

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  
組織図

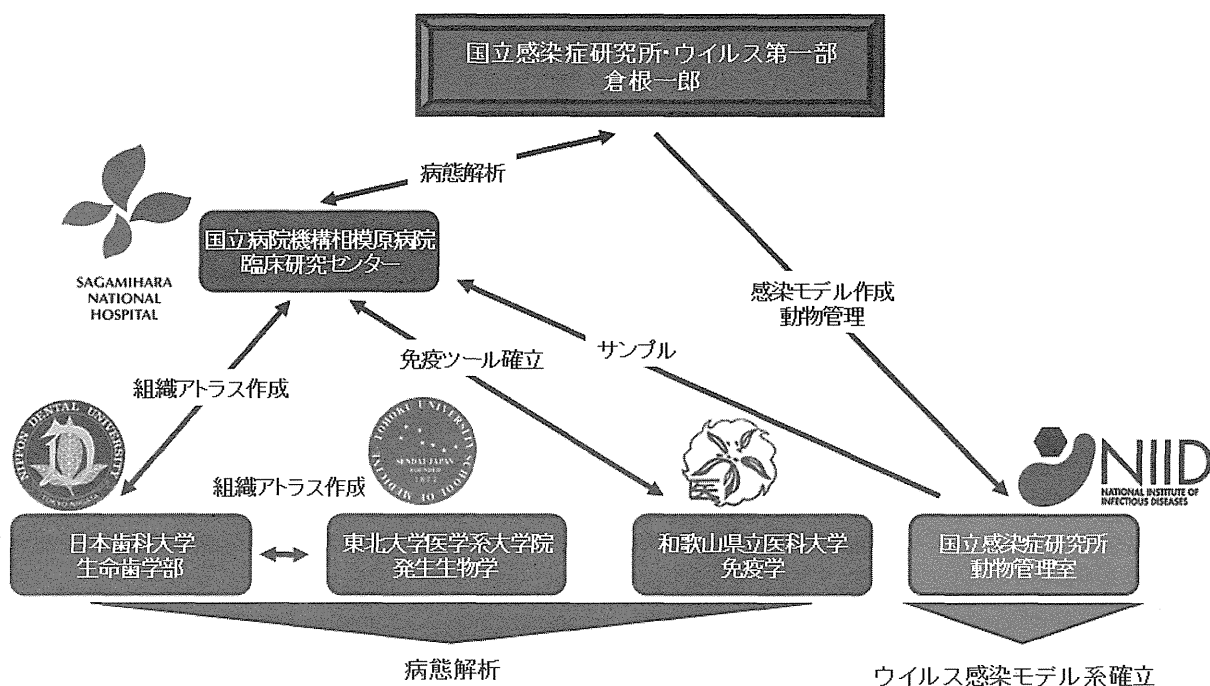


図 1. 本研究における組織図

Antigen recognition by TCR

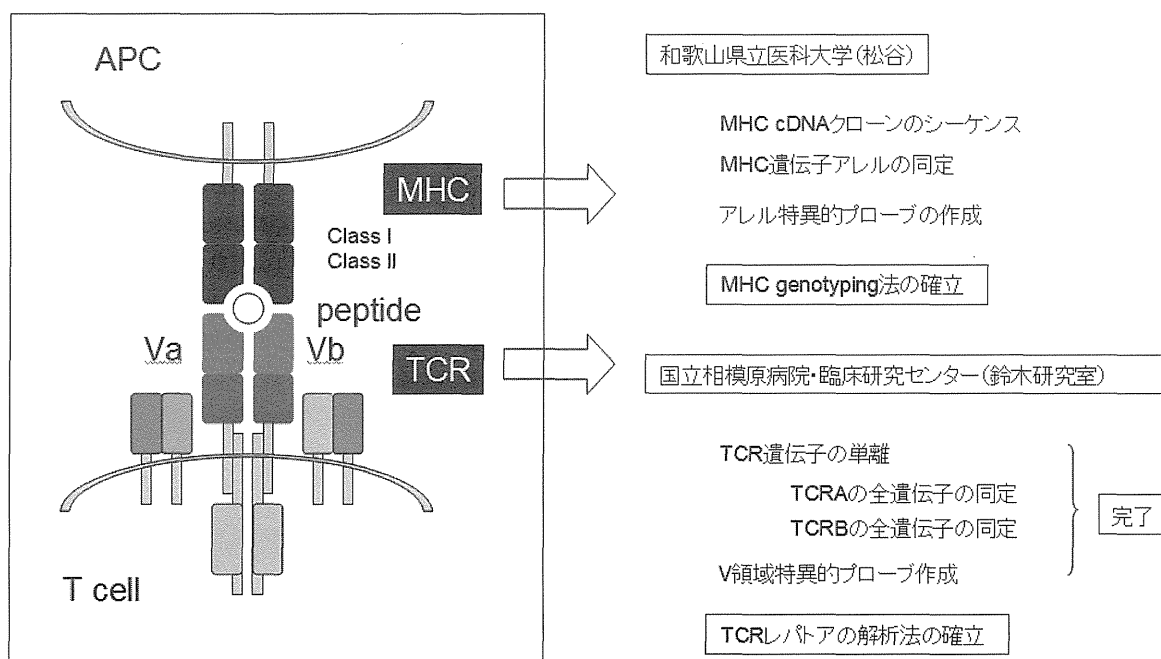


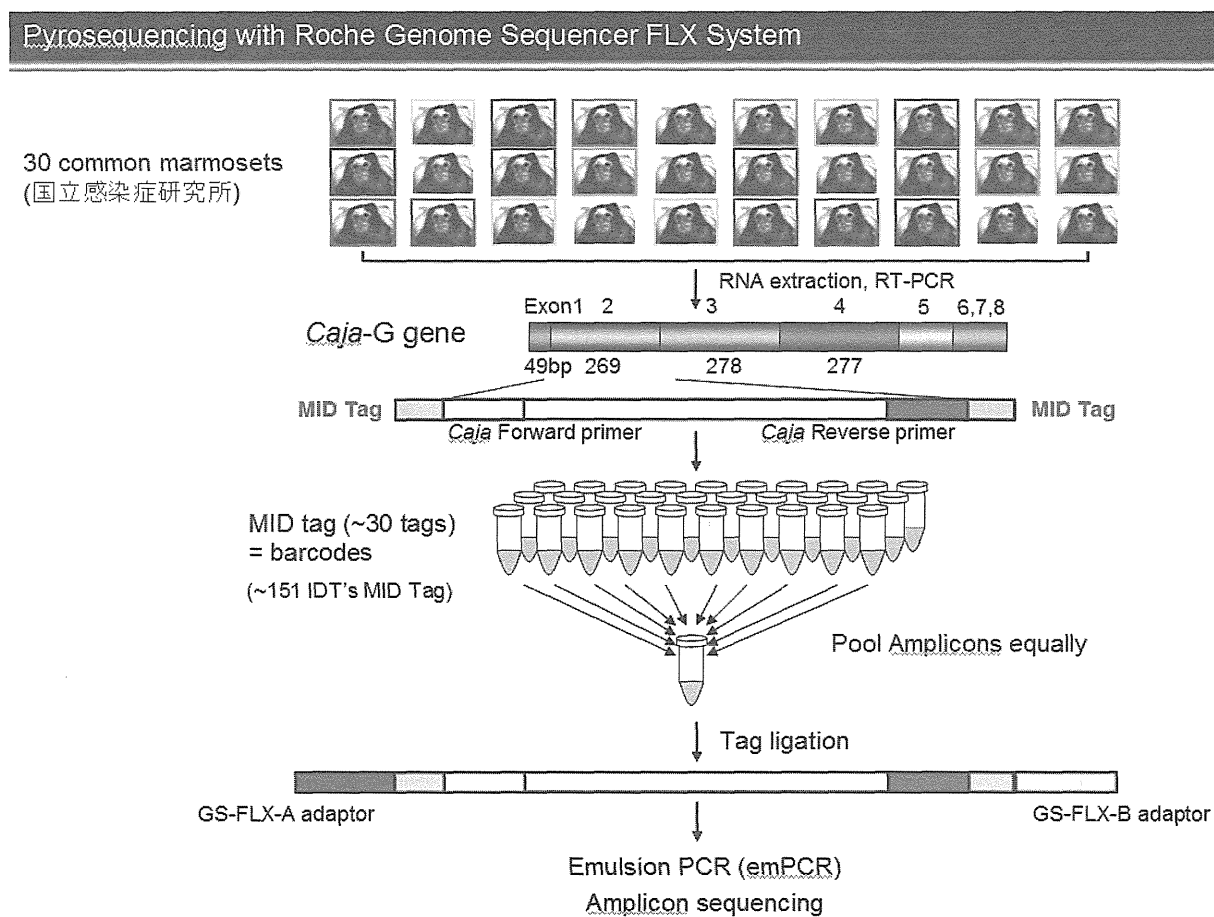
図 2. TCR における抗原認識機構およびマーモセットにおける TCR、MHC 解析手順

既にプライマーを設計し測定可能な遺伝子

Target	GenBank	備考	Target	GenBank	備考
GAPDH	DD279474		IL-1a	AB539803	新規登録
$\beta$ -actin	DD279463		IL-1b	AB539804	新規登録
HPRT	DD289567		IL-2	DQ826674	
CD3e	DQ189218		IL-4	EF493341	
CD4	AF452616		IL-5	DQ658152	
CD8a	DQ189217		IL-6	DQ658153	
CD14	AB539802	新規登録	IL-10	DQ658154	
CD20	DQ189220		IL-12b	AB539805	新規登録
CD25	DQ520834		IL-17a	EF534212	
CD28	EF534209		IL-17f	EF613223	
CD34	AB097501		INF- $\gamma$	FJ598593	
CD80	EF534214		TNF- $\alpha$	DQ520835	
CD86	EF534211				

\* 新規登録: 我々が塩基配列を特定してGenBankへ登録したもの

図 3. コモンマーマセット免疫関連遺伝子における検出可能遺伝子の一覧



MHC genotyping using massively parallel pyrosequencing

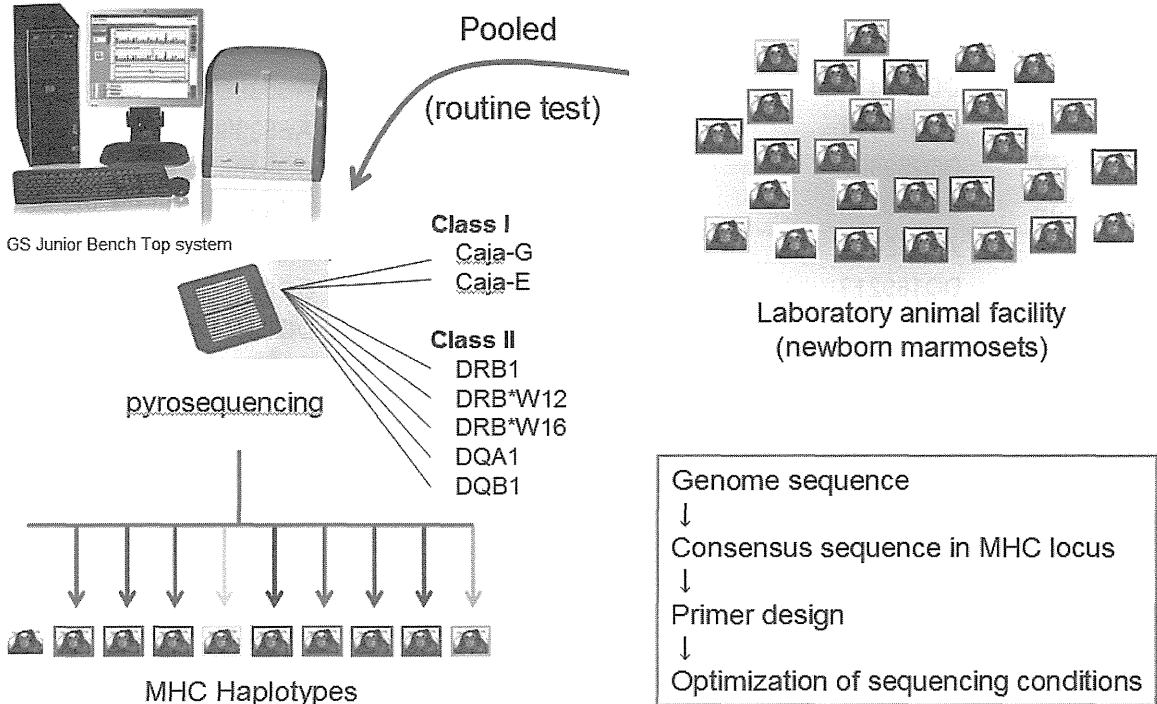


図 4. 次世代シーケンサーを用いた *Caja-G* 遺伝子ハプロタイプの決定

Accession Number	gene name	FR 1 (1-26)		CDR 1 (27-38)		FR 2 (39-55)		CDR 2 (56-65)		FR 3 (66-104)				CDR 3 (105-)		Nucleotide homology	Amino acid homology		
		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	+	ABC					
AB504390	CJTRAV1-2	GGNIGQ	PTIEVTAMEG	IVQINCYO	TTG	.....	FNG	LSWYGGRDGKAPTFLSY	NVL	.....	NG	LEE	RG	.....	HFSSFLNRSKGYVLLVKLQMKDSASYLC	AVR	90.9	83.5	
AB504391	CJTRAV2	RQVVSQ	PSTVASSEGAVVE	IFGNHS	VSN	.....	AYN	FFWYLFHPGHEPRLLVK	GS	.....	R	PSQ	QG	.....	RYNMYTER	FSSSLILQVQEDAAYVYC	A	95.7	92.9
AB504392	CJTRAV4	LAKTTO	PISMSYSEGEVNI	ISCSHD	NIAT	.....	SDY	IFWYGGFPNGGPRLLIQ	GY	.....	KT	NVA	NE	.....	VASLFI PAERKSSSTLSLPRVALSDTAAYYC	VVG	91.6	87.9	
AB504393	CJTRAV5	GGDMKOS	LFLSVREGDSVNI	INCYT	DSS	.....	SSY	LWYGGDPGASLQQLAY	ILS	.....	NTD	TQK	DQ	.....	RLTVQLDKKKNKLSLQIAETQGDSDAIYSC	AER	91.9	80.4	
AB504394	CJTRAV8-1	AGSVSPDYHV	ILSEGASLELRGNYS	YGG	.....	TVT	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	DTL	VKG	IK	.....	GFEAEFKRSQSSFNLRKPSVQWSDTAIEYFC	AVK	91.9	85.1		
AB504395	CJTRAV8-3	AGSVTQPDH	IVSEGASLELRGNYS	YGA	.....	TAY	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	DTL	VKG	IK	.....	GFEAEFKRSQSSFNLRKPSVQWSDTAIEYFC	AVK	96.4	97.8		
AB504396	CJTRAV8-6s1	AGSVTQDGOV	IVSEAPVLLKGNYS	SSV	.....	TVY	PFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	PTL	VKG	VK	.....	GFEAEIKKSESSFNLRKPSVQWSDTAIEYFC	AV	90.0	78.5		
AB504397	CJTRAV8-6s2	AGSVTQDGOV	IVSEAPVLLKGNYS	SSVS	.....	VVY	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	PTL	VKG	IK	.....	GFEAEFKKSESSFNLRKPSVQWSDTAIEYFC	AV	88.0	78.7		
AB504398	CJTRAV9-1	KNSVYVTEGEV	LLSEGDSLVNCSYE	STG	.....	YPS	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	GND	KGRSNK	.....	.....	DPEAIYRTETTFHLEKGSVQESDASVYFC	AL	91.8	83.9		
AB504399	CJTRAV10	KNOVEQSPQSL	VILEGKNGCTLQCYT	VTP	.....	FNN	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	MTF	SEN	TKS	NG	.....	RYAATLDANTKQSSHLITASQLSDSASYIC	.....	93.7	88.9	
AB504400	CJTRAV12-1	QKEVEQDPGPP	WPEGTYVFNCTYS	NSA	.....	SQS	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	SG	N	E	DG	.....	RFTACLNRASRVYSLFIRDSQLSDSATYLC	AV	94.1	91.1	
AB504401	CJTRAV12-2	QOKLEQNSG	PLWPEGTYVFNCTYS	DRG	.....	SQS	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	NG	DEE	DG	.....	RFTACLNRASRVYSLFIRDSQLSDSATYLC	AV	90.9	86.8		
AB504402	CJTRAV12-3	QKEVEQDPGPP	WPEGTYVFNCTYS	NRA	.....	FQY	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	SD	KKE	DG	.....	RFTACLNRASRVYSLFIRDSQLSDSATYLC	AVS	92.8	87.0		
AB504403	CJTRAV13-1	GENVEQRPSTL	SVQVGDSSVINCYS	DSA	.....	SNY	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	IRS	NVD	KRK	DR	.....	RMTVLLNKAKHFSHLITDTPQSDSALYFC	AAG	90.4	82.8	
AB504404	CJTRAV16	AQRVYTPQPKT	LVFEGAPYQLKGNYS	YSG	.....	NPD	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	HI	.....	S	RES	VK	.....	GFTADLNKGETSFHLEKGSVQESDASVYFC	AL	91.4	86.5
AB504405	CJTRAV17	SQGEFEFPQT	LVFEGAPYQLKGNYS	TSI	.....	SS	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	IRS	NER	EKY	SG	.....	RLRFTLDTSMKSSSFLIAAQAADTAAYFC	AT	91.2	81.3	
AB504406	CJTRAV18	GDSVYVTEGEV	LLSEGDSLVNCSYE	SSY	.....	SAF	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	SSE	NO	ETD	SR	.....	GFOASHVKSDSSFNLRKPSVQWSDTAIEYFC	ALR	94.6	92.4	
AB504407	CJTRAV19	ADKVYVTEGEV	LLSEGDSLVNCSYE	TSDT	.....	TYV	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	ONSF	NEQ	NEI	NG	.....	RYSNWFRSTSSFNLIITASQVSDSASYFC	ALSE	91.7	83.3	
AB504408	CJTRAV20	EDQVYVTEGEV	LLSEGDSLVNCSYE	VSS	.....	FNR	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	LYS	AGE	EKQ	KG	.....	RLKATLTK	KESFLHITAPKPEDSASYLC	AV	92.5	85.4
AB504409	CJTRAV21	KQEVYVTEGEV	LLSEGDSLVNCSYE	DRA	.....	IYS	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	IQS	SGR	EQT	SG	.....	RLTALLDKSSGHSTLYIAASQVSDSASYLC	AV	94.6	94.4	
AB504410	CJTRAV22	GIQVEQSPQSL	VILEGKNGCTLQCYT	TSV	.....	INN	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	SG	TQK	DQ	.....	RLSATVSMERYSLLHITSSHTDSDAIYFC	AV	93.7	87.8		
AB504411	CJTRAV23	QDQVKSQPSL	VIVKQGEISVMNCTYE	NSA	.....	FQY	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	IHS	VMI	VKE	EG	.....	RFKIFPNKSAKHFSLHIMASQVSDSASYFC	AA	91.0	79.3	
AB504412	CJTRAV24	ILYVEQSPQSL	VILEGKNGCTLQCYT	SSN	.....	FYA	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	NTL	NGD	EKK	KG	.....	RINVTLNTKQVYSLFIRDSQLSDSATYLC	AT	95.7	93.4	
AB504423	CJTRAV25	GQGIHQIPIHF	QVQDEDFTYVFNCTYS	TTL	.....	DN	IFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	GL	NET	NE	.....	RLTFQFGARKNSSHLITATQITDVGTYFC	AG	92.7	89.0		
AB504413	CJTRAV26-1	DAKTTO	PTSMDCAGRAANLPCNHS	T1SG	.....	NEY	IFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	GL	NET	NE	.....	MASLTVI AEDKSSSTLILPHATLRDAAYVYC	IVRV	94.9	92.4		
AB504414	CJTRAV26-2	DAKTTO	PTSMDCAGRAANLPCNHS	T1SG	.....	ADY	IFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	GT	TS	NVN	NR	.....	MASLTVI AEDKSSSTLILPHATLRDAAYVYC	IL	94.1	93.3	
AB504415	CJTRAV27	TQQLQESPGFL	SIVGEGEFTVYVFNCTYS	SVF	.....	TN	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	LVK	SGE	VKG	KG	.....	RLIFQFGDARKQSSHLITAAQVSDSASYLC	AV	93.0	85.6	
AB504416	CJTRAV29	DGQVKNTPFL	SVGEGEFTVYVFNCTYS	NNL	.....	FDY	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	IRS	VTN	QNK	DG	.....	RFTVFLNKSANHSLHIAASQVSDSASYLC	AA	91.4	80.4	
AB504417	CJTRAV34	SQELQESPGFL	SIVGEGEFTVYVFNCTYS	KTL	.....	FYA	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	LQI	GGE	EKS	HE	.....	KITAKLEDKQSSHLITASQVSDSASYLC	GA	93.8	92.3	
AB504418	CJTRAV36	EDQVYVTEGEV	LLSEGDSLVNCSYE	AAN	.....	FQS	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	LTS	SRI	EKK	SG	.....	LSLSSMLDKKERFSLHITATKTRDSATYLC	AV	90.5	81.3	
AB504419	CJTRAV37	QLPVEQDPQSL	VILEGKNGCTLQCYT	DSA	.....	SDF	FRWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	MLS	NVR	EKI	SG	.....	RFTARLEKQVHFSHLI EDSQLHSDTFFFC	AA	95.6	90.2	
AB504420	CJTRAV38-1	AQRVYVTEGEV	LLSEGDSLVNCSYE	SSDS	.....	DYV	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	IRV	QAY	QAT	EN	.....	RFVSNFQAAKSFSLKISGSLGDTAMVYFC	AYRS	95.1	91.7	
AB504421	CJTRAV38-2	SOVVAQSQP	EMSVQEAETVTLNCTYD	TSDS	.....	NYV	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	IRV	QAY	QAT	EN	.....	RFVSNFQAAKSFSLKISGSLGDTAMVYFC	AYRS	93.4	86.5	
AB504422	CJTRAV39	ELKVGQSPFL	STVQEGKNCITVYVFNCTYS	ATV	.....	SNR	LFWYVGNPQGLQLLLK	YVSG	.....	LFS	NGA	AIQ	EG	.....	QLTASLDTKARLSTLHITAPVHGLSATVYFC	AVD	90.3	82.6	
AB504424	CJTRAV41	KNEVQSPQDL	TVQEGEFTVYVFNCTYS	IGI	.....	TT	LQWLQGHPPGGIVSLFK	LS	.....	LS	SE	NKK	HG	.....	RLTATINLQEKHSSHLITASQVSDSASYLC	A	92.4	83.9	
Average																92.6	86.8		

Accession Number	gene name	FR 1 (1-26)		CDR 1 (27-38)		FR 2 (39-55)		CDR 2 (56-65)		FR 3 (66-104)		CDR 3 (105-)	Nucleotide identity	Amino acid identity		
		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90				100	
AB504471	CjTRBV2 (*)	EPEVTQTPSHQVTVMGGEVILWCVPI	PHH.....LN	FFWYRQILGKVKPEFLVY	FYN.....DNI	SEKSEIFDDRFVSKRP	DGSMFTLKI	QSTKLEDSATYFC	AS..	92.3	86.2					
AB504472	CjTRBV3-2 (*)	DSAVSQTPKYLVTQMGKESLQCEQ	LGH.....DA	MYWYQDSKLLKIMFI	YNN.....KER	ILNETVP	NRFSPESP	DKAHLNLHI	ESLELGDALYFC	ASSQ	93.5	89.2				
AB504473	CjTRBV4-1s1 (*)	DTGVTQPKHLVMGNTDEKSLQCEQ	LGH.....NA	MYWYQKAKKPELMFI	YNY.....EEI	SVNESVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHL	HALQPEDSALYLC	ASSQ	91.6	85.3				
AB504474	CjTRBV4-1s2	DTGVTQPKHLVMGNTDEKSLQCEQ	LGH.....NV	MYWYQKAKKPELMFI	YNY.....EEI	SVNESVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHL	HALQPEDSALYLC	ASSQ	91.3	83.2				
AB504475	CjTRBV4-1s3	DTGVTQPKHLVMGNTDEKSLQCEQ	LGH.....NV	MYWYQKAKKPELMFI	YNY.....KEI	SVNESVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHL	HALQPEDSALYLC	ASRQ	90.2	82.1				
AB504476	CjTRBV4-2	DTGVTQPKHLVMGNTNKKSLQCEQ	LGH.....NA	MYWYQKAKKPELMFI	YIL.....QER	TENNSVP	SRFSPCEP	DSSHLYLHL	HALQPEDSALYLC	ASSQ	89.8	86.3				
AB504477	CjTRBV5-1s1	EAGVTQTPRHLIKMRGQVTLRCSP	SGH.....SS	VYWYQAPGGGPOFLFQ	YNN.....EIQ	NEKGNFP	ARFSGRF	SNYSSEMMVNALE	LGDSALYLC	ASSL	90.5	80.0				
AB504478	CjTRBV5-1s2 (*)	EAEVTQTPRHLIKMRGQVTLRCSP	SGH.....NS	VYWYQAPGGGPOFLFQ	YNN.....AIE	RQKGNFP	DRFSGRF	SNYSSEMMVNALE	LGDSALYLC	ASSL	89.8	77.9				
AB504479	CjTRBV5-3	QAKVTQSPMHLIQTRGQVTLRCSP	SGH.....TS	VSWYQAPGGGPOFLFQ	YVN.....EPK	RSEGNFP	GRFSGYQF	SDYHSEMMI	STLELGDALYLC	ASS	89.4	83.0				
AB504480	CjTRBV6-5s1 (*)	NAGVTQPKFQVLRGGSTTNECSQD	MNH.....DR	MYWYQDPGMGLRLIHY	SVG.....EGT	TDKGEVH	DGYNVSRS	NTKDFPLRLE	SAAPSQTSVYFC	ASSD	90.6	80.0				
AB504481	CjTRBV6-5s2	TAGVTQPKFQVLRGGSTTNECSQD	MNH.....YY	MYWYQDPGMGLRLIHY	SVG.....KGT	TDKGEVH	DGYNVSRS	NREDFLRL	LESAAAPSQTSVYFC	ASS	91.9	85.1				
AB504482	CjTRBV7-2s1	GAGVSQSPNKKITEKGDVALRCDP	SGH.....NA	LWYWRSLGKGLLEFLIY	FQG.....NDA	PDKSGLPDRFSAERS	GRSFSTLKI	ORTEQDASAVYLC	ASSL	91.7	86.5					
AB504483	CjTRBV7-2s2	DAGVSQSPNKKITEKGDVALRCDP	SGH.....TA	LWYWRSLGKGLLEFLIY	FQG.....KDI	ADDKSGLPDRFSAERS	RGASSTLKI	ORTEQDASAVYLC	ASSL	89.6	83.3					
AB504484	CjTRBV7-6 (*)	GAGVSQSPRYKVTKRGQDIAFSGDP	SGH.....ET	LWYWRSLGKGLLEFLIY	FRY.....EAO	LDKSGLPDRFSAERS	GGSTLKI	ORTEQDASAVYLC	ASS	91.2	81.1					
AB504485	CjTRBV7-9	GAGVSQSPRYKVTKRGQDIAFSGDP	SGH.....TR	LWYWRSLGKGLLEFLIY	FQN.....EAO	SDKSGLPDRFSAERT	GGSTLKI	KRTVQDASAVYLC	ASS	89.9	78.9					
AB504486	CjTRBV9	DSGVTQPKHLLTAIGORVALRCSP	SGD.....LS	VYWYRSLDQSLQFLIY	YNN.....GNE	REKGNIP	EGFSGQF	PNMSSELNL	SSLELGDALYFC	ASS	92.2	86.2				
AB504487	CjTRBV10-1	DAEIQSPRHLIKETGRQVTLKCHQ	WNH.....DY	MYWYRDLGGGLRLIHY	SVG.....VED	INKEVFP	DGYVVSRS	DPEDFPL	TLESALSSQTSVYFC	ASSD	90.9	83.2				
AB504488	CjTRBV10-2	DAEIQSPRHLIKETGRQVTLKCHQ	WNH.....NY	MYWYRDLGGGLRLIHY	SVG.....ADD	TEKGEVF	DGYVVSRS	NLEDFSL	TLESATHSQTSVYFC	ASS	89.7	81.7				
AB504489	CjTRBV11-1	EAGVQVPRYKITEKROAVAFWCDPV	SGH.....AG	LWYWRQILGGPELIIQ	FLH.....EEV	VDDSQLPKDRFSAERL	EGVNSTLKI	OPALELGDASAVYLC	ASS	92.7	87.4					
AB504490	CjTRBV11-2	ETGVTQSPRYKITEKROAVAFWCDPV	SGH.....AG	LWYWRQILGGPELIIQ	YQN.....KDV	VDDSQLPKDRFSAERL	KGVNSTLKI	OPALELGDASAVYLC	ASS	92.0	86.3					
AB504491	CjTRBV12-3 (*)	DAEVTQSPQHEVTVMGQVTLRCPEI	SGH.....TO	LFWYRQTMKRLLEFLIY	FNN.....EDL	IDDGMPKDRFSAEMP	NASFSTLKI	OPSEPDASAVYLC	ASSL	92.4	87.5					
AB504492	CjTRBV12-5	DARVTQPRHVKTEMGQVTLRCPEI	FGH.....NT	VFWRQTVMGQLELLTY	LRL.....RAL	LDDSGMPKDRFSAEMP	TASLSTLKI	OPSEPDASAVYLC	ASGL	92.4	87.5					
AB504493	CjTRBV13	AAGVTQPRHLIKETRETATLKCPYI	PGH.....DT	VYWYRQILGGPELIIQ	YNE.....KMO	RDKGIIP	DRIAAROF	SDYHSELNMS	LELGDASAVYLC	ASS	94.0	89.3				
AB504494	CjTRBV14 (*)	AAGVTQPRHVKTEMGQVTLRCPEI	SGH.....ES	LFWYRRIMKGIKFLIY	FLR.....DSK	QDESGMPKDRFSAERT	GGTSTLTKI	VPKSAELDGSAYFC	ASS	90.2	78.9					
AB504495	CjTRBV15 (*)	DAMVTQPRYQLTQKGPVTLRCFQ	LNH.....DA	MYWYQKPSQAPKLLIY	YD.....KDL	NNEADTP	DNFQARRP	NTSFCFLDI	HSSVLDGAATYLC	ASSR	90.9	82.1				
AB504496	CjTRBV18	NAGVTQPRHVKTEMGQVTLRCPEI	EGH.....SH	VYWYQGLGEGKFLIY	LQK.....ESI	IDESGMPKDRFSAERP	KEGFSVLR	IQOAGRSDSAAYFC	ASS	92.5	86.3					
AB504497	CjTRBV19	DGGITQSPKYLFRKGGQVTLRCPEI	LNH.....DA	MYWYRQILGGPELIIY	YD.....VDA	FGKGDIT	EGYVSQE	KKESFPL	TVTSAGMGTAFFYLC	ASS	92.6	91.5				
AB504498	CjTRBV20-1 (*)	GAVVSQSPRIVLCKTGTSVKIEGRAL	DFQ.....ATT	MFWYHQSQKGLMLMAT	SNEG.....SKA	TYEGGFSEDMFPI	SHPLN	FTSSL	TVASAHPEDSFFYLC	SGR	90.0	79.4				
AB504499	CjTRBV21-1 (*)	DTKVTQPRYVYVTAKEQKAKMDCVPI	KGH.....SY	VYWYHQSQKGLMLMAT	FLVY	LON.....GEI	IQKSEVINER	FLAOCPE	ENSPCAL	ETI	OSTESKDEGLYFC	A..	90.7	80.6		
AB504500	CjTRBV23-1 (*)	HAKVTQPRYVYVTAKEQKAKMDCVPI	KGH.....TF	VYWYHQSQKGLMLMAT	TFLI	IS	FQI.....EQI	LEETE	IHKRFL	SDCP	RNSPCL	SLI	ESATSHHTALYFC	ASSQ	92.4	83.3
AB504501	CjTRBV24-1 (*)	DAGVTQPRNLIKRTGKKTITLCSQT	RND.....NO	MYWYRQDPGLGLRLIY	SLG.....VQD	INKEGIS	HGYVSQR	EQPKFSL	SLESATSHHTALYFC	ATS	91.5	80.9				
AB504503	CjTRBV27	EAOVTQPRYLVYVTAKEQKAKMDCVPI	MNH.....DY	MSWYRQDPGLGLRLIY	SNL.....VDL	VDKGVDP	EGYVSQR	EKRNFPL	I	VESPHOTSLYLC	ASS	92.6	88.3			
AB504504	CjTRBV28 (*)	EYKVTQPRYLVYVTAKEQKAKMDCVPI	MNH.....GR	MFWYRQDPGLGLRLIY	SYD.....IKN	YKGVDP	DGYVVSRE	KKRDFSL	ILGASATSQTSVYLC	ASS	91.2	81.9				
AB504505	CjTRBV29-1	GAVVSQSPRIVLCKTGTSVKIEGRAL	DFQ.....TL	MFWYHQSQKGLMLMAT	ANGG.....SEA	TYEKGFAKDKFPI	SRP	NLFTSL	LNYSNMS	PEDSGIFYC	SAG	89.9	81.3			
AB504506	CjTRBV30	SQTHQVATLVQPGVSSLSLECYK	GTS.....NPN	LWYWRSDRGLQLFLY	SVS.....VD	QIHSEVP	ONLSASRP	QDEQF	ILSSKLL	LLSDSGFYLC	AW	93.6	90.4			
												Average	91.3	84.0		

\*: Genes reported in the previous study

図 5. コモンマーモセットにおける TRAV および TRBV 遺伝子の一覧

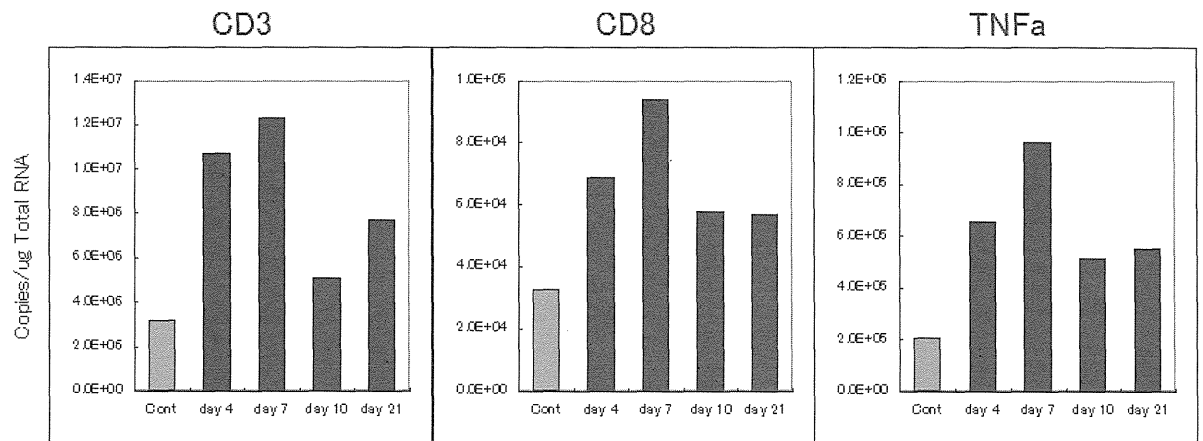


図 6. CHIKV 感染コモンマーモセット脾臓におけるリアルタイム PCR 解析結果 (Cont はコントロール、day は感染日数を示す)

## 小括

コモンマーマセットのTCRレパトアは、

- ・個体間で類似する  
→ヒトのTCRレパトアの傾向と類似
- ・リンパ組織間で類似する  
→組織特異性は低い
- ・胸腺分画間で類似する  
→マウスで認められるような  
DP、SP間の相違(MMTV感作による  
特定のβ鎖のデリージョン)は無い

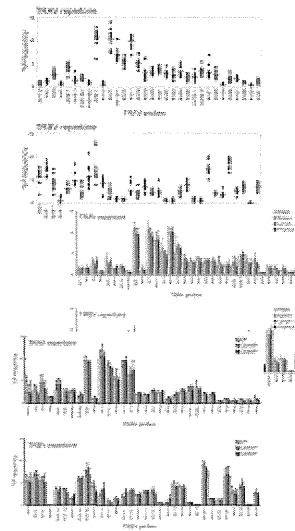


図7. コモンマーマセットのTCRレパトア解析系

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）

## デングウイルス感染症の診断および予防対策に関する研究

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、林昌宏、小滝徹、田島茂、倉根一郎（国立感染症研究所）

網康至、須崎百合子（国立感染症研究所動物管理室）

鈴木隆二、白井顕治、北浦一孝（国立病院機構相模原病院）

大松勉（東京農工大学農学附属国際家畜感染症防疫研究教育センター）

### 研究要旨

デングウイルスは、蚊によって媒介されるウイルスであり、世界的に大規模な流行を引き起こしている。年間約4億人がデング熱を発症し、そのうち約2万人が死亡する。我が国におけるデング熱の輸入症例は増加傾向にあり、年間数百症例が報告されている。しかし、デングウイルス感染症に対するワクチンおよび治療がいまだに実用化されていない。デングウイルス感染症の予防対策の一環として、診断法の評価と改良、新規診断法の開発、ワクチン・治療開発のためのモデル動物の確立が必要である。本研究班では、デングウイルスの実験室診断法を確立と評価を実施した。さらに、発症および防御に係る機構を明らかにするため、動物モデルを確立し、ワクチン・治療開発に必要な基盤研究が進展した。診断法の開発では、新規ウイルス分離法および複数の血清型ウイルスによる重複感染症の新規病原体診断を確立し、その有用性を証明した。デングウイルス感染症の動物モデル開発では、霊長類（マーモセット）デングウイルス感染症モデルを確立し、ウイルス学および血清学的の検討を行った。以上のモデル動物実験結果により、本モデル動物は、デング熱のワクチン・治療開発に有用であることを証明した。

### A. 研究目的

世界人口の3分の1がデング熱流行地域（熱帯・亜熱帯）で生活しており、年間約4億人がデング熱・出血熱を発症する。我が国におけるデング熱患者数は年々増加傾向にあり、2013年は1999年以来、もっとも高い患者数（249人）が報告された。世界的に患者

数が多いにもかかわらず、デング熱に対するワクチン・治療がいまだに実用化されていない。このように、デング熱に対する対策に関しては、診断およびワクチン・治療開発が必要である。本研究班では、デングウイルス感染の診断体制の確立・整備の一環として、新規病原体診断法（ウイルス分離、重複感染に

おけるウイルス分離、抗原検査)の開発および有用性検討をし、患者発生に備えている。さらに、ワクチン・治療開発のためには、モデル動物の構築や発症機序をウイルス学的や免疫学的に解明することが必要である。

## B. 研究方法

### 1. 診断法の開発・改良

1) 新規病原体診断法(抗体依存性感染増強現象を応用したウイルス分離法)の開発・有用性評価:

感染増強活性を有する抗体を用いて、FcγR 発現細胞にて Dengue ウイルス分離法を確立した。開発したアッセイ法を従来のウイルス分離法(C6/36 および FcγR 非発現 BHK 細胞)にて比較検討した。さらに、Dengue 熱患者から採取した血清を用いて、本アッセイの有用性を検討した。

2) 新規病原体診断法(複数の Dengue ウイルス血清型による重複感染症の確定診断法)の開発・有用性評価:

中和活性および感染増強活性を有する抗体(回復期血清)を用いて、FcγR 発現細胞にて新規 Dengue ウイルス分離法を確立した。開発したアッセイ法を従来のウイルス分離法(FcγR 非発現 Vero および BHK 細胞)にて比較検討を行なった。さらに、Dengue ウイルス重複感染症患者からの血清を用いて、本アッセイの有用性を検討した。ウイルス価は、RT-PCR およびプラーク法にて測定した。

3) 尿検体を用いた NS1 抗原迅速診断法により Dengue ウイルス病原体診断:

Dengue ウイルス NS1 抗原迅速検査キット、ELISA キットを用いて、尿検体における NS1

抗原の検出率を他の検査法(IgM/IgG 抗体および RT-PCR)と比較検討した。

## 2. Dengue ウイルス感染症のモデル動物の開発

1) マーモセットを用いた Dengue ウイルス感染症モデル動物の開発:

DENV2 をマーモセットに接種し、ウイルス価の定量、抗体上昇、生化学的および血液的の変化を検討した。

## C. 研究結果

### 1. 診断法の開発・改良

1) 新規病原体診断法(抗体依存性感染増強現象を応用したウイルス分離法)の開発・有用性評価:

本研究ではこれまでに確立した Dengue ウイルス血清学的検査法(抗体依存性感染増強(antibody-dependent assay, ADE)アッセイ法)がウイルス分離に使用可能であることを、Dengue 熱患者血清を用いて検討した。抗体依存性感染増強活性を有する抗体(mAb4G2)の存在下で、FcγR 発現 BHK 細胞を用いて患者血清からウイルス分離を試みた。患者血清からウイルス分離を試みたところ、感染増強抗体存在下の FcγR 発現 BHK 細胞上清のウイルス力価は、他の細胞(非 FcγR 発現 BHK 細胞、C6/36 細胞)より高価であった。さらに、50 検体中 16 検体においては、非 FcγR 発現細胞よりウイルスが分離できなかった。その 16 検体中 7 検体(44%)は ADE アッセイにて分離することが可能であった。以上の結果より、感染増強抗体の存在下での FcγR 発現 BHK 細胞(ADE アッセイ)は、従来のウイルス分離法と比較し高率に Dengue ウイルスの分離が可能であり、Dengue ウイルス分離検査に有用なツ

ールである。

## 2) 新規病原体診断法（複数のデングウイルス血清型による重複感染症の確定診断法）の開発・有用性評価：

我々はこれまでに確立した 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複感染に使用可能であることを、重複デングウイルス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、この FcγR 発現 BHK 細胞を用いた新規病原体診断法により、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明確に証明した。

## 3) 尿検体を用いた NS1 抗原迅速診断法によりデングウイルス病原体診断：

我々は、NS1 抗原 ELISA 法および簡易イムノクロマト法が尿検体を用いた場合にも NS1 抗原が検出であるかを検討した。さらに、血中の NS1 抗原検出率を尿検体の抗原検出率と比較検討を行った。ELISA 法では、血中の NS1 抗原が高感度で検出された。一方、尿中の NS1 抗原検出率は、血清検体を用いた場合よりやや低い。尿中の NS1 抗原は、いずれ検査法 (ELISA 法およびイムノクロマト法) においてもほぼ同じ検出率で検出された。

## 2. デングウイルス感染症のモデル動物の開発

### 1) マーモセットを用いたデングウイルス感染症モデル動物の開発：

感染モデルの評価については、ウイルス接種後、経時的にウイルス血症定量、中和抗体測定、体温、活動性、肝機能・腎臓機能検査を行った。本検討により、全ての個体において、ウイルス血症が認められた。感染ウイルス血清型に対する中和抗体上昇は全個体に認められたが、異なる血清型に対する中和抗体価は低い、または検出されなかった。12 個体中、5 個体 (5/12) においては、ウイルス接種後に血小板減少症が認められ、9 個体においては白血球減少症を呈した。7 個体は、発熱および活動低下を呈した。さらに、ウイルス接種を行っていない対象のマーモセット 4 個体においては、これらの症状を示さなかった。デング熱モデル動物であるマーモセットは、デングウイルス接種後においてはデング熱の典型的な症状 (発熱、活動低下) と生化学的変化を呈した。

## D. 考察

本研究班では、節足媒介性ウイルスの感染症予防対策の一環として、新規診断法の確立、既存の診断法の手順改良・評価し、病原体診断法 (ウイルス分離および抗原検出法) を整備するとともに、ワクチン・治療開発に必要なモデル動物の開発・評価に関する研究を実施した。

我々は、(1) 新規病原体診断法 (抗体依存性感染増強現象を応用したウイルス分離法) の開発・有用性評価を行い、開発した新規ウイルス分離法 (ADE アッセイ) は、従来のウイルス分離法と比較した。開発した新規 ADE アッセイにより、高率にデングウイルスの分離が可能となり、ウイルス分離検査に有用なツールであることが示唆された。さらに、我々



は、(2)複数のデングウイルス血清型による重複感染症の確定診断法を開発し、その有用性を証明した。本研究法では、中和および感染増強活性を有する回復期患者血清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、新規病原体診断法の重複感染症診断における有用性を証明した。(3) 既存の診断法の手順改良・評価では、尿検体を用いてもウイルス抗原(NS1 抗原)が検出されたことから、改良した方法は、病原体診断として有用であることを証明した。さらに、(4) 確立したデングウイルス感染症モデル動物(マーモセット)では、中和抗体上昇、IgM/IgM 抗体上昇パターンおよび症状((血小板・白血球数減少、AST/ALT 上昇など)がヒトデング熱患者と類似することから、本モデル動物は、デングウイルス感染症のワクチン・治療開発に有用であることを明らかにした。

#### E. 結論

本研究班では、節足媒介性ウイルスであるデングウイルスの感染に対する診断および予防対策に関する研究を行った。H23-25年は、デングウイルスの新規ウイルス分離法の確立および抗原検出法の改良を行なった。本研究班で開発した新規病原体診断法(ウイルス分離)および病原体診断法(NS1 抗原)の手順改良により、既存の診断法よりも高い有用性を示したことから、デング熱の臨床診断上においては、著しく進展が見られた。さらに、デングウイルスのモデル動物開発にはウイルス学的、免疫学的などの解析を行い、本マーモセットモデルは、病態解明および新規治療・ワクチン有効性評価と開発に有用であることを明らかにした。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

##### 2. 学会発表

###### 1) 国際学会

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, 2011年8月
2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection: revisit of antibody response and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK cells. 45<sup>th</sup> Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, California, USA, 2011年6月
3. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using FcγR-expressing cells. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, November 2012)
4. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Kotaki A, Takeshita N, Kanagawa S, Takasaki T, Ohmagari N. Dengue fever outbreak among Japanese construction workers returning from India. The 61st Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (Atlanta, November 2012)
5. Azami NAM, Moi ML, Takasaki T, Salleh AS, Neoh HM, Othman Z, Shah

- SA, Kurane I, Jamal R. Serological evidence of the co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Kuala Lumpur, Malaysia. 13<sup>th</sup> Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection. (China, October 2012)
6. Ujiie M, Moi ML, Kato Y, Kanagawa S, Ohmagari N, Takeshita N, Takasaki T. Ocular complications associated with imported dengue fever. 9<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5<sup>th</sup> Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore, May 2012)
  7. 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. 9<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5<sup>th</sup> Regional Meeting of the International Society of Travel Medicine. (Singapore, May 2012)
  8. 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.
  9. Moi ML, Kurane I, Takasaki T. Development of tools for advancing dengue pathogenesis and vaccine research. Malaysia-Japan Academic Scholar Conference. (Tokyo) November, 2013
  10. 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
  11. 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. Moi ML, Omatsu T, Nakamura S, Takasaki T, Ami Y, Katakai Y, Suzaki Y, Akari H, Kurane I. Role of antibodies in dengue infection and protective immunity during secondary infection of marmosets. The 60th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology (Osaka, November 2012)
  2. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Dengue vaccine development: re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers using FcγR-expressing cells. The 34th Naito Conference: Infection, immunity and their control for health (Hokkaido, October 2012)
  3. Moi ML, Lim CK, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. デング熱診断サーベイランスのための NS1 抗原検出診断キット. 86<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Association for Infectious Diseases (Nagasaki, April 2012)
  4. 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回マーマ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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
8. 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
9. 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.
10. 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

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）

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

平成 23 年度 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 第三室長

平成 24-25 年度 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。初年度には、デングウイルス様粒子の発現を確認した。一方で、1～4型全てのウイルスを VeroE6 細胞に継代しストックを調整した。次にこれらのウイルスを新生仔あるいは成マウスに接種し、その病原性を血液学的・組織学的に明らかにした。また、デングウイルス認識モノクローナル抗体を用いて、ELISA 法を利用したウイルス識別系と免疫組織化学法によるウイルス抗原検出系を確立した。

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

とした(平成 23 年度)。

また一方で、ワクチン評価系のための感染動物実験系とその病理学的評価系の確立を試みた（平成 24-25 年度）。

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。

我々は日本脳炎ウイルス様粒子(JE-VLP)、ウエストナイルウイルス様粒子(WNV-VLP)を利用したワクチン開発に携わってきた。そこで本研究では、WNV prM-E 遺伝子持続発現系によるウイルス様粒子抗原の産生、および JEV prM-E 遺伝子持続発現系による VLP 抗原の産生を利用して、デングウイルスサブユニットワクチン (DEN-VLP) の開発を目標

B. 研究方法

VLP の作出

JE-VLP、WNV-VLP 産生によるワクチン開発を基礎としてデングウイルスワクチンの開発を進めた。DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。

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 ウイルス認識モノクローナル抗体

不活化 DENV 1~4 混合抗原でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗体の反応性を検討した。

感染動物実験

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。

新生仔マウス

生後 1 日以内の 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マイクロシリンジで 10  $\mu$ l、右側視床内に脳内接種した。対照群には細胞培養液 MEM 10  $\mu$ l を同様に接種した。

接種後 25 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, 7, 25 日目に 3 または 4 匹ずつ過麻酔殺後に解剖を行い、ホルマリン灌流固定パラフィン包埋組織標本作製した。なお、臨床症状の発現を確認し哺乳困難と判断した個体は、過麻酔殺し病理標本作製した。

成マウス

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作製した。

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

1. DEN-VLP 発現ベクターの作成と発現確認: DENV 中和エピトープを含むフラビウイルスキメラ prM/E VLP 発現ベクターを 5 種作成し、ウエスタンブロットによって発現を確認した。

2. DENV ウイルスストックの調製: ウイルス分離・ウイルス増殖に汎用されている Vero 細胞を用いてウイルスストックの調整を試みた。DENV NS1 抗原ストライプを用いた検討では、DENV 3 以外は何れもウイルス増殖陽性であった。DENV 3 は NS1 抗原陽性に転換するまで Vero 細胞での継代を繰返し、最終的に DENV 1~4 のウイルスストックを調製した(表)。

3. DENV 認識単クローン抗体 ELISA: 不活化 DENV 1~4 混合抗原、JEV、WNV 不活化粒子でプレートをコートし、JEV-E 特異的・WNV-E 特異的単クローン抗体を対照にして、入手した 4 種の DENV 認識単クローン抗

体の反応性を検討した。その結果、2H2 は DENV にのみ反応し、JEV にも WNV にも全く反応性を示さなかった。一方、4G2 は DENV, JEV, WNV 何れにも強い反応性を示した。他方、JEV, WNV などの単クローン抗体 503, N.04 は JEV のみ、WNY-11 は WNV のみ、402 は JE 血清型に属する JEV と WNV のみを認識した。

4. 新生仔 ddY マウスに DENV1 および 2 型を脳内接種したところ、感染 8-10 日目に音などの外部刺激に対して過敏反応を示し、突然走り出す、跳ねるなどの神経症状を示した。いずれもその後、哺乳困難、瀕死となったため病理解剖を行った。その結果、海馬、皮質、視床、延髄等の神経・グリア細胞にウイルス抗原陽性細胞が認められ（接種 7 日目）、これに伴う神経細胞の脱落、壊死、炎症性反応がみられた（瀕死期）。DENV3 型脳内接種マウスは感染 14 日前後から外部刺激に対する過敏反応を示し一定期間体重増加が対照群に比べて緩徐となったが、これは一過性で 25 日目には回復した。25 日目の脳組織において、巣状壊死、血管を中心とした炎症所見が見られた。病変部の変性細胞にウイルス抗原が検出された（25 日目）。DENV4 型接種マウスは 13 匹の新生仔マウスに脳内接種を行ったが、6 匹が接種翌日に死亡しており、残りの 7 匹も瀕死であった。これを病理解剖したところ、いずれの個体においても脈絡叢の血管は拡大し、血管内には血栓様の構造が見られた。ただし、この病変は脳に限局しており、肺・肝・腎などの微小血管内で同様の所見は得られなかった。

5. 成マウスは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。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。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であった。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

DENV-VLP の作成において、ウイルス増殖性が低い DENV の 1~4 型全てでウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群、全フラビウイルス識別 ELISA 系まで樹立できた。以上の結果は、DENV-VLP の発現、DENV, JEV, WNV 其々に特異的に反応する単クローン抗体のパネルが準備できたことを示すとともに、全フラビウイルスを識別できる抗体 ELISA 系が樹立できた事も示している。また、実験に供するレベルのウイルス価が得難いとされる DENV について、1~4 型のウイルスストックの調整に成功したことは今後の感染価測定法の確立に繋がる成果であろう。DENV-VLP ワクチン作成の有力な基盤が得られたものと思われる。

一方、マウスにおける増殖性・病原性について検討したところ、今回使用した DENV4 型 NIID 08-11 標準株は、脳内接種後の新生仔マウスに非常に強い毒力を示したが、ウイルスが増殖した結果による病原性ではないと考えられるため、死因について更なる検討が必要である。組織所見から、接種後に局所に限局した急激な血液凝固反応あるいはショックを引き起こしたと考えられる。DENV1 と 2 型分離株は新生仔マウスの神経細胞、グリア細胞で増殖が可能で、ほぼ同様の病原性を発揮することが病理学的に示された。ただし、DENV2 型分離株の方が、血管を中心とした炎症性反応が強い傾向が見られた。この血管病変についても着目する必要がある。

成マウスを用いた感染実験では、接種後に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。これまでの感染実験の結果について表に総括した。今後は、結果に基づいて、これらのウイルスと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

DEN-VLP の発現を確認し、ウイルス増殖性が低い DENV の 1~4 型全てのウイルスストックの調整に成功し、DENV 特異的な ELISA 系のみならず、JEV, WNV, JE 血清型群を含む、全フラビウイルスを識別できる ELISA 系まで樹立できた。

DENV1-4 型分離株を使用して、新生仔および成マウスにおける病原性を明らかにした。一方で、VeroE6 細胞、マウス組織を使用したホルマリン固定パラフィン包埋参照標本を作

製し、ウイルス抗原検出系を確立した。

### G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

### F. 健康危険情報

特になし

### 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 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

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）

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、廣幡智子（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）  
倉林英彦、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

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であり、とくにデング熱は東南アジアに滞在する日本人の間で患者が多数発生していた。この状況を改善するため、流行地域に滞在する渡航者には適切な予防対策を提供することが必要であるが、在留邦人、企業の健康管理担当者、一般の海外渡航者において知識状況や必要とする情報に違いがみられた。こうした各集団の特性を考慮して、我々はホームページ、出版物、ポスター、動画（DVD）、講演会などの媒体を用いて、海外渡航者にデング熱を予防するための情報提供を行った。

#### 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、国内で診断される患者数が毎年 200 人以上にのぼっている。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. 海外在留邦人のデング熱罹患状況の調査

日本国内で診断されるデング熱患者数は厚生労働省より毎年報告されているが、海外で診断される日本人患者についてはその実態が明らかになっていない。そこで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を対象に、デング熱罹患状況について調査を行った。また、患者の多発する地域で環境調査を行い、感染のおこる背景について検討した。

##### 2. 海外渡航者に必要な情報内容の調査

海外渡航者がデング熱などの感染症対策を



行う際に必要な情報を明らかにするため、「海外在留邦人」、「企業の健康管理担当者」、「一般の海外渡航者」、を対象に、「海外渡航者の感染症対策状況に関する調査」と「デング熱の知識状況に関する調査」を行った。調査方法としては、講演会場でのアンケート配布、調査対象へのアンケート郵送、インターネットによるアンケート調査を対象に応じて選択した。

### 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など蚊媒介性ウイルス感染症に関する情報提供を各種媒体で行った。

(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. 海外在留邦人のデング熱罹患状況調査

2012年～2013年に、フィリピンのマニラ日本人会診療所でデング熱と診断された在留邦人の患者を対象に調査を行った。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。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た。患者の発生は雨期となる6月～8月に多くみられた。患者の滞在形態は、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。R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。2013年12月に環境調査を行ったところ、同地区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、同地区には緑地が多く、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、デング熱感染に必要な要因が備わる環境にあった。

### 2. 海外渡航者に必要な情報内容の調査

#### (1) 海外渡航者の感染症対策調査

各調査対象におけるデング熱を中心にした感染症対策の現状について調査を行った。

「海外在留邦人」の調査は2011年12月、インドネシア・ジャカルタ、フィリピン・マニラに在住する日本人を対象に実施した。アンケートの配布は現地で開催された医療講演会の参加者やその関係者を中心に行い、ジャカルタから100名、マニラから76名の回答があった。「心配している感染症は何か?」の質問では「デング熱」の回答が最も多く、「周囲でデング熱患者が発生したか?」の質問にはジャカルタで48%、マニラで68.4%が「発生した」と回答した。「予防対策を実施しているか?」については、マニラでは「実施している」が67.1%だったが、ジャカルタでは34%と少なかった。予防対策を実施していない者に理由を質問したところ、「予防方法が不明」との回答が大多数を占めた。

「海外派遣企業の健康管理担当者」の調査は2013年11月～12月、海外邦人医療基金の会員企業(161社)の健康管理担当者を対象

に、アンケート郵送方式で実施した。この結果、68社(42.2%)から回答を得ることができた。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、狂犬病に続いてデング熱(51社)が上位に挙げられた。また、デング熱に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の予防対策を聴取したところ、「蚊に刺されない対策の指導」や「再感染時の迅速な医療機関への受診指導」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少数みられた。

「一般の海外渡航者」については、2012年4月、ロングステイ財団の旅行モニター(海外旅行に興味のある成人)を対象にインターネットによる調査を実施した。この結果、1648名から回答を得ることができた。「旅先の健康問題として感染症に関心がある」と回答した者は816名だったが、関心のある感染症は下痢症、マラリア、ウイルス肝炎が多く、デング熱は275名(33.7%)と少なかった。デング熱の知識状況を聴取したところ、「全く知らない」と「あまり知らない」の合計が1219名(73.9%)で大多数を占めた。

## (2) デング熱の知識状況に関する調査

各調査対象にデング熱の原因、疫学、症状、予防、治療に関する10の質問を記載した用紙を配布し、その答えを「はい」か「いいえ」で答える形式をとった。

「海外在留邦人」の調査は2011年12月、インドネシア・ジャカルタ、フィリピン・マニラで在住する日本人を対象に実施した。調査方法は前述した両都市での医療講演会の場

で質問用紙を配布した(ジャカルタ:100名、マニラ:76名)。この結果、「蚊に刺されて感染する(正解:はい)」の正解率は100%近くに達したが、具体的な予防対策の質問である「昼間、蚊に刺されないよう注意すれば予防できる(正解:はい)」の正解率は50%台と低い結果になった。なお、マニラでは2013年12月に再調査を行っているが、2011年と同様な結果だった。

「海外派遣企業の健康管理担当者」の調査は2013年2月、都内で開催した医療講演会の参加者(104名)を対象に実施した。この結果、「昼間、蚊に刺されないよう注意すれば予防できる(正解:はい)」、「命にかかわる病気である(正解:はい)」の正解率が60%台と低かった。

「一般の海外渡航者」の調査は、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)の回答者を対象に行った。その結果、2011年12月~2013年11月までに830名の回答が得られた。正解率については、「日本国内でも流行している(正解:いいえ)」、「ワクチンで予防できる(正解:いいえ)」といった基本的な質問が70%台と低かった。

## 3. 海外渡航者への情報提供

以上の調査結果をもとに各種媒体を用いて海外渡航者への情報提供を行った。

### (1) ホームページの設置

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た。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。

### (2) デング熱に関するパンフレットの作成

海外渡航者向けにパンフレット「デング熱豆知識」を 2011 年度に作成し、トラベルクリニックや東南アジアの日本人会などに配布した。

### (3) デング熱に関するポスターの作成

デング熱を媒介する蚊の吸血時間帯に関する情報が不足していたため、この点を海外渡航者に啓発するポスター「昼の吸血鬼にご用心」を 2012 年度に作成した。このポスターは検疫所、国内のトラベルクリニック、海外派遣企業の健康管理室などに配布した。

### (4) デング熱予防対策の動画 (DVD) 作成

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) を 2013 年度に作成した。この動画はホームページ「海外旅行と病気」などで一般向けに公開している。

### (5) デング熱予防マニュアルの作成

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、デング熱の予防を指導するためのマニュアルを 2013 年度に作成した。このマニュアルはトラベルクリニックや企業の健康管理室に配布する予定である。

### (6) 医療講演会の開催

定期的にデング熱を中心にした感染症に関する医療講演会を開催した。

2011 年 12 月：ジャカルタ（在留邦人対象）

マニラ（在留邦人対象）

2013 年 2 月：東京（企業の健康管理担当者）

2013 年 12 月：マニラ（在留邦人対象）

## D. 考察

マニラ在留邦人の間でデング熱の患者は 2012 年、2013 年ともに 6 月～8 月の雨期に多発していた。患者の一部は入院を要したが、重症化する例はなく、全員軽快していた。患

者の居住地域をみるとマニラ市内の R 地区が多く、環境調査を行ったところ、建設工事による水たまりが数多くみられ、媒介蚊が生息しうる環境になっていた。さらに同地区はスラム街に隣接しており、周囲にデング熱患者が多い環境にあった。こうした現地環境を熟知したうえで、情報提供を行う必要がある。

「海外渡航者の感染症対策調査」は海外在留邦人、海外派遣企業の健康管理担当者、一般の海外渡航者を対象に実施した。「海外在留邦人」の調査はジャカルタとマニラで行ったが、感染症の中でもデング熱への関心が高い結果だった。その一方で、デング熱の予防対策を実施している者は一部の在留邦人で、予防対策を実施しない理由としては「予防方法が不明」が多くを占めていた。「企業の健康管理担当者」を対象にした調査でもデング熱への関心は高く、デング熱に罹患した従業員がいると回答した企業も比較的多かった。罹患経験のある従業員の再感染による重症化予防策は概ね適切であったが、「流行地域に滞在させない指導」を行っている企業が少数みられた。「一般の海外渡航者」の調査では、デング熱への関心が低く、その知識についても「全く知らない」と「あまり知らない」が大多数を占めていた。このように、各調査対象によって必要とする情報が異なることが明らかになった。

「デング熱の知識状況」に関する調査では、「流行地域の在留邦人」や「企業の健康管理担当者」については、基本的なデング熱の知識があるものの、蚊の対策（とくに吸血時間が昼間であること）についての知識が不足していることが明らかになった。その一方で、「一般の海外渡航者」についてはデング熱の基本的な知識が不足していることが明らかに

なった。このように、各調査対象で知識レベルにも差があり、その特性に応じた情報提供が必要であると考ええる。

なし

以上の調査結果にもとづいて、それぞれの対象に応じた情報提供を、ホームページ、出版物、ポスター、動画（DVD）、講演会などの媒体を用いて行った。

### 3. その他

なし

## E. 結論

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であり、とくにデング熱は東南アジアなどで罹患する日本人が数多くみられた。このため、流行地域に滞在する渡航者には適切な予防対策を提供することが必要であるが、在留邦人、企業の健康管理担当者、一般の海外渡航者において知識状況や必要とする情報に違いがあることが明らかになった。こうした各集団の特性を考慮して、我々はホームページ、出版物、ポスター、動画（DVD）、講演会などの媒体を用いて、海外渡航者にデング熱を予防するための情報提供を行った。これらの成果物により海外渡航者のデング熱罹患が減少していくことを期待している。

## F.健康危険情報

特になし

## 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. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録