

第 40 回日本脳炎ウイルス生態学研究会プログラム

第 1 日 2005 年 5 月 26 日 (木)

受付……………12:00~13:00

開会挨拶・オリエンテーション……………13:00~13:10

一般講演

第 1 群 13:10~14:10

座長：津田良夫

1. 本邦生息蚊類が保有するウイルスの検出およびその性状解析
星野啓太¹、伊澤晴彦¹、佐々木年則¹、津田良夫¹、比嘉由紀子¹、高崎智彦²、
小滝徹²、小林睦生¹、矢野和彦¹、澤邊京子¹
(¹国立感染症研究所・昆虫医科学部、²国立感染症研究所・ウイルス第 1 部)
2. 日本産ウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血嗜好性とアカイエカ種群の分子分類
澤邊京子・伊澤晴彦・比嘉由紀子・葛西真治・星野啓太・佐々木年則・津田良夫・
小林睦生(国立感染研・昆虫医科学)
3. ウエストナイルウイルスに対するイナトミシオカの感受性
江下優樹¹、上田泰史²、水田英生³、多森直樹¹、東原絢子¹、安西三郎¹、
Hamady Dieng¹、高崎智彦⁴、内田幸憲⁵、高島郁夫⁶、倉根一郎⁴
(¹大分大学医学部感染分子病態制御、²大阪検疫所、³福岡検疫所、⁴国立感染症研究
所ウイルス第 1 部、⁵神戸検疫所、⁶北海道大学大学院獣医学研究科公衆衛生学)

第 2 群 14:10~15:10

座長：澤邊京子

4. 大阪府におけるウエストナイルウイルスに関する蚊のサーベイランス調査
青山幾子、弓指孝博、高橋和郎、大竹徹、奥野良信
(大阪府立公衆衛生研究所感染症部)
5. 都市域における冬季の蚊幼虫・成虫調査
吉田政弘¹、山下敏夫¹、小林睦生²
(¹いきもの研究社、²国立感染症研究所昆虫医科学部)
6. 日本脳炎媒介蚊研究者からのウエストナイル熱対策に対する提言
前田 理¹、高橋光雄²
(¹元京都市衛生研究所、²元国立予防衛生研究所)

休憩 15:10～15:20

第3群 15:20～16:05

座長：桑山 勝

7. 倉橋島におけるウイルス関連血球貪食症候群 (virus associated hemophagocytic syndrome: VAHS)症例における日本脳炎抗体

高崎智彦¹、根路銘令子¹、桑山 勝²、内田陽三³、西浦哲雄³、松田俊二³§、倉根一郎¹ (¹国立感染症研究所ウイルス第一部、²広島県保健環境センター、³国立病院機構呉医療センター § 現国立病院機構松山医療センター)

8. 中国地方のイノシシにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の検討

高崎智彦¹、林 昌宏¹、濱野正敬¹、沢辺京子²、岸 昇³、桑山勝⁴、倉根一郎¹
(¹国立感染症研究所 ウイルス第一部 ²国立感染症研究所昆虫医科学部
³広島県 ⁴広島県保健環境センター)

9. 広島県倉橋島の日本脳炎媒介蚊調査

津田良夫¹、澤辺京子¹、比嘉由紀子¹、星野啓太¹、伊澤晴彦¹、佐々木年則¹、小林睦生¹、桑山勝²
(¹国立感染症研究所昆虫医科学部、²広島県保健環境センター)

第4群 16:05～16:45

座長：田島 茂

10. 最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる 3'-非翻訳領域の欠失が誘導する培養細胞でのウイルス増殖抑制

石川 知弘¹、Peter W. Mason²、田島 茂³、根路銘 令子³、高崎 智彦³、倉根 一郎³、小西 英二¹ (¹神戸大学医学部医療基礎、²テキサス大学医学部シアリーワクチン開発センター、³国立感染症研究所ウイルス第1部)

11. マウスにおける RNAi による JEV 感染増殖抑制効果

村上 学¹、奴久妻聡一²、太田隆英¹、竹上 勉¹
(¹金沢医大・総医研・分子腫瘍学研究部門、²神戸市環境保健研究所)

特別講演 16:45～17:45

座長 倉根一郎

「Current Status of Japanese Encephalitis in Korea」

Haewol Cho, Ph.D.

Director General, National Institute of Health, Ministry of Health and Welfare,
Seoul, Korea

第2日 2005年5月27日(金)

第5群 9:00~10:00

座長：高橋和郎

12. フラビウイルス prM 蛋白のアミノ酸配列保存領域のウイルス粒子出芽への影響

好井 健太郎¹、後藤 明子¹、仁尾 純子²、小原 真弓¹、川上 和江¹、
苅和 宏明¹、高島 郁夫¹

(北海道大学大学院獣医学研究科¹公衆衛生学教室、²解剖学教室)

13. 抗体依存性感染増強及び/または中和活性を示すマウス抗 Dengue 2 型ウイルスモノクローナル抗体の解析

山中 敦史、小西 英二(神戸大学・医学部・医療基礎学)

14. ウエストナイルウイルスのリバースジェネティクス法の確立

前田秋彦¹、前田潤子¹、高木弘隆²、倉根一郎³、堀内基広¹

(¹北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座、²国立感染症研究所
バイオセーフティー管理室、³同ウイルス第1部)

休憩 10:00~10:10

第6群 10:10~11:10

座長 小宮智義

15. 西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み

Afjal Hossain Khan¹、福家功²、石川豊数²、井上真吾¹、森田公一¹

(¹長崎大学熱帯医学研究所分子構造解析分野、²(財)阪大微生物病研究会観音寺研究所)

16. 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける致死性ウエストナイルウイルスからの交差防御

前田 健¹、Francis A. Ennis²、Sharone Green²

(¹山口大学農学部家畜微生物学教室、²マサチューセッツ州立大学医学部 CIDVR)

17. フラビウイルス DNA ワクチン及びタンパクワクチンの混合投与：Dengueウイルスと日本脳炎ウイルスのマウスにおける交差免疫原性

井本 淳一、小西 英二 (神戸大学医学部医療基礎)

総合討論 11:10~11:45 座長 森田公一、竹上 勉

閉会の挨拶 大谷 明

事務局より

特別講演

Current Status of Japanese Encephalitis in Korea

Hae Wol Cho, Ph.D.

Director-General, Korea National Institute of Health

曹海越 博士

韓国・国立保健研究院 院長

The epidemiology of Japanese encephalitis (JE) in the Republic of Korea has been changed over past 20 years from 1980 to 2004. A number of recent JE cases decreased dramatically and the different aspects of JE case have been observed: In general, the disease mainly affected children aged 4 to 7 years in the past, but over recent 20 years, age distribution has shifted to over 20 years of age.

The geographical distribution of JE cases in its high epidemic covered the southwestern part of the Korean peninsular, or Cholla province, but it has moved to the southeastern part of Korea, or Kyungsang province. We observed a correlation between the vector mosquitoes population and JE incidence in the seasonal distribution.

In epidemic of JE in Korea over last 10 years, less than 10 cases were reported. The annual disease cases dropped under 5 since 1983. There are many factors to explain this fact. Vaccination has been applied to the group (age of 3-14) since 1971. Presumably, vaccination of JE-susceptible people is an effective and practical way to control JE in Korea.

本邦生息蚊類が保有するウイルスの検出およびその性状解析

星野啓太¹、伊澤晴彦¹、佐々木年則¹、津田良夫¹、比嘉由紀子¹、高崎智彦²、小滝徹²、
小林睦生¹、矢野和彦¹、澤邊京子¹

(¹国立感染症研究所・昆虫医科学部、²国立感染症研究所・ウイルス第1部)

Detection and characterization of viruses from the field-collected mosquitoes in Japan

Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Tsuda, Y., Higa, Y., Takasaki, T., Kotaki, T., Kobayashi,
M., Yano, K., Sawabe, K.

(¹Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases,

²Department of Virology, National Institute of Infectious Diseases)

ウエストナイル(WN)ウイルスのわが国への侵入の監視および蚊媒介性アルボウイルスの野外分布の把握を目的として、野外捕集蚊からのアルボウイルスの検出と分離を行った。2004年に国内9地域で捕集された蚊成虫40種11,960個体を747プールに分けて供試した。蚊プールはヒトスジシマカ由来細胞系C6/36ならびに哺乳動物由来細胞系VeroおよびBHKへの接種により細胞変性効果(CPE)を観察、次いでこの培養上清からRT-PCRにより各種アルボウイルス(alphavirus、bunyavirus、flavivirus)遺伝子およびTaqManRT-PCRによりWNウイルス、日本脳炎ウイルス遺伝子の検出を試みた。今回および昨年(20種7,485個体348プール)の結果から、本邦野外捕集蚊におけるウイルス保有状況がほぼ全国的に把握できた。また、ウイルス検出過程で発見したフラビウイルスの性状解析についても併せて報告する。

日本産ウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血嗜好性とアカイエカ種群の分子分類

澤邊京子・伊澤晴彦・比嘉由紀子・葛西真治・星野啓太・佐々木年則・津田良夫・
小林睦生（国立感染研・昆虫医科学）

Blood source animals of Japanese mosquitoes susceptible to West Nile virus, and molecular
identification for *Culex pipiens* group.

Sawabe, K., Isawa, H., Higa, Y., Kasai, S., Hoshino, K., Sasaki, T., Tsuda, Y., Kobayashi, M.
(Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases)

米国におけるウエストナイル(WN)熱の流行は年々西へと進行し、2004年には3州を残し全土に広まった。米国においてWNウイルスが検出された蚊種は11属60種にも上るが、実験的にウイルス感受性が高いことが確認された種の中の5種類(アカイエカ種群トビロイエカ、ネッタイエカ、ヒトスジシマカ、キンイロヤブカ、ヤマトヤブカ)が日本にも生息している。WNウイルスは、通常、蚊と野鳥の間を行き来しその生活環が成り立っている。わが国のある地域にWNウイルスが侵入した場合、周辺に分布する蚊の中で、野鳥も人も吸血する種類の蚊がWNウイルスを人へ橋渡しをする「ブリッジベクター」として重要になってくる。わが国には約110種類の蚊が生息しているが、WNウイルス媒介者として注意すべき蚊は、都市部に限ると3~4種類ほどとされているが、アカイエカやヒトスジシマカに代表される都市に生息する蚊がどのような動物から吸血しているのかさえほとんど調べられていない。そこで本研究では、わが国においてヒトへのWNウイルス媒介蚊になり得る種を吸血嗜好性から評価しようとするものである。

我が国でアカイエカと呼ばれる蚊にはチカイエカも含まれ、両種は形態的特徴では分類が困難であることから種群(アカイエカ種群)を形成している。両種は形態学的に鑑別困難ではあるが、しかし、その生理的・生態的な特徴は大きく異なり、例えば、吸血産卵性と無吸血産卵性、休眠性の有無、活動場所の違い(地上部あるいは地下域)、広所交尾性と狭所交尾性、吸血嗜好性に見られる鳥類嗜好性とほ乳類嗜好性などの相違が知られている。我々はこれまでの結果では両種をまとめ、アカイエカ類はほ乳類よりも鳥類を好む傾向にあると結論してきたが、両種を分けて評価すべきであると考えたことから、アセチルコリンエステラーゼ(ACE)遺伝子とrDNA ITS1領域の配列を基にアカイエカ種群に対する分子分類法を開発し、アカイエカとチカイエカ、ならびに奄美、琉球列島以南に分布するネッタイエカも含めて、各種毎に吸血嗜好性を考察した。

これまでの結果から、わが国でWNウイルス媒介種としてもっとも注意すべきアカイエカ種群の蚊は3種類とも鳥類もほ乳類も吸血する米国タイプのアカイエカであったが、ヒト嗜好性はチカイエカの方が高いことが示された。地下域にのみ生息すると考えられていたチカイエカの多くが地上部で吸血活動を行っていたことは予想外の結果であった。また、キンイロヤブカおよびコガタアカイエカのほとんどがウシ、ブタを吸血し、鳥類は全く吸血していなかったことから、WNウイルスの媒介者としての評価は非常に低いと考えられる。以上の結果から、アカイエカ種群、ヒトスジシマカがわが国におけるWNウイルス媒介種として重要であることが示唆された。

ウエストナイルウイルスに対するイナトミシオカ感受性

江下優樹¹、上田泰史²、水田英生³、多森直樹¹、東原絢子¹、安西三郎¹、Hamady Dieng¹、高崎智彦⁴、内田幸憲⁵、高島郁夫⁶、倉根一郎⁴

(1 大分大学医学部感染分子病態制御、2 大阪検疫所、3 福岡検疫所、4 国立感染症研究所ウイルス第1部、5 神戸検疫所、6 北海道大学大学院獣医学研究科公衆衛生学)

Susceptibility of *Culex modestus inatomii* to West Nile virus

Yuki Eshita¹, Yasufumi Ueda², Hideo Mizuta³, Naoki Tamori¹, Junko Higashihara¹, Saburo Anzai¹, Hamady Dieng¹, Tomohiko Takasaki⁴, Yukinori Uchida⁵, Ikuo Takashima⁶, and Ichiro Kurane⁴

(1 Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, Oita University, 2 Osaka Quarantine office, 3 Fukuoka Quarantine office, 4 Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 5 Kobe Quarantine office, 6 Laboratory of Public Health, Department of Environment Veterinary Science, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

ウエストナイル熱の侵入が危惧されていることから、わが国に生息する蚊類のウエストナイルウイルス(WNV)媒介能を検討している。今回は大阪港湾区域で採集したイナトミシオカ *Culex modestus inatomii* の WNV 感受性を検討した。試験に用いた WNV は、米国の蚊から分離された WNV ニューヨーク株である。本ウイルスを雌成虫胸部に接種後、28 で 10 日間飼育した。その後、生存蚊から個別に総 RNA を抽出して、WNV ゲノムの増幅が認められるかどうかを RT-PCR 法で検討した。さらに、経口感染蚊についても同様な飼育条件で検討した。その結果、胸部接種の蚊では、供試個体全てからウイルスゲノムが検出された。また、経口感染蚊では、少数例ではあるが吸液量の大小に関わらず全て陽性であった。ウイルス感染血液をほぼ満腹に吸液した蚊では、蚊の頭部、胸部、腹部に強い RT-PCR 増幅が認められた。それに対して、少量を吸液した蚊では頭部、胸部に強い RT-PCR 増幅が認められたが、腹部の感染はいずれも陰性であった。これらのことから、吸液量の大小は、蚊の初期感染部位が異なるように思われた。供試個体数を増やしての検討が必要と思われるが A 蚊の中腸に到達しない程度のウイルスであっても、蚊胸部組織の細胞で初期感染・増殖して唾液線がウイルスで汚染される可能性があるように推測される。また、ナイジェリア株を用いた日本産の別種蚊の経口感染実験では、今回の実験のように経口感染率が高くはなかったことから、日本産蚊は WNV ニューヨーク株に対してより高い感受性を持っていることが推察される。今後、ニューヨーク株を用いた本邦産感受性蚊の再検討が必要と思われる。

大阪府におけるウエストナイルウイルスに対する蚊のサーベイランス調査

青山幾子、弓指孝博、高橋和郎、大竹徹、奥野良信
(大阪府立公衆衛生研究所感染症部)

Surveillance of West Nile virus in mosquitoes in Osaka Prefecture.

Ikuko Aoyama, Takahiro Yumisashi, Kazuo Takahashi,
Toru Otake, and Yoshinobu Okuno
(Department of Infectious Disease, Osaka Prefectural Institute of Public Health)

【目的】 米国でのウエストナイルウイルス(WNV)感染症の拡大を背景に、大阪府では危機管理の一環として、WNV の侵入を監視するため、2003 年度より府内にて蚊のサーベイランス調査を実施した。

【方法】 2003 年度の調査は府内の住宅地 12 地点において 7 月から 10 月までの 18 回、また関西国際空港対岸部および伊丹空港周辺を重点的に公共機関の敷地 17 地点において 8 月末から 10 月初めに 2 グループに分けて毎週交互に計 8 回蚊の捕集を実施し、2004 年度の調査は同様に公共機関の敷地 17 箇所にて 6 月から 9 月まで隔週に計 7 回調査を実施した。蚊の捕集は CDC ミニライトトラップを使用し、ドライアイスを用いて行った。トラップは原則として火曜日夕刻から水曜日にかけて約 17 時間設置した。捕集した蚊は種と雌雄を同定後、ウエストナイル熱媒介蚊対策に関するガイドラインに準じ、雌について地点ごと、種類ごとに 50 匹までを 1 プールとして凍結粉碎ミル(SK ミル TKN 8K-100 Tokken, Inc)を用いて蚊乳剤を作成した。WNV の保有については RT-PCR 法により遺伝子検査を行った。RNA の抽出は ULTRASPEC RNA (BIOTECX)を用い、RT-PCR はフラビウイルス共通の NS3 領域をターゲットにしたプライマーと WNV の Env 領域特異的プライマーを用いて実施した。

【結果】 捕集された蚊(雌)はアカイエカ(チカイエカを含む)、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ、シナハマダラカ、トウゴウヤブカ、オオクロヤブカ、ヤマトヤブカ、カラツイエカの 8 種 6777 匹であった。また、2003 年度の住宅地で行った調査では、大阪北部や大阪南部では蚊が 6~7 種類捕集されたのに対し、大阪市内では 2~4 種類となった。またこのときの住宅地での捕集蚊を合計するとアカイエカの割合が 74%、ヒトスジシマカは 15%と、アカイエカが多く見られたのに対し、2003 年度の公共機関の敷地ではアカイエカとヒトスジシマカの割合が 52%と 45%とほぼ同じであり、地点による違いがみられた。また平均気温が低下してくると、蚊の捕集数も減少することが示唆された。今回の 2 年間におよぶ調査では、全ての検体で WNV 遺伝子は検出されなかった。

【考察】 捕集された蚊はほとんどが WNV 媒介蚊として注意すべき種類にあげられているものであった。また、海岸や山間では調査していないため、その場合に捕集される蚊の種類や割合とは異なると思われるが、人の居住地域においても捕集される蚊の構成に地域差が見られることが明らかになった。さらに、今回、捕集地点に分布する主要な蚊はアカイエカとヒトスジシマカおよび少数のコガタアカイエカであり、今後の WNV に関する媒介蚊対策の対象としてこの 3 種が重要になると考えられた。今後も早期に WNV 保有蚊を検出すべく調査は継続予定である。

都市域における冬季の蚊幼虫・成虫調査

吉田 政弘¹、山下 敏夫¹、小林 睦生²
(¹いきもの研究社、²国立感染症研究所昆虫医科学部)

Examination of mosquito larvae and adult in winter season

Masahiro Yoshida¹, Tosio Yamasita¹, Mutuo Kobayashi²

(¹Laboratory of Bio-research, ²Department of Medical Entomology National Institute of Infectious Diseases)

2003年～2005年にかけて冬季における蚊幼虫および成虫調査を実施した。幼虫調査は、公共雨水枡および駐車場などに多い古タイヤを対象として調査した。成虫については、主として農業用水路の暗渠を対象とした。雨水枡での幼虫調査については2004年1月～2月にかけて大阪府内14市町、三重県1市の合計986雨水枡、2005年には主として前年に調査した239の雨水枡で、また半径500m内に存在する全ての古タイヤを対象として1月～3月にかけて幼虫調査した。成虫調査は、2005年2月に兵庫県西宮市12箇所、大阪府八尾市1箇所、東大阪市2箇所、三重県名張市4箇所の合計19箇所の用水路暗渠で目視採集を試みた。その結果、雨水枡ではアカイエカ群、ヤマトクシヒゲカ、トウゴウヤブカおよびヤマトヤブカの4種類の幼虫が採集された。古タイヤではヒトスジシマカ、トウゴウヤブカの2種類の幼虫が採集された。用水路暗渠ないでの成虫採集の結果は、東大阪市を除く他の暗渠でアカイエカ群の雌82個体、雄3個体、コガタアカイエカ雌11個体およびハマダラウスカ雌1個体を採集した。

日本脳炎媒介蚊研究者からのウエストナイル熱対策に対する提言

前田 理¹ 高橋三雄²(¹元京都市衛生研究所 ²元国立予防衛生研究所)

A proposal for West Nile fever project from entomologists of Japanese encephalitis vector

Osamu Maeda¹ and Mitsuo Takahashi²(¹Kyoto City Institute of Public Health * , ²National Institute of Health * , * Former position)

日本脳炎の疫学研究は流行の激しかった 1963 年頃から始まり、その後宮城、京都、福岡、長崎などの昆虫研究者が加わり、本研究会で活発な議論を重ねてきた。その後 1968 年以降、流行が急速に終息し、その当時研究に参加した人たちもほとんどが現役を去り、新たに起こりうるウエストナイル熱に対する脅威に貢献できない状況下にある。今振り返ってみて、今ならこのようにするなど、やり残したこと、問題点が多くあり、ここにこれを整理してウエストナイル熱の研究者に対する参考としたい。

日本脳炎終息の原因は媒介蚊であるコガタアカイエカの減少による。しかし豚集団からの吸血蚊感染率の減少、すなわち豚での viremia の平均力価の低下が保毒蚊の生産に関連していることは間違いない。しかしコガタアカイエカ減少の原因となると、諸説紛々である。農薬使用慣行の変化による天敵の減少、稲作耕種様式の変化、特に田植え時期の早くなったことの影響、中干しの影響、除草剤の使用など研究者により意見の分かれるところであるが、日本全体でほぼ同時に急激な減少が見られ、その原因は少数因子によるもので、多因子による複合的影響によるものではないと考えたい。何れにする研究開始当初における水田でのコガタ幼虫の生息状況に対する基礎的データの欠如が減少原因の探求に影響していることは間違いない。

日本脳炎ウィルスの越冬源については、大量の越冬コガタアカイエカの採取とそれからのウィルス検出ですべて陰性であったことから、ウィルスの外国飛來說まで飛び出した。しかし越冬する個体は本来吸血せずに越冬するのであって、越冬コガタアカイエカからのウィルス不検出には合理性がある。日本脳炎流行予測事業による屠場豚での HI 検査の結果から、毎年南から北への豚での日本脳炎の流行速度は日当たり 10km と速く、そのことは毎年の流行ウィルスは外来ではなく、ウィルス土着を伺わせる。三重医大塩見教授が調べられた冬期にウィルスが豚のリンパ球で残留していると言う事実は、豚での越冬の可能性をも残している。またサギ類では一過性の viremia がみられ、鳥類のこのような性質は鳥類がウィルス越冬源となりうることを示唆する。

ウエストナイル熱の日本への侵入経路として鳥による北ルートがあげられている。しかし北米と日本の鳥の共通種はほとんどなく、アラスカで日本からの鳥が感染したとしても日本への飛来は 10 月以後で、日本での鳥 蚊 鳥の感染による定着の可能性は少ない。むしろ航空機による直接蚊の持ち込みの可能性が高く、空港周辺での監視が重要である。各種蚊のウエストナイルウィルスに対する感受性はすでに実験済みと思うが、各種蚊の鳥類に対する吸血趣向性の調査、特に鳥のねぐらでの吸血蚊採取方法の確立は重要であろう。ウエストナイルウィルスの日本への侵入、定着の予測は鳥類の大量死からのウィルスの検出で可能であろう。また日本へ侵入した場合の流行の規模は、媒介蚊が何か、不顕性感染の程度によって異なるが、現在の日本での蚊の量から考えて昭和 40 年前後の日本脳炎大流

行となることは考えにくい。

1. 日本脳炎の終息の原因

A. 媒介蚊の減少 1967年を境に急激に減少した。1965年当時から比べて1/100~1/1000に減少、日本脳炎の減少に深く関係していることに間違いない。

B. 豚集団からの吸血蚊感染率の低下、豚での viremia の平均力価の減少。

C. 日本脳炎ウイルスの弱毒化

D. 豚飼育形態の大型化

E. 住宅での蚊進入防壁設備の普及

設備

2. 蚊の減少原因 いろいろの説がある。

A. 農薬使用慣行の変化による天敵の減少

B. 稲作耕種様式の変化

a. 田植え時期の早くなったこと

b. 中干しの影響

C. 水田における植生の変化、アオミドロ、浮き草の減少

3. 日本脳炎ウイルスの越冬源

A. コガタアカイエカ 大量のコガタの採取とウイルス分離で陰性
栄養生殖分離 越冬蚊は吸血しない。

B. その他の蚊 アカイエカ、ヒトスジシマカなど コガタに比べると感受性が低い。

C. トカゲなど冷血動物

D. トンボなど捕蚊昆虫 春の豚への感染につながらない

E. 水生生物、

F. 豚 冬期にウイルスが豚のリンパ球で残留している。越冬源になりうる。

G. 外国飛來說、コガタアカイエカ

H. 鳥 サギで一過性の viremia が見られた。可能性あり。

4. ウエストナイル熱対策に対する提言

A. キャリアとしての鳥類について 鳥類がキャリアになりうるか。

北米と日本での共通種 ほとんど無い

アラスカで蚊からの感染が起こりうるか。鳥 蚊 鳥の感染は起こりうる。

日本での鳥 蚊 鳥の感染の可能性 北からの鳥の飛来が10月以後で可能性は少ない。

日本でのウエストナイルウイルス侵入における鳥の役割 可能性は低い

侵入の可能性 航空機による蚊の持ち込み、鳥への感染 空港周辺での監視が重要

B. 媒介蚊について

各種蚊のウエストナイルウイルスに対する感受性 実験的に可能

各種蚊の鳥類に対する吸血趣向性 鳥のねぐらでの吸血蚊採取

C. 流行の予察 鳥類の大量死からのウイルスの検出で可能 有効

D. ウエストナイル熱の日本での定着の可能性

E. 流行の予測 媒介蚊が何かで流行の規模は異なるであろうが、現在の日本での蚊の量から考えて昭和40年前後の日本脳炎大流行の規模は考えにくい。

F. 日本脳炎ワクチンの有効性 阪大、長大で試作が進んでいる。

ウイルス関連血球貪食症候群 (VAHS) 4 症例における日本脳炎抗体

高崎智彦¹、根路銘令子¹、桑山 勝²、内田陽三³、西浦哲雄³、松田俊二³ §、倉根一郎¹

¹ 国立感染症研究所ウイルス第一部

² 広島県保健環境センター

³ 国立病院機構呉医療センター § 現国立病院機構愛媛病院

JEV antibodies in four patients diagnosed as virus associated hemophagocytic syndrome (VAHS) who lived in Kurahashi islands.

Tomohiko Takasaki¹、Reiko Nerome¹、Masaru Kuwayama²、Youzo Uchida³、
Tetsuo Nishiura³、Shunji Matsuda³ §、Ichiro Kurane¹

¹ National Institute of Infectious Diseases

² Hiroshima Prefectural Institute of Health and Environment

³ National Hospital Organization Kure Medical Center

§ National Hospital Organization Ehime National Hospital (Present address)

広島県安芸郡倉橋町 (倉橋島) 2004 年 4 月に 1 例、5 月に 3 例の発熱、意識障害、汎血球減少を呈した患者が、音戸大橋と早瀬大橋によってつながっている呉市の国立病院機構呉医療センターに相次いで入院した。いずれも著明な白血球減少を示す汎血球減少であったため、血液内科に入院となった。患者は骨髓検査の結果からウイルス関連血球貪食症候群 (VAHS) と診断されたが、本症候群の主要な病因とされているウイルスに関する検査結果は陰性であった。発熱 (38 ~ 39) および意識障害をともなったこともあり、日本脳炎ウイルスの検査が広島県保健環境センターに依頼された (2002 年に 3 例の日本脳炎患者が発生した広島県では日本脳炎に対する関心が高いことをうかがわせた)。患者の年齢は、60 歳代 2 名、70 歳代 2 名と高齢であった。

検査の結果、2 例で日本脳炎 HI 抗体、中和抗体が上昇した。また、1 例では上昇はないが高い中和抗体価を示した。4 例中 3 例で γ -グロブリン製剤を入院中に使用したという治療歴があったが、抗体上昇を認めた 1 例では使用されていなかった。また、中和抗体の上昇したもう 1 例でも、抗体上昇を確認した 2 回目の採血以降に投与されていた。確認のため 4 名の患者の 10 月の再来時に採血された血清の中和抗体を測定したところ、2 回目の血清の中和抗体価と比較して有意な低下を示さなかった。このことから、本症例の日本脳炎抗体価の有意な上昇が、 γ -グロブリン製剤投与等の受動的な抗体上昇ではないことが示唆された。

これらの 4 症例のうち、少なくとも 2 症例が日本脳炎ウイルスに感染したことが強く示唆された。感染時期が 4 月から 5 月にかけてであったことは、時期的には早いと考えられるが、昭和 22 年の岡山県の日本脳炎流行で 4 月に日本脳炎患者が発生していることを北岡らが報告していることから、発症の時期的なことから日本脳炎を除外されるものではない。

今回の症例は、いまだに明らかにされていない日本脳炎ウイルスの越冬の謎を解明する必要性を日本脳炎研究者に投げかけたものと考えられる。

中国地方のイノシシにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の検討

高崎智彦¹、林 昌宏¹、沢辺京子²、岸 昇³、桑山勝⁴、倉根一郎¹

¹ 国立感染症研究所 ウイルス第一部

² 国立感染症研究所 昆虫医科学部

³ 広島県立畜産技術センター

⁴ 広島県保健環境センター

Sero-prevalance of Boar in Chugku District for Japanese encephalitis

Tomohiko Takasaki¹, Chang Kweng Lim¹, Kyoko Sawabe², Masaru Kuwayama³,
Noboru Kishi⁴, Ichiro Kurane¹

¹National Institute of Infectious Diseases, Virology I

²National Institute of Infectious Diseases, Medical Entomology

³Hiroshima Prefectural Livestock technological research center

⁴ Hiroshima Prefectural Institute of Health and Environment

【目的】近年、中国地方では野生のイノシシが民家近くに出現し、畑を荒らす等の事例が多く、有害鳥獣として、駆除の対象となっている。したがって、イノシシがコガタアカイエカに吸血される機会が増えている可能性がある。そこで我々は中国地方のイノシシに関して、日本脳炎ウイルスに対する血清抗体保有状況を調査した。

【方法】広島県、島根県の狩猟期間（11月から2月）に捕獲したイノシシの血液（血清）を日本脳炎ウイルス IgG ELISA、IgM 捕捉 ELISA で抗体をスクリーニングし、IgG 抗体陽性の一部検体の中和抗体価を測定し確認した。IgG ELISA は、日本脳炎ウイルス不活化抗原を 96 穴プレートにコーティングし、2 次抗体は抗ブタ POD 標識抗体を用いた。イノシシに関して、日本脳炎抗体陰性血清、陽性血清が不明であるため、IgG 抗体陽性ブタ血清の 640 倍希釈レベルを便宜上、Cut off レベルとして判定した。IgM 抗体に関しても同様の方法により判定した。用いたイノシシの検体数は、広島県 41 頭、島根県 40 頭であった。

【結果】広島県のイノシシ血清 41 頭のうち、IgM 抗体陽性であったものは 1 頭のみであった。一方 IgG 抗体は、強陽性（Index;1.5 以上）は 2 2 頭、弱陽性（Indx:1.1 以上 1.5 未満）は 4 頭であった。島根県のイノシシでは、IgG 抗体強陽性 4 頭であった。IgG 抗体が陽性であった 3 血清に関して、プラーク減少法による中和試験を実施した確認したところ、中和抗体陽性であった。

【考察】2002 年に広島県で発生した日本脳炎の 1 症例（広島市内）は、居住地区周辺に水田はあるが、ブタ農場からは 10 数キロ離れていた。しかし、近隣の畑にはイノシシよけの柵が存在するような状況であった。イノシシの約 3 割が日本脳炎ウイルス抗体価を保有していたことから、民家周辺に出現するようになった野生のイノシシが、日本脳炎ウイルスの増幅動物となっている可能性を考慮する必要があると考えられる。

広島県倉橋島の日本脳炎媒介蚊調査

津田良夫¹、澤辺京子¹、比嘉由紀子¹、星野啓太¹、伊澤晴彦¹、
佐々木年則¹、小林睦生¹、桑山勝²
(¹国立感染症研究所昆虫医科学部、²広島県保健環境センター)

Vector Survey of Japanese encephalitis on Kurahashijima Island, Hiroshima, Japan

Yoshio Tsuda¹, Kyoko Sawabe¹, Yukiko Higa¹, Keita Hoshino¹, Haruhiko
Isawa¹, Toshinori Sasaki¹, Mutsuo Kobayashi¹, Masaru Kuwayama²
(¹Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases,
²Hiroshima Prefectural Institute of Health and Environment)

倉橋島は広島県呉市の南に位置する東西約 12 キロ、南北約 11 キロの島で、音戸大橋と早瀬大橋によって呉市と江田島につながっている。かつては花崗岩の採石業が盛んであったが、現在はトマト、ミカン、花卉を中心とした農業と沿岸の漁業が主な産業である。人口は約 7,000 人で、大きな豚舎は 1 ヶ所のみで蚊の吸血源となる家畜は少ない。しかしながら島内にはイノシシが多数生息しており近年農作物への被害が著しい。

倉橋町では 2004 年 5 月に日本脳炎と疑われる患者が 4 名発生しており、短期間に複数の患者がまとまって発生したことから、日本脳炎媒介蚊の発生状況を調査することになった。第 1 回目の調査は 2004 年 8 月に実施し、ドライアイストラップによる成虫採集と島内の視察を行って豚舎や幼虫発生源の位置などを確認した。2004 年の調査結果を参考にして、2005 年 4 月から日本脳炎媒介蚊の定期調査を開始した。定期調査は基本的にドライアイストラップを用いた成虫採集(連続した 3 日間)によって行い、サンプルは冷凍保存して持ち帰りウイルス分離を試みた。

島の海岸線に沿って約 20 の集落が存在している。集落の背後には小さな沢がひかえておりその傾斜地を利用して階段状に畑や水田が作られている。斜面の崩壊を防ぐためには石垣が利用されている。患者の居住地、調査の簡便さ、幼虫発生源の大きさなどを考慮して、4 つの集落(宇和木、倉橋、須川、尾立)を定期調査の採集地として選んだ。各採集地に 5 台のドライアイストラップを設置した。集落を大きく 2 つに分け、集落に隣接した部分と集落背後の傾斜地にそれぞれトラップ 2~3 台を設置して、集落内部の人為的な発生源から発生する種類と竹やぶや樹洞、湿地など自然の水域から発生する種類の両方を捕獲できるようにトラップを配置した。海岸の周回道路沿いに幼虫発生源の視察を行い、発生していた幼虫及び蛹を採集して持ち帰った。

2004 年 8 月の調査では設置したドライアイストラップが少なく、また調査時期が水田の中干直後であったためかコガタアカイエカ、シロハシイエカ、ヒトスジシマカの成虫が少数採集されたのみであった。2005 年 4 月の調査では合計 250 頭の雌成虫が捕獲された。このうち 241 頭はコガタアカイエカ、ついでアカイエカ群 8 頭、シナハマダラカ 1 頭であった。幼虫調査ではヤマトヤブカ、トウゴウヤブカ、ヤマダシマカ、キンパラナガハシカ、クシヒゲカの種類が採集された。2004 年のサンプルからは日本脳炎ウイルスは検出されなかった。2005 年 4 月のサンプルは現在処理中である。

最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる 3'-非翻訳領域の欠失が誘導する 培養細胞でのウイルス増殖抑制

石川 知弘¹、Peter W. Mason²、田島 茂³、根路銘 令子³、
高崎 智彦³、倉根 一郎³、小西 英二¹

(¹神戸大学医学部医療基礎、²テキサス大学医学部シアリーワクチン開発センター、
³国立感染症研究所ウイルス第1部)

A deletion of 13-15 nucleotides in the 3'-untranslated region of Japanese encephalitis virus genome found in recent isolates induces growth-restriction in cultured cells

Tomohiro Ishikawa¹, Peter W. Mason², Shigeru Tajima³, Reiko Nerome³,
Tomohiko Takasaki³, Ichiro Kurane³, Eiji Konishi¹

(¹Department of Health Sciences, Kobe University School of Medicine,
²Sealy Center for Vaccine Development, University of Texas Medical Branch,
³Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases)

近年、日本では日本脳炎患者はほとんど発生していないが、増幅動物であるブタからは毎年ウイルスが分離されている。分離されたウイルスの一部には、3'-非翻訳領域に欠失が報告されている(竹上ら、1999年、馬ら、2003年)。この欠失によってウイルスの病原性や宿主域が変化し、その結果、患者が減少していることが想定される。本研究では、この欠失の生物学的意義について解析するため、日本脳炎ウイルス感染性クローンの3'-非翻訳領域に欠失を導入し、培養細胞におけるウイルス増殖能を比較した。

中山株の塩基配列に基いて作製した感染性クローンの3'-非翻訳領域に、石川株(竹上ら、2000年)に認められた13塩基の欠失を、また広島、千葉、三重、香川及び静岡の5ヶ所で分離されたウイルスに共通して認められた15塩基の欠失を導入した(それぞれ石川変異型、広島変異型と称す)。構築した変異型のRNAをBHK細胞及びC6/36細胞にエレクトロポレーションにより導入し、培養液中に放出されたウイルス量について野生型と比較した。石川変異型をBHK細胞に導入すると、24時間後では 4.0×10^2 FFU/mlであり野生型の 7.4×10^7 FFU/mlより極めて低値であったが、72時間後では野生型と同程度にまで上昇した。石川変異型をC6/36細胞に導入するとウイルスは検出されなかった。一方、広島変異型をBHK細胞に導入すると24時間後では 1.4×10^6 FFU/mlであり野生型の 5.0×10^7 FFU/mlよりわずかに低値であったが48時間後には野生型と同程度にまで上昇した。C6/36細胞に導入するといずれの時間についても広島変異型の方が低値であった。

これらの結果から、最近の分離株に認められる3'-非翻訳領域の欠失が培養細胞でのウイルス増殖を抑制することが示された。

マウスにおける RNAi による JEV 感染増殖抑制効果

村上 学¹、奴久妻聡一²、太田隆英¹、竹上 勉¹

(¹金沢医大・総医研・分子腫瘍学研究部門、²神戸市環境保健研究所)

Inhibition of JEV in mice by RNAi

Manabu Murakami¹, Nukuzuma Souichi², Ota Takahide¹ and Tsutomu Takegami¹

(¹Med., Med. Res. Inst., Kanazawa Med. Univ., ²Kobe Institute of health)

本邦における日本脳炎は最近では年間数十人以下の低流行状態を維持しているが、日本以外のアジアモンスーン地帯では年間 4 万人以上が発症している。しかし、日本脳炎ウイルス (JEV) に対する抗ウイルス剤は開発されておらず、脳炎を発症すると治療法はなく対処療法のみであり、死を免れても半数近くは重篤な後遺症を残す。そこで、本研究では新たな抗ウイルス剤の開発の基として RNAi の JEV 複製阻害効果を調べた。昨年度、本研究会で細胞内での RNAi のウイルス複製阻害効果を報告したが、今回はマウス実験について報告する。

これまでの実験で JEV の配列を含む RNAi 発現ベクター pJRI には細胞内で非常に強い JEV 複製抑制効果があることが分かっている。そこで、pJRI を ICR マウス (、4 週齢) に導入し、ウイルス感染試験を行った。pJRI 投与は腹腔と尾静脈 (Hydrodynamics 法) より導入し、JEV は腹腔より感染させた。pJRI の導入は JEV 感染と同日および感染 3 日後とした。JEV 感染 14 日後でのコントロールマウスの生残率は 0% であったが、pJRI (5 μ g/g) 導入マウスは JEV 感染同日における腹腔導入で 100%、尾静脈からでも 100% であった。しかしながら JEV 感染 3 日後では腹腔導入 25%、尾静脈の生残率 75% であった。JEV 感染 3 日後における腹腔導入では空ベクター導入マウスに比べ症状の発症に遅延傾向が見られ、尾静脈導入ではより生残率が高かった。

これらの結果から、pJRI の抗ウイルス剤としての可能性が示唆された。しかし、JEV 感染と同日の pJRI 導入では強い感染増殖抑制効果があるが、3 日後では効果が低い事実、尾静脈より RNAi を導入する Hydrodynamics 法はマウス以外の動物には使用が不可能等の問題も提起された。

フラビウイルス prM 蛋白のアミノ酸配列保存領域のウイルス粒子出芽への影響

好井 健太郎¹、後藤 明子¹、仁尾 純子²、小原 真弓¹、
川上 和江¹、苅和 宏明¹、高島 郁夫¹
(北海道大学大学院獣医学研究科¹ 公衆衛生学教室、²解剖学教室)

Involvement of conserved region of flavivirus prM protein in virus particle budding

Kentarou Yoshii¹, Akiko Goto¹, Junko Nio², Mayumi Obara¹, Kazue Kawakami¹,
Hiroaki Kariwa¹, and Ikuo Takashima¹
(¹Laboratory of Public Health, and ²Laboratory of Anatomy,
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

フラビウイルス属のウイルスは細胞内の粗面小胞体 (endoplasmic reticulum : ER) より出芽し、ゴルジ体、trans-Golgi network にて糖鎖の修飾を受けながら、小胞輸送系を經由し、エキソサイトーシスにより細胞外へと放出される。このウイルス粒子形成・分泌過程において、エンベロープ膜蛋白 prM/E が主要な役割を果たしていると考えられているが、その詳細な分子機構についてはほとんど明らかになっていない。

我々はこれまでに北海道で分離された極東型のダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルス Oshima5-10 株より、哺乳動物細胞における prM/E 蛋白発現・ウイルス様粒子 (subviral particles : SPs) 分泌系を作成し、さらに prM 蛋白の一アミノ酸の変異によりウイルス粒子分泌が抑制されることを報告してきた。

今回、我々は prM 蛋白の pr-領域にフラビウイルス間でアミノ酸配列が非常に保存されている領域があることに注目し、この領域のウイルス粒子形成・分泌過程への影響を調べた。TBE ウイルスの SPs 分泌系を用いてこのアミノ酸配列保存領域に対しそれぞれ一アミノ酸ずつアミノ酸置換を行い、SPs 分泌の動態を調べたところ、この領域におけるアミノ酸置換により SPs 分泌量は低下し細胞内にウイルス蛋白は蓄積することが明らかになった。また、ウイルスの細胞内局在を観察したところ、この領域のアミノ酸置換によりウイルス蛋白はゴルジ体への輸送が行われておらず ER 内に蓄積していることが示された。さらにウイルス蛋白発現細胞を電子顕微鏡により観察したところ、本来のアミノ酸配列では細胞内に多数の球状の SPs が認められたが、アミノ酸置換によりフィラメント状の構造物が多数見られるようになり、SPs の出芽が正常に行われていないことが示唆された。これらの結果より prM 蛋白はウイルス粒子の出芽に重要な機能を果たしており、その機能に大きく関わる配列がフラビウイルスの pr-領域に保存されている可能性が示された。

今後はこのアミノ酸配列保存領域に関して、感染性 cDNA クローンや他のフラビウイルスの SPs 分泌系を用いてその役割を調べていくことを計画している。

抗体依存性感染増強及び/または中和活性を示す
マウス抗 Dengue 2 型ウイルスモノクローナル抗体の解析

山中 敦史、小西 英二
(神戸大学・医学部・医療基礎学)

Analysis of mouse anti-dengue type 2 virus monoclonal antibodies
showing antibody-dependent enhancement of infection and/or neutralizing activities

Atsushi Yamanaka, Eiji Konishi
(Department of Health Sciences, Kobe University School of Medicine)

Dengue 熱は世界規模で流行している感染症の一つに挙げられる。 Dengue 熱は重症化すると Dengue 出血熱や Dengue ショック症候群となる。 これら重症化の機序は未だ解明されていないが、感染増強抗体の存在が重症化に深く関与することが示唆されている。 従って、重症化の予防やワクチン開発を進める上で、クローナルレベルで中和または感染増強活性を示す抗体の解析が必要となる。 そこで我々は Dengue 1 型から 4 型ウイルスそれぞれに対するマウスモノクローナル抗体を作製し、個々の抗体の解析を行ってきた。 本研究では抗 Dengue 2 型ウイルスモノクローナル抗体に焦点を当て、感染増強及び中和活性の解析を行った。

中和試験は検体を補体存在下で Dengue 2 型ウイルスと混合した後、Vero 細胞に感染して行い、中和抗体価を 90% プラーク減少法で求めた。 感染増強試験はヒト白血病細胞である K562 細胞を用いて、抗体有無の条件下で Dengue 2 型ウイルスを感染させ、96 時間後に ABC 染色を行い、感染細胞率を求めた。

30 種の抗 Dengue 2 型ウイルスモノクローナル抗体の解析の結果、中和及び感染増強活性の両方を示すもの(6 種)、中和活性のみを示すもの(1 種)、感染増強活性のみを示すもの(3 種)、どちらの活性も示さないもの(10 種)、の 4 群に分類できた。 中和及び感染増強活性の両方を示す抗体のサブクラスは IgG2a、どちらの活性も示さないものは IgG1、どちらか一方のみの活性を示すものは IgG2a と IgG2b が多く存在した。

感染増強抗体の IgG 濃度は 0.01mg/ml 前後の時に強い感染増強活性を示した。 これは、感染増強活性が抗体濃度に大きく依存していることを示唆している。

また、中和及び感染増強活性両方を示す抗体は、感染増強を起こす IgG 濃度(0.01mg/ml)で中和活性を示した。

ウエストナイルウイルスのリバースジェネティックス法の確立

前田秋彦¹、前田潤子¹、高木弘隆²、倉根一郎³、堀内基広¹
 (¹北海道大学大学院獣医学研究科プリオン病学講座、²国立感染症研究所
 バイオセーフティー管理室、³同ウイルス第1部)

Establishment of the reverse genetic system of West Nile Virus

Akihiko Maeda¹, Junko Maeda¹, Hirotaka Takagi², and Ichiro Kurane³
 (¹Department of Prion Disease, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido
 University, ²Division of Biosafety Control and Research and ³Department of Virology
 1, National Institute of Infectious Disease,)

近年、各種ウイルスのリバースジェネティックス法が確立され、ウイルスの生物学的、病原学的解析が行われている。また、新規ワクチンの開発においても、本法が応用されつつある。私達はウエストナイルウイルス(WNV)の基礎的、応用的な研究を推し進めるために、リバースジェネティックス法を確立することを試みた。

WNVのゲノムRNAの構造蛋白質遺伝子の中で、ウイルスRNAの複製に関与しないと考えられる部位を欠失させ、その部位にマーカである赤色蛍光蛋白質(RFP)を組み込むことにより、自己複製可能なWNVのレプリコン(RFP-Rep)を合成することを試みた。RFP-Repを作製する方法は、1) RFP-Repを含むプラスミドを構築し、これを鋳型としてRFP-Repを合成する方法と、2) PCRで完全長のRFP-Rep cDNAを合成し、これを鋳型としてRFP-Repを合成する方法について検討した。

1) レプリコンを含むプラスミドを構築する方法：約11kbのWNVのゲノムRNAから、それぞれがオーバーラップし、ゲノムRNAの全長をカバーする4つのcDNA断片をPCRにより合成し、これらをプラスミドDNAに組み込んだ。これらのプラスミドとRFP遺伝子を適当な制限酵素部位を利用して結合することにより、目的とする完全長のRFP-Repを含むプラスミドを構築することを試みた。しかし、各種のプラスミド、宿主*E. coli.*、大腸菌の培養条件等について検討しているが、RFP-Repが組み込まれたプラスミドは得られていない。

2) PCRで完全長のレプリコンcDNAを合成する方法：1)で得た、WNVゲノムRNAの4つのcDNA断片を鋳型として、RFP-Repの全長をカバーする様にPCRをデザインしたところ、全長のRFP-RepのcDNAを得る事が出来た。次に、RFP-Rep RNAを*in vitro*で合成し、Vero E6や293Tに導入したところ、RFP-Repの転写・複製のシグナルである赤色蛍光蛋白質の発現が確認された。

これらの結果より、現段階ではPCRを基としてWNVのRFP-Repを作製する方が、全長のRFP-Rep cDNAを組み込んだプラスミドを構築し、これを基にRFP-Repを作製する方法よりも、技術的に応用し易く、組み換えRFP-Repを作製する時間も短いものと考えられる。現在、本法を用いて、組み換えWNV作製の可能性について検討している。

西ナイルウイルスに対する弱毒生ワクチン開発の試み

Afjal Hossain Khan¹、福家功²、石川豊数²、井上真吾¹、森田公一¹(¹長崎大学熱帯医学研究所分子構造解析分野、²財団法人阪大微生物病研究会観音寺研究所)

New strategy of live attenuated West Nile virus vaccine development

Afjal Hossain Khan¹, Isao Fuke², Toyokazu Ishikawa², Shingo Inoue¹, Kouichi Morita¹¹Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University²Kanonji Institute, The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University

西ナイルウイルス (WNV) は 1999 年にアメリカ合衆国北東部において深刻な公衆衛生上の問題として出現した。WNV はその後合衆国全土に広まり、現在では 15000 例を越える臨床例が報告され、カナダ、メキシコ、カリブ海諸国においても発生が報告されている。こうして北米において蔓延した WNV は近い将来アジアにまで拡大する可能性がある。現在北米に分布している WNV はヒト、ウマ、トリに非常に強い神経毒性を持つので、WNV に対するワクチンの開発は急務である。

WNV に対するヒト用ワクチンの開発は現在合衆国と日本などで行なわれており、合衆国では Dr. Monath のグループが黄熱病ワクチン株 (17D) の感染性 DNA クローンに WNV の遺伝子を組み込んだ弱毒生ワクチンを開発中である。日本では阪大微研、化血研そして長崎大学熱帯医学研究所などが不活化ワクチンを開発している。

我々は次のステップとして、より低コストで効力の強い弱毒生ワクチンを開発を目的としてこの研究を開始した。開発の方法としては従来のような低温馴化法や非感受性動物での継代による弱毒変異株の樹立ではなく、動物用に開発された日本脳炎ウイルス弱毒生ワクチン株 (ML-17) の全長遺伝子に WNV の野外株 (NY-99) のエンベロープ遺伝子を導入したキメラウイルス遺伝子の構築をロング PCR 法により行ない、in vitro transcription 法により調製した RNA を エレクトロポレーション法により感受性細胞 C6/36 細胞に導入し、その培養上清中から子孫キメラウイルスを回収した。

作製したキメラウイルスは、WNV や日本脳炎ウイルスと同様に各種哺乳類由来細胞や蚊由来細胞において感染増殖能を有していた。ワクチン効力試験として 3 週齢の C57BL マウスに $1 \sim 10^7$ FFU のキメラウイルスを 1 回腹腔内に免疫し、攻撃ウイルスとして 100FFU (= 250LD₅₀) の WNV (NY99) を腹腔内接種したところ、 $10^5 \sim 10^7$ FFU のキメラウイルス投与群においては感染防御が成立した。マウス神経侵襲性試験を行ったところ、ML-17 株と同様低いことが確かめられ、本キメラウイルスは WNV に対する弱毒生ワクチンの候補株として有望であることが示唆された。

日本脳炎ウイルス感染マウスにおける致死性ウエストナイルウイルスからの交差防御

前田 健¹、Francis A. Ennis²、Sharone Green²(¹ 山口大学農学部家畜微生物学教室、² マサチューセッツ州立大学医学部 CIDVR)

Cross-protection from lethal West Nile virus challenge in Japanese encephalitis virus-infected mice

¹Department of Veterinary Microbiology, Yamaguchi University,²Center for Infectious Disease and Vaccine Research, University of Massachusetts Medical School)

ウエストナイルウイルス(WNV)の発生は北米、シベリアまで広がり日本への侵入が危惧されている。しかし、日本や東南アジアでは WNV と同じ血清群に属する日本脳炎ウイルス(JEV)が蔓延しており、日本でヒト用に使用されている不活化ワクチンでも部分的に WNV に対する防御効果が報告されている。本研究では、JEV 感染既応がある動物が WNV 感染から防御されるかをマウスモデルを用いて検討した。

1999 年に NY で分離された WNV を 3 種類の系統が異なる BALB/c、C57BL/c、C3H/He マウスに腹腔内接種した結果、BALB/c マウスは感受性が接種容量依存性ではなく、C3H/He マウスは高感受性(1LD₅₀<1PFU)であった。そのため、以下の実験では C57BL/6 マウスを使用した。次に、黄熱ウイルス(YFV)の弱毒生ワクチン株 17D あるいは JEV の弱毒生ワクチン株 SA14-14-2 株を接種後、100LD₅₀(10^{3.9}PFU)および 10⁶PFU の WNV で攻撃した結果、JEV 感染マウスは完全に防御されたが、YFV 感染マウスは防御されなかった。さらに、YFV の prM-E を JEV あるいは WNV の prM-E と置き換えたキメラウイルス(YF/JE と YF/WN)をマウスに接種して同様の攻撃試験を行った結果、YF/WN 接種マウスは完全に防御されたのに対して、YF/JE 接種マウスは部分的に防御された。このことは、交差防御には prM-E 以外の領域に対する免疫、すなわち細胞性免疫も関与している可能性を示唆している。

以上の結果より、JEV 感染既応がある動物は、WNV による発症から防御される可能性が示唆された。これはマウスでの実験であるため、ヒトやウマでも同様の結果を得られるかは不明であるが、JEV と WNV の流行地域が異なることは本実験結果を支持すると考えている。加えて JEV や WNV の感染防御には中和抗体の誘導が重要であるといわれているが、細胞性免疫もまた感染防御に重要な役割を担っていることが示された。

フラビウイルス DNA ワクチン及びタンパクワクチンの混合投与：
デングウイルスと日本脳炎ウイルスのマウスにおける交差免疫原性

井本 淳一、小西 英二
(神戸大学医学部医療基礎)

Combined immunization of flavivirus DNA and protein vaccines:
Cross-immunogenicity between dengue viruses and Japanese encephalitis virus in mice

Jun-ichi Imoto, Eiji Konishi
(Department of Health Sciences, Kobe University School of Medicine)

日本脳炎ウイルス (JEV) とデングウイルスは、フラビウイルス属の中で異なる抗原性を持つグループに属し、中和試験における交差反応性は低いとされている。演者らはこれまでマウスモデルを用いて、DNA ワクチンとタンパクワクチンの同時投与により相互の免疫原性が相乗的に上昇することを、日本脳炎とデングそれぞれの系で報告してきた。今回、デング DNA ワクチンと日本脳炎不活化ワクチン (JEVAX) の混合投与により異なる抗原グループに属するウイルス間でも互いの免疫原性を高めるかどうかを検討した。

JEV あるいはデング 2 型ウイルス (DENV2) 過剰免疫マウス血清を用いて、中和試験における交差反応性を調べたところ、同種のウイルスに対する中和抗体価 (90% ブラーク減少法) が 1:10240 の時に、異種のウイルスに対して 1:20-1:40 を示した。1 群 5 匹の ddY マウスを用いて、10 μ g のデング 2 型 DNA ワクチン (pcD2ME) と 1/10 ドーズの JEVAX を針無注射器を用いて混合投与後 3 および 9 週目に、単独投与群と比較して DENV2 に対する中和抗体価にわずかではあるが有意の上昇が認められた (それぞれ 1:10 から 1:20、1:20 から 1:40、スチューデント t 検定により $P < 0.05$)。しかし、10 μ g の pcD2ME の DENV2 に対する中和抗体価は、10 μ g の日本脳炎 DNA ワクチンと混合投与しても上昇しなかった。

次に、1 群 6 匹の Balb/c マウスに、100 μ g のデング 4 価 DNA ワクチンと 1/10 ドーズの JEVAX を混合投与した。7 週間隔で 2 回投与後 2-5 週目に単独投与群と比較し、最も効果の見られた 3 型では 8 倍の抗体価上昇が認められた。以上の結果は、抗原グループを越えた交差免疫原性が DNA ワクチンとタンパクワクチンという異なるタイプによって生じることを示唆する。