

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 e-ASIA 共同研究プログラム
(英語) International Collaborative Research Program
The e-ASIA Joint Research Program

研究開発課題名：(日本語) 革新的なデング流行対策と治療法開発に資するデングウイルス準種と
血管透過性因子の網羅的解析
(英語) Comprehensive study on virus quasispecies and vascular permeability
factors in severe dengue infection in humans for innovative epidemic
and clinical managements

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人長崎大学 熱帯医学研究所 教授 長谷部 太
所属 役職 氏名：(英語) Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
Professor, Futoshi Hasebe

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

1) ベトナムとフィリピンにおいて流行するデングウイルスの血清型、遺伝子型、及び、ウイルス遺伝子の特性の解析、デング流行状況の把握：

ベトナムでは平成 26 年度から平成 28 年度にかけて合計 3,600 症例のデング疑い患者から血液検体を採取し、RT-PCR 法によるスクリーニング、及び、ウイルス分離を行いデングウイルス遺伝子の解析を行った。平成 25 年にベトナム中部で 20 万人を超えるデング患者発生の報告があり、real time RT-PCR 法によって血清型の鑑別を行い、デングウイルス 4 型 (DENV-4) が主流の流行であったことが判明、また、ウイルスゲノムの解析から土着の遺伝子型のウイルス株による流行であることを報告した (Takamatsu Y et al. J. Clin Virol 2015 May 66;24-26)。また、平成 25 年にベトナム北部の Hai Phong 市と中部の Ha Tinh 省で採取された検体から、これまでベトナムで報告されていないデングウイルス 3 型 (DENV-3) genotype III ウイルス株の侵入が確認された。Hai Phong の 1 症例ではデング症状を発症する前に神経症状を呈し、脳脊髄液 (CSF) から DENV-3 genotype III ウイルス株を分離し、この脳炎患者由来株の非構造蛋白 NS2A 領域に特異なアミノ酸置換 (Thr-1339-ile) が確認され報告した (Minh HPL et al. J. Clin Virol 2015 Sept;70:93-96)。

フィリピンでは平成 27 年度から研究予算が支給されるようになり、これまで 939 症例 (外来患者

724 人、入院患者 215 人) の Dengue 疑い患者から血液検体を採取し、IgM-ELISA による血清診断と realtime RT-PCR によるスクリーニングで 246 症例について血清型の解析を行った (DENV-1: 58, DENV-2: 20, DENV-3: 56, DENV-4: 43, 血清型不明: 69)。現在、ウイルス分離、及び、ウイルス遺伝子解析が進行中である。

2) Dengue 患者体内の Dengue ウイルス 準種、及び、血管透過性因子の同定、重症 Dengue の発病機構の解明 :

平成 26 年に DENV-1、及び、DENV-2 の分離株の非構造蛋白 NS4B 領域に蚊 (C6/36 細胞) と哺乳類細胞 (Vero 細胞) の宿主選択性に関与すると考えられるアミノ酸置換が確認された。限界希釈法を用いて同一患者血清から 3 種類の変異体ウイルスのクローニングに成功した。また、これら変異体と同じアミノ酸置換を NS4B に導入した感染性プラスミドクローンも作成し、生物学的性状の比較解析を行っている。

3) 中和抗体価の測定と流行予測への可能性 :

ハノイ市内の住人 (健康者) 100 名から平成 27 年の Dengue 流行期前と流行後に採血を行い、in-house の ELISA を用いて IgM 抗体、及び、IgG 抗体価を測定し、BHK FcrR 培養細胞用いて Dengue ウイルス型別、及び、日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価の測定を行った。発症が認められなかった 100 人中、12 人においては IgM 抗体の陽転が認められた。フラビウイルス交叉抗体が認められた 14 検体中、3 検体は DENV の IgM 抗体が陽性であったことから、最近の DENV 感染であることが示唆された。これまで DENV-1、及び、DENV-2 による流行が主流であったためか、DENV-3、特に DENV-4 に対する中和抗体を保有する住民が非常に少なかった。平成 25 年に DENV-4 型を主流とする大流行がベトナム中部で発生しており、又、これまでベトナムで報告されていない DENV-3 genotype III 株の侵入が確認されていることから、ベトナム北部における DENV-4 由来の流行や、Genotype shift による DENV-3 genotype III 株の流行が懸念される。

英文

1) Determination of the virus serotype, genotype and genomic sequences of epidemic dengue virus strains in the Philippines and Vietnam

In Vietnam, blood samples were collected from 3,600 dengue suspected patients. All specimens were screened by RT-PCR and subjected to virus isolation for viral genome analysis during the 3 year period of research. In 2013 in central Vietnam, a large dengue virus (DENV) outbreak occurred with 204,661 clinical cases. Five hundred one serum samples were tested by serotype-specific RT-PCR method and DENV-4 was found to be the dominant serotype (245 cases, 48.9%). Viral genome analysis revealed that this outbreak was caused by endemic strains and we reported our findings (Takamatsu Y *et al.*, May 2015, J Clin Virol 66:24-26). Also, we reported a case of dengue encephalitis caused by DENV-3 genotype III in a male patient with atypical symptoms of DENV infection in Hai Phong, Vietnam in 2013. The virus was isolated from the cerebro-spinal fluid of this patient and a unique amino acid substitution was confirmed in the NS2A region (Thr-1339-ile) of the virus protein. It is noteworthy to mention that DENV-3 genotype III was detected for the first time in Vietnam (Minh HPL *et al.*, Sept 2015, J Clin Virol 70:93-96).

The Philippine team counterpart received the allocated grants starting from fiscal year 2015. Thereafter, clinical samples were collected from a total of 939 (724 outpatients and 215 inpatients)

dengue suspected patients. Virus isolation and characterization are currently being performed.

2) Dengue analyses of DENV quasispecies and factor associated with vascular permeability to determine the mechanism of severe dengue

In 2014, amino acid mutations in the NS4B region of the DENV were determined. These mutations are hypothesized to be associated with host adaptability in mosquito (C6/36) and mammalian cells (Vero) in DENV-1 and DENV-2. By using the limited dilution method, 3 variants of DENV-1 quasispecies were successfully isolated from a single patient. Currently being performed are studies to determine the biological functions of the virus protein by using a DENV-1 infectious plasmid clone with the same mutations introduced into the NS4B region.

3) Determination of DENV antibody neutralizing titer to predict DENV epidemics:

In collaboration with the Preventive Medicine Center in Hanoi, samples from 100 residents (healthy individuals) were collected before and after the 2015 dengue season in Hanoi, and level of anti-DENV IgM and IgG antibodies were determined by using an in-house ELISA. The antibody seroconversion rates, and data on primary and secondary infection among the residents of Hanoi have been obtained. Dengue serotypes and Japanese encephalitis virus (JEV) specific neutralization antibody titers were determined on all IgM and IgG ELISA positive samples by plaque reduction neutralization test (PRNT) in Fc γ -R-BHK cells. Most of the residents had neutralization antibodies against DENV-1, DENV-2 and JEV, but neither against DENV-3 nor especially DENV-4. A large DENV-4 dominated outbreak was observed in the central provinces of Vietnam in 2013 and we isolated DENV-3 genotype III strains which were not detected in Vietnam before 2013. Therefore, it is our concern that a large dengue outbreak might occur in northern Vietnam in the near future caused by DENV-4 or DENV-3 genotype III as a result of genotype shift.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 9件、国際誌 7件)

1. モイ メン リン、森田公一 「ジカウイルスの世界的な流行と最近の知見」 医学のあゆみ 2017年2月 260巻6号 528-532.
2. 長谷部太 「ウエストナイル熱」 新興・再興感染症 -グローバル化に伴う注目すべき感染症 日本臨牀 2016年12月 74巻12号(通巻第1111号) 2030-2035.
3. 森田公一 「デング熱」 成人病と生活習慣病 2016年11月 46巻11号 1389-93.
4. 森田公一 「デング熱の現状と動向」 日本内科学雑誌 2016年11月 105巻11号 2140-45.
5. Ngwe Tun MM, Muthugala RV, Thuy NT, Ly PH, Thu LT, Dinh DT, Hoang NV, Mai LT, Moi ML, Buerano CC, Morita K, Hasebe F. “Dengue-associated acute encephalitis syndrome cases in Son La Province, Vietnam.” Jpn J Infect Dis. 2016 Oct 31. [Epub ahead of print]
6. Ngwe Tun MM, Inoue S, Thant KZ, Talemaitoga N, Aryati A, Dimaano EM, Matias RR, Buerano CC, Natividad FF, Abeyewickreme W, Thuy NT, Mai LT, Hasebe F, Hayasaka D, Morita K. “Retrospective seroepidemiological study of chikungunya infection in South Asia, Southeast Asia and the Pacific region.” Epidemiol Infect. 2016 Aug;144(11):2268-75.
7. Ulanday GE, Okamoto K, Morita K. Development and utility of an in vitro, fluorescence-based assay for the discovery of novel compounds against dengue 2 viral

- protease. *Trop Med Health*. 2016 Aug 10;44:22. doi: 10.1186/s41182-016-0025-6.
8. Ngwe Tun MM, Muta Y, Inoue S, Morita K. "Persistence of Neutralizing Antibody Against Dengue Virus 2 After 70 Years from Infection in Nagasaki." *Biores Open Access*. 2016 Jul 1;5(1):188-91. doi: 10.1089/biores.2016.0016. eCollection 2016.
 9. 森田公一 「デング熱、ジカ熱」 *医学のあゆみ* 2016年4月 258巻4号 870-76.
 10. 長谷部太 「蚊媒介性ウイルス感染症 -デング熱・日本脳炎・チクングニア熱-」 *化学療法の領域* 2015年5月号 特集「野外活動と感染症」
 11. kwoon Yong Pok, Raynal C Squires, Li Kiang Tan, Tomohiko Takasaki, Sazaly Abubakar, Futoshi Hasebe, Jeffrey Partridge, Chin Kei Lee, Janice Lo, John Askov, Lee Ching Ng and Frank Konings. "First round of external quality assessment of dengue diagnostics in the WHO Western Pacific Region, 2013." *Western Pac Surveil Response J*. 2015 Jun 30;6(2):73-81. doi:10.5365/WPSAR.2015.6.1.017. eCollection 2015 Apr-Jun.
 12. Minh Huong Phu Ly, Yuki Takamatsu, Takeshi Nabeshima, Linh Ly Pham Hoai, Hang PhamThi, Dinh Dang Thi, Ngoc Linh Nguyen, Thu Thuy Nguyen Thi, Quynh Mai Le Thi, Corazon C. Buerano, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. "Isolation of dengue serotype 3 virus from the cerebrospinal fluid of an encephalitis patient in Hai Phong, Vietnam in 2013." *J. Clin Virol* 2015 Sep;70:93-96. doi: 10.1016/j.jcv.2015.07.295. Epub 2015 Jul 17
 13. Yuki Takamatsu Y, Takeshi Nabeshima, Nguyen Thi Thu Thuy, Dang Thi Dinh, Pham Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Nguyen Thi Nam Lien, Phu Ly Minh Huong, Bui Thu Thuy, Le Thi Quynh Mai, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. "A Dengue virus serotype 4-dominated outbreak in central Vietnam, 2013." *J. Clin Med* 66; May 2015.24-26
 14. 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
 15. *感染症は一国の問題ではない ～エボラ出血熱、デング熱を例として～* 公益社団法人国際厚生事業団 初版発行 監修
 16. 長谷部太 「デング熱、日本脳炎、ウエストナイル熱」、*臨床と微生物* 話題の新興・再興感染症 Vol. 41, No.1, 2014: 309-315.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. "Recent dengue situation in Vietnam and dengue virus quasispecies." (Oral) Futoshi Hasebe. e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016. Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. November 22, 2016 (国外)
2. "Neurotropic characterization of dengue virus serotype-3 isolated from a dengue encephalitis patient in Vietnam." (Oral) Phu Ly Minh Huong. e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016." Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)
3. "Isolation and characterization of dengue virus serotype-1 with single mutation substitution in the non-structural protein NS4B in dengue patients, Vietnam 2013." (Oral) Bui Thu Thuy. e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016, Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)

4. "Molecular epidemiology of dengue viruses in the Philippines." (Oral) Corazon C. Buerano. e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016. Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)
5. "Increased vascular permeability in Filipino patients during the course of dengue virus infection." (Oral) Maria Terrese A. Dimamay. e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016, Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)
6. "Laboratory profiling of dengue virus infections in two major hospitals in Metro Manila." (Oral) Maria Luisa G. Daroy, e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016, Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)
7. "Clinical observation on dengue virus infection in Ho Chi Minh City, Vietnam 2016." (Oral) Satoshi Shimada. e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016, Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)
8. "Transcriptome analysis of severe dengue clinical samples." (Oral) Takeshi Nabeshima, e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016, Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)
9. "Implications of dengue cross-reactive antibodies in flavivirus endemic areas: the past, the present and the future." (Oral) Meng Ling Moi. e-ASIA JRP Seminar and Final Meeting in Vietnam, 2016, Library, National Institute of Hygiene and Epidemiology, Hanoi, Vietnam. 22 November 2016 (国外)
10. "Dengue situation in Vietnam and quasispecies of dengue viruses." (Oral) Futoshi Hasebe. Laboratory Medicine Congress & Exhibition & Korean Society Laboratory Medicine 57th Annual Meeting. The K-Hotel, Seoul, Korea. 26-28 October 2016. (国外)
11. "Isolation and characterization of dengue virus serotype 1 with single mutation substitution of the NS4B protein in patients, Vietnam 2013." (Poster) Thuy Thu Bui, Meng Ling Moi, Takeshi Nabeshima, Pham Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Dinh Dang Thi, Ngoc Linh Nguyen, Thuy Thu Nguyen Thi, Le Thi Quynh Mai, Corazon C. Buerano, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology "Virus Research - Over Countries and Generations" 北海道、札幌市、札幌国際会議場 2016年10月23日～25日 (国内)
12. "Neurotropic characteristics of dengue serotype 3 virus isolated from a dengue encephalitis patient in Vietnam." (Poster) Minh Huong Phu Ly, Yuki Takamatsu, Meng Ling Moi, Takeshi Nabeshima, Pham Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Dinh Dang Thi, Ngoc Linh Nguyen, Thuy Thu Nguyen Thi, Le Thi Quynh Mai, Corazon C. Buerano, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology "Virus Research - Over Countries and Generations" 北海道、札幌市、札幌国際会議場 2016年10月23日～25日 (国内)
13. "Dengue associated acute encephalitis syndrome cases in Son La Province, Vietnam in 2014." (Poster) Mya Myat Ngwe Tun, Rohitha V. Muthugala, Nguyen Thi Thu Thuy, Pham

- Hoai Linh Ly , Le Thi Hien Thu , Dang Thi Dinh , Nguyen Viet Hoang , Le Thi Quynh Mai , Meng Ling Moi, Corazon C. Buerano, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Hyogo prefecture, Japan. 6-9 September 2016. (国外)
14. "A dengue virus serotype 4 dominant outbreak in central Vietnam, 2013." (Poster) Nguyen Thi Thu Thuy, Yuki Takamatsu, Dang Thi Dinh, Nguyen Thi Nam Lien, Doang Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Bui Thu Thuy, Takeshi Nabeshima, Le Quynh Mai, Kouichi Morita, Futoshi Hasebe. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会 (The 63rd Annual Meeting of The Japanese Society for Virology.) 福岡国際会議場 (Fukuoka International Congress Center) 23 Nov 2015 (国内)
 15. "Clinical experience in Ho Chi Minh City, Vietnam 2015." (Oral) Satoshi Shimada. e-ASIA JRP Dengue Project Annual Meeting, St. Luke' s Medical Center (Quezon City Philippines). 16 November 2015 (国外)
 16. "Strategies for the investigation of viral diseases with next generation sequencer." (Oral) Takeshi Nabeshima. e-ASIA JRP Dengue Project Annual Meeting, St. Luke' s Medical Center, (Quezon City Philippines). 16 November 2015 (国外)
 17. "Overview of e-Asia research project in Japan." (Oral) Meng Ling Moi. e-ASIA JRP Dengue Project Annual Meeting, St. Luke' s Medical Center, (Quezon City Philippines), 16 November 2015 (国外)
 18. "Country report-Philippines." (Oral) Eugene Lopez. e-ASIA JRP Dengue Project Annual Meeting, St. Luke' s Medical Center, (Quezon City Philippines), 16 November 2015 (国外)
 19. "Country report-Vietnam." (Oral) Le Thi Quynh Mai. e-ASIA JRP Dengue Project Annual Meeting, St. Luke' s Medical Center, (Quezon City Philippines), 16 November 2015 (国外)
 20. In vitro growth and pathogenicity characterization of a dengue serotype 3 virus from the cerebrospinal fluid of a dengue encephalitis patient. (Oral) Phu Ly Minh Huong, Yuki Takamatsu, Takeshi Nabeshima, Pham Hoai Linh Ly, Pham Thi Hang, Dang Thi Dinh, Nguyen Ngoc Linh, Nguyen Thi Thu Thuy, Le Thi Quynh Mai, Corazon C. Buerano, Kouichi Morita and, Futoshi Hasebe. The 52nd Kyushu Branch Meeting of the Japanese Society for Virology. Beppu International Convention Center, B-ConPlaza. 4-5 September 2015 (国内)
 21. Dengue and Dengue Research in Vietnam. (Oral) Futoshi Hasebe. Scientific Workshop to Explore e-ASIA Research Collaboration Opportunities Focused on Emerging Infectious Disease and Cancer priorities in South East Asia and Pacific Rim (Convened in Conjunction with the e-ASIA JRP Board Meeting) Inya Lake Hotel, Yangon, Myanmar, 13-14 August 2015 (国外)
 22. "Vascular permeability assay." (Oral) Corazon C. Buerano. e-ASIA JRP Dengue Project Kickoff Meeting, Ryoujyun Hall (Nagasaki University), 09 May 2014 (国外)
 23. "Application of the next generation sequencer." (Oral) Takeshi Nabeshima. e-ASIA JRP Dengue Project Kickoff Meeting, Ryoujyun Hall (Nagasaki University), 09 May 2014 (国外)
 24. "Report on the dengue situation in the Philippines." (Oral) Maria Luisa G. Daroy and Filipinas F. Natividad. Ryoujyun Hall (Nagasaki University), 09 May 2014, (国外)

25. "Report on the dengue situation in Vietnam." (Oral) Le Thi Quynh Mai. e-ASIA JRP Dengue Project Kickoff Meeting, Ryoujyun Hall (Nagasaki University), 09 May 2014 (国外)
26. "Changing Pattern of DENV Serotypes in Vietnam." (Poster) 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. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections. Sendai International Center. 20-22, Jan. 2014. (国外)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「ベトナムにおけるデング熱、ジカ熱、日本脳炎の現状」、長谷部太、「蚊を知ることで快適なベトナム生活」、比嘉由紀子、実習1:「吸虫管を作ってみよう! オスとメスを分けてみよう!」、実習2:「幼虫と蛹を分けてみよう! 顕微鏡で蚊の種類を分けてみよう!」、角田隆、第9回長崎大学ハノイ公開講座 「蚊と蚊がもたらす病気について知ろう」 ベトナム在住邦人家族向け長崎大学熱帯医学研究所・ベトナム研究拠点 平成29年3月5日、国外。
2. 「デングウイルスとデング熱」、長谷部太、平成26年度新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究推進事業シンポジウムプログラム「感染症は一国の問題ではない ～エボラ出血熱、デング熱を例として～」ホテル椿山荘東京ジュピターホール シンポジスト 平成27年2月16日、国内。
3. 「デング熱/デング出血熱とは」Dengue Fever/Dengue Hemorrhagic Fever (DF/DHF)、長谷部太、「緊急開催!!デング熱の脅威」 大下財団主催 ANA クラウンプラザホテル広島【広島市中区中町】 平成26年11月13日 招待講演、国内。

(4) 特許出願

無し