

表1. 富山県における蚊の成虫発生調査定点の概要(平成18年)

	住宅区分	住所	設置場所	調査期間	備考
1 一般 民 家	①都市部住宅街	富山市	庭、地上 1m	5/10～10/24	
	②都市部周縁住宅	富山市	庭、地上 1m	5/9～10/23	7～8月に4回中断
	③都市部新興団地	富山市	庭、地上 1m	5/10～10/24	
	④海岸地域混合地区	射水市	菜園、地上 1m	5/10～10/24	
	⑤農村地域住宅団地	富山市	庭、地上 1m×3台、3.5m	5/10～10/24	
	⑥農村地域住宅	南砺市	庭、地上 1m	5/10～10/24	9月に5回中断
2 カ ラ ス	①高岡市古城公園	市立動物園	立木、地上 1m、8m	6/6～10/10	
	②富山市城址公園	市立図書館	回廊、地上 1m、12m、20m	5/10～10/11	
	③衛研隣杉林(鶏舎)	射水市	立木、地上 1m、6.5m	5/10～10/24	
3 他	①富山空港国際便口	富山市	構造物、地上 1m×2台	6/7～10/11	
	②丘陵際農村地域	富山市	厩舎(乗馬倶楽部)、3m	6/8～10/12	
	③山間高地農村地域	飛騨市	牛舎(肉牛4頭)、2m	5/7～10/9	

表2. 各定点における蚊種別の成虫捕集数(平成18年、雌雄合計)

1 一般民家

住宅区分	トラップ 設置高	蚊の種類						計	
		コガタ	アカイエカ	ヒトスジ	ヤマト	ハマダラ	ツノフサカ		キンハラ
都市住宅	1m	2	37	167	0	0	4	0	210
都市周縁	1m	0	12	17	0	0	0	0	29
都市団地	1m	3	48	6	1	1	0	0	59
海岸住宅	1m	15	146	43	0	0	0	0	204
農村団地	1m	135	5	22	0	0	0	2	164
農村住宅	1m	3	5	1	0	0	0	0	9
計		158	253	256	1	1	4	2	675

コガタはコガタアカイエカ、ヒトスジはヒトスジシマカ、ヤマトはヤマトヤブカ、ハマダラはハマダライエカ、ツノフサカはフシマツフサカ、キンハラはキンハラナガハシカを指す。

2 カラスのねぐら近く

定点名	トラップ 設置高	蚊の種類						計	
		コガタ	アカイエカ	ヒトスジ	ヤマト	キンハラ	ハマダラ		その他
高岡古城	1m	3	24	29	0	0	0	3	59
	8m	0	92	0	1	0	15	2	110
富山城址	1m	1	31	4	0	0	0	1	37
	12m	0	4	0	0	0	0	0	4
	20m	0	2	0	0	0	0	0	2
衛研隣杉林	1m	7	16	29	2	25	0	1	80
	6.5m	0	42	0	1	0	0	1	44
計		11	211	62	2	25	15	8	336

高岡古城のその他はカラツイエカ1個体、不明1個体、フシマツフサカ3個体であり、富山城址はフシマツフサカ1個体である。
衛研隣杉林は6.5mがフシマツフサカ、1mがフタクロホシヒカである。

3 その他

定点名	畜種など トラップ高	蚊の種類						計	
		コガタ	アカイエカ	ヒトスジ	ヤマト	オオクロ	シナハマ		その他
富山空港	外柱、1m	5	15	0	0	0	0	0	20
丘陵際農村	馬、3m	3,784	77	8	28	5	0	4	3,906
高地農村	肉牛、2m	164	0	11*	6	8	4	9	191
計		3,953	92	8	34	13	4	13	4,117

オオクロはオオクロヤブカ、シナハマはシナハマダラカを指す。
丘陵地農村のその他はカラツイエカ 1、ハマダライエカ 2、キンハラナガハシカ 1個体である。
高地農村のその他はカラツイエカ 2、ハマダライエカ 6、キンロヤブカ 1個体である。なお、ヒトスジシマカはヤマダシマカと思われる。

表3-1. ウイルス分離に用いた蚊(種類別)

種名	プール数	個体数
コガタアカイエカ	192 (4)	3147 (28)
アカイエカ	185 (5)	762 (5)
ヒトスジシマカ	127 (20)	377 (40)
キンパラナガハシカ	10	28
ハマダライエカ	8 (1)	19 (1)
フトシマツノフサカ	5	5
ヤマトヤブカ	5	5
フタクロホシチビカ	1	1
カラツイエカ	1	1
シナハマダラカ	1	1
種不明	1	1
計	536 (30)	4347 (74)

表3-2. ウイルス分離に用いた蚊(地点別)

住宅区分	設置場所	プール数	個体数	
民家	都市部住宅街	富山市	42 (10) 206 (25)	
	都市部周縁住宅	富山市	16 28	
	都市部新興団地	富山市	24 (1) 57 (1)	
	海岸地域混合地区	射水市	35 (1) 200 (1)	
	農村地域住宅団地	富山市 東1m	32	171
		富山市 北1m	21	93
		富山市 南西3.5m	19	91
		富山市 南西1m	37 (4)	174 (9)
	農村地域住宅	南砺市	9 (2) 9 (2)	
カラスの ねぐら	高岡古城公園	地上8m	23 109	
		地上1m	30 (3) 58 (3)	
	富山城址公園	地上20m	1 2	
		地上12m	2 4	
		地上1m	18 (4) 40 (4)	
	射水市鶏杉林	地上6.5m	15 41	
		地上1m	43 (3) 82 (3)	
空港	富山空港	北	6 8	
		南	8 12	
日本脳炎 定点	豚舎	南砺市	53 (1) 1045 (1)	
		上市町	17 210	
		黒部市	10 189	
	牛舎	富山市	74 (1) 1512 (25)	
厩舎	富山市	1 6		
	合計	536 (30)	4347 (74)	

カッコ内は♂

表4. 蚊の幼虫調査箇所と調査回数(平成16～18年)

	調査箇所の種類と調査述べ回数							計
	一般民家	公共施設	神社	寺・墓地	大公園	小公園	その他 ¹	
計	50	28	25	11	14	5	22	155

1. その他には集合住宅の敷地や道路・通路および畑などが含まれる。

表5. 調査箇所別の溜水数¹と有水率²、幼虫生息率³(平成16～18年)

調査箇所	調査箇所数	調査溜水種数	調査溜水数	有水溜水数	有水率(%)	幼虫生息溜水数	生息率(%)	生息蚊数/種数
一般民家	50	72	329	269	81.8	91	33.8	1,828/5
公共機関	28	24	153	128	83.7	23	18.0	882/4
神社	25	28	121	107	88.4	12	11.2	116/2
寺・墓地	11	17	91	58	63.7	20	34.5	324/4
大規模公園	14	12	214	135	63.1	39	28.9	1,378/6
小規模公園	5	14	25	14	56.0	2	14.3	20/1
その他	22	23	120	95	79.2	30	31.6	1,158/5
計	155	85 ⁴	1,053	806	76.5	217	26.9	5,706/8

1.溜水数とは地表の溜り水、池、排・用水溝、雨水枡などや缶、ビン、バケツなどの容器、さらにタイヤ、竹の切り株など水が溜まることが予想される多種多様の“凹み環境”を言う。

2.有水率=有水溜水環境数÷調査溜水環境数×100

3.生息率=幼虫生息溜水環境数÷有水溜水環境数×100

4.全体の溜水種数

表6. 調査箇所別幼虫採集成績(平成16～18年)

採集蚊種名 (単独・混合)	幼虫採集数/生息溜水環境数							計
	一般民家	公共施設	神社	寺・墓地	大公園	小公園	その他	
アカイエカ	553/11	442/6	0	0	76/8	0	388/5	1,459/30
ヒトスジシマカ	544/38	190/8	46/8	11/2	471/9	0	378/10	1,640/75
ヤマダシマカ	17/1	0	0	0	0	0	6/1	23/2
ヤマトヤブカ	260/21	58/4	62/3	129/13	0	20/2	51/6	580/49
トラフカクイカ	1/1	0	0	1/1	46/4	0	0	48/6
カラツイエカ	0	8/1	0	0	0	0	0	8/1
コガタアカイエカ	0	0	0	0	0	0	94/1	94/1
キョウトクシヒゲカ	0	0	0	0	0	0	5/1	5/1
アカイエカ+ヒトスジ	18+27/4	86+92/2	0	0	370+156/11	0	6+107/2	480+382/19
アカイエカ+ヤマト	9+146/2	0	0	4+94/1	0	0	0	13+240/3
アカイエカ+トラフ	15+2/1	0	0	0	1+3/1	0	0	16+5/2
ヒトスジシマカ+ヤマト	136+79/10	4+2/1	7+1/1	31+54/3	3+38/1	0	5+59/2	186+233/18
ヒトスジシマカ+ヤマダ	0	0	0	0	188+9/2	0	0	188+9/2
ヒトスジシマカ+?	0	0	0	0	0	0	52+2/1	52+2/1
ヤマトヤブカ+トラフ	1+1/1	0	0	0	1+3/1	0	0	2+4/2
ヤマトヤブカ+ヤマダ	0	0	0	0	0	0	2+3/1	2+3/1
ヤマトヤブカ+キョウト	0	0	0	0	2+6/1	0	0	2+6/1
アカ+ヒトスジ+トラフ	5+12+2/1	0	0	0	0	0	0	5+12+2/1
アカ+ヒトスジ+ヤマト	0	0	0	0	2+2+1/1	0	0	2+2+1/1
種不明	0	?/1	0	0	0	0	0	?/1
計	1,828/91	882/23	116/12	324/20	1,378/39	20/2	1,158/30	5,706/217

アカ=アカイエカ、ヒトスジ=ヒトスジシマカ、ヤマト=ヤマトヤブカ、トラフ=トラフカクイカ、ヤマダ=ヤマダシマカ、キョウト=キョウトクシヒゲカ

鳥類における WNV 検出および抗 WNV 抗体検出法の確立に関する研究

分担研究者 山田 章雄 国立感染症研究所 獣医科学部 部長
協力研究者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨： WNV の日本への侵入や、国内での流行の拡大には、野鳥の果たす役割も大きいと考えられる。そこで、鳥における WNV や抗 WNV 抗体を検出する方法について JEV との鑑別を考慮しながら検討した。また、鳥類の抗体保有状況を検討した。

1. WNV および JEV 遺伝子検出法の確立： LightCycler による、ハイブリダイゼーションプローブを用いた Real-Time PCR、Real-Time RT-PCR を確立した。WNV では env 領域を標的として NY99, Eg101 など lineage1 を検出するものを作製した。JEV では env 領域を標的として JaGAR, Beijing など genotype3 のみ特異的に検出するものと、PolyProtein 領域を標的として genotype1,3 とも検出するものを作製した。反応条件はすべての検出系で同一とし、一度に検討できるようにした。

2. 鳥類における WNV および JEV に対する抗体検出法の開発： 抗 WNV または抗 JEV モノクローナル抗体を用いて、WNV および JEV に対する Blocking-ELISA 法を確立した。Indirect-ELISA ではトリ種と二次抗体の組み合わせによっては反応性が様でないことがあるが、Blocking-ELISA では、トリ種に関係なく特異的抗体を比較検討できる。

3. 鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況調査： 渡り鳥および留鳥の WNV および JEV に対する抗体保有状況を PRNT および Blocking-ELISA を用いて検討した。検査した鳥類すべて、PRNT および Blocking-ELISA では WNV および JEV に対する抗体は検出されなかった。WNV で免疫したニワトリ血清は PRNT, Blocking-ELISA とともに JEV と若干の交差反応を示したが、WNV 感染トリ血清は交差反応を示さなかった。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス (WNV) は、蚊と鳥の間で感染環が維持され、主に蚊を介してヒトに感染し急性熱性疾患や脳炎を引き起こし、アフリカ、東ヨーロッパ、西アジアなどで流行が報告されている。米国における流行の拡大には野鳥の関与が考えられており、また、近年、

ロシアにおいて、野鳥の WNV 感染が確認され、その感染が西アジア方面からシベリア方面にまで広がってきている傾向が見られている。そこで、WNV の日本への侵入や拡大に備えるためには、その役割が大きいと考えられる鳥における WNV および WNV に対する抗体検出法を確立することが必要である。また、JEV との交差反応が考えられるため、その鑑別の可能な検

出系を構築する必要がある。これらの検討により、WNV の国内侵入リスクの把握や、国内での拡大に関する予測をたてることが可能となると思われる。本研究では、WNV および JEV 遺伝子検出法の確立、鳥類における WNV および JEV に対する抗体検出法の開発および鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況調査を行った。

B. 研究方法

1. ウイルス RNA の抽出と cDNA の作製 : WNV (Lineage 1: NY99-6922, Eg101, g2266; Lineage 2: FCG) および JEV (Genotype 3: JaGAR01, Beijing (JE/Beijing/1/1949); Genotype 1: kouchi (JEV/sw/kouchi/25)) の培養上清から QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコールに従い RNA を抽出した。cDNA は抽出した RNA より、SuperScript III (Invitrogen) と Random Hexamer Primer を用いて作製した。

2. WNV および JEV 遺伝子検出のための LightCycle (LC) を用いた Real-Time PCR および Real-Time RT-PCR : WNV 検出には Envelope 領域 (WNV-env) を標的とした PCR 用プライマーの増幅領域内にハイブリダイゼーションプローブを作成した。JEV 検出には Envelope 領域 (JEV-env) を標的とした PCR 用プライマーと、Poly Protein 領域 (JEV-PolyPr) を標的として新たにプライマーを作成し、各々の増幅領域内にそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションプローブを作成した。作成に当たっては、Table 1 に示した Genbank の遺伝子情報をもとに、WNV-env については No.1~4 と反応し、それ以外と反応しない配列を、JEV-env については No.7~10 と反応し、それ以外と反応しない配列を、JEV-PolyPr については No.7~12 と反応し、それ以外と反応しない配列を選んだ。

それぞれの反応条件は同一となるように設

定した。RNA を用いた Real-Time RT-PCR と cDNA を用いた Real-Time PCR を LC system DX400 を用いて比較検討した。

3. 鳥類サンプル : 渡り鳥 (ミヤマガラス、シギ・チドリ、ヨシゴイ、カモ類) および、留鳥 (ハシボソガラス、ハト、スズメ、ナキアヒル、イソシギ、ニワトリ) の血清を入手し抗体検出に用いた。陽性対照として、CDC より分与を受けたスズメおよびハトの WNV 感染血清と、不活化 WNV または JEV で免疫したニワトリ血清を用いた。

4. 中和抗体の測定 (PRNT) : WNV は NY99-6922 株、JEV は JaGAR01 株を、サンプルは 25 倍希釈より用い、定法どおり実施した。結果は 90% 減少 (PRNT₉₀) を示すサンプル希釈濃度で示した。

5. 特異抗体の測定 (Blocking-ELISA) : 抗原としてホルマリン不活化 WNV または JEV を、96well マイクロプレートにコーティングし、Immunoblock を用いて well をブロッキングした後、トリ血清サンプル (25 倍希釈) を反応させた。次に、抗 WNV モノクローナル抗体 (3.67G) もしくは抗 JEV モノクローナル抗体 (clone503) (mAb) を反応させ、二次抗体として HRPO 標識抗マウス IgG-ヒツジ IgG を反応させた。その後、OPD+H₂O₂ を用いて発色させ、OD490 にて吸光度を測定した。トリ血清サンプルを添加しない、いわゆる対照 well に対する吸光度の減少により、トリ血清サンプル中の抗原特異的抗体の有無を判定した。

C. 研究結果

1. LC を用いた Real-Time PCR および Real-Time RT-PCR : Table 2 に PCR、TaqMan PCR、TaqMan RT-PCR (Fig. 1a) と今回新たに作成した LC を用いた Real-Time PCR および

Real-Time RT-PCR (Fig. 1b-d) による検出の特異性を示した。今回作成した WNV-env に対するハイブリダイゼーションプローブは、WNV NY99-6922 および Eg101 (Lineage 1) を濃度依存性に検出し、FCG (Lineage 2) および JEV は検出しなかった (Fig. 1b)。しかしながら Lineage 1 である g2266 は PCR では検出可能であるが、その領域におけるシーケンスが異なるため LC では検出出来なかった。JEV-env に対するハイブリダイゼーションプローブは JEV JaGAR および Beijing (Genotype 3) を検出したが kouchi (Genotype 1) および WNV は検出しなかった (Fig. 1c)。JEV-PolyPr に対するハイブリダイゼーションプローブは JEV の Genotype 1&3 をそれぞれ濃度依存性に検出し、WNV は検出しなかった (Fig. 1d)。

いずれも検出感度は、TaqMan PCR および TaqMan RT-PCR とほぼ同様であり、それぞれ 1-10、0.1-1 PFU/reaction であった (Table 3, Fig. 1)。TaqMan アッセイと同様に、cDNA をテンプレートに用いたとき (Two-step Real-Time PCR) よりも RNA をテンプレートに用いた RT-PCR (One-step Real-Time RT-PCR) の方が 10 倍程度感度が良かった (Table 3)。

2. 特異抗体の測定 (Blocking-ELISA) : Fig. 2 に示したように、抗原として用いる WNV および JEV は、それぞれ 0.1、0.2 ug/ml の濃度が最も適していた。また、各々に用いる mAb 濃度もそれぞれ 1、2 ug/ml が適していた。抗原に WNV を用いたときは、スズメおよびハトの WNV 感染血清と WNV 免疫ニワトリ血清は特異的に mAb の結合抑制効果を示した (Fig. 3a)。一方、抗原に JEV を用いたときは、JEV 免疫ニワトリ血清は特異的に mAb の結合抑制効果を示した (Fig. 3b)。WNV 免疫血清も抑制を示したが、スズメおよびハトの WNV 感染血清では、全く交差反応を示さなかった (Fig. 3b)。

3. 鳥類サンプルにおける抗体保有状況 : 各

鳥類サンプルにおける、WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した。中和抗体 (PRNT) ならびに特異抗体 (Blocking-ELISA) の結果を Table 4 に示した。WNV 感染トリ血清は、PRNT、Blockig-ELISA いずれの測定においても WNV に対する抗体のみが検出された。免疫ニワトリ血清では、いずれの測定系でも免疫した抗原に対して強く抗体が検出されたが、もう一方の抗原にも交差反応が認められた。留鳥および渡り鳥のサンプルはすべて、いずれの測定系でもどちらの抗原に対しても特異的抗体は検出されなかった。

D. 考察

WNV の国内侵入ならびに侵入後の国内での拡大に対して、米国における近年の WNV 流行地域の拡大を考えると、鳥類の果たす役割は非常に大きいと思われる。そこで、鳥類の感染状況、抗体保有状況調査を実施することで、WNV の国内侵入リスクの把握や、国内での拡大に関する予測をたてることが可能となり、各々に対する対策を構築することが出来ると考えられる。そのためには、鳥類における WNV および JEV 遺伝子および抗原検出法を確立する必要がある。今回、WNV および JEV 遺伝子の検出方法として、あらたに LC を用いた Real-Time RT-PCR を開発した。LC は反応にキャピラリーチューブを用いるため非常に迅速でかつ感度も優れている。また、日本は JEV の常在地域であるため、JEV と WNV の鑑別が重要であることから、JEV を特異的に検出する方法を新たに開発した。これらの方法を用いることで、WNV および JEV の迅速な検出・鑑別が可能となる。今後は、実際の感染動物サンプルを用いて、最適なサンプル処理方法や、この検出方法の検出感度・特異性について検証しておく必要がある。

鳥類における WNV および JEV に対する抗体検査法として、各々に特異的な Blocking-ELISA を確立した。通常の ELISA (Indirect-ELISA)

では、二次抗体として特定のトリ種の抗体と反応するものを使用するが、トリ種が変わるとそれぞれに対する、たとえばニワトリの場合は抗 Chicken-IgG、カモの場合は抗 Duck-IgG などを使用することとなる。抗 Bird-IgG も使用可能であるが、それぞれの結果については二次抗体の反応性の違いにより、トリ種間での比較検討が困難である。そこで、その影響を避けるために Blocking-ELISA を開発したが、この方法を用いると、トリ種によらず結果の比較が可能となる。

この Blocking-ELISA と PRNT を用いて、鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査した。その結果、現時点では調査したサンプルは、渡り鳥・留鳥すべて、いずれの方法でも特異的抗体は検出されなかった。JEV など他のフラビウイルスに対する抗体は WNV と交差反応を示すことが知られている。そこで、今後は、鳥類における抗体保有状況の

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表等

調査の継続だけでなく、特に国内留鳥における JEV に対する抗体保有状況の現状調査が必要であると思われる。また、抗体の特異性および標的抗原を検討するために、免疫沈降反応や Western Blotting を確立する必要があると考えられた。

E. 結論

WNV および JEV 遺伝子検出のための、LightCycler による、ハイブリダイゼーションプローブを用いた Real-Time PCR、Real-Time RT-PCR を確立した。また、鳥類における WNV および JEV に対する抗体検出法として Blocking-ELISA 法を確立した。Blocking-ELISA を用いて鳥類における WNV および JEV に対する抗体保有状況を調査したところ、WNV および JEV に対する抗体は検出されなかった。

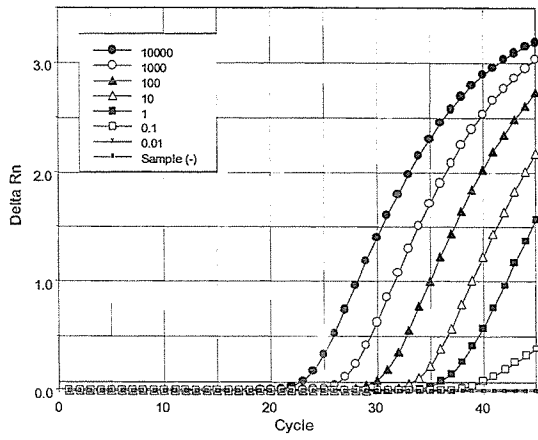
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

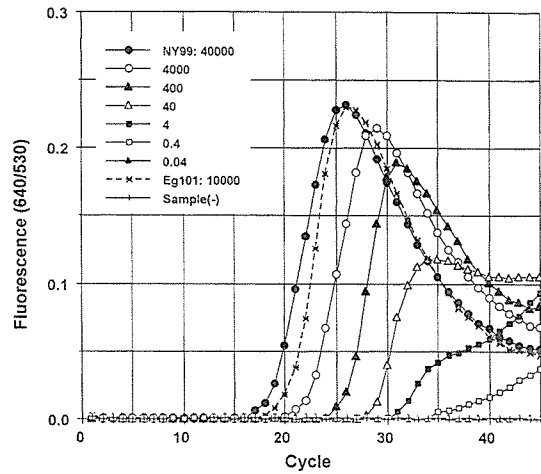
なし

Fig. 1) Real-Time RT-PCR による WNV/JEV の検出

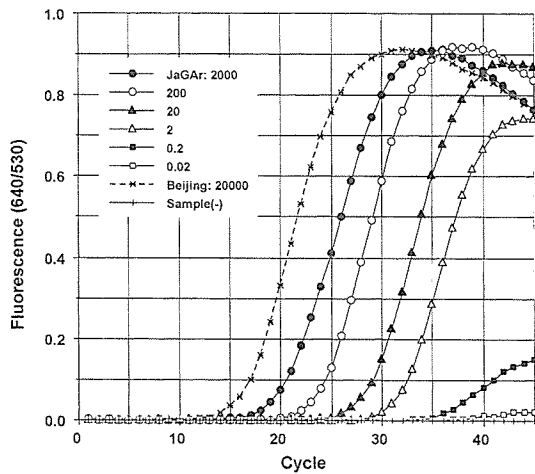
a) WNV (env) – TaqMan Probe (NY99)



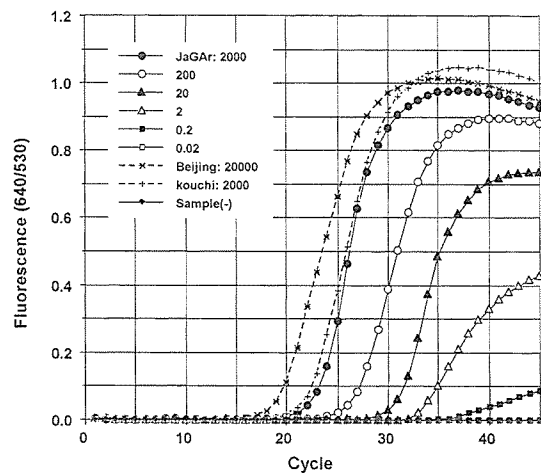
b) WNV (env) – Hybridization Probe



c) JEV (env) – Hybridization Probe



d) JEV (poly protein) – Hybridization Probe



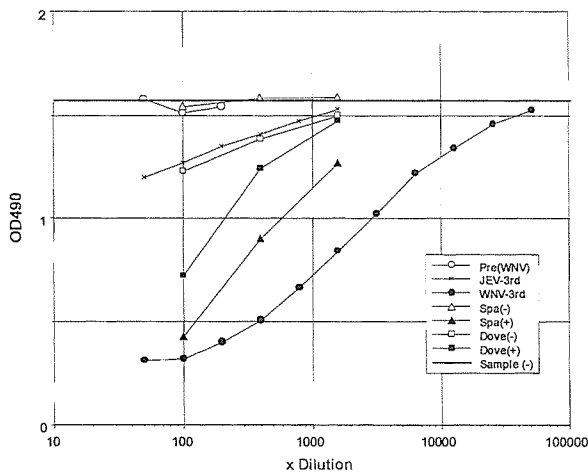
グラフ中の数字は PFU/reaction

Fig. 2) Blocking-ELISA の方法

Ag (WNV vaccine, 0.1ug/ml / JEV vaccine, 0.2ug/ml) in coating buffer
 4°C, ON
 Blocking (Immunoblock)
 RT, 1hr
 X25 diluted Samples in Immunoblock
 RT, 1hr
 Anti-WNV mAb (3.67G, 1ug/ml) / Anti-JEV mAb (503, 2ug/ml)
 RT, 1hr
 Anti-Mouse IgG-HRPO in Immunoblock
 RT, 1hr
 OPD
 RT, 30min
 Measure (OD490)

Fig. 3) 各種トリ血清の mAb 結合抑制効果

a) Ag: WNV



b) Ag: JEV

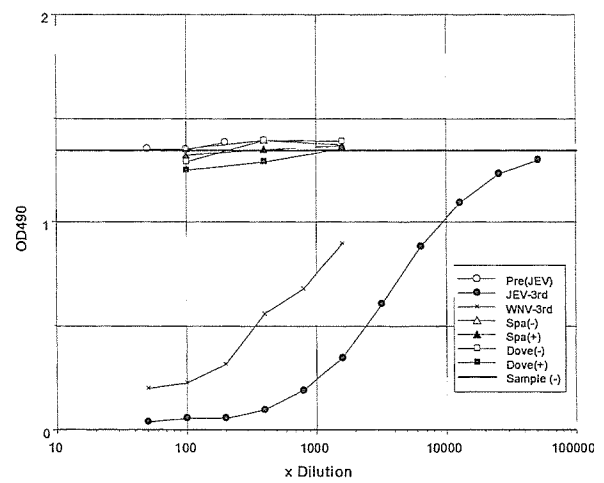


Table 1) プローブのデザインに参考にしたウイルス

No.		Strain	Genbank Accession
1	WNV	385-99	AY842931
2		Eg101	AF260968
3		Italy1998	AF404757
4		RO97-50	AF260969
5		FCG	M12294
7	JEV	JaOH0566	AY508813
8		JaGAR01	AF069076
9		JaTH160	AF269326
10		Beijing	L48961
11		Ishikawa	AB051292
12		Nakayama	U21057
13	YFV		NC002031
14	SLEV		AF205509
15	MVEV		AF161266
16	Dengue Virus	1	NC001477
17		2	NC001474
18		3	NC001475
19		4	NC002640
20	Newcastle disease virus		NC002617
21	Marek's disease virus		NC002229
22	Fowlpox virus		NC002188

Table 2) PCR, Real-Time PCR による WNV/JEV 検出の特異性

			PCR				Real-Time PCR / Real-Time RT-PCR				
			WNV		JEV	Fla	TaqMan Probe		Hybridization Probe		
			env		env	NS3	WNV		WNV		JEV
			env	PolyPr	env	NS3	env	3'NC	env	env	PolyPr
W N V	Lineage1	NY99-6922	+	+	-	+	+	+	+	-	-
		Eg101	+	+	-	+	+-	+	+	-	-
		g2266	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	Lineage2	FCG	-	+	-	+	-	-	-	-	-
J E V	Genotype3	JaGAR	-	-	+	+	-	-	-	+	+
		Beijing	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	Genotype1	kouchi	-	-	+	+	-	-	-	-	+

Table 3) PCR, Real-Time PCR, Real-Time RT-PCR による WNV/JEV 検出感度 (PFU/reaction)

Assay		Target		WNV	JEV	
PCR (cDNA)		WNV	env	10	-	
			PolyPr	1-10	-	
		Fla	env	-	1	
			NS3	100	100	
Real-Time PCR (cDNA)	TaqMan Probe (ABI7500)	WNV	env	1	-	
			3'NC	1-10	-	
	Hybridization Probe (LC)	WNV	env	1-10	-	
			JEV	env	-	1-10
		JEV	PolyPr	-	1	
Real-Time RT-PCR (RNA)	TaqMan Probe (ABI7500)	WNV	env	0.1	-	
			3'NC	0.1-1	-	
	Hybridization Probe (LC)	WNV	env	0.1-1	-	
			JEV	env	-	0.1-1
			JEV	PolyPr	-	0.1-1

Table 4) PRNT および Blocking-ELISA による鳥類サンプルの抗体測定

			PRNT90		Blocking-ELISA		
			JEV	WNV	JEV	WNV	
WNV Uninfected/Infected Birds (CDC)			House Sparrow (-)	<25	<25	-	-
			House Sparrow (+)	<25	300	-	+
			Rock Dove (-)	<25	<25	-	+/-
			Rock Dove (+)	<25	75	-	+
WNV/JEV Immunized Chicken			JEV-1	400	<25	++	+
			JEV-2	400	<25	++	+
			WNV-1	100	400	+	++
			WNV-2	200	400	+	++
留鳥	ハシボソガラス(東京'05)	n = 3	<25	<25	-	-	
	ハト(東京'05)	5	<25	<25	-	-	
	スズメ(東京'05)	3	<25	<25	-	-	
	ナキアヒル(合鴨、東京'05)	4	<25	<25	-	-	
	イソシギ(宮城'05)	3	<25	<25	-	-	
	ニワトリ(実験用'05)	11	<25	<25	-	-	
渡り鳥	ミヤマガラス(秋田'05)	n = 12	<25	<25	-	-	
	シギ・チドリ(千葉'05)	33	<25	<25	-	-	
	シギ類(宮城'06)	10	<25	<25	-	-	
	ヨシゴイ(サギ科、宮城'06)	3	<25	<25	-	-	
	コガモ(宮城'06)	2	<25	<25	-	-	
	オナガガモ(新潟'06)	10	<25	<25	-	-	
	マガモ(十勝'06)	14	<25	<25	-	-	
	オナガガモ(十勝'06)	6	<25	<25	-	-	
	マガモ(宮崎'06)	6	<25	<25	-	-	

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

北海道のカラス類におけるウエストナイルウイルスの疫学調査に関する研究

分担研究者： 前田秋彦 北海道大学大学院獣医学研究科 助教授
協力研究員： 前田潤子 （北海道大学大学院獣医学研究科）
浅川満彦、吉野智生
（酪農学園大学獣医学部感染・病理部門）
倉根一郎 （国立感染症研究所）

研究要旨：1999年にニューヨークで始まったウエストナイルウイルス（WNV）の流行は、数年の内に北アメリカ帯に拡大した。日本においてはWNVの侵入が危惧されており、その対策が急務である。特に北海道では、海を隔てて隣接するロシアのウラジオストックでWNVが野鳥において検出されており、そのサーベイランスによる侵入監視体制を整えることが必要性である。そこで、私たちはWNVに感受性の高いカラス類におけるWNVの疫学調査を北海道において開始した。今年度は、過去に北海道内で斃死したカラス6羽の検体を用いて、VecTestによるWNV抗原の検出、特異プライマーを用いたRT-PCR法によるWNV核酸の検出、各組織の乳剤を用いた培養細胞でのウイルス分離を行い、ウイルス検出法についての確認試験を行った。

A. 研究目的

これまで、ウエストナイルウイルス（WNV）はアフリカやヨーロッパ、東アジアを中心に散発的な流行を繰り返してきた。しかし、1999年にニューヨークで始まった北アメリカでの流行は、毎年のように合衆国内で流行を繰り返し、数年の内に合衆国のほとんど全ての州に拡大した。また、近年ではカナダや南米にまでその流行は拡大している。オーストラリアにおいては、WNVに近縁のクンジンウイルスの存在が古くから報告されている。アジアにおいては西アジア諸国からインド西部で、極東ロシアではウラジオストックにおいてもその存在が報告されている。したがって、WNVが日本へ侵入する危険性がより高くなってきているものと考えられる。極東ロシアに近接する北海道では、渡り鳥のルートとなっていることから特に注意を要する。そこで、私たちは本年度より、北海道内の野生鳥類におけるWNV感染の監視システムを確立することを目的として、特にWNVに感受性の高いカラス類における

疫学調査を開始した。

B. 研究方法

本調査研究の準備として、これまでに北海道内で斃死したカラス6羽について予備的な試験を行った（表1）。斃死したカラスの筋肉、脳、脾臓を摘出し、リン酸緩衝液の10%組織乳剤を作製した。これらのサンプルを用いて、VecTestによるWNV抗原の検出と培養細胞に接種することによりウイルスの分離を試みた。また、各臓器よりRNAを抽出し、WNVに特異的なプライマーを用いたRT-PCR法によりウイルス核酸の検出を行った。（倫理面での配慮）

本研究では、ヒトの検体をあつかわないため、倫理面の配慮は必要ないものと考えられた。

C. 研究結果

検査結果を表1に示す。全ての検査において、WNVは陰性であった。

D. 考察

北海道（日本）へ実際に WNV の侵入があった場合、1999 年に起きたニューヨークでの流行の時と同様に、先ず野鳥の大量死が起こる可能性が高いものと考えられる。したがって、野鳥における WNV のサーベイランスシステムを確立することが重要である。今後は、北海道の野生動物の斃死情報を迅速に集め、斃死体なるべく早く回収し、検査に供するシステムを確立することが必要である。

E. 結論

本年度、私たちは北海道のカラス類における WNV の感染疫学調査を開始した。今後は、サンプル数を増やすとともに、カラスの斃死体を出来るだけ早く発見し、検査に供するシステムを整える必要がある。

る。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. 特許取得 なし。

4. 実用新案登録 なし。

5. その他 なし。

表1. カラス検体を用いたWNV検査結果

No.	種	使用臓器	採集日	採集場所	テスト		
					VecTest	RT-PCT	ウイルス分離
1	ハシボソガラス	筋肉	09/21/06	札幌	-	-	-
2	ハシボソガラス	筋肉	09/21/06	札幌	-	-	-
3	ハシボソガラス	脳	10/04/04	江別	-	-	-
4	ハシブトガラス	脳	10/06/04	標津	-	-	-
5	ハシブトガラス	脾臓	09/26/05	根室	-	-	-
6	ハシブトガラス	脾臓	09/26/05	根室	-	-	-

厚生労働省・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侵入に備えての診断、予防対策への基盤的研究」班
(ウエストナイル熱ワクチンの開発)
(分担) 研究者 森田 公一 長崎大学・教授

研究要旨：

ウエストナイルウイルスは 1998 年まではアフリカ、中近東、西アジアで流行している蚊媒介性のウイルス感染症として知られていたが、1999 年に有史以来初めて、アメリカ大陸に侵入し、2006 年末までに米国を中心に数万人を越す患者が発生して国際感染症としてきわめて重要になっている。ウエストナイルウイルスは現在北米、中米、南米全域に拡大して今後、さらに多くの感染者、患者の発生が危惧されている。アメリカ大陸に伝播したウエストナイルウイルスは人やウマに感染した場合に従来知られていたより高い割合で中枢神経系に侵入し髄膜炎・脳炎をおこしている。わが国にこのウエストナイルウイルス株が侵入し定着した場合にもヒトにおいて多くの脳炎患者が発生することが想定されるため、本研究ではヒト用不活化ワクチン並びに家畜用リコンビナント生ワクチン開発を目的としている。ヒト用不活化ワクチンには、Vero 細胞を用いた組織培養法でウエストナイルウイルス（ニューヨーク分離株）を増殖し、ホルマリン処理により不活化する方法により作製し本年度は GLP 試験を実施し平成 19 年度中に実施するヒト臨床試験ワクチンロットを作製した。家畜用リコンビナント生ワクチン開発には、Fusion-PCR 法によりウエストナイルウイルス NY 9 9 株の E 蛋白遺伝子を弱毒日本脳炎生ワクチン株（ML 17 株）に挿入したキメラウイルスを作出し、弱毒株であることを確認したが、脳内に直接接種した場合には若干の増殖性をしめすことから、ウイルス E 蛋白質に人工的な変異を導入することを目的として本年はキメラウイルスの完全長 cDNA をクローニングした。さらに将来的なワクチンの実用化に不可欠のワクチン量の定量系の確立のためウエストナイルウイルス（ニューヨーク株）のタンクローン抗体を作製した。

(研究協力者)

長崎大学熱帯医学研究所

長谷部太

井上真吾

鍋島武（ニューマンサイエンス財団）

A.F.Khan

財阪大微生物病研究所（観音寺研究所）

福家功

木村優子

真鍋貞夫

谷下修

石川豊数

石橋正英

A. 研究目的

わが国へのウエストナイルウイルスの侵入にそなえ、感染予防に有効なワクチン開発を目的として、組織培養法を用いたヒト用不活化ウエストナイルワクチンおよび、日本脳炎ウイルス生ワクチン株の遺伝子にウエストナイルウイルス粒子表面蛋白質遺伝子を挿入したりコンビナント生ウエストナイルワクチン開発を目的としている。

B. 研究方法

[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

1) 不活化ワクチンの作製

マイクロキャリアー上に培養した Vero 細胞にウエストナイルウイルス株 (NY 株) を感染させ培養上清中のウイルス粒子を超遠心法により濃縮精製したのちホリマリンにより不活化しホルマリンを除去して作製した。

2) GLP 試験を下記の項目について実施した。

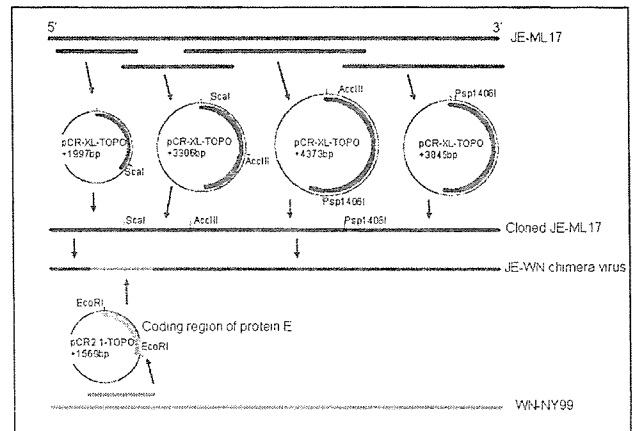
- ラットにおける単回皮下投与毒性試験
- イヌにおける単回皮下投与毒性試験
- 筋肉内局所刺激性試験
- 4 週間反復皮下投与毒性試験
- 一般薬理試験
- 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験

[2] 遺伝子組換えキメラウイルス生ワクチン

1) 完全長 cDNA クローンの構築

日本脳炎ウイルス生ワクチン株 (ML17) の遺伝子 RNA を鋳型として RT-PCR 法により (図 1) のように 4 個の cDNA 断片を pCR-XL に挿入してクローニングし、同時にウエストナイルウイルス NY 株から E タンパク遺伝子を同じく pCR-XL にクローニングしてそれぞれを試験管内でつなぎ合わせ、キメラウイルス cDNA を pMW119 にクローニングした。このプラスミドに組み込まれた完全長 cDNA の全塩基配列を決定し、突然変異のあった箇所は修復した。



(図 1) キメラウイルスプラスミドの構築

C. 結果

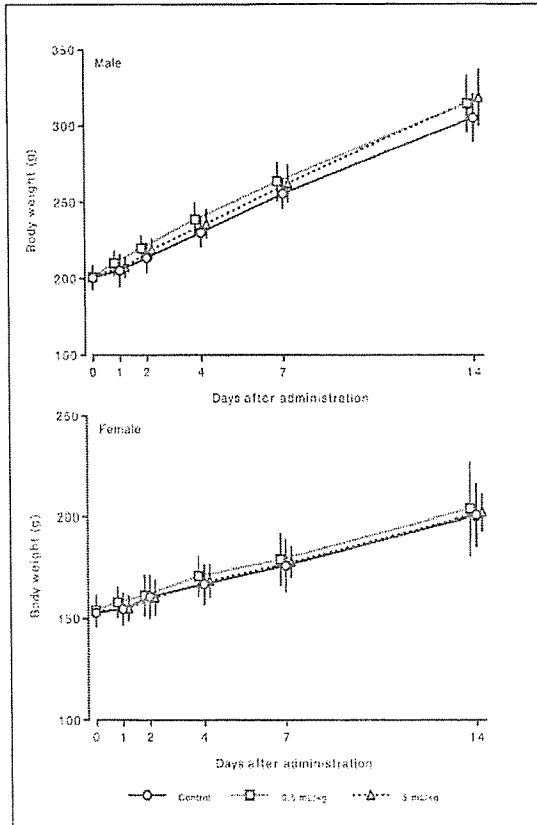
[1] ヒト用ウイルス不活化ワクチン

a) ラットにおける単回皮下投与試験

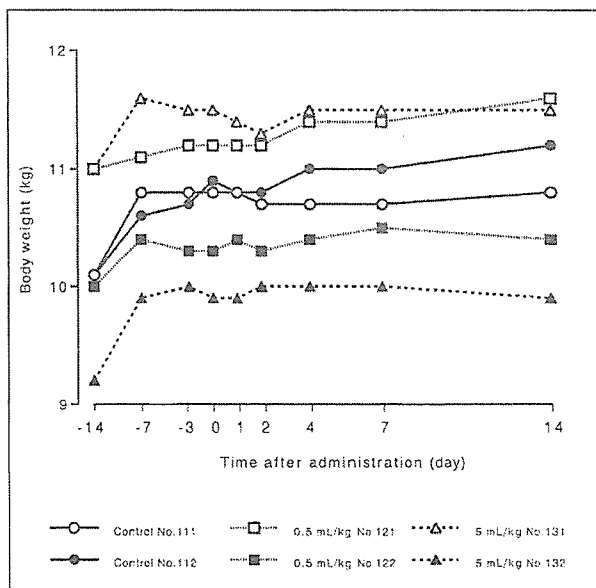
ウエストナイル熱ワクチンのヒトでの臨床投与量を 0.05 mL/kg と予定していることから、その 10 倍量である 0.5 mL/kg (低用量), 100 倍である 5 mL/kg (高用量), 対照群として生理食塩液 5 mL/kg の計 3 群を設定し、1 群雌雄各 5 匹に皮下投与し、その生死、体重の増加、局所の病理変異を検証した。その結果、雌雄とも観察期間を通じて死亡例はなく、一般状態にも投与による影響は認められなかった。体重の推移については雌雄とも観察期間を通じて 0.5 及び 5 mL/kg 群とも対照群との間に有意な体重変動はなく、投与による影響は認められなかった。剖検では、全例に被験物質投与による変化は認められなかった。体重推移のグラフを (図 2) に示す。

b) イヌにおける単回皮下投与毒性試験

7 か月齢のビーグルを用いて、ウエストナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 及び 100 倍量である 0.5 及び 5 mL/kg 並びに対照として日本薬局方生理食塩液 5 mL/kg の計 3 群を設定し、1 群雄各 2 頭に単回皮下投与した。一般状態、体重推移及び剖検において、被験物質投与による影響は認められなかった。体重推移のグラフを (図 3) に示す。



(図2) ラット単回投与における体重推移



(図3) イヌ単回投与における体重推移

15週齢の Kbl:JW, SPF ウサギ雄 18 匹を用いて左右又は右の外側広筋に, ウエストナイル熱ワクチン, 対照物質 (安定剤), 陽性対照物質 (1.7 及び 0.425 w/v% 酢酸溶液) 又は陰性対照物質 (日本薬局方生理食塩液) を 0.5 mL/site ずつ 6 匹に単回投与した. 投与後 2 日及び 7 日に各 3 匹, 計 9 匹を剖検して投与部位 (n=3) を摘出し, 病理学的検査を行った. ウエストナイル熱ワクチンでは, 肉眼所見で投与後 2 日及び 7 日も変化は認められなかった. 病理組織学的所見では, 投与後 2 日にごく軽度の偽好酸球や単核細胞からなる炎症性細胞浸潤及び筋線維の変性・壊死, 投与後 7 日にごく軽度の筋線維の再生が認められた.

ウエストナイル熱ワクチンの成分である安定剤及び生理食塩液では, 西ナイル熱ワクチンと同等の局所障害性が認められた. 一方, 陽性対照物質である 0.425 及び 1.7 w/v% 酢酸溶液では用量に関連して, 肉眼所見で投与後 2 日に灰白色化, 投与後 7 日に淡褐色~褐色化, 病理組織学的所見で投与後 2 日に筋線維の変性・壊死, 投与後 7 日に炎症性細胞浸潤, 筋線維の再生, 肉芽組織等を主体とした局所刺激性が認められた.

d) 4 週間反復皮下投与試験

6 週齢の Crj:CD (SD) IGS, SPF ラットをについて, ウエストナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 倍量である 0.5 mL/kg 並びに対照として日本薬局方生理食塩液 0.5 mL/kg の計 2 群を設定し, 1 群雌雄各 10 匹に 1 日 1 回, 1 週間隔で 4 回投与した. その間, 一般状態の観察, 体重・摂餌量の測定, 尿検査及び眼科学的検査を行い, 最終投与後 1 週間に採血して血液学的検査及び血液生化学的検査を行い, 安楽死させ剖検して病理学的検査を行った. その結果, 一般状態, 体重推移, 摂餌量及び諸検査において, ウエストナイル熱ワクチン投与による影響は認められなかったことから, 西ナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 倍量である 0.5 mL/kg の 1 日 1 回, 1 週間間隔での 4 回投与では明らか

c) 筋肉内局所刺激性試験

な全身性の毒性はないものと判断された。一例として投与群と対照群の尿生化学検査の比較を（表1）に示す。

Group		Control	West Nile virus vaccine 0.5 mL/kg	
Male	Volume (mL)	13.8 ± 2.4	15.2 ± 3.6	
	Specific gravity	1.057 ± 0.005	1.047 ± 0.008 *	
	Na (mEq/L)	140.4 ± 25.3	112.8 ± 13.9	
	K (mEq/L)	309.9 ± 21.4	252.4 ± 51.3 *	
	Cl (mEq/L)	196.8 ± 21.5	158.4 ± 28.2 *	
	Total excretion (mg/day)			
	Na	43.8 ± 4.7	38.8 ± 5.8	
	K	166.2 ± 20.4	144.6 ± 13.8	
	Cl	95.8 ± 11.6	85.0 ± 8.7	
	Female	Volume (mL)	12.4 ± 3.8	13.9 ± 8.4
Specific gravity		1.047 ± 0.017	1.042 ± 0.018	
Na (mEq/L)		102.4 ± 32.6	96.4 ± 50.0	
K (mEq/L)		250.3 ± 90.9	213.7 ± 96.3	
Cl (mEq/L)		145.6 ± 55.1	121.2 ± 66.2	
Total excretion (mg/day)				
Na		27.4 ± 6.1	25.6 ± 8.7	
K		111.6 ± 22.0	97.8 ± 32.3	
Cl		58.8 ± 14.7	49.6 ± 14.2	

Values are the mean ± standard deviation from 5 animals.

*, Significantly different from the control at $p < 0.05$.

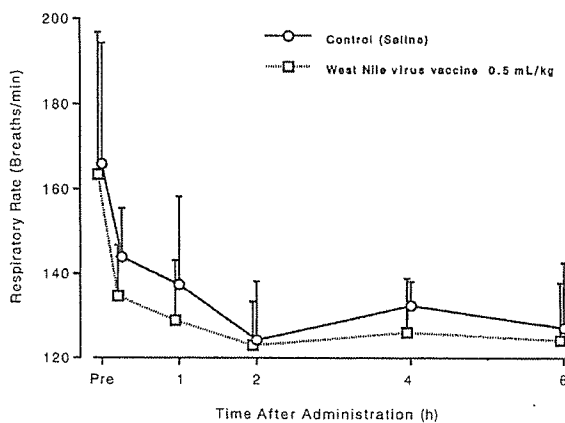
（表1）ラット4週間反復投与における尿生化学

e) 一般薬理試験

（ラットにおける呼吸機能に及ぼす影響）

6週齢の雄性SD系ラット、1群8例に、臨床投与量の10倍量である0.5 mL/kg及び対照として日本薬局方生理食塩液0.5 mL/kgをそれぞれ単回皮下投与した。投与前、投与後15分、1、2、4及び6時間にラットの呼吸機能（1回換気量、呼吸数及び分時換気量）を測定した。

ウエストナイル熱ワクチンの0.5 mL/kg群では、いずれの測定時点においても1回換気量、呼吸数及び分時換気量に変化は認められず呼吸に及ぼす影響はないと判断された。結果の一部を（図4）に示す。



（図4）ラットの呼吸に及ぼす影響（呼吸回数）
（ラットにおける腎機能に及ぼす影響）

6週齢のCrj:CD (SD) IGS, SPF ラットに、ウエストナイル熱ワクチンの臨床投与量の10倍量である0.5 mL/kgを単回皮下投与し、投与後6時間までの尿量及び尿中電解質を測定した。対照として、日本薬局方生理食塩液0.5 mL/kgを単回皮下投与した。その結果、投与後の尿量及び尿中電解質に、ウエストナイル熱ワクチンの投与による影響は認められなかった。結果を（表2）に示す。

Group	Animal No.	Volume 0-6h (mL)	Concentration (mEq/L)			Total Excretion (mg/0-6h)		
			Na	K	Cl	Na	K	Cl
Control	1101	5.8	133	112.8	144	17.7	25.6	29.6
	1102	4.4	141	198.3	224	14.3	34.1	35.0
	1103	3.8	182	189.6	257	15.9	28.2	34.7
	1104	3.2	184	217.1	287	13.5	27.2	32.6
	1105	3.4	178	208.1	259	13.9	27.7	31.3
	1106	4.4	107	163.3	171	10.8	28.1	26.7
	Mean SD	4.2 0.9	154.2 31.9	181.5 38.4	223.7 55.7	14.4 2.3	28.5 2.9	31.7 3.2
West Nile virus vaccine	1201	3.8	177	156.7	224	13.5	23.3	30.2
	1202	4.8	122	162.2	165	13.5	30.4	28.1
	1203	3.4	206	215.4	279	16.1	28.6	33.7
	1204	4.2	129	201.8	205	12.5	33.1	30.6
	1205	5.4	134	135.3	171	16.6	28.6	32.8
	1206	2.8	219	260.1	284	14.1	28.5	28.2
	Mean SD	4.1 0.9	164.5 42.1	188.6 46.0	221.3 51.4	14.7 1.6	28.8 3.2	30.6 2.3

No significant difference was found between the control and treated group.

（表2）ラット単回投与における腎機能への影響

f) 遺伝毒性試験

（細菌を用いた復帰突然変異試験）

ウエストナイル熱ワクチン本剤と溶剤を混合した調製原液を被験物質とし、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98 株、TA1537 株、TA100 株、TA1535 株及び大腸菌 (*Escherichia coli*) WP2uvrA 株の計5菌株を用いて、プレインキュベーション法により復帰突然変異試験を行った。

調製原液 500 μ L/plate を最高用量に、以下、200、100、50及び20 μ L/plate の計5用量でS9mixを添加した場合（代謝活性化法、+S9mix）と添加しない場合（直接法、-S9mix）について用量設定試験及び本試験を行った。それぞれ、陰性対照には生理食塩液100 μ L/plateを、陽性対照には陽性対照物質溶液100 μ L/plateを添加した。

その結果、用量設定試験及び本試験ともに、

いずれの用量においても陰性対照値の 2 倍を超える復帰変異コロニー数は認められなかった。また、生育阻害も認められなかった。

当試験では各菌株の陰性対照値及び陽性対照値は試験評価にとって妥当な反応であったことから、本試験は成立したと考えられウエストナイルワクチンの変異原性は検出できなかった。

[2] 動物用キメラウイルス生ワクチン

日本脳炎ウイルス弱毒生ワクチン株 (ML17) にウエストナイルウイルス NY 株の E タンパク遺伝子を組み替えたキメラウイルスの cDNA を大腸菌プラスミドに組み込んだ。このプラスミドの塩基配列を決定したところ複数の遺伝子変異が発生しており、Site specific mutagenesis 法により 1 つづつ元の塩基配列への修復作業を実施した。

結論

(1) 試作したヒト用のウエストナイルウイルス不活化ワクチンの GLP 試験により以下の結論が得られた。即ち、ウエストナイルワクチン試作品を臨床等用量の 10 倍量投与したラット、イヌでの単回投与およびラットでの 1 週間間隔での 4 回投与の場合においても一般状態、体重推移、摂餌量及び諸検査において、ワクチン投与による影響は認められなかったことから、西ナイル熱ワクチンの臨床投与量の 10 倍量でも明らかな全身性の毒性はないものと判断された。

またラットにおいて臨床投与量の 10 倍量を投与した場合においても呼吸、腎機能に及ぼす影響はなく一般薬理的な毒性はないものと判断された。

遺伝毒性試験においては西ナイル熱ワクチンにはネズミチフス菌及び大腸菌の計 5 菌株において変異原性は認められないと結論した。

(2) 日本脳炎ウイルス ML17 株とウエストナイルウイルス NY 株のキメラウイルス cDNA を大腸菌プラスミドを用いてクローニングした。

E. 考察

不活化ワクチンについては現在ヒト臨床試験用ロットを作製しており今後、追加 GLP 試験を実施したあとに、平成 19 年度中にヒトでの臨床試験を実施する必要がある。

生ワクチンについてはキメラウイルスの cDNA がクローニングできたことから、今後遺伝子操作を行いさらに完全弱毒化への作業が可能となった。

F. 研究発表

1) 論文発表

Pareesh Sumatilal Shah, Mariko Tanaka, Afjal Hossain Khana, Edward Gitau Matumbi Mathenge, Isao Fuke, Mitsuo Takagi, Akira Igarashi, Kouichi Morita. Molecular characterization of attenuated Japanese encephalitis live vaccine strain ML-17. *Vaccine* Vol.24, 402-411, 2006.

Islam M.A., Ahmed M.U., Begum N., Chowdhury N.A., Khan A.F., Parquet M.C, Bipolo S., Inoue S., Hasebe F., Suzuki Y., Morita K. Molecular Characterization and Clinical Evaluation of Dengue Outbreak in 2002 in Bangladesh. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, Vol.59, 85-91, 2006.

Aoki, C., Hidari, K. I. P. J., Itonori, S., Yamada, A., Takahashi, N., Kasama, T., Hasebe, F., Islam, M. A., Hatano, K., Matsuoka, K., Taki, T., Guo, C.-T., Takahashi, T., Sakano, Y., Suzuki, T., Miyamoto, D., Sugita, M., Terunuma, D., Morita, K., and Suzuki, Y.: Identification