

東京都内で検出されたデングウイルスの遺伝子解析結果 (2015年度～2022年度)

岡田 若葉^a, 原田 幸子^a, 糟谷 文^a, 熊谷 遼太^a, 天野 有紗^a,
森 功次^b, 長谷川 道弥^a, 三宅 啓文^c, 長島 真美^a, 貞升 健志^c

東京都では、2014年のデングウイルス (DENV) 国内感染例の発生以後、詳細な遺伝子解析検査の体制を整え、デングウイルス遺伝子解析の結果を集積している。2015年4月から2023年3月までに、東京都の積極的疫学調査事業等でデング熱疑いまたはデング熱確定例として搬入された患者検体について、検出状況および遺伝子解析結果をまとめた。476検体中220検体からデングウイルスを検出し、夏季に増加する傾向が見られた。また、血清型の内訳はDENV-2型、1型、3型、4型の順に多く、血清型別に分子系統樹解析を行ったところ、感染地域別に特徴的なクラスターが形成され、輸入症例の感染地域の推定にも一定の有用性があることが示唆された。今後もデータの蓄積を継続することで、国内感染発生の際には早期に探知することや、関連患者の調査やDENV感染蚊の駆除に活用し、迅速に流行を収束させることに貢献できるものと考えられる。

キーワード : デング熱, デングウイルス, 血清型別, 遺伝子型別, 分子系統樹解析

はじめに

デング熱は、ネッタイシマカやヒトスジシマカによって媒介されるデングウイルス (DENV) の急性感染症で、感染症法上、四類感染症に指定される。DENVに感染した人の半数以上が無症状であると考えられているが¹⁾、デング熱を発症すると急激な発熱および発疹等を呈し、重篤な場合には出血傾向を伴うデング出血熱となる場合もある。現在、デング熱はアジアや中南米等の熱帯・亜熱帯地域で広く流行しており、年間およそ1億人のデング熱患者が発生している²⁾。

日本国内においては、海外渡航先でDENVに感染し帰国後に発症する輸入症例が近年増加傾向にあり、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の影響を受ける以前の2019年まで、年間200～400例前後報告されていた³⁾。国内感染例については、2014年に東京都内の公園を中心とした集団感染がおおよそ70年ぶりに発生し、全国で162名 (うち都内108名) の患者と、当該公園周辺でDENV感染蚊が確認された⁴⁾。さらに2019年には、京都・奈良で感染したと推定される3名の事例⁵⁾と、沖縄での感染が疑われる1名の事例⁶⁾が報告された。

DENVはフラビウイルス科に属し、約11,000塩基から成るRNAウイルスで、1～4型の4つの血清型に型別される (それぞれDENV-1～DENV-4)。各血清型の中でもさらに細分化した遺伝子型に分類が可能であることから、血清型ごとのDENV系統解析を行うことで、輸入症例の感染地域との関連性を推定できる場合がある。また国内感染例においては、2014年の事例がDENV-1によるもので、DENV遺伝子 (エンベロープ (E) 領域) の分子系統樹解

析で患者と蚊に由来するDENVが同一のクラスターを形成した⁶⁾。このように、現在、系統解析は感染経路を推定するための有用な分析手法となっていることから、DENVの遺伝子解析結果の集積が重要である。

2023年に入り、デング熱流行国からは例年より早期の流行発生やDENV感染蚊の急増などが報告されており、世界各国が警戒を強めている^{7,8)}。今後、COVID-19の収束に伴い海外渡航の活発化が見込まれており、わが国でのデング熱輸入症例の増加や、国内感染例の発生を想定し、迅速に解析可能な検査体制を備える必要がある。

そこで今回、2015年度～2022年度の8年間に都内で検出されたDENVの血清型別結果および分子系統樹解析結果についてまとめたので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

感染症法に基づく積極的疫学調査事業および都内保健所からの依頼により、都内医療機関からデングウイルス感染疑いまたは確定例として2015年4月より2023年3月までの期間に搬入された、患者血液および尿476検体 (2015年度 : 111, 2016年度 : 130, 2017年度 : 74, 2018年度 : 53, 2019年度 : 83, 2020年度 : 5, 2021年度 : 2, 2022年度 : 18) を用いた。

2. 検査方法

1) リアルタイム RT-PCR 法による DENV 血清型別

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて上記材料 140 μL から RNA を抽出した後、国立感染症研究所のデ

^a 東京都健康安全研究センター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

^b 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

表 1. デングウイルス E 遺伝子増幅用およびシーケンス用プライマー

ターゲット	プライマー名	配列 (5'-3')	出典
DENV-1 E遺伝子	Den1-858s	ACA TCC ATY ACC CAG AAA GG	文献10
	D1Env641c	ARA AAC CAT TGT TTG TGG AC	
	D1Env491s	ATA ACA CCT CAA GCT CCY AC	
	D1Env1058c	GTT ATC AAT CTC CCA TTC TG	
	D1Env934s	GTG GCT GAC ACC CAG CAT G	
	Den1-2425c	ATT TGA GTT CTC TGC CCT TCC	
DENV-2 E遺伝子	Den2-845s	ATG GCM GCA ATC CTG GCA TA	文献10, 一部改変
	Den2-1518c	TTG AAG TCG AGG CCY GTT CT	
	Den2-1432s	CCA CAG AGY TCC ATC ACA GA	
	Den2-2045c	TCT GCT TCT ATG TTG ACT GG	
	Den2-1874s	GCA GAA ACA CAA CAT GGA AC	
DENV-3 E遺伝子	Den3-846s	CCC TAT TTC TTG CCC ATT ACA	文献10
	Den3-1459c	TCT AGC CCG AGG GTT CCA TAT	
	Den3-1381s	CCA GGT GGG AAA TGA AAC GCA	
	Den3-1927c	TCC GTG GAG AAA GGA ATC TTG	
	Den3-1725s	GAG CTA CAG AGA TCC AAA CCT	
	Den3-2422c	CCT TTC CAG TTT ATG ACA CAC	
DENV-4 E遺伝子	Den4-821s	ACT CAG AAA CCC AGG ATT CGC	本報
	Den4-1380c	CAT TTC CTA CWG CAT GGG T	
	Den4-1272s	GGA GTT GTG ACA TGT GCG AAG	
	Den4-1871c	CCA TGC TGT GTT TCT GCC ATC	
	Den4-1823s	GGG AAT GTC ATA CAC GAT GTG	
	Den4-2457c	CCG CTT CCA CAC TTC AAT TC	

ングウイルス感染症診断マニュアル⁹⁾に準拠し、試薬には QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて DENV-1 ~4 を検出するリアルタイム RT-PCR 法を行った。

2) RT-PCR 法による DENV 遺伝子の検出

リアルタイム RT-PCR 法で陽性と判定された検体について、E 領域周辺を 3 つに分割した断片を増幅する RT-PCR 法を行った¹⁰⁾。使用したプライマーセットは表 1 のとおりであり、PCR 反応では試薬に One-Step RT-PCR Kit (QIAGEN) を用い、温度条件は 50°C30 分、95°C15 分の後、94°C30 秒、55°C45 秒および 72°C1 分を 35 サイクル繰り返し、72°C10 分とした。得られた PCR 産物について電気泳動を行い、目的の位置にバンドが検出されることを確

認した。

3) ダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定

RT-PCR 法で確認されたバンドを含むアガロースゲルを切り出し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した後、精製物を Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) によるシーケンス反応にかけ、3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を取得した。

4) 血清型別の確認および分子系統樹解析

取得した塩基配列について、公共の遺伝子データベース (GenBank/DDBJ/EMBL) を利用した BLAST 解析により、血清型別を行った。また、DENV-1/2/4 は 1,485 塩基、

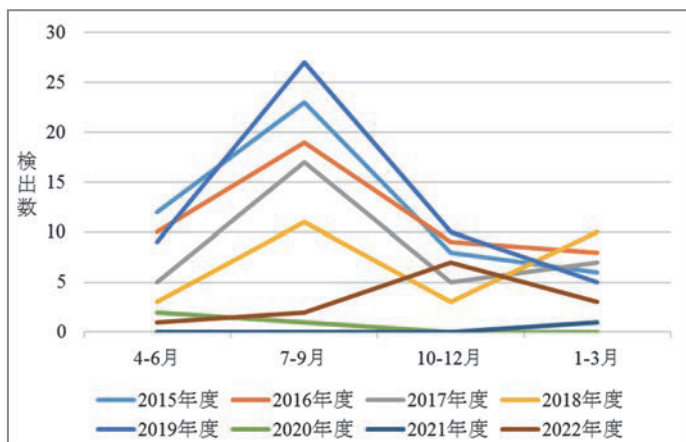


図 1. 東京都におけるデングウイルスの四半期別検出数 (2015 年度～2022 年度)

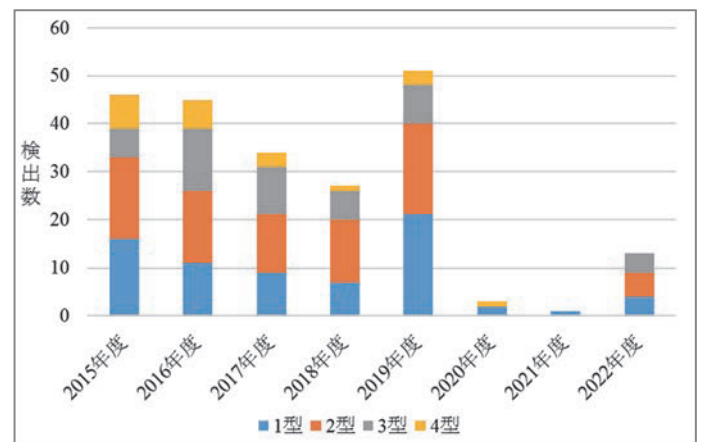


図 2. 東京都におけるデングウイルスの血清型別検出数 (2015 年度～2022 年度)

DENV-3 は 1,479 塩基の E 領域を含む配列について、MEGAX¹¹⁾を用いた近隣結合 (Neighbor-joining: NJ) 法¹²⁾により分子系統樹を作成し、Nextstrain¹³⁾を参照して遺伝子型を分類した。なお、樹形の信頼性はブートストラップ法にて確認した。

結果と考察

1. DENV検出状況および血清型別状況

対象期間のDENV検出例の全てが輸入症例であった。四半期ごとの検出数を見たところ、年間を通じて検出されているが、特に7~9月に多い傾向が見られた (図1)。DENV流行地域でのピークは雨季および雨季後とされており、7~9月に雨季および雨季後を迎える流行地域が多いことに加え、この時期の流行地域への渡航者数が多いことが影響すると考えられた。またCOVID-19による渡航数減少を受け、2020年度および2021年度の検出数は明らかに減少したが、2022年10~12月以降は回復傾向を認めており、DENV流行拡大への警戒が必要である。

血清型別状況の年次変化は図2に示した。2015年4月から2023年3月までの検出総数を比較すると、順にDENV-2 (81件)、DENV-1 (71件)、DENV-3 (47件)、DENV-4 (21件)であった。これはNextstrain上に登録された同時期の型別登録数 (DENV-2 : 1014件、DENV-1 : 841件、DENV-3 : 361件、DENV-4 : 233件)とも概ね一致し、東京都のみで特異的に多く検出された血清型はなかった。各年度ともDENV-2もしくはDENV-1が最も多く検出されており、各血清型の検出数について年度による大きな変化は見られなかった。

2. 各血清型における系統樹解析

今回得られた塩基配列について、海外分離株と共に分子系統樹解析を行ったところ、図3~6の通りとなった。なお供試検体名の並びに示すのは患者情報から得た渡航先である。

DENV-1には I ~ V 型の遺伝子型があり、50件 (70%) が I 型に、11件 (15%) が III 型に、10件 (14%) が IV 型に分類された。主に流行している地域は、I 型およびIV型は東南アジア・オセアニア、III型は南アジア・アフリカ、V型は北南米とされており、近年 II 型は世界的に報告されていない¹³⁾。

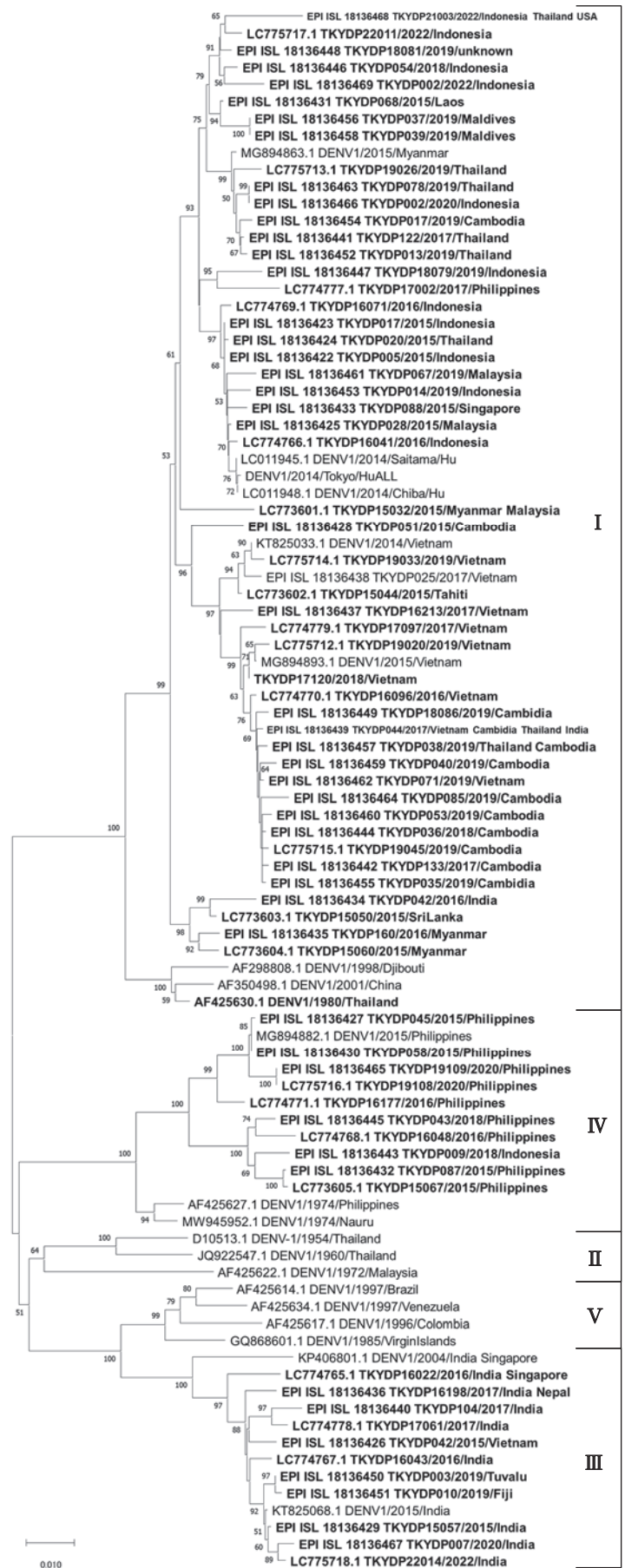


図 3. 東京都において検出されたデングウイルス 1 型 E 領域の NJ 法による分子系統樹解析 (2015 年度~2022 年度) (太字 : 東京都内検出例)

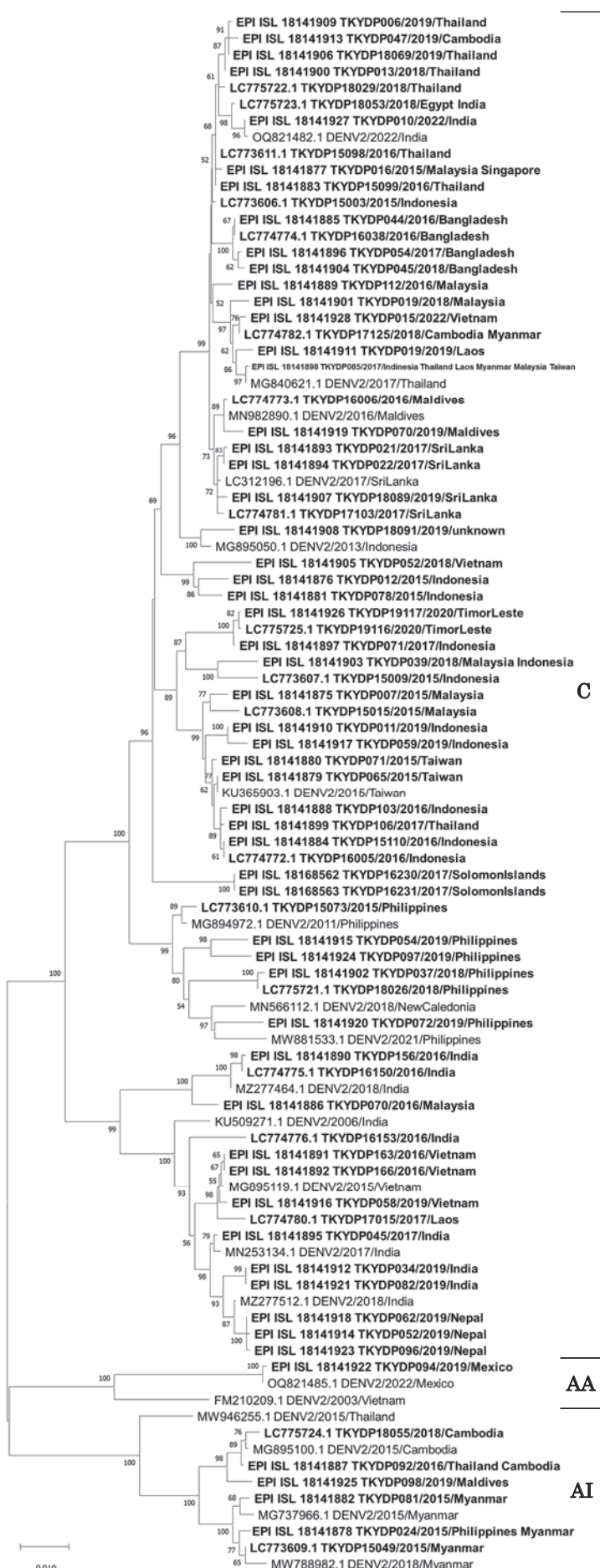


図 4. 東京都において検出されたデングウイルス 2 型 E 領域の NJ 法による分子系統樹解析 (2015 年度～2022 年度) (太字: 東京都内検出例)

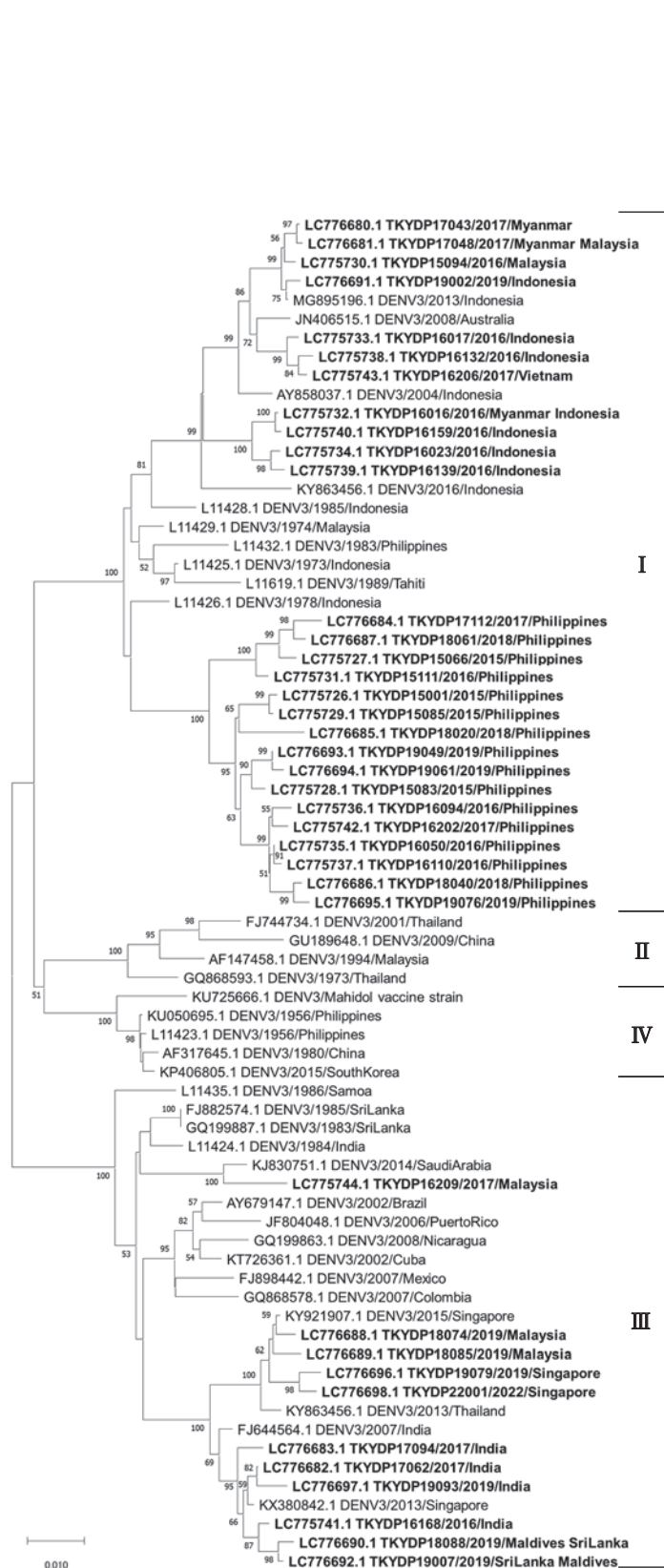


図 5. 東京都において検出されたデングウイルス 3 型 E 領域の NJ 法による分子系統樹解析 (2015 年度～2022 年度) (太字: 東京都内検出例)

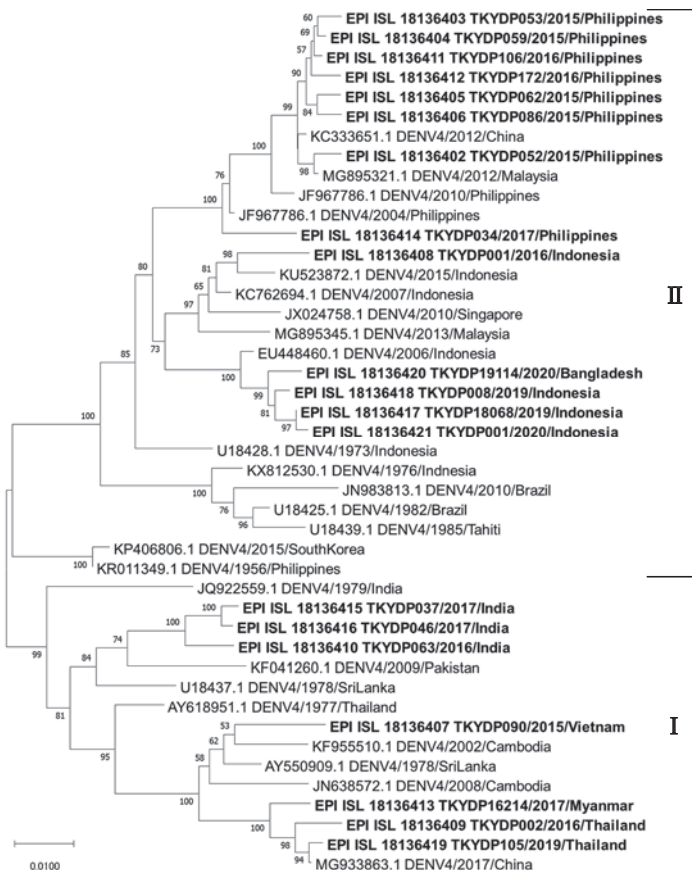


図 6. 東京都において検出されたデングウイルス 4 型 E 領域の NJ 法による分子系統樹解析 (2015 年度～2022 年度) (太字: 東京都内検出例)

DENV-2にはAA, AI, AM, CおよびSの遺伝子型があり, 68件 (91%) がC型に, 6件 (8%) がAI型に, 1件 (1%) がAA型に分類された。C型はアジア・アフリカで広く流行し, AI型はアジア, AA型は北南米に多く見られる¹³⁾。

DENV-3にはI～IV型の遺伝子型があり, 27件 (71%) がI型に, 11件 (29%) がIII型に分類された。I型は東南アジア・オセアニアで報告が増えており, III型は北南米・アフリカ・アジアで広く流行している。なおII型は東南アジアで多く見られたが, 2014年を最後に報告がなく, IV型は近年検出されていない¹³⁾。

DENV-4にはI型およびII型の遺伝子型があり, 13件 (65%) がII型に, 7件 (35%) がI型に分類された。II型はアジア・北南米と広く分布があり, I型は東南アジアで主に見られる¹³⁾。

都内で検出したDENVの遺伝子型の割合は, 全血清型を通して, 北南米地域で流行する遺伝子型に比べアジア地域での流行型が多かった。この結果から, DENV流行国のうち, 東京都からの渡航先としてアジア地域が多く選ばれている可能性が考えられた。

また, それぞれの系統樹において, 都内検出株の推定感染地 (渡航先) を参照配列データと合わせて比較すると, 大まかな地域の一致 (地域特異性) が認められ, さらに,

今回解析した期間においてこれら地域特異性の年次変化は見られなかった。このことから, 分子系統樹解析は, 国内感染例でのクラスター分析による関連性調査に加え, 輸入症例での感染地域推定にも有用であることが示唆された。

東京都ではデング熱等の国内流行を未然に防止するために, 都内生息蚊におけるDENV等保有状況を調査している (感染症媒介蚊サーベイランス)。2015年度以降はDENV陽性例が出ていない¹⁴⁾ものの, この蚊サーベイランス結果と本報告にある患者から検出されたDENV遺伝子解析結果は, 今後もDENV等の遺伝子データの蓄積を継続する必要がある。これにより, 国内感染発生の際には早期にこれを探知することに活用でき, 関連患者の調査やDENV感染蚊の駆除に活かし迅速に流行を収束させることに貢献できると考えられる。

ま と め

2015年度～2023年度の8年間の都内におけるDENV検出状況を分析した。患者検体476検体中223検体から検出され, COVID-19の影響を受けて2020年度以降大きく減少したものの2022年秋季から回復傾向が見られた。検出された血清型は多いものからDENV-2, DENV-1, DENV-3, DENV-4となっており, 年度ごとの大きな変動は認められなかった。また, 血清型ごとに分子系統樹解析を用いると感染地域別・感染経路別に分類できる場合があった。今後も海外での流行状況を注視しながら遺伝子解析結果の集積を続け, 輸入症例および国内感染例発生の際の調査に迅速に活用できるよう備えなければならない。

文 献

- 1) CDC: About Dengue, <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html> (2023年7月13日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 2) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **41**, 89–90, 2020.
- 3) 齊木 大, 長谷川道弥, 岡崎輝江, 他: 東京健安研七 年 報, **67**, 27–35, 2016.
- 4) 西村光司, 金澤剛二, 森岡一朗, 他: 病原微生物検出情報, **41**, 94–96, 2020.
- 5) 安藤美恵, 速水貴弘, 喜納園絵, 他: 病原微生物検出情報, **41**, 96–97, 2020.
- 6) 齊木 大, 日向綾子, 千葉隆司, 他: 東京健安研七 年 報, **68**, 55–59, 2017.
- 7) WHO: Dengue Situation Update 671, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/365676/Dengue-20230511.pdf?sequence=99&isAllowed=y> (2023年7月13日現在。なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 8) ECDC: Increasing risk of mosquito-borne diseases in EU/EEA following spread of Aedes species, <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/increasing-risk-mosquito-borne-diseases-eucea-following-spread-aedes->

- species (2023年7月13日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 9) 国立感染症研究所: デングウイルス感染症診断マニュアル,
<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf> (2023年7月13日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 10) Ito M., Takasaki T., Kotaki A., *et al.*: *Jpn J Infect Dis.*, **63**, 181–184, 2010.
- 11) Kumar S., Stecher G., Li M., *et al.*: *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547–1549, 2018.
- 12) Tamura K., Nei M., Kumar S.: *PNAS*, **101**, 11030–11035, 2004.
- 13) Nextstrain: Real-time tracking of dengue virus evolution,
<https://nextstrain.org/dengue/all> (2023年7月13日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 14) 東京都健康安全研究センター: 感染症媒介蚊サーベイランス,
https://www.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/kj_kankyo/mosq/mosquito/ (2023年7月13日現在. なお本URLは変更または抹消の可能性がある)

Genetic Analysis of Dengue Virus Detected from April 2019 to March 2022 in Tokyo

Wakaba OKADA^a, Sachiko HARADA^a, Fumi KASUYA^a, Ryota KUMAGAI^a, Arisa AMANO^a,
Kohji MORI^a, Michiya HASEGAWA^a, Hirofumi MIYAKE^a, Mami NAGASHIMA^a, and Kenji SADAMASU^a

From April 2015 to March 2023, the dengue virus had been detected in 220 of 476 suspected dengue fever specimens brought to the Tokyo Metropolitan Institute of Public Health for active surveillance in Tokyo and classified into serotypes and genotypes. The number of dengue virus cases detected tended to increase during the summer season, with DENV-2, type 1, type 3, and type 4 being the most common serotypes in descending order. Molecular phylogenetic tree analysis of each serotype from type 1 to type 4 showed that distinctive clusters were formed based on the presumed infection area, suggesting that this method is useful for estimating the infection area of imported cases. Continued accumulation of DENV genetic data will contribute to the early detection of domestic cases, investigation of related patients, and eradication of DENV-infected mosquitoes, thereby contributing to the rapid control of future epidemics.

Keywords: dengue fever, dengue virus, serotype, genotype, phylogenetic tree analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan