

ワクチンでも動物に中和抗体を誘導できることが示された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Jun-ichi Imoto and Eiji Konishi: Dengue tetraivalent DNA vaccine increases its immunogenicity in mice when mixed with a dengue type 2 subunit vaccine or an inactivated Japanese encephalitis vaccine. *Vaccine* 25, 1076-1084, 2007

### 2. 学会発表

Eiji Konishi, Mizue Shoda, Tomoyuki Suzuki, Takashi Kondo, Satoru Arai, Keiko Tanaka-Taya and Nobuhiko Okabe: Continued transmission and need for booster doses in an endemic country, *Vaccines for Viral Infections in Developing Countries Workshop*, Yokohama, Japan.

Tomohiro Ishikawa, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Souichi Nukuzuma, Takashi Kondo, Eiji Konishi: A west nile DNA vaccine elicits effective immune responses in mice by simultaneous administration with the commercial inactivated vaccine. *Fortieth Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program*, Sendai, Japan.

石川知弘、Peter W Mason、小西英二：3'非翻訳領域の欠失により抑制される日本脳炎ウイルス増殖能の哺乳類細胞内における回復。第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会（2005）。

山中敦史、小西英二：デング抗体依存性感染増強活性の簡便な測定法。第41回日本脳

炎ウイルス生態学研究会（2005）。

井本淳一、石川知弘、小西美佐子、村上賢二、林昌宏、濱野正敬、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：ブタにおける日本脳炎DNAワクチン及びタンパクワクチンの混合投与による中和抗体の誘導。第54回日本ウイルス学会学術集会。

山中敦史、小西英二：デング抗体依存性感染増強活性及び中和活性の簡便・迅速な測定法。第54回日本ウイルス学会学術集会。

北井陽子、近藤高志、小西英二：ウマのウエストナイルウイルス感染と日本脳炎ウイルス感染を鑑別するELISA法の確立。第54回日本ウイルス学会学術集会。

糸田川優、山中敦史、小西英二：デング1型及び3型ウイルスに対するマウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び抗体依存性感染増強活性の解析。第54回日本ウイルス学会学術集会。

山中敦史、小西英二：デング抗体依存性感染増強試験に及ぼす補体の影響。第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。

北井陽子、近藤高志、小西英二：補体媒介性細胞傷害を利用した日本脳炎ウイルスNS1抗体測定法：ウマ血清における検討。第13回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

「ウエストナイルウイルス感染の鑑別方法」小西英二、国立大学法人神戸大学、特願2006-236527

表1. ICRマウスにおける低ドーズのウエストナイルDNAワクチンの効果

ワクチン投与量 <sup>a</sup>			中和抗体価 <sup>c</sup>			HI 抗体価		
pcWNME ( $\mu$ g)	WNVAX (dose)	pcDNA3 <sup>b</sup> ( $\mu$ g)	3 <sup>d</sup>	6	9	3	6	9
1	1/10	-	<1:10	<u>1:160</u>	<u>1:160</u>	<u>1:80</u>	<u>1:320</u>	<u>1:320</u>
1	-	-	<1:10	1:10	<1:10	1:20	1:40	1:40
-	1/10	0.73	<1:10	1:20	1:10	1:20	1:80	1:40
0.1	1/10	-	<1:10	<u>1:40</u>	1:10	1:20	1:40	1:20
0.1	-	-	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10
-	1/10	0.073	<1:10	1:10	<1:10	1:10	1:40	1:40

<sup>a</sup> 4週令雌ICRマウス（1群6匹）に記載のワクチンを1回投与した。

<sup>b</sup> pcDNA3の量はpcWNMEに含まれるCpGモチーフのモル数と同じになるように調整した。

<sup>c</sup> 90%プラーク減少法で求めた。

<sup>d</sup> ワクチン投与後の週数

表2. ddYマウスにおける低ドーズのウエストナイルDNAワクチンの効果

ワクチン投与量 <sup>a</sup>			中和抗体価 <sup>c</sup>			HI 抗体価		
pcWNME ( $\mu$ g)	WNVAX (dose)	pcDNA3 <sup>b</sup> ( $\mu$ g)	3 <sup>d</sup>	6	9	3	6	9
0.1	1/10	-	<1:10	1:10	<u>1:40</u>	1:20	1:80	<u>1:80</u>
0.1	-	-	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:20	1:10
-	1/10	0.073	<1:10	1:10	<1:10	1:40	1:40	1:20
0.01	1/10	-	<1:10	<1:10	<1:10	1:20	1:40	1:20
0.01	-	-	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10	<1:10
-	1/10	0.0073	<1:10	<1:10	<1:10	1:10	1:10	1:20

<sup>a</sup> 4週令雌ddYマウス（1群6匹）に記載のワクチンを1回投与した。

<sup>b</sup> pcDNA3の量はpcWNMEに含まれるCpGモチーフのモル数と同じになるように調整した。

<sup>c</sup> 90%プラーク減少法で求めた。

<sup>d</sup> ワクチン投与後の週数

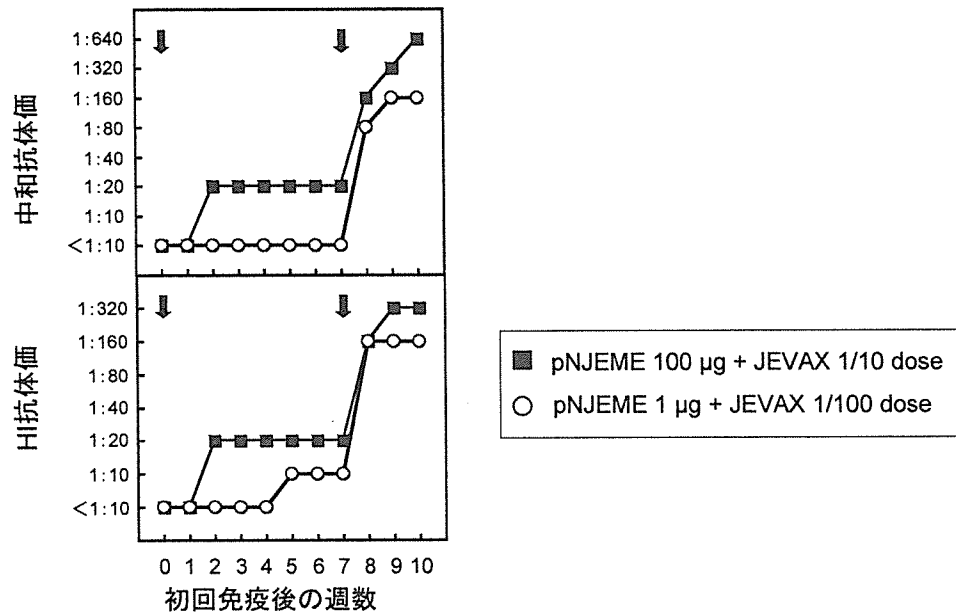


図1. ブタの大腿部内側に pNJEME と JEVAX の混合液を投与した後の中和抗体価 (90%プラーク減少法) 及び HI 抗体価。0 週目と 7 週目に投与した (矢印)。投与量を右側に示す。

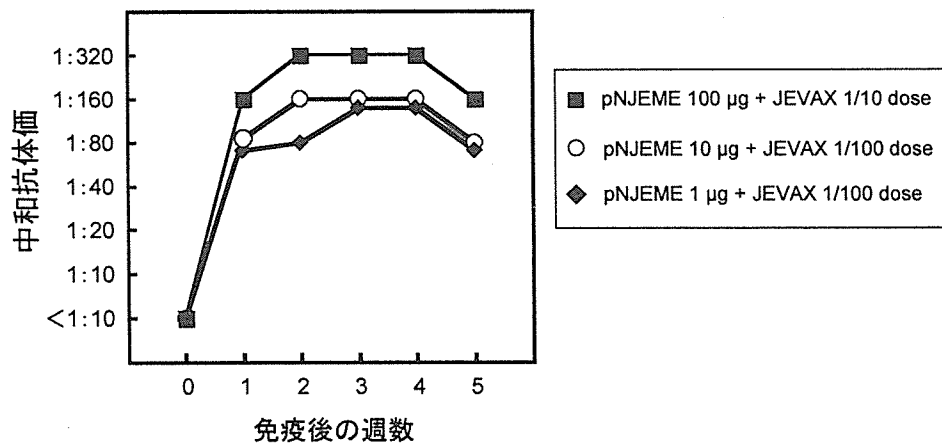


図2. ブタの耳根部に pNJEME と JEVAX の混合液を投与した後の中和抗体価 (90%プラーク減少法)。投与は 1 回のみであった (0 週目)。投与量を右側に示す。

表3. ブタ血清中のIgMとIgG分画の中和抗体価

ワクチン投与量		中和抗体価			
pNJEME ( $\mu$ g)	JEVAX (dose)	1週目 <sup>a</sup>		5週目	
		IgM	IgG	IgM	IgG
100	1/10	1:320	1:80	1:40	1:160
10	1/100	1:160	1:40	1:20	1:80
1	1/100	1:160	1:40	1:20	1:160

<sup>a</sup> ワクチン投与後の週数

表4. 血清の2-ME処理前後のHI抗体価

ワクチン投与量		HI 抗体価			
pNJEME ( $\mu$ g)	JEVAX (dose)	1週目 <sup>a</sup>		5週目	
		処理前	処理後	処理前	処理後
100	1/10	1:160	1:40	1:80	1:80
10	1/100	1:160	1:20	1:80	1:80
1	1/100	1:160	1:20	1:40	1:40

<sup>a</sup> ワクチン投与後の週数

## デングウイルス感染の抗体検査に関する研究

分担研究者 名和 優(埼玉医科大学)

研究協力者 町田早苗(埼玉医科大学)

高崎智彦、田島 茂、原田文植、倉根一郎(国立感染症研究所)  
水野泰孝、加藤康幸(国立国際医療センター)

**研究要旨** デングウイルス感染(デング)の診断を目的として、患者尿中よりデングウイルス特異的 IgA 抗体検出を行った。デングの診断は血清中よりデングウイルス遺伝子、あるいは特異的抗体の検出により実施されている。静脈採血は患者に苦痛を与え、また採血困難な状況も存在する。血清に替り尿中より抗体検出が可能であれば望ましい方法となる。

対象はデング流行地域へ旅行後発病し、国内でデングを疑われた日本人患者より検査材料として血清、尿等の採取された 11 症例であった。11 例中 4 例では急性期の血清、尿等より RT-PCR 法でデングウイルス遺伝子が班友の高崎らによって検出された。ほかに日本人健常者(成人)数名の尿を抗体陰性対照として用いた。抗体の検出測定はこれまで分担研究者らのグループが報告した抗体捕捉酵素免疫吸着測定法(capture ELISA)で行い、デングウイルス抗原も既に報告した方法で作成されたものである。採取された尿検体への血液の混入を潜血反応試薬で検査したが陰性であった。健常者尿の IgA 抗体測定(1:2~1:64 希釈)では、デングウイルス抗原に対する非特異的反応は問題とならないレベルであった。

デングウイルス遺伝子の検出された症例(3 例)の血清中の IgA 抗体を指標として、尿中の抗体を測定した。病日を追って採取された尿中のデングウイルス抗原に対する IgA 抗体レスポンスが 2 例(2/3)に観察された。

### A. 研究目的

デングは現在日本国内に常在しないが、日本人旅行者のデング常在流行地域での感染、あるいは当該地域住民の日本入国後、国内での発症例が報告されている。デングは第 4 類感染症に指定され、国内での発症例の把握が求められている。

デングの診断はふつう急性期患者血清よりのウイルス遺伝子検出、あるいは急性期および回復期患者血清中のデングウイルス特異的抗体検出で行われる。デ

グの検査では採血が必須であるが、採血には高度な技術が要求され、また被験者に苦痛を与える。

我々はデングの抗体検査に際して被験者の苦痛軽減を目的として、尿中よりデングウイルス特異的抗体検出を企画した。

### B. 研究方法

#### 1) 検査材料

対象となった症例は全 11 症例で、いずれもデング流行地域へ旅行後国内にてデングを疑われた日本人成人 11 症例であつ

た。血清検体の得られたもの 7 検体(4 症例)、尿検体の得られたもの 22 検体(11 症例)であった。その他デング流行地域への渡航歴のない日本人成人数名より同意を得て尿を採取し、抗体陰性対照とした。

## 2) 抗体測定方法

抗体は、平成 16 年度新興・再興感染症研究事業「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」に報告した測定方法を応用した。以下簡単に測定法を説明する。

最初に ELISA プレート表面を抗ヒト IgA 抗体でコーティングした。プレート表面をブロックした後、希釈した検体を加え、検体中の IgA 抗体を捕捉した。プレートを洗浄した後デングウイルス抗原および非感染コントロール抗原と一夜反応した。再びプレートを洗浄した後、検体中の抗体と反応した抗原を検出するため酵素標識したフラビウイルス特異的モノクローナル抗体 IgG を反応させた。抗原抗体反応を酵素発色後の吸光度で測定した。抗体陰性と陽性の判定は、平成 16 年度の研究報告書に記載したように、ウイルス抗原との反応で得られた吸光度(P)および非感染コントロール抗原との反応で得られた吸光度(N)比(P/N ratio)2.0 以上を抗体陽性とした。

また、デングウイルスと抗原交差反応性を有し、多くの日本人に抗体保有が認められている日本脳炎ウイルス抗原を用いて交差反応につき比較測定した。

## 3) その他の検査

採取した尿検体の血液混入を観察するため、市販の臨床検査試薬「プレテスト hII, 和光純薬」を用いた。

(倫理面への配慮)

デング感染診断を目的とした尿中よりの抗体測定は、平成 18 年 5 月 30 日に国立感染症研究所医学研究倫理審査に申請・登録された後、被験者の同意を得て国立国際医療センターにて採取された。

## C. 研究結果

### 1) 尿中よりデングウイルス特異的抗体の検出

希釈した日本人健常者尿と、デングウイルス抗原および非感染コントロール抗原と反応し、非特異的反応を観察した(図 1)。尿希釈 1:2~1:64 において、非感染コントロール抗原と比較してウイルス抗原との非特異的反応は観察されなかった。

つぎに、1 型デングウイルス遺伝子が検出され感染の確認された患者より発熱 14 病日に採取された尿を用いて、デングウイルス抗原および非感染コントロール抗原と反応し、尿中の IgA 抗体を検出した(図 2)。尿希釈 1:2 より 1:64 の範囲において ELISA 吸光度は希釈依存性に低下した。非感染コントロール抗原との非特異的反応は、図 1 と同様に低いレベルであった。

### 2) デング患者における尿中 IgA 抗体レスポンス

発熱後数回にわたり検体の採取された 3

症例を用いて、尿中の IgA 抗体産生を観察した。同時に、デングウイルスと交差反応性を示す日本脳炎ウイルス (JEV) 抗原との反応を観察した (図 3-1~3)。

図 3-1 に示された症例は、図 2 で示された症例であった。数値は P/N ratio で示した。デングウイルスに対する尿中の IgA 抗体は発病 7 日より 25 日後まで陽性を示した。一方日本脳炎ウイルス抗原 (JEV-Ag) に対する IgA 抗体の交差反応は、発病 8 日後より 14 日後まで陽性を示したが、発病 25 日後では陰性であった。

図 3-2 は 2 型デングウイルス感染例で、発病 4、7、および 14 日後に尿検体が採取された。発病 4 日後の急性期では抗体陰性であったが、発病 14 日後では尿中より抗体が検出された。デングウイルス抗原と比較して JEV-Ag に対する交差反応は低かった。

図 3-3 はデングウイルス遺伝子が検出されず、臨床症状よりデングと診断された症例であった。尿検体が発病 4、14 日および 89 日後に採取された。尿中の IgA 抗体は回復期に相当する発病 14 日後に検出されたものの、急性期の発病 4 日後および発病 89 日後には検出されなかった。以上の 3 症例では、尿中よりウイルス特異的 IgA 抗体は発病 8 日後より 14 日後の回復期に相当する期間に検出された。

次に発病後の経過と尿中 IgA 抗体の変動について観察した (図 4)。全 11 症例 (22 検体) のうち発病後日数の記載された 20 検体について、病日と尿中 IgA 抗体測定

結果を示した。抗体陽性と判定される P/N ratio が 2.0 以上を示したものは 10 検体あった。最も早期に検出された例は発病 5 日後 (1/2 検体) であった。発病 7 日後より 15 日後までの間に 8 検体 (8/10) に IgA 抗体が検出された。

#### D. 考察

デング患者の診断における苦痛の軽減を主目的とし、併せて日本国内へのデング輸入感染状況の調査を強化するために、検体採取の容易な尿中からの抗体検出を検討した。初年度は協力を依頼した臨床家の理解不足もあり、尿検体の採取できた症例数は 11 例と少なかったが、尿中よりデングウイルス特異的 IgA 抗体検出が可能であった。

図 3 および図 4 の結果は、感染後の回復と、尿中の IgA 抗体検出結果が平行し、患者尿中の IgA 抗体検出によるデングの診断が可能であることを示唆した。

今回の研究では尿中へ分泌される IgA 抗体を標的として検出したが、今後産生量の多い IgG 抗体についても検討する必要がある。その場合、デングウイルスと抗原交差反応性を示す日本脳炎ウイルス抗原を用いて観察する必要がある。日本脳炎ウイルスワクチン接種、あるいは日本脳炎ウイルスの自然感染による抗体を保有する日本人がデングウイルスに感染した場合、デング初感染・フラビウイルス再感染となって抗原交差反応による既往性反応が出現すると考えられる。健常

人尿の測定ではデングウイルス抗原との間で有意な反応は観察されなかった。しかしながらデングウイルス感染後に産生された尿中 IgA 抗体は日本脳炎ウイルス抗原(JEV-Ag)とも反応した。日本脳炎ウイルスに対する抗体保有の有無が、デングウイルス感染後の抗体産生あるいは臨床症状へ与える影響などにつき観察する必要がある。

今回の研究は予備的調査であり、結果をもって次年度に症例数を増やし、日本人のデング診断に尿中の抗体検査が有用であるか、詳細な検討を実施する。

#### E. 結論

デング患者の尿中より IgA 抗体検出により診断が可能と考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

名和 優、町田早苗、高崎智彦、田島 茂、原田文植、倉根一郎、水野泰孝、加藤康幸、第 13 回トガ・フラビ・ペスウイルス研究会、平成 19 年 1 月 東京：  
デングウイルス感染の抗体検査：患者尿中における IgM, IgA 抗体検出

#### 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



図1 日本人健常者尿中のデングウイルス抗原に対するIgA抗体測定

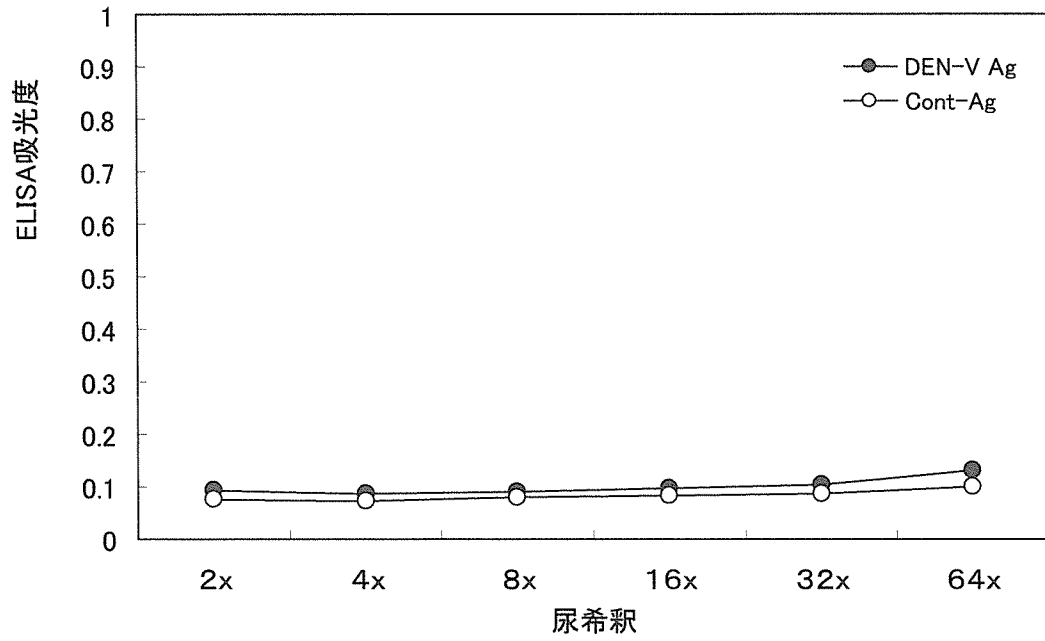


図2 1型デングウイルス感染例における14病日の尿中IgA測定

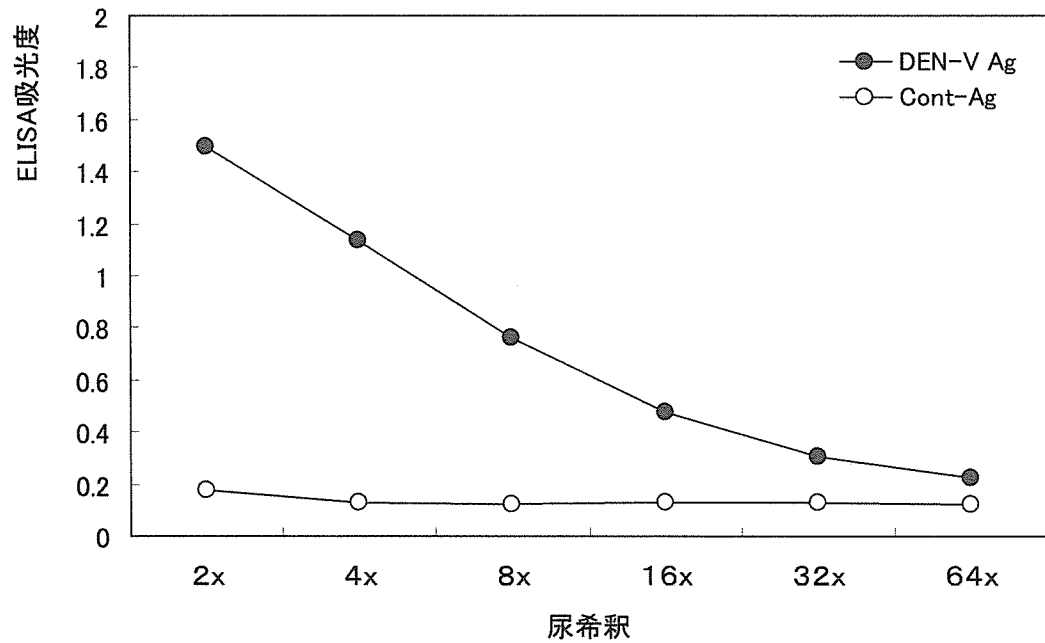


図3-1 1型デングウイルス感染例における尿中IgA抗体レスポンス

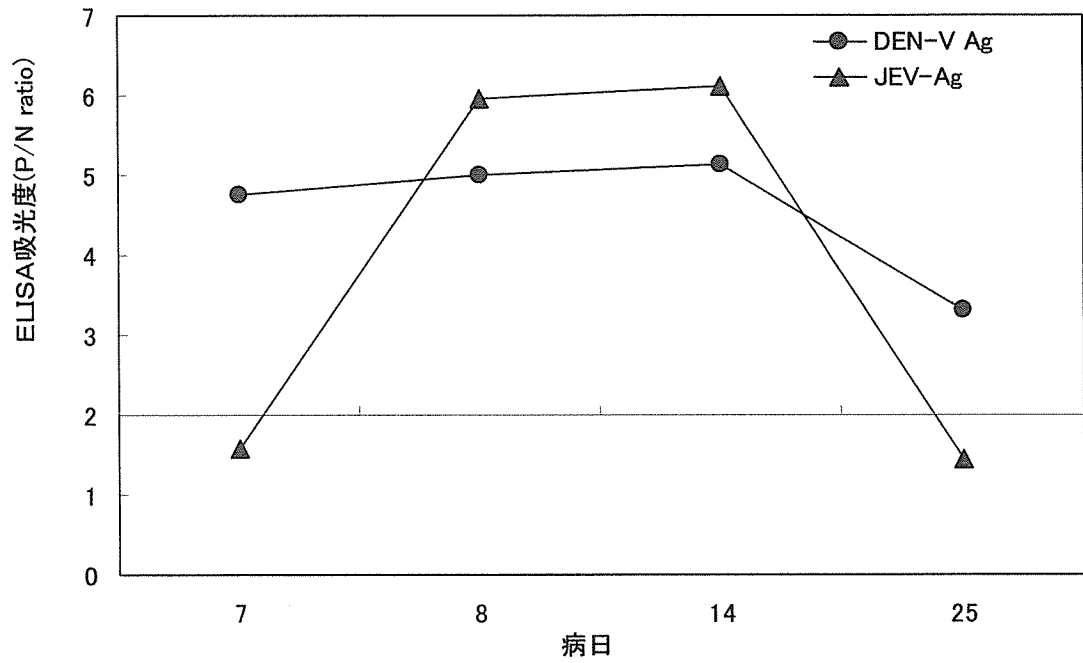


図3-2 2型ウイルス感染例における尿中IgA抗体レスポンス

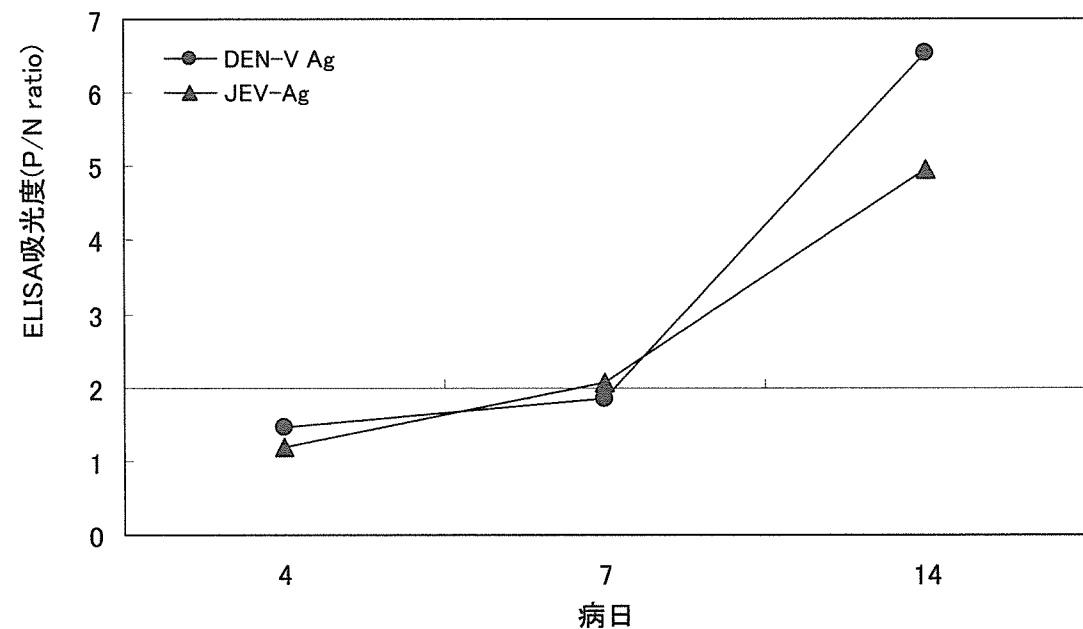


図3-3 デング様疾患患者における尿中IgA抗体レスポンス

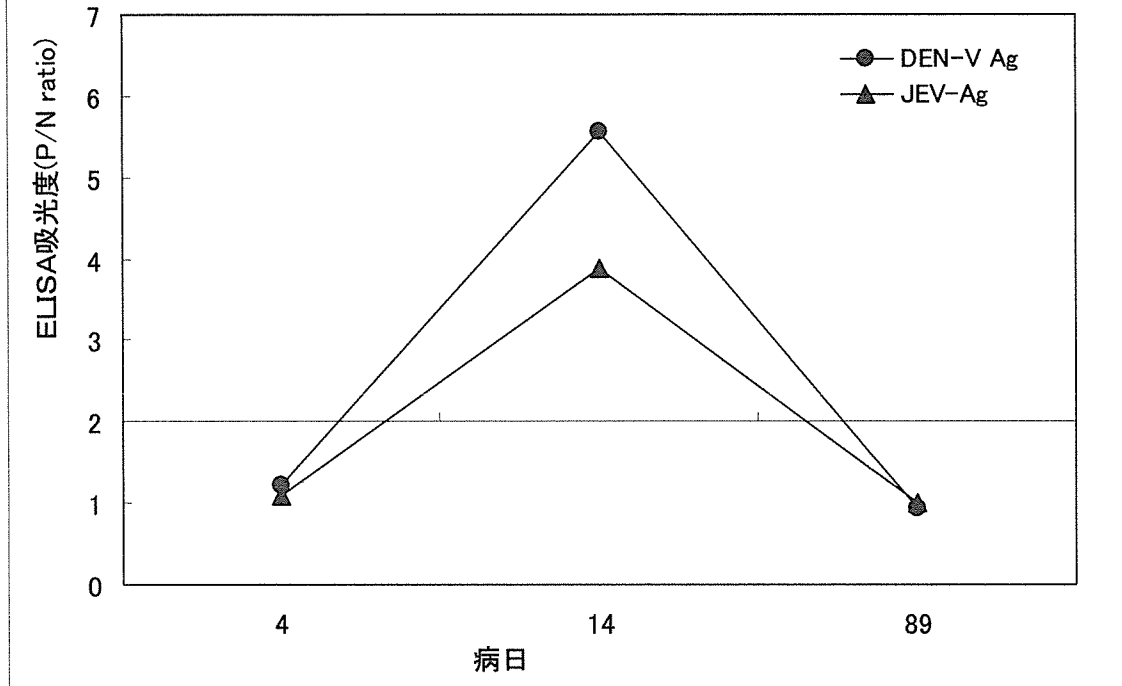
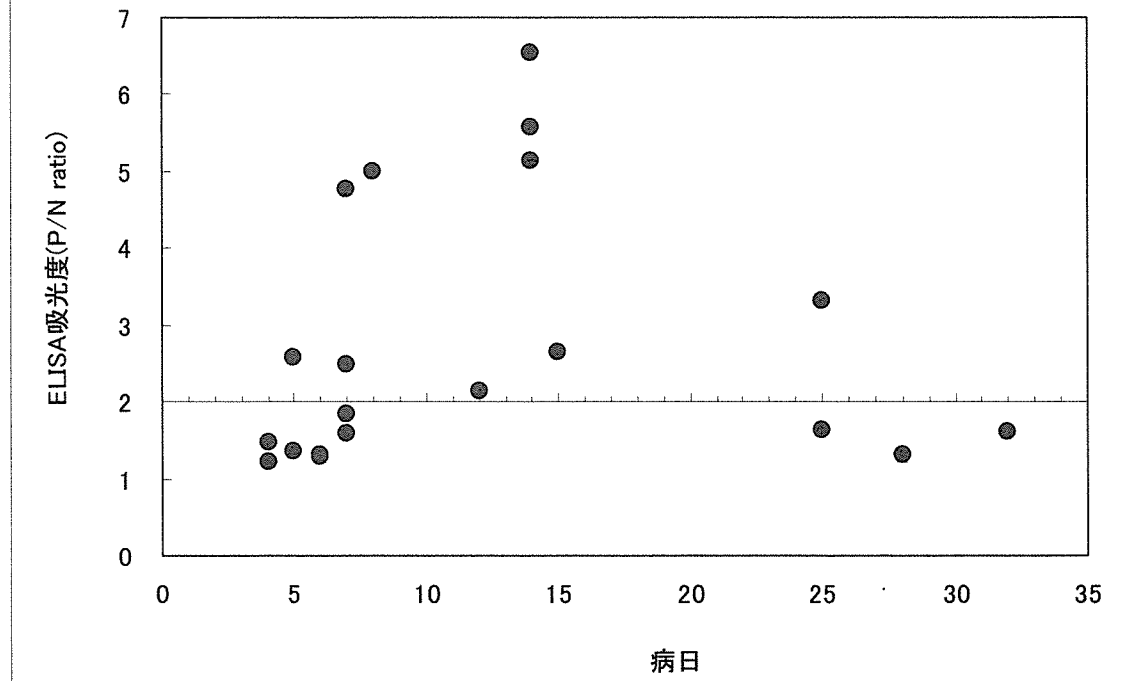


図4 発病後日数による尿中IgA抗体の変動 (n = 20)



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

マウス樹状細胞におけるデングウイルス感染機構の解析に関する研究

分担研究者 名和 優(埼玉医科大学)

研究協力者 町田早苗(埼玉医科大学)

高崎智彦、倉根一郎(国立感染症研究所)

**研究要旨** デングウイルスのワクチン開発、あるいは感染免疫を解析するうえで、免疫の獲得において司令塔的な役割を果たす樹状細胞の役割を明らかにすることは重要である。人の樹状細胞を用いた解析では、デングウイルスが未熟な樹状細胞上の DC-SIGN に結合し、ウイルス増殖したことが明らかになっている。しかしながら、これまで実験感染モデルとして広く用いられているマウス樹状細胞での感染の成立は明らかにされていない。我々は、BALB/c および C57BL/6 の 2 系統のマウスを用いて骨髄と脾臓から樹状細胞を分離し、マウス樹状細胞にデングウイルスが感染するかを間接蛍光抗体法および RT-PCR 法で解析した。デングウイルスは、人の解析と同様に骨髄の未熟な樹状細胞に感染することが間接蛍光抗体法で認められ、感染樹状細胞の上清中にウイルス遺伝子の存在が明らかになった。マウスにおいても未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスが増殖していることが示唆された。

**A. 研究目的**

Dengue virus (DenV) は、自然感染においては蚊媒介性で出血熱を起こす。最近報告された人の樹状細胞 (Dendritic cell ; DC) を用いた解析では、DenV が DC-SIGN に bind した後ウイルス増殖したことが明らかになった。一方、マウスは、DenV の感染モデルとして利用されているが、感染後の中和抗体産生、細胞傷害性 T 細胞の誘導などの免疫応答はみられるが、人と同じ病態を示さず、また、系統によってウイルス感受性等の違いがみられる。今回、我々は、BALB/c と C57BL/6 の 2 系統のマウスの骨髄と脾臓から DC を分離し、マウス DC に DenV が感染するか、また、DC が、DenV 感染の標的細胞であるのか、DC と DenV 感染との関連

性を解析した。

**B. 研究方法**

1) Dendritic 細胞の分離

5-6 週令の BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄 (Bone Marrow DC) と脾臓から (Splenic DC) を分離した。DC の分離は、骨髄もしくは脾臓から細胞を採取し、血球溶解 buffer (155mM NH<sub>4</sub>Cl) で溶血させ、RPMI (-) で洗浄した。GM-CSF (20ng/ml) 添加 10%FCS RPMI メディウム (20 GM-CSF Medium) を用いて 2x10<sup>6</sup>/10 ml に細胞を調整し、細菌培養用プレートで培養した。3 日後、20 GM-CSF Medium を加え更に 3 日間培養した。培養 6 日後、抗 CD11c magnetic beads (MACS) を用いて使用書に従い、ポジティブセレクション法で CD11c 陽性 (CD11c<sup>+</sup>) 細胞を単離した。

CD11c<sup>+</sup>細胞は、抗マウス CD11c ハムスター抗体と FITC 標識抗ハムスターウサギ抗体を用いてフローサイトメーターで CD11c<sup>+</sup>細胞が、90%以上であることを確認した。

## 2) デングウイルス感染

Dengue virus type 2 (Den V 2; ニューギニア C 株) を用いた。間接蛍光抗体およびウイルス RNA の測定には M. O. I. 1~2 PFU/cell で感染させ、3 日後または 7 日後に細胞および上清を回収した。

## 3) 間接蛍光抗体

細胞を PBS で 2 回洗浄後風乾し、パラホルムアルデヒドで固定した。0.2% Triton X-100 で処理した後、マウス IgG で Fc レセプターをブロックした後に抗体反応を行った。

蛍光抗体には一次抗体として Den V 2 特異的 E 蛋白モノクローナル抗体 (3H5)、フラビウイルス特異的 E 蛋白モノクローナル抗体 (4G2)、そして Den V 特異的 Pr M に対するモノクローナル抗体 (2H2) を使用した。2 次抗体として FITC 標識抗マウス IgG (Fab) 抗体を用いた。

## 4) 細胞増殖・活性化の定量 (XTT 法)

DC 細胞に DenV2 を M. O. I. =10 および 1 で接種し感染細胞とした。未感染 DC を対照とした。各 M. O. I. の感染細胞と未感染細胞を  $1 \times 10^4$  cell/well に調整してマイクロプレートに蒔いた。感染 1, 2, 3, および 5 日後に Cell Proliferation kit II (XTT, Roche Diagnostics) 試薬を添加し、20 時間後に吸光度を測定した。

## 5) ウイルスゲノムの測定

$1 \times 10^5$  個細胞に Den2 を M. O. I. 2 で感染させ、3 日後及び 7 日後の培養上清を用いてウイルスの有無を RT-PCR で検出した。培養上清から RNA を TRIZOL (Invitrogen) を用いて抽出し、森田らの報告による E 領域の D2S と D2C primer を用い、AccessQuick™ RT-PCR system (Promega) を用いて RT-PCR を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、埼玉医科大学実験動物委員会の許可を得て 3R の理念にのっとり施行した。

## C. 研究結果

### 1) DenV 感染による DC の細胞増殖・活性化の解析

BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄 DC と脾臓 DC に Den V 2 を感染させ、細胞増殖・活性化を測定した。BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄 DC の感染 1 日後に有意に細胞増殖・活性化が認められた。一方、脾臓 DC においては感染による感染増殖・活性化は非感染と差異がなく、BALB/c と C57BL/6 の結果は同様であった。

### 2) DenV 感染 DC 細胞の間接蛍光抗体法での解析

BALB/c 及び C57BL/6 マウスの骨髄と脾臓から DC を分離し、Den V 2 を M. O. I. 1 で感染し、感染後 3 日目に細胞を回収し、固定、抗体反応を行った。

骨髄 DC では Den V 2 特異的 E 蛋白モノクローナル抗体、フラビウイルス特異的 E

蛋白モノクローナル抗体 および Den V 特異的 Pr M に対するモノクローナル抗体に対して細胞質に特異的な蛍光が認められた (図 1)。しかし、脾臓の DC においては E 蛋白の抗体に対して蛍光が認められたが、Pr M に対する抗体では蛍光は認められなかった。この蛍光抗体法の結果は、BALB/c 及び C57BL/6 系統に関係はなく同様であった。

### 3) DenV 感染 DC 細胞上清中の Dengue ウイルス遺伝子の検出

C57BL/6 マウスの骨髄と脾臓から DC を分離し、Den V 2 を M. O. I. =2 で感染し、感染後 3 日目と 7 日目に細胞上清を回収し、上清中にウイルス RNA の存在が認められるか RT-PCR で検出した。骨髄 DC の 3 日目と 7 日目の細胞上清から Den V 2 遺伝子が検出された (図 2)。

### D. 考察

Dengue ウイルスのワクチン開発や感染免疫の研究において感染モデルとして使用されているマウスの性状を知ることは重要である。特に抗原提示細胞である樹状細胞に Dengue ウイルスが感染するかを確認することは感染免疫を研究する上で意義がある。人と同じようにマウスにおいても骨髄からの未熟な細胞に Dengue ウイルスが感染し、ウイルスの増殖が行われていることが示唆された。

### E. 結論

Dengue ウイルスの感染モデルであるマウスにおいても Dengue ウイルスが骨髄の

未熟な樹状細胞に感染し、ウイルスの増殖が起こっていることがわかった。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

町田早苗、名和 優、高崎智彦、倉根一郎：マウス樹状細胞における Dengue ウイルス感染機構の解析。第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜、11 月 20～22 日、2005 年

町田早苗、名和 優、山城 哲、西園 晃、高崎智彦、倉根一郎：マウス樹状細胞株 Jaws II 細胞を用いた Dengue ウイルス感染機構の解析。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、名古屋、11 月 19～21 日、2006 年

### 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

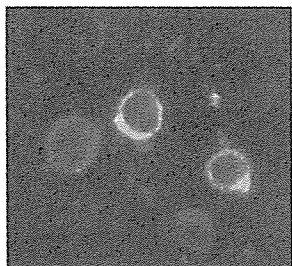
なし

#### 3. その他

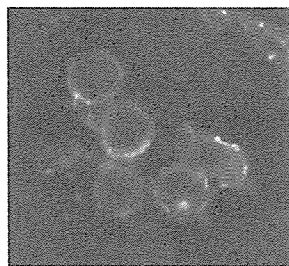
なし

図1. Den V感染DCの蛍光抗体法によるウイルス蛋白の検出

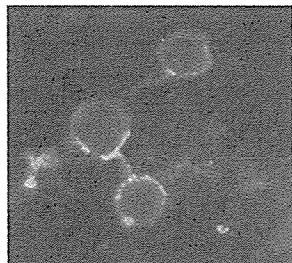
1) DenV2特異的E蛋白MoAb



2) フラビウイルス特異的E蛋白MoAb



3) DenV特異的Pr M蛋白MoAb



4) コントロール

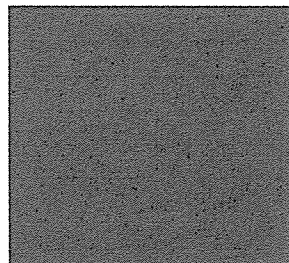
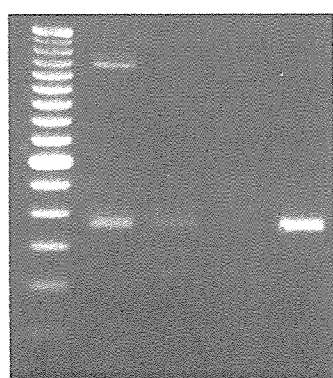


図2. ウイルスゲノムの検出



← 230 bp

M, Marker

1, Day 3

2, Day 7

3, Uninfected

4, Positive control

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

マラリア媒介蚊の行動解析に基づく防除対策および国内外の媒介蚊分布調査に関する研究

分担研究者 高木正洋 長崎大学・教授  
研究協力者 川田 均 長崎大学・講師

マラリア媒介蚊吸血習性について、調査方法が同一でデータ量も豊富なため、それなりの信頼性を担保した比較が可能と判断された、中国雲南省とタイ北部地方の夜間成虫採集結果を分析し、種毎の現場での吸血選択の実態を明らかにした。

#### A. 研究目的

マラリア媒介蚊吸血習性のうち、フィールドにおける種毎の吸血選択の実態を明らかにすることにより、多々ある防除手法の適用範囲を明確にし、合理的な防除戦略構築を提案する。

#### B. 研究方法

1988年以来現在まで分担研究者らにより蓄積されてきたアジア各地のマラリア媒介蚊採集データの内、調査方法が同一でデータ量も豊富なため、現場におけるマラリア媒介蚊の吸血選択について、それなりの信頼性を担保した比較が可能と判断された、中国雲南省とタイ北部地方の夜間成虫採集データを分析対象とした。特に、亜熱帯アジアにおける熱帯熱マラリアの主要媒介蚊である上に、我が国の南西諸島にも普通に分布しているコガタハマダラカ (*Anopheles minimus*) について詳細に吟味した。

##### 対象データの出自と採集方法

対象としたデータを収集した場所、期間、及びコード名を表1に示した。成虫採集方

法は各地とも概ね共通して以下のようなものであった。

(1) 18時より24時までの前半夜採集、または午前6時までの終夜採集。ここでは前半夜のデータのみを対象とした。

(2) 月例または年数回の現地調査を原則とし、1回の現地調査では毎回2夜から6夜の連続夜間採集を実施した。

(3) 各調査地では、2カ所から6カ所の複数地点に於いて、2人から3人の人囲を用いた採集と1頭の水牛（または牛）囲採集を併行して実施した。対象としたデータは全て屋外採集分である。

(4) 人囲は両脚膝より下を暴露し、毎時45分間採集に従事、15分間休止。水牛囲採集は、正方形の2重蚊帳（外蚊帳1辺6m、内蚊帳1辺4m、高さは内外共2mで外蚊帳は地上50cm程度空いている）の内蚊帳内に水牛または牛を係留、蚊（未吸血蚊）は回廊状の外蚊帳内外より毎時数分間採集した。

(5) サンプルは時刻毎にまとめ外部形態を元に同定した。従ってここでの



種名は全て同胞種を区別しないsensu latoである。

図表では略記されている種名の対応を列記する。min(*Anopheles minimus*), aco(*An. aconitus*), ann(*An. annularis*), niv(*An. nivipes*), vag(*An. vagus*), hyr(*An. hyrcanus*), bar(*An. barbirostris*), koc(*An. kochi*), spl(*An. splendidus*), phil(*An. phillipinensis*), tes(*An. tessellatus*), dir(*An. dirus*), mac(*An. maculatus*)。

#### (倫理面への配慮)

データ収集は、屋外にて水牛(または牛)を囿として得られるものであり、時に住民の敷地への立ち入りや家畜の借り出しに対する合意を得る他は、住居内への立ち入りや聞き取り調査などによるプライバシー侵害のリスクは皆無である。また人囿はスタッフが同意の上実施した。以上より倫理面で特に配慮すべき調査活動は内包しないと考えられる。

### C. 研究結果

#### 吸血習性の種間比較

各地で比較的共通に採集された13種のハマダラカについて、期間中の総個体数(人囿と水牛(牛)囿採集の合計数)を表2に、このうち人囿に襲来した雌蚊の割合を表3に示した。表2から種類構成をみると、北タイの3カ所間には共通の構成がみられるが、中ではBTでは、*An.minimus*が多数採集される一方、*An.dirus*もそれなりに捕獲されており、一方で水田や沼沢地発生種の多い*An.hyrcanus*や*An.aconitus*が少ないことから最も山地的、次いで山脚型のMT,そしてMMは*An.hyrcanus*や*An.aconitus*が優占する水田地帯型といえる。XDは、山地の景観を呈するが、前3カ所より700kmほど北に立地することから平均気温も低く、

*An.minimus*では大陸での分布北限に近い。種構成も趣を異にしており、*An.annularis*や*An.nivipes*がみられない一方で、*An.phillipinensis*はXDだけに現れた。

人囿に襲来した雌蚊の割合についてみると、表3に提示した13種の中では、*An.dirus*の人吸血割合の高さが際だっていた。次いで*An.minimus*と*An.maculatus* groupの20~30%台が続いた。後は*An.splendidus*を除き10%前半かそれ以下で、水牛(牛)との比較ではこれらはほとんど人からは吸血しないと結論された。

同種の吸血嗜好性に地域的変異が認められるかどうかは判然としなかったが、あっても種間の嗜好性の傾向が地域間で覆るほど大きなものではないと考えられる。

同種内の吸血嗜好性は、地域的より季節的に変化する傾向が疑われたので、人囿への襲来比率を乾季(11月~4月)と雨季(6月から10月)に分けて比較した。季節間変動が特に顕著と思われた*An.minimus*の結果を、XD, MT, BT, MMにSZ, ZWのデータも加え表4に示した。採集地を問わず雨季における人囿への襲来比率の上昇が顕著に認められた。更に人囿への襲来比率(H%)の季節的変動を、最も*An.minimus*の捕獲個体数が多かったMMとBTについて月別に検討し、捕獲個体数と共に図1(BT)と図2(MM)に示した。どちらの採集地でも11月から乾季中はH%が低く推移した後、雨季に入ると顕著に上昇傾向に転じ、雨季の中間期である7,8月頃に最も人への襲来比率が高い時期が現れることが判った。またこの季節的変化は、採集個体数の季節的変動と逆位相の関係にあることが確認された。

#### D. 考察

東南アジアの代表的なマラリア媒介蚊であり、我が国の南西諸島にも生息しているため、地球温暖化に伴う北への分布拡大が

懸念されているコガタハマダラカ (*An.minimus*) が多いとされる、中国雲南省と北タイの4カ所で収集したマラリア媒介蚊の夜間成虫採集結果を分析した。*An.minimus* は何れからも採集されたが、全体の種類構成には山地型 (BT)、山脚型 (MT)、水田地帯型の特徴が現れていた。この結果は、景観とよく符合しており納得のいくものであった。XDの種類構成には違いが認められた。XDも山地の景観を呈するが他の3カ所より700 km程北にあり、年間平均気温が2℃以上、特に乾季には5℃も低いこと、*An.minimus* の大陸部分布北限に近いことなどに依るものであろう。

水牛 (牛) 囿と人囿を併置し、人に襲来した雌蚊の割合から各ハマダラカの、自然条件下での吸血における人嗜好性を吟味した。13種の中では、*An.dirus* の人吸血割合の高さが際だっていた。次いで *An.minimus* と *An.maculatus* group の20~30%台が続いた。後は *An.splendidus* を除き10%前半かそれ以下で、水牛 (牛) との比較ではこれらはほとんど人からは吸血しないと結論された。この結果は従来の報告と良く一致するものである。また、吸血嗜好性の地域的変異については有無が判然としなかったが、あっても例えば人に対する嗜好性の種間順位を覆すほど大きなものではないと考えられた。このことは、表現された吸血嗜好性がどのような要因によって規定されているのかは別として、この性向が同胞種を内包した *sensus lato* のレベルで、地域を越え比較的固定しているものらしいことを示唆していると思われる。

一方、同じ種内でも季節的には水牛や牛に対する人への相対的な襲来比率が大きく変化する事実が検出された。この傾向は、各地での採集個体数が比較的多かった *An.minimus* や *An.aconitus* では特に明瞭に、しかも同じ傾向として確認された。即ち、

いずれの採集地でも採集個体数の多い乾季には人への襲来割合が低く、採集個体数が少ない雨季の襲来割合が高くなった。理由は今のところ不明だが、両季節間で宿主側 (吸血源) の条件、例えば皮膚の表面温度や呼吸量などに違いが有るのか、または蚊側に吸血嗜好性の異なる季節型が生じたり、個体群としての吸血行動が変化するか、それらのいずれかであろう。このようなことは従来報告されておらず、原因が後者であればその理由を含めて大変興味深い。

#### E. 結論

中国雲南省と北タイで収集したマラリア媒介蚊の夜間成虫採集結果を分析した結果、①山地、山脚、水田地帯、及び山地だが *An.minimus* の分布北限を表徴する種類構成が得られた。②*An.dirus* の強い人嗜好性、続く *An.minimus*、*An.maculatus* の中庸の人嗜好性、他の種の水牛 (牛) 嗜好性が確かめられた。③吸血嗜好性の季節的变化が検出された。*An.minimus* では、個体数の多い乾季には人への嗜好性が低く、個体数の少ない雨季には明らかに高かった。その原因は現時点では不明である。

#### G. 研究発表

1. 特になし
2. 特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特になし
2. 特になし
3. 特になし

表1. 対象データ採集場所、期間、コード名

採集場所	コード名	データ収集期間
中国中国云南省、 西双版纳自治区、 向東村	XD	1992年9月～1995年8月
中国中国云南省、 西双版纳自治区、 シュツイ村	SZ	1993年8月～1995年8月
中国中国云南省、 西双版纳自治区、 整腕村	ZW	1993年8月～1995年8月
タイ国チェンマイ県、 バンマエーダン村	MT	1988年12月～1990年11月
タイ国ランパン県、 バンテ村	BT	1992年12月～1998年11月
タイ国ランパン県、 マエモー村	MM	1992年12月～1998年11月

表2. 各採集地におけるハマダラカの採集個体数

Village	<i>min</i>	<i>aco</i>	<i>ann</i>	<i>niv</i>	<i>vag</i>	<i>hyr</i>	<i>bar</i>	<i>koc</i>	<i>spl</i>	<i>phil</i>	<i>tes</i>	<i>dir</i>	<i>mac</i>
MM	4221	65055	89	6791	1123	37255	740	435	578	5	2627	52	245
BT	4457	612	454	2178	1944	1340	177	652	41	2	329	98	1038
MT	3971	3311	6225	3066	7825	4532	1810	2657	614	0	945	0	1296
XD	293	812	0	0	340	2392	81	1173	109	1489	157	1	31

蚊種の略称コードについては本文の方法参照

表3. 各採集地におけるハマダラカの人囧への襲来割合(%)

Village	<i>min</i>	<i>aco</i>	<i>ann</i>	<i>niv</i>	<i>vag</i>	<i>hyr</i>	<i>bar</i>	<i>koc</i>	<i>spl</i>	<i>phil</i>	<i>tes</i>	<i>dir</i>	<i>mac</i>
MM	32.6	10.2	14.6	9.0	4.5	6.1	9.1	3.7	8.7	-	15.0	90.4	19.6
BT	28.0	9.2	6.6	12.9	0.3	3.8	6.8	0.8	0.0	-	4.3	54.1	27.6
MT	19.8	8.2	7.7	4.8	1.0	5.0	2.8	2.2	13.0	-	14.8	-	17.3
XD	32.1	12.6	-	-	2.4	6.5	8.6	3.8	30.3	4.2	7.6	-	25.8

蚊種の略称コードについては本文の方法参照

表4. 人囧への襲来割合(%)の季節的変動(コガタハマダラカの場合)

Season	MM	BT	MT	XD	SZ	ZW
Dry season	21.7	24.3	14.6	3.7	12.2	7.2
Rainy season	48.5	45.7	36.7	20.7	36.0	25.7

採集地の略称コードについては表1参照