

#### D. 考察

2003・2004年の2年にわたり WN ウイルスの日本国内への侵入を監視する目的で、WN ウイルスを含むフラビウイルス全般を網羅するウイルス検出を全国レベルで行ってきたが、現在までのところ、国内約 11 地域で捕集した蚊プールのいずれからも WN ウイルスは検出されなかった。本検出作業によって、わが国への WN ウイルスの侵入監視が完全に行われているとは言えないまでも、蚊集団から検出されるレベルまで WN ウイルスが子国内に定着しているとは言えないことは明白である。

ウイルス分離において、蚊集団に潜在的に感染している新規フラビウイルスの存在が、WN を始めとする既知のフラビウイルスの C6/36 細胞培地上での増殖を困難にしていることが示唆されたことから、本年は昆虫由来細胞である C6/36 細胞への接種に先んじて、ほ乳動物由来の Vero および BHK21 細胞へ接種し、継代した。しかし、本年の捕集蚊プールにも昨年同様存在しているであろう JE ウイルスはこれまでのところ検出されていない。本年作成したすべての蚊プールにおいて JE ウイルスの検出を行い、その結果を考慮して検出法の改良に反映させたい。

2003 年 10 月初旬に JE ウイルスが検出された川崎市高津区役所捕集のアカイエカ種群は、当時の分類法ではアカイエカとチカイエカの区別はなされなかった。しかしながら、本年新たに分子分類法を開発したことで、精度よく両種を分類することができ、7~11 月の捕集蚊の JE ウイルス検出結果はアカイエカとチカイエカに分けて評価する予定である。両種は形態学的には分類が困難であるが、生態学的にも生理学的にも大きく異なる性質を持っており、吸血嗜好性も後者の方が 10%程度ヒト指向性が高かった。チカイエカは無吸血産卵性ではあるが、ヒトへのウイルス媒介者としての役割は正確に評価されなければならないであろう。高津区役所内で昨年 JE ウイルスが検出された場所では捕集を開始した 7 月よりチカイエカがすでに地上

部トラップに捕集されており、駐車場の植え込みでも 9 月以降捕集されてくる傾向にあった。昨年の JE ウイルス陽性アカイエカ種群の蚊は、おそらくチカイエカであると推定されるものの、本年の TaqMan RT-PCR による JE ウイルスの検出結果が期待される。

昨年見出した新規フラビウイルスは、国内のかなりの地域に存在し、しかも高率に蚊が保有していることが明らかになったが、本邦産蚊集団にこのような潜在的なウイルスが存在する事は、WN ウイルスを始めとする外来性ウイルスの侵入と何ら関係があるのではないかと考えている。たとえば JE ウイルスの本来の媒介蚊であるコガタアカイエカからは、本フラビウイルスは検出されていない。一方、ヒトスジシマカは東南アジア諸国ではデングウイルスの媒介蚊であるが、本邦産ヒトスジシマカには固有のフラビウイルスが存在しており、また、アカイエカ種群の蚊ではアカイエカとネッタイエカそれぞれに固有のフラビウイルスが検出された。このような外来性フラビウイルスが侵入し得るか否かは、種固有のフラビウイルスの存在が関係しているのではないかと想像している。主にアカイエカが有する新規フラビウイルスの遺伝子構造解析はほぼ終了し、分類学的な位置付け、ならびにウイルス学的性状解析結果から、ウイルス本体の詳細を知ることができるであろう。

最後に、カラスを始め野鳥類に WN ウイルス感染死亡例が疑われる場合には、まず検出感度に優れる TaqMan RT-PCR を用いた検出法を優先することが望ましいと結論した。野生動物で多数の死亡個体が出る場合、蚊集団はすでにウイルスに汚染されていると想像される。よって、細胞培養系において危惧される様々な影響を排除し、また、少ないウイルス量をふやすような努力をせずともウイルスの検出は容易であろう。しかも迅速に判定結果を得なければならないことから、このような緊急時でのウイルス検出法として、TaqMan RT-PCR 法を推奨したい。

茨城県において実施した、WN ウイルス検出のみを目的とした 741 個体、38 プールの媒介蚊調査および蚊プールからのウイルス検出にかかった時間と消耗品費は以下の通りである。

- 1) 種の分類・同定・仕分け：4 時間
- 2) 蚊の乳剤作成：  
3 時間、4,000 円
- 3) RNA 抽出：3 時間、38,836 円
- 4) TaqMan RT-PCR：4 時間、22,800 円

所要時間合計 14 時間  
消耗品費合計 65,636 円

## E. 結論

1) 2003・2004 年の 2 年にわたり WN ウイルスを含むフラビウイルスの検出を行ったが、国内約 11 地域で捕集した蚊（10 属 44 種合計 11,667 個体、754 プール）のいずれからでも WN ウイルスは検出されず、未だ日本への WN ウイルスの侵入はないと結論された。

2) ウイルス検出作業において本年は、蚊の処理個体数を最高 30 個体までを 1 プールとした。2003 年からの継続捕集地においては、潜在的に感染している新規フラビウイルスの影響を抑える目的で、Vero および BHK21 など、ほ乳類由来細胞を C6/36 細胞への接種に先んじて行った。

3) 国内のかなりの地域でしかも高率にある種のフラビウイルスが存在していることが明らかになった。その遺伝子構造解析およびウイルス学的性状解析を進めている。

4) カラスを始め野鳥類に WN ウイルス感染死亡例が疑われる場合には、まず検出感度に優れる TaqMan RT-PCR を用いた検出法を優先することを推奨した。

## 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

津田良夫、倉橋弘、林利彦、葛西真治、伊澤晴彦、佐々木年則、沢辺京子、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, 2004 年 4 月 6 日.

倉橋弘、津田良夫、林利彦、葛西真治、伊澤晴彦、佐々木年則、沢辺京子、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, 2004 年 4 月 6 日.

小林睦生、伊澤晴彦、佐々木年則、二瓶直子、沢辺京子、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, 2004 年 4 月 6 日.

伊澤晴彦、沢辺京子、佐々木年則、津田良夫、倉橋弘、高崎智彦、吉田政弘、渡辺護、小林睦生. 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, 2004 年 4 月 6 日.

小林睦生、津田良夫、林利彦、葛西真治、伊澤晴彦、佐々木年則、沢辺京子、富田隆史、二瓶直子、吉田政弘. 都市部を中心としたウエストナイル熱媒介蚊の発生状況. 第 39 回日本脳炎生態研究会, 2004 年 6 月 17 日.

伊澤晴彦、星野啓太、佐々木年則、沢辺京子、津田良夫、倉橋弘、高崎智彦、吉田政弘、渡辺護、小林睦生. 本邦生息蚊類のウイルス保

有状況調査. 第 39 回日本脳炎生態研究会,  
2004 年 6 月 17 日.

沢辺京子. ウエストナイル熱媒介蚊と吸血嗜好性—遺伝情報から探る蚊の吸血源動物種—. 第 51 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2004 年 9 月 17 日.

比嘉由紀子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 二瓶直子, 沢辺京子, 津田良夫, 小林睦生. 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, 2004 年 10 月 25 日.

葛西真治, 駒形修, 正野俊夫, 富田隆史, 沢辺京子, 比嘉由紀子, 津田良夫, 元木貢, 高橋朋也, 谷川力, 吉田政弘, 小林睦生. 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, 2004 年 10 月 25 日.

沢辺京子, 伊澤晴彦, 星野啓太, 佐々木年則, 福士克男, 宮川憲三, 田村安雄, 佐藤英毅, 津田良夫, 比嘉由紀子, 小林睦生. 本邦産野外捕集蚊からのウエストナイルウイルスの検出—2004 年度前期報告—. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2004 年 10 月 25 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

表1 2004年ウイルス分離に用いた捕集蚊個体数およびプール数

2004年 捕集蚊 学名	和名	成田		首都圏		北海道		石垣島		沖縄		長崎		広島		三重		茨城		計		合計
		雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	
<i>Culex</i>		1,117	39	1,966	10	121																
	アカイエカ/チカイエカ	570	17	1																		
	<i>tritaeniorhynchus</i>	17																				
	<i>bitaeniorhynchus</i>	1	1																			
	<i>kyotoensis</i>	1																				
	<i>sasai</i>	1		47	77																	
	<i>orientalis</i>																					
	<i>quinquefasciatus</i>																					
	<i>infantulus</i>																					
	<i>nyukensis</i>																					
	<i>siftens</i>																					
	<i>brevipalpis</i>																					
	<i>okinawae</i>																					
	<i>tuberis</i>																					
	<i>pseudovishnui</i>																					
	<i>pallidothorax</i>																					
	<i>halifaxii</i>																					
	<i>nigropunctatus</i>																					
	<i>albopictus</i>	177	28	855	273																	
	<i>flavopictus</i>	9	1																			
	<i>vexans</i>	808	271																			
	<i>yamadai</i>																					
	<i>esoensis</i>																					
	<i>riversi</i>																					
	<i>Stegomyia</i> spp.																					
	<i>japonicus</i>	65	24																			
	<i>nipponicus</i>	4																				
	<i>dorsalis</i>																					
	<i>subalbatus</i>																					
	<i>kanayamensis</i>	109	26	1																		
	<i>nipponica</i>																					
	<i>sinensis</i>	12	11																			
	<i>minimus</i>																					
	<i>lesteri</i>	3	1																			
	sp.	48	17																			
	<i>bambusa</i>	35	1																			
	<i>novobscura</i>																					
	<i>jacksoni</i>																					
	<i>nivipleura</i>																					
	<i>annandalei</i>																					
	<i>macfarlanei</i>																					
	<i>ohamai</i>																					
	<i>yaeyamana</i>																					
	<i>anopheloides</i>	1																				
	<i>ochracea</i>	1																				
	<i>crassipes</i>																					
	<i>uniformis</i>																					
	合計	2,978	420	2,870	360	595	10	739	191	1,468	0	351	98	481	12	533	27	741	86	10,756	1,204	11,960
	プール数	188	39	181	43	20	4	48	15	95	0	14	4	28	4	19	3	38	4	631	116	747

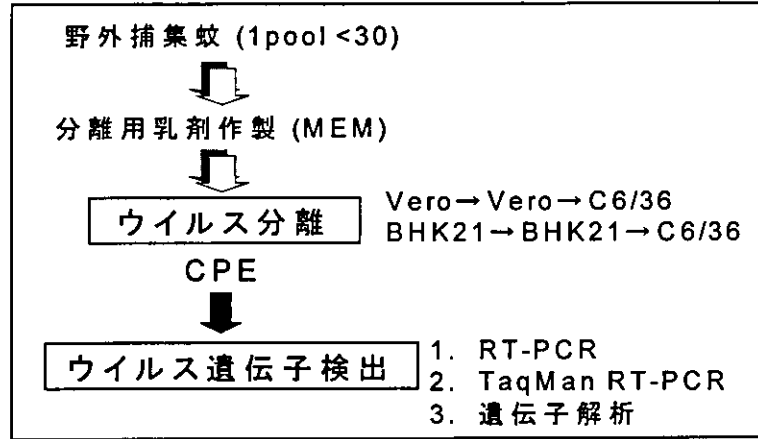


図1 蚊からのフラビウイルス分離・遺伝子検出法 (2004年)

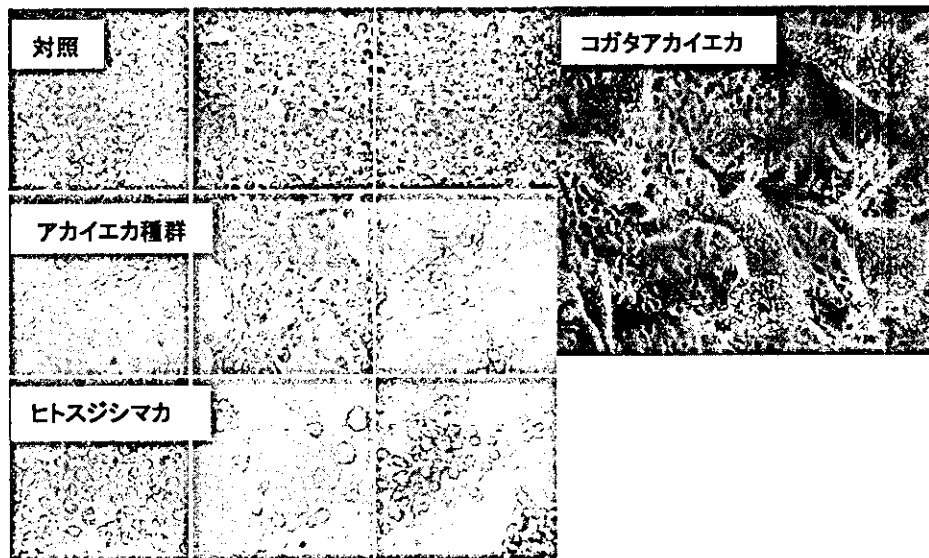
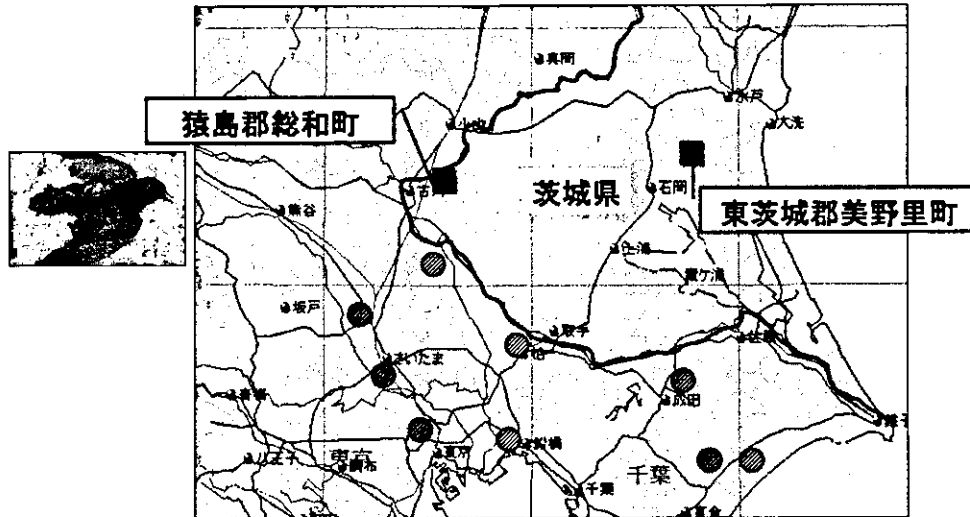


図2 C6/36細胞で認められた細胞変性効果 (CPE)

表2 川崎市高津区役所内2ヶ所で捕集されたアカイエカとチカイエカ

種	合計 (%)	駐車場植え込み (%)	倉庫裏 (%)
アカイエカ種群	83	60	23
アカイエカ	58(69.9)	48(80.0)	9(39.1)
チカイエカ	23(27.7)	12(20.0)	12(52.2)
未同定	2(2.4)	0	2(8.7)



● 首都圏および成田周辺調査地  
 図3 茨城県2箇所における蚊捕集(2004年9月1~3日)

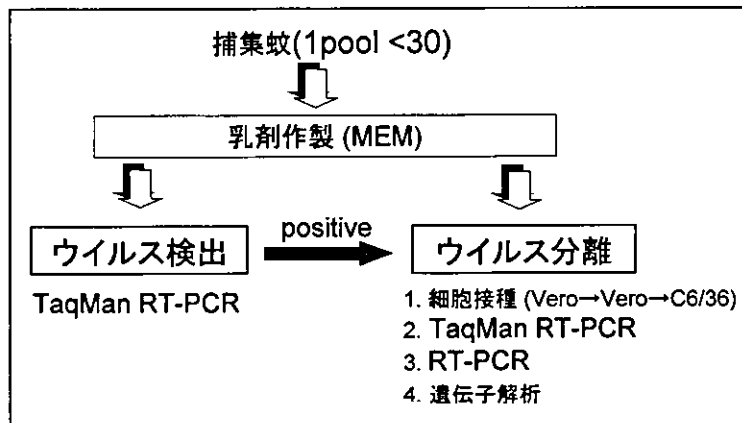


図4 WN ウイルスの検出

表3 茨城県下2箇所80トラップで捕集された蚊からのウエストナイルウイルス検出結果

種名	猿島郡総和町		東茨城郡美野里町		合計		TaqMan RT-PCR WN3'NC	
	no.	pools	no.	pools	no.	pools		
<i>Ae. albopictus</i>	ヒトスジシマカ	386	13	42	2	428	15	Negative
<i>Cx. pipiens</i>	アカイエカ類	63	2	136	5	199	7	N
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	カラツイエカ	6	1	53	2	59	3	N
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	コガタアカイエカ	2	1	20	1	22	2	N
<i>Ar. subalbatus</i>	オオクロヤブカ	1	1	10	1	11	2	N
<i>Oc. japonicus</i>	ヤマトヤブカ	4	1	4	1	8	2	N
<i>Cx. orientalis</i>	ハマダライエカ	2	1	5	1	7	2	N
<i>Ur. novobscura</i>	フタクロホシチビカ	3	1	1	1	4	2	N
<i>Or. anopheloides</i>	ハマダラナガスネカ	1	1	0	0	1	1	N
<i>Tr. bambusa</i>	キンバラナガハシカ	0	0	1	1	1	1	N
<i>Ae. vexans</i>	キンイロヤブカ	0	0	1	1	1	1	N
合計		468	22	273	16	741	38	

分担研究報告書

Yokose ウイルスの蚊およびマウスに対する感染性の検討

分担研究者 高崎智彦(国立感染症研究所ウイルス第一部)  
研究協力者：田島 茂 (国立感染症研究所ウイルス第一部)  
江下優樹 (大分大学 医学部 感染分子病態制御講座)

研 究 要 旨

Yokose ウイルスは 1971 年にユビナガコウモリの血液より分離されたフラビウイルスである。我々は全遺伝子の塩基配列を決定した Yokose ウイルスの蚊およびマウスに対する感染性、病原性を検討した。その結果、成熟マウスに対して、強い病原性は示さなかった。Yokose ウイルスの C6/36 細胞への感染能・増殖能は非常に弱いながら存在する可能性が示唆された。Yokose ウイルスがヒト由来細胞中で増殖可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

Yokose ウイルスは 1971 年に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。昨年我々は Yokose ウイルスの全ゲノムの塩基配列を決定した。また 6 種類の代表的なフラビウイルス（日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、デング 2 型ウイルス、黄熱ウイルス、ダニ媒介性ウイルス、RioBrabo 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ところ、Yokose ウイルスは黄熱ウイルスに比較的近縁であることが明らかとなった。また 3' 非翻訳領域内に存在する蚊媒介性フラビウイルスで保存性の高い配列（CS1）によく類似した配列を有していることから、Yokose ウイルスが蚊によって媒介さ

れる可能性が示唆された（図 1）。そこで、Yokose ウイルスが蚊細胞あるいは蚊個体に対する感染性・増殖性を検討し、マウス個体やヒト培養細胞における感染性・増殖性についても調べた。さらに Yokose ウイルスを感染させたマウスより血清を回収し、Yokose ウイルスに対する反応性についても調べた。

B. 研究方法

Yokose ウイルスを脳内接種し発病した乳のみマウスより得られた脳抽出液をウイルス原液とし、力価を測定後（ $1.8 \times 10^8$  p.f.u./ml）、以後の実験に使用した。Yokose ウイルスの蚊への接種は胸部および経口にて行ない、14 日後に蚊を回収した。胸部接種の場合、

蚊の脚から全 RNA を抽出した。経口接種したものは蚊 1 匹に対し 100  $\mu$ l の 2%FBS/MEM 中ですり潰し、4000rpm で 5 分間遠心分離後、上清と沈殿とに分けた。上清の一部を Vero 細胞および C6/36 細胞に添加しウイルスの検出を試みた。さらに一部を全 RNA の分離に用いた。また沈殿からは全 RNA を分離した。各 RNA からの Yokose ウイルスゲノムの検出は、cDNA を合成後、RT-PCR 法により行なった。マウスへの Yokose ウイルスの接種は 2 種類の系統 (DDY および ICR、接種時 3 週齢) を用いて行なった。DDY の場合、ウイルス原液を 10 倍ずつ段階希釈した後、10 匹ずつ腹腔へ 0.5 ml ずつ接種し経過観察した。ICR はウイルス原液を 50 倍および 100 倍に希釈し、10 匹ずつ腹腔接種し経過観察した。また生き残ったウイルス接種 DDY については初回接種後 5 週間後に 100 倍希釈のウイルス原液を追加免疫し、4 週間後に採血して血清を分離した。分離したマウス血清の Yokose ウイルス反応性は、Yokose ウイルスを接種した Vero 細胞の細胞抽出液および培養上清を用いたウエスタンブロット法および細胞塗末標本を用いた間接蛍光抗体法 (IFA) により評価した。C6/36 細胞およびヒトヘパトマ由来細胞 Huh-7 に対する Yokose ウイルスの感染性は、感染後 48 時間後に塗末標本を作製し、上記の抗血清を用いて IFA により調べた。一方増殖性は、培養上清を回収しウイルス力価を測定することにより調べた。

### C. 研究結果

蚊への感染性を調べるために、はじめにヒトスジシマカおよびアカイエカの胸部に Yokose ウイルスを接種し、14 日後に RT-PCR 法によりウイルス

RNA の検出を試みた (図 2)。すると両方でウイルス RNA が検出された。次に経口的にヒトスジシマカおよびアカイエカに接種し、14 日後に蚊をすりつぶし抽出液と沈殿を得、これらからウイルス RNA の検出を、また抽出液については C6/36 細胞および Vero 細胞に接種しウイルスが分離できるか試みた (図 3)。いずれの蚊においても、沈殿および抽出液中にウイルス RNA を確認することができなかった。また抽出液からウイルス分離することも出来なかった。

マウスに対する Yokose ウイルスの病原性を調べるため、段階希釈した Yokose ウイルスを DDY マウスに接種した (図 4)。接種後 2 週間後に  $1.8 \times 10^6$  p. f. u. 接種したマウス 10 匹のうち 1 匹が死亡した。このマウスは他に比べ体重が顕著に少なかった。残りの接種マウスについては初回接種後 5 週間後に追加接種し抗 Yokose ウイルス血清の調製に使用した。病原性についてもう一度確認するため、次に 3 週齢の ICR マウスに Yokose ウイルスを接種した。しかし接種後 3 週間経過してもマウスの健康状態に変化は見られなかった。

Yokose ウイルス接種 DDY マウスから得られた血清が Yokose ウイルス抗原を認識可能かをウエスタンブロット法により調べた (図 5)。ウイルス感染培養上清については、血清中の蛋白質に反応し、特異的なシグナルは検出されなかったが、細胞抽出液については、Yokose ウイルスの前駆体蛋白質と思われるシグナルが Yokose ウイルス感染細胞特異的に検出された。次に本抗血清を用いて IFA を行なったところ、Yokose ウイルス感染細胞特異的に細胞が染色された (図 6)。

蚊由来 C6/36 細胞およびヒトヘパト



マ細胞 Huh-7 への Yokose ウイルス感染性・増殖性を調べるため、Yokose ウイルスを接種し、48 時間後に上記の抗血清を用いて IFA を行なった(図 7)。C6/36 細胞では Yokose ウイルス陽性細胞はほとんど検出されなかった。一方、Huh-7 では多くの細胞が Yokose ウイルス陽性であった。次に Yokose ウイルスを感染させた細胞の培養上清中のウイルス力価を測定した(表 1 および図 8)。Huh-7 では感染後 6 日後に  $10^7$ /ml 以上の高いウイルス力価が観察されたが、C6/36 細胞では感染能を有するウイルスこそ存在するものの、力価は 6 日後や 10 日後でも  $10^3$ /ml 以下であった。

#### D. 考察

今回我々は Yokose ウイルスの伝播経路および病原性について考察するため、蚊個体、蚊およびヒト培養細胞、およびマウス個体を用いて解析を行ってきた。

蚊(ヒトスジシマカおよびアカイエカ)個体内でのウイルス増殖能では、胸部接種の結果と経口接種の結果が一致しなかった。このような違いが現れた要因は不明だが、経口接種では、今回調べた個体がウイルス液を吸入していなかったのかもしれない。今後ウイルス液を吸入したことを確認するための方法を考慮する必要がある。また様々な種類の蚊について検討する必要があるかもしれない。

Yokose ウイルスのマウスに対する病原性試験において、1 匹が接種後 2 週間で死亡した。しかし死亡原因が Yokose ウイルスによるものであるかどうかについては不明であり、今後因果関係を明白にする必要がある。

Yokose ウイルス接種マウスより抗

Yokose ウイルス血清を得る事ができた。本血清を用いることにより、他のフラビウイルス抗血清を用いた場合よりも高感度に Yokose ウイルスを検出ことが可能になった。今後様々な解析に活用できるものと思われる。また本抗血清の Yokose ウイルスおよび他のフラビウイルスに対する中和力価を測定しておく必要がある。

Yokose ウイルスの C6/36 細胞への感染能を調べたが、今回明確な結果は得られなかった。ただし、培養上清中の感染性を有するウイルスの量が 10 日後でも減少しないことから、非常にわずかながら C6/36 細胞に感染し、ウイルスを放出している可能性がある。一方、ヒトヘパトーマ細胞由来の Huh-7 は Yokose ウイルスに対し高い感受性を示した。データは示していないが細胞変性も明らかであった。さらに高いウイルス産生能も示した。これらの結果から、Yokose ウイルスはヒト細胞内で増殖する能力を有することが明らかとなった。

#### E. 結論

Yokose ウイルスの蚊(ヒトスジシマカおよびアカイエカ)への接種実験では、胸部接種ではウイルスが検出された一方、経口接種ではウイルスが検出されず、伝播能・増殖能については確認できなかった。マウスへの病原性試験では、死亡したマウスはあったが、Yokose ウイルスが原因であることを断定するには至らなかった。Yokose ウイルス感染マウスから、抗 Yokose ウイルス血清を得ることができた。Yokose ウイルスの C6/36 細胞への感染能・増殖能は非常に弱いながら存在する可能性が示唆された。Yokose ウイルスがヒト由来細胞中で複製可能であ

ることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tajima, S., Takasaki, T., Matsuno, S., Nakayama, M., Kurane, I. (2005): Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332: 38-44.

2. 学会発表

Tajima, S., Takasaki, T., Eshita, Y., and

Kurane, I. Characterization of Yokose virus, a flavivirus, which was isolated from the bat in Japan. 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 2004.12

田島茂、高崎智彦、江下優樹、倉根一郎：日本で分離されたフラビウイルス Yokose ウイルスの性状解析 第39回 日本脳炎ウイルス生態学研究会、2004年6月

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

図1: Yokose ウイルスと代表的なフラビウイルスとの間の  
3' NTR保存配列 (CS1, 2) の比較

CS1	YOKOSE	CAATATGTTGAC	Pink: Mosquito-borne Blue: Tick-borne Orange: No known vector
	YFV	CACCAATTTGAC	
	DEN2V	CAGCAATTTGAC	
	JEV	CACCAATTTGAC	
	WNV	CACCAATTTGAC	
	MOOV	ACCTAAAGTTT ACAGGGAGTGT	
CS2	YOKOSE	GGGACTTACGTTTAGGAGGACCCCT	
	YFV	GGGCTTAGAGGTTAGAGGAGACCCCT	
	DEN2V	AAGGACTTAGAGGTTAGAGGAGACCCCT	
	JEV	AAGGACTTAGAGGTTAGAGGAGACCCCT	
	WNV	AAGGACTTAGAGGTTAGAGGAGACCCCT	
	MOOV	ATTATGTAAGTTCAGAGGAGACCCCT AAGGACTTAGAGGTTAGAGGAGACCCCT	

図2: 蚊のYokoseウイルスに対する感受性の検討(胸部接種実験)

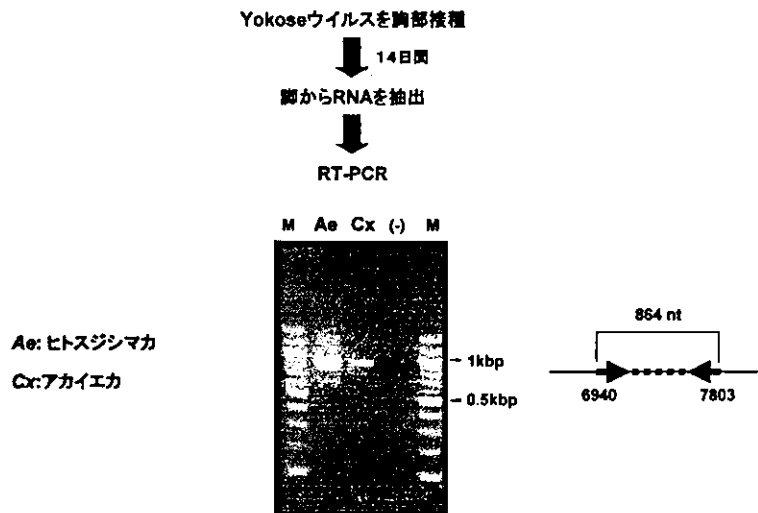


図3: 蚊のYokoseウイルスに対する感受性の検討(経口接種実験)

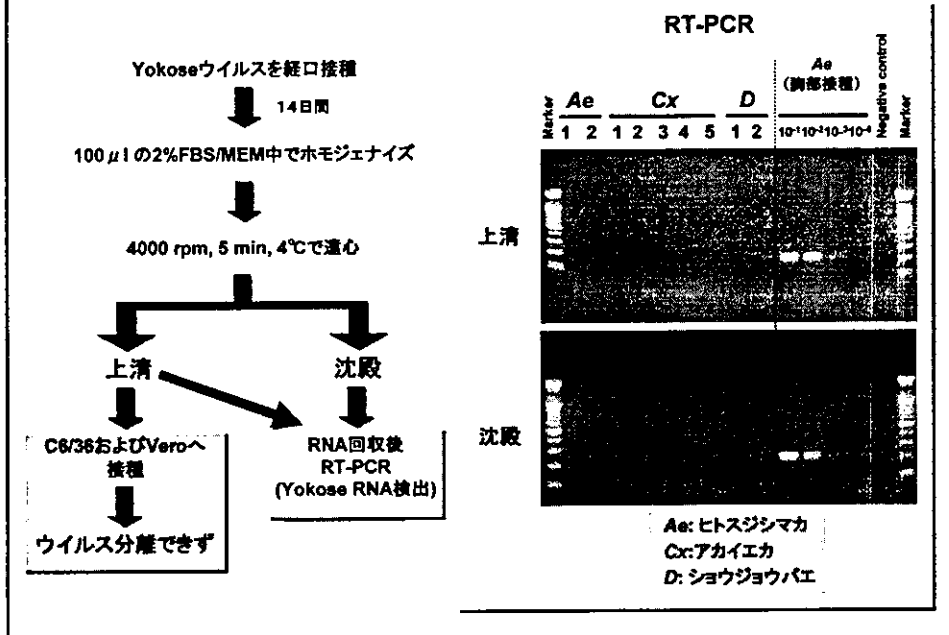


図4: マウスのYokoseウイルスに対する感受性の検討

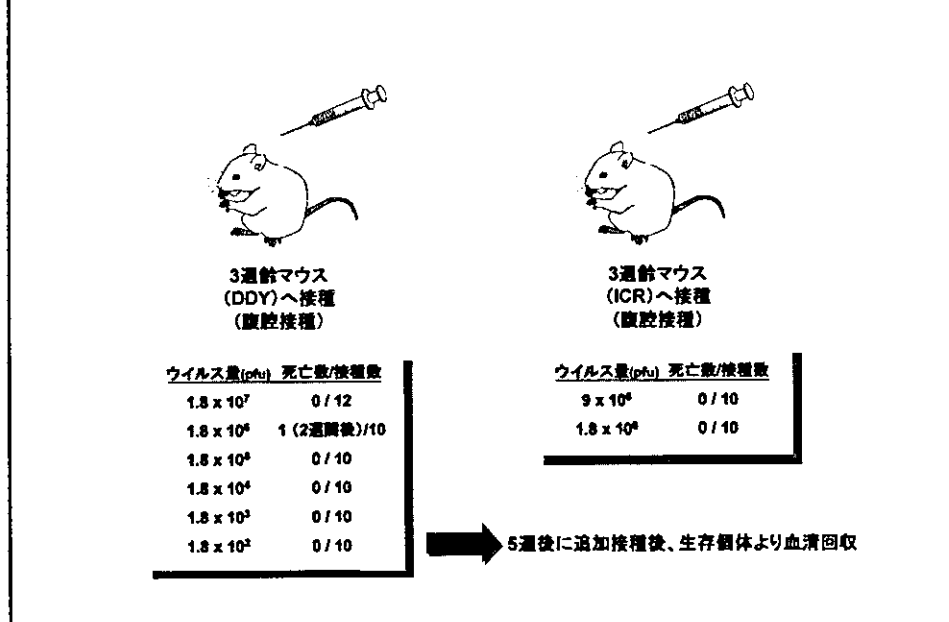


図5:Yokoseウイルス接種マウス由来血清を用いたYokoseウイルス蛋白の検出  
(ウエスタンブロット)

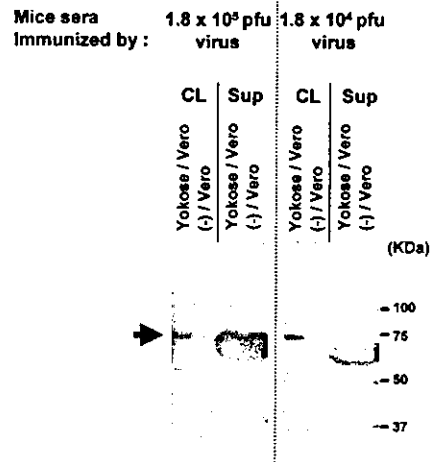


図6:Yokoseウイルス接種マウス由来血清を用いたYokoseウイルス感染Vero細胞の染色  
(間接蛍光抗体法)

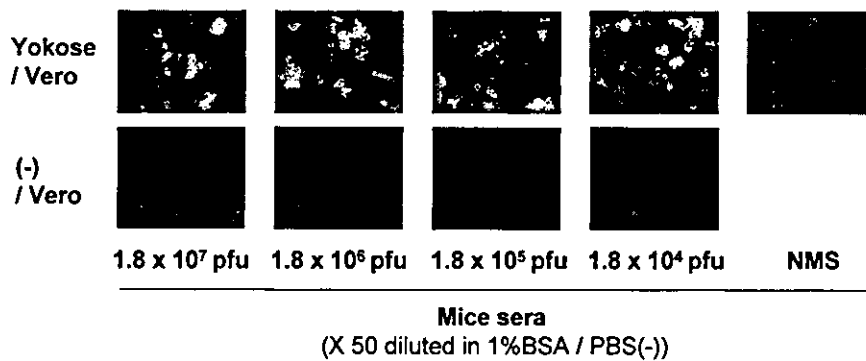


図7: 蚊由来細胞株およびヒト由来細胞株のYokoseウイルスに対する感受性の検討

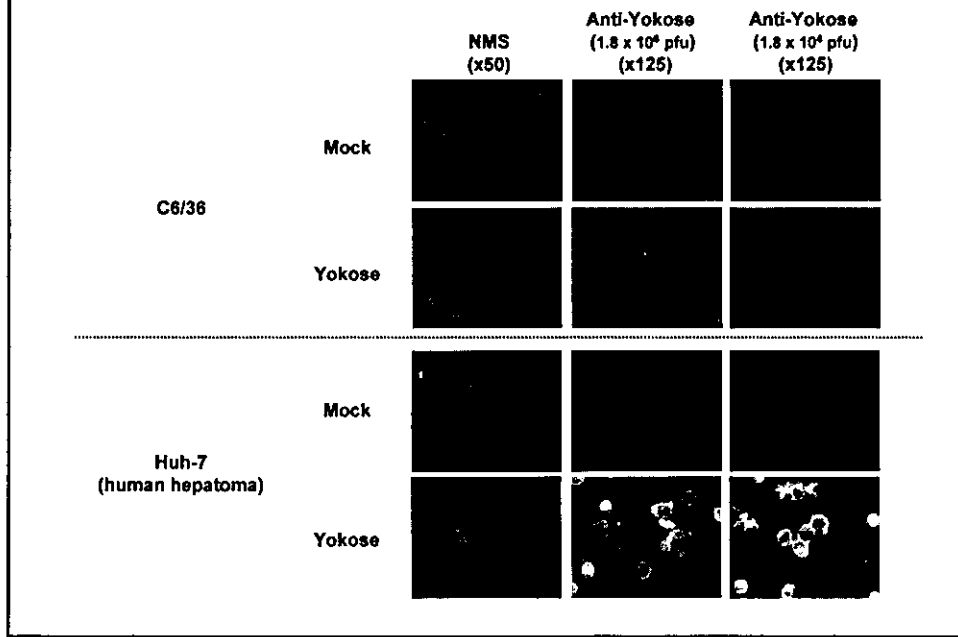
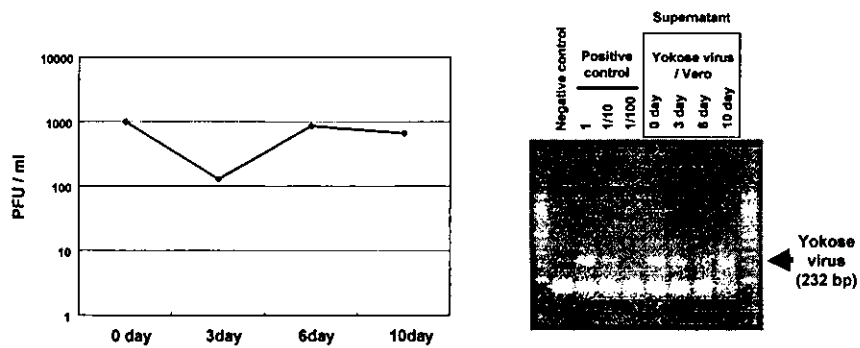


図8: C6/36細胞でのYokoseウイルス増殖能



培養上清中の感染性ヨコセウイルス量の変化  
(力価測定)

培養上清中のヨコセウイルスRNA量の変化  
(RT-PCR)

表1:Yokoseウイルス感染Huh-7培養上清中のウイルスカ価

接種後	
0日目	6日目
$9.33 \times 10^2$ pfu/ml	$2.43 \times 10^7$ pfu/ml

## 抗ウエストナイルウイルス効果のあるペプチドの検索

分担研究者 松岡裕之 自治医科大学・助教授

研究要旨 West Nile virus に準ずるウイルスとして Kunjin virus (KV) を導入し、KV と結合力の強いランダムペプチドを選定した。3.4 x 10<sup>11</sup> ヶのペプチド表出ファージを用意して KV と結合させて洗浄・溶出を繰り返し、KV との結合力の強いペプチド表出ファージ 3 つを得た。これら 3 つはいずれも KV の VERO 細胞への接着・侵入を阻害した。このファージの表出するペプチドを合成して、KV の VERO 細胞への接着・侵入阻害を確かめたところ、阻害は見られなかった。ファージの表出したペプチドと合成ペプチドは、一次配列は同じであるものの立体構造が異なるため、ウイルスの結合に関し異なる性状を持っていると考えられた。

### A. 研究目的

West Nile virus に準ずるウイルスとして Kunjin virus (KV) を導入した(感染研より供与を受けた)。このウイルスは人に感染した時 West Nile virus 様の症状を来たすものの症状が軽く、死亡例もないことから West Nile virus よりも遮蔽度の低い実験室(P-2)で使用できる。本年度はKVの細胞への接着・侵入を阻害するペプチドを得ることを目的として、自治医科大学研究倫理委員会の承認を得たうえで以下の実験を実施した。

### B. 研究方法

実験 1(スクリーニング):ファージ上にランダムにアミノ酸 15 ヶのペプチドを表出する発現系を構築し、KV と結合力の強いランダムペプチドを選定した。3.4 x 10<sup>11</sup> ヶのペプチド表出ファージについて、KV と結合させて洗浄・溶出を行ない、KV との結合力の強いペプチド表出ファージを選びだした。

実験 2(ブランクアッセイ):これらのペプチド表出ファージの、KV の VERO 細胞に対する侵入阻害を検討した。上記ペプチド表出ファージを KV と

インキュベーションさせ、そのうえで培養 VERO 細胞に感染させて生じてくるプラークの数を算出した。

実験 3(合成ペプチドを用いたブランクアッセイ):VERO 細胞に対する侵入阻害をもつファージが見つかったので、そのクローンペプチドを工業的に合成し、KV の VERO 細胞に対する侵入阻害をブランク法により検討した。

実験 4(合成ペプチドとペプチドファージとの競合実験):ファージとKVとの結合(実験 1)を合成ペプチドが競合阻害するかどうか検討した。

### C. 研究結果

実験 1(スクリーニング):3 回のスクリーニングの結果得られたペプチド表出ファージから、40 ヶのペプチドファージクローンについてペプチド部分をコードするDNAを読んだところ、ペプチド A(14 クローン)、ペプチド B(3 クローン)、ペプチド C(5 クローン)、ペプチド D(2 クローン)、その他のペプチド 16 クローンであった。その DNA 配列から



15ケのアミノ酸配列を予想した。

クローン A

○○○○○○○ Cys ○○○○○○○○ Cys

クローン B:

Cys ○○○○○○○○ Cys ○○○○○○○○

クローン C:

○○○○○ Cys ○○○○○ Cys ○○○○○○

クローン A, B, C ともに配列内に2ケのシステインを含んでいた。

実験2(プラークアッセイ):上記ペプチド表出ファージを KV とインキュベーションさせ、そのうえで培養 VERO 細胞に感染させて生じてくるプラークの数を算出した。陰性対照に比べて上記クローン A および B はそれぞれ有為にプラーク数を減少させた。すなわちクローン A, B は KV の VERO 細胞への接着または侵入を阻害した。

実験3(合成ペプチドを用いたプラークアッセイ):クローン A のペプチドを工業的に合成し、KV の VERO 細胞に対する侵入阻害をプラーク法により検討した。するとクローン A のペプチドはプラーク数を減少させなかった。すなわち KV の VERO 細胞への接着・侵入を阻害しなかった。

実験4(合成ペプチドとペプチドファージとの競合実験):ファージと KV との結合(実験1)を合成ペプチドが競合阻害するかどうか検討した。すると阻害は起きなかった。すなわちファージの表出しているペプチドと合成したペプチドは、一次配列は同じであるものの、ウイルスの結合に関する限り、異なる性状を持っていることが予測された。

#### D. 考察

接着・侵入阻害活性を認めたペプチド表出ファージは、いずれも分子内にシステインを2ケ持っていたことから、分子内架橋または分子間架橋

が起きていた可能性がある。従ってシステインを分子内または分子間架橋させたペプチドを合成して、KV の VERO 細胞への接着・侵入を阻害するかどうかを検索する必要がある。

#### E. 結論

KV の VERO 細胞への接着・侵入を阻害するペプチド表出ファージを見出した。このファージの表出するペプチドを合成して、KV の VERO 細胞への接着・侵入を阻害するかどうか確かめたところ、阻害は見られなかった。その理由として、ファージの表出しているペプチドと合成したペプチドは、一次配列は同じであるものの、ウイルスの結合に関する限り、異なる性状を持っていたためと考察した。

#### F. 健康危険情報

新規な健康危険情報は得られていない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Jalloh, A., Tantular, I. S., Pesarawati, S., Kawilarang, A. P., Kerong, H., Lin, K., Ferreira, M. U., Matsuoka, H., Arai, M., Kita, K. and Kawamoto, F.: Rapid epidemiologic assessment of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria-endemic areas in Southeast Asia using a novel diagnostic kit. *Trop. Med. Int. Health*, 9(5): 615-623, 2004.

Arai, M., Ishii, A. and Matsuoka, H.: Laboratory evaluation of the ICT Malaria *P.f./P.v.* immunochromatographic test for detecting the panmalarial antigen using a rodent malaria model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(2): 139-143, 2004.

松岡裕之:蚊の越冬・吸血行動. 日本医事新報, 4191: 98, 2004.

##### 2. 学会発表 なし

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
二瓶直子	感染症と GIS	中谷友樹, 谷村 晋, 二瓶直子, 堀越洋一	保健医療のた めの GIS	古今書院	東京	2004	127-165

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
Saitoh, Y., Hattori, J., Chinone, S., Nihei, N., Tsuda, Y., Kurahashi, H. and Kobayashi, M.	Yeast-generated CO <sub>2</sub> as a convenient source of carbon dioxide for adult mosquito sampling	Journal of American Mosquito Control Association	20	261-264	2004
Nihei, N., Yoshida, M., Kaneta, H., Shimamura, R. and Kobayashi, M.	Analysis of the dispersal pattern of newly introduced <i>Latrodectus</i> <i>hasseltii</i> (Araneae: Theridiidae) in Japan by spider diagram	Journal of Medical Entomology	41	269-276	2004
Moribayashi, A., Sugie, H., Katagiri, C., Uchida, K., Kobayashi, M. and Agui, N.	Polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, mediates larval-pupal and pupal-adult development in the malarial vector mosquito, <i>Anopheles stephensi</i>	Medical Entomology and Zoology	55	59- 66	2004
Suwonkerd, W., Tsuda, Y., Overgaard, H. J., Chawprom, S., Tsuno, N., Prajakwong, S. and Takagi, M.	Changes in malaria vector densities over a twenty-three year period in Mae Hong Son province, northern Thailand	Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health	35	316-324	2004

Kawada, H., Maekawa, Y., Tsuda, Y. and Takagi, M.	Laboratory and field evaluation of spatial repellency with metofluthrin-impregnated paper strip against mosquitoes in Lombok Island, Indonesia	Journal of American Mosquito Control Association	20	293-298	2004
Kawada, H., Maekawa, Y., Tsuda, Y. and Takagi, M.	Trial of spatial repellency of metofluthrin-impregnated paper strip against <i>Anophels</i> and <i>Culex</i> in shelters without walls in Lombok, Indonesia	Journal of American Mosquito Control Association	20	434-477	2004
Kobayashi, J., Phompida, S., Toma, T., Looareensuwan, S., Toma, T. and Miyagi, I.	The effectiveness of impregnated bed net in malaria control in Laos	Acta Tropica	89	299-308	2004
Miyagi, I., Toma, T. and Higa, Y.	A new species of <i>Mimomyia</i> ( <i>Ingramia</i> ) from Indonesia (Diptera: Culicidae)	Medical Entomology and Zoology	55	11-20	2004
Okudo, H., Toma, T., Sasaki, H., Higa, Y., Fujikawa, M., Miyagi I. and Okazawa, T.	A crab-hole mosquito, <i>Ochlerotatus baisasi</i> , feeding on mudskipper (Gobiidae: Oxudercinae) in the Ryukyu Islands, Japan	Journal of American Mosquito Control Association	20	134-137	2004
Miyagi, I., Toma, T. and Lien, J. C.	<i>Ochlerotatus (Geoskusea) timorensis</i> (Culicidae: Diptera), a new species from crab-holes, West Timor, Indonesia	Medical Entomology and Zoology	55	107-114	2004
Toma, T., Higa, Y., Tokuyama, Y. and Miyagi, I.	Comparison of rDNA ITS2 sequence of <i>Anopheles sapersoi</i> (Diptera: Culicidae) from two islands of the Ryukyu Archipelago, Japan	Medical Entomology and Zoology	55	115-120	2004
Sasaki, H., Fujikawa, M., Toma, T. and Miyagi, I.	Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) collected at Iriomote Island, Ryukyu Archipelago, Japan, and their blood source	Medical Entomology and Zoology	55	125-127	2004