

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究総合報告書

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

（分担）研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：節足動物媒介性ウイルスの将来的にわが国への影響が危惧される西ナイル（ウエストナイル）ウイルス、デングウイルス、チクングニヤウイルスについてその迅速診断法を確立する目的でウイルス遺伝子の検出法と感染初期に生産される IgM 抗体の検出技術を開発した。ウイルス遺伝子の迅速診断法の基礎技術には近年日本において発明された Loop Mediated Amplification (LAMP)法を採用した。この方法は、従来用いられている PCR 法と比較したばあい 1)特異性が高い、2)感度が高い、3)検出時間が半分以下である、4)特殊な温度管理を行う機械を必要としない、などの優れた特徴をもっている。西ナイルウイルスとデングウイルスに関しては従来の PCR 法と比較した結果、約 10 倍～100 倍の感度を持ち、日本脳炎ウイルス遺伝子やその他のフラビウイルス遺伝子と交叉反応を示さないことを確認しきわめて有用な迅速遺伝子検出系が確立できた。チクングニヤウイルスについては輸入伝染病として重要なデング熱・デング出血熱（DF/DHF）と類似の症状を呈するのでその鑑別のために IgM-capture ELISA 法および IgG-indirect ELISA 法を用いた迅速抗体検出系を作成した。これらの方法を用いて抗チクングニヤウイルス（CHIK）抗体および類症鑑別のため抗デングウイルス（DEN）抗体について東南アジアおよび太平洋州の 5 カ国で採集された有熱患者からの血清 305 検体（IgG については 422 検体）を測定した。その結果、全体で 4.9%の抗 CHIK-IgM 陽性患者ならびに 10.4%の抗 CHIK-IgG 陽性患者を検出でき、今回確立した抗体検出系が有用であることを示す共に、デング感染症とチクングニヤ感染症の鑑別が重要であることが示された。

A. 研究目的

1999 年に米国のニューヨーク市に侵入した西ナイルウイルスは米国本土に土着し 2003 年にはカリフォルニアなど太平洋岸の地域にまでウイルス汚染地域が拡大した。この結果、西ナイルウイルスが米国からわが国へ侵入する可能性は平成 16 年の夏から飛躍的に増大していると考えられる。このため、西ナイルウイルスのわが国への侵入を早期に検出する方法の開発・実用化が急務である。また近年、地球温暖化にともない熱帯性のウイルス感染症であるデング熱、デング出血熱の患者数は増加傾向にありわ

が国でも輸入感染症としての重要性が増している。この研究ではこれらのウイルス感染症の迅速診断を強化する目的でウイルス遺伝子を迅速かつ簡便・正確に患者や鳥、蚊のサンプルから高感度に検出する方法の確立を目的として、近年わが国で開発された遺伝子増幅技術（LAMP 法）を応用して、通常臨床検査室で利用可能な方法を開発した。またデング感染症の鑑別疾患として重要であるが、商業的に実験室診断法が供給されていないチクングニヤウイルス感染の血清診断法の開発も実施した。

## B. 研究方法

以下の方法で実施した。

### 1) RT-LAMP 法 :

RT-LAMP 増幅は独自にデザインしたプライマーを用いて栄研化学社の Loopamp DNA amplification キットを用い、25  $\mu$  l の反応系で 63°C、60 分反応させ、反応産物をアガロース電気泳動と Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan)を用いて反応産物濁度を測定する方法で実施した。反応系の組成条件は FIP と BIP プライマー (50 pmol)、F3 と B3 プライマー (5 pmol)、F と loop B プライマー (25 pmol) 1400  $\mu$ M 各 dNTP, 0.6 M betaine (Sigma, USA), 40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 20 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.125 U of AMV-RT (Invitrogen, USA), 8 U *Bst* DNA polymerase large fragment (New England Biolabs) でありここに、ウイルス RNA を混合する方法で行った。

### 2) IgM-capture ELISA :

抗ヒト IgM ( $\mu$  chain 特異的) ヤギ IgG (CAPPEL) を補捉抗体として 96 穴プレートに 37°C、1 時間 (あるいは 4°C、一晚) コートし、ブロックエース (あるいは BSA) にて室温、一時間ブロッキングした。PBS-Tween20 にてプレートを 3 回以上洗浄した。以下各試薬の反応後同様にプレートを洗浄した。サンプル血清およびコントロール血清はブロックエースを 1/10 量含む PBS-Tween20 にて 1 : 100 希釈したものを 37°C、1 時間反応した。次に抗原 (HA 力価 1 : 4) をのせ 37°C、1 時間反応し、抗 CHIK ウサギ IgG を一次抗体として のせ 37°C、1 時間反応した。二次抗体として HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体を用い 37°C、1 時間反応し、器質液として  $\sigma$ -phenylene diamine (OPD) を用い室温 30 分暗所にて反応させた。1 N 硫酸にて反応を停止し、OD<sub>492nm</sub> にて測定した。サンプル並びに陽性コントロールの OD 値を陰性コントロールの

OD 値で割り、2.0 をカットオフ値として陰性陽性の判定を行なった。

## C. 結果

### 1) 西ナイルウイルス NY 株の RT-LAMP 法による遺伝子増幅と特異性。

独自に設計したプライマーにより西ナイルウイルス遺伝子は RT-LAMP 法により検出された。ウイルス RNA を入れない反応では非特異的な産物は形成されなかった。この産物は制限酵素 (Alu1) により切断され予想される大きさの断片となり、増幅された遺伝子が西ナイルウイルスに特異的であることが示唆された。また精製産物の DNA を直接塩基配列を解読したところやはり西ナイルウイルス遺伝子が増幅されていることが確認された。また他のフラビウウイルスの遺伝子に対しては反応は認めず特異的な検出方法であることが示された。さらに従来の PCR 法との感度比較を実施した結果、約 10 倍の検出感度を示す事が確認された。さらに 63°C でのインキュベーションと濁度測定が同時に出来る Loopamp real-time Turbidimeter (LA-200, Teramecs, Japan) を用いて RT-LAMP を用いたリアルタイムでの西ナイルウイルスの遺伝子検出について評価を行った。その結果、アガロース電気泳動でみられた検出感度に相関して、濁度の検出が確認された。さらに、検出開始 (反応開始) 時間は鑄型ウイルス RNA の量に相関して、即ち RNA の量が多いほど検出開始時間が短くなった。このことは、本濁度計をもちいれればウイルス遺伝子の検出とその量の定量が可能であることを示していた。

### 2) デングウイルスの RT-LAMP 法における迅速診断法の開発

独自に設計したプライマーにより 4 つの血清型のデングウイルスの遺伝子は RT-LAMP 法により検出されることが示された。精製産物の DNA を直接塩基配列を解読したところそれ

ぞれのデングウイルス遺伝子が増幅されていることが確認された。また簡便法として特異的制限酵素 (BanII) で分解すると増幅産物はすべて 1 本もバンドとなった。このことから本デング RT-LAMP 法はデングウイルス遺伝子を増幅していることを証明した。さらにデングウイルス相互および他のフラビウイルス (JEV: 日本脳炎ウイルス、WNV: ウェストナイルウイルス、SLE: セントルイス脳炎ウイルス) の遺伝子に対して非特異反応も認めなかった。

従来から開発されていた RT-PCR 法と今回開発した RT-LAMP 法のデングウイルス遺伝子検出法、および培養細胞を用いてのウイルス分離法によるウイルス検出をフィリピンおよびバングラデシュ、インドの患者サンプルを用いて比較検討し結果、今回開発した RT-LAMP 法は感度、特異性ともに良好な結果が得られた。さらに西ナイルウイルスと同様にリアルタイムでのデングウイルスの遺伝子検出も可能であることを確認した。また、おり簡便は検出システムとして増幅 DNA を蛍光発色させて観察する手技を検討した。その結果、RT-LAMP 法では増幅産物が極めて多量であるために 63°C で反応後のチューブにサイバークリーンを添加して UV 照射下に観察した。その結果、蛍光検出を用いることで、この RT-LAMP 法は恒温水槽さえあれば感度の高い遺伝子検出系として利用できることが示された。

### 3) チクングニヤ IgM-capture ELISA

今回、作成したチクングニヤ IgM 抗体検出意系を用いてウイルス常在地の有熱患者血清を検索した結果、フィジー 4 例 (6.6%)、フィリピン 4 例 (11.2%)、インドネシア 5 例 (5.6%)、バングラデシュ 0 例 (0%)、スリランカ 2 例 (6.8%) の陽性例が認められた。合計 15 例の内 10 例についてはデング IgM も陽性だったため、確実にチクングニヤといえるケースは 5 例 (1.6%) であった。チクングニヤ IgG-indirect ELISA 法による血清の検査では

フィジー 3 例 (4.9%)、フィリピン 8 例 (9.0%)、インドネシア 22 例 (25.0%)、バングラデシュ 9 例 (5.8%)、スリランカ 2 例 (6.9%) の合計 44 例の陽性が認められた。

## D. 結論

- 1) RT-LAMP 法を用いた新しい西ナイルウイルスとデングウイルスお遺伝子検出系が確立された。
- 2) ウイルス検出感度は、従来遺伝子増幅検出系である RT-PCR 法と比較して 10 倍～100 倍の検出感度であった。
- 3) RT-LAMP 法による検出時間は 40 分以内であり、検出時間の短縮が図られた。
- 4) 今回設計した LAMP プライマーでは日本脳炎ウイルス、デングウイルス 2 型、セントルイス脳炎ウイルスなどの西ナイルウイルスと近縁のウイルスとの交叉は認められず極めて特異性の高い結果となった。
- 5) 蛍光物質を使った簡易診断法によりより簡便な RT-LAMP 法によるデングウイルス検出方法として増幅 DNA を蛍光発色させて観察する手技が確立された。
- 6) チクングニヤ IgM および IgG を測定する系が確立された。
- 7) この方法によりチクングニヤ熱は、大流行は認められないが、安定して広く東南アジアに存在していることが確認された。

## E. 考察

西ナイルウイルスの本邦への侵入にさいして行政レベルでも、市民レベルでも迅速な防疫を実施するなめには、ウイルスの侵入をいち早く検出する必要がある。従来、西ナイルウイルスに感染した動物のウイルスに対する特異抗体の検出あるいは、感染動物の血液、脳組織、あるいはウイルス感染蚊個体からのウイルス分離や PCR 法によるウイルス遺伝子の検出が開発されていた。

今回、われわれが開発した方法はウイルス遺

伝子の得的増幅によりウイルスの存在を検出する方法であるが、従来からのPCR法に比較して、より高感度、迅速、安価であるという利点がある。この方法は高度な解析器機がなくても利用できるという利点もある。また昨年のSARSの流行において、同じLAMP法によるSARSウイルス遺伝子検出試薬が開発されたため、この方法の手技と検出器機はすでに多くの検疫所、地方自治体の環境衛生研究所等に配備されている。このような現状に鑑み、今回開発した西ナイルウイルスの遺伝子検出系は実際の保健行政レベルでの研究室での利用が可能であると思われ、極めて有用であると期待できる。

熱帯地域にはデングウイルス感染と同様な症状を示す感染症が多いことからその確定診断は容易ではない。しかし、急性期の患者を正確に診断することは治療のみならず輸入伝染病対策を実施のために保健行政上も重要である。また臨床的には近年、日本人でも重症型のデング出血熱患者の発生が見られ発熱、血小板減少を示す輸入感染症例ですばやく原因となる病原体を同定できるか否かは予後を大きく左右する因子ともなる。

今回、開発した手法の最も重要な点はこの方法が高価な検出機器がなくとも利用可能な点である。従って、この方法が普及すれば開発途上国の検査室でも、あるいは日本など先進国でも末端の病院の検査室レベルでデング感染の一次検査が可能となる。今後、実用化に向けての種々の安定性試験、デングウイルス流行地域のデングウイルス株間の塩基配列の差異による検出効率の差異などを検討する必要がある。

近年、東南アジアや太平洋州の国々へビジネスあるいは観光で出かける人が増えている。こういった状況で、デングウイルス陰性例も無視できなくなってきている。チクングニヤウイルス感染症は臨床的には重度の出血熱あるいは

ショック症状を示さないとされているが、関節炎、関節痛はひどい痛みを伴う。したがってデングウイルス感染と同様確定診断のできる体制を整えておくことは適切な治療をするためにも大切である。また、ロスリバーウイルスの常在地であるオーストラリアだけでなく過去1979年に一度だけ大流行のあったフィジーにおいても最近毎年ロスリバーウイルスの症例報告がある。今回の調査の結果、オーストラリアからの輸入例だけでなくフィジーに定着している可能性を探る事も大切ではなからうか？増幅動物である有袋類のフィジーにおける代替動物は何なのか興味深いところである。今後、海外での調査を広げていくと共に海外からの帰国者の調査にもチクングニヤウイルスおよびロスリバーウイルスをデングウイルスの診断と共に行なうことは大切であろう。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究総合報告書

輸入デングウイルス感染症の検査・診断に関する研究

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部 室長）

協力研究者 西村聖美、鈴木尚文、佐藤之義、古川徹也、三輪俊樹、高橋正樹、

松本泰治、横田勉、河合誠義（成田空港検疫所）

伊藤美佳子、小滝 徹、原田文植、倉根一郎

（国立感染症研究所ウイルス1部）

デングウイルス感染症は東南アジア・中南米を中心として世界的規模で熱帯・亜熱帯地域に拡がっており、re-emerging infectious disease（再興感染症）の一つとして、極めて重要な感染症になっている。わが国では過去60年間国内流行のない感染症であるが、近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例がみられる。そこで、これら不明熱疾患についての検査、診断を行い、厚生行政に資することを目的とした。デングウイルス高感度遺伝子検出のために、リアルタイム RT-PCR（TaqMan 法）を開発し、ウイルス分離および IgM-捕捉 ELISA による IgM 抗体の両検出法により、流行地域からの帰国発熱患者のデングウイルス感染を診断した。2003 年は SARS の影響もあり海外渡航者が減少したことを反映して、デング熱輸入症例も減少したが、セイシェル、フィジー、ニューカレドニアなどインド洋や南太平洋諸島からの輸入症例が目立った。2004 年はミクロネシア（ヤップ島）からの集団輸入感染症例からウイルスを分離し現地に先駆けてミクロネシアの流行株の型別および遺伝子解析情報を、WHO を通じて現地に報告した。ネパールからの輸入症例からの現地流行ウイルスを世界で初めて分離し、その情報をネパールに伝えた。2005 年は、東南アジアを中心にデング熱流行が大きく、日本人の海外渡航者も多かったことを反映して、本研究グループで診断したデングウイルス感染症は、55 例であり、感染症法に基づいた届出数は 71 件にのぼった。また、スリランカでデング熱に感染した日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。さらに、インドネシアスマトラ島沖地震による津波災害に関連して、我々は 3 月に再び発生したスマトラ島近海のニアス島地震の被災地（ニアス島）で感染したデング熱患者から、ウイルスを分離することに成功した。このウイルスは、デングウイルス 2 型であり、2004 年に成田空港検疫所でインドネシア、ジャカルタからの輸入症例から分離されたデングウイルス 2 型と塩基配列において 98.5% という高いホモロジー相同性を示した。我々のサーベイランス事業が、厚生行政だけでなく国際貢献の面でも有用であることを示した。

A. 研究目的

デングウイルス感染症はわが国では過去 60 年間国内感染のない感染症であるが、熱帯・亜熱帯地域では流行域が拡大しており、再興感染症の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。感染症新法の施行に伴い、4 類感染症として全数届け出制とな

り、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例への対策が重要となった。そこで、本感染症に対する検査・診断を成田空港検疫所と国立感染症研究所で行い、厚生行政に資することを目的とした。

## B. 研究方法

供試ウイルスはプロトタイプデングウイルス（1型:Hawaii, 2型:New Guinea C, 3型:H87, 4型:H241）と患者検体からの分離株を蚊由来細胞 C6/36 株で増殖させた培養上清を用いた。リアルタイム RT-PCR は伊藤ら

(J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004)の方法により実施した。分離ウイルスはVero細胞によるプラーク法、PCR産物による遺伝子解析法で確認した。血清での抗体検査にはIgM-捕捉 ELISA kit (Focus社, CA, USA) および IgG-ELISA kit(PanBio社)によりIgMおよびIgG抗体を測定した。また、2005年のデング出血熱による死亡例においては、肝臓、肺、腎臓、脾臓など剖検材料からのウイルス遺伝子検出およびウイルス分離を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 輸入デング感染症の状況

#### 1) 成田空港検疫所での検査成績

熱帯地域から成田空港に帰国した時に不明熱があり、デング感染症検査を実施した総数は115症例(2003年)、128症例(2004年)、109症例(2005年)であった。これらの検体を特異遺伝子およびIgM抗体の検出により検査・診断した結果、3年間で合わせて32症例でデングウイルス遺伝子陽性であった。

#### 2) 国内医療機関からの依頼検査成績

国内医療機関からのデングウイルス感染に関する検査依頼件数は、2003年は34件、2004年は54件、2005年は71件であった。このうち、デングウイルス感染が確認された症例は、2003年は23例、2004年は20例、2005年は43例であった。2003年は、インドネシア(5例)、タイ(6例)、インド(3例)などの東南アジア以外にフィジー(2例)、ニューカレドニア(1例)、セイシェル(1例)など島国からの帰国者が目立った。2004年の特記すべきことは、8月に発生したミクロネシア連邦のヤップ島における日本人旅行者の集団感染事例(7名)であり、その後も9月、10月とヤップ島からの輸入症例が続いて発生

した。我々の分離したヤップ島の流行株はデングウイルス1型であり、このウイルスの3' NCR領域のVariable部位に遺伝子欠損があることが判明した。これは、デングウイルス1型に関しては、初めての株であった。2005年に関しては、日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。また、インドネシアスマトラ島沖地震による津波災害に関連して、我々は3月に再び発生したスマトラ島近海のニアス島地震の被災地(ニアス島)で感染したデング熱患者から、ウイルスを分離することに成功した。このウイルスは、デングウイルス2型であり、2004年に成田空港検疫所でインドネシア、ジャカルタからの輸入症例から分離されたデングウイルス2型(GenBank No.AB180478)と塩基配列において98.5%という高いホモロジー相同性を示した。

## D. 考察

デングウイルス感染症の診断では病原学的検索と血清学的検索の両面からなされる。PCRによるウイルス遺伝子の検出は型別まで確定することができるが、ウイルス血症が存在する時期の検体から検出される可能性が高い。それに対して、IgM捕捉ELISAによるIgM抗体は患者が解熱期に入り、回復してくる時期に検出される。即ち、PCRによるウイルス遺伝子とIgM-ELISAによるIgM抗体の検出の両検索を組み合わせることにより、初感染のデングウイルス感染症はかなりの精度で確定診断が可能であると考えられる。

近年、わが国の輸入デング感染症は増加傾向にあると思われるが、全国的な検査体制が確立していないので、検査が実施されなかったり、届出漏れがあったりとその実数は正確には把握できていない。感染患者の大半はインドネシア、フィリピン、タイ、シンガポールマレーシアなど東南アジアからの帰国者であるが、近年の海外渡航者の増加にともないインド洋や南太平洋諸島からの輸入症例も目立つようになってきた。

年間約500万の日本人が熱帯地域に旅行

し、約 200 万の人達が熱帯地域から日本に入国している現状を考え合わせると、帰国時での検疫所での検査およびその後の確定診断等、輸入感染症としてのデング熱、デング出血熱の把握は益々重要であると考えられる。

#### E. 結 語

近年、輸入デング症例は確実に増加傾向にあり、重症例も発生しており、2005 年は死亡例も発生した。海外旅行の多様化に伴って集団感染事例や東南アジア以外での感染症例も増加してきている。

また、インドネシアスマトラ島沖地震による津波災害に関連して、我々は 3 月に再び発生したスマトラ島近海のニアス島地震の被災地（ニアス島）で感染したデング熱患者から、ウイルスを分離することに成功した。その分離ウイルスは、デングウイルス 2 型であり、2004 年に成田空港検疫所でインドネシア、ジャカルタからの輸入症例から分離されたデングウイルス 2 型と塩基配列において 98.5%という高いホモロジー相同性を示し、我々のサーベイランス事業が、厚生行政だけでなく国際貢献の面でも有用であることが示唆された。今後は成田空港検疫所など主要国際空港での帰国時での初検査と国立感染症研究所での確定診断および各地方衛生研究所並びに各検疫所との連携システムを構築し、全国的な検査・診断体制を整備すること、また国内の医療機関にデング熱の診断が日本国内で可能であることを周知することが望まれる。

#### F. 健康危険情報

スリランカでデング熱に感染した日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。本症例では、発病後 18 日目に死亡し、その剖検肝臓組織からデングウイルス遺伝子を検出した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Sadao Yabe, Ichiro kurane. Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination

inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10(4) 725-728, 2003.

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka. Interference in Japanese encephalitis virus infection of Vero cells by a cationic amphiphilic drug, chlorpromazine. *Journal of General Virology* 84: 1737-1741, 2003.

高崎智彦、倉根一郎. 世界におけるデング熱・デング出血熱. 病原微生物検出情報 25(2) 33-34 (2004)

Ernawati Dewi Beti, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection. *J. Virological Methods*. 121: 171-180. (2004)

Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Ken-Ichiro Yamada, Reiko Nerome, Shigeru Tajima and Ichiro Kurane. Development and Evaluation of Fluorogenic Reverse Transcriptase PCR (TaqMan RT-PCR) Assays for Dengue Virus Types 1-4. *J. Clin. Microbiol.* 42(12):5935-5937. (2004)

Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Mikako Ito, Ichiro Kurane, Toshitaka Akatsuka. Detection of Dengue Virus Serotype-specific IgM by IgM capture ELISA in the presence of sodium thiocyanate (NaSCN). *Dengue Bulletin WHO* (2004) .

Kunishige M, Mitsui T, Leong HN, Takasaki T, Kurane I, Mihara A, Matsumoto T. Preferential gray matter involvement in dengue myelitis. *Neurology* 63(10):1980-1981. (2004)

Shigeru Tajima, Tomohiko Takasaki, Shigeo Matsuno, Mikio Nakayama, Ichiro Kurane. Genetic characterization of

Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332:38-44, (2005)

田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、長島真美、村田以和夫、諸角 聖、山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎. デングウイルス初感染例における中和抗体測定による血清型判定が可能な病日期間の検討. 臨床とウイルス. 32(1). 30-35, (2004)

Tajima S, Nukui Y, Ito M, Takasaki T, Kurane I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3 non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. *Virus research*. 116:38-44(2006)

Nawa M, Takasaki T, Ito M, Inoue S, Morita K, Kurane I. Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12(10) 1235-1237. (2005)

鳥居明子、月館幸一、原田勝代、高崎智彦. 来日後にデング出血熱を発症した4歳男児例. 日本小児科学会雑誌. 109(9) 1127-1131 (2005)

Yoko Nukui, Shigeru Tajima, Akira Kotaki, Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Kazuhiko Koike, Ichiro Kurane. Novel dengue virus type 1 with a 29-nucleotide deletion in the 3'NCR isolated from a traveler to Yap state, Micronesia, in 2004. *Emerg. Infect. Dis.* 12(2) 343-346 (2006)

## 2. 学会発表

伊藤美佳子、山田堅一郎、高崎智彦、根路銘令子、田島 茂、野村秀和、Ernawati Dewi Beti, 倉根一郎. Real time PCRによる Dengue virus の血清型分類. 第51回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

Beti Ernawatti, 高崎智彦、倉根一郎. PBL induce increase in the permeability on dengue virus infected-endothelial cells associated with down regulation of

VE-cadherin. 第51回日本ウイルス学会(京都) 10/27-29/2003

名和 優、赤塚俊隆、高崎智彦、伊藤美佳子、倉根一郎. デングウイルス血清型特異的 IgM 検出のためのタンパク変性試薬 (チオシアン酸ナトリウム) を用いた ELISA. 第51回日本ウイルス学会 (京都) 10/27-29/2003

Tomohiko Takasaki. Newly developed method for dengue diagnosis. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

Mika Shigematsu, Tomohiko Takasaki, Kazuyo Yamashita, Mikio Kimura, Nobuhiko Okabe. Imported dengue fever cases in Japan. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

K. Kishiro, Y Kurosawa, A Yamamoto, M Nakayama, T Ogawa, S Inoue, T Takasaki, R R Matias, F Filipinas Natividad, K Morita, I Kurane. Detection of anti-dengue virus IgM by a particle agglutination assay system using hydroxyapatite-coated nylon beads. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Travel Health Conference (Kuala Lumpur) 2004/10/4-7

伊藤美佳子、高崎智彦、向井 三郎、倉根一郎. サルにおけるデングウイルス感染増強抗体の解析. 第52回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

田島 茂、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎. デングウイルス1型完全長 cDNA クローンの作成およびウイルス産生系の確立. 第52回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23

名和優、高崎智彦、赤塚俊隆、伊藤美佳子、倉根一郎. デング血清診断における血清中 IgA 抗体検出と有用性の検討. 第52回日本ウイルス学会総会 (横浜市) 2004/11/21-23



Tajima Shigeru, Tomohiko Takasaki, Yuki Eshita, Ichiro Kurane. Characterization of Yokose virus, a Flavivirus, which was isolated from the Bat in Japan. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

Yuki Eshita, Tomohiko Takasaki, Shunro Imura, Yukinori Uchida, Ikuo Takashima, ター) 2004/12/4

西川由紀, 武井秀信, 長田陽介, 小林和郎, 徳永 毅, 湊 志仁, 椎貝達夫, 竹内 章, 高崎智彦. 肝障害を合併したデング熱の一例. 第527回日本内科学会関東地方会例会(東京) 2005年6月

Ichiro Kurane. Diagnostics dengue and West Nile viruses in mosquitoes. Forties Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Congress. (Kyoto) 2004/7-10

高崎智彦. わが国におけるアルボウイルス感染症の現状. 第7回近畿熱帯医学研究会(京都市; 京都大学東南アジア研究セン

Tajima Sigeru, Yoko Nukui, Takasaki Tomohiko, Ichiro Kurane. Identification and characterization of deletion in the variable region located in 3' non-translated region of dengue type 1 virus. 2<sup>nd</sup> Asian regional dengue research network meeting. (Singapore) 2005/September 28-30.

## 厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

### 総合研究報告書（H15-17）

#### 我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
協力研究者 根路銘令子、田島 茂、小滝 徹、伊藤美佳子、田島茂、  
林 昌宏、高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
吉住秀隆、小川知子（千葉県衛生研究所）  
田部井由紀子、吉田靖子（東京都健康安全研究センター）  
尾西 一（石川県保健環境センター）  
細谷佳行、神田政宏（静岡県西部食肉衛生検査所）  
足立 聡、佐原啓二（静岡県環境衛生科学研究所）  
杉山 明（三重県科学技術振興センター保健環境研究部）  
多田芽生、森下市子、山西重機  
（香川県環境保健研究センター）  
沖 浩臣（和歌山県衛生公害研究センター）  
田原研二（島根県保健環境科学研究所）  
桑山 勝（広島県保健環境センター）  
原田誠也、甲木和子（熊本県保健環境科学研究所）  
糸数清正（沖縄県衛生環境研究所）  
新井 智（国立感染症研究所感染症情報センター）

#### 研究要旨

1990 年以降、日本脳炎患者の発生は、毎年 10 人以下であるが、2001 年には和歌山県で 11 年ぶりに患者が発生し、2002 年には 13 年ぶりに広島県で患者が発生している。ブタの抗体調査によれば、依然として関東以西のブタの間では、日本脳炎ウイルスは蔓延している。我々は 2002 年春より「日本脳炎ワクチンの有効性評価」を狙いの一つとして、都県地方衛生研究所との共同研究の形で、ブタにおける「日本脳炎ウイルスサーベイランス」を開始し、本年度も上記 10 都県の 11 施設で実施した。近年アジア諸国では、我々が今回のブタ血清から分離したウイルスと同様に、抗原性や遺伝子型でワクチン株（3 型）と異なったウイルス（1 型）が多数分離されている。これらのウイルス遺伝子では 3'NCR 領域の Variable 領域に共通した欠損部位が確認された。2004 年にはこの 1 型ウイルスの中にマウスに対して高い病原性を示すウイルス株が確認された。三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウイルス 2 株（Sw/Mie/34/2004, Sw/Mie/40/2004）が、E 領域の塩基配列上異なるウイルスであった。また、香川県の分離株で 3'NCR 領域の Variable 領域に上記欠損部位とは異なる新たな欠損領域を有するウイルスが確認された。2005 年は沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、東京都のブタから 10 都県あわせて 31 株の日本脳炎ウイルスが分離され、日本脳炎ウイルスの活動が非常に活発であった。

## A. 研究目的

日本脳炎ウイルスは、毎年夏期になると九州、四国地方からブタの間で流行し始め、近畿・東海・北陸・関東地方へと侵淫地域を拡大する。しかし、三重県や静岡県は比較的早期に日本脳炎ウイルスの流行が始まり、年によっては三重県が九州や四国に先行することもある。近年の日本脳炎患者の発症数は10人以下であるが、依然としてブタの間では夏期にウイルスが蔓延しているのが、現状である。

現行日本脳炎ワクチンは「マウス脳由来不活化ワクチン」であり、国際的に認められている唯一の日本脳炎ワクチンである。また、現行ワクチン株(Beijing-1株)は、1949年に中国北京市でヒトから分離された日本脳炎ウイルスで、日本では1989年接種のワクチンより、それまでのNakayama-NIH株から、免疫性が高く、抗原性が野外分離株により近いとされるBeijing-1株に変更になり、以来17年が経過している。現行ワクチンの開発国である我が国は、その有効性についても責任が大きいものとする。そこで我々は、2002年春より「日本脳炎ワクチンの有効性評価」を狙いの一つとして、10都県地方衛生研究所等との共同研究の形で、ブタにおける「日本脳炎ウイルスサーベイランス」を開始した。日本脳炎ウイルスを分離しその分子疫学的解析を実施した結果、ブタから分離されたウイルスは、ワクチン株と異なり遺伝子型1型であった。近年アジア諸国では、我々が今回2002年のブタ血清から分離したウイルスと同様に、抗原性や遺伝子型でワクチン株から大きく変異したウイルスが多数分離されている。本研究において我々は、新しくブタから分離されたウイルスを抗原的、遺伝学的並びに進化的に解析するだけでなく、その病原性をマウスにおける中枢神経毒性および中枢神経侵入性の面から調査し、ワクチン株との比較を試みた。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス分離

#### 分離ブタ血清の採取法

日本脳炎ウイルスIgM抗体が陽性となった時点より、1週ないし2週前のブタ血清をウイルス分離材料として用いた。

#### ウイルス分離法

分離は株化細胞による分離法を主として用いた。各施設で、乳のみマウス脳内接種法が得意な場合は、マウスによる分離を実施した。使用した細胞はVero細胞(アフリカミドリザル腎臓由来)およびC6/36細胞(ヒトスジシマカ由来)を用いた。

#### 遺伝子解析

分離したウイルスのうち、増殖の良いものから、E領域と3'NCR領域に設定した5つのプライマーペアを用いてRT-PCR法により遺伝子を増幅し、ABI prism Avant 3100遺伝子解析装置を用いてE領域の遺伝子解析を実施した。

#### 分離ウイルスの病原性解析

2004年分離ウイルスの病原性を調べるために、生後3週令のマウスにウイルスを腹腔接種および脳内接種し、発病の有無を3週間観察し、その病原性を解析した。

## C. 研究結果

### ブタ血清からの日本脳炎ウイルス分離(2005年)

本年は10都県のブタ血清から日本脳炎ウイルス複数株が分離された。沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、東京都のブタからであり、表1に示す如く、10都県あわせて31株の日本脳炎ウイルスが分離された。なお、現在も分離中のものも数株存在する。

#### 2004年分離日本脳炎ウイルスの遺伝子解析

2004年の分離ウイルス株の遺伝子解析を実施したところ、いずれも遺伝子型1型ウイルスであった。2004年の分離株で特記すべきことは、三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウイルス2株(Sw/Mie/34/2004, Sw/Mie/40/2004)が、E領域の塩基配列上異なるウイルスである(ホモロジー98.3%)ことが、判明した(図1)。一方、香川

県の分離株で 3'NCR 領域の Variable 領域に新たな欠損領域を有することウイルスであった点である(図2)。

#### 2004 年分離日本脳炎ウイルスの病原性解析

上記三重県の分離ウイルス株 2 株 Mie34 (Sw/Mie/34/2004) 、 Mie40 (Sw/Mie/40/2004) に関して、その病原性を検討するために、3週令のマウスに脳内接種したところ、表2の如く LD50 を示すウイルス力価が、Mie34 が 2.12pfu、Mie40 が 0.25pfu と Mie40 が有意に高い病原性を示した。さらに神経侵襲性を含めた病原性をみるために、ウイルスを腹腔接種した。この場合も、LD50 を示すウイルス力価が、Mie34 が 3.72pfu、Mie40 が 2.67pfu と Mie40 が少ないウイルス量で LD50 を示した。

#### D. 考察

本邦における日本脳炎患者数は、1980 年代には、20 から 40 例の範囲にとどまっていたが、1990 年に 11 年ぶりに 50 例を越えた。しかし、1991 年の 13 例の後、1992 年以降患者数は 10 例を越えない。しかしながら、2001 年には和歌山県で 11 年ぶりに患者が発生し、2002 年には 13 年ぶりに広島県で患者が 3 例発生している。2005 年のブタからの日本脳炎ウイルスの分離株は 31 株であり、国内の日本脳炎ウイルスの活動が活発であったと考えられる。特に 2004 年には、静岡県、東京都、千葉県では、ブタの HI 抗体価の上昇時期も遅くウイルスが分離できなかった。しかし、2005 年は静岡県で 8 株、千葉県で 2 株、東京都でも 2 株分離されたことは特筆すべきことである。また、2005 年には静岡県で日本脳炎患者は 1 名報告されており、西日本にくらべて日本脳炎という病気に対して関心が高くない東海、関東で、今後患者発生に注意する必要がある。

また、三重県の 2004 年の分離株 Mie34 と Mie40 は、ともに遺伝子型 1 型のウイルスであったが、Mie40 はマウスに対して高い病原性を示した。その病原性は遺伝子型 3 型ウイルスである北京株よりも高いものであった。このような病原性の高い日本脳炎ウイルスが分離された翌年(2005 年)に、三重県で日本脳炎患者が発生したことは注目すべきであり、今後三重県およびその周辺での日本脳炎患者発生動向に注意する必要があるだろう。

一方、日本脳炎ウイルスの地域性に関して、今までほぼ同一のウイルスが同じ地域で分離されてきたが、2004 年の三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウイルス 2 株が、異なるウイルスであった。このことは、非常に狭い地域においても複数の日本脳炎ウイルスが活動していることが示唆された。また、香川県の分離株で 3'NCR 領域の Variable 領域に新たな欠損領域を有することウイルスであった点で、日本脳炎ウイルスも自然界で、遺伝子レベルでさまざまな変異を起こしていること明らかになった。このことはその病原性や自然界における生態も含めて変化する可能性があることを示唆している。

#### E. 結論

現在ブタの間で主として侵淫しているウイルスは、ワクチン株である北京株の遺伝子型 3 型と異なり、1 型である。しかし、1 型の中でも病原性が異なる株が存在する。

同じ豚農場においても異なる日本脳炎ウイルスが活動していることがある。

3'NCR 領域に新たな遺伝子欠損のある日本脳炎ウイルスが香川県で確認された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Masaru Kuwayama, Mikako Ito, Shinichi Takao, Yukie Shimazu, Shinji Fukuda, Kazuo Miyazaki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Detection of Japanese encephalitis virus genome in cerebrospinal fluids from meningitis patients in Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 11(3):471-473, 2005

高崎智彦、根路銘令子、倉根一郎. 2002 年日本におけるブタから分離された日本脳炎ウイルスの解析. *病原体検出情報* 24(7) 153. 2003

桑山勝、高尾信一、福田伸治、島津幸枝、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦、山田堅一郎、根路銘令子、伊藤美佳子、笠松淳也、中村就一、宮脇弘幸、香川治子、青山範子、

越智一秀、原田和歌子、時信弘. 2002年に発生した日本脳炎3事例についての詳報—広島県. 病原体検出情報 24(7) 152-153. 2003

根路銘令子、高崎智彦. 広範囲血液・尿化学検査・免疫学的検査—日本脳炎ウイルスおよびその他のフラビウイルス. 日本臨床 63(増刊号7):313-317(2005)

高崎智彦. 日本の予防接種・海外の予防接種—定期接種対象疾患:日本脳炎ワクチン. 臨床と微生物 32(5):461-465 (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 63(8) 721-727 (2005)

## 2. 学会発表

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、山田堅一郎、伊藤美佳子、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランスブタ血清からのウイルス分離とその解析および日本脳炎を疑われる患者検体からのウイルス分離. 第38回日本脳炎生態学研究会 2003年5月 (小樽)

根路銘令子、高崎智彦、野村秀和、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスのサーベイランス:ブタ血清からのウイルス分離とその解析. 第51回日本ウイルス学会総会、2003年10月27日-29日 (京都)

桑山 勝、伊藤美佳子、高尾信一、島津幸枝、福田伸治、宮崎佳都夫、倉根一郎、高崎智彦. 小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子検出. 第52回日本ウイルス学会総会(横浜市)2004/11/21-23

桑山 勝、高崎智彦、伊藤美佳子、高尾信一、島津幸枝、福田伸治、宮崎佳都夫、倉根一郎. 小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝

子の検出. 第79回日本感染症学会(名古屋市)2005年4月

高崎智彦、根路銘令子、桑山 勝、内田陽三、西浦哲雄、松田俊二、倉根一郎. 倉橋島におけるウイルス関連血球貪食症候群(virus associated hemophagocytic syndrome: VAHS)症例における日本脳炎抗体. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会(箱根)2005年5月

高崎智彦、林 昌宏、濱野正敬、沢辺京子、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

高崎智彦、倉根一郎. 無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究. 第9回日本ワクチン学会(大阪)2005年10月

高崎智彦、倉根一郎. 無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究. 第9回日本ワクチン学会(大阪)2005年10月

細川隆史、中島秀人、佐藤智彦、藤村智恵子、石田志門、古玉大介、杉野正一、木村文治、花房俊昭、高崎智彦. 髄液から日本脳炎ウイルスが検出された無菌性髄膜炎の1例. 第10回日本神経感染症学会(東京)2005年10

石川知弘、田島茂、根路銘令子、桑山勝、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(横浜)2005年11月

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
（分担）総合研究報告書

デング血清診断における血清中 IgA および IgM 抗体検出法の確立と有用性の検討、  
分担研究者 名和 優(埼玉医科大学微生物学教室)

**研究要旨** 平成 15 年度より 17 年度の 3 ヶ年における研究は、(1)平成 12 年度より 14 年度に補助金を得て確立した IgM 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法(IgM-ELISA) によるデング血清診断の特異性向上のための改良、(2)デング血清診断の指標として血清中の IgA 抗体測定の可能性検討、および(3)デング血清診断の精度向上を目的とした血清 IgA 抗体検出の有用性検討をおこなった。その結果、(1)ヒト血清とデングウイルス抗原との間の非特異的反応が、タンパク変性作用を示すチオシアン酸ナトリウムの存在下で低減されること、(2)日本人のデング感染例では、血清中に検出される IgA 抗体応答がデングウイルス感染を反映していること、(3)血清中の IgA 抗体測定により日本人デング患者の血清診断が可能で、IgM 抗体検出法の代替測定法として有用であったことを明らかにした。

#### A. 研究目的

地球上の熱帯・亜熱帯地域に流行するデング(熱)は、日本国民の海外旅行中の感染、あるいは感染した流行地域住民の日本への入国によって国内へ持ち込まれる。平成 12 年度より開始された本研究事業の実施により、1999 年以後毎年 50 例以上の日本人海外旅行者のデングが診断され、新興感染症あるいは輸入感染症としての重要性が認識されている。

これまでデング非流行地域として日本国内でのデング患者のウイルス学的、血清学的診断の確立が立ち遅れた状況に鑑み、国内での検査体制の確立を目標にして血清学的診断方法の確立を目指した。技術的には現在広く応用されている酵素免疫吸着測定法(ELISA)を基本として、ウイルス感染後最も初期に産生されるデングウイルス特異的 IgM 抗体を検出した。一般にデングの診断は、発熱後 5 日間程度の急性期では血清中よりウイルス遺伝

子 RNA を検出して確定診断する。それ以後の回復期では、血清中のデングウイルス特異的 IgM 抗体検出で診断可能である。

本研究の目的は、日本国内においてデング血清診断を広く普及させることであり、そのための診断方法の確立と診断精度を向上させるため、指標となるデングウイルス特異的抗体の検討をおこなった。

#### B. 研究方法

IgA-ELISA および IgM-ELISA は、本研究事業による補助金を得て開発され、これまでに論文発表された方法を応用した(Nawa et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 7, 774 - 777, 2000; Nawa et al., *J. Virol. Methods*, vol.92, 65 - 70, 2001; Nawa et al., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 12 1235 - 1237, 2005)。

診断に用いるデングウイルスは現在生物学的危険度クラス II に指定されていること、および将来の診断方法としての普及の観点よりベータプロピオラク톤の

添加で不活化した抗原として用いた。

研究に用いた血清検体は、国立感染症研究所ウイルス 1 部にて Dengue 感染の診断に供された日本人海外旅行者の血清であった。

#### (倫理面への配慮)

ヒト血清検体の使用に際しては、予め研究目的で使用されることが同意されたもので、かつ、2 重盲験法で個人情報の漏洩を防止した。

#### C. 研究結果

これまでに検査に供した 250 例以上の日本人 Dengue 被疑者血清での抗体検出率は、IgM 抗体および IgA 抗体とともに 80% 以上であった。発熱を指標として急性期および回復期に 2 回以上採取された血清を用いた抗体応答の観察では、Dengue ウイルス感染後の IgM 抗体および IgA 抗体の上昇が観察された。また Dengue 患者血清中に検出された IgM 抗体は、Dengue ウイルスに対して特異性を示した。反対に、日本脳炎患者血清中に検出された IgM 抗体は日本脳炎ウイルスに対し有意に特異性を示した。以上の結果より、Dengue 患者の血清診断では血清中の IgM 抗体および IgA 抗体測定が有効であった。

#### D. 考察

これまでの我々の研究より、日本人の Dengue 感染例では多くの場合 1 回のみの採血 (シングル血清検体) による診断が中心であった。血清中のウイルス遺伝子検出の不可能な回復期に採血された症例では、血清中の IgM 抗体検出による血清

診断を実施した。Dengue の血清診断の精度を向上させるため、IgM 抗体に加えて IgA 抗体の二つの指標を用いた診断基準の確定につき検討した結果、十分有用であった。

Dengue の診断は感染症診断の一般法則にならぬ、急性期と回復期の 2 回以上の採血を行い、血清中の抗体反応の変動をもって初めて診断するとの教科書的記述を周知徹底させる努力が必要であった。

#### E. 結論

Dengue 感染症例の血清診断に際し、IgA-ELISA は IgM-ELISA と同等の検出感度および特異性を有し、IgM-ELISA の代替測定法として実用可能であった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

別表に記載した。

#### 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

##### 3. その他

なし

厚生労働省・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、  
疫学およびワクチン開発に関する研究」班 分担研究総合研究報告書  
蚊類のアルボウイルス感受性ならびに媒介能

分担研究者	江下優樹	大分大学医学部感染分子病態制御講座	助教授
共同研究者	高崎智彦	感染症研究所ウイルス1部	室長
	上田泰史	大阪検疫所	検疫衛生専門官
	宮城洋実	大阪検疫所	検疫専門官
	田島章太郎	大阪検疫所	検査第一係長
	水田英生	大阪検疫所	企画調整官
	川越和四	大分イカリテクノス(株)	常務
	久保勝彦	大分イカリテクノス(株)	技術員
	渡部裕司	大分イカリテクノス(株)	技術員
	田辺時男	大分イカリテクノス(株)	課長
	穴見勝美	大分イカリテクノス(株)	部長
	菊屋奈良義	大分イカリテクノス(株)	社長
	Raweewan, Srisawat	元大分大学医学部感染分子病態制御講座	元客員研究員
	多森直樹	大分大学医学部感染分子病態制御講座	元大学院生
	東原絢子	大分大学医学部感染分子病態制御講座	大学院生
	加藤孝太郎	大分大学医学部感染分子病態制御講座	大学院生
	岡田貴志	大分大学医学部感染分子病態制御講座	大学院生
	安西三郎	大分大学医学部感染分子病態制御講座	元大学院生
	DIENG, Hamady	大分大学医学部	客員研究員
	小河正雄	大分県衛生環境研究センター	
	内田幸憲	神戸検疫所	所長
	井村俊郎	神戸検疫所	課長
	高島郁夫	北大・院・獣医・公衆衛生	教授
	倉根一郎	感染症研究所ウイルス1部	部長

## 研究要旨

3年間の研究を実施して、次の点を明らかにした。(1)ウエストナイルウイルス(WNV)に対する日本産蚊類の感受性と媒介の解析を中心に研究を行った。アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ、および日本を含む極東アジアに生息するイナトミシオカの4種類がWNVに感受性をもち、アカイエカとイナトミシオカではマウスを用いたWNV媒介試験を行って陽性結果を得た。また、(2)WNVを媒介可能なイナトミシオカの実験室内での継代飼育法を確立した。(3)日本産ミヤラシマカとミスジシマカのデングウイルス感受性を検討して、感受性を持つことを明らかにした。(4)Yokose ウイルスが分離された大分県横瀬地区での蚊調査を実施した。蚊類からの本ウイルスは分離されなかったが、コウモリが井路に生息していることを確認した。

## A. 3年間の研究結果と考察

### 1. 日本産媒介蚊のウエストナイルウイルス感受性と媒介能

#### (1) アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカのウエストナイルウイルス感受性と媒介能

わが国における媒介蚊となりうる蚊種に関する基礎資料を得るために、日本産蚊のウエストナイルウイルス(WNV)感受性試験および媒介能試験を行った。アカイエカ *Culex pipiens pallens*、チカイエカ *Cx. p. molestus* などのアカイエカ群 (*Cx. pipiens complex*) の蚊種、およびヒトスジシマカ *Aedes albopictus* など、日本に広く生息してい



るこれら3種の蚊はいずれもWNV感受性であった。特記すべき知見として、(1)経口感染アカイエカでは20℃でもWNVゲノムが検出され、感染率は42%程であった。(2)経口感染ヒトスジシマカでは、15℃の飼育蚊からWNVゲノムが検出され、感染率は50%程であった。(3)経口感染チカイエカでは、20℃でもWNVゲノムが検出され、感染率は100%であった。(4)経口感染したアカイエカ雌7刺咬吸血によってマウスが実際に発症するかどうかを調べたところ、蚊1個体の刺咬吸血でマウスが発症した。チカイエカやヒトスジシマカはWNV感受性を持つことから、同様なウイルス媒介能を有すると思われた。

### (2) ウエストナイルウイルスに対するイナトミシオカの感受性

大阪港湾区域で採集したイナトミシオカ *Cx. modestus inatomii* のWNV感受性を検討した。試験に用いたWNVは、米国の蚊から分離されたWNV ニューヨーク株である。本ウイルスを雌成虫胸部に接種後、28℃で10日間飼育した蚊では、供試個体全てからウイルスゲノムが検出された。また、経口感染蚊では、少数例ではあるが吸液量の大小に関わらず全て陽性であった。ナイジェリア株を用いた日本産の別種蚊の経口感染実験では、今回の実験のように経口感染率が高くはなかったことから、日本産蚊はWNV ニューヨーク株に対してより高い感受性を持っていることが推察される。今後、ニューヨーク株を用いた本邦産感受性蚊の再検討が必要と思われた。

### (3) イナトミシオカのウエストナイルウイルス媒介試験

媒介試験には、吸血意欲を高めるために一度産卵したイナトミシオカを用いた。胸部接種でWNVを蚊に感染させた後、その10日後に、8週令のマウスから吸血する機会を蚊に与えた。その後、マウスを8日間観察して、一部に発症が認められたので、全てのマウス脳・脾臓・肝臓を摘出して、WNVゲノムの有無を検討した。その結果、マウス8個体中7個体の主に脳からWNVゲノムが検出され、蚊のマウス刺咬によってWNVがマウスに伝播されたことが明らかとなった。イナトミシオカは、ヨーロッパに分布する近縁種の *Cx. modestus modestus* と同様にWNVを媒介する可能性が考えられる。また、イナトミシオカ幼虫の発生水域が汽水域に限られているが、環境の変化などによる一過性的塩水草原の拡大によって、幼虫の発生水域が一時的に広がる可能性が示唆された。

### 2. 無吸血産卵性イナトミシオカの継代飼育法の確立

我が国に生息するイナトミシオカが、WNVを媒介することを実験的に我々は証明した。ウイルス媒介能を詳細に検討するためには、実験室内での蚊の維持が必要である。本種幼虫を採集した発生水域が、海水の混じった汽水域であったことから、実験室内で真水を使って継代飼育可能かどうかを検討した。本種幼虫の発生水域の塩分濃度が0.4-0.5%だった事に着目して、適度な塩分を含む汲み置き水での幼虫飼育を試みた。発生水域から幼虫を採集して、0-2%塩分を含む水に幼虫を入れて、エアレーションを行いながら飼育を試みた。その結果、0%よりも0.5%の幼虫群から得られた羽化成虫の割合が高かった。なお、1%以上では成虫は得られなかった。0.5%の塩水を使って少なくともF14成虫が現在得られていることから、イナトミシオカの継代飼育が可能と思われた。

### 3. 日本産蚊のデングウイルス感受性

沖縄産ミヤラシマカ *Ae. flavopictus miyarai*、および北海道産ミスジシマカ *Ae. galloisi* のデングウイルス(DENV)感受性を検討した。タイ国産DENV2型を、蚊雌成虫胸部に接種した10日後に、両蚊種の全個体からDENVゲノムがRT-PCR法で検出された。また、蚊腹部、胸部、頭部、脚部におけるそのゲノムは、対照蚊種のタイ国産ネッタシマカ *Ae. aegypti* と同様に、全ての蚊部位で検出された。また、DENV2型の経口感染感染14日後のミヤラシマカおよび対照蚊種のヒトスジシマカとネッタシマカでは、蚊腹部からのウイルスゲノム検出率は17-30%であったが、蚊種間の差は認められなかった。ちなみに、蚊腹部におけるウイルスゲノム検出率は、胸部、頭部、脚部における検出率よりも10%程高かった。ことことから、ミヤラシマカとミスジシマカは対照蚊種と同様にウイルス媒介能を持つことが推察された。また、中腸バリアーがミヤラシマカにも存在すると考えられた。

#### 4. 大分県横瀬地区のコウモリ生息環境地域で採集した昆虫類について

1971年に大分県横瀬地区に生息するユビナガコウモリからYokoseウイルス(YKSV)が分離されて以来、YKSVの動態調査に関する情報は全くない。吸血性昆虫が媒介すると推定されるYKSVが、現在も活動しているか否かを検証する一環として、2004年5月から11月に横瀬井路の2地点で、コウモリの活動観察、飛来昆虫の定点採集を行った。週1回、午後6時から7時に採集を実施した。採集方法として、CDC捕虫機(炭酸ガス有または無)、モスキートマグネットおよび捕虫網を用いた人囀採集法を用いた。採集昆虫は吸血性と非吸血性昆虫に分けた後、吸血性昆虫では、さらに蚊または蚊以外に細分した。分類後のサンプルは、YKSV分離を行うために-80℃に保管した。その結果、1. 調査地点の井路で、コウモリの生息を観察した。2. 同一の採集時間帯ではあったが、薄暮から暗夜まで季節によって変化した。また、採集個体数は、気温、風力などの要因によっても影響した。蚊類では、ヒトスジシマカ、オオクロヤブカなど、蚊以外の吸血昆虫では、ヌカカ、ブユ、非吸血昆虫では、タマバエ、チョウバエなど、非昆虫類ではクモ類が採集された。3. 採集方法と採集個体数を検討したところ、捕虫網を用いた人囀法が最も採集数および種類数が多かった。次に、モスキートマグネットとCDC捕虫機(炭酸ガス有)であった。4. YKSVゲノムは採集蚊から検出できなかった。今後は、コウモリの動態とそれからのYKSV分離を検討する必要がある。

#### B. 結論

1. 日本産媒介蚊4種類のウエストナイルウイルス感受性と媒介能を明らかにした。
2. イナトミシオカの継代飼育法を確立したので、殺虫剤試験などへの利用が可能となった。
3. 北海道に分布するミヤラシマカのデングウイルス感受性を明らかにした。
4. 大分県横瀬地区のコウモリ生息環境地域で採集した蚊からは、Yokoseウイルスゲノムは検出されなかった。

#### C. 健康危険管理情報

なし

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

2003年度

Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Inanami, O., Yamamori, T., Goto, A., Aki, Y., Miyoshi, H., Miyamoto, H., Kariwa, H., Kuwabara M. and Takashima I. (2003): Characterization of JNK-like protein derived from a mosquito cell line, C6/36. *Insect Mol. Biol.*, 12(1):61-66.

Eshita, Y., Takasaki, T., Yamada, K. and Kurane, I. (2003): Isolation of arboviruses from field-collected mosquitoes (Chapter 6). In: *Anthology VI. Arthropod Borne Diseases*, (Edited by Richmond, J. Y.), American Biological Safety Association. Illinois, pp.63-71.

Mizutani, T., Kobayashi, M., Eshita, Y., Shirato, K., Kimura, T., Aki, Y., Miyoshi, H., Takasaki, T., Kurane, I., Kariwa, H., Umemura T. and Takashima I. (2003): Involvement of the JNK-like protein of the *Aedes albopictus* mosquito cell line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus. *Insect Mol. Biol.*, 12 (5) : 491-499.

林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森 英人、井村俊郎、江下優樹、内田幸憲 (2003) : One step RT-PCR 法による媒介蚊からのフラビウイルス RNA の検出条件の検討。 感染症学雑誌。 77(10):822-829.

Paeporn, P., Komalamisra, N., Thongrungrat, S., Deesin, V., Eshita, Y., and Rongsriyam, Y. (2003) : Potential development of temephos resistance in *Aedes aegypti* related to its mechanism and susceptibility to dengue virus. Proceedings of The Joint International Tropical Medicine Meeting 2002, Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 34 (Suppl. 2) : 136-141.

Paeporn, P., Komalamisra, N., Deesin, V., Rongsriyam Y., Eshita, Y., and Thongrungrat, S. (2003) : Temephos resistance in two forms of *Aedes aegypti* and its significance for the resistance mechanism. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 34(4) : 786-792.

#### 2004 年度

Ushijima, H., and Eshita, Y. (2004) : Molecular epidemiology of viral infection in Asia. Pediatrics International, 46(2):202-206.

Anzai, S., Fukuda, M., Otsuka, Y., and Eshita, Y. (2004) : Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of dengue type 2 virus isolated in the Dominican Republic. Virus genes, 29(2) : 219-227.

江下優樹、高崎智彦、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2004) : ウエストナイルウイルスとその媒介蚊。九州実験動物雑誌、(20) : 31-39.

江下優樹、牛島廣治 (2004) : 日本脳炎以外のアルボウイルス感染防止-とくにウエストナイル熱およびデング熱-。特大号 ワクチンのすべて。小児科診療 67(11):154-160.

Makino, Y., Shichijo, A., Bello, C., Eshita, Y., Disla, M., Cesin, A. J., Galcia, B., Lora, M., Valdez, S., Aquino, J. D., Aono, H., Ma, S-P., and Takeshita, M. (2004) : Seroepidemiology of dengue and assessment of public awareness in the Dominican Republic. Trop. Med. Health, 32(4) : 305-309.

#### 2005 年度

Tang, W. F., Eshita, Y., Tadano, M., Morita, K., and Makino, Y. (2005) : Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type-4/Japanese encephalitis virus to vero cells. Microbiology and Immunology, 49(3) : 285-294.

Onishi, Y., Eshita, Y., Murashita, A., Mizuno, M. and Yoshida, J. (2005) : Synthesis and characterization of 2-diethyl-aminoethyl dextran-methyl methacrylate graft copolymer for nonviral gene delivery vector. J. Appl. Polym. Sci., 98(1):9-14.

江下優樹、牛島廣治 (2005) : 再興感染症としてのデング熱とマラリア : 特にそれら病原体の媒介蚊について。小児感染免疫 17(3) : 211-219.

#### F. 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
- 3. その他  
なし