

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業  
委託業務成果報告

(委託業務題目)

国内侵入・流行が危惧される昆虫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

担当責任者研究報告書

媒介昆虫の垂直伝播に関する研究

担当責任者 澤邊京子 (国立感染症研究所 昆虫医科学部)

研究協力者 佐々木年則, 伊澤晴彦 (国立感染症研究所 昆虫医科学部)

皆川こごみ, 皆川昇 (長崎大学熱帯医学研究所 病害動物部)

高崎智彦 (国立感染症研究所 ウイルス第一部)

研究要旨

国内侵入・流行が危惧される昆虫媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立を目的として、蚊のデングウイルス垂直伝播について検討した。2014年夏から秋にかけて、東京都内の公園を中心に、国内に広く生息するヒトスジシマカによるデング熱患者の発生が続き大きな問題となった。殺虫剤の散布や季節的な蚊数の自然減少により、患者の発生は160名を超えたところで終息した。しかしながら、ヒトスジシマカは、卵のステージで越冬し、春に孵化幼虫が出現する。熱帯地方では、デングウイルスはネッタシマカ、ヒトスジシマカのいずれにおいても垂直伝播することが報告されているが、越冬については確認されていない。国内でのデングウイルスの越冬の可能性を探る目的で、まず、長年研究実績のあり、大型なため蛋白質の解析に向いているオオクロヤブカを用いてデングウイルスの垂直伝播を検討した。その結果、デングウイルス 2 型はオオクロヤブカ体内で増殖することが明らかになった。さらに、第 2 世代 (F2) のオオクロヤブカは、雌雄ともにデングウイルスに感染していることが確認されたが、雄より雌に多くウイルスが検出された。

今後、さらにオオクロヤブカにおけるデングウイルス伝播機構について解析し、ヒトスジシマカにおけるデングウイルス垂直伝播機構についても検討する予定である。

A. 研究目的

デングウイルスは、フラビウイルス科に属する RNA ウイルスである。世界中で年

間数千万人から 1 億人がデング熱、数十万人がデング出血熱を発症している。デング熱は、急性熱性疾患であるが、デング出血

熱は発症すると全身血管からの血漿漏出，補体系の異常活性化，血小板減少に伴う出血傾向，粘膜からの出血，藩種性血管内凝固症候群などをきたし，重篤な致死的経過をとる．国内の輸入症例中，毎年 2 ないし 3 例はデング出血熱の報告がある．我が国におけるデング熱輸入症例は年々増加し，2010 年には 220 症例を超え，2013 年は合計で 249 例が記録された．感染症法施行後最高の症例数を年々更新している状況にある．地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり，世界中で流行域の拡大が最も危惧される感染症である．

2013 年 9 月には，日本各地を旅行したドイツ人が成田空港からの直行便で帰国後にデング熱を発症した．当該患者は日本国内のブドウ畑で多数の蚊に刺されたことを記憶していたことから，国内感染が強く疑われた事例であった．デング熱はすでに日本国内に侵入している可能性が強く示唆された．2014 年夏から秋にかけて国内のヒトスジシマカによる 160 名を超える患者症例が，約 70 年ぶりに認められた．そこで本研究では，国内に広く分布する蚊のデングウイルス垂直伝播について評価した．

## B. 研究方法

オオクロヤブカ 406 系統は，戦後神奈川県相模原市で捕集された集団を実験室内で長年維持した系統である．

デングウイルス 1 型 (DENV1) は，タイバンコク市からの帰国者の血清から分離された株 (D1 11-120)，デングウイルス 2 型 (DENV2) は，インドネシア・バリ島からの帰国者血清から分離された株 (D2 11-122/1) であり，いずれもウイルス 1 部

から分与された分離株である．

ウイルス感染実験は， $10^8$  コピー/ml のウイルス株を人工膜吸血法により経口的に蚊に摂取させ，その後，感染蚊を 28°C のインキュベーター内で飼育した．その後，産卵させ幼虫，蛹とし，羽化させて成虫 (F1) を得ることが出来た．その後，人工膜吸血法によって吸血させ，産卵，羽化成虫 (F2) を得ることが出来た．デングウイルスの定量は，プラークアッセイ法で行った．

## C. 研究結果

オオクロヤブカに DENV1 を経口感染させたところ，体内で増殖することが確認された (data not shown)．そこで，第 1 および第 2 世代の雌雄成虫からデングウイルスを検出し，ウイルス力価をプラークアッセイ法によって測定した (図 1, 2)．

図 1 に示すように，デングウイルス感染後の第 2 世代 (F2) の雄成虫 5 頭のうち 2 頭から 3,000 PFU/mosquito 以上のウイルス量が検出された．一方，図 2 に示すように，デングウイルス感染後の第 2 世代 (F2) の 5 頭の雌成虫の全てから 50,000 PFU/mosquito 以上のウイルス量が検出された．

以上の結果から，オオクロヤブカはデングウイルス 1 型、2 型のいずれもその体内で増殖させることが明らかになり，さらにデングウイルス感染後第 2 世代では，雌は雄よりも高いウイルス量を保持していることが示唆された．

## D. 考察

オオクロヤブカ 406 系統は，長年，当研究部で系統維持され，大型であることから，

蛋白解析に用いられたり、これまでに多くの生理生化学的な解析の蓄積がある。このような特徴から、本種はデングウイルスの垂直伝播を生理生化学的に解析する上で、非常に有用な材料であると考えられている。

本研究で、オオクロヤブカにおいて DENV が垂直伝播することが確認され、DENV の垂直伝播のメカニズムを解明する上で有用な昆虫モデルとなる可能性が示唆された。今後は、オオクロヤブカを用いた DENV の垂直伝播評価系の確立を目指すとともに、ヒトスジシマカにおける DENV の垂直伝播および越冬の可能性の追求に役立つことを期待している。

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### E. 結論

デング熱の国内感染が毎年発生することが予想される中、ウイルスの垂直伝播を明らかにすることでデング熱の毎年の発生リスクの評価が可能になり、将来的には流行予測に貢献することが期待できる。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

1. 論文発表
  1. Sasaki T, Higa Y, Bertuso AG, Isawa H, Takasaki T, Minakawa N, and Sawabe K. Susceptibility of indigenous and transplanted mosquito spp. in Japan to dengue virus. **Jpn. J. Infect. Dis.** *in press.*
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

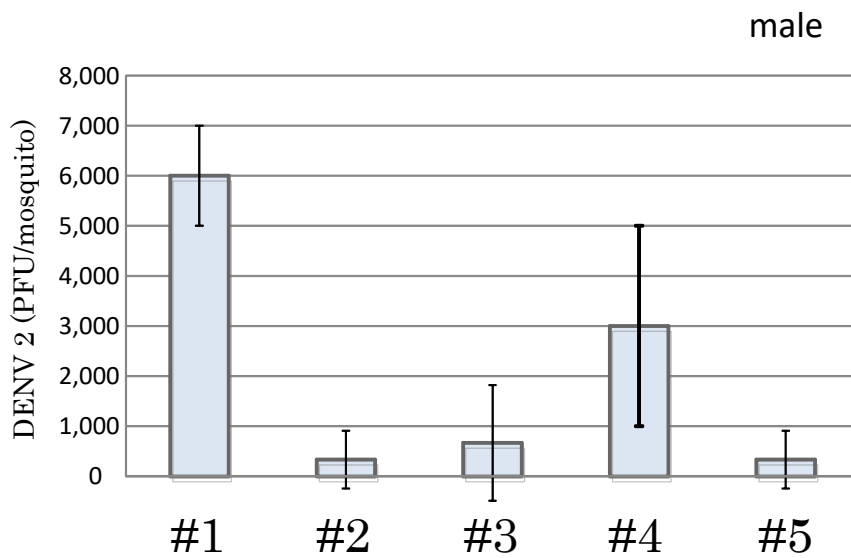


図 1. デングウイルス 2 型感染後第 2 世代オオクロヤブカ (F2) の雄成虫におけるデングウイルス 2 型の検出

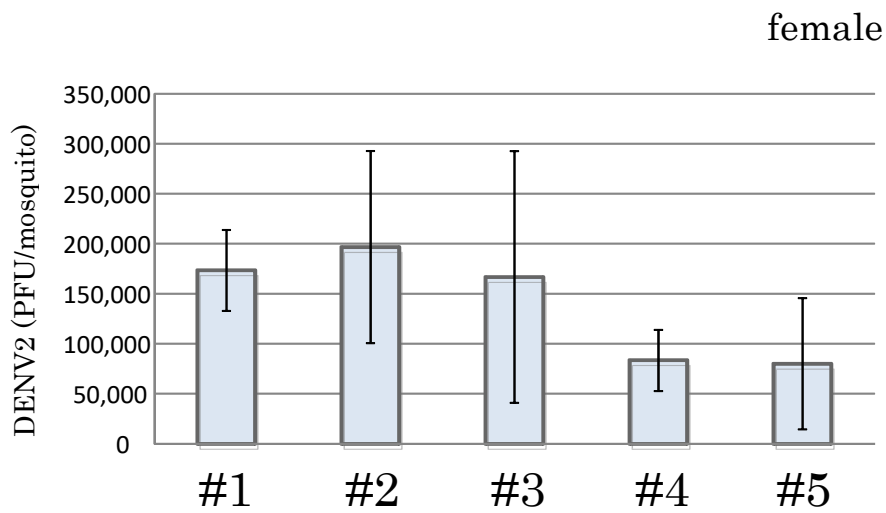


図 2. デングウイルス 2 型感染後第 2 世代オオクロヤブカ (F2) の雌成虫におけるデングウイルス 2 型の検出