

(Comoro) 諸島で大流行があり、死者 237 名が報告された。

本症の病原体はチクングニアウイルスである。レユニオン島株は、病原性が異なり、重症化をもたらす可能性がある。本株は、アメリカ、フランス、スイスのみならず、2006 年にはインド洋に隣接したインドやスリランカなど、さらに、香港を含む東南アジア地域まで流行が拡大している。2006 年 12 月に 2 例の輸入症例が日本国内で初めて報告された。

本症の主媒介蚊はヤブカ属 *Aedes* の蚊で、主としてネッタイシマカやヒトスジシマカである。レユニオン島で発した本症患者を刺した媒介蚊は、日本にも生息するヒトスジシマカであることが既に明らかとなっている。

本研究では、ウイルスのヒトへの病原性が強毒となったこと、およびウイルスゲノムの変化によって媒介蚊種がヒトスジシマカで効率的に媒介出来るようになったことから、日本国内に生息するヒトスジシマカを含む *Aedes (Stegomyia) scutellaris* 蚊種の本ウイルス感受性に関する検討を行い、蚊対策時の基礎情報を得る事を試みた。

B. 研究方法

1. 蚊の飼育

蚊の飼育は、25°C・1 日の日長 16 時間の飼育室で行った。幼虫の飼育は、マウス固形飼料の粉末：エビオス：テトラミンを等量で混合した微細粉末を用いた。成虫には綿に含ませた 4%砂糖水を与えた。羽化成虫は、20 (間口縦) x 20 (間口横) x 30 (奥行) cm のテトロンメッシュ製のケージ内で飼育した。羽化 7 日後に、麻酔したマウスから吸血の機会を蚊に与えた。産卵容器内には、湿った茶色のキムワイプをいれて、その上に産卵させた。産下卵は、25°C で 6 日程湿潤にしておき、その後卵を乾燥させて、11°C に保管した。卵を孵化させる際は、一度煮沸した後室温に保管してい

る水を使用した。

2. 供試蚊

リバーズシマカ *Aedes (Stegomyia) riversi* は、奄美大島名瀬市らんかん山の樹洞で発生していた幼虫およびヒトに飛来した雌成虫を、実験室に持ち帰り、継代飼育中の 5 世代目の羽化 7 日後の雌成虫を使用した。

ヤマダシマカ *Ae. (Stg.) flavopictus* は、長崎県諫早市で採集後、長崎大学熱帯医学研究所生物環境部門で継代飼育中のものを分与いただいた。その後、大分大学で継代飼育しているもので、羽化 7 日経過後の雌成虫を使用した。

ヒトスジシマカ *Ae. (Stg.) albopictus* は、福岡県久留米市の市街地で採集した成虫由来のものを実験室内で継代中の蚊を用いた。前述の 2 種と同様に、ヒトスジシマカは *Aedes (Stegomyia) scutellaris* グループに含まれることから、実験では比較するために、羽化 7 日経過後の雌成虫を用いた。

ネッタイシマカ *Ae. (Stg.) aegypti* は、*scutellaris* グループではないが、同様に *Stegomyia* 亜属に含まれることから、比較するために、羽化 7 日経過後の雌成虫を用いた。

3. 供試ウイルス

レユニオン島由来のチクングニアウイルスに感染した日本人から分離されたウイルス SL11131 株は、国立感染症研究所ウイルス 1 部から分与された。その後、実験の為に、C6/36 蚊培養細胞を用いてストックウイルス液 (ウイルス力価： 3×10^8 PFU/ mL) を準備して、供試ウイルスとした。

4. 蚊の感染実験

感染実験は大分大学の動物実験委員会から事前に承認を得て、BSL3 施設で実施した。

蚊の麻酔：羽化 7 日後の蚊に胸部接種するため

に、氷と二酸化炭酸ガスを用いて蚊を麻酔した。

蚊の胸部へのウイルス接種：接種装置を用いて、蚊の胸部にウイルス液を約 0.1 μ L 接種した。接種後の蚊は、容量 500 mL の紙製アイスクリームカップ（蓋部分はテトロン製のメッシュ）内に入れた。その後、28°C で 10 日間飼育して、生存蚊のみを -80°C に保管、後日、個別の蚊からウイルスゲノムの検出を行った。

蚊の経口摂食によるウイルス感染：ウイルスに非感染の正常ヒト血液を採血後、ガラスビーズを用いた、脱フィブリン血液を得た。その後、4 倍量の PBS (-) と混合後、低速遠心 (1,500 rpm x 10 分) で上澄みのみを除く操作を 2 回行った。2 回目の遠心で上澄みを除いた packed cell (採血時の血液量の約半分) に対して、蔗糖 (試薬特級、和光純薬) を最終濃度 2% になるように加えた。その後、チクングニアウイルス液 (原液: 1.5×10^8 の 8 乗) を等量加えて良く混合した。

5. RT-PCR 法によるチクングニアウイルスのゲノム検出

TRIzol® 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, USA) と RNeasy mini kit (Qiagen) を組合せて、蚊個体から全 RNA を抽出した。その後、チクングニアウイルスに特異的なプライマー (塩基配列は、国立感染症研究所ウイルス 1 部の高崎智彦室長作成による) を用いて、RT-PCR を行った。

PCR 混合物 (合計体積: 12.5 μ L) を 200 μ L マイクロチューブに入れた。マイクロチューブには、プライマーがそれぞれ 10 pico Mol、1X SuperScript™ One step RT-PCR、PLATINUM Taq 反応混合物 (Invitrogen, USA)、ならびにそれぞれの蚊の RNA 鋳型 200 ng が含まれていた。反応混合物を次にサーモサイクラー (Biometra, USA) に移した。反応の熱サイクルは、first strand cDNA の合成に 50°C 30 分間、逆転写酵素の不活性化と変性に 94°C 2 分間、その後、94°C 30 秒、65°C 30 秒、68°C 1 分間の PCR 反応を 35 サイ

クル実施した。最終伸長ステップでは反応混合物を 68°C に 2 分間保った。

PCR 生成物を、1.5% アガロースゲル上で 30 分間 100V の電気泳動を行った後、臭化エチジウムで染色、UV ライトで特異バンドの有無を調べた。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1. ウイルスを蚊の胸部に接種した際の蚊の感染結果

蚊の胸部にウイルスを接種すると、9 日後には、いずれの蚊種も、感染が成立した (表 1)。リバーズシマカとヤマダシマカもは本ウイルスに感受性をもつことが胸部接種法で示唆された。

2. 蚊が経口的にウイルスを吸液した際の蚊の感染結果

胸部接種法での結果は、ウイルスが中腸を経由していないので、実際の感染が蚊でおこるかどうかは明らかでなかった。そこで、蚊に経口的にチクングニアウイルスを取り込ませて、28°C で 14 日間生存した雌成虫のウイルス感染の有無を RT-PCR 法で調べた。

その結果、リバーズシマカとヤマダシマカから、ウイルスゲノムが検出された (表 2A、表 3)。この結果から、日本産の 2 蚊種はチクングニアウイルスに感受性を示すことが証明された。また、チクングニアウイルスに感染したヤマダシマカの脚からウイルスゲノムが検出されたことから (表 2B)、ウイルス媒介能を有することが示唆された。

ちなみに、いずれの蚊種でも、経口感染による感染率は、胸部接種でのそれよりも低かった。また、リバーズシマカとヤマダシマカで感染率が若干異なっていた。この理由が、摂取した血液量にもとづくものなのか否かは明らかではないが、今後の検討が必要である。

D. 考察

リバーズシマカとヤマダシマカがチクングニアウイルスに対して感受性を有することを、胸部接種法と経口摂食法によって、実験的に証明した。

経口摂食の実験では、ヒト血球にウイルス液を混合した液を綿に含ませて与えた。両蚊種は、ネッタシマカと比較して吸液欲がさほど高くなかったので、同様の実験を2回実施した。1回目の実験はいずれも、ウイルス液を含む綿を一晩蚊に暴露した。しかし、感染はヤマダシマカのみで認められ、リバーズシマカでは認められなかった。そこで、2回目の同様な実験では、ウイルス液を含む綿を3日間蚊に暴露した。その間に、綿の乾燥を防ぐために、中央に穴の開いたパラフィルムを載せ、更にその上に4%蔗糖液を含む綿を載せた。3日間の間に若干の砂糖水がウイルス液を含む綿に浸透していったが、アイスクリームカップの容器内側の底面にはおびただしい数の褐色の糞が認められたことから、蚊の生存に必要な量の液を吸液したと推定される。この処理によって蚊の死亡数が増えることは無かった。むしろ、1回目の実験結果(表2A)よりも2回目の実験結果(表3A)のほうが、2種から感染蚊が検出されており、かつ感染率が若干高い様に思われた。

なお、蚊の飼育温度は28°Cで行ったが、日数の経過と共に、ウイルス力価は低下したと思われたが、高濃度のウイルス力価(1.5 x 10⁸ PFU/mL)を使用したので、3日間経過しても、一部のウイルスは生存していたように、実験結果から思われた。

蚊の人工吸血方法には種々の方法が報告されているが、リバーズシマカとヤマダシマカは、マウスよりもヒトからの吸血嗜好性が高いように思われる。我々は、チクングニアウイルスを接種した種々の遺伝子ノックアウトマウスを用いた検討を始めている。この方法が確立されると経口感染実験はより容易であり、満腹吸血の蚊を使用

すれば、比較的定量性のある結果が導き出せると思われる。

リバーズシマカとヤマダシマカは我が国固有の蚊と考えられている。リバーズシマカは、南西諸島や琉球列島に広く分布している蚊である。九州本島に隣接した原生林が保持されている島々で分布生息している。また、本州では紀伊半島での採集が報告されている。しかし、それより以北での報告は今のところないように思われる。一方、ヤマダシマカはヒトスジシマカに混じって生息しているが、ヒトスジシマカが竹藪などの切り株で生息するのに対して、ヤマダシマカは人家に隣接した山林内を好んで生息している。

我が国において、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーズシマカの3蚊種のヒトとの接触度合いは、それぞれの蚊種の生息域から考えると、ヒトスジシマカが最も高く、ヤマダシマカ、リバーズシマカの順となろう。

しかしながら、ウイルスの感受性については同等と推測されることから疫学的な重要度のランク付けは容易ではないかもしれない。日本の本州ではヒトスジシマカがチクングニアウイルスの主要な媒介蚊と言うことは言えるかも知れない。しかし、南西諸島や琉球列島の島々は森林に覆われている地域が多いので、これらの地域ではリバーズシマカとヒトとの接触度合いは、都会よりも高いことが推察されることから、媒介蚊対策を講じる際は考慮する必要がある。

E. 結論

1. 蚊の胸部接種法と経口摂食法によるチクングニアウイルス感染実験を行い、日本に生息するリバーズシマカとヤマダシマカの雌成虫が、本ウイルス感受性を持つ事が明らかとなった。
2. 我が国における上記の蚊2種の分布生息域および蚊の感受性から疫学的意義を考察した。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Lucky Ronald Runtuwene, Eiji Konishi, Atsushi Yamanaka, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2014): Novel method for mass-infecting *Aedes aegypti* with dengue virus type 2. *Parasites & Vectors* (投稿済、査読後の修正原稿準備中)

2. 学会発表

(1) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi and Yuki Eshita (2013): The application of next generation sequencer in investigating the relationship of dengue virus and its vector. 第6回寄生虫感染免疫研究会、2013年3月8日(金)・9(土)、大分県由布市、大分大学医学部看護学科棟。第6回寄生虫感染免疫研究会プログラム講演要旨: 22, 2013

(2) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2012): Validation of RNA-seq Data Using qRT-PCR. 第65回日本衛生動物学会大会、2013年4月6日(土)・7(日)、酪農学園大学、北海道江別市。Med. Entomol. Zool., 64 (大会特集号): 40, 2013.

(3) 江下優樹, 松原祥恵, Lucky R. Runtuwene, 野口香緒里, 川上絵理, 大塚靖, 福田昌子, 小林隆志, 高崎智彦, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Bouasy Hongvanthong, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 今田美穂子, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2013): 節足動物媒介性ウイルスの迅速検出への RT-LAMP 法

の改良。日本家屋害虫学会 第34回大会・総会、2013年6月22(土)・23(日)、日本大学生物資源科学部、神奈川県藤沢市。

(4) Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Sachie Matsubara, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Arthur E. Mongan, Josef Tuda, Mihoko Imada, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Hironari Narita, Hiroshi Ushijima, Koichi Morita, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane (2013): INOVATIVE TECHNOLOGY FOR USE IN VECTOR CONTROL. “The 1st conference on Asian pediatric infectious diseases (第1回アジア小児感染症会議)”、2013年8月24(土)・26(月)、東京大学医学部3号館N101室、東京都文京区。

(5) Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga¹, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita¹ (2013): Comprehensive Gene Expression Analysis of Dengue-Infected Mosquitoes. “The 1st conference on Asian pediatric infectious diseases (第1回アジア小児感染症会議)”、2013年8月24(土)・24(土)・26(月)、東京大学医学部3号館N101室、東京都文京区。

(6) Yuki Eshita, Junya Yamagishi, Josef Tuda, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Arthur E. Mongan, Yutaka Suzuki (2013): Application of molecular biology methods for the analysis of tropical diseases in Manado. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12日(木)-14日(土)、インドネシア国マナド市サムラトランギ大学。

(7) Junya Yamagishi, Anna Natori, Mohammed

E. M. Tolba, Arthur E. Mongan, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Yuki Eshita, Josef Tuda, Yutaka Suzuki (2013) : A Description of Malaria by Transcriptome. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12日(木)-14日(土)、インドネシア国マナド市サムラトランギ大学。

(8) Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Junya Yamagishi, Mihoko Imada⁴, Ryuichiro Maeda, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Comprehensive gene expression analysis of dengue-infected *Aedes aegypti* and novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. インドネシア国寄生虫会議セミナー、2013年9月12日(木)-14日(土)、インドネシア国マナド市サムラトランギ大学。

(9) Yuki Eshita, Lucky Runtuwene, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Mihoko Imada, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Hiroshi Ushijima, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki (2013) : APPLICATION OF NEW TECHNOLOGIES FOR USE IN VECTOR CONTROL. Professor Polly Roy Group Reunion for celebrating 30 years of research in the Roy Laboratory, The Queen's College, University of Oxford, 13-15 September, 2013. 2013年9月13日(木)-15日(日)、英国オックスフォード市オックスフォード大学クイーンズコレッジ。

(10) 江下優樹、福田昌子、Lucky Runtuwene、大塚 靖、野口香緒里、川上絵理、徳永暁憲、小林隆志、服部正策、Raweewan Srisawat、Narumon Komalamisra、牛島廣治、倉根一郎、高崎智彦 (2013) : 本邦産 *Aedes (Stegomyia) scutellaris*

グループ蚊2種のチクングニアウイルス感受性。第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2日(土)・3(日)、大分県大分市、大分大学医学部臨床講義棟1F 臨床中講義室。第66回日本寄生虫学会・第63回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨 : 9, 2013. Med. Entomol. Zool., 64(2) : ???, 2013.

(11) Lucky Runtuwene, Shuichi Kawashima, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Akinori Tokunaga, Yutaka Suzuki, Takashi Kobayashi, Yuki Eshita (2013) : Potential novel anti-viral proteins in *Aedes aegypti*. 第66回日本寄生虫学会南日本支部大会・第63回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2013年11月2日(土)・3(日)、大分県大分市、大分大学医学部臨床講義棟1F 臨床中講義室。第66回日本寄生虫学会・第63回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨 : 10, 2013.

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

表 1. チクングニアウイルスをリバーズシマカおよびヤマダシマカ雌成虫の胸部に接種後、
28°C9 日間飼育した蚊体内におけるウイルスゲノムの有無

供試蚊種	感染実験区				対照区		
	接種した 雌蚊の数*1	14 日間生存した 雌蚊の数*2	調べた 雌蚊の数*3	感染蚊の数 (%)	接種した 雌蚊の数*4	調べた 雌蚊の数*2,*3	感染蚊の数 (%)
リバーズシマカ	14	1	1	1 (100)	3	1	0 (0)
ヤマダシマカ	21	7	5	7 (100)	20	5	0 (0)

*1 羽化 7 日後の雌成虫にチクングニアウイルス (SL11131 株、 6×10^4 PFU/0.2 μ L/雌蚊) を胸部接種

*2 4% 蔗糖 (試薬特級、和光純薬・株) 液を含む綿で、28°C9 日間生存した蚊

*3 28°C9 日間飼育した生存蚊から総 RNA を抽出した。その後、チクングニアウイルスゲノムに特異的なプライマーを用いた RT-PCR 反応を行い、電気泳動で特異的増幅が確認された蚊の数

*4 羽化 7 日後の雌成虫に 2% MEM 液 (0.2 μ L/雌蚊) を胸部接種

表 2A. チクングニアウイルス液を経口的に吸液したリバーズシマカおよびヤマダシマカ雌成虫を、
28°C14 日間飼育した後、蚊体内におけるウイルスゲノムの検出結果(経口感染実験1)

供試蚊種	感染実験区				対照区			
	供試した 雌蚊の数*1	14 日間生存した 雌蚊の数*2	調査した 雌蚊の数*3	陽性蚊の数 (%)	供試した 雌蚊の数	14 日間生存した 雌蚊の数*4	調査した 雌蚊の数	陽性蚊の数 (%)
リバーズシマカ	31	19	5+14	0 (0)	22	10	1	0 (0)
ヤマダシマカ	41	34	5	1(20)	25	20	1	0 (0)

*1 羽化 7 日後の雌成虫に、4%トレハロースとヒト赤血球を含むチクングニアウイルス (SL11131 株、 1.5×10^{10} PFU/1 mL/4x4cm 角綿) を含む綿から吸液の機会を 12 時間与えた。蚊の数はアイスクリームカップ (500 mL) 容器内の数。

*2 ウイルスに暴露後、10%トレハロース液を含む綿で、28°C14 日間蚊を飼育した。

*3 14 日間生存した蚊の脚を除く全蚊組織を用いて総 RNA を抽出した。その後、チクングニアウイルスゲノムに対する特異的プライマーを用いた RT-PCR を行って、電気泳動で特異的増幅を認めた蚊の数

*4 羽化 7 日後の雌成虫に、10%トレハロース液を含んだ綿で、14 日間飼育した

表 2B. チクングニアウイルス液を経口的に吸液したヤマダシマカ雌成虫を、28°C14 日間飼育した後、蚊の脚組織からのウイルスゲノムの検出(経口感染実験1)

供試蚊種	感染実験区			対照区		
	腹部陽性雌蚊の数*1	脚を調べた雌蚊の数	RT-PCR 陽性の数(%)	腹部未感染雌蚊の数*2	脚を調べた雌蚊の数	RT-PCR 陽性の数(%)
リバーズシマカ	NT	NT	NT	NT	NT	NT
ヤマダシマカ	1	1	1 (100)	1	1	0 (0)

*1 表 2A でチクングニアウイルスゲノム陽性の蚊由来の脚組織

*2 表 2A で対照区の未感染蚊由来の脚組織

表 3. チクングニアウイルス液を経口的に吸液したリバーズシマカおよびヤマダシマカ雌成虫を、
28°C14 日間飼育した後、蚊体内におけるウイルスゲノムの検出結果(経口感染実験 2)

供試蚊種	感染実験区				対照区			
	供試した 雌蚊の数*1	14 日間生存した 雌蚊の数*2	調査した 雌蚊の数*3	陽性蚊の数 (%)	供試した 雌蚊の数	14 日間生存した 雌蚊の数*2	調査した 雌蚊の数	陽性蚊の数 (%)
リバーズシマカ	30	10	5	2 (40)	25	15	1	0 (0)
	35	15	NT	0 (0)				
ヤマダシマカ	30	1	NT	0 (0)	25	20	1	0 (0)
	33	15	5	4 (80)				
ネッタシマカ	29	7	NT	0 (0)	25	20	1	0 (0)
	33	8	NT	0 (0)				

*1 羽化 7 日後の雌成虫に、4%蔗糖(試薬特級、和光純薬・株)とヒト赤血球を含むチクングニアウイルス(SL11131 株、 1.5×10^{10} PFU/1 mL/4x4cm 角綿)を含む綿から吸液の機会を 72 時間与えた。蚊の数はアイスクリームカップ(500 mL)容器内の数。

*2 4%蔗糖(試薬特級、和光純薬・株)液を含む綿で、28°C14 日間蚊を飼育した。

*3 14 日間生存した蚊の脚を除く全蚊組織を用いて総 RNA を抽出した。その後、チクングニアウイルスゲノムに対する特異的プライマーを用いた RT-PCR を行って、電気泳動で特異的増幅を認めた蚊の数

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）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書

「ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の評価」

研究分担者 澤邊京子（国立感染症研究所 昆虫医科学部長）
研究協力者 佐々木年則，斎藤一三，伊澤晴彦（国立感染症研究所 昆虫医科学部）
比嘉由紀子，皆川昇（長崎大学熱帯医学研究所 病害動物部）
Arlene G. Bertuso（フィリピン大学マニラ校・寄生虫学講座）
田島茂、高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究要旨

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立を目的として、国内産ヒトスジシマカのデングウイルス感受性を評価した。国内外のヒトスジシマカ、および外国産ネッタイシマカにそれぞれデングウイルス 1 型（DENV1）および 2 型（DENV2）を径口的に摂取させ、感染蚊を作製した。ウイルスゲノム RNA は SYBR Green 法により検出し、さらに免疫抗体法を用いてウイルスの存在を蛍光的に検出した。その結果、本研究に用いた国内および外国産ヒトスジシマカにおいては DENV1 の高い増殖性が認められたが、一方で、DENV2 は、DENV1 に比べて増殖性が低く、特にネッタイシマカでの増殖はほとんど確認できなかった。

ヒトスジシマカのデングウイルス感受性は系統によって差異はあるが、本研究に供した国内産ヒトスジシマカにおいてウイルスの増殖が確認されたことから、国内にデング熱が侵入した場合には、小規模なアウトブレイクが起こる可能性はあると考えるべきである。従って、国内でデング熱の患者が発生した場合には、患者宅周辺の蚊の密度調査を行うと同時に、殺虫剤を用いた迅速な蚊の防除を行うことが必要となる。今後は、感染蚊が次の世代へデングウイルスを持ち込む可能性を調べることも、国内でのデングウイルス定着の可能性を推測するために必要である。

A. 研究目的

デングウイルスは、フラビウイルス科に属する RNA ウイルスである。世界中で年間数千万人から 1 億人がデング熱、数十万人がデング出血熱を発症している。デング

熱は、急性熱性疾患であるが、デング出血熱は発症すると全身血管からの血漿漏出、補体系の異常活性化、血小板減少に伴う出血傾向、粘膜からの出血、播種性血管内凝固症候群などをきたし、重篤な致死的経過

をとる。国内の輸入症例中、毎年2ないし3例はデング出血熱の報告がある。我が国におけるデング熱輸入症例は年々増加し、2010年には220症例を超え、2013年は合計で249例が記録された。感染症法施行後最高の症例数を年々更新している状況にある。地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり、世界中で流行域の拡大が最も危惧される感染症である。

2013年9月には、日本各地を旅行したドイツ人女性が帰国後にデング熱を発症した。患者は日本国内で蚊に刺されたことを記憶していたこともあり国内感染が疑われたが、日本国内にすでにデング熱が侵入している可能性が強く示唆された事例となった。本研究では、国内に広く分布するヒトスジシマカのデングウイルス媒介能を評価した。

B. 研究方法

ネッタイシマカ LBN 系統は、2010年フィリピン・ロスバニョス市で捕集された雌成虫から採卵し、その後実験室内で維持された系統である。ヒトスジシマカは、2010年川崎市生田地区で捕集された系統 (IKT 系統)、2011年神奈川県海老名市捕集系統 (EBN 系統)、2012年ベトナム・ホーチミン市捕集系統 (HCM 系統) を感染実験に用いた。デングウイルス 1 型 (DENV1) は、タイ・バンコク市からの帰国者の血清から分離された株 (D1 11-120)、デングウイルス 2 型 (DENV2) は、インドネシア・バリ島からの帰国者血清から分離された株 (D2 11-122/1) であり、いずれもウイルス 1 部から分与された分離株を用いた。

脱繊維血と混合した 10^5 コピー/ml の力価のウイルス液を人工膜吸血法により経口

的に蚊に摂取させ、その後、感染蚊を 27°C 長日条件のインキュベーター内に約 20 日間維持した。デングウイルス RNA は、SYBR Green 法 (Callahan JD et al. 変法) で検出し、さらに免疫蛍光抗体法により、ウイルスの存在を観察した。

C. 研究結果

フィリピン由来ネッタイシマカ LBN 系統は、DENV1 の感染 21 から 23 日後、唾液腺、中腸、その他の組織において 10,000 コピー/組織 (以下、組織当たりのコピー数として省略) 以上が検出された (表 1)。一方、DENV2 は、ネッタイシマカ LBN 系統のいずれの組織においても 500 コピー以下しか検出されなかった。

国内産ヒトスジシマカ IKT 系統においては、DENV1 の感染 21 日から 23 日目の唾液腺、中腸、その他の組織において 10,000 コピー以上が検出された。一方、DENV2 の感染 21 日から 23 日目の唾液腺では、500 コピー以下しか検出されなかったが、中腸およびその他の組織においては 10,000 コピー以上が検出された。同じく国内産ヒトスジシマカ EBN 系統では、DENV1 の感染 21 日から 23 日後に唾液腺、中腸、その他の組織において 10,000 コピー以上が検出され、DENV2 でも感染 21 日から 23 日後の唾液腺において、5,000~10,000 コピーが検出された。

外国産ヒトスジシマカ HCM 系統においては、DENV1 の感染 21 日から 23 日後に唾液腺、中腸、その他の組織において 10,000 コピー以上が検出されたが、DENV2 は、唾液腺において 1,000~5,000 コピー、中腸およびその他の組織においては 10,000 コピー以上が検出された。

図 1 に各種蚊の唾液腺におけるデングウイルス 1 型 (図 1 左) および 2 型 (図 1 右) の増殖性を比較した。本研究に用いた国内および外国産ヒトスジシマカでは DENV1 の高い増殖性が認められた。一方, DENV2 は, DENV1 に比べて増殖性が低く, 特に LBN 系統ネッタイシマカではその増殖は非常に低いレベルであった。ヒトスジシマカのデングウイルス感受性は系統によって差異はあるが, 本研究に供した国内産ヒトスジシマカにおいては, ある程度の増殖性が示唆された。

D. 考察

ネッタイシマカ LBN 系統において, DENV2 がほとんど検出されなかったことは, 今後再確認が必要であるが, ヒトスジシマカ IKT 系統の唾液腺においても DENV2 の増殖は低いレベルであったことから, 蚊の種類ならびに系統によっては DENV2 に低感受性の集団が存在する可能性は否定できないものの, 今後, 多くの系統の感受性を評価することで結論したい。しかし, 少なくとも DENV1 に対しては, 国内の多くの集団が感受性であると考えて防除する必要があるだろう。本結果より, 国内にデング熱が侵入した場合には, 国内に分布するヒトスジシマカが媒介する小規模なアウトブレイクが起こる可能性は十分あると考えられる。

今後は, デングウイルス 3 型や 4 型に対する蚊のウイルス感受性を評価する必要があるが, デングウイルス感染蚊が, 次の世代へ持ち越せるかも評価したい。

E. 結論

1) 本研究に用いた国内および外国産ヒトスジシマカでは DENV1 の高い増殖性が認められた。

2) DENV2 は, DENV1 に比べて増殖性が低く, 特にネッタイシマカでの増殖はほとんど確認できなかった。

3) 今後, DENV3 および DENV4 の感受性評価系を確立する。

4) デングウイルス感染蚊が, 次の世代はウイルスを持ち込めるかも評価する必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

佐々木年則, 比嘉由紀子, ベンツーン G アーリン, 伊澤晴彦, 高崎智彦, 皆川 昇, 澤邊京子, 国内外で捕集された蚊のデングウイルス感受性, 第 66 回日本衛生動物学会大会, 2014 年 3 月 22 日, 岐阜大学

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

表1 国内外のネッタイシマカおよびヒトスジシマカにおけるデングウイルス感受性

経口感染後の日数		21-23日			
組織	デングウイルス	唾液腺	中腸	その他	
ネッタイシマカLBN系統	1型	6	6	6	
	2型	1	1	2	
ヒトスジシマカIKT系統	1型	6	6	6	
	2型	2	6	6	
EBN系統	1型	6	6	6	
	2型	5	6	6	
HCM系統	1型	6	6	6	
	2型	4	6	6	

6 >10,000
 5 5,000-10,000
 4 1,000-5,000
 3 500-1,000
 2 10-500
 1 <10
 (コピー数/組織)

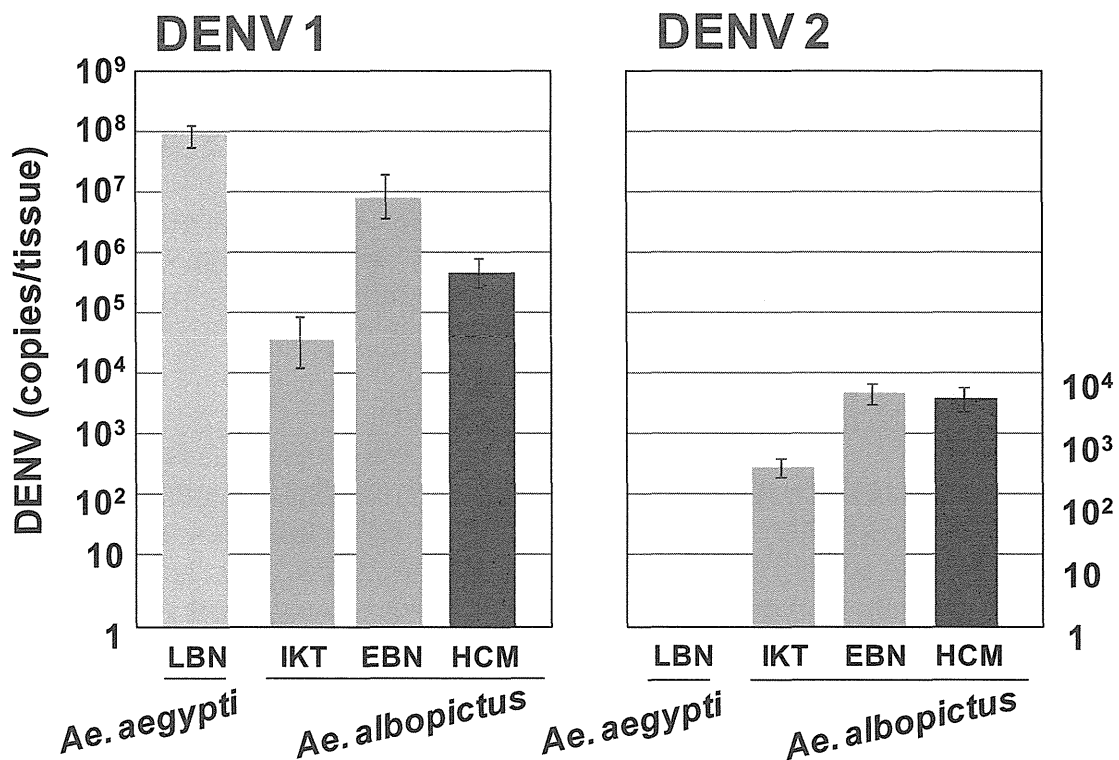


図1 ネッタイシマカおよびヒトスジシマカ唾液腺におけるデングウイルスの増殖性

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）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する
総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書

デングウイルス霊長類モデル（マーモセット）の
免疫学的解析系の評価

研究分担者 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 白井 顕治 国立感染症研究所ウイルス第一部 大学院生
北浦 一孝 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨： 近隣諸国で流行が認められているデングウイルスがヒトに感染すると、急性熱性疾患、出血熱などの疾病を伴い、本邦においても地球環境の変化によりその感染拡大が懸念されている。しかしながらマウスにおいてデングウイルス感染が成立しないため、ヒトで認められるような発症モデルを作成、解析することが困難であり、よりヒトに近い動物を用いた系の作成が急務である。したがって本研究では、新世界猿に属する小型の霊長類であるコモンマーモセットを用いた感染モデル系を確立し、感染時の病態を評価するための免疫学的解析を目的として行った。

A. 研究目的

デングウイルス（DEV）は、蚊の吸血によりヒトへ感染し、発熱のみならず致死的な出血熱などの疾病を起こすことがある。本邦では過去に東南アジアから侵入した DEV が、ヒトスジシマカによって媒介され、西日本を中心に多数の感染者を発生させた経緯があるため、再興感染症として監視が必要である。しかしながら、DEV はマウスにおいて感染が成立しない。したがって発症メカニズムやワクチン開発に必要な情報が不足しているため、霊長類をベースとした発症モデルの作成、病態解明等の基礎的研究は急務である。

コモンマーモセットは新世界猿に属する小型の霊長類であり、非ヒト霊長類モデルとして生理学、神経学等の研究で利用されている。他の霊長類モデル動物と比べて小型で多産であることから、本動物において感染モデル系を確立することは有用である。そして感染時の病態を評価するために、免疫学的解析の基盤整備も平行して進めなければならない。しかし現時点において、本動物における免疫学的情報は限定されている。ウイルス感染時の病態を解明するためには、抗体産生の有無だけでなく、病理組

織学的評価、経時的な炎症性サイトカインの変化、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）および T 細胞を中心とした細胞性免疫の挙動を評価することは重要である。したがって本研究では、多数の研究協力者および研究施設と連携（図 1）し、コモンマーモセットを用いた節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立と、その解析系を用いたデングウイルスを感染させたマーモセットの免疫学的評価を目的とした。

B. 研究方法

(1) コモンマーモセットにおける免疫解析ツールの確立（国立病院機構相模原病院臨床研究センター、和歌山県立医科大学）：感染実験によって得られたサンプルにおける免疫学的評価を実施するための基盤整備を行う。具体的には、Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系、コモンマーモセット MHC 解析系、コモンマーモセット TCR レパトア解析系、個体識別系の確立から構成される。T 細胞における特異的抗原認識は、T 細胞受容体（TCR）と病原性ウイルス由来ペプチドを提示した抗原提示細胞上の MHC 分子との相互作用により

開始される (図 2 左)。マーマーモセットはマウスのような近交系が確立した動物とは異なるため、MHC 分子における遺伝子アレルを正確に同定することで、個体間におけるウイルス感受性の差異について考慮することが可能となる。したがって図 2 右に示すような手順により MHC および TCR の解析を進める。これら解析系の確立は、感染実験に先立って健常コモンマーマーモセットより採取された血液および臓器を使用する。

(2) コモンマーマーモセットにおける標準臓器・組織アトラスの作成 (東北大学・日本歯科大学) : コモンマーマーモセットにおける病理学的評価を実施するためには、正常組織における基礎的情報が必要になる。したがって標準臓器・組織アトラス作成のため、感染実験に先立って健常コモンマーマーモセットより組織を採取し、組織標本を作製する。

(3) DEV 感染実験 (国立感染症研究所) : コモンマーマーモセットにおける DEV の感染実験を実施し、血中サイトカインレベルを測定し、ヒトにおけるデング熱疾患モデルとして評価を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立感染症研究所および各関連施設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) Real-time PCR によるサイトカイン等の発現解析系: ウイルス感染に伴う炎症性サイトカインの変化を検出するため、免疫関連の細胞表面抗原および炎症性サイトカイン、それらの数値を補正するためのハウスピーピング遺伝子に対する特異的プライマーを設計した (図 3)。

(2) MHC 解析系の確立: 現在 MHC における解析は、30 頭のコモンマーマーモセットを用いて *Caja-G* 遺伝子の同定が進められている。これらの解析には膨大なゲノムデータのシーケンスおよび解析が必要になるため、次世代シーケンサーおよびそれに対応した専用のソフトウェアにより、コモンマーマーモセットにおける MHC プロタイプを決定し、最終的に感染実験に供するコモンマーマーモセットの選別に寄与するものとなる。

(3) TCR レパトア解析系の確立: TCR レパトア解析を確立するために、まずコモンマーマー

セットにおける TCR 遺伝子を同定する必要があった。これまでに TCR における α 鎖および β 鎖可変領域 (TRAV、TRBV) 遺伝子の同定が完了した。TCR β 鎖遺伝子は過去に他のグループで報告された遺伝子群とオーバーラップした TCR ファミリーも含まれたが、Adaptor-Ligation mediated PCR (AL-PCR) によって増幅された TCR 遺伝子に対して 1000 クローンに及ぶシーケンス解析を実施した結果、最終的に 35 の新規 TRAV 遺伝子、21 の新規 TRBV 遺伝子を同定した。これによりコモンマーマーモセットでは、各 35 種類の TRAV および TRBV 遺伝子が発現することが確認された。さらにこれらの情報を基に、TCR レパトア解析系を構築するため、既にヒトおよびマウスにおいて確立された TCRV レパトア解析法を参考にしながら、コモンマーマーモセット TCRV 遺伝子配列に検出用 DNA プローブの選定を行った。

(4) コモンマーマーモセットにおける標準臓器・組織アトラスの作成: 採取された全身の臓器に対して、HE 染色および免疫学的染色手法を用いて、他の動物との差異について現在解析中である。

(5) DEV 感染マーマーモセットの免疫学的評価: DEV をコモンマーマーモセットに感染させたのち、感染後 2、4、7、10、15 日目において採血を行い、末梢 PBMC より RNA の抽出を行い、Real-time PCR において TNF- α 、IFN- γ 、IL-2、IL-5、IL-10 の発現量の経時的観測を行った結果、感染後 2 日から 7 日の範囲で TNF- α 、IFN- γ 、IL-5 の優位な上昇が認められた (図 4)。

D. 考察

本研究では、コモンマーマーモセットを用いて非ヒト霊長類ウイルス感染モデル系を作成することにある。さらに感染モデル系を評価するための免疫学的解析系についても開発を進めている。これまでの研究により、免疫関連遺伝子に対する Real-time PCR 系の確立により、感染動物における抗体産生の有無以外に、T 細胞の挙動および炎症性サイトカインの増加についても解析が可能になった。DEN 感染コモンマーマーモセットにおける TNF- α 、IFN- γ 、IL-5 の経時的な変化は、これまでマウスでは不可能であったウイルス感染が、コモンマーマーモセットにおいて成立したことを示唆するものである。

健康な人とマーマセットの末梢血におけるサイトカインの違いを考慮し、今後より詳細な疾患モデルとしての免疫学的評価が必須となる。**MHC** および **TCR** レパトア解析系は開発中であるため、感染サンプルに対して評価を行える段階にないが、今後は投与量および頭数を揃えることで、感染が成立する個体における **MHC** ハプロタイプの解析、また局所における炎症部位で浸潤する T 細胞の抗原特異性を探るために **TCR** レパトア解析が役立つものと思われる。炎症像やリンパ球浸潤を特定するためにも、正常組織との比較による病理学的解析、免疫組織学的が必要になる。

E. 結論

本研究により、マウスでは感染が成立しないウイルスに対して、非ヒト霊長類感染モデル動物としてコモンマーマセットに注目した結果、**Real-time PCR** 系によって感染の成立が確認され、また、疾患モデルとなり得る可能性が高いことが示唆された。今後コモンマーマセットにおける免疫学的解析ツールを充実させることで、感染時の病態に対する情報が得られるものと思われる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsutani T, Fujii Y, Kitaura K, Suzuki S, Tsuruta Y, Takasaki T, Ogasawara K, Nishimoto N, Kurane I, Suzuki R.
Increased positive selection pressure within the complementarity determining regions of the T-cell receptor β gene in New World monkeys.
Am J Primatol. 2011 Oct;73(10):1082-92.

Fujii Y, Matsutani T, Kitaura K, Suzuki S, Itoh T, Takasaki T, Suzuki R, Kurane I.
Comprehensive analysis and characterization of the TCR alpha chain sequences in the common marmoset.
Immunogenetics. 2010 Jun;62(6):383-95.

Fujii Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Kumagai K, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Hamada Y, Kurane I, Suzuki R.

Immune-related gene expression profile in laboratory common marmosets assessed by an accurate quantitative real-time PCR using selected reference genes.
PLoS One. 2013;8(2):e56296.

Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, Ogasawara K, Kurane I, Suzuki R.

A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay.

J Immunol Methods. 2012 Oct 31;384(1-2):81-91.

2. 学会発表

北浦一孝、松谷隆治、藤井克樹、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、小笠原康悦、西本憲弘、倉根一郎、鈴木隆二：新世界ザルにおける T 細胞受容体 β 鎖遺伝子の CDR3 領域における正の選択
第 40 回日本免疫学会学術集会（東京）2011 年 11 月 27-29 日

北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、倉根一郎、鈴木隆二：コモンマーマセットにおける TCR レパトア解析法の開発
第 59 回日本実験動物学会総会（別府）2012 年 5 月 24-26 日

北浦一孝、藤井克樹、松谷隆治、白井顕治、鈴木さつき、高崎智彦、亀谷美恵、倉根一郎、鈴木隆二：コモンマーマセットにおけるリアルタイム PCR を用いた免疫関連遺伝子発現解析
第 60 回日本実験動物学会総会（つくば）2013 年 5 月 15-17 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

コモンマーモセットを用いた
節足動物媒介性ウイルス感染モデル系および解析系の確立
組織図

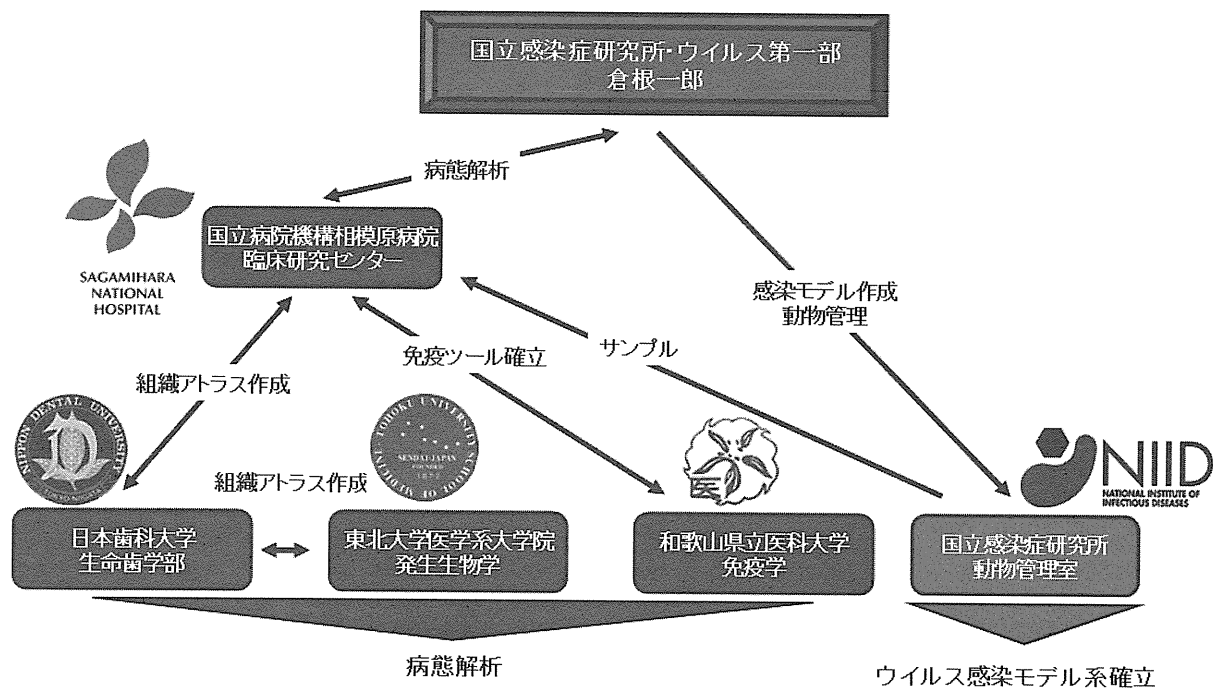


図-1. 本研究における組織図

Antigen recognition by TCR

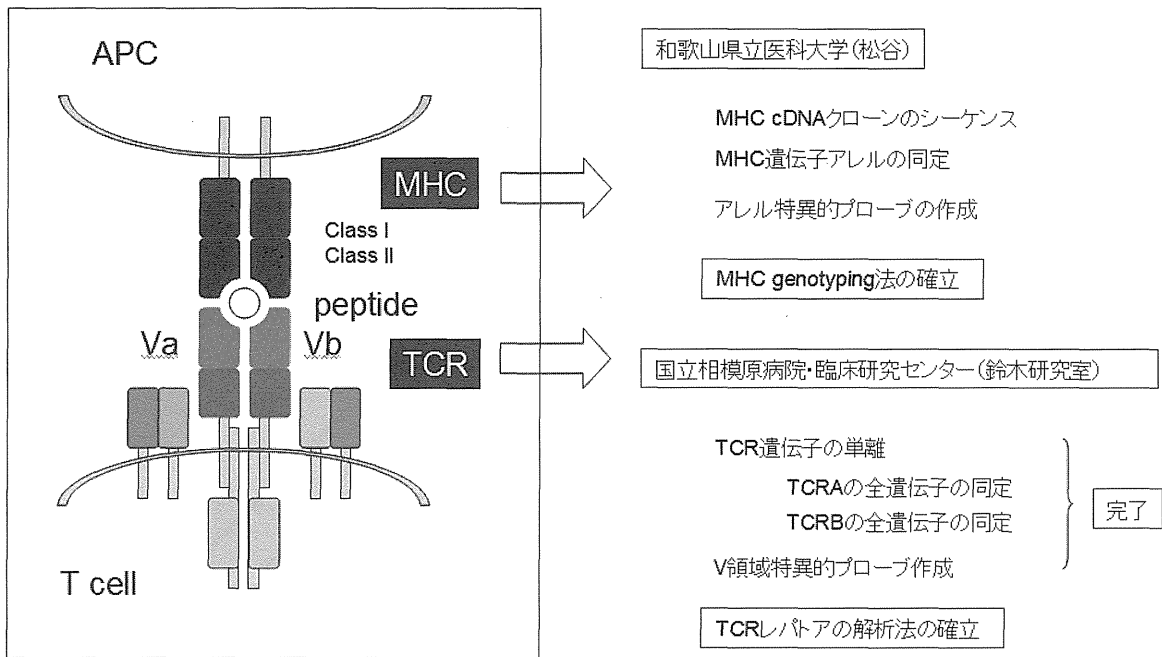


図-2. TCR における抗原認識機構及びマージンセットにおける TCR、MHC 解析手順

既にプライマーを設計し測定可能な遺伝子

Target	GenBank	備考	Target	GenBank	備考
GAPDH	DD279474		IL-1a	AB539803	新規登録
β -actin	DD279463		IL-1b	AB539804	新規登録
HPRT	DD289567		IL-2	DQ826674	
CD3e	DQ189218		IL-4	EF493341	
CD4	AF452616		IL-5	DQ658152	
CD8a	DQ189217		IL-6	DQ658153	
CD14	AB539802	新規登録	IL-10	DQ658154	
CD20	DQ189220		IL-12b	AB539805	新規登録
CD25	DQ520834		IL-17a	EF534212	
CD28	EF534209		IL-17f	EF613223	
CD34	AB097501		INF- γ	FJ598593	
CD80	EF534214		TNF- α	DQ520835	
CD86	EF534211				

* 新規登録:我々が塩基配列を特定してGenBankへ登録したもの

図-3. コモンマームセット免疫関連遺伝子における検出可能遺伝子の一覧

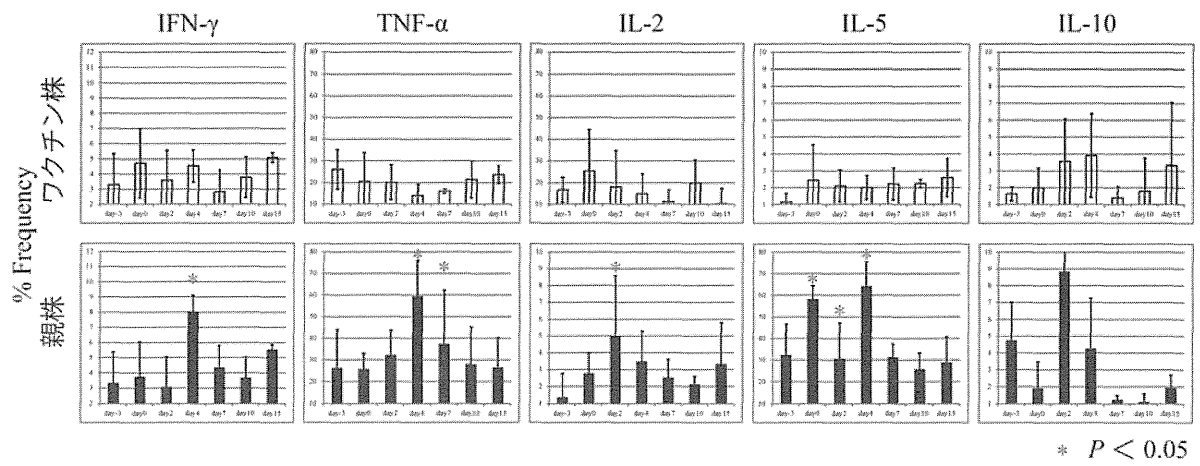


図-4. デングウイルス感染マーモセットの末梢血中サイトカインの変動