

厚生労働科学研究費

国際医学協力研究事業

ウイルス性感染症の診断、疫学及び  
予防に関する研究

平成 17 年度 総括研究報告書

平成 18 (2006) 年 3 月

主任研究者 高島郁夫

北海道大学大学院獣医学研究科

## 目 次

### I. 総括研究報告

- ウイルス性感染症の診断、疫学及び予防に関する研究 ..... 1  
高島郁夫

### II. 分担者研究報告

1. アルボウイルス感染症の診断法の開発 ..... 9  
倉根一郎
2. 日本脳炎ウイルスの疫学 ..... 12  
竹上 勉
3. 日本脳炎ウイルスの予防法の開発 ..... 16  
小西英二
4. ウイルス性下痢症の診断、疫学ワクチンと疾病負担 ..... 21  
中込 治
5. 狂犬病に対する治療法の開発 ..... 26  
西園 晃
6. 狂犬病の診断法の開発 ..... 39  
森本金次郎
7. 狂犬病予防法の開発 ..... 45  
河合明彦
8. ハンタウイルス感染症の疫学的研究 ..... 50  
荻和宏明
9. ハンタウイルス感染症の診断法 ..... 55  
有川二郎
10. クリミア・コンゴ出血熱の診断法の開発 ..... 61  
西條政幸
11. クリミア・コンゴ出血熱の疫学 ..... 66  
倉田 毅

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 69

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 70

## V. 研究成果の刊行物・印刷

総括研究報告書

ウイルス性感染症の診断、疫学  
及び予防に関する研究

主任研究者 高島郁夫 北海道大学大学院獣医学研究科 教授

研究要旨

アルボウイルス感染症の ELISA による血清診断法と、Real-time PCR による遺伝子検出法を開発した。日本脳炎ウイルスとデングウイルスの最近の流行株の遺伝子型を明らかにした。デングワクチンの防御効果をマウスで評価するモデルを作出した。ロタウイルス感染症の日本の小児における疫学状況を明らかにした。狂犬病ウイルスに対する中和活性を有するヒト型モノクローナル抗体を作出した。緑色蛍光物質遺伝子組換え狂犬病ウイルスを利用した新しい中和抗体測定法を開発した。狂犬病ワクチンの不活性化条件に改良を加えた。ハンタウイルス感染症とクリミアコンゴ出血熱の Real-time PCR 法による遺伝子診断法を開発し、ハンタウイルス感染症のハムスターにおける動物感染モデルを構築した。

研究分担者

荻和宏明・北海道大学・助教授

竹上 勉・金沢医科大学・教授

有川二郎・北海道大学・教授

河合明彦・京都大学・教授

倉田 毅・国立感染症研究所・所長

小西英二・神戸大学医学部・助教授

倉根一郎・国立感染症研究所・部長

西條政幸・国立感染症研究所・主任

西園 晃・大分大学医学部・教授

研究員

中込 治・長崎大学・教授

森本金次郎・国立感染症研究所・

室長

A. 研究目的

アルボウイルス感染症では、デング熱の患者が東南アジアを中心に多数発生しており、アメリカで流行してい

るウエストナイル熱の日本への侵入の危険性が高くなっている。ウイルス性下痢症は東南アジアの幼児を中心に流行していたが近年、日本の老人ホ

ームでノロウイルス感染症の流行が  
起り死者も発生したことから、社会問  
題となっている。狂犬病は、日本では  
発生はないものの、東南アジア諸国で  
は多数の死者を記録しており、日本へ  
の侵入の可能性も高い。腎症候性出血  
熱は中国、ロシアを中心に多数の患者  
発生を記録している。これらの感染症  
につき、精度の高い診断法を確立し、  
疫学調査を実施して、国内外における  
汚染地の特定とヒトにおける感染状  
況の解明に努める。さらに病原体を分  
離し性状を解析するとともにワクチ  
ンの開発を行う。

## B. 研究方法

アルボウイルス感染症；

診断法の開発：感染性を持たないウイ  
ルス様粒子を抗原に用い、安全で特異  
性に優れた ELISA による血清診断法  
を開発する。

疫学：国内外の流行地において人、動  
物、節足動物の野外材料からウイルス  
を分離して、分離ウイルスの性状を調  
べる。

ワクチン開発：培養細胞由来ワクチン、  
DNA ワクチンおよびウイルス様粒子  
ワクチンを開発し、評価する。

ウイルス性下痢症；

診断法の開発：ロタウイルス、ノロウ  
イルスとサポウイルスの疫学調査に  
利用できる診断法を開発する。

疫学：アジア地域で疫学調査を実施し、

ロタウイルス、ノロウイルスとサポウ  
イルスを分離する。これらのウイルス  
株の血清学的性状と遺伝子性状を調  
べる。

狂犬病；

ワクチンの開発：リバーズジェネティ  
クスを用いて狂犬病に対する安全で、  
安価な生ウイルスワクチンを開発す  
る。

治療用抗体の作出：狂犬病の暴露後治  
療に用いるために、ファージディスプレイ  
法により中和抗体活性を保有す  
る人型単クローン性抗体を作出する。

ウイルス性出血熱；

疫学：アジア地域でハンタウイルス感  
染症の人及び野生げっ歯類の疫学調  
査を実施しウイルスを分離する。患者  
の発生状況と流行地の特定を計り、病  
原巣げっ歯類を同定する。ウイルスの  
遺伝子の系統解析とげっ歯類の遺伝  
子の系統解析の成績を対応させ、ウイ  
ルスとげっ歯類の共進化の関連を明  
らかにする。

## C. 研究結果と考察

アルボウイルス感染症；

東チモールにおける 2005 年のデン  
グ熱流行時に TaqMan RT-PCR 法によ  
り 40 名からウイルス遺伝子が検出さ  
れた。このうち 37 名は 3 型、2 名は 2  
型、1 名は 1 型の Dengue ウイルス遺伝

子が各々検出され、TaqMan RT-PCR 法の有用性が確認された。石川県で 2005 年に採集した蚊から分離されたウイルスに遺伝子タイプ 1 型と 3 型のウイルスが混在していた。デングウイルスワクチンの防御効力を評価するためウイルス血症防御を指標として、ddy マウスを用いた感染モデルを作出した。今後デングウイルスワクチンの防御効果を評価し得ることが示された。

ウイルス性出血熱：

Puumala 型ハンタウイルスの TaqMan Real-time PCR 法による遺伝子検出法と抗原検出 ELISA 法を開発するとともに、ハムスターの感染モデルを構築した。本動物実験系がワクチンや抗ウイルス剤の評価に有用であることが明らかになった。TaqMan Real-time PCR 法によるクリミアコンゴ出血熱ウイルスの遺伝子検出法を開発した。

ウイルス性下痢症：

秋田県において急性胃腸炎の小児患者から分離したロタウイルス 763 検体の electropherotype を決定し、下痢症の重症度との関連について調べたところ、ロタウイルスの株の間にはその病原性に大きな違いがないことが示唆された。

狂犬病：

狂犬病ウイルスに対するヒト型抗

体を作成するため、コンビナトリアル・ライブラリー法におけるファージディスプレイ法を組み合わせ、中和抗体活性を有するヒト抗体 Fab クローンを 2 クローン選別できた。GFP-組換え狂犬病ウイルスを作出し、これを中和抗体測定用に応用したところ本法と従来の中和試験の抗体価の間に強い相関が示された。今後簡便な中和抗体測定法として有用であることが示された。狂犬病ウイルスワクチン不活性化法としてホルマリンと BPL を比較したところ、ホルマリン不活性化が抗原性の保存に優れていることが示された。

#### D. 結論

アルボウイルスの血清診断法と遺伝子検出法が開発され、日本脳炎ウイルスとデングウイルスの流行株が特定された。ロタウイルスの小児における流行状況が明らかとなった。狂犬病ウイルスに対する中和活性を有するヒト型 Fab モノクローナル抗体の作出に成功した。さらに GFP 遺伝子組換え狂犬病ウイルスを用いて新しい中和抗体測定法を開発した。ハンタウイルスとクリミアコンゴ出血熱ウイルスの Real-time PCR 法による優れた感度を有する遺伝子診断法を開発した。

#### E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nukui Y, Tajima S, Kotaki A, Ito M, Takasaki T, Koike K, Kurane I. Novel Dengue virus type 1 from travelers to Yap State, Micronesia. *Emerging Infectious Diseases*. 12:343-346, 2006
- 2) Murakami M, Ota T, Nukuzuma S, Takegami T. Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication in vitro and in vivo. *Microbiol Immunol*. 49:1047-1056, 2005.
- 3) Konishi E, Shoda M, Kondo T. Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in racehorses in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist. *Vaccine*. 24:516-524, 2005.
- 4) Ando T, Yamashiro T, Sonoda YT, Mannen K, Nishizono A. Construction of human Fab library and isolation of monoclonal Fabs with rabies virus neutralizing ability. *Microbiol Immunol*. 49:311-322, 2005.
- 5) Khawplod P, Shoji Y, Ubol S, Mitmoonpitak C, Wilde H, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. Genetic analysis of dog rabies viruses circulating in Bangkok. *Infect Genet Evol*. Jul, 2005.
- 6) Khawplod P, Inoue K, Shoji Y, Wilde H, Ubol S, Nishizono A, Kurane I, Morimoto K. A novel rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for rabies virus visualizing a green fluorescent protein. *J of Immunological Methods*. 125:35-40, 2005.
- 7) Irie K, Kawai A. Further studies on the mechanism of rabies virus neutralization by mAb#1-46-12. *Immunol*. 49:721-731, 2005.
- 8) Thirapanmethee K, Ootani N, Sakai M, Lien C.K, Kawai A. Further studies on the soluble form(Gs) of rabies virus glycoprotein(G): Molecular structure of Gs protein and possible mechanism of the shedding. *Microbiol Immunol*. 49:733-743, 2005.
- 9) Toriumu H, Kawai A. Structural difference recognized by a monoclonal antibody #404-11 between the rabies virus nucleocapsid(NC) produced in virus infected cells and the NC-like structures produced in the nucleoprotein(N) cDNA-transfected cells. *Microbiol Immunol*. 49:757-770, 2005
- 10) Schmidt J, Jandrig B, Yoshimatsu K, Arikawa J, Meisel H, Niedrig M, Pitra C, Kruger D. H, Ulrich R. Nucleocapsid protein of cell-culture-adapted Seoulvirus strain 80-39:

Analysis of its encoding sequence, expression in Yeast and Immuno-Reactivity. *Virus Gene*. 30:37-48, 2005.

- 11) Chandy S, Mitra S, Sathish N, Vijayakumar T S, Abraham Oc, M.V. Jesudason MV, Abraham P, Yoshimatsu K, Arikawa J, Sridharan G. A pilot study for serological evidence of hantavirus infection in human population in south India. *Indian J Med Res*. 122:211-215, 2005.

#### G. 学会発表

- 1) 苅和宏明：野生げっ歯類を対象としたハンタウイルス感染症の比較疫学的研究：第139回 日本獣医学会学術集会、和光(2005, 3)
- 2) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、舘敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：野生げっ歯類からのハンタウイルス抗原検出用ELISAの開発：第139回 日本獣医学会学術集会、和光(2005, 3)
- 3) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群

(SARS) コロナウイルスに対するモノクローナル抗体エピトープ解析：第139回 日本獣医学会学術集会、和光(2005, 3)

- 4) 野田寛、苅和宏明、浅野淳、安居院高志、倉野義裕、内田好昭、藤井信之、岡田政久、高島郁夫：重症急性呼吸器症候群(SARS) コロナウイルスのヌクレオキャプシドに対するモノクローナル抗体の性状解析：第140回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 5) 谷川洋一、苅和宏明、萩谷友洋、Nur Hardy Bin Abu Dand、Nandadeva Lokugamage、Kumari Lokugamage、舘敦史、好井健太郎、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析：第140回 日本獣医学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 6) 伊川綾恵、好井健太郎、川上和江、後藤明子、小原真弓、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いたELISA法による野鼠血清スクリーニング法



- の開発：第 140 回 日本獣医学学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 7) 中村一郎、吉松組子、奥村恵、YANAGIHARA Richard、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎：食虫類由来ハンタウイルス（トッタパラセンウイルス）のシクスにおける感受性の検討：第 140 回 日本獣医学学会学術集会、鹿児島(2005, 9-10)
- 8) 好井健太朗、後藤明子、小原真弓、伊川綾恵、苅和宏明、高島郁夫：フラビウイルス prM 蛋白のアミノ酸配列保存領域のウイルス粒子出芽への影響：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 9) 伊川綾恵、好井健太朗、後藤明子、小原真弓、苅和宏明、高島郁夫：ダニ媒介性脳炎ウイルス組み換え蛋白を用いた ELISA 法による野鼠血清スクリーニング法の開発：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 10) 苅和宏明、谷川洋一、好井健太朗、吉松組子、有川二郎、高島郁夫：ゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) における Puumala 型ハンタウイルスの感染様式の解析：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 11) 中村一郎、吉松組子、奥村恵、垂石みどり、苅和宏明、高島郁夫、有川二郎：タイランド型ハンタウイルス感染症の血清診断系の開発：第 53 回 日本ウイルス学会、横浜(2005, 11)
- 12) Yoshii K, Goto A, Hayasaka D, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion. 13<sup>th</sup> International Congress of Virology. San Francisco, U.S.A., 2005, July.
- 13) Arikawa J, Pattamadilok S, Lee B-H, Kumperasart S, Yoshimatsu K, Okumura M, Nakamura I, Araki K, Khoprasert Y, Dangsupa P, Panlar P, Jandrig B, Kruger DH, Klempa B, Jakel T, Schmidt J, Ulrich R, Kariwa H. Serological detection and antigenic and genetic characterization of Thai and virus, genus hantavirus, in humans and rodents in Thailand. 13<sup>th</sup> Internatio

- nal Congress of Virology. San Francisco, U. S. A., 2005, July.
- 14) Takashima I, Shirato K, Goto A, Kariwa H. Viral envelope glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. 13<sup>th</sup> International Congress of Virology. San Francisco, U. S. A., 2005, July.
- 15) Kariwa H, Lokugamage K, Lokugamage N, Miyamoto H, Iwasa MA, Hagiya T, Araki K, Tachi A, Mizutani T, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Genetic and antigenic characterization of hantavirus isolates in Amur and Far East genotypes. 13<sup>th</sup> International Congress of Virology. San Francisco, U. S. A., 2005, July.
- 16) Kariwa H, Tanikawa Y, Lokugamage K, Lokugamage N, Nur Hardy Bin Abu Daud, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I. Puumala virus infection in several rodent species of laboratory animal.
- 17) Yoshii K, Konno A, Goto A, Hayasaka D, Mizutani T, Kariwa H, Takashima I. Single point mutation in tick-borne encephalitis virus prM protein induces a reduction of virus particle secretion.
- 13<sup>th</sup> International Congress of Virology. San Francisco, U. S. A., 2005, July.
- 18) 井上 快, 丸山総一, 山田直之, 壁谷英則, 佐藤雪太, 見上 彪, 大橋典男, 増沢俊幸, 川森文彦, 角坂照貴, 高田伸弘, 藤田博己, 小泉信夫, 川端寛樹(2005): 日本の野鼠に分布する *Bartonella* 属菌と同定法の開発. 第139回日本獣医学会(埼玉, 理研)
- 19) 蔡 燕, 矢野竹男, 野村彩朱, 竹田有紀子, 中尾義喜, 松尾雄志, 芳賀敏美, 今井俊介, 平井克哉, 福士秀人: Q熱コクシエラ抗体スクリーニング(法)の改良. 第45回臨床化学会, 2005.
- 20) 川渕貴子 佐戸亜矢子 的場洋平 浅川満彦 辻 正義 石原智明. 札幌市近郊で捕獲されたアライグマから検出された *Babesia microti* 様原虫. 第139回 日本獣医学会学術集会、和光市、2005年3月31日.

- |   |  |
|---|--|
| <p>21) 辻正義、三竹博道、石原智明.<br/> <i>Babesia rodhaini</i> の grp78 遺伝子の<br/>         クローニング第 139 回日本獣医学会<br/>         学術集会、和光市、2005 年 3 月 31<br/>         日.</p>  | <p>1. 特許取得<br/>         「狂犬病ウイルスを効果的に中和す<br/>         るヒト抗体」<br/>         (特願 2004-332680)</p> |
| <p>22) 尾関陽子、辻 正義、磯貝真代、<br/>         川淵貴子、石原智明. ATCC で市販さ<br/>         れている 2 株の <i>Babesia microti</i> に<br/>         ついて. 第 140 回 日本獣医学会総<br/>         会、鹿児島市、2005 年 9 月 29～10<br/>         月 2 日.</p> | <p>2. 実用新案登録<br/>         なし</p>   |
| <p>23) 中嶋瑠衣、佐戸亜矢子、浅川満彦、<br/>         辻正義、石原智明九州と山口県の小<br/>         型野生ほ乳動物血液からのピロプラ<br/>         ズマ及びザルコシステイス原虫の検<br/>         出. 第 140 回日本獣医学会総会、鹿<br/>         児島市、2005 年 9 月 29～10 月 2 日.</p>        | <p>3. その他<br/>         なし</p>  |
| <p>24) 川淵貴子、佐戸亜矢子、陣内理生、<br/>         的場洋平、浅川満彦、辻正義、石原<br/>         智明. 北海道のアライグマから見つ<br/>         かった新たな <i>Babesia</i> 原虫. 第 140<br/>         回日本獣医学会総会、鹿児島市、2005<br/>         年 9 月 29～10 月 2 日.</p>  |  |
| <p>25) 辻正義、高橋弥生、岡 英樹、石<br/>         原智明. <i>Babesia rodhaini</i> 弱毒株に<br/>         対する感受性に影響を及ぼす宿主側<br/>         の要因. 第 140 回日本獣医学会総会、<br/>         鹿児島市、2005 年 9 月 29～10 月 2<br/>         日.</p>       |  |

G. 知的財産権の出願・登録状況（予  
 定も含む）

厚生労働科学研究費補助金（国際医学研究協力事業）

分担研究報告書

アルボウイルス感染症に対する診断法の開発

分担研究者： 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
協力研究者： 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室）  
伊藤美佳子（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室）  
田島 茂（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室）  
根路銘令子（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室）  
林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室）  
小滝 徹（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室）

研究要旨:我々はこれまで血清学的診断法とともにデングウイルスに対する遺伝子検出法の確立を行ってきた。本研究においては、デング熱流行における感染者の診断に遺伝子検出法を使用し、その有用性を確認することを目的とした。東チモールにおける2005年のデング熱流行時に、デング様症状を示した124名から採取された血清を用いた。40人においてはTaqMan RT-PCR法によってウイルス遺伝子が検出された。37名においてはデング3型ウイルス遺伝子、2名においてはデング2型ウイルス遺伝子、1名においてはデング1型ウイルス遺伝子が検出された。この124名は血清学的検査、遺伝子検査を総合的に判断して74名(60%)はデングウイルス感染と判断された。従って、デングウイルス遺伝子は全患者の3分の2において陽性となった。これまでに確立したTaqMan RT-PCR法が検体の採取時期を考慮すれば十分有用な方法であることが示された。

A. 研究目的：

節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）は世界的な規模で大きな問題となっているウイルスを含んでいる。このうち、特にデングウイルス感染症は年間5千万-1億人が感染し、約50万人が重篤な病態であるデング出血熱を発症していると推察されており、アルボウイルス感

染症においてもっとも大きな問題となる感染症といえる。わが国においてデングウイルスの国内感染はないが、年間約50例の輸入症例が報告されている。デングウイルス感染の確定診断においては病原体検出および血清学的検査が必須である。我々は、これまで血清学的診断法とともにデングウイルスに対する遺伝子検出法

の確立を行ってきた。本研究においては、この遺伝子検査法を発展途上国における Dengue 熱流行における感染者の診断に使用し、その有用性を確認することを目的とする。

#### B. 研究方法：

1) 検体の収集：2005 年 1 月-3 月、東チモールにおいて Dengue 熱の流行が発生した。1,069 人の患者、39 人の死亡が報告された。首都であるディリの国立病院において診断のために採取された 124 人の患者血清を使用した。これらの患者は Dengue 様の症状を有しており年齢は 7 ヶ月-54 歳であった。24 人からは急性期、回復期の 2 回採取された。

2) これらの血清検体はすでに報告した TaqMan RT-PCR 法 (Ito M. et.al., J. Clin. Microbiol.: 5935-5937, 2004) によって Dengue ウイルス遺伝子の検出を行った。Dengue ウイルス特異的 IgM および IgG は市販の ELISA キットにより測定した。血清からのウイルス分離は C6/36 細胞を用いて行った。

(倫理面への配慮)

すべての検体は Dengue 様症状を示した患者の診断を目的として採取され、結果は患者の診断に用いられた。

#### C. 研究結果

1) 124 名の Dengue 様症状を示す患者のうち 40 人においては TaqMan RT-PCR 法によってウイルス遺伝子が検出された。このうち 37 名においては Dengue 3 型ウイルス遺伝子、2 名においては Dengue 2 型ウイルス遺伝子、1 名においては Dengue 1

型ウイルス遺伝子が検出された。

2) Dengue ウイルス遺伝子が TaqMan RT-PCR 法によって検出された 40 検体を用いてウイルス分離を行った。14 検体からは Dengue ウイルスが分離され、分離されたウイルスは TaqMan RT-PCR 法によって決定されたウイルス型と同一であった。

3) 血清学的検査および遺伝子検出法両者を組み合わせて判断した場合、124 名の Dengue 様患者のうち 74 名 (60%) は Dengue ウイルス感染と判定された。

#### D. 考察：

東チモールにおける 2005 年の Dengue 熱流行時に Dengue 様症状を示した 124 名のから診断目的で採取した血清において TaqMan RT-PCR 法の有用性を検討した。この 124 名のうち血清、遺伝子検査を総合的に判断して 74 名 (60%) は Dengue ウイルス感染と判断された。従って、Dengue ウイルス遺伝子は全患者の 3 分の 2 において陽性となった。Dengue 熱の診断においては特異的 IgM や IgG の検出が実用的であり重要である。しかし、血清検体が感染後非常に早い時期に採取されたような場合には特異的抗体が検出されないということもあり、遺伝子検出が確定診断に重要な意味を持つてくる。勿論、発展途上国において機器が十分に備わっていないという現実はあるが、今回の研究においてはこれまでに確立した TaqMan RT-PCR 法がある条件では十分有用な方法であることが示された。

また、遺伝子検出、ウイルス分離いずれの検討においても、Dengue 3 型ウイル

スが東チモールにおけるデング熱流行の主要ウイルスであることが示された。

E. 結論：

東チモールにおけるデング熱流行時にデング様症状を示した患者の血清を用い、遺伝子検出法である TaqMan RT-PCR 法が確定診断に有用であることを示した。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nukui, Y., Tajima, S., Kotaki, A., Ito, M., Takasaki, T., Koike, K. and Kurane, I.:

Novwl dengue virus type 1 from travelers to Yap state, Micronesia. *Emerging Infectious Diseases* 12(2): 343-346, 2006

2. 学会発表

伊藤美佳子、高崎智彦、田島茂、林昌宏、根路銘令子、倉根一郎：東ティモールにおけるデング熱・デング出血熱流行に関する系統学および血清学的解析。第53回日本ウイルス学会学術集会。平成17年11月20-22日。横浜市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. Distribution of suspected dengue cases investigated by laboratory methods in February 12 to March 2, 2005

Dengue confirmed cases /studied cases (%) by laboratory methods	Laboratory methods				
	TaqMan RT-PCR		*Rapid test positive/studied (%)		*IgM-ELISA positive/studied (%)
	Serotype detected positive/studied (%)	Virus isolation positive/studied (%)	IgM	IgG	
	1	0			
	DENV-1;	DENV-1;			
74/124 (60%)	40/124 (32%)	14/40 (35%)	61/124 (49%)	50/124 (40%)	57/124 (46%)
	DENV-2;	DENV-2;			
	37	13			
	DENV-3;	DENV-3;			

\*Samples were collected twice from 27 of 124 patients at acute and convalescent stages

厚生科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）

分担研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

日本脳炎ウイルスの疫学

分担研究者 竹上 勉 金沢医科大学総合医学研究所分子腫瘍学研究部門 教授

## 研究要旨

本邦における日本脳炎患者数は近年においては年間 10 名に満たない数で推移している。しかしながら、ウイルスがいなくなったわけではないことに注意が必要である。我々は石川県における野外蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)の分離を試みている。2005年には8月、9月の2回にわたり蚊の採集を行い1,759匹の蚊を得た。40匹を1プールとして蚊の破碎液を調製した。それを材料としてさらにRNA抽出を行い、JEV特異的プライマーを用いてRT-PCRを行い、7個の陽性サンプルを得た。他方で蚊の破碎液を培養Vero細胞にかけ、ウイルス分離を行い、これまでに少なくとも1種の新ウイルス株を得ることができた。新分離ウイルス株のエンベロープ(E)蛋白領域のヌクレオチド配列を決定し、解析した結果、遺伝子タイプ1型のウイルスであった。ただし、同一サンプルに遺伝子タイプ3型のウイルスもいることが分かり、異なる遺伝子タイプのウイルスが混在していることが明らかになった。この結果は既に知られているように本邦におけるJEV分布が北陸地域にもあり、またそこには遺伝子タイプの異なるウイルス(1型及び3型)が共存していることを示唆している。

### A. 研究目的

本邦における日本脳炎患者数は近年においては年間10名に満たない数で推移している。しかしながら、日本脳炎ウイルス(JEV)がいなくなったわけではないことに注意が必要である。世界的にみれば、2005年夏においてもインドでの大流行が報じられており、他地域を合わせれば感染者は数万人になる。日本におけるウイルス分布の状況を正確に調査していくことは、本邦における日本脳炎発症に対する警戒を怠らず、脳炎大流行を抑えるためにも重要な課題といえる。そうした課題の中で、我々は1998年以来、石川県における野外蚊からの日

本脳炎ウイルス(JEV)の分離を試みている。本研究は定点、定時期でのJEV分布状況を調べ、また新分離ウイルス株の生物学的特性を解析することを目的とする。

### B. 研究方法

蚊の採集:ここでの蚊採集法では蚊帳をつり、ドライアイスによるCO<sub>2</sub>採集法を用いた。ただし、蚊帳を張る場所は豚舎に近い稲田で行った。

蚊の破碎液:蚊40匹を1プールとして乳鉢にてPBSを入れ、破碎した。破碎液は遠心(10,000 x g、10分間)にて分画した。

RNA抽出及びRT-PCR:先の蚊破碎液

を基に Isogen 試薬を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR では JEV 特異的プライマーのエンベロープ(E)蛋白、NS4a 蛋白領域、さらに 3'末端領域のプライマーを用いた。

ウイルス分離法: ウイルス分離のために培養細胞株 Vero 細胞を用いた。24 穴プレートを用い、5%牛血清入りの MEM 培養液の中で Vero 細胞を継代し、そこに蚊抽出液を吸着させた。4-5 日間の培養の後、細胞変性の有無でウイルス存在を確認した。培養上清液については、さらに BHK 細胞を用いたウイルス力価を計測した。

遺伝子解析法: ウイルスゲノムに対応した複数のプライマーを用意し、PCR 産物をテンプレートにして直接的塩基配列解析法によりヌクレオチド配列を決定する。

#### C. 研究結果

採集蚊の総計は 1,759 匹となった。その蚊を 40 匹ずつ 1 プールとして破砕液を調製した。RT-PCR 法による解析の結果、44 プール中、7 プールが陽性となった。PCR 産物はそれぞれヌクレオチド配列の解析によってウイルス特異的配列であることを確認した。陽性サンプルについては Vero 細胞を用いたウイルス分離を行った。その結果、1 プールからウイルスが分離された。ヌクレオチド配列解析からそのウイルスが JEV であり、遺伝子タイプ 1 型であることが分かった。しかしながら、ヌクレオチド解析の結果を精査したところ、そこに遺伝子タイプ

3 型が混ざっていることが分かった。これは 1 プール 40 匹で蚊破砕液を調製していることから推定するに、別々の蚊が異なる遺伝子タイプの JEV 株を有していたのであろうと推定された。

#### D. 考察

本研究の結果に示したように、我々は野外蚊から新しい JEV 分離株を得たが、その遺伝子解析から遺伝子タイプ 1 型および 3 型が混在していることが明らかになった。これは我々が既に報告している JEV 石川株 (遺伝子タイプ 1 型) (Takegami et al., 2000) に加え、これまで日本各地に分布していた旧来の遺伝子 3 型 JEV が依然として存在していることを示唆している。我々の研究結果により、北陸地域における JEV 分布の状況が実際に確認されたことは、本邦における今後のウイルス対策における警戒を強めることの必要性を訴え、また日本脳炎ワクチンについての再考の必要性を考える基になりうるであろう。他方で、我々は JEV 感染拡大防御の策として RNAi の活用を検討しており、これまでのところ細胞レベル及びマウス感染実験でウイルス増殖抑制効果があることを確認している (Murakami et al., 2005)。先のウイルス分離に平行して、こうしたウイルスの生物学的特性点についても JEV 増殖性、病原性変動等のレベルの解析を行っていく予定である。

#### E. 結論

野外蚊から新 JEV 株を分離すること



ができた。遺伝子解析の結果、遺伝子タイプ1型の他に3型タイプも混じっていた。この事実から、本邦における日本脳炎患者は年間10名に満たない数であるが、ウイルス(JEV)は北陸地域を含め、広く日本各地に分布していることが強く示唆された。将来の日本脳炎流行に対する対策はワクチンを含め、今後も継続して行う必要があり、重要な課題だと考える。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshida J, Ishibashi T, Imaizumi N, Takegami T, Nishio M: Capacitative Ca<sup>2+</sup> entries and mRNA expression for TRPC1 and TRPC5 channels in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Eur J Pharmacol* 510: 217-222, 2005
- 2) Murakami M, Ota T, Nukuzuma S, Takegami T: Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication *in vitro and in vivo*. *Microbiol Immunol* 49: 1047-1056, 2005
- 3) Tateishi U, Hasegawa T, Nojima T, Takegami T, Arai Y: MRI features of extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Skeletal Radiol.* 35, 27-33, 2006
- 4) Takegami T: Japanese encephalitis virus RNA synthesis *in vivo and in vitro*. *J Kanazawa Med Univ.* 30: (2005) (in press)

### 2. 学会発表

- 1) 村上 学、奴久妻聡一、太田隆英、竹上 勉: マウスにおけるRNAiによるJEV感染増殖抑制効果、第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会、箱根、(2005. 5)
- 2) 村上 学、劉寧、奴久妻聡一、太田隆英、竹上 勉: RNAiによるJEV感染増殖抑制効果、神経ウイルス研究会、浜松、(2005, 6)
- 3) Takegami T, Murakami M, Ota T, Nukuzuma S : Biological significance of 3' UTR and effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication. XIII International Congress of Virology San Francisco, (2005, 7)
- 4) Takegami T, Murakami M, Ota T, Nukuzuma S : Protection by RNAi to Japanese encephalitis virus (JEV) infection *in vivo*, and biological function of JEV-3'UTR. 39th Japan-US Cooperatives Medical Science Program Palo Alto, (2005. 7)
- 5) Takegami T, Murakami M, Ota T : Inhibitory effect of RNAi on Japanese encephalitis virus replication and biological roles of 3'UTR.

- 2<sup>nd</sup> Asian Regional Dengue Research network Meeting. Strategies for Vaccines and Therapeutics for Dengue and Other Flaviviral Diseases. Singapore (2005, 9)
- 6) 竹上 勉、村上 学、劉 寧、奴久妻聡一：日本脳炎ウイルス持続感染における非構造蛋白 NS4a 及び 3' UTR の生物学的役割、第 53 回日本ウイルス学会、横浜、(2005, 11)
- 7) 村上 学、奴久妻聡一、竹上 勉：JEV 感染マウスにおける RNAi によるウイルス増殖抑制効果、第 53 回日本ウイルス学会、横浜、(2005, 11)
- 8) Takegami T, Murakami M, Ota T : Japanese encephalitis virus (JEV) isolation from mosquitoes and inhibitory effect of RNAi on JEV infection. トガ・フナビ・ペステウイルス研究会、東京、(2006, 1)

厚生労働科学研究費補助金（国際医学協力研究事業）  
分担研究報告書

ウイルス感染症の診断、疫学および予防に関する研究

デングワクチンの防御効力を評価するためのマウスモデル

分担研究者 小西 英二 神戸大学医学部医療基礎学講座 助教授

### 研究要旨

デングワクチンの防御効力をマウスモデルを用いて調べるために、攻撃ウイルスを脳内接種して生存率で評価する方法が一般的に用いられてきた。しかし、この方法は自然界におけるヒトの感染を模倣していない。本研究では、マウス脳内接種に代わり得る系として、ウイルス血症防御モデルの確立を試みた。デング免疫ddYマウス及び非免疫マウスを用いて、マウスの尾静脈から0.5mlのウイルス液を注入した。注入後、経時的に採血し、血液中のウイルス量を測定した。その結果、非免疫群では比較的高いレベルのウイルス血症がすべての個体で注入後3分まで、多くの個体で注入後5分まで認められたのに対して、注入前に中和抗体価が1:640-1:1280であった群では注入後1分でも感染性ウイルスは検出されなかった。また、注入前に中和抗体価が1:40-1:80を示した群では、注入後3分までウイルスは検出されたが、その平均血中ウイルス量は非免疫群と比較して有意に低かった。以上の結果から、ウイルスを静脈内投与した後のウイルス血症レベルを比較することにより、デングワクチンの防御効果を評価し得ることが示された。

### A. 研究目的

デング熱/デング出血熱は、熱帯・亜熱帯地域に広く分布する蚊媒介性の疾患で、年間推定約1億人の患者を生ずる。特に、流行地域の拡大と患者数の増加が問題である。しかし、特異的な治療法はなく、また現在認可されているワクチンはない。これまで、種々の手法を用いてワクチン開発が進められてきた。この試作ワクチンの評価には、まず第1段階としてマウスモデルが用いられている。

従来のマウスモデルを用いたワクチンの評価では、液性及び細胞性免疫の誘導を調べることは可能である。しかし、防御効力の評価は、攻撃ウイルスを脳内接種した後に脳炎による死亡からの防御により通例判定されている。この評価法は、病気（脳炎）及び接種ルート（直接標的器官への投与）において、ウイルス保有蚊の刺咬を受けて感染するヒトでの状況を反映していない。

本研究では、マウス脳内接種に代わり得る系として、ウイルス血症防御モデルの確立を試みた。患者のウイルス血症レベルは病気の重篤度に関わるので、ワクチンによるウイルス量の低下は病気に対する防御能を示す。また、蚊を媒介してヒトからヒトに伝播するデングウイルスにおいては、ウイルス血症レベルの低下は伝播抑制に関係する重要な因子である。

### B. 研究方法

**ウイルス：** C6/36細胞にデング2型ウイルス（DENV2）ニューギニア C株を感染して得られた培養液を防御実験に用いた。

**免疫原：** DNAワクチンとタンパクワクチンを用いた。DNAワクチンとしては、デング4価DNAワクチンを用いた。デング4価DNAワクチンは、デング1型、2型、3型及び4型に対するDNAワクチンの混合液である。タンパクワクチンとしては、DENV2

細胞外粒子（EPワクチン：ニュークレオカプシドのない空の粒子型抗原）及び日本脳炎不活化ワクチン（JEVAX）を用いた。EPワクチンは、DENV2のprM-E遺伝子をCHO細胞にトランスフェクトして得られた連続抗原発現細胞の培養液を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法で精製して得た。JEVAXは、武田薬品工業製のものを使用した。

**マウス実験：**4週令の雄ddYマウス（各群4匹）に、DNAワクチン、タンパクワクチンあるいは両ワクチンの混合液を接種した。接種にはジェット式針無注射器（シマジェット、島津製作所）を用いて、大腿部に投与した。投与量は、DNAワクチンが100 µg（各型25 µg）、EPワクチンが150 ng、またJEVAXが1/10ドーズであった。

マウスの尾静脈から0.5mlのウイルス液を注入した。注入後、経時的に眼窩静脈叢からヘパリン採血し、遠心後の血漿をウイルス力価測定に供した。

**中和試験：**眼窩静脈叢から採血し、血清を分離した。2倍階段希釈した血清とウイルスの混合液に補体を最終濃度5%になるように添加し、90%プラーク減少法で判定した。

**統計解析：**平均血中ウイルス量のグループ間比較にはスチューデントのt検定を用いた。5%以上の有意水準で差が認められたときに有意差とみなした。

#### （倫理面への配慮）

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された。

### C. 研究結果

**予備実験：**既報（Konishi et al., *Vaccine* 21, 3675-3683, 2003）に記載したように、日本脳炎ウイルス（JEV）を腹腔内に投与した場合、1日後まで血液中にウイルスが検出された。この結果に基づき、デングウイルスにおいてもまず腹腔内投与から予備実験を開始した。しかし、1時間後、3時間後及び1日後の血液にはウイルスは検出されず、また1時間以内で細かく時間を割り採血した場合も、検出レベルの感染性ウイルスは存在しなかった。

そこで、静脈内に投与する系で実験を行

った。しかし、この場合も予想に反して、投与したウイルスの量に比べてかなり低い量しか検出されず、また投与後30分ではまったく検出されなかった。マウスの系統によっても差があり、ddYの方がBALB/cよりウイルス血症が長時間持続する傾向が認められた。

**デング免疫マウスを用いた実験：**DNAワクチンとタンパクワクチンの混合投与により免疫したddYマウスあるいはpcDNA3を接種した非免疫マウスを用いて、ウイルス注入後のウイルス血症レベルの経時的变化を調べた。注入には、 $6.9 \times 10^6$  PFU/mlのDENV2（1匹あたりの投与量は $3.5 \times 10^6$  PFU）を用いた。実験に用いたマウスに投与した免疫原を表1に、血液中のウイルス量の時間的推移を図1に示す。また、注入直前に採血して得られた中和抗体価も図1に示す。

pcDNA3を接種した陰性対照（グループ3）では、注入後1分ではどの個体も $10^{4.5} - 10^5$  PFU/mlであったが、その後ウイルス量は低下し、注入後30分ではすべての個体で検出できないレベルになった。低下の速度には個体差があり、注入後5分で検出レベル未満になった個体もあれば、10分でも血中ウイルスが残存している個体もあった。しかし、注入後3分まではどの個体も比較的高いレベルを保ち、個体差は10倍以下であった。

デング4価DNAワクチンとJEVAXを混合投与した群（グループ2）では、注入直前の中和抗体価が1:640-1:1280であり、注入後1分から30分の間で検出される感染性ウイルスはどの個体にも認められなかった。

一方、デング4価DNAワクチンとEPワクチンを混合投与した群（グループ1）では、注入直前の中和抗体価が1:40-1:80であり、注入後1分ではすべての個体に、2分では2個体に、また3分では1個体にウイルスが検出された。しかし、そのレベルはグループ3で示された値より低く、4個体の平均血中ウイルス量（黒四角で表示）には5分までのそれぞれの時点で有意差が認められた。

### D. 考察

非免疫マウスにおいてもDENV2が急速