

図5. アカイエカ種群蚊のナトリウムチャンネル遺伝子DII-S6領域のゲノムDNA配列の増幅

	988	1011
Susceptible	PFFLATVWIGNLWVLNLFLLLS	
*Ichikawa (L)	PFFLATVWIGNLWVLNLFLLLS	
Rinshi (L)	PFFLATVWIGNLWVLNLFLLLS	
Komae2	PFFLATVWIGNLWVLNLFLLLS	
Komazawa2	PFFLATVWIGNLWVLNLFLLLS	
Hino(L)	PFFLATVWIGNLWVLNLFLLLS	
*Shibuya	PFFLATVWIGNLWVLNLFLLLS	
*Ichikawa (S)	PFFLATVWIGNEWVLNLFLLLS	
Inarigi	PFFLATVWIGNSWVLNLFLLLS	
Rinshi (S)	PFFLATVWIGNSWVLNLFLLLS	
Komae1	PFFLATVWIGNSWVLNLFLLLS	
Noge (S)	PFFLATVWIGNSWVLNLFLLLS	
Hino (S)	PFFLATVWIGNSWVLNLFLLLS	
Komazawa1	PFFLATVWIGNSWVLNLFLLLS	

図6. アカイエカ種群蚊のナトリウムチャンネル遺伝子DII-S6領域のタンパク質配列
* チカイエカ; その他はアカイエカ

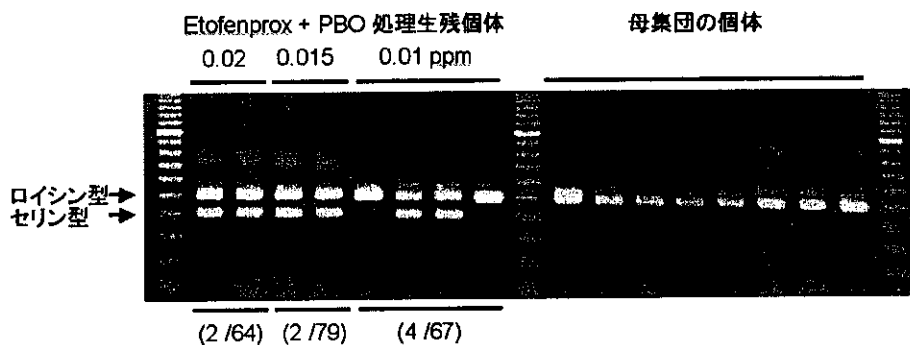


図7. アカイエカ林試の森コロニーのナトリウムチャンネル遺伝子DII-S6領域のPCR産物
括弧内は各殺虫処理区において生残した供試幼虫の割合。

Leu999

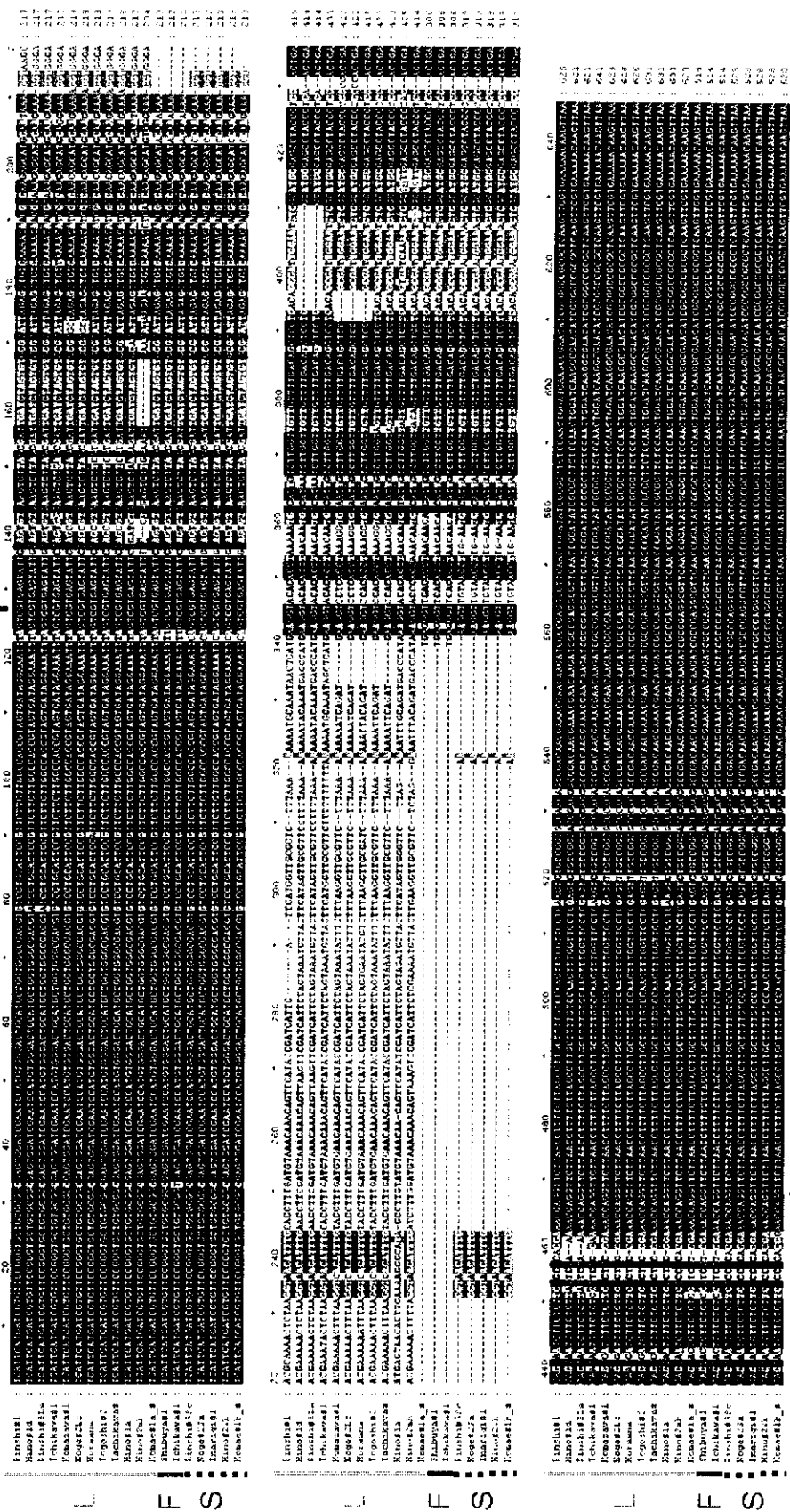


図8. アカイエカ種群蚊のナトリウムチャンネル遺伝子DII-S6領域の塩基配列多型
L, F, SはLeu999座位が、それぞれ、Leu, Phe, Serであることを示す。

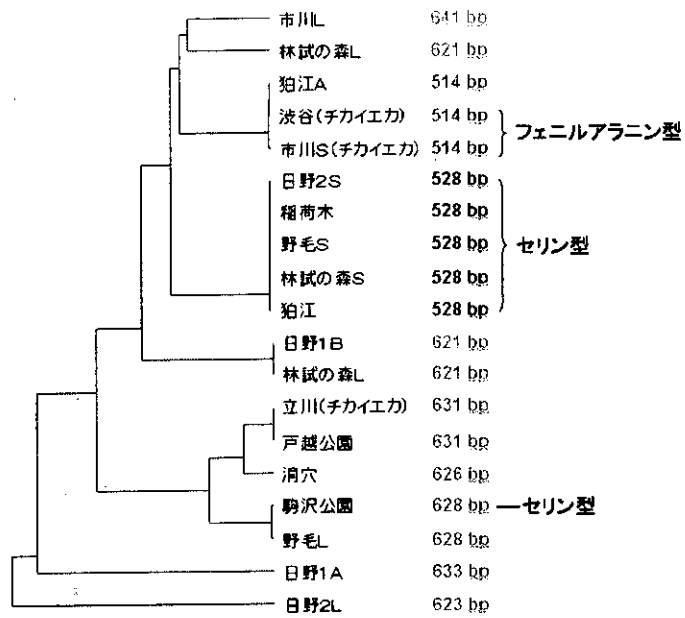


図9. アカイエカ種群蚊のナトリウムチャンネル遺伝子DII-S6領域のイントロンと両隣りのエクソンの一部分を含むDNA配列による分子系統樹
 系統樹作成はUPGMA法によった。解析したイントロンの上流に隣接するLeu999座位に生じたPheとSerへの置換変異を図中に明記したが、その他のハプロタイプはLeuをコードしていた。図中に示したDNA断片長変異はイントロン鎖長の変異により生じている。

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告

蚊の吸血嗜好性と本邦産蚊におけるウエストナイル(WN)ウイルス感受性

分担研究者 沢辺 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
協力研究者 佐々木年則・伊澤 晴彦（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
高崎 智弘・伊藤美佳子（同・ウイルス一部）
西海 功（国立科学博物館・動物研究部）
久居 宣夫・濱尾 章二（国立科学博物館・自然教育園）

研究要旨

WNウイルスの人への感染で重要になる蚊の種類は、吸血源として鳥と人の両方を利用する種類に限られる。そこで本研究では、吸血した蚊から動物血液由来のDNAを抽出し、ミトコンドリアDNAチトクロームb領域の部分塩基配列の解析から吸血源動物種の同定を試みた。調査したアカイエカ69匹中73%は鳥類のみ、12%がほ乳類のみを吸血し、14%はその両方の動物から吸血していた。一方、本年度の捕集個体数は14匹と少なかったが、ヒトスジシマカの50%は鳥類のみを、29%はほ乳類のみを、21%は両方の動物を重複吸血していることが分かった。ほ乳類ではアカイエカ(94%)、ヒトスジシマカ(86%)ともにそのほとんどが人から吸血していた。また、鳥類では両種ともにカモ類が最も多く（アカイエカ62%、ヒトスジシマカ100%）、アカイエカでは次いでスズメ類(23%)を吸血していた。その他に検出された鳥類種には、カワラヒワ、ムクドリ、シジュウカラ、モズ、カラスなどがいずれも1個体ずつから検出された。今回の調査で、日本のアカイエカは鳥だけではなく人も好んで吸血することが明らかになった。また、人吸血嗜好性が強いといわれているヒトスジシマカが鳥も人も吸血することも判明した。これらの結果からWNウイルスの人への伝播を考えた場合、アカイエカもヒトスジシマカも、人と鳥との間のブリッジベクターとして大きな役割を果たすであろうことが推察された。

平成15年度に捕集した日本各地の蚊集団におけるWNウイルスを含むフラビウイルスの検出を行った。都市部および森林、平野部など国内合計8箇所、主にドライアイストラップにより捕集された蚊7,281個体から320プールを作成し、C6/36細胞培養を行い変性細胞(CPE)を観察したところ、約30%の蚊プールが陽性であった。次いで同一蚊プールから抽出したRNAからRT-PCRおよびTaqMan RT-PCRでウイルスゲノムの検出を行った結果、約36%がフラビウイルスに対して陽性を示し、野外捕集蚊においてある種のフラビウイルスが存在していることが確認された。WNウイルスの検出結果はすべて陰性であったが、11プール（アカイエカ7プール、ヒトスジシマカ4プール）から日本脳炎(JE)ウイルスゲ

ノムが検出された。これらウイルス陽性プールは主に都市部住宅地から検出されており、人への感染が危惧される。引き続き詳細なフラビウイルス分布域の調査、ならびにウイルス種の同定を行う必要性がある。

A 研究目的

1. 吸血源動物種の同定：

WNウイルスは、通常蚊と野鳥の間を行き来し、その生活環が成り立っている。この生活環の中にいる蚊の中で、野鳥以外にも人や馬なども吸血する蚊は、ウイルスを本来の宿主ではない人や馬にも偶発的にウイルスを感染させることもあり、ある種の蚊はWNウイルスを人へ伝播するブリッジベクターとして重要な役割を果たすことが知られている。従って、WNウイルスの人への感染で重要になる蚊の種類は、吸血源として鳥と人の両方を利用し、両者間でWNウイルスの橋渡しができる種類に限られてくる。そこで本研究では、蚊が吸血した動物血液由来のDNAから得られる遺伝子情報をもとに動物の種類を特定しようと計画した。

これまでも吸血源動物の同定はELISAなどの抗原抗体法を用いた方法により行われてきたが、近縁の種では交差反応を示すこともあり種の特異性が困難であることが多かった。また、野鳥においては抗体作成が不可能な種が多いことから、PCRおよび遺伝子解析の技術を使った方法の確立を試みた。米国では近年、分類学上の「目」を識別するプライマーの配列が報告されたが、日本に分布する野鳥種の中でWNウイルスに高い感受性を示すとみなされる種は「スズメ目」に多いと創造されることから、「目」以下の属、種まで詳細に同定する必要があると考えた。よって本研究では「種」を識

別しうるDNA領域を独自に選び、プライマーを設計した。

2. 野外捕集蚊からのウイルス検出：

わが国における蚊からのウイルス検出および分離は、過去の日本脳炎流行に伴いコガタアカイエカからのJEウイルスの検出に代表される。JEウイルス以外では、1950年代にサギヤマウイルス(Scherer et al., 1962)、80年代にゲタ(GET)ウイルス(Igarashi et al., 1981)とSPウイルス(Okuno et al., 1984)などの報告がある。しかしながら、わが国の環境の推移とともに生息する蚊の種類も当時とは大きく異なってきており、当然検出されてくるウイルス種も過去とは異なる可能性は高い。一方、米国においては近年ウエストナイル熱が、東南アジアではデング熱が頻発し、世界的には蚊媒介性ウイルス感染症の流行は拡大の一途にあり、これらウイルスの日本国内への侵入が危惧されている。野外におけるアルボウイルスの最新の分布状況を早急に把握しなければならぬ状況下であり、WN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。培養細胞を用いることによってRT-PCRで検出可能な量までウイルス量を増やすことができ検出感度を上げることができる。よって得られる情報はウイルスRNAの検出結果のみに留まらず、その後のウイルス分離と電顕レベルでの種の同

定から、より正確に WN ウイルスのわが国への侵入と拡大を把握することが可能になると考えられる。

B 研究方法

野外捕集蚊：

平成 15 年 5 月～11 月、国内 8 箇所です主にドライアイストラップを用いて合計 12,125 個体の蚊を捕集した。「大阪・兵庫」、「首都圏」および「富山」は主に一般住宅地、それ以外の捕集地は、森林部、平野部など民家の数は少ない場所である。詳細は以下のとおりである。

1. 「成田」：成田市周辺 3 地点（成田市十余三、山武郡松尾町、印旛郡酒々井町）
2. 「盛岡」：東北農研センター（盛岡市下厨川）
3. 「大阪・兵庫」：大阪府周辺 12 地点（高槻市栄町、四条畷市米崎町、吹田市豊津町、豊中市箕輪、大阪市東淀川区、大阪市東成区、東大阪市下小阪、東大阪市中小阪、和泉市山荘町、和泉市内田町、西宮市西宮浜、西宮市枝川町）
4. 「首都圏」：東京都および近郊 3 県 14 地点（さいたま市浦和区、鶴ヶ崎市脚折町、春日部市大沼、東京都新宿区戸山、東京都新宿区小山台、東京都新宿区西早稲田、東久留米市大門町、東久留米市氷川台、柏市新柏、市川市中山、横浜市青葉区）
5. 「網走」：能取湖周辺（網走市卯原）
6. 「富山」：富山市周辺 11 地点（衛生研究所、城跡公園、高岡市古城公園、富山市小杉町黒河、富山市小杉町太閤、富山市小杉町山本新、新湊市海老名、富山市婦中町、薬事研究所、富山市大山町、富山

市鹿島町)

7. 「石垣」：石垣市内の牛舎
8. 「長崎」：長崎市金毘羅山中腹の洞穴

原則的に最高 50 個体までを 1 プールとし、蚊種、捕集日、捕集地毎にプールを作成しウイルス検出に供した。同時にトラップに捕集、あるいは畜舎において休息中を吸血管で捕集した吸血蚊（アカイエカ 69 個体、ヒトスジシマカ 14 個体、コガタアカイエカ 11 個体、その他 60 個体：シナハマダラカ、フタクロホシチビカ、セスジャブカ、ヤマトヤブカ、キンイロヤブカ、オオクロヤブカ）は吸血源動物種の同定に用いた。

1. 吸血源動物種の同定：

吸血源動物由来の DNA は、頭部を切り離した蚊虫体からフェノール・クロロホルム法（PURESCRIPT Blood RNA Isolation kit および PUREGENE DNA Purification kit, Gentra）により抽出した。ミトコンドリア DNA チトクローム b 領域を PCR 法によって増幅し（PC-701, アステック）、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を解析した（ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, PE Biosystems）。PCR は 94°C2 分、(94°C30 秒、55°C30 秒、72°C×90 秒)×35cycle で行った。まず、図 1 に示すように哺乳類血液と鳥類血液を選別しうる領域（p1, p2, p3）のプライマーを 3 種類ずつ作成し、鳥類と哺乳類のどちらの血液を吸血しているかを PCR 産物のアガロース電気泳動像より判別した（配列の詳細は省略する）。図 2 は実験的にそれぞれの血液を蚊磨砕液と混合した場合の電気泳動像である。次いで、いずれか単

独の血液のみを吸血していた場合は共通領域（プライマーL14841 および H15149 で増幅）の配列から、哺乳類と鳥類の両方を重複して吸血している個体については、各種の種特異的な部位の配列をもとに解析した。得られた配列は BLAST 検索により GenBank に登録されている配列情報と比較し種の同定を行った。

対象とした蚊は、今年度の野外捕集蚊中もっとも数の多かったアカイエカ（チカイエカを含む）とヒトスジシマカの2種である。また、アカイエカと同一豚舎で捕集されたコガタアカイエカも同様に実験に供し、上記2種との比較を行った。

2. 野外捕集蚊からのウイルス検出：

1) C6/36細胞による変性細胞（CPE）の観察

上記捕集蚊の20種類7,281個体から320プールを作成し、原則として最高50個体までを1プールとしMEM培養液で磨砕した。軽く遠心を行い、回収した上清をヒトスジシマカ由来のC6/36細胞に接種し28°C、5%CO₂下で約7日間培養した。培養上清を回収し、新しい培地に植え継ぎ、再度同じ条件下で培養した。2度目の培地の状態は適宜観察しCPEを観察した。

2) RT-PCRによるフラビウイルスの検出

2度目の継代培地上清からHigh pure viral RNA kit (Roche) を用いてウイルスRNAの抽出を行った。次いで、既知のフラビウイルス塩基配列をプローブにRT-PCRを行い (AccessQuick RT-PCR System, プロメガ) フラビウイルス保有の有無を判定した。用いたプライマーは、NS3領域(Fla- U5004: gg AAC DTCMggHTCNCCHAT, Fla-L5457: gTg

AARTGDgCYTCRTCCAT)と独自に作成したNS5領域の2種類（配列情報は省略し、便宜上NS5SとNS5Lとする）の合計3種類で、それぞれ53°C30分、92°C2分、(92°C1分、53°C1分、72°C×1分)×40cycle、72°C10分の温度条件でRT-PCRを行った（図3）。

3) WNウイルスの検出はTaqMan RT-PCRにより行った。2種類のプライマー・プローブセット、WNENV-forward (1160-1180), WNENV-reverse (1209-1229), WNENV- probe (1186-1207)、およびWN3'NC- forward (10668-10684), WN3'NC-reverse (10770-10756), WN3'NC-probe (10691-10714)を用い、48°C30分、95°C10分、(95°C15秒、60°C1分)×45 cycleの温度条件でRT-PCR (iCycler, BioRad) を行った。

吸血蚊からのWNウイルスゲノムの検出は、血液由来のDNAを抽出する際に得られたRNAを（前出PURESCRIPT Blood RNA Isolation kit, Gentraにより抽出）上述したと同様の温度条件のRT-PCRに供した。

C 研究結果

1. 吸血源動物種の同定：

調査したアカイエカ69個体中73%は鳥類のみ、12%がほ乳類のみを吸血し、14%はその両方の動物から吸血していた（図4）。一方、本年度の捕集個体数は14個体と少なかったが、ヒトスジシマカの50%は鳥類のみを、29%はほ乳類のみを、21%は両方の動物を重複吸血していた。ほ乳類ではアカイエカ（94%）、ヒトスジシマカ（86%）ともにそのほとんどが人を吸血していた。

また、鳥類種では両種蚊ともにカモ類が最も多く（アカイエカ62%、ヒトスジシマ

カ 100%)、アカイエカでは次いでスズメ類 (23%)を吸血していた。その他に検出された鳥類種は、カワラヒワ、ムクドリ、シジュウカラ、モズ、カラスなどで、いずれも 1 個体ずつから検出された (表 1)。比較のために用いたコガタアカイエカはそのほとんどが豚舎で捕集された個体であるが (10 個体)、同時に 5 個体のアカイエカも捕集された。そのコガタアカイエカがすべて豚のみを吸血していたのに対し、アカイエカは豚ではなくカモ類を吸血していた。

2. 野外捕集蚊からのウイルス検出：

平成 15 年度に日本各地 8 箇所ですべて主にドライアイストラップにより捕集した蚊は 20 種類合計 12,125 個体であったが、その 7,281 個体から 320 プールを作成しウイルス検出を行った (表 2)。C6/36 による細胞培養を行ったところ、約 30%の蚊プールに何らかの変性細胞 (CPE) が観察された。この CPE の形状はアカイエカタイプとヒトスジシマカタイプの 2 種類に分けられ (図 5)、少なくとも 2 種類以上の異なるウイルス種の存在が示唆された。

次いで 2 度の継代を行った培養上清から RNA を抽出し、RT-PCR および TaqMan RT-PCR によってウイルスゲノムの検出を行ったところ、約 36%の蚊プールがフラビウイルスに対して陽性を示し、野外におけるフラビウイルスの存在が明らかになった (表 3)。WNウイルスの検出結果はすべて陰性であったが、11 プール (アカイエカ 7 プール、ヒトスジシマカ 4 プール) は日本脳炎 (JE) ウイルス陽性であった。これらウイルス陽性プールは主に都市部住宅地から検出された。

D 考察

1. 吸血源動物種の同定：

吸血源動物種の探索は、従来から ELISA 法などの抗原抗体法を用いた方法により行われてきてはいたが、近縁の種では交差反応を示す場合もあり種の特定が困難であることが指摘されていた。事実、Sabage et al. (1993)の結果では、哺乳類を吸血した個体の 22% (110 個体中 24 個体)、鳥類種を吸血した個体の 51% (29 個体中 15 個体) の個体からはその吸血源動物種を同定することができなかった。抗体の入手しやすい哺乳類種においてはかなり高率に種の同定が行われるであろうが、野鳥においては、抗体の入手あるいは作成が不可能な場合が多く、従って従来の ELISA 法による検出ではほとんど同定不可能であると言っても過言ではない。このような背景のもとに我々は PCR 法および遺伝子解析の技術を使った同定法の確立を試み、哺乳類と鳥類を選別する有効なプライマーをミトコンドリア DNA チトクローム b の領域から作成することができた。それらプライマーを用いて野鳥の種名までを同定し、さらに未同定率を 7%まで下げることができたことは評価される成果である。

しかしながら、本結果が示したカモ類は多くがカルガモであり、次いでマガモが検出された。動物種の同定においては、家畜、愛玩動物として交雑された種 (カルガモ・マガモとアヒル・アイガモ、イノシシと豚、イヌとオオカミなど) も当然検出されるはずであり、それらの遺伝的差異は見出せないと思われる。よって、捕集地の地域情報

なども十分加味して動物種の同定を行う必要がある。

今年度捕集した吸血蚊は、ウイルス検出用蚊の捕集を目的に設置したドライアイストラップに同時に得られた蚊であるが、アカイエカの非吸血個体合計 8,391 個体に対して吸血蚊は 69 個体であった。吸血蚊の割合は低いものの吸血源動物種の同定作業に用いる数はある程度得られるようである。しかしながら、コガタアカイエカにおいては、その多くが豚舎に設置したトラップと吸虫管で捕集されたもので、非吸血個体 664 個体に対して 28 個体、さらにヒトスジシマカにおいては、1,943 個体に対してわずか 14 個体と捕集効率は著しく低かった。現在の捕集法あるいは設置条件など、対照とする蚊種毎に詳細に検討することが必要と思われる。しかしながら、本年度の結果から、我々の身近に生息する蚊、アカイエカ、コガタアカイエカおよびヒトスジシマカの 3 種類の蚊の吸血嗜好性に違いがあることは明らかになった。

近年の米国での WN ウイルスに関する媒介蚊調査から、最も WN ウイルスに対する感受性の高い種としてイエカの種、特にアカイエカが挙げられているが、米国では WN ウイルスの人への流行が毎年拡大し深刻化しているのに対し、欧州ではほとんど問題になっていないことの一理由として、米国のアカイエカの多くは鳥も人も吸血するタイプであるためブリッジベクターとして大きな役割を果たしている。一方、欧州のアカイエカは主に鳥のみを吸血するため WN ウイルスの人への感染にはほとんど関与していない。このように、両地域に生息するアカイエカの吸血嗜好性の違いを

もとに WN ウイルスの人への流行が推察されている (Fonseca et al., 2003)。本研究では、日本のアカイエカは鳥だけではなく人も好んで吸血する、米国と同様の吸血嗜好性を示すタイプであることが証明され、また、その多くが人との接点の多い都市部住宅地で捕集されたアカイエカに対して、ヒトスジシマカは自然公園のような通常は人との接点が少ない場所で捕集されたにも関わらず、アカイエカとほぼ同程度、あるいはそれよりも高い人への吸血嗜好性が示されたことから、本来のヒトスジシマカの嗜好性はもっと人に対して高いと考えられる。

WN ウイルス媒介種としては、アカイエカとヒトスジシマカは日本においても最も注意すべき種類になると考えられる。今後はさらに検査個体数を増やすことによって、より種特異的な嗜好性の差を表わせるものと期待している。

2. 野外捕集蚊からのウイルス検出：

平成 15 年度に捕集した各地の蚊集団における WN ウイルスを含むフラビウイルスの検出を、1) CPE の観察、2) RT-PCR、3) TaqMan RT-PCR の 3 点から検討したが、細胞に何らかの病変を生じた CPE の結果と、フラビウイルスの検出結果がほぼ一致したことは興味深い。

現在までのところ WN ウイルスの存在が確認されていないわが国においては、野外から得られた蚊プールから直接、VecTest や RT-PCR などの方法で検出されるほどのウイルス量があるとは想像できないことから C6/36 細胞培養のステップを入れることによって、検出可能な値までウイルス量を増加させる方法を選択した。その結果、ある

種のフラビウイルス、およびJEウイルスの存在を確認し得たものと考えている。

JEウイルスをはじめとするある種のフラビウイルスが野外に広く存在していることが判明し、さらにこれらウイルス陽性プールは主に都市部住宅地に分布していることが示されたことから、人への感染の可能性が危惧される。今後はフラビウイルス陽性プールに対して、さらに哺乳類由来の細胞を用いて培養することによって、昆虫由来のフラビウイルスで、なおかつ哺乳類へも親和性の高い、つまり人への感染性のあるフラビウイルスを探索、ウイルス分離を目標とする予定である。

WNウイルス検出のために特異的なプライマー・プローブセットを用いたTaqMan RT-PCRを行ったがすべて陰性であった。しかしながらJEウイルス検出のためのプライマー・プローブセットを用い同手法で検出したところ、RT-PCRでフラビウイルス陽性であった蚊プールの一部がJEウイルスであったことがほぼ確認された。JEウイルスがコガタアカイエカからではなく、アカイエカとヒトスジシマカから検出されたことは大変興味深い。人へのJEウイルスの感染経路を改めて見直す必要性を提起する結果である。引き続き詳細なフラビウイルス分布域の調査、ならびにウイルス種の同定を行うことを来年度の目標としたい。

E 結論

これまで主にELISAにより行われてきた蚊の吸血源動物種の同定を、哺乳類と鳥類の血液DNAを選別するプライマーをミトコンドリアDNAチトクロームb領域の配列から設計し、本領域の部分塩基配列を解析

することで「種」のレベルでの同定を行う方法を確立した。

また、この方法によりアカイエカ、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカの吸血嗜好性の違いを明らかにし、さらに、日本のアカイエカは鳥だけではなく人も好んで吸血する、米国タイプに近い吸血嗜好性を持つ蚊であることを証明した。次いで、ヒトスジシマカの人嗜好性はアカイエカとほぼ同程度か、あるいはそれよりも高いことが推察された。

これらの結果から、日本においてWNウイルスの人への伝播を考えた場合、アカイエカもヒトスジシマカも両種ともに、鳥と人との間のブリッジベクターとして大きな役割を果たす可能性があることを示唆した。

野外におけるフラビウイルスの分布調査は1980年代以降ほとんど行われていなかったが、本調査では野外捕集蚊からのWNウイルスを含むフラビウイルスの検出を、まずC6/36昆虫細胞を用いた培養系で一旦ウイルス量を増やしCPEを観察、その後RT-PCRでフラビウイルス全般を、次いでTaqMan RT-PCRによりWNウイルスを選択的に検出する方法を確立した。詳細なウイルス種の同定は現在検討中であるが、昆虫媒介性であり、なおかつ人へも親和性のあるフラビウイルスの分布状況を把握する必要性が提示された。

野外に生息する蚊集団の中にJEウイルスを含むある種のフラビウイルスが都市部住宅地を中心に、広域に、なおかつ30%以上という想像以上の高い頻度で分布していることが明らかになった。JEウイルスのコガタアカイエカ以外の種類から人への媒介経路を再検討する必要がある。

F 健康危険情報

米国および中米地域におけるWNウイルスの流行は今年度も拡大してきているが、日本国内における流行は現在のところみられていない。

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 佐々木年則・沢辺京子・伊藤美佳子・高崎智彦・倉根一郎・江下優樹・小林睦生
(2003) VecTest による蚊からのウエストナイルウイルスの検出. 第55回日本衛生動物学会(大分市), 2003年4月2日.

2) 沢辺京子・佐々木年則・伊澤晴彦・SudiptaRoychoudhury・小林睦生(2003) 野外採集蚊からのウエストナイルウイルスの検出—2003年度前期報告—. 第55回日本衛生動物学会東日本支部大会(横浜市), 2003年10月3日.

H 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

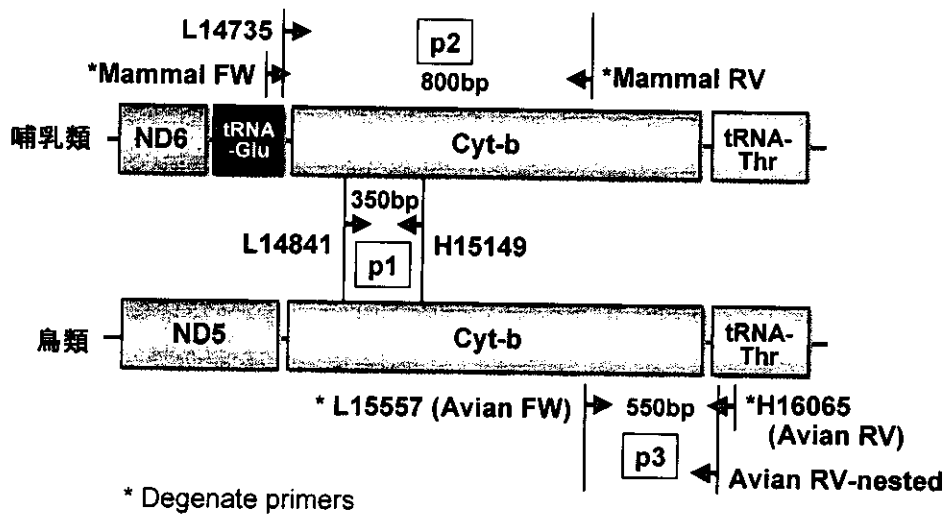


図 1. 吸血源同定のための PCR 用プライマーの作成

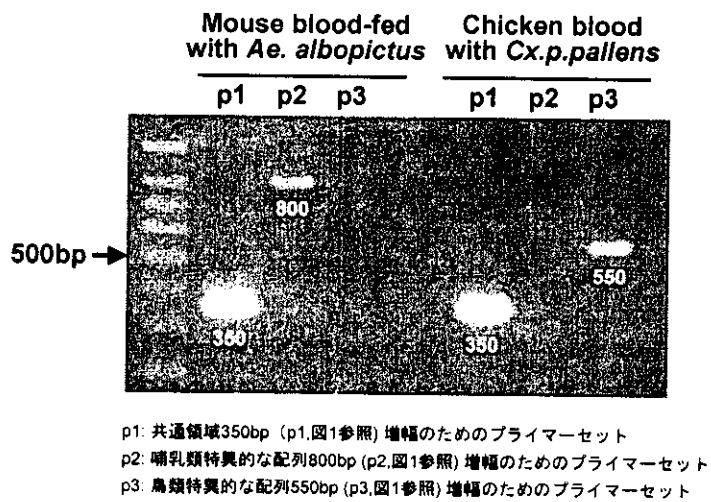


図 2. PCR による吸血蚊からの鳥類および哺乳類血液の検出

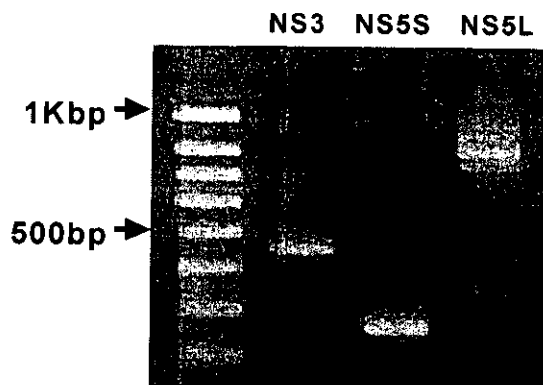


図 3. RT-PCR による WN ウイルスを含むフラビウイルスの検出

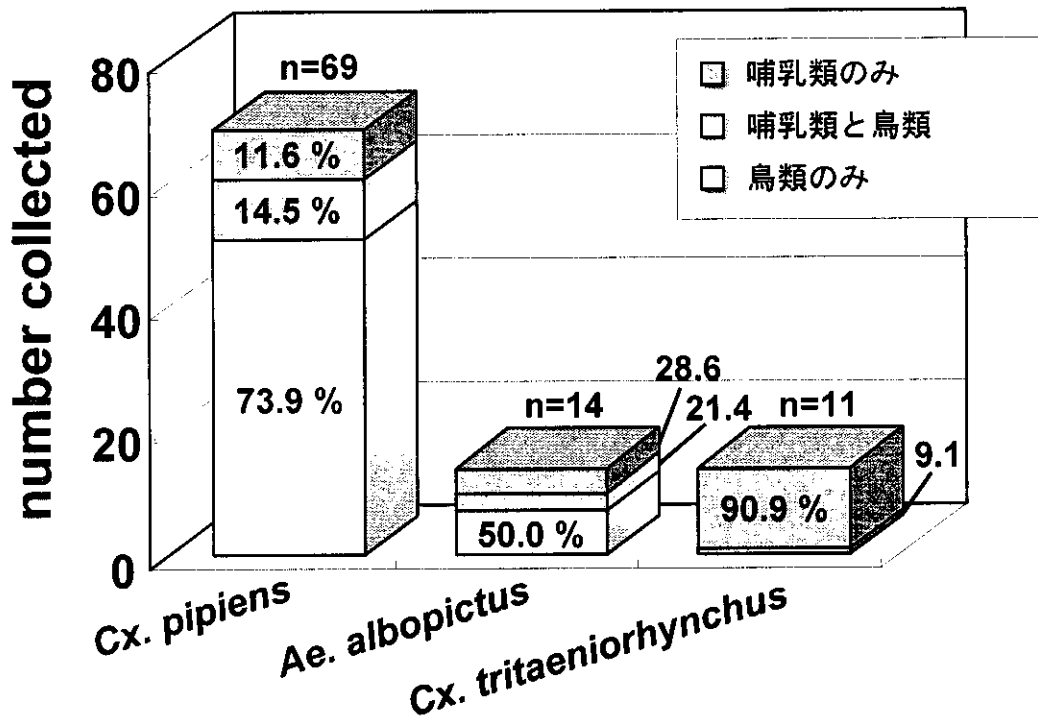


図 4. Avian and Mammal blood-meals in mosquitoes

表 1. 蚊の吸血源となった動物種

Source of blood	<i>Cx. pipiens</i> (n=69)	<i>Ae. albopictus</i> (n=14)	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i> (n=11)
哺乳類	(n=18)	(n=7)	(n=11)
ヒト	17 (94.4%)	6 (85.7%)	0
イヌ	1 (5.6)	0	0
ネコ	0	1 (14.3)	0
ブタ	0	0	10 (90.9%)
不明	0	0	1 (9.1)
鳥類	(n=61)	(n=10)	(n=1)
カモ類	38 (62.3%)	10 (100%)	0
スズメ類	14 (23.0)	0	0
ムクドリ	1 (1.6)	0	0
カワラヒワ	1 (1.6)	0	0
シジュウカラ	1 (1.6)	0	0
93% モズ	1 (1.6)	0	0
85% カラス科	1 (1.6)	0	0
不明	5 (8.2%)	0	1 (100)

表 2. ウイルス分離に用いた捕集蚊個体数およびプール数

捕集蚊	1. 成田		2. 盛岡		3. 大阪・兵庫		4. 首都圏		5. 網走		6. 富山		7. 石垣島		8. 長崎		合計	
	個体数	プール	個体数	プール	個体数	プール	個体数	プール	個体数	プール	個体数	プール	個体数	プール	個体数	プール	個体数	プール
アカイエカ	149	4	150	3	1,024	54	1,889	51	250	5	476	18			119	4	4,057	139
コガタアカイエカ	409	12			58	12					439	14					906	38
ハマダライエカ	16	3	50	1					144	3	3	1					213	8
カラツイエカ	4	3															4	3
トラフカクイカ											2	1					2	1
ヒトスジシマカ	150	3			632	50	643	25			209	9					1,634	87
ヤマダシマカ	80	4															80	4
アカエゾヤブカ									122	3							122	3
エゾヤブカ									2	1							2	1
キンイロヤブカ	2	1							3	1							5	2
ヤマトヤブカ	6	3	1	1	4	3					11	2					22	9
セスジヤブカ									37	2							37	2
シロカタヤブカ	4	2															4	2
オオクロヤブカ	25	3									1	1					26	4
キンバラナガハシカ	6	3	3	1							4	1					13	5
ハマダラナガスネカ	1	1															1	1
ヤマトハボシカ									1	1							1	1
フタクロホシチビカ	7	1															7	1
シナハマダラカ	140	4											3	3			143	7
オオツルハマダラカ													2	2			2	2
合計	9991	47	204	6	1,718	119	2,532	76	559	16	1,145	47	5	5	119	4	7,281	320

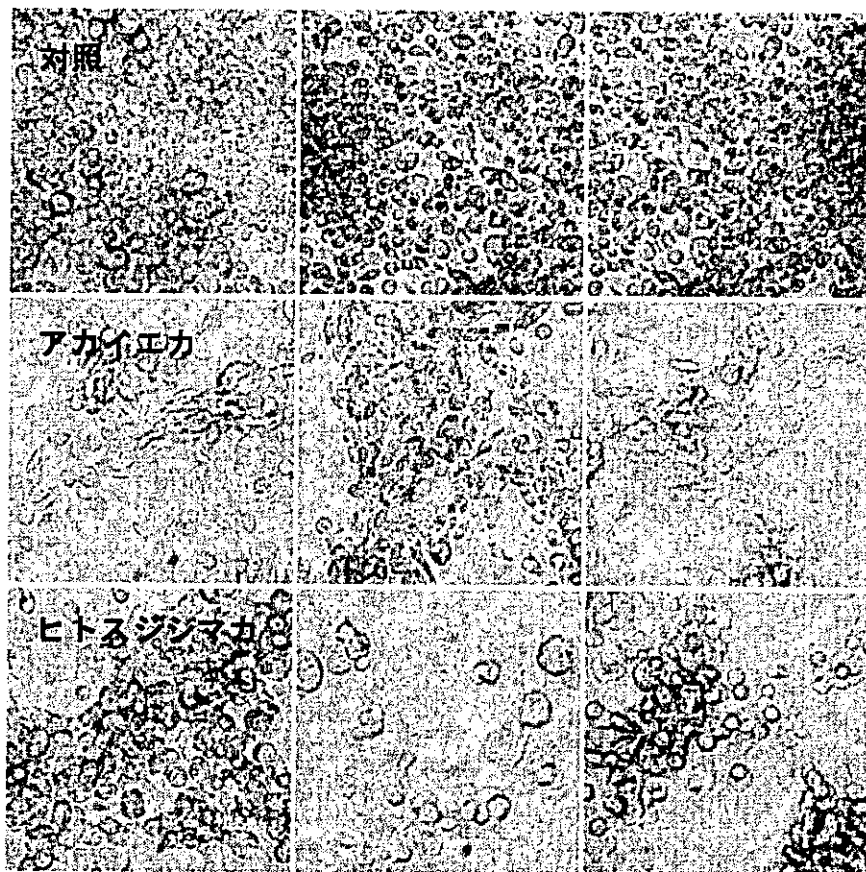


図 5. C6/36 細胞で認められた細胞変性

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

蚊からの日本脳炎ウイルスの検出

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所)

協力研究者：澤邊京子、伊澤晴彦

(国立感染症研究所昆虫医科学部)

伊藤美佳子、小滝 徹、倉根一郎

(国立感染症研究所ウイルス一部)

奥山恵子、清水英明 (川崎市衛生研究所)

研究要旨

1990年以降、わが国における日本脳炎患者の発生は、毎年10人以下であるが、2001年には和歌山県で11年ぶりに患者が発生し、2002年には13年ぶりに広島県で患者が発生している。ブタの抗体調査によれば、依然として関東以西のブタの間では日本脳炎ウイルスは、依然として蔓延している。一方米国での2002年のウエストナイル熱の大流行を受けて、わが国でもウエストナイルウイルス感染蚊のサーベイランス調査が各地で実施され検査されている。このような状況下で、日本脳炎ウイルスに関しても、より感度と特異性の高い検査法（TaqMan RT-PCR法）を開発し、感染蚊の実態把握を行ったところ、大阪市・東京都・川崎市といった都市部のヒトスジシマカから日本脳炎ウイルスが分離・同定された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルスは、毎年夏期になると九州、四国地方からブタの間で流行し始め、近畿・東海・北陸・関東地方へと侵淫地域を拡大する。近年の日本脳炎患者の発生数は10人以下であるが、依然としてブタの間では夏期にウイルスが蔓延しているのが、現状である。2002年春より「日本脳炎ワクチンの有効性評価」を狙いの一つとして、12都県地方衛生研究所との共同研究の形で、ブタにおける「日本脳炎ウイルスサーベイランス」を開始した。日本脳炎ウイルスを分離しその分子疫学的解析を実施した結果、ブタから分離されたウイルスは、ワクチン株と異なり遺伝子型1型であった。一方、米国での2002年のウエストナイル熱の大流行を受けて、わが国でもウエストナイル

ウイルス感染蚊のサーベイランス調査が各地で実施され検査されている。このような状況下でまず、日本脳炎ウイルスに関しても、より感度と特異性の高い検査法（TaqMan RT-PCR法）を開発し、その特異性および感度を評価した。本方法を用いて蚊からの日本脳炎ウイルス遺伝子検出を試み、陽性の検体からウイルス分離を試みた。

B. 研究方法

1. ウイルス分離

遺伝子検出；日本脳炎用 TaqMan RT-PCR法の確立

近年、わが国で分離される日本脳炎ウイルスは、遺伝子型1型と3型である。このため、両遺伝子型を増幅できるものを作製した。

設計したプライマーは下記のセットである。

JEen562s-585p/623cset :

CTGGAYTGTGARCCAAGGA

JEen623c-585p/562sset :

GAHCCCACGGTCATGAC

TaqMan プローブは下記のものある

200nM of the FAM-MGB -labeled probe

JEen585p562s623c

FAM-ACTRAACACTGAAGCGT-MGB

評価には、8種類の日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルス (NY 株)、クンジンウイルス (K47382 株、OR393 株)、黄熱ウイルス (17D 株)、デングウイルス 1 型、2 型、3 型、4 型 (各標準株) を用いた。実際の検査ではプール蚊をすりつぶした上清 5 μ l を試料とし実施した。

反応は、48 $^{\circ}$ C で 30 分間熱変性反応させ、その後 95 $^{\circ}$ C \cdot 15 秒 \rightarrow 57 $^{\circ}$ C \cdot 1 分のサイクルを 45 回繰り返した。産物は ABI Prism 7000 を用いて検出した。

ウイルス分離法

分離は株化細胞による分離法を主として用いた。各施設で、乳のみマウス脳内接種法が得意な場合は、マウスによる分離を実施した。使用した細胞は Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) および C6/36 細胞 (ヒトスジシマカ由来) を用いた。

遺伝子解析

分離したウイルスのうち、増殖の良いものから、E 領域に設定した 5 つのプライマーペアを用いて RT-PCR 法により遺伝子を増幅し、ABI prism Avant 3100 遺伝子解析装置を用いて E 領域の遺伝子解析を実施した。

C. 研究結果

日本脳炎用 TaqMan RT-PCR 法の評価

リアルタイム PCR の判定基準である Threshold を 0.5 に定めて、それを上回るサイクル数で評価した (図 1) JaTAn, JaGAr, Nakayama, JaTH 株などの古い日本の分離株 (遺伝子型 3 型)、Beijin 株、SK-14 株などの古い中国の分離株は、16 サイクルから 23 サイクルの間で陽性となった。また、近年日本のブタから分離された日本脳炎ウイル

ス (遺伝子型 1 型 : 2 株) も 19 サイクル前後で陽性となった。

しかしながら、アポウイルス、クンジンウイルス (K47382 株、OR393 株)、デングウイルス 1 型は、38 サイクルあるいは 39 サイクルでゆるやかな上昇を示し、擬陽性となった (表 1)。

この日本脳炎用 TaqMan RT-PCR 法を実際のプール蚊のサンプル 322 検体で応用した。その結果、東京都下のアカイエカ 1 プールで陽性 (36 サイクル) を示した。また、擬陽性領域である 37 サイクル以降 40 サイクル以内で上昇を示した検体は、成田市で 1 プール (アカイエカ)、大阪で 5 プール (アカイエカ 2、ヒトスジシマカ 3) 東京で 3 プール (アカイエカ) であった。このうち、大阪市東淀川区のアカイエカ検体からは、ウイルスが分離され一部遺伝子解析の結果、日本脳炎ウイルスであることが、同定されている。また、川崎市が収集した蚊プールからも、日本脳炎ウイルスを分離した。ウイルスの nested PCR 産物の遺伝子配列 (図 2) は、日本脳炎ウイルス Ja0Ar 株と 96% のホモロジーを示した。

D. 考察

本邦における日本脳炎患者数は、1980 年代には、20 から 40 例の範囲にとどまっていたが、1990 年に 11 年ぶりに 50 例を越えた。しかし、1991 年の 13 例の後、1992 年以降患者数は 10 例を越えない。しかしながら、2001 年には和歌山県で 11 年ぶりに患者が発生し、2002 年には 13 年ぶりに広島県で患者が 3 例発生している。1965 年以来現在まで毎年行われている日本脳炎感染源調査でのブタにおける日本脳炎ウイルス HI 抗体保有状況調査の結果は、現在も引き続き環境中に日本脳炎ウイルスが存在していることを示している。TaqMan PCR でウイルスの存在が示唆された検体は、ウイルス分離中である。今回我々の開発した TaqMan PCR 用プライマー、プローブセットは、他のフラビウイルスに対して弱い交叉反応をしめた。このため別領域でもう 1 セットを設計中である。また、今回蚊から分離できた日本脳炎ウイルスは、十分に増殖させた上で、構造遺伝子領域の遺伝子解析お

よび抗原性解析する予定である。

水田で繁殖するコガタアカイエカの減少という要因下で、都市部に生息するアカイエカの中に日本脳炎ウイルス感染蚊が存在することは、注目すべきことである。今後は野鳥との関連も検討する必要がある。ワクチン行政との関連からも、日本脳炎ウイルス感染蚊の調査は、ウエストナイルウイルスとともに今後も調査継続する必要がある。

E. 結論

ブタの抗体調査によれば、依然として関東以西のブタの間では日本脳炎ウイルスは、依然として蔓延している。このような状況の中で、川崎市・大阪市などの比較的都市部のアカイエカから日本脳炎ウイルスが、分離・検出された。このことは、わが国では、依然としてヒトが日本脳炎ウイルスに感染するリスクが存在することが強く示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe, Reiko Nerome, Mikako Ito, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane. Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice. *Vaccine* 21(31) 4514-4518, 2003

Mizutani T, Kobayashi M, Eshita Y, Shirato K, Kimura T, Ako Y, Miyoshi H, Takasaki T, Kurane I, Kariwa H, Umemura T, Takashima I. Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol Biol.* 2003 Oct;12(5):491-499.

Yuki Eshita, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane. *Anthology of Biosafety: VI. Arthropod Borne Diseases.* Editor: Jonathan Y. Richmond; Chapter 6; Isolation of

Arboviruses from Field-collected mosquitoes. *American Biological Safety Association.* 63-71 (2003)

伊藤美佳子、高崎智彦. 新興輸血感染症「ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎」. *血液フロンティア* 13(5) 613-617, 2003.

高崎智彦、伊藤美佳子. ウイルス性脳炎～ウエストナイル脳炎～. *化学療法の領域* 19(5) 797-801, 2003.

高崎智彦. 感染症診療・投薬ガイド 第II部 疾患各論 ウエストナイル熱. *総合臨床* 52, 351-355, 2003

高崎智彦. ウエストナイル熱 (West Nile Fever). *CURRENT CONCEPTS IN INFECTIOUS DISEASES* 22(3) 18-19, 2003

高崎智彦. ウエストナイルウイルス感染症. *畜産技術.* 581(10) 28-31, 2003

高崎智彦. ウエストナイル熱. *臨床医.* 29(10) 1779-1782. 2003

高崎智彦. フラビウイルス感染症およびその流行における鳥類の役割. *鶏病研究会報.* 39(増刊号) 1-6. 2003

高崎智彦. ウエストナイルウイルス感染症の動向. *Medicament News* 1759号. 4-6 (2003)

高崎智彦、根路銘令子、倉根一郎. 2002年日本におけるブタから分離された日本脳炎ウイルスの解析. *病原体検出情報* 24(7) 153. 2003

桑山勝、高尾信一、福田伸治、島津幸枝、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦、山田堅一郎、根路銘令子、伊藤美佳子、笠松淳也、中村就一、宮脇弘幸、香川治子、青山範子、越智一秀、原田和歌子、時信弘. 2002年に発生した日本脳炎3事例についての詳細ー広島県. *病原体検出情報* 24(7) 152-153. 2003

2. 学会発表

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランスブタ血清からのウイルス分離とその解析および日本脳炎を疑われる患者検体からのウイルス分離. 第38回日本脳炎生態学研究会 2003年5月 (小樽)

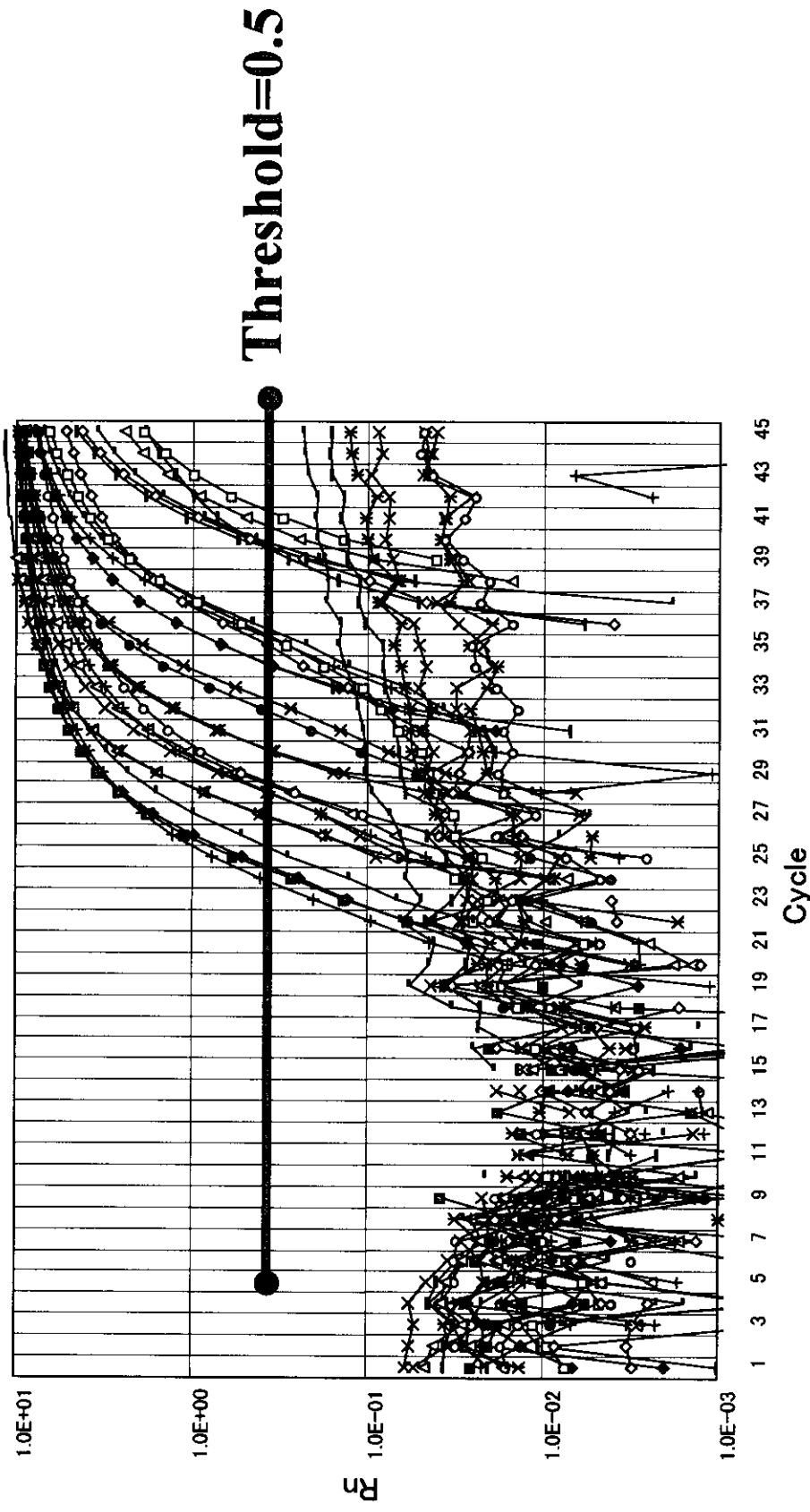
根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランス：ブタ血清からのウイルス分離とその解析。第51回日本ウイルス学会総会、2003年10月27日-29日 (京都)

表 1

Virus strain (JEV)	CT	Virus strain (JEV 以外)	CT
JaTAn	20.54	West Nile V(NY)	—
JaTH	20.79	黄熱ウイルス (17D)	—
JaGAr	16.28	Apoi ウイルス	38.21
Nakayama	21.16	クンジンウイルス (K47382)	38.26
SK-14	20.53	クンジンウイルス (OR393)	38.21
Beijin	22.48	デングウイルス 1 型	39.65
Shizuoka33	19.27	デングウイルス 2 型	—
Kagawa24	18.88	デングウイルス 3 型	—
		デングウイルス 4 型	—

图 1

TaqMan Real Time RT-PCR



Minimum Correlation coefficient: >0.98

The determination of the detection threshold: >0.5