

## 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

### 分担研究報告書

#### ブタにおける日本脳炎ウイルスサーベイランス

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)  
協力研究者 根路銘令子、伊藤美佳子、山田堅一郎、倉根一郎  
(国立感染症研究所)  
小川知子(千葉県衛生研究所)  
吉田靖子(東京都立衛生研究所)  
尾西 一(石川県保健環境センター)  
池ヶ谷朝香(静岡県西部食肉衛生検査所)  
佐原啓二(静岡県環境衛生科学研究所)  
杉山 明(三重県科学技術振興センター保健環境研究部)  
寺杣文男(和歌山県衛生公害研究センター)  
山西重機(香川県環境保健研究センター)  
渋谷 香(高知県衛生研究所)  
小野哲朗(大分県衛生環境研究センター)  
甲木和子 田端康二(熊本県保健環境科学研究所)  
糸数清正(沖縄県衛生環境研究所)

#### 研究要旨

1990年以降、日本脳炎患者の発生は、毎年10人以下であるが、2001年には和歌山県で11年ぶりに患者が発生し、2002年には13年ぶりに広島県で患者が発生している。ブタの抗体調査によれば、依然として関東以西のブタの間では日本脳炎ウイルスは、依然として蔓延している。近年、ブタからは、遺伝子型1型のウイルスが分離されている。ワクチン株として使用されている北京株は遺伝子型3型である。我々は、今回ブタの間で流行している日本脳炎ウイルス株が、遺伝子型1型であるのか遺伝子型3型であるのか、あるいは両者が混在しているのかを、8都県の施設によりウイルス分離を実施し、遺伝子解析により検討した。その結果香川県、三重県、静岡県のブタ血清から分離されたウイルス株は、遺伝子型1型であることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

日本脳炎ウイルスは、毎年夏期になると九州、四国地方からブタの間で流行し始め、近畿・東海・北陸・関東地方へと侵淫地域を拡大する。近年の日本脳炎患者の発生数は10人以下であるが、依然としてブタの間では夏期にウイルスが蔓延しているのが、現状である。近年、石川県や東京都のブタ

から遺伝子型1型のウイルスが分離されたという報告がある。一方、ワクチン株として使用されている北京株は遺伝子型3型である。従って、現在わが国で流行している株が、3型なのか1型なのかを明らかにする目的で、沖縄・高知・香川・三重・静岡・石川・千葉・東京の8都県のブタ血清からウイルスを分離し、遺伝子解析を実施した。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス分離

#### 分離ブタ血清の採取法

日本脳炎ウイルス IgM 抗体が陽性となった時点より、1 週ないし 2 週前のブタ血清をウイルス分離材料として用いた。

#### ウイルス分離法

分離は株化細胞による分離法を主として用いた。各施設で、乳のみマウス脳内接種法が得意な場合は、マウスによる分離を実施した。使用した細胞は Vero 細胞（アフリカミドリザル腎臓由来）および C6/36 細胞（ヒトスジシマカ由来）を用いた。

#### 遺伝子解析

分離したウイルスのうち、増殖の良いものから、E 領域に設定した 5 つのプライマーペアを用いて RT-PCR 法により遺伝子を増幅し、ABI prism 310 遺伝子解析装置を用いて E 領域の遺伝子解析を実施した。

## C. 研究結果

### 1. ウイルス分離

8 県のブタ血清から分離を試みたが、5 県の検体からウイルスが分離されている。現在、まだ試験実施中の検体もあるため、分離ウイルス株数および地域数は増える見込みである。いずれも株化細胞を用いて分離された（表 1）。

### 2. 遺伝子解析

香川県、三重県、静岡県 of ブタ血清から分離したウイルスのうち増殖の良いものから遺伝子解析を実施した。その結果、いずれも遺伝子型は 1 型であることが明らかとなった（図 1）。三重県と静岡県の分離ウイルス間のホモロジーは 99.6% であった。香川県の分離ウイルスは、三重県の分離株とは、98.1% のホモロジーであり、静岡県の分離株とは 97.9% のホモロジーであった。（図 1、2）

## D. 考察

本邦における日本脳炎患者数は、1980 年代には、20 から 40 例の範囲にとどまっていたが、1990 年に 11 年ぶりに 50 例を越えた。しかし、1991 年の 13 例の後、1992 年に降患者数は 10 例を越えない。しかしなが

ら、2001 年には和歌山県で 11 年ぶりに患者が発生し、2002 年には 13 年ぶりに広島県で患者が 3 例発生している。このような状況から我々は、現在わが国で日本脳炎ウイルスの増幅動物であるブタの間で、どのような株が流行しているのかを検討した。その結果、遺伝子型 1 型が分離された。以前から、石川県・東京都でブタから分離されたウイルスが 1 型であることが報告されていたことから、現在ブタの間で主として侵淫しているウイルスは、ワクチン株である北京株の遺伝子型 3 型と異なり、1 型であることが示唆された。今後、本邦のウイルス株が 1 型に置き換わっているのか、1 型と 3 型が混在しているのか、サーベイランスを続行し明らかにする必要がある。

## E. 結論

現在わが国に侵淫している日本脳炎ウイルスを分離しその分子疫学的解析を実施した結果、香川県・三重県・静岡県のブタから分離されたウイルスは、ワクチン株と異なり遺伝子型 1 型であった。

## F. 健康危険情報

日本脳炎は 2001 年に 11 年ぶりに患者が発生し、2002 年には 13 年ぶりに患者が 3 名発生した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane: Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *Journal of Virological Methods* 102, 61-66. 2002

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane: Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *Journal of Clinical Virology* 24(3):203-209. 2002

高崎智彦. 黄熱, その他のアルボウイルス感染症. *小児科診療* 65:2077-2081 (2002)

Yuuji Yamamoto, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Mikio Kimura, Kazushige Washizaki, Hiroki Yoshikawa, Akihiro Hitani, Tetsuya Nakamura, Aikichi Iwamoto. A Case of acute disseminated encephalomyelitis following dengue fever. *Journal of Infection and chemotherapy* 8:175-177, 2002

Arai YT, Kimura M, Sakaue Y, Hamada A, Yamada K, Nakayama M, Takasaki T, Kurane I. Antibody responses induced by immunization with a Japanese rabies vaccine determined by neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Vaccine*. 20(19-20):2448-2453, 2002

Akira Yamamoto, Mikio Nakayama, Yae Kurosawa, Ken Sugo, Hideharu Karasawa, Tetsuro Ogawa, Tomohiko Takasaki, Masato Tashiro, Ichiro Kurane. Development of a particle agglutination assay system for detecting Japanese encephalitis virus-specific human IgM, using hydroxyapatite-coated nylon beads. *J Virol Methods*. 104:195-201, 2002

多賀賢一郎、井村俊郎、林 昭宏、鎌倉和政、橋本 智、高崎智彦、倉根一郎、内田幸憲。日本人における黄熱ワクチン接種後の抗体獲得に関する検討。 *感染症学雑誌* 76(9):738-746, 2002

徳田敦子、多部田弘士、杉戸一寿、高崎智彦、山田堅一郎、倉根一郎：フィリピンへの団体旅行で感染したデング熱の3症例。 *感染症学雑誌* 76(11)953-957, 2002

高崎智彦。ウエストナイル熱／脳炎。 *東獣ジャーナル* 441(12)14-16 (2002)

高崎智彦。日本脳炎、その他の脳炎ウイルス。今日の治療指針 2003 年版。医学書院 143-144. 2003

高崎智彦。新世紀の感染症学「ウエストナイル熱／脳炎」 *日本臨床* 61(増刊号 2)288-291. 2003

高崎智彦。ウエストナイル熱／脳炎。 *Modern Media* 49(2) 1-6. 2003

## 2. 学会発表

K. I. Yamada, T. Takasaki, M. Nawa, I. Kurane: The future of dengue fever cases during 1998-2001 at National Institute of Infectious Diseases, Japan. XIIth International Congress of Virology (Paris) July. 2002

根路銘令子、高崎智彦、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎。フラビウイルス科、フラビウイルス属、日本脳炎ウイルス種の命名法に関する提案。第37回日本脳炎ウイルス生態学研究会。(大分)7月。2002年

中山幹男、松野重雄、吉田靖子、山西重機、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス分離株の遺伝学的変異と、その抗原性解析。第50回日本ウイルス学会。(札幌)10月。2002年

高崎智彦、倉根一郎。シンポジウム：新興・再興節足動物媒介ウイルス感染症の現状。第43回日本熱帯医学会大会(高知)11月。2002年

中山幹男、松野重夫、高崎智彦、倉根一郎。組織培養不活化日本脳炎ワクチンに関する研究—Vero細胞で増殖させたウイルスの遺伝学的検討—。第6回日本ワクチン学会(千葉)11月。2002年

新井 智、高崎智彦、多屋馨子、松永康子、倉根一郎、岡部信彦。2000年度感染症流行予測調査事業の結果を用いた、小児における予防接種歴別日本脳炎ウイルス中和抗体保有状況。第6回日本ワクチン学会(千葉)11月。2002年

表1. 各県より送付されたブタ血清からの日本脳炎ウイルス分離

2002.8.28-2003.3.7

県(衛研)名	採取月日	血清数		分離ウイルス数		PCR	増殖性	備考及び分離ウイルス名 (増殖性の良い株のみ)
		送付	治験	Vero	C6/36			
沖縄県衛環科研 北部  中南部	4月23日	25	0					
	4月30日	25	25	0	0			
	5月7日	25	0					
	5月7日	22	10	3	4	+	悪い	
	5月14日	25	18	1	1	+	悪い	
	5月21日	25	0					
高知県衛研	7月1日	10	10	2	2	+	悪い	
	7月15日	10	0					
静岡県西部食肉衛検所	7月15日	10	0					* 県衛研でもウイルスを分離している
	7月29日	10	0					
静岡県衛科研	8月5日	10	9	試験中	(4?)			JEV/sw/Shizuoka/33/2002
	8月12日	10	2*	2	2	+	非常に良い	JEV/sw/Shizuoka/39/2002
三重県科学技術振興センター保健環境研究部	7月23日	10	10	1	1(10?)	+	非常に良い	JEV/sw/Mie/41/2002
	7月30日	10	0					
	8月6日	10	0					
	8月13日	10	0					
石川県保健環境センター	8月7日	10	10	1	×**	+	悪い	**1 日後に細胞が脱落
	8月21日	10	10	4	2	試験中	良い	フィルター過後に接種 JEV/sw/Ishikawa/33/2002 JEV/sw/Ishikawa/38/2002 JEV/sw/Ishikawa/39/2002 JEV/sw/Ishikawa/42/2002
香川県衛研 坂出屠畜場	7月22日	20	12	3	3	+	非常に良い	JEV/sw/Kagawa/24/2002
	7月29日	20	0					JEV/sw/Kagawa/27/2002
	8月5日	20	2	2	1?	試験中	良い	JEV/sw/Kagawa/33/2002 JEV/sw/Kagawa/62/2002 JEV/sw/Kagawa/69/2002
熊本県保環科学研	7月1日	20	0					JEV/sw/Kumamoto/G1/2002
	7月8日	20	0					JEV/sw/Kumamoto/G5/2002
	7月15日	20	6	4	2	試験中	良い	JEV/sw/Kumamoto/G11/2002
	7月22日	20	3	3	3	試験中	良い	JEV/sw/Kumamoto/Y5/2002 JEV/sw/Kumamoto/Y10/2002 他2株
千葉県衛研 高安屠畜場	9月9日	10	8	試験中				
	9月17日	10	2	試験中	2?			
合計 8県	4月23日 ~9月17日	437	137	26	23(36?)			



☒ 2

		r	
AF045551.E-type1.txt	1:	TTTAACTGTCTGGGAATGGGGAATCGGGATTTTCATAGAAGGAGCCAGTGGAGCCACGTGG	60
SIZUOKA-39.E-protein	1:	.....C.....T...	60
KAGAWA-27.E-Protein	1:	.....C.....T...	60
MIE-41.E-Protein	1:	.....C.....T...	60
		***** *****	
AF045551.E-type1.txt	61:	GTGGATCTGGTGTTAGAAGGAGATAGCTGTTTGACAATTATGGCAAACGACAAACCAACA	120
SIZUOKA-39.E-protein	61:	.....A.....C.....C.....	120
KAGAWA-27.E-Protein	61:	.....C.....	120
MIE-41.E-Protein	61:	.....A.....C.....C.....	120
		***** *****	
AF045551.E-type1.txt	121:	CTAGATGTCCGCATGATCAACATTGAAGCTAGCCAACTTGCTGAAGTCAGGAGTTACTGT	180
SIZUOKA-39.E-protein	121:	.....C	180
KAGAWA-27.E-Protein	121:	.....C	180
MIE-41.E-Protein	121:	.....C	180
		*****	
AF045551.E-type1.txt	181:	TATCACGCTTCAGTCACTGACATTTCAACGGTGGCTCGATGCCCATGACTGGAGAAGCC	240
SIZUOKA-39.E-protein	181:	.....C...C....G...	240
KAGAWA-27.E-Protein	181:	.....T.....C.....	240
MIE-41.E-Protein	181:	.....C...C....G...	240
		***** *****	
AF045551.E-type1.txt	241:	CACAACGAAAAACGTGCTGACAGCAGCTACGTGTGCAAACAAGGCTTTACTGACCGCGGA	300
SIZUOKA-39.E-protein	241:	.....	300
KAGAWA-27.E-Protein	241:	.....	300
MIE-41.E-Protein	241:	.....	300
		*****	
AF045551.E-type1.txt	301:	TGGGGAAATGGATGTGGACTTTTCGGGAAAGGAAGCATTGACACATGCGCAAATTTTCT	360
SIZUOKA-39.E-protein	301:	.....	360
KAGAWA-27.E-Protein	301:	.....	360
MIE-41.E-Protein	301:	.....	360
		*****	

AF045551.E-type1.txt 361:TGTACCAGTAAGGCCATTGGAAGAATGATCCAACCAGAGAACATCAAGTACGAGGTTGGC 420  
 SIZUOKA-39.E-protein 361:.....A..... 420  
 KAGAWA-27.E-Protein 361:..... 420  
 MIE-41.E-Protein 361:.....C..... 420

\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 421:ATATTCGTGCACGGAACCACCACCTCGGAAAACCATGGGAATTACTCAGCGCAAGTAGGA 480  
 SIZUOKA-39.E-protein 421:.....T..... 480  
 KAGAWA-27.E-Protein 421:..... 480  
 MIE-41.E-Protein 421:..... 480

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 481:GCGTCTCAAGCAGCAAAGTTTACTGTAACTCCAAATGCTCCCTCAATAACCCTCAAGCTT 540  
 SIZUOKA-39.E-protein 481:.....C..... 540  
 KAGAWA-27.E-Protein 481:..... 540  
 MIE-41.E-Protein 481:.....C..... 540

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 541:GGTGATTATGGAGAAGTCACACTGGATTGTGAACCAAGGAGTGGACTGAACACTGAAGCG 600  
 SIZUOKA-39.E-protein 541:..... 600  
 KAGAWA-27.E-Protein 541:.....G..... 600  
 MIE-41.E-Protein 541:..... 600

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 601:TTCTATGTCATGACCGTGGGTTCGAAGTCATTCCCTAGTCCATAGGGAATGGTTCCATGAC 660  
 SIZUOKA-39.E-protein 601:.....C.....T.G..... 660  
 KAGAWA-27.E-Protein 601:.....T..... 660  
 MIE-41.E-Protein 601:.....C.....T.G..... 660

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*

AF045551.E-type1.txt 661:CTTTCTCTCCCTGGACGTCCCCTCGAGCACGGCATGGAGAAACAGAGAACTCCTCATG 720  
 SIZUOKA-39.E-protein 661:.....A.....T.....T..... 720  
 KAGAWA-27.E-Protein 661:.....A..... 720  
 MIE-41.E-Protein 661:.....A.....T.....T..... 720

\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 721:GAATTTGAACAGGCACATGCCACAAAACAATCCGTTCGTAGCTCTTGGGTCACAGGAGGGA 780

SIZUOKA-39.E-protein 721:.....G.....T.....G..... 780

KAGAWA-27.E-Protein 721:.....G.....T..... 780

MIE-41.E-Protein 721:.....G.....T.....G..... 780

\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 781:GGCCTCCATCAAGCGTTGGCAGGAGCCATCGTGGTGGAGTACTCGAGCTCAGTGAAGTTG 840

SIZUOKA-39.E-protein 781:..... 840

KAGAWA-27.E-Protein 781:..... 840

MIE-41.E-Protein 781:.....C..... 840

\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 841:ACATCAGGTCACCTGAAATGCAGGCTAAAAATGGACAACTGGCTCTGAAGGGCAGGACT 900

SIZUOKA-39.E-protein 841:.....T..... 900

KAGAWA-27.E-Protein 841:.....T..... 900

MIE-41.E-Protein 841:.....T..... 900

\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 901:TATGGCATGTGTACAGAAAAATTCTCGTTCGCGAAAAATCCAGCGGACACAGGCCATGGA 960

SIZUOKA-39.E-protein 901:..... 960

KAGAWA-27.E-Protein 901:..C..... 960

MIE-41.E-Protein 901:..... 960

\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 961:ACAGTTGTCATTGAGCTCACATACTCTGGAAGTGATGGTCCCTGTAAAATCCGATTGTC 1020

SIZUOKA-39.E-protein 961:.....T..... 1020

KAGAWA-27.E-Protein 961:.....C..... 1020

MIE-41.E-Protein 961:.....T..... 1020

\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*\_\*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 1021:TCAGTCGCGAGTTTAAACGACATGAC-CCCTGTGGGGAGGCTGGTAACAGTAAACCCCTT 1079

SIZUOKA-39.E-protein 1021:.....T.-..... 1079

KAGAWA-27.E-Protein 1021:.....-..... 1079



r

MIE-41.E-Protein 1021:.....T.-..... 1079  
 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 1080:CGTCGCGACATCTAGCTCCAACCTCAAAGGTGCTGGTTGAGATGGAACCTCCCTTCGGAGA 1139  
 SIZUOKA-39.E-protein 1080:..... 1139  
 KAGAWA-27.E-Protein 1080:..... 1139  
 MIE-41.E-Protein 1080:..... 1139  
 \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 1140:CTCTTATATCGTGGTTGGAAGAGGGGACAAGCAGATTAACCATCACTGGCACAAGCTGG 1199  
 SIZUOKA-39.E-protein 1140:..... 1199  
 KAGAWA-27.E-Protein 1140:.....C..... 1199  
 MIE-41.E-Protein 1140:..... 1199  
 \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 1200:AAGCACGCTGGGTAAAGCCTTCTCAACAACCTTTGAAAGGGGCTCAGAGACTAGCAGCGCT 1259  
 SIZUOKA-39.E-protein 1200:..... 1259  
 KAGAWA-27.E-Protein 1200:.....A..... 1259  
 MIE-41.E-Protein 1200:..... 1259  
 \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 1260:AGGTGACACAGCTTGGGACTTCGGCTCCATTGGAGGGGTATTCAACTCCATAGGGAAAGC 1319  
 SIZUOKA-39.E-protein 1260:.....C..... 1319  
 KAGAWA-27.E-Protein 1260:.....C.....C.....C..... 1319  
 MIE-41.E-Protein 1260:.....C..... 1319  
 \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 1320:TGTTACCAAGTATTTGGCGGTGCATTCAGAACGCTCTTCGGGGGAATGTCTTGATCAC 1379  
 SIZUOKA-39.E-protein 1320:.....G.C----- 1337  
 KAGAWA-27.E-Protein 1320:.....----- 1330  
 MIE-41.E-Protein 1320:.....T----- 1332  
 \*\*\*\*\*

AF045551.E-type1.txt 1380:ACAAGGACTAATGGGGGCCTTACTTCTTTGGATGGGTGTCAACGCACGAAACCGGTCAAT 1439  
 SIZUOKA-39.E-protein 1338:----- 1338

厚生労働省科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

デング IgM-ELISA へのベータプロピオラクトン不活化  
ウイルス抗原の応用

分担研究者 名和 優(埼玉医科大学微生物学教室)

共同研究者 高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス1部)  
山田堅一郎(国立感染症研究所ウイルス1部)  
倉根一郎(国立感染症研究所ウイルス1部)  
赤塚俊隆(埼玉医科大学微生物学教室)

**研究要旨** デングウイルス感染の血清学的診断法として有用な IgM-ELISA を実地応用する際に、ベータプロピオラクトン(BPL)不活化ウイルス抗原を用いて測定した。デングウイルスの感染培養液を 0.2% BPL, 37°C 30 分間反応後の不活化抗原を用いて得られた IgM-ELISA 結果は、不活化していないウイルス抗原で得られた結果と 67.9%一致した。不活化ウイルス抗原を用いた検査法の開発は、術者の生物学的危険性を回避するために有用であった。

**A. 研究目的**

デング熱は熱帯・亜熱帯地域に流行するウイルス感染症で、世界保健機関によれば年間数百万人の患者発生と、数万人規模の死亡があると推計されている。本研究事業の実施により、1999 年以来 4 年間に 100 例以上の日本人海外旅行者のデング感染が確認され、新興感染症としての重要性が認識された。

本研究の目的は、我が国におけるデング感染の血清学的診断に応用する目的で開発されたデングウイルス特異的 IgM 抗体検出のための酵素免疫吸着測定法(IgM-ELISA)を、国内で広く実施する為の改良であった。そ

の要点は、IgM-ELISA に使用するウイルス抗原の抗原性を損なうことなくウイルスの感染性を失活させ、検査実施者の安全を図ることであった。

日本国内にデングウイルスは常在しないから、日本人は一般に感染防御抗体を保有しない。したがって、術者の安全の追及は必須であった。

**B. 研究方法**

IgM-ELISA は、本研究事業による補助金を得て開発し、既に論文発表された方法を用いた(Nawa et al. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 2000; Nawa et al. *Journal of Virological Methods*, 92,

2001; Takasaki et al. Journal of Virological Methods, 102, 2002)。

1 型~4 型のプロトタイプ Dengue ウイルスは蚊由来 C6/36 cell へ感染し、4~5 日後の感染培養上清を抗原として用いた。感染培養上清中に含まれる感染性ウイルスを不活化するため、ベータプロピオラク톤を直接、最終濃度 0.2% に添加し、37°C、10 分から 1 時間保温した。BPL によるウイルス不活化の測定は、Vero cell を用いたフォーカス形成法を用いた。

IgM-ELISA に用いた血清検体は国立感染症研究所ウイルス 1 部にて Dengue 感染と診断されたものであった。

33 名の日本人を含む 48 検体の Dengue ウイルス IgM 陽性および陰性の患者血清を用いた。

(倫理面への配慮)

ヒト血清検体の使用に際しては、予め研究目的で使用されることが同意されたもので、かつ、2 重盲験法で個人情報の漏出を防止した。

## C. 研究結果

1) BPL による Dengue ウイルスの不活化を観察した(表 1)。

最初、感染培養上清中(0.025 ml あたり)に  $10^4$  から  $10^5$  フォーカス形成単位(FFU)と測定されたウイルス感染価は、0.2% BPL を添加し 37°C 10 分間の保温後に  $10^2$  FFU 以下に低下し

た。なお、感染価測定系の検出限界は  $10^2$  であったので、それ以下の感染価は測定できなかった。実験では 0.2% BPL で 37°C 30 分間処理したウイルス抗原を用いた。

2) BPL 不活化抗原と Dengue ウイルス抗体との反応性を観察した(図 1)。

ウイルス抗原の調整方法は、すでに公表した論文(Nawa et al. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 7, 2000; Nawa et al. Journal of Virological Methods, 92, 2001)にしたがった。4 価のウイルス抗原を階段希釈して ELISA 用プレートへ直接コーティングしたのち、一定濃度(2.5  $\mu$ g IgG/ml)に希釈した酵素標識した Dengue 患者血清由来 IgG およびフラビウイルス共通エピトープに対するマウスモノクローナル抗体 IgG (D1-4G2) とそれぞれ反応した。

図 1 は BPL 処理前後におけるウイルス抗原と検出抗体との反応を、特異的吸光度(ウイルス抗原での吸光度値 - 未感染コントロール抗原での吸光度値)で示した。BPL 処理後のウイルス抗原は、検出抗体と無関係に反応性が低下した。IgM-ELISA では、ウイルス抗原の希釈は吸光度 1.0~1.5 に調整されるので、BPL 処理後の 4 価抗原を 2 倍~4 倍希釈できた。そして、この時のウイルス感染価は  $10^2$

FFU 以下であったと推定された。

3) 以上の反応条件をもとに、ヒト血清検体を用いて、BPL 処理前後の抗原で IgM 検出した結果の相関を示す (図 2)。

2 回以上測定し、結果はすでに公表された方法 (Nawa et al. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7, 2000; Nawa et al. *Journal of Virological Methods*, 92, 2001) で表示した。BPL 処理前後の抗原で得られた結果 (P/N ratio) の相関係数 ( $r^2$ ) は 0.824 であった。これは、得られた数値の 67.9% は説明できる値であったことを示し、3 回の測定で 2 回以上の一致を意味した。

#### D. 考察

デングウイルス診断用キットは日本以外の数カ国で市販されているが、高価であり一般的でない。我が国に常在しない比較的希少な感染症であるデング感染診断を実施する時に、検査室あるいは研究室内でウイルスを培養し、IgM-ELISA を構築する必要がある。このような時にウイルスの抗原性を保持しつつ不活化する必要がある。感染症の血清診断に用いる微生物抗原一般の規制にしたがい、検査術者の安全を意図して不活化デングウイルス抗原の実用化が達成された。

BPL の不活化作用はタンパク質のアルキル化で、37°C 30 分間の反応中に水溶液中で水解するので処理後に除去を必要としないと説明されている。実際、米国では不活化狂犬病ワクチンの作成に BPL が使用されてきた。このことは、不活化に原因する抗原性変化を防止する意味からも、今回の実験結果と一致する点と言えた。

#### E. 結論

熱帯・亜熱帯地域よりの帰国者および入国者のデング感染診断を目的として、IgM-ELISA を安全に実施できる不活化ウイルス抗原がベータプロピオラクトン処理で可能となった。ベータプロピオラクトン不活化ウイルス抗原のデングウイルス IgM 抗体、および検出用フラビウイルス特異的モノクローナル抗体 D1-4G2 に対する反応性は、未処理ウイルス抗原と変化なかった。

#### F. 健康危険情報

実験はすべて生物学的安全基準にしたがって実施された。

#### G. 研究発表

本研究内容は *Dengue Bulletin*, volume 27, WHO, 2003 に刊行される予定である。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

Table1. Effect of BPL on infectivity of dengue viruses

Dengue virus serotypes	Original virus titers (FFU/25 $\mu$ l)	Incubation time (min.)	No BPL treatment (FFU/25 $\mu$ l)	0.2%BPL (FFU/25 $\mu$ l)
DENV-1	6.9x10 <sup>5</sup>	10	6.9x10 <sup>5</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		30	6.2x10 <sup>5</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		60	5.9x10 <sup>5</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
DENV-2	1.2x10 <sup>5</sup>	10	1.2x10 <sup>5</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		30	1.1x10 <sup>5</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		60	1.0x10 <sup>5</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
DENV-3	1.3x10 <sup>4</sup>	10	1.3x10 <sup>4</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		30	1.3x10 <sup>4</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		60	1.3x10 <sup>4</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
DENV-4	4.8x10 <sup>4</sup>	10	4.6x10 <sup>4</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		30	4.6x10 <sup>4</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
		60	4.6x10 <sup>4</sup>	<1x10 <sup>2</sup>

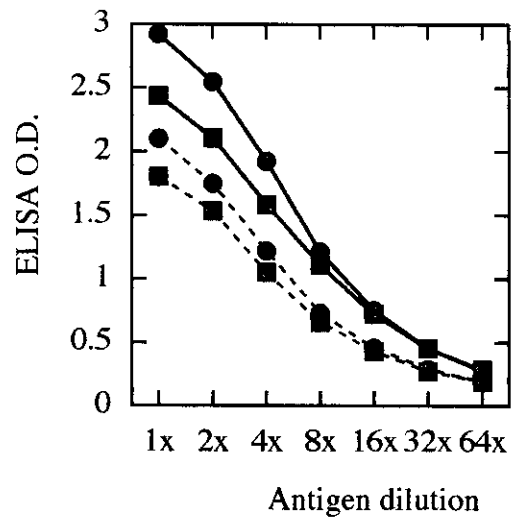


Fig. 1 Reactivity of the tetraivalent BPL-treated dengue viral antigen.

Dengue antigen captured on the solid phase was detected by horseradish peroxidase-conjugated human IgG (2.5 µg/ml, circle) and 4G2 IgG (2.5 µg/ml, square). Solid line indicates untreated antigen, and after broken line indicates BPL-treated antigen.

n=48

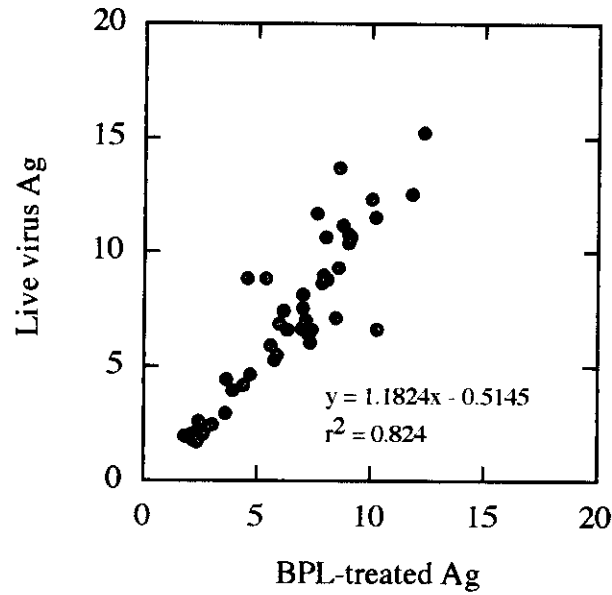


Fig. 2 Comparison of the results obtained by IgM-capture ELISA with BPL-treated tetravalent dengue viral antigen and by that with untreated antigen.

Forty-eight dengue IgM-positive and negative serum specimens were subjected to IgM-capture ELISA. Untreated and BPL-treated dengue antigens were used. Results were presented as Data as the P/N ratio.



厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：現在世界の熱帯地域の開発途上国における保健衛生面での最重要な節足動物媒介性ウイルスであるデングウイルスについてその病原性を分子レベルで明らかにすることを目的として、デングウイルス感染性 cDNA クローンをベースとして PrM 蛋白に変異を持ったリコンビナントウイルスを作製してその生物学的性状を検討した。その結果、PrM 遺伝子の 16 番目のアミノ酸としてイソロイシン（元はアルギニン）を持ったウイルスがヒト単核球系培養細胞クローン K562 において高い感染性をしめしかつヒト樹状細胞において高いサイトカイン刺激能を有することが示された。この結果はデング感染の重症化にウイルス側因子も重要な要因となることを直接的に示すものであり、デング流行の疫学調査においてはウイルス遺伝子の詳細な解析が不可欠であることを示唆している。またデング流行地域においてその鑑別診断上重要な蚊媒介性ウイルスであるチクングニヤウイルスについてその全塩基配列を明らかにし、この情報をもとにチクングニヤウイルス感染を迅速に検出し同時に分子疫学解析にも応用できるチクングニヤウイルス特異的遺伝子検出法を作製した。

A. 研究目的

デングウイルス感染症、西ナイルウイルス感染症など、蚊で媒介されるウイルス感染症はアジアを含む熱帯の発展途上の国々で近年その患者数・流行地域が増加・拡大しており、本邦でもこれらの地域への海外旅行者の増加に伴い輸入伝染症としてデング患者の発生が報告され公衆衛生上重要な感染症となっている。また蚊で媒介されるこれらの疾患は地球温暖化に伴い、日本を含む温帯地域において拡大する可能性も懸念される状況であり、実際に米国では 1999 年に中東地域から侵入した西ナイルウイルスが土着拡大し 2002 年には 3000 名をこえる患者が発生している。従って、これらの感染症に対する診断法の開発・改良や病原性の解明は感染予防、治療に直結する重要な研究項目である。

本分担研究では蚊媒介性ウイルス感染症のなかでも予防法の確立していないデングウイルス

感染に焦点をあて、デングウイルスの病原性を分子レベルで解析することを目的として遺伝子工学的手法で変異ウイルスを作製し、その病原性を検討した。また、デングウイルスと同じ蚊（ネッタイシマカ）によって媒介されるチクングニヤウイルスについてデングウイルスとの鑑別を分子レベルで迅速に行う事を可能にする目的でその全塩基配列を決定し、遺伝子検出法（特異的 RT-PCR）を作製した。

B. 研究方法

i) リコンビナントウイルスを用いたデングウイルスの病原性の研究

- 1) R.M.Kinney が確立した感染性デング 2 型ウイルスの cDNA クローン pD2/IC-30P-A に重症型デング患者からのウイルスに見られたアミノ酸置換 (PrM16 がイソロイシン) を置換

したクローンを構築する。またこのクローンの置換を元にもどしたクローン (リバータント) も作製する。

- 2) 構築したクローンプラスミドを精製して試験管内で T7 RNA 合成酵素を用いて変異人口ウイルスの RNA を転写する。
- 3) 転写した種々の人工ウイルス RNA をエレクトロポレーション法により LLC-MK2 細胞に導入する。
- 4) その後回収されたウイルスについて、ヒトの単核球系培養細胞 K562, および健康人から供与されたヒト樹状細胞 (DC 細胞) にたいする感染性、およびサイトカイン刺激性を検証する。
- 5) 以上の結果を総合的に判断して Dengue 感染症の病原性に関するウイルス側要因について検討する。

ii) チクングニヤウイルスの塩基配列の決定と遺伝子診断法の開発

- 1) 回転培養法で大量に培養したヒトスジシマカ培養細胞クローン C6/36 細胞にチクングニヤウイルスを感染させ培養液中に産生されたウイルス粒子を CS レジン、蔗糖密度遠心勾配超遠心法などを用いて高純度に精製し、そこからウイルス遺伝子 RNA を抽出する。
- 2) 逆転写酵素を用いてウイルス遺伝子 RNA に相補的な一本鎖 cDNA を合成する。この一本鎖 cDNA から LongPCR 技術を用いてチクングニヤウイルスの 5' と 3' 末端を除く 3 つの長い遺伝子断片を増幅してジーンウォーキング法で直接遺伝子断片の塩基配列を読む。
- 3) 5'、と 3' 末端についてはそれぞれ 5'RACE 法、3'RACE 法にて塩基配列を読む。
- 4) 上記の完全長のチクングニヤウイルス遺伝子塩基配列を他のアルファウイルスと比較解析する。

5) 上記の遺伝子情報を用いて特異的 RT-PCR 法を構築する。

C. 結果

- 1) 人工変異 Dengue 2 型ウイルスの作製。変異を導入した Dengue 感染性クローン pD2/IC-30P-A はウイルス粒子として回収できたものと出来ないものがあつた。即ち、クローン本来のウイルスと PrM の 16 と 81 が Dengue 出血熱 (DSS) 型をしたウイルス <Mut16>、及びその変異を元に戻したリバータントは増殖性のあるウイルスとして回収可能であつたが、PrM の 16 と 81 がその他の組み合わせのクローン、Mut81 や Mut16/81 のウイルスは回収できなかった (表 1)。このことは PrM 蛋白の 16 と 81 が立体構造上密接な関連をもっていることを示唆するものと考えられた。

(表 1) リコンビナントウイルスの回収

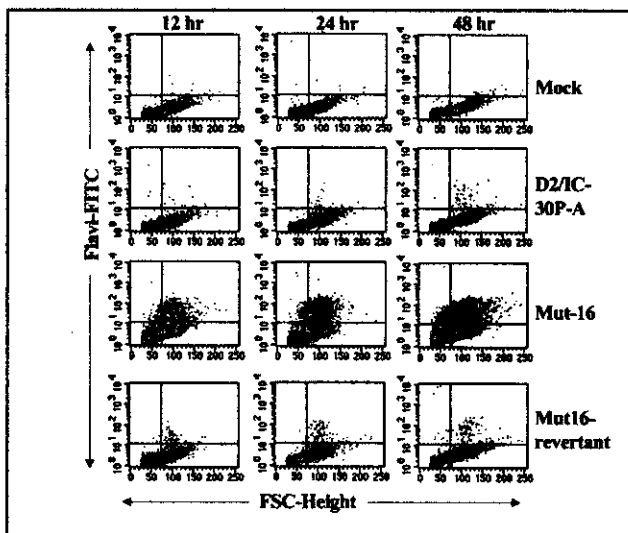
	Amino acid positions in PrM region		Infectivity
	16	81	
D2IC/30P-A	R	T	Low
Mut16	I	T	Highest
Mut16-revertant	R	T	Low
Mut81	R	A	Unstable
Mut16/81	I	A	Unstable
ThNH7/93	I	T	High

- 2) 回収されたウイルス株の解析。

表 1 の Mut16 は DSS タイプの変異を導入したウイルスである。このウイルスは図 1 に示すようにヒトの樹状細胞 (DC 細胞) に感染させた場合、元のウイルスと比較して 10 倍以上の高い感染性を示した。さらに Mut16 から PrM の 16 番目のアミノ酸を元のアミノ酸に戻した Mut16-revertant ではこの高い増殖性は見られず、PrM16 の 1 アミノ酸置換が高い増

殖性をもたらしていることが明らかとなった。この性状は K562 細胞でも同様であったが、蚊培養細胞での増殖性はこれほど差が見られず (Data not shown) この性質はヒト細胞に特に特徴的な現象であることが示された。

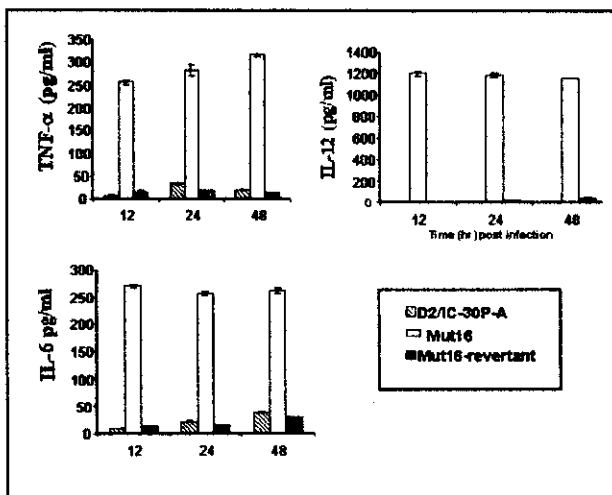
(図 1) ヒト DC 細胞へのウイルスの感染性



3) 変異ウイルスのヒト DC 細胞感染時のサイトカイン刺激能の差異。

上記のウイルス感染 DC 細胞培養上清中のサイトカインを定量しその差異を比較した。その結果 DSS タイプの変異ウイルス Mut16 は元のウイルス株に比べて極めて高いサイトカイン刺激能を持つことが明らかとなった。とくに今回計測した TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-6 のうち IL-12 の刺激が最も強いことがしめされた。

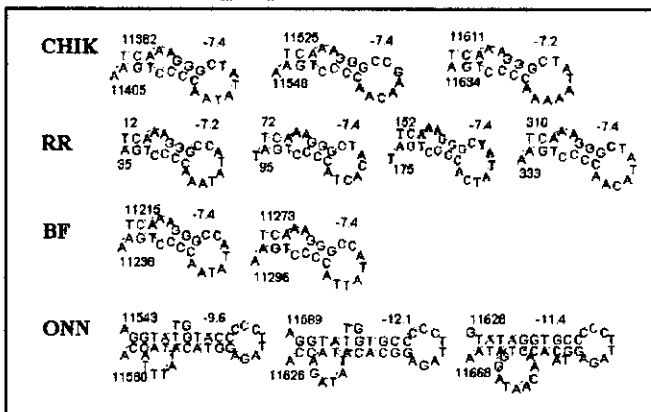
(図 2) 変異ウイルス感染ヒト DC 細胞におけるサイトカインの分泌



4) チクングニヤウイルスの全塩基配列。

チクングニヤウイルスのプロトタイプウイルスである S27 株 (タンザニア株) の全塩基配列を決定した。他のアルファウイルス群と比較した結果、本ウイルスは遺伝子の翻訳領域ではオニオンニオンウイルス (ONN) と高い近似性を示したが、5'および 3'非翻訳領域の配列および反復配列構造 (Repeated sequence element, RSE) が全くことになっており、ONN ウイルスとは異なる種として分類されるべきであると結論した (図 3)。また 3'非翻訳領域内部に本ウイルス株に特異的な Internal polyadenylation [I-poly(A)] 部位を発見した。この配列は GenBank に (AF369024) として登録された。この結果チクングニヤウイルス特異的 RT-PCR に用いるプライマーの設計が容易になった。

(図 3) チクングニヤウイルスと近縁のウイルスの 3 'RSE の構造比較



5) チクングニヤウイルス特異的遺伝子検出診断法の確立。

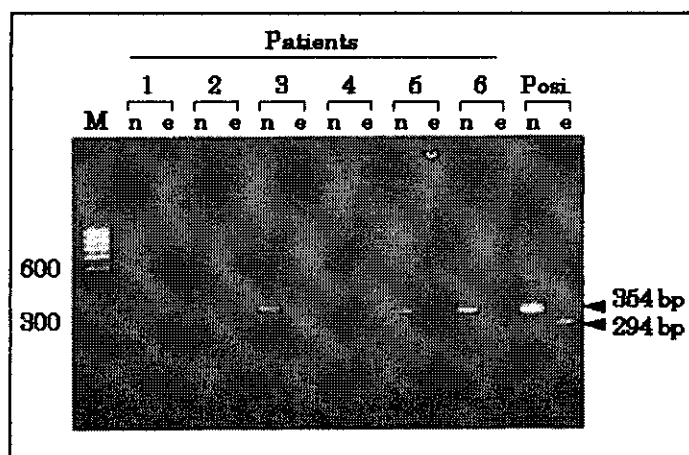
さきのウイルス全塩基配列のデータをもとに表 2 の診断用プライマーを設計・合成してデングウイルスと鑑別診断可能な迅速遺伝子検出法を確立した。これを 1998 年にマレーシアで発生したデング様疾患 (実はチクングニヤの流行) の流行時に採取された血清を用いて検証した結果、今回作製したチクングニヤ特異的

RT-PCR 法は特異性が高く、同時に遺伝子増幅産物が分子疫学にそのまま利用可能であることがしめされた。(図4)

(表2) プライマーの塩基配列と Tm 値

Primer Code	Sequence (5' to 3')	Tm (°C)	Product (bp)
<b>naP1 primer set</b>			
CHIK/naP1-S	TAGAGCAGGAAATTGATCCC	61.1	354
CHIK/naP1-C	CTTTAATCGCCTGGTGGTAT	61.7	
<b>E1 primer set</b>			
CHIK/E1-S	TACCCATTTCATGTGGGGC	62.7	294
CHIK/E1-C	GCCTTTGTACACCACGATT	59.4	

(図4) 特異的 RT-PCR による患者からのチクングニヤウイルス遺伝子の検出



#### D. 結論

- 1) デングウイルスの重症化即ち、デング出血熱の発症要因としてウイルス側の因子も大きく関与する可能性が示唆された。とくに PrM 蛋白については 1 アミノ酸の変異でもヒトのデング感染標的細胞である樹状細胞への感染性が大きく修飾されることが証明された。
- 2) デングウイルス感染症との鑑別疾患として重要なチクングニヤウイルスの全塩基配列を世界ではじめて完全に解読した。この結果、従来その差異が明確でなかったオニオンニオンウイルスとのウイルス遺伝学的な差異が明白となった。
- 3) 上記 (2) の研究結果にもとづき、デング

感染とチクングニヤ感染を迅速に鑑別できる RT-PCR 診断法が確立された。

#### E. 考察

デングウイルス感染における重症病型即ちデング出血熱の発症機序は依然として不明であり、デングワクチンの開発や治療法の改善に関して大きな障害となっている。従来発症機序に関してはウイルス要因説と二次感染説、ヒトの遺伝的素因説などが唱えられていたが、今回の我々の研究成果はウイルスの性状も明らかに病原性を修飾する因子であることを分子レベルで証明したものとして評価できる。とくにサイトカインの分泌がウイルス株により左右される事を示したことは、デング出血熱の病態である血管からの体液の漏出が何らかのリンフォカインによりコントロールされていると推測されている現状から鑑みて極めて重要な発見であると思われる。

チクングニヤウイルス感染は重症化することが稀であるため今まであまり重点的な研究がなされていなかった。今回、我々が発表するまで全遺伝子塩基配列の報告がなかったのもそのせいである。しかしこの疾患は臨床的にはデング熱との鑑別が困難でありまた、デングと同じ蚊により媒介されるため、デング熱の正確な疫学調査を行う上で極めて重要な疾患である。今回、このウイルス遺伝子の全塩基配列が明らかとなり、分子疫学を含む調査研究が促進されると期待される。

#### F. 健康危険情報

本年(平成15年2月)にインド中央部に位置する Pune 市をデングと日本脳炎の海外学術調査で訪問した。現地では上記2つの蚊媒介性疾患の他に西ナイルウイルスも恒常的に分離されているとの報告があった。この地域は従来からの西ナイルウイルス汚染地域ではあるが、今後このウイルスの分布が東方に拡大する可能性があり今後の調査が必要と考えられる。