

捗状況等を安全技術調査会に提案することとされた。

今後、東海四県の調査研究のプロトコルを変更し、引き続き疫学調査を拡大、継続し、中南米出身の献血者等のシャーガス病のリスクを評価する必要性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、内田茂治、日野学、鬼束惇義、南澤孝夫、小島精、高松純樹、田所憲治：東海 4 県の中南米居住歴を有する献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査とシャーガス病に関するアンケート結果について、第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012 年
- 2) 石野田正純、百瀬俊也、柴田玲子、日野学：問診票改訂に伴う中南米滞在歴を有する献血者数の変動について、第 60 回日本輸血・細胞治療学会総会、福島、2012 年
- 3) 百瀬俊也、三浦左千夫、佐藤陽子、石野田正純、松本千恵子、内田茂治、日野学、高松純樹、田所憲治：東海 4 県の中南米からの定住者の献血申込者に対する *Trypanosoma cruzi* 抗体検査パイロットスタディと日本における中南米からの定住者の献血者数の推計について、第 53 回日本熱帯医学会大会、帯広、2012 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 中南米渡航歴・居住歴のある
献血申込者数・献血者数

H22年度	申込者数	献血者数
渡航歴	42,075 (3,506/月)	35,988 (2,999/月)
居住歴	12,123 (1,010/月)	10,190 (849/月)
合計	54,198 (4,517/月)	46,178 (3,848/月)
H22年度 全体数	6,391,003	5,329,676

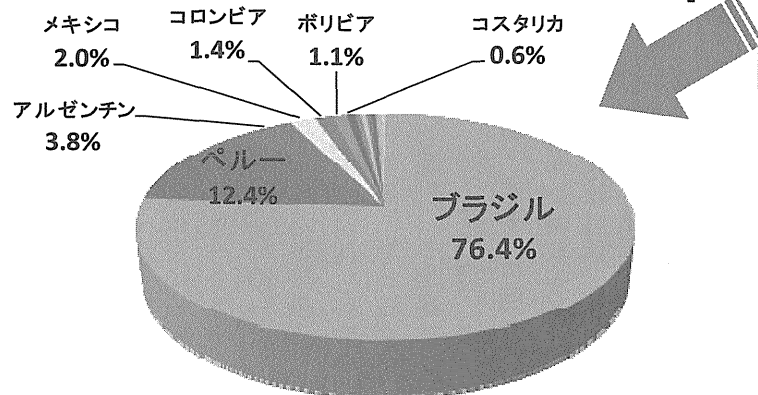
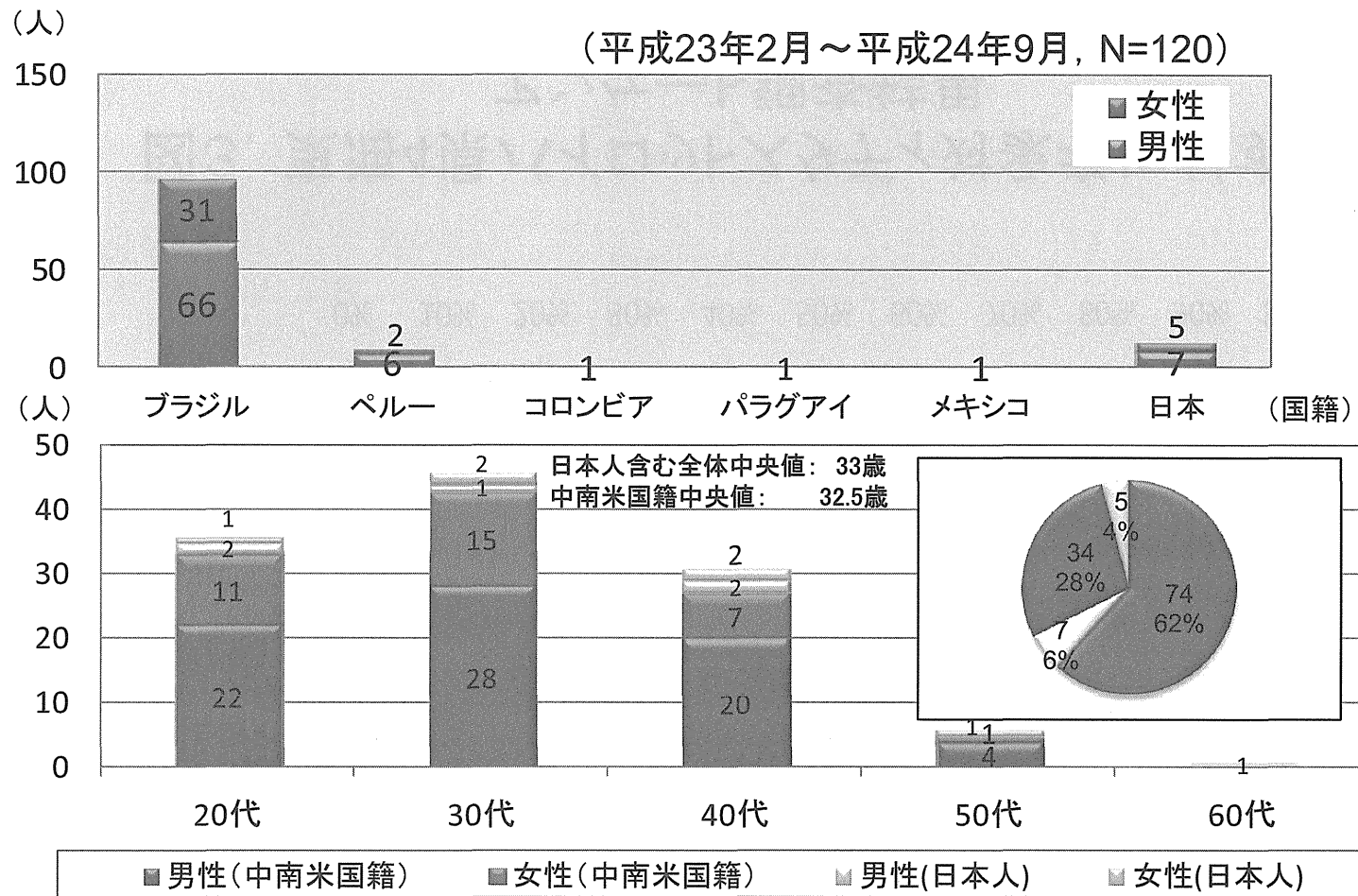


図1. 中南米居住歴のある国別外国人献血者割合

表2. 中南米居住歴のある国別献血者数
(日本人・外国人別)

H22 年度 国 名	中南米居住歴のある 献血者数		
	日本人	外国人	合 計
アルゼンチン	637	64	701
ウルグアイ	57	1	58
エクアドル	139	3	142
エルサルバドル	71	2	73
ガイアナ	0	0	0
グアテマラ	130	6	136
コスタリカ	160	11	171
コロンビア	172	23	195
スリナム	4	0	4
チリ	329	6	335
ニカラグア	112	1	113
パナマ	238	4	242
パラグアイ	322	8	330
ブラジル	2,991	1,299	4,290
ベネズエラ	156	7	163
ベリーズ	11	2	13
ペルー	526	211	737
ボリビア	267	18	285
ホンジュラス	1	0	1
メキシコ	2,167	34	2,201
仏領ギアナ	0	0	0
合 計	8,490	1,700	10,190



中南米国籍者の滞日年数: 平均10.7年(2ヵ月～28年)

図2. *T. cruzi* 抗体検査対象者の背景

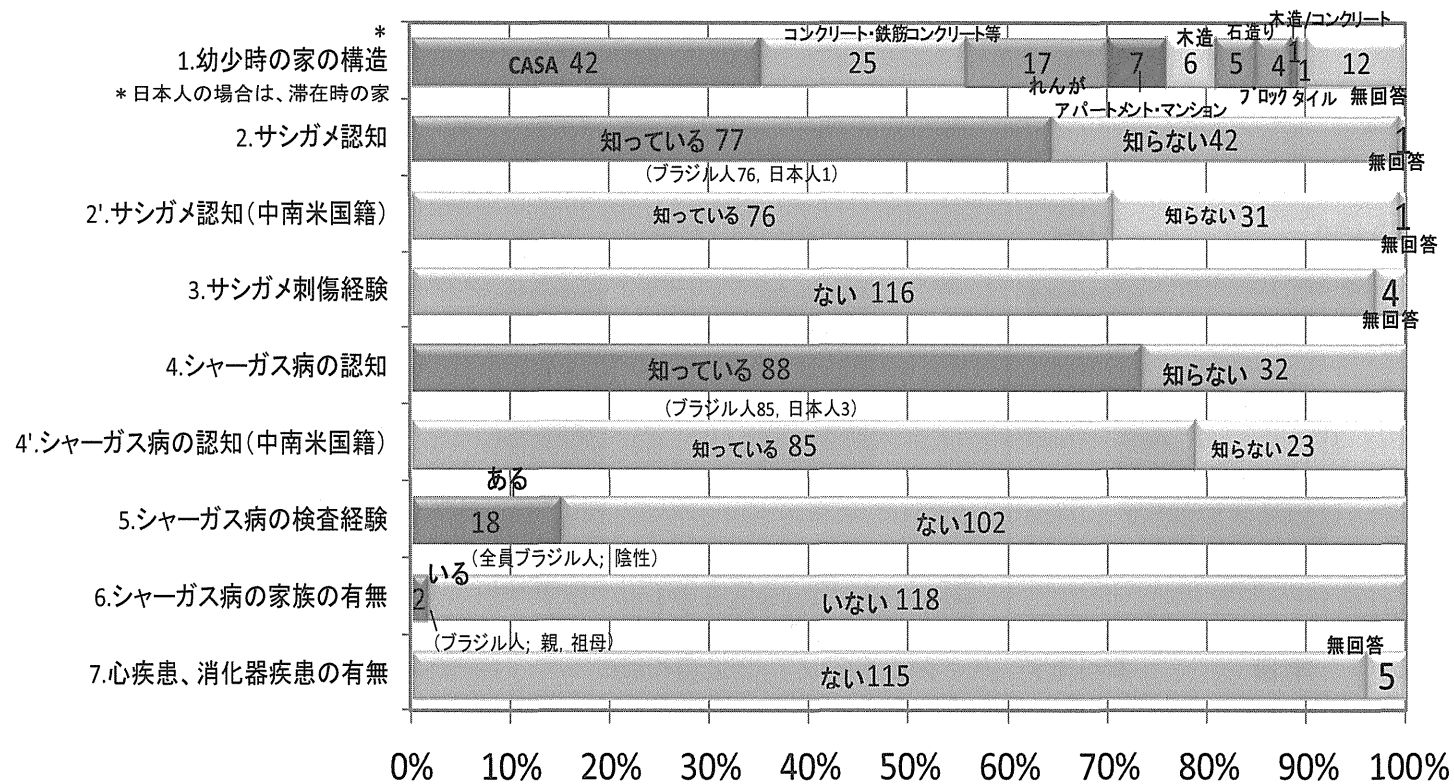


図3. 東海4県パイロットスタディ対象者に対するアンケート調査結果

中南米地域出身の方、または (ラテンアメリカ) 中南米地域に通算4週間以上 滞在された方々へ

下記1~3のいずれかに該当する方は、
献血の受付時にご申告をお願いいたします。

※シャーガス病の安全対策のため、いただいた血液は、
血漿分画製剤用の原料血漿として利用させていただきます。

1. 中南米諸国で生まれた、又は育った。
2. 母親が、中南米諸国で生まれた、又は育った。
3. 上記1.に該当しない方で、中南米諸国に通算4週間以上滞在した。

〈中南米地域対象国・地域〉

- | | |
|----------|----------------|
| ・アルゼンチン | ・パナマ |
| ・ウルグアイ | ・パラグアイ |
| ・エクアドル | ・ブラジル |
| ・エルサルバドル | ・ベネズエラ |
| ・ガイアナ | ・ペリース |
| ・グアテマラ | ・ペルー |
| ・コスタリカ | ・ボリビア |
| ・コロンビア | ・ホンジュラス |
| ・スリナム | ・メキシコ |
| ・チリ | ・フランス領ギアナ |
| ・ニカラグア | ・フォークランド諸島(英領) |



※シャーガス病とは、メキシコを含む中南米に流行地をもつサンガメ(昆虫)に媒介されて、原虫が感染する病気です。
日本には中南米諸国から来られた方々が25~30万人いると言われており、近年、その方々の中にシャーガス病の
感染者がいることが指摘されております。

この度、国の調査会において、輸血によるシャーガス病に対する安全対策の方針が示されました。

詳しくはこちら



人間を敬うのは、人間だ。Our world. Your move.

図4. 日本赤十字社のシャーガス病に対する安全対策
(中南米出身者等への周知)

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」

(H23-医薬-一般-003)

ヒトバベシア症に対する新規診断法の開発

研究分担者 横山直明 (帯広畜産大学・原虫病研究センター 教授)

研究要旨：赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* によるバベシア症は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立している一方、人獣共通感染症としても重要であり、アメリカ北東部では地方病として知られている。近年、本症の世界的な感染拡大が報告されており、日本でも、1999年に神戸で輸血により本邦初の人感染例が発生した。そこで、本研究では“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的とした。平成24年度は、簡易・迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) の開発について、*B. microti* の BMN1-17 蛋白質を用いて検討を行った。その結果、大腸菌を用いて可溶性の組換え BMN1-17 蛋白質が蛋白質の発現が可能となり、得られた rBMN1-17 蛋白質を用いた ICT は、*B. microti* に対する高い特異性を示した。また、ハムスターを用いた感染実験では、赤血球寄生率が検出されるほぼ同時期に ICT により抗体の検出が可能であった。更に、ヒト感染血清やドナーの血清を用いた ICT においても、抗体検出が可能であった。以上の結果を基盤にして、今後更に人の試料数を増やして実用性を検証する必要がある。

A. 研究目的

赤血球内寄生原虫 *Babesia microti* は、通常げっ歯類とダニの間で感染が成立しているが、感染ダニによる刺咬やキャリアーからの輸血により人にも感染し、人獣共通感染症として重要視されている。ヒトバベシア症は、アメリカ北東部の離島や沿岸地帯では地方病として知られている。最近、米国での感染拡大に加えて、中国、メキシコ、台湾、エジプト、南アフリカなどにおいても人感染例が報告され、その感染の拡大が懸念されている。日本でも、1999年神戸で輸血により本邦初の人感染例が報告され、血液製剤の安全性確保や更なる人への感染拡大防止のため、正確で迅速な血清並びに遺伝子診断法の開発が急務となっている。

本研究では、“バベシア症が疑われる患者の血液”あるいは“輸血用血液”の迅速で正確な血清及び遺伝子診断法を開発することを目的としている。24年度は、簡易迅速血清診断法であるイムノクロマト法 (ICT) について検討を行った。

B. 研究方法

(1) *Babesia microti* BMN1-17 組換え蛋白質の作製

B. microti に特異的な BMN1-17 の組換え蛋白質の作製を行った。最初に、*B. microti* から DNA を抽出し、*bmn1-17* 遺伝子をクローニングして pGEX 発現ベクターに組み込んだ。その後、GST-Fusion タンパク質として大腸菌に発現させ、精製後 SDS-PAGE で目的とする蛋白質の分子量について検討を行った。また、rBMN1-17 蛋白質とウサギで作製された抗 rBMN1-17 蛋白質 IgG を用いてウエスタンブロットを行い、抗原性について検討を行った。

(2) イムノクロマトストリップの作製

最初に、金コロイドの rBMN1-17 蛋白質への標識について検討を行った。異なる蛋白質濃度 (10-1,000 mg/ml) および pH (5.0-7.0) の条件検討を行い、

rBMN1-17 抗原と金コロイド (50nm) への最適な標識条件の検討を行った。これらの条件に基づいて得られた金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質をサンプルパットに塗布した。また、rBMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG を BioDot's 社製の装置を用いてニトロセルロース膜へジェット塗布した。その後、サンプルパット、ニトロセルロース膜、吸収パットを1枚のシートとして組み立て、6ミリ幅にカットした。ハムスターの陽性、陰性コントロール、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて得られた ICT ストリップの特異性について検討を行った。

また、感染赤血球を用いた間接蛍光抗体法 (IFAT) および rBMN1-17 蛋白質を用いた ELISA を確立した。

(3) 実験感染マウスの試料を用いた評価

ハムスターを用いた *B. microti* 感染実験を行い、継時的に血液試料を採取した。血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の算定、IFAT、そして今回発現精製した rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の検出感度を比較した。

また、ヒトバベシア患者の血液を用いて、rBMN1-17 蛋白質を用いた ICT により患者血清の抗体検出について検討した。

(倫理面への配慮)

人の血液材料並びにマウスを用いた感染実験については、帯広畜産大学の倫理委員会並びに実験動物委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

(1) *Babesia microti* BMN1-17 組換え蛋白質の作製

ICT ストリップ作製のためには、高純度・高濃度の組換え抗原が必要である。そこで、*B. microti* 特異抗原として BMN1-17 蛋白質を選び、大腸菌を利用した蛋白質発現について検討を行った。*B. microti* から抽出した DNA を用いて PCR

を行ったところ、1050bp の *bmn1-17* 遺伝子がクローニングされた。更にこの遺伝子を pGEX 発現ベクターに組み、GST 融合蛋白質として大腸菌に発現させた。この蛋白質は可溶性で、SDS-PAGE を行ったところ、約 75kDa の GST 融合蛋白質として認められ、GST を除いた分子量は約 50kDa と推定された。また、rBMN1-17 蛋白質とそれに対する抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、約 50kDa に主要バンドが確認されたが、GST 蛋白質にはバンドが認められなかった。

(2) イムノクロマト (ICT) ストリップの検討

ICT ストリップ作製のため、組換え抗原を用いて金コロイド標識の条件について検討したところ、組換え BMN1-17 蛋白質の濃度が 200mg/ml、pH 5.0 が最良であった。得られた金コロイド標識 rBMN1-17 蛋白質、BMN1-17 蛋白質と抗ウサギ BMN1-17 蛋白質 IgG を用いて、ICT ストリップを作製し、特異性について検討を行った。その結果、ハムスターの陽性血清、陰性コントロール、アナプラズマやエールリキアの感染血清を用いて検討を行ったが、陽性コントロールにのみバンドが確認され、他のサンプルでは陽性ラインは認められなかった。

(3) 実験感染マウスの試料を用いた評価

ハムスターを用いて感染実験を行い、継時的に血液を採取して、血液塗沫標本のギムザ染色による赤血球寄生率の測定、IFAT、rBMN1-17 を用いた ELISA 及び ICT の抗体検出感度を比較した。赤血球寄生率は、実験感染後 5 日目に 1% を越えて急激に増加し、約 2 週間後にピークを迎えた後、8 週後に 1% 以下に減少した。ELISA では、5 日目から抗体が検出され始め、1 週間ほどで急激に上昇してその後高い値を維持した。一方、ICT と IFAT では 7 日後から検出され始め、その後抗体が継続的に検出された。

(4) ICT による人患者の血液の検討

最後に輸血による *B. microti* 感染が日本で初めて確認されたヒト感染血清を用いた検討を行った。その結果、輸血を受けた患者血清および血液ドナーにバンドが認められ、抗体検出が可能であった。

D. 考察

イムノクロマト法 (ICT) は、ニトロセルロースなどの毛細管現象を利用した免疫学的測定法の1つである。微小金属粒子やラテックス粒子などを標識体として用い、検出対象が存在すると、多孔質体上に設けられた判定部位に標識体が捕捉されることで判定部位が発色し、検出対象の存在が確認できる。この方法は頻用されているELISAに比較し、血清試料などを滴下するだけで操作が簡便であり、判定時間も約15分と短い。また判定に、測定装置は不要で目視で可能であり、コスト面からも利点がある。

本研究では、輸血用血液の *B. microti* 感染の有無を評価する血清診断法としてイムノクロマト法 (ICT) の開発を試みた。ICTストリップ作製のためには、高純度・高濃度の組換え抗原が必要である。そこで、*B. microti* のDNAを用いてPCRを行い、*bmn1-17* 遺伝子をクローニングした。この遺伝子を大腸菌に組み込み、約50kDaの可溶性BMN1-17蛋白質として発現させた。この組換え抗原を用いて作製したICTストリップは、*B. microti* のハムスター感染血清とのみ発色し、ダニに媒介されるアナプラズマやエールリキアの感染血清では発色せず、*B. microti* に対する高い特異性が認められた。

ハムスター感染モデル実験で、感染後5日に赤血球内に *B. microti* に認められ、ELISAによっても抗体が検出された。ICTでは、やや遅れてIFATと同様感染後7日後に抗体が検出された。一般的にICTはELISAと同程度の検出感度を有するとされている。しかしながら、本研究ではICTによる抗体検出がELISAよりも遅れたことから、更にICTの検出感度を上げる改善が必要である。

最後に我が国でも数少ないヒトの感染血清を用いた試験を行った。その結果、*B. microti* 重症感染発症患者および不顕性の血液ドナーの血清中からICTにより

抗体が検出された。今後更により多くの人血清数を用いて、その有用性について検討する必要がある。

E. 結論

本研究では、*Babesia microti* の rBMN1-17 蛋白質を用いたイムノクロマト法が確立された。ハムスター実験感染モデルにおいて、IFAT や ELISA とほぼ同様の感度を示した。更に、*B. microti* 発症患者と血液ドナーの血清中からも抗体が認められた。今後、多数の人血液試料を用いて、イムノクロマト法の有用性および実用化について更に検討する必要がある。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Iseki H., Alhassan A., Kim C., Saito-Ito A., Inokuma H., Kawazu S., Masuzawa T., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Diagnosis of *Babesia microti* Infection. (準備中)
2. Iseki H., Kim C., Saito-Ito A., Minoda Y., Inokuma H., Yokoyama N., and Igarashi I.; Development of an immunochromato-graphic test for convenient serodiagnosis of human babesiosis. (準備中).

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」
(H23-医薬-一般-003)

分担研究報告書

献血制限に関わる昆虫学的研究：吸血飛来するヒトスジシマカの寿命、
移動分散範囲に関する基礎研究

研究分担者 津田良夫（国立感染症研究所 昆虫医科学部 室長）

ヒトスジシマカの移動分散範囲を1日当たりの移動距離と蚊の寿命の積によって推定した。吸血に飛来した個体の1日の平均移動距離は、個別にマークした雌を住宅地に隣接した林内に放逐して行ったマーキング実験の結果から推定した。その結果、ヒトスジシマカの1日当たりの平均移動距離は 10.1 ± 10.6 m、最大移動距離は44mと推定された。また、東京都の公園で人囀採集によって採集したヒトスジシマカ雌成虫の余命を実験室で調べたところ、平均余命は9月の採集雌で最も短く13.8日、6月の採集雌で最も長く平均40.8日だった。これらの値によって、ヒトスジシマカが一生の間に移動分散する範囲は平均200m（平均余命が20日の場合）から平均400m（平均余命が40日の場合）と推定された。

A.研究目的

蚊によって媒介される病原体の流行を想定し、感染の中心からどの程度の範囲を献血制限範囲とするかを決定するにあたり、問題となる病原体の媒介者である蚊の移動分散範囲を明らかにする必要がある。

蚊の移動分散範囲とは吸血や産卵などの活動に伴って飛翔する範囲を意味しており、主として吸血のために探索飛翔する個体を用いて推定されている。これまで報告されている移動分散範囲は蚊の種類によって大きく異なり、1日10数キロを飛び回る種類もあれば、一生を通じて

100mほどしか動き回らない種類もある。本研究ではデングウイルスやチクングニヤウイルスの媒介能力を持つヒトスジシマカの移動分散範囲を推定することを目的とした。ヒトスジシマカはいわゆるヤブカの仲間、潜伏している場所に動物が近づくと吸血のために飛来するという行動習性を持つため、移動分散範囲は比較的小さいと考えられている。

蚊の移動分散範囲の推定は、一般的にはマークした成虫を放逐して定期的に再捕獲を行い、放逐地点と再捕獲地点の距離を基にして、移動した距離を実測する方法が用いられている。しかし、この方

法では、実験を行った期間中に蚊が移動した範囲が推定されるので、調査期間が短ければ実験終了後にも蚊は移動を続けるはずであり、死亡するまでに分散する範囲よりは狭い推定値になると考えられる。

そこで、本研究では蚊が1日の間に分散する距離を推定するとともに、蚊の寿命を求め、両者の積によって一生の間に分散する範囲を推定する方法を検討した。

B.研究方法

ヒトスジシマカの個別マーキング：ヒトスジシマカが1日の間に動き回る範囲を知るために、1個体ずつ異なるマークを付けて放逐し、複数の採集場所で再捕獲を継続して行って、個体ごとに動いた軌跡を調べた。個別マークは、左右の翅それぞれに3か所、合計6ヶ所に、マジックペンで印をつけて行った。2012年7月24日から8月2日に感染研の構内とその周辺で合計199頭のヒトスジシマカを採集しマークして放逐したが、再捕獲された個体数がわずかに3頭と少なく、分析できるデータが得られなかった。そのため、同様の方法によって1990年に長崎市の市街地に隣接した林内で実施した調査結果から、44個体の再捕獲データを取り出して分析を行った。

ヒトスジシマカの寿命調査：東京都立林試の森公園で2005年6月から11月の期間にヒトスジシマカの人囀採集を行った。採集されたヒトスジシマカの雌成虫を持ち帰り $26.5 \pm 0.1^{\circ} \text{C}$ 、相対湿度 $58 \pm 0.9\%$ 、16時間日長に調節した飼育室で飼育しすべての個体が死亡するまで死亡日

と死亡個体数を毎日記録した。この調査結果に基づいて、野外捕集蚊の実験室内における平均余命を求めた。

個別マーキング法の検討：成虫の翅にマークする方法は翅に対するダメージが大きいと思われたので、新たなマーキング法を検討した。胸部背面の5ヶ所に白色の修正インクで印をつける方法を考案した。翅にマークする方法と胸部背面にマークする方法が、成虫の生存に対してどの程度影響するかを実験的に調べた。

C.研究結果

合計856雌に個別のマークをつけて、林の中に放逐した。林内の10か所で再捕獲と再放逐を15日間繰り返した。放逐後に、2回再捕獲された個体のデータが44組えられた。各個体について再捕獲された2ヶ所の採集場所の直線距離を移動距離として、1日の平均移動距離を推定した。その結果、1日当たりの平均移動距離は、 $10.1 \pm 10.6 \text{m}$ 、最大移動距離は44mであった。

野外で採集されたヒトスジシマカの飼育室における平均余命には、調査した月によって大きな変動がみられた。最も短かったのは9月の採集雌で13.8日、最も余命が長かったのは、6月の採集蚊で平均40.8日だった。調査した公園におけるヒトスジシマカの最高密度は8月の15.6頭であった。

ヒトスジシマカの移動分散範囲は、1日の平均移動距離と平均余命の積によって以下のように推定された。移動分散範囲は、平均余命が20日の場合、平均200m(最大880m)、平均寿命が40日の場合、平均400m(最

大1760m)である。

翅にマークした個体 15 頭、胸部背面にマークした個体 18 頭、対照区としてマークをしなかった個体 20 頭を飼育室内で飼育して、マーク後 10 日間の生存率を調べた。対照区では死亡個体はゼロであったが、翅にマークした個体は 40% (=6/15) が 10 日間で死亡した。これに対して胸部背面にマークした個体の 10 日間の死亡率は、11% (=2/18) であった。

D. 考察

蚊の移動分散範囲を 1 日当たりの移動距離と蚊の寿命の積によって推定する方法は、蚊が一生のうちで活動する範囲を推定することができ、有用であると思われる。現在利用できるデータに基づいて、ヒトスジシマカが 1 日に移動する距離は平均 10m (最大 44m) と推定された。このデータは市街地に隣接した林内で行われた実験で得られたものであり、ヒトスジシマカの吸血習性を考えると、住居が密集した住宅街での分散範囲の推定に適用するには無理があると思われる。今後、住宅街でマーキング実験を行って、より信頼度のある推定値を得る必要があるだろう。

公園で人を刺しに来たヒトスジシマカの余命が、月によってかなり大きく異なることが明らかになった。この変動の第一の原因は、公園に生息するヒトスジシマカ集団の中に占める若い成虫の比率が季節的に大きく変化することにあると思われる。数日前に羽化したばかりの若い成虫は、期待余命が長いので、若い個体が多いほど飼育条件下で観察される平均

余命は長くなると考えられる。

平均余命と 1 日の平均移動距離の積によって、ヒトスジシマカの移動分散範囲が平均 200m (平均余命が 20 日の場合) から平均 400m (平均余命が 40 日の場合) と推定された。これらの推定値は、今後の調査研究によってより正確な値へと修正されると思われるが、公園や林の内部のような環境における移動分散範囲と考えることができるだろう。

翅に対するマーキングは翅に損傷を与え、飛翔行動を妨げると考えられる。これに対して、胸部背面へのマーキングはマークの影響が小さいので、この方法による実験を将来実施するべきだろう。

E. まとめ

ヒトスジシマカの移動分散範囲を 1 日当たりの移動距離と蚊の寿命の積によって推定した。住宅地に隣接した林内のマーキング実験の結果から、1 日当たりの平均移動距離は 10.1 ± 10.6 m、最大移動距離は 44m と推定された。また、人囀採集によって採集した個体の余命を実験室で調べたところ、平均余命は 9 月の採集雌で最も短く 13.8 日、6 月の採集蚊で最も長く平均 40.8 日だった。これらの値によって、ヒトスジシマカが一生の間に移動分散する範囲は平均 200m (平均余命が 20 日の場合) から平均 400m (平均余命が 40 日の場合) と推定された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda, Y. and Kim, K.S. 2012.

Ecology of mosquitoes inhabiting a

park in urban Tokyo, Japan: density of biting *Aedes albopictus* and laboratory estimation of the residual longevity. *Medical Entomology and Zoology* 63: 223-230.

- 2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし
- 3. その他
なし

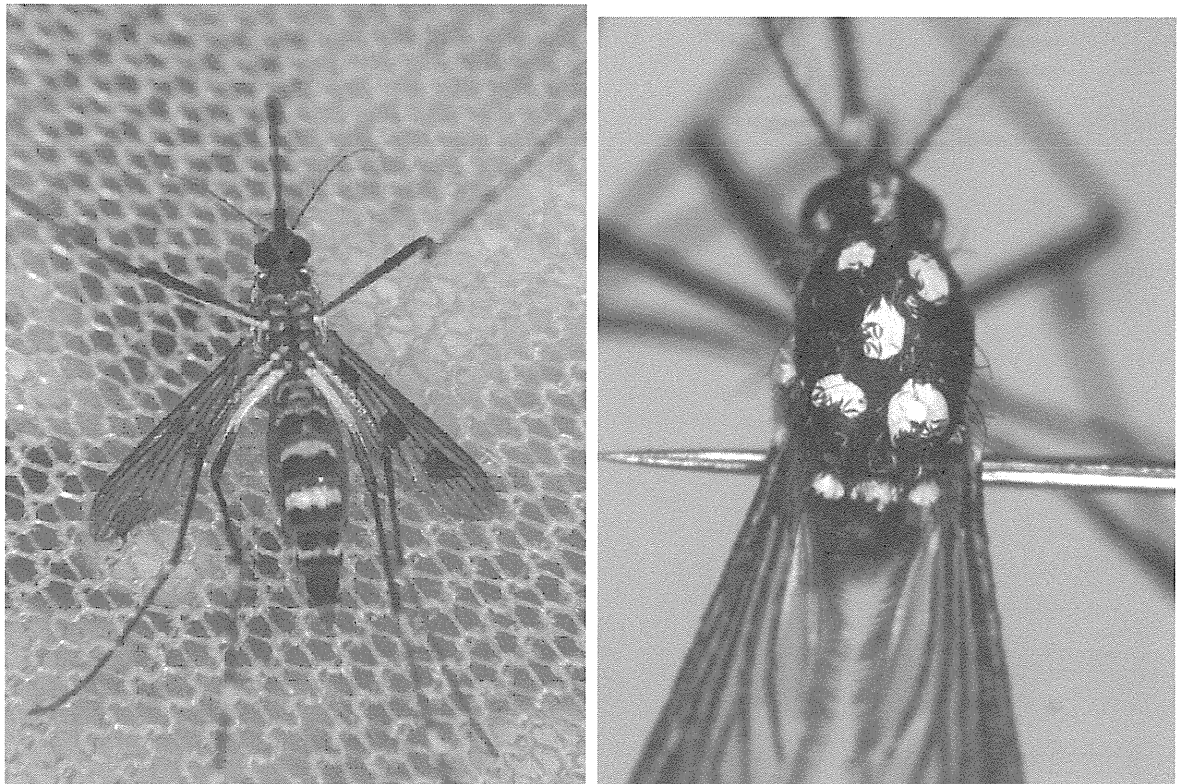


図1 翅の5ヶ所に3色でマークした個体（左）と胸部背面の5ヶ所に白色塗料でマークした個体（右）の例。

表1 東京都の公園で2005年6月から11月に採集されたヒトスジシマカを、 $26.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $58 \pm 0.9\%$ に調節された飼育室で飼育して観察された平均余命の値。

月	平均余命（日）		密度
6月	40.8 a	± 19.5 (23)	1.6
7月	21.3c	± 7.4 (123)	8.4
8月	29.2b	± 9.1 (39)	15.6
9月	13.8d	± 3.0 (127)	10.3
10月	25.6bc	± 10.3 (16)	1.4
11月	26.5bc	± 8.0 (22)	1.8

異なるアルファベット文字が付いている平均値間の差は統計的に有意であった。カッコ内は供試虫数を示す。

厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
「血液製剤の安全性確保と安定供給のための新興・再興感染症の研究」
(H23-医薬-一般-003)

分担研究報告書

デングウイルス感染による宿主側応答の解析
および高感度ウイルスゲノム検出法の検討

研究分担者 田島茂 (国立感染症研究所・ウイルス第一部・主任研究官)

デングウイルスにより引き起こされるデング熱・デング出血熱は、ウイルス媒介蚊の生息する世界中の熱帯・亜熱帯地方において年間数千万～1億人が感染していると推定され、その感染者の多さや重篤度から世界で最も深刻なヒト感染症の一つに挙げられる。しかしワクチンはいまだ開発途上にあり、感染防御は困難である。デング熱の多くは高いウイルス血症を呈することから、蚊や輸血を介したウイルス伝搬には注意を要する。

デングウイルスは他の近縁のフラビウイルス (日本脳炎やウエストナイルウイルス) に比べ *in vitro* での増殖能は低いにもかかわらず患者では逆により高いウイルス血症を誘導する。しかしその機序については不明な点が多い。

昨年度に引き続き本研究では、なぜデングウイルスが高いウイルス血症を呈するのか、その機序を解明するための第一歩として、デングウイルスと日本脳炎ウイルスとの間でウイルス感染細胞内での遺伝子発現動態を比較し、デングウイルス感染に特異的に強い発現誘導が観察された補体因子 C1s について踏み込んだ解析を行った。さらに血液中の高感度デングウイルスゲノム検出のための新たな RT-PCR 法も試みた。

A. 研究目的

米国において輸血や臓器移植によるウエストナイルウイルス感染例が報告されていることから、移植組織におけるフラビウイルス検査は非常に重要である。ウエストナイルウイルスと同じフラビウイルス属に属するデングウイルスは、デング熱およびデング出血熱の原因ウイルスである。世界 100 か国以上で年間数千～1

億人がデングウイルスに感染し、患者数は 4 千万人以上に上り 2 万人が死亡していると推定されている。デングウイルスは 1～4 型の 4 種の血清型群からなり、ときに以前と異なる型のデングウイルスに感染した場合に、より重篤度の高いデング出血熱に至る可能性が高くなる。これは中和能のないあるいは弱い抗デング抗体により引き起こされる抗体依存的感染増強が主要因と考えられている。デング熱は熱帯・亜熱帯地域に生息する蚊であ

るネッタイシマカにより伝搬され、ヒト-蚊で生活環が成立している。

デング感染症患者は他のフラビウイルスに比べ *in vitro* での増殖能は低いにもかかわらず、患者では逆に高いウイルス血症を誘導する。しかしその理由・機序については不明な点が多い。本研究では、なぜデングウイルスが高いウイルス血症を呈するのか、その原因・機序を解明するための第一歩として、昨年度に引き続きデングウイルスと日本脳炎ウイルスとの間でウイルス感染細胞内での遺伝子発現動態を比較した。特に今年度は昨年度にデングウイルス感染で特異的に強く誘導がみられた補体因子である C1s について踏み込んだ解析を行った。さらに今回は、血液中のデングウイルスゲノムをより高感度に検出するための新たな PCR 法 (Flap RT-PCR 法 : Afonina, I. et al., *Biotechniques* 43: 770-774, 2007) を試みた。

B. 研究方法

感染細胞中の遺伝子動態の変化は DNA マイクロアレイ法によりおこなった (昨年度報告書参照)。ヒト A549 細胞において、日本脳炎ウイルス感染に比べデングウイルス感染でより顕著な発現上昇が観察された遺伝子 C1s について、新たに遺伝子増幅用プライマーを作製しリアルタイム RT-PCR 法により発現変化を確認した。さらに培養上清中の C1s は抗 C1s 抗体を使用してウエスタンブロット法により検出した。日本脳炎ウイルスについてはこれまで使用してきた Mie/41/2002 株に加え、中山株および Mie/40/2004 株も用いた。またウイルス感染細胞としてヒト

肺癌由来細胞 A549 株に加え、ヒト単球系細胞 THP-1 細胞も使用した。Flap RT-PCR 法は Afonina らの報告を参考にした。具体的には従来我々が使用してきたデング 1 型ウイルス検出用プライマー (Ito et al., 2004) の 5'末端側に非ウイルス由来ヌクレオチドを 12 塩基 (5'-AATAAATCATAA-3') 付加した。鋳型にはデング 1 型ウイルス (NIID02-20 株) を A549 細胞に感染させたのちの培養上清から回収したウイルスゲノム RNA を使用した。また RT-PCR は SYBR Green I を用いた方法によりおこなった。

C. 研究結果

2 万以上のプローブを用いた DNA マイクロアレイ解析により、両ウイルス感染細胞中における遺伝子発現プロファイルを得ることができた (昨年度報告)。日本脳炎ウイルス感染よりもデング 1 型ウイルス感染でより顕著に発現上昇が観察された遺伝子のなかから 2 番目に顕著であった補体因子 C1s に注目し解析を進めた。リアルタイム RT-PCR 法により確かに RNA レベルで発現量の上昇がみられることを確認し、同様の結果は別のヒト細胞 (Huh-7) でも確認された (昨年度報告)。さらにこの誘導が今回用いたデング 1 型ウイルス株に特異的でないことも明らかにした (昨年度報告)。しかし同じフラビウイルスでも日本脳炎ウイルス感染ではほとんど発現誘導されず、デングウイルス感染で誘導されるのかは不明である。そこで両ウイルスで増殖速度が異なることが原因である可能性を疑い、日本脳炎ウイルス株の中でもプラーク形成が極度に

遅い中山株を使用し C1s 遺伝子の誘導を RT-PCR 法及びウエスタンブロッティング法で調べた。すると RNA レベル、蛋白質レベルで C1s の発現誘導が確認された (図 1)。次にこれまで使用してきた日本脳炎ウイルス株 Mie/41/2002 株とこれと近縁の Mie/40/2004 株を使用し、これまでよりも 10 倍以上低い multiplicity of infection (MOI) で感染させ、C1s 遺伝子の発現を観察した。するとデングウイルス程ではないものの明らかな C1s 遺伝子の発現誘導が確認された (図 2、3)。

実際ヒトなどにデングウイルスが感染する場合、その主な標的細胞は単球系の細胞と考えられている。さらにこれらの細胞は Fc γ レセプターを発現していることから、デング重症化の原因の一つとされる抗体依存性感染増強 (ADE) 時の主標的と考えられている。そこでヒト単球系細胞株 THP-1 にデングウイルスを感染させたときの C1s 遺伝子の発現を調べた (図 4、5)。また感染時に感染増強抗体 (4G2) を加えた。増強抗体を加えないと THP-1 中ではデングウイルスはほとんど増えないことが明らかとなった。デングウイルスが増殖できても C1s の特異的な発現上昇は観察されなかった。

通常使用しているウイルス遺伝子検出用プライマーに 12 塩基の非ウイルス由来配列 (Flap 配列) を連結すると、検出感度および増殖量が顕著に増加するとの報告がされた (Afonina, I. et al., *Biotechniques* 43: 770-774, 2007) この報告ではエンテロウイルスおよび水痘ウイルスで感度・増幅量が改善している。そこで我々が保有し、通常ウイルス検出用に使用している

プライマーに Flap 配列を連結した新たなプライマーを合成し、SYBR Green I を用いた RT-PCR 反応を行い従来のプライマーや、ややウイルス特異的配列を短縮したプライマーとの間で増幅感度・増幅量を比較した (図 6、7、8)。今回 5 パターンについて増幅したが、これまで使用してきたプライマーが最も高感度であった。

D. 考察

昨年度の研究により、デングウイルス感染により遺伝子発現が変動する遺伝子群を網羅的に抽出することに成功した。顕著発現上昇の見られた遺伝子のほとんどは、すでにインターフェロンにより誘導されることが明らかな遺伝子であったが、それ以外の遺伝子も多数見つかった。本年度はそれらの中でも、日本脳炎ウイルス感染細胞でよりもデング 1 型ウイルス感染細胞の方がより発現上昇が顕著であった補体因子 C1s に着目し解析を進めてきた。本当に C1s の発現誘導が日本脳炎ウイルスではほとんど起こらないのかを調べるため、プラーク形成が遅い (つまり細胞変性能が弱い) 中山株を使用して C1s の発現を観察したところ、誘導させることがわかった。さらにこれまでに使用してきたウイルスも、MOI を 10 倍以上に下げれば、C1s の誘導が起こることが明らかとなった。これより、*in vitro* では日本脳炎ウイルスのような増殖速度が速いウイルスでは C1s が誘導される前に細胞変性により誘導が抑えられている可能性が示唆された。つまり C1s の誘導は本質的にデングウイルスに特異的な現象でないことが明らかとなった。一方、感染

個体内でのデングウイルスの主要標的細胞と考えられている単球系細胞に由来する株化細胞 THP-1 細胞を使用して C1s の発現誘導を調べたが、誘導は確認されなかった。この原因としては、この細胞でのデングウイルス複製効率が非常に悪いことが（放出される感染性ウイルス粒子量が A549 細胞の約 1000 分の 1）考えられる。補体因子はデング感染症の悪性化に関与するとの報告がある。実際のデング患者血中での C1s の量などに関する報告はないが、この研究が端緒となり、そのような解析がされることを望んでいる。また今後は他の誘導蛋白質について詳細な解析を行う予定である。

迅速かつ高感度な病原体検出法は、血液製剤の安全性確保と安定供給のために非常に有用である。本研究では、現行の RT-PCR 法をさらに高感度にする可能性のある Flap RT-PCR 法を試みた。しかし結果は従来法に勝るどころか、少々劣る結果となった。また他のウイルス（ポリオマウイルス）でも同様の結果であったとの話を聞いている（私信）。この方法はすでに条件としてほぼ最適化されているものには適当でないのかもしれない。またサンプルの状況（もっとクールドであるとか）によっては威力を発揮するのかもしれない。今後検討する場合にはこのようなことを考慮するつもりである。

E. 結論

1) 補体成分の一つである C1s の誘導が感染条件や株によっては日本脳炎ウイルス感染によっても誘導されることが明らかとなった。

2) Flap RT-PCR 法がデングウイルス遺伝子の検出においてはあまり効果的でないことがわかった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表 論文発表（英文）

1. Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Kotaki, A., Sawabe, K., Saijyo, M., Watanabe, H., Kurane, I., Takasaki, T., and 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.

日本語総説

1. 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 第 40 巻第 5 号（印刷中）。

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, 熊本, 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, 2012 年 11 月

大阪, 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,

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし.

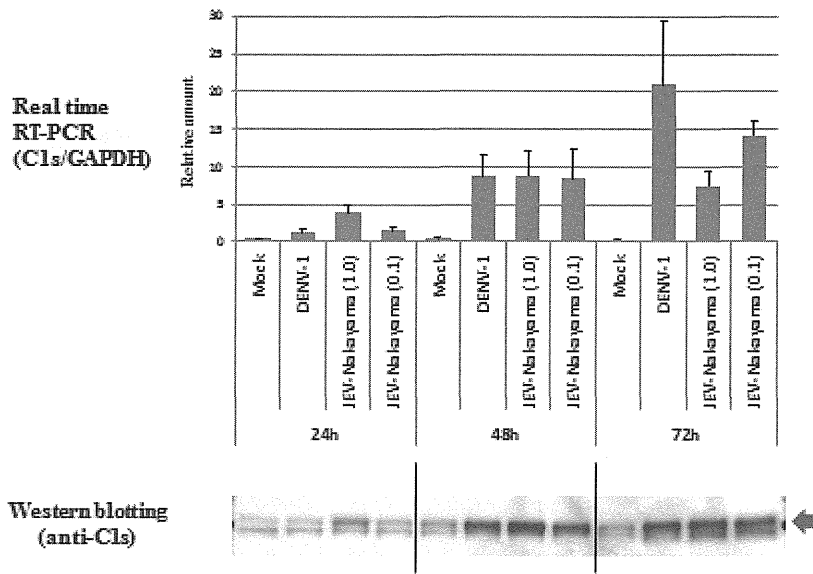


図 1

日本脳炎ウイルス中山株を用いた C1s 発現解析

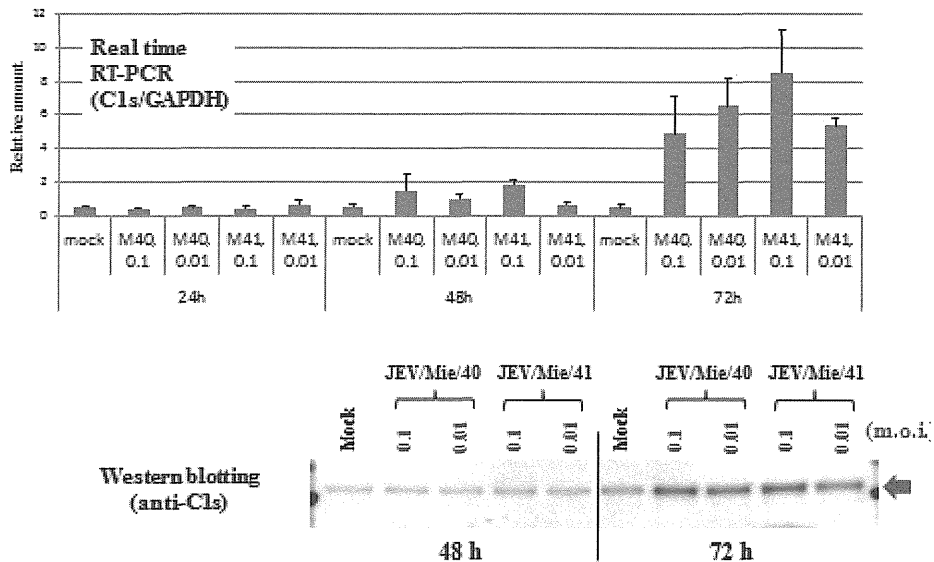


図 2

MOI を下げて感染させた時の C1s 発現解析

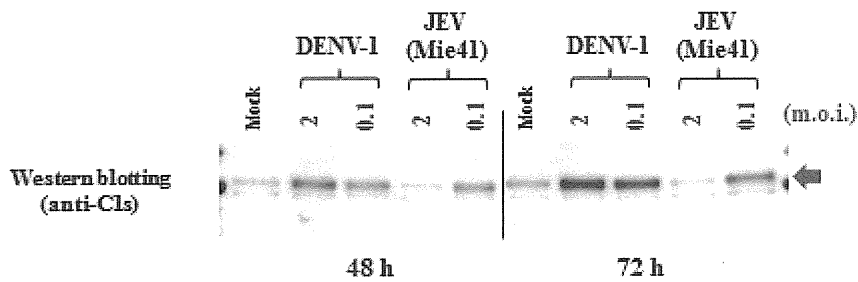


図3

MOI を下げた場合のデングウイルスと日本脳炎ウイルス感染での C1s 発現量の比較

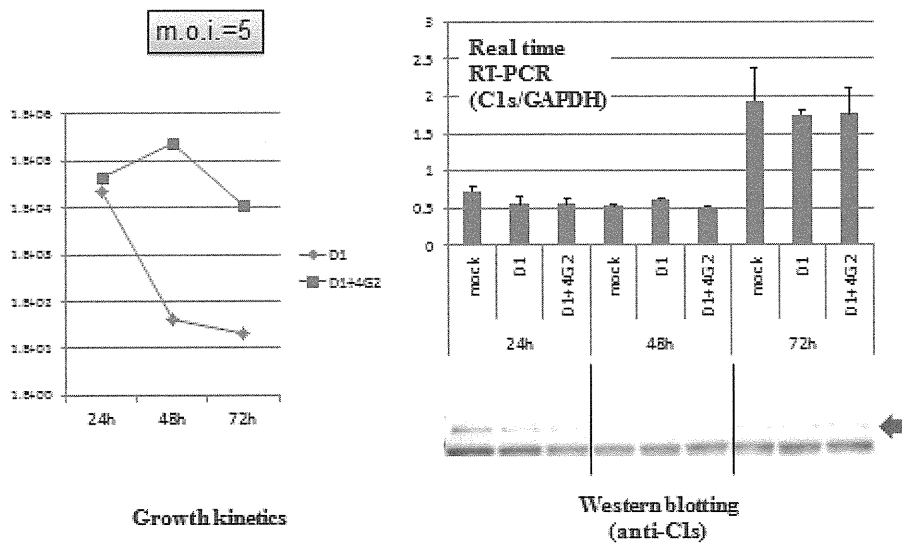


図4

ヒト単球系細胞での C1s 発現解析 (1)