

平成 21 年 5 月 6 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580310  
 研究課題名（和文） ニューヨーク株ウエストナイルウイルスに対する日本産蚊の媒介能解析  
 研究課題名（英文） Analyses of the vector competence of Japanese mosquitoes to New York strain of West Nile virus  
 研究代表者  
 江下 優樹（ESHITA YUKI）  
 大分大学・医学部・准教授  
 研究者番号：10082223

## 研究成果の概要：

日本に生息する蚊3種、アカイエカ、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカのニューヨーク株ウエストナイルウイルス感受性を調べた。本ウイルスが3種の蚊体内で増殖することを、感染実験とRT-PCR法で確かめた。本株の蚊体内での増殖は、ウガンダ株より高いことが示唆された。また、ウイルス感染後の蚊中腸に、複数タンパクの発現増強が二次元電気泳動で示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	480,000	3,080,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症、ウエストナイルウイルス、蚊、タンパク、プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

ウエストナイルウイルスは蚊によって媒介される。本ウイルスの感染環は蚊-ウイルス-野鳥で維持されているが、時として、ヒトやウマなどが感染する。本症は、人獣共通感染症である。日本脳炎ウイルスと血清学的に交差反応を示すことから、日本国内での診断には、中和試験、遺伝子診断などが必要である。1999年にニューヨーク州で突発的に発生したヒトへのウエストナイル熱流行は、アラスカとハワイ州を除く、全米に拡大している。その後遺症ともいえる重篤な脳炎患者の発生が問題となっている。ニューヨークで分離された本ウイルスは、アフリカのウガンダ

で分離された株と比較して強毒と考えられている。

2005年に米国から帰国した旅行者が日本国内で本症罹患患者として報じられた。このような状況が国内で頻繁に起これば、国内での野鳥の感染の可能性がある。このことから、日本の蚊が活動する夏期に、国内に生息する蚊による二次感染者の発生が危惧される。しかし、日本に生息する蚊が本ウイルスにどの程度の感染性を示すかを調べた報告は極めて少ない。

## 2. 研究の目的

我が国において、ヒトと家畜の生活環境に

密着して生息している蚊の本ウイルス感染性を明らかにすることは、国内への本ウイルス侵入の際にどのような種類の蚊を標的にして駆除を行うかなどのリスク評価と対策に役立てることができる。また、血液と共にウイルスを吸血した蚊がどのようにして感染蚊になるかは、蚊の中腸がその役割を担っていると考えられている。中腸におけるウイルス感染の初期に現れるタンパクの探索を試みた。

### 3. 研究の方法

(1) 蚊の感染実験：日本に生息する蚊の本ウイルス感染性を調べるために、BSL 3 実験室において、本学の委員会承認のもとで蚊のウイルス感染実験を行った。ウエストナイルウイルスとしては、ニューヨーク株およびウガンダ株を用いた。また、使用した蚊は、実験室内で飼育中のアカイエカ、ヒトスジシマカ成虫、および野外から採集した幼虫に由来するヤマトヤブカの雌成虫を用いた。実験に用いた蚊は、いずれも羽化1週間前後の個体を用いた。

(2) 500mL 容器に隔離した雌成虫に、メッシュを介して、ウイルスを含む血液混合液を、経口的に与えた。その後、2週間28°Cの恒温器内で飼育した。2日毎に、砂糖水を含む綿を交換した。2週間生存した蚊は、実験に用いるまで、-80°Cに保管した。個々の感染蚊を、組織別(頭、胸、腹、脚部)に分けた後、総RNAを抽出した。ウエストナイルウイルスのゲノムを検出するプライマーセットを用いて、one step RT-PCR(Invitrogen 社)により、本ウイルスゲノムの有無を調べた。

(3) 蚊中腸タンパクの二次元電気泳動：ウイルス感染前、および感染2週間経過し個々の蚊から、生理食塩水中で、中腸をとりだした。マイクロチューブに移した中腸に尿素、CHAP、DTT、ampholyte、bromophenol blueなどを含む緩衝液を加えた後にホモジナイズした。その後、12.5%polyacrylamide Ready Gels J(BioRad)を用いて二次元電気泳動を行った。PAGE泳動後のタンパク染色には銀染色(2D-Silver stain II、第一化学)を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 日本に分布するアカイエカ、ヒトスジシマカ、そしてヤマトヤブカ体内で本ウイルスが増殖することをRT-PCRで明らかにした。蚊体内におけるウイルスの分布は、蚊の個体により様々であった。3種蚊の胸部と頭部から本ウイルスゲノムが検出されたことから、唾液腺の感染の可能性が示唆された。アカイエカについては感染蚊のマウス刺咬によるマウス発症とマウスの血液と臓器からのウイルスゲノムを検出した。これらのことから、

蚊体内で増幅したウイルスは、唾液腺に到達して、唾液と共に吸血の際に、ウイルスが放出されることが3種蚊で推察された。3種蚊のウイルス増幅の程度はほぼ同程度であったことから、人家周辺で発生するアカイエカとヒトスジシマカが、本症勃発時の駆除対象の蚊と考えられる。

(2) ニューヨーク株ウエストナイルウイルスに対する蚊の感染率は、ウガンダ株のそれより高かったことから、日本の蚊は、ニューヨーク株ウイルスに親和性が高いと考えられる。この親和性についてさらに調べるために、血液のみを吸液した蚊、およびウイルス感染2週間後の蚊を用いて、それぞれの蚊中腸に発現しているタンパクを、二次元電気泳動で調べた。その結果、未感染蚊の中腸タンパクと比較して、25 から 100 kDA、pH3 から pH11 の範囲に散在する複数のタンパク発現の強いスポットが感染蚊の中腸で観察された。また、ウエストナイルウイルス抗体を用いたウエスタンブロット法で、感染蚊タンパクの一部スポットはウイルス由来であることがわかった。しかし、その抗体で検出されなかったタンパクがあることから、蚊由来のタンパクであることが示唆された。本タンパクの詳細を今後調べる必要がある。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

- ① Dieng, H., Boots, M., Tamori, N., Higashihara, J., Dieng, H., Boots, M., Tamori, N., Higashihara, J., Okada, T., Kato, K. and Eshita, Y. (2006): Some technical and ecological determinants of hatchability in *Aedes albopictus*, a potential candidate for transposon-mediated transgenesis. *J. Amer. Mosq. Cont. Assn.*, 22:382-389. 査読有
- ② Dieng, H., Boots, M., Higashihara, J., Satho, T., Kato, K., Okada, T., Komalamisra, N., Ushijima, H., Takasaki, T., Kurane, I. and Eshita, Y. (2006): Two-dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) with reference to sex and body size. *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.*, 17: 133-141. 査読有
- ③ 澤邊京子、佐々木年則、星野啓太、井澤晴彦、小滝 徹、伊藤美佳子、高崎智彦、江下優樹、小林睦生(2006):日本国内における蚊からのウエストナイルウイルス検出法の検討。衛生動物、57:279-286. 査読有

- ④ Dieng, H., Satho, T. and Eshita, Y. (2007): The Effects of Male on the Blood Feeding behavior of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Implications for laboratory oral feeding of *Aedes* vectors. Jpn. J. Environ. Entomol. Zool., 18:17-22. 査読有
- ⑤ Dieng, H., Boots, M., Tamori, N., Satho, T., Higashihara, J., Okada, T., Kato, K., Komalamisra, N., Ushijima, H., Takasaki, T., Kurane, I. and Eshita, Y. (2007): Effects of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus*. House and Household Insect Pest, 28:117-127. 査読有
- ⑥ Eshita, Y., Takasaki, T., Takashima, I., Komalamisra, N., Ushijima, H., and Kurane, I. (2007): Vector competence of Japanese mosquitoes for dengue and West Nile viruses (III. Biology, Natural Products and Biotechnology). In: Pesticide Chemistry. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, (Edited by Ohkawa, J., Miyagawa, H. and Lee, P. W.), Wiley-VCH, Weinheim, pp.217-225. 査読有
- ⑦ 江下優樹、牛島廣治 (2007) : デングウイルス, ウエストナイルウイルス。世界的にみた感染症の検査法 (牛島廣治 編)。臨床と微生物, 34 : 287-294. 査読無
- ⑧ 江下優樹、Srisawat Raweevan、高崎智彦、水田英生、井村俊郎、内田幸憲、小林睦生、高島郁夫、牛島廣治、倉根一郎 (2007) : ウエストナイルウイルスにおける吸血昆虫とウイルス増殖 日本獣医学会 家禽疾病学分科会会報、(15) : 3-12. 査読無
- ⑨ Kihara, Y., Satho, T., Eshita, Y., Sakai, K., Kotaki, A., Takasaki, T., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Srisawat, R., Lapcharoen, P., Sumroiphon, S., Iwanaga, S., Ushijima, H., Endoh, D., Miyata, T., Sakata, A., Kashige, N., Miake, F., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., and Mizutani, T. (2007): Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. J. Virol. Methods, 146:372-374. 査読有
- ⑩ 江下優樹 (2007) : 海外旅行中に蚊に刺された! 蚊が媒介する病気にはどんなものがある? ~マラリア、デング熱、日本脳炎、ウエストナイル脳炎~. (特集: 意外と知らない!? 感染症). チャイルドヘルス、10:764-767. 査読無
- ⑪ Dieng, H., Boots, M., Higashihara, J., Okada, T., Kato, K., Satho, T., Miake, F. and Eshita, Y. (2007): Effects of blood and virus-infected blood on protein expression in the midgut of the dengue vector *Aedes albopictus*. Med. Vet. Entomol., 21:278-283. 査読有
- ⑫ Yoshi, M., Mine, M., Kurokawa, K., Oda, T., Kato, K., Ogawa, Y., Eshita, Y. and Uchida, K. (2007): Human blood feeding activity of female hybrids between *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Bull. Nagasaki Univ. Sch. Health Sci., 20:91-93. 査読有
- ⑬ 日隈晴香、中山俊之、江下優樹、牧野芳大、三舟求真 (2007) : 別府市における輸入デング熱の一症例。日本渡航医学会誌, 1:45-48. 査読有
- ⑭ Jose D. J. Diaz Aquino, Wei-Feng Tang, Ryoichi Ishii, Tetsuro Ono, Yuki Eshita, Hiroshi Aono and Yoshihiro Makino (2008): Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: the association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. Virus Res. 137:266-270. 査読有
- [学会発表] (計 2 2 件)
- ① 江下優樹、水田英生、上田泰史、高崎智彦、多森直樹、東原絢、加藤孝太郎、岡田貴志、DIENG Hamady、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2006) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (10) イナトミシオカのウエストナイルウイルス媒介実験. 第 58 回日本衛生動物学会大会。2006 年 4 月 7-8 日、長崎市
- ② ESHITA Yuki, Takasaki, T., Takashima, I., Komalamisra, N., Ushijima, H., Kurane I. (2006): Vector competence of Japanese mosquitoes for dengue and West Nile viruses. 11th International congress of pesticide chemistry, Kobe, Japan. 6-11 August 2006
- ③ ESHITA Yuki, Mizuta, H., Ueda, Y., Takasaki, T., Tamori, N., Kato, K., Imura, S., Uchida, Y., Takashima, I., Kurane, I. (2006): Vector competence of Japanese salt marsh mosquito, *Culex inatomi* against two New York strains of West Nile virus. 11th International congress of pesticide

- chemistry, Kobe, Japan. 6-11 August 2006
- ④ 江下優樹 (2006): ヒトと媒介蚊からのアルボウイルス検出の変遷。ワークショップ: 感染症診断法の変遷、途上国でも利用できる検査法をめざして。第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会。2006年10月11日(水)～13日(金)。長崎市
- ⑤ 木原悠希、佐藤朝光、水谷哲也、江下優樹、宮田健、鹿志毛信広、見明史雄 (2006): WGA法を用いた新しいウイルス検出システムの確立。第23回日本薬学会九州支部大会。2006年12月9日(土)～10日(日) 熊本市
- ⑥ 江下優樹、Srisawat Raweewan、高島郁夫、高崎智彦、水田英生、内田幸憲、小林睦生、倉根一郎 (2007): 蚊類のアルボウイルス媒介能 (11) 北海道産ヤマトヤブカのウエストナイルウイルス感受性。第59回日本衛生動物学会大会。2007年4月2-4日、大阪市
- ⑦ 江下優樹 (2007): ウエストナイルウイルスにおける吸血昆虫とウイルス増殖 (シンポジウム: 人畜共通感染症病原体との戦い)。第143回日本獣医学会。2007年4月3-5日、茨城県つくば市
- ⑧ 水谷哲也、木原悠希、佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川 茂 (2007): 新興・再興ウイルスの網羅的検出方法、蚊媒介ウイルスへの応用。第144回日本獣医学会学術集会、北海道江別市、2007年9月2, 3, 4日
- ⑨ Diaz Aquino Jose, 湯 偉峰、石井竜一、小野哲郎、青野裕士、江下優樹、牧野芳大 (2007): パラグアイにおけるデングウイルス2・3型の分子疫学、2001-2006。第48回日本熱帯医学会大会。2007年10月12日(金)～13日(土)。別府市
- ⑩ 江下優樹、Raweewan Srisawat、Narumon Komalamisra、Yupha Rongsriyam、青野裕士、牧野芳大、牛島廣治 (2007): タイ国のデング熱患者宅で採集した蚊のデングウイルス感染。第48回日本熱帯医学会大会。2007年10月12日(金)～13日(土)。別府市
- ⑪ 日隈晴香、中山俊之、江下優樹、牧野芳大、三舟求真 (2007): 別府市における輸入デング熱の一症例。第48回日本熱帯医学会大会。2007年10月12日(金)～13日(土)。別府市
- ⑫ ESHITA Yuki, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Shunro Imura, Yukinori Uchida, Ikuo Takashima, Hiroshi Ushijima (2007): Experimental vectorial capacity of arbovirus-infected mosquitoes. Joint International Tropical Medicine Meeting 2007 "Health Security in the Tropics". 29-30 November, 2007, Bangkok, Thailand.
- ⑬ 江下優樹、牧野芳大、湯 偉峰、青野裕士、高崎智彦、田島 茂、高島郁夫、小林睦生、倉根一郎 (2008): 蚊類のアルボウイルス媒介能 (12) アカイエカ体内における日本脳炎ウイルスの増殖。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月17-19日、群馬県
- ⑭ 水谷哲也、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、佐藤朝光、黒田誠、関塚剛史、西村美保、酒井宏治、福士秀悦、緒方もも子、中内美奈、倉根一郎、森川茂 (2008): ウイルスの網羅的方法の改良と新しいブニヤウイルスの発見。第146回日本獣医学会学術集会、宮崎県宮崎市、2008年9月24日～26日
- ⑮ ESHITA Yuki, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Hiroshi Aono, MAKINO Yoshihiro, Tomohiko Takasaki and Hiroshi Ushijima (2008): Dengue infection's dynamics of vector mosquitoes in the patient's houses, Thailand. The Second International conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2008, "Global Innovation for Combating Dengue Infection". October 15, 16, 17, 2008, Phuket, Thailand.
- ⑯ 村田 亮、江下優樹、前田秋彦、前田潤子、秋田紗希、田中智久、好井健太朗、荻和宏明、梅村孝司、高島郁夫 (2008): ウエストナイルウイルスのE蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山県、岡山市、2008年10月26日(日)～28日

[図書] (計2件)

- ① ESHITA Yuki, Takasaki, T., Takashima, I., Komalamisra, N., Ushijima, H., and Kurane, I. (2007): Vector competence of Japanese mosquitoes for dengue and West Nile viruses. In: Pesticide Chemistry. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, (Edited by Ohkawa, J., Miyagawa, H. and Lee, P. W.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 217-225.
- ② 牧野芳大、江下優樹 (2008): 地球温暖化の影響による亜熱帯地域の感染症拡大に関する疫学研究。国立大学法人 大分大学環境報告書 2008 (2007年度)、41pp、

2008年9月大分大学発行 2007: 25-26。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江下 優樹 (ESHITA YUKI)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号: 1 0 0 8 2 2 2 3

(2) 研究分担者

牧野 芳大 (MAKINO YOSHIO)  
大分大学・医学部・教授  
研究者番号: 6 0 0 3 9 9 3 0

(3) 連携研究者

松本 顕 (MATSUMOTO AKIRA)  
九州大学・高等教育開発推進センター  
・助教  
研究者番号: 4 0 2 2 9 5 3 9  
水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)  
国立感染症研究所・ウイルス第一部  
・主任研究官  
研究者番号: 7 0 2 8 1 6 8 1