

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・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

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、小滝徹、田島茂、倉根一郎（国立感染症研究所）

齋藤悠香（日本大学）

#### 研究要旨

デングウイルス非構造 NS1 タンパクは、デング熱の検査マーカーとして、急性期の診断に有用である。一般的に、NS1 抗原検査は、血清検体が用いられているが、本研班では尿検体における NS1 抗原が検出可能かを検討し、デング熱早期診断ツールとしての有用性を検討した。我々は、血清の NS1 検出率を尿検体と比較検討を行い、ELISA 法および簡易イムノクロマト法が尿検体を用いた NS1 抗原検査に有用であるかを検討した。ELISA 法は、血清中の NS1 抗原を高感度で検出可能に対し、尿中の NS1 抗原検出率は、血清よりやや低い。いずれ検査法（ELISA 法およびイムノクロマト法）においてもほぼ同等の検出率で尿中の NS1 抗原を検出した。以上の結果により、我々は NS1 抗原簡易キットにて尿中の NS1 抗原を検査することが可能であることを明らかにした。また、デングウイルス NS1 抗原検出キットが日本脳炎患者および黄熱ウイルス感染者血清に非特異反応を呈さないことを確認した。

#### A. 研究目的

デングウイルスによる引き起こされたデング熱・出血熱は、年間約 4 億人が発症し、深刻な感染症である。国内の輸入症例は、年々増加傾向にあり、毎年数百症例が報告されている。

デング熱診断には病原体診断および抗体診断がある。最近の感染であることを鑑別す

るには、病原体診断が必要である。デングウイルス感染においては、抗体の上昇とともにウイルス血症が速やかに消失する特徴があるため、解熱後にはウイルス遺伝子診断が困難である場合が多い。我々は、NS1 抗原検出 ELISA キットおよび迅速 NS1 抗原検査キット（簡易イムノクロマト法）を用いて遺伝子検査法(RT-PCR)と比較検討を行ったところ、血

中における NS1 抗原はウイルス遺伝子よりも長く維持されることを明らかにした(Moi et al., J Travel Medicine, 2013)。

NS1 抗原は、デングウイルスの非構造タンパクの一つであり、感染細胞表面に発現されるとともに感染細胞から分泌される抗原である。NS1 抗原が血清以外の尿検体などに検出されるかはまだ明らかにされていない。デングウイルスの流行は日本国内において、旅行医学分野、サーベイランスのスクリーニング検査、フィールド調査や採血が困難な場合または出血傾向の強い患者の診断検査として有用であるデング熱迅速診断アッセイが求められる。そこで、我々は尿検体を用いて迅速 NS1 抗原キットによるデング熱診断法としての有用性を検討した。

## B. 研究方法

**患者血清：**2008~2013 年にデング熱流行地から帰国したデング熱患者 25 人から採取した 32 血清検体および 32 尿検体を用いた。血清および尿検体における IgM/IgG 抗体と NS1 抗原は、ELISA 法(IgM ELISA, Focus 社; IgG ELISA, Panbio 社, NS1 抗原 ELISA, Biorad 社)にて検討した(Moi et al., J Travel Med, 2013)。また、カンボジアの日本脳炎患者 10 検体、黄熱ワクチン接種後の 7 日目の血清 8 検体に関して交差反応を検討した。

**NS1 抗原簡易イムノクロマトキット：**血清検体 50 $\mu$ L に対し、希釈バッファーを 1 滴添加した。さらに、簡易イムノクロマト(Bio-Rad Dengue NS1 Ag Strip)を検体に浸す。判定は、15 分以内に行なった。尿検体の場合は、80 $\mu$ L の検体のみを使用した。

## C. 研究結果

我々は、2008 年~2013 年に採取したデング熱患者血清および尿検体を用いて、各種検体および検査法におけるデング熱診断法としての有用性を比較検討した。

尿検体を用いた NS1 簡易キットにおける抗原検出陽性率および血清検体を用いた NS1 抗原 ELISA キットと比較検討したところ、34 検体中、23 検体(68%)は、どちらの検査法においても陽性であった。6 検体(17%)は、NS1 抗原 ELISA により陽性であったが、尿検体(簡易キット)では陰性であった(表 1)。

さらに、尿検体中の NS1 抗原を簡易キットおよび ELISA にて比較検討したところ、34 検体中、23 検体(68%)は、簡易キットおよび ELISA キットにより陽性であった。NS1 抗原 ELISA で陽性であったが、簡易キットでは陰性であった検体は、1 検体(3%)のみであった(表 2)。NS1 抗原 ELISA で陰性検体(10 検体)であった検体を簡易キットにて検討したところ、全ての検体も陰性であった(10/10, 100%、表 2)。

黄熱ワクチン接種者の血清、日本脳炎患者血清はいずれも陰性であり、偽陽性を示すことはなかった。

## D. 考察

本研究班では、我々はデング熱患者において尿検体にも NS1 抗原が分泌されるかを簡易キットおよび ELISA キットにて検討した結果、尿検体を用いても NS1 抗原は簡易キットおよび ELISA キットにより検出可能であることを明らかにした。さらに、血清検体を用いた場合の NS1 抗原検出率は、尿検体より高いことが明らかになった。尿検体を用いた場合は、いずれの NS1 抗原 ELISA 法および簡易キット

においても NS1 抗原検出率はほぼ同じであった。

デングウイルス NS1 抗原イムノクロマトキットは、黄熱ワクチン接種者の血清や日本脳炎患者血清が偽陽性を示すこともなく、尿でも検出可能であることから、医療現場におけるその場診断にも有用であり、今後普及を図る必要がある。

#### E. 結論

我々は、尿検体にも NS1 抗原が存在することを証明した。さらに、いずれの NS1 抗原検査法 (NS1 抗原 ELISA および簡易キット) を用いても尿検体における NS1 抗原の検出率は、ほとんど相違がないことを明らかにした。一方、血清検体における NS1 抗原検出率と比較すると尿検体の NS1 抗原検出率はやや劣ることから、尿検体を用いた迅速キットによる検査結果は、あくまでも臨床上、治療方針を立てるための目安とするべきであり、確定診断には、他の実験法と併用することが不可欠である。しかし、NS1 抗原迅速検査キットの検査時間、利便性、採血不要の点に関しては、他の実験室検査法と比較して、大きな差があることから、迅速と柔軟性が求められる医療現場、空港検疫所、フィールドなどでは、有用な方法であり、普及を図る必要がある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.

2. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Efficacy of tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. *Lancet*, 381,9872,1094, 2013.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Moi ML, Saijo M. 抗アルボウイルス薬. *臨床と微生物*.40(1), 69-73, 2013.
7. Tochitani 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.

## 2. 学会発表

### 1) 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 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.

### 2) 国内学会

1. 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. 第3回マーモセットを用いたデングウイルス感染病態解析(九州) 2013年12月

2. 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
3. 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
4. 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
5. 枋谷健太郎、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
6. 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.

7. 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.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表 1. 各アッセイにおけるデング熱患者の尿検体および血清検体の NS1 抗原検出の陽性率。

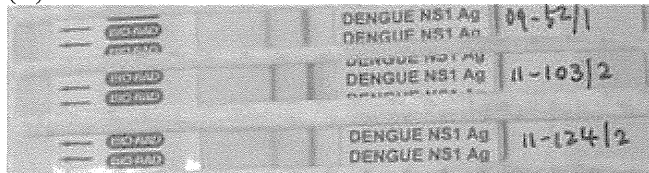
		デング NS1 抗原 ELISA キット、血清検体	
デング NS1 抗原簡易 キット、尿検体		陽性 (n=29)	陰性 (n=5)
	陽性 (n=23)	23/34 (67%)	0/34 (0%)
	陰性 (n=11)	6/34 (18%)	5/34 (15%)

表 2. 各アッセイにおけるデング熱患者の尿検体の NS1 抗原検出の陽性率。

		デング NS1 抗原 ELISA キット、尿検体	
デング NS1 抗原簡易 キット、尿検体		陽性 (n=24)	陰性 (n=10)
	陽性 (n=23)	23/34 (68%)	0/34 (0%)
	陰性 (n=11)	1/34 (3%)	10/34 (29%)

図 1. デング熱患者から採取した尿検体を用いて NS1 抗原イムノクロマトにて陽性率の検討。  
 (A) NS1 抗原陽性の場合、陽性バンドおよびコントロールバンドが出現した。(B) 陰性の場合、コントロールバンドのみ出現した。判定は、実験開始から 15 分以内に行なった。

(A)



(B)



厚生労働科学補助金（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

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

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、小滝徹、田島茂、倉根一郎（国立感染症研究所）

磯田貴義、本馬恭子、牧江俊雄、古市美絵子、久世敏輝、

金川真澄、森里美、三宅智（成田空港検疫所）

#### 研究要旨

本研究班では、デングウイルス重感染症(concurrent dengue virus serotypes infection)の病原体診断法を開発し、その有用性を証明した。従来、デングウイルス重感染の鑑別には、遺伝子診断法が用いられているが、病原体診断としては高い感受性を有する。一方、ウイルス遺伝子診断は、コンタミネーションや非特異反応のリスクがあり注意が必要である。一方、ウイルス分離は、重感染の確定診断を可能にするとともにウイルス性状解析もできるというメリットがある。しかし、重感染におけるウイルス分離は技術上で困難であって、いままではそれぞれのウイルス分離の成功例はなかった。そこで、我々はこれまでに確立した FcγR レセプター(FcγR)発現 BHK 細胞を用いた新規中和試験法がデングウイルス重感染に使用可能であることを、デングウイルス重感染の患者血清からデングウイルスの分離を試みた。我々は、中和および感染増強活性を有する回復期患者血清(NtAb)を用いて新規中和アッセイにより、それぞれのデングウイルスの分離に成功した。以上の結果により、我々は FcγR 発現 BHK 細胞を用いて、新規病原体診断法を確立した。さらに、我々はこのアッセイにより、デングウイルス血清型重複感染は、感染性のある二つの血清型ウイルスによる感染であることをはじめて明確に証明した。

#### A. 研究目的

デング熱・出血熱は、デングウイルスによって引き起こされる急性熱性疾患であり、年間約 4 億人がデング熱・出血熱を発症し、深刻な感染症である。国内の輸入症例は、年々に増加傾向にあり、2013 年は 1999 年以来、

もっとも多い症例数の 249 症例が報告された。

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。流行地では、二つまたは二つ以上の血清型ウイルスによる重複デングウイルス感染症が報告されたが、それぞれのウイルス分離成功例

はなかった。従来、デングウイルス重感染症の診断法として、RT-PCR および血清学的診断が用いられている、重感染の確定診断にはウイルス分離が必要である。

本研究班では、我々はこれまでに確立した FcγR 発現 BHK 細胞, FcγR 発現 BHK 細胞 (Moi et al., J Virol Methods, 2010; Moi et al., Clin Vac Immunol, 2010) を用いた新規中和試験法を用いて、重複デングウイルス感染の患者血清からのデングウイルスの分離を試みた。我々は、中和および感染増強活性を有する回復期患者血清 (pAb) を用いて新規中和アッセイにより、重複感染患者から、二つの血清型ウイルスの分離に成功した。以上の結果により、我々は FcγR 発現 BHK 細胞を用いて、新規病原体診断法を確立した。さらに、我々は、このアッセイにより、重複感染は、感染性のある二つの血清型ウイルスによる感染であることをはじめて明確に証明した。

## B. 研究方法

**細胞：** ヒト Fcγ 受容体 (FcγRIIA) 発現 BHK-21 細胞、BHK-21 細胞および Vero 細胞を用いた。

**患者血清：** 2011 年および 2013 年、デング熱流行地から帰国したデング熱患者 2 人から採取した血清 2 検体を用いた。患者 1 は、RT-PCR 法により DENV-1 および DENV-3 のウイルス遺伝子が検出された。患者 2 は、RT-PCR 法により DENV-1 および DENV-4 のウイルス遺伝子が検出された。

**ウイルス分離：** 血清をそれぞれの倍希倍率で釈後 (表 1, 図 1) 抗体および回復期の患者血清および同量の培地と混合後、37°C、1 時間

反応を行った。患者 1 からの検体は、感染増強抗体 (mAb 4G2)、DENV-1 に対する特異的な mAb15F3 抗体および DENV3 に対する特異的な mAb2H2 抗体と反応させ (Moi et al., J Clin Virol, 2011)、細胞に接種した (図 1)。患者 2 からの検体は、DENV-1 に対する中和活性、DENV-4 に対する感染増強活性を有する回復期の患者血清 (Moi et al., PLoS NTD, 2012) と反応させ、細胞に接種した (表 2)。各ウイルス-反応液を FcγR 発現 BHK 細胞および FcγR 非発現 BHK に接種し、37°C、1 時間吸着後、0.5ml 培地 (10%FCS, MEM) を加え、37°C で 5 日間培養した。ウイルス定量は、RT-PCR 法およびプラークアッセイにより行った。ウイルス抗原は、immunofluorescence assay, IFA 法により検討した。

**中和試験：** 中和試験においては DENV-1 (NIID01-44 株), DENV-2 (TLC30 株), DENV-3 (CH53649 株), DENV-4 (TVP360 株) を用いた。本中和試験では、FcγR 発現 BHK 細胞および BHK-21 細胞を用いた (Moi et al., Clin Vac Immunol, 2010)。

## C. 研究結果

**患者 1：** RT-PCR 法により、血中には DENV-1 型および DENV-3 型のウイルス遺伝子が検出された。FcγR 発現細胞および FcγR 非発現細胞を用いてウイルス分離を行った。感染細胞の上清を検討したところ (図 1A)、DENV-1 型および DENV-3 型のウイルス遺伝子が検出された。しかし、同ウイルス分離実験で用いた細胞を IFA 法で検討したところ、DENV-1 のみ検出された (図 1C)。さらに、回復期患者血清 (発症 16 日目) における中和抗体価は、DENV-1 BHK PRNT<sub>50</sub>=640, DENV-3



BHK PRNT<sub>50</sub>=40 であって、発症 143 日目の血清における中和抗体価は、DENV-1 BHK PRNT<sub>50</sub>=640, FcγR-BHK PRNT<sub>50</sub>=40; DENV-3 BHK PRNT<sub>50</sub>=40, FcγR-BHK PRNT<sub>50</sub><10 であった(図 1B)。以上の結果により、患者 1 は、DENV-1 に感染されたことが示唆された。

患者 2: RT-PCR 法にて、患者血清には DENV1 および DENV4 の遺伝子が検出された。Vero および FcγR 非発現 BHK 細胞によるウイルス分離では、DENV1 のみが分離できた。さらに、DENV1 に対する中和活性、DENV4 に対する感染増強活性を示す患者血清(Moi et al., PLoS NTD, 2012)を用いたウイルス分離では、DENV4 の分離に成功した(表 1)。DENV1 および DENV4 をそれぞれ E タンパクのシークエンスしたところ、分離したウイルスが DENV1Genotype1 および DENV4Genotype4 であることを明らかにした。さらに、分離した DENV1 および DENV4 それぞれの遺伝子配列を血中のウイルス遺伝子配列と比較検討したところ、血中および分離したウイルスの遺伝子配列が 100%一致した。

#### D. 考察

本研究班では、FcγR 発現細胞を用いて、デングウイルス重複感染症の確定診断法を確立し、その有用性を証明した。2 つ以上のデングウイルス血清型による重複感染症は、流行地において複数の報告はあったが、我が国においては、はじめての確定症例である。

遺伝子検出法である RT-PCR 法による重複感染症の診断は、簡便かつ迅速であるが、患者 1 のような症例およびウイルス遺伝子の非特異反応のリスクがあるため、複数のデングウイルス血清型による重複感染症は、ウイル

ス分離法により確定診断を行うことが重要である。

#### E. 結論

本研究では、複数のデングウイルス重複感染症の診断法を確立した。さらに、我々はこの新規診断アッセイを用いて、一人の患者から 2 つの血清型ウイルスを分離することに成功したことにより、重複感染症は、二つの感染性を有する血清型による感染であることをはじめて明確に証明した。本症例では、一人の渡航者から二つの血清型ウイルスを分離したことから、ウイルス血症期間中においては、一人の渡航者でも複数のデングウイルスを媒介蚊により媒介されるリスクがある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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.
2. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Efficacy of tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. *Lancet*, 381,9872,1094, 2013.
3. 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.
4. 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.
  5. 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.
  6. Moi ML, Saijo M. 抗アルボウイルス薬. *臨床と微生物*.40(1), 69-73, 2013.
  7. Tochitani 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.
2. 学会発表
- 1) 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 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.
  - 2) 国内学会
    1. 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. 第3回マーモセットを用いたデングウイルス感染病態解析 (九州) 2013年12月
    2. 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
    3. 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
4. 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
5. 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
6. 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 FcγR3-expressing cells. 54th Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine. (Nagasaki) October, 2013.
7. 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.
- 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

## 重複DENV感染 (患者1)

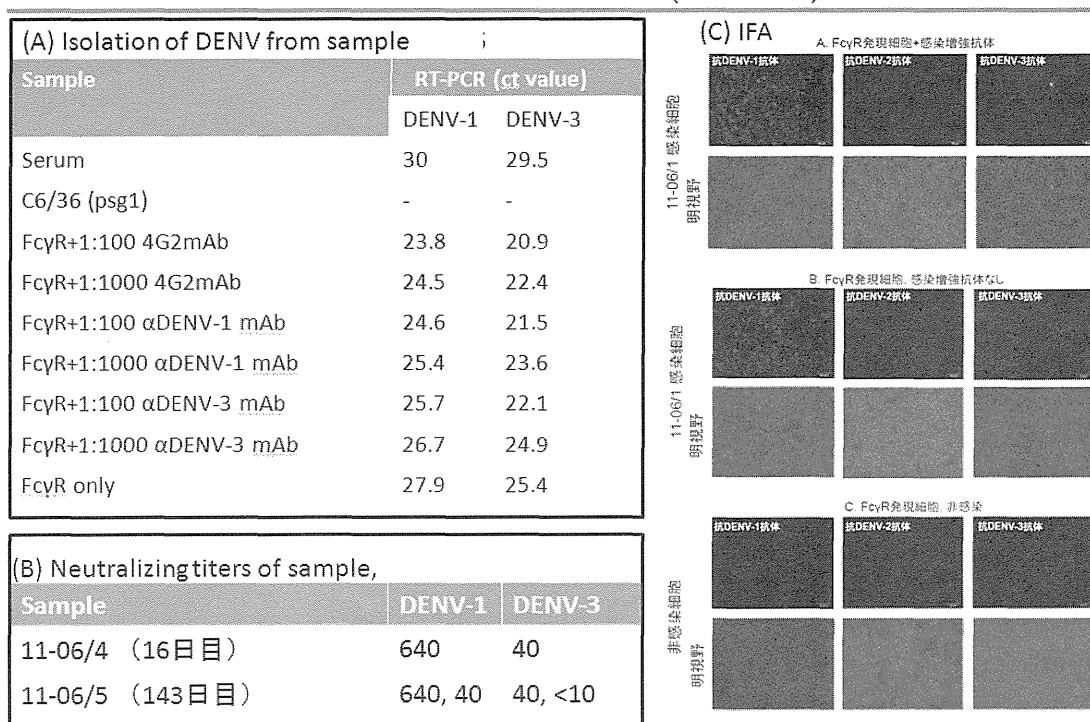


図1. 患者1の血清を用いたウイルス分離。(A) 血清をそれぞれフラビウイルスに対する感染増強活性を有する抗体(4G2)、DENV1に対する特異的なmAb15F3抗体およびDENV3に対する特異的なmAb2H2抗体と反応させ、FcyR発現BHK細胞に接種した。培養5日後、RT-PCR法によりウイルス遺伝子を検出した。(B) BHK細胞およびFcyR発現BHK細胞にて、回復期血清(発症16日目、143日目)における中和活性を検討した。(C) 感染細胞におけるDENV1およびDENV3のEタンパク抗原量をIFA法にて検討した。いずれの感染細胞(BHK細胞およびFcyR発現BHK細胞)においてもDENV1の抗原のみが検出された。

表 1. 患者 2 の血清を用いたウイルス分離

継代数	サンプル	分離法	Log10 genome copies/ml	
			DENV-1	DENV-4
0	患者 2	患者血清のみ	9.8	6.1
1	1-1	10 $\mu$ l 血清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	7.5	-
	<u>1-2</u>	10 $\mu$ l 血清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	6.0	7.3
2	1-2-1	10 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	8.8	8.6
	1-2-2	10 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	4.0	-
	<u>1-2-3</u>	1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	4.4	8.2
	1-2-4	1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	5.0	-
	1-2-5	10 $\mu$ l 上清+ 10 $\mu$ l undiluted Nt Ab	7.4	8.5
	1-2-6	1 $\mu$ l 上清+ 10 $\mu$ l undiluted Nt Ab	4.9	7.9
	1-2-7	50 $\mu$ l 上清 only	10.0	8.1
3	1-2-3-1	10 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	8.4
	1-2-3-2	10 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	8.8
	1-2-3-3*	1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	8.0
	1-2-3-4	1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	8.5
	1-2-3-5	0.5 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	8.2
	1-2-3-6	0.5 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	8.3
	1-2-3-7	0.1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	7.8
	1-2-3-8	0.1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 1:10 Nt Ab	-	8.1
	1-2-3-9	10 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	8.6
	1-2-3-10	10 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	8.8
	1-2-3-11	1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	8.0
	1-2-3-12	1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	8.5
	1-2-3-13	0.5 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	7.9
	1-2-3-14	0.5 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	8.5
	1-2-3-15	0.1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	7.8
	1-2-3-16	0.1 $\mu$ l 上清 + 10 $\mu$ l 希釈なし Nt Ab	-	7.9
	1-2-3-17	10 $\mu$ l 上清のみ	-	8.7

“Nt Ab” は、DENV-1 に対する中和活性, DENV-4 に対する感染増強活性を示す回復期患者血清 (Moi et al., PLoS NTD, 2012); “-” 検出限界以下; 下線は、次の感染実験に用いたサンプルを示し、DENV-4 の分離には、低い DENV-1 ウイルス価および 高い DENV-4 ウイルス価のサンプルを選択した。

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

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

永田 典代 国立感染症研究所 感染病理部 第二室長

研究要旨：本研究では、デングウイルス様粒子を用いたワクチン開発を目標として、感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を目的としている。今年度は、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。

協力研究者：

国立感染症研究所 感染病理部 小島朝人、  
鈴木忠樹、小谷治、岩田奈織子、長谷川秀樹

A. 研究目的

デングウイルス(DENV)は4つの血清型を持ち、感染者の吸血蚊が媒介するヒトを宿主とするウイルスである。異なる型の DENV に再感染した場合、致死性のデング出血熱を発症する。そのため、ワクチン施策には DENV 1～4 型に対する 4 価ワクチンが必須であると考えられており、現在のところ有効なワクチンは未だ無い。

本研究では、デングウイルス様粒子を用いたワクチン開発を目標として、感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を目的としている。昨年度までに、分与された 4 つの血清型のデング熱患者分離株を VeroE6 細胞に継代、馴化を行い新生仔マウスにおける病原性を明らかにした。また、病理組織標本におけるウイルス抗原の検出系を確立した。今年度は、成マウスに対する病原性の確認を行い、昨年度に実施した新生仔マウスを用いた感染

実験とあわせてマウスに対する病原性を総括した(表)。

B. 研究方法

使用ウイルスと細胞

いずれも高崎智彦博士より分与いただいた。

- DENV 1 型: NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)
- DENV 2 型: NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)
- DENV 3 型: Den 3, 00-27/1 株 (C6#1, Vero9013#1. 08 Decem, 2003)
- DENV 4 型: NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)

これらを VeroE6 細胞で継代し、培養上清で  $10^5$  PFU/ml 以上を回収できるように馴化した(表参照)。

感染動物実験

6 週齢の ddY マウス (SLC より購入) に対し、VeroE6 細胞で 4 継代目のウイルス感染細胞上清をそれぞれ 100  $\mu$ l 静脈内接種した。対照群には細胞培養液 MEM 100  $\mu$ l を同様に接種した。

接種後 15 日まで体重測定、臨床症状の観察を行い、病原性発現の有無を検討した。また、接種 3,15 日目に 4 匹ずつ過麻酔下で心臓採血を行い、その後解剖し、ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を作製した。なお、本動物実験は国立感染症研究所の動物実験委員会に承認された実験計画に従って実施した。

#### 病理学および免疫組織学的検索

10%ホルマリン緩衝液灌流および浸漬固定後の DENV1-4 型感染マウス組織材料（脳、脊髄、心、肺、腎、肝、脾）を用いて、常法どおりパラフィン包埋切片を作製した。脱パラフィン後、一部はヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施した。また、ウイルス抗原を検出するために、一次抗体として Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody [8] (ab80914) を用いて免疫組織化学染色を実施した。脱パラフィンした切片を抗原賦活化剤 (pH6.0) (ニチレイ) 中で 121°C10 分オートクレーブ処理によって抗原賦活化し、過酸化水素水・メタノール（室温 30 分）による内因性ペルオキシダーゼの阻止を行った。その後は、ヒストファイン マウスキット [マウス組織用マウス第一抗体] (ニチレイ) を用い、プロトコールに従い免疫染色を行い、ウイルス抗原を検出した。なお、1 次抗体は 2000 倍希釈し、4°C で一晩インキュベートした。

#### C. 結果

いずれの接種群も無症状で耐過した。2 型、3 型接種群は対照群を含めた他の群と比べて体重の上昇が良かった(図 1 A)。接種 3 日目の血液検査では 2 型と 3 型接種群で血小板の有意な減少がみられ、15 日には上昇傾向が見られた(図 1B)。4 型接種群はいずれの接種日でも低い傾向が見られた。また、ヘマトクリット値はウイルス接種 3 日目でいずれの接種群においても対照群に比べて低い傾向が見られ

たが、2 型接種群で有意な低値がめつた。いずれの個体も明らかな臨床症状を示さず、組織学的に著変はみられなかった。

#### D. 考察

血液像に変化が見られたことから、VeroE6 継代株は成マウスに対しても感染性を有すると考えられた。今後は、これらのウイルスと年齢の異なるマウスを用いて重複感染実験を行い、病原性解析とワクチン攻撃実験に必要な動物実験系を確立する。

#### E. 結論

DENV1-4 型分離株を使用して、成マウスにおける病原性を明らかにした。昨年度と今年度の実験結果を総括した(表)。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1.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. 2013 e71643.

2.Kentaro Y, Yamazaki S, Mottate K, Nagata N, Seto T, Sanada T, Sakai M, Kariwa H, Takashima I. Genetic and biological characterization of tick-borne encephalitis virus isolated from wild rodents in southern Hokkaido, Japan in 2008. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013. 13:406-414.

3.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

4. Kotani O, Shirato K, Nagata N, Ikeda H, Takahashi K, Taguchi F. Neuropathogenesis of a mouse-adapted porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling mice. J Gen Virol. 2013. 94:831-836.

## 2. 学会発表

1. 永田典代、岩田奈織子、鈴木忠樹、佐藤由子、中島典子、片野晴隆、長谷川秀樹：脳炎・髄膜炎関連ウイルスの病理学的検索の

ための参照標本の作製と抗体の検討。第 102 回日本ウイルス学会(札幌)2013年6月。

2. 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 回日本ウイルス学会(神戸)2013年11月。

## G. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 デングウイルス分与株の VeroE6 細胞における増殖性と ddY マウスに対する病原性

血清型	ウイルス株名	VeroE6 細胞		ddY マウスに対する病原性		
		継代数	上清の感染価 pfu/ml	新生仔・脳内 10 µl	新生仔・皮下 10 µl	6 週齢・静脈内 100 µl
1 型	NIID10-07 標準株 (D1/Hu/Philippines)	4	1.4 x 10 <sup>6</sup>	有(致死的)	有(弱)	無
2 型	NIID20110116 株 (D2/Hu/INDIA09-74)	4	1.7 x 10 <sup>6</sup>	有(致死的)	有(一過性)	有(一過性)
3 型	Den3,00-27/1(C6#1, Vero9013#1.08Decem, 2003)	4	1.6 x 10 <sup>5</sup>	有(一過性)	無	有(一過性)
4 型	NIID 08-11 標準株 (D4/Hu/Solomon)	4	8.8 x 10 <sup>5</sup>	有(致死的)	有(弱)	無



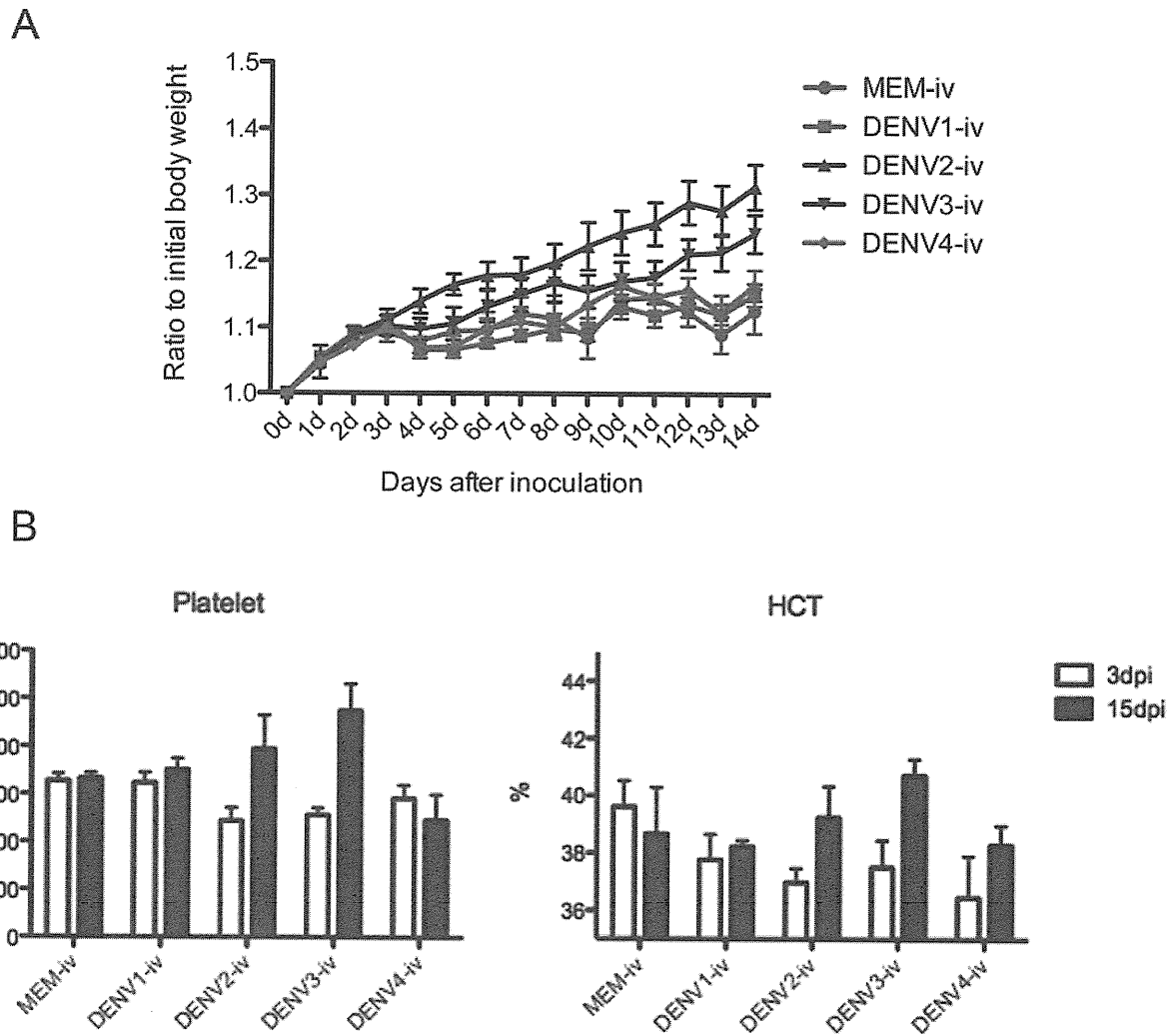


図1 デングウイルス静脈内接種後の成マウスの体重変化と血液像

A. デングウイルス 1-4 型および細胞培養液接種後(Control : MEM)の体重変化。いずれの接種群も無症状で耐過した。2 型および 3 型接種群は他の群に比べて体重の上昇が早かった。 B. 接種 3 日目の血液検査では対照群と比べて、2 型と 3 型接種群で血小板の有意な低値とヘマトクリット値の有意な低値 (2 型接種群のみ)が見られた。接種 15 日目の血小板数はいずれも高値を示す傾向があった(有意差はない)。

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）

「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する  
総合的対策の確立に関する研究」（H23－新興－一般－010）

### 分担研究報告書

#### 海外渡航者を対象にした蚊媒介性ウイルス感染症の情報提供

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  
研究協力者 福島慎二 東京医科大学病院 渡航者医療センター  
水野泰孝 東京医科大学病院 感染制御部  
山口佳子 東京医科大学病院 総合診療部  
村田英美 一般財団法人 海外邦人医療基金  
菊池宏久 マニラ日本人会診療所

#### 研究要旨

2013年度は「海外派遣企業の健康管理担当者」を対象に、海外勤務者の感染症対策の状況に関する調査を行った。この集団ではデング熱などの感染症を重要な健康問題と認識しており、従業員にデング熱の罹患者がいる企業も少なくなかった。デング熱の予防については適切な対応がなされていた。また「マニラ在留邦人」や「一般の海外渡航者」を対象に知識レベルの調査を行ったが、後者については基本的な知識が不足していることが明らかになった。さらに、マニラ在留邦人のデング熱罹患状況を解析したところ、ある地区の住民に患者発生が多くみられ、この地区の環境調査により、蚊の発生や患者の存在など、デング熱感染がおこりやすい状況が確認された。以上の調査結果をもとに、2013年度はデング熱予防のための動画や、医療従事者向けの予防対策マニュアルを作成した。

#### A. 研究目的

海外渡航者にとって蚊媒介性ウイルス感染症は重要な健康問題の一つである。とりわけデング熱は患者数が多く、2013年には国内で診断された患者数が249人にのぼった。さらに、日本脳炎、黄熱、チクングニア熱なども海外渡航者にリスクのある蚊媒介性ウイルス感染症にあげられる。こうした感染症については国民に情報が広く浸透しておらず、海外渡航時に効果的な予防対策がとられていないのが現状である。そこで本研究では海外渡航

者に必要とされる蚊媒介性ウイルス感染症の情報内容を調査し、その提供を行うことを目的とする。

#### B. 研究方法

##### 1. 必要とされる情報内容の調査

2013年度の調査対象は海外派遣企業の健康管理担当者、海外在留邦人、一般の海外渡航者とした。調査方法として「海外派遣企業の担当者」はアンケート用紙の郵送方式、「海外在留邦人」は講演会場でのアンケート配布方式、「一般の海外渡航者」はインターネット

上のアンケートへの回答方式を用いた。調査項目は、海外でかかる感染症への関心や情報入手の方法、デング熱など蚊媒介性ウイルス感染症の知識レベルや予防対策の実施状況である。

## 2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

前年度と同様にマニラ日本人会診療所を受診する在留邦人のデング熱罹患状況について調査を行った。年齢、性別、渡航目的など罹患者の特性とともに、季節性についての解析も実施した。また、2013年度はデング熱罹患者の多発する地域の環境調査を行い、感染のおこる背景について検討した。

## 3. 海外渡航者への情報提供

以上の調査結果をもとにデング熱の予防に関する情報提供を行った。2013年度は、既に開設しているインターネット上のホームページで最新情報を提供するとともに、一般の海外渡航者を対象に、デング熱予防のための動画(DVD)を作成した。また、トラベルクリニックや海外派遣企業の医療関係者を対象に、デング熱予防マニュアルを作成した。

### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

### 1. 必要とされる情報内容の調査

・「海外派遣企業の健康管理担当者」を対象にした感染症対策に関する調査

本調査は2013年11月～12月に海外邦人医療基金の協力のもとに行われた。同基金の会員企業161社の健康管理担当者にアンケート用紙を郵送し、海外勤務者の感染症対策やデ

ング熱対策の状況について聴取した。この結果、68社(42.2%)から回答を得ることができた。回答者は事務職(52社)、看護師(11社)、医師(2社)の順であった。業種は製造業が47社と大多数を占めた。従業員数は1000人以上の大企業が49社で、海外駐在員数も100人以上と回答した企業が44社だった。従業員を派遣している地域は、アジア(62社)、北米(59社)、西欧(57社)が多かった。

海外勤務者の健康問題として「感染症の重要性」を聴取したところ、「大変重要」と答えた企業が60社(88.2%)にのぼった。また、心配な感染症としてはウイルス性肝炎(54社)、狂犬病(53社)、デング熱(51社)、マラリア(46社)が上位に挙げられた。感染症情報の入手元としては外務省HP(55社)や厚生労働省検疫所HP(53社)が多く、テレビ・新聞などのマスコミ(30社)がこれに続いた(表1)。ワクチン接種に関しては、駐在員に推奨していると回答した企業が60社(88.2%)にのぼったが、出張者に推奨している企業は35社(51.5%)と半数だった。帰国後に感染症を疑う患者の診療ができる医療機関を特定している企業は34社(50%)だった。

デング熱に関しては、罹患した従業員がいると回答した企業が20社(29.4%)と比較的多かった。罹患経験のある従業員の再感染による重症化を予防する対策を聴取したところ、「蚊に刺されない対策の指導」(34社)や「再感染時の迅速な医療機関への受診指導」(27社)が多く、「流行地域に滞在させない指導」を行っている企業も4社みられた(表2)。

・「デング熱の知識レベル」に関する調査

本研究では2011年度より海外在留邦人や

海外派遣企業の健康管理担当者などを対象に「デング熱の知識レベル」に関する調査を行っているが、2013年度は「マニラ在留邦人」と「一般の海外渡航者」を対象に調査を実施した。

「マニラ在留邦人」の調査は、2013年12月にマニラ日本人会で開催した医療講演会の会場で参加者を対象に実施した。この結果、17名から回答が得られた。同地では2011年にも同じ用紙で調査を行っているが、2013年の正解率には大きな変化がみられなかったと(表3)。とくに「昼間、蚊に刺されない対策が有効か? (正解: はい)」の質問の正解率が前回と同様に50%台と大変低かった。

「一般の海外渡航者」を対象にした調査は、我々がインターネット上に開設した「デング熱 e-learning」(HP「海外旅行と病気」に掲載)の回答者を対象にしたもので、2011年12月～2013年11月までに830名の回答が得られた(表3)。この集団では「日本国内でも流行しているか? (正解: いいえ)」、「ワクチンで予防できるか? (正解: いいえ)」といった基本的な質問への正解率が70%台と低かった。

## 2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

### ・マニラ在留邦人のデング熱罹患状況

2012年からフィリピンのマニラ日本人会診療所を受診する在留邦人のデング熱罹患状況について調査を行っているが、今回は2年間の集計結果について解析した。デング熱の診断は抗原検出キット(NS1抗原)か抗体検出キット(IgM抗体、IgA抗体)で陽性になった者とした。その結果、2012年は55名、2013年は54名のデング熱患者が確認された(表4)。このうち30%前後の患者が入院しているが、全例が重症化することなく回復し

ていた。患者の発生は雨期となる6月～8月に多くみられた(図1)。患者の滞在形態としては、2012年は帯同家族が半数以上と多かったが、2013年は帯同家族が少なくなり、駐在員本人が半数以上を占めた。

患者の感染場所を明らかにするため、2013年7月以降は患者の居住地域を特定するようにした。その結果、居住地域が判明したデング熱患者42名のうち、R地区の居住者が12名(28.6%)と多かった。

### ・マニラ・R地区の環境調査

在留邦人のデング熱患者が多発するR地区で2013年12月に環境調査を行った。同地区はマニラ市内にある新興住宅街で、日本人の居住者も増加傾向にある。地域内には建設工事現場が多く、蚊の繁殖しやすい水たまりが多数みられた。また、R地区の中心にあるショッピングセンターには各所に緑地があり、そこで在留邦人が蚊に刺される機会が多いものと推測された。さらに、R地区に隣接してスラム街があり、この住民の間で患者が多発している可能性があった。このようにR地区は、デング熱の感染に必要な各種要素が備わっている環境であった。

## 3. 海外渡航者への情報提供

### ・ホームページの作成

2011年よりインターネット上にホームページ「海外旅行と病気」

(<http://www.tra-dis.org>)を開設し、デング熱など海外渡航に関連する病気の情報提供を行っている。2013年度は最新の感染症情報の更新を毎月行った。この結果、2013年のアクセス件数は毎月3000件前後に増加し、とくに8月～9月の夏休みシーズンには月5000件に達した(図2)。

### ・デング熱予防対策の動画(DVD)作成