

## 市内におけるデングウイルス検出状況について

西川 和佳子、水村 綾乃、坂本 美砂子

(環境保健研究所 健康科学課)

**要旨** 平成22年から26年度までの期間にデング熱疑い患者47名の検査を実施したところ、13名でデングウイルス陽性となり、国内感染例が2例含まれていた。遺伝子検査に加え、抗体及び抗原検査を併用することで、検査結果の精度が高くなることが示唆された。

**Key Words** : デング熱, デングウイルス, 国内感染例

### 1. はじめに

デング熱は、アジア、アフリカ等亜熱帯地域で流行している急性の熱性疾患で、デングウイルス（以下DENVとする）を保有する蚊（ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ）に刺咬されることで感染が成立し、感染症法では四類感染症に定められている。DENVには4つの血清型があるが、症状としてはいずれも3から7日の潜伏期を経て、発熱、発疹、関節痛及び筋肉痛を主徴とすることが共通している。

国内では、戦中の1942から1945年にかけて長崎、佐世保、広島、呉、神戸及び大阪で流行したが<sup>1)</sup>、その後国内感染による発生はなく、近年では海外渡航による輸入感染例が年間200件以上発生していた<sup>2)</sup>。しかし、2014年8月に約70年ぶりに東京都の代々木公園を中心とした国内感染例が162件発生し<sup>2)</sup>、本市居住者においてもその感染が認められた。

本市では、平成22年度よりDENV検査を開始し、平成26年度までにデング熱疑いの患者47名の検査を実施したので、それらの結果について報告する。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 検査材料

平成22年から26年度までの期間に採取されたデング熱疑い患者47名の血液（全血または血清）を検査材料とした。

なお、採血は患者の受診した医療機関で行い、本市保健所を経由して当研究所に搬入された。また、検査は検体が搬入された当日に実施した。

#### 2.2 抗体及び抗原検査

抗体及び抗原検査は、患者血清を用いてイムノクロマト法により実施した。抗体検査は、PANBIO DENGUE DUO CASSETTE (Panbio) によりIgM抗体及びIgG抗体の検出を行った。抗原検査はDengue NS1 Ag STRIP (BIORAD) により非構造蛋白(NS1)抗原の検出を行った。なお、抗原検査については平成25年度から実施した。

#### 2.3 遺伝子検査

患者血液（全血または血清）200 $\mu$ LからHigh Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いてRNAを抽出し、さらにSuper Script III (Invitrogen) を用いた逆転写反応によりcDNAを作製後、既報<sup>3)</sup>に従いRT-PCR法またはReal Time RT-PCR法を実施した（表1及び表2）。

RT-PCR法は、反応量を1tubeあたり50.0 $\mu$ Lとし、45.0 $\mu$ LのRT-PCR反応液（TaKaRa EX Taq HS（タカラバイオ）、10 $\times$ PCR Buffer、2.5mM dNTP、500nMプライマー及びRNase-free滅菌蒸留水を混合）に5.0 $\mu$ LのcDNAを加え、94 $^{\circ}$ Cで1分間、53 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1分間の増幅反応を40回行った。増幅産物は2.5%アガロースゲルで電気泳動し、各血清型の特異的なバンドの有無を確認した。RT-PCR法により得られた増幅産物の一部は、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。

Real Time RT-PCR法は、反応量を1tubeあたり25.0 $\mu$ Lとし、20.0 $\mu$ LのReal Time RT-PCR反応液（2 $\times$ Taq Man Universal PCR Master Mix (Applied biosystem)、800nMプライマー、200nM TaqManプローブ及びRNase-free滅菌蒸留水を混合）に5.0 $\mu$ L

の cDNA を加え、ABI 7300 Real Time PCR system (Applied biosystem) を使用して増幅反応を行った。反応条件は、95°C で 15 分間の DNA ポリメラーゼ活性化の後、95°C で 15 秒間、57°C で 1 分間の増幅反応を 45 回行った。

表 1. RT-PCR 法のプライマー配列

DENV血清型	プライマー名	配列 (5'→3')	サイズ	検出遺伝子
Type1	D1s	GGAAGTGGATGAGGTTTGG	490bp	E
	D1c	ATGGGTGTGGCCTAATCAT		NS1
	DW2s	AGRTTYGTCTGCAACACCTCC		E
Type2	DW2c	GTGTTACTTTRATTTCTGTTG	231bp	E
	D3s	GTGCTTACACAGCCATATT		E
Type3	D3c	TCCATTCTCCCAAGCGCTG	320bp	NS1
	D4s	CCATTATGGCTGTGTGTT		NS2a
Type4	D4c	CTTCATCTGCTTCACTTCT	398bp	NS2b
	DUs	TCAATATGCTGAAACGGCGAGAACCG		C
Universal	DUc	TTGCACCAACAGTCAATGCTTCCAGGTTTC	511bp	PreM

表 2. Real Time RT-PCR 法のプライマー・プローブ配列

DENV血清型	プライマー・プローブ名	配列 (5'→3')	サイズ	検出遺伝子
type1	D1MGBEn469s	GAACATGGRACAATTGCAACAT	67bp	E
	D1MGBEn536r	CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTTC		
	D1MGBEn493p*	ACACTCAAGCTCC		
type2	D2MGBEn493s	ACACACAGAGTCCATCACAGA	68bp	E
	D2MGBEn568r	CATCTATTGAAGTCNAGGCC		
	D2MGBEn545p*	CGATGGARTGCTCTC		
type3***	D3MGBEn1s	ATGAGATGTGGGAGTRGGAAC	70bp	E
	D3MGBEn71r	CACCACDTCAACCCAGTAGCT		
	D3MGBEn27p*	AGATTTGTGGAAGGYCT		
type4	D4TEh711s	GGTGACRTTYAARGHCTCAT	75bp	E
	D4TEh786c	WGARTGATRGCTCCYCTCTG		
	D4TEh734p**	CCAAGAGACAGGATGTGACAGTGTGGATC		

\* MGB probes が 5' 末端に FAM reporter dye と共にラベルされている。3' 末端には quencher dye TAMRA はラベルされていない。  
 \*\* 5' 末端に FAM reporter dye がラベルされている。3' 末端には quencher dye TAMRA がラベルされている。  
 \*\*\* 平成 26 年 9 月に以下のとおり改訂。

DENV血清型	プライマー・プローブ名	配列 (5'→3')	サイズ	検出遺伝子
type3	DEN-3 (4P) forward	GAAGTGGACACAGCACTCA	73bp	E
	DEN-3 (4P) reverse	CATGCTCTACCTTCTCGACTTGTCT		
	DEN-3P-Barbara	FAM-ACCTGGATGTGGCTGAAGGAGCTTG-TAMRA		

表 3. DENV 陽性検体における検査結果

患者 No.	年齢	性別	採取時期 (発症後日数)	検査年度	検査結果					血清型	発熱 (°C)	発疹	頭痛	筋肉痛	関節痛	その他	海外渡航歴	備考
					抗体検査		抗原検査		遺伝子検査									
		IgM	IgG	NS1	RT-PCR	Real Time RT-PCR												
1	22	女	1	24	-	-		+	type 1	41.9	-	+	+	+	嘔吐		カンボジア	
2	60	男	2	25	-	-	+	+	type 4	39	+	-	-	-	血小板減少、肝機能障害		マレーシア	
3	28	男	3	22				+	type 1	38	-	+	+	+	-		タイ	
4	6	女	4	24	+	-		+	type 1	39	+	-	-	-	下痢、血小板減少、白血球減少		フィリピン	
5	10	男	5	22	-	-		+	type 1	39	-	-	-	-	出血傾向、肝臓機能障害		タイ	
6	42	男	5	25	+	-	+	+	type 4	38	+	-	+	+	白血球減少、血小板減少、肝機能障害		マレーシア	
7	36	女	6	25	+	-	+	+	type 1	39	+	-	+	+	白血球減少、血小板減少、蚊刺症		タイ	
8	45	男	6	25	+	+	+	-	不明	有 (度数不明)	+	-	+	-	血小板減少		タイ、インド	
9	31	女	7	23	+	-		-	不明	38.5	+	-	+	+	下痢、肝機能障害		スリランカ	
10	11	女	8	22	-	-		+	type 1	39	+	-	-	-	嘔気、腹痛、尿道炎		フィリピン	
11	70	男	8	26	+	+	+	+	不明	39	+	+	+	-	肝機能障害	渡航歴なし	代々木公園 訪問歴：あり	
12	69	男	8	26	+	+	+	+	type 1	39.4	-	+	+	-	嘔気、肝機能障害、蛋白尿、腎不全、全身倦怠感、食欲不振	渡航歴なし	代々木公園 訪問歴：なし	
13	23	男	9	22				+	type 3	39.9	-	-	-	-	下痢		インド	

+ : 検出、- : 不検出、空欄 : 未実施

### 3. 結果

47 検体中、輸入感染例 11 検体、国内感染例 2 検体の計 13 検体が DENV 陽性となった (表 3)。

抗体検査では、IgM 抗体が 7 検体 (発症後 4~8 日)、IgG 抗体が 3 検体 (発症後 6~8 日) から検出された。また、抗原検査では、NS1 抗原が 6 検体 (発症後 2~8 日) から検出された。

遺伝子検査では、RT-PCR 法により 10 検体 (発症後 1~9 日) から、Real Time RT-PCR 法により 1 検体 (発症後 2 日) から DENV 遺伝子が検出された。血清型の内訳は、1 型が 7 検体、3 型が 1 検体、4 型が 2 検体、型不明が 3 検体であった。国内感染例は 2 検体 (患者 No.11 及び 12) で、そのうち代々木公園への訪問歴がなく、市内で感染したと推定される患者 No.12 の血清型は、遺伝子解析の結果、代々木公園で感染した患者と同様に 1 型であり D1/Hu/Saitama/NIID100/2014 株 (LC011945) と 99% の相同性を示した。なお、代々木公園への訪問歴のある患者 No.11 は血清型別は不能であった。

DENV 陽性患者における臨床症状の出現頻度は、発熱 100%、発疹及び筋肉痛 62%、関節痛及び血小板減少症 38%、頭痛 31%、白血球減少症 23% であった。

#### 4. 考察

デング熱の実験室診断における検査材料の採取時期は、DENV 遺伝子の検出には発症後 5～6 日以内（発熱期、解熱以前）のものが望ましいとされている<sup>3)</sup>。一方、IgM 抗体は解熱前から検出されることが多く、NS1 抗原の検出は解熱後も数日間検出できる場合が多いとの報告がある<sup>4)</sup>。当研究所が実施した抗体検査では、採取時期の早い検体は陰性であったが、発症から日数が経過し DENV 遺伝子が検出されない検体で陽性を示すものがみられた。また、抗原検査では、採取時期の早い検体から発症後日数が経過した時期に採取された検体までの幅広い時期で抗原が検出された。このことから、遺伝子検査に加え、抗体及び抗原検査を併用することで検査結果の精度が高くなることが分かった。

DENV は、4 つある血清型いずれにおいても同様の症状を呈することから、症状から DENV の血清型を推定することはできない<sup>5)</sup>。DENV に感染すると、同じ血清型に対する終生免疫は獲得するが、他の血清型に対する免疫は短期間持続するのみで、再度他の血清型に感染した場合にデング出血熱を引き起こすとの報告もある<sup>5)</sup>。よって、DENV 感染を疑う場合には病原体の検査をするとともに、血清型の型別を行うことが重要となるが、抗体及び抗原検査では血清型は判別できないことから、遺伝子検査が必要である。しかし、DENV 遺伝子が検出されないものや、DENV 遺伝子が検出されたものの、その塩基配列が解析できなかったものがあることから（表 3）、検査方法の検討等、今後の課題としたい。

臨床症状の出現頻度は、ガイドライン<sup>6)</sup>によると発熱が 99%、血小板減少及び白血球減少が 78%、頭痛が 72%、発疹が 48%、全身の筋肉痛が 22%、骨関節痛が 18%となっている。本市における症例の臨床症状出現頻度をガイドラインと比較すると、発熱はほぼ一致するが、筋肉痛及び関節痛は出現頻度がガイドラインを上回り、逆に頭痛、血小板減少症及び白血球減少症はガイドラインよりも大幅に低かった。また、患者 No.13 のように症状が発熱と下痢のみと典型的なデング熱の臨床症状とは異なるケースもみられた。このことから、臨床症状の他に、海外渡航歴、流行地域での屋外活動歴や蚊の刺咬歴の聴取を踏まえて検査を実施することが必要であることが示唆された。

今回、約 70 年ぶりに国内感染例が発生した中で、市内で感染したと推定される症例があり、その患者の居住地周辺では蚊の調査と駆除が実施された。国内には DENV を媒介するヒトスジシマカが生息し、また、

輸入感染例が年間 200 件以上発生している現在の状況下では再び国内感染が発生する可能性があると考えられる。国内感染の発生や拡大を防止するためには、現在までの DENV 検出状況を踏まえ、関係機関と連携し、迅速かつ正確な検査体制を構築することが重要である。

#### 文 献

- 1) 高山智彦,デング熱・デング出血熱と最近の知見,モダンメディア,53巻,6号,1-5,2007
- 2) 国立感染症研究所,デング熱・デング出血熱 2011～2014年,病原微生物検出情報 (IASR) ,36,136,2015
- 3) 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,病原体検出マニュアル
- 4) 国立感染症研究所,デング熱の実験室診断とその留意点,病原微生物検出情報 (IASR) ,36,40-41,2015
- 5) 倉根一朗,デング出血熱の病態解明の進展とワクチン開発の現状,ウイルス,第52巻,第1号,pp15-20,2002
- 6) 国立感染症研究所,デング熱・チクングニア熱の診療ガイドライン,2015