

分担研究報告書

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

分担研究者 倉根 一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部・部長）
協力研究者 前田 秋彦（北海道大学大学院獣医学研究科・助教授）
前田 潤子（北海道大学大学院獣医学研究科・研究員）
高木 弘隆（国立感染症研究所・研究員）
高島 郁夫（北海道大学大学院獣医学研究科・教授）

研究要旨

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。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、本研究課題では、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 SvPs 間で、両ウイルスに対する hyper immune serum 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（WB）法について検討したところ、両ウイルスに対する hyper immune serum 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 WB 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。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス（WNV）は日本脳炎ウイルス（JEV）と同一のフラビウイルス血清型群に属する。同一血清型群に属するウイルス間ではそれらの抗原性が類似しているため、各ウイルスに対する特異抗体を検出する血清診断は非常に困難であると考えられている。そこで、本研究課題においては、WNV と JEV の感染血清の鑑別法の確立を目的とする。本年度は、WNV と JEV および、それらの中空粒子（SvPs）の hyper immune serum への反応性を ELISA 法や IFA 法、ウエスタンブロット（WB）法により検討した。

B. 研究方法

1. ウイルス:WNV の NY 株（NY）と Eg101

株（Eg）、JEV の JaGA01 株（JaG）と Beijin 株（Bei）を Vero E6 細胞で増殖させた。培養上清中に放出されたウイルス粒子をショ糖密度勾配遠心法により精製し、これらをウイルス抗原とした。

2. hyper immune serum: BALB/c マウスへのウイルス感染はマウスに致死的であり、抗体価の十分に上昇した抗血清を得ることは難しい。そこで、不活化ウイルスをマウスに 2 回免疫し、最後にウイルスを感染して得られた血清を使用した。

3. SvPs: 各ウイルスの SvPs を発現するベクター（各ウイルスの C 蛋白質の C 末端領域と prM および E 蛋白質をコードする遺伝子を発現するように設計したプラスミド）を 293T 細胞に導入した。上清中に放出された各ウイルスの SvPs を

上述の様に精製し、SvPs 抗原とした。

4. 各種ウイルスと SvPs の hyper immune serum への反応性の検討：WNV と JEV の hyper immune serum を用いて、ELISA 法や IFA 法、WB 法により、その反応性を比較検討した。

C. 研究結果

1. ELISA による JEV と WNV に対する hyper immune serum の反応性の比較

各精製ウイルス粒子 40 ng (抗原)をコーティングしたプレートを用いた時の ELISA の結果を図 1 に示す。JEV の JaG 株あるいは Bei 株をコーティングした場合、抗原の 2,000 倍希釈 (20 pg) で、JEV (Bei 株) と WNV (NY 株) の各 hyper immune serum の反応性は 1.4、1.91 倍、JEV の方が高かった。一方、WNV の Eg あるいは NY 株を抗原とした場合は、各 4.9、3.4 倍、WNV の方が高かった。

次に、JEV の Bei 株、WNV の Eg あるいは NY 株の SvPs 160 ng を抗原として使用した (図 2)。Bei 株では 1.65 倍、JEV (Bei 株) hyper immune serum の反応性は WNV (NY 株) のものよりも高く、Eg101 あるいは NY 株を抗原にした場合は、それぞれ 6.17、6.31 倍、WNV (NY 株) の方が JEV (Bei 株) に比べて高かった。

2. IFA による JEV と WNV に対する hyper immune serum の反応性の比較

JEV (Bei 株) に対する hyper immune serum の反応性は、JEV の感染細胞の方が WNV の感染細胞を抗原とした場合に比べ 2~6 倍高かった (表 1)。一方、WNV (NY 株) に対する hyper immune serum の反応性は、WNV の感染細胞の方が JEV の感染細胞を抗原とした場合に比べ 4~6 倍高かった (表 1)。

また、各ウイルスの SvPs 発現細胞を抗原とした場合、JEV (Bei 株) に対する hyper immune serum の反応性は、JEV の SvPs 発現細胞の方が WNV の SvPs 発現細胞に比べ 4 倍高かった (表 2)。一方、WNV (NY 株) に対する hyper immune serum の反応性は、WNV の SvPs 発現細胞の方が JEV の SvPs 発現細胞に比べ 2~4 倍高か

った (表 2)。

3. WB による JEV と WNV に対する hyper immune serum の反応性の比較

等量 (250ng) のウイルス粒子の蛋白質を SDS-PAGE により展開し、PVDF 膜に転写した。次に、JEV (Bei 株) あるいは WNV (NY 株) に対する hyper immune serum を用いてウイルス特異的な蛋白質を検出したところ、hyper immune serum の 2,000 倍以下の希釈でそれぞれのウイルス抗原 (E 蛋白質) が特異的に検出された。hyper immune serum の 500 倍希釈で使用した場合には、弱いながら交差反応 (抗 JEV hyper immune serum で WNV を、あるいは抗 WNV hyper immune serum で JEV を検出) が認められた (図 3)。

D. 考察

ELISA 法と IFA 法では、ウイルス粒子を抗原として用いた場合と同様に、各ウイルスの SvPs を用いた場合も、JEV と WNV の交差反応が強く認められたが、両ウイルスに対する抗体の鑑別は可能であると考えられた。ELISA 法の場合、抗原として WNV のウイルス粒子あるいは SvPs を用いた場合 (3.4~6.31 倍)、JEV を抗原とした場合に比べ (1.4~1.91 倍)、効果的に両ウイルスに対する hyper immune serum を区別することが可能であった。また、IFA 法でも交差反応は認められたものの、各ウイルスに対する hyper immune serum は、それらの作製に使用したウイルスの抗原により強く反応した。WB 法では、他の方法に比べ、より特異的に両ウイルスに対する hyper immune serum を区別することが出来た。以上のことから、JEV あるいは WNV の感染により産生される抗体についても、検査鑑別が可能であることが期待できる。今後、実際のウイルス感染血清を使用して検討する予定である。

E. 結論

本研究により、JEV と WNV に対する hyper immune serum を実験室内検査により鑑別し得ることが示された。これらの結果は、JEV が既に存在する日本において、WNV の感染をより確実に診断できることを示して

いる。

なし。

F. 健康危険情報
特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

G. 研究発表
1. 論文発表
なし。
2. 学会発表

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他

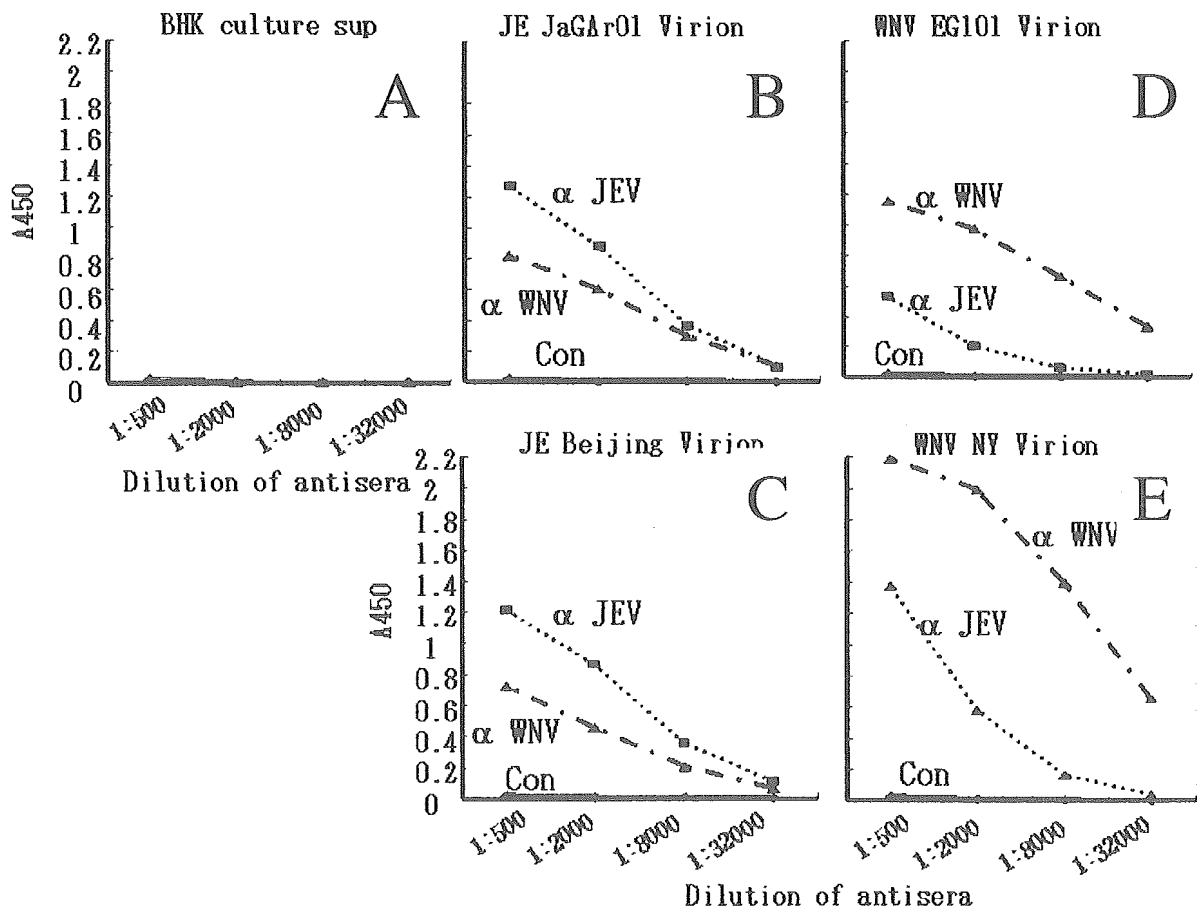


図 1. ウイルス抗原を使用した ELISA による WNV と JEV の hyper immune serum の反応性

Mock 感染 BHK 細胞 (A)、および JaG (B)、Bei (C)、Eg (D)、NY (E) を感染した BHK 細胞の培養上清を密度勾配遠心法により分画した。ウイルス粒子を含む画分を 20% ショ糖をクッションとして、超遠心分離することでウイルス粒子を得た。これらを抗原として、プレートに固定し、抗 JEV あるいは抗 WNV の hyper immune serum あるいはコントロールとして非感染 BALB/c マウスの血清を用いて ELISA することにより、両 hyper immune serum の反応性を比較した。

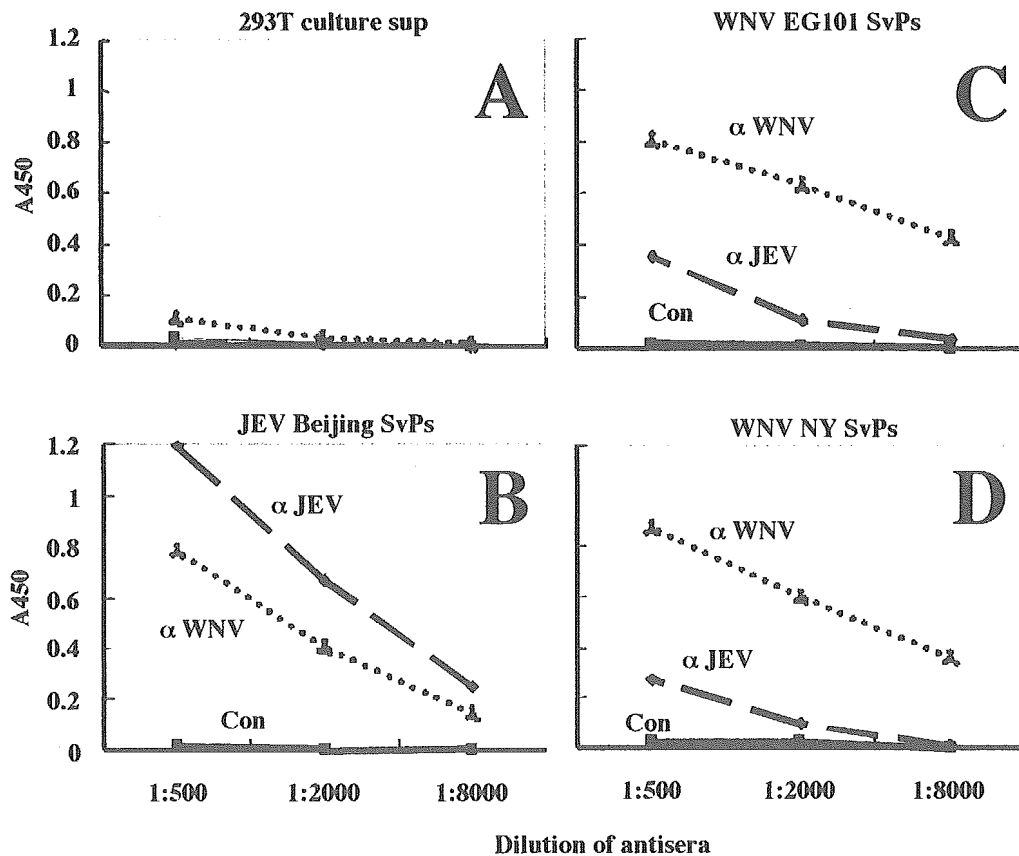


図 2. ウイルスの SvPs 抗原を使用した ELISA による WNV と JEV の hyper immune serum の反応性

Mock 導入 293T 細胞 (A)、および Bei (B)、Eg (C)、NY (D) の各 SvPs の発現ベクターを導入した 293T 細胞の培養上清を密度勾配遠心により分画した。SvPs 粒子を含む画分を 20% ショ糖をクッションとして、超遠心分離することで SvPs 粒子を得た。これらを抗原として、プレートに固定した。抗 JEV あるいは抗 WNV の hyper immune serum あるいはコントロールとして非感染 BALB/c マウスの血清を用いた ELISA 法により、両 hyper immune serum の反応性を比較した。

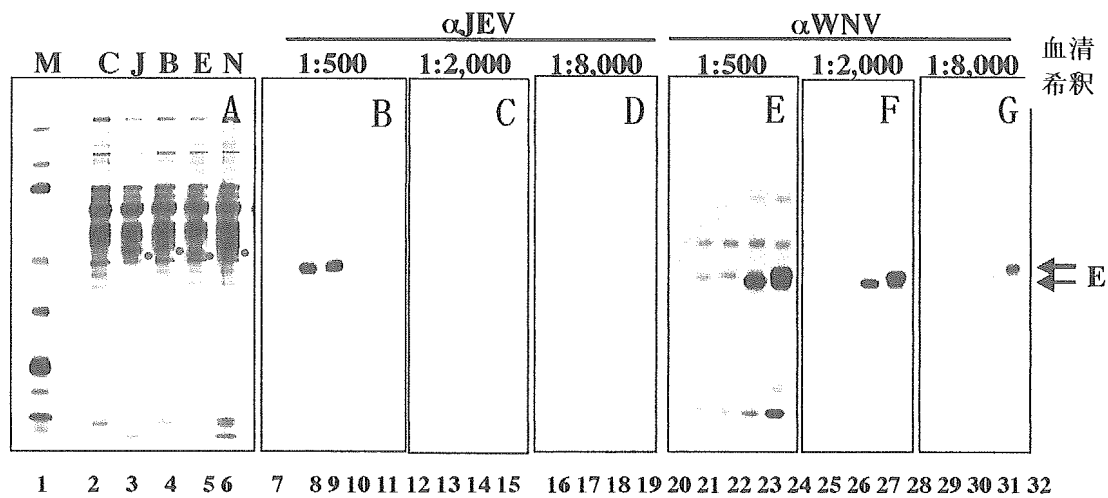


図3. ウイルス粒子を抗原とした WB 法による抗 WNV および抗 JEV hyper immune serum の反応性

コントロールの非感染 BHK 細胞の培養上清 (C, レーン 2, 7, 20) および JEV JaG (J, レーン 3, 8, 12, 16, 21, 25, 29)、Bei (B, レーン 4, 9, 13, 17, 22, 26, 30)、WNV Eg (E, レーン 5, 10, 14, 18, 23, 27, 31)、NY (N, レーン 6, 11, 15, 19, 24, 28, 32) の各ウイルス粒子を SDS-PAGE で展開し、銀染色 (パネル A) あるいは、PVDF 膜に転写したのち抗 JEV hyper immune serum (パネル B, C, D)、もしくは抗 WNV hyper immune serum (パネル E, F, G) で反応させた。右側 E (矢印) およびパネル A 中の丸印はウイルスの E 蛋白質を示す。M: 蛋白質マーカー。

表 1. ウイルス感染細胞を抗原とした IFA 法による抗 WNV および抗 JEV hyper immune serum の反応性

Ab ^a	At ^b	Abの希釈 (X)							
		1,600	3,200	6,400	12,800	25,600	51,200	102,400	204,800
JaG	NY	++	+	+	<u>±</u>	-	-	-	-
Bei	NY	++	++	+	<u>±</u>	<u>±</u>	-	-	-
NY	NY	+++	+++	++	++	+	+	<u>±</u>	-
Eg	NY	+++	++	++	++	+	<u>±</u>	-	-
JaG	Bei	++	+	+	+	<u>±</u>	-	-	-
Bei	Bei	++	+	+	<u>±</u>	-	-	-	-
NY	Bei	+	+	<u>±</u>	-	-	-	-	-
Eg	Bei	+	<u>±</u>	-	-	-	-	-	-

a: 抗原として使用したウイルス粒子

b: 抗体として使用した hyper immune serum

表 2. ウイルスの SvPs 発現細胞を抗原とした IFA 法による抗 WNV および抗 JEV hyper immune serum の反応性

a Ag (SvPs)	b Ab	Abの希釈 (X)					
		400	800	1,600	3,200	6,400	12,800
JaG	NY	+	±	-	-	-	-
Bei	NY	+	±	-	-	-	-
NY	NY	++	+	+	±	-	-
Eg	NY	+	+	±	-	-	-
JaG	Bei	++	++	+	+	±	-
Bei	Bei	++	++	+	+	±	-
NY	Bei	++	+	±	-	-	-
Eg	Bei	++	+	±	-	-	-

a: 抗原として使用した SvPs 粒子

b: 抗体として使用した hyper immune serum

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

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

分担研究者	小林 睦生	(国立感染症研究所・昆虫医科学部 部長)
協力研究者	星野 啓太	(同・昆虫医科学部 流動研究員)
	伊澤 晴彦	(同・昆虫医科学部 研究員)
	佐々木年則	(同・昆虫医科学部 主任研究官)
	小滝 徹	(同・ウイルス第一部 協力研究員)
	高崎 智彦	(同・ウイルス第一部 室長)
	澤邊 京子	(同・昆虫医科学部 室長)

研究要旨: ウエストナイル(WN)ウイルスのわが国への侵入に対するリスクは年々増してきている。わが国における WN ウイルス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。そこで、本研究では WN ウイルスの検出法として、VecTestTM(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。一方、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: 2.5pfu、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。それぞれの検出にかかる費用は VecTest の約半分であった。

ウイルスの侵入が確認されていないわが国において、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、WN ウイルス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。

A. 研究目的

米国において1999年に突如として起こったウエストナイル(WN)熱の流行は年々西へと流行域を拡大し、これまでに 60 種類以上の蚊および、300 種類以上の野鳥からウイルスが検出された。2006年3月現在で、蚊、馬、人のいずれにも感染例が報告されていない州はアラスカ州

とハワイ州のみである。また、WN 熱の小規模な流行は北米大陸のみならず、ヨーロッパ諸国、ロシア、極東地域においても散発的に起こっていることから、WN ウイルスのわが国への侵入に対するリスクは年々増してきていると言える。米国では、逆転写-PCR (RT-PCR) 法、TaqMan 法、NASBA 法などによるウイルス遺伝子の検出、あるいは ELISA 反応、イムノクロマトグラフィー法 VecTest™ (以下 VecTest) などによるウイルス抗原の免疫学的検出法などの様々なウイルス検出法が試みられているが、本研究では、蚊からのウイルスの検出において、VecTest、RT-PCR 法、TaqMan 法についてその経済性、検出限界力価、迅速性、および煩雑性などの比較検討を行った。

わが国における WN ウイルス事情は米国とは大きく異なり、未だウイルスの侵入・定着は確認されていない。従って、1)ウイルスの侵入が確認されていない場合の検出法、2)侵入および定着が確認された後の検出法、の2つの場合に分けて考えるべきである。それぞれの場合を想定して実際に行ったウイルス検出結果を紹介する。

B. 研究方法

1. ウイルス遺伝子検出法の比較

1) WN ウイルスおよびウイルス感染蚊の作成

WN ウイルスは感染研ウイルス第一部で Vero 細胞により継代、馴化した NY 株を使用した。

ウイルス感染蚊の作成は、ヒトスジシマカおよびアカイエカの胸部に WN ウイルス FCG 株 10^7 pfu/ml を 0.3μ l 胸部に注射し、ウイルス接種後 $29-30^\circ\text{C}$ 下 4% の砂糖水を与え 14 日間飼育した (大分大学医学部、江下優樹氏から分与)。各感染蚊におけるウイルス力価は、Vero 細胞を用いたプラークアッセイ法により、ヒトスジシマカ $7.5 \pm 6.5 \times 10^6$ pfu ($3.0-15 \times 10^6$, $n=3$)、アカイエカ

$2.1 \pm 1.7 \times 10^6$ pfu ($0.24-3.5 \times 10^6$, $n=3$) と算出された。

各種検出法における検出限界ウイルス力価を検討するために、非感染蚊 50 個体に力価を調整したウイルス液を添加した。また、非感染蚊 49 個体にウイルス感染蚊 1 個体を混入して磨砕し、希釈しながら検出し、検出限界を求めた。

2) VecTest (イムノクロマトグラフィー法)

付属のプラスチックチューブに雌蚊 50 匹を入れ、2.5 ml の Grinding Solution と銅製のビーズを 4 個入れる。付属の蓋をしっかりと締め、高速で約 1 分間ボルテックスし虫体を磨砕し、遠心 ($5,000$ 回転、5 分程度) した。上清 250μ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し、付属のテストストリップをマイクロチューブの中に入れ、約 15~30 分間静置した後判定を行った。

3) RT-PCR 法

蚊プールは MEM 培養液中で細胞破砕機 MM300 (QIAGEN) を用いて破砕し、軽く遠心し回収した上清からウイルス RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。RT-PCR は AccessQuick RT-PCR System (プロメガ) あるいは Takara RNA PCR Kit (AMV) により、 53°C 30 分、 92°C 2 分、(92°C 1 分 \rightarrow 53°C 1 分 \rightarrow 72°C \times 1 分を 40 回繰り返した)、 72°C 10 分の条件で RT-PCR を行った。用いたプライマーは、NS3 領域 (Fla-U5004, Fla-L5457; 配列は省略、Thomas ら、1999 から引用) と NS5 領域の 2 種類 (FU1F, CFD2R; FU2f, CFD3R, 配列は省略、Kuno ら、1998 から引用) の 3 種類である。

4) TaqMan RT-PCR 法

上述したと同様に蚊ホモジネートを作成し、ウイルス RNA の抽出を行った。用いたプライマー・プローブセットは以下の 2 種類のものである。

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)。RT-PCRは、48°C 30分、95°C10分、(95°C15秒、60°C1分)×45回の温度条件で実施した(iCycler, BioRad)。

5) 細胞接種およびウイルス分離

蚊プールはMEM培養液中で細胞破碎機MM300(QIAGEN)を用いて破碎し、軽く遠心回収した後、培養上清をC6/36、あるいはVero (Vero9013株)およびBHK (BHK21株)細胞を用いて3代盲継代を行った。細胞変性効果(CPE)は適宜観察し、最終培地上清からウイルスRNAを抽出し、RT-PCRでウイルス遺伝子の検出を行った。RNAの抽出およびRT-PCRの条件は3)に記した通りである。

2. 蚊の捕集

蚊の捕集はCDC型トラップにドライアイス約1kg/24時間を目安に発泡スチロール製の箱に入れて地上から約150~160cmの高さに吊るしたトラップ横に置き、24時間捕集した。

1) 2003~2005年の3年間で、国内合計12地域(北海道、秋田・岩手、茨城、成田、首都圏、富山、三重、大阪・兵庫、広島、高知、長崎、沖縄)で蚊の捕集を行い、合計11属47種類23,226個体、1,335プールからウイルス分離および検出を行った(詳細は省略)(表1)。

2) 2004年9月1~3日の2日間に合計80個のCDC型ドライアイストラップを用いて茨城県下2カ所で蚊の捕集を行った。猿島郡総和町では合計9種類468個体を捕集し、ウイルス検出に22プールを作成した。東茨城郡美野里町では合計10種類273個体を捕集し16プールを作

成した(合計11種類、741個体、38プール)。

C. 結果

1. WNウイルス検出法の比較

VecTestは、近年WNV検出に対応して米国で開発された抗原検出キットで、操作が非常に簡単で、検査結果が得られるまでの時間が1時間以内と非常に短く、結果の判定が容易であった(表2)。反面、キットの値段は高価で、検出感度は比較した方法の中で最も低かった(10^5 pfu)。

RT-PCR法およびTaqMan RT-PCR法は、ウイルス全般に対して行われる一般的な遺伝子検出法であるが、検出感度はVecTestよりも高く(順に 10^2 および2.5pfu)、消耗品にかかる費用も安価であった(順に1,000円および1,200円)(表2)。また、プライマーセットを選択するだけでWNウイルス以外のフラビウイルスRNA(例えば日本脳炎ウイルス)の検出も可能になることなどからその汎用性も高い。反面、RNAの抽出からRT-PCRまでの手順は非常に複雑で、使用する試薬類ならびに器具類などは多岐にわたり、それらの取り扱いには熟練を要する。さらに、判定を得るまでに10時間前後の時間がかかり迅速判定には不向きである。

2. WNウイルス検出結果(2003~2005年成果)

1) 「WNウイルスの侵入が未確認の場合の検出法」として、まずC6/36あるいはVero、BHKなどによる細胞培養を行った後にウイルスRNAを抽出し、ウイルス遺伝子の検出に用いた。2003~2005年の3年間に行ったWNウイルス遺伝子の検出結果はすべて陰性であったが(表3)、都市部住宅地を主な調査対象とした媒介蚊調査において、東京都および首都圏3県、大阪府、兵庫県で捕集されたアカイエカ種群(8プール)

およびヒトスジシマカ(5 プール)から JE ウイルス遺伝子が検出され、各地域における陽性プール率はどちらも 5%以上を示した(結果は略)。

2) 「WN ウイルスの侵入および定着が確認された後の検出法」として、カラスの死亡が報告された茨城県内において WN ウイルスの検出を目的とした 2 夜連続の捕集調査を行った。捕集作業後は直ちに種の同定および RNA の抽出を行い、捕集開始から 4 日後に TaqMan RT-PCR 法による判定結果を得た。2 箇所 で 6 属 11 種 741 個体を捕集し、38 プールから TaqMan RT-PCR により WN ウイルス遺伝子の検出を行ったが、結果はすべて陰性であった。従って、ウイルス陽性プールが得られた場合に予定した細胞接種によるウイルス分離作業は実施しなかった。本結果から、懸念された茨城県内への WN ウイルスの侵入はないと判断された。

D. 考察

わが国における WN ウイルスの検出法として、VecTest、RT-PCR 法、TaqMan 法について、その経済性、検出限界ウイルス力価、迅速性、および煩雑性などを比較検討した。わが国は未だ WN 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。従って、米国では簡便なスクリーニングの手段として汎用されている VecTest ではあるが、わが国においては、ある程度の高いウイルス力価がなければ検出できない本法は、現状では適していないと判断した。従って、捕集蚊プールからのウイルス遺伝子検出法としては、検出感度に優れる TaqMan RT-PCR を推奨した。一方、研究機関においては最終的にはウイルス分離を視野に入れるべきであり、そのためには細胞培養による最低でも 3 代の盲継代後に RT-PCR

法でウイルス遺伝子の検出を行う方法が望ましいと思われる。

C6/36 細胞接種による一連のウイルス分離作業の中で、我々は新たな昆虫フラビウイルスを発見するに至ったが、C6/36 細胞における新規フラビウイルスの存在が、WN あるいは JE ウイルスなどのほ乳類細胞に感染性の高いウイルス種の分離を困難にする可能性が示唆された。よって、初期の 2 代を Vero あるいは BHK 細胞接種により盲継代した後に C6/36 細胞系に移行する方法を試みた。その結果、JE ウイルスに関してはいずれの細胞を用いても遜色なく分離されることが確認され、もし、WN ウイルスも JE ウイルスと同程度に、その増殖が細胞種に影響されないのならば、いずれの細胞培養系を経ても分離されることが推察される。しかし、その回答はまだ得られていない。従って、現時点での WN ウイルスの分離法としては、まず Vero あるいは BHK 細胞への接種後 2 代盲継代し、C6/36 細胞接種系へ移行する方法を採用する。

一方、WN ウイルス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、TaqMan RT-PCR 法により遺伝子を検出し、陽性判定を得た蚊プールからは上述したと同様の細胞種への接種後ウイルス分離を行う方法を実施することを決定した。この場合の陽性判定は RT-PCR でを行い、遺伝子解析を実施するべきであろう。

近年の WN ウイルスの流行は、わが国へのウイルスの侵入が米国大陸からだけでなく、欧州、極東アジア地域からの侵入経路もあり得ることを示唆している。つまり、NY 株(1999 年米国 NY 市より分離)のみならず、これまでに分離された FCG 株(ナイジェリア)、g2266 株(インド)、Eg101 株(エジプト)なども含め、あら

ゆる地域からの種々遺伝子型の検出にも対応できなければならない。我々が用いたフラビウイルス共通プライマーでは、WNウイルスの遺伝子型を特定するために毎回PCR産物から得られる塩基配列を確認する必要がある。しかし、わが国の現状を考えると、むしろ、WNウイルスの遺伝的差異も含めて広く検出できる最適な方法ではないかと考えている。

E. 結論

- 1) VecTest は操作も簡単で迅速に判定が得られるが、検出感度に劣り検出費用も高価である。
- 2) RT-PCR 法および TaqMan RT-PCR 法は操作が煩雑で専門的な設備および手技が求められるが検出感度に優れる。費用も VecTest に比べると安価である。
- 3) WN ウイルスの侵入が確認されていない場合の検出法として、Vero あるいは BHK 細胞培養による2代の盲継代を行った後 C6/36 細胞へ接種し、ウイルス RNA の抽出、遺伝子検出を行う方法を推奨した。
- 4) WN ウイルスの侵入および定着が確認された後の検出法としては、TaqMan RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出を優先し、陽性蚊プールから後日 Vero あるいは BHK 細胞接種後 C6/36 細胞へ継代の一連の細胞接種系を経る、ウイルス分離方法が望ましいと考えた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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, 小林睦生. 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).

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)

II. 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 2003-05 年野外捕集蚊リスト

<i>Anopheles minimus</i> コガタハマダラカ	* <i>Cx. pipiens</i> アカイエカ種群
<i>An. lesteri</i> オオツルハマダラカ	<i>Cx. pseudovishnui</i> シロハシイエカ
<i>An. sinensis</i> シナハマダラカ	* <i>Cx. quinquefasciatus</i> ネットアイエカ
<i>Armigeres subalbatus</i> オオクロヤブカ	<i>Cx. ryuukyensis</i> リュウキュウクシヒゲカ
* <i>Aedes albopictus</i> ヒトスジシマカ	<i>Cx. sasai</i> ヤマトクシヒゲカ
<i>Ae. esoensis</i> エゾヤブカ	<i>Cx. sitiens</i> ヨツホシイエカ
<i>Ae. flavopictus</i> ヤマダシマカ	** <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> コガタアカイエカ
<i>Ae. galloisi</i> ミスジシマカ	<i>Cx. tubercis</i> カニアナツノフサカ
<i>Ae. riversi</i> リバーズシマカ	<i>Uranotaenia annandalei</i> オキナワチビカ
<i>Ae. yamadai</i> ヤマダヤブカ	<i>Ur. jacksoni</i> ストウンチビカ
* <i>Ae. vexans</i> キンイロヤブカ	<i>Ur. macfarlanei</i> マクファレンチビカ
<i>Ochlerotatus dorsalis</i> セスジヤブカ	<i>Ur. nivipleura</i> ムネシロチビカ
* <i>Oc. japonicus</i> ヤマトヤブカ	<i>Ur. novobscura</i> フタクロホシチビカ
<i>Oc. nipponicus</i> シロカタヤブカ	<i>Ur. ohhamai</i> シロオビカニアナチビカ
<i>Culex bitaeniorhynchus</i> カラツイエカ	<i>Ur. yaeyamana</i> ハラグロカニアナチビカ
<i>Cx. brevipalpis</i> クロウスカ	<i>Orthopodomyia anopheloides</i> ハマダラナガスネカ
<i>Cx. halifaxii</i> トラフカクイカ	<i>Culiseta kanayamensis</i> ミスジハボシカ
<i>Cx. infantulus</i> フトシマツノフサカ	<i>Cu. nipponica</i> ヤマトハボシカ
<i>Cx. kyotoensis</i> キョウトクシヒゲカ	<i>Tripteroides bambusa</i> キンパラナガハシカ
<i>Cx. nigropunctatus</i> クロフクシヒゲカ	<i>Coquilletidia crassipes</i> ムラサキヌマカ
<i>Cx. okinawae</i> オキナワクロウスカ	<i>Co. ochracea</i> キンイロヌマカ
<i>Cx. orientalis</i> ハマダライエカ	<i>Mansoniauniformis</i> アシマダラヌマカ
<i>Cx. pallidothorax</i> アカクシヒゲカ	

* わが国において WN ウイルス媒介蚊の可能性が高いと予想される種

** JE ウイルスの主要な媒介蚊種

表 2 各種 WN ウイルス検出法の比較

検査方法	必要機材および試薬類	所要時間	検出限界 (pfu)	消耗品費用 (円/1プール)
VecTest™	検査キット一式 ボルテックス	約 1 時間	>10 ⁵	約 2,000 円
RT-PCR 法	RNA抽出キット One step RT-PCR kit Primerセット PCR機 電気泳動装置 ゲル染色液, 写真撮影装置	約 12 時間	>10 ²	約 1,000 円
TaqMan 法	RNA抽出キット One step TaqMan assay kit Probe&Primerセット	約 8 時間	>2.5	約 1,200 円
* LAMP 法	RNA増幅試薬 kit Loopamp primerセット WNV 濁度測定装置 恒温器	約 6 時間	>10	約 1,400 円

* 栄研化学株式会社 News Release 他から引用)

表 3 2003～2005 年におけるウエストナイル(WN)および日本脳炎(JE)ウイルス
遺伝子検出結果

種名	個体数	プール数	ウイルス陽性プール数	
			WNV	JEV
アカイエカ種群	8,371	425	0	7
ヒトスジシマカ	5,667	362	0	5
コガタアカイエカ	2,376	132	0	0
ヤマトヤブカ	158	26	0	0
キンイロヤブカ	1,181	54	0	0
その他	5,473	336	0	0
合計	23,226	1,335	0	12

表 4 茨城県下 2ヶ所 80トラップで捕集された蚊からの WN ウイルス検出結果

種名		S町		M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. anopheleoides</i>	ハマダラナガスネカ	1	1	0	0	1	1	N
<i>Tr. bambusa</i>	キンパラナガハシカ	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	

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

アカイエカ群の個眼数に見られる季節変異と地理的変異

分担研究者 小林睦生 (国立感染症研究所 部長)
研究協力者 津田良夫 (国立感染症研究所 室長)
比嘉由起子 (国立感染症研究所 リサーチレジデント)
葛西真治 (国立感染症研究所 主任研究官)
澤辺京子 (国立感染症研究所 室長)

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。長崎系統チカイエカの場合、気温の低い4月にはアカイエカの個眼数の頻度分布との重なりは10数%に過ぎなかったが、季節的な気温の上昇に伴い個眼数が9個のチカイエカの構成割合が高くなり、7月には頻度分布の重なりが40%にまで達した。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。

A. 研究目的

アカイエカ群 (*Culex pipiens* gr) はヨーロッパ・シベリアから北米大陸にかけて分布するトビイロイエカ (*Cx. pipiens pipiens*)、熱帯・亜熱帯に分布するネッタイエカ (*Cx. quinquefasciatus*)、かつてトビイロイエカの亜種 (*Cx. pipiens molestus*) とされ現在は無吸血産卵性を有する生態型とされるチカイエカなど熱帯

から温帯、寒帯地方まで全世界的に分布するイエカのグループである。トビイロイエカは現在北米で大流行しているウエストナイル熱の野鳥における流行を維持している主要媒介蚊であるとされている。わが国には琉球列島から九州南部にはネッタイエカ、九州以北にはアカイエカ (*Cx. pipiens pallens*) およびチカイエカ (*Cx. pipiens form molestus*) が生息してい

る。北米大陸におけるウエストナイル熱の大流行におけるトビロイエカの重要性に加え、わが国に生息するアカイエカ群とトビロイエカの近縁関係を考慮すると、なんらかの方法によってウエストナイルウイルスがわが国に進入した際にアカイエカ群がわが国における流行を左右する可能性が高い。しかもトビロイエカが人からほとんど吸血しないのに対して、わが国に生息するアカイエカやチカイエカ、ネッタイエカは人からもよく吸血する習性があるので、野鳥におけるウエストナイル熱の流行の維持だけでなく、野鳥から人へウイルスを伝播するブリッジベクターとしても重要な働きをすると予想される。

このような推測に基づけばわが国におけるアカイエカ群の発生状況を把握することは、ウエストナイルウイルスの進入・定着・流行を監視する上で最も重要な課題の一つであるということができるところがわが国のアカイエカ群の発生状況を把握する際に非常に厄介な問題がある。それはアカイエカとチカイエカの種同定法の問題である。これら 2 種は形態が酷似しているため、これまで一般に用いられてきた種同定法は雄成虫の交尾器の形態に基づいていた。またチカイエカとアカイエカの主要な幼虫発生源は前者がビルの地下などに設置された浄化槽や湧水層など屋内の水域であるのに対して、後者は屋外に存在する雨水マスや排水溝、水がめ、貯水容器であることから、屋内の地下で採集された場合はチカイエカ、屋外で採集された場合はアカイエカであると考える傾向があった。しかしながら

我々が過去 3 年間に実施した野外調査によって、関東地方の広い範囲でチカイエカが吸血のために地上で活動していることが明らかになってきた。

アカイエカとチカイエカの発生状況を把握しかつ両種の媒介蚊としての重要性を評価するためには、これら 2 種の雌成虫同定法の確立が急務である。これまで報告されている雌成虫の同定方法としては、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。

アカイエカ群成虫の個眼数に着目してアカイエカとチカイエカを区別する方法は Noguchi and Asahina (1966) によって報告されている。この方法によれば複眼の体中線から数えて 4 あるいは 5 列目の個眼数が 8 個以下であればチカイエカ、9 個以上であればアカイエカと判定する。彼らが検討した実験室コロニーでは個眼数の違いははっきりしていた。しかしながら野外で採集されたサンプルで調べると、個眼数には変異が見られ頻度分布が重複することがわかってきた。そのため個眼数の違いによってこれら 2 種を 100% 確実に同定することはできない。さらに森ら (1982) は個眼数が幼虫の飼育温度に依存して変化し、飼育温度が高いと個眼数が 9 個であるチカイエカの割合が高くなること、また逆に飼育温度が低い場合には個眼数が 8 個であるアカイエカの割合が高くなることを報告している。そこで、これらの問題を検討し個眼数による種同定がどの程度信頼できるかを明らかにする必要がある。

本研究ではアカイエカ群の個眼数によ

る同定方法の再検討を行い、合わせて個眼数にみられる季節変異と地理的変異に関して考察を行った。

B. 研究方法

国立感染症研究所構内，春日部，品川区（林試の森公園）で採集されたアカイエカ成虫から確立した実験室系統を 27°C の恒温室で飼育し個眼数を調べた（付録参照）。得られた結果をチカイエカの 4 系統（福岡，大手町，渋谷，横浜）での調査結果と比較考察した。

個眼数の季節変化を調査するために、温度調節の行われていない住居内でアカイエカとチカイエカ幼虫を飼育して得られた成虫の個眼数を調査した。住居内には温湿度の自動記録センサーを設置し、気温と湿度の季節変化を 4 時間毎に記録した。チカイエカの個眼数調査は落合系統を用いて 2004 年 6～10 月、長崎系統を用いて 2005 年 4～7 月に実施した（図 1）。アカイエカの個眼数調査は 2005 年 4～10 月に実施し、4、5 月の実験では実験室系統（感染研系統）より得られた卵を用いたが、6 月以降は林試の森公園の雨水マスで採集された卵を用いた。

本研究とは別に我々が実施した疾病媒介蚊調査によって各地の調査地で採集されたサンプルについて、個体別に個眼数を調べ、同一個体の他部位（脚，胸部など）より抽出した DNA を用いて最近開発された分子分類的手法による種類判定を行い、同定結果の一致度を検討した。今回用いたサンプルは秋田，関東地方，大阪，広島，高知，長崎の 6 地域より得られたものである。

C. 研究結果

調査期間中の室温の変化を図 1 に示した。2004 年は猛暑で 7 月中旬から 8 月中旬まで日平均気温が 30°C 前後と気温が非常に高かった。そのためチカイエカ幼虫の発育が悪くしかも羽化した成虫の卵が孵化しなかったため、この期間のデータは得られなかった。チカイエカの飼育実験は 2005 年の 8 月にも高温のために卵が孵化せず継続できなかった。

各飼育実験で孵化後すべての個体が蛹化するまでの期間について日平均気温を計算しその平均値を表 1 に示した。チカイエカについては 19.4°C から 28.1°C，アカイエカについては 18.9°C から 30.6°C の温度範囲についてデータが得られた。それぞれの飼育期間に羽化した雌成虫の個眼数を調べ、右側 5 列目の個眼数を用いてその平均値と標準偏差を求めて図 2 に示した。図 2 には実験室コロニーで求めた平均個眼数と標準偏差も示した。

アカイエカの個眼数は 4 月にはやや少なく平均 8.72 個で、その後 6 月には 8.97 個とほぼ 9 個に達しそれ以降も同様の値を示した。実験室系統の個眼数は春日部系統が平均 8.9 個であったが、林試の森系統では 8.41 個とかなり少なかった。

チカイエカの個眼数は 2004 年 6 月から 10 月の調査では 7.69～8.0 個と安定していた。また今回調べた 4 つの実験室系統でも 7.91～8.03 個とよく似た値であった。しかしながら 2005 年の調査結果は大きく異なっていた。2005 年 4 月の飼育個体はすべて個眼数 8 個であった。しかし平均個眼数はその後徐々に増加し 7 月には 8.53 個に達した。

個眼数と幼虫発育期の気温の相関関係

を図 3 に示した。アカイエカの場合ははっきりした正の相関関係 ($r=0.875$) が見られた。これに対してチカイエカでは相関係数が $r=-0.124$ ではっきりした関係は示さなかった。2004 年と 2005 年では使用した系統が異なるので、系統毎に相関係数を求めた。その結果 2004 年の落合系統は $r=-0.714$ 、長崎系統は $r=0.985$ とかなり異なる結果が得られた。

個眼数によって 8 個以下の個体をチカイエカ、9 個以上の個体をアカイエカと判定する方法では個眼数に季節的变化があると判定精度が影響される。季節的变化が判定にどの程度影響するかを、長崎系統のチカイエカと林試の森系統のアカイエカについて、個眼数の頻度分布を求めその重複度を計算して表 2 に示した。複眼の左右で個眼数を比べると同じ個体でありながら左右で個眼数が異なる個体と、左右同数の個体がいる。左右の違いを考えずにすべての個体について頻度分布を求めてその重複度を求めた場合、4 月には 12% の重なりであったがその後徐々に高くなり 7 月には 38.3% の重複度を示した。個眼数が左右同数の個体のみを対象として重複度を求めると、4、5 月は 15% 前後であったが、6、7 月には 49.8、46.8% とかなり高い重複度であった。

チカイエカの落合系統と長崎系統で観察された個眼数の季節的变化の違いは生息地域によって個眼数の変異の様子が異なることを予想させる。そこで 6 地域の媒介蚊調査で得られたアカイエカ群のサンプルについて、個眼数による形態学的方法と分子分類法の 2 法によって種類同定を行いその結果を比較した。個眼数が 9

個でアカイエカと判定された個体でありながら分子分類ではチカイエカであった個体、また個眼数が 8 個でチカイエカと判定された個体でありながら分子分類ではアカイエカであった個体が区別できる。そこで調査したアカイエカあるいはチカイエカ集団それぞれについて、個眼数が 8 個のアカイエカの割合あるいは個眼数が 9 個のチカイエカの割合を求めて図 4 に示した。個眼数が 9 個のチカイエカは西日本のチカイエカ集団の 20% 前後を占めていたが、関東と秋田の集団では見つからなかった。個眼数が 8 個のアカイエカは大阪と広島サンプルからは見つからないが、その他の地域では集団の 20~40% ほどを占めていた。

D. 考察

チカイエカとアカイエカの種同定はこれらの種の発生源対策を構築する上で非常に重要な課題である。両種の発生源は異なり、チカイエカの主要な幼虫発生源がビルの地下などに設置された浄化槽や湧水層など屋内の水域であるのに対して、アカイエカは屋外に存在する雨水マスや排水溝、水がめ、貯水容器が主要な発生源である。したがって防除対象となる水域はまったく異なり、採集された成虫がどちらの種類であるのかがはっきりしなければ、有効な発生源対策を講じることができない。

個眼数に基づく種同定は分子分類に比べ容易で費用も安価である。しかしながら本研究の結果明らかになったように、個眼数には変異がありそのため個眼数に基づく同定法の精度は季節的にもまた地域によっても異なることが予想される。

地域的に見ると関東以北ではかなり正確な同定が期待できるが、西日本では同定の精度が落ちると思われる。この理由のひとつは個眼数が幼虫発育期間の温度条件に依存して変化することである。特にチカイエカ長崎系統の個眼数の温度依存性が高く、春先の比較的気温が低い時期にはアカイエカとの違いははっきりしている。しかし、夏季には個眼数が9個のチカイエカの割合が高くなりその結果アカイエカの個眼数との重なりが40%にまで達する。個眼数が9個のチカイエカの構成割合は大阪、広島、高知のサンプルでも20%前後であり、これらの地域でも長崎系統で得られた結果と似たような状況であることが予想される。

アカイエカの個眼数は幼虫期の生育温度が低温であると少なくなる(9個から8個に減る)傾向が見られた。これは森ら(1982)の報告と一致している。個眼数が8個のアカイエカの構成割合にも地域差が見られた。秋田や関東のサンプルで個眼数が8個のアカイエカの割合が比較的高いのは気温の影響である可能性が高い。しかしながら、高知、長崎など比較的温暖な地域で個眼数が8個のアカイエカが20~40%ほど含まれる理由は今回の調査では不明である。

個眼数の地理的変異は観察個体数が十分ではないので、さらに検討を加える必要があるだろう。

E. 結論

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。実験室系統より得られたサンプルで検討した限りでは、複眼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、季節的に気温が変化する状況下で得られたサンプルでは、アカイエカでもチカイエカでも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。発育温度が低いと個眼数は少なくなり、発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。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。

F. 健康危険度情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし