チクングニアウイルス感染蚊の体内における ウイルスの消長

山西 浩* 小西 英二**

* 神戸学院女子短期大学 (〒653 神戸市長田区林山町 27-1)

** 神戸大学医学部医動物学教室 (〒650 神戸市中央区楠町 7)

(受領: 1987 年 8 月 8 日)

Studies on the development of chikungunya virus
in the organs of infected mosquitoes

Hiroshi YAMANISHI and Eiji KONISHI

* Kobe Gakuin Women's Junior College, Nagata-ku, Kobe 653, Japan

** Department of Medical Zoology, Kobe University School of Medicine,
Chuo-ku, Kobe 650, Japan

Key words: chikungunya virus, *Aedes albopictus*, midgut, hemolymph.

はじめに

蚊のチクングニアウイルス感受性は種によって異なる。一般的に *Aedes albopictus* や *Ae. aegypti* などの *Aedes* 属では感受性は高く, *Culex fatigans*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. poicilipes* や *Cx. quinquefasciatus* などの *Culex* 属では低い (山西ら, 1983; McIntosh and Jupp, 1970; Jupp *et al.*, 1981)。また蚊のウイルス伝搬能力は増幅動物に対する吸血嗜好性の有無, 吸血活動の範囲あるいは個体群の大きさなどによって影響されるが, 種のもつウイルス感受性は伝搬能力に及ぼす最も基本的な要因である。

蚊の各器官におけるウイルスの消長は感受性決定の機構を知るうえできわめて興味深い。したがってこの観点での研究は多く, *Culex tarsalis* における西部馬脳炎ウイルスの増殖 (Thomas, 1963), *Culex pipiens* における日本脳炎ウイルスの増殖 (LaMotte, 1960), *Culex annulirostris* における MVE ウイルスの増殖 (McLean, 1953), *Culex tritaeniorhynchus* における日本脳炎ウイルス (Doi, 1970; Takahashi, 1982) あるいは *Aedes albopictus* におけるデング熱ウイルスの増殖 (Kuberski, 1979) などの報告がある。

筆者らはヒトスジシマカにおけるチクングニアウイルスの感受性を調べている。ヒトスジシマカをはじめ種々の蚊でのチクングニアウイルス感受性 (山西ら, 1983), 高感受性のヒトスジシマカにおける系統間の感受性の比較 (山西ら, 1984; 山西・小西, 1986; Konishi and Yamanishi, 1986) について報告してきた。

これらの報告でチクングニアウイルスの蚊の感受性は種や系統で著しく異なっていることが明らかとされた。そこでウイルス感染後に器官でのウイルス消長を調べ, 種によってウイルス感受性が異なる原因を探った。その結果若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

蚊

今回の実験で使用した蚊はヒトスジシマカ (オアフ系, 兵庫系, 仙台2系), ネットアイシマカ (フィリピン系) およびコガタアカイエカ (大阪系) であった。それぞれの系統の由来は次のとおりである。オアフ系はハワイ大学, Arbovirus Program, Rosen 研究室で累代飼育されていた系統であり, 1983 年 8 月より本研究室で累代飼育している。兵庫系は実験の前に採集し 3 代累代飼育した後実験に供した。仙台2系は長崎大学医学部医動

物教室より1985年5月に分与された系統である。ネッタイシマカ、フィリピン系はフィリピン大学寄生虫研究室より分与され、コガタアカイエカは大阪府公衆衛生研究所医動物研究室より分与された系統である。これらの蚊の飼育は約27°C、相対湿度70%、長日条件(16時間明、8時間暗)下で行った。幼虫は1,000個体を30×50 cmのバット容器に入れマウス用固形飼料の粉末を与えて飼育した。成虫は30×30×30 cmの布ケージに移しておよそ0.7%の砂糖水を与えて飼育した。

ウイルス

感染実験に使用したチクングニアウイルスは、分離後乳飲みマウス脳で174代継代したもので大阪大学微生物病研究所より分与されたアフリカ株である。この株をBHK-21単層培養細胞で4代継代したものを使用した。

感染方法

約50°Cの湯を入れた100 mlの三角フラスコに脱脂綿を固定し、その脱脂綿にウイルス混入血液を約10 mlしみこませ、ケージに入れて蚊に吸わせた。ウイルス混入血液はおよそ 1.3×10^9 PFU/mlの感染培養液1 mlをめん羊脱繊維血20 mlと混合したものである。ウイルスを経口的に感染させたときの蚊の日齢は羽化後6～8日であった。ウイルス混入血液を吸血した蚊は別のケージに移して飼育した。

ウイルスの測定方法

コガタアカイエカ、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカでの感染後の体内でのウイルスの消長を比較するため、頭胸部、中腸および中腸をとり除いた腹部の3部分において感染後のウイルス量を測定した。ただし吸血直後は中腸の摘出が困難であったので、ウイルスの測定は頭胸部と腹部の2部分に分けて行った。

チクングニアウイルス感受性の異なるオアフ系と兵庫

系でウイルス感染後、脳、唾液腺、中腸、体液でウイルス量を経口的に調べ比較した。さらにオアフ系と仙台2系でも体液でのウイルス量の変動を比較した。体液はPBSで腹部を洗浄し、洗浄後のPBSのウイルス量を測定した。ウイルス量の測定方法は山西ら(1984)などと同様である。

結 果

実験 1 感染後のコガタアカイエカ、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ(兵庫系、オアフ系)の頭胸部、中腸、腹部におけるチクングニアウイルスの変動

チクングニアウイルス感染後の頭胸部、中腸、中腸を除いた腹部のウイルス量をFigs. 1～4に示した。コガタアカイエカではチクングニアウイルスは増殖しないので(山西ら, 1983)血液が完全に消化した感染後4日めまでウイルス量を測定した。感染直後のウイルス量は $10^{4.5} \sim 10^{4.9}$ PFUであった。感染直後に測定した5個体のうち2個体で頭胸部に少量のウイルスが検出された。これは血液が消化器官を通過したとき、頭胸部の消化器官の内壁に付着していたものであろう。感染後1日目には中腸にだけ感染直後よりやや低い値のウイルスが認められ、感染後2日目と3日目には頭胸部、中腸、腹部のいずれの部位からもウイルスは検出されなかった。

ネッタイシマカの感染直後の中腸におけるウイルス量は $10^{4.8} \sim 10^{5.2}$ PFUであったが、頭胸部にも少量のウイルスが検出された。感染後1日目にはやはり中腸にのみウイルスが認められた。与えたウイルス量が異なっていたためか感染直後のウイルス量はやや多かったが、感染後1日目にはコガタアカイエカとほぼ同じ量になった。2日目以降は一部の個体の中腸にのみウイルスが検出された。2日目から14日目にかけて調べた25個体の

Fig. 1 Chikungunya virus titer (log PFU) in head/thorax, abdomen (without midgut) and midgut of individual *Culex tritaeniorhynchus* mosquitoes after oral infection.

Fig. 2 Chikungunya virus titer (log PFU) in head/thorax, abdomen (without midgut) and midgut of individual *Aedes aegypti* mosquitoes after oral infection.

うち中腸でウイルスの認められた個体の割合は12.0%であった。

ヒトスジシマカ兵庫系では感染直後は中腸で $10^{4.3} \sim 10^{4.6}$ PFUであり、頭胸部で2個体にウイルスが検出された。感染後1日目にはやはり中腸に $10^{2.8} \sim 10^{4.0}$ PFUのウイルスが検出されたが、2日目以降のウイルスの消長は前の2種とは著しく異なっていた。感染後2日めに1個体で頭胸部、中腸、腹部のすべての部分からウイルスが検出され、頭胸部でのウイルス量は感染時のウイルス量とほぼ同じであった。さらに3日めにも $10^{2.1}$ PFUと量はやや低いけど頭胸部からも検出された。しかし2～4日めの感染初期に中腸でウイルスの検出されなかった個体も多く、15個体のうち8個体とおよそ半数を占めた。しかし感染後7日め、14日めには10個体のうち9個体からウイルスが検出された。しかし頭胸部や腹部(中腸を取り除いた残部)からはウイルスは検出されなかった。

オアフ系ヒトスジシマカでは感染直後は中腸で $10^{4.3} \sim 10^{4.8}$ PFUと兵庫系や他の種とほぼ同じであったが、頭

胸部でウイルスの検出された個体が4個体と多かった。感染後1日目にはウイルスは中腸だけに認められ、兵庫系あるいは他の種とまったく同じ傾向であった。感染後2～4日めは全個体の中腸でウイルスが検出された。中腸を取り除いた腹部では2日め、3日めに1個体ずつ、4日めに4個体にウイルスが検出された。頭胸部では感染後3日めに1個体、4日めに3個体にウイルスが検出された。4日めには $10^{5.4}$ PFUと高いウイルス量を示す個体も観察された。7日め、14日めにはすべての部分でウイルスが検出された個体が10個体のうち6個体あった。ウイルス量は頭胸部でもっとも高く、最高で $10^{7.3}$ PFUであった。ウイルスの動向を兵庫系と比較すると、感染初期の2～4日めの感染率、7日目以降の増殖ウイルス量に違いがみられた。

実験2 ヒトスジシマカ兵庫系とオアフ系の脳、唾液腺、中腸前部および後部におけるウイルスの消長

ヒトスジシマカオアフ系でウイルス感染後3日め、7日め、14日めに脳、唾液腺、中腸前部および後部でウイルス量を測定した。また兵庫系で14日めに同様に測定

Fig. 3 Chikungunya virus titer (log PFU) in head/thorax, abdomen (without midgut) and midgut of individual *Aedes albopictus* (Hyogo strain) mosquitoes after oral infection.

してオアフ系と比較した (Table 1). オアフ系では感染後 3 日目にはすべての個体の中腸後部にウイルスが検出され、また 2 個体には中腸前部にもウイルスが認められた。7 日目にはまったくウイルスの検出されない個体が 2 個体あったが、脳、唾液腺の両方に高いウイルス量を認めた個体が 1 個体あった。14 日目には 4 個体に全器官で、また 2 個体に中腸のみにウイルスを検出した。いっぽう、兵庫系の感染後 14 日目には 7 個体のうち 6 個体で中腸にウイルスが認められた。実験 1 と同様兵庫系とオアフ系における蚊体内でのウイルスの消長の違いが示された。

実験 3 ヘモリンフにおけるウイルスの出現

実験 1, 実験 2 において、中腸におけるウイルスの増殖およびそこからのウイルスの移動が、蚊のウイルス感受性を決定しているように思われたので、中腸から他の器官へのウイルスの移動におけるヘモリンフの役割に注目し、ヒトスジシマカの各系統でウイルスの変動を比較した。感染後 7 日目に兵庫系とオアフ系で脳、ヘモリン

フ、中腸でウイルス量を比較して Table 2 にまとめた。オアフ系では 7 日目には測定した 8 個体のすべての中腸にウイルスが認められたが、そのうち 6 個体がヘモリンフから、また 3 個体が唾液腺からウイルスが検出された。兵庫系では全個体で中腸にウイルスが検出されたが、ヘモリンフでは 3 個体、唾液腺で 1 個体であった。

兵庫系よりやや感受性の高い仙台 2 系とオアフ系で中腸と体液のウイルス量を比較した (Fig. 5). オアフ系では感染直後から 1 日目にかけて中腸でのウイルス量は $10^{2.0} \sim 10^{3.0}$ PFU とやや低かったが、2 日目より 10^3 台となりウイルスが維持されていた。14 日目にはおよそ $10^{4.0}$ PFU に達した。ヘモリンフでのウイルスは感染後 1 日目に $10^{2.0}$ PFU 程度で検出されたが、感染後の日数がたつにつれてウイルスの検出されない個体もみられた。検出された個体ではウイルス量は多くなり、6 日目には $10^{4.2}$ PFU, 14 日目には $10^{5.5}$ PFU となった。

仙台 2 系では中腸では感染直後より 7 日目までおよそ $10^{3.0}$ PFU であり、14 日目には $10^{5.0}$ PFU と高いウイ

Fig. 4 Chikungunya virus titer (log PFU) in head/thorax, abdomen (without midgut) and midgut of individual *Aedes albopictus* (Oahu strain) mosquitoes after oral infection.

ルス量の個体が観察された。ヘモリンフでは感染直後は $10^{1.0} \sim 10^{2.3}$ PFU であった、2～7 日めにかけて検出されない個体が多かった。14 日めには $10^{3.0} \sim 10^{5.0}$ PFU とウイルス量の多い個体もみられた。オアフ系と仙台 2 系のウイルス消長を比較すると中腸ではほぼ同じ傾向がみられたが、ヘモリンフではオアフ系ではウイルスが維持されている個体が多く、仙台 2 系ではウイルスの検出されない個体が多いところに系統間の違いが認められた。

感染血液を吸った直後の蚊の中腸のウイルス量は $10^{4.3} \sim 10^{4.8}$ PFU であったが (Fig. 4), この実験では $10^{1.8} \sim 10^{2.4}$ PFU と低かった。これは中腸の洗浄の結果であるが、早い時期にウイルスが中腸壁に吸着することが示唆された。

考 察

チクングニアウイルスに感受性のまったくないコガタアカイエカ、感受性の非常に低いネッタイシマカ、感受

性のあるヒトスジシマカ兵庫系、ヒトスジシマカオアフ系における経口感染後の中腸、腹腔、頭胸部でのウイルス消長を比較した。中腸での血液の消化は吸血後 2 日めにほぼ完了するが (Konishi and Yamanishi 1986), ウイルス感受性がまったくないコガタアカイエカの場合には血液の消化とともにウイルスが完全に消失していた。また低い感受性を示すネッタイシマカでは初期の状態はコガタアカイエカと同じ傾向がみられたが、2 日め以降に一部の個体の中腸でウイルスが保持されていた。ウイルス感受性の高いヒトスジシマカ兵庫系やオアフ系では感染後の中腸でのウイルス保持が継続され、系統によって中腸以降のウイルスの動向が異なっていた。このようにチクングニアウイルスの感受性は血液消化に伴って中腸で決定されるようである。

この中腸での感受性決定は他のウイルスでも報告されている。ウイルスに感染した後の蚊の器官でのウイルスの移行は蛍光抗体法を用いて Doi (1970) がコガタアカイエカで日本脳炎ウイルス, Kuberski (1979) がヒトス

Table 1 Virus titer in organs of *Aedes albopictus* at intervals after oral infection.

Specimen No.	Brain	Salivary glands	Anterior of midgut	Posterior of midgut
Oahu strain				
3rd day	1	<1.00	<1.00	3.11
	2	<1.00	<1.00	2.78
	3	<1.00	<1.00	3.60
	4	<1.00	<1.00	2.75
	5	<1.00	1.70	3.64
	6	<1.00	<1.00	3.72
	7	<1.00	<1.00	2.04
7th day	1	<1.00	<1.00	<1.00
	2	<1.00	<1.00	<1.00
	3	<1.00	<1.00	2.36
	4	5.15	5.57	3.89
	5	<1.00	<1.00	2.41
	6	<1.00	<1.00	3.30
	7	<1.00	—	3.49
14th day	1	3.69	3.64	3.96
	2	<1.00	<1.00	3.14
	3	<1.00	<1.00	3.59
	4	<1.00	<1.00	—
	5	4.00	5.36	5.73
	6	5.11	5.30	3.32
	7	3.51	5.27	5.67
Hyogo strain				
14th day	1	<1.00	<1.00	<1.00
	2	<1.00	<1.00	3.88
	3	<1.00	<1.00	3.45
	4	<1.00	<1.00	3.38
	5	1.85	<1.00	3.00
	6	<1.00	<1.00	3.62
	7	<1.00	1.00	2.67

Table 2 Virus titer in salivary glands, hemolymph and midgut of *Aedes albopictus* on 7th day after oral infection.

Specimen No.	Salivary glands	Hemolymph	Midgut
Oahu strain			
1	<1.00	<1.00	3.08
2	<1.00	3.38	4.81
3	<1.00	<1.00	3.69
4	4.64	4.48	4.11
5	<1.00	3.11	4.73
6	5.00	4.08	4.68
7	2.49	3.43	4.41
8	<1.00	2.80	4.55
Hyogo strain			
1	<1.00	4.62	3.38
2	<1.00	<1.00	4.60
3	<1.00	<1.00	3.95
4	3.89	5.08	3.23
5	<1.00	<1.00	3.48
6	<1.00	3.88	3.60
7	<1.00	<1.00	3.98

ターの有無が考えられる。それ以外に囲食膜の作用、インターフェロンないし類似のウイルス増殖抑制物質の産生（高橋ら，1973）などが考えられる。

培養細胞におけるチクングニアウイルスの成熟過程をみるとウイルス前駆体の細胞質膜下への出現，前駆体の細胞膜の突き上げとウイルス envelope の形成，ウイルス感染によって修飾された細胞膜による前駆体のつつみこみを経て成熟するという（松村，1975）。このようなウイルス成熟過程で中腸の生理的環境が影響を及ぼすのであろう。

ウイルス感受性の定量的表現として5%程度あるいは50%を感染せしめるウイルス量としての minimum infective dose や50% infective dose など種々の方法が使われている。蚊の感受性をみると中腸でのウイルスの動態は重要である。したがって中腸で血液の消化が完了した時期における腸内のウイルス量あるいは感染率は感受性の定量的な値を示すと思われる。実験1で血液が消化される感染後2～3日めのウイルス感染率で示すと、コガタアカイエカ0%、ネッタシマカ10%、ヒトスジシマカ兵庫系40%、同オアフ系では100%となり、それぞれの種あるいは系統の感受性の違いが表されている。

ウイルス感受性のあるヒトスジシマカの系統間でも器

ジシマカでデング2型ウイルスを報告している。また LaMotte (1960) はネッタイエカに日本脳炎ウイルスを感染させ10週間にわたって器官別にウイルス量を測定している。

これらの報告ではチクングニアウイルスの場合も含めて感染後の蚊器官間のウイルスの移行日数は異なるが、ウイルスの初期感染はいずれも中腸後部の表皮細胞に始まることが示唆されている。しかしウイルスの増殖が中腸で決定される機構については明らかでない。

中腸でのウイルスの増殖または不活化に影響を及ぼす要因としてまず中腸上皮細胞のウイルスに対するレセプ

Fig. 5 Virus titer (log PFU) in hemolymph (●) and midgut (○) of *Aedes albopictus* (Oahu and Sendai 2) strains at intervals after infection.

官でのウイルス移行は異なっていた。オアフ系、兵庫系、仙台2系のいずれの系統でも感染後腸でウイルスがみられた。どの系統でも腸でのウイルス量はおよそ $10^{4.0}$ 台を越えなかった。しかし脳や唾液腺など他の器官への感染はオアフ系で著しかった。これはヘモリンフの中のウイルスにもみられ、腸以降のウイルスの動態に興味をもたれた。兵庫系などではウイルスを腸にとどめておく機構があるのかもしれない。

ま と め

コガタアカイエカ、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ兵庫系、ヒトスジシマカオアフ系でチクングニアウイルス感染後の体内でのウイルス消長を調べた。腸、腹部(腸を取り除いた残部)と頭胸部の3部分に分けて、感染後のウイルス量を測定した。コガタアカイエカでは感染後2日めに腸でウイルスは消滅した。ネッタイシマカでは感染後2日めに腸で消滅した個体が多かったが、一部の個体では腸でウイルスが認められた。ヒトスジシマカ兵庫系では腸に多くの個体でウイルスが存

在していたが、感染後日数を経ても他の部分ではほとんど検出されなかった。ヒトスジシマカオアフ系では腸をはじめ腹部、頭胸部でもウイルスがみられた。このように腸におけるウイルスの動態は感受性決定に重要であり、ウイルス感受性の差を示す方法として血液消化時のウイルス保有率で表現することができよう。また感受性の高いヒトスジシマカでは系統によって器官間のウイルス移行の差がみられた。

引用文献

- Doi, R. (1970): Studies on the mode of development of Japanese encephalitis virus in some groups of mosquitoes by the fluorescent antibody technique. *Jpn. J. Exp. Med.*, **40**: 101-115.
- Jupp, P. G., B. M. McIntosh, I. Dos Santos and P. de Moor (1981): Laboratory vector studies on six mosquitoes and one tick species with chikungunya virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **20**: 642-645.
- Konishi, E. and H. Yamanishi (1986): Titer distribution analysis of chikungunya virus in *Aedes albopictus*. *J. Med. Entomol.*, **23**: 92-98.
- Kuberski, T. (1979): Fluorescent antibody studies on the development of Dengue-2 virus in *Aedes albopictus*. *J. Med. Entomol.*, **16**: 343-349.
- LaMotte, L. C. (1960): Japanese B encephalitis virus in the organs of infected mosquitoes. *Am. J. Hyg.*, **72**: 73-87.
- 松村武男 (1975): 培養細胞におけるウイルス成熟機構—特にトガ (Toga) ウイルスを中心として—。組織培養, **1**: 168-175.
- McIntosh, B. M. and P. G. Jupp (1970): Attempts to transmit chikungunya virus with six species of mosquito. *J. Med. Entomol.*, **7**: 615-618.
- McLean, D. M. (1953): Transmission of Murray valley encephalitis virus by mosquitoes. *Aust. J. Exp. Biol.*, **31**: 481-490.
- Takahashi, M. (1982): Differential transmission efficiency for Japanese encephalitis virus among colonized strains of *Culex tritaeniorhynchus*. *Jpn. J. Sanit. Zool.*, **33**: 325-333.
- 高橋三雄, 石井 孝, 唐牛良明 (1973): 日本脳炎ウイルスの vector. ウイルス, **23**: 173-183.
- Thomas, L. A. (1963): Distribution of the virus of Western equine encephalitis in the mosquito vector, *Culex tarsalis*. *Am. J. Hyg.*, **78**: 150-165.
- 山西 浩, 小西英二 (1986): ヒトスジシマカにおけるチクングニアウイルス量の蛍光抗体法による測定の試み. 衛生動物, **37**: 371-375.

山西 浩, 小西英二, 松村武男 (1984): 2系統のヒトスジシマカにおけるチクングニアウイルス感受性の比較. 衛生動物, **35**: 361-365.

山西 浩, 小西英二, 沢山俊子, 松村武男 (1983): 数種の蚊のチクングニアウイルス感受性について. 衛生動物, **34**: 229-233.

Summary

Chikungunya (CHIK) virus concentrations in the head/thorax, midgut and other abdominal parts were measured to compare virus multiplication in the mosquito *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes aegypti* and two strains of *Ae. albopictus* (Hyogo and Oahu strain) by plaque assay with BHK 21 cells. In *Cx. tritaeniorhynchus*, CHIK virus disappeared from the midgut by the 2nd days after feeding. In *Ae. aegypti*, CHIK virus was observed in 12 % of the midgut for 2 weeks

after infection. In the Hyogo strain of *Ae. albopictus*, CHIK virus was observed in 60 % of the midgut for 2 weeks. CHIK virus was not detected in the other tissues on the 4th day after feeding. In the Oahu strain of *Ae. albopictus*, all the midgut specimens were positive for CHIK virus by the 7th day after infection. On the 7th and the 14th day after infection, CHIK virus was detected in the other parts than the midgut.

Multiplication of CHIK virus in the brain, salivary glands, anterior midgut, posterior midgut and hemolymph was compared between the Oahu and the Hyogo strains of *Ae. albopictus*. Virus titers in their organs were clearly different between the two strains in parallel with the difference in susceptibility. Multiplication of CHIK virus in hemolymph was considered to play a role in disseminating the virus released from midgut cells to the other organs of mosquitoes.