

厚生労働省科学研究費補助金（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

中部山岳国立公園立山の観光ルート沿いにおける蚊類幼虫調査

分担研究者 滝澤剛則（富山県衛生研究所）
協力研究者 小原真弓、山内健生（富山県衛生研究所）
渡辺 護（国立感染症研究所）

研究要旨

地球温暖化による感染症媒介蚊の垂直分布の変化を調べるため、2009年9月、10月、2010年7月、8月、および10月に、中部山岳国立公園の立山観光ルート沿い（標高約500～2,000m）において、蚊類幼虫の分布を調査し、1989～1994年に同地点で実施された調査結果と比較した。今回の調査では、計2,143個体の蚊類が採集され、これらは少なくとも10種に分類された。個体数がもっとも多かったのはキンパラナガハシカ *Tripteroides bambusa* (1,168個体) で、ヤマトヤブカ *Ochlerotatus japonicus* (725個体) がこれに次いだ。ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、2009年10月に標高1,200m地点で14個体が採集されたが、それ以外にはまったく採集されなかった。このことから、標高1,200m地点で採集されたヒトスジシマカは、何らかの理由で一時的に発生していたものと推定された。本研究では、地球温暖化の影響により感染症媒介蚊の分布が高標高域へと広がっているという証拠を見出すことはできなかった。

A. 研究目的

ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、日本の代表的なヤブカ類の1種であり、海外ではウエストナイル熱やデング熱の主要な媒介種でもある。従来、ヒトスジシマカはわが国の東北地方以南に広く分布することが知られていたが、近年、東北地方において本種の分布北限が北へ拡大していることが判明し、地球温暖化との関連性から注目されている。

地球温暖化がヒトスジシマカの分布に影響を与えるならば、本種の分布

は、北方だけでなく、垂直方向で高標高域へと広がることが予想される。しかし、我が国においてヒトスジシマカをはじめとした蚊類の垂直分布に関する研究例はほとんどなく、その詳細は不明である。

中部山岳国立公園の立山観光ルート沿いでは、1989～1994年に富山県衛生研究所によって蚊類の垂直分布が調査された。そこで、現在の蚊類の分布を過去の分布と比較するため、中部山岳国立公園の立山観光ルート沿い（標高約500～2,000m）において、蚊

類幼虫の分布調査を実施した。

B. 研究方法

1. 調査地

調査は、富山県南東部に位置する中部山岳国立公園立山観光ルート沿いの5地点：千寿ヶ原（標高500m）、美女平（標高980m）、ブナ坂（標高1,200m）、上ノ小平（標高1,500m）、および追分（標高1,900~1,980m）で実施した。

千寿ヶ原は、ミズナラ、サワグルミ、トチノキ、コナラ、イタヤカエデなどを主体とする落葉広葉樹林でおおわれる。ここでの調査は立山カルデラ砂防博物館付近で実施した。

美女平には一帯に樹齢数百年のスギ林が存在する。ここでの調査は立山ケーブルカーの駅（美女平駅）付近で実施した。

ブナ坂はブナの原生林で部分的にスギ・ミズナラなどが混生する。

上ノ小平はブナ坂と追分の中間的な要素を持つ地点である。

追分は、冬季には5m程度の積雪があるため、無雪期間は150日程度と短く、池塘と呼ばれる水たまりが点在し、多くの湿性植物が生育する高層湿原である。ここでの調査は立山有料道路の追分料金所付近で実施した。

これらの地点には、登山ブームの影響もあり、多くの観光客が訪れるが、立山有料道路の桂台検問所よりも上部にある美女平～追分には、環境保全のため自家用車の乗り入れが禁止されている。

2. 調査方法

現地での幼虫採集（採水）は、2009年9月2日、10月5日、2010年7月20日、8月16日、および10月6日に実施した。千寿ヶ原では、地表の発泡スチロールの空き箱およびビニールシートに溜まった水をスポイトで採取した。美女平では、ブナの木の上2mに位置する樹洞に溜まった水をスポイトで採取し、また、林内の地表に置かれたタイヤに溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。ブナ坂では、林内の地表に置かれたタイヤおよび倒木の樹洞に溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。上ノ小平では、地表に置かれたタイヤと道路脇のポールを差し込むための穴に溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。追分では、地表の水溜りと道路脇のポールを差し込むための穴に溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。

採取した水は研究室へ持ち帰り、水中から羽化した成虫を同定・計数した。

（倫理面への配慮）

本研究は野外の水溜りに生息する蚊幼虫を対象としており、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

2009年9月2日に採取した水からは699個体、10月5日は471個体、2010年7月20日は471個体、8月16日は191個体、そして10月6日は311個体の蚊類が羽化した（表1-5）。これらの蚊類は少なくとも10種に分類された。

個体数をもっとも多かったのはキンパラナガハシカ *Tripteroides bambusa* (1,168 個体) で、ヤマトヤブカ *Ochlerotatus japonicus* (725 個体) がこれに次いだ。

ヤマトヤブカとクシヒゲカ亜属 *Culex* (*Culiciomyia*) の種 (キョウトクシヒゲカ *Culex kyotoensis* とヤマトクシヒゲカ *Cx. sasai* を含む) はすべての調査地点で採集された。ヤマダシマカ *Ae. flavopictus* は標高 1,500m 地点以外のすべての調査地点で採集された。一方、ハマダラカ属 *Anopheles* の 1 種は標高 500m と約 1,000m 地点のみから、ブナノキヤブカ *Ae. oreophilus* は標高約 1,000m 地点のみから、コバヤシヤブカ *Ae. kobayashii* は標高約 1,000m 地点の樹洞のみから、トラフカクイカ *Lutzia vorax* は標高約 1,000m と 1,500m 地点のタイヤのみから採集された。ヒトスジシマカは 2009 年 10 月に標高 1,200m 地点のタイヤのみから採集された。

蚊類が採集された地点のうちもっとも高標高である標高約 2,000m 地点では、ヤマトヤブカ、ヤマダシマカ、ヤマトクシヒゲカ種群のみが採集された。

標高 1,500m 地点と標高約 2,000m 地点にみられた地表の水溜りの多くでは、アメンボ類、ゲンゴロウ類、キクロプス目ケンミジンコ (*Eucyclops serrulatus* など) などの捕食性水生動物がしばしば観察された。

D. 考察

ヒトスジシマカは、2009 年の調査では標高 1,200m 地点で採集されたが、2010 年の調査ではまったく採集されなかった。すなわち、ヒトスジシマカは立山の高標高域に定着しているのではなく、2009 年には何らかの理由で一時的に発生していたものと推定される。このことは、何らかの理由で高標高域へヒトスジシマカが運ばれて産卵する可能性があることを示している。この時、ヒトスジシマカ卵が越冬可能な条件がそろっていれば定着する可能性があるものと考えられる。

ヤマダシマカは、1989~1994 年の立山観光ルート沿いにおける調査では、標高 1,200m が分布上限であった。2010 年に標高約 2,000m で本種が 1 個体採集されており、これは本種の分布新記録となる。しかし、採集個体数が少ないため、本種の分布上限が上昇したのか、あるいは何らかの理由で高標高域へ運ばれたのかを判断することはできない。

キンパラナガハシカは、採集個体数をもっとも多かったが、人嗜好性が低く、本種による吸血被害が生じる可能性はきわめて低いと考えられる。

すべての調査地点で採集されたヤマトヤブカはウエストナイル熱を媒介可能で、しばしば人を襲うことが知られている。立山の高標高域で夏~秋季に蚊に襲われる被害が出たとするならば、原因種として本種をまず疑うべきであると考えられた。立山の高標高域では、ポール穴が本種の発生源となっており、駆除を実施する際の対象

にすべき水溜りであると考えられた。

E. 結論

地球温暖化の影響によりヒトスジシマカなどの感染症媒介蚊の分布が高標高域へと広がっているという証拠を見出すことはできなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Obara, M., Yamauchi, T., Watanabe, M., Hasegawa, S., Ueda, Y., Matsuno, K., Iwai, M., Horimoto, E., Kurata, T., Takizawa, T., Kariwa, H., Takashima, I. Continuity and change of Japanese encephalitis virus in Toyama prefecture, Japan. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. in press.

2. 学会発表

1) 渡辺 護、小原真弓、山内健生「1 民家における蚊の捕集成績 (2003~08 年)」第 63 回日本衛生動物学会西日本支部大会、神戸市、2008 年 11 月

2) 小原真弓、山内健生、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤

剛則「コガタアカイエカから分離された *Culex flavivirus* の解析及び日本脳炎ウイルスの増殖への干渉」第 45 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、新宿区、2010 年 5 月

3) 小原真弓、山内健生、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則「*Culex flavivirus* の解析及び日本脳炎ウイルスの増殖への干渉」第 58 回日本ウイルス学会、徳島市、2010 年 11 月

G. 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

H. 謝辞

野外調査に協力していただいた富山県衛生研究所の高森亮輔研究員にお礼申し上げます。

表 1. 立山観光ルート沿いにおける 2009 年 9 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類						合計
	500	980		1200	1500	1900-1980	
	人口容器	樹洞	タイヤ	タイヤ	ポール穴	ポール穴	
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	1	0	0	0	1
トワダオオカ	0	1	0	0	0	0	1
キンバラナガハシカ	0	11	223	281	0	0	515
ヤマトヤブカ	13	4	12	5	43	53	130
ブナノキヤブカ	0	1	0	0	0	0	1
ヤマダシマカ	0	0	0	0	0	0	0
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	0
コバヤシヤブカ	0	0	0	0	0	0	0
トラフカクイカ	0	0	1	0	0	0	1
* <i>Culex (Culiciomyia)</i> spp.	0	47	0	2	1	0	50
合計	13	64	237	288	44	53	699

*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む

表 2. 立山観光ルート沿いにおける 2009 年 10 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類						合計
	500	980		1200	1500	1900-1980	
	人口容器	樹洞	タイヤ	タイヤ	ポール穴	ポール穴	
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	3	0	0	0	3
トワダオオカ	0	0	0	0	0	0	0
キンバラナガハシカ	1	1	191	29	1	0	223
ヤマトヤブカ	21	2	0	41	92	0	156
ブナノキヤブカ	0	0	1	0	0	0	1
ヤマダシマカ	0	0	0	13	0	0	13
ヒトスジシマカ	0	0	0	14	0	0	14
コバヤシヤブカ	0	0	0	0	0	0	0
トラフカクイカ	0	0	0	0	0	0	0
* <i>Culex (Culiciomyia)</i> spp.	40	16	4	0	1	0	61
合計	62	19	199	97	94	0	471

*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む

表 3. 立山観光ルート沿いにおける 2010 年 7 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類								合計		
	500		980		1200		1500			1900-1980	
	人口容器	樹洞	タイヤ	樹洞	タイヤ	ボール穴	タイヤ	ボール穴		地表の水溜り	
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
トワダオオカ	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
キンバラナガハシカ	0	1	83	2	107	0	—	0	0	193	
ヤマトヤブカ	20	5	28	2	23	74	—	8	111	269	
ブナノキヤブカ	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
ヤマダシマカ	0	0	1	6	0	0	—	0	1	8	
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
コバヤシヤブカ	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
トラフカウイカ	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
* <i>Culex (Culicomyia)</i> spp.	0	0	1	0	0	0	—	0	0	1	
合計	20	6	113	8	130	74	—	8	112	471	

*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む。

表 4. 立山観光ルート沿いにおける 2010 年 8 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類								合計		
	500		980		1200		1500			1900-1980	
	人口容器	樹洞	タイヤ	樹洞	タイヤ	ボール穴	タイヤ	ボール穴		地表の水溜り	
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
トワダオオカ	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
キンバラナガハシカ	0	1	4	0	15	0	0	0	0	20	
ヤマトヤブカ	2	3	49	3	1	37	4	37	0	136	
ブナノキヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ヤマダシマカ	1	0	0	3	6	0	0	0	0	10	
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
コバヤシヤブカ	0	9	0	0	0	0	0	0	0	9	
トラフカウイカ	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	
* <i>Culex (Culicomyia)</i> spp.	0	0	0	0	0	2	2	7	0	11	
合計	3	13	53	6	23	39	10	44	0	191	

*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む。

表 5. 立山観光ルート沿いにおける 2010 年 10 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類								合計		
	500		980		1200		1500			1900-1980	
	人口容器	樹洞	タイヤ	樹洞	タイヤ	ボール穴	タイヤ	ボール穴		地表の水溜り	
<i>Anopheles</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
トワダオオカ	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
キンバラナガハシカ	0	0	34	10	67	0	106	0	0	217	
ヤマトヤブカ	9	0	0	5	15	0	5	0	0	34	
ブナノキヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ヤマダシマカ	0	1	7	22	0	0	0	0	0	30	
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
コバヤシヤブカ	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	
トラフカウイカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
* <i>Culex (Culicomyia)</i> spp.	0	0	0	0	1	0	4	19	0	24	
合計	10	6	41	37	83	0	115	19	0	311	

*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む。

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」
—フラビウウイルスの感染鑑別法の開発と
中国・広東省におけるフラビウウイルス感染症の発生状況調査—

研究代表者：	倉根 一郎	国立感染症研究所・副所長
分担研究者：	前田 秋彦	京都産業大学・教授
協力研究者：	前田 潤子	北海道大学・研究員
	荻和宏明	北海道大学・准教授
	高島郁夫	北海道大学・教授
	村田 亮	北海道大学・大学院生
	白藤浩明	動物衛生研究所・研究員
	金平克史	動物衛生研究所・研究員
	染谷 梓	京都産業大学・助教
	西野 佳以	京都産業大学・准教授
	村田 英雄	京都産業大学・教授
	柯 昌文	中国・広東省 CDC・副所長
	Jiang Shu	中国・広東省 CDC・研究員

研究要旨： 蚊媒介性感染症は地球温暖化に際して、その感染流行地域の拡大が危惧されている感染症の一つである。本研究では、(1) 蚊が媒介するフラビウウイルス感染症に焦点を絞り、各種フラビウウイルス感染症の新規鑑別検査法を開発するとともに、(2) 隣国である中国の、アジア諸国との貿易の要衝である広東省でのフラビウウイルス感染症、特にデングウイルス感染症の発生状況と当該地域の、近年の気象変化について調査した。

分担研究者：

前田 秋彦
北海道大学 (H20-H21)・准教授
京都産業大学 (H22)・教授

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流行の拡大が危惧されている。アジア諸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、それらの媒介蚊の日本国内への侵入や、これまで生息が報告されていなかった地域への蚊の分布域の拡大が報告されて来ている。したがって、地球温暖化に伴い変化する感染所として特に注意を要する感染症の一つであると考えられている。また、日本には

現在、存在しないけれども、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、第一に (1) フラビウウイルス感染症の鑑別診断・検査法の開発を目的とした。蚊媒介性フラビウ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。フラビウ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。従来の中和試験では生ウイルスを使用するため、感染事故を引き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、検査に使用する生ウイルスの代替として病原性の無い中空ウイルス粒子 (SvPs) やウイルス様粒子 (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試験法の開発を目指した。

また、(2) 中国・広東省では、日本脳炎やデング熱等の蚊媒介性フラビウイルス感染症の流行が毎夏報告されているが、これまで系統的な解析は為されていない。そこで本研究では、広東省におけるデングウイルス (DENV) 感染症に関する近年の発生状況を調査するとともに、当該地の気象と DENV 感染との関連について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) 新規フラビウイルス感染鑑別法の開発

(1-1) 中空ウイルス様粒子 (SvPs) を用いたフラビウイルス感染鑑別法の開発

SvPs は以下に示す方法に従って作製した。フラビウイルス E 蛋白質の Domain III (D III) 領域はウイルス種に特異的な抗体との反応部位であると考えられている。そこで、WNV SvPs の発現ベクター (pCAG WNV SvPs E(WWW)) の E 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))。

これらのベクターをヒト腎由来細胞である 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)。

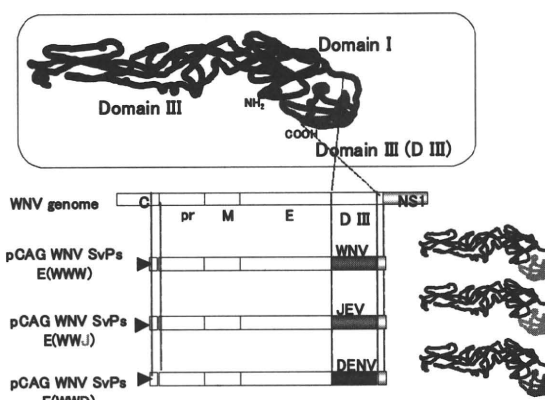


図 1. キメラ SvPs の構造

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。

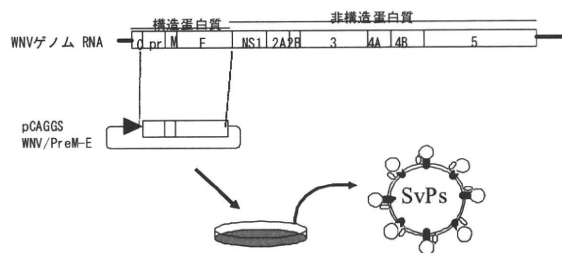


図 2. 中空ウイルス粒子の作製方法

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。

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 (ウエ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。

(1-2) ウイルス様粒子 (VLPs) を用いたフラビウイルス感染鑑別法の開発

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 3)。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。

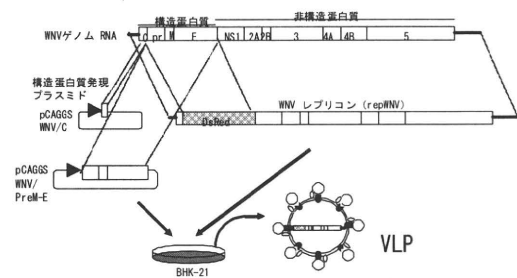


図 3. WNV-VLP の作製
WNV レプリコンと WNV の構造蛋白質発現ベクターの構築法および WNV-VLP 作製法を模式化した。repWNV はウイルスのゲノムの構造蛋白質遺伝子領域をレポーター蛋白質である DsRed の遺伝子で置換したものである。VLP は repWNV をウイルスの構造蛋白質と共に BHK-21 細胞に発現することにより作製した。

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。

(2) デングウイルス感染症の発生状況と当該地域の気象

中国・広東省の 1978~2007 年における DENV 感染症の疫学データと当該年度の気象データは共同研究者である中国・広東省感染症予防制御研究所の柯昌文博士とともに収集した。

(倫理面への配慮)

中国・広東省における DENV 感染症のデータの収集においては、生命倫理の観点よりインフォームド・コンセント等中国での倫理規定に則って行った。

C. 研究成果

(1) 新規フラビウイルス感染鑑別法の開発 (1-1) 中空ウイルス様粒子 (SvPs) を用いたフラビウイルス感染鑑別法の開発

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)。

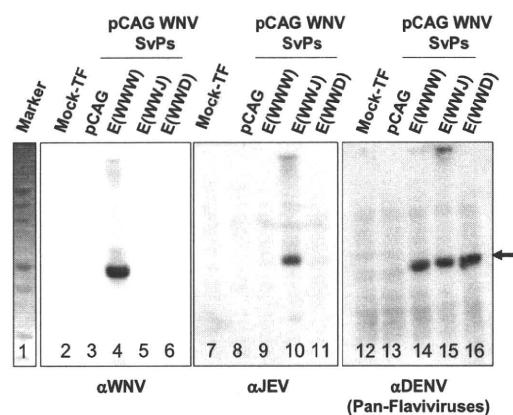


図 4. ウェスタンブロット法による感染鑑別

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。

(1-2) ウイルス様粒子 (VLPs) を用いた
フラビウイルス感染鑑別法の開発

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。

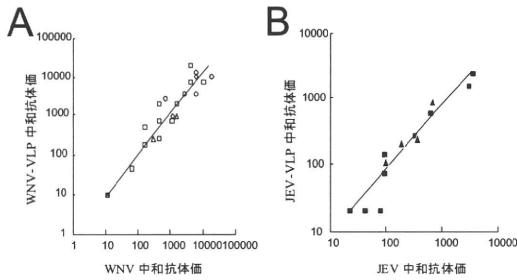


図 5. フラビウイルス中和試験における生ウイルス中和抗体価と VLP 中和抗体価の相関

WNV および WNV-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。

(2) デングウイルス感染症の発生状況と当該地域の気象変化

(2-1) 中国・広東省の 1978~2007 年における DENV 感染症の発生状況

本省の 1978~2007 年における DENV 感染症の患者数を図 6 に示す。

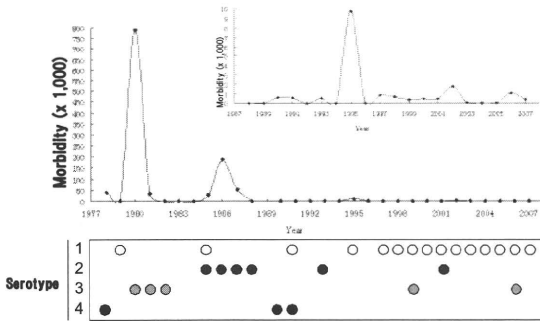


図 6. 中国・広東省の 1978~2007 年における DENV 感染症の発生状況

各年度の DENV 感染者数を記す (上段)。1997 年以降の患者数の推移は上段右上に示す。また、各流行時に検出された DENV の血清型を下図として記す。DENV 1~4 型を、それぞれ黄、赤、薄紫、黒丸として記す。

1980 および 1986、1995、2002 年と 6~10 年間隔で比較的多い流行が認められたが、患者数は顕著に減少している (図 6、上図)。また 1990 年代半ばより、DENV 1 型の流行が主となっている (図 6、下図)。

(2-2) 広東省の 1978~2007 年における気象

広州市では、過去 30 年間の年最高、最低、平均気温に上昇傾向が認められた (図 7A)。年平均降水量は年により変動が認められた (図 7B)。近年における相対湿度の減少は顕著であり周期性が認められた (図 7C)。また年平均日射量は周期的な変化が認められた。また、相対湿度が前年に比べ減少し、日射量が増加した年に DENV 感染症が流行する傾向が認められた (図 7D)。

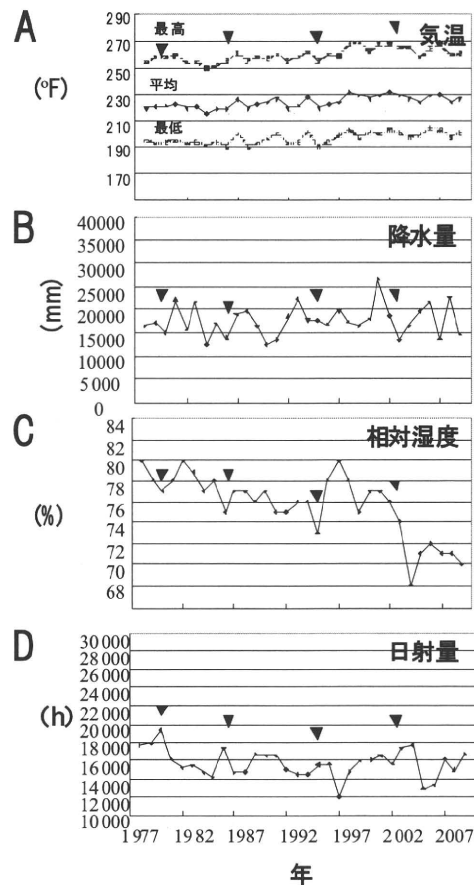


図 7. 1978~2007 年における広州市の気象調査

広州市における当該年の最高気温および年平均気温、最低気温 (A)、降水量 (B)、相対湿度 (C) および日射量 (D) を示す。黒三角は、比較的大きな DENV 感染症の流行が認められた年を示す。

D. 考察

1. 新規フラビウイルス感染鑑別法の開発
地球温暖化に伴い日本国内での流行が危惧されてい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ことを目的として、各種フラビウイルスの SvPs と VLPs を作製し、これらの鑑別検査法への適用の有効性について検討した。その結果、SvPs を用いたウエスタンブロット法や VLPs を用いた中和試験法の有効性が示された。また、今回開発した方法は、生ウイルスを使用する従来法に比べ安全に実施することが可能であるため、汎用性が高いものと考えられる。

2. デングウイルス感染症の発生状況と当該地域の気象変化
近年のグローバル化に伴い、世界の至るところで発生した感染症が日本に侵入する危険性は非常に高くなっているものと考えられる。特に日本に近隣のアジア諸国で発生している感染症、特に蚊等節足動物が媒介する感染症（地球の温暖化に伴い、その感染域の拡大が危惧されている）が、日本に侵入し流行する危険性は高いものと考えられる。そこで、本研究では日本の隣国である中国の広東省における、蚊媒介性フラビウイルス感染症の発生状況と当該地の気象との関連性の有無について検討した。

広東省における DENV 感染症の流行は 6～10 年間隔で周期的に起こっており、日射量や湿度等様々な気象因子と関連していることが示唆された。本省における流行地は広州市を含む珠港デルタ地域とその近郊の都市である。この地域は、中国における南アジア地域との貿易の要衝となっており、人や物資の移動が活発である。したがって、DENV 感染症が他のアジア諸国から輸入される危険性が非常に高く、毎夏その流行が危惧されている。日本と広州市との経済的な関係が深まるにつれ、同市を經由して新た

な感染症が日本に侵入する危険性も高まっている。また、広東省内で、DENV 感染症のエンデミックな流行が疑われるケースも報告されている。そこで今後は、省内の気象データと DENV 感染症流行の関連をより詳細に検討するとともに、省内に棲息する媒介蚊の DENV の保有調査を行い省内での DENV の存在様式を調べる必要があると考えられる。また、中国の近隣諸国での DENV 流行との関連を詳細に検討する必要がある。

E. 結論

本研究を通して、(1) 地球温暖化により感染拡大が危惧される蚊媒介性フラビウイルス感染症の新規の鑑別診断法の開発に成功した。また、(2) 中国・広東省 CDC と良好な信頼関係を築き、蚊媒介性フラビウイルスの一つであるデングウイルス感染症について流行解析を行うことが出来た。

F. 健康危険情報

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, A., pp. 103-116. Trans Research Network, Kerala, India, 2010

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, A., pp. 89-102. Trans Research Network, Kerala, India, 2010

- 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
- 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 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
- 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
- Murata, R., Eshita, Y., Maeda, A., Maeda, J., Sakai, A., Tanaka, T., Yoshii, K., Kariwa, H., Umemura, T., and Takashima, I. Glycosylation of West Nile virus envelope protein increases *In vivo* and *In vitro* viral multiplication in birds. *American J. Trop. Med. Hyg.*, 82; 696-704, 2010
- Hasebe, R., Suzuki, T., Makinno, Y., Igarashi, M., Yamanouchi, S., Maeda, A., Horiuchi, M., Sawa, H., and Kimura, T. Transcellular transport of West Nile virus-like particles across human endothelial cells depends on residues 156 and 159 of envelope protein. *BMC Microbiol.*, 10; 165-164., 2010
- Moritoh, K., Maeda, A., Sasaki, N., and Agui, T. Deveropement and application of West Nile virus subgenomic replicon RNA expressing secreted alkaline phosphatase. *J. Vet. Med. Sci.*, In press, 2010
- Maeda, A., Maeda, J., Ma, H., Ke, C.-W., Takagi, H., Takashima, I., and 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、苅和宏明、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、苅和宏明、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、苅和宏明、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)
- 秋山稔、村田亮、高島郁夫、苅和宏明、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, 2009, 6/19-6/20)
- 秋山稔、村田亮、高島郁夫、苅和宏明、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, 2009, 9/25-9/27)
- 前田秋彦、前田潤子、村田亮、白藤浩明、金平克史、苅和宏明、高島郁夫、倉根一郎 ウエストナイルウイルスと日本脳炎

2. 学会発表

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, 2009,
10/25-10/27)

前田秋彦、染谷梓、西野佳以、村田英雄、
倉根一郎. ウエストナイルウイルス・レ
プリコンの持続的複製細胞株の樹立. ト
ガ・フラビ・ペスチウイルス研究会 (東
京, 2010. 12. 10)

Maeda, A., and Ke, Chang-Wen.
Epidemiological study of
mosquito-borne diseases in Guangdong
province, China. The Workshop of
Network Laboratories on Emergency
Response and Surveillance of
Infectious Diseases in Pan Pearl River
Delta Region (Guangzhou, China,
2010. 12. 12)

H. 知的財産権の出願・登録状況
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）
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

分担研究報告書

ウエストナイルウイルス感染マウス脳内浸潤 T 細胞における
TCR レパトア解析によるウイルス特異性に関する研究

分担研究者 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： 本研究では 3 ヶ年を通して、地球環境の変化によりその拡大が懸念されるウエストナイルウイルス（WNV）感染症について、マウスモデルを作成し、脳内浸潤 T 細胞の免疫学的性状解析、ウイルス特異性の解析を行い、他のフラビウイルスとその比較検討を行った。WNV 感染マウスは、脳において組織破壊が進行し、Th1/Tc1 タイプのサイトカインバランスに基づき CD3+CD8+T 細胞の浸潤を認めた。WNV 感染によって誘導される T 細胞の TCR レパトアは WNV に対して極めて特異性が高く、また *in vitro* の解析においてもこの T 細胞は WNV に特異性を示し、機能的性状を有していることが証明された。また、TCR レパトア、CDR3 size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析による WNV、JEV、TBEV 間比較において、脳内に浸潤する抗原特異的 T 細胞は、非常に限定された TCR α 鎖と比較的多様な TCR β 鎖によって構成されることが判明した。本研究によって得られた知見は、WNV 特異的 T 細胞の抗原特異性における新規情報を示すだけでなく、ワクチン開発における基礎的知見を提供することができると考えられた。

A. 研究目的

WNV はフラビウイルス属のウイルスで、蚊と鳥の間で感染環が成立する。蚊の吸血によりヒトへ感染し、軽い発熱から急性熱性疾患、致死的な脳炎などの疾病を起こす。地球温暖化に伴い、感染媒介昆虫が本邦に侵入することが懸念されている。WNV は本来アフリカ地域の風土病であったが、1999 年にアメリカのニューヨークで大流行を起こし、多数の死者を発生させた。したがって WNV が日本へ侵入した場合、同様の流行が発生する可能性があり、大規模な新興感染症の発生が予想される。しかしながらヒトにおけるワクチンや特異的治療法は存在せず、脳炎発症のメカニズムも不明なままである。CD8+T 細胞がウエストナイル脳炎の防御において重要な役割を果たすと考えられているが、タイラーウイルス感染マウスの脊髄に出現する CD8+T 細胞が脱髄と相関するという報告があり、必ずしも防御的に作用するとは限らない。

最近、WNV と同じ日本脳炎血清群に含まれる日本脳炎ウイルス（JEV）感染マウスの脳内

浸潤 T 細胞の研究において、特定の TCRV 遺伝子をもつ抗原特異的 T 細胞の存在が解明された。WNV と JEV 間のアミノ酸配列の相同性は高く、本邦に存在する JEV 不活化ワクチンの接種により、マウスにおいて WNV 感染マウスの致死率を減少させるという報告がある。したがって T 細胞レベルにおいても同ウイルス間で共通エピトープを認識する可能性がある。WNV 感染病態解明は、ワクチン開発の基礎的情報として有用性が高く、WNV 感染で脳内に浸潤する T 細胞がどのような特異性を有しているか検討する必要がある。

本研究では、TCR レパトア解析を中心に、WNV 感染マウスモデルを用いて脳内浸潤 T 細胞の特異性を解析した。さらに JEV およびダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）感染マウスモデルのそれと比較し、共通エピトープに対して認識する可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) 動物感染実験：WNV は NY99-6922 株を使用し、7 週雌 C3H/HeNjcl (H-2^k) マウスに

感染させ、脳と脾臓を採取した。

(2) 病理学的解析：脳において組織学的解析 (HE 染色)、免疫組織学的解析 (CD3、CD4、CD8) を実施した。

(3) リアルタイム PCR：脾臓と脳から total RNA を抽出し、リアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて、ウイルス RNA 量やサイトカインバランスを解析した。

(4) T 細胞の特異性解析：WNV 感染による T 細胞の抗原特異性を評価するため、TCR レパトア解析、相補性決定領域 3 (CDR3) size spectratyping、CDR3 アミノ酸配列解析を実施した。JEV および TBEV で同様の解析により得られた結果を基に、ウイルス間における脳内浸潤 T 細胞の特異性を比較した。

(5) 交差反応性の解析：WNV および JEV 感染マウス脳内浸潤 T 細胞を分離し、*in vitro* におけるそれぞれのウイルスに対する交差性を評価するために、感染腹腔細胞との共培養による IFN- γ 産生能を解析した。さらに共培養後の T 細胞について、クローナリティーの変化を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および国立病院機構相模原病院 臨床研究センターにおける実験動物委員会のガイドラインにしたがって実施した。

C. 研究結果

(1) 組織学的および免疫組織学的解析で、WNV 感染マウスの脳では、組織破壊と CD3+CD8+細胞の浸潤が認められた (図-1)。

(2) リアルタイム定量 RT-PCR 解析で、WNV 感染マウスの脳では、WNV RNA 量が増加し、Th1/Tc1 タイプのサイトカインが亢進していた。さらに CD3、CD8、CD25 (IL-2R)、CD69、Perforin、Granzyme A、Granzyme B の発現レベルが、経時的に増加した (図-2)。

(3) TCR レパトア解析で、WNV 感染マウスの脳では、TCRAV1-1、2-1、BV5-2、8-2 が有意に増加していた (図-3A)。CDR3 size spectratyping 解析で、TCRAV1-1、2-1、BV5-2 はクローナリティーが非常に高かったが、TCRBV8-2 はオリゴクローナルであった (図-3B)。CDR3 アミノ酸配列解析で、TCRAV1-1 で複数の同一クローンを個体間で認め、それらの類似性は CDR3 領域内の N 領域における 1

アミノ酸の相違を持つことであった (図-4)。TCRAV2-1 においても類似の傾向が認められた。TCRBV5-2 および 8-2 では同一クローンは認められなかった。WNV、JEV、TBEV 間の脳内浸潤 T 細胞を比較した結果、共通の TCR クローンを持つ T 細胞は存在しなかった (図-4、図-5)。

(4) WNV 脳内浸潤 T 細胞と WNV 感染腹腔細胞の共培養系で IFN- γ 産生誘導を確認したが、JEV 感染腹腔細胞との共培養では有意な産生は認められなかった (表-1)。WNV 感染腹腔細胞との共培養により、WNV 脳内浸潤 T 細胞のクローナリティーは亢進し、限られた TCR クローンで占められるようになった (表-2)。

D. 考察

WNV 感染マウスモデルにおいては、脳組織の破壊、CD3+CD8+細胞の浸潤などの典型的な脳炎像を呈していた。この結果は CD3、CD8 mRNA 発現量の増加とも相関していた。リアルタイム定量 RT-PCR 解析の結果は、WNV 感染による脳内の免疫状態が Th1/Tc1 タイプで、IL-2 により活性化された細胞傷害性 T リンパ球がウイルス感染細胞の排除のため作用していることを示唆している。

TCR レパトア解析の結果から、WNV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞は、特定の TCR ファミリーを高度に使用し、抗原特異的であることが考えられる。また個体間で共通して得られた TCR クローンは、複数の V α 鎖、V β 鎖から構成されたことは、生体が認識しえる WNV エピトープが複数に及ぶことを反映しているものと推測する。さらにクローンレベルの解析において、TCR α 鎖が限定的であるのに対して、TCR β 鎖が多様である脳内浸潤 T 細胞の傾向から、WNV 抗原の認識において TCR α 鎖が重要であることが考えられる。WNV、JEV、TBEV 間で脳内に浸潤する T 細胞は、特異性解析の結果より完全に異なり、異なる抗原エピトープを認識し、ウイルス特異的に反応したことを示唆している。

in vitro における T 細胞による IFN- γ 誘導能を指標にした交差性の検討により、WNV と JEV の間で交差性は全く認められなかった。このことから WNV 初回感染時では、MHC によって提示されるウイルス関連ペプチドにより選択されて脳内に浸潤する T 細胞は、他の

近縁なウイルス間で交差性を示さないことが証明された。これはワクチンを設計するうえで、JEV および WNV の共通エピトープを用いた場合、初回感染における免疫賦活効果が弱い可能性を示唆している。WNV 感染マウス脳内浸潤 T 細胞の WNV 感染腹腔細胞との共培養によるクローナリティーの亢進は、その T 細胞が WNV 特異的であり、再刺激によって特異性が増強されたことを示唆する。したがって、初回感染時の WNV 感染マウス脳内に浸潤する T 細胞は、他の血清学的に類似するフラビウイルスと交差することなく、ウイルス特異的であることが証明された。

E. 結論

本研究により、各ウイルス感染で脳内に浸潤する T 細胞は、クローンレベルで異なることを証明した。さらに初回感染時に誘導される T 細胞が他のウイルス感染細胞によって活性化されないことを証明した。

これはウイルス間の共通配列部位では免疫系を強く刺激することができないことを示している。免疫賦活効率の良いワクチンを作製するためには、配列の異なる部位で検討する方が良いことが考えられる。ただし、ウイルスによっては T 細胞の活性化が、高度の組織破壊を引き起こしている可能性も視野に入れなければならないため、各ウイルスの脳浸潤 T 細胞が防御と破壊のどちらにシフトしているのか、今後詳細に検討する必要がある。

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 J, 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.

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

なし。

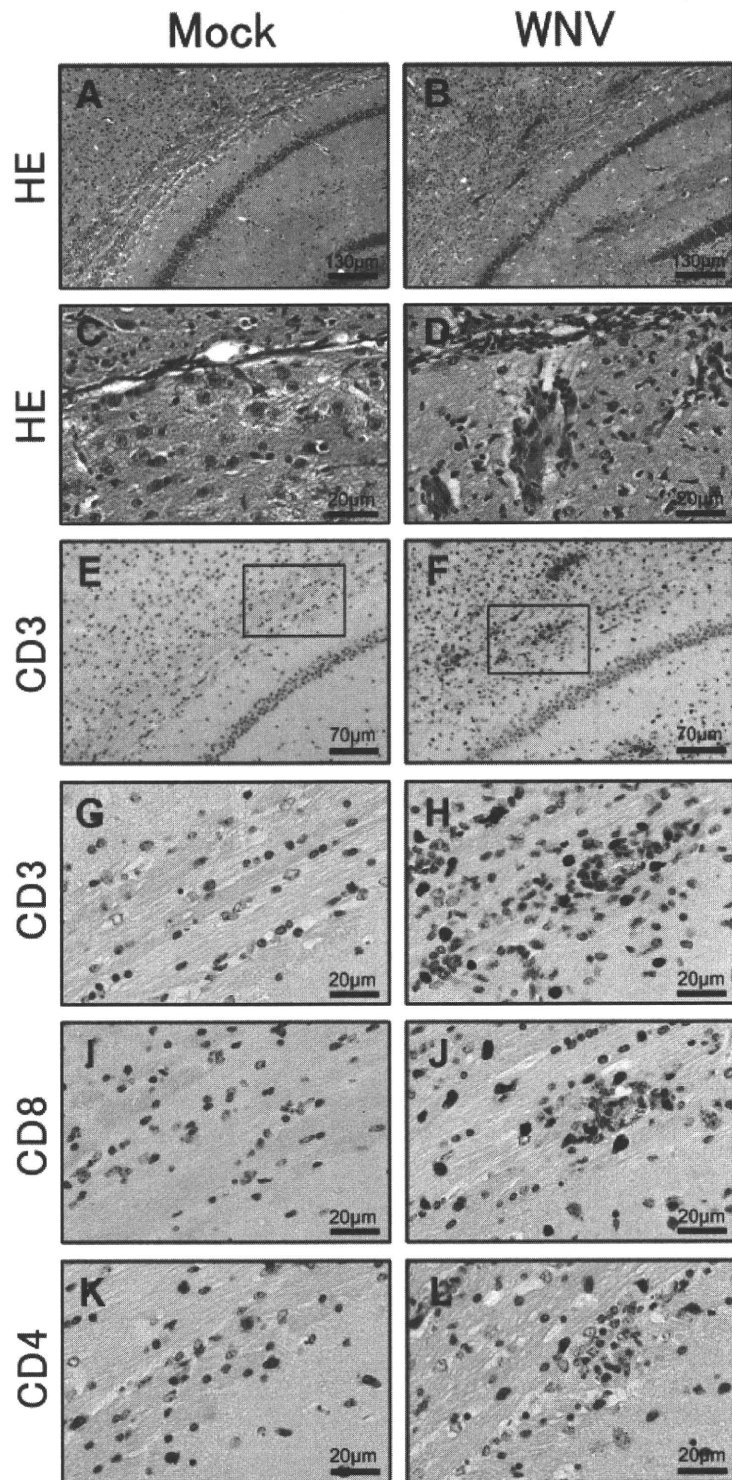


図-1. WNV感染マウス脳における組織学的解析と免疫組織学的解析。Mockマウス脳と比較して、WNV感染マウス脳では、広範囲に及ぶ脳組織の破壊とCD3+CD8+細胞の浸潤を認めた。ミクログリアがCD4を低発現するため、mockおよび感染マウス脳の両方でCD4+細胞が認められた。

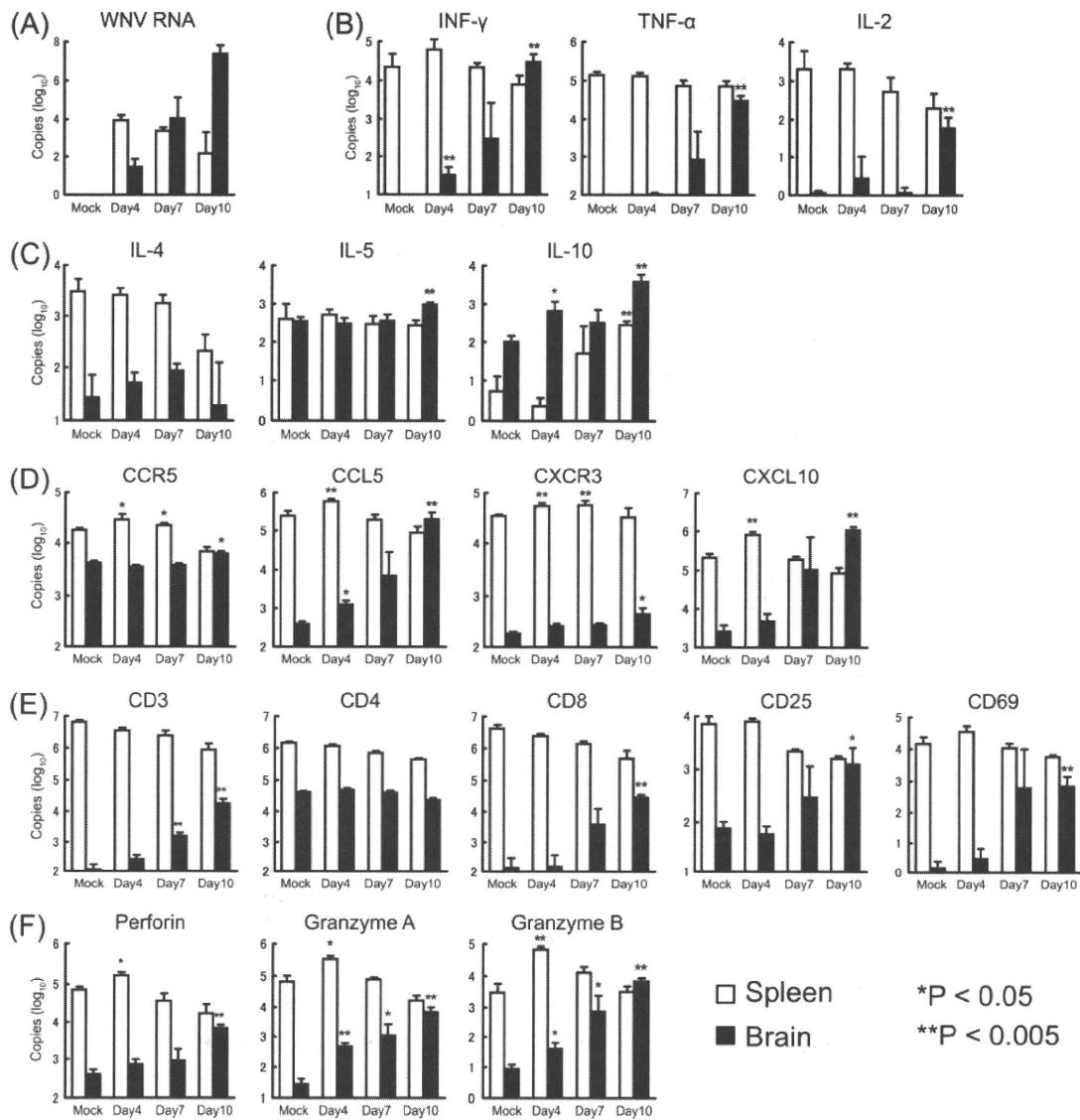


図-2. リアルタイム PCR による WNV RNA、サイトカイン、サイトカイン受容体、ケモカイン、ケモカイン受容体、T 細胞関連抗原、細胞傷害性顆粒の定量。Total RNA 50 ng 中の (A) WNV RNA のコピー数、(B) IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 (Th1 型サイトカイン)、(C) IL-4、IL-5、IL-10 (Th2 型サイトカイン)、(D) CCR5、CCL5、CXCR3、CXCL10 (ケモカイン)、(E) CD3、CD4、CD8、CD25 (IL-2R)、CD69 (T 細胞表面抗原)、(F) Perforin、Granzyme A、Granzyme B (細胞傷害性顆粒) の mRNA 発現レベルを示す。

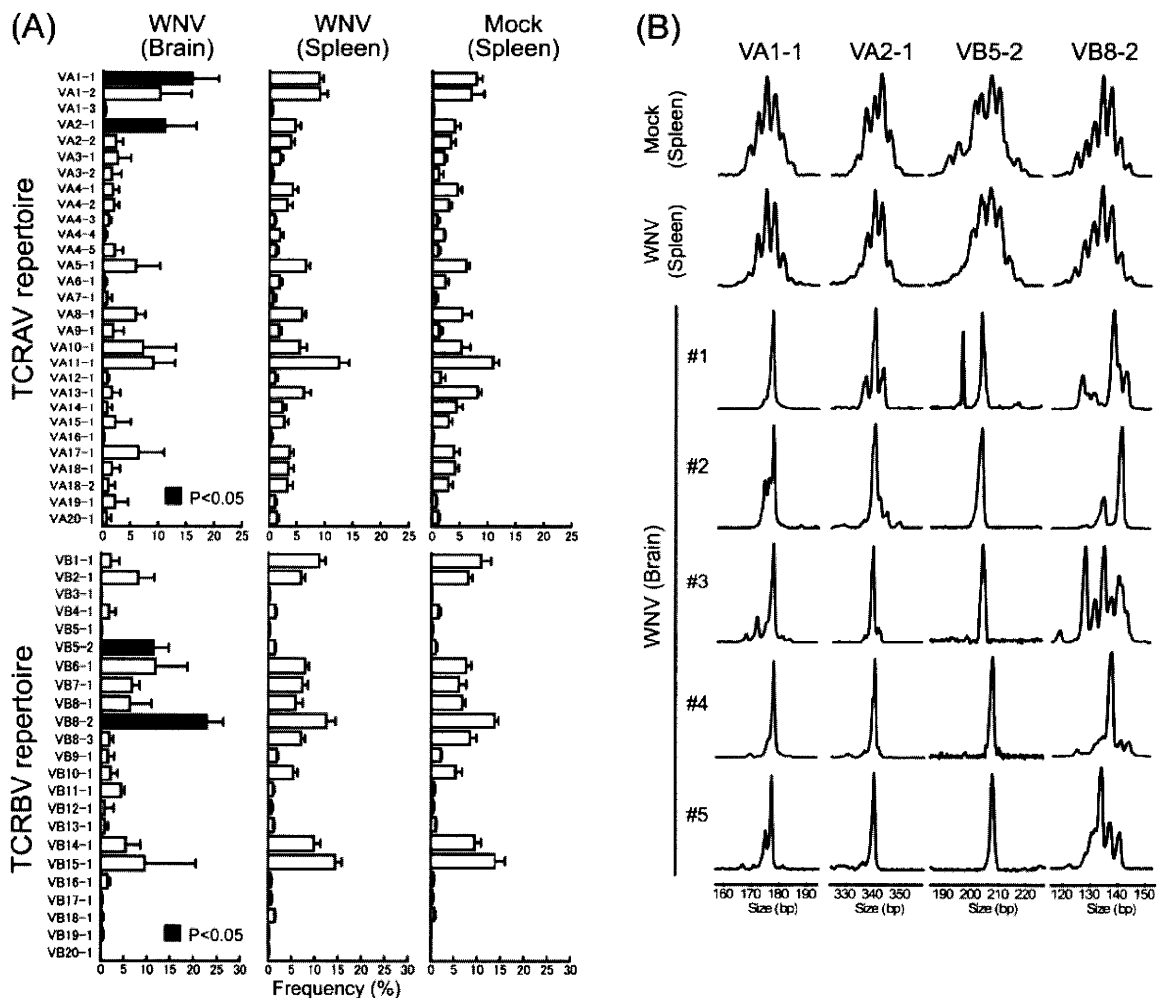


図-3. WNV 感染マウスにおける TCR レパトア解析と CDR3 サイズスペクトラタイピング。(A) TCR レパトア解析では Mock 脾臓を基準として、WNV 感染マウス脳で有意に増加が認められたファミリーを黒棒で示した。(B) TCR レパトア解析において有意差の認められたファミリーについて CDR3 サイズスペクトラタイピングを実施し、クローナリティーについて検討した。

	Brain	Clonal frequency	V	N	J	J gene	
(A) VA 1-1	#1	24/51	CAVS	IG	NSGTYQRF	AJ13	§
		21/51	CAVS	MG	NSGTYQRF	AJ13	¶
		3/51	CA	ASGL	SNTNKVVF	AJ34	
		2/51	CAVS	KG	NSGTYQRF	AJ13	θ
		1/51	CA	AL	NTGYQNFY	AJ49	
	#2	33/52	CAVS	LA	NSGTYQRF	AJ13	
		8/52	CAVS	RG	NSGTYQRF	AJ13	¶
		6/52	CAVS	MG	NSGTYQRF	AJ13	
		3/52	CAVS	MG	GYQNFYF	AJ49	†
		1/52	CA	ASME	GDNSKLIW	AJ38	
		1/52	CA	AED	YANKMICG	AJ47	
		#3	13/50	CAVS	PG	NSGTYQRF	AJ13
	9/50		CA	AN	NVGDNSKLIW	AJ38	*
	8/50		CA	ASM	TGNTRKLI	AJ37	
	6/50		C	GGKEG	GADRLTF	AJ45	
	4/50		CAVS	MG	NSGTYQRF	AJ13	¶
	3/50		CAVS	MG	GYQNFYF	AJ49	†
	3/50		CAVS	PA	NSGTYQRF	AJ13	
	2/50		CAV		NTNTGKLI	AJ27	
	1/50		C	GGKG	GSALGRLHF	AJ18	
	1/50		CA	ASI	NTNTGKLI	AJ27	
	#4		26/52	CAV	RPT	ASLGKLOF	AJ24
		15/52	CAVS	IG	NSGTYQRF	AJ13	§
		6/52	CAVS	RG	QGGRALIF	AJ15	
		3/52	CAAS	P	SGGSNAKLI	AJ42	
		2/52	CA	ASEMD	YANKMICG	AJ47	
	#5	18/51	CAVS	KG	NSGTYQRF	AJ13	θ
		12/51	CAVS		TNAYKVI	AJ30	
		9/51	CAVS	R	TOVVGGLF	AJ05	
		7/51	CAVS	PG	NSGTYQRF	AJ13	‡
		4/51	CA	AN	NVGDNSKLIW	AJ38	*
		1/51	CAV	LTG	GADRLTF	AJ45	

	Brain	Clonal frequency	V	N	J	J gene	
(B) VA 2-1	#1	34/50	CAAS	EG	GNKYVVF	AJ40	§
		6/50	CA	PRG	NNYAQGLTF	AJ26	
		5/50	CAAS	EG	TNTGKLI	AJ27	
		3/50	CAA	VD	YANKMICG	AJ47	
		2/50	CAA		TGGNKLTF	AJ56	
	#2	18/53	CAAS	G	GSALGRLHF	AJ18	
		15/53	CAAS	VA	GNKYVVF	AJ40	¶
		14/53	CAAS	EA	GNKYVVF	AJ40	
		3/53	CAA	NEA	GNKYVVF	AJ40	
		2/53	CAAS	AVY	NTNTGKLI	AJ27	
		1/53	CAAS	VS	SGGNKYKPTF	AJ06	
	#3	15/52	CAA	RG	NNYAQGLTF	AJ26	
		11/52	CAAS	EA	GNKYVVF	AJ40	¶
		7/52	CAAS	G	NNYAQGLTF	AJ26	
		6/52	CA	VRG	NNYAQGLTF	AJ26	
		6/52	CAAS	EG	GNKYVVF	AJ40	§
		5/52	CAAS	ET	GNKYVVF	AJ40	
		2/52	CAA	RD	VGDNSKLIW	AJ38	
	#4	21/52	CAAS	EA	GNKYVVF	AJ40	¶
		14/52	CAAS	P	TNAYKVI	AJ30	
12/52		CAA	I	TGGNKLTF	AJ56		
4/52		CAAS	MA	GNKYVVF	AJ40		
1/52		CA	G	NNNAGAKLTF	AJ39		
#5		17/50	CAAS	EA	GNKYVVF	AJ40	¶
	11/50	CAAS	LA	GNKYVVF	AJ40		
	9/50	CAA	RGN	YADGLTF	AJ26		
	8/50	CAAS	NA	NAYKVI	AJ30		
	3/50	CAAS	AGD	NYAQGLTF	AJ26		
	2/50	CA	V	HAGAKLTF	AJ39		

	Brain	Clonal frequency	V	N-D-N	J	J gene	
(C) VB 5-2	#1	49/52	CASS	PQTGG	YEQYF	BJ2.7	
		3/52	CASS	RTG	SAETLYF	BJ2.3	
		46/53	CASS	RGD	YAEQFF	BJ2.1	
	#2	5/53	CAS	FRGD	YAEQFF	BJ2.1	
		2/53	CASS	GTGG	NERFF	BJ1.4	
	#3	34/51	CASS	LEL	YAEQFF	BJ2.1	
		13/51	CASS	PEL	YAEQFF	BJ2.1	
		4/51	CASS	LDP	EQYF	BJ2.7	
	#4	26/51	CASS	PRD	NYAEQFF	BJ2.1	
		15/51	CASS	LGGG	SYEQYF	BJ2.7	
		8/51	CASS	LLDN	AETLYF	BJ2.3	
	#5	2/51	CASS	LTGA	NTEVFF	BJ1.1	
		42/51	CASS	LRDS	YAEQFF	BJ2.1	
	9/51	CASS	LNRV	YAEQFF	BJ2.1		

	Brain	Clonal frequency	V	N	J	J gene	
(D) VB 8-2	#1	18/52	CASG	DWGAQ	SQNTLYF	BJ2.4	
		10/52	CASG	DRTGL	NERLFF	BJ1.4	
		9/52	CASG	DWTGK	SQNTLYF	BJ2.4	
		7/52	CASG	EWGG	AEQFF	BJ2.1	
		3/52	CASG	DVGGG	NTEVFF	BJ1.1	
		3/52	CAS	SATTGG	NSDYTF	BJ1.2	
	#2	2/52	CASG	DDR	YEQYF	BJ2.7	
		28/53	CASG	DWAGFS	SYEQYF	BJ2.7	
		9/53	CAS	SDDRG	SAETLYF	BJ2.3	
		9/53	CASG	DPGG	SYEQYF	BJ2.7	
		3/53	CASG	ESGARD	NSPLYFA	BJ1.6	
		2/53	CAS	SPGTP	SYEQYF	BJ2.7	
		1/53	CAS	SDGTGDN	NSPLYFA	BJ1.6	
	#3	1/53	CASG	ERAGFS	SYEQYF	BJ2.7	
		16/50	CASG	DWG	DTQYF	BJ2.5	
		13/50	CASG	DAG	NQDQYF	BJ2.5	
		8/50	CASG	DAWGR	EQYF	BJ2.7	
		7/50	CASG	DWTGDT	YAEQFF	BJ2.1	
		3/50	CASG	DGGG	EQYF	BJ2.7	
		2/50	CASG	DWTGGAG	QNTLYF	BJ2.4	
	1/50	CASG	DWTGD	NYAEQFF	BJ2.1		
	#4	32/51	CASG	GLGS	SAETLYF	BJ2.3	
		8/51	CASG	DWTGGD	ERLFF	BJ1.4	
		5/51	CASG	DAGN	SYEQYF	BJ2.7	
		4/51	CASE	DWTGGALG	QNTLYF	BJ2.4	
		2/51	CASG	DL	YNSPLYFAAG	BJ1.6	
		#5	16/50	CASG	GTGL	NTRYF	BJ2.4
	13/50		CASG	EPGGA	NTRYF	BJ2.4	
	8/50		CASG	DARD	SNERFF	BJ1.4	
	4/50		CAS	RPRDWGN	YEQYF	BJ2.7	
	3/50		CASG	DARTN	SGNTLYF	BJ1.3	
	3/50		CAS	SDWGA	SAETLYF	BJ2.3	
	2/50		CASG	ADGG	ETLYF	BJ2.3	
	1/50		CASG	DEE	NTRYF	BJ2.4	

図-4. WNV 感染マウス脳において有意な増加が認められた各 TCR ファミリーの CDR3 アミノ酸配列の比較。個体間で認められた同一配列についてシンボルで示した。