

図25 滞水池周辺ヒトスジシマカの方法別採取数

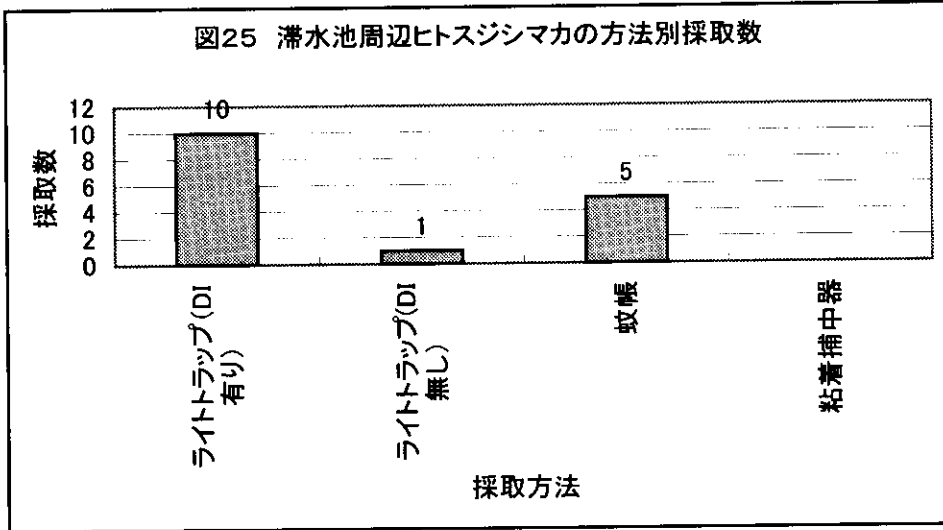


図26 滞水池周辺コガタイエカの方法別採取数

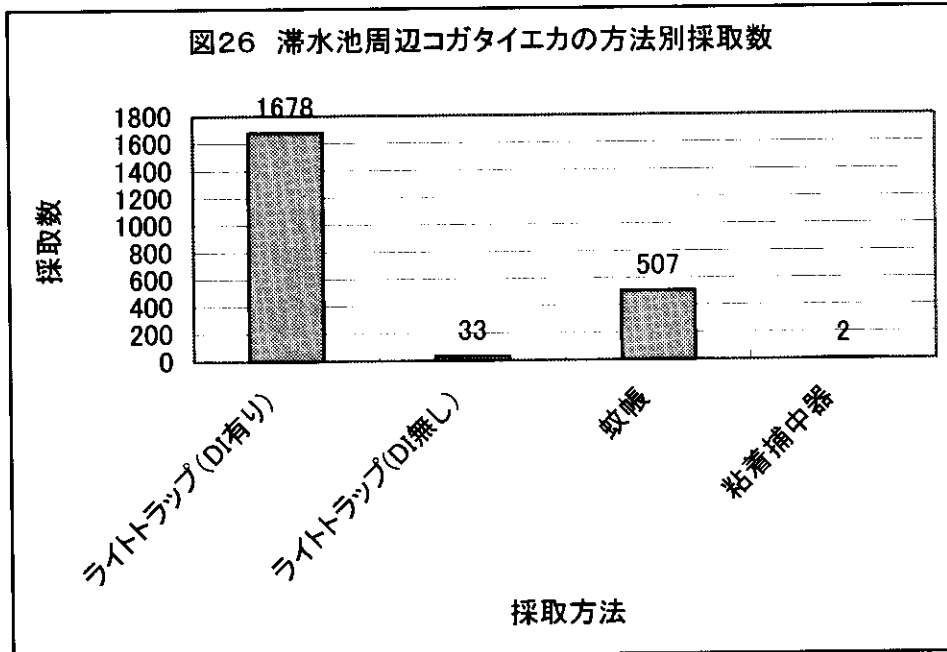


図27 滞水池コガタイエカの月別採取数

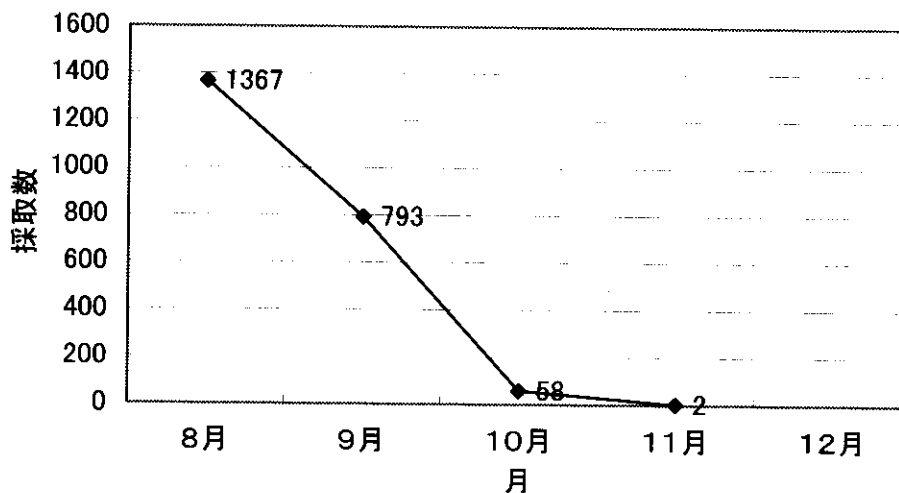
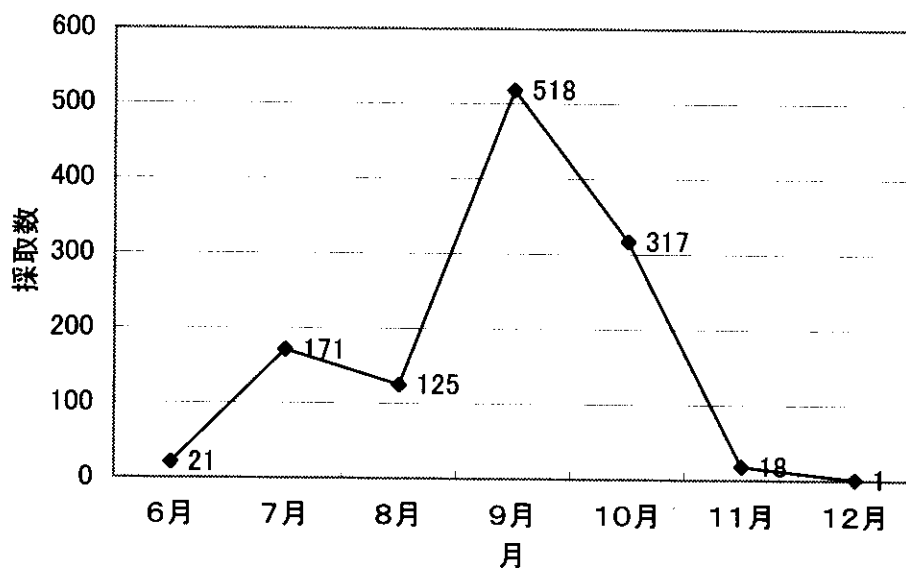


図29 竹藪月別採取数



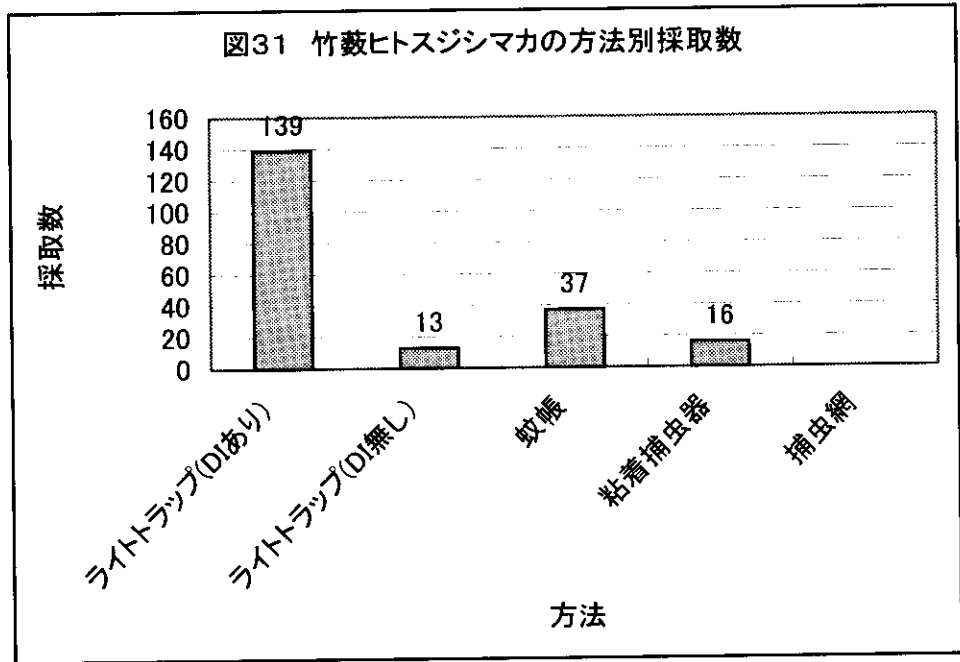
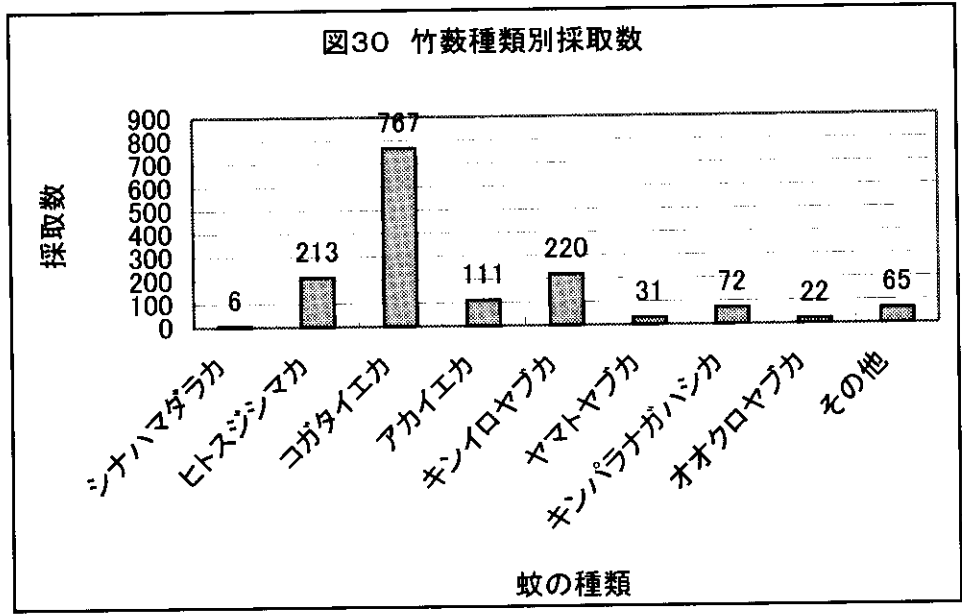


図32 竹藪ヒトスジシマカの月別採取数

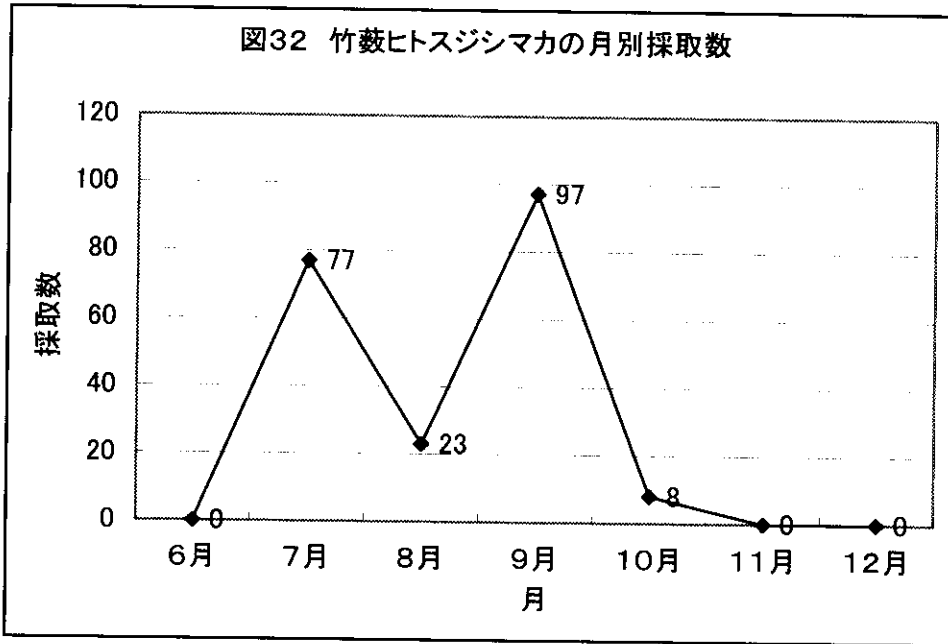


図33 竹藪コガタイエカの月別採取数

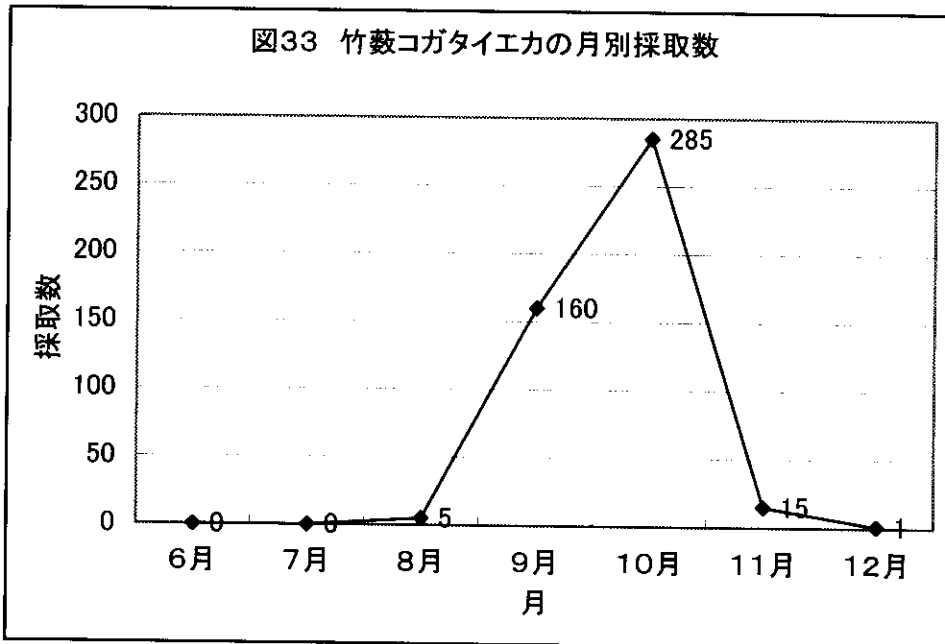


図34 竹藪コガタイエカの方法別採取数

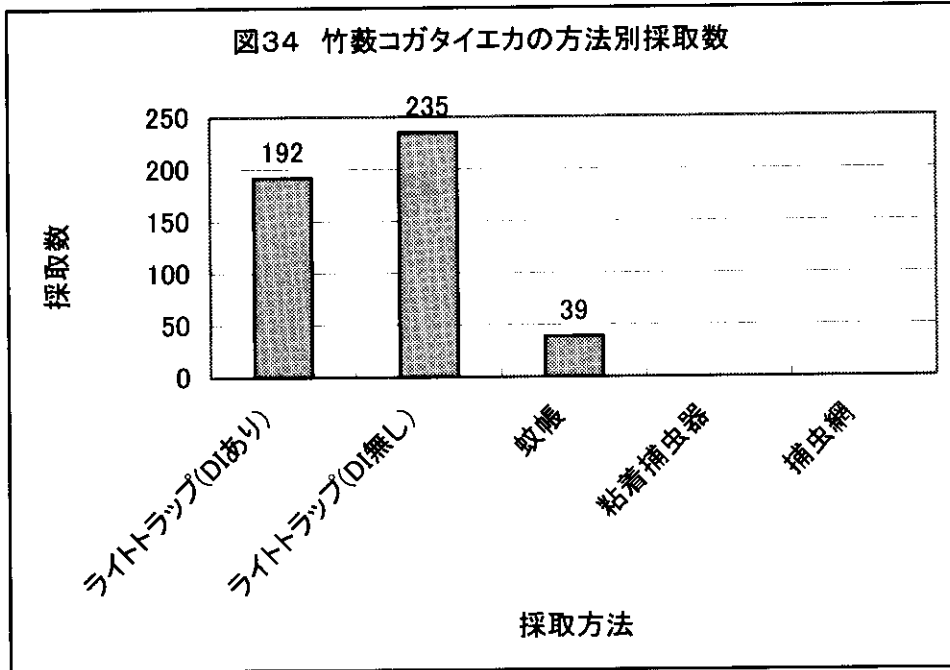


図35 竹藪アカイエカの方法別採取数

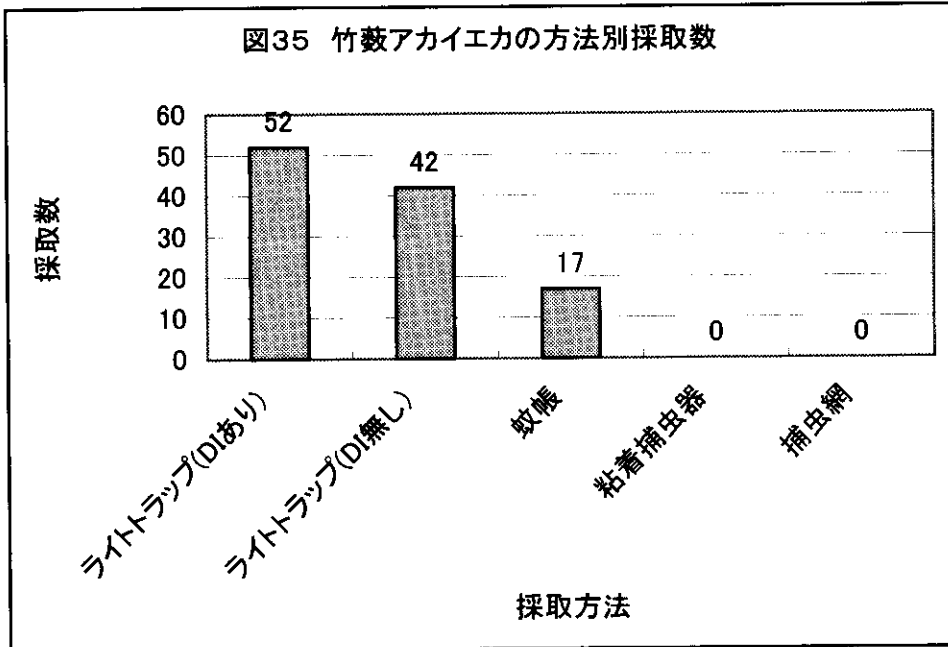


図36 竹藪アカイエカの月別採取数

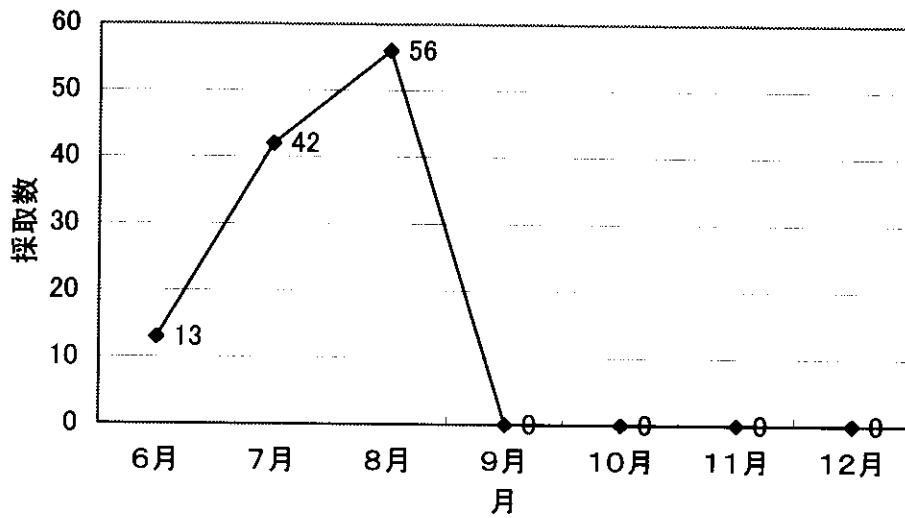


図37 第1PTB第4サテライト月別採取数

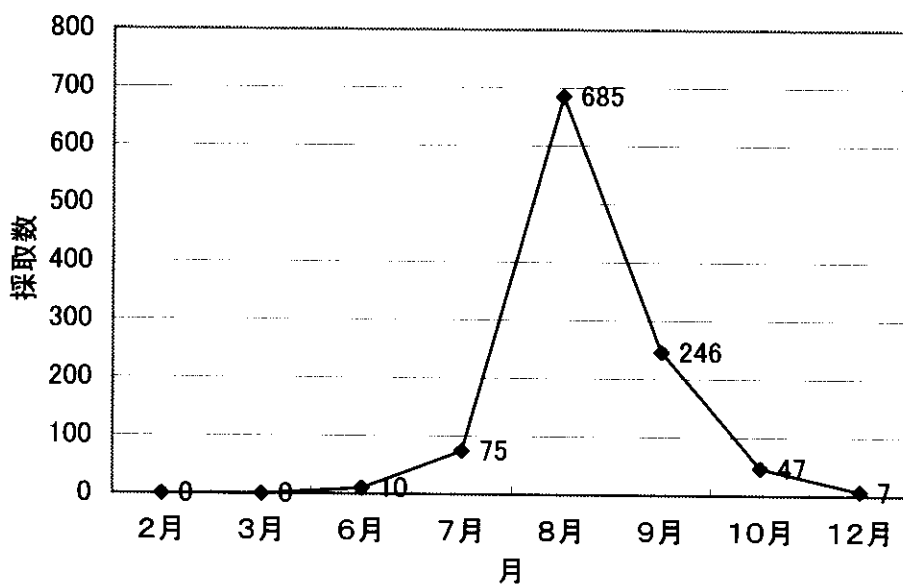


図38 第4サテライトシナハマダラカの方法別採取数

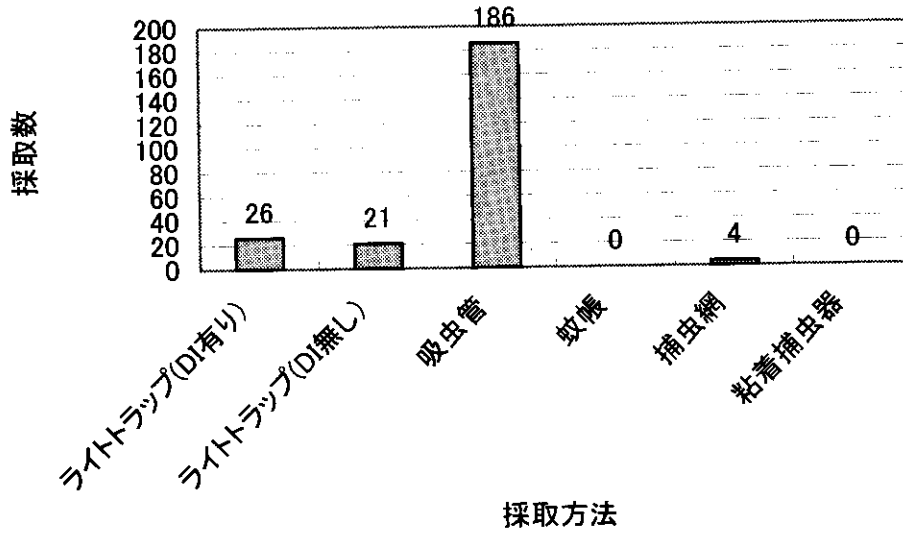


図39 第4サテライトのシナハマダラカ月別採取数

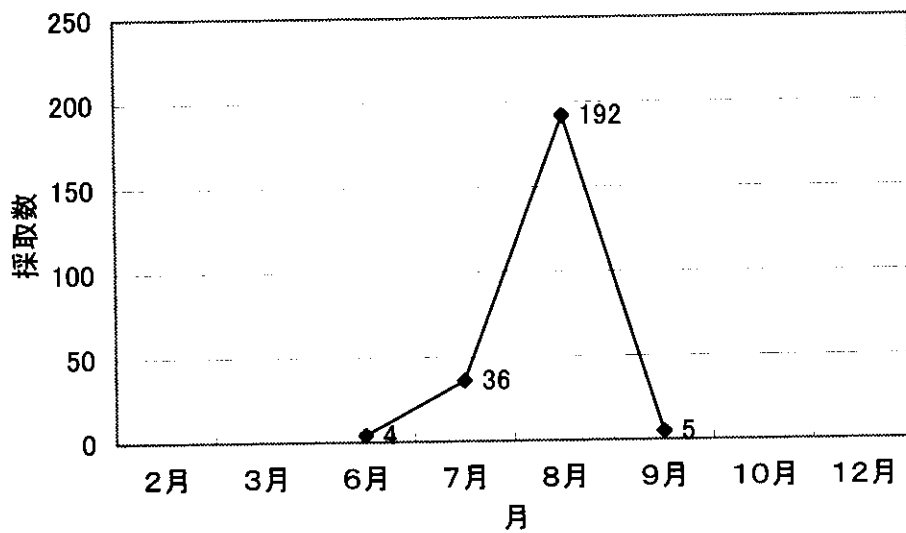


図40 第4サテライトのコガタイエカ方法別採取数

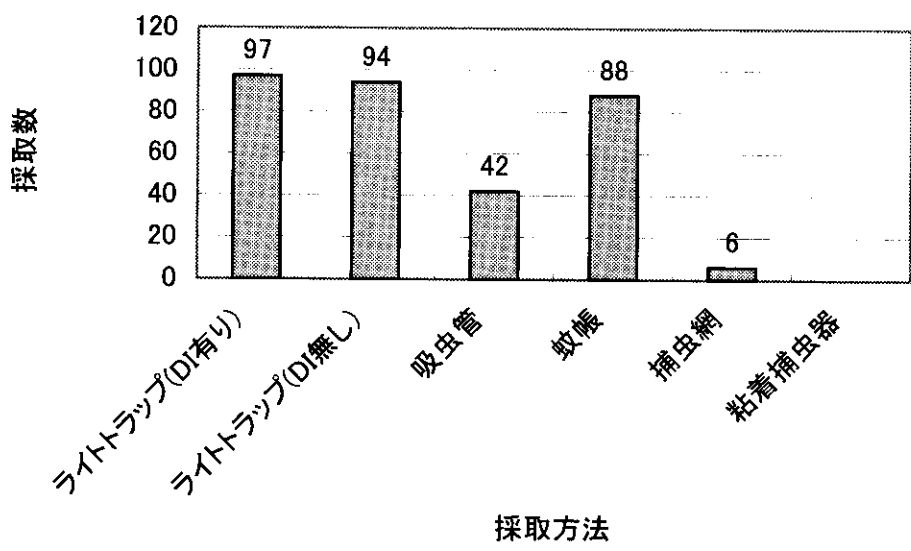


図41 第4サテライトのコガタイエカ月別採取数

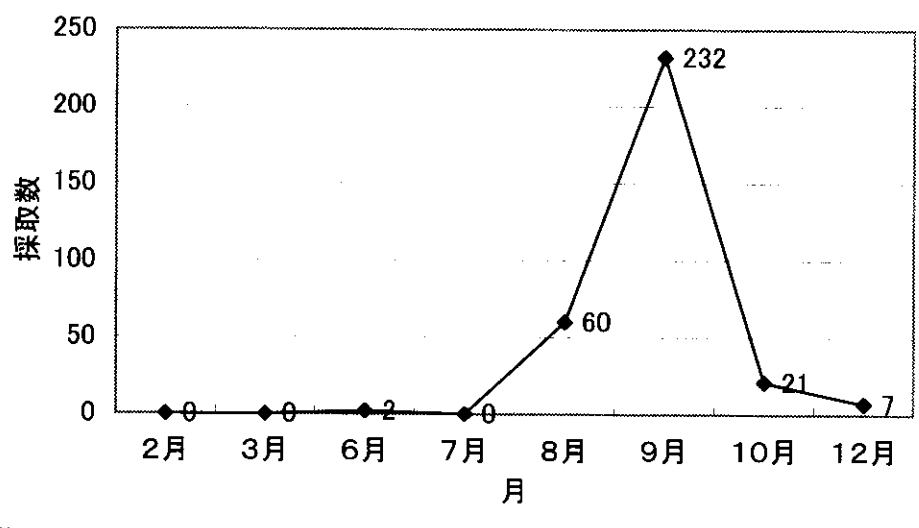
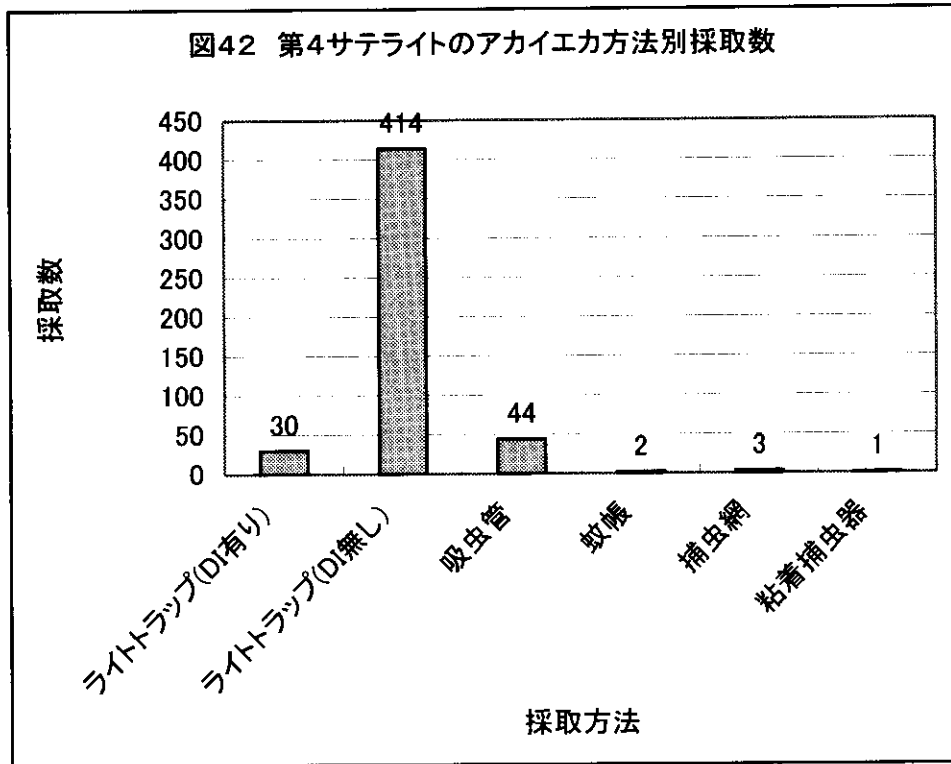


図42 第4サテライトのアカイエカ方法別採取数



RT-PCR法によるフラビウイルス（ Dengue・黄熱・日本脳炎）
検査法の基礎的検討

分担研究者：	内田幸憲	（神戸検疫所）
協力研究者：	林 昭宏	（神戸検疫所）
	鎌倉和政	（神戸検疫所）
	多賀賢一郎	（神戸検疫所）
	森 英人	（神戸検疫所）
	江下優樹	（大分大学医学部）

研究要旨

近年、ウイルスの同定・確認方法として、ウイルス分離による方法¹⁾⁷⁾、免疫学的な検査方法に加え、遺伝子検査法(RT-PCR法等)が用いられるようになってきている⁸⁾⁻¹⁶⁾。

昨年は、Dengueウイルス感染蚊からのウイルス同定、確認法の高感度、高特異的な改良 one step RT-PCR 法を開発し¹⁷⁾、蚊から直接 RT-PCR によりウイルス特異遺伝子の検出が可能であることを明らかにした。

今年、蚊からの RNA 抽出方法をさらに検討し、one-step RT-PCR 法による Dengue、黄熱および日本脳炎ウイルスの検出感度をウイルス量(pfu)として求めた。さらに、フィールドで採取した蚊を検査に供するまでの保存条件がウイルス RNA の減衰に影響を及ぼすのか否かを明らかにするために、Dengueウイルスおよびその感染蚊を用いて暴露される温度条件を変えて保存した後、RT-PCR によりウイルス特異遺伝子の検出を行った。

その結果、一度に100匹の蚊をプールして検査を実施した場合でも1匹の感染蚊(ウイルス量にして 10^3 pfu)が存在すれば、ウイルス特異遺伝子を検出できることが確認できた。また、ウイルス RNA は低温で保存するほど長期間保存されることが確認されたが、感染蚊では常温で放置した場合でも10日間はウイルス RNA が保存されていたことから、採取された蚊は検査に供するまで10日以内であれば常温に放置することが可能であることが分かった。

これらの検討をもとに、蚊の採取、保存、ウイルス学的検査という Dengueウイルスをはじめとするフラビウイルスに関する効率的なベクターサーベイランスを実施できるものと考えられる。

A. 研究目的

近年国内における日本脳炎患者の減少により、各都道府県を中心としたベクターサーベイランスが縮小あるいは廃止されるようになった。しかしながら海外に於いてはアメリカにおけるウエストナイル脳炎の大流行、東南アジアを中心とした Dengue 熱、日本脳炎の患者発生等、依然フラビウイルスによる感染症が流行しており、海外からの優入門戸である空港、海港を中心とした

ベクターサーベイランスは国内の患者の発生の有無に関わらず定期的に実施されなければならない。そのため、より効率的な広範囲の病原体の検索を目的とした検査法を整備し、それらの結果に基づいた媒介動物対策を実施すべきと考える。

また昨年度、種々の感染症に係る法律が改正され、検疫法においても検疫感染症及びそれに準ずる感染症を媒介する動物、昆虫類等の病原体保有の有無に関する検査が拡

充された。これらの対象感染症のうち、蚊によって媒介されるデング熱、黄熱、日本脳炎の病因ウイルスの検査には、蚊からのウイルス検索、特にウイルスの特異遺伝子の検出を実施することが急務となった。

海港、空港等で採取された蚊は、検査センターに送付搬入され、病原体の有無を検査することとなる。しかし、採取した蚊種の同定、保存、送付等の一連の過程で暴露される温度条件及び経過時間が蚊によって異なることから、検査結果に大きな相違が生じる可能性がある。

既に、昨年度の「侵入動物及び侵入ベクターのサーベイランスシステム構築に関する研究」において、感染蚊が50匹中1匹存在すればデングウイルス特異遺伝子は検出可能であったことを報告した¹⁷⁾。今年はさらに蚊からのRNA抽出法を改良、検討し、一度により多くの蚊をプールして検査ができるように抽出法ごとのRT-PCR感度をウイルス量(pfu)として求めた。

また、採取した蚊を検査に供するまでの保存条件を実際に沿った形で検証するため、フラビウイルスを種々の保存条件に置いた際に、その特異遺伝子増幅の経時変化を確認し、ウイルスRNAの減衰に影響を及ぼさない保存条件を検討した。このようにして、採取された蚊の保存、送付、遺伝子検査という一連の基礎的検討を実施したので報告する。

B. 研究方法

1) ウイルスストック液

デングウイルス(1型、2型)、黄熱ウイルス(17D株)、日本脳炎ウイルス(JaG ar株)をC6/36培養細胞で増殖させ、ウイルスストック液を作製した。ストック液のウイルス量はブラック法¹⁸⁾によりそれぞれ算出し、供試するまでの間、-80℃に保存した。

2) RNA抽出法及びRT-PCR条件

ウイルスストック液を培養液で希釈したものをISOGEN-LS(ニッポンツーン)及びRNeasy Min

i Kit(QIAGEN)により抽出精製した(図1)。これらの精製RNAを用い、YF1,3(フラビ共通)、YF-S10, C10(黄熱特異)、DC1,2(デング共通)、JE8K, JEER(日本脳炎特異)の各プライマー対(表1)によるRT-PCRを行った。即ち、精製RNA 5µlに4µlのd-NTP(TAKARA, 2.5mM)、0.5µlの各プライマー(100pM)、0.05µlの逆転写酵素(Wako, 200U/µl)、0.2µlのリボヌクレアーゼ阻害剤(Wako, 20U/µl)及び0.25µlのTaqポリメラーゼ(TAKARA, Ex-taq5U/µl)mixtureを加え蒸留水にて50µlとした。これをサーマルサイクラー(PERKIN ELMER, GeneAmp PCR System 9700)にセットし、53℃10mins逆転写反応を行い1本鎖のcDNAを合成した後、92℃1分、53℃1分、72℃1分のPCRサイクルを35回行った。反応生成物5µlをアガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により増幅されたDNA断片のバンドを確認し、各ウイルスストックの希釈倍率から検出感度を求めた。

3) 蚊からのウイルス特異遺伝子の検出

ウイルスストック液にネッタイシマカ、ヒトスジシマカ、アカイエカを1、10、50及び100匹加え、ISOGEN抽出、ISOGEN-QIAGEN抽出、加熱処理-ISOGEN-QIAGEN抽出、遠沈処理-ISOGEN抽出(図1, 2)したものをそれぞれ用いて検出感度を求めるとともに蚊の種類による検出感度の差を確認した。日本脳炎ウイルスの検出感度を求めるに当たり、コガタイエカの入手が困難であったため、入手可能なアカイエカを用いた。

4) フラビウイルス特異遺伝子の経時変化

フラビウイルスの特異遺伝子の経時的な減衰を、デングウイルス2型ストック液をISOGENに浸漬したもの、10匹の未感染蚊にデングウイルス2型を加え、乳剤とした後ISOGENに浸漬したものを保存条件(常温、4℃、-20℃、-80℃)を変えて検討した。また、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカの胸部に 2.5×10^3 8SMicLD50のウイルス量のデングウイルス1型を接種し¹⁹⁾、28℃で1

週間飼育したもの（感染蚊）を -80°C で殺した後、常温で保存した場合も同様に検討した。

C. 研究結果

1) ウイルスストック液のRT-PCR検出感度
各フラビウイルスのRT-PCR結果は図3に示した。

ウイルスストック液のみを用いISOGEN抽出した場合のRT-PCR法による検出感度は、表2に示したようにフラビ共通プライマーで 10^1 pfu、各特異プライマーで 10^0 pfuであった。QIAGEN精製を加えることで約10倍程度感度の低下がみられた。

2) 蚊からのRT-PCR検出感度

蚊からのウイルス特異遺伝子の検出においては、1匹の蚊をISOGEN抽出した場合には共通プライマーを用いて 10^2 pfu、特異プライマーを用いて 10^1 pfuであった。10匹の場合にISOGEN-QIAGEN抽出では共通プライマーで 10^4 pfuであり、非特異的なバンドの出現があった。乳剤を 100°C で5分間の加熱処理行い（図1①）、ISOGEN-QIAGEN抽出した場合には、共通プライマーで 10^4 pfu、特異プライマーで 10^3 pfuであった（表3）。乳剤の遠沈上清を用いた図2の方法によりISOGEN抽出した場合には、共通プライマーで 10^3 pfu（10匹）、 10^4 pfu（50及び100匹）、特異プライマーでは、それぞれ 10^2 pfu（10匹）、 10^3 pfu（50及び100匹）であった。（表4）

供試した蚊の種類ごとの感度は、共通プライマーを用いた場合には、差がみられなかったものの、日本脳炎ウイルスの特異プライマーを用いた場合に他の2種類の蚊の場合に比べて約10倍程度の感度の低下がみられた。（表3、4）

4) フラビウイルス特異遺伝子の経時変化

フラビウイルスの保存条件による特異遺伝子の経時的な変化は、ウイルスストック液をISOGENに入れた場合、 10^2 pfuのウイルス量で、常温において20日まで、4、 -20 、 -80°C では60日後でもなお検出可能であっ

た（表5）。10匹の蚊にウイルスストック液を加えた場合には 10^3 で20日まで、 10^4 で30日でも検出できた（表6）。感染蚊を用いた場合は、常温保存で10日後においても検出可能であった（図3）。

D. 考察

全国の海港、空港で採取、同定された蚊の病原体の有無を調査するため、迅速な検査法であるRT-PCR法の導入を検討した。

まず各種プライマー対を用いた RT-PCR の検出感度をウイルスのみ、ウイルスに蚊を1匹、10匹、50匹、100匹加えて抽出、精製法を検討しながら求めた。ウイルスのみの RT-PCR の感度は ISOGEN 抽出のみで共通プライマーで 10^1 、特異プライマーで 10^0 と良好な結果が得られたため、蚊にウイルスを加えたものを ISOGEN 抽出したところ、加える蚊の匹数を多くするほどウイルス量を増やさねばならなかった。そのため QIAGEN の抽出キットを併用し、精製を行ったが、易熱性タンパク等の影響と思われる感度、再現性の低下に加え、非特異的バンドの出現等の問題が残った。山田らが報告した¹³⁾加熱処理を加えた結果、特異性と再現性においては良好な結果が得られたが、検出感度が低かった。10匹以上の蚊をプールして全量 ISOGEN 抽出することが物理的にも困難であると考えられたため、蚊の乳剤の遠沈上清を用いて ISOGEN 抽出を行ったところ、遠沈により高い精製効果も得られ、感度、再現性及び特異性に於いて良好な結果が得られた。この抽出法を用いてネッタシマカ及びヒトスジシマカの場合には100匹中に 10^3 pfu のウイルスが存在すれば特異プライマーを用いた RT-PCR 法により黄熱及びデングウイルス特異遺伝子が検出可能であることが確認された。フラビ共通プライマーでも 10^4 pfu のウイルス量で検出できた。共通プライマーを用いた場合には、蚊とウイルスの組み合わせによる感度の差はみられなかったが、日本脳炎ウイルスの特異プ

ライマーの場合には、他の2種類の蚊の場合に比べ約10倍程度の感度の低下がみられた。このことは、使用したプライマー特性によるものと考えられるが、アカイエカは他の2種の蚊に比べて重量比で1.5倍と大型であったことから、蚊の種類による検出感度の違いは、蚊の大きさに影響をうけることも示唆された。

LEON ROSENらの報告等^{19)・21)}によると、デング熱ウイルス感染蚊のウイルス量は 10^4 から 10^5 pfu/mosquitoであることから、本法で十分検出可能であると思われる。

フィールドで採取された感染蚊は、種の同定を行った後に宅配便等の手段で検査部門に送付され、検査が実施されるが、採取を行った機関の施設により冷凍設備の条件は異なる。家庭用冷蔵庫しか所有しないものから -80°C での保存が可能な施設まである。そのため採取した蚊の特に送付までの間の保存条件を実際に即した形で検証し、種々の温度条件下で蚊の体内のウイルスRNAが減衰するかどうかを確認する必要がある。まず、種々の温度条件を常温、 4°C 、 -20°C 、 -80°C に設定し、ウイルス液をISOGENに優漬することで検討した。温度が低くなるほどウイルスRNAは保存されていたが、常温でも20日間は検出可能であった。10匹の蚊にウイルスストック液を加え乳剤としたものを同様に用いた場合もほぼ同じ結果が得られた。10匹程度の保存であればISOGENに優漬することも有効と考えられる。次に行った感染蚊を用いた実験でもウイルスRNAは常温保存で10日間は保存されていることが確認できた。

これらのことからフィールドで採取された蚊は同定終了までは常温保存し、同じ場所で採取された同種の蚊をプールして、送付までの間の日数に応じ低温(4°C 、 -20°C 、 -80°C)保存することで一度に100匹の蚊からのフラビウイルス特異遺伝子の検査は可能であることが確認された(図5)。

多くの場合、検査結果が陰性であることが予想されるが、 10^3 pfuの検出感度は保証されるものと考えられ、検疫法第27条に基づく検査のうちフラビウイルス関連の検査は今後本法により実施可能と思われる。

本研究において、検体の採取から検査まで、現実に則した検証を実施してきたが、主としてライトとラップで採取した場合等の常温で自然死した蚊中のウイルスRNAの経時的減衰、また、分別不可能な多種雑多な蚊のプールからのウイルス遺伝子の検出感度等、今後検討すべきと考える。

E. 結論

昨年確立したone step RT-PCR法を改良し、100匹の蚊をプールして検査可能な抽出法を検討した結果、 10^3 pfuのウイルス量の感度でフラビウイルス特異遺伝子が検出できた。

感染蚊中のデングウイルスRNAは常温に放置した場合でも10日間は保存されていた。

F. 謝辞

本研究を実施するに当たり、多数の蚊の分与をしていただいた大日本除虫菊株式会社吉村正樹先生はじめ職員の方々に深謝致します。

G. 研究発表

1) 学会発表

林昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森英人、橋本智、井村俊郎、江下優樹、内田幸憲：RT-PCR法によるフラビウイルス(デング・黄熱・日本脳炎)検査法の基礎的検討、第3回日本検疫医学会学術大会、東京、第3回検疫医学会大会プログラム・抄録集 H. 文献

1) Akira Igarashi, Kazuo Buei, Noboru Ueda, Masahiro Yoshida, Sumiyo Ito, Hiroshi Nakamura, Fuyoko Sasao, Konosuke Fukai. Isolation of viruses from female *Culex tritaeniorhynchus* in *Aedes albopictus* cell cultures. Am.J.Trop.Med.Hyg.30(2), 449-460,1981

- 2) Ajello, C.A., :Evaluation of *Aedes albopictus* tissue culture for use in association with arbovirus isolation. *J. Med. Virol.* 3, 301-306, 1979
- 3) Akira Igarashi, :Isolation of Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses.:*J. Gen. Virol.*, 40, 531-544, 1978
- 4) Singh, K.R.P. :Cell cultures derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). *Curr.Sci.*,36, 1967
- 5) Varma, M.G.B., Pudney, M. Colin J. et al.: Isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line (Mos 61) of yellow fever virus strains from original field material. *Intervirology*, 6, 50-56, 1975
- 6) Yunker C.E., Cory J.:Plaque production by arboviruses in Singh's *Aedes albopictus* cell. *Appl. Microbiol.*, 79,81-89,1975
- 7) C. J. Mitchell, et al. :Isolation of eastern equine encephalitis virus from *Aedes albopictus* in Florida. *SCIENCE*, 257,526-527,1992
- 8) Eva Harris, T.Guy Roberts, Leila Smith, John Selle, Laura D.Kramer, Sonia Valle, Erick Sandoval, Angel Balmaseda.:Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR.:*Journal of clinical microbiology*, 36(9), 2634-2639,1998
- 9) Vodkin MH, Streit T, Mitchell CJ, McLaughlin GL, Novak RJ, PCR-based detection of arboviral RNA from mosquitoes homogenized in detergent, *Biotechniques*, 17 (1) 114-116,1994
- 10) Mariko Tanaka :Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction.*Journal of Virological Methods*, 41, 311-322, 1993
- 11) 森田公一、田中真理子、五十嵐章 : PCR法を用いたフラビウイルスの迅速診断法の開発. *臨床とウイルス*, 18(3),322-325,1990
- 12) 江下優樹, 山田堅一郎, 津田良夫, 安居院宣昭 : ウイルスー蚊 : シマカ亜属蚊の Dengue ウイルス媒介能について, *化学療法の領域*, 12(11), 2023-2030, 1996
- 13) 五十嵐章, 森田公一, 長谷部太他, 媒介蚊における Dengue ウイルス遺伝子の検出と解析, *長崎大学熱帯医学研究所共同研究報告書*, 8-13, 1998
- 14) 木村朝昭他, 弓指孝博, 山崎謙治, 小田美光, 原嘉宏, 木村明生, 中村央, 吉田政弘, 峯川好一, PCR 法による野外採集蚊からの日本脳炎ウイルスゲノムの検出, *大阪府立公衛研所報*, 公衆衛生編, 30, 59-64, 1992
- 15) Kenichiro Yamada, Masaru Nawa, Tomohiko Takasaki, Sadao Yabe:Laboratory diagnosis of dengue virus infection by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Jpn. J. Infect. Dis.* ,52 ,150-155, 1999
- 16) Vincent T. K. Chow, Y. C. Chain, Rita bYong, K. M. Lee, L. Lim, Y. K. Chung, S. G. Lam-Phua.:Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing.:*Am. J. Trop. Med. Hyg.*,58(5)

578-586, 1998

17) 倉根一郎, 江下優樹, 山田堅一郎, 高崎智彦, 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, 平成 11 年度厚生科学研究報告書, 64-69, 2000

18) Rao BL :Plaque formation of dengue viruses in Vero cell culture under carboxymethylcellulose overlay. Indian J. Med Res. 64 (12), 1709-1712, 1976

19) Leon Rosen, Duane Gubler :The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Vol. 23, No. 6, 1153-1160, 1974

20) Gubler DJ, Suharyono W, Tan R, Abidin M, Sie A: Viremia in patients with naturally acquired dengue infection. Bull WHO 59 (4), 623-630, 1981

21) 山西浩, ヒトスジシマカのチクングニアウイルス感受性について, 神戸学院女子短期大学紀要, 26, 225-254, 1993

图 1 RNA extraction method from Mosquito

ISOGEN extraction

Put a mosquito into 1.5ml microtube
 | +Virus stock 100μl
 Homogenize (on ice) ← ①
 | +ISOGEN-LS 300μl
 | +DEPC 100μl mix
 Room temp. for 5min
 | +Chloroform 100μl,
 | Vortex for 30sec
 Store at 4 °C for 5min
 |
 Centrifuge at 14,000rpm, 10min, 4 °C
 |
 Take supernatant into another tube
 | +Isopropanol same volume
 | +Ethachin mate 3μl
 | +3M Sodium Acetate 16.5μl, mix
 Store at room temp. for 20-30min
 | (or 4 °C overnight)
 Centrifuge at 14,000rpm, 10min, 4 °C
 |
 Discard supernatant without pellet
 | +75% Ethanol 90μl
 Centrifuge at 14,000rpm, 10min, 4 °C
 |
 Discard supernatant without pellet
 | +99.9% Ethanol 90μl
 Centrifuge at 14,000rpm, 10min, 4 °C
 |
 Discard supernatant without pellet
 |
 Dry up (not completely) → ②
 | +DEPC 100μl
 | (+RNase inhibitor 1U/μl)
 Store at 4 °C for 30min
 |
 RT-PCR

Heat treatment

① Boil at 100 °C for 5min

QIAGEN purification

② Dry up (not completely)

+DEPC 10μl
 (+RNase inhibitor 1U/μl)

Store at 4 °C for 30min
 | +RNase free water 90μl
 | +RLT 350μl
 | +Mercaptoethanol 3.5μl
 | +99.9% Ethanol 250μl
 | pipetting
 Apply into RNeasy mini spin column
 |
 Centrifuge at 10,000rpm, 15sec
 |
 Put column into another collection tube
 | +RPE 500μl
 Centrifuge at 10,000rpm, 1min
 |
 Put column into another collection tube
 |
 Dry column for 2min
 | +RNase free water 50μl
 Store at room temp. for 10min
 |
 Centrifuge at 10,000rpm, 1min
 |
 RT-PCR

2 Modified extraction method in case of using the supernatant of mosquitoes homogenate

Put a mosquito into 3ml glasstube

| +Virus stock (100µl for 10 mosquits, 500µl for 50, 1,000µl for 100)

Homogenize (on ice)

| Centrifuge at 14,000rpm ,10min ,4 °C

| Take supernatant into another tube (Take 250µl for 50and 100mosquits)

| +ISOGEN-LS (300µl for 10 mosquits, 750µl for 50 and 100 mosquits)

| +DEPC 100µl mix

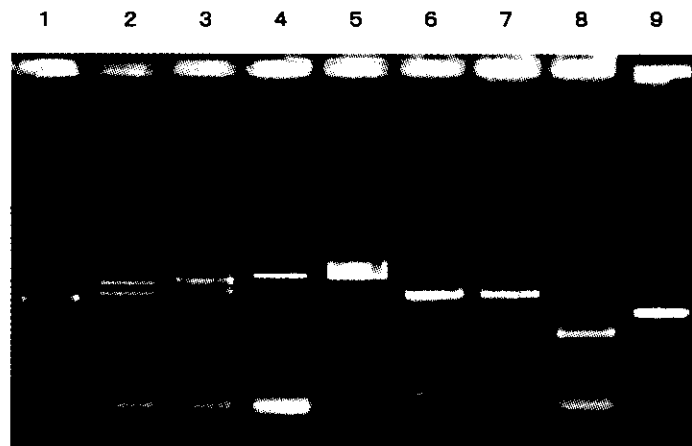
Room temp. for 5min

| +Chloroform (100µl for 10 mosquits, 200µl for 50 and for 100)

| Vortex for 30sec

Store at 4 °C for 5min

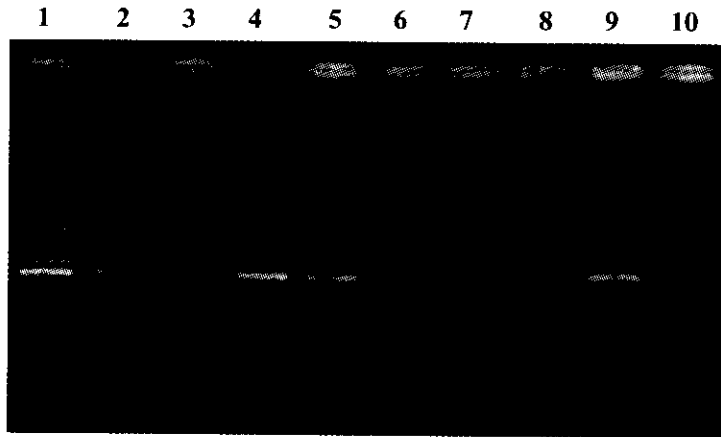
3 Detection of DV1,2, YFV and JEV by RT-PCR



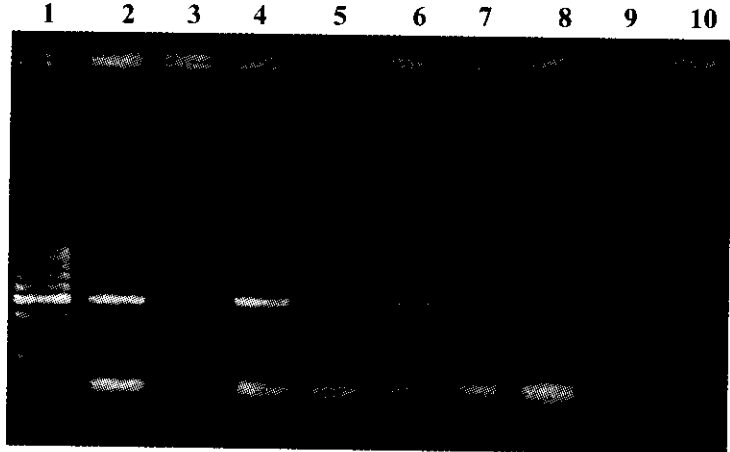
Lane No.	Virus con. (pfu/tube)	Primer
1	Marker	
2	DV1	YF-1,3
3	DV2	
4	YFV (17D)	
5	JEV	
6	DV1	DC-1,2
7	DV2	
8	YFV (17D)	YF-C10,S10
9	JEV	JE8K,JEER

☒ 4 DV1 detection from infected mosquitoes stored at room temperature by RT-PCR

Ae. aegypti



Ae. albopictus



Lane No.

1
2
3
4
5

Marker
0 hrs
6 hrs
12 hrs
24 hrs

Lane No.

6
7
8
9
10

2 days
3 days
5 days
10 days
DW

図5 蚊の調査・病原体（フラビウイルス）検査フロー

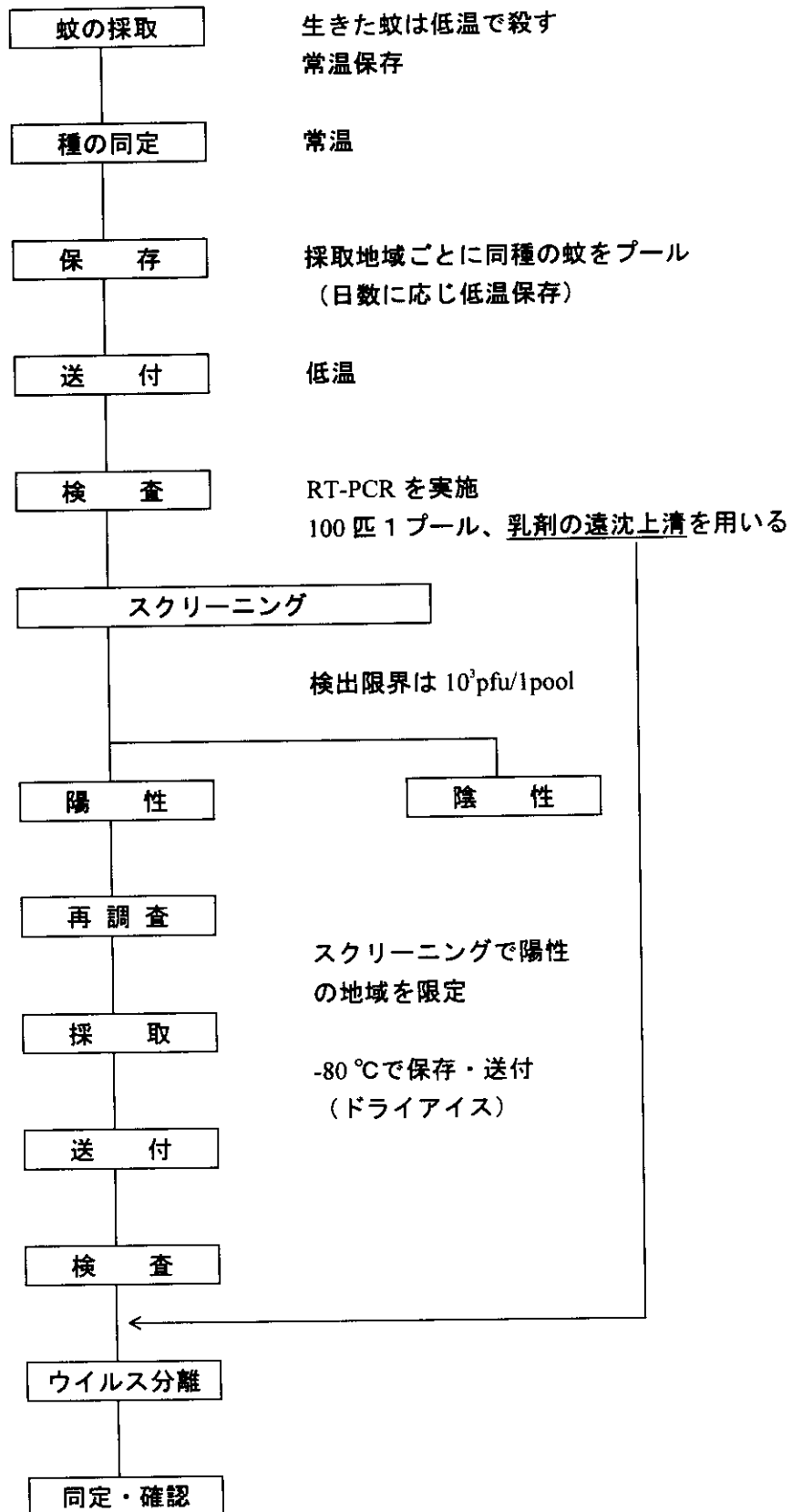


表 1 Sequence of synthetic oligonucleotide primers.

Primer code	Sequence (5' to 3')	Product (bp)	References
YF-1	GGTCTCCTCTAACCTCTAG	YFV 675	Rice et al.
YF-3	GAGTGGATGACCACGGAAGACATGC	DV1 534,618 DV2 541,628 JEV 673,751	1987
YF-S10	GTAACAGTTACATCGCYGAG	278	Rice et al.
YF-C10	AGCAAGAAACATGTCCACCA		1987
DC1	TCAATATGCTGAAACGOGCGAGAAACCG	511	Lanciotti et al.
DC2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTC		1992
JE8K	ATGGAACCCCCCTTC	385	Morita et al.
JEER	AGCATGCACATTGGTCGCTA		1991

表 2 Sensitivity of Flavivirus detection by RT-PCR

Extraction	ISOGEN
	YFV (pfu/tube)
YF1,3	10 ¹
YF-S10,C10	10 ⁰
	DV2 (pfu/tube)
YF1,3	10 ¹
DC1,2	10 ⁰
	JE (pfu/tube)
YF1,3	10 ¹
JE8K,JEER	10 ⁰