

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590778

研究課題名(和文)パラワン島(フィリピン)におけるデング早期診断のための研究

研究課題名(英文)Research on the early diagnosis of dengue in the Philippines

研究代表者

齊藤 麻理子(Saito, Mariko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80404234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：フィリピン、ターラック州立病院を訪れた、発熱後5日以内の患者を対象とした。登録患者から血液、唾液、尿を採取し、NS1抗原検出キットでの迅速診断テストを行い、入院患者は入院中の臨床症状も記載した。血清からのデングウイルス分離およびRT-PCRによる確認を行った。

2014年5月から2015年3月に外来患者369症例、入院患者95症例を登録した。NS1迅速診断キットとRT-PCRの両テストを行った合計230例の結果を比較したところ、NS1迅速診断の結果は感度30%、特異度96%であった。外来患者における各種症状の有無とRT-PCRでのウイルス検出結果との間に相関は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The outpatient and inpatient cases with fever within 5 days were enrolled at Tarlac Provincial Hospital, Philippines. Blood (whole blood and filter paper), urine, saliva were taken from the cases. Dengue virus were propagated from the serum and serotyping was determined by real-time RT-PCR.

Between May 2014 to March 2015, total of 369(outpatients) and 95(inpatients) cases were enrolled. Serum were collected from 371 cases and 87 cases were RT-PCR positive. Among the 230 cases which were tested both NS1 rapid test and RT-PCR, the sensitivity of NS1 rapid test against RT-PCR was 30% and specificity was 96%. There were no significant correlation between the symptoms (cough, headache, joint pain, vomiting, abdominal pain, rash, bleeding) and RT-PCR among the outpatients. Further analysis will be conducted.

研究分野：ウイルス学

キーワード：デングウイルス サーベイランス フィリピン

1. 研究開始当初の背景

2010年、フィリピンにおけるデング患者報告数は過去最高を記録した(フィリピン保健省発表)。デングは熱帯・亜熱帯の都市近郊部を中心に拡大している蚊媒介性の急性熱性疾患であり、年間5000万人が感染しているとされる(Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control, WHO, 2009)。また近年の気候変動によるデング流行パターンの変化が指摘されており、注意深いモニタリングが必要な疾患である。しかし、デングは軽症例では医療機関を受診しない例も多く、臨床診断だけでは他の急性熱性疾患との鑑別が困難である等の理由により正確な症例数を把握することは不可能である。特に、デングの初期症状として高熱、全身倦怠感、筋肉痛、頭痛等が多く、これらの症状の多くはインフルエンザとも共通しているため、両疾患の流行地においてこれらを早期に鑑別することは重要である。

2. 研究当初の目的

本研究では、1)デングの確定診断として通常用いられている抗体価測定およびRT-PCRの他にNS1測定のサーベイランスへの導入についての有用性を検討すること、2)急性熱性疾患の患者から途上国の地方病院レベルの検査においてもデングを鑑別可能な指標を見出すことを目的とし、フィリピンにおけるデングサーベイランスの精度を上げることを目指す。具体的には、パラワン州立病院において(A)現行のデングサーベイランスより症例定義を広げた症例(これを「デング疑い症例」とする)、(B)ILIサーベイランス該当症例を対象に、まずNS1も加えた実験室診断を行いデングの検出率を検討し、デング/非デングの臨床症状および途上国の地方病院でも行える血液検査結果項目を比較し、ロジスティック回帰分析にてデングの早期診断に有効なパラメータを決定する。

3. 研究の方法

本研究にかかる東北大学の倫理委員会の承認が2013年6月に、フィリピン熱帯医学研究所の倫理委員会の承認が2014年4月に得られるので、2014年5月より患者登録・検体収集を開始した。なお、研究を行う場所を当初の予定であったパラワン州からターラック州へ変更した。

フィリピンルソン島中部(図1)にある、ターラック州立病院の外来および入院患者のうち、発熱後5日以内の患者を対象とし、インフォームドコンセントを取った。研究への参加に同意した患者から血液(全血およびフィルターペーパー)、唾液、尿を採取した。その場で血清分離を行い、PanBio社NS1抗原検出キットをもちいた迅速診断テストを行った。また入院患者においては入院中の臨床症状も併せて記載した。採取した検体はす

べてRITMへ送付し、Vero細胞およびC6/36細胞によるウイルス分離を行った。さらにrealtime RT-PCRを用いてデングウイルスE1遺伝子検出および血清型の決定を行った。RNA抽出は、200uLの血清からQIAamp MinElute (Qiagen)を用いて行った。RTおよびPCR反応は既報を参考にして行った(Johnson *et al*, J Clin Microbiol, 2005)。検出に利用したプライマーおよびプローブを表1に示した。

図1 ルソン島ターラック州の位置



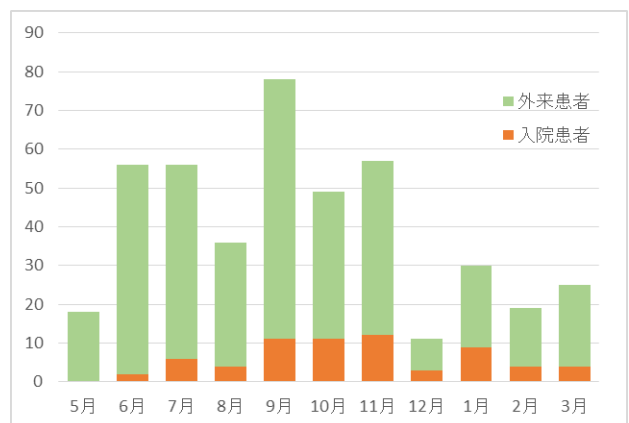
表1 デングウイルス検出に利用したプライマーおよびプローブ

DEN-1 F	5'-CAA AAG GAA GTC GTG CAA TA-3'
DEN-1 C	5'-CTG AGT GAA TTC TCT CTA CTG AAC C-3'
DEN-1 Probe	5'-FAM-CAT GTG GTT GGG AGC AGC C-BHQ1-3'
DEN-2 F (revised)	5'-CAG GCT ATG GCA CTG TCA C-3'
DEN-2 C (revised)	5'-CCA TTT GCA GCA ACA CCA TC-3'
DEN-2 Probe (revised)	5'-HEX-CTC TCC GAG AAC GGG CCT CGA CTT CAA-BHQ1-3'
DEN-2 F	5'-CAG GTT ATG GCA CTG TCA TGA T-3'
DEN-2 C	5'-CCA TCT GCA GCA ACA CCA TCT C-3'
DEN-2 Probe	5'-HEX-CTC TCC GAG AAC AGG CCT CGA CTT CAA-BHQ1-3'
DEN-3 F	5'-GGA CTG GAC ACA CGC ACT CA-3'
DEN-3 C	5'-CAT GTC TCT ACC TTC TCG ACT TGT CT-3'
DEN-3 Probe	5'-TEXAS RED-ACC TGG ATG TCG GCT GAA GGA GCT TG-BHQ2-3'
DEN-4 F	5'-TTG TCC TAA TGA TGC TGG TCG-3'
DEN-4 C	5'-TCC ACC TGA GAC TCC TTC CA-3'
DEN-4 Probe	5'-CY5-TTC CTA CTC CTA CGC ATC GCA TTC CG-BHQ3-3'

4. 研究成果

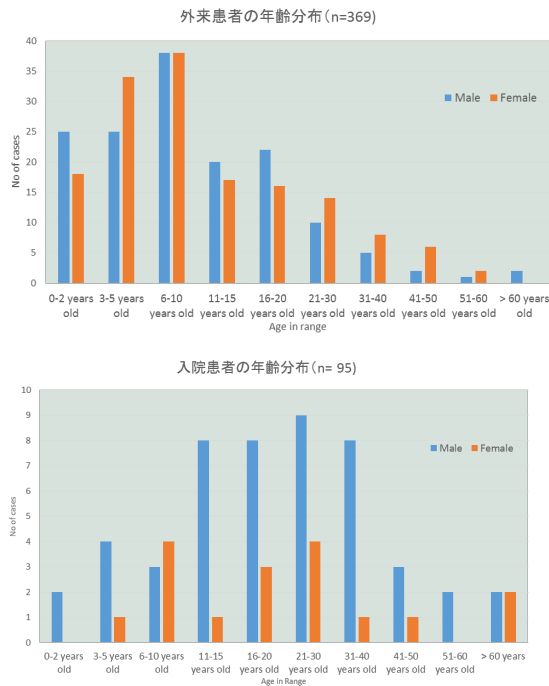
2014年5月から2015年3月の間に外来患者369症例、入院患者95症例を登録した。月別の登録患者数の内訳を図2に示す。

図2 月別登録患者数の推移(2014年5月 2015年3月)

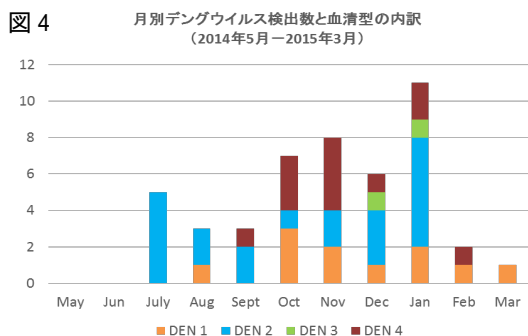


外来患者の平均年齢は 13 歳（中央値 9 歳）入院患者の平均年齢は 24 歳（中央値 21 歳）であった。外来および入院のそれぞれの年齢分布を図 3 に示す。

図 3 外来および入院患者の年齢分布



血清が収集できたのは外来 299 例および入院 72 例で、デングウイルス陽性症例数はそれぞれ 64 (21.4%) および 23 (31.9%) であった。PCR 陽性症例 87 例における血清型の内訳は 1 型が 45 例、2 型が 24 例、3 型が 2 例、4 型が 13 例、1 型と 2 型の混合感染が 2 例、2 型と 4 型の混合感染が 1 例であった。月別のデングウイルス検出数について図 4 に示した。



また、NS1 迅速診断キットと RT-PCR の両テストを行った、入院および外来合計 230 例の結果を比較したところ、NS1 迅速診断テストの結果は感度 30%、特異度 96% であった (表 1)。この感度の差は迅速診断キットと PCR の感度の差によるものと考えられるため、今後 ELISA または PCR による NS1 検出を行なう予定である。

表 1: NS1 迅速診断テストと RT-PCR を用いたデングウイルス抗原検出の比較

		RT-PCR (E1 遺伝子)		
		陽性	陰性	
NS1	陽性	16	7	23
	陰性	37	170	207
		53	177	230

次に、外来患者のうち RT-PCR 結果の得られている 251 例について、臨床症状とウイルス検出結果を比較した結果を以下に示した。一般的なインフルエンザ様症状（咳、頭痛、関節痛）のみならず、紅斑や出血といったデングウイルス感染後に多いと思われる症状の有無は RT-PCR 陽性と陰性の間ではほぼ同じ割合であった (表 2)。

表 2: 外来患者における、デングウイルス RT-PCR の結果と症状の有無の割合の比較 (n=251, 単位 = %)

	咳		頭痛		関節痛	
	あり	なし	あり	なし	あり	なし
PCR 陽性 (n=61)	45.9	54.1	31.1	68.9	21.3	78.7
PCR 陰性 (n=190)	45.3	54.7	27.4	72.6	16.3	83.7

	嘔吐		腹痛	
	あり	なし	あり	なし
PCR 陽性 (n=61)	8.2	91.8	26.2	73.8
PCR 陰性 (n=190)	14.2	85.8	29.5	70.5

	紅斑		出血	
	あり	なし	あり	なし
PCR 陽性 (n=61)	9.8	90.2	14.8	85.2
PCR 陰性 (n=190)	4.2	96.3	10.5	89.5

今回、臨床症状と RT-PCR の結果の比較について、単数項目では有意な差が見られなかったが、今後は複数の項目の臨床症状と RT-PCR 結果について比較を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 麻理子 (SAITO, Mariko)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80404234

(2)研究分担者

神垣 太郎 (KAMIGAKI, Taro)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80451524

鈴木 陽 (SUZUKI, Akira)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20443989

(3)連携研究者

なし