

および 1986、1995 年の流行) では患者数のピークは 8~9 月と他年度におけるピーク (10~11 月) より早い傾向が認められた。

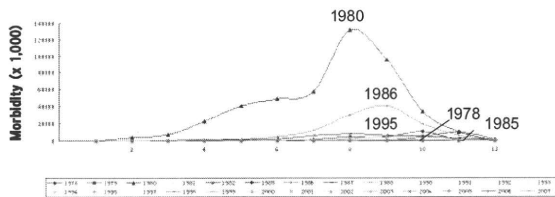


図 2. 広東省の 1978~2007 年の DENV 感染症の月別患者数の推移
各年度における DENV 感染症の月別患者数をプロットした。各年度は色の違いで示す。

2. 広東省の 1978~2007 年の気象

広東省における、DENV 感染者の約 97% は広州市を含む珠港デルタ地域で報告されている (図 3、青い三角で示す領域)。



図 3. 広東省における DENV 患者数の地理的分布
図左上に広東省の位置を赤の四角で示す。1978~2007 年に省内で報告された DENV 感染者は珠港デルタとその近傍の地域 (青三角内、76,782 件) を中心に北部 (259 件) と西部 (2,449 件) より報告された。図に示す都市は調査地を示す。

そこで珠港デルタに位置する広州市 (Guangzhou) の 1978~2007 年における気象変化を調査した (図 4)。

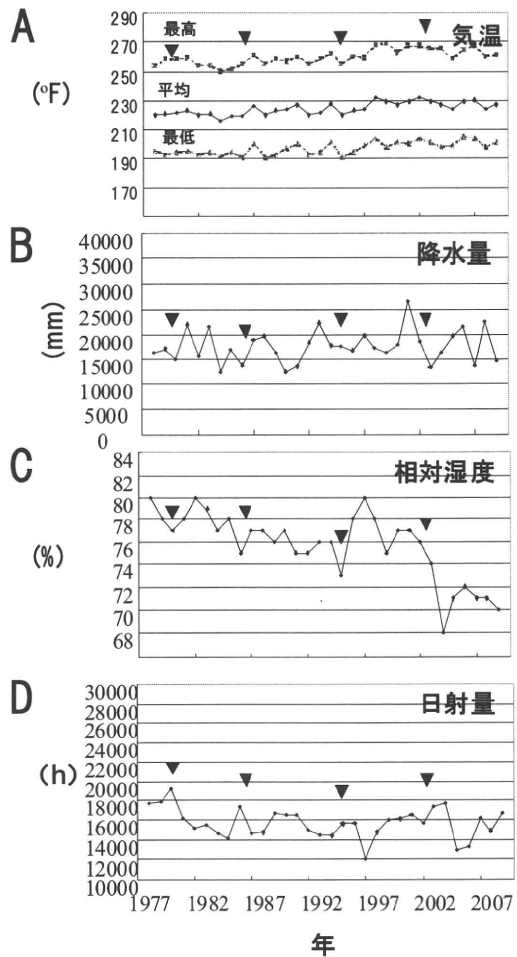


図 4. 1978~2007 年における広州市の気象
広州市における当該年の最高気温および年平均気温、最低気温 (A)、降水量 (B)、相対湿度 (C) および日射量 (D) を示す。黒三角は、比較的大きな DENV 感染症の流行が認められた年を示す。

広州市では、過去 30 年間の年最高、最低、平均気温に上昇傾向が認められた (A)。年平均降水量は年による変動が認められた (B)。相対湿度の減少は顕著であり周期性が認められた (C)。また年平均日射量は周期的な変化が認められた。また、相対湿度が前年に比べ減少し、日射量が増加した年に DENV 感染症が流行していた。

D. 考察

近年、広東省より報告される DENV 感染症の患者数は 1980 年の流行をピークに激減している。これは、本感染症に対する迅速な検査法の開発による早期診断が可能とな

ったことや、媒介蚊の駆除等の公衆衛生上の対策によるものと考えられる。

広東省における DENV 感染症の流行は周期的に起こっており、日射量や湿度等様々な気象因子と関連している傾向が認められた。本省内における流行地は広州市を含む珠江デルタ地域とその近郊の都市であった。この地域は、中国における南アジア地域との貿易の要衝となっており、人や物資の移動が活発に行われている。したがって、当地では DENV 感染症が他のアジア諸国から輸入される危険性が非常に高く、毎夏その流行が危惧されている。また、広東省内で、DENV 感染症のエンデミックな流行が疑われるケースも報告されている。そこで、今後は省内の気象データと DENV 感染症流行の関連をより詳細に検討するとともに、省内に棲息する媒介蚊の DENV の保有調査を行い、省内での DENV の存在様式を調べる必要がある。また、中国の近隣諸国（特に南アジア諸国）での DENV 流行との関連を詳細に検討する必要があるものと考えられた。

E. 結論

中国・広東省での DENV 感染症の流行は、日射量や湿度等様々な気象因子と関連している可能性があり、地球温暖化に伴う気象変動と当該ウイルス感染症の流行との因果関係について、更に詳細な検討が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Sakai, A., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T., and Takashima, I. Glycosylation of West Nile virus envelope protein increases In vivo and In vitro viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82; 696-704, 2010

(2) Hasebe, R., Suzuki, T., Makinno, Y., Igarashi, M., Yamanouchi, S., Maeda, A., Horiuchi, M., Sawa, H., and Kimura, T.

Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.*, 10; 165-164., 2010

(3) Moritoh, K., Maeda, A., Sasaki, N., and Agui, T. Development and application of West Nile virus subgenomic replicon RNA expressing secreted alkaline phosphatase. *J. Vet. Med. Sci.*, In press, 2010

2. 学会発表

(1) 前田秋彦、染谷梓、西野佳以、村田英雄、倉根一郎。ウエストナイルウイルス・レプリコンの持続的複製細胞株の樹立。トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (2010.12.10, 東京)

(2) Maeda, A., and Ke, Chang-Wen. Epidemiological study of mosquito-borne diseases in Guangdong province, China. The Workshop of Network Laboratories on Emergency Response and Surveillance of Infectious Diseases in Pan Pearl River Delta Region (2010.12.12, Guangzhou, China)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書 (H22 年度)

デングウイルス NS1 抗原検出キットの評価

研究分担者 高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
研究協力者 Moi Meng Ling、小滝 徹、田島 茂、倉根一郎
(国立感染症ウイルス第一部)

我が国のデング熱輸入症例は、1999 年の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は増加傾向にあり、2010 年は輸入患者数が 243 症例と近年の 100 例前後を大きく上回った。日本国内にはデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、その実験室診断をより迅速で確実なものにする必要がある。また、空港検疫所では急性期の患者が健康相談に立ち寄ることもあり、特に病原体診断の精度向上が求められるものである。本年度は、デングウイルス NS1 抗原検出迅速キット (イムノクロマト法、ELISA 法) の検体を希釈した場合の感度・特異性をウイルス遺伝子検出法と比較検討した。その結果 10 倍希釈の場合は、ある程度の感度を示し、乳幼児・小児で採血量が少量である場合は、10 倍希釈で検査を実施することが推薦される。

A. 目的

我が国のデング熱輸入症例は、1999 年の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は増加傾向にあり、2007 から 2009 年は 100 例前後が報告されていた。しかし、2010 年は 243 例と急増し、2011 年に入ってもこの傾向は継続している。日本国内にはデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、その実験室診断をより迅速で確実なものにする必要がある。そのため、病原体診断としてウイルス遺伝子検査にデングウイルスの非構造タンパクである NS1 抗原の検出キットを引き続き評価した。NS1 蛋白は、46kD の糖蛋白であり、デングウイルス感染哺乳類細胞内、細胞膜表面に発現するとともに

に感染細胞から分泌されるウイルス抗原である。3 年間、NS1 抗原 ELISA、イムノクロマト法を用いた NS1 抗原検出迅速キットの感度・特異性および有用性を評価した。しかし、NS1 抗原検出検査の欠点として使用する検体必要量が他の抗体検査 ELISA に比べて 50 倍と多く、遺伝子検査の検体量と比べても約 5 倍を必要とすることである。そこで、10 分の 1 量の検体量での検査感度を中心に検討した。

B. 方法

1. デングウイルス NS1 抗原検出キットの評価

1) ウイルス遺伝子の検出
陽性コントロールはデングウイルス 1、

2、3、4型（感染研標準株）を蚊由来細胞 C6/36 株で増殖させた培養上清を用いた。デングウイルス型別リアルタイム RT-PCR（TaqMan 法）は Ito ら（*J.Clin.Microbiol.* 42(12):5935-5937,2004）の方法により実施した。

2) NS1 抗原検出

① NS1 抗原検出迅速キット（イムノクロマト法）は BioRad 社のキット（Dengue NS1 Ag strip®）を使用した。検査方法は下記の如くである。

1) プラスチック試験管に血清 50 μ L を入れ、緩衝液を 1 滴加える。よく混和した後に Strip の先を検体液中に浸漬する。

2) 15–20 分室温にて反応させる。

3) コントロールのバンドを確認し、NS1 抗原のバンドの有無を判定する。

② NS1 抗原検出 ELISA キット

BioRad 社のキット（PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA®）を使用した。本キットの検体（血清）使用量は、50 μ l を使用する。

C. 結果

1) NS1 抗原検出 ELISA キット

検体を 10 倍希釈して、検出感度を検討したところ、Index が 10 以上の 37 検体に関しては、37 検体すべてが 10 倍希釈によっても検出が可能であった。Index が 10 未満 1 以上の場合は、16 検体中 13 検体で抗原が検出された。全体では 93% (40/43) の感度であった（図 1A）。

検体を 100 倍に希釈した場合は、Index が 10 未満 1 以上の 10 検体では、いずれも抗原は検出できなかった（図 1B）。

2) イムノクロマト NS1 抗原検出キット

イムノクロマト法では、Index が 10 以上の検体では、10 倍希釈で 91.7% の検出率であったが、Index が 10 未満 1 以上の検体では抗原は検出されなかった。

D. 考察

デングウイルス NS1 抗原検出キットの病原体診断法としての有用性は H20–21 年度で確認している。しかしながら、NS1 抗原検出の欠点として、必要サンプル量が 50 μ L と多いことである。ウイルス遺伝子検査に必要な検体量としては、10 μ L ~ 20 μ L であり、抗体検査では 1 μ l であることから、デングウイルス NS1 抗原検出キットにおけるサンプル量を検討した。その結果、10 倍希釈においても、NS1 抗原検出 ELISA を実施すべき感度を有していることが確認された。しかし、迅速キット（イムノクロマト法）では感度が落ちるため、10 倍希釈で実施して陰性の場合、その結果は必ずしも信頼できない。

乳児、デング出血熱患者などで採血量が十分でない場合は、10 倍希釈で NS1 抗原検出 ELISA を実施することを考慮すべきである。

E. 結論

乳児、デング出血熱患者などで採血量が十分でない場合は、10 倍希釈で NS1 抗原検出 ELISA を実施することが許容、推薦される。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*, in press (2011)
2. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Sakamoto M, Iwagoe H, Kobayashi K, Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis*, 16 (11), 1770-1772 (2010)
3. Moi ML, Ujiie M, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection in travellers returning from Benin to France, July – August, 2010. *Eurosurveillance*, 15(39):pii=19674 (2010)
4. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in dengue neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing tests using FcγR-negative and FcγR-expressing BHK cells. *Clin Vac Immunol*, 17: 402-407 (2010)
5. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcγRIIA. *J Virol Meth*, 163:205-209 (2010)
6. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the FcγRIIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol*, 91:103-111 (2010)
7. Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. *Intern Med*, 49:501-505 (2010)
8. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Omatsu T, Kurane I. Dengue importations into Japan from Bali. *ProMed*, promed archive no. 20100329.09 (2010).
9. Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Sakamoto M, Kobayashi K, Kurane I. Dengue importations into Japan from Tanzania. *ProMed*, promed archive no. 20100323.0922 (2010).

2. 学会等発表

1) 国際学会

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Titration of neutralizing antibody and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK-21. 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Kuala Lumpur, Malaysia, 2010年10月
2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T,

Kurane I. Dengue virus enhancing activity in serum samples from dengue patients determined using FcγRIIA-expressing BHK cells. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Hokkaido, Japan, 2010年6月

2) 国内学会

1. モイメンリン、林昌宏、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎：デング再感染患者血清中ウイルス力価の検討：感染性抗体－デングウイルス複合体は FcγR 発現細胞においてのみ検出された。第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）。平成22年11月

2. モイメンリン、大松勉、中村伸一郎、片貝裕子、高崎智彦、倉根一郎：Marmoset as a tool for dengue virus vaccine efficacy evaluation. 第17回日トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（東京）。平成22年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

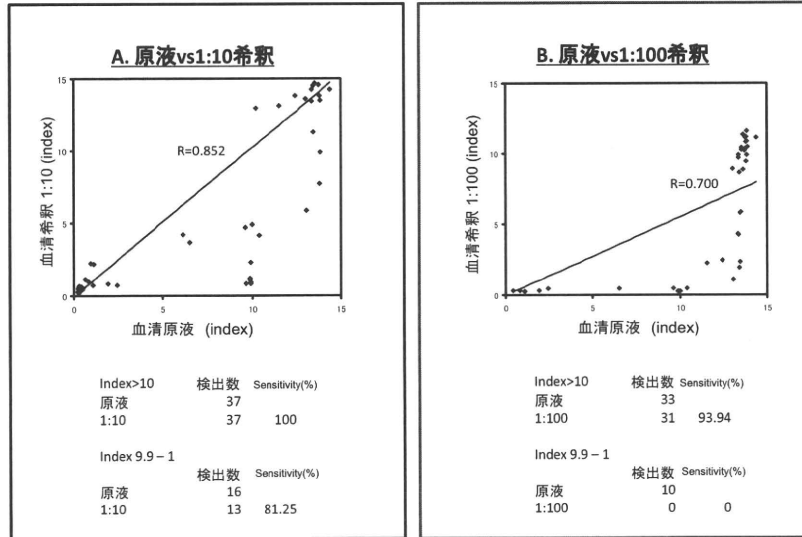
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

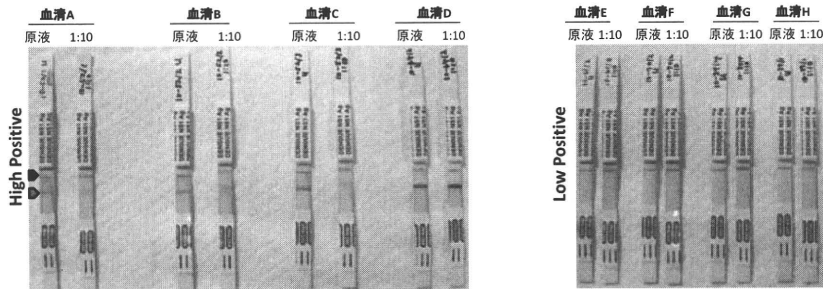
患者血清希釈による感度への影響 (BioRad NS1 ELISA)



ELISA index>10の血清を1:10希釈および1:100希釈すると感度への影響はほとんど認められなかった。Index<10の血清において、1:10希釈による感度への影響は少ない。Index<10の血清において、1:100希釈すると感度が著しく落ち、検出限界以下という判定になった。

患者血清希釈による感度への影響 (BioRad NS1 StripTest)

| 検出数/合計(感度%) | |
|---|------------------|
| High Positive (ELISA Index >10) | |
| 原液 | 11/11 (100.00 %) |
| 1:10 希釈 | 11/12 (91.67 %) |
| Low Positive (ELISA Index <10) | |
| 原液 | 3/12 (25.00 %) |
| 1:10 希釈添付 | 0/12 (0.00 %) |



厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究
(H20-新興一般-015)

分担研究報告書 (H22)

FcγRIIA 発現細胞を用いたデングウイルス研究の有用性

研究代表者：倉根一郎 (国立感染症研究所・副所長)

研究協力者：Moi Meng Ling (国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究官)

高崎 智彦 (国立感染症研究所・ウイルス第一部第二室・室長)

林 昌宏 (国立感染症研究所・ウイルス第一部第三室・室長)

研究要旨

デングウイルスはヒトと蚊の間で感染環が維持され、蚊を介してヒトに感染し、一過性急性熱性疾患であるデング熱(DF)及び重篤疾患であるデング出血熱(DHF)を引き起こす。地球温暖化に伴い、媒介蚊の生息地域の拡大とデング熱流行地域の拡大も影響を受けると考えられている。デング熱・出血熱の病態及びヒトにおける感染防御メカニズム解明はワクチン開発および今後の予防戦略に重要である。DHFは疫学的研究によりデングウイルス(DENV)の再感染時に多く発症することが示された。これは初感染時に誘導された中和能を有しないDENV型交差抗体に起因する抗体依存性感染増強(ADE)によると考えられている。本研究では、ヒト血清並びに抗体における感染増強活性を測定する ADE assay 及び ADE 活性測定基礎的条件を確立した。確立した ADE assay はヒト血清における DENV に対する感染増強活性と中和活性を合わせた生物活性が測定できることが明らかとなった。この ADE assay により感染性ウイルス-抗体複合体が検出され、感染増強活性を合わせたウイルス力価が測定できることが明らかになった。DENV の感染ターゲット細胞の多くが FcγR 発現細胞であることから、本測定法により測定したウイルス中和抗体価およびウイルス力価は生体内において有意義であることが示された。

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱はデングウイルス(DENV)の感染によって発症する急性熱性疾患である。デング出血熱は致死率(20%)が高く、年間世界で子供を中心として、約2万人以上が死亡していると推計

されている。近年の熱帯・亜熱帯地域での人口増、ヒトおよび物のグローバルな移動などを背景とし、デング熱患者が急速に増加している。熱帯地域を始めとし大きな流行が起こっており、デングウイルスの流行地域も拡大傾向にある。近年、ネパール、

ブータン、オーストラリアやフランス南部などに国内感染が報告された。日本での生息地域が拡大しつつあるヒトスジシマカもデングウイルスを媒介する能力があることから、デングウイルス流行地域が日本へと拡大する可能性が示唆された。このような状況下で、デング熱・出血病態および感染防御メカニズム解明は、ワクチン・有効な治療開発および今後の予防戦略に重要である。

デング出血熱は疫学的研究により、再感染時に多く発生する。デング出血熱は母子移行抗体として獲得された抗体、あるいは初感染時に誘導された中和能を有しない抗体が感染時に体内にあるターゲット細胞の monocyte および FcγR を有する細胞の DENV 感染を増強させることが感染の重症化の起因の一つと考えられている。従来のヒト血清における感染増強活性測定法では、FcγR を有する浮遊系細胞 (monocyte, macrophage, K562 等) が用いられたが、この方法ではプラーク法によるウイルス力価を測定することが困難であった。これを可能とする 1 つの方法は、プラーク形成能のある細胞に FcγR を恒常発現させることである。

我々は、DENV 感染に対するプラーク形成能のある BHK-21 細胞に FcγR の一種である FcγRIIA を恒常発現させ、ヒト血清における感染増強活性の測定法を確立した。確立した ADE assay は、プラーク形成能を有する BHK-21 細胞が用いられたため、従来のプラーク減少法による感染増強活性と中和活性を合わせた中和抗体価が測定できることが明らかになった。

現在はウイルス力価を FcγR 非発現細

胞による測定することが一般的である。しかし、用いられた細胞は FcγR を有しない細胞であるため、感染増強活性と合わせたウイルス力価の測定が困難である。そこで我々は樹立した ADE assay を用いてウイルス力価を検討した。

DENV の感染標的細胞の多くが FcγR を有する細胞であるため、本研究で樹立した FcγR 発現細胞を用いた中和抗体価およびウイルス力価測定法は、生体内を反映する点で有意義な測定法であることが示唆された。

B. 研究方法

FcγR 発現 BHK 細胞の樹立： ヒト Fcγ 受容体の 1 つである FcγRIIA (CD32a) 遺伝子を pcDNA3.1 発現ベクターに導入し、BHK-21 細胞に発現させた。FcγRIIA の発現率は flow cytometry 法にて FcγR の発現を確認した。FcγR の発現が認められた細胞を用いてモノクローナル抗体および患者血清における DENV に対する感染増強活性をプラーク法により検討した。

中和試験： 50%プラーク減少法を用いた標準法により、初感染および再感染患者血清中の中和抗体価を FcγR 発現細胞および FcγR 非発現細胞にて測定した。

初感染血及び再感染患者におけるウイルス力価の検討： 2004 年から 2010 年までの間に国立感染症研究所でデング熱と診断された患者 54 名の血清 73 検体を対象として、ウイルス力価の測定を試みた。FcγR 発現細胞および FcγR 非発現細胞を用いて従来のプラーク法により、初感染および再感

染におけるウイルス血症を測定した。また接種 5 日後の培養上清を回収し、real time-PCR (TaqMan 法) により遺伝子量 (genome copies) を測定した。

C. 研究結果

FcγR 発現 BHK 細胞の樹立: DENV の力価をプラーク法にて検討したところ、FcγR 発現細胞に対する感染増強抗体の条件下での DENV の力価は抗体を加えない場合と比較して高力価であり、DENV の感染増強抗体による ADE が観察された。しかしながら FcγR 非発現 BHK 細胞ではこの現象は観察されなかった。同様の現象は抗 DENV-IgG 陽性患者血清でも FcγR 発現 BHK 細胞において観察されたが抗 DENV-IgG 陰性患者血清では観察されなかった。

FcγR 発現細胞を用いた中和抗体価の測定: 当研究室で確立した FcγR 発現細胞を用いてプラーク法にて初感染および再感染患者血清における患者血清中の中和能を調べた。モノクローナル抗体の中和抗体価を検討したところ、FcγR 発現 BHK 細胞を用いた中和抗体価は FcγR 非発現細胞を用いた場合に比べ低値であった。FcγR 発現細胞を用いて測定した抗 DENV-IgG 陽性患者血清の抗体価は BHK 細胞を用いて測定した抗体価に比べ、低値であった。

初感染血及び再感染患者におけるウイルス症価の検討: 第 1 病日から第 7 病日までの患者血清におけるウイルス血症が FcγR 発現細胞および FcγR 非発現細胞を用いて観察された。再感染時の血清を検討したところ FcγR 発現細胞を用いたウイルス

血症のレベルは FcγR 非発現細胞を用いた場合と比較して約 10 倍高力価であった。FcγR 発現細胞に再感染患者血清を接種した培養上清においても FcγR 非発現細胞より高力価であることが認められた。再感染時のウイルス血症も初感染と比べて約 1 日長く継続したことが明らかとなった。

D. 考察

デングウイルス感染の重症化の要因の一つは抗体依存性感染増強(ADE)現象による抗体ウイルス複合体を含む高ウイルス血症と考えられている。本研究で樹立した ADE assay はヒト血清中の感染増強活性を従来のプラークによって測定できることが明らかとなった。またこの assay は DENV 感染によるプラークおよび細胞変性効果 (cytopathic effect , CPE) が観察できるためウイルスが細胞に感染したことが簡便に確認できることが明らかになった。

現在は、50%プラーク減少法が中和抗体価および DENV に対する感染防御の測定基準として認められている。しかしながら、一般的に用いられている細胞が FcγR 非発現細胞であることから、感染増強活性と合わせた中和活性の測定が困難である。そこで我々は、樹立した ADE assay を用いたプラーク減少法により、中和抗体測定法を確立した。非 FcγR 発現細胞を用いた場合、モノクローナル抗体 4G2 は DENV1-4 に対する中和活性を示した。しかしながら同様な抗体およびウイルスを用いて FcγR 発現細胞により測定した結果、中和活性が認められなかった。このことから、抗体における感染増強活性はウイルスに対する中和能を低下させることが明らかとなった。ヒト血

清においても同様な現象が認められた。

定量 PCR 及び FcγR を有しない細胞を用いた従来のウイルス定量法はウイルス-抗体複合体の感染能が反映されていないため再感染時における ADE 活性による感染性ウイルス量の上昇の測定が困難であった。本研究では、初感染において FcγR 発現細胞による測定したウイルス力価と FcγR 非発現細胞による測定結果に相違が認められなかった。したがって、従来の方法によるウイルス力価の測定は初感染のみに有意義であることが示唆された。しかしながら、再感染患者血清を用いた場合、FcγR 発現細胞による測定したウイルス力価は非 FcγR 発現細胞による測定した力価より約 10 倍高力価であった。このことから、現在の再感染患者ウイルス血症の定義よりも 10 倍以上のウイルス力価が存在することが示唆された。

E. 結論

新たに確立した ADE assay は簡便で安定した結果が得られるため、デング出血熱発症機序における抗体の役割の解明に資すると考えられる。FcγR 発現 BHK 細胞を用いて測定した中和活性は ADE 活性を合わせた生物活性が測定できることが明らかとなった。DENV の感染ターゲット細胞の多くが FcγR 陽性細胞であることから、本測定法により測定した中和抗体価およびウイルス力価は生体を反映する点で有意義であることが示唆された。

F. 健康危機管理情報

2010 年は、日本へのデング熱輸入症例が、2009 年の 92 症例と比べ、2 倍以上の増加が

みられ、243 症例が報告された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*, in press (2011)
2. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Sakamoto M, Iwagoe H, Kobayashi K, Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis*, 16 (11), 1770-1772 (2010)
3. Moi ML, Ujiie M, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection in travellers returning from Benin to France, July – August, 2010. *Eurosurveillance*, 15(39):pii=19674 (2010)
4. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in dengue neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing tests using FcγR-negative and FcγR-expressing BHK cells. *Clin Vac Immunol*, 17: 402-407 (2010)
5. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcγRIIA. *J Virol Meth*, 163:205-209 (2010)

6. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I.
Involvement of the Fcγ₂ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol*, 91:103-111 (2010)
 7. Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. *Intern Med*, 49:501-505 (2010)
 8. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Omatsu T, Kurane I. Dengue importations into Japan from Bali. *ProMed*, promed archive no. 20100329.09 (2010).
 9. Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Sakamoto M, Kobayashi K, Kurane I. Dengue importations into Japan from Tanzania. *ProMed*, promed archive no. 20100323.0922 (2010).
 10. Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus isolation method relying on antibody-dependent enhancement mechanism using Fcγ₂-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *in submission*.
2. 学会等発表
 - 1) 国際学会
 1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Titration of neutralizing antibody and viremia in dengue patients using Fcγ₂-expressing BHK-21. 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Kuala Lumpur, Malaysia, 2010年10月
 2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus enhancing activity in serum samples from dengue patients determined using Fcγ₂-expressing BHK cells. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Hokkaido, Japan, 2010年6月
 - 2) 国内学会
 1. モイメンリン、林昌宏、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎：デング再感染患者血清中ウイルス力価の検討：感染性抗体－デングウイルス複合体は Fcγ₂ 発現細胞においてのみ検出された。第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）。平成22年11月
 2. モイメンリン、大松勉、中村伸一郎、片貝裕子、高崎智彦、倉根一郎：Marmoset as a tool for dengue virus vaccine efficacy evaluation. 第17回日トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（東京）。平成22年12月
- 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

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

「地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究」
—2010年、中国・広東省で発生したデング熱の分子遺伝学的解析—

研究代表者： 倉根 一郎 国立感染症研究所・副所長
研究分担者： 前田 秋彦 京都産業大学・教授
研究協力者： 柯 昌文 中国・広東省感染症予防制御研究所・副所長
Jiang Shu 中国・広東省感染症予防制御研究所・研究員

研究要旨： 2010年、中国・広東省で発生したデング熱の患者よりデングウイルスの血清型1型（DENV1）および3型（DENV3）分離された。これらウイルスのE蛋白質の遺伝子配列を決定し、広東省や中国国内の他省、あるいは海外各国から報告されているデングウイルスについて系統解析を行った。その結果、2010年のデング熱の原因DENV1の由来は様々であると考えられた。近年、広東省のデング熱はDENV1が主な原因ウイルスであるが、2010年にはDENV3が分離された。本ウイルスは、近年United StatesやVenezuela流行しているものに近縁であり、近年、本省に輸入された可能性が高いものと考えられた。地球温暖化により感染の拡大が危惧されるデングウイルス感染症について、今後とも国際的な注意が必要であると考えられた。

A. 研究目的

現在、日本におけるデング熱患者は流行地からの帰国者であるため、流行地での本病の発生動向を常に監視する必要がある。中国・広東省は中国におけるアジア諸国との貿易の要衝であり、多くの人と物資の移動が活発である。日本とは経済的な関係も深く、本省への日本企業の進出が多い。また、広東省は中国第3の大都市として中国国内のさまざまな地域より人が流入している。このような状況の下、本研究では広東省で2010年に分離されたデングウイルス（DENV）についての分子疫学的な解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

2010年、中国・広東省の77人のデング様症状を示した患者より血清を採取し、DENVに対する血清中の抗DENV抗体の検出を行ったところ55件体が陽性であった。蚊由来のC6/36細胞を用いてウイルスの分離を試み、8株のDENVを分離した。定法に従い、これらウイルスのRNAを抽出し、cDNAを作製し、完全長のE蛋白質の遺伝子配列

を決定した。これら分離株と既に報告のある38株のDENV1および12株のDENV3のE蛋白質の遺伝子をClustalX v. 1.83を用いてMultiple sequences alignmentsした。系統樹はMEGA 3.1 softwareを用いて作製した。また、省内において1985、1991、1999、2006および2008年に分離したDENV株についても同様に解析した。本研究は中国・広東省感染症予防制御研究所の柯昌文博士と共同でおこなった。

（倫理面への配慮）

中国・広東省におけるデング患者血清の採取等は生命倫理の観点よりインフォームド・コンセント等中国の倫理規定に則って行った。

C. 研究結果

(1) DENV1

近年、広東省ではDENV1の流行が主となっている。本研究で分離したDENVは8株中7株が1型の血清型ウイルスであった。また、今回解析した広東省分離DENV株の内、3株（1985、1991および2008年分離株）がDENV1であった。これらのウイルス株のE

蛋白質全領域の塩基配列を決定し、過去に報告された DENV1 の塩基配列と比較検討した (図 1)。本年度分離株は 2004 年に隣省である Fujian で報告された DENV1、2007 年に韓国で報告された DENV1 (2001 年に広州で報告されたものと)、2008 年に Singapore で報告された DENV1 あるいは 2006 年に Indonesia や Vietnam で報告された DENV1 (1991 年に広州で報告されたものと) と近縁であった。

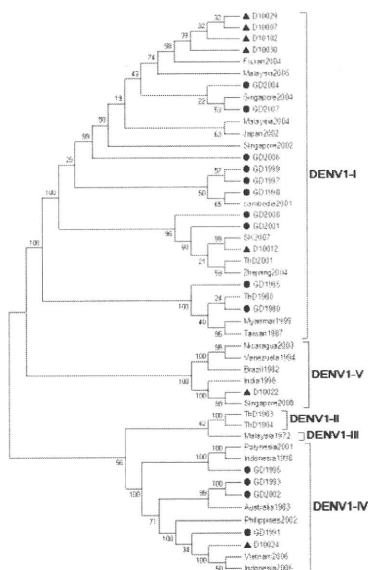


図 1. DENV1 の E 蛋白質を基にした系統樹解析を行った。黒三角は 2010 年分離株を、黒丸は広東省で過去に分離された DENV1 を示す。また、諸外国から報告されたウイルスについても同様に解析した。

(2) DENV3

2010 年度、DENV1 とともに DENV3 が分離された。DENV1 と同様に、ウイルスの E 蛋白質の遺伝子配列の解析を行ったところ

(図 2)、2006 年に United States および 2007 年と 2008 年に Venezuela から報告された DENV3 と近縁であることが明らかとなった。

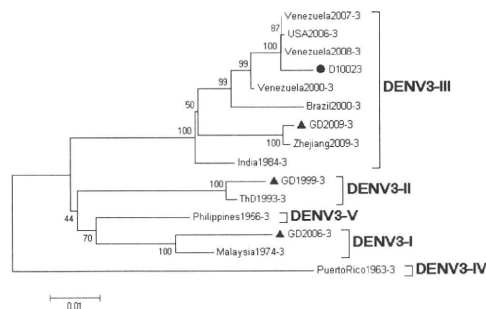


図 3. DENV3 の E 蛋白質を基にした系統樹解析を行った。黒丸は 2010 年分離株を、黒三角は広東省で過去に分離した DENV3 を示す。また、諸外国から報告されたウイルスについても同様に解析した。

D. 考察

DENV1 の系統樹解析の結果から、2010 年に広東省で分離された DENV1 の由来は多岐に渡るものと考えられる。この結果は、広東省以外の中国国内あるいは外国で流行したウイルスの輸入によるものか、あるいは国内で流行するウイルスのエンデミックな感染によるものかは不明である。しかし、副遺伝子型 I 型に属する 1997-1999 の各年に広東省で分離されたウイルスの様に認められるように、近縁なウイルスの経年における分離例が認められることから、広東省における DENV1 のエンデミックな流行が起こっている可能性が高いものと考えられる。

2010 年には DENV1 の他に、DENV3 も分離された。このウイルスは、近年 United States や Venezuela 流行しているものに近縁であり、本省に輸入された可能性がある。さらに詳細な検討が必要である。

E. 結論

2010 年、中国・広東省における Dengue 熱患者より、DENV1 と DENV3 が分離された。地球温暖化により感染の拡大が危惧される Dengue ウイルス感染症について、今後とも国際的な注意が必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Sakai, A., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T., and Takashima, I. Glycosylation of West Nile virus envelope protein increases In vivo and In vitro viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82; 696-704, 2010

(2) Hasebe, R., Suzuki, T., Makinno, Y., Igarashi, M., Yamanouchi, S., Maeda, A., Horiuchi, M., Sawa, H., and Kimura, T. Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.*, 10; 165-164., 2010

(3) Moritoh, K., Maeda, A., Sasaki, N., and Agui, T. Development and application of West Nile virus subgenomic replicon RNA expressing secreted alkaline phosphatase. *J. Vet. Med. Sci.*, In press, 2010

2. 学会発表

(1) 前田秋彦、染谷梓、西野佳以、村田英雄、倉根一郎。ウエストナイルウイルス・レプリコンの持続的複製細胞株の樹立。トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (2010.12.10, 東京)

(2) Maeda, A., and Ke, Chang-Wen. Epidemiological study of mosquito-borne diseases in Guangdong province, China. The Workshop of Network Laboratories on Emergency Response and Surveillance of Infectious Diseases in Pan Pearl River Delta Region (2010.12.12, Guangzhou, China)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究

イエカ類における日本脳炎ウイルス増殖能の評価

研究分担者 小林睦生（国立感染症研究所 昆虫医科学部長）

研究協力者 佐々木年則、沢辺京子（国立感染症研究所 昆虫医科学部）

研究要旨

これまでの研究で、コガタアカイエカが日本国内で越冬できる地域は限局され、日本脳炎ウイルス (JEV) の越冬に関与する可能性は低いと考えられ、アカイエカの生理・生態的特徴はむしろ JEV の越冬に適していることが示唆された。特にアカイエカでは、夏季に羽化し、吸血した雌成虫が国内で越冬することが可能であり、コガタアカイエカ以外の冬季のウイルス感染環に大きく関与することが示唆された。そこで、この2種イエカにおける JEV の増殖性を比較・評価した。

アジア全域で JEV の主要な媒介種として知られるコガタアカイエカにおいては、特に Nagasaki37 株、JaGAr 株の高い増殖能が唾液線を確認されたが、アカイエカにおいてはいずれのウイルス株の増殖も認められなかった。また、コガタアカイエカにおいては、JEV1 型、3 型のジェノタイプに関わらず高率に増殖したが、イノシシ由来の 1 型株 (JaNBo) の増殖能は両株に比べて低かった。本株は冬季捕獲イノシシ由来株あり、これまでに蚊が係わる感染環と異なる増殖で維持されていた可能性があり、媒介蚊での増殖能が低かったのではないかと考えられた。

蚊の体内における JEV の越冬温度・日長条件を想定し、ウイルス経口摂取後の蚊を異なる飼育条件下で最長 4 カ月間維持した結果、コガタアカイエカでは 20°C に 1 ヶ月間維持した後 1 頭当たり 50,000 コ⁺数のウイルス量が得られ、さらにその 3 ヶ月後でも 120,000 コ⁺数/頭が検出された。コガタアカイエカが 10°C の低温を 1 ヶ月経験しても、JEV は 4 ヶ月間蚊の体内で維持され、さらに後半の高温 (28°C) 条件による維持によってウイルス量が増加したことが示唆された。一方、いずれの条件下でもアカイエカにおける JEV の増殖は認められなかった。

国内に分布する JEV は、海外から飛来する株と国内に定着している株とが混在すると考えられている。国内定着株の存在を考えた場合、アカイエカが関与する可能性のある地域と、コガタアカイエカが関与する地域は異なると考えらるべきであろう。それぞれの蚊の生理・生態学的な特徴をさらに詳細に検討する必要がある。

A. 研究目的

地球温暖化に伴い媒介蚊の分布域の拡大、蚊個体群密度の上昇、短時間での病原体の増殖、病原体の増殖能の変化など種々の影響が考えられる。コガタアカイエカは、日本を含むアジア全域で、日本脳炎ウイルス (JEV) の主要な媒介蚊とされている。しかし、近年、国内においてコガタアカイエカの活動時期や生息場所以外での患者の発生も報告され、特に冬季においてコガタアカイエカ以外の節足動物が関与する感染環の存在も指摘されている。しかし、近年の JEV 分離株に見られるウイルス遺伝子の変異、日本脳炎の流行時期や場所の変化、発症例数の減少等、このような変化とコガタアカイエカ以外の蚊種ならびに蚊以外の節足動物における JEV 感受性との関係はよく分かっていない。

温帯地域に生息するイエカ類には、一種の休眠現象と考えられる吸血抑制が短日条件下で発現することが知られている。JEV が蚊体内で越冬するためには、この現象が起こる前に蚊がウイルスを取り込み越冬しなければならない。これまでの我々の研究で、長日である夏季に羽化したアカイエカが長期間生存し、実験的には越冬が可能であることが確認されている。一方、コガタアカイエカの寿命はアカイエカよりも短く、国内で越冬できる地域は限局され、その確率は非常に低いと結論された。このように、アカイエカの生理・生態的特徴はむしろ JEV の越冬に適していると考えられるが、JEV の体内での増殖を正確に評価した研究は少ない。そこで、本研究では、コガタアカイエカおよびアカイエカに焦点を絞り、それら蚊体内において JEV の増殖を正確に評価

するために実験を行った。

B. 研究方法

実験に用いたイエカ類は、2008 年出雲市捕集のコガタアカイエカ、および同年、東京都新宿区で捕集されたアカイエカであり、いずれも捕集後は 25°C 長日条件の飼育室内で継代維持した集団である。

蚊への経口感染実験に用いた JEV は、2005 年長崎県で捕集された蚊から分離された 1 型 Nagasaki37 株、1959 年に群馬県で捕集されたコガタアカイエカから分離され、その後培養細胞系で継代維持されてきた 3 型 JaGAR01 株、および 2008 年西宮市内で捕獲されたイノシシ血液から分離された 1 型 JaNBo 株の 3 株である。蚊への感染には人工膜吸血装置を用い、Nagasaki37 および JaNBo は 10^6 コピ- /ml を、JaGAR01 は 5×10^6 コピ- /ml をそれぞれウサギ脱繊維血液と混合し経口摂取させた。

ウイルスの定量は、定量 RT-PCR 法により JEV 遺伝子のコピー数を算出した。

C. 研究結果

図 1 にアカイエカおよびコガタアカイエカの各組織における JEV の増殖性を示した。コガタアカイエカにおいては、感染 22 日以降の唾液腺 ($10,000 < \text{コピ-} / \text{組織}$)、中腸 ($5,000 \sim 10,000$)、その他の部位 ($1,000 \sim 5,000$) のいずれにおいても JEV の強い増殖が認められた。一方、アカイエカにおいては JEV の増殖は認められなかった。

JEV 変異株の蚊唾液腺における増殖性を比較した (図 2)。コガタアカイエカ体内での JEV の増殖はウイルス株によって異なり、Nagasaki37、JaGAR01 に対しては高い増殖

性が見られたが (15,000<、60,000< コピー/組織)、イノシシ由来株 (JaNBo) での増殖性は低かった (<1,000 コピー/組織)。また、アカイエカでは、いずれのウイルス株の増殖も認められなかった。

次いで、蚊の体内における JEV の越冬温度・日長条件を想定し、ウイルス経口摂取後の蚊を異なる飼育条件下で最長 4 カ月間維持し、ウイルス量を定量した。ウイルス摂取後、コガタアカイエカを 28℃長日で約 2 週間飼育し、その後 20℃短日、10℃短日、20℃長日にそれぞれ 1 ヶ月、最後に 28℃で 1 ヶ月飼育した (図 3)。20℃短日に 1 ヶ月維持した後の JEV のコピー数は 50,000/頭であった。さらに、その 3 ヶ月後の個体からは 120,000 コピー/頭以上のウイルス量が検出され、約 4 ヶ月間で JEV はコガタアカイエカ体内で増殖したことが示唆された。一方、アカイエカをコガタアカイエカ同様にウイルス摂取後約 4 ヶ月維持した結果、20℃短日条件下で 1 ヶ月飼育した後、わずかに遺伝子が検出されたが (<100)、それ以外は、いずれの時期でも JEV は増殖しなかった。

アカイエカにおいては、ウイルス摂取後 28℃の飼育期間中にかなりの個体が死亡し、生存率が非常に低下した (データは省略)。そこで、ウイルス摂取直後から 20℃短日下に維持し、JEV 量の変動を観察した。アカイエカの生存率は上昇したが、2 ヶ月後および 4 ヶ月後の感染蚊のいずれからも JEV は検出されず、アカイエカにおいてウイルスの増殖は認められなかった。

D. 考察

これまでの研究で、コガタアカイエカが

日本国内で越冬できる地域は限局され、JEV の越冬に関与する可能性は低いと考えられ、アカイエカの生理・生態的特徴はむしろ JEV の越冬に適していることが示唆された。特にアカイエカでは、夏季に羽化し、吸血した雌成虫が国内で越冬することが可能であり、コガタアカイエカ以外の冬季のウイルス感染環に大きく関与することが示唆された。そこで、この 2 種イエカにおける JEV の増殖性を比較・評価した。

日本を含む東南アジア全域で JEV の主要な媒介種として知られているコガタアカイエカにおいては、特に Nagasaki37 株、JaGAR 株の高い増殖が蚊唾腺で確認されたが、アカイエカにおいてはいずれのウイルス株の増殖も認められなかった。コガタアカイエカにおいては、JEV1 型、3 型のジェノタイプに関わらず高い増殖性が認められたが、イノシシ由来の 1 型株 (JaNBo) の増殖は両種に比べて低かった。本株はイノシシ由来株であり、これまでに蚊が係わる感染環と異なる増殖で維持されていた可能性があり、その結果、蚊での増殖能が低かったのではないかと考えられた。今後、同じ 1 型ではあるが増殖能の異なる両株の蚊に対する親和性を様々な角度から調査する必要がある。

アカイエカの JEV 感受性は、韓国で捕集された系統を用いた経口感染実験から、コガタアカイエカほどではないものの、アカイエカにおいても JEV 感受性があることが指摘された (Turell *et al.* 2006)。また、Kumanomido *et al.* (1986) が実施した国内調査においても、アカイエカから JEV が分離されており (宮崎県 25 プール中 1 プールから分離、茨城県 72 プール中 1 プールから分離)、国内のアカイエカが JEV を媒介する

可能性も示唆されている。しかし、本実験結果は、過去のいずれとも異なっており、我々が用いたアカイエカが東京都内で捕集された集団であったことから、結果の違いがもたらされたとも考えられる。今後は、他の地域で捕集される蚊集団においても同様に JEV の増殖能を評価することを検討したい。

蚊の体内における JEV の越冬温度・日長条件を想定し、ウイルス経口摂取後の蚊を異なる飼育条件下で最長 4 カ月間維持した結果、コガタアカイエカでは 20°C に 1 ヶ月間維持した後 1 頭当たり 50,000 個⁻数のウイルス量が得られ、さらにその 3 ヶ月後でも 120,000 個⁻数/頭が検出された。本結果から、コガタアカイエカが 10°C の低温を 1 ヶ月経験しても、合計して 4 ヶ月の間 JEV が蚊の体内で維持され、さらに 4 ヶ月後の値が高かったことが明らかになった。様々な温度・日長条件下にそれぞれ 50 頭を供試し、その生存日数を比較した実験から、すべての設定条件下でコガタアカイエカの生存日数はアカイエカには劣ったが、例えば 10°C あるいは 15°C 下（いずれも短日条件）で、最長 170 日以上生存する個体が確認されている（データは省略）。ある地域の野外集団の約 2%（1/50 頭）が 6 ヶ月弱生存可能であるとすれば、実験室で設定した温度条件を満たす地域を逆に推定することで、JEV の越冬地、あるいは次の年の流行開始地域の特定に繋がるかもしれない。

近年、国内において分離される JEV は、海外から飛来するウイルス株と国内に定着しているウイルス株とが混在し、年によってその傾向が変わると考えられている（Nabeshima et al. 2008）。国内定着株を

考えた場合、アカイエカが関与する地域とコガタアカイエカが関与する地域とを切り離して考えるべきかもしれない。それぞれの蚊の生理・生態的な特徴をさらに詳細に検討するとともに、局所的な気象データの解析も必要である。

E. 結論

コガタアカイエカにおいて、特に Nagasaki37 株、JaGAR 株の高い増殖能が唾液線で確認されたが、アカイエカにおいてはいずれのウイルス株の増殖も認められなかった。また、コガタアカイエカにおいては、JEV1 型、3 型のジェノタイプに関わらず高い増殖能が得られたが、イノシシ由来の 1 型株（JaNBo）の増殖は両種に比べて低かった。

蚊の体内における JEV の越冬温度・日長条件を想定し、ウイルス経口摂取後の蚊を異なる飼育条件下で最長 4 カ月間維持した結果、コガタアカイエカが 10°C の低温を 1 ヶ月経験しても、JEV は 4 ヶ月間蚊の体内で維持され、さらに 4 ヶ月後の値が増加したことが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

佐々木年則，澤邊京子，鍬田龍星，金京純，津田良夫，伊澤晴彦，小林睦生. 蚊の日本脳炎ウイルス感受性，第 62 回日本衛生動物学会大会，2010 年 4 月