

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2012

課題番号：20405040

研究課題名（和文） 中国・広東省における蚊媒介性フラビウイルス感染症の疫学調査

研究課題名（英文） Epidemiological study on mosquito-borne flavivirus infection in Guangdong Province, China

研究代表者

前田 秋彦 (MAEDA AKIHIKO)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：70333359

研究成果の概要（和文）：近年の地球規模でのグローバル化と地球温暖化により、蚊媒介性フラビウイルス感染症の世界的な流行が公衆衛生上、危惧されている。本研究では、分子生物学的手法を用いて新規のフラビウイルス感染の鑑別血清診断法の開発を行った。また、中国・広東省における本感染症の分子疫学調査を行うとともに、広東省における本感染症発生と気候条件などの相関について解析した。

研究成果の概要（英文）：The outbreak of mosquito-borne flavivirus infection caused by recent world-globalization and global-warming, is one of big concerns on world public health. In this study, we developed a new protocol of differential serodiagnosis for flavivirus infection using molecular biological techniques. And we performed an epidemiological study on flavivirus infection in Guangdong province, China. We also analyzed the interrelation of an outbreak of flavivirus infection and meteorological conditions in this province.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	10,500,000	3,150,000	13,650,000

研究分野：農学 B

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：蚊媒介性感染症、フラビウイルス、中国、広東省、疫学調査、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

近年、アジアに端を発する新興・再興感染症のアウトブレイクが相次いでいる。国際社会のグローバル化に伴う日本とアジア諸国の経済や文化での交流が深まっている現代社会において、ある国の地方病として発生した感染症が日本へ侵入する危険性は、以前にも増して高くなっている。特に、近年の地球

温暖化の影響で、蚊などの節足動物媒介性ウイルス感染症の地球規模での流行の拡大が懸念されている。本研究では、日本脳炎 (JE) やデング熱/デング出血熱 (DF/DHF)、ウエストナイル熱/脳炎 (WNF/WNE) などの蚊媒介性フラビウイルス感染症を対象とする。アジアでは、毎夏、日本脳炎ウイルス (JEV) やデングウイルス (DENV) 感染症の流行が報告さ

れている。日本においても、ヒトへの JEV ワクチン定期接種の積極的な勧奨の取り止め（厚生労働省勧告）や、地球温暖化に伴うウイルス媒介蚊の生息域が拡大していることなどから、新たなフラビウイルス感染症の流行が懸念されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本およびアジア諸国の自然界における病原性フラビウイルスの存在様式を明らかにすると共に、分離されるフラビウイルスの性状を詳細に解析することを目的とした。

疫学調査は、中国・広東省で行った。本省は、これまでに世界中で流行したインフルエンザや SARS の発生地である。本省にはエマージングウイルス感染症の発生に関与する何らかの要因が存在するものと考えられる。広東省はアジア各国と中国との交易の要衝であり、日本との交易も活発に行われている。したがって、アジア各国で発生した新型感染症が中国・広東省を経由し、ヒトや動物を介して日本に侵入することも考えられる。本研究課題においては、吸血昆虫である蚊がヒトと動物間あるいは動物と動物間で媒介するフラビウイルス感染症について、広東省での感染疫学調査を行うことを計画した。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、次の3つの項目について検討した。すなわち、(1) 安全で高感度なフラビウイルスの新規検査法の開発、(2) 中国・広東省の蚊媒介性フラビウイルス感染症の疫学調査および (3) フラビウイルス感染症の発生と気象条件との相関関係の解析について検討した。

### (1) 安全で高感度なフラビウイルスの新規検査法の開発

蚊媒介性フラビウイルス感染症の鑑別診断や検査において、同一血清型群に属する近縁のウイルス間では抗原性が類似しているため感染ウイルスに特異的な抗体を検出することが難しい。現在、フラビウイルス感染鑑別には、比較的特異性の高いウイルスを用いた中和試験法が行われている。しかし、従来の中和試験ではウイルスを使用するため、感染事故を起こす危険性が常に伴う。また、ウエストナイルウイルス (WNV) は病原性レベル3のウイルスに分類されており、高度に制御されたバイオセーフティーレベル3

(BSL3) の実験室での取扱いが義務づけられている。そこで、本研究では検査に使用する

ウイルスの代替としてウイルス様粒子 (VLPs) を用いた安全で簡便なフラビウイルス感染鑑別中和試験法の開発を行った。

### ① フラビウイルス VLP の作製

WNV のゲノム RNA にコードされているウイルス構造蛋白質の遺伝子領域を赤色蛍光蛋白質 (DsRed) 遺伝子に置換した自己複製型 RNA (WNV レプリコン、repWNV) を作製した。repWNV を、WNV あるいは日本脳炎ウイルス (JEV) の構造蛋白質と共に細胞に共発現することにより、WNV あるいは JEV の殻を持ち repWNV を内包する VLP を得ることが出来る。そこで、WNV と JEV の構造蛋白質 C および prM-E を発現するベクター、pCAGGS WNV/C、pCAGGS WNV/prM-E、pCAGGS JEV/C および pCAGGS JEV/prM-E を作製した (図1)。WNV の殻を持つ VLP (WNV-VLP) は pCAGGS WNV/C、pCAGGS WNV/prM-E を repWNV と、JEV の殻を持つ VLP (JEV-VLP) は pCAGGS JEV/C および pCAGGS JEV/prM-E を repWNV と共に BHK-21 細胞に発現することで作製した。

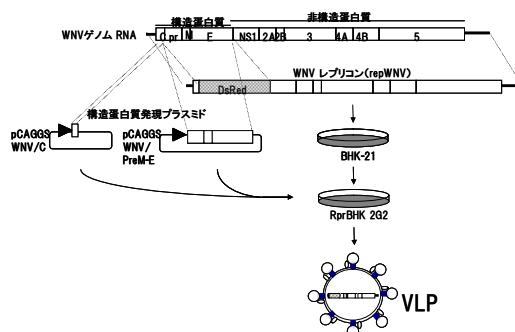


図 1. WNV-VLP の作製

WNV レプリコンと WNV の構造蛋白質発現ベクターの構築法および WNV-VLP 作製法を模式化した。repWNV はウイルスのゲノムの構造蛋白質遺伝子領域をレポーター蛋白質である DsRed の遺伝子で置換したものである。VLP は repWNV をウイルスの構造蛋白質と共に BHK-21 細胞に発現することにより作製した。

### ② 免疫染色 (IFA)

細胞をメタノールで固定し、一次抗体として各々のウイルスの E 蛋白質に特異的な抗体を反応させた。次に二次抗体として、FITC または Alexa488 標識した免疫動物 IgG 抗体を細胞に反応させた。反応終了後、蛍光顕微鏡下で細胞を観察した。

### ③ VLP 価の測定

VLP 価は、ウイルス価を測定するプラークアッセイ法に準じて測定した。VLP の原液を 10 倍段階希釈し、それらの一定量を Vero 細胞に接種した。VLP を細胞に 1 時間吸着後、

感染細胞を 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 48-72 時間培養し、蛍光顕微鏡下で蛍光を発する細胞数を測定し、VLP 価/ml を求めた。

#### ④ ウエスタンブロット法

精製した各種 VLP およびウイルス粒子を 4-12% 勾配 SDS ポリアクリルアミドゲル上に展開した。展開したタンパク質を PVDF 膜にブロットし、各ウイルスの E 蛋白質に特異的に反応する抗体を用いてウイルスの E 蛋白質を検出した。

#### ⑤ 中和試験

100 focus forming units (F. f. u.) の VLP あるいはウイルスを、各々のウイルス感染動物血清と 37°C で 1 時間反応後、Vero 細胞に接種した。感染 1 時間後に細胞を PBS(-) で 3 回洗浄し、感染細胞を 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。感染後 48-72 時間にウイルス感染により形成された Focus 数あるいは蛍光を発する細胞数を測定し、陰性コントロールと比較して 80% の感染価の減少を指標とし中和抗体価を算出した。

#### (2) 中国・広東省の蚊媒介性フラビウイルス感染症の疫学調査

現在、日本で発生するデング熱の患者は流行地からの帰国者であるため、流行地での本病の発生動向を常に監視する必要がある。そこで、本研究では広東省で 2010 年に分離されたデングウイルス (DENV) についての分子疫学的解析を行った。

##### ① ヒト血清

2010 年、中国・広東省の 77 人のデング様症状を示した患者の血清を採取した。

##### ② 感染疫学解析

血清中の抗 DENV 抗体の検出を行ったところ 55 件体が陽性であった。また、これらの血清を、蚊由来の C6/36 細胞に接種してウイルスの分離を試みたところ、8 株の DENV を分離した。ウイルスの RNA を抽出し、完全長の E 蛋白質の遺伝子配列を決定した。分離株と既に報告のある 38 株の DENV1 および 12 株の DENV3、省内において 1985、1991、1999、2006 および 2008 に分離した DENV 株の E 蛋白質の遺伝子について系統解析した。本研究は中国・広東省感染症予防制御研究所の柯昌文博士と共同で行った。

#### (3) フラビウイルス感染症の発生と気象条件との相関関係の解析

中国・広東省では、日本脳炎やデング熱等の蚊媒介性フラビウイルス感染症の流行が毎夏報告されているが、これまで系統的な解析は行われていなかった。そこで本研究では、広東省におけるデング熱やデング出血熱等デングウイルス (DENV) 感染症に関する近年の発生状況を調査するとともに、当該地の気象との関連について解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 安全で高感度なフラビウイルスの新規検査法の開発

###### ① 成績

WNV と JEV の VLP 産生細胞における VLP 膜蛋白質のウイルス種特異性を IFA により検討したところ、各々の産生細胞では各々のウイルス種に特異的な E 糖蛋白質の発現が認められた (図 2)。

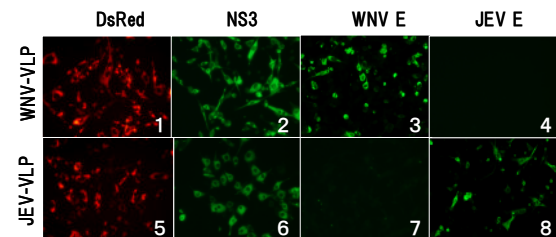


図 2. VLP 産生細胞におけるウイルス種特異的なウイルス E 膜蛋白質の発現

WNV-VLP (パネル 1-4) および JEV-VLP (パネル 5-8) 産生細胞をメタノールで固定し、WNV の非構造蛋白質 NS3 (パネル 2 および 6) および各ウイルスに特異的な E 膜蛋白質 (パネル 3、4、7 および 8) を検出した。レプリコンの複製は DsRed (パネル 1 と 5) の発現と NS3 (パネル 2 および 6) の発現により確認した。

VLP の産生量を測定したところ、WNV-VLP は約  $1.6 \times 10^6$ 、JEV-VLP は約  $6.4 \times 10^5$  であった。これらの VLP を構成する粒子の殻が各々のウイルスに由来する膜タンパク質より構成されていることを、各々のウイルス膜蛋白質に特異的に反応する抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した (図 3)。

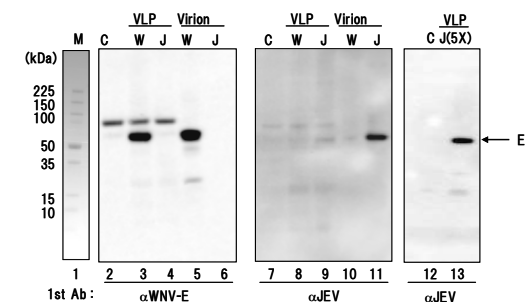


図 3. VLP を構成する E 蛋白質の解析

直径 3.5cm の培養プレートで作製した WNV-VLP (レーン 3 と 8) と JEV-VLP (レーン 4、9 と 13) の構成蛋白質を 4-12% 勾配 SDS ポリアクリルアミドゲル上に展開し、PVDF 膜にブロッティングした。PVDF 膜に  $\alpha$ WNV-E 抗体 (レーン 2-6) あるいは  $\alpha$ JEV-E 抗体 (レーン 7-11 および 12-13) を反応させた。陽性コントロールとして WNV (レーン 5 と 10) および JEV の粒子 (レーン 6 と 11) を展開した。レーン 12 および 13 は、各々ネガティブコントロール (C) およびレーン 4 および 9 の 5 倍量の JEV-VLP を展開したものである。W: WNV, J: JEV, C: Control, M: 蛋白質 Marker を示す。

WNV あるいは JEV の感染により中和抗体の存在が明らかである動物血清を用いて、生ウイルスを用いた中和試験と VLP を用いた中和試験の相関性を検討した (図 4)。その結果、両中和試験法には強い正の相関が認められた。

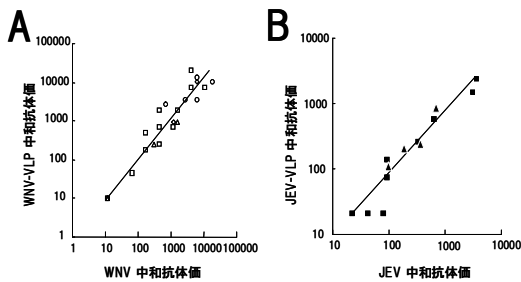


図 4. フラビウイルス中和試験における生ウイルス中和抗体価と VLP 中和抗体価の相関

WNV および WNV-VLP の中和抗体価の相関 (A) と JEV および JEV-VLP の中和抗体価の相関 (B) を示す。

WNV あるいは JEV の感染ニワトリ雛血清を用いて、各々のウイルスについての感染鑑別の可能性について検討した (図 5)。WNV を感染させたヒヨコ血清を用いた場合、WNV-VLP の中和試験で WNV に特異的な中和抗体が検出された。一方、JEV に感染させたヒヨコ血清を用いた場合、JEV-VLP の中和試験で JEV に特異的な中和抗体が検出された。

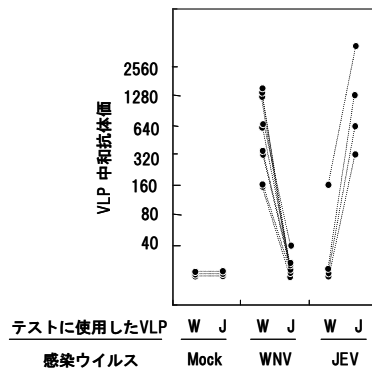


図 5. VLP 中和試験のウイルス種特異性

比較的制御された環境下で舎内飼育されたニワトリ雛に WNV あるいは JEV を感染し、得られた感染ニワトリ雛血清について各々の VLP 中和試験を行った。W: WNV, J: JEV を示す。

## ② 結論

フラビウイルス VLP を用いた中和試験は、ウイルス種特異的であり、安全かつ簡便に鑑別診断・検査することを可能とする試験法である。したがって、現行の生ウイルスを用いた中和試験の代替として有用であると考えられる。

## (2) 中国・広東省の蚊媒介性フラビウイルス感染症の疫学調査

### ① 成績

近年、中国・広東省 (図 6) では DENV1 の流行が主となっている。

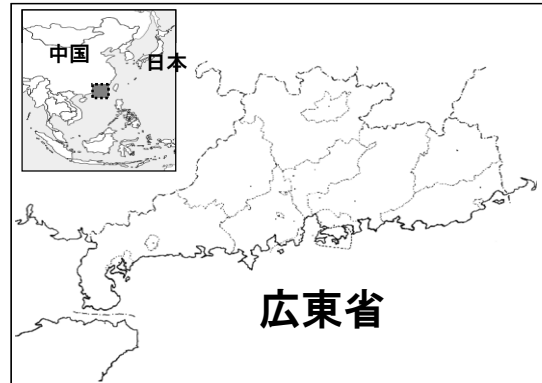


図 6. 調査地

中国・広東省と日本の地理的位置を図示する。

本研究で分離した DENV は 8 株中 7 株が 1 型の血清型ウイルスであった。分離 DENV 株の内、3 株 (1985、1991 および 2008 年分離株) が DENV1 であった。これらのウイルス株の E 蛋白質全領域の塩基配列を決定し、過去に報告された DENV1 の塩基配列と比較検討した (図 7)。本年度分離株は 2004 年に Fujian で報告された DENV1、2007 年に韓国で報告された DENV1、2008 年に Singapore で報告された DENV1 あるいは 2006 年に Indonesia や Vietnam で報告された DENV1 と近縁であった。

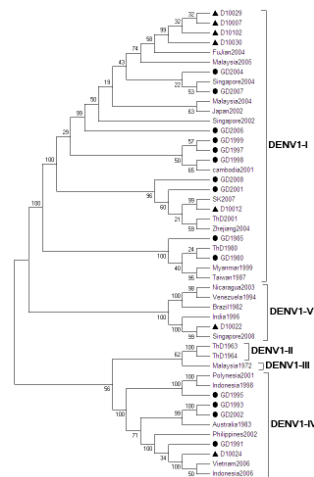


図7. DENV1 の E 蛋白質を基にした系統樹解析を行った。黒三角は 2010 年分離株を、黒丸は広東省で過去に分離された DENV1 を示す。また、諸外国から報告されたウイルスについても同様に解析した。

2010 年度、DENV1 とともに DENV3 が分離された。DENV1 と同様に、ウイルスの E 蛋白質の遺伝子配列の解析を行ったところ (図 8)、2006 年に United States および 2007 年と 2008 年に Venezuela から報告された DENV3 と近縁であることが明らかとなった。

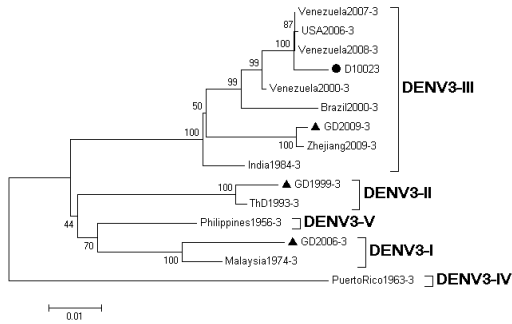


図 8. DENV3 の E 蛋白質を基にした系統樹解析を行った。黒丸は 2010 年分離株を、黒三角は広東省で過去に分離した DENV3 を示す。また、諸外国から報告されたウイルスについても同様に解析した。

## ② 結論

2010 年、中国・広東省におけるデング熱患者より、DENV1 と DENV3 が分離された。地球温暖化により感染の拡大が危惧されるデングウイルス感染症について、今後とも国際的に注意する必要がある。

## (3) フラビウイルス感染症の発生と物理的環境条件との相関関係の解析

### ① 成績

本省の 1978～2007 年における DENV 感染症の患者数を図 9 に示す。1980 および 1986、1995、2002 年と 6～10 年間隔で比較的大きな流行が認められたが、患者数は顕著に減少していた。また 1990 年代半ばより、DENV 1 型の流行が主となっている (図 9、下図)。

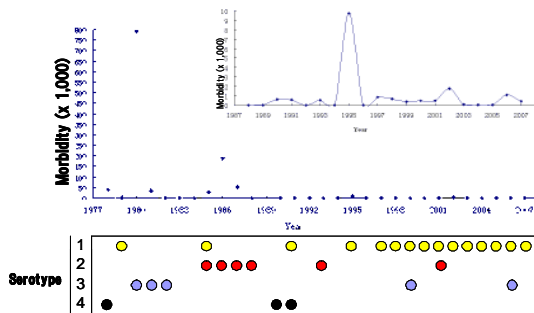


図 9. 中国・広東省の 1978～2007 年における DENV 感染症の発生状況

各年度の DENV 患者数を記す (上段)。1997 年以降の患者数の推移を上段右上に示す。また、各流行時に検出された DENV の血清型を下図に記す。DENV 1～4 型を、それぞれ黄、赤、薄紫、黒丸として記す。

図 10 に、1978～2007 年の DENV 感染症の月別患者数を示す。比較的大きな流行 (1980 および 1986、1995 年の流行) では患者数のピークは 8～9 月と他年度におけるピーク (10～11 月) より早い傾向が認められた。

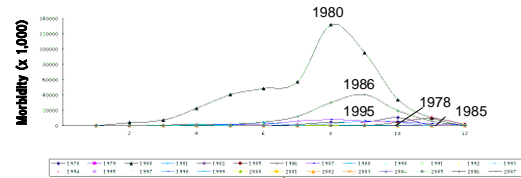


図 10. 広東省の 1978～2007 年の DENV 感染症の月別患者数の推移

各年度における DENV 感染症の月別患者数をプロットした。各年度は色の違いで示す。

広東省における、DENV 感染者の約 97% は広州市を含む珠港デルタ地域で報告されている (図 11、青い三角で示す領域)。

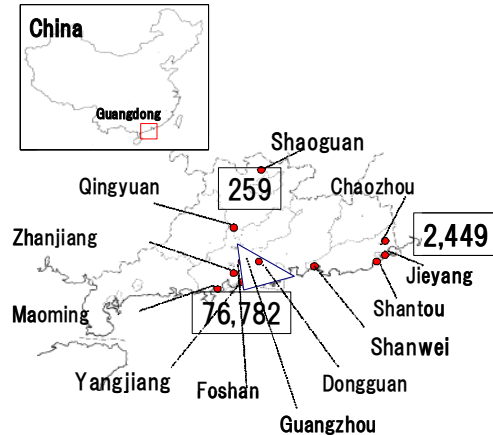


図 11. 広東省における DENV 患者数の地理的分布

図左上に広東省の位置を赤の四角で示す。1978～2007 年に省内で報告された DENV 感染者は珠港デルタとその近傍の地域 (青三角内、76,782 件) を中心に北部 (259 件) と西部 (2,449 件) より報告された。図に示す都市は調査地を示す。

そこで珠港デルタに位置する広州市 (Guangzhou) の 1978～2007 年における気象変化を調査した (図 12)。広州市では、過去 30 年間の年最高、最低、平均気温に上昇傾向が認められた (A)。年平均降水量は年による変動が認められた (B)。相対湿度の減少は顕著であり周期性が認められた (C)。また年平均日射量は周期的な変化が認められた。また、相対湿度が前年に比べ減少し、日射量が増加した年に DENV 感染症が流行していた。

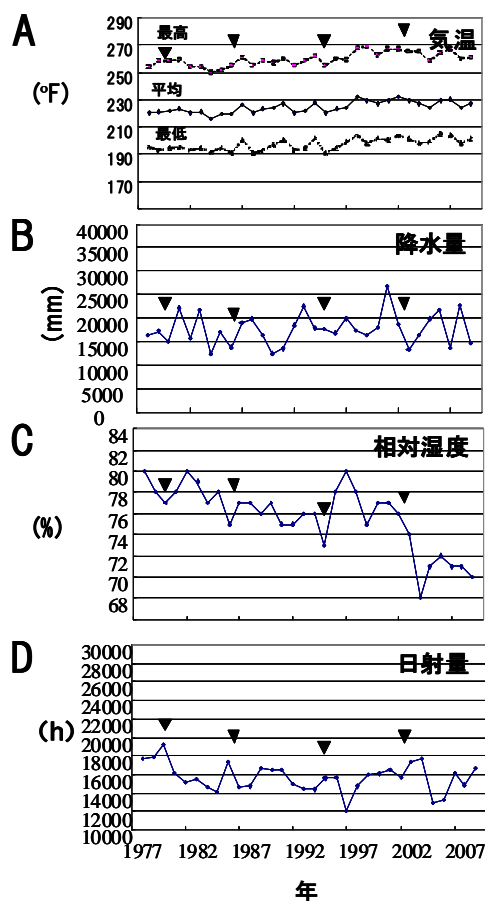


図 12. 1978～2007 年における広州市の気象

広州市における当該年の最高気温および年平均気温、最低気温 (A)、降水量 (B)、相対湿度 (C) および日射量 (D) を示す。黒三角は、比較的大きな DENV 感染症の流行が認められた年を示す。

## ② 結論

中国・広東省での DENV 感染症の流行は、日射量や湿度等様々な気象因子と関連している可能性があり、地球温暖化に伴う気象変動と当該ウイルス感染症の流行との因果関係について、更に詳細な検討が必要である。

## 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 12 件)

- ① Maeda, A., and Maeda, J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet. J.*, 195: 33-40, 2013, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.08.019., 査読有
- ② Zheng, K., Zhou, H.-Q., Yan, J., Ke, C.-W., Maeda, A., Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., Ma, H., and Xie, X.-M. Molecular characterization of the E gene of dengue virus type 1 isolated in

Guangdong Province, China, in 2006. *Epidem. Inf.* 137: 73-78, 2009, doi: 10.1017/S0950268808000617., 査読有

- ③ Maeda, J., Takagi, H., Hashimoto, S., Kurane, I., and Maeda, A. A PCR-based protocol for generating West Nile virus replicons. *J. Virol. Methods*, 148: 244-252, 2008, doi: 10.1016/j.jviro.2007.12.005., 査読有

〔学会発表〕 (計 13 件)

- ① 前田秋彦, Chang-Wen, Ke, Jiang Shu, 倉根一郎. 中国・広東省の 1978-2010 年におけるデングウイルス感染症の流行調査. 第 18 回 トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会, 2011.11.11. 東京
- ② Maeda, A., and Ke, ChangWen. Epidemiological study of mosquito-borne diseases in Guangdong province, China. WHO meeting, 2010.10.12. Guangzhou, China
- ③ 前田潤子, 村田亮, 菊和宏明, 倉根一郎, 高島郁夫, 前田秋彦. ウエストナイルウイルスと日本脳炎ウイルスの鑑別中和試験法の開発. 第 146 回日本獣医学会. 2008.9.24. 宮崎

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Ma, H., Ke, C.-W., Maeda, J., Takashima, I., Kurane, I., and Maeda, A. Epidemiological study on Flaviviruses in Guangdong province, China, 2005-2007. pp89-101, Ed. Maeda, A., RESEARCH SIGNPOST, India, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前田 秋彦 (MAEDA AKIHIKO)  
京都産業大学・総合生命科学部・教授  
研究者番号: 70333359

### (2) 研究分担者

前田 潤子 (MAEDA JUNKO)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・  
客員研究員  
研究者番号: 70399989  
(H20: 研究分担者)

### (3) 研究協力者

Ke Chang-Wen (KE CHANG-WEN)  
中国・広東省 CDC・所長  
研究者番号: なし  
Shu Jiang (SHU JIANG)  
中国・広東省 CDC・研究員  
研究者番号: なし