

表1. 我が国におけるウエストナイルウイルス感染  
発生時の献血者への対応

感染媒体	人		
	流行地から帰国後 4週間以内の渡航者	港湾又は空港近隣の 労働者又は居住者	左記以外の人
感染源	海外	外来蚊又は輸入動物	国内
献血制限範囲	渡航者本人	感染が疑われた場所から半径数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認された人の行動範囲十半径10km以内及び接する市区町村の居住者
制限期間	感染確認後120日まで	蚊のいなくなる時期から4週間(11月頃を目安)まで	4週間(11月頃を目安)まで
NATの実施		必要なし	感染が確認された人が所在する地方ブロック単位

感染媒体	蚊	
	港湾又は空港で採取された蚊	左記以外(日本に生息している蚊)
感染源	海外	国内
献血制限範囲	感染が確認された蚊の採取地の半径数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認された蚊の採取地の半径10数km以内及び接する市区町村の居住者
制限期間	蚊のいなくなる時期から4週間(11月頃を目安)まで	4週間(11月頃を目安)まで
NATの実施	必要なし	感染が確認された蚊の採取地の都道府県単位

感染媒体	鳥又は動物		
	輸入鳥又は輸入動物	左記以外でペットとして飼育している鳥又は動物	国内に生息する野鳥又は野生動物
感染源	海外	国内	国内
献血制限範囲	感染が確認された輸入鳥等の採取地の半径数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認されたペットの採取地の半径10数km以内及び接する市区町村の居住者	感染が確認された野鳥等の採取地の半径10数km以内及び接する市区町村の居住者
制限期間		蚊のいなくなる時期から4週間(11月頃を目安)まで	4週間(11月頃を目安)まで
NATの実施	必要なし		採取地の都道府県単位

平成17年度第1回薬事・食品衛生審議会血液事業部会安全技術調査会資料

表2. 検体輸送シミュレーション(案)

(1) 中央血液研究所NAT実施分

都道府県	集荷時刻	主な輸送手段	到着時刻
北海道		→	要検討
青森	17:30	航空便	23:45
岩手	16:00	JR	23:45
宮城・山形	19:00	JR	23:45
秋田	17:00	航空便	22:30
福島	19:00	JR	23:45
茨城	17:15	陸送	21:00
栃木	16:15	陸送	21:15
群馬	16:45	陸送	21:15
埼玉・長野	19:45	陸送	21:15
千葉	18:00	陸送	21:00
東京・山梨			14:00/21:00
神奈川	18:00	陸送	21:00
新潟	15:45	JR・陸送	21:15
沖縄	18:45	航空便	23:45

(2) 血液管理センターNAT実施分

都道府県	集荷時刻	主な輸送手段	到着時刻
富山	16:00	陸送	22:30
石川	17:50	陸送	22:30
福井	16:40	陸送	22:30
静岡	15:30	陸送	23:10
愛知・岐阜	19:20	陸送	23:10
三重	16:00	陸送	23:10
京都	19:30	陸送	22:00
大阪・和歌山	19:50	陸送	23:00
兵庫・滋賀	21:00	陸送	23:00
奈良	17:30	陸送	23:00
岡山・鳥取	19:30	陸送	22:20
広島・島根	19:30	陸送	00:10
山口	16:30	陸送	00:10
香川・徳島	17:10	陸送	22:20
愛媛	18:00	陸送	23:20
高知	16:10	陸送	23:20
九州	18:00	航空便	02:00

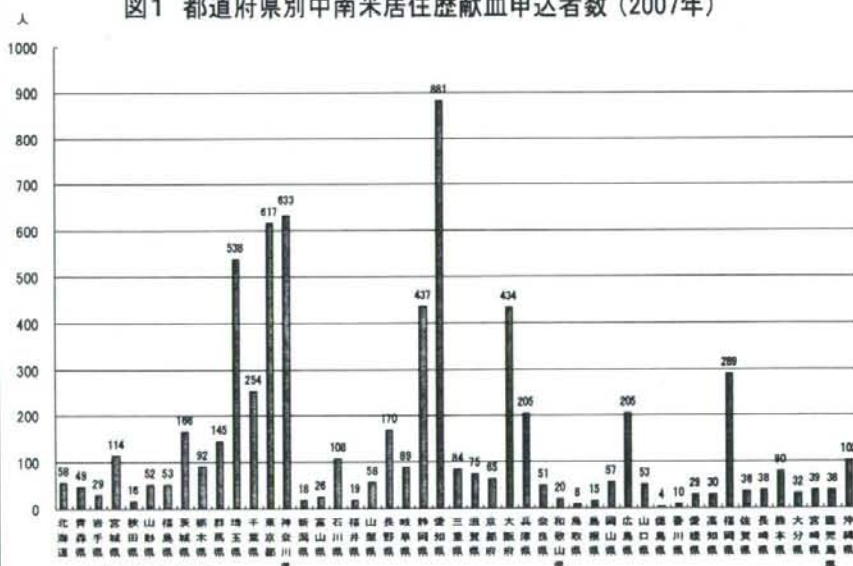
表3. 中南米居住歴を有する献血申込者数\*(2007年)



国名	献血申込者数
ブラジル	3,384
メキシコ	1,235
ペルー	445
アルゼンチン	341
パラグアイ	186
ボリビア	176
チリ	173
コロンビア	132
パナマ	111
エクアドル	94
ベネズエラ	93
グアテマラ	75
コスタリカ	70
ニカラグア	50
エルサルバドル	26
ウルグアイ	18
スリナム	7
ホンジュラス	4
ベリーズ	1
合計	6,621

\* 献血者数ではない

図1 都道府県別中南米居住歴献血申込者数\*(2007年)



\* 献血者数ではない

分担研究報告書

献血制限を実施するための媒介蚊の分布、飛翔範囲、発生活長に関する基礎的研究

研究分担者	小林 睦生	国立感染症研究所	昆虫医科学部
研究協力者	澤辺 京子	国立感染症研究所	昆虫医科学部
	津田 良夫	国立感染症研究所	昆虫医科学部
	葛西 真治	国立感染症研究所	昆虫医科学部

研究要旨

アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカの吸血源動物の解析の結果、アカイエカ種群の2種は野鳥とほ乳動物の両方からほぼ同率で吸血すること、ヒトスジシマカは哺乳動物吸血嗜好性が高いが、一部野鳥からも吸血することが示された。蚊の飛翔範囲に関しては、兵庫県西宮市の西宮浜でアカイエカ約2万匹を放逐し、その後4日間100mから1,200mの同心円状にトラップを設置して再捕獲を行った。その結果、再捕獲された雌成虫は121個体で、放逐された雌成虫10,183個体の約1.2%であった。最も離れた再捕獲地点は1,200mであった。この人工島のアカイエカ幼虫の主要な発生源7,000ヶ所に薬剤を処理して、その後、トラップで成虫の捕集を行った。その結果、薬剤処理前のトラップによる平均捕獲数と比較して、顕著な防除効果が認められなかったことから、アカイエカ種群は、相当広範囲に飛翔し、人工島周辺地区から移入して来ることが強く示唆された。この結果は、ウエストナイル熱の流行時の献血制限地域の設定にある種の科学的根拠を与えることが示唆された。チクングニヤ熱、デング熱の重要な媒介蚊であるヒトスジシマカの飛翔範囲は100~200m程度と狭いことが知られている。患者の行動範囲が関係するが、患者宅周辺の狭い範囲に二次、三次の患者が発生することから、献血制限はアカイエカが媒介するウエストナイル脳炎の場合と比べると明らかに狭い範囲の設定で充分と考えられる。

A. 研究目的

蚊が媒介するウイルス感染症の中で、我が国で現在もウイルスの活動が認められる日本脳炎、東南アジア、中南米、南太平洋島嶼国等で流行しているデング熱、1999年から米国で突然流行が始まり、現在までに1千人以上が死亡したウエストナイル熱、2005-2006年にかけてインド洋島嶼国、インド、スリランカ等で170万人を越す大きな流行が起こり、2008年も東南アジア諸国を中心に流行が続いているチクングニヤ熱などが重要な感染症と考えられる。これら4種のウイルス感染症の媒介蚊は、我が国に生息しているコガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、アカイエカなどで、夏期の媒介蚊が活動している時期に患者が発生した場合、局所的または地域全体に流行が起こる可能性がある。そこで、献血制限地区の設定に必要な、媒介蚊の生態学的、生理学的な特徴を明らかにし、感染症ごとに制限地区の設定を行うために基礎的研

究として本事業を行った。

B. 研究方法

媒介蚊の分布に関するデータは、国立感染症研究所昆虫医科学部が現在までに蓄積してきた分布情報を基に、分布域を地図上に図化した。飛翔範囲は、現在までの情報と2007年にアカイエカを用いて兵庫県で行った標識・放逐・再捕獲法による飛翔行動の調査および吸血源の解析から判断された飛翔範囲等のデータを利用した。発生活長は、2003、2004年に感染症研究所昆虫医科学部が行ってきた、首都圏18ヶ所におけるCDCトラップを用いた成虫捕集調査の結果をもとに作成した。

（倫理面への配慮）

ヒトの検体、感染症の疫学調査等は行っていない。

C. 研究結果

都市部での蚊の発生状況をトラップを用いて調査した結果、首都圏で捕集される蚊の種類は非常に限られており、98%以上がアカイエカ種群（アカイエカとチカイエカ）およびヒトスジシマカであった。一方、千葉県の成田市周辺では17種が捕集され、上記3種以外にコガタアカイエカ、キンイロヤブカ、オオクロヤブカ、シナハマダラカ等が捕集された。アカイエカ種群の発生消長は7月上旬から中旬にかけての発生ピークがあり、その後9月上旬の小さなピークの後は急速に活動するアカイエカが減少した。アカイエカとチカイエカを分子分類することが可能となり、種ごとに発生消長を解析した。その結果、アカイエカは7月から9月にかけて発生ピークがあるが、チカイエカは4月～5月と9月～11月に活動ピークが認められた。一方、家屋内に侵入してきたアカイエカ種群の125匹を分子分類し、家屋内で採集されるアカイエカ種群の種構成をしらべたところ、全体の83%はチカイエカであり、7月から8月の時期をのぞいて、4月下旬から11月下旬まで家屋内で吸血するのが観察された。アカイエカの屋外での活動がほぼ終息した10月下旬においてもチカイエカが屋内で吸血することから、ウエストナイル熱(WNF)の伝播を考えた場合に、チカイエカがより重要な媒介蚊となる可能性がある。しかし、秋に屋内に侵入してくるチカイエカが8-9月の野外で吸血経験のある個体なのかは分かっていない。アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカの吸血源動物の解析において、アカイエカ種群の2種は野鳥とほ乳動物の両方からほぼ同率で吸血することが示され、WNVウイルスを橋渡しするBridge vectorであることが明らかとなっている。また、ヒトスジシマカは哺乳動物吸血嗜好性が高いが、一部野鳥からも吸血することが示されており、限定された場所で媒介蚊と成りうるということが明らかとなった。

蚊の飛翔範囲に関しては、種々の調査方法が知られている。しかし、実際の飛翔範囲を反映している調査法として、「標識・放逐・再捕獲法」が一般的である。この方法では、微量の蛍光色素を蚊成虫に噴霧し、その後ある場所から放逐し、経時間的に種々の距離で再捕獲する方法である。再捕獲は、トラップを使用する場合と、ヒト囮法で吸血飛来してきた成虫を捕獲する方法がある。体表面に付着した微量の色素は、約1週間は検出可能である。この方法を用いて、兵庫県西宮市の人工島である西宮浜でアカイエカ約2万匹を放逐し。その後4日間100m, 200m, 400m, 800m, 1,200mの同心円状にトラップを42個設置して行った。また、同時に7ヶ所でヒト囮法による蚊の捕集を行った。

その結果、再捕獲された雌成虫は121個体で、放逐された雌成虫10,183個体の約1.2%であった。最も離れた再捕獲地点は1,200mであった。一方、この人工島のアカイエカ幼虫の主要な発生源である雨水橋約7,000ヶ所に薬剤を処理して、成虫の発生を抑えた後、トラップで成虫の捕獲を行った。その結果、薬剤処理前のトラップによる平均捕獲数と比較して、顕著な防除効果が認められなかった。2008年にも同様の実験を行ったが、薬剤処理地区の平均捕集数が未処理地区より明らかに多い結果となった。この事は、アカイエカ種群は、相当広範囲に飛翔し、人工島周辺地区から新たに移入して来ることが強く示唆された。この結果は、ウエストナイル熱の流行時の防除対象地域の設定に重要であり、献血制限地域の設定にもある種の科学的根拠を与えることが示唆された。チクングニヤ熱、デング熱の重要な媒介蚊であるヒトスジシマカは、飛翔範囲が狭いことが知られており、100~200m程度である。患者の行動範囲が関係するが、患者宅周辺の狭い範囲に二次、三次の患者が発生することから、地図上に患者宅をプロットすると集中した塊として表れる。その意味で献血制限はアカイエカが媒介するウエストナイル脳炎の場合と比べると明らかに狭い範囲の設定で充分と考えられる。

#### D. 考察

我が国は、温帯地域に存在する南北に長い地形を有しており、九州以北に関しては季節の変化が明確である。一方、南西諸島の南側に位置する沖縄本島、石垣島、西表島では、蚊の発生消長は本州と異なっており、越冬する蚊は存在せず、1月から2月に幼虫の発育期間が著しく長期化し、成虫密度が低下することが知られている。その意味で、九州以北の蚊の発生消長と大きく異なっている。アカイエカ種群、ヒトスジシマカなど都市部で夏期に普通に見られる種類は、4月中旬から11月上旬にかけて活動が認められるが、それ以外は卵や成虫の状態で越冬している。その意味で献血制限の期間の設定は春から秋にかけての8ヶ月間程度が想定される。また、蚊の種類によって飛翔範囲が相当異なることから、蚊媒介性感染症ごとに献血制限範囲の設定が必要となる。しかし、患者の行動に関する聞き取り調査を速やかに行う必要があり、これらの情報を基に総合的に判断しなければならない。都市部に分布するアカイエカ種群やヒトスジシマカの吸血嗜好性も、我々の蓄積された吸血源動物の分子同定のデータが存在することから、種々の角度から検討が可能と思われる。

## E. 結論

アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカの吸血源動物の解析において、アカイエカ種群の2種は野鳥とほ乳動物の両方からほぼ同率で吸血すること、ヒトスジシマカは哺乳動物吸血嗜好性が高いが、一部野鳥からも吸血することが示された。蚊の飛翔範囲に関しては、兵庫県西宮市の西宮浜でアカイエカ約2万匹を放逐し、その後4日間100mから1,200mの同心円状にトラップを設置して行った。その結果、再捕獲された雌成虫は121個体で、放逐された雌成虫10,183個体の約1.2%であった。最も離れた再捕獲地点は1,200mであった。この人工島のアカイエカ幼虫の主要な発生源7,000ヶ所に薬剤を処理して、その後、トラップで成虫の捕獲を行った。その結果、薬剤処理前のトラップによる平均捕獲数と比較して、顕著な防除効果が認められなかった事から、アカイエカ種群は、相当広範囲に飛翔し、人工島周辺地区から新たに移入して来ることが強く示唆された。この結果は、ウエストナイル熱の流行時の献血制限地域の設定にある種の科学的根拠を与えることが示唆された。チクングニヤ熱、デング熱の重要な媒介蚊であるヒトスジシマカの飛翔範囲は100~200m程度と狭いことが知られている。患者の行動範囲が関係するが、患者宅周辺の狭い範囲に二次、三次の患者が発生することから、献血制限はアカイエカが媒介するウエストナイル脳炎の場合と比べると明らかに狭い範囲の設定で充分と考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi M, Komagata O, Nihei N. Global warming and vector-borne infectious diseases. *Journal of Disaster Research* 3(2):105-112, 2008.
- 2) Kobayashi M, Kasai S., Sawabe K., Tsuda Y. Distribution and ecology of potential vector mosquitoes of West Nile fever in Japan. *Global Environmental Research*, 12:27-33, 2008.

## H. 知的財産件の出願・登録状況

特になし

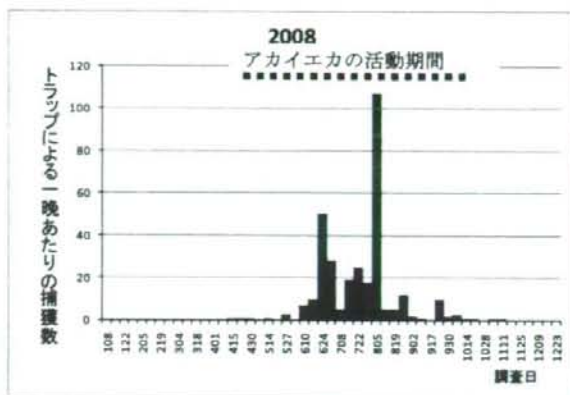


図1 アカイエカのトラップによる捕集  
4月から11月まで捕集される

図2 アカイエカの推定飛翔距離  
西宮市での標識・放逐・再捕獲による調査

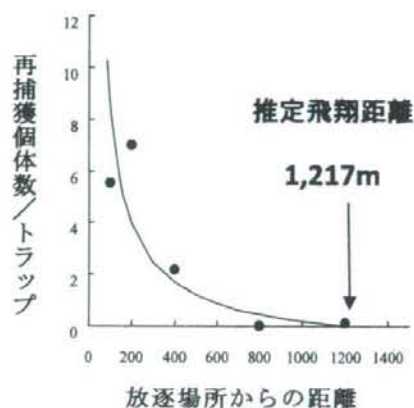


図3 我が国のヒトスジシマカの分布

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

「新規フラビウイルス検出法開発のための基盤的研究」

研究分担者 田島茂 (国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官)  
研究協力者 加藤文博 (国立感染症研究所・ウイルス第一部第二室・実習生)

研究要旨：臨床検体中の感染性フラビウイルスを簡便、迅速かつ高感度に検出する方法を確立するための Dengue 1 型ウイルスレプリコンプラスミドおよびレポーターミニゲノムプラスミドの構築を試みた。レプリコンプラスミドについては 2 種類が完成した。各レプリコンプラスミドから合成したレプリコン RNA を培養細胞に導入し、経時的にレポーター活性を測定した。導入 RNA に由来するレポーター遺伝子の発現は確認されたものの、細胞内で複製された RNA に由来するレポーター遺伝子の発現は確認出来なかった。一方、ミニゲノムプラスミドは現在構築中である。

A. 研究目的

米国において輸血や臓器移植によるウエストナイルウイルス感染例が報告されていることから、移植組織におけるフラビウイルス検査は非常に重要である。患者血清中のフラビウイルスの検出法としては、1) ウイルス感受性細胞への接種、2) ELISA 等によるウイルス抗原の検出、3) PCR 法によるウイルス遺伝子の増幅などが挙げられるが、検出感度および迅速性から PCR 法 (NAT 法) が最も一般的である。しかし、擬陽性や操作時のコンタミネーションの危険性なども指摘されている。さらには核酸検出法ではウイルスの感染性 (能) を判断することはできない。本研究では、感染力を持つフラビウイルスを簡便、迅速かつ

高感度に検出するための基盤技術の開発を目的とする。はじめに、フラビウイルスである Dengue 1 型ウイルスのゲノムをもとに、ウイルスゲノム複製に必要な最小単位と考えられるゲノム領域 (5' および 3' 非翻訳領域、C 遺伝子領域の一部)、およびウイルス遺伝子の翻訳とは逆方向に IRES2-ルシフェラーゼ遺伝子-ポリ A シグナルを連結したレポーターミニゲノムを作製する (図 1)。レポーターミニゲノムがウイルス複製に関与する非構造蛋白質存在下で複製され、ルシフェラーゼ活性が検出されれば、感染性ウイルス検出に用いることが可能である (図 2)。そこで本年度はウイルス非構造蛋白質を発現させるためのレプリコンプラスミドの構築と発現確認お

よびレポーターミニゲノムプラスミドの構築を行った。

## B. 研究方法

我々が以前構築したデング1型ウイルスの感染性分子クローンプラスミドより、ウイルスの構造遺伝子領域の大部分を、ウミシイタケルシフェラーゼ (RLuc) 遺伝子および細胞内プロテアーゼによる切断配列 (FMDV2A) に置換したもの (R3)、および RLuc 遺伝子と IRES2 配列に置き換えたもの (R4) を作製した (図3)。これらのクローンより RNA を合成後、アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞にトランスフェクトした。細胞を定期的に回収し、RLuc 活性を測定した。一方、分子クローンの5'非翻訳領域、C領域のN端側の一部、および3'非翻訳領域以外の部位を除去し、代わりに IRES2-ルシフェラーゼ遺伝子-ポリAシグナル配列をウイルスの翻訳方向とは逆向きに挿入したレポーターミニゲノムプラスミドを作製した (図1)。

## C. 研究結果

### 1) デング1型ウイルスレプリコンプラスミドの構築および複製能の解析

レポーターミニゲノムの複製能を評価するためのデング1型ウイルスレプリコンプラスミドを2種類 (R3 および R4) 作製した。レプリコン RNA が細胞内で複製されるかを調べるため、*in vitro* で合成した RNA を細胞に導入し、RLuc 活性を測定した (図4)。導入後12時間後に、導入した RNA に由

来すると考えられる RLuc 活性が検出された。活性は R3 よりも R4 の方が約2倍強かった。しかしその後活性は急激に低下し、48時間後にはほとんど検出されなくなった。その後96時間まで観察したが、活性は上昇しなかった。

### 2) デング1型ウイルスレポーターミニゲノムプラスミドの構築

感染性ウイルスのインジケーターとなるレポーターミニゲノムをコードするプラスミドの作製を試みた。現在プラスミドクローンの塩基配列を確認中である。

## D. 考察

デング1型ウイルスレプリコンを2種類構築した。デング2型ウイルス等で、ほぼ同等のレプリコン構築の報告があり、それらにほぼ従って作製した。RLuc 遺伝子のC端にストップコドンを導入せず、代わりに下流に細胞内プロテアーゼ切断配列を導入したもの (R3) と RLuc 遺伝子C端にストップコドンを導入し、さらに IRES 配列を導入したもの (R4) の2種類を作製した。活性は後者の方が高いようであったが、ともにウイルスの複製を確認することは出来なかった。今後、導入する RNA 量や導入法を検討する必要がある。また現在、レプリコンを安定に維持するための構築 (R5) も進行中である (図3)。これまでにミニゲノムのような構造の RNA が、非構造蛋白質を供給することで複製できたという報告はない。出来れば画期的である

が、まだ未知の、ウイルス複製に必要なシス配列・領域がフラビウイルスゲノム上に存在するかもしれない。そのことを明らかにするためにも、一刻も早くレポーターミニゲノムプラスミドを完成させる必要がある。

#### E. 結論

デング1型ウイルスレプリコンプラスミドを2種類構築した。しかし、現在までにレプリコンの複製能は確認できていない。一方、レポーターミニゲノムプラスミドは作製途中である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tajima, S., Takasaki, T., and Kurane, I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes*, 36: 323-329, 2008.

##### 2. 学会発表

田島茂、加藤文博、小滝徹、貫井陽子、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルスゲノム3'非翻訳領域上の欠失・挿入変異体の性状解析。第56回日本ウイルス学会学術集会（平成20年10月）

貫井陽子、田島茂、池田真紀子、小滝徹、加藤文博、根路銘令子、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎。日本脳炎ウイルス非構造蛋白NS4Aの1アミノ酸変異はIFN $\beta$ の誘導を低下させることによ

り病原性を高める。第56回日本ウイルス学会学術集会（平成20年10月）

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし



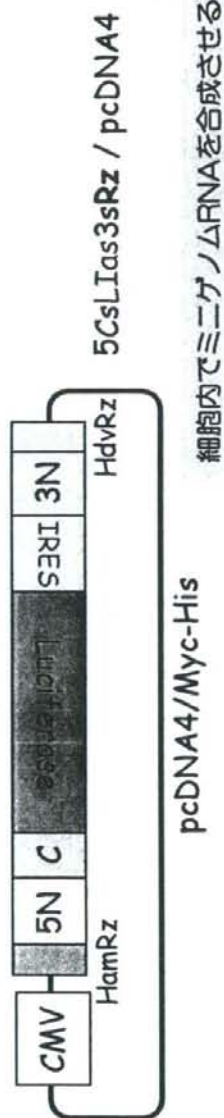
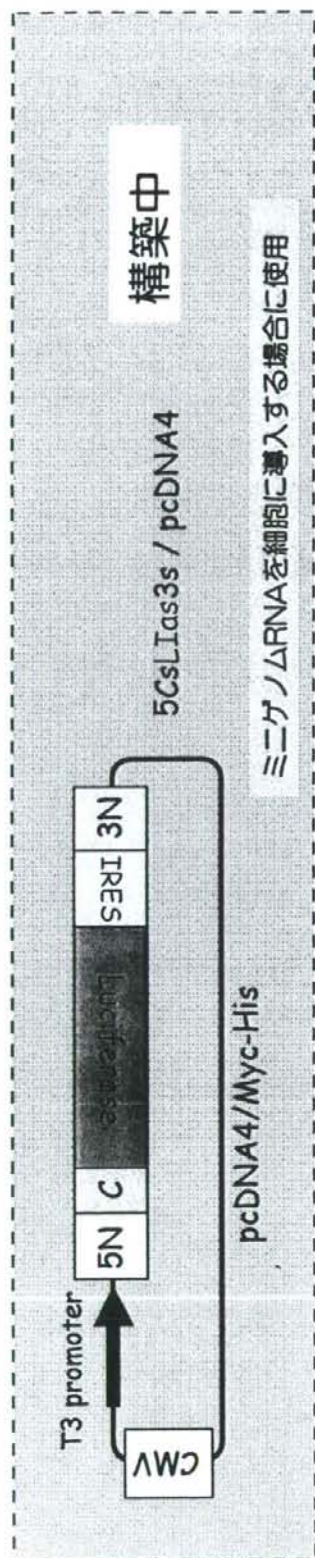
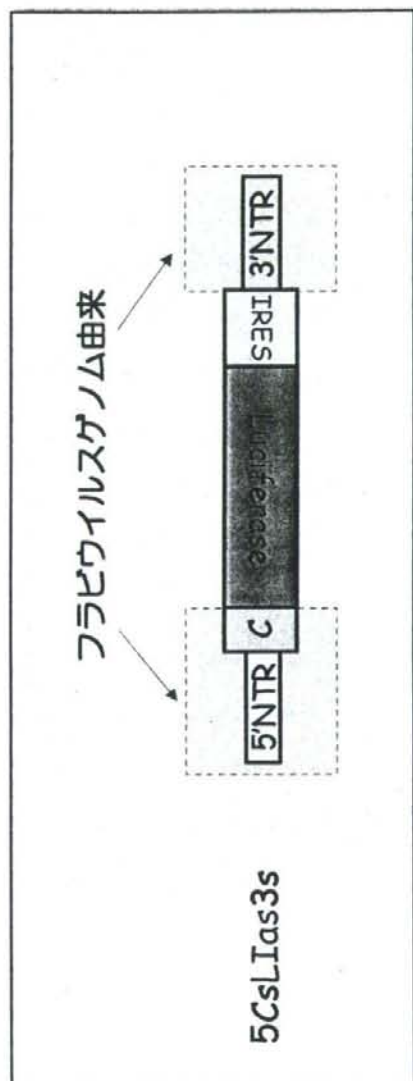
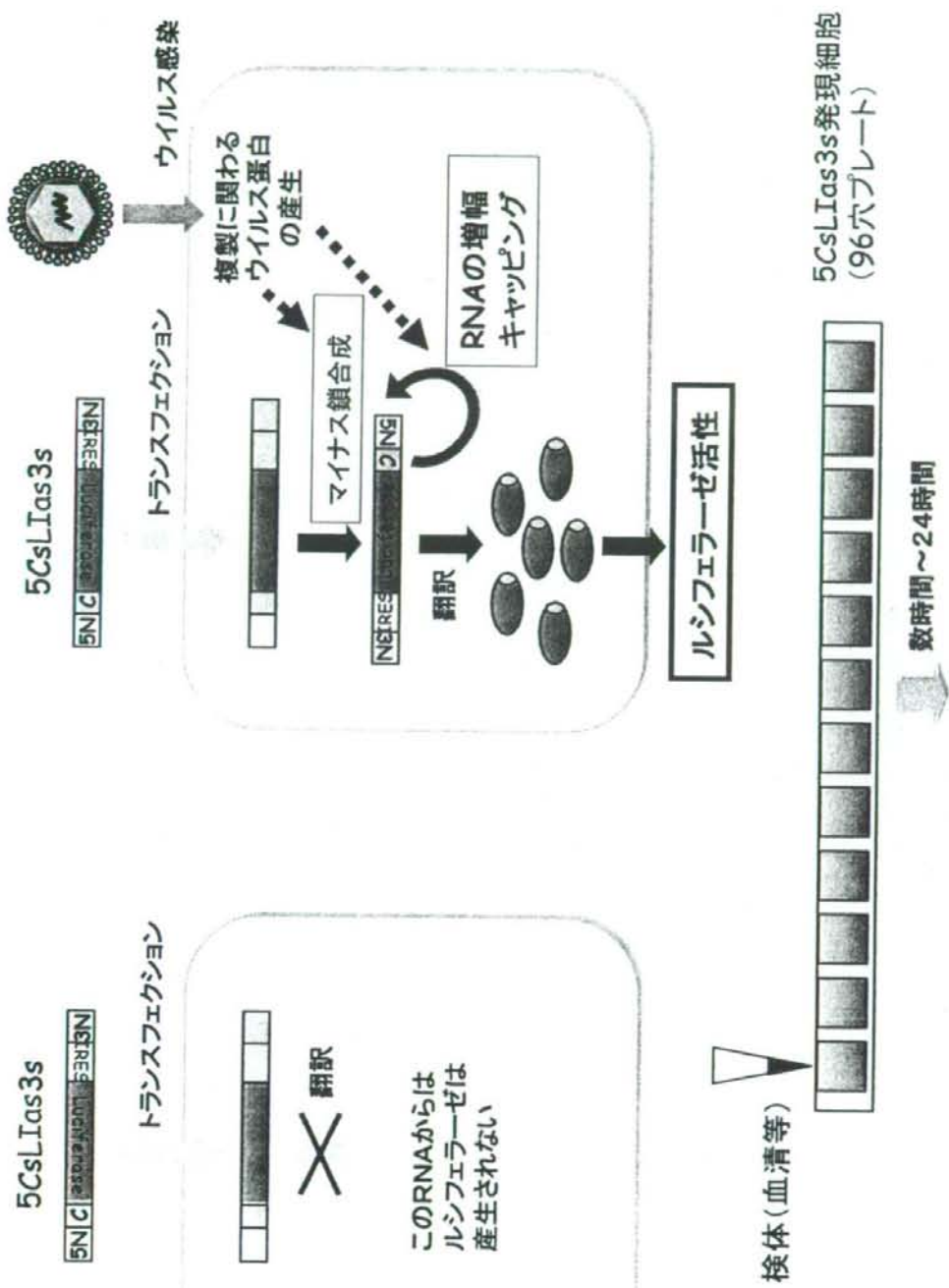


図1 感染性ウイルスを検出するためのフラビウイルスレポーターミニゲノム



ルシフェラーゼ活性検出用試薬添加後、そのままミノメーターによる測定へ。

図2 レポーターミニゲノムによる感染性ウイルス検出法

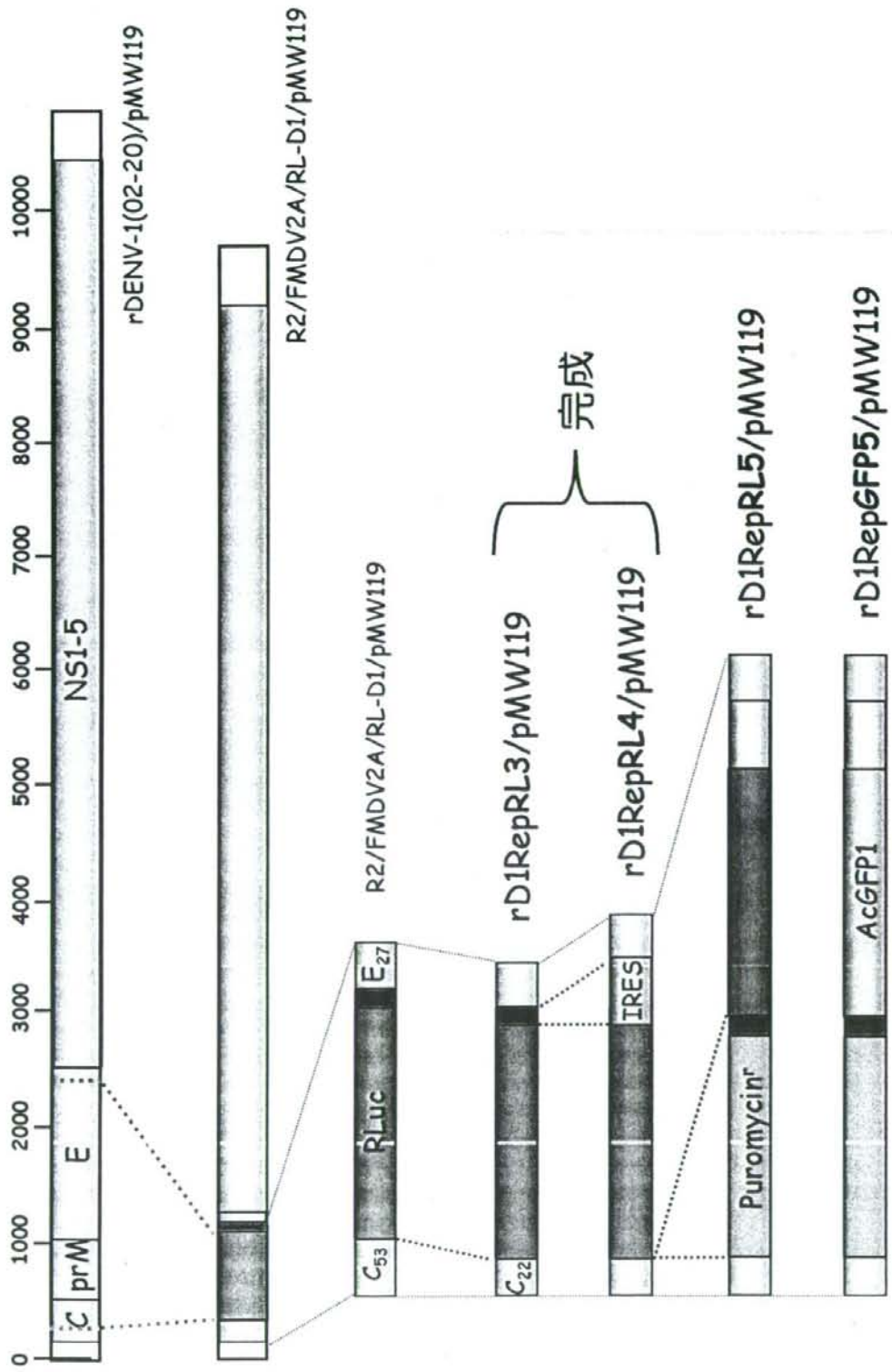
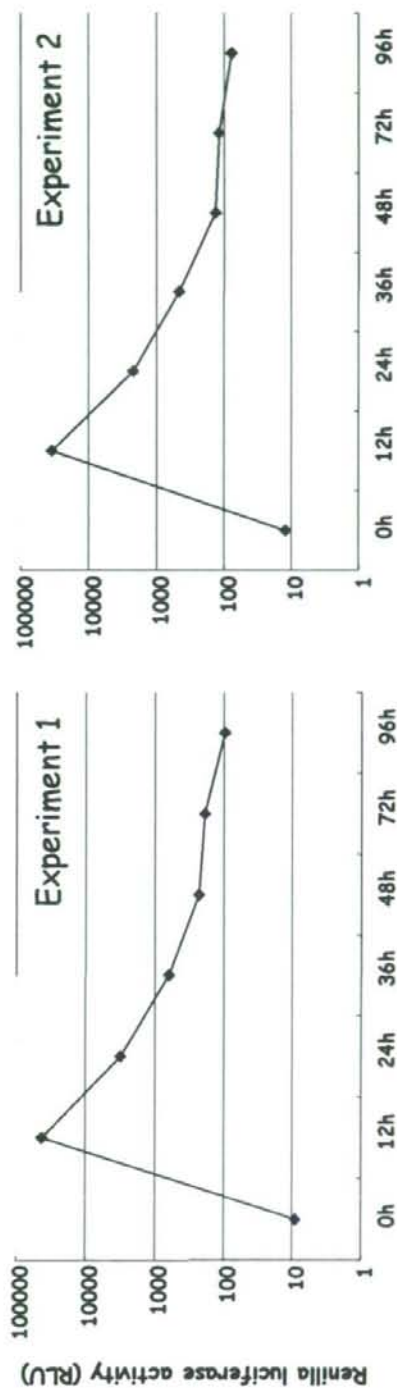


図3 テングウイルスレポーターレプリコンの構築

RL3 replicon



RL4 replicon

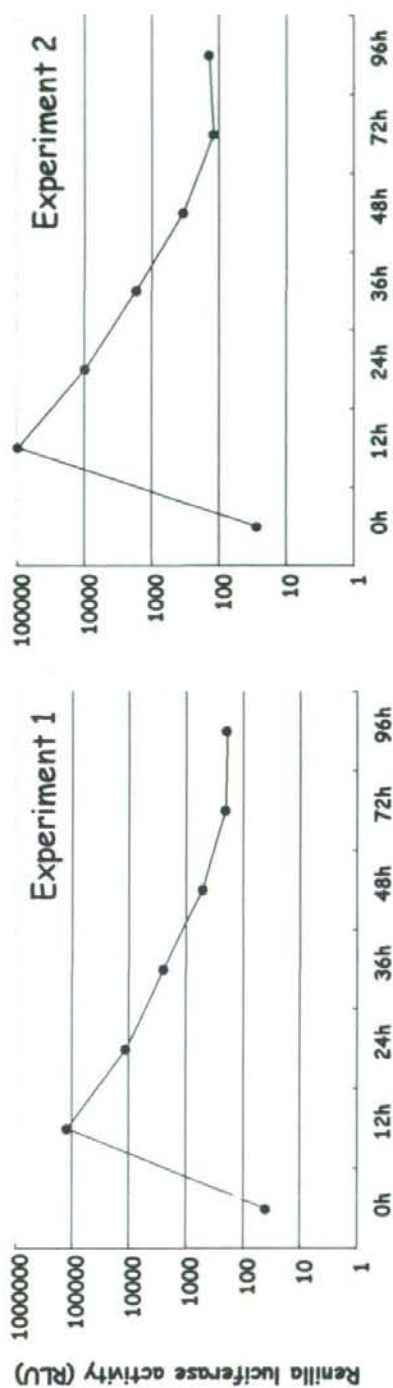


図4 テングウイルスレポータープリコン複製能の解析