

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

- 1) 東北地方における疾病媒介蚊の分布域拡大に関する調査研究
- 2) ヤブカ寄生原虫 *Ascogregarina* spp. を用いた新しい防除法確立に関する基礎的研究

分担研究者	小林 陸生	国立感染症研究所昆虫医科学部
研究協力者	二瓶 直子	国立感染症研究所昆虫医科学部
	Roychoudhury, S.	国立感染症研究所昆虫医科学部
	斉藤 一三	国立感染症研究所昆虫医科学部
	伊澤 晴彦	国立感染症研究所昆虫医科学部
	佐々木 年則	国立感染症研究所昆虫医科学部
	澤邊 京子	国立感染症研究所昆虫医科学部
	津田良夫	国立感染症研究所昆虫医科学部

研究要旨

1) ヒトスジシマカに関する調査: 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、2003年に盛岡では、2コロニー(2/51)からヒトスジシマカ幼虫が初めて確認されたが、2004年の調査(0/71)、2005年の調査(0/29)で同蚊は確認できなかった。2004年の調査では、岩手県宮古(0/9)、秋田県八森(0/17)、青森県岩崎(0/6)、深浦(0/13)、その他鱒ヶ沢、弘前で確認されなかった。しかし、太平洋岸の釜石(1/19)で初めて確認された。2005年の調査では、能代の北約20kmの八森町(1/14)で初めてヒトスジシマカが確認されたが、青森県の岩崎、深浦、鱒ヶ沢では見つかっていない。一方、3年前に同蚊が確認された気仙沼では市内広域に分布が広がっていた。また、2004年に初めて確認された釜石では同蚊を確認することができなかった(0/32)。しかし、大船渡(1/20)で初めてヒトスジシマカが確認された。釜石、大船渡では、近い将来ヒトスジシマカが定着する可能性が高いと考えられ、物流等に関するデータとの関係を調査中である。

2) コガタアカイエカに関する調査: コガタアカイエカの分布は琉球から北海道までで、日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から判断すると、分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度は相当低いことが想像される。2005年8月上旬、秋田県大仙市(大曲市)と秋田市内の牛舎でライトトラップによる蚊の捕集を試み、富山県および埼玉県の同時期の捕集成績と比較した。その結果、トラップ・一晩当たりの捕集数は富山県の約1/100、埼玉県の約1/10程度と少なく、この事が秋田県におけるHI抗体陽性率の低さに関係している可能性がある。なお、2005年9月に秋田県で豚のHI抗体陽性が確認された。

3) デング熱媒介蚊(ネッタシマカとヒトスジシマカ)の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノムDNAを高純度で得る方法を確立し、分子分類が可能となった。また、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカから上記2種とは異なる原虫を分離することに成功し、生物的防除に利用する可能性を検討した。

A：研究目的

1) 我が国、特に東北地方におけるデング熱媒介蚊であるヒトスジシマカの分布域は、1950年代から比較すると相当北へ拡大しており、特に1990年代における分布域拡大が顕著である。現在の分布状況に関する詳細なデータが存在しない。同蚊はデング熱のみならず、ウエストナイルウイルスに対しても高い感受性を示すことから、現在の分布域を正確に把握することが、感染症の予防対策に重要である。また、疾病媒介蚊の分布域拡大がどのような要因に係るのか、気象データ、人口密度、温暖化を予想するメッシュ気候図を用いて検討する必要がある。

2) コガタアカイエカの分布調査は1950年代および一部1960年代に行われたが、その後の分布域および密度に関してほとんどデータがない。1980年代までは日本脳炎の発生予測事業の一環で、各地方衛生研究所で水田地帯の牛舎、豚舎で捕集調査が行われていたが、現在は埼玉県、富山県などの少数の自治体が継続して行っているだけで、発生状況が分かっていない。地球規模での温暖化傾向が日本脳炎媒介蚊の発生、分布にどのような影響を与えているか調査する必要がある。

3) ネットアイシマカおよびヒトスジシマカの寄生原虫である *Ascogregarina* spp. は宿主特異性が高く、感染後期にマルピギー管内に形成されるガメトシストには多数のオーシストが形成され、最終的に水系に排泄される。このような生活環を利用し、この原虫に外来遺伝子を導入してヤブカ幼虫に感染させ、生理機能をかく乱させる方法等によって蚊を防除することを最終目的に基

礎的研究を進めている。また、直接別種の原虫を防除対象のヤブカに感染させることによって防除する方法も詳細に評価する必要がある。この原虫のオーシストは感染蚊から大量に回収することが可能で、生物的防除、遺伝子導入法確立のために実験に利用しやすい特徴があり、新しい発想による防除法の確立が期待される。

B：研究方法

1) 東北地方でのヤブカの分布調査においては、各都市の神社、寺院、公園、古タイヤ集積場等の墓石、手水鉢、花立て、プラスチック容器等の小用量の水が溜まっている人工容器からピペットで幼虫を採取し、ポリビンに入れて研究所に持ち帰り、成虫まで飼育してから種の同定を行った。これら人工容器から発生する蚊類には、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、フタクロホシチビカ、ヤマダシマカ、アカイエカ、キンパラナガハシカ、オオクロヤブカ、トウゴウヤブカなどであるが、都市部では多くがヒトスジシマカとヤマトヤブカの2種である。

2) コガタアカイエカの調査

大仙市（大曲市）の秋田県畜産試験場の牛舎、豚舎および秋田市内の牛舎に3台のライトトラップを設置し、2晩蚊の捕集を行った。トラップで捕集された蚊は、現地で蚊のみを分け、ドライアイス中に入れて研究所まで冷凍状態で移送した。形態による分類後、日本脳炎ウイルスの検出を行った。

3) 東北および北海道で捕集されたヤマトヤブカの幼虫および蛹を解剖して *Ascogregarina* sp. 原虫の栄養体、ガメトシストおよびオーシストを検出し、寄生状況

を調査した。

オオクロヤブカから分離された原虫のオーシストを大量に得るために1令幼虫にオーシストを摂食感染させ、その後の発育を観察した。

C：研究結果

1) ヒトスジシマカに関する調査：東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、2003年に盛岡では、2コロニー(2/51)からヒトスジシマカ幼虫が初めて確認されたが、2004年の調査(0/71)、2005年の調査(0/29)で同蚊は確認できなかった。これは、2003年に一時的に盛岡に侵入したヒトスジシマカが定着できなかったと判断された。2004年の日本海側の調査では、能代市内には相当高密度にヒトスジシマカが分布していることが再確認されたが、能代から北へ約20kmの八森(0/17)、青森県岩崎(0/6)、深浦(0/13)、その他、鱈ヶ沢、弘前では小容器に発生している幼虫はほとんどがヤマトヤブカであり、ヒトスジシマカは確認されなかった。一方、太平洋岸の釜石(1/19)で初めて確認された。2005年の日本海側での調査では、能代の北約20kmの八森町(1/14)で初めてヒトスジシマカが確認されたが(図1)、青森県の岩崎、深浦、鱈ヶ沢では依然として確認されていない。現時点で、青森県にはヒトスジシマカの侵入、定着が起こっていないと考えられる。一方、4年前に同蚊が確認された気仙沼では市内広域に分布が広がっていた。また、2004年に初めて確認された釜石(1/22)では同蚊を確認することができなかった(0/32)。しかし、大船渡(1/20)の港湾地域および2カ所の寺院での捕虫網による採集で

初めてヒトスジシマカが確認された(図1)。釜石、大船渡などの陸中海岸の都市では、近い将来ヒトスジシマカが侵入、定着する可能性が高いと考えられる。

2) コガタアカイエカに関する調査：コガタアカイエカの分布は琉球から北海道まで、日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から、分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度は相当低いことが想像されるが、分布域および分布密度に関する調査は全く行われていない。2005年8月上旬、秋田県大仙市(大曲市)と秋田市内の牛舎でライトトラップによる蚊の捕集を試み、富山県および埼玉県の同時期の捕集成績と比較した(図2)。その結果、トラップ・一晩当たりの捕集数は富山県の約1/100、埼玉県の約1/10程度と少なく、この事が秋田県の豚におけるHI抗体陽性率の低さに関係している可能性がある。今回は秋田県のみでの調査であったが、豚の抗体陽性が報告されている宮城県、抗体調査は行われていないが、埼玉県との中間に位置する福島県での調査が必要と考えられた。2005年9月に秋田県の大仙市の南部で久しぶりに豚のHI抗体陽性が確認された。コガタアカイエカが生息していることは確認されているので、地域的に、また、一時的にコガタアカイエカの個体密度が晩夏に高まり豚における感染が起こることが示唆された。

3) デング熱媒介蚊(ネッタイシマカとヒトスジシマカ)の寄生原虫である*Ascogregarina* spp.に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノムDNAを高純度で得る方法を確立した。

その結果、少なくとも4種の原虫を分子分類することが可能となった。また、系統樹解析を行ったところ、ネットアイシマカとヒトスジシマカの原虫は非常に近縁で、塩基配列に関して相同性が高かったが、ヤマトヤブカおよびオオクロヤブカの原虫は上記の2種とは若干離れることが明らかとなった(図3)。特に、オオクロヤブカの原虫である *Ascogregarina armigerei* は分子的にも形態的にも相当異なることがあきらかとなった。この原虫は栄養体が中腸上皮細胞に侵入してから動き回る傾向があり、最終的に栄養体同士が10-20匹集まっている像が観察されている。この行動は蚊の幼虫の中腸の上皮細胞に相当ダメージを与えることが想像された。実際、オオクロヤブカの1令幼虫に *A. armigerei* を実験感染させた場合、幼虫死亡率が高いことが観察された。これら原虫の性質から、他種の蚊幼虫の生物的防除に利用する可能性が示唆された。

D:考察

1) 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域拡大に関する2005年の調査で、太平洋岸では大船渡で初めて確認された。しかし、2004年に確認された釜石では、32コロニーを採集したにもかかわらず、定着が確認されなかった。また、4年前に同蚊が確認された気仙沼では、寺院および市内の住宅街で広範に分布が確認され、ほぼ定着していることが示された。東北新幹線に沿った内陸部での北限は水沢であるが、同市から約15km北に位置する北上では30コロニーを市内の8カ所の寺院で採集したが、全ての幼虫はヤマトヤブカであった。この

傾向は、ここ数年変化がなく、一関および水沢と北上の間にヒトスジシマカの定着を決定する要因の存在が強く示唆された。一方、日本海側での調査では、能代市では分布が完全に定着していることが確認された。また、2005年に初めて能代の北約20kmの八森町ヒトスジシマカが確認された。この八森は日本海沿岸に長く青森県の県境まで続く町であるが、その中央部付近の古タイヤから幼虫が採集された。また、青森県内の岩崎、深浦、鱒ヶ沢の漁港を中心に幼虫調査を行ったが、採集された幼虫は多くがヤマトヤブカで、一部トウゴウヤブカが確認された。メッシュ気候図のデータからは分布、定着が可能な年平均気温が確認されているので、今後も注視して分布域の拡大を調査する必要がある。

盛岡では、1998年以前から数回にわたって、複数の研究者によってヒトスジシマカの調査が行われたが、全く分布が確認されていなかった。しかし、2003年9月に、盛岡で初めてヒトスジシマカの分布が市内の1寺院で確認された。これが夏季の一時的な定着なのかを確認するため、2004年、2005年にその寺院を中心に調査を行った。しかし、多数のコロニーを採集したにもかかわらずヒトスジシマカは確認できなかった。盛岡の気候が同蚊の定着に適していない可能性があり、今後の温暖化および都市部のヒートアイランド現象等の推移を見守る必要がある。また、釜石でも2004年に初めてヒトスジシマカが確認されたが、2005年の調査では定着が認められなかった。このように、相当頻繁にヒトスジシマカの移入が起きているが、越冬卵が翌年まで生存し、定着する可能性は、その地域の冬期

の気温等の微妙な気象要因が関係している可能性があり、今後詳細に調査、解析する必要がある。また、我々の年平均気温による分布要因解析では分布が可能な地域となっているにもかかわらず、未だに定着が認められない地域として、秋田県の湯沢、宮城県の花巻、北上、釜石、青森県の岩崎、深浦、鱈ヶ沢が知られている。年平均気温のデータ等から判断して、今後近い将来に同蚊の侵入・定着が起こる可能性があると思われるが、定着しない理由の一つとしてヒトスジシマカの分布が見られる関東、南東北地域からの物流の量が関係していると考えられる。また、ヒトスジシマカが発生する同様の人工容器を発生源とするヤマトヤブカは東北地方に一般的なヤブカで、都市部にも普通に発生している。山形市では一度ヒトスジシマカの侵入・定着が起こると、短期間にヤマトヤブカが消え、ほとんど全ての幼虫がヒトスジシマカに置き換わる現象がみられた。この種間関係の解析ができていない現状では、ヤマトヤブカがどのようにヒトスジシマカの侵入に係わっているか不明である。この問題は、亜熱帯・熱帯地域におけるネッタシマカとヒトスジシマカとの棲み分けに共通する現象で、今後より詳細な解析が必要と思われる。同蚊の分布域拡大と年平均気温、都市部における人口密度との関係を解析したが、東北地方の1997年から2000年にかけての温度上昇が、同蚊の侵入・定着に関与していた可能性が示唆された。1998年から調査対象の都市におけるヒトスジシマカの分布形態を以下の3つに分類した（A:市内に広範囲に分布、B:市内の一部に分布、C:分布していない）が、1999年から2000

年にかけて新たな分布・定着が起こった都市が多いことが示された。また、過去30年間(1961-1990)の気象データを用いて作成されたメッシュ気候図では、年平均気温が10-11℃の地域に存在する都市に同蚊の分布が認められるが、例外的な地域も存在することから、人口密度、物流、微気象等の複雑な要因が係わっている可能性が強く示唆された。

3) コガタアカイエカの分布は琉球から北海道までとなっているが、北海道での採集記録は少ない。また、東北地方における同蚊の分布および個体群密度に関しての最近の調査は行われておらず、最近の温暖化傾向を考えた場合、どの程度コガタアカイエカの個体密度が高まったかを把握する必要がある。日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から、東北地方の分布周縁部での個体群密度は相当低いことが想像される。2005年8月上旬、秋田県大仙市（大曲市）と秋田市内の牛舎でライトトラップによる蚊の捕集を試み、富山県および埼玉県の同時期の捕集成績と比較したところ、トラップ・一晩当たりの捕集数は富山県の約1/100、埼玉県の約1/10程度と少なく、この事が秋田県の豚におけるHI抗体陽性率の低さに関係している可能性がある。今までに、豚のHI抗体の陽性が報告されている宮城県、抗体調査は行われていないが、埼玉県との中間に位置する福島県での調査が必要と考えられた。2005年9月に秋田県の大仙市の南部で豚のHI抗体陽性が確認された。コガタアカイエカが生息していることは確認されているので、地域的に、また、一時的にコガタアカイエカの個体密度が晩夏に上昇し、豚における感染が起こ

ることが示唆された。

3 デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. は宿主特異性が高く、ヤブカ幼虫に大量に感染させることによって、容易に多数のオーシストを回収することが出来る。この生物学的特徴を利用して、外来遺伝子の運びや(vector)として利用し、新しい防除法の確立を最終目標として基礎的研究を行った。原虫の生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノム DNA を高純度で得る方法を確立した。その結果、4 種の原虫を分子分類することが可能となった。また、系統樹解析を行ったところ、ネッタイシマカとヒトスジシマカの原虫は近縁で、塩基配列に関して相同性が高かったが、ヤマトヤブカおよびオオクロヤブカの原虫は上記 2 種とは若干離れることが明らかとなった。特に、オオクロヤブカの原虫である *Ascogregarina armigerei* は分子的にも形態的にも他の種類と異なることが明らかとなった。この原虫は中腸上皮細胞に侵入してから動き回り、最終的に栄養体同士が 10-20 匹集まる性質を有している。この行動は蚊の幼虫の中腸の上皮細胞に相当ダメージを与えることが想像された。実際、オオクロヤブカの 1 令幼虫に *A. armigerei* を実験感染させた場合、他の原虫と宿主との感染例と比べ幼虫死亡率が高いことが観察された。これら原虫の性質を利用して、他種の蚊幼虫の生物的防除に利用する可能性が示唆された。

E: 結論

1) ヒトスジシマカに関する調査：東北地方におけるヒトスジシマカの分布域調査に関して、2005 年の調査では、能代の北約 20 km の八森町(1 / 14)で初めてヒトスジシマカが確認されたが、青森県の岩崎、深浦、鱒ヶ沢では見つかっていない。一方、3 年前に同蚊が確認された気仙沼では市内広域に分布が広がっていた。また、2004 年に初めて確認された釜石では同蚊を確認することができなかった(0 / 32)。しかし、大船渡(1 / 20)で初めてヒトスジシマカが確認された。釜石、大船渡では、近い将来ヒトスジシマカが定着する可能性が高いと考えられ、物流等に関するデータとの関係を調査中である。

2) コガタアカイエカに関する調査：日本脳炎ウイルス(JEV)に対する豚の抗体陽性率から判断すると、分布周縁部にあたる東北地方での個体群密度は相当低いことが想像される。2005 年 8 月の月上旬、秋田県大仙市（大曲市）と秋田市内の牛舎で蚊の捕集を試み、トラップ・一晚当たりの捕集数は富山県の約 1/100, 埼玉県の約 1/10 程度と少なく、この事が秋田県における HI 抗体陽性率の低さに関係している可能性が示唆された。

3) デング熱媒介蚊（ネッタイシマカとヒトスジシマカ）の寄生原虫である *Ascogregarina* spp. に関して生活環、生物学的特徴、オーシストの耐乾燥性等を詳細に調べ、種々の遺伝子解析に利用可能なゲノム DNA を高純度で得る方法を確立し、分子分類が可能となった。また、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカから上記 2 種とは異なる原虫を分離すること

に成功し、生物的防除に利用する可能性を検討した。

F:健康危機管理情報
特筆なし。

G: 研究発表

1. 発表論文

1) Roychoudhury, S. and Kobayashi, M.: New finding on the developmental process of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina chulicis* in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. J. Am. Mosq. Control Assoc. (in press).

2) Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Hayashi, T., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Tanabayashi, K., Hotta, A., Saito, T., Yamada, A. and Kobayashi, M.: Detection and Isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. J. Am. Trop. Med. Hygiene. (in press)

3) Sasaki, T., Poudel, S.K.S., Isawa, H., Hayashi, T., Seki, N., Tomita, T., Sawabe K. and Kobayashi, M.: First molecular evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), collected from Nepalese children. J. Med. Entomol., 43:110-112, 2006.

4) Seki, N., Sasaki, T., Sawabe, K., Sasaki, T., Matsuoka, M., Arakawa, Y., Marui, E. and Kobayashi, M.:

Epidemiological studies on *Bartonella quintana* infections among homeless people in Tokyo, Japan. JJID., 59:31-35, 2006.

5) Kobayashi, M., Nihei, N. & Kurihara, T. Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. Journal of Medical Entomology, 39(1): 4-11, 2002. (参考論文)

和文発表

1) 津田良夫, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 星野啓太, 澤邊京子, 小林陸生: ウエストナイルウイルスの主要媒介蚊を決定する生態的特徴. 臨床とウイルス. 33 (1) : 17-21, 2005.

2) 小林陸生: アタマジラミは不潔さと無関係. 毎朝のブラッシングで髪点検を. こども未来, 2005.7: 25, 2005.

3) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 林 利彦, 津田良夫, 倉橋 弘, 棚林 清, 堀田昭豊, 山田章雄, 西藤岳彦, 小淵正次, 田代真人, 小林陸生: 2004年高病原性鳥インフルエンザ国内流行地で採集されたクロバエ類からのH5N1 亜型インフルエンザウイルスの検出と分離. 病原微生物検出情報, 26 (5): 7, 2005.

4) 二瓶直子, 津田良夫, 小林陸生: 空中写真で衛生環境をどこまで読み取れるか. 生活と環境, 50(9): 48-53, 2005.

5) 小林陸生: 新興・再興感染症の流行と環境. 生活と環境, 50(11): 5, 2005.

II. 学会発表

1. 国際学会

1) Sasaki, T., Isawa, H., Seki, N., Hoshino, K., Higa, Y., Kubota, M., Sasaki, T., Sawabe, K., Arakawa, N. and Kobayashi, M.: *Bartonella quintana* from Body Lice, *Pediculus humanus* (Anoplura: Pediculidae), infesting homeless people in Tokyo. MEDICINE AND HEALTH IN THE TROPICS (XVI th International Congress for Tropical Medicine and Malaria, IV th European Congress on Tropical Medicine and International Health), September 11-15, Marseille, France.

2. 国内学会

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, 小林陸生, 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 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町.

2) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 比嘉由紀子, 葛西真治, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 小林陸生: 日本産ウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血嗜好性とアカイエカ種群の分子分類. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町.

3) 吉田政弘, 山下敏夫, 小林陸生: 都市域における冬季の蚊幼虫・成虫調査. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17 年 5 月 26-27 日, 箱根町.

4) 津田良夫, 澤邊京子, 比嘉由紀子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 小林陸生, 桑山 勝: 広島県倉橋島の日本脳炎媒介蚊調査. 第 40 回日本脳炎生態学研究会, 17

年 5 月 26-27 日, 箱根町.

5) 高井憲治, 小熊 謙, 栗原 毅, 小林陸生: *Anopheles sinensis* 成虫雌の脚白帯対節比の地理的変異. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

6) 津田良夫, 比嘉由紀子, 川田 均, 高木正洋, 小林陸生: アカイエカとチカイエカの地上における生態の比較調査法. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

7) 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, 小林陸生: 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, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

8) 二瓶直子, 津田良夫, 倉橋 弘, 比嘉由紀子, 駒形 修, 望月貫一郎, 小林陸生: 住宅地周辺のドライアイストラップ捕集蚊類等の発生状況と環境要因との関係. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

9) 渡辺 護, 小原真弓, 出村尚子, 松澤留美子, 小林陸生: 富山県における感染症媒介蚊の発生実態調査 (2003-04 年). 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

10) 吉田政弘, 山下敏夫, 小林陸生: 都市域における蚊幼虫発生状況. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

11) 小林陸生, 葛西真治, 伊澤晴彦, 林 利彦, 二瓶直子, 津田良夫: 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, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

12) 吉田政弘, 山下敏夫, 田所勝巳, 平良

常弘, 小林陸生: 都市域における蚊類の越冬調査. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

13) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 比嘉由紀子, 葛西真治, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 小林陸生: 日本に分布するウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血源動物種. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

14) 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, 小林陸生, 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, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

15) Sudipta Roychoudhury, Isawa, H., Sasaki, T., Sawabe, K., Kobayashi, M.: Molecular variations in SSU rDNA sequences of some species of *Ascogregarina*, the non-pathogenic parasites of mosquitoes. The 57th Annual Meeting of the Japan Society of Medical Entomology and Zoology, June 1-3, 2005. Sapporo.

16) 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 澤邊京子, 小林陸生: 蚊体液中に含まれるシアル酸特異的レクチンの質量分析による解析. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

17) 佐々木年則, 佐々木次雄, 久保田真由美, 川端寛樹, パウデル・カンタ・シャルマシュリー, 星野啓太, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 富田隆史, 澤邊京子, 荒川宜親, 小林陸生: 再興感染症としての塹壕熱および回帰熱に関する疫学調査. 第 57 回日本衛生動物学会

大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

18) 葛西真治, 駒形 修, 正野俊夫, 富田隆史, 倉橋 弘, 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, 橋本知幸, 新庄五朗: ACE 遺伝子をマーカーとした日本産 *Culex pipiens complex* の簡易判別法. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

19) 葛西真治, 駒形 修, 正野俊夫, 富田隆史, 津田良夫, 小林陸生, 元木 貢, 高橋朋也, 谷川 力, 吉田政弘, 橋本知幸, 新庄五朗: 2003 年と 2004 年に行ったアカイエカ種群蚊の殺虫剤感受性調査. 第 57 回日本衛生動物学会大会, 17 年 6 月 1-3 日, 札幌市.

20) 小林陸生: 国内における疾病媒介昆虫類の生態と分布. シンポジウム—動物由来感染症ウイルス, 衛生微生物技術協議会第 26 回研究会, 17 年 7 月 7-8 日, 福井市.

21) 小林陸生: 病原体伝播者としてのハエ類. 「ハエの功罪」第 44 回日本衛生動物学会東日本支部例会, 17 年 7 月 22 日, 東京.

22) 佐々木年則, 星野啓太, 伊澤晴彦, 澤邊京子, 小林陸生: オオクロヤブカ由来シアル酸特異的レクチンの質量分析による解析. 日本比較免疫学会第 17 回学術集会, 17 年 8 月 24-26 日, 東京.

23) Kobayashi, M.: Mosquito surveillance in urban areas of Japan and blood preference of vector mosquitoes in West Nile fever. Japan-Taiwan Symposium on Zoonotic Diseases, September 7-8, 2005.

24) 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. 日米医学協力寄生虫疾患専門部会・平成 17 年度国内会議, 18 年 2 月 18 日, 東京.

25) 二瓶直子, 津田良夫, 駒形 修, 比嘉由紀子, 倉橋 弘, 望月貫一郎, 小林陸生: 空中写真・都市GISによる首都圏の感染症媒介蚊の監視. 日米医学協力寄生虫疾患専門部会・平成 17 年度国内会議, 18 年 2 月 18 日, 東京.

26) 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, 高崎智彦, 小林陸生: 蚊からのウエストナイル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・平成 17 年度国内会議, 18 年 2 月 18 日, 東京.

図1 東北地方におけるヒトスジシマカの分布域の拡大(1998-2005)

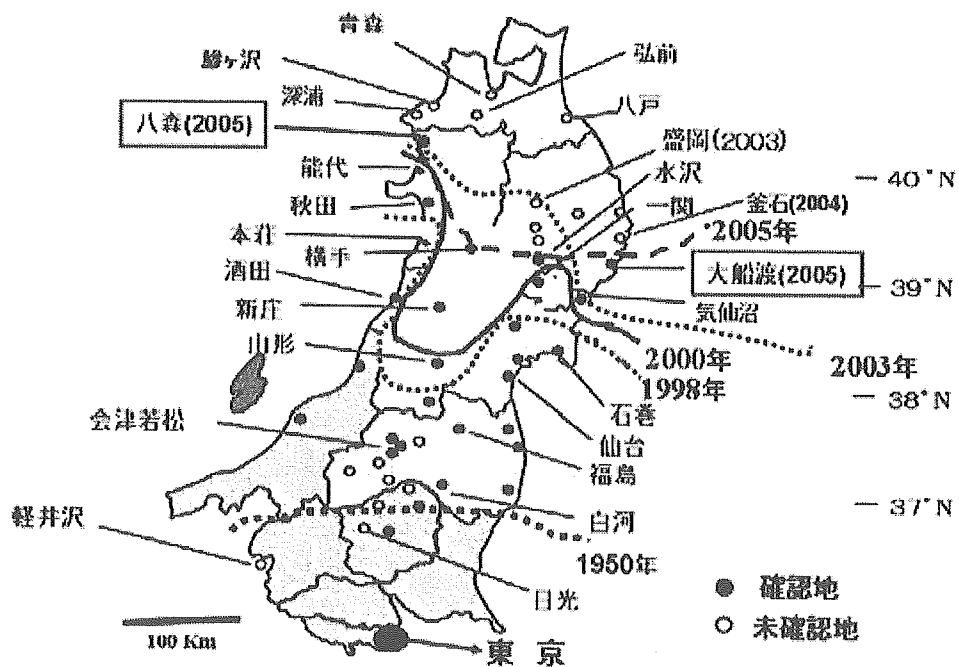


図2 豚の日本脳炎感染状況(2003)とコガタアカイエカの捕集成績

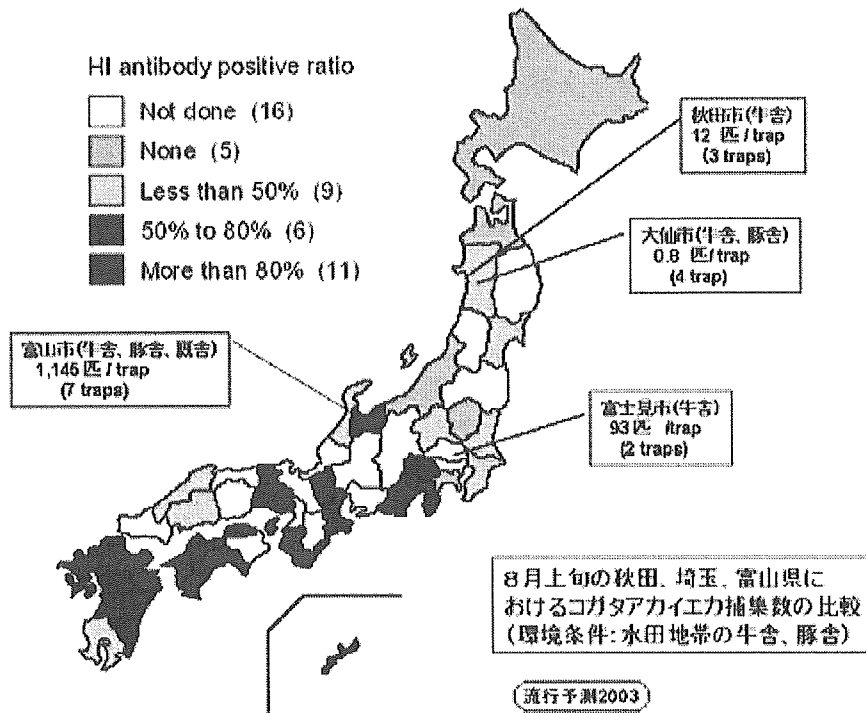
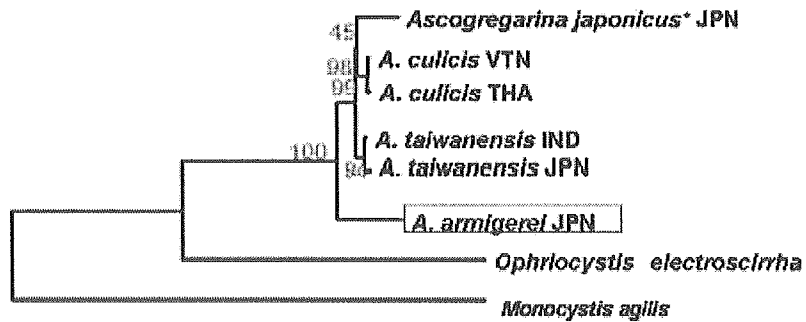


図3 Apicomplexa NJ系統樹 (SSU-rDNA 塩基配列より推定)



0.02

* ヤマトヤブカから分離された *Ascogregarina* 原虫(未記載)

JPN: 日本, VTN: ベトナム, THA: タイ, IND: インド

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

タンパクワクチンとの混合投与によるデング 4 価 DNA ワクチンの
マウスにおける中和抗体誘導能の上昇

分担研究者 小西 英二（神戸大学医学部医療基礎学講座）

共同研究者 井本 淳一（神戸大学医学部医療基礎学講座）

研究要旨 デング 4 価 DNA ワクチンの中和抗体誘導能を高めることを目的として、マウスモデルを用いてタンパクワクチンとの混合液の針無注射投与方法を試みた。デング 4 価 DNA ワクチンは、デング 1 型、2 型、3 型及び 4 型に対する DNA ワクチンの混合液である。タンパクワクチンとして、デング 2 型ウイルス細胞外粒子（EP ワクチン）及び市販の日本脳炎不活化ワクチン（JEVAX）を用いた。ddY マウスに、100 µg のデング 4 価 DNA ワクチンと 150 ng の EP ワクチンまたは 1/10 ドーズの JEVAX を混合した接種液を投与した。両タンパクワクチン共に、4 価 DNA ワクチンとの混合投与群が、それぞれの単独投与群より相乗的に高い中和抗体価をマウスに誘導した。この上昇は、デングの 4 型すべてに対して示された。また、初回免疫後 13 週目に行った 2 回目の投与の後、4 型すべてに対して中和抗体価は上昇し、追加免疫の効果が認められた。

A. 研究目的

デング熱及びデング出血熱は、熱帯及び亜熱帯地域に分布する地球規模の疾患であるが、特異的な治療法はなく認可ワクチンもない。我々は、昨年度にデング 4 価 DNA ワクチンを試作し（平成 16 年度厚生科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学及びワクチン開発に関する研究」研究報告書「デング 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける評価」）、マウスにデング 1 型から 4 型全てに対する中和抗体を誘導することを証明した。

しかし、評価に用いた中和試験は 70%フォーカス減少法であり感度を高めていたこと、また 4 型全てに対する中和抗体を誘導するために 2 回の投与を必要とした。したがって、中和抗体誘導能を高める工夫が必要とされた。

我々はこれまで日本脳炎モデルを用いて DNA ワクチンの中和抗体誘導能を高める工夫を行ってきた。その中で、針無注射投与方法及びタンパクワクチンとの同時投与方法

が効果的であった。さらに、これら 2 つの方法を統合して、DNA-タンパク混合ワクチンを針無注射器で投与すると、格段に DNA ワクチンの中和抗体誘導能を高めることが明らかにされた。

本研究では、デング 4 価 DNA ワクチンをタンパクワクチンと混合して、針無注射投与方法による中和抗体誘導能の上昇効果を調べた。

B. 研究方法

ウイルス:デング 1 型ウイルス (DENV1) 望月株、デング 2 型ウイルス (DENV2) ニューギニア C 株、デング 3 型ウイルス (DENV3) H87 株、デング 4 型ウイルス (DENV4) H241 株及び日本脳炎ウイルス (JEV) を用いた。中和試験及び ELISA の抗原には、それぞれのウイルスを Vero 細胞に感染して得られた培養液を用いた。

DNA ワクチン:デング 1 型、2 型、3 型及び 4 型に対する DNA ワクチン（それぞれ pcD1ME、pcD2ME、pcD3ME 及び pcD4ME）は、昨年度の報告（上記と同）

に記載した。DNA ワクチンに組み込んだ prM/E 遺伝子は、それぞれ望月株 (1 型)、ニューギニア C 株 (2 型)、H87 株 (3 型) 及び H241 株 (4 型) であった。すべてのプラスミド DNA は、キアゲン DNA 精製キットで精製した。1 型から 4 型に対する DNA ワクチンの混合液 (各 25 µg、計 100 µg/匹) を Dengue 4 価 DNA ワクチンとした。

タンパクワクチン : DENV2 細胞外粒子 (EP ワクチン : ニュークレオカプシドのない空の粒子型抗原) 及び市販の日本脳炎不活化ワクチン (JEVAX) を用いた。EP ワクチンは、DENV2 の prM-E 遺伝子を CHO 細胞にトランスフェクトして得られた連続抗原発現細胞の培養液を、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法で精製して得た。

マウス実験 : 4 週令の雄 ddY マウス (各群 5-6 匹) に、4 価 DNA ワクチンとタンパクワクチンの混合液を大腿部にジェット式針無注射器 (シマジェット、島津製作所) を用いて投与した。片脚につき 50 µl (1 匹あたり 100 µl) を接種した。対照として、4 価 DNA ワクチン単独投与群及びタンパクワクチン単独投与群を設けた。免疫後 3 週毎に眼窩静脈叢から採血し、中和抗体価をプール血清で測定した。

中和試験 : 2 倍階段希釈した血清とウイルスの混合液に補体を最終濃度が 5% になるように添加し、90% フォーカス減少法で判定した。すなわち、Vero 細胞を感染後 3-4 日目に固定し、DENV 特異的モノクローナル抗体あるいは抗 DENV 過剰免疫マウス腹水 (HMAF) を反応させた後 ABC 染色し、フォーカスを計数した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

pcD2ME と JEVAX の混合 : 予備的に単価ワクチン (pcD2ME) を用いて、JEVAX との混合投与により中和抗体誘導能が上昇するかどうかを調べた。pcD2ME と JEVAX の混合液を 5 匹の 4 週齢の雄 ddY マウスに 1 回投与し、免疫後 9 週間までのプール血

清中の DENV2 に対する中和抗体価を測定した。対照として、pcD2ME 単独投与群、JEVAX 単独投与群を設けた。pcD2ME と JEVAX のドーズは、それぞれ 10 µg と 1/10 ドーズ (図 1 左)、1 µg と 1/100 ドーズ (図 1 右) であった。

10 µg の pcD2ME により誘導された中和抗体のレベルは、JEVAX と混合投与した群の方が pcD2ME 単独投与群よりすべての実験期間において 2 倍高かった (図 1 左)。プール血清における 2 倍の差は通例有意とはみなされないが、個々のマウスから得られた平均中和抗体価をこの 2 群で比較したところ、3 週目と 6 週目において統計的有意差が認められた (スチューデントの t 検定で $P < 0.05$)。さらに、1 µg の pcD2ME 単独投与群では検知しうる中和抗体の誘導が認められなかったのに対して、1/100 ドーズの JEVAX との混合投与により検知レベルの抗体価を誘導した (図 1 右)。これらの結果は、極めて小さい差ではあるものの、JEVAX が pcD2ME の免疫原性を増強したことを示す。

ウイルス間の交差反応性 : フラビウイルス属の中で、4 種の Dengue ウイルス (1 型から 4 型) は Dengue グループに属し、JEV は日本脳炎グループに属する。血清学的に交差反応性があるため、特異性が高いと言われる中和試験に基づいて混合投与の評価を行ってはいるものの、どの程度の交差があるのかを調べておく必要がある。

それぞれのウイルス抗原に対する HMAF を用いて、5 種のウイルスに対する中和試験を行った (図 2)。同種のウイルスに対する中和抗体価が 1:5120 あるいは 1:10240 を示す条件下で、異種のウイルスに対する抗体価は 1:10-1:40 であり、測定法上の交差反応は 1/128-1/1012 程度の極めて低いものであることが確認された。

4 価 DNA ワクチンとタンパクワクチンの混合 : EP ワクチンのドーズは、前報 (Konishi et al., *Vaccine*, 2003) に基づき 150 ng とした。また、JEVAX のドーズは、本実験で用いた市販のヒト用 JEVAX が 1 ドーズで 0.5 ml の容量であること、及びマウスに投与できる最大容量は 0.1 ml であることから 1/10 ドーズとした。

1 群 6 匹の 4 週齢の雄 ddY マウスに、100

μg の Dengue 4 価 DNA ワクチンと 150 ng の EP ワクチンまたは 1/10 ドーズの JEVAX を混合した接種液を 1 回投与し、免疫後 12 週目まで 3 週間隔で採血し、プール血清中の Dengue 1-4 型に対する中和抗体価をそれぞれ測定した。対照として、4 価 DNA ワクチン単独投与群及びタンパクワクチン単独投与群を設けた。ただし、タンパクワクチン単独投与群には、4 価 DNA ワクチンに含まれると等しいモル数の CpG アジュバント配列が含まれるように、73 μg の pcDNA3 ベクターを加えた。追加免疫の効果を調べる目的で、接種後 13 週目に初回免疫と同じ免疫原を投与した。初回接種後、15 及び 18 週目に採血して中和抗体価を測定した。各グループにおけるワクチン投与量を表 1 に示す。

EP ワクチンを用いた実験の結果を図 3 に、また JEVAX を用いた実験の結果を図 4 に示す。なお、表 1 におけるグループ 6 の結果はすべての実験期間において中和抗体価が <1:10 であったため、図 3 及び 4 に示さなかった。両タンパクワクチン共に、4 価 DNA ワクチンとの混合投与群がそれぞれの単独投与群より高い中和抗体価をマウスに誘導した。この上昇は、Dengue の 4 つの型すべてに対して見られた。接種後の週数により抗体価は変化するが、混合投与群と単独投与群における抗体価の差から、この上昇効果は相乗的と考えられる。また、初回免疫後 13 週目の投与の後、4 型すべてに対して中和抗体価は上昇し、追加免疫の効果が認められた。

D. 考察

現在の Dengue ワクチン開発は、中和抗体の誘導をマーカーに行われている。初回感染と同じ型の 2 度目の感染は防御されることが疫学的に証明されており、防御の中心的役割を果たすのは中和抗体と考えられている。本研究では、針無注射器を用いた DNA ワクチンとタンパクワクチンの混合投与方法が、Dengue 4 価 DNA ワクチンの中和抗体誘導能を高めるために極めて効果的な方法であることが示された。しかも、この上昇は全ての型に対して認められたため、1 型から 4 型に対する中和抗体価のバランスが崩れることによる重症化の可能性

も考えにくい。

DNA-タンパクワクチンの混合投与により誘導される免疫応答の相乗的上昇に関わる主要なメカニズムとして、多量のタンパクワクチンにより prime され、プラスミド DNA がトランスフェクトされた細胞より長期間にわたり放出される少量の抗原タンパクによって boost されることが考えられる。この作用に加えて、針無注射器投与方法により、プラスミドが比較的多くの筋肉細胞に取り込まれ、産生抗原量が増加したことも、高い中和抗体価の誘導に関係したと考えられる。

本研究では、タンパクワクチンとして EP ワクチン (DENV2 抗原) と JEVAX を用いた。Dengue 4 価 DNA ワクチンと EP ワクチンとの混合投与においては、DNA ワクチンとタンパクワクチンが同じ血清グループ (Dengue グループ) の抗原から成り立っているため、DNA-タンパクワクチン混合投与による相乗的上昇は、これまでに報告した日本脳炎をモデルにした結果と一致する。しかし、この相乗効果は異なる血清グループによる DNA-タンパクワクチン混合投与 (Dengue 4 価 DNA ワクチンと JEVAX) にも同様に認められた。わずかな抗原交差性が、免疫誘導に影響したとも考えられるが、その理由は現在のところ不明である。

E. 結論

タンパクワクチンとして DENV2 細胞外粒子または JEVAX を用いて混合投与した結果、4 価 DNA ワクチンの中和抗体誘導能を相乗的に上昇した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Eiji Konishi, Mizue Shoda and Takashi Kondo: Analysis of yearly changes in levels of antibodies to Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in racehorses in central Japan shows high levels of natural virus activity still exist. *Vaccine* 24, 516-524, 2005

Eiji Konishi, Saori Kosugi, and Jun-ichi Imoto: Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice. Vaccine, in press

Tomohiro Ishikawa and Eiji Konishi: Mosquito Cells Infected with Japanese Encephalitis Virus Release Slowly-Sedimenting Hemagglutinin Particles in Association with Intracellular Formation of Smooth Membrane Structures. Microbiol. Immunol., in press.

Eiji Konishi, Mizue Shoda, Seigo Yamamoto, Satoru Arai, Keiko Tanaka-Taya, and Nobuhiko Okabe: Natural infection with Japanese encephalitis virus among inhabitants of Japan: A nationwide survey of antibodies against nonstructural 1 protein. Vaccine, in press

小西英二: 日本脳炎。Clinical Neuroscience 7 巻、784-785 頁、2005

小西英二: 日本脳炎。Modern Physician 25 巻、591-594 頁、2005

小西英二: 日本脳炎。小児科診療 68 巻、2128-2132 頁、2005

小西英二: 日本脳炎の臨床と疫学。日本臨床 63 巻、2138-2142 頁、2005

小西英二: 日本脳炎ワクチンに関する最近の話題。防菌防衛、34 巻、2006、印刷中

小西英二: 日本脳炎ウイルスの不顕性感染。小児科 47 巻、2006、印刷中

小西英二: 日本脳炎ワクチン接種の問題。クリニカル プラクティス 25 巻、2006、印刷中

2. 学会発表

Eiji Konishi, Saori Kosugi and Jun-ichi Imoto: Development of a dengue tetravalent DNA vaccine and its

evaluation in mice. Thirty-Ninth Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Palo Alto 2005

石川知弘、Peter W. Mason、田島茂、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎、小西英二: 最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる 3'-非翻訳領域の欠失が誘導する培養細胞でのウイルス増殖抑制。第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2005)。

井本淳一、小西英二: フラビウイルス DNA ワクチン及びタンパクワクチンの混合投与: デングウイルスと日本脳炎ウイルスのマウスにおける交差免疫原性。第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2005)。

山中敦史、小西英二: 抗体依存性感染増強及び/または中和活性を示すマウス抗 Dengue 2 型ウイルスモノクローナル抗体の解析。第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (2005)。

小西英二: ウエストナイル熱。日本防菌防衛学会第 32 回年次大会 (2005)。

石川知弘、高崎智彦、倉根一郎、小西英二: ウエストナイルウイルス感染症に対する DNA ワクチンのマウスにおける評価。第 9 回日本ワクチン学会学術集会 (2005)。

松永貞一、小西英二: 東京都葛飾区の一診療所の患者からみた同地域における日本脳炎ウイルス不顕性自然感染の可能性に関する考察。第 9 回日本ワクチン学会学術集会 (2005)。

石川知弘、田島茂、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎、小西英二: 最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる 3'-非翻訳領域の欠失が引き起こす培養細胞におけるウイルス増殖抑制。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (2005)。

井本淳一、小西英二: タンパクワクチンとの混合投与による Dengue 4 価 DNA ワクチンのマウスにおける免疫原性の上昇。第 53 回日本ウイルス学会学術集会 (2005)。

山中敦史、小杉紗織、小西英二：マウス抗
 デング2型及び4型ウイルスモノクローナ
 ル抗体における抗体依存性感染増強と中和
 活性の関係。第53回日本ウイルス学会学術
 集会（2005）。

奴久妻聡一，小杉紗織，小西英二：デングウ

イルスに対するモノクローナル抗体可変領
 域のアミノ酸配列の解析。第53回日本ウイ
 ルス学会学術集会（2005）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

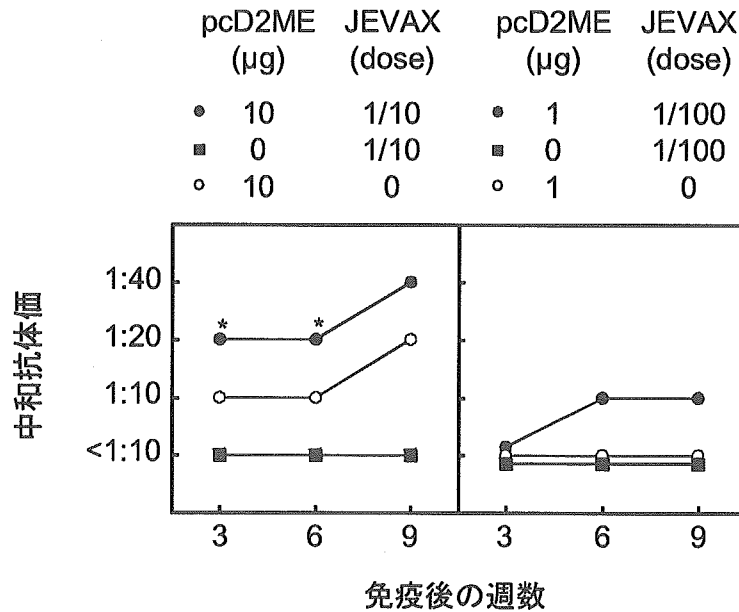


図 1. pcD2ME と JEVAX の混合投与により誘導された中和抗体価。*印では、個体別に測定した時に得られた平均中和抗体価が、同じ免疫後の週数で得られた単独投与群における平均中和抗体価と有意差が認められた。

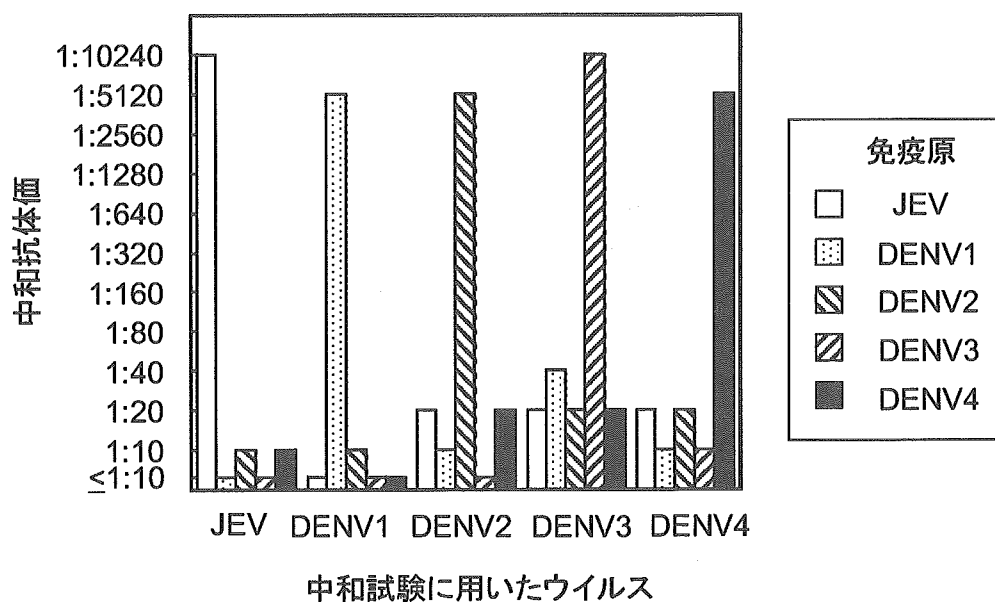


図 2. 4種のデングウイルスと JEV のそれぞれに対する HMAF の、これら 5 種のウイルスに対する中和抗体価。

表 1. 各群における DNA ワクチンおよびタンパクワクチンのドーズ

グループ ^a	pcD1ME	pcD2ME	pcD3ME	pcD4ME	pcDNA3 ^b	JEVAX	EP
1	25 μ g	25 μ g	25 μ g	25 μ g	-	-	-
2	25 μ g	25 μ g	25 μ g	25 μ g	-	1/10ドーズ	-
3	25 μ g	25 μ g	25 μ g	25 μ g	-	-	150 ng
4	-	-	-	-	73 μ g	1/10ドーズ	-
5	-	-	-	-	73 μ g	-	150 ng
6	-	-	-	-	73 μ g	-	-

^a 1群6匹の4週齢の雄ddYマウスを用いた。

^b 73 μ gのpcDNA3ベクターには、4価DNAワクチンに含まれると等しいモル数のCpGアジュバント配列が含まれる。

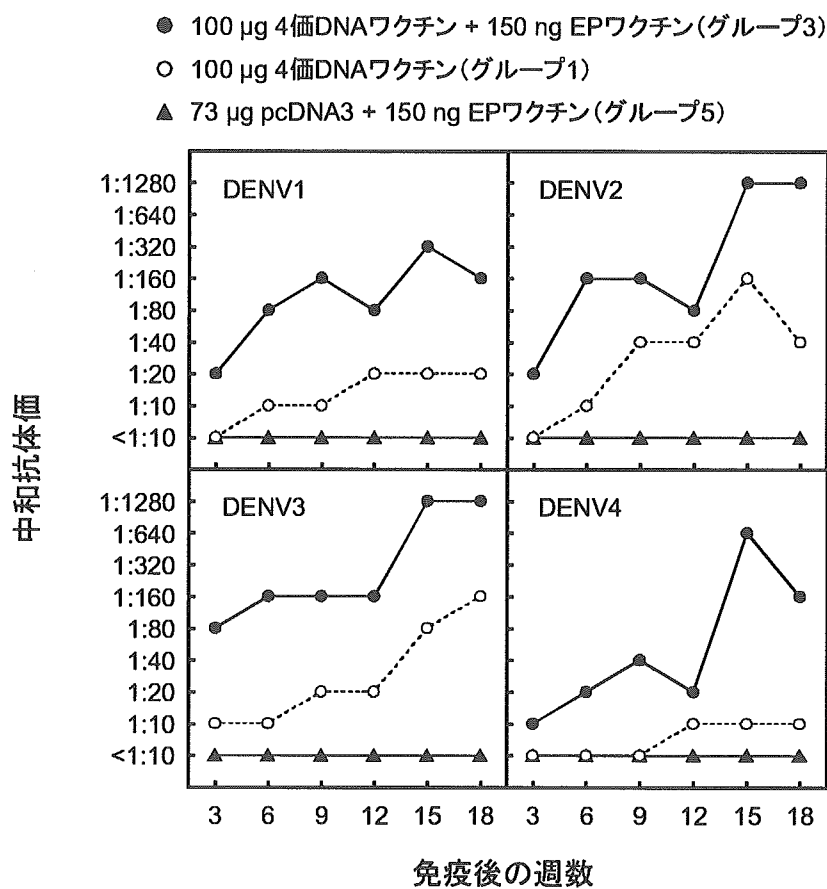


図3. デング4価DNAワクチンとEPワクチンの混合投与による中和抗体の誘導。グループ1,3及び5を比較した(表1参照)。4種のデングウイルス(DENV1、DENV2、DENV3及びDENV4)に対する中和抗体価の推移を示す。免疫後13週目に追加免疫を行った。

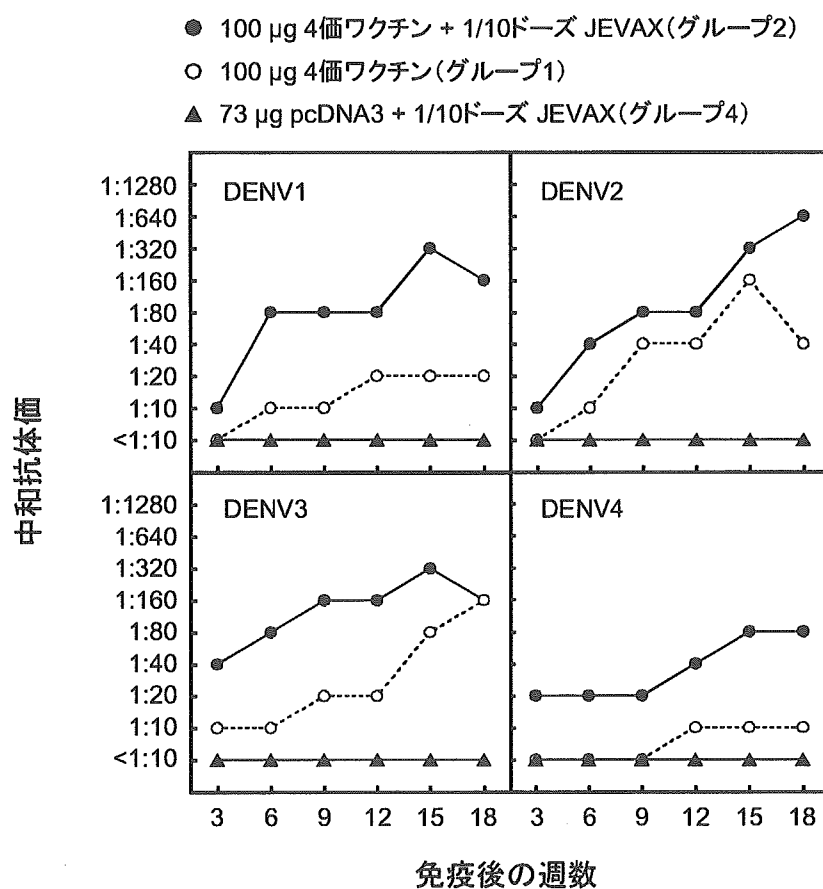


図4. デング4価DNAワクチンとJEVAXの混合投与による中和抗体の誘導。グループ1、2及び4を比較した(表1参照)。4種のデングウイルス(DENV1、DENV2、DENV3及びDENV4)に対する中和抗体価の推移を示す。免疫後13週目に追加免疫を行った。