

图1. 中国新疆自治区の CCHF流行地

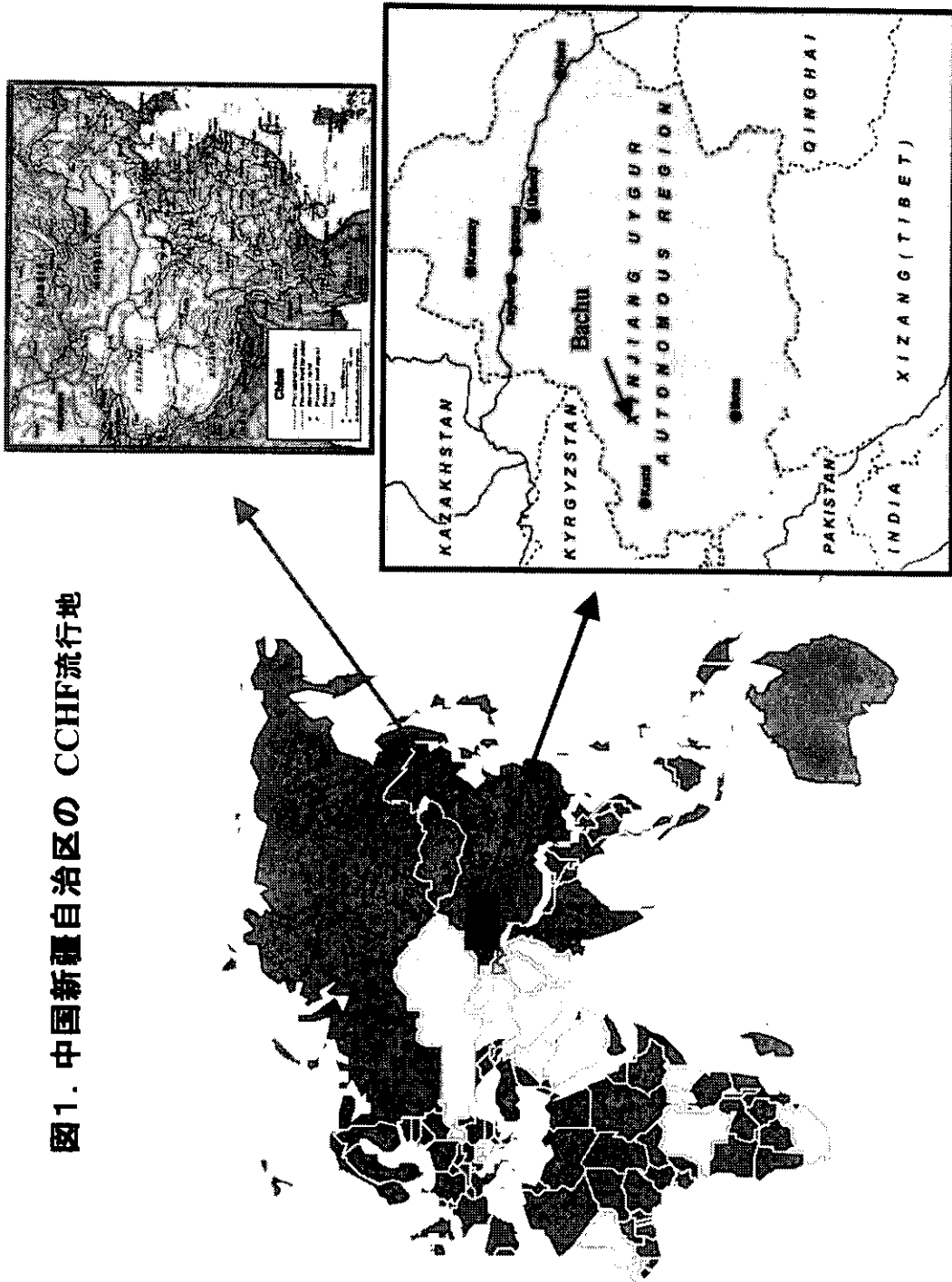
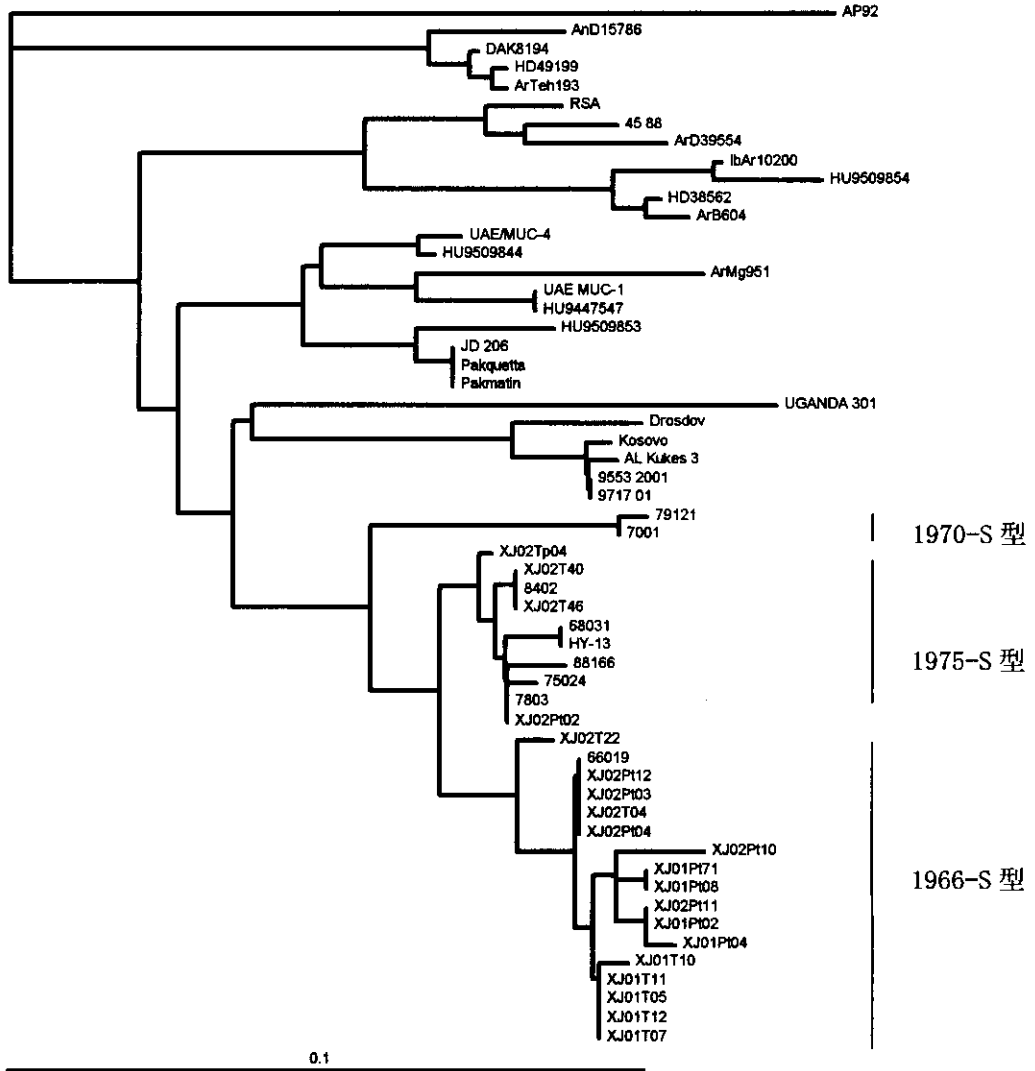


図2. CCHFウイルスの部分 S-RNA 遺伝子配列による分子系統樹



2001年：患者：XJ01Pt02, 04, 08, 71, ダニ：XJ01T05, 07, 10, 11, 12

2002年：患者：XJ02Rt02, 03, 04, 10, 11, 12 ダニ：XJ02T04, 22, 40, 46, p04

図 3. 2002 年に捕獲したダニの 16S-ribosomal DNA の部分配列による分子系統樹

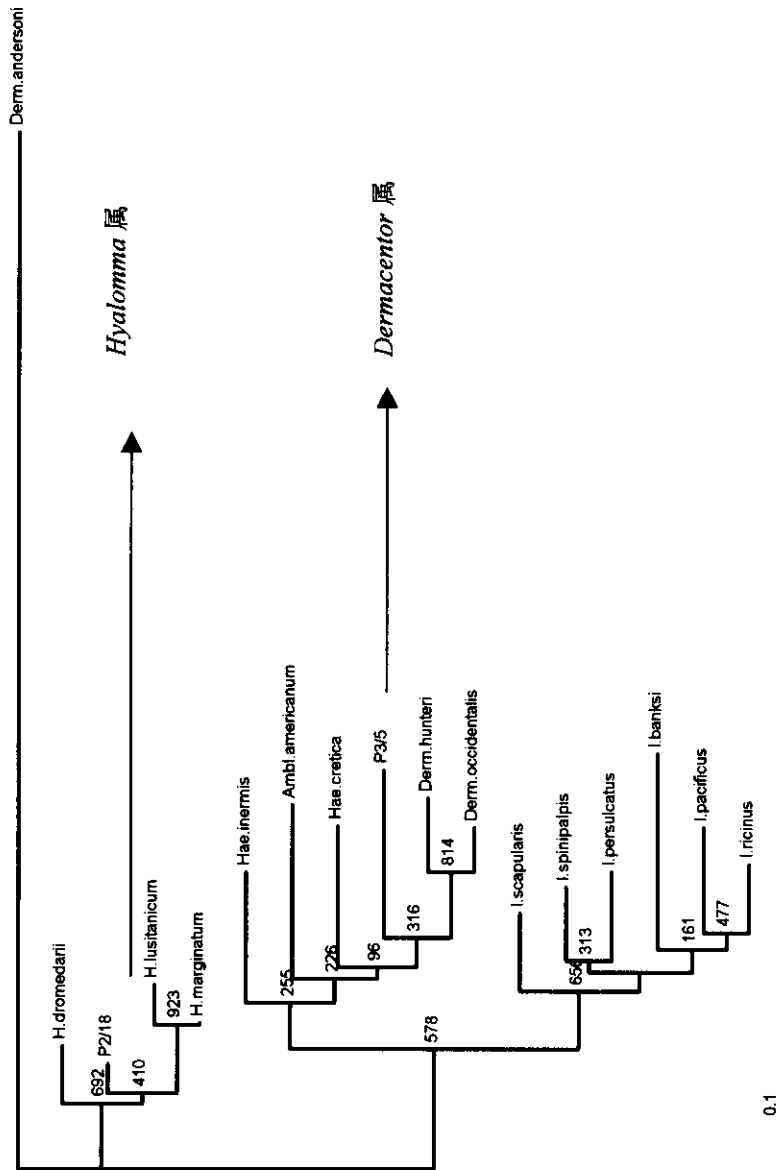
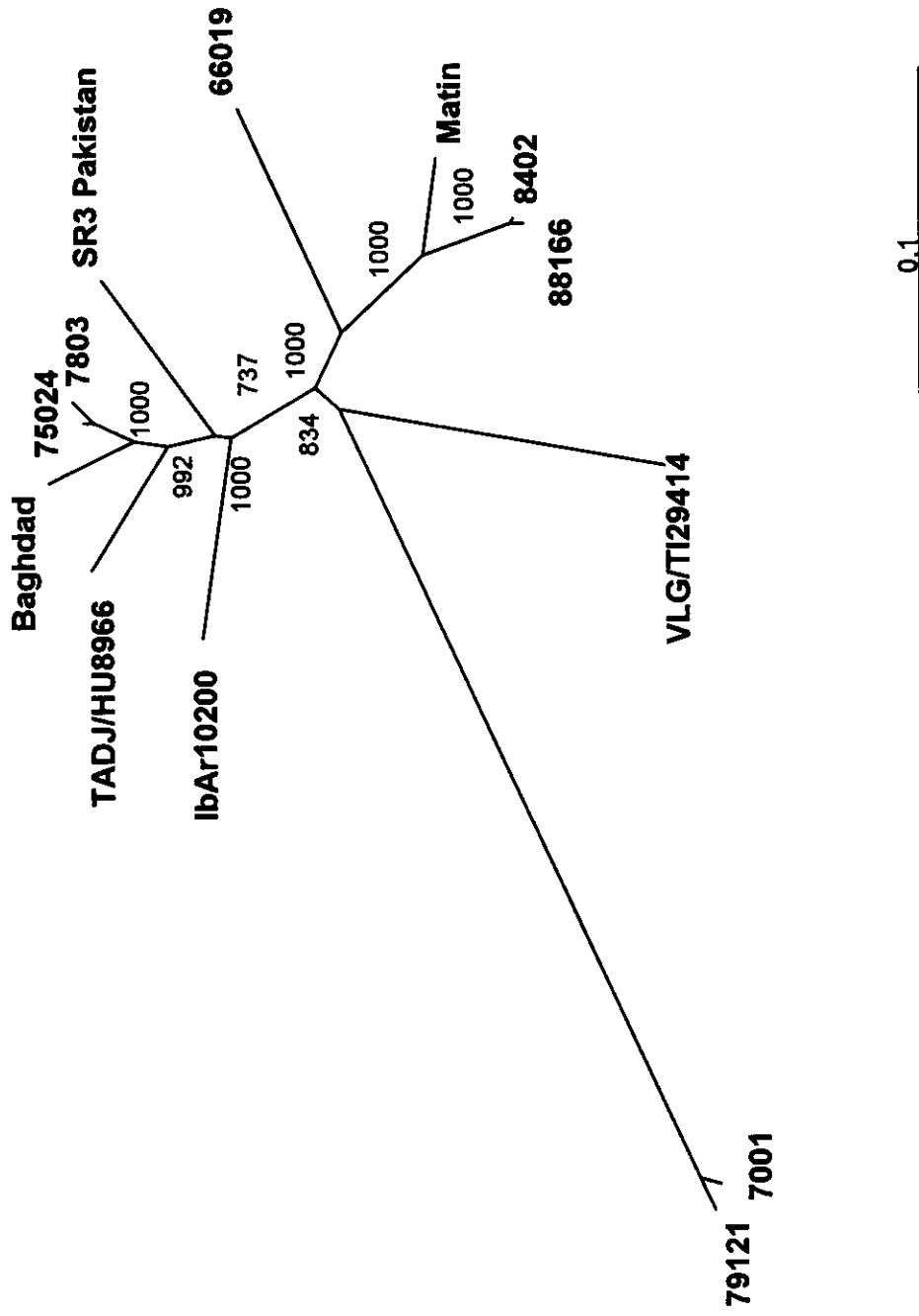


図4. CCHFウイルスの M-RNA 全アミノ酸配列による分子系統樹



5. Schematic representation of M-RNA encoded ORF of CCHF

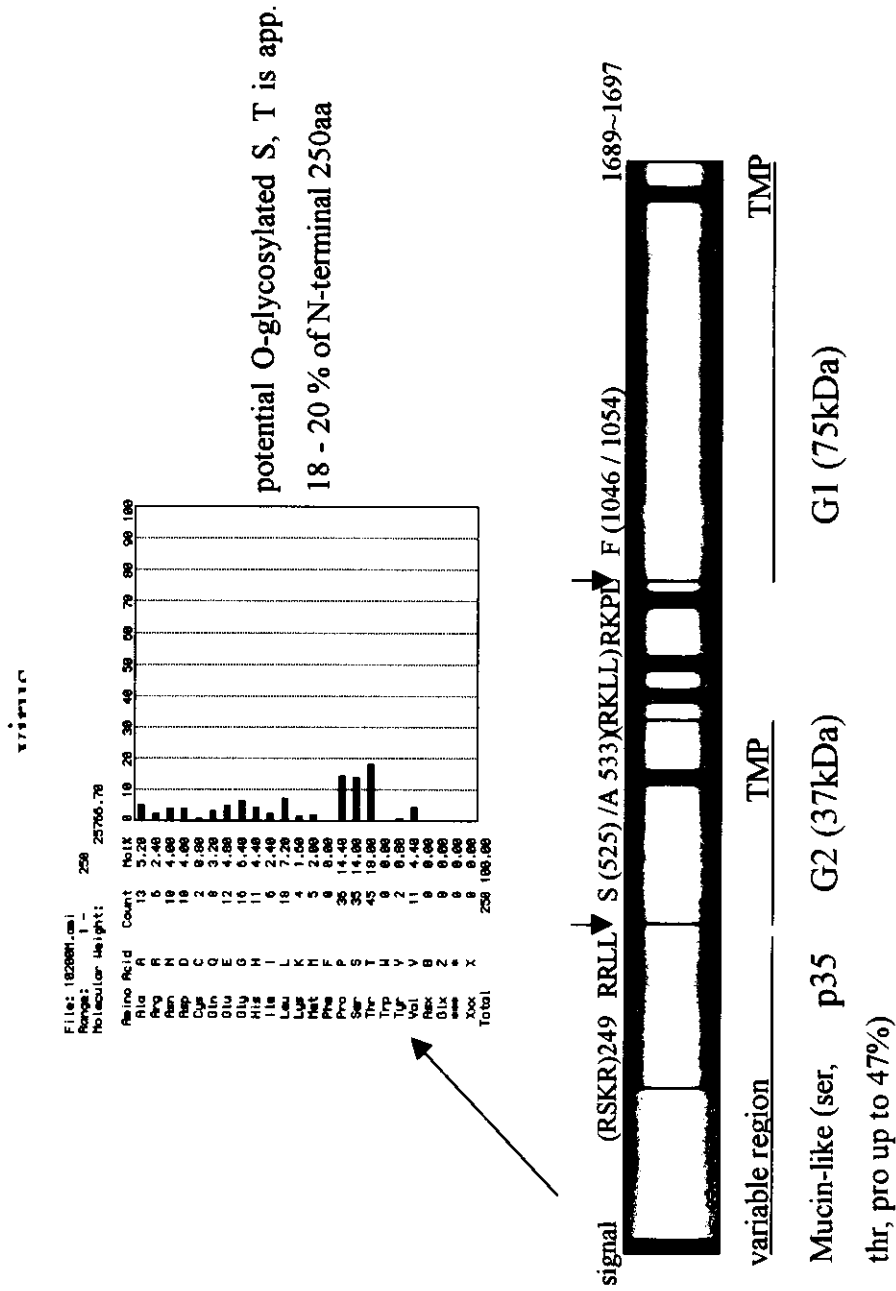


表 1. Identity within the variable/conserved region of M-orf

seq#	nucl. #	10200	75024	78003	66019	8402	88166	7001	79121	SR3(Pakistan)	Baghdad12	TAD/HLE966	VLD/T129414	Metin
		93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	78-957/858- 5168nuc	78-857/858- 5158nuc	79121 79-857/858- 5147nuc	79-834/835- 5145nuc	54-809/810- 5120nuc	54-806/807- 5117nuc	95-810/811- 5121nuc
10200	1-246/247-1683aa	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	93-833/834- 5144nuc	78-957/858- 5168nuc	78-857/858- 5158nuc	79121 79-857/858- 5147nuc	79-834/835- 5145nuc	54-809/810- 5120nuc	54-806/807- 5117nuc	95-810/811- 5121nuc
75024	1-252/253-1689aa	82.1/89.9	82.1/89.9	82.1/89.9	82.1/89.9	82.1/89.9	82.1/89.9	49.9/75.3	49.9/75.2	78.9/88.4	79.9/89.0	78.5/89.0	86.2/83.0	84.9/83.8
78003	1-252/253-1689aa	72.5/94.6	72.5/94.6	72.5/94.6	72.5/94.6	72.5/94.6	72.5/94.6	50.9/75.4	50.9/75.3	93.1/93.7	93.1/93.7	88.0/94.9	66.9/83.3	85.0/84.3
66019	1-252/253-1689aa	47.6/91.2	49.2/92.3	50.0/91.8	56.7/84.0	64.2/84.3	64.3/84.2	51.0/75.1	51.0/75.0	81.9/89.5	92.6/95.4	88.0/94.7	66.6/83.1	84.7/84.2
8402	1-252/253-1689aa	45.3/92.5	46.4/93.5	46.4/93.0	56.3/93.5	72.2/86.5	72.3/86.5	50.8/75.9	50.8/75.6	68.0/83.3	66.5/84.4	65.2/83.9	65.5/83.9	73.3/86.5
88166	1-252/253-1689aa	45.7/92.3	46.8/93.3	46.8/92.8	59.1/93.2	99.6/89.7	99.6/89.7	49.3/76.1	49.3/76.0	64.2/83.7	64.0/84.3	63.3/84.1	63.9/83.7	86.1/94.8
7001	1-260/261-1697aa	29.2/85.6	29.4/85.1	29.0/82.6	24.0/82.0	29.2/83.7	29.6/83.6	100/99.8	100/99.8	47.5/75.5	47.6/75.4	47.6/75.4	50.5/76.1	49.2/75.8
79121	1-260/261-1697aa	29.2/82.4	29.4/82.7	29.0/82.2	24.0/81.7	29.2/83.3	29.6/83.3	100/99.5	100/99.5	47.5/75.5	47.6/75.9	47.6/75.3	50.6/76.0	49.2/75.7
SR3(Pakistan)	1-247/248-1685aa	59.6/92.8	75.7/94.4	74.5/93.9	59.4/91.0	47.8/92.1	48.6/91.9	20.7/82.8	20.7/82.4	80.2/86.6	80.2/86.6	79.6/89.1	65.3/82.8	85.2/83.8
Baghdad12	1-252/253-1689aa	56.6/94.3	89.3/97.4	88.5/97.1	49.6/92.2	46.4/93.4	46.6/93.2	29.3/83.4	29.3/83.1	72.5/93.7	72.5/93.7	84.5/93.4	65.0/83.2	85.6/84.2
TAD/HLE966	1-252/253-1689aa	55.6/94.1	81.3/96.7	81.0/96.3	46.6/91.5	44.8/92.6	45.2/92.3	23.7/82.4	23.7/82.0	74.6/96.0	74.6/96.0	48.0/89.9	64.6/83.2	85.6/83.5
VLD/T129414	1-251/252-1689aa	48.2/90.0	50.8/90.5	51.2/90.2	49.6/90.4	46.4/91.2	47.2/91.0	28.0/82.8	28.0/82.4	49.8/90.1	49.8/90.1	48.0/89.9	64.6/83.2	85.6/83.5
Metin (Pakistan)	1-252/253-1689aa	47.4/92.5	48.4/93.2	48.8/92.8	61.9/92.9	77.4/97.4	77.4/97.4	27.1/83.7	27.1/83.3	47.0/91.7	47.2/93.2	45.6/92.3	46.4/91.0	85.6/83.5

* % identity in nucleotides. ** % identity in amino acid

厚生科学研究費補助金（厚生労働科学 新興・再興感染症事業）
分担研究報告書

コウモリから分離されたフラビウイルス（Yokose ウイルス）の遺伝子解析

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)
協力研究者 田島 茂、倉根一郎（国立感染症研究所）
江下優樹（大分大学医学部）

研究要旨

1971年に大分県ヨコセ水路でユビナガコウモリの血液より分離されたYokose ウイルスの全遺伝子を決定し、Yokose ウイルスと他の代表的なフラビウイルスおよびこれまでにYokose ウイルスと近縁関係にあるとされるフラビウイルスとの間でアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を比較し、一部のウイルス蛋白質のアミノ酸配列および塩基配列を用いて系統樹解析を行った、また日本脳炎およびデング熱患者、および黄熱ワクチン接種者由来血清によるYokose ウイルス感染中和能を調べた。さらに上記血清を用いて間接蛍光抗体法やウエスタンブロットティングによりウイルス蛋白質の検出を試みた。Yokose ウイルスは、全長10857ヌクレオチドからなり、3425アミノ酸からなる蛋白質がコードされる領域（10275ヌクレオチド）と、150ヌクレオチドの5'非翻訳領域および432ヌクレオチドの3'非翻訳領域が存在する。以上の結果、フラビウイルス科のウイルスであることが、確定した。黄熱ウイルスと最も近くその相同性は、NS5領域で約60%であった。しかし、デング熱患者や黄熱ワクチン接種者などの血清でYokose ウイルス抗原が検出可能であったものの、中和能はほとんど認められず、これらの血清型群には属さないものと思われる。

A. 研究目的

Yokose ウイルスは1971年に大分県ヨコセ水路でユビナガコウモリの血液より分離されたウイルスである。ウイルスゲノムの一部（NS5領域）の遺伝子解析およびウイルス粒子の電子顕微鏡像から、Yokose ウイルスはフラビウイルスに属することが明らかとなったが、病原性やゲノム配列などに関しては不明な点が多い。近年、動物由来感染症が人類に脅威を与えているが、なかでもコウモリは重要な動物であるため、本ウイルスの詳細な解析を実施した。今回我々は、1) Yokose ウイルスの全ゲノムの塩基配列を決定した、2) Yokose ウイルスと他の代表的なフラビウイルスおよびこれまでにYokose ウイルスと近縁関係にあるとされるフラビウイルスとの間でアミノ酸配列およびヌクレオチド配列を比較した、

3) 一部のウイルス蛋白質のアミノ酸配列および塩基配列を用いて系統樹解析を行った、4) 日本脳炎およびデング熱患者、および黄熱ワクチン接種者由来血清によるYokose ウイルス感染中和能を調べた、5) 上記血清を用いて間接蛍光抗体法やウエスタンブロットティングによりウイルス蛋白質の検出を試みた。

B. 研究方法

Yokose ウイルスを脳内接種された乳のみマウスより得られた脳抽出液をウイルス溶液とし、これよりウイルスRNAを回収してcDNA合成時の鋳型として用いた。最初にフラビウイルス間で比較的保存性の高いE領域の一部とNS3領域の一部をRT-PCR法により増幅後、塩基配列を決定した。次に明らかとなった配列を用いて、5'および3'

RACE 法、および RT - PCR 法により残りの領域を増幅後、塩基配列を決定した。ウイルス蛋白質の翻訳開始点および蛋白プロセッシング位置は、他のフラビウイルスと比較することにより推測した。決定した E 領域の塩基配列および予想されるアミノ酸配列と他のフラビウイルスの配列とを比較し、さらにこれらの配列を用いて系統樹を作成した。日本脳炎患者、デング熱患者、および黄熱ワクチン接種者由来血清を用いて Yokose ウイルス感染に対するこれら血清の中和能をプラーク減少試験法により調べた。上記ヒト血清を用い、Yokose ウイルス感染 Vero 細胞について間接蛍光抗体法によりウイルス抗原の検出を試みた。また、Yokose ウイルス感染 Vero 細胞の細胞抽出液およびその上清から粗精製ウイルス液を調整し、上記ヒト血清を用いて通常のイムノブロット法によりウイルス抗原の検出を試みた。

C. 研究結果

Yokose ウイルスは、全長 10857 ヌクレオチドからなり、3425 アミノ酸からなる蛋白質がコードされる領域 (10275 ヌクレオチド) と、150 ヌクレオチドの 5' 非翻訳領域および 432 ヌクレオチドの 3' 非翻訳領域が存在すると推測された (図 1)。6 種類の代表的なフラビウイルス (デング 2 型、日本脳炎、ウエストナイル、黄熱、ダニ媒介性脳炎、Rio bravo) との間で予測されるアミノ酸配列を比較すると、黄熱ウイルスのものと最も相同性が高かった。系統樹解析からも、これらのウイルスのうちでは黄熱ウイルスと最も近縁であることが示唆された。しかし黄熱ウイルスとの相同性は、以前に報告された NS5 領域の一部のアミノ酸配列を用いたときに近縁とされた 3 種のウイルス (Entebbe bat virus、Sokuluk virus、Sepik virus) には及ばなかった。ヒト血清を用いた中和試験では、黄熱ワクチン接種者血清で非常に弱い中和能が観察されたのみであった。一方感染細胞の免疫染色では、デング熱患者および黄熱ワクチン接種者血清でウイルス抗原を検出することが可能であった。またウエスタンブロット解析では、デング熱患者および黄熱ワクチン接種者血

清、およびデングウイルス感染マウス血清により、E、NS1、および NS3 に相当すると思われるウイルス蛋白質が検出された。

D. 考察

本研究により Yokose ウイルスの全塩基配列が明らかとなり、現在のところアフリカで発見された Entebbe bat virus に最も近縁であることがわかった。このように地理的に離れた場所のウイルスがなぜ最も近縁関係にあるかは不明である。またこのウイルスを媒介する節足動物は現在のところ不明であるが、配列情報は蚊が媒介する可能性を示唆している。デング熱患者や黄熱ワクチン接種者などの血清で Yokose ウイルス抗原が検出可能であったものの、中和能はほとんど認められず、これらの血清型群には属さないものと思われる。今後は本ウイルスの病原性や蚊が媒介するか等について解析を進める予定である。

E. 結論

1971 年、大分県でユビナガコウモリから分離された Yokose ウイルスの全遺伝子配列を決定した結果、フラビウイルス科のウイルスであることが、確定した。NS5 領域のアミノ酸配列を比較した結果、黄熱ウイルスと最も近かった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

田島茂、高崎智彦、松野重夫、中山幹男、倉根一郎. Yokose ウイルスの全塩基配列の決定および他のフラビウイルスとの相同性の比較. 第 51 回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

図1

Yokose ウイルスの全塩基配列

<p>1 61 121 181 241 301 361 421 481 541 601 661 721 781 841 901 961 1021 1081 1141 1201 1261 1321 1381 1441 1501 1561 1621 1681 1741 1801 1861 1921 1981 2041</p>	<pre> AGTAAATTTGCGTGCTAGTCGCTGAGCGTCAGACCGCAAAGTGAGTTTTTAGTGATCTA AAGTGAGGAGTTATTCTTACTGTCATCAAACACTACAAATAAACACGTTGAAATTATTC CGGAAGACAACACTGTCCGGAATCAAAGACGATGAAAAATCGTAGACAAAACACCCGAATT TCGGGTGTCAATATAAAAAAGCAAATCCAAAAACAAAAACAAAATAAAAAACA TCTGTTGTA AAAAGAGGCAAGCGCTCTGTGCAACCTTTTGGATTCTGAATCCAATCATG AGAGTCCGAGCTCTGATAGTCTATCTAATCACCATGATTTGACTGGGCGCCAATGGACC AAAGGAATGAACTTTTCTGGAAGCGGGTTAACCCACAGATGGCTATAGCGACCTTGAA CGAGTCCGCAACATCACAACCAATTTACTGACTGGACTCATGAAACGGAAACGCAGAAGC TCTGTCAAGTTGTGAACCTTGTGACTACTACTGATGGTAACTGTAGGAGCTCTACAG ATTGGGAGGATGAGATTTGCCGGAAGATAGTACTGTCAATCAACGCAACAAAATATGAT ATAGGAAAAACATTTGATATCATGAACGGCACATGCACAGTCATGGCAGTAGACGTGGGG AATTGGTGTGACGATTATGTCATCTACCAATGCCCTACTCTGACAGAGAATGAAAATCCC GAAGACATTGACTGCTGGTGCTATGGAGTGCCCAACGTGTATGTCACATACGGACGTTGC AAACATGATGGACAACCGGAAGGAACAGACGATCCGTGGCTTTGACAAACCATGTTGAA GAAACATTGAACACCCGTGGAGAGAGGTGGGCCGTAGACAAGATAGGGAAACAGCAATTT GAAAAGATTGAACGATGGATCATTGCAACCCGCTATATGCCCTGGCAGTTGTTGGCATT AGTACATGCTAGGGAGCAACGTAGGTCAGAGAATCATTATATGCATCTGCTGTTACTT GTCGCCCCAGCATAACGACACACTGTACAAATGTGGAAAAAGAGATTTTCTCCAAAGC ACCTCGGGTTCCCTCGTGGACAACGGTTGTGCTGGAACATGGTGGATGTGTAACCTTGTCC GCTAAAGACAAGCCAAGTGTTGACGTATGGCTGTCAATCAGTCACCATCAATAATCCACCG CTGACCCGGAAGTCTGCTACAAGGAACCCCTCTCAGAACATAAGACAGCCAACCATTGC CCAACGGCAGGAGAAGCCTTTTTAGATGAAGAGAGTGATGACCAACATATTTGCAAACGT GGGTTCTCTGACCAGGCTGGGGAATGGATGTGGGTTATTTGGAAAAGGAAGTATTGTC GCCTGCTCAAAATTCACATGCAATCATGACATGCACCTCATGGAATTGATCAAAATAAG ATACATTTTAAGGTGACAGCTCAAGTGCATACATCAGAGAGAGATGCCACTTCAAAGGAA TGGAAAAGAGAAACAGAATTCACCATGGCCTCTGGACCACAAGTGATTGGATTGCGCGGA TATGGCACCGCCACGGTTTCTTGCAACCTGAAAACATCCATGGATCTTAATAACTATTAT GTCTCAAAAATGGCAGATGAGTATTTCCCTCCTGAACAAACAGTGGGTTATGGATTGCCA CTCCCGTGGACACCAGCTACCGCCACTTCTGGAGGGAAAAACATTATCTCACCCACTTT GATGAGCCACACGCTACAACAGTCACCGTCACGAGCATGGGGAACCAAGAAGGATCCCTG AAGGCATCCATGGTTGGGGCTACAAAATCTCTTATCTGAAAACAAATATCACATCAA GGAGGACATGCAGTTTGCCAAATACAACACTACAGGGACTAACCATGAAAGGAAGCACATAC ACCATGTGCAAAGGGGGTTACTCATTTTCAAAAACACCTGTTGACTCGGGTCATCAACA GTGATAATGAAAGTTAAAGTGTCAAAAGCCACCCGTCAGAATCCCTGTGGCAGTCATT GACTCAATGCAGAGCAACATTAATAGGGGAGTTGTTGTCACCACCAACCCCGTGGCCTTT </pre>	<p>5' NTR</p> <p>C</p> <p>PrM</p> <p>E</p>
---	---	--

2101 GAGGCTGCAACGGAAGTGATGATTGAAGTCGTTCCCTCCGTTTGGAGAGAGTGTGATCACG
 2161 ATTGGAAACGGAGAGGACAGGCTGACCTACCAATGGCATCAAGAAGGGAGCACGATAGGG
 2221 AAAGCGTTCTCAGAGACCCTAAAAGGACTCGAACGACTCACAATCATTGGAGATGACGCG
 2281 TGGGATTTCCGATCCACGGGGGAATTTTCAACACAATTGGGAAGGCCATCCATACAGTT
 2341 TTCCGAGGGGCTTTTTCCGCCGCTTTTGGTGGCGTCAGCTGGATTGTGAAACTACTCTTA
 2401 GGAGTAGCATTCTATGGCTGGGAGTCAATGCGAGGAATGGAACCCCTAACTCTTATCTTG
 2461 ATGACTTTGGGGGAATCCTAATTTTTCTGGGAACTGGAGTTGGAGCCGAACAAGCCTGC
 2520 GCTGTCTCATGGGAGAGAAGAGATTCAAATGCGGAGATGGCATGTTTCATTTCCGAGAC
 2581 ACAATGACTTCTTGGCAAGTACAAGATGTACCCAACATCGCCGCGTGAATGCTGCC
 2641 GTCATTGCACAAACATTCTCAAATGGCGCATGTGGGCTCAACTCTGTGGATGAGTTAGAA
 2701 CACCAAATGTGGAAGGAATGAAGATGAAATTAACCACGTTCTAAGTGAGAATGGTCTG
 2761 GATCTGTCGTAGTCGTGCAGGACCCCCACAACATTTATAGAAGAGGAGGAAAAAGTTTT
 2821 TCACCAGCCCAACGAACGTTGGAATATGGATGGAAAACGTGGGGAAAGTCTTCTACTCT
 2881 GCAGTAGAGAGGAAAAACAATTCCTTTATTATAGATGCCCTAGATCAAATGAATGCAAAA
 2941 AATGCTGAAAGGTATGGAATCTTTAGAACTGGAGGAATTTGGATTTGGGTTTTTAAA
 3001 ACAAGCTCTTCTTAAACCAAGGTTTGATTACTCAAAGAAATGTCCGACATACCTGTTA
 3061 GGAACAGCGGTGAAACATGCCAGGGCAGTCCATGGTGACCAGAACATGTGGATGGAGTCT
 3121 GAGCATGTCAATGGAACCTGGCAAATTACCAGATTGGAATTACAATCATAACAGGAATGT
 3181 CTTTGGCCTCCAATGCACACAGCAGGAATCACTTCTGTGATGGAAAGTATTTGFTCATG
 3241 CCCCAGAGCTGGGAGGACCTGTACCTTACATAACCATATCCCAGGTTACGCGACACAG
 3301 GTTTATGGAGCCTGGCATTTACCGAATATGGAACGAAAAGGGAAGAATGCCCTGGCACT
 3361 ACGGTGCAGGTAAAAGACAATTGTGGAAAACGTGGTCCATCAGTTAGATCAACCACAGCA
 3421 AGTAACAAAGTGATACCCCATTGGTGTGTGCTTCTGCACCATGCCACCCGTGACCTAT
 3481 AGAACAGCAAATGAGTGTGGTATGCAATGGAATTAGACCTGAAAACATGCAGGAAGAA
 3541 CACCTGGTAAAAGCTGGGCTTCGGCCGGGGAAGGAAGAATGTCCGATCATTTCTCAGGA
 3601 GGGCTGTTTGCCTTAATCATTTTGATGGACTTGATAATACCCATCGTCTCTCCACGC
 3661 AAGCATTGCTCCTAATCCTGCTGTAGCGCTCCTAACCGTGTTCGGAGGAGTTCCATG
 3720 CGTGATCTTGCACGATGTTTGTCTTACTCGGACACACATTTAACACCATGAACTCTGGT
 3781 ACTGAAGTCGCTCATTGGCAATGGTGGCACTCACCAAATGCGGGCTGGCTTCATAACT
 3841 GGATACTTCTTGCAGGACCCCTTGGACCGAGAGGGAATTTCTCCTCGTTGTGGCCTTG
 3901 TCTTTACTGCAGACGACACTCCCATGAACATGGAATTCATGGAATGGGCCGACTCATTG
 3961 GGACTTGTGCTGGCGCTGGCAGATGCCCTCTACACAATGCATGCCGACAGCTGGACAATG
 4021 CTAGGTCTGATAGCCCTAAACCCACTTGGAAACCACATGTTAGTGAAGACAGTCACAACG
 4081 ATACTGTTCTCGGTGTGTGCTTTTGTGCTAGTCAACAAGAAAATCAACATCCATAAGAAAA
 4141 ACTTATCCCCAACTGATAACTGCGGGGTTAGTGGAACTAGGGATGCTGCGAGGGTGGATC
 4201 CTAGGTCTCCTTGTGGGCTGCACAGGAAAAACAATGGCAAGGTTCCGGTCGATTGATTGG

NS1

NS2A

4261 ACTGATGGAGTCACTGTCCCTAGGTGTAGTAGCTGGCTTACTAGGGATGCTTTGTGGAGAA
 4321 CGTGAGGAGTTACTGGCTCCATTCGTCATTGGGTCAATCCTGCTACTTTGCTACGTGTTC
 4381 AGCATGAAGAGTGACGGATTAGAACTTGAACGGGTGCTGATGTGACCTGGGATGAAGAA
 4441 GCTGAGTATTCCGGAGAAGCGGAGCGGTTTGATGTGACGGTCAATCACAATGGGGAATTC
 4501 AATCTGATAGACCAGAAACCAGTACCATGGTCACACGTCCCTGATGGGCACAGGTCTGTAT
 4561 ATAGTGTCAACTGTGCACCCAGCTGGATTGGTTCTGGCCGCTTTTCGCATTCTGGTATTAT
 4621 CAGTACACCAAGCAACGCAGCAATATTCTATGGGAACTACCAGAAGTCGCCGAGCGGACA
 4681 CCAATGTTGACTGAAGGAGTGCCGTGATGGAGTGTACCGTATCATGCAGAAGGGGGTGTTC
 4741 GGACCACAGCAAAAAGGAGTAGGGGTAGGAAAAGCGGAACCTTCCACACGATGTGGCAT
 4801 GTAACCCACGGTTCATTATTAAGATTAATGGGAACTGGTCACTCCAAGCTGGGCCAAT
 4861 GTAAAAAAGGACTTAATCGCTTATGGCGGGCCATGGCGGTTAACAGATCAGTGGGTAGAA
 4921 AATGAGGATGTCCAAGTGATAGTGTGCTCTCCAGAGCTGTGATCAGAAACGTCCAGACT
 4981 ACTCCAGGTATGTTACCACCATTGAGGGGAAGAAAATCGGAGCTGTGTCACTGGATTAC
 5041 CCGCCAGGAACATCAGGTTCCGCCATTATCAACAAAAGAGGTGAGGTTATTGGACTATAT
 5101 GGAAATGGAATCCTCACAGAGGAGAAGAGGTTTGTATCCTCCATAGCCCAAGCAAGCGTT
 5161 GAGGAGACTGCCAGTCCAACACCTGCATTTCTCTGTCAAAAAGGAAACCTGCATGTGTTA
 5221 GACCTGCATCCAGGATCTGGGAAAACCCGACAAGTACTGCCCGCTCTTCTTAGGAAATGT
 5281 GTGGAAAAAGGCTTAGAACACTCGTCTGGCTCCAACAAAAGTAGTGTGAGTGAATG
 5341 CATGAAGCAGTTAAAGACTTACCAGTTAGGTTCCACACGAGCGCCGCGCTGGAAACAAAG
 5401 AAAACAGGAGCCCTGATAGACTTGATGTGCCATGCTACTCTAGCAAACCGCCTCTTGGA
 5461 CCAACACGTTACGTTAACTGGGAAGTGGTCGTCATGGACGAGGTCACTTTCTTGACCCA
 5521 CACAGCATAGCTGTGAGAGGGTGGATGCAACAATTGGTGACTCTCAAGTTGGCAGCAGTT
 5581 GTGTTAATGACAGCAACACCTCCTGGAAACAAGTGATCCATTCGCGAGTCTAATGGGACA
 5641 ATAGAAGACACACAGGTGACTATTCCAGATGAACCTTGAAAAGAGGCAACGAATGGATA
 5701 CTTGATGATCCCCGGCCAACCTGCGTGGTTCTGCCTTCCATCAAAGCAAGTAACATTATG
 5761 GCTGCTTTTCTAAAAAAGAAATGGGAAAAAAGTTGTGGTTCTGAATAGGAAAACATTTGAC
 5821 AAAGAATATGGAACGTTGAAAGCGGAAAAGCCTGACTTCATACTGACCACAGACATTGCT
 5881 GAAATGGGAGCAAACCTGCCTGTTGAAAGAGTGATTGACCCAAGGACATGCATGCGTCCA
 5941 GTGTTAGTGGATGAGAAAAATAGAGTGGAGCTGCAGGGACCCTTCCCATCACAGCTTCT
 6001 TCAGCTGCGCAGCGGAGGGGCAGGATAGGAAGAAACCCAGATCGCAACACGGACTCTTAC
 6061 ATGTATGAAGGGGAGACCAGTGAAGAAAATGGAGATTTGGTGTGCTGGAAAGAAGCGTTG
 6121 ATGATCCTGGATAACATGGAAATCCTTGGAGGATTCACGATGAGCCTCTTTGGTAGTGAG
 6181 GCTAGGAAAGTCGAGCACGTTCCAGGGGAATACCGTTTAAAACCAGAAGCAAGGAAACGG
 6241 TTCAGGCAACTGATGAGGAAGTATGAGTTTACACCATGGTTGGCTTGAAAGTCGCAAG
 6301 AATACCAAAGAGATGGAAATGTCTTGATAGTGAAGGACCTAAGAGAACAGAGTCTTA

NS2B

NS3

6361 AATGAGTTTGGTGAGAACCTGACGTTCAAAGCAGGTATGGCTCAATTGAGAAAATACAA
 6421 CCAATCTGGAGCGATGCTAGAATGTTTGTGACGGACAGACCCAAAAGCGTTCATAGAG
 6481 TACGCAACAACAACACGATCAATAACAGCCGTGATCGAAAAGGTGGCTATGGTGCCAGAG
 6541 GCCTTAAAAGACAAGGTGCAGGATGCTTTCGACACCTACTACACTTTGTACAAGGCAGAA
 6601 GAAAAATCACGCAGTTACCAAATCGCTCTTGAACAGATACCTGATGCCCTAATAACGACA
 6661 TTGTGCTTGGGAGCCTTGGCTGCAGCCACAGGAGGAATCCTTCTCTATTTGTGCTGCCA
 6721 AAAGGAATGTCTCGCATGACACTGGCTTCTTCACTATGTTGGTAACGGGGGCTGGTTTA
 6781 TGGATGGGAGGACTATCAACAGTGAAGGTGGCCAGTGCATGCTGGTCTTTTTCATACTG
 6841 TGTGTTGTGCTGATTCCAGACACTGGAATGCAACGTCCATCCAAGATAACTACTTGGCT
 6901 TACTTCATCATCAGTCTAATAAGCTGTGTGGCCCTTATTGTCGCCAACGAAAACGGCTAC
 6961 CTGGAGAAAACATAAGAGGATCTATTTGGAAGGAGAGCGCTGAACAGCTCAAATGTTTAT
 7021 GCCAACTTGCCAGTGGAAAAGTGGCTGAGCCTTGACTTACAGCCTGCCACTTCCTGGACA
 7081 CTCTATGCTGTAATAGTGGGGGTGTTGTCAACCGCTGTACCACCATATCGAACACGTCAAC
 7141 TATGGAGCCATATCATTACAGGGAATATCCAGGGAGCGGCTGCCCTTTTTCAGATGGAC
 7201 AAGGGGTATCCTTTCATGCGGTTGAGAATCCGCTGGTTCGCTGTTGGCAGGGGCCATC
 7261 AACAACTCACTGCCATCACAGCAGGACTAGGGTTCCTATGTGCTATGATACATTGGGCT
 7321 TTGGTTTTGCCTGGCTTGAAGGCCAAATTAGCAAACAGGCGTTGCCGAGAACGTACCAT
 7381 GGGGTCACAAAAACGCTGTGGTGGACGGCATGTGCACAAATGACCTAGATGCTGGGGAC
 7441 GACATGCCCTGAAAAGTTTGAAGAACTAGGAACCTTTGTGCTCATCACCCTTGTTTTC
 7501 TTAACGTAATTCTGAATCACAATGTAAAGGCTTTTCTGGAGGGAATGGTCTGGTATCC
 7561 GCCAGCCTGCAACCATTATTGACAGGGGTCCAAATCCGTACTGGAATCAACAAATAGCT
 7621 GTAGGTGTGGCAGGTCTCATGAGAGGAACTACATGGCTGCAGTAGGAATGGCTCATGCC
 7681 TTATGGAATGCCAGGCAAATCGCAGAGGTGGCACAGGATCCGGAATGACCCAGGGGAG
 7741 GCTTGAAGAAACAGCTGAATAAGCTTGGGAAAACACAATTTGAGCAGTACAAGAGATCA
 7801 TGCATACTTGAAGTGGACAGGACACATGCCAGAGACTCTTTGAAAATGGCATTCAGAAT
 7861 GGGATAGCTGTCTCCAGAGGGAGCGCAAAGTTAAGGTGGATGGAAGAAAGAGGCTACGTG
 7921 AAACCAACTGGAATCGTGGTTGACCTCGGCTCGGTCGAGGGGGTGGAGTTACTATGCT
 7981 GCTTCGCTGAAAATGTGAAAAAAGTAATGGCCTTACCCTGGGTGTGCAAGGGCATGAA
 8041 AAGCCAATAATGAGAACAACCTCTAGGGTGAATCTCATAAGATTCAAGGACAAGACAGAT
 8101 GTGTTCAACATGGAAGTAATCCCTGGGGACACACTGTTATGTGACATTGGAGAAAGTTCA
 8161 CCGAGCATTGCAAGTGAAGAACAGCGCACCCCTAAAAGTCTTAAATTGTGAAAACAATGG
 8221 CTACAGGAGGGAAATTACACCGAGTTCTGCATCAAGGTGTTGTGTCCCTACACCCCTCTC
 8281 ATAATGGAAGAACTCTCCAGGTTACAACATAAGCATGGAGGAGGCTTGGTTAGGGTGCCA
 8341 CTTCCCGTAACTCAACTCATGAGATGTATTGGGTGTCAGGAACAAGAACTGATGTGGTG
 8401 GGCACCGTGTCAAATGTGTCGCGGTTGTTGACCAGGAGGATGTTGAATAAGCCGCAACCC

NS4A

2K

NS4B

8461 CCAACACTGGAAGATGACGTGATTCTGGATATGGGCACCCGAAGCATGGAATGTGATACA
 8521 GGTCCATTGATGAGGACAAGATAAGACGACGGTGGACCTTCTAAGAGAAGAGTACAAG
 8581 AAGACCTGGTTCCATGATTTAAACCATCCATACAGGACGTGGCATTACATTGGCTCTTAC
 8641 TTGACAAGAGGAGGAGGAACAGCGGCATCCATGACCAATGGCATAAGTCAAACCTCATGTCA
 8701 CAACCATGGGACGCAGTGGCTGGGGTGGCATGCATGGCCATGACTGACACAACACCATTT
 8761 GGACAGCAGAGAGTGTTTAAAGAGAAAGTGGATACCAAACCGCCAGAACCCAACAGACA
 8821 GTGCGTCATGTGATGGCCATGACTAATAGCTGGATCATGAAATACTTGGCCAGGAATAAG
 8881 CAACCACGGCTGTGCACTAAGGAAGAGTTCATAGCTAAGGTCGATCCCACGCTGCCCTC
 8941 GGAGCTTTTCGTCCAGAGTTGGAAGGTTGGAGTTCAGCACATGAGGCCGTCCATGATCAA
 9001 CGGTTCTGGAACTTGTTGATGAGGAAAGGGAGTTGCACAAAAAAGGTGAATGTAGAACA
 9061 TGTGTGTACAACATGATGGGAAACGAGAGAAGAAACCATCTGAATTTGGGAAAGCCAAA
 9121 GGGAGCCGAGCCATATGGTATATGTGGCTCGGAGCTCGGTTTCTTGAGTTTGAGGCACTG
 9181 GGTTCCTTAAATGAAGATCACTGGGTCTCCCGGAAGAACTCTCTGAGCGGAGTGAAGGC
 9241 GTTGGGCTGCAATACCTCGGCCATGTTCTGAAAACATTGGAAAGAAAAAGTGGGACGTC
 9301 TATTATGCAGATGACACGGCTGGATGGGATACCAGGATAACGATAGCTGATCTAGAAGAT
 9361 GAGCAAGACATCTTGACTTACATGAGACTAGAGCACCGAATCCTGGCCGAAGCTGTAATG
 9421 AACCTGGCATACAAACACAAAGTGGTTAGGGTTGAAAGACCTATTCAGGGCGGGAAAAC
 9481 GCAATGGACATCATCTATAGGCAGGAGCATCGAGGATCTGGGCAGGTGGTGACGTACGGC
 9541 TTCAACACCATCACAAACATGAAGGTCCAATTGATAAGAATGGCCGAGAGTGAAGAAGTC
 9601 CTACCTGACCCGTCCCAAGAAATGGACTCCAGAACACGGAAACACACTATGGCAATGGCTG
 9661 AATGAAAATGGGAAGACAGACTTGGCAGAATGGCTGTTAGTGGAGATGACTGCGTGGTG
 9721 AAACCTATAGATGATCGCTTCGCAACATCCTTGACTTACCTGAACCACATGGCCAAAATA
 9781 AGGAAAGATATATCTGAGTGAAGCCATCAAACCATTCATGGACATCGAGGAAGTTCCCT
 9841 TTCTGCTCCCACCATTTCACAAACTCATCCTCCGGGATGGAAGAGAGATAATGGCCCTT
 9901 TGCAGAGAACAGGATGAGCTGATCGGGAGGGCTAGGATTTCCCTGGAAATGGCTGGTTG
 9961 GTTAGAGAGACTGCCCCATTAAGCAAGGCCATGCTAACATGTGAAACTGTTTTACTTT
 10021 CACCGTAGAGATCTAAGGCTGATGGCTAATGCAATCAACTCAGCTGTCCCATTGACTGG
 10081 GTCCCAACGGGACGTACCACATGGTCAGTTCATGGAAAAGGAGAGTGGATGACGTCAGAA
 10141 GACATGCTAGATGTGTGGAATAGAGTATGGATCACCACAAACCCCTTCATGAACCGGAAA
 10201 ACTTTGATAGGGAAGTGGCAGGACATCCCGTACATTTCCAAGTCACAGGATGTCCGTTGT
 10261 GGCTCAATGATTGGCACATCAAAGAGAAGCAGTTGGGCTGAAGCTCTTCTCACACTGTA
 10321 CAAAAGGTGAGAGGCATTGTGGGGACACAAGAGAGGTACCGTGATTACCTTGAAACTCAA
 10381 AACAGGTTCAGGACCATAGTCCAACATCTTGTGGAGATATCCTGTGAGAGCAATAAAAA
 10441 ATTTTAAAGACAAAAGTGTGAGGCAAGATTGAGAAAATCTTGCCACAGCTTGGCAGACT
 10501 GTGCAGCCTGCAGCCCTAGAGGGAGACTGACCAACTCCCTTTAGTAGAAAAGGTCAGGGA

NS5

10561 AGAACTTGAGGATGGGTGTGGCCTCAAGATCTTCTCAAAAAACGGACTGAACACCACA
10621 CCTAGATGAAGATAGTAGGGGAGCCTCCGCCAATGGTGGCTTACATATTGAGCTACTGC
10681 ATTGGTCGATGGGGACTAGCGGTTAGAGGAGACCCTCCTACGCATGGATTTGCAATA
10741 TGTGACATCAGGGAAGACCGGGTGTGTCGGTCCGGAGAGCTCCGGAGGCCAGGGC
10801 GCCGTTGCCCGTAGTTATAACTGGCCTTCGGGATCGAAGGAGTTGCCAAACACT

3' NTR

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) 東北地方におけるデング熱媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究
- 2) ヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp.を用いた新しい防除法確立に関する基礎的研究

分担研究者	小林 睦生	国立感染症研究所昆虫医科学部
研究協力者	二瓶 直子	国立感染症研究所昆虫医科学部
	金田 弘幸	パスコ GIS 研究所
	栗原 毅	国立感染症研究所昆虫医科学部
	伊澤 晴彦	国立感染症研究所昆虫医科学部
	Roychoudhury, S.	国立感染症研究所昆虫医科学部
	佐々木 年則	国立感染症研究所昆虫医科学部
	澤邊 京子	国立感染症研究所昆虫医科学部

研究概要

1) 2001年に新たに分布が確認された横手、新庄、気仙沼において、定着を確認するため再調査を行い、また継続して湯沢、盛岡、花巻、北上、釜石等で調査を行った。新庄では13/14コロニー(93%)がヒトスジシマカで、市内の広範に分布していたが、横手では5/50(10.0%)であり、分布は市内の一部に限局しており、2年前と大きな変化が見られなかった。盛岡市では、ヒトスジシマカが初めて確認された。同蚊が確認された都市と確認されない都市に関して、年平均気温のメッシュ気候図を作成し、また、過去7年間の年平均気温の推移および都市部の人口密集に関するメッシュデータを検討した。その結果、1 km²あたり1,000人以上の密度を示すメッシュ数が多い都市にヒトスジシマカの分布拡大が認められ、また、1999年の年平均気温の急激な上昇が、分布域の拡大に関わっている可能性が示唆された。なお、ヒトスジシマカが新たに侵入した都市において、ヤマトヤブカ個体群が明らかに減少し、種の置き換わり(replacement)が観察された。

2) ネットアイシマカとヒトスジシマカの寄生原虫である *Ascogregarina* spp. オーストからの効率の良いDNA抽出法を検討し、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノムDNAを高純度を得る方法を確認した。この方法により *As. culicis* 2株、*As. taiwanensis* 2株よりDNAを抽出し、rDNAの小サブユニット領域をPCR法にて増幅し、その塩基配列の解析を行った。その結果 *Ascogregarina* と他のアピコンプレックス原虫類との間の、分子レベルでの類縁関係が初めて明らかになった。さらに本領域内に *As. culicis*、および *As. taiwanensis* 両種を明確に区別し得る塩基配列が見出された。現在、*As. culicis* のHSP70遺伝子のクローニングに着手し、部分的なシーケンスを得ている。

A: 研究目的

- 1) 我が国、特に東北地方におけるデング

熱媒介蚊であるヒトスジシマカの分布域は、徐々に拡大しており、現在の分布状況に関する詳細なデータが存在しない。同蚊はデング熱のみならず、ウエストナイルウイルスに対しても高い感受性を示すことから、現在の分布域を正確に把握することが、感染症の予防対策には重要である。また、疾病媒介蚊の分布域拡大がどのような要因に関係するか、気象データ、人口密度、温暖化を予想するメッシュ気候図を用いて検討した。

2) ネットアイシマカおよび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る生活環を持っている。この原虫に外来遺伝子を導入し、導入原虫をヤブカ幼虫に感染させることによって生理機能をかく乱させ、それによって防除することを最終目的に基礎的研究を進めている。この原虫のオーシストは大量に回収でき、感染直後にヤブカ幼虫の中腸から多数のスポロゾイトを回収できることが分かり、遺伝子操作の対象生物として適していることを明らかにしてきた。そこで、ヒトスジシマカとネットアイシマカに寄生する *As. culicis* と *As. taiwanensis* の種関係を明らかにするために rDNA の解析をおこなった。また、将来の外来遺伝子導入への準備として、HSP70 の遺伝子のクローニングを行っている。

B: 研究方法

1) 東北地方でのヤブカの分布調査においては、各都市の神社、寺院、公園、古タイ

ヤ集積場等の墓石、手水鉢、花立て、プラスチック容器等の小用量の水が溜まっている人工容器からピペットで幼虫を採取し、ポリビンに入れて研究所に持ち帰り、成虫まで飼育してから種の同定を行った。これら人工容器から発生する蚊類には、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、フタクロホシチビカ、ヤマダシマカ、アカイエカ、キンバラナガハシカ、オオクロヤブカ、トウゴウヤブカなどであるが、都市部では多くがヒトスジシマカとヤマトヤブカの2種で、有機物が多い水たまりにアカイエカ幼虫の発生が見られるのみである。各都市の年平均気温は気象庁の統計資料から情報を得た。また、年平均気温を地理学的に解析するために1 Km メッシュ気候図(気象庁、1996)を利用し、温暖化による平均気温が1℃—3℃上昇した場合のメッシュ気候図を作成し、将来の分布域拡大の予測に用いた。

2) *Ascogregarina* 原虫オーシストからの DNA 抽出

ネットアイシマカおよびヒトスジシマカ幼虫に対し、*Ascogregarina culicis* および *Ascogregarina taiwanensis* 原虫それぞれのオーシストを大量に感染させ、蛹を飼育した水の遠心分離および羽化後の感染蚊を解剖してオーシストを回収した。回収したオーシストからのゲノム DNA の抽出は、*Eimeria* 原虫オーシストからの DNA 抽出法 (Zhao *et al.*, 2001) を参考にし、手順を一部変更して行った。まず、オーシストを 5.75 % の次亜塩素酸ナトリウム溶液 (NaClO) に懸濁し、氷中に 30 分間静置することでオーシスト外壁を破壊した。次に、蒸留水で 3 回洗浄して残存する NaClO を

除去した。これに Lysis buffer (660 mM EDTA, 1.3% Lauroylsarcosine, 2 mg/ml Proteinase K, pH 9.5)を加え 65°C 45 分間加温することで、オーシスト内壁およびスポロゾイト膜を変性・可溶化させた。さらにオーシストに含まれる多糖類を除去する目的で、Cetyltrimethylammonium Bromide(CTAB)を含むバッファー (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM TrisHCl)を加えて 60°C 1 時間処理した。一連の処理後の溶液に対して、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)抽出を行い、最終的にエタノール沈殿によりゲノム DNA を回収した。

2) *Ascogregarina* spp. rRNA 小サブユニット遺伝子(SSU rDNA)のクローニングと塩基配列の解析

Ascogregarina spp. SSU rDNA 遺伝子の単離は、Ex Taq polymerase (TAKARA)を用いたゲノム PCR 法で行った。まず、上記の方法で回収した *As. culicis* 2 株(タイ株、ベトナム株) および *As. taiwanensis* 2 株(日本株、インド株) のゲノム DNA を TE buffer に懸濁し、以後の PCR のテンプレートとして用いた。プライマーには、真核生物の rRNA 小サブユニット遺伝子領域(約 1.8 kb) の増幅用にデザインされたユニバーサルプライマー primer A: 5'-CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' および primer B: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' (Medlin *et al.*, 1988)を用いた。PCR の反応条件は、基本的に Ex Taq polymerase に添付のプロトコ

ールに準拠して行った。反応後の PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動で解析し、得られた増幅バンドは DNA 抽出キット (Qiaquick Spin Gel purification Kit, Qiagen)を用いてゲルより回収した。回収した PCR 産物は pGEM-T ベクター (Promega)にクローニングした後、常法に従いサイクルシーケンシングを行った。

3) *Ascogregarina culicis* の HSP70 遺伝子のクローニング

Ascogregarina culicis の HSP70 遺伝子のクローニングは、ゲノム DNA をテンプレートに用いたデジェネレート PCR で行った。プライマーには、HSP70 遺伝子ファミリーの ATPase ドメイン内配列の増幅を目的としてデザインされたデジェネレートプライマー primer A: 5'-CCCGGGIATHGAYYTIGGNAC-3', Primer B: 5'-GAATTCRTTRAARTAIGCNGG-3', primer E: 5'-GAATTCRAARTCYTCICCNCC-3', primer X: 5'-ACAGCYTCRTCAGGRTTDDAT-3' (Budin and Philippe, 1998)を用いた。ここでは耐熱性ポリメラーゼとして AmpliTaq Gold polymerase (PE Biosystems)を用い、PCR の反応条件は添付のプロトコールに従った。反応後の PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動で解析し、上記と同様にクローニングとシーケンシングを行った。

C: 研究結果

1) 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大を引き続き調査している。2001 年の調査で、横手(2/29 コロニー, 9.5%)、新庄(11/12, 91.7%)、気仙沼(4/18, 22.2%)で新たに同蚊の分布が確認された。その後 2 年が経過したので、定着を確認するため再

調査を行い、また継続して湯沢、横手、盛岡、花巻、北上、釜石等で調査を行った。新庄では 13 / 14 コロニー(93%)がヒトスジシマカで、市内の広範に分布していたが(表 1)、横手では 5 / 50(10.0%)であり、分布は市内の一部に限局しており、2年前と比べ大きな変化が見られなかった(表 2)。1998年以前の数回にわたって、盛岡でのヒトスジシマカの調査が行われたが、分布が確認されていなかった。しかし、2003年9月に、盛岡で初めてヒトスジシマカの分布が市内の1寺院で確認された(2 / 51 コロニー, 3.9%) (表 3)。なお、湯沢、花巻、北上、大船渡、釜石で依然としてヒトスジシマカの分布は確認されず、小水域に発生する幼虫の多くはヤマトヤブカであった(表 4, 5)。同蚊の分布域拡大がどのような要因と関連するか、各都市における過去7年間の年平均気温、メッシュ気候図を用いたGIS解析、都市部における人口密度の高い地域の面積等を分布解析に用いた。東北地方の各都市における年平均気温は、1997年から上昇傾向にあり、特に、1998-1999年にかけては、過去30年間(1961-1990)の平均と比べ明らかに上昇が認められた。1998年から調査対象の都市におけるヒトスジシマカの分布形態を以下のように分類した。A:市内に広範囲に分布、B:市内の一部に分布、C:分布していない(表 6)。その結果、1999年から2000年にかけて新たな分布・定着が起こった都市が多いことが示された。また、過去30年(1961-1990)の気象データを用いて作成されたメッシュ気候図では、年平均気温が10-11°Cの地域に存在する都市に同蚊の分布が認められるが、1°C上昇を予想し

たメッシュ気候図上に現在の分布をプロットした場合に、年平均気温が11-12°Cの地域に分布確認都市が存在することが明らかに示された。しかし、一部青森県の数都市においては、温度に関する条件は分布可能となっているが、実際に分布が確認されていない。そこで、これらの矛盾点を、人口密度の高い地域の面積から解析を試みた。その結果、山形、秋田、盛岡、石巻、水沢等の都市では、人口密度が1,000人/Km²以上の地域がいずれも30メッシュ以上存在することが明らかとなった(図1)。

2) *Ascogregarina* のオーシストは、夾雑物の混入が少なく比較的高純度で多量に回収できることから、遺伝子解析に利用可能な純度のゲノムDNAを回収するのに最も適したステージと考えられた。しかしながら、*Ascogregarina* のオーシストは非常に強固な外殻構造を持つため、従来の抽出方法ではDNA回収は困難であると予想された。そこで類似のオーシスト構造を持つと考えられる *Eimeria* 原虫で開発されたDNA抽出法(Zhao *et al.*, 2001)を参考に、*Ascogregarina* オーシストからのDNA抽出を試みた(図2)。その結果、回収効率にはやや難があるものの、比較的高純度のゲノムDNAの回収に成功し、本方法が *Ascogregarina* 原虫オーシストにも十分適用できることが分かった。

3) 我々は、外来遺伝子導入 *Ascogregarina* 原虫を用いた、新しいヤブカ防除法の開発を目指している。しかしこれまでのところ、本原虫に関しては遺伝子工学的操作を行う上での基礎的な知見が乏しい。すなわち本

原虫に関する分子生物学的な解析はほとんど行われておらず、本原虫が属するアピコンプレックス門の他の原虫類との分子レベルでの類縁関係もよく分かっていない。そこでまず生物の種間関係の推定によく利用される rRNA の小サブユニットをコードするゲノム領域(SSU rDNA)のクローニングと塩基配列の解析を行った。材料には、*As. culicis* 2株(タイ株、ベトナム株)および *As. taiwanensis* 2株(日本株、インド株)を用いた。これら各株のゲノム DNA を用いた PCR を行い、得られた増幅産物の塩基配列を解析したところ、確かに SSU rDNA 領域であることが確認された(図3)。また本領域内には、*As. culicis*、*As. taiwanensis* 両種を明確に区別し得る塩基配列が見出された(図4)。さらに本領域を指標にして、*Ascogregarina* と他のアピコンプレックス原虫類との間の類縁関係を推定する目的で、分子系統樹を作製した(図5)。

4) *Ascogregarina* 原虫の外来遺伝子導入系に用いるプロモーターの候補としては、遺伝子産物の高発現が期待できる HSP70 遺伝子プロモーターが最も有望と考えている。実際、様々な生物種において転写活性の高い HSP70 プロモーターを用いた外来遺伝子発現の成功例が報告されており、いくつかのアピコンプレックス原虫における外来遺伝子発現にも利用されている。そこで、*Ascogregarina* の HSP70 プロモーターを単離する目的で、まず HSP70 コード領域(ORF)のクローニングを行った。HSP70 遺伝子は多くの生物種でイントロンを含まないのが特徴であり、そのアミノ酸配列は生

物間でよく保存されていることが知られている。そこで、*As. culicis* オーシストから抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、生物間で高度に保存されているアミノ酸配列をもとに設計された数組のデジェネレートプライマー(Budin and Philippe, 1998)を用いて PCR を行った。種々のプライマーの組み合わせのうち、primer A と primer E'を用いて行った PCR において予想されるサイズの増幅産物(約 600bp)が得られた。この産物の配列を解析したところ、トキソプラズマなど他のアピコンプレックス原虫類の HSP70 に非常に高い相同性が認められ、本配列が *As. culicis* の HSP70 遺伝子の一部であることが強く示唆された(図6)。現在、得られた領域を足がかりとしたゲノムウォーキング法により、上流のプロモーター領域の単離を進めているところである

D:考察

1) 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大に関する 2001 年の調査で、横手、新庄、気仙沼で新たに同蚊の分布が確認され、その後 2 年が経過したので、定着を確認するため再調査を行った。また継続して湯沢、横手、盛岡、花巻、北上、釜石等の今までに同蚊が確認されていない地域においても継続して調査を行った。その結果、新庄ではヒトスジシマカが、市内の広範に分布していたが、横手では分布は市内の一部に限局しており、2 年前と比べ大きな変化は見られなかった。盛岡では、1998 年以前から数回にわたって、複数の研究者によってヒトスジシマカの調査が行われたが、全く分布が確認されていなかった。しかし、

2003年9月に、盛岡で初めてヒトスジシマカの分布が市内の1寺院で確認された。この確認が、夏季の一時的な定着なのかは今後継続して調査する必要がある。また、湯沢、花巻、北上、大船渡、釜石で依然としてヒトスジシマカの分布は確認されていないが、年平均気温のデータ等から判断して、今後近い将来に同蚊の侵入・定着が起こる可能性があると思われる。ヒトスジシマカの分布が見られない地域においては、小水域に発生する幼虫の多くはヤマトヤブカである。山形市のように、一度ヒトスジシマカの侵入・定着が起こると、短期間にヤマトヤブカが消え、ほとんど全ての幼虫がヒトスジシマカに置き換わる現象がみられた。この問題は、亜熱帯・熱帯地域におけるネッタイシマカとヒトスジシマカとの棲み分けに共通する現象で、今後より詳細な解析が必要と思われる。同蚊の分布域拡大と年平均気温、都市部における人口密度との関係を解析したが、東北地方の1997年から2000年にかけての温度上昇が、同蚊の侵入・定着に関与していた可能性が示唆された。1998年から調査対象の都市におけるヒトスジシマカの分布形態をA:市内に広範囲に分布、B:市内の一部に分布、C:分布していない、に分類したが、1999年から2000年にかけて新たな分布・定着が起こった都市が多いことが示された。また、過去30年間(1961-1990)の気象データを用いて作成されたメッシュ気候図では、年平均気温が10-11℃の地域に存在する都市に同蚊の分布が認められるが、1℃上昇を予想したメッシュ気候図上に現在の分布をプロットした場合に、年平均気温が11-12℃の地域に分布確認都市が存在

することが明らかになった。しかし、一部青森県や岩手県の都市においては、温度に関する条件は分布可能となっているが、実際に分布が確認されていない例があり、人口密度の高い地域の面積の大きさが、ヒトスジシマカの侵入・定着に係る可能性が示唆され、今後のより詳細な解析が必要と考えられた。

2) 2種のヤブカ原虫 *Ascogregarina* spp. に関する分子生物学的な解析はほとんど行われていない。今回、これらの原虫のオーシストから、効率よくDNAを抽出する方法が明らかとなり、今後の解析に貢献すると思われる。また、本原虫が属するアピコンプレックス門のなかでの分子レベルでの類縁関係が明らかになり、形態的分類の情報しかなかった *Ascogregarina* spp. の同定に重要な情報が得られた。また、rRNAの小サブユニットをコードするゲノム領域(SSU rDNA)の解析で、ネッタイシマカに寄生する *As. culicis* およびヒトスジシマカに寄生する *An. taiwanensis* を明確に区別することが可能となり、走査型電子顕微鏡によるオーシストおよび栄養体の形態比較のみしか不可能であった同定が可能となった。この原虫は、宿主特異性が高く、ヤブカ幼虫に大量に感染させることによって、容易に多数のオーシストを回収することが出来る。この生物学的特徴を利用して、外来遺伝子の運びや(vector)として利用し、新しい防除法の確立を目指している。その前段階として、強力な転写活性を有するHSP70プロモーターを用いた外来遺伝子発現系を考えている。今回、HSP70の部分配列を得ることに成功し、今後、プロモーターを含む全配列の解読を行うことを計画