

表1

目的：日本産アカイエカのウエストナイルウイルス感受性

方法：胸部接種した雌成虫⇔28°C、14日間飼育
経口吸液した雌成虫⇔20, 25, 28°C、14日間飼育

検出：RT-PCR法によるウイルスゲノムの検出

Primer: 1. Flavivirus特異的プライマー

2. West Nile virus特異的プライマー

検討事項：1. アカイエカのウイルス感受性の有無
2. 異なる温度での蚊の感染率比較、自然界
における本種蚊のウイルス伝播能を推察

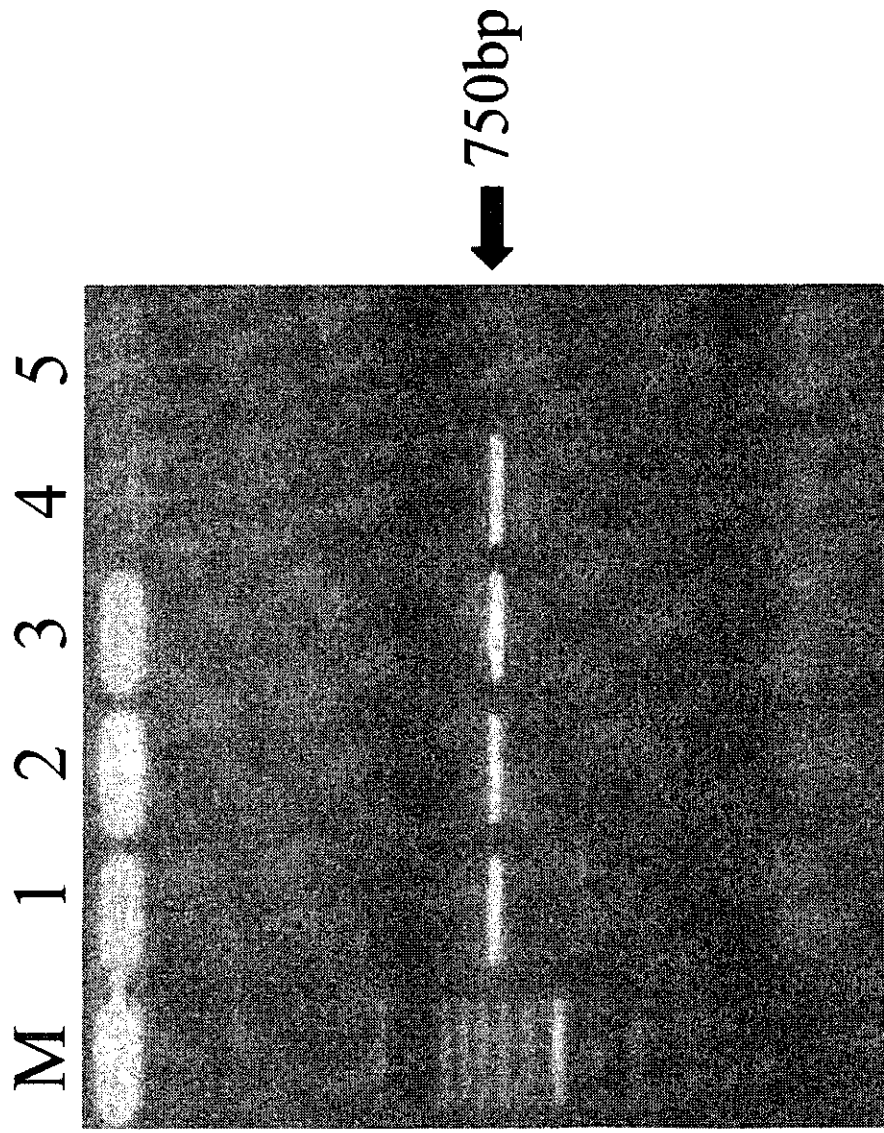


Fig.1 West Nile virus specific products amplified by RT-PCR with flavivirus group-specific primer set, YF1 and YF3 in intrathoracically-injected *Culex pipiens pallens*

(M: 100 bp ladder Marker, lanes 1-4: single mosquito incubated for 14 days at 28°C, lane 5: un-infected mosquito)

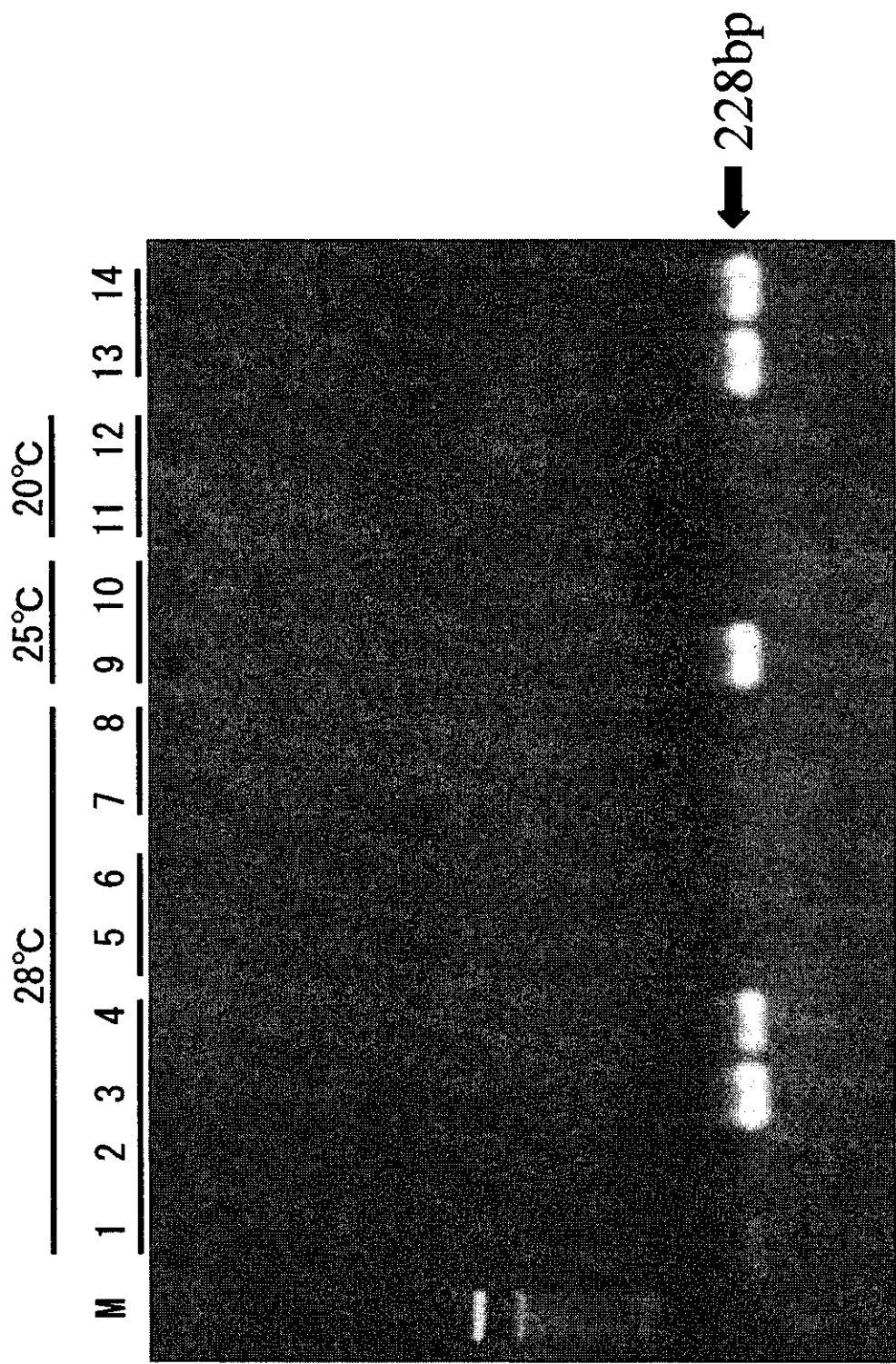


Fig.2 West Nile virus-specific products amplified with the virus specific primer set, WNS3 and WNC3 by RT-PCR in orally-infected *Culex pipiens pallens*

(M: 100 bp ladder Marker, lanes 1-4, 5&6, 7&8: fully-, partially-, few blood fed mosquito maintained for 14 days at 28°C, lane 9&10: fully-fed mosquito at 25°C, lane 11&12: fully-fed mosquito at 20°C, lanes 13&14: viral RNA derived from the infected C6/36 cell as positive control)

経口吸液後、20-30°Cで14日間飼育したアカイカのウイルス感染状況

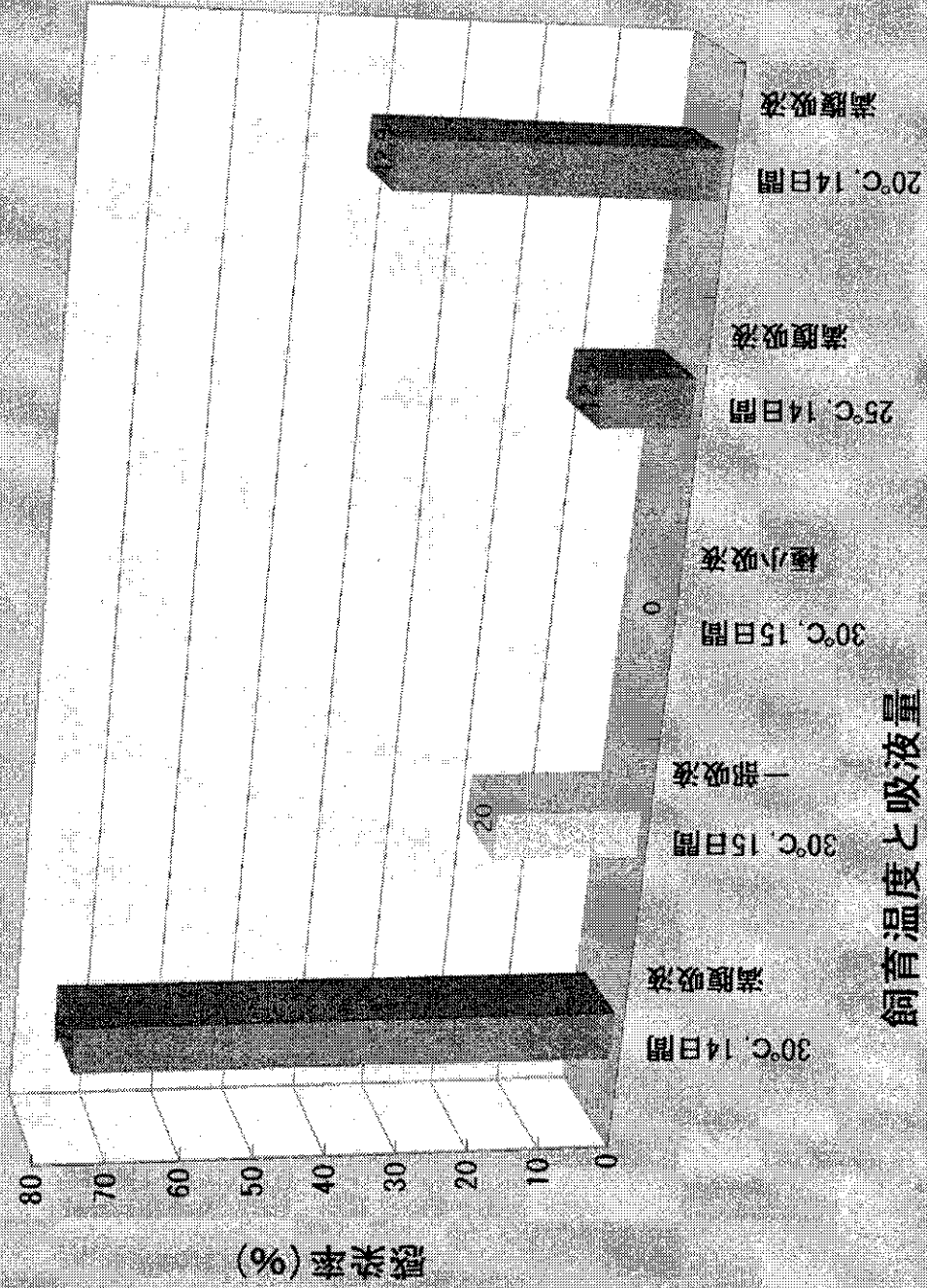


図3. 経口吸液した蚊のウイルス感染率は、28°Cでは75% (感染蚊6/供試個体8)、25°Cで12.5% (1/8)、20°Cで42.9% (3/7)

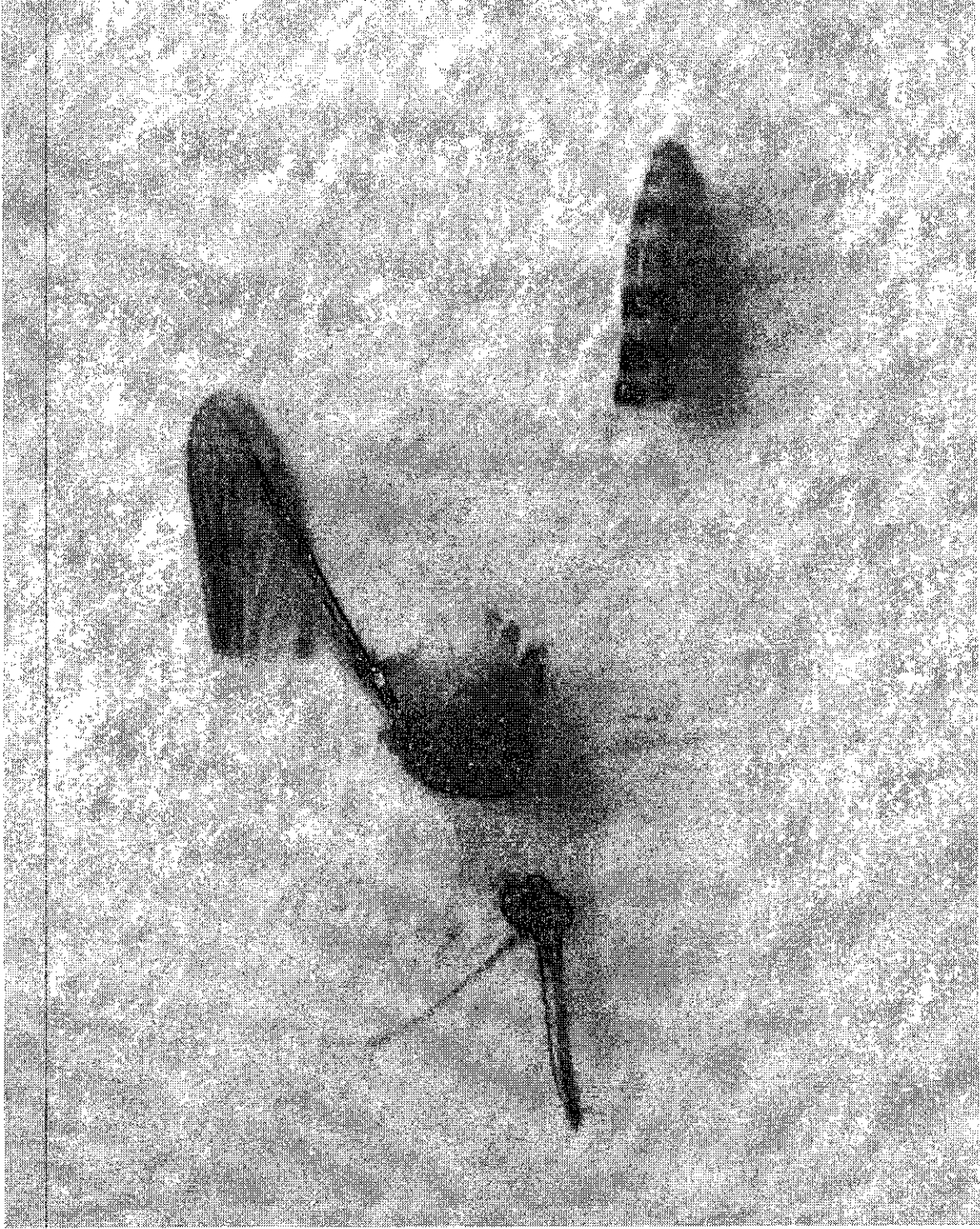


Fig.4 Head with proboscis, thorax and abdomen
of *Culex pipiens pallens* female

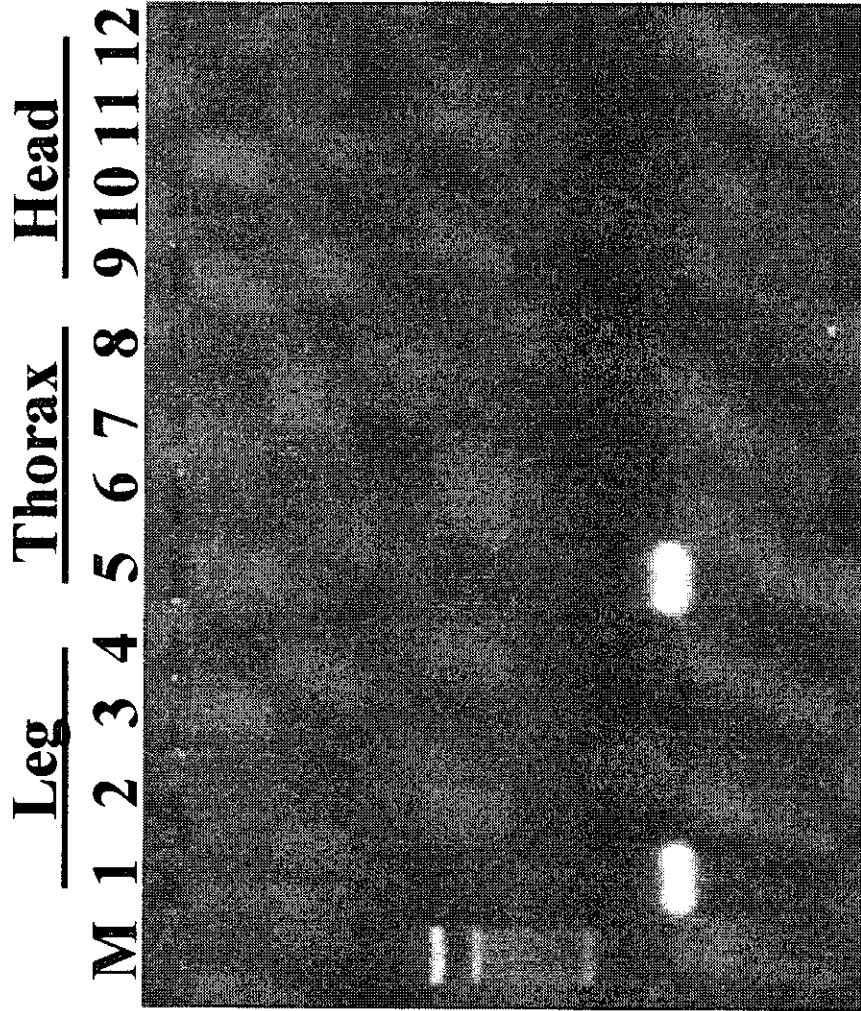


Fig.5 RT-PCR amplification of West Nile viral genome in partial mosquito leg, thorax and head, respectively, derived from four mosquito abdomens with viral genome-positive. (Each template RNA was extracted by Qiagen system)

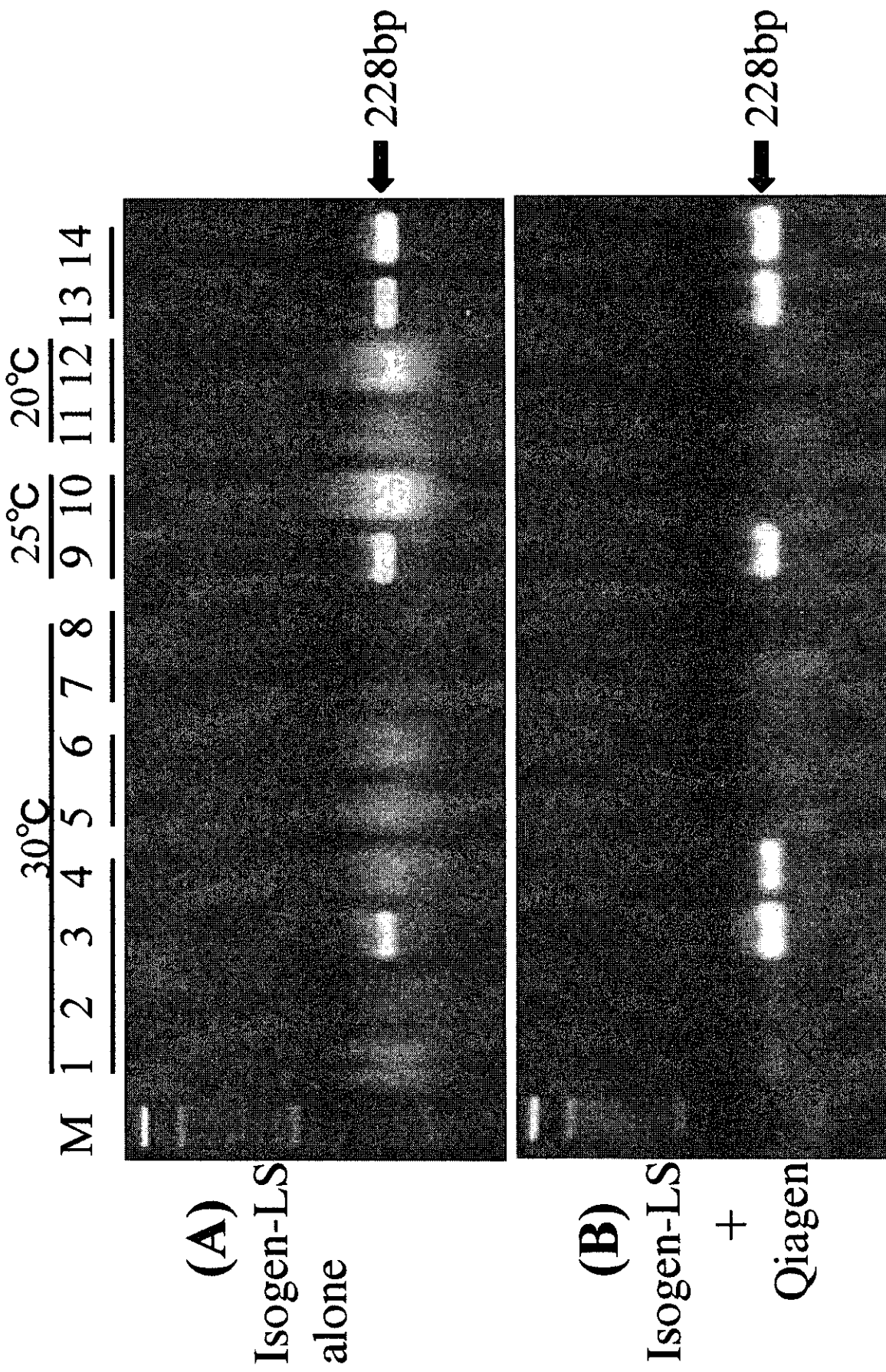


Fig.6 West Nile virus-specific products amplified with the virus specific primer set, WNS3 and WNC3 by RT-PCR in orally-infected *Culex pipiens pallens*

表 2

目的：日本産ヒトスジシマカとチカイエカの
ウエストナイルウイルス感受性の有無を検討

方法：経口感染した雌成虫⇔15 20, 25, 28°C、14日間飼育

検出：RT-PCR法によるウイルスゲノムの検出
West Nile virus特異的プライマー

検討事項：蚊2種のウイルス増殖能
15°Cでのウイルスの増殖性

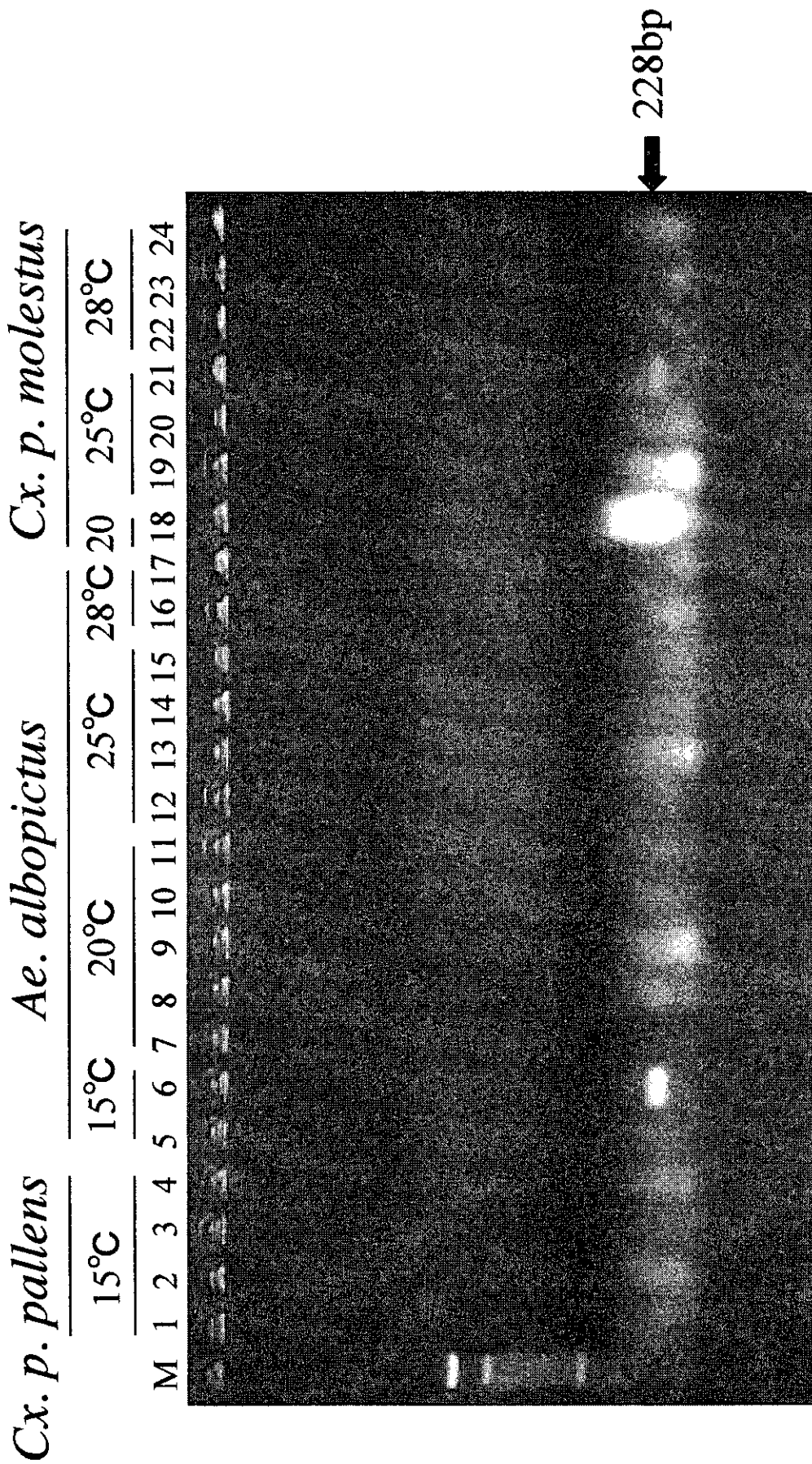


Fig.7 West Nile virus-specific RT-PCR products amplified with the virus specific primer set, WNS3 and WNC3 in orally-infected *Culex pipiens pallens*, *Aedes albopictus* and *Cx. p. molestus*

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告

- 1) デング熱媒介蚊の寄生原虫 *Ascogregarina* spp.を用いた新しい防除法の開発
- 2) 蚊からのウエストナイルウイルスの検出における VecTest と RT-PCR 法との比較
- 3) ウエストナイル熱の媒介蚊対策に関するガイドライン作成

分担研究者 小林 睦生 国立感染所研究所昆虫医科学部長
研究協力者 澤邊 京子 国立感染所研究所昆虫医科学室長
佐々木 年則 国立感染所研究所昆虫医科学研究所員
Roychoudhury, S. 国立感染所研究所昆虫医科学研究生

研究概要

1) ヤブカ類の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. は1令幼虫に取り込まれたオーシストがスポロゾイトを消化管内で放出し、栄養体が蛹化時にマルピギー管内に移行した発育を完了すると考えられていたが、2、3、4令幼虫に取り込まれたオーシストも順調に発育し、羽化後1週間でオーシストが形成される事が明らかになった。これは、将来の遺伝子導入原虫によるヤブカ防除を考えると、より広範な環境に原虫オーシストを分散させるのに適していると考えられる。2) ウエストナイルウイルス(WNV)を野外採取蚊から検出方法として VecTest と RT-PCR がある。50匹の未感染蚊と定量された WNV をまぜ、VecTest と RT-PCR 法の検出感度の比較を行った。その結果、RT-PCR と比べて検出感度は若干低い、迅速性、労力などの点で VecTest が優れており、地方自治体、検疫所等でのウイルス検出にこの方法を導入することに関して支障がないと考えられた。3) 将来の WNV 侵入に備えて、地方自治体が独自に媒介蚊の調査および防除が行えるように「ウエストナイル熱の媒介蚊対策に関するガイドライン」を10名の協力者の参加を得て作成した。

A: 研究目的

1) ネットアイシマカやヒトスジシマカの寄生原虫である *Ascogregarina* spp.は宿主特異性が高く、感染後期にマルピギー管内に形成されるガメトシストには多数のオーシストが形成され、最終的に水系に排泄されて次の感染の機会を待つ生活環をもっている。この原虫に外来遺伝子を導入して、感染したヤブカの生理機能を攪乱させ、交尾行動の阻害などが出来れば、野外でのヤブ

カの個体数を著しく低下させる事が可能になる。そこで、オーシスト、スポロゾイト、栄養体、ガモント、ガメトシストからなる発育環において大量に回収しやすく、電氣的に外来遺伝子を導入しやすいステージはスポロゾイトと考え、オーシストが消化管に取り込まれてから何時間でスポロゾイトの放出が起こるか、また、原虫感染を2-4令幼虫を用いて行った場合に、その後の発育が正常に起こるか検討した。

2) わが国におけるウエストナイル熱対策が講じられる中、ウイルスの国内への侵入を監視するためには、各種蚊からのウイルス検出が精度よく行われなければならない。本研究は、研究班で作成された WNV 防除のためのガイドラインに従って各自治体が野外で採集した蚊からウイルス検出を実施する場面を想定し、より有効な検出法を検索し、かつ簡便な手順およびその検査に係る諸条件を検討する目的で行った。

B：研究方法

1) ヒトスジシマカ幼虫に *Ascogregarina* 原虫のオーシストを大量に感染させ、羽化後に感染蚊を解剖してオーシストを回収した。これらのオーシストにトリプシン、ペプシン、アミラーゼ、アミノペプチダーゼ等の酵素を種々の濃度に調整し、オーシストと反応させた。また、水酸化ナトリウム、塩酸の希釈液とも反応させた。ガラスビーズとオーシストとを混ぜ、Vortex で 30 秒から 1 分間激しく振とう処理した。2-4 令幼虫にオーシストを感染させ、これらの原虫の発育が正常に起こるかを蛹、成虫期に定期的にサンプリングして、解剖後顕微鏡で観察した。

2) 米国で近年市販された「VecTest」(Medical Analysis System 社) とフラビウイルス検出で一般的に用いられる「RT-PCR」との検出感度の比較を行った。WNV 感染蚊は大分医大において 2 種の国内産蚊(ヒトスジシマカ、アカイエカ)に約 2×10^3 乗個を注射し作成した。また、感染症研究所ウイルス 1 部で系統維持されている培養された WNV を各濃度に希釈し、各々のウイルス液を非感染蚊 50 匹の摩碎

液に混合し、上記 2 種でのウイルス検出法の検出限界を調べた。

C：研究結果

1) オーシストからスポロゾイト(図 1)を効率よく回収するために、種々の酵素類、化学物質、物理的刺激等を検討したが、スポロゾイトの放出効率が悪く、その後の実験に利用できる方法は見つからなかった。一方、オーシストをヤブカ幼虫に感染させ、経時的に調べた結果、感染後 75-90 分で多くのオーシストからスポロゾイトが放出しているのが観察され(図 2)、ヤブカの中腸内では非常に速やかにスポロゾイトの放出が起こることが明らかとなった。オーシストが 1 令幼虫に取り込まれた場合のみ、正常な発育が起こると考えられていたが、2-4 令に感染させる実験で、幼虫のステージに関係なくこの原虫の発育が起こり、2 令幼虫への感染では原虫発育に要する日数が 11 日と 1 令幼虫への感染より 1 日長くなり、3, 4 令幼虫への感染ではそれが 12 日間となり、1 令幼虫への感染と比べ約 2 日間長くなった(表 1)。

2) VecTest、RT-PCR のいずれの方法でも、リン酸緩衝液中で事前にホモジナイズした蚊粗抽出を作り、それを基にウイルス検出の手順をスタートさせることで、肉眼的により判定しやすい結果を得ることができた。

・感染蚊を用いた実験では、RT-PCR、VecTest のいずれでも、それぞれの種の感染蚊(WNV 10^5 個以上のウイルスプラーク形成)を 50 匹中に 1 匹の割合で混ぜたウイルス濃度で検出可能であった(図 3)。

・希釈したウイルス液を用いた実験では、WNV 特異的なプライマーを用いた場

合、RT-PCR で検出される濃度は VecTest でのそれより約 100～1000 倍優れていた。

・VecTest において、ヒトスジシマカの比重が軽くチューブ内の磨砕液表面に浮いてしまうため所定の時間ではうまく磨砕できなかったが、液量を半量まで少なくすると十分に磨砕でき、また検出感度も変わらないことが分かった。

D:考察

1)ヤブカ原虫の *Ascogregarina* spp. は種特異性が高く、我が国の野外で採集されたヒトスジシマカや東南アジアで採集されたネッタイシマカには高率に寄生が認められる。この原虫に蚊の生理機能を攪乱する物質や交尾行動に変化を起こさせるペプチド等の外来遺伝子を発現させ、野外の小容量の水系に散布すれば、安全で効率の良い生物学的防除法の確立が可能になる。そこで、原虫の発育ステージであるスポロゾイトを大量に集める方法を開発する目的で、蚊の中腸内での詳細な発育過程を観察した。スポロゾイトは終令幼虫に感染させても、回収が可能であることが示され、電気的に遺伝子を導入する方法を応用する可能性が示唆された。

2)蚊からのウイルス検出法で、RT-PCR は VecTest に比べはるかに検出感度に優れている結果が得られたが、一方、感染蚊が 50 匹の蚊プールの中に 1 匹でも存在すればどちらの検査法でも同程度に検出できることも示された。つまり、いずれの検出法ともに感染蚊の実際のウイルス保有量にその検出感度が左右されると言える。

今後は、感染蚊が保有しているウイルス

の実際量が 10^5 個以上であるかを確認すること、また、ヒトを発病させるのに必要なウイルス量がどの程度かを推定することなどが重要な課題になるろう。

E:結論

1) *Ascogregarina* spp. は種特異性が高く、この原虫に蚊の生理機能を攪乱する物質等外来遺伝子を発現させ、野外の小容量の水系に散布すれば、全く新しく、安全で効率の良い生物学的防除法の確立が可能になる。スポロゾイトを大量に集める方法を確立しつつあり、電気的に遺伝子を導入する方法を応用する可能性が示唆された。

2)RT-PCR は一連の煩雑な行程に約 2 日程度の時間と労力を割かなければならないが、かかる費用は VecTest に比べると安価であり、検出感度は高い。RT-PCR 検査の経験のある自治体であれば特に本検査の導入に支障はないであろう。

一方、VecTest は 30 分～1 時間でウイルス保有の判定までのすべてが終了し、操作も非常に簡単であるが RT-PCR 法と比べて値段は若干嵩む。これまでウイルス検査の経験のない自治体であっても、安全キャビネット等の装置があれば、その導入は容易であろう。

3)ウエストナイル熱の媒介蚊対策に関するガイドラインの作成

媒介蚊対策に関する指針が全く存在しない状況で、WNV が我が国で検出された場合、相当混乱した状況に陥ることが予想される。そこで、長年衛生昆虫学の分野で衛生昆虫等の防除や調査に携わってこられた 10 名の専門家に本研究事業の研究協力者として参画いただき、ガイドラインの執筆

をお願いした。本ガイドラインは、我が国において WNV の侵入が確認された場合を想定した蚊の防除対策の立案に役立つようにまとめられた。しかし、ウイルスが検出されない段階から各地方自治体で媒介蚊の調査体制を構築し、蚊または野鳥から WNV が検出された場合には遅滞のない媒介蚊対策の実施が可能となるようにまとめられている。また、我が国の種々の状況を考慮し、今まで媒介蚊対策に従事した経験のない地方自治体の担当者にも、基本的な蚊の生態や分類、幼虫発生源の調査法、成虫採集法、蚊からの WNV 検出法および総合的な防除法などが理解できるように資料の部分を充実して編集した。

F:健康危機管理情報

特筆なし。

G: 研究発表

1. 発表論文

Kobayashi, M., Nihei, N. & Kurihara, T.
Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system.

Journal Medical Entomology, 39(1): 4-11, 2002.

Sasaki, T., Kobayashi, M. & Agui, N.
Detection of *Bartonella quintana* from bodylice, *Pediculus humanus* (Anoplura: Pediculidae), infesting homeless people in Tokyo by molecular technique.

Journal Medical Entomology, 39(2):427-429, 2002

Kobayashi, M., Sasaki, T. & Agui, N.
Possible food contamination with the excreta of housefly with entero-

hemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7
Medical Entomology and Zoology, 53: 83-87, 2002

Nihei, N. Hashida, Y. Kobayashi, M. Ishii, A.
Analysis of malaria endemic areas on the Indochian Peninsula using remote sensing. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55:160-166, 2002.

小林 睦生 (三橋 淳 監修)

「昆虫学大辞典」(分担)

害虫各論 1.9 衛生害虫 p. 920-933,
朝倉書店、東京、2003年3月出版

2. 学会発表

小林睦生、二瓶直子、佐々木年則、栗原毅：メッシュ気候図による東北地方のヒトスジシマカの分布解析 第54回日本衛生動物学会、14年4月1-3日、東京

小林睦生、Sudipta Roychoudhury、二瓶直子、佐々木年則：デング熱媒介蚊に防除に応用するための *Ascogregarina* 原虫に関する予備的研究

小林睦生、二瓶直子、栗原毅：北海道北東部の能取湖で採集されたセスジヤブカの産卵について 第54回日本衛生動物学会東日本支部大会、14年9月28日

小林睦生：東北地方のヒトスジシマカの分布拡大について：山形市を中心に 日米医学協力研究会、15年1月24-25日

小林睦生：米国におけるウエストナイル熱の現状と我が国での媒介蚊対策 大阪府立公衆衛生研究所第150回セミナー 15年2月7日

図 1

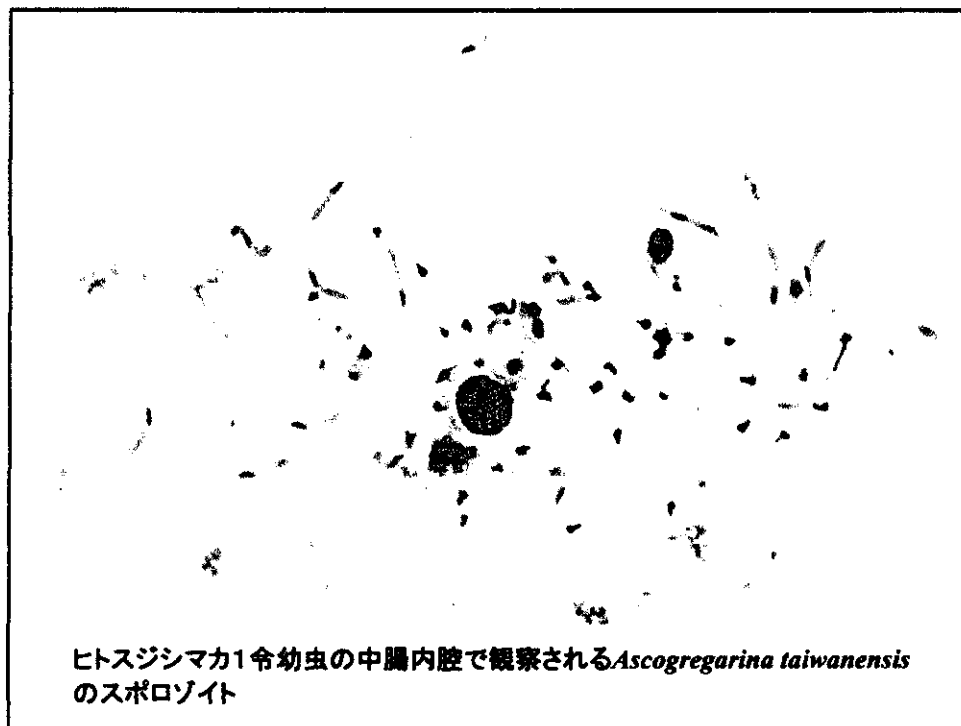


図 2

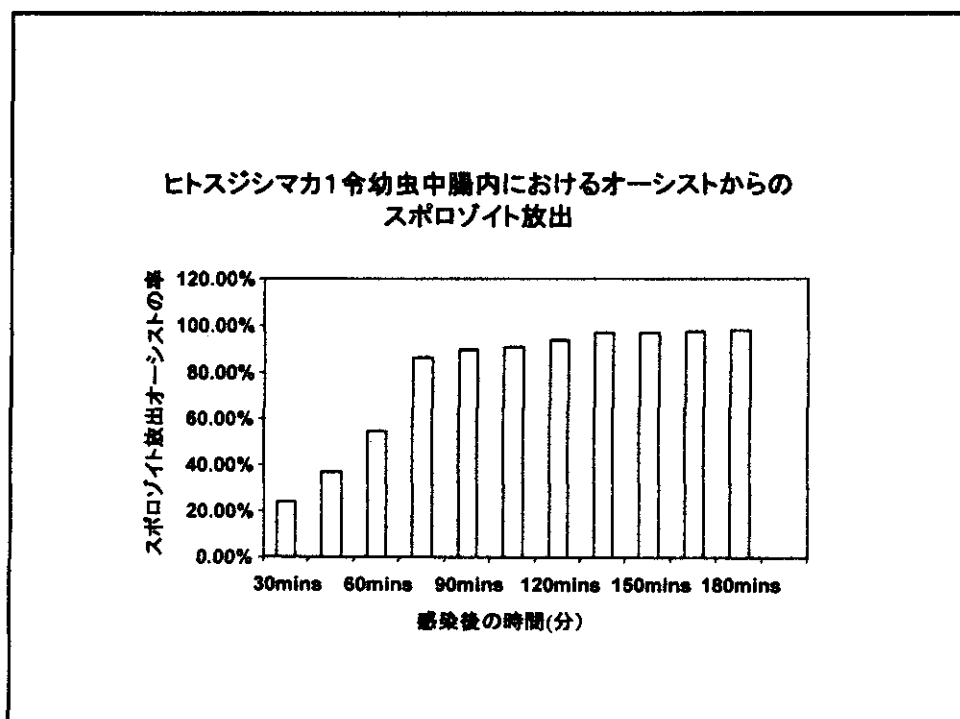
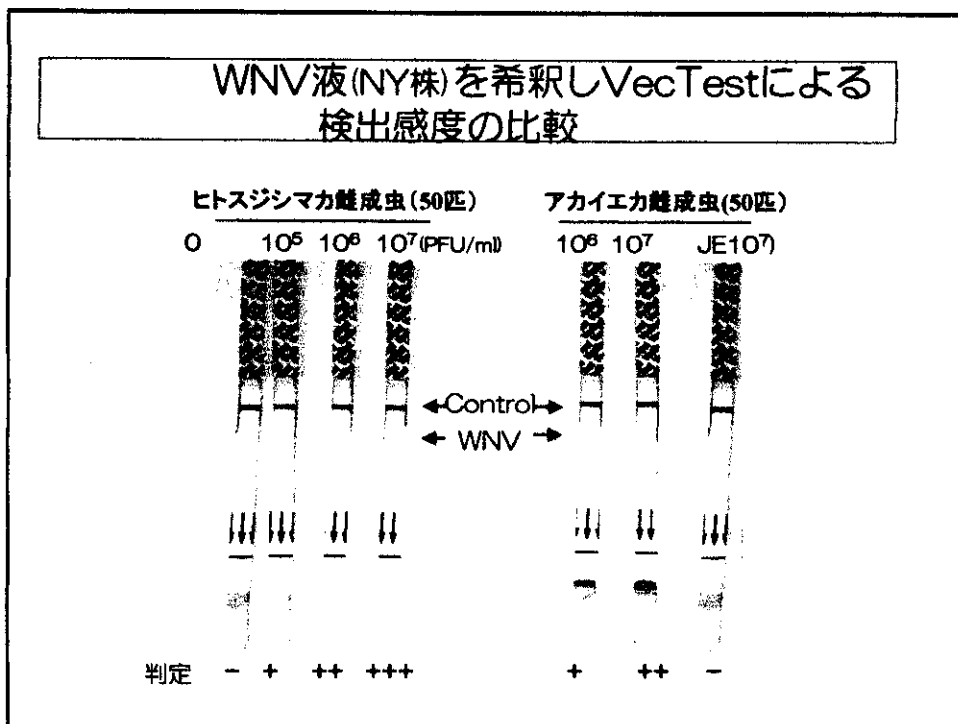


表 1

ヒトスジシマカの各幼虫ステージにおける <i>Ascogregarina</i> 感染と原虫の1世代発育に要する日数									
Different stages of <i>Ascogregarina</i> seen in different stages of <i>Aedes</i>									
	Larva (8 ± 1) days				Pupa (2 ± 1) days	Newly emerged Adult	Oocyst seen on (-)th day of adult age	Duration of life cycle (days)	
	1st	2nd	3rd	4th					
	1st	Sp	Tr	Gm	Gms	Gms	O	1	10 ± 2
Larval instar of parasite inoculation	2nd	--	Sp	Tr	Gm	Gms	Gms	3	11 ± 2
	3rd	--	--	Sp	Tr	Gm	Gms	6	12 ± 2
	4th	--	--		Sp	Tr	Gm	8	12 ± 2
Average time taken complete life cycle									11.22 ± 2

Sp : Sporozoite, Tr : Trophozoite Gm : Gamont Gms : Gamatocyst

図 3



分担研究報告書

カニクイザルにおける日本脳炎DNAワクチンの有効性に関する研究

分担研究者 棚林 清 国立感染症研究所

研究要旨 日本脳炎ウイルス(JEV)に対するDNAワクチンの開発に向け、候補プラスミドDNAを投与方法、投与量を変えてカニクイザルに接種した。これらのサル血清中抗JEV抗体測定を詳細に行うとともに、病原ウイルス攻撃後の材料について組織学的病変の検索を試みた。個体差が認められるもののDNAワクチン接種により明らかに中和抗体が誘導され、免疫期間中特記すべき臨床症状は認められなかった。また、病原ウイルス株による攻撃実験を行ったがワクチン接種による明確な感染防御効果を判定するには至らなかったが既往性抗体反応が認められるとともに生残動物においては明瞭な脳組織病変はなかった。今後、免疫方法の改良および精度の高い実験を行うことで、JEVに対するDNAワクチンの有用性評価が期待されるものと考えられた。

A. 研究目的

JEVに対するDNAワクチンの実用化に際しては、ヒトにおける有効性並びに安全性が確立されていなければならない。これまでの2回のカニクイザルを用いて行われた免疫実験における抗体誘導の詳細な検証を行うとともに安全性の評価のために一部の検体について病理組織学的検索を行い、ヒトへの応用を視野に入れて作成した試作DNAワクチンの有効性や安全性を、カニクイザルにおいて明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

試作DNAワクチン

JEV中山株のprM及びE遺伝子をpNGVL4aベクターに挿入して得られたpNJEMEのDNAを精製し、ワクチンとして使用した。

コントロールとしてはベクターDNAを用いた。

動物

国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターで出生、育成された年齢11-20歳のカニクイザル9頭（実験1）、年齢4歳（オス）9頭（実験2）を用いた。

免疫方法

実験1においては、カニクイザルにベクターDNA（2頭）、pNJEME（3頭）300 μ gを筋肉内(im)に接種し、2頭にはジーンガンを用いて3 μ gを接種した。対照として参照日本脳炎ワクチンをヒトの1用量を皮下に接種した（2頭）。接種は4から6週間隔で3回行った。

実験2では、5頭にpNJEME 500 μ gを大腿部筋肉内に4週間隔で3回投与した。4頭には対照としてベクターDNA 500 μ gを同様に接種した。

ウイルス攻撃実験

最終免疫から2から3週間後に北京株またはJaTH株を攻撃ウイルスとして経鼻接種し、観察した。

抗JEV抗体の測定

血清ウイルス中和抗体は90%または70%プラーク法により行った。また、抗EおよびNS1抗体についてもELISA法またはNS1発現抗原を用いた免疫化学染色法により行った。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所動物実験委員会による審査を受け承認されたものである。

C. 研究結果

1. 実験1においてはpNJEME(im)の免疫により3頭中2頭で中和抗体価が認められたが1頭は検出限界以下だった(図1A)。ジーンガンによる免疫でも弱い中和抗体が誘導された(図1B)。ベクターコントロールでは抗体誘導は認められず(図1C)、現行ワクチン接種では2頭ともに抗体の上昇が認められた(図1D)。ウイルス攻撃後に著しい中和抗体の上昇が認められたが、抗体上昇の無い1頭と弱く反応した1頭で発症死亡した。コントロール2頭では抗体上昇もないが発症もなかった。実験2ではpNJEME(im)免疫5頭中4頭で中和抗体の誘導が認められたが1頭では検出されなかった。この1頭はウイルス攻撃後も抗体上昇がなかった。また、ウイルス攻撃後に抗体上昇がない個体も有った(図2AB)。ベクターコントロール群4頭には抗体は検出されなかったが、ウイルス攻撃後には2頭で抗体誘導が認められた。抗体上昇のなかった1頭は発症死亡した。(図2CD)。

2. 2回の実験において免疫期間中、臨床的に全身および局所的反応は認められなかった。ウイルス攻撃後発症した3個体では病理組織学的検索において脳各所で血管周囲細胞浸潤を伴う神経細胞変性が認められたが、抗体上昇が認められた3頭にはなかった。

D. 考察

日本脳炎ウイルスに対するDNAワクチンの有効性安全性をサルにおいて明らかにするために、JEVのMおよびE蛋白を発現するプラスミドDNAの投与量、方法変えて免疫を行った後ウイルス攻撃を行った2回の実験についてその中和抗体の詳細な抗体測定を行うとともに病理組織学的検索を実施した。いずれの免疫方法によってもウイルス中和抗体の上昇を示す個体が認められる一方、微弱な反応しかない個体も存在した。このことは個体間の免疫反応に差があることが考えられた。免疫期間中臨床的に特記すべき全身および局所の反応は見られず、さらに詳細な試験が必要では有るが著しい副反応は起きないと思われる。ウイルス攻撃後に発症した個体では細胞浸潤を伴う変化が脳組織に認められウイルス感染に伴うものと考えられた。本実験では抗体誘導が起きない個体や、対照群で発症しない個体が有ったことなどを考慮し、さらに精度の高い実験を行なうことが必要と考えられた。

E. 結論

日本脳炎ウイルスを標的としたDNAワクチン候補について、カニクイザルに免疫し、抗JEV抗体の産生が認められ、また明らかな局所、全身反応はなかったものの、抗体上昇のない個体も存在し、

更なる解析やアジュバント等を含めた有効な方法の解析が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Tanabayashi, K. , Mukai R. , Yamada, A. , Takasaki, T. , Kurane, I. , Yamaoka, M. , Terazawa, A. , and Konishi, E. : Immunogenicity of a Japanese encephalitis DNA vaccine candidate in cynomolgus monkeys. Vaccine, in press.

Uda, A. , Tanabayashi, K. , Mukai, R. , Terao, K. , and Yamada, A. : Identification of an amino acid responsible for the CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Med. Primatol., in press.

H. 知的所有権の取得状況

特になし

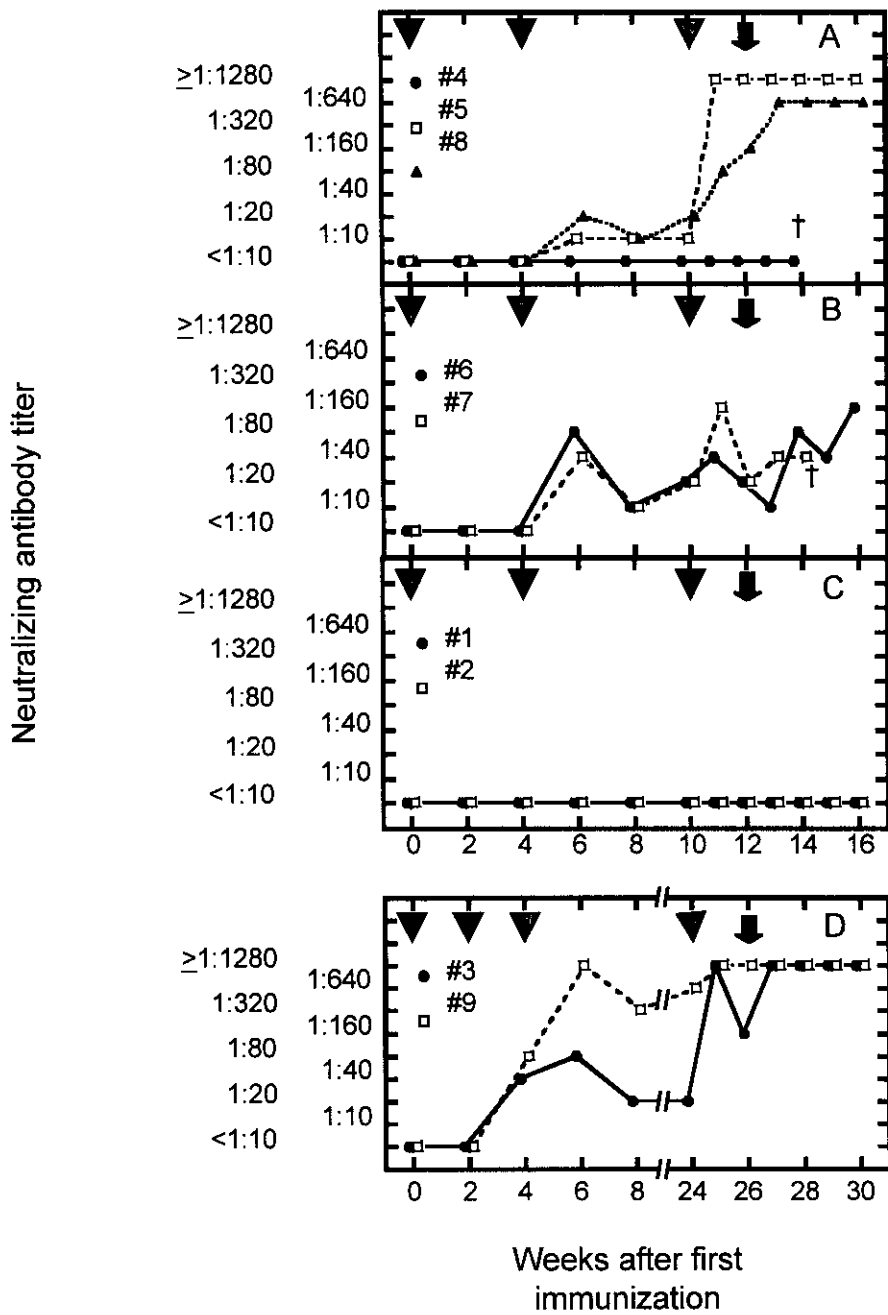


Fig. 1.

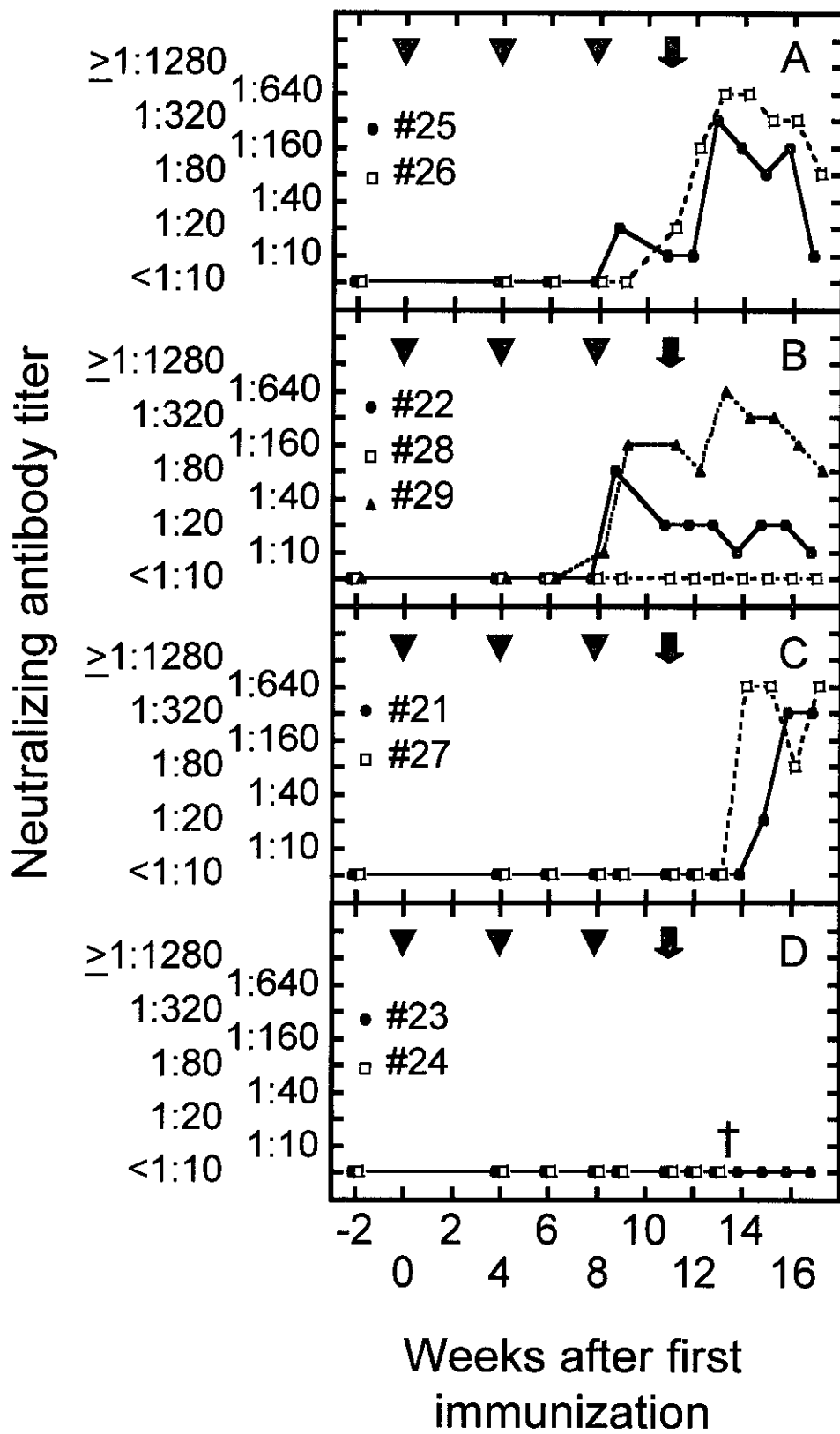


Fig. 2.