

表4

コンテナ貨物より採集した虫類目録
(神戸検疫所、大阪検疫所における1999年度の調査)

種	個体数	積込地域	貨物品目	検査港
Insecta 昆虫綱				
Orthoptera 直翅目				
<i>Periplaneta fuliginosa</i> クロゴキブリ (幼虫)	1	中国	衣料品	大阪
<i>Periplaneta</i> sp. ゴキブリの一種 (幼虫)	1 (D)	台湾	工具、靴	〃
Diptera 双翅目				
Chironomidae ユスリカ科の一種	1	台湾	自動車部品	大阪
<i>Aedes albopictus</i> ヒトスジシマカ (♀)	1 (D)	オーストラリア	綿花	神戸
<i>Musca domestica</i> イエバエ (♀)	1	中国	衣料品	大阪
Anthomyiidae ハナバエ科の一種	1	〃	〃	〃
Hymenoptera 膜翅目				
Ichneumonidae ヒメバチ科の一種	1 (D)	中国	塩漬キュウリ	神戸
<i>Pheidole</i> sp. オオズアカアリの一種 (A)	1	〃	衣料品	大阪
<i>Pheidole</i> sp. オオズアカアリの一種 (B)	2	韓国	雑貨	〃
Formicidae アリ科の一種	1 (D)	タイ	缶詰	神戸
Lepidoptera 鱗翅目				
Noctuidae ヤガ科の一種	1 (D)	中国	自動車部品	神戸
Pyralidae メイガ科の一種	1	〃	豆類	〃
Coleoptera 鞘翅目				
<i>Dermestes</i> sp. カツオブシムシの一種 (幼虫)	2	スーダン	綿花	神戸
<i>Trogoderma</i> sp. マダラカツオブシムシの一種	1 (D)	インド	〃	〃
<i>Gibbium aequinoctiale</i> ニセマルヒョウホンムシ	1 (D)	中国	自動車部品	〃
<i>Necrobia rufipes</i> アカアシホシカムシ	1 (D)	〃	豆類	〃
<i>Tribolium castaneum</i> コクヌストモドキ	3 (1D)	スーダン	綿花	〃
	1	インド	〃	〃
	3 (D)	〃	〃	〃
<i>T. confusum</i> ヒラタコクヌストモドキ	1 (D)	〃	〃	〃
<i>Tenebrioides mauritanicus</i> コクヌスト	4 (D)	ミャンマー	穀物 (ゴマ)	〃
Trogossitidae コクヌスト科の一種	1 (D)	オーストラリア	綿花	〃
Tenebrionidae ゴミムシダマシ科の一種	1 (D)	中国	乾燥コンブ	〃
Silvanidae sp. ホソヒラタムシの一種	1	台湾	工具、靴	大阪
<i>Dinoderus bifoveolatus</i> タケノマルコシンクイ	1	中国	塩漬キュウリ	神戸
<i>Heterobostrychus hamatipennis</i> オナガシンクイムシ	1 (D)	マレーシア	衣料品	大阪
Platypodidae ナガシンクイムシ	2	中国	塩漬キュウリ	神戸
Arachnida 蛛形綱				
Pseudoscorpiones カニムシ目				
Cheliferidae カニムシ科の一種	1 (D)	中国	乾燥コンブ	神戸
Araneae 真正蜘蛛目				
<i>Crossopriza lyoni</i> オダカユウレイグモ	2	台湾	自動車部品	大阪
	1	〃	工具、靴	〃
<i>Pholcus</i> sp. ユウレイグモの一種 (♀)	1	中国	家具	〃
Pholcidae ユウレイグモ科の一種 (幼体)	1	〃	衣料品	〃
	3	マレーシア	〃	〃
<i>Theridion</i> sp. ヒメグモの一種 (幼体)	1	台湾	自動車部品	〃
	47			

(D) ----- 死体で採集したもの。

表5 関西空港検疫所においてコンテナ貨物より採集された虫類（1999年度調査）

種	個体数	積込地	貨物品目
Collembola 粘管目	1 (D)	オランダ	雑貨
Isotomidae フシトビムシ科	1 (D)	中国	合鴨コース
Entomobryidae ツノトビムシ科			
Psocoptera 嚙虫目			
Liposcelidae コナチャタテムシ科	2 (D)	アメリカ	機械部品
Thysanoptera 総翅目			
Thripidae アザミウマ科	1	フランス イギリス	衣類・部品
Phlaeothripidae クダアザミウマ科	1	韓国	カニ
Hemiptera 半翅目			
Deltocephalidae ヨコバイ科	1 (D)	スペイン ポルトガル	布
Delphacidae ウンカ科	1 (D)	中国	衣類
Psyllidae キジラミ科	2 (D)	アメリカ	機械部品
Aphididae アブラムシ科	1	中国	衣類
Anthocoridae ハナカメムシ科	1 (D)	スイス	花
Anthocoridae ハナカメムシ科	1 (D)	オランダ	雑貨
Diptera 双翅目			
Tipulidae カガンボ科	1 (D)	デンマーク・ドイツ ベルギー	雑貨・車部品
Chironomidae ユスリカ科	1 (D)	中国	衣類
Chironomidae ユスリカ科	1 (D)	デンマーク・ドイツ ベルギー	雑貨・車部品
Ceratopogonidae ヌカカ科	1 (D)	アメリカ	機械部品
Mycetophilidae キノコバエ科	1 (D)	スイス	貴金属
Sphaeroceridae ハヤトビバエ科	1 (D)	スイス	機械部品
Sphaeroceridae ハヤトビバエ科	1 (D)	ドイツ ポルトガル	部品・履物
Hymenoptera 膜翅目			
Braconidae コマユバチ科	1 (D)	中国	ハモ
Formicidae アリ科	1 (D)	オランダ	雑貨
Coleoptera 鞘翅目			
Scydmaenidae コケムシ科	1 (D)	中国	ウナギ
Anthicidae アリモドキ科	1 (D)	中国	衣類
Lepidoptera 鱗翅目			
Noctuidae ヤガ科	1 (D)	中国	衣類
Isopoda 等脚目			
Oniscoidea ワラジムシ亜目	3 (D)	オランダ	雑貨
Araneae 真正蜘蛛目			
Theridiidae ヒメグモ科	1 (D)	デンマーク・ドイツ ベルギー	雑貨・車部品
Theridiidae ヒメグモ科	2 (D)	キュート	カタログ
Theridiidae ヒメグモ科	1 (D)	中国	衣類
	32		

(D) ----- 死体で採集されたもの。

採集された種について
(分類上の位置・生態・病害性)

1. クロゴキブリ
ゴキブリ目, ゴキブリ科。中国南部と日本に分布する種。衛生害虫として重要である。
2. *Periplaneta* sp. ゴキブリの一種
ゴキブリ目, ゴキブリ科。衛生害虫として重要なグループである。船舶等の交通機関内にもよく発見される。ポリオウイルスを伝搬することが知られている。
3. ユスリカの一種
双翅目。池水や河川に多量に発生した場合、不快昆虫として問題となることがある。
4. ヒトスジシマカ
双翅目, カ科。東洋区の熱帯、亜熱帯に広く分布する種で、近年アメリカ大陸に侵入した。日本から輸出した古タイヤの水の中に幼虫が入って運ばれたものとされている。人為的に移動する能力のある種とおもわれる。デング熱を媒介する。
5. イエバエ
双翅目, イエバエ科。世界共通種であるが、地域的に色彩等に差があり、これを利用して侵入地を想定することができる。採集した個体は1個体で産地を特定できなかったが、日本国内のものでないことは容易に判明した。近年問題となった腸管出血性大腸菌O-157を保菌、伝搬することが確認され注目されている。
6. ハナバエの一種
双翅目, ハナバエ科。発生源は多様で、各種の人為的な汚物に発生する。
7. オオズアカアリの一種
膜翅目, アリ科。昆虫の死体等に来る比較的肉食性の強い種である。居住地にも多く生息する。無害。
8. *Dermestes* sp. (幼虫)
甲虫目, カツオブシムシ科。貯蔵動物質の害虫。
9. *Trogoderma* sp.
甲虫目, カツオブシムシ科。ほぼ世界共通に分布する。乾燥した動物質を食べる。

10. ニセセマルヒョウホンムシ
甲虫目，ヒョウホンムシ科。腐敗動植物質を食す。住居環境にも生息する。
11. アカアシホシカムシ
甲虫目，カッコウムシ科。世界共通に分布する。肉類の薫製品等に被害を与える。
12. コクヌストモドキ
甲虫目，ゴミムシダマシ科。世界中に分布している。穀粉害虫。
13. ヒラタコクヌストモドキ
甲虫目，ゴミムシダマシ科。世界共通種。穀粉類の害虫。飛翔力がないことから貨物に付着して持ち込まれたものと思われる。
14. ウンカの種類
半翅目，ウンカ科。燈火に飛来することから食品工場での製造工程で混入例がある。
15. ホソヒラタムシの種類
甲虫目，ホソヒラタムシ科。木材から発見されるが、時には貯穀に害を与えるものもある。この個体については不明。
16. ゴミムシダマシの種類
甲虫目，ゴミムシダマシ科。腐朽材に生息する。無害。
17. タケノマルコシンクイ
甲虫目，ナガシンクイムシ科。全世界の熱帯、亜熱帯に分布するが、日本未記録である。このことから、外地から侵入した例と思われる。
18. オナガシンクイ
甲虫目，オナガシンクイムシ科。東南アジアに広く分布している。木材の害虫。
19. カニムシの種類
カニムシ目，カニムシ科。多様な生活様式を持ち、ダニ類を捕食する種もある。本種については不明。
20. オダカユウレイグモ
真正蜘蛛目，ユウレイグモ科。本種はインドから中国南部に分布していたものであるが、近年になって愛知県、宮崎県、沖縄県から報告され、人為的な要因によって分布を広げたものとされている。屋内性のクモであることから室内に環境のよく似た、コンテナ内でも生息できるものと思われる。無害。

21. ヒメグモの一種

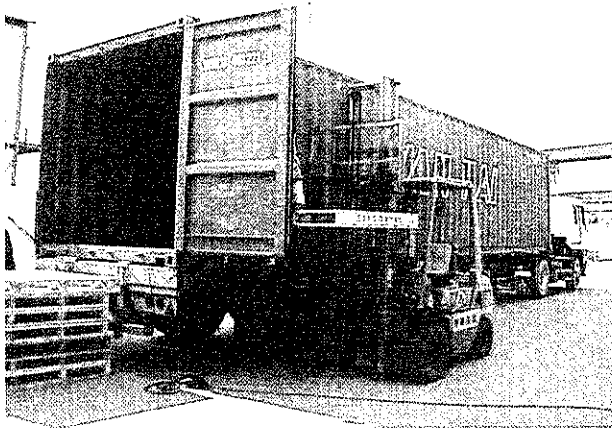
真正蜘蛛目，ヒメグモ科。この科には住居性の種が多いが、この個体は不明。無害と思われる。

21. ワラジムシの一種

等脚目，ワラジムシ亜目。土壌動物である本種が付着侵入したことは貨物が野積みされていたことが想像される。

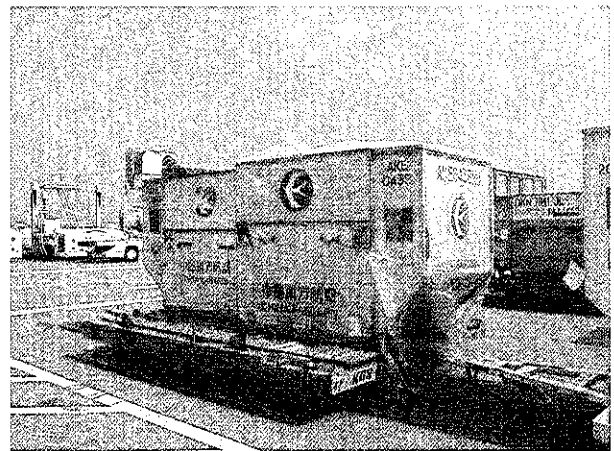
型別に見たコンテナ各種

1. 船舶用のコンテナ

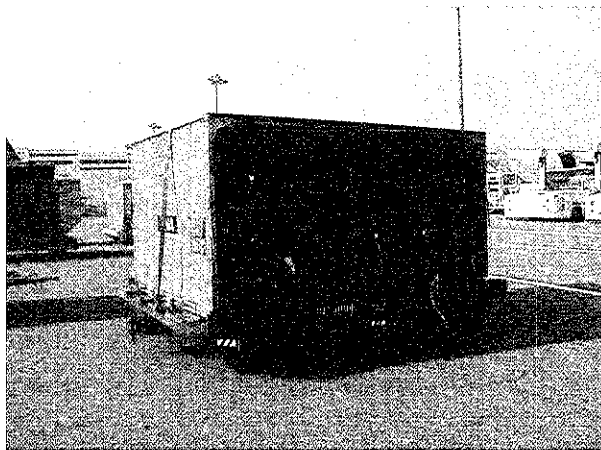


2. 航空機用のコンテナ

2-a 閉鎖型のコンテナ



2-b 半閉鎖型のコンテナ



2-c パレット積みコンテナ



分担研究報告書

高感度・高特異的な改良 one step RT-PCR 法を用いた、媒介蚊からの デングウイルスの検出

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス1部）

共同研究者 江下優樹（大分医科大学感染予防医学講座）

山田堅一郎（国立感染症研究所ウイルス1部）

高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス1部）

研究要旨 デング熱・デング出血熱は、熱帯亜熱帯地域の国々では公衆衛生上重要な感染症である。本症はネッタイシマカ *Aedes aegypti* などの蚊によって媒介されるウイルス性疾患である。我々は、本ウイルスに感染した媒介蚊の疫学情報を得るために、流行地域で採集した個々の蚊あるいはプールした媒介蚊を用いて、RT-PCR法による本ウイルスゲノムの検出について検討した。デング熱流行地から採集した本ウイルス陰性の媒介蚊および実験的に本ウイルスを感染させた陽性蚊を用いて、個々の蚊あるいはプール蚊からのデングウイルスゲノムの高感度かつ特異的な増幅・検出を行うために、改良した one step RT-PCR 法を確立した。そのためには、総 RNA の抽出あるいはカラムによる総 RNA の再精製が必須であった。本法を用いて、1 個体の陽性蚊 49 個体の陰性蚊のプールから本ウイルスゲノムを検出することができた。本症流行地での媒介蚊対策を検討する際に、本ウイルスを保有している媒介蚊の動態を把握することに本法が応用されることが期待される。

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱は、熱帯亜熱帯地域の国々で公衆衛生上重要な感染症として今なお位置づけられている。本症はネッタイシマカ *Aedes aegypti* あるいはヒトスジシマカ *Aedes albopictus* によって媒介されるウイルス性疾患であるが、流行地域での媒介蚊体内における本ウイルスの動態は不明なところが多い。我々

は、本ウイルスに感染した媒介蚊の疫学動態を探る方法として、RT-PCR 法の応用を検討している。デング熱流行地から採集したウイルス陰性の媒介蚊および実験的に本ウイルスを感染させた陽性蚊を用いて一連の検討を行い、蚊からウイルスゲノムを高感度・高特異的に検出可能な one step RT-PCR 法を開発したので報告する。

B. 研究方法

1) ウイルス：乳のみマウスに順化した Dengue ウイルス 1 型の 10% マウス脳乳剤を用いた。

2) Dengue 熱流行地からの媒介蚊の採集：フィリピン国のマニラ市に隣接した Dengue 熱流行地で媒介蚊の採集を行った。採集した蚊は、3 日間飼育した後に生殺および蚊種の同定を行った。Dengue ウイルス媒介蚊のネッタイシマカ *Aedes aegypti* は Isogen-LS 液（日本ジーン社製）に浸けた後に、ドライアイスで凍結して、日本に持ち帰りその後の実験に使用した。

3) Dengue ウイルス感染蚊の作製：約 0.005ul の Dengue ウイルス液を、羽化 5 日後の雌ネッタイシマカの胸部側板内に接種した。接種した蚊は、3 重の飼育容器内に密封して 25°C で 14 日間飼育を行った後に -80°C で容器ごと生殺して、その後の実験に用いるまで -80°C に保存した。

4) 個々の蚊からのウイルスゲノムの精製：個々の蚊から総 RNA を抽出するために、Isogen-LS（日本ジーン社製）を使用した。抽出の手順は日本ジーン社の使用の手引きに従った。抽出した総 RNA ペレットは 10ul の RNase free の蒸留水に溶解した。

5) プール蚊からのウイルスゲノムの精製：ウイルスゲノム陽性の蚊 1 個体に未感染蚊数を増やして行って、ウイルスゲノムの検出感度を RT-PCR 法で検討した。個々の蚊から総 RNA を Isogen-LS で精製した後に、ウイ

ルスゲノム陽性の蚊 1 個体由来の 2ul の総 RNA 液に未感染蚊由来の総 RNA 液を個体数分を混合して、カラム精製 (RNeasy Mini Kit, QIAGEN 社製, Cat.#74103) を行った。カラムから得られた再精製液は 100ul の量に調整した。

6) RT-PCR 法：RT-PCR 法の手法を簡略化するために、one step RT-PCR 法 (One Step RT-PCR system, Cat. No. 10928-026, Gibco-BRL company) を用いて、蚊からの Dengue ウイルスゲノムの検出を試みた。

Dengue ウイルスに特異的なプライマーとして、4 つの血清型に共通な配列を有する DC primer (DC1 (5'-3') : TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG、および DC2 (5'-3') : TTGCACCAACAGTCAA TGTCTTCAGGTTC) を使用して、511 bp の特異的 PCR 産物を得た (Lanciotti, R. S., Calisher, C. H., Gubler, D. J., Chang, G. J., and Vorndam, A. V. : Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30(3):545-551, 1992)。なお、型特異的なプライマーとしては、Morita, K., Tanaka, M., and Igarashi, A. : Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29(10): 2107-2110, 1991) のプライマーを使用した。

RT-PCR の温度条件として、RT 反応：

53°C 30分、PCR反応：(1回) 94°C 2分、(45回) 94°C 1分、53°C 1分、68°C 2分、(1回) 68°C 7分を設定した。また、特異的な PCR 産物の有無は 2%アガロースゲルで泳動して確認した。

C. 研究結果

1) 個体の蚊からの Dengue ウイルスゲノム検出：個々の蚊から総 RNA を抽出しないで粗抽出液を RT-PCR 反応に用いた場合は、特異的なプライマーを用いても PCR 産物が得られない例が観察された。そこで、Isogen-LS 液によって個別に蚊から総 RNA を抽出すると、RT-PCR 法で特異的な PCR 産物が得られた。

2) プール蚊からの Dengue ウイルスゲノム検出：Isogen-LS 液を使って個々の蚊から抽出した総 RNA をプールにして、RT-PCR 反応を行ったところ、総 RNA 濃度が高いほど特異的な PCR 産物が得られにくい傾向が観察された。この点を改善するために、プールにした蚊の総 RNA 液をカラムで再度精製したところ、特異的で明瞭な PCR 産物の泳動像が観察された(図1)。カラム精製した総 RNA のプール液 10 μ l (1回目の RNA 精製から計算すると 1:50 に希釈された template RNA を RT-PCR 反応に使用したことになる) を用いて RT-PCR を行った場合の結果は、図1のレーン1~6に示した。図1の M は 100bp のラダーマーカーである。レーン1では9個体が未感染蚊由来の総 RNA を含ん

でいる。順次未感染蚊の数が増えて、レーン5では49個体の未感染蚊の総 RNA を含んでいる。また、レーン7~11はカラム精製した総 RNA のプール液 50 μ l (1回目の RNA 精製から計算すると 1:10 に希釈された template RNA を RT-PCR 反応に使用したことになる) を用いて RT-PCR を行った場合の結果である。ちなみにレーン6と12は陰性のコントロールで50個体の未感染蚊由来の総 RNA を含んでいる。蚊1個体当たり抽出精製した総 RNA の 1/50 あるいは 1/10 を用いても、明瞭な 511塩基数の特異的な PCR 産物が得られた。

D. 考察

マラリア媒介蚊では、1,000個体程度の蚊の唾液腺を調べるとマラリア原虫陽性蚊が検出されるという疫学情報が把握されている。ところが、Dengue 熱・Dengue 出血熱がある地域で勃発する際に、その地域での媒介蚊のウイルス感染状況を把握する事は重要であるにも関わらず、何個体の陽性蚊が存在しているかについての詳しい資料は少ない。この困難さの要因として、顕微鏡下で媒介蚊の唾液腺を検査してマラリア原虫を確認できるのとは異なり、Dengue ウイルス保有蚊であるか否かはもっぱら RT-PCR 法が有効な方法であることによる。しかし、本法を実施する際には Dengue ウイルスゲノムを蚊から検出する際の特異性と検出感度が問題となる。

媒介昆虫から病原体を PCR で検出

する場合に、PCR 反応を阻害する要因があることが報告されている (Vodkin, M.H., Streit. T., Mitchell. C.J., McLaughlin. G.L., and Novak. R.J.: PCR-based detection of arboviral RNA from mosquitoes homogenized in detergent. *Biotechniques*, 17(1): 114-116, 1994)。我々も同様な PCR 反応阻害結果を得た。しかし、この阻害による PCR 陰性をさける事を改するため に総 RNA の精製後にカラム精製による再度の総 RNA 精製を行つところ、50 個体の蚊プールに Dengue ウイルスゲノム陽性蚊 1 個体が含まれていても、本ウイルスゲノムを検出可能なことが明かとなった。カラムによる総 RNA の再精製によって、PCR 反応を阻害する要因が除けたことと、総 RNA の純度が高くなったことが検出感度と特異性の向上に役立ったと考えられる。

少なくともなく前述の 2 つ改良によって、1 個体から精製した総 RNA 量の 50 分の 1 量を RT-PCR の反応に用いても特異的な PCR 産物が得られたことは、特記すべきことと思われる。個々の蚊個体のウイルス保有状況を調べる目的では、適当なプール個体数の上限は 50 が妥当であろうと思われる。ちなみに、100 個体の蚊プールに Dengue ウイルスゲノム陽性蚊 1 個体が含まれていても、本ウイルスゲノムを検出可能と思われるが、実際の疫学調査に本法を使用してプール蚊の保有の有無を調べる際の適当なプール個体数は 100 が上限かもし

れない。

今回の RT-PCR 法では、1~4 型の Dengue ウイルスゲノムに共通のプライマーを用いて、良好な成績を得た。流行地で採集した蚊からのウイルス保有状況を調査する際の一時スクリーニングには、経済的な共通プライマーの使用が有用であろう。

Dengue 熱の勃発している地域、あるいは散発的な流行がおこっている地域などで採集された蚊を用いて、一連の疫学情報の蓄積に本法が今後応用されることが期待される。

E. 結論

改良した一連の one step RT-PCR 法を用いて、個々の蚊あるいはプール蚊からの Dengue ウイルスゲノムの高感度かつ特異的な増幅・検出法を確立した。そのためには総 RNA の抽出、あるいはカラムによる総 RNA の再精製が必須であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Oda, T., Uchida, K., Mori, A., Mine, M., Eshita, Y., Kurokawa, K., Kato, K. and Tahara, H.: Effects of high temperature on the emergence and survival of adult *Culex pipiens molestus* and *Culex pipiens quinquefasciatus* in Japan. *J. Amer. Mosq. Cont. Assoc.*, 15(2): 153-156 (1999).

江下優樹、松本 顕：伝播昆虫の制御：遺伝子工学を用いた病原体耐性蚊の開発。(地球規模の寄生虫対策の時代)。医学のあゆみ 191 (1) : 98 -103 (1999)。

2. 学会発表

江下優樹, 長谷部 太, 山田堅一郎, 五十嵐 章 (1999) : 臨床症状の異なる患者から分離されたデングウイルスの媒介蚊体内での増殖. 第51回日本衛生動物学会大会、調布市文化会館、1999年4月9・10日., 第51回日本衛生動物学会大会プログラム : A23, Med. Entomol. Zool., 50 (Suppl.) :40 (1999)。

江下優樹 : デング熱と蚊. 第34回日本脳炎ウイルス生態学研究会、東京、1999年6月3・4日. 日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集 : 8, 1999. 日本脳炎ウイルス生態研究会報 (31) : (2000)。

江下優樹, 伊藤高明, Surathin, K., 五十嵐 章 : オリセットネットを用いた人家内のネッタイシマカ防除. 第15回日本ペストロジ学会 大会、名古屋、中電ホール、1999年12月1・2日. 第15回日本ペストロジ学会大会プログラム・講演要旨 : 37 (1999)

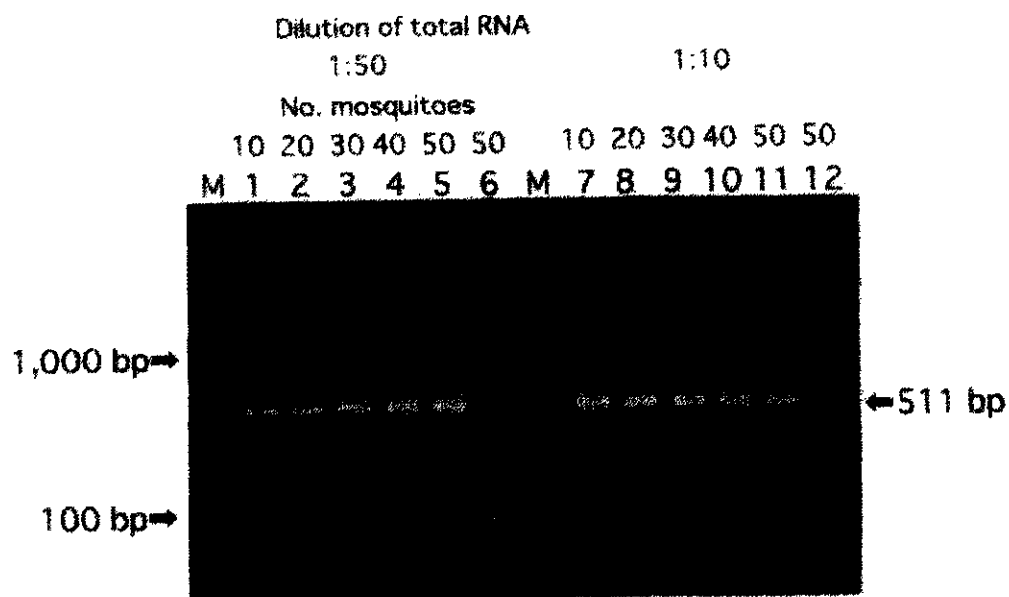


図1. デングウイルス陰性で異なった数のネッタイシマカ *Aedes aegypti* および感染蚊1個体を含むプール総RNA液を用いて、そのプール総RNAを再度カラム精製して得たtemplate RNAを使った際のRT-PCRの成績。図1のMは100bpのラダーマーカーである。レーン1では9個体が未感染蚊由来の総RNAを含んでいる。レーン2から4では順次未感染蚊の数が19、29、39と増えて、レーン5では49個体の未感染蚊の総RNAを含んでいる。また、レーン7~11はカラム精製した総RNAのプール液50ulを用いてRT-PCRを行った場合の結果である。ちなみにレーン6と12は陰性のコントロールで50個体の未感染蚊由来の総RNAを含んでいる。蚊1個体当たり抽出精製した総RNAの1/50あるいは1/10を用いても、明瞭な511塩基数の特異的なPCR産物が得られた。

分担研究報告書

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスの組換え核蛋白を用いた 抗体検出システムの開発

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所 ウイルス第1部）
協力研究者 西條政幸（国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室）
新倉昌浩（国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室）
森川茂（国立感染症研究所ウイルス第1部外来性ウイルス室）

研究要旨：クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルスの核蛋白（CCHF-NP）の N-末端側にヒスチジンタグを付加した組換え蛋白（His-CCHF-NP）を昆虫細胞で発現する組換えバキュロウイルスを作製し、発現した組換え蛋白を Ni²⁺-カラムを用いて精製した。精製 His-CCHF-NP を用いて IgG ELISA を開発した。回復期の CCHF 患者 2 名の血清は、この IgG ELISA で陽性を示し、96 名の日本人血清はすべて陰性を示したことから、感度と精度の高い IgG ELISA であることが明らかとなった。また、CCHF-NP を恒常的に発現する HeLa 細胞株を樹立し、それを抗原とする蛍光抗体法（IF）法も確立した。この IF 法も高い感度と精度を有していた。CCHF ウイルスは、BL4 の高度安全研究施設でのみ扱うことが許されるウイルスであり、BL4 実験室の稼動していない現状では、抗体検出のための抗原を準備することはできない。今回、組換え CCHF-NP を抗原とする IgG ELISA や IF 法を用いることで特異抗体を検出する系を開発できた。

A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）は、ブニヤウイルス科ナイロウイルス属の CCHF ウイルスによって引き起こされるウイルス性出血熱である。その致死率は 50% を越える場合があり、CCHF ウイルスは、BL4 実験室で扱われるべきウイルスの一つである。そのため BL4 実験室が稼動されていない本邦においては、CCHF ウイルス感染症の血清診断は不可能であった。このような状況下でも CCHF の血清診断が行えるように、分子生物学的手法を用いて CCHF の血清診断システム

を確立することを目的とした。組換えバキュロウイルスにより His-CCHF-NP を発現し、精製組換え蛋白を抗原とした IgG ELISA を確立し、血清診断への有用性を検討した。一方、CCHF-NP を恒常的に発現する HeLa 細胞株を用いた蛍光抗体（IF）法の有用性についても検討した。

B. 研究方法

- 1) cDNA : CCHF ウイルス核蛋白の cDNA は、パスツール研究所（フランス）より供与を受けた。
- 2) 組換えバキュロウイルスの作製 :

N-末端にヒスチジンタグ (6×His タグ) を付加した CCHF-NP (His-CCHF-NP) を発現する組換えバキュロウイルス (Ac-His-CCHF-NP) を以下の方法で作製した。CCHF-NP をコードする cDNA を pQE30 ベクター (QIAGEN) のクローニングサイトに His-tag とフレームに合うように挿入し, His-CCHF-NP をコードする DNA を回収, pAcYM1 ベクターに挿入した (pAc-His-CCHF-NP)。pAcYM1-His-CCHF-NP とバキュロウイルス DNA を high five 細胞にトランスフェクションし, His-CCHF-NP を発現する組換えバキュロウイルス (Ac-His-CCHF-NP) を得た。

- 3) 組換え CCHF-NP 発現ベクターの作製: pKS336 ベクター [阪井博士 (国立感染症研究所エイズ研究センター) より分与] を使用した。このベクターによる外来遺伝子の発現は, EF-BOS promoter の制御を受ける。pKS336 ベクターのクローニングサイトに CCHF-NP 遺伝子を順方向に挿入し, pKS336-CCHF-NP を得た。このベクターは, SV40 プロモーターに制御される blastocidin 耐性遺伝子を発現する。
- 4) 組換え CCHF-NP の発現と精製: 組換えバキュロウイルス (Ac-His-CCHF-NP) を high five 細胞に感染させ, 感染 3 日後に細胞を回収した。回収した細胞を超音波処理し, さらに 12000 回転/分で遠心することにより可溶分画である上精を得た。その上精から, Ni²⁺-カラムを用いて His-CCHF-NP を精製した。一方, 組換え CCHF-NP の HeLa 細胞での発現は, 以下の方法により行われた。pKS336-CCHF-NP を

HeLa 細胞にトランスフェクションし, blastocidin 耐性細胞を選別して CCHF-NP を恒常的に発現する HeLa 細胞株を樹立した。

- 5) 血清: 2 名の CCHF 患者の回復期血清 [血清 #703215 と #089518 の 2 検体, CJ Peters 博士 (米国疾病予防センター特殊病原体部門部長) より供与を受けた] および 96 人の日本人血清を用いた。
- 6) IgG-ELISA: 約 100ng/well になるように精製 His-CCHF-NP を ELISA 用プレート (Falcon 社) に 4°C 一晩吸着させた。5% skim milk/ T-PBS でブロッキング後, それぞれの被験血清を 100 倍から 6400 倍まで 4 倍階段希釈し, 37°C 1 時間反応させた。0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝液 (T-PBS) で洗浄後, ペルオキシダーゼ (HRPD) 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社, 500 倍希釈) を 37°C 1 時間反応させた。T-PBS で十分洗浄後, 基質である ABTS 液 (Beohlinger-Mannheim 社) を加え, 37°C 30 分反応させ吸光度 (OD₄₀₅) を測定した。対照として, 抗原をコートしていない well を用いて, それぞれの希釈された被験血清について同様の反応をおこなった。そして対応する OD₄₀₅ から対照の OD₄₀₅ を差し引いた値を, CCHF-NP に対する反応としての OD₄₀₅ とした。
- 7) IF 法による IgG 抗体の検出: 組換え CCHF-NP を発現する HeLa 細胞をトリプシンで分散後, リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄して, マルチウェル蛍光用スライドガラス (Matsunami 社) に塗抹乾燥し, さらに室温で 10 分間アセトン固定した。これを IF 用の抗原とし,

また、同様の処置をした CCHF-NP を発現しない HeLa 細胞を対照抗原とした。25 倍から PBS で 2 倍階段希釈された被験血清をそれぞれの抗原に 37°C1 時間反応させ、PBS で洗浄後、100 倍希釈された FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社) を 37°C1 時間反応させた。PBS で洗浄後、グリセリン封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。

C. 結果

- 1) His-CCHF-NP の発現と精製 : Ac-His-CCHF-NP に感染した high five 細胞で発現された His-CCHF-NP および Ni カラムにより精製した His-CCHF-NP を SDS-PAGE 法により確認した。SDS-PAGE 法により 53Kda の大きさの精製された His-CCHF-NP が確認された。
- 2) 精製 His-CCHF-NP を抗原とした IgG ELISA の精度と感度 : 96 検体の日本人血清の 100 倍および 400 倍希釈時の IgG ELISA におけるカットオフ値 (OD_{405} の平均値 + 3 × 標準偏差の値) は、それぞれ 0.591 および 0.215 であった。2 名の CCHF 患者の回復期血清 #703215 および #089518 の 100 倍における OD_{405} は、ともに >3.500 であった。また、血清 #70321 および #089518 の 400 倍における OD_{405} は、それぞれ >3.500 と 2.129 であった。カットオフ値をともにはるかに上回っているので、血清 #703215 および #089518 の 2 検体は CCHF-NP に対する抗体が陽性と判定された。一方、96 人の日本人血清において 100 倍希釈および 400 倍希釈において、カットオフ値を上回る OD_{405} を呈したも

のはなかった。これらの成績から、精製 His-CCHF-NP を抗原とした IgG ELISA の感度と精度は、ほぼ 100% と考えられた。

- 3) pKS336-CCHF-NP の導入された HeLa 細胞における組換え CCHF-NP の発現 : 抗 CCHF-NP ウサギ血清 (NIID#1) を用いて、CCHF-NP を恒常的に発現する HeLa 細胞における組換え CCHF-NP の発現を IF 法で確認した (図 1)。通常の HeLa 細胞には、図 1 に示したような特徴的な蛍光像は認められず、CCHF-NP 発現 HeLa 細胞株は、IF 法の抗原として有用であることが示唆された。
- 4) CCHF-NP 発現 HeLa 細胞を抗原とした IF 法の評価 : 2 名の CCHF 患者血清 #703215 および #089518 は、それぞれ最高希釈倍率が 400 倍および 200 倍まで陽性を示した。一方、96 人の日本人血清すべて 25 倍希釈において陰性を示した。これらの成績より、CCHF-NP 発現 HeLa 細胞を抗原とした IF 法の精度と感度は、ともに 100% であった。

D. 考察

pQE30-CCHF-NP により形質転換された大腸菌 (BL21) を用いて、組換え CCHF-NP を発現させることを試みたところ、発現量が極めて低かった (未公表)。そこで CCHF-NP を発現させる組換えバキュロウイルス Ac-His-CCHF-NP を作製して、His-CCHF-NP の発現を検討した結果、バキュロウイルスシステムを利用することで、効率よく His-CCHF-NP を発現させ精製することができた。

今回、組換え CCHF-NP を抗原とし

て、CCHF ウイルス核蛋白に対する抗体を検出するシステム (ELISA 法と IF 法) を開発した。精製された His-CCHF-NP を抗原とした IgG ELISA の CCHF 患者に出現する CCHF 抗体を検出するための感度を評価するには、CCHF 患者血清が 2 検体と少なく、正確な感度を評価するためにはさらなる検討を要する。しかし、今回の検討により、CCHF 患者の回復期には、CCHF ウイルスの核蛋白に対する抗体が出現し、しかも、その抗体を組換え CCHF-NP を抗原として検出できることが確認された。一方、この IgG ELISA 法の精度はほぼ 100% と考えられる。これらの成績により、His-CCHF-NP を抗原とした IgG ELISA は CCHF の血清診断に有用であると考えられる。また、組換え CCHF-NP を発現する HeLa 細胞を抗原とする IF 法も、IgG ELISA と同様に高い精度と感度を有していることが明らかになった。つまり、今回、開発された IF 法も、CCHF の血清診断に有用であると考えられる。また、CCHF に対する IgG 抗体の検出システムは、CCHF の血清診断のみならず、CCHF ウイルスのヒトや動物における感染状況を調べるための血清疫学的研究にも応用できると考えられる。

本研究においては、CCHF ウイルスに対する IgG 抗体検出システムを開発し評価をしたが、CCHF 患者の迅速な診断のためには、CCHF ウイルスに特異的な IgM 抗体の検出することやウイルス抗原を検出することが必要である。今後さらに、CCHF ウイルスに特異的な IgM 抗体を検出するため

の方法を開発する予定である。また、CCHF ウイルス抗原の検出のための RT-PCR 法や抗原検出 ELISA を開発する予定である。

E. 研究発表

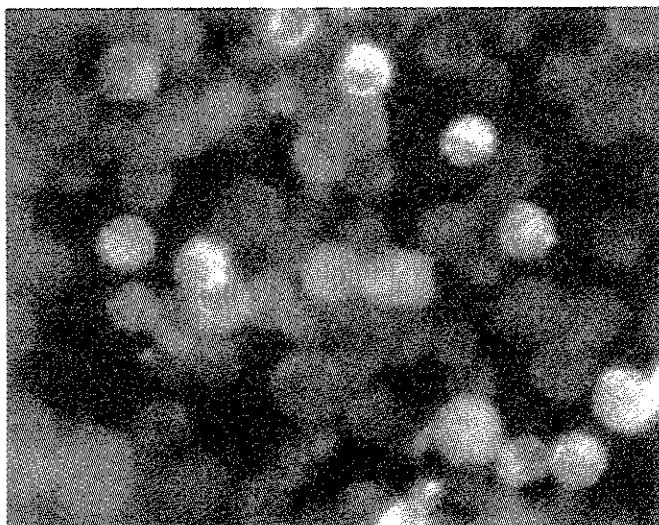
1. 論文発表

- 1) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. 日本医師会雑誌 1999;122 (臨時増刊号) 54-55.
- 2) 森川茂. マールブルグ病. 日本医師会雑誌 1999;122 (臨時増刊号) 60-61.

2. 学会発表

- 1) Saijo M, Niikura M, Ogata M, Morikawa S, Kurane I, Meyers R, Ksiazek T, Peters CJ. Ebola virus (EBO) and Marburg virus (MBG) antibody detection using their recombinant nucleoproteins. 11th International Congress of Virology, Sydney, 1999
- 2) 西條政幸, 新倉昌浩, 緒方もも子, 森川茂, 倉根一郎. エボラウイルス (EBO) とマールブルグウイルス (MBG) の組換え核蛋白を用いた抗体測定システム. 日本ウイルス学会 第 47 回学術集会・総会, 横浜, 1999
- 3) 森川茂, 西條政幸, 新倉昌浩, 緒方もも子, 倉根一郎. ラッサウイルスの組換え N 蛋白を用いた血清診断法の開発. 第 47 回学術集会・総会, 横浜, 1999.

図1. HeLa 細胞において発現された組換え CCHF-NP の抗 CCHF-NP ウサギ抗体 (NIID#1) を用いた IF 法による染色像.



諸外国の人獣共通感染症にかかわる動物およびベクターの サーベイランスシステムに関するアンケート調査

分担研究者 : 内田 幸憲 (神戸検疫所)
協力研究者 : 高橋 央 (国立感染症研究所情報センター)

研究要旨:

諸外国における人獣共通感染症にかかわる動物・ベクターのサーベイランスシステムをアンケートにより調査した。この中で侵入動物・侵入ベクターサーベイランスのあり方も設問した。アンケートは、電子メール、航空郵便およびファックスを用いて行った。対象国はカナダ、アメリカ合衆国、中華人民共和国、韓国、台湾、フィリピン、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランド、ドイツとした。アンケートにおいて質問した人獣共通感染症は黄熱、デング熱、日本脳炎などの蚊媒介性疾患、ラッサ熱、ハンタウイルス肺症候群などのげっ歯類媒介性疾患、クリミア・コンゴ出血熱、ライム病などのダニ媒介性疾患、そして狂犬病やその他の人獣共通感染症とした。現在(3月14日)までに韓国、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランド、ドイツの5カ国より最終回答を得た。アメリカ合衆国とフィリピンは完全回答まで時間を必要とし、回答を保留している。5カ国すべてで該当するサーベイランスが機能しており、水際防疫としてのサーベイランスはシンガポール、ニュージーランドで行われていた。サーベイランス期間、時期、サーベイランス地域、サーベイランス方法は、対象疾病、ベクター・動物により効率的に調整されていた。サーベイランスで得られた検査資料はバイオセーフティー規則に従い厳格な管理運営がなされ、サーベイランスにより得られた情報はインターネットなどにより積極的に還元されていた。

A. 研究目的

人獣共通感染症制圧と予防のために、ヒト患者サーベイランスおよび病原体サーベイランスは活発に行われている。感染症新法の施行により、エボラ出血熱、クリミア・コンゴ出血熱、ラッサ熱といった1類感染症ばかりでなく、4類感染症に指定された黄熱、Q熱、狂犬病、包虫症(エキノコックス症)、オウム病、腎症候性出血熱、炭疽、ツツガムシ病、日本紅斑熱、日本脳

炎、ハンタウイルス肺症候群、Bウイルス病、ブルセラ症、発疹チフス、ライム病などの人獣共通感染症がヒト・サーベイランスの対象となっている。

しかし、人獣共通感染症の制圧と予防には、その病原体のベクター(媒介昆虫)および病原体保有動物に関する疫学的理解が不可欠であり、関係する動物のサーベイランスが必要となる。人獣共通感染症の多くは、ベクター・動物間での病原体サイクル

の中にヒトが踏み込んで感染し、そのうちの一部が発病する事例が多いため、ヒト、ベクター、保有動物に関して日常的な監視が必要である。

そのため、地球規模の環境変化やヒト・モノの移動が進む今日、検疫業務を通じた旅行者と動物の検疫、及び港湾の衛生動物・ベクター検査から得られる疫学的情報は、ますます有用となっている。また、大学などの研究機関で限定的に行われている同様のサーベイランスからの情報も、人獣共通感染症対策に組み入れられるべきである。

このような実情を考慮し、今回は世界の主要国でベクターおよび保有動物に関するサーベイランスが、どの疾患に対して、どのように実施されているかをまず把握する目的で、質問票を作成し、各国担当者の自己記入方式による回答を得ることとした。

B. 研究方法

アンケートへの協力依頼文（資料1）質問票A（資料2）と質問票B（資料3）が英語で作成された。質問票Aではまず、回答者の国内に人獣共通感染症を制圧・予防するためのベクターあるいは動物サーベイランスが存在するかを質問した。ない場合には、そこで回答を終了とし、ある場合には対象疾病名を質問した。想定した疾病には、黄熱、デング熱、日本脳炎、その他の蚊媒介性疾患、ペスト、ラッサ熱、ハンタウイルス肺症候群、腎症候性出血熱、その他のげっ歯類媒介性疾患、クリミア・コンゴ出血熱、ライム病、その他のダニ媒介性疾患、狂犬病、その他の人獣共通感染症とした。

質問票Bでは、質問票Aで挙げられた各々の疾患について、どのベクターまたは保有動物がサーベイランスの対象となって

いるか、そのサーベイランスはどのような形態で維持されているか、そのサーベイランスの実施間隔、サーベイランスが実施されている地域、搜索サーベイランスか報告サーベイランスか、病原体をどの検査室で調べているか、サーベイランスで得られた情報をどのように還元しているか、を問うた後、そのサーベイランスに関する年報などがあれば、1部同封することを求めた。

協力依頼文、質問票AとBは電子メール、航空郵便、およびファックスで、平成12年1月下旬までに、カナダ、アメリカ合衆国、中華人民共和国、韓国、台湾、フィリピン、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランド、ドイツへ向けて、WHO（世界保健機関）より推薦された各国担当者宛てに送られた。質問票を受け取った者が一人で回答できない場合は、適当な回答者へ転送することを求めた。

C. 研究結果

平成12年3月14日までに、韓国、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランド、ドイツより最終回答を得た。アメリカ合衆国とフィリピンは、完全な回答までにさらに時間が必要とし、回答留保を申し出た。回答国はいずれも、該当するサーベイランスが機能していると回答した。

1) シンガポール

質問票Aは、Dr. Shirley Wan, Senior Registrar, Quarantine & Epidemiology Department, Ministry of the Environmentより回答あり。各疾病サーベイランス担当者が質問票Bを回答した。黄熱、デング熱、日本脳炎、マラリア、ラッサ熱、ハンタ肺症候群、腎症候性出血熱、レプトスピラ症、チフス、ペスト、狂犬病、ニッパウイルス感染症、キャンピロバクター感染症、サル

モネラ症、ハンタウイルス感染症が挙げられた。これらのサーベイランスは法律に規定され、国の予算と調査研究費で継続的な active/passive サーベイランスが国全体で実施されている。病原体解析および情報還元は定期的に行われている。

2) オーストラリア

Dr.Terry Nicholls, Agriculture, Fishery and Forestry, Australia によって質問票 A・B が回答された（ただし同国では検疫業務が Australian Quarantine Inspection Service (AQIS) に委託されており、AQIS のサーベイランス責任者は Dr.David Banks)。日本脳炎、オーストラリア（マレー渓谷）脳炎、ロスリバー脳炎、クンジンに対してサーベイランスが行われている。

これらのサーベイランスは AQIS への検疫委託料で賄われ、それぞれの疾病流行期間、流行地域のみで active サーベイランスが実施されている。アルボウイルスの分離は、高度安全施設で行われている。情報還元は質問票で質問した全てのルートで還元されていた。

3) ニュージーランド

質問票 A は Dr.Steve Hathaway, the New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry (MAF) に送付され、Ms.Lucy Martinez より関係資料が寄せられた。Standard for MAF Regulatory Authority Approved Veterinary Diagnostic Laboratories (March, 1999) によれば、包虫症、オウム病、旋毛虫症、サルモネラ症、ウシ海面脳症 (BSE)、ウシ結核が報告対象疾患として挙げられている。

質問票 B は同封されなかったが、サーベイランスの集計結果をまとめた Surveillance (MAF Reg reporting New Zealand's Animal Health Status) 等が同封された。

4) ドイツ

Dr.Mattias Hartung, Bundesinstitut für Gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinarmedizin, bgVV によって質問票 A・B が回答された。ドイツで報告対象疾患となっているものは、狂犬病、サルモネラ症、キャンピロバクター感染症、腸管出血性大腸菌感染症であった。

質問票 B は同封されなかった。代わりにサーベイランス結果の報告書 (BgVV-Heft 09/99 ed.M.Hartung, ISSN 0948-0307-ISBN 3-931675-49-1) があることが連絡された。

5) フィリピン

フィリピン実地疫学専門家養成コース (FETP) の Dr.Elizabeth Miranda に質問票 A の回答をお願いしている。フィリピンでは狂犬病、レストン型エボラ出血熱、腎症候性出血熱が対象サーベイランスとなっているが、詳細は調査中。

6) アメリカ合衆国

Food and Drug Administration・Centers for Disease Control and Prevention 兼任の Dr.Thomas Gomez に回答を依頼した。現在、FDA 本場で、回答内容の公表許可取得中。

7) 侵入動物・侵入ベクターに関するサーベイランスについて

最終回答のあった韓国、シンガポール、オーストラリア、ニュージーランド、ドイツの 5 カ国すべてでサーベイランスシステムが機能していた。国境や空海港でのサーベイランスシステムはシンガポール、ニュージーランドで機能し、ドイツでは不明、オーストラリアでは機能していなかった。

ニュージーランドでは、海空港でのサーベイランスは航空機とその貨物室、航空コンテナ、空港とその周辺と設問したすべての地域で行われていた。