

米国と英国においては日本以上にピレスロイド抵抗性の拡がり深刻である。これらを考えあわせると、海外で生じた抵抗性遺伝子が遅れて進入してきて、わが国では、幸いにも低い抵抗性の出現率に留まっているとみなされる。

地球規模での温暖化傾向が今後進んだ場合、我が国でも節足動物媒介性感染症の突発的な流行の可能性は否定できない。我が国の媒介蚊の調査および防除対策は平時から行うことが重要と考えられる。また、デング熱、チクングニヤ熱、マラリアなどの輸入感染症の症例が増加した場合、臨床医および研究機関による迅速な診断が強く望まれる。本研究事業において、媒介蚊、ウイルス、マラリアの研究が多角的に進行し、媒介蚊の調査、防除、患者の診断、治療が円滑に行われることが強く望まれる。

E. 結論

1) 都市部での成虫の発生状況に関しては、アカイエカ種群（アカイエカ、チカイエカ）およびヒトスジシマカの2種で全捕集蚊の99%を占めており、種構成が著しく偏っていた。一方、青森県、千葉県、富山県、兵庫県など都市の郊外や水田地帯で捕集した場合には、上記3種以外にコガタアカイエカ、シナハマダラカ、イナトミシオカ、ヤマダシマカが加わり、種構成が多彩になる。

2) 都市部での媒介蚊幼虫に関して、兵庫県西宮市で大規模かつ詳細に調査を行った。市内の10地区にある公園、道路、公共施設、一戸建住宅、集合住宅敷地内の雨水枡に関して、有水率、幼虫の種類、幼虫数などを調査し、公園の雨水枡ではイエカが、

一戸建住宅、公共施設、マンションではヒトスジシマカがより多く発生しているなど、周辺の環境で発生する蚊の種類が異なることが示された。道路の雨水枡はイエカとヤブカがほぼ同程度に発生しており、全体の数が多いことから、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。

3) 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。

4) アカイエカの飛翔距離に関して、色素を用いて羽化成虫を標識し、その後放逐後にトラップで再捕獲することを行った。放逐後4日間連続で捕獲を試み 1.2%が再捕獲された。これらの調査で少なくともアカイエカは 1,200m 飛翔することが明らかとなったが、その後の解析等から、設置された41個のトラップ網（半径 1,200m）を遙かに飛び越えて分散した可能性が示唆され、WNV が検出された周辺では、相当広範囲に媒介蚊の防除を行うことが重要であると思われた。

5) ウエストナイル DNA ワクチンと日本脳炎 DNA ワクチンを用いて、低ドーズにおける中和抗体誘導能を調べた結果、市販のウエストナイル不活化ワクチンの 1/10 ドーズを混合することによって1回の接種でマウスに中和抗体を誘導した。この方法は日本脳炎にも応用可能で、DNA ワクチンの

低減化と低コスト化が可能となった。

6) アカイエカにウイルス力価の高い日本脳炎ウイルス液を接種した場合、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、低濃度のウイルス液を蚊に接種した場合は、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、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。

7) 日本脳炎ウイルス(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り、病原性の異なる2株のE蛋白質のアミノ酸配列を比較し、8アミノ酸の相違が認められた。さらに、どのアミノ酸が関係するかを検討し、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。Beijing-1株やキメラ群では大脳、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。

8) 日本人デング患者より血清、尿および唾液を経目的に採取し、ウイルス遺伝子検出、およびIgA、IgM抗体産生を解析した。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。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は分離されなかったが、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。

9) 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送付(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。

10) 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において、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。

11) 面積約2.59km²の西宮市の西宮浜の

幼虫発生源と考えられる雨水槽 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 km²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、市街地の面積を約57 km²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。

1 2) マラリア流行地域に滞在し、予防内服の「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。が当てはまる。「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。

1 3) アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性に関して、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。

F. 健康危機管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi M, Komagata O, Nihei N. Global warming and vector-borne infectious diseases. *J. Disaster Res.* 2008 (in press).

Kobayashi M, Kasai S, Sawabe K, Tsuda Y. Distribution and ecology of potential vector mosquitoes of West Nile fever in Japan. *J. Environ. Res.* 2008 (in press).

葛西真治, 富田隆史. Question & Answer - アタマジラミは増えているのでしょうか. *健*, 37(1): 12-14, 2008.

富田隆史. 復活したアタマジラミ. すこやかファミリー, 第575号: 22-23, 2007.

富田隆史, 葛西真治. アタマジラミ症. *健康教室*, 59(5): 84-87, 2008.

富田隆史, 葛西真治. アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性. *週刊日本医事新報* 第4377号: 97-98, 2008.

江下優樹, Srisawat R. (2007): デング熱とシマカ. 特集「熱帯病と昆虫」(皆川 昇編), *昆虫と自然*, 42(3): 14-17.

Dieng H, Satho T, Eshita Y. (2007): The Effects of Male on the Blood Feeding behavior of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Implications for laboratory oral

feeding of *Aedes* vectors. Jpn. J. Environ. Entomol. Zool., 18(1): 17-22.

Dieng H, Boots M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. (2007): Effects of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus*. House and Household Insect Pest, 28(2): 117-127.

Dieng H, Satho T, Miake F, Eshita Y. (2007): Copepod predation and arbovirus control: potential thinning with focus on dengue epidemics. House and Household Insect Pest, 29(1): 1-25.

Eshita Y, Takasaki T, Takashima I, Komalamisra N, Ushijima H, Kurane I. (2007): Vector competence of Japanese mosquitoes for dengue and West Nile viruses (III. Biology, Natural Products and Biotechnology). In: Pesticide Chemistry. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, (ed. Ohkawa J, Miyagawa H, Lee PW), Wiley-VCH, Weinheim, pp.217-225.

江下優樹, 牛島廣治(2007) : デングウイルス, ウエストナイルウイルス. 世界的にみた感染症の検査法 (牛島廣治編), 臨床と微生物, 34(4) : 287-294.

江下優樹, Srisawat R, 高崎智彦, 水田英生, 井村俊郎, 内田幸憲, 小林睦生, 高島郁夫, 牛島廣治, 倉根一郎(2007) : ウエストナイルウイルスにおける吸血昆虫とウイルス増殖. 日本獣医学会家禽疾病学分科学会報, (15): 3-12.

Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Srisawat R, Lapcharoen P, Sumroiphon S, Iwanaga S, Ushijima H, Endoh D, Miyata T, Sakata A, Kashige N, Miake F, Fukushi S, Saijo M, Kurane I, Morikawa S, Mizutani T. (2007): Rapid determination of viral RNA

sequences in mosquitoes collected in the field. J. Virol. Methods, 146(2007): 372-374.

江下優樹(2007) : 海外旅行中に蚊に刺された! 蚊が媒介する病気にはどんなものがある? -マラリア, デング熱, 日本脳炎, ウエストナイル脳炎-. (特集: 意外と知らない!? 感染症). チャイルドヘルス, 10(11): 764-767.

Dieng H, Boots M, Higashihara J, Okada T, Kato K, Satho T, Miake F, Eshita Y. (2007): Two-dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* with reference to meal status. Med. Vet. Entomol., 21(3): 278-283.

Yoshi M, Mine M, Kurokawa K, Oda T, Kato K, Ogawa Y, Eshita Y, Uchida K. (2007): Human blood feeding activity of female hybrids between *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Bull. Nagasaki Univ. Sch. Health Sci., 20(1): 91-93.

Mizuno Y, Kotaki A, Harada F, Tajima S, Kurane I, Takasaki T. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007;101(7): 738-739.

Nawa M, Machida S, Takasaki T, Kurane I. Plaque formation by Japanese encephalitis virus bound to mosquito C6/36 cells after low pH exposure on the cell surface. Jpn. J. Infect. Dis., 2007 60: 118-120.

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with downregulation of vascular endothelial cadherin. J Gen Virol. 2008 Mar;89, 642-652.

Ito M, Yamada K, Takasaki T, Pandey B,

- Nerome R, Tajima S, Morita K, Kurane I. Phylogenetic analysis of dengue viruses isolated from imported dengue patients: possible aid for determining the countries where infections occurred. *J Travel Med.* 2007 Jul-Aug;14(4): 233-244.
- Tajima S, Nukui Y, Takasaki T, Kurane I. Characterization of the variable region in the 3' non-translated region of dengue type 1 virus. *J Gen Virol.* 2007 Aug;88(8): 2214-2222.
- Tajima S, Takasaki T, Kurane I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes.* 2008 Feb 21; [Epub ahead of print]
- Nerome R, Tajima S, Takasaki T, Yoshida T, Kotaki A, Lim CK, 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: 2762-2768.
- Ishikawa T, Takasaki T, Kurane I, Nukuzuma S, Kondo T, Konishi E. Co-immunization with West Nile DNA and inactivated vaccines provides synergistic increases in their immunogenicities in mice. *Microbes and Infection,* 9: 1089-1095, 2007
- Kitai Y, Shoda M, Kondo T, Konishi E. Epitope-Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Differentiate West Nile Virus from Japanese Encephalitis Virus Infections in Equine Sera. *Clinical and Vaccine Immunology,* 14: 1024-1031, 2007.
- Yamanaka A, Kosugi S, Konishi E. Infection-enhancing and neutralizing activities of mouse monoclonal antibodies against dengue type 2 and 4 viruses are controlled by complement levels. *Journal of Virology,* 82: 927-937, 2008.
- Konishi E, Kitai Y, Kondo T. Utilization of Complement-Dependent Cytotoxicity to Measure Low Levels of Antibodies: Evaluation in a Model of Japanese Encephalitis Nonstructural Protein 1. *Clinical and Vaccine Immunology,* 15: 88-94, 2008.
- Nawa M, Pan C-Y, Tsai W-H, Chan C-D, Machida S, Takasaki T, Lim CK, Harn M-R, Kurane I. Evaluation of immunoglobulin A-capture enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of dengue virus infection. *Dengue Bulletin,* 30: 157-161, 2006.
- Nawa M, Machida S, Takasaki T, Kurane I. Plaque formation by Japanese encephalitis virus bound to mosquito C6/36 cells after low pH exposure on the cell surface. *J. J. I.D.,* 60: 118-120, 2007.
- Rivera, PT, Crisostomo BA, Villacorte EA, Escueta AD, Maekawa Y, Takagi M, Samaniego J, Ebo A, Kano S. GIS and Malaria Surveillance, A study in disaster-prone malarious provinces in the Philippines (ed. Tongol-Rivera P, Kano S). Free Press Co, Tokyo, 2007 (ISBN: 978-4-902358-04-9)
- Nonaka D, Kobayashi J, Jimba M, Vilaysouk B, Tsukamoto K, Kano S, Phommasack B, Singhasivanon P, Waikagul J, Tateno S, Takeuchi T. Malaria education from school to community in Oudomxay province, Lao PDR. *Parasitol Int,* 57(1): 76-82, 2008.
- Khamlome B, Eto H, Mita T, Sakurai M, Saito T, Tsuzuki A, Kobayashi J, Phompida S, Kobayakawa T. The status of malaria before and after distribution of ITNs from 1999 to 2006 in two districts of Khammounae Province, Lao P.D.R. *Trop Med Health,* 35(4): 343-350, 2007.

Naoshima-Ishibashi Y, Iwagami M, Kawazu S, Looareesuwan S, Kano S. Analyses of cytochrome *b* mutation in *Plasmodium falciparum* isolates in Thai-Myanmar border, *Trav Med Inf Dis*, 5: 132-134, 2007.

Krudsood S, Tangpukdee N, Muangnoicharoen S, Thanachartwet V, Luplertlop N, Srivilairit S, Irat Wilairatana P, Kano S, Ringwald S, Looareesuwan S. Clinical efficacy of chloroquine versus artemether-lumefantrine for *Plasmodium vivax* treatment in Thailand, *Korean J Parasitol*, 45(2), 111-114, 2007.

水野泰孝, 工藤宏一郎, 狩野繁之. 確定診断が困難であったアフリカからの三日熱マラリア輸入例. *感染症学雑誌*, 81(5), 597-599, 2007.

那覇 唯, 原永修作, 比嘉 太, 健山正男, 藤田次郎, 狩野繁之. アーテスネート静注を用いて著明な改善を得た重症熱帯熱マラリアの1例. *Clinical Parasitology*, 18(1), 2007.

狩野繁之. アーテミスニン系薬剤によるマラリア治療の位置づけ. *病原微生物検出情報* 28(1): 7-9, 2007.

2. 学会発表

伊澤晴彦, 中口 梓, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 井上真吾, 森田公一, 比嘉由紀子, 川田 均, 高木正洋, 千屋誠造, 渡辺 護, 斎藤一三, 小林睦生, 澤邊京子. 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および系統解析. 第59回日本衛生動物学会, 2007年4月, 大阪市.

水田英生. ウェストナイル熱の有力な媒介蚊となりうるイナトミシオカについて. 第62回日本衛生動物学会西日本支部大会, 2007年10月21日. 大津市.

Tsuda Y. A mark-release-recapture study on

flight distance of *Culex pipiens pallens* at an urban area in Japan. 42nd Annual Meeting of the US-Japan Parasitic Diseases Joint Panels, January 16~19, 2008, Davis.

津田良夫, 金京純. 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. 第59回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2007年10月, 東京.

松井 晋, 津田良夫, 斉藤篤思, 赤谷加奈, 山内健生, 佐藤雪太, 高木昌興, 村田浩一. 南大東島における鳥マラリア媒介蚊の季節消長. 第59回日本衛生動物学会大会, 2007年4月, 大阪市.

當間孝子, 宮城一郎. 沖縄県北部の田芋畑や水田地域での蚊幼虫, 成虫調査. 第60回日本寄生虫学会南日本支部大会・第57回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会, 2007年10月, 熊本市.

小曾根恵子, 伊藤真弓, 金山彰宏, 小菅皇夫, 小林睦生. 横浜市における蚊類成虫の生息調査—都市部におけるチカイエカの生息状況—. 第23回ペストロジー学会大会, 2007年10月, 長野市.

小曾根恵子, 金山彰宏, 矢矧束穂. ヒトスジシマカの産卵行動. 第60回日本衛生動物学会大会, 2008年4月, 下野市.

二瓶直子, 吉田政弘, 水谷正時, 駒形 修, 望月貫一郎, 小林睦生. 西宮市における蚊幼虫の発生状況調査 (3)GISによる幼虫発生状況の解析と防除対策立案にむけて. 第59回日本衛生動物学会大会, 2007年4月, 大阪市.

二瓶直子, 駒形 修, 小林睦生. ALOS画像を用いた日本住血吸虫症などの感染症の疫学的解析. 長崎大学平成19年度共同研究会、リモートセンシングおよびGISを用いた社会環境要因に記する感染症対策への適用研究, 2008年2月, 長崎市.

Nihei N, Komagata O, Kobayashi, M.
Epidemiological analysis of infectious diseases
and the establishment of a surveillance system
through remote sensing using ALOS images.
The first joint PI symposium of ALOS Data
Nodes for ALOS Program in Kyoto, Nov.
19-23, 2007. Kyoto.

小林睦生, 吉田政弘, 水谷正時, 二瓶直子,
駒形 修, 望月貫一郎. 西宮市における蚊
幼虫発生状況調査 (1) 疾病媒介蚊対策の重
要性に関する科学的根拠. 第 59 回日本衛生
動物学会大会, 2007 年 4 月, 大阪市.

渡辺 護. 震災後の衛生害虫の多発の懸念.
ペストロジー学会第 23 回大会, 2007 年 10
月, 長野市.

葛西真治, 石井則久, 駒形 修, 小林睦生,
富田隆史, 夏秋 優. ピレスロイド剤抵抗
性アタマジラミの実態調査. 日本農薬学
会第 33 回大会, 2008 年 3 月, 奈良市.

江下優樹, Srisawat R, 高島郁夫, 高崎智彦,
水田英生, 内田幸憲, 小林睦生, 倉根一郎.
蚊類のアルボウイルス媒介能 (11) 北海道
産ヤマトヤブカのウエストナイルウイルス
感受性. 第 59 回日本衛生動物学会大会.
2007 年 4 月, 大阪市, *Med. Entomol. Zool.*,
58 (Suppl.): 26, 2007.

木原悠希, 佐藤朝光, 酒井宏治, 江下優樹,
宮田 健, 鹿志毛信広, 見明史雄, 水谷哲也.
未知の蚊媒介性ウイルス検出を目的とした
Whole genome amplification の応用. 第 59
回日本衛生動物学会大会, 2007 年 4 月, 大
阪市, *Med. Entomol. Zool.*, 58 (Suppl.): 28,
2007.

江下優樹. ウエストナイルウイルスにおけ
る吸血昆虫とウイルス増殖 (シンポジウム:
人畜共通感染症病原体との戦い). 第 143
回日本獣医学会, 2007 年 4 月, つくば市,
第 143 回日本獣医学会学術集会 講演要旨
集: 108 (ES-2) 2007.

水谷哲也, 木原悠希, 佐藤朝光, 江下優樹,
酒井宏治, 高崎智彦, 小滝 徹, 遠藤大二,
福士秀悦, 緒方もも子, 西條政幸, 倉根一
郎, 森川 茂. 新興・再興ウイルスの網羅
的検出方法, 蚊媒介ウイルスへの応用. 第
144 回日本獣医学会学術集会, 2007 年 9 月,
江別市.

Diaz Aquino Jose, 湯 偉峰, 石井竜一,
小野哲郎, 青野裕士, 江下優樹, 牧野芳大.
パラグアイにおけるデングウイルス 2・3 型
の分子疫学, 2001-2006. 第 48 回日本熱帯医
学会大会, 2007 年 10 月, 別府市, *Trop. Med.*
Hlth., 35 (増刊号): 12D-07.

江下優樹, Srisawat R, Komalamisra, N,
Rongsriyam Y, 青野裕士, 牧野芳大, 牛島
廣治. タイ国のデング熱患者宅で採集した
蚊のデングウイルス感染. 第 48 回日本熱帯
医学会大会, 2007 年 10 月, 別府市, *Trop. Med.*
Hlth., 35 (増刊号): 12D-21.

日隈晴香, 中山俊之, 江下優樹, 牧野芳大,
三舟求真人. 別府市における輸入デング熱
の一症例. 第 48 回日本熱帯医学会大会, 2007
年 10 月, 別府市, *Trop. Med. Hlth.*, 35 (増刊
号): 13D-11.

佐藤朝光, 木原悠希, 江下優樹, 酒井宏治,
見明史雄, 牛島廣治, 高崎智彦, 小滝 徹,
遠藤大二, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも
子, 倉根一郎, 森川 茂, 水谷哲也. ウイ
ルスの網羅的検出方法, RDV 法による蚊媒
介性 RNA ウイルスの検出. ペスチウイルス
研究会, 2007 年 10 月, 札幌市.

佐藤朝光, 江下優樹, 酒井宏治, 見明史雄,
牛島廣治, 高崎智彦, 小滝 徹, 遠藤大二,
福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一
郎, 森川 茂, 水谷哲也. タイで採集された
ネッタイシマカからの RDV 法による RNA ウ
イルスの検出. 第 55 回日本ウイルス学会学
術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

木原悠希, 佐藤朝光, 酒井宏治, 江下優樹,
宮田 健, 鹿志毛信広, 見明史雄, 水谷哲也.

Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法による蚊媒介性 RNA ウイルスの検出. 第 60 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 57 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会, 2007 年 10 月, 熊本市.

Eshita Y, Srisawat R, Komalamisra N, Rongsriyam Y, Takasaki T, Kurane I, Imura S, Uchida Y, Takashima I, Ushijima H. Experimental vectorial capacity of arbovirus-infected mosquitoes. Joint International Tropical Medicine Meeting 2007 "Health Security in the Tropics". 29-30 November, 2007. Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. Symposium session on S12 Vector control. Abstract of Joint International Tropical Medicine Meeting 2007 (JITMM 2007): 85.

水野泰孝, 加藤康幸, 原田文植, 工藤宏一郎, 高崎智彦, 倉根一郎. 尿および唾液中より Dengue ウイルス遺伝子が検出された 1 例. 第 81 回日本感染症学会, 2007 年 4 月, 京都市.

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, 京都市.

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. プ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, 白山市.

田島 茂, 貫井陽子, 根路銘令子, 高崎智彦, 倉根一郎. Genotype 間キメラウイルスを用いた日本脳炎ウイルスの性状解析. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2007 年 5 月, 白山市.

Meng Ling Moi, Lim Chang-Kweng, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Role of human

Fc-gamma II receptor in antibody dependent enhancement of dengue viral infection. 3rd Asian Regional Dengue Research Network Meeting. August, 21-24, 2007.

高崎智彦. 輸入 Dengue 熱の診断と治療. 平成 19 年度第 2 回静岡県感染症医療関係者研修会, 2007 年 10 月, 静岡市.

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, 札幌市.

田島 茂, 高崎智彦, 倉根一郎. Dengue 1 型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製に及ぼす影響. 第 55 回日本ウイルス学会, 2007 年 10 月, 札幌市.

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, 2007 年 10 月, 札幌市.

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, 札幌市.

高崎智彦, 田島 茂, 小滝 徹, 水野泰孝, 倉根一郎. Dengue 熱患者における尿および唾液中の Dengue ウイルス遺伝子検出. 第 55 回日本ウイルス学会, 2007 年 10 月, 札幌市.

名和 優, 町田早苗, 高崎智彦, 田島 茂, 水野泰孝, 倉根一郎. Dengue ウイルス感染の抗体検査: 患者尿中の IgA 抗体検出. 第 55 回日本ウイルス学会, 2007 年 10 月, 札幌市.

Yoko Nukui, Shigeru Tajima, Tomohiko

Takasaki, Ichiro Kurane. Definition on the major determinant responsible for neurovirulence of Japanese encephalitis virus. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 56 th Annual Meeting, November 4-8, 2007, Philadelphia, USA.

貫井陽子, 田島 茂, 林 昌広, 根路銘令子, 高崎智彦, 倉根一郎. 日本脳炎ウイルスの Genotype shift の解明. 第 81 回日本感染症学会学術集会, 2007 年 4 月, 京都市.

貫井陽子, 田島 茂, 林 昌広, 根路銘令子, 高崎智彦, 倉根一郎. 日本脳炎ウイルスの E 遺伝子が病原性を規定する. 第 12 回日本神経感染症学会学術集会, 2007 年 10 月, 福岡市.

貫井陽子, 田島 茂, 林 昌広, 根路銘令子, 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学術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

町田早苗, 名和 優, 高崎智彦, Ming-Rong Harn, 倉根一郎. 台湾での Dengue 感染診断における IgA 抗体捕捉 ELISA の評価. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2007 年 5 月, 白山市.

Tomohiro Ishikawa, Yoko Kitai, Takashi Kondo, Peter W. Mason, Eiji Konishi: Current status of Japanese encephalitis virus circulation in Japan: surveys of antibodies to NS1 and implications of deletions in the 3'-untranslated region. Forty-First Joint Viral Diseases Panel Meeting US-Japan Collaborative Medical Sciences Program, Baltimore, September, 2007.

糸田川優, 小西英二. 中和活性または感染増強活性を示す抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2007 年 5 月, 白山市.

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, 白山市.

北井陽子, 近藤高志, 小西英二. 新しい日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法: 補体媒介性細胞傷害の利用. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2007 年 5 月, 白山市.

山中敦史, 小西英二. ウイルス血症に対する防御を評価するマウスモデルの確立: Dengue 2 型ウイルスを用いた予備的検討. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2007 年 5 月, 白山市.

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学術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

桑原三和, 小西英二. 昆虫細胞を用いた Dengue 蛋白ワクチン大量生産系確立の基礎的検討. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

北井陽子, 近藤高志, 小西英二. 補体を利用した日本脳炎ウイルス NS1 抗体測定法の開発. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

山中敦史, 小西英二. Dengue ワクチンの防御効力を評価するマウスモデル. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

酒井陽平, 小西英二. インドネシアにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の調査. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

糸田川優, 小西英二. 抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び

感染増強活性の解析. 第 55 回日本ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月, 札幌市.

町田早苗, 名和 優, 高崎智彦, Ming-Rong Harn, 倉根一郎. 台湾での Dengue 感染診断における IgA 抗体捕捉 ELISA の評価. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2007 年 5 月, 白山市.

Rivera Pilarita T, Crisostomo Bobby A, Villacorte Elena A, Escueta Aleyla D, 前川芳秀, 高木正洋, Samaniego Jocelyn, Ebol Antonietta, 狩野繁之. フィリピンの被災地域における地理情報システムによるマラリアサーベイランス. 第 48 回日本熱帯医学会大会, 2007 年 10 月, 大分.

新垣奈々, 三條場千寿, 片貝裕子, 服部正策, 狩野繁之, Emsri Pongponratn, Srivicha Krudsood, Mario Riganti, Sornchai Looareesuwan, 松本芳嗣. 脳性マラリアにおける非感染赤血球の血管外漏出および血漿成分の血管外浸出. 第 76 回日本寄生虫学会大会, 大阪.

Kobayashi J. Beyond deworming: the promotion of school-health-based interventions by Japan. 100 years of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene at the Centenary Conference, September 2007, London, UK.

Yasuko Naoshima-Ishibashi, Moritoshi Iwagami, Toshihide Mitamura, Sornchai Looareesuwan, Shigeyuki Kano. Analyses of cytochrome *b* mutations in *Plasmodium falciparum* isolates in Thai-Myanmar border, 2002-2005. 2nd International Conference of the Journal of Travel Medicine and Infectious Disease, Church House, Dean's Yard, Westminster, London, UK, 12 September, 2007.

石橋(直嶋)康子, 三田村俊秀, 河津信一郎, 北 潔, 狩野繁之. アトバコン耐性熱帯熱マラリア原虫株の *in vitro* での作製とそのミトコンドリアゲノムにおける変異の同定.

第 76 回日本寄生虫学会大会, 2007 年 3 月, 大阪市.

水野泰孝, 加藤康幸, 工藤宏一郎, 狩野繁之. 当センターにおけるマラリア予防内服処方の実績と評価. 第 81 回日本感染症学会学術講演会, 2007 年 4 月, 京都市.

那覇 唯, 原永修作, 中村秀太, 屋良さとみ, 東 正人, 比嘉 太, 健山正男, 當眞 弘, 狩野繁之, 藤田次郎. アーテスネート静注を用いて著名な改善を得た重症熱帯熱マラリアの 1 例. 第 18 回日本臨床寄生虫学会, 2007 年 6 月, 日本大学会館大講堂.

水野泰孝, 加藤康幸, 工藤宏一郎, 狩野繁之. アーテスネート・ルメファントリン合剤(リアメット)による治療後に再燃を認めた熱帯熱マラリアの 1 例. 第 56 回日本感染症学会東日本地方会総会・第 54 回日本化学療法学会東日本支部総会 2007 合同学会, 2007 年 10 月, 東京.

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

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

分担研究者 澤邊 京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・第二室長)
研究協力者 伊澤 晴彦 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官)
星野 啓太 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員)
佐々木年則 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官)
金 京純 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究生)
津田 良夫 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・第一室長)
小林 睦生 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長)

研究要旨: 近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間十人以下と少ない状態が続いているが、野外環境下での日本脳炎ウイルス(JEV)の維持サイクルは健在であり、その活動は依然として活発であると考えられる。本分担課題では、JEV の国内主要媒介蚊であるコガタアカイエカについて、年毎の JEV 保有状況とウイルス遺伝子の変化・推移を監視することを主な目的として、2005 年以降国内各地で捕集された個体からの JEV 検出と培養細胞接種によるウイルス分離、ならびに分離ウイルス株の遺伝子配列をもとにした系統解析を継続して行ってきた。2007 年度も継続して野外捕集コガタアカイエカの JEV 保有検査と分離されたウイルス株の遺伝子解析を行った。

本年度のコガタアカイエカの捕集は、4 月から 10 月にかけて、九州地区(長崎県、熊本県、鹿児島県)の養豚場を含む畜舎とその周辺、臨海の渡り鳥飛来地(新潟県佐潟、東京港野鳥公園)、および東京都市部の公園(林試の森公園)で行った。捕集されたコガタアカイエカは、最高 20 個体までを 1 プールとして乳剤を調製し、ウイルス分離ならびにウイルス遺伝子の検出に供した。その結果、例年ブタの JEV 抗体陽性率の高い九州 3 県の畜舎とその周辺で捕集されたコガタアカイエカからは高率に JEV が検出・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 9 月に捕集されたコガタアカイエカからは JEV が分離された。一方、東京都内の 2 調査地では、いずれも JEV は検出されなかった。

さらに、今回得られた JEV 分離株の遺伝子解析を行い、それらの遺伝子型の同定を行うとともに、これまでに報告されている JEV 分離株との分子系統関係を解析した。その結果、今回得られた分離株はすべて、近年東アジア地域で多く見いだされている Genotype I に属することが分かった。また近年、Genotype I 分離株においてウイルスゲノム 3' 非翻訳領域の変異領域に特徴的な配列欠損が認められ、この変異がウイルス増殖に影響することも報告されている。例年同様、今回得られた各分離株にも同様の配列欠損が認められたが、長崎県の 1 分離株にはこれまでに報告のない新たな欠損部位が存在することが判明した。

A. 研究目的

ここ数年の日本国内における日本脳炎患者数は、年間十例以下と低く推移している。これには、現行の日本脳炎ワクチンによる予防接種が大きく寄与していると考えられる。一方で、現行ワクチン接種の副作用として、急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) による健康被害との因果関係も指摘されている。このため、より安全性の高いと考えられる新規ワクチンが開発され、近い将来の認可が見込まれている。こうした現状が勘案され、2005 年に現行ワクチンの積極的勧奨の差し控えが勧告された。しかしながら、先に述べたように、国内においてここ数年日本脳炎の症例報告は僅かではあるものの、西日本の高齢者を中心に罹患者の発生は毎年途切れることなく続いている。特に、昨年熊本県では 3 例の症例が報告され、うち一件は 3 歳の幼児であった。一方で、近年の急速な遺伝子検出技術の向上を背景に、これまで原因不明の脳炎・無菌性髄膜炎あるいは意識障害と診断されてきた症例の中には、日本脳炎ウイルス (JEV) が関与している場合が少なからず含まれていることも報告されている。また、毎年継続的に行われている全国的なブタの JEV 抗体価の調査からは、依然として JEV の地域的な蔓延が強く示唆されており、実際主要媒介蚊であるコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* から JEV が分離されている。これらの事実は、日本国内では JEV の活動は依然として活発であり、ヒトが日本脳炎に感染する機会には完全には失われていないことを示している。しかしながら、日本脳炎の高流行時に盛んであった各地方衛生研究所による継続的なコガタアカイエカのウイルス保有状況調査については、現在では行

われなくなって久しく、ウイルス媒介蚊の現状に関する知見が極めて乏しい。

以上のような背景から、我々は媒介蚊の JEV 保有状況を改めて把握しておく必要があると考え、2005 年以降日本各地で捕集したコガタアカイエカからの JEV の分離・検出ならびに遺伝子解析を継続的に行なってきた。これまでの過去 2 年間の調査の結果、例年ブタの JEV 抗体陽性率が高い地域で捕集されたコガタアカイエカからは、かなり高率に JEV が検出されることが分かった。特に養豚場周辺のコガタアカイエカ集団については、夏期のある時期かなり高い JEV 保有率を示すことが改めて確認された。これらの結果から、高ウイルス血症を示す動物の周辺に生息するコガタアカイエカによって、地域や時期によっては JEV がヒトへ感染する可能性があると考えられた。

2007 年度は、例年患者の発生がみられる九州地区を重点調査地として選定し、他に大規模野鳥飛来地や都市部も対象として、コガタアカイエカの JEV 保有検査と分離された株の遺伝子解析を行なった。

B. 研究方法

1. コガタアカイエカの捕集

コガタアカイエカは、各調査地点の状況に応じ、捕虫網、CDC 型背負い式電動吸引機、吸虫管あるいは CDC 型ドライイストラップを用いて捕集した。2007 年に、国内で行ったコガタアカイエカの捕集日および捕集地 (ウイルス検出と分離に用いた個体数および分析プール数) は以下の通りである。

- 1) 2007 年 7 月 26 日、長崎県諫早市畜舎 (700 個体・36 プール)
- 2) 2007 年 8 月 6-7 日、熊本県合志市畜舎

- (1,192 個体・60 プール)
3) 2007 年 8 月 20-21 日、鹿児島県川辺町豚舎(1,200 個体・60 プール)
4) 2007 年 5~10 月、新潟県新潟市佐潟湿地(231 個体・14 プール)
5) 2007 年 4~10 月、東京都大田区東京港野鳥公園(70 個体・8 プール)
6) 2007 年 10 月 15 日、東京都品川区林試の森公園(280 個体・14 プール)

2. 捕集蚊の処理とウイルス分離

捕集蚊は、捕集地および捕集日時ごとに最高20個体までを1プールとしてマイクロチューブに回収し、-80°Cで保存した。このうち、吸血後のため腹部に動物血液を有する蚊については、少なくとも1週間砂糖水のみで飼育を継続して消化管内の血液を完全に消化させるか、あるいは卵産下後に回収することで、血液中の残存ウイルスならびに中和抗体の影響を極力排除した。これら蚊プールを、2%牛胎児血清(ICN Biomedicals)および0.2 mM非必須アミノ酸液(SIGMA)を添加した Eagle's Minimum Essential Medium(ICN Biomedicals)中で、細胞破碎機(MM300, QIAGEN)を用いてホモジェナイズした。この蚊乳剤を遠心分離にかけ、得られた遠心上清の一部をtotal RNAの抽出用として取り分け、残りをウイルス分離用の接種源とした。これを濾過用フィルター(口径0.45 μm)で濾過した後、ヒトスジシマカ由来C6/36細胞に接種し、細胞変性効果(CPE)出現の有無を観察しながら、28°C、5% CO₂存在下で7日間培養した。これら各サンプルにつき、少なくとも2代盲継代を繰り返した後、培養上清を回収し-80°Cで保存した。

3. JEVゲノムRNAの検出と遺伝子解析

蚊乳剤の遠心上清からの全RNAの抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて行った。一方、細胞接種後の培養上清からのtotal RNA抽出には、QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)を用いた。各抽出操作は基本的に添付のマニュアルに従った。続くJEVゲノム検出は、既に報告されているReal-Time PCR (TaqMan RT-PCR法)を利用して行った。検査の結果、JEV陽性と判断されたプールについてはエンヴェロープ(E)領域および3'非翻訳領域(UTR)の解析のための遺伝子増幅を行った。まず、SuperScript III first strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen)を用いてfirst strand cDNAを合成した。なお、プライマーにはキット内包の random hexamerを用い、逆転写反応は添付マニュアルで推奨されている条件で行った。逆転写後のPCRは、KOD plus ver.2 (TOYOBO)で行った。なお、プライマーには、①JEV E領域特異的プライマー3組(配列省略)、②JEV 3'UTR特異的プライマー1組(配列省略)を用い、PCR反応条件は添付のマニュアルに従った。反応後産物は2%アガロースゲル電気泳動により確認した。得られた増幅産物はゲルから抽出・精製後、BigDye Terminator ver.1.1にて解析サンプルを調製し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の解析には、GENETYX-WIN ver.9 (GENETYX Co.)およびBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)プログラム(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を利用した。また、分子系統樹作成は、MEGA ver.3.1を用いて行った。

C. 結果

2007年の調査地としては、過去2年連続して JEV が分離されている長崎県、昨年3例のヒト症例が報告された熊本県、ブタの飼養頭数が全国一位である鹿児島県、以上の九州3県の養豚場を含む畜舎とその周辺を選定した。図1に示すように、これら3県は前年のブタの HI 抗体価に見られる日本脳炎感染状況がいずれも50%以上を示す高度感染地域といえる。その他の調査地は周辺に養豚場などの畜舎はみられないが、渡り鳥を含む野鳥の飛来がみられる大規模湖沼や都市部の公園である。うち2調査地(林試の森公園と東京港野鳥公園)が含まれる東京都では、前年のブタの抗体陽性率は50%以下と報告されている。一方、佐潟がある新潟県では、前年にブタの抗体価上昇は認められていない。

表 1 に、TaqMan RT-PCR 法で判定された JEV 陽性プール数と陽性率、ならびにこれらの数値から算出された JEV の最小感染率 (MIR) を示した。まず、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。

次に、得られた JEV 分離株の遺伝子解析を行い、それらの遺伝子型の同定を行うとともに、これまでに報告されている JEV 分離株との分子系統関係を解析した。まず解析対象株として、各地の JEV 分離株から 1~3 プールを選び出し、以下に示すように仮称した。

- 1) 長崎県 (3 分離株): Nagasaki/06/2007, Nagasaki/15/2007, Nagasaki/23/2007
 - 2) 熊本県 (2 分離株): Kumamoto/35/2007, Kumamoto/67/2007
 - 3) 鹿児島県 (2 分離株): Kagoshima/36/2007, Kagoshima/72/2007
 - 4) 新潟県 (1 分離株): Niigata/97/2007
- (以上、合計 8 株)

これら各ウイルス株のゲノム RNA を抽出し、それぞれの E 領域および 3'UTR を RT-PCR にて増幅し、それらの塩基配列解析を行った。その結果、E 遺伝子の塩基配列をもとにした解析により、本年分離の上記ウイルス株はすべて Genotype I に属することが確認された。さらに近隣結合 (NJ) 法により分子系統樹を作成したところ、近年東アジア地域で分離された株や、2002 年以降に西日本を中心に分離された Genotype I の株と遺伝的に極めて近縁であることが示された (図 2)。また、昨年までに我々が分離した株と比較したところ、塩基配列レベルで若干の多様性が認められるものの、そのほとんどがアミノ酸の変異を伴わない置換であることが分かった。しかしながら、本年分離株の多く (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。

次に、ゲノム 3'UTR の翻訳停止コドン下流の可変領域と呼ばれる領域の塩基配列を比較した (図 3)。その結果、Ishikawa 株 (1994 年分離) に代表される近年分離の Genotype I に共通して認められる 13 塩基の配列欠損が今回解析した 8 株すべてに認められた。また、2004 年香川県のブタからの分離株で初めて見いだされ、我々が高知県 (2005 年) と長崎県 (2006 年) で捕集した蚊から分離した株でも確認している別の 9 塩基の欠損をもつタイプが、本年鹿児島県の分離株の中にも見出された (Kagoshima/72/2007)。前に示した E 遺伝子の分子系統解析の結果からも、これら欠損を持つウイルス株は互いに非常に近縁な関係にあることが強く示唆された。一方、長崎県の 1 分離株 (Nagasaki/06/2007) には、翻訳停止コドン直下にこれまでに報告のない 6 塩基の欠損が存在することが判明した。

D. 考察

2007 年、我々が主にコガタアカイエカを捕集した場所は、JEV の増幅動物であるブタが肥育されている畜舎とその周辺である。今回、JEV が分離された時期の長崎、熊本、鹿児島県の九州 3 県では、例年この時期に、ブタの HI および 2-ME 感受性抗体の上昇が確認されており、捕集したコガタアカイエカの中には、ウイルス血症を呈した時期のブタを吸血した

経験のある個体が少なからず含まれていたと考えられる。当年の JEV のブタにおける蔓延状況を考え合わせると、本結果のように高率にコガタアカイエカが JEV を保有していても不思議ではない状況であったといえる。特に長崎県での過去 2 年の調査では、ほぼ同じ時期に採集された蚊から JEV が高率に分離されていることから、これら地域では毎年 JEV の活動が非常に活発であるといえる。また、今回初めての調査地となる熊本県と鹿児島県でも高率に JEV が分離されてきた。このように、時期や地域によっては JEV を保有したコガタアカイエカがヒトの生活環境の近くに多数存在することが明らかとなった。現在では、日本脳炎ワクチンの普及や生活環境の変化等により、ブタの感染状況とヒトの患者発生は必ずしも一致していない。しかしながら、ブタや媒介蚊の感染状況から JEV が蔓延していると推測される地域では、JEV に対する免疫が低い住民への感染の危険性は依然として高いと考えられる。実際、西日本を中心とした散発的な日本脳炎患者の発生は、これら JEV を保有したコガタアカイエカによる刺咬が直接的な原因である可能性が極めて高い。

今回初めて調査を行った新潟県の佐潟では、9 月 19 日に捕集したコガタアカイエカから JEV が分離された。佐潟は、新潟市の南西部に位置する砂丘湖であり、ラムサール条約に登録されている国内有数の水鳥の一大生息地である。今年度新潟県では 9 月の時点でブタにおける JEV の流行は確認されておらず、また佐潟周辺には田園地帯は広がっているが特に大規模な養豚場は見あたらないことから、今回の JEV 陽性蚊個体が何時如何にしてウイルスを獲得したかについては推定するのは難しい。一般にコガタアカイエカの行動範

囲は他の蚊種に比べ非常に広範であることが知られており、今回の JEV 保有蚊がかなり離れた地域から飛来してきたことも考えられる。また今回の場合、JEV の保有宿主となり得る水鳥類が周辺に多数生息しており、コガタアカイエカの吸血嗜好性も考え合わせると、これら付近の野鳥類からウイルスを獲得した可能性も十分考えられる。

JEV は増殖動物および媒介蚊によってインド以東のアジア広域に拡散すると考えられており、その流行に伴って日本における JEV の遺伝子型が、1990 年頃を境に Genotype III から Genotype I へと移行してきたことが報告されている。遺伝子解析の結果、今回国内各地のコガタアカイエカから分離されたウイルスは全て Genotype I に属し、近年日本をはじめとする東アジア各地域で分離された株と極めて近縁であることが判明した。しかしながら、本年分離株の多くは、明らかに昨年までの分離株とは独立したクラスターに属することが、分子系統解析で示された。また、これらと同所的に分離された株であっても、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あつた。すなわち、それぞれの蔓延地域の JEV は遺伝的に必ずしも均一ではなく、遺伝的多様性のある複数のウイルスが混在している状況であることが示唆された。また最近、いくつかの Genotype I 分離株において 3'UTR の可変領域に特徴的な配列欠損が認められ、この変異がウイルスの毒性といった表現型に影響することが報告されている。今回得られた分離株にも同様の欠損が認められたが、本年はこれまでに確認されていない新たな欠損部位が存在するウイルスも見つかった。これらの配列欠損がいかなる理由で起こり、また、ウイルスの複製・増殖・病原性あるいは疫学的

にどう影響しているのかについては現時点では未解明な部分が多く、今後の課題である。

以上本研究により、依然として地域や時期によっては JEV がコガタアカイエカからヒトへ媒介される可能性があることが強く示唆され、今後とも国内における媒介蚊の JEV 保有状況とウイルス遺伝子の変化・推移を把握しておくことは、疫学上重要であると考えられる。

E. 結論

1) 2007 年、長崎、熊本、鹿児島各県の豚舎を含む畜舎とその周辺で捕集されたコガタアカイエカから高率に JEV が分離された(陽性プールの割合は 3.3-19.4%)。また、大規模野鳥飛来地である新潟県佐潟で捕集したコガタアカイエカからも JEV が分離された。

2) E 領域および 3'UTR の配列解析の結果から、今回得られた分離株はすべて、近年日本をはじめとする東アジア地域で多く分離されている Genotype I のウイルスと遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。また、長崎県の 1 分離株には、これまでに報告のない 3'UTR 内の欠損変異が確認された。

3) 養豚場を含む畜舎周辺で捕集されたコガタアカイエカは JEV を高率に保有していることが明らかになり、これら感染状況から JEV が蔓延していると推測される地域では、ヒトへの感染の危険性が高くなっていると考えられる。

謝辞： コガタアカイエカの捕集およびウイルス検出を実施するにあたり、以下の方々にご協力をいただいた。ここに記して深謝する(敬称略)。梁瀬徹・今田忠男(動物衛生研究所九州支所)、奥菌義美・山崎嘉都夫・内村江

利子(鹿児島県南薩家畜保健衛生所)、松村正哉(九州沖縄農業研究センター・難防除害虫研究チーム)、川田均・角田隆・大橋和典・前川芳秀・高木正洋(長崎大学熱帯医学研究所・生物環境部門)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1)伊澤晴彦, 中口梓, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 井上真吾, 森田公一, 比嘉

由紀子,川田均, 高木正洋, 千屋誠造, 渡辺護, 斎藤一三, 小林睦生, 澤邊京子. 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および系統解析. 第 59 回日本衛生動物学会. 4 月, 大阪市(2007)。

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

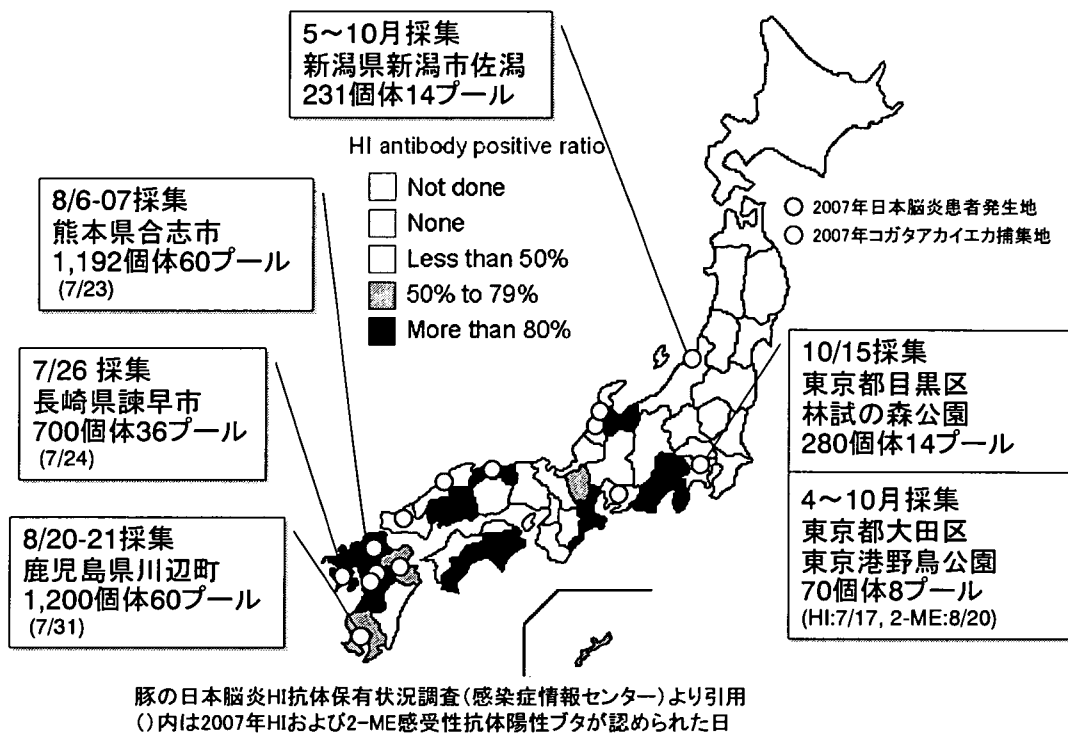


図 1 2007 年ブタの日本脳炎感染状況およびコガタアカイエカの国内捕集地

表 1 2007 年捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルス分離状況

蚊捕集地	供試虫数	プール数	JEV陽性 ^a プール数(%)	MIR ^b
長崎県諫早市(豚舎)	700	36	7 (19.4)	10.0
鹿児島県川辺町(豚舎)	1,200	60	6 (10.0)	5
熊本県合志市(畜舎)	1,192	60	2 (3.3)	1.7
新潟県新潟市佐潟	231	14	1 (7.1)	4.3
東京都目黒区林試の森公園	280	14	0	0
東京都大田区東京港野鳥公園	70	8	0	0
合計	3,673	192	16 (8.3)	4.4

a: JEV陽性プールは、蚊腐砕液をC6/36細胞により2代盲継代後、上清より抽出したRNAを用いて TaqMan RT-PCR(WNV/JEV検出用プライマー&プローブセット, Shirato et al., 2005) により遺伝子の有無を確認。その後、envelopおよび3'UTRにおける遺伝子解析を行った。

b: 陽性プールに最低1匹の陽性蚊が存在したと考えた場合の1,000匹中の感染蚊数 (MIR: 陽性プール数/総捕集数×1,000)

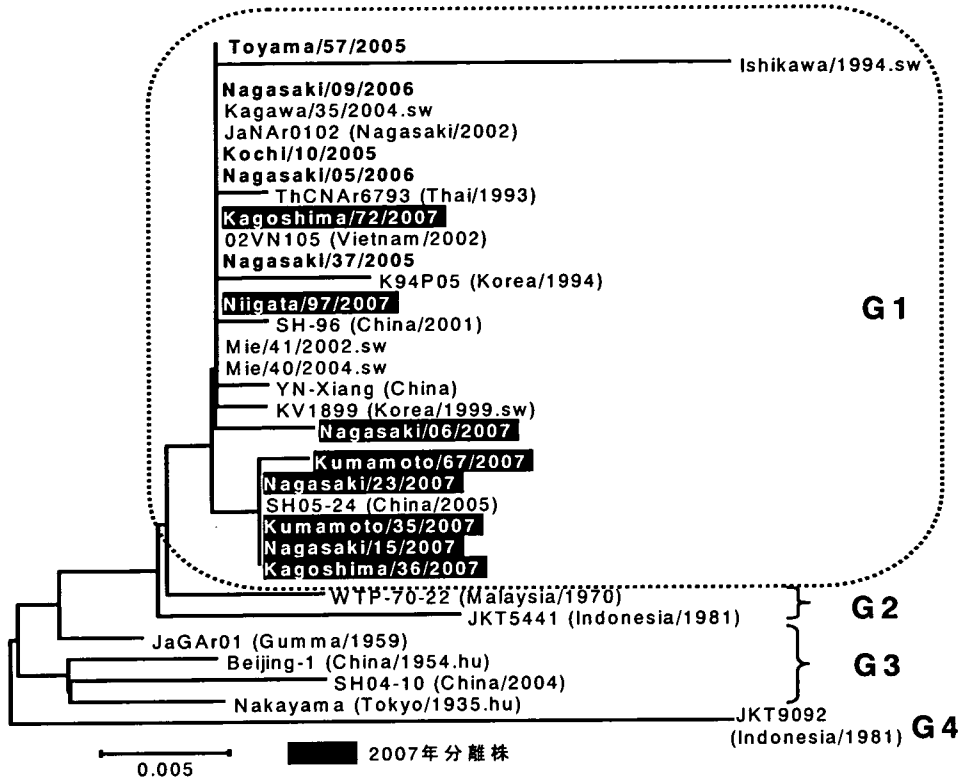


図2 エンヴェロップ(E)領域アミノ酸配列をもとに作成したNJ系統樹

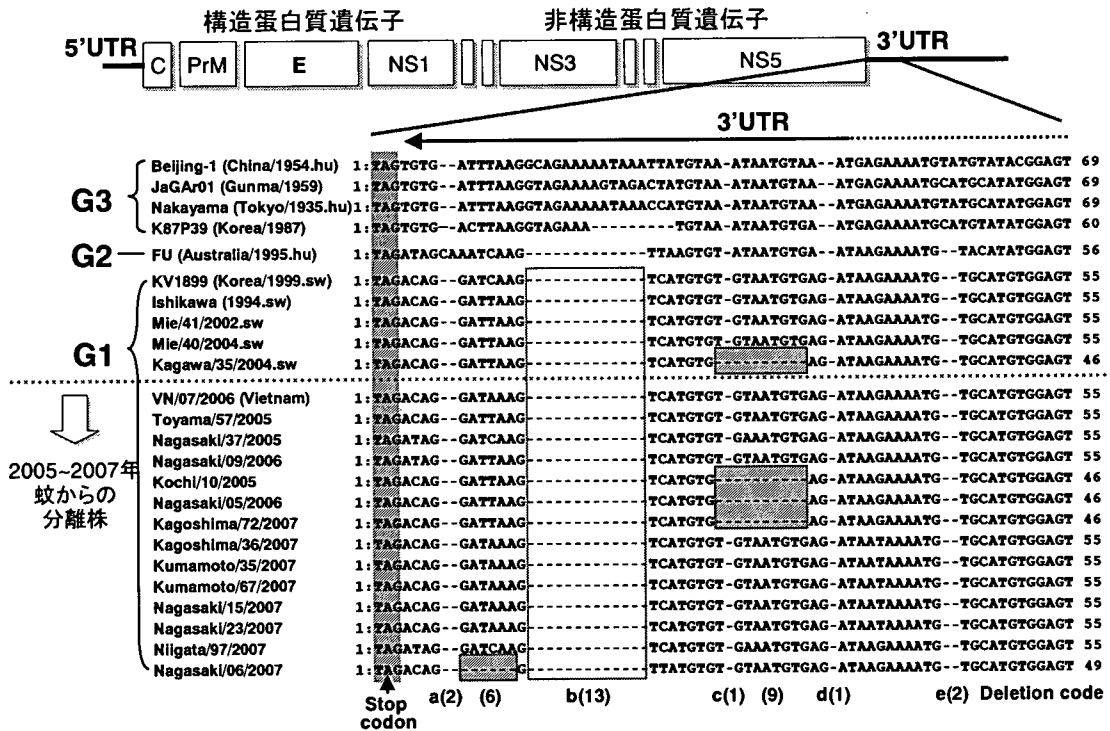


図3 3'非翻訳領域に見られた特徴的な配列欠損

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

分担研究者 小林睦生 国立感染症研究所
研究協力者 水田英生 神戸検疫所
後藤郁夫 神戸検疫所・副統括検査官
森 英人 神戸検疫所・副統括検査官
白石祥吾 神戸検疫所・衛生管理官

研究要旨 平成18年度に引き続き、養豚場周辺の日本脳炎ウイルス（JEV）媒介蚊の発生状況と養豚場内における JEV の活動を明らかにすることに加え、JEV の周辺地域への拡散を明らかにするため、昨年 JEV の活動が活発にみられた養豚場内の3ヶ所に加え、養豚場から約400m離れた集落内1ヶ所にライトトラップを設置し、成虫を経時的に捕集し、種別後、雌を抽出し、吸血の有無、さらには脚部と胴部に分け JEV 遺伝子を検出し、養豚場および周辺地域の JEV 活動状況を調査した。また、養豚場周辺の媒介蚊の発生状況も昨年同様併せて調査した。捕集され成虫は6属10種、幼虫は6属16種であり、幼虫、成虫共捕集個体数の多かった種はコガタアカイエカ（*C. tri*）とシナハマダラカ（*A. sin*）であった。JEV 媒介蚊の *C. tri* は昨年同様田植えが始まる5月中旬以降に養豚場周辺地域で発生が認められるようになったが、成虫はそれよりも1ヶ月早い4月に豚舎前や豚舎内で捕集された。そして幼虫の発生率が増加するに伴い豚舎内でも約1ヶ月遅れで成虫の捕集個体数が増加するようになった。捕集された蚊はほとんどが雌であり、雌のうちフタクロホシチビカ（*U. nov*）を除く1,614個体109プール（内 *C. tri* は1,396個体61プール）について JEV 遺伝子検出を試みたが、昨年の結果と相反し、JEV 遺伝子は検出されなかった。2年間の調査で、越冬蚊が豚舎内に侵入する時期から捕集蚊にウイルス遺伝子が認められる時期まで約3~4ヶ月かかること、昨年、養豚場内で多数の感染蚊が認められたにも関わらず本年は全く JEV 保有蚊が認められなかったことから、この地域では蚊におけるウイルスの越冬は無いものと思われ、ウイルスは何らかの方法でこの地域に持ち込まれるものと思われた。また、本年は周辺地域での *C. tri* 幼虫の発生率や豚舎内での *C. tri* 捕集個体数が昨年に比べ相対的に多かったことから、周辺地域の *C. tri* 発生と豚舎内で捕集される *C. tri* 個体数の間に相関関係があるように思われたが、昨年の7月中旬に *C. tri* の発生率が本年に比べ低かったにも関わらず豚舎内での *C. tri* 捕集個体数が飛び抜けて多かったことから、周辺地域の *C. tri* 発生率と豚