

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 年 (2014) 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プ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

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マセツトが、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、マーマセツトは、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。そこでマーマセツトの 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マセツ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死的となる。

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

結保存のものとリアルタイム逆転写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 2.3x10²PFU, 2 型 6.0x10⁴PFU, 3 型 3.2x10³FFU, 4 型 2.3x10²FFU であった。J E V Beijing-1 株に対する検出限界は、1.0x10²FFU 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-12β、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。TRA8-1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關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關与する制御性 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シマカの野外採集集団に生じていた。

(2) 2009 年にフィリピン国内 30 カ所で採集された 688 頭のシマカシマカ幼虫に關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マ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。感染マーマ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