

201225032A

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24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）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24年度 総括・分担研究報告書

平成25（2013）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検査法の研究 1 5
研究分担者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）
 2. タイ国のデング熱流行地で採集したネッタイシマカのアトリエムチャンネル遺伝子
(KDR) IIS6 ドメインの点突然変異について 2 3
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. デング熱モデル動物を用いたデングウイルス感染症の病態機序解明に関する研究：初
感染における生化学および免疫学の解析 3 1
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）
 4. 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症にかかわる脳内浸潤 T 細胞の解析
. 3 8
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. コモンマーモセットにおける定量リアルタイム PCR 解析系の開発に関する研究 . . 4 5
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. ジェノタイプング法による媒介蚊の殺虫剤感受性評価の検討 5 3
研究分担者：澤邊京子（国立感染症研究所昆虫医科学部部長）
 7. 日本脳炎ウイルスレプリコンを用いた 1 回感染性フラビウイルス粒子の産生と
その利用 5 8
研究分担者：小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）
 8. デングウイルス新規ワクチン開発のための病理学的評価系の確立 6 8
研究分担者：永田典代（国立感染症研究所感染病理部室長）
 9. GENEUCUBE 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の持続効果 7 3
研究分担者：高橋和郎（大阪府立公衆衛生研究所副所長）
 10. チクングニアウイルスのコモンマーモセット感染モデルにおける病理学的解析 . . . 7 8
研究分担者：倉根一郎（国立感染症研究所副所長）
 11. 蚊媒介性ウイルス RNA 安定室温保存に関する研究 8 4
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）
 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の確立 9 2
研究分担者：濱田篤郎（東京医科大学病院 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 9 9

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などから103例であったが、2012年は再びデング熱輸入症例は220例と200例を超えた。本研究班では、現場で迅速に対応できる前処理を簡略化した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）を改良した。また日本脳炎ウイルスレプリコンを用いた1回感染性フラビウイルス粒子産生系を構築し、抗原性を保持しているだけでなく中和試験のような機能的検査にも利用できることが明らかになった。抗体検査においては、イムノクロマト法を開発し良好な感度、特異性が得られた。またデングウイルス粒子抗原検出イムノクロマト法も開発に着手した。

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モセットが、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、マーモセットは、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。そこでマーモセットの CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b の4遺伝子およびT細胞レセプター遺伝子（TCR 遺伝子）の α 鎖、 β 鎖可変領域（TRAV、TRBV）の56遺伝子を同定したデータをもとに、免疫関連遺伝子発現量を評価するために定量リアルタイムPCR（qPCR）を開発した。

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た。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、2012年にはメトロマニラをはじめ各地に拡大した。我が国への輸入症例も10例であった。また、旅行者ワクチンとしての細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの評価として成人での抗体応答を解析した。その結果、接種後一ヶ月で上昇した中和抗体が、一年後に有意に低下することが明らかになった。また、日本脳炎のマウス脳組織における免疫学的解析も実施した。

媒介蚊であるネッタイシマカおよびヒトスジシマカの殺虫剤感受性評価の結果、フィリピン国内には抵抗性個体が広く分布していることが明らかになり、ペルメトリン耐性シマカでは二ヶ所の遺伝子変異で、二つのアミノ酸置換；S989P(T \Rightarrow C)とV1016G(T \Rightarrow G)が生じていることが明らかになった。

海外渡航者や海外派遣企業の健康管理担当者を対象に、蚊媒介感染症のうちでもデング熱に関する意識調査や知識レベルの調査を行った。「流行地域の在留邦人」や「海外派遣企業の健康管理担当者」についてはデング熱への関心が高いが、媒介蚊の対策など予防面での知識が不足していることが明らかになった。こうした調査結果にもとづき、ホームページ、パンフレット、ポスターなどによる情報提供を開始した。

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）

永田典代（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
部長）

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

ピンミンダナオ島で流行が確認され、2012年にはメトロマニラに流行が波及し、ルソン島以外の島々にも流行が拡大した。

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、駐在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

RT-LAMP 法による媒介蚊からのウイルス検出法、ヒトの全血からの前処理を省略したウイルス遺伝子検出法を検討した。チクングニアウイルスと媒介蚊乳剤あるいはヒトの血液を混合し、前処理を省略して 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 プローブ設計し、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。

1 回感染性フラビウイルス粒子の産生

JEV Nakayama 株のレプリコン cDNA を CMV プロモーターと HDV リボザイム配列の間に挿入したレプリコンプラスミドを

作製した。また、このレプリコンから NS5 領域でフレームシフトさせ、RNA ポリメラーゼ活性を持たない変異体も作製した。JEV の構造蛋白質発現プラスミドは、JEV Nakayama 株由来の C-E、C、prME 領域それぞれの cDNA を CAG プロモーター下流に挿入して構築した。

2. ワクチン

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、さらに接種一年後の中和抗体価を測定し、中和抗体 (防御抗体) の維持に関して検討した。

3. 動物モデルの開発、病態解析

マーマセットの免疫学的解析法

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マセットは、新世界ザルであり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検討し、ハウスキーピング遺伝子 (HKG) および免疫関連遺伝子の特異的プライマーをヒト配列と相同性の高い部分を採用し設計し、定量リアルタイム PCR を構築した。日本脳炎ウイルスを腹腔接種し、ウイ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。

デングウイルス初感染マーマセットにおける生化学および免疫学の解析

マーマセットに DHF0663 株、D2/Hu/Jamaica/77/2007NIID 株、D2/Hu/Maldives を 1.8×10^5 pfu/dose から 1.8×10^3 pfu/dose まで 10 倍段階希釈したウイルスをそれぞれ各 2 頭ずつ背側皮下に接種し、接種前および接種後 2、4、7、14、21 日目に採血を行なった。対象グループ (4 個体) は、採血のみ行なった。さらに、4 個体においては、DENV-2 (DHF0663 株) の接種を行い、接種後 2、4、7、14 日目に採血を実施した、血液一般検査、生化学検査、ウイルス遺伝子検査、抗体検査を実施した。

日本脳炎ウイルス感染マウス脳炎発症にかかわる脳内浸潤 T 細胞の解析

JEV は S982 株を使用し、7 週雌 C57B/6j マウスに感染させ、13dpi に脳と脾臓から total RNA を抽出し、TCR レパトア解析、相補性決定領域 3 (CDR3) size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析を実施した。WNV および TBEV で同様の解析により得られた結果を基に、ウイルス間における脳内浸潤 T 細胞の特異性を比較した。リアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて細胞性免疫にかかわる各種マーカーの発現量を定量しサイトカインバランスを解析した。

病理学的解析

チクングニアウイルス感染マーマセットの諸臓器を病理学的に解析した。また、新生仔マウスにデングウイルスを脳内接種し、マウス組織を用いて参照標本を作製し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体の交差反応性と至適条件の検討を行い、組織切片上のウイルス抗原検出系を検討した。

(倫理面への配慮)

上記動物実験は、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. 媒介蚊の殺虫剤感受性試験

2009 年および 2010 年にフィリピンで採集したネッタイシマカ幼虫サンプル (エタノールに浸漬) より 1 頭ずつ DNA を抽出し (REDExtract-N- Amp Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich), PCR の鋳型とした。4 カ所のアミノ産置換をターゲットとするために、2 組の PCR を行なった。すなわち、I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534C である。I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534C の遺伝子断片を増幅した。また、I1011MorV および L1014F を検出するために aegSCF3 プライマーでシーケンス解析を行い、V1016G を検出するために aegSCR22 プライマーを用いた。また、F1534C を検出するために aegSCR8 プライマーを用いてシーケンス解析を行なった。

タイのネッタイシマカ 幼虫を野外で採

集し、繁殖させて成虫になるまで育てた。成虫にし 0.75%ペルメトリンに 1 時間暴露させて生存したネッタイシマカ成虫をペルメトリン耐性とし、ペルメトリン耐性シマカのアトリエドメイン IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行った。それらの個体から全 RNA を抽出後、kdr 遺伝子ドメイン II の S4 ならびに S6 をカバーする領域の first strand cDNA を PCR 増幅させた。PCR 生成物を精製し、遺伝子配列を決定し、変異を同定した。

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デングウイルス 1-4 型 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)、30°C および 40°C で長期保存して、-80°C 凍結保存のものと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

「海外旅行に興味のある者」や「海外派遣企業の担当者」を対象に、蚊媒介性感染症のうちでもデング熱に関する意識調査や知識レベルの調査を行った。「海外旅行に興味のある者」についてはデング熱への関心が低く、また病気の基本的な情報に乏しい状況にあることが明らかになった。また、「海外派遣企業の担当者」については、デング熱への関心が高いものの、その予防方法（とくに蚊の対策）についての知識が不十分であることが明らかになった。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充実させ (<http://www.tra-dis.org>)、東南アジア各国におけるデング熱流行状況もホームページに掲載した。 (<http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/dengue.htm>)

C. 研究結果

1. 診断法の開発・評価

1 回感染性フラビウイルス粒子の産生

JEV のレプリコン cDNA を CMV プロモーター下流に挿入する事により、*in vitro* で RNA 合成をする事なく、プラスミドを直接細胞に導入して JEV ゲノムを複製させる事が出来た。またこの時に構造領域発現プラスミドを同時にトランスフェクションすれば、1 回感染性のウイルス粒子が得られる事が明らかとなった。これを用いて中和試験を実施したところ、生ウイルスを用いた結果と同等であった。

ウイルス遺伝子迅速診断法の開発

(1) (RT-LAMP) 法

RT ランプ法では全血を 10 倍に薄めることで、RNA 抽出のような前処理を実施することなくチクングニアウイルス遺伝子を検出できた。

(2)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

DV は 1-4 型すべて検出可能であった。検出感度は 4 型が 10 コピー、3 型が 100 コピーであった。最少検出ウイルス力価は 1 型 2.3×10^{-2} PFU, 2 型 6.0×10^{-4} PFU, 3 型 3.2×10^{-3} FFU, 4 型 2.3×10^{-2} FFU であった。JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} FFU であった。

迅速抗体検査キットの開発

IgM 捕捉法によりデングウイルス特異的イムノクロマト法を作製し、ベッドサイド利用できる迅速抗体検査を開発した。この検査に用いることのできる安全なウイルス粒子様抗原を昆虫細胞で安定に発現する系を構築した。

2. ワクチン

旅行者ワクチンとしての細胞培養日本脳炎不活化ワクチンの評価

ワクチン接種者のうち継続調査ができた 154 名の幾何平均抗体価は、ワクチン接種 1 ヶ月後 87.6 倍から 1 年後には 21.8 倍と約 1/4 に低下した。1 年後の陰転率は 21.4% で、ワクチン接種後の抗体価が低いほど陰転化する割合は上昇した。ワクチン接種前の中和抗体価が <10 で抗体陽転した 80 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 30 例 (37.5%) であり、1 年後に陰転化した 31 例の 96.7% を占めた。一方、ワクチン接種

前の中和抗体価が ≥ 10 ワクチン接種前の中和抗体価が ≥ 10 で抗体上昇した 64 名の群では、1 年後 < 10 に陰転化した例は 1 例 (1.6%) であった。

3. 動物 (霊長類) モデルの開発、病態解析

マーモセットの免疫学的解析法の確立

(1) 8 種類のハウスキーピング遺伝子 (HKG) の各組織における発現量が最も多かったのは rRNA で、逆に少なかったのは UBC であった。

(2) *geNorm* を用いた遺伝子発現安定性を厳密に調べるため *geNorm* を用いて解析を行った結果、脾臓、空腸、小脳は他の組織と比べて安定性が低かった。しかし、すべての組織で 8 遺伝子解析時において、安定性が高いことを示した。全組織で 2 遺伝子のみで normalization が十分であることを示した。多くの組織において、GAPDH、ACTB、SDHA、TBP はランキングが高く、逆に HPRT、rRNA、B2M は低かった。

(3) マーモセットとヒト白血球における各免疫関連遺伝子の発現を比較したところ CD4、IL-4 の発現量は、ヒトよりもマーモセットで有意に低値を示したが、IL-10、IL-12 β 、IFN- γ は有意に高値を示した。CD8/CD4 比において、マーモセットではヒトよりも有意に高値を示した。さらに IFN- γ /IL-4、IL-2/IL-4 比においてもマーモセットはヒトよりも有意に高値を示し、Th バランスがヒトと異なることを示した。

デングウイルス初感染マーモセットにおける生化学および免疫学的解析

生化学検査では DENV-2 接種マーモセット (5 個体) において AST 値、ALT 値の上昇が認められた。LDH 値上昇は、6 個体に認められた。BUN 上昇は 2 個体に認められた。Mock グループにおける AST、ALT、LDH および BUN の有意な上昇は認められなかった。血液一般検査では、血小板の減少が、ウイルス接種 12 個体中 5 個体に認められた。さらに、9 個体においては白血球数の減少が認められた。DENV-2 接種 7 日目のマーモセットにおいて、Mock と比較して、白血球数が有意に減少した ($P=0.03$)。

日本脳炎ウイルス感染マウス脳炎発症にかかわる脳内浸潤 T 細胞の解析

TCR レパトア解析では、JEV 感染マウスの脳では、TCRAV8-1、10-1、BV2-1 が有意に増加していたが、その増加の程度は Surviving 群と Dying 群で差は有意でなかった。TRAV8-1 に対して CDR3 size spectratyping 解析を行った結果、高いクローナリティーが認められた。CDR3 アミノ酸配列解析で、重症群では複数の同一クローンを個体間で認められ、そのクローンの一部は軽症群にも確認された。しかし軽症群では群に共通するクローンは認められなかった。J 遺伝子の発現パターンの解析の結果、Surviving 群と Dying 群では異なる J 遺伝子の使用率がそれぞれ高くなっていることが確認された。リアルタイム PCR 解析で、Mock 群の脳と比較して感染マウスの脳では CD3、CD8、CD25 (IL-2R)、CD69、Perforin、Granzyme A、Granzyme B の発現レベルが増加した。Surviving 群と比較すると Dying 群では Perforin、Granzyme A、Granzyme B が有意に上昇していた。また脳内サイトカインバランスを測定した結果、脳内サイトカインバランスは感染後徐々に Th1 側に偏っていた。しかし体重により予後判定のできる 13 dpi では Dying 群では Surviving 群と比較してより Th1 側に偏っていた。

フラビウイルス脳炎の病態解析

脳炎を起こすフラビウイルス感染により異なる病態を示す群間で、ウイルス感染免疫に重要な役割を示す T 細胞のクローンレベルでの変化がこれらの表現型に関与している可能性がある。今後は今回検討したものの以外の V ファミリーのクローンレベルの詳細な検討を行うとともに、サイトカインレベルに関与する制御性 T 細胞関連因子にも着目し感染後の予後決定因子を検索する必要がある。

病理学的解析

チクングニアウイルス感染マーモセットの諸臓器を病理学的に解析したところ、CHIKV 接種 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出された。また肝臓および脾臓において特異的

抗原が検出され、肝臓においては肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤、脾臓においては二次濾胞の形成および starry sky 像が観察された。また、新生仔マウスにデングウイルスを脳内接種し、マウス組織のホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体の交差反応性と至適条件の検討の結果、Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody (ab80914)が良好な反応を示した。

4. 媒介蚊の薬剤感受性試験

(1) ペルメトリン耐性シマカのアミノ酸チャンネルドメイン IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行った。4つの塩基変異が検出された。2つの突然変異で、2つのアミノ酸が置換されたすなわち、S989P (T→C)と V1016G (T→G)であった。この突然変異部位については、82サンプルの中で、SS 遺伝子型が卓越していることがわかり(n= 64)、それに SR (n= 14)ならびに RR 遺伝子型(n= 4)が続いた。得られたデータから、これらのアミノ酸置換が、ペルメトリン耐性ネッタシマカの野外採集集団に生じていた。

(2) 2009年にフィリピン国内30カ所で採集された688頭のネッタシマカ幼虫に関してピレスロイド剤感受性マップと比較するとこれまで中南米地域で確認されている I1011 の変異はどの個体からも検出されなかったが、V1016G の変異は0~61%の頻度で、F1534C は0~76.3%の頻度で確認された。G1016, C1534ともにフィリピン全土から採集されたネッタシマカから広範囲に確認され、特に地理的な偏りは見いだせなかった。

(3) ペルメトリン耐性シマカのアミノ酸チャンネルドメイン IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行った。4つの塩基変異が検出された。2つの突然変異で、2つのアミノ酸が置換された。すなわち、S989P (T→C)と V1016G (T→G)である。上記2ヶ所の突然変異部位については、82サンプル中で、SS 遺伝子型が卓越していることがわかり(n= 64)、それに SR (n= 14)ならびに RR 遺伝子型(n= 4)が続いた。

5. 診断技術等の技術移転：蚊媒介性ウイ

ルス RNA 安定室温保存に関する研究

デングウイルス遺伝子の長期保存安定性に関する検討した結果、デングウイルス 1型~4型いずれの RNA も RNA stable tube 室温保存で5ヶ月間安定であった。また高温保存における安定性を検討した結果、1型~4型 30℃、40℃下に4週間 RNA stable tube にて保存した結果いずれも RNA は安定であった。

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。東南アジア主要各国(フィリピン、ベトナム、カンボジア、ラオス、マレーシア、シンガポール、タイ、台湾)およびオーストラリアにおけるデング熱流行状況もホームページに掲載した。

(<http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/dengue.htm>)

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、検体前処理法の改良、イムノクロマト法による迅速抗体検出法の開発を行った。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、血液からの前処理をなくした検出は遠心機のないベットサイドでの検査に有用で 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 GENE CUBE®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地方衛生研究所等のマンパワーの不足を補えるものと考えられる。抗体検査として、独自のデングウイルス IgM 抗体イムノクロマトキットを開発した。今後チクングニアウイルス IgM 抗体イムノクロマトキットも開発する予定である。また、プラスミドトランスフ

エクシオンによる1回感染性 JEV 粒子産生系は、中和試験などの機能性アッセイが可能である。また prME の配列を変える事によりデングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの1回感染性粒子の迅速簡便な作製も可能であり、遺伝子配列が分かれば対応可能である。

ワクチン開発では、最も実用化に近いと思われていた黄熱弱毒生ワクチン株とデングウイルス1-4型のキメラウイルスがタイの臨床試験で芳しくない結果が報告されたため (Arunee et al. ; *The Lancet*.380(9853):1559-67,2012)、むしろワクチンの評価方法や動物モデルに重点を置くべきであり、それがワクチン実用化への近道である。

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。また、幾何平均抗体価は、ワクチン接種1ヶ月後87.6倍から1年後には21.8倍と約1/4に低下した。1年後の陰転率は21.4%で、154人中31例が非防御レベルの中和抗体価10倍以下となった。

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モ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、そのmRNAをリアルタイムPCR法を確立したことは、マーモセットを用いる実験において、それらの解析に非常に有用である。また、デングウイルス感染病理組織の免疫染色には Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody (ab80914) が有用であることを確認した。

チクングニアウイルス (CHIKV) 感染マーモセットに関する病理学的解析では、CHIKV接種4~21日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出されたこと、さらに肝臓および脾臓において特異的

抗原が検出され、肝臓においては肝細胞における特異的抗原の観察、肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤が観察され、脾臓では二次濾胞の形成および二次濾胞内に starry sky 像が観察されたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。したがって今後さらなるウイルス学および病理学的詳細を解析する必要がある。

媒介蚊の殺虫剤感受性に関しては、フィリピンのネッタイシマカがピレスロイド剤に対して高頻度で耐性であることが判明した。また、タイのネッタイシマカが0.75%ペルメトリンに対して80%未満の死亡率という高い耐性を有していた。生存したペルメトリン耐性ネッタイシマカ個体のナトリウムチャンネル遺伝子の IIS4-S6 ドメインに4つのヌクレオチド置換が検出された。これらのネッタイシマカの殺虫剤耐性が、近年のデング熱の流行拡大と関係する可能性が考えられ、デングウイルス、チクングニアウイルス媒介蚊で日本国内に生息するヒトスジシマカに関しても検討する必要がある。

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デングウイルスは少なくとも室温保存5ヶ月間安定であることが確認できた。また4週間の30℃、40℃下での保存でも安定であることを確認した。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 法の確立と蚊および臨床検体(血液)への応用研究を実施し、前処理の簡略化を図った。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も検討した。また、イムノクロマト法による IgM 抗体検出キットの開発を開始した。

プラスミドトランスフェクションによる1回感染性 JEV 粒子産生系を確立した。

prME の配列を変える事によりデングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの1回感染性粒子の迅速簡便な作製も可能であり、それらは感染中和アッセイ等に有用である。

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し、サイトカイン、T細胞関連の遺伝子など免疫学的マーカーの測定系を確立した。感染マーマセットの末梢血検査（生化学、血球数）にヒトと同様の変化が生じることを確認した。

2009年に製造承認された、細胞培養不活化日本脳炎ワクチンの旅行者ワクチンとしての有効性は、2回接種が望ましいがその防御抗体の維持能が長くないという問題点が明らかになった。

ウイルス遺伝子 RNA の常温保存・輸送法を見出し、30℃、40℃の高温下で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、ポスターを作成した。

F. 健康危険情報

H23年夏に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が、H24年には流行がメトロマニラを含むルソン島はじめ多くの地域に拡大した。日本人のフィリピンからの輸入症例も確認された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R. : Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes. *PLOS ONE*.8: e56296 (2013)
2. Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, Takasaki T, Kanagawa S. Dengue

virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan. *Journal of Travel Medicine*, 19(4):255-257 (2012).

3. Omatsu T, Moi ML, Takasaki T, Nakamura S, Katakai Y, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Akari H, Kurane I. Changes in hematological and serum biochemical parameters in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Journal of Medical Primatology*, 41(5):289-296 (2012).
4. Moi ML, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I. 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).
5. Kikuchi T, Shimizu S, Okame M, Koibuchi T, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Dengue-importations into Japan from East Timor-3 cases-DENV-3. ProMed, promed archive no. 20120319.1074013 (2012).
6. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, Takasaki T. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol*. 50(6):2047-2052(2012)
7. Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Harada F, Lim CK, Moi ML, Ito M, Ikeda M, Kurane I. Demographic features of imported dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Japan from 2006 to 2009. *Dengue Bulletin*, 35:217-222 (2011).
8. Tomomitsu SATHO, Yuki NAGANO, Yuki ESHITA, Yujin HISATOMI, Akira SAKATA, Takeshi MIYATA, Nobuhiro KASHIGE, Fumio MIAKE, Lucky R RUNTUWENE, Shuetsu FUKUSHI, Masayuki SAIJYO, Ichiro KURANE, Shigeru MORIKAWA and Tetsuya MIZUTANI (2012): Inhibitory effects of JNK on *Aedes albopictus* early larval development. *Urban pest management*, 2(1): 7-13.
9. Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Chamnarn Apiwathnasorn, Pungasem Paeporn, Sittiruk Roytrakul, Yupha Rongsriyam, Yuki Eshita (2012): Field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti*

- from central Thailand contain point mutations in the domain IIS6 of the sodium channel gene (KDR). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 43(6): 1380-1386, 2012.
10. 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, Cynthia A. Mapua, Filipinas F. Natividad, Kenji Hirayama, and Kouichi Morita. Serological characterization of Dengue virus infections observed among dengue hemorrhagic fever/ dengue shock syndrome cases in Upper Myanmar. *Journal of Medical Virology*, (in press) 2013.
 11. Kenta Okamoto, Hitomi Kinoshita, Maria del Carmen Parquet, Muhareva Raekiansyah, Daisuke Kimura, Katsuyuki Yui, Mohammed Alimul Islam, Futoshi Hasebe, Kouichi Morita. Dengue virus strain DEN2 16681 utilizes a specific glycochain of syndecan-2 proteoglycan as a receptor. *Journal of General Virology*. Vol. 93(4): 761-770. 2012
 12. Takahisa Furuta, Lyre Anni Murao, Nguyen Thi Phuong Lan, Nguyen Tien Huy, Vu Thi Que Huong, Tran Thi Thuy, Vo Dinh Tham, Cao Thi Phi Nga, Tran Thi Ngoc Ha, Yasukazu Ohmoto, Mihoko Kikuchi, Kouichi Morita, Michio Yasunami, Kenji Hirayama, and Naohiro Watanabe, Association of Mast Cell-Derived VEGF and Proteases in Dengue Shock Syndrome. *PLoSNTD*, Vol.6:e1505.2012
 13. Futoshi Hasebe, Nguyen Thi Thu Thuy, Shingo Inoue, Fuxun Yu, Yoshihiro Kaku, Shumpei Watanabe, Hiroomi Akashi, Dang Tuan Dat, Le Thi Quynh Mai, Kouichi Morita. Serologic Evidence of Nipah Virus Infection in Bats, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*. Vol.18(3):536-7. 2012
 14. Lauber C, Ziebuhr J, Junglen S, Drosten C, Zirkel F, Nga PT, Morita K, Snijder EJ, Gorbalenya AE. Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses. *Arch Virol*. Vol.157, 1623-1628. 2012
 15. Mulyatno KC, Yamanaka A, Yotopranoto S, Konishi E: Vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* collected in Surabaya, Indonesia, during 2008–2011. *Jpn J Infect Dis*. 65, 274-276, 2012
 16. Yamanaka A, Tabuchi Y, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Soegijanto S Konishi E: Dengue virus infection -enhancing and neutralizing antibody balance in children of the Philippines and Indonesia. *Microbes Infect*. 14:1152-9, 2012
 17. Yamaji H, Segawa M, Nakamura M, Katsuda T, Kuwahara M, Konishi E: Production of Japanese encephalitis virus-like particles using the baculovirus-insect cell system. *J Biosci Bioeng*. 114:657-62, 2012
 18. Konishi E, Kitai Y, Nishimura K, Harada S: Follow-up survey of Japanese encephalitis virus infection among humans in Kumamoto Prefecture, south-west Japan: status during 2009–2011. *Jpn J Infect Dis*. 65:448-50, 2012
 19. Yamaji H, Nakamura M, Kuwahara M, Takahashi Y, Katsuda T, Konishi E: Efficient production of Japanese encephalitis virus-like particles by recombinant lepidopteran insect cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012 Sep 5. [Epub ahead of print]
 20. Sjatha F, Takizawa Y, Yamanaka A, Konishi E: Phylogenetic analysis of dengue virus types 1 and 3 isolated in Jakarta, Indonesia in 1988. *Infect Genet Evol*. 12:1938-43, 2012
 21. Kuwahara M, Kitai Y, Kondo T, Konishi E: Survey of antibodies specific for West Nile virus in horses from 2006 to 2010 in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 65:553-5, 2012
 22. Suzuki R, Saito K, Kato T, Shirakura M, Akazawa D, Ishii K, Aizaki H, Kanegae Y, Matsuura Y, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Trans-complemented hepatitis C virus particles as a versatile tool for study of virus assembly and infection. *Virology*. 432:29-38, 2012
 23. Murayama A, Sugiyama N, Watashi K, Masaki T, Suzuki R, Aizaki H, Mizuochi T, Wakita T, Kato T. Japanese reference panel of blood specimens for evaluation of hepatitis C virus RNA and core antigen quantitative assays. *J Clin Microbiol*. 50:1943-9, 2012

24. Ando T, Imamura H, Suzuki R, Aizaki H, Watanabe T, Wakita T, Suzuki T. Visualization and measurement of ATP levels in living cells replicating hepatitis C virus genome RNA. *PLoS Pathog.* 8:e1002561, 2012
 25. Shimoda H, Inthong N, Noguchi K, Terada Y, Nagao Y, Shimojima M, Takasaki T, Rerkamnuaychoke W, Maeda K. Development and application of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for serological survey of Japanese encephalitis virus infection in dogs. *J Virol Methods.* 187(1):85-89. 2013
 26. Sakamoto N, Nakamura-Uchiyama F, Kobayashi K, Takasaki T, Ogasawara Y, Ando S, Iwabuchi S, Ohnishi K. Severe murine typhus with shock and acute respiratory failure in a Japanese traveler after returning from Thailand. *J Travel Med.* 20(1):50-53. 2013
2. 学会発表
(国際学会)
1. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using FcyR-expressing cells. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, November 2012)
 2. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Kotaki A, Takeshita N, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Dengue fever outbreak among Japanese construction workers returning from India. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, November 2012)
 3. Azami NAM, Moi ML, Takasaki T, Salleh AS, Neoh HM, Othman Z, Shah SA, Kurane I, Jamal R. Serological evidence of the co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Kuala Lumpur, Malaysia. 13th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection. (China, October 2012)
 4. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N, Takeshita N, Takasaki T. Ocular complications associated with imported dengue fever. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore, May 2012)
 5. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Application of the dengue non-structural protein 1 (NS1) ELISA for the detection of dengue virus infection in travelers. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore, May 2012)
 6. Kouichi Morita: Therapy of Japanese encephalitis virus. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR), Sapporo Japan April 16-19, 2012
 7. Daisuke Hayasaka, Kazutaka Kitaura, Kotaro Aoki, Kenji Shirai, Dash Sima Simanti, Noriyo Nagata, Yuki Takamatsu, Ryuji Suzuki and Kouichi Morita: TNF α has an immunomodulating effect and prevents severe disease following Japanese encephalitis virus infection. 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, June 19-20, 2012, Beppu, Japan
 8. Kouichi Morita, Mosquito-transmitted Disease Consortium; Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, January 23-24., Tokyo, Japan 2013
 9. Nguyen Thi Thu Thuy, Dang Anh Tuan, Vu Dinh Luan, TruongThi Ha, Takeshi Nabeshima, Posadas-Herrera Guillermo, Dang Thi Dinh, Pham Hoai Linh Ly, Nguyen Bao Ngoc, Le Thi Quynh Mai, Vu Thi Que Huong,
 10. Kouichi Morita and Futoshi Hasebe. Molecular Epidemiology of Dengue Virus Type 4 in Vietnam, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan January 23 -24 , 2013.
 11. Phan Thi Nga, Bui Minh Trang, Dang Thu Thao, Do Phuong Loan, Hoang

- Minh Duc, Guillermo Posadas H., Takeshi Nabeshima, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. Bnna Virus Specific IgM Antibody Detected in the CSF Collected from Unknown Encephalitis Patients, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan January 23 -24 , 2013.
12. Corazon C. Buerano, Takeshi Nabeshima, Maria Terrese G. Alonzo, Lady-Anne C. Suarez, Mya Myat Ngwe Tun, Shingo Inoue, Ronald R. Matias, Filipinas F. Natividad, and Kouichi Morita Molecular Epidemiology of DENV3 in the Philippines Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan January 23 -24 , 2013.
 13. Allan ole Kwallar, Shingo Inoue, Anne W. T. Muigai, Rosemary Sang, Toru Kubo, Kouichi Morita and Matilu Mwau. A Real-time Rever Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Rapid Detection of Yellow Fever Virus. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan January 23 -24 , 2013.
 14. Muhareva Raekiansyah, Kenta Okamoto, Lyre Anni Espada-Murao, Toru Kubo, Kouichi Morita Physiological Change of Dengue Virus-infected Endothelial Cells and its Response to Enhancing Permeability Effect of Proinflammatory Cytokines in vitro. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, Tokyo, Japan January 23 -2 , 2013
 15. Tomohiko Takasaki. Development of an animal model for evaluation of vaccine and therapeutics against dengue virus infection. 第9回日台シンポジウム 2012年9月20-21日(台北)
 16. Tomohiko Takasaki. Dengue vaccine development in the world: overview and status update. Scientific Meeting on Infectious Diseases, Advance Update on Pathogenesis of Viral Infection: Hepatitis, Dengue, Coxsackie, Epstein Barr, and HIV. 2012/Oct/24th. FMUI (Jakarta, Indonesia)
- (国内学会)
1. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Takasaki T, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Akari H, Kurane I. Role of antibodies in dengue infection and protective immunity during secondary infection of marmosets. The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (Osaka, November 2012)
 2. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Dengue vaccine development: re-assessment fo dengue neutralizing antibody and viremia titers using FcyR-expressing cells. The 34th Naito Conference: Infection, immunity and their control for health (Hokkaido, October 2012)
 3. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. デング熱診断サーベイランスのための NS1 抗原検出診断キット . 86th Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases (Nagasaki, April 2012)
 4. 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦 , Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2012) : RT-LAMP法を用いた蚊からのアルボウイルスゲノムの迅速検出。第64回日本衛生動物学会大会、2012年3月30日-31、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号):64, 2012
 5. Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2012) : Whole transcriptome analysis comparison of *Aedes aegypti* 6- and 14-day post-dengue infection using RNA-seq.

- 第64回日本衛生動物学会大会、2012年3月30 - 31日、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号) :64, 2012.
6. 江下優樹(2012): 病原性の単細胞生物とそれを媒介するベクター。第45回日本発生病物学会(JSDB) /第64回日本細胞生物学会(JSCB) 合同大会、ランチョンセミナー、兵庫県神戸市、国立感染症研究所(2012年5月31日) 第45回日本発生病物学会(JSDB) /第64回日本細胞生物学会(JSCB) 合同大会・プログラムプログラム講演要旨: 5, 2012.
 7. Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2012): Validation of 40S ribosomal protein 17S as internal control for qRT-PCR of dengue-infected *Aedes aegypti*. 第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2012年11月10日(土)・11(日)、長崎県長崎市、長崎大学医学部ポンペ会館。第65回日本寄生虫学会・第62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: 2012. Med. Entomol. Zool., 64(2), 2013.
 8. 江下優樹¹, Lucky R. Runtuwene¹, 大塚靖¹, 松原祥恵¹, 小林隆志¹, 川島 秀一², 服部正策³, 倉石 武³, 甲斐智恵子³, Raweewan Srisawat⁴, Narumon Komalamisra⁴, Yupha Rongsriyam⁴, Arthur E. Mongan⁵, 前田龍一郎⁶, 杉本千尋⁷, 牛島廣治⁸, 高崎智彦⁹, 倉根一郎⁹ (2012): リバーズシマカの系統確立および奄美大島・鹿児島県佐多岬でのその生息環境。第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2012年11月10日(土)・11(日)、長崎県長崎市、長崎大学医学部ポンペ会館。第65回日本寄生虫学会・第62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: 2012. Med. Entomol. Zool., 64(2):2013.
 9. Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane (2012): New emerging technology for use in vector control. Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 (JITMM 2012) and The 7th Seminar on Food- and Water - Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ7). 12-14 December, 2012. Centara Grand & Bangkok Convention Centre At CentralWorld, Bangkok, Thailand. Symposium session on S34 Entomological approaches for the study of arboviruses. Abstract of Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 (JITMM 2012)
 10. 葛西真治, 駒形修, 糸川健太郎, 小林睦生, 富田隆史 ネットアイシマカのピレスロイド剤抵抗性機構(3): マイクロアレイおよび連関解析 第64回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2012年10月20, 川崎市産業振興会館ホール
 11. 白井顕治, 北浦一孝, 早坂大輔, 高崎智彦, 鈴木隆二, 倉根一郎: 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳炎発症にかかわる脳内浸潤 T 細胞の解析 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月13-15日
 12. 早坂大輔, 青木康太郎, 北浦一孝, 白井顕治, Dash Sima Simanti, 永田典代, 高松由基, 鈴木隆二, 森田公一: 日本脳炎ウイルス感染において TNF α は免疫応答を調節し重症化の抑制に働く 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月13-15日
 13. 小瀧将裕, 山口総平, 花原景子, 小西英二: マウスモノクローナル抗体を用いたデング1型ウイルス E 抗原上での中和及び増強エピトープの解析。第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2012年5月。
 14. Sjatha F, Konishi E: Chimeric Japanese encephalitis-dengue DNA vaccine as a strategy to reduce induction of dengue virus infection-enhancing antibodies in mice. 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会。2012年5月。
 15. Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Siti Churrotin, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soegeng

- Soegijanto and Eiji Konishi: Molecular epidemiology of dengue and chikungunya viruses in Surabaya, Indonesia 2008-2012. The 46th Joint Working Conference on Viral Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, 2012年6月。
16. 山中敦史、小西英二: インドネシア及びタイで分離されたデングウイルスの分子疫学解析。第53回日本熱帯医学会。2012年9月。
 17. 山中敦史, Thongrungrat S, Ramasoota P, 小西英二: Cell Fusing Agent Virusのタイ国における分離と分子系統樹解析。第19回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2012年11月。
 18. 小西英二: デングワクチンの開発と抗体依存性感染増強への対策。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月。
 19. Sjatha F, Kuwahara M, Sudiro TM, Konishi E: Dengue virus envelope protein domain III substitution on Japanese encephalitis DNA vaccine reduced induction of infection-enhancing antibodies in vaccinated mice. 第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月。
 20. Sudiro TM, Yunita R, Putri DH, Antonjaya U, Sjatha F, Dewi BE, Rukmana A, Mustaqim, Sudarmono P, Konishi E: Immunogenicity of DNA Vaccine Containing Premembrane & Envelope Genes of Dengue Virus Type 2 Indonesian Isolate. 第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月。
 21. 小瀧将裕、小西英二: デング1型ウイルスE抗原エピトープの解析: 感染中和及び増強活性のみを示すマウスモノクローナル抗体を用いたアプローチ。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月。
 22. 山中敦史、小西英二: タイ国のネットアイシマカから分離された Cell Fusing Agent Virus の分子進化解析。第60回日本ウイルス学会学術集会。2012年11月。
 23. 小西英二、小瀧将裕、山中敦史: デングワクチンによる感染増強抗体誘導の懸念と最小化の戦略。第16回日本ワクチン学会学術集会。2012年11月。
 24. Soegijanto S, Sari DW, Yamanaka A, Kotaki T, Kameoka M, Konishi E: Awareness of using Ringer's Lactate Solution in Dengue Virus Infection can Induce Severity. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. 2013年1月。
 25. Mulyatno KC, Churrotin S, Nindya I, Yamanaka A, Kotaki T, Kameoka M, Soegijanto S, Konishi E: Phylogenetic and Molecular Clock Analysis of Dengue Virus Strains Isolated in Surabaya and Sidoarjo, Indonesia, during 2011-2012. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2013. 2013年1月。
 26. 永田典代、岩田奈織子、早坂大輔、佐藤由子、小島朝人、佐多徹太郎、長谷川秀樹: BALB/c マウスを用いた脳炎関連フラビウイルスの病原性の比較。第60回日本ウイルス学会(大阪)2012年11月。
 27. 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の持続効果。第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月(大阪)
 28. C.K. Lim, M.L. Moi, A. Kotaki, M. Saijo, I. Kurane, T. Takasaki. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan. June 12-13, 2012.
 29. C.K. Lim, A. Kotaki, T. Omatu, M.L. Moi, I. Kurane, M. Saijo, T. Takasaki. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.
 30. 林昌宏, 網康至, 藤井克樹, 北浦一

孝, モイ メンリン, 白井顕治, 小滝 徹,
須崎百合子, 森川 茂, 西條政幸, 鈴木
隆二, 倉根一郎, 高崎智彦: マーモセ
ットを用いたチクングニアウイルスの
霊長類モデルの検討, 第 60 回日本ウイ
ルス学会学術集会 (大阪市) 2012 年 11
月 13-15 日.

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

厚生労働省科学研究費補助金（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検査法の研究

研究分担者 森田 公一（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

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 万人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、高感度また簡便な診断法の開発を通して、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、初年度には LAMP 法をデングウイルス検出に応用した手法を開発したが、2 年次である本年度は迅速抗体診断法としてイムノクロマト法を開発し、あわせて安価な診断用抗原の供給を目的として遺伝子工学手法を用いたデングウイルス様粒子の作成技術を開発した。得られた結果から、本研究をさらに推進することでデングウイルスの高感度で安全、安価なベッドサイト抗体診断薬が供給可能であると判断した。さらに、東南アジアの重症デング患者血清を定量的に測定したところ、デングウイルスの一次感染で重症化する例が多々あり、従来から言われている 2 次感染で重症化するとする抗体依存性感染増強（ADE）に加えて、もう 1 つの重要な重症化メカニズムの存在が示された。

A. 研究目的

デングウイルス感染の診断に利用可能な簡便、迅速なデング抗体検出法開発すること。またこの診断薬に用いる、安全、安価な診断抗原を作成するためデングウイルス粒子様抗原を遺伝子工学手法を用いて作成し、その特性や感度について評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 診断薬評価のための抗体調査

デングウイルス感染症流行地であるミャンマー国の医療機関において 2004 年と 2006 年

に臨床的にデング熱・デング出血熱（DHF/DSS）と診断された患者 160 名からの急性期と回復期のペア血液を用いた。血清サンプルは長崎大学熱帯医学研究所で開発した IgM-Capture ELISA 法、および間接 IgG-ELISA 法で抗体価を測定し、井上らの定義により一次感染と二次感染を決定した。また一部のサンプルについては 4 つの血清型のデングウイルスに対するウイルス中和抗体をそれぞれ測定して、パークらの定義にしたがい一次感染と二次感染を確認しパネル血清を定義した。