

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)
研究分担報告書

病原体及び毒素の管理システムおよび評価に関する総括的な研究(H24-新興-一般-013)
デングウイルスのゲノム解析およびデータベース化に関する研究

研究代表者	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部・部長
研究協力者	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部・室長
	中山絵里	国立感染症研究所ウイルス第一部・研究員
	モイメンリン	長崎大学熱帯医学研究所・准教授
	田島茂	国立感染症研究所ウイルス第一部・主任研究官

研究要旨:2014年8月末,海外渡航歴のない患者がデング熱に感染していることが確認された。その後,代々木公園,新宿中央公園等を感染推定地域とする国内症例が合計162例確認された。日本では2010年以降ほぼ毎年200例を超す輸入症例が報告されており,輸入症例を介して国内にデングウイルスが侵入した可能性が高い。2014年は国内流行が終息するまでに44例の輸入症例が報告された。本研究では国内流行株の由来を明らかにすることを目的とし,国内流行株および2014年のデング熱輸入症例由来ウイルスのエンベロップ蛋白質の塩基配列を決定し,系統学的解析を実施した。その結果,国内流行株はアジアで流行するウイルスと近縁で,異なる2株のウイルスが本流行に関与していたことが明らかとなった。

A. 研究目的

2014年のデング熱の国内流行では合計162例が報告された。感染推定地域は最初の症例が報告された代々木公園に留まらず,新宿中央公園,上野公園,千葉県,静岡県等に拡大した。感染推定地域の異なる症例が同一のウイルスによるものか,複数のウイルス株が関与しているかどうかを明らかにすることを目的に本

実験を行った。

また,日本では2010年以降ほぼ毎年200例以上の輸入症例が報告されていることから,輸入症例を介してデングウイルスが国内に侵入した可能性が考えられた。デングウイルスは血清型1~4型が存在する。国内流行株と同じ血清型1型に属す輸入症例由来ウイルスと国内流行株の関係を明らかとすることを目的とした。

B. 研究方法

患者血清由来ウイルスのエンベロープの塩基配列をダイレクトシーケンスまたは次世代シーケンサーを用いて決定した。ダイレクトシーケンス実施のため、患者血清から High Pure Viral RNA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて RNA を抽出し、ランダムプライマーおよび Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA)を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, MA, USA)およびプライマーセット, den1s792 (GAGACTTGGGCTTTGCGACAC), den1c2919 (AGTCACGCAATTTCAACCATA)を用いて PCR を行い、増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンスで決定した。次世代シーケンスでは、Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Texas, USA)を用いて患者血清から RNA を抽出し、ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre, WI, USA)を用いて RNA-seq ライブラリーを作成した。作成したライブラリーは Illumina MiSeq を用いて解析した。決定したエンベロープ蛋白質の塩基配列を基に系統学的解析を行った。

(倫理面からの配慮について)

行政検査依頼を通じて分離された Dengue ウィルス等を用いて解析した。

C. 研究結果

確定診断を行った国内症例 42 例のうち、感染推定地域の異なる症例を中心に 11 例の患者血

清中のウイルス遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を実施した。国内症例第一例目 (14-100J) 由来のエンベロープの塩基配列 (GenBank: LC002828) は、2013 年の中国の分離株および 2010 年のインドネシアの分離株と近縁であった。また、11 症例中 1 症例 (14-181J) を除き、14-100J 由来のエンベロープの塩基配列と 100% 一致した。一方、14-100J と 14-181J 由来のエンベロープの塩基配列の相同性は 98.4% で、1485 塩基中 24 塩基が異なっていた。14-181J は東京の訪問歴がない静岡県在住の患者であった。

Dengue ウィルスには血清型 1~4 型が存在するが、輸入症例 44 例のうち 20 例が国内流行を起こした血清型と同じ 1 型のウイルスによるものであった。血清型 1 型による輸入症例 20 例のうち、9 症例でエンベロープの塩基配列を決定し、系統解析を実施した (図 1)。このうち 8 月末にシンガポールで感染した患者 (14-144) 由来の配列 (GenBank: LC012534) が国内流行株と近縁で、エンベロープの塩基配列の相同性は 99.9% (1483/1485 塩基) であった。

D. 考察

解析した国内症例 11 例のうち、10 例は第一例目 (14-100J) の塩基配列と 100% 一致したことから、同一のウイルスによるものと考えられた。一方、14-181J 由来のウイルスは 14-100J と異なるウイルス株であり、2014 年の国内流行は少なくとも 2 種類の異なるウイルス株によって引き起こされていたことが明らかとなった。

輸入症例の患者 14-144 は 8 月 20~24 日にシンガポールを訪問し、21 日にシンガポールで

蚊に刺されている。帰国後、国内の感染推定地域の訪問歴はなく、27日に発症した。14-144由来のウイルスは国内株と近縁であるが、最初の国内症例は8月20日に発症していることから、14-144が国内流行の引き金となった可能性は低い。

E. 結論

今回、2例の輸入症例から160例を超す国内流行が起きた。2010年以降、ほぼ毎年200例以上の輸入症例が報告されていることから、2015年以降も輸入症例を発端にデング熱が国内で流行する可能性がある。また、東南アジアを初めとしたデング熱流行地域から毎年8万人以上の旅行者が日本を訪れており、自国でデングウイルスに感染した外国人旅行者が日本へ入国後にデング熱を発症した事例も報告されている。今や日本へのデングウイルスそのものの侵入を防ぐことは不可能である。デングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが活発に活動する夏季期間には、日本においてもデング熱流行のリスクがあることを認識しなくてはならない。

F. 健康危険情報

デング熱非流行国である日本においても、デング熱やチクングニア熱のような蚊媒介性ウイルス感染症が流行することが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Arima Y, Matsui T, Shimada T, Ishikane M, Kawabata K, Sunagawa T, Kinoshita H, Takasaki T, Tsuda Y, Sawabe K, Oishi K. Ongoing local transmission of dengue in Japan, August to September 2014. *Western Pac Surveill Response J.* 28;5(4):27-9. 2014.
- 2) Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A, Ota M, Shinohara K, Kobayashi T, Yamamoto K, Fujiya Y, Mawatari M, Sato T, Kunimatsu J, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Autochthonous dengue fever, Tokyo, Japan, 2014. *Emerg Infect Dis.* 21(3):517-20. 2015.

2. 学会発表

- 1) 高崎智彦. デング熱国内流行 2014～媒介蚊とデングウイルス～. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 神奈川, (2014. 11)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。

1. 特許取得

特記事項なし。

2. 実用新案登録

特記事項なし。

3. その他

特記事項なし。

図 1. エンベロープ蛋白質の塩基配列に基づいたデングウイルス血清型 1 型の系統樹

