

201318010B (DVD-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23年度～平成25年度 総合研究報告書

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23年度～平成25年度 総合研究報告書

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 総合研究報告

- 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 9
研究分担者：森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）
2. チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作及びキメラデング 1 型ウイルス様粒子の作製
と診断用抗原としての評価 13
研究分担者：小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）
3. GENEUCUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発、および健常成人における細胞
培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果 17
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. 媒介蚊からの簡便な病原体ゲノム検出、流行地における媒介蚊のナトリウムチャンネル遺伝子調
査、および日本の新規媒介蚊の確定 22
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およびジェノタイピング法による媒介蚊の殺
虫剤感受性評価に関する研究 29
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. コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立 . 33
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. デングウイルス感染症の診断および予防対策に関する研究 41
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. 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 47
研究分担者：永田典代（国立感染症研究所感染病理部室長）
9. 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 51
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）
10. チクングニアウイルスのコモンマーモセットモデルにおける病理学的解析および夏期の
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 56
研究分担者：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 59

- IV 研究成果の刊行物・別刷・DVD 63

I. 総合研究報告書

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った。抗体検査においては、イムノクロマト法を開発し良好な感度、特異性が得られた。またデングウイルス粒子抗原検出イムノクロマト法も開発に着手し、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欠点がある。そこでマーモセットの CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b の 4 遺伝子および T 細胞レセプター遺伝子 (TCR 遺伝子) の α 鎖、 β 鎖可変領域 (TRAV、TRBV) の 56 遺伝子を同定したデータをもとに、免疫関連遺伝子発現量を評価するために定量リアルタイム PCR (qPCR) を開発してきたが、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。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を開始した。

分担研究者：

小西英二（大阪大学微生物病研究所教授）

森田公一（長崎大学熱帯医学研究所教授）

高橋和郎（大阪府公衆衛生研究所副所長）

永田典代（国立感染症研究所感染病理部
室長）

澤辺京子（国立感染症研究所昆虫医科学部
部長）

鈴木隆二（相模原病院臨床研究センター室
長）

江下優樹（大分大学医学部・感染分子病態
制御学講座准教授）

モイメンリン（国立感染症研究所ウイルス
第一部 研究官）

濱田篤郎（東京医科大学渡航者医療センタ
ー教授）

倉根一郎（国立感染症研究所副所長）

A. 研究目的

デングウイルス(DV)はフラビウイルス科、チクングニアウイルス(CHIKV)はトガウイルス科アルファウイルスに属するRNAウイルスである。どちらもネッタイシマカあるいはヒトスジシマカなどの蚊を媒介としてヒトに感染する。DVはデング熱(DF)やデング出血熱(DHF)という異なる病態を惹起する。世界的に年間数千万～1億人がDF、数十万人がDHFを発症している。地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり流行地域拡大が最も危惧されている感染症である。我が国の輸入症例も年々増加し、2013年には249例と感染症法施行後最高の報告数となった。また、2013年8月に日本国内

を旅行したドイツ人が直行便で帰国後、デング熱を発病した事例があり、病院の検査室レベルで実施できる迅速キットの評価を行い普及の可否を検討する。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。

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。多くの日本人はDVと近縁な日本脳炎ウイルスに対する抗体を保有している。抗日本脳炎抗体がDV感染者における感染増強現象を、我々の開発したFcレセプター発現BHK細胞を用いて感染増強抗体を測定し、わが国にDVが侵入した場合の重症デング熱発生頻度を推定する。

B. 研究方法

1. 診断法の開発・評価

RT-LAMP 法を用いたウイルス遺伝子迅速診断法の開発・応用

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

GENECUBE を用いたアルボウイルスウイルス遺伝子迅速診断法の開発

検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置である GENECUBE® (TOYOBO) による GENECUBE Qprobe 法のためのプライマーと Q プローブ設計し、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの検出感度、特異性を検討した。

1 回感染性フラビウイルス粒子の産生

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

2. ワクチン

成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答

健康成人 272 名 (20~72 歳、平均 43 歳) に細胞培養日本脳炎ワクチン (ジェービック V®) を接種し、約一ヶ月後の抗日本脳炎中和抗体価を測定し、さらに接種一年後の中和抗体価を測定し、中和抗体 (防御抗体) の維持に関して検討した。

3. 動物モデルの開発、病態解析

マーモセットの免疫学的解析法

デングウイルス感染霊長類モデルとして確立されつつあるマーモセットは、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。そこで、サイトカイン系の発現解析、MHC、T 細胞レセプター、個体識別マーカーなどを検討し、ハウスキーピング遺伝子 (HKG) および免疫関連遺伝子の特異的プライマーをヒト配列と相同性の高い部分を採用し設計し、定量リアルタイム PCR を構築した。日本脳炎ウイルスを腹腔接種し、ウエストナイル脳炎を発病した感染マウス脳内の細胞性免疫 (ウイルス特異的脳内浸潤 T 細胞) を解析した。

デングウイルス初感染マーモセットにおける生化学および免疫学の解析

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 日目に採血を行なった。対象グループ (4 個体) は、採血のみ行なった。さらに、4 個体においては、DENV-2 (DHF0663 株) の接種を行い、接種後 2、4、7、14 日目に採血を実施した、血液一般検査、生化学検査、ウイルス遺伝子検査、抗体検査を実施した。日本脳炎ウイルス感染マウス脳炎発症にかかわる脳内浸潤 T 細胞の解析

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

病理学的解析

チクングニアウイルス感染マーモセットの諸臓器を病理学的に解析した。また、新生仔マウスにデングウイルスを脳内接種し、マウス組織を用いて参照標本作製し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体

の交差反応性と至適条件の検討を行い、組織切片上のウイルス抗原検出系を検討した。

(倫理面への配慮)

上記動物実験は、国立感染症研究所および各関連施設における実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

4. 媒介蚊の殺虫剤感受性試験

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

タイのネッタイシマカ幼虫を野外で採集し、繁殖させて成虫になるまで育てた。成虫にし0.75%ペルメトリンに1時間暴露させて生存したネッタイシマカ成虫をペルメトリン耐性とし、ペルメトリン耐性シマカの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。それらの個体から全RNAを抽出後、kdr遺伝子ドメインIIのS4ならびにS6をカバーする領域のfirst strand cDNAをPCR増幅させた。PCR生成物を精製し、遺伝子配列を決定し、変異を同定した。

5. 診断技術等の技術移転

地方衛生研究所、検疫所にウイルス遺伝子検査のための陽性コントロールを配布できるようにウイルスRNA遺伝子の常温保存・輸送方法を検討した。RNA抽出キットを用いて抽出したデングウイルス1-4型RNA遺伝子を、RNA stable tube (RNA stable 1.5ml Screw-Cap Tube)に入れ、蓋を緩めた状態で真空遠心機により乾燥させる。乾燥させたチューブを室温(15-25°C)、30°Cおよび40°Cで長期保存して、-80°C凍

結保存のものとりアルタイム逆転写PCR (TaqMan)法により評価した。

6. 海外旅行者への啓蒙ツール開発

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

C. 研究結果

1. 診断法の開発・評価

1 回感染性フラビウイルス粒子の産生

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

ウイルス遺伝子迅速診断法の開発

(1) (RT-LAMP)法

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

(2)GENECUBEを用いたアルボウイルス遺伝子迅速診断法の開発

DVは1-4型すべて検出可能であった。検出感度は4型が10コピー、3型が100コピーであった。最少検出ウイルス力価は1

型 2.3×10^2 PFU, 2 型 6.0×10^4 PFU, 3 型 3.2×10^3 FFU, 4 型 2.3×10^2 FFU であった。J E V Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^2 FFU であった。

迅速抗体検査キットの開発

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

2. ワクチン

旅行者ワクチンとしての細胞培養日本脳炎不活化ワクチンの評価

ワクチン接種者のうち継続調査ができた 154 名の幾何平均抗体価は、ワクチン接種 1 ヶ月後 87.6 倍から 1 年後には 21.8 倍と約 1/4 に低下した。1 年後の陰転率は 21.4% で、ワクチン接種後の抗体価が低いほど陰転化する割合は上昇した。ワクチン接種前の中和抗体価が <10 で抗体陽転した 80 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 30 例 (37.5%) であり、1 年後に陰転化した 31 例の 96.7% を占めた。一方、ワクチン接種前の中和抗体価が ≥ 10 ワクチン接種前の中和抗体価が ≥ 10 で抗体上昇した 64 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 1 例 (1.6%) であった。

3. 動物（霊長類）モデルの開発、病態解析

マーモセットの免疫学的解析法の確立

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

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

(3) マーモセットとヒト白血球における

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

デングウイルス初感染マーモセットにおける生化学および免疫学の解析

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

日本脳炎ウイルス感染マウス脳炎発症にかかわる脳内浸潤 T 細胞の解析

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

に上昇していた。また脳内サイトカインバランスを測定した結果、脳内サイトカインバランスは感染後徐々に Th1 側に偏っていた。しかし体重により予後判定のできる 13 dpi では Dying 群では Surviving 群と比較してより Th1 側に偏っていた。

フラビウイルス脳炎の病態解析

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

病理学的解析

チクングニアウイルス感染マーマセットの諸臓器を病理学的に解析したところ、CHIKV 接種 4~21 日の長期に渡り脾臓および腋窩リンパ節にウイルス遺伝子が検出された。また肝臓および脾臓において特異的抗原が検出され、肝臓においては肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤、脾臓においては二次濾胞の形成および starry sky 像が観察された。また、新生仔マウスにデングウイルスを脳内接種し、マウス組織のホルマリン固定およびパラフィン包埋標本におけるウイルス特異的モノクローナル抗体の交差反応性と至適条件の検討の結果、Anti-Dengue Virus E glycoprotein antibody (ab80914)が良好な反応を示した。

4. 媒介蚊の薬剤感受性試験

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

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

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

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

5. 診断技術等の技術移転：蚊媒介性ウイルス RNA 安定室温保存に関する研究

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

6. 海外旅行者への啓蒙ツール開発

デング熱などの蚊媒介性ウイルス感染症の啓蒙のために、ホームページを作成し e-learning 形式の「デング熱に関する検定」を作成した。また、ジャカルタ、マニラの在留邦人を対象に、デング熱の知識に関するアンケート調査を実施した。その結果、日本人は蚊には夜刺されるという意識が強く、デング熱の媒介蚊が夕方や明け方に刺されることが多いという知識乏しいことが明らかとなった。東南アジア主要各国 (フィリピン、ベトナム、カンボジア、ラオス、マレーシア、シンガポール、タイ、台湾)

およびオーストラリアにおけるデング熱流行状況もホームページに掲載した。

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

D. 考 察

診断法の開発としては、ウイルス遺伝子検出法の開発、検体前処理法の改良、イムノクロマト法による迅速抗体検出法の開発を行った。ウイルス遺伝子検出法としては、現場即時検査の面からの RT-LAMP 法の確立は媒介蚊の調査、血液からの前処理をなくした検出は遠心機のないベットサイドでの検査に有用で POCT (Point of care testing) の手段となると考えられる。一方、検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置である GENECUBE®による遺伝子検出法の確立は、国内流行が拡大した場合に地方衛生研究所等のマンパワーの不足を補えるものと考えられる。抗体検査として、独自のデングウイルス IgM 抗体イムノクロマトキットを開発した。今後チクングニアウイルス IgM 抗体イムノクロマトキットも開発する予定である。また、プラスミドトランスフェクションによる 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 (Arune et al. ; *The Lancet*.380(9853):1559-67,2012)、むしろワクチンの評価方法や動物モデルに重点を置くべきであり、それがワクチン実用化への近道である。

成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答では、現在の細胞培養日本脳炎ワクチン 1 回接種の中では、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ーシス、細胞浸潤が観察され、脾臓では二次濾胞の形成および二次濾胞内に starry sky 像が観察されたことから CHIKV の感染が成立した可能性が示唆された。したがって今後さらなるウイルス学および病理学的詳細を解析する必要がある。

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

実験室診断法の技術移転の一環として検討した RNA 遺伝子の常温保存・輸送方法の検討では、RNA stable チューブを使用することでデングウイルスは少なくとも室温保存 5 ヶ月間安定であることが確認できた。また 4 週間の 30℃、40℃下での保存でも安定であることを確認した。本方法により国内衛生研究所、検疫所等の検査機関に輸送する際に、ドライアイスを使用する必要がなく、新たな RNA ウイルス感染症の検査体制構築に極めて有用である。

E. 結論

蚊媒介性ウイルスの遺伝子検出法として、現場即時検査法として RT-LAMP 法の確立と蚊および臨床検体（血液）への応用研究を実施し、前処理の簡略化を図った。また、検査機関におけるマンパワーの不足を補うために検体の遺伝子抽出から核酸増幅・検出・判定までを行う全自動遺伝子解析装置による検出法も検討した。また、イムノクロマト法による IgM 抗体検出キットの開発を開始した。

プラスミドトランスフェクションによる 1 回感染性 JEV 粒子産生系を確立した。prME の配列を変える事によりデングウイルス、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスの 1 回感染性粒子の迅速簡便な作製も可能であり、それらは感染中和アッセイ等に有用である。

デングウイルス感染動物モデルとして有用であるマー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℃、40℃の高温下での安定性を確認した。

デング熱流行地の在留邦人のデング熱に関する認識度調査を行った結果、媒介蚊に関する知識が不足していることが判明した。

日本人海外旅行者向け感染症に関するホームページ、ポスターを作成した。

F. 健康危険情報

H23 年夏にフィリピン熱帯医学研究所 (RITM) に確認したところ、チクングニア熱のミンダナオ島での流行が確認されたが、H24 年には流行がメトロマニラを含むルソン島はじめ多くの地域に拡大した。日本人のフィリピンからの輸入症例も確認された。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

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）

分担研究総合報告書（H23-25年度）

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 万の感染者が発生していると見積もっている。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、迅速診断法の開発、改良を目的とした。

初年度は日本で開発された遺伝子増幅検出技術である LAMP 法をデングウイルス等の検出に応用した手法を開発した。これまで開発された同様の手法の多くは 4 つあるデングウイルスの血清型それぞれについての検査が必要であったが、今回開発した方法では、1 つの検査で 4 つの型ともに高感度に検出することが可能であった。さらにデングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等とは反応せず、非特異反応もほとんどなかった。このことから、本手は十分に有用な診断法であると判断した。

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成技術を開発した。得られた結果から、本研究をさらに推進することでデングウイルスの高感度で安全、安価なベッドサイト抗体診断薬が供給可能であると判断した。

3 年次の研究では、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デングウイルス、チクングニアウイルスの迅速検出技術をデング熱流行国で活用してデングウイルス、チクングニアウイルスの検出を実施しミャンマーでは同国に初めて 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

我が国への侵入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、迅速なウイルス遺伝子検出系、特異的抗体検出系を開発すること。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、安価な診断用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. デングウイルスをはじめとする LAMP 法による迅速診断法の開発

デング 1~4 型ウイルスの遺伝子ゲノム 3' 末端にあるコンセンサス配列からデングウイルスコンセンサスプライマーを合成した。栄研化学社製の RT-LAMP キットに LAMP プライマーを添加し、ウイルス培養液、ヒト血清サンプルから抽出した RNA を添加して Auto-turbidimeter で 63°C、1 時間測定した。RT-PCR 法はインビトロゲン社製の RT-PCR キットを用いて 2. の RT-PCR プライマーとサンプル RNA を添加し常法にしたがって、遺伝子増幅を行い、アガロース電気泳動によって増幅産物を検出した。黄熱ウイルスやダニ媒介性脳炎ウイルスについても同様に LAMP 法の実験を実施した。

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。)

ウイルス様粒子の作製については昆虫細胞発現ベクター pIB/V5-His (Invitrogen 社製)を用いデングウイルス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 blasticidin により高発現細胞を選択し安定発現系を得た。同様に、日本脳炎ウイルスや黄熱ウイルスについてもウイルス粒子様抗原の発現を実施した。(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。

3. 診断薬評価のための流行地での調査

2010年7月~10月の期間にミャンマー国にある 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ている 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うけ実施した。

C. 結果

1. デングウイルスをはじめとする LAMP 法による迅速診断法の開発

デングコンセンサス RT-LAMP プライマーを用いて 4 つの血清型のデングウイルスの遺伝子が検出可能であった。検出限界は DEN-1, -2,

-3, -4 型の代表型 について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。野生株 16 株を用いた RT-PCR 法との比較では 7 株で 10~100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。デングウイルスと近縁の日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、セントルイス脳炎ウイルス等について consensus デング RT-PCR との反応性を検討したがいずれのウイルスでも遺伝子増幅はなかった。また、過去にウイルス分離が陽性であった患者サンプルから抽出した RNA から高感度にデングウイルス遺伝子が検出され、非感染者血清からの RNA では非特異的増殖は見られなかった。

バングラデシュで 2006 年~2009 年に採取されたデング熱疑いの有熱患者血清、42 例、88 例、21 例、126 例から、このデングコンセンサス LAMP 法を用いて、25 例のデング 1~3 型のウイルスが検出できた。この結果はウイルス分離、PCR 法による検査結果と概ね一致していた。

このほか、研究期間中に黄熱ウイルス、第媒介性脳炎ウイルスについても LAMP 法を応用して迅速ウイルス検出法の開発を完了し、以前に開発していた、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルスの LAMP 法と合わせて日本に侵入する可能性のある蚊媒介性ウイルスの迅速遺伝子検出のための LAMP 法が確立された。

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

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。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。

3. 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 例のデング熱疑い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。

D. 結論

1. デングウイルスの 4 つの血清型のすべてを同時に検出し得るデングウイルス共通 RT-LAMP 法を確立した。この RT-LAMP の検出限界は DEN-1, -2, -3 -4 型の代表型 について、それぞれ 1, 10, 10, 1 copy であった。デングウイルス 16 株を用いたコンセンサス RT-PCR 法との比較では 7 株で 10 ~ 100 倍高い感度、6 株では同じ感度であった。コンセンサス RT-PCR 法と他のフラビウイルスとのクロス反応はなかった。患者血清からも Consensus デング RT-LAMP でウイルスが検出でき、健康者血清からは非特異反応はなく、臨床検体からもデングウイルスを検出できた。

2. IgM 補足法による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。

3. 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。

E. 考察

1. デングウイルスのコンセンサス LAMP デングウイルス感染症の迅速診断、フィールドサーベイランスに極めて有用であると考えられる。
2. 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. デングウイルスをはじめとして、フラビウイルス粒子様抗原は安全安価な抗原として有望であり、他のフラビウイルスや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。
4. 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。

F. 研究発表

1) 論文発表

Kwallah AO, et. al., 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, et. al., 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

Basu D. 他: First Isolation of Dengue Virus from the 2010 Epidemic in Nepal. *Tropical Medicine and Health* Vol. 41 No. 3: 1-9, 2013

2) 学会発表

Toru Kubo 他: Developing a panel of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assays for comprehensive detection of causing viruses in pediatric severe pneumonia. *International Union of Microbiological Societies Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011*

Mya Myat Ngwe Tun 他: Dengue primary infections observed among dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome cases in upper Myanmar. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, September 11-16, 2011*

Allan ole Kwallar 他: A Real-time Reverse 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.*

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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（H23-25 年度）

チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作及び
キメラ Dengue 1 型ウイルス様粒子の作製と診断用抗原としての評価

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 蚊媒介性ウイルス疾患には国際感染症が多く含まれ、その中で Dengue 熱やチクングニア熱はわが国の輸入感染症例数が近年増加している。しかし、治療薬やワクチンは無い。本研究班における初年度（平成 23 年度）は、チクングニア熱を予防する DNA ワクチンの試作を行った。2 年目（平成 24 年度）は、日本脳炎ウイルス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。最終年度（平成 25 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が、本来の DENV-1 の代替抗原として中和試験及び感染増強試験に使用可能であることを示した。ウイルスの国境を超える移動の制限は大きいとため、国外のウイルスが遺伝子情報のみで国内で容易に作製できる技術は有用であり、ワクチンの評価や診断系の開発、また国民のリスクアセスメントや病原性の解明などへの利用が期待される。

A. 研究目的

チクングニア熱（CHIKF）は通常は非致死性の発疹性熱性疾患であるが、必発する関節痛は数週間から数カ月にわたって続く場合があり、重症例では神経症状や劇症肝炎による死亡も報告されている。Dengue 熱（DF）は、発熱、発疹、頭痛、眼窩痛、筋肉痛、関節痛等を呈する一過性熱性疾患であるが、重症の Dengue 出血熱（DHF）は、Dengue 熱の症状に加えて血漿漏出や出血傾向、さらにショック症状を示して致死的となる。現在のところ、特異的な治療方法はなく、認可された予防ワクチンもない。

これらの疾患は熱帯・亜熱帯地域に流行するが、わが国では流行国への渡航者による輸入感染症が問題となる。そして近年、輸入感染症例数は増加している。しかも輸入感染症にとどまらず、国内流行の可能性も危惧される。これらの病気を媒介するヒトスジシマカは東北以南に生息するため、輸入感染症として帰国したウイルス血症の患者をヒトスジシマカが吸血することで、蚊にウイルスが伝播する可能性がある。ウイルス保有蚊が生じると、その刺咬によりヒトが感染を受けていわゆる国内伝播が発生する。温帯地域における国内伝播の事例

はヨーロッパの国々で報告されており、わが国でも国内伝播を示唆するDF患者発生が最近報告された。

これらの疾患に対する総合的対策の確立を目的として、初年度(平成23年度)には、CHIKVを予防するDNAワクチンを試作した。2年目(平成24年度)には、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。最終年度(平成25年度)には、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)が、中和試験及び感染増強試験に使用可能であることを示した。

B. 研究方法

CHIKV ゲノム RNA : BaH306 株 (AY424803)、SL10571 株 (AB455494)、S27 株 (AF369024) のゲノム RNA は国立感染症研究所ウイルス第一部の高崎智彦室長から分与を受けた。

JEV レプリコンプラスミドの作製 : JEV 中山株のレプリコン cDNA を、CMV プロモーターと HDV リボザイム配列の間に挿入して JEV レプリコンプラスミドを作製した。pCMV-JErep は、JEV 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した。一方 pCMV-JErep-fullC は、JEV ゲノムにおける全長の C 領域は保存し、全長の prM と大部分の E 領域のみを除いたレプリコンが機能するように設計された。

JEV または DENV-1 の構造蛋白質発現プラスミド : JEV 中山株あるいは DENV-1 望月株の C-E、C、prM/E 領域それぞれの cDNA を CAG プロモーター下流に挿入し

て構築した。

SRIP の感染力価測定法 : レプリコンプラスミドおよび構造蛋白領域発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養上清を Vero あるいは K562 細胞に感染させ、2 日後に抗 JEV-NS1 抗体を用いた細胞染色により計数した。

中和試験 : 段階希釈した抗体と抗原 (JEV、DENV-1、JEV-SRIP、D1-SRIP) を混合し、室温で 1 時間あるいは 37°C で 2 時間保温後に Vero 細胞に感染させ、2 日後に抗 NS1 抗体を用いて細胞染色を行い、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。

増強試験 : 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 抗体を用いた細胞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、補体を含む系と含まない系で行った。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト血清の使用および動物実験は、当該研究機関の倫理委員会及び動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

CHIKV DNA ワクチンの試作及び評価 : BaH306 株、SL10571 株、S27 株のウイルスゲノム RNA から RT-PCR を行い、E1 - E3、6K 遺伝子を pcDNA3 ベクターに組込んだ。これらのプラスミドを CHO 細胞へ導入し、免疫染色により細胞内 CHIKV 抗原の発現が確認された。

JEV レプリコンプラスミドの評価：JEV レプリコンプラスミドを Huh7 細胞にトランスフェクションし、2 日後に細胞を固定し、抗 dsRNA 抗体を用いて細胞を染色すると、陽性細胞が認められた。この結果は、ウイルス RNA が細胞内で複製され、レプリコンとして機能したことを示す。

JEV-SRIP 放出の確認：JEV レプリコンプラスミドと JEV の C-E 発現プラスミドを 293T にトランスフェクションすると、3 日目の培養上清中に約 10^6 IU/ml の感染性粒子が産生された。C-E 発現プラスミドを、C 発現プラスミドおよび prME 発現プラスミドの 2 つプラスミドに分割して発現させた場合でも、同様の結果が得られた。この結果は、プラスミドのコトランスフェクションにより細胞から感染性粒子が放出されたことを示す。また、このようにして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、得られたウイルスは 1 回のみでの感染性である事が確認できた。

JEV 抗体による JEV-SRIP の中和：抗 JEV ウサギ血清による JEV-SRIP の感染中和は、血清の濃度依存的に認められ、またそのレベルは JEV 中山株に対する活性と同程度であった。この結果は、JEV-SRIP の表面抗原構造が、本来の JEV のそれと同様であることを示す。

他のフラビウイルスの表面抗原を持つ SRIP の作製：DENV、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 prM/E 発現プラスミドと JEV レプリコンプラスミド、JEV C 発現プラスミドを 293T 細胞にコトランスフェクションしたところ、DENV では感染価が低かったものの、試した全てのウイルスで 1 回感染性粒子の産生が認められた。

D1-SRIP 収量を増加させる工夫：pCMV-JErep-fullC を用いて作製された

D1-SRIP の放出量を継時的に測定したところ、トランスフェクション後 3 日目ではほぼ最高値に達した。この値 (10^4 IU/ml) は、pCMV-JErep を用いて得られた感染力価 (10^3 IU/ml) より約 10 倍高値であった。この結果は、全長の C 領域遺伝子をレプリコンプラスミドに組み込む工夫により、SRIP の収量が上昇したことを示す。

D1-SRIP 抗原の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。得られた抗体濃度依存的反応曲線は、本来の DENV-1 抗原を用いて得られた曲線と類似した。さらに希釈度 $1:10^1 \sim 1:10^6$ で得られた感染細胞数を、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で比較したところ、補体存在下でも非存在下でも、高い有意の相関を示した（相関係数は 0.95 以上：P<0.001）。

次に、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-VLP 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。希釈度 $1:10^1 \sim 1:10^5$ で得られた感染細胞数も、補体存在下と非存在下の両条件において、DENV-1 抗原と D1-VLP 抗原の間で高い有意の相関を示した（相関係数は 0.98 以上：P<0.001）。

D1-SRIP 抗原の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。増強試験の結果と同様に、DENV-1 抗原と D1-VLP 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認められた（相関係数は 0.919：P<0.001）。

D. 考察

「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