

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

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变化を検討した。

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に明確に証明した。

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 (マーマセツト) 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、本マーマセツトモデルは、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. 45th 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. 13th 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. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th 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. 9th Asia Pacific Travel Health Conference in conjunction with the 5th 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. 86th 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
 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. 柄谷健太郎、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