

兵庫県におけるデング熱の検査診断状況及び遺伝子系統樹解析

押部 智宏* 荻 美貴 高井 伝仕 近平 雅嗣 三村 昌司

Laboratory Diagnosis and Phylogenetic Analysis of the Dengue Viruses in Hyogo Prefecture, Japan

Tomohiro OSHIBE*, Miki OGI, Densi TAKAI, Masatsugu CHIKAHIRA and Masashi MIMURA

¹ Infectious Disease Research Division, Public Health Science Research Center, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Consumer Sciences, 2-1-29, Arata-cho, Hyogo-ku, Kobe 652-0032, Japan

We compared the laboratory diagnosis of dengue virus infections using samples that have been carried into this institute. As a result, simple and rapid NS1 antigen detection kit by immunochromatography was found to be most useful. In addition, real-time RT-PCR method by serotype (Dengue virus 1~4) specific primers were useful for more accurate examination.

From the results of the phylogenetic analysis of the envelope gene, the three dengue virus type 1 (DENV-1) strains were classified as genotypes I and V. The four DENV-3 strains were classified as genotypes I, II, and V.

I はじめに

デング熱は、熱帯、亜熱帯地域で流行している蚊媒介性の急性熱性疾患であり、稀に出血傾向やショック症状を併発し重症化することがある。本疾病は 1940 年代に西日本を中心に流行が確認されたが¹⁾、それ以降の国内感染は見られなかった。このため当所では流行地域へ渡航し、発熱・発疹等のデング熱様の症状を呈した患者を中心に年間数件程度の検査診断を行ってきた。

しかしながら、2013 年になって日本での感染が疑われたドイツ人のデング熱症例が報告され²⁾、2014 年には東京の代々木公園を中心とした国内感染が多発した^{3,4)}。これに関連して、西宮市在住の代々木公園等を訪問したことのないデング熱患者から、国内感染事例で検出されたウイルスと同一の塩基配列の遺伝子が検出され、市内

での2次感染が否定できない事例も発生した。

これらの事例から海外からの輸入例だけでなく、県内流行も想定して、これまで以上に本疾病の検査体制の充実に努めることが求められている。

本稿では、2013 年度に当所で実施したデング熱の検査診断状況やウイルス遺伝子、抗原及び抗体検査法を比較して有用性を検討した結果及び疫学調査で重要となるデングウイルスの Envelope 遺伝子領域の系統樹解析を行った結果について報告する。

II 材料と方法

1. 検体

2013年4月から2014年3月までにデング熱疑いで当所に搬入された血液11検体を用いた。

2. デングウイルスの遺伝子検査

血液検体からのウイルスRNAの抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN社)を用いた。コンベンショナルRT-PCR法は、Moritaら⁵⁾の方法に基づき、全て

感染症部

*別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町 2-1-29
兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
感染症部 押部 智宏

の血清型に反応するユニバーサルプライマー及び1~4型の血清型に特異的に反応するプライマーを用い、QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) で増幅した。リアルタイムRT-PCR法は、Itoらの方法⁶⁾に基づき1~4型の血清型に個別に反応するプライマー、プローブ及び反応試薬に QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)を用いてABI PRISM 7900HT Fast (Applied Biosystems社) で検出した。

3. デングウイルス抗原検査及び抗体検査

NS1抗原検査には、イムノクロマトグラフィー法の DENGUE NS1 AG STRIP (BIO RAD社) を用いた。

IgM抗体検査には、IgM Capture ELISA法による Dengue IgM Capture DxSelect (FOCUS社) を用いた。

4. デングウイルスの遺伝子系統樹解析

血液検体から抽出したウイルスRNAをコンベンショナルRT-PCR法で増幅したEnvelope領域 (Dengue 1型: 1,485 nt, Dengue 3型: 1,479nt) について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

得られた塩基配列から、デングウイルス1型は Goncalvezら⁷⁾の方法、デングウイルス3型はWittkeら⁸⁾の方法を用いて系統樹解析により分類した。解析には、GenBankに登録された株の塩基配列を用い、系統樹上にGenBank accession numberを示した。

III 結果と考察

1. デングウイルスの検査結果と検査法の比較

デング熱疑い患者から採取された11検体の検査診断結果及び患者の臨床症状、検体採取時期ならびに海外渡航地域をTable 1に示した。

リアルタイムRT-PCR法によるデングウイルス遺伝子検査では、11検体中8検体 (デングウイルス1型: 4検体、デングウイルス3型: 4検体) が陽性となった。

コンベンショナルRT-PCR法のユニバーサルプライマーを用いた検査では11検体中8検体が陽性となり、リアルタイムRT-PCR法の結果と一致した。ただし、このうち2検体で増幅反応が弱かったため、プライマー領域の塩基配列を調べたところ、検体D13001ではForward側のプライマーに5カ所、検体D13007では6カ所のミスマッチが見られた。

一方、型特異プライマーを用いた検査では、ユニバーサルプライマーで陽性となった検体のうちD13006、D13007の2検体が陰性となった。これらの検体のプライマー領域を調べたところ、検体D13006はForward側の

プライマーに1カ所、Reverse側に3カ所のミスマッチが見られ、検体D13007はReverse側のプライマーに6カ所のミスマッチが認められた。

リアルタイムRT-PCR法で陽性となった検体のうち、ユニバーサルと型特異プライマーによる検査で双方が陰性となる検体は見られなかったものの、今回明らかになったようにプライマー領域に相応の変異を認める株があったことから、今後の遺伝子変異によっては陽性を見逃すことも考えられるため注意が必要である。

NS1抗原検査の結果では、11検体中8検体が陽性となり、リアルタイムRT-PCR法の結果と一致した。NS1抗原は感染細胞から分泌されるタンパクで、抗体上昇に伴うウイルス血症の消失後もしばらくは血中に残存することから、ウイルス遺伝子の検出よりも検出期間が長く、イムノクロマトグラフィー法では第9病日まで検出可能と報告されている⁹⁾。本法は操作が簡便で迅速判定が可能であり、今回対象とした検体数は少なかったものの、リアルタイムRT-PCR法の結果と一致したことから、スクリーニングに有用と考えられた。

IgM抗体検査では、11検体中3検体が陽性で、陽性検体の採取日はいずれも第5病日と第6病日であった。リアルタイムRT-PCR法およびNS1抗原が陽性でIgM抗体検査が陰性となった5検体は、第1病日から第4病日に採取されたもので、発症から間もないため十分な抗体上昇が見られなかったためと考えられた。IgM抗体は、発症3日~5日に50%、5日以降は80%、6日以降は90%検出され、第90病日までは検出可能であると報告されており⁹⁾、今回の結果はこれを裏付けるものとなった。

デングウイルスの検査法を比較した結果、急性期に採取された検体では、簡便性や迅速性からNS1抗原検査をスクリーニングとして行い、さらにリアルタイムRT-PCR法でウイルスの血清型を型別することにより、より精度の高い検査が可能と考えられた。

デング熱と確認された8例の臨床像は、発熱が全ての症例で認められ、発疹が5例、頭痛が3例、その他、関節痛、眼窩痛、出血傾向 (歯肉出血) が1例ずつであった。患者D13005は、発熱や発疹の症状から麻疹の疑いと診断されたが、検査によりデング熱と確認された。また、患者D13009は、同じく発熱や発疹の症状からデング熱あるいは麻疹が疑われたが、検査では麻疹と確定診断された。このように発熱や発疹を伴う症状は、麻疹や風疹などの多くのウイルス性疾患でもみられることから、臨床診断に加えて実験室診断を併用した鑑別が重要である。

2. デングウイルス1型の遺伝子系統樹解析

Goncalvezら⁷⁾の分類によるデングウイルス1型の

Table 1 Laboratory diagnosis of dengue virus infections by Realtime RT-PCR, RT-PCR, NS1 antigen and IgM antibody assay

ID	Age	Gender	Symptoms	Samples		RT-PCR			IgM [†] (Index Value)	Travel history	Period
				Days after onset	Realtime RT-PCR (D1~D4 ^{***})	DU ^{**}	D1~D4 ^{***}	NS1Ag [†]			
D13001	49	F	Fever,Rash,headache	6	D1+	+	D1+	+	+(11.8)	Thailand	June 5-12,2013
D13002	22	F	Fever,Rash,headache	4	D1+	+	D1+	+	-(0.3)	Thailand	June 10-14,2013
D13003	67	F	Fever	4	-	-	-	-	-(0.2)	Hawaii	-
D13004	20	M	Fever,Joint pain	1	D3+	+	D3+	+	-(0.3)	Thailand	September 1-11,2013
D13005	20	M	Fever,Rash	5	D3+	+	D3+	+	+(4.8)	Thailand,Vietnum,Cambodia	September 3-12,2013
D13006	32	M	Fever,Rash,eye pain (behind eyes)	6	D3+	+	-	+	+(1.7)	India	September 14-October 2,2013
D13007	16	F	Fever,headache	1	D1+	+	-	+	-(0.1)	Malaysia	October 1-5,2013
D13008	63	M	Fever	4	D3+	+	D3+	+	-(0.3)	Philippines	November 7-12,2013
D13009	40	M	Fever,Rash	6	-	-	-	-	-(0.0)	Philippines	-
D13010	35	M	Fever	7	-	-	-	-	-(0.1)	Cambodia	-
D13011	35	M	Fever,Rash,Gingival bleeding	4	D1+	+	D1+	+	-(0.1)	Indonesia	February 3-6,2014

* Use of Dengue virus universal primers

*** Use of serotype (Dengue virus 1~4) specific primers

† Immunochromatography method

‡ IgM Capture ELISA method

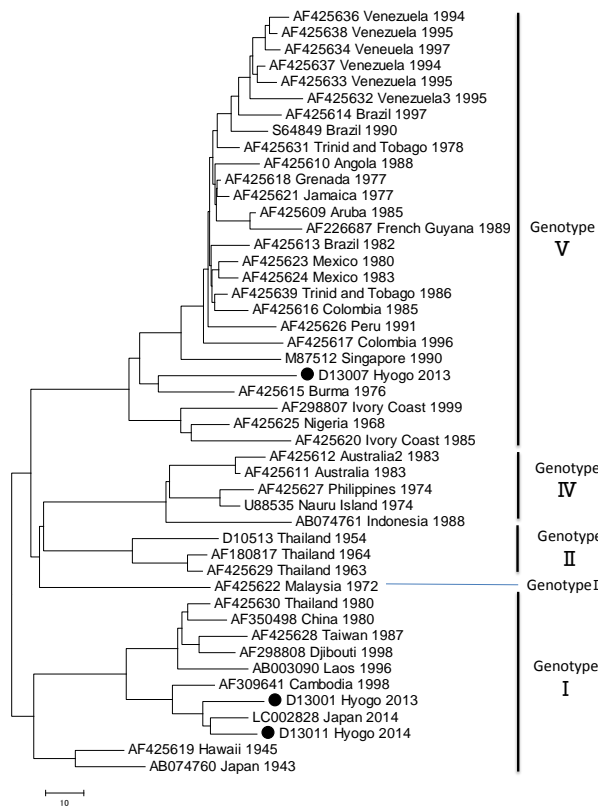


Fig. 1 Phylogenetic analysis of Dengue virus type 1 Envelope genes

Envelope遺伝子領域の系統樹解析結果をFig. 1に示した。遺伝子型はGenotype I から Vに分類され、Genotype I は、主に東南アジア、中国及び東アジア地域、Genotype IIは1950年代及び1960年代のタイ、Genotype IIIはマレーシアのSylvatic (森林型) 株、Genotype IVは西太平洋諸島及びオーストラリア地域、Genotype Vはアメリカ、西アフリカ及び少数のアジア地域に分布している10)。

今回解析したD13001株、D13011株は、Genotype I、D13007株は、Genotype Vに属した。

D13001株及びD13011株は、AF309641 Cambodia 1998 (D1/H/IMTSSA-CAMB/98/658株) と最も近縁であった。この株とD13001株との塩基配列の相同性が97.7%、D13011株とは97.6%であった。

D13001株とD13011株はGenotype I が分布するタイ及びインドネシアから帰国した患者由来であり、両者は地理的にも検体採取時期も異なるが塩基配列を比較したところ、1,485塩基中1,454塩基が一致しており、97.9%と高い相同性であった。

また、2014年に東京の代々木公園を中心に感染が拡大した LC002828 Japan 2014 (D1/Hu/Saitama/NIID100/2014株)、Patient 2 (LC006123) 及びPatient 4、10の4株は塩基配列が一致しており11)、D13001株、D13011株及

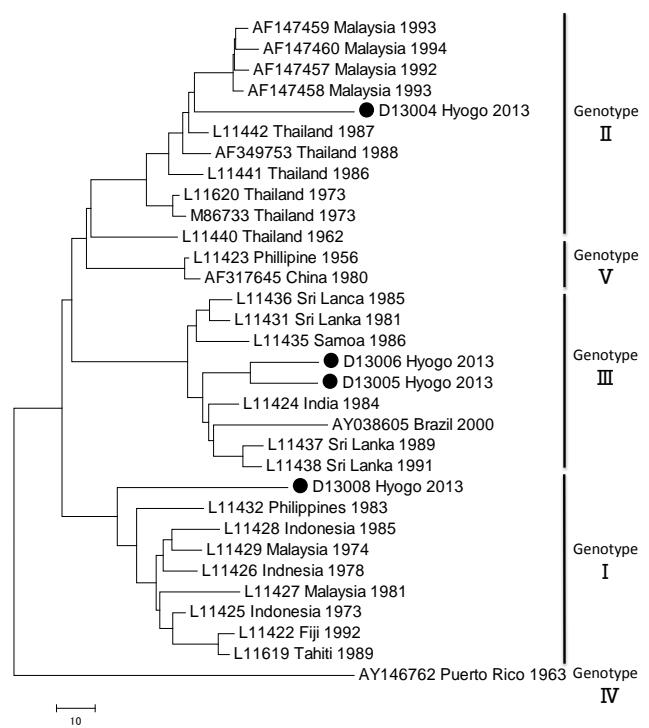


Fig. 2 Phylogenetic analysis of Dengue virus type 3 Envelope genes

びAF309641 Cambodia 1998と同じクラスターに分類された。これらの国内感染関連株とD13001株との塩基配列の相同性は98.2%であり、D13011株とは98.5%であった。一方、アミノ酸配列の相同性は、同じクラスター内にある国内感染関連株、D13001株、D13011株、AF309641 Cambodia 1998は100%一致し、高い相同性を有していた。

これらの株は、採取地域や時期が異なるにも関わらず高い相同性を有していることから、国内流行が起こった際の疫学調査で必要となるウイルス株間の同一性の解析には、Envelope領域以外の他の領域や全ゲノムを対象にして、より詳細に解析する必要があると考えられた。

Genotype Vに属したD13007株は、マレーシアから帰国した患者から採取され、系統樹上でAF425615 Burma 1976 (PRS 228686株) と最も近似しており、相同性は96.2%であった。Genotype Vはアメリカ、西アフリカ及び少数のアジア地域に分布しているが、その大半が南北アメリカ、カリブ海諸国に集中している12)。このD13007株はマレーシア由来と推定され、ミャンマーの株と近似したことから、少数ながらもアジア地域で維持されてきたGenotype V株に由来すると考えられた。

3. デングウイルス3型の遺伝子系統樹解析

Wittke⁸⁾らの分類に基づくデングウイルス3型のEnvelope遺伝子領域の系統樹解析結果をFig. 2に示した。

Dengue ウイルス 3 型は Genotype I から V に分類され、 Genotype I は主にインドネシア、マレーシア、フィリピン及び南太平洋諸島、 Genotype II はタイ、ベトナム及びバングラディシュ、 Genotype III はスリランカ、インド、アフリカ及びサモア、 Genotype IV はプエルトリコ、ラテン、中央アメリカ及びタヒチに分布し^{10),13)}、 Genotype V は、フィリピン、中国及びマレーシアに分布する⁸⁾。

今回の解析では、D13008 株は Genotype I、D13004 株は Genotype II、D 13005 株、D 13006 株は Genotype III に属していた。

D13008 株は Genotype I が分布するフィリピンから帰国した患者から検出され、D13004 株は Genotype II が分布するタイから帰国した患者由来であり、これらの株はいずれも Genotype の分布地域と一致した。

Genotype III に属した D 13005 株と D 13006 株は、系統樹上では L11424 India 1984 (1416 株) と最も近似しており、同株との塩基配列の相同性は 97.3% と 97.2% であった。D 13005 株は Genotype III が分布するインドから帰国した患者由来であり、Genotype の分布地域と一致したが、D 13006 株は主に Genotype II が分布するタイ、ベトナム、カンボジアへの渡航歴のある患者から検出された。

Genotype III の分布はスリランカ、インドからアフリカやアメリカへと急速に地域が拡大し、他の型よりも重篤な Dengue 出血熱を引き起こす傾向が強いことが示されている¹⁴⁾。また、台湾における輸入 Dengue 熱の調査では、タイやマレーシアの入国者からも分離されることが報告されており¹⁵⁾、患者 D 13006 の渡航先である東南アジア地域においても Genotype III が少数ながら感染を繰り返しているものと考えられた。

IV 要 旨

当所に搬入された検体を用いて Dengue 熱の検査診断法を比較した。その結果、簡便で迅速に結果が判明するイムノクロマトグラフィー法の NS1 抗原検出キットが有用であることが分かった。また、リアルタイム RT-PCR 法と併用してウイルスの血清型を型別することにより、より精度の高い検査が可能であると考えられた。

血液検体からウイルス遺伝子の Envelope 領域を解析した結果、Dengue ウイルス 1 型が Genotype I と Genotype V に分類され、Dengue ウイルス 3 型は、Genotype I、Genotype II 及び Genotype III に分類された。

文 献

1) 堀田進：Dengue 熱媒介蚊に関する一考察：1942-1944 年の日本内地の Dengue 熱流行におけるヒトス

ジシマカ *Aedes albopictus* およびネッタイシマカ *Aedes aegypti* の意義について。衛生動物, **49**(4), 267-274 (1998)

- 2) Schmidt-Chanasit J, Emmerich P, Tappe D, Günther S, Schmidt S, Wolff D, Hentschel K, Sagebiel D, Schöneberg I, Stark K, Frank C. Autochthonous dengue virus infection in Japan imported into Germany, September 2013. Euro Surveill., **19**(3), Article 1 (2014)
- 3) Arima Y, Matsui T, Shimada T, Ishikane M, Kunio Kawabata K, Sunagawa T, Kinoshita H, Takasaki T, Tsuda Y, Sa
- 4) wabe K and Oishi K. : Ongoing local transmission of dengue in Japan, August to September 2014. Western Pacific Surveillance and Response Journal (WPSAR), **5** (4), 27-29 (2014)
- 5) 国立感染症研究所感染症疫学センター：IASR 病原微生物検出情報（月報），**35**，第 10 号，241-242 (2014)
- 6) Morita K, Tanaka M, and Igarashi A. : Rapid identification of dengue virus Serotypes by using polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., **29**, 2107-2110 (1991)
- 7) Ito M, Takasaki T, Yamada K, Nerome R, Tajima S, Kurane I. : Development and evaluation of fluorogenic TaqMan Reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. J Clin Microbiol. , **42**(12), 5935-7 (2004)
- 8) Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, Liprandi F. : Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. Virology. , **303**(1), 110-119 (2002)
- 9) Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, Vaughn DW, Endy TP, Holmes EC, Aaskov JG. : Extinction and rapid emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. Virology., **301**(1), 148-156 (2002)
- 10) Moi ML, Takasaki T. : Dengue 熱, 小児科, **53**(4), 457-465 (2012)
- 11) Weaver SC, Vasilakis N. : Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. Infect Genet Evol, **9**(4), 523-40 (2009)
- 12) Kutsuna S, Kato Y, Moi ML, Kotaki A, Ota M,

- 13) 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)
- 14) Villabona-Arenas CJ, Zlotoff PM.: Worldwide spread of Dengue virus type 1. *PLoS One*, **8**(5), e62649 (2013)
- 15) Lanciotti RS, Lewis JG, Gubler DJ, Trent DW. : Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses., *J Gen Virol.* , **75** ,65-75. (1994)
- 16) Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. : Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis.* , **9**(7), 800-9. (2003)
- 17) Huang JH, Su CL, Yang CF, Liao TL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Shu PY. : Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010. , *Am J Trop Med Hyg.* , **87**(2), 349-58. (2012)

[平成27年3月30日受理]