

立感染症研究所学友会編)、p. 121-122, 朝倉書店、2004.

## II. 学会発表

1) 小林睦生：ウエストナイルウイルスの伝播と媒介蚊の役割. シンポジウム”ウエストナイルウイルス感染症の疫学”－現状と対策－, 第16回獣疫学会学術集会シンポジウム, 16年4月3日, 藤沢市.

2) Sudipta Roychoudhury, 伊澤晴彦, 澤邊京子, 佐々木年則, 小林睦生：ヤブカ寄生性原虫 *Ascogregarina culicis* のリボゾームDNAおよび熱ショック蛋白質70遺伝子のクローニング. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

3) 森林敦子, 林利彦., 倉橋弘, 小林睦生, 内田桂吉, 杉江元：クロバエ2種の脂質について. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

4) 林利彦, 澤邊京子, 二瓶直子, 栗原毅, 小林睦生：日本産ハマダラカ属3種の卵および蛹の形態比較. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

5) 澤邊京子, 二瓶直子, 高井憲治, 林利彦, 栗原毅, 小林睦生：日本産ハマダラカ属 *hyrcanus* 種群の分類と北海道における分布域の推定. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

6) 斉藤康秀, 服部順子, 茅根士郎, 二瓶直子, 津田良夫, 倉橋弘, 小林睦生：蚊成虫捕獲トラップのための二酸化炭素源：酵母による生物発酵法. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

7) 津田良夫, 倉橋弘, 林利彦, 葛西真治, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤邊京子, 富田隆史, 二瓶直子, 小林睦生：都市域にお

けるドライアイストラップによる蚊類の発生状況調査. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市

8) 倉橋弘, 津田良夫, 林利彦, 葛西真治, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤邊京子, 富田隆史, 二瓶直子, 小林睦生：ドライアイストラップで捕集された都市域の昆虫類. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

9) 小林睦生, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 二瓶直子, 澤邊京子, 津田良夫：北海道能取湖におけるドライアイストラップによる蚊の捕集：設置場所と捕集数に関する考察. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

10) 小林睦生, 二瓶直子, 栗原毅：東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大と関連する要因. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

11) 吉田政弘, 山下敏夫, 小原豊美, 小林睦生：都市域における蚊の発生状況(2003年). 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

12) 富田隆史, 石川剛, 正野俊夫, 津田良夫, 小林睦生, 葛西真治：首都圏を中心としたウエストナイル熱媒介蚊の殺虫剤感受性試験：ピレスロイド剤抵抗性アカイエカ群の確認. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

13) 葛西真治, 石川剛, 李時雨, 正野俊夫, 津田良夫, 小林睦生, 富田隆史：ピレスロイド剤抵抗性アカイエカ群の抵抗性機構について：日本産アカイエカからの *kdr* 遺伝子の初確認. 第56回日本衛生動物学会大会, 16年4月5-7日, 福井市.

14) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 佐々木年則,

Sudipta Roychoudhury, 西海 功, 濱尾章二, 津田良夫, 小林陸生: チトクローム b 遺伝子解析による吸血源動物種の同定. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 16 年 4 月 5-7 日, 福井市.

15) 伊澤晴彦, 澤邊京子, 佐々木年則, 津田良夫, 倉橋 弘, 高崎智彦, 吉田政弘, 渡辺 護, 小林陸生: 本邦野外捕集蚊からのアルボウイルスの分離. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 16 年 4 月 5-7 日, 福井市.

16) 比嘉由紀子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 二瓶直子, 澤邊京子, 津田良夫, 小林陸生: 北海道東部におけるドライアイストラップによる蚊の捕集. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 16 年 10 月 25 日, 川崎市.

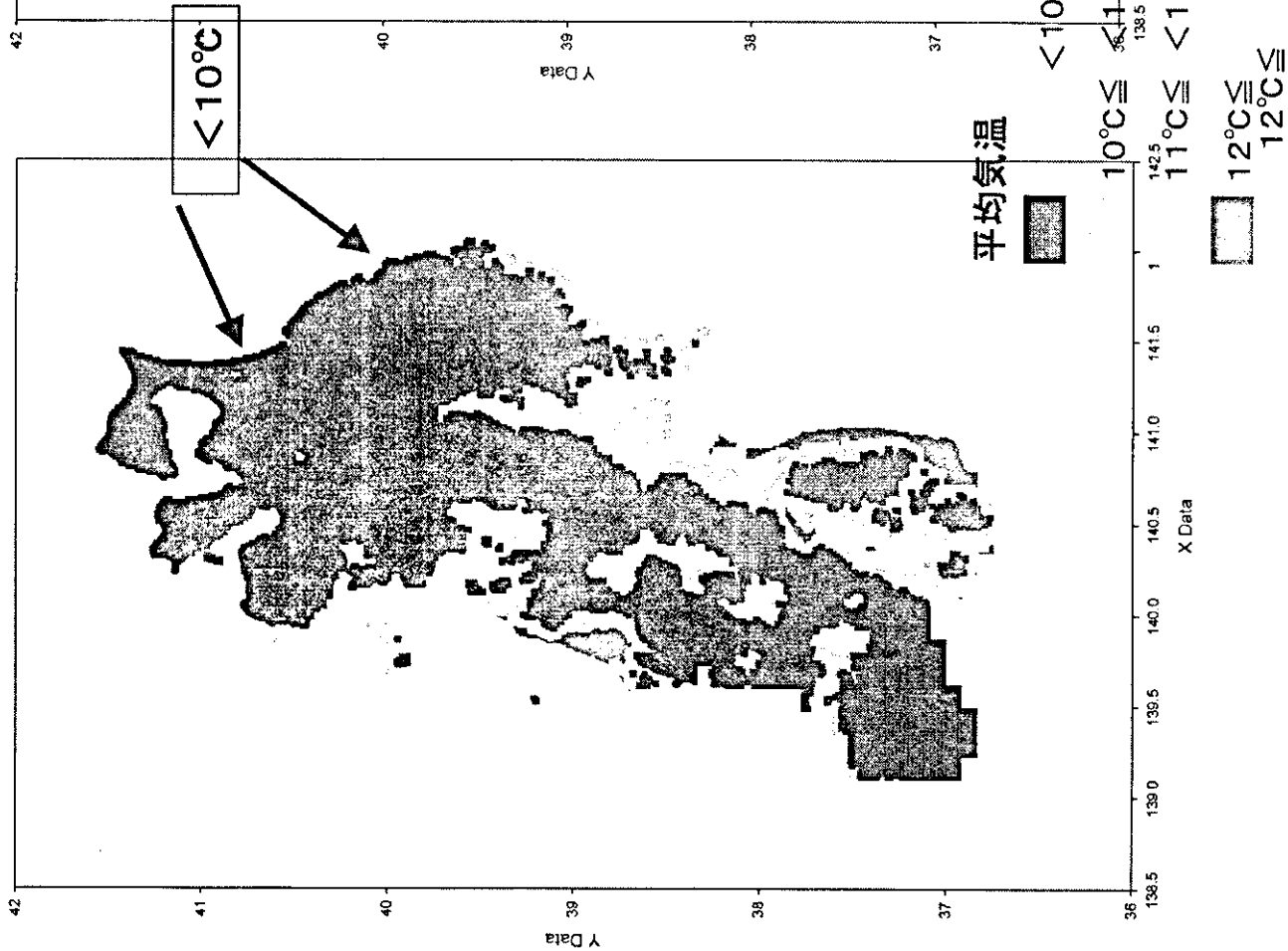
17) 小林陸生, Sudipta Roychoudhury, 比嘉由紀子, 二瓶直子, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤邊京子, 津田良夫: 日本産ヤブカ類幼虫に新たに認められた *Ascogregaria* spp. について.

第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 16 年 10 月 25 日, 川崎市.

18) 葛西真治, 駒形 修, 正野俊夫, 富田隆史, 澤邊京子, 比嘉由紀子, 津田良夫, 小林陸生, 元木 貢, 高橋朋也, 谷川 力, 吉田政弘: 日本産アカイエカとチカイエカの分子生物学的判別法. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 16 年 10 月 25 日, 川崎市.

図 1

2003年の年平均気温の分布



2004年の年平均気温の分布

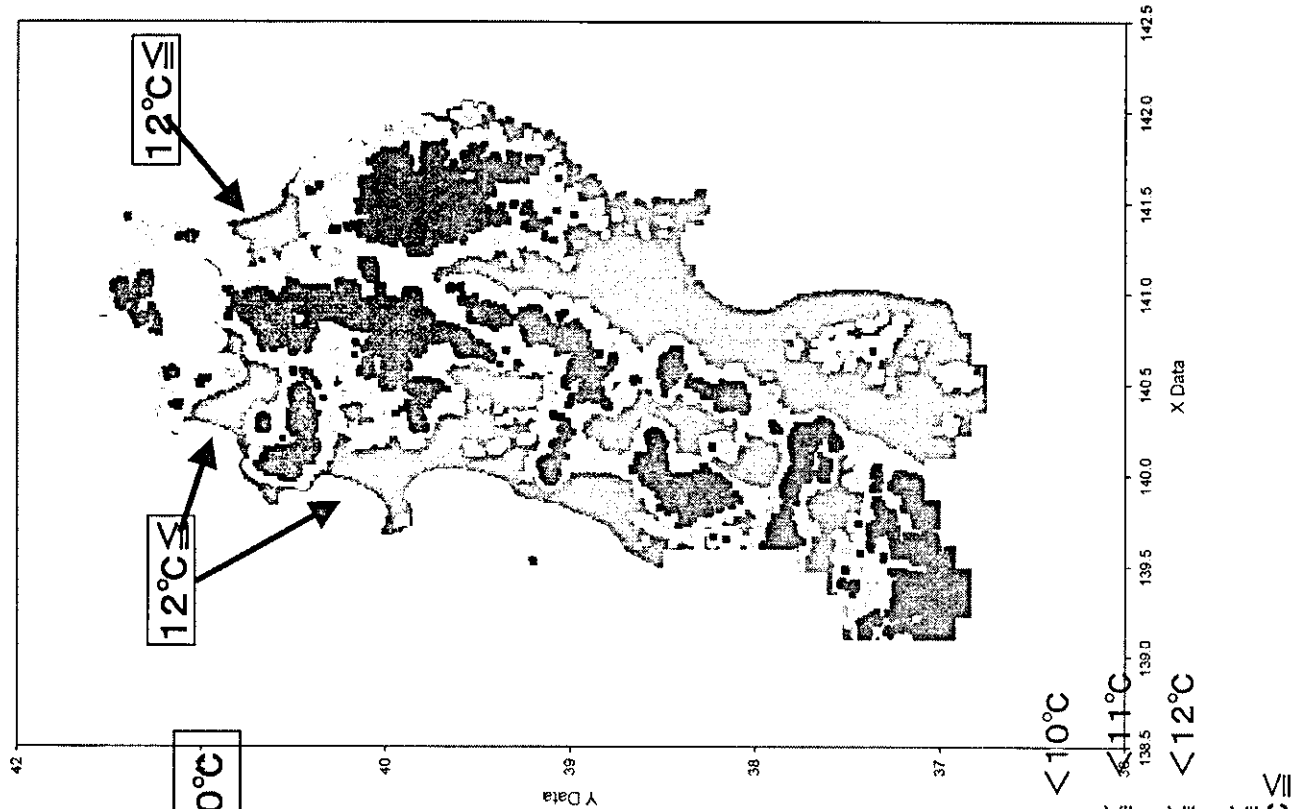


図 2

2004年の11°C以上の有効積算温度とヒトスジシマカの1世代の発育に要する温日度365で算出された世代数

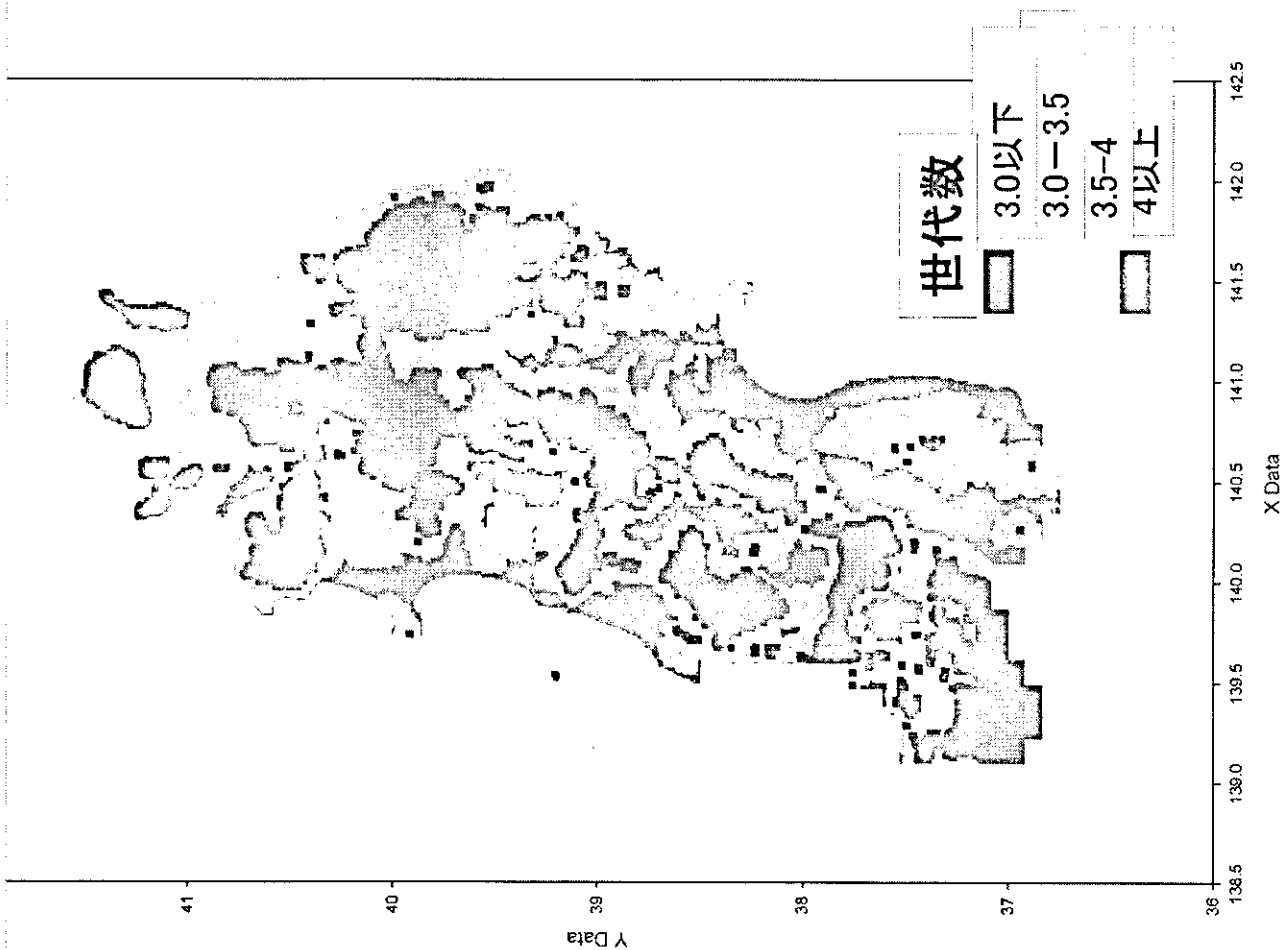
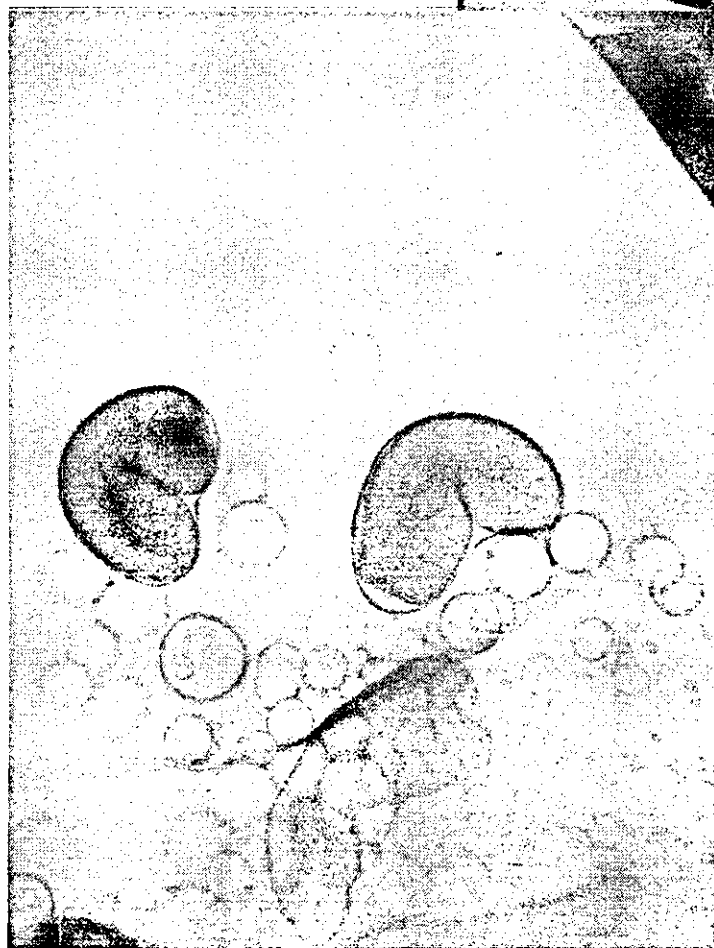


図 3

秋田県八森町で採集されたトウゴウヤブカの幼虫中腸に寄生が見られた*Ascogregarina* sp. 栄養体(若齢)



トウゴウヤブカの幼虫中腸に寄生が見られた*Ascogregarina* sp.



図 4

那覇市内で採集されたオオクロヤブカの幼虫中腸に寄生が見られた*Ascogregarina* sp.の栄養体

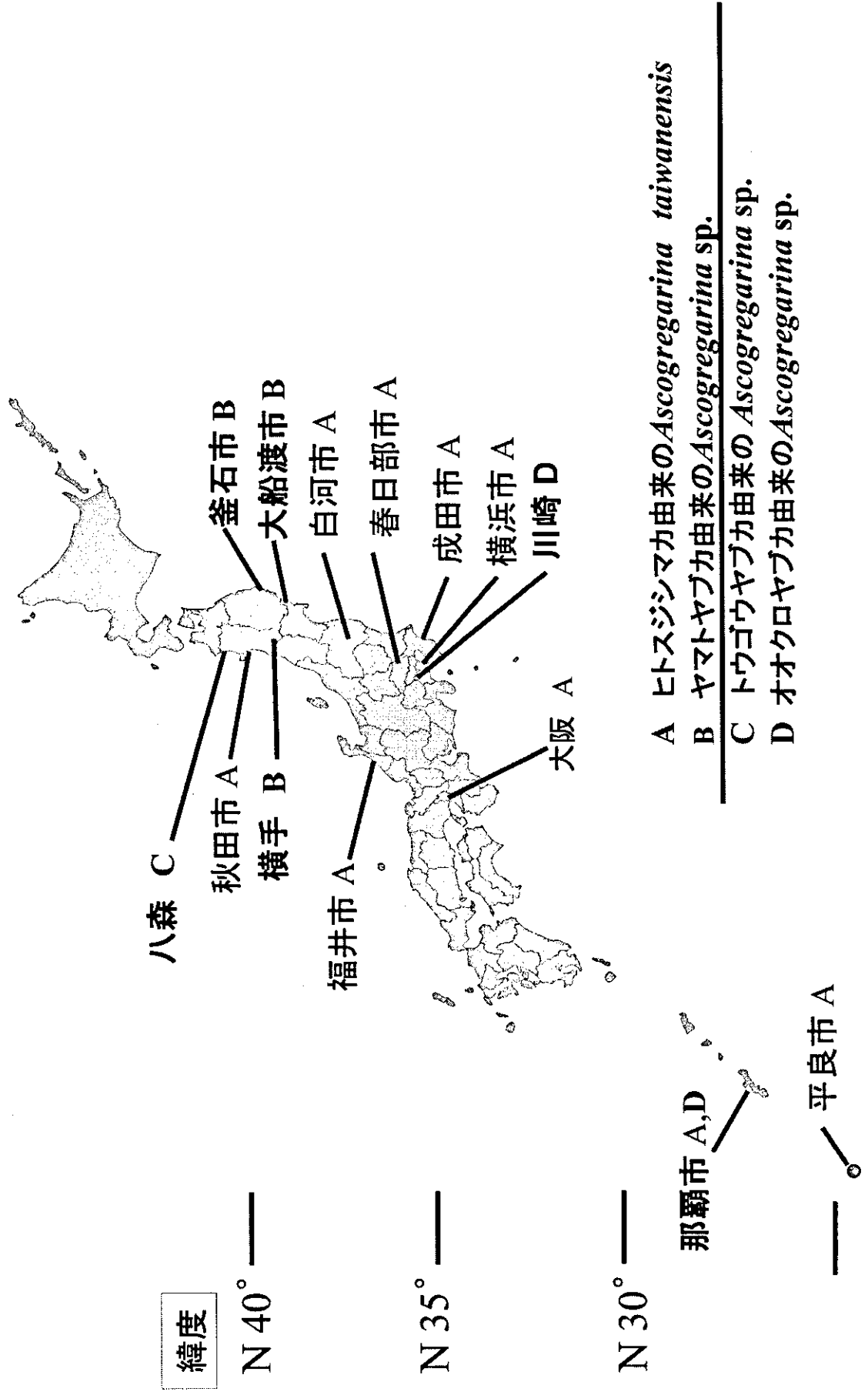


オオクロヤブカの蛹マルピギー管で形成されたgametocysts



図 5

日本における *Ascogregarina* spp. の分布



分担研究報告書

蚊のウエストナイルウイルス媒介試験に用いるマウスの有用性、  
およびイナトミシオカの本ウイルス感受性

分担研究者	江下優樹（大分大学医学部感染分子病態制御講座）
協力研究者	Srisawat Raweevan（大分大学医学部感染分子病態制御講座）
	多森直樹（大分大学医学部感染分子病態制御講座）
	東原絢子（大分大学医学部感染分子病態制御講座）
	安西三郎（大分大学医学部感染分子病態制御講座）
	Hamady Dieng（大分大学医学部感染分子病態制御講座）
	高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）
	宮城洋実（大阪検疫所）
	上田泰史（大阪検疫所）
	田島章太郎（大阪検疫所）
	水田英生（福岡検疫所）
	井村俊郎（神戸検疫所）
	内田幸憲（神戸検疫所）
	高島郁夫（北海道大学大学院獣医学研究科）
	倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究要旨

アルボウイルス感染症のわが国での勃発時における蚊防除対策の一環として、日本に生息する蚊類のウエストナイルウイルス(WNV)感受性を検討している。本報告では、蚊のウイルス媒介試験に用いるマウスの有用性、および日本産イナトミシオカ *Culex modestus inatomii* の WNV 感受性の有無を検討した。WNV 感染アカイエカ *Cx. pipiens pallens* の刺咬後のマウス尾静脈血からの WNV ゲノム検出率は低いように思われたので（2003 年度報告書、H15-新興-17）、マウスの臓器（脳、肝臓、脾臓）中の WNV ゲノムの有無を検討した。その結果、尾静脈血で陰性であったマウスのいずれの臓器からも WNV ゲノムが検出される事がわかった。また、麻痺などの臨床症状が観察されたにも関わらず死亡しなかったマウス臓器からも WNV ゲノムが検出された。これらのことから、蚊のウイルス媒介試験にマウスを用いる際にはマウス臓器中のウイルスゲノムの調べる必要があると思われた。次に、大阪港湾区域で発生していたイナトミシオカの WNV 感受性を検討した。WNV ニューヨーク株の胸部接種および経口感染で満腹吸液した蚊では、腹、胸、脚、頭部いずれからもウイルスゲノムが RT-PCR で検出された。また、経口感染で少量吸液した蚊では、腹部感染率は 0%（0 個体/3 個体）、胸部は 100%（3/3）、脚部は 33.3%（1/3）、また頭部のそれは 66.7%（2/3）であった。これらの結果から、唾液腺が位置する胸部の感染が認められたことからウイルスを媒介する可能性がイナトミシオカで示唆された。ちな



みに、経口感染蚊の腹部感染率が胸部のそれより低かった要因については明らかでないが、蚊腹部が陰性でしかも胸部からウイルスゲノムが検出された個体はいずれも少量吸血蚊であった。蚊の感染動態の詳細は、今後予定しているウイルス媒介試験とともに検討予定である。

## A. 研究目的

ウエストナイル熱は、アフリカ、アジア、ヨーロッパに常在するウエストナイルウイルス (WNV) 感染蚊の人刺咬・吸血によって起こるアルボウイルス性疾患である。近年、北アメリカのカリフォルニア州で本症勃発以来、わが国への侵入が危惧されている。わが国における WNV の主要媒介蚊と目されるアカイエカ群 (*Culex pipiens complex*) のうち、アカイエカ *Cx. p. pallens*、チカイエカ *Cx. p. molestus*、およびブリッジベクターと推定されるヤブカ属ヒトスジシマカ群のヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、WNV ナイジェリア株に感受性を示し、アカイエカはウイルスを媒介することを報告してきた。今回は、蚊の媒介試験を実施する際のマウスの有用性を再評価することを目的として、マウス臓器内でのウイルスゲノムの有無を調べた。また、日本産のイナトミシオカ *Culex modestus inatomii* の WNV 感受性を検討した。

## B. 研究方法

### B. 1. 蚊の媒介試験を実施する際のマウスの有用性の評価試験(実験1)

マウスの有用性を調べるために、WNV ナイジェリア株に感染したアカイエカにマウス吸血の機会を与えて、マウス臓器内のウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で検討し (詳細は平成 16 年度本研究報告を参照)。

ウイルス: 国立感染症研究所から分与された WNV のナイジェリア株 ( $2-3 \times 10^7$  pfu/ml)。

供試蚊: 感染実験に用いたアカイエカは、大阪市内の道路側溝で採集された後、キンチョウ

研究所で継代中のものの分与を受けて、実験に供した。

供試マウス: 媒介試験には、苦痛を緩和するために麻酔した BALB/c マウスの雌を使用した。なお、本実験を行うに際して、大分大学医学部実験動物委員会の承認を得た。

蚊の飼育: 25°C、日長 14 時間の飼育室内で蚊の飼育を行った。幼虫の餌として、エビオスと粉碎したマウス固形飼料を等量ずつ混合したものを乳ばち内で水を加えて液状にして幼虫に与えた。幼虫の密度は 7 平方 cm あたり幼虫 1 個体と低密度にして、ホーロー製容器を使って飼育した。羽化成虫には 4% の砂糖水を与えて飼育を行い、羽化 5 日~6 日後に実験に供した。

ウイルス感染蚊の作製: 蚊胸部接種感染では、約 0.2ul ( $4-6 \times 10^3$  pfu/0.2ul) の WNV 液を、羽化 5-6 日後のアカイエカ雌成虫の胸部側板内に接種した。感染蚊は、3 重の飼育容器内に密封して 28°C で 14 日間飼育を行った。ウイルス媒介試験に供試蚊を用いた後、-20°C で飼育容器を 30 分程保管して蚊を生殺した。後日、ウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で確認するまで -80°C に保存した。

ウイルス媒介試験の手順: WNV 感染後 14 日経過した雌蚊の入った飼育容器のメッシュカバーを介して麻酔したマウスから吸血の機会を約 1 時間蚊に与えた。その間、吸血した蚊の数をマウス毎に記録した。マウスは 2 週間観察を行い、異常な症状の認められたマウスは、適量の麻酔下で臓器 (脳、肝臓、脾臓) の摘出を行い、-80°C に保管した。

マウス臓器からの総 RNA 精製: マウス臓器

(脳、肝臓、脾臓) から総 RNA を抽出するために、Trizol-LS (Gibco BRL 社製) および RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) を使用した。抽出手順は会社の説明書に従った。抽出した総 RNA ペレットは 50ul の RNase inhibitor を含む蒸留水に溶解した後、実験に使用するまで -80°C に保存した。

RT-PCR 法 : RT-PCR 法の手法を簡便化するために、one step RT-PCR 法 (One Step RT-PCR system with Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen 社) を用いて、マウス臓器からの WNV ゲノム検出を行った。ちなみに、ウエストナイルウイルスに特異的プライマー、WN-S3 : 5' CAC AGC GGG CTT TAC TAT CT 3' および、WN-C3 : 5' CAT TTC CAG CAG CTA GGA CC 3' (Castle *et al.*, 1985 ; Wengler *et al.*, 1985) を用いて、229bp の PCR 産物の有無を調べた。RT-PCR の反応条件として、RT 反応 : 53°C 30 分、PCR 反応 : (1 回) 94°C 1 分, (35 回) 94°C 30 秒, 53°C 30 秒, 68°C 1 分, (1 回) 68°C 2 分を設定して、MJ Research 社の PCR 増幅装置を使用した。さらに、PCR 産物の有無は 1.5% アガロースゲルで泳動して特異的な PCR 産物の大きさを確認した。

## B. 2. イナトミシオカに対するウエストナイルウイルスの感受性試験(実験 2)

3 組の WNV プライマーセットの比較および、感染蚊の腹、胸、脚、頭部組織から精製した総 RNA 中のウイルスゲノムの有無を検討した。

ウイルス : ウエストナイルウイルスのニューヨーク株 NY99-6922, MosqVISM2 ( $3 \times 10^6$  pfu/ml) を用いた。ウイルスに感染した C6/36 蚊培養細胞の上澄み液からストックウイルスを準備して、実験に供した。

供試蚊 : 感染実験に用いたイナトミシオカは、大阪港湾区域で採集後、実験室内で 2 世代飼育した個体群を用いた。

蚊の飼育 : 25°C、日長 14 時間の飼育室内で蚊の飼育を行った。幼虫の餌として、エビオスと粉碎したマウス固形飼料を等量ずつ混合したものを、乳ばち内で水を加えて液状にして用いた。幼虫の密度は 7 平方 cm あたり幼虫 1 個体と低密度にして、ホーロー製容器を使って飼育した。羽化成虫には 4% 砂糖水を与えて飼育を行い、羽化 5 日 - 6 日後に実験に供した。

ウイルス感染蚊の作製 : イナトミシオカ成虫の胸部接種感染 ( $6 \times 10^2$  pfu/0.2ul) では、約 0.2ul ( $3 \times 10^6$  pfu/ml) の WNV 液を、羽化 5-6 日後の雌成虫の胸部側板内に接種した。また、経口感染 ( $3 \times 10^3$  pfu/1ul) では、PBS で 3 回洗ったヒト赤血球 (遠心後、上澄みを除いた packed red blood cell) にほぼ等量のウイルス液を加え、最終濃度 4% の蔗糖を加えた。ちなみに十分に吸液した際のウイルス液を 2ul とすると、取込んだウイルス量は  $4-6 \times 10^4$  pfu/2ul となる。感染蚊は、3 重の飼育容器内に密封して 28°C で 10 日間飼育を行った。その後、-20°C で飼育容器を 30 分程保管して蚊を生殺した。後日、実験に用いるまで -80°C に保存した。

感染蚊からの総 RNA 抽出 : RNeasy Mini Kit (RNeasy Mini Kit, キアゲン社製, Cat. #74103) を用いて総 RNA を抽出・精製した。手順はキアゲン社の説明書に従った。その最終段階では、RNase inhibitor (RNase out, インビトロジェン社製) を含む 50 ul の RNase free の蒸留水をカラムに加えて溶出した後、実験に使用するまで -80°C に保存した。

RT-PCR 法 : RT-PCR 法の手法を簡便化するために、one step RT-PCR 法 (One Step RT-PCR system with Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen company) を用いて、蚊からの WNV ゲノムの検出を行った。RT-PCR の反応条件として、RT 反応 : 53°C 30 分、PCR 反応 : (1 回) 94°C 1 分, (35 回) 94°C 30 秒, 53AR TGD GCY

TCR TCC AT (THE LANCET 354:1261-1262)を使用した。また、E 領域を増幅するプライマー2として、WNNY514V-E (5'-3'): CGG CGC CTT CAT ACA CA、および WNNY904-E (5'-3'): GCC TTT GAA CAG ACG CCA TA (高崎智彦博士、開発作製)を、また、E 領域を増幅するプライマー3として、WNNY514V2-E (5'-3'): CGG CGC CTT CAT ACA CW、および WNNY904-E (5'-3'): GCC TTT GAA CAG ACG CCA TA (高崎智彦博士、開発作製)を使用して、511 bp の特異的 PCR 産物を得た。

(倫理面への配慮) ウエストナイルウイルスは、国立感染症研究所および北海道大学獣医学部から大分医科大学 (現 大分大学医学部) に分与されたものである。また、大分医科大学 (現 大分大学) 医学部附属動物実験施設内での蚊の飼育および媒介実験に関連して、大分医科大学 (現 大分大学) 医学部動物実験委員会からの承認を得た。

## C. 研究結果

### C. 1 蚊の媒介試験を実施する際のマウスの有用性の評価試験

胸部注射したアカイエカに吸血されたマウスの発症とマウス臓器からの WNV ゲノムの検出: 複数の感染蚊の入った飼育容器の上部蓋のネットの上にマウス2個体を1時間載せて、蚊の吸血の有無を観察した。飼育容器 No. 030604.1 では、それぞれのマウスに4個体のアカイエカが吸血をプロービングが観察された。飼育容器 No. 030604.2 では、1個体のマウスに3個体あるいは1個体の感染蚊が吸血あるいはプロービングを行っていることが観察された。また、飼育容器 No. 030604.3 では、プロービングを1個体の蚊がマウスに行っていた (詳細は、平成15年度報告書 H15-新興-17を参照)。

吸血10日後までマウスを観察したところ、3、

7、10 日後に麻痺用の症状が出た。それらマウスの尾静脈から採血して、ウイルスゲノムの有無を RT-PCR で検討したところ、マウス3個体中の1個体で極めて薄いバンドが検出された。その薄いバンドの塩基配列の結果から、WNV ゲノム由来であることを既に報告した (詳細は、平成15年度報告書 H15-新興-17を参照)。

マウス臓器からの本ウイルスゲノムの検出: マウスの脳、肝臓、脾臓中のウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で調べた。その結果、いずれの部位からも WNV ゲノムが明瞭なバンドとして検出された。蚊の胸部にウイルスが感染していたことから唾腺の感染が強く示唆された (図1)。

### C. 2 ウエストナイルウイルスのニューヨーク株に対するイナトミシオカの感受性試験

胸部接種法および経口感染蚊の腹部の総 RNA 中のウイルスゲノムの有無を、3種類のプライマーセットで比較した。その結果、RT-PCR 法でプライマー2を用いた際に、最も強い PCR 産物が得られた (図2)。そこで、今後の試験にはプライマー2を用いて検討を行うことにした。

胸部接種法で感染したイナトミシオカ雌成虫体内のウイルスゲノム: 28°C 温度で10日間飼育したイナトミシオカでは、いずれの3個体から特異的 PCR 産物が認められた (図2)。胸部接種感染蚊3個体の各組織でのウイルスゲノム検出率は、腹部では100% (3個体/3個体)、胸部は100% (3/3)、脚部は66.7% (2/3)、また頭部は33.3% (1/3)であった (図3、図4)。

経口感染したイナトミシオカ雌成虫体内のウイルスゲノム: 28°C で10日間飼育した経口感染イナトミシオカでは、いずれの4個体から特異的 PCR 産物が認められた (図2)。WNV ニューヨーク株の経口満腹吸血した感染蚊1個

体では、腹、胸、脚、頭部いずれからもウイルスゲノムが RT-PCR で検出された (図2と図3のレーン7)。しかし、経口で少量吸液した蚊では、腹部感染率は 0% (0 個体/3 個体)、胸部は 100% (3/3)、脚部は 33.3% (1/3)、また頭部のそれは 66.7% (2/3) であった (図2, 図3)。

#### D. 考察

ウエストナイルウイルスに感受性を持つ日本産アカイエカ、チカイエカおよびヒトスジシマカのうち、アカイエカ雌成虫が WNV をマウスに媒介することは、前報 (平成 15 年度報告書、H15-新興-17) で明らかとなっている。しかし、前回の媒介試験では、症状を示しながら血中のウイルスゲノムが証明されたかったマウス個体が観察されたことから、蚊の媒介試験にマウスが適していないように考えられた。しかしながら、マウス臓器中のウイルスゲノムを調べた結果、血中からウイルスゲノムが検出できなかったマウス 2 個体の臓器 (脳、肝臓、脾臓) からもウイルスゲノムが検出された。ウイルス血症を示さないマウスでも臓器にはウイルス粒子あるいはそれ由来のウイルス RNA が存在することが示唆された。蚊のウイルス媒介試験にマウスを利用して尾静脈血中のウイルスゲノム陰性の場合、臓器検査を行うことが重要である。これによって、蚊のウイルス媒介の有無を明らかにすることが可能と思われる。

わが国の汽水域に生息するイナトミシオカが WNV に対して感受性を持つことが初めて明らかとなった。イナトミシオカの胸部接種蚊では、3 個体いずれも感染が成立しており、各組織別では、胸部と腹部の感染率が 100% (3/3 個体)、脚 66.7% (2/3) と頭部 33.3% (1/3) の順で感染が成立していた。一方、経口感染蚊では、100% (4/4) の蚊個体からウイルスゲノムが検出され、アカイエカやヒトスジシマカの

それらよりも高い経口感染率を示すように思われた。また、ウイルス液を含む血液を少量吸液した経口感染蚊 4 個体中の 3 個体は、胸部感染率が 100% (3/3 個体) であったにも関わらず、その腹部感染率が 0% (0/3 個体) であった。この要因として、(1) ウイルスを含む液には血液および 4% の蔗糖を加えているので、蚊の背側食道憩室 (dorsal diverticulum: DD) に一部液が侵入して胸部から感染が広がった、(2) RT-PCR 反応に際して PCR 反応の阻害が起こり蚊腹部のウイルスゲノム増幅が起こらなかった、(3) 吸液量が少量であったことなどが想定されるが詳細は不明である。蚊の感染動態の詳細は、今後予定しているウイルス媒介試験とともに検討予定である。

#### E. 結論

(1) ウエストナイルウイルスの蚊媒介試験にマウスを用いる際は、マウスの臓器 (脳、肝臓、脾臓) からのウイルスゲノム検出が重要であり、高い媒介効率を得ることが示唆された。

WNV 感染アカイエカのマウス刺咬による、マウス臓器内の WNV ゲノムの有無を RT-PCR 法で検討した。感染蚊に刺されたマウス 3 個体の脳、肝臓、脾臓から尾静脈血よりも高い率で WNV ゲノムが検出された。ウイルス血症の程度はマウスでは低いが、マウス臓器組織内のウイルスゲノムは高感度に検出されることが示唆された。感染蚊の WNV ウイルス媒介試験の際に、マウスは有用な実験動物として利用可能と思われる。

(2) 日本産のイナトミシオカが WNV 感受性であることが初めて明らかとなった。

WNV を胸部接種あるいは経口感染したイナトミシオカは、28°C で 10 日後に、いずれの個体からもウイルスゲノムが RT-PCR で検出された。イナトミシオカの経口感染率が少なくともアカイエカと同等と思われた。また、WNV ニューヨーク株はナイジェリア株よりも日本の蚊に

に対する感染性が強いことが示唆された。イナトミシオカは、他のアカイエカ群の蚊種と同様にウイルス媒介能を有すると推定される。

#### F. 健康危険管理情報

わが国の汽水域で発生するイナトミシオカにウエストナイルウイルス感受性がある

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Ushijima, H., and Eshita, Y. (2004): Molecular epidemiology of viral infection in Asia. *Pediatrics International*, 46(2):202-206.

(2) Anzai, S., Fukuda, M., Otsuka, Y., and Eshita, Y. (2004): Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of dengue type 2 virus isolated in the Dominican Republic. *Virus genes*, 29(2): 219-227.

(3) 江下優樹、高崎智彦、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎(2004): ウエストナイルウイルスとその媒介蚊。九州実験動物雑誌、(20): 31-39.

(4) 江下優樹、牛島廣治 (2004): 日本脳炎以外のアルボウイルス感染防止-とくにウエストナイル熱およびデング熱-。特大号 ワクチンのすべて。小児科診療 67(11):154-160.

(5) Makino, Y., Shichijo, A., Bello, C., Eshita, Y., Disla, M., Cesin, A. J., Galcia, B., Lora, M., Valdez, S., Aquino, J. D., Aono, H., Ma, S-P., and Takeshita, M. (2004): Seroepidemiology of dengue and assessment of public awareness in the Dominican Republic. *Trop. Med. Health*, 32(4):

305-309.

##### 2. 学会発表

江下優樹 (2004): 蚊媒介性疾患としてのアルボウイルス症。第28回日本熱帯医学会九州支部大会。2004年1月31日(土)-2月1日(日)。大分大学医学部看護学科棟、大分。

江下優樹、Srisawat Raweevan、安西三郎、多森直樹、Narumon Komalamisra、Somjai Leemingsawat、Yupha Rongsriyam、牛島廣治 (2004): タイ国のデング熱流行地域で採集した媒介蚊からのデングウイルスゲノム検出。第19回日本国際保健医療学会東日本地方会。2004年2月28日(土曜日)。東京大学医学部図書館、東京。

江下優樹、Srisawat Raweevan、多森直樹、安西三郎、高崎智彦、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎(2004): 蚊類のアルボウイルス媒介能 (8) 日本産 *Aedes flavopictus miyarai* と *Aedes galloisi* のデングウイルス感受性。第56回日本衛生動物学会大会。2004年4月5、6、7日、福井県国際交流会館、*Med. Entomol. Zool.*, 55 (大会特集号): 56, 2004.

水谷哲也、江下優樹、赤穂芳彦、三好洋嗣、荻和宏明、高島郁夫 (2004): C6/36 細胞 (ヒトスジシマカ由来) の JNK の活性化はアポトーシスを抑制する。第56回日本衛生動物学会大会。2004年4月5、6、7日、福井県国際交流会館、*Med. Entomol. Zool.*, 55 (大会特集号): 56, 2004.

Tang, O. Wei-feng, Eshita, Y., Tadano, M., Morita, K. and Makino Y. (2004): Molecular basis for adaptation of a dengue type-4/Japanese encephalitis chimeric virus

to vero cells. ウイルス学会九州支部総会。第 41 回日本ウイルス学会九州支部総会、平成 16 年 9 月 3 日 (金) ~4 日 (土)、福岡県歯科医師会館。

江下優樹、安西三郎、多森直樹、東原絢子、Hamady Dieng、Srisawat Raweevan、Narumon Komalamisra、Somjai Leemingsawat、Yupha Rongsriyam、牛島廣治 (2004) : タイ国デング熱流行地でのウイルス保有蚊調査。第 57 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 54 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2004 年 10 月 22-23 日、北九州市、産業医科大学、Med. Entomol. Zool., 56 : 2005。

Hamady Dieng, Naoki Tamori, Junko Higashihara, Saburo Anzai and Yuki Eshita (2004) : Study of midgut protein profiles in *Aedes albopictus* with reference to some ecological and physiological attributes. 第 57 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 54 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2004 年 10 月 22-23 日、北九州市、産業医科大学、Med. Entomol. Zool., 56 : 2005。

長野佑基、佐藤朝光、水谷哲也、江下優樹、宮田 健、鹿志毛信広、見明史雄 (2004) : *Aedes* 属一齢幼虫に対する c-Jun N-terminal kinase の脱皮阻害効果。第 57 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 54 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2004 年 10 月 22-23 日、北九州市、産業医科大学、Med. Entomol. Zool., 56 : 2005。

多森直樹、安西三郎、東原絢子、Hamady Dieng、江下優樹 (2004) : ヒトスジシマカ卵を用いたトランスポゾン注入法の確立、及び孵化幼虫の GFP 蛍光観察。第 57 回日本寄生虫学会南日本

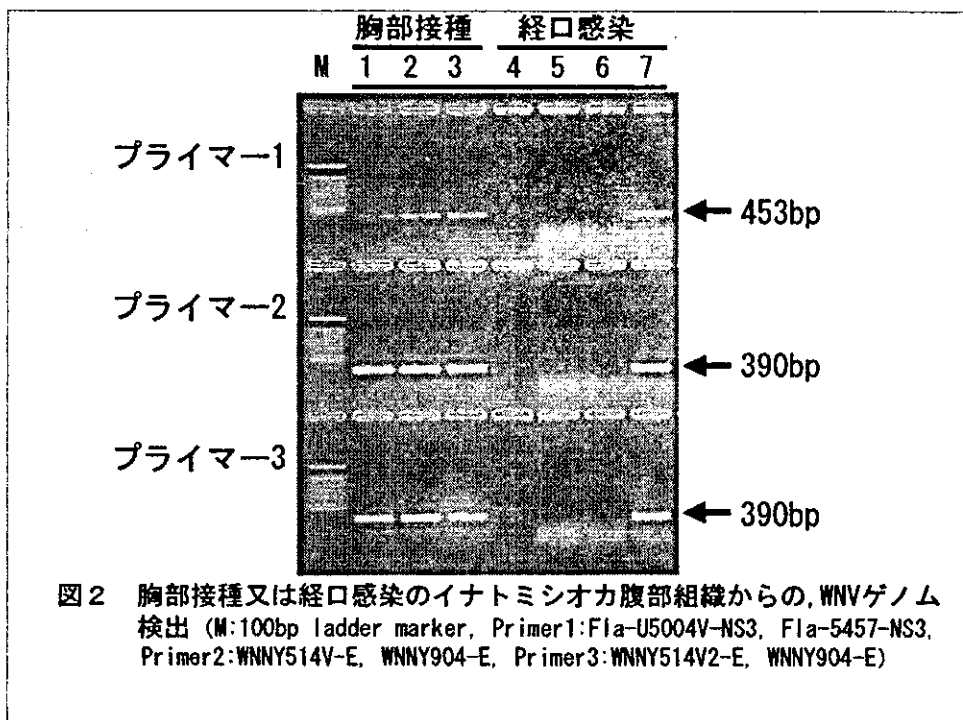
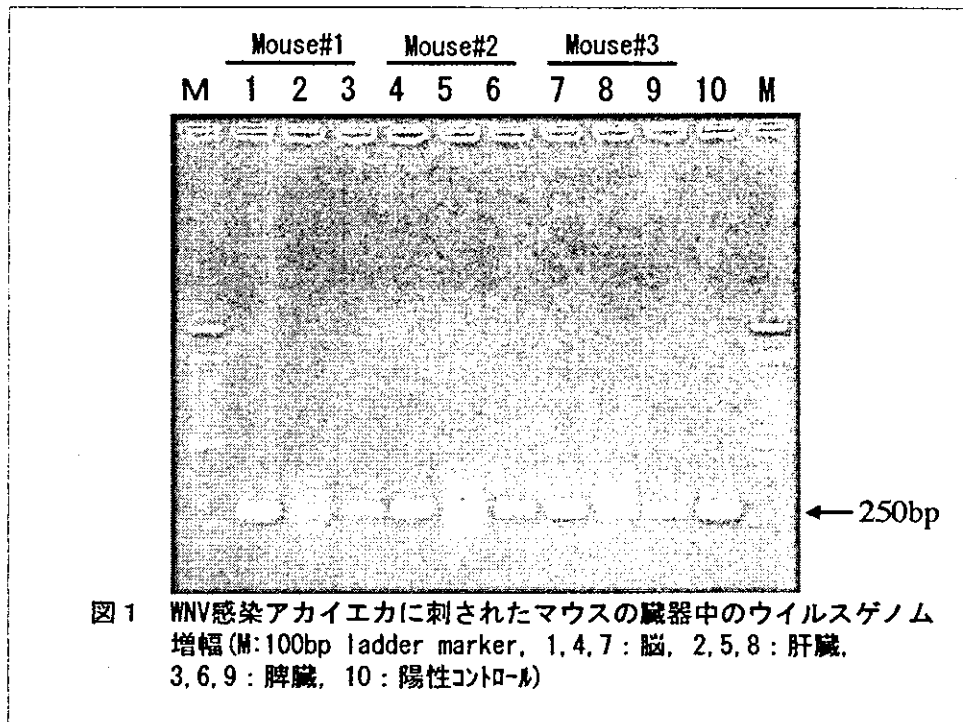
支部大会・第 54 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2004 年 10 月 22-23 日、北九州市、産業医科大学、Med. Entomol. Zool., 56 : 2005。

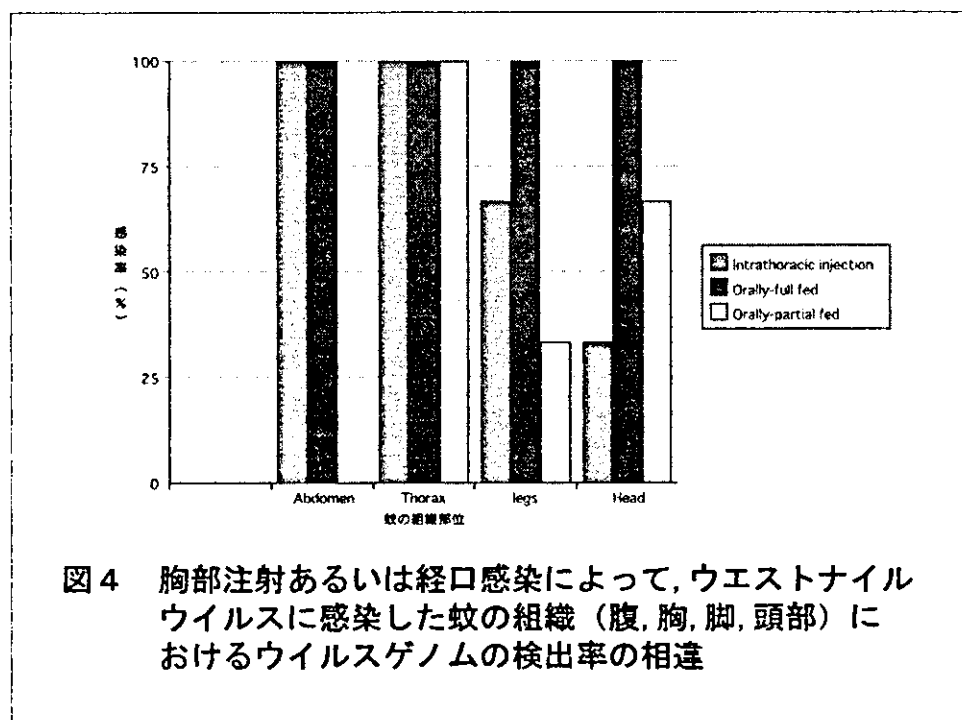
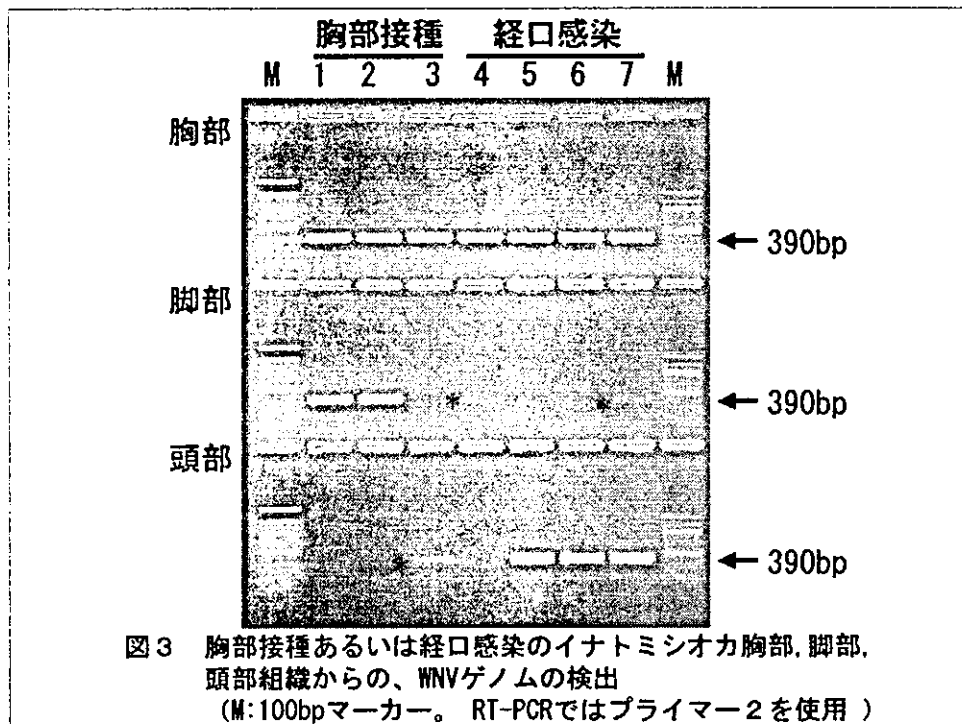
江下優樹 (2004) : 再興感染症としてのデング熱とマラリア : 特にそれら媒介蚊について。第 36 回日本小児感染症学会、第 20 回 ICD (Infectious Control Doctor) 講習会 (国際感染症と病院対策)。2004 年 11 月 12-13 日、16 : 00-18 : 00, 東京、都市センターホテル、会場コスモス、日本小児感染症学会プログラム・抄録集, 89, 2004。

Eshita, Y., Takasaki, T., Imura, S., Uchida, Y., Takashima, I., Kurane, I. (2004) : Diagnostics on dengue and West Nile viruses in mosquitoes. *In*: Vector-borne infectious diseases and control. Joint symposium on parasitic panel and viral disease panel, Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program, 日米医学協力計画 40 周年記念国際会議、第 39 回日米医学協力寄生虫疾患専門部会日米合同会議、08 : 40-09 : 10, December 7-10, 2004. 京都、国立京都国際会館、京都国際会議場、Program & Abstract 日米抄録集, 35(SY6-02), 2004。

#### H. 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・再興感染症事業）

分担研究報告書

サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

協力研究者 伊藤美佳子（国立感染症研究所ウイルス第一部）

向井鏖三郎（国立感染症研究所つくば霊長類センター）

研究要旨

デングウイルスには血清型 1-4 の 4 つの型が存在する。ヒトにおいてはデング熱・デング出血熱を起すウイルスであり、初感染とは異なる血清型のウイルスによる感染増強が確認されている。感染増強のメカニズムを解明するために、サルにおけるデングウイルス感染モデルを用いて、デングウイルス中和抗体および感染増強抗体の出現を検討した。サルにデングウイルスを感染後、血清を経時的に採取し、ウイルス血症、血清型特異的中和抗体価および交叉性中和抗体価を明らかにし、さらに、感染増強抗体の出現を解析した。交叉中和抗体価および型特異中和抗体価ともに感染後 46 週目まで増加したが、その後減少した。デングウイルス感染において、未希釈血清を使用した場合、交叉性抗体による感染増強は感染後 2、46、50、54、58 週目の血清を用いた場合確認されたが、型特異抗体ではいずれの場合も確認されなかった。デングウイルス感染前血清を用いた場合や、血清を含まない場合には感染増強は認められなかった。従って、ヒト体内において、デングウイルス再感染時の感染増強がより発生しやすいのは、初期感染時の中和抗体が残存し、再感染時のウイルスの血清型が初感染時とは異なる場合であることが示唆された。

A. 研究目的

蚊によって媒介されるフラビウイルスであるデングウイルス、西ナイルウイルス、黄熱、日本脳炎ウイルス等はヒトに感染して重篤な感染症を引き起こす。特にデングウイルスは患者数、世界的な分布、重篤度数から最も重要なものと言える。デングウイルスには4つの血清型が存在する。デングウイルスに対する防御免

疫は終生持続するが、他の型に対しては短期間持続するのみである。デングウイルスに感染した場合、典型的な症状を示す場合一過性の熱性疾患であるデング熱、致死的疾患であるデング出血熱という2つの異なる病態を示す。デング出血熱の病態がなぜおこるかは、現在でもデングウイルス感染症研究の最も大きなテーマといえる。デング出血熱の病態機序は生

体の免疫反応によるとするもの、デングウイルス自体の病毒性の違いによるとするものの2通りが考えられている。初感染とは異なる血清型のデングウイルスによる感染増強が確認されている。そこで、生体の免疫状況がどのように感染増強に関わるかについて現状では唯一の動物モデルであるサルにおけるデングウイルス感染によるデングウイルス中和抗体および感染増強抗体の出現を検討した。

## B. 研究方法

カニクイザル各2頭にデングウイルス1型（デング熱分離株）および2型（デング出血熱分離株）を、さらに1頭は非感染細胞上清を接種する。感染後、血清を経時的に採取し、

- ①ウイルス血症の推移を plaque titration およびリアルタイム RT-PCR で観察し、
- ②同時に発熱等の臨床症状、血小板減少の有無を調べる
- ③血清型特異的中和抗体価および交叉性中和抗体価を中和試験により、IgM 抗体価を ELISA 法により測定した。
- ④次に中和抗体および感染増強抗体の出現を解析するために、50ul ( $4 \times 10^5$  PFU) のデングウイルスを10倍階段希釈した交叉性中和抗体または型特異的中和抗体 (1:1) により1時間4℃で処理した後、U937細胞を50ul 加え、2時間37℃で感染 (MOI=4) させた。24時間および48時間後に IFA によりデングウイルス感染細胞を観察した。

## C. 研究結果

ウイルス血症は感染後3日目まで認められた (Table 1)。IgM 抗体は感染後2週間目をピークに減少し続け、12週目まで持続した (Fig.1)。中和試験による交叉中和抗体価は感染後46週目まで、増加したが、その後減少した。また、型特異的中和抗体価についても感染後46週目まで上昇したが、その後減少した。U937細胞を用いたデングウイルス感染において、交叉性抗体による感染増強は1:30倍希釈で、型特異抗体は1:300倍希釈で最大値を示した。未希釈血清を

使用した場合、交叉性抗体による感染増強は感染後2、46、50、54、58週目の血清を用いた場合確認されたが、型特異抗体ではいずれの場合も確認されなかった。デングウイルス感染前血清を用いた場合や、血清を含まない場合には感染増強は認められなかった。

## D. 考察

感染後46週目以降の血清を用いた場合のみ未希釈交叉性抗体による感染増強が確認されたことから、初感染とは異なる血清型のウイルスは同型よりも再感染時に感染増強が発生しやすいことが示唆された。このことから、ヒト体内において、デングウイルス再感染時の感染増強がより発生しやすいのは、初期感染時の中和抗体が残存し、再感染時のウイルスの血清型が初感染時とは異なる場合であることが考えられた。感染後2週目に感染増強が確認されたのは IgM 抗体が関わっている可能性が示唆された。

## E. 結語

現在、デングウイルスに対する有効な実験小動物モデルは確立されておらず、多くの研究者はデングウイルスによるマウスの脳炎をモデルとして用いている。しかし、ヒトのデングウイルス感染による病態はデング熱・出血熱である。ヒトのモデルにより近い霊長類を用いて、感染増強のメカニズムを解明することは、デングウイルス感染による病態解明に有用な基礎データを得るために重要である。

また、デングウイルスに対する実用化されているワクチンはなく、現在臨床試験段階である。初感染とは異なる血清型のウイルス再感染時における感染増強の発生が本実験により明らかとされたことから、ワクチン接種後のデングウイルス感染時においても感染増強が発生する場合を想定する必要がある。今後、ウイルス抗体による感染増強を考慮したワクチンの防御効果を慎重に検討することが望まれる。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ernawati Dewi Beti, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J. Virological Methods*. 121: 171-180. 2004

Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Reiko Nerome, Shigeru Tajima and Ichiro Kurane. Development and Evaluation of Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan RT-PCR) Assays for Dengue Virus Types 1-4. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5935-5937, 2004

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Mikako Ito, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka. Detection of Dengue Virus Serotype-specific IgM by IgM capture ELISA in the presence of sodium thiocyanate (NaSCN). *Dengue Bulletin WHO* 2004.

Kunishige M, Mitsui T, Leong HN, Takasaki T, Kurane I, Mihara A, Matsumoto T. Preferential gray matter involvement in dengue myelitis. *Neurology* 63(10):1980-1981.2004

Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Shigeo Matsuno, Mikio Nakayama, Ichiro Kurane. Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332:38-44, 2005

田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美、村田以和夫、諸角 聖、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎。 Dengueウイルス初感染例における中和抗体測定による血清型判定が可能な病日期間の検討。 *臨床とウイルス*。 32(1). 30-35, 2004

2. 学会発表

Ito, M., Takasaki, T., Mukai, R., Nerome, R., Tajima, S., Ernawatewi, B. and Kurane, I. (2004): Augmentation of dengue virus infection by heterotypic anti-dengue virus monkey serum. Asian Dengue Network Meeting at Bangkok, Thailand. October 2004.

Tomohiko Takasaki. Newly developed method for dengue diagnosis. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

Mika Shigematsu, Tomohiko Takasaki, Kazuyo Yamashita, Mikio Kimura, Nobuhiko Okabe. Imported dengue fever cases in Japan. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

K. Kishiro, Y Kurosawa, A Yamamoto, M Nakayama, T Ogawa, S Inoue, T Takasaki, R R Matias, F Filipinas Natividad, K Morita, I Kurane. Detection of anti-dengue virus IgM by a particle agglutination assay system using hydroxyapatite-coated nylon beads. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

伊藤美佳子、高崎智彦、向井 三郎、倉根一郎。 サルにおける Dengueウイルス感染増強抗体の解析。 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

田島 茂、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎。 Dengueウイルス 1 型完全長 cDNA クローンの作成およびウイルス産生系の確立。 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

名和優、高崎智彦、赤塚俊隆、伊藤美佳子、倉根一郎。 Dengue血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討。 第 52 回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

Tajima Shigeru, Tomohiko Takasaki, Yuki Eshita, Ichiro Kurane. Characterization

of Yokose virus, a Flavivirus, which was isolated from the Bat in Japan. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

Yuki Eshita, Tomohiko Takasaki, Shunro Imura, Yukinori Uchida, Ikuo Takashma, Ichiro Kurane. Diagnostics dengue and ター) 2004/12/4

West Nile viruses in mosquitoes. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

高崎智彦. わが国におけるアルボウイルス感染症の現状. 第7回近畿熱帯医学研究会 (京都市; 京都大学東南アジア研究セン