

地球温暖化に伴うウイルス性感染症の早期予防法の確立に関する研究

デングウイルス NS1 抗原検出 ELISA キット (Dengue Early ELISA®)
の実用性に関する応用研究

研究分担者 高崎智彦

研究協力者 大松 勉、倉根一郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
木村雅子、井川尚紀、米倉瞳、三浦彰子、山形晃明、
鎌倉和政、井村俊郎 (関西空港検疫所)
成田空港検疫所

研究要旨

デングウイルスは急性熱性疾患であるデング熱を引き起こすウイルスであり、蚊によってヒトからヒトへ感染が拡大する。近年の地球温暖化に伴い、媒介蚊の生息地域の拡大とデング熱流行地域の拡大が懸念されている。我が国への輸入症例数は感染症法施行後、年々増加傾向にあり、2008 年にはその報告数は 100 例を超えた。本研究では、新たなデング熱に対する実験室診断法としてオーストラリア製の NS1 抗原検出 ELISA (Dengue Early ELISA®) の評価を、実際にデング熱の実施している国立感染症研究所、成田空港検疫所、関西空港検疫所において実施した。その結果、国立感染症研究所においてはデング熱患者 113 名の検体中 70 名 (61.9%) で、血中より NS1 抗原が検出された。一部の患者ではデングウイルス遺伝子およびデングウイルス特異的 IgM 抗体が共に検出されない時期の血中より NS1 抗原が検出されたものもあった。しかし、本キットはデングウイルス 4 型感染患者においては本 NS1 抗原検出キットの感度が低いことが確認された。従って、本キットをウイルス遺伝子検出に代えて単独で使用するには適さないが、デングウイルス病原体診断の一つとして NS1 抗原の検出は有用であり、患者血清を対象とした NS1 抗原検出をこれまでの診断法と併用することにより、より迅速で正確な診断が可能になることが明らかになった。

A. 研究目的

デングウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属するウイルスであり、急性熱性疾患であるデング熱を引き起こす。デング熱は予後の良い疾患であるが、一部の感染患者ではデング出血熱あるいはデン

グショック症候群を発症することがあり、この場合死にいたることがある。世界のデング熱患者数は 1950 年代以降熱帯・亜熱帯地方を中心として年々増加傾向にあり、現在では年間数千万人もの患者が報告されている。また、我が国への輸入症例も 2004

までは 50 例前後であったが、2005 年 74 例、2007 年 89 例であり、2008 年には 104 例と年間報告数が 100 例を超えた。デングウイルスは蚊の吸血によって媒介され、ヒトからヒトへと感染する節足動物媒介性ウイルスである。主な媒介蚊はネッタイシマカであるがヒトスジシマカも媒介能力を有しており、1942 年から 1945 年にかけて西日本を中心に温帯地域最大の流行が発生した歴史を鑑みた場合、我が国の防疫体制のいっそうの強化が必要である。そのためには輸入デング熱症例のより迅速で確実な診断が重要である。デング熱の確定診断としては臨床診断と共に実験室診断が必須である。実験室診断としては PCR 法を基にしたウイルス遺伝子検出もしくは培養細胞を用いた病原体分離による病原体診断と、デングウイルス特異的 IgM 抗体検出もしくはペア血清を用いた中和抗体価上昇による血清診断が行われている。近年、新たな迅速診断法の対象としてデングウイルスの非構造蛋白質の一つである NS1 抗原が着目されている。NS1 抗原はデングウイルスが細胞に感染した場合に、感染細胞から放出される非構造蛋白質である。デングウイルスは 4 つの型に分類されるが NS1 は型間で高度に保存されているタンパク質である。NS1 抗原は患者血中においても認められることは明らかになっている。そこで、本研究ではオーストラリア製の NS1 抗原検出 ELISA (Dengue Early ELISA[®]) を用いて NS1 抗原検出の診断における有用性を評価した。

B. 研究方法

2007 年 1 月から 2008 年 11 月までの間

に国立感染症研究所ウイルス第一部第 2 室でデング熱と診断された患者 113 名の血清 208 検体を対象として、血中のデングウイルス NS1 抗原の検出を試みた。NS1 抗原の検出にはオーストラリア製の Dengue Early ELISA kit (PanBio) を用い、その使用方法に準拠して評価を行った。簡単にプロトコールをまとめると図 1 のようであり、検査に要する時間はプレート洗浄時間を考慮しても 2 時間 30 分である。

また、ウイルス遺伝子検査 (リアルタイム RT-PCR TaqMan 法) は伊藤ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004) の方法に基づいて実施した。分離ウイルスは Vero 細胞によるブラーク法、PCR 産物による遺伝子解析法で確認した。抗体検査は IgM 捕捉 ELISA kit (Focus 社, CA, USA) および IgG-ELISA kit (PanBio 社) により IgM および IgG 抗体を測定し、デングウイルス感染であることを確認した。

C. 研究結果

Dengue Early ELISA を用いた NS1 抗原の検出

1. 国立感染症検疫所における評価

113 名中 70 名 (61.9%) のデング熱患者において血中から NS1 抗原が検出された。検出は発症後 12 日目の検体においても可能であった。また、TaqMan RT-PCR 法からウイルス型が明らかになった 77 名の検体について型別に NS1 蛋白検出を評価した結果、1 型では 24 名中 22 名 (91.7%)、2 型では 14 名中 10 名 (71.4%)、3 型では 31 名中 19 名 (61.3%)、4 型では 8 名中 2 名 (25%) でいずれかの時期の血清中から NS1 抗原が検出された。また、208 検体中、

NS1 蛋白 (+)・ウイルス遺伝子 (-)・特異的 IgM 抗体 (-) となったものが 2 検体、NS1 蛋白 (+)・ウイルス遺伝子 (-)・特異的 IgM 抗体 (+) となったものが 28 検体認められた。ウイルス型別でそれぞれ感度が異なることが明らかとなった。特に検体数は他の型に比べて少ないが 4 型ウイルスの場合に 25% という感度であった。

2. 関西空港検疫所における評価

関西空港では、2 例のデング熱症例が診断された。1 例目はデングウイルス 3 型感染であり、2 例目はデングウイルス 4 型感染であった。NS1 抗原 ELISA 法では、3 型ウイルス感染では陽性であったが、4 型ウイルス感染では陰性であった。

3. 成田空港検疫所における評価

成田空港検疫所では、1 例のデング熱症例が診断された。デングウイルス 1 型感染であり、NS1 抗原 ELISA 法の結果は陽性であった。

D. 考察

NS1 抗原は非構造蛋白質であるにもかかわらずデングウイルス感染細胞から放出されるため、病原体診断法としての有用性が東南アジアを中心に報告されている。本研究結果から、ELISA 法を用いた NS1 抗原検出はデング熱患者の病原体診断法として有用であることが明らかとなった。NS1 抗原は Dengue Early ELISA[®] においては発症後 12 日目の患者血中からも検出されていた。TaqMan RT-PCR 法を用いたウイルス遺伝子の検出は発症後 11 日後まで可能であったことから、NS1 抗原検出はウイル

ス遺伝子検出と比較するとほぼ同期間かより長期間の血清を対象とした検索が可能であることが明らかになった。

デング熱においては抗体の上昇とともにすみやかにウイルス血症が消失するため、ウイルス遺伝子検出とデングウイルス特異的 IgM 抗体検査を組み合わせることで実験室診断を実施しているが、採血時期によっては共に認められない場合もある。特に検疫所においては採血がワンポイントであるため、検査で検出できない可能性がある。今回の評価においては、ウイルス遺伝子および IgM 抗体陰性検体のうち Dengue Early ELISA を用いて 2 検体で、NS1 抗原が検出された。この結果は、NS1 抗原の検出が早急で確実な診断が重要となるデングウイルス感染症に関して有用であり、これまでの実験室診断に新たに導入することにより、より確実な診断が可能になることが示唆された。

しかし、今回評価した Dengue Early ELISA ではウイルス型間で感度の差が認められた。このことは今後改善される必要があるが、本キットがリアルタイム RT-PCR に代えて病原体診断法として単独で実施する試験法としては不十分である。また、Dengue Early ELISA ではウイルス型別が判明できないことも欠点である。しかし、検査時間に関してはリアルタイム PCR に比べて大きな違いはないことから、リアルタイム RT-PCR 法と併用することは可能であると考えられる。

E. 結論

NS1 蛋白検出 ELISA 法は有用であり、TaqMan RT-PCR 法による病原体診断およ

び ELISA 法による血清診断と共に用いる
ことでより正確で迅速な診断が可能になる
ことを明らかにした。

F. 健康危険情報

2008 年は、我が国へのデング熱輸入症例
が、1999 年の感染症法施行後、初めて 100
例を超え、104 例報告された。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

表 1 NS1 抗原検出、ウイルス遺伝子検出と病日の関係

	Days after onset														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
検体数	14	11	23	22	30	20	20	14	7	9	12	6	3	6	3
PCR*	14/14	10/11	16/17	12/16	14/22	4/14	4/8	5/10	1/4	0/5	1/7	0/3	0/3	0/4	0/0
NS1 抗原 (PanBio)	8/14	6/11	15/23	16/22	22/30	9/18	10/20	11/14	1/7	2/9	3/12	1/6	0/3	0/6	0/3

*PCR はリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法を用いた)

検出感度はリアルタイム PCR の方が良い。しかし、NS1 抗原は第 10 病日以降も検出できる場合がある。

厚生労働省科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

分担研究報告

ダニ媒介性脳炎ウイルスの遺伝子診断法の確立に関する研究

分担研究者 鈴木 隆二 国立病院機構相模病院 臨床研究センター
協力研究者 藤井 克樹 国立感染症研究所 ウイルス第一部
北浦 一孝 国立感染症研究所 ウイルス第一部
早坂 大輔 東京都神経科学総合研究所

ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）はわが国においても北海道に分布していることが知られているが、未だ簡便にウイルス遺伝子を検出・定量することが可能な real-time PCR 法が確立されていない。そこで本研究では TBEV Oshima 株に対するプライマーを設計し、迅速なウイルス遺伝子検出および定量法の確立を試みた。その結果、TBEV 感染マウスの脳サンプルから、E 領域および NS1 領域をターゲットとした 2 種類のプライマーを用いることによって、TBEV 遺伝子を特異的に検出することが可能であった。この方法は実験室内のウイルス遺伝子検出および定量法として充分利用可能であり、診断および研究の領域で広く応用可能になると考えられた。

A. 研究目的

ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）はマダニ（Ixodidae）によって媒介されるフラビウイルスの一種であり、ヒトに感染すると日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルスと同様の致死性の高い脳炎を引き起こす。わが国においても 1993 年、北海道で患者が発生し、その原因となる TBEV がイヌ、ノネズミおよびマダニから検出され、特に道南地域のイヌにウイルスが分布していることが判明している。

TBEV の診断方法としては培養細胞を用いたウイルス中和試験や IgM ELISA 法などが行われているが、ウイルス遺伝子の検出と定量を同時に且つ簡便に行える real-time PCR 法は未だ確立されていない。そこ

で本研究では、研究や診断に利用できる TBEV 検出・定量のための real-time PCR 法の開発を試みた。

B. 研究方法

TBEV 特異的プライマーは Oshima 5-10 株（AB062063）を基盤として設計した。E 領域（TBEV-E_0714F : CGGAACGGCTG GTTGAGTTTG、TBEV-E_0861R : TAGT CCTACCTCGCATGTCACG）および NS1 領域（TBEV-NS1_139F : CGGCTAGCCA CACTATCGACAA、TBEV-NS1_256R : GGCGAGTACTTCCATGGTCCCTT）の 2 種類を作製し、それぞれの検出能について検討を行った。

検討に用いたサンプルは、C57BL/6 マウ

スに TBEV (Oshima 5-10 株、 1×10^8 pfu) を皮下接種し、一定期間 (8 および 37 日) 経過したマウスから採取した脳の total RNA を使用した。コントロールとして正常マウスの脳の total RNA を用いた。組織から抽出した RNA は PrimeScript™ RT reagent kit (Takara Bio) を用いて cDNA に調製し、これをサンプルとして用いた。この逆転写反応には 50pmol random 6mer を用いて 37°C で 15 分間反応を行った。PCR 反応は SYBR® Premix Taq™ (Takara Bio) を用いて Lightcycler (Roche Diagnostics) にて検出した。プライマー濃度は forward および reverse プライマー共に 0.2 μ M、サンプル DNA は 2 μ L 使用し total 20 μ L のスケールで検討を行った。反応条件は初期変性反応を 95°C で 10 秒、その後のサイクルは 95°C で 5 秒および 60°C で 30 秒の 2 ステップを 40-50 サイクル行った。また、65°C -95°C の間における蛍光強度の推移を測定し、melting curve を作成することにより特異性の確認を行った。各サンプルのコピー数はスタンダードサンプルから検量線を描くことにより算出し、その値を RNA 1 μ g あたりに換算して示した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律 (平成 17 年法律第 68 号)」による「実験動物の使用及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年度環境省告示第 88 号)」及び文部科学省が策定した「研究機関等における動物実験等の実施に関する基準 (平成 18 年 6 月 1 日告示)」に基づき、日本学術会議が作成した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (平成 18 年 6 月 1

日通知)」に従って行った。

C. 研究結果

E 領域プライマー、NS1 領域プライマー共に TBEV 遺伝子を特異的かつ定量的に検出することができた (図 1)。また、10 copies/ μ L 以下では検量線の直線性が得られなかった。TBEV 感染マウスの脳内におけるウイルス遺伝子を定量したところ、いずれのプライマーで定量した場合でも、TBEV 感染後 8 日ではおよそ 10^5 copies / 1 μ g RNA、37 日では 10^2 - 10^3 copies / 1 μ g RNA 程度であった (図 2)。コントロールマウスではウイルス遺伝子は検出されなかったが、NS1 領域プライマーでは稀にプライマーダイマーと思われるノイズが見られた (図 1 C)。これは melting curve を描くことにより擬陽性であることが容易に判別可能であった (図 1 D)。

D. 考察

以上の結果から、TBEV の E 領域および NS1 領域をターゲットとした real-time PCR を行うことにより、TBEV 遺伝子を定量的に検出できることが確認できた。この方法は実験室内のウイルス遺伝子検出および定量法として充分利用可能であると考えられた。現在までに登録されている遺伝子情報から、これらのプライマーは北海道株だけでなく、Sofjin 株やハバロフスク株などの大部分の極東型ウイルスを検出可能であると考えられるが、実際に他の株でも検出可能であるか否かは今後検討する必要がある。また、稀に見られるプライマーダイマーの形成を抑えることも今後の課題である。

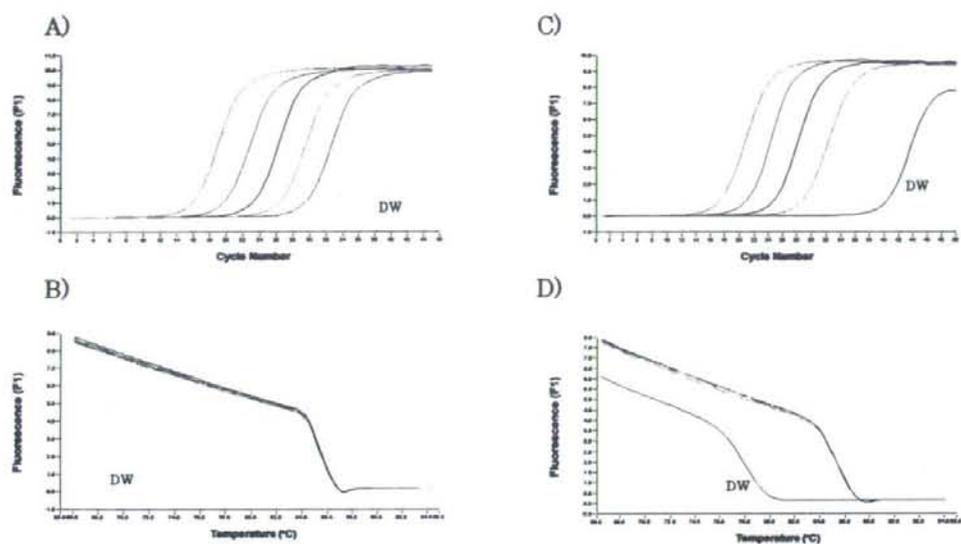


図1 Real-time PCR 解析結果

A) E 領域プライマーおよび C) NS1 領域プライマーを用いて real-time PCR を行った結果を示す。サンプルとしてスタンダードサンプルの希釈系列 ($10^3 \cdot 10^6$ copies/uL) を用いている。また、Negative control として DW を用いている。B, D) それぞれの melting curve を示す。

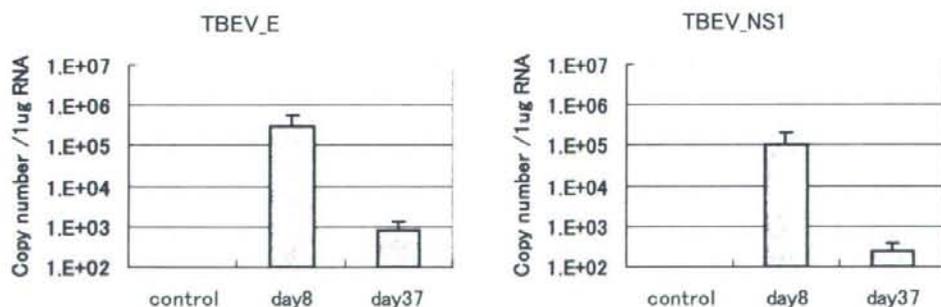


図2 特異的プライマーを用いた TBEV 遺伝子の定量

E 領域プライマーおよび NS1 領域プライマーを用いてマウス脳内の TBEV 遺伝子を定量した結果をサンプル RNA 1 μ g あたりのコピー数として示す (n=4)。感染後 37 日経過したマウスにおいてもウイルス遺伝子が検出されている。

E. 結論

TBEV 遺伝子の迅速かつ簡便な検出・定量法として E 領域および NS1 領域をターゲットとした real-time PCR が利用可能となった。この手法は診断および研究の領域で広く応用可能になると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitaura K., Kanayama K., Fujii Y., Shiobara N., Tanaka K., Kurane I., Suzuki S., Itoh T., Suzuki R.: T Cell Receptor Repertoire in BALB/c Mice Varies According to Tissue Type, Sex, Age and Hydrocortisone Treatment. *Experimental Animals* (in press)

Hayasaka D., Nagata N., Fujii Y., Hasegawa H., Takashima I., Sata T., Suzuki R., Koike S.: Development of encephalitis is necessary but not sufficient for mortality after subcutaneous infection with Tick-borne encephalitis virus Oshima strain in a mouse model. (in submission)

2. 学会発表

藤井克樹、早坂大輔、小池智、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：フラビウイルス脳炎における脳内の生体反応の解析 第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）2008 年 10 月 26-28 日

北浦一孝、藤井克樹、林 昌宏、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：ウエストナイルウイルス感染マウスにおける脳炎発症に関わる脳内浸潤 T 細胞の解析 第 56 回日本

ウイルス学会学術集会（岡山）2008 年 10 月 26-28 日

早坂大輔、永田典代、藤井克樹、長谷川秀樹、佐多徹太郎、鈴木隆二、小池智：ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）の皮下接種マウスモデルにみられる早い時期と遅い時期の致死性 第 56 回日本ウイルス学会学術集会（岡山）2008 年 10 月 26-28 日

藤井克樹、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎：フラビウイルス脳炎における脳内浸潤 T 細胞の TCR レパトア解析 第 15 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（岡山）2007 年 10 月 25 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

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)

分担研究報告書

ウイルス様粒子を用いた蚊媒介性フラビウイルス感染症の

診断・検査法の開発に関する研究

分担研究者：	前田 秋彦	北海道大学	大学院獣医学研究科	准教授
協力研究員：	前田 潤子	北海道大学	大学院獣医学研究科	客員研究員
	村田 亮	北海道大学	大学院獣医学研究科	大学院生
	秋山 稔	北海道大学	獣医学部	学生
	苅和 宏明	北海道大学	大学院獣医学研究科	准教授
	高島 郁夫	北海道大学	大学院獣医学研究科	教授
	倉根 一郎	国立感染症研究所	ウイルス第一部	部長

研究要旨： 近年、我が国においても地球温暖化に伴う蚊媒介性フラビウイルス感染症の拡大が危惧されている。一般に各種フラビウイルス感染症の血清学的な鑑別は困難であるとされている。本研究では、各種フラビウイルス感染症の鑑別法の確立を目指し、ウイルス様粒子 (VLP) を用いた中和試験法による感染鑑別について検討した。フラビウイルスに属する日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスの VLP (各々、JEV-VLP と WNV-VLP) を作製した。各 VLP を用いた中和試験法と生ウイルスを用いた常法により得た結果について比較検討したところ、強い正の相関が認められた。また、JEV-VLP を用いた試験では JEV の感染血清中に存在する JEV に対する中和抗体が、WNV-VLP を用いた試験では WNV 感染血清中に存在する WNV に対する中和抗体が特異的に検出された。これらの結果は、本試験法が各種フラビウイルス感染症の鑑別に有効であることを示している。

A. 研究目的

近年の地球温暖化に伴い、蚊等による節足動物媒介性感染症の拡大が危惧されている。特に現在もアジア各国で流行を繰り返しているデング熱や日本脳炎については、それらの感受性蚊の日本国内への侵入や、これまで越冬できなかった地域へ蚊の分布の拡大が報告されており、特に注意を要する感染症であると考えられている。また、日本には存在しないがアフリカや西アジア、ヨーロッパ、ロシア、最近では北米や中南米にまで感染が拡大している蚊媒介性のウエストナイル熱の日本国内への侵入についても警戒し

なければならない。

そこで本研究では、フラビウイルス感染症の鑑別診断・検査法の開発を主たる目的とした。蚊媒介性フラビウイルス感染症の鑑別診断や検査においては以下に示す問題が報告されている。(1) フラビウイルスの同一血清型群に属する近縁のウイルス間では抗原性が非常に似ているため、ウイルスに感染したヒトや動物の血清中に存在する感染ウイルスに特異的な抗体を検出することが難しい。現在、フラビウイルス感染の鑑別には、比較的特異性の高い IgM 捕捉 ELISA 法や生ウイルスを用いた中和試験法が行われてい

る。(2) 従来の中和試験では生ウイルスを使用するため、感染事故を起こす危険性が常に伴う。さらに、ウエストナイルウイルス (WNV) は病原性レベル3の病原体であり、高度に制御されたバイオセーフティーレベル3 (BSL3) の実験室で取扱わなければならない。以上の点を考慮して、私たちは検査に使用する生ウイルスの代替として病原性の無いウイルス様粒子 (VLP) を用いることにより、安全で簡便な各種フラビウイルス感染の鑑別中和試験法の開発を目指した。

B. 研究方法

フラビウイルス VLP の作製

WNV のゲノム RNA にコードされているウイルス構造蛋白質の遺伝子領域を赤色蛍光蛋白質 (DsRed) 遺伝子に置換した自己複製型 RNA (WNV レプリコン、repWNV) を作製した。repWNV を各種フラビウイルスの構造蛋白質と共に細胞に共発現することにより、WNV と日本脳炎ウイルス (JEV) の殻を持ち repWNV を内包する VLP を得た。WNV と JEV の構造蛋白質 C および prM-E を発現するベクター、pCAGGS WNV/C、pCAGGS WNV/prM-E、pCAGGS JEV/C および pCAGGS JEV/prM-E を作製した (図 1)。WNV の殻を持つ VLP (WNV-VLP) は pCAGGS WNV/C、pCAGGS WNV/prM-E を repWNV と、JEV の殻を持つ VLP (JEV-VLP) は pCAGGS JEV/C および pCAGGS JEV/prM-E を repWNV と共に BHK-21 細胞に発現することで作製した。

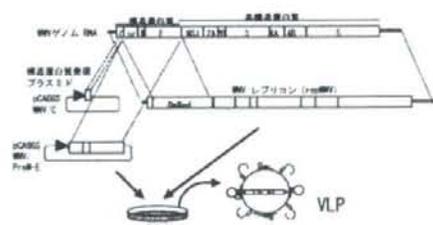


図 1. WNV-VLP の作製
repWNV は WNV の構造蛋白質遺伝子領域をレポーター遺伝子である DsRed の遺伝子で置換したものである。VLP は repWNV をウイルスの構造蛋白質と共に BHK-21 細胞に発現することにより作製した。

免疫染色 (IFA)

WNV あるいは JEV の E 蛋白質に特異

的に反応する抗体を用いて、各ウイルスの構造蛋白質発現細胞における各々の E 蛋白質の発現を検出した。細胞をメタノールで固定し、一次抗体として各々のウイルスの E 蛋白質に特異的な抗体を反応させた。次に二次抗体として、FITC または Alexa488 標識した免疫動物 IgG 抗体を細胞に反応させた。反応終了後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察した。

VLP 価の測定

作製した VLP 価は、ウイルス価を測定するプラークアッセイ法に準じて測定した。VLP の原液を 10 倍段階希釈し、それらの一定量を Vero 細胞に接種した。VLP を細胞に 1 時間吸着後、感染細胞を 37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で 48-72 時間培養し、蛍光顕微鏡下で蛍光を発する細胞数を測定し、VLP 価/ml を求めた。

ウエスタンブロット法

ウエスタンブロット法により、各種 VLP およびウイルス粒子を構成する膜蛋白質の解析を行った。精製した各種 VLP およびウイルス粒子を 4-12% 勾配 SDS ポリアクリルアミドゲル上に展開した。展開したタンパク質を PVDF 膜にブロットし、各ウイルスの E 蛋白質に特異的に反応する抗体を用いてウイルスの E 蛋白質を検出した。

中和試験

100 focus forming unitsの各々の VLP あるいはウイルスを、各々のウイルス感染動物血清と 37°C で 1 時間反応後、Vero 細胞に接種した。感染 1 時間後に PBS で 3 回洗浄し、感染細胞を 37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。感染後 48-72 時間にウイルス感染により形成された focus 数あるいは蛍光を発する細胞数を測定し、陰性コントロールと比較して 80% の感染価の減少を指標とし中和抗体価を算出した。

C. 研究結果

VLP の作製

WNV と JEV の VLP 産生細胞における VLP 膜蛋白質のウイルス種特異性を IFA により検討したところ、各々の産生細胞では各々のウイルス種に特異的な E 糖蛋白質の発現が認められた (図 2)。VLP の

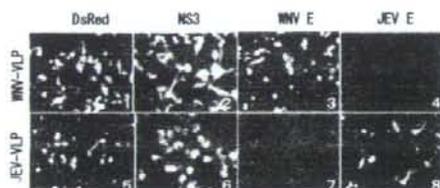


図 2. VLP 産生細胞におけるウイルス種特異的な E 糖蛋白質の発現
WNV-VLP (パネル 1-5) および JEV-VLP (パネル 6-9) 産生細胞をメタノールで固定し、WNV の膜糖蛋白質 NS3 (パネル 2 および 8) および各ウイルスに特異的な E 糖蛋白質 (パネル 3, 4, 7 および 9) を検出した。レプリコンの発現は DsRed (パネル 1 と 6) の発現と NS3 (パネル 2 および 8) の発現により確認した。

産生量をブラックアッセイ法により測定したところ、WNV-VLP は約 1.6×10^6 、JEV-VLP は約 6.4×10^5 であった。これらの VLP を構成する粒子の殻が各々のウイルスに由来する膜タンパク質より構成されていることを、各々のウイルス膜蛋白質に特異的に反応する抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した (図 3)。直径 3.5-cm の細胞培養皿を用いて作製した各 VLP について比較したところ、WNV-VLP の産生は JEV-VLP の産生に比べ有意に多かった (図 3)。また、各々の VLP の殻を構成する膜蛋白質は、各々のウイルス膜蛋白質より構成されていることが確認された (図 3)。

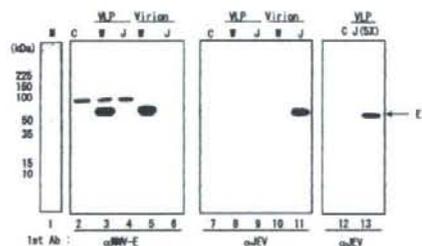


図 3. VLP を構成する E 糖蛋白質の検出
直径 3.5cm の培養プレートで作製した WNV-VLP (レーン 3 と 8) と JEV-VLP (レーン 4, 9 と 12) の構成蛋白質を 4-12% SDS ポリアクリルアミドゲル上に展開し、PVDF 膜にブロットニングした。PVDF 膜に α WNV-E 抗体 (レーン 7) あるいは α JEV-E 抗体 (レーン 7, 11 および 12, 13) を反応させた。陽性コントロールとして WNV (レーン 5 と 10) および JEV の粒子 (レーン 6 と 11) を展開した。レーン 12 および 13 は、各々ネガティブコントロール (C) およびレーン 4 および 9 の 5 倍量の JEV-VLP を展開したものである。W, V, J: JEV, C: Control. W: 蛋白質 Marker を示す。

VLP の一代限りの感染性

今回作製した VLP が一度だけの感染性しか持たないことを確認するために、

作製した VLP を Vero 細胞で 2 回連続継代した。各世代の培養上清を Vero 細胞に接種することにより、培養上清中に感染性の VLP が存在するか否かについて検討した (図 4)。その結果、VLP は Vero 細胞に感染するが、VLP が感染した Vero 細胞からは VLP は放出されないことが明らかになった。

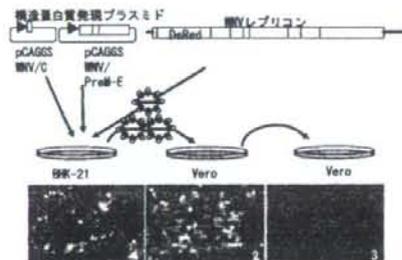


図 4. VLP の一代限りの感染性
WNV レプリコンと C および pPst-E 発現ベクター (pCAGGS WNV/C および pCAGGS WNV/C を BHK-21 細胞に共感染させ (パネル 1)、WNV-VLP を作製した。WNV-VLP は培養上清中に放出されるため、その培養上清を Vero 細胞に感染すると VLP の感染の指標となる DsRed の発現が認められた (パネル 2)。更に、その培養上清を新たに培養した Vero 細胞に感染しても VLP の発現は認められなかった (パネル 3)。

ウイルスを用いた中和試験法と VLP を用いた中和試験法の相関性

WNV あるいは JEV の感染により中和抗体の存在が明らかである動物血清を用いて、生ウイルスを用いた中和試験と VLP を用いた中和試験の相関性を検討した (図 5)。その結果、両中和試験法には強い正の相関が認められた。

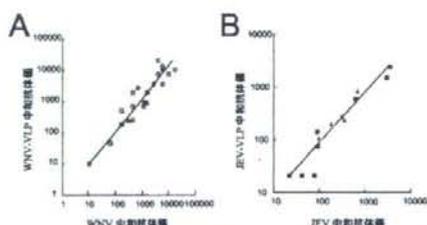


図 5. フラビウイルス中和試験における生ウイルス中和抗体価と VLP 中和抗体価の相関
WNV および JEV-VLP の中和抗体価の相関 (A) と JEV および JEV-VLP の中和抗体価の相関 (B) を示す。

VLP を用いた中和試験法の特異性

WNV あるいは JEV の感染ニワトリ雑血清を用いて、各々のウイルスについての感染鑑別の可能性について検討した (図 6)。WNV を感染させたヒヨコ血清を用いた場合、WNV-VLP の中和試験で WNV

に特異的な中和抗体が検出された。一方、JEV に感染させたヒヨコ血清を用いた場合、JEV-VLP の中和試験で JEV に特異的な中和抗体が検出された。

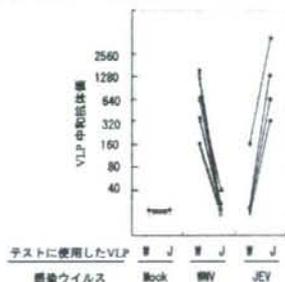


図 6. VLP 中和試験のウイルス種特異性
比較的制御された環境下で管内飼育されたニワトリ雛に WNV あるいは JEV を感染し、得られた感染ニワトリ雛血清について各々の VLP 中和試験を行った。WNV, J, JEV を示す。

D. 考察

本研究で開発したフラビウイルス（今回は WNV と JEV）の VLP 鑑別中和試験法は、研究目的で挙げたフラビウイルスの鑑別診断・検査についての二つの問題点を克服できるものと考えられた。すなわち、(1) 各々のフラビウイルスの診断・検査の特異性については、現在のところ最も信頼性が高いとされている中和試験法を採用することで両ウイルスの感染鑑別が可能であることが示された。また、

(2) VLP は一代限りの感染性しか示さない（図 4）。そこで、中和試験法に使用する生ウイルスの代替として VLP を使用することで、より安全に試験を行うことができるものと考えられた。さらに、VLP を用いた試験は BSL2 実験室で行うことが可能であるため、より簡便に試験できる。以上のことから、今回確立したフラビウイルス VLP 中和試験法は、フラビウイルス感染症の鑑別診断・検査法として有効であると考えられた。

E. 結論

フラビウイルス VLP を用いた中和試験は、ウイルス種特異的であり、安全かつ簡便に鑑別診断・検査することを可能とする試験法である。したがって、現行の生ウイルスを用いた中和試験の代替と

して有用である。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., and Maeda, A. A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons. *J. Virol. Methods* 148: 244-252, 2008

Maeda, A., Maeda, J., Murata, R., Akiyama, M., Kariwa, H., Takashima, I., and Kurane, I. Differential sero-diagnosis of flaviviruses using sub-viral particles and virus-like particles *Animal Viruses*. Eds. Maeda, et al., *In press*, 2009

Ma, H., Ke, C.-W., Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., and Maeda, A. Epidemiological study on Flaviviruses in Guangdong province, China, 2005-2007. *Animal Viruses*. Eds. Maeda, et al., *In press*, 2009

2. 学会発表

Maeda, A., Maeda, J., Ma, H., Ke, C.-W., Takagi, H., Takashima, I., Kurane, I., Epidemiological study on Flaviviruses in Guangdong province, China, 42nd Joint Viral Diseases Panels Meeting, US-Japan Cooperative Medical Science Program, Nagasaki (2008, 5)

前田秋彦、前田潤子、橋本新吾、荻和宏明、高島郁夫、倉根一郎、ウエストナイルウイルスのウイルス様粒子の作製、第 43 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、香川 (2008、5)

前田潤子、村田亮、荻和宏明、倉根一郎、高島郁夫、前田秋彦、ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの鑑別中和試

験法の開発、第 146 回日本獣医学会、宮崎 (2008、9)

前田秋彦、前田潤子、村田亮、苺和宏明、高島郁夫、倉根一郎、ウイルス様粒子を用いたウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルス感染症との鑑別中和試験法の開発、トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、岡山 (2008、10)

前田秋彦、前田潤子、倉根一郎、ウエストナイルウイルス RNA 複製の解析-マイナス鎖 small RNA を中心に、第 56 回日本ウイルス学会、岡山 (2008、10)

H. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む)
特になし

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

渡り鳥飛来地に生息するイナトミシオカの生態的研究

1. 幼虫の発育に対する温度の影響

研究分担者	小林睦生	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
	片野理恵	麻布大学
	斉藤康秀	麻布大学

イナトミシオカ幼虫を6つの異なる温度で飼育し、有効積算温量則に基づく分析を行った。その結果イナトミシオカの幼虫・蛹期の発育零点は、雌で8.75℃、雄で9.51℃、発育を完了するのに要する温量は、雌が270日度、雄が208日度と推定された。幼虫期の生存率と温度の関係および気温と成虫の吸血活動の関係から、日最高気温が18℃以上の日を活動可能日とし、近年東日本で生息が確認された地域について、活動可能期間および年間世代数を推定した。検討した地域の中で最北に位置する釧路では、年間の活動期間は76日、世代数の推定値は1.75世代であった。生息地の緯度が低くなるにしたがって、活動可能期間は長く推定年間世代数は多くなり、青森142日、3.88世代、新潟183日、6.33世代、東京では208日、7.64世代と推定された。野外で実現されるイナトミシオカの年間世代数は、気温だけでなく幼虫発生源の安定性などにも大きく依存すると考えられるので、気象条件以外の環境条件について今後さらに詳しく検討する必要がある。

A. 研究目的

イナトミシオカ、*Culex inatomii*、は1968年に岡山県倉敷市の干拓地で初めて採集され記載されたイエカ属の蚊である。当初はユーラシア大陸に分布する *Cx. modestus* の亜種として記載されたが現在は種として扱われている。近縁種の *Cx. modestus* は地中海沿岸からロシア、中国まで広範囲に分布し、野外で採集されたサンプルから日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルスが検出されており、重要な疾病媒介蚊であるとされている。イナトミシオカも実験的にはこれらウイルスに感受性であることが示唆されている。

イナトミシオカの採集記録は1968年以降30年間報告されず、1999年に関西国際空港で再発見された。その後の関西地方での調査によって大阪南港野鳥園、神戸ポートアイランドなどで生息が確認されている。さらに新興・再興感染症研究事業の一環として実施した東京湾沿岸の渡り鳥飛来地の疾病媒介蚊調査(2006年)および新潟県佐潟、青森県十三湖の疾病媒介蚊調査(2007年)によって東日本で初めて本種の生息が確認された。海外では韓国で1975年にソウル周辺で本種が採集され、1997年には東部海岸の湿地帯で大量発生して問題になったことがある。

今年度実施した釧路湿原での疾病媒介蚊調査でも本種成虫 2 個体が捕獲されており、予想外に広い地理的分布を有することが分かってきた(図 1)。

これまで明らかになったイナトミシオカの生息地は、渡り鳥が多数飛来する地域と重なっており、野鳥が保持する病原体を吸血によって取り込む可能性がある。実際、東京港野鳥公園で 2006 年に採集されたイナトミシオカの吸血蚊 3 個体の未消化血液からは、人(2)とツバメ(1)の DNA が検出されている。イナトミシオカと野鳥や人との接触がどの程度起きているかを明らかにすることは、本種の媒介蚊としての重要性を評価する上で非常に重要な課題である。

渡り鳥の飛来時期は種類によって様々であるが、大きく分けて繁殖のために飛来する夏鳥と越冬のために飛来する冬鳥、そして季節移動の中継地として飛来する鳥の 3 つを区別できる。イナトミシオカとこれら渡り鳥の接触機会は本種が吸血活動を行う季節に限られることは明らかであり、したがって本種の繁殖が一年のいつ開始し、いつ終了するかを正確に把握することが重要な研究課題のひとつとなっている。

本研究は種々の飼育温度でイナトミシオカの幼虫の発育を調べ、有効積算温度則を適用して発育速度と飼育温度の関係を分析し、得られた結果に基づきイナトミシオカの分布北限や活動期間の予測を行った。

B. 研究方法

6 つの異なる飼育温度(18、20、23、25、27、29℃)を設定し、幼虫の発育期間を調査した。それぞれの設定飼育温度条件下で孵化後 24 時間以内の幼虫 50 個体を初期個体群として 200ml の飼育水で飼育した。飼育水の塩分濃度は 0.5%、日長条

件は明:暗=12:12 として実験を行った。各設定温度区で 2 回の繰り返しを行い、それぞれについて幼虫・蛹期の生存率、羽化率、成長速度(発育日数の逆数)を求めた。有効積算温度則に基づいて発育速度(平均発育日数 d の逆数)と飼育温度(T)について次式を仮定した回帰分析を行い、幼虫発育の限界温度(発育零点、 Z)を推定した。

$$1/d = 1/k (T - Z)$$

これまでの調査で本種が採集されている北海道(釧路)、青森(十三湖)、新潟県(佐潟)、東京(東京港野鳥公園)の調査地に最も近い気象観測地点の気象データを入手し、1 シーズンの活動期間と年間世代数を推定した。野外での観察や他の実験結果から、18℃を下回るとイナトミシオカ幼虫の死亡率が高まり、成虫の吸血活動も行われないと予想されることから、日最高気温が 18℃以上の日を活動可能日として選び出した。活動可能日ごとに日平均気温を求めその値から発育零点を差し引いた有効積算量を計算し、これを積算して活動可能期間全体の有効積算量を求めた。こうして得られた有効積算量を 1 世代を完了するのに要する積算量で割ることによって、年間の世代数を求めた。

C. 研究結果

幼虫・蛹期の生存率と飼育温度の関係を図 2 に示した。平均生存率は飼育温度が 18℃の実験区では 8%とかなり低い値であったが、飼育温度が高くなるにしたがって成虫まで育つ個体は多くなり、25℃区で 73%と最も高い生存率が示された。25℃よりも高い 27、29℃区では生存率は低くなり、幼虫発育が高温によって阻害されることが示唆された。飼育温度と発育速度の関係を雌雄別に図 3 に示した。回帰分析の結果、雌雄ともに有意な回帰直線が得られ、直線の傾きと y 切片

値から発育零点は雌 8.75°C、雄 9.51°Cと推定された。幼虫期および蛹期を完了するのに要する温量は、雌 270 日度、雄 208 日度と推定された。1 世代を完了するのに要する温量は幼虫・蛹期と成虫期を完了するために要する温量の合計である。成虫の繁殖活動に対する温度の影響は調べられていないので、以下では成虫が最初に産卵するまでの期間が 25°C で 5 日と仮定し、幼虫の発育零点との差を有効温量と考へて成虫期 5 日間の積算温量 81.25 日度を成虫期を完了するのに要する温量とした。その結果 1 世代を完了するのに要する温量の推定値（雌）として 351.53 日度が得られた。東日本で近年イナトミシオカが採集され生息地と考へられる 4 か所について、活動可能期間と年間世代数を推定して表 1 に示した。イナトミシオカの活動可能期間は釧路で最も短く 7 月から 9 月の 76 日、東京では 2.7 倍の約 208 日であった。年間世代数は釧路で 1.75 世代、東京では 7.64 世代と推定され、その差は 4.4 倍であった。

D. 考察

イナトミシオカの活動可能期間は、釧路地方の場合 7 月 11 日から 9 月 25 日（76 日間）とかなり短期間に限られることがわかった。年間世代数の推定値も 1.75 世代なので、恐らくこの地域が生息域の北限に近く発生密度はかなり低いと思われる。短期間の活動と低い生息密度の結果として、野鳥から吸血する個体は少ないと予想される。これに対して新潟や東京の場合、活動可能期間はそれぞれ 183 日、208 日と長く、春から晩秋まで活動できると思われる。年間世代数も 6 世代以上であるので繁殖期の後半にはかなりの高密度に達すると予想される。イナトミシオカの活動可能期間に観察される野鳥を挙げると、東京港野鳥公園の場合、チュウ

シヤクシギ、コチドリ、メダイチドリ、キアシシギなどの渡り鳥が 4~9 月に飛来する。加えてカイツブリ、カワウ、アオサギ、キジバトなどの留鳥も一年を通じて観察されている。新潟県佐潟湿地では、ツバメ、コアジサシ、タカブシギ、オオヨシキリなどの渡り鳥が夏季に確認され、ヒヨドリ、オナガ、ムクドリ、ホオジロなどの留鳥も多数観察されている。冬鳥の飛来は例年 9 月末から始まることから、気象条件によっては佐潟湿地に飛来した冬鳥からイナトミシオカが吸血する可能性も否定できない。

東京港野鳥公園で 2006 年、2007 年に実施した定期調査では、イナトミシオカは 6 月に発生のピークを示した後、激減して 9 月以降はほとんど採集されなかった。本研究で推定したよりもイナトミシオカの活動期間が短期間であったのは、公園内のイナトミシオカ幼虫発生源である泥炭湿地の規模が小さく、夏季の高温によって 1~2 ヶ月でほとんど干上がってしまったことによると思われる。2007 年に新潟県佐潟湿地で毎月実施した定期調査では、イナトミシオカは 5 から 10 月まで継続して採集されており、本研究で推定された活動可能期間とほぼ一致していた。このようにイナトミシオカの主要発生源は自然の湿地であるため、発生源の規模や安定性が成虫の発生量や季節消長に大きな影響を与えている。気象条件以外の環境条件について、今後さらに詳しい検討が必要である。

E. 結論

イナトミシオカの幼虫・蛹期の発育零点は雌で 8.75°C、雄で 9.51°C と推定された。近年東日本で生息が確認された地域について、有効積算温量に基づき年間世代数を推定した。検討した地域の中で最北に位置する釧路では、年間世代数の推

定値は1.75世代であった。生息地の緯度が低くなるにしたがって推定年間世代数は多くなり、青森3.88、新潟6.33、東京では7.64世代と推定された。イナトミシオカの年間世代数は気温だけでなく、幼虫発生源の安定性などにも大きく依存している。気象条件以外の環境条件について今後さらに検討する必要があるだろう。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
片野理恵、斉藤康秀、津田良夫. 2008. 渡り鳥飛来地に生息す

る日本産ウエストナイルウイルス(WNV)媒介蚊の生態的特徴：イナトミシオカ (*Culex inatomii*) の場合. 第14回日本野生動物医学学会大会、神戸大学、2008年9月3日～7日。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし



図 1. 我が国でこれまでにイナトミシオカの生息が確認された地域

表 1. イナトミシオカの生息地における活動可能期間と年間世代数の推定結果

生息地	活動可能期間	年間世代数
釧路	7月11日から9月25日 (76日)	1.75
青森	5月30日から10月9日 (142日)	3.88
新潟	4月26日から10月26日 (183日)	6.33
東京	4月14日から11月8日 (208日)	7.64

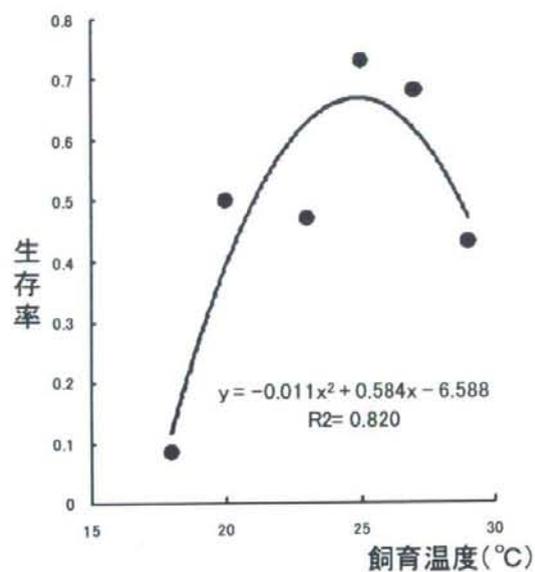


図 2. 幼虫の飼育温度と幼虫期の生存率の関係

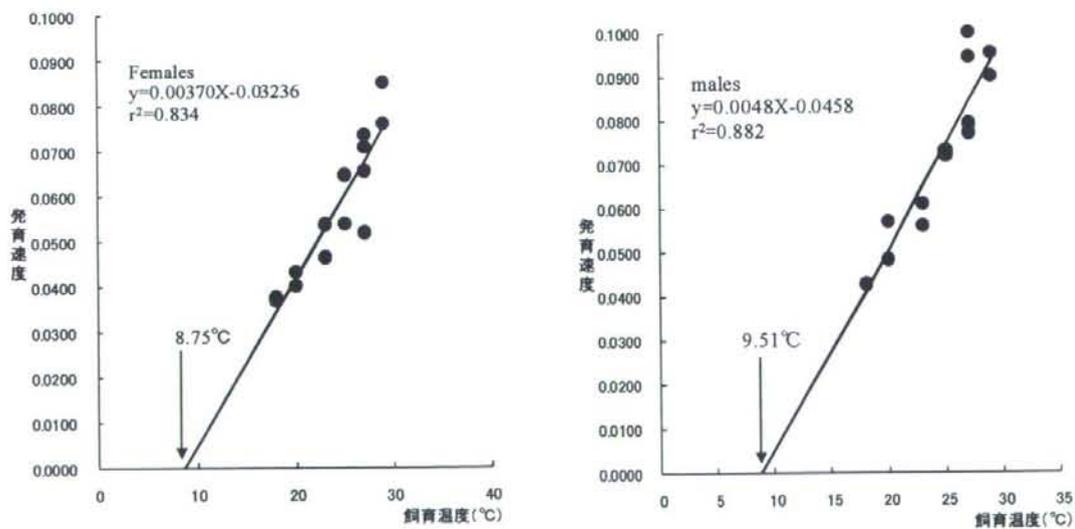


図 3. イナトミシオカ幼虫の发育速度と飼育温度の関係