

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用は、ミャンマー国、長崎大学熱帯医学研究所倫理委員会において承認をうけ実施した。

2. イムノクロマト法を用いた抗体診断薬の開発と、診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

セルロース膜に抗ヒトIgMを固相化した。フラビウイルス特異的マウスモノクロー抗体の金コロイドによる標識は定法により行い、イムノクロマト法のバッファーに患者血清、標識抗体、抗原(4価のウイルス感染培養液)を混合し15分間IgM補足抗体を固相化したセルロース膜スティックを浸すことで固相化した抗ヒトIgMの位置に出現するバンドの有無で陽性、陰性を判断した。

(謝辞:イムノクロマト法については大塚製薬、織田哲也博士のご指導をいただきました。)

また、ウイルス様粒子の作製については昆虫細胞発現ベクタ pIB/V5-His (Invitrogen 社製)を用いてデングウイルス1型~4型までのPrM-E遺伝子をそれぞれ挿入して発現系を構築し、blastidicin により高発現細胞を選択して増殖培養をおこない、安定発現系を得た。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験については長崎大組換え DNA 安全委員会への申請許可を得て実施した。

C. 研究結果

1. デング流行地域の重症化デング感染における抗体反応の特性

臨床的に重症デング感染と診断された160名の患者のうち139名が実際にはデングウイルスに感染していた。検体量が十分であった94例については中和抗体を解析し13例(14%)が一次感染、81例(86%)が

二次感染であった(図1)。一次感染で発症したデングウイルス感染でも重症度IからIVそして最も重症なDSSまで広く分布していた(図2)。一次感染で重症化した患者では一次感染のデング熱患者や二次感染患者と比較して有意に高いIgM抗体価を示した。移行抗体の存在が否定される1歳以上の患者においても一次感染で重症化した例を確認した。重症度とIgG抗体価の相関は認めなかった(図3)。

2. イムノクロマト法を用いた抗体診断薬の開発と、診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

抗ヒトIgM抗体を固相化したイムノクロマト法すなわちIgM補足法によりデング患者血清中に存在するデングウイルス特異的IgM抗体の検出が15分で判定可能であった(図4)。非特異的な反応はみられなかった。

昆虫細胞を用いた、ウイルス様粒子産生細胞が構築できた。抗原量はウイルス感染細胞上清と同等の力価をしめした(図5)。

D. 考察

デング流行国では出血を伴う急性ウイルス感染において、デングウイルスの感染が最も重要であることが示された。また、デングウイルスの一次感染においても重症化する症例が発生している事が明らかになった。このことはデングウイルスの重症化にはADEによらない重症化機序が存在することを示していると考えられる。

デング感染、特に二次感染時にはきわめて高い抗体産生があることがわかっており、一次感染時と比較して10~100倍もの特異的IgG抗体が産生される。しかし今回の定量的解析においてはIgG抗体価と重症度の相関は認められず、抗原刺激(ウイルス抗

原産生量) と重症度とは必ずしも相関するものではないと考えられた。今後、デングウイルス感染の重症化メカニズムを解明するうえで、これまで研究されてきた二次感染での宿主の免疫応答の関与に加えて、ウイルス側因子についても十分な探求を行う必要があると思われる。

今回、イムノクロマト法によるデング抗体診断薬が開発でき、この診断試薬が市場に供給できれば国内でも国外でも有用であると思われる。3年次には今回準備したパネル血清を用いて、特異性と感度を評価することが必要であるとともに、今回利用したウイルス感染培養液上清を本年開発したウイルス様粒子に置き換えることも必要である。また、デングウイルス感染の鑑別診断として重要なチクングニアウイルスについても同様に簡易抗体診断法を開発を継続する必要がある。

E. 結論

デング血清診断薬を評価するパネル血清が準備された。またデング流行地患者群の詳細な抗体定量評価によりデングウイルスの一次感染でも重症化する症例が確認された。

IgM捕捉法によりデング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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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

Takahisa Furuta, Lyre Anni Muraio, 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

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

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

森田公一、ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎 (p324-327)、黄熱病 (p334-337)、デング熱 (p403-406)、ニパウイルス感染症 (p423-426)、感染症事典、感染症事典編集委員会編、オーム社、2012.

森田公一、アルボウイルス、新編ウイルスの今日の意味、柳雄介、堤裕幸編、医薬ジャーナル社、2012年9月30日、p82-90

2. 学会発表

Kouichi Morita: Therapy of Japanese encephalitis virus. 25th International Conference on Antiviral Research (ICAR), Sapporo Japan April 16-19, 2012

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

Kouichi Morita, Mosquito-transmitted Disease Consortium ; Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, January 23-24., Tokyo, Japan 2013

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, 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.

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.

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.

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.

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.

早坂大輔、北浦一孝、青木康太郎、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47回の本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇市、2012年5月25日～26日

高松由基、ディン ティアン デュク、早坂大輔、森田公一。「病原性の異なる日本脳炎ウイルス2株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み」第47回の本脳炎ウイルス生態学研究会、第47回の本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇市、2012年5月25日～26日

吉川亮、鍋島武、井上真吾、徳田昌紘、池田秀樹、森田公一、吾郷昌信「長崎県で発生した日本脳炎患者の実験室診断」、第47回の本脳炎ウイルス生態学研究会、阿蘇市、2012年5月25日～26日

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53回日本熱帯医学会大会、とちぎプラザ(北海道帯広市)、2012年9月5日～6日

高松由基、ディン ティアン デュク、早坂大輔、森田公一、「病原性の異なる日本脳炎ウイルス2株のマウスにおける病原性の違いを解明する試み」、第53回日本熱帯医学会大会、とちぎプラザ(北海道帯広市)、2012年9月5日～6日

青木康太郎、早坂大輔、森田公一、「LAMP法によるダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)遺伝子検出法確立」、第53回日本熱帯医学会大会、とちぎプラザ(北海道帯広市)、2012年9月5日～6日

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、大阪市、2012年11月13日～15日

青木康太郎、早坂大輔、森田公一、「RT-LAMPによるダニ媒介性脳炎ウイルス遺伝子検出法の確立」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13日～15日

安部智子、左一八、渡邊一平、池田潔、森田公一、鈴木隆「抗 Dengue ウイルス剤の探索および性状解析」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13日～15日

内田玲麻、Espada-Murao Lyre Anni、森田公一「Dengue ウイルス感染ヒト培養細胞における I 型インターフェロンの発現抑制」、第60回日本ウイルス学会学術集会、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13日～15日

余福勲、岡本健太、森田公一、Expression of Dengue virus type 2 envelope protein in Pichia

pastoris and application for sero-diagnosis. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13日～15日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

吉川亮、徳田昌紘、池田秀樹、山口顕徳、北川由美香、鍋島武、井上真吾、森田公一、吾郷昌信「2010, 2011年に長崎県で発生した日本脳炎に関する疫学解析」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13日～15日

鍋島武、井上真吾、岡本健太、遠藤友志郎、一ノ瀬昭豊、Filipinas F. Natividad、森田公一、「未知の蚊媒介性ウイルスを探索する」、第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪市、2012年11月13日～15日

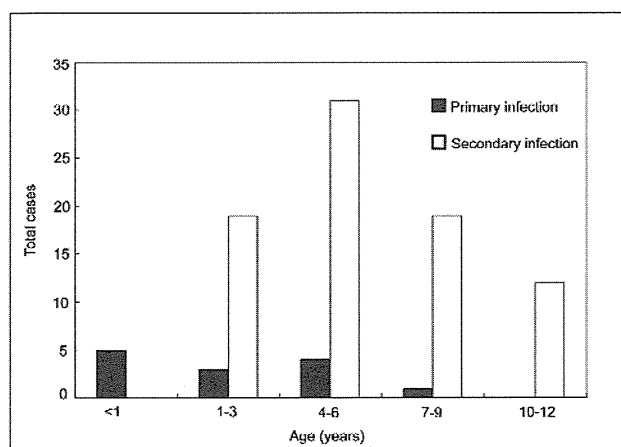


図1. デング重症例 (DHF/DSS) における一次感染と二次感染。一次感染においても重症型のデング感染 (デング出血熱、デングショック症候群) が発生している。移行抗体が消失する生後12か月以上の小児にも重症例がみられる。

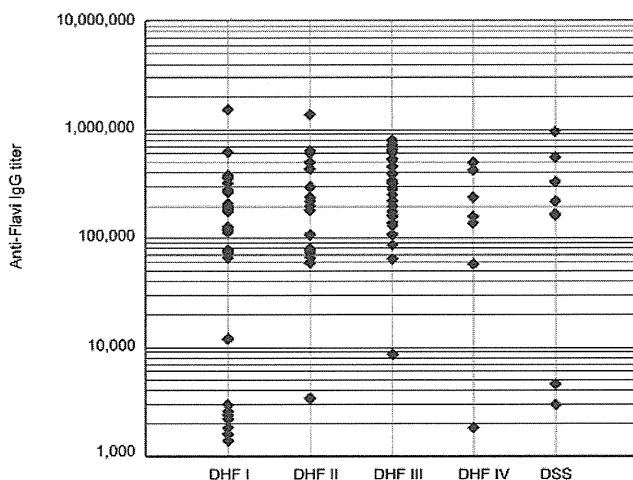


図2. I g G抗体価と重症度の比較。抗体価と重症度は相関がみられなかった。

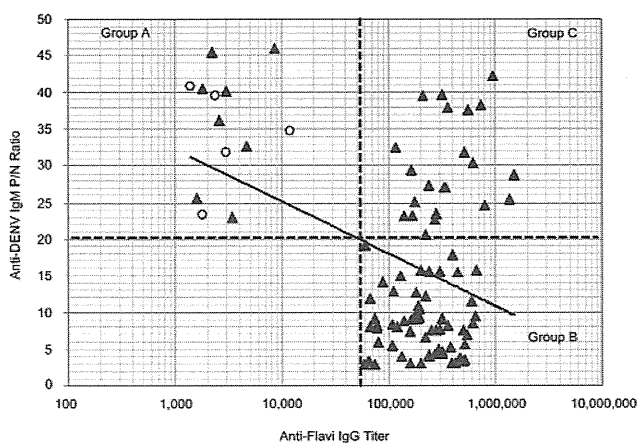


図3 重症患者群のデング特異的 I g M抗体価と I g G抗体価。定量的 E L I S A法により一次感染と二次感染を区別することができる。一次感染でも重症化例がみられる。

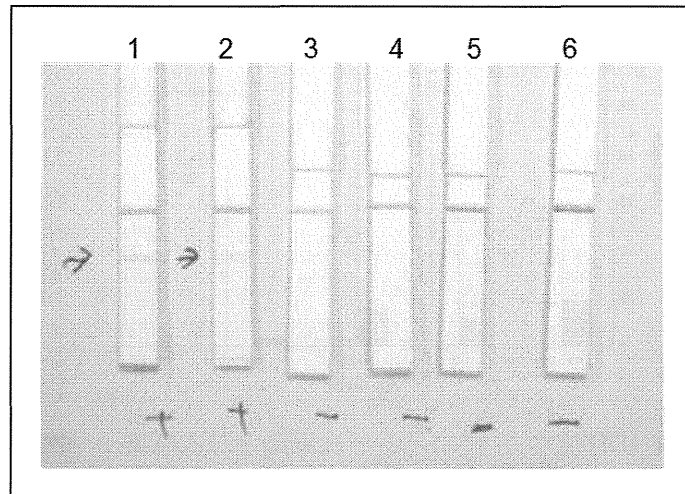


図4 イムノクロマト法の結果。デング I g M抗体が特異的に15分で判定できる。

(Sample)	(Buffer)	(Ag)	(Conjugate)	(Incubation)	(Stick)	(判定)
1.DHF-pt#1 (2.5ul)	+7.5ul +	DEN-CF (20ul)	+ anti-flavi-Gold (3ul)	→ 5 min	→ anti-h-IgM	= +
2.DHF-pt#2 (2.5ul)	+7.5ul +	DEN-CF (20ul)	+ anti-flavi-Gold (3ul)	→ 5 min	→ anti-h-IgM	= +
3.DHF-pt#1 (2.5ul)	+27.5ul +	(none)	+ anti-h-IgM-Gold (3ul)	→ 5 min	→ JEV Ag stick	= neg
4.DHF-pt#2 (2.5ul)	+27.5ul +	(none)	+ anti-h-IgM-Gold (3ul)	→ 5 min	→ JEV Ag stick	= neg
5.DHF-pt#3 (5ul)	+25ul +	(none)	+ anti-h-IgG-Gold (3ul)	→ 5 min	→ JEV Ag stick	= neg
6.DHF-pt#4 (5ul)	+25ul +	(none)	+ anti-h-IgG-Gold (3ul)	→ 5 min	→ JEV Ag stick	= neg

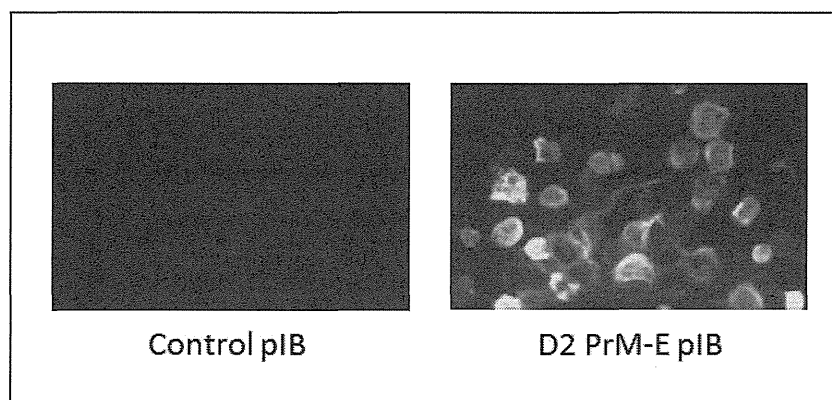


図5 デングウイルス粒子様抗原発現細胞の構築。安定的に発現している抗原が免疫染色で確認できる。(右)

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

タイ国の Dengue 熱流行地で採集したネッタイシマカの ナトリウ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

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
研究協力者	Lucky R. Runtuwene	大分大学医学部感染予防医学講座 大学院博士課程 1 年
	Raweevan Srisawat	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 科学者
	Narumon Komalamisra	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 准教授
	Chamnarn Apiwathnasorn	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 准教授
	Pungasem Paeporn	タイ国、厚生省医科学部門国立衛生研究所
	Sittiruk Roytrakul	National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology for Development Agency, Thailand
	Yupha Rongsriyam	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 准教授
	Bouasy Hongvanthong	ラオス共和国マラリア・寄生虫・昆虫センター センター長
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス 1 部 室長
	倉根一郎	国立感染症研究所 副所長

研究要旨

昆虫にピレトロイド耐性が生じる原因機序の一つは、電位開口型ナトリウムチャンネル遺伝子 (*kdr*) のドメイン IIS6 に突然変異が生じることである。本研究の目的は、野外でのペルメトリン耐性ネッタイシマカのナトリウムチャンネル遺伝子に存在するアミノ酸置換を特定することである。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。ペルメトリン耐性シマカのナトリウム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。得られたデータから、これらアミノ酸置換が、ペルメトリン耐性ネッタイシマカの野外採集集団に生じていたことが明らかになった。

A. 研究目的

ピレトロイドは公衆衛生の媒介昆虫、とりわけ、Dengue 熱やチクングニア熱などの重篤な疾患の伝播に関与する媒介昆虫のコントロールに使われている殺虫剤である。ピレトロイドは、ヒトや哺乳動物に対する毒性が低く、土壌中の残留が少ないという特性があるため、広く使われている。そのため、室内のスプレーや、蚊帳、カーテ

ン、サンスクリーンに使われ、また、蚊取り線香やマット、エアゾールに使われている。Dengue 熱の発生が報告されると、タイ厚生省では、24 時間以内に患者宅の周囲地区にデルタメトリンあるいはペルメトリンを噴霧し、近傍に生息する全ての蚊成虫を殺処分する。しかし、これらの殺虫剤を長期間あるいは頻繁に使用したことで、タイ国の蚊は、それら殺虫剤に耐性を持つようになった

た。

殺虫剤耐性は、ヒトに疾患をおこす病原体を媒介する昆虫をコントロールするのに重大な障壁となる。この問題は多くの地域で起こり、多くの昆虫やダニに生じている。タイでは、ペルメトリンと DDT に対する耐性がネッタイシマカに広く分布しており、ネッタイシマカはまた、タイ国中央部、とりわけバンコクでは、デルタメトリンに対する耐性も示している。

ピレトロイドならびに DDT 耐性が昆虫に生じる機序には、標的部位、つまり電位開口型ナトリウムチャンネルの感受性の変化が関係する。電位開口型ナトリウムチャンネルは4つのホモログス・リピート・ドメイン (I、II、III、IV) から構成されており、各ドメインは、6個の膜貫通領域から構成され、円周状に配置されてイオン孔を形成している。この遺伝子に“ノックダウン耐性” (*kdr*) として知られる突然変異が生じることが、幅広い昆虫でのこのターゲットの感受性変化と関係があるとされている。

これまでの研究で、電位開口型ナトリウムチャンネル遺伝子のドメイン II に次のような1塩基置換があると、ネッタイシマカにピレトロイドに対する標的部位耐性が誘発されることがわかっている。すなわち、1016位での Val → Gly あるいは Val → Ile、1011位での Ile → Met あるいは Ile → Val、982位での Leu → Trp、923位での Gly → Val、ならびに 989位での Ser → Pro。S989P 変異は、デルタメトリンで選択したコロニーで最初に報告され、その後、野生で捕獲したネッタイシマカに見つかっている。ペルメトリンとデルタメトリンは異なるタイプのピレトロイドであるのに、この突然変異にはペルメトリン耐性も伴うものと予想されている。本研究では、野外で採集したネッタイシマカにおけるペルメトリン耐性と関係のある *kdr* 遺伝子の IIS4-6 ドメインにおける突然変異の頻度を検討した。

B. 研究方法

1. 野外で採集したペルメトリン耐性ネッタイシマカ

ネッタイシマカ幼虫を、ペルメトリン耐性が報告されている地区 (Bang Khae 地区、Bangkok; Muang 地区、Prachin Buri 県; Pongsawai 地区、Ratchaburi 県) で採集した。採集した場所の GPS 座標を記録した。幼虫を実験室で育て、成虫にした。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判断した (WHO 判断基準)。Buri Rum 県で採集した感受性株を10年前にマヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座で実験室内コロニーとして用いた。

2. 殺虫剤感受性試験

羽化後2-5日の未吸血雌蚊25個体で、WHO標準手順に従って殺虫剤感受性試験を行った。殺虫剤に暴露する前に蚊をホールディング試験管内に置いた。その後、蚊をホールディング試験管から0.75%ペルメトリンを浸漬させた紙を敷いた暴露試験管に静かに移した。蚊に殺虫剤を1時間暴露し、その後ホールディング試験管に戻し、10%ショ糖液を与えた。24時間後に死亡を調べた。感受性試験をそれぞれの系統から100頭のメスの蚊を使って実施した。対照蚊は、殺虫剤を含まないシリコンオイルを含む紙に暴露させた。対照蚊の死亡率が20%を超えたら、実験を終了した。対照蚊の死亡率が5%から20%の範囲であれば、死亡率を、以下の Abbott の式を使って補正した：

$$\frac{(\% \text{試験群の死亡率} - \% \text{対照群の死亡率})}{(100 - \% \text{対照群の死亡率})} \times 100$$

3. ペルメトリン耐性ネッタイシマカの *kdr* 遺伝子の増幅と配列決定

TRIzol[®]試薬 (Invitrogen, Carlsbad, USA) を使ってペルメトリン耐性系統の個体から全 RNA を抽出した。その後、*kdr* 遺伝子ドメイン II の S4 ならびに S6 をカバーする NaF プライマー (順

方向プライマー) 5' CGT GGC GCT GTC GTT GCT C
3' と NaR プライマー(逆方向プライマー) 5'
CTT GTT CGT TTC GTT GTC GGC 3' を使って、first
strand cDNA を PCR 増幅させた(Srisawat *et al.*,
2010)。PCR 混合物(合計体積:12.5 μ L)を200 μ L
マイクロチューブに入れた。マイクロチューブに
は、プライマーがそれぞれ 10 pico Mol、1X
SuperScript™ One step RT-PCR、PLATINUM Taq
反応混合物(Invitrogen, USA)、ならびにそれぞ
れの蚊の RNA 鋳型 200 ng が含まれていた。反応
混合物を次にサーモサイクラー(Biomedtra,
USA)に移した。反応の熱サイクルは、first
strand cDNA の合成に 50°C 30 分間、逆転写酵素
の不活性化と変性に 94°C 2 分間、その後、94°C 30
秒、65°C 30 秒、68°C 1 分間の PCR 反応を 35 サイ
クル実施した。最終伸長ステップでは反応混合物
を 68°C に 2 分間保った。

PCR 生成物を、1.5%アガロースゲル上で 30 分
間 100V の電気泳動をかけて解析し、臭化エチジ
ウムで染め、UV 光で現像した。PCR 生成物を次に
精製し、ABI BigDye Terminator Cycle Sequencing
キットと 3730xl Automated DNA シーケンサー(PE
Applied Biosystems)を使い、Macrogen Inc.,
Korea が配列決定した。

4. ペルメトリン暴露時間に対する 2 つの突然 変異(989, 1016)の影響

Ratchaburi 県(タイ国)で 2003 年に採集し先
の研究でペルメトリン耐性を有することがわか
っていた。ネッタイシマカの Pongsawai 系統を、
WHO 標準プロトコール(World Health
Organization, 1998)に従った 2 つの耐性アレル
の出現頻度とペルメトリンの暴露時間との関係
を調べた。ペルメトリンに 60 分間、270 分間、
もしくは 360 分間暴露させた。生存していたネッ
タイシマカのみを用いて、耐性アレル頻度を調べ
た。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

全てのネッタイシマカが 0.75 % ペルメトリン
に対して高い耐性を有していた。すなわち、80%
未満の死亡率であった。これは、WHO が耐性蚊の
定義に用いている判定基準である(World Health
Organization, 1998)。Bang Khae 地区のネッタ
イシマカの死亡率を異なる採集場所からのもの
で計算し(31.80 \pm 7.03)、ペルメトリン耐性が最
も高かったのは、BK-2 と BK-1 で採集された蚊で
あった。Ratchaburi(死亡率 35%)と Prachin Buri
(死亡率 51%)で採集したネッタイシマカも高い
ペルメトリン耐性を示した(表 1)。

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
れまでは、アミノ酸の置換を生じさせる 2 つのヌ
クレオチド置換(S989P と V1016G)しか報告され
ていない。1011 と 982 の置換は同義置換であっ
た。最初の非同義置換 S989P では、コドンの最初
の位置の T が C に置換され、その結果、アミノ酸
レベルではセリン(TCC)がプロリン(CCC)に置換
される。第二の突然変異 V1016G は、コドンの第
二ポジションが T から G に置換されるもので、バ
リンがグリシンに変化する。両方の置換が、本研
究の耐性群に見つかった。

ペルメトリン耐性ネッタイシマカの約 20.65 %
(94/455)をサンプルして、3 つの遺伝子型をチェ
ックした(SS, SR, RR)。94 サンプルの上記 2 箇
所の突然変異部位を調べて、SS 遺伝子型が卓越
しており(74 個体)、それに SR(15 個体)と RR
(5 個体)が続いていることがわかった(表 2)。

耐性アレルの出現頻度はバンコクで採集した
ネッタイシマカ(0.17)のほうが、Ratchaburi
(0.08)や Prachin Buri(0.03)で採集したネッタ
イシマカより高かった。一方、感受性系統は、ホ

モ接合感受性アレルを有していた。

さらに、Ratchaburi で採集したネッタイシマカのペルメトリン耐性アレル頻度は、暴露時間が長くなるほど上昇した (表 3)。これらの集団では、SS 遺伝子型は見つからなかった。

D. 考察

Bang Khae 地区 (バンコク) ; Ratchaburi ; ならびに Prachin Buri の野生ネッタイシマカ集団で、高レベルのペルメトリン耐性が認められた。現時点で、タイ国のほとんどのネッタイシマカはペルメトリンに対して耐性がある。そのため、ネッタイシマカ集団のコントロールには、ほとんど効果がない。有機リン酸などの別の殺虫剤に変更することが考えられるが、それらの殺虫剤は悪臭がし、噴霧作業者のアセチルコリンエステラーゼレベルを下げてしまう。ペルメトリンと相乗剤を併用することが、もう一つ考えられる手段である。

バンコク (都市地区) の耐性アレルの出現頻度は、Prachin Buri や Ratchaburi 地区 (辺地) のものより高かった。都市地区の家屋は小さく密閉度が高い。そのため、屋内で殺虫剤を噴霧すると、家屋内の空間が限られているため、蚊は殺虫剤に暴露する可能性が高い。ペルメトリンは、市販されているエアゾール殺虫剤製品の主要成分である。従って、蚊にはそれに対する耐性が生じた。対照的に、辺地では、家屋は大きく開放的である。蚊を追い払う蚊取り線香のほうが、辺地では、蚊対策として好まれている。そのため、蚊は殺虫剤と接触する確率が低く、従って、殺虫剤耐性が生じる確率が低い。

ペルメトリン耐性ネッタイシマカは *kdr* 遺伝子の IIS6 ドメインに 2 つの突然変異を有していた。しかし、ドメイン II では多数の非同義ヌクレオチド置換が、殺虫剤耐性と関連して生じている。実際、ドメイン II 内の 5 つの置換 (G923V, L982W, S989P, I1011M/V, V1016G) が、ネッタイシマカのピレトロイド耐性と関係している。

Rajatileka et al. (2008) は、タイ国の南部で採集した蚊サンプルに G から A の突然変異があり、I1011V 置換が生じていると報告したが、その突然変異は、タイ国の中央部で採集したわれわれのサンプルには見つからなかった。従って、I1011V 突然変異の分布は、地理的な影響を受けているのであろう。Bregues et al. (2003) が報告したアミノ酸残基 923 と 982 の突然変異は、われわれの蚊集団には観察されなかった。S989P と V1016G の突然変異に至った、われわれの研究で見つかった 2 つの非同義ヌクレオチド置換は、デルタメトリンで選択したネッタイシマカに見つかったものと同様であった (Srisawat et al., 2010)。感受性系統には、989 置換も 1016 置換も見つからなかった。

耐性集団での耐性アレルの出現頻度は、ベトナムやブラジル、メキシコのネッタイシマカのものと比較して低かった。これらの国の蚊では、*kdr* 耐性遺伝子型の出現頻度が上昇しつつあることが実証されている)。しかし、タイ国の蚊集団で *kdr* 耐性アレルの頻度が上昇していることを示す徴候がある。

kdr 耐性アレルの頻度が低いことと感受性試験の結果 (高レベルのペルメトリン耐性が見つかっていること) との間の矛盾を説明できる一つの可能性は、他の耐性機序が存在していることである。標的感受性部位に突然変異が生じることに加え、解毒酵素の発現レベルが上昇することも、殺虫剤耐性の機序に関与しているものと考えられる。一部の蚊は、野生型 *kdr* 遺伝子を持っていても、ペルメトリン暴露後に生存できる。従って、主なピレトロイド解毒酵素、混合機能オキシダーゼやエステラーゼの発現レベルが上昇し、殺虫剤耐性に大きな役割を果たしているものと考えられる。これは、Yaicharoen et al. (2005) がデルタメトリン耐性ネッタイシマカについて報告していることと同様の機序である。加えて、ペルメトリン耐性と関係のあるドメイン I とドメイン

III の突然変異についても考慮する必要がある。ドメイン III に F/F1534 感受性遺伝子型を持つネッタイシマカは、ドメイン II にホモ接合突然変異 V1016G と S989P を有するため、ペルメトリン耐性となり、ペルメトリン暴露後も生存できることを明らかにした。残念なことに、解毒酵素の発現や、別のドメインでの突然変異については、本研究では調べなかった。

本研究では、ペルメトリン暴露時間と関係のある *kdr* 遺伝子型と表現型発現の相関関係が、野外採集したペルメトリン耐性ネッタイシマカで検出された。これは、デルタメトリンで選抜したネッタイシマカ 実験室系統で報告されているものと同様であった。

kdr 遺伝子のドメイン IIS6 の 2 箇所の突然変異が、バンコックで野外採集したペルメトリン耐性ネッタイシマカでの分布が最初に報告された。通常は、ネッタイシマカ集団では、少数のホモ接合耐性アレルが見つかる。しかし、タイ国の多くの地域では、耐性アレルの分布がまだ解明されていない。これらの耐性アレルが出現したことは、ネッタイシマカのペルメトリン耐性に主要な／軽微な役割を果たしている可能性があることを示すものであり、さらに研究が必要である。従って、殺虫剤耐性状態を調べるのが有用である。タイ国では、ピレトロイドの使用が続いていること、および、異なる殺虫剤クラス間の交差耐性が生じるのを避けることを考えれば、そのような情報は不可欠のものである。ある国が、媒介昆虫対策としてピレトロイドに頼るのであれば、ネッタイシマカの耐性集団が生じることは、媒介昆虫対策プログラムにとって懸念されることとなる。

E. 結論

1. 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。ペルメトリン耐性シマカのナトリウム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。

2. 上記 2 過著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。

3. 得たデータから、これらのアミノ酸置換が、ペルメトリン耐性ネッタイシマカの野外採集集団に生じていたことが明らかになった。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

(2) 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.

2. 学会発表

(1) 江下優樹, ルッキー R. ルントウエネ,

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、2011年11月11日、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会・プログラムプログラム講演要旨: 5, 2011.

(2) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦, Raweevan 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(金)・31(土)、信州大学、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号):64, 2012

(3) 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日(金)・31(土)、信州大学、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号):64, 2012.

(4) 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回日本発生生物学会(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 共用第一会議室、2012年5月31日 12:25-12:50、第45回日本発生生物学会(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.

(5) Lucky R. Runtuwene¹, Shuichi

Kawashima², Yutaka Suzuki³, Sumio Sugano³, Kenta Nakai⁴, Ryuichiro Maeda⁵, Chihiro Sugimoto⁶, Tomohiko Takasaki⁷, Ichiro Kurane⁷ and Yuki Eshita¹ (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、長崎大学医学部ボンペ会館。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.

(6) 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, Raweevan 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): リバース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、長崎大学医学部ボンペ会館。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.

(7) Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Raweevan 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)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

表 1. 0.75% ペルメトリンに1時間暴露させた後のネッタイシマカ成虫の死亡率

採集場所	コード	GPS 座標系	死亡率 (%)
Bang Khae 地区, バンコック	BK-1	N13 70 91.5, E100 42 59.5	9
	BK-2	N13 74 88.9, E100 35 42.7	0
	BK-3	N13 41 47.8, E100 25 44.6	52
	BK4	N13 41 986, E100 23 32.3	35
	BK-5	N13 42 13.4, E100 24 51.2	63
Pongsawai 地区, Ratchaburi 県	RB-1	-	35
Muang 地区, Prachin Buri 県	PR-1	N14 06 49.1, E101 19 52.1	51
実験室感受性系統 (Buri Rum 県)	SBU	-	100

- データなし

表 2. 野外採集したペルメトリン耐性ネッタイシマカと感受性系統の *kdr* 遺伝子ドメイン IIS6 突然変異の遺伝子型頻度

殺虫剤に対する h 状態	地域	N	989/1016 の遺伝子型			R アレル
			SS	SR	RR	頻度
ペルメトリン- 耐性系統	Bangkok	73	0.75 (55)*	0.09 (13)	0.07 (5)	0.17
	Prachin Buri	15	0.93 (14)	0.03 (1)	0 (0)	0.03
	Ratchaburi	6	0.83 (5)	0.08 (1)	0 (0)	0.08
	計	94	0.79 (74)	0.08 (15)	0.05 (5)	0.12
ペルメトリン-感受性系						
統	Buri Rum	6	1 (6)	0 (0)	0 (0)	0

* () 蚊の頭数をかっこ内に示す

表 3. 0.75% ペルメトリンに様々な時間暴露させた後の Ratchaburi 県から採集したネッタイシマカ成虫の 2 箇所突然変異の遺伝子型頻度

暴露時間(分)	N	突然変異部位			R アレル
		989/1016			頻度
		SS	SR	RR	
		SS/VV	SP/VG	PP/GG	
60	6	0.83 (5)*	0.08 (1)	0 (0)	0.08
270	5	0 (0)	0.3 (3)	0.4 (2)	0.7
360	6	0 (0)	0.33 (4)	0.33 (2)	0.7

* () 蚊の頭数をかっこ内に示す

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

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）

研究協力者 高崎智彦、倉根一郎、田島茂、中山絵里、林昌宏（国立感染症研究所）
鈴木隆二、白井顕治、北浦一孝（国立病院機構相模原病院）

大松勉（東京農工大学農学附属国際家畜感染症防疫研究教育センター）

網康至、須崎百合子（国立感染症研究所動物管理室）

研究要旨

本研班ではこれまでに確立したデング熱感染モデル（マーモセット）が病態機序解明に有用であるかを生化学および免疫学的に検討した。感染モデルの評価については、ウイルス接種後、経時的にウイルス血症定量、中和抗体測定、体温、活動性、肝機能・腎臓機能検査を行った。今回の検討により、全ての個体において、ウイルス血症が認められた。感染ウイルス血清型に対する中和抗体上昇が全個体に認められたが、異なる血清型に対する中和抗体価が低いまたは検出されなかった。12 個体中、5 個体 (5/12) においては、ウイルス接種後に血小板減少症が認められ、9 個体においては白血球減少症を呈した。7 個体は、発熱および活動低下を呈した。さらに、ウイルス接種を行っていない対象のマーモセット 4 個体においては、これらの症状を示さなかった。デング熱モデル動物であるマーモセットは、デングウイルス接種後においてはデング熱の典型的な症状（発熱、活動低下）と生化学的変化を呈した。さらに、中和抗体および IgM/IgM 抗体上昇パターンは、デング熱患者と類似することから、デングウイルス感染症の病態機序解明に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

デングウイルスは、蚊によって媒介されるフラビウイルスであり、世界的に大規模な流行を起こしている。年間約 25 億人がデング熱流行地域に生活しており、年間の発症者数が約 1 億人である。デングウイルスは、4 つの血清型が存在し、いずれの血清型によっても同様な病態を示す。多くは、不顕性感染あ

るいは軽度の発熱にとどまるが、典型的な症状を示す場合、デング熱・出血熱と呼ばれる 2 つの病態を示すことがあり、病像は多彩である。デングウイルスに対するワクチンおよび治療が実用化されていない一因はデング熱・出血熱の病態機序が明らかにされていないことにある。

デング熱・出血熱の病態解明には、モデ

ル動物が必要である。一般的に、カニクイサル、アカゲザルなどの霊長類が病態解明研究とワクチン開発研究に用いられている。実験的にデングウイルスに感染された霊長類は、高ウイルス血症と症状（発熱、生化学的な変化など）を呈しないため、ウイルス血症などの症状が生じるモデル動物が必要である。

我々は、マーモセットを用いて発症するモデル動物を確立した。さらに、実験的に感染されたマーモセットは、高ウイルス血症を示すことを明らかにした。そこで、本研究班では、マーモセットーデングウイルス(DENV)感染モデル動物の確立と病態解明・感染防御解析系の確立を目的とし、DENV 感染によってマーモセットにおける化学的および血清的な変化を検討した。

B. 研究方法

霊長類：生化学および血液検査にはマーモセット 20 個体を用いた。中和抗体の検討には、マーモセット 4 個体を用いた。本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会の審査において承認を受け、国立感染症研究所における動物委員会のガイドラインに基づいて実施した。

ウイルス：デングウイルス 2 型 (DHF0663 株、D2/Hu/Jamaica/77/2007NIID 株、D2/Hu/Maldives) を用いた。中和試験には、DENV-1 (01-44 株)、DENV-2 (DHF0663 株)、DENV-3 (CH53489 株) および DENV-4 (TVP-360 株) を用いた。

ウイルス接種：腹腔内にテレメーターを挿入したマーモセットに 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 日目に採血を行った。対象グループ (4 個体) は、採血のみ行った。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。

実験室検査：血中ウイルス定量 (ウイルス遺伝子定量、感染性ウイルス定量, Omatsu et al., *J Gen Virol*, 2011; Moi et al., *J Infect Dis.*, 2011)、デングウイルス中和抗体価の測定 (Moi et al., *PLoS Neg Trop Dis*, 2012) とともに、血液検査を行い、血球数および生化学値も検討した (Omatsu et al., *J Med Primatology*, 2012)。

体温・活動性の検討：体温と活動性の変動は、テレメーター (PhysioTel, Dataquest devices) を用いて検討した。体温と活動は、ウイルス接種 3 日前～接種 10 日目に測定した (Omatsu et al., *J Med Primatology*, 2012)。

C. 研究結果

血算検査：ウイルス接種マーモセット 12 個体における血球数を測定した。DENV-2 接種マーモセット D2-2, D2-3, D2-4 のウイルス血症検出期間が 3 日間であり、D2-5, D2-6, D2-7, D2-8, D2-9, D2-10, D2-11, D2-12, D2-13 においては 7 日間である。血小板の減少は、ウイルス接種 12 個体中 5 個体に認められた (図 1A, C, D, F, H)。さらに、9 個体においては白血球数の減少が認められた (図 1A, B, D, F, H, J, L)。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 ($P=0.03$) (表 1)。Mock (4 個体)

においては、血算数の有意な変動が認められなかった。

生化学検査：DENV-2 接種マーマセット (5 個体) において AST 値の上昇が認められた (図 1A, C, D, G, L)。さらに、DENV-2 接種マーマセット 4 個体では、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 (図 1A, D, G, H, J, K)。BUN 上昇は 2 個体に認められた (図 1 B, F)。AST 値は、接種 7、14、21 日目に有意な上昇が認められた ($P_{\text{DAY}7}<0.01$, $P_{\text{DAY}14}=0.03$, $P_{\text{DAY}21}<0.01$)。さらに、LDH 値は、接種 7、14 日目に有意な上昇が認められた ($P_{\text{DAY}7}=0.01$, $P_{\text{DAY}14}=0.04$) (表 1)。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。

DENV-2 接種後における症状：ウイルス接種後 21 日間にわたり症状 (体温、活動変動) を観察した (図 2)。体温の上昇は、7 個体に認められた (図 2A, C, D, F, H, J, K)。さらに、6 個体では、活動低下が観察された (図 2A, B, D, F, H, I)。

中和抗体価の検討：一次感染のマーマセット (4 個体) における中和抗体価の上昇パターンを検討した。接種 0 日目、4 日目においては、全てのウイルス血清型(DENV1-4)に対する中和抗体価が $<1:20$ (4 個体)。接種 14 日目の検体においては、感染ウイルス血清型(DENV-2)に対する中和抗体が Fc γ R 発現 BHK 細胞および非 Fc γ R 発現 BHK 細胞にて検出された (PRNT₅₀=10, 表 2)。しかし、感染血清型ウイルスと異なる血清型に対する中和抗体価は Fc γ R 細胞において検出されないまたは検出された場合でも中和抗体価は低かった

($\leq 1:40$)。

D. 考察

DENV 感染マーマセットモデルにおいては、高ウイルス血症、抗体上昇、肝機能・腎臓機能上昇 (AST, ALT, LDH, BUN)、血小板減少症、白血球減少症、体温上昇、活動低下などの Dengue 熱様兆候を呈していた。さらに、白血球数減少、LDH および AST 値の上昇は、Mock (非接種) と比較して、有意であることが確認できた。以上の結果より、白血球減少症などの症状は、DENV-2 感染によって誘導されたもので、採血や麻酔によるものの可能性は低い。

本研究では、DENV 皮下接種(DENV-2, 10^7 - 10^3 PFU/dose)によってウイルス血症、IgM・IgG および中和抗体上昇と典型的な Dengue 熱症状(血小板・白血球数減少、AST/ALT 上昇など)を呈するマーマセットモデルを確立した。しかし、全ての個体において、典型的な臨床症状が観察されなかった。症状に個体差があることについては、マーマセットもヒトと同様に遺伝的多様性であり、それらの違いが発症に関与していることが考えられる。

E. 結論

本研究により、Dengue ウイルス感染マーマセットモデルは、DENV 感染によってヒトにおける Dengue 熱に類似した血液学 (生化学、血球数) 的な変化および症状が出現することを明らかにした。さらに、我々は、一次感染におけるマーマセットの中和抗体価上昇パターンが Dengue 熱患者と類似することを証明した。以上の結果により、マーマセットを用いることにより、Dengue 熱・出血熱の病態解明および感染防御メカニズム解明が可能となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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).
2. 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).
3. 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).
4. モイメンリン, 高崎智彦. 感染症迅速診断キットの有用性と限界: デング熱. *小児科* 53(4). 457-465 (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. 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).

2. 学会発表

1) 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 FcγR-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)
- 2) 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 FcγR-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)
- 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