

用されている Stat-Pack(Chembio)とその結果を比較検討したが、若干の False-Positive ケースが出るものの、False-Negative は無く、献血現場で問診中に結果が出せ、問診を助ける情報を提供するスクリーニング用に使用可能と思われる。中南米諸国での献血輸血現場ではシャーガス病に関しては HIV,HCV,マラリアなどと同様にスクリーニング対象になっている。

E. 結論

ブラジル人集住地区での疫学調査がブラジル領事館の理解の下に行えるようになったことで各地のラテンアメリカ人のシャーガス病感染状況が今後も更に明らかに出来る。また感染者の検査呼びかけ、安全血液供給のための啓蒙活動は在日ブラジル人を支援する NPO,NGO のネットワークを通じ今後も実施可能である。同時に日赤などで行う献血現場で実施する問診票の改訂特に在ブラジルでの居住暦などについてはより詳細に尋ねることが必要であり、感染リスクの高い地域出身者を除外できる。

更に簡易抗体スクリーニングキットの併用は安全血液確保にはより確実な方法である。今回 3 名の抗体陽性者が検出されたが、いずれも無症状で、感染の自覚は無かった。そのため健常人と変わらぬ生活を継続している。2/3 名は充分

に献血可能年齢である。シャーガス病慢性感染者の多くは健常人と見分けが自他共に判らないことが献血現場の脅威である。

F:健康危険情報

なし。

G:研究発表

1)論文発表

しのびよるシャーガス病——中南米の知られざる感染症

慶應義塾大学出版 2009—3月

竹内勤・三浦左千夫

2)学会発表:

三浦 左千夫・竹内 勤

58回日本臨床寄生虫学会東

日本学術集会;輸入感染症:在日ラテンアメリカ人の慢性シャーガス病キャリアーと2次感染予防

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3.その他

将来的に *Trypanosoma cruzi* 抗体スクリーニングキットが評価されれば出願する予定。

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
平成 21 年度研究報告書

「献血の安全性確保と安定供給のための新興感染症等に対する
検査・スクリーニング法等の開発と献血制限に関する研究」
(H20-医薬-一般-077)

分担研究報告書

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応及び
国内献血におけるシャーガス病の感染リスクの把握

研究分担者 百瀬俊也 (日本赤十字社血液事業本部 安全管理課長)
研究協力者 沖 学 (日本赤十字社血液管理センター 検査課長)
平 力造 (日本赤十字社血液事業本部 安全管理課)
坂本達也 (日本赤十字社血液管理センター 検査課)
大塚裕司 (日本赤十字社血液事業本部 安全管理課)

研究要旨：

ウエストナイルウイルス (以下、WNV という) の国内感染が認められた場合の献血者への対応については、都道府県単位で 1 ヶ月間 WNV-NAT が実施できるよう当該試薬を日本赤十字社(血液管理センター)に備蓄しており、献血者が最も多い東京都の 1 ヶ月平均 51,000 人で 1.8 ヶ月間検査可能であると試算された。併せて、WNV-NAT 検査手順 (案) を作成し円滑な実施に臨むべく準備している。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する 2008 年の献血申込者数及び献血者数を集計・解析した。その数は 21 カ国・地域で献血申込者数 9,435 人、献血者数 7,709 人であり、献血申込者の 82%が献血していた。その内ブラジル居住歴を有する者は、献血申込者数 4,572 人、献血者数 3,752 人であり、いずれも全体の約半数を占めた。中南米居住歴者の都道府県別の献血者数では、愛知県の 960 名が最も多く、以下、東京都、神奈川県、大阪府、埼玉県、静岡県と続いた。ブラジル居住歴者の都道府県別の献血者数では、愛知県の 560 名が最も多く、以下、東京都、静岡県、神奈川県、埼玉県、大阪府の順であった。ブラジル居住歴者の男女別年代別の分布では、男女比は 2.8:1 と男性の方が多く、男性では 30 代、女性では 20 代が、他の年代より多かった。全体では 30 代以下が 64%、40 代以上が 36%であり、シャーガス病感染リスクの比較的低いと考えられる若い世代が多く献血している状況が窺えた。

中南米諸国、特にブラジルからの定住者が多い地域に対して、選択的に対策を検討する必要があると考えられ、三浦班員と協同し、静岡、浜松、埼玉、群馬・太田及び名古屋 (実施予定) において、血液センター職員及び行政のコミュニティ担当者等にシャーガス病の意見交換会を兼ねた研修会を実施し、知識啓発を図った。

A. 研究目的

ウエストナイル熱等の新興感染症発生時の献血対応には、感染媒体及び感染源により献血制限の範囲、制限期間及び NAT の実施の有無などが示されている。3～11 月の期間に都道府県単位で WNV-NAT を実施することを想定し、当該試薬を確保することは、献血血液の安全確保と安定供給に一定の担保を得ることができる。

国内献血におけるシャーガス病の感染リスクを把握することは、南米からの定住者が約 40 万人ともいわれる日本において、献血血液の重要な安全対策上の課題と言える。献血申込者の居住歴の問診事項から、国内での献血申込及び献血状況を把握し、措置を講ずる必要性のある対象の絞り込みを行い、選択的対策の一助とする。

B. 研究方法

血液管理センターに備蓄している WNV-NAT 試薬が、都道府県単位で 1 ヶ月間実施可能であることを 2009 年の献血状況を参考に確認した。また、血液管理センターにおける WNV-NAT 実施手順案を作成した。

中南米諸国の居住歴を有する 2006 年～2008 年の献血申込者数及び 2008 年の献血者数を血液事業統一コンピュータシステムより抽出し集計・解析した。

C. 研究結果

昨年度に引き続き、WNV-NAT 試薬 (Procleix® WNV Assay) を 5000 テスト分血液管理センターに備蓄している。これは、20 プールで検査を実施した場合、約 95,000 検体の検査が実施可能である。2009 年の都道府県別の献血者数で最も多いのは東京都の 613,127 人であり、1 ヶ月平均が約 51,000 人、1.8 ヶ月間実施可能な量である。

本試薬は TMA 法の試薬であり、現在のところ測定機器を保有しているのは京都府福知山市の血液管理センター及び東京都江東区の中央血液研究所（現在は東京都赤十字血液センターへ機器を移設）である。HBV、HCV、HIV の 3 ウイルスクリーニング NAT に先立ち WNV-NAT を実施す

るための手順書案を作成した。

シャーガス病の感染リスクのある中南米諸国の居住歴を有する 2008 年の献血申込者数及び献血者数を集計した。その数は 21 ヶ国・地域で献血申込者数 9,435 人、献血者数 7,709 人であり、献血申込者の 82% が献血していた。その内ブラジル居住歴を有する者は、献血申込者数 4,572 人、献血者数 3,752 人であり、いずれも全体の約半数を占めた (表 1)。中南米居住歴者の都道府県別の献血者数では、愛知県の 960 人が最も多く、以下、東京都 953 人、神奈川県 711 人、大阪府 493 人、埼玉県 491 人、静岡県 481 人と続いた (図 1)。ブラジル居住歴者の都道府県別の献血者数では、愛知県の 560 人が最も多く、以下、東京都 413 人、静岡県 365 人、神奈川県 295 人、埼玉県 240 人、大阪府 213 人の順であった (図 2)。ブラジル居住歴者の男女別年代別の分布では、男女比は 2.8:1 と男性の方が多く、男性では 30 代、女性では 20 代がピークとなり他の年代より多かった。全体では 30 代以下が 64%、40 代以上が 36% であり、シャーガス病感染リスクの比較的低いと考えられる若い世代が多く献血している状況が窺えた (図 3)。

2006 年～2008 年の献血申込者 1 万人当たりのブラジル居住歴者数は、全国平均では 2006 年 5.1 人、2007 年 5.6 人、2008 年 7.4 人と、2008 年は増加傾向を示した。都道府県別では、静岡県が最も多く、2006 年 20.2 人、2007 年 20.3 人、2008 年 27.2 人であり、続く愛知県は 2006 年 12.6 人、2007 年 15.3 人、2008 年 20.5 人であった。その他三重県、岐阜県、長野県も多く、頻度としては東海地域に偏在している状況が窺えた (図 4)。

中南米諸国、特にブラジルからの定住者が多い地域に対して、選択的に対策を検討する必要があると考えられ、三浦班員と協同し、静岡、浜松、埼玉、群馬・太田及び名古屋 (実施予定) において、血液センター職員及び行政のコミュニティ担当者等にシャーガス病の意見交換会を兼ねた研修会を実施し、知識啓発を図った。

D. 考察

WNV-NATの実施体制の準備を進めるうえで、発生時に迅速に対応するためには、4カ所の NAT センターいずれでも実施可能な TaqMan PCR 法の試薬の検討も必要であると考えられる。また、WNV の国内での発生について、厚生労働省及び国立感染症研究所と情報共有しておくことが重要である。

シャーガス病はサシガメが媒介して感染する *Trypanosoma cruzi* 感染症である。日本では媒介虫が生息していないことから、感染者の献血血液の輸血のほか新たなリスクはないと見てよい。現在のところ、日本では輸血を介してシャーガス病に感染したとの事例は報告されていない。南米からの定住者が約 40 万人ともいわれる中で、シャーガス病に関する献血問診上の取り扱いは、海外渡航歴に関連して、中南米諸国の場合、「シャーガス病の既往歴のある者から採血しないこと」としている。しかし、感染者自身も無症候期には自覚していないことから、実際にはシャーガス病の既往歴を申告する者はいないと考えられる。現状においては、日本語を十分に理解していない外国人は献血に協力することは困難なことから一定のバリアとなっている可能性があり、また、中南米の一部地域はマラリア流行地と重なることなどから、献血申込者のうち 18% は採血不可となっていた。

2008 年に中南米居住歴を有する献血者が年間 7,700 人いることが明らかとなった。その約半数がブラジル居住歴を有する献血者であった。その献血者の年齢分布では、感染リスクの低いと考えられる 30 代以下の若い世代が約 2/3 を占めていた。

以上のような状況から、日本における輸血を介した感染リスクは低いと考えられるが、中南米居住歴を有する献血者の中に、*T. cruzi* キャリアが存在する可能性は否定できない。

愛知県、静岡県など東海地域にブラジル居住歴を有する献血申込者が偏在していることから、これらの地域で、中南米居住歴を有する献血申込者に対して、パイロットスタディとしてシャーガス病に関する事前問診項目、倫理面に配慮した *T. cruzi* 抗体検査など具体的な検討を行う必要があると考えられた。

E. 結論

日本における輸血を介したシャーガス病感染リスクは低いと考えられるが、中南米居住歴を有する献血者の中に、*T. cruzi* キャリアが存在する可能性は否定できない。今後、中南米からの定住者が多い地域において、中南米居住歴を有する献血申込者に対して、選択的な対策を検討する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 中南米居住歴を有する献血申込者・献血者数(2008年)

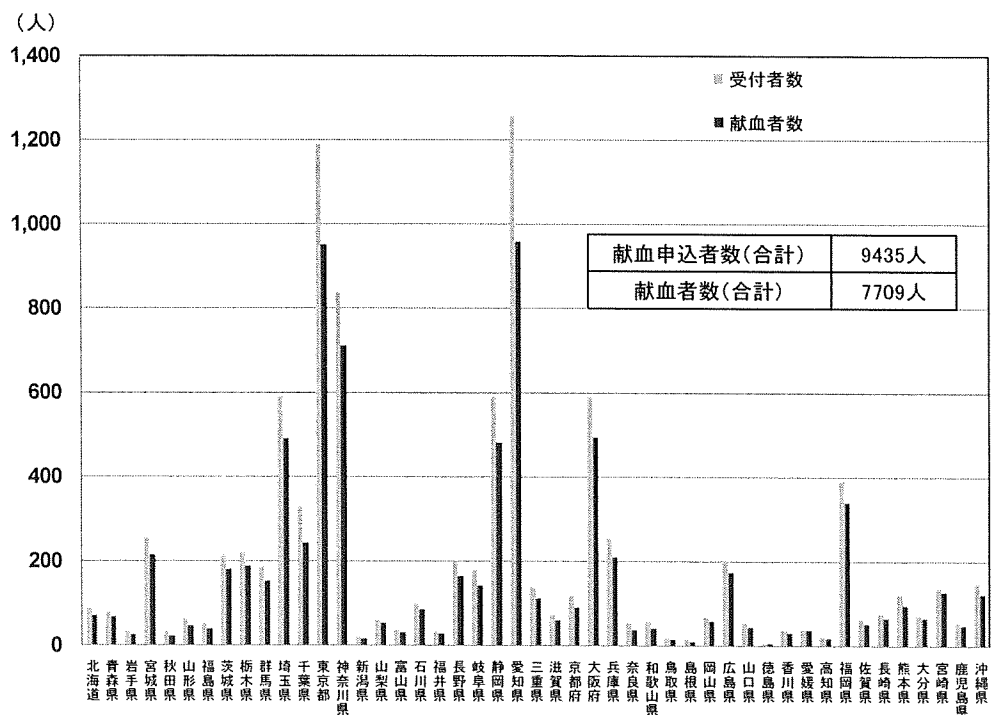
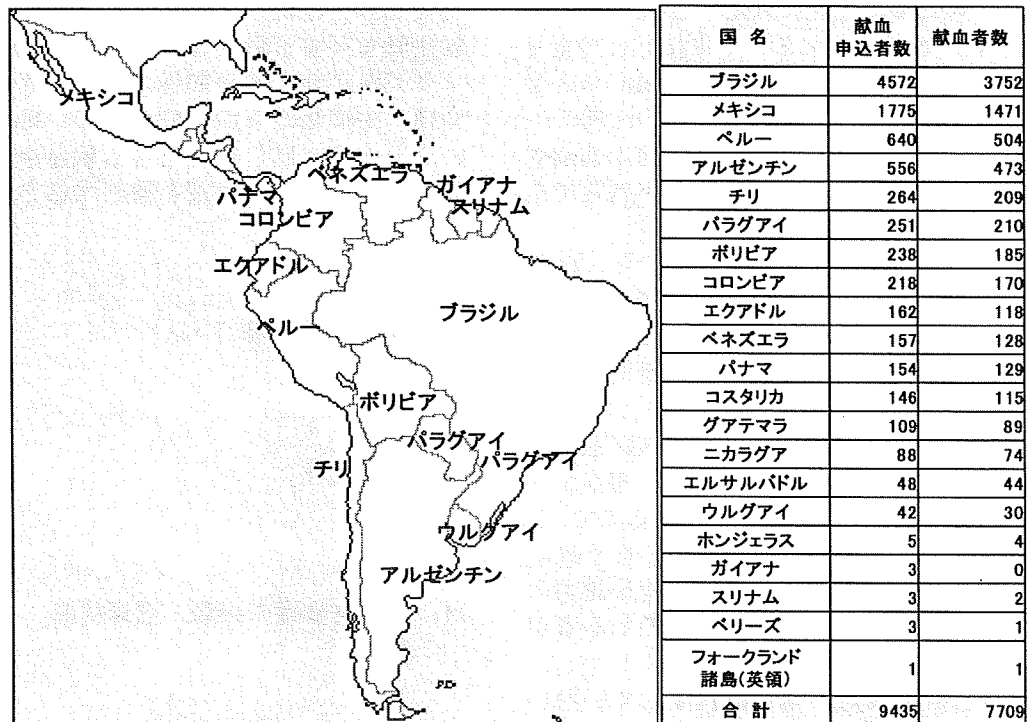
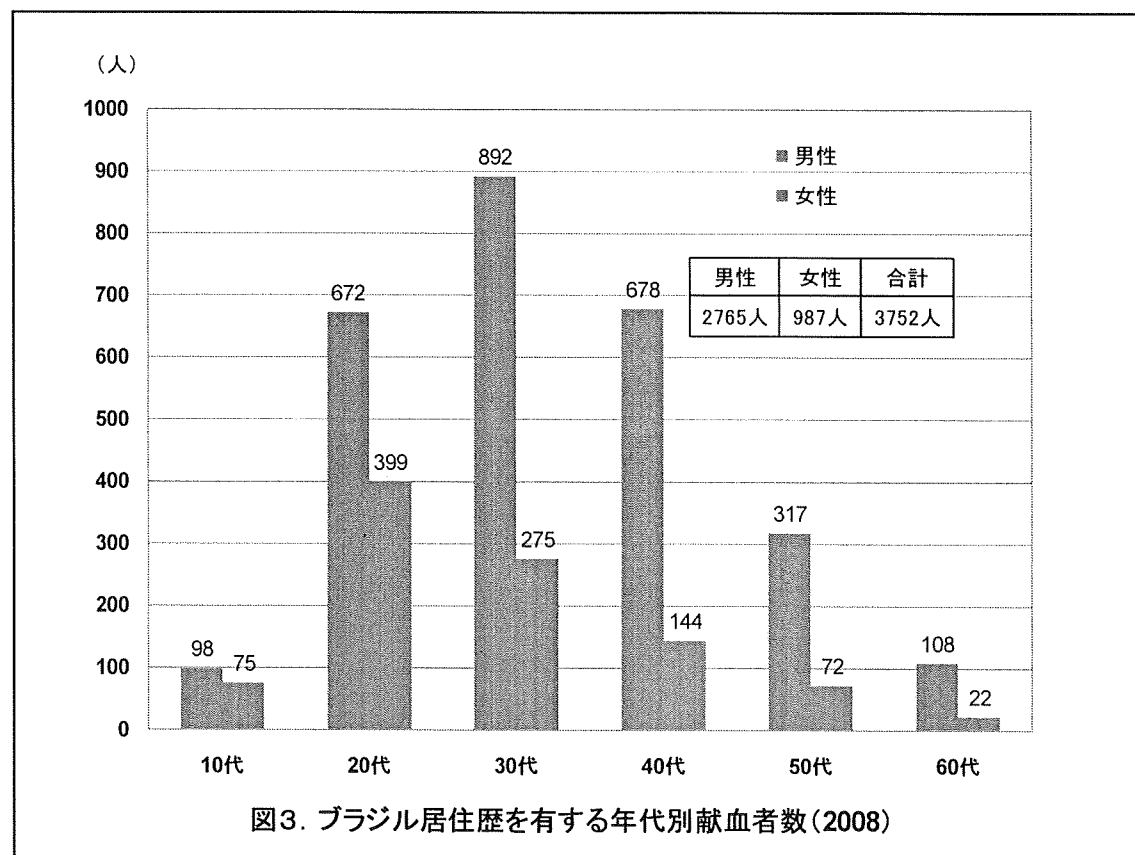
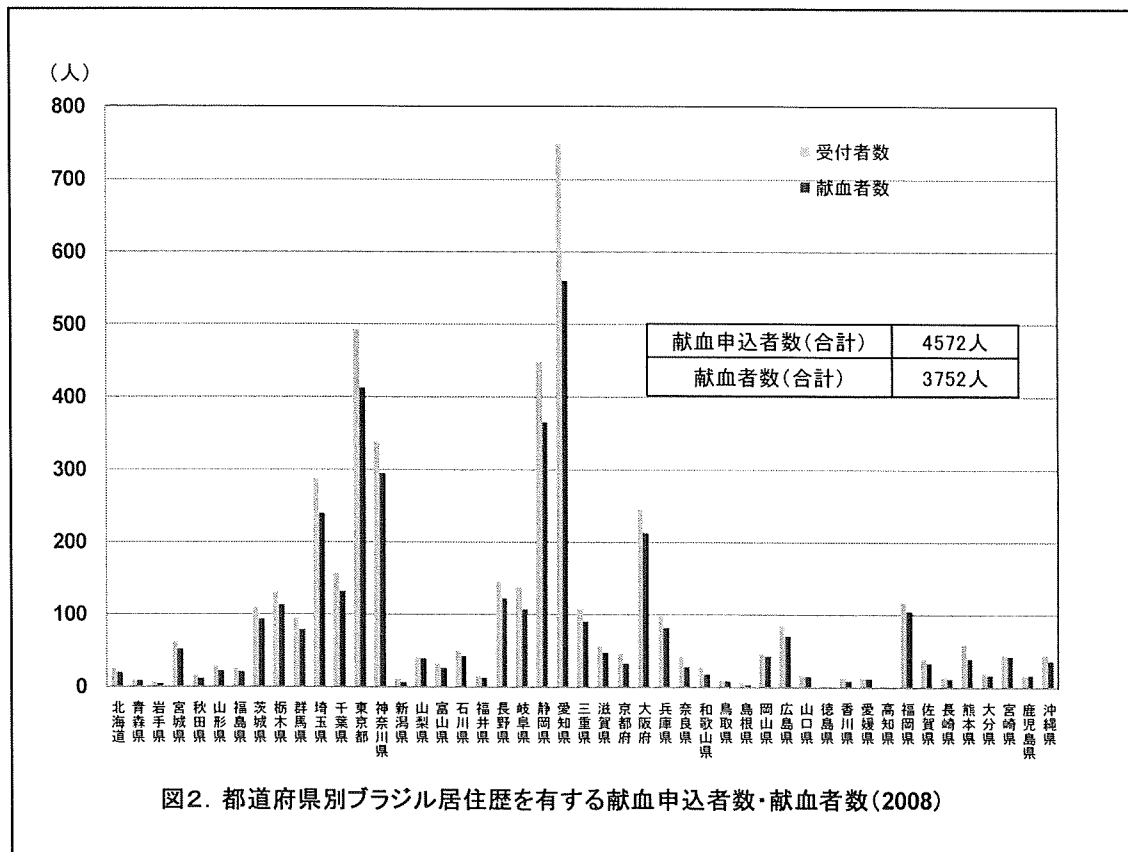
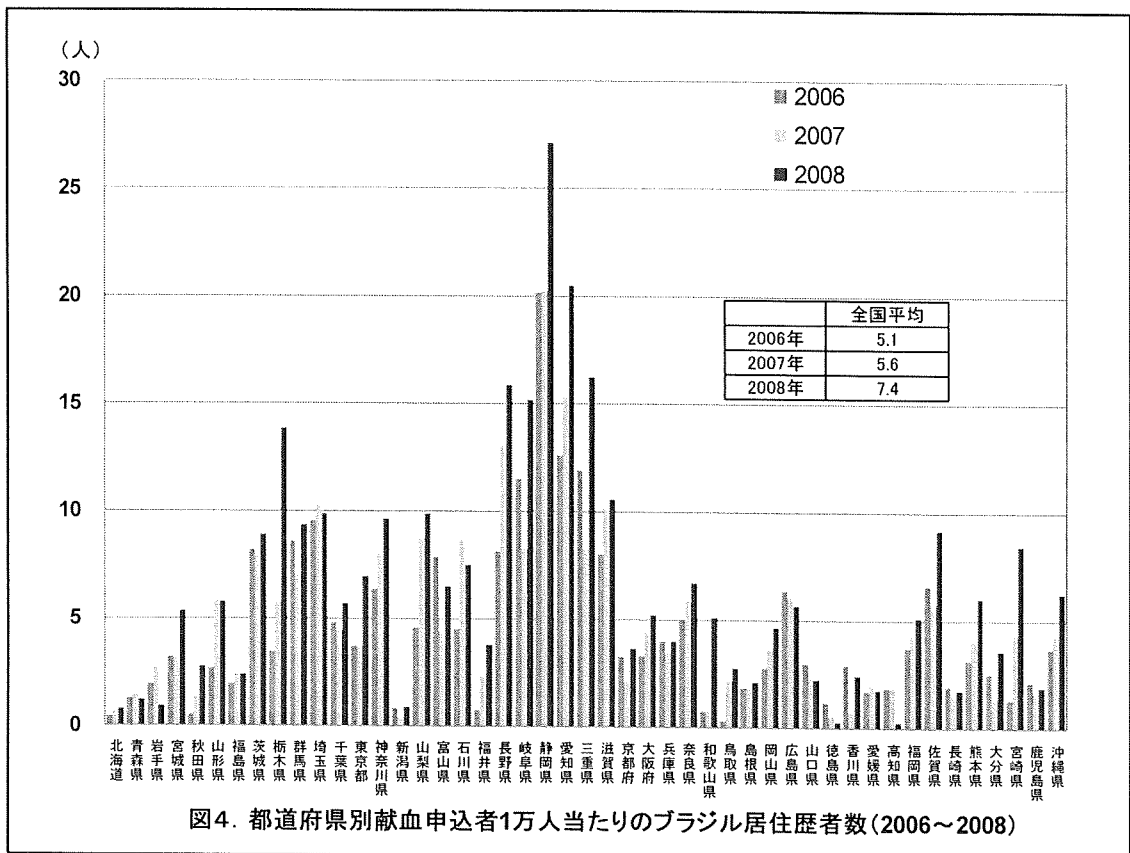


図1. 都道府県別中南米居住歴を有する献血申込者数・献血者数(2008)





厚生労働科学研究費補助金
レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「献血の安全性確保と安定供給のための新興感染症等に対する
検査・スクリーニング法等の開発と献血制限に関する研究」
分担研究報告書

献血制限に関する昆虫媒介性感染症の問題

研究分担者 小林陸生 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)
研究協力者 沢辺京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)
佐々木年則 (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)

2005 年以來のインド洋島嶼国、インド、東南アジア諸国におけるチクングニヤ熱の流行は、2009 年も東南アジアを中心に流行が続いており、我が国にも 2005 年以來 15 名の輸入症例が知られている。ウイルスの遺伝子変異によって、ヒトスジシマカ体内での増殖活性が 100 倍以上上昇し、媒介蚊体内での増殖速度も他のウイルスと比べて非常に早いことが知られている。ヒトスジシマカは哺乳動物特に人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。アカイエカの飛翔範囲に関しては、昨年の報告書でまとめ、最低で 1.2km としたが、その後の薬剤防除の効果実験等の結果から数キロは飛翔することが強く示唆された。ヒトスジシマカは 100~150m が行動範囲と言われているが、患者の行動範囲も考慮しつつ、患者宅周辺の狭い範囲に二次、三次の患者が発生する可能性を排除するために、成虫防除対策と適正な献血制限地域の設定を行うことが重要である。コロモジラミ媒介性感染症である壱塚熱は、東京都の路上生活者に寄生していたコロモジラミから遺伝子を検出したが、いまだ病原体の分離は出来ていない。抗体による鑑別診断の適切な方法が確立されていないので、今後、診断法の確立は急務である。また、大阪市など大都市での路上生活者において、どの程度壱塚熱が流行しているか実態調査が行われておらず、今後、外部寄生虫のコロモジラミ側からの調査のみならず、血清疫学的な調査も必要と考えられる。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルスは、我が国で現在もウイルスの活動が認められる唯一の蚊媒介性感染症である。一方、デング熱は東南アジア、中南米、南太平洋島嶼国等ではほぼ毎年のように流行しており、2008、2009 年と輸入症例が増加している。また、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は、極東ロシアでのウイルスの活動が野鳥の特異的抗体の調査で明らかとなり、渡り鳥を通じて我が国に突発して侵入して来る可能性は否定できない。チクングニヤ熱は、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、2009 年もインドネシア、マレーシア、タイなどの東南アジア諸国を中心に流行が続いている。チクングニヤウイルスは、2006 年にレユニオン等で1個のアミノ酸が変異した株が発見され、その変異がヒトスジシマカでの増殖活性を100倍以上上昇させたことが既に報告されている。2007年にイタリア北東部で突発して流行したチクングニヤ熱は、約300人の患者が報告され、1人が死亡した。媒介蚊は、米国から輸入されたヒトスジシマカである。

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り、献血制限地区の設定が必要となる。

最近、先進国の路上生活者に寄生しているコロモジラミから塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* の遺伝子が検出、または病原体が分離された症例がフランス、米国、ロシア等で報告されている。我が国でも東京都の路上生活者から採取されたコロモジラミから同病原体遺伝子が10%(6/60 コロニー)の率で検出された。最近、大阪市のあいりん地区の病院から入手したコロモジラミから高率(60%)に塹壕熱の病原体遺伝子が検出され(未発表)、我が国においてもこのシラミ媒介性感染症が相当広範に広がっているのが示唆された。そこで、蚊媒介性感染症およびシラミ媒介性感染症の現状を把握して、感染症ごとに輸血制限地区の設定を行うための基礎的研究事業として本研究を行った。

B.研究方法

チクングニヤ熱の流行を想定し、媒介蚊であるヒトスジシマカの分布、幼虫発生場

所、成虫密度に関する情報を整理し、幼虫および成虫の防除対策の範囲を考慮して、献血制限地区の設定の問題を考察する。特に、チクングニヤ熱とウエストナイル熱の媒介蚊から見た違いをまとめて考察した。コロモジラミ媒介感染症に関しては、東京都の路上生活者から入手したコロモジラミの分析結果、最近の大阪市の路上生活者からの得たコロモジラミの検査結果を踏まえて、都市部における塹壕熱の流行状況をどのように調査するか考察した。

(倫理面への配慮)

直接的なヒトの検体は調査対象になっていないが、外部寄生虫であるコロモジラミは入手している。病院からの検体は、匿名化した形で入手しており、倫理面で配慮している。なお、感染症の疫学調査等は行っていない。

C. 研究結果 及び D.考察

インド洋島嶼国、インド、東南アジアでのチクングニヤ熱の流行状況、輸入症例の推移等を調査し、2005年からどのような広がり方をしてきた、発症患者の確定および推定数を ProMed 情報、関係国の感染症情報等で収集し、図1にインド洋島嶼国、インド、スリランカ、東南アジアにおけるチクングニヤ熱の流行の広がり、患者発生数等をまとめた。流行の流れからすると、レユニオン島で確認されたウイルスの変異株が東南アジア地域でも確認されていることから、ネッタインマカ以外にヒトスジシマカが関わる広範な流行が起こっていることが示唆された。実際、我が国での輸入症例の患者から分離されたウイルス株においても、一部変異株が確認されている(未発表情報)。

また、チクングニヤウイルスは、蚊体内での増殖速度が著しくはやく(表1)、

感染後2日目には唾液腺にウイルスが確認されている。その意味で、デング熱や日本脳炎ウイルスと相当ことなるウイルスであることが示された。チクングニヤの媒介蚊は、我が国では青森県以外の東北以南の地域に広く分布するヒトスジシマカである。都市部の公園、墓地、戸建て住宅の庭などで朝方から夕方まで執拗に吸血するヤブカで、密度が高い場所では、8分間吸血飛来してきた雌成虫を捕虫網で捕集すると20-50頭捕集される環境が存在する。その意味で、チクングニヤ熱患者の居住環境によっては、容易にウイルスを取り込み、近隣の住人に感染を起こすことが予想される。我が国にチクングニヤウイルスが侵入し、患者が複数発生した場合、速やかに成虫防除対策を実施し、患者の行動調査を的確に行って、防除対象地域を設定する必要がある。媒介蚊の飛翔(行動)範囲が狭い事から、献血制限は限られた地域に限局できると考えられる。

コロモジラミ媒介性感染症である塹壕熱は、1990年代に、先進諸国の路上生活者から採取したコロモジラミから検出され、我が国においても1999年から主に豊島区の路上生活者対策で入手したコロモジラミから塹壕熱の病原体である *Bartonella quintana* の遺伝子が検出された。路上生活者におけるコロモジラミの感染率は2.6~14.2%(平均6.4%)と報告されているが(表2)、実際は10%を越えているのではと推測されている。1999年から2004年までの6年間に採取されたコロモジラミ60コロニーの内6コロニー(10%)から塹壕熱病原体の遺伝子が検出された。コロモジラミに実験的に塹壕熱病原体を感染させ、その後排泄物中の菌数を調べたところ、1週間後には100万以上の菌が排泄されることが明らかとな

り(図2)、1匹の感染コロモジラミから糞を介して容易に感染が起こることが示唆された。この *B. quintana* は人の赤血球内で増殖することが知られており、輸血によって感染する可能性がある。我が国における塹壕熱の罹患率を全国規模で調査する必要性があり、血清抗体による診断および赤血球や血餅からの *Bartonella* 遺伝子の検出法の確立が急務と考えられる。

E. 結論

ヒトスジシマカの飛翔範囲は、100~150mほどと狭く、ウイルスを持った蚊が広範囲に分散することはない。患者が確認された場合、早急に周辺での成虫防除を行うことが必要で、感染拡大を狭い範囲で封じ込めることが重要である。その意味で、輸血制限範囲も患者の行動範囲を考慮しつつ狭い範囲で設定できると考えられる。

塹壕熱に関しては、路上生活者に寄生しているコロモジラミから *Bartonella quintana* の遺伝子を検出した(10%, 6/60コロニー)。 *B. quintana* は人の赤血球内で増殖することが知られている。路上生活者等の罹患率を遺伝子の検出または特異的な抗体(IgM, IgG)の保有によって、全国規模で路上生活者等を調査する必要があり、それらの疫学データを元に、輸血によって感染する可能性のある疾患として注視する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 関なおみ、小林陸生 インターネットリサーチを利用したアタマジラミ症の

実態調査なし

Medical entomology and zoology 60(3)
225-231, 2009

2) Sawabe K, Tanabayashi K, Hotta A,
Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Yamada A,
Kurahashi H, Shudo C, Kobayashi M.
Survival of avian H5N1 influenza A
viruses in *Calliphora nigribarb*

(Diptera: Calliphoridae). J Med
Entomol. 46(4):852-5, 2009.

3) Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Sawabe
K, Kobayashi M. Isolation and
characterization of a new insect
flavivirus from *Aedes albopictus* and
Aedes flavopictus mosquitoes in Japan..
Virology. 15;391(1):119-29, 2009

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

図1 2005年以降の世界のチクングニヤ熱の流行とヒトスジシマカの分布

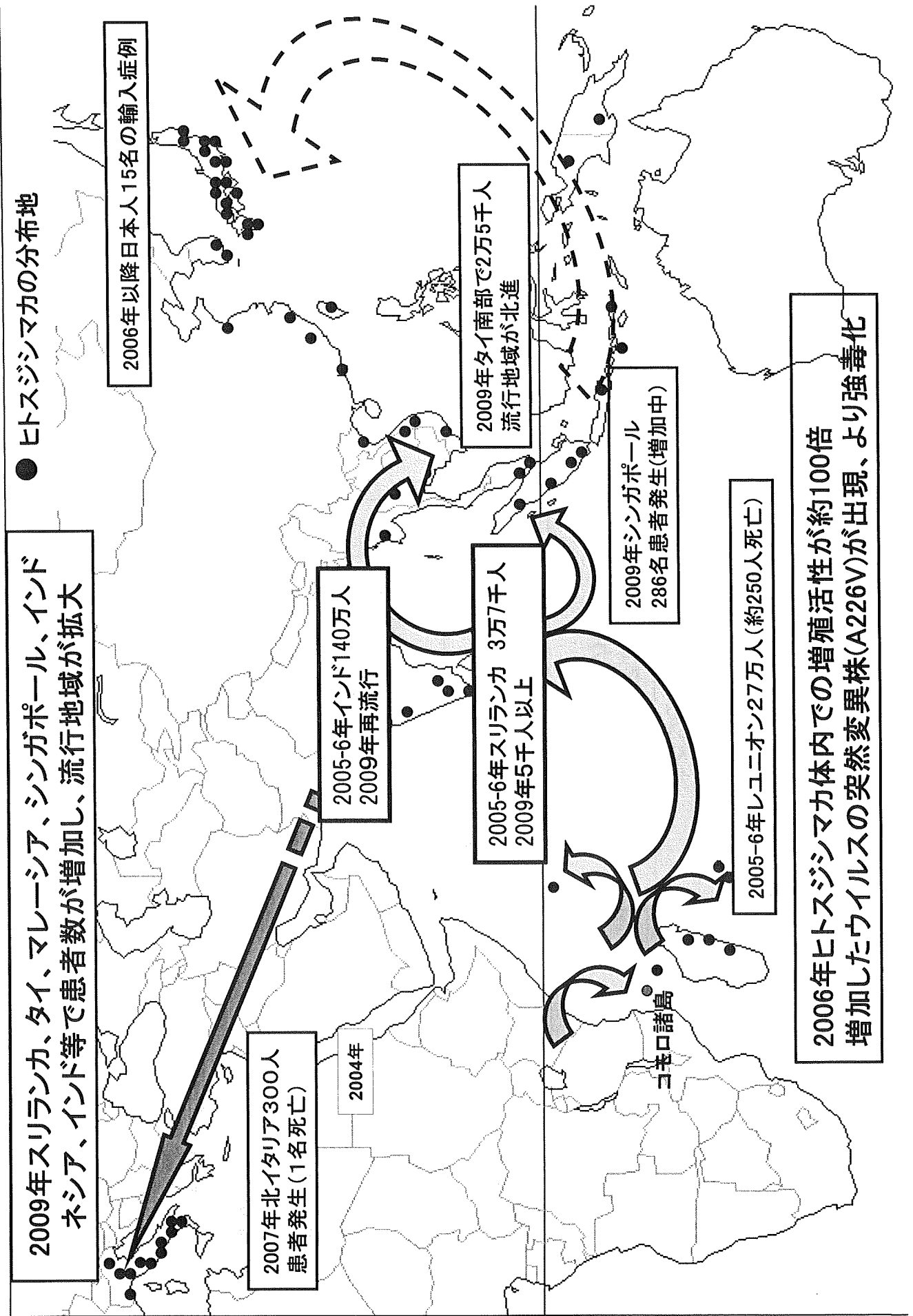


表1 チクングニヤおよびウエストナイルウイルスの生物学のおよび疫学的特徴の比較

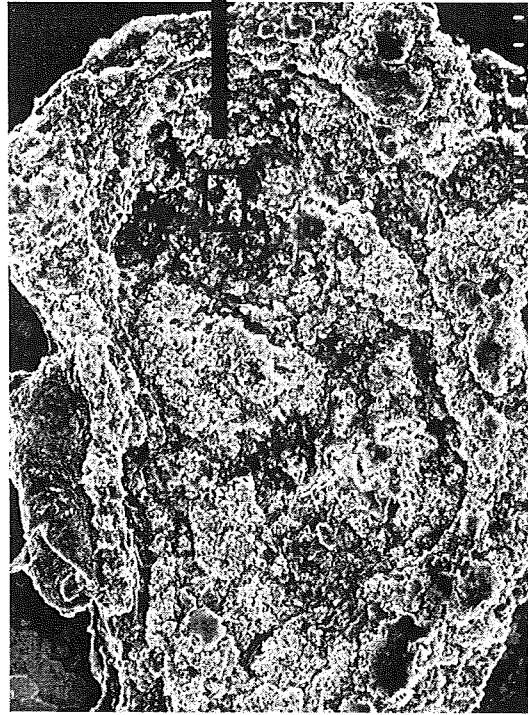
	チクングニヤ熱	ウエストナイル熱
媒介蚊	ヒトスジシマカ ネッタイシマカほか	アカイエカ チカイエカ ヒトスジシマカほか
蚊体内でのウイルスの増殖速度	早い (患者吸血後2日目から唾液腺で検出される)	遅い (唾液腺で7-10日目から検出される)
流行におけるヒトの重要度	高い (ヒトでのウイルス血症は発症後2-6日ほど持続する)	低い (ヒト, ウマは終末宿主) 輸血の場合には重要
患者発生の広がり	局所的 (媒介蚊の飛翔範囲が狭い)	広域的 (野鳥, 媒介蚊の飛翔範囲が広い)
成虫防除の緊急性	高い	高い
成虫防除の有効性	高い	低い
幼虫防除の対象範囲	狭い	広い

表2 ホームレスにおけるコロモジラミの寄生率

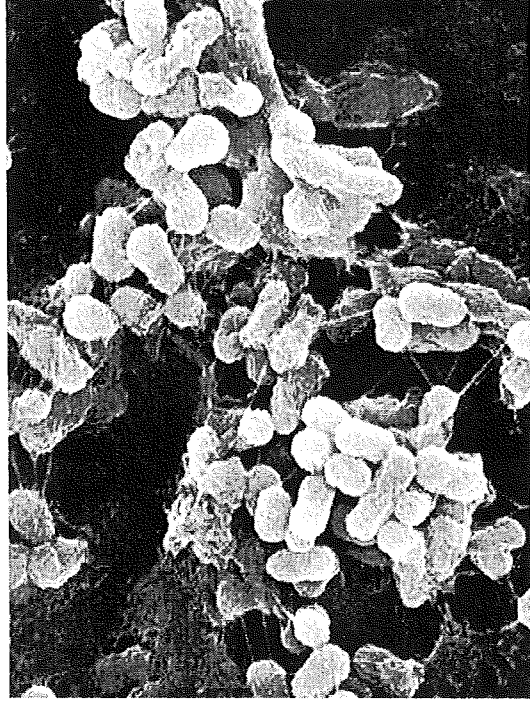
	No. of checking	No. of positive	Infestation rate
1999			
May	78	4	5.1
October	75	2	2.6
January	60	2	3.3
February	24	2	8.3
2000			
May	84	12	14.2
October	54	3	5.5
January	45	2	4.4
February	25	2	8.0

(Ikebukuro Health Center, Toshima)

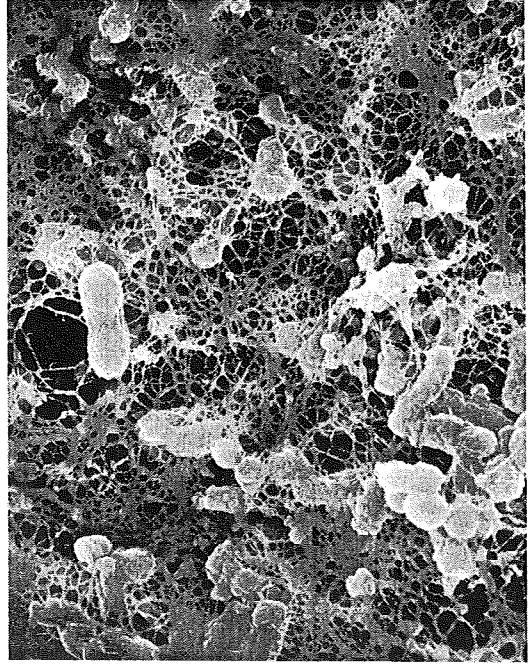
図2 実験感染コロモジラミの糞に見られる *Bartonella quintana*



感染後17日目のコロモジラミの糞



感染コロモジラミの糞の拡大図



メッシュ構造をしめしている 塹壕熱病原体

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・研究生)

迅速、高感度かつ簡便に感染性ウイルスを検出できる新規フラビウイルス検出方法の開発を目指し、デングウイルスレポーターミニゲノムクローンを作製した。さらに本クローンのマイナス鎖 RNA を導入した細胞よりルシフェラーゼ活性が検出できたことから、レポーターミニゲノムのマイナス鎖が合成されればルシフェラーゼ活性により検出可能であることが示唆された。次にレポーターミニゲノムのプラス鎖 RNA とデング 1 型ウイルスレプリコン RNA を共導入しルシフェラーゼ解析を行なったが、活性は検出されなかった。

マウス個体内で良好に増殖可能なデングウイルスを得ることを目標とし、最初にデング 1 型ウイルスと日本脳炎ウイルスとの間でマウス肝癌 Hepa1-6 細胞への感染能を比較した。日本脳炎ウイルスに比べると顕著に低いレベルながら、ウイルスの増殖を確認できた。また磁気粒子ウイルス導入試薬により、両ウイルスの Hepa1-6 細胞への感染性が約 10 倍増加することがわかった。

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し、昨年引き続きレポーターミニゲノムクローンの構築を試みた。

日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルスなどの同類のフラビウイルスに比べ、デングウイルスはマウスに対する毒性が非常に低く、in vivo で

の病原性解析が困難である。このことが病態解析やワクチンや抗ウイルス薬の開発を遅らせている一因となっている。毒性が低い理由として、マウス個体内でのデングウイルスの増殖性に低さが挙げられる。そこでこの低増殖性を克服することを目的とし、今回はマウス肝癌由来培養細胞 Hepa1-6 を用いて、デング 1 型ウイルスの増殖性を日本脳炎ウイルスと比較した。さらに磁気粒子ウイルス導入試薬を用いて Hepa 1-6 細胞への感染性が改善されるかを調べた。

B. 研究方法

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)。塩基配列を確認後、本プラスミドを鋳型として T3 および T7 プロモーターを利用した *in vitro* 転写法によりプラス鎖およびマイナス鎖ミニゲノム RNA を合成した。合成した RNA は lipofectamine 2000 を用いて Vero 細胞にトランスフェクトした。7 時間および 24 時間で細胞抽出液を調製しルシフェラーゼ活性を測定した。また *in vitro* 転写法で合成したマイナス鎖ミニゲノム RNA および昨年度作製したデング 1 型ウイルスレプリコン RNA (R3 および R4) を Vero 細胞にトランスフェクトし、8 時間後に細胞抽出液

を得、ルシフェラーゼ活性を測定した。

マウス肝癌由来株化細胞である Hepa1-6 細胞を 6 ウェルプレートにまき、翌日にデング 1 型ウイルス (NIID02-20 株) および日本脳炎ウイルス (Mie/41 株、Beijing-1 株) を接種した。また一部については、接種前に磁気粒子ウイルス導入試薬 ViroMag を $2\mu\text{l}$ あるいは $10\mu\text{l}$ 加え 4°C で 10 分間インキュベート後接種した。接種後 30 分間インキュベータ内で細胞をマグネット上に静置した。培養上清を定期的に回収し、感染性ウイルスの量 (感染力価) を Vero 細胞を用いたプラーク形成法により評価した。

C. 研究結果

1) 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 (5CsLIas3s) をコードするプラスミドを研究方法で示した方法で作製した (図 1)。本プラスミドクローンより、プラス鎖およびマイナス鎖ミニゲノムを合成し Vero 細胞へ導入したところ、マイナス鎖において 7 時間後で高いルシフェラーゼ活性が検出された (図 2)。一方プラス鎖では活性は検出されなかった。次にウイルス複製蛋白質供給用で昨年度作製したデング 1 型ウイルスレプリコン (R3 および R4、図 3) とマイナス鎖ミニゲノム RNA を細胞に共導入しルシフェラーゼ活性を測定した (図 4)。しかしレプリコン RNA 量依存的な活性の上昇は観

察されなかった。

2) マウス肝癌由来 Hepa1-6 細胞への デング1型ウイルスおよび日本脳炎ウ イルスの感染

はじめに Hepa1-6 細胞内でデング1型ウイルスおよび日本脳炎ウイルスが増殖可能かを調べるため、本細胞に両ウイルスを接種した(図5)。日本脳炎ウイルスでは、感染当日に比べ6日目での感染性粒子数が上昇していたが、デング1型ウイルスでは低下していた。次にデング1型ウイルスを磁気粒子ウイルス導入試薬 ViroMag で処理後 Hepa1-6 細胞に接種した(図6)。感染後3日目および6日目でのウイルス力価は0日目に比べ徐々に低下していった。次にもう1度、今度は日本脳炎ウイルスも加えて1日目、2日目および4日目での上清中のウイルス力価を調べた(図7)。すると、デング1型ウイルスでも感染後2日をピークにウイルスが増殖していることが確認できた。しかし4日目には劇的に低下し、0日目以下の力価となった。一方日本脳炎ウイルスでは感染後1-2日目かピークとなり、以降低下した。さらに、両ウイルスにおいて、ViroMagを加えることにより、感染粒子数が約10倍増加した。

D. 考察

デングウイルスのレポーターミニゲノムクローン(5CsLIas3s/pcDNA4)を作製することができた。本クローンから合成したマイナス鎖ミニゲノムRNAからルシフェラーゼが合成され

ることが確認された。このことから、マイナス鎖RNAを細胞に導入し、そこにウイルス等から複製関連蛋白質が供給されれば、ミニゲノムが複製され、ルシフェラーゼ活性が量依存的に上昇する可能性が示唆される。しかし、ウイルスの代わりにレプリコンを共導入した系では特異的な上昇は見出されなかった。しかしこれはレプリコンからの複製関連蛋白質の供給が不十分であった可能性がある。この問題を解決するためには、感染性ウイルスを用いるのが最も適当であるが、遺伝子組換え実験(大臣確認実験)になり、時間を要する。そこで来年度は、シス配列として複製に必要なゲノムの領域を調べる実験を行う予定である。

マウスを用いてデングウイルスの病原性解析は行なわれているが、日本脳炎ウイルスやウエストナイルウイルスの場合とは異なり、特殊なマウス(免疫不全に近いマウス)の使用や、マウス脳に馴化したウイルスの使用、高力価のウイルスを接種するなどする必要はある。我々は比較的容易な方法で、脳以外のマウスの組織に馴化したデングウイルスを分離を試みるため、今回はマウス肝癌由来細胞を用いて感染実験を行った。その結果、日本脳炎ウイルスに比べると感染能は非常に低いものの、ウイルスの増殖が確認できた。つまり全く増殖できないのではなく、増殖しにくいことを意味するため、継代することにより本細胞に馴化したウイルスが得られる可能性がある。今後本細胞を用いてデング1

型ウイルスの継代を続けてゆく予定である。さらにその際、5-FU などの変異誘発剤や、今回感染能を増大させた ViroMag など活用してゆく予定である。

E. 結論

デング1型ウイルスレポーターミニゲノムクローンを作製した。またこれから合成されたマイナス鎖 RNA がレポーター活性を有することを確認した。しかし、ウイルス検出系として機能しうるかはまだ確認できていない。

デング1型ウイルスがマウス肝癌由来培養細胞 Hepa1-6 細胞で増殖可能であることを確認した。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

論文発表 (英文)

- 1) Takasaki, T., Kotaki, A., Lim, C.-K., Tajima, S., Ohmatsu, T., Moi, M.-L., and Kurane, I. Arbovirus infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J. Disaster Res.* 4: 322-328, 2009.
- 2) Tajima, S., Nerome, R., Nukui, Y., Kato, F., Takasaki, T., and Kurane, I. A single mutation in the Japanese encephalitis virus E protein (S123R) increases its growth rate in mouse neuroblastoma cells and its pathogenicity in mice. *Virology*, 396:

298-304, 2010.

論文発表 (和文)

- 1) 田島茂、高崎智彦。日本脳炎。診断と診療、97(10)2097-2100, 2009.

学会発表

- 1) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの性状解析。第44回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (平成21年6月)
- 2) 加藤文博、田島茂、小滝徹、司馬肇、細野邦昭、高崎智彦、倉根一郎：3' NTR 内に欠失・挿入変異を有する組換え日本脳炎ウイルスの増殖性および病原性解析。第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月)
- 3) 田島茂、加藤文博、高崎智彦、倉根一郎：ウイルス性状を左右する日本脳炎ウイルス E 蛋白質上のアミノ酸置換。第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月)
- 4) 田島茂、高崎智彦、倉根一郎：デング1型ウイルス非構造蛋白質 NS4A のN末端側領域の解析。第57回日本ウイルス学会学術集会 (平成21年10月)
- 5) 高崎智彦、小滝徹、田島茂、大松

勉、林昌宏、倉根一郎：イノシシ末梢血からの日本脳炎ウイルスの分離と性状解析。第57回日本ウイルス学会学術集会(平成21年10月)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし