神奈川県衛生研究所研究報告　No. 48 (2018)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

総説

蚊媒介ウイルス感染症
～日本脳炎とデング熱～

髙崎智彦

Mosquito-borne viral diseases
－Japanese encephalitis and dengue fever－

Tomohiko　TAKASAKI

Key Words：Japanese encephalitis, dengue fever, Vector, Fcγ receptor, *Callithrix jacchus*

はじめに

蚊媒介ウイルス感染症のなかで，日本が大きな役割を果たした疾患として日本脳炎とデング熱があげられる．日本脳炎ウイルス，デングウイルスとも世界で初めて日本人により分離された．日本脳炎ウイルスに対するワクチンは，1954年に実用化された後，改良が重ねられVero細胞を用いた細胞培養不活化ワクチンが実用化され現在に至っている．また日本脳炎ウイルスがブタとコガタアカイエカの間で生活環を形成していることが国立予防衛生研究所と多くの地方衛生研究所の協力によって1960年代に明らかにされた．一方，2014年に東京で国内流行が発生したデング熱については，その流行の歴史とワクチン開発の困難な理由とワクチン評価のための動物モデル開発について新世界ザルであるマーモセットを用いた霊長類モデルを中心に詳述する．

日本脳炎研究の歴史

日本脳炎ウイルスが蚊によって媒介されることは，昭和10年から16年にかけて日本の研究陣が明らかにした世界に誇る業績であった．昭和10年（1935年）には日本脳炎患者の脳組織から日本脳炎ウイルス（中山株）が初めて分離され，中山株は戦後の日本脳炎ワクチン製造用株となった．しかし，太平洋戦争によりその後の研究は中断されていた．終戦後の日本脳炎に関する研究は，神奈川県座間市にあった米軍406研究所がリードし，主たる媒介蚊がコガタアカイエカであること，ブタとゴイサギの感染が大量の感染蚊の発生に関連があるらしいことまでをつきとめていた．昭和33年米国ロックフェラー研究所での留学を終え帰国した大谷明博士は，国立予防衛生研究所にウイルス学者，昆虫学者，獣医学者を含む日本脳炎研究チームを結成し，日本脳炎患者発生の多かった群馬県を選び，群馬県衛生研究所の協力を得て研究の拠点とした．昭和34年（1959年）の夏季の夕暮れ時に家畜小屋周辺で採取した蚊から39株の日本脳炎ウイルスが分離された．そのうち38株はコガタアカイエカから分離され，日本脳炎ウイルスの主媒介蚊がコガタアカイエカであることが明らかになり，その吸血嗜好性，環境における免疫のない動物の個体数などから飼育ブタが強く疑われ，白暮の頃に無作為に採集した吸血メス蚊の血液の抗原分析からもブタが増幅動物であると判断されるにいたった．この頃から全国の地方衛生研究所が，日本脳炎研究チームの仕事に興味を示し，積極的な協力が得られることになった．東京都衛生研究所で芝浦のと畜場のブタの日本脳炎抗体保有調査をしたところ，初夏には日本脳炎未感染の個体が９割以上を占めていたが，夏季のある時点から突如として高率の抗体陽性（感染）が認められ，その時点から３週間後に患者発生のピークがみられた．この現象は日本各地で確認され，ブタ→カ→ヒトの日本脳炎ウイルスの自然生態環が明らかになった[1]．この知見をもとに，日本脳炎ウイルスの活動状況をモニターするために，感染症流行予測事業における日本脳炎感染源調査が1965年に開始され，現在まで毎年実施されている．その内容は夏季を中心に，各都道府県において，日本脳炎ウイルスの活動の指標として飼育ブタの赤血球凝集抑制（Hemagglutination Inhibition：HI）抗体保有率と2-Mercaptoethanol 感受性抗体（2-ME 感受性抗体；IgM抗体）の出現を追跡するものである．その調査によると，夏季には日本脳炎ウイルスに感染しウイルスを保有した蚊が発生し，多くのブタが感染しており，日本脳炎ウイルスは依然として関東以西の日本国内の自然界で活発に活動している．小西らは，2007年から2008年度に採血された熊本県住民の年間自然感染率を調査した結果，約2.6%という感染率を報告している[2]．また，この50年以上にわたる膨大な調査結果は，地球温暖化の解析にも利用され，気温や降水量との相関に関して報告されている[3]．

日本脳炎ワクチン開発

日本脳炎ワクチンが開発されたのは1954年である．1955年に実用化された当時のワクチンは，中山株をマ

神奈川県衛生研究所　所長
〒253-0087　茅ヶ崎市下町屋1-3-1

ウス脳内に接種し，ウイルスが増殖しマウスに脳炎の症状が出現した時期に脳を採取し，5%脳乳剤の遠心上清を調製後，ホルマリンを加えて不活化したもので，接種により熱発や発赤腫脹が頻発した．その後改良を重ね1971年には総蛋白窒素量0.01mg/mＬ 以下と精製度を高め，1976年には日本薬局方に収載された．1989年には日本脳炎野生株に対してより幅広く中和抗体を誘導する北京株（Beijing-1株）に変更された．マウス脳由来日本脳炎不活化ワクチンの製造技術は国際協力事業団（JICA）の協力によりタイ，インドへ，WHO西太平洋地域事務局によりベトナムに技術移転が行われ，その他台湾，韓国などにも技術移転され，これらの国々の日本脳炎の流行制御に大きく寄与した．

1990年代になってマウスを用いたワクチン製造は，動物愛護のためとマウスの確保の不安定性からの脱却のためにVero細胞を用いた製造法への変更が検討され始めた．Vero細胞が使用された理由は，1980年代にフランスで，Vero細胞を用いて不活化ポリオワクチンと狂犬病ワクチンが製造されていたこと，WHOのワクチン製造用細胞としてガイドラインで承認されていた[4]ことによる．細胞培養日本脳炎ワクチンの実用化が成功したのは，日本脳炎ウイルスを増殖させやすいVero細胞を，マイクロキャリアー（Cytodex）に付着させてタンク培養する技術が開発されたことである．Vero細胞は，1962年に安村美博博士により樹立された細胞で，インターフェロンを産生せず腫瘍原性も有しない株化細胞である[5,6]．その後，この細胞培養不活化日本脳炎ワクチンは2009年６月に使用が開始された．

日本脳炎ウイルスの流行遺伝子型の変遷

日本脳炎ウイルスは単一血清型であるが，遺伝子型ではⅠからⅤ型に分類される．現在東アジア，東南アジアでの主流行株はⅠ型である．日本においても1990年以前の主流行株はⅢ型であったが1990年代前半にⅠ型に置き換わった．この現象は遺伝子型シフト（genotype shift）と呼ばれ，時期に多少のずれはあったがアジアの主流行株は遺伝子Ⅲ型からⅠ型にシフトした．しかし近年，遺伝子Ⅴ型ウイルスの検出がしばしば報告されている．Ⅴ型ウイルスは1952年にマレーシアで流行した[7]後，検出されてこなかったが，2009年に中国[8]で，2010年韓国で確認され[9]，その後も韓国や中国でたびたび検出，分離されている．今後，Ⅴ型ウイルスによる遺伝子型シフトが発生しないかモニターする必要がある．

デング熱流行の歴史

デング熱は，18世紀から20世紀前半まで中東，東南アジアや台湾においてしばしば流行が発生したが，世界的規模の流行はなかった．しかし，1980年代には南米，1990年代はブータン，ネパール，北米（ハワイ，フロリダ州），ギリシャ，フランス，スペインおよび中国においても国内発生が報告された．現在では，世界各地の100ヶ国以上がデング熱の流行地域である．2000年以降，アフリカ大陸においても報告数が増加傾向にあり，渡航者の症例報告を含めて，大陸の13カ国以外，すべてのアフリカ諸国はデング熱の症例が確認された．日本においては，1942～1945年にかけて約20万人規模の国内流行が西日本で発生した太平洋戦争中は，南方戦線からの帰還兵や軍関係者などの輸入症例によって長崎，佐世保，福岡，広島，呉，神戸，大阪で流行が発生した[10]．この流行のなかで1943年，長崎のデング熱患者からデングウイルス１型（望月株）が堀田進博士らによって分離された[11]．これが世界で最初に分離されたデングウイルスである．1945年以降，約70年間は，デング熱の国内発生は報告されなかったが，2014年に東京を中心にデング熱の小流行が発生し，蚊媒介ウイルス感染症に対する関心が高まった．

デングワクチン開発

デングウイルスが単一血清型のウイルスであれば，デングウイルス望月株を製造用株として日本脳炎同様不活化ワクチンが作られたであろうが，デングウイルスは４種の血清型（DENV-1～DENV-4）があること，デング熱の流行地の経済状況を考えるとより安価な生ワクチンが望まれることから，デングワクチンの開発は弱毒生ワクチンの開発に向かった．デング熱の流行地は，複数の血清型が同時に流行することもあり，疫学的にデングウイルス再感染患者は，重症型デング熱の発症リスクが初感染者より比較的に高い．このことから，ワクチン接種によりすべての４種血液型ウイルスに対して感染防御免疫を誘導しなければならいがDENVの４種血清型間の交差防御力は弱く，また，単価ワクチンでは感染増強の可能性が懸念されることが，デングワクチン開発にとって大きな困難をもたらしてきた．特にワクチンの有効性を評価するための正しい免疫学的指標を何にするかという問題と理想的なデングウイルス感染動物モデルがなかったことは大きな障害となった．

日本脳炎ワクチンの有効性評価の免疫学的指標として中和試験による中和抗体価10倍以上を指標[10]として，予防接種政策を推進してきて現在のコントロール下にあるのであるが，４種の血清型があるデングウイルスに関しては，中和試験において交差反応が存在し，交差性中和抗体の感染防御能が弱いため中和抗体価10倍を指標に

はできない．さらに，中和能のない抗体であっても血清型の異なる血清型のデングウイルスと抗原抗体複合物を形成するが，その抗原抗体複合物が感染性を有したまま抗体のレセプターであるFcγレセプターを介して細胞に取り込まれ増殖するという抗体依存性感染増強（ADE）をきたす．この現象は一般に中和試験によく使われるFcγレセプターを持たないVero細胞やBHK細胞による中和試験で反映することはできない．そこで我々の研究グループは，BHK細胞にFcγⅡA遺伝子を組み込んだ細胞を作製した[12]．この細胞を用いて中和試験を実施すると交差中和反応を除外できる[13]こと，患者血液中の感染性のあるウイルス抗体複合体も検出できることにより，本来生体内に存在すると考えられるより多くの感染性ウイルス粒子を検出できることが明らかになった[14]．また，抗体が出現する時期になると血液からのウイルス分離効率が下がることが多いが，FcγⅡA遺伝子搭載BHK細胞を用いることで分離率が向上し，ADE活性をもつ単クローン抗体を添加することで低ウイルス血症の血液からも分離できる場合がある[15]．

デングウイルス感染動物モデル開発は，わが国でもウイルスが分離される以前の大正時代に，患者の血液をさまざまな動物に接種して同様の症状が発生しないかといった研究がなされていた[16]．その後も，マウス，ラット，モルモット，ウサギ，イヌ，ヤギなどの哺乳類をはじめハトやトカゲにいたるまで試されたがいずれも明確な症状を呈することはなかった[17]．デングウイルスに対して感受性のある動物は，インターフェロンノックアウトマウスやヒトIL-2Rγなどを発現させた特殊なマウスを除けばサルのみである．遺伝子改変マウスは，自然な免疫を持っていない点でワクチンの有効性評価には適さない．サルのなかでもアカゲザル（rhesus macaque）やカニクイザル（cynomolgus macaque）などの旧世界ザルは，デングウイルス感染は成立するが発病することはなく，ウイルス血症も短期間で低い[18,19]．したがって，ワクチンや抗ウイルス剤の評価モデルとしては理想的であるとはいえない．我々の研究グループは，デングウイルス感染霊長類モデルとして，南米に生息する新世界ザルであるマーモセットを見出した．デングウイルス感染マーモセットはアカゲザルやカニクイザルと比べてはるかに高いウイルス血症が確認され，接種後２~７日以上持続した[20]．マーモセットは体重が300グラム程度と旧世界ザルと比べて小さく扱いやすいという利点もある．しかし，新世界ザルであるマーモセットの免疫学的背景は旧世界ザルと比較して不明な部分が多いため，Real-time PCRによるサイトカイン等の発現解析系，コモンマーモセットMHC解析系，コモンマーモセットTCRレパトア解析系，個体識別系を確立した[21]．また，以前に弱毒生ワクチン候補として臨床試験第Ⅱ相まで進んだ弱毒生ワクチン株を用いて，デングウイルスを感染させたマーモセットのウイルス学的，免疫学的動態を解析して，臨床試験のヒトにおけるデータと近似することも確認した[22]．デングワクチンとしては，黄熱ウイルスワクチン株とデングウイルスのキメラワクチンが世界20ヶ国で承認されているが，臨床試験の継続調査の結果，ワクチン接種者がデングウイルスに感染した場合の入院率が，被接種者群より高いという結果が出て，接種対象者が過去にデング熱に罹患した人を対象とすることになっている．デングワクチン開発はより安全で有効なものを求めて今後も継続しなければならない．FcγⅡA遺伝子搭載BHK細胞とマーモセットが候補ワクチンの有効性，安全性評価に活用されることを期待している．

おわりに

蚊が媒介するウイルスは，ヒトだけに感染する天然痘ウイルス，ポリオウイルス，麻疹ウイルスと違い地球上から排除することはまず不可能である．蚊媒介ウイルスは蚊においても増殖するし，日本脳炎ウイルスではブタが増殖動物であり，デングウイルスにもある種の霊長類との間の感染環が存在する．したがってウイルスそのものを地球上から駆逐することはできない．日本脳炎に関してはワクチン接種プログラムの継続，デングウイルスに関しては有効なワクチンの実用化と効果的な媒介蚊対策の継続の両方が必要である．

謝辞

文中の「我々の研究グループ」とは，国立感染症研究所ウイルス第一部第２室を中心とした研究チームである．マーモセットの感染実験や免疫機構の解析にご協力いただいた皆様，FcγⅡA cDNAを提供していただいたロックフェラー大学Dr. Jeffrey V. に深謝します．本稿の内容の一部には厚生労働科学研究H23-shinkou-ippan-010，AMED感染症実用化研究事業 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（JP16fk0108307）によって実施された成果が含まれる．

文献

１）大谷明．ウイルス学エピソード． 第一メディカル株式会社 p44-51 （株）誠文堂（2007）
２）Konishi E, Kitai Y, Tabei Y, Nishimura K, Harada S.: Natural Japanese encephalitis virus infection among humans in west and east Japan shows the need to continue a vaccination

program. Vaccine, 28, 2664-2670 (2010)
3) Ichiro Kurane, Ken-ichi Shibasaki, Akira Kotaki, Yasuaki Hijioka, Tomohiko Takasaki.: The Effect of Precipitation on the Transmission of Japanese Encephalitis (JE) Virus in Nature: A Complex Effect on Antibody-Positive Rate to JE Virus in Sentinel Pigs. Int. J. Environ. Res. Public Health, 10, 1831-1844 (2013)
4) WHO.: WHO Requirements for continuous cell lines used for biological's production, WHO Technical Report Series (TRS) no. 745, http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_745.pdf (1987)
5) Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE.: Defectiveness of Interferon Production and of Rubella Virus Interference in a Line of African Green Monkey Kidney Cells (Vero). J of Virology, 2, 955-961 (1968)
6) Levenbook IS, Petricciani JC, Elisberg BL.: Tumorigenicity of Vero cells. J of Biol. Stand., 12:391-398 (1984)
7) Mohammed MA, Galbraith SE, Radford AD, Dove W, Takasaki T, Kurane I et al.: Molecular phylogenetic and evolutionary analyses of Muar strain of Japanese encephalitis virus reveal it is the missing fifth genotype. Infect Genet Evol., 11(5),855-862 (2011)
8) Li, M. H., Fu, S. H., Chen, W. X., Wang, H. Y., Guo, Y. H., Liu, Q. Y. et al.: Genotype v Japanese encephalitis virus is emerging. PLoS Negl Trop Dis, 5, e1231 (2011)
9) Kim, H., Cha, G. W., Jeong, Y. E., Lee, W. G., Chang, K. S., Roh, J. Y., et al.: Detection of Japanese encephalitis virus genotype V in Culex orientalis and Culex pipiens (Diptera: Culicidae) in Korea. PLoS One 10, e0116547. (2015)
10) Susumu Hotta.: Dengue epidemics in Japan, 1942-1945. J. Trop. Med. Hygiene, 56,83 (1953)
11) 堀田進：デングウイルス研究60年の回顧．ウイルス 51,105-107 (2001)
12) Meng Ling Moi, Lim CK, Takasaki T, Kurane I.: Involvement of the Fc γ receptor IIA cytoplasmic domain in antibody enhancement of dengue virus infection. J Gen Virol. 91, 103-111 (2010)
13) Moi ML, Lim CK, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I.: Discrepancy in Neutralizing Antibody Titers between Plaque Reduction Neutralizing Tests Using Fc{gamma}R-negative and Fc{gamma}R-expressing BHK-21 cells. Clin Vaccine Immunol. 17, 402-407 (2010)
14) Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Akira Kotaki, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane: Detection of Higher Levels of Dengue Viremia Using Fc γ R - expressing BHK-21 Cells than Fc γ R - negative Cells in Secondary Infection but Not in Primary Infection. The Journal of Infectious Diseases. 203, 1405-1414 (2011)
15) Moi ML, Lim CK, Tajima S, Kotaki A, Takasaki T, Kurane I.: Dengue virus isolation relying on antibody-dependent enhancement mechanism using Fc γ R-expressing BHK cells and a monoclonal antibody with infection-enhancing capacity. J Clin Virol. 52(3):225-230.2011
16) 小泉　丹，山口謹爾，殿村京造．「デング」熱ノ研究．學説及實驗．大正五年巻　432－463 (1916)
17) Tenji Taniguchi, Tunesaburo Fujino, Yoshimori Okuno, et al.: Studies on the experimental inoculation of dengue fever. Medical Journal of Osaka Univ. 2,1-36 (1951)
18) Marchette, N. J., Halstead, S. B., Jr. Falkler W. A., Stenhouse A. & Nash D. (1973). Studies on the pathogenesis of dengue infection in monkeys. III. Sequential distribution of virus in primary and heterologous infections. J Infect Dis 128, 23-30.
19) Ito, M., Mukai, R. Z., Takasaki T., Kotaki A. & Kurane I: Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in vitro by undiluted sera from monkeys infected with heterotypic dengue virus. Arch Virol. 155, 1617-1624 (2010)
20) Omatsu T, Moi ML, Hirayama T, Takasaki T, Nakamura S, Tajima S, et al.: Common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a primate model of dengue virus infection: development of high levels of viraemia and demonstration of protective immunity. J Gen Virology. 92, 2272-2280 (2011)
21) Kitaura K, Fujii Y, Matsutani T, Shirai K, Suzuki S, Takasaki T, et al.: A new method for quantitive analysis of the T cell receptor V

region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay. J Immnol Mrthods. 352, 287-300 (2012)

22) Moi ML, Ami Y, Muhammad Azami NA, Shirai K, Yoksan S, Takasaki T, et al.: Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates. J Gen Virol., 98, 2955-2967 (2017)

Mosquito-borne viral diseases
—Japanese encephalitis and dengue fever—

Tomohiko TAKASAKI

Japanese encephalitis virus (JEV) and dengue virus (DENV) were isolated firstly in Japan. Japanese scientists have contributed to the study and vaccine development for both viruses. The history and research on JE were summarized, and our research results on dengue were introduced in the summary. The life cycle of JEV between pigs and mosquitoes (*Culex tritaeniorhynchus*) was elucidated in 1960 by Japanese research team. The team consisted of Japanese national institute of health and some prefectural public health institutes. On dengue the general understanding on the biological properties of antibody in protection against DENV infection is based on neutralizing antibody levels determined by FcγR-negative cells using conventional plaque reduction neutralizing test (PRNT). In the absence of FcγR, conventional PRNT do not consider infection-enhancement activity, and the potential of these infection-enhancement activity that may hamper neutralizing activity. For examples the conventional PRNT could not detect infective DENV-antibody complexes, meanwhile PRNT using FcγR-expressing BHK cells which can detect infective DENV-antibody complexes exclude the heterologous neutralizing antibodies. On the other hand, one of the major obstacles to dengue vaccine development is the animal model to evaluate efficacies and safeties. We found that marmosets are good non-human primate (NPH) models. The marmosets infected with dengue viruses showed enough viremia to evaluate the efficacy of dengue vaccines.