

C. 結果

2つのリコンビナントウイルスのカクテル (A6 と T5) と患者からの分離株 (0566) から、それぞれ 5 個ずつの中和抗体 escaped mutant をクローン化した。表 1 に示したように、全てのクローン化したウイルスはフラビウイルス共通反応性でウイルス中和能力のない mAb301、および抗日本脳炎ポリクローナル抗体とは反応したが、ウイルスを中和するモノクローナル抗体 mAb503 とは全く反応性が見られなかった

(表 1) ウイルス感染細胞の各種抗体による免疫染色結果

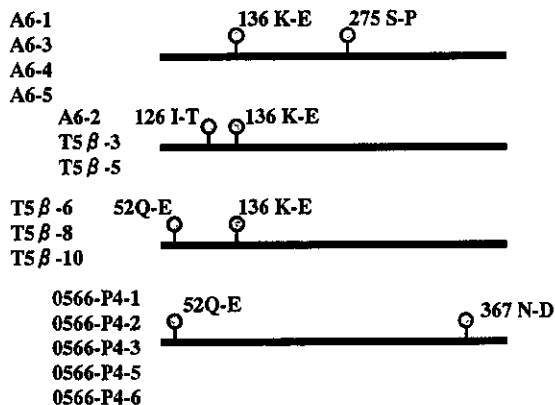
Virus	Poly clone (anti-flavi)	mAb301 (Group1)	mAb503 (Group8)
0566	+	+	+
S982	+	+	+
A6-1	+	+	-
A6-2	+	+	-
A6-3	+	+	-
A6-4	+	+	-
A6-5	+	+	-
T5β-3	+	+	-
T5β-5	+	+	-
T5β-6	+	+	-
T5β-8	+	+	-
T5β-10	+	+	-
0566-1	+	+	-
0566-2	+	+	-
0566-3	+	+	-
0566-5	+	+	-
0566-6	+	+	-

このクローン化した Escaped mutants の E 遺伝子を PCR 法で増幅したのち、遺伝子の塩基配列を決定し、E 蛋白質上のアミノ酸の変異を解析した。その結果、これらの変異ウイルスは 4 種類に分類できた (図 2)。すべての Escape mutant について 2 個のアミノ酸変異が E 蛋白質上に認められた。変異の総数は 5 個である。すなわち、52 番目の Q から E、126 番目の I から T、136 番目の K から E、275 番目の S から P、367 番目の N から D であった。これらは E 蛋白質上の広範な領域にみられ、アミノ酸の一次構造上ではこの中和エピ

トープの位置を特定することはできなかった。

(図 2)

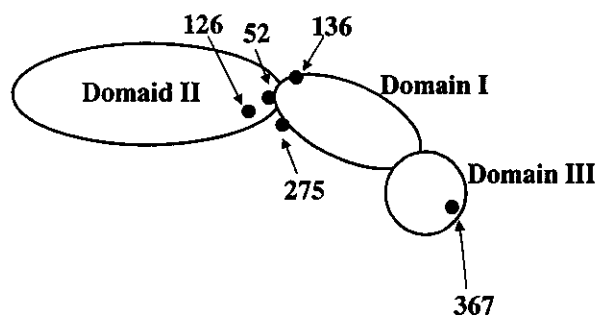
Amino acid replacement on E protein of mAb 503 escape mutants



しかしながらこれらの変異を、近年発表された日本脳炎ウイルス (フラビウイルス) の E 蛋白質の立体構造モデル上にドットしてみると、図 3 に明らかなように、E 蛋白質上のアミノ酸変異は E 蛋白質のドメイン I とドメイン II との結合部に集中していることが明らかとなった。したがって日本脳炎で最も重要であると考えられるウイルス中和に関するエピトープはこの結合部に存在することが推測された。

(図 3)

フラビウイルス E タンパク構造



(表2)

Antibody reactivity of partial revertants with mAbs

Virus	mutation (AA position)	mAb301 (O.D.)	mAb503 (O.D.)	503/301 Ratio	NT(503) End point
0566	-	0.691	1.238	1.79	51,200x
S982	-	0.726	1.411	1.94	51,200x
A6-1	136, 275	0.730	0.007	0.01	100>
A6-2	126, 136	1.073	0.012	0.01	100>
T5 β -10	52, 136	0.998	0.006	0.01	100>
0566-P4-1	52, 367	0.539	0.002	0.00	100>
Kosai-5	126,	1.086	1.181	1.09	1600x
Kosai-9	, 136	1.167	1.294	1.11	nt
mock	-	0.017	0.004	-	0

NT:ウイルス中和抗体価

4種類の Mutants に存在する2個のアミノ酸変異のうち、どちらか一方のみが重要であるのか、或いは双方の変異が必要なのかを確定するため、再び Long-PCR 法を用いたリコンビナントウイルス作成技術を用いて、E 蛋白質上に1個のアミノ酸変異のみを有するウイルスを作成し、各種モノクローナル抗体との反応及び mAb503 による中和抗体価を測定した(表2)。その結果、例えば A6-2 については2つのアミノ酸変異のうち1個の変異を導入したものでは mAb503 との反応性が中程度に低下し、中和からの Escape も不完全であった。したがって完全に mAb503 による中和から逃れるためには、2個のアミノ酸変異が必要であることが確認され、ドメイン I とドメイン II の結合部が日本脳炎ウイルス中和の最も重要な部位であることが結論された。

D. 考察

今回開発した Long-PCR 法をもちいたリコンビナントウイルス作製技術は簡便であり、今後ウイルス病原性に関する基礎的研究に応用が広がると期待される。また今回発見されたウイルス中和のエピトープ部位は、それぞれの種

のフラビウイルスで極めて良く保存されており、ウイルスの病原性や臓器特異性などを解明する上で重要な発見であると考えられる。

E. まとめ

日本脳炎ウイルスの最も重要なウイルス中和部位は、ウイルス外被膜糖蛋白質 (E) のドメイン I とドメイン II の結合部分であることが明らかとなった。今後、フラビウイルスワクチン開発に際してこの知見の応用が期待される。

8. 西ナイルウイルスを中心としたフラビウイルスの遺伝子近縁度の解析

研究協力者： マリア・デル・カルメン・バルケット
 (長崎大学熱帯医学研究所 分子構造解析分野)

A. 目的

フラビウイルスには、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、デングウイルスなど、多くの種が含まれおり、従来はそれぞれ特定の地域で生息し、限られた地域で人への流行が報告されていた。これらはフラビウイルスの『住み分け』と称されていた。例えば、米国にはセントルイス脳炎ウイルスが生息しているが日本脳炎(日本を含むアジアに生息)や西ナイルウイルス(アフリカ、中近東、西アジアに生息)は存在していなかった。しかしながら近年、航空機による大陸間の大量で迅速な物資と人の移動により、フラビウイルスも従来の枠をこえて移動するようになり、上記の極めて近縁なフラビウイルスが同一地域で混在するようになり、その迅速な鑑別が重要となっている。本研究では、これら近縁なフラビウイルスの E 蛋白質について、その近縁度を数値化し、血清検査や遺伝子解析を行う上での基礎的な情報を得ることを目的としている。

B. 方法

各種フラビウイルスの E 蛋白質の遺伝子塩基配列とアミノ酸残基の配列を Gene Bank より得た(表 1)。この情報をもとに DINASIS-Mac プログラム Ver.3.6(Hitachi)を用いて、ホモロジー検索、マルチアラインメントの処理を施した後、近縁度解析の為に Phylogenetic 解析は PHYLIP Computer プログラム (Ver.3.57c、Felstein 1995) を用いた。遺伝子塩基配列からの進化距離の計算は Kimura の Two-Parameter method をもちい、アミノ酸配列からの進化距離の計算は PROTDIST (Ver.3.5c、Felstein 1993) を用いた。進化系統樹の作成は UPGMA 法を用いておこない TREEVIEW プログラムで図に変

換した。

(表 1)

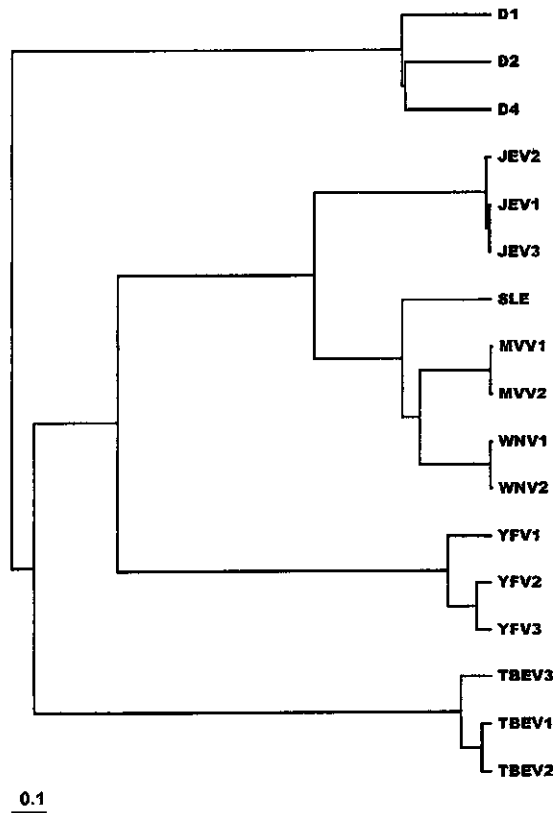
Virus (strain)	Vector	Gene Bank Accession #
Dengue	M	AF231721
Dengue	M	AF231720
Dengue	M	AF231726
JEV1	M	AB028270
JEV2	M	AB028267
JEV3	M	AB028269
YFV1	M	U23580
YFV2	M	U23577
YFV3	M	U23575
SLE	M	AF202541
WNV1	M	AF196835
WNV2	M	AF161266
MVEV1	M	M24220
MVEV2	M	M24220
TBEV1	T	AB001026
TVEV2	T	AB022297
TVEV3	T	AF091018

M: 蚊 T:ダニ

C. 結果

塩基配列に基づく表 1 のフラビウイルスの進化系統樹を図 1 に示す。図から明らかなように、これらのフラビウイルスは 4 つのサブグループ分類できた。即ち(1)デングウイルス群(デング 1, 2, 4 型)、(2)蚊媒介性脳炎ウイルス群(日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス、西ナイルウイルス)、(3)黄熱ウイルス群、(4)ダニ媒介性脳炎ウイルス群である。アミノ酸配列に基づく解析においても同様のグループ化が可能であった(データは添付せず)。以上の結果は抗原解析から定義されているフラビウイルスのグループ群、即ち Dengue complex、Japanese

encephalitis complex (日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、マレーバレー脳炎ウイルス)、黄熱病ウイルス Complex、ダニ脳炎ウイルス Complex と完全に一致した。



また各グループのウイルス間で E 蛋白質の近縁度 (Homology) を数値化すると、デング Complex では 63.9~68.6% の範囲であり、JE Complex は 70.7~99.6% の範囲であった。(表 2)

Table 2

Sub-group	Pairwise identities
Dengue complex	63.9 – 68.6 %
JE complex	70.7 – 99.6 %
YF complex	95.5 – 99.2 %
TB complex	95.3 – 99.2 %

JE: 日本脳炎 YF: 黄熱 TB: ダニ脳炎

D. 考察

デングウイルス Complex に属するデング 1 型から 4 型のウイルスは互いに高い交叉抗原性を有し、血清診断での鑑別は容易ではないことが知られている。今回の解析結果からは西ナイル病、マレーバレー脳炎、日本脳炎、セントルイス脳炎ウイルスはアミノ酸レベルでの近縁度は極めて高く、その鑑別診断を免疫学的に行う場合には結果の解釈について十分な注意が必要であることが確認された。特に日本においては日本脳炎が土着しているため、外来性のフラビウイルス脳炎の侵入には血清学的検索に加えて、ウイルス学的調査が必要不可欠であると考察される。

E. 参考文献

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Felsenstein, J. (1983). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c Department of Genetics, University of Washington Seattle

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J.Mol.Evol.* 16.111-120

Page RDM. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Cabios* 1996; 12:357-358

9. 日本において西ナイルウイルス媒介可能な蚊の分布に関する総括研究

研究協力者：高木正洋・津田良夫

(長崎大学熱帯医学研究所・生物環境分野)

A. 目的

1999年米国において西ナイルウイルスの侵入と流行が発生し、わが国においても同様の事態が起こることが危惧されている。西ナイルウイルスの侵入に備え、影響の範囲を予測する為には媒介蚊の状況を把握しておく必要がある。しかしながら我国に分布する蚊類の中で西ナイルウイルスに関する感受性が実験的に調べられている種類はほとんどない。したがって、西ナイル地域における媒介蚊種とその生態に関する情報から、我国で媒介蚊になると疑われる種類をまず選び出し、それらの種類について日本国内とその周辺地域における分布を総括的に整理して行くことを目的に研究を行った。

B. 方法

過去10年間の長崎市におけるイエカ類の発生状況やすでに文献に発表されているデータをもとに日本における西ナイルウイルスを媒介可能な蚊の現状を推定する。

C. 結果と考察

西ナイル地域における媒介蚊種とその生態

西ナイルウイルスは野生の鳥類と、鳥から吸血する蚊類の間で、感染環が成立していると考えられている。主要な媒介蚊は *Culex univittatus* で、部分的に *Culex antennatus* と *Culex pipiens* が感染に関与していると言われる。また、鳥吸血性の *Coquillettidia metallica* からウイルスが分離されたことがある。

主要媒介蚊である *Culex univittatus* は多様な止水に発生する。湿地の池や湿地性草原の周辺部に最も普通で、よどんだ水溜まりや溝、流

れのゆるやかな川にも見られる。植物が生えていることが普通であるが、植物の茂みで覆われるような水域ではない。*Culex antennatus* は *Culex univittatus* と同じように止水性の水溜まりや溝に発生し、幼虫の形態も酷似している。*Culex pipiens* の幼虫もあらゆる種類の自然の水溜まりに発生する。どちらかといえば有機物が多く覆いのない止水に普通に発生する。

西ナイルウイルス媒介蚊と近縁な蚊類の我国における分布

西ナイル地域における媒介蚊はイエカ属イエカ亜属に属している。このグループに属する蚊は表9-1に示したように、種々のアルボウイルスを媒介している。我国における西ナイルウイルス媒介可能な蚊類として最も有力なのは、やはりイエカ亜属の種類であると思われる。表9-2に東洋区におけるイエカ属イエカ亜属蚊類42種の分布を示した。西ナイル地域における媒介蚊である *Culex univittatus* は中近東、地中海、エチオピアからミャンマーまで分布しているが、それ以東のインドシナ半島から中国、日本には分布していない。東洋区に分布しているイエカ類で日本に分布しているのはネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*)、スジアシイエカ (*Culex vagans*)、カラツイエカ (*Culex bitaeniorhynchus*)、ミツホシイエカ (*Culex sinensis*)、セシロイエカ (*Culex whitmorei*)、シロハシイエカ (*Culex pseudovishnui*)、コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*)、ミナミハマダライエカ (*Culex mimetics*)、ハマダライエカ (*Culex orientalis*)、ヨツホシイエカ (*Culex sitiens*)、*Culex fuscocephala*、*Culex jacksoni* の12種

類である。これに旧北区に分布するアカイエカ (*Culex pipiens pallens*) とチカイエカ (*Culex pipiens molestus*) の 2 種を加えた合計 14 種類が、我国に分布している (表 9-3)。

これら 14 種のうち日本国内の分布が琉球列島に限られる *Culex jacksoni*、*Culex fuscocephala*、ヨツホシイエカ (*Culex sitiens*) の 3 種は、その発生密度が低く人からの吸血習性も弱いことから媒介蚊としての重要度は低いと考えられる。

残りの主要イエカ類 11 種について、発生源と吸血における人嗜好性を表 9-4 にまとめて示した。人嗜好性がないスジアシイエカ (*Culex vagans*)、ハマダライエカ (*Culex orientalis*)、ミナミハマダライエカ (*Culex mimetics*) の 3 種類は媒介蚊にはなり得ない。人嗜好性の弱い 5 種類の中で、コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) は水田における発生数が多く、本種によって媒介される日本脳炎患者が今だに少数ではあるが発生することから考えて、もし西ナイルウイルスに対する感受性があれば媒介蚊になりうると思われる。他 4 種は発生数自体が少ないことを考慮すると、感染環を維持できるとは思われない。

人嗜好性の強いネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*)、チカイエカ (*Culex pipiens molestus*)、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) の 3 種は、発生水域も人家に近接しており、人がこれらの蚊に吸血される機会はかなり多い。最近アメリカ合衆国で発生した西ナイル病が *Culex pipiens* によって媒介されていることを考慮すると、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) とその近縁種であるネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*)、チカイエカ (*Culex pipiens molestus*) も西ナイルウイルスの媒介蚊として注意するべきであろう。

西ナイルウイルスの媒介蚊として注意を要する 4 種イエカのうち、ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) を除く 3 種は表 9-3 に示したように日本全国に分布している。しかしなが

ら、その発生量は蚊の種類あるいは場所によって大きく異なることが予想される。我国における疾病媒介蚊のモニタリングはほとんど行われておらず、そのため近年の疾病媒介蚊の発生状況に関しては全く解明されていないのが現状である。

日本全国の疾病媒介蚊の発生状況は不明であるが、長崎市における最近 10 年間のイエカ類の発生状況について、独自の調査結果があるので、これを表 9-5 および 9-6 に示した。この調査は長崎大学熱帯医学研究所構内に毎週 1 回ライトトラップを設置して行った。採集された蚊はすべて種類を同定し、その個体数を雌雄別に記録した。過去 10 年間に採集された蚊は 9 種類で、個体数の多い順にヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*)、コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*)、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*)、オオクロヤブカ (*Armigeres subalbatus*)、シナハマダラカ (*Anopheles sinensis*)、ヤマトヤブカ (*Aedes japonicus*)、キンバラナガハシカ (*Tripteroides bambusa*)、トラフカクイカ (*Culex halifaxii*)、スジアシイエカ (*Culex vagans*) であった。採集総個体数に対するコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) とアカイエカ (*Culex pipiens pallens*) の割合はそれぞれ、35% および 23% で全体の 58% に及んでいた。発生源や吸血習性を考慮するとイエカ類の構成割合が高い傾向は、我国の都市部で共通しているものと思われる。ただし、蚊の発生状況は年々変化していることが、表 9-5、9-6 に示した調査結果から示唆される。

コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) の採集数は 1995 年を境として大きく異なり、90 年～94 年の 5 年間に雌 303、雄 32、合計 335 頭採集されたのに対して、1995 年以降は雌 20、雄 19、合計 39 頭と近年減少傾向にあることがうかがわれる。これに対して、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) の採集数は、90 年～94 年の 5 年間に雌 26、

雄 54、合計 80 頭採集されたのに対して、1995 年以降は雌 86、雄 83、合計 169 頭と増加傾向を示している。

アメリカ合衆国で発生した西ナイル病の感染源のひとつとして、輸入された鳥類が疑われている。我国でもペットとして鳥類が輸入されている状況は同様である。人家周辺で発生し、屋内吸血性であるアカイエカ (*Culex pipiens pallens*) やチカイエカ (*Culex pipiens molestus*) が屋内で飼育されている鳥類から吸血する可能性は高いだろう。これに対して、コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) がペットとして飼育されている鳥類から吸血する機会は非常にまれであると考えられる。したがって、我国における西ナイルウイルスの媒介蚊として最も注意を要するのは、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) とチカイエカ (*Culex pipiens molestus*) の 2 種であり、その分布が日本全国にわたることから、できるだけ速やかに全国的な発生状況調査を実施する必要があると思われる。

表 9-1 重要な蚊媒介性アルボウイルス病と主要媒介蚊種

Arbovirus	Epidemics	Case fatality rate (%)	Disease	Principal human vector
<i>Togaviridae</i>				
Chikungunya	yes	rare	hemorrhagic	<i>Aedes aegypti</i>
	yes	0	febrile	
Eastern equine encephalitis	yes	50-75	encephalitis	<i>Coquilletidia perturbans</i>
Ross River	yes	0	febrile	<i>Culex annulirostris</i>
Sindbis	yes	rare	febrile	<i>Cx. univittatus</i>
Venezuelan equine encephalitis	yes	0.1-20	encephalitis	<i>Cx. pipiens</i> > 30 species
Western equine encephalitis	yes	5-10	encephalitis	<i>Cx. tarsalis</i>
<i>Flaviridae</i>				
Dengue 1-4	yes	3-12	hemorrhagic	<i>Ae. aegypti</i>
	yes	0	febrile	<i>Ae. albopictus</i>
West Nile	no		febrile	<i>Cx. univittatus</i>
Japanese encephalitis	yes	30-40	encephalitis	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>
Murray Valley encephalitis	yes	20-70	encephalitis	<i>Cx. annulirostris</i>
St. Louis encephalitis	yes	4-20	encephalitis	<i>Cx. pipiens complex</i> , <i>Cx. nigripalpus</i>
Yellow fever	yes	5-20	hemorrhagic	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Ae. africanus</i> , <i>Ae. simpsoni</i> , <i>Haemagogus spp.</i>
<i>Bunyaviridae</i>				
Rift Valley fever	yes	0	febrile	flood water <i>Aedes spp.</i> , <i>Cx. pipiens</i>
LaCrosse encephalitis	no	1	encephalitis	<i>Ae. triseriatus</i>

Nasci & Miller (1996)より

表 9-2 東洋区におけるイエカ属イエカ亜属蚊類 *Culex (Culex)* の分布

Distribution Species	ORIENTAL																	EXTRA LIMITAL				
	Pakistan	Afghanistan	India	Bangladesh	Myanmar	Sri Lanka	Thailand	Cambodia, Laos	Vietnam	Pein. Malaysia	Malaysia	Singapore	Indonesia	Philippines	Hong Kong	Taiwan	Ryukyus	S. China	Middle East	Mediterranean	Ethiopian	Japan
<i>quinquefasciatus</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●	●
<i>vagens</i>	●		●	●											●		●	●				●
<i>hutchinsoni</i>			●				●	●	●		●			?								
<i>theileri</i>	●	●	●		●													●	●	●	●	
<i>univittatus</i>	●		●		●														●	●	●	
<i>fuscocephala</i>	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●				●
<i>gelidus</i>	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●				
<i>bitaeniorhynchus</i>	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●
<i>infula</i>			●	●	●	●			●	●	●		●	●								
<i>luzonensis</i>														●								
<i>selangorensis</i>										●												
<i>pseudosinensis</i>							●			●		●										
<i>longicornis</i>							●			●												
<i>sinensis</i>			●	●	●	●	●		●	●			●	●	●	●		●				●
<i>cornutus</i>	●		●																			
<i>epidesmus</i>	●	●	●	?																		
<i>geminus</i>										●		●										
<i>kinabaluensis</i>											●											
<i>sitiens</i>	●		●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●	●
<i>alis</i>							●		●	●	●	●	●	●		●						
<i>whitemorei</i>	●		●	●	●	●	●		●	●	●		●	●		●	●	●				●
<i>annulirostris</i>													●	●								
<i>vishnui</i>	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●				
<i>pseudovishnui</i>	●		●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●				●
<i>perplexus</i>							●		●	●	●											
<i>alienus</i>							●		●	●	●											
<i>philippinensis</i>														●								
<i>incognitus</i>													●	●								
<i>tritaeniorhynchus</i>	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●				●
<i>whitei</i>			●				●		●	●			●	●								
<i>barraudi</i>	●		●	?			●											●				
<i>edwardsi</i>			●	?																		
<i>mimeticus</i>	●		●		●				●	●					●	●	●	●	●	●		●
<i>fasyi</i>														●								
<i>jacksoni</i>			●			●									●	●		?				●
<i>tsengi</i>																●						
<i>mimuloides</i>			●															●				
<i>diengensis</i>															●							
<i>mimulus</i>	●		●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●				
<i>murrelli</i>			●				●		●	●						●		●				
<i>propinquus</i>											●											
<i>orientalis</i>														?		?		●				●

Sirivanakarn (1976)、Tanaka et al. (1979)、Toma and Miyagi (1986)より

表 9-4 日本に分布する主要なイエカ 11 種の発生源および人嗜好性

種類	発生源	人嗜好性
<i>quinquefasciatus</i> ネッタイエカ	下水、溝、雨水升、など	強い
<i>sinensis</i> ミツホシイエカ	水田、窪地、排水溝など日当たりのよい水域	弱い
<i>pseudovishnui</i> シロハシイエカ	水田、窪地、湿原、池沼など	弱い
<i>whitemorei</i> セシロイエカ	冷水の水田、窪地、湧水、湿原など	弱い
<i>tritaeniorhynchus</i> コガタアカイエカ	主に水田	弱い
<i>bitaeniorhynchus</i> カラツイエカ	水田、窪地、排水溝など日当たりのよい水域	弱い
<i>mimetics</i> ミナミハマダライエカ	水田、窪地、湿原、池沼など	なし
<i>vagans</i> スジアシイエカ	水田、窪地、湿原、池沼など	なし
<i>orientalis</i> ハマダライエカ	水田、窪地、湿原、池沼など	なし
<i>pipiens molestus</i> チカイエカ	ビルの地下水溜り、浄化槽など	強い
<i>pipiens pallens</i> アカイエカ	下水、溝、雨水升、など	強い

表 9-5 最近 10 年間に長崎大学熱帯医学研究所構内でライトトラップによって採集されたコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) の個体数

コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) 雌

年	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	合計
1990	5	3	4	69	36	4	1	0	122
1991	6	2	0	11	9	2	0	0	30
1992	2	3	2	3	11	7	0	0	28
1993	0	2	0	5	9	4	0	1	21
1994	8	2	3	75	13	1	0	0	102
1995	1	0	0	1	0	0	0	0	2
1996	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1997	No data								
1998	0	2	0	0	0	0	0	0	2
1999	1	1	8	1	2	2	0	0	15

コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) 雄

年	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	合計
1990	0	5	3	0	4	3	0	0	15
1991	0	2	0	1	1	0	0	0	4
1992	0	1	0	1	0	0	0	0	2
1993	0	0	1	0	4	1	0	0	6
1994	0	0	1	0	4	0	0	0	5
1995	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1996	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1997	No data								
1998	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1999	0	1	10	5	1	0	1	1	19

表 9-6 最近 10 年間に長崎大学熱帯医学研究所構内でライトトラップによって採集されたアカイエカ(*Culex pipiens pallens*)の個体数

アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) 雌

年	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	合計
1990	0	0	1	0	0	1	0	0	2
1991	0	0	1	2	1	1	0	0	5
1992	0	1	0	2	0	3	0	0	6
1993	1	0	0	1	0	0	2	0	4
1994	0	0	1	4	1	1	2	0	9
1995	0	1	17	9	7	0	1	0	35
1996	0	12	8	3	1	9	0	0	33
1997	No data								
1998	0	0	1	4	1	1	1	1	9
1999	0	0	6	3	0	0	0	0	9

アカイエカ (*Culex pipiens pallens*) 雄

年	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	合計
1990	0	0	1	2	0	0	0	0	3
1991	0	0	2	2	4	0	0	0	8
1992	0	0	0	3	5	4	0	0	12
1993	0	1	1	1	1	0	0	1	5
1994	0	1	1	11	5	2	6	0	26
1995	0	1	10	26	8	3	1	0	49
1996	0	0	0	2	9	10	0	0	21
1997	No data								
1998	0	0	3	2	1	0	1	1	8
1999	0	0	3	2	0	0	0	0	5

10. 西ナイル病を含むフラビウイルスの疫学・診断・治療のガイドライン(案)

主任研究者：五十嵐 章（長崎大学熱帯医学研究所・病原体解析部門・分子構造解析分野）

研究協力者：大谷 明（国立感染症研究所 名誉所員）

：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

A. 緒言

1999年夏から秋にかけて、ニューヨーク市を中心とした米国東北において発生した、西ナイル（WN）ウイルスのヒトと動物の間での流行は異例のもので、新興感染症の病原体が新たな流行地域へ拡大する事態が容易に発生することを如実に示したものとして注目される。この流行は、米国において深刻に受け止められたことは云うまでもないが、ヒトの移動、及び各種の動物を含む物資の輸送が、世界的規模で益々増加している現代において、本症が日本にも持ち込まれる可能性は十分に考えられる。更に、本ウイルスが日本に持ち込まれた場合、それを伝播できる媒介蚊、及びウイルスを増幅する脊椎動物宿主が日本に生息していることを考慮すれば、日本において、国、及び地方自治体、更には民間の保健衛生機関及び医療機関が、本症に対して監視、予防、防除体制などの準備体制を前もって整備しておくことが、国民の健康を守るために必要である。国立感染症研究所と長崎大学熱帯医学研究所は共同して、平成 11 年度構成科学研究費の援助によって、1999 年米国東北部で発生した WN ウイルスのヒトと動物における流行に関する情報を総括し、日本において将来発生しうる WN ウイルスの流行に対処するための指針を策定することとなった。

B. 監視体制

日本において近い将来、WN ウイルスが流行する可能性のある都道府県において、監視体制を確立することが必要である。これらの地域は、北海道以外のほとんどの都府県が該当し、殊に毎年日本脳炎（JE）ウイルスの伝播が高頻度で認められる近畿以西は要注意地域である。日本で JE が大流行していた 1966 年以前では、多くの都府県でウイルス分離を含む媒介蚊の調査が毎年夏に実施されていた。近年日本では JE の低流行状態が持続している関係上、多くの都府県ではブタの抗体調査を唯一の JE 監視業務としている状態である。このことは今回の課題である WN ウイルス脳炎に対する監視体制の確立にとって憂慮すべき状態である。日本国政府は、この事態を深刻に受け止め、既存の JE 監視体制を基本として、患者の臨床及び疫学、鳥類・哺乳類・媒介蚊を含む生態学、更にそれらを支援する実験室内診断、及び一度流行が確認された場合には、それが拡大する以前に予防対策を実施できる体制を整備するために指導力を発揮すべきである。

1. 鳥類に対する能動的な監視。野鳥、殊にカラスの異常死に関する情報を、一般市民、特に野鳥愛好家や自然保護団体の支援を得て収集し、死亡後新鮮な検体からウイルスを分離同定するか、ウイルス遺伝子を RT-PCR で検出する

ことによって、当該地域の野鳥におけるアルボウイルスの活動を追跡する。

2. 媒介蚊に対する能動的な監視。媒介蚊調査の能力がある地域において野外蚊を採集し、種の同定・分別の後、WN ウイルスその他のアルボウイルスの分離・同定、或いは RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出を行ない、当該地域における媒介蚊の同定、蚊個体数の監視を行なう。
3. 家畜に対する受動的な監視の強化。当該地域における WN ウイルスの存在を検出し、トリと蚊の間の伝播サイクル以外に別の伝播サイクルが存在する可能性を探る補助的手段として実施する。神経系疾患を示す各種の家畜動物の血清、及び髄液 (CSF) を用いて、WN ウイルスに対する抗体を測定すると共に、CSF 及び死亡後の脳組織からウイルスを分離・同定、及び RT-PCR によるウイルス遺伝子を検出する。
4. ヒトに対する受動的な監視の強化。WN ウイルスの存在を検出する補助的手段として実施する。ウイルス性脳炎 (殊に弛緩性マヒを伴う症例について)、及び経費が許せば無菌性髄膜炎患者に対して、血清及び CSF 中の WN ウイルス、JE ウイルス、その他のアルボウイルスに対する抗体を測定すると共に、CSF 及び死亡後の脳組織からウイルスの分離・同定、及び RT-PCR によるウイルス遺伝子を検出する。

C. 実験室内診断

WN ウイルスおよびその他アルボウイルス感染症に対する確定診断には、特殊の実験

室内検査が必要である。監視の成否は、そのような診断ができる実験室が使用できるか否かに係っている。実験室内では最小限下記の試験ができることが必要である。国立感染症研究所 (NIID) 及び長崎大学熱帯医学研究所 (ITM) は必要に応じて試薬を供給し、人員に対する教育・訓練を行なう。

1. 血清反応。IgM 及び IgG ELISA は、ヒト及び動物の血清及び髄液検体中の抗体測定法として最初に用いるべき試験であり、全ての都府県、及び特定の政令都市の衛生研究所及び獣医学研究所において実施態勢を確立しなければならない。更に、NIID、ITM、その他特定される数カ所の研究機関では、WN ウイルスと JE その他のフラビウイルスを区別するために、型特異的抗体測定法としての中和試験を実施することが必要である。NIID 及び ITM は、これらの試験に使用するための標準陽性及び陰性血清、並びに抗原を確保し、他の検査機関からの要請に応じて配布できる体制を整備するものとする。血清試験には、急性期と回復期に採血された対血清を使用する。検体には患者の住所氏名、年齢、性別の他、採血日、発病日、臨床診断、過去の予防接種歴 (殊に日本脳炎、黄熱、ダニ脳炎など) のデータを伴っていることが必要である。

2. ウイルス分離と検出。WN ウイルスを含むフラビウイルスは、個々の種毎に特異的な反応を示す以外に、抗原的に近縁な間系にあるフラビウイルスに共通な群特異的抗原、並びに全てのフラビウイルスに共通な。このため、血清

反応では、殊に二次感染の症例では、患者に感染したウイルスの種類を同定できないことがしばしば見られる。従って、患者に感染したウイルスの種を同定するには、ウイルスを分離した後、型特異的単クローン抗体 (MAb) を用いた免疫学的方法、或いは型特異的プライマーを用いた RT-PCR 法でウイルスの型を同定するか、或いは検体から直接 RT-PCR でウイルス遺伝子を検出することが必要である。特定の都府県及び中央の研究機関では、ウイルス分離と同定の能力を具備する必要がある。それに加えて、いくつかの特定の実験室では逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によってウイルス RNA を検出・型同定ができる必要がある。米国 CDC では WN ウイルスを生物災害防止安全レベル 3 (BSL3) に分類しているので、生きたウイルスを扱う研究室は全て BSL3 の封じ込め施設を必要とする。患者その他の血清検体は、ウイルスが含まれている可能性があるため、56°C、30 分間の加熱処理を施した後、BSL2 の封じ込めレベルで検査してもよい。プールした蚊材料中のウイルス抗原を検出するための抗原検出 ELISA を開発し、中央の研究機関で使用すると共に、地方の研究機関に普及する必要がある。更に、いくつかの特定の研究機関では、剖検材料中に WN ウイルスを検出し、JE ウイルスと区別するための免疫組織化学染色の能力を具備する必要がある。

D. 患者の治療

WN ウイルスその他のフラビウイルスに特異的に有効な抗ウイルス剤は存在しないので、患者に対する治療は対症療法によって生命を維持し、自然治癒を助けることが基本となる。特に呼吸 (必要な場合にはレスピレーターや気管切開) 及び血液循環の確保と、必要に応じて非経口的栄養補給、体位転換による褥瘡の防止、受動的運動による筋萎縮の防止などの看護措置が重要である。高熱に対しては解熱剤、痙攣に対しては鎮静剤の投与、脳浮腫に対してはマンニトール静注が行なわれる。

E. 予防・防除対策

現時点で使用可能な予防ワクチンが開発されていない、WN ウイルスその他のアルボウイルスがヒトその他の動物に伝播されることを防ぎ、一度伝播が開始された時点で流行を防ぐ最も効果的な方法は、媒介蚊防除を用いて、ヒトその他の動物が病原体に感染する機会を低下させることである。ヒト及び家畜の疾患を防除するために、WN ウイルス流行の可能性が危惧される都府県の衛生部当局は十分な媒介蚊防除能力を備えておく必要がある。

1. 蚊の発生源対策。媒介蚊に対する最も有効で経済的な防除法は幼虫に対する発生源対策である。経験的には、地方自治体の財源を利用して、ヒト及び家畜に感染が及ぶ前に、蚊幼虫の発生源に殺虫剤を投入するプログラムが最善である。このプログラムは、ある地域でヒトの患者が発生した報告を受けた後でも最初に実施すべき緊急活動である。殺虫剤の空中散布によって媒介蚊

の成虫を防除する方法は最後の手段として保留すべきである。

2. 公衆に対する対応。蚊媒介性疾患に対する防除計画の重要な部分は、これらの疾患の伝播様式、及びその防除対策を、一般住民に教育することである。公衆に対する教育は対象となる住民に情報を効果的に伝達するために、マスメディアを含む多種類の広報活動を活用する必要がある。

F. 公衆衛生学的基盤

WN ウイルスを含む節足動物媒介性疾患を効果的に監視し、防除対策を実施するためには、地方自治体及の衛生当局が使用できる財源・人材に対する優先順位を再評価することが必要な場合もある。現在、節足動物媒介性疾患に対して十分に対処できる人的・財政的基盤を備えた地方自治体は限られている。各都府県の衛生部は少なくとも、衛生昆虫学及び獣医学領域において、十分な設備と訓練された人員を備え、アルボウイルスに対する監視及び対応能力を有するための予算が配分される必要がある。

G. 複数の研究機関間におけるデータの共有

WN ウイルスはヒトを含む多種類の動物に感染する人獣共通感染症である。従って本疾患を有効に監視し、防除対策を実施するためには、中央政府、及び地方自治体において、媒介蚊防除、農業、自然保護に至る数多くの行政管轄機関の間で、調整を図り、情報とデータを交換し、共有することが必要である。このためには、認可された使用者が誰でもアクセスできる電子的な連絡網を活

用することも考えられる。

H. 優先的研究課題

1999年にニューヨーク市及びその周辺において、WN ウイルスの流行が何故どのようにして発生したか、このウイルスが西半球に持ち込まれたことが公衆衛生学的及び獣医学的にどのような意味を有し、その流行を効果的に防止するにはいかなる戦略を立てれば良いか、同様の流行が日本で発生する可能性があるのか、あるとすればいつどこでどのようにして発生するか、といった質問に答えるには、それ相当の研究を行なわなければならない。現時点で高い優先順位を与えられるべき研究項目を下記に記載する：

- ・現在及び将来における WN ウイルスの地理的分布
- ・野鳥の移動による WN ウイルスの散布
- ・媒介蚊と WN ウイルスとの関係、及び媒介蚊の飛翔距離
- ・脊椎動物宿主と WN ウイルスとの関係、及び脊椎動物宿主の移動距離
- ・WN ウイルスの存続機構
- ・媒介蚊の生物学と行動
- ・媒介蚊防除の手法
- ・媒介蚊の監視手法
- ・WN ウイルスに対する予防戦略の開発と評価法の開発
- ・実験室内診断法の改良、殊に JE その他のフラビウイルスとの区別
- ・WN ウイルス感染により患者が示す臨床的病像の範囲と長期間にわたる予後
- ・動物間の流行が発生している地域における感染の危険要因に関する研究
- ・WN ウイルスの発病機構

- ・ WN ウイルスの病原性に関する遺伝学的及び分子生物学的関係
- ・ 動物用及びヒト用 WN ウイルスワクチンの開発
- ・ JE ワクチンによる WN ウイルス感染に対する交差免疫の検討
- ・ WN ウイルスに対する抗ウイルス治療薬
- ・ WN ウイルス感染による経済的損失

(添付資料-1)

米国における西ナイルウイルスのヒト及び動物における流行：

監視、予防、防除の指針

1999年11月8—9日、コロラド州フォートコリンズで開催された研究会
(和訳)

要約

1999年夏から秋にかけて米国東北部でヒトと動物の間で発生した西ナイル(WN)ウイルスの流行は異例のもので、新興感染症の病原体が新たな流行地域へ拡大する事態が容易に起こることの実例である。この流行によって、米国における節足動物媒介性疾患の流行に対して、地方、州、及び国立の保健衛生機関が準備体制を整えておくことの問題が指摘された。WNウイルスが冬の間米国で生存できるか否か、すでに新たな地域へ拡大したか否か、更に本症が持ち込まれたことによって公衆衛生学的・獣医学的にどのような影響を与えたかは不明であるので、米国において将来WNウイルスの流行が発生する可能性に対処する監視、予防、防除体制を前もって確立しておくことが重要である。従って疾病防疫対策センター(CDC)と米国農業省(USDA)が共同して、米国東北部で発生したWNウイルスのヒトと動物における流行に関する知識を総括し、WNウイルスの活動状況を追跡し、将来発生しうる流行を未然に予防する計画に関する指針を策定することとなった。

監視体制

既に流行が発生した州、及び野鳥の移動によって今後流行の危険性が高い州において、監視体制を強化することが優先順位の高い課題である。これらの州にはマサチューセッツからテキサスに至る大西洋沿岸、及びメキシコ湾沿岸の州、更にはカリブ海沿岸から中南米に至る諸国が含まれ、国際協力の必要性が指摘される。各州の地理的位置によって、年中媒介蚊の活動が可能な南部の州では、能動的な監視業務を今から開始して冬季間中持続する必要がある。一方、寒い冬の期間中は媒介蚊が活動できない北部の州では、早春から監視業務を開始することになる。WNウイルスの活動の可能性のある州では、北部・南部を問わず下記の監視業務を行うことが強調されなければならない。

1. 鳥類に対する能動的な監視。野鳥、歩哨動物としての鳥、或いはその両者におけるアルボウイルスの活動を追跡する。特に死亡したカラスは当該地域においてWNウイルス

スを検出するための感度の良い指標である。

2. 媒介蚊に対する能動的な監視。蚊群の監視、WN ウイルスその他のアルボウイルスの検出、当該地域における媒介蚊の同定、蚊個体数の監視を行なう。
3. 家畜に対する受動的な監視の強化。WN ウイルスの存在を検出し、トリと蚊の間の伝播サイクル以外に別の伝播サイクルが存在する可能性を探る補助的手段として、動物、特にウマ、における神経系疾患に対する受動的監視を強化する。
4. ヒトに対する受動的な監視の強化。WN ウイルスの存在を検出する補助的手段としてウイルス性脳炎、及び経費が許せば無菌性髄膜炎患者に対する受動的監視を強化する。

実験室内診断

WN ウイルスおよびその他アルボウイルス感染症に対する診断を下すには、特殊の実験室内検査が必要である。監視が成功するか否かは、そのような診断ができる実験室が使用できるか否かに係っている。下記の実験室内診断ができることが最小限必要である。CDC は必要に応じて試薬を供給し、人員に対する訓練を行なう。

1. 血清反応。IgM 及び IgG ELISA は、ヒト及び動物の血清及び髄液検体中の抗体測定法として最初に用いるべき試験であり、全ての州立衛生研究所及び獣医学研究所で使用できる態勢にしなければならない。更に、特定の州立衛生研究所、獣医学研究所、及び中央の研究機関では、フラビウイルス特異的抗体を測定するための中和試験を行なう能力が必要とされる。
2. ウイルス分離と検出。特定の州立衛生研究所及び中央の研究機関では、ウイルス分離と同定の能力を具備する必要がある。それに加えて、いくつかの特定の実験室では逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によってウイルス RNA を検出できる必要がある。生きたウイルスを扱う研究室は全て生物災害防止安全レベル3の封じ込め施設を必要とする。プールした蚊材料中のウイルス抗原を検出するための抗原検出 ELISA を開発し、中央の研究機関で使用すると共に、地方の衛生研究所に普及する必要がある。最後に、いくつかの特定の州立衛生研究所及び獣医学研究所では、剖検材料中に WN ウイルスを検出するための免疫組織化学染色の能力を具備する必要がある。

予防・防除対策

現時点で、WN ウイルスその他のアルボウイルスがヒトその他の動物に伝播されることを防ぎ、一度伝播が開始された時点で流行を防ぐ最も効果的な方法は、媒介蚊防除によってヒトが病原体に暴露される機会を低下させることである。ヒト及び家畜の疾患を防除するために、州立及び地方の衛生部当局は十分な媒介蚊防除能力を備えておく必要がある。