

201123044A

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

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症  
に対する総合的対策の確立に関する研究

(H23-新興-一般-010)

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24 (2012) 年 3 月

研究代表者 高 崎 智 彦

(国立感染症研究所)

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

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症  
に対する総合的対策の確立に関する研究

(H23－新興－一般－010)

平成23年度 総括・分担研究報告書

平成24 (2012) 年 3 月

研究代表者 高 崎 智 彦

(国立感染症研究所)

## 目 次

### I 総括研究報告

- 我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する  
総合的対策の確立に関する研究 研究代表者 高崎智彦 . . . . . 1

### II 分担研究報告

1. デングウイルス、チクングニアウイルスの迅速遺伝子検出法の研究 . . . . . 13  
研究分担者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）
2. 簡便 RT-LAMP 法を用いた媒介蚊からのウイルスゲノム検出 . . . . . 22  
研究分担者：江下優樹（大分大学医学部感染予防医学講座准教授）
3. 抗体依存性感染増強（ADE）現象を応用した高効率デングウイルス分離法に関する  
研究 . . . . . 27  
研究代表者：高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部室長）
4. コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の  
確立 . . . . . 31  
研究分担者：鈴木隆二（国立病院機構相模原病院 臨床研究センター室長）
5. ウエストナイルウイルス感染マウス脳内浸潤 T 細胞における TCR レパトア解析  
によるウイルス特異性に関する研究 . . . . . 39  
研究分担者：鈴木隆二（国立病院機構相模原病院 臨床研究センター室長）
6. ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の検討ー評価系の確立ー . . . . . 42  
研究分担者：沢辺京子（国立感染症研究所昆虫医科学部室長）
7. チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作 . . . . . 48  
研究分担者：小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）
8. DENV キメラ prM/E VLP の発現 . . . . . 55  
研究分担者：高橋秀宗（国立感染症研究所感染病理部室長）
9. GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発および健常成人における  
細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答 . . . . . 57  
研究分担者：高橋和郎（大阪府公衆衛生研究所副所長）
10. チクングニアウイルスの霊長類モデルの検討 . . . . . 62  
研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所副所長）
11. ウイルス RNA 安定保存に関する研究 . . . . . 70  
研究分担者：モイ メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部研究官）
12. 海外渡航者を対象にした蚊媒介性ウイルス感染症の情報提供法に関する研究 . . . . 74  
研究分担者：濱田篤郎（東京医科大学 渡航者医療センター教授）

- III 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . . 81

# I. 総括研究報告書

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する  
総合的対策の確立に関する研究

研究代表者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第 1 部 室長）

研究要旨：

デングウイルス(DV)はフラビウイルス科、チクングニアウイルス(CHIKV)はトガウイルス科アルファウイルスに属する RNA ウイルスである。どちらもネッタイシマカあるいはヒトスジシマカなどの蚊を媒介としてヒトに感染する。DV はデング熱(DF)やデング出血熱(DHF)という異なる病態を惹起する。世界的に年間数千万～1 億人が DF、数十万人が DHF を発症している。地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり流行地域拡大が最も危惧されている感染症である。我が国の輸入症例も年々増加し、2010 年には 245 例と感染症法施行後最高の報告数であった。2011 年は、震災後の海外旅行者の減少、東南アジアでの流行が 2010 年に比較するとやや沈静化したことなどから、103 例であった。しかしながら、近年は年間約 100 例の輸入症例が報告されている。本研究班では、現場で迅速に対応できる検査法の確立のために LAMP 法のデングウイルス、チクングニアウイルス検出法（ヒト検体および蚊）、感染増強（ADE）現象を応用したより分離効率の良いウイルス分離法を開発した。動物モデルに関しては、デングウイルスに対して感受性の高いマーマセツトが、チクングニアウイルスに対しても同等以上の感受性を有することが明らかとなった。しかし、マーマセツトは、旧世界ザルと比較すると免疫学的背景は明らかでない部分が多い欠点がある。そこでマーマセツトの CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b の 4 遺伝子を同定し、T 細胞レセプター遺伝子（TCR 遺伝子）の  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖可変領域（TRAV、TRBV）の 56 遺伝子を同定した。媒介蚊の感受性に関しては、日本産（神奈川県）ヒトスジシマカのデングウイルスに対する感受性を確認した。新規ワクチン開発に関しては、チクングニア DNA ワクチンのコンストラクトを構築し、抗原発現を確認した。またデングウイルスの中空粒子抗原の発現系を作製した。本抗原は診断キットの抗原としても有用である。2011 年 2 月から、感染症法において 4 類感染症全数把握疾患に規定されたチクングニアウイルスは、2005 年に西インド洋諸国で流行が拡大した後、インド、スリランカに拡大し、2007 年にはインドからの輸入症例によりイタリアで国内流行が発生し、2011 年にはフィリピンミンダナオ島で国内流行が確認されている。また、旅行者ワクチンとしての不活化チクングニアワクチンやウエストナイルワクチンの実用化のため細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの成人での抗体応答を解析した。また、ウエストナイル脳炎のマウス脳組織における免疫学的解析も実施した。

分担研究者：

小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）  
森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）  
高橋和郎（大阪府公衆衛生研究所副所長）  
高橋秀宗（国立感染症研究所感染病理部  
室長）  
澤辺京子（国立感染症研究所昆虫医科学部  
室長）  
鈴木隆二（相模原病院臨床研究センター室

長）

江下優樹（大分大学医学部・感染分子病態  
制御学講座准教授）  
モイ メンリン（国立感染症研究所ウイル  
ス第一部 研究官）  
濱田篤郎（東京医科大学渡航者医療センタ  
ー教授）  
倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

## A. 研究目的

デングウイルス(DV)はフラビウイルス科、チクングニアウイルス(CHIKV)はトガウイルス科アルファウイルスに属する RNA ウイルスである。どちらもネッタイシマカあるいはヒトスジシマカなどの蚊を媒介としてヒトに感染する。DV はデング熱(DF)やデング出血熱(DHF)という異なる病態を惹起する。世界的に年間数千万～1億人が DF、数十万人が DHF を発症している。地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり流行地域拡大が最も危惧されている感染症である。我が国の輸入症例も年々増加し、2010年には245例と感染症法施行後最高の報告数となった。輸入症例中に毎年数例の出血熱、重症例の報告がある。DHFは発症すると全身血管からの血漿漏出、補体系の異常活性化、血小板減少に伴う出血傾向、粘膜からの出血、播種性血管内凝固症候群などをきたし致死的となる。また、2005年に西インド洋諸国で流行が拡大したチクングニア熱は、インド、スリランカに拡大し、2007年にはインドからの輸入症例によりイタリアで国内流行が発生し、2011年にはフィリピンで国内流行が確認されている。昆虫媒介性ウイルス感染症流行の拡大傾向のなかで、より迅速な病原体、血清診断法を開発し地方衛生研究所、検疫所等に技術移転する。また輸入症例に対しては、海外渡航者への啓発ガイドブックとビデオ等を作成し、海外渡航先での感染防止策を確立する。また、CHIKV、DV に対する新たなワクチン開発のための基礎データを収集する。媒介蚊対策は、CHIKV、DV は国内に生息するヒトスジシマカが媒介可能であるため、国内のヒトスジシマカサーベイランスと両ウイルス感受性について解明する。多くの日本人は DV と近縁な日本脳炎ウイルスに対する抗体を保有している。抗日本脳炎抗体が DV 感染者における感染増強現象を、我々の開発した Fc レセプター発現 BHK 細胞を用いて感染増強抗体を測定し、わが国に DV が侵入した場合の重症デング熱発生頻度を推定する。

## B. 研究方法

### 1. 診断法の開発・評価

### RT-LAMP 法を用いたウイルス遺伝子迅速診断法の開発・応用

GenBank から得たデングウイルス 1～4 型ウイルスの遺伝子配列に基づいて良く保存された領域を選びアライメントを作成し、デングウイルスコンセンサスプライマーを合成した。プライマーはアジア各国で分離されたデングウイルスを用いて評価した。同様にしてチクングニアウイルス用のプライマーを合成した。

さらに RT-LAMP 法による媒介蚊からのウイルス検出法を検討した。チクングニアウイルスと媒介蚊乳剤を混合し、RT-LAMP 法によりチクングニアウイルス増幅を試みた。

### GENECUBE を用いたアルボウイルスウイルス遺伝子迅速診断法の開発

検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置である GENECUBE® (TOYOBO) による GENECUBE Qprobe 法のためのプライマーと Q プロブ設計し、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの検出感度、特異性を検討した。

### 抗体依存性感染増強 (ADE) 現象を応用した高感度ウイルス分離法の開発

蚊媒介性ウイルスの分離には、従来蚊由来細胞 (C6/36 細胞) やアフリカミドリザル腎臓由来細胞 Vero 細胞、ハムスター腎臓由来細胞 BHK 細胞などがよく用いられてきた。急性期のデング熱患者血清 50 検体を BHK 細胞、C6/36 細胞および Fc $\gamma$ IIA 発現 BHK 細胞に接種し、ウイルス分離を行いそれぞれの分離効率を比較検討した。Fc $\gamma$ 発現 BHK 細胞には、血清接種時に感染増強単クローン抗体 (mAb4G2) を添加した。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、各施設倫理委員会において承認された。

## 2. ワクチン開発

### チクングニアウイルスワクチン開発

チクングニア熱を予防する DNA ワクチンを試作した。CHIKV 3 株を用いてコンストラクトを作製し、CHO 細胞に LipofectamineLTX を用いて遺伝子を導入した。

## デングウイルス

デングウイルスの中和エпитープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP を作成し、4種のデングウイルス単クローン抗体、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス単クローン抗体を用いた ELISA 系によりフラビウイルスキメラ prM/E VLP の抗原性を検討した。

## 成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答

健康成人 272 名 (20~72 歳、平均 43 歳) に細胞培養日本脳炎ワクチン (ジェービック V®) を接種し、約一ヶ月後の抗日本脳炎中和抗体価を測定した。

### 3. 動物モデルの開発、病態解析

デングウイルス感染霊長類モデルとして確立されつつあるマーモセットは、新世界ザルであり旧世界サルと比べて免疫学的背景は明らかでない部分が多い。そこで、サイトカイン系の発現解析、MHC、T 細胞レセプター、個体識別マーカーなどを解明した。また、マーモセットのチクングニアウイルスに対する感受性を感染実験により検討した。

ウエストナイルウイルスを腹腔接種し、ウエストナイル脳炎を発病した感染マウス脳内の細胞性免疫 (ウイルス特異的脳内浸潤 T 細胞) を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および各関連施設における実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

### 4. 蚊のデングウイルス感受性試験

デングウイルス媒介蚊で日本国内に生息するヒトスジシマカのデングウイルス 1~4 型に対する感受性を、神奈川県で捕集されたヒトスジシマカを用いて検討した。脱繊維血と混合した  $10^6$  copies/ml の各ウイルス液を、人工膜吸血法を用いて雌蚊に経口的に接種させた。感染蚊はその後一定期間 27°C 長日下に維持した。感染蚊からの DENV の検出は、TaqMan プローブ法および免疫蛍光抗体法により行った。

### 5. 診断技術等の技術移転

地方衛生研究所、検疫所にウイルス遺伝子検査のための陽性コントロールを配布できるようにウイルス RNA 遺伝子の常温保存・輸送方法を検討した。RNA 抽出キットを用いて抽出したチクングニアウイルス RNA 遺伝子を、RNA stable tube (RNA stable 1.5ml Screw-Cap Tube) に入れ、蓋を緩めた状態で真空遠心機により乾燥させる。乾燥させたチューブを室温 (15-25°C) で 6 ヶ月以上保存して同量の蒸留水により溶解し、リアルタイム逆転写 PCR (TaqMan) 法により評価した。

### 6. 海外旅行者への啓蒙ツール開発

日本国民を対象にしたインターネット調査、特定な集団を対象とした海外でかかる病気への関心や情報入手の方法、デング熱など蚊媒介性ウイルス感染症の知識レベルや予防対策についてアンケート配布調査を行った。また、海外渡航者への効果的な情報提供を行うためホームページを開設し、デング熱に関する e-learning 形式の Web サイトを構築した。

## C. 研究結果

### 1. 診断法の開発・評価

#### ウイルス遺伝子迅速診断法の開発 (RT-LAMP) 法

作製したプライマーを使用して、RT-LAMP 法により、4つの型のデングウイルスすべてが検出でき、検出感度は 1~10 copy/sample であった。

RT-LAMP 法を用いたウイルスと蚊の乳剤原液の混合物からのチクングニアウイルス遺伝子検出法を検討した結果、所要時間 30~45 分でウイルス遺伝子を検出できた。GENECUBE を用いたアルボウイルスウイルス遺伝子迅速診断法の開発

同時に多種類の測定を行えるように、どの対象ウイルスも検出できる増幅条件を検討した結果、増幅条件は 98°C 1 秒、58°C 3 秒、63°C 5 秒を 50 サイクルと決定した。ウイルス特異的プライマーの感度は十分であった。D1-D4 は検出可能であったが、共通プライマーの感度は  $10^5$  FFU/tube と十分ではなかった。

#### 高感度ウイルス分離法の開発

デング熱患者急性期血清 50 検体のうち

34 検体においてはいずれの細胞においてもウイルスが分離された。分離されなかった 16 検体中 7 検体から Fc $\gamma$  IIA 発現 BHK 細胞を用いた抗体依存性感染増強 (ADE) 現象を応用した方法でウイルスが分離された。

## 2. ワクチン開発

### チクングニアウイルス

チクングニア熱を予防する DNA ワクチンを試作した。CHIKV 3 株を用いて CHO 細胞に LipofectamineLTX を用いて遺伝子を導入し、すべてのプラスミドにおいて細胞内で CHIKV ウイルス抗原の発現が確認された。

### デングウイルス

DENV キメラ prM/E VLP の発現させ、ワクチン基礎データを収集するとともに、発現タンパクを利用して、ウイルス抗原を識別できる ELISA 系を確立した。

### 成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答

1 回接種の陽転率は 80% (135 名/168 名) であった。1 回の接種で抗体が上昇しなかった 27 名中 17 名であった。

## 3. 動物 (霊長類) モデルの開発

マーモセットの CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b の 4 つの遺伝子を同定した。T 細胞レセプター遺伝子 (TCR 遺伝子) の  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖可変領域 (TRAV、TRBV) の遺伝子を同定した。TRAV に関しては 35 の遺伝子、TRBV については 21 の遺伝子を新たに同定した。

チクングニアウイルス感染マーモセットモデルに関しては、ウイルスを接種してすべての 4 個体にウイルス血症が確認され、中和抗体の上昇も確認された。症状としては感染 3 日後に腹部の発赤が確認された。

ウエストナイル脳炎を発病したマウス脳内においては、CD8<sup>+</sup>T 細胞が IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を産生することが確認された。感染初期の脳内では感染細胞を排除するために細胞障害性 T 細胞が

## 4. 蚊のデングウイルス感受性試験

海老名市捕集のヒトスジシマカを用いてデングウイルス感染蚊を作製した結果、DENV2 の増殖が高く DENV1 の増殖は低かつ

た。

## 5. 診断技術等の技術移転

ウイルス RNA 遺伝子の常温保存・輸送方法を検討の結果、RNA stable チューブを使用することにより、少なくとも 8 ヶ月間は室温下で安定であることが確認された。

## 6. 海外旅行者への啓蒙ツール開発

デング熱などの蚊媒介性ウイルス感染症の啓蒙のために、ホームページを作成し e-learning 形式の「デング熱に関する検定」を作成した。また、ジャカルタ、マニラの在留邦人を対象に、デング熱の知識に関するアンケート調査を実施した。その結果、日本人は蚊には夜刺されるという意識が強く、デング熱の媒介蚊が夕方や明け方に刺されることが多いという知識乏しいことが明らかとなった。

## D. 考察

診断法の開発としては、ウイルス遺伝子検出法の開発、ウイルス分離法の改良を行った。

ウイルス遺伝子検出法としては、現場即時検査の面からの RT-LAMP 法の確立は媒介蚊の調査に有用である。また我が国で国内流行が発生した場合は、POCT (Point of care testing) の手段となると考えられる。一方、検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置である GENECUBE®による遺伝子検出法の確立は、国内流行が拡大した場合にマンパワーの不足を補えるものと考えられる。

ウイルス分離法に関しては、蚊媒介性ウイルスの分離には、従来蚊由来細胞 (C6/36 細胞) やアフリカミドリザル腎臓由来細胞 Vero 細胞、ハムスター腎臓由来細胞 BHK 細胞などがよく用いられてきた。C6/36 細胞は高感度であるが、哺乳類の血清により細胞が障害される欠点がある。Vero 細胞、BHK 細胞は C6/36 細胞より分離効率が悪く、中和抗体が出現している患者血清では、分離効率が低下する。今回、Fc $\gamma$  レセプターを発現させた BHK 細胞を用いて抗体依存性感染増強効果を利用してより高効率でデングウイルスを分離する方法を開発した。



今後、日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルスについても検討する予定がある。

ワクチン開発では、開発のための基盤的研究に着手し、DNA ワクチンを作製した。今後、チクングニアウイルスに対して十分な感受性を確認したマーマセットを用いて評価する。また、デングワクチンに関しては DENV キメラ prM/E VLP を作製し、十分な抗原性を有することが確認された。この VLP 抗原は抗体検査系の抗原としても使用できると考えられる。

成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答では、現在の細胞培養日本脳炎ワクチン 1 回接種では、20%の抗体非上昇者が存在した。やはり海外渡航者のための旅行者ワクチン接種も 2 回接種が必要である。旅行者用チクングニアワクチン、ウエストナイルワクチンの開発についても参考にすべきデータである。

動物モデルの開発では、デングウイルスは自然なマウスではウイルス血症も起こさない。ワクチンや治療薬の実用化の点からも霊長類モデルの開発を行った。新世界ザルであるマーマセットは旧世界ザルよりも高いウイルス血症を示すことから感染モデルとして有用であるが、旧世界ザルと比べて免疫系の基本情報が不足している点であるが、サイトカイン、T細胞関連の遺伝子を同定したことは今後の解析に非常に有用である。また、マーマセットはチクングニアウイルスに対しても、デングウイルスと同等以上のウイルス血症をおこし、感染霊長類モデルとして有用であることが明らかとなった。ウエストナイル脳炎マウス脳内においては、CD8+T 細胞が IFN- $\gamma$  および TNF- $\alpha$  を産生することが確認され、感染初期の脳内では感染細胞を排除するために細胞障害性 T 細胞が展開することが示唆された。

媒介蚊のウイルス感受性に関しては、海老名市捕集のヒトスジシマカを用いてデングウイルス感染蚊を作製した結果、DENV2 の増殖が高く DENV1 の増殖は低かったが、これが地域性によるのかウイルス側の要因によるのか今後検討する

実験室診断法の技術移転の一環として検

討した RNA 遺伝子の常温保存・輸送方法の検討では、RNA stable チューブを使用することで室温保存 8 ヶ月間安定であることが確認できた。本方法により国内衛生研究所、検疫所等の検査機関に輸送する際に、ドライアイスを使用する必要がなく、新たな RNA ウイルス感染症の検査体制構築に極めて有用である。

## E. 結論

蚊媒介性ウイルスの遺伝子検出法として、現場即時検査法として RT-LAMP 法の確立と蚊への応用研究を実施し、実用への目途を立てた。また、検査機関におけるマンパワーの不足を補うために検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置による検出法の確立にも着手した。また、ADE 現象を応用したより効率のよいデングウイルス分離法を開発した。また日本産ヒトスジシマカのデングウイルスに対する感受性を確認した。

デングウイルス感染動物モデルとして有用であるマーマセットの免疫学的背景を明らかにチクングニアウイルスに対する感受性も解析した。

チクングニア DNA ワクチンのコンストラクトを確認し、抗原発現を確認した。またデングウイルスの中空粒子抗原の発現系を確立した。本抗原は診断キットの抗原としても有用である。

ウイルス遺伝子 RNA の常温保存・輸送法を見出し、その安定性を確認した。

デング熱流行地の在留邦人のデング熱に関する認識度調査を行った結果、媒介蚊に関する知識が不足していることが判明した。日本人海外旅行者向け感染症に関するホームページを作成した。

## F. 健康危険情報

H23 年 8 月に台湾 CDC はフィリピン(ミンダナオ島)からの輸入チクングニア症例を確認した。フィリピン熱帯医学研究所 (RITM) に確認したところ、チクングニア熱のミンダナオ島での流行が確認された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Wichit S, Jittmittraphap A, Hidari KI, Thaisomboonsuk B, Petmitr S, Ubol S, Aoki C, Itonori S, Morita K, Suzuki T, Suzuki Y, Jampangern W. Dengue virus type 2 recognizes the carbohydrate moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian and mosquito cells. *Microbiol Immunol*.55: 135-140, 2011

Duc Tuan Dinh, Mai Thi Quynh Le, Cuong Duc Vuong, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. An Updated Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of H5N1 Avian Influenza Viruses. *Tropical Medicine and Health*. 39:3-7, 2011

Lyre Anni Espada-Murao and Kouichi Morita. Delayed cytosolic exposure of Japanese encephalitis virus double-stranded RNA impedes interferon activation and enhances viral dissemination in porcine cells. *Journal of Virology*, 85 : 6736–6749, 2011

Phan Thi Nga, Maria del Carmen Parquet, Chris Lauber, Manmohan Parida, Takeshi Nabeshima, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Shingo Inoue, Takashi Ito, Kenta Okamoto, Akitoyo Ichinose, Eric J. Snijder, Kouichi Morita, Alexander E. Gorbalenya. Discovery of the First Insect Nidovirus, a Missing Evolutionary Link in the Emergence of the Largest RNA Virus Genomes. *PLoS Pathogens* 7 (9): e1002215. 2011

Tran Thi Ngoc Ha, Nguyen Tien Huy, Lyre Anni Murao, Nguyen Thi Phuong Lan, Tran Thi Thuy, Ha Manh Tuan, Cao Thi Phi Nga, Vo Van Tuong, Tran Van Dat, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kouichi Morita, Vu Thi Que Huong, Kenji Hirayama. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos One* 6(10):e25969. 2011

森田公一、岡本健太：ウイルスの今日的意義・11 アルボウイルス. 化学療法の領域、Vol.27:3-10, 2011

Yuki Eshita, Junko Higashihara, Masayasu Onishi, Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, Tomohiko Takasaki, Hidekatsu Yoshioka, Naoji Kubota and Yasuhiko Onishi (2011) : Mechanism of the introduction of exogenous genes into cultured cells using DEAE-Dextran-MMA graft copolymer as a non-viral gene carrier. II. Its thixotropy property. *J. Nanomed. Nanotech.* 2:105.

doi:10.4172/2157-7439.1000105.

Yusuke Sayama, Yuki Eshita, Takuya Yamao, Miho Nishimura, Tomomitsu Satho, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Kouji Sakai, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Tetsuya Mizutani (2011): Prevalence of Phasi Charoen virus in female mosquitoes. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 3(1): 19-21.

Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Theerawit Phanphoowong, Tomohiko Takasaki, Lucky Ronald Runtuwene, Ichiro Kurane, Hironari Narita, Yuki Eshita (2011): Present status of the insecticide susceptibility of *Aedes* mosquitoes in Thailand. *Journal of Japanese Red Cross Toyota College of Nursing*, 6(1): 31-37.

Juan Sun, Xiaohui Ouyang, Yuki Eshita, Yan Wu, Erping Qin, Heping Ma, Zhifang Liu, Hailin Wang, Teer Ba, Shuwei Yang and Jiang Bian (2011): The role of the food additives in regulation of vacuolation induced by VacA in AGS cells. *Journal of Alternative Medicine Research*, 3(1):115-124.

Kasem Somthana, Yuki Eshita, Ratchanok Kumsisri, Paron Dekumyoy, Jitra Waikagul, Thareerat Kalambaheti and Yaowapa Maneerat (2011): Roles of partially purified antigens from *Gnathostoma spinigerum* larvae on antibody production by human B cell culture, 42(4): 772-781.

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I.: Detection of higher levels of dengue viremia using FcyR-expressing BHK-21 cells than FcyR negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*, 203(10):1405-14 (2011)

Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. : Dengue

virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using FcγR-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of Clinical Virology* 52(3):225-30 (2011).

Ujiie M, Moi ML, Takeda N. Dengue maculopathy in a traveler. *Am J Trop Med Hyg.* 85(6):965-6 (2011)

Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. *J Gen Virol.* 92:2272-80 (2011)

Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R. : Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor β gene in New World monkeys. *Am J Primatol.* 2011 Oct;73(10):1082-92.

Fujii Y, Matsutani T, Kitaura K, Suzuki S, Itoh T, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. : Comprehensive analysis and characterization of the TCR alpha chain sequences in the common marmoset. *Immunogenetics.* 2010 Jun;62(6):383-95.

Kitaura K, Fujii Y, Hayasaka D, Matsutani T, Shirai K, Nagata N, Lim CK, Suzuki S, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I. : High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by TCR usage in the brains of mice infected with West Nile virus. *J Immunol.* 2011 15;187: 3919-30.

Eiji Konishi and Yamato Takizawa: Effect of pre-existing immunity to flaviviruses on balanced induction of neutralizing antibodies by a dengue tetravalent DNA vaccine in mice. *J Vaccin Vaccinat.* 1, 1000102, 2011, (DOI

10.4172/2157-7560.1000102)

Eiji Konishi, Yuko Miyagawa: Balance of infection-enhancing and neutralizing antibodies induced by a dengue tetravalent DNA vaccine in a mouse model. *Microbes and Infection.* 13(12-13):1091-8, 2011

Eiji Konishi and Mayu Konishi: Nonstructural protein 1 antibody-based epitope-blocking enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate Japanese encephalitis virus from dengue virus infections in humans. *Japanese Journal of Infectious Diseases.* 64(4):284-91, 2011

Eiji Konishi: Issues Related to Recent Dengue Vaccine Development. *Tropical Medicine and Health.* Advance Publication Article, 6 Aug 2011

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the Predominant Dengue Virus from Type 2 to Type 1 with a Subsequent Genotype Shift from IV to I in Surabaya, Indonesia 2008-2010. *PLoS One.* 2011;6(11): e27322. Epub 2011 Nov 7.

石川 知弘、小西 英二 : フラビウイルス、「ウイルス」61巻2号、221-238、2011

Kris Cahyo Mulyatno, Atsushi Yamanaka, Ngadino and Eiji Konishi: Resistance of *Aedes aegypti* larvae to temephos insecticide in Surabaya, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 43:29-33. (2012).

Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Atsushi Yamanaka, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi: First isolation and phylogeny of Chikungunya virus from Surabaya, Indonesia. *Jpn J Infect Dis.* 65, 92-94 (2012).

小西英二：デングワクチン。「日本臨床」69巻9号、1617-1621頁、2011。

小西英二：デング熱とワクチン開発。「Pharma Medica」29巻49-52頁、2011。

Ohtaki N, Takahashi H, Kaneko K, Gomi Y, Ishikawa T, Higashi Y, Todokoro M, Kurata T, Sata T, Kojima A. Purification and concentration of non-infectious West Nile virus-like particles and infectious virions using a pseudo-affinity Cellufine Sulfate column. *J Virol Methods*. 174(1-2):131-135. 2011

M.L. Moi, C.K. Lim, K.B. Chua, T. Takasaki, I. Kurane. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2):e1536. 2012

## 2. 学会発表 (国際学会)

Kouichi Morita and Lyre Anni Espada Murao: Cytosolic exposure of Japanese encephalitis virus double-stranded RNA as a regulatory mechanism for interferon response and viral dissemination. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, Stanford University, California, USA. June 20-22, 2011

Kenta Okamoto, Muhareva Rawekiensya, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui, Mohammed Alimul Islam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: DEN2 strain derived from DHF patient utilizes SDC2 for infection in erythroid cells. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Lyre Anni Espada-Murao, Kouichi Morita: The tripartite relationship between cytosolic exposure of double-stranded RNA interferon activation, and dissemination of Japanese encephalitis virus in cultured cells. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Alexander E Gorbalenya, Chris Lauber, Jelle J Goeman, Phan Thi Nga, Maria del Carmen

Parquet, Manmohan Parida, Takeshi Nabeshima, Fuxun Yu, Takashi Ito, Eric J Snijder, Kouichi Morita: The largest RNA virus genomes evolved by wavelike expansions of three major coding regions. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Basu Dev Pandey, Yogendra Shah, Kishor Pandey, Takeshi Nabeshima, Ichiro Kurane, Kouichi Morita: Emergence of dengue in Kathmandu, Nepal. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Fuxun Yu, Kenta Okamoto, Kouichi Morita: Establishment of a cell line stably expressing Japanese encephalitis virus PRM-E protein and application for IGM capture ELISA. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Toru Kubo, Hidekazu Nishimura, Hiroyuki Moriuchi, Kouichi Morita: Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

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 serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection: revisit of antibody response and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK cells. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, California, USA, September 11-16, 2011

Daisuke Hayasaka, Yoshiki Fujii, Noriyo Nagata, Dihn Tuan Duc, Yuki Takamatsu, Kazutaka Kitaura, Kanae Tanaka, Tetsutaro Sata, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: Multiple mechanisms of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Shota Era, Kazuya I.P.J Hidari, Ipei Watanabe, Kiyoshi Ikeda, Kouichi Morita, Takashi Suzuki: Small carbohydrate inhibitor targeting dengue virus E protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Katsuki Ekawa, Kazuya I.P.J Hidari, Kouichi Morita, Takashi Suzuki: Biochemical properties of N-linked Glycosylation of dengue virus NS1 protein. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Mya Myat Ngwe Tun, Kyaw Zin Thant, Shingo Inoue, Yae Kurosawa, Yee Yee Lwin, Sanda Lin, Kay Thi Aye, Pe Thet Khin, Tin Myint, Khin Htwe, Kouichi Morita: Dengue primary infections observed among dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Futoshi Hasebe, Takeshi Nabeshima, Kenta Okamoto, Toru Kubo, Takashi Tsunoda, Guillermo Posadas Herrera, Thuy Thi Thu Nguyen, Yen Thi Nguyen, Mai Thi Quynh Le, Kouichi Morita: Characterization of dengue 1 epidemic strains proliferated in Hanoi, Vietnam in 2009. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian Dwi Sary, Fedik Abdul Rantam, Soengeng Soegijanto and Eiji Konishi: Displacement of the predominant dengue virus in Surabaya, Indonesia: status in 2008-2010. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Eiji Konishi, Yoko Kitai, Koichi Nishimura, and Seiya Harada: Natural infection with Japanese encephalitis virus in inhabitants of Kumamoto Prefecture, Japan, from 2004 through 2010. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Tomohiro Kotaki, Shoko Takeda, Eiji Konishi: Monoclonal antibodies to dengue virus types 1 and 3 exhibit neutralizing and enhancing activities depending on epitopes on envelope protein and subclass of IgG. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Hideki Yamaji, Takashi Nagasuga, Yusuke Takahashi, Masataka Nakamura, Tomohisa Katsuda, Miwa Kuwahara, and Eiji Konishi: Efficient production of extracellular subviral particles of Japanese encephalitis virus by recombinant insect cells. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Miwa Kuwahara, Hideki Yamaji and Eiji Konishi: Evaluation of extracellular subviral particles of dengue type 2 virus produced by insect cells for use as vaccine and diagnostic antigens. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011

Futoshi Hasebe, Takashi Tsunoda, Takeshi Nabeshima, Kenta Okamoto, Toru Kubo, Posadas-Herrera Guillermo, Nguyen Thi Thu Thuy, Dang Thi Dinh, Pham Hoai Linh Ly, Nguyen Bao Ngoc, Nguyen Hoang Le, Ataru Tsuzuki, Nguyen Thi Yen, Tran Vu Phong, Le Thi Quynh Mai and Kouichi Morita: Characterization of dengue 1 epidemic strains in Hanoi, Vietnam in 2009, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

Kouichi Morita, Kenta Okamoto, Shingo Inoue, Takeshi Nabeshima, Posadas H. Guillermo, Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Bui Minh Trang, Vu Sinh Nam, Phan Thi Nga, Le Q. Mai, Nguyen Tran Hien, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe: Rapid and comprehensive identification of virus strains by using LC tandem-MS method. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

Phan Thi Nga, Bui Minh Trang, Do Phuong Loan, Nguyen Viet Hoang, Do Quang Ha, Vu Thi Que Huong, Huynh Thi Kim Loan, Hoang Minh Duc, Vu Sinh Nam, F. Hasebe and K. Morita: Circulation of Nam Dinh and Banna viruses in Viet Nam, 1964-2011. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

Nguyen Tien Huy, Tran Thi Ngoc Ha, Lyre Anni Murao, Nguyen Thi Phuong Lan, Tran Thi Thuy, Ha Manh Tuan, Cao Thi Phi Nga, Vo Van Tuong, Tran Van Dat, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami, Kouichi Morita, Vu Thi Que Huong and Kenji Hirayama: Cell-free Circulating DNA: a Novel Biomarker in Dengue Virus Infection. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012, Kobe, Japan, January 11-12, 2012

Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi. Complement levels correlated with disease severity in dengue patients in Indonesia. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Soegeng Soegijanto, Helen Susilowati, Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi. Unusual Manifestation of Dengue Virus Infection and its Management. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Kris Cahyo Mulyatno, Atsushi Yamanaka, Subagyo Yotopranoto, Helen Susilowati, Eiji Konishi. Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia 2008 - 2011. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Helen Susilowati, Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi. Isolation of chikungunya virus from patients clinically diagnosed as

dengue fever in Surabaya, Indonesia, 2010 - 2011. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

Eriko Kubota, Miwa Kuwahara Hideki Yamaji and Eiji Konishi. Construction of a dengue type 4 extracellular subviral particles using a High Five expression system. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2012. Kobe, Japan. January, 2012.

(国内学会)

早坂大輔、藤井克樹、永田典代、堀 朋子、辻百衣璃、北浦一孝、田中香苗、佐多徹太郎、鈴木隆二、森田公一・日本脳炎ウイルス感染後の重症化に関わるIL-10応答, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

江良翔太、左 一八、渡邊一平、池田 潔、杉浦信夫、木全弘治、森田公一、鈴木 隆: デングウイルスEタンパク質機能を阻害する低分子誘導体, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

左 一八、田島 茂、高崎智彦、倉根一郎、森田公一、鈴木 隆・病原性の異なる日本脳炎ウイルス株の硫酸化糖鎖認識・第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

村木優子、杉浦正明、福家功、真鍋貞夫、石川豊数、奥野良信、東 雍、森田公一・ウエストナイルワクチンのマウス及びサルにおける免疫原性, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

吉川 亮、井上真吾、岡本健太、鍋島 武、比嘉由紀子、前川芳秀、森田公一、吾郷昌信・長崎県下のブタ、イノシシにおける日本脳炎ウイルスの侵淫状況, 第46回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 石川県金沢市, 2011年5月20-21日

早坂大輔、北浦一考、永田典代、青木康太郎、藤井克樹、鈴木隆二、森田公一：日本脳炎ウイルス感染後の免疫病原性による重症化、第52回日本熱帯医学会大会、第26回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会・東京都・2011年11月4日～6日

NGWETUN MYAMYAT、早坂大輔、森田公一：The Pathogenic mechanisms of Tick-Borne Encephalitis Virus by using IL-10 knock-out mice、第52回日本熱帯医学会大会、第26回日本国際保健医療学会学術大会 合同大会・東京都・2011年11月4日～6日

鳥羽聡史、甲斐直子、阿南栄一朗、岡 宏亮、横山 敦、大谷哲史、石井 寛、岸 建志、白井 亮、時松一成、平松和史、山田健太郎、アハメド・カムルディン、江下優樹、西園 晃、門田淳一（2011）：当科で経験したデング熱の一症例。大分感染症研究会 第48回例会。2011年3月24日。大分東洋ホテル、大分市。大分感染症研究会 第48回例会プログラム。

Lucky R. Runtuwene, Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011): Novel method using mice to infect *Aedes aegypti* with dengue virus type 2. 第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool., 62 (大会特集号):74, 2011.

江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Boualy Kheokhamphanh, Bounpone Sidavong, Kham Thong, Silivanh Chanthavong, Khambang Silavong, Kalounna Keokenechanh, Hongkham Keomanila,

牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2011) : RT-LAMP 法を用いた蚊

からのデングウイルスゲノムの迅速検出。第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool.,62(大会特集号):75, 2011.

青木千春、瀬戸陽子、大塚 靖、福田昌子、江下優樹、高岡宏行（2011）：大分大学医学部感染予防医学講座で経験した東洋眼虫のヒト寄生症例について。第64回日本寄生虫学会南日本支部大会・第61回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2011年11月3日(土)・4(日)、宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ。第64回日本寄生虫学会・第61回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨：17, 2011. Med. Entomol. Zool., 63(2), 2012.

Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011): Whole transcriptome analysis of *Aedes aegypti* 14 days post-dengue infection using RNA-seq. 第64回日本寄生虫学会南日本支部大会・第61回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2011年11月3日(土)・4(日)、宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ。第64回日本寄生虫学会・第61回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨：22, 2011. Med. Entomol. Zool., 63(2), 2012.

江下優樹, ルッキー R. ルントウェネ, 川島秀一, 鈴木 穰, 菅野純夫, 中井謙太, 前田龍一, 杉本千尋, 高崎智彦, 倉根一郎 (2011): デングウイルス感染蚊の網羅的トランスクリプトーム解析。第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京都新宿区、国立感染症研究所 共用第一会議室、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会・プログラム講演要旨：5, 2011.

北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二：新世界ザルにおけるT細胞受容体β鎖遺伝子のCDR3領

域における正の選択. 第40回日本免疫学会  
学術集会(東京) 2011年11月27-29日

桑原三和、窪田衣里子、斎藤直輝、永菅尚、  
高橋裕輔、中村匡崇、山地秀樹、小西英二：  
JEV抗原を高発現する昆虫細胞の樹立と産  
生抗原のワクチンへの適用。第45回日本脳  
炎ウイルス生態学研究会、2011年5月

小瀧将裕、武田祥子、小西英二：デング1  
型および3型マウスモノクローナル抗体の  
中和活性および増強活性を規定する因子の  
解析。第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会、  
2011年5月

Atsushi Yamanaka, Helen Susilowati,  
Kris C. Mulyatno, Soegeng Soegijanto,  
Eiji Konishi: Isolation of chikungunya  
virus from patients clinically diagnosed  
as dengue fever in Surabaya, Indonesia,  
2010. 第52回日本熱帯医学会大会, 2011年  
11月

Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno,  
Subagyo Yotopranoto, Helen Susilowati,  
Eiji Konishi: Vertical transmission of  
dengue virus in *Aedes aegypti* collected in  
Surabaya, Indonesia 2008 – 2009. 第52  
回日本熱帯医学会大会, 2011年11月

桑原三和、北井陽子、近藤高志、小西英二：  
ウマを対象とした2006-2010年におけるウ  
エストナイルウイルス国内侵入の監視。第  
52回日本熱帯医学会大会, 2011年11月

桑原三和、小西英二：昆虫細胞を用いたデ  
ング2型タンパクワクチンの作製と評価。  
第15回日本ワクチン学会学術集会、2011  
年12月

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし



## Ⅱ. 分担研究報告書

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）  
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書

デングウイルス、チクングニアウイルスの迅速遺伝子検出法の研究

分担研究者 森田 公一 長崎大学・熱帯医学研究所 教授  
研究協力者 久保 亨 長崎大学・熱帯医学研究所 助教

研究要旨：熱帯、亜熱帯を中心として蚊で媒介されるウイルス感染症、特にデングウイルスとチクングニアウイルスの感染が世界的に増加・拡大傾向にある。とりわけ、デングウイルスによる被害は深刻であり、世界保健機関は毎年世界では 2000 万～4000 万の感染者が発生しているの見積もっている。我が国においても、アジア、アフリカ、中南米を旅行し帰国後発症するデング、チクングニア感染者が増加しており輸入感染症として重要であるが、加えて、こられのウイルスを媒介する能力のあるヒトスジシマカが本邦内で繁殖しているため、ウイルスの国内流行も視野に入れた対策を講じ、準備をしておくことが必要と思われる。本分担研究では、高感度のウイルス遺伝子検出法の開発、改良を通して、より迅速、正確な実験室診断を提供することを目的として、研究初年度である本年は日本で開発された遺伝子増幅検出技術である LAMP 法をデングウイルス検出に応用した手法を開発した。また、これまで開発された同様の手法の多くは 4 つあるデングウイルスの血清型それぞれについての検査が必要であったが、今回開発した方法では、1 つの検査で 4 つの型ともに高感度に検出することが可能であった。さらにデングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等とは反応せず、非特異反応もほとんどなかった。このことから、本手は十分に有用な診断法であると判断した。

A. 研究目的

デングウイルス感染の診断に利用可能な新規の迅速ウイルス遺伝子検出法を、単一温度での核酸増幅が可能な手法である LAMP を応用して開発し、現在広く用いられている RT-PCR 法と感度、特異性について比較検討して、新規診断技術の有用性について評価することを目的とする。

B. 研究方法

1. LAMP primer の設計

GenBank から得たデング 1～4 型ウイルスのデータに基づき、遺伝子ゲノム 3' 末端にあるコンセンサス配列からデングウイルス間で良く保存された領域を選び、アラインメントを作成して常法により（表 1）のデングウイルスコンセンサスプライマーを合成した。

## 2. PCR プライマー

LAMP 法との比較のため、下記の広く用いられているデングウイルスのコンセンサス RT-PCR プライマーを合成して使用した。

〈RT-PCR プライマー〉

DC-1S: TCAATATGCTGAAACGCGCAGAAACCG

DC-2C: TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC

## 3. LAMP 法、PCR 法

栄研化学社製の RT-LAMP キットに表 1 に示した LAMP プライマーを添加し、ウイルス培養液、ヒト血清サンプルから抽出した RNA を添加して Auto-turbidimeter で 63°C、1 時間測定した。RT-PCR 法はインビトロゲン社製の RT-PCR キットを用いて 2. の RT-PCR プライマーとサンプル RNA を添加し常法にしたがって、遺伝子増幅を行い、アガロース電気泳動によって増幅産物を検出した。

## 4. ウイルス株

表 2 に示した、アジア各国で分離されたデング 1~4 型ウイルスを用いて特異度、感度を比較した。

## C. 結果

### 1. Consensus デング RT-LAMP を用いたデングウイルスの遺伝子検出

図 1 に示すように、表 1 のコンセンサス RT-LAMP プライマーを用いて 4 つの血清型のデングウイルスの遺伝子が検出可能であった。検出限界は DEN-1, -2, -3, -4 型の代表型について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。

### 2. RT-PCR 法と Consensus RT-LAMP 法のデングウイルス検出感度比較。

表 4 に示すように、16 株を用いた RT-PCR 法との比較では 7 株で 10~100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。

### 3. 反応の特異性と患者血清からの遺伝子の検出

デングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス等について consensus デング RT-PCR との反応性を検討したがいずれのウイルスでも遺伝子増幅はなかった。また、過去にウイルス分離が陽性であった患者サンプルから抽出した RNA から高感度にデングウイルス遺伝子が検出され、非感染者血清からの RNA では非特異的増殖は見られなかった。(データ不掲載)

### 4. 2006 年~2009 年にバングラデシュで採取された有熱患者血清からのデングウイルスの検出。

バングラデシュで 2006 年~2009 年に採取されたデング熱疑いの有熱患者血清、42 例、88 例、21 例、126 例から、25 例のデング 1~3 型のウイルスが検出できた。この結果はウイルス分離、PCR 法による検査結果と概ね一致していた。

## D. 結論

1. デングウイルスの 4 つの血清型のすべてを同時に検出し得るデングウイルス共通 RT-LAMP 法を確立した。
2. この RT-LAMP の検出限界は DEN-1, -2, -3 -4 型の代表型 について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。
3. 16 株を用いたコンセンサス RT-PCR 法との比較では 7 株で 10 ~ 100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。
4. コンセンサス RT-PCR 法と他のフラビウイルスとのクロス反応はなかった。
5. 患者血清からも Consensus デング RT-LAMP でウイルスが検出でき、健康者血清からは非特異反応はなかった。
6. 2006 年~2009 年にバングラデシュ患者から 1~3 型デングウイルスを検出できた。

## E. 考察

1. デングウイルス株間で検出感度に差異があった。これは設計したコンセンサスプライマーと特定の株の遺伝子配列とのミスマッチが原因と考えられるため、今後プライマーの配列を混合配列にする等の方法で感度の向上、均一化が可能であると推察される。
2. 本手法はデングウイルス感染症の迅速診断、フィールドサーベイランスに極めて有用であると考えられる。

F. 健康管理危険情報  
なし

G. 研究発表

1) 論文発表

森田公一、岡本健太：ウイルスの今日的意義・11  
アルボウイルス. 化学療法の領域、Vol. 27:3-10,  
2011

Wichit S, Jittmittraphap A, Hidari KI,  
Thaisomboonsuk B, Petmitr S, Ubol S, Aoki C,  
Itonori S, Morita K, Suzuki T, Suzuki Y, Jampangern  
W. Dengue virus type 2 recognizes the carbohydrate  
moiety of neutral glycosphingolipids in mammalian  
and mosquito cells. *Microbiol Immunol.*55: 135-140,  
2011

Duc Tuan Dinh, Mai Thi Quynh Le, Cuong Duc  
Vuong, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. An  
Updated Loop-Mediated Isothermal Amplification  
Method for Rapid Diagnosis of H5N1 Avian  
Influenza Viruses. *Tropical Medicine and Health.*  
39:3-7, 2011

Lyre Anni Espada-Murao and Kouichi Morita.  
Delayed cytosolic exposure of Japanese encephalitis  
virus double-stranded RNA impedes interferon  
activation and enhances viral dissemination in  
porcine cells. *Journal of Virology*, 85 : 6736-6749,  
2011

Phan Thi Nga, Maria del Carmen Parquet, Chris  
Lauber, Manmohan Parida, Takeshi Nabeshima,  
Fuxun Yu, Nguyen Thanh Thuy, Shingo Inoue,  
Takashi Ito, Kenta Okamoto, Akitoyo Ichinose, Eric J.  
Snijder, Kouichi Morita, Alexander E. Gorbalenya.  
Discovery of the First Insect Nidovirus, a Missing  
Evolutionary Link in the Emergence of the Largest  
RNA Virus Genomes. *PLoS Pathogens* 7 (9):  
e1002215. 2011

Tran Thi Ngoc Ha, Nguyen Tien Huy, Lyre Anni  
Murao, Nguyen Thi Phuong Lan, Tran Thi Thuy, Ha  
Manh Tuan, Cao Thi Phi Nga, Vo Van Tuong, Tran  
Van Dat, Mihoko Kikuchi, Michio Yasunami,  
Kouichi Morita, Vu Thi Que Huong, Kenji Hirayama.  
Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in  
Patients with Acute Dengue Virus Infection. *Plos  
One* 6(10):e25969. 2011

2) 学会発表  
国際会議における発表

Kouichi Morita and Lyre Anni Espada Murao:  
Cytosolic exposure of Japanese encephalitis  
virus double-stranded RNA as a regulatory  
mechanism for interferon response and viral  
dissemination. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference  
on Immunology and Viral Diseases, Stanford  
University, California, USA. June 20-22, 2011

Kenta Okamoto, Muhareva Rawekiensya, Daisuke  
Kimura, Katsuyuki Yui, Mohammed Alimul Islam,  
Futoshi Hasebe, Kouichi Morita: DEN2 strain  
derived from DHF patient utilizes SDC2 for infection  
in erythroid cells. International Union of  
Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo,  
Japan, September 11-16, 2011

Lyre Anni Espada-Murao, Kouichi Morita: The  
tripartite relationship between cytosolic exposure of