

**表 3 Sensitivity of Flavivirus detection from mosquitoes by RT-PCR**

Number of Mosquitoes	1	10
Extraction	ISOGEN	Boiled+ISOGEN+QIAGEN
	YFV (pfu/tube)	
YF1,3	$10^2$	$10^4$
YF-S10,C10	$10^1$	$10^3$
	DV2 (pfu/tube)	
YF1,3	$10^2$	$10^4$
DC1,2	$10^1$	$10^3$
	JEV (pfu/tube)	
YF1,3	$10^2$	$10^4$
JE8K,JEER	$10^2$	$10^4$

**表 4 Sensitivity of Flavivirus detection from the supernatant by RT-PCR**

Number of Mosquits	10	50	100
	YFV (pfu/tube)		
YF1,3	$10^3$	$10^4$	$10^4$
YF-S10,C10	$10^2$	$10^3$	$10^3$
	DV2 (pfu/tube)		
YF1,3	$10^3$	$10^4$	$10^4$
DC1,2	$10^2$	$10^3$	$10^3$
	JE (pfu/tube)		
YF1,3	$10^3$	$10^4$	$10^4$
JE8K,JEER	$10^3$	$10^4$	$10^4$

**表 5 Detection of DV2 preserved in ISOGEN at room temperature by RT-PCR**

Sample	DV2 stock+ISOGEN							
	Room Temp		4 °C		-20 °C		-80 °C	
Condition	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>
Virus	(pfu)							
5days	+	+	+	+	+	+	+	+
10days	+	+	+	+	+	+	+	+
20days	+	+	+	+	+	+	+	+
30days	-	-	-	+	+	+	+	+
60days	-	-	-	+	+	+	+	+

**表 6 Detection of DV2 preserved in ISOGEN with 10 mosquitoes at room temperature by RT-PCR**

Sample	DV2 stock+10 mosquitoes+ISOGEN	
	Room Temp	
Condition	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Virus (pfu)		
5days	+	+
10days	+	+
20days	+	+
30days	-	+

厚生科学研究費補助金（生活安全研究総合事業）

分担研究報告書

PCR法を用いたデングウイルス媒介蚊の鑑別、および外国産を含む  
ヒトスジシマカrDNAシストロンのITS2領域の比較

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス1部）  
協力研究者 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 熱は、熱帯・亜熱帯地域のみならずアメリカやヨーロッパ諸国においても公衆衛生上重要な感染症になりつつある。ウイルス性疾患である本症はネッタイシマカ *Aedes aegypti* やヒトスジシマカ *Aedes albopictus* などのシマカ亜属の蚊によって媒介される。我々は、野外から採集した蚊のウイルス保有状況を得るために、高感度かつ特異的なウイルスゲノムの増幅と検出を蚊から行うために、改良したone step RT-PCR法を報告した（平成11年度研究成果報告書）。今回は、PCR法を用いたデングウイルス媒介蚊の鑑別法を検討した。その結果、ハエ目（双翅目）に共通なプライマーを用いた場合は、ネッタイシマカ（タイ国、グアテマラ、アフリカ）では約350 bpの特異的PCR産物が得られた。また、ヒトスジシマカ（日本、タイ国、アメリカ）では約530bpの大きさのPCR産物が得られ、ネッタイシマカのそれとは約180 bpの違いが認められた。次に、日本、タイ国、アメリカの3地域由来のヒトスジシマカのrDNAシストロンのITS2（Internal Transcribed Spacer 2）領域を比較したところ、多くの配列は相同配列であった。また、日本とタイ国産のITS2領域の一部配列の10塩基を比較すると、そこには2種類の共通配列が認められたが、アメリカ産のものはそのうちの1種類が確認された。これらのことから、日本に生息しないネッタイシマカのサーベイランスがヒトスジシマカと対比してPCR法で可能と思われた。また、rDNAシストロンのITS2領域の比較では、日本とタイ国産の類似性は、アメリカ産のものよりも高い傾向が示唆され、前2者は後者よりも比較の変異に富んでいるようにも思われた。このことは、アメリカ本土に近年土着したヒトスジシマカ集団が持っていたrDNAシストロンのITS2領域の変異と関連しているのかも知れない。日本産各地のヒトスジシマカ集団の解析が今後なされる必要がある。

**A. 研究目的**

デング熱・デング出 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の一つである。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。近年は、南北ア

リカやヨーロッパ諸国などでもデングウイルスを媒介可能なヒトスジシマカの生息が確認されていて、世界的なデング熱の拡大が懸念されている。

かって我国では、沖縄および熊本県天草の本庄でネッタイシマカの生息が報告されている。前者では水道施設の普及、

後者では蚊本来の生息環境に適さなかったことおよび人為的な発生源の駆逐によってネッタイシマカは絶滅して現在ではそれらの地域にはヒトスジシマカが生息している。ネッタイシマカの生息は現在の日本では確認されていない。

我国の国際線を有する空港では熱帯地域に生息している蚊種が一時的に空港内で発生していたことが既に報告されている。このことから、地球規模での交通網の発達によって、デング熱流行地からのネッタイシマカあるいはヒトスジシマカの侵入が航空機などによってもたらされる可能性が警戒され始めた。さらに、デングウイルスの保有蚊が、我国の港湾や空港で採集される可能性が指摘されている。本報告では、これらのサーベイランスに応用可能な検査方法について以下の2点を検討した。

(1) デングウイルス媒介蚊としては、ネッタイシマカとヒトスジシマカの2種が標的蚊種である。それら2種の形態的違いは、その外部形態、特に胸部背板上にある金色(ヒトスジシマカは白色)鱗粉の模様によって明瞭に区別することができる。しかし、羽化後の経過日数に伴って成虫の胸部背板上の鱗粉は剥がれやすく、その特徴が失われやすい。このようにして、形態的特徴を失った野外採集蚊の同定は困難を極める。そこで、それに替わる方法として、一組のプライマーセットを用いたPCR法を検討して、両蚊種の鑑別を行ったので報告する。

(2) また、ヒトスジシマカについては、我国にも生息している。しかし、近隣の諸外国から同一蚊種が侵入する可能性もあることから、検査体制を確立することは疫学上重要と考えられた。形態学的特徴をもって同一蚊種をわけることは困難と思われたので、日本、タイ国およびアメリカ産のヒトスジシマカを用いて、それらの rDNA システムの ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2) 領域の比較を行い、類似性が地域毎に認められるか否かを検討したので報告する。

## B. 研究方法

**蚊種:** タイ国ナコンパノム県(ナコンパノム系統)、グアテマラ国(グアテマラ系統)、タンザニア国(Dares-salaam 系統)由来のネッタイシマカ3系統、および日本国福岡県久留米市(旭町系統)、タイ国ナコンパノム県(ナコンパノム系統)、アメリカ合衆国オアフ島(オアフ系統)とルイジアナ州(Lake Charles産: LC 系統)由来のヒトスジシマカ4系統を使用した。

**蚊の飼育:** 25°C、日長14時間の飼育室内で蚊の飼育を行った。幼虫の餌として、エビオスとマウス固形飼料を粉碎したものを等量混合したものを乳ばち内で水を加えて液状にして与えた。幼虫の密度は1平方cmあたり0.5-1個体として、ホーロー製容器を使って飼育した。羽化成虫には4-10%の砂糖水をあたえて飼育を行い、羽化4日-7日後に、クロロフォルムで雌成虫を生殺処理した。それら雌成虫はその後の解析実験を行うまで-20°Cに保存した。

**個々の蚊からのゲノムDNAの抽出と精製:** 個々の蚊からゲノムDNAを抽出するために、IsoQuick (ORCA Research Inc. / MicroProbe Corporation製)を使用した。抽出/精製の手順は同社の手引きに従った。抽出したゲノムDNAペレットは20 ulのDNase/RNase freeの蒸留水に溶解した。

**蚊のゲノムDNAの再精製:** PCRの特異性と検出感度を高めるために、ゲノムDNAの再精製を行った。IsoQuickで抽出/精製したゲノムDNAを用いて、さらにカラム精製(DNeasy Tissue Kit, QIAGEN社製, Cat. #69504)を行った。精製手順はQIAGEN社の使用手引きに従った。使用手引きの最終段階では、100ulの蒸留水をカラムに加えて溶出した再精製DNA液は70-100ulで、最終的な容量は65-95ulに調整した。

**使用したプライマー:** 蚊のゲノムDNA上にあるリボソームDNAシステムのITS2 (internal transcribed spacer 2) 領域を比較するために、ハエ目(双翅目)に共通して利用可能なプライマー保存領域

がすでに報告されている。今回の解析には、5.8S primer (ITS2) : (5' TGT GAA CTG CAG GAC ACA T 3')、および28S primer (ITS2) : (5' TTG CTT AAA TTT CAG GGG GT 3') のオリゴヌクレオチド・プライマーを合成して実験に使用した。

**PCR法** : PCR法の手法をより簡略化するために、one tube PCR 法 (PCR SUPER High Fidelity system, Cat. No. 10790-020, Gibco-BRL company) を用いて、蚊からのITS2領域の増幅を試みた。

PCRの条件としては、0.2 mlのマイクロチューブを用いて、25マイクロリッターの反応量で行った。また、そのPCR反応温度と時間は、(1回) 94°C 2分、(35回) 94°C 1分、53°C 1分、68°C 2分、(1回) 68°C 7分とした。その後、特異的PCR産物の有無を確認するために1.2%アガロースゲルでサンプルを電気泳動した。

**ライゲーションとトランスフォーメーション** : ヒトスジシマカのリボソームDNAシストロンのITS2領域のPCR産物は、TAプラスミドベクターシステム (Invitrogen社) またはpGEM T Easy Vector (Promega社) を使用してライゲーションを行った。その後、XL2-Blueコンピテント細胞を用いてトランスフォーメーションを行い、組換え体の選別を行った。個々の組換えコロニーを5個ないし6個無作為に選んで、プラスミド精製および塩基配列の決定を行った。

**塩基配列の解析** : ヒトスジシマカのrDNAシストロンのITS2領域の塩基配列解析には、ABI 310 (アプライドバイオシステムジャパン社) を使った。鋳型DNAの調整などは、アプライドバイオシステムズ社の手引きに準じて試料を作成した。有無は1.2%アガロースゲルで泳動して確認した。

(倫理面への配慮) 本研究は蚊を対象としており該当しない。

### C. 研究結果

PCR法によるネッタイシマカとヒトスジシマカの鑑別 : ゲノムDNA上にあるリボソームDNAシストロンのITS2領域を比較するために、ハエ目(双翅目)に共通して利用可能なプライマーを用いてPCRを行ったところ、両蚊種で特異的なPCR産物が認められた(図1)。ネッタイシマカ(タイ国、グアテマラ、アフリカ)では約350 bpのPCR産物が得られたが、ヒトスジシマカ(日本、タイ国、アメリカ)では約530 bpの大きさの異なるPCR産物が得られた。両者のPCR産物の大きさには約180 bpの相違が認められたことから、形態的特徴が不明瞭となった両蚊種では、PCR法の適用によって両種を区別することが可能な結果が得られた。

ヒトスジシマカ系統間のrDNAのITS2領域の比較 : 日本産と外国産のヒトスジシマカのITS2領域の塩基配列を比較したところ、部分的には異なるものの、日本、タイ国、アメリカ産のITS2領域の多くの配列は相同配列であった(図2)。さらに、1個体由来の配列でも多くは相同配列であったが、異なる部位も認められた。また、日本とタイ国産の配列には10塩基程度の共通配列が2種類程認められ、アメリカ産のものではその内の1種類が認められた。これらのことから、rDNAのITS2領域を比較した場合は、アメリカ産ヒトスジシマカが日本とタイ国産のどちらにより類似しているかということをサポートするデータは得られなかった。

### D. 考察

デングウイルスを媒介する主な標的蚊として、ネッタイシマカとヒトスジシマカがあげられる。現在の我国にネッタイシマカが生息しているという報告はみあたらない。そこで、我国におけるデングウイルスを媒介可能な蚊としてはヒトスジシマカが第一の標的となる。しかしながら、世界的な交通網の発達によって、近隣の東南アジアに広く生息するネッタイシマカが我国に侵入する可能性も今後否定できない。そこで、これら2種類の蚊

を容易に対比鑑別する方法について検討を始めた。羽化直後の両蚊種には明瞭な形態的鑑別点がある。成虫の外部形態、とくに胸部背板上にの鱗片の色模様によって明瞭に区別することができる。しかし、羽化後の経過日数に伴って成虫胸部背板上の鱗粉は剥がれやすく、その特徴が容易に失われやすい。一端形態的特徴を失ったこれら2種類の蚊を対比して区別すること困難である。それに替わる方法として、一組の特異的プライマーセットを用いたPCR法による両蚊種の同定を検討することとなった。

ハエ目(双翅目)に共通なプライマーは、世界各地のネッタイシマカとヒトスジシマカをPCR産物の大きさの違いで区別可能で、両者には約180 bpの違いが認められた。このことから、形態的特徴が不明瞭となった両蚊種であっても、PCR法を用いることによって種の鑑別が可能なが示唆された。今後、我国に生息する近縁蚊種との比較を行う必要があるが、少なくとも、日本に生息しないネッタイシマカなどのデングウイルス媒介蚊の生息サーベイランスにPCR法で利用可能と思われる。

ヒトスジシマカは我国にも生息しているので、外国からの本種の侵入の有無を事前に検査する体制を確立することは疫学上重要と考えられる。形態学的特徴で同一種内をわけることは形態分類学上困難を伴うと思われたので、別の手法の導入が必須となった。ヒトスジシマカは1980年代に、日本あるいは東南アジアからアメリカに人為的に運ばれて土着したとされている。当時の疫学調査では日本からアメリカの港に直行した船舶に搭載されていた古タイヤ内の水にヒトスジシマカが発生していたことが報告されている。しかしながら、古タイヤを搭載した船舶の一部は日本から東南アジア経由でアメリカ本土に運ばれたことが当時の通産省に記録されていた。従来の文献では疫学的な状況証拠も加味されてアメリカ本土に土着したヒトスジシマカは日本由

来とされている。もし、状況証拠がなくても適当な手法を使うことによって、アメリカ産、東南アジア産、および日本産のヒトスジシマカを区別することができれば、外来性ヒトスジシマカの我国への侵入をもサーベイランスすることが可能と思われる。

ヒトスジシマカの種内変異を地域的に調べる方法としては、SSCP (single strand conformation polymorphism)、RAPD-PCR (arbitrarily primed PCR)、RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RLGS (restriction landmark genomic scanning)、単なるfingerprinting、rDNA、あるいは特異的遺伝子配列などを比較・解析することなどがあげられる。蚊の分子分類にはrDNAの解析が広く使われていることから、私達はrDNAのITS 2領域に着目して検討を始めた。当初蚊のITS 2領域の長さは、蚊種が異なっても同じと想像していたが、ネッタイシマカとヒトスジシマカで約180 bpの違いが認められた。この詳細は今後解析を予定しているが、近縁種をさらに調べることによってその糸口がつかめるとと思われる。

世界の3地域から採集され実験室内で系統化されたヒトスジシマカのrDNAのITS2領域の多くは相同配列であった。しかし、日本産とタイ国産のITS2領域の一部に10塩基程の変異しやすい部位が認められ、しかもその配列は2種類の共通配列が認められた。また、アメリカ産のものではその配列部位にはそれらの内の1種類の共通配列が確認された。これらのことから、rDNAのITS2領域の比較解析では、アメリカ、日本、タイ国産のヒトスジシマカを明確に区別することは困難なように思われた。今後、東南アジアおよび日本の各地域のヒトスジシマカを用いた同様な解析を継続しながら、本種の相違部位の探索を行う必要がある。

ITS2の比較では、アメリカ産とヒ日本産がより類似しているという結論を出すことが出来なかった。近年になってヒト

スジシマカの生息がヨーロッパでも認められるようになったので、今後はヨーロッパのヒトスジシマカ系統をも含めて同様な解析を行いたい。

媒介昆虫のゲノムDNAあるいは媒介昆虫内の病原体をPCRで検出する場合に、PCR反応を阻害する要因が報告されている(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)。今回の実験では、ゲノムDNAの調整を行う際には、カラムによるゲノムDNAの再精製を行って、PCR反応を阻害する要因物質の除去、およびゲノムDNAの純度を高めることによって、検出感度と特異性の向上を計った。

蚊からデングウイルスゲノムの有無を調べる際には改良RT-PCR法を用いて実施することを平成11年度研究成果報告書で報告した。その際に、ネッタイシマカあるいはヒトスジシマカの一部脚などから抽出/精製/再精製したゲノムDNAを用いて、蚊種の同定が同時に可能と考えられる。デング熱流行地あるいは我国での媒介蚊の動態を把握するサーベイランスの際に、これら一連の方法が応用可能と思われる。

## E. 結論

(1) PCR法によって、我国に生息しているヒトスジシマカと、我国に今後侵入の可能性のあるネッタイシマカを簡単に区別することが可能となった。

(2) PCR法を用いることによってネッタイシマカの侵入を監視することが可能になったことから、検疫業務への本システムの導入が示唆される。

(3) 日本、タイ国およびアメリカ国由来のヒトスジシマカのrDNAシストロンのITS2領域の塩基配列を比較検討したところ、いずれの地域のものも相同塩基配列の部分が大部を占めていた。しかし、前2地域の配列の一部10塩基程では共通す

る2種類の配列が認められ、アメリカ産ではその内の1種類の配列が認められた。

(4) 今回使用したヒトスジシマカの相違性が、地域毎のITS2塩基配列の性質を十分に代表しているかどうかは今後さらに検討する必要がある。とりわけ、今回の結果を考慮すると、従来いわれているようにアメリカ産のものは日本由来であるとの結論は下せなかった。

## F. 健康危機管理情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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) 江下優樹：研究最前線(デング熱媒介蚊の研究)。大分医科大学学報、78号：18-20, 2000。
- 3) Eshita, Y.: Vector competence of Japanese mosquitoes against dengue viruses. *SP World*, No. 29: 13-17, 2001.
- 4) 高岡宏行、江下優樹：フィリッピン国サン・ラサロ病院訪問およびブユ、蚊の採集。海外レポート。大分医科大学学報、80号：印刷中、2001。

### 2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.

3) 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回日本ペストロジエ学会 大会、名古屋、中電ホール、1999年12月1・2日. 第15回日本ペストロジエ学会大会プログラム・講演要旨: 37、1999.

4) Eshita, Y. : Vector competence of mosquitoes against dengue viruses. Core University Program. International Seminar on emerging and Re-emerging Infectious Diseases. Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Nagasaki, and Japan Society for the Promotion of Science (JSPS). November 16-18. Session 5 (Vector mosquitoes) :5.4, 2000.

5) 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 (デング熱・黄熱・日本脳炎) 検査法の基礎的検討。第3回日本検疫学医学学術大会、東京検疫所、2001年2月14日、第3回日本検疫学医学学術大会プログラム: 2001.

6) 江下優樹、福田昌子、デュ・ジョーン・マハンディ・クルス、ロナルド・エンリケ・モラレス、山田堅一郎、倉根一郎、内田幸憲、長谷部 太、五十嵐 章: 蚊類のアルボウイルス媒介能(1) RT-PCRによる蚊からのデングウイルスゲノムの検出。第53回日本衛生動物学会大会、山形市中央公民館、2001年4月4・5日、第70回日本寄生虫学会・第53回日本衛生動物学会合同大会記録: 135, 2001.

H. 知的財産権の出願登録状況  
なし



1 2 3 4 5 6 7

Japan, Oahu, Traava, LC 111

*Ae. albopictus*

図1. 蚊ゲノムDNA上にあるrDNAシストロンのITS2領域をPCRして得られた増幅産物の電気泳動パターン。  
Mは100bpのラダーマーカー、レーン1~4はそれぞれ日本、アメリカ (OAHU)、タイ国、アメリカ (LC) 産  
ヒトスジシマカのPCR産物、レーン5~7はそれぞれタイ国、アフリカ、グアテマラ産ネッタイシマカのPCR産物。

		10	20	30	40	50	
alb.1.1.1	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.1.1.2	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.1.1.4	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.1.1.5	1	-GTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.1.1.6	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.2.1.1	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.2.1.3	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.2.1.6	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.2.1.7	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.2.1.9	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.1	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.2	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.4	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.6	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.7	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.8	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.9	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGATA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
alb.7.1.10	1	TGTGAACTGC	AGGACACATG	AACACCCGACA	CGTTGAACGC	ATATTGCACA	50
		60	70	80	90	100	
alb.1.1.1	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.1.1.2	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.1.1.4	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.1.1.5	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.1.1.6	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.2.1.1	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.2.1.3	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.2.1.6	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.2.1.7	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.2.1.9	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.1	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.2	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.4	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.6	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.7	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.8	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.9	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
alb.7.1.10	51	TCGTACCTCC	AGTACGATGT	ACACATTTTT	GAGTGCCTAT	ATTTATACAT	100
		110	120	130	140	150	
alb.1.1.1	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	AGCGTACG--	CGTATGCATA	150
alb.1.1.2	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.1.1.4	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	AGCGTACG--	CGTATGCATA	150
alb.1.1.5	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.1.1.6	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	AGCGTACG--	CGTATGCATA	150
alb.2.1.1	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	AGCGTACG--	CGTATGCATA	150
alb.2.1.3	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.2.1.6	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	AGCGTACG--	CGTATGCATA	150
alb.2.1.7	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.2.1.9	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	AGCGTACG--	CGTATGCATA	150
alb.7.1.1	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.7.1.2	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.7.1.4	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.7.1.6	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.7.1.7	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.7.1.8	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.7.1.9	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
alb.7.1.10	101	TCAACTATAC	GTGTGACTCC	CTCTCGGGGG	TGTGCGCGCA	CGTATGCATA	150
		160	170	180	190	200	
alb.1.1.1	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.1.1.2	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.1.1.4	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.1.1.5	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.1.1.6	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.2.1.1	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.2.1.3	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.2.1.6	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.2.1.7	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.2.1.9	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.1	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.2	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.4	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.6	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.7	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.8	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.9	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200
alb.7.1.10	151	GTGATGTTTT	CCCGCCTTCG	GTGCGCGGTA	AAACATTCAA	GATAGTCAGA	200

図2. 蚊ゲノムDNA上にあるrDNAシストロンのITS2領域の塩基配列比較。  
 albo.1のシリーズは日本産、albo.2のシリーズはタイ国産、albo.7のシリーズは  
 アメリカ産（LC系統）の塩基配列を示す。

	210	220	230	240	250	
alb.1.1.1	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.1.1.2	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.1.1.4	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.1.1.5	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.1.1.6	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.2.1.1	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.2.1.3	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.2.1.6	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.2.1.7	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.2.1.9	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.1	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.2	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.4	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.6	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.7	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.8	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.9	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
alb.7.1.10	201 CGCGACGGTG GCCGGCGTGC CAGTCGTCGT CGTGGTTGAT GAGTACATCC	250				
	260	270	280	290	300	
alb.1.1.1	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.1.1.2	251 CAAACCGAG TCAATCAGTG GCAGTGAGCC TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.1.1.4	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.1.1.5	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.1.1.6	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.2.1.1	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.2.1.3	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.2.1.6	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.2.1.7	251 CAAACCGAG TCAATCAGTG GCAGTGAGCC TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.2.1.9	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.1	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.2	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.4	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.6	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.7	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCC TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.8	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCT TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.9	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCC TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
alb.7.1.10	251 CAAACCGGAG TC--TCAGTG GCAGTGAGCC TAGTACCCCC GTGTGCTAGT	300				
	310	320	330	340	350	
alb.1.1.1	301 TGTGTGGTG- -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.1.1.2	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.1.1.4	301 TGTGTGGTG- -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.1.1.5	301 TGTGTGGTG- -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.1.1.6	301 TGTGTGGTG- -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.2.1.1	301 TGTGCGGTGC -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.2.1.3	301 TGTGCGGTGC -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.2.1.6	301 TGTGCGGTGC -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.2.1.7	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.2.1.9	301 TGTGCGGTGC -GTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.1	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.2	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.4	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.6	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.7	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.8	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.9	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
alb.7.1.10	301 TGTGCGGTGC GGTGTCGTGG AATTAGGCGC GTGCGCGGGA GCGCACGCGC	350				
	360	370	380	390	400	
alb.1.1.1	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.1.1.2	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AACG-ACACC CGCAACGACG	400				
alb.1.1.4	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.1.1.5	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.1.1.6	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.2.1.1	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.2.1.3	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.2.1.6	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.2.1.7	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.2.1.9	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.1	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.2	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.4	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.6	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.7	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AACG-ACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.8	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.9	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AACG-ACACC CGCAACGACG	400				
alb.7.1.10	351 GGCCCGGCGG GGC'TTTTTC CACGACACAC AA--AACACC CGCAACGACG	400				

図2 (続1) . 蚊ゲノムDNA上にあるrDNAシストロンのITS2領域の塩基配列比較。  
 albo.1のシリーズは日本産、albo.2のシリーズはタイ国産、albo.7の  
 シリーズはアメリカ産 (LC系統) の配列

		410	420	430	440	450	
alb.1.1.1	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.1.1.2	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.1.1.4	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.1.1.5	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.1.1.6	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.2.1.1	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.2.1.3	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.2.1.6	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.2.1.7	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAAAAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.2.1.9	401	AACCACAC--	GGCAG-GGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.1	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTGGAACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.2	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTGGAACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.4	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTGGAACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.6	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTGGAACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.7	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.8	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTGGAACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.9	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTG-AACTCT	CAGTGTGCTC	450
alb.7.1.10	401	AACCACACAC	GGCAGCGGGG	GAACAGTCAC	CTGGAACTCT	CAGTGTGCTC	450
		460	470	480	490	500	
alb.1.1.1	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.1.1.2	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAA-ATCA	500
alb.1.1.4	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.1.1.5	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAA-ATCA	500
alb.1.1.6	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.2.1.1	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.2.1.3	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.2.1.6	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.2.1.7	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.2.1.9	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	A----TATCA	500
alb.7.1.1	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAC-ATCA	500
alb.7.1.2	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAC-ATCA	500
alb.7.1.4	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAC-ATCA	500
alb.7.1.6	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAC-ATCA	500
alb.7.1.7	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAC-ATCA	500
alb.7.1.8	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCTAGT-	-----AT	AAAAC-ATCA	500
alb.7.1.9	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCAAGT-	-----AT	AAAAC-ATCA	500
alb.7.1.10	451	CATCACATCA	GCCCAGTCTA	GTCGCTAGT-	GCAAGTATAT	A-----TCA	500
		510	520	530	540	550	
alb.1.1.1	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.1.1.2	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.1.1.4	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.1.1.5	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.1.1.6	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.2.1.1	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.2.1.3	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.2.1.6	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.2.1.7	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.2.1.9	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.1	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.2	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.4	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.6	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.7	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.8	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.9	501	GTAGGCCTCA	AATAACGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550
alb.7.1.10	501	GTAGGCCTCA	AATAATGTGT	GACTACCCCC	TGAAATTTAA	GCAAA.....	550

図2 (続2) . 蚊ゲノムDNA上にあるrDNAシストロンのITS2領域の塩基配列比較  
 albo.1のシリーズは日本産、albo.2のシリーズはタイ国産、albo.7の  
 シリーズはアメリカ産 (LC系統) の配列

## 厚生科学研究費補助金（生活安全研究総合事業）

### 分担研究報告書

クリミア・コンゴ出血熱ウイルス組換え核蛋白発現 HeLa 細胞を抗原とした  
蛍光抗体法によるヒツジ血清中イムノグロブリン G 抗体の検出

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）  
前田秋彦（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）  
唐 青（中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所  
第二ウイルス性出血熱）

**研究要旨：**クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルスの組換え核蛋白（CCHFV NP）を恒常的に発現する HeLa 細胞（HeLa/CCHFV-NP 細胞）を樹立し、それを抗原とした間接蛍光抗体法（IFA）（HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA）によるヒツジ血清中の CCHFV NP に対するイムノグロブリン G（IgG）抗体検出における感度と精度を、CCHF ウイルス感染 Vero E6 細胞を抗原とした IFA（CCHFV-Vero E6 細胞 IFA）と比較して評価した。また、中国各地のヒツジ血清について、CCHF ウイルスに対する IgG 抗体の有無について検討し、CCHF ウイルスの血清疫学的研究を行った。HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA の感度と精度はそれぞれ 80%と 100%であった。両 IFA を用いて、CCHF 流行地である中国西部の新疆ウイグル自治区（31 検体）、南西部の西藏省（チベット自治区）（50 検体）、南部の海南省（51 検体）、および東部の山東省（50 検体）のヒツジ血清について、CCHF ウイルスに対する抗体保有状況について調べた。新疆ウイグル自治区のヒツジから採取された血清の約 50%が CCHF ウイルス抗体陽性であった。一方、その他の地域のヒツジから採取された血清はすべて CCHF ウイルス抗体陰性であった。HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA の感度は、CCHFV-Vero E6 細胞 IFA に比べて 80%に低下するもののその精度は十分高く、HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA のヒツジ血清における疫学的研究に有用である。

#### A. 研究目的

クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）ウイルスはブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類され、重篤なウイルス性出血熱を引き起こす。我が国ではその扱いは BSL-4 実験室でのみ許されている。しかしながら、我が国では BSL-4 実験室の稼働が許されていないため生きた CCHF ウイルスを用いた CCHF ウイルス抗体検出のための検査は不可能であった。そこで私たちは組換え CCHF ウイルス核蛋白（CCHFV NP）を発現する HeLa 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法（IFA）（HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA）の開発を試みた。その CCHF ウイルス抗体検

出における有用性を評価するには、CCHF ウイルス感染 Vero E6 細胞を抗原とした IFA（CCHFV-Vero E6 細胞 IFA）と比較する必要がある。そこで CCHF の流行が確認されている中国新疆ウイグル自治区のヒツジから採取された血清および中国のその他の地域のヒツジから採取された血清を用いて HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA の有用性を検討するとともに、血清疫学的研究を行った。

#### B. 研究方法

- 1) cDNA:CCHF ウイルス核蛋白の cDNA は、C. Prehaud 博士（パスツール研究所、フランス）より供与を受けた。その cDNA は、

中国新疆ウイグル自治区で分離された CCHF ウイルス 8402 株に由来している。

- 2) CCHFV-Vero E6 細胞を用いた IFA 抗原の作製 (中国予防医学科学院唐青担当): CCHF ウイルス (66019 株) を Vero E6 細胞に感染させ 5 日間培養し, 2 回リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し, トリプシン処理して細胞を回収した. その細胞を非ウイルス感染 Vero E6 細胞と 1:2 の割合で混和し, マルチスポット蛍光用スライドガラス (AR Brown) に乾燥固定し, さらに 10 分間の冷アセトン固定処理を施した. 使用するまで  $-70^{\circ}\text{C}$  に保存し, 使用時には乾燥させてから用いた.
- 3) 組換え CCHFV NP 発現 HeLa 細胞の樹立と IFA 抗原の作製: cDNA をテンプレートとして PCR 法で CCHF ウイルス核蛋白 DNA を増幅し, それを真核細胞発現ベクター pKS336 [阪井弘治博士 (国立感染症研究所エイズ研究センター) より分与] のクローニングサイトに順方向に挿入し, pKS336-CCHFV-NP を得た. このベクターは, EF-BOS プロモーターにより外来遺伝子を発現し, SV40 プロモーターにより blastocidin 耐性遺伝子を発現する. この pKS336-CCHFV-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 pKS336-CCHFV-NP 発現ベクターの挿入された HeLa 細胞 (HeLa/CCHFV-NP 細胞) 株を得た. HeLa/CCHFV-NP 細胞を 2 日間培養し, PBS で 2 回洗浄し, IFA 用マルチスポットスライドガラスに乾燥固定し, 上記と同様に IFA 抗原を作製した.
- 4) 血清: CCHF 流行地である中国西部の新疆ウイグル自治区 (31 検体), 中国南西部の西蔵省 (チベット自治区) (50 検体), 南部の海南省 (51 検体), および東部の山東省 (50 検体) からのヒツジ血清を用いた. また, 陽性コントロール血清として高力価の抗 CCHF ウイルスマウス腹水 (#703086, Ksiazek TG 博士, CDC, 特殊病原体部門, から供与) を用いた.
- 5) IFA: 各 IFA 抗原に PBS で 50 倍希釈したヒツジ血清を,  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた. PBS で洗浄し, 70 倍希釈された FITC 標識ウサギ抗ヒツジ IgG 抗体 (Vector

Laboratories) を  $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた. PBS で洗浄し, グリセリンを封入して蛍光顕微鏡下で蛍光シグナルを観察した.

(倫理面への配慮) 本研究においてはヒト検体は使用していない. 動物検体の採取にあたっては, 動物の愛護に十分配慮し苦痛を与えない配慮をしながら検体の採取を行った.

### C. 結果

- 1) CCHFV-Vero E6 細胞抗原と HeLa/CCHFV-NP 細胞抗原の高力価 CCHF ウイルスネズミ腹水による染色像. 図 1 に高力価 CCHF ウイルスマウス腹水による両抗原の染色像を示す. CCHF ウイルスおよび組換え CCHFV NP 抗原がそれぞれ細胞質内に発現し, 顆粒状に染色された.
- 2) CCHFV-Vero E6 細胞 IFA と HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA によるヒツジ血清中の CCHF ウイルスに対する抗体検出の関係. CCHFV-Vero E6 細胞 IFA で陽性を示した 15 検体のヒツジ血清のうち 12 検体が HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA でも陽性を示した. 一方, CCHFV-Vero E6 細胞 IFA で陰性を示したすべての 167 検体は HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA でも陰性を示した. HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA のヒツジ血清中 CCHF ウイルス抗体検出における精度と感度は, CCHFV-Vero E6 細胞 IFA に比較してそれぞれ 80% と 100% であった (表 1).
- 3) 中国各地域のヒツジから採取された血清における CCHF ウイルス抗体保有率. 新疆ウイグル自治区のヒツジ血清 31 検体の中で, CCHFV-Vero E6 細胞を抗原とした IFA で抗体陽性を示したのは 15 検体 (約 50%) で, その他の地域から採取されたヒツジ血清には抗体陽性を示したものはなかった.

### D. 考察

CCHF ウイルスは南アフリカから中近東, 東ヨーロッパ諸国そして中国西部にいたる広範な地域に常在し, 毎年, 多くの CCHF 患者が発生している. ヒツジなどの家畜や齧歯類の野生動物などが宿主で, ダニ (Hyalomma 属) が媒介する. ヒトへは CCHF ウイルスを有するダニに咬まれる経路と CCHF ウイルス

が含まれる血液などの体液に直接接触する経路で感染する。我が国の感染症予防法では CCHF ウイルス感染症はエボラウイルス、マールブルグウイルスそしてラッサウイルス感染症とともに 1 類感染症に分類され、その診断法の確立が急務である。また、中国西部の新疆ウイグル自治区をはじめとする CCHF 流行地からの CCHF ウイルスに感染した旅行者や家畜動物の移動に伴って、CCHF ウイルスが我が国に侵入する可能性がある。平成 11 年度の本研究班研究成果報告書に記載したように、ヒト血清中の CCHF ウイルス抗体検出に組換え CCHFV NP を抗原とした抗体検出システム (IgG ELISA, IFA) は高い精度を有していることが明らかにされている。今回のヒツジ血清を用いた検討により、HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA の感度と精度は、CCHFV-Vero E6 細胞 IFA に比較してそれぞれ 80% と 100% であることが明らかになった。CCHFV-Vero E6 細胞 IFA に比べて感度が 20% 低下するもののその精度は高く、ヒツジにおける CCHF ウイルスの血清疫学的研究に有用であると考えられる。HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA 抗原の染色像は特徴的であり陽性陰性の判定が容易で、さらに、抗原作製時に CCHF ウイルスに感染する恐れがないことなど、HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA の利点がある。

今回の疫学的研究では、中国国内の 4 ヶ所の地域から 30-51 検体のヒツジ血清を用いて血清疫学的検討を行った。現在のところ、CCHF 流行地域である新疆ウイグル自治区以外に CCHF ウイルスが中国の他の地域に蔓延しているという事実は認められなかった。今後も検体数、調べる地域を増やして CCHF ウイルスに関する詳細な疫学的検討を行いたいと考えている。

#### E. 結論

HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA の感度と精度はそれぞれ 80% と 100% であった。IFA を用いて、CCHF 流行地である中国西部のヒツジ血清について、CCHF ウイルスに対する抗体保有状況について調べた。HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA の感度は、CCHFV-Vero E6 細胞 IFA に比べて 80% に低下するもののその精度は十分高く、HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA のヒツジ血清に

おける疫学的研究に有用である。

#### F. 健康危機管理情報

クリミア・コンゴ出血熱ウイルスは中国西部に侵入しており、旅行者や家畜を介しての日本への侵入に注意する必要がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Ksiazek TG, Meyer RF, Peters CJ, Kurane I. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1-7, 2001
- 2) Saijo M, Niikura M, Morikawa S, Kurane I. Immunofluorescent method for detection of Ebola virus immunoglobulin G, using HeLa cells which express recombinant nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 776-778, 2001
- 3) Niikura M, Ikegami T, Saijo M, Kurane I, Miranda ME, Morikawa S. Ebola viral antigen-detection enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody to nucleoprotein. *Journal of Clinical Microbiology*, in press.
- 4) 倉根一郎, 西條政幸, 新倉昌浩, 森川茂. 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. 厚生科学研究費生活安全総合研究事業「侵入動物及び侵入ベクターのサーベイランス構築に関する研究. 平成 11 年度研究成果報告書, p70-74, 2000

##### 2. 学会発表

- 1) 西條政幸, 森川茂, 倉根一郎. 蛍光抗体法によるエボラウイルスに対する抗体検出システム (感度と精度の評価). 第 74 回日本感染症学会総会, 福岡, 2000
- 2) 西條政幸, 新倉昌浩, 森川茂, 倉根一郎. エボラウイルスとマールブルグウイルスの組換え核蛋白を用いた抗体検出システム. 第 2 回日本検疫学会, 東京, 2000
- 3) 新倉昌浩, 池上徹郎, 西條政幸, 森川茂,

倉根一郎. NP 蛋白に対する単クローン性抗体を用いたエボラウイルス抗原検出 ELISA 系. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000

4) 西條政幸, 新倉昌浩, 池上徹郎, 緒方もも子, 森川茂, 倉根一郎. クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) ウイルスの組換え核蛋白を用いた CCHF ウイルス感染症診断法の開発. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000

5) 池上徹郎, 新倉昌浩, 西條政幸, 緒方もも子, 森川茂, 倉根一郎, 吉川泰弘. エボラ

ウイルスレ斯顿株自然感染サルの病理組織学的研究. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000

6) 池上徹郎, 森川茂, 新倉昌浩, 西條政幸, 緒方もも子, 倉根一郎, 吉川泰弘. エボラウイルスレ斯顿株 NP, VP35, VP40, GP の塩基配列. 第 48 回日本ウイルス学会学術総会, 津, 2000

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



表 1. 表. CCHFV-Vero E6 細胞 IFA と HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA によるヒツジ血清中 CCHF ウイルス抗体検出における関係.

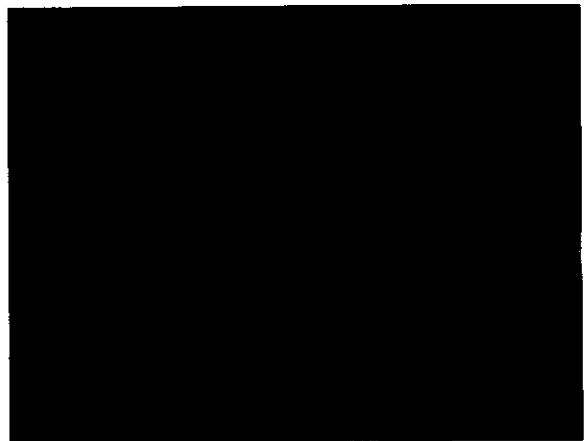
		HeLa/CCHFV-NP 細胞 IFA		計
		陽性	陰性	
CCHFV-Vero E6 細胞 IFA	陽性	12	3	15
	陰性	0	167	167
計		12	170	182

図 1. 高力価抗 CCHF ウイルスマウス腹水 (#703086, CDC) による CCHFV-Vero E6 細胞 (a) と HeLa/CCHFV-NP 細胞 (b) の IFA による染色像.

(a)



(b)



動物・ベクターサーベイランスの見地から見た感染症発生動向調査について

分担研究者：内田 幸憲 (神戸検疫所)

協力研究者：井村 俊郎 岩倉 宏樹 (神戸検疫所)

研究要旨：

海外からの病原体媒介動物、ベクターが関与する疾患の国内侵入・流行を予防 / 予測するためのサーベイランスシステムを検討するために国立感染症研究所でまとめられた感染症発生動向調査（1～4類感染症）の結果と過去の事例（日本紅斑熱、ダニ媒介性脳炎、エキノコックス症）を文献的に検証した。海外の感染症流行情報の早期把握が重要であることはいうまでもない。動物・ベクターが関与する疾患で長期にわたって国内発生例が知られていない疾患およびヒトからヒトへの感染が重要な感染ルートである疾患（1, 2類および4類の一部）については発症動向調査報告の週報による速報値の年次最終報告数に対する捕捉率も高く、疾患侵入後の調査・国内流行防止の契機として有効である。媒介動物・ベクターを含めた系統だった調査により汚染地域の確定と侵入時期、経路などの特定が期待される。しかし、ヒトからヒトへの感染が稀にしか認められない疾患（4類）では速報値の捕捉率も低く、国内侵入防止 / 予測の指標としては期待できない。過去の例の検証から動物・ベクターが関与する感染症ではヒトの国内発症例が認められる前に輸入動物・ベクターにより国内の動物・ベクターへ病原体の感染が広がっていることが推定された。少数の疾患を目的として行なわれている現行のサーベイランスではなく、内部寄生虫、ベクターを含めて多岐にわたる病原体または抗体検索をルーチン化することにより、ヒトの発症前に国内流行防止 / 予測に役立たせることが出来るようなモニタリング的なサーベイランスシステムを構築することが必要である。

## A. 研究目的

平成 11 年 4 月 1 日から『感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律』（以下『感染症新法』という）が施行された。それにともない、事前対応型の行政が柱の 1 つにあげられ、対応策の 1 つとして感染症を新たに 1 ～ 4 類に類型化し、その疾患について国立感染症研究所で感染症発生動向調査体制を一元化することにより充実が図られている。従来法定・届出伝染病等と比較すると類型化された疾患には人獣共通感染症の範疇に入る疾患が増えたことが特徴となっている。

今回、ヒトの全数把握ができる感染症発生動向調査（1 ～ 4 類感染症）のなかで動物・ベクターが関与する感染症と考えられるものを抽出し、国立感染症研究所から報告された IDWR（Infectious Diseases Weekly Report Japan）を参考にすることで海外からの輸入動物、ベクターが関与する疾患の国内侵入・流行の予防 / 予測のためのサーベイランスとしての意味合いを検討した。また、過去の事例から輸入動物・ベクターが関与する感染症の国内流行について考察した。

## B. 研究方法

平成 11 年 4 月 1 日より感染症新法の 1 ～ 4 類感染症について感染症発生動向調査として国立感染症研究所から毎週報告されている IDWR（Infectious Diseases Weekly Report Japan）を平成 12 年 12 月 31 日まで参考にした。また、過去 5 年間の疾患発生動向のうちで今回の統計と以前

の法定・届出・指定伝染病統計の両方に登録されている疾患について比較した（表 1）。2000 年の報告結果については最終報告数と IDWR の『今週の発生動向総覧』に報告される速報値、およびその中から海外からの侵入・輸入例を抽出し、速報値の年次最終報告数に対する捕捉率を検討した（表 2）。この速報値と年次最終報告数との関連について国立感染症研究所発行の月報、病原微生物検出情報（IASR：Vol. 22、No. 2）および国立感染症研究所・感染症情報センターからの資料により、マラリアを中心に検討した（表 3）。今回の調査目的から動物・ベクターが関与する感染症の発生動向調査に限定するため、1 ～ 3 類感染症および 4 類感染症の中でヒトの全数把握ができる感染症に局限した。（表 4）。

過去の事例として細菌感染症である日本紅斑熱（Japanese spotted fever）、ウイルス感染症のダニ媒介性脳炎（ロシア春秋脳炎）、寄生虫感染症である多包虫（エキノコックス）症について文献的に考察した。

## C. 研究結果と考察

### 1. 感染症発生動向調査の報告について：

伝染病予防法時代から新感染症法が施行されたこの 5 年間の疾患発生動向を表 1 に比較して示した。1999 年は第 14 週（4 月 1 日以降）からの報告数となっている。1 類感染症に分類される疾患については輸入・流行した記録のあるペスト、感染者の輸入例が確認されているラッサ熱も

含めて 5 疾患ともに動物・ベクターが関与する感染症であると考えられる。ペストに関してはヒトの発生報告以外に検疫所では媒介動物としてネズミ族、ベクターとしてノミの調査を継続して実施しており、現在のところ、港湾・空港地区に限定されているがペスト菌も血清抗体陽性例も認めていない。定点観察であり、

” passive surveillance “ として位置付けられよう。

2 類感染症に分類される 6 疾患についての発生報告例のなかで注目されるのは細菌性赤痢である。細菌性赤痢はサル、特に東南アジアからのサルにも見られる動物が関与する感染症であり、感染源となりうることは忘れてはならないことである。

2000 年の報告件数は 818 件と過去 4 年に較べて明らかに報告件数の減少が認められる。また、海外からの侵入・輸入例の検索は IDWR の『今週の発生動向総覧』に報告された速報値をまとめた 741 件 ( 表 5 ) から海外感染例 538 例、国内 203 例 ( 27.4% ) となった。国内発生例は 96 年には 282 人 ( 27% )、97 年には 171 人 ( 15% )、98 年には 971 人 ( 61% ) と増加傾向にあるかの様相であったが速報値からは感染推定国の比率を含めて国内発生率は 5 年前と同様の比率となっている。

平成 11 年 12 月 24 日以前には検疫所では空港などで入国前に糞便培養検査をした段階で結果のいかんを問わず該当保健所に報告していたが、以降は通達により検疫感染症もしくは新感染症法に従って感染症の病原体が発見された時のみ該当保健所に

報告されることになっている。このことが細菌性赤痢の発生件数の減少につながっているとの見解がある。細菌性赤痢の発生報告例を高める方策として ” active surveillance “ とまではいえないかもしれないが検疫所からの入国前の糞便培養検査をした段階での該当保健所への報告を再考すべきかもしれない。

4 類感染症の中で 5 年間の比較ができる疾患については発生報告例が増加している。この中で動物・ベクターが関与する感染症でかつ海外からの輸入感染症であるマラリアの IDWR の速報値と年次最終報告数との関連について病原微生物検出情報 ( IASR : Vol. 22, No. 2 ) および国立感染症研究所・感染症情報センターからの資料を参考に、検討した ( 表 3 )。IDWR の速報値では 80 例、年次最終報告数は 152 例と速報値の捕捉率は 53% となる。速報値では掲載されず、1 週以上遅れて報告されている例を含めた最終報告のデータと比較すると感染地の不明のものが 15 例から 3 例とほとんどなくなり、速報値では確認されていなかった推定感染国名が 8 ケ国、複数の国名・地域名が 6 ケ所追加されている。しかし、原虫の型不明例は 2 例から 25 例に増加している。

IDWR の速報値の年次最終報告数に対する捕捉率について表 2 にまとめたが 1 ~ 3 類感染症に関しては比較的捕捉率はよいが 4 類に関しては Dengue 熱、日本脳炎を除いて捕捉率はよくない。迅速性の点と傾向の把握には速報値は重要であり、感染症新法の浸透とともに捕捉率は上昇するも