

採集地点のサンプル全体に含まれるハプロタイプの種類が最少となるように暫定的に2つのハプロタイプに分解した。

15) 国内産イエカ属蚊から発見された新規フラビウイルスの遺伝子構造解析

・顕微鏡観察：細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)は、ウイルス接種細胞を接種後7日まで位相差顕微鏡で観察した。ウイルス粒子の電子顕微鏡観察は、Yano *et al.* (1996)に従った。

・ウイルス粒子の精製および構成タンパクの解析：ウイルス粒子の精製は、ウイルスストックを原液として開始した。本ストックは、7.5% polyethylene glycol, 0.5M NaClの条件で混合し、氷上で2時間置いた後、遠心(10,000 rpm, 30min., 4℃)し、得られた沈殿をTSE bufferで懸濁した。この懸濁液を30% glycerol-45% potassium tartrate, 続いて5-40% sucroseの密度勾配遠心(25,000-30,000 rpm, 2-2.5 hrs., 4℃)を行い、得られたウイルスバンド画分は回収後、透析によりTSE bufferに置き換えウイルス精製粒子とした。

・ヌクレオチド配列決定および系統解析：ウイルスRNAは、ウイルスストックからRNeasy Mini Kit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、産物は精製しサイクルシーケンシング法でヌクレオチド配列決定を行った。さらに、得られた配列情報から構成タンパクEおよび非構成タンパクNS5の両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。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法による系統的な推定を試みた。

16) 国内で捕集された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  
・蚊の捕集：2006~2008年に国内で行ったコガタアカイエカの捕集地は下記のとおりである。

2006年：宮城県角田市牛舎、東京都新宿区、高知県安芸市牛舎、長崎県諫早市畜舎および森山町豚舎。捕集蚊合計813頭・41プール。

2007年：新潟県新潟市佐潟湿地、東京都目黒区林試の森公園、同・大田区東京港野鳥公園。長崎県諫早市畜舎。熊本県合志市畜舎。鹿児島県南九州市豚舎。捕集蚊合計3,673頭・192プール。

2008年：山形県酒田市牛舎、茨城県那珂市牛舎、千葉県館山市豚舎、東京都目黒区林試の森公園、神奈川県横浜市牛舎、静岡県御前崎市豚舎、滋賀県彦根市牛舎、島根県出雲市牛舎、長崎県諫早市畜舎、熊本県菊池市豚舎、鹿児島県南九州市豚舎、沖縄県石垣市豚舎。捕集蚊合計4,620頭・235プール。

・細胞培養およびウイルス分離：捕集蚊は、最高20個体までを1プールとして蚊乳剤を作成した。蚊乳剤の一部を、主にヒトスジシマカ由来C6/36細胞に接種し、細胞変性効果(CPE)の有無を観察しながら、28℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で7日間培養した。2~3代の盲継代によりウイルス分離を試みた。

・ウイルスRNAの検出および遺伝子解析：  
細胞接種後の培養上清から全 RNA を抽出し、逆転写 PCR (RT-PCR) を行った。使用したプライマーは、①フラビウイルス NS5 領域ユニバーサルプライマー (FU1, cFD2 および FU2, cFD3) (Kuno *et al.*, 1998)、②JEV E 領域特異的プライマー (配列省略)、③JEV 3' 非翻訳領域特異的プライマー (配列省略) である。2%アガロースゲル電気泳動により確認された増幅産物をゲルから抽出・精製し、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列情報を基に分子系統樹を作成した。なお、2008年の検体に関しては、real-time PCR (TaqMan) 法 (Shirato *et al.*, 2005) により遺伝子検出を行い、JEV 陽性プールについては、上述したと同様に塩基配列を解析した。

17) デングウイルス抗原により前免疫したマウスにおけるデング 4 価 DNA ワクチンの中和抗体誘導能の増強及び交差免疫原性の考察

ウイルス：デング1型ウイルス (DENV1) 望月株、デング2型ウイルス (DENV2) ニューギニアC (NGC) 株、デング3型ウイルス (DENV3) H87株、デング4型ウイルス (DENV4) H241株、WNVのEg101株及びJEV中山株を用いた。

DNAワクチン：デング1型、2型、3型及び4型に対するDNAワクチン、ウエストナイルDNAワクチン及び日本脳炎DNAワクチンは、それぞれのウイルスのprM-E遺伝子をpcDNA3ベクターに組み込み作製した。ただし、pNJEMEのベクターは、ミシガン大学ベクターコアから分与されたpNGVL4aである。また、デング4価DNAワクチンは、1型から4

型に対するDNAワクチンの等量混合液とした。

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) の培養液を、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得たDENV2細胞外粒子 (D2EP) を用いた。また、市販の日本脳炎不活化ワクチン (JEVAX; 武田製薬) 及びウエストナイル不活化ワクチン (WNVAX; フォートドッジ社) を用いた。

マウス実験：4-5週齢のICRまたはddY系統のマウス (1群4~6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投与した。投与にはジェット式針無注射器 (島津製作所) を用いて麻酔下で接種した。採血は眼窩静脈叢から行い、血清を中和試験に供した。

ブタ実験：4週齢のブタ (クラウンミニ系) に、pNJEMEとJEVAXの混合液を麻酔下で針無注射器を用いて、大腿部内側に投与した。

18) デング熱患者における尿および唾液中のデング熱ウイルス遺伝子検出およびチクングニヤウイルス感染症実験診断法の開発

デングウイルス：我々は2006年よりデング熱患者の診断検査に際し、血液とともに尿および唾液からのウイルス検出を検討した。デングウイルス輸入症例 61 例につき、血液 (血清) および尿、唾液を採取した。尿は粗遠心し沈査を除去した後、その上清を簡易濃縮遠心チューブにて濃縮し 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 (J. Clin. Microbiol. 42 (12): 5935-5937, 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、シークエ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。デング熱診断のための血清抗体検査は IgM-捕捉 ELISA kit および IgG-ELISA kit により IgM および IgG 抗体を測定した。リアルタイム PCR により陽性であった 27 症例の検体に関して、通常の PCR を実施したところ 8 症例の検体で産物が増幅・検出された。cDNA の増幅 (E 遺伝子領域) が確認された検体は、デングウイルス型別用のプライマーを用いてダイレクトシークエンスにより、ベックマンコールター社のプロトコールに従い塩基配列を決定した。

チクングニヤウイルス：

1) 逆転写 PCR 用プライマーセット

・Chik3512s : (10273bp)

ACG CAA TTG AGC GAA GCA CAT

・Chik3991s : (10552bp)

AAA TTG TCC TGG TCT TCC TG

2) リアルタイム PCR (TaqMan 法) 用プライマー&プローブセット TaqMan 用プローブ、プライマー

・Probe: Taq-Chik638P

FAM-TACCAGCCTGCACAYC-MGB-3'

・Primer(F) : Taq-Chik607F (10849)

GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT

・Primer(R) : Taq-Chik672R (10894)

GCC CCC RAA GTC KGA GGA R

19) 蚊類のアルボウイルス感受性、大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査、およびタイ国でのデング熱媒介蚊調査に関する研究

ウイルス： ウェストナイルウイルスは、ニューヨーク株を、日本脳炎ウイルスとし

ては、北京株、日本国内で分離された JaGAR01 株(蚊から分離)、JaTh160 株、および三重株(ブタから分離)を用いた。ヤマトヤブカは野外から採集した蚊を用いた。アカイエカは、大阪で採集されたものを大日本除虫菊(株)から譲り受け、大分大学の飼育施設で継代飼育しているものを使用した。チカイエカ、トウゴウヤブカの蚊種は、実験室内で継代飼育中の蚊を用いた。

蚊の感染：羽化後 1 週間程の未吸血のアカイエカ *Culex pipiens pallens* 雌成虫、チカイエカ *Culex pipiens molestus*、ヤマトヤブカ *Ochleloratus japonicus* を用いた。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。また、蚊の接種感染では、ウイルス液を 0.2ul 接種した。その後、8 日間 28°C で飼育した。その間 4% 砂糖水を含む綿を蚊に与えた。ハーベストした蚊は、ウイルス力価を個体別に測定するまで、-80°C に保管した。

20) 日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究

病原性を規定する部位を同定するために必要な JEV 分子クローンを構築し、JEV のリバーシジェネティクスを確立した。構築のための親ウイルスとしては、低病原性を示す Sw/Mie/41/2002 (Mie41) 株を用いた (Nerome et al. J. Gen. Virol. 88: 2762-2768 (2007))。これよりウイルス RNA を合成し、Vero 細胞に導入することにより組換えウイルス粒子を得た。Mie41 と比較するウイルス株として、高病原性株である

Beijing-1(smb37)株とSw/Mie/40/2004(Mie40)株を用いた。これら2株とMie41株との組換えキメラウイルスを作製した。さらに部位を絞り込むため、様々な点変異ウイルスも作製した。病原性はマウス(ddYあるいはC3H/He系統、3週齢)の腹腔に各ウイルスを接種し、3週間経過観察することにより判定した。

#### 21) デングウイルス感染の抗体検査に関する研究

デングウイルス感染症の血清学的診断は、発熱後5日間程度の急性期では血清中よりデングウイルスRNAを検出して確定診断する。それ以後の回復期では、血清中の特異的IgM抗体検出で診断可能である。流行地台湾でのデング患者のIgA抗体とIgM抗体の解析でIgM抗体が感染後1ヶ月以上検出される例があり、特異的IgA抗体検出の方が抗体消失も早期で感染様態を反映していることが分かった。

尿中、唾液中のIgA抗体検出:尿及び唾液でのIgA抗体検出を目的とし、方法は血清IgA-ELISA検出法を応用し、交差反応が懸念される日本脳炎ウイルスIgA抗体を同時に測定し検討した。非感染日本人の尿では抗デングIgA抗体は検出されず、日本人輸入デング症例において8倍希釈で尿中および唾液でのIgA抗体が検出された。

#### 22) 動物モデルを用いたマラリア重症化機構に関する研究

脳性マラリア発症機序の解明:原虫は熱帯熱マラリア原虫*Plasmodium falciparum* Indochina-I/CDC株、実験動物はボリビア型リスザルを用いた。感染リスザル赤血球 $10^9$ 個を6頭のリズザルに静脈内接種した。リスザルは安楽死後剖検に供した。昏睡を

来した後死亡したリスザルについては死亡直後に脳を含む各臓器を摘出し解析に用いた。採取したリスザルの脳を用い、病理学組織学的解析、超微形態学的解析および免疫組織化学的解析を行った。

L-FABPのバイオマーカーとしての有用性:原虫はBalb/cマウスに対して致死的な感染を惹起する*P. berghei* ANKA株および、Balb/cマウスに対して一過性の原虫血症を起こした後自然消失する*P. chabaudi*を用い感染を行った。動物はBalb/cを遺伝的背景とするヒトL-FABP遺伝子導入マウスを用いた。マラリア原虫感染赤血球接種後、感染マウスにおける末梢血感染赤血球率をギムザ染色血液塗抹標本により測定した。また、連日、尿を採取し、尿中hL-FABP濃度はELISA(ヒト型L-FABP測定キット、IBL)により測定した。また、感染マウス腎臓の病理組織学的解析を行った。クロロキンによる治療は総量35mg/kgを5日に分け腹腔内投与することにより行った。

#### 23) 変容する環境の中でのマラリア媒介蚊防除対策

感染リスクを左右する吸血嗜好性については、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うち、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(1地域)とタイ北部地方(3地域)の夜間成虫採集データを分析対象とした。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*)については特に詳細に吟味した。採集は、18時より24時までの前半夜採集

とし、各調査村の2カ所から6カ所の複数地点において、人囷を用いた採集と水牛(または牛)囷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。危険種の分布と災害調査は、フィリピン・ミンダナオ島の海岸に面したマラリア流行地で行った。それぞれの地域は、異なる環境(土地被覆、雨量、温度など)から構成されており、過去に自然災害(地震・津波など)があった州も含んでいた。採集方法は、前年に実施した中国雲南省の方法に準ずる。同胞種の精査については、予備実験により *COI*, *COII*, *cit b*, *ND5*, *ND6*, *ITS* の各遺伝子座のうち、*COI* (mtDNA) 部分配列の増幅に成功したので、ベトナム各地で採集された *Anopheles* 属 *Leucosphyrus* Group (*An. dirus* s. l., *An. leucosphyrus* ConSon form ならびに *An. sp. like takasagoensis*) 52 個体について、*COI* 遺伝子座 225bp をシーケンズした。

24) 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

タイ国マヒドン大学熱帯医学部、国際寄生虫対策アジアセンター (ACIPAC)、国際寄生虫対策西アフリカセンター (WACIPAC) を中心に、各国のマラリア対策の戦略と進行状況を調査した。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の入手を図った。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、感染地域の調査にてマラリア感染の実態を把握し、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見出した。さらにアジア貧困僻地に

おけるマラリア対策の現状と問題点を明らかにするために、ラオス・カンボジアにおいて保健政策策定者・マラリア対策策定者とともに貧困僻地の行政機関従事者・医療機関従事者・ヘルスポランテニアにインタビューを実施した。さらにラオスにおいてはマラリア対策政策と貧困削減戦略とを比較検討を行った。

三日熱マラリアの再発・再燃に関する疫学調査においては2007年5月より2008年10月の間、タイ国、ラーチャブリー県、スアンブンにある Rajanagarindra Tropical Disease International centre (RTIC) を来訪した患者のうち顕微鏡診断にて三日熱マラリア陽性と診断(熱帯熱マラリアとの mixed infection は除く)された患者で3歳以上を対象とし、研究の趣旨を説明後、参加に同意する患者のみを本研究の研究対象とした。

25) マラリア重症患者の管理および治療体制に関する研究

・マラリア予防ガイドラインの改訂とその評価研究:「マラリア予防ガイドライン」の運用評価研究、および、ガイドラインの改訂を行った。改訂にあたっては、「マラリア予防専門家会議」を再編成し、特に予防内服の「実施基準」の項目に大幅な改訂を加えた。

・ACT の有用性に関する臨床研究: 薬剤耐性マラリアおよび重症マラリアに特に有効とされる青蒿素 (チンハオスー / Qinghaosu : Artemisinin) 誘導体との混合療法 (Artemisinin-derivatives Combination Therapy: ACT) の有用性に関する臨床研究を、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、

その有用性を評価した。

・輸入マラリア患者の臨床管理に関する研究：国立国際医療センター/国際疾病センター渡航者健康管理室（トラベルクリニック）を訪れた日本人患者の症例、および、琉球大学附属病院を訪れたスーダン人の患者で、アーテスネート静注（わが国では未承認の新薬：青蒿素誘導体）を用いて救命しえた重症熱帯熱マラリア患者の症例報告を行った。また、日本国内で発症したマラリア患者の臨床管理に関して、詳細な記載を行って論文にまとめることで、新しい治療法の均質化をわが国で図った。

（倫理面への配慮）本研究は、ヘルシンキ宣言における臨床研究の基準を遵守した。国立国際医療センターのクライアントの情報取り扱いに関しては十分な配慮を行うとともに、書面による同意を得ている。マヒドン大学の倫理委員会の審査も通過している。

## C: 研究結果

### ①千葉県におけるカ類の生息実態調査

・千葉県北部のカ類発生动向  
（平成18～20年度）

千葉定点ではアカイエカ群が3年間を通して優占種となった。コガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカも構成比が20%をこえたが、捕獲数が上位種に集中することはなく構成比の変動は少なかった。成田定点はヒトスジシマカが18年度の優占種だったが19年度からコガタアカイエカに変わった。構成比は2位のヒトスジシマカと2種で90%以上を占め上位種に偏る傾向が強く、種類数が18年度の11種から20年度は8種に減少した。

・成虫の活動する温度条件  
（平成18～20年度）

千葉定点では18年3月27日にアカイエカ群が捕獲された。前日の最低気温は13℃でこの地域のアカイエカの活動開始気温が12℃という従来の知見と一致した。20年1月9日に捕獲された日の最低気温は5℃で1月の気温としては高く、前年秋期の活動の継続であれば秋期の活動が終了する最低気温5℃の気象条件と一致した。成田では19年4月15日にコガタアカイエカが捕獲されたが、前日の最低、平均気温はそれぞれ12℃、17℃で平年の5月中旬の気温だった。20年は3定点のコガタアカイエカの活動開始日（6月中旬）と活動終了日（12月上旬）とがほぼ一致した。

・幼虫の薬剤感受性試験  
（平成19, 20年度）

各種カ幼虫について4種の薬剤で90%以上の死亡率が得られた濃度はフェニトロチオンが0.0125～0.025ppm（19年度）、0.0063～0.025ppm（20年度）、ダイアジノンが0.025～0.05ppm（19, 20年度）、フェンチオンが0.005～0.01ppm（19年度）、0.0025～0.01ppm（20年度）、ペルメトリンが0.005ppm（19年度）、0.005～0.01ppm（20年度）だった。カの種類間により薬剤の感受性に2～4倍以内の差が認められたが、防除の現場では種間の差は現れないものと思われる。防疫上問題となるアカイエカ群とヒトスジシマカはウエストナイル熱媒介カ対策に関するガイドラインが示す診断基準の水準Iのレベルで、薬剤抵抗性の問題点は認められなかった。

②2007年4月から定期調査を行っていた東京都立林試の森公園で、蚊の繁殖シーズン

の終了期に相当する9月末に、突然コガタアカイエカ成虫が多数捕獲され始めた。継続して調査した結果、9月末から12月にかけてコガタアカイエカ成虫が集団で飛来していることが明らかになった。採集された雌成虫を解剖し、卵巣の形態観察を行った結果85.7%の個体が繁殖休眠状態にあることがわかった。2008年1月から4月の調査によって、越冬から覚めた成虫が捕獲され、多数飛来したコガタアカイエカの一部分がこの調査地で越冬していたことがわかった。コガタアカイエカの都市域での生態に関しては不明な点が多く、さらに研究を継続する必要がある。

・2007年4月から12月まで東京都内の公園でsweeping採集によって、吸血個体21個体を含む76個体のヤマトクシヒゲカが採集された。ヤマトクシヒゲカ成虫の季節消長には、4~7月と10~12月のおおよそ2回の活動時期が認められた。2007年に採集されたヤマトクシヒゲカの吸血蚊からDNAを抽出し、吸血源動物の同定と併せて鳥マラリア原虫の検出を行った。本種の吸血源の87%は野鳥で、吸血源とされた野鳥種はシジュウカラ、シロハラ、ハシブトガラス、スズメ、ヤブサメの5種であった。鳥マラリア原虫は、シジュウカラ、シロハラ、ハシブトガラスを吸血していた3個体から検出された。検出された鳥マラリア原虫の系統は3つあり、2つは海外の調査で報告されているものと一致したが、残りの1系統はこれまで報告されていない独自のものであった。

・野外における吸血蚊の採集と潜伏場所に関して、捕虫網によるsweeping採集では1時間あたり平均7.8雌と捕獲個体数は多く

はないが、頻繁に採集を実施することで数百個体の吸血蚊を得ることができた。また、ハマダラナガスネカ、トラフカクイカ、ヤマトクシヒゲカなど、ドライアイストラップや人囮採集ではほとんど捕獲されない種類が捕獲された。特殊な道具を必要としないこと、採集にさほど経験を要しないことから、捕虫網によるsweeping採集は吸血蚊を採集する方法として有効であると思われる。サギ類の集団営巣地として利用されている林(サギ山：島根県平田市)および森林(千葉県立野鳥の森)を対象として、吸血蚊のsweeping採集を試みた。サギ山で2008年5月~8月に実施した採集では、17種類287個体(雌200、雄87)の蚊が捕獲された。このうち吸血蚊は10種類45個体であった。

・渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査では、東京湾沿岸の干潟地域を選び、ドライアイストラップによって蚊の捕集を行った。東京港野鳥公園では6種類1,640個体、谷津干潟では4種類361個体が捕獲された。東京湾沿岸の干潟地域で、これまで関西でしか採集されていなかったイナトミシオカの生息が大阪以東で初めて確認された。渡り鳥飛来地として、青森県十三湖周辺、新潟県佐潟水鳥・湿地センター、東京港野鳥公園の3調査地を選び、疾病媒介蚊の発生状況を調査した。3地域全体で10属17種5,338個体の蚊成虫が採集された。アカイエカ群は3調査地のいずれでも捕獲数の最も多い優占種であった。丘陵地の採集場所で希少種のコガタキンイロヤブカ、*Ae. bekkui*が2個体採集された。

③2006年度に捕獲された蚊は、アカイエカ群、コガタアカイエカ、カラツイエカ、ヒ

トスジシマカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカ、シナハマダラカ、キンパラナガハシカ、フタクロホシチビカの6属9種であった。2007年度、2008年度に捕獲された蚊は2006年度の採集種にヤマトクシヒゲカを加えた6属10種であった。捕獲された種は3年間の調査を通じほぼ同様であった。

横浜市内の4住宅ではアカイエカ群が優占であった。アカイエカ・チカイエカの季節消長に関しては、中区住宅で捕獲されたアカイエカ群雌を同定分類したところ、チカイエカが長期間にわたって高い割合で捕獲された(2006年72.5%、2007年65.3%、2008年78.4%)。雄はアカイエカの割合が高く、チカイエカの割合は2006年5.9%、2007年8.0%、2008年8.0%であった。雨水橋幼虫に対する殺虫剤実地効力試験において、薬剤投入後、個体数が減少し、観察終了まで低いレベルで推移した桁が4桁、10月に個体数の回復した桁が1桁、最初の薬剤投入では効果がみられず個体数が上昇した桁が2桁と、桁ごとに差がみられた。また対照区では9月、10月の調査で個体数が急激に減少した。処理区、対照区それぞれの平均個体数変化には顕著な差がみられなかった。

#### ④ジフルベンズロン製剤による雨水橋対策の検討

18年度：雨水橋中の幼虫・蛹数は、1回目の薬剤処理後3区分共に減少し、特にジフルベンズロン処理区はその後も低レベルで推移して、調査終了まで対照区より少なかった。

19年度：雨水橋中の幼虫・蛹数は、1回目の薬剤処理9日後に、処理前の0.3%に減少した。その後、10月4日に23%に増加

したので、10月5日に2回目の薬剤処理を行った。その10日後には、2回目薬剤処理前の1.8%に減少した。ライトトラップによる総採集個体数は、1回目の薬剤処理後、処理前の21%に減少した。その後、雨水橋中の幼虫・蛹がやや増加した10月4日には、ライトトラップによる採集個体数も39%に増加したが、2回目薬剤処理後、処理前の36%に減少した。ライトトラップによるアカイエカ群およびヒトスジシマカの採集個体数の増減は、共に総採集個体数と同様の傾向であった。

20年度：薬剤処理区の雨水橋中の幼虫・蛹個体数は、1回目の薬剤処理後、処理前の20%に減少し、その後1%以下で推移した。一方、対照区は8.58倍に増加し、その後も毎回処理区より多い個体数で推移した。

ライトトラップで採集した対照区の成虫個体数は全ての調査回で処理区を上回った。アカイエカ群とヒトスジシマカについても同様の結果であった。

#### ⑤ヒトスジシマカの産卵習性

・地上からの高さとの産卵

最初のヒトスジシマカ幼虫は6月初旬、5月上旬に設置した高さ1m(1個体)および3m(16個体)のトラップで確認された。

6月に設置したトラップでは16m、20m地点のものを除くすべてのトラップにヒトスジシマカの発生がみられた。なお、8m地点で幼虫の発生がみられたのは6月、側壁に設置したトラップだけで、以後7、8月の設置では確認されなかった。7、8月に設置した0m～5mのトラップでは高い割合で発生が確認された。一方、地上から16m、20m地点に設置したトラップでは、観察期間中、幼虫の発生は確認できなかった。



#### ・屋内での産卵

一回目の実験では、放飼後三日目までの観察で、居間(①、②)、トイレ、寝室を除く、8箇所(応接、玄関、階段下部、居間、台所、洗面所、階段上部、書斎)と台所に設置した小容器の計9箇所産卵が確認された。放飼後一日目には7箇所、二日目には書斎の容器と小容器の2箇所、三日目には応接室の1箇所産卵が確認された。二回目の放飼でも一回目と同様な傾向であったが、産卵が確認された台所、洗面、玄関、居間および階段下部はいずれも一階部分であった。

#### ⑥震災後に多発生が懸念された衛生害虫と媒介性感染症に関する調査結果

・中越沖地震：柄杓で蚊幼虫の生息有無を確認したのは道路側溝と排水溝などの止水溜り18箇所中、2箇所アカイエカの蛹と老熟幼虫を、寺社11箇所中5箇所の手水鉢、花立て、闕伽などからヒトスジシマカとヤマトヤブカの蛹と幼虫を確認した。ハエ類は調査時点ではみられなかったが、公園などの公衆トイレの多くでは便器への放置大便がみられ誘引が懸念された。家庭生ごみの放置は近隣市や災害協定都市のごみ収集車が出勤回収し、ほとんどみられなかった。ただ、公園などのゴミ籠は弁当空やジュース類の空き缶、ペットボトルなどで満杯になっており、それらからはオオキモンノミバエとショウジョウバエの1種が少数採集された。7月27日の2回目の調査時点では上水道の復旧は82.8%、ガスはわずかに1%であった。下水道の復旧程度は確認出来なかったが、一部地域では水洗トイレの使用が可能であった。公共雨水枡や排水溝などでの止水溜りは、7月20～27日の

間に3回の降雨があつたにもかかわらず増加していなかった。7月20日にみられた公衆トイレにおける放置大便は、ほとんどのトイレで清掃され厳密に使用禁止の処置がとられていたが、周辺にはキンバエ類の飛翔がみられた。公園などのゴミ籠の放置ゴミも片付けられ、小バエ類の飛翔はみられなかった。8月29日の3回目の調査時点では電気が完全復旧、上下水道やガスも大部分が復旧し、水洗トイレも一部の地区を除いて使用出来るようになり、仮設トイレの大部分は片付けられていた。仮設住宅が設置され避難所は閉鎖、また、派遣されていた自衛隊と艦船は帰還しており、商店街も営業が再開されていた。一方で、倒壊家屋や倒壊物の覆いに用いられているブルーシートに、水溜りがみられ落ち葉と共にヒトスジシマカとヤマトヤブカの生息が確認された。ブルーシートは多くの場所で使用されており、蚊の発生源として注意を向ける必要が強く感じられた。

・岩手・宮城内陸地震：6月20-21日に1回目の現地調査を行い、ライフラインなどの被害の程度が中越沖地震に比べ小さく、住宅地での止水溜まりなどがほとんど無く、蚊の発生の危惧を感じなかったため以後の調査は行わなかった。被害は山間地での道路や橋の損壊がみられたが、家屋の倒壊はほとんどみられなかった。寺社の損壊と墓、石碑などの倒壊がみられ、それらにはブルーシートが掛けられ、既に水溜りが出来ており、蚊の発生が懸念された。

⑦幼虫対策を主とした実地試験の結果：対策を行った2006、7年と、対策を行わなかった前後の年と比較すると、明らかに蚊数は減少した。とくに、ヒトスジシマカの減

少幅が大きかった。さらに、対策を取らなかった住宅と比べても明らかに蚊数は少なかった。このことは、ヒトスジシマカは敷地内からの発生が多いことを示したと思われる。日常からの対策が効果を示すと考えられる。

成虫対策を主とした実地試験の成績：住宅街、住宅団地の住宅とも、ファン式携帯蚊取器の効果が認められた。前述の幼虫対策同様、ヒトスジシマカで顕著であり、アカイエカではその効果は小さいと判断された。

バケツでの蚊発生の抑止モデル実験の結果：対照のバケツでは実験開始後1カ月目からアカイエカ、ヤマトヤブカ、ヒトスジシマカの全種もしくは何れかが毎週見られるようになったのに対し、ヒメダカを入れたバケツでは全く蚊の発生が認められなかった。しかし、蚊取り線香を入れたバケツ、防虫用品を吊下げたバケツではアカイエカとヒトスジシマカの発生が1回ずつ観察された。

⑧沖縄県と鹿児島県奄美大島での日本脳炎媒介蚊とシマカ類に関する調査研究

○日本脳炎媒介蚊に関する調査

a) 沖縄本島金武における幼虫調査

2006年

水田や田芋畑等における発生水域の割合：蚊幼虫が生息していた水域の87%に *Cx. vishnui* subg. が生息し、その87%にコガタアカイエカ、12.5%にウシニイエカが生息していた。

各水域における月別の個体数：田芋畑1では、5、7、9月に、田芋畑2は5、6月に多く採集され、最も多かったのは5月であった。水田1では10、11月、水田2では

10月に多かった。休耕田は10月に11,291個体のコガタアカイエカが採れた。いずれの水域でもコガタアカイエカが多かった。

2007年

田芋畑や水田等における日本脳炎媒介蚊とその他の蚊幼虫の発生数と割合：

田芋畑や水田などでは8種の蚊幼虫が採集された。田芋畑では、19回調査し、1,331個体の幼虫を採集し、個体数が最も多かったのはコガタアカイエカで958個体、その割合は72%であった。その傾向は水田(223個体、72.9%)や溝などでも同様であった。個体数は少ないが田芋畑と水田でウシニイエカが採集された。

b) 沖縄県伊平屋島、沖縄本島、西表島と鹿児島県奄美大島における幼虫の生息状況について

伊平屋島では、水田などでは2種の蚊幼虫が採集され、蚊が生息していた水域の70%にコガタアカイエカが生息し、シロハシイエカやウシニイエカは採集されなかった。

沖縄本島では、9種類の蚊が採集された。蚊が生息していた水域の83.5%に *Cx. vishnui* subg. の蚊が生息し、コガタアカイエカは81.8%に、ウシニイエカは33.3%の水域に生息していた。シロハシイエカは19.7%であった。

西表島では、23水域に幼虫が生息し、その69.6%(16水域)に *Cx. vishnui* subg. の蚊が生息し、コガタアカイエカはその75%、ウシニイエカは56.3%、シロハシイエカは12.5%の水域に生息していた。

奄美大島では、2007年は、蚊が生息していた11水域の73.3%に *Cx. vishnui* subg. の蚊が生息し、その45.5%にコガタアカ

エカ、18.1%にシロハシエカが生息していた。2008年は蚊が生息していた22水域の81.8%に *Cx. vishnui* subg. の蚊が生息し、その83.3%にコガタアカイエカ、22.2%にシロハシエカが生息していた。ウシニエカの生息は確認できなかった。

#### ○シマカ類に関する調査研究

—沖繩本島— 那覇市の住宅地TT地点、中部の住宅地に隣接している大学の敷地ではヒトスジシマカのみが採集された。国頭村与那のYS、Y0地点ではヒトスジシマカ、リバーズシマカ、ダウズシマカ3種の幼虫が採集された。

—西表島— 古見部落内のKM地点ではヒトスジシマカ、リバーズシマカ、部落から離れたKCやOR地点ではリバーズシマカ、ミヤラシマカ *Ae. f. miyarai* の幼虫が採集され、KRではリバーズシマカとミヤラシマカが採集された。いずれの地域でもネッタシマカは採集されなかった。

#### ⑨西宮浜（人工島）の雨水マスへの薬剤散布後の成虫調査

平成19年度には西宮浜内における散布後1週後（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個体でそのうちイエカ類は84.3%を占め、ヒトスジシマカは15.7%であった。7月24日より9月25日までの9回採集分については、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。一方、西宮浜以外の採集蚊も種類構成はよく類似していた。平成20年度には蚊幼虫の発生初期の5月初旬から薬剤散布したにもかかわらず、アカイエカ群およびヒトスジシマカともに防除地域外での捕集個体数よりも顕著に多かった。雨水

を用いた幼虫試験ならびに幼虫調査では、平成19年度の効果はいずれの薬剤ともにおおむね1ヶ月間有効であったが、平成20年度の成績では2週間程度であった。薬剤散布地域でのアンケート調査では、配布枚数の総数は3,167枚で回答数は1,005枚で31.7%であった。本年平成19年に蚊成虫に刺された頻度を昨年と比較した設問に対して、住家の内外で例年よりも蚊成虫に刺された回数は大半の回答者が少なかったと回答した。

⑩道路雨水枡と蚊幼虫相：道路雨水枡の有水率は4%、そのうち幼虫生息率は38%であった。蚊の採集数は、北部に少なく、中央部ではばらつきがあり、南部地域では多い。南部部臨海低地に蚊総数の高い調査区が集中している。さらにイエカ属、ヤブカ属の比率を見ると、海岸線海に近い部分にアカイエカ群が多い傾向があった。

—一戸建住宅雨水枡と蚊幼虫相：全市で425戸調査して雨水枡総数は1,603枡で、有水率は69%、幼虫生息率は平均9%であった。蚊幼虫総数は1,929個体でうちイエカ属、ヤブカ属の割合は4:963で明らかにヤブカが多かった。地区別に見ると北部と南部で比較的多かったが、中央部では0-1個体と少ない傾向であった。

GISを用いた道路・一戸建住宅の雨水枡から発生する蚊相の特徴：両雨水枡をGISで重ね合せて、蚊生息調査がほぼ同時期に実施された地域で、しかも両地目の有水枡が隣接する地域を選び、両者の蚊の採集数や種類を比較した。ある調査区では道路雨水枡ではヤブカ属974個体、イエカ属157個体採集できたにもかかわらず、一戸建住宅ではヤブカ属111個体で、イエカ属は採

集できなかった。

道路雨水枡・一戸建住宅別イエカ属・ヤブカ属別採取数を調査区別に示すと、道路と一戸建住宅の雨水枡の幼虫発生状況では似たような傾向、すなわち北部・中部に少なく、南部に高いことなどが確認された。

雨水枡貯留水の水質分析：一戸建住宅雨水枡については、調査項目の中には明らかにアンモニア態窒素、硝酸態窒素、CODなど水質として極端に高い値も見られたが、大部分は蚊の生育に影響を与えるような値は示されなかった。しかし、pHなどで比較すると、生息枡では最低5.6も認められたが、6.4-6.6が多かったのに対し、非生息枡では5.4-5.6が多かった。一方、分流区域ではpH5.6と低い雨水枡があり、幼虫は生息しなかった。合流地区は主にpH6.0-7.0であった。道路幼虫生息無雨水枡は一戸建て住宅と同様pHが低い傾向にあった。

⑩8分間スウィーピング法の捕集数における最高捕集数と平均捕集数との相関：各公園のA地点における最高捕集数を見ると、8分間で20個体をこす非常に成虫密度の高い公園が3ヶ所存在する。また、10個体代の公園が6公園存在した。時期によっては成虫密度が相当高いことが明らかとなった。最高捕集数が得られた時期としては、7月下旬から8月上旬が多い傾向があるが、10月上旬に最高捕集数を記録した公園も認められた。

8分間スウィーピング法による平均捕集数と捕集地点周辺の環境との関係：遮蔽物の多少に関する数値的表現は捕集地点の環境を種々の角度から撮影した写真によったが、1) 捕集地点の近くに住宅が存在する、2) 公園と民間の敷地を隔てる塀が存在する、

3) 風の通しを妨げる構造物が存在する、4) 土手などの構造物が存在するなどを写真で判断した。その結果、遮蔽物に関するスコアが高いほど蚊の捕集数が多い傾向が見られ、中程度の相関関係が認められた。蚊の潜み場所において、風通しが悪いほど成虫にとって適した環境であると考えられる。ヒトスジシマカの捕集数に影響を与える環境要因：捕集数の増加に関係すると考えられる要因、関係しないと考えられる要因とにある程度分けることが可能となった。数学的解析が不十分であるが、捕集数が増加する要因としては、1) 樹木による日陰の存在、2) 潜み場所としての灌木の存在、3) 地表面における植物の存在、4) 遮蔽物の存在などの要因が考えられる。一方、関係ないと考えられる要因としては、1) 公園の面積、2) 3m以上の樹木の密度、3) 捕集場所から幼虫発生源までの最短距離などが考えられる。また、ライトトラップによる捕集数と8分間スウィーピング法による捕集数とに何らの相関が認められず、多くの場合に、8分間スウィーピング法による捕集数が明らかに多い傾向が認められた。

⑪2006年から2008年末までの3年間の調査を通算して、407コロニー分、1,005個体（複数の卵をまとめて処理したケースも1個体として数に換算）をピレスロイド系駆除剤に対する抵抗性に関して試験した。試験料は29都道府県より寄せられ、3年間の通算で8.4%であった。各年別に見ると、2006年の4.8%（試験コロニー数(N)=42）、2007年の6.2%（N=178）、および2008年の11.2%（N=187）であり、抵抗性コロニーが増加した傾向も示された。

抵抗性遺伝子は全部で34のコロニーか

ら検出された。抵抗性遺伝子は、検査対象とした4座位に関し、すべて四重アミノ酸置換変異(D11E, M850I, T952I, L955F)を有していた。また、抵抗性遺伝子のヘテロ接合体しか見出されなかった4コロニーを除く残りの30コロニーからは、ホモ接合体の存在が確認された。同じ医療機関で別家族より採取された抵抗性遺伝子を含むシラミコロニーの例が、東京都江東区で5件、兵庫県赤穂市で8件あった。採集情報によるといずれの医療機関の場合も、それぞれの地域で同じ小学校に通う小児たちに見出された。

⑬食塩水等の殺幼虫効果および産卵抑制効果の検討：処理1日後のアカイエカ幼虫およびヒトスジシマカ幼虫の $LC_{50}$ 値は、それぞれ、1.25% (0.214M) および 1.24% (0.212M)を示し、以後、日数経過に従って、その値は徐々に小さくなる傾向にあり、処理3日後の値はそれぞれ、0.993% (0.170M) および 0.939% (0.161M)を示した。各種幼虫に対する食塩水の致死効果は、食塩濃度0.5%よりも高い濃度では、わずかな変化で急激に高まり、0.75%では補正致死率が概ね10%未満であるのに、その2倍濃度(1.5%)では2日後までに致死率100%が得られた。なお、2種の間では食塩水に対する感受性差はほとんど認められなかった。また、薬剤感受性の異なる2系統のチカイエカを用いた食塩濃度1.5%における試験では、系統間で差は認められなかった。

産卵抑制効果：アカイエカの場合、食塩濃度1.0%では産卵は全く認められなかったが、0.5%では合計66卵舟が産卵され、対照区への産卵(52卵舟)と差はなかった。一方、ヒトスジシマカでは対照区での産卵

数が2,324個であったのに対して、0.5%では1,503個、1.0%でも453個の産卵が確認されたが、濃度依存的に産卵数は低下する傾向が見られ、食塩添加により産卵抑制効果が期待できると判断された。また、食塩水区では、ろ紙に産卵された卵がろ紙から離れて水面上や水面下に流出する傾向が対照区に比べて強かった。なお、1.0%区でも幼虫の孵化は確認されたが、孵化幼虫は全て死亡した。

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：全都道府県、特別区及び市町村(計1,874自治体)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項目について回答を求めるアンケートを発送し、62.9%の自治体から回答を得た。その回答を、都道府県、保健所設置市・特別区、市、町村別に集計した。

その結果、住民からはハチやネズミの相談が多いこと、衛生動物の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(委託割合は30~65%)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(評価実施割合は7~35%)、疾病媒介蚊に対する調査、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る自治体は少ないこと(実施割合はそれぞれ0~20, 2~17, 1~14%)、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(使用割合は0~14%)、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も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

明らかとなり、また、質問項目によっては、都道府県、保健所設置市・特別区、市、町村で回答内容が異なる傾向が認められた。国に対する要望事項としては、財政支援が最も多く、教育・研修制度の拡充、衛生動物対応のための法整備などについても挙げられていた。これらの結果から、国や自治体の連携、種々の衛生動物に対する対応が円滑に行えるような法整備などが必要と考えられた。

⑭西表島サンプルには、*Ace2*に最も遺伝子配列の多様性が認められた。ダイレクトシーケンシングの結果、試験した57個体の中に35の塩基置換多型座位が関わる26種類の異なる遺伝子型が含まれていた。F455座位の置換に基いて遺伝型を抵抗性ホモ接合体(W455/W455)、感受性ホモ接合体(F455/F455)、およびヘテロ接合体(W455/F455)の3つに分類し、抵抗性遺伝子(W455)の頻度を62%と推定した。抵抗性に関する3つの遺伝子型頻度のHardy-Weinberg平衡遺伝子型頻度への適合性を検定したところ( $Df=1$ ,  $\chi^2=0.13$ )、有意差はなかった。本州と九州の6地点における採集に基づき、135個体のF455座位に関する遺伝子型を推定した結果、抵抗性遺伝子(W455)の頻度はどの地点においても9割前後と推定された。タイで採集した7個体(14遺伝子)には抵抗性と感受性の遺伝子が半数ずつ含まれていた。抵抗性遺伝子は全てTYMハプロタイプであった。7つの感受性遺伝子は互いに異なるハプロタイプであった。試験した個体の中に感受性遺伝子の割合が非常に小さかった南大東島、感受性遺伝子が含まれなかったベトナムとセイロン島の抵抗性遺伝子は全てTYMハ

プロタイプであった。ジャワ島で採集した116個体は、F455座位に関しては、全てホモ接合体(F455/F455)であった。これらの遺伝子型を殺虫剤感受性の標準系統としている高知系統に含まれるタンパク質配列と比べても、塩基配列を決定した609ベースの中には何らアミノ酸置換変異は同定されなかった。

⑮CXFVは蚊由来細胞系に接種した場合のみRT-PCRにより検出が可能であったが、CPEは弱い傾向にあり、出現しない場合も見られた。電子顕微鏡観察では、小胞体内にフラビウイルスの特徴を有する粒子が確認され、CXFV抗血清によるウェスタンブロット解析では、CXFV構成タンパクであるE(60kDa)、prM(20kDa)、C(15kDa)そしてM(7kDa)と思われるバンドが検出された。決定されたCXFVゲノムは10,837ヌクレオチドで構成され、3,363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91, 657ヌクレオチドの非翻訳領域を有した。またアミノ酸配列情報からCXFV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が産生されることが推定された。これまでに分離されたCXFV(8株)のE領域のヌクレオチド配列に基づきその系統関係を推定したところ、すべてCFAあるいはKRVとは離れたひとつのcladeに包含されることが確認された。

⑯国内で捕集された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

2006年は、長崎県諫早市捕集の蚊からの

み JEV が分離された(10/24, 24 プールのうち 10 プールが陽性、JEV 陽性プール率 41.7%)。秋田県および東京都は、2006 年ブタの HI 抗体価に見られる日本脳炎感染状況はいずれも 50%未満と低く、高知県は例年 50%以上の抗体価を示す高度感染地域ではあったが、いずれからも JEV は分離されなかった。

2007年は、長崎県諫早市(7プール, 19.4%)、熊本県合志市(2プール, 3.3%)、鹿児島県南九州市捕集の蚊(6プール, 10%)からそれぞれ JEV が分離された。また、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かったが、同県下の佐潟湿地で捕集されたコガタアカイエカ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。

2008年は、静岡県御前崎市(7プール, 16.7%)、長崎県諫早市(3プール, 9.1%)、鹿児島県南九州市(3プール, 6.3%)の豚舎を含む畜舎周辺で捕集された蚊からそれぞれ JEV が分離された。

2006年~2008年の3年間に我々が分離した JEV は合計34株になり、そのうちの21株の遺伝子解析を行うとともに、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。E領域の遺伝子解析から、これまでに分離された分離株はすべて1型に属し、近年東アジア地域で分離されているウイルス株と遺伝的に極めて近縁であることが示唆された。

⑰マウスに中和抗体を誘導する Deng4 価 DNA ワクチンのドーズ: 1つの型について25、5あるいは1  $\mu$ g の Deng4 価 DNA ワクチンを、150 ng の D2EP と混合してマウスに7週間隔で2回投与した。その結果、25  $\mu$ g 投与群及び5  $\mu$ g 投与群では、すべての型の DENV に対

して中和抗体が誘導された。一方、1  $\mu$ g 投与群及び PBS 投与群では、検知レベルの中和抗体価はほとんど認められなかった。次に、これらの免疫マウスを DENV2 により攻撃した結果、25  $\mu$ g 及び5  $\mu$ g 投与群に加えて1  $\mu$ g 投与群でも中和抗体価の2次免疫応答が示された。1  $\mu$ g 投与群では攻撃前においては中和抗体の誘導は検知できなかったが、この群のマウスにも記憶B細胞が誘導されたことを示す。

マウスに中和抗体を誘導する pcWNME のドーズ: 1あるいは0.1  $\mu$ g の pcWNME を1/10ドーズの WNVAX と混合して ICR マウスに1回投与した結果、混合投与群の中和抗体価は単独投与群より有意に高かった。この結果は DNA と蛋白の相乗効果を示す。次に、ddY マウスに0.1あるいは0.01  $\mu$ g の pcWNME を WNVAX と混合投与した結果、0.01  $\mu$ g 投与群では相乗効果を認めなかったが、0.1  $\mu$ g 投与群では投与後9週目に相乗効果が示され、検知レベルの中和抗体価が認められた。

ブタに中和抗体を誘導する pNJEME のドーズ: ブタに pNJEME と JEVAX を混合投与した結果、100  $\mu$ g の pNJEME と1/10ドーズの JEVAX を投与した個体では、初回免疫後2週目に1:20の中和抗体価を誘導し、7週目まで持続が認められた。一方、1  $\mu$ g の pNJEME と1/100ドーズの JEVAX を投与した個体では、初回免疫後7週目まで中和抗体価は検知レベル未満であった。しかし、2回目の免疫から1週間には、両個体とも、1:80-1:160の高い中和抗体価を示した。これらの結果は、針無注射器を用いた DNA と蛋白の混合投与方法が、ブタにおいては1  $\mu$ g の2回接種で中和抗体を誘導できることを示す。

DNA ワクチンのドーズ低減に関わるメカニズム： Dengue 2 型抗原で前免疫した後に Dengue 4 価 DNA ワクチンを接種したマウスに誘導される中和抗体価は前免疫しない場合より高く、その現象は同種 (2 型) のみならず異種 (1 型、3 型、4 型) の免疫原に対しても認められた。この上昇は中和試験の交差反応のレベルを有意に超えていた。この有意の上昇は、過去のデータの解析により、Dengue 4 価 DNA ワクチンの後に、あるいは同時に Dengue 2 型抗原で免疫した場合にも認められた。

⑬輸入 Dengue 熱 61 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。61 症例中にはすでに回復期に入った症例も含まれる。血清からウイルス遺伝子が検出できた症例は 37 症例 (検出率 60.7%) であった。一方、尿中から遺伝子が検出された症例は 27 例 (検出率 44.3%)。尿中から Dengue ウイルス遺伝子を検出した検体は、27 例中 26 例で、採尿時点での血清抗 Dengue ウイルス抗体は陽性であった。尿中 Dengue ウイルス遺伝子の解析にいたった症例 8 例のウイルス型別は、1 型 3 例、2 型 1 例、3 型 1 例、4 型 3 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ではいずれも尿中と血中ウイルス遺伝子配列は 100% 一致した。尿中 Dengue ウイルス遺伝子は、血中のウイルス遺伝子が検出できない急性期以降でも検出できる症例があった。

平成 18 年にスリランカからの輸入チクングニヤ熱症例を診断した。遷延する関節痛より確定診断に至ったチクングニヤ熱の本邦初症例 (1 例目)、本邦で初めてウイルスが分離されたチクングニヤ熱輸入症例 (2 例目) の 2 症例であった。

⑭蚊のアルボウイルス感受性：ヤマトヤブカは、ウエストナイルウイルスに感受性を持つことを証明した。日本脳炎ウイルス株 4 種を接種したアカイエカでは、ワクチン株よりも 36~510 倍程高い力価が他 3 株で認められた。高濃度のウイルス液を経口摂食した蚊では、いずれの株でも同程度の感染が成立したが、低濃度のウイルス液の場合は、蚊個体間に感染の差が認められ、株間にも差が見られた。アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性は、チカイエカ、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカのそれらより高いことが示唆された。

Dengue 熱流行地タイでの媒介蚊調査： Dengue 熱患者宅で採集したネッタイシマカから Dengue ウイルス 2 および 4 型を分離した。患者宅のウイルス感染蚊の割合は、年毎に変動していたが、約 5~50% であった。感染蚊の一部は、患者宅から近隣の家に移動していることが示唆された。

⑮ JEV リバースジェネティクス法の確立： Mie41 株の完全長 cDNA をプラスミド pMW119 に導入することにより、分子クローンを得た。これより RNA を合成後、Vero 細胞に導入することにより、ウイルス粒子の産生を確認した。これにより JEV のリバースジェネティクスが確立した。

JEV Beijing-1 株中の高病原性に関わる部位の同定： JEV の E 領域が病原性に関与するとの報告があることから、この E 領域 (EB1)、E 領域の N 側半分 (nEB1) および C 側半分 (cEB1) を Beijing-1 (smb37) に置換したキメラウイルスを作製し病原性を調べた。すると EB1 と nEB1 は Beijing-1 (smb37) と同等の病原性を示した。この E 領域内には Mie41 株と Beijing-1 (smb37)



株とでアミノ酸配列を比較したところ、4ヶ所のアミノ酸配列の差異(123番目、129番目、222番目、227番目)が存在していた。次にこれらそれぞれ単独の点変異体ウイルスを作製し、病原性を比較した。すると123番目をBeijing-1(smb37)に置換したウイルスのみがBeijing-1(smb37)と同等の病原性を示した。以上よりBeijing-1(smb37)のE123番目のアミノ酸(アルギニン)がマウス病原性を規定することが明らかとなった。

JEV Mie40株中の高病原性に関わる部位の同定:Mie40株およびMie41株の全塩基配列を決定したところ計7ヶ所のアミノ酸が異なっていた。また非翻訳領域については、3'側が6ヶ所が異なっていた。両者の差異をもとに4種類の組換えキメラウイルスNS3-4A(Mie40)NS4B-5(Mie40), 3' NTR(Mie40), CprME, NS3-3' NTR(Mie40)を作製し病原性を比較した結果、NS5領域の4ヶ所のアミノ酸置換および3' NTRの塩基置換は病原性に関与しないことが明らかとなった。次に残り3ヶ所のアミノ酸置換各々について点変異体を作製し同様に解析したところ、NS3での変異は病原性に関与しないことが明らかとなった。一方C部位(10番目)とNS4A(2126番目)部位は各々単独で病原性に関与することが明らかとなった。10番目の部位は、アミノ酸がリジンの場合高病原性を示しアルギニンの場合は低病原性を示す。また2126番目の部位は、バリンの場合は低病原性を示し、イソロイシンでは高病原性を示す。

②1 デング流行地での回復期の血清診断ではIgA抗体の検出が感染指標になり得ることを示唆した。

日本人輸入感染例で尿中および唾液中の抗デングIgA抗体が検出され、血清採取不

可例での補助的診断に利用できる可能性が判明した。

日本脳炎ウイルスのC6/36細胞への感染はエンドサイトーシスを介していることを示唆した。

BALB/cマウスとC57BL/6マウスの骨髄中の未熟な樹状細胞にデングウイルスが感染していることが明らかになった。

②2 脳性マラリア発症リスザルモデルを用い、脳性マラリアが血液脳関門の異状、破綻が深く関与することを示し、同様の所見が脳性マラリアで死亡した患者の脳においても認められることを示した。脳性マラリアの発症における血液脳関門の関与は脳性マラリアの病態形成機序論に新たな一説を提供する。また、ヒト肝臓型脂肪酸結合タンパク(hL-FABP)遺伝子導入シマウスを用い、マラリア感染の進行に伴い尿中hL-FABP量が増加することを示した。マラリア特異的診断法と併用することにより、尿中hL-FABPがマラリア重症化の早期予知、治療の判定に有用なバイオマーカーであることを示唆している。今後マラリア患者の尿中hL-FABP量と重症度との関連を明らかにすることにより、我が国におけるマラリア患者の予後の判定および治療に大きく貢献できるものとする。

②3 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、*An. dirus* s.l.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。また吸血嗜好性の季節的変化が検出された。*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。我が国でも南西諸島には普通に棲息している

*An. minimus*の動向に注意を払う必要が改めて示唆された。フィリピン・ミンダナオ島の海岸と山地では、両地域間の距離は近いために、海岸性と山地性のマラリア媒介蚊4種が同時に採取された。このことから本調査地のマラリア感染環境は非常に複雑であり、津波などの災害時対策では海岸発生種の分布拡大が、山地性媒介蚊とのリンクを増す方向にならぬよう特別な配慮が必要なることが判った。これらの知見は山地が海に迫る地形が多い我が国の災害時対策におけるひとつの留意点ともいえる。ベトナムでは台湾の山岳部で記録された *An. takasagoensis* に酷似した新種が記録された。温暖化の流れの中で我が国の南部に対するリスクも考慮すべき事態が生じないとは言いきれないので、この種についてのより詳細な分布実態解明が必要である。

②4 邦人のマラリア感染のリスク回避のためには現時点ではマラリア感染が未だ蔓延している貧困僻地をさけることが最も有効であることはいうまでもない。その地域が近年中に改善されるとはいえない状況であるため、十分な注意が必要である。

また三日熱マラリアの感染については、適切な医療機関での治療を受けることが必要であることはいうまでもない。特に、その不十分な投薬は再発・再燃に関連していると本研究で推定されたため、今後更なる研究の継続が必要であろう。治療指針の策定とその徹底がマラリア流行地域の中核医療機関や邦人が主に受診する外国人専用の医療機関、さらに日本での医療機関でも行われる必要があるだろう。

②5 1) マラリア予防ガイドラインの改訂とその評価研究、2) ACTの有効性に関する臨

床研究、さらに3) 輸入マラリア患者の臨床管理に関する研究を行い、世界における最先端の臨床研究成果を、わが国におけるマラリアの医療に導入しようと試みた。ガイドラインの普及による予防の徹底、そしてACTの有効性の検証を進展させ、わが国の国際感染症に関する政策医療の質の向上を図り、さらにその技術の均等化を国内でさらに図ってゆく必要がある。

#### 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は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、上記の感染症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年代からは日本脳炎の患者数が顕著に減少しており、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。しかし、東南アジアでは熱帯マラリアの患者数が減少しており、今後の問題としては、貧困地域における有効な予防および治療対策、三日熱マラリアの根治法の徹底などの問題にシフトする可能性がある。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。2008年の輸入症例は戦後始めて100症例を超えた。また、2005～2006年にかけて、インド洋島嶼国(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。2007年には、北東イタリアの小さな村でチクングニヤ熱の300人規模の流行が起こり、温帯地域での初めての流行となった。イタリアでの媒介蚊は米国から輸入されたヒトスジシマカである。2008年にもインドネシア、タイ、シンガポール、スリランカ等で流行拡大が続いており、我が国でいつ流行が起こっても不思議ではない状況である。

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生息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、西宮市の人工島である西宮浜において、雨水枡7ヶ所以上に昆虫発育制御剤(IGR)を処理し、防除効果を週1回CDC型ライトトラップを設置することで評価した。2年間ほぼ同様の調査を行ったが、人工島内でのトラップのアカイエカ捕集数に顕著な減少が認められず、島の周辺から

相当広範囲にアカイエカが飛来してくることが強く示唆された。ウエストナイル熱などが流行した場合の防除対象地域の選定を行う上で重要な情報が得られたと考えている。

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、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。長崎県では3年間連続して同じ豚舎周辺でJEVが分離され、その遺伝子構造解析を進めている。2007年には分離株間のアミノ酸レベルの違いが認められていたが、2008年には2006年に分離されたウイルスと類似した配列が認められ、毎年新たなウイルスがどこからか侵入してくるのか、どこかに定着しているウイルスが各年の流行に関わるのか不明である。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1型に属するもので、東南アジアでの分離株と類似性が高い。しかし、我が国で何らかの野生動物体内でウイルスが越冬している可能性も否定できないのが現状である。

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ズ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ワクチンに従来のタンパク質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2型抗原で前免疫した後に4価DNAワクチンを接種したマウスに誘導される中和抗体価は前免疫しない場合より高く、その現象は同種のみならず異種のウイルス型(1, 3, 4型)の免疫原に対しても認められた。この上昇は中和試験の交差反応のレベルを有意に超えており、

交差免疫原性と考えられた。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入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、一部遺伝子解析が可能であった。また、尿から IgA 抗体を検出することに成功し、発症後早期に IgA 抗体が検出される症例も認められた。

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。ATV (Artemisin combination therapy) の臨床評価をマヒドン大学および国立国際医療センターで行い、有効な治療結果が得られている。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 L-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。その後、抵抗性遺伝子を保有するアタマジラミが増加しており、2008 年には 11% を超すコロニーから検出された。この結果から、抵抗性をもたらすナトリウムチャンネル遺伝子は全都道府県に広がっている可能性が想像される。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。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、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我が国に移入されて来たと考えられ、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 地区にある雨水枡を中心に幼虫の発生状況を調査し、下水システムとの関係に関して、分流式と合流式における発生蚊の種類の違い等を検討した。また、10 地区内の各 2 ヶ所の公園で行ったヒトスジシマカの 8 分間捕集に関して、公園の環境と捕集数にある種の間関係があること、8 分間で 20 個体を超す雌成虫が捕集される公園が存在すること、15 週の平均捕集数が 2 匹以上の公園が相当存在することなどが明らかとなり、チクングニヤ熱の突発した流行