

厚生労働科学研究委託費

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高崎 智彦  
(国立感染症研究所ウイルス第一部 室長)

平成27(2015)年 3月

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究	1
高崎 智彦	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 黄熱ウイルス野生株（南米株対応、アフリカ株対応）検出用リアルタイムPCR法の開発	15
高崎 智彦	
2. デングウイルス・リフトバレー熱ウイルスの病原体迅速検査法の確立に関わる技術開発	20
森田 公一	
3. フラビウイルス抗体測定に有用な感染性ウイルス用粒子の開発と応用	27
小西 英二	
4. 抗デングウイルス活性測定と化合物スクリーニングに関わる研究開発	37
日紫喜 隆行	
5. デングウイルスに対する抗ウイルス剤の開発	42
高橋 和郎	
6. 媒介昆虫の垂直伝播に関する研究	44
澤辺 京子	
7. 昆虫媒介性ウイルス感染症の有効な情報提供法の開発に関する研究	48
濱田 篤郎	
8. マーモセットを用いた再感染デング熱動物モデルの構築	57
モイメンリン	
9. マーモセットにおけるデング熱（再感染）モデルの病理学的解析	62
鈴木 隆二	
10. ロスリバーウイルスに対する日本産蚊の感受性と媒介能	66
江下 優樹	
11. チクングニアウイルスレプリコンの設計および抗チクングニア剤評価のための霊長類モデルに関する研究	72
倉根 一郎	
III. 研究成果の刊行物・別刷	

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り、患者検体を用いて評価したところ生ウイルスを使った場合と高い相関を示した。抗体検査においては、イム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。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  $\alpha$  鎖、 $\beta$  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。2013 年にはカリブ海諸国にも流行が波及し、アメリカ大陸への侵入の可能性もでてきた。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、動画 DVD「デング熱の予防対策」を作製した。

研究分担者：

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。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。また、2013 年にはカリブ海の諸国でもチクングニア熱が流行した。

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。

## B. 研究方法

### 1. 診断法の開発・評価

イムノクロマト法を用いたウイルス遺伝子抗原・抗体検査法の開発・応用・評価

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 Dengue ウイルス様粒子の作製技術を開発した。また、Dengue ウイルス NS1 抗原検出キットを用いて Dengue 熱患者血清、尿からの感度・特異性を検討した。

#### 1 回感染性フラビウイルス粒子による中和試験の評価

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。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 領域に Dengue ウイルスの cDNA を CAG プロモーター下流に挿入して構築した。この粒子を用いて患者血清を用いて中和試験を実施し、生ウイルスを攻撃ウイルスにした場合と比較した。

## 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 2 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。また、日本脳炎ウイルス遺伝子 1 型、5 型に対する中和抗体を測定し、その力価を検討した。

## 3. 動物モデルの開発、病態解析

#### マーマセットの免疫学的解析法

Dengue 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マセットは、新世界ザルであり免疫学的背景は明らかでない部分が多い。平成 24 年度には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 を構築したが、今年度はこのアッセイ系を Dengue ウイルス 1 型感染マーマセットに応用した。

#### 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。また、新

生仔マウスに Dengue 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. 新規蚊媒介性ウイルス感染症の診断法の検討と確立

ロスリバーウイルス (ロスリバー熱)、Zika virus のリアルタイム逆転写 PCR 法のプライマーおよびプローブセットをそれぞれ確立し、それぞれ IgM 捕捉 ELISA 法を作製した。

## 5. 媒介蚊感受性に関する検討

チクングニアウイルスのヒトスジシマカ、リバーズシマカ、ヤマトヤブカの感受性を胸部接種および経口摂食により感染させ、RT-PCR 法により検討した。日本国内産ヒトスジシマカの Dengue ウイルス 1 型、2 型臨床分離株の感受性を検討した。

## 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 Dengue 熱に関する意識調査や知識レベルの調査を行った。さらに、海外渡航者に Dengue 熱の予防法を具体的に理解してもらうため、動画 (DVD) 「Dengue 熱の予防対策」を作成し、動画はホームページでも閲覧可能にした。

## 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) 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。

デングウイルス NS1 抗原検出キット(ELISA キット、イムノクロマトキット)を評価した結果、特異性が高く感度も十分であった。感度の面では ELISA キットの方が、イムノクロマトキットよりも高かった。しかし、NS1 抗原イムノクロマトキットは病院で使用できるキットとして有用であるという結果であった。また、感度がさがるが患者の尿から NS1 タンパク抗原を検出できることも明らかになった。

## 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 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上であり、2年間継続調査ができた全 142 名の幾何平均抗体価の推移は、ワクチン接種 1 か月後 91.7 から 1 年後には 20.9 と約 1/4 に低下し、2 年後には 8.59 と約 1/10 に低下した(表 1)。1 年後に抗体価が <10 となった陰転率は 23%であったが、2 年後には 39%(56/142) が陰転した。健常人における日本脳炎ワクチン接種 2 年後の幾何平均中和抗体価はわずか 9.4%まで減少し、陰転率も 39%と高く 1 年後の陰転率の約 2 倍となった。

## 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デングウイルス感染マーモセットへの応用と評価(生化学および免疫学の解析)

DENV1 感染マーモセットの免疫学的評価: DENV1 をコモンマーモセットに感染させたのち、感染後経日的に採血を行い、末梢 PBMC より RNA の抽出を行い、real-time PCR において TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-5、IL-10 の発現量の経時的観測を行った結果、感染後 2 日から 7 日の範囲で TNF- $\alpha$ 、IFN-

$\gamma$ 、IL-5 の優位な上昇が認められた。

### 病理学的解析

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。

## 4. 新規蚊媒介性ウイルス感染症の診断法の検討と確立

ロスリバーウイルスを 4 株(T48 株、QML#1 株、QML#2 株、Couper 株)を入手した。ロスリバーウイルス(ロスリバー熱)のリアルタイム逆転写 PCR 法により、検出可能であることが確認された。ロスリバーウイルス抗原を作製して、IgM 捕捉 ELISA 法を立ち上げたところ、2013 年 5 月にオーストラリアからの初輸入症例を確認し、中和抗体陽性であった。

Zika 熱も 2013 年 12 月に同様にリアルタイム逆転写 PCR 法により、フランス領ポリネシア(ボラボラ島)からの輸入症例 2 例を確認し、2 例目の回復期血清の中和抗体陽性を確認し、その血清を用いて抗 Zika ウイルス IgM 捕捉 ELISA を構築した。

### 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して、2 年目までに評価が確立した RNA stable tube を用いて、Zika virus RNA および Ross River virus RNA を希望する地方衛生研究所に送付した。

## 5. 媒介蚊感受性に関する検討

チクングニアウイルスは、日本国内のヒトスジシマカだけでなくヤマトヤブカやリバーズシマカも感受性があることが明らかになった。国内産ヒトスジシマカはデングウイルス 1 型の方が 2 型に対して高い感受性を示した。

## 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」を改良した。また、東南アジア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。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) 「デング熱の予防対策」を作成し、動画はホームページでも閲覧可能にした。

#### 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、検体前処理法の迅速簡易化、イム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。抗体検査として、独自のデングウイルス IgM 抗体イムクロマトキットを開発した。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 (Aruneet al. ; The Lancet.380(9853):1559-67,2012)、まず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。

媒介蚊ウイルス感受性に関しては、チクングニアウイルスが日本国内のリバーズシマカよヤマトヤブカにも感受性があることが確認された。また、デングウイルスのヒトシマカへの感受性に関して今回使用した株に関しては、デングウイルス 1 型のほうが 2 型より感受性が高かった。我が国で 1942-45 年に発生した流行が 1 型によるものであったこととの関連について今後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°C、40°C 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、動画「デング熱の予防対策」<http://www.tra-dis.org/movie/index.html> を作成した。

## F. 健康危険情報

2013 年 8 月に日本を旅行し帰国後 3 日目に発病したドイツ人デング熱症例は、その旅行日程とデング熱の潜伏期間から、日本国内で感染した可能性は否定しがたい。つまり、2013 年の夏に日本国内で小さなデング熱流行が発生した可能性がある。

## G. 研究発表

1. 論文発表
  1. Kwallah AO, Inoue S, Muigai AW, Kubo T, Sang R, Morita K, Mwau M., 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
  2. Ngwe Tun MM, Thant KZ, Inoue S, Kurosawa Y, Lwin YY, Lin S, Aye KT, Thet Khin P, Myint T, Htwe K, Mapua CA, Natividad FF, Hirayama K, Morita K. 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
  3. 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
  4. 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.* August 5;8(8):e71643. 2013
  5. Nguyen Thanh Thuy, Tran Quang Huy, Phan Thi Nga, Kouichi Morita, Irene Dunia, Lucio Benedetti. A new nidovirus (NamDinh virus NDiV): Its ultrastructural characterization in the C6/36 mosquito cell line. *Virology* Vol.444, 337-342, 2013
  6. Basu D, Pandey, Takeshi Nabeshima, Kishor Pandey, Saroj P. Rajendra, Yogendra Shah, Bal R. Adhikari, Govinda Gupta, Ishan Gautam, Mya M. N. Tun, Reo Uchida, Ichiro Kurane and Kouichi Morita. First Isolation of Dengue Virus from the 2010 Epidemic in Nepal. *Tropical Medicine and*

- Health Vol. 41 No. 3: 1-9, 2013
7. Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R. : Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes. *PLOS ONE*.8: e56296 (2013)
  8. ○Yuki Takamatsu, Leo Uchida, Phan Thi Nga, Kenta Okamoto, Takeshi Nabeshima, Dang Thi Thu Thao, Do Thien Hai, Nguyen Thi Tuyet, Hoang Minh Duc, Le Xuan Luat, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita. An approach for differentiating Echovirus 30 and Japanese encephalitis virus infections in acute meningitis/encephalitis: a retrospective study of 103 cases in Vietnam. *Virology Journal* 10:280, 2013
  9. Galectin-9 Plasma Levels Reflect Adverse Hamatological and Immunological Features in Acute Dengue Virus Infection *J.Clin.Virol.* Vol.58. 635-640, 2013
  10. ○Yuki Takamatsu, Kenta Okamoto, Duc Tuan Dinh, Fuxun Yu, Daisuke Hayasaka, Leo Uchida, Takeshi Nabeshima, Corazon C. Buerano and Kouichi Morita, NS19 protein expression facilitates production of Japanese encephalitis virus in avian cells and embryonated chicken eggs, *Journal of General Virology*, 95, 373–383. 2014
  11. 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.
  12. Moi ML, Takasaki T, Kurane I. Efficacy of tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren. *Lancet*, 381,9872,1094, 2013.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. Yamaji H, Konishi E. Production of Japanese encephalitis virus-like particles in insect cells. *Bioengineered*. 4 (6) :438-442, 2013
  18. Atsushi Yamanaka, Eryk Hendrianto, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Soegeng Soegijanto and Eiji Konishi: Correlation between complement component levels and disease severity in dengue patients in Indonesia. *Jpn J Infect Dis.* 66, 366-374, 2013
  19. Yamanaka A, Thongrungrat S, Ramasoota P, Konishi E: Genetic and evolutionary analysis of cell-fusing agent virus based on Thai strains isolated in 2008 and 2012. *Infect Genet Evol.* 19, 188-194, 2013
  20. Sjatha F, Takizawa Y, Kotaki T, Yamanaka A, Konishi E: Comparison of infection-neutralizing and -enhancing antibody balance induced by two distinct genotype strains of dengue virus type 1 or 3 DNA vaccines in mice. *Microbes Infect.* 15, 828-836, 2013

21. Yamanaka A, Kotaki T, Konishi E: A Mouse Monoclonal Antibody against Dengue Virus Type 1 Mochizuki Strain Targeting Envelope Protein Domain II and Displaying Strongly Neutralizing but Not Enhancing Activity. *J Virol.* 87, 12828-12837, 2013
22. Suzuki R, Ishikawa T, Konishi E, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Takasaki T, Wakita T. Chimera: Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *J Gen Virol.* 95, 60-65 2014
23. Sjatah F, Kuwahara M, Sudiro TM, Kameoka M, Konishi E: Evaluation of chimeric DNA vaccines consisting of premembrane and envelope genes of Japanese encephalitis and dengue viruses as a strategy for reduced induction of dengue virus infection-enhancing antibody response. *Microbiol Immunol.* 2013 Dec 20. doi: 10.1111/1348-0421.12125. [Epub ahead of print]
24. Eiji Konishi: Memory B cells: a proposed new immunological correlate for protective efficacy of Japanese encephalitis vaccine. *Expert Review of Vaccines* 12, 871-873, 2013
25. Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 440:515-20, 2013
26. Watashi K, Liang G, Iwamoto M, Marusawa H, Uchida N, Daito T, Kitamura K, Muramatsu M, Ohashi H, Kiyohara T, Suzuki R, Li J, Tong S, Tanaka Y, Murata K, Aizaki H, Wakita T. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha trigger restriction of hepatitis B virus infection via a cytidine deaminase AID. *J Biol Chem.* 288:31715-272013, 2013
27. Suzuki R, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Signal peptidase complex subunit 1 participates in the assembly of hepatitis C virus through an interaction with E2 and NS2. *PLoS Pathog.* 9(8): e1003589, 2013
28. Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Date T, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Miyamura T, Wakita T, Aizaki H. Antiviral Activity of Glycyrrhizin against Hepatitis C Virus in Vitro. *PLoS ONE*, 8(7):e68992, 2013
29. 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
30. 森田公一、デング熱と vector-borne diseases、化学療法の領域、Vol. 29 (8): 25-32, 2013
31. 森田公一、デング熱、臨床と研究 90:12号 18-22、2013
32. 鈴木亮介、小西英二: フラビウイルスのリバースジェネティクス、「ウイルス」63巻1号、13-22、2013
33. 小西英二: デング熱・デング出血熱と生体防御: 世界初のデングワクチン防御効力試験の成績に鑑みて。感染・炎症・免疫 43巻1号、2-9頁、2013
34. 石川 知弘、小西英二: デングウイルス感染症: 治療薬開発の現状と課題。化学療法の領域 29巻増刊号『新興・再興感染症up to date』、153-159頁、2013
35. Moi ML, Saijo M. 抗アルボウイルス薬. *臨床と微生物.*40(1), 69-73, 2013.
36. 森田公一、デング熱の世界的な流行と予防対策に関する将来的展望。化学療法の領域. Vol.30 (2). 275-281. 2014
37. 濱田篤郎、山口佳子: デング熱の予防対策. *バムサジャーナル* 26: 掲載予定, 2014

38. 濱田篤郎：海外旅行時の感染症対策. *Infection Control* 22:105-108, 2013
39. 濱田篤郎：海外渡航者への感染症予防対策. *都薬雑誌* 35:4-9, 2013
40. 濱田篤郎：海外渡航中に注意する健康問題と予防法. *国際人流* 2013.12: 4-8. 2013
2. 学会発表  
(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 WHO 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.
  5. Ryosuke Suzuki, Eiji Konishi, Tomohiro Ishikawa, Mami Matsuda, Koichi Watashi, Hideki Aizaki, Tomohiko Takasaki, Takaji Wakita: Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with a DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Positive Strand RNA Viruses meeting. Boston, April 2013.
  6. 山中敦史, 小西英二：キメラ Dengue ウイルス様粒子抗原の中和及び感染増強試験における有用性評価：第 54 回日本熱帯医学会。2013 年 10 月。
  7. Eiji Konishi: Current Status of Dengue Vaccine Development. Seminar on Infectious Diseases: Networking for the Promoting One World, One Health for a Better Tomorrow, Prevention and Treatment using Natural Products, Vaccines and Antivirals. Surabaya, Indonesia, October 2013.
  8. Atsushi Yamanaka, Chayanee Setthapramote, Pongrama Ramasoota, Pannamthip Pitaksajjakul and Eiji Konishi: Preliminary evaluation of a novel DNA vaccine candidate expressing dengue neutralizing antibody. Joint International Tropical Medicine Meeting 2013. Bangkok, 2013.
  9. Soengeng Soegijanto, Kris Cahyo Mulyatno, Siti Churotin, Amaliah Labiqah, Teguh Hari Sucipto, Tomohiro Kotaki, Masanori Kameoka, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka: Molecular Epidemiology of Dengue Virus in 4 Cities of East Java, Indonesia. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections (AARF) 2014. 2014 年 1 月。
  10. Aizaki H, Watanabe N, Aoyagi H, Watashi K, Suzuki R, Kojima S, Matsuura T, Wake K, Suzuki T, Wakita T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. 17th International Symposium on cells of the Hepatic Sinusoid. Osaka, Japan. 2013.9.23-25.
  11. Ito M, Ito N, Fukuhara T, Suzuki R, Matsuura Y, Wakita T, Suzuki T. Loss of susceptibility to HCV infection and decreased tumorigenicity mediated by reprogramming of human hepatoma cells. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.

12. Shi G, Ando T, Suzuki R, Ito M, Wakita T and Suzuki T. Possible mechanism for selective packaging of HCV genome into the infectious particles. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
  13. Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. Isolation of a natural compound which can reduce infectious HCV production by inhibiting of liver X receptor. 20th International Meeting on Hepatitis C Virus and Related Viruses. Melbourne, Australia. 2013.10.6-10.
  14. Kazuo Takahashi, Ikuko Aoyama, Takahiro Yumisashi, Tetsuo Kase, Tomohiko Takasaki Antibody response and its durability of cell culture-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese healthy adults. 7<sup>th</sup> International Conference of Vaccinology, October, 2013 (Barcelona)
  15. Yuki Eshita, Junya Yamagishi, Josef Tuda, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Arthur E. Mongan, Yutaka Suzuki (2013) : Application of molecular biology methods for the analysis of tropical diseases in Manado. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12-14日(土)、(インドネシア)
  16. Junya Yamagishi, Anna Natori, Mohammed E. M. Tolba, Arthur E. Mongan, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Yuki Eshita, Josef Tuda, Yutaka Suzuki (2013) : A Description of Malaria by Transcriptome. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12-14日、(インドネシア)
  17. Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Junya Yamagishi, Mihoko Imada<sup>4</sup>, Ryuichiro Maeda, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Comprehensive gene expression analysis of dengue-infected *Aedes aegypti* and novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12日(木)-14日(土)、(インドネシア)
- (国内学会)
1. 森田公一：シンポジウム「新興・再興感染症と生体防御」デング熱・デング出血熱、第24回日本生体防御学会学術総会、平成25年7月10~12日、熊本市
  2. Ernest W. Apondi, Koki Taniguchi, Satoshi Komoto, Yoshimasa Maeno, Mitsutaka Wakuda, Mohammad Shah, Kouichi Morita, Yoshio Ichinose: Detection and molecular characterization of rotavirus strains from diarrhoeal children in Kiambu, Kenya, between 2009 and 2011. 第66回日本細菌学会九州支部総会 第50回日本ウイルス学会九州支部総会、長崎、2013年9月6~7日
  3. 青木康太郎, 早坂大輔, Mya Myat Ngwe, 嶋田聡, 森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の分析, 第66回日本細菌学会九州支部総会 第50回日本ウイルス学会九州支部総会、長崎、2013年9月6日~9月7日
  4. 余福勲, Ferdinard Adungo, 内田玲麻, 井上真吾, 森田公一：Preparation of genetically-engineered antigen of RVF virus for development of antibody-detecting diagnostic test kits. 第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月10~12日
  5. 早坂大輔, 青木康太郎, Mya Myat Ngwe Tun, 嶋田聡, 森田公一：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける感染量とインターフェロン応答の解析。第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月10~12日
  6. 高松由基, 岡本健太, Dihn Tuan Duc, 余福勲, 早坂大輔, 内田玲麻, 鍋島武, Corazon C Buerano, 森田公一：日本脳炎ウイルスのNS1タンパク質は、鳥細胞でのウイルス産生を増加させる。第61回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013年11月10-12日
  7. 安倍智子, 左一八, 梅原薫,

- Sabaratnam S. Vikineswary, 森田公一, 野口博司, 鈴木隆: オオヒラタケ熱水抽出物によるデングウイルス感染阻害。第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 神戸, 2013 年 11 月 10 日~11 月 12 日
8. 小瀧将裕, 山中敦史, 小西英二, 亀岡正典: インドネシア国スラバヤ市におけるデングウイルスの分子疫学調査 2008-2013。第 20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2013 年 11 月 (神戸市)。
  9. 鈴木亮介, 小西英二, 石川知弘, 嵯峨涼平, 松田麻未, 渡士幸一, 相崎英樹, 高崎智彦, 脇田隆字: 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の産生。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 (神戸市)。
  10. 山中敦史, 小西英二: デング中和抗体発現型ワクチンのマウスにおける基礎的評価。第 61 回日本ウイルス学会学術集会。2013 年 11 月 (神戸市)。
  11. Mya Myat Ngwe Tun, Daisuke Hayasaka, Kotaro Aoki, Masachika Senba, Kenji Shirai, Ryuji Suzuki, Kouichi Morita: TNF- $\alpha$  and IL-10 reduce the incidence of mortality in mice following tick-borne encephalitis virus infection. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月 10~12 日 (神戸市)
  12. Nguyen Thi Thu Thuy, Takeshi Nabeshima, Guillermo Posadas-Herrera, Dang Thi Dinh, Maria Terrese G. Alonzo, Lady-Anne C. Suarez, Mya Myat Ngwe Tun, Nguyen Le Khanh Hang, Pham Hoai Linh Ly, Le Thi Quynh Mai, Corazon C. Buerano, Filipinas F. Natividad, Futoshi Hasebe and Kouichi Morita: Changing Pattern of DENV Serotypes in Vietnam. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 新興・再興感染症に関する アジア・アフリカリサーチフォーラム 2014, 仙台, 2014 年 1 月 20~22 日
  13. Thuong Van Nguyen, Lan Nguyen Thi Phuong, Thanh Le Chi, Thang Minh Cao, Nhon Cao Thi My, Nhung Cao Thi Hong, Mai Thi Nguyen, Truong Quang Nguyen, Ngu Vu Thien Thu, Quoc Kien Do, Ha Tran Thi Ngoc, Huy Tien Nguyen, Ton Tran, Mihoko Kikuchi, Quang Chan Luong, An Van Tran, Huong Vu Thi Que, Kouichi Morita, Kenji Hirayama: Cell-mediated Immunity in Dengue Virus Infection – Increase of Activated Th1 and CD8 Effector T Cells on Day -1 of Defervescence Indicates Protection against Severe form of Dengue. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム 2014, 仙台, 2014 年 1 月 20~22 日
  14. Mitsuru Toda, Ian Njeru, Shikanga O-Tipo, David Kareko, Matilu Mwau, Shingo Inoue, Yoshio Ichinose, Kouichi Morita: Establishing a Disease Outbreak Alert System in Kenya: Findings from the Baseline Survey. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 新興・再興感染症に関するアジア・アフリカリサーチフォーラム 2014, 仙台, 2014 年 1 月 20 日~1 月 22 日
  15. Kouichi Morita, Mosquito-transmitted Disease Consortium; Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, January 23-24., Tokyo, Japan 2013
  16. 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. マーモセットを用いたデングウイルス感染病態解析. 第 3 回マーモセット研究会 (福岡市) 2013 年 12 月
  17. 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
18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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.
  22. 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.
  23. Eiji Konishi: Dengue vaccine development: current status and future challenges. 第 54 回日本熱帯医学会シンポジウム。2013 年 10 月。
  24. 鈴木亮介、石川知弘、小西英二、嵯峨涼平、松田麻未、渡士幸一、相崎英樹、高崎智彦、脇田隆字. プラスミドトランスフェクションによるトランスパッケージング型 1 回感染性フラビウイルス産生系の確立. 日本分子生物学会第 36 回年会, 2013 年 12 月 3-6 日 (神戸市).
  25. 高橋和郎、加瀬哲男、高崎智彦. 健康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. 第 17 回日本ワクチン学会学術総会 2013 年 11 月 (三重県、津市)
  26. Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2013): The application of next generation sequencer in investigating the relationship of dengue virus and its vector. 第 6 回寄生虫感染免疫研究会、2013 年 3 月 8-9 日、大分県由布市、大分大学医学部看護学科棟. 第 6 回寄生虫感染免疫研究会プログラム講演要旨 : 22, 2013
  27. Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2012) : Validation of RNA-seq Data Using qRT-PCR. 第 65 回日本衛生動物学会大会、2013 年 4 月 6-7 日、(北海道江別市)。Med. Entomol. Zool., 64 (大会特集号) :40, 2013.
  28. 江下優樹, 松原祥恵, Lucky R. Runtuwene, 野口香緒里, 川上絵理, 大塚 靖, 福田昌子, 小林隆志, 高崎智彦, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Bouasy Hongvanthong, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2013) : 節足動物媒介性ウイルスの迅速検出への RT-LAMP 法の改良. 日本家屋害虫学会 第 34 回大会・総会、2013 年 6 月 22-23 日、(神奈川県藤沢市)。
  29. Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Sachie Matsubara, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupa Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Arthur E. Mongan, Josef Tuda, Mihoko Imada, Shuichi Kawashima, Junya Yamagish, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro

- Maeda, Chihiro Sugimoto, Hironari Narita, Hiroshi Ushijima, Koichi Morita, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane (2013) : INOVATIVE TECHNOLOGY FOR USE IN VECTOR CONTROL. “The 1<sup>st</sup> conference on Asian pediatric infectious diseases (第1回アジア小児感染症会議)”、2013/8/24-26、(東京)
30. Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga<sup>1</sup>, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Comprehensive Gene Expression Analysis of Dengue-Infected Mosquitoes. “The 1<sup>st</sup> conference on Asian pediatric infectious diseases (第1回アジア小児感染症会議)”、2013年8月24-26日(東京)
31. Yuki Eshita, Lucky Runtuwene, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Mihoko Imada, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Hiroshi Ushijima, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki : APPLICATION OF NEW TECHNOLOGIES FOR USE IN VECTOR CONTROL. Professor Polly Roy Group Reunion for celebrating 30 years of research in the Roy Laboratory, The Queen’s College, University of Oxford, 9/13-15, 2013.(イギリス)
32. 江下優樹、福田昌子、Lucky Runtuwene、大塚 靖、野口香緒里、川上絵理、徳永暁憲、小林隆志、服部正策、Raweewan Srisawat、Narumon Komalamisra、牛島廣治、倉根一郎、高崎智彦 (2013) : 本邦産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループ蚊2種のチクングニアウイルス感受性。第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2-3、(大分市)。第66回日本寄生虫学会・第63回日本衛生動物学会南日本支部合同大会
33. Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013): Potential novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. 第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2-3日、(大分市)
34. 佐々木年則、比嘉由紀子、ベンツース Gアーリン、伊澤晴彦、高崎智彦、皆川昇、澤邊京子、国内外で捕集された蚊のデングウイルス感受性、第66回日本衛生動物学会大会、2014年3月22日、(岐阜)
35. 北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二：新世界ザルにおけるT細胞受容体β鎖遺伝子のCDR3領域における正の選択。第40回日本免疫学会学術集会(東京)2011年11月27-29日
36. 北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、倉根一郎、鈴木隆二：コモンマーモセットにおけるTCRレパトア解析法の開発。第59回日本実験動物学会総会(別府)2012年5月24-26日
37. 北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、亀谷美恵、倉根一郎、鈴木隆二：コモンマーモセットにおけるリアルタイムPCRを用いた免疫関連遺伝子発現解析。第60回日本実験動物学会総会(つくば)2013年5月15-17日
38. 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。2013年11月(神戸)

## 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

## 分担研究報告

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

黄熱ウイルス野生株（南米株対応、アフリカ株対応）検出用リアルタイム PCR 法の開発

高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

中山絵里（国立感染症研究所ウイルス第一部）

小滝 徹（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨：黄熱ウイルスのリアルタイム RT-PCR (TaqMan) 法はすでに感染症研究所において確立しているが、あくまでワクチン株 (17D) により評価しているに過ぎない。17D 株はアフリカの黄熱患者から分離された Asibi 株を弱毒化したものである。しかし、近年は経済的にも政治的にも重要であるアフリカ大陸および 2013 年サッカーワールドカップおよび 2014 年のオリンピックが開催される南アメリカ大陸野生株に対応した系およびアフリカ大陸野生株対応の遺伝子検出系を確立し、まず 17D 株で評価した結果、南米株対応型では検出できず、アフリカ株対応型でのみ検出できた。

A. 研究目的

現在、日本で使われている黄熱ウイルス遺伝子検出リアルタイム RT-PCR 法は、ワクチン株 (17D 株) を用いて評価されているのみである。特に 2013 年サッカーワールドカップおよび 2014 年のオリンピックがリオデジャネイロといった行事が続く南米への渡航者が今後増加する状況で、

B. 研究方法

GenBank に登録された黄熱ウイルスの塩基配列を収集し、アライメントした後、アフリカ株用、南米株用のリアルタイム逆転写 PCR (TaqMan 法) のプライマーおよびプローブセットを塩基配列部位 8280-

8354、4769-4862 に設計し、南米株用のセットは、9393-9453 に設計した。それらをまずはアフリカ株に由来する黄熱ワクチン株 (17D) により検出可能かどうかをリアルタイム PCR により評価した。

C. 研究結果

保有する黄熱ウイルス 17D 株は、アフリカ株であり、アフリカ株用 2 セット 8280/8308FAM/8354c と 4769/4804FAM/4862c で 0.08pfu/tube まで検出可能であった。しかし、南米株用の 9393/9415FAM/9453c では検出されなかった (表 1)。

#### D. 考 察

黄熱ウイルスのリアルタイム RT-PCR (TaqMan) 法により、南米株対応、アフリカ株対応セットを作ることが、可能であることが確認された。評価のためには、南米野生株およびアフリカ野生株のウイルス遺伝子 (RNA) を入手する必要がある。

#### E. 結 論

黄熱ウイルスアフリカ株および南アフリカ株に対応するリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) のプライマー、プローブを設計した。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzuki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of General Virology*, 95(Pt 3):591-600, 2014.
2. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as main parameter in a dengue virus antibody-dependent

enhancement assay using

FcyR-expressing BHK cells. *Archives of Virology*, 159(1):103-16, 2014.

3. Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: A case of coinfection. *Archives of Virology*. 159(11): 2969-75, 2014.
4. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, Matono T, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveillance*, 19(4). pii: 20683, 2014
5. 朽谷健太郎、清水恒弘、篠原 浩、土戸康弘、モイ メンリン、高崎智彦. オーストラリア渡航中に発症したロスリバーウイルス感染症の本邦発報告. *感染症学雑誌*. 88(2):155-159 (2014)

##### 2. 学会発表

###### 国際学会

1. Tomohiko Takasaki. Re emerging dengue in Japan 2014. The 8<sup>th</sup> Korea-Japan-China for communicable disease control and prevention. Nov.26, 2014. (The Lotte Hotel, Jeju, Korea)
2. Tomohiko Takasaki. Re-emerging dengue in Japan: Where do we stand today? 17<sup>th</sup> International

Conference on Emerging Infectious Diseases (Taipei, Taiwan, 27–29 Jun 2015)

3. Moi ML, Rattanamahaphoom J, Lim CK, Sirivichayakul C, Saijo M, Sabchareon A, Takasaki T, Kurane I. Neutralizing antibody titers as a surrogate for protection against dengue: a revisit of neutralizing antibody titers of dengue virus using FcγR-expressing cells. Joint International Tropical Meeting (JITMM) (Bangkok), December, 2014.
4. Moi ML, Shirai K, Ami Y, Lim CK, Suzuki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Development of a non-human primate model for primary and secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). The 63rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (New Orleans, Louisiana, USA) November, 2014
5. 高崎智彦. デング熱 国内感染の流行をどう受け止めるか. 日本記者クラブ. 平成 26 年 9 月 12 日 (東京都、日本プレスセンタービル)
6. 高崎智彦. 海外で流行する昆虫媒介性ウイルス感染症とデング熱国内流行 (特別講演). 平成 26 年度地方衛生研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会
7. 高崎智彦. デング熱国内発生への対応ーデング熱の基礎と疫学ー. 第 46 回日本小児感染症学会. 平成 26 年 10 月 18–19 日 (東京)
8. 高崎智彦. 緊急企画 : 70 年を経ての再来ーデング熱国内流行 2014. 第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会. 平成 26 年 10 月 23–25 日 (岡山市)
9. 高崎智彦. 緊急報告「デング熱ー今年の国内流行」. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10–12 日 (横浜市)
10. MoiMeng Ling, 白井颯治、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦一孝、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10–12 日 (横浜市)
11. 山中敦史、Moi Meng Ling、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・増強抗体応答に及ぼす影

#### 国内学会

1. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデングワクチン. 第 25 回トラベラーズワクチンフォーラム研修会. 平成 26 年 2 月 22 日 (東京都)
2. 高崎智彦. 黄熱ワクチンとデング熱ワクチン. 第 11 回渡航医学実用セミナー「海外赴任前健康ガイダンス」平成 26

- 響. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10～12 日 (横浜市)
10. 齋藤悠香、Moi Meng Ling、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. Fc $\gamma$ R 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会. 平成 26 年 11 月 10～12 日 (横浜市)
11. 高崎智彦. 「デング熱から身を守るために～忍び寄る地球温暖化～」川崎市地球温暖化防止活動推進センター主催. 平成 26 年 11 月 16 日 (東京都多摩市)
12. 高崎智彦. 「市民公開講座」デング熱 これからどうなる?. 日本獣医学会 公衆衛生分科会主催. 平成 26 年 12 月 1 日 (東京、日本獣医生命科学大学)
13. 高崎智彦. 「デング熱国内感染と海外の対応」日本旅行医学会 第 8 回看護部会セミナー. 平成 26 年 12 月 13 日 (東京 東医健保会館)
14. 高崎智彦. デング熱国内流行 ～70 年の時を経て～ (特別講演). 第 21 回リケッチャ研究会. 平成 26 年 12 月 20～21 日 (東京 国立感染症研究所)
15. 高崎智彦. デング熱・チクングニア熱など蚊媒介性ウイルス感染症. 平成 26 年度阪神地区感染症懇話会 平成 27 年 1 月 26 日 (大阪市 大阪府病院年金会館)

表 プライマー&プローブセット

8280/8308FAM/8354c	0.08 pfu	YF 17D/W. Africa
4769/4804FAM/4862c	0.08 pfu	YF 17D/W. Africa
9393/9415FAM/9453c	Not detectable	S. America 1 & 2

評価中であり配列は示さない。

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

デングウイルス・リフトバレー熱ウイルスの病原体迅速検査法の確立  
に関わる技術開発

担当責任者： 森田公一 長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野

研究要旨：

蚊で媒介されるウイルス疾患のなかで、デングウイルス感染症は、毎年約1億人が感染し、数十万人が重症のデング出血熱を発症すると見積もられている。これにともない、我が国の輸入症例も増加し、2013年は249例を超えて感染症法施行後最高の症例数となった。そしてついに、2014年8月～9月にかけて東京都において70年ぶりの国内流行が発生し160名以上の患者が確認された。一方、リフトバレー熱はアフリカを中心に発生しており、近年では中近東へも侵入して患者発生が報告され、アジアひいては日本にも侵入することが危惧される。これらのウイルス感染症の国内侵入の阻止、および侵入した場合その被害を最小限に食い止めるためには、迅速診断法の開発は重要である。本分担研究では、これら二つの蚊媒介性ウイルス感染症の簡便な実験室診断法を確立し、キット化の基盤的開発研究をすることを目的として、研究初年度はデング熱の迅速診断法の開発を実施し、デングウイルス NS1 蛋白を大腸菌発現系にて大量発現させ、加えて NS1 蛋白に対する単クローン抗体を樹立し、さらにイムノクロマト法による NS1 抗原検出キットを試作した。

## A. 研究目的

デング熱、リフトバレー熱の迅速診断法の簡便な実験室診断法を確立し、キット化の基盤的開発研究をすることを目的として、研究初年度はデング熱のイムノクロマト法を用いた迅速診断法の開発を実施した。

## B. 研究方法

### 1) NS1 抗原の大腸菌発現系での発現：

デング 2 型ウイルスの非構造蛋白質の NS1 蛋白遺伝子を大腸菌発現ベクター pQE30 のクローニングサイトに挿入して His-tag を付加した状態で大腸菌に発現させ、溶菌処理を実施した後、定法により高速遠心にて不純物を除去し、ニッケルカラムにて精製した。

### 2) 単クローン抗体の樹立：

発現 NS1 蛋白を BALB/マウスに免疫し、4 回免疫したのち、脾臓を摘出して B 細胞を精製し、ミエローマ細胞 SP2/0 を用いてハイブリドーマ細胞を樹立して NS1 蛋白に対する単クローン抗体を作成した。抗体のデングウイルス NS1 抗原に対する特異的結合は、ウイルス感染細胞の間接蛍光染色、および、NS1 抗原発現バキュロウイルス感染細胞の免疫染色、およびウエスタンブロット法により確認した。さらに特異性を確認した、単クローン抗体は定法にしたがって金コロイドと結合させ、金コロイド標識 NS1 単クローン抗体を作成した。

### 3) イムノクロマト法による NS1 抗原検出系の作製：

ニトロセルロースメンブレン (HSF 240) に抗 NS1 モノクローナル抗体をコーティングしたのち乾燥させ、その後ブロッキング溶液で処理し、バッファーで洗浄して再度乾燥させた。乾燥したメンブレンは細い短冊状に切断して、イムノクロマト法に使用した。抗原検出能力の確認のため、NS1 抗原陽性検体と金コロイド標識 NS1 単クローン抗体、バッファー溶液を  $40\mu\text{l}$  をロードし、 $100\mu\text{l}$  のバッファー溶液でさらにチェイスしてバンドが検出されるか否かを 30 分後に判定した。

(倫理面からの配慮について)

本年度の研究では、ヒトサンプルを用いた研究は実施していないので、特段の配慮は必要ないが、次年度以降はヒトサンプルを用いた検証実験を行うため、長崎大学病院倫理委員会の承認を得て実施する予定である。

## C. 研究結果

### 1) NS1 抗原の大腸菌発現系での発現：

大腸菌発現デング 2 型ウイルス NS1 蛋白抗原の回収率は 1 リットル培養で約 10mg の収率であった。カラム精製した発現蛋白質をポリアクリルアミド電気泳動でその分子量が設計値と一致することが確認された (図 1 左)。また抗 His 抗体を用いたウエスタンブロット法によりこの蛋白が発現蛋白であることを確認した (図 1 右)。

## 2) 単クローン抗体の樹立：

合計12ハイブリドーマを得た。デング2型ウイルス NS1 蛋白との反応性をウエスタンブロット法、間接蛍光法で確認した。図2にはデング NS1 蛋白単クローン抗体がデングウイルス感染細胞と反応し、日本脳炎ウイルス感染細胞とは反応しないことを示している。

## 3) イムノクロマト法による NS1 抗原検出系の作製：

今回試作したイムノクロマト法の試験結果を図3に示す。ロードしたサンプルはデングウイルス感染細胞液上清 (DEN2-ICF)、日本脳炎有ウイルス感染細胞上清 (JEV-ICF)、デング NS1 発現バキュロウイルス感染細胞上清、陰性コントロール、精製デングウイルス NS1 抗原である。陰性コントロール、日本脳炎ウイルス検体ではバンドは検出されず、デング NS1 抗原が含まれる残りの3つのサンプルではバンドが検出された。

## D. 考察

本年度開発したデングウイルス2型NS1タンパク質の大腸菌発現蛋白は1リットル培養で多量の抗原を発現させることが可能であり、今後血清診断系をふくむ多方面での活用が期待される。ただし、今の処可溶性が低く、現在、再フォールディング等の方法により可溶性の向上を模索中である。しかし、今回試作したイムノクロマト法によるデングウイルスの NS1 抗原検出キットは十分に機能した。今後、単クローン抗体のメンブレン

上のブロットを実際の製造に用いられる線上噴霧に切り替えることで感度の向上が期待され、限界感度試験、患者血清を用いた評価へと進展させることが必要である。またさらなる感度向上をめざして銀粒子を用いた超高感度化も検討する。

## E. 結論

大腸菌発現によるデングウイルス NS1 タンパク質高発現系と抗 NS1 単クローン抗体を樹立してイムノクロマト法によるデング NS1 抗原検出キットを試作した。

## F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

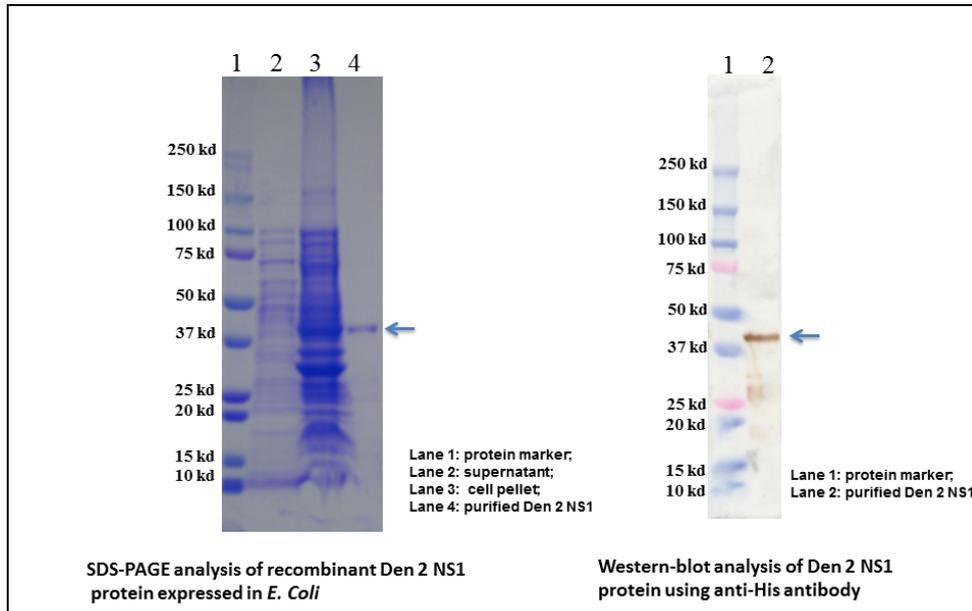
- 1) 森田公一、デング熱の世界的な流行と予防対策に関する将来的展望. 化学療法の領域. Vol.30 . 275-281. 2014
- 2) Muhareva Raekiansyah, Lyre Anni Espada-Murao, Kenta Okamoto, Toru Kubo, Kouichi Morita . Dengue virus neither directly mediates hyperpermeability nor enhances TNF- $\alpha$ -induced permeability in vitro. Japanese Journal of Infectious Diseases, Vol.67:86-94, 2014
- 3) Tomoko Abe, Ayumi Sando, Fumiteru Teraoka, Tadamune Otsubo, Kouichi Morita, Hiroaki Tokiwa , Kiyoshi Ikeda , Takashi Suzuki , Kazuya I.P.J. Hidari. Computational design of a sulfoglucuronide derivative fitting into a

- hydrophobic pocket of dengue virus E protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol449:32-37, 2014
- 4) Ngwe Tun MM, Thant KZ, Inoue S, Nabeshima T, Aoki K, Kyaw AK, Myint T, Tar T, Maung KTT, Hayasaka D, Morita K. Emergence of East Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Myanmar, 2010. *Emerg Infect Dis*. 20:1378–1381, 2014
- 5) Ngwe Tun MM, Aoki K, Senba M, Buerano CC, Shirai K, Suzuki R, Morita K, Hayasaka D. Protective role of TNF- $\alpha$ , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus. *Sci Rep*. 4:5344, 2014
- 6) Aoki K, Shimada S, Simantini DS, Ngwe Tun MM, Buerano CC, Morita K, Hayasaka D. Type-I interferon response affects an inoculation dose-independent mortality in mice following Japanese encephalitis virus infection. *Virology*. 11; 105, 2014
- 7) 森田公一、デング熱：日本にも忍び寄る熱帯感染症、感染症道場、Vol.3, p41-44, 2014
- 8) 森田公一：感染症診療 update (デング熱)：日本医師会雑誌 143 巻・特別号 (2)、S388-389, 2014
- 9) 高松由基、森田公一：デング熱ワクチン、臨床と微生物、Vol.41:763-770, 2014
- 10) Leo Uchida, Lyre Anni Espada-Murao, Yuki Takamatsu, Kenta Okamoto, Daisuke Hayasaka, Fuxun Yu, Takeshi Nabeshima, Corazon C. Buerano, and Kouichi Morita. The dengue virus conceals double-stranded RNA in the intracellular membrane to escape from an interferon response. *Scientific Reports*. 4:7395. doi: 10.1038/srep07395. 2014
- ## 2. 学会発表
- 1) 井上真吾, Allan ole Kwallah, Salame Ashur, Mulati Omuyundo, Missiani Ochwoto, Samson Muuo, Lucy Okubi, Matilu Mwau, 森田公一：ケニアインド洋沿岸におけるデング熱の発生報告, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日
- 2) 内田玲麻, Espada-Murao Lyre Anni, 早坂大輔, 森田公一：Double stranded-RNA concealing によるデングウイルスの I 型 IFN 誘導回避機構, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日
- 3) 高松由基, 岡本健太, Dinh Tuan Duc, 余福勲, 早坂大輔, 内田玲麻, 鍋島武, Corazon C Buerano, 森田公一：NS1' タンパク質はトリ細胞で日本脳炎ウイルスの増殖及び適応に機能する, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日
- 4) 鍋島武, 二見恭子, 今西望, 吉川亮, 松本文昭, 高松由基, 内田玲麻, 森田公一：長崎県対馬と五島列島における蚊の採集と JEV の分離, 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 山口, 2014 年 5 月 16 日～5 月 17 日

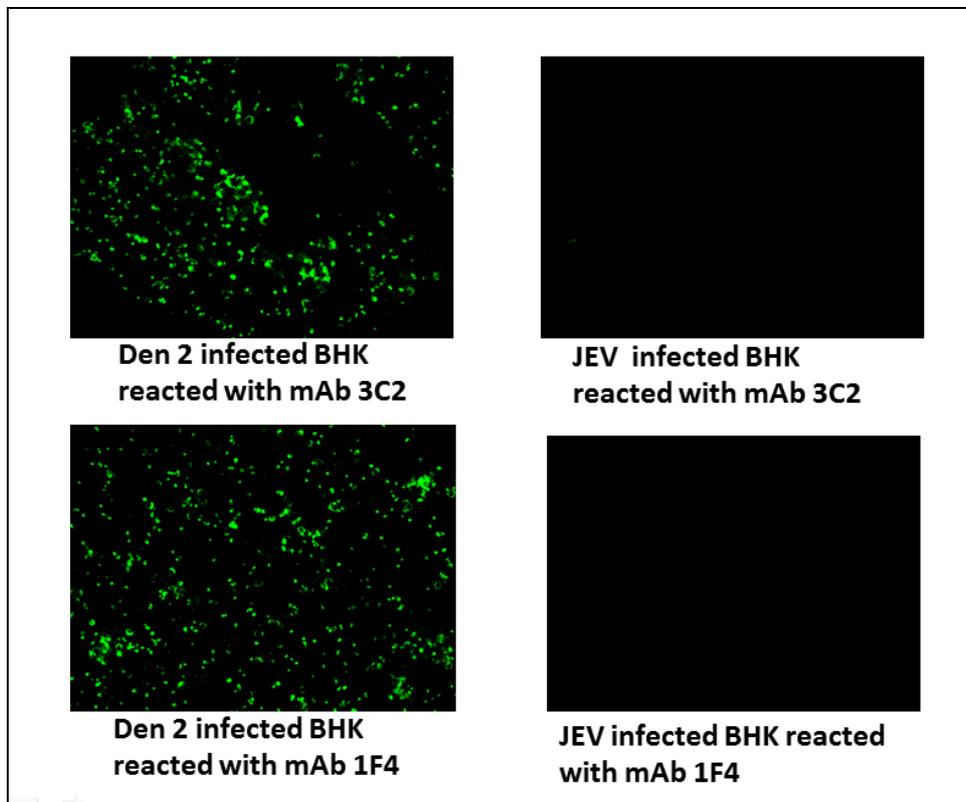
- 5) 森田公一：デング熱の基礎と臨床、4学会緊急セミナー「エボラ出血熱、デング熱への対応」、東京、ベルサール汐留、2014年10月13日
- 6) 森田公一：わが国へ侵入が危惧されるフラビウイルス感染症、第14回ヒトと動物の共通感染症研究会学術集会、東京、国立感染症研究所、2014年11月8日
- 7) 内田玲麻、浦田秀造、高松由基、森田公一、早坂大輔：脂質合成阻害薬によるヒト培養細胞におけるデングウイルス感染抑制、第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日～11月12日
- 8) 余福勲、Adungo Ferdinand、早坂大輔、森田公一：Development of monoclonal antibodies against SFTS virus nucleocapsid protein and application in sero-diagnosis, 第62回日本ウイルス学会学術集会、横浜、2014年11月10日～11月12日
- 9) 森田公一：デングウイルス感染の自然免疫系制御機構の解明、第46回九州微生物研究会、福岡、平成25年12月22日
- 10) Kouichi Morita, The function of Japanese encephalitis virus NS1' protein on pathogenicity in avian hosts. 49<sup>th</sup> US-Japan Medical Science Cooperation Program, Viral Diseases Panel Meeting, Taipei, Taiwan, 2015, January 28, 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

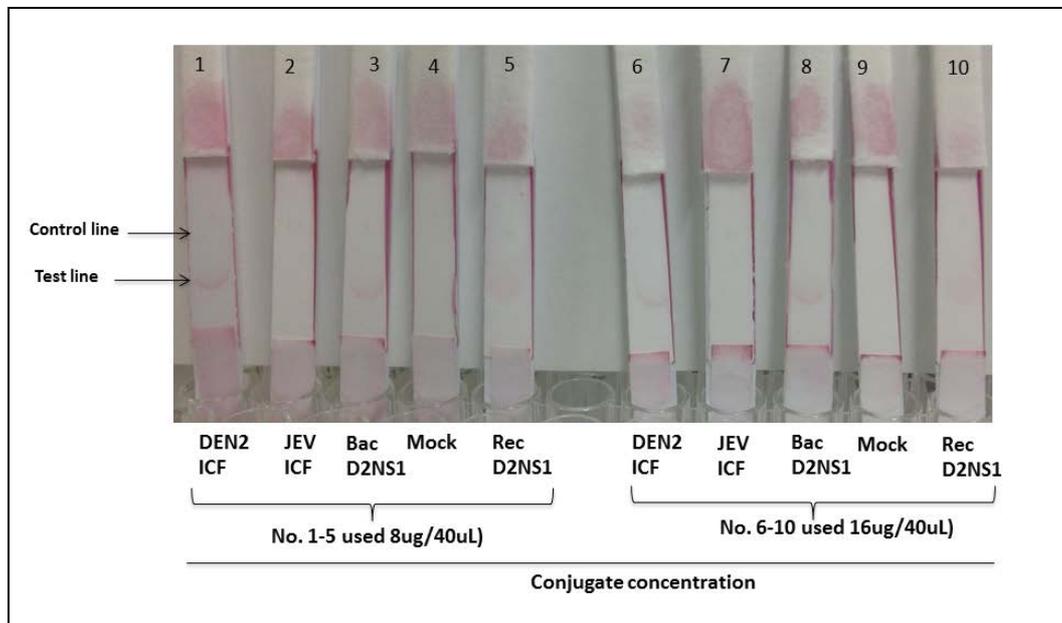
<図1>大腸菌による Dengue 2 型ウイルス NS1 蛋白の発現



<図2>単クローン抗体と Dengue ウイルス(左)、日本脳炎ウイルス(右)との反応性  
(間接蛍光染色法)



(図3) イムノクロマト法によるデング 2 型 NS1 抗原の検出



新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

フラビウイルス抗体測定に有用な 1 回感染性ウイルス様粒子の開発と応用

担当責任者 小西 英二 (国立大学法人大阪大学・微生物病研究所；タイ国マヒドン大学・熱帯医学部)

研究協力者 モイ・メンリン (国立感染症研究所・ウイルス第一部)

高崎智彦 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)

倉根一郎 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)

鈴木 亮介 (国立感染症研究所・ウイルス第二部)

山中 敦史 (国立大学法人大阪大学・微生物病研究所；  
タイ国マヒドン大学・熱帯医学部)

**研究要旨** 昆虫媒介性ウイルスは世界に分布する病原体である。我が国には少数種しか存在しないが、昨年のデング熱のように外国から侵入し流行を起こす可能性がある。流行を抑えるためには、診断法や予防ワクチンの開発などの幅広い対策が求められる。しかし、開発に必要となるウイルスの国境を超える入手は困難になりつつある。我々は一昨年度の本研究班において、ウイルスの遺伝子情報のみで 1 回感染性ウイルス様粒子 (SRIP) を作出する方法を確立した。昨年度は、デング 1 型ウイルス (DENV-1) の遺伝子情報から作製した D1-SRIP が、DENV-1 の代替抗原として、中和試験等の抗体機能試験に使用可能であることを示した。本年度は、昨年度から輸入症例の散見されるジカウイルスの SRIP 作製に成功した。この結果は、新規診断法の開発に SRIP 技術が有用であることを示す。また、DENV-1 の遺伝子型 I あるいは IV に感染した輸入症例の血清は、各遺伝子型の DENV-1 株から作製した 5 種の D1-SRIP に対して、ほぼ同じ中和抗体価を示すことを明らかにした。この結果は、デングウイルスの遺伝子型による比較的大きな抗原性の違いが指摘される中、DENV-1 ワクチンに関しては 1 種の遺伝子型ですべての遺伝子型をカバーできることを示唆する。

**A. 研究目的**

昆虫媒介性ウイルス感染症には脳炎等ヒトに重篤な症状を引き起こすものが多い。また、世界における分布域も広い。我が国

の昆虫媒介性ウイルス感染症は限られるが、海外への旅行者や外国から渡航する旅行者の数は増加し、ヒトやモノの移動による国内へのウイルス侵入の可能性も同時に高く

なってきた。昨年にはデングウイルスが国内伝播を起こし、160人以上が感染した。今後、デングウイルスに限らず、国外の昆虫媒介性ウイルスの我が国への侵入が懸念される。すでに診断法や予防ワクチンが確立されているものは少数の昆虫媒介性ウイルス感染症に対するものであり、流行を未然に防ぐあるいは小規模に止めるためには、これら国外で流行する感染症に対する診断法やワクチンの開発など、幅広い対策が求められる。

診断については、患者の遺伝子学的検査や抗体検査による確定診断が重要である。中和試験は、最も特異性の高い抗体検査法として広く用いられてきた。したがって、中和試験の抗原となる国外のウイルスが必要である。一方、ワクチン開発のためには、誘導された抗体が種々の地域に流行中のウイルスに対して有効かどうかについて評価する際などに、国外のウイルス株を入手する必要がある。しかし、「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」が重視されてきたため、国境を超えるウイルスの運搬は困難となってきた。したがって、遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルスを容易に作製できる系は有用である。

我々は一昨年度の本研究班において、中和試験等の抗体機能検査用の抗原を、ウイルスの遺伝子情報のみで作出できる方法を確立した。これは、日本脳炎ウイルス(JEV)レプリコンプラスミドと、JEVの表面蛋白の合成に関わる前駆膜蛋白(prM)及びエンベロープ蛋白(E)遺伝子を発現するプラスミドを哺乳類細胞に共導入することにより、1回感染性のウイルス様粒子(SRIP)を産生させる方法である。利点は、他のフラビウイルスの表面蛋白を発現するプラスミドとの共導入により、キメラSRIPが得られることにある。昨年度は、デング1型ウイルス(DENV-1)の遺伝子情報から作製し

たD1-SRIPが、DENV-1の代替抗原として抗体機能試験に使用可能であることを示した。このことは、遺伝子情報に基づく表面蛋白を有するキメラSRIPが形成されたことを意味し、入手できない外国株でもその塩基配列から、同一の表面を持つウイルスが国内で使用できることにつながる。

本年度は、SRIP技術の診断法確立への応用として、ジカウイルス(ZIKV)の遺伝子情報からSRIP(ZIKV-SRIP)作製を試みた。また、ワクチン開発への応用として、DENV-1の遺伝子型による抗原性の違いを検討した。ZIKVは、アジア、アフリカやオセアニアに分布し、このウイルスが引き起こすジカ熱の輸入症例が最近認められるようになってきた。一方、デングウイルスはデング熱(DF)やデング出血熱(DHF)を引き起こし、世界の熱帯・亜熱帯地域に分布する。わが国では輸入感染症として1999年から報告され、2009年まで概ね年間100例までの患者が発生してきたが、その数は増加傾向にあり、2010年、2012年及び2013年には200例以上が報告された。そのような中、2014年には国内伝播症例が発生し、輸入感染症例と合わせて、その数は300名以上に達した。

## B. 研究方法

**ZIKV-SRIPの作製**：国内輸入症例から分離されたZIKV(MR766-NIID株：GenBank LC002320)の表面蛋白遺伝子を哺乳動物細胞発現ベクターpcDNA3に組み込み、表面蛋白発現プラスミドpcZIKMEを作製した。JEVレプリコンプラスミドとして、JEV(中山株)ゲノムから大部分のprM/E遺伝子を除いたpCMV-JErep-fullCを用いた(図1A)。pcZIKMEとレプリコンプラスミドを293T細胞にコトランスフェクトし、3日目の培養上清に含まれるZIKV-SRIPをVero細胞及びK562細胞に対する感染性で評価した。ただし、K562

細胞を用いた評価では、低濃度のフラビウイルス交差性モノクローナル抗体 4G2 を感染前に加える系も用いた。また、pcZIKME をトランスフェクトした 293T 細胞を 4G2 抗体で免疫染色することにより、ZIKVprM/E 遺伝子の発現を調べた。

**D1-SRIP の作製**：GenBank に登録されている DENV-1 表面蛋白遺伝子の塩基配列情報から合成された DNA を pcDNA3 に組み込み、表面蛋白発現プラスミドを 5 種類の遺伝子型 (GI-GV) について作製した (表 1)。pCMV-JErep-fullC と共に 293T 細胞にコトランスフェクトし、3~7 日目の培養上清に含まれる D1-SRIP を感染力価測定後に、抗体試験用抗原として用いた。

**SRIP の感染力価測定法**：96 穴プレートに段階希釈した SRIP を含む培養上清を用意して、Vero 細胞および準接着系 K562 細胞の浮遊液を加えた。3 日後に接着した細胞層を固定し、抗 NS1 抗体を用いた免疫染色を行い、感染細胞を計数して感染力価を求めた。ミリリットルあたりの感染単位 (IU/ml) として表した。

**ヒト血清**：2004-2012 年に採取・保存されたデング輸入症例血清を急性期・回復期のペアで合計 44 検体を用いた (表 2)。

**増強抗体試験**：96 穴プレート中で段階希釈した検体と各遺伝子型の D1-SRIP 抗原を混合し、37°C で 2 時間保温した後に、準接着系 K562 細胞を加えた。3 日後に抗 NS1 抗体を用いた免疫染色を行い感染細胞を計数した。実験群で得られた感染細胞数を、抗体を含まない陰性対照の感染細胞数が 100 になるように換算した。

**中和抗体試験**：96 穴プレート中で段階希釈した検体と各遺伝子型の D1-SRIP 抗原を混合し、4°C で一夜保温した後に、24 穴プレートの Vero 細胞に感染させた。3 日後に抗 JEV-NS1 抗体を用いた免疫染色を行い、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、75%減少を示す希釈度を中和抗体価とした。

#### (倫理面への配慮)

ヒト血清の使用には、国立感染症研究所及び実験実施場所であるタイ国マヒドン大学熱帯医学部の倫理委員会から承認を受けた。

### C. 研究結果

**ZIKV-SRIP の収量**：pcZIKME が ZIKV 抗原を発現するかを予備的に調べるために、293T 細胞にトランスフェクトした後、4G2 抗体で免疫染色した。図 1B に示すように、抗原の発現が確認できた。次に、pCMV-JErep-fullC と pcZIKME を 293T 細胞にコトランスフェクトすることにより放出された ZIKV-SRIP の量を 3 日後に測定した。測定に用いた Vero 細胞の染色像を図 1C に、感染価 (産生量) を図 1D に示す。Vero 細胞を用いたとき、また 4G2 抗体を加えない系で K562 細胞を用いたときは、 $10^2$  オーダーの低い値であったが、4G2 抗体を加えた系では  $10^4$  オーダーにまで上昇した。この結果から、放出感染性粒子数は  $10^4$  を超えると考えられる。

**デング輸入症例急性期血清を用いた初感染の確認**：ヒトにおける DENV-1 の各遺伝子型に対する抗体応答を比較解析するためには、1 つの遺伝子型の DENV-1 に感染したヒト血清を用いる必要がある。今回対象とした血清は、ELISA により測定された IgG 値と IgM 値、及びその比率から初感染と判定されたものであるが、さらに中和試験によりすべての血清型に対して中和抗体価が 1:10 未満であることを確認した。

**DENV-1各遺伝子型に対する中和抗体価の比較**：DENV-1に感染した輸入症例の血清と各遺伝子型のDENV-1株から作製した5種のD1-SRIPを用いて、中和抗体価を比較した。個体差を標準化するためにGI感染者であれば、GI抗原に対する中和抗体価を1

として、他の遺伝子型抗原に対する中和抗体価を相対値で表した(図2)。感染した遺伝子型が塩基配列から判定された患者と渡航国から推定された患者とで差が見られなかったため、まとめて図に表した。GI感染者及びGI感染推定者においても、GIV感染者及びGIV感染推定者においても、他の遺伝子型抗原に対する中和抗体価の平均値は、感染した遺伝子型に対する中和抗体価の平均値と2倍以上の差は認められなかった。この結果は、DENV-1のGIあるいはGIVに感染したヒトは5種の遺伝子型に対して、ほぼ同じレベルの中和抗体を誘導することを示す。しかし、GIIに対する中和抗体価には、GI感染者においてもGIV感染者においても比較的大きな個体差が示された。

**DENV-1各遺伝子型に対する増強抗体活性の比較:** 中和抗体の誘導が不十分な場合、感染増強が起こる可能性が指摘されている。そこで、各遺伝子型のDENV-1株から作製した5種のD1-SRIPに対する感染増強活性を調べた。感染増強活性は、2種の指標で解析した。1つは感染増強率であり、2倍階段希釈血清で示された感染細胞数を血清無添加対照で示された感染細胞数に対する増加として対数で表し、その最高値とした(一般的にFold enhancementと呼ばれる値)。他の1つは、感染増強抗体価であり、血清希釈度依存性曲線で表される増強活性が対照で得られた平均値+3×標準偏差値を下回らない最高血清希釈度とした。

感染増強率及び感染増強抗体価共に、他の遺伝子型抗原に対して得られた平均値は、感染した遺伝子型に対して得られた平均値と同等の値であった。この結果は、DENV-1のGIあるいはGIVに感染したヒトは5種の遺伝子型に対して、ほぼ同じレベルの感染増強抗体を誘導することを示す。しかし大きな個体差が認められ、GIV感染者においては感染増強率及び感染増強抗体価共に、GIまたはGV抗原に対して最大10倍以上の

差を示す個体が存在した。

#### D. 考察

フラビウイルス prM/E 遺伝子の発現によりニュークレオカプシドが存在しない空の粒子が細胞から放出されるが、同時にレプリコンプラスミド (pCMV-JErep-fullC) を導入すると、細胞内で RNA を含むニュークレオカプシドが形成されて粒子形成の際に取り込まれるため、SRIP が放出される。すでに JEV の他、ウエストナイルウイルス、黄熱ウイルス、ダニ脳炎ウイルス及びデングウイルスの prM/E 遺伝子を用いて SRIP が放出されることを証明してきたが、今回 ZIKV の prM/E 遺伝子によっても SRIP が放出されることを示した。今後、中和試験に使用可能かを評価する必要がある。

SRIP 技術により、prM/E 領域の遺伝子情報に基づき、他国のウイルスと同様の抗原性を有する粒子を作製することは理論的に可能である。DENV-1 は 5 種類の遺伝子型に分類される、今回 GenBank に登録されている塩基配列から SPIR を作製し、中和試験及び増強試験の抗原として使用した。SRIP 抗原の作製は比較的容易であり、情報に基づき DENV の prM/E 発現プラスミドを作製し、pCMV-JErep-fullC と共に細胞にコトランスフェクションすることで得られる。この技術により世界中に分布する DENV 抗原の作製が可能となり、抗体解析やワクチン開発に貢献すると考えられる。

本研究では、DENV-1 に感染したヒトに誘導される抗体が、どの程度遺伝子型に依存しているかを SRIP 抗原を用いて調べた。マウスモデルにおいては、比較的大きな抗原性の違いが同一の血清型の中で証明されている。一方、現在開発中の種々戦略によるデング 4 価ワクチンには、各血清型で様々な遺伝子型が代表として使用されている。2012 年に報告された世界初のデングワクチン効力評価では、予想外に効力が低か

ったが、1つの理由としてワクチン株と流行株との抗原ミスマッチが指摘されたため、ヒトの抗体誘導における遺伝子型の影響を調べる意義は大きい。

これまでヒトにおいて遺伝子型のインパクトが調べられてこなかった理由として、単一の遺伝子型・血清型のみで感染したヒトを、デング流行国では容易に見つけられないことが挙げられる。複数の遺伝子型・血清型に感染したヒトに誘導された抗体では、正しい解析が困難である。そこで、本研究では我が国の輸入症例を対象とした。非流行国における輸入症例では初回感染が多く、従って単一の遺伝子型のみにより誘導された抗体の解析が可能となる。ペア血清を用い、急性期血清ですべての血清型に対する中和抗体が陰性であることを確認したのちに、回復期血清中の各遺伝子型に対する抗体レベルを比較した。

その結果、DENV-1の遺伝子型IあるいはIVに感染した輸入症例の血清は、各遺伝子型のDENV-1株から作製した5種のD1-SRIPに対して、ほぼ同等の中和抗体価を示すことが示された。このことは、DENV-1ワクチンに関しては1種の遺伝子型ですべての遺伝子型をカバーできることを示唆する。マウスにおける比較的大きな抗原性の違いは、E蛋白分子を構成する3つのドメインのうち、抗原特異性の高いドメインIIIに対する中和抗体をマウスが多く誘導することに基づくと考えられる。一方、ヒトに誘導される中和抗体はドメインIII以外に対するものであり、交差性抗体が多いとされる。

今後、他の血清型についても遺伝子型の影響を調べる予定である。SRIP作製系により多様なウイルス抗原の作製が可能となり、これらを用いて抗体の機能試験を行うことは、将来のワクチン開発や国外流行株の国内侵入時の対策に貢献することが期待される。

## E. 結論

SRIP技術により、ZIKVの1回感染性粒子が作製できた。各遺伝子型のDENV-1抗原を作製し、GI/GIV感染がヒトに誘導した抗体は他の遺伝子型に対しても同等のレベルで中和することを示した。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Runtuwene LR, Konishi E, Yamanaka A, Makino Y, Suzuki Y, Takasaki T, Kurane I, Kobayashi T, Eshita Y. Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse. *Parasit Vectors*. 7(1):143, 2014.
2. Tomohiro Ishikawa, Atsushi Yamanaka and Eiji Konishi: A review of successful flavivirus vaccines and the problems with those flaviviruses for which vaccines are not yet available. *Vaccine*. 32(12):1326-37, 2014.
3. Tomohiro Kotaki, Atsushi Yamanaka, Kris Cahyo Mulyatno, Amaliah Labiqah, Teguh Hari Sucipto, Siti Churrotin, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi, Masanori Kameoka: Phylogenetic Analysis of Dengue Virus Type 3 Strains Primarily Isolated in 2013 from Surabaya, Indonesia. *Jpn J Infect Dis*. 67(3), 227-229, 2014.
4. Yamanaka A, Suzuki R, Konishi E. Evaluation of single-round infectious, chimeric dengue type 1 virus as an antigen for dengue functional

- antibody assays. *Vaccine*. 32(34):4289-95, 2014.
5. Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Japanese encephalitis: epidemiology, prevention, and current status of antiviral drug development. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 2(9), 1-14, 2014.
  6. Kotaki T, Yamanaka A, Mulyatno KC, Churrotin S, Labiqah A, Sucipto TH, Soegijanto S, Kameoka M, Konishi E. Continuous dengue type 1 virus genotype shifts followed by co-circulation, clade shifts and subsequent disappearance in Surabaya, Indonesia, 2008-2013. *Infect Genet Evol.* 28C:48-54, 2014.
  7. 山中敦史、小西英二: デングワクチン。最新医学『グローバル感染症』69巻、4号、819-823頁、2014.
- ## 2. 学会発表
1. Ryohei Saga, Akira Fujimoto, Noriyuki Watanabe, Mami Matsuda, Ryosuke Suzuki, Makoto Hasegawa, Koichi Watashi, Hideki Aizaki, Noriko Nakamura, Eiji Konishi, Takanobu Kato, Haruko Takeyama, Takaji Wakita: Japanese encephalitis virus-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes induce neutralizing antibodies against HCV. 21st International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses. Banff Canada, September 7-11, 2014.
  2. Atsushi Yamanaka and Eiji Konishi: Dengue type 1 virus monoclonal antibody cocktails for analyzing neutralizing and enhancing antibody responses in human sera. 8th Vaccine & ISV Congress, Philadelphia, PA, USA, October 27, 2014
  3. 山中敦史、小西英二: デング 1 型ウイルスに対するマウスモノクローナル抗体を用いたヒト中和・増強抗体の解析。第 55 回日本熱帯医学会。2014 年 11 月 2 日。
  4. 小瀧将裕, Siti Churrotin, Nur Laila Fitriati Ahwanah, Soegeng Soegijanto, 小西英二, Orapim Puiprom, 岡林環樹, 生田和良, 亀岡正典: インドネシアのデング患者血を用いた抗デングウイルスヒト型モノクローナル抗体の樹立。第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2014 年 11 月 9 日。
  5. 正木秀幸、小澤龍彦、高崎智彦、青山幾子、弓指孝博、小西英二、岸 裕幸、村口 篤: I S A A C 法による日本脳炎ワクチン被接種者末梢血単核球からのヒト抗ウエストナイルウイルス中和モノクローナル抗体の樹立。第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。2014 年 11 月 9 日。
  6. 嵯峨涼平、藤本陽、渡邊則幸、松田麻未、長谷川慎、渡士幸一、相崎英樹、中村紀子、小西英二、加藤孝宣、竹山春子、脇田隆宇、鈴木亮介: 日本脳炎ウイルスおよび C 型肝炎ウイルス 2 価ワクチン抗原の発現と中和抗体の誘導。第 62 回日本ウイルス学会学術集会。2014 年 11 月 12 日。
  7. 山中敦史、モイメンリン、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二: デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにお

ける中和・増強抗体応答に及ぼす影響。  
第 62 回日本ウイルス学会学術集会。  
2014 年 11 月 12 日。

8. Atsushi Yamanaka, Duangjai Oddgun, Nantarat Chantawat, Tamaki Okabayashi, Pongrama Ramasoota, Siti Churrotin, Tomohiro Kotaki, Masanori Kameoka, Soegeng Soegijanto, Eiji Konishi: Dengue virus infection-neutralizing and enhancing antibody responses in

central Thai populations against Indonesian and Thai strains. Joint International Tropical Medicine Meeting (JITMM 2014) and the 8th Seminar on Food- and Water-borne Parasitic Zoonoses (FBPZ8), Bangkok Thailand December 2, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

表 1. SRIP 作製に用いた各遺伝子型の DENV-1 株

遺伝子型	株名	GenBank*	分離年	分離国
GI	ThD1_0102_01	AY732479	2001	タイ
GII	16007	AF180817	1964	タイ
GIII	P72-1244	EF457905	1972	マレーシア
GIV	D1/JKTA4/88	AB600922	1988	インドネシア
GV	DENV-1/BR/BID-V2374/2000	FJ850070	2000	ブラジル

\*GenBank 登録番号

表2. 本研究で用いた DENV-1 輸入患者症例

患者番号	年齢	性	血清採取年	渡航国	決定遺伝子型*	推定遺伝子型**
08-14	40	M	2008	ベトナム	GI	-
08-92	20	M	2008	カンボジア	GI	-
04-40	28	M	2004	マレーシア	GI	-
07-27	32	M	2007	インドネシア	GI	-
12-54	35	M	2012	タイ	-	GI
11-60	33	F	2011	モルジブ	-	GI
11-61	30	M	2011	モルジブ	-	GI
10-14	20	M	2010	カンボジア	-	GI
08-80	40	F	2008	タイ	-	GI
10-57	6	M	2010	ラオス	-	GI
11-10	58	M	2011	フィリピン	GIV	-
12-05	31	F	2012	フィリピン	GIV	-
11-06	25	F	2011	インドネシア	GIV	-
05-18	46	M	2005	インドネシア	GIV	-
04-41	31	M	2004	ミクロネシア	GIV	-
04-47	37	F	2004	ミクロネシア	GIV	-
11-09	31	F	2011	インドネシア シンガポール	GIV	-
11-106	22	M	2011	フィリピン	GIV	-
12-80	48	M	2012	フィリピン	-	GIV
09-09	53	M	2009	東チモール	-	GIV
07-06	47	F	2007	フィリピン	-	GIV
06-71	34	M	2006	サモア	-	GIV

\*塩基配列に基づいた。

\*\*渡航国から推定された。

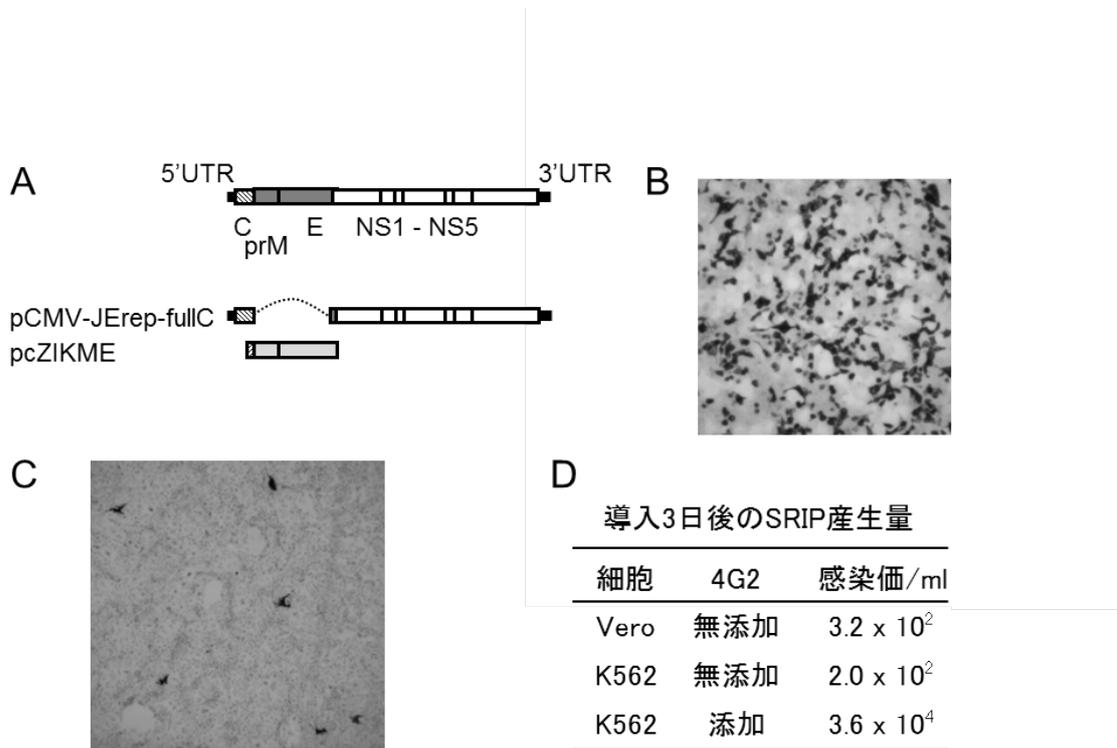


図1. ZIKV-SRIP の作製及び産生量。(A) ZIKV-SRIP を産生させるために用いた遺伝子の模式図。(B) pcZIKME トランスフェクション 2 日後の 293T 細胞の 4G2 免疫染色像。(C) ZIKV-SRIP 感染 3 日後の Vero 細胞の 2D5 免疫染色像。(D) pCMV-JErep-fullC と pcZIKME をコトランスフェクション 3 日後の 293T 細胞培養液中に含まれた ZIKV -SRIP の感染力価。

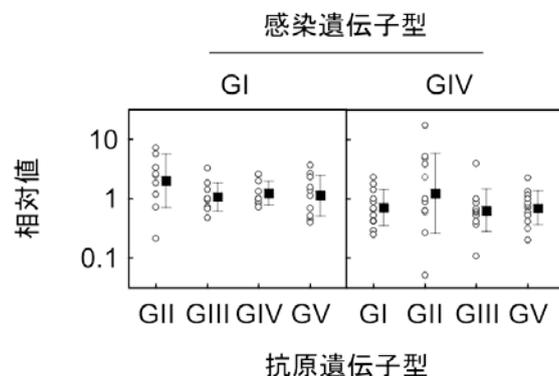


図2. DENV-1 の GI 株あるいは GIV 株に感染した、あるいは感染したことが推定される輸入感染症例における各遺伝子型の DENV-1 株に対する中和抗体価。感染遺伝子型で求められた中和抗体価に対する相対値で表した。白丸は個々のデータ、黒四角は平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

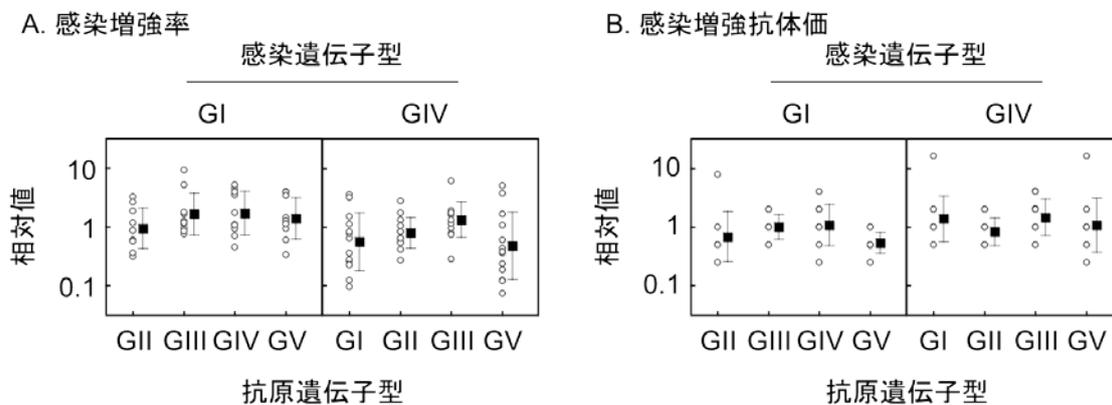


図3. DENV-1 の GI 株あるいは GIV 株に感染した、あるいは感染したことが推定される輸入感染症例における各遺伝子型の DENV-1 株に対する感染増強活性。感染増強率 (A) および感染増強抗体価 (B) を、感染遺伝子型で求められた中和抗体価に対する相対値で表した。白丸は個々のデータ、黒四角は平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

抗 Dengue ウイルス 活性測定と化合物スクリーニングに関わる研究開発

研究分担者 日紫喜隆行 (京都大学ウイルス研究所)

研究協力者 加藤文博 (京都大学ウイルス研究所)

**研究要旨：**

Dengue ウイルス 治療薬 開発の 為には、 効率的な 抗ウイルス 化合物の 探索ツール が必要で ある。 そこで 本研究班 では以前 我々が 開発した 一過性発 現型のレ プリコン の系を改 良し、 分泌型ル シフェラーゼ を有する 恒常発現 型のレプ リコン細 胞の樹立 を試みた。 まず薬剤耐 性遺伝子 とルシフェ ラーゼ遺 伝子の発 現方法を 検討する 為に、3 種類のコ ンストラ クトを構 築した。 続いて、 それぞれ *in vitro* で合成し た RNA を培養細胞 に導入し、 薬剤選抜 を行った が全ての 細胞が死 滅し、レ プリコン 細胞の樹 立には至 らなかつ た。 今後は RNA の導入方 法および 外来遺伝 子挿入位 置の検討 を行う予 定である。

**A. 研究目的**

Dengue ウイルスは熱帯・亜熱帯地域を中心に蔓延しており、公衆衛生上大きな問題となっているにもかかわらず、抗ウイルス薬やワクチンは未だ実用化されていない。その理由の一つに抗ウイルス薬開発や、ウイルス学的解析に用いるためのツールが不足していることが挙げられる。

我々は昨年、一過性発現型のレポーターサブゲノムレプリコンという新たなツール

を構築した。この系は、ウイルス粒子形成に必要な構造遺伝子を欠失させていることからウイルス粒子が形成されず安全に扱う事が出来る。また、構造遺伝子の代わりに分泌型ルシフェラーゼ遺伝子が挿入してあるため、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定することによってウイルスの複製率を簡便かつ迅速に解析することが可能である。しかしながらこの系は一過性発現系であるため、抗ウイルス薬耐性変異の解析な

ど長期培養には不向きである。そこで本研究班ではこの系を改良し、細胞内で恒常的に発現するレポーターサブゲノムレプリコン細胞の樹立を試みる。

## B. 研究方法

デングウイルス1型の分子クローン (02-20/pMW119) をもとに作製した一過性発現型のサブゲノムレプリコンを恒常発現型にするために、プロモーターの変更 (CMVからT3に)、および薬剤耐性遺伝子 (ネオマイシン耐性遺伝子) の挿入を行なった。また、ルシフェラーゼ遺伝子と薬剤耐性遺伝子の挿入位置を検討する為に、計3種類のプラスミドを構築した。これらのコンストラクト作製には、15 bpのオーバーラップ配列による相同組み換えを利用したIn-Fusionシステム (Clontech社) を用いた。続いて、*in vitro*合成したRNAを培養細胞 (ヒト肝癌由来細胞: Huh7細胞) にトランスフェクション法によって導入後、G418 (500 µg/ml) 入りの培地による薬剤選抜を行なった。3日毎に薬剤入りの新しい培地に交換し、その際に培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。

## C. 研究結果

ルシフェラーゼ遺伝子と薬剤耐性遺伝子の挿入位置が異なる計3種類のコンストラクトを作製した (図1)。それぞれを *in vitro* RNA 合成し培養細胞に導入後、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定したところ、導入3日後には20万以上の値を示していた

が、経時的に値が低下し、導入12日後にはほぼ検出限界値になった (図2)。また、導入21日後には全ての細胞が死滅してしまい、生存細胞を選抜することは出来なかった。

## D. 考察

In-Fusionシステムを用いる事によって余計な配列が付加されることなく、任意の場所に遺伝子配列を挿入する事が出来るため、ウイルスの遺伝子組換えには本手法が非常に有用である。

今回薬剤耐性細胞を選抜することができなかったのは、培養細胞に導入するRNA量が少な過ぎた為である可能性が考えられる。そこで今後は、トランスフェクション法を検討し、細胞に多量のRNAを導入することによってレプリコン細胞の樹立を試みる予定である。また、薬剤耐性遺伝子が発現 (または機能) していない可能性も考えられるため、薬剤耐性遺伝子を挿入する場所の検討を試みる。

## E. 結論

レプリコン細胞樹立の為にコンストラクト構築は完了したものの、レプリコン細胞樹立する事は出来なかった。

本研究班で作製するレプリコン細胞は、抗ウイルス化合物探索などの多検体解析への応用が期待される。また、当該細胞はデングウイルス複製機構の解析にも有用であり、そこから得られる成果は診断薬やワクチン開発に大きな波及効果をもたらすこと

が期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kato F., Kobayashi T., Tajima S., Takasaki T., Miura T., Igarashi T., and Hishiki T.

Development of a novel dengue-1 virus replicon system expressing secretory Gaussia luciferase for analysis of viral replication and discovery of antiviral drugs. *Jpn. J. Infect. Dis.* 67, 209-212, 2014.

2. Hishiki T., Han Q., Arimoto K., Shimotohno K., Igarashi T., Vasudevan S., Suzuki Y., and Yamamoto N. Interferon-mediated ISG15 conjugation restricts dengue virus 2 replication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 448, 95-100, 2014.

### 2. 学会発表

1. 日紫喜隆行、加藤文博、三浦智行、五十嵐樹彦：抗 Dengue ウイルス活性を有する生薬由来成分の探索と性状解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）、2014 年 11 月

2. 加藤文博、石田裕樹、大石真也、藤井信

孝、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：bromocriptine による抗 Dengue ウイルス活性機構の解析、第 62 回日本ウイルス学会学術集会（横浜）、2014 年 11 月

3. 加藤文博、三浦智行、五十嵐樹彦、日紫喜隆行：非ヒト霊長類 PBMC における Dengue ウイルス増殖能の比較、第 21 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（横浜）、2014 年 11 月

4. 加藤文博、日紫喜隆行、大石真也、藤井信孝、三浦智行、五十嵐樹彦：抗 Dengue ウイルス化合物のスクリーニングと作用機序の解析、第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（山口）、2014 年 5 月

5. 日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、高崎智彦、三浦智行、五十嵐樹彦：分泌型ルシフェラーゼを有する Dengue ウイルス 1 型レプリコンの構築、第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会（山口）、2014 年 5 月

## 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

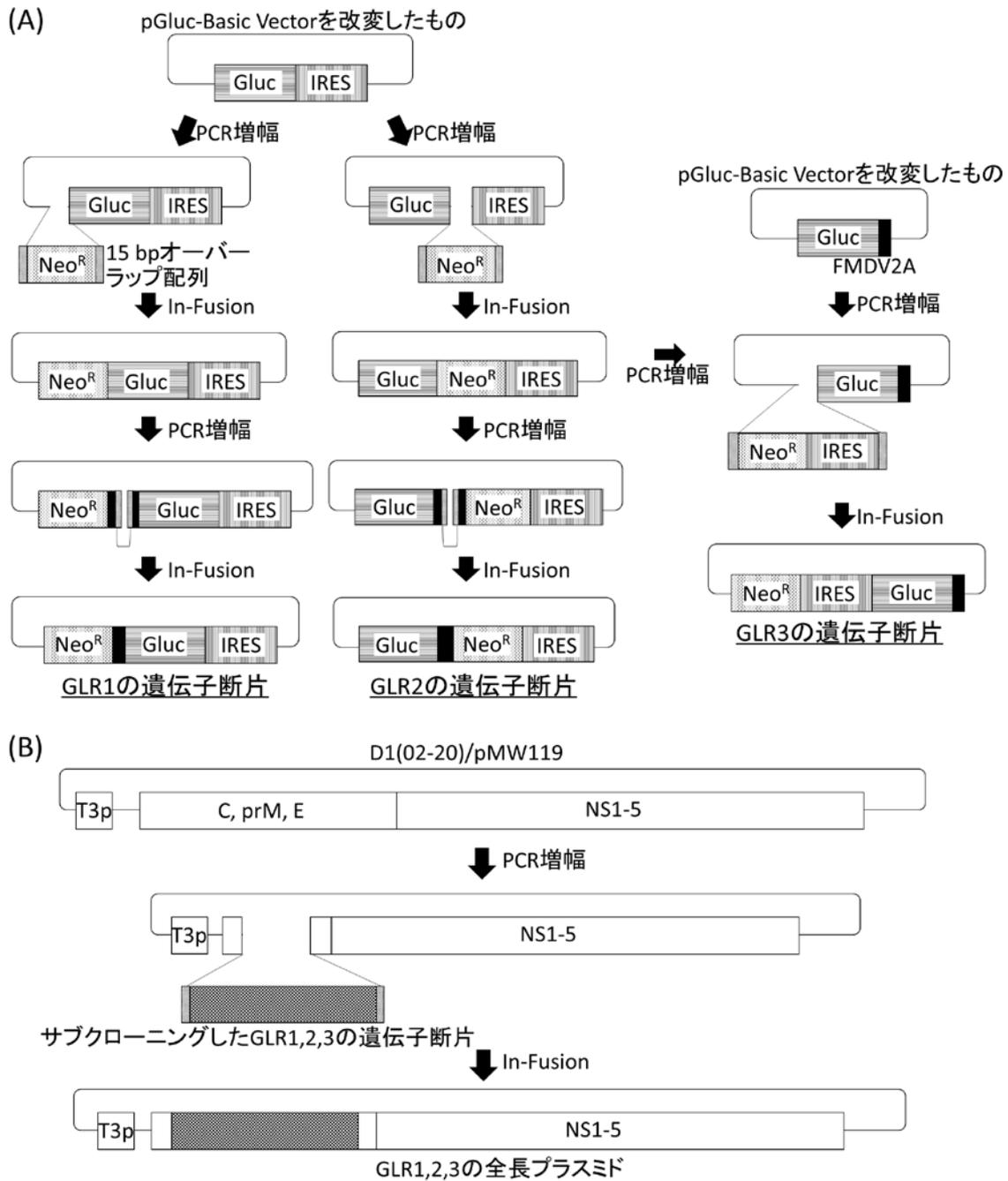


図1. レプリコン細胞作製用のコンストラクト

(A) ネオマイシン耐性遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子の発現法の検討のため、3種類の遺伝子断片を作製した。(B) 作製した遺伝子断片をそれぞれ分子クローンの構造遺伝子領域と置換した。Gluc: Gaussia lusiferase gene, IRES: Internal ribosome entry site derived from encephalomyocarditis virus, Neo<sup>R</sup>: Neomycin resistance gene, FMDV2A: Foot-and-mouth-disease 2A cleavage sequence, T3p: T3 promoter

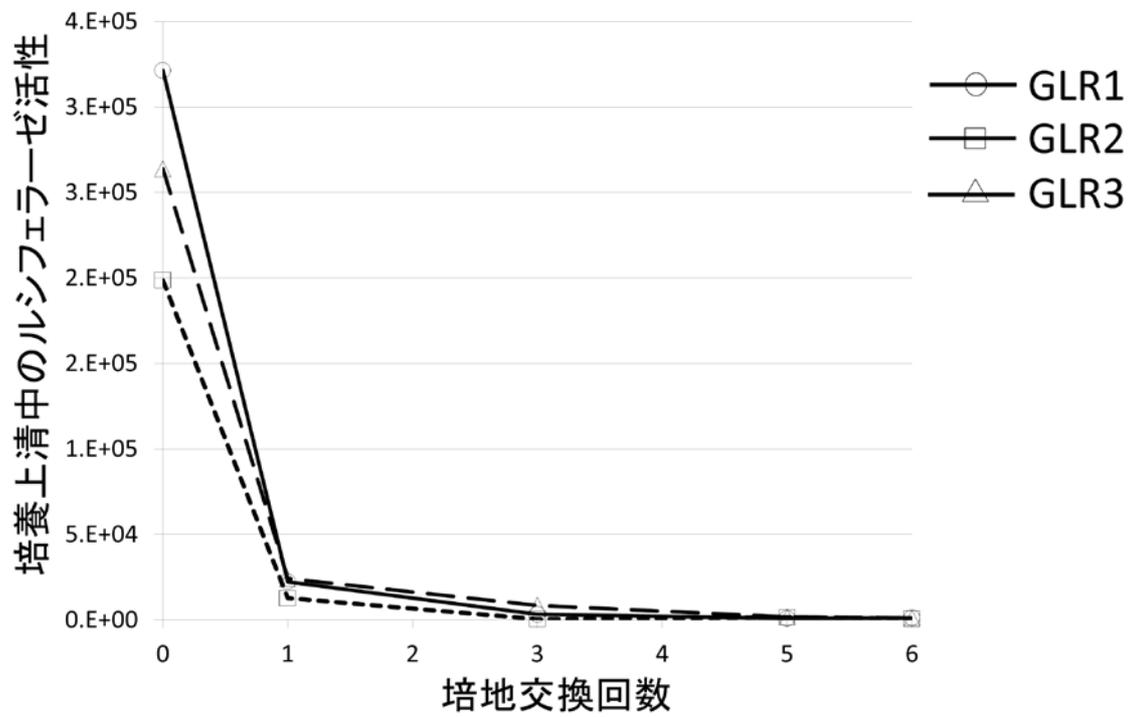


図2. RNA導入後の培養上清中のルシフェラーゼ活性  
 作製した3種類それぞれのプラスミドから *in vitro* 合成したウイルスRNAをHuh7細胞にトランスフェクションした。3日ごとにG418入りの新しい培地に交換し、培養上清中のルシフェラーゼ活性を測定した。

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）  
委託業務成果報告

（委託業務題目）

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

デングウイルスに対する抗ウイルス剤の開発

高橋 和郎

大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長

研究要旨

- (1)抗デングウイルス剤をスクリーニングする方法をフォーカス形成減少法により評価する方法を確立した。
- (2)上記方法を用いて市販の漢方薬 20 種類の抗デングウイルス活性を評価したが、有効な薬剤は認められなかった。

A. 研究目的

現在治療薬のないデングウイルス感染症に対する治療薬を開発することが目的であるが、目的が達成された場合には、重症デングウイルス感染症による死亡率、入院率、重症化率を低減させることが可能となり、その治療に貢献できる。そのために、初期目標としてウイルスの *in vitro* での増殖を阻害する物質、化合物を選定し、動物実験における効果を評価する。

B. 研究方法

1. ウイルス増殖阻害活性の評価

デングウイルス増殖の阻害活性はフォーカス形成減少法を用いて評価した。8 穴の培

養用スライドグラスに Vero9013 細胞を培養し、被検物質とデングウイルス(50FFU)を加え、3 日間培養する。細胞を固定後、デングウイルス特異的モノクローナル抗体を用いて感染細胞を染色しフォーカス (FFU)を算出して、フォーカス数を半減以下にする被検物質の濃度を 50%増殖阻害濃度とした。

2. 被検物質

市販の漢方薬 40 種類の阻害活性を検討した。漢方薬の原末を蒸留水に溶解し、高圧蒸気滅菌後牛胎児血清を 1%に添加し、検査に供した。

C. 研究結果

1. デングウイルスを感染させたスライドガラス上の1穴では約 50 個のフォーカスが染色され評価に足る個数であった。

2. 市販の漢方薬 20 種類の抗デングウイルス活性を評価したが、増殖を抑制する有効な薬剤は認められなかった。

#### D. 考察

本課題で行ったフォーカス形成減少法は薬剤候補物質の増殖阻害活性を評価する方法として可能であると考えられるが、手技が煩雑で時間を要するため、より簡便な評価方法を開発する必要があると考えられる。

また、有効な抗デングウイルス剤を発見するためには、より多くの化合物をスクリー

ニングする必要がある。

#### E. 結論

市販の漢方薬 20 種類の抗デングウイルス活性を評価したが、増殖を抑制する有効な薬剤は認められなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

媒介昆虫の垂直伝播に関する研究

担当責任者 澤邊京子 (国立感染症研究所 昆虫医科学部)

研究協力者 佐々木年則, 伊澤晴彦 (国立感染症研究所 昆虫医科学部)

皆川こごみ, 皆川昇 (長崎大学熱帯医学研究所 病害動物部)

高崎智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)

研究要旨

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立を目的として、蚊のデングウイルス垂直伝播について検討した。2014年夏から秋にかけて、東京都内の公園を中心に、国内に広く生息するヒトスジシマカによるデング熱患者の発生が続き大きな問題となった。殺虫剤の散布や季節的な蚊数の自然減少により、患者の発生は160名を超えたところで終息した。しかしながら、ヒトスジシマカは、卵のステージで越冬し、春に孵化幼虫が出現する。熱帯地方では、デングウイルスはネッタシマカ、ヒトスジシマカのいずれにおいても垂直伝播することが報告されているが、越冬については確認されていない。国内でのデングウイルスの越冬の可能性を探る目的で、まず、長年研究実績のあり、大型なため蛋白質の解析に向いているオオクロヤブカを用いてデングウイルスの垂直伝播を検討した。その結果、デングウイルス 2 型はオオクロヤブカ体内で増殖することが明らかになった。さらに、第 2 世代 (F2) のオオクロヤブカは、雌雄ともにデングウイルスに感染していることが確認されたが、雄より雌に多くウイルスが検出された。

今後、さらにオオクロヤブカにおけるデングウイルス伝播機構について解析し、ヒトスジシマカにおけるデングウイルス垂直伝播機構についても検討する予定である。

A. 研究目的

デングウイルスは、フラビウイルス科に属する RNA ウイルスである。世界中で年

間数千万人から 1 億人がデング熱、数十万人がデング出血熱を発症している。デング熱は、急性熱性疾患であるが、デング出血

熱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，藩種性血管内凝固症候群などをきたし，重篤な致死的経過をとる．国内の輸入症例中，毎年 2 ないし 3 例はデング出血熱の報告がある．我が国におけるデング熱輸入症例は年々増加し，2010 年には 220 症例を超え，2013 年は合計で 249 例が記録された．感染症法施行後最高の症例数を年々更新している状況にある．地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり，世界中で流行域の拡大が最も危惧される感染症である．

2013 年 9 月には，日本各地を旅行したドイツ人が成田空港からの直行便で帰国後にデング熱を発症した．当該患者は日本国内のブドウ畑で多数の蚊に刺されたことを記憶していたことから，国内感染が強く疑われた事例であった．デング熱はすでに日本国内に侵入している可能性が強く示唆された．2014 年夏から秋にかけて国内のヒトスジシマカによる 160 名を超える患者症例が，約 70 年ぶりに認められた．そこで本研究では，国内に広く分布する蚊のデングウイルス垂直伝播について評価した．

## B. 研究方法

オオクロヤブカ 406 系統は，戦後神奈川県相模原市で捕集された集団を実験室内で長年維持した系統である．

デングウイルス 1 型 (DENV1) は，タイバンコク市からの帰国者の血清から分離された株 (D1 11-120)，デングウイルス 2 型 (DENV2) は，インドネシア・バリ島からの帰国者血清から分離された株 (D2 11-122/1) であり，いずれもウイルス 1 部

から分与された分離株である．

ウイルス感染実験は， $10^8$  コピー/ml のウイルス株を人工膜吸血法により経口的に蚊に摂取させ，その後，感染蚊を 28°C のインキュベーター内で飼育した．その後，産卵させ幼虫，蛹とし，羽化させて成虫 (F1) を得ることが出来た．その後，人工膜吸血法によって吸血させ，産卵，羽化成虫 (F2) を得ることが出来た．デングウイルスの定量は，プラークアッセイ法で行った．

## C. 研究結果

オオクロヤブカに DENV1 を経口感染させたところ，体内で増殖することが確認された (data not shown)．そこで，第 1 および第 2 世代の雌雄成虫からデングウイルスを検出し，ウイルス力価をプラークアッセイ法によって測定した (図 1, 2)．

図 1 に示すように，デングウイルス感染後の第 2 世代 (F2) の雄成虫 5 頭のうち 2 頭から 3,000 PFU/mosquito 以上のウイルス量が検出された．一方，図 2 に示すように，デングウイルス感染後の第 2 世代 (F2) の 5 頭の雌成虫の全てから 50,000 PFU/mosquito 以上のウイルス量が検出された．

以上の結果から，オオクロヤブカはデングウイルス 1 型、2 型のいずれもその体内で増殖させることが明らかになり，さらにデングウイルス感染後第 2 世代では，雌は雄よりも高いウイルス量を保持していることが示唆された．

## D. 考察

オオクロヤブカ 406 系統は，長年，当研究部で系統維持され，大型であることから，

蛋白解析に用いられたり、これまでに多くの生理生化学的な解析の蓄積がある。このような特徴から、本種はデングウイルスの垂直伝播を生理生化学的に解析する上で、非常に有用な材料であると考えられている。

本研究で、オオクロヤブカにおいて DENV が垂直伝播することが確認され、DENV の垂直伝播のメカニズムを解明する上で有用な昆虫モデルとなる可能性が示唆された。今後は、オオクロヤブカを用いた DENV の垂直伝播評価系の確立を目指すとともに、ヒトスジシマカにおける DENV の垂直伝播および越冬の可能性の追求に役立つことを期待している。

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### E. 結論

デング熱の国内感染が毎年発生することが予想される中、ウイルスの垂直伝播を明らかにすることでデング熱の毎年の発生リスクの評価が可能になり、将来的には流行予測に貢献することが期待できる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  1. Sasaki T, Higa Y, Bertuso AG, Isawa H, Takasaki T, Minakawa N, and Sawabe K. Susceptibility of indigenous and transplanted mosquito spp. in Japan to dengue virus. **Jpn. J. Infect. Dis.** *in press.*
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

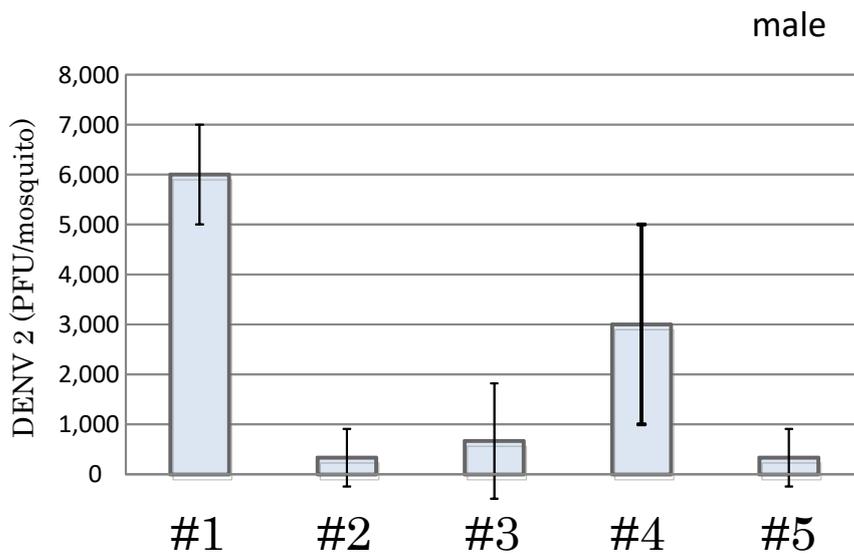


図 1. デングウイルス 2 型感染後第 2 世代オオクロヤブカ (F2) の雄成虫におけるデングウイルス 2 型の検出

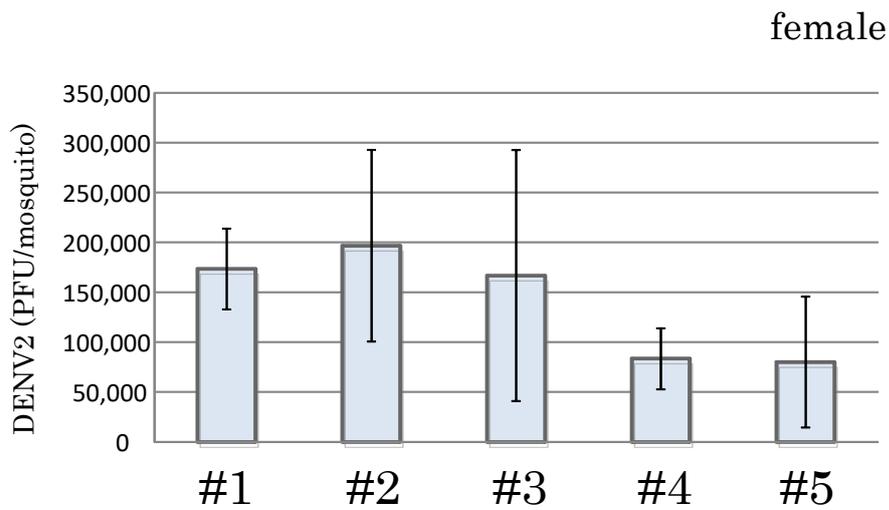


図 2. デングウイルス 2 型感染後第 2 世代オオクロヤブカ (F2) の雌成虫におけるデングウイルス 2 型の検出

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

昆虫媒介性ウイルス感染症の有効な情報提供法の開発に関する研究

分担研究者 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  
多田有希 東京医科大学病院 渡航者医療センター  
吉川みな子 京都大学 学際融合教育研究推進センター  
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  
日暮浩実 シンガポール日本人会診療所

研究要旨

2014年度は「一般国民」と「シンガポール在留邦人」を対象に、デング熱の対策や知識についての調査を行った。いずれの集団でもデング熱への関心は高いものの、予防対策については知識が不十分な面もあった。また、ワクチンや国内での診療体制などに関して新たな情報も必要とされていた。今後はこうした点を考慮し、効果的な情報提供を行っていく必要がある。また、2014年度はマニラとシンガポールにおける日本人渡航者のデング熱罹患状況調査も実施した。それぞれの地域では定常的に日本人のデング熱患者が発生しており、地域特有の感染状況がみられた。こうした調査結果をもとに、2014年度は国内医療機関向けに「デング熱診療ガイドライン」を作成するとともに、ホームページ、講演会、小冊子などで国民への情報提供を行った。

A. 研究目的

海外渡航者にとって昆虫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輸入症例が多く、2014年には輸入症例を起点とする国内感染例が多発した。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昆虫媒介性ウ

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。また、2014年のデング熱の国内感染例発生時には、医療従事者も情報不足のため診療に混乱をきたすことが多くみられた。そこで本研究では国民に必要とさ

れる昆虫媒介性ウイルス感染症の情報内容を調査し、その提供を効果的に行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### 1. デング熱予防に必要な情報内容の調査

「一般国民」と「流行地域の在留邦人」を対象にデング熱に関する対策と知識の状況を調査した。

「一般国民」の調査はインターネットネット調査会社のコンピュータ・プランニング・リサーチ社に委託し、同社のモニター1500人（デング熱を知っている者）を対象に行った。調査日は2014年12月中旬である。質問内容としては「デング熱の認識度」「デング熱の対策状況」「デング熱の知識レベル」などである。

「流行地域の在留邦人」の調査はシンガポールの在留邦人を対象に行った。シンガポール日本人会診療所で2014年12月中旬～2015年1月中旬に受診した日本人にアンケートの記載をお願いし、記載に同意した259人が解析対象となった。質問内容は「一般国民」の調査とほぼ同じ内容にした。また、シンガポールでは2015年1月19日に日本人会で感染症に関する講演会を開催したが、この講演会の参加者92人にデング熱予防に関するアンケート調査の協力をお願いし、90人から回答が得られた。この結果は現在解析中である。

### 2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

マニラおよびシンガポールにおける日本人渡航者のデング熱罹患状況について調査を行った。マニラでは日本人会診療所を受診する日本人のデング熱罹患状況を調査した。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。シンガポールでは同国保健省の協力を得て、2013年の日本人デング熱患者の情報を解析した。また、

日系診療所（日本人会診療所、Gクリニック、Rクリニック、）を受診する日本人のデング熱罹患状況についても調査を行った。

### 3. デング熱診療ガイドラインの作成

国内の医療機関でデング熱を疑う患者の診療を行う際のガイドラインを作成した。このガイドラインの案文は2014年7月に本研究班内で作成したが、同年8月の国内感染例の発生に伴い、国立感染症研究所・感染症疫学センターと協力して専門家会議を開催し、最終版を作成した。

### 4. 国民へのデング熱に関する情報提供

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。2014年度は、既に開設してあるインターネット上のホームページ「海外旅行と病気」(<http://www.tra-dis.org/>)で最新情報を提供するとともに、一般国民を対象にした小冊子「デング熱予防の手引き」を作成した。また、2015年1月19日にシンガポール日本人会で現地在留邦人を対象に「海外渡航者の健康管理～感染症対策を中心に」を開催し、デング熱対策などの情報提供を行った。

### (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. デング熱予防に必要な情報内容の調査

#### ・一般国民を対象とした調査

本調査はインターネットネット調査会社のコンピュータ・プランニング・リサーチ社に委託し、2014年12月に同社のモニター1500

人を対象に行った。

#### (調査対象の特性)

調査対象の半数は5年以内に海外渡航経験のある者（このうち東南アジア渡航経験ありを50%とした）で、残りの半数は海外渡航経験が無い者とした。なお、性別は男女同数で、年代は20歳代～60歳代まで均等に分布し、居住地も国内で均等に分布していた。

#### (感染症情報の入手)

「感染症関係の情報をどこから入手しているか？」の質問には「テレビ」(63.4%)が最も多く、「インターネットのニュースサイト」(41.4%)、「新聞」(36.4%)、「公的機関のHP」(16.9%)、「民間のHP」(6.8%)の順であった。「テレビ」「新聞」の回答は60歳代で多く、20歳代で少なかった。

#### (デング熱の認識度)

「デング熱を知っているか？」という質問には、対象者全員が「知っている」と回答し、このうち24.3%が「詳しく知っている」と回答した。「デング熱を心配しているか？」という質問には、44.1%が「心配している」と回答した(表1)。この割合は、東南アジアに渡航経験がある集団で有意に高かった。

#### (デング熱の対策状況)

「普段から蚊の対策をしているか？」という質問には、24.0%が「とくに対策をしていない」と回答した(表1)。この割合は20歳代で高く、60歳代で低かった。対策の種類としては「蚊取り線香や殺虫剤の使用」(50.5%)が最も多く、「窓に網戸を張る」(49.4%)、「昆虫忌避剤の使用」(42.8%)、「皮膚を露出しない」(30.5%)の順で、「蚊を増やさない対策」(24.7%)は少なかった。各対策の実施率は東南アジアに渡航経験がある集団で有意に高かった。

「ワクチンが開発されたら受けるか？」の質問には、42.1%が受けたいと回答した(表1)。この割合も東南アジアに渡航経験がある集団で有意に高かった。受けないと回答した者の理由は「値段が高そう」が最も多くあげられた。

「デング熱を疑う症状でたら、どの医療機関を受診するか？」の質問には、「地域の基幹病院」(35.7%)、「かかりつけの診療所」(27.8%)、「感染症科のある病院」(20.7%)の順で回答が多かった。

#### (デング熱の知識レベル)

デング熱の知識に関する6つの質問をしたところ、「媒介する蚊は昼間に吸血する」(正解：はい)の正解率が48.1%と大変低かった(表2)。また、「致死率の高い病気である」(正解：いいえ)の正解率も67.9%とやや低い結果だった。

#### ・シンガポール在留邦人を対象にした調査

本調査はシンガポール日本人会診療所を2014年12月中旬～2015年1月中旬に受診した日本人を対象に行い、259人が解析対象になった。

#### (調査対象の特性)

調査対象の年齢は10歳代～60歳代に分布し、40～50歳代が156人と最も多かった。シンガポール滞在期間は1年以上が81.8%で、ほとんどが長期滞在者だった。滞在目的は日本の民間企業からの派遣が69.1%を占めていた。

#### (感染症情報の入手)

「感染症関係の情報をどこから入手しているか？」の質問には「インターネットのニュースサイト」(55.6%)が最も多く、「テレビ」(29.7%)、「日本人会情報」(27.0%)、「日本

大使館情報」(23.2%)、「新聞」(20.5%)の順であった。

#### (デング熱の認識度)

「デング熱を心配しているか?」という質問には、78.0%が「心配している」と回答した(表1)。また、「周囲でデング熱にかかった人はいるか?」との質問には、28.2%が「いる」と回答した。「かかった人が誰か?」を質問したところ、「周囲の在留邦人」が最も多かった。

#### (デング熱の対策状況)

「デング熱の対策を行っているか?」との質問には、50.2%が「行っている」と回答した。「行っていない」(49.0%)と回答した者に、その理由を質問したところ、「予防方法がわからない」が半数近くを占めた。

「普段から蚊の対策をとっているか?」という質問には、13.1%が「とくに対策をとっていない」と回答した(表1)。対策の種類としては「昆虫忌避剤の使用」(56.0%)が最も多く、これに「蚊を増やさない対策」(48.6%)が続いた。「蚊取り線香や殺虫剤の使用」(23.6%)、「皮膚を露出しない」(14.7%)、「窓に網戸を張る」(4.6%)は少なかった。

「ワクチンが開発されたら受けるか?」の質問には、67.6%が受けたいと回答した(表1)。受けないと回答した者の理由は「副作用が心配」が多くあげられた。

#### (デング熱の知識レベル)

デング熱の知識に関する6つの質問をしたところ、「媒介する蚊は昼間に吸血する」(正解:はい)の正解率が38.6%と大変低かった(表2)。また、「致死率の高い病気である」(正解:いいえ)の正解率も61.4%とやや低い結果だった。

## 2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

### ・マニラでの調査

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。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、2014年は年間患者数が31人で、2012年(55人)、2013年(54人)に比べて大幅に減少した。(表3)。このうち約30%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。患者の発生は例年、雨期となる6月~8月に多くみられていたが、2014年は9月~11月に多い傾向だった(図1)。

### ・シンガポールでの調査

シンガポール保健省の協力を得て、同国での日本人デング熱患者の報告状況を解析した。2013年は9人、2014年は14人で計23人の日本人患者が報告された。性別は男性15人、女性8人で、年齢は30歳代(8人)、10歳未満(5人)が多かった。旅行者は4人で、大多数が居住者だった。

シンガポールでは日系診療所を受診する日本人のデング熱罹患状況についても調査を行った。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)で陽性になった者とした。Gクリニックでは、2014年に年間で33人の日本人デング熱患者が受診しており、2月と9月に患者数が多くみられた。このうち16人はシンガポール以外の国での感染を疑うケースだった。ほとんどの患者は軽症で外来診療のみで軽快した。日本人会診療所では2013年のデング熱患者数が14人、Rクリニックでは年間10~20人だった。

## 3. デング熱診療ガイドラインの作成

国内の医療機関でデング熱を疑う患者の診

療を行う際のガイドラインを作成し、2014年9月に発表した。このガイドラインにはデング熱の症状、診断方法、治療方法などが記載されている。なお、一般の医療機関で疑わしいケースがあった場合は、必要に応じて専門の医療機関に紹介して診断治療を受けることを原則とした。ガイドラインは厚生労働省の下記HPに掲載されている。

<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10906000-Kenkoukyoku-Kekkakukansenshouka/0000057969.pdf>

#### 4. 国民へのデング熱に関する情報提供

本研究班で既に作成してあるホームページ「海外旅行と病気」<http://www.tra-dis.org>を用いて、最新のデング熱情報を国民に広く提供した。本ホームページへのアクセス件数は2014年8月以降急増し、9月は4万件、10月と11月も1万件以上になった。

2015年1月19日にシンガポールで開催した講演会には92人の在留邦人が参加した。参加者の内訳は、日本企業からの駐在員が74人で帯同家族が21人だった。濱田が「グローバル感染症の脅威」、吉川（京都大学）が「シンガポール政府の感染症対策」の講演を行った。参加者からは昆虫忌避剤の効果、フォギングの弊害、デング出血熱のメカニズムなどの質問があった。

なお、今回の調査結果をもとに、一般国民を対象とした小冊子「デング熱予防の手引き」を作成した。

#### D. 考察

##### 1. デング熱予防に必要な情報内容の調査

「一般国民」を対象にした調査によれば、対象者全員がデング熱について知っている

回答した。これは、2014年の国内感染例発生により、マスコミなどでデング熱の話題が数多く取り上げられた影響によるものと考えられる。また、デング熱を心配している者も半数近くにのぼり、関心の高さがうかがえた。

デング熱対策としては、蚊の対策を実践している者が多かった。しかし、「蚊取り線香や殺虫剤の使用」、「窓に網戸を張る」など夜間の蚊対策が多く、デング熱予防に必要な「昆虫忌避剤の使用」や「皮膚を露出しない」は比較的少なかった。また、根本的な対策である「蚊を増やさない対策」を実践している者も少なかった。今後は、こうした効果的な蚊対策を啓発する必要があると考える。デング熱ワクチンへの期待は高く、半数近くの者が、ワクチンが開発されたら接種したいと回答した。海外ではワクチンが近日中に承認される動きがあり、今後はこの点に関する情報提供も必要になってくるだろう。発病時の対応については、「地域の基幹病院」や「かかりつけの診療所」を受診すると回答した者が多く、こうした医療機関でデング熱診療が行える体制を構築する必要がある。

デング熱の知識レベルについては、媒介蚊が昼間吸血することを知らない者が多かった。この点については、東南アジアの在留邦人を対象とした過去の調査でも指摘されている。

なお、今回の「一般国民」を対象とした調査では、「東南アジアに渡航経験がある集団」を別個に集計したが、「渡航経験がない集団」に比べて、デング熱への関心が高く、蚊の対策についても「昆虫忌避剤の使用」や「蚊を増やさない対策」が比較的高率に実践されていた。こうした集団の協力を得ることで、国民への情報提供を効果的に行っていくことも検討したい。

「シンガポール在留邦人」の調査では、デング熱を心配する者が8割近くにのぼり、関心の高さがうかがえた。しかしながら、デング熱対策を行っている者は半数に留まり、対策を行っていない者の理由としては、「予防方法がわからない」が最も多かった。蚊の対策については、多くの者が適切に実践しており、「昆虫忌避剤の使用」や「蚊を増やさない対策」も高率に行われていた。その一方で、知識レベルの調査では、「一般国民の調査」と同様に、媒介蚊が昼間吸血することを知らない者が大変に多かった。この点を在留邦人に周知させる必要があると考える。

なお、「在留邦人」の調査では感染症情報の入手方法についても聴取したが、日本人会や日本大使館などを介して情報を入手する者が多く、今後の在留邦人への情報提供にあたっては考慮すべき点である。

## 2. 日本人渡航者のデング熱罹患状況の調査

2014年度はマニラとシンガポールで調査を行った。マニラについては3年目の調査になるが、2014年度は過去の2年に比べて日本人の患者数が大幅に減少した。これは、この年にフィリピン国内でデング熱の流行が鎮静化していたためと考える。ただし、マニラでは2011年と2013年に在留邦人を対象としたデング熱予防のための講演会を開催しており、その影響も考えられる。来年度以降も経過観察を続けていく必要がある。

今年度はシンガポールでの罹患状況についても調査を行った。マニラに比べて日本人の患者数は少ないが、近隣国滞在中に罹患する事例が多い模様である。また、近年、シンガポールでは建設工事現場付近での集団発生が報告されており、日本人患者の感染場所についても詳しい調査を進めていきたい。

## 3. デング熱診療ガイドラインの作成

今回のガイドラインは2014年9月時点の社会状況を基に作成されているが、その後の変化に応じて修正加筆する必要がある。たとえば、検査方法については抗原検査キットが近日中に国内承認される可能性がある。また、診療体制については、専門医療機関に紹介する方を提示しているが、学会などの協力を得て、専門医療機関リストを作成することも検討する。さらに、国や自治体の対策ガイドラインが作成されており、こうしたガイドラインとの整合性も検討しなければならない。

## 4. 国民へのデング熱に関する情報提供

以上の調査結果をもとに、2014年度は「ホームページ」、「講演会」、「冊子」により国民への情報提供を行った。

## E. 結論

2014年度は「一般国民」と「シンガポール在留邦人」を対象に、デング熱の対策や知識についての調査を行った。いずれの集団でもデング熱への関心は高いものの、予防対策については知識が不十分な面もあった。また、ワクチンや国内での診療体制など新たな情報も必要とされていた。今後はこうした点を考慮し、効果的な情報提供を行っていく必要がある。

また、今年度はマニラに加えてシンガポールにおける日本人渡航者のデング熱罹患状況調査も実施した。それぞれの地域には特有の感染状況があり、さらに詳細な調査を行うことで、各地域の状況に応じた予防対策を提示して予定である。

こうした調査結果をもとに、海外渡航者にデング熱の予防についての適切な情報提供を行うことで、国内へのデング熱侵入を防ぐこ

とができるものとする。さらに、国民や国内の医療関係者に向けて、蚊の対策や診療体制などの情報を提供することが、国内でのデング熱の蔓延を阻止するために必要なことと考える。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・濱田篤郎、山口佳子：デング熱の予防対策.  
バムサジャーナル 26：26-30, 2014

・濱田篤郎：渡航医学（トラベルメディスン）の概要. 診断と治療 102：486-489. 2014

### 2. 学会発表

・濱田篤郎：「旅人と感染症の三千年史～旅人が運ぶ感染症への対策」 第18回日本渡航医学会学術集会 2014年7月20日 名古屋

・濱田篤郎：「海外遠征時にみられる感染症と

その対策」 第25回日本臨床スポーツ医学会学術集会 2014年11月9日 東京

・濱田篤郎：「海外勤務者の感染症対策」 第62回日本職業・災害医学会学術大会 2014年11月16日 神戸

・濱田篤郎：「アジアから学ぶ～デング熱の国内感染症例の発生を受けて」 平成26年度アジア感染症対策プロジェクト共同調査研究会 2014年11月19日 東京

## 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. デング熱の対策状況の調査

	一般国民の調査		シンガポール在留邦人の調査 (259人)
	全体 (1500人)	東南アジア渡航経験あり (350人)	
心配している病気である	44.1%	54.3%*	78.0%
ワクチン接種を希望する	42.1%	56.6%*	67.6%
<b>蚊の対策</b>			
昆虫忌避剤の使用	42.8%	60.3%*	56.0%
蚊取り線香、殺虫剤の使用	50.5%	57.7%*	23.9%
皮膚を露出しない	30.5%	40.6%*	14.7%
窓に網戸を張る	49.4%	52.3%	4.6%
蚊を増やさない対策	24.7%	31.1%*	48.6%
とくに対策をしていない	24.0%	14.9%	13.1%

・一般国民の調査：国内の住民を対象にしたインターネットによる調査

・シンガポール在留邦人の調査：日本人会診療所を受診した日本人を対象にした調査

\*「東南アジア渡航経験あり」の集団が 「東南アジア渡航経験なし」の集団に比べて有意に高

い数值 (p<0.05)

表2.デング熱の知識レベルに関する質問の正解率

	質問 「はい」か「いいえ」	正解	一般国民の調査	シンガポール 在留邦人の調査
原因	患者との接触で感染する？	いいえ	82.3%	92.3%
疫学	東南アジアで流行している？	はい	78.2%	95.8%
症状	致死率の高い病気である？	いいえ	67.9%	61.4%
予防	媒介する蚊は昼間吸血する？	はい	<u>48.1%</u>	<u>38.6%</u>
治療	特効薬はない？	はい	70.3%	81.5%
	どの解熱薬を服用してもよい？	いいえ	86.3%	76.8%

表3. マニラ日本人会診療所で診断された在留邦人のデング熱患者数

	2012年	2013年	2014年
患者総数	55名	54名	31名
重症度	入院数：16名(29.0%) 死亡数：0名	入院数：18名(33.0%) 死亡数0名	入院数：9名(29.0%) 死亡数0名
年齢	成人：41名(74.5%) 小児：14名	成人：45名(83.3%) 小児：9名	成人：26名(83.9%) 小児：5名
性別	男性：32名(58.2%) 女性：23名	男性：37名(68.5%) 女性：17名	男性：21名(67.7%) 女性：10名
滞在形態	駐在員：26名(47.3%) 帯同家族：29名 旅行者：0名	駐在員：32名(59.3%) 帯同家族：20名 旅行者：2名	駐在員：17名(54.8%) 帯同家族：13名 旅行者：1名(留学)

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が 危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

担当責任者研究報告書

マーモセットを用いた再感染デング熱動物モデルの構築

研究分担者 モイメンリン（長崎大学熱帯医学研究所、国立感染症研究所）

研究協力者 高崎智彦、倉根一郎、林昌宏（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、宮田幸長（国立病院機構相模原病院）

**研究要旨**

本研班ではこれまでに確立した初感染のデング熱モデル動物のマーモセットが再感染モデル動物モデルとして有用であるかをウイルス学および免疫学的に検討した。再感染モデルの評価には、ウイルス接種後、経時的にウイルス血症定量、IgM/IgG 抗体の測定、中和抗体測定を行った。今回の検討により、全ての再感染個体において、初感染と異なる血清型の接種により、高ウイルス血症の誘導が認められた。この結果から、マーモセットは再感染時において感染が成立し、症状を呈することが明らかとなった。さらに、再感染個体の血中には、感染性ウイルス-抗体複合体が Fc $\gamma$ R 発現 BHK 細胞にて検出された。さらに、再感染後のマーモセットにおいては、型特異的抗体および型交叉性中和抗体の上昇がすべての個体に認められた。本研究により、デング熱モデル動物であるマーモセットは、再感染時にデングウイルス接種後において高ウイルス血症が誘導されるとともに再感染デング熱の特徴である感染性ウイルス-抗体複合体が形成されることが明らかとなった。さらに、中和抗体および IgM/IgG 抗体上昇パターンは、デング熱再感染患者と似ていることから、本マーモセットモデルは、ワクチン評価モデル、再感染の病態機序解明に有用であることが明らかとなった。

**A. 研究目的**

デングウイルスは、蚊によって媒介されるフラビウイルスであり、世界的に大規模な流行を起こしている。年間約 25 億人がデング熱流行地域に生活しており、発症者数が約 1

億人である。デングウイルスは、4 つの血清型が存在し、いずれの血清型も同様な病態を引き起こす。デング熱の特徴としては、一つの血清型に感染されることにより、同じ血清型に対する終生防御免疫が誘導される。しかし、異なる血清型に対する防御免疫は、短期

間に消失する。このように、初感染における型交叉性防御免疫が消失するとともに、異なる血清型に感染しうる状態となる。さらに、再感染における型交叉性抗体は、異なる血清型と交叉性を有することにより、ウイルス—抗体複合体が形成される。このウイルス—抗体複合体は、Fc $\gamma$ R を有する細胞の感染を増強させ、デング出血熱の特徴である高ウイルス血症誘発の要因であると考えられている。

我々は、マーマセットを用いてデング熱初感染モデル動物を確立することに成功した (Omatsu et al., 2011)。本モデル動物は、初感染時に、高ウイルス血症を示すとともに、誘導された免疫は、デング熱患者と似ていることが明らかとなった。本研究では、マーマセットを用いてデング熱再感染モデル動物の確立と、病態解明・感染防御解析系の確立を目的とし、デングウイルスの再感染によってマーマセットにおけるウイルス学および免疫学的な解析を行った。

## B. 研究方法

**霊長類:** マーマセット 13 個体を用いた。本研究は、国立感染症研究所動物実験委員会の審査において承認を受け、国立感染症研究所における動物委員会のガイドラインに基づいて実施した。

**ウイルス:** DENV-1 02-17 株, DENV-1 01-44 株, DENV-2 DHF0663 株 (GenBank accession no. AB189122) および DENV-3 DSS1403DHF0663 株を用いた。中和試験には、DENV-1 (01-44 株)、DENV-2 (DHF0663 株)、DENV-3 (CH53489 株) および DENV-4 (TVP-360 株)を用いた。

**ウイルス接種:** デングウイルス 2 型の感染歴を有するマーマセット 9 個体には、デングウイルス 1 型の感染実験を行った。さらに、DENV2 の感染歴を有する 2 個体に、DENV3 の接種を行った。さらに、DENV 感染歴のない 2 個体には、DENV1 の接種を行った。DENV 接種前および接種後 2、4、7、10、14 日目に採血を行った。

**実験室検査:** RT-PCR にてウイルス血症の定量を行った。さらに、BHK 細胞、Fc $\gamma$ R 発現細胞にて感染性ウイルスの定量を行った (Omatsu et al., *J Gen Virol*, 2011; Moi et al., *J Infect Dis.*, 2011)。デングウイルス中和抗体価は、BHK 細胞および Fc $\gamma$ R 発現細胞にて測定した (Moi et al., *PLoS Neg Trop Dis*, 2012)。

## C. 研究結果

**ウイルス血症:** 接種前および接種後 2、4、7、14 日目におけるウイルス血症を RT-PCR にて測定した。すべての個体において、高ウイルス血症の誘導が確認できた。さらに、ウイルス血症は、接種 2 日目から 10 日目まで検出された。

さらに、BHK 細胞および Fc $\gamma$ R 発現細胞にてウイルス血症の測定を行った。再感染のマーマセットにおけるウイルス血症を Fc $\gamma$ R 発現細胞にて検出されたところ、ウイルス血症は、BHK 細胞より 10 倍高いということが明らかとなった。さらに、Fc $\gamma$ R 発現細胞にて測定したところ、ウイルス血症は BHK 細胞より、約 1 日長く継続したことが明らかとなった。初感染の個体においては、いずれの BHK 細胞および Fc $\gamma$ R 発現細胞を用いてもウイルス血症のレベルに相違が認められなかった。

**IgM/IgG 抗体**：初感染および再感染における IgM/IgG 抗体の上昇パターンを検討した。初感染の個体において、感染 4 日目から IgM 抗体の上昇が認められた。しかし、再感染の個体には、感染 7～10 日目から IgM 抗体の上昇が認められた。さらに、初感染の個体において、感染 7 日目から IgG 抗体の上昇が認められた。再感染の個体においては、感染 0 日目から IgG 抗体が認められた。

**中和抗体価の検討**：初感染のマーモセット（2 個体）および再感染の個体（6 個体）における中和抗体価を経時的に測定した。再感染の個体において、接種 0 日目～4 日目においては、初感染のウイルス血清型(DENV2)に対する中和抗体価が $>1:10$ であった。さらに、接種 14 日目には、すべての血清型(DENV1-4)に対する中和抗体が検出された。さらに、BHK 細胞にて測定された中和抗体価は、Fc $\gamma$ R 発現細胞より高価であることが明らかとなった。DENV1 の接種を受けた初感染のマーモセットでは、同血清型(DENV1)に対する高価な中和抗体が誘導された。

#### D. 考察

DENV 再感染マーモセットモデルにおける高いウイルス血症、抗体上昇パターン、感染性ウイルス-抗体複合体の検出は、デング熱再感染患者の兆候と似ている。さらに、DENV 感染歴を有するマーモセットにおいて、デング熱患者と同様に、異なる血清型ウイルスに対する防御免疫がなかったことは、再感染実験にて証明することに成功した。RT-PCR にて測定したウイルス血症は、初感染および再感染において同じレベルであったが、再感染のマーモセットにおけるウイルス血症は、初感

染の個体より約 1 日長く継続した。さらに、再感染個体において、感染性ウイルス-抗体複合体が検出された。初感染の個体では、感染後 IgG 抗体および中和抗体の速やかな上昇が認められた。一方、IgM 抗体の上昇は、初感染より遅れている。

#### E. 結論

デングワクチン・治療開発にはモデル動物が不可欠である。そこで、我々は、マーモセットにおけるウイルス血症および免疫誘導がデング熱再感染患者と似ていることを明らかにした。さらに、再感染時に高価な型交叉性中和抗体が検出されたことから、本モデルでは、記憶免疫（T 細胞および B 細胞）が誘導されたことが示唆された。以上の結果から、本モデル動物は、ワクチン評価や再感染における免疫の役割解明に有用であることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzuki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans. *Journal of*

- General Virology*, 95(Pt 3):591-600, 2014.
2. Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I. Determination of antibody concentration as main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells. *Archives of Virology*, 159(1):103-16, 2014.
  3. Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, Saijo M, Kurane I, Takasaki T. Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: A case of coinfection. *Archives of Virology*. 159(11): 2969-75, 2014.
  4. Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, Matono T, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari N. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveillance*, 19(4). pii: 20683, 2014
  5. Tochitani K, Shimizu T, Shinohara K, Tsuchido Y, Moi ML, Takasaki T. A first case report of Ross River virus disease patient in Japan who came back from Australia. *The Journal of the Japanese Association of Infectious Diseases*, 88:155-159, 2014.
  6. Moi ML, Takasaki T. 帰国後診療：デング熱. 実地医家のための渡航医療. 診断と治療. 102:4, pp560-566, 2014.
  7. Moi ML, Takasaki T. マレー溪谷脳炎ウイルス. 神経症候群 I. 26: pp607-612, 2014.
- ## 2. 学会発表
- 1) 国際学会
    1. Moi ML, Rattanamahaphoom J, Lim CK, Sirivichayakul C, Saijo M, Sabchareon A, Takasaki T, Kurane I. Neutralizing antibody titers as a surrogate for protection against dengue: a revisit of neutralizing antibody titers of dengue virus using FcγR-expressing cells. Joint International Tropical Meeting (JITMM) (Bangkok), December, 2014.
    2. Moi ML, Shirai K, Ami Y, Lim CK, Suzaki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I. Development of a non-human primate model for primary and secondary dengue virus infection using marmosets (*Callithrix jacchus*). The 63rd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (New Orleans, Louisiana, USA) November, 2014
  - 2) 国内学会
    1. モイメンリン. デングワクチンの実用化への展望. 石橋記念講演 (東京) 2014年 11月.
    2. Moi ML, Shirai K, Ami Y, Miyata Y, Lim CK, Suzaki Y, Kitaura K, Saijo M, Suzuki R, Kurane I, Takasaki T. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as

- a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 日本ウイルス学会学術集会. (東京) 2014 年 11 月
3. 齋藤悠香、モイメンリン、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. FcγR 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強の検討. 第 62 日本ウイルス学会学術集会. (東京) 2014 年 11 月
  4. 山中敦史、モイメンリン、高崎智彦、倉根一郎、小西英二. デング 1 型ウイルスの遺伝子型がヒトにおける中和・感染増強応用に及ぼす影響. 第 62 日本ウイルス学会学術集会. (東京) 2014 年 11 月
  5. 齋藤悠香、モイメンリン、小滝徹、池田真紀子、田島茂、司馬肇、細野邦昭、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦. 尿中デングウイルス非構造タンパク (NS1) 抗原の ELISA 法による検出. 第 55 回日本熱帯医学会大会, (東京) 2014 年 11 月
- 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

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究班

担当責任者研究報告書

マーモセットにおけるデング感染（再感染）モデルの病理学的解析

分担研究者	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
研究協力者	鈴木 さつき	日本歯科大学生命歯学部	
	モイ・マイリン	国立感染症研究所ウイルス第一部	
	北浦 一孝	国立感染症研究所ウイルス第一部	
	宮田 幸長	国立病院機構相模原病院 臨床研究センター	
	高崎 智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部	

研究要旨： 近隣諸国で流行が認められているデングウイルスはヒトに感染すると、急性熱性疾患、出血熱、関節炎などの疾病を伴い、本邦においても地球環境の変化によりその感染拡大が懸念されていたが、昨年、海外渡航歴が無く国内感染患者が 69 年ぶりに発見され、総計 160 名の感染患者が 15 都道府県で確認された。デングウイルス感染症に対しては認可されたワクチンが無く、また、有効な治療薬も無いのが現状である。その理由として、デングウイルス感染動物モデル系が無いのが隘路となっている。我々は、既に、新世界サルに属する小型の霊長類であるコモンマーモセットがデングウイルスに初回接種により感染することを見出して報告してきた。今回、デングウイルス再感染による病態解析に一環として、病理組織学的な検討を行い、網内系臓器（肝臓・脾臓）、および腎臓に於ける反応変化、また、皮膚に於ける出血の有無に関して詳細に検討を行う伴に、免疫系の惹起に関してはサイトカインの変動を検討したので報告する。

A. 研究目的

デングウイルス（DEV）は、蚊の吸血によりヒトへ感染し、発熱のみならず致死的な出血熱などの疾病を起こすことがある。本邦では過去に東南アジアから侵入した DEV が、ヒトスジシマカによって媒介されることが知られている。昨年度、日本国内で発生した DEV 感染者の発見から、再興感染症として監視が必要であると伴に、早期にワクチン創製に向けた対応が急務である。

DEV はマウスにおいて感染が成立しない。したがって発症メカニズムやワクチン開発に必要な情報が不足しているため、霊長類をベースとした発症モデルの作成、病態解明等の基礎的研究は急がなければならない。

コモンマーモセットは新世界猿に属する小型の霊長類であり、非ヒト霊長類モデルとして生理学、神経学等の研究で利用されている。他の霊長類モデル動物と比べて小型で多産であることから、本動物において感染モデル系を確

立することは有用である。そして感染時の病態を評価するために、感染病態の病理学的検討と免疫学的解析の基盤整備も平行して進めなければならない。

コモンマーモセットを用いた DEV 感染モデル系の確立を目的とした。

B. 研究方法

(1) コモンマーモセットにおける DEV 再感染モデルの確立：コモンマーモセットに DENV-2 を接種後、126 週～75 週間の間隔を開けて DENV-1 を接種し、再感染接種後に 2 週間後の臓器を採取して病理組織学的検討を行った。また、この間に血液を経時的に採血して、Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析および臓器の肝臓、脾臓、腎臓など各臓器の病理学的解析を実施した。

(倫理面への配慮)

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。

### C. 研究結果

(1) Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系：DENV 再感染に伴う炎症性サイトカインの変化を検出するため、それらの数値を補正するためのハウスピーキング遺伝子に対する特異的プライマーを設計し、5種類の遺伝子 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-5, IL-2, IL-10) の発現解析を行った結果、再感染 2 日後に IL-2, IL-5 の優位な増加が確認され、7 日後までに感染前のレベルに低下した。IFN $\gamma$  は 4 日後に優位な増加が確認され、その増加は 14 日まで続いた。IL-10 は感染 4 日目から減少し 10 日目まで経時的に低下し 14 日目でもその低下は継続していた。

(2) 再感染後の各種臓器の病理学的検討：  
肝臓：①一般的なウイルス感染症と同様に、進行すると網内系 (肝・脾) に反応性変化をしました。②肝・脾の細胞への感染を伴い、炎症性反応を示唆する所見が出現した。③肝の変化は、感染後は肝細胞の腫大、肝実質への炎症性細胞浸潤がウイルス感染の程度と炎症の反応性変化の程度で変化が確認された。④肝細胞の腫大はウイルス感染により破壊された肝細胞の再生による所見で、肝実質への炎症性細胞浸潤は破壊された細胞の処理の反応性変化が確認された。④126~92 週後に再感染した群で炎症性細胞浸潤が高度である。⑤41 週後に再感染した群では、炎症性細胞浸潤が軽度である。⑥75 週後に再感染した群では、高度~軽度までの個体が存在する。⑦肝臓の病理変化は、初感染の際のウイルス接種量と再感染時のウイルス接種量間に明確な依存性は確認されていないが、再感染時のウイルス接種量は、1.00E+09~1.00E+03 の個体でも確認された。  
脾臓：①脾臓の変化は、白脾髄の拡大、胚中心の出現、赤脾髄へのリンパ球の出現程度の増加であり、いずれもウイルス感染により生じた反応性変化が観察された。  
腎臓：①腎臓に於いては、びまん性で区域差の無い間質性腎炎が観察された。  
皮膚：①皮膚に関しては皮下血腫と血栓を伴った静脈の像が確認された症例があった。  
その他、肺、消化管、脳、心臓には明らかな変化は観察されなかった。

### D. 考察

本研究では、コモンマーモセットを用いて非ヒト霊長類ウイルス感染モデル系を作成することにある。今回は、異なるタイプの DENV による再感染を行い、感染モデル系を評価するために病理組織学検討と免疫学的解析として各種サイトカインの発現解析を Real-time PCR 系を用いて行った。病理組織学検討により、①DENV 再感染による肝細胞の腫大範囲が再生の程度を示唆し、炎症性細胞浸潤の程度は破壊後の程度を示唆された。②脾臓に関しては、胚中心の出現と赤脾髄へのリンパ球浸潤の程度は、ウイルス感染の程度と相関することが示唆された。また、腎臓では間質性腎炎を主とし円柱、うっ血、組織破壊像が顕著であり、既報した血尿の症状を理解できる。皮膚における変化として皮下失血増が確認され、ヒトに於ける点状出血、毛細血管の破綻と極めて類似した病態を呈していた。

### E. 結論

本研究により、マウスでは感染が成立しないウイルスに対して、非ヒト霊長類感染モデル動物としてコモンマーモセットに注目した結果、Real-time PCR 系によって感染の成立が確認された。また、病理組織学検討により、ヒトの臨床症状と類似した臨床像を呈する事が確認された。以上のことから、今回の再感染モデル系はワクチンの評価系に充分に対応できる可能性がある。今後コモンマーモセットにおける免疫学的解析ツールを充実させることで、感染時の病態に対する詳細な情報が得られるものと思われる。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

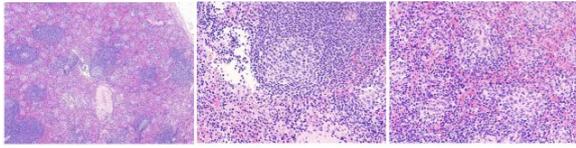
Shirai K, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, Morita K, Suzuki R, Kurane I.

Qualitative differences in brain-infiltrating T cells are associated with a fatal outcome in mice infected with Japanese encephalitis virus.

Arch Virol. 2015 Jan 22. [Epub ahead of

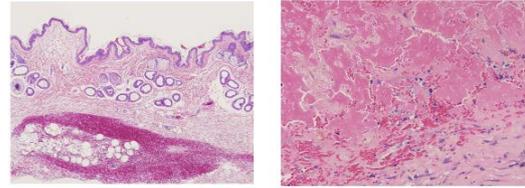


#5077 病理(脾臓)



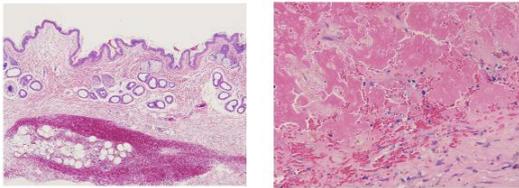
白脾髄の胚中心形成、白脾髄腫大、赤脾髄リンパ球増加

#5161 病理(皮膚)



皮下血腫の散在、血栓を伴った拡張した静脈

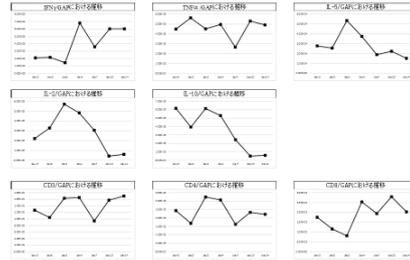
#5161 病理(皮膚)



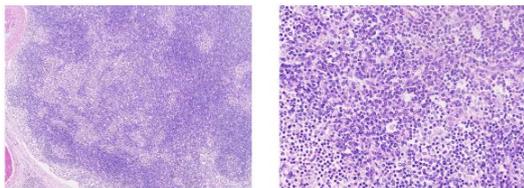
皮下血腫の散在、血栓を伴った拡張した静脈

マーモセット:5071個体におけるサイトカインに時系列な推移

5071におけるサイトカインの推移



#5075 病理(リンパ節)



反応性腫大

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

ロスリバーウイルスに対する日本産蚊の感受性と媒介能

分担研究者 江下優樹 大分大学医学部感染予防医学講座 准教授  
研究協力者 福田昌子 大分大学医学部感染予防医学講座 助教  
Lucky R. Runtuwene 大分大学医学部感染予防医学講座 大学院生  
野口香緒里 大分大学医学部感染予防医学講座 大学院生  
小林隆志 大分大学医学部感染予防医学講座 教授  
Thipruethai Phanitchat タイ国、マヒドン大学熱帯医学部 大学院生  
Raweevan Srisawat タイ国、マヒドン大学熱帯医学部 科学者  
Narumon Komalamisra タイ国、マヒドン大学熱帯医学部 准教授  
森田公一 長崎大学熱帯医学研究所 教授  
高崎智彦 国立感染症研究所ウイルス1部 室長  
倉根一郎 国立感染症研究所 副所長

研究要旨

海外からの帰国者がロスリバー熱に感染した症例が報告されたことから、国内に生息する蚊のロスリバーウイルスに対する感受性と媒介能について検討を行った。その結果、日本産ヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに対して感受性であり、媒介能を持つ事が明らかとなった。また、ヤマダシマカとリバーズシマカが本ウイルスに対して感受性であることが胸部接種法で明らかとなった。その中でも、ヤマダシマカは、ヒトスジシマカと同等の感受性があることが示唆された。今回の成績は、ロスリバー熱患者の国内勃発の際に、蚊対策に有用な情報となる。

A. 研究目的

2014年夏期の日本国内でのデング熱の勃発以来、チクングニア熱、ロスリバー熱などのアルボウイルス症の国内への侵入・流行が懸念されている。これらウイルスの主要な媒介蚊として、国内に生息するヒトスジシマカ *Aedes albopictus* があげられる。本蚊種のウイルス媒介能を把握することは、媒介蚊対策を早期に

行い、患者発生を未然に防ぐ方策につながる。

この目的のために、本蚊種のこれらのロスリバーウイルス媒介能を検討した。

国内には、ヒトの生活と接点の多いヒトスジシマカ、ヒトスジシマカに混在して生息するヤマダシマカ *Aedes flavopictus*、および主に九州から沖縄の島々の主に森林内の樹洞内の水たまりで発生するリバーズシマカ *Aedes*

*riversi* は、いずれも同じ *Aedes (Stegomyia)* の蚊種として分類されている。一般に、*Stegomyia* 亜属の蚊種がデングウイルスを媒介することから、チクングニアウイルスやロスリバーウイルスについても感受性を持つ事が推定されることから、これら蚊種のウイルス媒介能を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 材料および方法

供試蚊： 福岡県久留米市で採集した久留米産と東京都渋谷区初台で採集したヒトスジシマカ、長崎県諫早市で採集したヤマダシマカ、鹿児島県奄美大島名瀬市で採集したリバーズシマカおよびリバプール系ネッタシマカ *Aedes aegypti* 雌成虫を使用した。なお、いずれの蚊も実験室内で継代されているものを用いた。

供試ウイルス： チクングニアウイルス (SL11131) は、レユニオン島由来で、患者から分離された株である。国立感染症研究所ウイルス1部の高崎智彦博士から、正式に分与されたものを用いた。実際の使用に際しては、C6/36細胞を使ってストックウイルスを作製して蚊の実験に供した。ロスリバーウイルス [MMNT-78, T48A1p(7dICF)] は、長崎大学熱帯医学研究所の森田公一博士から、正式に分与されたものを使用した。実際の使用に際しては、C6/36細胞を使ってストックウイルスを作成して蚊の実験に供した。

蚊への感染方法： 胸部接種法による感染では、接種装置を用いて、雌蚊の胸側部にウイルス液を接種した。その後、28°Cで飼育して所定日数後に、生存蚊のみをハーベストして、試験まで-80°Cに保存した。また、経口感染法では、① 2 x 2 cm の無菌綿に所定のウイルス液を含ませて、蚊に3日間暴露させる方法、および、② Hemotek 装置を用いた膜 (ブタの腸)

を介してウイルス液を吸液させる方法を行った。なお、②では、吸液時間を1時間としたが、その後3日間は、①の方法に従って同じウイルス液を3日間暴露して感染効率を高めた。

感染させた蚊は、28°Cで14日間飼育を行い、生存蚊のみを-80°Cに保存して、その後の実験に供した。

蚊からの RNA 精製： ペレットミキサーと2%MEM を用いて、個体毎に蚊の乳剤を作製した。その後、低速遠心した上澄み液を原液として、RNeasy Mini Kit (キアゲン) を用いて蚊から総 RNA を抽出・精製した。

RT-PCR： One-step RT-PCR キット (ライフテクノロジー社) を用いて、蚊の精製 RNA を鋳型にして、RT-PCR をマニュアルに従って実施した。なお、プライマーは、チクングニアウイルスゲノム特異的プライマー、あるいはロスリバーウイルス特異的プライマー配列を感染研の高崎博士から供与を受けた。

### (倫理面への配慮)

蚊のウイルス感染実験を行う際は、BSL3 実験室で実施した。実施に際しては、大分大学動物実験委員会から承認を得て開始した。

## C. 研究結果

### 1. 1 ロスリバーウイルスを雌蚊胸部に接種した際の日本産ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーズシマカ、および外国産ネッタシマカの感受性

羽化5~8日後の上記4蚊種の雌成虫胸部にロスリバーウイルスのストックウイルスを約0.25 uL 接種した。28°Cで10日間飼育後の生存蚊から個別に総 RNA を抽出して RT-PCR を行った。その後、アガロース電気泳動で得た結果を Fig. 1a に示した。RT-PCR で予想された増幅産物は100bpであった (Fig. 1a のレーン9)。その結果は、4種の蚊で、ロスリバーウイルス

ゲノムの増幅が確認されたことから (Fig. 1a のレーン 1~8)、いずれの蚊種も本ウイルスに感受性を示すことが示唆された。また、定性的ではあるが、ヒトスジシマカおよびヤマダシマカはリバーズシマカよりもウイルスゲノムの増幅効率が高いことから、細胞の感受性に若干の差があることが推察された (Fig. 1b)。

#### 1. 2 ロスリバーウイルスを経口吸液した日本産ヒトスジシマカ雌成虫の感受性と媒介能

羽化 5~8 日後のヒトスジシマカ初台系の雌成虫にロスリバーウイルスのストックウイルスを経口投与した。Hemotek の膜を介してウイルス液を吸液する機会を 1 時間与えた。その後、ウイルス液を含む綿を介して吸液の機会を 28°C で 3 日間与え続けた。飼育は 1 日 16 時間照明の 28°C の恒温槽内で、4% 砂糖水を与えながら 14 日間飼育した。14 日経過後の生存蚊は、-80°C に保存したのちに、個別毎に脚を除いた組織から総 RNA を抽出して RT-PCR を行った。

アガロース電気泳動で得た結果を Fig. 2a に示した。RT-PCR で予想された増幅産物は 100bp であった (Fig. 2a のレーン 7)。ウイルス液単体を吸液した 3 個体の蚊 (Fig. 2a のレーン 1, 2, 3) あるいは、ウイルス液にアデノシン二リン酸を加えた液を吸液した 2 個体蚊 (Fig. 2a のレーン 4, 5) のうち、それぞれ 1 個体からロスリバーウイルスゲノムの増幅が認められた (Fig. 2a のレーン 2 と 5)。このことから日本産のヒトスジシマカは経口感染で本ウイルスに感受性があることが明らかとなった。また、個体数は少ないが、ウイルス液にアデノシン二リン酸を加えた液と加えない液とで、蚊から検出されるウイルスゲノムはほぼ同等と推定された (Fig. 2b)。

次に、Fig. 2a でウイルスゲノムが検出された個体の脚から抽出・精製した総 RNA を鋳型として、ロスリバーウイルス特異的プライマーを

用いて RT-PCR を行った。その結果、いずれの個体の脚からも本ゲノム陽性のバンドが電気泳動で検出された (Fig. 3a)。このことから、中腸細胞で増殖したロスリバーウイルスは蚊の体腔内に放出されて、全身に拡散していることが推察され、唾液腺にも本ウイルスは到達していると想像される。また、脚から抽出したウイルスゲノムと脚以外から抽出したそれらの増幅程度を比較したところ、若干増幅程度は低い、ほぼ同程度の増幅であった。

#### D. 考察

日本産のヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに感受性があり、ウイルスを媒介する可能性が今回の実験で示唆された。

今回の胸部接種法による実験から、ヤマダシマカ、リバーズシマカに本ウイルス感受性があることが明らかとなった。両蚊種の媒介能を検討するためには、経口感染実験を今後検討する必要がある。

同じヒトスジシマカ群に属するヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、及びリバーズシマカでは、いずれもウイルスの増殖は認められるが、リバーズシマカでは増殖が若干低いように思われた。今後、例数を増やす必要がある。

#### E. 結論

(1) 日本産ヒトスジシマカは、ロスリバーウイルスに対して感受性であり、媒介能を持つ事が明らかとなった。

(2) ヤマダシマカとリバーズシマカが本ウイルスに対して感受性であることが胸部接種法で明らかとなった。

(3) 日本産ヒトスジシマカとヤマダシマカの本ウイルス増殖効率は、ほぼ同程度であり、リバーズシマカのそれは若干低いことが胸部接種法の結果から示唆された。

## F. 健康危険管理情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Lucky Ronald Runtuwene, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014): Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse Parasit Vectors, 7:143. doi:10.1186/1756-3305-7-143

(2) Lucky Ronald Runtuwene, Kaori Noguchi, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Kenta Nakai and Yuki Eshita (2014): Vector competence of *Aedes aegypti* to dengue virus. Urban Pest Management 4(1) : 1-14.

(3) Junya Yamagishi, Anna Natori, Mohammed E.M. Tolba, Arthur E. Mongan, Chihiro Sugimoto, Toshiaki Katayama, Shuichi Kawashima, Wojciech Makalowski, Ryuichiro Maeda, Yuki Eshita, Josef Tuda and Yutaka Suzuki (2014): Interactive transcriptome analysis of malaria patients and infecting *Plasmodium falciparum*. Genome Res., 24: 1433-1444,

(4) Jąkalski, Marcin; Wakaguri, Hiroyuki; Kischka, Tabea; Nishikawa, Yoshifumi; Kawazu, Shin-ichiro; Matsubayashi, Makoto; Kawahara, Fumiya; Tsuji, Naotoshi; Cao, Shinuo; Sunaga, Fujiko; Xuan, Xuenan; Okubo, Kazuhiro; Igarashi, Ikuo; Tuda, Josef; Mongan, Arthur; Eshita, Yuki; Maeda, Ryuichiro; Makalowski, Wojciech; Suzuki, Yutaka; Yamagishi, Junya (2014) : DB-AT: a 2015 update to the Full-parasites database brings a multitude of new transcriptomic

data for apicomplexan parasites. NAR-02635-Data-E-2014.R1 Nucleic Acid Res., 42(1):D123-131.

### 2. 学会発表

(1) 江下優樹, 福田昌子, Lucky Runtuwene, 大塚 靖, 野口香緒里, 川上絵理, 徳永暁憲, 小林隆志, 服部正策, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, 牛島廣治, 倉根一郎, 高崎智彦 (2014): 本邦産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループ蚊 2 種のチクングニアウイルス感受性(2)。第 66 回日本衛生動物学会大会、2014 年 3 月 21 日(金)・22(土)・23(日)、岐阜大学地域科学部、岐阜県岐阜市。Med. Entomol. Zool., 65 (大会特集号) :45, 2014

(2) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014) : Utilization of CCL-125 for analyzing innate immunity in *Aedes aegypti*. 第 66 回日本衛生動物学会大会、2014 年 3 月 21 日(金)・22(土)・23(日)、岐阜大学地域科学部、岐阜県岐阜市。Med. Entomol. Zool., 65 (大会特集号) :46, 2014

(3) 三井マルセロ孝弘、藤田直子、宇佐川佑子、田村寛子、岩田敦子、岸 健志、江下優樹、小林隆志、西園晃、門田淳一(2014) : 病初期の IgM 迅速検査で陰性であった Dengue 熱の 1 例。第 62 回日本化学療法学会西日本支部総会、第 57 回日本感染症学会中日本地方会学術集会、第 84 回日本感染症学会西日本司法界学術集会合同開催。2014 年 10 月 23 日(木)~25日(土)、岡山コンベンションセンター、岡山市。合同開催プログラム・抄録集 2014: 378. (抄録番号 234)

(4) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 小西英二, 山中敦史, 牧野芳大, 野口香緒里, 川上絵理, 福田昌子, 小林隆志, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 山岸潤也, 鈴木 穰, 中井謙太, 前田龍一郎, 杉本千尋, 倉根一郎, 高崎智彦 (2014): 一過性的にデングウイルス血症をマウスに起こして、定量的感染蚊を大量に作る新規の方法。第35回都市有害生物管理学会大会・総会、2014年6月27(金)・28(土)、日本大学生産工学部、千葉県習志野市。

(5) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Junya Yamagishi, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Yuki Eshita and Takashi Kobayashi (2014): Potential novel anti-dengue virus in *Aedes aegypti* mosquito. The 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Pacifico Yokohama, Kanagawa Prefecture, November 25-27, 2014, MBSJ 2014 Program: 112. (Poster # 1P-0015)

(6) 岩中 愛, 松原祥恵, 福田昌子, Thipruethai Phanitchat, Raweewan Srisawat, Lucky R. Runtuwene, 野口香緒里, Arthur E. Mongan, 鈴木 穰, Narumon Komalamisra, 成田弘成, 森田公一, 倉根一郎, 高崎智彦, 林田京子, 杉本千尋, 小林隆志, 江下優樹 (2014): RT-LAMP 法の改良によるアルボウイルス症診断の検討。第26回日本環境動物昆虫学会年次大会、長崎大学教育学部、長崎市、11月29日(土)、30日(日)、第26回日本環境動物昆虫学会年次大会プログラム集 P-11。

#### 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

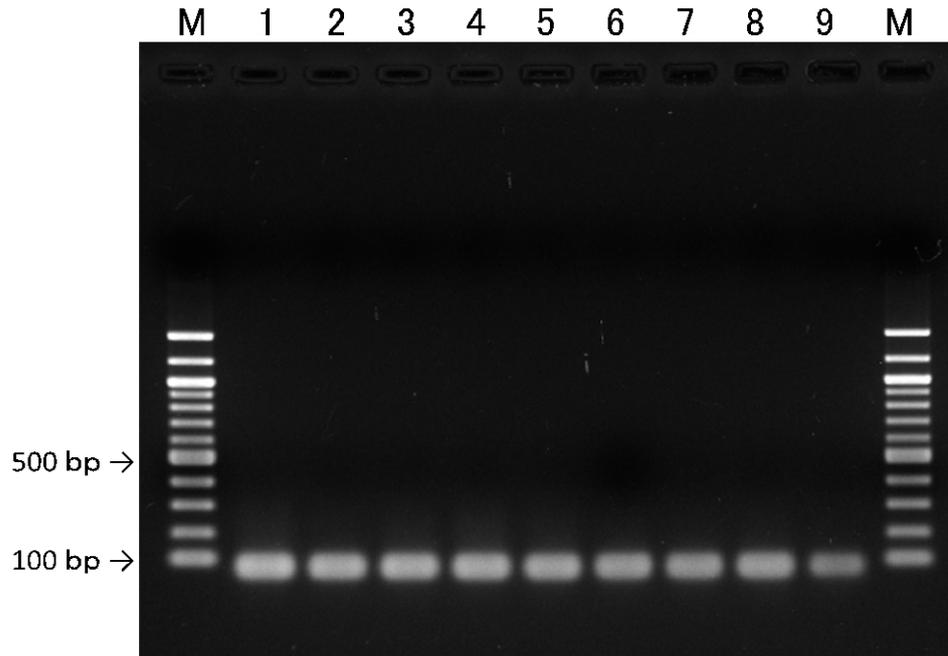
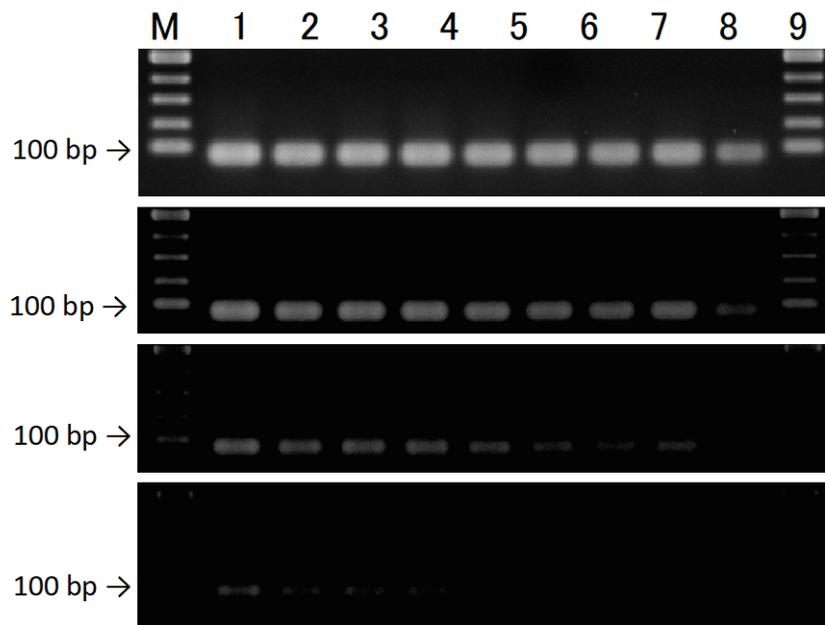


Fig. 1a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of intrathoracically Ross River virus-inoculated mosquitoes 10 days post infection at 28C.  
(M: 100 bp ladder marker, lanes 1-2: *Ae. albopictus* (Kurume), lanes 3-4: *Ae. flavopictus* (Nagasaki), lanes 5-6: *Ae. rivarsi*, lanes 7-8: *Ae. aegypti*, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (141216-141226)  
(1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)



*Ae. albopictus* > *Ae. flavopictus* > *Ae. rivarsi*

Fig. 1b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of intrathoracically Ross River virus-inoculated mosquitoes 10 days post infection at 28C.  
(M: 100 bp ladder marker, lanes 1-2: *Ae. albopictus* (Kurume), lanes 3-4: *Ae. flavopictus* (Nagasaki), lanes 5-6: *Ae. rivarsi*, lanes 7-8: *Ae. aegypti*, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (141216-141226)  
(1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

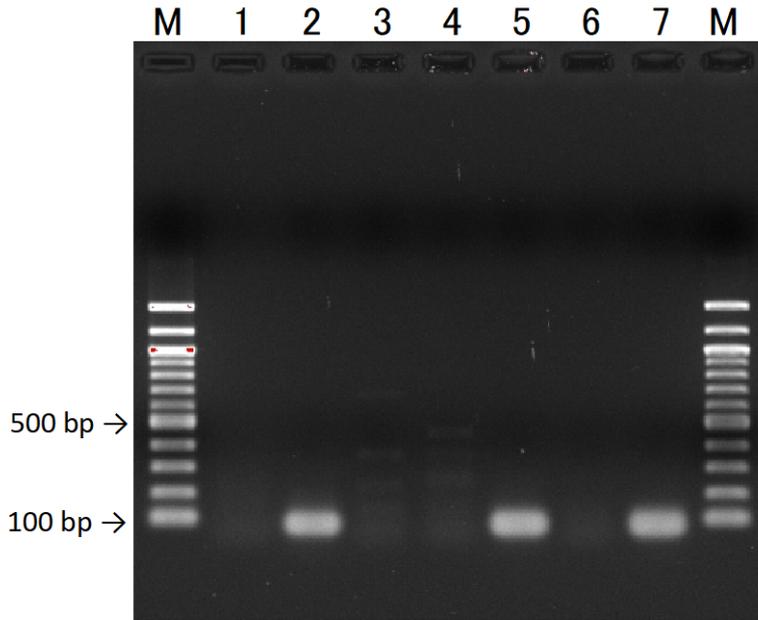


Fig. 2a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquitoes w/o legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).  
 (M: 100 bp ladder marker, lanes 1-5: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lanes 1-3: RRV alone, lanes 4-5: RRV and Adenosine diphosphate (final concentration : 0.077 M) and lane 6: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

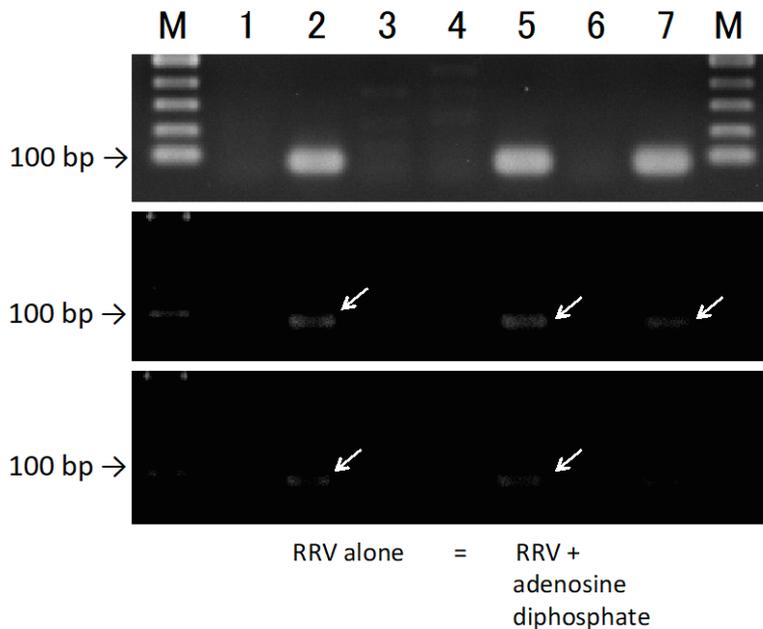


Fig. 2b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquitoes w/o legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).  
 (M: 100 bp ladder marker, lanes 1-5: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lanes 1-3: RRV alone, lanes 4-5: RRV and adenosine diphosphate (final concentration : 0.077 M) and lane 6: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 9: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

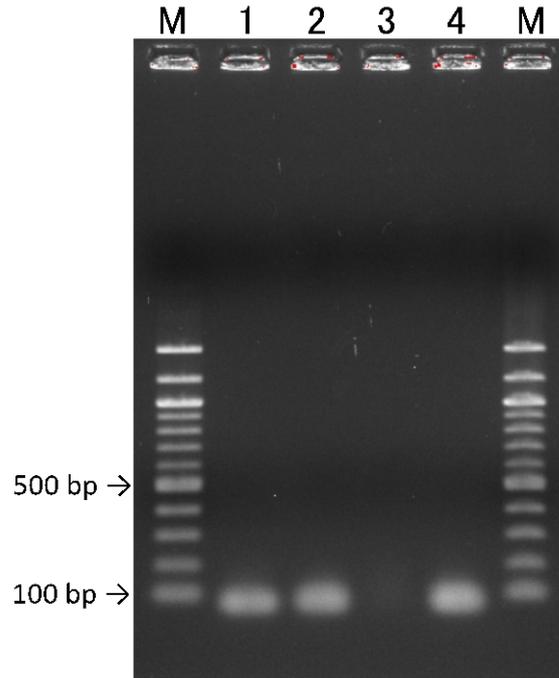


Fig. 3a Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquito legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).

(M: 100 bp ladder marker, lanes 1 & 2: *Aedes albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lane 1: RRV alone, lane 2: RRV and 0.077 M adenosine diphosphate, and lane 3: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 4: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

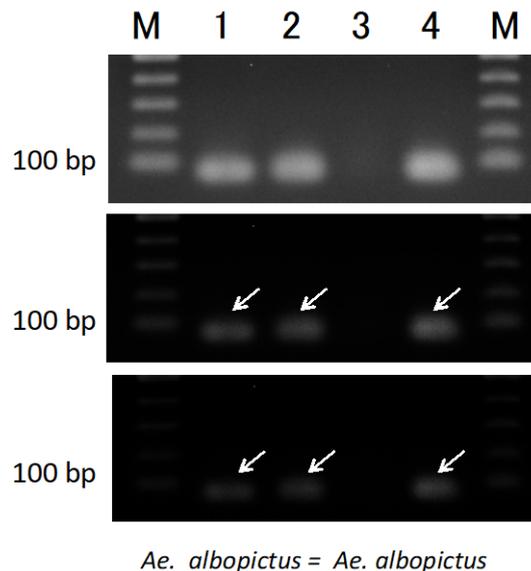


Fig. 3b Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products originated from total RNA of orally Ross River virus-infected mosquito legs, 14 days post infection at 28C (Hemotek membrane & 2% MEM-impregnated cotton (150120-150123)).

(M: 100 bp ladder marker, lanes 1 & 2: *Ae. albopictus* (Hatsudai, Tokyo), lane 1: RRV alone, lane 2: RRV and 0.077 M adenosine diphosphate, and lane 3: un-infected *Ae. albopictus* (Hatsudai) as negative control, lane 4: Ross River viral RNA as positive control (1.5% agarose in 1X TAE buffer, 4% Sucrose solution as a meal for female mosquitoes)

## 新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

### 国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策に関する研究

#### 担当責任者研究報告書

#### チクングニアウイルスレプリコンの設計および抗チクングニア剤評価のための 霊長類モデルに関する検討

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所副所長）  
協力研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室長）  
高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）  
鈴木隆二（国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室長）  
網 康至（国立感染症研究所動物管理室主任研究官）  
藤井克樹（国立感染症研究所ウイルス第二部研究員）  
モイ メンリン（国立感染症研究所ウイルス第一部研究員）  
北浦一 孝（国立相模原病院臨床研究センター診断治療研究室流動研究員）  
白井顕治（筑波大学大学院人間総合科学研究科ウイルス医学）  
ギジェルモ ポサダス・エレラ（国立感染症研究所ウイルス第一部第三室）  
森川 茂（国立感染症研究所獣医科学部長）  
西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

#### 研究要旨

近年チクングニア熱が東南アジアからアフリカにかけて流行しているが、2013年末には西半球では初めてカリブ海諸島での流行が確認された、2014年にはアメリカ、メキシコ、ブラジル等の諸国に流行が拡大した。またイタリア（2007年）およびフランス（2010年）では温帯地域での流行も報告された。したがって媒介蚊の生息する日本国内へのチクングニアウイルス（CHIKV）の侵淫の可能性は否定できない。そこで本研究においてコモンマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討を行うと共に詳細な CHIKV の病態モデルの解析のためのレプリコンの設計を行った。CHIKV 接種マーモセットの血液に対する生化学的試験および病理学的解析を行った結果、CHIKV 接種 3-7 日後に AST, ALT, LDH の上昇が示され、肝機能障害が示唆された。さらに肝臓の病義学的解析において肝のシングルセルネクロシス、細胞浸潤が観察された。また肝臓において特異的抗原が検出された。これらの結果からマーモセットにおいて CHIKV の感染が成立したことが示された。

- A. 研究目的
- 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属に分類される一
- 本鎖の(+)RNA ウイルスである。CHIKV はチクングニア熱の原因ウイルスであり、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) や日本にも広範囲に

生息するヒトスジシマカ (*A. albopictus*) などのヤブカ属のカによって媒介される。近年 CHIKV がアフリカ東岸からインド、東南アジアにかけて再興しているが、2013 年末には西半球では初めてカリブ海諸島で流行が確認された。2005 年のレユニオン島でのチクングニア熱の流行においては発熱、発疹、関節痛などのこれまでに知られているチクングニア熱の症状とは別に、呼吸器不全、心代償不全、髄膜脳炎、劇症肝炎、腎不全等の症状と 219 人の死者が報告された。我が国においても 2007 年より 2013 年末までに 72 例の輸入症例が確認された。チクングニア熱は日本周辺で大流行しており日本においても媒介蚊であるヒトスジシマカが存在するため国内侵淫の可能性は否定できない。しかしながらチクングニア熱の病態はいまだ不明な点が多い。そこで我々はマーモセットを用いた CHIKV 感染モデルの検討およびレプリコンを用いた病態解明モデルの設計を行ったので報告する。

## B. 研究方法

**ウイルスと培養細胞:** 感染実験には CHIKV SL10571 株を供試した。ウイルス分離およびウイルス中和試験にはサル腎由来の Vero 細胞を用いた (American Type Culture Collection)。

**動物:** 体重 300 g ~ 379 g のコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) を用いた。麻酔は塩酸ケタミン+塩酸キシラジン混合麻酔法により導入した。

**感染実験:** マーモセットに対して、SL10571 株 (500ul ;  $10^4$ - $10^8$  pfu/animal) を背側頸部に皮下接種した。感染 7 日後、10 日後、21 日後に安楽殺を行い各組織を採取した。

**血液生化学試験:** 採血した血液中の ALT (U/l), AST (U/l), LDH (U/l) の測定を行った。

**病理学的解析:** 採取した組織は 10%ホルマリンにて固定し、組織標本を作製した。作製した組織標本は HE 染色および抗 CHIKV マウス腹水を用いて免疫染色を行った。

**レプリコンの設計:** CHIKV レプリコンを設計するために GenBank 等より CHIKV の各種株の遺伝子配列を解析した。また、これまでに発表されているアルファウイルス、フラビウイルスのレプリコンを文献学的に解析した。

## C. 研究結果

**臨床症状:** 接種 3 日後より元気消沈、食欲減退を呈する個体が観察された。しかしながら発熱、体重減少は認められなかった。

**生化学試験:** 採血した血液中の ALT, AST, LDH の測定を行った結果、#5013 および#5014 のマーモセットにおいて ALT, AST, LDH の上昇が観察された、#5016 のマーモセットにおいて AST, LDH の上昇が認められた。#5015 および陰性対照である#5017 においては特異的上昇は認められなかった。

**病理学的解析:** 採取した各組織の病理解析を行った結果、#5013 のマーモセットの肝臓において、細胞浸潤、肝のシングルセルネクロシスが認められ、肝細胞、肝管上皮細胞および kupper 細胞に特異的抗原が観察された。#5014 の肝臓においては肝細胞、kupper 細胞に特異的抗原が観察された。#5015 の肝

臓においては類洞内への細胞浸潤が観察され、kupper 細胞に特異的抗原が観察された。#5016 の肝臓においても細胞浸潤が観察されたが、特異的抗原は認められなかった。対照個体である#5017 の肝臓において病理学的変化は認められなかった。

**レプリコンの設計：**文献学的にこれまでに発表されているアルファウイルスおよびフラビウイルスレプリコンを解析した結果、これまでに国内で分離された CHIKV 株 SL11131 株をベースにして CHIKV レプリコンを作製することにした。ところで野生株から作製されたレプリコンは細胞毒性を有し、そのレプリコンを導入された宿主細胞は死滅する。これは主にウイルスの非構造タンパク質である nsP2 が原因である。これまでに nsP2 の毒性を低下させるためには、P718G の変異体を導入することが有効であると報告されているため、P718G 変異を導入したレプリコンを設計した。

#### D. 考察

CHIKV 接種3日後から AST, LDH の上昇が、接種4日後から ALT の上昇が観察され、CHIKV 接種による肝機能障害が示された。また CHIKV 接種3, 7, 10, 21 日後に安楽殺を行いコモンマーモセットの各臓器を採取しウイルス学的および病理学的解析を行った。その結果、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たことから CHIKV の感染が成立したことが示されたと考えられた。今後レプリコンを用いた CHIKV の病態、感染機構の解明、ウイルス学および病理学的解析を行う必要がある。

#### E. 結論

急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニア熱は今後も流行が続くことが予想される。また西半球においても小流行が発生しており、今後も注視する必要がある。したがって日本においても将来のワクチン開発、特異的治療法の開発は重要な課題であり、早期のチクングニア熱の動物実験モデルの開発はその病態解明および将来のワクチン開発、病態生理に基づく新治療法の開発に資する。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし

#### G. 研究発表

特記事項なし

#### H. 学会発表

- 1) Moi ML, 白石健二、網康至、宮田幸長、林昌宏、須崎百合子、北浦孝一、西條政幸、鈴木隆二、倉根一郎、高崎智彦。Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第62回日本ウイルス学会学術集会。横浜, 2014年11月10-12日。
- 2) 齋藤悠香、Moi ML、竹下望、林昌宏、司馬肇、細野邦明、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦。FcγR 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討。第62回日本ウイルス学会学術集会。横浜, 2014年11月10-12日。

- 3) 山口幸恵、林昌宏、伊藤（高山）睦代、垣内五月、堀谷まどか、田島茂、高崎智彦、倉根一郎、渡邊治雄、西條政幸. 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に関与する炎症性サイトカインの解析。第 62 回日本ウ

イルス学会学術集会. 横浜, 2014 年 11 月 10-12 日.

I. 知的財産権の出願・登録状況  
特記事項なし

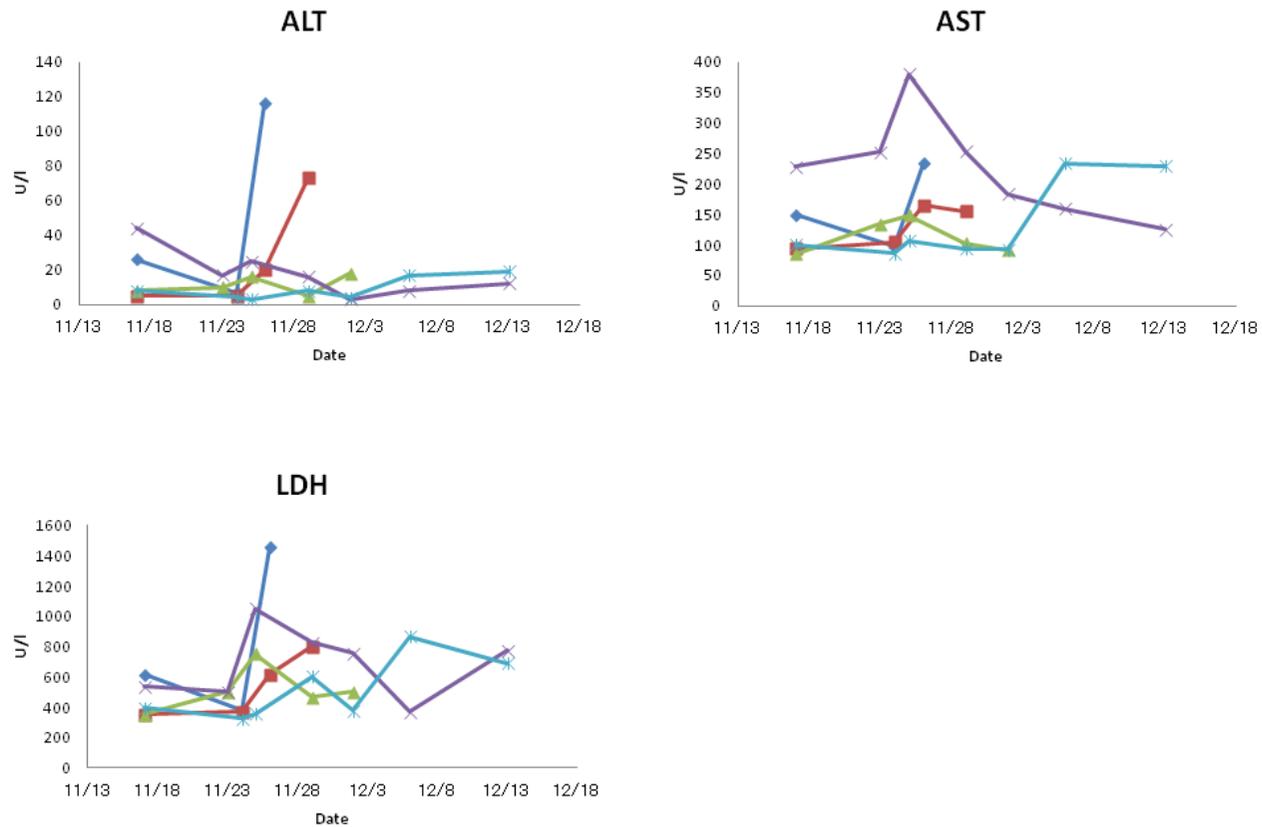


図 1 コモンマーモセットの血液生化学検査：マーモセットに対して，CHIK SL10571 株を背側頸部に皮下接種した，#5013 (◆)，#5014 (■)，#5015 (▲)，#5016 (×)，#5017 (※)．その結果接種 3 日後から AST と LDH の上昇が #5013，#5014，#5016 において観察された．また接種 4 日後からは ALT の上昇が #5013，#5014 において確認された．対照個

体（#5017）においては ALT, AST, LDH の上昇は観察されなかった。

研究成果の刊行に関する一覧表(論文)

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Moi ML, Takasaki T, Omatsu T, Nakamura S, Katakai Y, Ami Y, Suzuki Y, Saijo M, Akari H, Kurane I.	Demonstration of marmosets ( <i>Callithrix jacchus</i> ) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans.	Journal of General Virology	95(Pt 3):	591-600	2014
Moi ML, Takasaki T, Saijo M, Kurane I.	Determination of antibody concentration as main parameter in a dengue virus antibody-dependent enhancement assay using FcγR-expressing BHK cells.	Archives of Virology	159(1)	103-116	2014
Tajima S, Kotaki A, Yagasaki K, Taniwaki T, Moi ML, Nakayama E, Saijo M, Kurane I, Takasaki T.	Identification and amplification of Japanese encephalitis virus and Getah virus propagated from a single porcine serum sample: A case of coinfection.	Archives of Virology.	159(11):	2969-2975	2014
Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Uemura H, Matono T, Fujiya Y, Mawatari M, Takeshita N, Hayakawa K, Kanagawa S, Ohmagari	Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014.	Euro Surveillance	19(4)	pii:20683	2014
Runtuwene LR, Konishi E, Yamanaka A, Makino Y, Suzuki Y, Takasaki T, Kurane I, Kobayashi T, Eshita Y.	Dengue transmission model by means of viremic adult immuno-competent mouse.	Parasit Vectors	7(1)	143	2014
Meng Ling Moi, Yasushi Ami, Kenji Shirai, Chang-Kweng Lim, Yuriko Suzuki, Yuka Saito, Kazutaka Kitaura, Masayuki Saijo, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki.	Formation of Infectious Dengue Virus–Antibody Immune Complex In Vivo in Marmosets ( <i>Callithrix jacchus</i> ) After Passive Transfer of Anti-Dengue Virus Monoclonal Antibodies and Infection with Dengue Virus.	Am. J. Trop. Med. Hyg.	92(2)	370-376	2015
Meng Ling Moi, Takeshi Hosogai, Yasuko Honma, Naoko Moriwaki, ---- Akira Kotaki, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Satoru Miyake, Tomohiko Takasaki	Virological confirmation of concurrent dengue virus serotypes-1 and serotype-4 by virus isolation using Fcγ receptor expressing BHK cells.	International Journal of Infectious Diseases.	33	e177-e178	2015
Eri Nakayama, Akira Kotaki, Shigeru Tajima, Miki Kawada, Kuniharu Miura, Aki Gemma, Takuya Adach, Tsuyoshi Sekizuka, Kengo Kato, Akifumi Yamashita, Meng Ling Moi, Makiko Ikeda, Kazumi Yagasaki, Takumi Tomikawa, Kenichi Shibasaki, Yuka Saito, Masayuki Saijo, Makoto Kuroda, Tomohiko Takasaki	Two different dengue virus strains in the Japanese epidemics of 2014.	Virus Genes	52	722-726	2016
Meng Ling Moi, Yasushi Ami, Kenji Shirai, Chang-Kweng Lim, Yuriko Suzuki, Yuka Saito, Kazutaka Kitaura, Masayuki Saijo, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki.	Formation of Infectious Dengue Virus–Antibody Immune Complex In Vivo in Marmosets ( <i>Callithrix jacchus</i> ) After Passive Transfer of Anti-Dengue Virus Monoclonal Antibodies and Infection with Dengue Virus.	Am. J. Trop. Med. Hyg.	92(2)	370-376	2015
Tajima S, Nakayama E, Kotaki A, Moi ML, Ikeda M, Yagasaki K, Saito Y, Shibasaki KI, Saijo M, Takasaki T.	Whole Genome Sequencing-Based Molecular Epidemiologic Analysis of Autochthonous Dengue Virus Type 1 Strains Circulating in Japan in 2014.	Jpn J Infect Dis.	70(1)	45-49 doi: 10.7883/yoken .JJID.2016.086	2017 (doi 2016)
Kato F, Ishida Y, Oishi S, Fujii N, Watanabe S, Vasudevan SG, Tajima S, Takasaki T, Suzuki Y, Ichiyama K, Yamamoto N, Yoshii K, Takashima I, Kobayashi T, Miura T, Igarashi T, Hishiki T.	Novel antiviral activity of bromocriptine against dengue virus replication.	Antiviral Res.	131	141-147	2016
Yamashita A, Sakamoto T, Sekizuka T, Kato K, Takasaki T, Kuroda M.	DGV: Dengue Genographic Viewer.	Front Microbiol.	0.899305556	doi: 10.3389/fmicb. 2016.00875.	2016

Moi ML, Kobayashi D, Isawa H, Sasaki T, Saijo M, Kurane I, Sawabe K, Takasaki T.	Dengue Virus Isolation in Mosquito <i>Aedes albopictus</i> Captured During an Outbreak in Tokyo, 2014, by a Method Relying on Antibody-Dependent Enhancement Mechanism Using FcγR-Expressing BHK Cells.	Vector Borne Zoonotic Dis.	16(12)	810-812	2016
Moi ML, Ami Y, Muhammad Azami NA, Shirai K, Yoksan S, Suzaki Y, Kitaura K, Lim CK, Saijo M, Suzuki R, Takasaki T, Kurane I.	Marmosets ( <i>Callithrix jacchus</i> ) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates.	J Gen Virol.	98(12)	2955-2967	2017
Eri Nakayama, Tajima S, Kotaki A, Shibasaki KI, Itokawa K, Kato K, Yamashita A, Sekizuka T, Kuroda M, Tomita T, Saijo M, Takasaki T.	A summary of the imported cases of Chikungunya fever in Japan from 2006 to June 2016.	J Travel Med. doi: 1	25(1)	0.1093/jtm/tax072.	2018
Nor Azila Muhammad Azami, Meng Ling Moi, Yasushi Ami, Yuriko Suzaki, Chang-Kweng Lim, Satoshi Taniguchi, Masayuki Saijo, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane	Genotype-specific and cross-reactive neutralizing antibodies induced by dengue virus infection: detection of antibodies with different levels of neutralizing activities against homologous and heterologous genotypes of dengue virus type 2 in common marmosets ( <i>Callithrix jacchus</i> )	Virology Journal	<a href="https://doi.org/10.1186/s12985-018-0967-x">doi.org/10.1186/s12985-018-0967-x</a>		2018

本研究班は平成27年度、平成28年度はAMEDの研究事業として継続したもので、それらによる成果も追記した。