

## 分離されたデングウイルスの分子疫学

第 55 回日本ウイルス学会、札幌 (2007. 9)

小原真弓、渡辺 護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則：富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況：平成 18 年度日本獣医師会、さいたま市、2007 年 2 月

小原真弓、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅：富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況 (2004 年～2006 年)：第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、白山市、2007 年 5 月

山内健生、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、岩井雅恵、林美貴子、米田 豊、安藤秀二、堀田 和、城石将幸、出村尚子、松浦涼子、廣瀬 修、渡辺 護：富山県の平野部における感染症媒介蚊の生息調査 (2003～2007 年)：第 62 回日本衛生動物学会西日本支部大会、大津市、2007 年 10 月

藤井克樹、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳内浸潤細胞の T cell receptor レパトア解析。第 55 回日本ウイルス学会学術集会 2007 年 10 月

澤邊京子、森林敦子、津田良夫、葛西真治、伊澤晴彦、林利彦、金京純、小林陸生 (2008) 日本産アカイエカ種群蚊の越冬に関する研究 (1) 野外捕集蚊における脂質含量と脂肪酸組成の季節変動。第 60 回日本衛生動物学会大会。4 月。下野市。

森林敦子、澤邊京子、津田良夫、葛西真治、小林陸生 (2008) 日本産アカイエカ種群蚊の越冬に関する研究 (2) アカイエカおよびチカイエカの寿命と脂質に関する室内実験。第 60 回日本衛生動物学会大会。4 月。下野市。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

「ウエストナイルウイルスワクチンおよびその製造方法」、平成 19 年 11 月 7 日出願 (発明者：小島朝人、高橋秀宗、他)

「フラビウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント」、平成 19 年 12 月 21 日出願 (発明者：小島朝人、他)

「ウイルス感染症ワクチンおよびフラビウイルス感染症ワクチン用アジュバント」 発明者：森 康子 他

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

地方衛生研究所と検疫所における WNV 検査準備状況

|       |            |      |
|-------|------------|------|
| 分担研究者 | 国立感染症研究所   | 岡部信彦 |
| 協力研究者 | 国立感染症研究所   | 多田有希 |
|       | 国立感染症研究所   | 大日康史 |
|       | 国立感染症研究所   | 菅原民枝 |
|       | 群馬県衛生環境研究所 | 鈴木智之 |

研究要旨

**目的：** ウエストナイルウイルス(WNV)感染症が疑われた場合その検査を担当すると思われる地方衛生研究所における検査体制を把握し、より効果的な体制作りのための方法を考察することを目的とした。**材料と方法：** 地方衛生研究所ネットワークにおけるメーリングリストを用いて全国の地衛研 77 ヲ所と、郵送法による検疫所を対象にした質問票調査を実施し、得られた回答について単純集計を行った。**結果：** 回答を得たすべての全ての都道府県型地衛研と、79%の市区型地衛研において検査実施可能と回答を得た。RT-PCR 法などの遺伝子検査は多くの地衛研で実施することが可能であった(98%)が、血清学的検査の実施可能率は低かった(11%)。多くは国立感染症研究所が公開しているマニュアルにしたがって検査の実施が予定されているが、迅速性・簡便性や特定の株の検出を目的として独自選定されたプライマーセットや RT-LAMP 法などが導入されている。地域ブロック内における協力体制は、近畿支部と中国・四国支部において構築されており、検査依頼などが可能とされている。また、検査に関する相談先が確保できていない地衛研が存在することが認められ、ウイルス検査専任担当者が 3 人未満の地衛研においては、協力体制の構築・相談先の確保ともにその割合が 3 人以上の地衛研と比して低かった。検疫所においては、検査の実施が 2 検疫所で実施することが定められており、検疫所内における協力体制が構築されていた。**考察：** 地衛研が導入しやすいと思われる RT-PCR 法や、簡便性・迅速性を目的としてすでに一部で導入されている LAMP 法に関して推奨法の提示や研修会の実施を行うことが、わが国における WNV 検査体制の整備・強化につながるものと考えられる。また、全ての地衛研で検査体制の準備を行うことが理想的ではあるが、地域と国立感染症研究所との明確な役割分担と、各地域ブロック内における協力体制を構築しておくことによって、地域ブロック単位内でそれぞれの地衛研の不足分を補完できることが期待できる。さらに、すべての地衛研と検疫所が、少なくとも国立感染症研究所は検査に関する相談先と認識できるよう情報提供をおこなうことは優先的な課題であると思われた。

## A. 研究目的

1999年に米国で認められたウエストナイル熱の流行以後、同国においてはその分布域の拡大とともに本症患者が毎年多数認められるようになり、2007年においては3598人(2008年3月4日現在, CDC)が確認されている。また、ヨーロッパ諸国、ロシアや極東地域においては本症の散発的な流行が認められていることから、わが国でもウエストナイルウイルス(WNV)の侵入が懸念されている。WNVに感受性である鳥類や蚊は国内にも存在するため、侵入後は米国のように急速に国内各地に侵淫する可能性が否定できない。さらに輸入例を早期に診断するためにも、本症に対する検査体制の構築が望まれる。

本研究では、本症が疑われた場合その検査を担当すると思われる地方衛生研究所における検査体制を把握し、より効果的な体制作りのための方法を考察することを目的とした。

## B. 方法

### 地方衛生研究所に対する調査

地方衛生研究所ネットワークにおけるメーリングリストを用いて、地方衛生研究所(地衛研)全国協議会に加盟している全ての地衛研77カ所に質問票を送付し電子メールによる回答を依頼した。提出期限日の前日に回答が得られていなかった地衛研には、電話で回答の提出を依頼した。質問票には、①2007年度施設内ウイルス担当者数(専任・兼任)、②WNV感染症の検査の可否と検査方法、③WNV調査・検査実施状況(ヒト;2002年以降、ヒト以外;2007年)、④1日あたりの検査能力、⑤鑑別診断の説明、⑥WNV感染症の検

査における地域連携、⑦相談先の有無について回答を求め、得られた回答について単純集計を行った。

### 検査所に対する調査

郵送法により検査所へ質問票を送付し、回答を求めた。質問事項は地衛研と同様に①2007年度施設内ウイルス担当者数(専任・兼任)、②WNV感染症の検査の可否と検査方法、③WNV調査・検査実施状況(ヒト;2002年以降、ヒト以外;2007年)、④1日あたりの検査能力、⑤鑑別診断の説明、⑥WNV感染症の検査における地域連携、⑦相談先の有無についてとした。

## C. 研究結果

### 地方衛生研究所に対する調査

#### 1. 有効回答率

71ヶ所の地衛研より有効回答が得られた(有効回答率;92%)。47都道府県の地衛研の内、43ヶ所(91%)、30市区の地衛研の内28ヶ所(93%)より有効回答を得た。各地域ブロック別の有効回答率は、北海道・東北・新潟支部;100%、関東・甲・信・静支部;81%、東海・北陸支部;88%、近畿支部;93%、中国・四国支部;100%、九州支部;100%であった。

2007年度施設内ウイルス担当者数専任担当者数中央値は3人(0-15人)、兼任担当者数中央値は0人(0-6人)であった。

#### 2. WNV感染症の検査の可否と検査方法

有効回答が得られた地衛研71ヶ所のうち、65ヶ所は検査可能と回答した(92%)。検査不可能と回答した地衛研6ヶ所はいずれも市区型であり、5ヶ所はウイルス検査専任担当者が0人であつ

た。

回答を得たすべての都道府県においては WNV 感染症の検査が実施可能な地衛研が存在する(表1)。

検査実施可能と回答を得た地衛研のうち、検査実施が可能な割合が高い検査法は順に RT-PCR 法(92%)、細胞培養を用いる分離(40%)とリアルタイム RT-PCR(28%)であった(図1)。RT-PCR の実施が不可能な地衛研は、リアルタイム RT-PCR や LAMP 法などが実施可能と回答があり、遺伝子検査が実施できる地衛研の割合は高い(98%)。一方で、ウイルス抗原を所有している地衛研は23ヶ所(35%)あるにもかかわらず、概して血清学的検査が実施可能な地衛研は少ない(11%)。

検査は、多くがウエストナイルウイルス病原体検査マニュアルに記載している方法に従って実施(準備)されている。しかし、検出感度、簡便さ、検査時間において、マニュアルには記載されていない RT-LAMP 法(Parida et al. J. Clin. Microbiol. 42 (1): 257-263, 2004)などの方法を導入している地衛研や、推奨法では検出できないことが確認されている G2266 FCG 株を検出するために、独自選定されたプライマーセットを用いてリアルタイム RT-PCR を実施している地衛研も認められた。ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアルに記載されていない LAMP 法のみ実施可能と回答した地衛研も1ヶ所認められた。

### 3. ヒト以外の検査実績

19ヶ所の各地衛研では2007年にヒト以外を対象にした WNV サーベイランスを実施し、18ヶ所は自施設で検査も実施していた。WNV サーベイランスの実施率は、概してウイルス検査専任担当

者が多い地衛研ほど実施率が高い。実施している地衛研はすべて関東以西に分布する地衛研であった(関東・甲・信・静支部;7ヶ所、東海・北陸支部;2ヶ所、近畿支部;7ヶ所、中国・四国支部;2ヶ所、九州支部;1ヶ所)。

ヒト以外の検査を自施設で検査を実施した地衛研18ヶ所すべてにおいて蚊[中央値81.5プール(23-861)]、6ヶ所において鳥類[中央値14羽(1-40)]、1ヶ所においてコウモリ(20匹)を対象としたサーベイランスが実施された。

### 4. ヒトの WNV 検査実績

2002年以降に、ヒトの WNV 検査実績がある地衛研は15ヶ所(1件-3件)であった(累計22件)。内14ヶ所の地衛研においては自施設で検査を実施依頼している。7ヶ所では、国立感染症研究所への検査依頼(確認検査)も実施していた。なお、国立感染症研究所以外に検査依頼する場合は、所在地の都道府県型地衛研や同地域ブロック内の地衛研へ検査を依頼していた。

ヒトの検査実績が複数ある地衛研は東京都や大阪府などの対象とする人口規模が大きい地衛研であったが、「検査実績1件」は比較的人口規模の小さい地衛研でも認められた。原因病原体は群馬県のデング熱2件を除けばすべて不明であった。1日あたりに可能な検査数は10-19件(26地衛研)、1-9件(12地衛研)の順で多くの回答を得た。

### 5. 鑑別診断についての助言

日本脳炎の検査依頼時の WNV 検査の必要性の説明は、19地衛研で「必ず説明する」、18地衛研で「説明することもある」、13地衛研で「説明しない」と回答が得られた(図2)。

### 6. 検査可能件数

各地衛研における 1 日あたりの検査可能件数は、10-19 件がもっとも多く(49%)、ついで 1-9 件が多かった(23%)。図 3 に検査可能件数を各地衛研のウイルス検査専任担当者数毎の集計結果を示す。専任担当者数が少ない 0-2 人である地衛研においては 1 日あたり 20 件以上の検査が可能と回答した地衛研は少ない。それに対して、専任担当者数が 3 人以上の地衛研では、20 件以上の検査が可能と回答している地衛研が比較的多く認められ、地衛研ごとの検査件数は、担当者の人数に依存している可能性があることが示唆された。

#### 7. 地域ブロック内における検査協力と相談先

地域ブロック内において WNV の検査協力体制が構築されていることが認められたのは、近畿支部と中国・四国支部であった。これらの地域においては、検査実施、検査材料の共有や検査に対する助言を大阪府立公衆衛生研究所と広島県立総合技術研究所保健環境センターが担当する協力体制が構築されていた。

WNV 検査についての相談先を質問した結果、相談先があると回答が得られた地衛研は 56 ヶ所(79%)であった。その多くは国立感染症研究所を相談先と回答した(38 ヶ所)。地域ブロック内の協力体制が確立されている近畿支部と中国・四国支部においては、大阪府立公衆衛生研究所と広島県立総合技術研究所保健環境センターが相談先と考えられていた。また、市区型の地衛研においては、所在する都道府県型の地衛研が相談先として考えられている。新潟市衛生環境研究所においては新潟検疫所も相談先とされていた。

ウイルス検査の専任担当者数が 3 人未満である

地衛研(29 ヶ所)と 3 人以上である地衛研(42 ヶ所)で分類し協力体制の有無と相談先の有無を集計した結果、協力体制が確立されていると回答を得たのは、ウイルス検査専任担当者が 3 人未満である地衛研が 28%、ウイルス検査専任担当者が 3 人以上である地衛研が 31%、一方、相談先が記載されていたのは順に 69%と 86%であった(図 4)。

#### 8. 質問・意見

以下に、記載された意見・質問を記す。①PCR 陽性コントロールがないためウイルスを分与してほしい、②蚊などのサーベイランスは要員・予算から調査規模や期間が限定される、③検査法や蚊の分類について研修会を企画してほしい、④血清検査用 IgM-capture ELISA のキットが高価であり、単独で購入すると負担が大きい、⑤血清学的検査(推奨法)で使用する抗原、抗体の確保ができない。

#### 検疫所に対する調査

##### 1. WNV 感染症の検査

検疫所では、地衛研と異なり各施設で業務が分担されており、WNV 検査は横浜検疫所と神戸検疫所の 2 ヶ所で実施することが定められている。他 2 検疫所からも検査は実施可能との回答を得たが、以下では横浜検疫所と神戸検疫所について記述する。

双方ともに検査法は、細胞培養を用いる分離・RT-PCR・リアルタイム RT-PCR と IgM-capture ELISA が実施可能であったが、さらに、横浜検疫所においては中和試験が、神戸検疫所は LAMP 法の実施が可能である。基本的に各検査は推奨

法にしたがって実施している。

## 2. ヒト以外の検査実績

回答を得た全ての検疫所において、2007年1-12月において検査のために蚊を捕獲し、横浜・神戸検疫所のいずれかで検査が実施されていた。横浜検疫所では当該期間に800プールを対象に検査が実施されている。

## 3. ヒトのWNV検査実績

2002年以降に、横浜検疫所・神戸検疫所においてヒトのWNV検査は実施されていなかった。成田検疫所においては、19例のヒトのWNV検査が国立感染症研究所に依頼して実施されていた。

## 4. 協力体制と相談先

上述のように検査は横浜検疫所と神戸検疫所によって実施され、明確な協力体制が確立されている。

検査を行う2検疫所を含む11検疫所においては、WNV検査についての相談先として国立感染症研究所、横浜検疫所、神戸検疫所と考えられているが、1ヵ所からは相談先がないと回答を得た。

## D. 考察

今回用いた地方衛生研究所ネットワークのメーリングリストの利用と、電話での再依頼による調査方法はすべての地衛研に対して低予算、かつ効率よく質問票調査が実施できる方法であると思われる。電話による再依頼は、改めての調査依頼、質問票を添付したメールの受信確認や、受信できていない地衛研を特定することができた点において、非常に有効であったと考えられる。

回答が得られたすべての都道府県型地衛研

においてはWNV検査が実施できることが確認されたため、WNV侵入時の準備が実施されていると考えられる。一方で、市区型においては、検査不可能な地衛研がいくつか認められた。サックリングマウス脳内接種法、細胞培養を用いる分離や血清学的検査は、導入している地衛研が、ウイルス検査先任者数が比較的多い地衛研であるのに対して、RT-PCR法は多くの地衛研で実施可能と回答が得られ、比較的導入が容易であると思われる。したがって、地衛研が導入しやすいと思われるこれらの方法や、簡便性・迅速性を目的としてすでに一部で導入されているLAMP法に関して推奨法の提示や研修会の実施を行うことが、わが国におけるWNV検査体制の整備・強化につながるものと考えられる。また、地衛研で実施することが困難な検査法のうち、診断に有用であるIgM-capture ELISA法などについては、地域ブロック内の特定地衛研で担当することや、国立感染症研究所で実施することによって、各地衛研と国立感染症研究所における検査の役割を明確にするとより効率的に検査が実施できると思われる。また、地域ブロック内に検査を担当する地衛研を配置することによって、各地衛研における検査材料の購入費負担も軽減すること、すべての地衛研で相談先の地域ブロック内での確保も期待できる。

ウイルス検査専任担当者が少ない3人未満の地衛研においては、協力体制や相談先の確保の必要性は相対的に高いと思われるが、現時点においてはウイルス検査専任担当者3人未満である地衛研において、協力体制の構築と相談先を確保できていない地衛研の割合が多いことが認められた。全ての地衛研と検疫所が、少なくとも

も国立感染症研究所は検査に関する相談先と認識できるよう情報提供することは優先課題であると思われる。

わが国に WNV の侵入が確認されていない現時点において、WNV 感染症の検査体制を構築することは、各地衛研・各検疫所において優先的に取り組むことができる課題ではないかも知れない。一方で、平成 18 年の日本人における海外渡航者数は 1753 万人を越え、平成 12 年について多く(法務省,平成19年版「出入国管理」)、年々増加傾向にあり海外渡航者における WNV 感染症の輸入例に対する検査準備は構築しておく必要がある。

複数の都道府県にまたがって検査施設を持つ大規模なコマーシャルラボにおいても、WNV 感染症の検査を受け付けているところは多くはない(4 施設/12 施設で RT-PCR 法の実施が可能;群馬県衛生環境研究所独自の電話調査による)上に、検疫所における WNV 検査は、入国時の疑い例を対象にした検査と、ヒト以外の動物や媒介蚊等を対象にした WNV 侵入監視が主な目的であるため、WNV 感染症の検査にける地衛研の役割は非常に大きい。

全ての地衛研で検査体制の準備を行うことが

理想的ではあるが、地域と国立感染症研究所との明確な役割分担と、地域ブロック単位内でそれぞれの地衛研の不足分を補完することを目的とした協力体制を構築しておくことが現時点における現実的な手段であると思われる。

以上から、WNV 検査の準備状況には今後も複数の点で改善の余地が残されていると結論する。

#### E. 論文発表

#### F. 学会発表

鈴木智之,菅原民枝,大日康史,多田有希,岡部信彦渡航者: 渡航予定者におけるウエストナイル熱の認知状況, 48 回日本熱帯医学会・第 21 回日本国際保健医療学会合同学会,別府市,2007 年

#### G. 謝辞

本研究にご協力いただいた地方衛生研究所に深謝いたします。

本調査の実施に当たって、多くのご助言をいただきました国立感染症研究所ウイルス 1 部 2 室の高崎智彦先生に深謝いたします。

表 1. WNV 検査準備状況 (都道府県型・市区型)

n=71

| 地方衛生研究所      | 都道府県型<br>(43ヶ所) | 市区型<br>(28ヶ所) |
|--------------|-----------------|---------------|
| 検査実施可<br>(%) | 100             | 79            |

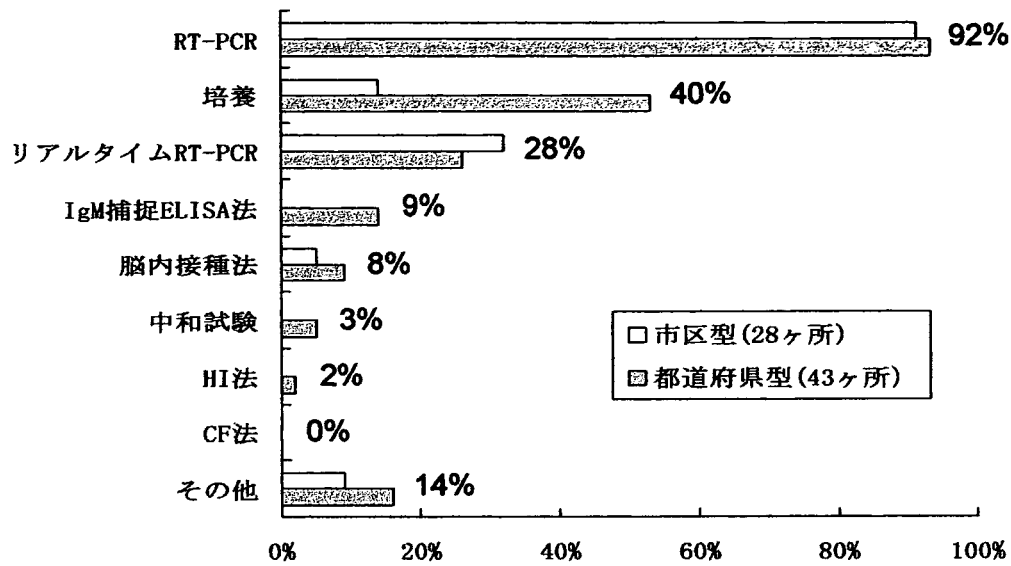


図1. 実施可能な検査法

検査が可能な65地衛研の回答を集計（複数回答可）

図中の値は、都道府県型・市区型のすべてにおける検査可能割合(%)を示す

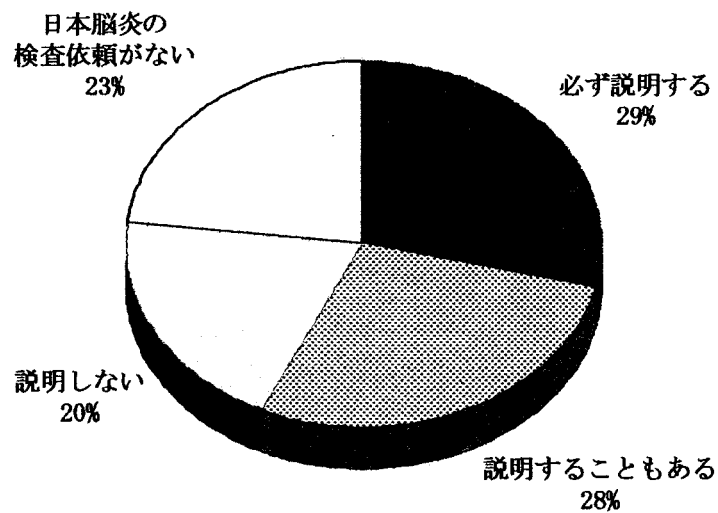


図2. 日本脳炎の検査依頼時のWNV感染症鑑別診断についての説明実施状況

検査が可能な65地衛研の回答を集計



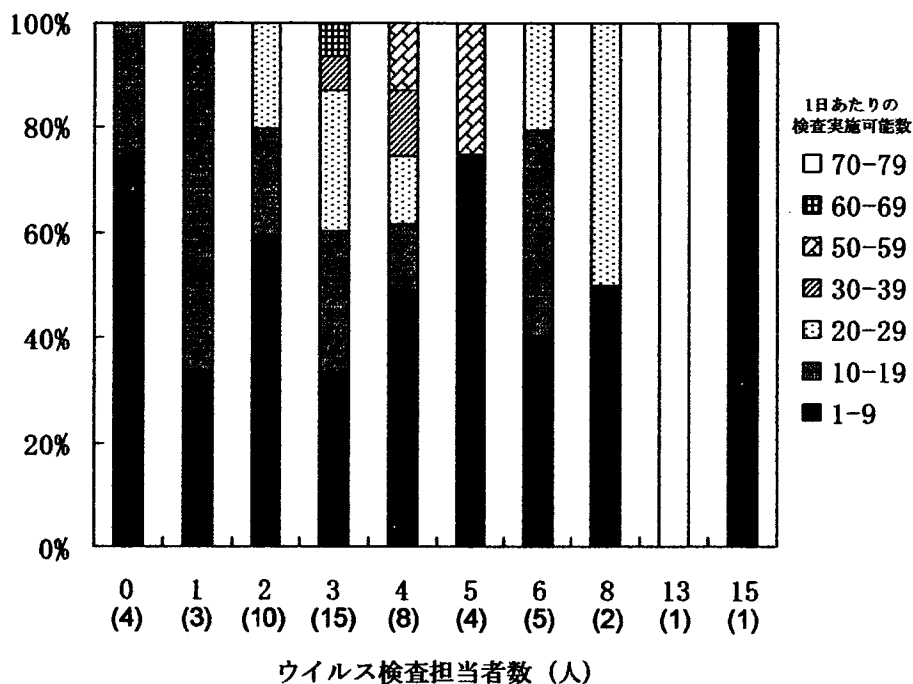


図3. 検査実施可能件数 ウイルス検査専任担当者数別 (n=53)

検査可能件数集計不可・未回答であった地衛研は集計対象外とした。下段のカッコ内数値は該地衛研数を示す。

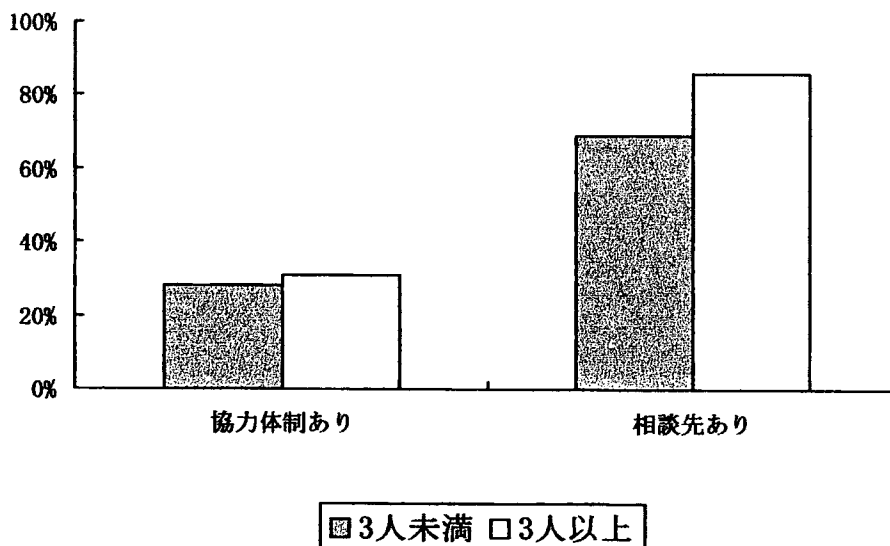


図4. WNV 検査協力体制構築と相談先確保の割合 (n=71)

各地衛研のウイルス検査専任担当者数を3人未満と3人以上で分類し集計した。

厚生労働科学研究費補助金  
(新興・再興感染症研究事業)

平成 19 年度分担研究報告書

急性脳炎患者におけるウエストナイルウイルス除外 サーベイランス

主任研究者 倉根一郎 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部室長)

協力研究者 林 昌宏 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部研究員)

高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第 1 部部長)

フラビウイルス属における異なるサブグループ間の交差中和抗体の存在はしばしば報告されている。特に日本脳炎不活化ワクチンの接種者に黄熱ワクチン (弱毒生ワクチン) を接種した場合、ウエストナイルウイルスに対して交差中和反応を示したという報告もあり、日本人のように日本脳炎ウイルスに対する免疫学的記憶がある場合、血清診断上交差反応が強く診断が困難になる可能性がある。そこで我々は日本脳炎症例および日本脳炎を疑われた急性脳炎症例について、日本脳炎およびウエストナイルウイルスに関する実験室診断を実施した。その結果、2005 年は 25 症例中 5 例が日本脳炎、2 例がウエストナイル熱であった。2006 年は 10 症例を検査し、4 例が日本脳炎でウエストナイル脳炎は無かった、2007 年は 13 症例を検査し、日本脳炎が 6 症例でウエストナイル脳炎は無かった。2006 年の日本脳炎症例では発病後、7 ヶ月にわたり抗体検査を実施し、抗ウエストナイル抗体および抗日本脳炎抗体の推移を検討した。その結果、本日本脳炎患者における抗体推移は、抗日本脳炎抗体に比べて、交叉性抗ウエストナイル抗体は早期に低下あるいは陰性化した。

A. 研究目的

フラビウイルス属における異なるサブグループ間の交差中和抗体の存在はしばしば報告されている。特に日本脳炎不活化ワクチンの接種者に黄熱ワクチン (弱毒生ワクチン) を接種した場合、ウエストナイルウイルスに対して交差中和反応を示したという報告もあり、日本人のように日本脳炎ウイルスに対する免疫学的記憶がある場合、血清診断上交差反応が強くなる可能性が高い。一方、米国における 2007 年の患者数は 3598 人、カナダの患者

数は 2353 人であり、依然として終息の兆しは見えない。そこで我々は、日本国内で日本脳炎あるいはウエストナイル脳炎が疑われた急性脳炎症例について、ウエストナイルウイルス感染の除外診断を実施し、わが国へのウエストナイルウイルスの侵入の有無を確認した。

B. 研究方法

日本国内で日本脳炎あるいはウエストナイル脳炎が疑われた急性脳炎症例について、主

として、血清学的に鑑別診断を実施した。病初期の検体がある場合は、病原体診断（遺伝子診断）を実施した。日本脳炎ウイルスに関して、IgM 捕捉 ELISA 法、IgG ELISA 法および Beijing1 株を用いたフォーカス減少法により中和抗体価を測定した。ウエストナイルウイルスに関しては NY99-6922 株を用いたフォーカス減少法を用いた。ウエストナイルウイルス IgM 捕捉 ELISA、IgG ELISA は米国 Focus 社のキットを使用した。日本脳炎 IgM 捕捉 ELISA および日本脳炎 IgG ELISA は、in house のキットを用いた。

### C. 研究結果

2005 年は、ウエストナイル熱・脳炎を疑った検査依頼が 13 件、日本脳炎の検査依頼が 12 件の計 25 件があった。そのうち、日本脳炎が 5 例、ウエストナイル熱が 2 件であった。2006 年は、ウエストナイル熱・脳炎症例はなく、日本脳炎が 4 例であった。2007 年もウエストナイル熱・脳炎症例はなく、日本脳炎が 6 例であった。2006 年の日本脳炎症例のなかの 1 例は、発病後 7 ヶ月に渡って経時的に抗体価を測定した。急性期の検体（血清、髄液）は得られなかった。最初の血清は、発病後 21 日めであった。この血清中の IgM 抗体は、日本脳炎ウイルス（JEV）に対して Index20 以上、ウエストナイルウイルス（WNV）に対しては Index=3.04 とどちらも陽性であったが、日本脳炎に有意に高かった。また、中和抗体は、日本脳炎に対して 2560 倍（陽性）、ウエストナイルウイルスに対して 80 倍（陽性）であった。IgM 抗体は、発病後 4 ヶ月では陰性となったが、抗 WNV 中和抗体は 4 ヶ月目まで 80 倍を維持し、5 ヶ月目に 40 倍に低下したが、7 ヶ月後でも 40 倍を維持した。一方抗

JEV 中和抗体は、7 ヶ月後も 2560 倍を維持した。また、IgG 抗体に関しては、発病後 21 日目、28 日目の時点で抗 JEV IgG 抗体は陽性であったが、抗 WNV IgG 抗体は陰性であった。その後、抗 JEV IgG 抗体はさらに上昇し、抗 WNV IgG 抗体も陽性となった。しかし、抗 WNV IgG 抗体は、84 日目をピークに減少傾向を示した。抗 JEV IgG 抗体は 7 ヶ月後まで上昇傾向を示した。

### D. 考 察

2005 年は 25 症例中 5 例が日本脳炎、2 例がウエストナイル熱であった。2006 年は 10 症例を検査し、4 例が日本脳炎でウエストナイル脳炎は無かった、2007 年は 13 症例を検査し、日本脳炎が 6 症例でウエストナイル脳炎は無かった。いずれの症例も日本脳炎とウエストナイル熱・脳炎の血清学的鑑別診断は容易であった。発病後 7 ヶ月間にわたり血清を得られた日本脳炎症例では、WNV に対する交叉抗体は、中和抗体および IgM 抗体に関しては、4 ないし 5 ヶ月以後低下あるいは陰性化したことから、発病早期に血清学的鑑別診断が困難であった場合も、発病後 5 ヶ月以降の血清により、確認検査を実施することで鑑別が可能であることが示唆された。また、IgG 抗体は、発病後 21 日目、28 日目の時点で抗 JEV IgG 抗体は陽性であったが、抗 WNV IgG 抗体は陰性であったことから、JEV と WNV 間において交叉反応の強い IgG ELISA も鑑別診断に有用である場合があり、実施すべき検査であると考えられる。米国における 2007 年の患者数は 3598 人、カナダの患者数は 2353 人であり、依然として終息の兆しは見えない状況であり、今後も日本脳炎患者あるいは日本

脳炎を疑われる患者において、ウエストナイル脳炎は、依然として重要な鑑別疾患であり、今後も除外診断が必要である。

#### E. 結 論

過去 3 年間に、日本脳炎患者 15 症例、ウエストナイル熱患者 2 例について鑑別診断を実施したが、IgM 捕捉 ELISA および中和試験を実施することで、鑑別診断が可能であった。日本脳炎患者の 1 例は発病後、7 ヶ月後まで検体（血清）を得ることができた。日本脳炎に対して非常に高い抗体を示し続けたにもかかわらず、ウエストナイルウイルスに対しては、発病 4 ヶ月後から低下を認めた。今後も日本脳炎患者あるいは日本脳炎を疑われる患者において、ウエストナイル脳炎は、依然として重要な鑑別疾患であり、今後も除外診断が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I. Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine. *Virology* 2008 Jan 21; [Epub ahead of print]

Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I.,

Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection*, 12, 1-4, 2007

Nerome, R., Tajima, S., Takasaki, T., Yoshida, T., Kotaki, A., Lim, C.K., Ito, M., Sugiyama, A., Yamauchi, A., Yano, T., Kameyama, T., Morishita, I., Kuwayama, M., Ogawa, T., Sahara, K., Ikegaya, A., Kanda, M., Hosoya, Y., Itokazu, K., Onishi, H., Chiya, S., Yoshida, Y., Tabei, Y., Katsuki, K., Tabata, K., Harada, S., Kurane, I. Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004. *J. Gen. Virol.* 2007. 88(Pt 10):2762-8.

Fumiue Harada, Chang Kweng Lim, Mikako Ito, Hirotaka Takagi, Akira Kotaki, Reiko Nerome, Shigeru Tajima, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki  
Cross Neutralizing Antibodies to West Nile Virus in Japanese Dengue Fever Patients in Japan. *J. Virol. Method.* (in submission).

##### 2. 学会発表

[海外]

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Ishikawa, T., Kurane, I. Mouse Antibody Response to novel Vero-Cell-derived Inactivated Human West Nile Vaccine for Immunization against West Nile virus. 第 41 回日米医学ウイルス性疾患専門部会 2007 年 7 月

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. Role of Fc-gamma II receptor in antibody dependant enhancement of dengue viral infection. 第 3 回デングウイルス研究ネットワーク会議 2007 年 8 月

[国内]

貫井陽子、田島 茂、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルス Genotype shift の生物学的意義、第 81 回日本感染症学会 2007 年 4 月

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二：ブタ流産予防を目的とした日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果、第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2007 年 5 月

高崎智彦、林 昌宏、小滝 徹、水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、渡邊香奈子、倉根一郎：チクングニヤ熱輸入 2 症例と実験室診断法、第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2007 年 5 月

貫井陽子、田島 茂、根路銘令子、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定、第 12 回日本神経感染症学会 2007 年 10 月

モイ メンリン、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：デング出血熱における Fc  $\gamma$  IIA (CD32) 受容体を介した抗体依存性感染増強 (ADE) メカニズムの解析、第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月

貫井陽子、田島 茂、根路銘令子、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定、第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、小西英二：ブタにおける日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合針無投与方法の有用性評価、第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月

林 昌宏、高崎智彦、小滝 徹、モイ メンリン、伊藤美佳子、倉根一郎：チクングニヤ熱輸入症例患者血清より日本で初めて分離されたチクングニヤウイルスの性状解析、第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月

表1 日本脳炎、ウエストナイル脳炎 検査実績 (2005-2007年)

|       | 検査総数 | 日本脳炎 | ウエストナイル熱・脳炎 |
|-------|------|------|-------------|
| 2005年 | 25   | 5    | 2*          |
| 2006年 | 10   | 4    | 0           |
| 2007年 | 13   | 6    | 0           |

\*ウエストナイル脳炎ではなくウエストナイル熱であった。

図1. 日脳患者における中和抗体経時変化  
(抗JEV、抗WNV) JE06-01Kouchi

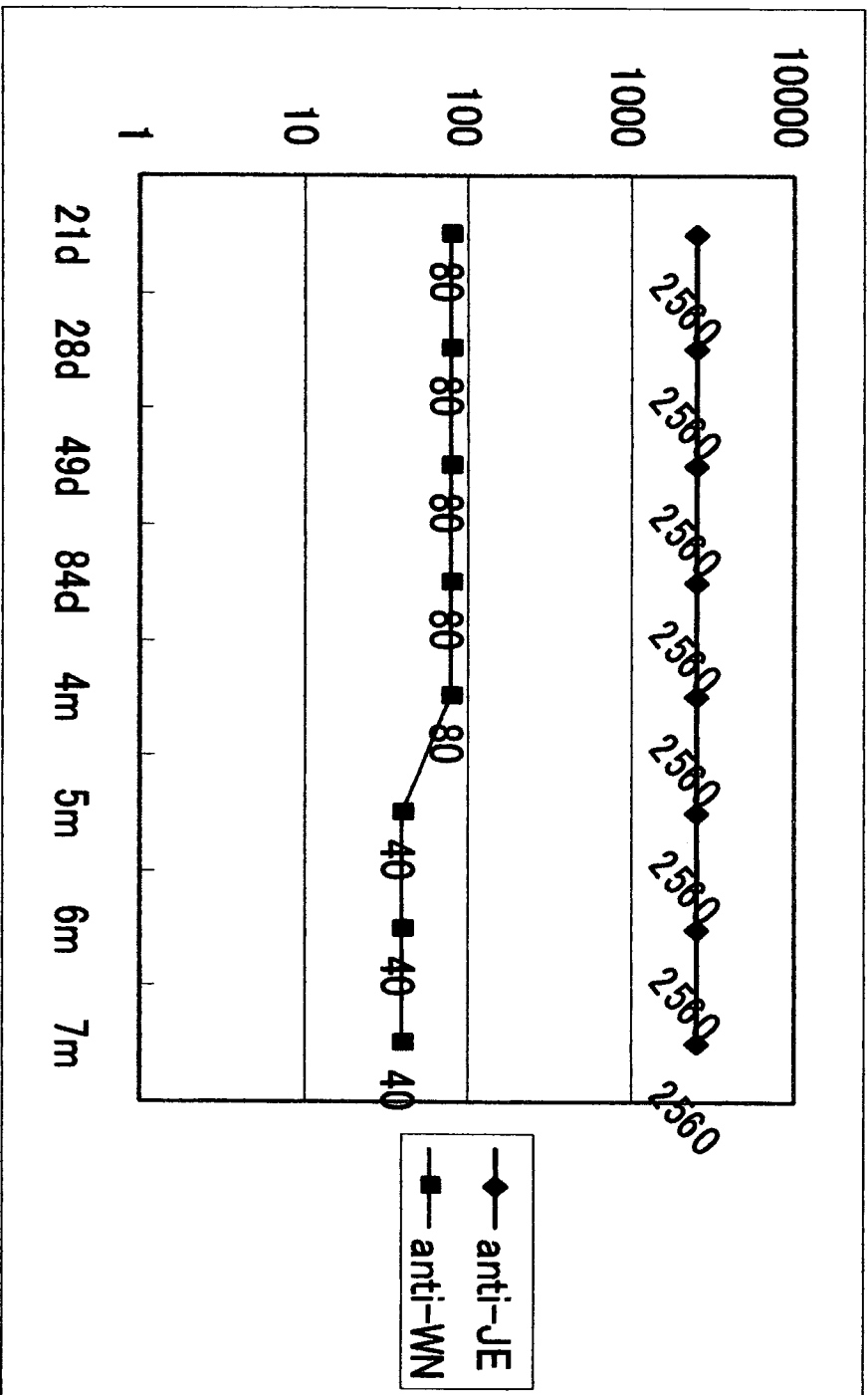


図2. 日脳患者におけるIgM抗体経時変化  
(抗JEV、抗WNV) JE06-01Kouchi

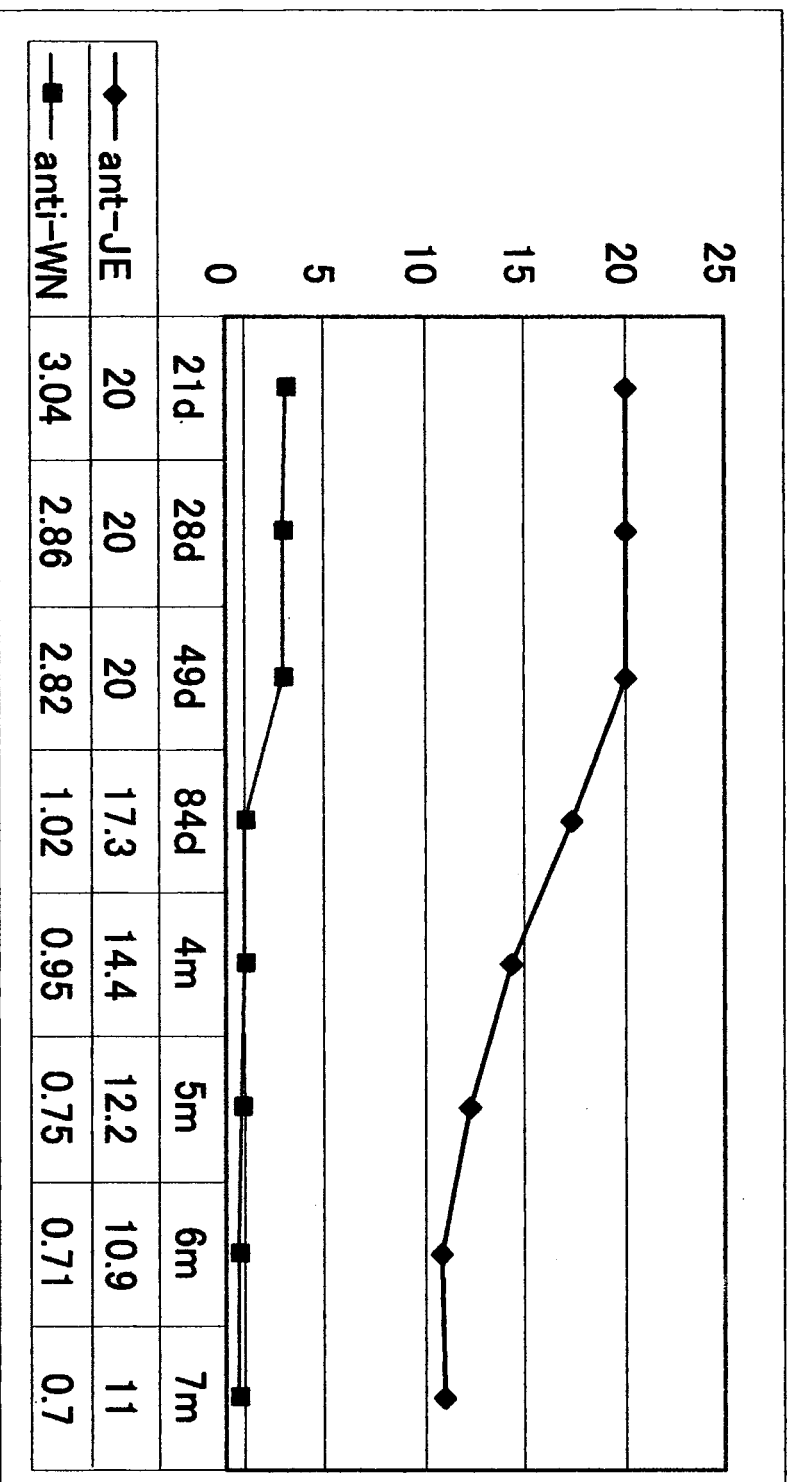
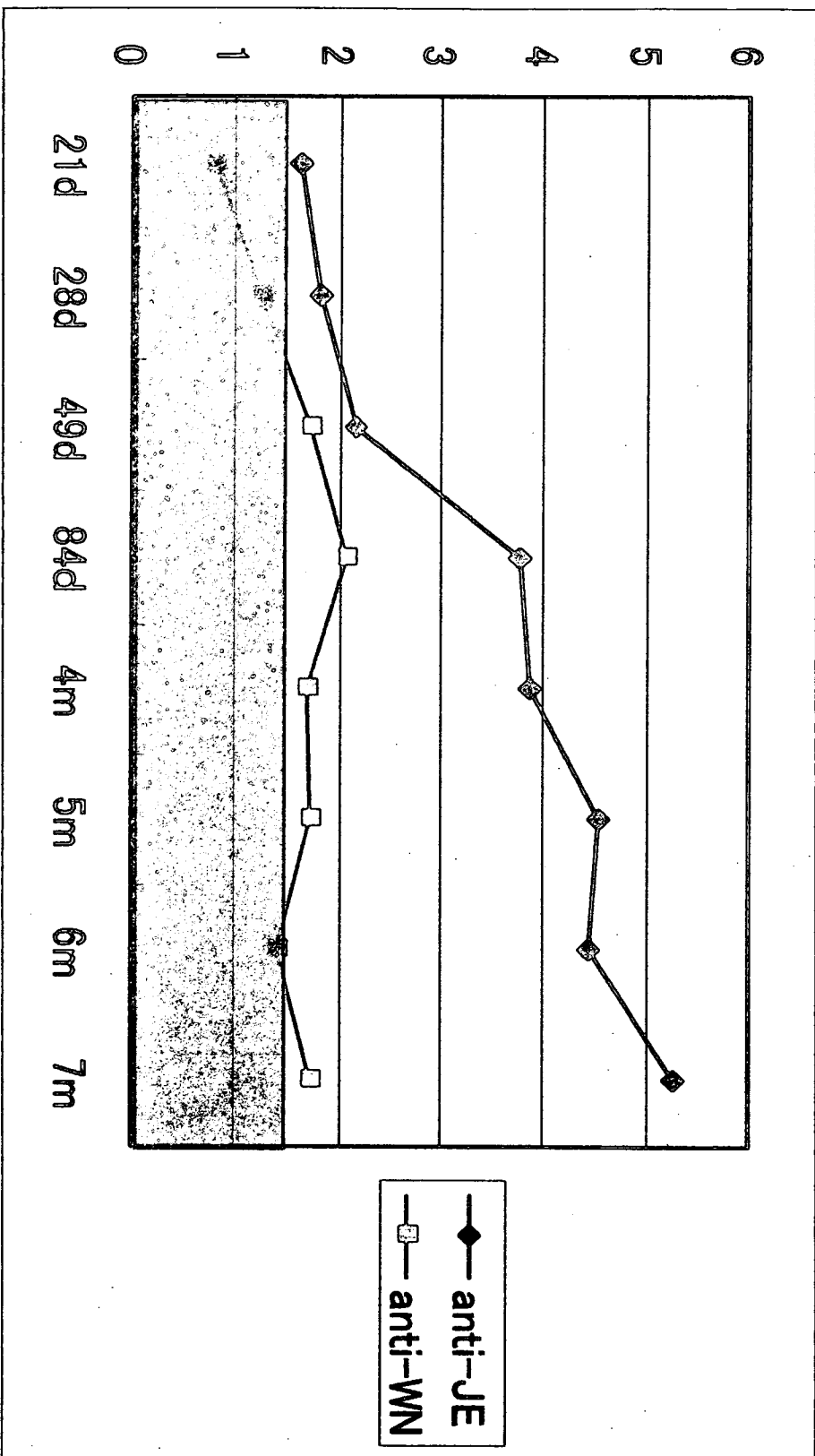




図3. 目脳患者におけるIgG抗体経時変化  
(抗JEV、抗WNV) JE06-01Kouchi



厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)  
分担研究報告

本邦産ヤブカ属蚊類から発見された新規フラビウイルスの遺伝子構造解析

分担研究者 小林 睦生 (国立感染症研究所・昆虫医科学部 部長)  
協力研究者 伊澤 晴彦 (同・昆虫医科学部 主任研究官)  
星野 啓太 (同・昆虫医科学部 流動研究員)  
佐々木年則 (同・昆虫医科学部 主任研究官)  
津田 良夫 (同・昆虫医科学部 室長)  
澤邊 京子 (同・昆虫医科学部 室長)

**研究要旨:** 本邦における野外捕集蚊からフラビウイルスの検出および分離を実施した結果、ヒトスジシマカをはじめとするヤブカ属蚊類から新規フラビウイルスを見出し、*Aedes flavivirus* (AEFV) と命名した。AEFV は、得られた NS5 遺伝子の部分配列情報から、本邦産イエカ属蚊類から分離された *Culex flavivirus* (CXFV) を含む昆虫フラビウイルスのグループに属することが予想された。更なる性状を決定するために、千葉県成田市産ヒトスジシマカから分離された AEFV の 1 株についてゲノムの全ヌクレオチド配列決定を試みた。その結果、AEFV は CXFV と系統学的に明確に区別され、ヤブカ属蚊類から分離されている昆虫フラビウイルスに近縁の新規フラビウイルスであることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

フラビウイルス属ウイルスは、ヒトに対する病原性を有するウイルスを多く含んでおり、そのほとんどは節足動物により媒介され、とくに蚊とのかかわりが深いことが知られている。本邦生息蚊については、イエカ属蚊類が日本脳炎ウイルスの主要媒介蚊として認識されているが、イエカ属およびヤブカ属蚊類各々の主要蚊種であるアカイエカおよびヒトスジシマカについては、ウエストナイルウイルスの媒介能を有することが証明されており、ウエストナイルウイルスの国内侵入の監視において特に重要視されるべき蚊種である。

一方、国内 7 地点から採集したアカイエカには、蚊に対してのみ宿主特異性を有する昆虫フラビウイルスに分類される *Culex flavivirus* (CXFV) の存在が確認されている。昆虫フラビウイルスとは、近年明らかとなってきた蚊においてのみ分離されるフラビウイルスのグループであり、現在までにアフリカ、プエルト・リコ産ヤブカ属蚊類から Cell fusing agent (CFA)、Kamiti river virus (KRV) という 2 種類が報告されている。このようなウエストナイルウイルス媒介能を有する蚊種に存在する同属ウイルスの性状の把握は、ウエスト

ナイルウイルスを含むフラビウイルス検出、分離などの検査作業の向上に極めて重要であると思われる。今回、本邦産ヤブカ属蚊類から初めて見出された昆虫フラビウイルスについて性状解析を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 顕微鏡観察

細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE) は、ヒトスジシマカ由来細胞系 C6/36 を用いてウイルス接種後 7 日まで位相差顕微鏡で観察を行った。

### 2. ヌクレオチド配列決定

ウイルス RNA は、ウイルスストック (3 回継代培養上清) から RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) を用いて抽出した。E、NS3 および NS5 のそれぞれの領域にプライマーを設計し、TaKaRa RNA LA PCR KIT ver. 1.1 (TAKARA BIO, Shiga, Japan) を用いて Long-PCR によるウイルスゲノムの大部分を包含する断片の増幅を行った。反応後産物は精製した後、サイクルシーケンシング法でヌクレオチド配列決定 (ABI PRISM310, 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA を使用) を行った。さらに得られた配列情報から E および NS5 の各領域に特異的プライマーを設計し、GeneRacer Kit (Invitrogen Corp.) を用いて RACE 法によるウイルスゲノムの 5' および 3' 末端部の増幅を試み、上記と同様にヌクレオチド配列決定を行った。使用プライマーおよび配列決定の概念を図 1 に示した。

### 3. 遺伝子構造解析および系統学的解析

決定されたゲノム配列情報は GENETYX

ソフトウェア (Genetyx Corp., Tokyo, Japan) および Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を利用して解析した。ヌクレオチドあるいはアミノ酸配列は、各解析領域について、Clustal W による alignment を行い、MEGA program ver. 3.1 (Kumar et al., 2004) を用いて、neighbor-joining 法による系統学的な推定を試みた。

## C. 結果

AEFV は蚊由来細胞系に接種した場合にのみ RT-PCR により検出が可能であり、CPE は弱い傾向にあり (図 2)、出現しない場合も見られた。決定された AEFV ゲノムは 11,066 ヌクレオチドで構成され、3,341 アミノ酸から成る 1 つのポリプロテインをコードした ORF を含んでおり、さらに 5' および 3' 末端部にそれぞれ 96、945 ヌクレオチドの非翻訳領域を有するものであった (図 1)。またアミノ酸配列情報から AEFV を構成する各種タンパクを生成するのに必要である開裂部位が予測され、そのほとんどがそれぞれの開裂条件に適合するものであり、3 つの構成タンパクおよび 7 つの非構成タンパクの生じうることが確認できた (表 1)。AEFV のフラビウイルスにおける系統関係は、昆虫フラビウイルス (*Culex flavivirus*: CXFV、Cell fusing agent: CFA、Kamiti river virus: KRV)、本邦における既分離フラビウイルス (Japanese encephalitis virus: JEV、Yokose virus: YOKV、Tick borne encephalitis virus: TBEV、Apoi virus: APOIV) および Dengue type 2 virus (DEN2V) を比較対象として、非構成タンパク NS5 について解析を行った。その結果、AEFV は CXFV、CFA、KRV と同じ昆虫フラ

ピウウイルスの clade に配置されることが推定された(図 3)。さらにこれまでに分離された AEFV4 株について、NS5 領域の部分ヌクレオチド配列に基づき昆虫フラビウイルスにおける系統関係を推定したところ、すべて CXFV、CFA、KRV とは離れたひとつの clade に包含され、ヤブカ属由来の CFA、KRV とより近縁であることが明らかとなった(図 4)。

#### D. 考察

本邦産ヤブカ属蚊類から発見された新規フラビウイルス AEFV は、今回、その 1 株についてゲノムの全ヌクレオチド配列情報が決定された結果、遺伝子構造レベルにおいてフラビウイルスの基本的特徴を有することを確認できた。すなわち、AEFV はフラビウイルスの構成タンパク、複製に関わる酵素などの保存された領域、それらの生成に必要な開裂部位、さらに非翻訳領域における 2 次構造などの特徴を有することが確認された。したがって、AEFV は既知のフラビウイルスに普遍的な複製様式等を保持することが予測された。しかしながら、AEFV はフラビウイルス属ウイルスの中にあつて未分類とされていた CFA、KRV、CXFV と系統学的に近縁であり、さらに蚊由来細胞でのみ分離され、弱い CPE を示すなど、蚊への特異性が高いという特徴において、これらのウイルスとの共通点を多く有するものであった。故に AEFV はフラビウイルスのなかで明らかに CFA、KRV、CXFV と同じ分類群に包含されるものであり、共に近年提唱されている昆虫フラビウイルスという新たなグループを形成するものと考えられた。また、解析に用いた AEFV の 4 分離株全てが 1 つの clade を形成し、ヤ

ブカ属蚊類由来の CFA、KRV と近縁であったことから、AEFV は CXFV とは異なり、本邦産ヤブカ属蚊類に特異性の高いことが予想された。しかしながら、AEFV および CXFV の蚊における伝播様式等を含む感染動態については、現在のところ不明な点が多い状況である。AEFV の由来蚊種ヒトスジシマカは、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルスをはじめ、いくつかの他科病原性ウイルスについても媒介可能であることが知られていることから、本種における AEFV の潜在的保有の影響を今後精査してゆく必要があると思われる。さらに、今回の AEFV の分子レベルにおける性状解析は、ウエストナイルウイルスの国内侵入の監視を実施する際に、蚊からのウイルス検出における感度の向上、誤同定の回避に貢献する有益な情報となりうるものと考えられた。

#### E. 結論

本研究により、ウエストナイルウイルス媒介能を有する蚊種である本邦産ヒトスジシマカから新規フラビウイルスを発見し、*Aedes flavivirus* (AEFV) と命名した。AEFV は、遺伝子構造解析からフラビウイルスの特徴を有することが確認され、系統学的解析から昆虫フラビウイルスのグループに属するヤブカ属蚊類に特異性の高いものであることが示唆された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表:

- 1) Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T.,