

構造蛋白である NS1 蛋白の検出キットを評価した。NS1 蛋白は、46kD の糖蛋白であり、デングウイルス感染細胞内、細胞膜表面に発現するとともに感染細胞から分泌されるウイルス抗原である。初年度は NS1 抗原 ELISA を評価したが、今年度はイムノクロマト法を用いた NS1 抗原検出迅速キットの感度・特異性および有用性を評価した。

B. 方法

1. デングウイルス NS1 抗原検出キットの評価

1) ウイルス遺伝子の検出

陽性コントロールはプロトタイプデングウイルス(1型:Hawaii, 2型:New Guinea C, 3型:H87, 4型:H241)と患者検体からの分離株を蚊由来細胞 C6/36 株で増殖させた培養上清を用いた。デングウイルス型別リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法)は Ito ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004)の方法により実施した。

2) NS1 抗原検出

① NS1 抗原検出迅速キットは BioRad 社のキット (Dengue NS1 Ag strip®) を使用した。検査方法は下記の如くである。

1) プラスチック試験管に血清 50 μ L を入れ、緩衝液を 1 滴加える。よく混和した後、Strip の先を検体液中に浸漬する。

2) 15-20 分室温にて反応させる。

3) コントロールのバンドを確認し、NS1 抗原のバンドの有無を判定する。

② NS1 抗原検出 ELISA キット

昨年度 panbio 社のキット (Dengue early ELISA®) がデングウイルス 4 型に対して感度が低いことが確認された。今回は、BioRad 社のキット (PLATELIA Dengue

NS1 Ag ELISA®) を使用した。

2. チクングニヤ熱・デング熱サーベイランス

成田空港検疫所および関西空港検疫所の健康相談室を訪れた発熱患者でチクングニヤ熱が疑われる症例で、検査の同意が得られた相談者に対してウイルス遺伝子検査を実施した。

C. 結果

1. デングウイルス NS1 抗原検出キットの評価

2009 年のデング熱輸入症例に関して検討した。国立感染症研究所に検査依頼のあった 113 名のデング熱疑い患者中 70 名 (61.9%) のデング熱患者において血中から PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA® によって 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。D4 に対しては表 1 にも示すように ELISA キットと比較して明らかに感度が低かった。

NS1 抗原検出迅速キットおよび NS1 抗原 ELISA キットの両方を、第 10 病日までの急性期検体 36 症例 50 検体について実施した。その結果、ELISA キットでは 41 検体で NS1 抗原が検出され、迅速キットでは 31 検体で NS1 抗原が検出された。迅速キット陽性の 31 検体はすべて NS1 抗原 ELISA

キットでも陽性であった(表2)。また、PCR検査より発症後やや長めに検出が可能であるという特性は有していた。

2. チクングニヤ熱・デング熱サーベイランス

チクングニヤ熱の検疫所における検査は昨年度から2年間実施したが、9月によくインドネシアからの輸入症例が、成田空港検疫所で確認された。ウイルス分離・遺伝子解析の結果2005年の西インド諸島の流行に端を発し、インド・スリランカ・イタリア・シンガポール・マレーシア・タイに拡大したアフリカ型でなく、従来から小流行を起こしていたアジア型のチクングニヤウイルスであることが、遺伝子解析によって確認された。遺伝子解析の結果、アミノ酸配列226番目のアミノ酸はヒトスジシマカでの増殖性が高いとされるはバリン(V)ではなくアラニン(A)であった(図1)。また、関西空港検疫所ではデングウイルス1型、2型、4型、2型の4株がそれぞれインドネシア、マレーシア、フィリピン、インドネシアからの輸入症例から分離された。関西空港検疫所では2005年にもフィリピンからの輸入症例からデングウイルス4型を検出したが、E領域の遺伝子解析の結果は98%のホモロジーであり、今回の株とは少し異なることが明らかとなった。一方、成田空港検疫所ではデングウイルス3型、2型、1型をそれぞれマレーシア、インド、ブラジルからの輸入症例から分離した。

D. 考 察

デングウイルス NS1 迅速キットは、ELISA キットと比較してやはり感度は低い。が特異性で劣ることはなかった。また、PCR

検査より発症後やや長めに検出が可能であるという特性は ELISA 同様に有していた。したがって、病原体診断には PCR 法との併用が望ましい。しかし、検査時間が 30 分以内であることを考えると、空港検疫所での健康相談者に対する検査としては有用である。NS1 迅速キットで陽性バンドを確認すれば、健康相談者にその場でデング熱の可能性が高いことを伝えることができると考えられる。

本年度は、成田空港検疫所で 3 株、関西空港検疫所で 4 株のデングウイルスが検出され国立感染症研究所にて分離され遺伝子解析された。一方、チクングニヤ熱サーベイランスについては、東南アジアで流行が拡大している現状から、チクングニヤ熱輸入症例は今後も増加することが予想されるが、感染症法にも収載されていない疾患を研究班の一環として実施することは、非常に効率が悪いことが明らかになった。2008 と 2009 年の 2 年間でチクングニヤ熱輸入症例が 13 例確認されたが、空港検疫所において確認されたのは、わずかに 1 例であった。したがって、まず法律に規定されることが重要であると考えられる。

E. 結 論

NS1 迅速キットの感度は、NS1 抗原 ELISA キットに比べて感度が低く、デングウイルス 4 型に対してその傾向が強いことが判明した。現状ではウイルス遺伝子検出法に替えることは望ましくなく、併用することが望ましい。

空港検疫所でデング熱と診断された健康相談者の血清からデングウイルス 7 株が分離された。チクングニヤ熱サーベイランス

の結果、インドネシアからの輸入症例を病原体診断によって確認し、チクングニヤウイルス（アジア遺伝子型）が分離された。

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

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 デングウイルス4型に対するNS1抗原検出キットの評価

| Case ID | リアルタイム PCR | NS1 抗原 迅速キット | NS1 抗原 ELISA (BioRad) | NS1 抗原 ELISA (panbio) | 病日 |
|---------|---------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|----|
| 09-10 | D4 | — | + | — | 6 |
| | — | — | + | — | 8 |
| | NT | NT | — | — | 14 |
| 09-76 | D4 | + | + | NT | 7 |

NS1 迅速キットはD4 に対してELISA (BioRad 社) よりも感度が低いが、09-76 の結果が示すように検出は可能である。

＋：陽性

－：陰性

NT：not tested

表2

デング熱輸入症例36例におけるNS1抗原検出迅速キットとELISAキットの比較

| | 検体数 | 陽性数 | 陰性数 |
|---|-----|-----|-----|
| NS1 抗原検出 ELISA (PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA®) | 50 | 41 | 9 |
| NS1 抗原迅速キット | 50 | 31 | 19 |

図1

輸入症例から分離されたチクングニヤウイルス
E1タンパク質領域226番目のアミノ酸配列

226

Japan (Indonesia) 2009

EDVYANTQLVLQRPSA **A** GTVHVHPYSQAPSGFK

Japan (Malaysia) 2009

KDVYANTQLVLQRPA **V** GTVHVHPYSQAPSGFK

分担研究報告書

フラビウイルスによる脳炎発症の局所および全身における免疫応答の解析

研究分担者 鈴木 隆二 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター 室長
研究協力者 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 大学院生

研究要旨： 地球環境の変化によりその拡大が予想されるフラビウイルス感染症について、フラビウイルス感染マウス脳炎モデルを作成し、脳炎発症に伴う脳内および末梢における免疫応答について解析をした。使用したウイルスは、日本脳炎ウイルス(JEV)、ウエストナイルウイルス(WNV)は、ダニ媒介性脳炎ウイルス(TBEV)を用いた。これらフラビウイルスをマウスに感染させ、経時的に脳および脾臓におけるウイルス量の測定、リンパ球マーカー(CD 抗原)、サイトカインについては定量的 PCR を行った。さらに、網羅的 TCR レパトア解析を行い、T 細胞の動態と特性について解析を行った。3 種類のフラビウイルス感染モデル系において、感染後に脾臓中のウイルスは検出されなくなり、脳内でのウイルス増殖が観察された。脳内においては Th1/Tc1 タイプの免疫応答が優位であった。JEV,WNV,TBEV に特異的な T 細胞の浸潤が確認され、それぞれのウイルスに対して交差反応性を示す TCR レパトアは確認されなかった。脾臓においては、ウイルスの減少から基本的な免疫バランスを示す結果は得られなかったが、共通して IL-10 の優位な発現増加が確認された。TBEV 感染モデルマウスにおいて、致死個体と回復個体の比較検討から、IL-10 の発現増加と致死が優位に相関する可能性が示唆された。

A. 研究目的

地球環境の変化に起因するベクター媒介性感染症としてフラビウイルスは重要な問題である。日本においてその危険性を有する日本脳炎、ウエストナイル脳炎、ダニ媒介性脳炎について、感染後の病態解析を行い、如何なる生体反応が惹起され、病態の重症度を左右しているのかは不明である。今回、我々は、これら三種類のフラビウイルスをマウスに感染させ、経時的に免疫反応を脳と脾臓において解析をした。

本研究により、T 細胞を中心とした詳細な解析からフラビウイルス脳炎の病態メカニズムが解明される事により、新たなエピトープを用いた安全かつ効果的なワクチン開発や、脳炎を軽減する治療法開発につながる可能性を探索する。また、ウイルスの毒性の指標として生態の反応性が如何に反映されるのかを明らかにす

る事を目的とした。

B. 研究方法

- (1) 動物感染実験： 使用したフラビウイルスは WNV は NY99-6922 株を、JEV は JaTH160 株を、TBEV は Oshima5-10 株を使用した。感受性が高いことが知られる C3H/He の LD₅₀ 値を求めた。投与ルートは、神経病原性と神経侵入性の両方を反映する腹腔内接種により行った。
- (2) サンプル採取および病理学的検討： それぞれのウイルスをマウスに腹腔内接種し経時的に脳および脾臓を採取した。
- (3) TCR レパトア解析： 脳から抽出した total RNA をサンプルとして、TCR レパトア解析を行なった。total RNA から cDNA を合成した後、adaptor を付加し、消化酵素処理により adaptor 付加 cDNA を適当な形にし、adaptor および TCR 定常領域にそれぞれ相補的なプライマーセットを用いて

nested PCR を行った。これにより、全ての TCR をコードする遺伝子を同一条件下で特異的に増幅させることが可能であり、得られた PCR 産物を、全ての TCRAV ファミリーおよび TCRBV ファミリーにそれぞれ相補的なオリゴ DNA を固相化したマイクロプレートに播種してハイブリダイズさせた後、酵素反応を用いて発色させ吸光度を測定した。得られた吸光度から、各 TCR V ファミリーの存在率を算出することにより、mRNA レベルにおける脳内浸潤 T 細胞の TCRV ファミリーの偏在性を検討した。

(4) T 細胞 clonality および CDR3 シーケンス解析：WNV 感染および JEV 感染マウスの脳内における TCR レパトアの全てについて、CDR3 size spectratyping によりフラグメント解析を行い、T 細胞の clonality を確認した。さらに各 TCR 遺伝子を TA-cloning 法によりプラスミドにクローニングし、塩基配列を解析することにより、CDR3 シーケンスレベルの発現頻度を解析した。これにより、WNV および JEV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞における TCR 遺伝子発現頻度をライブラリとして構築した。

(5) リアルタイム PCR：CD3、CD4、CD8、IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、TNF α についてウイルス感染マウス脳および脾臓中の発現について解析した。

(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）」を踏まえて、国立感染症研究所で定めた所内規定を遵守して行った。

C. 研究結果

(1) ウイルス量の経時的変化：腹腔内接種 5~7 日後、脳内にウイルスの急激な増殖が確認された。脾臓においては、感染後 4 日にウイルスが検出されたが、7 日

には低下し 10 日では僅かに検出された(図-1)。

(2) 感染群および非感染群の脳内および脾臓中の面系バランスについて検討した結果、脳内では Th1/Tc1 タイプの免疫応答が惹起された(図-2)。脾臓内においては特徴的な IL-10 の産生増加が確認された(図-3)。

(3) TBEV 感染マウス系における致死群と非致死群のサイトカインバランスの解析結果から、致死群では脾臓中に IL-10 の産生が優位に高値を示していた(図-4)。

(4) それぞれのウイルス感染後の脳内浸潤 T 細胞の特異性の解析：TCR レパトア解析と CDR3 サイズスペクトラ解析、CDR3 シーケンスを行った。その結果、それぞれのウイルスの特異的な T 細胞が脳内に浸潤している事が明らかになった。フラビウイルス共通に反応する T 細胞の存在は書く委任されなかった(図-5、図-6)。

D. 考察

三種類のフラビウイルス脳炎マウスモデルの解析から、実験的感染後に、脳内に細胞浸潤が観察された。TCR レパトア解析においては、正常コントロールの脳では全く存在しないシグナルがそれぞれのウイルス感染後に経時的に検出され、脳炎の進展と T 細胞浸潤が同時期に惹起している事が示唆された。感染後に浸潤した T 細胞は、TCR レパトア解析および CDR3 size spectratyping 解析により、クローンとして存在している事から、ウイルス specific T 細胞であると考えられた。リアルタイム PCR によるサイトカインの脳内発現での結果から、Th1/Tc1 タイプの免疫状態が脳内では惹起されている。

WNV、JEV、TBEV 特異的 T 細胞は共通した TCR レパトアを保有する事は無い事が確認された。以上の結果から、それぞれのウイルスに特異的に脳内に浸潤している事が明らかとなった。この事は、日本脳炎血清型として分類される相同性の高い WNV と JEV の T 細胞に認識されるエピトープは厳格に異なる可能が示唆された。

また、脾臓中のサイトカインの発現解析から、脳内とは異なり IL-10 と特徴的な発現が観察され、IL-10 発現量と致死が優位に相関する事が観察された。

E. 結論

今回の解析から、フラビウイルス感染後の脳内には極めて限定したT細胞の浸潤が示された。T細胞はウイルス間で交差反応性を有する可能性が極めて低い事が示唆された。また、脳炎による致死の全身の免疫状態は脳内のTh1/Tc1とは異なりIL-10の発現に強弱に関連する可能性がある(図-7)。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

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.
Exp Anim. 2009 Apr;58(2):159-68.

Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, Suzuki R, Gould EA, Takashima I, Koike S : Mortality following peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses.
Virology. 2009 Jul 20;390(1):139-50. Epub 2009 May 24.

2. 学会発表

北浦一孝、藤井克樹、早坂大輔、高島郁夫、高崎智彦、鈴木隆二、倉根一郎 : ダニ媒介性脳炎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57回日本ウイルス学会学術集会(東京)2009年10月25-27日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

「地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究」
—中空ウイルス粒子を用いたフラビウイルス鑑別診断法の開発—

研究分担者：北海道大学大学院獣医学研究科 前田秋彦
協力研究者：北海道大学大学院獣医学研究科 前田潤子、荻和宏明、高島郁夫

研究要旨 中空ウイルス粒子 (SvPs) はウイルス粒子の殻のみで構成され、物理的、抗原的性状がウイルス粒子と類似しているため、ウイルスの検査やワクチンへの応用が期待されている。本研究では、地球温暖化に伴い感染、流行の拡大が危惧されている蚊媒介性のフラビウイルス感染症、特に日本脳炎ウイルス (JEV) やデングウイルス (DENV)、ウエストナイルウイルス (WNV) 感染を SvPs 用いて血清学的に鑑別する方法について検討した。各種フラビウイルスに特異的な多くの抗体は、ウイルス E 膜蛋白質の Domain III (D III) 領域を認識する。そこで、WNV SvPs (SvPs(WWW)) の E 膜蛋白質の D III 領域を、JEV あるいは DENV-1 の D III 領域と置換した SvPs (SvPs(WWJ) および SvPs(WWD)) を作製した。DENV に対する抗体 (非特異的にフラビウイルスの E 蛋白質を認識する) を用いてウエスタンブロット解析した場合、全ての SvPs と反応した。次に WNV あるいは JEV 感染マウス血清を用いて WB 解析したところ、それぞれの SvPs に特異的に反応した。本結果は、今回作製したキメラ SvPs を抗原としてウエスタンブロット解析することにより JEV と DENV、WNV の感染が鑑別可能であることを示唆している。

A. 研究目的

本研究では、地球温暖化に伴い日本への侵入と感染の拡大が危惧される蚊媒介性フラビウイルス感染症であるデングウイルス (DENV) やウエストナイルウイルス (WNV)、日本に常在し感染拡大が危惧される日本脳炎ウイルス (JEV) の感染を血清学的に鑑別する方法の開発を目的とした。フラビウイルスの検査では交差反応性が強く特異性が低いため、感染鑑別は困難であるとされている。またウイルスの各種検査法は生ウイルスを使用することが多く、WNV のように P3 レベルのウイルスを用いる場合には Biosafety レベル 3 (BSL 3) の実験室内での作業が義務付けられている。したがって、より安全、簡便で特異性の高い検査法の開発が望まれている。そこで、今回は感染性のないウイルスの中空粒子 (SvPs) を用いて、特異性の高いフラビウイルス感染鑑別法の開発について検討した。

B. 研究方法

SvPs は以下に示す方法に従って作製した。WNV SvPs の発現ベクター (pCAG WNV SvPs

E(WWW)) の E 蛋白質の Domain III (D III) 領域を JEV あるいは DENV-1 の D III 領域と置換したキメラ SvPs を作製した (図 1. それぞれ pCAG WNV SvPs E(WWJ)、pCAG WNV SvPs E(WWD))。

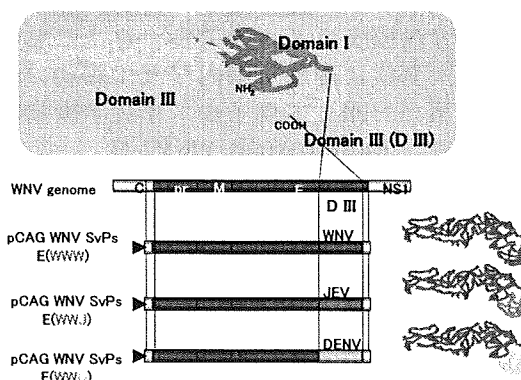


図 1. キメラ SvPs の構造

WNV の SvPs (WNV SvPs E(WWW)) を基にして E 蛋白質の Domain III (D III) 領域を JEV あるいは DENV-1 の D III 領域に置換した WNV SvPs E(WWJ)、WNV SvPs E(WWD) を作製した。

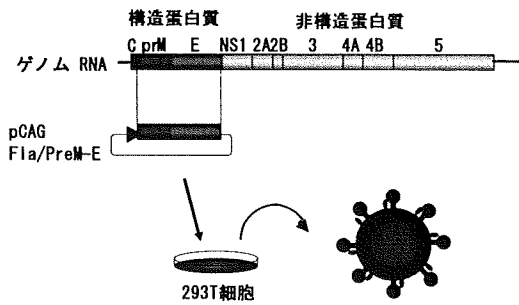


図2. 中空ウイルス粒子の作製方法

WNV SvPs 発現ベクター、pCAG WNV SvPs E(WWW)および各キメラ SvPs 発現ベクター、pCAG WNV SvPs E(WWJ)と pCAG WNV SvPs E(WWD)を 293T 細胞に導入し、培養上清中に放出された SvPs を回収した。

これらのベクターをヒト腎細胞である 293T 細胞に導入することにより培養上清中に放出された SvPs を回収した (図 2)。

各 SvPs を 4-12%のグラジエント SDS-PAGE ゲル中で展開した後、PVDF 膜に blot した (ウェスタンブロット解析)。この PVDF 膜に、一次抗体として抗 DENV モノクローナル抗体 (pan-flavivirus 抗体) や 抗 WNV 感染マウス血清、抗 JEV 感染マウス血清を反応させ、次に Horse-radish peroxidase を結合させた抗マウス IgG 二次抗体を作用させた。最後に ABC 法により、抗原-抗体複合体を検出した。

C. 研究結果

今回、DENV-1 SvPs を作製する目的で、DENV-1 の Core 蛋白質の C 末端を含む prM-E 蛋白質領域を発現ベクターの pCAG に組み込み、細胞に導入したところ、SvPs の産生は認められなかった (結果は示さず)。そこで、感染抗血清の多くのエピトープが存在すると考えられる DENV-1 の E 蛋白質 D III 領域を WNV SvPs E(WWW) の D III 領域に置換した WNV SvPs E(WWD) の作製を検討した。NV SvPs E(WWD) は WNV SvPs E(WWW) に比べ量的に少ないものの、培養上清中に放出された WNV SvPs E(WWD) が確認された (図 3, lane 12)。また、JEV の D III 領域に置換した WNV SvPs E(WWJ) についても同様に検討したところ、WNV SvPs E(WWJ) の発現が確認された (図 3, lanes 5 および 11)。

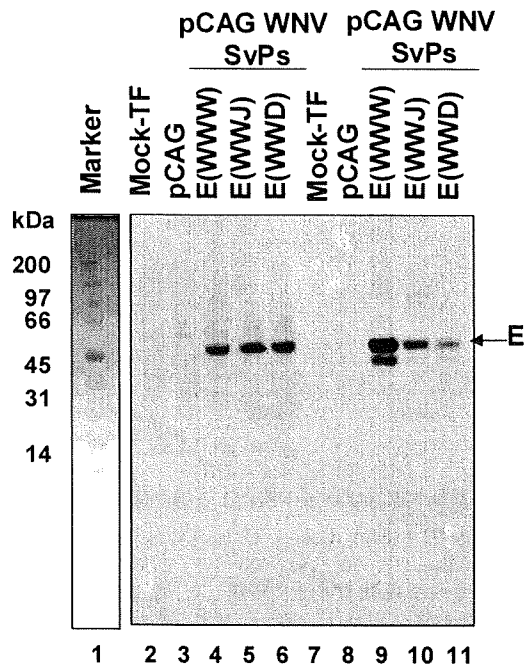


図3. キメラ SvPs の発現

WNV SvPs (WNV SvPs E(WWW)) (lanes 4, 9) とその D III 領域を JEV (lanes 5, 10) あるいは DENV-1 (lanes 6, 11) に置換した WNV SvPs E(WWJ) あるいは WNV SvPs E(WWD) を 293T 細胞に発現した。細胞 (lanes 2-6) および培養上清中 (lanes 7-11) の蛋白質を SDS-PAGE し、PVDF 膜上にプロットした。これら全てのフラビウイルスを検出する抗体で各 E 蛋白質を検出した結果を図に示す。ネガティブコントロールとして、何も導入しない細胞 (lanes 2 と 7) および空ベクターを導入した細胞 (lanes 3 と 8) に由来する蛋白質を使用した。Lane1: 蛋白質サイズマーカー。

次に、等量の SvPs を SDS-PAGE ゲル上に展開し、WNV (lanes 2-6) あるいは JEV 感染マウス血清 (lanes 7-11) あるいはフラビウイルス共通抗体である抗 DENV-1 モノクローナル抗体 (lanes 12-16) をさよう反応させた (図 4)。その結果、WNV 感染マウス血清は WNV SvPs E(WWW) と特異的に反応し (lane 4)、JEV 感染マウス血清は WNV SvPs E(WWJ) と特異的に反応した (lane 10)。また、抗 DENV-1 モノクローナル抗体では、全ての SvPs と反応した (lanes 14-16)。

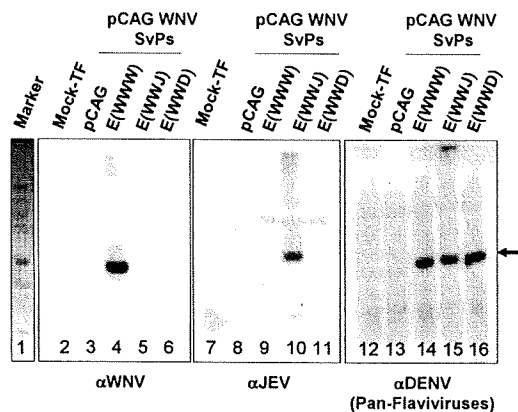


図4. ウェスタンブロット法による感染鑑別

WNV SvPs E(WWW) (lanes 4, 9, 14)およびWNV SvPs E(WWJ) (lanes 5, 10, 15)、WNV SvPs E(WWD) (lanes 6, 11, 16)をSDS-PAGEゲル上に展開した。電気泳動後、PVDF膜上に蛋白質をblotし、WNVに対する抗血清(lane 2-6)あるいはJEVに対する抗血清(lane 7-11)、DENVに対するフラビウイルス共通抗体 (lanes 12-16) と反応させた。ネガティブコントロールとして正常細胞上清(lanes 2, 7, 12)および空ベクターであるpCAGを導入した細胞上清(lanes 3, 8, 13)を使用した。Lane 1: 蛋白質サイズマーカー。

D. 考察

地球温暖化に伴い日本国内での流行が危惧される蚊媒介性フラビウイルス感染症は主として、日本脳炎、デング熱/出血熱およびウエストナイル熱である。これら感染症のヒトでの流行を予測するためにも、自然界でのウイルスのサーベランスが必要であると考えられる。その方法論としてウイルスの血清学的検査が有効であるが、フラビウイルス感染の場合、その強い交差反応性が問題となっている。そこで、より特異性の高い検査法を確立する目的で今回、各ウイルスのSvPsを用いた鑑別検査法について検討した。

DENV-1のSvPsの作製を試みたところ、全ての配列をDENV-1のものを使用した場合、培養上清中へのSvPsの放出は認められなかった。そこで、フラビウイルスの抗血清中に含まれる多くの抗体のエピトープとなっていると考えられているウイルスE蛋白質のD III領域に着目して、WNV SvPs E(WWD)を作製した。その結果、量的にはWNV SvPs E(WWW)やWNV SvPs E(WWJ)よりも少ないものの、WNV SvPs E(WWD)を得ることができた。

次に、これらのキメラSvPsを用いたウェスタンブロット解析による、これらウイルス感染の鑑別について検討したところ、JEVとWNV

感染は効果的に鑑別することが可能であった。また、DENV-1感染については感染血清を用いて検討する必要があると考えられるが、JEVとWNV感染と比較検討することでDENV-1も鑑別できるものと考えられた。今後は、より多くのウイルス感染血清を用い、本試験の有効性について検討しなければならない。

E. 結論

本研究より、WNVのE蛋白質のD III領域をJEVやDENV-1のD III領域と置換することによりDENV-1の抗体と反応するSvPsを作製できることが可能となった。さらに、今回作製したSvPsを用いるウェスタンブロット解析により、これらのフラビウイルス感染を血清学的に鑑別できる方法を確立できるものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maeda, A., Murata, R., Akiyama, M., Takashima, I., Kariwa, H., Watanabe, T., Kurane, I., and Maeda, J. A PCR-based protocol for generation of a recombinant West Nile virus. *Virus Res.* 144: 35-43. 2009
- (2) 吉田智生、藤本智、小林伸行、前田秋彦、前田潤子、大沼学、桑名貴、村田浩一、浅川満彦 帯広市内で発見されたハシブトガラス *Corvus macrorhynchos* 白化個体死体のウイルス学的検査および剖検記録。北獣会誌 53: 165-167. 2009
- (3) 吉田智生、上村純平、相澤空見子、盛田徹、吉田順子、前田秋彦、浅川満彦 北海道胆振地方にて採集されたカササギ *Pica pica* の剖検記録3例とウイルス学的検査。北獣会誌 53: 545-547. 2009
- (4) Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Akita, S., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T., and Takashima, I. Glycosylation of the West Nile virus envelope protein increases *in vitro* and *in vivo* viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *In press*, 2010

2. 学会発表

- (1) 秋山稔、村田亮、高島郁夫、荻和宏明、

渡辺智正、倉根一郎、前田潤子、前田秋彦
PCR法による組み換えウエストナイルウイルスの作製 第44回日本脳炎ウイルス生態研究会 北海道千歳市 6/19-6/20

(2) 秋山稔、村田亮、高島郁夫、荻和宏明、
渡辺智正、倉根一郎、前田潤子、前田秋彦
PCR法を用いた組み換えウエストナイルウイルスの作製 第148回日本獣医学会 鳥取 9/25-9/27

(3) 前田秋彦、前田潤子、村田亮、白藤浩明、
金平克史、荻和宏明、高島郁夫、倉根一郎
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 日本ウイルス学会 東京 10/25-10/27

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

和試験を行った(図1)。WNV非感染の各種動物では両ウイルスに対するVLP中和抗体は検出されなかった。WNV感染ウマ血清中には、WNV/VLPに対する中和抗体は検出されたが、JEV/VLPに対する中和抗体は検出されなかった(図1A)。WNV感染カモ血清中のWNV/VLPに対する中和抗体価は交差反応性のJEV/VLPに対する中和抗体価に比べ、少なくとも4倍以上の差が認められた(図1B)。興味深いことに、WNV感染に対するカモの血清学的な反応は、二つのパターンに分類された(図1Baおよびb)。すなわち、JEV/VLPを中和する交差反応性の抗体を産生する個体(図1B, a)と産生の認められない個体(図1B, b)が存在した。また、WNV感染ハシブトカラスにおいては、高度なWNV/VLP中和抗体の産生が認められた。また、交差反応性のJEV/VLP中和抗体の産生も認められた。しかし、WNV/VLPに対する中和抗体価はJEV/VLPに対する交差反応性の中和抗体価よりも2倍以上高かった。

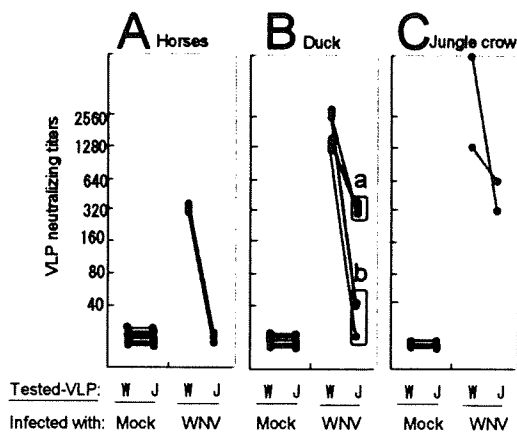


図1. 日本国内で飼育あるいは生息する各種動物のWNV感染にともなうVLP中和抗体の産生

WNVおよびJEV中和抗体の検出されないウマ(A)、カモ(B)およびハシブトカラス(C)にWNVを感染した。抗WNV/VLP(W)および抗JEV/VLP(J)に対する中和抗体価を昨年度確立した「VLP中和試験法」により測定した。同一血清を破線で結んだ。カモ(B)のWNV感染によるJEV/VLPに対する血清学的反応性の異なる二つの反応性を示す個体を破線括弧(a)と(b)で示した。

D. 考察

WNVが日本国内に侵入した場合に、その感染とJEV感染やワクチネーションの影響とを鑑別する必要がある。そこで、本研究では、両ウイルス感染を血清学的に鑑別する方法として両ウイルスのVLPを用いた「VLP中和試験法」を確立し、その有効性を検討した。前年度報告した様に、ニワトリ雛にWNVあるいは

はJEVを実験感染した場合、本法を用いることで両ウイルスによる感染を血清学的に鑑別することが可能であった。本年度、日本国内で室外飼育されているウマにWNVを感染し、その感染を診断できるか否かを検討した。その結果、WNV/VLPに対する中和抗体のみ検出されたため、ウマにおいて本法の有効性が示された。一方、カモやハシブトカラスでは、WNV/VLPに対する中和抗体のみならずJEV/VLPに対する交差反応性の中和抗体の上昇も確認されたため、日本の屋外飼育された鳥類や野鳥におけるWNV感染検査においては、その結果の判断には十分、注意する必要があると考えられた。また、カモ類においてはWNV感染への血清学的な反応に二つのパターンが存在した。その理由は個体差なのか、あるいはフラビウイルス感染に特異的に認められる鳥類の反応(antigenic sin等)であるのかについては、今のところ不明である。

E. 結論

本研究より、日本の屋外で飼育されているウマやカモ、あるいは屋外に生息するカラス等でのVLP中和試験によるWNV感染診断の有効性が示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Maeda, A., Murata, R., Akiyama, M., Takashima, I., Kariwa, H., Watanabe, T., Kurane, I., and Maeda, J. A PCR-based protocol for generation of a recombinant West Nile virus. *Virus Res.* 144: 35-43. 2009
- (2) 吉田智生、藤本智、小林伸行、前田秋彦、前田潤子、大沼学、桑名貴、村田浩一、浅川満彦 帯広市内で発見されたハシブトカラス *Corvus macrohynchos* 白化個体死体のウイルス学的検査および剖検記録。北獣会誌 53: 165-167. 2009
- (3) 吉田智生、上村純平、相澤空見子、盛田徹、吉田順子、前田秋彦、浅川満彦 北海道胆振地方にて採集されたカササギ *Pica pica* の剖検記録3例とウイルス学的検査。北獣会誌 53: 545-547. 2009
- (4) Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Akita, S., Tanaka, T., Yoshii, K.,

Kariwa, H., Umemura, T., and Takashima, I. Glycosylation of the West Nile virus envelope protein increases *in vitro* and *in vivo* viral multiplication in birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *In press*, 2010

2. 学会発表

- (1) 秋山稔、村田亮、高島郁夫、荻和宏明、渡辺智正、倉根一郎、前田潤子、前田秋彦
PCR法による組み換えウエストナイルウイルスの作製 第44回日本脳炎ウイルス生態研究会 北海道千歳市 6/19-6/20
- (2) 秋山稔、村田亮、高島郁夫、荻和宏明、渡辺智正、倉根一郎、前田潤子、前田秋彦
PCR法を用いた組み換えウエストナイルウイルスの作製 第148回日本獣医学会 鳥取 9/25-9/27
- (3) 前田秋彦、前田潤子、村田亮、白藤浩明、金平克史、荻和宏明、高島郁夫、倉根一郎
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 日本ウイルス学会 東京 10/25-10/27

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

各種蚊における日本脳炎ウイルス増殖能の評価

研究分担者 小林睦生 (国立感染症研究所 昆虫医科学部長)

研究協力者 佐々木年則、澤邊京子、伊澤晴彦、鍬田龍星、金京純、津田良夫
(国立感染症研究所 昆虫医科学部)

研究要旨

近年の地球規模による温暖化現象により、媒介蚊に様々な影響を及ぼすことが予想される。例えば、媒介蚊の分布域拡大、個体群密度の増加、媒介蚊体内での病原体増殖速度の加速化、病原体の増殖能の変化などである。そこで本研究では、日本脳炎ウイルス(JEV)を対象に、ウイルスの増殖が蚊体内でどのような機構で制御されているかを明らかにすることを目的とし、まず、対象とする蚊に経口的にウイルスを感染吸血させる実験系を確立した。次いで、その系を用いて国内に生息する各種蚊の JEV 感受性を評価した。

2005 年長崎県で捕集されたコガタアカイエカから分離された JEV1 型株(長崎/37/2005)の各種蚊類における増殖は、主要な媒介種であるコガタアカイエカにおいては顕著に高い感受性が認められたが、アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ、キンイロヤブカおよびオオクロヤブカにおいては、その増殖は認められなかった。一方、国内には生息しないが、ネツタイシマカの唾液腺でも JEV の増殖が認められた。以上の結果から、国内においてはコガタアカイエカ以外の蚊が JEV の伝搬に関与する可能性は低い可能性が示唆されたが、蚊の系統ならびにウイルス株の様々な組み合わせの結果を検討することが必要であろう。

A. 研究目的

国内において、日本脳炎ウイルス(JEV)の主要な媒介蚊はコガタアカイエカである。しかしながら、近年の JEV 分離株に見られるウイルス遺伝子の変異、日本脳炎の流行時期や場所の変化、発生症例数の減少等、このような変化と蚊の JEV 感受性との関係はよく分かっていない。また、地球温暖化に伴う媒介蚊の分布域の拡大、蚊個体群密度の上昇、短時間での病原体の増殖、病原体の増殖能の変化など、様々な影響を及ぼすと

考えられることから、現在国内に生息する主要な蚊種の JEV 媒介能を正確に評価する必要があると考えた。

また、昆虫のウイルスに対する免疫機構はほとんど知られていなかったが、近年、Toll 経路、RNA 干渉経路、Janus kinase (Jak)-signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路が報告された。ウイルスの増殖が蚊体内でどのような機構で制御されているかを明らかにすることも必要である。以上のことから、まず、人工膜吸血

法を用いた感染吸血により、蚊に経口的にウイルスを取り込ませる実験系を確立し、次いで国内に生息する主要な蚊種6種のJEV感受性を評価した。

B. 研究方法

感染実験に用いた蚊は、採集後昆虫医学部飼育室内で継代された系統であるが、オオクロヤブカを除き、継代年数は6年未満である。以下()内は採集年と採集地を記す。コガタアカイエカ(2008年出雲市)、アカイエカ(2008年新宿区)、チカイエカ(2003年渋谷区)、ヒトスジシマカ(2009年川崎市)、キンイロヤブカ(2009年千葉市)、ヤマトヤブカ(2004年成田市)、オオクロヤブカ(406系統、1950年代座間市近郊)、ネッタイシマカ(2004年インドネシア、スラバヤ)である。

感染実験に用いたJEVは、2005年長崎県で捕集されたコガタアカイエカから分離されたJEV1型株(長崎/37/2005)である。約 10^6 コピー/mlのJEVをニワトリ脱繊維血に混合し、人工膜吸血法により蚊に吸血させた。感染蚊はその後27-28℃で約30日間飼育し、その間定期的に5頭以上の蚊を抽出し、唾液腺、中腸およびその他の部位に分けて分析した。JEVの増殖性は、各部位毎に抽出したRNAから定量RT-PCR法によりJEV遺伝子のコピー数を算出した。さらに、間接蛍光抗体法により、各組織におけるJEVの局在を免疫組織学的に観察した。

C. 研究結果

図1にJEVの各種蚊組織における増殖性を評価した結果を示した。コガタアカイエカにおいて、感染22日以降虫体の各部分でJEVの強い増殖が示された。特に唾液腺に

おいては10,000コピー以上と推察された。チカイエカの中腸では、感染後14日目まで500-1,000コピーの増殖が見られたが、アカイエカ、ヒトスジシマカ、キンイロヤブカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカ体内では、顕著なJEVの増殖は認められなかった。一方、国内には生息しないが、東南アジア諸国においてデングウイルスおよびチクングニヤウイルスの主要な媒介蚊であるネッタイシマカにおいて、感染11日目から本ウイルスの増殖が認められ、感受性が高いことが推察された。図2は間接蛍光抗体法によりコガタアカイエカ唾液腺に観察されたJEV粒子の免疫組織像である。

D. 考察

国内に生息する主要な6種類の蚊に対してJEV感受性を評価した。本結果では、日本を含む東南アジア全域でJEVの主要な媒介種として知られているコガタアカイエカにおいて、最も高いJEVの増殖能が得られたが、それ以外の蚊種におけるJEVの増殖は認められなかった。Turell *et al.* (2006a, b)は、韓国で採集されたアカイエカ、およびウズベキスタンで採集されたチカイエカのそれぞれ次世代の雌成虫と、2000年に韓国のコガタアカイエカから分離されたJEV(Turell *et al.*, 2003)の組み合わせで経口感染実験を行った。その結果、コガタアカイエカほどではないものの、アカイエカおよびチカイエカにおいてもJEV感受性があることを指摘した。一方、Kumanomido *et al.* (1986a, b)が実施した国内調査において、宮崎・茨城両県で採集したアカイエカから(宮崎 1/25 プール、茨城 1/72 プール)、茨城県で採集したキンイロヤブカ(1/280 プール)からそれぞれJEVが

分離された。いずれもコガタアカイエカに比べ非常に低い陽性率ではあったが、国内のアカイエカおよびキンイロヤブカが JEV を媒介する可能性が示唆された。本実験では、チカイエカの JEV 感受性は低いと評価されたが、アカイエカおよびキンイロヤブカにおいてはその増殖は認められず、過去のいずれとも異なった結果であった。我々が用いた蚊の系統およびウイルス株と、彼らが用いたそれらとが異なっていた所以かもしれない。今後、蚊の系統とウイルス株の様々な組み合わせの感染実験を行う予定である。

我々のオオクロヤブカでは、JEVの増殖は認められなかった。しかし、台湾の捕集蚊からはJEVが分離され、感染実験からも本種の非常に高いJEV感受性が示されており

(Chen *et al.*, 2000), 本実験においてもJEVの増殖が予想された。本実験に用いたオオクロヤブカ406系統は第二次世界大戦後駐留する米軍によって採集され、それ以降50年以上もの長期間当研究室で維持されてきた系統である。オオクロヤブカ以外の蚊種は、野外から採集して6年未満の比較的飼育日数の浅い集団であったため、オオクロヤブカのJEV感受性を正確に評価されたかは疑問である。野外集団に近い集団で再度確認する必要がある。また、Takashima and Rosen (1989)は、ヤマトヤブカにJEV媒介能があることを報告している。今回用いたヤマトヤブカの供試虫数は非常に少なかったため、再度検討する予定である。

最後に、日本には生息していないが、ネッタイシマカの唾液腺で JEV の増殖が認められたことは興味深い。本種はデングウイルスおよび黄熱ウイルス等の JEV と同じフラビウイルス属のウイルスの媒介種である。ネッタイ

シマカは JEV の本来の媒介種ではないが、JEV に対して何らかの親和性を有している可能性もある。今後検討したい。

E. 結論

国内に生息する主要な 6 種類の蚊に対して蚊由来 JEV1 型株を経口感染させ、蚊体内でのウイルスの増殖を評価した。日本を含む東南アジア全域で JEV の主要な媒介種であるコガタアカイエカでは、顕著な JEV の増殖能が認められたが、それ以外の蚊種での増殖は認められなかった。正確に蚊の JEV 感受性を評価するためには、蚊の系統とウイルス株の様々な組み合わせで感染実験を行うことが必要であろう。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

1) 佐々木年則・澤邊京子・楢田龍星・金京純・津田良夫・伊澤晴彦・小林陸生. 国内に生息する蚊類の日本脳炎ウイルス感受性. 第 62 回日本衛生動物学会大会, 鹿児島市, 2010 年 4 月 2-4 日

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. 各種蚊における日本脳炎ウイルス増殖能の評価

| 組織 | 1 - 4日 | | | 8 - 14日 | | | 22 - 29日 | | |
|------------------------|-----------|----------|---------|---------|----|---------|----------|----|---------|
| | SG 唾液腺 | MG 中腸 | Others* | SG | MG | Others* | SG | MG | Others* |
| コガタアカイエカ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 6 | 5 | 4 |
| アカイエカ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| チカイエカ | 1 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | NT | NT | NT |
| ヒトスジシマカ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| キンイロヤブカ | 1 | 1 | 1 | NT | NT | NT | 1 | 1 | 1 |
| ヤマトヤブカ | 1 | 1 | 1 | NT | NT | NT | 1 | 1 | 1 |
| オオクロヤブカ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ネッタイシマカ (国内には生息しない) | 1 | 2 | 1 | 4 | 3 | 4 | 3 | 5 | 6 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|---|------------------|---|-----------------|---|---------------|---|------------|---|-----|----|
| 6 | >10,000 (コピー数/組織) | 5 | 5,000 -10,000 | 4 | 1,000 -5,000 | 3 | 500 -1,000 | 2 | 10 -500 | 1 | <10 | NT |
|---|----------------------|---|------------------|---|-----------------|---|---------------|---|------------|---|-----|----|

*Othersは 唾液腺(SG), 中腸(MG)を取り除いた残査のすべて

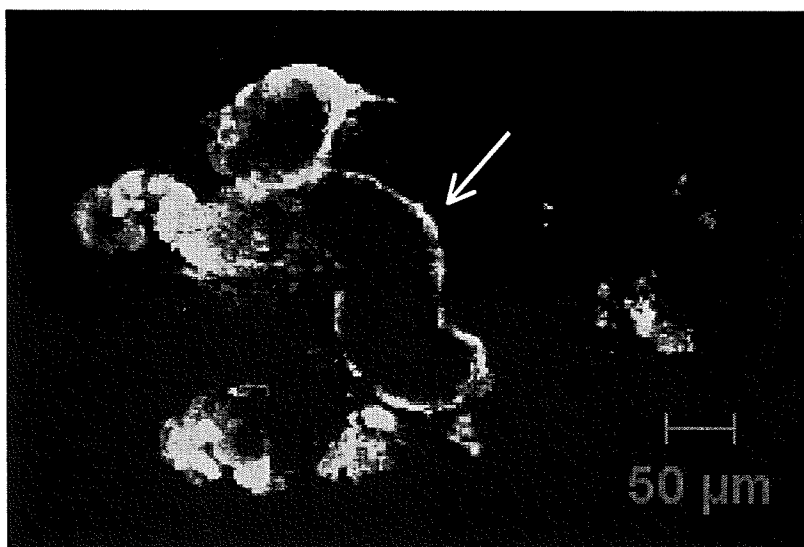


図1. 間接蛍光抗体法で観察されたコガタアカイエカ唾液腺内のJEV

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

イエカ類の休眠生理から解析した日本脳炎ウイルスの蚊体内での越冬の可能性

研究分担者 小林陸生 (国立感染症研究所・昆虫医科学部長)

研究協力者 澤邊京子、森林敦子、佐々木年則、葛西真治、津田良夫(同・昆虫医科学部)

研究要旨

わが国において、日本脳炎ウイルス(JEV)の主要な媒介蚊はコガタアカイエカであるが、近年、コガタアカイエカ以外の蚊あるいは節足動物が関与する感染環の存在も指摘されている。そこで本研究では、冬季の蚊の耐低温性と、栄養生殖分離(休眠の一種)の特徴をもとに、イエカ類体内での JEV の越冬の可能性を検討した。

JEV の主要な媒介種であるコガタアカイエカ、JEV 感受性があると報告されているアカイエカおよびチカイエカの孵化幼虫を様々な温度・日長条件下で飼育し、栄養生殖分離を発現する臨界日長を検討した。20℃の温度条件下では、アカイエカでは 12.5 時間、コガタアカイエカでは 13.8 時間(関東地方では 9 月下旬および 8 月下旬に相当)以降の短い日長条件下に孵化した雌は、その成虫の吸血と産卵が阻害されたが、チカイエカでは短日条件下でも阻害されなかった。次いで、羽化後の成虫を種々飼育条件で飼育し生存日数を比較した。アカイエカは他の 2 種に比べ最も寿命が長く、15℃短日条件下では平均 155.5 日(最長で 282 日)生存し、特に 5℃前後の低温下での 50%生存率は 80 日を超え、コガタアカイエカの 22 日に比べて有意に長命であった。夏季に羽化したアカイエカが成虫で越冬する可能性が示唆された。以上の結果から、コガタアカイエカが国内で越冬できる地域は限局され、その確率は低いと考えられるが、アカイエカの生理・生態的特徴はむしろ JEV の越冬に適していると結論される。特にアカイエカでは、夏季にウイルスを取り込んだ雌成虫が越冬することが可能であり、コガタアカイエカ以外の感染環に大きく関与すると思われる。

A. 研究目的

我が国における日本脳炎患者数は、近年年間 10 名以下と少ないものの、西日本を中心に増幅動物であるブタの抗体価は毎年上昇し、媒介蚊であるコガタアカイエカからは高率に日本脳炎ウイルス(JEV)が分離されるなど、野外環境下における JEV の活動は依然として活発である。一方、コガタアカイエ

カの活動時期や生息場所以外での患者の発生も報告され、特に冬季においてコガタアカイエカ以外の節足動物が関与する感染環の存在が指摘されている。

JEV のコガタアカイエカ体内での越冬の可能性についてはこれまでに多くの議論がなされ、その可能性はほとんどないと結論された(小田ら, 1978)。つまり、短日下で羽化