

濃度 1.5%のみで、殺幼虫効果を確認した。
供試虫は以下の通りとした。

- ①アカイエカ終齢幼虫 御所コロニー (有機リン, ピレスロイド感受性)
- ②ヒトスジシマカ終齢幼虫 医科研コロニー (同上)
- ③チカイエカ終齢幼虫 戸塚コロニー (有機リン, ピレスロイド感受性)
横浜コロニー (ピレスロイド抵抗性)

(2) 産卵抑制効果

吸血して 4 日間経過した蚊を入れたケージ内の底面に、アカイエカでは、脱塩素水で所定濃度 (0, 0.5, 1.0% (w/v)) に希釈した食塩水 100mL を入れたプラスチック製容器 (径 8.5 cm) を、ヒトスジシマカでは、直径 5cm×深さ 1.5cm のガラスシャーレに上記食塩水約 10mL を注ぎ、その内周にろ紙を貼り付け、併置した。いずれのケージも産卵容器配置後、一昼夜、飼育室内 (25℃, 16L:8D) で保存後、産卵 (産卵舟) 数を計数し下記の式により産卵抑制率を算出した。

供試虫は以下の通りとした。

- ①アカイエカ成虫 御所コロニー (有機リン, ピレスロイド感受性)
- ②ヒトスジシマカ成虫 医科研コロニー (同上)

産卵抑制率(%)

$$= \{1 - (\text{処理区産卵(舟)数} / \text{対照区産卵(舟)数})\} \times 100$$

4) 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、その質問内容の要約は以下のとおりである。

(1) 害虫獣に関する住民からの相談状況について (種類・件数・集計状況等)

- (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について (啓発活動・薬剤配布・機器貸与・防除費用負担状況等)
- (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について
- (4) 蚊の幼・成虫の発生状況等の調査の実施について
- (5) 蚊に対する殺虫剤の使用状況について (使用の有無・薬剤の種類等)
- (6) 蚊媒介性疾患の発生時の対応について (防除実施体制の構築、マニュアル作成状況等)
- (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について
- (8) 殺虫剤の備蓄状況について (有無・量・種類等)
- (9) 散布 (防除) 機器の保有状況について (種類・台数等)
- (10) 衛生動物対策に係る予算・担当者数について
- (11) 国への要望事項について

5) コロモジラミの生存条件に関する検討

累代飼育されているコロモジラミ *Pediculus humanus* 雌雄成虫を 15, 20 および 25℃ の水道水または 0.1% の洗濯洗剤 (界面活性剤 35% 含有) 水中に 6 および 20 時間浸漬した後に回収してろ紙上に置き、20~25℃ の温度下に保存して 24 時間後の死亡状況を観察した。また、浸漬せずに、ろ紙上で乾燥状態で吸血させずに保存した場合の死亡状況を 20, 30 および 35℃ 下で観察した。

C. 研究結果および考察

1) 薬剤処理雨水枡から周辺雨水枡への

殺虫剤の効果拡大に関する検討

薬剤処理前に採集した蛹の羽化率は80~100%であったが、薬剤処理後の処理枡の羽化率は標準量、5倍量区ともに8週後までほとんど羽化が認められないか、蛹が採集できなかった。一方、それらの隣接枡から採集された蛹の羽化率は、イエカ群、ヒトスジシマカ共に処理前の羽化率と大きな違いはなく、低い場合でも66.7%で、その他は、5倍量処理区の隣接枡でも2~8週後にかけてほぼ90~100%の高い羽化率を示した。

これらの結果から、今回試験を実施した雨水枡の構造では、処理枡から周辺の雨水枡への効果拡大は期待できないと判断された。また、処理2~4、4~6週の間にはかなりの降雨があったにもかかわらず、効果が周辺の雨水枡に及んでいないことから、大量の水が雨水枡に流入するような条件下でも、集水管からの逆流による効果拡大は期待できないと考えられた。

2) 銅ファイバーを用いた蚊幼虫駆除に関する検討

(1) 基礎効力試験

銅ファイバー処理区のLT50(50%致死日数)は、若齢で1.11~2.63日、老齢で4.71~7.43日で、LT90(90%致死日数)はそれぞれ2.25~4.77日、9.63~14.9日であった。また、弱齢幼虫は羽化することなく全て1週間以内に死亡した。老齢幼虫では2~12%の羽化が認められたが、対照区の羽化率に比べると明らかに低かった。また、黄銅ファイバー処理区では、銅ファイバー処理区に比べて致死に至るまでの日数が長くなる傾向が見られ、若齢で1.70~5.10日、老齢で5.40~9.10日で、LT90(90%致死日数)はそれぞれ3.36~

15.2日、12.1~19.7日であった。なお、黄銅ファイバー処理区の弱齢幼虫も羽化することなく全て死亡したが、致死日数は銅ファイバー区に比べて2~3倍を要した。老齢幼虫の羽化率は銅ファイバー区とほぼ同様であった。なお、銅ファイバー区、黄銅ファイバー区ともに、薬剤感受性コロニーと抵抗性コロニー間に差は認められなかった。また、いずれの区でもファイバー投入量を増やすことにより効果が高まる傾向は見られたが、顕著ではなく、銅イオン濃度も処理量依存的には増加しなかった。なお、銅ファイバーによる蚊幼虫の致死効果がどのような機序であるのかを明らかにするための基礎試験を行った結果、銅ファイバー処理と関連することが疑われる物質が供試虫の中腸内に認められ、銅ファイバーを処理することによって、蚊幼虫の中腸に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

(2) 実地試験

実地試験を実施した雨水枡では、一部のものが観察期間中に滞留水が無くなってしまい評価できなかったが、ほとんどの枡で滞留水が認められた2または4週後までの結果で見限り幼虫密度の明確な減少は認められなかった。また、8週後まで継続観察が可能であった4.5g/L処理区では、8週後の時点でもかなりの幼虫の生息が認められ、処理枡から採集した蛹の羽化率は、蛹が採集できた4週後までの段階では、いずれの種類も90~100%であった。処理日から2週後までの降水量は少なかったが、2~4、4~6週の間にはかなりの降雨があった。

雨水枡の銅イオン濃度(処理4ヵ月後:測定前2週間は降雨なし)は基礎試験の1/5~1/10程度しか上昇していなかった

ため、確認のために雨水槽の底泥と滞留水を用いて基礎効力試験と同様の方法で銅イオン濃度の上昇状況を調べたところ、特に底泥の存在下で上昇の程度が低く、泥によるイオンの吸着やファイバーの被覆などが原因ではないかと考えられた。

3) 食塩水等の殺幼虫効果および産卵抑制効果の検討

(1) 殺幼虫効果

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。参考材料として実施したエタノール、台所用洗剤、ザラメの希釈水によるアカイエカ幼虫に対する致死効果は、エタノールでは濃度 1%で、1 日後致死率は 13.3%、2%で 79.6%、4%で 100%、3 日後の 1 および 2%区はそれぞれ 38.1、100%であった。台所用洗剤水では、濃度 0.0156%ではほとんど死亡しなかったが、0.0313%区では、1 日後に 89.1%、3 日後に 100%の致死率で、0.0625%区では 1 日後に 100%の致死率が得られた。であった。成虫の餌として与えているザラメでは、3

日後の観察で、濃度 20%(0.585M)で 100%、10%で 95.0%、5%で 38.2%の致死率であった。の高い致死率が得られたが、成虫に与えている濃度とほぼ同等の 5%(0.146M)ではほとんど致死が認められなかった。

以上のことから、食塩や洗剤等を用いた蚊幼虫の防除も可能であることが示唆された。

(2) 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。

4) 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。

5) コロモジラミの生存条件に関する検討

20時間水に浸漬したコロモジラミの24時間後の致死率は、15℃の水に浸漬したものでは0%、20℃で80%、25℃で85%であった。また、洗剤水の場合は、いずれの水温でも95%であったが、6時間浸漬では、水の場合は全ての温度区で0%、洗剤水区でも10%以下であり、水中に落下した場合や洗濯水中でも長時間生存できると思われた。

水等に浸漬せずに保存した場合は、30および35℃では4日以内に全て死亡した

が、20℃では、4日時点の致死率は9.1%にとどまり、7日後で27.3%、8日後で72.7%、全てが死亡するのに要した日数は9~12日であり、吸血できない状況でも、低温下ではかなりの期間生存し、再感染できる可能性が示唆された。

D. 結論

薬剤処理雨水枡から周辺雨水枡への効果拡大については、今回試験を実施したような形態の雨水枡では期待できないと判断された。

基礎試験で0.5g/L以上の処理でチカイエカ幼虫に対する効果が認められた銅ファイバーは、雨水枡に発生するイエカ群やヒトスジシマカを対象とした実地試験においては、明確な効果は認められず、処理法や処理量、効果阻害要因に関する検討が必要と判断された。

アカイエカならびにヒトスジシマカ幼虫は、食塩水濃度に依存して、感受性が高まり、濃度0.75%ではほとんど殺虫効果は得られないが、1.5%では高い殺虫効果が得られた。また、成虫の産卵に対しても1.0%で産卵を回避する傾向が見られた。アカイエカおよびヒトスジシマカが生息する水域に塩を処理する場合には、一般的な殺虫剤処理よりもコストはかかるが、殺虫剤が入手しにくい状況では、緊急的・一時的には駆除効果が得られるものと判断された。また、台所用洗剤でも0.0313%の濃度でアカイエカに対して100%の致死効果を示した。

自治体の衛生動物に対する対応は自治体により異なり、中にはほとんど対応していないと思われる自治体もあった。ウエストナイル熱等の蚊媒介性疾患の侵入に備えた調査や防除体制、薬剤の備蓄や薬剤散

布機器の保有などに多くの問題があり、また、アシナガバチやスズメバチ等の有害害虫、ユスリカやヤスデなどの不快害虫への対応に関しては自治体によって様々であると考えられ、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た。また、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た。

コロモジラミに関する検討で、感染者から落下したコロモジラミは、水中や洗濯洗剤水中でも 6 時間以上に渡って生存し、乾燥状態では温度により異なるが、低温の場合には 1 週間以上に渡って感染力を有する可能性が示唆された。

E. 研究発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究総合報告書

アジアのコガタアカイエカ集団における殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の分布

研究分担者	小林睦生	(国立感染症研究所)
研究協力者	富田隆史	(国立感染症研究所)
研究協力者	葛西真治	(国立感染症研究所)
研究協力者	駒形修	(国立感染症研究所)
研究協力者	津田良夫	(国立感染症研究所)
研究協力者	李時雨	(国立感染症研究所)
研究協力者	比嘉由紀子	(国立感染症研究所)
研究協力者	Indira S Weerasinghe	(Med Res Inst, Sri Lanka)

アセチルコリンエステラーゼ 2 (*Ace2*)のアシルポケット座位に見出された F455W 置換は、コガタアカイエカの有機リン剤抵抗性のおもな要因である。日本本土、南大東島、沖縄本島、西表島、タイ、ベトナム、セイロン島、およびジャワ島における W455 変異をもつ *Ace2* 抵抗性遺伝子について、頻度と F455 座位周辺約 0.6 kb の塩基置換多型を調べた。ジャワ島を除く各地方集団では W455 抵抗性遺伝子が存在し、F455 感受性遺伝子に対して優勢であった。W455 遺伝子には 2 つのタイプがあったが、これらが同時に含まれていたのは西表島においてのみで、一方のタイプがジャワ島を除く全ての地方集団に全て含まれていた。蚊の移住と水田での有機リン系農薬の散布により、1 つの突然変異起源に由来する抵抗性遺伝子が過去半世紀の間にアジア広域に分布を広げたことが示された。

A. 研究目的

日本脳炎の流行がわが国で最盛期であった 1960 年代までの過去においても、水田に発生する主要媒介蚊のコガタアカイエカを殺虫剤で防除するという発想はなかった。しかしながら、イネ害虫の防除を目的として散布された農薬殺虫剤の選抜により、日本本土のコガタアカイエカ集団に強度の有機リン剤抵抗性が発達したことが 1980 年代に明らかになった(Yasutomi and Takahashi 1986)。おもな抵抗性機構は有機リン系・ピレスロイド系殺虫剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の殺虫剤非感受性であることも示された(Takahashi and Yasutomi 1986)。その後、昆虫種に 2 つある AChE 遺伝子の一方、*Ace2* に殺虫剤非感受性の原因となるアミノ酸置換突然変異、F455W、が有機リン剤抵抗性の富山系統の蚊から同定された(Nabeshima et al, 2004)。

イネの害虫防除の目的でわが国では全国的に似

通った農薬の散布を行ってきたこと、およびコガタアカイエカは飛翔能力の高い蚊種とみなされていることから、抵抗性遺伝子の起源が新しくその数が限られていれば、遺伝的組換えの影響を最小限に免れたままに抵抗性遺伝子ハプロタイプの地理的流布が観察できると考えた。

本研究では、日本を含むアジアのいくつかの地点で採集した蚊を使い、*Ace2* 遺伝子の F455 座位をコードする 1 つのエクソン塩基配列を決定し、コガタアカイエカ地方集団における *Ace2* 遺伝子の遺伝的多様性、F455W 置換を指標とする抵抗性遺伝子の頻度、ならびに抵抗性遺伝子に認められるハプロタイプの種類について解析した。

B. 研究方法

コガタアカイエカの採集地は、千葉県酒々井町、富士見市、横浜市、小矢部市、岐阜市、諫早市(以上 2002 年採集)、南大東島、沖縄本島、西表島、

ベトナム国ハノイ市, タイ国ナム・ヤ・ボン郡, スリランカ, インドネシア国ジャワ市であった。西表島では終齢幼虫を採集し, 他の採集地点では成虫を採集した。個体毎にゲノム DNA を抽出した。Tomaら(2000)による分子分類法を適用し, 亜熱帯・熱帯地方におけるコガタアカイエカとその近縁種である *Culex vishnui* と *Cx. pseudovishnui* を予め分別した。コガタアカイエカと判定された個体の DNA を鋳型として PCR により *Ace2* 遺伝子の F455 座位を含む 1 つのエクソンの一部を増幅した。次いで, ダイレクト・シーケンシング法により 609 塩基長の配列を解析した。ヘテロ接合体の配列は, ホモ接合体に含まれ一意的に決まるハプロタイプを最初の手がかりとして用いることにより, 各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。

C. 研究結果

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。西表島ではすくい取りにより幼虫を採集したが, この検定結果によれば, サンプリングに偏りはなく, 任意交配集団からランダムに幼虫をサンプリングしたものとみなされる。F455 座位の周辺配列における塩基置換から, 抵抗性ホモ接合体の中には 2 つのハプロタイプが含まれ, それぞれのハプロタイプに関するホモ接合体も存在した。1 つは 1980 年代に室内飼育を始めた富山系統で最初に見いだされたハプロタイプと同一で, 他方は西表島のみから見いだされたハプロタイプであった。これら2つの抵抗性型ハ

プロタイプを富山型(TYM)と西表型(IRO)と呼ぶことにする。抵抗性と感受性のヘテロ接合体は, 全て TYM または IRO のいずれかを保有しているものとして矛盾なく 2 つのハプロタイプに分離できた。推定した感受性ハプロタイプの種類は全部で 13 で, 感受性遺伝子(F455)の頻度が 38%と劣勢であったにもかかわらず, 抵抗性遺伝子に比べて豊富な遺伝的多様性が認められた。

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。採集した抵抗性ホモ接合体(W455/W455)の一部(23 個体)と他の遺伝子型の全ての個体(F455/F455 の 7 個体と W455/F455 の 2 個体)を同様に解析した。抵抗性遺伝子(W455)はすべて TYM ハプロタイプであり, 感受性遺伝子(F455)の中には少なくとも 7 つの異なるハプロタイプが含まれていた。日本本土(本州・九州)においても, 感受性遺伝子の頻度が 1 割前後と劣勢であったにもかかわらず, 抵抗性遺伝子に比べて豊富な遺伝的多様性が認められた。

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。

D. 考察

日本において, イネの害虫防除に散布されてきた主要な有機リン系殺虫剤の登録は, パラチオンが

高知型ハプロタイプ(KCH), TTT コドンで F455 をコードする:	T-G-TT-T-C-T-C-C
富山型ハプロタイプ(TYM), TGG コドンで W455 をコードする:	C-G-GG-T-T-C-C-T
西表型ハプロタイプ(IRO), TGG コドンで W455 をコードする:	T-A-GG-C-C-T-T-C

1952年(1971年まで)、マラチオンが1953年、フェニトロチオン1961年と半世紀遡る。コガタアカイエカの発生地は水田や湿地などの広水域系であり、稲作を行う東アジアから南アジアにかけてコガタアカイエカは広く分布している。日本以外での水田における農薬の散布歴と使用規模を知ることは難しいが、現在では今回採集地とした各国で有機リン系殺虫剤が使用されている。南大東島では、主要な農作物であるサトウキビの害虫防除にフェニトロチオンが使用されているため、空中散布のドリフトにより湿地に発生するコガタアカイエカが薬剤選抜を受けている可能性がある。

広範なアジア地域のコガタアカイエカ集団において、TYMハプロタイプが席捲していることを本研究で示した。TYMハプロタイプに含まれるF455W置換突然変異の起源が1つである可能性は、W455(TGG)をもたないTYMハプロタイプの亜型が感受性遺伝子に見いだせなかったことから推察される。TYMハプロタイプの原型が保存されている点については、他の地方集団にこのハプロタイプを持つ蚊が移住した際も、有機リン系殺虫剤の選抜によりその地でこのハプロタイプ頻度が急激に増大したため(いいかえると、抵抗性のヘテロ接合体の頻度が急激に減少したため)、遺伝的組換え体を生ずる機会が急速に失われていったためと考えられる。アジア広域に及びTYMハプロタイプが分布することは、本種の移動能力が高いことを示すものである。

IROハプロタイプは、TYMハプロタイプと比べて、W455座位に隣接する上流と下流の塩基置換座位を含む全部で7つの塩基置換があるため、同一な突然変異(TTT→TGG)が独立に生じた異なる起源に基づくハプロタイプとみなされる。西表島に近い台湾における本種集団の遺伝的構成に興味もたれる。

ジャワ島においては、調査個体数が最も大きかったにもかかわらず、W455抵抗性遺伝子が認められなかった。この結果を説明することは今のところ難しい。近隣に位置するスマトラ島さらにマレー半島における遺伝的構成、ならびにインドネシアにおける農薬の散布歴とその規模を知ることが手がかりになるはずである。本研究で対象としなかった配列に未知の殺虫剤低感受性変異が存在する可能性も否定できない。

E. 結論

1. *Ace2* 殺虫剤抵抗性遺伝子(W455)が高頻度でアジアの広い地域に分布する。
2. 抵抗性遺伝子の起源は少なくとも2つある。
3. 抵抗性型のTYMハプロタイプが普遍的に分布する。
4. 頻度の低い感受性遺伝子(F455)には、抵抗性遺伝子にない遺伝的多様性が豊富に含まれている。
5. TYMハプロタイプは、移住と殺虫剤選抜により、急速に(永くとも過去半世紀のスパンで)アジア広域に伝播したと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

富田隆史, 駒形修, 津田良夫, 比嘉由紀子, Indira S Weerasinghe, 葛西真治, アジアのコガタアカイエカ集団における殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の分布, 第51回日本応用動物昆虫学会大会, 2007年3月29日。

李時雨, 葛西真治, 駒形修, 津田良夫, 比嘉由紀子, Weerasinghe Indra, 小林睦生, 富田隆史, コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の東アジアにおける分布, 第59回日本衛生動物学会大会, 2007年4月4日。

富田隆史, 駒形修, 葛西真治, 津田良夫, 比嘉由紀子, 小林睦生, Indira S Weerasinghe, Hsi-Chieh Wang, アジアのコガタアカイエカ集団における殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子(*Ace2*)の分布(II), 第53回日本応用動物昆虫学会大会, 2009年3月29日。

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究総合報告書

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

研究分担者 澤邊 京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)
研究協力者 星野 啓太・伊澤 晴彦・佐々木年則 (同・昆虫医科学部)
小滝 徹・高崎 智彦 (同・ウイルス第一部)

研究要旨: 国内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、アカイエカをはじめとするイエカ属蚊類から新規フラビウイルスを見出し、*Culex flavivirus* (CXFV) と命名した。東京都新宿区産アカイエカから分離された CXFV の 1 株について、形態学的、血清学的手法による性状解析を行い、さらに CXFV ゲノムの全ヌクレオチド配列決定を試みた。その結果、CXFV はフラビウイルスの起源的なタイプとされる昆虫フラビウイルスに属するが、多くの新たな特徴を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

フラビウイルスは日本脳炎ウイルス(JEV)、ウエストナイルウイルス(WNV)などの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るが、特に蚊との関わりが深いことが知られている。わが国に生息する蚊のうち、イエカ属蚊類は JEV の主要な媒介蚊として認識されているだけでなく、WNV などに対しても媒介能を有する種類も含まれるため、フラビウイルス属ウイルスの媒介蚊類として重要視されている。本研究において、国内捕集イエカ属蚊から発見された新規フラビウイルスは、フラビウイルスと蚊類との進化的な関係および生態学的な関わりについての重要な情報をもたらすものと予想された。そこで、本ウイルスに関する様々な性状解析を実施するとともに、多くの重要情報を包含するゲノムの遺伝子構造解析を重点的に行い、

その本質を捉えることを目的とした。

B. 研究方法

1. 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することで行った。ウイルス粒子の電子顕微鏡観察は、Yano *et al.* (1996)に従った。感染細胞を 5% glutaraldehyde および 1% osmic acid で固定脱水後、Epon 812 樹脂で包埋し、これの切片を uranyl acetate 染色した後、電子顕微鏡による観察と写真撮影を行った。

2. 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(4 回継代培養上清)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°C)し、得られた沈殿を新たに TSE buffer (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH7.4)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°C)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。不活化した精製粒子は、ウイルス構成タンパクの解析および抗体作成の抗原として使用した。ウイルス構成タンパクの解析には、10-20% gradient gel (e-PAGEL gel, ATTO Corp., Tokyo, Japan)および Immunoblot Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)を使用した。

3. ス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(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、産物は精製サイクルシーケンシング法でスクレオチド配列決定を ABI PRISM310, 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して行った。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、上記と同様にスクレオチド配列決定を行った。使用プライマーの情報は Hoshino *et al.*,

(2007)に記載した通りである。決定された配列情報は、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。ス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

CXFV 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 ス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 スクレオチドの非翻訳領域を有するものであった。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。CXFV を構成する 10 種類の各タンパクについて、昆虫フラビウイルス(Cell fusing agent: CFA, Kamiti river virus: KRV)、国内ですでに分離されているフラビウイルス 2 種(JEV, Yokose virus: YOKV, Tick borne encephalitis virus:

TBEV、Apoi virus : APOIV)および Dengue type 2 virus (DEN2V)との相同性の比較を行った結果、prM、E については CFA に最も相同性が高く、NS3、NS5 については CFA および KRV との相同性が高かった。これらのウイルス間における系統関係について、E および NS5 について Tamana bat virus (TABV)および Hepatitis C virus (HCV)を加えて解析したところ、CXFV はいずれの場合も CFA、KRV と同じ clade に配置され、E に関しては CFA とともにフラビウイルスの尤も外側に配置されることが推定された。さらに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。

D. 考察

国内産イエカ属蚊類から発見された新規フラビウイルス CXFV は、そのゲノムの全ヌクレオチド配列情報が決定され、遺伝子構造レベルにおいてもまたフラビウイルスの基本的特徴を有することが明らかとなった。従って、CXFV は、その遺伝子構造の特徴、さらに構成タンパクのプロフィール、電子顕微鏡観察などから、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、CXFV はフラビウイルス属ウイルスの中において未分類とされていた CFA と系統学的に近縁であり、さらに分離状況あるいは増殖様式における蚊への特異性が高いという特徴においても CFA との共通点を多く有するものであった。近年、アフリカから記載された KRV もまた、採集された幼虫から羽化させた *Aedes macintoshi* のオス成虫から分離されており、多くの点で CXFV、CFA との類似性が示唆された。これら

のことから、CXFV はフラビウイルスのなかで明らかに CFA、KRV と同じ分類群に包含されるものであり、近年提唱されているように昆虫フラビウイルスという新たな clade を形成することが推察された。CXFV は昆虫フラビウイルスにおいて初めてイエカ属蚊類から発見されたが、それらは分離された蚊種、あるいは採集地点に関わらず1つの clade を形成したことから、CXFV はイエカ属蚊類との特異性が高いことが推察された。イエカ属蚊類はヒト病原性を有するフラビウイルス(JEV、WNV など)を媒介可能であるとされるが、CXFV と他種フラビウイルスとのウイルス生態学的な相互関係は現在のところ全く不明である。したがって、今後 CXFV を詳細に解析することで、その伝播様式あるいは生活環などのフラビウイルスとイエカ属蚊類とのかかわりについてより明らかになるものと考えられた。さらに、今回の CXFV の分子レベルにおける性状解析は、蚊からのフラビウイルスの検出におけるプライマー設計などの技術的改変に対して有益な情報となりうるものである。

E. 結論

1. 国内産イエカ属蚊類から新規フラビウイルスを発見し、*Culex flavivirus* (CXFV)と命名した。
2. CXFV はフラビウイルスの遺伝子構造的特徴を有することが明らかとなった。
3. CXFV は昆虫フラビウイルスの clade に配置され、さらにイエカ属蚊類に特異性の高い新たなグループであることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M. and Sawabe, K. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359: 405-414 (2007)

3. その他

なし

2. 学会発表

1) 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 比嘉由紀子, 矢野和彦, 高崎智彦, 小林睦生, 澤邊京子. 本邦生息蚊類が保有するフラビウウイルスの検出および性状解析. 第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2006年5月26-27日, 長崎市

2) 星野啓太, 伊澤晴彦, 津田良夫, 矢野和彦, 佐々木年則, 油田正夫, 高崎智彦, 小林睦生, 澤邊京子. 本邦イエカ属蚊類から分離された新規フラビウウイルスの性状解析. 第59回日本衛生動物学会大会. 2007年4月2-4日, 大阪市

3) 星野啓太, 伊澤晴彦, 津田良夫, 佐々木年則, 澤邊京子, 小林睦生, 高崎智彦. 本邦生息蚊における昆虫フラビウウイルスの検出およびその性状解析. 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2007年5月18-19日, 白山市

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

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究総合報告書

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

研究分担者 澤邊 京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)
研究協力者 伊澤 晴彦・佐々木年則・鯉田 龍星・星野 啓太・津田 良夫
(国立感染症研究所・昆虫医科学部)
小滝 徹・高崎 智彦 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)
中口 梓 (国立がんセンター研究所)
比嘉 由紀子(長崎大学熱帯医学研究所)

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 10 名以下と低い値で推移しているが、環境中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ている。そこで、国内の蚊集団における JEV の保有状況を把握することを目的として、2006～2008 年の 3 年間に国内数カ所でコガタアカイエカを捕集し、JEV の検出、ならびに分離株の遺伝子配列をもとに系統解析を行った。コガタアカイエカは、2006 年 1 都 3 県(4 地点)、2007 年 1 都 4 県(6 地点)、2008 年 1 都 11 県(12 地点)の豚舎を含む畜舎周辺で捕集し、主に C6/36 培養細胞を用いた細胞接種系によりウイルス分離を試み、RT-PCR あるいは real-time PCR 法によりウイルス遺伝子を検出、遺伝子解析を行った。

例年、ブタの JEV 抗体陽性率の高いことが報告されている静岡、長崎、熊本、鹿児島各県下の豚舎を含む畜舎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、大規模野鳥飛来地である新潟県佐潟湿地で捕集したコガタアカイエカからも JEV が分離された(陽性プール率は 3.3-41.7%)。一方、分離された JEV 株のゲノム中のエンヴェロップ(E)領域の遺伝子配列を解析した結果、これまでに得た分離株はすべて 1 型に属し、近年、東アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁であることが示唆された。2007 年分離株はアミノ酸レベルで新たな変異が認められたものの、2008 年に分離された株は 2007 年よりもむしろ 2006 年以前の分離株に近縁であることも示唆された。3'非翻訳領域の可変領域に 1 型株に特徴的な配列欠損が認められ、さらに新たな欠損部位も見つかった。

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、疫学上重要であることが強く示唆された。

A. 研究目的

近年の日本国内における日本脳炎患者

報告数は、年間 10 例以下と低く推移しており、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たため、より安全性の高い新規ワクチンの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、罹患者の発生は毎年途切れることなく続いている。さらに、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されてきた症例の中に、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た。一方で、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からも 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 JEV 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等が現在では行われなくなって久しく、最近のウイルス媒介蚊の現状に関する知見は極めて乏しい。このような背景から、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ってきた。

B. 研究方法

1. 蚊の捕集

コガタアカイエカは、捕虫網・CDC 型背負い式電動吸引機・吸虫管あるいは CDC 型ドライアイストラップを用いて捕集した。2006～2008 年に国内で行ったコガタアカイエカの捕集地(ウイルス検出と分離に用いた頭数、以下、単位は省略)は下記の通りである。

- 1) 2006 年:宮城県角田市牛舎(20)、東京都新宿区(200)、高知県安芸市牛舎(113)、長崎県諫早市畜舎および森山町豚舎(計 480)。合計 813 頭・41 プール。
- 2) 2007 年:新潟県新潟市佐潟湿地(231)、東京都目黒区林試の森公園(280)、同・大田区東京港野鳥公園(70)。長崎県諫早市畜舎(700)。熊本県合志市畜舎(1,192)。鹿児島県南九州市豚舎(1,200)。合計 3,673 頭・192 プール。
- 3) 2008 年:山形県酒田市牛舎(1)、茨城県那珂市牛舎(2)、千葉県館山市豚舎(460)、東京都目黒区林試の森公園(240)、神奈川県横浜市牛舎(40)、静岡県御前崎市豚舎(240)、滋賀県彦根市牛舎(450)、島根県出雲市牛舎(1,094)、長崎県諫早市畜舎(660)、熊本県菊池市豚舎(471)、鹿児島県南九州市豚舎(960)、沖縄県石垣市豚舎(2)。合計 4,620 頭・235 プール。

2. 細胞培養およびウイルス分離

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% CO₂ 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。吸血個体は少なく

とも1週間砂糖水のみで飼育し、消化管内の血液を完全に消化させ、あるいは産卵させ回収することで、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。

3. 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。

C. 結果

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。また、2007年分離株はアミノ酸レベルで新たな変異が認められたものの、2008年に分離された株は2007年よりもむしろ2006年以前の分離株に近縁である可能性が示唆された。次に、ゲノム3'非翻訳領域(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結果、近年の1型株で特徴的とされる配列欠損が存在し、さらに新たな欠損部位の存在も認められた。

D. 考察

2006～2008年の3年間にJEVが分離された静岡、長崎、熊本、鹿児島県の4県は、例年、ブタのHIおよび2-ME感受性抗体価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含まれていたことが示唆された。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

かとなったことから、JEV が蔓延していると推測される地域住民の本ウイルスへの感染の危険性は依然として高いと推察される。一方、佐潟湿地は、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。

2007年新潟県では、9月の時点でブタの抗体価は上昇しておらず、また佐潟周辺に特に大規模な養豚場が見あたらないことから、9月19日に捕集されたJEV陽性蚊個体がどこからもたらされたかを推定することは難しい。しかし、コガタアカイエカが他の種の蚊に比較して飛翔範囲が広範であることを考慮すると、かなり離れた地域から飛来してきた可能性もあると思われる。

JEVは増幅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、日本を含む東南アジア一帯で1990年頃を境にその遺伝子型が3型から1型へと移行してきたことが知られている。本研究における遺伝子解析の結果、2007年分離株はアミノ酸レベルで新たな変異が認められたものの、2008年に分離された株は2007年よりもむしろ2006年以前の分離株に近縁である可能性が示唆された。また、近年、いくつかの1型株において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。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、今後検討すべき課題である。

以上、3年間の研究により、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、疫学上非常に重要であることが強く示唆された。

E. 結論

1) 例年、ブタのJEV抗体陽性率の高いことが報告されている静岡、長崎、熊本、鹿児島各県下の豚舎を含む畜舎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、大規模野鳥飛来地である新潟県佐潟湿地で捕集したコガタアカイエカからもJEVが分離された(陽性プール率は3.3-41.7%)。

2) E領域の遺伝子配列の解析から、これまでに分離されたウイルス株はすべて1型に属し、近年東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判明した。

3) 2007年分離株はE領域でアミノ酸レベルの新たな変異が認められ、また、3'UTRの可変領域にも新たな配列欠損が見出されたものの、2008年に分離された株は2007年よりもむしろ2006年以前の分離株に近縁である可能性が示唆された。今後も継続して変異の追跡を行う必要があると思われる。

4) 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、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示唆された。

謝辞: 蚊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)。足立論

(静岡県環境衛生科学研究所)、井上真吾・鍋島武・木下一美・森田公一・比嘉由紀子・大橋和典・前川芳秀・角田隆・川田均・高木正洋(長崎大学熱帯医学研究所)、小川智子(千葉衛生研究所)、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)、佐山勇輔(東北大学)、高崎智彦・小滝徹・倉根一郎(国立感染症研究所・ウイルス第1部)、千屋誠造(高知県衛生研究所)、中村憲夫(安房健康福祉センター)、松村正哉(九州沖縄農業研究センター)、梁瀬徹・白藤浩明・今田忠男(動物衛生研究所九州支所)

G. 研究発表

1. 論文発表: なし

2. 学会発表

1) 澤邊京子・星野啓太・伊澤晴彦・中口梓・佐々木年則・比嘉由紀子・津田良夫・高崎智彦・小滝徹・井上真吾・森田公一・川田均・高木正洋・永野博明・藤井猪一郎・千屋誠造・渡辺護・斎藤一三・小林睦生. 2005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分離. 第58回日本衛生動物学会. 2006年4月6-8日, 長崎市

2) 中口梓・星野啓太・伊澤晴彦・佐々木年則・比嘉由紀子・津田良夫・澤邊京子・小林睦生. 2005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分離. 第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2006年5月26-27日, 長崎市

3) 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2-4日, 大阪市

4) 津田良夫・星野啓太・伊澤晴彦・澤邊京子・秋場哲哉・小林睦生・東京都および近隣都市域におけるコガタアカイエカの発生状況. 第42回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2007年5月18-19日, 白山市

5) 伊澤晴彦・星野啓太・佐々木年則・津田良夫・金京純・梁瀬徹・今田忠男・川田均・角田隆・大橋和典・前川芳秀・高木正洋・小林睦生・澤邊京子. 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および系統解析. 第60回日本衛生動物学会. 2008年4月18-19日, 下野市

6) 澤邊京子・伊澤晴彦・星野啓太・佐々木年則・金京純・津田良夫・小林睦生. 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. 第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2008年5月30-31日, 観音寺市

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

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究総合報告書

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

研究分担者 小西英二（神戸大学・准教授）
研究協力者 高崎智彦（国立感染症研究所・室長）
近藤高志（日本中央競馬会競走馬総合研究所・研究役）

研究要旨 DNAワクチンは種々の利点を持ち、国際的に普及できる感染症予防戦略の一つとして囑望されている。しかし、市場化を遅らせている1つの問題点は、遺伝子組換え製剤に対する人々の懸念である。本事業の3年間では、解決策として、蛋白混合投与方法や針無投与方法によるDNAワクチンのドーズ低減に焦点を当てた。初年度には、この手法によりウエストナイルウイルス（WNV）のマウスモデルにおいては0.1 μg の1回接種で、また日本脳炎ウイルス（JEV）のブタモデルにおいては1 μg の2回接種で中和抗体を誘導できることを証明した。マウスにおけるDNAワクチンの初期評価に通常用いる100 μg と比較すると、格段のドーズ低減である。次年度には、デングウイルス（DENV）のマウスモデルを用いて、5 μg （各型）のデング4価DNAワクチンが、全ての型に対して中和抗体を、また1 μg でも攻撃後に2次免疫応答を誘導できることを示した。最終年度は、DNAワクチンのドーズ低減が可能となるメカニズムについてDENVモデルを用いて検討し、DNA・蛋白混合投与方法においてはフラビウイルス間の抗原交差性が効果的に働き、相互の免疫原性を増強する現象（交差免疫原性）に基づくことを示した。このことから、比較的頻繁に自然暴露を受ける流行地では、さらなるドーズ低減が可能と考えられた。

A. 研究目的

節足動物媒介性フラビウイルスには、地球上に広く分布し、ヒトに重篤な疾患を引き起こすものが多い。DENVは、熱帯・亜熱帯地域で流行し、年間推定約1億人のデング熱及びデング出血熱患者を生ずる。WNVは熱帯・亜熱帯のみならず温帯地域に、またJEVはアジアの広い地域に存在する。DENV及びWNV

は現在わが国に存在しないが、地球温暖化が進めば流行域が北上し、侵入の可能性が危惧される。

これらのウイルスが原因となる病気に対して特異的な治療法はないため、予防が重要である。予防の中でワクチンは最も普遍的な手段である。フラビウイルスに対しては、認可ワクチンの入手できないものが多いが、入手できるものでも改

良が望まれている。特に、国際的視野に立ち病気を予防するためには、それに適したワクチンを開発する必要がある。

DNAワクチンは、安全・安価で、開発途上国に導入可能である。我々の教室では上記の病気に対するDNAワクチンを試作してきた。しかし、一般的に臨床試験や大動物を対象とした評価に用いられるDNAワクチンのドーズは数百 μg から数mgである。遺伝子組換え製剤に対する人々の懸念があり、今後ヒト用DNAワクチンが認可されるためにはドーズの低減が必要と考えられる。

これまで我々は、蛋白ワクチンを同時投与することにより、また針無投与方法により、DNAワクチンの効果を高めることを報告してきた。本事業の3年間では、3種のフラビウイルスDNAワクチンを対象にして、中和抗体を誘導するためのドーズをどの程度にまで低減できるかを明らかにし、ドーズが低減できるメカニズムを検討した。

B. 研究方法

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 (それぞれpcD1ME、pcD2ME、pcD3ME及びpcD4ME)、ウエストナイルDNAワクチン (pcWNME) 及び日本脳炎DNAワクチン (pNJEME) 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 (NIH grant#U42RR11149: 現在pUMVC4a) 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。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、神戸大学大学院医学系研究科動物実験委員会により承認された。

C. 研究結果

マウスに中和抗体を誘導するデング4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 μg のデング4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 μg 投与群及び5 μg 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 μ 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 μ g及び5 μ g投与群に加えて1 μ g投与群でも中和抗体価の2次免疫応答が示された。1 μ 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 μ 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 μ gのpcWNMEをWNVAXと混合投与した結果、0.01 μ g投与群では相乗効果を認めなかったが、0.1 μ 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 μ 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 μ 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週間後には、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 μ 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。

D. 考察

DENVのマウスモデルでは1 μ g(2回投与)、WNVのマウスモデルでは0.1 μ g(1回投与)、またJEVのブタモデルでは1 μ g(2回投与)までドーズを低減できることが示された。通常の試験に用いられる量の100~1000分の1であり、安全性の向上と共に価格の低下につながる。低ドーズで投与できる他の方法として、遺伝子銃(ジーンガン)も開発されてきたが、比較的大掛かりな装置を必要とし、多数のヒトを対象とするワクチン接種に適用するには困難と思われる。一方、ジェット式針無注射法は、近年の針刺し事故の増加に対応するため、ワクチンに限らず一般的な薬剤投与のために開発が急速に進められ、簡便な装置で容易に使用できることを特徴とする。

Dengue 4価DNAワクチンに混合した蛋白ワクチンは、pcD2MEと同型のD2EPであった。しかし、特異性が高い中和試験においても同等の抗体価が4型共に示され、蛋白ワクチンによるDNAワクチンの増強効果が他の型にも認められた。フラビウイルス属の中で、4種のDENV(1型か