

六甲山系で採取されたダニにおけるウイルス保有調査

分担研究者 林 昌宏 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)
協力研究者 伊澤晴彦 (国立感染症研究所・昆虫科学部)
伊藤 (高山) 睦代 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)
江尻寛子 (国立感染症研究所・昆虫科学部)
山口 (木下) 一美 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)
鋤田龍星 (国立感染症研究所・昆虫科学部)
垣内五月 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)
高崎智彦 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)
西條政幸 (国立感染症研究所・ウイルス第一部)
澤邊京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)

研究要旨

マダニ類はウイルス、細菌、リケッチア、原虫等の病原体を媒介することが知られている。また、これまでに多くのダニ媒介性アルボウイルスが報告されている。しかしながら我が国におけるダニ媒介性アルボウイルスの分布状況は明らかにされていない。そこで兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行った。その結果細胞培養を用いたウイルス分離において細胞変性効果(CPE)が観察された。また乳飲みマウスを用いたウイルス分離においては成長不良を示す個体が認められ採脳を行った。よって今後これらサンプルについて詳細な検討を行う必要が示唆された。

A. 研究目的

古くからダニ類のうちマダニ類はウイルス、細菌、リケッチア、原虫等の病原体を媒介することが知られている。我が国においてもこれまでにダニ媒介性脳炎ウイルス、ライム病ボレリア、紅斑熱群リケッチア、バベシア原虫等の病原体がマダニ類から分離されている。マダニ類は幼虫、若虫、成虫の各発育期のすべてが吸血寄生性で、主に山林内のササ類に生息し、ネズミやイノシシ等の野生動物に寄生する。ヒトにも寄生し、吸血されると吸血部位にわずかな痒み、痛み、違和感等を生じる場合がある。しかしながらマダニ類の吸血には数

日から 1 週間を要するにもかかわらず多くの場合、全く自覚症状がない。

近年、ダニに関連するウイルス感染症が国内外を問わず、新興・再興感染症として注目されている。我が国においても 2013 年 2 月には重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) の発症例が報告された。SFTS ウイルスはブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるウイルスである。その他に国内外においてはダニによって媒介されるウイルスとしてブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類されるクリミア・コンゴ出血熱、オルトミクソウイル

スコトゴトウイルス属に分類されるトゴトウイルスおよびドーリウイルス, フラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるロシア春夏脳炎ウイルス, 中央ヨーロッパダニ脳炎ウイルス, オムスク出血熱ウイルス, キャサヌール出血熱ウイルス, ランガットウイルスおよびポワッサンウイルス, レオウイルス科オルビウイルス属に分類されるケメロボウイルス, 同じくレオウイルス科コルチウイルス属に分類されるコロラドダニ熱ウイルス等の多くのウイルスが知られている. しかしながらこれらウイルスの国内における分布は明らかにされていない. そこで我々は兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行った. その結果細胞培養を用いたウイルス分離試験におけるいくつかのサンプル接種培養細胞において細胞変性効果(CPE)が観察された. また乳飲みマウスを用いたウイルス分離においては成長不良を示す個体が認められたため採脳を行った. よって今後これらサンプルについて詳細な検討を行う必要が示唆された.

B. 研究方法

ダニ: 兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシの被毛から採取されたマダニ類およびイノシシ生息域周辺の地点において旗ざり法により採取されたマダニ類より 10% 乳剤を作製しウイルス分離を行った. 用いたダニは, フタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*), キチマダニ (*H. flava*), タカサゴチマダニ (*H. formosensis*), ヤマアラシチマダニ (*H. hystricis*), オオトゲチマダニ (*H. megaspinosa*), タネガタマダニ (*Ixodes nipponensis*), アカコッコマダニ (*I. turdus*), ヤマトマダニ (*I. ovatus*), タカサゴキララマ

ダニ (*Amblyomma testudinarium*), タイワンカクマダニ (*Dermacentor taiwanensis*)であった (図 1). 得られたダニは 1~52 頭を 1 プールとし, 192 プールを作製した. 次に作製したダニプールを用いて 10%ダニ乳剤を作製した. ダニ乳剤を 0.45 μm のフィルターでろ過し, ウイルス分離に供試した.

培養細胞と動物: ウイルス分離にはサル腎由来 Vero 細胞 (American Type Culture Collection) およびシリアンハムスター腎由来細胞である BHK-21 細胞 (American Type Culture Collection) を用いた. また, 2 日齢の乳飲みマウス (ddY) をウイルス分離に供試した.

培養細胞を用いたウイルス分離: 10%ダニ乳剤を作製し, Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種した.

乳飲みマウスを用いたウイルス分離: 10%ダニ乳剤を作製し, 1 腹 8 匹, 24 腹の乳飲みマウスの脳内に 20 μl 接種した. その後接種 3 日後および接種 7 日後に採脳した.

ウイルス遺伝子の検索: 採取したサンプルよりウイルス遺伝子を抽出し, 逆転写 (RT)-PCR 法によりフラビウイルス属およびブニヤウイルス属の検索を行った.

C. 研究結果

培養細胞を用いたウイルス分離: ダニサンプルより 10%ダニ乳剤を作製し, Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種した結果いくつかのサンプルにおいて CPE が観察された. また培養細胞上清よりウイルス RNA を抽出し, RT-PCR 法を用いてフラビウイルス属およびブニヤウイルス属のウイルスの検討を行ったところ目的増幅産物は得られなかった (表 1).

マウスを用いたウイルス分離：2日齢の乳飲みマウス脳内に10%ダニ乳剤を接種し、7日間観察した。その結果4個体において発育不良が観察されたため接種3日後において採脳した。

D. 考察

兵庫県六甲山系において採取されたマダニ類におけるウイルス保有状況を検討した。その結果培養細胞を用いたウイルス分離によりいくつかのサンプルにおいてCPEが観察された。CPEはウイルス感染およびリケッチア感染において観察されるため、今後さらに病原体を同定する必要性が示唆された。また乳飲みマウスを用いたウイルス分離の検討により、4個体において発育不良が観察された。病原体感染による乳飲みマウスの発育不良はこれまでも報告されているため乳飲みマウスの発育不良の原因究明を行う必要性が示唆された。

E. 結論

急速な輸送手段の発達と森林部への人口拡張により今後のアルボウイルスの分布域の拡大が予想される。我が国および周辺諸国においてもSFTSウイルス、ダニ脳炎ウイルス、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス等の重篤な疾患を起こすダニ媒介性ウイルスが存在する。よって我が国におけるダニ媒介性アルボウイルスの分布域の調査は必須である。本研究において六甲山系より採取されたマダニ類における病原体の存在が示唆された。したがって今後得られたサンプルに対する遺伝子学的解析、ウイルス学的解析をさらに進めていく必要がある。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

1. Lim, C.K., Moi, M.L., Kotaki, A., Saijo, M., Kurane, I., Takasaki, T. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. Sapporo, Japan. June 12-13, 2012.

2. Lim, C.K., Kotaki, A., Omatu, T., Moi, M.L., Kurane, I., Saijo, M., Takasaki, T. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). Rio de Janeiro, Brazil. September 23-27, 2012.

3. Moi, M.L., Lim, C.K., Saijo, M., Takasaki, T., Kurane, I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using FcγR-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. Atlanta, Georgia USA. November 11-15, 2012.

4. 伊藤（高山）睦代，中道一生，山口（木下）一美，王麗欣，林昌宏，西條政幸. Establishment of the in vitro test for residual virulent rabies virus in inactivated rabies vaccines. 第11回狂犬病研究会. 東京都, 2012年4月.

5. 中道一生，井上直樹，倉根一郎，林昌宏，西條政幸：進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析，第

17 回日本神経感染症学会総会，京都市，
2012 年 10 月．

6. 林 昌宏，網 康至，藤井克樹，北浦一
孝，モイ メンリン，白井顕治，小滝 徹，
須崎百合子，森川 茂，西條政幸，鈴木隆
二，倉根一郎，高崎智彦：マーモセットを
用いたチクングニアウイルスの霊長類モ
デルの検討，第 60 回日本ウイルス学会学
術集会，大阪市，2012 年 11 月．

7. 垣内五月，木下（山口）一美，伊藤（高
山）睦代，西村秀一，林 昌宏，西條政幸：
造血幹細胞移植病棟にみられたパライン
フルエンザウイルス 3 型感染症流行の分
子疫学的解析，第 60 回日本ウイルス学会
学術集会，大阪市，2012 年 11 月．

8. 伊藤（高山）睦代，中道一生，林 昌宏，
山口（木下）一美，垣内 五月，王 麗欣，
倉根 一郎，西條政幸：乾燥組織培養不活
化狂犬病ワクチン国家検定法における
3Rs の導入，第 60 回日本ウイルス学会学
術集会，大阪市，2012 年 11 月．

9. 山口（木下）一美，中道一生，伊藤（高
山）睦代，林 昌宏，倉根 一郎，西條 政
幸：LAMP 法を用いた PML 患者の脳脊髄
液中の JC ウイルスの検出および定量試験，
第 60 回日本ウイルス学会学術集会（大阪
市）2012 年 11 月．

10. 中道 一生，林 昌宏，西條 政幸：進
行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に
検出された JC ポリオーマウイルスの経時
的なゲノム変異パターンの解析，第 60 回
日本ウイルス学会学術集会，大阪市，2012
年 11 月．

H. 知的財産の出願・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

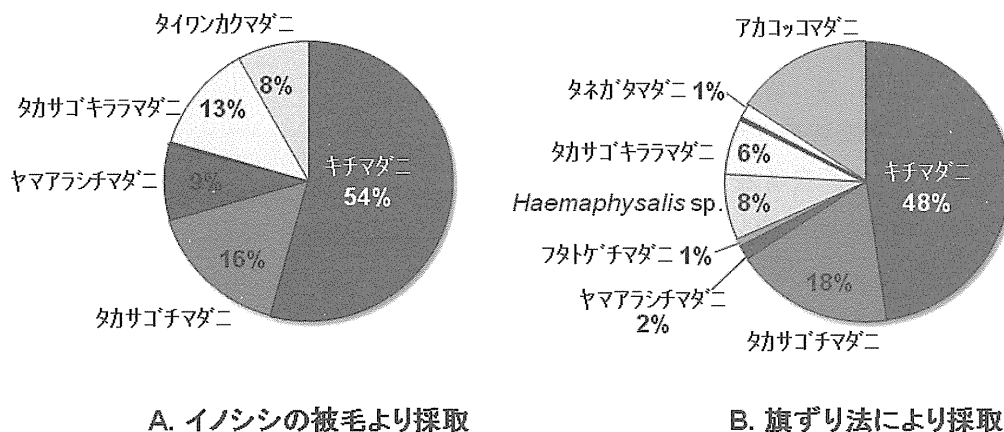


図1. 兵庫県六甲山系で採取されたマダニ類の種構成. 兵庫県六甲山系におけるイノシシより採取したマダニ類(A)およびイノシシ生息域周辺において旗ずり法により採取したマダニ類(B)の種構成を検討した結果キチマダニが54%(A)および48%(B)とそのほぼ半数を占めた.

表1. 旗ずり法により採取されたダニ類のRT-PCR法によるウイルス遺伝子の検討

species	date	number	sample no.	RT-PCR positive pool no.		
				Bunyavirus		Flavivirus
				Nairovirus	Phlebovirus	
<i>I. nipponensis</i>	091222~100113	25	3	0	0	0
<i>I. turdus</i>	091014~100526	246	8	0	0	0
<i>I. ovatus</i>	090512	1	1	0	0	0
<i>A. testudinarium</i>	090512~100607	101	11	0	0	0
<i>D. taiwanensis</i>	090512~100621	8	2	0	0	0
<i>H. formosensis</i>	090512~100625	250	11	0	0	0
<i>H. flava</i>	091027~091207	23	1	0	0	0
<i>H. histricis</i>	090512~100607	27	6	0	0	0
<i>H. longicornis</i>	090723~091027	12	4	0	0	0
<i>H. megaspinoso</i>	091027	1	1	0	0	0
合計		694	48	0	0	0

日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発
「日本脳炎ウイルス国内分離株のゲノムと病原性の監視」

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	田島 茂	国立感染症研究所・ウイルス第一部
	小滝 徹	国立感染症研究所・ウイルス第一部
	山口幸恵	国立感染症研究所・ウイルス第一部

研究要旨

最近我々は、遺伝子型 I 型日本脳炎ウイルス（JEV）の非構造蛋白質 NS4A の N 末端側から 3 番目のアミノ酸をバリン（Val）からイソロイシン（Ile）へ置換することにより、マウスに対する病原性が増強することを報告した（Yamaguchi et al. 2011）。しかし本部位が Ile（3-Ile 型）である I 型 JEV 株は、我々が配列決定した中ではこれまで Mie/40/2004 株が唯一であり、データベース上でも国内分離株としては登録がなかった。この理由として、NS4A 領域の配列データが蓄積されていないことが考えられた。本研究では国内および国外での 3-Ile 型株の蔓延状況を把握し、かつ Mie/40/2004 株以外の 3-Ile 株の性状解析を進めることにより国内に存在する JEV を監視することを目的とする。1994 年から 2010 年に国内で分離された I 型 JEV 分離株の NS4A 領域の塩基配列を決定したところ、約 20% が 3-Ile 型であった。これらの株は 2004 年から 2008 年の間に本州で分離されたものであった。系統樹解析によりその多くが非常に近縁であることがわかった。3-Ile 型株より 5 株を選択し全塩基配列を決定したところ、うち 4 株は Mie/40/2004 株とアミノ酸配列に相違がみられた。哺乳動物由来株化細胞を用いた *in vitro* での増殖能は、Mie/40/2004 株を含む 3-Ile 型 5 株で顕著な差異は観察されなかった。一方、蚊由来培養細胞では株間で大きいもので 7 倍程度の差異が観察された。マウスへの接種実験では Mie/40/2004 株に比べ明らかに病原性の低い株が 1 株見いだされた。これより、3-Ile は JEV を強毒化する絶対的な要因ではないことが明らかとなった。

A. 研究目的

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）の感染が原因の中樞神経の疾患である。感染しても多くの場合不顕性感染に終わるが、発症した場合には致死率は 20～40% に達する重篤な感染症である。JEV は水田等に発生するコガタアカイエカなど、イエカにより媒介され、ブタや水鳥などのウイルス増殖動物とともに感染環を形成する。一方ヒトは終宿主に当たる。日

本脳炎の発生地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内での日本脳炎患者数は 1990 年以降 10 例以下で推移している。しかし WHO の推計では、世界で年間約 4 万 3 千人が日本脳炎を発症し、うち約 1 万 1 千人が死亡、約 9 千人が重篤な超える後遺症に苦しんでいるとされる。このように世界的にみれば日本脳炎は決して過去の疾患ではなく、現在も警戒すべき感染症であ

る。また日本国内でも JEV は現在も毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。

JEV には 5 つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウイルスは 90 年代初頭を境に III 型から I 型へと変化した。同様の変化は日だけでなく、韓国やベトナムでもほぼ同時期に起こっている。さらに近年では中国、台湾、タイ、インドでも同様の変化が認められている。これまでに我々の研究室では、I 型 JEV 分離株の性状解析を続けてきた。分離株のマウスに対する病原性を調べてきた結果、1 つの株

(Mie/40/2004 株) が他に比べ顕著に高い病原性を示し、その原因を探ったところ、ウイルスの非構造蛋白質 NS4A 蛋白の 3 番目のアミノ酸を Val から Ile へ変化させることにより病原性が強くなることを見出した (Yamaguchi et al. 2011)。しかしこの解析を行った当時、本部位が Val である JEV 分離株は Mie/40/2004 株のみしか知られておらず、どの程度 3-Ile 株が蔓延しているかは不明であった。この理由として、NS4A 領域がこれまであまり注目されてこなかったため、本領域の配列データが蓄積されてこなかったと考えられた。そこで本研究では国内および国外での 3-Ile 株の蔓延状況を把握し、かつ Mie/40/2004 株以外の 3-Ile 株の性状解析を進めることにより国内に存在する JEV を監視することを目的とした。

B. 研究方法

我々の所有する I 型 JEV 分離株 98 株の NS4A および E 遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。データベースに登録されている国内外の JEV 配列と比較し、3-Ile 型株の地理的分布状況を調べた。3-Ile 型 JEV 分離株 5 株の全塩基配列を決定し、既知の株の配列と比較し

た。またこれらの株について、マウス神経芽細胞腫細胞株 Neuro-2A および N18 細胞、マウス脳血管内皮細胞株 MBEC4 細胞および蚊由来細胞株 C6/36 細胞中での増殖速度を調べた。3-Ile 型分離株のマウスに対する病原性を調べるため、3 週齢のマウス (ddY 系統) に 1×10^5 pfu/mL の各ウイルス液を腹腔接種し、21 日間経過観察した。生存曲線を作成し、log-rank 法により 3-Val 型 Mie/41/2002 株との差異を比較検討した。

C. 研究結果

1994 年～2010 年に国内で分離された I 型 JEV 分離株 98 株の NS4A 領域の塩基配列を決定した (各ウイルスの分離地域は以下の通りである：東京都、千葉県、静岡県、新潟県、石川県、三重県、兵庫県、広島県、島根県、香川県、高知県、長崎県、熊本県、鹿児島県および沖縄県)。20 株 (20.4%) が 3-Ile 型であった (表 1)。3-Ile 型株はすべて 2004 年～2008 年に分離されたもので、地域は本州西部～東日本 (広島県、兵庫県、三重県、石川県、静岡県および千葉県) にわたっていたものの、九州や四国では 1 株も同定されなかった (表 1 および図 1)。三重県では 3 年連続で 3-Ile 型のウイルスが分離されていることがわかった。NS4A 配列をもとにした系統樹上において、1 株の例外を除き 3-Ile 型株が 1 つのクラスターを形成した (図 2)。E 配列を用いた場合にも同様のクラスターを形成した (図 3)。国外の分離株についても調べたところ、中国において日本とほぼ同時期 (2004 年～2008 年) に各々隣接していない 3 省で 3-Ile 型株が分離・同定されていた (図 4)。そのうちの 1 株は日本脳炎患者から分離されたものであった。我々が同定した 3-Ile 型株の中から 5 株 (Mie/34/2004, Mie/84/2005,

Mie/51/2006, Tokyo/373/2005, Tokyo/602/2005) を選択し全塩基配列を決定したところ、Mie/84/2005 株は Mie/40/2004 株とアミノ酸配列が完全に一致したが、他 4 株はそれぞれ Mie/34/2004 株で 2 残基、Mie/51/2006 株で 5 残基、Tokyo/373/2005 株で 1 残基、Tokyo/602/2005 株で 4 残基が異なっていた (表 2)。3 種の哺乳動物由来培養細胞 (Neuro-2A, N18, MBEC4) を用いた *in vitro* での感染実験において、3-Ile 株間で増殖速度に顕著な差異は認められなかった (図 5)。一方、蚊由来株化細胞 C6/36 細胞においては、同じ 3-Ile 型株である Tokyo/602/2005 株 (低増殖性株) と Mie/51/2006 株 (高増殖性株) 間で 7 倍以上の差異が認められた (図 5)。各 3-Ile 型株のマウスに対する病原性 (神経浸潤毒性) を調べたところ、Mie/34/2004 株、Tokyo/373/2005 株および Tokyo/602/2005 株は Mie/40/2004 株とほぼ同等の病原性を示した。一方、Mie/51/2006 株は Mie/40/2004 株に比べ顕著に病原性が弱く、その程度は Mie/41/2002 株とほぼ同等であった (図 6)。

D. 考察

本研究により 3-Ile 株は主要株ではないものの、本州の広範囲に存在していたことが判った。また Obara らの報告 (2011) と我々のデータと統合すると、今回調べていない富山県でも 2005 年から 2009 年に 3-Ile 型の JEV が存在していたことが示唆された。以前我々は、3-Ile 型ウイルスと 3-Val 型ウイルスで *in vitro* での増殖性に顕著な差異が認められないことを示した (Yamaguchi et al., 2011)。今回の結果も哺乳動物由来株化細胞を使用した場合はほぼ同様であった。一方、蚊由来培養細胞 C6/36 細胞を使用したとき、3-Ile 株間で最大 7 倍以上の差異が観察された。こ

の解析で高増殖性を示した Mie/51/2006 株は、3-Val 型株である Mie/41/2002 と同等であり、さらにもにマウスを用いた病原性解析では両ウイルスとも Mie/40/2004 株に比べ有意に低い病原性を示した。C6/36 細胞での増殖性とマウス病原性が逆相関しているようなデータであり興味深い、その理由は不明である。Mie/51/2006 株は今回性状解析した株の中では最も Mie/40/2004 株とアミノ酸が異なる株であり、E 領域に 2 ヶ所、NS4B 領域に 1 ヶ所、NS5 領域に 2 ヶ所差異がある。これらの部位は他の株とは共通していないことから、これらのうちの何処かが病原性の弱さに関与しているものと想像される。このような部位を同定することにより、新たな病原性規定部位を明らかにすることが可能であろう。

国内の日本脳炎患者数は近年 10 例以下と低水準で推移しているものの、依然として JEV はコガタアカイエカや豚血清より分離され続けている。今後も日本各地の地方衛生研究所にご協力頂き、JEV の分離を進め、その遺伝子解析および性状解析を進めてゆく予定である。

E. 結論

- 1) JEV の NS4A 遺伝子領域に焦点を当て、近年の野外分離株の遺伝子解析を行った。約 20% が高病原性型である 3-Ile 型株であった。
- 2) 3-Ile 型の分離株計 5 株の *in vitro* での増殖性を調べた。哺乳動物由来株化細胞において差異は認められなかったが、蚊由来細胞 C6/36 細胞において数倍の差異が観察された。
- 3) 2) の株についてマウスに対する病原性を比較したところ、1 株が他の 3-Ile 株に比べ有意に低い病原性を示した。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Saijyo, M., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., Tajima, S. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *Journal of General Virology*, 94: 90–96, 2013.

2. Wong, K.T., Ng, K.Y., Ong, K.C., Ng, W.F., Shankar, S.K., Mahadevan, A., Radotra, B., Su, I.J., Lau, G., Ling, A.E., Chan, K.P., Macorelles, P., Vallet, S., Cardoso, M.J., Desai, A., Ravi, V., Nagata, N., Shimizu, H., Takasaki, T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 38: 443–453, 2012.

3. 白鳥（田島）茂，高崎智彦。「日本脳炎ワクチンの品質管理」臨床とウイルス，40: 297–305, 2012.

4. 高崎智彦. 感染症ワクチン：最近の話題，課題「日本脳炎」. *BIO Clinica*, 28: 332–336, 2013.

学会発表

国内学会

1. 山口幸恵，小滝徹，新井智，沢辺京子，倉根一郎，西條政幸，高崎智彦，田島茂. 非構造蛋白質 NS4A に着目した日本脳炎ウイルスの分子疫学的解析. 第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会，阿蘇市，2012 年 5 月

2. 田島茂，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦. デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染細胞における細胞側遺伝子発現動態の網羅的解析. 第 19 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会，大阪市，2012 年 11 月

3. 田島茂，山口幸恵，小滝徹，新井智，沢辺京子，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦. 日本脳炎ウイルス NS4A の分子疫学的解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会，大阪市，2012 年 11 月

H. 知的財産の出願・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

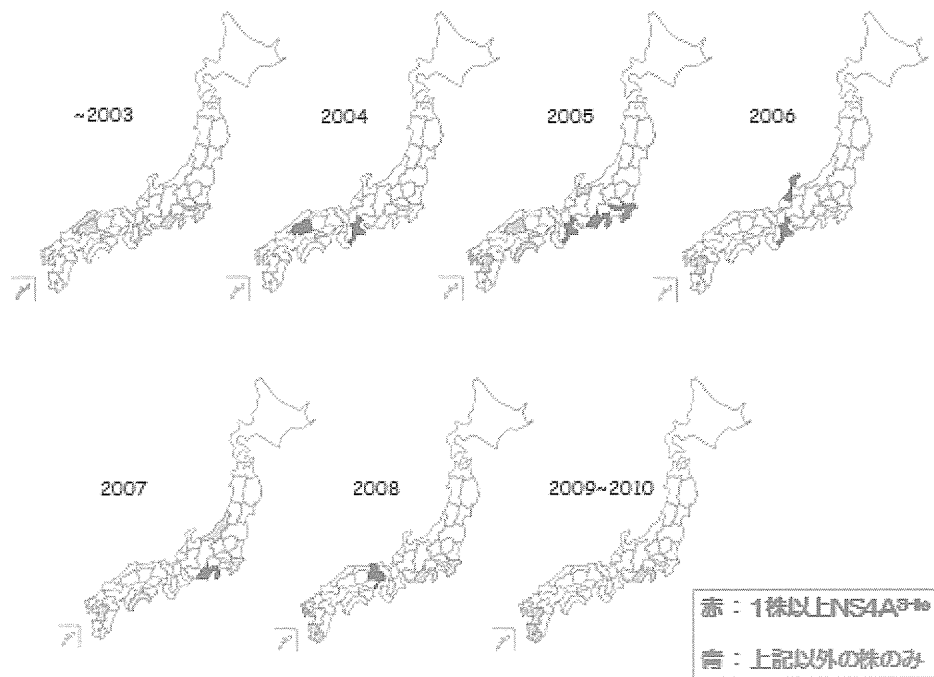


図1 3-Ile 型 JEV が分離された年および地域



図2 分離株の系統樹解析 (NS4A 遺伝子)

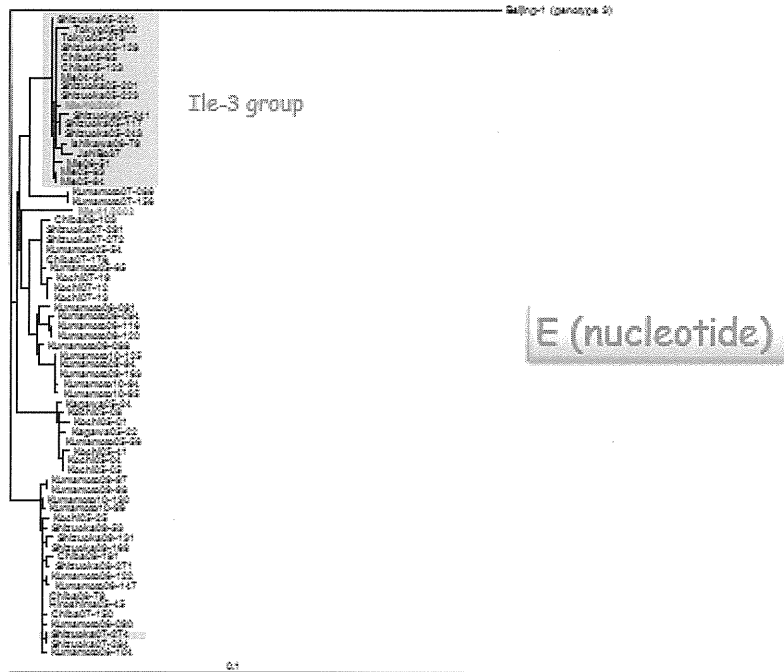
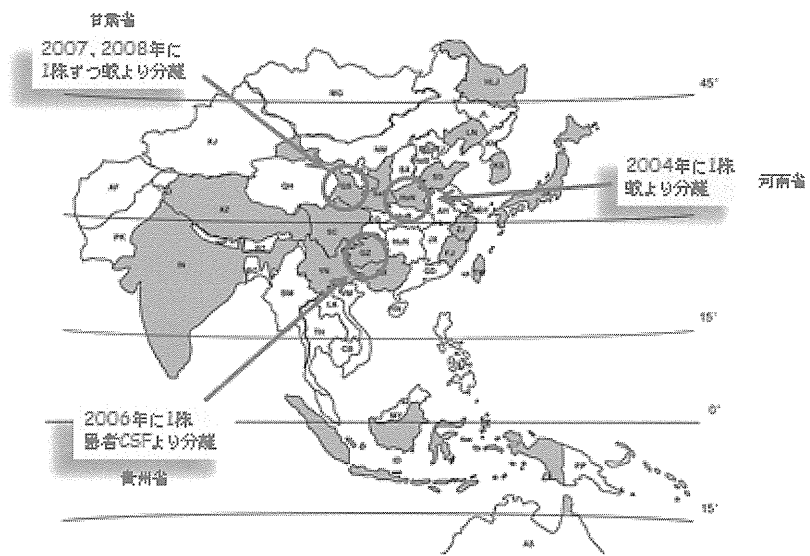


図3 分離株の系統樹解析 (E 遺伝子)



Pan X et al. J. Virol. 2011; doi:10.1128/JVI.00825-11

図4 中国において分離された 3-Ile 型 JEV (原図を改変)

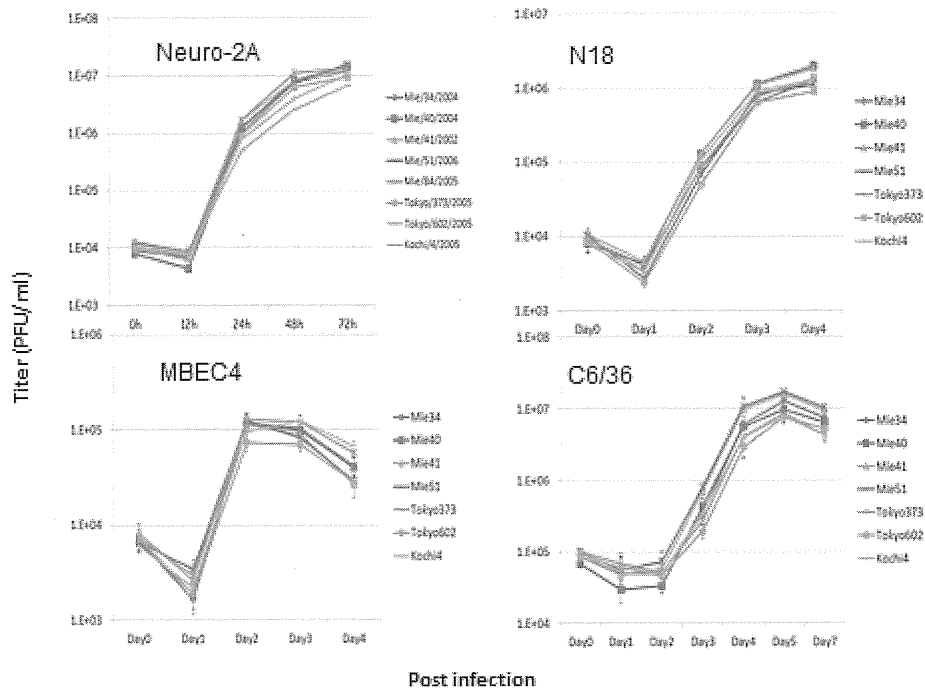
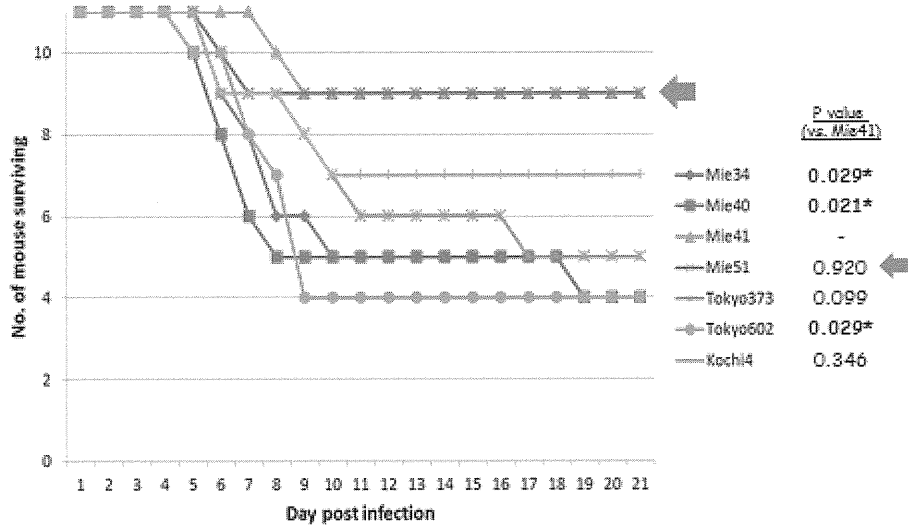


図5 in vitro における 3-Ile 型 JEV の増殖性の比較 (増殖曲線)



Mouse strain: ddY (♀), 3 weeks old
 1×10^3 pfu/mouse, i.p. route

図6 3-Ile 型 JEV のマウスに対する病原性の比較 (生存曲線)

表 1 使用した JEV 株の分離年，地域および NS4A の 3 番目のアミノ酸の種類

地域	1990s	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
九州			Okinawa/285 V /2003 al		Kumamoto/5 V 4/2005 al	Kumamoto/81 V /2006 al	Kumamoto/86 V /2007 al	Kagoshima/0 V 5/2008 al	Kagoshima/53 V /2009 al	Kumamoto/94 V /2010 al
					Kumamoto/5 V 6/2005 al	Kumamoto/84 V /2006 al	Kumamoto/15 V 6/2007 al	Kagoshima/4 V 0/2008 al	Kumamoto/94 V /2009 al	Kumamoto/95 V /2010 al
					Kumamoto/6 V 5/2005 al	Kumamoto/88 V /2006 al		Kagoshima/4 V 3/2008 al	Kumamoto/97 V /2009 al	Kumamoto/96 V /2010 al
					Nagasaki/37 V 2005 al	Kumamoto/90 V /2006 al		Nagasaki/10 V 2008 al	Kumamoto/98 V /2009 al	Kumamoto/12 V 5/2010 al
					Kumamoto/10 V 4/2006 al			Nagasaki/14 V 2008 al	Kumamoto/16 V 3/2009 al	Kumamoto/13 V 0/2010 al
					Kumamoto/11 V 6/2006 al			Nagasaki/27 V 2008 al		
					Kumamoto/12 V 0/2006 al					
四国		Kagawa/27 V 2002 al		Kagawa/35 V 2004 al	Kochi/1/200 V 5 al		Kochi/12/200 V 7 al			
					Kochi/4/200 V 5 al		Kochi/13/200 V 7 al			
					Kochi/5/200 V 5 al		Kochi/19/200 V 7 al			
					Kochi/8/200 V 5 al					
					Kochi/25/20 V 05 al					
					Kochi/41/20 V 05 al					
					Kagawa/21/2 V 005 al					
中国	Hiroshima V /46/1998 al	Hiroshima/2 V /2002 al	Shimane/101 V /2003 al	Hiroshima/4 V 3/2004 al	Hiroshima/45 V /2005 al					
			Shimane/107 V /2003 al	Hiroshima/5 V 4/2004 al						
			Shimane/112 V /2003 al							
			Shimane/113 V /2003 al							
			Shimane/114 V /2003 al							
			Shimane/117 V /2003 al							
		Shimane/129 V /2003 al								

近畿		Mie/41/2002 Val		Mie/34/2004 Ie Mie/40/2004 Ie	Mie/83/2005 Ie Mie/84/2005 Ie	Mie/51/2006 Ie		JaNB037/200 Ie		
北陸					Toyama/57/2 Val005	Ishikawa/79/2 Ie006	Niigata/97/20 Val07			
東海		Shizuoka/33 Val/2002 Shizuoka/39 Val/2002			Shizuoka/117 Ie/2005 Shizuoka/128 Ie/2005 Shizuoka/201 Ie/2005 Shizuoka/221 Ie/2005 Shizuoka/223 Ie/2005 Shizuoka/241 Ie/2005 Shizuoka/243 Ie/2005		Shizuoka/272 Val/2007 Shizuoka/274 Ie/2007 Shizuoka/284 Val/2007 Shizuoka/291 Val/2007	Shizuoka/271 Val/2008 Omaezaki/02 Val/2008 Omaezaki/09 Val/2008	Shizuoka/53 Val/2009 Shizuoka/131 Val/2009 Shizuoka/169 Val/2009	
関東	JaTAn1/1 Val994	Chiba/88/20 Val02			Tokyo/373/2 Ie005 Tokyo/602/2 Ie005 Chiba/65/20 Ie05 Chiba/123/2 Ie005		Chiba/150/20 Val07 Chiba/178/20 Val07	Chiba/79/20 Val08 Chiba/103/2 Val08 Chiba/181/2 Val008		

表 2 3-Ile 型 JEV 株の全アミノ酸配列の比較

	C			pM	E			NS1	NS3			NS4A	NS4B		NS5							Differences (vs. Mie40)			
	10	79	123		143	345	575		729	1021	1811		1911	1971	1990	2126	2296	2522	2547	2553	2804		2956	3053	3211
Sw/Mie/40/2004	K	K	A	N	S	T	N	E	L	I	N	L	I	P	K	S	K	E	G	G	H	M	S	V	-
Sw/Mie/34/2004	K	K	A	N	S	T	N	K	L	I	N	L	I	P	K	S	K	E	G	G	H	I	S	V	2
Sw/Mie/84/2005	K	K	A	N	S	T	N	E	L	I	N	L	I	P	K	S	K	E	G	G	H	M	S	V	0
Sw/Mie/51/2006	K	K	A	N	N	A	N	E	L	I	N	L	I	P	R	S	K	K	G	G	Y	M	S	V	5
Sw/Tokyo/373/2005	K	K	A	N	S	T	N	E	L	V	N	L	I	P	K	S	K	E	G	G	H	M	S	V	1
Sw/Tokyo/602/2005	K	K	A	S	S	T	S	E	Q	V	N	L	I	P	K	S	K	E	G	G	H	M	S	V	4
Mo/Kochi/4/2005	K	R	V	N	S	T	N	E	L	I	N	S	V	S	K	S	R	E	G	G	H	M	S	A	7
Sw/Mie/41/2002	R	K	A	N	S	T	N	E	L	I	S	L	V	P	K	G	K	E	S	V	H	M	T	V	7
Sw/Hiroshima/25/2002	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	V	-	-	S	-	-	G	G	-	-	S	-	nd
Sw/Kagawa/35/2004	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N	-	V	-	-	S	-	-	G	G	-	-	S	-	nd

日本脳炎ウイルス媒介蚊コガタアカイエカ由来細胞株の樹立

分担研究者	伊澤晴彦	国立感染症研究所・昆虫医科学部
協力研究者	鎌田龍星	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	星野啓太	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
	佐々木年則	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	小林睦生	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	澤邊京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	高崎智彦	国立感染症研究所・ウイルス第一部
	田島茂	国立感染症研究所・ウイルス第一部

研究要旨

アルボウイルス研究に有用なイエカ由来培養細胞系の樹立を目的として、4種類のイエカ属の蚊（アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ、コガタアカイエカ）から初代培養を試みた。その結果、VP-12 培地を基礎培地としたコガタアカイエカの初代培養において付着性細胞の顕著な増殖が認められた。これらの細胞集団を維持・継代することにより、コガタアカイエカ由来培養細胞の株化に成功した。本細胞株に日本脳炎ウイルスならびにデングウイルスを接種したところ、両区においてウイルスの増殖が認められたことから、本細胞株はフラビウイルスの諸研究に有用であることが示された。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus (JEV) は東南アジアに広く分布し、WHOの報告では世界中で年間3~5万人の患者を生じると推定されている。JEVはイエカ属の蚊、主としてコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* の吸血により媒介される。

蚊由来培養細胞は蚊媒介性ウイルスの研究に必須である。しかし、デングウイルス (DENV) や黄熱ウイルス、チクングニアウイルス等を媒介するヤブカ属の蚊に関しては汎用性の高い細胞株が存在する一方、JEVやウエストナイルウイルス (WNV) を媒介するイエカ属の蚊の汎用細胞株は存在しない。そこで本研究では、ウイルス研究に有用なイエカ属蚊由来の新規細胞株の樹立を試みた。

B. 研究方法

1. 初代培養

4種類のイエカ属の蚊（アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ、コガタアカイエカ）の胚を用いて初代培養を行った。それぞれの蚊の雌成虫より得られた産下1日後の卵を8%次亜塩素酸水溶液で表面殺菌し、滅菌水でよく洗浄したものを初代培養に用いた。卵をFALCON社製 Primaria Easy Grip Tissue Culture Dishes (3.5 cm) に置き、少量の培地を加えた後、Feather Disposable Scalpel でスライスすることにより組織片を作成した。増殖が進んだ細胞集団の維持・継代には同社製 Cell Culture Flask (50 mL) を使用した。

2. 培養液

基礎培地として MM 培地または VP-12 培地を用いた。各培地の組成を Table 1 に示す。これら基礎培地に非働化牛胎児血清 (FBS) を最終濃度 20, 15, 10% でそれぞれ添加したものを培養液として使用した。

3. 核型分析

継代数 45 回の細胞集団を用いて核型分析を行った。終濃度 10^{-6} M のコルチヒンを含む培地で 9 時間培養した細胞を回収し、室温で低張液 (40 mM 塩化カリウム, 25 mM クエン酸ナトリウム) に細胞を 20 分間浸した。その後、氷冷したカルノア固定液 (MeOH:AcOH = 3:1) を氷上で低張液と同量加え、ゆっくりピペッティングして細胞を固定した。軽く遠心して上清を除き、新しいカルノア固定液を加えて氷上で 10 分間再固定した。この操作をさらに 2 回行い、最後は適量のカルノア固定液に懸濁した細胞をスライドグラス上に滴下し、風乾後、ギムザ染色を行い観察した。

4. 細胞増殖曲線

継代数 30 回ならびに 60 回の細胞集団を用いて、細胞の増殖曲線と倍加時間を求めた。FBS の濃度を 12, 10, 5, 0% に調整した VP-12 培地で懸濁した細胞を FALCON 社製 Primaria Easy Grip Tissue Culture Dishes (3.5 cm) に播種し、温度 25°C, 湿度 100%, CO₂ 制御無しの条件下で細胞を培養した。24 時間ごとに細胞を回収して数をカウントし、増殖曲線ならびに倍加時間を求めた。

5. 由来蚊種の同定

細胞集団の由来を明らかにするため、分子生物学的手法を用いた生物種の同定を行った。細胞集団ならびに形態に基づいて同定された国内捕集蚊 (Table 2) から、それぞれ Qiagen 社製 DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型

に、LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAA AGATATTGG-3'), HCO2198 (5'-TAAACTT CAGGGTGACCAAAAAATCA-3') のプライマーセットを用いて、ミトコンドリア DNA 上のチトクロム C 酸化酵素サブユニット I (COI) 遺伝子の一部 (648 塩基) を PCR により増幅後、塩基配列を決定した。得られた塩基配列のデータより細胞集団の由来蚊種を分子同定した。

6. ウイルス感受性

細胞集団の JEV ならびに DENV に対する増殖能を調査した。試験に用いたウイルスは、JEV Mie/41/2002 株 (Genotype I, Nerome *et al.*, 2007), JEV JaGAR-01 株 (Genotype III, Mangada and Takegami, 1997), DENV I NIID02-20 株 (Tajima *et al.*, 2006), DENV II 09-74 株 (GeneBank Accession no. AB693936) の 4 分離株を用いた。予め Vero 細胞 (NIBSC) で増殖させた各ウイルス株を multiplicity of infection (MOI) = 0.1 plaque-forming units (PFU)/cell の濃度で細胞に接種した。2 時間後にウイルス接種液を除き、フラスコ内を洗浄後、2% FBS 含有 VP-12 培地を 5 mL 加え、温度 25°C, 湿度 100%, CO₂ 制御無しの条件下で細胞をインキュベートした。少量の培地を経時的に回収してサンプリングを行い、Vero 細胞 (NIBSC) を用いたプラークアッセイ法により培養上清中のウイルス濃度を測定した。

C. 結果

1. 細胞株の樹立

各種イエカの組織片からそれぞれ多様な形態の細胞の遊出が認められた。これらのうち、15% FBS 含有 VP-12 培地を培養液としたコガタアカイエカの実験区において付着性細胞の顕著な増殖が観察された。これらの細胞集団を維持・継代することにより、現在、培養開始から約 1,000 日を経、継代数は 125 回

に達した (Fig. 1). これら継代可能な細胞集団を NIID-CTR cell line と命名した.

初代培養時, 細胞集団は様々な形態の細胞で構成されており (Fig. 2A), 継代を重ねるにつれ, 雑多な形態で構成されていた細胞集団は徐々にクローン化が進んだ (Fig. 2B, C). 継代数 60 回の細胞集団はプラスチック底面に付着性の層を形成し (Fig. 2D, E), これらは主として紡錘形 ($4.5\text{--}8.2\ \mu\text{m} \times 16.2\text{--}40.0\ \mu\text{m}$) の細胞および, 一部, 円形 ($7.2\text{--}10.0\ \mu\text{m}$) の形態を示す 2 タイプの細胞から構成されていた (Fig. 2F).

2. 核型分析

NIID-CTR は他の蚊由来細胞と同様, 主に 3 対の染色体を含む二倍体細胞 ($2n=6$) で構成されており, 時折, 4 倍体の細胞 ($4n=12$) が観察された (Fig. 3).

3. 細胞増殖曲線

NIID-CTR の増殖は培養液に含まれる FBS の濃度に依存していた (Fig. 4). 各実験区における対数期の細胞倍加時間は, それぞれ約 20 時間 (12% FBS), 20 時間 (10% FBS), 46 時間 (5% FBS), 76 時間 (0% FBS) と算出された. 培養開始から 7 日後, 各実験区の細胞数は, それぞれ約 6.6 倍 (12% FBS), 5.9 倍 (10% FBS), 3.1 倍 (5% FBS), 1.7 倍 (0% FBS) に増加していた.

4. 由来蚊種の同定

解析の結果, NIID-CTR の遺伝子型は, 国内で採集されたコガタアカイエカの遺伝子型と最も高い相同性を示したことから, 本細胞集団は確かにコガタアカイエカを由来とすることが確認された (Fig. 5).

5. ウイルス感受性

NIID-CTR は実験に用いた JEV ならびに DENV 株に対して感受性を示し, 各ウイルス

の増殖が確認された (Fig. 6). これらウイルスの感染・増殖により, NIID-CTR が顕著な細胞変性を示すことはなかった.

NIID-CTR に接種した JEV 2 株は, ともに接種後 3 日間で増殖性を示し, 培養上清中のウイルス力価は最大で 4×10^7 PFU/mL (Mie/41/2002 株) および 2×10^8 PFU/mL (JaGA01 株) に達した. 一方, NIID-CTR に接種した DENV 2 株は, 増殖曲線のパターンは JEV の増殖パターンと類似したが, 培養上清中のウイルス力価は JEV に比べて低かった. NIID-CTR に接種した DENV 2 株は, JEV の増殖パターンと同様, 接種後 3 日間で増殖性を示し, 培養上清中のウイルス力価はともに 10^5 PFU/mL に達した.

D. 考察

日本脳炎ウイルスの主要媒介蚊であるコガタアカイエカを由来とする新規細胞株 NIID-CTR cell line の樹立に成功した. これまで蚊由来細胞株を培養・維持するために必要な栄養素を含む様々な人工培地が検討されてきたが, 本研究で用いた VP-12 培地は, コガタアカイエカの細胞株を培養・継代するために必要な栄養分を十分に含んだ培地であることが示された.

NIID-CTR は本研究で用いた JEV, DENV 分離株に対して高感受性を示し, とくに JEV において顕著な増殖がみられた. この傾向は他の蚊由来培養細胞と相似する. 一般に, JEV や WNV などが含まれる JEV 血清型群のウイルスは, 過去に報告されたイエカ由来培養細胞で一様に高い増殖性を示す一方, DENV に関しては, 血清型やセルラインによって過去に報告された蚊由来細胞での増殖性が異なる. 今回, 我々が樹立した細胞株は, ウイルス力価は異なるものの, JEV, DENV ともに増殖性を示し, また, 遺伝子型ならびに血清型間の顕著な違いは検出されなかったことから, 本細胞株はフラビウイルス研究に有

用であることが示された。今後、本細胞株について、フラビウイルス以外の蚊媒介性ウイルス感染症(チクングニア熱, リフトバレー熱など)の病原ウイルスに対する感受性についても調べる必要がある。

近年、無脊椎動物の RNA 干渉による抗ウイルス作用に関する研究が個体レベル, 培養細胞レベルで展開されている。しかし, これまで研究資源として汎用性の高い蚊由来細胞株はヤブカ由来のものに限られていたため, イエカを由来とする本細胞株を用いた研究成果は, 宿主蚊の抗ウイルス作用などに関する新たな知見をもたらすことが期待される。また, 世界中で高い汎用性を示す蚊由来培養細胞としてヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞が知られているが, 本細胞株は RNA 干渉による抗ウイルス能が低下していることが明らかとなったことから, C6/36 細胞に代わる新たな蚊由来の汎用細胞株が望まれている。今後は本細胞株の有用性をアピールし, 細胞バンクへの寄託等, 研究資源としての汎用化が必要である。

E. 結論

- 1) 日本脳炎ウイルスの主要媒介蚊であるコガタアカイエカを由来とする新規細胞株の樹立に成功した。現在, 培養開始から約 1,000 日を経, 継代数は 125 回に達した。
- 2) 本細胞株の維持は, FBS 10 または 5% 含有 VP-12 培地を培養液とし, 継代は 6 日間隔, split ratio は 1:9 の条件で行った。
- 3) 本細胞株は紡錘形の付着性細胞を主とし, 細胞倍加時間は約 1.4 日と算出された。また, 他の蚊細胞と同様, 主として 3 対の染色体を持つ二倍体細胞(2n=6)の核型を示す細胞で構成されていた。
- 4) 本細胞株は JEV および DENV に対して増

殖性を示したことから, フラビウイルス研究に有用であることが示された。

F. 健康危険度情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kuwata, R., Nga, P.T., Yen, N.T., Hoshino, K., Isawa, H., Higa, Y., Hoang, N.V., Ttang, B.M., Loan, D.P., Phong, T.V., Sasaki, T., Tsuda, Y., Kobayashi, M., Sawabe, K., Takagi, M. Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 88: 681–688, 2013.

2. Kuwata, R., Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Tajima, S., Sasaki, T., Takasaki, T., Kobayashi, M., and Sawabe, K. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 486: 369-376, 2012.

学会発表

1. 鎌田龍星, 伊澤晴彦, 星野啓太, 佐々木年則, 小林睦生, 沢辺京子. *Culex flavivirus* 持続感染コガタアカイエカ細胞に対する蚊媒介性フラビウイルスの重複感染. 第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇市, 2012 年 5 月

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

Table 1. Composition of basal medium used in this study

	VP12	MM
NaCl	390	700
KCl	55	20
CaCl ₂ ·2H ₂ O	40	20
MgCl ₂ ·6H ₂ O	110	10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	120	-
NaH ₂ PO ₄	-	20
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	55	-
NaHCO ₃	50	12
D-glucose	200	400
myo-inositol	40	-
Choline chloride	25	-
Eagle vitamin mixture (x100)	2 ml	-
Lactalbumin hydrolysate	500	650
TC-Yeastolate	-	500
Bovine albumin powder	100	-
L-glutamine	30	-

Table 2. List of insect species and COI gene sequence accession numbers used in this study

Families, genus, and species	Site (city and prefecture)	GenBank accession number
Family <i>Ceratopogonidae</i>		
Genus <i>Culicoides</i>		
<i>C. japonicus</i>	Ishigaki, Okinawa	AB690832
Family <i>Culicidae</i>		
Genus <i>Anopheles</i>		
<i>A. lindesayi japonicus</i>	Okutama, Tokyo	AB690833
<i>A. lesteri</i>	Ishigaki, Okinawa	AB690834
Genus <i>Aedes</i>		
<i>A. albopictus</i>	Kawasaki, Kanagawa	AB690835
<i>A. japonicus</i>	Laboratory Colony ^a	AB690836
<i>A. vexans</i>	Sanbu, Chiba	AB690837
Genus <i>Armigeres</i>		
<i>A. subalbatus</i>	Iwanuma, Miyagi	AB690838
Genus <i>Culex</i>		
<i>C. bitaeniorhynchus</i>	Ishigaki, Okinawa	AB690839
<i>C. inatomii</i>	Iwanuma, Miyagi	AB690840
<i>C. orientalis</i>	Iwanuma, Miyagi	AB690841
<i>C. pipiens</i>	Shinjuku, Tokyo	AB690842
<i>C. sasai</i>	Shinagawa, Tokyo	AB690843
<i>C. vishnui</i>	Ishigaki, Okinawa	AB690844
<i>C. tritaeniorhynchus</i>	Iwanuma, Miyagi	AB690845
	Niigata, Niigata	AB690846
	Kitasouma, Ibaraki	AB690847
	Chiba, Chiba (2009) ^b	AB690848
	Chiba, Chiba (2010) ^b	AB690849
	Chiba, Chiba (2011) ^b	AB690850
	Izumo, Shimane	AB690851
	Komatsushima, Tokushima	AB690852
	Isahaya, Nagasaki	AB690853
	Koshi, Kumamoto	AB690854
	Minamikyushu, Kagoshima	AB690855
NIID-CTR cell line	Chiba, Chiba	AB690856

^a A laboratory colony established by Hoshino et al. (2010).

^b Year of mosquito collection in the same place