,185-193,2013.
  4. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Infection-enhancement activity in dengue patients using undiluted serum samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107,51-58,2013.
  5. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Takasaki T. Diagnosis of viral haemorrhagic fevers in travelers returning from West Africa. *Journal of Travel Medicine*, 20(1), 63-64, 2013.
  6. Tochitani K, Shimizu T, Shinohara K, Tsuchido Y, Moi ML, Takasaki T. Ross River virus - Japan ex Australia: (VI). *ProMed*, *promed archive no.* 20130616.1776324, 2013.
2. 学会発表
    - 1) 国際学会
      1. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Application of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in travelers. Fifth Informal Japanese Encephalitis Laboratory Meeting. (Tokyo) November, 2013.
      2. Moi ML, Kurane I, Takasaki T. Development of tools for advancing dengue pathogenesis and vaccine research. Malaysia-Japan Academic Scholar Conference. (Tokyo) November, 2013
      3. Moi ML, Lim CK, Nakayama E, Tajima S, Kotaki A, Ikeda M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Imported cases of chikungunya and Ross River fever in Japan. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013
      4. Lim CK, Takasaki T, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Chua KB, Saijo M, Kurane I. Molecular analysis of Chikungunya virus in Malaysia. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013.
    - 2) 国内学会
      1. 高崎智彦、モイメンリン、網康至、須崎百合子、大松勉、平山隆則、田島茂、林昌宏、中村紳一郎、片貝裕子、吉田友教、明り宏文、白井颯治、北浦一孝、藤井克樹、鈴木隆二、西條政幸、倉根一郎. 第3回マーモセットを用いたデングウイルス感染病態解析 (九州) 2013年12月



2. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T. Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月
  3. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会(神戸) 2013年11月
  4. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する中和活性および感染増強活性の検討. 第20回トガ・ペクチ・フラビウイルス研究会(神戸) 2013年11月
  5. 栃谷健太郎、清水恒広、篠原浩、土戸康弘、高崎智彦、モイメンリン. オーストラリア渡航中に発症した本邦初のロスリバーウイルス感染症 1 例. 第56回日本感染症学会西日本地方学会学術集会(大阪) 2013年11月
  6. Moi ML, Lim CK, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. Towards a safe and effective dengue vaccine: assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers using a novel assay by FcγR-expressing cells. 54th Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine. (Nagasaki) October, 2013.
  7. Takasaki T, Ikeda M, Yagasaki K, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Saito Y, Tajima S, Kurane I, Jee Y. JE as a vaccine preventable disease: laboratory network organized by WHO. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会(熱海, 静岡) May, 2013.
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1 デングウイルス1型の遺伝子系統樹

図2 デングウイルス2型の遺伝子系統樹

図3 デングウイルス3型の遺伝子系統樹

図4 デングウイルス4型の遺伝子系統樹

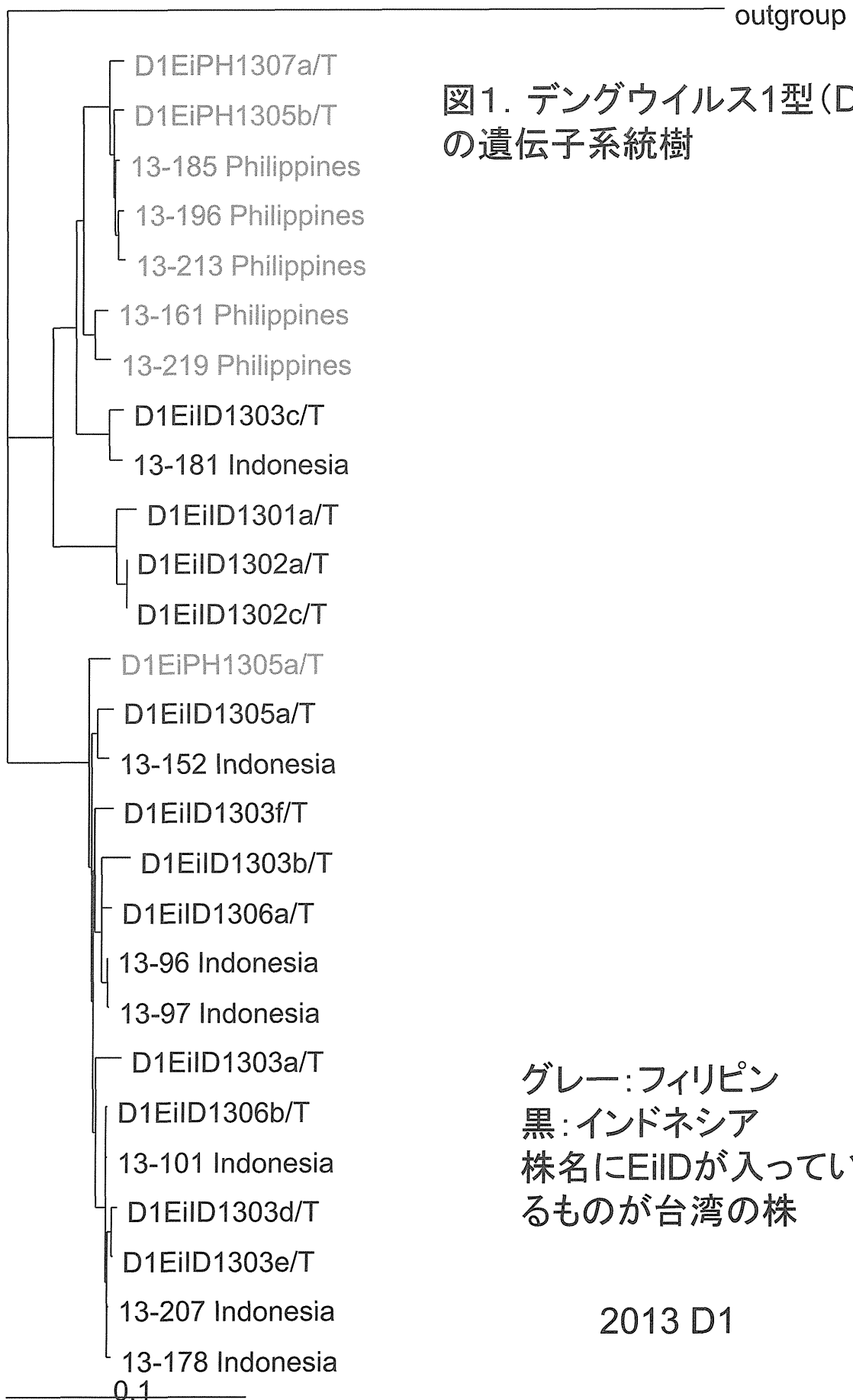


図1. デングウイルス1型(D1)の遺伝子系統樹

グレー: フィリピン  
 黒: インドネシア  
 株名にEiIDが入っているものが台湾の株

2013 D1



図2. デングウイルス2型(D2)の遺伝子系統樹

グレー: フィリピン  
 黒: インドネシア  
 株名にEiIDが入っているものが台湾の株

