

## E. 考察

ミャンマー国への侵入が確認されたアフリカ由来のチクングニアウイルス(ECSA型)は2008年-2009年に近隣のマレーシア、タイ、2010年には中国に侵入したことが確認されており、ミャンマー国へはこれらの近隣諸国から伝搬した可能性が高い。この系統のウイルスは従来のアジアで流行しているチクングニアウイルスよりも高い病原性を持つことが示されており今後、この系統のウイルスの拡大や我が国への伝搬には留意する必要がある。

デングウイルスをはじめとして、蚊媒介性フラビウイルスは世界的に拡大傾向にある。本年も、多くのデング熱輸入例が報告されているが、新たにデング熱と近似の症状を呈する Zika ウイルスの輸入例が確認された。本研究班の研究で開発したフラビウイルスのウイルス粒子様抗原作製技術は安全、安価な診断用抗原作製法として、このようなフラビウイルスの診断系開発にも有用であると思われる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

Ngwe Tun MM, Thant KZ, Inoue S, Kurosawa Y, Lwin YY, Lin S, Aye KT, Thet 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

○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

○Hayasaka D, Shirai K, Aoki K, Nagata N, Simantini DS, Kitaura K, Takamatsu Y, Gould E, Suzuki R, Morita K. TNF- $\alpha$  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

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

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

森田公一、デング熱と vector-borne diseases、  
化学療法領域、Vol.29 (8): 25-32, 2013

○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

Galectin-9 Plasma Levels Reflect Adverse  
Hamatological and Immunological Features in  
Acute Dengue Virus Infection *J.Clin.Virol.*  
Vol.58. 635-640, 2013

森田公一、デング熱、臨床と研究 90:12号  
18-22、2013

○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

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. 化学療法領域.  
Vol.30 (2). 275-281. 2014

## 2. 学会発表

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 日～12 日、熊本市

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 日～9 月 7 日

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

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 日～11 月 12 日  
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 日～11 月 12  
日

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 日~11 月 12 日

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

Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: TNF- $\alpha$  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, 神戸, 2013 年 11 月 10 日~11 月 12 日

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 日~1 月 22 日

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 日~1 月 22 日

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

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

図1. ミャンマーで分離されたチクングニアウイルスの分子疫学解析：2010年に流行した株（図では This study）は ECSA (East Central South African) genotype に属している。

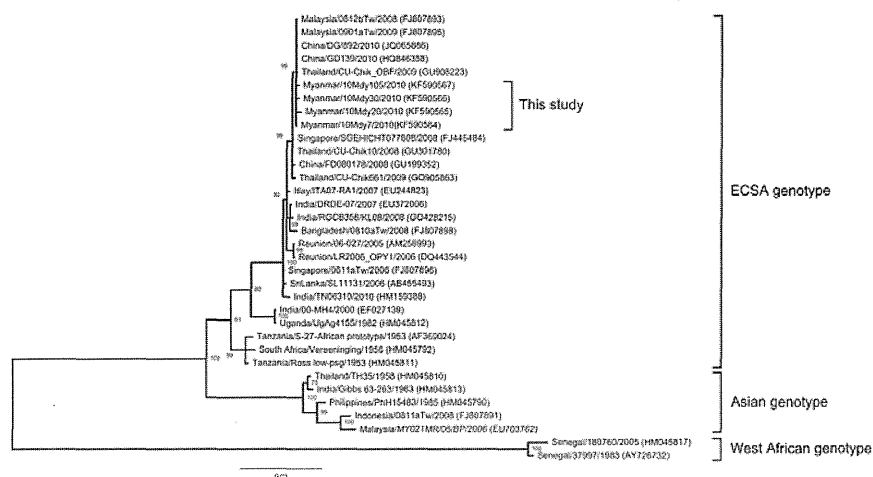
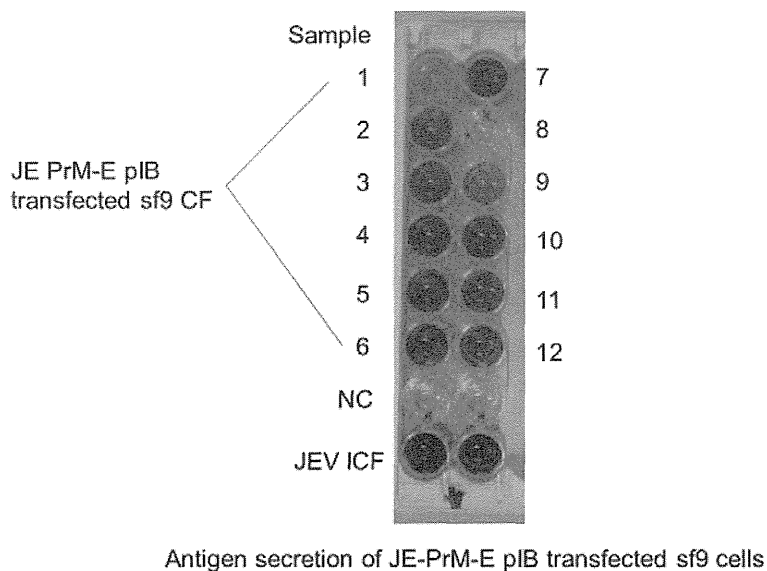


図2. ウイルス粒子様抗原の力価：日本脳炎ウイルス感染培養液（JEV ICF）と同等の抗原力価を示すウイルス粒子様抗原の持続発現細胞が確立された。



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

キメラ Dengue 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

研究分担者 小西 英二（国立大学法人大阪大学・タイ国マヒドン大学）  
研究協力者 鈴木 亮介（国立感染症研究所）  
山中 敦史（国立大学法人大阪大学・タイ国マヒドン大学）

**研究要旨** アルボウイルスは世界に分布する病原体であるが、ウイルスの国境を超える移動の制限は大きいため、遺伝子情報のみで容易に診断用抗原が作出できる方法が、ワクチンの評価や診断系の開発に必要である。昨年度は、日本脳炎ウイルス（JEV）レプリコンプラスミドを作製して1回感染性のウイルス様粒子（SRIP）産生系を確立し、他のフラビウイルスの表面蛋白を有するキメラ SRIP も作製できることを示した。本年度は、Dengue 1 型ウイルス（DENV-1）の表面蛋白を有するキメラウイルス様粒子（D1-SRIP）が、中和試験及び感染増強試験に使用できるかどうかを評価した。昨年度に作製された D1-SRIP は収量が低かったため、JEV レプリコンプラスミドを改良して産生量を約 10 倍高めた。Dengue 流行地のヒト血清及びマウスモノクローナル抗体を対象として、この D1-SRIP を抗原とした中和試験及び感染増強試験を行い、本来の DENV-1 抗原を用いて得られた値と比較した。その結果、中和試験及び感染増強試験共に、両抗原で同様の値が得られ、相関係数が 0.9 以上の高値であった。この結果は、D1-SRIP が DENV-1 の代替抗原として抗体機能試験に使用可能であることを示す。

#### A. 研究目的

「安全保障貿易管理」や「生物多様性条約に基づくアクセスおよび利益配分」が重視される昨今、国境を超えるウイルスの運搬には制限があり、他国で分離されたウイルスを入手することは困難となってきた。一方で、多くの海外渡航者が現地で流行しているウイルスを輸入感染症として国内に持ち込む可能性も増大しているため、診断用抗原として海外のウイルスを用いる必要性も生じる。そこで、遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルスを容易に作製で

きる系の確立は、大きな意義を持つ。

Dengue 熱（DF）や Dengue 出血熱（DHF）は国際感染症であり、主に熱帯・亜熱帯地域に分布する主要媒介蚊であるネッタイシマカの刺咬によりヒトに伝播する。約 25 億人が感染リスク下にあるため、世界の中で最も重要な蚊媒介性ウイルス感染症として位置付けられる。原因となる Dengue ウイルス（DENV）には 4 つの血清型が存在し（DENV-1~DENV-4）、いずれもフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される。

わが国では輸入感染症として 1999 年から

2009年まで概ね年間100例までの患者が発生してきたが、2010年以降は2011年を除き200例以上が報告され、症例数は増加傾向にある。媒介蚊の1種であるヒトスジシマカが東北以南に生息するため、活動期にウイルス血症の患者を吸血し、ウイルスの生活環が形成される可能性がある。最近、国内伝播を示唆する患者発生が報告された。DFやDHFのコントロールは重要であるが、治療薬やワクチンは開発途上にある。

DFからDHFへの重症化機序に関して未だ定説はないが、抗体依存性感染増強(ADE)が最も可能性の高い仮説として認められている。血中のウイルス量を低減する中和抗体と上昇させる感染増強抗体の測定は、ワクチン開発や患者の診断、国民のリスクアセスメントや病原性の解明などのために必須である。そして、これらの抗体を測定する試験(中和試験や増強試験)においては、国外の種々ウイルス株の抗原が必要となる。

近年の遺伝子工学の発展により、遺伝子情報からウイルスを作出することが可能となった。しかし、感染性クローンを作製することは容易ではなく、また入手できるデングウイルスの配列はエンベロープ(E)領域が主である。このため、限られた情報で本来のウイルスと同様の表面抗原構造を持つウイルスを容易に作製する技術の確立が望まれる。E領域は遺伝子系統解析の対象に使用されることが多く、GenBankに登録されている情報も主にE領域である。幸いにE蛋白はウイルス表面の主要蛋白であり、中和抗体や増強抗体のエピトープを多く含んでいるため、この領域の遺伝子情報で、他国のウイルスと同様の抗原性を有する粒子を作製することは理論的に可能である。

昨年度は、日本脳炎ウイルス(JEV)レプリコンプラスミドを用いて1回感染性ウイルス様粒子(JEV-SRIP)の作製に成功した。さらに、他のフラビウイルスの表面蛋

白を有するキメラSRIPも作製できることを示した。ところが、これまでの作製方法では抗体の機能試験を行えるだけの十分な感染力価は得られなかった。本年度は、デング1型ウイルス(DENV-1)の表面蛋白を有するキメラウイルス様粒子(D1-SRIP)の産生量を増加させるための改良をJEVレプリコンプラスミドに加え、産生されたD1-SRIPを用いて中和試験及び感染増強試験を行い、抗体の機能試験におけるD1-SRIPの実用性を評価した。

## B. 研究方法

**D1-SRIPの作製**：昨年度は3種類のプラスミドを293T細胞にコトランスフェクションしてD1-SRIPを作製した(図1A)。すなわち、JEVレプリコンプラスミドとして、JEV(中山株)ゲノムからカプシド(C)領域の大部分、全長の前駆膜(prM)そしてE領域の大部分を除いた遺伝子がレプリコンとして細胞内で複製されるように設計されたpCMV-JErepを用いた。このプラスミドを、JEVの全長のC蛋白を発現するpCAG-JECとDENV-1(望月株)由来の全長のprM/E蛋白を発現するpcD1MEとコトランスフェクションすることにより補完し、D1-SRIPの産生を導いた。

本年度は、JEVレプリコンプラスミドとして、JEVゲノムにおける全長のC領域は保存し、全長の前駆膜(prM)と大部分のE領域のみを除いたpCMV-JErep-fullC(図1A)を用い、pcD1MEで補完した。すなわち、D1-SRIPの作製のために上記2種類のプラスミドを293T細胞にコトランスフェクションし、3~7日目の培養上清を中和試験及び増強試験の抗原として用いた。

**D1-SRIPの感染力価測定法**：293T細胞にコトランスフェクションして得られた培養上清中のD1-SRIP量は、感染力価として測定した。具体的には、96穴プレートに段階希釈した培養上清を用意して、準接着系

K562 細胞の浮遊液を加えた。2 日後に接着した細胞層を固定し、抗 NS1 抗体を用いた免疫染色を行い、感染細胞を計数して感染力価を求めた。ミリリットルあたりの感染単位 (IU/ml) として表した。

**抗体：**デング流行地域のヒト血清及びマウス抗 DENV-1 モノクローナル抗体を用いた。

**増強試験：**96 穴プレート中で段階希釈した抗体と抗原 (DENV-1 または D1-SRIP) を混合し、37°C で 2 時間保温した後に、準接着系 K562 細胞を加えた。2 日後に抗 NS1 抗体を用いた免疫染色を行いプラークまたは感染細胞を計数した。実験群で得られたプラーク・感染細胞数を、抗体を含まない陰性対照のプラーク・感染細胞数が 100 になるように換算した。また、これらの活性は補体レベルに依存することがあるため、抗原・抗体混合液に補体を含む系 (C'(+) と表示) と含まない系 (C'(-) と表示) で行った。

**中和試験：**96 穴プレート中で段階希釈した抗体と抗原 (DENV-1 または D1-SRIP) を混合し、37°C で 2 時間保温した後に、Vero 細胞を加えた。2 日後に抗 NS1 抗体を用いた免疫染色を行い、プラークまたは感染細胞を計数した。抗体を含まない陰性対照で得られた平均値からの減少率を % で表し、50% プラーク (または感染細胞) 数減少を示す希釈度 (PRNT50) を中和抗体価とした。中和試験も、C'(+) と C'(-) の系で行った。

(倫理面への配慮)

ヒト血清の使用には、実験実施場所であるタイ国マヒドン大学熱帯医学部の倫理委員会から承認を受けた。

### C. 研究結果

**D1-SRIP の収量：**pCMV-JErep-fullC と pcD1ME を 293T 細胞にコトランスフェクションすることにより放出された D1-SRIP の量を経日的に測定したところ、3

日後ではほぼ最高値に達した (図 1B)。この値 (10<sup>4</sup> IU/ml) は、pCMV-JErep を用いて得られた感染力価 (10<sup>3</sup> IU/ml) より約 10 倍高値であった。なお、D1-SRIP が 1 回感染性であることは、コトランスフェクションにより得られたウイルスを Vero 細胞に感染させても、その感染細胞の培養上清中にはウイルス感染価が認められないことから確認できた。

**増強試験における評価：**D1-SRIP とデング抗体陽性ヒト血清を用いて、増強試験を行なった。図 2A に 4 検体の血清で得られた結果を示す。D1-SRIP 抗原を用いて得られた抗体濃度依存的反応曲線は、C'(+) 及び C'(-) で本来の DENV-1 抗原を用いて得られた曲線と類似した。さらに 8 検体の希釈度 1:10<sup>1</sup>~1:10<sup>6</sup> で得られた感染細胞数を、DENV-1 抗原と D1-SRIP 抗原の間で比較した。補体の存在/非存在に関わらず、高い有意の相関を示した (P<0.001 : 図 2B)。

次に、4 種類の抗 DENV-1 モノクローナル抗体を用いて増強試験を行ったところ、血清で得られた結果と同様に DENV-1 抗原と D1-SRIP 抗原の間で類似の抗体濃度依存的反応曲線が確認された (図 3A: 補体非存在下、図 3B: 補体存在下)。6 種類のモノクローナル抗体の希釈度 1:10<sup>1</sup>~1:10<sup>5</sup> で得られた感染細胞数も、DENV-1 抗原と D1-SRIP 抗原の間で高い有意の相関係数を示した (P<0.001 : 図 3C)。

**中和試験における評価：**Vero 細胞を用いた従来の中和試験でも同様の比較を行った。図 4A に 2 検体の血清と 2 種類のモノクローナル抗体を用いて得られた結果を示す。増強試験の結果同様に、DENV-1 抗原と D1-SRIP 抗原を用いて得られた抗体濃度依存的反応曲線に大きな差異は見られなかった。さらに、PRNT50 を求めたところ、両抗原で得られた値に有意の相関が見られた (P<0.001 : 図 4B)。

#### D. 考察

フラビウイルス粒子表面蛋白の合成に関わる prM/E 遺伝子の発現により、ニュークレオカプシドが存在しない空の粒子が細胞から放出される。この粒子は ELISA 等の抗体結合試験の抗原として使用可能であることが、JEV 等の比較的産生量の高いウイルスでは示されている。しかし、DENV では抗原として使用できるほどの収量が通常は得られない。一方、prM/E 遺伝子の導入と同時にレプリコンプラスミド (pCMV-JErep-fullC) を導入すると、RNA を含むニュークレオカプシドが存在する SRIP が放出される。感染性があるため、抗原としての感度が上がり、また中和試験や増強試験等の抗体機能試験に使用可能となる。本研究で行った評価により、D1-SRIP は Dengue 抗体機能試験において、ウイルスの代替抗原として使用できることが示された。

今回、全長の C 領域を含むレプリコンプラスミド (pCMV-JErep-fullC) を用いることにより、一部の C 領域しか含まないレプリコンプラスミド (pCMV-JErep) を用いた場合より D1-SRIP 放出量が増加した。この理由として、導入するプラスミドが 3 種類から 2 種類に減少したことで、すべてのプラスミドが導入される細胞数が上昇したこと、ウイルス RNA の近くで C 蛋白が合成されるためパッケージング効率も上昇したこと等が考えられる。

Dengue ウイルスの 4 つの血清型は、さらに各血清型につき 4~6 種類の遺伝子型に分類される。GenBank には約 1 万の株の遺伝子塩基配列が登録されており、その情報から世界中に分布する DENV 抗原の作製が可能となる。SRIP 抗原の作製は比較的容易である。すなわち、情報に基づき DENV の prM/E 発現プラスミドを作製し、pCMV-JErep-fullC と共に細胞にコトランスフェクションすることで SRIP が培養液

中に放出される。

2012 年に報告された世界初の Dengue ワクチン効力評価では、中和抗体が検出されているにもかかわらず低い効力が Dengue 2 型ウイルスで示され、従来の測定法で求められた中和抗体価では必ずしも防御の指標とはならず、中和試験を改良する必要性が示唆された。中和活性と増強活性のバランスを測定する方法は、その解決策の 1 つである。本研究の SRIP 作製系により様々な血清型・遺伝子型のウイルス抗原の作製が可能となり、これらを用いて抗体の機能試験を行うことは、将来のワクチン開発や発症機序の解明、さらに国外流行株の国内侵入時の対策に貢献することが期待される。

#### E. 結論

D1-SRIP は、本来のウイルスの代替抗原として、Dengue 抗体機能試験に使用可能であることが示された。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
1. Yamaji H, Konishi E. Production of Japanese encephalitis virus-like particles in insect cells. *Bioengineered*. 4 (6) :438-442, 2013
2. 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
3. Yamanaka A, Thongrungrat 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
4. Sjatha 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
  5. 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
  6. 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
  7. Sjatha F, Kuwahara M, Sudiro TM, Kameoka M, Konishi E.: Evaluation of chimeric DNA vaccines consisting of premembrane 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]
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. 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
  12. 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
  13. 鈴木亮介、小西英二：フラビウイルス

- のリバースジェネティクス、「ウイルス」63巻1号、13-22、2013
14. 小西英二： Dengue 熱・ Dengue 出血熱と生体防御：世界初の Dengue 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
  15. 石川 知弘、小西 英二： Dengue ウイルス感染症：治療薬開発の現状と課題。化学療法領域 29巻増刊号『新興・再興感染症 up to date』、153-159頁、2013
2. 学会発表
1. 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.
  2. 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。
  3. 山中敦史、小西英二：キメラ Dengue 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。
  4. 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.
  5. 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 Dengue 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。
  6. 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。
  7. 山中敦史、小西英二： Dengue 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。
  8. Atsushi Yamanaka, Chayaneer Setthapramote, Pongrama Ramasoota, Pannamthip Pitaksajjakul and Eiji Konishi: Preliminary evaluation of a novel DNA vaccine candidate expressing dengue neutralizing antibody. Joint International Tropical Medicine Meeting 2013. Bangkok, 2013.
  9. Soengeng 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. Suzuki R. Endocytosis pathway for entry of hepatitis C virus. Italy-Japan Liver Workshop, Hepatitis, Steatosis and Hepatocellular Carcinoma: molecular basis and clinical links. Trapani, Italy. 2013.10.20-21.
  15. Iwamoto M, Watashi K, Tsukuda S, Aly H H, Suzuki R, Aizaki H, Koiwai O, Kusahara H, Wakita T. Mechanistic analysis on hepatitis B virus entry in an NTCP-overexpressing cell line. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
  16. Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Kitamura K, Muramatsu M, 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. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
  17. Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Wakita T. A Retinoid Derivative Inhibits Hepatitis B Virus Entry Mediated by NTCP. International Meeting on Molecular Biology of Hepatitis B Viruses. Shanghai, China. 2013.10.20-23.
  18. 松田麻未、斎藤憲司、鈴木亮介、佐藤充、鐘ヶ江裕美、渡士幸一、相崎英樹、千葉丈、斎藤泉、脇田隆字、鈴木哲朗。細胞内発現抗体（イントラボディ）による C 型肝炎ウイルスの増殖抑制。日本ウイルス学会第 61 回学術集会，神戸，2013 年 11 月 10-12 日。
  19. 内田奈々子、渡士幸一、中嶋翔、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、千葉丈、脇田隆字。C 型肝炎ウイルス分泌過程は phospholipase D が関わる膜輸送により制御される。日本ウイルス学会第 61 回学術集会，神戸，2013 年 11 月 10-12 日。

20. 後藤耕司、相崎英樹、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、山越智、四柳宏、森屋恭爾、小池和彦、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字. C型肝炎ウイルスNS5A結合膜蛋白ELAVL1のウイルス複製・翻訳スイッチング機構の解析. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
21. 藤本陽、相崎英樹、松田麻未、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、鈴木哲朗、宮村達男、脇田隆字. C型肝炎ウイルス感染による宿主細胞の脂質代謝変化とHepatic Lipase発現制御. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
22. 青柳春代、相崎英樹、松本喜弘、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、松浦知和、鈴木哲朗、宮村達男、和氣健二郎、脇田隆字. Phospholipase A2およびAutophagyによるC型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程の制御—グリチルリチンによる抗HCV作用—. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
23. 中嶋翔、渡士幸一、紙透伸治、竹本健二、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆字. Liver X Receptor転写活性および感染性C型肝炎ウイルス粒子産生を阻害する天然化合物の同定. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
24. 九十田千子、渡士幸一、岩本将士、鈴木亮介、相崎英樹、小嶋聡一、脇田隆字. B型肝炎ウイルス侵入阻害剤の同定及びNTCPを介する感染阻害機構. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
25. 史国利、安東友美、鈴木亮介、伊藤昌彦、脇田隆字、鈴木哲朗. The RNA structures located at 3' end of HCV genome act as cis-elements in selective packaging of its genome into the infectious particles. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
26. 岩本将士、渡士幸一、九十田千子、アリフセイン、鈴木亮介、相崎英樹、小祝修、楠原洋之、脇田隆字. ヒトNTCP安定発現細胞株におけるB型肝炎ウイルス侵入機構の解析. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
27. 伊藤昌彦、伊藤徳臣、福原崇介、鈴木亮介、田川陽一、松浦善治、脇田隆字、鈴木哲朗. 肝細胞癌株のリプログラミングによるHCV感受性および腫瘍原性の低下. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
28. 渡士幸一、Guoxin Liang、岩本将士、丸澤宏之、喜多村晃一、村松正道、鈴木亮介、相崎英樹、脇田隆字. シチジンデアミナーゼAID誘導を介した抗B型肝炎ウイルス細胞内免疫応答機構の解明. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日.
29. 鈴木亮介. C型肝炎ウイルスの粒子形成に重要な新規NS2結合宿主因子の同定. 日本ウイルス学会第61回学術集会, 教育セミナー 神戸, 2013年11月10-12日.
30. 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、脇田隆字. 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, 神戸, 2013年12月3-6日.
31. 青柳東代、相崎英樹、松本喜弘、松田麻未、Su Su Hmwe、渡邊則幸、渡士幸一、鈴木亮介、市野瀬志津子、松浦

知和、鈴木哲朗、和氣健二郎、宮村達男、脇田隆字. Phospholipase A2 および Autophagy による C 型肝炎ウイルス(HCV)分泌過程の制御—グリチルリチンによる抗 HCV 作用—. 日本分子生物学会第 36 回年会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

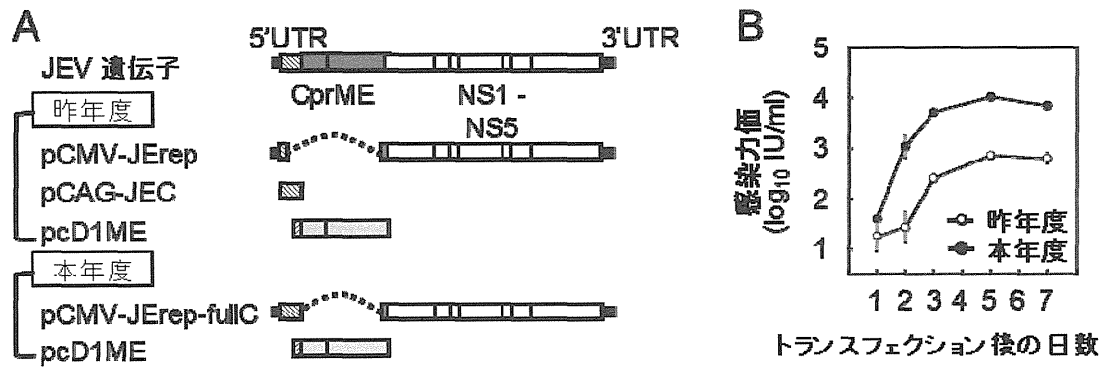


図1. D1-SRIP の作製及び産生量。(A) D1-SRIP を産生させるために用いた遺伝子の模式図。(B) トランスフェクション後に放出される D1-SRIP の経日的感染力価。

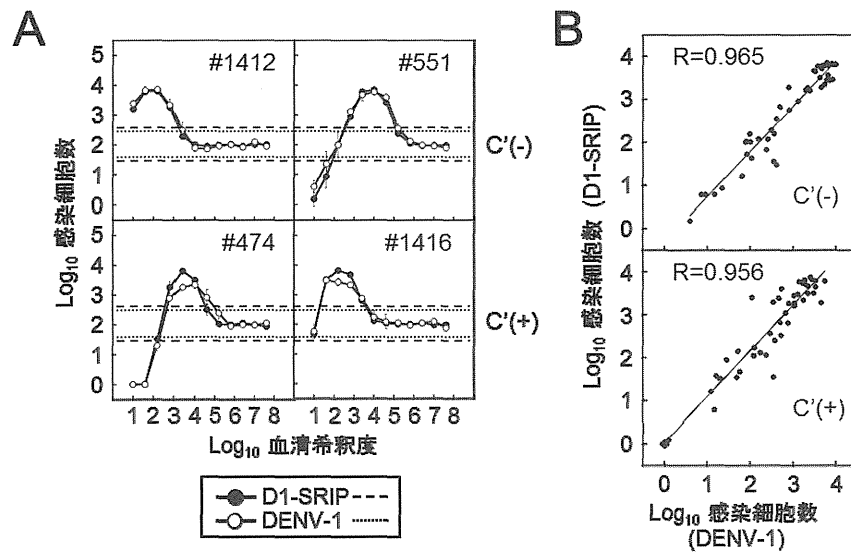


図2. デング抗体陽性ヒト血清を用いた増強試験による D1-SRIP 抗原の評価。(A) 血清濃度依存性の抗体活性。横軸に血清希釈度、縦軸に感染細胞数を示す。補体存在下 (C' (+)) と非存在下 (C' (-)) の条件で行った。●は D1-SRIP 抗原で得られた感染細胞数、○は DENV-1 抗原で得られた感染細胞数を示す。抗体を含まない陰性対照の平均値±3SD を増強活性または中和活性のボーダーラインとし、破線または点線で示した。(B) 両抗原で得られた感染細胞数の相関。横軸に DENV-1 抗原、縦軸に D1-SRIP 抗原で得られた感染細胞数を示す。

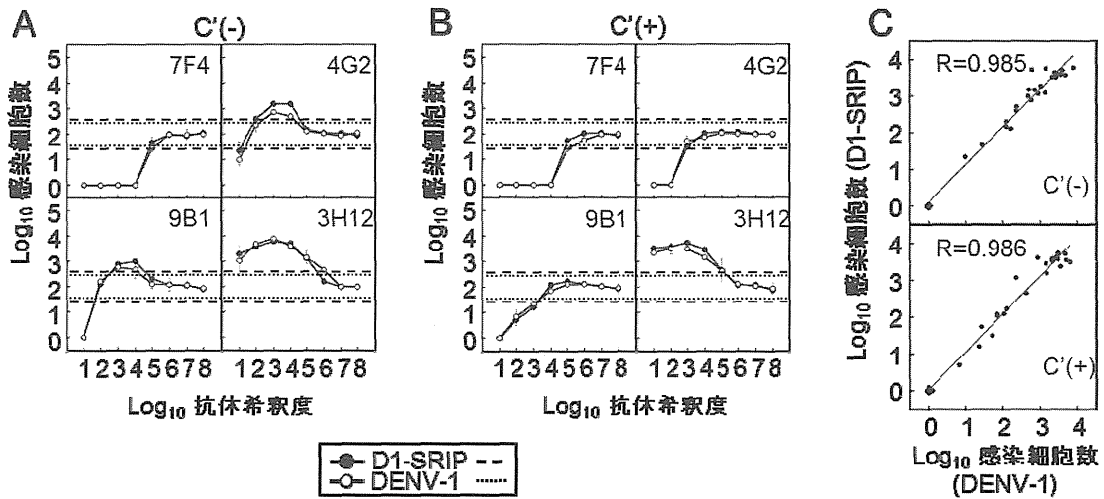


図3. 抗 DENV-1 モノクローナル抗体を用いた増強試験による D1-SRIP 抗原の評価。(A、B) 抗体濃度依存性の抗体活性。補体非存在下 (A)、補体存在下 (B) で増強試験を行った。●は D1-SRIP 抗原で得られた感染細胞数、○は DENV-1 抗原で得られた感染細胞数を示す。横軸に血清希釈度、縦軸に感染細胞数を示す。抗体を含まない陰性対照の平均値±3SD を増強活性または中和活性のボーダーラインとし、破線または点線で示した。(C) 両抗原で得られた感染細胞数の相関。横軸に DENV-1 抗原、縦軸に D1-SRIP 抗原で得られた感染細胞数を示す。

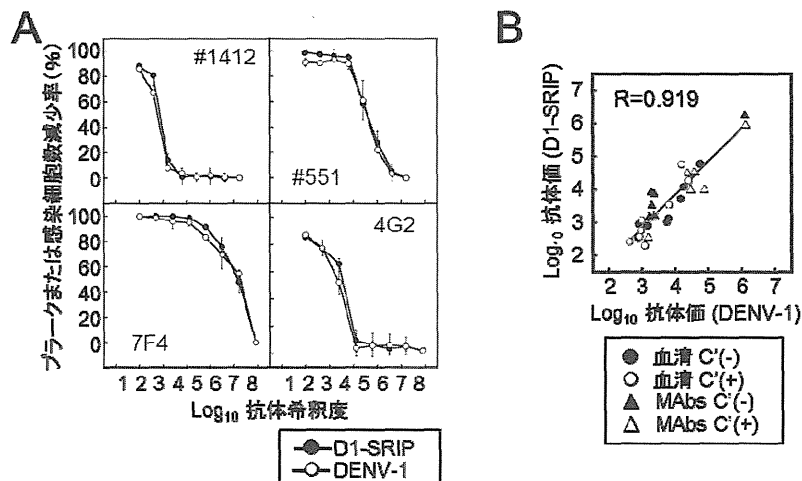


図4. Vero 細胞を用いた従来の中和試験による D1-SRIP 抗原の評価。(A) 抗体濃度依存性のプラーク数減少率または感染細胞数減少率。2 検体のデング抗体陽性ヒト血清及び 2 種類の抗 DENV-1 モノクローナル抗体を用いた。●は D1-SRIP 抗原で得られた感染細胞数減少率、○は DENV-1 抗原で得られたプラーク数減少率を示す。この実験は、補体非存在下で行った。(B) 両抗原で得られた PRNT50 の相関。8 検体のデング抗体陽性ヒト血清及び 6 種類の抗 DENV-1 モノクローナル抗体を用いた。横軸に DENV-1 抗原、縦軸に D1-SRIP 抗原で得られた抗体価を示す。補体非存在下 (●、▲)、補体存在下 (○、△) で行った。

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

「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」

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)

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博、小川 由里、加瀬 哲男

(大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課)

#### 研究要旨:

1. 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。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。
2. 日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

#### A. 研究目的

[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]

本邦で使用されている日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであるため、抗体価は接種後5～10年で低下するといわれている。厚生労働省感染症流行予測調査の結果では、40～50代の抗体保有率が低く、近年発生する日本脳炎患者の3～4割はこの年代である。また、2009年から新しい乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが定期接種に使用されているが、成人における使用例は少なく、その効果に関する情報は少ない。今回我々は、成

人における新規日本脳炎ワクチンの抗体応答とその持続性について解明することを目的とした。ワクチン接種1年後の昨年度に続き、本年度は接種2年後の抗体持続性について解析した。また、ワクチン株以外のアジアで流行する日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体価を決定し、トラベラーズワクチンとしての有効性を評価することも目的とした。

#### B. 研究方法

[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]

1) 対象



本研究に同意を得た一般健康人 272 名 年齢：20～72 歳(中央値 43 歳) に乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン(阪大微研 ジェービック V®)を接種し、ワクチン接種前と、接種約 1 か月後に採血を実施し、ワクチン接種により抗体が陽転した対象者のうち 142名について接種2年後に再度採血を実施した。

## 2)中和抗体価測定

日本脳炎ウイルス(JEV) Beijing-1 株に対する中和抗体価を 50%フォーカス減少法(FRNT<sub>50</sub>)を用いて測定した。このとき、血清希釈 10 倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。幾何平均抗体価は、中和抗体価 10 倍未満を 0.5 とし算出した。

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

## C. 研究結果

[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—ワクチン接種2年後の中和抗体価の持続状況について]

### 1. ワクチンにより誘導された抗体価の減少率について

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。

142 名の対象者のうち、ワクチン接種前中和抗体価が $\geq 10$  (n=59)と<10 (n=83)の 2 群に分けると、ワクチン接種 1 か月後では幾何平均抗体価はそれぞれ 305,39 であったが、2 年後にはそれぞれ 77, 1.8 と減少し、それぞれ 25%, 4.6%に減少した。2 群における抗体価の差は、

接種 1 か月後は 7.8 倍であったが、2 年後には 43 倍と差がさらに拡大した。2 群での抗体価の差はいずれの時期も有意差が認められた。

上記 2 群におけるワクチン接種 1 および 2 年後の抗体陰転率を検討した。ワクチン接種前の中和抗体価が $\geq 10$  であった 59 名の群では、1 年後<10 に陰転化した例は 1 例(1/59, 1.7%)であった。この例はワクチン接種前抗体価 10 で、接種後 1 か月の抗体価が 20 と低抗体価の例であった。接種 2 年後に陰転した例は認められなかった。一方、接種前の中和抗体価が<10 である 83 名の群では、1 年後<10 に陰転化した例は 32 例 (32/83, 38.5%) であり、1 年後に陰転化した 33 例の 97.0%を占めた。2 年後さらに陰転化した例は 23 例で、総計 55 例が陰転化し、陰転率は 66% (55/83%) であった。陰転化した総数 56 例の 98%を占めた。

### 2. 年齢群別の中和抗体価の持続状況について

接種 1 か月後、2年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体の有無に分けた 2 群ともに、年齢が上昇するにつれて低下した(例外は 20 歳代で接種前抗体が陰性の群のみ)。年齢群別の抗体価減少率は接種前抗体陽性群は年齢と関係なく 70-80%であったが、接種前抗体陰性群では年齢と共に減少率は増加した。さらに、各年齢群別の抗体陰転率は年齢と正の相関を示し、20 歳代が 33%であったが、50-61 歳代では 78%と大きく増加した。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

ワクチン接種者 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上の陽性者のうち 24 例について、日本脳炎ウイルス G1 および G5 遺伝子型に対する交差中和抗体価を測定した。その結果、Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、抗体価は G1 株に対して約 50%, G5 株に対しては約 11%と低下した。Beijing-1 株と G1 株に対する抗体価は正の相関

が認められたが、G5 株に対しては相関が認められなかった。

#### D. 考察

[健全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—ワクチン接種2年後の中和抗体価の持続状況について]

過去2年間の本研究班の研究結果では、健全成人において、日本脳炎ワクチンの1回接種により接種1か月後に中和抗体陽性者(≥10)は88%となり、その中和抗体陽性者では1年後の抗体価は23%に減少し、陰転率は23%であった。2年後の抗体価はさらにわずか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。日本脳炎の発症を阻止する最少中和抗体価については結論が得られていないが、中和抗体価10は十分な発症阻止抗体価であると考えられている。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。

ワクチン接種前の中和抗体の保有の有無の観点から2群における抗体価の減少を検討すると、接種前中和抗体陽性群では、陰性群と比較して2年後の幾何平均抗体価の減少率(25% vs 4.6%)、陰転率(1.7% vs 66%)ともに有意な差を認め、抗体価が維持されていた。この事実はワクチン接種後の抗体の持続能にワクチン接種前の免疫記憶能が大きく影響を与えていることを示唆している。本研究では被接種者におけるワクチン接種歴は明確に調査できなかったため不明である。接種前中和抗体陽性群は小児期での日本脳炎ワクチン歴が十分であり、陰性群はワクチン歴がないか不十分であるか、あるいは1次、2次ワクチン不全者と考えられる。

中和抗体価の経時的減少について年齢群別に検討すると、2年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体保有の有無に関わらず年齢と

逆相関を示した。免疫応答能、免疫記憶能は年齢とともに低下することを反映している。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

本研究結果では、日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、抗体価は G1 株に対して約 50%, G5 株に対しては約 11%と低下した。しかし、Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられる。

#### E. 結論

[健全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]

1. 健全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。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。
2. 日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

#### F. 健康危機情報

近年、40~50 代の日本脳炎患者報告も増加し、2011 年には日本脳炎の輸入症例が報告された。今後、抗体保有率の低い年代については、ワク

チンの追加接種を考慮することが必要であると考  
えられる。

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)

G. 研究発表

1. 論文発表

なし(予定あり)

2. 学会発表

1) Antibody response and its durability of  
cell culture-derived Japanese encephalitis  
vaccine in Japanese healthy adults

Kazuo Takahashi, Ikuko Aoyama, Takahiro  
Yumisashi, Tetsuo Kase, Tomohiko Takasaki  
7<sup>th</sup> International Conference of Vaccinology,  
October, 2013 (Barcelona)

2) 高橋和郎<sup>1)</sup>、加瀬哲男<sup>1)</sup>、高崎智彦  
健康成人における細胞培養日本脳炎ワクチ

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

表1 ワクチン接種前後の日本脳炎ウイルスに対する年齢別中和抗体価

JEワクチン接種2年後の中和抗体価の減少率

年齢群	人数	幾何平均中和抗体価					
		ワクチン接種					
		前	1ヶ月後	1年後		2年後	
		抗体価	陰転率(%)	抗体価	陰転率(%)		
20歳代	25	$\geq 10$	944	472	0	311	0
	3	$< 10$	40	15.9	0	5.84	33.3(1/3)
30歳代	12	$\geq 10$	283	113	0	57.3	0
	22	$< 10$	66.2	10.6	31.8(7/22)	4.07	50(11/22)
40歳代	16	$\geq 10$	155	50.1	6.25(1/16)	31.3	6.25(1/16)
	26	$< 10$	36.0	3.78	53.9(14/26)	1.56	69.2(18/26)
50歳以上	6	$\geq 10$	71.3	28.3	0	22.4	0
	32	$< 10$	28.9	5.16	34.4(11/32)	1.05	78.1(25/32)
全体	59	$\geq 10$	305	125	1.69(1/59)	76.9	1.69(1/59)
	83	$< 10$	39.0	5.89	38.5(32/83)	1.81	66.3(55/83)
	142		91.7	20.9	23.2(33/142)	8.59	39.4(56/142)

分担研究報告書

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

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	福田昌子	大分大学医学部感染予防医学講座 助教
	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 3年
	大塚 靖	大分大学医学部感染予防医学講座 助教
	野口香緒里	大分大学医学部感染予防医学講座 大学院博士課程 2年
	川上絵理	大分大学医学部感染予防医学講座 大学院博士課程 2年
	徳永暁憲	大分大学医学部 特任助教
	小林隆志	大分大学医学部感染予防医学講座 教授
	服部正策	東京大学医科学研究所奄美病害動物研究施設
	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
	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
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス一部 室長
	倉根一郎	国立感染症研究所 副所長

研究要旨

重篤な症状をヒトに起こすレユニオン島由来のチクングニアウイルスは、アジア諸国のみならず、2013年にはカリブ海の島々にも拡散が報告され、世界の熱帯・亜熱帯への蔓延が懸念されている。本ウイルスを媒介する蚊種は、ネッタイシマカ *Aedes (Stegomyia) aegypti* とヒトスジシマカ *Ae. (Stg.) albopictus* である。レユニオン島由来のチクングニアウイルスは、ヒトスジシマカの生息する熱帯・亜熱帯地域でも患者発生が認められている。わが国では輸入患者の症例が既に報告されていることから、国内のヒトスジシマカおよびその近縁種である、リバーズシマカ *Ae. (Stg.) riversi* とヤマダシマカ *Ae. (Stg.) flavopictus* の本ウイルス感受性を検討した。本ウイルスをこれら蚊の胸部に接種した蚊は、ヒトスジシマカと同様に、本ウイルスのゲノムが RT-PCR 法で検出された。また、本ウイルスを経口的にリバーズシマカとヤマダシマカに吸液させて、その後 28°C で 14 日間飼育した 2 種の蚊からウイルスゲノムが RT-PCR 法で検出された。わが国固有の蚊種であるこれら蚊種がチクングニアウイルスに感受性を持つ事が明らかになったことから、チクングニアウイルスが国内に侵入した際は、ヒトスジシマカのみならず、これら蚊種の対策も考慮する必要がある。

A. 研究目的

1952 年タンザニアで初めて流行したチクングニア熱は、アフリカ、南・東南アジアなどに拡大、多発している。2013 年にカリブ海諸国で本症の

患者が報じられるようになり、感染地域は拡大の傾向にある。

本症は、症状の軽い疾患として認識されていたが、2005 年初頭にレユニオン島を含むコモロ