

実験研究後のヒト血清、ウイルス抗原、試薬類および器具類は、バイオハザードの基準にしたがって処理し、自治体の要求基準にしたがって廃棄した。

IgM-ELISA の反応原理は、(1)あらかじめ固相に抗ヒト IgM 抗体を被覆しておき、ここへ患者血清を反応させる。(2)患者血清中の Dengue ウイルスに対する IgM 抗体を含む、すべての IgM 抗体を捕捉する。(3)ウイルス抗原(P)と正常非感染抗原(N)とを別々に加えて、固相に捕捉された Dengue ウイルス特異的 IgM 抗体と反応させる。(4)Dengue ウイルス特異的 IgM 抗体と反応したウイルス抗原を、酵素標識した D1-4G2(先の方法では Dengue 患者血清由来 IgG)を反応させて検出する。(5)酵素に対する発色基質を加えて発色させ、吸光度を測定する。(6)Dengue ウイルス抗原(P)および正常非感染抗原(N)との間の吸光度の比(P/N 比)を算出する。(7)Dengue 流行地への海外渡航歴のない日本人血清(20名以上)の血清で得られた測定結果を陰性対照として、その平均値(P/N 比)プラス 3SD 以上を IgM 陽性とした。

(倫理面への配慮)

ヒト血清検体を用いた実験は 2 重盲験法で行い、個人情報漏出を阻止した。

### C. 研究結果

フラビウイルス特異的モノクローナル抗体(以下 D1-4G2 と略)は従来の Dengue 患者血清由来 IgG と比較して、Dengue ウイルス抗原(P)に対する非特異的反応が有意に低かった。

その結果、従来の測定方法で IgM 抗体陰性と診断された血清 34 例のうち 2 例が、D1-4G2 を使用して IgM 抗体陽性と診断された。

これら 2 例の血清は 2 名の Dengue 様患者より採取されたものであって、1 例は発熱後 4 日、他の 1 例は発熱後 30 日のものであった。

D1-4G2 を用いる改良型 IgM-ELISA で IgM 抗体陰性と診断された 32 例の血清検体は、従来のヒト IgG を用いた IgM-ELISA ではすべて陰性であった。

### D. 考察

血清中の Dengue ウイルス特異的 IgM 抗体を検出するに際し、ウイルス抗原(P)と正常非感染抗原(N)との反応の比(P/N 比)を指標とした測定方法では、正常非感染抗原(N)と検出用抗体との間の非特異的反応が出現すると P/N 比が低下し、Dengue ウイルス特異的 IgM 抗体が存在するにもかかわらず陰性(偽陰性)が出現する。

今回改良された IgM-ELISA では、正常非感染抗原(N)と検出用酵素標識

抗体(D1-4G2)の間の非特異的反応が Dengue 患者由来 IgG より有意に弱かった結果、Dengue ウイルス特異的 IgM 抗体を高感度に検出できた。

そのほか、検出抗体を Dengue 患者血清由来 IgG に替えてマウスモノクローナル抗体(D1-4G2)にする利点は、(1)ヒト由来組織を診断に使用することの倫理的配慮。(2)ヒト由来の感染性因子で汚染された材料を使用する危険性の回避。(3)特異性の明確な抗体で、有償で入手可能という諸点があげられる。

#### E. 結論

我が国に常在流行しない Dengue 熱を血清学的に診断する IgM-ELISA が確立できた。この方法を用いて、Dengue 流行地域へ旅行し、帰国後発症した日本人の Dengue 熱を診断可能であった。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nawa, M., Yamada, K., Takasaki, T., Akatsuka, T. and Kurane, I. Serotype-cross-reactive IgM responses in dengue virus infection determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 774 – 777. 2000.

2. Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K., Akatsuka, T. and Kurane, I. Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. J. Virol. Methods. 92 (2), 65 – 70. 2001.

##### 2. 学会発表

1. 山田堅一郎、高崎智彦、名和 優、倉根一郎「Dengue ウイルス感染診断キットの評価：その有用性と問題点」熱帯医学会大会、平成 12 年 11 月、東京都

2. Yamada, K., Takasaki, T., Hamada, A., Okuzawa, E., Nawa, M. and Kurane, I. “Rate of seroconversion for dengue viruses among Japanese who stayed in tropical areas for extended periods.”

第 15 回日本国際保健医療学会、平成 12 年 8 月、長崎県

3. 山田堅一郎、高崎智彦、名和 優、武田 昭、倉根一郎「自己免疫疾患患者における抗 Dengue IgM 抗体偽陽性例について」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県

4. 田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美。平田一郎、小久保弥太郎、名和 優、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎「Dengue ウイル

ス感染症の実験室内診断－種々の測定法による抗体価の検討－」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県

5. 名和 優、赤塚俊隆、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎「モノクローナル抗体を用いたデング IgM-ELISA の構築と、血清型別診断への応用」第 35 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、平成 12 年 6 月、沖縄県

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

（分担）研究報告書

節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・講師

研究要旨：日本脳炎ウイルスとデングウイルスの病原性を分子レベルで明らかにしワクチン開発や血清診断用抗原に用いることを目的に、2つのウイルスでウイルス表面抗原遺伝子（E）を入れ替えたキメラウイルスを作成しその性状を検証した。日本脳炎ウイルス遺伝子にデング E 蛋白遺伝子を挿入したキメラウイルスは蚊培養細胞でよく増殖し、診断用抗原作成に有用であることが判明した。またこのウイルスは哺乳類細胞では「みなし児感染」をおこし極めて弱毒であった。しかし哺乳類細胞での培養を繰り返すことで容易にこの細胞で増殖可能な変異体ウイルスが出現した。

A. 研究目的

日本脳炎とデング熱・デング出血熱はアジアの発展途上の国々において近年その患者数・流行地域が増加・拡大している。わが国に関しても邦人の海外渡航者の増加に伴い輸入伝染病としてのデング感染者も増加しており国際的な見地から見て公衆衛生上極めて重要な感染症である。また蚊で媒介されるこれらの蚊媒介性疾患は地球温暖化とともに日本を含む世界の温帯地域において拡大する事が懸念されている。

本分担研究では蚊媒介性ウイルス感染症のなかでも予防法の確立していないデングウイルス感染に焦点をあて、日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラウイルスを作製しその性状を解析することで1) 既存の培養細胞で増殖性が良く診断用抗原として有用なデングキメラウイルスを作製し、また2) デングウイルスの治療法を改善するため、デングウイルスの病原性を分子レベルで解析することを目的としている。

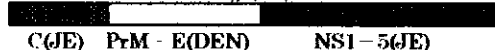
B. 研究方法

1) 日本脳炎ウイルスとデングウイルスを蚊培養細胞 C6/36 細胞を用いた大量回転培養法で大量に培養し両ウイルスを CS レジン、蔗糖

密度遠心勾配超遠心法によって高純度に精製する。

- 2) 精製したウイルスからウイルス遺伝子 RNA を抽出し逆転写酵素を用いてウイルス遺伝子に相補的な一本鎖 DNA を合成する。
- 3) この一本鎖 cDNA から LongPCR 技術を用いて目的の遺伝子断片（2 本鎖 DNA）を作製してつなぎ合わせキメラウイルスの基となる 11 k p s の DNA を下の図のように合成する。

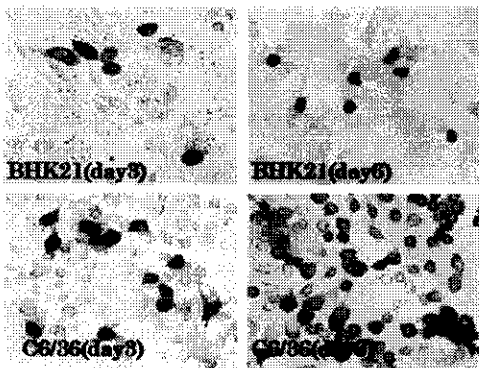
（図 1）



- 4) 上記の完全長のキメラ cDNA から T7 フェージの RNA 合成酵素を用いて試験管内でキメラウイルス RNA を作製し、これを BHK21 細胞、C6/36 細胞に導入し、数日間培養する。
- 5) 数日間培養した細胞を免疫学的に抗日脳、抗デング抗体で染色し、遺伝子 RNA 導入細胞内におけるウイルス関連蛋白の生産の有無を確認するとともに、細胞上清をさらに培養細胞を用いて連続継代してキメラウイルスの増殖の状況を検証するとともに、一部は実験動物での感染性も検証する。

C. 結果

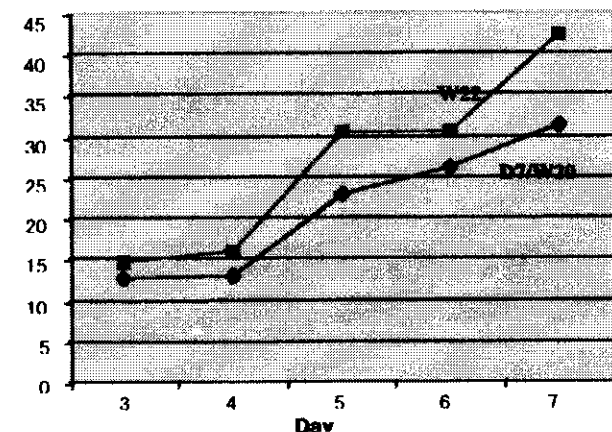
1) 日本脳炎ウイルスとデングウイルス 2 型の PrM-E 遺伝子を入れ替えたキメラ DNA から作製した 11kb の RNA は哺乳類細胞 (BHK21)、蚊細胞 (C6/36) の双方に感染性をしめし、RNA 導入後 3 日で細胞内にウイルス関連抗原を確認した。6 日目には蚊細胞のほうではウイルスは順調に増殖し感染粒子を産生したのに対して、哺乳類細胞では感染は一時的なものであり、持続的にウイルスを産生することは出来ず一時的な『みなし児感染』であった。(図 2)



(図 2) キメラウイルス遺伝子導入後の細胞内抗原

2) 現在、図 1 で示した遺伝子構造を持つ二系統の日本脳炎/デング 2 型キメラウイルス (D7/W20 と W22) を作製しその増殖性について検討しているが、C6/36 細胞においてはこのキメラウイルスは親株の日本脳炎ウイルスと同等の増殖能をしめしている。(表 1)

(表 1: キメラウイルスの増殖)



3) キメラウイルスのマウスへの感染実験では親株の日本脳炎ウイルスと比較して、キメラウイルスに対する抗体産生は低く、培養細胞レベルで観察された様にキメラウイルスの哺乳類 (マウス体内) での増殖性は低いことが示された。しかし、低レベルではあるが親株のデング 2 型ウイルスよりは高い抗体産生が見られた。この事はマウス体内においても、キメラウイルスが『みなし児感染』してウイルス特異的蛋白質を産生していることを示していると考えられた。

(表 2)

mouse ID	Virus	ELISA titer
1	IE	6400x
2	IE	3200x
3	IE	6400x
4	IE	6400x
5	D2	100
6	D2	100
7	D2	100
8	D2	<100
9	D2/I	400
10	D2/I	200
11	D2/I	150
12	D2/I	200

IE: IaOH0566. D2: D2Th7. D2/IE: T7/W20-D6

\*: titer measured by BHK

4) 蚊培養細胞で 5 回継代したキメラウイルス ( $1 \times 10^8$  FFU/ml) 内には BHK 細胞でも感染・増殖が可能なウイルス粒子を産生する能力のある変異体がすでに出現していることが判明した。この変異体キメラウイルスをさらに BHK 細胞で継代することで、哺乳類細胞でも増殖可能な日本脳炎/デングキメラウイルス株 W20-B7 と W22-B7 を樹立した。この哺乳類細胞 (BHK) で増殖可能なキメラウイルスは継代をかさねる毎に感染性が高くなり、BHK での感染性は親株のデングウイルスよりも高く、もう 1 つの親株である日本脳炎ウイルスと同レベルの感染性を示していた。

#### D. 結論

- 1) デングウイルスと日本脳炎ウイルスのキメラウイルスを作製することに世界で初めて成功した。
- 2) このキメラウイルスは蚊培養細胞では高い増殖性 ( $1 \times 10^8$  FFU/ml) をしめしこのキメラウイルスを利用して十分な診断用抗原が作製可能であることがしめされた。
- 3) キメラウイルスは日本脳炎ウイルス親株と比較して哺乳類動物では感染性が低く、キメラウイルスの生ワクチンとしての可能性を示唆していた。
- 4) しかし同時にこのキメラウイルスは数回の継代で容易に哺乳類細胞での増殖性を獲得し、今回見られた弱毒化が不安定な特性であることがしめされた。

#### E. 考察

今回、作製した日本脳炎ウイルスとデングウイルスのキメラウイルスは PrM-E 蛋白遺伝子を入れ替えたものであり、他のフラビウイルス間のキメラウイルス（日本脳炎と黄熱病ウイルス、デングウイルスとダニ媒介性ウイルスなど）と同様の構造で作製した。今後更に詳細な病原性の検討を行なうにあたり、遺伝子の他の領域（NS1 など）を入れ替えたキメラウイルスを作製する必要がある。また今回、得られた哺乳類細胞で高い増殖性を示す日本脳炎・デングのキメラウイルスが実験動物でどのような病原性を示すのかについては極めて興味深く、人における両ウイルスの病原性の差異（脳炎と発熱・出血熱）を解明する何らかの手がかりが得られる可能性がある。またデングウイルスには 4 つの血清型が存在するので、今後順次残る 3 つの型のデングウイルスと日本脳炎ウイルスのキメラウイルスを作製する予定である。

#### F. 健康危険情報

アジアにおいてはデング熱・デング出血熱は 3 年から 4 年の周期で大流行を繰り返している。本年度（2001 年）は前回（1997 年～1998 年）の大流行から 3 年目にあたり既に、カンボジアなどでは患者数が前年比で増加傾向にあり、デングウイルスの存在する地域（アジア、太平洋諸国）では警戒が必要である。

#### G. 研究発表

発表準備中

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在出願予定はない。

## 日本における日本脳炎不顕性感染者の割合

分担研究者 小西英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

共同研究者 鈴木智之（神戸大学医学部医療基礎学講座）  
伯耆由美（神戸大学医学部医療基礎学講座）  
奴久妻智代子（神戸大学医学部医療基礎学講座）

**研究要旨** 日本において日本脳炎の患者数は年に10人以下と少ないが、自然界では日本脳炎ウイルス（JEV）のサイクルは存続しており、ヒトは暴露を受けていると考えられる。が、どの程度の暴露を受けているのかに関する調査はない。今回、JEV非構造蛋白NS1に対する抗体測定を行い、不顕性感染者の割合を推定した。NS1抗体測定の意義は、不活化ワクチン接種者に存在する抗体（構造蛋白に対する抗体のみ）と感染により誘導される抗体を区別することにある。現在までに1,745検体を調べ、NS1抗体陽性率が全体で15.7%であった。男の0歳から20歳代、また女の60歳代の平均抗体保有率は低く、男女共80歳以上には高いNS1抗体保有率が認められた。日本において、ヒト集団はJEVの暴露を自然界から高率に受けており、また追加接種を受けている成人は稀であるにもかかわらず、患者数が年に10人以下と少ないのは、日本脳炎ワクチンによって誘導された免疫が日本脳炎の発症防御に貢献しているからであると考えられた。また、自然界からの暴露が追加免疫的役割を果たし、防御免疫を維持しているものと思われる。

### A. 研究目的

日本脳炎ウイルス（JEV）は、ブタを増幅動物とする蚊媒介性フラビウイルスであり、東南アジア地域を中心に広く分布している。ウイルスを保有する蚊に刺咬されたヒトの大多数は不顕性感染にとどまるが、数百人に1人が高熱、頭痛、意識障害などの急性脳炎症状を呈する。我が国における患者発生数は近年少なくなり年間10人以下の状態であるが、ブタのJEV抗体保有率は依然として高く、自然界においてJEVの伝播サイクルは回りつづけており、ヒトもJEVの曝露を受けていることが考えられる。日本ではほとんどのヒトが15歳までに日本脳炎ワクチン接種を受けているが、防御に重要とされる中和抗体を維持するために追加接種を受けている成人は稀と思われる。従って日本のワクチン被接種者を対象としたJEV感染状況の疫学調査は、不顕

性感染率やワクチンの防御機序を知る上で重要である。

JEVの構造蛋白はコア蛋白（C）、外被膜糖蛋白（E）、膜蛋白（M）の3種類である。ゲノムRNAは約11kbの塩基から成る1本鎖プラス極性RNAで、上記の構造蛋白遺伝子の他、7種類の非構造蛋白遺伝子（NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5）をコードする。不活化ワクチンは精製ウイルス粒子を成分とするため構造蛋白しか含まず、不活化ワクチン被接種者には構造蛋白に対する抗体しか産生されない。一方、JEV感染者には非構造蛋白に対する抗体も産生されるため、非構造蛋白に対する抗体を検出することにより感染を証明することができる。

7種類の非構造蛋白の中で、感染の指標として最も適切な蛋白はNS1であると考えられる。NS1はかつて可溶性補体結合抗

原と呼ばれた糖蛋白質で、フラビウイルス感染細胞から放出され、宿主はNS1に対する抗体産生が比較的効率よく誘導される。NS1に対するモノクローナル抗体の移入によりマウスが致死量の攻撃から防御されるため、NS1抗体はフラビウイルス感染症に対する防御因子の1つと考えられている。これらの理由により本研究ではNS1抗体に注目した。

NS1抗体測定には従来免疫沈降反応が用いられてきたが、この方法はラジオアイソトープを使用するため、多数の検体を扱うには適さない。またJEV感染培養液からNS1を抽出する生化学的手法には危険性などの点で制限がある上、精製過程での抗原性の失活も考えられる。抗NS1を感作した固相をJEV感染細胞培養液と反応させてNS1蛋白を吸着させた後、このNS1を抗原として用いるcapture ELISAの系は理論的であるが、実際的には陽性検体と陰性検体を区別しにくい経験を我々はした。そこで、NS1を連続的に発現する細胞株を樹立し、この細胞を抗原とした免疫染色法がNS1抗体を測定する最適な方法と考えた。

本研究では、免疫染色によるNS1抗体測定系を用いて、感染状況の疫学調査を行った。

## B. 研究方法

**血清及び血漿：**調査対象の血清は、1995年に神戸大学医学部附属病院中央検査室より分与を受け当講座に保管してあった1,745検体である（Khin-Sane-Win et al., *Kobe Journal of Medical Sciences* 43, 159-168, 1998）。NS1抗体陰性ヒト検体としてJEVの曝露を受けていないアメリカ健康人血清30検体（Konishi et al., *Journal of Medical Virology* 48, 76-79, 1996）、また、陽性ヒト検体としてタイ患者血漿6検体（Konishi et al., *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53, 278-283, 1995）及び韓国患者血清4検体（Konishi et al., *Journal of Medical Virology* 48, 76-79, 1996）を用いた。

**抗原の作製：**クローン化したNS1連続発現CHO細胞と、NS1非発現CHO細胞を各々 $2 \times 10^5$ 細胞ずつ6穴マイクロプレートに入

れ（ウエルあたり各々 $3.3 \times 10^4$ 細胞）、コロニーを形成するまで3~4日培養した。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄した後、アセトン・メタノール（1:1）で固定した。なお、NS1発現細胞に関しては、平成11年度「 Dengueウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する新型ワクチンの開発に関する研究」研究班の分担研究報告書『日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1連続発現細胞クローンの樹立』に詳述した。

**NS1抗体測定法：**平成11年度上記研究班の分担研究報告書『日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1抗体測定系の確立』に記載した方法に改良を加え以下の手順で行った。まず、抗原プレートを乾燥させ反応面をPAPペンで区切り、1ウエル当たり12の反応区を作った。次いで、Tween 20を0.05%添加したPBS（PBS-Tween）により抗原細胞を湿潤させた後、2%カゼイン、1%ウシ血清アルブミン及び1%正常ヤギ血清を添加したPBS-Tween（血清希釈液）で37°Cに1時間保温することによりブロッキングした。PBS-Tweenにより洗浄した後、反応区あたり10ulの検体（血清希釈液により1:5から2倍階段希釈）と4°Cで1夜あるいは2夜反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗ヒトIgGと30分間、さらにABC試薬（アビジン・ビオチン標識パーオキシダーゼ複合体、Vector社製）と30分間反応させ、最後に基質であるVIP（Vector社製）により染色した。細胞質、特に核膜周辺の染色、またコロニー間における染色強度の差を指標にして抗体陽性、陰性を判定した。陽性反応を示した血清の最高希釈度をNS1抗体価とした。

**ELISAによるE抗体の測定：**JEV細胞外粒子（Konishi et al., *Journal of Virology* 75, 2204-2212, 2001）を抗原として、ELISAによりヒト血清中のE抗体を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究に用いたヒトの血清及び血漿検体は、古い時期に採取されたものである。病院検査室で測定済みの余剰の血清であり、また本研究はJEV抗体調査を目的としていること、さらに検体は完全匿名化していることから、研究対象者に不利益を及ぼす可能性はない。



### C. 研究結果

**NS1抗体測定条件の決定**：前年度の報告では96穴マイクロプレートを使用したのが、反応液の表面張力に基づくと考えられる反応性の減少があり、今回6穴マイクロプレートを用いて反応面をPAPペンで区切ることとした。これにより、表面張力の問題が解決できると同時に反応液量の節減にもなった。また、ブロッキング法や1次反応の時間、またNS1抗原発現クローンの選択により、もう1つの問題点であった非特異反応が弱まり、血清の1:5の希釈度でも測定できるようになった。

**患者と健常人におけるNS1抗体価の比較**：患者の10検体及びアメリカ健常人血清30検体を、1:5から2倍階段希釈し、NS1抗体価を測定した(図1)。患者検体は、1:320から1:5120のNS1抗体価を示したのに対して、健常人検体はすべて1:5未満であり、明確に区別することが可能であった。

**NS1抗体保有率**：1,745検体を対象としてNS1抗体を測定した結果、274検体(15.7%)が陽性であった。男女別、年齢別にNS1抗体保有率を比較すると(図2)、年代層によりNS1抗体保有率は6%から25%の範囲内で変動した。その中で、男の0歳から20歳代の平均抗体保有率(9.8%)は30歳以上の平均抗体保有率(19.3%)より低く( $P<0.001$ )、また女の60歳代(6.3%)はそれ以外の年代(16.4%)より低く( $P<0.01$ )、さらに全体で80歳以上(23.0%)は79歳以下(15.1%)より高かった( $P<0.05$ )。

**E抗体保有率**：ELISAにより測定した1,745検体のE抗体値の頻度分布を図3に示す。ポアソン分布を呈し、仮にELISA値0.4をボーダーラインとすると、男女別、年齢別のE抗体陽性率は、図4のようになった。すなわち、男女共0歳及び10歳代が高く、30歳代で最低となり、その後年齢の上昇とともにE抗体陽性率も上昇した。

### D. 考察

免疫染色法を用いた今回のNS1抗体測定法の特徴の1つは、同一視野の中でNS1発現細胞と非発現細胞コロニー間の染色強度を比較することにより判定を行う点である。これにより、血清由来の非特異

反応に基づく偽陽性の判定を少なくすることができる。また、ABC染色を用いて反応終点を求めやすくした。

今回の調査で、全体として15.7%のヒトがNS1抗体を保有していることが明らかにされた。先に述べたように、NS1抗体の存在は、自然界からJEVの曝露を受けたことを意味する。NS1抗体がどれくらいの期間持続するのかはまだ不明であるが、いったん陽性となったNS1抗体が仮に平均5年間検知され続けるとすれば、年間約3%のヒトがJEV感染を受けていることになる。

平均NS1抗体保有率は男女差及び年齢差があるものの6%から25%の範囲内であった。JEVの伝播が蚊の刺咬によることを考えると、感染機会はヒトの生活環境や行動様式に関係するが、今回の調査のように比較的多数の集団を対象とした場合、男女間、年齢間でそれほど大きな差が生じるとは考えにくい。男の若年齢層や全体として80歳以上の集団に見られた平均NS1抗体保有率の違いは、宿主の免疫状況を反映しているのかもしれない。

E抗体保有率は、日本脳炎ワクチンの定期接種時期である若年齢層で高く、20歳代で低下、30歳代で最低となった後、年齢とともに徐々に上昇した。この結果は、ヒトは若年齢層でワクチンを受けるが、追加接種する人は少ないことを示す。年齢依存のE抗体保有率の変動は、他の日本人集団と類似する(平成8年度伝染病流行予測調査報告書、厚生省保健医療局結核感染症課)。

中和抗体が存在すれば感染を防御するsterile immunityが考えられるので、ワクチン接種を受けてE抗体保有率が高い若年齢層においてはNS1抗体保有率が低いことが予想された。しかし、男では有意差があったものの女では差が認められなかった。蚊の刺咬時には唾液を出しながら毛細管を探すといわれる。唾液にウイルスが含まれるが、このウイルスが宿主細胞に感染するまでに抗体が働く機会は少ないのかもしれない。

日本人は、JEVの曝露を自然界から比較的高い頻度で受けていることが今回の調査で明らかにされた。しかも、ほとんどの集団が日本脳炎ワクチンの追加接種

を受けていないと考えられる。しかしながら、患者発生数は少ない。このことから、宿主が自然界において蚊からの暴露を受け、JEVの感染を許し、それに対する2次免疫応答を誘起することにより防御が成立していると推察される。すなわち、ワクチンの防御効果はsterile immunityではなく、感染は許すが発病は許さないタイプの防御であること、そしてそれがほとんどの日本人に当てはまることが想定できる。この2次免疫応答により増強した免疫が、更なる防御免疫の持続に関連していると考えられる。

ヒトにおける感染状況を把握することは、現行のワクチンの防御機構解明に重要であり、さらにこの防御機構は新しいワクチンを開発する上に不可欠の情報となる。我々が開発中の日本脳炎やデングに対する中和抗体誘導型のDNAワクチンは、マウスに防御免疫を誘導するが中和抗体の誘導レベルは日本脳炎不活化ワクチンと比較して低い。しかし、現行の不活化ワクチンの役割が免疫のprimingであり、防御が感染後の2次免疫応答によるならば、これと同等の防御機構をもつDNAワクチンは、高価な不活化ワクチンに代わり得る安価なワクチン候補の1つと考えられる。

## E. 結論

日本におけるJEV不顕性感染状況を調べるため、NS1抗体調査を行った。1,745検体のヒト血清を対象にNS1抗体を測定した結果、15.7%の陽性率であった。日本人の集団は自然界からJEVの暴露を比較的頻繁に受けていることが明らかにされた。

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Konishi E., Kurane I. and Mason P. W.: Immune response to traditional and genetically engineered Japanese encephalitis vaccines. *Recent Research Developments in Virology* 2, 1-21 (2000).

Kanesa-thasan N., Smucny J. J., Hoke C. H., Marks D. H., Konishi E., Kurane I., Tang

D. B., Vaughn D. W., Mason P. W. and Shope R. E.: Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus - poxvirus vaccines in vaccinia-nonimmune and vaccinia-immune humans. *Vaccine* 19, 483-491 (2000).

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. *Journal of Virology* 75, 2204-2212 (2001).

## 2. 学会発表

Konishi E., Yamaoka M., Kurane I. and Mason P. W.: Japanese encephalitis DNA vaccine candidates expressing pre-membrane and envelope genes induce virus-specific memory B cells and long-lasting antibodies in swine. The 34th Joint Working Conference of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Inuyama (2000).

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason: Generation and characterization of a mammalian cell line continuously expressing Japanese encephalitis virus subviral particles. The 34th meeting of the Japan-US Cooperative Medical Science Program Viral Diseases Panel, Inuyama (2000).

網代直子、奴久妻智代子、倉根一郎、小西英二：日本脳炎ウイルスに対する防御CTLエピトープの検索。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会（2000）。

小西英二、藤井敦子：日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS1の役割－哺乳類細胞と蚊細胞から放出されるウイルス粒子からのアプローチ。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会（2000）。

藤井敦子、小西英二：デングウイルス細胞外ウイルス様粒子を産生する細胞クローンの樹立。第48回日本ウイルス学会学術集会・総会（2000）。

Konishi E., Fujii A. and Peter W. Mason:

Development of subunit vaccines for Japanese encephalitis and dengue. International Seminar on Emerging and Re-emerging Infectious Diseases, Nagasaki (2000).

Konishi E.: Development of DNA and subunit vaccines for Japanese encephalitis. The 6th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Philippines (2001).

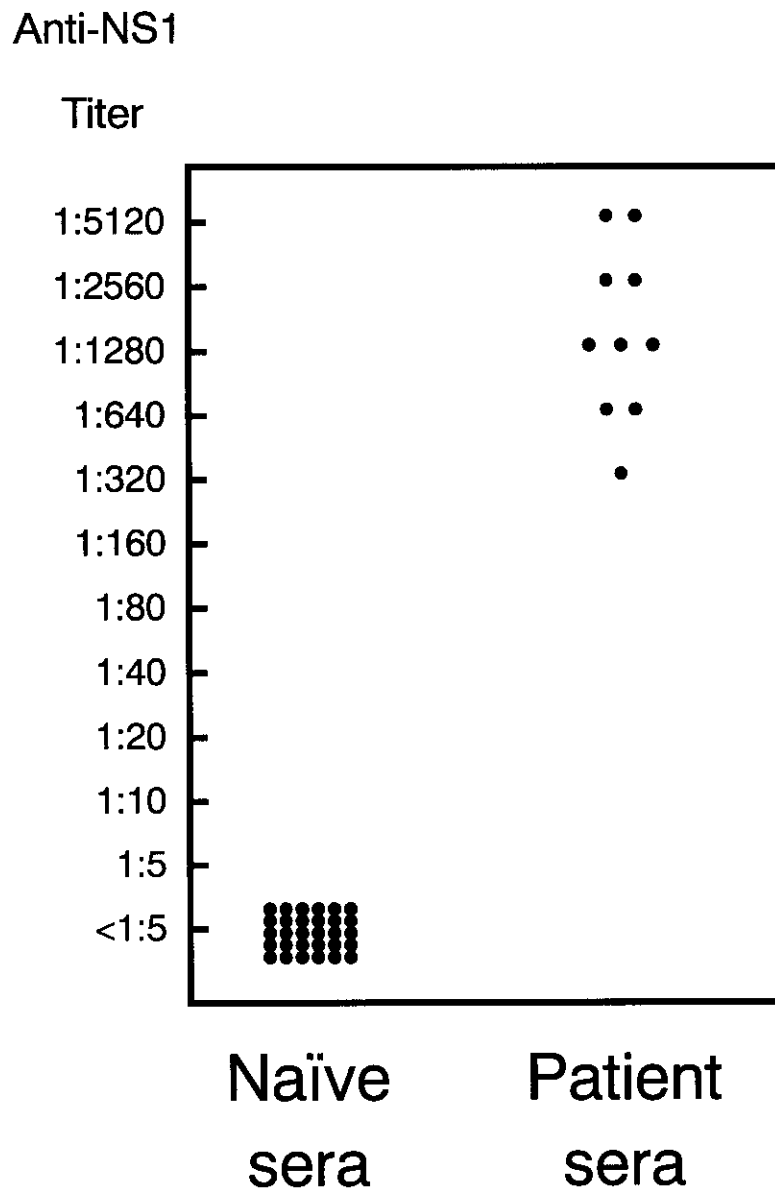


図1 日本脳炎患者の10検体及びアメリカ健常人血清30検体のNS1抗体価

# Age prevalence of anti-NS1

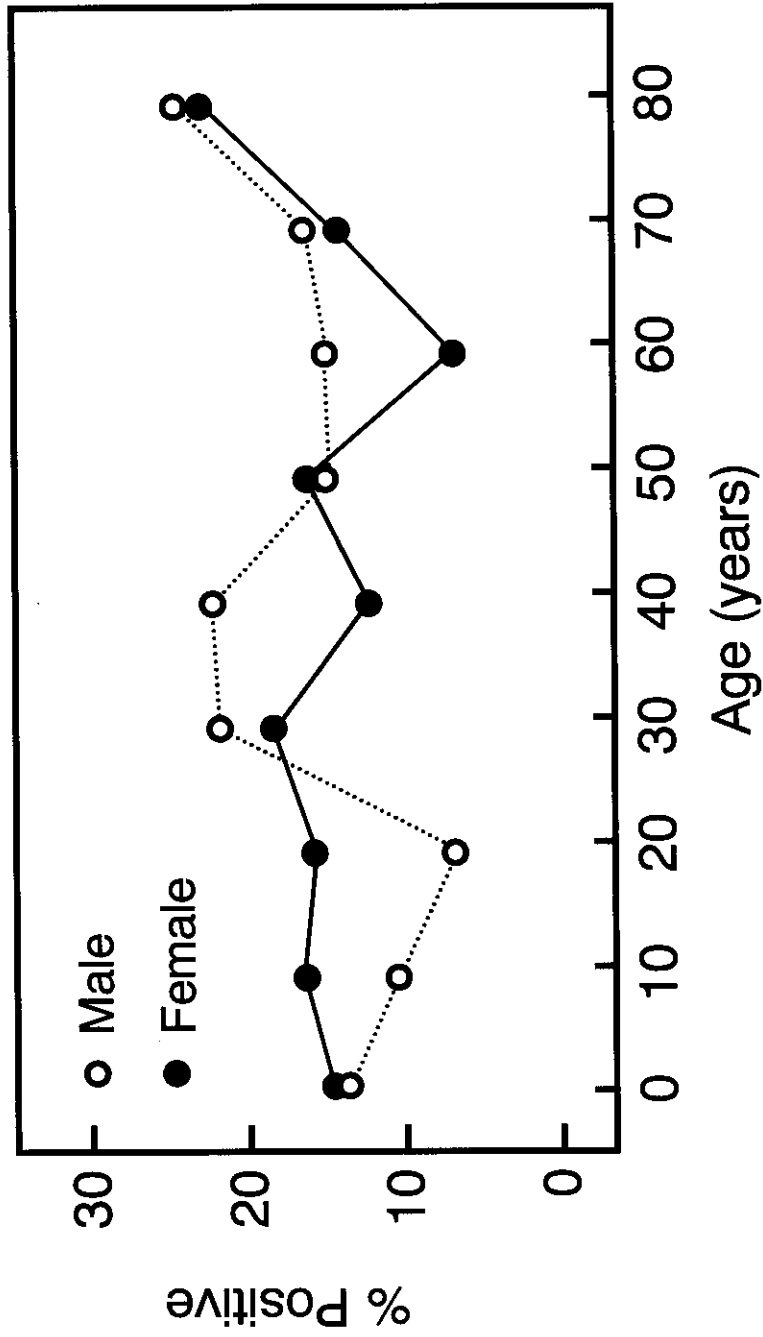


図2 男女別、年齢別の日本脳炎ウイルス NS1 抗体保有率

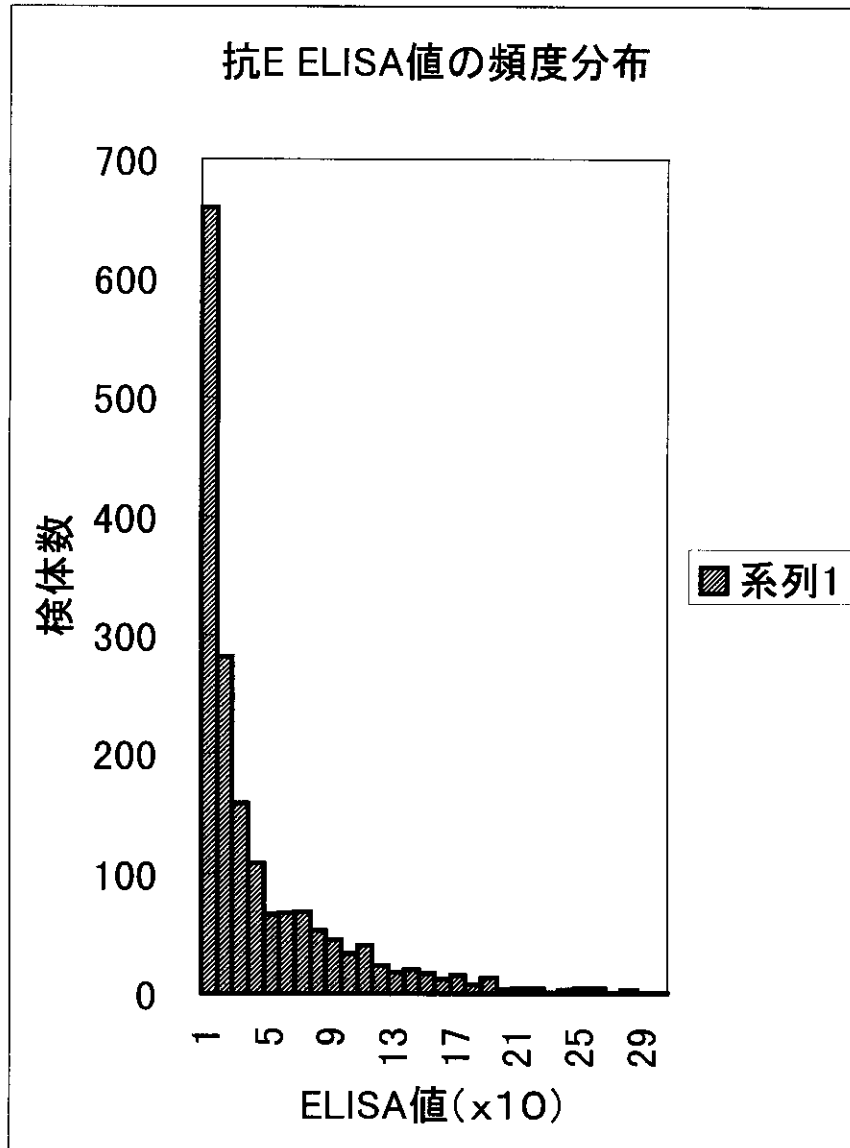


図3 ELISAにより測定した1745検体のE抗体値の頻度分布

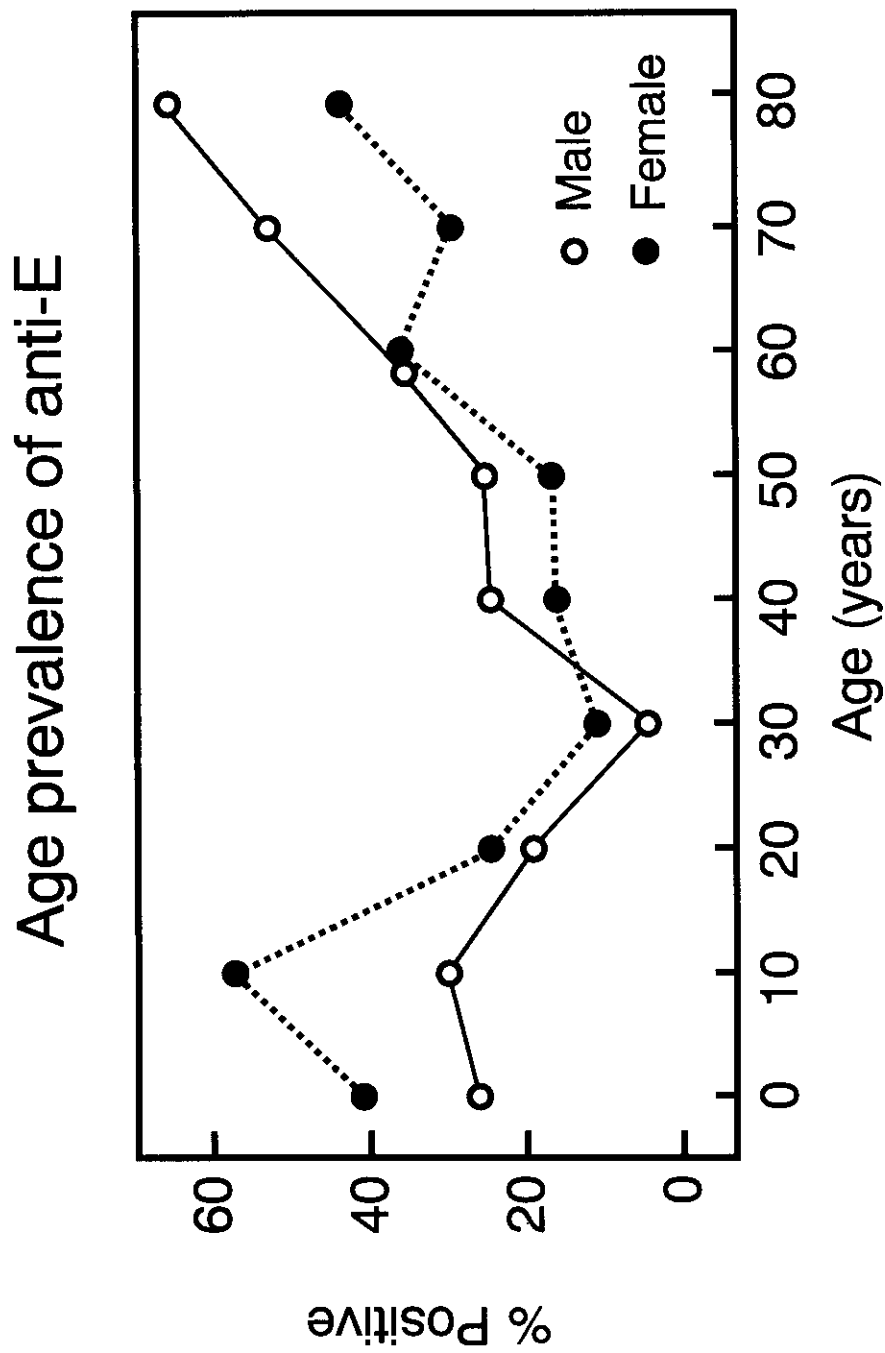


図4 男女別、年齢別の日本脳炎ウイルスE抗体保有率

## 別紙 5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Konishi E., Kurane I. and Mason P. W.	Immune response to traditional and genetically engineered Japanese encephalitis vaccines	<i>Recent Research Developments in Virology</i>	2	1-21	2000
Kanesa-thasan N., Smucny J. J., Hoke C. H., Marks D. H., Konishi E., Kurane I., Tang D. B., Vaughn D. W., Mason P. W. and Shope R. E.	Safety and immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV attenuated recombinant Japanese encephalitis virus - poxvirus vaccines in vaccinia- nonimmune and vaccinia- immune humans	<i>Vaccine</i>	19	483- 491	2000



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

デング熱媒介蚊に見られる寄生原虫 *Ascogregarina* spp. について

分担研究者 安居院 宣昭（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

共同研究者 小林 睦生・二瓶 直子・佐々木年則・栗原 毅（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

#### 研究要旨

デング熱媒介蚊であるヒトスジシマカ幼虫に寄生する *Ascogregarina* sp. がどの程度広範に本邦産ヒトスジシマカに認められるか調べた。その結果、東北地方、関東地方、関西地方、沖縄地方から採集した幼虫から同原虫の寄生を認めた。寄生率および幼虫当たりの寄生栄養体数は発生源や発生場所によって大きな差が見られた。また、岩手県で採集されたヤマトヤブカ幼虫から同様の寄生原虫を分離することが出来た。これらの原虫に加えて、タイ国チェンマイ市で採集したネツタイシマカからも *Ascogregarina* sp. を分離した。3種のヤブカ幼虫より分離した寄生原虫の超微形態を走査電顕で比較したところ、栄養体の後端部の構造とオーシストの表面構造にそれぞれ明瞭な違いが確認され、ヤマトヤブカ由来の *Ascogregarina* sp. は新種と考えられた。ヒトスジシマカ由来原虫のオーシストをネツタイシマカに感染させた場合、幼虫発育に若干の遅延が認められたが、死亡率には影響は見られなかった。2種（ヒトスジシマカおよびヤマトヤブカ由来）の原虫オーシストを数種ヤブカ類とハマダラカに感染させたが、非常に宿主特異性が高い傾向が認められた。今後、生物的防除法への *Ascogregarina* spp. の利用と外来遺伝子の運びや（遺伝子ベクター）としてこれら原虫を疾病対策に利用する方法を模索する事が重要と考えられる。

#### A 研究目的

デング熱およびデング出血熱は東南アジア、中南米、南太平洋諸島を中心に猛威を振るっており、毎年、10万人以上がデング出血熱またはデングショック症候で死亡していると考えられている。媒介蚊は主にネツタイシマカとヒトスジシマカである。ヒトスジシマカは東南アジアを起源とするヤブカで、1942-1945年の長崎、大阪などでのデング熱の流行時に媒介蚊となったことが知られている。1950年代のヒトスジシマカの分布の北限は栃木県となっており、その後徐々に分布域を北方へ拡大し、

1990年代前半では仙台市が太平洋側の分布限界地域となっていた。最近の我々の調査では、日本海側では秋田市および能代市で2000年に新たに同蚊の分布が確認され、今までの北限が75Km北上したことになった。一方、太平洋側では2000年に新たに一関市および東山町で確認され、今までの北限とされていた古川市から計算して45Km北限が移動したことになった。このことは急激な温暖化が関係していることが我々の地理情報システムを利用した解析で明らかになりつつある。また、我が国へのデング熱患者の輸入症例は着実に増加する傾向にあり、今後、我が国での二次感染が

起こる可能性も視野に入れてヒトスジシマカの分布調査を行う必要がある。ヤブカ類に寄生が認められる *Ascogregarina* spp. は孢子虫類のグレガリナ目に属する寄生原虫である。1895年、マラリア研究で有名な R. Ross がインド産のヤブカ (*Aedes*) から発見し、*Gregarina culicidis* と命名したが、その後彼は学名を *culicidis* から *culicis* に変更している。この寄生原虫の属名は *Lankesteria* に変更され、その後、*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes koreicus*, *Armigeres subalbatus* 等から発見された原虫は、全て *L. culicis* として分類されている。初期の栄養体は、蚊の中腸上皮細胞に侵入し、そこである程度発育した後、中腸内腔に移動し、発育を続ける。現在までに属名が *Gregarina*, *Lankesteria*, *Ascocystis* と変遷がみられるが、現在は *Diplocystidae* 科の *Ascogregarina* 属に統一されている。現在までに6種類ほどがヤブカ類から記載されているが、栄養体の形態、ガメトシストの直径、オーシストの大きさおよび宿主特異性が分類の根拠になっている。1980年に台湾のヒトスジシマカから *Ascogregarina taiwanensis* が始めて記載された (Lien & Levine, 1980)。しかし、我が国のヒトスジシマカに関しては全くこの原虫に関して調査がされていなかった。本研究事業では、我が国のヒトスジシマカ幼虫にどの程度 *Ascogregarina* sp. の寄生が見られるか、また、走査電子顕微鏡での詳細な観察によって、明瞭な形態的差を検査すること、また、この寄生虫が他種のヤブカ類の幼虫発育にどの程度影響を与えるかを明らかにする。また、本邦産の別種ヤブカ類にどの程度 *Ascogregarina* sp. の寄生が認められるか調査を行い、デング熱媒介蚊の分布およびそれらの寄生が幼虫発育に与える影響を検討した。

## B 研究方法

ヤブカ幼虫は、墓地の花立て、手水鉢、線香立て、プラスチック容器、空き缶、古タイヤ等から駒込ピペットを用いて幼虫を約 100 ml のポリエチレン容器に採集し、研究所に持ち帰った。終令幼虫まで飼育し、*Ascogregarina* 栄養体の寄生を確認するために、実体顕微鏡下で幼虫を解剖し、中腸を摘出して後、囲食膜に囲まれた未消化物を膜ごとピンセットで取り出した。中腸上皮細胞からなる中腸壁をスライドグラス上の PBS (Dulbecco's, pH 7.0) 1 滴中に置き、カバーグラスをかけて光学顕微鏡で観察した。栄養体の超微形態を観察するために、必要に応じて 2.5% glutaraldehyde と 2% paraformaldehyde (0.1M PBS, pH 7.2) で固定を行った。また、採集されたヤブカ幼虫は種の同定を行うために、成虫まで飼育した。

野外採集した幼虫で、*Ascogregarina* sp. 栄養体の寄生が確認された場合は、蛹または成虫まで飼育し、マルピギー管を解剖によって取り出し、オーシストを回収した。

実験感染は、5-10  $\mu$ l 当たりのオーシスト数を算出し、ヤブカ幼虫 1 匹当たり 100-300 個ほどのオーシストが取り込まれるように調整して感染させた。

(倫理面への配慮： 野外での蚊幼虫採集および寄生原虫の実験室内での観察が主な研究方法であるので、特に問題ない)

## C 研究結果

### 1. 本邦産ヒトスジシマカの *Ascogregarina* sp. の寄生状況

埼玉県春日部市内で採集された幼虫では、9 コロニー中 6 コロニーから寄生原虫が認められ、各々の寄生率は 50-100% であった。幼虫当たりの栄養体寄生数はコロニーによって 38.5-209 と幅があり、同じコ

ロニーでも大きな差が見られた。その他、神奈川県横浜市、福島県白河市・会津若松市、秋田県秋田市、沖縄県那覇市、福井県福井市、千葉県成田空港等から採集されたヒトスジシマカに寄生原虫が認められた(図1)。なお、宮古島平良市で採集されたヒトスジシマカ 18 コロニー中 16 (88.9%)、伊良部島で 7 コロニー中 6 (85.7%)コロニーに原虫の寄生が認められた。これらのことより、本邦産ヒトスジシマカには *Ascogregarina* sp. が広く寄生していることが明らかとなった。

#### 2 ヤマトヤブカ幼虫より分離された *Ascogregarina* sp. について

岩手県大船渡市、釜石市から採集されたヤマトヤブカ幼虫に、ヒトスジシマカに寄生が認められた原虫と形態的に類似した原虫が確認された。蛹まで飼育し、マルピギー管から多数のオーシストを得ることに成功した。大船渡からのコロニーでは 3/4 に寄生が見られ、釜石からのコロニーでは 2/4 (50%) に原虫の寄生が認められた。一方、山形市では、多数のヤマトヤブカ幼虫を採集したが、*Ascogregarina* sp. の寄生は全く認められなかった。

#### 3 チェンマイ市(タイ国)で採集されたネッタシマカ幼虫の *Ascogregarina* sp.

2000年11月にチェンマイ市内でヤブカ幼虫を採集した。採集された6コロニーの内、1コロニーのネッタシマカ幼虫より *Ascogregarina* の栄養体を確認した。そこで、成虫まで飼育し、マルピギー管より多数のオーシストを回収することが出来た。その後、継代飼育しているネッタシマカの1令幼虫に感染させ、それら成虫からもより多数のオーシストを回収した。

#### 3 *Ascogregarina* spp. の生活史

野外採集ヒトスジシマカ蛹のマルピギー管から分離したオーシストを継代飼育しているヒトスジシマカ1令幼虫に感染させ、経時間的に幼虫を解剖して、*Ascogregarina* の発育を観察した。その結果、初期の栄養体は中腸上皮細胞内に侵入し、その後3令以降に中腸内腔に出て発育をすること、終令幼虫では体長 200  $\mu$ m 程のガモントに発育し、その後蛹化する前にマルピギー管内に侵入することが観察された。蛹化直後の短時間に有性生殖が行われることが予想されたが、そのステージはほとんど観察できなかった。蛹化後2日目には未成熟なガメトシストがマルピギー管の末端部を中心に認められ、その後羽化までの1-2日の間にガメトシスト内に多数のオーシストが形成されるのが観察された。羽化時には、大部分のガメトシストは崩壊し、多数のオーシストがマルピギー管の管腔にびっしりつまっている像が観察され、一部はマルピギー管から後腸(直腸)に移行していた。ヒトスジシマカでは、蛹が羽化した後の飼育水から多数のオーシストが回収出来たことから、大部分のオーシストは羽化時に排泄される蛹便(meconium)と一緒に水系に捨てられると考えられた(図2)。

#### 4 走査電子顕微鏡による *Ascogregarina* spp. の観察 (栄養体)

終令幼虫の中腸内での *Ascogregarina* 栄養体は、光学顕微鏡では全体が茶褐色に見え、拡大すると内部に褐色の微少な顆粒が多数存在するのが観察された。形態は多型を示し、後端部がくびれていたり、未成熟なガモントでは筋構造が観察される場合がある。体長はばらつきがあり(60-80  $\mu$ m)、緩慢であるが運動性を示す。走査電顕で3種のヤブカ由来の *Ascogregarina* 栄養体の微細構造を観察したところ、前端部から後端部へ体表全体に細かいひだが存在してい

た。低倍での観察では3種の違いを認めることは出来なかった(図3)。栄養体の前端部の一部分は中腸の微絨毛に埋没しており、固着しているのが観察された(図4 A)。なお、固定の過程で上皮細胞からはずれた栄養体の前端部を観察したところ、特に固着に関わる構造は認められなかった(図4 B)。栄養体後端部の観察では、ヒトスジシマカ由来のものでは突起(mucron)が認められ、他2種の形態と明らかに異なっていた(図5 A)。ネッタイシマカ由来のものでは、突起は無く、ひだ構造が後端中央ではほぼ終わっていた(図5 C)。一方、ヤマトヤブカ由来のものでは、ひだ構造が後端中央を越えて反対側までのびており、他2種と構造が異なっていた(図5 B)。

(オーシスト)

3種のオーシストは、長径 8-12  $\mu\text{m}$ 、短径 4-5  $\mu\text{m}$  のレモン型をした構造を持っている。3種のヤブカ由来オーシストを走査電顕の観察で詳細に計測したところ、長径に差が認められた(表1)。オーシストの表面構造を詳細に観察したところ、ヒトスジシマカ由来原虫のオーシストでは表面に微細な突起構造が認められたが、ヤマトヤブカのものでは表面が非常にスムーズで、全く突起構造が認められなかった。一方、ネッタイシマカ由来のオーシストでは、表面全体に均一な付着物が存在しており、その中に規則的な突起様の構造物が存在していた。これらの観察から、走査電顕を用いると3種を明らかに分類する事が可能であることが明らかとなった(図6)。また、ヤマトヤブカより分離した *Ascogregarina* sp. は新種の可能性が高いことが明らかとなった。

5 ヒトスジシマカ由来原虫オーシストのネッタイシマカへの実験感染

ネッタイシマカ 1 令幼虫を 90 匹ずつ 50ml のピーカーに入れ、その中にヒトスジシマカ由来のオーシストをピーカー当た

り約 32,000 個播種し、10 日間 27℃ で飼育した。毎日1回(夕方)蛹になった個体数を数え記録した。

解剖様に準備した感染幼虫は、終令時に解剖し、中腸内の栄養体数を数え、平均感染数を算出した。その結果、感染させたネッタイシマカでは平均86.4匹の栄養体が観察されたが、光学顕微鏡で、構造が一部崩壊している栄養体が観察された。

蛹化に関しては、未感染の幼虫と比べ、明らかに約1日程遅延するのが認められた(図7)。また、死亡率は感染幼虫が若干高い傾向があったが、有意な差ではなかった。

## 6 *Ascogregarina* spp. の宿主特異性

ヒトスジシマカおよびヤマトヤブカ由来のオーシストをネッタイシマカ、ヒトスジシマカ、オオクロヤブカ、ハマダラカ (*Anopheles stephensi*) の 1 令幼虫に感染させ、終令幼虫を一部解剖し、栄養体の発育を観察した。また、その後蛹まで飼育し、マルピギー管内のガメトシストの有無を調べた。その結果、ヒトスジシマカ由来の *Ascogregarina* はネッタイシマカおよびオオクロヤブカでは栄養体まで発育が進んだが、その後ガメトシストを形成することはなかった。ヤマトヤブカ由来の *Ascogregarina* ではネッタイシマカでは栄養体まで発育が見られたが、その後の発育は認められなかった。一方、ヒトスジシマカでは栄養体の発育後、非常に少数であるが、ガメトシストを形成し、一部オーシストの形成が観察された。ハマダラカに関しては、両原虫とも全く発育が認められなかった(表2)。一部例外が見られたが、本来の自然宿主以外での幼虫では、ガメトシストへの発育が見られず、一部不完全な栄養体にまで発育が進むのみであった。これらのことから、*Ascogregarina* spp. は非常に高い宿主特異性を示すことが明らかとなっ