

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
「節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究」

チクングニア熱実験室診断法の開発と評価

研究分担者 高崎智彦（国立感染症研究所、ウイルス第一部 室長）

協力研究者 池田真紀子、モイ メンリン、小滝 徹、田島 茂、林 昌宏
（国立感染症研究所ウイルス第一部）

小長谷昌未、藤本嗣人（国立感染症研究所感染症情報センター）

倉根一郎（国立感染症研究所 副所長）

チクングニア熱は、チクングニアウイルスによって引き起こされる蚊媒介性ウイルス感染症であり、ヒト→蚊→ヒトの感染環をもつ。21年度、22年度の2年間は、チクングニアウイルス遺伝子検出の迅速検出法 Hyper RT-PCR 法を開発・評価した。その結果、複数の遺伝子型のチクングニアウイルスを検出できる特異性の高いチクングニアウイルス迅速遺伝子検出法を開発した。チクングニア熱は、2011年2月1日に感染症法に4類感染症全数把握疾患に規定されたことから、23年度は抗体検査法の評価を行った。チクングニア熱輸入症例は、急性症状が治まっても関節痛が持続することで病院を受診する場合も多い。そのため抗体検査が重要である。特に IgM 抗体検査が重要になってくるが、チクングニアウイルスは BSL3 のウイルスであるため、IgM 捕捉 ELISA のためのウイルス抗原をどこの施設でも用意できるわけではない。我々は、世界において商業ベースで入手（輸入）可能な抗チクングニアウイルス IgM 抗体検査キットを評価した。しかし、イムノクロマト法による迅速キットは3キットともいずれも感度は低かった。また、IgM 捕捉 ELISA キットは、ロット間の特異性に問題があり、偽陽性きたす場合があった。今回、評価したチクングニアウイルス IgM 抗体検査キットは、いずれも実験室診断に用いるに堪えるものではなかった。

A. 目的

チクングニア熱は、平成 23 年 2 月 1 日より感染症法において全数把握の 4 類感染症として診断後ただちに届け出ることが医師に義務付けられた。また、同時に検疫感染症として検疫法に規定された。チクングニア熱は、臨床症状がデング熱と類似し、流行地域も東南アジア、南アジア、ア

フリカとデング熱と重なることから実験室診断（病原体診断法、血清診断法）が重要となってくる。チクングニア熱は高いウイルス血症を呈するが、本疾患の認知度がまだ低く受診あるいは検体採取の時期が遅れがちである。そのため高いウイルス血症の時に検体採取される場合は少なく、より高感度のウイルス遺伝子検出法が求め

られる。また、チクングニア熱は急性症状が治まっても関節痛が続くため、急性期を過ぎて病院を受診する患者も多く、その場合は抗体検査が重要である。そこで、迅速で高感度なチクングニアウイルス遺伝子検出法 (Hyper RT-PCR 法) を開発・評価した比較的早期に検出できる IgM 抗体検査キットを評価した。

B. 方法

1、Hyper RT-PCR 法

チクングニアウイルスの構造タンパク質コーディング領域にセンスプライマー 8 種類、アンチセンスプライマー 7 種類を設計した。また、ウイルス遺伝子 RNA 数を定量するため E1 領域をプラスミドベクター-pcDNA3.1 にクローニングし、合成 RNA を合成した。これらを用いて、Hyper PCR UR MK-IV を用いて、チクングニアウイルス Hyper RT-PCR 法を開発・確立した。

2、IgM 抗体検査法

評価したキットは、以下の 4 つのキットである。いずれも輸入品であり、日本国内で認可されたものではない。

1) Chikungunya (CHIKV) IgM; Millenium Biotechnology, Inc., USA/SA.

2) Chikungunta (IgM) Test (Cassette); AZOG, Inc., NJ USA.

3) Chikungunya IgG/IgM Test (Cassette); biocam Diagnostic Inc. BC Canada.

以上はイムノクロマト法を利用した迅速診断キットである。検査法は 3 キットともほぼ同じであり、それぞれのキットのプロトコルに基づいて検査は実施した。

4) NovaLisa™ Chikungunya Virus IgM μ -capture ELISA; NovaTec

Immundiagnostica GmbH. Diezenbach, Germany は IgM 抗体捕捉 ELISA キットである。検査はキットのプロトコルに基づいて実施した。

C. 結果

1、Hyper RT-PCR 法

1) 温度条件の検討

至的な温度条件は、48°C60 秒、95°C60 秒、[95°C4 秒、68°C4 秒、68°C4 秒] で 45 サイクルの反応条件でチクングニアウイルスに対して 10 RNA コピー/サンプルの検出感度を示した。またアガロースゲル泳動による増幅産物解析においても目的のバンド以外に非特異的バンドが観察されなかった。

2) 検出感度の検討

チクングニアウイルス合成 RNA を 10^5 コピー数から 10 倍階段希釈し、プライマーペア; CHIK10572f/CHIK10798r の感度を測定したところ 1 RNA コピー/サンプルまで検出できることが確認された。

3) チクングニアウイルス野外株に対するプライマーペアの検討

プライマーペア-CHIK10572f/CHIK10798r の他のチクングニアウイルス野外株への反応性を検討した結果、アジア型、東・中央アフリカ型のいずれにも反応し、十分な感度を示した。

2、IgM 抗体検査

1) イムノクロマトキット

日本のチクングニア熱輸入症例の血清を用いて評価したが、in house IgM 捕捉 ELISA キットで陽性、回復期血清で抗チクングニア中和抗体陽性の血清に対して、反

応しないあるいは、バンドが極めて薄いなど十分な感度を示さなかった。

2) IgM抗体捕捉ELISAキット(表1)

(NovaLisa™)では検体10-57/1は *in house kit*では陰性でその後の中和抗体検査でもチクングニア熱ではなかった検体であるが、本キットでは判定保留となった。

10-23/1は *in house kit*では判定保留、10-23/2は陽性となった症例の検体であったが本検体に関しては結果が一致した。本キットの陽性コントロールのOD値は0.652であるのに対して、Cut off血清のOD値は0.585と0.589であり、非常にわずかな差でありCut offのOD値の微妙な変動が判定結果に及ぼす影響が大きいことが示唆された。実際本キットの次のロットでは、検体10-57/1は陽性の判定結果となった。

D. 考 察

チクングニアウイルス遺伝子検出法(Hyper RT-PCR法)に関してセンスプライマー8種、アンチセンスプライマー7種を作製し、さまざまな組み合わせの特異性および感度を検討した。その過程でHyper RT-PCR法は、アニーリング温度から熱変性温度までのスピードが速いため伸長効率が高く、かつ非特異的な増幅が起きにくいプライマー設計および温度条件が重要であることが明らかとなった。そのような条件検討の結果、CHIK10572f/CHIK10798rが最も適していた。CHIK10572f/CHIK10798rを用いて様々な野外株に関して検出感度を検討した結果、アジア型およびアフリカ型量遺伝子型に関して十分な検出感度が確認された。

チクングニアウイルスIgM抗体検査キットで使用が可能な商業ベースのキットは見いだせなかった。イムノクロマト法を用いた迅速診断法キットは、デングウイルスに対するキットにおいても感度、特異性に関して満足のものはない。したがって、まずはIgM捕捉ELISAキットに関して評価するほうが効率的である。今回評価したIgM捕捉ELISAキット(NovaLisa™)もヒトの診断用として使用に堪えるものではなかったが、今後新たなキットが販売されることが予想されている。入手出来しだい評価したい。

チクングニアウイルスは、トガウイルス科アルファウイルスに属するウイルスであり、抗アルファウイルスIgG抗体を有する日本人は稀である。この点が、日本脳炎ウイルスと交差反応を示すデングウイルスとは異なり、IgG抗体検査(IgG ELISA法)もペア-血清がそろった症例では有用である。今後、商業ベースの抗チクングニアウイルスIgG ELISAキットの評価する必要がある。

E. 結 論

チクングニアウイルス遺伝子迅速検出法としてHyper RT-PCR法を確立した。短時間でウイルス遺伝子型にかかわらず検出可能であることが確認された。

IgM抗体検査キットの評価では信頼のおける抗チクングニアウイルスIgM抗体検査キットは確認されなかった。入手でき次第他のキットも評価するが、今後、*in house*キットを普及させるためには、チクングニアウイルス抗原のレコンビナント化などを考慮する必要がある。また、チク

ングニアウイルスは、トガウイルス科アルファウイルスに属するウイルスであり、抗アルファウイルス IgG 抗体を有する日本人は稀であることから、今後は抗チクングニアウイルス IgG 抗体キットを評価する予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoyama I, Uno K, Yumisashi T, Takasaki T, Lim CK, Kurane I, Kase T, Takahashi K. A case of chikungunya fever imported from India to Japan, follow-up of specific IgM and IgG antibodies over a 6-month period. *Jpn J Infect Dis.* 63(1):65-66, 2010
2. Lim CK, Nishibori T, Watanabe K, Ito M, Kotaki A, Tanaka K, Kurane I, Takasaki T. Chikungunya virus isolated from a returnee to Japan from sri lanka: isolation of two sub-strains with different characteristics. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Nov;81(5):865-868.
3. CK Lim, Kurane I. Takasaki T., Re-emergence of Chikungunya virus. *Animal viruses.* p1-22. (Edited by Maeda A) printed by Transworld Research Network (2010)
4. Tomohiko Takasaki, A. Kotaki, S. Tajima, T. Omatsu, F. Harada, C.K. Lim, M.L. Moi, M. Ito, M. Ikeda, I. Kurane. Demographic feature of imported dengue haemorrhagic fever in Japan from 2006 to

2009. *Dengue Bulletin*, edited by WHO 35:218-223 (2011).

5. 林昌宏. チクングニアウイルス。臨床と微生物、36(3) : 211-216, 2009

6. チクングニアウイルス感染症. 獣医学雑誌、15(2) : 114-116.

2. 学会発表

1) 国際学会

1. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Detection of higher levels of dengue viremia using Fc γ R-expressing BHK-21 cells than Fc γ R negative cells in serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, 2011年9月
2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection: revisit of antibody response and viremia in dengue patients using Fc γ R-expressing BHK cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, California, USA, 2011年6月
3. Chang-Kweng Lim, Yasuo Ami, Yoshiaki Fujii, Meng Ling Moi, Kazutaka Kitaura, Akira Kotaki, Shigeru Morikawa, Masayuki Saijo, Ryuji Suzuki, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki. Phasogenesis of Epidemic Chikungunya virus in Nonhuman Primates. XV

International Congress of Virology.
11-16 September 2011 (Sapporo)

4. Lim. C.K., Takasaki T., Moi M.L.,
Omatsu, T., Kotaki, A., Chua K.B.,
Kurane I. Molecular Diagnosis and
analysis of Chikungunya virus in
Malaysia. 第8回日中国際ウイルス学会.
ハルビン. 中国、2011

5. Takasaki, T., Moi M.L., Lim C.K.,
Kurane I. Imported Chikungunya fever
and dengue fever in Japan. 第7回日台ワ
クチン・旅行医学シンポジウム. 台湾 (台
北)、2010 (9月)

2) 国内発表

1、水野泰孝、氏家無限、竹下 望、加藤
康幸、金川修三、工藤宏一郎、高崎智彦、
林昌宏、倉根一郎. 遷延する関節痛を主訴
に来院したチクングニヤ熱の3症例. 第58
回日本感染症学会東日本地方会学術集会
(東京都). 2009年10月30-31日

2、林昌宏、高崎智彦、モイメンリン、大
松勉、倉根一郎. 近年のチクングニヤ熱流
行におけるチクングニヤ熱疑い患者血清の

病原体および血清学的解析. 日本感染症学
会総会 2010/4/5-6 (京都)

3、青山幾子、弓指孝博、高崎智彦、加瀬
哲男、高橋和郎. チクングニヤ熱において
IgM抗体が持続した1症例. 第51回臨床ウ
イルス学会. 2010年6月19-20日 (高松)

4、林昌宏、藤本嗣人、小長谷昌美、モイ
メンリン、小滝 徹、倉根一郎、高崎智彦.
近年のチクングニア熱の流行と迅速診断
法の検討. 第58回日本ウイルス学会学術集
会 2010年11月 (徳島)

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

厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究
(H21-新興-一般-005)

分担研究報告書

デングウイルスの性状解析および感染時における抗体の役割検討に関する研究

研究分担者 倉根一郎 (国立感染症研究所・副所長)
協力研究者 高崎智彦 (国立感染症研究所ウイルス第一部・室長)
モイメンリン (国立感染症研究所ウイルス第一部・研究官)

研究要旨

本研究ではこれまでに確立したデングウイルス血清学的検査法(抗体依存性感染増強(ADE)アッセイ法・新規中和試験法)の有用性を検討した。さらに、この ADE アッセイを用いてデング熱サーベイランス等のためのウイルス分離法としての有用性を検討し、分離したウイルスの性状解析を行った。この検査法を用いてデング熱流行地の患者および住民の 80 検体を検討した。その結果、デング熱再感染患者と確認された検体においては、感染したウイルスの血清型に対する中和能を非 Fc γ R 発現細胞を用いて検出したが、Fc γ R 発現細胞においては検出されなかった。「感染増強活性」および「中和活性」を同時に測定しうる有用な中和試験・ADE アッセイ法を確立した。さらに、ADE 法を用いて、アフリカ渡航歴のあるデング熱患者からウイルスを分離し、ウイルスの性状解析を行った。Fc γ R 発現細胞を用いた ADE 法によるウイルス分離法は、効率よくウイルスを分離できる場合があることから、デング熱サーベイランスにも活用できる有用なツールであることが示唆された。

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱は、近年世界の熱帯・亜熱帯地域に拡大しており、公衆衛生上大きな問題となっている。デングウイルスは 4 つの血清型が存在する。感染したウイルスの血清型に対する防御免疫は終生持続するが、他の血清型に対する防御免疫能は不完全なものである。初感染時に誘導された非中和交差抗体が再感染時に他の血清型の感染ウイルスを増強させることが

致死性の高いデング出血熱の発症機序の一要因とされている。感染時に誘導された抗体は 2 つの相反する生物活性を有し、「感染増強活性」は症状を悪化させる一要因となる。一方、「中和活性」は感染防御につながるとされている。ワクチンがいまだに実用化されていない背景には、① デングウイルスに対する防御免疫が解明されていないこと、② ワクチンの接種によって誘導さ

れた抗体が感染増強作用を保有し、症状を悪化させる可能性があることがあげられる。抗体のデングウイルスに対する中和活性は、通常、非 FcγR 発現細胞によって測定されている。しかし、従来の方法は非 FcγR 発現細胞において中和活性を検出することが可能であっても、デングウイルスの体内における標的細胞である monocyte/macrophage など FcγR 発現細胞に対する感染増強活性を同時に検出することが不可能である。本研究では、いままで確立し FcγR 発現 BHK 細胞が中和能を有するデング患者血清における感染増強活性の検出・測定に使用可能かを検討した。

さらに、確立した ADE アッセイを用いて、デング熱渡航者の血清からウイルス分離に使用可能かを検討した。流行地域から帰国した患者からのウイルス株を分離するとともに、デング熱サーベイランスの情報が限られているアフリカにおける流行株の性状解析を行った。

B. 研究方法

患者血清：マレーシアのペラ州在住の 80 人から 80 検体（血清）を採取した。アフリカ渡航者 4 人から 4 検体を採取し、ウイルス分離（感染増強活性を有する抗体 mAb4G2 を用いた FcγR 発現細胞によるウイルス分離法(ADE 法)および C6/36 細胞、Moi et al., Emerg Infect Dis, 2010; Moi et al., J Clin Virol, 2011)および血清学的検査ならびにウイルス抗原検査(NS1 ELISA, BioRad 社)を行った。

抗体：感染増強活性を有する抗体 (mAb4G2)をウイルス分離に用いた。

ウイルスと細胞培養：デングウイルス中和試験および ADE 試験においては DENV-1(NIID01-44 株), DENV-2(TLC30 株), DENV-3 (CH53649 株), DENV-4(TVP360 株)を用いた。ウイルス中和試験および感染増強(ADE)試験にはヒト FcγR(FcγRIIA,CD32a)発現 BHK-21 細胞および非発現 BHK-21 細胞を用いた。

ウイルス遺伝子および抗ウイルス抗体検出：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, 2004)の方法により実施した。

抗デングウイルス IgM 抗体検査: IgM 捕捉 ELISA 法 (Focus 社キット)によった。検査はキットのプロトコールに従い実施した。また、IgG ELISA 法 (Panbio 社キット)もプロトコールに従い実施した。

ウイルス遺伝子解析および系統樹解析: 分離されたデングウイルスは、デングウイルス 3 型用遺伝子配列用プライマーを用いて RT-PCR 法によりウイルス遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンスにより、ABI prism Avant 7100 (ABI 社)によりプロトコールに従い塩基配列を決定し、ホモロジー・系統樹解析した。

中和価試験および感染増強アッセイ：デングウイルスの中和試験は FcγR 発現 BHK 細胞および非 FcγR 発現 BHK を用いた 50%ブランク減少法ならびに感染増強(ADE)アッセイにて検討した。マレーシアの住民 80 人から採取した血清を非動化し、10 倍希釈後 2 倍階段希釈(1:10-1:2560)を行った。希釈し

た血清とウイルスを混合後、37°C、1 時間反応を行った。各ウイルス-反応液を非 FcγR 発現 BHK 細胞および FcγR 発現 BHK に接種し、37°C、1 時間吸着後、1.0%メチルセルロースを加え、37°C で 5 日間培養した。ホルマリンによる固定 1 時間後、メチレンブルーを用いて細胞を 1 時間染色し、ウイルス中和抗体価およびウイルス力価を算出した。デングウイルス遺伝子は RT-PCR 法にて検出した。

C. 研究結果

マレーシアの住民から採取した 80 検体を検討した。25 (25/80)検体においてはデングウイルス遺伝子が検出され、そのうち 18 (18/25)検体では同時に抗デングウイルス IgG 抗体および中和抗体も検出された。うち 7(7/18)検体から DENV1 遺伝子が検出され、11(11/18)検体から DENV3 遺伝子が検出された。このことから、18 人は再感染のデングウイルス感染であることが示唆された。55 (55/80) 検体においては、ウイルス遺伝子が検出されなかった。FcγR 発現細胞を用いた ADE アッセイ法により 1:10 に希釈した血清の 75% (60/80)は中和活性とともに感染増強抗体を有することが示された。再感染患者 18 人のうち 11(11/18)検体は、感染したウイルスの血清型に対する中和能 (PRNT \geq 10)が非 FcγR 発現細胞にて検出されたが FcγR 発現細胞では検出されなかった。非 FcγR 発現細胞を用いたところ、18 検体中 7 検体においては DENV2 のみに対する中和能が検出され、11 検体においては複数の血清に対する中和能を有していた。13 検体(13/18) においては DENV2 のみに対する中和能が FcγR 発現細胞にて検出された。2

検体(2/18)においては DENV1 に対する中和抗体が FcγR 発現細胞にて検出された。興味深いことに、10 検体(10/18)は、感染されたウイルス血清型に対する中和抗体を非 FcγR 発現細胞にて検出したが、FcγR 発現細胞では中和能が検出されなかった。

DENV1 患者血清における感染増強活性を検討したところ、DENV1=0.7-5.6, DENV2= $<$ 0.1-2.1, DENV3=0.9-4.9, DENV4= 1.1-7.0 であった。DENV3 患者における感染増強活性は、DENV1= $<$ 0.1-5.5, DENV2= $<$ 0.1-2.3, DENV3= 0.6-6.7, DENV4=0.9-7.1 であった。以上の結果により、再感染患者血清における抗体は、感染したウイルスの血清型に対する感染増強活性を有することが示唆された。

ADE アッセイを用いて、アフリカ輸入症例の検体からウイルスを分離した。タンザニアからの輸入デング熱症例は、デングウイルス 3 型感染によるデング熱であった。遺伝子解析の結果も 96~98%程度のホモロジーであり、アフリカでは現在ほぼ近縁なデングウイルス 3 型による流行が発生していることが示唆された。アフリカのデングウイルスに関するウイルス遺伝子情報は少なく、輸入症例から我々がコートジボアールとタンザニアからの輸入症例患者から分離したウイルスは 2004 年にサウジアラビアで分離されたデングウイルス 3 型とホモロジーが高く約 98~99%であった。さらにホモロジー検索を実施すると、2003 年から 2004 年のインド北部におけるデング熱流行時のデングウイルス 3 型と 98%のホモロジーを有することが確認された。また、我々がタンザニアからの 2 症例を ProMed に報告した (*ProMed*, archive no. 20100323.0922) 後、

タンザニア国内で 17 例のデング熱患者が確認され、抗デングウイルス IgM/IgG 抗体保有タンザニアの住民も確認された(Vairo et al., Int J Infect Dis, 2012; Hertz et al., Am J Trop Med Hyg, 2012)。

D. 考察

本研究では、抗デングウイルス抗体における非 FcγR 発現細胞によって測定された中和抗体価と FcγR 発現細胞によって検出された ADE 活性との関連を検討した。デングウイルス流行地であるマレーシアのペラ州の住民から採取された血清においては検体の 75%(60/80)が中和活性および ADE 活性を有する。非 FcγR 発現細胞により測定された中和抗体価は FcγR 発現細胞より高価である。再感染患者 8 検体においては、非 FcγR 発現細胞によって検出された中和抗体が複数のウイルス血清型に対する中和能を有する。しかし、FcγR 発現細胞を用いたところ、DENV2 型のみに対する中和能(1:10->1:1280)が検出され、血清型間の交叉中和活性(cross-reactive neutralizing activity)による中和能が検出されなかった。このことによって、感染増強活性は、中和活性を低下させる可能性があることが示唆された。

再感染の患者 11 人において感染したウイルス型に対する中和活性が非 FcγR 発現細胞にて検出された(PRNT50=1:10-1:80)。しかし、FcγR 発現細胞を用いたところ、中和抗体が検出されなかった。この結果により、FcγR 発現細胞のみに対する感染性を有する抗体-ウイルス複合体が感染時に存在することが示唆された。

我が国へのデング熱、デング出血熱輸入症例の大部分は、東南アジア・南アジアか

らである。しかし、2008-2010 年は、アフリカからの輸入症例 4 例を確認した。このことは、アフリカでもデング熱流行が拡大していることを示唆している。今後、アフリカのデング熱流行が拡大すると、アフリカからのデング熱・デング出血熱輸入症例も考慮しなければならない。

E. 結論

初感染によって誘導された中和抗体は感染された同血清型に対する中和能が終生持続する。デング熱流行地の住民血清における中和・感染増強活性を検討したところ、FcγR 発現細胞のみに検出された感染増強活性が非 FcγR 発現細胞においては検出された中和活性を低減させることが明らかとなった。非 FcγR 発現細胞にて検出された中和活性を有しない、または中和活性の低い抗体においては、感染増強活性が検出された。これまでに確立した FcγR 発現細胞を用いて、感染増強活性および中和活性を同時に測定しうる新規中和試験法を確立した。以上の結果により、非 FcγR 発現細胞によって測定された中和抗体活性は感染増強活性が考慮されない状態で検討されたことから、生体における抗体の機能を反映していない可能性があることが示唆された。

また、ADE 法を用いてアフリカ渡航者から分離し、ウイルスの性状解析を行った。FcγR 発現細胞を用いた ADE 法によるウイルス分離法は、デング熱サーベイランスにも活用できる有用なツールであることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Moi ML, Lim CK, Chua KB, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus infection-enhancing activity in serum samples with neutralizing activity as determined by using FcγR-expressing cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases, in press*, 2012.
2. Ujiie M, Moi ML, Kobayashi T, Takeshita N, Kato Y, Takasaki T, Kanagawa S. Dengue virus type-3 infection in a traveler returning from Benin to Japan. *Journal of Travel Medicine, in press*, 2012.
3. Takasaki T, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Harada F, Lim CK, Moi ML, Ito M, Ikeda M, Kurane I. Demographic features of imported dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Japan from 2006 to 2009. *Dengue Bulletin, in press*, 2012.
4. モイメンリン, 高崎智彦. 感染症迅速診断キットの有用性と限界:デング熱. *小児科*, 2012.
5. 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. *Journal of Infectious Diseases*, 203(10):1405-14, 2011.
6. Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Saijo M, Takasaki T, Kurane I. Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using FcγR-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. *Journal of Clinical Virology* 52(3):225-30, 2011.
7. Ujiie M, Moi ML, Takeda N. Dengue maculopathy in a traveler. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 85(6):965-6, 2011.
8. Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, Ito M, Yoshida T, Saito A, Katakai Y, Akari H, Kurane I. Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viremia and demonstration of protective immunity. *Journal of General Virology*. 92:2272-80, 2011.
9. モイメンリン, 高崎智彦, 岩越一, 坂本光男, 小林謙一郎, 氏家無限. アフリカからのデング熱輸入症例. *Infectious Agents Surveillance Report*, 32 (6), 164 – 165, 2011.
10. モイメンリン. クロアチアにおけるデング熱の流行. *Infectious Agents Surveillance Report*, 32 (6), 165 – 167, 2011.
11. モイメンリン, 高崎智彦. デング熱・デング出血熱. *小児感染症学*. 508 – 511, 2011.
12. 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 Cote d'Ivoire. *Emerging Infectious Diseases*. 16(11):1770-2, 2010.
13. 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)
14. 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. *Clinical Vaccine and Immunology*, 17: 402-407 (2010)
 15. 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. *Journal of Virological Methods*, 163:205-209 (2010)
 16. Moi ML, Lim CK, Takasaki T, Kurane I. Involvement of the FcγRIIA cytoplasmic domain in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of General Virology*, 91:103-111 (2010)
 17. Yamamoto K, Matumoto K, Lim CK, Moi ML, Kotaki A, Takasaki T. Chikungunya fever from Malaysia. *Internal Medicine*, 49:501-505 (2010)
 18. 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).
 19. 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. 学会発表
 - 1) 国際学会
 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 serum samples from patients with secondary infection but not in those with primary infection. IV International Congress on Virology, Sapporo, Japan, 2011年8月
 2. Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection: revisit of antibody response and viremia in dengue patients using FcγR-expressing BHK cells. 45th Joint Working Conference on Immunology and Viral Diseases, US-Japan Cooperative Medical Science Program, California, USA, 2011年6月
 3. 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
 4. 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

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

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)
分担研究総合報告書

日本産哺乳類・鳥類の外部寄生虫に関する基礎的研究

研究分担者	山内健生	富山県衛生研究所
研究協力者	名古屋真弓	富山県衛生研究所
研究協力者	滝澤剛則	富山県衛生研究所
研究協力者	渡辺 護	国立感染症研究所・昆虫医科学部
研究協力者	山本栄治	山本森林生物研究所

日本産哺乳類・鳥類の外部寄生虫に関する基礎的研究として、富山県の都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長、愛媛県における秋季の鳥類寄生マダニ相、富山県における愛玩動物の外部寄生虫相と保有病原体を調査した。調査の結果、典型的な南方系種とみなされていたタカサゴチマダニとヤマアラシチマダニが、北陸地方に分布する可能性が示された。紅斑熱のベクターであるヒトツトゲマダニがアオジから初めて採集された。これは本種が鳥類から採集された初めての記録となる。フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、およびキチマダニは、イヌに寄生することにより、山野のみならず市街地にも広く生息している可能性が示唆された。イヌとネコから得られたミカドケナガノミは、通常はタヌキやイタチなどに寄生する種であり、室内飼育のイヌやネコであっても、野生中型肉食獣の外部寄生虫に寄生されうることが示唆された。愛玩動物の行動圏内に生息するマダニ類の紅斑熱群リケッチア保有率は、山岳地帯のそれより低いと考えられた。

A. 研究目的

哺乳類・鳥類の外部寄生虫（マダニ類やノミ類など）は、人獣共通の感染症を媒介することによって、宿主の健康や生命に影響を与えうるものが少なくないため、医学的に重要な存在である。外部寄生虫が媒介する感染症の発生は、原則的に、感染症媒介種の分布に依存するため、有力な媒介種の分布調査は疫学的な意義が高い。加えて、

新興・再興感染症が猛威を振るう今日、未知の可能性を考慮するならば、類縁の外部寄生虫全般についての先見的な調査が望まれる。しかしながら、我が国では、外部寄生虫の研究者が少なく、分布や宿主―寄生者関係といった基礎的な情報が不足していた。そこで今回は、都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長、秋季の鳥類寄生マダニ相、愛玩動物の外部寄生虫相と保有病

原体、の調査を実施した。

B. 研究方法

都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長調査は、富山市の都市部周辺に位置する自然林（標高 110～140m）において、2008 年 4 月～2009 年 12 月の毎月 1 回実施した。調査全体を通して同一の調査者 1 人が、毎月前半の晴天日に、旗ずり採集を 2 時間実施し、ネル布に付着したマダニ成虫全個体を採集した。採集後、マダニ類を 70%エタノール液浸として保存し、種の同定を行った。

鳥類寄生マダニ類の調査は、愛媛県久万高原町二名由良野の森で実施した。秋季には夏鳥が南方へ渡るため、2008-2010 年の秋季、毎年約 40 日間かすみ網を調査地に設置し、鳥類を捕獲した。捕獲した鳥類の頭部を目視で注意深く調査し、ピンセットを用いて寄生マダニ類を採集した。採集したマダニ類は 75-80%エタノール中に保存し、同定した。

愛玩動物の外部寄生虫相調査では、2011 年 6～12 月に、富山県動物管理センターと富山県内の動物病院 17 施設に持ち込まれたイヌ、ネコの体表から、目視により可能な限り多くの外部寄生虫個体を採取した。これらの外部寄生虫をエタノール液浸とし、同定した。

すべてのマダニ個体と大多数のノミ個体から DNA を抽出し、2nd PCR もしくは nested PCR により、紅斑熱群リケッチア、エーリキア、アナプラズマの遺伝子検出を試みた。

C. 研究結果

都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長調査で採集したマダニ成虫は合計 802 個体で、これらは次の 2 属 7 種に分類され

た：キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、フタトゲチマダニ、オオトゲチマダニ、タネガタマダニ、およびヤマトマダニ。採集個体数をもっとも多かったのはキチマダニ（497 個体）で、ヤマトマダニ（288 個体）がこれに次いだ。

キチマダニ成虫は一年を通して採集されたが、夏～初秋と厳寒期の採集個体数は少なかった。一方、ヤマトマダニ成虫は 3～8 月に採集された。残りの 5 種については、少数の個体が採集されたのみであった。

鳥類寄生マダニ類の調査では、44 種 2,742 羽の鳥類を調査した結果、13 種 82 羽から 6 種 116 個体のマダニ類を採集した。採集したマダニ類のほとんどはキチマダニとアカコッコマダニであり、残り 4 種は少数が採集されたにすぎなかった。

キチマダニはさまざまな鳥種から採集されたが、アカコッコマダニでは大多数の個体がアオジから採集された。20 羽以上の個体を調査した鳥種のうち、マダニ寄生率をもっとも高かったのはシロハラで、14.7%であった。これは主としてキチマダニの寄生によるものであった。

愛玩動物の外部寄生虫相調査では、マダニ類・ノミ類が採取されたイヌは 39 頭、ネコは 31 頭であった。イヌからは 3 種 75 個体のマダニ類（ほかに、チマダニ属幼虫 322 個体も得られたが未同定）と 2 種 55 個体のノミ類が得られ、ネコからは 2 種 117 個体のノミ類が得られた。

マダニ類はイヌのみから得られ、大多数はフタトゲチマダニであったが、ヤマトマダニとキチマダニも得られた。採取されたフタトゲチマダニの大多数は若虫で、成虫は雌 1 個体のみが採取された。ヤマトマダ

ニとキチマダニについては、成虫のみが採取され、若虫は採取されなかった。

ノミ類はイヌとネコの両方から得られ、大多数はネコノミであった。その他は、室内飼育のイヌとネコからミカドケナガノミが計3個体採取されたのみであった。

ノミ類とマダニ類から各種病原体の遺伝子検出を試みたが、いずれも検出限界以下であった。

D. 考察

キチマダニ成虫は、埼玉県南西部では一年を通して下草上で採集されるものの、夏と冬に一時的に採集個体数が減少することが知られていた。また、ヤマトマダニ成虫は下草上では春から夏に出現し、初夏に明瞭なピークを持つ1峰性を示すことが知られていた。本調査結果もこれらの結果にほぼ一致していたことから、両種にみられた季節消長は、本州中部において広く共通したパターンである可能性が高いと考えられた。

今回の調査によって、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、およびオオトゲチマダニが富山県で初めて採集された。これらのうち、タカサゴチマダニとヤマアラシチマダニは、南西諸島や東南アジアなどに広く分布する南方系の種である。今回の発見により富山県が両種の分布北限となる。これにより、典型的な南方系種とみなされていたタカサゴチマダニとヤマアラシチマダニが、北陸地方に分布する可能性が示された。

キチマダニは、多くの哺乳類と鳥類に寄生することが知られており、鳥類では5目36種が宿主として記録されている。本調査で、カヤクグリ、コホオアカ、アトリ、ベ

ニマシコが本種の宿主として初めて記録された。このように、キチマダニが多くの鳥類から記録されており、本調査でも13種から記録されたことは、キチマダニの幼若虫の宿主特異性が弱いことを示していると考えられる。

ヒトツトゲマダニは紅斑熱の原因となる *Rickettsia helvetica* のベクターであり、その幼若虫は小型哺乳類にそして成虫は大動物に寄生することが知られていた。本報告で、ヒトツトゲマダニがアオジから初めて採集された。これは本種が鳥類から採集された初めての記録となる。

愛玩動物の外部寄生虫相調査でイヌから採取されたフタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、およびキチマダニは、いずれも富山県におけるマダニ人体刺症の原因種として報告されており、これらのうちヤマトマダニとキチマダニは県内の低地で優占することが知られている。本調査結果から、これら3種のマダニ類は、イヌに寄生することにより、山野のみならず市街地にも広く生息している可能性が示唆される。

本調査でイヌとネコから得られたミカドケナガノミは、通常はタヌキやイタチなどの野生中型肉食獣に寄生する種である。したがって、本調査結果は、室内飼育のイヌやネコであっても、野生中型肉食獣の外部寄生虫に寄生されうることを示唆している。

2010年度実施した予備調査では、5月に放浪犬から採取したキチマダニから、病原性不明の紅斑熱群リケッチアが検出され、ヒトに身近な動物であるイヌにもリケッチア保有マダニ類が寄生していることが確認された（未発表）。しかしながら、本調査では、いずれの検体からも病原体遺伝子は検

出されなかった。従って、少なくとも 6～12 月にペットに付着した外部寄生虫を介してリケッチア等の病原体に感染する可能性は低いと考えられる。これまでの調査により、富山県内の山岳地等のマダニ類が紅斑熱群リケッチアを保有することが明らかになっているが、今回調査対象とした愛玩動物の行動圏内（住宅街や公園等）に生息するマダニ類の紅斑熱群リケッチア保有率は、山岳地帯のそれより低いと考えられる。

E. 結論

日本産哺乳類・鳥類の外部寄生虫に関する基礎的研究として、富山県の都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長、愛媛県における秋季の鳥類寄生マダニ相、富山県における愛玩動物の外部寄生虫相と保有病原体を調査した。調査の結果、典型的な南方系種とみなされていたタカサゴチマダニとヤマアラシチマダニが、北陸地方に分布する可能性が示された。紅斑熱のベクターであるヒトツトゲマダニがアオジから初めて採集された。これは本種が鳥類から採集された初めての記録となる。フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、およびキチマダニは、イヌに寄生することにより、山野のみならず市街地にも広く生息している可能性が示唆された。イヌとネコから得られたミカドケナガノミは、通常はタヌキやイタチなどに寄生する種であり、室内飼育のイヌやネコであっても、野生中型肉食獣の外部寄生虫に寄生されることが示唆された。愛玩動物の行動圏内に生息するマダニ類の紅斑熱群リケッチア保有率は、山岳地帯のそれより低いと考えられた。

F. 健康危険度情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamauchi, T., Tsurumi, M. and Kataoka, N. (2009) Distributional records of *Lipoptena* species (Diptera: Hippoboscidae) in Japan and Jeju-do, Korea. *Medical Entomology and Zoology*, 60: 131-133.

Yamauchi, T., Shimazu, Y. and Mizuta, H. (2009) A case of human tick bite by a nymphal tick, *Haemaphysalis hystrix* (Acari: Ixodidae), in Japan. *Medical Entomology and Zoology*, 60: 135-137.

Yamauchi, T., Tabara, K., Kanamori, H., Kawabata, H., Arai, S., Katayama, T., Fujita, H., Yano, Y., Takada, N. and Itagaki, A. (2009) Tick fauna associated with sika deer density in the Shimane Peninsula, Honshu, Japan. *Medical Entomology and Zoology*, 60: 297-304.

山内健生・高野 愛・坂田明子・馬場俊一・奥島雄一・川端寛樹・安藤秀二 (2010) タカサゴキラマダニによる人体刺症の 5 例. *日本ダニ学会誌*, 19: 15-21.

山内健生・福井米正・渡辺 護・中川彦人・上村 清 (2010) 富山県におけるマダニ人体刺症の 40 例. *衛生動物*, 61: 133-143.

山内健生・渡辺 護 (2010) 家屋内で採集したコウモリマルヒメダニ. *家屋害虫*, 32: 23-25.

Yamauchi, T., Obara, M. and Yuasa, S. (2010) A new host record for *Nycteribia pleuralis* (Diptera: Nycteribiidae). *Biogeography*, 12: 141-142.

山内健生・小松謙之 (2011) シラミバエ科による製品混入例. 都市有害生物管理, 1: 133-135.

Yamauchi, T., Tsuda, Y., Sato, Y. and Murata, K. (2011) Pigeon louse fly, *Pseudolynchia canariensis* (Diptera: Hippoboscidae) collected by dry ice trap. Journal of the American Mosquito Control Association, 27: 441-443.

Yamauchi, T., Agetsuma, N., Araki, N. and Fukushima, M. (2012) Ixodid ticks collected from the raccoon dog *Nyctereutes procyonides albus* and the common raccoon *Procyon lotor* in southern Hokkaido, Japan. International Journal of Acarology, 38: in press.

2. 学会発表

山内健生・小原真弓・渡辺 護・安藤秀二・品川保弘・長谷川澄代・中村一哉・滝澤剛則 (2009年4月3日) 富山県産哺乳類に寄生していたマダニ類 第61回日本衛生動物学会大会 高松

山内健生・福井米正・渡辺 護・中川彦人・上村 清 (2010年2月4日) 富山県におけるマダニ人体刺症の概観 第44回富山県公衆衛生学会 富山

小原真弓・山内健生・渡辺 護・岩井雅恵・堀元栄詞・滝澤剛則 (2010年9月5日) 富山県における近年のつつが虫病分布状況 平成22年度日本獣医三学会(中

部) 長野

山内健生・茂木周作・山本英恵・小原真弓・滝澤剛則 (2010年9月11日) イノシシの分布拡大はマダニの分布拡大をもたらすのか? 第19回日本ダニ学会大会 仙台

山内健生 (2010年11月4日) マダニ類の調査法とその実践例 第26回日本ペストロジー学会大会 松山

小原真弓、山内健生、渡辺護、滝澤剛則 (2010年11月5日) 富山県のイノシシと寄生マダニ類からのリケッチア検出 第65回日本衛生動物学会西日本支部大会 倉敷

山内健生・高野 愛・丸山宗利・川端寛樹 (2010年11月5日) マレー半島における *Amblyomma* 属マダニによる人体刺症, およびその人体咬着輸入例 第65回日本衛生動物学会西日本支部大会 倉敷

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

マダニ類およびシラミ類からの病原体の分離と検出

分担研究者 沢辺京子(国立感染症研究所・昆虫医科学部)
研究協力者 林 利彦・楢田龍星・伊澤晴彦・佐々木年則(同・昆虫医科学部)
高野 愛・川端寛樹(同・細菌第二部)
小滝 徹・高崎智彦(同・ウイルス第一部)
司馬英博・米庄静男・平良常弘・岡田邦宏(西宮市環境局・環境衛生課)
吉田政弘(いきもの研究社)
Arlene G. Bertuso (Parasitology, University of the Philippines, Manila)
比嘉由紀子(長崎大学熱帯医学研究所)
平山幸雄(大阪社会医療センター)
吉田英樹(大阪市保健所)

研究要旨

2008年12月に兵庫県西宮市内の六甲山系で捕獲されたイノシシから日本脳炎ウイルス(JEV)I型株(JaNBo37)が分離された。冬季のJEV感染環にコガタアカイエカ以外の蚊,あるいは蚊以外の節足動物の関与が指摘されたことから,同年10月-2010年9月に捕獲されたイノシシの皮毛,および旗ずり法により捕集されたマダニ類からJEVの分離と検出を試みた。JaNBo37株が分離されたイノシシ皮毛に寄生していたキチマダニの唾液腺と消化管をJEV特異的抗体により免疫染色し免疫組織学的観察を行ったが,JEV粒子は確認されず,唾液腺からもJEVは分離されなかった。これまでに合計260頭のキチマダニのプール磨砕液をC6/36細胞およびHmLu-1細胞接種系によりウイルス分離を試みたが,JEVは検出されなかった。

大阪市西成区にある医療センターを受診した簡易宿泊施設,臨時宿泊施設の利用者および路上生活者(42-74歳)の衣類に寄生していたコロモジラミ,およびフィリピンマニラ市近郊のLaguna州Los Banos市に住む未成年者(7-18歳)の頭髪に寄生するアタマジラミを対象に塹壕熱*Bartonella quintana*遺伝子の検出を試みた。大阪市では10人中6人から得られたコロモジラミ(60%),Los Banos市では50人中1人のアタマジラミ(2%)から*B. quintana*遺伝子が検出された。人口密度の高いこのような大都市において,塹壕熱侵襲の実態把握がより必要であることが示唆された。

A. 研究目的

2008年12月に兵庫県西宮市で捕獲されたイノシシの血清からJEVが分離され(高崎ら,2009),コガタアカイエカの活動時期や生息場所以外での患者症例も報告されるなど,近年,ブタとコガタアカイエカ以外の感染環の存在が指摘されている。西宮市で捕獲さ

れたイノシシには多くのマダニ類が寄生していたことから,それらマダニ類からのJEVの分離と検出を試みた。

1999-2004年に東京都豊島区において,路上生活者対策プログラムの一環として実施された健康診断に訪れた路上生活者を対象に,シラミ保有調査と塹壕熱バルトネラ菌

Bartonella quintana 遺伝子の検出を行い、10%のコロモジラムが遺伝子陽性であったことを報告した(Sasaki *et al.*, 2006). 東京 23 区内に限らず、同様の大都市における路上生活者ならびに簡易宿泊施設利用者等の環境や衛生状況は類似していることから、大都市での塹壕熱侵襲の実態把握が必要であると考へ、大阪市西成区、ならびにフィリピンマニラ市近郊で得られたシラミ類から塹壕熱バルトネラ菌遺伝子の検出を行った。

B. 研究方法

1-1. マダニ類の捕集

2008年10月-2010年9月の2年間に兵庫県西宮市内の六甲山系 29 地点において合計 157 頭のイノシシを捕獲し、その皮毛に寄生していたマダニ類を採取した。特にイノシシが頻繁に出没した地域では、旗ずり法による捕集も行った。

1-2. ウイルス粒子の免疫組織化学的観察

I 型 JEV (JaNB037) が血清から分離されたイノシシに寄生していたキチマダニ 11 頭(雌 8 頭、雄 3 頭)をそれぞれ解剖し、唾液腺および消化管を摘出した。一対の唾液腺の片方と消化管を個別に間接蛍光抗体法により免疫染色し、共焦点顕微鏡および蛍光顕微鏡下で JEV の局在を免疫組織学的に観察した。

1-3. ウイルス分離

上述したキチマダニの片方の唾液腺を個別に細胞破砕機MM300(QIAGEN)を用いて磨碎し、その遠心上清をヒトスジマカ由来C6/36細胞に接種した。細胞変性効果(CPE)の有無を観察しながら、28°C、5%CO₂存在下で約7日間培養した。次いで、合計260頭のキチマダニを対象に、C6/36細胞およびハムスター肺由来HmLu-1細胞(37°C、5%CO₂存在下で継代)接種系によりJEVの分離を試みた。最終ウイルス培養上清から

それぞれ全RNAを抽出し、real-time PCR (TaqMan法) (Shirato *et al.*, 2005)によりJEV遺伝子を検出した。

2-1. シラミ類の入手

大阪市西成区内にある大阪社会医療センターを受診した、簡易宿泊施設および臨時宿泊施設の利用者および路上生活者の合計10名(男性、42-74歳)の衣類からコロモジラムを採取した。フィリピンマニラ市近郊のLaguna州Los Banos市に住む未成年者50名の頭髪からアタマジラムを採取した。一方、日本国内32自治体の学童を主な対象とした調査で入手されたアタマジラムから合計579頭の個体を抽出した。アタマジラムの採取にあたり、個別に専用のすき櫛を用いて極力コンタミネーションを防ぐ努力をした。

2-2. シラミ類からのバルトネラ菌遺伝子の検出

シラミは個別別に細胞破砕機MM300を用いて碎破し、REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma社)により全DNAを抽出した。ITS1領域のプライマー(QHVE1/ QHVE3, Roux and Raoult, 1999, QHVE12/ QHVE14, Sasaki *et al.*, 2004)によるnested PCR, ならびにクエン酸合成酵素*gltA*遺伝子用プライマー(CSBAR218/CSBAR698, Roux and Raoult, 1999)を用いたPCRにより目的遺伝子を検出した。得られたすべてのPCR産物は、ダイレクトシーケンシング法でヌクレオチド配列を決定し(ABI PRISM310, 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA), GENETYXソフトウェア(Genetyx Corp., Tokyo, Japa)およびBasic Local Alignment Search Tool プログラム(BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)により*B. quintana*遺伝子であることを確認した。

C. 結果

1. マダニ類からのウイルス分離

2008年10月–2010年9月の2年間に合計29地点から157頭のイノシシを捕獲し、その皮毛からマダニ類(3属7種3,442頭)を採取した。キチマダニ(54%)が最も多く、次いでタカサゴチマダニ(16%)、タカサゴキララマダニ(13%)の順に多く採取された。一方、旗ずり法により、合計4属11種1,573頭のマダニ類が採取された。キチマダニ(48%)、タカサゴチマダニ(18%)の順に多く捕集された。いずれの方法でも、キチマダニ属マダニ(キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニの3種)の合計は全体の約80%を占めたが、旗ずり法では、タイワンカクマダニ(1%)、ヤマアラシチマダニ(2%)の捕集数は少なく、むしろアカコッコマダニ(16%)が多く捕集され、前者とは異なる種構成を示した。

六甲山系で優先種であったキチマダニは10–3月の冬季のイノシシに多く寄生していたが、4–9月は極端に低下し、タカサゴチマダニ、タカサゴキララマダニ、タイワンカクマダニ、ヤマアラシチマダニが夏季に多く採取された。一方、旗ずり法では、キチマダニ、タカサゴチマダニは年間を通じてよく捕集されたが、アカコッコマダニは1–6月に多かった。また、イノシシ皮毛では成虫の構成比が高かったのに対し、旗ずり法では、逆に若虫・幼虫の捕集率が顕著に高かった。

JaNBo37株が血清から分離されたイノシシに寄生していたキチマダニ11頭の唾液腺の片方、および消化管をコンフォーカル顕微鏡および蛍光顕微鏡下でJEVの局在を免疫組織学的に観察したが、いずれにおいてもJEVの存在は確認されなかった。先に摘出した唾液腺の片方を用いて、さらに、合計260頭のキチマダニを対象にウイルス分離を行ったが、いずれのプールからもJEVは分離されなかった。

2. シラミ類からのバルトネラ菌遺伝子の検出

大阪市西成区における簡易宿泊施設・臨時宿泊施設の利用者、ならびに路上生活者の10人中6人から得られたコロモジラミから*B. quintana*遺伝子が検出された(6/10名、遺伝子保有性率は60%)。また、42歳男性の血餅から*B. quintana*の遺伝子は検出されたが、病原体の分離はできなかった。Los Banos市では、貧困層の居住地域に生活する未成年者50名のうち1名から採取されたアタマジラミに*Bartonella*属共通遺伝子が認められ(1/50名、2%)、ITS1領域の塩基配列を解析した結果、*B. quintana*であることが確認された。一方、日本国内32自治体から得られた579頭のアタマジラミからは*B. quintana*遺伝子は検出されなかった。

D. 考察

1. マダニ類からのウイルス分離

国内におけるJEVの活動は、西日本を中心にブタやコガタアカイエカの中では依然として活発であり、毎年数名の患者が報告されている。今回、調査を行った兵庫県のブタの抗JEV抗体保有率は例年高く、特に2008年–2010年の我々の調査期間中では、毎年抗体陽性率が80%以上を記録し、常にウイルスの活動が活発な県であるといえる。JaNBo37株が分離されたイノシシ(高崎ら、2009)は、11月下旬から12月初旬に感染したと推定されるが、その時期のコガタアカイエカの活動は非常に低いことから、コガタアカイエカ以外の蚊、あるいは蚊以外の節足動物が関与した可能性が強く指摘された。西宮市で捕獲されたイノシシには多くのマダニ類が寄生していたことから、それらマダニ類によるJEVの伝播の可能性が示唆された。しかし、JaNBo37株が分離されたイノシシに寄生していたキチマダニの唾液腺および消化管のいずれにもウイルスの存在は確認されず、C6/36細胞接種系においてもウイルスは分離