

B. 研究方法

1. PCR法を用いた *Histoplasma capsulatum* 遺伝子の検出系作成.

H. capsulatum 遺伝子検出用PCR法の標的遺伝子としてM antigen 遺伝子および100-kDa 蛋白遺伝子 (Bialek R et al. J Clin Microbiol 40: 1644-7, 2002) を選択し、nested PCR法を行った。First PCRとして用いた primerの塩基配列は、Msp1F: 5'-acaagagacgacggttagcttcacg-3'、Msp2R: 5'-accagcggccataaggacgctc-3'であり、アニーリング温度60°C、サイクル数40にて反応を行った。次にnested PCRとして、first PCRの反応液10 µlを供し、Msp2F: 5'-cgggccgcttaacagcgcc-3'、Msp3R: 5'-ataaggacgctcacgaagggc-3'を用いて上記と同様の条件で増幅を行った。100-kDa 蛋白質遺伝子に関しては、HcI: 5'-gcttccgagcctccacctaac-3'、HcII: 5'-atgtccatcgggcgccgtgtagt -3'をfirst PCRに、HcIII: 5'-gagatctagtcgcgccaggttca -3'、HcIV: 5'-aggagagaactgtatcggtgcttg -3'を用いた。

なお増幅産物については、direct sequence法により2本鎖両方向から塩基配列を確認した。

2. 自然環境からのヒストプラスマ属検出の検討.

日本における調査対象地域は、コウモリの生息を第一の条件として、現在まで同様の調査がなされていない地域を選定した。

タイ・チェンマイ地方の北部にあるコウモリの生息する2つの洞窟を選定した。いずれの場所においてもコウモリの堆積糞を含んだ土壌を採取して解析を行った。

a. PCR法

堆積糞と土壌をPBSに懸濁し、上清をproteinase K、Westase™ (Takara) で処理してDNAを抽出した。さらにphenol-chloroform、エタノール沈澱でDNAを精製し、PCR法に供した。

b. 真菌分離培養法

2. で採取した堆積糞と土壌をPBSに懸濁し、上清をBHI寒天培地に接種し、30°Cで8週間培養を行った。

c. マウス腹腔内接種法による分離培養法

現在までに報告されている方法 (Am J Trop Med Hyg 69: 663-669, 2003) に準じて行った。3. と同様に処理したPBS上清1mlを9週令、メスのICRマウス腹腔内に接種した。接種後8週目にマウスを屠殺後、肝臓、脾臓を摘出し、ホモジネートした溶液をBHI寒天培地に塗布し、30°Cで4週間培養を行った。

3. エアーサンプリング法による空中浮遊真菌検出の検討. PBI international 社製のSASスーパー100 エアーサンプラーを用いて、1地点あたり200L、50Lの2点法で大気中空中浮遊真菌の検出の検討を行った。

なお、上記検討はわが国で採取した検体については国立感染症研究所で、タイで採取された検体はチェンマイ大学微生物学教室で、双方同じプロトコルを用いて検討した。

C. 研究結果

1. 自然環境からのヒストプラスマ属検出の検討

(日本で採取された検体での検討)

調査対象とした地点で採取された検体のうち、平成 20 年度に 1 検体が、平成 21 年度に行った 2 回目のサンプル採取において 14 検体中 3 検体が M antigen 遺伝子を標的とした PCR 法で陽性を示した。

さらに、この増幅産物の塩基配列を確認したところ、*H. capsulatum* の遺伝子と 98% の一致率であった。一方、100-kDa 蛋白遺伝子を標的とした PCR 法では先の 4 検体のうち 1 検体が陽性を示し、塩基配列の確認で、*H. capsulatum* の遺伝子と 99% の一致率が認められた。また、この PCR 法の結果は違う日に処理した検体からも再現性をもって認められた。

(タイで採取された検体での検討)

今回の検討では、Chiang Dao Cave、Pha Dang Cave の 2 か所から、複数のコウモリの堆積糞を含む土壌検体が採取された。Chiang Dao Cave の検体では 21 検体中 4 検体が、Pha Dang Cave の検体では 28 検体中 3 検体が M antigen 遺伝子、100-kDa 蛋白遺伝子を標的とした両 PCR 法で陽性を示した。また増幅産物の塩基配列は *H. capsulatum* のそれぞれの遺伝子と 95~98% の一致率が確認された。

2. 環境サンプルからの in vitro *H. capsulatum* 分離培養法

H. capsulatum 検出用 PCR 法が陽性であった検体の PBS 懸濁液上清を 1 検体あたり約 60 枚の BHI 寒天培地に接種したが、*H. capsulatum* の発育は観察されなかった。また、タイで採取された検体を用いた分離培

養でも菌の発育は認められなかった。

3. マウス腹腔内接種法による分離培養法

日本で採取された検体のうち、PCR 法が陽性を示した検体のみを供試した。1 検体当たり 3 匹のマウスの腹腔に懸濁液上清を接種したが、現時点まで明らかな *H. capsulatum* の発育は認めていない。なお、タイのサンプルについては現在接種が終わり、検討を継続している。

D. 考察

調査対象地域としてはコウモリの生息を第一の条件として、現在まで同様の調査がなされていない地域とした。今回の検討では、PCR 法のみではあるが、ヒストプラスマ属特異的な 2 種類の PCR 法で陽性結果が得られるなど、ヒストプラスマ属が日本でも生息しているのは確実であろうと考えている。我々の結果は、客観的なデータにより、ヒストプラスマ属が日本の環境中に生息している可能性を示したはじめての報告となるものである。一方、我々の検討では未だ培養での菌体の証明はできていないが、検体中の菌の生死や、活動性が関与していると考えられる。またマウスの腹腔内接種法による培養法も、マウスの免疫能によって排除された可能性も否定できないため、今後改良した方法で実験を行う予定である。またタイで採取された検体を用いた検討でも、日本での検討と同様、PCR 法では陽性が得られたが、分離培養法では菌体の証明が困難であったことは、本菌の培養の難しさを証明するとともに、PCR 法の有用性を示す結果であろうと考える。

タイ・チェンマイ地域では毎年4~6名程度の培養陽性のヒストプラズマ症が発生しているが、培養陽性率は極めて低いことを考慮すると実数は数十例の患者が発生していると推測されるが、感染源について検討した報告はない。我々の検討から、これらヒストプラズマ症の感染源としてコウモリの堆積糞がリザーバーとして関与していることが示され、今後この地域での対策に貢献できるものと考えらる。

我々の検討結果は公衆衛生学的にも極めて重要な課題となる可能性があるため、今後更なる検討が加えられることを期待する。

E. 結論

1. 地球温暖化により問題となる真菌症と考えられるヒストプラズマ症について、ヒストプラズマ属の日本における生息を調査した結果、菌の発育は認められなかったが、ヒストプラズマ属特異的 PCR 法にて *H. capsulatum* と高い相同性を有する増幅産物が得られ、わが国でのヒストプラズマ属の存在が示唆された。
2. タイにおけるヒストプラズマ症の感染源について、コウモリの堆積糞がリザーバーとして関与していることが推測された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kohno S, Izumikawa K, Ogawa K, Kurashima A, Okimoto N, Amitani R, Kakeya H, Niki Y, Miyazaki Y; Japan Chronic Pulmonary Aspergillosis Study Group (JCPASG). Intravenous micafungin

versus voriconazole for chronic pulmonary aspergillosis: a multicenter trial in Japan. *J Infect.* 61(5):410-8, 2010.

2. Kaneko Y, Ohno H, Kohno S, Miyazaki Y. Micafungin alters the expression of genes related to cell wall integrity in *Candida albicans* biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 63:355-357, 2010.
3. Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and *Crz1* in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 54(4): 1639-43, 2010
4. Miyazaki T, Inamine T, Yamauchi S, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Role of the Slr2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 10(3):343-52, 2010
5. Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-Candida-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90-related stress responses. *Med Mycol.* 48(4):606-12, 2010.
6. Hoshino Y, Fujii S, Shinonaga H, Arai K, Saito F, Fukai T, Satoh H, Miyazaki Y, Ishikawa J. Monooxygenation of rifampicin catalyzed by the *rox* gene

- product of *Nocardia farcinica*: structure elucidation, gene identification and role in drug resistance. *J. Antibiot.* 63:23-8, 2010
7. Ohno H, Ogata Y, Suguro H, Yokota S, Watanabe A, Kamei K, Yamagoe S, Ishida-Okawara A, Kaneko Y, Horino A, Yamane K, Tsuji T, Nagata N, Hasegawa H, Arakawa Y, Sata T, Miyazaki Y. An outbreak of histoplasmosis among healthy young Japanese women after traveling to Southeast Asia. *Intern Med* 49:491-495, 2010.
8. 河野 茂、二木芳人、網谷良一、小川賢二、倉島篤行、宮崎義継：肺アスペルギルス症に対する micafungin の臨床効果。日本化学療法学会誌 58, 128-139. 2010
2. 学会発表
- 1) 梅山 隆、大野秀明、棚町千代子、橋本好司、佐川公矯、田辺公一、山越 智、宮崎義継。福岡県筑後地区周辺におけるクリプトコッカス症多発発生例の疫学的検討。第 22 回日本臨床微生物学会総会、岡山 (2011 年 1 月)
- 2) 筋野恵介、樽本憲人、山口敏行、前崎繁文、大野秀明、宮崎義継。ミカファンギン低感受性 *Candida famata* および *fermentati* 血症の 3 例。第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京 (2010 年 10 月)
- 3) 田辺公一、大野秀明、山越 智、宮崎義継。タイにおける自然環境からの *Histoplasma capsulatum* の検出に関する検討。第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会、東京 (2010 年 10 月)
- 4) 金子幸弘、大野秀明、宮崎義継。抗真菌薬投与下における *Candida* バイオフィルムのキチン合成・分解酵素遺伝子発現調節。第 54 回日本医真菌学会総会、東京、(2010 年 10 月)
- 5) 若山 恵、大久保陽一郎、篠崎 稔、中山晴雄、蜜田亜希、大野秀明、宮崎義継、中谷行雄、亀井克彦、渋谷和俊。In situ hybridization を用いたヒトヒストプラズマ症の組織診断の検討。第 54 回日本医真菌学会総会、東京 (2010 年 10 月)
- 6) 山越 智、橋本ゆき、梅山 隆、田辺公一、金子幸弘、大野秀明、宮崎義継。*Aspergillus fumigatus* 分泌蛋白質 Y-1 を標的とした ELISA 検出系の構築と病原性の検討。第 54 回日本医真菌学会総会、東京 (2010 年 10 月)
- 7) 高園貴弘、泉川公一、行徳 宏、池田直樹、神田哲郎、宮崎泰可、関 雅文、掛屋 弘、山本善裕、柳原克紀、大野秀明、矢口貴志、宮崎義継、亀井克彦、河野 茂。軽症の糖尿病患者に発症した *Aspergillus udagawae* による気管支アスペルギルス症の 1 例。第 54 回日本医真菌学会総会、東京 (2010 年 10 月)
- 8) 宮崎義継、山越 智、金子幸弘、福田恵子、田辺公一、梅山 隆、大野秀明、金城雄樹。真菌感染局所におけるヒト線維芽細胞の線維化と炎症への影響。第 54 回日本医真菌学会総会、東京 (2010 年 10 月)
- 9) 田辺公一、名木 稔、山越 智、大野秀明、宮崎義継。病原真菌 ABC タンパク質と機能阻害物質との相互作用部位の検討。第 58 回日本化学療法学会総会、長崎 (2010 年 6 月)

10) 金子幸弘、今村圭文、大野秀明、河野 茂、宮崎義継。 *Candida albicans* の biofilm に対する抗真菌薬の拮抗作用に関連した Hsp90 関連ストレス応答に関する検討。第 58 回日本化学療法学会総会、長崎 (2010 年 6 月)

11) 名木 稔、田辺公一、山越 智、大野秀明、宮崎義継。病原真菌 *Candida glabrata* におけるステロールトランスポーターの機能解析。第 58 回日本化学療法学会総会、長崎 (2010 年 6 月)

12) 樽本憲人、金城雄樹、山越 智、大野秀明、宮崎義継。 *Candida albicans* の細胞壁分泌蛋白抗体による in vitro 増殖抑制効果の検討。第 58 回日本化学療法学会総会、長崎 (2010 年 6 月)

13) 宮崎義継、梅山 隆、田辺公一、大野秀明。 ヒストプラスマ等のアウトブレイク型真菌症への対策。第 31 回衛生微生物技術協議会、鹿児島 (2010 年 5 月)

14) 金子幸弘、大野秀明、河野 茂、宮崎義継。 *Candida albicans* の抗真菌薬治療抵抗性と Hsp90 関連ストレス応答。第 84 回日本感染症学会総会、京都 (2010 年 4 月)

15) 乾佐知子、中村竜也、清水千裕、奥田和之、佐野 一、中田千代、藤本弘子、大倉ひろ枝、植村芳子、田辺公一、大野秀明、宮崎義継、高橋伯夫。 *Candida*

glabrata の薬剤感受性と micafungin 低感受性株の検出について。第 84 回日本感染症学会総会、京都 (2010 年 4 月)

16) 田辺公一、大野秀明、宮崎義継。 *Candida glabrata* のステロール取り込みと病原性の関係。第 84 回日本感染症学会総会、京都 (2010 年 4 月)

20) Ohno H, Tanabe K, Kaneko K, Umeyama T, Yamagoe S, Miyazaki Y. Evaluation of two-stage PCR for diagnosis of Histoplasmosis. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore (2010 年 12 月)

21) Norkaew T, Sriburee P, Takarn P, Tharavicitkul P, Tanabe K, Ohno H, Miyazaki Y. Detection of *Histoplasma capsulatum* in soil contaminated with bat guano by nested PCR. 12th Western Pacific Congress on Chemotherapy and Infectious Diseases, Singapore (2010 年 12 月).

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

分担研究報告書

分担する研究項目：熱帯アジアにおける感染症と地球温暖化

分担研究者 我妻ゆき子 筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授

研究要旨

目的：本研究では、アジアにおける温暖化影響評価と予測のための疫学的・統計学的解析法の開発、温暖化研究ネットワーク構築と、温暖化影響解析手法の技術移転を目的とした。

方法：バングラデシュにある国際下痢症研究センターと共同研究協定を締結し、感染症発生データに関して共同研究利用承認を得た。気象データベースに関しては、バングラデッシュ気象局と京都大学防災研究所の協力を得て研究利用可能とした。異常気象現象、特に降雨や温度の変動に関して下痢症発生の時系列分析を行った。また気候変動にともなう栄養不全や小児成長への影響と感染症発生についてもデータ収集を行った。

結果：下痢症患者の発生数の20年間値からの変異には2つのピークがあり、プレモンスーンでは気温変動が、モンスーンでは異常降雨が影響していることが観察された。コレラに関する分析では、多雨と少雨の両方で閾値をもって発生が増加した。また、小児の栄養状態が気象因子と関連していることが示唆された。

まとめ：気象因子の変異は、病原微生物の増殖、人への暴露状況、人の栄養状態や免疫機能の変動を伴って、これらの現象を起こしているものと考えられる。疾病発生や病原微生物等の増殖に関わる因子について、気候変動との関連を明らかにする更なる研究が必要とされる。

A. 研究目的

これまでバングラデッシュでは、コレラの発生とベンガル湾の海水温の上昇などについて、特定の数年間についての研究は報告されてきたが、地上気象因子の変動との長期的関連をみる研究はなかった。

本研究では、アジアにおける温暖化影響評価と予測のための疫学的・統計学的解析法の開発、温暖化研究ネットワーク構築と、影響解析手法の技術移転を目的とした。

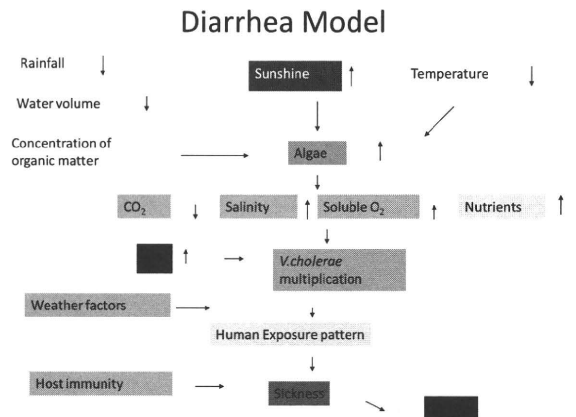
B. 研究方法

はじめに、バングラデッシュにおける地上気象因子が下痢疾患発生数に及ぼす影響について、気象データベースと疾病発生データベースを作成し、過去20年間にわたる量的エビデンスを計測することから開始した。

バングラデッシュにある国際下痢症研究センターと共同研究協定を締結し、下痢症発生データに関して共同研究承認を得た。気象データベースに関しては、バングラデッシュ気象局と京都大学防災研究所の協力を得て研究利用可能とした。異常気象現象、特に降雨や温度の変動に関して下痢症発生の時系列分析を行った。

さらに、胎児コホートや出生コホート研究により、気候変動による疾病発生が、早期栄養・

早期免疫プログラミングを通じて影響されているかの検証を行った。



Methods - Data Source

Meteorological Elements (MEs) from BMD - Surface

- Pressure 3 hourly
- Wind Dir. & Speed 3 hourly
- Temperature 3 hourly
- Relative Humidity 3 hourly
- Cloud Amount 3 hourly
- Precipitation Daily
- Max & Min Temp. Daily
- Sunshine hour Daily

Health and Population Data from ICDDR,B

- No. of Patients Daily
- Cholera, Shigella, Typhoid, ETEC, Rota virus cases
 - Total diarrhea cases

(倫理面への配慮)

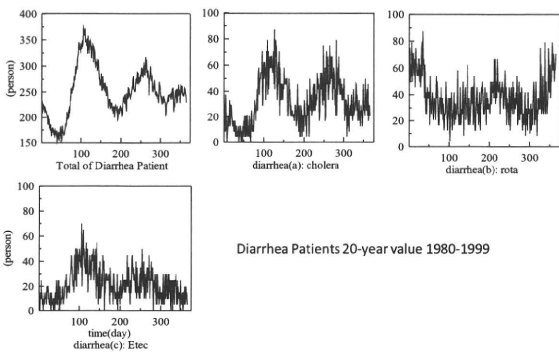
国際下痢症研究センター (ICDDR, B) の研究審査委員会及び倫理委員会に研究プロトコルを提出し、承認を得た。

C. 研究結果

下痢症患者の発生数の20年間値からの変異には2つのピークがあり、はじめのピークは4月から5月にかけてで、2つ目のものは8月から10月にかけてであった。はじめのピークは1ヶ月のラグをもって気温上昇変動と相関するとともに、先行する冬の寒さにも関連していた(1°Cごとに16%の疾病発生数の上昇)。2つめのピークについては、ラグをもち、同期間、特に雨季の後期に降った降雨量と関連していた(110mm/moごとに30%の疾病発生数の上昇)。

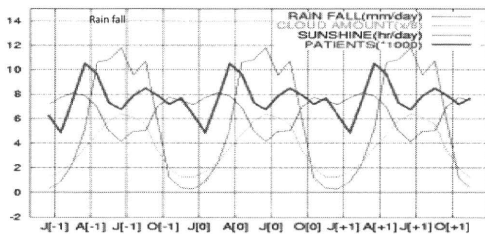
コレラ患者のみを分析した結果、平均雨量が45mmの閾値から、10mm増加するごとに患者数は14%(95%信頼区間: 10.1%–18.9%)増加した。また、閾値以下の雨量においても、10mm減少するごとに24%(95%信頼区間: 10.7%–38.6%)増加した。

バングラデシュにおいて、約5,000人の妊婦-胎児-小児コホートについて4.5歳児までフォローアップを完了した。妊婦とその子供の血液データからmicronutrientsに気象因子による影響が示唆された。



Seasonal Anomaly of ME and No. of Diarrhea Patients

Diarrhea cases (1980-2001) – 22-year trend; ME – 5-year moving average



- Two peaks are found: 1st = Apr.-May; 2nd = Aug. – Oct.
- 1st peak precedes the start of the rainy season.
- 2nd peak corresponds with the later half of the rainy season

D. 考察

下痢症発生と気象因子の時系列分析によって、その関連性のパターンを同定することができた。また、その影響は、温度や雨量など、気象因子の絶対量と、その変動の両方に影響され、特にある閾値以上、もしくは以下では、下痢症患者数の増減の程度を数量化することが可能であった。水位のデータをモデル中に組み入れた後も、大きく雨量と下痢症発生の関係を変えることはなかった。これは、水位の上昇という現象は、降雨が特定以上となるあるパスウェイを示しているにすぎないことを示唆していると考えられる。

季節変動や年々変動にみられる変異は、病原細菌側の因子と、ヒト側の因子、たとえば発病率や重症化因子を考慮に入れなければならない。現在の疾病サーベイランス手法(医療施設による systematic sampling)での発生度の精度を上げるため、妥当性検定を実施することを考慮し、医療施設における疾病モニタリングと、地域罹患データの住民番号によるリンク構築の必要性について、共同研究機関と調整を行っている。これによって、アジアレベルでの標準化感染症サーベイランス手法についての改良と提案を行って行く予定である。

大洪水の前後のコレラとコレラ以外の下痢患者数の分析では、大洪水が特に影響を及ぼしたのは、圧倒的に低所得者層であった。水系感染においては、飲料水ソースや社会経済指標もモデルに組み入れて、地球温暖化インパクト測定モデルの改善を図る必要があると思われる。

出生コホートを用いた研究は、micronutrientsや免疫機能の気候変動との関連分析が進んでおり、感染症重症化の早期予防につながる示唆を得ることが期待される。

E. 結論

気象因子の変異は、病原微生物の増殖や人への暴露の変動を伴って、これらの現象を起こしているものと考えられる。病原微生物等の増殖因子について、気候変動との関連の明らかにするさらなる研究が必要とされる。気候変動は、食糧生産に大きな影響を与え、熱帯アジアの途上国においては、食糧セキュリティを低下させることが報告されている。このことは、すでに低栄養児の多い開発途上国において、一層問題を深刻にしている。この低栄養と感染症重症化の悪循環に対する地球温暖化影響インパクトに関して、明確なエビデンスを出してゆく必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashizume M, Wagatsuma Y, Faruque AS, Hayashi T, Hunter PR, Armstrong B, Sack DA. Factors determining vulnerability to diarrhoea during and after severe floods in Bangladesh. J Water Health. 2008;6:323-32.

Hashizume M, Wagatsuma Y, Hayashi T, Saha SK, Streatfield K, Yunus M. The effect of temperature on mortality in rural Bangladesh--a population-based time-series study. Int J Epidemiol. 2009;38:1689-97.

2. 学会発表

Wagatsuma Y, Terao T, Hayashi T, Faruque ASG, Sack DA. Influence of Local and Global Climatic Changes on Diarrhea Diseases in Bangladesh. US-Japan Viral Disease Panel Satellite Symposium, Nagasaki, Japan, 26 May 2008.

Terao T, Hayashi T, Faruque ASG, Wagatsuma Y. Relationship between the anomalies of local and global meteorological elements and diarrhea diseases in Bangladesh. 第10回チュニジア-日本

文化・科学・技術学術会議 (TJASSST 10) .チュニジア共和国、ハマメット, 2009年11月11-13日。

Wagatsuma Y. Climate change impact on health: seasonality, malnutrition and fetal programming. 第135回生存圏シンポジウム第5回 国際研究集会「南アジアの気象環境と人間活動に関する研究集会」 Relationship between weather environment and human activity in South Asia. 京都大学東南アジア研究所 稲盛財団記念館. 2010年1月30-31日。

Hisamatsu M, Ma E, Wagatsuma Y. The effect of meteorological factors on fetal growth. チュニジア-日本 文化・科学・技術学術会議. チュニジア共和国, チュニス, 2010年11月30日。

Hisamatsu M and Wagatsuma Y. Temperature effect during pregnancy influenced on birth size -- an example of the use of Matlab HDSS, Bangladesh. 第1回 Health and Demographic Surveillance System(HDSS)研究会, 京都. 2010年11月28日。

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当せず。

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)
(H20-新興一般-015)

分担研究報告書 (H20-22 年度)

デング熱診断サーベイランスのための NS1 抗原検出キットの評価および
空港検疫所におけるチクングニア熱・デング熱サーベイランス

分担研究者 高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
協力研究者 大松 勉、Moi Meng Ling、小滝 徹、林昌宏、田島茂、
倉根一郎 (国立感染症研究所ウイルス第一部)
厚生労働省成田空港検疫所
厚生労働省関西空港検疫所

我が国のデング熱輸入症例は、この3年間は100人前後が報告されている。1999年の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は増加傾向にある。日本国内にはデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、その実験室診断をより迅速で確実なものにする必要がある。また、空港検疫所では急性期の患者が健康相談に立ち寄ることもあり、特に病原体診断の精度向上が求められるものである。本研究班では、デングウイルス NS1 抗原 ELISA 法および検出迅速キット (イムノクロマト法) の感度・特異性および有用性をウイルス遺伝子検出法と比較検討した。また、2005 年以来流行を拡大しているチクングニア熱は、我が国では法律に規定されていない感染症である。そこで、本研究班では厚生労働省成田空港検疫所および関西空港検疫所と共同研究としてチクングニア熱に関してサーベイランスを実施した。その結果、2009 年 9 月にインドネシアから帰国のチクングニア熱患者を確認し、ウイルスも分離した。分離されたウイルスは現在大きな流行を起こしているアフリカ型ではなくアジア型であることが遺伝子解析によって明らかになった。また各空港検疫所で確認されたデング熱患者の血清からウイルスを計7株分離し、遺伝子解析を行った。また、NS1 抗原検出 ELISA 法では、10 倍希釈の場合でも十分な感度を示し、乳幼児・小児で採血量が少量である場合は、10 倍希釈で検査を実施することが可能である。

A. 目的

我が国のデング熱輸入症例は、この数年

間は 100 人前後が報告されている。1999 年

の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は

増加傾向にあり、2007 から 2009 年は 100 例前後が報告されていた。しかし、2010 年は 243 例と急増し、2011 年に入ってもこの傾向は継続している。日本国内にはデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、その実験室診断をより迅速で確実なものにする必要がある。そのため、病原体診断としてウイルス遺伝子検査にデングウイルスの非構造蛋白である 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。本研究班では NS1 抗原 ELISA、迅速キット（イムノクロマト法）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

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. 42:5935-5937) 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。よく混和した後に 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

panbio 社のキット (Dengue early ELISA®)、BioRad 社のキット (PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA®) を使用した。

2. チクングニア熱・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ア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 (H20-21 年度)。

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、Dengue early ELISA® キットは 4 型に対して感度が低かった。しかし、PLATELIA Dengue NS1 Ag ELISA® は 4 型ウイルスに対しても十分な感度を有していた。

NS1 抗原検出迅速キットおよび NS1 抗原 ELISA キットは、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. チクングニア熱・デング熱サーベイランス

チクングニア熱の検疫所における検査は H22 年度から 2 年間実施したが、9 月にイ

インドネシアからの輸入症例が、成田空港検疫所で初めて確認された。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ア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。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。

D. 考 察

デングウイルス NS1 迅速キット (イムノクロマト法) 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。また、NS1 抗原検出 ELISA キットは感度が高く、乳児やデング出血熱患者などで採血量が十分でない場合は、10 倍希釈で NS1 抗原検出 ELISA を実施することが許容、推薦される。

チクングニア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、チクングニア熱輸入症例は今後も増加することが予想され、2011 年 2 月に法律 (感染症法、検疫法) に規定されたことから、今後我が国への侵入防止対策が進展するものと期待される。

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。しかし、ウイルス遺伝子検査 (PCR 法) より発症後やや長めに検出が可能である NS1 抗原検出キットは、ウイルス遺伝子検出法とともに今後有用な病原体診断法となると考えられる。また、NS1 抗原検出 ELISA キットは感度が高く、乳児やデング出血熱患者などで採血量が十分でない場合は、10 倍希釈で NS1 抗原検出 ELISA を実施することが許容、推薦される。

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。チクングニア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、チクングニアウイルス (アジア遺伝子型) が分離された。

F. 健康危険情報

2010 年夏に、フランス国内 (南部) でデング熱、チクングニア熱が国内発生した。また、2010 年は、日本へのデング熱輸入症例が、2009 年の 92 症例と比べ、2 倍以上の増加がみられ、243 症例が報告された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*, in press (2011)
2. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Sakamoto M, Iwagoe H, Kobayashi K, Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis*, 16 (11), 1770-1772 (2010)
3. Moi ML, Ujiie M, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection in travellers returning from Benin to France, July – August, 2010. *Eurosurveillance*, 15(39):pii=19674 (2010)
4. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in dengue neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing tests using FcγR-negative and FcγR-expressing BHK cells. *Clin Vac Immunol*, 17: 402-407 (2010)
5. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcγRIIA. *J Virol Meth*, 163:205-209 (2010)
6. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the FcγRIIA receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol*, 91:103-111 (2010)
7. Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. *Intern Med*, 49:501-505 (2010)
8. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Omatsu T, Kurane I. Dengue importations into Japan from Bali. *ProMed*, promed archive no. 20100329.09 (2010).
9. Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Sakamoto M, Kobayashi K, Kurane I. Dengue importations into Japan from Tanzania. *ProMed*, promed archive no. 20100323.0922 (2010).
2. 学会等発表
 - 1) 国際学会
 1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Titration of neutralizing antibody and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK-21. 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Kuala Lumpur, Malaysia, 2010年10月
 2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus enhancing

activity in serum samples from dengue patients determined using FcyRIIA-expressing BHK cells. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Hokkaido, Japan, 2010年6月

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

厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
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
(H20-新興-一般-015)

分担研究総合報告書 (H20-H22)

FcγRIIA 発現細胞を用いたデングウイルス研究の有用性

研究代表者：倉根一郎 (国立感染症研究所・副所長)

研究協力者：Moi Meng Ling (国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究官)

高崎 智彦 (国立感染症研究所・ウイルス第一部第二室・室長)

林 昌宏 (国立感染症研究所・ウイルス第一部第三室・室長)

研究要旨

デングウイルスはヒトと蚊の間で感染環が維持され、蚊を介してヒトに感染し、一過性急性熱性疾患であるデング熱(DF)及び重篤な疾患であるデング出血熱(DHF)を引き起こす。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も影響を受けていると考えられている。デング熱・出血熱の病態及びヒトにおける感染防御メカニズム解明はワクチン開発および今後の予防戦略に重要である。DHFは疫学的研究によりデングウイルス(DENV)の再感染時に多く発症することが示された。これは初感染時に誘導された中和能を有しないDENV型交差抗体に起因する抗体依存性感染増強(ADE)によると考えられている。本研究では、ヒト血清並びに抗体における感染増強活性を測定するADE assay及びADE活性測定基礎的条件を確立した。確立したADE assayはヒト血清におけるDENVに対する感染増強活性と中和活性を合わせた生物活性が測定できることが明らかとなった。このADE assayにより感染性ウイルス-抗体複合体が検出され、感染増強活性を合わせたウイルス力価が測定できることが明らかになった。DENVの感染ターゲット細胞の多くがFcγR発現細胞であることから、本測定法により測定したウイルス中和抗体価およびウイルス力価は生体内において有意義であることが示された。

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱はデングウイルス(DENV)の感染によって発症する急性熱性疾患である。デング出血熱は致死率(20%)が高く、年間世界で約2万人以上

が死亡していると推計している。近年の熱帯亜熱帯地域での人口増、ヒトおよび物のグローバルな移動などを背景とし、デング熱患者が急速に増加している。熱帯地域を

始めとし大きな流行が起こっており、デングウイルスの流行地域も拡大傾向にある。近年、ネパール、ブータン、オーストラリアやフランス南部などに国内感染が報告された。日本での生息地域が拡大しつつあるヒトスジシマカもデングウイルスを媒介する能力があることから、デングウイルス流行地域が日本へと拡大する可能性が示唆された。このような状況下で、デング熱・出血病態および感染防御メカニズム解明は、ワクチン・有効な治療開発および今後の予防戦略に重要である。

デング出血熱は疫学的研究により、再感染時に多く発生する。デング出血熱は母子移行抗体として獲得された抗体、あるいは初感染時に誘導された中和能を有しない抗体が感染時に体内にあるターゲット細胞の monocyte および FcγR を有する細胞の DENV 感染を増強させることが感染の重症化の起因の一つと考えられている。従来のヒト血清における感染増強活性測定法では、FcγR を有する浮遊系細胞 (monocyte, macrophage, K562 細胞等) が用いられたが、この方法ではプラーク法によるウイルス力価を測定することが困難であった。これを可能とする 1 つの方法は、プラーク形成能のある細胞に FcγR を恒常発現させることである。

我々は、DENV 感染に対するプラーク形成能のある BHK-21 細胞に FcγR の一種である FcγRIIA を恒常発現させ、ヒト血清における感染増強活性の測定法を確立した。確立した ADE assay は、プラーク形成能を有する BHK-21 細胞が用いられたため、従来のプラーク減少法による感染増強活性と中和活性を合わせた中和抗体価が測定でき

ることが明らかになった。

現在はウイルス力価を FcγR 非発現細胞による測定することが一般的である。しかし、用いられた細胞は FcγR を有しない細胞であるため、感染増強活性と合わせたウイルス力価の測定が困難である。そこで我々は樹立した ADE assay を用いてウイルス力価を検討した。

DENV の感染標的細胞の多くが FcγR を有する細胞であるため、本研究で樹立した FcγR 発現細胞を用いた中和抗体価およびウイルス力価測定法は、生体内を反映する点で有意義な測定法であることが示唆された。

B. 研究方法

FcγR 発現 BHK 細胞の樹立： ヒト Fcγ 受容体の 1 つである FcγRIIA (CD32a) 遺伝子を pcDNA3.1 発現ベクターに導入し、BHK-21 細胞に発現させた。FcγRIIA の発現率は flow cytometry 法にて FcγR の発現を確認した。FcγR の発現が認められた細胞を用いてモノクローナル抗体および患者血清における DENV に対する感染増強活性をプラーク法により検討した。

中和試験： 50%プラーク減少法を用いた標準法により、初感染および再感染患者血清中の中和抗体価を FcγR 発現細胞および FcγR 非発現細胞にて測定した。

初感染血及び再感染患者におけるウイルス力価の検討： 2004 年から 2010 年までの間に国立感染症研究所でデング熱と診断された患者 54 名の血清 73 検体を対象として、ウイルス力価の測定を試みた。FcγR 発

現細胞および FcγR 非発現細胞を用いた従来のプラーク法により、初感染および再感染におけるウイルス血症を測定した。また接種 5 日後の培養上清を回収し、real time-PCR (TaqMan 法) により遺伝子量 (genome copies) を測定した。

C. 研究結果

FcγR 発現 BHK 細胞の樹立: DENV の力価をプラーク法にて検討したところ、FcγR 発現細胞に対する感染増強抗体の条件下での DENV の力価は抗体を加えない場合と比較して高力価であり、DENV の感染増強抗体による ADE が観察された。しかしながら FcγR 非発現 BHK 細胞ではこの現象は観察されなかった。同様の現象は抗 DENV-IgG 陽性患者血清でも FcγR 発現 BHK 細胞において観察されたが抗 DENV-IgG 陰性患者血清では観察されなかった。

FcγR 発現細胞を用いた中和抗体価の測定: 当研究室で確立した FcγR 発現細胞を用いてプラーク法にて初感染および再感染患者血清における患者血清中の中和能を調べた。モノクローナル抗体の中和抗体価を検討したところ、FcγR 発現 BHK 細胞を用いた中和抗体価は FcγR 非発現細胞を用いた場合に比べ低値であった。FcγR 発現細胞を用いて測定した抗 DENV-IgG 陽性患者血清の抗体価は BHK 細胞を用いて測定した抗体価に比べ、低値であった。

初感染血及び再感染患者におけるウイルス血症の検討: 第 1 病日から第 7 病日までの患者血清におけるウイルス血症が FcγR 発現細胞および FcγR 非発現細胞を用

いて観察された。再感染時の血清を検討したところ FcγR 発現細胞を用いたウイルス血症のレベルは FcγR 非発現細胞を用いた場合と比較して約 10 倍高力価であった。FcγR 発現細胞に再感染患者血清を接種した培養上清においても FcγR 非発現細胞より高力価であることが認められた。再感染時のウイルス血症も初感染と比べて約 1 日長く継続したことが明らかとなった。

D. 考察

デングウイルス感染の重症化の要因の一つは抗体依存性感感染増強(ADE)現象による抗体ウイルス複合体を含む高ウイルス血症と考えられている。本研究で樹立した ADE assay はヒト血清中の感染増強活性を従来のプラークによって測定できることが明らかとなった。またこの assay は DENV 感染によるプラークおよび細胞変性効果 (cytopathic effect , CPE) が観察できるためウイルスが細胞に感染したことが簡便に確認できることが明らかになった。

現在は、50%プラーク減少法が中和抗体価および DENV に対する感染防御の測定基準として認められている。しかしながら、一般的に用いられている細胞が FcγR 非発現細胞であることから、感染増強活性と合わせた中和活性の測定が困難である。そこで我々は、樹立した ADE assay を用いたプラーク減少法により、中和抗体測定法を確立した。非 FcγR 発現細胞を用いた場合、モノクローナル抗体 4G2 は DENV1-4 に対する中和活性を示した。しかしながら同様な抗体およびウイルスを用いて FcγR 発現細胞により測定した結果、中和活性が認めら

れなかった。このことから、抗体における感染増強活性はウイルスに対する中和能を低下させることが明らかとなった。ヒト血清においても同様な現象が認められた。

定量 PCR 及び FcγR を有しない細胞を用いた従来のウイルス定量法はウイルス-抗体複合体の感染能が反映されていないため再感染時における ADE 活性による感染性ウイルス量の上昇の測定が困難であった。本研究では、初感染において FcγR 発現細胞による測定したウイルス力価と FcγR 非発現細胞による測定結果に相違が認められなかった。したがって、従来の方法によるウイルス力価の測定は初感染のみに有意義であることが示唆された。しかしながら、再感染患者血清を用いた場合、FcγR 発現細胞による測定したウイルス力価は非 FcγR 発現細胞による測定した力価より約 10 倍高力価であった。このことから、現在の再感染患者ウイルス血症の測定値よりも 10 倍以上のウイルス力価が存在することが示唆された。

E. 結論

新たに確立した ADE assay は簡便で安定した結果が得られるため、デング出血熱発症機序における抗体の役割の解明に資すると考えられる。FcγR 発現 BHK 細胞を用いて測定した中和活性は ADE 活性を合わせた生物活性が測定できることが明らかとなった。DENV の感染ターゲット細胞の多くが FcγR 陽性細胞であることから、本測定法により測定した中和抗体価およびウイルス力価は生体内を反映し有意義であることが示唆された。

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using FcγR-expressing BHK-21 cells than FcγR negative cells in secondary infection but not in primary infection. *J Infect Dis*, in press (2011)
2. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Sakamoto M, Iwagoe H, Kobayashi K, Kurane I. Importation of dengue virus type 3 to Japan from Tanzania and Côte d'Ivoire. *Emerg Infect Dis*, 16 (11), 1770-1772 (2010)
3. Moi ML, Ujiie M, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection in travellers returning from Benin to France, July – August, 2010. *Eurosurveillance*, 15(39):pii=19674 (2010)
4. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Discrepancy in dengue neutralizing antibody titers between plaque reduction neutralizing tests using FcγR-negative and FcγR-expressing BHK cells. *Clin Vac Immunol*, 17 (3): 402-407 (2010)
5. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of an antibody-dependent enhancement assay for

- dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcγRIIA. *J Virol Meth*, 163 (2):205-209 (2010)
6. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the FcγRIIA receptor IIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Gen Virol*, 91 (1):103-111 (2010)
7. Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. *Intern Med*, 49 (5):501-505 (2010)
8. Moi ML, Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Lim CK, Omatsu T, Kurane I. Dengue importations into Japan from Bali. *ProMed*, promed archive no. 20100329.09 (2010).
9. Takasaki T, Moi ML, Kotaki A, Sakamoto M, Kobayashi K, Kurane I. Dengue importations into Japan from Tanzania. *ProMed*, promed archive no. 20100323.0922 (2010).
10. Moi ML, Takasaki T. アジア渡航米国人における日本脳炎の3症例, 2003 – 2007年 – 米国. *Infectious Agents Surveillance Report*, 30 (9), 244 – 245 (2009).
11. Takasaki T, Kotaki A, Lim CK, Tajima S, Omatsu T, Moi ML, Kurane I. Arbovirus Infections: the challenges of controlling an ever-present enemy. *J Disaster Res*, 4 (5), 322 – 327 (2009).
12. Moi ML, Kurane I. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever. (in Japanese). *Antibiotics and Chemotherapy*, 24(11) 1592-1598 (2008).
13. Takasaki T, Moi ML. 地球温暖化に伴う新規感染症. *Clinician*, 55 (570), 732 – 734 (2008).
2. 学会等発表
1) 国際学会
1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Titration of neutralizing antibody and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK-21. 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, Kuala Lumpur, Malaysia, 2010年10月
2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus enhancing activity in serum samples from dengue patients determined using FcγRIIA-expressing BHK cells. 44th Joint Working Conference on Viral Diseases US-Japan Cooperative Medical Sciences Program, Hokkaido, Japan, 2010年6月
3. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Development of antibody-dependent enhancement assay for dengue virus using stable BHK-21 cell lines expressing FcγRIIA 58th Annual Meeting of American Society of Tropical Medicine and

Hygiene, Washington D.C., 2009年11月

第16回日トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（東京）．平成21年10月

4. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I.

Determination of the regions in human FcγIIA receptor responsible for the antibody-dependent enhancement in dengue virus infection. 7th Japan-China Conference of Virology, Tokyo, Japan, 2008年6月

5. モイメンリン、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎 : Determination of the regions in FcγRIIA which is responsible for antibody dependent enhancement in dengue viral infection. 第56回日本ウイルス学会学術集会（岡山）．平成20年11月

2) 国内学会

1. モイメンリン、林昌宏、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎 : デング再感染患者血清中ウイルス力価の検討: 感染性抗体-デングウイルス複合体は FcγR 発現細胞においてのみ検出された. 第58回日本ウイルス学会学術集会（徳島）．平成22年11月

2. モイメンリン、大松勉、中村伸一郎、片貝裕子、高崎智彦、倉根一郎 : Marmoset as a tool for dengue virus vaccine efficacy evaluation. 第17回日トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会（東京）．平成22年12月

3. モイメンリン、林昌宏、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎 : FcγRIIA 発現 BHK-21 細胞を用いた抗デングウイルス抗体依存性感染増強(ADE)アッセイの開発. 第57回日本ウイルス学会学術集会（東京）．平成21年11月

4. モイメンリン、林昌宏、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎 : Discrepancy in viremia titers in dengue serum samples between BHK cells and FcγR-expressing BHK cells.

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
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

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

イエカ類の休眠生理、生態、日本脳炎ウイルスの増殖能および越冬の可能性

分担研究者 小林睦生（国立感染症研究所 昆虫医科学部長）

研究協力者 津田良夫、沢辺京子、佐々木年則、森林敦子、葛西真治

（国立感染症研究所 昆虫医科学部）

研究要旨

日本脳炎ウイルスの媒介能力が高いと考えられるイナトミシオカ幼虫を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、幼虫・蛹の発育零点は雌 8.75℃、雄 9.51℃となった。有効積算温日度は雌が 270 日度、雄が 208 日度であった。日最高気温が 18℃以上を活動可能日として活動可能期間、年間世代数を推定したところ、釧路では活動期間が 76 日、世代数は 1.75 世代であった。青森ではそれぞれ 146 日、3.88 世代、新潟では 183 日、6.33 世代となり、東京では 208 日度、7.74 世代と推定された。

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。

これまでの研究で、コガタアカイエカが日本国内で越冬できる地域は限局され、日本脳炎ウイルス (JEV) の越冬に関与する可能性は低いと考えられ、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ことが示唆された。そこで、この 2 種イエカにおける JEV の増殖性を比較・評価した。アジア全域で JEV の主要な媒介種として知られるコガタアカイエカにおいては、特に Nagasaki37 株、JaGar 株の高い増殖能が唾液線を確認されたが、アカイエカにおいてはいずれのウイルス株の増殖も認められなかった。また、コガタアカイエカにおいては、JEV1 型、3 型のジ