

東京都におけるデングウイルス検出状況

田部井 由紀子*, 吉田 靖子*, 長谷川 道弥*, 長島 真美*
平田 一郎*, 諸角 聖**

Surveillance of Dengue Virus in Tokyo

Yukiko Tabei*, Yasuko Yoshida*, Michiya Hasegawa*, Mami Nagashima*
Ichiro Hirata* and Satoshi Morozumi**

Keywords: デング熱, dengue fever, デングウイルス, dengue virus, 酵素抗体法, ELISA, RT-PCR法, reverse transcription polymerase chain reaction, 中和抗体, Neutralizing antibody

緒言

デング熱は、デングウイルス（以下DEV）を保有した蚊（ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ）によって媒介される急性の熱性疾患である。一般に症状は軽く予後は良好であるが、稀に出血傾向、ショック症状を伴うデング出血熱やデングショック症候群を起こし重症疾患になることがある。

近年、デング熱の流行地域は広く拡大し、熱帯、亜熱帯に位置するアジア、アフリカ、アメリカ大陸、南太平洋地域の100カ国以上で流行している。また、デング熱患者数は劇的に増加しており、1999年のWHOの報告¹⁾では患者数は年間120万人以上にも達し、デング熱は世界の公衆衛生上の重要な問題の1つとなっている^{1,2)}。

日本におけるデング熱の流行は、1940年代に関西以西の一部地域でみられたが、その後は国内感染によるデング熱の発生や流行はみられなかった。しかし近年、海外旅行者の増加に伴って、現地でDEVに感染して日本で発病する、いわゆる輸入感染例が多くなってきている。

平成11年4月に施行された「感染症新法」では、デング熱は「四類感染症・全数届出疾患」に定められ、デング熱を診断した医師は、診断した日から7日以内に当該保健所に届け出ることが義務となったことから、感染症発生動向調査においても、デング熱疑いの検査依頼がみられるようになった。当研究科では、平成11年度よりDEVの検査を開始し、平成12年度はデング熱疑いの患者18名の検査を実施したので、それらの検査結果を報告する。

材料と方法

1. 検査材料

検査材料は、平成12年度に都内病院から搬入されたデング熱疑いの患者18名から採取された血清である。

2. 抗体検査

DEV抗体検査は、スクリーニング試験としてイムノクロマト法によるRapid Immunochromatographic Test for Dengue feverキット（PanBio社）を用いてIgMおよびIgG抗体の検出を行った。また、確認試験としてELISA法によるDengue IgM capture ELISAキット（PanBio社）を用いてIgM抗体の検出を行った。

3. 病原体検査

1) RT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出

RNA抽出は、患者血清50 μ LからセパジーンRVR（三光純薬）を用いて行い、滅菌蒸留水50 μ Lで再浮遊して供試RNAとした³⁾。

RCR法は、既報^{4,5)}に準じて行った。すなわち、4本のPCRチューブに供試RNAを10 μ Lずつ分注し、DEV1および3型はE蛋白からNS1領域のプライマー、DEV2型はE蛋白領域のプライマー、DEV4型はNS2AからNS2B領域のプライマーをそれぞれに加え、53℃、10分間の逆転写反応後、92℃、1分間、53℃、1分間、72℃、1分間の増幅反応を40回行った。増幅産物は、0.01%エチジウムブロマイドを加えた2%アガロースゲルで電気泳動し、それぞれの血清型に特異的なバンドの有無を確認した。

2) ウイルス分離試験

組織培養ボトル（75cm²、IWAKI製）で単層培養したC6/36細胞に、2%牛胎児血清および1%非必須アミノ酸を加えたイーグルMEM培地で10倍希釈した患者血清100 μ Lを接種し、1時間吸着後、28℃で7日間培養した。培養上清5 μ LからRNAを抽出してRT-PCR法を行い、特異的なバンドの有無によってウイルス分離試験の判定および血清型別の同定を行った⁶⁾。

4. 中和抗体測定によるDEV血清型別

患者血清100 μ LをPBS(-)で10倍希釈し、56℃で30分間

* 東京都立衛生研究所微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

** 微生物部

非働化した。これを1%牛胎児血清を加えたイーグルMEM培地で4倍希釈(40倍希釈)し、さらに2段階希釈(80倍から10,240倍)して希釈患者血清とした。100pfu/100 μ Lに調製したDEV1から3型(1型:Hawaii株, 2型:New Guinea C株, 3型:H-87株)および50 pfu/100 μ Lに調製したDEV4型(H-241株)と希釈患者血清を等量混合し、37 $^{\circ}$ Cで1時間、中和反応を行った。次に、 1×10^5 個/mLのVero細胞浮遊液1.5 mLを12穴平底プレートに播き、5%CO₂存在下で35 $^{\circ}$ C, 2日間単層培養したものに中和反応後の混合液200 μ Lを接種し、37 $^{\circ}$ Cで1時間吸着した。吸着後、1%メチルセルロースおよび1%牛胎児血清を加えたイーグルMEM培地2 mLを重層した。これを5%CO₂存在下で35 $^{\circ}$ C, 7日間培養後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定、メチレンブルー染色を行い、ブラック数を数えた。ウイルスコントロールは1%牛胎児血清を加えたイーグルMEM培地と調製したDEV1から4型を等量混合してVero細胞に接種し、患者血清と同様に培養後、ブラック数を数えた。ウイルスコントロールのブラック数と

比べて、50%以上の抑制を示す血清希釈倍数を中和抗体価とした。中和抗体価による感染DEV血清型別の判定は、得られた中和抗体価が最も高く、かつ他の血清型の中和抗体価よりも4倍以上高い価を示したものを陽性とした。

結 果

1. 抗体検査

デング熱疑いの患者18名の血清を対象に実施したDEV抗体検査の結果を表1に示した。イムノクロマト法によるスクリーニングテストでは、患者No.1(6病日血清)、患者No.6(10病日血清)、患者No.7(9病日血清)、患者No.10(11病日血清)、患者No.11(7および9病日血清)、患者No.17(16病日血清)の計6名からIgMまたはIgG抗体が検出された。ELISA法による確認検査によっても、この6名からはIgM抗体が検出され、デング熱と診断された。

抗体検査によってデング熱と診断された患者6名の海外渡航歴および臨床症状は表1に示すように、スリランカ、

表1. デングウイルス検査成績

患者 No.	年齢	性別	血清 採取日	検 査 結 果					海外渡航歴	備 考 主要症状
				抗体検査			病原体検査			
				イムノクロマト法 IgM	ELISA法 IgG	PCR法 IgM	ウイルス 分離			
1	22	男	6病日	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	スリランカ・インド	発熱(39 $^{\circ}$ C), 発疹, 関節痛, 筋肉痛, 肝脾腫, 上気道炎
2	31	男	8病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	中国	発熱(40.5 $^{\circ}$ C), 筋肉痛, 発疹
3	31	女	47病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	インドネシア	発熱(39.5 $^{\circ}$ C), 筋肉痛, 関節痛
4	20	女	10病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	メキシコ	発熱(38.5 $^{\circ}$ C), 発疹
5	20	女	不明	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	メキシコ	発熱(38.5 $^{\circ}$ C), 発疹
6	43	男	10病日	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	フィリピン	発熱(40 $^{\circ}$ C) 発疹, 出血傾向
7	24	女	4病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	フィリピン	発熱(39 $^{\circ}$ C), 発疹, 関節痛, 筋肉痛
			9病日	(+)	(\pm)	(+)	(-)	(-)		
8	16	女	10病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	マレーシア	発熱(39 $^{\circ}$ C), 発疹, 関節痛, 筋肉痛
9	40	女	6病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	マレーシア	発熱(39 $^{\circ}$ C), 発疹, 関節痛, 筋肉痛
10	52	男	11病日	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	インド	発熱(39 $^{\circ}$ C), 発疹, 関節痛, 筋肉痛, 肝機能障害
11	33	女	7病日	(\pm)	(+)	(+)	(-)	(-)	インドネシア	発熱(40 $^{\circ}$ C) 関節痛, 発疹, 筋肉痛, 出血傾向, 脾腫, 肝機能障害
			9病日	(\pm)	(+)	(+)	(-)	(-)		
12	32	男	4病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	インドネシア	発熱(39 $^{\circ}$ C), 関節痛, 筋肉痛, 肝機能障害
13	38	女	7病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	マダガスカル	発熱(39.0 $^{\circ}$ C), 発疹
14	26	男	1病日	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	インドネシア	発熱(39.0 $^{\circ}$ C), 発疹
15	32	男	4病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	インドネシア	発熱(40 $^{\circ}$ C), 筋肉痛, 肝機能障害
16	22	男	5病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	タイ	発熱, 関節痛
17	49	男	3病日	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	インドネシア	発熱(39.6 $^{\circ}$ C), 発疹
			16病日	(+)	(\pm)	(+)	(-)	(-)		
18	27	男	1病日	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	タイ, インドネシア	発熱(38.5 $^{\circ}$ C), リンパ節腫脹, 肝機能障害

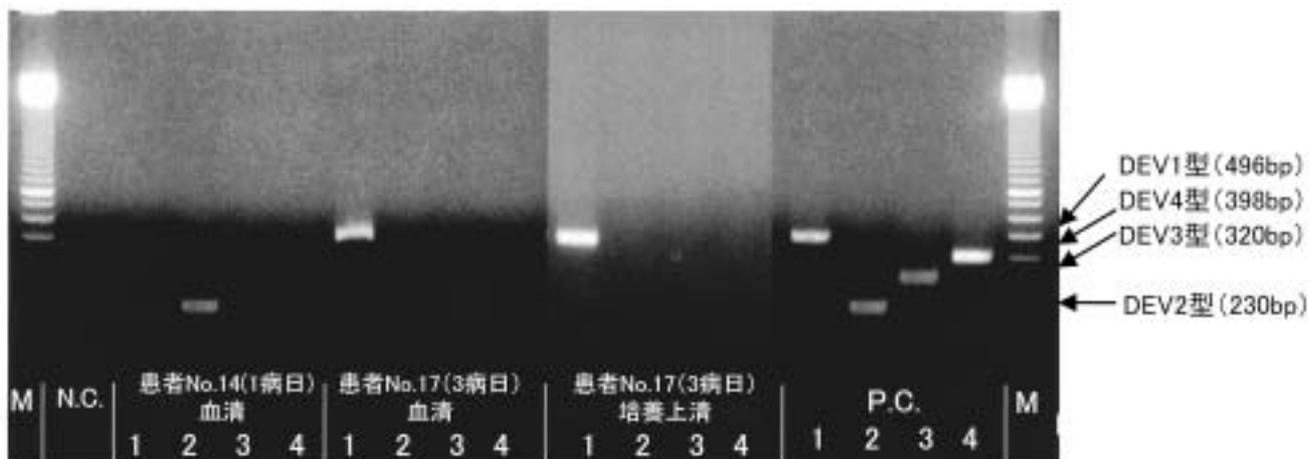


図1. PCR法によるDEV遺伝子の検出成績

M: マーカー, N.C: 陰性コントロール,

P.C.: 陽性コントロール,

1: DEV1型, 2: DEV2型, 3: DEV3型, 4: DEV4型

インド, フィリピン, インドネシア等への海外渡航歴があり, 臨床症状は, 40 近い発熱と発疹が6名全員に共通していた。その他, 関節痛, 筋肉痛および肝機能障害を呈する症例も多くみられた。

2. 病原体検査

デング熱疑いの患者18名における病原体検査成績を表1および図1に示した。

PCR法によるDEV遺伝子検査では, 18名のうち患者No.14(1病日血清)および患者No.17(3病日血清)の2名からDEV遺伝子が検出された(抗体検査は共に陰性)。その血清型は前者がDEV2型, 後者がDEV1型であった(図1)。なお, 患者No.17(3病日血清)からはウイルス分離試験でもDEVが分離され, PCR法で血清型を確認したところDEV1型であった(図1)。以上の病原体検査の結果, 抗体検査では陰性であった患者No.14が新たにデング熱と診断された。なお, 患者No.17は16病日血清の抗体検査でもデング熱と診断された。

3. 中和抗体測定によるウイルス血清型別

中和抗体を測定することによりウイルスの血清型別が判定できるか否かを, 抗体検査のみでデング熱と診断された患者5名(No.1, 6, 7, 10, 11)の血清を用いて検討した。その結果を表2に示した。

患者No.1の中和抗体価は, DEV1型で80倍, DEV2型で1,280倍, DEV3型で40倍以下, DEV4型で40倍を示した。最高値を示したDEV2型の中和抗体価が, DEV1型より16倍高い価を示したことにより, 患者No.1はDEV2型感染と判定した。同様に, 患者No.10は, DEV1型で2,560倍, DEV2型で640倍, DEV3型で320倍, DEV4型で640倍の中和抗体価を示した。DEV1型の中和抗体価がDEV2型および4型より4倍高い抗体価を示したことで, 患者No.10はDEV1型感染と判定した。また, 患者No.7は, 4病日の血清では全ての血清型で40倍以下の中和抗体価であったが, 9病日の血清では, DEV1型で1,280倍, DEV2型および

DEV3型で80倍, DEV4型で40倍の中和抗体価を示した。DEV1型の中和抗体価がDEV2型および3型より16倍高い抗体価を示したことで, 患者No.7はDEV1型感染と判定した。患者No.6は, 全ての血清型で中和抗体価が40倍またはそれ以下であったため, 血清型別は判定不能であった。逆に患者No.11は, 全ての血清型で640倍以上の高い中和抗体価を示したが, 最高値を示した血清型が他の血清型と4倍以上の差を示さなかったために, 血清型別は判定不能であった。

考 察

デング熱は, DEV感染3~7日後に突然の高熱によって発病し, 頭痛, 眼窩痛, 筋肉痛および関節痛を伴うことが多く, 発病3, 4日後には発疹が出現する。しかしながら, このような臨床症状はデング熱以外のウイルス性熱性疾患でもみられる症状であり, 臨床症状だけでデング熱と診断することは困難であるといわれている。今回, 感染症発生動向調査で当研究科に検査依頼のあったデング熱疑いの患者18名は, いずれの患者も発病前にデング熱流行地である東南アジア等への渡航歴があり, 臨床症状も前述の症状を呈していた。これらの患者血清についてDEV検査をした結果, 抗体検査および病原体検査の両法でDEV感染が確認された患者が1名, 抗体検査のみで確認された患者が5名, 病原体検査のみで確認された患者が1名の計7名であった。このことから, デング熱の診断には臨床症状および発病前の海外渡航歴の有無に加えて, DEV抗体検査および病原体検査を実施することが最も重要であることがわかった。

今回, DEVに対するIgM抗体検査においてDEVの感染が確認された患者6名の血清は, 全て6病日以降16病日以内に採血されたものであった。これに対し, 病原体検査でDEVの感染が確認された患者2名の血清は, 1病日と3病日の発病初期に採血されたものであった。したがって,

表2. 中和抗体測定による感染デングウイルス血清型別

患者 No.	血清 採取日	中和抗体価				血清型
		DEV1	DEV2	DEV3	DEV4	
1	6病日	80	1280	<40	40	2型
6	10病日	<40	<40	40	<40	不明
7	4病日	<40	<40	<40	<40	1型
	9病日	1280	80	80	40	
10	11病日	2560	640	320	640	1型
11	7病日	1280	2560	2560	640	不明
	9病日	1280	5120	2560	640	

DEV感染の有無を正確に診断するには、血清が発病何日目に採取されたのか調べて、採取時期に適した検査方法（抗体検査または病原体検査）を選択することが大切であると思われた。

DEVには4つの血清型があり、感染後に得られる免疫は同じ血清型のDEVにのみ感染防御する。したがって、一度デング熱に罹患しても、異なる血清型のDEVには感染する可能性がある。また、異なる血清型のDEVに再感染することによって、デング出血熱やデングショック症候群に進行し、特に子供では致命率が40～50%を示す程に重症化するという報告⁸⁾もあり、DEV感染の有無を確認するとともに、DEV血清型を検査することも重要となってきた。これまでDEVの血清型別は、病原体検査でDEVが検出されたものでしか実施できなかった。そこで我々は、病原体のDEVが検出されなくとも、患者血清中の中和抗体を測定することによって、DEVの血清型別ができるか否か、その可能性を検討した。今回は、抗体検査のみでDEV感染が診断された5名の血清を対象に、各血清型のDEVに対する中和抗体価を測定した結果、5名のうち3名については、感染しているDEVの血清型を明らかにすることができた。また、全ての血清型に対して640倍以上と高い中和抗体価を示した患者No.11については、過去にDEV感染の既往歴があり、今回の感染によって抗体のとも上がり現象が起き、全ての血清型に対する中和抗体価が高い値になったと推測された。しかし、この患者も7病日と9病日の間でDEV2型にのみ2倍の抗体上昇が見られたことから、今回の感染はDEV2型によるものと推測された。このように、病日を追って中和抗体価を測定していくことにより、ある程度は血清型が推測できることも明らかとなった。したがって、中和抗体測定は、感染DEV血清型を判定する方法として有用であることが確認された。

1940年代に起こった国内デング熱の流行は、東南アジアから軍用船で帰国したデング熱患者によって国内にもたら

され、国内に生育する媒介蚊の1つのヒトスジシマカによって流行したとみられている。現在、国内にはDEVは常在していないため国内感染例はみられないが、海外渡航歴のある不明熱患者の検査を行ったところ、1/3がデング熱によるものだったという報告もあり⁷⁾、実際の国内デング熱患者数は報告されている症例数よりも多いと推定されている。一方、地球の温暖化に伴うデング熱流行地域の拡大、流行地域への海外旅行者の増大等、我々がDEVに感染する機会も多くなっている。また、国内にはDEVを媒介するヒトスジシマカが存在しており、DEV国内感染の可能性が全くないとは言いきれない状況下にある。今後も、迅速かつ正確なDEVの検査を行ってデング熱患者の発生を監視するとともに、発生予防のために関連各機関へ正確な検査情報を提供していく必要がある。

文 献

- 1) WHO: *Strengthening Implementation of the Global Strategy for Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever Prevention and Control, 1999*
- 2) Kurane, I., Takasaki, T., Yamada, K.: *Emerg. Infect. Dis.*, **6**(6), 569-571, 2000
- 3) 田部井由紀子, 貞升健志, 吉田靖子, 他: 東京衛研年報, **49**, 17-22, 1998
- 4) Morita, K., Tanaka, M., Igarashi, A.: *J. Clin. Microbiol.*, **29**, 2107-2110, 1991
- 5) Morita, K., Maemoto, T., Honda, S., et al.: *J. Med. Virol.*, **44**, 54-58, 1994
- 6) 木村朝昭, 弓指孝博, 奥野良信: 臨床とウイルス, **27**(4), 318-325, 1998
- 7) 矢部貞雄, 中山幹男, 山田堅一郎, 他: 感染症学雑誌, **70**(11), 1160-1169, 1996
- 8) Kliks, S., Nimmannitya, S., Nisalak, A., et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **38**, 411-419, 1988