

201318010A (CD-R 1枚有)

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25年度 総括・分担研究報告書

平成26 (2014) 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25年度 総括・分担研究報告書

平成26 (2014) 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. キメラデング 1 型ウイルス様粒子の中和及び感染増強試験用抗原としての有用性評価 . . . 2 1
研究分担者：小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）
3. 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および
日本脳炎ウイルス亜型に対する中和能の評価 3 2
研究分担者：高橋和郎（大阪府立公衆衛生研究所副所長兼感染症部長）
4. 日本産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループ蚊種のチクングニアウイルス
感受性について 3 6
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）
5. ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の評価 4 6
研究分担者：澤邊京子（国立感染症研究所昆虫医科学部長）
6. デングウイルス霊長類モデル（マーモセット）の免疫学的解析系の評価 5 0
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）
7. デング熱・出血熱患者の尿検体における NS1 抗原に関する研究：デングウイルス NS1 抗原迅
速キットの有用性および限界の検討 5 7
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）
8. 複数デングウイルスによるデングウイルス重感染症の診断法開発に関する研究 6 3
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）
9. 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 7 0
研究分担者：永田典代（国立感染症研究所感染病理部第二室長）
10. 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 7 4
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）
11. 新規蚊媒介性ウイルス感染症の実験室診断と輸入症例の確認 8 3
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. 夏期の日本旅行後デング熱を発症したドイツ人デング熱患者症例と実験室確認診断 . . . 8 9
研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

III 研究成果の刊行に関する一覧表 9 5

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一部 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、2013 年には 249 例と感染症法施行後最高の報告数であった。2010 年以後は震災後の海外旅行者が減少した 2011 年を除いて、毎年 200 例以上のデング熱輸入症例が報告されている。2013 年 8 月に日本国内を旅行したドイツ人旅行者が、直行便でドイツに帰国後デング熱を発症した日本からのデング熱輸出症例の疑い症例が報告され、患者検体をドイツから取り寄せて確認検査を実施したところ、デングウイルス 2 型感染であることを確認した。

また、デング熱と類似の症状を来たす Zika 熱が 2007 年のミクロネシアでの流行以後、太平洋島嶼国、東南アジアで流行が散発している。2013 年 12 月にフランス領ポリネシア BoraBora 島から我が国への初めての Zika 熱輸入症例 2 例を病原体検査および中和抗体測定により確認した。今後 IgM 抗体検査法を確立する必要がある。また、チクングニアウイルスに近縁であるロスリバーウイルスによりオーストラリアで流行しているロスリバー熱の初輸入症例を 2013 年 5 月に確認し、IgM 抗体検査法を含めて実験室診断法がほぼ確立された。

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り、患者検体を用いて評価したところ生ウイルスを使った場合と高い相関を示した。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、ウイルス抗原を昆虫細胞発現ベクターにより増殖させた。

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。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) を開発してきたが、これを実際にデングウイルス、チクングニアウイルス感染マーモセットモデルにより応用した。

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。2013 年にはカリブ海諸国にも流行が波及し、アメリカ大陸への侵入の可能性もでてきた。我が国への輸入症例も 2013 年は 13 例であった。ヒトスジシマカにおいては DENV1 の高い増殖性が認められたが、一方で、DENV2 は、DENV1 に比べて増殖性が低いという結果が得られたが、1942-45 年の国内デング熱流行株がデングウイルス 1 型株であったこととの関連は明確ではない。また、チクングニアウイル

スに対する国内蚊感受性の検討の結果、ヒトスジシマカ以外にリバーズシマカとヤマダシマカも感受性を有することが明らかとなった。

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。特に接種前の日本脳炎抗体陰性接種者では抗体低下が顕著であった。

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、動画 DVD「デング熱の予防対策」を作製した。

研究分担者：

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、2013

年には 249 例と感染症法施行後最高の報告数となった。輸入症例中に毎年十数例の出血熱、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命的となる。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、継続している。また、2013 年にはカリブ海の諸国でもチクングニア熱が流行した。

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、海外渡航者や医療従事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。

B. 研究方法

1. 診断法の開発・評価

イムノクロマト法を用いたウイルス遺伝子抗原・抗体検査法の開発・応用・評価

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 Dengue ウイルス様粒子の作製技術を開発した。また、Dengue ウイルス NS1 抗原検出キットを用いて Dengue 熱患者血清、尿からの感度・特異性を検討した。

1 回感染性フラビウイルス粒子による中和試験の評価

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。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 領域に Dengue ウイルスの cDNA を CAG プロモーター下流に挿入して構築した。この粒子を用いて患者血清を用いて中和試験を実施し、生ウイルスを攻撃ウイルスにした場合と比較した。

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 2 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。また、日本脳炎ウイルス遺伝子 1 型、5 型に対する中和抗体を測定し、その力価を検討した。

3. 動物モデルの開発、病態解析

マーモセットの免疫学的解析法

Dengue 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、新世界ザルであり免疫学的背景は明らかでない部分は多い。平成 24 年度には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 を構築したが、今年度はこのアッセイ系を Dengue ウイルス 1 型感染マーモセットに応用した。

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。また、新

生仔マウスに Dengue 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. 新規蚊媒介性ウイルス感染症の診断法の検討と確立

ロスリバーウイルス (ロスリバー熱)、Zika virus のリアルタイム逆転写 PCR 法のプライマーおよびプローブセットをそれぞれ確立し、それぞれ IgM 捕捉 ELISA 法を作製した。

5. 媒介蚊感受性に関する検討

チクングニアウイルスのヒトスジシマカ、リバーズシマカ、ヤマトヤブカの感受性を胸部接種および経口摂食により感染させ、RT-PCR 法により検討した。日本国内産ヒトスジシマカの Dengue ウイルス 1 型、2 型臨床分離株の感受性を検討した。

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 Dengue 熱に関する意識調査や知識レベルの調査を行った。さらに、海外渡航者に Dengue 熱の予防法を具体的に理解してもらうため、動画 (DVD) 「Dengue 熱の予防対策」を作成し、動画はホームページでも閲覧可能にした。

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) 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。

デングウイルス NS1 抗原検出キット(ELISA キット、イムノクロマトキット)を評価した結果、特異性が高く感度も十分であった。感度の面では ELISA キットの方が、イムノクロマトキットよりも高かった。しかし、NS1 抗原イムノクロマトキットは病院で使用するキットとして有用であるという結果であった。また、感度がさがるが患者の尿から NS1 タンパク抗原を検出できることも明らかになった。

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 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上であり、2年間継続調査ができた全 142 名の幾何平均抗体価の推移は、ワクチン接種 1 か月後 91.7 から 1 年後には 20.9 と約 1/4 に低下し、2 年後には 8.59 と約 1/10 に低下した(表 1)。1 年後に抗体価が <10 となった陰転率は 23%であったが、2 年後には 39%(56/142) が陰転した。健常人における日本脳炎ワクチン接種 2 年後の幾何平均中和抗体価はわずか 9.4%まで減少し、陰転率も 39%と高く 1 年後の陰転率の約 2 倍となった。

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デングウイルス感染マーモセットへの応用と評価(生化学および免疫学の解析)

DENV1 感染マーモセットの免疫学的評価: DENV1 をコモンマーモセットに感染させたのち、感染後経日的に採血を行い、末梢 PBMC より RNA の抽出を行い、real-time PCR において TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-5、IL-10 の発現量の経時的観測を行った結果、感染後 2 日から 7 日の範囲で TNF- α 、IFN-

γ 、IL-5 の優位な上昇が認められた。

病理学的解析

VeroE6 細胞に継代した 4 つの血清型の臨床分離株を成マウスに接種し、その病原性を血液学的・組織学的に検討した。デングウイルス 2 型、3 型はマウスに対し一過性の血小板減少とヘマトクリット値の減少、体重の増加を引き起こしたが、いずれの個体も顕著な臨床症状や組織病変は示さなかった。

4. 新規蚊媒介性ウイルス感染症の診断法の検討と確立

ロスリバーウイルスを 4 株(T48 株、QML#1 株、QML#2 株、Couper 株)を入手した。ロスリバーウイルス(ロスリバー熱)のリアルタイム逆転写 PCR 法により、検出可能であることが確認された。ロスリバーウイルス抗原を作製して、IgM 捕捉 ELISA 法を立ち上げたところ、2013 年 5 月にオーストラリアからの初輸入症例を確認し、中和抗体陽性であった。

Zika 熱も 2013 年 12 月に同様にリアルタイム逆転写 PCR 法により、フランス領ポリネシア(ボラボラ島)からの輸入症例 2 例を確認し、2 例目の回復期血清の中和抗体陽性を確認し、その血清を用いて抗 Zika ウイルス IgM 捕捉 ELISA を構築した。

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して、2 年目までに評価が確立した RNA stable tube を用いて、Zika virus RNA および Ross River virus RNA を希望する地方衛生研究所に送付した。

5. 媒介蚊感受性に関する検討

チクングニアウイルスは、日本国内のヒトスジシマカだけでなくヤマトヤブカやリバーズシマカも感受性があることが明らかになった。国内産ヒトスジシマカはデングウイルス 1 型の方が 2 型に対して高い感受性を示した。

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」を改良した。また、東南アジア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。海外渡航者にデング熱の予防法を具体的に理解してもらうため、動画 (DVD) 「デング熱の予防対策」を作成し、動画はホームページでも閲覧可能にした。

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、検体前処理法の迅速簡易化、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ド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。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。また、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)、まず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。

媒介蚊ウイルス感受性に関しては、チクングニアウイルスが日本国内のリバーズシマカよヤマトヤブカにも感受性があることが確認された。また、デングウイルスのヒトスジシマカへの感受性に関して今回使用した株に関しては、デングウイルス 1 型のほうが 2 型より感受性が高かった。我が国で 1942-45 年に発生した流行が 1 型によるものであったこととの関連について今後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モ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。感染マーモ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°C、40°C 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、動画「デング熱の予防対策」<http://www.tra-dis.org/movie/index.html> を作成した。

F. 健康危険情報

2013 年 8 月に日本を旅行し帰国後 3 日目に発病したドイツ人デング熱症例は、その旅行日程とデング熱の潜伏期間から、日本国内で感染した可能性は否定しがたい。つまり、2013 年の夏に日本国内で小さなデング熱流行が発生した可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
1. Kwallah AO, Inoue S, Muigai AW, Kubo T, Sang R, Morita K, Mwau M., A real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of yellow fever virus. *J Virol Methods.* ;Vol.193(1):23-27. 2013
2. Ngwe Tun MM, Thant KZ, Inoue S, Kurosawa Y, Lwin YY, Lin S, Aye KT, The Khin P, Myint T, Htwe K, Mapua CA, Natividad FF, Hirayama K, Morita K. Serological characterization of dengue virus infections observed among dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in Upper Myanmar. *J. Med. Virol.* Vol.85:1258-1266, 2013
3. Hayasaka D, Aoki K, Morita K. Development of simple and rapid assay to detect viral RNA of tick-borne encephalitis virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal* Mar 4;10:68. 2013
4. Hayasaka D, Shirai K, Aoki K, Nagata N, Simantini DS, Kitaura K, Takamatsu Y, Gould E, Suzuki R, Morita K. TNF- α acts as an immunoregulator in the mouse brain by reducing the incidence of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. *PLoS One.* August 5;8(8):e71643. 2013
5. Nguyen Thanh Thuy, Tran Quang Huy, Phan Thi Nga, Kouichi Morita, Irene Dunia, Lucio Benedetti. A new nidovirus (NamDinh virus NDiV): Its ultrastructural characterization in the C6/36 mosquito cell line. *Virology* Vol.444, 337-342, 2013
6. Basu D. Pandey, Takeshi Nabeshima, Kishor Pandey, Saroj P. Rajendra, Yogendra Shah, Bal R. Adhikari, Govinda Gupta, Ishan Gautam, Mya M. N. Tun, Reo Uchida, Ichiro Kurane and Kouichi Morita. First Isolation of Dengue Virus from the 2010 Epidemic in Nepal. *Tropical Medicine and*

- Health Vol. 41 No. 3: 1-9, 2013
7. 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)
 8. ○Yuki Takamatsu, Leo Uchida, Phan Thi Nga, Kenta Okamoto, Takeshi Nabeshima, Dang Thi Thu Thao, Do Thien Hai, Nguyen Thi Tuyet, Hoang Minh Duc, Le Xuan Luat, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. An approach for differentiating Echovirus 30 and Japanese encephalitis virus infections in acute meningitis/encephalitis: a retrospective study of 103 cases in Vietnam. *Virology Journal* 10:280, 2013
 9. Galectin-9 Plasma Levels Reflect Adverse Hamatological and Immunological Features in Acute Dengue Virus Infection *J.Clin.Virol.* Vol.58. 635-640, 2013
 10. ○Yuki Takamatsu, Kenta Okamoto, Duc Tuan Dinh, Fuxun Yu, Daisuke Hayasaka, Leo Uchida, Takeshi Nabeshima, Corazon C. Buerano and Kouichi Morita, NS19 protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs, *Journal of General Virology*, 95, 373–383. 2014
 11. Moi ML, Omatsu T, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Presence of viral genome in urine and development of hematuria in common marmosets (*Callithrix jacchus*) after inoculation with dengue virus. *Pathogens*, 2,357-363,2013.
 12. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Efficacy of tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. *Lancet*, 381,9872,1094, 2013.
 13. Moi ML, Omatsu T, Tajima S, Lim CK, Kotaki A, Ikeda M, Harada F, Ito M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Detection of dengue virus non-structural protein 1 (NS1) by using ELISA as a useful laboratory diagnostic method for dengue virus infection of international travellers. *Journal of Travel Medicine*, 20,3,185-193,2013.
 14. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Infection-enhancement activity in dengue patients using undiluted serum samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107,51-58,2013.
 15. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Takasaki T. Diagnosis of viral haemorrhagic fevers in travelers returning from West Africa. *Journal of Travel Medicine*, 20(1), 63-64, 2013.
 16. Tochtani K, Shimizu T, Shinohara K, Tsuchido Y, Moi ML, Takasaki T. Ross River virus - Japan ex Australia: (VI). ProMed, promed archive no. 20130616.1776324, 2013.
 17. Yamaji H, Konishi E. Production of Japanese encephalitis virus-like particles in insect cells. *Bioengineered*. 4 (6) :438-442, 2013
 18. Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Correlation between complement component levels and disease severity in dengue patients in Indonesia. *Jpn J Infect Dis.* 66, 366-374, 2013
 19. Yamanaka A, Thongrunkiat S, Ramasoota P, Konishi E.: Genetic and evolutionary analysis of cell-fusing agent virus based on Thai strains isolated in 2008 and 2012. *Infect Genet Evol.* 19, 188-194, 2013
 20. Sjataha F, Takizawa Y, Kotaki T, Yamanaka A, Konishi E.: Comparison of infection-neutralizing and -enhancing antibody balance induced by two distinct genotype strains of dengue virus type 1 or 3 DNA vaccines in mice. *Microbes Infect.* 15, 828-836, 2013

21. Yamanaka A, Kotaki T, Konishi E: A Mouse Monoclonal Antibody against Dengue Virus Type 1 Mochizuki Strain Targeting Envelope Protein Domain II and Displaying Strongly Neutralizing but Not Enhancing Activity. *J Virol.* 87, 12828-12837, 2013
22. Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Chimera: Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol.* 95, 60-65 2014
23. Sjatha F, Kuwahara M, Sudiro TM, Kameoka M, Konishi E: Evaluation of chimeric DNA vaccines consisting of pre-membrane and envelope genes of Japanese encephalitis and dengue viruses as a strategy for reduced induction of dengue virus infection-enhancing antibody response. *Microbiol Immunol.* 2013 Dec 20. doi: 10.1111/1348-0421.12125. [Epub ahead of print]
24. Eiji Konishi: Memory B cells: a proposed new immunological correlate for protective efficacy of Japanese encephalitis vaccine. *Expert Review of Vaccines* 12, 871-873, 2013
25. Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 440:515-20, 2013
26. Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem.* 288:31715-272013, 2013
27. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog.* 9(8): e1003589, 2013
28. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus in Vitro. *PLoS ONE*, 8(7):e68992, 2013
29. Yoshii K, Moritoh K, Nagata N, Yokozawa K, Sakai M, Sasaki N, Kariwa H, Agui T, Takashima I. Susceptibility to flavivirus-specific antiviral response of Oas1b affects the neurovirulence of the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus. *Arch Virol.* 2013. 158:1039-1046
30. 森田公一、デング熱と vector-borne diseases、化学療法の領域、Vol. 29 (8): 25-32, 2013
31. 森田公一、デング熱、臨床と研究 90:12号 18-22、2013
32. 鈴木亮介、小西英二: フラビウイルスのリバーシジェネティクス、「ウイルス」63巻1号、13-22、2013
33. 小西英二: デング熱・デング出血熱と生体防御: 世界初のデングワクチン防御効力試験の成績に鑑みて。感染・炎症・免疫 43巻1号、2-9頁、2013
34. 石川 知弘、小西 英二: デングウイルス感染症: 治療薬開発の現状と課題。化学療法の領域 29巻増刊号『新興・再興感染症 up to date』、153-159頁、2013
35. Moi ML, Saijo M. 抗アルボウイルス薬. *臨床と微生物.*40(1), 69-73, 2013.
36. 森田公一、デング熱の世界的な流行と予防対策に関する将来的展望. *化学療法の領域.* Vol.30 (2). 275-281. 2014
37. 濱田篤郎、山口佳子: デング熱の予防対策. *バムサジャーナル* 26: 掲載予定, 2014

38. 濱田篤郎：海外旅行時の感染症対策. *Infection Control* 22:105-108, 2013
39. 濱田篤郎：海外渡航者への感染症予防対策. *都薬雑誌* 35:4-9, 2013
40. 濱田篤郎：海外渡航中に注意する健康問題と予防法. *国際人流* 2013.12: 4-8. 2013
2. 学会発表
(国際学会)
1. 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. Fifth WHO Informal Japanese Encephalitis Laboratory Meeting. (Tokyo) November, 2013.
2. Moi ML, Kurane I, Takasaki T. Development of tools for advancing dengue pathogenesis and vaccine research. Malaysia-Japan Academic Scholar Conference. (Tokyo) November, 2013
3. Moi ML, Lim CK, Nakayama E, Tajima S, Kotaki A, Ikeda M, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Imported cases of chikungunya and Ross River fever in Japan. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013
4. Lim CK, Takasaki T, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Chua KB, Saijo M, Kurane I. Molecular analysis of Chikungunya virus in Malaysia. *Chikungunya*, 2013. (Langkawi, Malaysia) October, 2013.
5. Ryosuke Suzuki, Eiji Konishi, Tomohiro Ishikawa, Mami Matsuda, Koichi Watashi, Hideki Aizaki, Tomohiko Takasaki, Takaji Wakita: Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with a DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Positive Strand RNA Viruses meeting. Boston, April 2013.
6. 山中敦史、小西英二：キメラデングウイルス様粒子抗原の中和及び感染増強試験における有用性評価：第54回日本熱帯医学会。2013年10月。
7. Eiji Konishi: Current Status of Dengue Vaccine Development. Seminar on Infectious Diseases: Networking for the Promoting One World, One Health for a Better Tomorrow, Prevention and Treatment using Natural Products, Vaccines and Antivirals. Surabaya, Indonesia, October 2013.
8. Atsushi Yamanaka, Chayanee Setthapramote, Pongrama Ramasoota, Pannamthip Pitaksajakul and Eiji Konishi: Preliminary evaluation of a novel DNA vaccine candidate expressing dengue neutralizing antibody. Joint International Tropical Medicine Meeting 2013. Bangkok, 2013.
9. Soegeng Soegijanto, Kris Cahyo Mulyatno, Siti Churotin, Amaliah Labiqah, Teguh Hari Sucipto, Tomohiro Kotaki, Masanori Kameoka, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka: Molecular Epidemiology of Dengue Virus in 4 Cities of East Java, Indonesia. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2014. 2014年1月。
10. Aizaki H, Watanabe N, Aoyagi H, Watashi K, Suzuki R, Kojima S, Matsuura T, Wake K, Suzuki T, Wakita T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. 17th International Symposium on cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka, Japan. 2013.9.23-25.
11. Ito M, Ito N, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Loss of susceptibility to HCV infection and decreased tumorigenicity mediated by reprogramming of human hepatoma cells. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.

12. Shi G, Ando T, Suzuki R, Ito M, Wakita T and Suzuki T. Possible mechanism for selective packaging of HCV genome into the infectious particles. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
 13. Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Isolation of a natural compound which can reduce infectious HCV production by inhibiting of liver X receptor. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
 14. Kazuo Takahashi, Ikuko Aoyama, Takahiro Yumisashi, Tetsuo Kase, Tomohiko Takasaki Antibody response and its durability of cell culture-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese healthy adults. 7th International Conference of Vaccinology, October, 2013 (Barcelona)
 15. Yuki Eshita, Junya Yamagishi, Josef Tuda, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Arthur E. Mongan, Yutaka Suzuki (2013) : Application of molecular biology methods for the analysis of tropical diseases in Manado. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12-14日(土)、(インドネシア)
 16. Junya Yamagishi, Anna Natori, Mohammed E. M. Tolba, Arthur E. Mongan, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Yuki Eshita, Josef Tuda, Yutaka Suzuki (2013) : A Description of Malaria by Transcriptome. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12-14日、(インドネシア)
 17. Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Junya Yamagishi, Mihoko Imada⁴, Ryuichiro Maeda, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Comprehensive gene expression analysis of dengue-infected *Aedes aegypti* and novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12日(木)-14日(土)、(インドネシア)
- (国内学会)
1. 森田公一：シンポジウム「新興・再興感染症と生体防御」デング熱・デング出血熱、第24回日本生体防御学会学術総会、平成25年7月10～12日、熊本市
 2. Ernest W. Apondi, Koki Taniguchi, Satoshi Komoto, Yoshimasa Maeno, Mitsutaka Wakuda, Mohammad Shah, Kouichi Morita, Yoshio Ichinose: Detection and molecular characterization of rotavirus strains from diarrhoeal children in Kiambu, Kenya, between 2009 and 2011. 第66回日本細菌学会九州支部総会 第50回日本ウイルス学会九州支部総会、長崎、2013年9月6～7日
 3. 青木康太郎, 早坂大輔, Mya Myat Ngwe, 嶋田聡, 森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の分析, 第66回日本細菌学会九州支部総会 第50回日本ウイルス学会九州支部総会、長崎、2013年9月6日～9月7日
 4. 余福勲, Ferdinard Adungo, 内田玲麻, 井上真吾, 森田公一：Preparation of genetically-engineered antigen of RVF virus for development of antibody-detecting diagnostic test kits. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸、2013年11月10～12日
 5. 早坂大輔, 青木康太郎, Mya Myat Ngwe Tun, 嶋田聡, 森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸、2013年11月10～12日
 6. 高松由基, 岡本健太, Dihn Tuan Duc, 余福勲, 早坂大輔, 内田玲麻, 鍋島武, Corazon C Buerano, 森田公一：日本脳炎ウイルスのNS1'タンパク質は、鳥細胞でのウイルス産生を増加させる。第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸、2013年11月10-12日
 7. 安倍智子, 左一八, 梅原薫、

- Sabaratnam S. Vikineswary, 森田公一, 野口博司, 鈴木隆: オオヒラタケ熱水抽出物によるデングウイルス感染阻害。第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10 日~11 月 12 日
8. 小瀧将裕, 山中敦史, 小西英二, 亀岡正典: インドネシア国スラバヤ市におけるデングウイルスの分子疫学調査 2008-2013。第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2013 年 11 月 (神戸市)。
 9. 鈴木亮介, 小西英二, 石川知弘, 嵯峨涼平, 松田麻未, 渡士幸一, 相崎英樹, 高崎智彦, 脇田隆字: 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。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 (神戸市)。
 10. 山中敦史, 小西英二: デング中和抗体発現型ワクチンのマウスにおける基礎的評価。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 (神戸市)。
 11. Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: TNF- α and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice following tick-borne encephalitis virus infection. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10~12 日 (神戸市)
 12. Nguyen Thi Thu Thuy, Takeshi Nabeshima, Guillermo Posadas-Herrera, Dang Thi Dinh, Maria Terrese G. Alonzo, Lady-Anne C. Suarez, Mya Myat Ngwe Tun, Nguyen Le Khanh Hang, Pham Hoai Linh Ly, Le Thi Quynh Mai, Corazon C. Buerano, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita: Changing Pattern of DENV Serotypes in Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 新興・再興感染症に関する アジア・アフリカリサーチフォーラム 2014, 仙台, 2014 年 1 月 20~22 日
 13. Thuong Van Nguyen, Lan Nguyen Thi Phuong, Thanh Le Chi, Thang Minh Cao, Nhon Cao Thi My, Nhung Cao Thi Hong, Mai Thi Nguyen, Truong Quang Nguyen, Ngu Vu Thien Thu, Quoc Kien Do, Ha Tran Thi Ngoc, Huy Tien Nguyen, Ton Tran, Mihoko Kikuchi, Quang Chan Luong, An Van Tran, Huong Vu Thi Que, Kouichi Morita, Kenji Hirayama: Cell-mediated Immunity in Dengue Virus Infection – Increase of Activated Th1 and CD8 Effector T Cells on Day -1 of Defervescence Indicates Protection against Severe form of Dengue. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム 2014, 仙台, 2014 年 1 月 20~22 日
 14. Mitsuru Toda, Ian Njeru, Shikanga O-Tipo, David Kareko, Matilu Mwau, Shingo Inoue, Yoshio Ichinose, Kouichi Morita: Establishing a Disease Outbreak Alert System in Kenya: Findings from the Baseline Survey. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム 2014, 仙台, 2014 年 1 月 20 日~1 月 22 日
 15. Kouichi Morita, Mosquito-transmitted Disease Consortium; Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, January 23-24., Tokyo, Japan 2013
 16. 高崎智彦, モイメンリン, 網康至, 須崎百合子, 大松勉, 平山隆則, 田島茂, 林昌宏, 中村紳一郎, 片貝裕子, 吉田友教, 明り宏文, 白井顕治, 北浦一孝, 藤井克樹, 鈴木隆二, 西條政幸, 倉根一郎. マーモセットを用いたデングウイルス感染病態解析. 第 3 回マーモセット研究会 (福岡市) 2013 年 12 月
 17. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I, Takasaki T. Development of a novel non-human primate model for secondary dengue virus infection using

- marmosets (*Callithrix jacchus*). 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月
18. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討. 第61回日本ウイルス学会学術集会 (神戸) 2013年11月
 19. 齋藤悠香、モイメンリン、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する中和活性および感染増強活性の検討. 第20回トガ・ペスチ・フラビウイルス研究会 (神戸) 2013年11月
 20. 栃谷健太郎、清水恒広、篠原浩、土戸康弘、高崎智彦、モイメンリン、オーストラリア渡航中に発症した本邦初のロスリバーウイルス感染症1例. 第56回日本感染症学会西日本地方学会学術集会 (大阪) 2013年11月
 21. Moi ML, Lim CK, Kurane I, Saijo M, Takasaki T. Towards a safe and effective dengue vaccine: assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers using a novel assay by FcγR-expressing cells. 54th Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine. (Nagasaki) October, 2013.
 22. Takasaki T, Ikeda M, Yagasaki K, Moi ML, Nakayama E, Kotaki A, Saito Y, Tajima S, Kurane I, Jee Y. JE as a vaccine preventable disease: laboratory network organized by WHO. 第48回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (熱海, 静岡) May, 2013.
 23. Eiji Konishi: Dengue vaccine development: current status and future challenges. 第54回日本熱帯医学会シンポジウム. 2013年10月.
 24. 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆宇. プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型1回感染性フラビウイルス産生系の確立. 日本分子生物学会第36回年会, 2013年12月3-6日 (神戸市).
 25. 高橋和郎、加瀬哲男、高崎智彦. 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の持続効果. 第17回日本ワクチン学会学術総会 2013年11月 (三重県、津市)
 26. Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2013): The application of next generation sequencer in investigating the relationship of dengue virus and its vector. 第6回寄生虫感染免疫研究会、2013年3月8-9日、大分県由布市、大分大学医学部看護学科棟. 第6回寄生虫感染免疫研究会プログラム講演要旨: 22, 2013
 27. 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 RNA-seq Data Using qRT-PCR. 第65回日本衛生動物学会大会、2013年4月6-7日、(北海道江別市)。Med. Entomol. Zool., 64 (大会特集号): 40, 2013.
 28. 江下優樹, 松原祥恵, Lucky R. Runtuwene, 野口香緒里, 川上絵理, 大塚靖, 福田昌子, 小林隆志, 高崎智彦, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, Bouasy Hongvanthong, 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 (2013): 節足動物媒介性ウイルスの迅速検出への RT-LAMP法の改良. 日本家屋害虫学会 第34回大会・総会、2013年6月22-23日、(神奈川県藤沢市)。
 29. Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Sachie Matsubara, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Arthur E. Mongan, Josef Tuda, Mihoko Imada, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro

- Maeda, Chihiro Sugimoto, Hironari Narita, Hiroshi Ushijima, Koichi Morita, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane (2013) : INOVATIVE TECHNOLOGY FOR USE IN VECTOR CONTROL. “The 1st conference on Asian pediatric infectious diseases(第1回アジア小児感染症会議)”、2013/8/24-26、(東京)
30. Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga¹, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Comprehensive Gene Expression Analysis of Dengue-Infected Mosquitoes. “The 1st conference on Asian pediatric infectious diseases(第1回アジア小児感染症会議)”、2013年8月24-26日(東京)
31. Yuki Eshita, Lucky Runtuwene, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Rawewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Mihoko Imada, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Hiroshi Ushijima, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki : APPLICATION OF NEW TECHNOLOGIES FOR USE IN VECTOR CONTROL. Professor Polly Roy Group Reunion for celebrating 30 years of research in the Roy Laboratory, The Queen’s College, University of Oxford, 9/13-15, 2013.(イギリス)
32. 江下優樹、福田昌子、Lucky Runtuwene、大塚 靖、野口香緒里、川上絵理、徳永暁憲、小林隆志、服部正策、Rawewan Srisawat、Narumon Komalamisra、牛島廣治、倉根一郎、高崎智彦 (2013) : 本邦産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループ蚊2種のチクングニアウイルス感受性。第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2-3、(大分市)。第66回日本寄生虫学会・第63回日本衛生動物学会南日本支部合同大会
33. Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013): Potential novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. 第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2-3日、(大分市)
34. 佐々木年則、比嘉由紀子、ベンツーツ Gアーリン、伊澤晴彦、高崎智彦、皆川昇、澤邊京子、国内外で捕集された蚊のデングウイルス感受性、第66回日本衛生動物学会大会、2014年3月22日、(岐阜)
35. 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
36. 北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、倉根一郎、鈴木隆二：コモンマーモセットにおけるTCRレパトア解析法の開発。第59回日本実験動物学会総会(別府)2012年5月24-26日
37. 北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、亀谷美恵、倉根一郎、鈴木隆二：コモンマーモセットにおけるリアルタイムPCRを用いた免疫関連遺伝子発現解析。第60回日本実験動物学会総会(つくば)2013年5月15-17日
38. 永田典代、小島朝人、鈴木忠樹、岩田奈織子、小谷治、佐藤由子、佐多徹太郎、長谷川秀樹：デングウイルスVeroE6継代株のマウスに対する病原性。第61回日本ウイルス学。2013年11月(神戸)

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診断法の研究

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年次に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製技術を開発した。最終年次の本年度の研究では、過去2年間に得た経験を活用して、デングウイルスとの鑑別診断が必要な日本脳炎などの他のフラビウイルスについてのLAMP法の作成やウイルス様粒子作製法の構築を実施し、加えてこれまでに開発したチクングニアウイルスの迅速検出技術をミャンマー国で活用してチクングニアウイルスの検出を実施して、ミャンマーに初めて、ECSA型（East Central South African genotype）が侵入したことを明らかにした。

A. 研究目的

我が国に侵入することが危惧される蚊媒介性ウイルス感染症のうち、特にデングウイルス感染やチクングニアウイルス感染等の簡便、迅速な診断手法の開発すること。またこれらのウイルスに対する抗体検出系診断薬に利用することのできる、安全、安価な診断抗原を作成するため、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、加えて試作した手法を疾病流行地域で活用しその有用性について検討することを目的と

した。

B. 研究方法

1. 診断薬評価のためのウイルス調査

2010年7月～10月にミャンマー国、Mandalay小児病院をデング熱疑いで受診した患者のうちインフォームドコンセントが得られた116例の患者サンプルを得た。ウイルス特異的血清IgM、IgG検査、本研究で開発したLAMP法やRT-PCR法によりウイルス遺伝子の検出を実施し、併せて検体の一部をヒトスジシマカ培養細胞クローン

C6/36 細胞に接種しウイルス分離を実施した。分離されたチクングニアウイルスについては E 1 遺伝子部分の塩基配列を決定し MAFFT, version 7.058b によりアラインメントを調整して、Bayesian MCC tree (version 3.1.2) と FigTree software (version 1.4.0.) を用いて樹状解析を実施した。

(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受け実施した。

2. 診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

昆虫細胞発現ベクターである pIB/V5-His (Invitrogen 社製) のクローニング部位に日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス等のフラビウイルスの PrM-E 遺伝子部分の cDNA を挿入して発現系を構築し、blasticidin により高発現細胞を選択して増殖培養して安定発現系を作製した。また、抗原発現細胞は蛍光免疫染色法にて発現の有無を確認したのち、培養液中に放出される抗原を ELSIA 法に用いて、ウイルス培養上清のウイルス抗原量と比較評価した。

(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. デング熱、チクングニア熱流行地域での

血清診断と分離ウイルスの分子疫学解析

116 例の患者の血清抗体検査では特異的 IgM 検査において、チクングニア陽性 (5.2%)、デング陽性 (47.4%)、両方陽性 (6%) であった。特異的 IgG 検査ではチクングニア陽性 (14.6%)、デング陽性 (48.2%)、双方陽性 (7.7%) であった。

ウイルス検査については 4 検体でチクン

グニアウイルス遺伝子陽性検体があり、C6/36 細胞接種によりウイルスが 4 株分離された。E 1 遺伝子 (遺伝子番号 9952-11271) の塩基配列を決定し登録した (GenBank accession numbers- KF 590564, KF 590565, KF 590566, KF 590567)。これらの配列を樹状解析したところ、有史以来はじめてミャンマー国にアフリカのチクングニアウイルス ECSA 型 (East Central South African genotype) が侵入していたことが判明した。(図 1)

2. 診断用抗原(ウイルス様粒子)作製

昆虫細胞を用いて、日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルス(野生株)の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 2)。その他、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの遺伝子検出の為の LAMP 法が作成できた。

D. 結論

ミャンマー国で臨床的にデング熱が疑われた患者の血清抗体検査により 47.4% はデングウイルス感染であることが確認できたが、5.2% はチクングニアウイルス感染であった。また 4 例ではチクングニアウイルスが分離され系統樹解析の結果、アフリカ由来の ECSA 遺伝子型が同国に侵入したことが判明した。

昨年度開発した昆虫細胞を用いた、デングウイルス様粒子の作製手法を応用して日本脳炎ウイルス、黄熱ウイルスなど蚊媒介性フラビウイルスのウイルス様粒子の作製手法が確立し、安価で安全な診断用抗原が作成できることが示された。