

200500627A

厚生労働科学研究費補助金

平成17年度

新興・再興感染症研究事業

ウエストナイルウイルス侵入に備えての診断、予防対策への

基盤的研究（H17-新興-2）

研究報告書

平成18年3月

主任研究者 倉根一郎

（国立感染症研究所）

目 次

I. 総括研究報告

- ウエストナイルウイルス侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究・・・・・・・・・・ 1
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

II. 分担研究報告

- ウエストナイルウイルス感染症の認知とワクチン需要予測・・・・・・・・・・ 12
分担研究者：岡部信彦（国立感染症研究所・感染症情報センター）
- ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスに対する感染血清の鑑別に関する研究・・・ 19
分担研究者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）
- ウエストナイルウイルス感染蚊検出のための遺伝子検査法の確立・・・・・・・・・・ 27
分担研究者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
- アカエイカ群の個眼数に見られる季節変異と地理的変異・・・・・・・・・・ 34
分担研究者：小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部）
- 鳥類における WNV 検出法および抗 WNV 抗体検出法の確立に関する研究・・・・・・・・ 44
分担研究者：山田章雄（国立感染症研究所・獣医科学部）
- ウエストナイルウイルスのワクチン開発・・・・・・・・・・ 51
分担研究者：森田公一（長崎大学・熱帯医学研究所）
- ウエストナイル不活化ワクチン及び日本脳炎不活化ワクチン免疫マウスにおけるウエストナイルウイルスに対する防御能の検討・・・・・・・・・・ 57
分担研究者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）
- 遺伝子組換えを用いたウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発・・・・・・・・ 64
分担研究者：小島朝人（国立感染症研究所・感染病理部）
- ウエストナイルワクチン用アジュバントの開発に関する研究・・・・・・・・・・ 68
分担研究者：森 康子（医薬基盤研究所・基盤研究部）
- 治療法開発のためのウイルス高病原性機序の解明・・・・・・・・・・ 71
分担研究者：佐多徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）
- ウエストナイルウイルス NS4B の核内移行に関する研究・・・・・・・・・・ 74
主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・ 80

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

総括研究報告書

ウエストナイルウイルス侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究

主任研究者：倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第一部 部長）

研究要旨：

ウエストナイル熱・脳炎は北米大陸において多くの患者発生が報告されている。さらにシベリアへのウイルスの侵入も確認されている。このような状況からウエストナイルウイルスはわが国にとっても大きな脅威であると考えらるべきである。ウエストナイルウイルスは未だわが国へは侵入していないが、仮にわが国に本ウイルスが侵入した場合には急速に日本各地に侵淫することも予想される。本研究においては、わが国におけるウエストナイルウイルス対策のための総合的科学基盤を確立することを目的として、社会学・疫学研究、検査・診断研究（実験室検査法開発研究、蚊検査法開発研究、トリ検査法開発研究）、予防・治療法研究（ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究）を遂行した。社会学・疫学研究においては、ウエストナイル熱流行状況に関する国民向け情報により国民の啓発を行なうとともに、ウエストナイル熱・脳炎がまだ一般国民に十分には認識されていないことを明らかにした。検査・診断研究においては、ウエストナイル熱・脳炎の病原体・血清検査法を確立し、非感染性ウイルス用粒子を用いた方法の開発も進展させた。また、感染蚊、感染鳥の検出法を確立した。予防・治療法研究においては、組織培養細胞由来不活性化ワクチンの試験的作製を行い、動物における防御能を示した。さらに、キメラワクチンやサブユニットワクチン開発、アジュバント開発の基盤を確立し、脳炎の病態解明のための動物モデル開発を進展させた。以上の研究によって、ウエストナイルウイルス対策のための総合的科学基盤を各研究項目について進展させた。

分担研究者：

岡部信彦（国立感染症研究所感染症情報センター センター長）

小島朝人（国立感染症研究所感染病理部

室長）

小林睦生（国立感染症研究所昆虫医科学部 部長）

佐多徹太郎（国立感染症研究所感染病理部

部長)

高崎智彦 (国立感染症研究所・ウイルス第一部 室長)

森田公一 (長崎大学熱帯医学研究所 教授)

山田章雄 (国立感染症研究所獣医科学部 部長)

森 康子 (医薬基盤研究所基盤研究部 部門長)

A. 研究目的

ウエストナイル熱・脳炎は北米大陸においては年々ウイルス活動地域が拡大し、2004 年は太平洋岸においても多くの患者発生が見られ、2005 年にも引き続き多くの患者発生が報告されている。さらに近年シベリア等世界の他の地域においても流行やウイルスの侵入が報告されている。このような状況からウエストナイルウイルスはわが国にとっても大きな脅威であると考えべきである。現在、ウエストナイルウイルスは未だわが国へは侵入していないが、高感受性を有するトリや蚊は日本国内にも存在することから、仮にわが国に本ウイルスが侵入した場合には急速に日本各地に侵淫することも予想され、正確に侵淫地域を確認する必要が生じる。さらに、輸血等蚊の吸血以外の経路による感染対策も必要となる。また、国内への侵入に備えたワクチンの早急な整備も必要となる。一方、今日でも海外において感染した疑い患者が帰国した場合には、迅速な検査による確定診断が必要となる。従って、ウエストナイルウイルス感染対策としてウイルス、ヒト、蚊、トリ等多面的な研究が要求される。本研究はウエストナイルウイルス対策のための総合的科学基盤の確立を目的とする。具体的

には以下の6つの目標を有する。(1) 国民のウエストナイル熱・脳炎に対する理解を深める、(2) ウエストナイル熱・脳炎の病原体・血清検査法の確立、標準化を行い、国内各施設への技術移転によって輸入症例やウイルスの国内侵入に備える、(3) 国内媒介蚊の分布調査により国内へのウイルス侵入時の蚊対策の基盤を確立する、(4) ウエストナイルウイルス感染蚊や感染鳥検査技術の確立により、国内へのウイルス侵入の検出を可能にし国内侵入に備える、(5) ウエストナイルワクチン開発に関する基盤研究によりワクチン実用化への基盤技術を確立する、(6) ウイルス高病原性の機序を解明することにより新たな治療法開発への基盤を確立する。本研究の研究成果は我が国において、北米におけるようなウエストナイル熱・脳炎の大流行を防ぎ、国民の健康を守り、社会の安定を維持することに大きく貢献する。

B. 研究方法

本研究は主任研究者倉根、分担研究者 8 名 (岡部、小島、小林、佐多、高崎、森田、山田、森) の計 9 名が遂行した。当該年度においては大きく社会学的研究、検査・診断研究 (実験室検査法開発研究、蚊検査法研究、トリ検査法研究)、予防・治療法研究 (ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究) の 3 項目に分けて遂行された。国内におけるウエストナイル熱の理解状況、病原体・遺伝子検査法の確立、感染蚊・感染鳥検出のための検査法の確立、ワクチン及びアジュバント開発の基盤的研究、及びウイルスの高病原性解明のためのモデル開発、病原性の分子基盤の解明、を行なった。研究はこれらの各分担研究が独立した科学

的事実の集積にとどまることなく、有機的に関連して進められるよう主任研究者の責任を持って進められた。さらに、確立した技術の国内各機関への技術移転、継続的な改訂を行なうことにより、日本全体におけるウエストナイル検査システム網の充実を行なう等、研究成果が行政施策に直結しうるように遂行した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いる場合には、疫学研究に関する倫理指針、臨床研究に関する倫理指針を遵守し、各研究機関における倫理委員会において承認を得た上で研究を遂行する。研究対象者に対して、研究の目的、個人の不利益、危険性に対して十分に説明し、倫理委員会により承認されたインフォームドコンセントにサインあるいは捺印を得た上で遂行する。動物を用いる実験の倫理面においては、各研究機関の動物実験委員会において審査し承認を得た上で行なう。

C. 研究結果

1. ウエストナイルウイルスの認知とワクチン需要に関する研究

ウエストナイルウイルス感染症についての、今後の一般市民に対する知識の普及の効果を知るために、認知や知識に関するベースラインを取得すること、また現在は開発導入が行われていないがワクチン接種に対する需要予測を行うことを目的とした。市民を対象にウエストナイルウイルス感染症についての認知や知識、あるいはワクチン接種に対する需要に関する調査を2回行った。調査時期は、2005年10月の国内発症第1例報告の前後とする。調査内容は、①屋外活動時間、②蚊に刺されやすいか否

か、③周囲の状況、④蚊に刺されないための対策、⑤ウエストナイルウイルス感染症の認知、⑥WNV感染症の認知した時期、⑦死亡リスクの認知、⑧年齢別死亡リスクの認知、⑨感染経路の認知、⑩日本への侵入リスクの評価とする。WNVワクチンの需要分析は、仮想的な質問を行い、そこでの接種希望の有無を尋ねる。軸は①費用、②副反応率、③流行程度とした。ウエストナイルウイルス感染症の認知は20%であった。死亡リスク(感染経路)まで認知しているのは15(12)%であった。侵入リスクは75%が懸念していた。わが国における最初の輸入症例の報道を知っているヒトは21%であった。

ワクチン需要予測は、接種費用を5,000円、副反応率1/1,000万として現在の状況で導入すると、接種希望率は、小児15%、成人8%、高齢者5%であった。費用が1,000円上がると9、3、0%に低下する。国内感染が確認されると23、15、16%に増加する。死亡例が出ると60、46、47%に増加する。副反応率が1/100万になると6、2.5、2.3%に低下すると予想された。

2. ウエストナイルウイルス感染の検査・診断法に関する研究

1) ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスに対する感染血清の鑑別に関する研究:

日本脳炎ウイルス(JEV)とウエストナイルウイルス(WNV)は血清学的に近縁なウイルス群に属するため、両ウイルスの感染を血清学的に区別することは困難であることがある。しかし、WNVの日本国内への侵入をモニタリングするためには、現在あるい

は過去における両ウイルスに対する感染歴を把握する必要がある。そこで、JEV と WNV の感染により産生される抗体の検査鑑別の可能性について検討した。使用する抗原としては、精製した各ウイルス粒子と中空ウイルス粒子 (SvPs)、ウイルス感染細胞、SvPs 発現細胞を用いた。ウイルス粒子と中空ウイルス粒子間で、両ウイルスに対する免疫抗への反応性に差異は認められなかった。ELISA 法や IFA 法、ウエスタンブロット法について検討したところ、両ウイルスに対する抗血清間で交差反応は認められたが、両者を区別することは可能であった。特にウエスタンブロット法では、比較した他の方法に比べ、より効果的に両ウイルスに対する抗体を区別できることが示された。

2) ウエストナイルウイルス感染蚊検出のための遺伝子検査法の確立:

わが国における WNV 事情は米国とは大きく異なり、未だウイルスの侵入・定着が確認されていない状況にあるため、その検出にはより高い精度が要求される。WNV の検出法として、VecTest™ (以下 VecTest)、RT-PCR 法、TaqMan 法について、経済性、検出限界ウイルス力価、迅速性、および煩雑性を比較検討した。VecTest は、蚊ホモジネート作成から 1 時間以内で判定結果が得られ、検出にかかる時間および操作の簡便さにおいて最も優れる。しかし、検出限界ウイルス力価は 10^5 pfu と他の検出法に比べて最も低く、検出にかかるプールあたりの費用は高価であった。RT-PCR 法および TaqMan RT-PCR 法は、RNA 抽出に時間を要し操作も煩雑である上、PCR 機を始め遺伝子操作の可能な設備と専門的な手技を必

要とするが、検出感度に優れ (TaqMan RT-PCR 法: 2.5 pfu、RT-PCR 法: 10^2 pfu)、かなり少ないウイルス量でも検出が可能であった。ウイルスの侵入が確認されていないわが国においては、蚊ホモジネートをまず Vero あるいは BHK 細胞接種後少なくとも 2 代の盲継代を行った後に C6/36 細胞接種系に移し、RT-PCR 法でウイルス遺伝子を検出する方法が望ましいと思われた。一方、WNV によるカラスや他の野鳥の死亡が確認された場合は、まずウイルス遺伝子の検出を優先させることから TaqMan RT-PCR 法により遺伝子検出を行い、陽性蚊プールから前述した細胞培養系を経てウイルス分離を行う方法を実施することを推奨した。

わが国にウエストナイルウイルスが侵入した場合、トリからヒトへのブリッジベクターとして重要であると考えられるアカイエカとチカイエカこれら 2 種の雌成虫同定法の確立を行った。これまで報告されている雌成虫の同定方法として複眼の個眼数によるものが知られているが、実際に使用するにあたっていくつか検討すべき問題が残されている。アカイエカとチカイエカの個眼数にみられる変異を実験的に調べた。実験室系統 (チカイエカ 4 系統、アカイエカ 2 系統) より得られたサンプルで検討した限りでは、複眼の 5 あるいは 6 列目の個眼数が 8 個の個体をチカイエカ、9 個の個体をアカイエカと判定しても大きな問題はないと思われた。しかしながら、温度調節が行われていない住居内で季節的に気温が変化する状況下ではアカイエカもチカイエカも成虫の個眼数は幼虫発育時の気温によって変化することが示された。どちらの種でも生育温度が低いと個眼数は少なくなり、

生育温度が高いと個眼数が多くなる傾向が示された。ただしこの個眼数の温度依存性はチカイエカの系統によって大きく異なり、長崎系統は温度依存性が高いのに対して落合系統はほとんど影響を受けないことがわかった。さらに6つの異なる地域（秋田、関東、大阪、広島、高知、長崎）より得られた野外のアカイエカ群サンプルについて、個眼数による同定と分子分類による同定を行ってその判定結果の一致度を調べた。その結果アカイエカとチカイエカの個眼数に地理的変異が存在することが示された。

3) 鳥類におけるウエストナイルウイルス検出法および抗ウエストナイルウイルス抗体検出法の確立に関する研究：

ウエストナイルウイルスの日本への侵入や国内での流行の拡大には野鳥の果たす役割が大きい。トリにおいてウエストナイルウイルスおよび抗ウエストナイルウイルス抗体を検出する方法の確立を行った。

①陽性対照ニワトリ血清の作製：ニワトリをホルマリン不活化ウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスで5回免疫し陽性対照血清を作製した。抗日本脳炎ウイルス抗血清はウエストナイルウイルスと若干の交叉反応を示したが、抗ウエストナイルウイルス抗血清は、ウエストナイルウイルスに強い特異性を示した。

②鳥類におけるウエストナイルウイルスに対する中和抗体保有状況の検討：鳥類におけるウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する中和抗体の存在を検討した。渡り鳥（シギ、チドリ、ミヤマガラス）および留鳥（ナキアヒル、カラス、スズメ、ハト、ニワトリ）の血清を用いた。

どの検体においてもウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスに対する抗体は検出されなかった。

③ウエストナイルウイルス遺伝子検出法の設定：ウエストナイルウイルス遺伝子用には Polyprotein(WNV-PoPr) 及び E 遺伝子(WNV-Env)、日本脳炎ウイルス用には E 遺伝子(JEV-Env)、両者共通には NS3 遺伝子(WJ-NS3)に対するプライマーを作製し、PCRの条件検討を行った。検出感度は WNV-PoPr が 1-10 pfu、WNV-Env が 10 pfu、JEV が 10 pfu、WJ-NS3 が 100 pfu であった。さらに、ウエストナイルウイルス用に 3' NC、E 遺伝子(WNV-3NC、WNV-EnvRT)に対するプライマーと TaqMan プローブを作製した。その感度は抽出 RNA を用いた Real-time RT-PCR では WNV-Env-RT が 0.1 WNV-3NC が 0.1-1 であった。

3. ウエストナイルワクチン開発に関する研究

1) 不活化およびリコンビナント生ウエストナイルワクチン開発に関する研究：
ウエストナイルウイルスはヒトやウマでの感染では急性熱性感染症を引き起こし、時には中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎を発症することが知られている。日本でもウエストナイルウイルスが侵入し定着した場合、多くの動物での発生ならびにヒトにおいても多くの脳炎患者が発生することが危惧される。ヒト用不活化ワクチン開発のため、Vero 細胞を用いた組織培養法でウエストナイルウイルス NY99 株を増殖し、ホルマリン処理により不活化させた。ワクチン効力試験をマウスにて実施したところウエストナイルウイルス NY99 株 (100MLD₅₀) の攻撃

に対し 100%感染防御効果を示した。リコンビナント生ワクチン開発には、Fusion-PCR 法によりウエストナイルウイルス NY99 株の E 蛋白遺伝子を弱毒日本脳炎生ワクチン株 (ML17 株) に挿入したキメラウイルスを作出した。このキメラウイルスの生物学的性状を解析したところ、ウエストナイルウイルス NY99 株と比較して大幅に病原性、神経侵襲性、神経毒性が低下しており、弱毒株であることを確認した。次いで、ワクチン効力試験をマウスにて実施したところウエストナイルウイルス NY99 株 (100MLD₅₀) の攻撃に対し 100%感染防御効果を示した。

2) ウエストナイル不活化ワクチン及におけるウエストナイルウイルスに対する防御能の検討:

Vero 細胞由来ウエストナイル不活化ワクチンを免疫したマウスを用いてウエストナイルウイルス攻撃実験を行いその効果を検討した。C3H/He マウスのウエストナイルウイルス NY99-6922 株に対する 1LD₅₀ は 1.3×10^4 PFU であることが明らかとなった。またこのとき含まれるウエストナイルウイルス RNA のコピー数は 8.0×10^1 コピーであることが示された。ウエストナイル不活化ワクチン免疫マウスにおいては 1LD₅₀ 及び 100LD₅₀ WNV 攻撃群ともに生存率 100%を示し、ウイルス血症も観察されなかった。JE ワクチン免疫及び非免疫コントロール群においては多くの個体において高いウイルス血症が観察されたが、生存マウスにおいては多くの場合ウイルス血症が観察されず、ウイルス血症が観察された個体においても血中ウイルスの迅速な排除が観察された。また JE ワクチン免疫マウスにおいて 1LD₅₀

WNV 攻撃群では 40% の生存率を 100LD₅₀ WNV 攻撃群では 30% の生存率が観察された。以上の結果より、ウエストナイル不活化ワクチン免疫マウスにおいては 100%の生存率を示しウイルス血症も観察されなかった。それに対してコントロール群においては低い生存率を示し高いウイルス血症が観察された。これらの結果から現在米国で流行しているウエストナイルウイルスに対するウエストナイル不活化ワクチンの有効性が示唆された。

3) 遺伝子組換えを用いたウエストナイルウイルスサブユニットワクチンの開発:

ウエストナイルウイルスワクチン抗原開発のために、中和抗体を誘導するウイルス様粒子 (VLP) 抗原産生細胞作製を目的とした。日本脳炎ウイルス (JEV) 及び JEV VLP の研究より、VLP の産生には E と PrM 蛋白、さらに C 蛋白 C 末端のシグナルシーケンスが不可欠であることが判明している。WNV PrM の上流に配置するシグナルシーケンスについて、粒子産生の効率化という観点から解析した。その結果、シグナルシーケンスが粒子産生効率に大きな影響を与えること、かつそのアミノ酸配列長には規則性のあることが判明した。構築された PrM-E cDNA の中で最も発現効率の高い cDNA から産生された WNV VLP は、平衡蔗糖密度勾配遠心法で比重 ≈ 1.19 の画分に単一のピークを示した。VLP 抗原産生細胞株樹立の基盤を確立できた。

4) ウエストナイルワクチン用アジュバントの開発に関する研究:

ウエストナイルウイルス侵入に備えての

予防対策にはワクチン開発は大きな意義を有する。特に不活化ワクチンあるいは非感染性のサブユニットワクチン開発においては安全かつ効果的なアジュバントの併用が重要である。モデルとして現行の不活化日本脳炎ワクチンおよび日本脳炎ウイルス Virus-like particles (VLP) を用いて、VLP のワクチンとしての可能性およびアジュバントの必要性の有無に関する検討を行った。不活化日本脳炎ワクチンあるいは VLP (アジュバント併用の有無) をマウスに接種することによって誘導される各々の抗体応答をマウス血清中における日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価を測定することによって調査した。VLP 単独接種マウス群での中和抗体価は、不活化日本脳炎ワクチン接種マウス群のそれに比較し、やや低値を示したが、アジュバント併用 (アルミアジュバント) VLP 接種マウス群では、不活化日本脳炎ワクチン接種マウス群とほぼ同等の抗体応答を得ることができた。以上の結果より、製造過程の簡便性、病原体取り扱いレベルを考慮すると、アジュバント併用 VLP のワクチンとしての可能性が考えられた。

4. ウエストナイルウイルスの病原性の解明に関する研究

1) 治療法開発のためのウイルス高病原性機序の解明:

ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスは血清学的に近縁で鑑別が難しい。ウエストナイルウイルス感染臨床検体の病理学的診断法を確立するため、免疫組織化学法を行い日本脳炎ウイルスとの交叉性を示さないウエストナイルウイルス特異的抗体を調べた。その結果、調べた抗体はウエ

ストナイルウイルスに特異的であり、病理学的診断法に使用可能であることが明らかとなった。また、マウスを用いたウエストナイルウイルス感染動物モデルとの病態比較のため日本脳炎ウイルス感染動物モデルの作製を試みた。日本脳炎ウイルス感染動物モデルはヒトの感染例と同じ病変を示し、モデルとして使用できることが示された。

2) ウエストナイルウイルス NS4B の核内移行に関する研究:

ウエストナイルウイルス (WNV) NS4B 蛋白質は、他のウイルス蛋白質と共にインターフェロンのアンタゴニストになること、感染の後期に細胞の核に局在することが報告されているが、その生物学的意義は不明な点が多い。そこで、NS4B 蛋白質の核内への局在について解析し、その生物学的意義について考察した。NS4B 蛋白質は、ウイルスの感染細胞のみでなく、赤色蛍光色素を付加した融合蛋白質として、非感染細胞でも核に局在することが観察された。NS4B 蛋白質の核移行には、本蛋白質の C 末端 50 アミノ酸が重要であることが、欠損変異体の解析から明らかとなった。また、多くの NS4B 蛋白質が分裂細胞核に局在していることから、細胞分裂の制御に関与していることが示唆された。

D. 考察

ウエストナイル熱・脳炎は北米大陸においては 2005 年も多くの患者の発生があった。さらに、日本へ渡り鳥が飛来するシベリアにもウエストナイルウイルスが侵入していることが明らかとなっている。本研究はウエストナイルウイルス対策のための総合的科

学基盤の確立を目的として遂行された。現在わが国におけるウエストナイル熱における問題点として、(1) ウエストナイル熱・脳炎に対する国民の理解、啓発のための情報は十分でない、(2) ウエストナイル熱・脳炎の実験室診断技術の標準化、普及は十分でない、(3) ウエストナイル熱ワクチンは実用化されていない、(4) 日本産蚊種のウエストナイルウイルス媒介能や分布調査は行われていない、(5) ウエストナイルウイルス感染鳥検査技術の確立と標準化、普及は十分でない、(6) ウエストナイルウイルス高病原性の機序は解明されていない、等があげられる。その解決を目標として、研究を遂行した。研究は大きく社会学・疫学的研究、検査・診断研究（実験室検査法開発研究、蚊検査法研究、鳥検査法研究）、予防・治療法研究（ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究）の3項目に分けて遂行された。

社会学・疫学研究においてはウエストナイル熱流行状況に関する国民向け情報をホームページに掲載し国民の啓発を行なうとともに、ウエストナイル熱・脳炎がまだ一般国民に十分には認識されていないことが明らかとなった。検査・診断研究においては、(1) ウエストナイル熱・脳炎の病原体・血清検査法をほぼ確立し、国内各施設に技術移転した。(2) 2005年米国からの帰国者において日本でも初めて輸入ウエストナイル熱患者が確認された。この患者の確定診断にこれまで確立された血清診断法が使用され、その有用性が確認された。加えて、多数の疑い患者検体を検査したが陰性であった。(3) 新型検査キットの開発に使用しうる非感染性ウイルス用粒子の作製に成功

した。(4) 媒介蚊からのウイルス分離法、感染蚊の検出法を確立した。(5) 国内におけるウエストナイルウイルス媒介蚊の識別法を検証した。(6) 鳥類からのウエストナイルウイルス遺伝子検出法を確立した。また国内の鳥類における抗体保有状況を検査しこれまでのところすべて陰性であった。予防・治療法研究においては、(1) 組織培養細胞由来不活性化ワクチンの試験的作製を行い、動物における防御能を示した。(2) さらにキメラ生ウエストナイルワクチンの開発基盤を確立した。(3) サブユニットワクチン候補として蛋白発現ベクターを構築した。(4) フラビウイルスワクチンにおけるアジュバントの有用性を確認した。(5) ウエストナイル熱、脳炎の病態解明のための動物モデルを作製し、また、病理学的検索に有用な特異抗体の検討と陽性コントロールの作製を行った。

本年度の成果は今後以下のように活用される。(1) ウエストナイル熱・脳炎に対する国民の理解が増進される。(2) ウエストナイル熱・脳炎の輸入症例、国内発生時の迅速かつ確実な診断が可能となる。(3) わが国におけるウエストナイル熱診断技術の確立がなされ、地方衛生研究所や検疫所当におけるウエストナイル熱検査の向上と水際対策が促進される。(4) ウイルス侵入時におけるウエストナイルウイルス媒介蚊対策に対する科学基盤が提供される。(5) 鳥類による国内へのウエストナイルウイルス侵入のサーベイランス、および侵入した場合の対策を促進する。(6) ウエストナイルワクチン開発を促進し、ワクチンによる防御免疫誘導が可能となる。(7) ウエストナイルウイルス病原性の科学基盤に基づいた

治療法開発が可能となる。以上により、わが国における総合的なウエストナイルウイルス対策の推進が可能となる。

E. 結論

わが国におけるウエストナイルウイルス対策のための総合的科学基盤の確立を目的とし、社会学的研究、検査・診断研究（実験室検査法開発研究、蚊検査法研究、トリ検査法研究）、予防・治療法研究（ワクチン開発基盤研究、病原性治療法基礎研究）を遂行した。ウエストナイル熱・脳炎はまだ一般国民に十分には認識されていないことが明らかとなった。一方、検査・診断研究においては、確立した実験室診断法がヒトにおけるウエストナイルウイルス感染の確定診断に有用であることが示された。また、感染蚊や感染鳥の検出法の確立も進展した。予防・治療法研究においては、組織培養細胞由来不活性化ワクチンの試験的作製を行い、動物における防御能を示した。本年度の研究によって、ウエストナイルウイルス対策のための総合的科学基盤は大きく進展した。

F. 健康危機管理情報

1) 海外においてウエストナイル熱に感染し帰国後ウエストナイル熱を発症した輸入例が確認された。今後も輸入例の存在には十分注意すべきである。

G. 研究発表

1. 論文発表

Paresh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo

Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita. Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17. *Vaccine* 24: 402-411, 2006.

Wei-Feng Tang, Yuki Eshita, Masayuki Tadano, Kouichi Morita and Yoshihiro Makino: Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type4/Japanese encephalitis virus to vero cells. *Microbiol. Immunol.* 49:285-294, 2005.

澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 伊藤美佳子, 高崎智弘, 江下優樹, 小林陸生: 蚊からのウエストナイルウイルスの検出法および分離法の検討 (投稿準備中)

森田公一: 西ナイル熱・脳炎 — 最近の動向. *長崎市医師会報* 39: 14-16, 2005

森田公一: ウエストナイル熱に対するワクチン. *臨床とウイルス* 33: 28-32. 2005

森田公一: ウエストナイル熱. *モダンフィジシャン* 25: 523-526. 2005.

森田公一: ウエストナイル熱とワクチン開発の現状. *感染症* 35: 91-96. 2005.

森田公一: フラビウイルスによる疾患 (ウエストナイル熱、デング熱を中心に). *カレントセラピー* 27: 722-724, 2005.

森田公一: ウエストナイル脳炎. *Infectious*

Disease Report No28, 2005.

森田公一：ウエストナイルウイルス. Drug Delivery System. 20 : 556-557, 2005.

森田公一：西ナイル熱の現状. Medical Science Digest 31 : 548-549, 2005

小泉加奈子、中島由紀子、松崎真和、小井戸則彦、大曾根康夫、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎、秋月哲史：本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. 感染症学雑誌 80:56-57, 2006

林 昌宏、倉根一郎：ウエストナイルウイルス. 日本臨床 63 (増刊号7) : 321-323, 2005

林 昌宏、高崎智彦：フラビウイルス脳炎-ウエストナイルウイルスを中心に-. 臨床病理, 53: 721-727, 2005

林 昌宏、高崎智彦：ウエストナイル熱/脳炎. 遺伝 59: 37-42, 2005

林 昌宏、倉根一郎：ウエストナイルウイルスに関する最新の知見と対策. 山口獣医学雑誌, 32 : 1-12, 2005

倉根一郎：アルボウイルス感染症におけるウエストナイル熱・脳炎の位置づけ. ウィルス 55: 63-68, 2005.

倉根一郎：ウエストナイル熱・脳炎. 臨床神経学 45: 884-886, 2005

2. 学会発表

1) 国際学会

Morita K: Arboviral encephalitis infection in Asia: The Old and the New. German-Japanese Symposium on Emerging and re-emerging viruses. Toyama, Japan, May 14-17, 2005

Lim C, Takasaki T, Kotaki A, Nerome R, Ito M, Tajima S, Morita K, Ishikawa T, Kurane I: Mouse Antibody Response to Inactivated West Nile and Inactivated Japanese Encephalitis Vaccines for Immunization against West Nile virus and other Flaviviruses. 2006 National Conference on West Nile Virus in the United States. San Francisco Feb. 23-24, 2006

2) 国内学会

星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、津田良夫、比嘉由紀子、高崎智彦、小滝徹、小林睦生、矢野和彦、澤邊京子：本邦生息蚊類が保有するウイルスの検出およびその性状解析. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 5月, 箱根 2005

小林睦生、津田良夫、林利彦、葛西慎治、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40回日本脳炎生態研究会, 5月, 箱根 2005

星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、津田良夫、比嘉由紀子、當間孝子、佐藤英毅、高崎智彦、小林睦生、澤邊京子：本邦野外

捕集蚊からのアルボウイルスの検出. 第57回日本衛生動物学会大会, 6月, 札幌市 2005

澤邊京子、星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、比嘉由紀子、津田良夫、伊藤美佳子、高崎智弘、小林睦生: 蚊からのウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスの検出と吸血嗜好性から見た疾病媒介能の検討, 日米医学協力寄生虫疾患専門部会研究成果報告会, 2月, 東京 2006

Afjal Hossain Khan、福家 功、石川 豊数、井上 真吾、森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会・神奈川県 箱根, 2005年5月26-27日

Afjal Hossain Khan、福家 功、石川 豊数、井上 真吾、森田 公一: 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み. 第42回日本ウイルス学会九州支部総会、沖縄 2005年7月8-9日

林昌宏、高崎智彦、小滝徹、根路銘令子、伊藤美佳子、田島茂、森田公一、石川豊数、倉根一郎: ウエストナイル不活化ワクチンの日本脳炎血清型群ウイルスに対する交差反応の検討. 第53回日本ウイルス学会総会 横浜市 2005年11月20-22日

前田秋彦、前田潤子、高木弘隆、倉根一郎、堀内基広: ウエストナイルウイルス NS4B 蛋白質の核内移行の解析. 第53回日本ウイルス学会総会 横浜市 2005年11月20-22日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

ウエストナイルウイルス生ワクチン開発に関する特許を申請中 (長崎大学、森田公一)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

ウエストナイルウイルス感染症の認知とワクチン需要予測

分担研究者 国立感染症研究所 岡部信彦
協力研究者 国立感染症研究所 大日康史
国立感染症研究所 多田有希
国立感染症研究所 ポール キツタニ
国立感染症研究所 登坂直規
国立感染症研究所 菅原民枝
国立感染症研究所 鈴木智之

研究要旨

目的：本研究では、ウエストナイルウイルス（WNV）感染症についての、今後の一般市民に対する知識の普及の効果を測るために、認知や知識に関するベースラインを取得すること、また現在は開発導入が行われていない WNV ワクチン接種に対する需要予測を行う。この需要分析によって、接種方式、生産量や価格に対する目安を与える。

方法：一般市民を対象に WNV 感染症についての認知や知識、あるいは WNV ワクチン接種に対する需要に関する調査を 2 回行った。調査時期は、2005 年 10 月の国内発症第 1 例報告の前後とする。調査内容は、①屋外活動時間、②蚊に刺されやすいか否か、③周囲の状況、④蚊に刺されないための対策（複数回答）、⑤WNV 感染症の認知、⑥WNV 感染症の認知した時期、⑦死亡リスクの認知、⑧年齢別死亡リスクの認知、⑨感染経路の認知（複数回答）、⑩日本への侵入リスクの評価とする。WNV ワクチンの需要分析は、仮想的な質問を行い、そこでの接種希望の有無を尋ねる。軸は①費用、②副反応率、③流行情度とする。

結果：WNV 感染症の認知は 20%であった。死亡リスク（感染経路）まで認知しているのは 15（12）%であった。侵入リスクは 75%が懸念している。第一例の報道を知っているのは 21%であった。需要予測は、接種費用を 5000 円、副反応率 1/1000 万として現在の状況で導入すると、接種希望率は、小児 15%、成人 8%、高齢者 5%であった。費用が 1000 円上がると 9, 3, 0%に低下する。国内感染が確認されると 23, 15, 16%に増加する。死亡例が出ると 60, 46, 47%に増加する。副反応率が 1/100 万になると 6, 2.5, 2.3%に低下する。

A. 研究目的

本研究は、ウエストナイルウイルス（WNV）感

染症について、一般市民における今後の知識の普及の効果を測るための認知や知識に関するベー

スラインを取得することを目的とする。

WNV 感染症は、日本では 2005 年 10 月に国内での発症が確認された第 1 例の報告が行われたが、それによって、一般市民の行動が変化したかどうかを調査する。また、現在は開発導入がされていない WNV ワクチン接種に対する需要予測をする。この需要分析によって、接種方式、生産量や価格に対する目安を与えようとするのも本研究の目的である。

B. 研究方法

WNV 感染症における一般市民の認知の調査及び WNV ワクチンの需要分析を行う。調査は 2005 年 10 月の第 1 例報告の前後の 2 回に郵送法で実施した。第 1 回調査の対象者は、調査会社の保有する全国 25 万世帯が無作為抽出されているパネルから地域、年齢郡で層別抽出する。第 2 回調査は、第 1 回調査の回答者に対して行った。

調査内容は、①屋外活動時間、②蚊に刺されやすいか否か、③周囲の状況、④蚊に刺されないための対策（複数回答）、⑤WNV 感染症の認知、⑥WNV 感染症の認知した時期、⑦死亡リスクの認知、⑧年齢別死亡リスクの認知、⑨感染経路の認知（複数回答）、⑩日本への侵入リスク の評価とする。

WNV ワクチンの需要分析は、仮想的な質問を行い、そこでのワクチン接種希望の有無を尋ねる。軸は①費用、②副反応率、③流行程度とする。

それぞれ条件を変えて一人に 8 問質問する。8 問を 5 パターン作って、都合 40 通りの組み合わせとする。軸の水準は、①費用は、無料、3000、5000、10000 円、②副反応率は、1/10、1/100、1/1000 万人に意識・運動能力に障害が残る、③流行程度は、現状（海外での感染者が一人発生）、国内感染の患者が一人発生、患者が多数発生し死亡例もあるとする。

解析は、認知に関しては単純集計を行い、需要分析に関しては、接種希望率の推定結果から、年齢別需要曲線（副反応率 1/1000 万を仮定）を導出する。需要分析は、小児、成人、高齢者に質問し年齢層ごとに解析する。

C. 研究結果

回答数は 1 回目調査（9 月に実施）は 5987 名、2 回目調査（10 月に実施）は 4268 名であった。記述統計を、表 1 に示す。

表 2 に 1 回目調査を、表 3 に 2 回目調査結果を示す。表 4 に 2 回目調査における 1 例目の報告の認知と行動変化のクロス集計を示す。図 1 に蚊に刺されないための対策の変化を示す。

結果は、WNV 感染症の認知は 20%であった。死亡リスク（感染経路）まで認知しているのは 15（12）%であった。侵入リスクは 75%が懸念している。第 1 例の報道を知っているのは 21%であった。

需要予測は、表 5 に小児（6 ヶ月以上 12 歳以下の子供）の推定結果、高齢者の推定結果、成人の推定結果を示す。図 2 は、これらの推定結果をもとに需要曲線を示している。

接種費用を 5000 円、副反応率 1/1000 万として現在の状況で導入すると、接種希望率は、小児 15%、成人 8%、高齢者 5%であった。

費用が 1000 円上がると 9, 3, 0%に低下する。国内感染が確認されると 23, 15, 16%に増加する。死亡例が出ると 60, 46, 47%に増加する。副反応率が 1/100 万になると 6, 2.5, 2.3%に低下する。

D. 考察と結論

現在まで WNV 感染症の国内感染例は確認されていないこともあり、日本人の WNV 感染症に対する関心は高くはないと思われる。また、厚生

労働省や各自治体によるホームページやパンフレット等を用いた一般市民に対する教育・情報提供がされているが、その効果は公衆衛生当局によって事後評価はなされていない。今後、一般市民に対する効果的な教育・情報提供を行っていくために、現在の WNV 感染症に対する認知度・対策行動を把握しておくことは重要である。米国、カナダなど諸外国においてはすでにアンケート調査によって、WNV 感染症に対する一般市民の知識や行動の認知度が、公衆衛生当局によって評価されており、高齢者の高い感染リスク、媒介蚊対策（蚊との接触を避ける、蚊の発生源の除去、防虫剤の使用など）の必要性などが高い割合で一般市民に認知されていることが確認されている。他方で日本においては、一般市民における WNV 感染症の認知度は、先のカナダの調査（99%）と比して非常に低いことが確認された。

先のカナダにおける調査では、多くの一般市民の情報源はテレビであったことが確認されている。本研究において国内での 10 月の輸入感染例を認知している群では、ニュースの重大性の認識だけでなく行動変容も示唆された。しかし、マスメディア報道によって一般市民の蚊対策につながったのであればかどうか、輸入感染例についての正しい理解が一般市民においてなされていたのかは疑問が残る。

国内に WNV 感染例がないことは一般市民の低い認知度と関係すると思われるが、より高い認知度を得るために、WNV 感染症に関わる積極的な教育や情報提供を行うことが今後求められる。

また、今回仮想的に WNV 感染症に対するワクチンの需要予測を行った。その結果。最もリス

クが低いと思われる小児において最も高い需要を認めた。WNV ワクチンは現在開発中であり、その効果や安全性などに関する内容は未知であるが、開発導入される時の接種体制や生産面において本研究は重要な示唆を与えると思われる。また、同様の調査を継続することによって、その変化を追えば、一般市民の WNV 感染症に対するリスク認識とワクチンの効果に対する認識をモニターすることが可能である。

参考文献

1. 厚生労働省ウエストナイル熱について：
<http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/10/tp1023-1.html>
 2. 厚生労働省ウエストナイル熱・脳炎 Q&A：
<http://www.mhlw.go.jp/topics/2002/10/tp1023-1b.html>
 3. 東京都衛生研究所：
<http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/westnile/wn.html>
 4. Centers for Disease Control and Prevention. Knowledge, attitudes, and behaviors about West Nile virus—Connecticut, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2003; 52:886-8.
 5. Michael Aquino, Murray Fyfe, Laura MacDougall, and Valencia Remple. Protective Behavior Survey, West Nile Virus, British Columbia. Emerging Infectious Diseases. Vol. 10, No. 8, August 2004, 1499-1501.
- E. 健康危険情報
なし
- F. 研究発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1. 記述統計

	n	平均年齢		性別	n	割合
		平均値	S D			
1回目	5958	25.45	19.95	男	2,847	47.74
				女	3,117	52.26
2回目	4301	22.10	18.33	男	2,085	48.7
				女	2,196	51.3

表2. 1回目調査の結果

		割合
①屋外活動時間	1時間未満	14.4
	1～2時間未満	24.4
	2～3時間未満	22.6
	3～5時間未満	20.3
	5～10時間未満	13.6
	10時間以上	4.8
②蚊に刺されやすいか否か	刺されやすいと思う	40.7
	変わらないと思う	48.2
	刺されにくいと思う	9.3
③周囲の状況	水田	23.9
	山林	21.1
	河川	52.3
	養豚所	1.6
	いずれでもない	32.1
④蚊に刺されないための対策（複数回答）	家庭の周囲にある水が溜まる容器（植木鉢・バケツ）からの水抜き	8.9
	割れた窓や破れた網戸の補修	13.0
	網戸のない窓を開けたまま放置しないこと	62.4
	皮膚を覆う衣服（長袖・長ズボン）の着用	9.2
	蚊用の防虫剤を皮膚にスプレーする	36.8
	蚊取り線香や蚊取り器具（水性タイプ、電子仮蚊取りマット）等の長時間使用	51.9
	蚊帳の使用	0.7
	その他	1.7
⑤WNV感染症の認知	知っている	20.4
	知らない	51.7
	わからない	27.9
⑥WNV感染症の認知した時期	2005年	10.8
	2004年	59.3
	2004年以前	29.8
⑦死亡リスクの認知	認知している	73.0
	認知していない	0.6
	わからない	26.4
⑧年齢別死亡リスクの認知	0-4歳	35.2
	4-10歳	2.8
	10-20歳	0.8
	20-50歳	0.8
	50-65歳	0.7
	65歳以上	22.9

	わからない	36.8
⑨感染経路の認知（複数回答）	人の接触によって	3.4
	鳥との接触によって	3.9
	その他の動物との接触によって	5.2
	汚染された食品を食べることで	5.9
	汚染された水を飲むことで	10.1
	蚊に刺されることによって	62.0
	わからない	28.0
⑩日本への侵入リスクの評価	大変心配	25.0
	少し心配	49.4
	あまり心配ではない	14.9
	まったく心配していない	0.5
	関心がない	1.1
	わからない	9.0

表3. 2回目調査

	割合		
知っている	21.81		
知らない	78.19		
	増えた	変わらない	減った
家庭の周囲にある水が溜まる容器（植木鉢・バケツ）からの水抜き	6.25	91.09	2.66
割れた窓や破れた網戸の補修	6.30	92.67	1.03
網戸のない窓を開けたまま放置しないこと	27.17	70.15	2.69
皮膚を覆う衣服（長袖・長ズボン）の着用	15.30	84.31	0.40
蚊用の防虫剤を皮膚にスプレーする	32.99	66.10	0.91
蚊取り線香や蚊取り器具（水性タイプ、電子仮蚊取りマット）等の長時間使用	34.28	64.65	1.07
蚊帳の使用	0.78	96.97	2.26
その他	1.32	98.68	0.00

表4. 10月の1例目の認知の有無と行動変容のクロス

知っている群	増えた	変わらない	減った	確率値*
家庭の周囲にある水が溜まる容器（植木鉢・バケツ）からの水抜き	13.64	81.95	4.40	0.000
割れた窓や破れた網戸の補修	10.96	87.54	1.50	0.000
網戸のない窓を開けたまま放置しないこと	37.72	59.16	3.13	0.000
皮膚を覆う衣服（長袖・長ズボン）の着用	15.79	83.35	0.86	0.035
蚊用の防虫剤を皮膚にスプレーする	28.36	69.82	1.83	0.000
蚊取り線香や蚊取り器具（水性タイプ、電子 仮蚊取りマット）等の長時間使用	38.99	59.61	1.40	0.001
蚊帳の使用	0.54	96.63	2.83	0.292
その他	2.64	97.36	0.00	0.000

知らない群	増えた	変わらない	減った
家庭の周囲にある水が溜まる容器（植木鉢・バケツ）からの水抜き	4.23	93.58	2.19
割れた窓や破れた網戸の補修	5.05	94.05	0.90
網戸のない窓を開けたまま放置しないこと	24.32	73.10	2.58
皮膚を覆う衣服（長袖・長ズボン）の着用	15.08	84.65	0.27
蚊用の防虫剤を皮膚にスプレーする	34.18	65.18	0.63
蚊取り線香や蚊取り器具（水性タイプ、電子 仮蚊取りマット）等の長時間使用	33.03	65.98	0.99
蚊帳の使用	0.85	97.04	2.11
その他	0.89	99.11	0.00

*知っている群と知らない群のカイ二乗検定

表5. コンジョイント分析の推定結果

小児	マージナル効果	確率値
費用	-0.00006	0.000
副反応率	0.00010	0.000
流行程度	0.07862	0.000
流行程度	0.45774	0.000

高齢者	マージナル効果	確率値
費用	-0.00005	0.000
副反応率	0.00003	0.370
流行程度	0.11351	0.006
流行程度	0.41538	0.000

成人	マージナル効果	確率値
費用	-0.00005	0.000
副反応率	0.00006	0.000
流行程度	0.06668	0.000
流行程度	0.38223	0.000

図1 蚊に刺されないための対策の変化

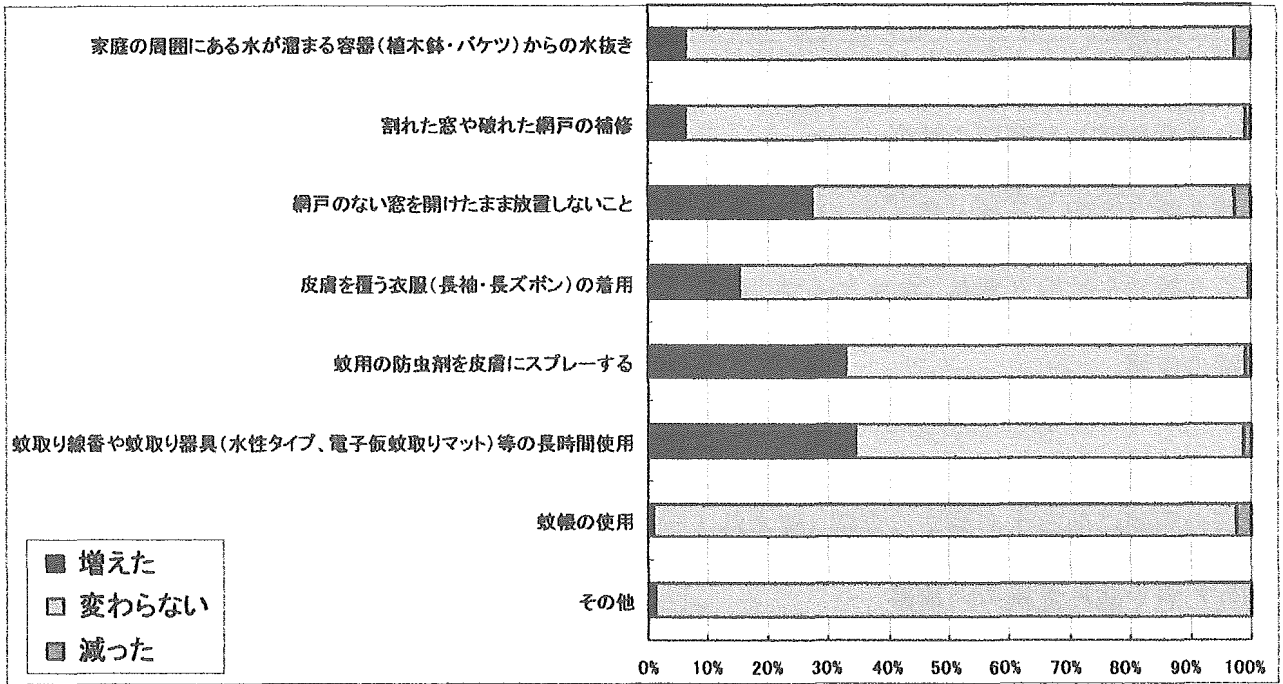


図2 需要曲線

