

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）
分担研究総括報告書

国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析

| | | |
|-------|-------|-----------------------|
| 分担研究者 | 伊澤晴彦 | 国立感染症研究所・昆虫医科学部・第二室長 |
| 協力研究者 | 小林大介 | 国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究生 |
| | 江尻寛子 | 国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員 |
| | 鎌田龍星 | 国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員 |
| | 津田良夫 | 国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官 |
| | 佐々木年則 | 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

近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間 10 人以下で推移しているが、野外環境下での日本脳炎ウイルス（JEV）の活動は依然として活発であると考えられる。我々は、国内における日本脳炎主要媒介蚊であるコガタアカイエカの JEV 保有状況の把握とウイルス遺伝子解析を主な目的として、国内各地で捕集された蚊個体からの JEV の検出と分離、ならびにウイルス遺伝子の分子系統解析を 2005 以降継続して行ってきた。

2011 年は石川県七尾市 (9/11) および熊本県合志市 (8/29)、2012 年は長崎県諫早市 (9/3-4) および群馬県前橋市 (8/31-9/1)、2013 年は長崎県諫早市 (9/4-5) の畜舎とその周辺においてコガタアカイエカを捕集した。捕集蚊は最高 25 個体までを 1 プールとして乳剤を調製し、C6/36 細胞を用いてウイルス分離を試みた。その結果、2012 年および 2013 年の長崎県諫早市捕集蚊のそれぞれ 1 プールから JEV が分離された。分離株のゲノム中のエンベロープ (E) 領域の遺伝子配列を解析した結果、ウイルスの遺伝子型は 1 型であることが判明し、近年日本を含む東アジア地域で報告されている株と遺伝的に極めて近縁であることが確認された。

今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況を調査し、分離株の遺伝子解析を継続することで、JEV 媒介蚊からの感染リスクを把握しておくことは予防対策上重要であると考えられる。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus (JEV) は東南アジアに広く分布し、WHO の報告では世界中で年間 3~5 万人の患者が発生していると推定されている。近年の日本国内における日本脳炎患者数は、年間十例以下と低く推移している。これには、現行の日本脳炎ワクチンによる予防接種が大きく寄与していると考えられる。しかしながら、西・南日本の高齢者を中心に日本脳炎患者の発生は毎年途切れることなく続いており、症例として顕在化していない不顕性感染

者も相当数あると推定される。また、近年の急速な遺伝子検出技術の向上を背景に、これまで原因不明の脳炎・無菌性髄膜炎あるいは意識障害と診断された症例の中には、JEV 感染が関与している場合が少なからず含まれていることも報告されている。一方、毎年継続的に行われている全国的なブタの JEV 抗体価の調査からは、依然として JEV の地域的な蔓延が強く示唆されており、主要媒介蚊であるコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* の発生も毎年広範囲で確認されることから、国内における JEV の感染リスク

は依然として高いものと考えられる。

我々は、媒介蚊の JEV 保有状況と感染リスクを把握する目的で、2005 年以降、日本各地で捕集したコガタアカイエカから JEV の分離を試み、得られた分離株の遺伝子解析を継続して行ってきた。本研究では 2011-2013 年の夏期に国内各所で捕集したコガタアカイエカからの JEV の分離を試み、分離株の遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. コガタアカイエカの捕集

コガタアカイエカは各調査地点の状況に応じ、捕虫網、吸虫管あるいはドライアイストラップを用いて捕集した。

2. 捕集蚊の処理とウイルス分離

捕集蚊は捕集地および捕集日ごとに最高 25 個体までを 1 プールとしてマイクロチューブに回収し -80°C で保存した。このうち、吸血直後のため腹部に動物血液を有する蚊個体については、少なくとも 1 週間砂糖水のみで飼育を継続して消化管内の血液を完全に消化させるか、あるいは卵の産下後に回収することで、血液中の残存ウイルスならびに中和抗体の影響を極力排除した。これら蚊プール検体を、2%牛胎児血清および 0.2 mM 非必須アミノ酸液を添加したイーグル最少培地中で破碎した。この破碎蚊乳剤を遠心分離にかけ、得られた遠心上清の一部を口径 0.45 μm の濾過フィルターに通したのち、ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞に接種した。接種後は細胞変性効果の出現の有無を確認しながら 28°C 、5% CO_2 存在下で 7 日間培養した。さらに少なくとも 2 代盲継代を繰り返した後、培養上清を回収し -80°C で保存した。

3. JEV ゲノムの検出と遺伝子解析

検体接種後の培養上清からの全 RNA 抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。各抽出操作は基本的に添付のマニュアルに従った。続く JEV ゲノム検

出には、Kuno (1998) により報告されているフラビウイルス汎用プライマーセット (FU1 & cFD2 および FU2 & cFD3) を用いた One step RT-PCR で行った。反応後産物は 2% アガロースゲル電気泳動により確認した。これにより、フラビウイルス陽性と判定された検体については、エンベロープ (E) 領域の解析のための遺伝子増幅を行った。まず、SuperScript III first strand synthesis system for RT-PCR (Life Technologies) を用いて first strand cDNA を合成した。プライマーにはキットに内包のランダムヘキサマーを用い、逆転写反応は添付のマニュアルで推奨されている条件で行った。逆転写後の PCR は、KOD plus ver.2 (TOYOBO) で行った。プライマーには、JEV E 全領域をカバーするように設計した特異的プライマー 3 組 (配列省略) を用い、反応条件は製品添付のマニュアルに従った。反応後の PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動により確認した。得られた増幅産物はゲルから抽出・精製後、BigDye Terminator ver.1.1 (Life Technologies) でシークエンシングサンプルを調製し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の解析には、GENETYX-WIN ver.12 および BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用した。分子系統樹作成は、MEGA ver.5.1 を用いて行った。

C. 結果

今回、2011-2013 年夏期に 4 県の畜舎で捕集したコガタアカイエカからウイルス分離を試みた結果、2012 年および 2013 年の長崎県諫早市の同地点で捕集されたコガタアカイエカそれぞれ 1 プールから JEV が分離された (2012 年: 検査蚊個体数 940 頭, 陽性プール数 1/検査プール数 42, プール陽性率 2.4%; 2013 年: プール陽性率 2.2%) (表 1)。最小感染率 MIR (陽性プールに最低 1 頭の感染蚊が存在すると仮定した場合の 1000 頭中の感染蚊個体数) は、2012 年は

1.06, 2013 年は 0.89 と算出された。長崎県は例年ブタにおける HI 抗体保有率は 80% を超え、これまでの媒介蚊調査からも JEV の保有がほぼ毎年確認されることから、JEV の感染リスクが高い地域といえる。一方、他の地域の蚊からは JEV は分離されなかったが、蚊特異的ウイルスと考えられるコガタアカイエカラブドウイルス (CTRV) は、長崎県を含むいずれの地域でも高率に分離された (表 1)。

分離された JEV 株の E 領域の塩基配列を決定し、これを基に分子系統樹を作成した (図 1)。その結果、今回分離されたウイルス株の遺伝子型は 1 型であり、近年東アジア地域から報告された株や 2002 年以降西・南日本を中心に分離された株と遺伝的にみて極めて近縁あることが確認された。また、これまで我々が解析した国内分離株と比較したところ、塩基配列レベルで若干の多様性が認められるものの、そのほとんどがコード蛋白質のアミノ酸変異を伴わない置換であった。一方、ウイルスの病原性に関連のあるとされる E 蛋白質の 123 番目のアミノ酸残基について、近年国内で分離される 1 型株は、アスパラギン (N) あるいはセリン (S) のほぼいずれかであることが報告されているが、今回の 2 つの分離株も、アスパラギン (N) ならびにセリン (S) であった。

D. 考察

今回 JEV が分離された長崎県諫早市の蚊捕集場所は、JEV の増幅動物であるブタが肥育されている畜舎で、周辺にはコガタアカイエカの発生源となる水田が点在している環境である。また、ヒトの生活環境にも程近い。JEV が分離された時期には、例年ブタの HI および 2-ME 感受性抗体の上昇が確認されており、捕集されたコガタアカイエカの中には、ウイルス血症を呈した時期のブタを吸血した経験のある個体が少なからず含まれていたと考えられる。ウイルス遺伝子の分子系統解析の結果、2 分離株ともに同一のクラスタ

一を形成した。このことは、近年東アジア地域で流行している株が毎年当地域に侵入してくる可能性、あるいは当地域周辺において JEV が年を越えて維持・伝播されている可能性も考えられる。さらに、同地域で過去に行った調査でも、ほぼ同じ時期に採集された蚊から高率にウイルスが分離されていることから、毎年 JEV の活動が活発な地域であることがうかがえる。現在では、日本脳炎ワクチンの普及や生活環境の変化により、ブタの感染状況と患者発生は必ずしも一致していない。しかし、ブタや媒介蚊のウイルス感染状況から JEV が蔓延していると推測される地域では、JEV に対する免疫が低い周辺住民への感染リスクは依然として高いと推定される。実際、西・南日本の高齢者を中心とした散発的な患者発生は、JEV 保有コガタアカイエカによる刺咬が直接的な原因と考えられる。日本国民においてはワクチンの定期接種により効果的な感染阻止が図られているが、日本脳炎ワクチンの接種が行われていない国や地域からの渡航者が日本国内で日本脳炎に感染するリスクはより高くなると考えられる。このため、今後急速に増加が見込まれる海外からの渡航者に向けた日本脳炎の感染リスクの周知と防蚊対策の啓発も重要である。

JEV は増幅動物や媒介蚊によってインド以東のアジア広域に拡散すると考えられており、その流行に伴って日本における JEV の遺伝子型が、1990 年ごろを境に 3 型から 1 型へと遷移したことが報告されている。遺伝子解析の結果、今回分離された株は 1 型に属しており、近年日本をはじめとする東アジア各地域で分離された株と極めて近縁であることが判明した。今後、これら分離株の増殖性や病原性を詳細に解明し、予防対策につなげていくことが重要である。

本研究により、依然として地域や時期によっては、JEV がコガタアカイエカからヒトへ媒介される可能性があることが強く示唆さ

れ、今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況とウイルス遺伝子の変化と推移を把握しておくことは、疫学上重要であると考えられる。

E. 結論

1) 2011 年に石川、熊本、2012 年に長崎、群馬、2013 年に長崎の各県下の豚舎を含む畜舎で捕集されたコガタアカイエカからウイルス分離を行なった結果、2012 年および 2013 年の長崎県捕集蚊のそれぞれ 1 プールから JEV が分離された (2012 年: プール陽性率; 2.4%, MIR; 1.06, 2013 年: プール陽性率; 2.2%, MIR; 0.89)。

2) E 領域の配列解析の結果から、今回分離されたウイルス株は、近年日本を含めた東アジア地域で多く検出されている 1 型のウイルスと遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。

3) 豚舎を含む畜舎周辺で捕集されたコガタアカイエカは JEV を高率で保有する可能性があり、ブタと蚊の感染状況から JEV が蔓延していると推測される地域では、ヒトへの感染リスクが高くなっていると考えられる。

謝辞

コガタアカイエカの捕集とウイルス検出を実施するにあたり、以下の方々にご協力いただきました (敬称略)。

砂原俊彦、二見恭子、今西望、皆川昇 (長崎大学 熱帯医学研究所 病害動物分野)
吉川亮、松本文昭、吾郷昌信 (長崎県 環境保健研究センター)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwata R, Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y,

Tajima S, Sasaki T, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K. 2012. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **8**:369-376.

Kuwata R, Nga PT, Yen NT, Hoshino K, Isawa H, Higa Y, Hoang NV, Trang BM, Loan DP, Phong TV, Hien NT, Sasaki T, Tsuda Y, Kobayashi M, Sawabe K, Takagi M. 2013. Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008. *Am J Trop Med Hyg.* **88**:681-688.

Kuwata R, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Kobayashi M, Maeda K, Sawabe K. 2015. Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) cells persistently infected with *Culex* flavivirus (*Flaviviridae*). *J Med Entomol.* in press.

Hoshino K, Isawa H, Kuwata R, Tajima S, Takasaki T, Iwabuchi K, Sawabe K, Kobayashi M, Sasaki T. 2015. Establishment and characterization of two new cell lines from the mosquito *Armigeres subalbatus* (Coquillett) (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* in press.

2. 学会発表

田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 小林大介, 谷脇妙, 沢辺京子, 高崎智彦. Flap 配列を付加したフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーの評価とゲタウイルス検出の実例について. 第20回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 2013年11月, 神戸市

小林大介, 伊澤晴彦, 江尻寛子, 佐々木年則, 砂原俊彦, 二見恭子, 吉川亮, 松本文昭, 吾郷昌信, 津田良夫, 鋤田龍星, 田島茂, 皆川昇, 小林睦生, 太田伸生, 沢辺京子. 2012 年に国内で捕集されたコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* のウイルス保有状況調査. 第 66 回日本衛生動物学会大

会，2014年3月，岐阜市

小林大介，伊澤晴彦，江尻寛子，佐々木年則，前川芳秀，吉川亮，松本文昭，吾郷昌信，津田良夫，鍬田龍星，田島茂，小林睦生，太田伸生，沢辺京子．2012年および2013年に長崎県で捕集されたコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* のアルボウイルス保有状況調査．第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014年5月，山口市

小林大介，伊澤晴彦，前川芳秀，糸川健太郎，砂原俊彦，今西望，吉川亮，松本文昭，吾郷昌信，津田良夫，江尻寛子，佐々木年則，小林睦生，小滝徹，高崎智彦，皆川昇，太田伸生，沢辺京子．2013年に長崎県で捕集されたコガタアカイエカのウイルス保有状況調査．第67回日本衛生動物学会大会，2015年3月，金沢市

H. 知的財産権の出願・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 2011－2013 年国内捕集コガタアカイエカからのウイルス分離成績

| 捕集地 | ♂/♀ | 捕集日 | 個体数 | プール数 | 分離結果 | |
|--------|-----|-------------------------|------|------|------|------|
| | | | | | JEV | CTRV |
| 熊本県合志市 | ♀ | 2011 年 8 月 29 日 | 177 | 18 | 0 | 4 |
| 石川県七尾市 | ♀ | 2011 年 9 月 11 日 | 38 | 4 | 0 | 2 |
| 群馬県前橋市 | ♀ | 2012 年 8 月 31 日・9 月 1 日 | 121 | 6 | 0 | 6 |
| 長崎県諫早市 | ♀ | 2012 年 9 月 3・4 日 | 940 | 42 | 1 | 14 |
| 長崎県諫早市 | ♀ | 2013 年 9 月 4・5 日 | 1125 | 45 | 1 | 8 |

図 1 エンベロープ(E)領域の塩基配列に基づく分子系統解析(近接結合法による系統樹)

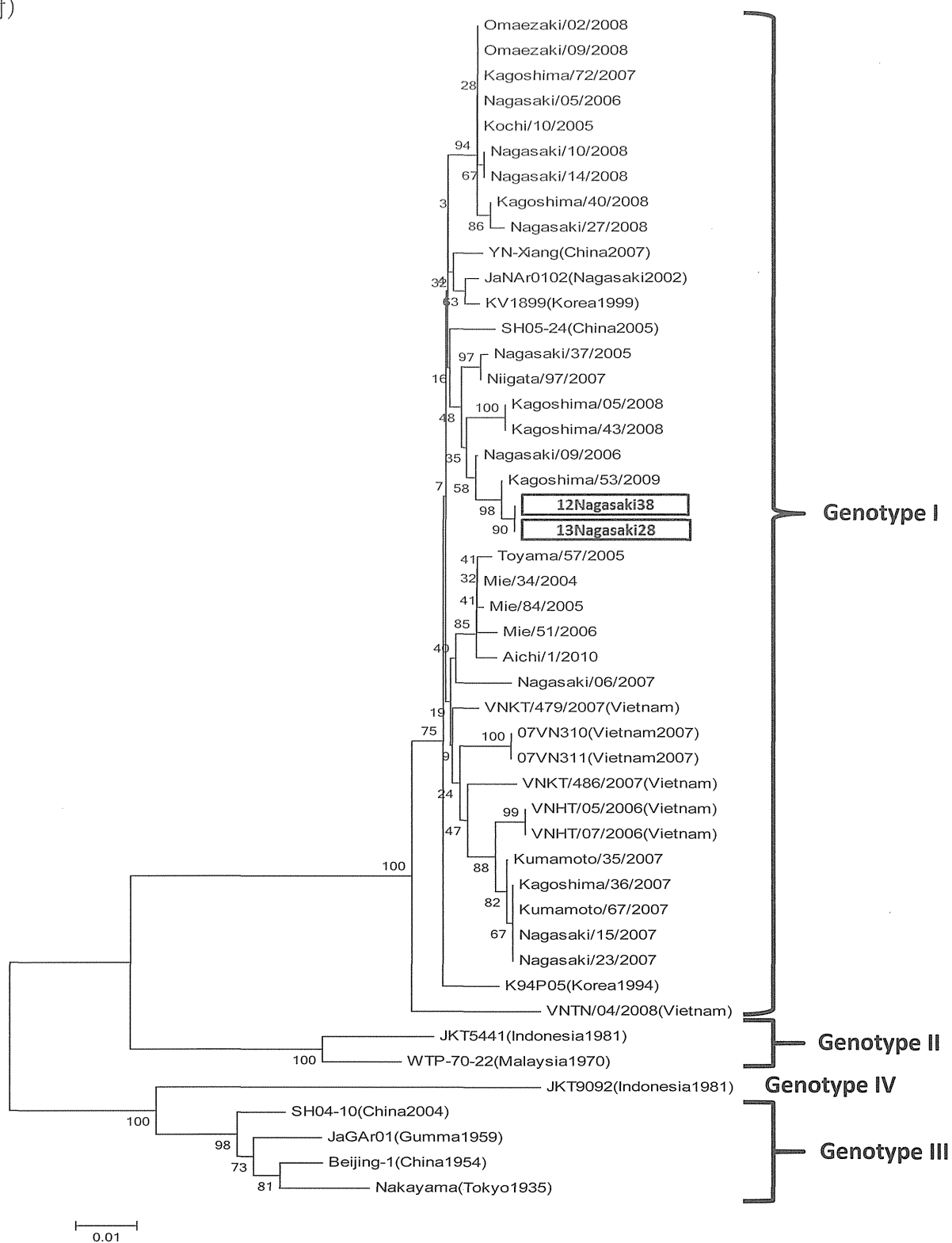


図2 近年のJEV国内分離株におけるエンベロープ蛋白質の123番アミノ酸残基に見られる変異

| 分離年代 | 株番号 | アミノ酸残基 |
|-------|----------------|-------------------------------|
| | 05Kochi05aa | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| 2005年 | 05Nagasaki37aa | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 05Toyama57aa | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| 2006年 | Nagasaki0506_1 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | Nagasaki0906_1 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 07KGM36-Env_1 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| | 07KGM72-Env_1 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| 2007年 | 07Kumamoto35 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| | 07Kumamoto67 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| | 07Nagasaki06 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 07Nagasaki15 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| | 07Nagasaki23 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| | 07Niigata97 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 08Kagoshima05 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 08Kagoshima40 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 08Kagoshima43 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| 2008年 | 08Nagasaki10 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 08Nagasaki14 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 08Nagasaki27 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 08Omaezaki02 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 08Omaezaki09 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| 2009年 | 09Kagoshima53 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| 2010年 | Aichi_1_2010 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| | 05Kochi10 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |
| 2012年 | 12Nagasaki38 | IDTCAKFSC T NKAIGRMIQP |
| 2013年 | 13Nagasaki28 | IDTCAKFSC T SKAIGRMIQP |

Genotype I

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・第二室長
協力研究者 田島 茂 ウイルス第一部・主任研究官

研究要旨

本研究事業において我々は主に蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス (JEV) について、近年国内外で分離された JEV 株の性状解析およびこれらの株に対する現行ワクチンの効果を調べてきた。本研究期間中の研究成果として、1) 高病原性型と考えられる NS4A 3-Ile 型株の分離株中の割合を調べ、約 20%であることを示した。また 3-Ile 型でも高病原性を示さない株が存在することを明らかにした。2) 遺伝子型 III 型ベースで生産されている現行ワクチンは I 型株に対しても III 型と同様に中和効果があることを明らかにした。3) 一方、遺伝子型 V 型に対する現行ワクチンの中和効果は I, III 型に比べ低く、また V 型 Muar 株のマウス病原性は比較的強いことを明らかにした。我々の結果は、現在の主要型である遺伝子型 I 型に対してはこれまでの対応で特に問題ないことを示す一方で、現在のところ国内で確認されていない V 型が侵入した場合には、ワクチン接種をしても不安が残ることを示唆している。V 型株はこれまでに世界でも 3 株しか分離されていないことから解析が進んでおらず、性状も不明な点が多いためこの先蔓延する可能性があるのか予測できない。今後はワクチン接種したヒト血清を用いた解析や、蚊での媒介能力など更なるウイルス性状解析が必要となるだろう。

A. 研究目的

日本脳炎は日本脳炎ウイルス (JEV) の感染が原因の中枢神経の疾患である。感染しても多くの場合不顕性感染に終わるが、発症した場合には致死率は 20~40%に達する重篤な感染症である。JEV は水田等に発生するコガタアカイエカなど、イエカにより媒介され、ブタや水鳥などのウイルス増殖動物とともに感染環を形成する。一方ヒトは終宿主に当たる。日本脳炎の発生地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内での日本脳炎患者数は 1990 年以降 10 例以下で推移している。しかし WHO の推計では、世界で年間約 4 万 3 千人が日本脳炎を発症し、うち約 1 万 1 千人が死亡、約 9 千人が重篤な超える後遺症に苦しんでいるとされる。このように世界

的にみれば日本脳炎は決して過去の疾患ではなく、現在も警戒すべき感染症である。また日本国内でも JEV は現在も毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。

JEV には 5 つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウイルスは 90 年代初頭を境に III 型から I 型へと変化した。同様の変化は日だけでなく、韓国やベトナムでもほぼ同時期に起こっている。さらに近年では中国、台湾、タイ、インドでも同様の変化が認められている。これまでに我々は I 型 JEV 分離株の性状解析を続けてきた。分離株のマウスに対する病原性を調べてきたところ、1 つの株 (Mie/40/2004 株) が他に比べ顕著に高い病原性を示した。その原因を探ったところ、ウイルスの非構造蛋白質 NS4A 蛋

白の3番目のアミノ酸を Val から Ile へ変化させることにより病原性が強くなることを見出した (Yamaguchi *et al.* 2011). しかし本部位が Val である JEV 分離株は Mie/40/2004 株のみしか知られておらず, どの程度 3-Ile 株が蔓延しているかは不明である.

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 (I 型) 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. しかし現行の国内ワクチンはこれら海外のワクチン株とは異なることから, 別途解析が必要である.

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, 韓国のものを含め 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.

以上の背景を踏まえ, 本研究事業において我々は, 1 年目に国内および国外での 3-Ile 株の蔓延状況を把握し, かつ Mie/40/2004 株以外の 3-Ile 株の性状解析を行った. 2 年目には近年分離された遺伝子型 I 型 JEV に対する III 型ベースで生産されている現行ワクチンの有効性について調べた. さらに 3 年目には 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

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

型 JEV 分離株 5 株の全塩基配列を決定し, 既知の株の配列と比較した. またこれらの株について, 各種培養細胞中での増殖速度を調べた.

3-Ile 型分離株のマウスに対する病原性を調べるため, 3 週齢のマウス (ddY 系統) に 1×10^5 pfu/mL の各ウイルス液を腹腔接種し, 21 日間経過観察した. 生存曲線を作成し, log-rank 法により 3-Val 型 Mie/41/2002 株との差異を比較検討した.

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), これらに加え 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 キメラクローン (rJEV-E^{Beijing-1}-M41/pMW119 および rJEV-E^{Nakayama}-M41/pMW119) に加え、今回新たに 2 種類の組換えキメラクローン (rJEV-E^{Muar}-M41/pMW119 および rJEV-E^{XZ0934}-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。各クロー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

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

ころ、中国において日本とほぼ同時期 (2004 年～2008 年) に各々隣接していない 3 省で 3-Ile 型株が分離・同定されていた。そのうちの 1 株は日本脳炎患者から分離されたものであった。我々が同定した 3-Ile 型株の中から 5 株 (Mie/34/2004, Mie/84/2005, Mie/51/2006, Tokyo/373/2005, Tokyo/602/2005) を選択し全塩基配列を決定したところ、Mie/84/2005 株は Mie/40/2004 株とアミノ酸配列が完全に一致したが、他 4 株はそれぞれ Mie/34/2004 株で 2 残基、Mie/51/2006 株で 5 残基、Tokyo/373/2005 株で 1 残基、Tokyo/602/2005 株で 4 残基が異なっていた。3 種の哺乳動物由来培養細胞を用いた *in vitro* での感染実験において、3-Ile 株間で増殖速度に顕著な差異は認められなかった。一方蚊由来株化細胞 C6/36 細胞においては、同じ 3-Ile 型株である Tokyo/602/2005 株 (低増殖性株) と Mie/51/2006 株 (高増殖性株) 間で 7 倍以上の差異が認められた。各 3-Ile 型株のマウスに対する病原性 (神経浸潤毒性) を調べたところ、Mie/34/2004 株、Tokyo/373/2005 株および Tokyo/602/2005 株は Mie/40/2004 株とほぼ同等の病原性を示した。一方 Mie/51/2006 株は Mie/40/2004 株に比べ顕著に病原性が弱く、その程度は Mie/41/2002 株とほぼ同等であった (図 2)。

方法欄に記したワクチン接種マウス血清およびウイルス株を用いて中和解析を行った (表 2)。遺伝子型 I 型, III 型については、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。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 3)。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と考えられた。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 3)。 $10^{1.5}$ 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

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

3-Ile 株間で最大 7 倍以上の差異が観察された。この解析で高増殖性を示した Mie/51/2006 株は, 3-Val 型株である Mie/41/2002 と同等であり, さらにともにマウスを用いた病原性解析では両ウイルスとも Mie/40/2004 株に比べ有意に低い病原性を示した。C6/36 細胞での増殖性とマウス病原性が逆相関しているようなデータであり興味深い。その理由は不明である。Mie/51/2006 株は今回性状解析した株の中では最も Mie/40/2004 株とアミノ酸が異なる株であり, E 領域に 2 ヶ所, NS4B 領域に 1 ヶ所, NS5 領域に 2 ヶ所差異がある。これらの部位は他の株とは共通していないことから, これらのうちの何処かが病原性の弱さに関与しているものと想像される。このような部位を同定することにより, 新たな病原性規定部位を明らかにすることが可能であろう。

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。我々はこの 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た。その結果国内で生産されている現行ワクチンは I 型にも III 型と同等の効果があることが明らかとなった。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

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

現在国内に蔓延している JEV はほとんど

が I 型であるが、これらに対しても III 型から製造された日本脳炎ワクチンは有効であると考えられた。一方、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. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

白鳥（田島）茂，高崎智彦。「日本脳炎ワクチンの品質管理」2012. 臨床とウイルス，第 40 巻第 5 号: 297-305.

2. 学会発表

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，2012 年 5 月，阿蘇市

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，2012 年 11 月，大阪市

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, 2012
年 11 月, 大阪市

田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 小林大介,
谷脇妙, 沢辺京子, 高崎智彦. Flap 配列を
付加したフラビウイルス共通プライマーお
よびアルファウイルス共通プライマーの評
価とゲタウイルス検出の実例について. 第
20 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会,
2013 年 11 月, 神戸市

田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林昌宏, 西
條政幸, 高崎智彦. 製造株と異なる遺伝子
型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの
中和能の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学
術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

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. 知的財産権の出願・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 使用したJEV株の分離年，地域およびNS4Aの3番目のアミノ酸の種類

| 地域 | 1990s | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 |
|----|-----------------------------|--|--|--|---|--|---|--|--|---|
| 九州 | | | Okinawa/28 V 5/2003 al | | Kumamoto/5 V 4/2005 al Kumamoto/5 V 6/2005 al Kumamoto/6 V 5/2005 al Nagasaki/37/ 2005 V | Kumamoto/81 V al/2006 al Kumamoto/84 V al/2006 al Kumamoto/88 V al/2006 al Kumamoto/90 V al/2006 al Kumamoto/10 V 4/2006 al Kumamoto/11 V 6/2006 al Kumamoto/12 V 0/2006 al Kumamoto/12 V 2/2006 al Kumamoto/14 V 7/2006 al | Kumamoto/86 V al/2007 al Kumamoto/15 V al/2007 al | Kagoshima/0 V 5/2008 al Kagoshima/4 V 0/2008 al Kagoshima/4 V 3/2008 al Nagasaki/10/ 2008 V al/2008 al Nagasaki/14/ 2008 V al/2008 al Nagasaki/27/ 2008 V al/2008 al | Kagoshima/53 V al/2009 al Kumamoto/94 V al/2009 al Kumamoto/97 V al/2009 al Kumamoto/98 V al/2009 al Kumamoto/16 V 3/2009 al Kumamoto/12 V al/2010 al | Kumamoto/94 V al/2010 al Kumamoto/95 V al/2010 al Kumamoto/96 V al/2010 al Kumamoto/12 V al/2010 al Kumamoto/13 V al/2010 al |
| 四国 | | Kagawa/27/2 V 002 al | | Kagawa/35/2 V 004 al | Kochi/1/2005 V al Kochi/4/2005 V al Kochi/5/2005 V al Kochi/8/2005 V al Kochi/25/200 V 5 al Kochi/41/200 V 5 al Kagawa/21/2 V 005 al Kagawa/22/2 V 005 al Kagawa/24/2 V 005 al | | Kochi/12/2007 V al Kochi/13/2007 V al Kochi/19/2007 V al | | | |
| 中国 | Hiroshima V a/46/1998 al | Hiroshima/2 V 5/2002 al | Shimane/101 V 2003 al Shimane/107 V 2003 al Shimane/112 V 2003 al Shimane/113 V 2003 al Shimane/114 V 2003 al Shimane/117 V 2003 al Shimane/129 V 2003 al | Hiroshima/4 H 3/2004 al Hiroshima/5 V 4/2004 al | Hiroshima/45 V 2005 al | | | | | |
| 近畿 | | Mie/41/2002 V al | | Mie/34/2004 H e Mie/40/2004 H e | Mie/83/2005 H e Mie/84/2005 H e | Mie/51/2006 H e | | JaNB037/200 H 8 e | | |
| 北陸 | | | | | Toyama/57/2 V 005 al | Ishikawa/79/2 H 006 e | Niigata/97/200 V al | | | |
| 東海 | | Shizuoka/33/ V 2002 al Shizuoka/39/ V 2002 al | | | Shizuoka/117 H 2005 e Shizuoka/128 H 2005 e Shizuoka/201 H 2005 e Shizuoka/221 H 2005 e Shizuoka/223 H 2005 e Shizuoka/241 H 2005 e Shizuoka/243 H 2005 e | | Shizuoka/272/ V 2007 al Shizuoka/274/ H 2007 e Shizuoka/284/ V 2007 al Shizuoka/291/ V 2007 al | Shizuoka/271 V al/2008 al Omaezaki/02 V 2008 al Omaezaki/09 V 2008 al | Shizuoka/53/2 V al/2009 al Shizuoka/131/ V al/2009 al Shizuoka/169/ V al/2009 al | |
| 関東 | JaTAn1/1 V 994 al | Chiba/88/20 V al | | | Tokyo/373/20 H 05 e Tokyo/602/20 H 05 e Chiba/65/200 H 5 e Chiba/123/20 H 05 e | | Chiba/150/200 V al/2007 al Chiba/178/200 V al/2007 al | Chiba/79/200 V al/2008 al Chiba/103/20 V al/2008 al Chiba/181/20 V al/2008 al | | |

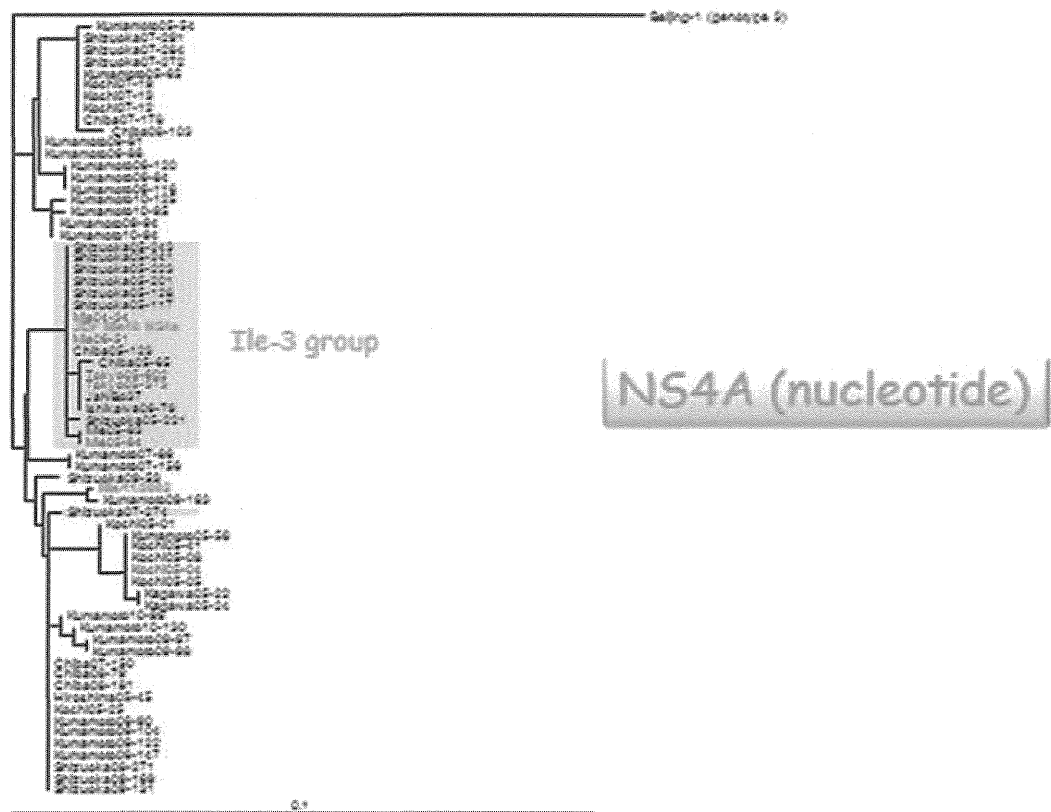


図1 分離株の系統樹解析 (NS4A 遺伝子)

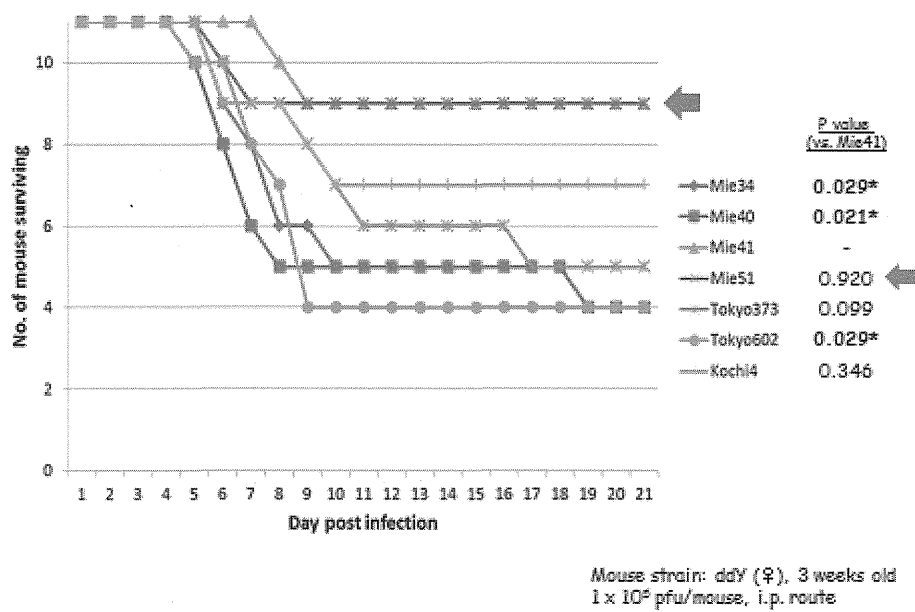


図2 3-Ile型 JEV のマウスに対する病原性の比較 (生存曲線)

表 2 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 | |
| | JaNB037/2008 | 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 | 100.8 | |
| GV | Muar/1952 | 20 | <10 | 20 | 10 | |

表 3 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 ^{Nakayama} | >1280 | 640 | 640 | 160 |
| rJEV-E ^{Beijing-1} | 40 | 10 | 160 | 40 |
| rJEV-E ^{Muar} | 10 | <10 | 20 | <10 |
| rJEV-E^{XZ0934} | <10 | <10 | 10 | <10 |

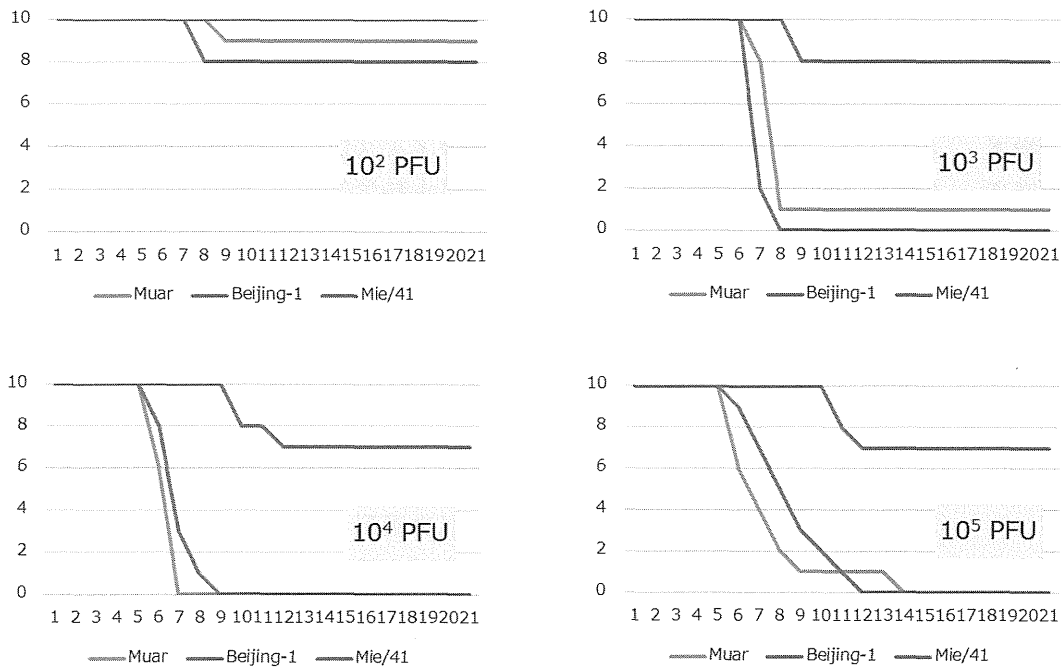


図3 マウスにおける病原性解析 (生存曲線: X軸は接種後の生存日数, Y軸は匹数)

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）
分担研究総括報告書

六甲山系で採取されたマ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 |
| | 鋤田龍星 | 国立感染症研究所昆虫科学部 |
| | 垣内五月 | 国立感染症研究所ウイルス第一部 |
| | 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

マダニ類はウイルス、細菌、リケッチア等の病原体を媒介することが知られている。またこれまでに多くのダニ媒介性アルボウイルスが報告されている。我が国においても重症熱性血小板減少症候群ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスが常在することが明らかになっているが、その他のダニによって媒介されるウイルスの分布状況は明らかにされていない。そこで兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行った。その結果、細胞培養を用いたウイルス分離において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オルビウイルス属 Great Island virus group に属するウイルス (Ix-7V) およびブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される Uukuniemi 様 virus (T-32V) をダニサンプルより分離した。これらのウイルスを乳のみマウスの脳内接種により継代したところ、乳のみマウスに病原性を示す株がそれぞれ分離された。

A. 研究目的

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

感等を生じる場合がある。しかしながらマダニ類の吸血には数日から1週間を要するにもかかわらず多くの場合、全く自覚症状がない。近年ダニに関連するウイルス感染症が国内外を問わず、新興・再興感染症として注目されている。我が国においても2013年2月には重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) の発症例が報告された。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。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経ていることが報告されている。その他に国内外においてはダニによって媒介されるウイルスとしてブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類されるクリミア・コンゴ出血熱、オルトミクソウイルス科トゴトウイルス属に分類されるトゴトウイルスおよびドーリウイルス、フラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるロシア春夏脳炎ウイルス、中央ヨーロッパダニ脳炎ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、キャサヌール出血熱ウイルス、ランガットウイルスおよびポワッサンウイルス、レオウイルス科オルビウイルス属に分類されるケメロボウイルス、同じくレオウイルス科コルチウイルス属に分類されるコロラドダニ熱ウイルス等の多くのウイルスが知られている。しかしながらこれらウイルスの国内における分布は明らかにされていない。そこで我々は兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. ダニ

兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシの被毛から採取されたマダニ類およびイノシシ生息域周辺の地点において旗ずり法により採取されたマダニ類より 10%乳剤を作製しウイルス分離を行った。用いたダニはフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)、キチマダニ (*H. flava*)、タカサゴチマダニ (*H. formosensis*)、ヤマアラシチマダニ (*H. hystericis*)、オオトゲチマダニ (*H. megaspinosus*)、タネガタマダニ (*Ixodes nipponensis*)、アカコッコマダニ (*I. turdus*)、ヤマトマダニ (*I. ovatus*)、タカサゴキララマダニ (*Amblyomma testudinarium*)、タイワンカクマダニ (*Dermacentor taiwanensis*)であった。得られたダニは1~52頭を1プールとし、

192 プールを作製した。次に作製したダニプールを用いて 10%ダニ乳剤を作製した。ダニ乳剤を 0.22 μm あるいは 0.45 μm 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。

3. 培養細胞を用いたウイルス分離

10%ダニ乳剤を作製し、Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種し 7 日間観察した。

4. 乳飲みマウスを用いたウイルス分離

10%ダニ乳剤を作製し、1 腹 8 匹の乳飲みマウスの脳内に 20 μl 接種した。接種後 14 日間観察し採脳した。

5. ウイルス遺伝子の検索

採取したサンプルよりウイルス遺伝子を抽出し、逆転写(RT)-PCR 法によりフラビウイルス属およびブニヤウイルス属の検索を行った。また次世代シーケンサーを用いてダニから得られたウイルスの遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

1. ダニ類の採取

兵庫県六甲山系でダニ類の採取を行った。兵庫県六甲山系におけるイノシシの被毛より採取されたマダニ類はキチマダニ 54%、タカサゴチマダニ 16%、タカサゴキララマダニ 13%、ヤマアラシチマダニ 9%、タイワンカクマダニ 8%であった。

2. 培養細胞を用いたウイルス分離

マダニサンプルより 10%ダニ乳剤を作製し、Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種し