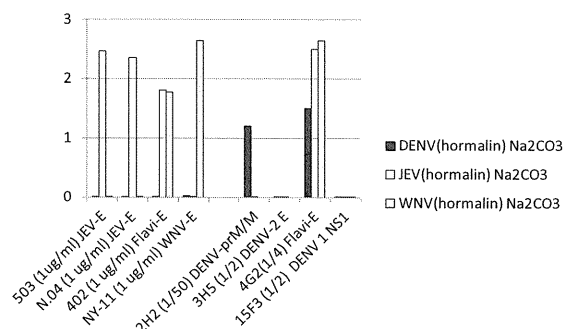


試みた。DENV NS1 抗原ストライプを用いた検討では、DENV 3 以外は何れもウイルス増殖陽性であった。DENV 3 は NS1 抗原陽性に転換するまで Vero 細胞での継代を繰返し、最終的に DENV 1~4 のウイルスストックを調製した。

3. DENV 認識単クローン抗体 ELISA:不活化 DENV 1~4 混合抗原、JEV、WNV 不活化粒子でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗体の反応性を検討した。その結果、2H2 は DENV にのみ反応し(下図 黒棒)、JEV にも WNV にも全く反応性を示さなかった。一方、4G2 は DENV, JEV, WNV 何れにも強い反応性を示した(下図 黒、白、灰色棒)。他方、JEV, WNV などの単クローン抗体 503, N.04 は JEV のみ、WNY-11 は WNV のみ、402 は JE 血清型に属する JEV と WNV のみを認識した。

D. 考察

DEN-VLP の作成において、ウイルス増殖性が



低い DENV の 1~4 型全てでウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群, 全フラビウイルス識別 ELISA 系まで樹立できた。以上の結果は、DEN-VLP の発現、DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できたことを示すとともに、全フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた事も示している。また、実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に

成功したことは今後の感染価測定法の確立に繋がる成果であろう。DEN-VLP ワクチン作成の有力な基盤が得られたものと思われる。

デング出血熱をもたらす ADE(抗体依存性感染増強)活性が低く、中和防御抗原性の高い VLP 作出には、ADE モデル動物系が不可欠である。今後はデングウイルス感染小動物開発のためのヒト化マウス (NOG-SCID) の開発、デングウイルスの感染実験、デングウイルス感染小動物開発のための Balb/C マウスへのウイルス馴化を行う必要がある。

E. 結論

DEN-VLP の発現を確認し、ウイルス増殖性が低い DENV の 1~4 型全てのウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群を含む、全フラビウイルスを識別できる ELISA 系まで樹立できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の出願・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)
「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)」班
分担研究報告書

GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発および
健康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

分担研究者 高橋 和郎 (大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長)

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博 (大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課)

研究要旨:

1. GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

短時間でかつ全自動遺伝子解析が可能な GENECUBE Qprobe 法を用いて、アルボウイルスの迅速診断法を検討した。今年度はフラビウイルスを対象とし、日本脳炎ウイルス(JEV)、デングウイルス(DENV)、ウエストナイルウイルス(WNV)について検出系を作成した。JEV は比較的高感度で検出可能であった。DENV の感度は検討中であるが、1~4型を検出可能であった。WNV は作成した検出系が低感度であり、今後の検討課題である。

2. 健康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

厚生労働省感染症流行予測調査により、日本人の 30 代から 50 代の日本脳炎に対する抗体保有率が低下していることが明らかになっている。これらの年代への対策を考慮するため、一般健康人に日本脳炎ワクチンを接種し、日本脳炎ワクチンの有効性を検討した。その結果、ワクチンを接種した一般成人の 88% に中和抗体の上昇が見られ、成人におけるワクチン接種の有効性が確かめられたが、抗体の陽転率を年代別に見ると年齢が高くなるにつれて陽転率が減少する傾向が見られた。

A. 研究目的

1. GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

GENECUBE® (TOYOBO)は、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。地方衛生研究所では、一検体に対し、多項目のウイルス検索が必要な場合があるが、本機械を使用すると同時に複数の項目を短時間で検査できるという利点がある。また、アルボウイルスに関して、当所では患者検体以外に蚊やカラス検体を対象に遺伝子検査を実施している。しかし、対象となる蚊の検体数が多く、検査には時間を要する。今般、遺伝子検査を約 1

時間で判定可能な GENECUBE を使用し、迅速で高感度な検出方法の開発を目的とした。この実験診断法が確立すると、より効率的で高性能な診断法が導入でき、より迅速な感染症対策に寄与できることが期待される。

2. 健康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

我が国には日本脳炎ウイルス(JEV)が存在し、ワクチンが普及している。本邦で使用されている日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであるため、抗体価は接種後 5~10 年で低下するといわれている。厚生労働省感染症流行予測調査の結果では、

40～50代の抗体保有率が低く、近年発生する日本脳炎患者の3～4割はこの年代である。2009年から新しい乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが定期接種に使用されているが、成人における使用例は少なく、有益な情報はほとんどない。今回我々は、乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンの成人に対する抗体反応性について検討した。

B. 研究方法

1. GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

1) 対象ウイルスとPCR法の設計

今年度はフラビウイルスを対象とし、検出系の確立を試みた。プライマーとQプローブはウイルス遺伝子の3'端近傍に設計し、デングウイルス(DENV)は1-4型に共通する配列、JEVは特異的な配列と、ウエストナイルウイルス(WNV)に共通する配列を選定し、共通する配列でのQプローブは1塩基異なる部位を選定して反応性でウイルスを鑑別できるように設計した。

2) PCR反応と検出感度の検討

本年度は各プライマーの増幅効率について検討するため、各ウイルスのcDNAを作成して、増幅部分についてのみGENECUBEでの検討を実施した。各ウイルスのcDNA作成には逆転写酵素としてRevatraAce RT kit (TOYOBO)を用いた。GENECUBEではKOD DNAポリメラーゼによりPCR反応を行い、Qプローブと反応することにより特異性が検証される(図1、2)。検出感度は既知の力価のウイルスから抽出したRNAを段階希釈することにより検討した。

2. 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

1) 対象

本研究に同意を得た一般健常人272名(20～72歳、平均43歳)に、採血後乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン(ジェービックV®)を接種し、約1ヶ月後に再度採血を実施してワクチン接種前後の中和抗体価を比較した。接種後の抗体価が陰性だった場合、再度ワクチン接種を同様に実施した。

2) 中和抗体価測定

両血清について、JEV(Beijing-1株)に対する中和抗体価を、50%フォーカス減少法(FRNT₅₀)を用いて測定した。このとき、血清希釈10倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。幾何平均抗体価は、中和抗体価10倍未満を0.5として算出した。

なお、本研究は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会承認を受けており、検体提供者へはインフォームドコンセント及び検体の匿名化など倫理面への配慮がなされている。

C. 研究結果

1. GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

1) ウイルス遺伝子の検出条件

GENECUBEによる増幅反応は、同時に多種類の測定を行えるように、どの対象も同じ条件で増幅を試みた。各ウイルスについてcDNAを作製後、増幅は98°C1秒、58°C3秒、63°C5秒を50サイクル実施して行った。50サイクルに要する時間は約30分であった。

2) 検出感度の検討

JEVの特異的プライマーは、Beijing-1株に対して0.01FFU/tubeが検出限界であった。JEVとWNVの共通プライマーに対する検出限界はWNV10⁵FFU/tubeと非常に低感度であった。しかし、JEVとの同時検出は可能であった。DENVは1-4型すべて検出可能であった。検出感度の検討は今後精査し行う予定である。

2. 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

新しい乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン追加接種者272名のうち、104名はワクチン接種前よりJEVに対する中和抗体を保有していた(表1)。ワクチン接種によりJEV中和抗体価が2倍以上上昇したのは239名(88%)で、JEVに対する幾何平均抗体価は接種前2.7倍、接種後50.4倍と約19倍抗体価の上昇が認められた。ワクチン接種前より抗体を保有していた104名は、接種により全員抗体価が

上昇した。接種前に中和抗体を保有していない168名のうち1回の接種で抗体が陽転した人は135名(80%)であった(表2)。1回接種の陽転率を年代別に見ると20歳代100%、30歳代97%、40歳代83%、50歳代69%、60歳代63%となり、年齢が低い方が陽転率は高い傾向が見られた。1回のワクチン接種で抗体が上昇しなかった対象のうち、2回目を接種した27名の陽転率は63%で、1、2回目を合わせた陽転率は94%となった。2回接種の陽転率は40歳代71%、50歳代65%、60歳代33%となり、1回目と同様年齢が低い方が陽転率は高い傾向が見られた。また、ワクチン接種に関わる副反応は軽微なものであった。

D. 考察

1. GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

GENECUBE 法による JEV に対する特異的プライマー(プローブを含む)の検出感度は 0.01FFU であり、コピー数としては 10 コピー程度と推定されるので、従来の遺伝子検出法と遜色ない感度と考えられる。

JEVと WNV 共通のプライマー(プローブを含む)は、これらの同時検出は可能であったが、WNV に対して低感度であった。この原因は不明であるが、使用した WNV NY99 株のプライマーとプローブの塩基配列に変異があることも推定されるので、今後の検討が必要である。

2. 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

今回使用したワクチンは成人でも 100%のブースター効果がみられ、有効性が確かめられた。また、陽転率は 80.4%となり、成人に対する接種も有効であることが確認できた。陽転率は年齢があがると低くなることから、年齢により免疫応答が低下していることが示唆された。初回 2 回接種後の小児の陽転率が 99.2%であることと比較すると、成人の陽転率はやや低い値ではあるが、十分有効であると考えられた。

今後は、成人における血清抗体価がどれほど持続するかの検討が必要である。

E. 結論

1. GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

GENECUBE 法により JEV は比較的高感度で検出可能であった。DEN は検出可能であったが、検出感度は検討中である。WNV に対する低感度性は今後の検討課題である。

2. 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

本研究結果から、成人に対する日本脳炎ワクチン免疫は有効であることが示された。ただし、一度の接種では抗体価が上昇しない場合が 1 割ほどあることが想定され、50 代以上になると 2 回接種をするほうが望ましいと考えられた。

F. 健康危機情報

近年、40～50 代の日本脳炎患者報告も増加し、2011 年には日本脳炎の輸入症例が報告された。今後、抗体保有率の低い年代については、ワクチンの追加接種を考慮することが必要だと考えられる。

G. 研究発表

1.論文発表 なし(予定あり)

2.学会発表

青山幾子、弓指孝博、加瀬哲男、高橋和郎:成人における日本脳炎ワクチンに対する抗体応答.第86回日本感染症学会総会 2012年4月(長崎)(予定)

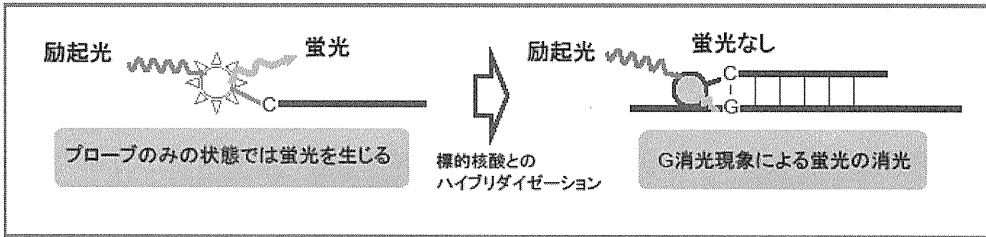
3.その他

青山幾子:日本脳炎の現状と予防接種、大阪公衆衛生 83、p.18-19、2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

図1 Genecube の検出原理・・・PCR-Qprobe法

蛍光Probeの消光原理



ホモジニアス検出

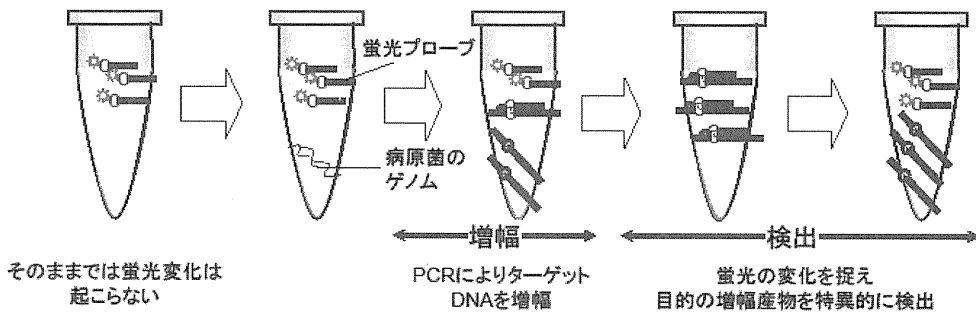


図2 Genecube の検出原理・・・ミスマッチの判定

PCRにより、標的配列を含む領域を特異的に増幅後、蛍光標識プローブを用いて、標的配列および変異の有無を検出する。

.... CGG **AA** AGACC CCGTG....
 CGG **SG** AGACC CCGTG....
 ※ SはG or C

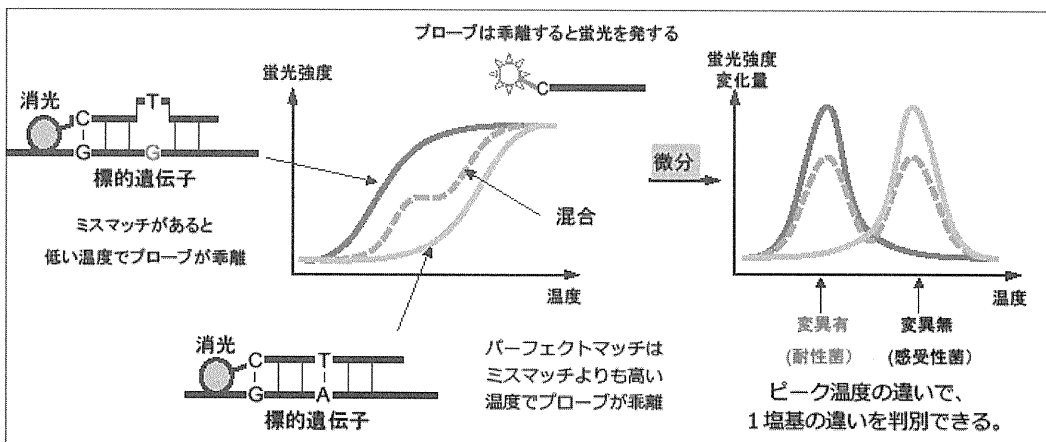
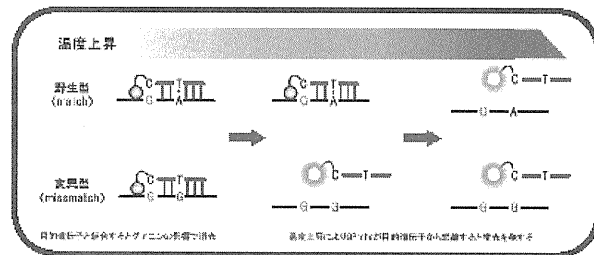


表1 ワクチン接種前後のJEVに対する年代別中和抗体価

年齢	人数	ワクチン接種前										posi tive %	ワクチン接種後										posi tive %	
		(人数)											(人数)											
		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560		<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560		<5120
20-29	51	7	8	5	5	5	10	2	3	4	2	86.3	2	1	3	4	9	7	2	9	5	9	100	
30-39	57	37	6	8	2	4						35.1	1	4	5	6	12	19	6	2	2		98.2	
40-49	73	48	8	7	5	4	1					34.2	8	10	11	9	15	11	2	5	2		89.0	
50-59	78	68	6	3		1						12.8	21	12	19	12	6	6	1	1			73.1	
60-	13	8	3	1		1						38.5	3		2	1	1	4	2				76.9	
合計	272	168	31	24	12	15	11	2	3	4	2	38.2	33	28	38	31	38	49	18	10	13	5	9	87.9

表2 陽転率の年代別比較

ワクチン1回接種後

Age	人数	pre		post JEV-NT								positive	
		<10	(人数)	<10	10	20	40	80	160	320	640	1280	%
20-29	51	7		2		2	1	1	1				100.0
30-39	57	37	1	4	5	4	9	10		2	2		97.3
40-49	73	48	8	10	9	7	10	3		1			83.3
50-59	78	68	21	12	17	10	3	4		1			69.1
60-	13	8	3		2	1	1	1					62.5
合計	272	168	33	28	33	24	24	19	1	4	2		80.4

ワクチン2回接種後

Age	1st vaccine failure	2nd vaccinated	(人数)		post2 JEV-NT					positive		
			<10	(人数)	<10	10	20	40	80	160	%	
30-39	1											
40-49	8	7	2		1		2	2				71.4
50-59	21	17	6		2	3	3	2	1			64.7
60-	3	3	2				1					33.3
合計	33	27	10		3	3	6	4	1			63.0

pre: ワクチン接種前血清 post: ワクチン接種後血清
JEV-NT: JEV neutralizing antibody titer by FRNT₅₀

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

チクングニアウイルスの霊長類モデルの検討

分担研究者 倉根一郎 (国立感染症研究所副所長)
協力研究者 林 昌宏 (国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長)
高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長)
鈴木隆二 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室長)
網 康至 (国立感染症研究所動物管理室主任研究官)
藤井克樹 (国立感染症研究所ウイルス第二部研究員)
モイ メンリン (国立感染症研究所ウイルス第一部研究員)
北浦一 孝 (国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室流動研究員)
白井顕治 (筑波大学大学院人間総合科学研究科ウイルス医学)
森川 茂 (国立感染症研究所ウイルス第一部第一室長)
西條政幸 (国立感染症研究所ウイルス第一部長)

研究要旨

近年チクングニア熱が再興し、アフリカ東岸から南アジア、東南アジアにかけて大流行している。2007年には温帯地域における初めての国内流行がイタリアで、さらに2010年にはフランスで国内発生が報告されており、媒介蚊の生息する日本国内へのチクングニアウイルスの侵淫の可能性は否定できない。チクングニア熱は平成23年2月に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)において4類感染症に指定されており、今後ともその動向の把握が求められる。チクングニア熱の主な症状は発熱、発疹、激しい関節痛である。特に関節痛は腫脹を伴うことが多く数週間から数カ月持続することがあり、日常生活の維持に大きな支障となる。また近年のチクングニア熱の特徴は重症例の報告である。しかしながらチクングニア熱の病態形成機序は解明されておらず、実用化されているワクチン・治療薬はない。したがってチクングニア熱の病原学的解析が急務である。しかしながらいまだ有用な動物モデルはない。そこで我々は新世界ザルであるコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) を用いたチクングニアウイルスの感染モデルの確立を行った。その結果、複数の遺伝子型のチクングニアウイルスを検出できる比較的的特異性の高いHyper real time RT-PCRを開発したので報告する。

- A. 研究目的
- チクングニアウイルス (Chikungunya virus) はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の(+)RNAウイルスであり、チクングニア熱の原因ウイルスである。チクングニアウイルスには東・中央アフリカ型、アジア型、西アフリカ型の3つの遺伝子型が存在する。チクングニアウイルスは昆虫媒介性ウイルスであり、その媒介蚊はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) や日本にも広範囲に

生息するヒトスジシマカ (*A. albopictus*) などのヤブカ属のカである。チクングニア熱は日本周辺で大流行しており日本においても媒介蚊が存在するため国内侵淫の可能性は否定できない。自然界では霊長類、げっ歯類、翼手類からチクングニアウイルスが分離されている。チクングニアウイルス感染症の病態はいまだ明らかにされておらず、マウス等を用いた動物モデルは確立されていない。現在、霊長類を用いた動物モデルの確立が期待されており、カニクイザルを用いた実験では臨床症状は示さないが、高いウイルス血症が報告されている。霊長類の一種であるコモンマーモセットは、小型で実験上の取り扱いが容易、繁殖効率が高いという特徴を持つ。また、実験動物としてのコロニーが存在するため、性別、年齢、体重などをコントロール群、実験群で複数匹揃え、繰り返し実験を行う事が可能である。これまでにヒトモデルとして神経科学研究、免疫学研究、毒性病理学研究、生殖学研究など幅広い領域で使われている。また、マーモセットの全ゲノムシーケンスの解読、ゲノムライブラリーや cDNA ライブラリーの構築、ジーンマーカーの開発、各種モノクローナル抗体の作製、ES 細胞の樹立、脳アトラスの作製、などが急速に進んでおり、マーモセットが実験動物として使い易い状況が整いつつある。しかしながらこれまでにコモンマーモセットを用いたチクングニアウイルス感染モデルの報告はない。そこで我々はマーモセットを用いたチクングニヤ熱実験動物モデルの開発に取り組んだので報告する。

B. 研究方法

ウイルスと培養細胞: 感染実験にはチクング

ニアウイルス SL10571 株を供試した。チクングニア中和試験においては CHIKV S27 株を用いた。ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

動物: 体重 300 g ~ 379 g のコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) を用いた。麻酔は塩酸ケタミン+塩酸キシラジン混合麻酔法により導入した。

ウイルス中和試験: ウイルス中和試験は、Vero細胞を用いた50%フォーカス減少法にて検討した。得られたサンプル血清を非動化し、10倍希釈後2倍階段希釈を行った。希釈した血清とウイルスを等量混合後37°C1時間中和反応を行った。各血清-ウイルス反応液をVero細胞に接種し、37°Cで90分吸着後1%メチルセルロースを重層し37°Cにて培養した。10%ホルマリンにて固定後メチレンブルーにて感染細胞を染色しウイルス中和抗体価を算出した。

血清中のウイルス RNA コピー数の検討: チクングニアウイルスの E1 蛋白質領域をプラスミドベクターpcDNA3.1 にクローニングし、目的 RNA を合成した。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出し TaqMan リアルタイム PCR 法において検量線を作製した。

感染実験 1: マーモセット 2 頭に対して、SL10571 株 (500ul ; 10⁸pfu/animal) を背側頸部に皮下接種した。感染前、および感染後 2, 4, 7 日目において 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、抗体価、サイトカイン量について経時的な変化を検討した。また、同時に臨床症状についても検討した。感染 4 日後、7 日後に安楽殺を行い、全身組織におけるウイルス分布および組織病理学的な検討を行

った。(図1)

感染実験 2: マーモセット 2 頭に対して、SL10571 株 (500ul; 10^8 pfu/animal) を背側頸部に皮下接種した。感染前、および感染後 1, 3, 7, 10, 14, 21 日目において 1.0ml の採血を行い、血中ウイルス量、抗体価、サイトカイン量について経時的な変化を検討した。また、同時に臨床症状についても検討した。感染 10 日後、3 週間後に安楽殺を行い、全身組織におけるウイルス分布および組織病理学的な検討を行った。対照実験群としてマーモセット 1 頭を用意した。(図1)

C. 研究結果

感染実験 1 および 2: マーモセット 2 頭に対して、SL10571 株を背側頸部に皮下接種し、経時的観察を行ったところ感染 3 日後において腹部に発赤が観察された。その他の臨床症状は認められなかった。

血清中のチクングニアウイルス RNA 量の検討: 経時的に採血したサンプルより血清を分離し、TaqMan RT-PCR 法により血清中のウイルス RNA コピー数を計測した。その結果接種 1 日後よりウイルス RNA が検出された。対照個体ではウイルス RNA は検出されなかった(表1)。

血清中のチクングニアウイルス抗体の検討: 経時的に採取した血清中の抗チクングニアウイルス抗体価をVero細胞を用いた50%フォーカス減少法による中和試験により検討した。その結果チクングニアウイルス接種7日後より抗チクングニアウイルス抗体価の上昇が観察され、感染21日後の血清においては抗体価が1,280倍であった。対照個体では抗体価の上昇は観察されなかった(表2)。

D. 考察

これまでに我々はチクングニア熱の実験室診断法として RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan 法) を用いた遺伝子検出法、IgM 捕捉 ELISA 法、50%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した。またスリランカからの輸入症例より SL10571 株を分離した。しかしながらチクングニア熱の病態はいまだ不明であり、その動物モデルもない。ところで近年コモンマーモセットが新たな霊長類モデルとして注目されている。コモンマーモセットは、南米の熱帯雨林に生息する霊長目オマキザル科マーモセット属の新世界ザルであり、繁殖効率が高く、小型で実験上取り扱いが容易である。実験動物としてのコロニーが存在するため、性別、年齢、体重などをコントロール群、実験群で複数匹揃え、繰り返し実験を行う事が可能である。マーモセットを用いた CHIKV の感染実験の結果感染 1 日後よりウイルス血症が認められ、ウイルス血症は感染 7 日後まで観察された。感染 7 日後より抗体価の上昇が認められ感染 21 日後にはその抗体価が 1280 倍に達した。また抗体価の上昇とともに血中のウイルス血症は速やかに消失した。このことよりウイルスの感染に対する宿主の応答が惹起されたことが示唆された。また感染 3 日後においては腹部の発赤が認められた。しかしながら発熱等その他の臨床症状は認められなかった。マーモセットは樹上生活のため筋肉が発達しており、運動量が激しく安静時と活動時の体内温度の変動が激しいことが知られている。また保定を目的とした麻酔による体温低下も著しく発熱等の観察は不可能であった。今後は病理学的観察等のさらなる解析を進めていきたい。

E. 結論

チクングニア熱の治療法は確立されておらず、チクングニアウイルスの動向にはヒト、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であり、日本においても媒介蚊であるヒジシマカが生息することからチクングニアウイルスの我が国への侵入は予断を許さない。急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニア熱は今後も流行が続くことが予想される。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニア熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、行政、研究機関の一層の協力体制を確立するために今後も関係各機関にこれまでの成果を提供する。

F. 健康危険情報

近年の流行では世界的に 160 万人以上の症例が報告されている。媒介蚊の一つであるヒトスジシマカは日本国内にも生息しているため日本へのチクングニアウイルスの侵淫の可能性は否定できない。事実イタリアではインドからの輸入症例からイタリア国内で 300 例以上のチクングニア熱の発生が報告された。したがってチクングニア熱の流行地域に渡航する場合はカに吸血されにくい服装や忌避剤の使用等の予防対策が必須である。チクングニア熱は平成 23 年 2 月に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)において 4 類感染症に指定されており、今後ともその動向

の把握が求められる。よって、日本においても将来のワクチン開発、特異的治療法の開発は重要な課題であり、早期のチクングニア熱の動物実験モデルの開発はその病態解明および将来のワクチン開発、病態生理に基づく新治療法の開発に資する。

G. 研究発表

M. L. Moi, C. K. Lim, A. Kotaki, T. Takasaki, I. Kurane. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc gammaR-expressing BHK-21 cells than Fc gammaR-negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*. 203(10), 1405-1414, 2011

M. L. Moi, C. K. Lim, S. Tajima, A. Kotaki, M. Saijo, T. Takasaki, I. Kurane. Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using Fc γ R-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of Clinical Virology*. 52(3), 225-230, 2011

K. Kitaura, Y. Fujii, D. Hayasaka, T. Matsutani, K. Shirai, N. Nagata, C. K. Lim, S. Suzuki, T. Takasaki, R. Suzuki, I. Kurane. High clonality of virus-specific T lymphocytes defined by TCR usage in the brains of mice infected with West Nile virus. *Journal of Immunology*. 187(8), 3919-3930, 2011

T. Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Omatsu, F. Harada, C. K. Lim, M. L. Moi, M. Ito, M. Ikeda, I. Kurane. Demographic virological features of imported dengue fever/dengue hemorrhagic fever cases in Japan from 2006 to 2009. *Dengue Bulletin*, in press.

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 Fc γ R-expressing cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2):e1536. 2012.

H. 学会発表

M.L. Moi, C.K. Lim, A. Kotaki, T. Takasaki, I. Kurane. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc γ R-expressing BHK-21 cells than Fc γ R negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. 第15回国際ウイルス学会 2011年9月

C.K. Lim, Y. Ami, Y. Fujii, M.L. Moi, K. Kitaura, A. Kotaki, S. Morikawa, M. Saijo, R. Suzuki, I. Kurane, T. Takasaki. Pathogenesis of epidemic chikungunya

virus in nonhuman primates. 第15回国際ウイルス学会 2011年9月

C.K. Lim, T. Takasaki, M.L. Moi, A. Kotaki, I. Kurane, M. Saijo. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2010. 第60回アメリカ熱帯医学衛生学学会年次総会 2011年12月

I. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

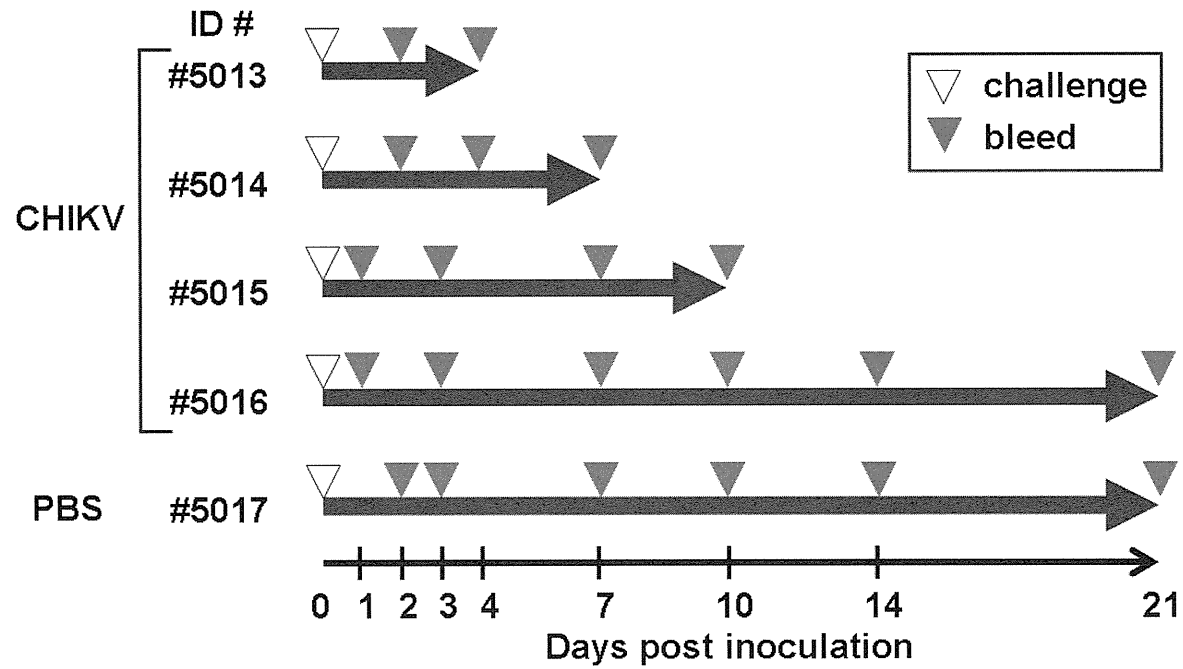


図 1 . コモンマーモセツトにおける CHIKV 感染実験スケジュール : マーモセツト 4 頭に対して, SL10571 株を背側頸部に皮下接種した . 接種前, および接種後 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 21 日目において 1.0 ml の採血を行い, 血中ウイルス量, 抗体価について経時的な変化を検討した . 対照実験としてマーモセツト 1 頭に PBS を接種した .

表1. 血清中のチクングニアウイルスRNAコピー数の検討

ID#	Days post inoculation								
	pre	1	2	3	4	7	10	14	21
# 5013	ND	-	6.1×10^7	-	4.6×10^5	†	†	†	†
# 5014	ND	-	1.7×10^7	-	1.1×10^5	ND	†	†	†
# 5015	ND	1.2×10^8	-	4.8×10^6	-	5.2×10^4	ND	†	†
# 5016	ND	1.7×10^8	-	7.9×10^6	-	ND	1.7×10^5	ND	ND
# 5017	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND

ND: not detected, -: Not done, †: sacrifice for pathological study

表2. 血清中の抗チクングニアウイルス抗体価の推移

ID#	Days post inoculation								
	pre	1	2	3	4	7	10	14	21
# 5013	<10	-	<10	-	<10	†	†	†	†
# 5014	<10	-	<10	-	<10	20	†	†	†
# 5015	<10	<10	-	<10	-	10	20	†	†
# 5016	<10	<10	-	<10	-	10	80	640	1280
# 5017	<10	-	<10	<10	-	<10	<10	<10	<10

-: Not done, †: sacrifice for pathological study

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

ウイルス RNA 安定保存に関する研究

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）

協力研究者 小滝 徹、山口幸恵、高崎智彦

（国立感染症研究所ウイルス第一部）

蚊媒介性ウイルスには、デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス以外にも、ウマ脳炎ウイルス、黄熱ウイルスなど多種類のウイルスが存在する。しかし、これらのウイルスはすべて RNA 遺伝子を有する RNA ウイルスである。RNA は DNA と異なり非常に不安定であり、保存管理および輸送法を考慮する必要がある。最近、ウイルス RNA を安定させる器材（チューブ）が市販されたことから、その使用に当たって、有効な安定期間等を評価した。その結果、室温で非常に安定であり、ウイルス RNA を冷蔵あるいは室温で安定化して多数のストックを保存できることが確認された。この手法を用いることで地方衛生研究所、検疫所等でウイルス遺伝子検査の陽性コントロール（ウイルス RNA 遺伝子）を常温で輸送が可能であることが確認された。

A. 目的

蚊媒介性ウイルスには、デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス以外にも、ウマ脳炎ウイルス、黄熱ウイルスなど多種類のウイルスが存在する。1999年のニューヨークでのウエストナイル熱の流行、2005年のインド洋島嶼国での突然のチクングニア熱流行とその後のイタリア、フランス南部、中国南部、フィリピンミンダナオ島でのチクングニア熱の流行発生事例をみても予期せずに突然勃発することが多い。そこで、

そのような場合に、迅速に遺伝子診断のための陽性コントロールを迅速に地方衛生研究所、検疫所等に送付できるように室温保存・常温輸送の方法を検討した。

B. 方法

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。サンプル量が、10-20 μ l の場合は 30 分、20-30 μ l では 1 時間、30-100 μ l は 1.5

時間かけて乾燥させる。乾燥させたチューブを室温（15-25℃）で6ヶ月以上保存してリアルタイム逆転写 PCR 法により、チクングニアウイルス遺伝子の安定保存について検討した。乾燥チューブの溶解は乾燥前の RNA 量と等量の RNase(-)蒸留水を加えて溶解した。

C. 結果

2011年6月8日に作製したチクングニアウイルス RNA stable チューブを室温保存し、6ヶ月間以上を経て2012年1月23日、2月10日、2月15日に溶解しチクングニアウイルスリアルタイム PCR (TaqMan 法)により遺伝子検出を行った。その結果、ウイルス RNA は非常に安定な状態を8カ月にわたり保持していた。

D. 考察

RNA は DNA と比較すると不安定な遺伝子であり、長期保存には-80℃保存が必要であった。したがって、RNA ウイルス遺伝子検査の陽性コントロールとして送付する際も、ドライアイスに梱包し凍結状態を維持する必要があった。今回検討した 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。したがって、本方法を使うことで国内衛生研究所、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。また、蚊媒介性ウイルスは、フラビウイルス属、トガウイルス属、ブニヤウイルス属など多種に及ぶことか

ら、現在世界的にも大きな流行を起こしていないウイルスについてもあらかじめウイルス RNA を抽出の上、保存しておくことで、一旦流行が発生した場合に迅速な対応が可能となる。

今後、37℃、42℃、55℃などの温度条件で本チューブを保存し、どの程度の苛酷条件でどのくらいの期間保存が可能かを検討し、熱帯および亜熱帯地域における利用の可能性も検討したい。

E. 結論

RNA stable チューブにウイルス RNA を乾燥保存することで、室温保存が少なくとも8ヶ月は可能であることが確認された。したがって、ウイルス RNA を常温輸送することが可能であることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし

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 Fe³R-expressing BHK-21 cells than Fe³R negative cells in secondary infection but not in primary infection. *Journal of Infectious Diseases*, 203(10):1405-14 (2011)
2. Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I : Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using

- Fc³R-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of Clinical Virology* 52(3):225-30 (2011).
3. Ujiie M, Moi ML, Takeda N. Dengue maculopathy in a traveler. *Am J Trop Med Hyg.* 85(6):965-6 (2011)
 4. 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)
 5. T. Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Omatsu, F. Harada, C.K. Lim, M.L. Moi, M. Ito, M. Ikeda, I. Kurane. Demographic virological features of imported dengue fever/dengue hemorrhagic fever cases in Japan from 2006 to 2009. *Dengue Bulletin*, in press.
 6. 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 Fc³R-expressing cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2):e1536. 2012
2. 学会発表
 - 1) 国際学会
 1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc³R-expressing BHK -21 cells than Fc³R negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, 2011年9月
 2. 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 Fc³R-expressing BHK cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, California, USA, 2011年6月
 - 2) 国内発表

なし
 - 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

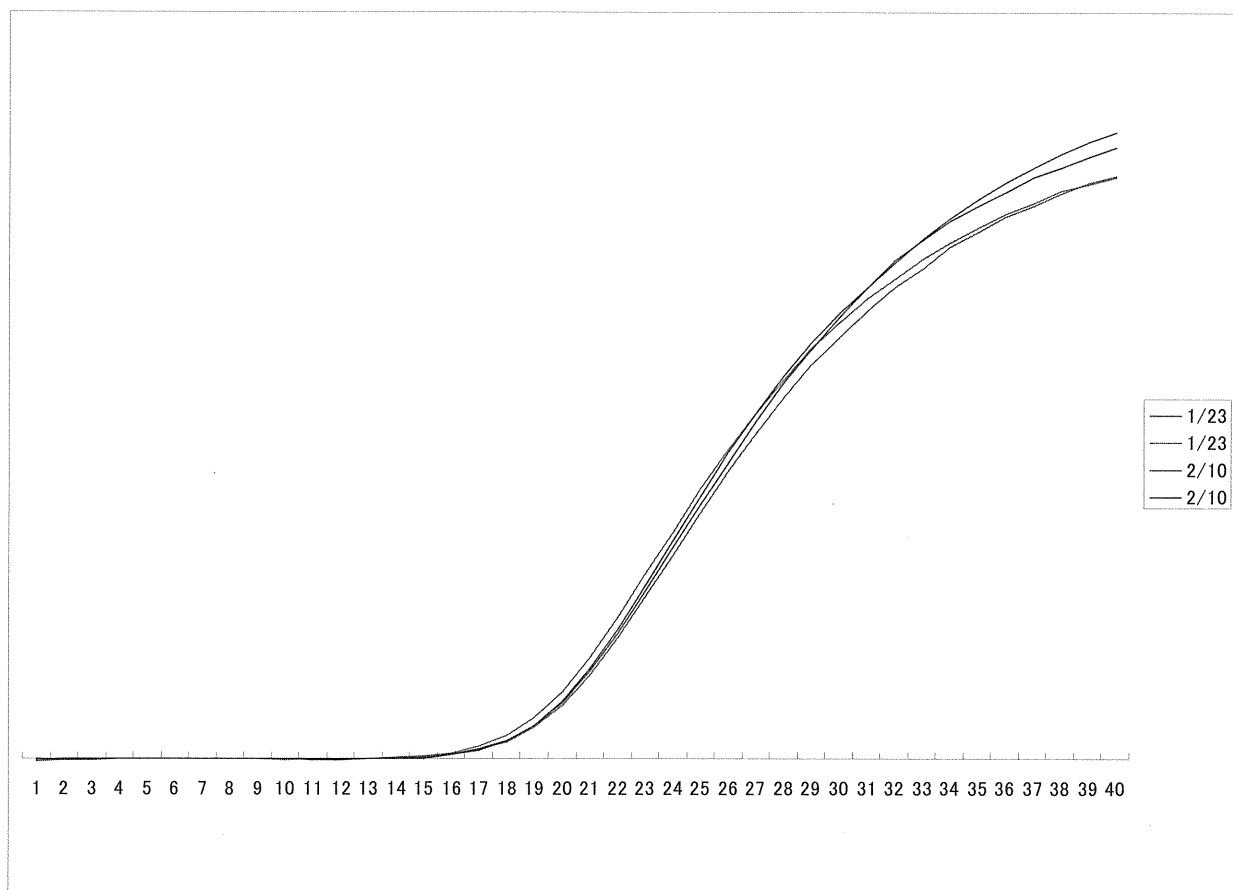
なし

表 1

2011/6/8 RNA stable tube 作成時(ct18)

Sample 溶解日	検査実施日		
	1/23	2/10	2/15
1/23	18.97	20.23	14.76
2/10	-	20.34	15.28
2/15	-	-	15.58

図 1



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

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

分担研究者 濱田篤郎 東京医科大学病院 渡航者医療センター

研究協力者 水野泰孝 東京医科大学病院 渡航者医療センター

福島慎二 東京医科大学病院 渡航者医療センター

山口佳子 東京医科大学病院 総合診療部

倉林英彦 財団法人 海外邦人医療基金

研究要旨

東南アジアの在留邦人を対象に、蚊媒介感染症のうちでもデング熱に関するアンケート調査や情報提供を行った。この集団ではデング熱が日常的に発生しており、病気への関心が高いにもかかわらず予防対策の実施が不十分だった。その原因は予防方法（蚊の対策）についての知識が不足しているためと考えられた。今後、ホームページやパンフレットなどを用いて、海外渡航者に予防方法を中心とした情報提供を行っていくことが必要である。

A. 研究目的

海外渡航者にとって蚊媒介性ウイルス感染症は重要な健康問題の一つである。とりわけデング熱は患者数が多く、2010年には国内で診断された者の数が238人にもなった。さらに、日本脳炎、黄熱、チクングニア熱なども海外渡航者にリスクのある蚊媒介性ウイルス感染症にあげられる。こうした感染症については国民に情報が広く浸透しておらず、海外渡航時に効果的な予防対策がとられていないのが現状である。そこで本研究では海外渡航者に必要とされる蚊媒介性ウイルス感染症の情報内容を調査し、その提供を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 必要とされる情報内容の調査

海外渡航者に必要とされる情報内容について

デング熱を中心に調査する。調査方法としては一般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アンケート配布調査を行う。特定な集団としては海外在留邦人、海外旅行者、海外派遣企業の担当者などとする。調査項目は、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の実施状況である。

2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

・海外での日本人患者数の調査

日本国内で診断されたデング熱患者数は厚生労働省より毎年報告されているが、海外で罹患した日本人患者数についてはその実態が不明である。そこで、東南アジアの医療機関と連携し、日本人患者でデング熱と診断された者の数を明らかにする。この調査結果をも

とに地域的なニーズに応じた情報提供の方法を検討する。

・国内での患者調査

国内で診断されたデング熱患者について、罹患した背景や臨床的な特徴を調査する。この調査結果をもとに医療従事者への診療マニュアルの作成を行う。

3. 海外渡航者への情報提供

以上の調査結果をもとに海外渡航者への効果的な情報提供を行う。提供方法として当初はホームページを開設し、情報内容を順次更新する。ある程度の情報量が蓄積された段階で、パンフレットやポスターなど印刷物の作成を行う。最終的にはDVDなどの映像手段での情報提供を計画する。

(倫理面への配慮)

原則的には、ヘルシンキ宣言における臨床研究の基準を遵守する。アンケート調査や問診用紙の調査においては匿名とし、番号のみで登録する。

C. 研究結果

1. 必要とされる情報内容の調査

・インターネットによる調査

2011年11月、インターネット上にホームページ「海外旅行と病気」を開設し、その中に「デング熱に関する e-learning」を掲載した。この回答者の特性などを解析することにより、一般国民のデング熱に関する知識レベルの検討を行なう予定である。2011年11月～2012年1月末までに166名のデータが登録された。

・アンケート配布調査

今年度は海外在留邦人を対象に調査を行った。2011年12月、インドネシア・ジャカルタ、フィリピン・マニラに在住する日本人

に「海外渡航者の健康状況とデング熱対策に関するアンケート調査」を実施した。アンケートの配布は12月に現地で開催された医療講演会の参加者やその関係者を中心に行い、ジャカルタから100名、マニラから76名の回答があった。

「心配している健康問題は何か？」の質問では「感染症」の回答が最も多く、ジャカルタでは回答者の70%、マニラでは75%にのぼった。「心配している感染症は何か？」の質問では「デング熱」の回答が最多で、ジャカルタで66%、マニラで75%だった。「周囲でデング熱患者が発生したか？」の質問にはジャカルタで48%、マニラで68.4%が「発生した」と回答した。「予防対策を実施しているか？」については、マニラでは「実施している」と答えた者が67.1%だったが、ジャカルタでは34%と少なかった。予防対策を実施していない者に理由を質問したところ、「予防方法が不明」との回答が大多数を占めた。

表.デング熱の知識に関する質問の正答率

	質問 「はい」か「いいえ」	ジャカルタ 100名	マニラ 76名
原因	蚊に刺されて感染？	98.0%	96.1%
	ウイルスが原因？	70.0%	70.8%
疫学	日本国内でも流行？	92.8%	90.1%
	都市部は安全？	98.0%	100%
症状	熱や発疹がでる？	94.8%	98.7%
	命にかかわる病気？	88.0%	90.1%
予防	ワクチンで予防？	90.0%	97.3%
	昼間、蚊に刺されない対策が有効？	50.0%	54.1%
治療	市販の解熱薬を服用？	90.9%	90.7%
	特効薬はない？	83.8%	86.5%