

氏 名	平 山 隆 則
(ふりがな)	(ひらやま たかのり)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成 25 年 1 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題名	Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum (尿中デングウイルス遺伝子のリアルタイム RT-PCR による検出: 血中ウイルス消失後の有用な検査診断法)
論文審査委員	(主) 教授 河 野 公 一 教授 浮 村 聡 教授 田 窪 孝 行

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《研究目的》

フラビウイルス科フラビウイルス属デングウイルスは 4 種の血清型に分類される。デングウイルス感染症はデング熱のほかに、血清型の異なるウイルスに再感染した場合にデング出血熱を来し、さらに進行し致死的な経過をたどるデングショックを起こすことがあるため、ウイルスの血清型別診断は特に重要である。

流行地域では検査設備の整備が遅れていることなどから診断がつかないまま、感染者が本邦に帰国することがある。非流行地域である本邦では不明熱として扱われることが多く臨床診断が遅れ病後にペア血清による検査で確定診断される。血中抗体はフラビウイルス属のウイルス間で交差反応を示すため診断に難渋することもあり、型別診断に至らないため、確定診断には血中デングウイルス遺伝子検出法や抗原検出法が広く用いられている。しかし、デングウイルス血症は病初期にのみ出現し、十分な量の抗体が形成される時期以

降ではウイルスの血清型別診断はできない。

そこで、申請者は患者尿中にウイルス遺伝子が存在することを示唆する症例報告に基き、感染実験によりマーマセット尿中にデングウイルス遺伝子が存在することを示した。本研究ではその先行研究の成果を臨床応用するために、患者尿中のウイルス遺伝子検出法を用いたデングウイルス感染症の確定診断と感染ウイルスの型別診断の意義と有用性を評価した。

#### 《対象と方法》

本研究は 2006 年から 2008 年の間に、日本国内の医療機関から国立感染症研究所に検査依頼された 53 例のデングウイルス感染症例の血液 78 検体及び尿 77 検体を対象として、国立感染症研究所の倫理審査委員会（2006 年 7 月 3 日開催）に於いて、審査承認の下に行われた。すべての症例は、発熱した日を第 0 病日とし、発症前にデングウイルス感染症流行地域への渡航歴があり、第 0 病日以降のいずれかの時点で血液中のデングウイルス遺伝子または特異抗原が陽性であった。

尿中の感染性ウイルスの分離には Vero 細胞を用いた細胞培養法を用い、血液と尿のデングウイルス遺伝子の検出には TaqMan RT-PCR 法を用いている。血液と尿共にデングウイルス遺伝子が陽性であった検体について、デングウイルス遺伝子 E 領域のシーケンスを比較した。血中の抗デング IgM 抗体の検出には IgM-capture ELISA kit を用い、抗デング IgG 抗体の検出には IgG indirect ELISA kit を用いた。

#### 《結 果》

すべての尿検体から感染性ウイルスは分離できなかったものの、尿中ウイルス遺伝子の陽性率は、第 0～1 病日および第 6～16 病日において 50%以上であり、そのうち第 8～11 病日では約 80%で、解熱期から回復期に陽性率が高いことを見出した。他方、血中ウイルス遺伝子の陽性率は、第 0～1 病日で 100%、第 2～5 病日で約 70～90%で、第 0～7 病日では 50%以上、解熱期以前の陽性率が高い結果であった。

一方、血中のデングウイルス特異 IgM 抗体は、第 4～5 病日に約 90%の検体で陽性を示し、同 IgG 抗体は第 6～7 日病日に約 90%が陽性となることを見出した。

同日に採取した尿あるいは血液のいずれか、または両者にウイルス遺伝子が検出された個体の陽性率は全経過を通して常に 50%以上で、第 0～2 病日と第 8～11 病日には 80%以上の陽性率を示すことを明らかにした。2 例では血中に特異抗体が産生されて血中ウイルス遺伝子を検出できなかったが、回復期においても尿中にウイルス遺伝子を検出した。

また、尿と血液から同時にウイルス遺伝子が検出された 6 症例の検討では、同時に分離同定されたそれぞれ遺伝子のシーケンスは一致した。

#### 《考 察》

本研究では、血中デングウイルス遺伝子検出法では血中のデングウイルス特異的抗体陽性率が上昇する解熱期には検出率が低下するのに対し、尿中ウイルス遺伝子検出法は、抗体陽性率が 100%に達する解熱期以降でも一定の確率で可能なことを明らかにした。

日本における致死的なデング出血熱あるいはデングショックの予防策として、ある型のデングウイルスに感染した者は他の型のデングウイルス流行地への渡航を控えることであるとされており、患者が感染したウイルスの型を明らかにすることは重要である。本研究では、血液を検体とした場合に一般に困難であるとされていた解熱期以降のウイルス遺伝子の分離を、尿を検体として用いることによって可能とした。尿からウイルス遺伝子が検出されるメカニズムは明らかではないが、少なくとも感染性のデングウイルスの分離はできないことから、免疫複合体としての非感染性のウイルスあるいはウイルスのコンポーネントが尿中に排泄されている可能性があった。

申請者は本研究の結果から、尿を用いたデングウイルス診断法は、感染性のない尿の単回採取により血清型同定も含めて診断可能であり、また血中ウイルス検出に比してより長期の検出が可能であった。

(様式 乙9)

## 論文審査結果の要旨

本研究は、デングウイルスの輸入感染症例 53 例の血液 78 検体と尿 77 検体のデングウイルス遺伝子をリアルタイム RT-PCR 法を用いて、血中デングウイルス特異抗体を EIA 法で検出し、デングウイルスの血中および尿中の動態を明らかにすることによって、尿中ウイルス遺伝子検出が臨床検査診断に応用できるか否かを明らかにしようとするものである。

本研究によって、血中デングウイルス特異抗体が上昇し、血中ウイルスが消失した後も患者尿からウイルス遺伝子を分離同定できることを明らかにしている。この結果は、症例報告やマーマセットの感染実験で観察されたウイルス尿症が、ヒトにおいて広く存在することを証明し、血中ウイルス検査や特異抗体検査ではカバーできない時期の病原体診断やウイルス型別診断が臨床的に可能であることを示すものである。

尿を用いたデングウイルス診断法は、感染性のない尿の単回採取により血清同定も含めて診断可能であり、また血中ウイルス検出法に比してより長期の検出が可能であることから、デング熱の診断及び感染症衛生対策に寄与するものと考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Clinical Microbiology 50(6): 2047-2052, 2012