

運搬には制限があり、他国で分離されたウイルスを入手することは困難となってきた。一方で、多くの海外渡航者が現地で流行しているウイルスを輸入感染症として国内に持ち込む可能性も増大しているため、診断用抗原として海外のウイルスを用いる必要性も生じる。そこで、遺伝子情報取得のみで同一表面を持つウイルスを容易に作製できる系の確立は、大きな意義を持つ。

本研究班における2年目と3年目の研究において、JEVのレプリコンcDNAをCMVプロモーター下流に挿入する事により、*in vitro*でRNA合成をする事なく、プラスミドを直接細胞に導入してJEVゲノムを複製させる事が出来た。またこの時に構造領域発現プラスミドを同時にトランスフェクションすれば、1回感染性のウイルス粒子が得られる事が明らかとなった。従って、構造領域に変異を導入したウイルスの作製を迅速、簡便に行える事が期待される。

フラビウイルス粒子表面蛋白の合成に関わるprM/E遺伝子の発現により、ニュークレオカプシドが存在しない空の粒子が細胞から放出される。この粒子はELISA等の抗体結合試験の抗原として使用可能であることが、JEV等の比較的産生量の高いウイルスでは示されている。しかし、DENVでは抗原として使用できるほどの収量が通常は得られない。一方、prM/E遺伝子の導入と同時にレプリコンプラスミドを導入すると、RNAを含むニュークレオカプシドが存在するSRIPが放出される。感染性があるため、抗原としての感度が上がり、また中和試験や増強試験等の抗体機能試験に使用可能となる。本研究の評価により、D1-SRIPはデング抗体機能試験において、ウイルスの代替抗原として使用できることが示された。

2012年に報告された世界初のデングワクチン効力評価では、中和抗体が検出されているにもかかわらず低い効力がデング2型ウイルスで示され、従来の測定法で求められた中和抗体価では必ずしも防御の指標とはならず、中和試験を改良する必要性が示唆された。中和活性と増強活性のバランスを測定する方法は、その解決策の1つである。本研究のSRIP作製系により様々な血清型・遺伝子型のウイルス抗原の作製が可能となり、これらを用いて抗体の機能試験を行うことは、将来のワクチン開発や発症機序の解明、さらに国外流行株の国内侵入時の対策に貢献することが期待される。

E. 結論

CHIKVの3株を用いて試作したDNAワクチンは、いずれも細胞内にCHIKV抗原を発現することを確認した。また、プラスミドトランスフェクションによる1回感染性JEV粒子産生系を確立した。prM/Eの配列を変える事により他のフラビウイルスとのキメラ粒子も作製できた。キメラデング1型ウイルス様粒子は、本来のウイルスの代替抗原として、デング抗体機能試験に使用可能であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表に記載した。

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（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（H23-25年度）

「GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発、および健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果」

研究分担者 高橋 和郎（大阪府立公衆衛生研究所 副所長兼感染症部長）

研究協力者 青山 幾子、弓指 孝博、加瀬 哲男

（大阪府立公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課）

研究要旨：

1. GENECUBE®を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発

GENECUBE 法によりDV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられた。WNV に対しては低感度であり今後の検討課題である。

2. 健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果

成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が<10である群の陰転化率は37.5%と高値であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群（高齢者が多数を占める）では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。

健常人における日本脳炎ワクチン接種2年後の幾何平均中和抗体価はわずか9.4%まで減少し、陰転率も39%と高く1年後の陰転率の約2倍となった。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。

日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者におけるBeijing-1株、G1株、G5株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ502, 261, 56.6であり、交差反応性が認められた。Beijing-1株に対する中和抗体はすべてG1,G5株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者におけるBeijing-1株、G1株、G5株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ502, 261, 56.6であり、交差反応性が認められた。Beijing-1株に対する中和抗体はすべてG1,G5株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

A. 研究目的

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

現在、地方衛生研究所では、アルボウイルスの遺伝子診断について、患者検体および蚊やカラス検体を対象にPCR法と塩基配列の決定により確定診断を行っている。しかし、蚊の検体数は多く、検査には3-5日を要する。今般、遺伝子検査を2時間以内で判定可能な自動核酸検出装置を使用し、迅速で高感度な検出方法の開発を目的とした。この実験診断法が確立すると、地方衛生研究所では、より効率的で高性能な診断法が導入でき、より迅速な感染症対策に寄与できることが期待される。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

本邦で使用されている日本脳炎ワクチンは不活化ワクチンであるため、抗体価は接種後5~10年で低下するといわれている。厚生労働省感染症流行予測調査の結果では、40~50代の抗体保有率が低く、近年発生する日本脳炎患者の3~4割はこの年代である。また、2009年から新しい乾燥細胞培養日本脳炎ワクチンが定期接種に使用されているが、成人における使用例は少なく、その効果に関する情報は少ない。そこで、本研究では、成人における新規日本脳炎ワクチン接種による抗体応答とその持続効果について解明することを目的とした。

B. 研究方法

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. 対象ウイルスとPCR法の設計

対象ウイルスはデングウイルス(DV)1-4型、ウエストナイルウイルス(WNV)、日本脳炎ウイルス(JEV)である。DVのプライマーとプローブはウイルス遺伝子の3'端近傍に位置し、4種の型に共通する配列を選定した。WNVとJEVについては、プライマーはこれらに共通する配列を選定し、プ

ローブは1塩基異なる配列の部位を選定した。

2. PCR反応と検出感度の検討

既知の力価のウイルスからRNAを抽出し、逆転写酵素でcDNAを作製してKODポリメラーゼによりPCR反応を行い、プローブと反応することにより特異性が検証される。検出感度は抽出したRNAを、また上記PCR産物DNAを段階希釈することにより検討した。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1) 対象

本研究に同意を得た一般健常人272名 年齢:20~72歳(中央値43歳)に乾燥細胞培養日本脳炎ワクチン(阪大微研 ジェービック V®)を接種し、ワクチン接種前と、接種約1ヶ月後に採血を実施し、ワクチン接種により抗体が陽転した対象者のうち154名について接種1年後に再度採血を実施した。

2) 中和抗体価測定

日本脳炎ウイルス(JEV) Beijing-1 株に対する中和抗体価を50%フォーカス減少法(FRNT₅₀)を用いて測定した。このとき、血清希釈10倍以上で中和活性を示した血清を中和抗体陽性とした。幾何平均抗体価は、中和抗体価10倍未満を0.5として算出した。

なお、本研究は大阪府立公衆衛生研究所の倫理審査委員会で承認を受けており、検体提供者へはインフォームドコンセント及び検体の匿名化など倫理面への配慮がなされている。

C. 研究結果

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. ウイルス遺伝子の検出と検出感度の検討

DVは1-4型すべて検出可能であった。検出感度は4型が10コピー、3型が100コピーで、1,2型は今後精査し行う予定である。最少検出ウイルス力価は1型 2.3×10^{-2} PFU, 2型 6.0×10^{-4} PFU, 3型 3.2×10^{-3} FFU, 4型 2.3×10^{-2} FFU であった。

JEV Beijing-1 株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} FFU であった。

WNV NY株に対する検出限界は、NY株のPCR産物をテンプレートとした場合 10^4 コピーと非常に低感度であった。

[健全成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1. ワクチン接種前後の JEV に対する中和抗体価

日本脳炎ワクチン接種者 272 名のうち、104 名 (38%) はワクチン接種前より JEV に対する中和抗体を保有していた。1 回のワクチン接種により JEV 中和抗体価が 2 倍以上上昇したのは 239 名 (88%) で、JEV に対する幾何平均抗体価は接種前 2.7 倍、接種後 50.4 倍と約 19 倍の有意な上昇が認められた。ワクチン接種前より抗体を保有していた 104 名は、接種により全員 2 倍以上抗体価が上昇した。

2. ワクチンにより誘導された抗体価の持続性

ワクチン接種者 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上であり、2 年間継続調査ができた全 142 名の幾何平均抗体価の推移は、ワクチン接種 1 か月後 91.7 から 1 年後には 20.9 と約 1/4 に低下し、2 年後には 8.59 と約 1/10 に低下した (表 1)。1 年後に抗体価が <10 となった陰転率は 23% であったが、2 年後には 39% (56/142) が陰転した。接種後 160 倍以上の対象者では陰転化した例は認められなかった。

142 名の対象者のうち、ワクチン接種前中和抗体価が ≥ 10 (n=59) と <10 (n=83) の 2 群に分けると、ワクチン接種 1 か月後では幾何平均抗体価はそれぞれ 305, 39 であったが、2 年後にはそれぞれ 77, 1.8 と減少し、それぞれ 25%, 4.6% に減少した。2 群における抗体価の差は、接種 1 か月後は 7.8 倍であったが、2 年後には 43 倍と差がさらに拡大した。2 群での抗体価の差はいずれの時期も有意差が認められた。

上記 2 群におけるワクチン接種 1 および 2 年後の抗体陰転率を検討した。ワクチン接種前

の中和抗体価が ≥ 10 であった 59 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 1 例 (1/59, 1.7%) であった。この例はワクチン接種前抗体価 10 で、接種後 1 か月の抗体価が 20 と低抗体価の例であった。接種 2 年後に陰転した例は認められなかった。一方、接種前の中和抗体価が <10 である 83 名の群では、1 年後 <10 に陰転化した例は 32 例 (32/83, 38.5%) であり、1 年後に陰転化した 33 例の 97.0% を占めた。2 年後さらに陰転化した例は 23 例で、総計 55 例が陰転化し、陰転率は 66% (55/83%) であった。陰転化した総数 56 例の 98% を占めた。

3. 年齢群別の中和抗体価の持続状況について

接種 1 か月後、2 年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体の有無に分けた 2 群ともに、年齢が上昇するにつれて低下した (例外は 20 歳代で接種前抗体が陰性の群のみ)。年齢群別の抗体価減少率は接種前抗体陽性群は年齢と関係なく 70-80% であったが、接種前抗体陰性群では年齢と共に減少率は増加した。さらに、各年齢群別の抗体陰転率は年齢と正の相関を示し、20 歳代が 33% であったが、50-61 歳代では 78% と大きく増加した。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

ワクチン接種者 272 名のうち接種後抗体価が 10 以上の陽性者のうち 24 例について、日本脳炎ウイルス G1 および G5 遺伝子型に対する交差中和抗体価を測定した。その結果、Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、抗体価は G1 株に対して約 50%, G5 株に対しては約 11% と低下した。Beijing-1 株と G1 株に対する抗体価は正の相関が認められたが、G5 株に対しては相関が認められなかった。

D. 考察

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENECUBE法によるDVに対する検出感度は10-100コピー(DV3,4型)であり、ウイルス力価として1型 2.3×10^{-2} PFU, 2型 6.0×10^{-4} PFUであった。また、JEV Beijing-1株に対する検出限界は、 1.0×10^{-2} FFUであったことから、これらウイルスに対する検出限界はコピー数としては10-100コピー程度と推定されるので、遜色ない感度と考えられる。

2. WNVに対しては低感度であり、使用したWNV NY99株のプライマーとプローブの塩基配列に変異があることも推定されるので、今後の検討課題である。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

今回使用した細胞培養由来ワクチンは成人でも100%のブースター効果がみられ、有効性が確かめられた。また、陽転率は80.4%となり、成人に対する接種も有効であることが確認できた。陽転率は年齢とともに低下することから、年齢により免疫応答能が低下していることが示唆された。また60代以上では低年齢でのワクチン接種歴がない場合が多く、初期免疫がないために抗体価が上昇しにくい可能性が考えられた。本研究において、ワクチン1回および2回接種後の総陽転率は93.8%であり、初回2回接種後の小児の陽転率が99.2%(添付文書記載)であることと比較すると、成人での陽転率は十分高いと考えられる。ただし、一回の接種で抗体価が10倍以下で上昇しない場合が1割ほどあることが想定され、50代以上では2回接種が望ましいと考えられた。

本研究班の研究結果では、健常成人において、日本脳炎ワクチンの1回接種により接種1か月後に中和抗体陽性者(≥10)は88%となり、その中和抗体陽性者では1年後の抗体価は23%に減少し、陰転率は23%であった。2年後の抗体価はさらにわずか9.4%まで減少し、陰転率も39%と高く1年後の陰転率の約2倍となった。日本脳炎の発症を阻止する最少中和抗体価については結論が

得られていないが、中和抗体価10は十分な発症阻止抗体価であると考えられている。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。

ワクチン接種前の中和抗体の保有の有無の観点から2群における抗体価の減少を検討すると、接種前中和抗体陽性群では、陰性群と比較して2年後の幾何平均抗体価の減少率(25% vs 4.6%)、陰転率(1.7% vs 66%)ともに有意な差を認め、抗体価が維持されていた。この事実はワクチン接種後の抗体の持続能にワクチン接種前の免疫記憶能が大きく影響を与えていることを示唆している。本研究では被接種者におけるワクチン接種歴は明確に調査できなかったため不明である。接種前中和抗体陽性群は小児期での日本脳炎ワクチン歴が十分であり、陰性群はワクチン歴がないか不十分であるか、あるいは1次、2次ワクチン不全者と考えられる。

中和抗体価の経時的減少について年齢群別に検討すると、2年後の年齢群別幾何平均抗体価は、接種前抗体保有の有無に関わらず年齢と逆相関を示した。免疫応答能、免疫記憶能は年齢とともに低下することを反映している。

[日本脳炎ウイルス亜型に対する中和抗体の交差反応性]

本研究結果では、日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者におけるBeijing-1株、G1株、G5株に対する幾何平均抗体価は、それぞれ502, 261, 56.6であり、抗体価はG1株に対して約50%, G5株に対しては約11%と低下した。しかし、Beijing-1株に対する中和抗体はすべてG1, G5株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられる。

E. 結論

[GENECUBE を用いたアルボウイルスの迅速診断法の開発]

1. GENECUBE 法によりDV, JEV は比較的高感度で検出可能であり、臨床検査への応用が可能と考えられる。WNV に対しては低感度であり今後の検討課題である。

[健常成人における細胞培養日本脳炎ワクチンに対する抗体応答の持続効果]

1. 本研究結果から、成人において日本脳炎ワクチン接種により88%の成人は有意な抗体上昇を認めたが、1年後にはその21%が陰転化した。特に、ワクチン接種前の中和抗体価が<10である群の陰転化率は37.5%であった。さらに、ワクチン接種後10倍という低い中和抗体価しか獲得できなかった群(高齢者が多数を占める)では90%の人が陰性化した。以上より50歳代以上では2回接種を受けるほうが望ましいと考えられた。
2. 健常人における日本脳炎ワクチン接種2年後の幾何平均中和抗体価はわずか9.4%まで減少し、陰転率も39%と高く1年後の陰転率の約2倍となった。昨年の研究結果結論と同様、旅行者ワクチンとしての日本脳炎ワクチン接種は2回接種が勧められ、1回接種の場合は、旅行者ワクチンとして1年後も接種を受けることが勧められる。
1. 日本脳炎ウイルス中和抗体陽性者における Beijing-1 株、G1 株、G5 株に対する幾何平均

抗体価は、それぞれ 502, 261, 56.6 であり、交差反応性が認められた。Beijing-1 株に対する中和抗体はすべて G1, G5 株ともに中和活性を認めることが判明し、これらウイルス亜型の流行地域への旅行者に対する旅行者ワクチンとしては十分有効であると考えられた。

F. 健康危機情報

近年、40~50 代の日本脳炎患者報告も増加し、2011 年には日本脳炎の輸入症例が報告された。今後、抗体保有率の低い年代については、ワクチンの追加接種を考慮する必要があると考えられる。

G. 研究発表

研究成果の刊行に関する一覧表を参照

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（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（H23-25年度）

媒介蚊からの簡便な病原体ゲノム検出、流行地における媒介蚊のナトリウムチャンネル遺伝子調査、
および日本の新規媒介蚊の確定

研究分担者	江下優樹	大分大学医学部感染予防医学講座 准教授
研究協力者	福田昌子	大分大学医学部感染予防医学講座 助教
	Lucky R. Runtuwene	大分大学医学部感染予防医学講座 大学院博士課程3年
	小林隆志	大分大学医学部感染予防医学講座 教授
	Raweevan Srisawat	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 科学者
	Narumon Komalamisra	タイ国、マヒドン大学熱帯医学部医昆虫学講座 准教授
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス1部 室長
	倉根一郎	国立感染症研究所 副所長

研究要旨

感染蚊からウイルスゲノムを RT-LAMP 法で簡便化を計り、反応時間の短縮および長波長 UV ライトの使用により目視検査で陰・陽性の区別が明確となった。また、RNA の精製過程を省略しても陽性の結果が得られること、さらに携帯型長波長 UV ライトを使用することによって、設備の整っていない流行地においても迅速な RT-LAMP 法が実施可能となった。

デング熱流行地で採集したネッタイシマカ幼虫を羽化させた後、ペルメトリン耐性蚊に存在するナトリウムチャンネル遺伝子の IIS6 の部分断片を、RT-PCR 法で増幅させ、配列決定を行ったところ、4 つの塩基変異が検出された。これら 2 ヶ所の突然変異部位について詳細を解析した結果、ペルメトリン耐性ネッタイシマカの野外集団が既に生じていたことが明らかとなった。

レユニオン島由来のチクングニアウイルスによる日本国内輸入症例が報告されていることから、国内のヒトスジシマカおよびその近縁媒介蚊種、リバーズシマカとヤマダシマカの本ウイルス感受性を検討したところ、前述の 2 種に本ウイルス感受性があることが明らかとなった。わが国固有の蚊種であることから、本ウイルスが国内に侵入した際は、ヒトスジシマカのみならず、これら蚊種の対策も考慮する必要がある。

A. 研究目的

1. 流行地でウイルスに感染した蚊の動態を把握して早期に駆除することは、患者発生を未然に防ぐ方策にもつながる。このために、採集蚊からの病原体検出を迅速に行う必要がある。RT-LAMP

法の更なる簡便化計った。

2. ピレトロイド系薬剤は、ヒトや哺乳動物に対する毒性が低いことから広く使われている。タイでは、24 時間以内に患者宅の周囲地区にデルタメトリンあるいはペルメトリンを噴霧し、近傍

に生息する全ての蚊成虫を殺処分している。しかし、殺虫剤抵抗性の蚊に関する情報は少ない。薬剤耐性が蚊で生じる要因として、電位開口型ナトリウムチャンネル遺伝子の感受性の変化がある。この遺伝子の1塩基置換は、ピレトロイドに対する標的部位耐性を誘発する。本研究では、野外で採集したネッタイシマカにおけるペルメトリン耐性と関係のある *kdr* 遺伝子の IIS4-6 ドメインにおける突然変異の頻度を検討した。

3. レユニオン島由来のチクングニアウイルスは、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。本症の主媒介蚊はヒトスジシマカとされていることから、日本国内に生息するヒトスジシマカの近縁種を含む蚊2種の本ウイルス感受性を実験的に検討した。

B. 研究方法

B. 1. 調査方法

1. 供試蚊：日本国産ヒトスジシマカおよびタイ国産ネッタイシマカ雌成虫を使用した。

蚊乳剤の作製：2%MEMを用いて蚊乳剤を作製し、その遠心・上澄み液を原液として試験に用いた。

供試ウイルス：国立感染症研究所より分与されたチクングニアウイルス SL11131 を用いた。

試験方法：10倍希釈系列を準備して蚊乳剤とウイルスの混合液を準備した。

RT-LAMP法：栄研科学(株)のRNA増幅試薬キット(RT-LAMP)を用いた。

RT-PCR法：Invitrogen社のOne-step RT-PCR試薬を用いた。

2. ペルメトリン耐性ネッタイシマカが報告されている地区で採集した。羽化成虫に0.75%ペルメトリンを1時間暴露させて生存した成虫をペルメトリン耐性と判断した(WHO判断基準)

2. 1. 殺虫剤感受性試験

羽化後2-5日の未吸血雌蚊を使って、WHO標準手順に従って殺虫剤感受性試験を行った。なお対

照区の蚊の死亡率が20%を超えたら、実験を終了した。

2. 2. 薬剤耐性ネッタイシマカの *kdr* を調べるために、PCR生成物を精製し、Automated DNAシーケンサー(PE Applied Biosystems)を使い、Macrogen Inc., Koreaが配列決定した。

2. 3. ペルメトリン暴露時間に対する2つの突然変異の影響を調べた。

3. 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。

3. 2 供試蚊：継代飼育虫の奄美大島産のリバースシマカと長崎産ヤマダシマカを用いた。実験には、羽化7日経過後の雌成虫を使用した。

3. 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からストックウイウイルス液(ウイルス力価： 3×10^8 PFU/mL)を準備した。

3. 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。蚊の経口摂食によるウイルス感染：速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を等量加えて混合した。

3. 5. RT-PCR法によるチクングニアウイルスのゲノム検出には、TRIzol®試薬(Invitrogen, Carlsbad, USA)とRNaeasy mini kit(Qiagen)を組合せて、蚊個体から全RNAを抽出した。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1. 1. RT-LAMP法による蚊乳剤中のウイルスゲノム検出：反応液中に、ウイルス力価を含む蚊

乳剤のいずれにおいても、RT-LAMP 法の目視で蛍光を観察した。

1.2. RT-PCR 法による蚊乳剤中のウイルスゲノム検出： RNA 未精製の蚊乳剤の濃度が高い反応液では、PCR 産物の増幅は認められなかった。蚊乳剤の濃度が薄くなると、特異的な増幅が RT-PCR で認められた。

2.1. 採集したネッタシマカは高いペルメトリン耐性を示した。また、生存した耐性ネッタシマカ個体のナトリウムチャンネル遺伝子にヌクレオチド置換が検出された。

3.1. ウイルスを蚊の胸部に接種した際の蚊の感染結果では、リバーズシマカとヤマダシマカも本ウイルスに感受性をもつことが示唆された。

3.2. 蚊が経口的にウイルスを吸液した際の蚊の感染結果では、同様に2種蚊から、ウイルスゲノムが検出されたことから、本2蚊種のチクングニアウイルス感受性が明らかとなった。また、ヤマダシマカの脚から本ウイルスゲノムが検出されたことから、ウイルス媒介能を有することが示唆された。

D. 考察

1. RNA 未精製の蚊乳剤を使っても、RT-LAMP 法では、目的の増幅産物を得ることができた。これは *Bst* DNA Polymerase の特性に由来すると考えられた。また、RNA 未精製の蚊乳剤を用いても、目視検査を行うことが可能であった。

2.1. タイ国の野生ネッタシマカ集団で、高レベルのペルメトリン耐性が認められた。ペルメトリンと相乗剤を併用することが、もう一つ考えられる手段である。耐性集団での耐性アレルの出現頻度は、タイ国の蚊集団で *kdr* 耐性アレルの頻度が上昇していることを示す徴候がある。タイ国では、ピレトロイドの使用が続いていること、および、異なる殺虫剤クラス間の交差耐性が生じるのを避けることを考えれば、そのような情報は不可欠のものである。ある国が、媒介昆虫対策とし

てピレトロイドに頼るのであれば、ネッタシマカの耐性集団が生じることは、媒介昆虫対策プログラムにとって懸念されることとなる。

3.1. 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。

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。

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。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だろう。

E. 結論

1.1. 蚊乳剤から RNA を精製しなくても RT-LAMP 法で目的の増幅産物を得ることが出来た。

1.2. 蛍光・目視検出試薬を反応液に加えた際は、長波長のブラックライトが有効であったことから、携帯用の市販品を見つけることが出来たので、フィールド調査には有効であろう。

1.3. 感染症の流行地で RT-LAMP 法を行う場合は、反応試薬中に、蚊ホモジネート、蛍光・目視

検出試薬などを加えて、30～45 分後に携帯型の長波長ブラックライトを用いて陽性の有無を調べる事が可能となった。

2. 1. 野外で採集した幼虫を実験室に持ち帰り、羽化した成虫を用いて、薬剤試験を行ったところ、ペルメトリン耐性の点突然変異が 4 箇所で見つかった。

2. 2. これらのアミノ酸置換が、ペルメトリン耐性ネッタイシマカ. の野外採集集団に生じていたことが明らかになった。

3. 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。

3. 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) Yusuke Sayama, Yuki Eshita, Takuya Yamao, Miho Nishimura, Tomomitsu Satho, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Kouji Sakai, Shuetsu Fukushi, Masayuki Saijo, Hitoshi Oshitani, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa and Tetsuya Mizutani (2011): Prevalence of Phasi Charoen virus in female mosquitoes. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 3(1): 19-21.

(2) Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Theerawit Phanphoowong, Tomohiko Takasaki, Lucky Ronald Runtuwene, Ichiro Kurane, Hironari Narita, Yuki Eshita (2011): Present status of the insecticide susceptibility of *Aedes* mosquitoes in Thailand. *Journal of Japanese Red Cross Toyota College of Nursing*,

6(1): 31-37.

(3) Tomomitsu SATHO, Yuki NAGANO, Yuki ESHITA, Yujin HISATOMI, Akira SAKATA, Takeshi MIYATA, Nobuhiro KASHIGE, Fumio MIAKE, Lucky R RUNTUWENE, Shuetsu FUKUSHI, Masayuki SAIJYO, Ichiro KURANE, Shigeru MORIKAWA and Tetsuya MIZUTANI (2012): Inhibitory effects of JNK on *Aedes albopictus* early larval development. *Urban pest management*, 2(1): 7-13.

(4) Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Chamnarn Apiwathnasorn, Pungasem Paeporn, Sittiruk Roytrakul, Yupha Rongsriyam, Yuki Eshita (2012): Field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti* from central Thailand contain point mutations in the domain IIS6 of the sodium channel gene (KDR). *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 43(6): 1380-1386, 2012.

(5) 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) 鳥羽聡史、甲斐直子、阿南栄一朗、岡 宏亮、横山 敦、大谷哲史、石井 寛、岸 建志、白井 亮、時松一成、平松和史、山田健太郎、アハメド・カムルディン、江下優樹、西園 晃、門田淳一 (2011) : 当科で経験したデング熱の一症例。大分感染症研究会 第48回例会。2011年3月24日。大分東洋ホテル, 大分市。大分感染症研究会 第48回例会プログラム。

(2) Lucky R. Runtuwene, Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi, Yoshihiro Makino, Yutaka Suzuki,

Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011): Novel method using mice to infect *Aedes aegypti* with dengue virus type 2. 第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool., 62 (大会特集号):74, 2011.

(3) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, Boualy Kheokhamphanh, Bounpone Sidavong, Kham Thong, Silivanh Chanthavong, Khambang Silavong, Kalounna Keokenechanh, Hongkham Keomanila, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, Arthur E. Mongan, 前田龍一郎, 森田公一, 杉本千尋, 倉根一郎 (2011) : RT-LAMP 法を用いた蚊からのデングウイルスゲノムの迅速検出。第63回日本衛生動物学会大会、2011年4月14日(木)・16(土)、国立感染症研究所、一橋記念講堂 東京都。Med. Entomol. Zool., 62(大会特集号):75, 2011.

(4) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2011): Whole transcriptome analysis of *Aedes aegypti* 14 days post-dengue infection using RNA-seq. 第64回日本寄生虫学会南日本支部大会・第61回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2011年11月3日(土)・4(日)、宮崎県宮崎市 宮崎市民プラザ。第64回日本寄生虫学会・第61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:22, 2011. Med. Entomol. Zool., 63(2), 2012.

(6) 江下優樹, ルッキー R. ルントウエネ, 川島秀一, 鈴木 穰, 菅野純夫, 中井謙太, 前田龍一, 杉本千尋, 高崎智彦, 倉根一郎 (2011): デングウイルス感染蚊の網羅的トランスクリプ

トーム解析。第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京都新宿区、国立感染症研究所 共用第一会議室、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会・プログラムプログラム講演要旨:5, 2011.

(6) 江下優樹, ルッキー R. ルントウエネ, 川島秀一, 鈴木 穰, 菅野純夫, 中井謙太, 前田龍一, 杉本千尋, 高崎智彦, 倉根一郎 (2011): デングウイルス感染蚊の網羅的トランスクリプトーム解析。第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、東京都新宿区、国立感染症研究所 共用第一会議室、2011年11月11日、第18回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会・プログラムプログラム講演要旨:5, 2011.

(7) 江下優樹, Lucky R. Runtuwene, 高崎智彦, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Bouasy Hongvanthong, 牧野芳大, 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 (2012): RT-LAMP法を用いた蚊からのアルボウイルスゲノムの迅速検出。第64回日本衛生動物学会大会、2012年3月30日(金)・31(土)、信州大学、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号):64, 2012

(8) Lucky R. Runtuwene, Shuichi Kawashima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane and Yuki Eshita (2012): Whole transcriptome analysis comparison of *Aedes aegypti* 6- and 14-day post-dengue infection using RNA-seq. 第64回日本衛生動物学会大会、2012年3月30日・31、信州大学、長野県上田市。Med. Entomol. Zool., 63 (大会特集号):64, 2012.

(9) Lucky R. Runtuwene¹, Shuichi Kawashima², Yutaka Suzuki³, Sumio Sugano³, Kenta Nakai⁴, Ryuichiro Maeda⁵, Chihiro Sugimoto⁶, Tomohiko Takasaki⁷, Ichiro Kurane⁷ and Yuki Eshita¹ (20

12): Validation of 40S ribosomal protein 17S as internal control for qRT-PCR of dengue-infected *Aedes aegypti*. 第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2012年11月10日(土)・11(日)、長崎県長崎市、長崎大学医学部ポーンペ会館。第65回日本寄生虫学会・第62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:2012. Med. Entomol. Zool., 64(2), 2013.

(10) 江下優樹¹, Lucky R. Runtuwene¹, 大塚靖¹, 松原祥恵¹, 小林隆志¹, 川島 秀一², 服部正策³, 倉石 武³, 甲斐智恵子³, Raweevan Srisawat⁴, Narumon Komalamisra⁴, Yupha Rongsriyam⁴, Arthur E. Mongan⁵, 前田龍一郎⁶, 杉本千尋⁷, 牛島廣治⁸, 高崎智彦⁹, 倉根一郎⁹ (2012): リバーズシマカの系統確立および奄美大島・鹿児島県佐多岬でのその生息環境。 第65回日本寄生虫学会南日本支部大会・第62回日本衛生動物学会南日本支部大会 合同大会、2012年11月10日・11、長崎県長崎市、長崎大学医学部ポーンペ会館。第65回日本寄生虫学会・第62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:2012. Med. Entomol. Zool., 64(2):2013.

(11) Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Shuichi Kawashima, Junya Yamagishi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Kenta Nakai, Ryuichiro Maeda, Chihiro Sugimoto, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane (2012): New emerging technology for use in vector control. Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 (JITMM 2012) and The 7th Seminar on Food - and Water - Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ7). 12-14 December, 2012. Centara Grand & Bangkok Convention Centre At CentralWorld, Bangkok, Thailand. Symposium session on S34 Entomological approaches for the study of

arboviruses. Abstract of Joint International Tropical Medicine Meeting 2012 (JITMM 2012)

(12) 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

(13) 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.

(14) 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, Raweevan 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・23、日本大学生物資源科学部、神奈川県藤沢市。

(15) Yuki Eshita, Lucky R. Runtuwene, Sachie Matsubara, Kaori Noguchi, Eri Kawakami, Masako Fukuda, Yasushi Otsuka, Akinori Tokunaga, Takashi Kobayashi, Raweevan 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・26、東京大学医学部3号館N101室、東京都文京区。

(16) 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・25・26、東京大学医学部3号館N101室、東京都文京区。

(17) 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-14日、インドネシア国マナド市サムラトランギ大学。

(18) 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。

(19) 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.

(20) 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・3、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

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（H23-25 年度）

ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の評価およびジェノタイピング法による媒介蚊の殺虫剤感受性評価に関する研究

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，葛西真治，斎藤一三，伊澤晴彦，鎌田龍星
（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防除法の確立を目指し、デングウイルスの国内産ヒトスジシマカにおける感受性を評価した。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たヒトスジシマカから TaqMan プローブ法により、4 型（DENV4）以外のウイルス型のウイルスゲノム RNA が検出された。次いで、免疫蛍光抗体法をによりウイルス粒子を検出した結果、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸で確認されたが、DENV1 は観察されなかった。SYBR Green 法により国内外のヒトスジシマカのウイルス感受性を評価した結果、ヒトスジシマカのすべての系統で DENV1 は非常によく増殖したが、DENV2 の増殖率は低く、特にネッタイシマカでの増殖はほとんど確認できないほどであった。蚊種および系統によって DENV 感受性に差異はあると思われるが、少なくとも本研究で用いた国内産ヒトスジシマカにおいて、デング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、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ろう。また、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。

そこで、殺虫剤抵抗性遺伝子の変異領域をターゲットにしたジェノタイピング法により、媒介蚊の殺虫剤抵抗性を評価した。フィリピン国内で採集したネッタイシマカにおいて、薬剤感受性レベルを裏付けるように作用点ナトリウムチャンネルが変異した個体（V1016G および F1534C）が高頻度で見つかった。その一方で、抵抗性レベルが高いにもかかわらず *kdr* 遺伝子頻度が低い集団も確認された。作用点変異を指標にしたジェノタイピング法がある程度薬剤感受性の状況を反映していることが明らかになったが、*kdr* 因子以外の抵抗性要因がネッタイシマカのピレスロイド系殺虫剤抵抗性に関与していることも示唆された。今後は、ヒトスジシマカにおける作用点と解毒酵素の双方の突然変異をターゲットとしたジェノタイピング法を検討していく必要がある。

A. 研究目的

デング熱は地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり、流行地拡大が最も危惧される感染症である。我が国の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例を記録した。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。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。ヒトスジシマカは日本国内に普遍的に分布するのみならず、その分布域を北に拡大させており、国内のヒトスジシマカのデングウイルス媒介能を正確に把握することが急がれる。

一方、デング熱の流行地においてはネッタイシマカは主要な媒介蚊であり、世界中の熱帯・亜熱帯地域に広く分布している。近年、成虫防除に用いられるピレスロイド殺虫剤に抵抗性を発達させた個体群が世界各地で確認されて問題となっている。媒介蚊対策が殺虫剤による防除に頼らざるを得ない現状から鑑みると、抵抗性の発達はそのまゝ感染症に対するリスクを高めることに繋がる。野外における媒介蚊の殺虫剤感受性を把握することは、殺虫剤の防除効果を高める上で重要である。そこで、薬剤抵抗性遺伝子変異を指標としたジェノタイプング法を確立し、野外集団の薬剤感受性の状況を迅速かつ簡便に把握することを目標とした。

B. 研究方法

1. 媒介蚊のデングウイルス感受性評価

ヒトスジシマカは、2010年川崎市生田(IKT系統)、2011年神奈川県海老名市(EBN系統)、2012年ベトナム・ホーチ

ミン市(HCM系統)でそれぞれ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を用いた。ネッタイシマカLBN系統は、2010年フィリピン・ロスバニョス市捕集の室内維持系統である。

デングウイルス1型(DENV1)は、タイ・バンコク市(D1 11-120株)、デングウイルス2型(DENV2)は、インドネシア・バリ島から帰国した患者血清よりそれぞれ分離された(D2 11-122/1株)。加えて3型(DENV3)および4型(DENV4)も使用した(ウイルス1部から分与)。

脱繊維血と混合した $10^5 \sim 10^6$ 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、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。ウイルスRNAは、TaqManプローブ法(Callahan *et al.*, 2001)、あるいはSYBR Green法(Callahan JD *et al.*変法)により検出した。次いで、免疫蛍光抗体法により、蚊の各器官におけるウイルスの存在を顕微鏡下で観察した。

2. ジェノタイプング法による媒介蚊の殺虫剤感受性の評価

2009年~2010年にフィリピン国内の古タイヤより採集したネッタイシマカ幼虫から個別にDNAを抽出し(REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich)、4カ所のアミノ産置換をターゲットとして2組のPCR(I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534C)を行った。I1011MorV, L1014F, V1016Gを検出するために aegSCF20/aegSCR21 プライマーセット、F1534Cを検出するために aegSCF7/aeg SCR7 のプライマーセットを用いて各遺伝子断片を増幅した。シーケンス解析には、I1011MorV およびL1014F検出用として aegSCF3 プライマー、V1016G用に aegSCR22 プライマー、F1534C検出用に aegSCR8 プライマーを

それぞれ使用した。

C. 研究結果

1. 媒介蚊のデングウイルス感受性評価

TaqMan プローブ法により、ヒトスジシマカに経口的に感染させた DENV1 および DENV3 は、いずれも 1 コピーまで検出可能であり、DENV2 も検出されたが、DENV4 は検出できなかつた。DENV2 特異的抗体を反応させた免疫蛍光抗体法により、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸においてウイルス粒子の存在が確認されたが、DENV1 は確認できなかつた。

次に、SYBR Green 法により、蚊のウイルス感受性を評価した。唾液腺におけるウイルスの増殖性において、本研究に用いた国内および外国産ヒトスジシマカで DENV1 の高い増殖性は認められたが、DENV2 の増殖性は低く、特に LBN 系統ネッタシマカではほとんど確認できなかつた。ウイルスの感受性は、蚊種および系統によって差異はあるものの、本研究で用いた国内産ヒトスジシマカにウイルス感受性が示唆されたことから、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十分にあると考えるべきである。

2. ジェノタイプング法による媒介蚊の殺虫剤感受性の評価

2009 年にフィリピン国内 30 カ所で採集された 688 頭のネッタシマカ幼虫の *kdr* 遺伝子頻度を比較した結果、これまで中南米地域で確認されている I1011 の変異はどの個体からも検出されなかつたが、V1016G の変異は 0～61% の頻度で、F1534C は 0～76.3% の頻度で確認された。G1016, C1534 とともにフィリピン全土から採集されたネッタシマカから広範囲に確認され、特に地理的な偏りは見いだせ

なかつた。全土的にピレスロイド系殺虫剤による淘汰が進んだため、抵抗性個体が全国的に広がったと推察された。本結果は、先行試験で、K index (薬剤感受性レベルを 1～36 でランク分け、数字が大きいほど抵抗性レベルが高いことを示すインデックス) が多くの地域で最大の 36 を示した結果を裏付けるものとなつた。

D. 考察

TaqMan プローブ法によるウイルス RNA の検出において、DENV1, DENV2, DENV3 のゲノム RNA は 0.1 コピーまで検出可能であつたが、DENV4 は検出できなかつた。DENV4 のスタンダード RNA に問題があつた可能性が考えられた。また、免疫蛍光抗体法において、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸のいずれにもウイルス粒子は観察されたが、DENV1 は検出できなかつたことから、蚊のウイルス感受性の評価系として免疫蛍光抗体法も有効ではあるが、DENV1 以外の検出も検討すべきと考える。また、今回使用したウイルス株は海外で流行している株であることから、蚊とウイルス株の様々な組み合わせを検討する必要があると考える。

ネッタシマカ LBN 系統において、DENV2 がほとんど検出されず、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つた。この結果は、DENV2 に低感受性の蚊種ならびに系統が存在する可能性を否定できないものの、さらに多くの系統を評価することで結論したい。また、DENV3 および DENV4 に対する蚊のウイルス感受性の評価も必要であり、デングウイルス感染蚊が、次の世代へ持ち越せるかの評価も望まれている。しかし、少なくとも DENV1 に対しては、国内の多くのヒトス

ジシマカ集団がデングウイルス感受性である可能性は高い。従って、国内にデング熱が侵入した場合には、国内に普遍的に生息するヒトスジシマカが関与する小規模なアウトブレイクが起こる可能性は十分にあると考えるべきである。

野外における媒介蚊の殺虫剤感受性を把握することは、殺虫剤の防除効果を高める上で重要である。まずフィリピン産ネッタイシマカを用いて薬剤抵抗性遺伝子変異を指標としたジェノタイピング法を確立し、その手法を国内産ヒトスジシマカに応用することを目指した。これまでにベトナムのネッタイシマカ 70 地域由来の 756 頭を調べた結果、G1016 の置換はわずか 1 地域から 20% の頻度として検出されていた (Kawada et al., 2009)。今回のフィリピンの結果では、調査した 30 地域中 29 カ所から G1016 の変異が検出され、その頻度も比較的高く、事態はより深刻であることが分かった。また、V1016G のみならず F1534C を有する個体の頻度も高く、近い将来フィリピン全土において両タイプの *kdr* 遺伝子頻度が 100% に限りなく近くなる可能性も否定できない。

今回得られたデータから、G1016 の頻度と C1534 の頻度の和と、抵抗性レベルを示す K index との関係調べたところ、薬剤感受性が低いほど *kdr* 頻度も低いことが示され、*kdr* 遺伝子頻度の調査が、ピレスロイド剤感受性調査の結果をある程度反映するものであると推察された。その一方で、K index が 36 を示す個体群の *kdr* 遺伝子頻度は 5.3%~116.3% と大きな開きが認められ、*kdr* 因子以外にも解毒酵素や皮膚透過性の低下などの要因が抵抗性機構として関与している可能性が示唆された。

E. 結論

- 1) TaqMan プローブ法および SYBR Green 法により、DENV1, DENV2, DENV3 のウイルス RNA の定量・評価系を確立した。
- 2) 免疫蛍光抗体法により DENV2 感染蚊の唾液腺および中腸でのウイルスの存在を確認したが、DENV1 は確認できなかった。異なる系統とウイルス株を用いて再検討する。
- 3) 供試した国内外のヒトスジシマカにおいて DENV1 の高い増殖性が認められたが、DENV2 は増殖性が低く、ネッタイシマカでは増殖はほとんど確認できなかった。
- 4) 作用点ナトリウムチャネルの変異を指標としたジェノタイピング法は、野外蚊のピレスロイド剤感受性レベルをある程度反映していることが明らかになったが、*kdr* 因子以外の抵抗性機構も関与していることも示唆された。
- 5) 今後は、作用点変異のみならず、解毒酵素等その他の抵抗性機構を加味した簡便で迅速な薬剤感受性試験法 (ジェノタイピング法) を検討していく必要がある。

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

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

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（H23-25 年度）

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

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	伊藤 恒敏	東北大学医学系大学院発生生物学
	松谷 隆治	和歌山県立医科大学免疫学
	鈴木 さつき	日本歯科大学生命歯学部
	藤井 克樹	国立感染症研究所ウイルス第一部
	北浦 一孝	国立感染症研究所ウイルス第一部
	白井 顕治	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、チクングニアウイルスがヒトに感染すると、急性熱性疾患、出血熱、関節炎などの疾病を伴い、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、チクングニアウイルスの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における基盤整備を目的とした。

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。またチクングニアウイルス（CHIKV）は、発熱、筋肉痛、関節痛を主症状とする急性の発疹性熱性疾患である。DEV と同様にヤブカ属の媒介によりヒトへの感染が成立し、アフリカと東南アジアで流行しており、地球温暖化に伴って感染症媒介昆虫の生息域が拡大することで、本邦侵入に伴う感染症の流行が懸念される。しかしながら、DEV、CHIKV 共に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モセットより組織を採取し、組織標本を作製する。

(3) DEV、CHIKV 感染モデル系の確立 (国立感染症研究所): コモンマーモセットにおける DEV および CHIKV の感染実験を実施し、感染モデル系として最適な条件等を確立する。感染成立の有無については、抗体産生、体温、血液生化学的評価、炎症性サイトカインの評価等を上述した解析系を交えながら総合的に判断する。

(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キング遺伝子に対する特異的プライマーを設計した (図 3)。うち 4 つの遺伝子 (CD14、IL-1a、IL-1b、IL-12b) は本実験によって同定したものである。

(2) MHC 解析系の確立: 現在 MHC にお

ける解析は、図 4 に示すように、30 頭のコモン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クエンスおよび解析が必要になるため、次世代シークエンス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、まずコモンマーモセットにおける 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クエ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 (図 5)。現在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、コモンマーモセット TCRV 遺伝子配列に検出用 DNA プロブの選定し、microplate hybridization 法による定量的・網羅的検出系を確立した。

(3) コモン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。

(4) DEV、CHIKV 感染モデル系の確立: DEV および CHIKV をコモンマーモセットに感染させるため、最適なウイルス量や投与経路についての検討を実施している。予備実験の段階で、両ウイルス共に皮下接種において、ウイルス投与コモンマーモセットから抗体が検出されたことと合わせて、CHIKV では Real-time PCR において CD3、CD8、TNF α の経時的な変化が脾臓において観察された (図 6)。

D. 考察

本研究では、コモン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。CHIKV 感染コモンマーモセットにおける CD3、CD8、TNF α 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、コモンマーモセットにおいて成立したことを示唆するものである。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モ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た。今後コモンマーモ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

Fuji Y, Kitaura K, Matsutani T, Shirai K, Suzuki RS, 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 Oct 3;8(10):e76385.

Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K,

Suzuki S, Takasaki T, Shimada S, Kametani Y, Shiina T, Takabayashi S, Katoh H, 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;352(29):287-300.

Kurane I, Matsutani T, Suzuki R, Takasaki T, Kalayanarooj S, Green S, Rothman AL, Ennis FA.: T-cell responses to dengue virus in humans.

Trop Med Health. 2012 Oct 31;384(1-2):81-91.

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.

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

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。