

日本熱帯医学会雑誌

第27巻 第3号 平成11年9月

内 容

総 説

抗 Dengue ワクチン：歴史と展望

堀田 進397-415

原 著

新しい迅速検査法である Determine™ Malaria Pf と、標準顕微鏡法、ICT Malaria P. f™, ParaSight™F との比較評価 (英文)

Dorina G. Bustos, Remigio M. Olveda, 根岸 昌功, 栗村 敬417-425

パラグアイ国から分離された *Trypanosoma cruzi* 株の DNA 多形性に関する比較研究 (英文)

馬場さゆみ, 松本 珠美, 神原 廣二, 坂本 信, Marisel Maldonado, Antonieta Rojas de Arias, 佐谷 秀行, 三森 龍之427-431

インドネシア, スラバヤ地区における小児下痢症からの腸管病原菌分離頻度：
病院における5年間の推移 (英文)

Eddy Bagus Wasito, Pitono Soeparto, Subijanto Marto Soedarmo, Liek Sunarni Djupri, Lindawati Alimsardjono, Dadik Rahardjo, 片岡 陳正, 仲宗根 昇433-436

1999年度日本熱帯医学会会員名簿437-459

会報・記録

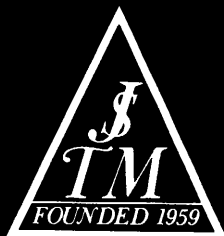
理事会記録461-462

1999年度日本熱帯医学会役員名簿463

雑誌編集委員名簿464-465

投稿規定466-468

著作権複写に関する注意469



総説

抗 Dengue ワクチン：歴史と展望

堀田 進

1999年5月10日受付/1999年5月17日受理

序 言

Dengue 熱 (以下 DEN と略記) は, すでに数世紀以前から存在していたと推定されるが, 20世紀に入ってその発生が世界的規模で拡大した。特に, 第二次世界大戦中, その主戦場の一つであった東南アジア, 西太平洋地区で猛威を振り, 日本内地もその余波を受けて, 史上稀にみる大流行を来したことは, 今なお記憶に新しい。戦後, 本病は一時減少の傾向を示したが, その後1960-1970年代以降再び爆発の兆しを見せはじめた。数万, 数十万, 時には百万以上の患者を出す流行 (公的記録による) が決して稀ではない。調査から洩れた患者などを考えれば, 年間の全世界の患者数は1億に達する場合すらあり得ると推定されている (Halstead, 1988; Monath, 1994)。

DEN の病原体がウイルスであることは Ashburn and Craig (1907) により証明され, また, *Aedes* に属する蚊によって媒介されることは, 多くの研究者によって確定された (Hotta, 1969; Schlesinger, 1977)。従って, 本病制圧の要点が媒介蚊の駆除とワクチンの開発にあることは, ほとんど常識と言ってよい。前者はかつて最も直接的かつ確実な手段と見なされたが, 現在のところ実施上大きな困難に直面している。その理由は, 殺虫剤の広範囲の使用は, 必然的に薬剤耐性蚊の出現をもたらすと共に, 環境汚染をひき起こす恐れがあるからである。殺虫剤の撒布のみによって媒介蚊の撲滅を企図することには, 疑問を呈する研究者が少なくない (Gubler, 1993)。ただし, 殺虫剤を浸み込ませた mesh net を住居の戸口や窓に張る方法が, 防蚊上有効であると主張されている (Igarashi, 1997)。

一方, 抗 DEN ワクチン開発の研究は, ウイルス病因説の確定の後, 比較的早い時期から開始され, 既に長い歴史を経ている。ワクチンが, 本病制圧に必要な不可欠の手段の一つであることには, 理論上も異論がない。それにもかかわらず, 種々の試みは概ね実験室内の段階に止まっており, 人体に確実に有効無害と見なされるワクチンの実用化は, 未だ達成されていない。しかし, 研究の努力は絶えることなく続けられてきたし, 現在も続けられている。本論文では, その経過をふりかえって, これを将来の希望につなげたいと思う。記述に当たっては, 最近の研究成果の他に,

あえて古い年代の研究実例をも紹介し, 一つの大きな流れを辿ることを試みた。

ちなみに, 第二次大戦中に Dengue ウイルス (以下 DENV と略記) のマウス伝達が成功し, ついで組織培養によるウイルス培養も可能となり, ワクチン研究も新しい段階に入った。さらに分子生物学や分子遺伝学の進歩が加わって, 今日に至っている。よって以下ワクチン研究の経緯を, (A) 「大戦前」と (B) 「大戦中および大戦後」の二時期に大別して論じることとする。また, ワクチンには, (I) 有毒ウイルス株を不活化した「死ワクチン」と, (II) 無毒化ないし弱毒化したウイルス株による「生ワクチン」との2種類があることは周知の通りであり, 本論文でもこの区分に従って考察を進める。

(A) 「第二次世界大戦前」の研究

A. I. 「死ワクチン」の研究

供試されたウイルス素材は, 有熱期の患者血液, 感染サルの臓器 (サルが DENV に感染することは, 比較的早くから知られていた; Blanc *et al.*, 1929a), および感染蚊体等であった。いずれも, 活性ウイルスを含有すると考えられるものである。

A. I. a. 「胆汁ワクチン」

DEN ワクチンの人体適用に関する世界最初の学術論文は, おそらく Blanc and Caminopetros (1929b, 1930) のそれであろう。彼らは, 有熱期患者血清をウシの胆汁で処理したものを, ワクチンとして用いた。予備実験において, 胆汁と血液との混合比率を 1:15 (胆汁濃度 7%) とすると, ウイルス活性 (人体感染性) は完全に失われたが, 混合比率を 1:20 (胆汁濃度 5%) とすると, ウイルス活性が少し残存し, 被検者の一部がワクチン注射自体によって軽度に発症した。この成績に基づいて, 人体にまず「1:15 ワクチン」を与え, 適当な時期を置いて「1:20 ワクチン」を与えると, 被検者に異常な症状を起さしめないで,

しかも強い免疫（有毒ウイルスに対する感染防御能）を生ぜしめたと唱えた。

A. I. b. 「乾燥血ワクチン」および「蚊体ワクチン」

Simmons *et al.* (1931) は、フィリピンにおいて「乾燥血ワクチン」(desiccated blood vaccine) と「蚊体ワクチン」(mosquito vaccine) を試みた。

乾燥血ワクチンは、有熱期患者血清をガラス管内に封じ、18°C に静置、乾固させ、一定期間後に生理食塩水で溶解したものである。完全に人体感染性を失った材料0.5 ml ないし1.0 ml を被検者に注射し、8 ないし18日後に有毒蚊をもって攻撃した。しかし、全員定型的に発症し、本ワクチンは無効と判定された。

蚊体ワクチンは、下記のごとく作製された。蚊 (*Aedes aegypti*) に患者を刺咬させ、一定潜伏期の後、ウイルスが充分増殖したと思われる蚊体を集め、食塩水を加え磨潰、フェノールとホルマリンを加えて48時間静置の後、遠沈して上清をとる。食塩水をもって適宜に希釈、フェノールとホルマリンの最終濃度をそれぞれ0.4%および0.1%とし、ワクチン1 ml 当たり約50蚊体の成分を含むように調整された。ワクチンの1回注射、2回注射（8 ないし10日間隔）、3回注射（9 ないし12日間隔）のグループ、また、蚊体ワクチン・乾燥血ワクチン併用（両者の間隔は10日）のグループを置いた（各回、ワクチン1 ml、皮下注射）。しかし、供試の全例において、有毒ウイルスの攻撃に対する防御能は全く認められず、無効と判定された。

ちなみに、発疹チフスに対して「血液ワクチン」と、「シラミ・ワクチン」が試みられたことがある。前者は、患者血液を58°C、30分加熱したもの。後者は、リケッチア感染シラミの腸内容を磨潰して乳剤とし、ホルマリン不活化したものである。いずれも、人体に感染防御能を与えることを実験的に確かめた後、実際に野外で使用して有効であったと主張されている。同様に、ロッキー山紅斑熱に対して「ダニ・ワクチン」（感染ダニの乳剤に、ホルマリンを加えて不活化したもの）も有効であったという報告がある (Weigl, 1920; Manson-Bahr, 1935, 1964)。

現在リケッチア疾患に対しては、孵化鶏卵卵黄嚢内で発育したリケッチアから作製した不活化ワクチンが実用化されており、シラミあるいはダニ・ワクチンは、全く過去のものとなった。しかし、患者血液あるいは媒介節足動物を素材とするワクチンという共通の発想があったことは、歴史的に興味ある事実と思われる。

A. I. c. 「サル肝ワクチン」

St. John and Holt (1931) は、「サル肝ワクチン」の効果調べた。患者血液を接種されて感染したサル (*Macacus philippinensis*) の肝を採集し、その乳剤にホルマリンを加

えてウイルスを不活化した。しかし、これも人体において全く感染防御能を示さないという結果になり、その後の検討は放棄されている。

A. II. 「生ワクチン」の研究

古来、微生物の変異株を得る目的のために、(1) 特定宿主での継代通過、あるいは(2) 放射線の照射という手段がとられている。この方法によって、抗 DEN 生ワクチンを作製しようとする試みがなされた。

A. II. a.

Cleland *et al.* (1919) は、患者血液を健常人に注射し、発症した場合の血液をさらに次の健常人に注射するという「ヒト→ヒト通過」を行った。しかし、ウイルスの毒力に変化は見られず、ワクチン株樹立は成功しなかった。その後、第二次世界大戦中に、緒方、吉井 (1943) は同様の試みをしたが、その成績は Cleland のそれに異なるところはなかった。

A. II. b.

Siler *et al.* (1926) は、上記の方法をやや改変して、「ヒト→蚊→ヒト→蚊通過」を行ったが、これによってもウイルスの毒力に変化は認められなかった。

A. II. c.

Simmons *et al.* (1931) は、「蚊→蚊通過」の実験を行った。患者血液を吸引後7日以上を経過させて、完全に感染力を帯びた *Ae. aegypti* を磨潰、健常人血を加えて乳剤とし、これを次の蚊に吸引させて帯毒させる。かようにして、順次蚊通過のウイルス株を得た。しかし、このウイルスもその感染力に変化がなかった。ただし、彼らの記載によれば、蚊通過ウイルスで感染した患者の症状は、通常の感染の症状よりも軽症の例があった。換言すれば、一見ウイルス毒力の減弱とみなし得る傾向が認められた。しかしその後この種の実験を続行して、ワクチン株の獲得を目指したことは報告されていない。

A. II. d.

Holt とその共同研究者 (1931a, b) は、帯毒した蚊に X 線あるいは紫外線を照射した後にヒトを刺咬させたが、その感染力に全く変化は認められなかったと報告した。

表1 「第二次世界大戦前」になされた抗デング・ワクチン研究のまとめ

(I) 各種素材を用いた「死ワクチン」の効果判定実験			
素材と作製法	評価方法	感染防御成立の有無	文献
有熱期患者血清 ウシ胆汁処理	ヒト接種	+	Blanc and Caminopetros (1929b, 1930)
有熱期患者血清 乾燥処理	ヒト接種	-	Simmons <i>et al.</i> (1931)
感染蚊乳剤 フェノール・ホルマリン処理	ヒト接種	-	Simmons <i>et al.</i> (1931)
感染サル肝乳剤 ホルマリン処理	ヒト接種	-	St. John and Holt (1931)
(II) 無毒（ないし弱毒）変異株獲得の試み			
方法	評価方法	無毒化の可否	文献
ヒト→ヒト通過	ヒト接種	-	Cleland <i>et al.</i> (1919) 緒方, 吉井 (1943)
ヒト→蚊→ヒト→蚊通過	ヒト接種	-	Siler <i>et al.</i> (1926)
蚊→蚊通過	ヒト接種	-	Simmons <i>et al.</i> (1931)
感染蚊のX線または紫外線照射	ヒト接種	-	Holt <i>et al.</i> (1931a, b)

ここに紹介した研究は、すべて人体接種実験に基づいたものである。また、供試材料中に含まれるウイルスの性状や、濃度も明確にされていない。現代のウイルス学から見れば、不完全な実験といわざるを得ないかも知れない。しかし、全く無意味であったかと言えば、必ずしもそうとは断定出来ないであろう。「死ワクチン」にしる、「生ワクチン」にしる、何か有効なものを見出そうとして苦闘した先人の努力は、歴史上一つの意義ある段階を形づくったと考えるべきである。

唯一「胆汁ワクチン」が、若干の陽性成績を収めている。これは、後にマウス伝達ウイルスを用いた実験においても、ある程度の有効性が認められた（後述）。

ちなみに、この研究は偶然に意外な方向に進展した。胆汁は脂質溶解作用を有するので、脂質溶解物質のDENVに及ぼす作用を検討しようという発想が生まれたのである。その結果、エチルエーテル (Hotta and Evans, 1956c), deoxycholate (Theiler, 1957), リパーゼ (Takehara and Hotta, 1961) が、いずれもDENVの感染性を失わせることが明らかになった。同様のことが、日本脳炎(JE), 黄熱(YF)などの *Flavivirus*, ならびにウマ脳炎ウイルス (*Alphavirus*) についても認められた (Takehara and Hotta 1961)。さらに、³²PでラベルされたDENVを分画することにより、ウイルス粒子に脂質の存在することが確実に証明された (Stevens and Schlesinger, 1965)。この場合、脂質分画にとり込まれる³²P量はウイルスの赤血球凝集価に対し、コンスタントであることが示されている。またJEVがリパーゼ処理されると、その抗原性(抗体産生能)が減弱することも知られた(徳地, 1961)。これらの成績は、ワクチン開発という当初の研究目的からは外れたが、ウイルス

の基礎的構造の一端を解明することにつながったもので、いささか興味あることと思われた。

「第二次大戦前」のDENワクチン研究成果をまとめてみると、表1のごとくになる。

(B) 「第二次世界大戦中および大戦後」の研究

第二次大戦中にDENVのマウスへの感染が成功し、ついで組織培養によるウイルス培養が達成されたので、ワクチンの研究も新しい段階に入った。

B. I. 「死ワクチン」の研究

B. I. a. 「ホルマリン・ワクチン」

DENVがマウス接種によって分離されてから(木村, 堀田, 1943, 1944a), 直ちにワクチンの研究が開始され、まず、ホルマリン・ワクチンが試みられた(木村, 堀田, 1944b, c; 堀田, 1947a; Hotta, 1954)。

ウイルス浮遊液(感染マウス脳のTyrode液添加10%乳剤を, 3,000 rpm, 10分遠心の上清)に、ホルマリンを0.4%および0.2%の割合に加えてウイルスを不活化した。マウスにまず「0.4%ワクチン」, その5日後に「0.2%ワクチン」をそれぞれ0.1 ml 宛皮下注射し、第2回注射の10日後に、強毒ウイルスの脳内注射により攻撃を行った。かような条件において、ワクチン接種群マウスは、対照マウス群に比べ、有意の死亡率の低下、死期(生存期間)の延長を示し、こ

のワクチンは感染防御上有効であると判定された。

この方式が人体に適用された (0.4%ワクチン, 0.2%ワクチン共に0.5 ml を皮内注射)。しかし, 被検者の抗体産生は極めて微弱で, 有効な感染防御能が与えられたとは到底考えられなかった。すなわち, 上記の条件による限り, このワクチンはマウスでは有効であったが, ヒトでは有効でなかったと判定された。

これとは全く独立に, アメリカの Sabin らは, マウス接種により DENV を分離し, そのハワイ株ウイルスによるホルマリン・ワクチンを人体に試みたが, 感染防御効果は得られなかったと報告した (Sabin and Schlesinger, 1945; Sabin, 1948, 1950, 1952, 1955)。

かようなマウス・ヒト間の成績の不一致の理由は, 明らかでない。考え得られる可能性として, 異種動物間の免疫反応の差異があるかも知れない。しかし, むしろ単純に, 投与ワクチンの量的差異によると考えるのが妥当ではなからうか。ヒトに与えられた抗原の相対的な量 (対体重比) が, マウスに与えられたそれよりも格段に少なかったため, 誘発された免疫の程度が弱かったと説明することが可能である。言い換えれば, 充分高濃度の抗原が与えられれば, ヒトにおいても十分な免疫が成立するであろうと推定された。よって, 濃縮された抗原材料を用いた実験が, 新たに試みられた。

Fujita *et al.* (1976) は, 感染マウス脳乳剤を硫酸プロタミン処理後, 蔗糖密度勾配遠心 (100,000 g/90 min) によって得られた高力価の赤血球凝集能を有する component が不活化されても, なおウサギおよびサルにおいて (静脈内注射による), 抗体産生 (中和および赤血球凝集抑制) をもたらすことを示した。

Mori *et al.* (1986) は, 感染マウス脳乳剤を硫酸プロタミン処理, ホルマリン不活化, 活性炭処理, 59,000 g/6 hr 遠心の操作によって精製されたウイルスが, マウスに良好な抗体産生を促すことを示した (ワクチン作製の方法および効果判定の基準等は, すべて現行の JE ワクチンのそれに従っている)。彼らは, DENV の 4 種の血清型の代表株を用いて, 1 価 (monovalent), 2 価 (bivalent), 3 価 (trivalent), および, 4 価 (tetraivalent) のワクチンを作り, おのおのについて各型ウイルスに対する反応を定量的に比較検討している。

これらのグループのいずれにおいても, ヒトにおける感染防御効果は調べられていないが, 上記動物における抗体産生の程度, あるいは感染防御能の発現, 並びに JE ワクチンの実際の効果から類推して, おのおの「ワクチン」はヒトにおいても, 相当程度の効果を発揮するであろうことが示唆された。抗 DEN 「死ワクチン」も, あながち悲観的な結論のみを下すべきではなからうと考えられる。

B. I. b. 「胆汁ワクチン」

ホルマリン・ワクチンの初期の実際に併行して, 「胆汁ワ

クチン」の効果が検討された (木村, 堀田, 1944b, c; 堀田, 1947a; Hotta, 1954)。Blanc and Caminopetros (1929b, 1930) の記載に準じて, マウス継代ウイルスをウシ胆汁で処理した「1:15ワクチン」と「1:20ワクチン」が作製され, ヒトに第1回に「1:15ワクチン」, 第2回(10日後)に「1:20ワクチン」をそれぞれ0.5 ml 宛皮内注射した。第2回注射の3-6週後に, 被検者の血中にウイルス中和抗体が出現した。この時期に有毒ウイルス(有熱期患者血清)を皮内注射すると, 感染防御効果が認められた。すなわち, 「胆汁ワクチン」は人体に一定度の予防効果を与えると判定された。ただし, 被検者の一人が「ワクチン」そのものの注射後に, 軽度ながら DEN 様症状を発したので, これはおそらく, ウイルスの不活化が不十分で, 残存した活性ウイルスによって, 感染がひき起こされたためではなからうかと推定された。

この成績に関し, 次のような説明が可能であるかも知れない。胆汁の作用によって完全に不活化されず, ながしかの程度の活性 (人体感染性) を保有しているようなウイルスが, ワクチンとして有効であったのではないか。言い換えれば, 生死の中間の微妙な状態にあるウイルスが, 有効性を発揮したのではないかという考察が可能であった。「胆汁ワクチン」に関して, 以後追試や再試はなされていない。

マウス伝達ウイルスを用いた「死ワクチン」研究の成績は, 表2にまとめられる。

B. II. 「生ワクチン」の研究

B. II. a.

DENV をマウス脳内接種により連続継代している間に, 一種の変異株が得られた。このウイルスを活性のまま健康人に接種 (皮内または皮下注射) すると, 異常な症状を全く呈しないで, その後に強い免疫が成立した。この免疫は, 明瞭な抗体産生 (中和, 赤血球凝集抑制, 補体結合), および強毒ウイルスの攻撃に対する感染防御として示される。すなわち, 「生ワクチン」として用いられる可能性が提供されたのである。

第二次世界大戦中に, 日本とアメリカで殆ど同じ研究成績が独立的に得られた (木村, 堀田, 1944d; 堀田, 1947b, c, Hotta, 1952, 1969; Sabin and Schlesinger, 1945; Sabin, 1948, 1950, 1952, 1955; Schlesinger, 1977)。最も典型的かつ異論のない成績をもたらしたウイルス株は, 日本の長崎で分離された望月株 (Mochizuki strain) と, ハワイで採取されたハワイ株 (Hawaiian strain) である。現在の知見によれば, いずれも 1 型に属する。その後 Schlesinger *et al.* (1956) は, ニューギニアで分離された 2 型ウイルス・ニューギニア株のマウス通過によって, 同様な弱毒変異株を樹立した。

これらの研究は, 当初もっぱら実験室内で限られた人数

表2 「第二次世界大戦中および大戦後」になされた抗 Dengue ワクチン研究のまとめ
(I): 死ワクチンの研究

マウス脳通過ウイルスを用いた「死ワクチン」の効果判定実験			
素材と処理法	評価方法 ⁽¹⁾	効果	文献
感染マウス脳乳剤 ホルマリン不活化	マウス (C) ヒト (S)	+ -	木村, 堀田 (1944b) 木村, 堀田 (1944c); 堀田 (1947a); Hotta (1954)
感染マウス脳乳剤 ウシ胆汁不活化	マウス (C) ヒト (C)	- + ⁽²⁾	木村, 堀田 (1944b) 木村, 堀田 (1944c); 堀田 (1947a); Hotta (1954)
感染マウス脳乳剤 ホルマリン不活化	ヒト (C)	-	Sabin and Schlesinger (1945)
感染マウス脳乳剤 蔗糖密度勾配遠心分画	サル (S)	+	Fujita <i>et al.</i> (1976)
感染マウス脳乳剤 ホルマリン不活化 活性炭処理 超遠心沈渣	マウス (S)	+	Mori <i>et al.</i> (1986)

(註)(1) C (Challenge): 強毒ウイルスの攻撃に対する感染防御。

S (Serology): 抗 Dengue 抗体の産生。

(2) 被検者のうち、ワクチン接種後に軽度の発熱をきたした例があった。胆汁によるウイルスの不活化が、不完全なためではなかったかと推定された。

の特志者を求めて行われたが、その後、野外での応用も試みられた。Wissemann と共同研究者は Sabin-Schlesinger のハワイ株から出発して新しい亜株 (MD-1 と命名された) を分離し、これを Puerto Rico での DEN 流行 (1963) に際し住民に接種したところ、流行を頓挫的に終息させる効果があったと報告した (Wissemann *et al.*, 1963; Wissemann, 1966; Bellanti *et al.*, 1966)。興味あることは、この Puerto Rico の流行では 3 型ウイルスが主役を演じたのだが (別になされた疫学調査から判明)、そうであるならば、1 型ハワイ株由来のワクチンが 3 型の流行にも有効であったと考えられるわけである。この点は、DENV の血清型間の交差反応や二次感染・三次感染の問題ともからめて、さらに追求検討する必要がある。

B. II. b.

DENV が *in vitro* の培養細胞で増殖可能ということが判明したので (Hotta and Evans, 1956a, b; Hotta, 1959)、組織培養されたウイルスを用いての「生ワクチン」の実験が開始された。組織培養液はマウス脳乳剤にくらべて、不純物混入度が格段に低いこと、また DENV に関する限り、感染培養液と感染脳乳剤の、それぞれの単位体積当たりウイルス濃度に大きな差異がないことなどから、組織培養ワクチンがより優れていることは明らかである。

既にマウス通過によってヒト無毒化した望月株ウイルスを素材とし、サル腎、ハムスター腎、イヌ腎などの培養の感染培養液が供試された (Hotta, 1957; Hotta *et al.*, 1966;

Fujita *et al.*, 1969, 1972)。結論として、培養されたウイルスもよく免疫原性を保持しており、マウス、サル、ヒトなどにおいて良好な抗体産生をもたらし、あるいは、感染防御効果を与えた。この場合、黄熱ワクチン (17D 株) との combined immunization も可能であった。また、ワクチンを接種されたサルの組織を採って培養し、その培養液中に出現する抗体を調べると、肺、肝、脾、リンパ腺などの組織が良好な抗体産生を行っていることが認められた。これらの組織は、リンパ球・マクロファージ系の細胞を豊富に持っていることが知られており、恐らくそれらの細胞が抗体産生に主として関与したのであろうと推定された。無毒株ウイルスが、培養細胞通過によって毒力を回復するか否かについては、一定期間の観察に関する限り、その恐れは認められなかった。よって組織培養された無毒化 DENV を生ワクチン材料として使用することは、原則的に充分合理的であると判定された。

この段階までの「生ワクチン」研究の成績は、表 3 にまとめられる。

(C) 細胞培養通過による変異株ウイルス獲得の試み

C. a.

上述の研究は、マウス通過によってヒトに完全に無毒化した変異株ウイルスを用いたものであった。これに対し、マウスに一旦伝達されたが、その継代数が比較的少なく、ヒトに感染性をなお保有するウイルスから、細胞培養通過

によってより好適なワクチン株を得ようとする試みがなされた。その目的は、マウス脳通過によって発現し得る神経毒性 (neurovirulence) の危険性、および既知、あるいは未知のウイルスの迷入の恐れを、可及的除去しようとするにある。

C. a. 1.

Beasley *et al.* (1960, 1964) は、2型 Trinidad 1751株ウイルスをKB細胞培養に継代培養することによって、培養細胞での増殖能は不変であるにもかかわらず、マウスに対する病原性が著明に低下したことを観察した。しかし、これをワクチンとして用いる実験は報告されていない。

C. a. 2.

Price *et al.* (1973a, b; 1974) は、2型ニューギニアC株ウイルスを、アフリカミドリザル腎細胞を通過させて無毒化変異株を得た。この株と、近縁フラビウイルスの無毒株 (17D 黄熱ワクチン株あるいは Langat E5 株) とを組み合わせて、連続免疫処理 (sequential immunization procedure) を施すと、はなはだ優秀な免疫効果が得られると報告した。実験動物としては、各種のサル、すなわち spider monkey (*Ateles geoffroyi*), squirrel monkey (*Saimiri sciureus*), cynomolgus monkey (*M. philippinensis*), rhesus monkey (*M. mulatta*), チンパンジーなどが用いられた。

ウイルスから出発して、初代ハムスター腎細胞培養により、温度感受性 (temperature-sensitivity; ts) を指標として変異株を選択した。この株は親株ウイルスに比べて、マウスあるいはハムスターでの脳内致死率の低下、rhesus monkey でのウイルス血症 (viremia) の消失を来し、しかもサルに極めて良好な抗体産生を促した。ちなみに、この研究においては、使用細胞培養の培養液に5-azacytidine が添加され、変異効率の促進が企図されている。

C. a. 3.

Tarr and Lubiniecki (1975, 1976) は、2型 TH-36 株ウイルスから出発して、初代ハムスター腎細胞培養により、温度感受性 (temperature-sensitivity; ts) を指標として変異株を選択した。この株は親株ウイルスに比べて、マウスあるいはハムスターでの脳内致死率の低下、rhesus monkey でのウイルス血症 (viremia) の消失を来し、しかもサルに極めて良好な抗体産生を促した。ちなみに、この研究においては、使用細胞培養の培養液に5-azacytidine が添加され、変異効率の促進が企図されている。

C. b.

上記の研究では、その出発材料はいずれもマウス脳通過を経たウイルスであった。従って、マウス通過世代数の多少にかかわらず、神経毒性の発現や他種ウイルス迷入の可能性は、不可避ではないかという異論が起り得た。よって、患者血液から出発して細胞培養に直接伝達して、変異株ウイルスを得ようとする研究が行われた。

表3 「第二次世界大戦中および大戦後」になされた抗デング・ワクチン研究のまとめ
(II): 生ワクチンの研究

マウス脳通過無毒化ウイルスおよびその組織培養伝達ウイルスを用いた「生ワクチン」の効果判定実験			
材料	ウイルスの型	評価方法と効果 ⁽¹⁾	文献
感染マウス脳乳剤	1	ヒトC(+), S(+)	木村, 堀田 (1944d) 堀田 (1947b, c) Hotta (1952, 1969)
感染マウス脳乳剤	1	ヒトC(+), S(+)	Sabin and Schlesinger (1945) Sabin (1950, 1952, 1955) Schlesinger <i>et al.</i> (1956) ⁽²⁾
感染マウス脳乳剤	2	ヒトS(+)	
感染マウス脳乳剤	1	ヒトF(+)	Wisseman <i>et al.</i> (1963) Wisseman (1966) Bellanti <i>et al.</i> (1966)
細胞培養液 サル (<i>Macacus mulatta</i> または <i>M. fuscatus</i>) 腎初代培養	1	マウスC(+) サルS(+) ヒトS(+)	Hotta (1957) Hotta <i>et al.</i> (1966)
細胞培養液 サル (<i>M. mulatta</i>)腎ま たはイヌ腎初代培養	1	ヒトS(+)	Fujita <i>et al.</i> (1969, 1972) ⁽²⁾

- (1) C (Challenge): 強毒ウイルスの攻撃に対する感染防御。
S (Serology): 抗デング抗体の産生 (中和抗体, 赤血球凝集抑制抗体)。
F (Field): 野外において流行を抑制。
(2) 17D 黄熱ワクチンとの混合免疫例を含む。

C. b. 1.

Walter Reed 陸軍医学研究所, CDC, ハワイ大学, メリーランド大学, コロラド州立大学などを含めたアメリカ・グループは, 上記の線に沿った広範な研究を進めた (Eckels *et al.*, 1976, 1980, 1984; Scott *et al.*, 1980, 1983; Bancroft *et al.*, 1982a, b, 1984; Miller *et al.*, 1982; Halstead *et al.*, 1981, 1984a-d; Innis *et al.*, 1988; Marchette *et al.*, 1990; Hoke *et al.*, 1990; Schoepp *et al.*, 1991; Edelman *et al.*, 1994)。

培養細胞としては, アフリカミドリザル腎, ビーグル犬腎の初代培養, rhesus monkey 胎児肺細胞 (diploid 株) などが用いられた。これに患者血液が接種され, 継代実験が行われた。変異株ウイルス選択に当たっては ts, 小型プラク形成 (small plaque formation) (Innis *et al.*, 1988) を主要なマーカーとし, その他に, ヒト単核球培養における増殖の可否 (Halstead *et al.*, 1981), 被接種サルにおける 50%感染価 (ID₅₀) の減少, 及びその viremia 出現の有無 (Innis *et al.*, 1988), 媒介蚊 (*Ae. aegypti*) 体内での増殖の有無 (Miller *et al.*, 1982), などが参考にされた。

最終的にはヒトに接種されて, DEN 症状発現の有無, 抗体産生の状況が調べられた。また, 黄熱17D ワクチンとの混合免疫 (combined immunization) も併せ試みられた。被検者は, 陸軍兵士を含め全員健康成人であった。すべての実験において, プラセボ接種対照群を置き, 二重盲検方式を採用している。

上記マーカーに適合したと見なされる変異株ウイルスが, いくつか得られた。これを被検者に接種 (多くの場合, 皮下注射) してみると, いずれも良好な抗体産生をひき起こした。この場合, DEN・黄熱併用免疫群の抗体産生度が, DEN 単独免疫群のそれよりも優れていることが証明された。これは, 前述の Price *et al.* の成績 (C.a.2. の項参照) と軌を一にするものであろう。

しかし, 被検者において「ワクチン」接種後に軽度ではあるが, DEN 症状 (発熱, 発疹, 白血球減少等) を発するものが観察された。変異株ウイルス自体は, これをマウスに「戻し接種」すると, 比較的容易に親株への復帰 (reversion) を来した例があった。

このように, なお解決の困難な問題点が横たわっているが, 研究の着眼点そのものは, 現在のウイルス学からみて決して誤っていないので, さらに検討を進めて, 成功に到達することを望みたい。

C. b. 2.

タイ国の Natth Bhamarapravati のグループは, アメリカ・グループの一部の協力を得て, 上記と同様の発想に基づいて変異株ウイルスの獲得を試みた。培養細胞にはアフリカミドリザル腎, あるいはイヌ腎の初代培養が用いられ, 変異株選択の主要マーカーとして ts と small plaque を採用し, その他に, マウス神経毒性の低下, サル viremia の

消失などを参考条件としている。DENV の 4 種の血清型のすべてについて変異株を追求し, 4 価ワクチン (tetraivalent vaccine) の作製を目指している (Yoksan *et al.*, 1986; Bhamarapravati *et al.*, 1987; Bhamarapravati and Yoksan, 1989, 1990; Yoksan and Bhamarapravati, 1990; Bhamarapravati and Yoksan, 1993; Vaughn *et al.*, 1996)。

この場合にも, 変異株を接種された被検者に, 軽度ながら発熱, 白血球減少症などの DEN 症状が観察された。しかし彼らは, この程度の副作用は臨床上許容し得るもの (tolerable) と見なし, 「ワクチン」使用に対し致命的な欠陥にはならないと主張している。この立場に立って, タイ政府の認可の下にこれをタイの小児に与え, 現在 Phase II ないし Phase III の実験が進められつつある由である。野外でも十分に有効, かつ無害であるか否かの最終的結論には, しばらく時日を仮す必要があるであろう。

上に述べた細胞培養通過による変異株ウイルス獲得の試みは, 表 4 にまとめられる。

DEN ワクチン研究の歴史の小括

以上 DEN ワクチン研究の流れを, かなり古くに溯って概観した。このように, DEN ワクチンはかなり長い研究の歴史を有するにもかかわらず, 現在なお実用化の段階には至っていない。ウイルス疾患のワクチンについては, 種痘や狂犬病ワクチンのごとき歴史的な成果に引き続いて, 既にくいつかの成功例が示されている。特に第二次世界大戦後において, ポリオ, 麻疹, 風疹などの生ワクチンが世界的な規模で実用化されており, 死ワクチンとしても, B 型肝炎, 日本脳炎に対するそれが国際的な評価を得て適用範囲が広まりつつある。このように見てくると, DEN の流行が世界的に拡大しつつある現状にもかかわらず, ワクチンが今なお完成の域に達しないことは, 誠に残念と言うほかない。タイ国での試みが希望を持たしめられるが, その完成には, なおしばらくの時を要すると予想される。

このように, DEN ワクチンの開発には大きな困難が立ちだかっているが, しかしそれにはそれなりの理由があるのであって, 以下にその問題点のいくつかを列挙して見たいと思う。

DEN ワクチン開発の問題点

(1) まず, 本質的な問題点として, DENV には 4 種の異った型 (1-4 型) が存在する事実がある。これらの型は相互に cross-seroreactive であるが, non-cross-immunogenic であると言われる。すなわち, 各型のウイルスは血清反応の上では交差するけれども, 感染防御の上では無関係である。従って, ある型の DEN に感染して回復しても, 感染防御はその型に対してのみ成立し, 他の型には及ばない。実際臨床的に, 同一個体が DEN の複数回感染を被ることは古くから観察されており, そのために, DEN には

表4 細胞培養通過によるデング・ウイルス変異株獲得の試みとその効果判定実験

出発材料	使用細胞	文 献
感染マウス脳乳剤 (未変異ウイルス)	KB 細胞	Beasley <i>et al.</i> (1960, 1964)
感染マウス脳乳剤 (未変異ウイルス)	アフリカミドリザル腎 初代培養	Price <i>et al.</i> (1973a, b, 1974) ⁽¹⁾
感染マウス脳乳剤 (未変異ウイルス)	ハムスター腎 初代培養	Tarr and Lubiniecki (1975, 1976) ⁽²⁾
患者血清	アフリカミドリザル腎ま たはビーグル犬腎の初代 培養, または rhesus monkey 胎児肺細胞 (di- ploid 株)	Eckels <i>et al.</i> (1976, 1980, 1984) Scott <i>et al.</i> (1980, 1983) Bancroft <i>et al.</i> (1982a, b, 1984) Halstead <i>et al.</i> (1984a-d) その他本文中に引用の文献参照
患者血清	アフリカミドリザル腎ま たはイヌ腎の初代培養	Bhamarapavati <i>et al.</i> (1987) Yoksan and Bhamarapavati (1990) Bhamarapavati and Yoksan (1993) その他本文中に引用の文献参照

(註)(1) 黄熱ワクチン, その他数種のフラビウイルス変異株との組合せ免疫。

(2) 変異の促進を企図するため, 細胞培養液に5-azacytidine が添加された。

感染後免疫が成立しないのではないかとの説が, 一時信じられたほどであった。要するに, DEN ワクチンには4種類を揃えねばならないが, これは実際上は必ずしも容易なことではない。

(2) 次に, DEN には immune enhancement という特異な事象が著明に認められる。例えば, 1型 DEN に感染回復した後に2型の感染を受けると, その症状が初感染のそれよりも重くなるという例が少なからず起こる。DEN の重症型である「デング出血熱・ショック症候群」(DHF/DSS) は, 初感染例よりも二次感染例に多く見られるという臨床疫学的事実が, その裏付けの一つとなっている。1981年のキューバでの流行で, この現象が顕著に観察されたと言われている。

このことは, 実験的にも証明される。例えば, 2型 DENV を感染させた細胞培養に抗1型血清, あるいは, 中和反応を示さない程度の濃度にまで希釈された (subneutralizing) 抗2型血清を加えると, 2型ウイルスの産生が増大するという事実が認められる。この点から推理すると, 一つの型のワクチンのみを与えて, それに対する抗体が産生された後に, 他の型のウイルスの感染を被ると, かえって重篤な症状を発する恐れがあるということになる。従って, DEN ワクチンは必ず4種の型の全部を包含する4価ワクチン, しかもどの型に対しても, 充分強力な防御能を与えられるものでなければならないということになる。

この問題に関連して, いわゆる booster injection についても, 考慮されねばならない。仮に優秀なワクチンが作られたとしても, 多分何年か後には免疫の低下が避けられず, 従って booster が必要となるであろう。その場合, 前回注射によってなお残存する抗体が(たとえ少量であっても), 第2回目に与えられたウイルスと反応して, 一種のショック症状をひき起こす可能性は充分あり得ることである。現在

実用化されている DEN 以外のウイルスワクチンには, この恐れは実際上無いようであるが, DEN の4価ワクチンについては果してどうであろうか, 真剣な考慮と対応が求められる。ちなみに, DEN に近縁の YF については既に17D ワクチンがあるが, その効果は少なくとも6年間持続すると言われている (Dick and Smithburn, 1949)。YFV が単一血清型であることと併せて, YF の予防接種は比較的困難度が少ないと考えられ, また事実そうであったわけである。

(3) 更に, 有効無害な変異株 DENV の獲得が困難な根本的原因の一つに, DENV には確実な「毒力マーカー」(virulence marker) が知られていないという事実がある。例えば, ts マーカーはポリオウイルスについては Sabin and Lwoff (1959) 以来確認されているが, DENV については, 必ずしも確定されたとは称し難いようである。その他, small plaque マーカーやヒトリンパ球培養における増殖の有無, サルにおける viremia など提唱されているが, それらの確実性に対しては, 若干の疑問を呈する研究者もある (McKee *et al.*, 1987; Schoepp *et al.*, 1991)。また, これらのマーカーに基づいて変異したと見なされた DENV も, 比較的容易に逆変異を起こして親株に復帰することなども知られている。DENV の基礎的性状や複製過程には, ポリオウイルスなどとは異なった, 特有の事象が存在するのかも知れない。DENV の毒力マーカーについては, 更に基礎的な諸問題に立ち帰って, 根本的に究明することが必要と考えられる。

(4) もう一つ重要な点は, DEN 感染, 特にその重症型である DHF/DSS に関して厳密な意味での「動物実験モデル」が存在しないことがある。マウスが脳内注射により DENV に感染するが, その病理学的本態はヒトの DEN ないし DHF/DSS のモデルにはなり難い。いくつかの新しい

試みがなされているが(例えば、ヒトの遺伝子を組み込んだ transgenic mice の利用)、現在のところ完全なものとは考え難い。以上のことが、DEN ワクチンの開発、DEN の pathogenesis の解明などに、大きなネックとなっているのである。

今後の方策の若干

上記の問題点をふまえて、今後取るべき、ないし取る可能性のある方策のいくつかを考察してみたい。

(1) 上に述べた問題は、常に念頭に置くべき案件であろう。ただし、それらはウイルス学的に極めて基本的な事項であるから、早急には解決に向い得ないものかも知れない。従って、次善策とでも言うべきか、ベストでなくても、ベターな方策を探るのも一つの道であろうと思われる。それには、次のような事項が考えられるかも知れない。

(2) ウイルスの細胞培養を継続して、変異株を獲得しようとする場合、屢々経験されることは、継代数の少ない世代ではなおヒト感染性が保持され、継代数を重ねるにつれて次第に弱毒化が進む。しかし、ある程度以上に継代されると、ヒト病原性は消失するが、同時に免疫原性(「生ワクチン」の場合は、ごく軽度のヒト感染性)も無くなるという事実がある。言い換えれば、ワクチン材料として、最適の継代数が定まっているように思える。Edelman *et al.* (1994) は、イヌ腎初代培養において1型 DENV のある株では、約20代前後が最適ではないかと述べている。むしろ、これは細胞の種類、ウイルスの株の如何によって異なるであろうが、着眼すべき一つの点であろうと考えられる。

(3) 現在、多くの研究者の目は、もっぱら「生ワクチン」の作製に向けられている。しかし、「死ワクチン」についても、全く考慮の余地はないのであろうか。日本脳炎の「死ワクチン」の有効性が認められている以上、それに倣った方式を試みるのも、一つの方策ではなかろうか。「死ワクチン」ならば、4価ワクチンも比較的無理なく作製出来るように思われる。むしろ、その技術と費用は、日脳ワクチンに比べて格段に複雑・高価となるであろう。従って、広く一般向きではないかも知れない。しかし特殊な必要に迫られた人たち(例えば、浸淫地での長期滞在者)への適用などは、考慮されてよいのではなかろうか。もっとも、この場合にも immune enhancement の問題は、避けて通れないであろう。

(4) 免疫原性の比較的弱い変異株については、adjuvant の利用を考慮することも一方法であろうと考えられる。DEN ではないが、黄熱については、Ambrosch *et al.* (1994) は、17D 株ワクチンと *Salmonella typhi* の Vi-polysaccharide との combined vaccination が、良好な黄熱抗体の産生をもたらすと述べている。DENV にも、試みられる価値があるように思われる。

ちなみに、ある種の細菌菌体成分によって monocyte/macrophage 系の細胞の活性が、著明に増進することが既に知られている。元来生ワクチンは、「軽度の感染」をひき

起こすことによって免疫効果を得ようとするものであるから、ウイルスの感染性と免疫原性との微妙な兼ね合いを、細菌菌体成分、その他特殊な生物活性物質によって刺激促進させて、免疫効果の増大を図るという可能性は、一考に価するのではないかと考えられる。

(5) 筆者の独断を許していただけるならば、少なくとも DEN に関する限り、細胞培養によるよりも、マウス脳通過によって比較的容易かつ確実に弱毒変異株が得られるような印象を受ける。ただし、これに対しては、前述したごとくウイルスの神経毒性(neurovirulence)の発現について根本的な抵抗感がある。しかし、何らかの手段によって、特に最近の遺伝子工学的方法によって、神経毒性だけを除去することが出来ないであろうか。

Desprès *et al.* (1993) は *Ae. pseudoscutellaris* AP61 株細胞に培養された DENV-1 について、low pH 処理によって2種の mutants (BR/90 と FGA/89) を作り、両者を比較して下記の差異を認めた。(i) BP/90 は AP61 に強い CPE を来すが、FGA/89 はほとんど CPE を示さない。しかし細胞当たりのウイルス産生量は、FGA/89 が BR/90 よりも多量である。(ii) mouse-neurovirulence は、BR/90 は極めて強いが、FGA/89 は弱い。(iii) E sequence において、E96 (hydrophobic domain) が BR/90 は Phe, FGA/89 は Val, E379 (conserved region) が BR/90 は Val, FGA/89 は Ile となっている。

Guirakhoo *et al.* (1993) は、DENV-2 と *Ae. albopictus* C6/36 株細胞の組合せについて、酸性 pH 処理による mutant (AM) と塩化アンモニウム処理による mutant (FM) を選択し、両者と親ウイルスとの差異を比較したところ、(i) AM では E153 (Asn → Asp), (ii) FM では E6 (Ile → Met), E134 (Asn → Ser), E153 (Asn → Tyr) の変異を認めた。ただし、neurovirulence との関係は述べられていない。

Sánchez and Ruiz (1996) は、DENV-2 メキシコ株に関して、次の所見を得ている。Nucleotide 1168 の変化が E390 のアミノ酸の変化をもたらす、さような株から plaque size で variant を分けると、small plaque 株は nucleotide 1168 (G → A), E390 (Asp → Asn) で mouse-neurovirulence が弱く、これに対し large plaque 株は 1168 (G → C), E390 (Asp → His) で mouse-neurovirulence が強いことが示された。

ちなみに、現行の黄熱ワクチン 17D 株は脳内接種によりマウスを斃し得るので、その意味で neurovirulent であるが、Ryman *et al.* (1997) は、17D 親株よりいくつかの variant を作ってその neurovirulence を解析した。それによると、(i) variant 17D (-wt) はマウス脳内感染値が著明に低下しているが、それは E240 (Ala → Val) の変異を来していること、(ii) 一方、17D (+wt) は親株と変わらない neurovirulence をもち、E173 (Thr → Ile) の変異を示し、同時に、wild-type の Asibi 株ウイルスに specific な nucleotide (17D ワクチン株はこれを有していない) を回復していること、などが示された。

これらの事象が、一般的なものであるか否かは今後の検討にまたねばならないが、比較的簡単な処理によってEの変化を来し、それがウイルスの毒力の変異につらなるという可能性は、さらに追求すべき課題と考えられる (Neurovirulenceの問題は、後述の「新世代ワクチン」に関連して再論する)。

(6) ここにおいて、最近の分子生物学、遺伝子工学の技術を用いて、いわゆる「新世代ワクチン」(new generation vaccine)、ないし「第二世代ワクチン」(second generation vaccine)を作製しようとする試みがなされてきた。この種の研究は未だ発展途上の段階で、ワクチンとしての有用性に関し、確定的な結論を下すには至らないが、有望な将来性をもつことは否定出来ないであろう。よって次章以下において、今日までに挙げられた成果を紹介することとする。

(D) 新世代ワクチン (new generation vaccine) ないし第二世代ワクチン (second generation vaccine)

「新世代ワクチン」ないし「第二世代ワクチン」とは、広義には、従来と異なる新しい発想と手法によって作製されたワクチンを意味する。これには、新しい adjuvant の開発、あるいは新しい投与方法の考案(たとえば、combined immunization や mucosal immunization)なども含まれるかも知れない。

一方、狭義には、最近の分子生物学、あるいは分子遺伝学の技術を応用して作られたワクチンを総称する。ここでは、狭義のものについて紹介する。そのようなワクチンは既に多種類の微生物について(ウイルスのみならず、細菌、原虫なども含め)試みられている。しかし、そのすべてを網羅することは本論文の目的ではないので、DENV に関する成果のみに限って記述することとする。(脚註)*

狭義の「新ワクチン」の要点を一言に言えば、DENV-RNA の nucleotide sequence の内の免疫機能を code する部分を操作して、免疫原性物質を新しく作ろうとするものである。その目的のために、いくつかの具体的な技術がある。

誘導される免疫機構の相異によって2つのカテゴリーに大別される。(i)組換え蛋白を作り、それによって特異的抗体を産生させる手法と、(ii)組換えウイルス自体を作って、これをワクチンとして用いる手法である。前者は、*E. coli*, baculovirus を利用することが多く、後者は現在のところ、vaccinia virus (一部 avipox virus) を利用する方法が取られている。

一方、DNA の plasmid を直接利用することも試みられている。これは、免疫誘導機構の点からは、組換えウイルスのそれと同じである。また、synthetic peptide を作り、これによって、抗体を産生せしめ免疫を成立させようとする試みもなされている。これは、原理的には、遺伝子工学的技術によるものではないが、一つの新しい研究方向と言えるであろう。これらをも併せて、以下に記述することとする。

D. I. *E. coli* を用いる方法

DENV の E protein gene と *E. coli* の適当な gene とを fuse させて、*E. coli* にウイルス特異的免疫原性物質を発現させることが出来る。

Fonseca *et al.* (1991) は、1-4 の各型 DENV について、E protein を code する genome の特定部位から cDNA を作り、適当な primer を定め、これらと *E. coli* の *trpE* fusion protein gene を合わせることによって、型特異的抗原を産生させた。これらは、DEN の各型抗体(たとえばマウス免疫腹水)と特異的に反応するので、診断用 reagents として極めて有用であると主張した。しかし、動物に感染防御能を与える作用があるか否かについては、述べられていない。

Tan *et al.* (1996) は、1型 DENV の非構造蛋白 NS5 を *E. coli* に発現させたと報告したが、その免疫学的活性についての検討はなされていない。

この点に関し、JEV についてであるが、Mason *et al.* (1987, 1989) は、*E. coli* で発現させた fusion protein はウイルスと結合する抗体を作るが、感染防御的な機能は有しないと述べている。一方、Srivastava *et al.* (1991) は、同じく JEV に関して、E protein gene と NS1 protein gene とを併せ用いることによって、感染防御能を動物に与えることが可能であると主張している。これらの事項については、JEV および DENV について今後さらなる検討が必要であろう。

Simmons *et al.* (1998) は、DENV-2 envelope protein の B domain アミノ酸298-400の部位と、*E. coli* の maltose binding protein (MBP) とを fuse させた recombinant protein は、マウスにおいて IgG 抗体を産生せしめ、 $100 \times LD_{50}$ 親ウイルスの脳内攻撃に対し、約80%の防御率を示したと報告した。これは、優秀な効果であると評価出来る。

(脚註)*これらの問題について単行本が刊行されており、また、ニューヨーク科学アカデミーが、一連のシンポジウムを開催している。筆者の手許にある若干の文献を以下に挙げるが、急速に進展する領域の記載として、いささか旧聞に属するものであるかも知れない。雑誌 Vaccine には、本問題に関する新しい成績が掲載されつつある。

Isaacson, R.E. (ed.) (1992): Recombinant DNA Vaccines, Rationale and Strategy, New York, Marcel Dekker.

Prokop, A. and Bajpai, R.K. (eds.) (1991): Recombinant DNA Technology I. Ann. NY Acad. Sci., 646, 1-386

Williams, J.C., Goldenthal, K.L., Burns, D.L. and Lewis, B.P. Jr. (eds.) (1995): Combined Vaccines and Simultaneous Administration: Current Issues and Perspectives. Ann. NY Acad. Sci., 754, 1-404

Asenjo, J.A. and Andrews, B.A. (eds.) (1996): Recombinant DNA Biotechnology III. The Integration of Biological and Engineering Sciences. Ann. NY Acad. Sci., 782, 1-569

D. II. Baculovirus を用いる方法

Baculovirus (Family *Baculoviridae*) は節足動物由来のウイルスで、成熟粒子は12-30の異なる peptide を有し、核酸は90-160 kb の dsDNA である。かような性状のため、遺伝子操作が比較的容易であるとされている。特に、Species *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV, 134 kbp) が好んで供試され、昆虫細胞 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) で増殖させられる。

上述の *E. coli* の場合と同じく、DENV の構造蛋白あるいは非構造蛋白を code する cDNA と AcMNPV の特定の genome を合わせ、これを Sf9 細胞で増殖させることによって、特異的免疫原性物質の産生を目指すのである。

かような原理に基づいてなされた研究の代表的なものを、ほぼ発表年代順に挙げて見ると次のごとくとなる。

Zhang *et al.* (1988); Lai *et al.* (1989); Lai *et al.* (1990); Deubel *et al.* (1991); Putnak *et al.* (1991); Qu *et al.* (1993); Feighny *et al.* (1994); Eckels *et al.* (1994); Bielefeldt-Ohmann *et al.* (1997); Staropoli *et al.* (1997).

また、Desprès *et al.* (1991) は、黄熱ウイルス (YFV) について同様な研究を報告している。

いずれの成績においても、培養 Sf9 細胞より DENV 特異的蛋白が分泌され、これを動物に与えると特異的抗体が産生され、あるいは親ウイルス (強毒) の攻撃に対する感染防御能をひき起こすことが示された。この場合も、構造蛋白 (E) と非構造蛋白 (NS1) を同時に用いた成績が、より有効のように考えられる。また、Bielefeldt-Ohmann (1997) は、DENV-2 と DENV-3 の hybrid envelope protein の産生が可能であると述べている。これは、後述する chimera virus 作製の試みと同じく、究極的には polyvalent なワクチンの製造を目指すもので、今後の進展が望まれるところである。

D. III. Vaccinia virus を用いる方法

Vaccinia virus も大型であって、遺伝子操作が比較的容易である。しかも元来生ワクチンの素材であるから、recombinant virus をそのまま生体に与えることが可能という利点がある。Recombinant 作製の技術的原理は、上述の baculovirus の場合と同様である。

アメリカの Lai 一派は、recombinant vaccinia virus/DENV に関して一連の広範な研究を展開した。Zhao *et al.* (1987a, b); Bray *et al.* (1989a, b); Falgout *et al.* (1990); Men *et al.* (1991); Bray and Lai (1991a, b); Bray and Lai (1992); Pletnev *et al.* (1992); Pletnev *et al.* (1993); Kawano *et al.* (1993); Chen *et al.* (1995); Bray *et al.* (1996); Pletnev and Men (1998)。

彼らの研究の特色の一つは、DENV の異なるウイルス間、または、DENV と異なる種類のアルボウイルス間に

おいて、chimera を形成したことである。

以下論文の一つについての紹介を省き、筆者なりに理解した要点を列記することとする。

(1) DENV (主として 4 型) の構造蛋白、および非構造蛋白を code する cDNA を作り、これをもって vaccinia virus recombinant を得た。これを細胞に感染させると、構造蛋白および非構造蛋白 (主として NS1) が産生された。

(2) C, prM, E, NS1, NS2a を code する DNA sequence を含む vaccinia recombinant は、マウスに親株 DENV の脳内攻撃に対する感染防御能を与えた。

非構造蛋白 NS1/NS2a を含む recombinant は、マウスにおいて抗 NS1 抗体を産生しめた。

(3) 解析を進めた結果、C-terminus を欠いた部位を発現する recombinant が免疫学的に、より有効であることが判明した。すなわち、E sequence の最初の 392 のアミノ酸が重要であり、79% まで短縮されたもの (79% E) が、抗体産生およびマウス感染防御の上で、より良好な成績をもたらすと述べている。ちなみに、彼ら (Jan *et al.*, 1993) は JEV についても、C-terminus を欠いた recombinant の免疫学的効果が、よりすぐれていることを示した。

(4) 彼らの研究で興味ある点は、異なる種類のウイルスの間で chimera を作製したことであろう。すなわち、intratypic (D4 の間)、intertypic (D1/D4, D2/D4 の間)、および DENV と tick-borne encephalitis virus (TBEV) との間の chimera などを作り、その免疫学的性状、並びに neurovirulence を調べた。

(i) まず D4 について、neurovirulent (nv) 株と non-neurovirulent (non-nv) 株との間で chimera を作ると、Ser (156) → Pro は non-nv, Thr (155) → Ile は nv, Phe (401) → Leu は両者の中間であることなどが示された。つまり、E のこれらの部分が neurovirulence を支配するのであろうと述べている。

(ii) D4 の非構造蛋白と、D1 (C-prM-E) あるいは D2 (prM-E) のおのおのの chimera を作り、これらを rhesus サルに皮下注射してみると、D1/D4 chimera を与えられたサルは抗 D1 抗体を、D2/D4 chimera を与えられたサルは抗 D4 抗体をそれぞれ産生した。D1/D4 と D2/D4 の混合物を与えると、抗 D1、抗 D2 の両方の抗体が産生された。いずれの場合も、おのおのの親株ウイルスの攻撃に対し、サルは一定度の感染防御 (viremia の抑制) を示した。

(iii) DENV-4 と TBEV の M/E を code する部位との chimera を作製したが、それは下記のごとき性状を示した。

(a) TBE/D4 chimera は、サル腎細胞培養において TBE 親ウイルスよりもより高値の増殖を示し、大きな plaque を作る。しかし蚊細胞培養での増殖は、制限されている。(b) Chimera ウイルスは、wild-type TBE と異なり、マウスの peripheral 感染 (皮内または腹腔内注射による) で脳炎をひき起こさないが (ただし脳内注射によってはマウスを斃し得る)、その後の強毒 TBEV の攻撃に対して防御を与える。このことは、弱毒 TBE ワクチンの可能性を示唆する

ものである。(c)同様の成績が、Langat (LGT) ウイルスについても得られた。すなわち、LGT (prM-E)/DEN4 chimera は LGT 親株ウイルスに比べて mouse-neurovirulence は低下しているが、これを腹腔内注射されたマウスは抗 LGT 中和抗体を産生し、親株ウイルスの攻撃に対し抵抗を示した。

同様な研究が、他のグループによってもなされている。早く Hahn *et al.* (1990) は、DENV-2 の prM/M を含む vaccinia virus recombinant を作り、これを与えられたマウスは抗体 (中和) を産生したこと、また、同じ実験を黄熱ウイルス (YFV) 17D 株について行ったところ、その場合の抗体産生効率率は DENV のそれよりも低かったなどと報告した。Fonseca *et al.* (1994) も、DENV-1 の prM/M を含む vaccinia virus recombinant がマウスに抗 DEN 抗体産生をひき起こすこと、およびこれについて DENV の C-gene は不要であることなどを示した。

このように、vaccinia virus/DENV recombinant を作り、あるいは異なったウイルス間の chimera を作って、その免疫原性や neurovirulence などを追求解析することが可能となったわけである。

この種の研究は、DENV と同じく *Flavivirus* に属する日本脳炎ウイルス (JEV) についても盛んに行われている。それらのデータは DENV に対しても有用であると考えられるので、ここに併せ紹介することとする。

エール大学と神戸大学との共同研究において、Mason and Konishi および共同研究者は、vaccinia/JE recombinant について一連の広範な研究を遂行した。その成績の要点を、再び筆者の理解に基づいて列挙してみると、下記のごとくなる。まず、発表論文は次の通りである。Mason *et al.* (1991); Konishi *et al.* (1991); Konishi *et al.* (1992); Konishi *et al.* (1994); Konishi *et al.* (1997a); Konishi *et al.* (1997b); Konishi *et al.* (1998a)。なお、彼ら (Pincus *et al.*, 1992) は黄熱ウイルス (YFV) についても、同様の検討成績を発表している。

(1) JEV/vaccinia recombinant は、prM-E-NS1 を発現して M-E を含む粒子成分 (hemagglutinin 作用をもつ) を細胞外に放出し、これはマウスに特異抗体 (中和並びに赤血球凝集抑制) を産生せしめると共に、親株ウイルスに対する感染防御効果をもたらした。非構造蛋白 NS1 を発現する recombinant も免疫的効果をもたらすが、その程度は prM/E の recombinant よりも弱度であった。

(2) prM/E, NS1 を発現する recombinant は、JEV 感染ブタの viremia を阻止した。その意味で、JE の流行に対する抑止効果を期待することが出来る。

(3) vaccinia virus と平行して、avipox virus に属する canarypox virus を用いた実験が行われた。JEV の prM-E-NS1, あるいは prM-E を発現する avipox recombinant は、いずれもマウスに抗体産生能と感染防御能を賦与した。

(4) 上記のごとき JE/poxvirus recombinant を HeLa 細胞に感染せしめると、免疫原性を有する粒子成分が産生分泌される。これと、prM/E recombinant とを併用する

と、マウスにおいて一層良好な免疫効果をもたらされた (後述“DNA vaccine [plasmid vaccine]”の部を参照のこと)。

(5) これら recombinant または粒子成分は、マウスおよびヒトに接種されると、cytotoxic T lymphocyte (CTL) を誘導し、それは CD8⁺CD4⁻ type であることが示された。細胞性免疫の誘発は、ワクチンの効果を考える上で極めて重要な点であり、今後この種の知見は DENV においても蓄積される必要がある。

なお、彼らは黄熱ウイルスについても vaccinia recombinant を作製し、その免疫的効果を検討している (Pincus *et al.*, 1992)。

また、Sato *et al.* (1993) も vaccinia/JE の recombinant について研究し、JEV の prM/E を発現する recombinant は、感染組織培養細胞に JEV-E 蛋白を作らしめてこれを細胞外に放出すること、この場合培養細胞に DENV-2 を予め感染させておくと、JEV-E 蛋白の細胞外放出が増大すること、および、そのような E 蛋白放出の増大は、NS2b および NS3 を併せ発現する recombinant によってももたらされること、などを報告している。

以上の要約

上に述べた研究の基本的発想を改めて要約すると、次のごとくなるであろう。DENV (または JEV) の核酸 (RNA) の、免疫に関与する特定部位を含む cDNA を作り、(i) これを *E. coli* や baculovirus の核酸に組み込んで、組換え蛋白としての特異的抗体を誘導せしめて免疫を成立させたり、(ii) あるいは、vaccinia virus を用いて組換えウイルスを作り、これによって抗体産生の他に、cytotoxic lymphocyte の誘導を図ったり、または (iii) 異なったウイルス間の chimera を作って、より毒性の低いウイルス株を産出し、究極的には polyvalent なワクチンの創製をも、企図しようとするものである。

免疫に関する特定部位としては、prM, E, NS1 が重要であることに見解が一致している。この点に関し、早く Kaufman *et al.* (1987, 1989) が monoclonal 抗体によって、DENV の prM および E が感染防御に必要な因子であることを明らかにし、また、Henchal *et al.* (1988) は同じく NS1 が不可欠であることを示した。それ以後の多くの研究は、いずれもこの点に関しては一致した成績を得ている。

D. IV. その他の方法

上記の他にも、新しい試みがなされつつある。

(a) DNA vaccine (plasmid vaccine)

前述したように、これによる免疫誘導機構は、原理的には組換えウイルス (たとえば vaccinia/DEN recombinant virus) によるそれと類似であるが、いわばより直接的に免

疫効果を得ようとするものであると言える。

Kochel と Porter およびその共同研究者 (Kochel *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1998) は DENV-2 を用いて, その prM と E の92% を code する cDNA をベクターに組み込み, plasmid を作った。これをマウスに皮内注射すると, 被投与マウスの全例において抗 DEN 抗体 (中和) の産生を見た。しかし, これだけではマウスに感染防御を与えることが出来なかったが, これに CpG motif を含む pUC19 を加えてマウスに与えると, 抗体産生をより増強させると共に, 親株ウイルスの攻撃に対する感染防御をも, 成立せしめたと述べている。

JEV について Konishi *et al.* (1998b) は, prM/E を含む plasmid を作製, それがマウスに抗 JE 抗体 (中和) の産生と感染防御をもたらすことを示した。また, 免疫マウスの脾組織から, JE 特異的の cytotoxic T lymphocyte (CTL/CD8⁺) が検出され, その持続は約6カ月に及んだと述べている。彼らは, 既に vaccinia/JE recombinant による CTL (CD8⁺ CD4⁻) の産生を報告している (Konishi *et al.*, 1997a, b)。ワクチン接種による細胞免疫増強効果は, 今後さらに検討を進めるべき重要課題である。

ちなみに DEN 感染に伴うリンパ球の動態については, 倉根 (一郎) 及び共同研究者による一連の広範な研究があるが, 本論文ではそれへの言及は割愛することとする。

(b) Synthetic Peptide

Markoff *et al.* (1988) は DENV-4 を用いて, その envelope glycoprotein を code する sequence に基づき, 38箇の peptide (おのおのは15箇のアミノ酸より成る) を作った。その内, 9箇の peptide は抗 DEN 抗体 (マウス免疫腹水) に結合し, さらにその内の8箇の peptide は, DEN 回復患者血清の少なくとも50% に反応したと報告している。しかし, 感染防御効果については述べられていない。

「新世代ワクチン」研究の小括

以上, 「新世代ワクチン」に関する最近の研究を, 概観した。新しい考え方と技術に基づいて進められるこの種の研究は, 魅力的であり, 新しい希望をもたらすものであろう。特に現時点でなお確実有効なワクチンを有しない DEN については, 一層その感が強い。ただし, 希望を現実とすることは, 必ずしも容易な道程ではない。前章に述べたいいくつかの問題点, 例えば, immune enhancement の解決, 毒力マーカーの確立, 動物実験モデルの作製などは, そのまま新ワクチンにも当てはまることである。

ただ, neurovirulence など副作用の若干点については, 遺伝子工学的的手法による解決の曙光が, かすかながら見えてきたように思われる。最終的には, 人体に適用して無害性・有効性を確める必要のあることは, 言うまでもない。

おわりに

DEN ワクチンについて, ほぼ80年に亘る研究の歴史の流れを辿ってみた。初期の, 専ら人体材料のみに依存していた, いわば播種期の研究から, ウイルスのマウスあるいは培養細胞への伝達, それによる人体無毒化ないし弱毒化ウイルス株の選択, それを材料としたワクチン開発の研究を経て, 現在の分子遺伝学的解析に至るまでの道筋である。おのおのの研究は, それぞれの段階において必然的な意義を持つものである。さような意味において, それらは, ウイルス学自体の発展の姿を, そのまま映し出していると言えるであろう。来世紀は, DEN ワクチンにとっても, 文字通り新しい世紀になるであろうと思われる。本論文が, 今後 DEN ワクチンの研究に携わられる方々, 特に若い研究者諸氏に何らかの参考になり得るならば, 筆者の喜びこれに過ぎるものはない。

謝 辞

五十嵐章教授 (長崎大学熱帯医学研究所), 小西英二博士 (神戸大学医学部保健学科) は草稿をお目通しの上, 貴重な御助言を賜った。原稿の整理には児島利香さん, 小澤牧人君 (神戸大学医学部学生) の援助を頂いた。これらの方々に対し, 深甚の謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Ambrosch, F., Fritzell, B., Gregor, J., Jonas, S., Kollaritsch, H., Teulieres, L. and Wiedermann, G. (1994): Combined vaccination against yellow fever and typhoid fever: a comparative trial. *Vaccine*, 12, 625-628
- 2) Ashburn, P.M. and Craig, C.F. (1907): Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. *J. Infect. Dis.*, 4, 440-475
- 3) Bancroft, W.H., Top, F.H., Jr., Eckels, K.H., Anderson, J.H., Jr., McCown, J.M. and Russell P.K. (1982a): Dengue-2 vaccine: virological, immunological, and clinical responses of six yellow fever-immune recipients. *Infect. Immun.*, 31, 698-703
- 4) Bancroft, W.H., Scott, R. McN., Brandt, W.E., McCown, J.M., Eckels, K.H., Hayes, D.E., Gould, D.J. and Russell, P.K. (1982b): Dengue-2 vaccine: infection of *Aedes aegypti* mosquitoes by feeding on viremic recipients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 1229-1231
- 5) Bancroft, W.H., Scott, R. McN., Eckels, K.H., Hoke, C. H., Jr., Simms, T.E., Jesrani, K.D.T., Summers, P.L., Dubois, D.R., Tsoulos, D. and Russell, P.K. (1984): Dengue virus type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers. *J. Infect. Dis.*, 149, 1005-1010
- 6) Beasley, A.R., Lichter, W. and Sigel, M.M. (1960): Studies on latent infections of tissue cultures with dengue virus. I. Characteristics of the system. *Arch. f. ges. Virusforsch.*, 10, 672-683

- 7) Beasley, A.R., Wellings, F.M., Sigel, M.M. and Williams, J.A. (1964): Studies on latent infections of tissue cultures with dengue virus. II. Alterations in the virus. *Arch. f. ges. Virusforsch.*, 14, 411-421
- 8) Bellanti, J.A., Bourke, A.T.C., Buescher, E.L., Cadigan, F.C., Cole, G.A., Banawi, Y.E.L., Hatgi, J.N., McCown, J. M., Negron, H., Ordonez, J.V., Scheider, F.G., Smith, T., Warram, J.H. and Wisseman, C.L., Jr. (1966): Report of dengue vaccine field trial in the Caribbean, 1963: a collaborative study. *Bull. WHO.*, 35, 93
- 9) Bhamarapavati, N., Yoksan, S., Chayanitayothin, T., Angsubphakorn, S. and Bunyaratvej, A. (1987): Immunization with a live attenuated dengue-2 virus candidate vaccine (16681-PDK53): clinical, immunological and biological responses in adult volunteers. *Bull. WHO.*, 65, 189-195
- 10) Bhamarapavati, N. and Yoksan, S. (1989): Study of bivalent dengue vaccine in volunteers. *Lancet* (i), 1077
- 11) Bhamarapavati, N. and Yoksan, S. (1990): The clinical trial of trivalent dengue vaccine. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health*, 21, 709
- 12) Bhamarapavati, N. and Yoksan, S. (1993): Immunization in humans with live attenuated trivalent dengue vaccine. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* (Suppl. 1), pp. 246-249
- 13) Bielefeldt-Ohmann, H., Beasley, W.C., Fitzpatrick, D.R. and Aaskov, J.G. (1997): Analysis of a recombinant dengue-2 virus-dengue-3 virus hybrid envelope protein expressed in a secretory baculovirus system. *J. Gen. Virol.*, 78, 2723-2733
- 14) Blanc, G., Caminopetros, J., Dumas, J. and Saenz, A. (1929a): Recherches expérimentales sur la sensibilité des singes inferieur au virus de la dengue. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 188, 468-470
- 15) Blanc, G. and Caminopetros, J. (1929b): Contribution à l' étude de la vaccination contre da dengue. *Bull. Acad. Nat. Med. (Paris)*, 102, 37-40
- 16) Blanc, G. and Caminopetros, J. (1930): Recherches expérimentales sur la dengue. *Ann. l'Inst. Pasteur*, 44, 367-436
- 17) Bray, M., Zhao, B., Markoff, L., Eckels, K.H., Chanock, R.M. and Lai, C.-J. (1989a): Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. *J. Virol.*, 63, 2853-2856
- 18) Bray, M., Falgout, B., Zhao, B., Markoff, L., Moss, B., Chanock, R.M. and Lai, C.-J. (1989b): Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue-4 structural proteins and/or nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue encephalitis. *Vaccine*, 89, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 357-362
- 19) Bray, M. and Lai, C.-J. (1991a): Construction of intertypic chimeric dengue viruses by substitution of structural protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10342-10346
- 20) Bray, M. and Lai, C.-J. (1991b): Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response. *Virology*, 185, 505-508
- 21) Bray, M. and Lai, C.-J. (1992): Construction and characterization of chimeric dengue viruses. *Vaccine* 92, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 271-276
- 22) Bray, M., Men, R. and Lai, C.-J. (1996): Monkeys immunized with intertypic chimeric dengue viruses are protected against wild-type virus challenge. *J. Virol.*, 70, 4162-4166
- 23) Chen, W., Kawano, H., Men, R., Clark, D. and Lai, C.-J. (1995): Construction of intertypic chimeric dengue viruses exhibiting type 3 antigenicity and neurovirulence for mice. *J. Virol.*, 69, 5186-5190
- 24) Cleland, J.B., Bradley, B. and McDonald, W. (1919): Further experiments in the aetiology of dengue fever. *J. Hyg.*, 18, 217-254
- 25) Desprès, P., Dietrich, J., Girard, M. and Bouloy, M. (1991): Recombinant baculoviruses expressing yellow fever virus E and NS1 proteins elicit protective immunity in mice. *J. Gen. Virol.*, 72, 2811-2816
- 26) Desprès, P., Frenkiel, M.-P. and Deubel, V. (1993): Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modification of viral structure. *Virology*, 196, 209-219
- 27) Deubel, V., Bordier, M., Megret, F., Gentry, M.K., Schlesinger, J.J. and Girard, M. (1991): Processing, secretion, and immunoreactivity of carboxy terminally truncated dengue-2 virus envelope proteins expressed in insect cells by recombinant baculoviruses. *Virology*, 180, 442-447
- 28) Dick, G.W.A. and Smithburn, K.C. (1949): Immunity to yellow fever six years after vaccination. *Am. J. Trop. Med.*, 29, 57-61
- 29) Eckels, K.H., Brandt, W.E., Harrison, V.R., McCown, J. M. and Russell, P.K. (1976): Isolation of a temperature-sensitive dengue-2 virus under conditions suitable for vaccine development. *Infect. Immun.*, 14, 1221-1227
- 30) Eckels, K.H., Harrison, V.R., Summers, P.L. and Russell, P.K. (1980): Dengue-2 vaccine: preparation from a small-plaque virus clone. *Infect. Immun.*, 27, 175-180
- 31) Eckels, K.H., Scott, R. McN., Bancroft, W.H., Brown, J., Dubois, D.R., Summers, P.L., Russell, P.K. and Halstead, S.B. (1984): Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. V. Human response to immunization with a candidate vaccine prepared in fetal rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33, 684-689
- 32) Eckels, K.H., Dubois, D.R., Summers, P.L., Schlesinger, J.J., Shelly, M. Cohen, S., Zhang, Y.-M., Lai, C.-J., Kurane, I., Rothman, A., Hasty, S. and Howard, B. (1994): Immunization of monkeys with baculovirus-dengue type-4 recombinant containing envelope and nonstructural proteins: evidence of priming and partial protection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50, 472-478
- 33) Edelman, R., Tacket, C.O., Wasserman, S.S., Vaughn, D. W., Eckels, K.H., Dubois, D.R., Summers, P.L. and Hoke, C.H. (1994): A live attenuated dengue-1 vaccine candi-

- date (45AZ5) passaged in primary dog kidney cell culture is attenuated and immunogenic for humans. *J. Infect. Dis.*, 170, 1448-1455
- 34) Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J.J. and Lai, C.-J. (1990): Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus non-structural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.*, 64, 4356-4363
 - 35) Feighny, R., Burrous, J. and Putnak, R. (1994): Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50, 322-328
 - 36) Fonseca, B.A.L., Khoshnood K., Shope, R.E. and Mason, P.W. (1991): Flavivirus type-specific antigens produced from fusion of a portion of the E protein gene with the *Escherichia coli* type E gene. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 44, 500-508
 - 37) Fonseca, B.A.L., Pincus, S., Shope, R.E., Paoletti, E. and Mason, P.W. (1994): Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 12, 279-285
 - 38) Fujita, N., Oda, K., Yasui, Y. and Hotta, S. (1969): Research on dengue in tissue culture. IV. Serologic responses of human beings to combined inoculations of attenuated, tissue-cultured type I dengue virus and yellow fever vaccine. *Kobe J. Med. Sci.*, 15, 163-180
 - 39) Fujita, N., Izaki, S., Oda, K., Kimura, E. and Hotta, S. (1972): Research on dengue in tissue culture. V. Production of anti-dengue antibodies in tissue cultures from monkeys inoculated with an attenuated type 1 dengue virus strain. *Kobe J. Med. Sci.*, 18, 143-152
 - 40) Fujita, N., Tamura, M. and Hotta, S. (1976): Immunobiological studies on dengue. I. Immunogenic effects of partially purified dengue-1 virus and some of its components. *Kobe J. Med. Sci.*, 22, 211-228
 - 41) Gubler, D.J. (1993): Epidemiology of dengue and dengue hemorrhagic fever. (2) Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas. *In: Monograph on Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever*, (compil.) Prasert Thongcharoen, 1993, pp. 9-22, New Delhi, WHO Regional Office for South-East Asia
 - 42) Guirakhoo, F., Hunt, A.R., Lewis, J.G. and Roehrig, J.T. (1993): Selection and partial characterization of dengue 2 virus mutants that induce fusion at elevated pH. *Virology*, 194, 219-223
 - 43) Hahn, Y.S., Lenches, E.M., Galler, R., Rice, C.M., Dalrymple, J. and Strauss, J.H. (1990): Expression of structural proteins of dengue 2 and yellow fever virus by recombinant vaccinia viruses. *Arch. Virol.*, 115, 251-265
 - 44) Halstead, S.B. (1988): Pathogenesis of dengue: challenge to molecular biology. *Science*, 239, 476-481
 - 45) Halstead, S.B., Diwan, A.R., Marchette, N.J., Palumbo, N.E. and Srisukonth, L. (1984a): Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. I. Attributes of uncloned virus at different passage levels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33, 654-665
 - 46) Halstead, S.B., Marchette, N.J., Diwan, A.R., Palumbo, N.E. and Putvatana R. (1984b): Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. II. Attributes of virus cloned at different dog kidney passage levels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33, 666-671
 - 47) Halstead, S.B., Marchette, N.J., Diwan, A.R., Palumbo, N.E., Putvatana, R. and Larsen, L.K. (1984c): Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. III. Reversion to virulence by passage of cloned virus in fetal rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33, 672-678
 - 48) Halstead, S.B., Eckels, K.H., Putvatana, R., Larsen, L.K. and Marchette, N.J. (1984d): Selection of attenuated dengue 4 viruses by serial passage in primary kidney cells. IV. Characterization of a vaccine candidate in fetal rhesus lung cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33, 679-683
 - 49) Halstead, S.B., Tom, M.C. and Elm, J.L., Jr. (1981): *In vitro* virulence marker: growth of dengue-2 virus in human leukocyte suspension cultures. *Infect. Immun.*, 31, 102-106
 - 50) Henchal, E.A., Henchal, L.S. and Schlesinger, J.J. (1988): Synergistic interactions of anti-NS1 monoclonal antibodies protect passively immunized mice from lethal challenge with dengue 2 virus. *J. Gen. Viol.*, 69, 2101-2107
 - 51) Hoke, C.H., Jr., Malinoski, F.J., Eckels, K.H., Scott, R. M., Dubois, D.R., Summers, P.L., Simms, T., Burrous, J., Hasty, S.E. and Bancroft, W.H. (1990): Preparation of an attenuated dengue 4 (341750 Carib) virus vaccine. II. Safety and immunogenicity in humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43, 219-226
 - 52) Holt, R.L. and Kintner, J.H. (1931a): Notes on dengue. *Philippine J. Sci.*, 46, 593-599
 - 53) Holt, R.L., Fleming, W.D. and Kintner, J.H. (1931b): Resistance of dengue virus. *Philippine J. Sci.*, 46, 601-609
 - 54) 堀田 進 (1947a): デング熱の研究: 人体における予防接種実験(1), フォルモワクチン及び牛胆汁ワクチンの予防効果. *日本医学*, 3413号, 87-89
 - 55) 堀田 進 (1947b): デング熱の研究: 変性した病毒について. *日本医学*, 3413号, 89-90
 - 56) 堀田 進 (1947c): デング熱の研究: 人体における予防接種実験(2), 変性病毒より作った予防液の効果. *日本医学*, 3414号, 105-106
 - 57) Hotta, S. (1952): Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J. Infect. Dis.*, 90, 1-9
 - 58) Hotta, S. (1954): Experiments of active immunization against dengue with mouse-passaged unmodified virus. *Acta Tropica*, 11, 97-104
 - 59) Hotta, S. (1957): Some immunological properties of dengue virus cultivated in tissue culture. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 51, 249-255
 - 60) Hotta, S. (1959): Propagation of dengue virus in tissue culture. *Acta Tropica*, 16, 108-150
 - 61) Hotta, S. (1969): *Dengue and Related Hemorrhagic Diseases*. Warren H. Green, Inc., St. Louis

- 62) Hotta, S. and Evans, C.A. (1956a): Cultivation of mouse-adapted dengue virus (type 1) in rhesus monkey tissue culture. *J. Infect. Dis.*, 98, 88-97
- 63) Hotta, S. and Evans, C.A. (1956b): Cultivation of type 2 dengue virus in rhesus kidney tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93, 153-155
- 64) Hotta, S. and Evans, C.A. (1956c): Ether-sensitivity of dengue virus. *Virology*, 2, 704-706
- 65) Hotta, S., Fujita, N., Shimazu, Y., Yasui, Y., Okubo, Y. and Maruyama, T. (1966): Research on dengue in tissue culture. III. Immunogenic effect of a tissue-cultured (human-attenuated) type 1 virus strain. *Kobe J. Med. Sci.*, 12, 199-205
- 66) Igarashi, A. (1997): Impact of dengue virus infection and its control. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 18, 291-300
- 67) Innis, B.L., Eckels, K.H., Kraiselburd, E., Dubois, D.R., Meadors, G.F., Gubler, D.J., Burke, D.S. and Bancroft W. H. (1988): Virulence of a live dengue virus vaccine candidate: a possible new marker of dengue virus attenuation. *J. Infect. Dis.*, 158, 876-880
- 68) Jan, L.-R., Yang, C.-S., Henschal, L.S., Sumiyoshi, H., Summers, P.L., Dubois, D.R. and Lai, C.-J. (1993): Increased immunogenicity and protective efficacy in outbred and inbred mice by strategic carboxyl-terminal truncation of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 48, 412-423
- 69) Kaufman, B.M., Summers, P.L., Dubois, D.R. and Eckels, K.H. (1987): Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36, 427-434
- 70) Kaufman, B.M., Summers, P.L., Dubois, D.R., Cohen, W. H., Gentry, M.K., Timchak, R.L., Burke, D.S. and Eckels, K.H. (1989): Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41, 576-580
- 71) Kawano, H., Rostapshov, V., Rosen, L. and Lai, C.-J. (1993): Genetic determinants of dengue 4 virus neurovirulence for mice. *J. Virol.*, 67, 6567-6575
- 72) 木村 廉, 堀田 進(1943): デング熱の研究: マウス接種実験成績. 日本医学健康保険, 3344号, 1378-1379
- 73) 木村 廉, 堀田 進(1944a): デング熱の研究: マウス接種実験を中心として. 日本医学, 3379号, 629-633
- 74) 木村 廉, 堀田 進(1944b): デング熱の研究: 能働免疫について. 日本細菌学誌, 1, 96-99
- 75) 木村 廉, 堀田 進(1944c): デング熱の研究: フォルモワクチン及び牛胆汁ワクチンの人体における予防効果. 文部省学術研究会議報告
- 76) 木村 廉, 堀田 進(1944d): デング熱の研究: 変性したデング熱ウイルス及びそれより作った予防液の効果. 文部省学術研究会議報告
- 77) Kochel, T. Wu, S.J., Raviprakash, K., Hobart, P., Hoffman, S. Porter, K. and Hayes, C. (1997): Inoculation of plasmids expressing the dengue-2 envelope gene elicit neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*, 15, 547-552
- 78) Konishi, E., Pincus, S., Fonseca, B.A.L., Shope, R.E., Paoletti, E. and Mason, P.W. (1991): Comparison of protective immunity elicited by recombinant vaccinia viruses that synthesize E or NS1 of Japanese encephalitis virus. *Virology*, 185, 401-410
- 79) Konishi, E., Pincus, S., Paoletti, E., Laegreid, W.W., Shope, R.E. and Mason, P.W. (1992): A highly attenuated host range-restricted vaccinia virus strain, NYVAC, encoding the prM, E, and NS1 genes of Japanese encephalitis virus prevent JEV viremia in swine. *Virology*, 190, 454-458
- 80) Konishi, E., Pincus, S., Paoletti, E., Shope, R.E. and Mason, P.W. (1994): Avipox virus-vectored Japanese encephalitis virus vaccines: use as vaccine candidates in combination with purified subunit immunogens. *Vaccine*, 12, 633-638
- 81) Konishi, E., Kurane, I., Mason, P.W., Shope, R.E. and Ennis, F.A. (1997a): Poxvirus-based Japanese encephalitis vaccine candidates induce JE virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in mice. *Virology*, 227 353-360
- 82) Konishi, E., Khin, S.W., Kurane, I., Mason, P.W., Shope, R.E. and Ennis, F.A. (1997b): Particulate vaccine candidate for Japanese encephalitis induces long-lasting virus-specific memory T lymphocytes in mice. *Vaccine*, 15, 281-286
- 83) Konishi, E., Kurane, I., Mason, P.W., Shope, R.E., Kanesa-Thanan, N., Smucny, J.J., Hoke, C.H., Jr. and Ennis, F.A. (1998a): Induction of Japanese encephalitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by poxvirus-based JE vaccine candidates. *Vaccine*, 16, 842-849
- 84) Konishi, E., Yamaoka, M., Khin-Sane-Win, Kurane, I. and Mason, P.W. (1998b): Induction of protective immunity against Japanese encephalitis in mice by immunization with a plasmid encoding Japanese encephalitis virus premembrane and envelope genes. *J. Virol.*, 72, 4925-4930
- 85) Lai, C.-J., Zhang, Y.-M., Bray, M., Chanock, R. and Eckels, K.H. (1989): Use of dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS1 produced by recombinant baculovirus for immunization against dengue virus infection. *Vaccine* 89, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 351-356
- 86) Lai, C.-J., Zhang, Y.-M., Men, R., Bray, M., Chanock, R. M., Dubois, D.R. and Eckels, K.H. (1990): Immunization of monkeys with baculovirus recombinant-expressed dengue envelope and NS1 glycoproteins induces partial resistance to challenge with homotypic dengue virus. *Vaccine* 90, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 119-124
- 87) Manson-Bahr, P.H. (1935): *Manson's Tropical Disease*, 10th Ed., Cassell, London, p. 225
- 88) Manson-Bahr, P. (1964): *Tropical Diseases*, 15th Ed., Cassell, London, pp. 247-248
- 89) Marchette, N.J., Dubois, D.R., Larsen, L.K., Summers, P. L., Kraiselburd, E., Gubler, D.J. and Eckels, K.H. (1990): Preparation of an attenuated dengue 4 (341750 Carib) virus vaccine. I. Preclinical studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43, 212-218
- 90) Markoff, L.J., Bray, M., Lai, C.-J., Chanock, R.M.,

- Eckels, K., Summers, P., Gentry, M.K., Houghten, R.A. and Lerner, R.A. (1988): Antigenic analysis of the dengue virus envelope glycoprotein using synthetic peptides. *Vaccine* 88, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 161-165
- 91) Mason, P.W., McAda, P.C., Dalrymple, J.M., Fournier, M.J. and Mason, T.L. (1987): Expression of Japanese encephalitis virus antigens in *Escherichia coli*. *Virology*, 158, 361-372
- 92) Mason, P.W., Dalrymple, J.M., Gentry, M.K., McCown, J.M., Hoke C.H., Burke, D.S., Fournier, M.J. and Mason, T.L. (1989): Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 70, 2037-2049
- 93) Mason, P.W., Pincus, S., Fournier, M.J., Mason, T.L., Shope, R.E. and Paoletti, E. (1991): Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. *Virology*, 180, 294-305
- 94) McKee, K.T., Jr., Bancroft, W.H., Eckels, K.H., Redfield, R.R., Summers, P.L. and Russell, P.K. (1987): Lack of attenuation of a candidate dengue 1 vaccine (45AZ5) in human volunteers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36, 435-442
- 95) Men, R., Bray, M. and Lai, C.-J. (1991): Carboxy-terminally truncated dengue virus envelope glycoproteins expressed on the cell surface and secreted extracellularly exhibit increased immunogenicity in mice. *J. Virol.*, 65, 1400-1407
- 96) Miller, B.R., Beaty, B.J., Aitken, T.H.G., Eckels, K.H. and Russell, P.K. (1982): Dengue-2 vaccine: oral infection, transmission, and lack of evidence for reversion in the mosquito *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 31, 1232-1237
- 97) Monath, T.P. (1994): Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 2395-2400
- 98) Mori, C., Bundo, K., Matsuo, S., Igarashi, A., Takagi, M., Yoshida, I., Fukai, K. and Okuno, Y. (1986): Antigenicities and immunogenicities of mouse brain-grown and formalin-inactivated dengue viruses. *Trop. Med.*, 28, 87-99
- 99) 緒方規雄, 吉井宗武(1943): デング熱ウイルスの分離, 保存及び性状に関する研究, 日本医学健康保険, 3338号, 1124-1128
- 100) Pincus, S., Mason, P.W., Konishi, E., Fonseca, B.A.L., Shope, R.E., Rice, C.M. and Paoletti, E. (1992): Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology*, 187 290-297
- 101) Pletnev, A.G., Bray, M., Huggins, J. and Lai, C.-J. (1992): Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10532-10536
- 102) Pletnev, A.G., Bray, M. and Lai, C.-J. (1993): Chimeric tick-borne encephalitis and dengue type 4 viruses: effects of mutations on neurovirulence in mice. *J. Virol.*, 67, 4956-4963
- 103) Pletnev, A.G. and Men, R. (1998): Attenuation of the Langat tick-borne flavivirus by chimerization with mosquito-borne flavivirus dengue type 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 1746-1751
- 104) Porter, K.R., Kochel, T.J., Wu, S.-J., Raviprakash, K., Phillips, I. and Hayes, C.G. (1998): Protective efficacy of a dengue 2 DNA vaccine in mice and the effect of CpG immuno-stimulatory motifs on antibody responses. *Arch. Virol.*, 143, 997-1003
- 105) Price, W.H., Thind, I.S. and O'Leary, W. (1973a): The attenuation of the 26th mouse brain passage of New Guinea C strain of dengue 2 virus for use in the sequential immunization procedure against group B arboviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 92-99
- 106) Price, W.H., Casals, J., Thind, I. and O'Leary, W. (1973b): Sequential immunization procedure against group B arboviruses using living attenuated 17D yellow fever virus, living attenuated Langat E5 virus, and living attenuated dengue 2 virus (New Guinea C isolate). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 509-523
- 107) Price, W.H., Casals, J. and O'Leary, W. (1974): Studies on the sequential immunization against group B arboviruses in squirrel monkeys, cynomolgus monkeys, rhesus monkeys and chimpanzees. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23, 118-130
- 108) Putnak, R., Feighny, R., Burrous, J., Cochran, M., Hackett, C., Smith, G. and Hoke, C. (1991): Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus-neutralizing antibody in mice and protects them from virus challenge. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45, 159-167
- 109) Qu, X., Chen, W., Maguire, T. and Austin, F. (1993): Immunoreactivity and protective effects in mice of a recombinant dengue 2 Tonga virus NS1 protein produced in a baculovirus expression system. *J. Gen. Virol.*, 74, 89-97
- 110) Ryman, K.D., Xie, H., Ledger, T.N., Campbell, G.A. and Barrett, A.D.T. (1997): Antigenic variants of yellow fever virus with an altered neurovirulence phenotype in mice. *Virology*, 230, 376-380
- 111) Sabin, A.B. (1948): Recent advances in phlebotomus and dengue fevers. *Proc. 4th Internat. Congr. Trop. Med. Malaria*, Washington, D.C., pp. 520-525
- 112) Sabin, A.B. (1950): The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriol. Rev.*, 14, 225-232
- 113) Sabin, A.B. (1952): Research on dengue during World War II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1, 30-50
- 114) Sabin, A.B. (1955): Recent advances in our knowledge of dengue and sandfly fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 4, 198-207
- 115) Sabin, A.B. and Lwoff, A. (1959): Relation between reproductive capacity of polio viruses at different temperatures in tissue culture and neurovirulence. *Science*, 129, 1287-1288
- 116) Sabin, A.B. and Schlesinger, R.W. (1945): Production of immunity to dengue with virus modified by propagation

- in mice. *Science*, 101, 640-642
- 117) Sánchez, I. and Ruiz, B.H. (1996): A single nucleotide change in the E protein gene of dengue virus 2 Mexican strain affects neurovirulence in mice. *J. Gen. Virol.*, 77, 2541-2545
- 118) Sato, T., Takamura, C., Yasuda, A., Miyamoto, M., Kamogawa, K. and Yasui K. (1993): High-level expression of the Japanese encephalitis virus E protein by recombinant vaccinia virus and enhancement of its extracellular release by the NS3 gene product. *Virology*, 192, 483-490
- 119) Schlesinger, R.W. (1977): *Dengue Viruses*. Virology Monographs 16, Springer-Verlag, Wien
- 120) Schlesinger, R.W. and Frankel, J.W. (1952): Adaptation of the "New Guinea B" strain of dengue virus to suckling and to adult Swiss mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1, 66-76
- 121) Schlesinger, R.W., Gordon, I., Frankel, J.W., Winter, J. W., Patterson, P.R. and Dorrance, W.R. (1956): Clinical and serologic response of man to immunization with attenuated dengue and yellow fever vaccines. *J. Immunol.*, 77, 352-364
- 122) Schoepp, R.J., Beaty, B.J. and Eckels, K.H. (1991): Infection of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue parent and progeny candidate vaccine viruses: a possible marker of human attenuation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45, 202-210
- 123) Scott, R. McD., Nisalak, A., Eckels, K.H., Tingpalapong, M., Harrison, V.R., Gould, D.J., Chapple, F.E. and Russell, P.K. (1980): Dengue-2 vaccine: viremia and immune response in rhesus monkeys. *Infect. Immun.*, 27, 181-186
- 124) Scott, R. McD., Eckels, K.H., Bancroft, W.H., Summers, P.L., McCown, J.M., Anderson, J.H. and Russell, P.K. (1983): Dengue-2 vaccine: dose response in volunteers in relation to yellow fever immune status. *J. Infect. Dis.*, 148, 1055-1060
- 125) Siler, J.F., Hall, M.W. and Hitchens, A.P. (1926): Dengue: its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity, and prevention. *Philippine J. Sci.*, 29, 1-304
- 126) Simmons, J.S., St. John, J.H. and Reynolds, F.H.K. (1931): Experimental studies of dengue. *Philippine J. Sci.*, 44, 1-251
- 127) Simmons, M., Nelson, W.M., Wu, S.J.L. and Hayes, C.G. (1998): Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 58, 655-662
- 128) Srivastava, A.K., Morita, K., Matsuo, S., Tanaka, M. and Igarashi, A. (1991): Japanese encephalitis virus fusion protein with protein A expressed in *Escherichia coli* confers protective immunity in mice. *Microbiol. Immunol.*, 35, 863-870
- 129) Staropoli, I., Frenkiel, M.-P., Mégret, F. and Deubel, V. (1997): Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. *Vaccine*, 15, 1946-1954
- 130) Stevens, T.M. and Schlesinger, R.W. (1965): Studies on the nature of dengue viruses: I. Correlation of particle density, infectivity, and RNA content of type 2 virus. *Virology*, 27, 103-112
- 131) St. John, J.H. and Holt, R.L. (1931): A dengue vaccine prepared from *Macacus philippinensis*. *Am. J. Trop. Med.*, 11, 325-336
- 132) Takehara, M. and Hotta, S. (1961): Effect of enzymes on partially purified Japanese B encephalitis and related arboviruses. *Science*, 134, 1878-1880
- 133) Tan, B.H., Fu, J., Sugrue, R.J., Yap, E.H., Chan, Y.C. and Tan, Y.H. (1996): Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology*, 216, 317-325
- 134) Tarr, G.C. and Lubiniecki, A.S. (1975): Chemically induced temperature-sensitive mutants of dengue virus type 2: I. Isolation and partial characterization. *Arch. Virol.*, 48, 279-287
- 135) Tarr, G.C. and Lubiniecki, A.S. (1976): Chemically induced temperature-sensitive mutants of dengue virus type 2: comparison of temperature sensitivity *in vitro* with infectivity in suckling mice, hamsters, and rhesus monkeys. *Infect. Immun.*, 13, 688-695
- 136) Theiler, M. (1957): Action of sodium deoxycholate on arthropod-borne viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 96, 380-382
- 137) 徳地幹夫 (1961): 組織培養された日本脳炎ウイルスの抗原性に関する研究. *神戸医科大学紀要*, 23, 822-835
- 138) Vaughn, D.W., Hoke, C.H., Jr., Yoksan, S., LaChance, R., Innis, B.L., Rice, R.M. and Bhamarapavati, N. (1996): Testing of dengue-2 live attenuated vaccine (strain 16681 PDK-53) in ten American volunteers. *Vaccine*, 14, 329-336
- 139) Weigl, R. (1920): Untersuchungen und Experimente an Fleckfieberläusen: Die Technik der Rickettsia-Forschung. *Beitr. Klin. Infektionskr. Immun. Forsch.*, 8, 353-376
- 140) Wisseman, C.L., Jr., Sweet, B.H., Rosenzweig, E.C. and Eylar, O.R. (1963): Attenuated living type 1 dengue vaccines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 12, 620-623
- 141) Wisseman, C.L., Jr. (1966): Prophylaxis of dengue, with special reference to live virus vaccine, *熱帯医学会報*, 7, 51-56
- 142) Yoksan, S., Bhamarapavati, N. and Halstead, S.B. (1986): Dengue virus vaccine development: study on biological markers of uncloned dengue 1-4 viruses serially passaged in primary kidney cells. *In: Arbovirus Research in Australia: Proceedings of 4th Symposium*, (eds.) St. George TD, Kay BH, Blok J. pp. 35-38
- 143) Yoksan, S. and Bhamarapavati, N. (1990): Evaluation of biological markers for live attenuated dengue vaccines. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health*, 21, 708-709
- 144) Zhang, Y.-M., Hayes, E.P., McCarty, T.C., Dubois, D.R., Summers, P.L., Eckels, K.H., Chanock, R.M. and Lai,

- C.-J. (1988): Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. *J. Virol.*, 62, 3027-3031
- 145) Zhao, B., Prince, G., Horswood, R., Eckels, K., Summers, P., Chanock, R. and Lai, C.-J. (1987a): Expression of dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS1 by a recombinant vaccinia virus. *J. Virol.*, 61, 4019-4022
- 146) Zhao, B., Mackow, E., Guiler, M., Kruger, S., Markoff, L., Prince, G., Chanock, R., Moss, B., Lai, C.-J., Eckels, K. and Summers, P. (1987b): Expression of dengue virus structural proteins and nonstructural protein NS1 by a recombinant vaccinia virus. *Vaccine* 87, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 397-402

EVALUATION OF A NEW RAPID DIAGNOSTIC TEST "DETERMINE™ MALARIA PF" AGAINST STANDARD BLOOD FILM, *ICT MALARIA P.f*™ AND *PARASIGHT™ F*

DORINA G. BUSTOS¹, REMIGIO M. OLVEDA¹, MASAYOSHI NEGISHI²
and TAKASHI KURIMURA^{3,*}

Received March 26, 1999/Accepted May 21, 1999

Abstract: A new rapid immunochromatographic test for malaria diagnosis, Determine™ Malaria Pf, was evaluated. This diagnostic kit is an antigen capture assay based on the detection of histidine-rich protein 2 (HRP-2) of *Plasmodium falciparum*. Positive test results are read visually, with the formation of red bands within 30 min. 438 patient samples were tested from malaria endemic areas in Palawan, Philippines and non-endemic areas, the Research Institute for Tropical Medicine in Metro Manila and the Komagome Hospital and Keio University Hospital in Tokyo. Of 136 malaria samples, 101 was *P. falciparum*, 33 *P. vivax* and 2 mixed infection. There were 302 other diseases, 26 of infectious nature, 201 non-infectious, and 75 working normals. Using microscopy as the gold standard, sensitivity for Determine™ Malaria Pf, *ICT Malaria P.f*™ and *ParaSight™ F* was 100%, 99% and 100%, respectively, and specificity was 96.7%, 99.1%, and 93.4%, respectively. The positive predictive value for Determine™ Malaria Pf was 90.4%, 97.1% for *ICT Malaria P.f*™ and 82.4% for *ParaSight™ F*. The negative predictive value was 100% for Determine™ Malaria Pf, 99.7% for *ICT Malaria P.f*™ and 100% for *ParaSight™ F*. Determine™ Malaria Pf had an analytical sensitivity for parasite detection as low as 30-50 parasites/ μ l. Antigenemia was seen to persist until about 9 days in patients treated with the second line drug sulfadoxine-pyrimethamine (Fansidar®) despite a negative blood film. It was longer in chloroquine-treated patients, 14-21 days, only to give a strong positive signal on the day some patients recrudescence, also with a positive blood film. Following of HRP-2 antigen clearance might be used to predict early treatment failures or drug resistance. Determine™ Malaria Pf is a very simple 2-step rapid and convenient procedure with excellent sensitivity and specificity. Its marked simplicity and reliability makes it ideal for field use where remote health centers are minimally equipped and staffed, and malaria diagnosis urgently needed.

Keywords: *Plasmodium falciparum*, diagnosis, histidine rich protein 2 (HRP-2), immunochromatography

INTRODUCTION

The development of rapid and specific diagnostic tests to identify individuals infected with malaria is of paramount importance in efforts to control the public health impact of this disease. Despite the simple technology and relatively low direct costs, microscopic diagnosis is still expensive requiring an adequate infras-

tructure to purchase and maintain supplies and equipment, to train microscopists and to ensure proper quality assurance of the service. Rural clinics do not have the ability to diagnose malaria on-site due to lack of microscopes and trained technicians to evaluate blood films. Since access to a microscopic diagnosis in case of illness in the Rural Health Units (RHU) of endemic areas is not only difficult but time-constrained, a simple

1 Research Institute for Tropical Medicine, Department of Health, Alabang, Muntinlupa City, Philippines

2 Department of Infectious Diseases, Komagome Hospital, 18-22 3 Chome, Honkomagome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8677, Japan

3 Department of Viral Infections, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871 Japan

* Correspondence: Dr. TAKASHI KURIMURA (565-0781 吹田市山田丘 3-1 大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野 栗村 敬)

and rapid diagnostic test is most useful for early case detection and prompt treatment. If such a simple test is made available to trained village health workers, this will save the patient time to treatment and the cost of travel.

The urgent need for new simple and cost-effective diagnostic tests to overcome the deficiencies of light microscopy have been recognized for a long time (WHO, 1996).

Recent advances have now made it possible to consider the feasibility of supplementing light microscopy with a standard antigen detection test using high technology production methods and low technology applications. In the last 5 years, rapid diagnostic tests have been developed and tested in the field. These tests are based on the detection of the parasite-specific histidine-rich protein 2 (HRP-2), commercially available *ParaSight*TM F and Immunochromatographic Test; *ICT Malaria Pf*TM, and lactate dehydrogenase enzyme known as OptiMAL[®] Test (Flow Inc., Portland, Oreg. USA). All tests use a dipstick technique, a methodology that has been successfully employed in clinical biochemistry. This dipstick has been evaluated extensively and found to have a level of diagnostic sensitivity equal to, or better than conventional microscopy. The first 2 procedures make use of a dipstick to which are attached antibodies directed against the *P. falciparum* HRP-2 antigen. This water-soluble protein is secreted by the parasite and is present in both blood and plasma (Howard *et al.*, 1986; Parra *et al.*, 1991; Desakorn *et al.*, 1997). OptiMAL[®] utilizes a dipstick coated with monoclonal antibodies against the intracellular metabolic enzyme parasite lactate dehydrogenase (LDH) (Palmer *et al.*, 1998). Comparative studies of these different diagnostic tests with Giemsa-stained blood films showed good sensitivities (84%-98.5%) and specificities (86% to 99.5%) (Schiff *et al.*, 1993; Beadle *et al.*, 1994; Garcia *et al.*, 1996; WHO, 1996; Valecha *et al.*, 1998). The availability of the commercially available rapid tests is however constrained by its cost. There will always be a compelling reason to try the least expensive, simplest and rapid quality test procedures available to health providers.

More recently, another rapid immunochromatographic test known as DetermineTM Malaria Pf had been developed. It is also an antigen capture assay, based on the detection of the circulating HRP-2 antigen of *P. falciparum*. If this simple rapid test is made available at low cost in the field, the current flow of work in malaria diagnosis shall be changed and improved considerably. The primary purpose of this study was to test the

clinical diagnostic utility of the kit DetermineTM Malaria Pf in actual field conditions in endemic areas in the Philippines, comparing its performance with the standard malaria blood smear, *ICT Malaria Pf*TM and *ParaSight*TM F among *P. falciparum* and *P. vivax* infections. The secondary purpose was to test in a non-endemic area in Japan against imported malaria and non-malaria specimen. A third purpose was to test the antigen clearance and assess if the test results could be used to predict drug resistance if antigens do not clear, or they are detectable earlier in the blood before a blood film becomes positive.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area and study population

The study was conducted in endemic areas in Palawan, Philippines, where suspected malaria patients were screened at the Palawan Provincial Hospital in Puerto Princesa City, and in Quezon and El Nido, Palawan. Non-malarious cases, suspected malaria patients and working normals were tested in non-endemic areas at the Research Institute for Tropical Medicine in Metro Manila, Philippines, and the Komagome Hospital and Keio University in Tokyo, Japan.

2.2. Collection and microscopic analysis of specimen

Following a signed informed consent, a fingerprick was done and approximately 200 μ l blood taken for a thick and thin blood film, *ParaSight*TM F, *ICT Malaria Pf*TM and DetermineTM Malaria Pf tests. The thick and thin blood films were examined blindly on site, without reference to the results of the rapid tests. Malaria microscopy was considered as the gold standard. Blood films were considered negative if no parasites were seen in 200 WBC counts on thick film. Parasitemia was determined on thick film, counting the number of parasites per μ l of blood against 200 WBCs, and 800 WBCs if parasites are very scarce. If parasitemia was too high, this was counted in the thin film, counting the asexual forms against 1,000 RBCs per μ l blood. The thin film was used to differentiate *P. falciparum* from *P. vivax*. If found positive by any of the above procedures, 2 ml of venous blood was extracted and set aside for cold storage (2-8°C for 1 week) and retested. The results of the retest were used as final results. All positive malaria patients were given the appropriate treatment and hospitalized if necessary.

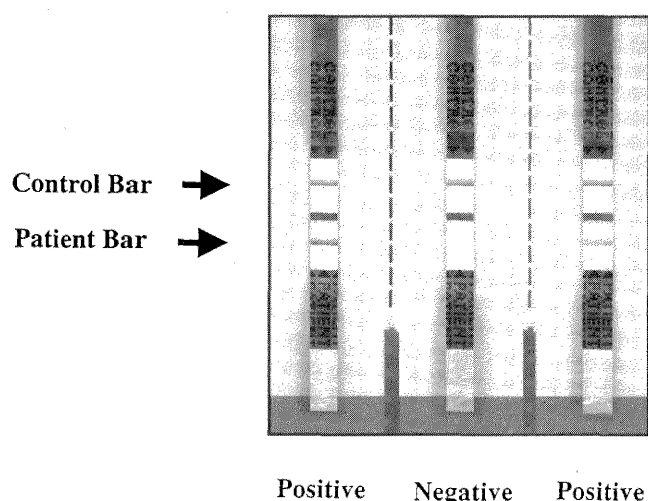


Figure 1 Description of Determine™ Malaria Pf assay.

2.3. Determine™ Malaria Pf test

All blood samples were tested with Determine™ Malaria Pf (Abbott Laboratories, Japan), an immunochromatographic rapid test. This is an antigen capture assay, based on the detection of the circulating histidine rich protein-2 (HRP-2) antigen of *P. falciparum* in blood (Figure 1). The test uses a nitrocellulose strip with a conjugate site containing anti-HRP-2 IgG coated selenium conjugate, and a capture site containing anti-HRP-2 IgG. If a sample contains HRP-2 antigen, it first reacts with the anti-HRP-2 selenium conjugate. As the antigen-antibody selenium colloid complex flows past the capture site, a visible red line forms within 2–5 min. About 2 μ l of whole blood is deposited on the sample pad using a calibrated sampling device, followed by the addition of 2 drops of a chaser buffer. The test strip also contains a control site which confirms the validity of the assay by the formation of a second visible red line. According to manufacturing instructions, standard reading time is 30 min. The test device can be stored at 2–

30°C. It is a 2-step procedure, simpler, more rapid and easier to use and store than the other available kits. Comparison of assay feature between Determine™ Malaria Pf and other HRP-2 tests is shown in Table 1.

2.4. Comparison of microscopy with other HRP-2 Malaria tests

All smear positive and negative specimen were evaluated against the Determine™ Malaria Pf and two other commercially available tests *ParaSight™ F* (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) and *ICT Malaria P.f™* (ICT Diagnostics, Sydney, Australia). These were used as previously described (Schiff *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1996), to determine the level of agreement with the Determine™ Malaria Pf and blood smears.

2.5. Antigen clearance determination in chloroquine-treated isolates

To confirm the antigen clearance period (antigenemia) of whole blood in Determine™ Malaria Pf, finger prick and venous blood were further collected from 10 *P. falciparum* cases on days 0, 1, 2, 4, 7, 9, 21 and 28. The same whole blood specimen were also examined on blood film and compared with *ICT Malaria P.f™* and *ParaSight™ F*. Results were reassessed for the antigen clearance especially in recrudescing cases.

2.6. Threshold of parasite detection

To determine the lowest end point sensitivity, serial dilution was performed in 1 Pf isolate, comparing the intensity of the signal of Determine™ Malaria Pf kit as against standard microscopy count (parasites/ μ l). The Pf specimen was diluted up to 1:80 to achieve low level detection limit, a parasite count of less than 50 asexual forms/ μ l.

Table 1 Comparison of 3 rapid HRP-2 tests

Product Name	Determine™ Malaria Pf	<i>ICT Malaria P.f™</i>	<i>ParaSight™ F</i>
No. of Assay Step	2 steps	5 steps	6 steps
Sample Volume	2 μ l	10 μ l	50 μ l
Storage Condition	2–30°C	2–8°C	2–30°C
Time to Result	30 min	5–10 min	20–30 min
Components	Reagent card Chase Buffer Sample collection device	Reagent card Chase Buffer Capillary tube	Reagent card Chase Buffer Capillary tube Sample lysing reagent Liquid conjugate Sample treatment tube

2.7. Interference and Rheumatoid Factor test

To confirm the effect of interference substance, high concentrations of triglyceride (1,000 mg/dl) and bilirubin (20 mg/dl) was added to 5 *P. falciparum* specimen and 5 negative specimen, and tested by Determine™ Malaria Pf.

Patient samples from Tokyo were also subjected to rheumatoid factor (RF) tests to determine any cross reactions with the HRP-2 kits as reported in previous literatures (Bartoloni *et al.* 1998; Grobusch *et al.*, 1999). This was done by latex agglutination (Iatron Laboratories, Inc. LPIA Ace RF) on automated instrumentation. Subjects in Keio Univ. were 1 *P. vivax* and 150 in-outpatients, 147 of those specimens could be tested for RF. Subjects in Komagome Hospital were 16 outpatients for Clinic of Infectious Diseases, 15 of those specimens could be tested for RF.

2.8. Statistical design and analysis

The sample size was calculated based on positive blood specimen as the study population rather than disease prevalence. This was estimated using hypothesis tests for 2 population proportions, with the following

parameters; 5% level of significance and power of 80%, one-sided test, assuming that the gold standard (blood film) will achieve 95% sensitivity and 85% for the test kit. This gives us n=111 positive specimen (Pf and Pv). The statistical analysis included descriptive statistics, sensitivity and specificity, the positive and negative predictive values, accuracy of the test, and McNemar's test is to evaluate significant change in positivity of each HRP-2 rapid test as compared to the gold standard.

RESULTS

Comparison of microscopy with HRP-2 tests

A total of 438 samples were collected from various patients, examined by microscopy and compared with **ParaSight™ F**, **ICT Malaria Pf™** and **Determine™ Malaria Pf**. Of 438 samples tested microscopically (Tables 2, 3), 101 were *P. falciparum*, 33 *P. vivax*, 2 were mixed infection *P. vivax* and *P. falciparum*, 26 tropical diseases those were collected in Research Institute for Tropical Medicine (a breakdown of those were 12 dengue fever, 3 urinary tract infection, 3 hepatitis, 2

Table 2 Sensitivity results of the 3 rapid HRP-2 tests vs. microscopy gold standard

Sample	Microscopy	Determine*	ICT**	ParaSight F***
Pf malaria	<i>P. falciparum</i>	100% (101/101)	99% (100/101)	100% (101/101)
Mixed Infection	<i>P. falciparum</i> and <i>P. vivax</i>	100% (2/2)	100% (2/2)	100% (2/2)
Total	Pf+mixed infection	100% (103/103)	99% (102/103)	100% (103/103)

* : Determine™ Malaria Pf

** : ICT Malaria Pf™

*** : **ParaSight™ F**

Table 3 Specificity results of the 3 rapid HRP-2 tests vs. microscopy gold standard

Sample	Microscopy	Determine*	ICT**	ParaSight F***
Pv malaria	<i>P. vivax</i>	100% (33/33)	100% (33/33)	100% (33/33)
Tropical diseases	Negative	100% (26/26)	100% (26/26)	100% (26/26)
Other diseases	Negative	94.5% (190/201)	98.5% (198/201)	89.1% (179/201)
Working Normal	Negative	100% (75/75)	100% (75/75)	100% (75/75)
Total	<i>P. vivax</i> and negatives	96.7% (324/335)	99.1% (332/335)	93.4% (313/335)

* : Determine™ Malaria Pf

** : ICT Malaria Pf™

*** : **ParaSight™ F**

Table 4 Comparative results of the 3 rapid HRP-2 tests

Test	Sensitivity	Specificity	PPV†	NPV††	Accuracy	McNemar X ² value	P value
Determine*	100%	96.7%	90.4%	100%	97.5%	9.091	0.0026†††
ICT**	99.0%	99.1%	97.1%	99.7%	99.1%	0.250	0.6171
PFT***	100%	93.4%	82.4%	100%	95.0%	20.045	0.0001†††

* : Determine™ Malaria Pf
 ** : ICT Malaria Pf™
 *** : ParaSight™ F
 † : Positive Predictive Value
 †† : Negative Predictive Value
 ††† : statistically significant at 5% level (p<0.05)

leprosy, 2 pulmonary TB, 2 typhoid fever, 1 chronic obstructive pulmonary disease, 1 erythematous patch and multiple papules, 1 systemic viral infection), 201 non-malarious (other diseases) and 75 working normals (negative). Of 103 samples positive for *P. falciparum* and mixed infections microscopically, 103, 102 and 103 were positive each by ParaSight™ F, ICT Malaria Pf™ and Determine™ Malaria Pf, giving a sensitivity of

100%, 99% and 100%, respectively. Of 33 samples positive for *P. vivax* by microscopy, all 33 were negative each by ParaSight™ F, ICT Malaria Pf™ and Determine™ Malaria Pf, giving a specificity of 100% for all tests. Of 302 samples of tropical diseases, non-malarious (other diseases) and working normals by microscopy, 280, 299 and 291 were found to be negative each by ParaSight™ F, ICT Malaria Pf™ and Determine™

Table 5 Length of antigenemia according to treatment

Pt No	Tx	Test	D0	D2*	D3	D5*	D7	D14	D21	D28
C09	CQ	ThBF	Pf 8080	Pf 40	Pf 40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		DetPf	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	+
C10	CQ	ThBF	Pf 800	Pf 1080	Pf 100	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		DetPf	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++
C12	CQ	ThBF	Pf 160	Pf 80	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		DetPf	++++	+++	+++	++	++	+	(-)	(-)
H21	CQ	ThBF	Pf 1920	Pf 800	Pf 20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
		DetPf	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
EN23	CQ	ThBF	Pf 15,000	ND	Pf 32	ND	(-)	(-)	(-)	(-)
		DetPf	++++	ND	++++	ND	++++	++	+	(-)
EN24	CQ	ThBF	Pf 43,520	ND	Pf 32	ND	(-)	(-)	(-)	(-)
		DetPf	++++	ND	++++	ND	++++	++	+	(-)
EN27	CQ	ThBF	Pf 31,904	ND	fg 80	ND	(-)	(-)	Pf 2325	fg 312
		DetPf	++++	ND	++++	ND	++++	+++	++++	+
EN31	SP	ThBF	Pf 2238	ND	fg 16	ND	fg 32	(-)	(-)	(-)
		DetPf	++++	ND	++	ND	+	(-)	(-)	(-)
EN36	SP	ThBF	Pf 8472	ND	fg 687	ND	fg 754	fg 320	fg 800	fg 32
		DetPf	++++	ND	++	ND	+	(-)	(-)	(-)
EN48	CQ	ThBF	Pf 60,160	ND	Pf 2298	ND	(-)	(-)	(-)	(-)
		DetPf	++++	ND	++++	ND	++++	++++	+++	++

* =only Patients C9, 10, 12 and H12 had Day 2 and 5 blood samples tested

ThBF=Thick Blood Film

DetPf=Determine Malaria Pf

ND=Not Done

CQ=Chloroquine treatment at a total dose of 25 mg base/kg BW over 3 days

SP=Sulfadoxine-Pyrimethamide (Fansidar) single dose

Pf=*P. falciparum* asexual forms/ μ l

fg=*P. falciparum* gametocytes/ μ l

++++=considered the maximum intensity of a positive signal with+ as the faintest positive signal of Determine™ Malaria Pf

Malaria Pf, giving a specificity each of 92.7%, 99.0% and 96.4%, respectively. One patient positive on blood film with a parasitemia of 32 parasites/ μ l was negative by *ICT Malaria Pf*TM and positive on the 2 other tests, and had been previously treated. Another patient negative by blood film (verified by 3 well-trained microscopists) was strongly positive in all 3 HRP-2 tests, with no history of treatment. Patient samples with gametocytes only were excluded in the final analysis as the HRP-2 antigen is not secreted by mature gametocytes. There was one patient that remained gametocyte positive until Day 14 of the follow-up but was HRP-2 test negative.

Overall, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values and accuracy of the *Para Sight*TM F, *ICT Malaria Pf*TM and *Determine*TM Malaria Pf as against the gold standard are summarized in Table 4. The McNemar's Test shows significance of deviation

from the gold standard, as implied by the relatively high false positive rate in each test.

As *Determine*TM Malaria Pf was designed for 30 min reading time, there was no difference between 20 and 30 min to get results in all tests.

*Length of antigenemia of the Determine*TM *Malaria Pf*

Of 10 cases followed-up until day 28, 5 cases showed slower antigen clearance period in whole blood up to the last day of follow-up (Table 5). In one particular patient treated with chloroquine, the signal remained positive up to day 14 despite a negative blood film. But by day 21, the patient returned with fever of 2 days duration, was blood film positive for *P. falciparum*, and all HRP-2 tests strongly positive. The delayed antigen clearance could therefore be an indication of drug resistance, as the blood film subsequently became positive on

Table 6 Endpoint sensitivity of *Determine*TM Malaria Pf as against parasitemia

Dilution	Parasites/ μ l	Intensity of signal
Initial parasitemia	11,862	++++
1 : 4	2,705	++++
1 : 10	1,095	+++
1 : 20	256	++
1 : 40	48	++
1 : 80	32	+

Table 7 Interference test results

Malaria Positive Samples	Bilirubin (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	<i>Determine</i> [*] Results
H12	0	0	Positive
	20	1,000	Positive
H11	0	0	Positive
	20	1,000	Positive
S01	0	0	Positive
	20	1,000	Positive
S02	0	0	Positive
	20	1,000	Positive
S03	0	0	Positive
	20	1,000	Positive
Negative Samples	Bilirubin (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	<i>Determine</i> [*] Results
H06	0	0	Negative
	20	1,000	Negative
H07	0	0	Negative
	20	1,000	Negative
H08	0	0	Negative
	20	1,000	Negative
C01	0	0	Negative
	20	1,000	Negative
M02	0	0	Negative
	20	1,000	Negative

* : *Determine*TM Malaria Pf

Table 8 Specificity data from Japanese patients and RF test results

Test Site	Determine™ Malaria Pf	ICT Malaria Pf™	ParaSight™ F
Komagome Hospital	93.8% (15/16) 1/1 RF(+)**	100% (16/16)	75% (12/16) 1/4 RF(+)**
Parasitology Dept., Keio University	100% (1/1)*	100% (1/1)*	100% (1/1)*
Keio University Hospital	94% (141/150) 6/9 RF(+)**	98.7% (148/150) 0/1 RF(+)**	90% (135/150) 7/14 RF(+)**
Total	94% (157/167)	98.8% (165/167)	88.6% (148/167)

* Malaria *P. vivax* infection

** False positivity associated with positive rheumatoid factor (RF)

*** Inadequate blood sample in one patient, hence could not be tested for RF

further follow-up. Two other patients treated with Sulfadoxine-Pyrimethamine (Fansidar®) following recrudescence after chloroquine treatment failure gave the faintest positive signal until day 7, and had a definitive negative signal by day 14 and until the end of the follow-up.

Analytical sensitivity

Comparison of end-point sensitivity (detection limit) by serial dilution as against parasitemia per μl of blood by microscopy showed that the minimum sensitivity of Determine™ Malaria Pf could be at least 30-50 asexual forms per μl (Table 6). And from field samples, parasite counts of 32, 40, 40 and 80 asexual forms/ μl by microscopy were all positive on Determine™ Malaria Pf.

Interference and rheumatoid factor tests

All 5 *P. falciparum* positive specimen and 5 negative specimen were not affected by triglyceride and bilirubin up to 1,000 mg/dl and 20 mg/dl respectively (Table 7). Table 8 shows the specificity data of patient samples from Japan, where false positivity in the 3 rapid HRP-2 tests are associated with positive RF test results in more than 50% of false positive patients.

DISCUSSION

Malaria is of major public health importance and ranks among the top ten leading causes of morbidity in the Philippines, especially in rural areas. It remains endemic in 63 out of 76 provinces in the country. Detection of the malaria parasite by microscopy remains as the standard operational diagnostic procedure. Unfortunately, especially in the remote areas where malaria is highly endemic, microscopy is not readily accessible and it can take as long as 2-3 weeks

before slide results are available (WHO, 1996). Hence the delay in the diagnosis and treatment of cases contribute to the continuing transmission in these areas. Because of the scarcity of microscopes and well-trained microscopists to read the slides, there is a need for more rapid and simple diagnostic tests that can be carried out with ease in remote areas by a village health worker with minimum training.

This study compared the diagnosis of malaria by a new rapid test, Determine™ Malaria Pf, with standard microscopy and 2 other commercially available HRP-2 antigen tests, and found that the 3 methods yielded comparable results. Blood films identified positive by the gold standard microscopical diagnosis were mostly positive by ICT Malaria Pf™, ParaSight™ F and Determine™ Malaria Pf. That one suspect Pf sample was strongly positive by the 3 HRP-2 tests and not detected on blood film may be explained by the fact that the kits detect circulating antigen which may still be in the blood 6-14 days post-treatment (Shiff *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1997). Another possible explanation for this discrepancy is subpatent parasitemia not detected in the peripheral circulation with or without treatment. The study of length of antigenemia was done in El Nido, northern area of Palawan island, being famous as endemic area of *P. falciparum* and people in this area had been infected by *P. falciparum* repeatedly since their infancy. As we had appropriately observed in 1 recrudescing case, the Determine™ Malaria Pf remained positive even after the blood films were negative for 2 weeks, only to give a stronger signal (again) when the blood films became positive by the 3rd week (day 21). In 2 other patients who received sulfadoxine-pyrimethamine following treatment failure with chloroquine, the HRP-2 test was negative by the second week even if gametocytes were still present in the blood films. A highly efficacious drug will eliminate parasites in a

shorter time hence antigenemia will also be shorter. These observations indicate the potential of Determine™ Malaria Pf as a diagnostic tool to predict early treatment failures in areas where resistance to currently used antimalarials is an emerging problem. It can be used to monitor *in vivo* response to antimalarial treatment (Di Perri *et al.*, 1997), but more field tests may have to be done.

The present study shows that Determine™ Malaria Pf is highly sensitive and specific, comparable with other HRP-2 tests (Schiff *et al.*, 1993; Beadle *et al.*, 1994; Valecha *et al.*, 1998). In the analytical sensitivity tests, the lower detection of 30–50 parasites/ μ l indicated by a faint positive signal on Determine™ Malaria Pf makes it superior to microscopy, since a longer examination time and expertise is needed with the latter. From field samples, parasite counts of 32, 40, 40 and 80 asexual forms/ μ l by microscopy were all positive on Determine. The lowest parasite count of 32 ring forms/ μ l in one patient was positive by ParaSight™ F and Determine™ Malaria Pf with a weak signal, but negative by ICT Malaria Pf™. A similar finding was observed with the serial dilution of one positive sample wherein the corresponding intensity of the signal was graded (Table 6). Craig and Sharp (1997) reported that an expert microscopist can detect 80 parasites/ μ l with good reproducibility, and that sensitivity of microscopic detection diminishes with counts less than 50/ μ l. Determine™ Malaria Pf would therefore have the same detection sensitivity as an expert microscopist, but at a shorter time and with less training or expertise and equipment needed.

A relatively high false positive rate with all 3 HRP-2 tests was observed in patients from Tokyo, associated with the findings of high rheumatoid factor (RF). 82% of this Japanese study population was over 40 years old. Tohge *et al.* (1991) reported that the average RF value in a population of 20–29 year old was 3.5 IU/ml, significantly lower than in the 40–49 year old age group which had 6.3 IU/ml, and 5.6 IU/ml in the 50–59 year old age group. 19.8% (32/162 excluding untested inadequate samples) of the Tokyo study population was RF positive, coming mainly from an elderly age group. Grobusch *et al.* (1999) reported that ICT Malaria Pf™ and ParaSight™ F showed high false positives in RF positive specimen, 6.6% and 16.5%, respectively. Bartoloni *et al.* (1998) also showed 68.4% (13/19) false positives with ParaSight™ F in RF positive specimen, and mentioned a prevalence rate of 5% in healthy persons and 10–20% in over 65 years old. We cannot discount the possibility that the relatively high false

positives associated with positive RF tests accounts for the significant change between the gold standard and each HRP-2 kit (by McNemar's test). Relatively high false positive rates of HRP-2 tests in RF positive specimen was considered a general issue for HRP-2 detecting kits (Grobusch *et al.*, 1999). This may need to be investigated further in malaria endemic areas across population age groups.

Technical difficulties and discrepancies in microscopic readings are a common problem in the field. In one field survey in Quezon, Palawan, 6 *P. falciparum* false positive slides were read by an inexperienced field-based microscopist, which were all negative on the 3 HRP-2 tests. Some ICT Malaria Pf™ tests were invalidated as there was no band formation on the positive control of the test card. This technical variability may be due to lot variation of the kits. In a field situation, the reliability of each test, the ease with which it is performed operationally, the rapidity of yielding results in a large number of sick patients and the economic costs are all very important factors to consider. Since the HRP-2 tests are specific for *P. falciparum*, it still has its limitations in areas where the prevalence of other species such as *P. vivax* are just as high, and relapsing infections contribute significantly to the malaria morbidity in these regions.

Determine™ Malaria Pf is a very simple, rapid, easy-to-read and convenient diagnostic test with excellent sensitivity and specificity for field use. Furthermore, comparing with other HRP-2 tests, Determine™ Malaria Pf has some advanced features. Though final reading time is designed as 30 min, it is easy for every technician to see a clear red line in patient bar within 2–5 min in case of strong positive specimens. Assay procedure needs only 2 steps while ParaSight™ F needs 6 steps and card type device is easy to handle and keep it. Storage condition is 2–30°C so that device could be stored in room temperature. Required sample volume is only 2 μ l and unique sample collecting device is attached for easy to apply sample to card. As ParaSight™ F needs 50 μ l sample, it is difficult for infant malaria patient to collect large volume. Though some ICT Malaria Pf™ tests were invalidated showing no band formation on the positive control of the test card, invalid result was not occurred in Determine™ Malaria Pf during this study. Its marked simplicity and reliability puts it at a greater advantage than other rapid tests, with the provision that its price can be as competitive and economically affordable in developing countries where its ultimate usefulness will be put to test.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge the laboratory personnel of the Palawan Provincial Hospital, the Diagnostic Parasitology Section of the Research Institute for Tropical Medicine in Metro Manila, the staff of the Malaria Control Service, Palawan, the Rural Health Unit staff of El Nido and Quezon, Palawan, and the staff of Komagome Hospital and Keio University Hospital in Tokyo, Japan. We also wish to thank Dainabot Laboratories, Japan, for this technical collaborative research.

REFERENCES

- 1) Bartoloni, A., Strohmeyer, M., Sabatinelli, G., Benucci, M., Serni, U. and Paradisi, F. (1998): False positive Parasight F test for malaria in patients with rheumatoid factor. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 92, 33-34
- 2) Beadle, C., Long, G.W., Weiss, W.R., McElroy, P.D., Maret, S.M., Oloo, A.J. and Hoffman, S.L. (1994): Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet*, 343 (8897), 564-568
- 3) Craig, M.H. and Sharp, B.L. (1997): Comparative evaluation of four techniques for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 91, 279-282
- 4) Desakorn, V., Silamut, K., Angus, B., Sahassananda, D., Chotivanich, K., Suntharasamai, P., Simpson, J. and White, N.J. (1997): Semi-quantitative measurement of *Plasmodium falciparum* antigen PfHRP-2 in blood and plasma. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 91, 479-483
- 5) Di Perri, G., Olliaro, P., Nardi, S., Allegranzi, B., Deganello, R., Vento, S., Lanzafame, M., Cazzadori, A., Bobora, S. and Concia, E. (1977): The Parasight-F rapid dipstick antigen capture assay for monitoring parasite clearance after drug treatment of *Plasmodium falciparum* malaria. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 91, 403-405
- 6) Garcia, M., Kirimoama, S., Marlborough, D., Leafasia, J. and Rieckmann, K.H. (1996): Immunochromatographic test for malaria diagnosis. *Lancet*, 347, 1549
- 7) Grobusch, M.P., Alpermann, U., Schwenke, S., Jelinek, T. and Warhurst, D.C. (1999): False-positive rapid tests for malaria in patients with rheumatoid factor. *Lancet*, 353, 297,
- 8) Howard, R.J., Uni, S., Aikawa, M., Aley, S.B., Leech, J. H., Lew, A.M., Wellems, T.E., Rener, J. and Taylor, D. W. (1986): Secretion of a malarial histidine-rich protein (Pf HRP II) from *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Cell Biol.*, 103, 1269-1277
- 9) Palmer, C.J., Lindo, J.F., Klaskala, W.I., Quesada, J.A., Kaminsky, R., Baum, M.K. and Ager, A.L. (1998): Evaluation of the OptiMAL test rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J. Clin. Microbiol.*, 36(1), 203-206
- 10) Parra, M.E., Evans, C.V. and Taylor D.W. (1991): Identification of *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein 2 in the plasma of humans with malaria. *J. Clin. Microbiol.*, 29(8), 1629-1634
- 11) Schiff, C.I., Premji, Z. and Minjas, J.N. (1993): The rapid manual Parasight F test. A new diagnostic tool for *Plasmodium falciparum* infection. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 87, 647-648
- 12) Singh, N., Valecha, N. and Sharma, V.P. (1997): Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 91, 396-397
- 13) Tohge, H., Ichimura, M., Sakiyama, J., Ohi, H. and Kawanami, H. (1991): RA (Rheumatoid Arthritis) test' - RF (Rheumatoid Factor). *Sogo Rinsho*, 40, 368-376 (in Japanese)
- 14) Valecha, N., Sharma, V.P. and Usha Devi, C. (1998): A rapid immunochromatographic test (ICT) for diagnosis of *Plasmodium falciparum*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 30, 257-260
- 15) WHO (1996): Informal Consultation of Recent Advances in Diagnostic Techniques and Vaccines for Malaria: A rapid dipstick antigen capture assay for the diagnosis of falciparum malaria. *WHO Bulletin OMS.*, 74(1), 47-54

COMPARATIVE STUDY OF RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA OF *TRYPANOSOMA CRUZI* ISOLATES FROM PARAGUAY

SAYUMI BABA¹, TAMAMI MATSUMOTO², HIROJI KANBARA³,
MAKOTO SAKAMOTO⁴, MARISEL MALDONADO⁵,
ANTONIETA ROJAS DE ARIAS⁵, HIDEYUKI SAYA¹ AND TATSUYUKI MIMORI^{1*}

Received April 26, 1999/Accepted June 2, 1999

Abstract: The variation of Paraguayan *Trypanosoma cruzi* isolates was examined using the unweighted pair group method analysis (UPGMA) based on the resulting matrix of the Dice similarity coefficients of random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles. These isolates were also compared with the established strains isolated from Brazil, Chile and Colombia in South America. Of 9 Paraguayan isolates, 3 isolates were similar to the Berenice, Y and Sao Felipe strains (zymodeme type; Brazilian Z2), respectively, isolated from Brazil, and 4 strains were similar to the Tulahuen strain from Chile. There was no isolate similar to the Colombiana I strain (Z1) from Colombia.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas' disease, Paraguay, random amplified polymorphic DNA (RAPD), unweighted pair group method analysis (UPGMA)

INTRODUCTION

Chagas' disease caused by *Trypanosoma cruzi*, is widely distributed in South and Central America and represents a considerable health problem. In Paraguay, 20-30% of the population is infected in endemic areas (Rojas de Arias *et al.*, 1984), where *Triatoma infestans* is a responsible vector for the domestic transmission of *T. cruzi* (Canese, 1978). In Paraguay, about 30% of the patients infected with *T. cruzi* have cardiac symptoms, but digestive symptoms are rare (Canese *et al.*, 1972). The multiform symptoms of Chagas' disease might be caused by genetic differences in *T. cruzi* strains (Miles *et al.*, 1981).

The classification and identification of *T. cruzi*

strains has mainly depended on by zymodeme analysis (Ebert, 1982; Miles and Cibulskis, 1986; Higo *et al.*, 1997). Schizodeme analyses have been adopted for classification of *T. cruzi* strains using kinetoplast DNA restriction fragment length polymorphism (Carreno *et al.*, 1987; Mimori *et al.*, 1992) and polymerase chain reaction (PCR) methods (Avila *et al.*, 1990). Recently, random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis using arbitrarily-primed polymerase chain reaction (AP-PCR) have been also adopted for classification of *T. cruzi* strains because of its sensitivity and besides the point that it does not require sequence information for primer design, and recommended the RAPD analysis method as a useful tool for the study of parasite populations (Steindel *et al.*, 1993; Brisse *et al.*, 1998; Gomes *et*

1 Department of Tumor Genetics and Biology, Kumamoto University School of Medicine, Honjo 2-2-1, Kumamoto 860-0811, Japan

2 Ginkyo College of Medical Science, Okubo 1-6-2, Kumamoto 860-0038, Japan

3 Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Sakamoto 1-12-4, Nagasaki 852-8523, Japan

4 Sanwa Hospital, Sanwa-machi, Nagasaki 851-0403, Japan

5 Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asuncion, P.O. Box 2511, Asuncion, Paraguay

*Correspondence: Dr. TATSUYUKI MIMORI

Department of Tumor Genetics and Biology, Kumamoto University School of Medicine, Honjo 2-2-1, Kumamoto 860-0811, Japan
Tel. +81-96-373-5117 Fax. +81-96-373-5120 E-mail: tmimori@kaiju.medic.kumamoto-u.ac.jp
(860-0811 熊本市本荘 2-2-1 熊本大学医学部腫瘍医学教室 三森 龍之)

al., 1998).

In the present study, we conducted an RAPD analysis on *T. cruzi* isolates from different endemic areas of Paraguay and compared them with established strains from Brazil, Chile and Colombia using the Dice similarity coefficient.

MATERIALS AND METHODS

Parasites:

Seven *T. cruzi* isolates were from Chagas' disease patients, 3 males and 4 females, and two isolates were from vector insects in endemic areas of Paraguay, South America. Three strains were isolated from patients of the acute Chagas' disease with Romana's sign or oedema; JAG strain from Ita Moroti in Department of Paraguari, MG from Ygatimi in Canindeyu and RF from Altos in Cordillera. Two were from seropositive (IgG) patients without the symptoms of the disease; DG from Paraguari in Paraguari and LO from Tobati in Cordillera. The other patients have chronic chagasic cardiopathy; CIR from Quiindy in Paraguari and ARM from Villeta in Central. Two strains were isolated from *Triatoma infestans*, 201 and 204, captured in two houses of Ypahu in Paraguari, which is a highly endemic area of Chagas' disease (Table 1). Five established *T. cruzi* strains, i.e., Colombiana I (Z1 by zymodeme classification) from Colombia, Y, Berenice (Brazilian Z2) and Sao Felipe (Brazilian Z2) from Brazil, and Tulahuen from Chile, were used for comparison with the Paraguayan strains. The *T. rangeli*, *Leishmania amazonensis*, *L. guyanensis* and *L. mexicana* were also examined for comparison.

DNA preparation:

T. cruzi epimastigotes were cultured in a Schneider's

medium with 15% fetal bovine serum at 26°C and washed with physiological saline, then the parasite pellets were suspended in SE buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8.0), lysed with sarkosyl and digested with proteinase K at 60°C. The kinetoplast DNA-enriched materials were collected by centrifugation (16,000 rpm for 90 min at 4°C), extracted by phenol/chloroform and precipitated by ethanol (Mimori *et al.*, 1992). These DNAs were used as the templates for AP-PCR.

PCR amplification and polyacrylamide gel electrophoresis:

The protocol of AP-PCR was based on our method for *Leishmania* parasites (Mimori *et al.*, 1998). Each amplification reaction was done in a final volume of 15 µl reaction solution containing 200 µM each dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, and 30 ng template DNA, 150 ng primer, 0.3 Units *rTaq* DNA polymerase (Takara), and was performed on a GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). The following 6 primers were tested for the amplification of *Trypanosoma* DNA: FL-S (5'-GCCATGCAGCAGCCCTTCAATTAC-3'), M-13 (5'-GTAAAACGACGGC-CAGT-3'), LS-3 (5'-AAGTGTTGATACCCACTTTGT-3') FL-AS (5'-GTGCTTCTCTTAGAGCTTATATAAGCC-3'), PDR2-S (5'-CTGGTAAGTTTAGTCTTTTGTC-3') and PDR2-AS (5'-GTGCCAAGCTTG-CATGCCTG-3'). The reaction mixture was subjected at 94°C for 5 min for the initial denaturation, and was subjected to the initial 10 cycles though the following profiles: 94°C for 30 sec for denaturation, 37°C for 30 sec for annealing and 72°C for 30 sec for extension, followed by 30 cycles where the annealing step was altered to 60°C. Finally, the mixture was subjected to 72°C for 7 min, and stored at 4°C. Each 7 µl of PCR product were analyzed by electrophoresis in 6% polyacrylamide gels

Table 1 Paraguayan *Trypanosoma cruzi* isolates used in this study

Isolate	Host (Age and sex)	Phase	Locality
RF	Man (7, M)	Acute	Altos (Cordillera)
JAG	Man (12, M)	Acute	Ita Moroti (Paraguari)
MG	Man (41, M)	Acute	Ygatimi (Canindeyu)
DG	Man (45, F)	Indeterminate	Paraguari (Paraguari)
LO	Man (15, F)	Indeterminate	Tobati (Cordillera)
ARM	Man (59, F)	Chronic cardiopathy	Villeta (Central)
CIR	Man (65, F)	Chronic cardiopathy	Quiindy (Paraguari)
Vector			
201	<i>Triatoma infestans</i>		Ypahu (Paraguari)
204	<i>Triatoma infestans</i>		Ypahu (Paraguari)

at 100 V for 1 hr. The gels were stained by the silver nitrate staining.

Data analysis:

Phenetic trees based on the Dice similarity coefficient (Dice, 1945) between all possible pairs in an analysis group were constructed. The similarity coefficient between an isolate 1 and an isolate 2 was calculated in

the following formula. The similarity coefficient $S = 2a / 2a + b + c$; a = the number of bands present in both isolates, b = the number of bands present in an isolate 1 and absent in isolate 2, and c = the number of bands present in an isolate 2 and absent in isolate 1. These data were compared by means of an UPGMA. The phenon line, which was marked on the phenetic tree of UPGMA, is the average of the similarities among all possible

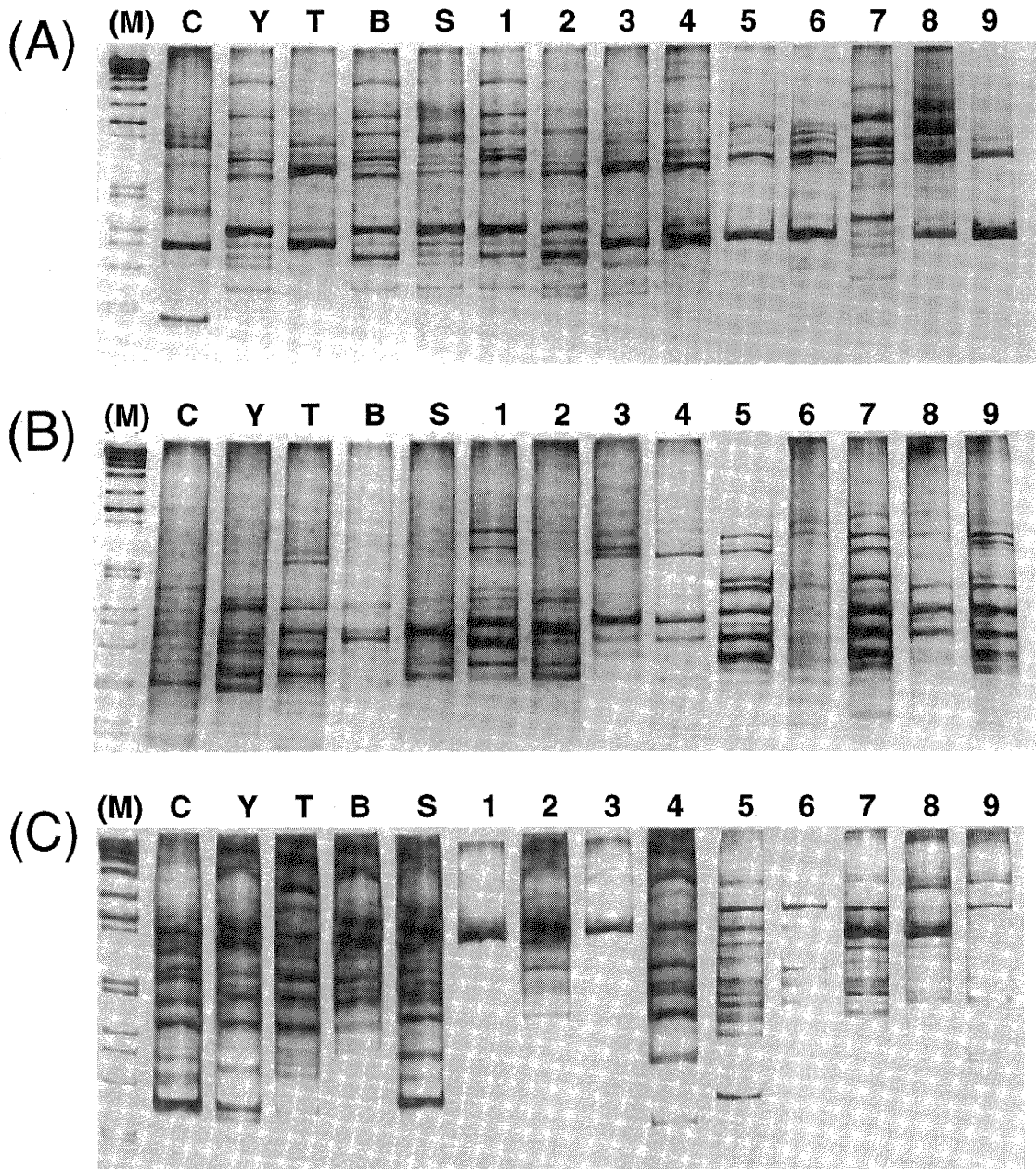


Figure 1 RAPD products of established and Paraguayan *Trypanosoma cruzi* strains using arbitrary primers FL-S(A), M-13(B) and LS-3(C) separated on 6% polyacrylamide gels stained with silver. (M); 1 kb ladder. C; Colombiana I, Y; Y strain, T; Tulahuen, B; Berenice, S; Sao Felipe, 1; CIR, 2; JAG, 3; RF, 4; MG, 5; DG, 6; LO, 7; ARM, 8; 201 and 9; 204.

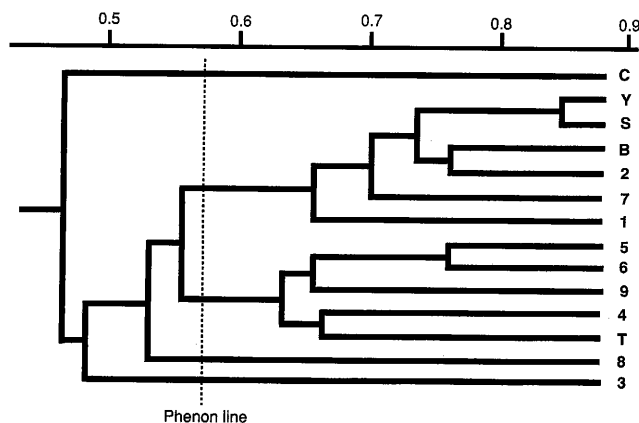


Figure 2 UPGMA dendrogram of the established and Paraguayan *T. cruzi* strains based on the Dice similarity coefficients of RAPD profiles (average data of the matrix with the primers FL-S, M-13 and LS-3). The vertical bar indicates the phenon line. C; Colombiana I, Y; Y strain, T; Tulahuen, B; Berenice, S; Sao Felipe, 1; CIR, 2; JAG, 3; RF, 4; MG, 5; DG, 6; LO, 7; ARM, 8; 201 and 9; 204.

pairs, and indicates separation among groups (Steindel *et al.*, 1993; Vidigal *et al.*, 1994).

RESULTS AND DISCUSSION

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns of AP-PCR were compared among Paraguayan isolates and established strains of *T. cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania* strains. Six arbitrary primers were tested for the amplification of parasite DNA, and three primers (FL-S, M-13 and LS-3) were found to give the clear consistent DNA fingerprinting patterns for the strain-comparison as shown in Figure 1. The Colombian I strain had a DNA profile very different from those of the others. The Y, Berenice and Sao Felipe strains were similar to each other. The DNA profile of the Tulahuen were slightly different from the others. There was a similar tendency of the division of Paraguayan and established strains among RAPD profiles with each primer. The DNA profiles patterns of *T. rangeli* and 3 *Leishmania* strains were completely different from those of *T. cruzi* strains (data not shown). As well as the zymodeme analysis, RAPD was successfully used for classification of *T. cruzi* variants (Steindel *et al.*, 1993; Brisse *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1998). Moreover, it was indicated that RAPD analyses might make a major contribution to the study of the genetics of the snail, *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for Schistosomiasis (Vidigal *et al.*, 1994). Our conditions of PCR method and arbitrary primers were differ-

ent from those of previous research, however, we were also able to construct the appropriate grouping of *T. cruzi*. This method is a useful technique for the classification of *T. cruzi* strains without requiring much amount of DNA.

Dice similarity coefficients between two strains were calculated according to the method described in materials and methods. The construction of the UPGMA dendrogram of Paraguayan and established strains was based on the average data of the matrix of Dice similarity coefficients in the RAPD profiles with 3 primers. These strains of *T. cruzi* were divided into 5 distinct groups as indicated by the position of the phenon line. Of 9 Paraguayan isolates, 3 isolates (CIR, JAG and ARM) were similar to the Berenice, Y and Sao Felipe strains isolated from Brazil (zymodeme type; Brazilian Z2), respectively, and 4 strains (DG, 204, LO and MG) were similar to the Tulahuen strain from Chile. There was no Paraguayan isolate similar to Colombiana I (Z1) from Colombia in this study. The classification by present RAPD profiles were also paralleled to analyses of our restriction enzyme analysis previously reported (Mimori *et al.*, 1992) and those of zymodeme analyses (Ebert, 1982; Higo *et al.*, 1997). We were able to construct the appropriate grouping of *T. cruzi*. The RAPD profiles were easy and convenient as a classification of *T. cruzi* organisms.

It is interesting that the strains in the same groups; 3 strains (CIR, JAG and ARM) and 3 strains (DG, 204 and LO) were isolated from near endemic areas, respectively. The ubiquity observed in the strains studied in the work, as well as in other investigations has been explained by the clonality criteria used mainly in studies employing zymodeme techniques (Tibayrenc *et al.*, 1984). The fixed heterozygosity observed in several loci over time and in distant geographical areas is due to the absence of meiotic segregation in *T. cruzi* populations (Tibayrenc and Ayala, 1988; Lewicka *et al.*, 1995). In this study, we found no correlation between the pathogenicity and the DNA profiles of *T. cruzi* strains. A further detailed analysis for more different strains might clarify this correlation in this country.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by a grant from the Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University. We thank Takako Arino for her editorial assistance.

REFERENCES

- 1) Avila, H., Goncalves, A.M., Nehme, N.S., Morel, C.M. and Simpson, L. (1990): Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 42, 175-188
- 2) Brisse, S., Barnabe, C., Banuls, A.L., Sidibe, I., Noel, S. and Tibayrenc, T. (1998): A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 92, 253-256
- 3) Canese, A. (1978): Datos actualizados sobre conocimientos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en el Paraguay. *Revista Paraguaya de Microbiol.*, 13, 3-6
- 4) Canese, A., Adorno, A., Cattoni, A., De Vargas, H., Galeano, A. and Sanchez, A. (1972): Alteraciones electrocardiográficas en pacientes con inmunofluorescencia positiva para la enfermedad de Chagas. *Rev. Paraguaya de Microbiol.*, 7, 15-16
- 5) Carreno, H., Rojas, C., Aguilera, X., Apt, W., Miles, M. and Solari, A. (1987): Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from Chile. *Exp. Parasitol.*, 64, 252-260
- 6) Dice, L.R. (1945): Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 26, 853-860
- 7) Ebert, F. (1982): The identification of two main-groups of *Trypanosoma cruzi* stocks from Brazil by their isoenzyme patterns of isoelectrofocusing. *Tropenmed. Parasitol.*, 33, 140-146
- 8) Gomes, M.L., Macedo, A.M., Pena, S.D. and Chiari, E. (1998): Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. *Acta Trop.*, 69, 99-109
- 9) Higo, H., Yanagi, T., Matta, V., Agatsuma, T., Kanbara, H., Tada, I., De Leon, M.P., Monroy, C. and Tabaru, Y. (1997): Genetic Structure of *Trypanosoma cruzi* in Central America and its comparison with South America strains. *Inter. J. Parasitol.*, 27, 1369-1374
- 10) Lewicka, K., Breniere, S., Barnabe, C., Dédet, J.P. and Tibayrenc, M. (1995): An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. *Exp. Parasitol.*, 81, 20-28
- 11) Miles, M.A., Povoas, M., Prata, A., Cedillos, R., DeSouza, A.A. and Macedo, V. (1981): Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet*, 8234, 1338-1340
- 12) Miles, M.A. and Cibulskis, R.E. (1986): The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today*, 2, 94-97
- 13) Mimori, T., Maldonado, M., Samudio, M., Rojas de Arias, A., Moreno, R. and Sakamoto, M. (1992): Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolates from Paraguay, using restriction enzyme analysis of kinetoplast DNA. *Annal. Trop. Med. Parasitol.*, 86, 231-237
- 14) Mimori, T., Sasaki, J., Nakata, M., Gomez, E.A., Uezato, H., Nonaka, S., Hashiguchi, Y., Furuya, M. and Saya, H. (1998): Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene*, 210, 179-186
- 15) Rojas de Arias, A., Monzon, M.I., Velazques, G., Guillen, E. and Torreani, T.N. (1984): A seroepidemiologic survey of Chagas' disease in two Paraguayan villages. *Bull. Pan Am. Heal. Org.*, 18, 164-171
- 16) Steindel, M., Neto, E.D., De Menezes, C.L.P., Romanha, A.J. and Simpson, A.J.G. (1993): Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 60, 71-80
- 17) Tibayrenc, M., Echalar, L., Dujardin, J.P., Poch, O. and Desjeux, P. (1984): The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in southern Bolivia; new isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 78, 519-525
- 18) Tibayrenc, M. and Ayala, F.J. (1988): Isozyme variability in *T. cruzi*, the agent of Chagas disease: Genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, 42, 277-292
- 19) Vidigal, T.H.D.A., Neto, E.D., Carvalho, O.D.S.C. and Simpson, A.J.G. (1994): *Biomphalaria glabrata*: Extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Exp. Parasitol.*, 79, 187-194

ISOLATION FREQUENCY OF ENTEROPATHOGENS FROM PEDIATRIC DIARRHEAL STOOL IN SURABAYA, INDONESIA: A FIVE YEAR HOSPITAL BASED STUDY

EDDY BAGUS WASITO¹, PITONO SOEPARTO², SUBIJANTO MARTO SOEDARMO², LIEK SUNARNI DJUPRI²,
LINDAWATI ALIMASARDJONO^{1,3}, DADIK RAHARDJO³, NOBUMASA KATAOKA^{4,*}
AND NOBORU NAKASONE⁵

Received April 16, 1999/Accepted June 8, 1999

Abstract: In order to increase our knowledge of the epidemiology for our patient population, we retrospectively analyzed the data obtained from stool samples received at Tropical Disease Research Center, Airlangga University during a five year period. Isolation frequency of enteropathogens from diarrheal stools from 1993 to 1997 were examined in Surabaya, Indonesia. A total of 1,477 hospitalized pediatric patients under 2 years of age with acute diarrhea were enrolled. Bacterial enteropathogens other than *Campylobacter jejuni* and *Clostridium difficile* were positive cumulatively in 1,086 cases out of 1,477 (73.5%), and the annual isolation frequency ranged from 61.1% to 82.4%. *Rotavirus* was detected cumulatively in 408 cases out of 1,184 examined (34.5%), and 210 cases of 408 (51.5%) were co-infected with diarrheagenic *Escherichia coli*. Generally, diarrheagenic *E. coli* were dominant isolates (53.8%) while *Vibrio cholerae* O1, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. were also isolated from the patients with lower frequencies.

Key words: isolation frequency, enteropathogens, diarrheal stool, Surabaya, Indonesia

INTRODUCTION

Diarrhea remains a frequent disease worldwide, with attack rates estimated to be from 2 to 12 or more diarrheal episodes per person annually (Bern *et al.*, 1992). It was the first leading cause of death among young children in developing countries until 1980s. Although the mortality of diarrheal disease in the past decade appears to be decreasing because of intensive world wide promotion of Primary Health Care (PHC) activities including the enhancement of oral rehydration therapy (ORT), it still remains as a major cause of death among young children in these areas. About 3.3 million children younger than 5 years die each year from diarrhea (Bern *et al.*, 1992).

Moreover, about 10%-50% of tourists to the Third World develop traveler's diarrhea (Echeverria *et al.*,

1981; Serichantalergs *et al.*, 1997). From these viewpoints, diarrheal disease should be regarded as a global health problem. In order to increase our knowledge of the epidemiology for our patient population and monitor the situation of diarrheal diseases in Surabaya, we retrospectively analyzed the data obtained from stool samples received at Tropical Disease Research Center, Airlangga University during a five year period.

MATERIALS AND METHODS

Patients: A total of 1,477 patients with acute diarrhea at Dr. Soetomo Hospital in Surabaya during the period from January 1993 to December 1997 were examined. They were children under 2 years of age and were admitted to the hospital.

Specimens: Stool samples were taken before giving

1 Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Airlangga University

2 Department of Child Health School of Medicine Airlangga University

3 Tropical Disease Center, Airlangga University

4 Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine

5 Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus

* Correspondence: Dr. NOBUMASA KATAOKA, Faculty of Health Science, Kobe University School of Medicine, 7-10-2 Tomogaoka, Suma-ku, Kobe 654-0142, Japan

(654-0142 神戸市須磨区友が丘 7-10-2 神戸大学医学部保健学科 片岡 陳正)

Table 1 Isolation frequency of enteropathogens

	1993 No. (%)	1994 No. (%)	1995 No. (%)	1996 No. (%)	1997 No. (%)	Total(%)
No. examined	461	303	250	144	319	1,477
No. pathogen positive	351 (76.1)	234 (77.2)	206 (82.4)	88 (61.1)	207 (64.8)	1,086 (73.5)
No. pathogen negative	110 (23.9)	69 (22.8)	44 (17.6)	56 (38.9)	112 (35.2)	391 (26.5)
Diarrheagenic <i>E. coli</i>	292 (63.3)	185 (61.1)	164 (65.6)	60 (41.7)	93 (29.2)	794 (53.8)
<i>Shigella</i>	32 (6.9)	20 (6.6)	21 (8.4)	5 (3.5)	4 (1.3)	82 (5.6)
<i>Salmonella</i>	35 (7.6)	13 (4.3)	4 (1.6)	0 (0)	12 (3.8)	64 (4.3)
<i>Aeromonas</i>	13 (2.8)	5 (1.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18 (1.2)
<i>V. cholerae</i> O1	32 (6.9)	19 (6.3)	27 (10.8)	4 (2.8)	6 (1.9)	88 (6.0)
<i>K. oxytoca</i>	10 (2.2)	5 (1.7)	6 (2.4)	5 (3.5)	5 (1.6)	31 (2.1)

antibiotics. Self medication prior to visiting the hospital could not be completely excluded. An appropriate amount of stool was collected in a plastic container.

Microbiological examinations: The target bacteria for isolation from all patients were *Vibrio*, *Aeromonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* and *Klebsiella oxytoca*. Ten fold dilution of stool samples were made in sterile normal saline solution, and one loopful of the dilution was streaked on to Thiosulphate Citrate Bile salt Sucrose agar (TCBS agar, Eiken), *Salmonella-Shigella* agar (SS agar, Eiken) and modified Drigalsky medium (BTB agar, Eiken). The colonies grown on agar plates were identified by routine laboratory tests. For the detection of Rotavirus, the stools were diluted ten times in buffer solution and were centrifuged and a drop of supernatant was mixed with a drop of anti-rotavirus antibody sensitized latex (Biomerieux) on a slide glass.

RESULTS

Enteropathogenic bacteria were isolated cumulatively from 1,086 cases out of 1,477 examined

(73.5%), and the annual isolation frequency are shown in Table 1. Diarrheagenic *E. coli* (DEC) were isolated from more than half of specimens examined (53.8%). The isolation rate of DEC among pathogens was 73.0%.

Shigella spp., *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp. and *V. cholerae* O1 were also isolated with lower frequencies of 7.6%, 5.8%, 1.7% and 8.1%, respectively. Rotavirus was detected cumulatively in 408 pediatric diarrhea cases out of 1,184 examined (34.5%), however, diarrheagenic *E. coli* were also isolated cumulatively from 210 cases of the 408 (51.5%) with rotavirus-positive diarrhea. The annual detection rates of rotavirus are shown in Table 2.

DISCUSSION

The isolation rate of enteropathogens from diarrheal stools is largely dependent on the effort of the person conducting the examination. In well conducted studies, the isolation rates of bacterial enteropathogens from diarrheal stools in developing countries have been reported as about 40 to 60% (Adkins *et al.*, 1987;

Table 2 Detection rate of rotavirus

	1993 (%)	1994 (%)	1995 (%)	1996 (%)	1997 (%)	Total (%)
No. examined	168	308	250	144	319	1,184
No. rotavirus positive	56 (33.3)	95 (31.4)	71 (28.4)	52 (36.1)	134 (42.0)	408 (34.5)
rotavirus and DEC both positive	43 (76.8*)	61 (64.2*)	43 (60.6*)	22 (42.3*)	41 (30.6*)	210 (51.5*)

DEC: diarrheagenic *E. coli*.

*: The percentages of DEC positive cases among rotavirus positive cases.

Iwanaga *et al.*, 1993; Kain *et al.*, 1991; Rohner *et al.*, 1997; Siddique *et al.*, 1992).

The present study revealed the isolation rate of 73.5%. And it may be possible to increase the isolation rate by using enrichment media such as Selenite-F broth for *Salmonella*, alkaline peptone water for *Vibrios*, and ampicillin blood agar for *Aeromonas*. Adkins *et al.* (1987) reported that approximately 60% of *Salmonella* isolates were obtained only after enrichment (Adkins *et al.*, 1987).

Three to four colonies of *E. coli* isolated from each sample were examined only for their serogroup based enteropathogenicities in the present study. Therefore, if enterotoxin production was examined, the isolation frequency of pathogens would be higher than the present report. However, it should be noted that serogroup based enteropathogenicities are not necessarily compatible with the real pathogenicities. Therefore, if gene analysis such as detection of *eaeA*, *bfp*, and *IpaH* for enteropathogenic *E. coli* and enteroinvasive *E. coli* were carried out, the isolation frequency of pathogens would go down. Recently, Rohner *et al.* (1997) reported an isolation rate of 8.8% for total of 3 genera (*Salmonella* spp., *Shigella* spp. and *Campylobacter* spp.) from 3,837 stool samples originating from pediatric patients in Switzerland. Although the pediatric cases were not separately analysed, *Campylobacter* revealed the highest isolation rate in total of 13,965 samples from 7,124 patients including adult cases (Rohner *et al.*, 1997).

In the present study, DEC was predominant isolates whereas the isolation rate for *Shigella* spp., *Salmonella* spp. were 5.6% and 4.3% respectively, yielding a cumulative isolation rate of 9.9%. *Shigella* spp., *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. are known to cause mainly community-acquired diarrhea (Barbut *et al.*, 1995). And rotavirus may cause both community-acquired and nosocomial diarrhea, with the latter being a particular cause of diarrhea in children (Iwanaga *et al.*, 1993). Rotavirus was detected cumulatively in 34.5% of infantile diarrhea during 5 years study with no definite seasonal variation. This epidemiological feature is in contrast to that in Japan where the epidemic of rotavirus infection is concentrated in the first 3 months of the year (Fujita, 1990). The reason for this epidemiological contrast is of great interest in the field of tropical medicine and public health. More than one half of the cases with rotavirus infection were also infected with another enteropathogens. The pathogenic role of microorganisms in the dual infection is obscure.

The recent emergence of a new serovar of non-O1 *Vibrio cholerae* in India suggests the necessity of contin-

uous monitoring for etiologic agents of diarrheal diseases (Albert *et al.*, 1993; Ramamurthy *et al.*, 1993).

ACKNOWLEDGEMENT

And also to Sugeng Harijono, Wahyu Hidayatining-sih and Sarah Wuryani who helped in conducting laboratory work and administration.

REFERENCES

- 1) Adkins, H.J., Escamilla, J., Santiago, L.T., Ranoa, C., Echeverria, P. and Cross, J.H. (1987): Two year survey of etiologic agents of diarrheal disease at San Lazaro Hospital, Manila, Republic of the Philippines. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1143-1147
- 2) Albert, M.J., Siddique, A.K., Islam, M.S., Faruque, A.S.G., Ansaruzaman, M., Faruque, S.M. and Sack, R.B. (1993): Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet*, 341, 704
- 3) Barbut, F., Leluan, P., Antoniotti, G., Collignon, A., Sedallian, A. and Petit, J.C. (1995): Value of routine stool cultures in hospitalized patients with diarrhea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14, 346-349
- 4) Bern, C., Martines, J., de Zoysa, I. and Glass, R.I. (1992): The magnitude of the global problem of diarrheal disease: A ten-year update. *Bull. W.H.O.*, 70, 705-714
- 5) Echeverria, P., Blacklow, N.R., Sanford, L.B. and Cukor, G. (1981): Traveller's diarrhea among American peace corps volunteers in rural Thailand. *J. Infect. Dis.*, 143, 767-771
- 6) Fujita, Y. (1990): Rotavirus infection -Clinical symptoms and influence of climate. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, 64, 1255-1263
- 7) Iwanaga, M., Nakasone, N., Nakamura, S., Wasito, E.B., Soeparto, P., Sudarmo, S.M., Soewandojo, E. and Ranuh, I.G.N.G. (1993): Etiologic agents of diarrheal diseases in Surabaya, Indonesia. *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, 21, 143-147
- 8) Haffeejee, I.E. (1995): The epidemiology of rotavirus infections: a global perspective. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 20, 275-286
- 9) Kain, K.C., Barteluk, R.L., Kelly, M.T., Xin, H., Hua, G. D., Yuan, G., Proctor, E.M., Byrne, S. and Stiver, H.G. (1991): Etiology of childhood diarrhea in Beijing, China. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 90-95
- 10) Ramamurthy, T., Garg, S., Sharma, R., Bhattacharya, S. K., Nair, G.B., Shimada, T., Takeda, T., Karasawa, T., Kurazono, H., Pal, A. and Takeda, Y. (1993): Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet*, 341,

703-704

- 11) Rohner, P., Pittet, D., Pepey, B., Nije-Kinge, T. and Auckenthaler, R. (1997): Etiological agents of infectious diarrhea: implications for requests for microbial culture. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1427-1432
- 12) Serichantalergs, O., Nirdnoy, W., Cravioto A., LeBron, C., Wolf, M., Svennerholm, A.M., Shlim, D., Hoge, C.W. and Echeverria, P. (1997): Coli surface antigens associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from persons with traveler's diarrhea in Asia. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1639-1641
- 13) Siddique, A.K., Zaman, K., Baqui, A.H., Akram, K., Mutsuddy, P., Eusof, A., Haider, K., Islam, S. and Sack, R.B. (1992): Cholera epidemic in Bangladesh: 1985-1991. *J. Diarroal Dis.*, 10, 79-86

JAPANESE JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE

VOL. 27 NO. 3 SEPTEMBER 1999

CONTENTS

Review

- Hotta, S.
Antidengue Vaccine: Retrospect and Prospect (in Japanese)397-415

Original article

- Bustos, D.G., Olveda, R.M., Negishi, M. and Kurimura, T.
Evaluation of a New Rapid Diagnostic Test "Determine™ Malaria Pf"
against Standard Blood Film *ICT Malaria P. f*™ and *ParaSight™ F*417-425
- Baba, S., Matsumoto, T., Kanbara, H., Sakamoto, M., Maldonado, M.,
Rojas de Arias, A., Saya, H. and Mimori, T.
Comparative Study of Random Amplified Polymorphic DNA of
Trypanosoma cruzi Isolates from Paraguay427-431
- Wasito, E.B., Soeparto, P., Soedarmo, S.M., Djupri, L.S., Aimsardjono, L.,
Rahardjo, D., Kataoka, N. and Nakasone, N.
Isolation Frequency of Enteropathogens from Pediatric Diarrheal
Stool in Surabaya, Indonesia: a Five Year Hospital Based Study433-436

