

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（ウイルス第一部・室長）

協力研究者 田島 茂（ウイルス第一部・主任研究官）

**研究要旨**

昨年度我々は、日本国内で分離された日本脳炎ウイルス（JEV）遺伝子型 I 型株の現行ワクチンに対する感受性を保持しているかについて調べ、これらの分離株に対し現行ワクチンは中和活性を保持していることを示した。本年度は近年中国および韓国で相次いで分離された遺伝子型 V 型の JEV に着目し、我々が保有する V 型株（Muar 株）に対する日本脳炎ワクチンの中和効果をワクチン接種マウス血清を用いて調べた。I 型の場合とは異なり Muar 株に対しては現行ワクチンの効果が低いことが明らかとなった。次に我々は、遺伝子型 I 型 JEV をベースとしたリバーシジェネティクス法によりエンベロップ（E）蛋白質のみを Muar 株および中国で分離された V 型株 XZ0934 株のものに置換した組換え JEV を作製し、これらに対するワクチンの中和効果を調べた。その結果 Muar 株と同様、両組換えウイルスに対する中和効果は低いことが明らかとなった。V 型株はこれまでに世界中で 3 株しか分離されておらず、その性状解析は全く進んでいない。そこで Muar 株のマウスに対する病原性を調べた。Muar 株は強毒株の北京株と同等の病原性を有することが明らかとなった。以上より、V 型は病原性が高く、かつ現行ワクチンが効きにくい可能性が示唆された。今後 V 型株の国内への侵入を注意深く監視していくとともに、蚊での媒介能力など詳細な性状解析が必要である。

**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。現在流通している日本脳炎ワクチンは開発された 50 年以上前より III 型の JEV より製造されて今日に至っている。ワクチン製造株と流行株との間の遺伝

子型の齟齬については国外でも心配されており、すでにこの件について検証した結果が数件報告されている。昨年度我々は、国内で分離された遺伝子型 I 型株が現行のワクチンに対して感受性を保持しているかについて調べた。その結果、現行の国内ワクチンは I 型株に対し中和活性を維持していることを明らかにした。

一方近年、中国と韓国で相次いで遺伝子型 V 型の日本脳炎ウイルスが蚊から約 60 年ぶりに分離同定された。V 型ウイルスは今回の中国、韓国のもを含め 3 株しか分離されていない。系統樹解析からは、現在の主流である I 型、III 型からは遺伝学的に少し離れていることがわかっているが、その他ウイルス性状等についてはほとんど解析されていない。そこで本年度我々はこの V 型 JEV に焦点をあて、我々が唯一所有する V 型株である Muar 株を使用し、現行ワクチンの V 型株に対する有効性や V 型株の病原性解析を進めた。

## B. 研究方法

ワクチン接種用のマウスは、通常日本脳炎ワクチンの国家検定にも使用されている ddY 系統 (4 週齢, メス, SPF) を使用した。接種ワクチンは中山株および北京株より製造された日本脳炎ワクチン参照品 2 種類をしようした。これらのワクチンを規定量の滅菌蒸留水にて溶解し、それを 2 倍および 8 倍に希釈して、1 匹あたり 500 マイクロリットルずつ 10 匹に接種した。1 週間後に同量を追加接種し、その 1 週間後、初回免疫から 2 ヶ月後および 4 ヶ月後に全採血し、中和反応に使用するプール血清を得た。

中和反応の攻撃用ウイルスとして、昨年度使用した株 (ワクチン株である中山株と北京株、遺伝子型 III 型野外株として、JaTAn1/75, JaTAn1/90, JaTH160 の 3 株、遺伝子型 I 型野外株として Hiroshima/46/98, Mie/41/02, Tokyo602/05, Mie/51/06, Kochi/25/05, Kumamoto/65/05, Kumamoto/81/06,

Kumamoto/104/06, Chiba/103/08, Chiba/150/07, JaNBo37 の 11 株) に加え V 型の Muar 株 (1952 年にマレーシアで分離された) を使用した。中和解析は Vero 細胞を用いてプラーク減少法で行った。血清を 10 倍から 640 倍まで 2 倍階段希釈し、適当に希釈したウイルス液と混合後 35°C で 90 分間中和反応した。反応後細胞に接種し、メチルセルロース重層培地の下 4~6 日間 35°C にて培養した。ホルマリンで固定後、メチレンブルー液で染色し、プラーク数をカウントした。各条件における減少率 (50%, 70% および 90% 減少率) を算出しウイルス間で比較した。

すでに作製済みの遺伝子型 I 型ベースの組換え JEV キメラクロン (rJEV-E<sup>Beijing-1</sup>-M41/pMW119 および rJEV-E<sup>Nakayama</sup>-M41/pMW119) に加え、今回新たに 2 種類の組換えキメラクロン (rJEV-E<sup>Muar</sup>-M41/pMW119 および rJEV-E<sup>XZ0934</sup>-M41/pMW119) を作製した。Muar 株由来配列は Muar 株ゲノム RNA から作製し、XZ0934 株由来配列は登録されている塩基配列情報から合成 DNA を作製して使用した。各クロンから全長の組換えウイルス RNA を *in vitro* で合成し、それを Vero 細胞にトランスフェクトした。培養上清中に分泌されるウイルス液を回収し、感染力価を測定後解析に用いた。

マウスに対する病原性を調べるため、3 週齢の ddY 系統マウスに 3 種類のウイルス (Beijing-1 株, Mie/41/2002 株および Muar 株) をそれぞれ  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  pfu ずつ (各群 10 匹) を腹腔より接種し、3 週間経過観察した。

## C. 研究結果

昨年度使用したウイルス株に Muar 株を加えて中和解析を行った (表 1~3)。昨年度も使用した株の中ではワクチン株を除いていずれの条件においても株間で顕著な差異は認められなかった。一方、Muar 株につ

いては、いずれの条件においても常に中和力価が低く、他に比べて4倍程度低い場合が半数程度の条件で観察された。このことから、現行のワクチンは他の株に比べ Muar 株を中和しにくいことが明らかとなった。

中和反応においてもっとも重要な役割を果たす E 蛋白質のアミノ酸配列を今回使用したウイルス間で比較した(表4)。すると、Muar 株以外はワクチン株との差異が2.4%以下であるのに対し Muar 株は8.2% (北京株) および8.8% (中山株) であった。また他の V 型株についても Muar 株と同等あるいはそれ以上であった(8.2~9.2%)。

次に4種類の組換え E 領域キメラウイルスを使用して上記で使用したワクチン接種血清を用いて中和反応を行った(表5)。中山株、北京株、Muar 株由来 E 蛋白に置換したキメラウイルスはいずれもそれらの由来ウイルスと同様の中和力価を示した。このことから E 蛋白置換キメラウイルスでその由来ウイルスのワクチン感受性を判定可能であることが確認された。XZ0934 株の E 蛋白を持つキメラウイルスを用いた場合、Muar キメラウイルスと同等あるいはそれよりも中和力価が低かった。よって V 型ウイルスは I 型、III 型ウイルスに比べ現行のワクチンに中和されにくいことが考えられた。V 型 JEV のマウスに対する病原性を明らかにするため、Muar 株、および強毒株である北京株 (III 型)、比較的病原性が低くまた今回用いた組換えウイルスクローン株でもある Mie/41/2002 株 (I 型) の3種類の JEV 株を5段階の濃度に希釈後マウスに接種し経過観察した(図1)。 $10^1$  pfu 接種ではいずれのウイルスでも死亡は確認されなかった。生存曲線から Muar 株は北京株と類似した比較的強い病原性を示すことが明らかとなった。

#### D. 考察

日本国内に蔓延している JEV の主要型は現在 I 型と考えられる。しかし一方で使用

されている日本脳炎ワクチンは III 型から製造されたものである。昨年度はこの III 型由来のワクチンが国内で分離された複数の I 型株に対し中和能を保持しているかを調べ、現行のワクチンは I 型にも III 型と同等の効果があることを示した。しかし近年、中国および韓国で立て続けに新たな遺伝子型 V 型のウイルスが分離同定された。V 型株は1952年に初めて分離されたのだが、この一度きりでその後約60年間報告がなかった。そのため V 型株に関する知見は遺伝子配列情報以外皆無であった。そこで本研究では V 型株に対する現行ワクチンの中和能およびウイルスの病原性を調べた。するとワクチンは効きにくい傾向がみられ、病原性も高い可能性が示唆された。ワクチン効果については、やはり E 蛋白の相同性が低いことが影響していると考えられる。遺伝子型は違っても I 型と III 型では3%も違わない。それに対し V 型はこれらと8%以上異なる。実際に今回我々は、E 蛋白を I 型から V 型に置換することで、中和力価が8倍もしくはそれ以上低下することを示した。今回用いたのは現行ワクチンを接種したマウス血清であることから、必ずしもヒトで同様の結果になるかは限らない。今後は実際にワクチン接種前後のヒト血清を用いた研究が必要であろう。しかし今回の我々のデータは現行ワクチンの汎用性に対し問題提起できたということで価値があると考えている。

またもう一つの成果として、Muar 株が比較的(我々が調べた多くの I 型分離株と比べて)強いマウス病原性を有していることが明らかとなったことである。ただし、V 型が全般的に強毒であると結論づけるのは早計である。Muar 株のような何十年も前に分離されたウイルスはマウス脳への接種により分離・増殖・継代させてきたものが多い。するとマウスに順化している可能性も高く本来の性状を維持・反映しているかは不明である。一方、最近分離同定された株はそ

のような影響は少ない。今回我々は、E 蛋白のみ XZ0934 株のものに置換したキメラウイルスを作製した。さらに我々のグループを含め多くの研究室で E 蛋白が病原性を規定しているとの発表がなされている。今後このキメラウイルスの病原性を解析することにより、V 型本来の性状を解明していきたいと考えている。

#### E. 結論

近年中国と韓国で相次いで分離同定された遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルスに対する現行の日本脳炎ワクチンの中和効果は、遺伝子型 I 型や III 型株に比べて弱い可能性が示唆された。また V 型ウイルスは強い病原性を維持している可能性も示唆された。国内で V 型株が確認されたとの報告はないが、今後も注意深く監視を続けることが重要である。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，モイメンリン，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦．日本脳炎ウイルス遺伝子型 I 型，III 型および V 型株に対する不活化日本脳炎ワクチンの効果．第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014 年 5 月，山口市

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，Moi Meng Ling，林昌宏，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦．遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルス株に対する日本脳炎ワクチンの中和効果．第 62 回日本ウイルス学会学術集会，2014 年 11 月，横浜市

#### 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

表 1 初回免疫から 2 週間経過したマウスの血清を用いた中和試験 (PRNT50)

Genotype	Strain	Nakayama vaccine		Beijing-1vaccine	
		x2 dilution	x8 dilution	x2 dilution	x8 dilution
Vaccine strain	Nakayama(NIID)	>640	320	320	160
	Beijing-1(NIID)	80	40	320	160
GI	Hiroshima/46/1998	80	40	160	80
	Mie/41/2002	320	80	160	80
	Tokyo602/2005	160	40	80	80
	Kochi/25/2005	160	40	160	40
	Kumamoto/65/2005	80	40	160	40
	Mie/51/2006	160	80	80	80
	Kumamoto/81/2006	80	40	80	40
	Kumamoto/104/2006	80	40	80	40
	Chiba/150/2007	160	40	160	40
	Chiba/103/2008	80	40	80	40
	JaNBo37/2008	160	80	160	80
GMT of GI viruses		124.4	48.3	116.8	54.8
GIII	JaTH160/1960	80	40	160	80
	JaTAn1/75/1975	160	40	80	80
	JaTAn1/90/1990	160	80	160	160
	GMT of GIII viruses		127.0	50.4	127.0
GV	Muar/1952	20	<10	20	10

表 2 初回免疫から 2 ヶ月経過したマウスの血清を用いた中和試験

Genotype	Strain	Nakayama vaccine x2 dilution			Nakayama vaccine x8 dilution			Beijing-1vaccine x2 dilution			Beijing-1vaccine x8 dilution		
		PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT	PRNT
		50	70	90	50	70	90	50	70	90	50	70	90
Vaccine strain	Nakayama(NIID)	>640	>640	320	320	160	80	320	160	40	320	160	40
	Beijing-1(NIID)	80	40	20	10	10	<10	>640	320	160	320	160	40
GI	Hiroshima/46/1998	160	80	80	20	10	10	160	160	80	160	80	40
	Mie/41/2002	320	160	80	20	20	10	320	160	40	320	80	40
GIII	JaTH160/1960	160	160	80	20	10	<10	320	160	40	80	80	40
	JaTAn1/75/1975	160	80	40	20	10	<10	80	40	20	80	80	20
	JaTAn1/90/1990	320	160	80	20	10	<10	160	40	40	160	40	40
GV	Muar/1952	20	20	<10	<10	<10	<10	20	20	10	20	10	<10

表3 初回免疫から4ヶ月経過したマウスの血清を用いた中和試験

Genotype	Strain	Nakayama vaccine x2 dilution			Nakayama vaccine x8 dilution			Beijing-1vaccine x2 dilution			Beijing-1vaccine x8 dilution		
		PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90	PRNT 50	PRNT 70	PRNT 90
Vaccine strain	Nakayama(NIID)	>640	>640	>640	160	160	80	320	160	80	80	40	20
	Beijing-1(NIID)	80	80	40	40	40	20	320	160	80	320	160	40
GI	Hiroshima/46/1998	320	160	80	40	40	20	160	80	80	80	80	40
	Mie/41/2002	320	320	160	80	40	40	160	160	40	80	80	40
GIII	JaTH160/1960	160	160	160	80	40	40	160	80	80	80	80	40
	JaTAn1/75/1975	160	160	80	40	40	20	80	80	20	40	40	20
	JaTAn1/90/1990	160	160	80	80	40	20	160	80	40	80	40	20
GV	Muar/1952	80	20	10	10	<10	<10	80	40	20	40	10	<10

表4 E蛋白におけるワクチン株とのアミノ酸の差異 (%)

Genotype	Strain	VS. Nakayama(NIID)	VS. Beijing-1(NIID)
GI	Hiroshima/46/1998	2.2	1.8
	Mie/41/2002	2.0	1.6
	Tokyo/602/2005	2.2	1.8
	Kochi/25/2005	2.2	1.8
	Kumamoto/65/2005	2.2	1.8
	Mie/51/2006	2.2	1.8
	Kumamoto/81/2006	2.2	2.0
	Kumamoto/104/2006	2.2	1.8
	Chiba/150/2007	2.2	1.8
	Chiba/103/2008	2.4	2.0
JaNBo37/2008	2.2	1.8	
GIII	JaTH160/1960	1.6	1.2
	JaTAn1/75/1975	1.6	1.2
	JaTAn1/90/1990	1.2	0.8
GV	Muar/1952	8.8	8.2
	XZ0934/China/2009	9.2	8.6
	10-1827/South Korea/2010	8.8	8.2

表5 キメラウイルスを用いた中和試験 (PRNT50)

Recombinant virus	Nakayama vaccine		Beijing-1 vaccine	
	X2 dilution	X8 dilution	X2 dilution	X8 dilution
Mie/41/2002 (parent virus)	160	80	160	80
rJEV-E <sup>Nakayama</sup>	>1280	640	640	160
rJEV-E <sup>Beijing-1</sup>	40	10	160	40
rJEV-E <sup>Muar</sup>	10	<10	20	<10
<b>rJEV-E<sup>XZ0934</sup></b>	<b>&lt;10</b>	<b>&lt;10</b>	<b>10</b>	<b>&lt;10</b>

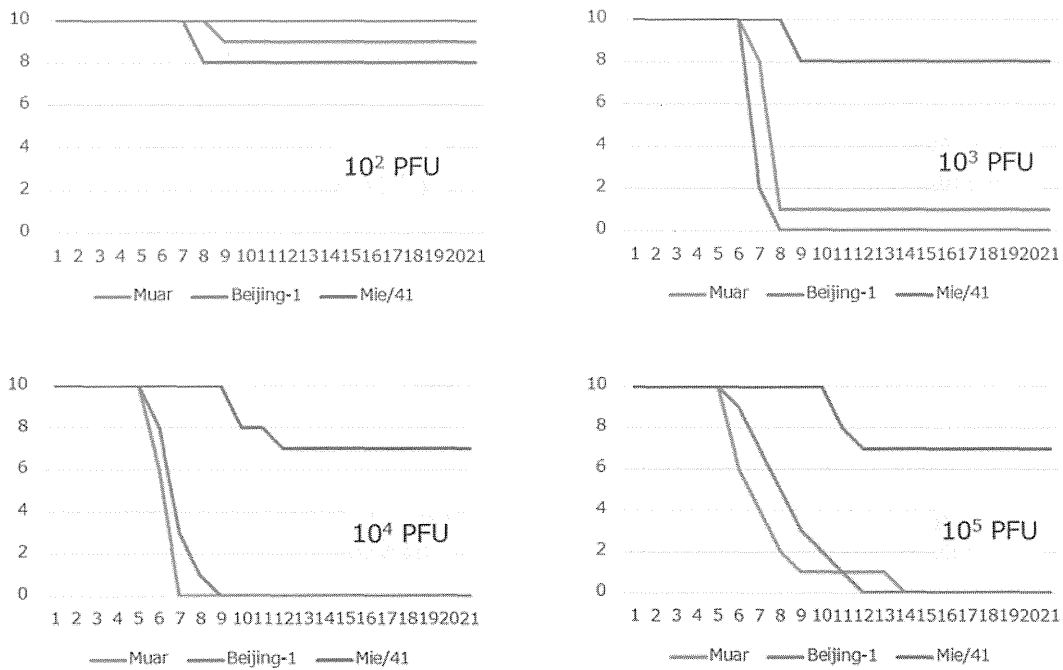


図1 マウスにおける病原性解析 (生存曲線: X軸は接種後の生存日数, Y軸は匹数)

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）  
分担研究報告書

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第3室長)
協力研究者 伊澤晴彦	(国立感染症研究所昆虫科学部第2室長)
江尻寛子	(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主任研究官)
山口(木下) 一美	(国立感染症研究所ウイルス第一部)
鍬田龍星	(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)
堀谷まどか	(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第2室長)
澤邊京子	(国立感染症研究所昆虫医科学部長)
西條政幸	(国立感染症研究所ウイルス第一部長)

研究要旨

近年ダニによって媒介されるウイルス性感染症が日本においても問題となっている。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未だ明らかにされていない。そこで国内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これまで日本においてその存在が知られていなかったレオウイルス科、Great Island virus group に属するウイルス(Ix-7V)および Uukuniemi 様 virus (T-32V) をダニサンプルより分離した。またこれらのウイルスを乳飲みマウスを用いて継代し、乳のみマウスに病原性を示すウイルスをそれぞれ分離した。

A. 研究目的

近年我が国においてダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV)、重症熱性血小板減少症候群ウイルス (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTSV) 等のダニによって媒介されるウイルスが問題となっている。TBEV はフラビウイルス科フラビウイルス属に分類される 1 本鎖(+)RNA ウイルスであり、マダニ類のダニによって媒介される。これまでに北海道でその存在が確認されているが、本州以南でのその分布域は不明である。SFTSV はブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される 3 分節の 1 本鎖(-)RNA ウイルスであり、マダニ類のダニによって媒介される。2013 年に日本でその存在が明らかにされたが、

疫学解析の結果日本で流行している SFTSV は中国で流行している SFTSV とは独立したクラスターを形成し独自の進化を遂げたことが示されている。したがって我が国においては TBE や SFTSV 等の既知のダニ媒介性ウイルスの分布について不明な点が多く、且つ未だ確認されていないダニ媒介性のウイルスが他にも存在する可能性も考えられた。そこで我々は国内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いて細胞変性効果 (CPE) を伴いかつ乳飲みマウスに毒性を示す 2 種のウイルスを分離したので報告する。



## B. 研究方法

### 1. ダニ

国内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ずり法により採取されたマダニ類より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*), タカサゴキラマダニ (*Amblyomma testudinarium*), タイワンカクマダニ (*Dermacentor taiwanensis*)であった (表 1)。得られたダニは 1~52 頭を 1 プールとし, 630 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  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し, ウイルス分離に供試した。

### 2. 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 (図 1)。

### 3. 培養細胞を用いたウイルス分離

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ずり法により採取されたマダニ類を 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 0.22  $\mu\text{m}$  あるいは 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し, Vero 細胞, BHK-21 細胞に接種した (図 1)。

### 4. 乳飲みマウスを用いたウイルス分離

培養細胞への接種を行ったと同じ 10%ダニ乳剤を, 1 腹 8 匹の乳飲みマウスの脳内に 20  $\mu\text{l}$  接種した。接種後 14 日間観察し採脳した (図 1)。

## C. 研究結果

### 1. 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。CPE を呈した培養上清を採取し大量培養後, 核酸を抽出し次世代シーケンサーによって解析した結果レオウイルス科オルビウイルス属のウイルスである Great Island virus group に属するウイルス (Ix-7 virus) とブニヤウイルス科フレボウイルス属 Uukuniemi virus (UUKV) に近縁のウイルス (T-32 virus) がそれぞれ分離された。

### 2. 分離ウイルスの遺伝子配列による系統学的解析

Ix-7V よりウイルスゲノムを抽出し, 次世代シーケンサーを用いて各セグメントの遺伝子配列を解析した。その結果 Ix-7V は Tribec ウイルス (TRBV) に近縁であることが示唆された (図 2)。また T-32V の遺伝子配列を系統樹解析した結果, T-32V はフレボウイルスの中でも Uukuniemi ウイルス (UUKV) に近縁であることが示された (data not shown)。

### 3. 乳飲みマウスを用いた Great Island virus group 分離株 Ix-7V の病原性の検討

2 日齢の乳飲みマウス脳内に Ix-7V 培養上清を接種し 14 日間観察した。Ix-7V を接種した乳飲みマウス (初代培養) では感染 13 日後に接種 16 匹中 2 匹のマウスに発育不良と異常行動が認められた。分離ウイルスを 1 継代した結果接種 12 日後に 8 匹中 1 匹のマウスに発育不良と行動異常がみとめられた。さらに 2 継代目では接種 9 日後にすべてのマ

ウスが発症し、6匹中死亡2、麻痺3、シック1であり、翌日には死亡率100% (6/6匹)であった。臨床症状として発育不良、異常行動、麻痺を示し、剖検所見では点状出血が観察された。さらに1継代を行うことにより発症日接種7日後となり、8日後には死亡率100%であった(図3A)。以上のことより乳飲みマウスに対して強毒性を示すIx-7Vが分離されたことが示唆された。

#### 4. Ix-7V 接種乳のみマウス脳からの Ix-7 遺伝子の検出

乳のみマウス脳にIx-7を接種し、10%マウス乳剤を作製、乳のみマウス脳にて計5継代行った。各継代における乳のみマウスより採脳を行い、RNAを抽出した。抽出したRNAを鋳型としてIx-7V segment 5に対するプライマーを用いてRT-PCRを実施した。その結果、初代培養から5継代のすべての脳においてIx-7Vが検出された(図3B)。このことからIx-7は乳のみマウス脳内において増殖していることが示唆された。

#### 5. 乳飲みマウスを用いた Uukuniemi 様 virus 分離株 T-32V の病原性の検討

次に2日齢の乳飲みマウス脳内にT-32Vの培養上清を接種し14日間観察した。T-32V接種群においては接種16匹中1匹に発育不良が認められた。そこで、さらに1継代して観察した結果、接種した8匹のマウスのうち2匹のマウスが死亡した。以上のことより乳飲みマウスに対して強毒性を示すT-32Vが分離されたことが示唆された。

#### D. 考察

兵庫県内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レオウイルス科オルビウイルス属のウイルスであるGreat Island virus groupに属するIx-7Vとブニヤウイルス科フレボウイルス属UUKVに近縁のT-32Vがそれぞれ分離され

た。また乳のみマウスを用いてこれらの分離ウイルスをそれぞれ継代し、乳飲みマウスに対して病原性を示すウイルスを得た。

TRBVは1963年にスロバキアのトリベック山の*I. ricinus*とげっ歯類から初めて分離されたダニ媒介性オルビウイルスである。TRBV, KEMV, Lipovnik ウイルス(LIPV)はケメロボ血清型群を形成する。LIPVはヒトに感染しKEMVはヒトにまれに脳炎を起こすことが知られている。またTRBVおよびLIPVは実験的にアカゲザルに髄膜炎を起こす。したがってKEMV血清型群のウイルスはヒトの脳炎の原因ウイルスと考えられている。今後、本研究において分離されたIx-7Vの性状解析および病原性について解析する必要がある。

ブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるUUKVに近縁のBhanja ウイルス(BHAV)はダニによって媒介される神経系ウイルスとして知られている。BHAVは1954年にインドのダニから分離されたウイルスで、中欧からアフリカ、中東、インドにかけて分布するヒトにまれに熱性疾患および脳炎を起こすウイルスである。したがって今後分離されたT-32Vの性状解析あるいは成マウスに対する毒性を解析する必要がある。

#### E. 結論

急速な都市化と森林部への人口拡張により今後もアルボウイルス感染症が問題となることが予想される。また近年我が国においてもSFTSVが常在することが明らかとなり、ダニによって媒介されるウイルスの詳細な調査が求められている。本研究において我々はこれまで日本においてその存在が知られていなかったGreat Island virus groupに属するウイルスおよびUukuniemi 様 virus をダニサンプルより分離した。今後さらなる詳細を解析するとともに、今後もダニにおけるウイルス保有調査を引き続き行っていく必要性が示唆された。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Moi M.L., Ami Y., Shirai K., Lim C.K., Suzaki Y., Saito Y., Kitaura K., Saijo M., Suzuki R., Kurane I., Takasaki T. Formation of infectious dengue virus-antibody immune complex in Vivo in Marmosets (*Callithrix jacchus*) after passive transfer of antidengue virus monoclonal antibodies and infection with dengue virus. Am. J. Trop. Med. Hyg. (In press)

Takeshita N., Lim C.K., Mizuno Y., Shimbo T., Kotaki A., Ujiie M., Hayakawa K., Kato Y., Kanagawa S., Kaku M., Takasaki T. 2014. Immunogenicity of single-dose Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese adults. J. Infect. Chemother., 20(4): 238-242.

Takayama-Ito M., Nakamichi K., Kinoshita H., Kakiuchi S., Kurane I., Saijo M., Lim C.K. 2014. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. Biologicals. 42(1): 42-47.

Nakamichi K., Lim C.K., Saijo M. 2014. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. Jpn. J. Infect. Dis., 67(4): 307-310.

Nakamichi K., Tajima S., Lim C.K., Saijo M. 2014. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Arch. Virol. 159(7): 1687-1696.

### 2. 学会発表

西條政幸, 伊藤 (高山) 睦代, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 林昌宏. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発.

第 19 回日本神経感染症学会総会, 2014 年 9 月, .金沢市

中道一生, 林昌宏, 西條政幸. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 西條政幸. 非増殖型組換え狂犬病ウイルスを用いたアレナウイルスに対するワクチンの開発. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, . 2014 年 11 月, 横浜市

Moi M.L.,白石健二, 網康至, 宮田幸長, 林昌宏, 須崎百合子, 北浦孝一, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

齋藤悠香, Moi ML, 竹下望, 林昌宏, 司馬肇, 細野邦明, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. FcyR 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

山口幸恵, 林昌宏, 伊藤 (高山) 睦代, 垣内五月, 堀谷まどか, 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎, 渡邊治雄, 西條政幸. 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に関与する炎症性サイトカインの解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

林昌宏, van den Braak W, 堀谷まどか, 伊藤 (高山) 睦代, 山口幸恵, 垣内五月, 西條政幸. Expression of rabies virus glycoprotein G by using recombinant baculovirus. 第 62 回日本ウ

ウイルス学会学術集会，2014年11月，横浜市

中山絵里，小滝徹，谷ヶ崎和美，林昌宏，西條政幸，高崎智彦. チクングニア熱の輸入症例の報告および血清学的診断法の開発. 第62回日本ウイルス学会学術集会，2014年11月，横浜市

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，Moi M.L.，林昌宏，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦. 第62回日本ウイルス学会学術集会，2014年11月，横浜市

#### 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

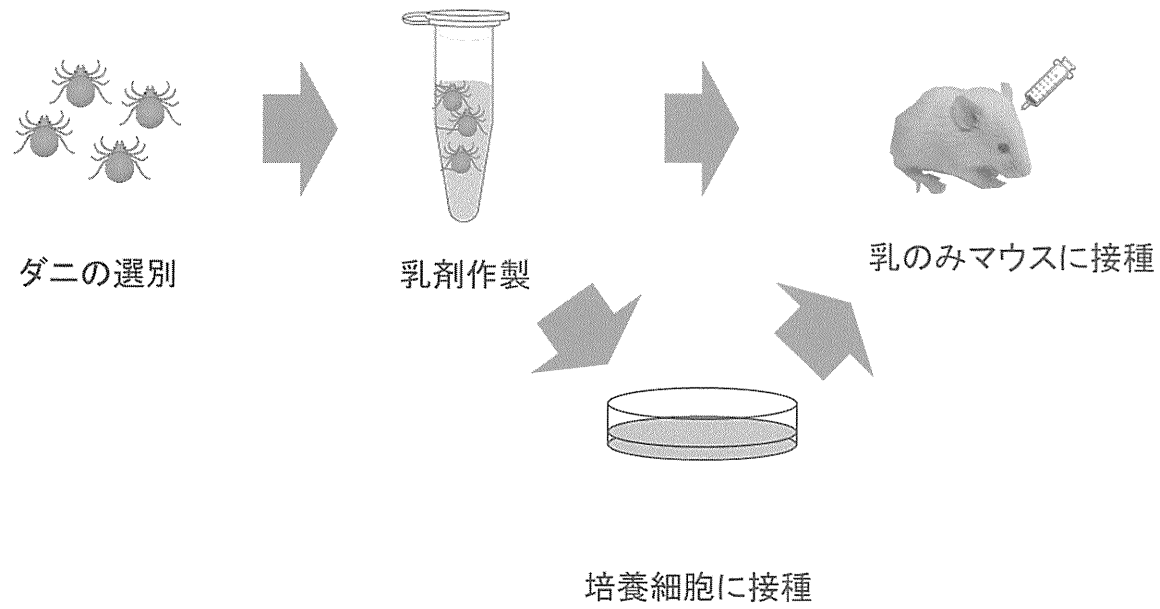


図 1 ダニからのウイルス分離の概要

## Ix-7: Segment 7 (T13)

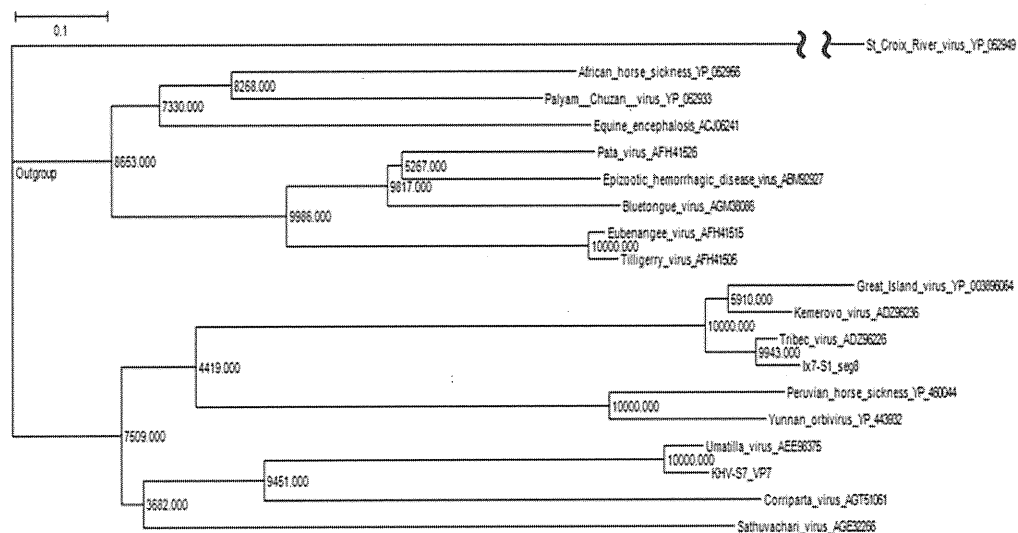


図2 Ix-7V遺伝子セグメント7 (T13)の系統学的解析.

Ix-7Vと主なオルビウイルスのセグメント7の遺伝子配列情報を用いて系統学的解析を行った。解析に用いたウイルスの配列はSaint Croix River virus, African horse sickness virus (AHSV), Palyam Chuzan virus, equine encephalosis virus (EEV), Pata virus, Epizootic hemorrhagic disease virus, Blue tongue virus, Eubenangee virus, Tilligerry virus, Great Island virus, Kemerovo virus, Tribec virus, Peruvian horse sickness virus, Yunnan orbivirus, Umatilla virus, Koyama Hill virus, Corripata virus, Sathuvachari virusであった。

A.

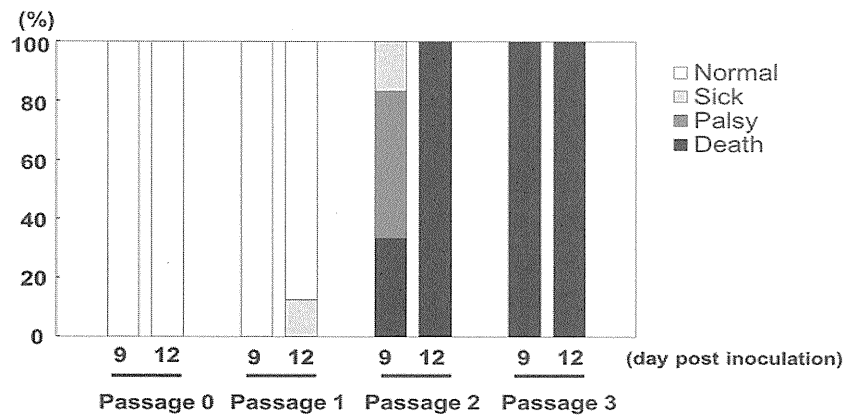
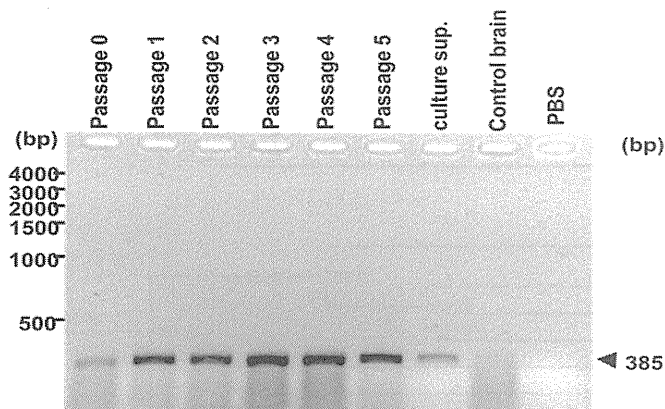


図3 国内で採取されたダニより分離されたウイルスIx-7Vの乳のみマウスに対する病原性解析.

Ix-7V脳内接種後9日後と12日後のマウスの症状 (A) : 培養細胞への接種により分離されたIx-7Vを乳のみマウスに脳内接種し, 14日間観察した. 初回接種のマウス脳から得られたウイルスをPassage 0とした. マウスの発病後あるいは接種14日後に採脳し, 継代を5回続けて行った. その結果初回接種9日後および12日後には症状は観察されなかったが, 接種13日後にマウス個体16匹中2匹において行動異常と発育不全が観察された. 発症マウス脳をさらに2継代したマウスにおいては接種9日後に6匹中6匹が発症し, 接種10日後にはすべて死亡した. 3継代したマウス群においては接種7日後に8匹中8匹が発症し, 接種8日後にはすべて死亡した. Ix-7V脳内接種マウスの脳内におけるIx-7Vの増殖 (B) : 初回接種および1継代から5継代の発症マウスの脳からウイルスRNAを抽出し, Ix-7Vセグメント5に特異的なプライマーを用いてRT-PCRを実施した. その結果, ウイルス特異的な増殖産物が385bp付近に観察され, Ix-7が乳のみマウス脳内で増殖していることが示された.

B.



厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

シラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* などによる感染症の疫学研究

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	佐々木年則	(国立感染症研究所 昆虫医科学部)
	久保田眞由美	(国立感染症研究所 細菌第2部)
	柴山 恵吾	(国立感染症研究所 細菌第2部)
	山岸 拓也	(国立感染症研究所 感染症疫学センター)
	大石 和徳	(国立感染症研究所 感染症疫学センター)
	伊藤 航人	(東京都済生会中央病院)
	川崎 麻紀	(東京都済生会中央病院)
	十菱 大介	(東京都済生会中央病院)
	平尾 磨樹	(東京都済生会中央病院)
	足立 智英	(東京都済生会中央病院)
	澤邊 京子	(国立感染症研究所 昆虫医科学部)

研究要旨

感染症を媒介する節足動物による感染リスクを把握する目的で、東京都済生会中央病院と共同で、シラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* に対する疫学研究を始めた。東京都内から路上生活者が運び込まれてくる同院は、東京のシラミ媒介性細菌 *B. quintana* に対する疫学研究をする上で、最適の場所である。

昨年度に引き続き、2014年度17名のシラミを持つ患者から血液、シラミの提供や臨床情報の提供を得ている。シラミから *B. quintana* の遺伝子検出を行い、15サンプルで全て陽性であった。血液において *B. quintana* に対するIgG抗体保有率は36%であり、*B. quintana* に対するIgM抗体保有率は57%であった。菌の分離に関して、*B. quintana* は分離されなかった。

シラミから *B. quintana* が検出され、なおかつ血清抗体価が上がっている患者を認め、*B. quintana* の感染を疑わせる症例として13名中10名(76.9%)を確認できた。

A. 研究目的

近年、先進諸国の大都市部において、路上生活者における *Bartonella quintana* 感染が問題となっている(Brouqui *et al.*, 1999)。ドキシサイクリン等の抗生物質投与による治療で治癒するが、無治療の場合1%未満で死亡する。そこで、正しい処置が求められる。悪化した場合、心内膜炎にいたることが報告され、気をつけなければならない再興感染症として世界中から注目されている。日本において、希少感染症と考えられる *B. quintana* 感染症の疫学研究を行い、国民に

情報提供さらには *B. quintana* 感染症対策へ貢献することを目的とした。

B. 研究方法

東京都済生会中央病院において、2013年7月30日から2015年1月5日まで、初診時にシラミが見つかった住所不定者、あるいは生活保護受給者を対象にした。患者カルテから年齢、性別、路上生活歴、主な生活場所、入院時の病名、体温、血圧、脈拍、頭痛の有無、湿疹の有無、抗生剤投与の有無、既往歴、血液検査で判明した項目およ



び結果、シラミの有無、シラミ採取部位、血液培養の施行有無の基本情報、臨床情報を得た。

シラミ陽性患者が見つかった場合、病院でシラミと日常臨床上の検査で余った血液検体を利用した。血液検体は、残血を病院で血清と血餅に分離し 4°C で保存の上、培養検体は採取 2 週間後、シラミは数日以内に研究協力者が病院から回収した。また、病院検査部からは血液培養結果を入手した。

遺伝子検出は、*Bartonella* 属、あるいは *B. quintana* 特異的 PCR を行った。シラミからの菌分離は、シラミをヨード・エタノールで滅菌後、シラミを 2 分割し一方を PCR に用いた。残りを羊血液寒天培地に塗布し 37°C 5%CO<sub>2</sub> で 1 ヶ月から 3 ヶ月間培養した。ELISA は、久保田らが開発した方法に従った(Matsuoka *et al.*, 2013)。

シラミ、血液、アンケートは、本人に対し十分な説明を行い、同意のもと提供された。なお、この調査は、国立感染症研究所ヒトを対象とする医学倫理審査委員会（受付番号 372）および東京都済生会中央病院倫理委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

表において、2013 年 7 月から東京都済生会中央病院の協力を得て、15 名の患者からシラミおよびバルトネラについて調査することが出来た。13 名 92.9% 男性で、45 歳から 75 歳にわたる。中央値が 65 歳であり中高齢者となった。

路上生活歴は、半年から 20 年と幅が広く、中央値として 8 年となった。主な生活場所として、山谷、秋葉原、渋谷、両国、代々木、上野、港区（氷川神社）、新宿、浅草、日本橋、東京駅、青山、高輪、代々木公園各 1 名となった。入院時の病名は、蜂窩織炎 2 名、多発痛風結節、下腿潰瘍、胃潰瘍、腹痛、腰痛、低体温、ショック、貧血、臍胝、結核、リンパ節腫脹各 1 名と多岐にわたった。体温について、36°C 未満の患者が

7 名、37.3°C 以上患者が 1 名であり、発熱をしていた患者が 7% であったが、臨床的に塹壕熱が疑われる患者はいなかった。頭痛は報告されなかった。白血球数は、13,650/ $\mu$ l と高く、またヘモグロビン (Hb) が 9.1 g/dl と同様に低い値を示した。抗菌薬は 6 名 (43%) で、初診時診療前に投与されていた。

血液培養液から *B. quintana* に対する PCR を行ったところ、8 検体全て陰性であった。さらに、シラミから *Bartonella* 属に対する PCR を行うと 6 検体全て陽性であった。シラミから培養を行うと 8% 菌分離が陽性で、その中に *Acinetobacter baumannii* とと思われる菌を得た。*B. quintana* に対する IgG を ELISA で測定したところ、14 名中 5 名 (36%) が陽性で、*B. quintana* に対する IgM に関して、14 名中 8 名 (57%) が陽性であった。シラミ PCR と抗体検査で陽性患者は、13 名中 10 名 (76.9%) となった。

### D. 考察

このような調査を行い昨年と同様の年齢層となった。白血球数が多く、何かに感染していくことが考えられ、Hb の値が低いため貧血であることがわかった。シラミ PCR 陽性率の高さと抗体陽性率の低さを説明するのに、*Bartonella quintana* に対する IgG や IgM が産生されるのに少ない *Bartonella quintana* の感染量かもしれない。コロモジラミから *B. quintana* は、分離されなかったが、サンプル数が少ないため東京近辺の状況を表しているとは言えず、今後継続的な検査が必要と思われた。ELISA による *B. quintana* に対する検出系もサンプル数を増やすため、継続的な検査を必要すると考えられた。敗血性ショックで亡くなられた患者がいた。どの細菌による敗血性ショックかはわからないが、*Bartonella quintana* 等による可能性が考えられる。また、亡くなられた方の血液を調べることができず、情報が必要と思われた。

## E. 結論

*B. quintana* の遺伝子は、検出されているものの、分離には至っていない。*B. quintana* に対する IgG は 36%、*B. quintana* に対する IgM は 57%と遺伝子検出率からすれば低い。現在、2年間の疫学研究のため、さらに継続的な疫学研究を行い、サンプル数を増やして *B. quintana* の感染状況を把握する必要がある。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

佐々木年則，関なおみ．2014．シラミ媒介性感染症，特に塹壕熱の現状と今後の課題．化学療法の領域，30 (2): 106-113

### 2. 学会発表

佐々木年則，伊藤航人，久保田眞由美，山岸拓也，川崎麻紀，十菱大介，平尾磨樹，伊澤晴彦，足立智英，大石和徳，柴山恵吾，澤邊京子．2012年から2014年におけるシラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* の疫学研究．第67回日本衛生動物学会大会，2015年3月，金沢市

## 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 東京都済生会中央病院における路上生活者でのシラミ・バルトネラ調査状況、2014年

項目	数	割合
総数 (質問紙回収数)	15	(14)
<b>基本情報 (N=11)</b>		
性別	男	13 92.9%
年齢 (歳)	中央値 (範囲)	65 (45-75)
路上生活歴 (年)	中央値	8 (0.5-20)
主な生活場所 (重複あり)	1	
	山谷、秋葉原、両国、代々木、上野、港区 (氷川公園)、新宿、浅草、日本橋、東京 駅、青山、高輪、代々木公園	
入院時病名	蜂窩織炎	2
	多発痛風結節、下腿潰瘍、胃潰瘍、腹痛、 腰痛、低体温、ショック、貧血、胼胝、結核、 リンパ節腫脹	1
<b>身体所見・検査所見 (N=14)</b>		
血圧	sBP <90mmHg	3 21%
脈拍数	中央値	87
体温	<36℃	7 27%
	≥37.3℃	1 7%
頭痛	有	0 0%
湿疹	有	5 38%
既往歴	糖尿病、心疾患、呼吸器疾患	1 7%
	なし	11 79%
WBC (/μl)	中央値	13,650
Hb (g/dl)	中央値	9.1
血液培養前抗菌薬投与	有	6 43%
<b>患者検体の検査</b>		
血液培養結果 (N=8)	MSSA	1 13%
	<i>E. coli</i>	1 13%
	陰性	3 38%
血液培養液 <i>B. qintana</i> PCR (N=8)	陰性	8 100%
	未実施	0 0%
血餅 <i>B. qintana</i> PCR (N=13)	陽性	0 0%
	未実施	13 100%
血清IgG抗体 (ELISA) (N=14)	陽性	5 36%
	陰性	9 64%
	未実施	0 0%
血清IgM抗体 (ELISA) (N=14)	陽性	8 57%
	陰性	6 43%
	未実施	0 0%
<b>シラミの検査</b>		
シラミ採取部位 (重複あり) (N=14)	衣類	12 91%
	頭部 (衣類、陰部と重複)	1 7%
	頭部	1 7%
	不明	1 7%
シラミ <i>B. qintana</i> PCR (N=15)	陽性	14 93%
	未実施	1 7%
シラミからの培養 (N=12)	陽性( <i>A. baumannii</i> ?)	1 8%
	陰性	10 83%
	未実施	1 8%

### ネッタイシマカのピレスロイド代謝抵抗性に関する量的形質座位解析

分担研究者 富田隆史（国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長）  
協力研究者 小川浩平（国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員）  
駒形 修（国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員）  
糸川健太郎（国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員）  
葛西真治（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）  
澤邊京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）

#### 研究要旨

ネッタイシマカ抵抗性系統(SP 系統)は、ナトリウムチャンネルに 2 箇所の点突然変異を持ち、ペルメトリンによる 10 世代の室内淘汰により感受性系統(SMK 系統)と比べ 1647 倍の抵抗性比を示す。SP 系統の抵抗性比は、PBO による解毒酵素シトクロム P450 の阻害により 33 倍にまで減少することから、同系統の殺虫剤抵抗性には、作用点変異に加えて解毒酵素の関与が疑われる。そこで SP 系統のペルメトリン抵抗性に関与する原因遺伝子を解明するために、量的形質遺伝子座(QTL)解析を行った。QTL 解析のために、殺虫剤感受性 SMK 系統と SP 系統の識別が可能なマイクロサテライト、SNPs、および DNA 配列挿入/欠失を利用した 33 座位の分子マーカーを開発した。SMK♂×SP♀の交配に基づく F2 雌成虫 96 個体に対して <sup>14</sup>C 標識されたペルメトリンの局所施用を行い、個体毎に排泄されたペルメトリン量を測定するとともに、33 座位の遺伝子型を決定した。F2 の排泄量とマーカー型を基にした QTL 解析の結果、第 1 および第 3 染色体に排泄量増大に関与する QTL の存在が明らかになった。排泄量への関与が特に大きかった第 1 染色体上の QTL 近傍には、少なくとも 8 つの P450 遺伝子が存在した。これらの内で SP 系統でのみ発現している CYP6AA5v2 は、SP 系統の代謝抵抗性要因の最有力候補として挙げられる。

#### A. 研究目的

ハエや蚊などの畜産・衛生害虫対策において、殺虫剤抵抗性の発達は害虫防除の妨げとなる。ことに、媒介蚊の防除に強く依存しているデング熱などの蚊媒介性疾病対策の有効性は、殺虫剤抵抗性の発達に大きく左右される。このため、殺虫剤抵抗性の原因変異を特定することは、野外個体群の抵抗性発達の監視や防除対策において公衆衛生学上にも重要な意義がある。

熱帯地域を中心として発生するデング熱は世界規模へと拡大しており、現在では全世界の 40%の人々がデング熱のリスクにさらされていることなどから、世界保健機関

(WHO) は「世界保健デー2014」のテーマとして【節足動物が媒介する感染症】に焦点をあてた。日本においては、2013 年 9 月に日本を旅行したドイツ人がデング熱を発症しており、さらに 2014 年には、160 人のデング熱国内感染患者が確認された。

シンガポールで採集に由来するネッタイシマカのピレスロイド抵抗性系統(SP 系統)は、ペルメトリンによる 10 世代の室内淘汰により、感受性系統(SMK 系統)と比べ 1647 倍のピレスロイド抵抗性を表す。SP 蚊に解毒酵素 P450 の阻害剤である PBO を共力剤として用いた場合、SP 系統の抵抗性比は 33 倍にまで減少することから、SP 系統の殺虫