

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 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 $^{\circ}\text{C}$ 、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 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

ーを形成した。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, 鎌田龍星, 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 , 鎌田龍星 , 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)

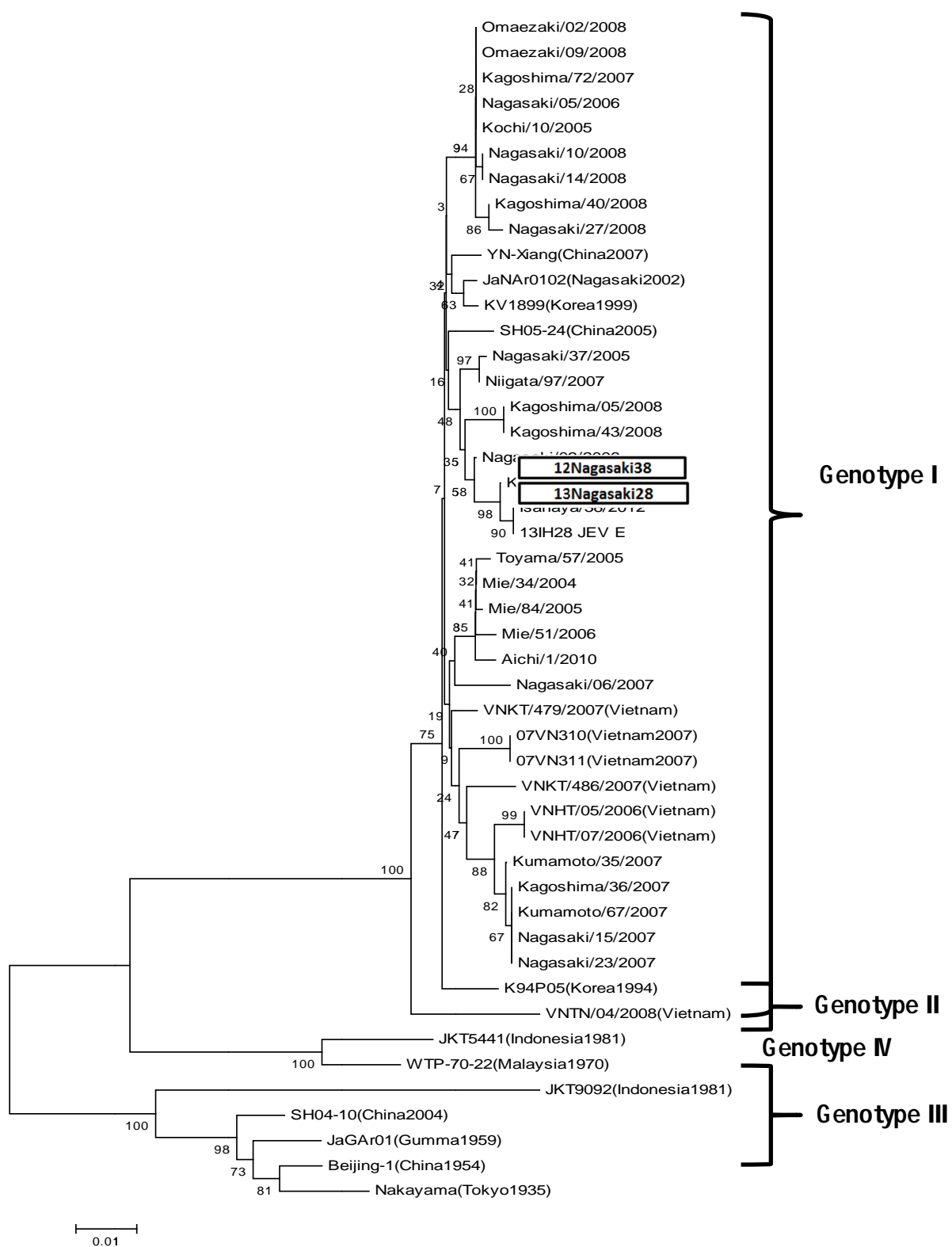


図2 近年の JEV 国内分離株におけるエンベロープ蛋白質の 123 番アミノ酸残基に見られる変異

分離年代	Accession	Sequence
	05Kochi05aa	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
2005年	05Nagasaki37aa	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	05Toyama57aa	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
2006年	Nagasaki0506_1	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	Nagasaki0906_1	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
2007年	07KGM36-Env_1	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP
	07KGM72-Env_1	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	07Kumamoto35	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP
	07Kumamoto67	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP
	07Nagasaki06	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	07Nagasaki15	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP
	07Nagasaki23	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP
2008年	07Niigata97	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	08Kagoshima05	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	08Kagoshima40	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	08Kagoshima43	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	08Nagasaki10	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	08Nagasaki14	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
2009年	08Nagasaki27	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	08Omaezaki02	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	08Omaezaki09	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	09Kagoshima53	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP
2010年	Aichi_1_2010	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
	05Kochi10	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP
2012年	12Nagasaki38	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP
2013年	13Nagasaki28	IDTCAKFSCTSKAIGRMIQP

Genotype I