

比嘉由紀子・津田良夫・倉橋 弘・林 利彦・  
葛西真治・澤邊京子・星野啓太・駒形 修・  
伊澤晴彦・佐々木年則・富田隆史・二瓶直子・  
小林睦生 (2005) : 関東地方におけるチカイエ  
カとアカイエカの地上での発生状況(個眼数  
による判別の試み)。第 57 回日本衛生動物学  
学会大会、6 月 2-3 日。札幌市。衛生動物、56、  
(Suppl.), 44

津田良夫・比嘉由紀子・星野啓太・葛西真治・  
林 利彦・伊澤晴彦・駒形 修・佐々木年則・  
澤邊京子・富田隆史・倉橋 弘・二瓶直子・  
小林睦生(2005) : 成田空港の周辺 3 地域にお  
ける疾病媒介蚊相に関する調査結果。第 57  
回日本衛生動物学会大会、6 月 2-3 日。札幌  
市。衛生動物、56、(Suppl.), 55.

小林睦生・葛西真治・伊澤晴彦・林 利彦・  
二瓶直子・津田良夫 (2005) : 都市部における  
アカイエカ越冬個体の観察。第 57 回日本衛生  
動物学会大会、6 月 2-3 日。札幌市。衛生動  
物、56、(Suppl.), 49.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

# 地理情報システムを用いた媒介蚊の発生環境解析

雌蚊の捕集結果から定点を類型区分

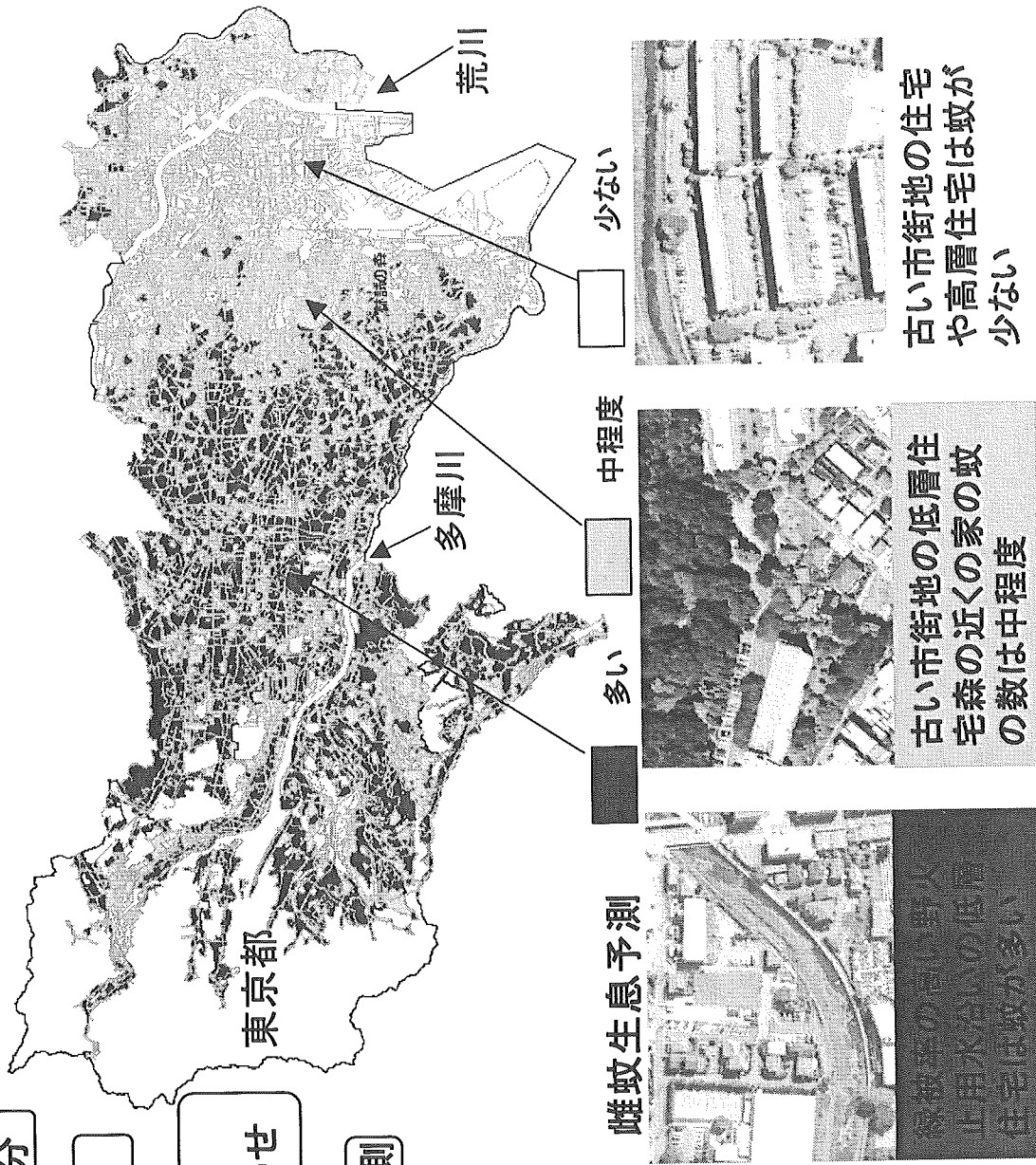
空中写真による類型の環境判読

東京都の都市情報データ(建ぺい率・容積率など)と蚊の生息条件を重ね合わせ

首都圏における蚊の生息状況を予測

蚊の生息情報管理

人口動態調査・洪水地形分類・国土基本図など数理地図統計との重ね合わせによるリスク管理



雌蚊生息予測

古いま街地の住宅や高層住宅は蚊が少くない

古いま街地の低層住宅森の近くの家の蚊の数は中程度

蚊の生息予測

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媒介蚊の殺虫剤感受性調査および抵抗性簡易検出法の確立

分担研究者：富田 隆史（国立感染症研究所）

研究協力者：李時雨，駒形修，葛西真治（国立感染症研究所）

アセチルコリンエステラーゼ(AChE)の殺虫剤非感受性は、コガタアカイエカの有機りん剤抵抗性の主要因である。AChEをコードする*Ace2*遺伝子に生じた1つのアミノ酸置換変異 Phe455Trp が酵素の殺虫剤非感受性をもたらすことが最近明らかにされた。この抵抗性*Ace2*遺伝子の国内における頻度分布を、本州、九州、沖縄を含む7つの地点での採集にもとづき、調査した。その結果、抵抗性遺伝子は日本各地にほぼ一様に約90%またはそれ以上の高い頻度で分布していると推測された。Phe455座位近傍の200余りのcDNA配列を決定した結果に基づくと、Phe455Trp置換変異は単一起源性を示した。

#### A. 研究目的

コガタアカイエカは日本脳炎を媒介する主要な衛生害虫であるが、1960年代までの日本で日本脳炎の罹患率が高かった時期においても、水田・湿地に発生するこの蚊を化学的防除によって駆除するという発想はなかった。水田に散布する農薬による選択により、1980年代までに、有機りん剤に著しい抵抗性を示すコガタアカイエカが日本各地に分布したことが知られている。その抵抗性のおもな要因は、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)の感受性低下による。神経シナプス後膜上にあるAChEは、神経伝達物質のアセチルコリンを加水分解する生体機能をもち、有機りん系とカーバメイト系の殺虫剤の作用点である。1980年代に試験された各地の有機りん剤抵抗性のコガタアカイエカは、ほとんどの有機りん系薬剤に対して1000倍以上の抵抗性比を示した。有機りん系殺虫剤の有効成分として農薬・防疫用殺虫剤にも広く用いられているフェニトロチオンの体内活性化型フ

ォームであるフェニトロオクソンに対しては、有機りん抵抗性系統Toyamaの蚊に含まれるAChEは、約1000倍の感受性低下を示すことが知られている。

2004年にコガタアカイエカで2つ目となるAChE遺伝子(*Ace2*) cDNA配列が殺虫剤感受性と抵抗性の系統を使って決定され、活性中心近傍のアシルポケット部位に生じた一つのアミノ酸置換、Phe455Trp、が有機りん剤を始めとする数多くのAChE阻害剤の感受性を著しく低下させることが立証された。1990年代後半から2000年にかけて、日本の水田で農薬として使われる主力殺虫剤には、AChEとは作用点が異なるクロロニコチニル系の薬剤が加わった。その後、コガタアカイエカ集団における有機りん剤抵抗性レベルがどのように推移していったかについては、確かめられていない。

日本脳炎の地方的再興、ウエストナイル熱ウイルスの日本侵入などに備え、農村地域での人家と畜舎などで蚊成虫を化学的に

防除する際に、コガタアカイエカに対して、主要な防疫用・家畜用殺虫剤成分である有機りん剤がどの程度有効であるか評価する必要がある。本蚊種において、有機りん剤抵抗性の主要因である AChE 抵抗性遺伝子の頻度分布を調査した。併せて、抵抗性遺伝子を直接塩基配列決定によらず簡易に判別することを目的として、対立遺伝子特異的 PCR (AS-PCR) に基づく分子判別をアミノ酸置換変異の検出に適用することを試みた。

## B. 研究方法

昆虫：2003年と2005年に本州の5県、長崎県、沖縄県のそれぞれ1つの畜舎において、ライトトラップまたは吸虫管で蚊を採取し、生きた雌成虫を断頭し、頭部は酵素阻害試験に、残りを RNA 抽出に用いた。採集情報の詳細は、研究結果の項で後述する。

酵素阻害試験：フェニトロオクソン(和光純薬)を酵素阻害剤として用い、Ellman の DTNB 法に基づく前方法(Nabeshima et al, 2004)に従い、アセチルチオコリン(Sigma-Aldrich)の加水分解に共役する呈色反応に基づき、AChE 活性を測定した。

遺伝子型決定：1頭ごとに RNA を Isogen (Nippon Gene) を用いて抽出し、ReverTra Ace (Toyobo) を用いて逆転写反応を行った。得られた cDNA を鋳型とし、F101-CtAce2 (GTTGTGGACGGAGCCTTC) と R102-CtAce2 (AGGGGTTTCCTTTGCTTCTG) をプライマーとして、Ace2 cDNA 断片を PCR 増幅した。その産物を ExoSAP-IT (Amersham) を用いて dNTP と ssDNA を分解する反応を行った。この PCR 産物を鋳型として、対立遺伝子特異的プライマー F103-CtAce2 (GTAACACCGAGGAGGGCTACTACTTT)

または F104-CtAce2 (TAACACCGAGGAGGGCTACTACTGG) のそれぞれ一方と、共通プライマー R105-CtAce2 (CCGTTTCACGTACGGATTCAACTCC) を含む2つの反応液を用意し、cDNA 配列に含まれる Phe455Trp 置換変異(TTT to TGG)を標的とする対立遺伝子特異的 PCR (AS-PCR)を行った。反応試薬には iQ SYBR Supermix (Bio-Rad) を用い、PCR と cyber green 法による dsDNA 量の検出には iCycler (Bio-Rad) を用いた。温度サイクリング条件は 95 °C 3' > [95 °C 15" > 50 °C 30" > 72 °C 30" ] x50 であった。F104-CtAce プライマーを用いた反応における threshold cycle ( $C_t$ ) から F105-CtAce105 プライマーを用いた反応における  $C_t$  を差し引いた比較値( $\Delta C_t$ )を求め、Phe455 座位の遺伝子型推定に用いた。一部の個体に関しては、AS-PCR に使ったものと同じ cDNA を鋳型とし、F101-CtAce2 と R102-CtAce2 のそれぞれをプライマーとし、BigDye Dideoxy Terminator Cycling kit v1.1 (ABI) を用い、direct sequencing により配列を決定した。

## C. 研究結果

沖縄を除く、国内の6地点で採集した合わせて135頭の雌成虫について(表1)、1頭ごとに、頭部に含まれる AChE の *in vitro* 酵素阻害試験を行い、0.0001 M のフェニトロオクソン濃度における AChE の相対阻害率をアセチルチオコリンを基質として測定した。残りの虫体に由来する Ace2 cDNA を鋳型として AS-PCR を行い、比較  $C_t$  値を求めた。このうち、明瞭に殺虫剤感受性が示された個体または大きな比較  $C_t$  値から Trp455 ホモ接合体と容易に推定された一部の個体(図1、凡例中のアミノ酸表記のない R/R ラベルで示

される45頭)を除き、90頭については *Ace2* cDNA の部分配列を direct sequencing により決定した(図1, 凡例中の F/F455, F/W455, および W/W455 のラベルで示される個体)。酵素阻害試験と AS-PCR の結果をパイプロットで表したものが図1である。cDNA の直接塩基配列決定とパイプロットの結果から総合的に判定し、AChE の阻害剤感受性に関する表現型(または遺伝子型)を3群に分けた(図1, S/S, S/R, および R/R)。それぞれの群における酵素阻害率と比較 *Ct* 値の平均を求めたものが表2である。

阻害剤に対して感受性と低感受性を示す2種類の AChE を併せもつ表現型(S/R)と感受性の AChE のみをもつ表現型(S/S)の2群に関しては、両者にそれぞれに属する任意の2個体を酵素阻害率で識別することは困難であった。この識別が困難であった理由として、次の2点が影響しているものと考えられる:(i) *Ace1* 遺伝子の *Ace2* 遺伝子に対する相対発現量が非常に低いと測定されていること(水野, 未発表); (ii) 殺虫剤低感受性の *Ace2* Trp455 変異酵素は、生体内の本来の基質であるアセチルコリンに対しては、加水分解活性が同等またはそれ以上の活性を示すが、本実験で用いた基質であるアセチルチオコリンに対しては、逆に1/3程度の加水分解活性しか示さないこと(Kono and Tomita, 2006)。これらの理由により、*Ace2* Phe/Trp455 ヘテロ接合体のフェニトロオクソン阻害率が感受性 Phe455 遺伝子のホモ接合体の阻害率に接近した値となったものと理解できる。一方、比較 *Ct* 値による *Ace2* 遺伝子型の比較においては、Trp455 ホモ接合体と Phe/Trp455 ヘテロ接合体との識別が困難であった。AS-PCR に用いた2つのアミノ酸置換特異的なプライマーの3'末端には、連続する2塩基の違い

が互いに含まれているにもかかわらず、プライマー末端にミスマッチを生じる鋳型との組合せにおいて、polymerization 開始に十分な抑止効果が得られなかったものと考えられる。以上の結果から、酵素阻害率と比較 *Ct* 値を併用することにより初めて、*Ace2* の Phe455 座位に生じた抵抗性型変異に関する3つの遺伝子型が識別可能であったといえる。

沖縄で採集した26頭の蚊については、*Ace2* cDNA の部分配列のみを決定し、Phe455 座位の遺伝子型を推定した。この結果と沖縄を除く国内の6地点で採集した135頭について同遺伝子型を推定した結果から、各採集サンプルにおける Trp455 抵抗性遺伝子の頻度を求めた(表1)。その結果、合わせて322の *Ace2* 遺伝子のうち、抵抗性遺伝子が306含まれると推定された。富士見市で採集した蚊を用いて Trp455 遺伝子の頻度が82%であったことを除き、他の6サンプルでの同遺伝子の頻度は92-100%であった。採集地には本州の5県のほか、沖縄本島、長崎県を含んでいることから、有機りん剤作用点に感受性低下をもたらす *Ace2* 抵抗性遺伝子は、全国的に一様に高い頻度で分布しているものと推測される。116頭を対象とした *Ace2* cDNA の配列決定では、Phe455 座位を含む226 base を共通して解読することができた。塩基置換多型を解析し、この鎖長に含まれる対立遺伝子の最少数を推定した。その結果、16の Phe455 をコードする感受性遺伝子からは、少なくとも7種類の異なるハプロタイプが含まれていると推定された。コガタアカイエカの自然集団中では、この感受性遺伝子は現在圧倒的に少数者であるにもかかわらず、遺伝的多様性を保持していたことになる。一方、Trp455 置換変異を含む抵抗性遺伝子ハプロタイプは同一で一つの起源に

由来するものとみなされる。殺虫剤感受性遺伝子に生じた隣接する2塩基置換突然変異が、水田における農薬の散布による選択を受けて全国的に分布を広げていったものと考えられる。

#### D. 考察

AS-PCRに基づく比較 Ct法のみによっては、*Ace2* cDNA の Phe455Trp 置換変異に関する3つの遺伝子型を明瞭に識別することは困難であった。その原因として、PCRプライマーのミスマッチ特異性の低さが考えられる。Molecular beacon を用いても同座位の変異の検出を検討したが、良好な成績は得られなかった。これらの方法とは原理的に異なる、プライマー伸長法に基づく SNaPshot 法などの適用をさらに検討する必要がある。

コガタアカイエカは、水田や湿地などの比較的広い水域に発生し、アジア各国に広く分布し、アカイエカ種群蚊に比べてその移動能力は高いとみなされている。本種の国内における越冬場所は未だに不明であるという理由もあり、検証はされていないが、一部の個体群は毎年偏西風にのり大陸より飛来し、そのことが日本脳炎ウイルスの国内における供給源となっているという仮説も唱えられている。水田における害虫防除の目的では、現在に至るまで有機りん系とカーバメイト系の農薬が主力である。本種の広域移動と殺虫剤抵抗性遺伝子の起源を考える上でも、アジア各国における本種の殺虫剤抵抗性遺伝子について分子解析を進める必要がある。

#### E. 結論

1. 有機りん剤・カーバメイト剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼに殺虫剤非感受性をもたらす *Ace2* の Phe455Trp 置換変異遺伝子が概ね 90% またはそれ以

上の頻度で全国的に分布していると推定した。

2. Trp455 置換をもつ抵抗性遺伝子は単一起源性を示した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T (2004) An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*, Biochemical and Biophysical Research Communications 313: 794-801.

Oh S-H, Kozaki T, Mizuno H, Tomita T, Kono Y, (2006) Expression of *Ace*-paralogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system, Pesticide Biochemistry and Physiology 85: xxx-xxx (in press).

##### 2. 学会発表

Oh S-H, Kozaki T, Tomita T, Kono Y, Expression of *Ace*-paralogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring Insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system, 5th Asia-Pacific Congress of Entomology, 19 Oct. 2005.

呉承協, 古崎利紀, 富田隆史, 河野義明, 活性中心のアミノ酸置換が AChE の特性に及ぼす影響, 日本応用動物昆虫学会 第 50 回大会, 2006 年 3 月 29 日.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得  
(無し)
2. 実用新案登録

- (無し)
3. その他  
(無し)

表1. 殺虫剤抵抗性Ace2遺伝子の頻度

採集地 (年)	個体の数	遺伝子型の数			R遺伝子の頻度
		S/S	S/R	R/R	
千葉県酒々井町 (2003)	23	0	1	22	0.98
埼玉県富士見市 (2003)	24	4	0	20	0.83
神奈川県横浜市 (2003)	24	2	0	22	0.92
富山県小矢部市 (2003)	16	0	0	16	1.00
岐阜県岐阜市 (2003)	24	1	0	23	0.96
長崎県諫早市 (2003)	24	0	1	23	0.98
沖縄県那覇市 (2005)	26	0	0	26	1.00
合計	161	7	2	152	0.95

表2. 推定されたAce2遺伝子型ごとの酵素阻害率と比較Ct値

推定Ace2 遺伝子型	個体の数	阻害率(%) ± S.D.	$\Delta Ct$ ± S.D.
S/S	7	74.2 ± 5.9	-4.0 ± 1.7
S/R	2	46.8 ± 8.7	1.8 ± 0.2
R/R	126	7.0 ± 4.8	7.4 ± 1.4
合計	135	-	-

表3. Ace2遺伝子に含まれる塩基配列の多様性

F455またはW455の 遺伝子の数	塩基配列を決定した 個体の数	異なる ハプロタイプの数 *
16 (F)	7 (F/F) + 2 (F/W)	7
100 (W)	49 (W/W) + 2 (F/W)	1

\* 最少推定数





アカイエカ種群から分離された新規フラビウイルスの性状解析

分担研究者 澤邊 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部 室長）  
研究協力者 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）

**研究要旨：** 国内でのウエストナイル（WN）ウイルスの検出を目的とし、2003年-2005年の3年間に国内各地で主に CDC タイプのドライアイストラップを用いて蚊を捕集し（合計 11 属 47 種類 23,226 個体）、ウイルス遺伝子の検出と、Vero、BHK21 および C6/36 の細胞を組み合わせた培養系によりウイルス分離を試みた。一連の作業の中で、アカイエカ種群から WN ウイルスでも日本脳炎（JE）ウイルスでもない新規フラビウイルスを分離することに成功した。次いで RT-PCR 法により本ウイルスの全塩基配列を決定し構造解析を行った。本ウイルスのゲノム全長は 10,840 塩基、ウイルス蛋白質は 3,364 アミノ酸から構成されており、近年発見された Kamiti river ウイルス（KRV）あるいは Cell fusing agent（CFA）など昆虫フラビウイルスに近縁なウイルスではあるが、これらよりもさらに起源的な位置にある進化的にも非常に興味深いウイルスであることが判明した。継続して行っている蚊の捕集調査から、本ウイルスは国内のかなりの地域でしかも高率に存在していることが明らかになり、アカイエカ以外にも同類のウイルスが存在することが分かってきた。フラビウイルスに対する実験系モデルとしてウイルス感染実験などへの利用が期待されるだけでなく、フラビウイルス全体の生態、進化、および分布拡散を考察する上での重要なツールとなる可能性も示唆される。

#### A. 研究目的

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（JE）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 ら、1962）、80 年代にゲタ（GET）ウイルス（Igarashi ら、1981）と SP ウイルス（Okuno ら、1984）などの報告があるが、国内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変貌し、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と想像された。一方、米国においては近年ウエストナイル (WN) 熱が、東南アジアではデング熱などが頻発し、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中、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ない状況下にあると言っても過言ではない。

我々はこれまでに、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%以上という非常に高い頻度で分布していることを明らかにしてきた。そこで本年度は、野外捕集蚊プールから分離に成功したウイルス株 (以下、便宜上 CxFV と呼称する) を用いて遺伝子構造解析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 野外捕集蚊

2003年5月～2005年9月にかけて国内各地で、主にドライイストラップにより捕集された蚊は、11属47種類、合計23,226個体で、種別、地域別にまとめウイルス分離用プールを作成した。本研究では2003年7月に新宿区戸山で捕集された蚊プールから得られたウイルス株の性状解析を行った。

### 2. ウイルス分離

捕集蚊は最高50個体までを1プールとし、MEM培養液中で細胞破砕機MM300 (QIAGEN) で破砕後、分利用乳剤を作成した。軽く遠心し上清を回収、C6/36細胞に接種し28°C、5%CO<sub>2</sub>下で7日間培養した。その

後2代盲継代培養を行い、継代培養中は適宜細胞変性効果 (CPE) を観察し、最終培地上清からRNAを抽出した。

### 3. ウイルス遺伝子の検出

C6/36細胞培地上清からRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてウイルスRNAの抽出を行った。RT-PCRはAccessQuick RT-PCR System (プロメガ) およびTakara RNA PCR Kit (AMV) により、53°C30分、92°C2分、(92°C1分→53°C1分→72°C×1分を40回繰り返し)、72°C10分の熱変性を加えた。

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) の合計3種類である。

### 4. 遺伝子解析

NS3 および NS5 領域の遺伝子検出用プライマーで増幅された配列を基にプライマーを設計し RT-PCR 法により増幅した。この操作を数回繰り返し解読範囲を伸長した (図 1)。5' および 3' 両末端の塩基配列は RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法によって決定した。塩基配列は PE/ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (PE/ABI) を用いて解読し、BLAST-search および GENETYX-WIN ver.6 により解析を行った。

## C. 結果

各種蚊の MEM 乳剤を C6/36 細胞に 3 代接種したところ、図 2 のように様々な形状の CPE が観察され、一部ウイルス分離に成功した。ウイルスが C6/36 細胞内に侵入、感染し

ている像は電子顕微鏡撮影によって確認された(図3)。

2003年7月新宿区戸山で捕集されたアカイエカ種群から分離されたウイルス株(CxFV)から抽出したRNAのNS3およびNS5領域を基点にRT-PCRを行い、次いでRACE法によりウイルスゲノムの全長配列を解読した結果、ゲノム全長10,840塩基、ウイルス蛋白質3,364アミノ酸から構成されることが明らかになった。次いでNS5領域の全塩基配列(約900アミノ酸)を基に、WNおよびJEウイルスなどを含むフラビウイルス科の分子系統樹をMaximum Parsimony法により作成した(図4)。CxFVは、近年発見された昆虫フラビウイルスのKamiti riverウイルス(KRV, Sangら, 2003; Crabtreeら, 2003)やCell fusion agent(CFA, Stollar and Thomas, 1975; Cammisa-Parksら, 1992)と同じクラスターに位置するものの、WNやJEウイルスとの距離は上記2種よりもさらに遠く、これまでに知られているすべてのフラビウイルスに対して最も起源的な位置にあることが示唆された。

また、我々が継続して行っている蚊の捕集調査から、本ウイルスは国内のかなりの地域で、しかも高率に存在していることが明らかになり、アカイエカ以外にも、コガタアカイエカ、シロハシイエカ、ヒトスジシマカ等に同類のウイルスが存在することも確認された。それぞれの分離株についても同様に性状解析を進めている。

#### D. 考察

本研究で我々が分離したCxFVは、WNやJEウイルスを含む人感染性を示す既知のフラビウイルス種との遺伝的距離は遠く、

近年発見された昆虫フラビウイルスの一種であるKRVやCFAにむしろ近縁ではあるが、これまでに知られているすべてのフラビウイルスに対して進化学的に最も起源的なウイルスであることが示唆された。本ウイルスの遺伝的および生物学的特性を追求することは、純粋に進化学的議論を行う上で重要な意味を持つことは明白である。

本研究では、蚊プールのC6/36細胞への接種に先んじて、試験的にほ乳動物由来のVeroあるいはBHK21細胞への接種と継代を試みたが、CxFVはいずれの蚊プールからも分離されなかった。つまり、ほ乳類由来の細胞への感染は成立せず、昆虫細胞でのみ病変を示すことが示唆されたのである。今後はマウスを用いて病原性の評価を行う予定であるが、本細胞培養系での結果から、おそらくCxFVはほ乳類への感染性がないか非常に低い、昆虫特異的なフラビウイルスの一種であることが推察される。将来的には、CxFVのように野外に広く分布するウイルスで、かつ、人への病原性の低いウイルスを遺伝子導入ベクターとして利用することも期待される。

CxFVは国内のかなりの地域で、しかも高率に存在していることが我々の野外調査から明らかになっているが、自然界における生態学的な知見はほとんど得られていない。例えば、潜在的に本ウイルスを保有している蚊体内で、同じフラビウイルスの仲間であるJEウイルス、あるいはWNウイルスなどが感染した場合に、蚊虫体に、あるいは互いのウイルスに対してどのような影響を与えるか。共感染

した場合の蚊体内におけるウイルスの局在・動態について、自然界における伝播様式は経卵巣伝播であるのか、など今後検討すべき課題は多い。

一方、日本脳炎は、わが国では過去に猛威を振るい1980年代を境に急激に患者数が減少したことは知られているが、それ以降現在に至っても少数ではあるが毎年患者が発生し、豚においては西日本を中心にJEウイルスの抗体価は毎年ある時期に上昇し、蚊からもウイルスが分離される現状にある。このことは、国内においてJEウイルスが依然として活発に活動していることを示しており、JEウイルスの越冬生態、および自然界での感染環を知ることは、多くの研究者の長年の懸案事項であった。媒介蚊あるいは増幅動物の体内で越冬する可能性については古くから議論されてきたが、未だその実態を把握するには至っていない。CxFVのような人への親和性の低い昆虫フラビウイルスを実験モデルとして用いた感染実験によって伝播経路を探ることが出来れば、JEウイルスの越冬生態をもシミュレートすることも不可能ではない。

## E. 結論

1) 2003-2005年の3年にわたり国内各地で主にCDCタイプのドライアイストラップを用いて、合計11属47種類23,226個体の蚊を捕集した。それら捕集蚊をWNウイルスを含むフラビウイルス遺伝子の検出と、Vero、BHK21およびC6/36の細胞を組み合わせた培養系によりウイルス分離に用いた。

2) イエカ属蚊から新規フラビウイルス

遺伝子を検出し、C6/36細胞培養系によりアカイエカ種群からウイルスを分離することに成功した(CxFV)。

3) CxFVの全塩基配列を決定し、NS5領域の塩基配列を基に作成した分子系統樹から、本ウイルスは昆虫フラビウイルスに近縁であるが、既知のフラビウイルスの中で進化学的に最も起源的な位置にあることが判明した。

4) CxFVの発見は、フラビウイルスに対する実験系モデルとしてウイルス感染実験などへの利用が期待されるだけでなく、フラビウイルス全体の生態、進化、および分布拡散を考察する上での重要なツールとなる可能性も示唆している。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M. and Sawabe, K. Isolation and genetic characterization of a new flavivirus from *Culex pipiens* mosquito in Japan (投稿準備中).

2) 津田良夫, 比嘉由紀子, 倉橋弘, 林利彦, 星野啓太, 駒形修, 伊澤晴彦, 葛西真治, 佐々木年則, 富田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林陸生. 都市域における疾病媒介蚊の発生状況調査—ドライアイストラップを用いた2年間の調査結果— (Med. Entomol. & Zool., 投稿中).

3) Higa, Y., Hoshino, K., Tsuda, Y., Kobayashi, M. Dry ice-trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern

Hokkaido, Japan (Med. Entomol. & Zool., in submitted).

2. 学会発表

- 1) 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55回日本衛生動物学会大会, 4月, 福井市 (2004)
- 2) 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. 6月, 神戸市 (2004)
- 3) 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)
- 4) 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)



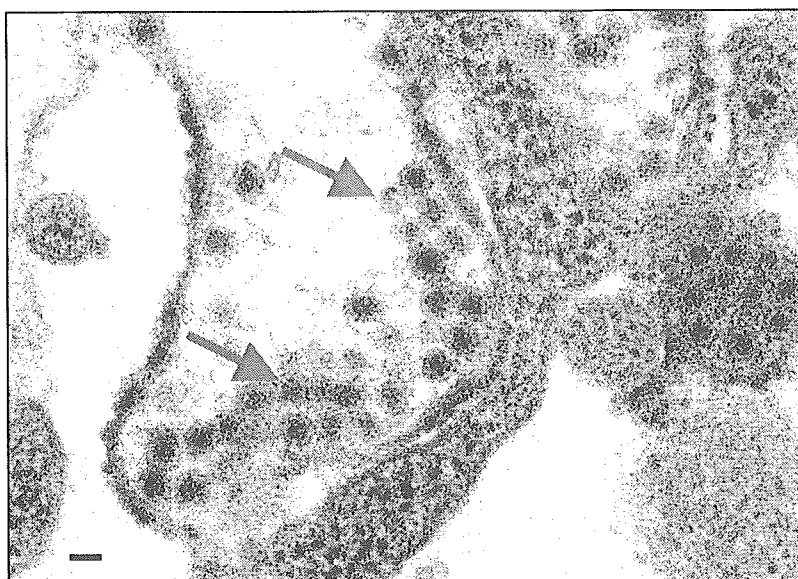


図3 接種後4日目のC6/36細胞内に蓄積したウイルス粒子  
(写真 矢野和彦氏より提供)

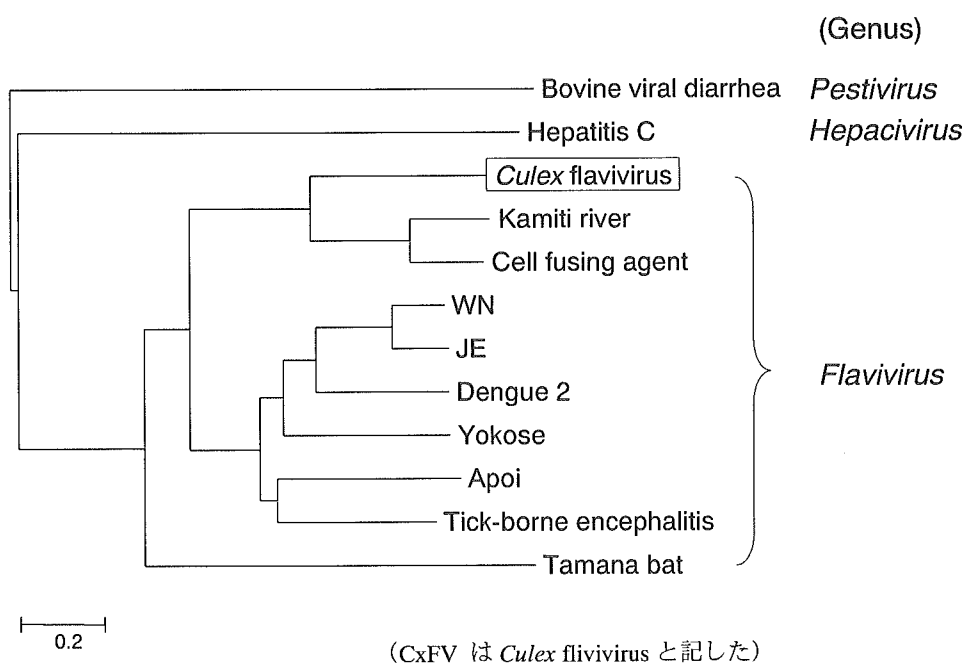


図4 Maximum Parsimony 法により作成したフラビウイルス科の分子系統樹



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

## 分担研究報告書

### 野生イノシシにおける日本脳炎抗体保有状況

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：濱野正敬（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
澤邊京子（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
桑山 勝（広島県保健環境研究センター）

## 研究要旨

近年、西日本とくに中国地方では、イノシシが居住地域に出現する状況が顕著となっている。広島県では 2002 年に日本脳炎患者が 3 名発生し、その後の調査で、2000 年にも日本脳炎ウイルスによる無菌性髄膜炎の 4 症例も報告された。そのためブタ以外の増幅動物として野生イノシシの日本脳炎ウイルス感染状況調査を実施した。その結果、約 30%のイノシシが IgG 抗体陽性であり、17 頭のイノシシで日本脳炎中和抗体陽性であった。

### A. 研究目的

近年、中国地方では野生のイノシシが民家近くに出現し、畑を荒らす等の事例が多く、有害鳥獣として、駆除の対象となっている。したがって、水田のある民家周辺に出現するイノシシがコガタアカイエカに吸血される機会が増している可能性がある。そこで我々は中国地方のイノシシに関して、日本脳炎ウイルスに対する血清抗体保有状況を調査した。

### B. 研究方法

広島県、島根県の狩猟期間（11 月から 2 月）に捕獲したイノシシの血液（血清）を日本脳炎ウイルス IgG ELISA、IgM 捕捉 ELISA で抗体をスクリーニングし、IgG 抗体陽性の一部検体の中

和抗体価を測定し確認した。IgG ELISA は、日本脳炎ウイルス不活化抗原を 96 穴プレートにコーティングし、2 次抗体は抗ブタ POD 標識抗体を用いた。イノシシに関して、日本脳炎抗体陰性血清、陽性血清が不明であるため、IgG 抗体陽性ブタ血清の 640 倍希釈レベルを便宜上、Cut off レベルとして判定した。IgM 抗体に関しても同様の方法により判定した。用いたイノシシの検体数は、広島県 41 頭、島根県 40 頭であった。

### C. 研究結果

広島県のイノシシ血清 41 頭のうち、IgM 抗体陽性であったものは 1 頭のみであった。一方 IgG 抗体は、強陽性（Index;1.5 以上）は 22 頭、弱陽性

(Indx:1.1 以上 1.5 未満) は4頭であった。島根県のイノシシでは、IgG 抗体強陽性4頭であった。広島県のイノシシに関してIgG抗体が陽性であった19検体の血清について、広島県の2002年のブタからの日本脳炎ウイルス分離株を用いてプラーク減少法による中和試験を実施して確認したところ、表に示した如く17頭で中和抗体価陽性を示した。そのうち2頭は2560倍という高い中和抗体価を示し、3頭は160倍、3頭が40倍という比較的高い中和抗体価を示した。IgG抗体陰性であった血清を無作為に選んだ6頭に関しては、中和抗体陰性であった。また、一頭で比較的最近日本脳炎ウイルスに感染したことを示唆するIgM抗体が陽性であった。

#### D. 考察

2002年に広島県で発生した日本脳炎の1症例(広島市内)は、居住地区周辺に水田はあるが、ブタ農場からは10数キロ離れていた。しかし、近隣の畑にはイノシシよけの柵が存在するような状況であった。イノシシの約3割が日本脳炎ウイルス抗体価を保有していたことから、民家周辺に出現するようになった野生のイノシシが、日本脳炎ウイルスの増幅動物となっている可能性を考慮する必要があると考えられる。また、近年の地球温暖化に伴い日本国内のイノシシの分布域も北上していることから、より広範囲な地域における調査が必要と考えられる。そしてイノシシが増幅動物で

あるとすれば、媒介蚊に関しても、コガタアカイエカ以外の蚊も考慮する必要もあり、イノシシの吸血蚊(媒介蚊)に関する調査研究も必要であると考えられる。

#### E. 結論

近年、ヒトの居住地域に出没するようになった野生イノシシが、日本脳炎に対する抗体を保有していた。野生のイノシシが日本脳炎ウイルスの増幅動物となっている可能性があり、今後イノシシおよびその吸血蚊(媒介蚊)に関する調査を含めて、西日本を中心としたより広範囲な調査が必要である。

#### F. 健康危険情報

主要な増幅動物であるブタ以外に野生イノシシが、日本脳炎ウイルスの増幅動物となっている可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

高崎智彦、林 昌宏、濱野正敬、澤邊京子、岸 昇、桑山勝、倉根一郎. 中国地方のイノシシにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の検討. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会(箱根)2005年5月

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

表 広島県のイノシシにおける日本脳炎中和抗体

Sample No.	Date	Sex	Places	Body weight (kg)	PRNT <sub>50</sub> titer	IgG-ELISA	IgM-ELISA
22	12/22/2004	M	E	80	2560	+	-
24	1/19/2005	F	F	24	2560	+	-
35	2/6/2005	F	J	65	160	+	+
33	2/4/2005	M	D	25	160	+	-
16	1/2/2005	M	B	95	160	+	-
21	12/21/2004	M	D	30	40	+	-
10	12/17/2004	M	C	40	40	+	-
17	1/8/2005	M	F	90	40	+	-
1	11/20/2004	F	A	60	10	+	-
8	12/8/2004	M	C	32	10	+	-
2	11/21/2004	M	B	110	10	+	-
18	1/9/2005	M	G	95	10	+	-
29	1/24/2005	M	B	70	10	+	-
3	11/30/2004	M	B	70	10	+	-
19	1/10/2005	F	H	55	10	+	-
34	2/5/2005	M	A	70	10	+	-
28	1/22/2005	M	I	65	10	+	-
6	11/19/2004	M	C	40	<10	-	-
7	12/8/2004	F	C	30	<10	-	-
9	12/9/2004	F	C	40	<10	-	-
11	12/17/2004	M	K	100	<10	+	-
14	12/26/2004	M	B	90	<10	-	-
31	1/19/2005	F	D	26	<10	-	-
30	1/25/2005	F	E	70	<10	+	-
39	2/8/2005	M	L	27	<10	-	-

Total number is 25 (n= 25). Places indicated the towns in Hiroshima prefecture, where blood specimens were obtained. (See figure for towns A~K). + and - indicate positive and negative, respectively.

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	世界の重要感染症	清水靖夫, 三船恵美, 二瓶直子, 中島 勇 監修	2006 年版 世界情報地図	日本文芸社	東京	2006	18-19.

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
Haruki K, Hayashi T, Kobayashi M, Katagiri T, Sakurai Y, Kitajima T	Myiasis with <i>Dermatobia hominis</i> in a traveler returning from Costa Rica: Review of 33 cases imported from South America to Japan	J. Travel Medicine	12	285-288	2005
Sasaki T, Poudel SKS, Isawa H, Hayashi T, Seki N, Tomita T, Sawabe K, Kobayashi M	First molecular evidence of <i>Bartonella quintana</i> in <i>Pediculus humanus capitis</i> (Phthiraptera: Pediculidae), collected from Nepalese children	Journal of Medical Entomology	43	110-112	2006
Seki N, Sasaki T, Sawabe K, Sasaki T, Matsuoka M, Arakawa Y, Marui E, Kobayashi M	Epidemiological studies on <i>Bartonella quintana</i> infections among homeless people in Tokyo, Japan	Japanese Journal of Infectious Diseases	59	31-35	2006
Toma T, Miyagi I	Redescription of <i>Armigeres (Armigeres) conjungens</i> Edwards (Diptera: Culicidae) collected from the Peninsular Malaysia	Medical Entomology and Zoology	56	1-9	2005
Toma T, Miyagi I, Higa Y, Okazawa T, Sasaki H	Culicid and Chaoborid flies (Diptera: Culicidae and Chaoboridae) attracted to a CDC miniature frog call trap at Iriomote Island, the Ryukyu Archipelago, Japan	Medical Entomology and Zoology	56	65-71	2005
Toma T, Miyagi I	Notes on mosquitoes in Chichi-jima, Ogasawara Archipelago, Japan and biology of <i>Culex (Sirivanakarnius) boninensis</i> (Diptera: Culicidae)	Medical Entomology and Zoology	56	237-241	2005