

200726022A

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

(H18-新興-一般-009)

平成19年度総括・分担研究報告書

平成20年3月

主任研究者 小林睦生

国立感染症研究所 昆虫医科学部

## 目 次

### I. 総括研究報告書

#### 節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

小林陸生	1
------	---

### II. 分担および協力研究報告書

1. 2007年国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析 澤邊京子他	29
2. 養豚場周辺のコガタアカイエカの動静と養豚場内の日本脳炎ウイルス保有蚊の 活動状況に関する研究 第2報 水田英生他	39
3. 自然環境が感染症媒介蚊の発生に与える影響に関する研究 第2報 水田英生他	51
4. 都市環境におけるアカイエカの飛翔距離 津田良夫他	61
5. 野外における吸血蚊の採集と潜伏場所に関する生態的調査 津田良夫他	67
6. トラップの設置場所による蚊捕獲数の違いに関する景観生態学的分析と考察 津田良夫他	71
7. 沖縄県での日本脳炎媒介蚊とシマカ類に関する調査研究 當間孝子他	77
8. 横浜市における蚊類成虫の生息状況調査 小曾根恵子他	87
9. ヒトスジシマカの産卵習性 小曾根恵子他	95
10. 千葉県におけるカ類の生息実態調査と幼虫の薬剤感受性 藤曲正登他	101
11. 西宮市での蚊防除の評価 吉田政弘他	111
12. 疾病媒介蚊監視システムの構築に向けてー西宮市における蚊発生状況のGIS による解析 二瓶直子他	123
13. 西宮市における媒介蚊の発生状況調査および防除費用の算定 小林陸生他	133
14. ジフルベンズロン製剤による雨水枡対策の検討 - ライトトラップによる効果の 確認 - 小菅皇夫他	149
15. 戸別住宅において防蚊対策を行った場合の蚊成虫の捕集状況 渡辺 護他	157

16.	中越沖地震後に多発生が懸念された衛生害虫などの現地調査 渡辺 護他	167
17.	自治体を対象とした衛生動物への対応の現状に関するアンケート調査 武藤敦彦他	177
18.	銅ファイバーを用いた蚊幼虫駆除に関する研究 (第2報) 武藤敦彦他	199
19.	アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性 富田隆史他	209
20.	アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性、およびタイ国のデング熱媒介蚊調査に 関する研究 江下優樹他	215
21.	デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子検出 高崎智彦他	223
22.	デングウイルス感染の抗体検査に関する研究 : 台湾でのデング感染診断に おける IgA 抗体捕捉 ELISA の評価 名和 優他	231
23.	日本脳炎の病原性を規定するウイルス因子の同定 高崎智彦他	237
24.	デング 1 型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製におよぼす影響 倉根一郎他	243
25.	デング 4 価 DNA ワクチンのドーズ低減とデング蛋白ワクチンの製造法に 関する研究 小西英二	251
26.	日本脳炎ウイルスの吸着と侵入に関する研究 名和 優他	261
27.	フィリピンの自然災害被災地におけるマラリア媒介蚊の分布 高木正洋他	265
28.	動物モデルを用いたマラリア重症化機構に関する研究-特に脳性マラリア等 重症マラリアの発症機序の解明および重症化の指標となるバイオマーカーの 探索 松本芳嗣	269
29.	薬剤耐性マラリアの流行拡散に関する疫学研究および海外の高リスク地域の 評価に関する研究 小林 潤他	275
30.	マラリア重症患者の管理および治療体制に関する研究 狩野繁之他	281

III.	研究成果の刊行に関する一覧表	289
------	----------------	-----

節足動物媒介感染症の効果的な防除法等の対策研究

主任研究者 小林 睦生 国立感染症研究所昆虫医科学部

研究要旨

2005年から2007年にかけて媒介蚊から分離された日本脳炎ウイルス(JEV)の遺伝子解析において、分離株全てが Genotype I に属し、ウイルスゲノムの3'非翻訳領域の可変領域に特徴的な配列欠損が認められた。また、長崎県の分離株ではこれまでに報告のない新たな欠損部位が見つかった。一方、兵庫県の豚舎で捕集されるコガタアカイエカからの JEV の分離に関して、2006年は多数の感染蚊が確認されたにもかかわらず、2007年は全くウイルスを検出することが出来なかった。JEV が豚舎周辺の環境で越冬する可能性は低いことが示唆された。また、昨年のコガタアカイエカの捕集数から、周辺地区での媒介蚊の発生数と豚舎での捕集数とに相関関係は見られなかった。

トラップによる蚊の捕集に関して、その捕集数が周囲の環境とどのように関係するか景観生態学的解析を行い、ある離島ではネッタイエカの捕集は並木の方角に、ヌマカ、イナトミシオカ、アカイエカ種群は湿地の構成比率や水域の構成比率等に関係することが明らかとなった。沖縄での日本脳炎媒介蚊の調査において、田芋畑でコガタアカイエカが捕集蚊の中で優占種であることが明らかとなり、少数の *Culex vishuui* (ウシニイエカ) も人家に飛来していることが明らかとなった。横浜市での媒介蚊発生状況調査で6属10種類の蚊が採集され、アカイエカとチカイエカとを同定した結果、一部ではチカイエカが60%以上を占めた。ヒトスジシマカの産卵習性に関する調査で、地上0mのオビトラップの産卵率が高かったが、地上8mのトラップにも産卵が認められた。千葉県での調査ではコガタアカイエカの捕獲数のピークが8-9月の高温傾向を反映して9月に表れた。

兵庫県西宮市ならびに社団法人大阪府 PCO 協会員の全面的な協力を得て、西宮浜（人工島で総面積 2.59 k m<sup>2</sup>）全域において事前に発生源の分布マップを作成し、薬剤散布を実施した。チャブ BT 錠、スミラブ発泡錠ミニ、デミリン発泡錠の IGR 剤を使用し、その効果を判定するために散布後1週間より CDC 型ライトトラップを用いて効果判定をおこなった。その結果、人工島全体の成虫発生を抑えたにも関わらず、トラップでの媒介蚊捕集数は7月は特に薬剤処理前と大きな差が見られなかった。ウエストナイル熱等蚊媒介性感染症侵入時の効果的防除対策を立案し迅速に対応するために地理情報システム GIS を導入し、西宮市で実施している蚊生息調査を地区別、調査区別、地目別に解析し、全市的に媒介蚊の発生状況の監視体制の確立を行った。西宮市の公園 52 ヶ所、公共施設 76 ヶ所、道路側溝の雨水枡、一戸建て住宅 420 戸、マンション 43 棟、市営住宅 236 ヶ所の幼虫発生状況を調

査し、雨水枡に発生している蚊の種類は公園ではアカイエカ種群の比率が高く、一戸建住宅、公共施設、マンションではヒトスジシマカの比率が明らかに高かった。幼虫防除に必要な費用を昆虫発育制御剤を処理することで計算したところ、5月から9月の間に月1回の薬剤投入で、市街地面積を約57km<sup>2</sup>として計算した場合、西宮市において年間約5千5百万円が必要との試算結果を得た。横浜市において、ジフルベンズロン製剤を用いて雨水枡中の幼虫・蛹の個体数を減少させ、ライトトラップによって成虫の動態を観察した。その結果、幼虫・蛹数と成虫の捕獲数には関連があり、雨水枡に対する薬剤処理が住宅地におけるアカイエカ種群やヒトスジシマカなどの媒介蚊対策に有効であることが確認された。富山市内のある限定された地区で成虫駆除を主体とした防蚊対策を行い、ドライアイス吸引トラップにより成虫の捕集状況を観察した。都市周縁の団地住宅では、2004～6年の成虫捕獲数に比べ、アカイエカが明らかに減少したが、ヒトスジシマカは減少しなかった。防蚊対策を行った住宅と、防蚊対策を行わなかった住宅調査定点とを比較すると、防蚊対策を行わなかった定点でも、2007年はアカイエカもしくはヒトスジシマカが減少した定点があり、防蚊対策と蚊捕集数の減少が直接関係していない傾向が認められた。自治体の感染症媒介蚊を始めとした種々の衛生動物に対する取り組み状況を全都道府県、特別区及び市町村に対し、住民からの相談内容、防除体制・予算、媒介蚊等の調査状況、薬剤の備蓄、散布機器の保有状況、予算、担当者数など28項目についてアンケート調査した。疾病媒介蚊に対する緊急時対応体制の構築、緊急時の対応マニュアルが存在しない自治体が多いこと、薬剤防除を行っている自治体が少ないこと、薬剤の備蓄を行っている自治体は半数以下であること、薬剤散布機器を保有している自治体は半数程度であること、衛生動物対策関連の予算や担当者数は減少傾向にあることなどが明らかとなった。アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性を接種法および経口感染実験で調べた。力価の高いウイルス液を接種した場合は、4株ともほぼ同程度のウイルス増殖を示したが、力価の低いウイルス液を接種した場合は、ワクチン株と36～510倍ほどの差が3株で認められた。、経口感染後14日経過した蚊のウイルス力価は、接種法よりも10倍から100倍ほど何れの株でも低い値であった。経口感染させたワクチン株とJath16株が同程度の増殖をしたのに対し、JaGar01株は2倍ほど、三重株は10倍ほどの高いウイルス力価が認められた。タイ国の Dengue 熱患者宅で採集したネッタシマカから Dengue ウイルス 2 型を分離し、ウイルス陽性蚊を検出した家で採集した蚊総数の 5～8%がウイルス陽性蚊であった。Dengue ウイルス検出は、急性期の血液から検出されるが、出血傾向の強い Dengue 出血熱患者からの採血が困難な場合も多いため、尿や唾液からのウイルス遺伝子の検出を 33 症例に関して試みた。その結果、12 症例の尿、唾液から遺伝子を検出し、5 症例に関して遺伝子解析にも成功した。台湾・高雄市の Dengue 患者（PCR 陽性）と Dengue 疑い患者（IgM 抗体陽性）の血清を用いて IgA 補足 ELISA 法での IgA 抗体検出を行った。PCR 陽性 34 例では、18 例が IgA 抗体陽性となった。IgA 抗体が検出されなかった例では 6 病日以前の検体がほとんどであった。判定保留 1 例を含む PCR 陰性 8 例では、ペア血清を解析できた 6 例が IgA 抗体陽性であり、残りの 1 例は IgM 抗体のみ陽

性であった。また、IgM 抗体陽性のデング疑い 39 例では、33 例が IgA 抗体陽性となった。日本脳炎ウイルス (JEV) は 1990 年代初頭にゲノタイプが 3 型から 1 型へと変化した。これまでの検討で、3 型の Beijing-1 株と比し 1 型の Mie41 株は Vero 細胞上のプラークサイズが大きい一方で、病原性が低いことが明らかとなっている。そこで今回 JEV の増殖性及び病原性を規定するウイルス因子の同定を試み、JEV の E 蛋白質がウイルスの増殖性や病原性に関与すること、Beijing-1 株と Mie41 株における E 蛋白質の配列を比較したところ、8 アミノ酸の相違が認められた。さらに領域を絞り込むため点変異体を作成し解析を行ったところ 123 番目のアミノ酸が JEV の増殖性、病原性を規定する主要な因子であることが明らかとなった。デング 1 型ウイルス (DENV-1) の増殖における NS1 糖鎖付加の意義について解析した。DENV-1 感染性分子クローンを用いて、糖鎖付加部位である 130 番目と 207 番目の Asn を、一方および両方を Ala に置換したクローンを作製し、各クローンより合成したゲノム RNA を各種培養細胞に導入しウイルス産生を試みたが 130Ala を有するゲノム RNA (130Ala RNA) からのウイルスの増殖は確認できなかった。野生型あるいは 130Ala NS1 発現プラスミドを導入した細胞に野生型 DENV-1 を接種し、各細胞から産生される感染性ウイルス量を比較したところ、NS1 非発現および野生型発現細胞に比べ 130Ala NS1 発現細胞からのウイルス産生は著しく低下していた。DENV-1 NS1 の糖鎖付加部位である 130 番目の Asn がウイルス増殖に重要な役割を果たすことが明らかとなった。ウエストナイル DNA ワクチン (pcWNME) と日本脳炎 DNA ワクチン (pNJEME) を用いて、低ドーズにおける中和抗体誘導能を調べた。その結果、市販のウエストナイル不活化ワクチンの 1/10 ドーズを混合した時、0.1 µg の pcWNME は、1 回の接種でマウスに中和抗体を誘導し大幅なドーズ低減が可能であることを示す。また、市販の日本脳炎不活化ワクチンの 1/100 ドーズを混合した時、1 µg の pNJEME は、1-2 回の接種でブタに中和抗体を誘導した。これらの結果は、大動物においても投与法の工夫により DNA ワクチンのドーズを格段に低減できることを示す。フィリピン数州のマラリア流行地で採集されたハマダラカ成虫の外部形態による種同定を行い、被災地におけるマラリア感染リスクを媒介蚊の種類構成から評価した。11 種のハマダラカが同定され、この中にフィリピンでの媒介蚊としてよく知られる *An. flavirostris* と *An. litoraris*、東南アジアからインド、スリランカにかけた広い地域で媒介に与っている *An. subpictus* が含まれていた。3 種の主な生息環境は、丘陵地 (*An. flavirostris*)、臨海地 (*An. litoraris*)、その両方 (*An. subpictus*) で、自然災害の影響を大きく被る自然環境に発生していることが示唆された。マラリア重症化の予知および重症マラリアの治療技術の開発のためにバイオマーカーの探索は必須であり、マラリア病態形成機序の解明のため有用な情報を提供できるものと考えられる。マラリア重症化のバイオマーカーとして尿中肝臓型脂肪酸結合タンパク (L-FABP) に注目して検討を行い、ヒト L-FABP (hL-FABP) 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、マラリア感染の進行に伴い尿中 hL-FABP 排出量が増加することを示した。マラリア感染時における尿中 L-FABP の挙動は熱帯熱マラリアにおける様々な合併症の発症機序の解明にも有用な情報を提供す

ると考えられる。ACT (Artemisinin-derivatives Combination Therapy) の普及がマラリア対策に重要であり、ACT が低いカバー率であると、薬剤耐性マラリアの出現を助長してしまうおそれがあることがわかってきた。タイ国および周辺諸国においては三日熱マラリア対策が重要になっており、再発についてその疫学的要因を明らかにするため調査を始めたが、現時点での再発率は6%未満であり要因の解析のためには来年度の研究継続が必要となっている。マラリア予防ガイドラインの改訂とその評価研究、ACT の有用性に関する臨床研究、さらに輸入マラリア患者の臨床管理に関する研究を行った。予防ガイドラインの改定の作業では、実施基準の項目に「渡航期間 7 日以上」という「絶対的適応」の必要条件を追加した。さらに、ACT は、マヒドン大学の三日熱マラリア患者 98 人の治療と、日本への輸入重症マラリア患者での臨床研究に応用しそれぞれに極めて優れた治療成績を収めた。アタマジラミのピレスロイド抵抗性は特異的かつ共通に見いだされている四重アミノ酸置換突然変異が原因である。餓死し自然乾燥させた標本を利用し、遺伝子型を SNaPshot 法で同時に解析する方法を確立し、2006 年度までに 10 都道府県より収集した 54 コロニー (126 個体) の試料を試験した。その結果、茨城県、長野県、兵庫県、香川県に由来する 4 コロニー (7%) が同じ四重変異をもつ抵抗性遺伝子を保有していた。うち 3 コロニーで試験したシラミ 8 頭はすべて抵抗性遺伝子のホモ接合体であった。

#### 分担研究者

當間孝子	琉球大学 教授
澤邊京子	国立感染症研究所 室長
江下優樹	大分大学 准教授
狩野繁之	国立国際医療センター 研究所 部長
松本芳嗣	東京大学大学院 准教授
高木正洋	長崎大学熱帯医学研究所 教授
小林 潤	国立国際医療センター 研究所 厚生労働技官
高崎智彦	国立感染症研究所 室長
小西英二	神戸大学 准教授
倉根一郎	国立感染症研究所 部長
名和 優	埼玉医科大学 講師

ウエストナイル熱、黄熱など節足動物媒介性感染症は未だに世界的に猛威をふるっている。効果的なワクチンが未だ開発されていないデング熱は毎年のように世界規模で流行し、最近、輸入症例も確実に増加している。一方、我が国の日本脳炎 (JE) 患者数は過去 10 年ほど顕著に減少が見られるが、豚の抗体調査が示すように、ウイルスの活動は東京以西では毎年 100% 近くの豚に新たな感染が認められている。媒介蚊であるコガタアカイエカの JEV 保有状況は非常に高い陽性率を示す地域が確認されており、約 3 年間にわたって同じ地域の蚊から JEV の分離に成功した。分離株は全て Genotype I 型に属し、近年東南アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。2005 年から 2006 年にかけてインド洋諸島国、インド、スリランカ等でヒトスジシマカとネッタイシマカが重要

#### A. 研究目的

マラリア、デング熱、チクングニヤ熱、

な媒介蚊であるチクングニヤ熱の大きな流行が起こり、全体で170万人以上の患者が発生した。これらの状況を踏まえて、我が国における媒介蚊の発生状況調査、媒介蚊の生態的、生理的解析、限定された地域における防除対策および防除に関する費用の試算を試みた。

日本脳炎(JE)は西日本を中心にウイルスの活動が活発に起こっているが、患者数は1960年代と比べると激減している。これはワクチン接種および蚊に刺されにくい家屋構造、媒介蚊の発生数の減少が患者発生を抑えていると考えられている。しかし、地方または地域によっては、小児へのワクチン接種が必須であると考えられる。一方、マラリアはアフリカ大陸のサハラ砂漠以南の諸国で猛威をふるっており、インド、中近東、東南アジア、中国でも多数の患者が発生しており、毎年、80-100万人ほどの乳幼児の死亡の原因となっている。デング熱は中南米、カリブ海諸国、西太平洋諸国、インド、東南アジア等で数年おきに世界規模の流行が起こっており、熱帯・亜熱帯地域で重要な蚊媒介性感染症である。両疾患は現在、輸入症例として50-100名ほどが報告されている。

ウエストナイルウイルス(WNV)が万が一我が国に侵入した場合には、ウイルスの増幅動物としての多種類の野鳥やウイルスを伝播する能力のあるアカイエカ種群の蚊が都市部を中心に多数生息していることを考えると、相当広範囲にWNVが広がる可能性が予想される。現在、媒介蚊の発生状況調査を行っている地方自治体は一部の府県に限られており、最近までの調査目的は日本脳炎の流行予測に関連する蚊の捕集で、

郊外の水田地帯にある牛舎や豚舎での成虫捕集調査であった。しかし、WNVの我が国への侵入を想定した場合、人口密度が高い都市部の媒介蚊の発生状況調査が必要である。1999年にニューヨークで突然流行が起こったウエストナイル熱は、7年間でほぼ全米にウイルスの活動域が広がり、現在までに23,707人の患者が発生し、928人が死亡している。渡り鳥、飛行機等による米国からの感染蚊の移入およびユーラシア大陸の極東地域からの感染した渡り鳥によるウイルスの持ち込みなどにより、我が国でいつウエストナイル熱が流行するか予断を許さない状況である。

日本各地で採集されたコガタアカイエカからJEVの分離を積極的に行い、得られたウイルス分離株における遺伝子解析を行うことにより、地域間に見られるウイルスの遺伝的關係を明らかにし、ウイルスの我が国での越冬生態の解明を試みた。また、我が国の都市部に分布する数種の蚊に関してJEVに対する感受性を再検討し、都市部で捕集されたアカイエカ、ヒトスジシマカなどからのウイルスの検出の可能性を評価した。また、デング熱が流行している東南アジアでネッタイシマカを採集し、ウイルスの保有状況を解析し、患者が発生した住宅周辺における成虫防除の重要性を解析した。

DNAワクチンの開発では従来の投与量の1/10~1/100程度の量で中和抗体を誘導する方法を詳細に検討した。デング熱の診断法は、急性期の血液からのウイルスの分離、遺伝子の検出が困難なため、抗体による血清診断が必要となる。また、出血傾向にある患者からの採血は困難が伴い、唾液、尿からの抗体または遺伝子の検出は有用性



が高い。

1993 年から韓国の非武装地帯を中心に三日熱マラリアが流行し始め、その後、軍人のみならず民間人にも 5,000 名を超す患者が全国的に発生した。また、輸入感染症として我が国に発生するマラリアに関しては、医療関係者のマラリアに関する知識、理解が不足しており、適切な治療が行われているか疑問視する意見も散見される。

重症マラリアの治療、海外でのマラリア対策に関する問題点を解決する目的で、「マラリア予防ガイドライン」の評価研究を行い、同ガイドラインの改定を行った。また ATV(Artemisin combination therapy)の臨床評価をマヒドン大学および同センターで行った。東南アジアにおける三日熱マラリアの重要性が高まっており、再発の問題を含めて疫学的解析を行った。

重症マラリアのバイオマーカーの検索が今後の疾病管理に貢献する可能性が示唆された。

このように、我が国を取り巻く節足動物媒介性感染症の流行状況は常にある種のリスクを伴っており、ウイルスの病原性に関する分子機構、アルボウイルスに関する新しいワクチンの開発、新たな診断法の確立、マラリアの予防対策の啓発は重要である。開発途上国におけるマラリア対策の問題点、我が国の、特に都市部における媒介蚊の調査および防除対策に関する地方自治体の準備状況の問題点、緊急時の対応等の問題点も少しずつ顕在化してきており、流行が起こっていない平時からの媒介蚊対策が最も重要で効果的であると考えられる。

## B. 研究方法

### 1)成虫の発生状況調査

長崎県諫早市、熊本県合志市、鹿児島県川辺町、新潟県新潟市佐潟湿地、東京都大田区東京港野鳥公園、東京都品川区、富山県富山市、神奈川県横浜市、東京都新宿区、兵庫県姫路市と西宮市、千葉県千葉市、成田市等において、日本脳炎ウイルス媒介蚊であるコガタアカイエカ、ウエストナイルウイルスの媒介蚊と考えられているアカイエカ、チカイエカ、デング熱およびチクングニヤ熱の媒介蚊であるヒトスジシマカの捕集を CDC 型ドライアイストラップ、ブラックライト型のライトトラップで行った。フィリピン・ミンダナオ島の自然災害の被災地 10 地点において、水牛囿により夜間マラリアの媒介蚊であるハマダラカ類の捕集を行った。なお、我が国都市部では、一部人囿法、捕虫網によるスィーピング法によって蚊の捕集を行った。

### 2)標識・放逐・再捕獲法によるアカイエカの飛翔範囲

野外の発生源からボウフラ約 30,000 匹を採集し、これを室内で飼育して成虫を羽化させた。羽化後 4-8 日経過した雌成虫(約 10,000 個体)に蛍光塗料(ローダミン B、0.5%水溶液)を噴きつけてマークした。マーク虫は 19:00 に一ヶ所から放逐し、放逐後 1 日目から連続 4 日間再捕獲を行った。再捕獲は、放逐場所から 100、200、400、800、1200m離れた場所(合計 41ヶ所)に 1kg のドライアイスを誘引源とするトラップを設置して行った。また、100、200、400、800mの地点(合計 7ヶ所)で人囿採集による再捕獲も試みた。トラップで捕獲された成虫は毎朝回収し、殺した後ろ紙の上に並べて 70%

アルコールを滴下して紫外線下で色素の有無を判定した。

### 3)蚊の分類および同定

幼虫および蛹の形態、羽化成虫の形態によって同定を行ったが、アカイエカ種群の分類は個眼数を数える方法、歩脚等から抽出した DNA と特異的プライマーを用いた分子分類によった。標識蚊の放逐前に、各ケージからアカイエカのサンプルを取り出し、分子分類によってアカイエカとチカイエカの比率を算出した。

### 4)野外捕集蚊からのウイルスの検出

フラビウイルスの検出法は種々知られているが、千葉、富山、新潟、長崎、熊本、鹿児島等で捕集されたコガタアカイエカ成虫 20 匹を 1 プールとし、ウイルスの検出および分離を試みた。2007 年は全体で約 3,673 匹から 192 プールを作成し、MEM 培地で磨砕後、ヒトスジシマカ由来の細胞株である C6/36 に接種し、7 日間培養した。培養上清を再度新しい培地に接種し、細胞変性(CPE)を確認した。継代培養上清からウイルス RNA を抽出し、フラビウイルス特異的な塩基配列をプローブにして RT-PCR で検出を試みた。また、PCR の陽性産物はダイレクトシーケンスで塩基配列を解読した。一部の培養上清は、日本脳炎ウイルス(JEV)の検出のために、リアルタイム PCR 用に開発された反応系で JEV の検出を試みた。また、CPE 陽性を示すが、JEV および WNV が RT-PCR で陰性のプールがアカイエカおよびコガタアカイエカから検出され、新規フラビウイルスとして遺伝子解析を行った(厚生労働科学研究 H17-新興-2)。

### 5)西宮市における幼虫発生源調査

市内を 10 地区に分け、各々の地区内の町数の 10%に当たる地域で、その地域に存在する全ての道路(43 丁)、公園 (52 ヶ所)、マンション(43 等)、市営住宅(236 ヶ所)、一戸建住宅(各 40-50 戸)、小・中学校各 1 校、幼稚園、保育園は 1-6 カ所、体育館およびその他の市の施設(76 ヶ所)に存在する全ての雨水マス、污水管、マンホール等の位置と数を記録し、その場所を地図上に記録し、水が停滞していた場合を有水マスとし、幼虫調査は柄杓を用いて四隅を掬う方法で行った。柄杓内の幼虫はピペットで採集し、幼虫は数を数え、種類の同定のため容器に入れて実験室に持ち帰り、必要によっては羽化成虫で同定を行った。

### 6)幼虫発生源に関する地理情報システムの応用

デジタルマップとして、MapInfo で作動する西宮市土木管理課が作成管理している西宮市国土基本図(地形図、1/2500DMデータ)およびデジタルマッピングデータファイル(平成 11 年作成、改定同 17 年)を、ArcView で作動させ、紙地図として、西宮市土木局土木管理課が販売している A0 サイズの縮尺 1:2,500 西宮市地形図を用いた。これに西宮市環境衛生課が調査した道路雨水柵の位置を記入してスキャンした後、デジタル化して Tif ファイルで解析に供した。

また、下水道台帳の一般利用されている下水道合流・分流区域図を、西宮市のホームページからダウンロードして用いた。

### 7)西宮市における雨水マスの幼虫防除試験

一斉薬剤散布に先立ち西宮浜の住所区画(1丁目から4丁目)ごとに、道路、施設、会社、マンション、一戸建て住宅別に雨水柵の数を調査し、マップを作成した。

ピリプロキシフェン 0.15%、*Bacillus thuringiensis israelensis* 0.459%含有（チャブT錠 1g）は平成 19 年 7 月 2 日に、ピリプロキシフェン 0.5%含有（スマラブ発泡錠 0.5g）は平成 19 年 8 月 1 日、ジフルベンズロン 1%含有（デミリン発泡錠 3g）は平成 19 年 9 月 3 日にかけて雨水枡のマップに基づき 4 班構成で人員を割り当て実施した。

#### 8)西宮浜における薬剤散布後の評価

平成 19 年 7 月より 9 月末まで各薬剤投入 1 週後より週 1 回に計 11 回 CDC 型のドライアストラップによる蚊の捕集を行った。成虫採集地点は薬剤散布域の 6 地点で、8 月後半からは（8/27 以降）西宮浜以外の西宮市内の 6 地点を追加した。また、6 月の下旬に 6 地点で 4 日連続でトラップによる捕集を行い、薬剤処理前の成虫密度を調査した。捕集蚊は -20℃で麻酔後、蚊を種別別、性別に同定集計した。なお、アカイエカとチカイエカの判別は雌雄蚊共に個眼数によって両種を識別した。

#### 9)地方自治体における衛生動物対策の現状評価のためのアンケート調査

全都道府県、特別区及び市町村の関連部署にアンケートを発送（計 1,874 通）して回答を求め、集計・解析した。

質問は 28 項目で、概略は 1) 害虫獣に関する住民からの相談状況。2) 衛生動物に対する具体的な取り組み及び住民に対する対応状況。3) 防除業者（PCO）等への防除業務の委託状況及びその実施内容等の評価。4) 蚊の幼・成虫の発生状況等の調査の実施。5) 蚊に対する殺虫剤の使用状況。6) 蚊媒介性疾患の発生時の対応。7) 住民からの蚊防除に関する問い合わせに対

する対応内容。8) 殺虫剤の備蓄状況。9) 散布（防除）機器の保有状況。10) 衛生動物対策に係る予算・担当者数。11) 国への要望事項についてなどである。

#### 10)アカイエカの日本脳炎ウイルスの感受性

羽化後 1 週間程の未吸血のアカイエカ *Culex pipiens pallens* 雌成虫を用いて、その胸部に段階希釈したウイルス液を 0.02ul 接種し、その後、8 日間 28℃で飼育した。蚊のウイルス力価を個体別に測定するまで、-80℃に保管した。また、蚊の経口感染では、PBS(-)液で 2 回洗ったヒト赤血球に等量のウイルス液を加えた液に最終濃度 2%の蔗糖を加えて、蚊に与えた。経口感染で取り込んだ吸液量を約 3.3ul として、蚊個体毎のウイルス力価を PAP 法で算出した。

#### 11)デング熱患者の尿、唾液よりのウイルス遺伝子および抗体の検出

デングウイルス輸入症例 33 例につき、血液（血清）および尿、唾液を採取した。急性期から回復期まで検体が採取できた症例が 19 例、急性期のみの症例が 14 例であった。尿は簡易濃縮遠心チューブにて 5 倍に濃縮し、それぞれ 200 μl から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR（TaqMan 法）により、ウイルス遺伝子を検出した。リアルタイム RT-PCR 法は伊藤ら(2004)の方法により実施した。TaqMan 法で陽性であった検体に関して、通常の RT-PCR を実施し、増幅された検体については、シーケンス解析を行い血清中から検出されたウイルス遺伝子と比較検討した。

#### 12)日本脳炎ウイルスの genotype shift に関する解析

昨年度構築した JEV genotype1 型完全長 cDNA クローン及びウイルス産生系を使用し、genotype 3 型 Beijing-1 株との点変異体を作成した。哺乳類由来 Vero 細胞、神経系由来 N18 細胞内での増殖能や DDY マウスでの病原性につき解析を行った。

### 13) 低ドーズ DNA ワクチンの中和抗体誘導能の評価

哺乳類細胞由来蛋白ワクチン：DENV2 の prM-E 遺伝子を CHO 細胞にトランスフェクトして構築した連続抗原発現細胞 (D細胞) から調整した。4 週令の雄 ICR マウス (各群 5 匹) に、DNA ワクチンと蛋白ワクチンを単独で、あるいは混合して大腿部にジェット式針無注射器 (島津製作所) で投与した。投与後 3 週毎に採血し、プール血清を用いて中和抗体価を、または個々の血清を用いて ELISA 抗体値を測定した。昆虫細胞用発現プラスミド pIB/V5-His に DENV2 の prM-E 遺伝子を組み込み、pIBD2ME を作製した。pIBD2ME を蛾細胞由来の Sf9 細胞にトランスフェクトし、24-72 時間後の培養液から、ポリエチレングリコール沈殿法及び蔗糖密度勾配遠心法で精製して、昆虫細胞由来蛋白ワクチン (D2EP-Sf9) を得た。DENV2 に対するウサギポリクローナル血清を感作したマイクロプレートを用いて抗原量をカリブレーションした。

### 14) マラリア重症患者の管理および治療体制に関する研究

昨年度の「マラリア予防ガイドライン」の運用評価研究成果をうけて、本年度はガイドライン改訂を、「マラリア予防専門家会議」を再編成し、実用面で予防内服の「実施基準」の項目に大幅な改訂を加えた。

タイ・バンコクのマヒドン大学熱帯医学病院との共同研究で行い、三日熱マラリアの患者に対する ACT (Coartem<sup>®</sup> Novartis : artemether と lumefantrine の合剤) の有効性を評価した。対象となったのは、急性期のマラリア患者 98 人 (体重 40kg 以上、15 才以上、女性では妊婦を除外) で、治療開始時から 28 日間、同病院で経過観察を行った。

### 15) 薬剤耐性マラリアの流行拡散に関する疫学研究および海外の高リスク地域の評価

タイ、ラオス、カンボジア保健省のマラリア対策機関とタイアップして疫学的データを入手した。アフリカにおいてはガーナ保健省の協力のもと対策プログラムの進行状況を把握し、マラリア感染の実態調査をし、また首都と県レベルの医療施設を調査して邦人が現地にて治療する場合の可能性と留意点を検討した。

### 16) マラリアの発症機序の解明および重症化の指標となるバイオマーカーの探索

感染実験では *P. berghei* ANKA 株赤内型原虫、動物は Balb/cA を遺伝的背景とするヒト L-FABP 遺伝子導入マウス (hL-FABP Tg マウス) を用いた (Kamijo, A. et al., J. Lab. Clin. Med., 2004)。受け身免疫の影響を避けるため *Plasmodium berghei* ANKA 株原虫を Balb/cA RAG-2 ノックアウトマウスに感染させ、実験に用いる感染赤血球のドナーとして用いた。感染 RAG-2 ノックアウトマウスより得られた感染赤血球  $1 \times 10^6$  個を hL-FABP Tg マウスおよびコントロールとして Balb/cA マウスに腹腔内接種し、マラリア原虫接種後、感染赤血球率を求めた。自然排尿によりスポット尿を採取し、尿中 hL-FABP 濃度を Enzyme Linked Immuno-

Sorbent Assay (ELISA) (ヒト型 L-FABP 測定キット、IBL)により測定した。

#### 17)アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

2001年に東京都で採集しフェノトリンに約160倍の抵抗性を示したコロニー(R2)のアタマジラミをエタノール中で保存しておいたものを、ピレスロイド抵抗性の標準虫として用いた。R2コロニーはナトリウムチャンネル(以下SCと略す)に4つのアミノ酸置換(D11E, M850I, T952I, L955F)が生じた遺伝子のホモ接合体である。2004年に札幌市で採集し国立感染症研究所で継代飼育しているNIID系統のコロモジラミを-80℃で保存しておいたものを、殺虫剤感受性の標準虫として用いた。

### C. 研究結果

#### ①成虫の発生状況調査

兵庫県姫路市郊外の調査地点4ヶ所(住居前、豚舎前、豚舎内、村落内)で捕集された蚊成虫は6属10種で、多く捕集されたのはコガタアカイエカとシナハマダラカであった。豚舎内での捕集数が最も多く、次いで豚舎前での捕集であった。コガタアカイエカは4月中旬から下旬にかけて少数捕集されたが、その後捕集されなかった。7月初旬から豚舎周辺で多数捕集されるようになり、7月下旬には豚舎内で269個体が捕集された。しかし、8月初旬には一旦捕集数が減少した後8月中旬から9月初めにかけて急激に上昇、9月初めには278個体とピークに達し、その後は急激に減少した。

青森県十三湖では6属9種類、合計337個体が採集された。これらの中でイナトミシオカとキンイロヌマカはこの地域の初採

集記録である。捕獲個体数はアカイエカ群が296個体と全体の88%を占めた。オオツルハマダラカがまとまって捕集されたのが特徴的である。渡り鳥の飛来する湿地を発生源としている種類として、オオツルハマダラカ、シナハマダラカ、ハマダライエカ、イナトミシオカ、ヤマトハボシカ、キンイロヌマカが採集されているが、コガタアカイエカはまったく採集されなかった。

新潟県佐潟水鳥・湿地センターでは6属11種類、合計2,672個体が採集された。イナトミシオカはこの地域からの初採集記録であり、幼虫の発生水域も確認された。個体数をもっとも多かったのはアカイエカ群で、特に5-7月には全体の85%以上を占めていた。次いで捕獲総数が多かったのはコガタアカイエカ、3番目に個体数が多かったのはイナトミシオカである。注目すべき点は本種が10月の採集でも捕獲されていることである。この調査地へのガンカモ類の飛来は今シーズンも9月下旬から確認されており、イナトミシオカがこれらの渡り鳥から吸血する可能性が充分考えられる。イナトミシオカはWNVに対して感受性であることが実験的に確かめられており、ユーラシア大陸に分布する近縁種 *Cx. modestus* からはWNVが検出されている。また、フランスではWNVの最も重要な媒介蚊とされている。

東京港野鳥公園では3属6種類、合計2,329個体が採集された。ヒトスジシマカは捕虫網による人囀採集で捕獲された個体が698と多かった。ドライアイストラップによる採集では、ここでもアカイエカ群の捕獲個体数が最も多かった。次いでヒトスジシマカ、コガタアカイエカ、イナトミシ

オカの順であった。イナトミシオカは少数だがシーズンの初期5月と終期10月にも捕獲されており、比較的低温でも発育可能であることが予想される。

富山市郊外の住宅地において、環境整備を行い、一部雨水枡に薬剤散布による成虫対策を行った住宅で蚊の捕集を行った。防蚊対策を行った2007年のトラップ捕集数は3種134個体であり、防蚊対策を行わなかった2003年の3種76個体、2004年の3種53個体、2005年の3種114個体と比べると、2007年は明らかに増加した。しかし、2006年の4種210個体に比べると明らかに減少し、それはヒトスジシマカで顕著であった。しかし、アカイエカでは逆に2倍強に増加し、周辺の防除対策の効果が認められなかった。

## ②標識・放逐・再捕獲法によるアカイエカの飛翔範囲

羽化成虫の性比を1:1として放逐した場合の放逐個体数は10,183雌であった。再捕獲された雌成虫はトラップで56雌、人囀採集では65雌で、再捕獲率は約1%であった。再捕獲率と無マーク虫の捕獲総数から調査地域全体の野外個体群の推定個体数を求めたところ、100,170±8,509雌であった。

放逐場所からの距離ごとに再捕獲された雌成虫の個体数を示した。再捕獲個体の総数は1日目から順に18、15、7、15個体で、放逐場所から1,200mの場所に設置されたトラップでは放逐後1、4日目に各1個体が再捕獲された。トラップ当たりの捕獲個体数を計算し、各距離の範囲に到達した雌成虫数を推定して、これら

の成虫が移動した平均距離を求めた。その結果、平均移動距離は287から517m/日となった。放逐場所からの距離の対数値と平均捕獲個体数+1の対数値を用いて、回帰分析を行ったところ有意な回帰直線が得られた( $R^2=0.861$ 、 $p=0.023$ )。回帰直線によって最大飛翔距離を推定したところ、1,217mであった。

## ③西宮市における幼虫発生源調査と幼虫防除対策の費用の算出

市内の公園、学校等の公共施設、道路、マンション、市営住宅、一戸建住宅、調整池での幼虫発生の状況を市内10地区に分けて詳細に行った。各施設の雨水枡に発生する幼虫は、主にアカイエカ種群(アカイエカおよびチカイエカ)とヒトスジシマカの幼虫であるが、イエカとヤブカの比率は調査場所によって大きく異なっていた。公園の雨水枡においてイエカ属の占める比率が高いこと、公共施設、一戸建住宅、マンションにおけるヤブカ(ヒトスジシマカ)の比率が高かったことが特徴的で、水質、周辺環境等の関係が示唆された。道路の雨水枡においては、イエカとヤブカがほぼ同様に発生しており、全体の雨水枡数から考えて、都市部における媒介蚊の重要な発生源となっていることが示された。調整池(26ヶ所)の調査では、全く幼虫が採集されず、緊急対策の防除対象から除外できることが明らかとなった。全体として、自治体が防除を積極的に行うべき発生源が多数存在することが示され、今後の媒介蚊防除の体制の構築が全国的に強く望まれる。

面積約2.59km<sup>2</sup>の西宮浜の幼虫発生源と考えられる雨水枡7,032ヶ所に幼虫発育制

御剤を6月から8月にかけて月1回処理し、島全体での成虫発生を抑えることを試みた。その作業に関して、PCO業者22名の人件費を一人当たり1万2千円、経費5千円として計算した。薬剤費はスミラブ発泡錠剤の購入費として計算した。その結果、島の面積である2.59 km<sup>2</sup>での1回の防除費用に約46万円が必要である計算となった。この概算費用をもとに西宮市全体の面積から山林面積を引き、市街地の面積を57 km<sup>2</sup>として計算したところ、1回の薬剤処理に約1千百万円の費用が必要であることが明らかとなった。夏期に5回(5月から9月までの月1回)薬剤投与を行うこととした場合、全体で5千5百万円が幼虫防除費用として必要である。これは幼虫対策のみの費用で、緊急時の成虫防除、広報活動に必要な経費など広範に蚊媒介性感染症が流行した場合の費用は含まれておらず、あくまでも平常時の幼虫対策に必要な経費である。

#### ④西宮市における雨水マスの幼虫防除試験

薬剤散布域の西宮浜内における散布後1週間(7月9日)より9月25日までの週1回計11回の蚊成虫採集総個体数は804個体でその内イエカ類は84.3%を占め、ヒトスジシマカは15.7%であった。7月24日以降9月25日までの9回採集分についての西宮浜内における採集成虫蚊の種類構成は、アカイエカは54.4%、チカイエカ24.1%、コガタアカイエカ0.8%でヒトスジシマカは20.7%を占めた。7月9日より7月17日分の採集に関して、7月の月上旬より下旬にかけてイエカ類の採集数の山があり、以後8月上旬~9月下旬にかけて低減していった。西宮浜内でのヒトスジシマカ採集数につい

ては、採集期間中顕著な山は見られなかった。またイエカ類については8月27日以降の4回の採集成績に過ぎないが、薬剤処理地区と未処理地区において採集数に大差が見られず、イエカ類についても同様な傾向であった。薬剤処理前の6月のトラップでの捕集数と薬剤散布後の捕集数の比較では、7月には全く減少が見られなかったこと、8月および9月にも捕集数は減少したがアカイエカ類が捕集されたことから、島内での成虫発生は抑えられていたが、周辺からの成虫の移動がアカイエカの捕集数に影響を与えていることが強く示唆された。

#### ⑤幼虫発生源に関する地理情報システムの応用

基本地形図上の調査区の重心上に採集総数をイエカ、ヤブカに分けて棒グラフで示し、西宮市北部では一調査区でヤブカが採集されているに過ぎないが、同市南部では海岸寄りの範囲に蚊総数の高い調査区が集中していた。さらにイエカ属、ヤブカ属の比率を見ると、海岸線に近い部分にアカイエカ種群が多い傾向があった。この蚊数の多い地域は汚水・雨水の合流污水管が存在する区域と一致するのではないかと関係者の間では考えられている。西宮市下水道台帳から合流污水管の地域を抽出すると、その境界部分で不明な地域があるが、1, 2の例外を除いてほぼアカイエカ種群の発生数が多い地区と一致することが明らかになった。

#### ⑥地方自治体における衛生動物対策の現状評価のためのアンケート調査

全都道府県、特別区及び市町村の関連部

署にアンケートを発送（計 1,874 通）して回答を求め、集計・解析した。62.9%の自治体から回答を得たが、住民からはハチやネズミの相談が多いこと、防除は一部委託も含めて PCO 等に委託している自治体が多いが、その内容等については評価している自治体は少ないこと、疾病媒介蚊に対する緊急時対応体制の構築、緊急時の対応マニュアル作成を行っていない自治体が多いこと、蚊の防除手段として薬剤を使用している自治体は少ないこと、防除薬剤の備蓄を行っている自治体は半数以下であること、薬剤散布機器を保有している自治体は半数程度であること、衛生動物対策関連の予算や担当者数は減少傾向にあることなどが明らかとなった。国主導による調査の実施や薬剤の備蓄、法整備や指針の策定、専門家の育成等が必要と思われ、国と自治体及び自治体間の連携による情報等の共有や防除体制の構築も検討する必要があると考えられる。

#### ⑦媒介蚊からの日本脳炎ウイルスの検出

長崎県諫早市は、2005 年以降毎年 JEV が高率に分離されている定点調査地であるが、本年の蚊検体（700 個体・36 プール）のうち、7 プール（19.4%）から JEV が分離された。一方、今回初めての調査地となる熊本県合志市捕集の蚊検体（1,192 個体・60 プール）では、うち 2 プール（3.3%）から JEV が分離された。同じく長崎県以南の初調査地である鹿児島県川辺町捕集の蚊検体（1,200 個体・60 プール）については、6 プール（10%）から JEV が分離された。また、今年度新潟県では 9 月の時点で JEV 抗体陽性のブタは確認されていないが、同県下の佐潟で捕集されたコガタアカイエカ（231 個体・14 プール）のうち、9 月 19 日に捕集された 1 プールから JEV が分離された。一

方、東京都下の東京港野鳥公園（70 個体・8 プール）と林試の森公園（280 個体・14 プール）では、JEV は検出されなかった。

本年のコガタアカイエカからの分離株の多く（Nagasaki/15/2007, Nagasaki/23/2007, Kumamoto/35/2007, Kumamoto/67/2007, Kagoshima/36/2007）は、そのアミノ酸配列の特徴からも、明らかに昨年までの分離株とは異なるクラスターに属していた。一方で、これらと同所的に分離されたウイルス株であっても、長崎県や鹿児島県の分離株（Nagasaki/06/2007, Kagoshima/72/2007）のように、昨年以前の分離株が包含されるクラスターに属するものが認められた。また、新潟県で分離された Niigata/97/2007 株は過去 2 年に長崎県で分離された株（Nagasaki/37/2005, Nagasaki/09/2006）により近縁であった。

#### ⑧アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性に関する実験結果

ウイルス力価の高い日本脳炎ウイルス液を接種したアカイエカ体内のウイルス力価には、個体毎のばらつきが認められた。しかし、調査個体数を増やして 7 個体を調べた結果、何れの株での平均はほぼ同程度の値となった。しかし、低濃度のウイルス液を蚊に接種した場合は、それぞれ蚊 2 個体の結果ではあるが、ワクチン株と他の株とは 35 から 500 倍ほどの差が認められた。

また、経口感染後 14 日間を経過した蚊のウイルス力価について、各株とも 2 個体について検討し、接種法で得られた値よりも低い値を示した。また、経口感染した蚊が取り込んだウイルス力価を考慮して 4 株を比較すると、ワクチン株と Jath16 株が同程度の力価であるのに対して、JaGAR01 株は 2 倍ほど、三重株は 30 倍ほどの高い力価となった。

#### ⑨タイ国のデング熱媒介蚊調査の結果



2007年にネッタイシマカ雌成虫からデングウイルス2型のゲノムがRT-PCRによって検出された。しかしながら、ネッタイシマカ幼虫からのデングウイルスゲノムは検出されなかった。デング熱患者の家から感染蚊が採集された家は、11.8%であった。また、陽性蚊を発見した家において、陽性蚊の割合は採集総数の5-8%であった。

#### ⑩日本脳炎ウイルスの genotype shift の解析と病原性に与える影響

JEVのE蛋白質がウイルスの増殖性、病原性を規定することが明らかとなった。そこでBeijing-1株とMie41株におけるE蛋白質の配列を比較したところ、8アミノ酸の相違が認められた。さらに領域を絞り込むため前半4アミノ酸をBeijing-1株に置換したキメラウイルス(nE)、後半4アミノ酸を置換したキメラウイルス(cE)を作成し細胞内での増殖や病原性を解析したところ、前半4アミノ酸が重要であることが判明した。そこで前半4アミノ酸相違部位(123、129、222、227番目のアミノ酸)をBeijing-1株と置換した点変異体を作成し解析を行った。その結果、Vero細胞、N18細胞での増殖能は123番目のアミノ酸を置換した(セリン→アルギニン)変異体(123m)でのみBeijing-1株と類似した性質を示した。またマウスの病原性解析では123mのみBeijing-1株やnE同様高い死亡率を呈した。Mie41株では大脳皮質、腰髄に軽度の細胞浸潤やウイルス抗原陽性を認めるのみであったが、Beijing-1株や上記キメラ群では大脳、脊髄全般に強い細胞浸潤やウイルス抗原陽性を認め、このアミノ酸変異は中枢神経内でのウイルス増殖にも深く関与して

いることが示唆された。またこのアミノ酸変異がBeijing-1株、nE、123mでヘパリンへの高い吸着能を呈し、ウイルスの細胞への接着効率に大きく影響を与える可能性が示唆された。

#### ⑪DNAワクチンの開発

ウエストナイルDNAワクチン(pcWNME)と日本脳炎DNAワクチン(pNJEME)を用いて、低ドーズにおける中和抗体誘導能を調べた。その結果、市販のウエストナイル不活化ワクチンの1/10ドーズを混合した時、0.1µgのpcWNMEは、1回の接種でマウスに中和抗体を誘導した。マウスを用いるDNAワクチンの初期評価には通常100µgを複数回投与するので、大幅なドーズ低減が可能であることを示す。また、市販の日本脳炎不活化ワクチンの1/100ドーズを混合した時、1µgのpNJEMEは、1-2回の接種でブタに中和抗体を誘導した。大動物に通常用いられるDNAワクチンのドーズは数百µgから数mgであり、今回の結果は、大動物においても投与方法の工夫によりDNAワクチンのドーズを格段に低減できることを示す。

#### ⑫デング熱患者の尿、唾液からのウイルス遺伝子および抗体の検出

輸入デング熱33症例に関して、尿・唾液中のウイルス遺伝子検査を実施した。血清からウイルス遺伝子が検出できた症例は19症例で検出率は、57.6%であった。一方、尿中から遺伝子が検出された症例は12例で、検出率は36.4%であった。また、33症例のうち唾液が採取できたのは17症例であった。唾液からウイルス遺伝子が検出さ

れた症例は2例であった。尿中からデングウイルス遺伝子を検出した検体は、現在までのところ、その時点での血清抗デングウイルス抗体は陽性である。発病後3日目という急性期に検出した症例は、再感染例であると考えられ、その時点ですでにIgG抗体、IgM抗体ともに陽性であった。

尿中からデングウイルス遺伝子を検出した上記12症例の腎機能には特に異常を認めなかった。また、尿検体からのウイルス分離の結果、ウイルスは分離されなかった。

尿中デングウイルス遺伝子の解析にいたった症例5例のウイルス型別は、1型2例、2型1例、3型1例、4型1例であった。血液からのウイルス遺伝子も検出できた症例が、4例でありいずれも尿中と血中ウイルス遺伝子配列は100%一致した。

#### ⑬重症マラリアの管理および治療体制

マラリア流行地域に滞在し、下記3項目のすべてに該当するケースを、予防内服の「絶対的適応」とする。「絶対的適応」に当てはまるケースでは、マラリアの感染、発症、重症化の危険性が高いため、防蚊対策に加えて予防内服をおこなうことが強く勧められる。3項目としては1) 熱帯熱マラリアの高度流行地域に滞在する。2) 旅行期間が7日以上である。3) マラリア発症時に適切な医療対応が期待できない。が考えられる。「相対的適応」に当てはまるケースでは、マラリアに感染後発症しても重症化する危険性は低いので、防蚊対策を中心にした感染予防が勧められる。予防内服を行う場合には、マラリア感染のリスクと予防内服による副作用のリスクを十分に検討する必要がある。ACTの有用性に関する臨

床研究としてはマヒドン大学の98例の三日熱マラリア患者を、Coartem<sup>®</sup>での治療例47例と、従来よりの特効薬であるクロロキンによる治療例51例を対象に、治療経過を記載した。

#### ⑭脳性マラリア等重症マラリアの発症機序の解明および重症化の指標となるバイオマーカーの探索

マラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種後の末梢血感染赤血球率は、接種2日目にはhL-FABP Tgマウスにおいて0.37%、Balb/cAマウスにおいて0.43%であった。その後両マウスにおいて感染赤血球率は急激に上昇し、接種7日目にはhL-FABP Tgマウスにおいて49.43%、Balb/cAマウスにおいて48.30%に達し、感染率の差は認められなかった。同様の方法、接種量で感染させたBalb/cAマウスは感染9日目までに全て死亡することがこれまでの実験から明らかとなっている。

hL-FABP Tgマウスにおける尿中hL-FABP量は、マラリア原虫 *P. berghei* ANKA 株接種前で17ng/ml、であったものが、感染の進行に伴い増加し、接種5日目で187ng/ml、接種7日目では631ng/mlに達した。感染の進行に伴い尿中へのhL-FABPの排出が著しく亢進したことを示している。HE染色における腎臓の病理組織学的検索では、hL-FABP Tgマウスにおいて、マラリア原虫感染Balb/cAマウスに比べ、近位尿細管の拡大、および近位尿細管細胞核の位置の異常が顕著であった。糸球体に顕著な差は認められなかったものの、hL-FABP Tgマウスにおいて軽度の萎縮像が観察された。

#### ⑮ 東南アジアにおけるマラリア対策

邦人の海外渡航は多岐にわたり、マラリア感染のリスク地域への渡航も多い我が国としては薬剤耐性のモニタリングと ACT の普及をはかり、邦人の健康被害を考慮する必要がある。またアフリカ地域における緊急医療体制は脆弱であり、邦人の渡航において重症マラリアに対する治療については極めて深刻な状況であることもわかった。タイ国においては三日熱マラリア対策が重要になっており、周辺各国も熱帯熱マラリアにかわって重要な要素になりつつある。三日熱マラリア対策に重要な要素である再発についてその疫学的要因を明らかにするため調査を始めたが、現時点での再発率は 6%未満であった。

#### ⑯ アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

ナトリウムチャンネル遺伝子のアミノ酸置換突然変異を分子検出することにより、アタマジラミのピレスロイド抵抗性遺伝子型を推定できる方法を確立した。2006年度に収集した 10 都道県に由来するアタマジラミ 54 コロニー中のピレスロイド駆除剤抵抗性 SC 遺伝子の保有率は 7%であった。

#### D. 考察

マラリア、フィラリア症、デング熱、発疹チフスなど節足動物が媒介する感染症の流行が第二次世界大戦後にも認められていた。しかし、戦後の急激な復興に伴う衛生状態の改善、有効な殺虫剤の普及、経済成長に伴う家屋構造の変化など種々の要因で患者発生数は激減し、マラリア、フィラリア、デング熱、発疹チフスなどの疾病は国内感染が認められなくなった。しかし、日

本脳炎(JE)は現在でも西日本を中心にウイルスが活発に活動しており、ブタの抗体が高率に検出されている。1990年代から日本脳炎の患者数が減少しており、ワクチン接種、コガタアカイエカの個体数の減少、養豚場の郊外への移転、蚊に刺されにくい家屋構造など、種々の要因が関係していると考えられている。一方、マラリアは依然としてアフリカ大陸、インド、中近東、東南アジア、中国で多数の患者が発生しており、毎年、80・100万人ほどの乳幼児の死亡の原因となっている。デング熱は数年おきに世界規模で大きな流行が起こっており、熱帯・亜熱帯地域で重要な蚊媒介性感染症である。また、2005～2006年にかけて、インド洋諸島国（モーリシャス、レユニオン、セーシェル、マヨット、コモロ）、インド、スリランカ等で主にヒトスジシマカが媒介するチクングニヤ熱の大きな流行が起こった。

1999年に米国のニューヨークで突然流行したウエストナイル熱は、毎年 3・4千人の患者が発生している。ウエストナイルウイルス(WNV)が万が一我が国に侵入した場合には、ウイルスの増幅動物としての多種類の野鳥やウイルスを伝播する能力のあるアカイエカ種群の蚊が都市部を中心に多数存在することを考えると、相当広範囲に流行が起こる可能性が予想される。兵庫県西宮市における媒介蚊の発生状況調査では、公園、公共施設、道路、一戸建住宅、集合住宅等の敷地内に存在する雨水枡が媒介蚊の重要な発生源となっていることが明らかとなった。一方、自治体を対象とした衛生動物対策に関するアンケート調査では、緊急時の対応マニュアルが作成されていない、

薬剤の備蓄がない、散布器具の準備がない、PCO との連携が進んでいない、関係する職員が全体的に不足している、関連予算が確保されていないなど種々の問題が明らかとなった。特に、人口がすくない町村での対策が非常に遅れていることが示され、今後の媒介蚊および衛生昆虫対策の課題が明らかとなった。

日本各地で採集されたコガタアカイエカから JEV の分離を積極的に行い、分離されたウイルス分離株における遺伝子解析を行っている。3年間連続して同じ豚舎で分離された JEV の遺伝子構造解析を進めているが、一部、分離株間のアミノ酸レベルの違いが認められており、JEV がその場に留まって翌年の流行に関与している可能性は低いことが一部の結果から示唆された。これは、毎年、種々の変異をもったウイルスが何らかの方法で持ち込まれることを意味している。今後の詳細な解析を待ちたい。基本的に今までに分離された株の遺伝子型は全て Genotype 1 に属するもので、東南アジアでの分離株と類似性が高い。

DNA ワクチンの開発で中和抗体の誘導を積極的に促す接種法とドースの低減化が求められている。より安価なワクチン開発を目指すために、DNA ワクチンに従来のワクチンを混合して接種する方法の検討を行い、従来の投与量の 1/10～1/100 程度の量で中和抗体を誘導できることが明らかとなった。デング熱の診断法は、急性期の血液からのウイルスの分離、遺伝子の検出が困難なことが多く、抗体による血清診断によることが多い。そこで、患者の尿および唾液からの特異的抗体やウイルス遺伝子の検出ができれば、患者に苦痛を与えずに診断

が可能となる。輸入デング熱患者の検体を手して検討を行った結果、患者の一部の唾液および尿からウイルス遺伝子の検出に成功した。また、尿から IgA 抗体を検出することに成功した。

重症マラリアの治療に関する問題点を解決する目的で、「マラリア予防ガイドライン」の評価研究を行い、同ガイドラインの改定を行った。ガイドラインにおいて「絶対的適応」に当てはまるケースでは、マラリアの感染、発症、重症化の危険性が高いため、防蚊対策に加えて予防内服をおこなうことが強く勧められ場合で 1) 熱帯熱マラリアの高度流行地域に滞在する。2) 旅行期間が7日以上である。3) マラリア発症時に適切な医療対応が期待できない。が該当する。また ATV (Artemisinin combination therapy) の臨床評価をマヒドン大学および同センターで行い、三日熱マラリア患者にも顕著な治療効果があった。脳性マラリア等重症マラリアの発症機序の解明および重症化の指標となるバイオマーカーの探索を hL-FABP の尿中への排出に着目して行っており、重症化の予測に臨床応用することを目指している。

2006 年度に 10 都道府県で収集した 54 のアタマジラミコロニーのうち 4 コロニー(7%) から、四重アミノ酸置換変異をもつ SC 抵抗性遺伝子を保有していたことが確認された。この結果から、抵抗性をもたらす SC 遺伝子は全都道府県に伝播している可能性が容易に想像される。四重アミノ酸置換変異をもつ抵抗性遺伝子は、日本のみならず、米国と英国でも共通に見出されている(Lee et al., 2003)。これら 4 つの変異が独立に生じる可能性はほぼないと考えてよい。また、