



図3. 陽転した個体が、その後NS1抗体価の変動する様子を図2のデータに基づいてシミュレートした。黒いバーは陽転者総数を100%としたときの抗体価の頻度分布、白いバーは1年以内に新たに陰転した個体の割合を示す。

表1. 平均NS1抗体保有期間の算定

保有年数	新たな陰転者 (%)	累積陰転者 (%)	抗体保持者 (%)	保有年数 × 新たな陰転者
1	52.02	52.02	47.98	52.02
2	22.59	74.61	25.39	45.18
3	12.09	86.70	13.30	36.27
4	6.32	93.02	6.98	25.29
5	3.32	96.34	3.66	16.59
6	1.74	98.08	1.92	10.44
7	0.91	98.99	1.01	6.39
8	0.48	99.47	0.53	3.83
9	0.25	99.72	0.28	2.26
10	0.13	99.85	0.15	1.32
11	0.07	99.92	0.08	0.76
12	0.04	99.96	0.04	0.43
合計	99.96			200.77

平均NS1抗体保有期間 $200.77 / 99.96 = 2.01$ 年

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

分担研究報告書

2001 年度輸入デングウイルス感染症の検査・診断

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所）
協力研究者 三輪俊樹、高橋 正樹、横田 勉、田中絹枝
（成田空港検疫所）
山田堅一郎、倉根一郎（国立感染症研究所）

研究要旨

デングウイルス感染症は東南アジアを中心として熱帯・亜熱帯地域に拡がっており、*re-emerging infectious disease*（再興感染症）の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。わが国では国内流行のない感染症であるが、近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例がみられる。そこで、これら不明熱疾患についての検査、診断を行い、厚生行政に資することを目的とした。輸入デングウイルス感染症では、PCR によるウイルス遺伝子と IgM-ELISA による IgM 抗体の両検出法により、流行地域からの帰国者で初感染のデング熱の確定診断が可能であった。

A. 研究目的

デングウイルス感染症はわが国では国内感染のない感染症であるが、熱帯地域では流行域が拡大しており、再興感染症の一つとして、世界的に重要な感染症になっている。感染症新法の施行に伴い、4 類感染症として全数届出制となり、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例への対策が必要となった。そこで、本感染症に対する検査・診断を成田空港検疫所と国立感染

症研究所で行い、厚生行政に資することを目的とした。

B. 研究方法

供試ウイルスはプロトタイプデングウイルス（1 型:Hawaii, 2 型:New Guinea C, 3 型:H83, 4 型:H241）と患者検体からの分離株を蚊由来細胞株 C6/36 で増殖させた培養上清を用いた。RT-PCR は Morita, K. et al (J.Clin.Microbiol.29,1991)の方法に基づいた one-tube 法で行った。分離ウイ

ルスは Vero 細胞によるプラーク法で確認した。血清での抗体検査には Immuno chromatographic test kit (PanBio, East Brisbane, Australia)、IgM-capture ELISA kit (Cypress, CA, USA) および IgG-ELISA kit(PanBio)により IgM および IgG 抗体を測定した。

C. 研究結果

1. 輸入デング感染症の状況

1) 成田空港検疫所での検査成績

熱帯地域から成田空港に帰国した時に不明熱があり、デング感染症の検査依頼があった総数は 69 症例であった。これらの検体を特異遺伝子および IgM 抗体の検出により検査・診断した結果、9 症例 (13 %) が陽性 (男性 : 5、女性 : 4) であった。その内、2 症例がデングウイルス 1 型と判定された。これらの患者は東南アジア (タイ、マレーシア、インドネシア、ベトナム、インドなど) からの帰国者であったが、エルサルバドルからの帰国者も 1 症例含まれていた。これらの検体は国立感染症研究所で再検査され、確定診断された。

2) 国立感染症研究所での検査成績

各地の医療機関、衛生研究所から検査依頼のあった不明熱患者の検体について検査した結果は Table 1 に示した。検査総数 76 症例中 35 症例 (46 %) がデング熱 (男性 : 18、女性 : 17) と診断された。この 35 症例には帰国時に成田空港検疫所で検査され、陽性と診

断されたものが 3 症例含まれていた。35 症例中 21 症例が PCR で型別が確定された (1 型 : 15 例、2 型 : 3 例、3 型 : 3 例、4 型 : 0 例)。感染患者の大半はタイ、フィリピン、カンボジアなど東南アジアからの帰国者であるが、タヒチ、サモアからの帰国者からも陽性例が検出された。また、フィリピン人の来日者は二次感染であると判定された。

2. デング熱症例のウイルス血症と抗体反応の解析

デング熱症例のうち、発熱日と解熱日 (37°C になった日とする) のデータが明確な症例から得られた検体について、RT-PCR による特異的ウイルス遺伝子の検出と IgM と IgG 抗体価を調べた。尚、本法による PCR の検出感度は 0.5-5.0 pfu/tube であった。ウイルス遺伝子は解熱日を含み、それより以前の検体から検出された。それに対し、IgM 抗体は解熱日の 3 日前から検出され、解熱日以降、陽性例は上昇した。IgM 抗体が検出される日時を発熱日から計算すると発熱後 5-6 日目であった。患者の回復に伴って IgM 抗体価が上昇し、IgG 抗体も検出された。IgM 抗体は回復後 2-3 ヶ月続くものもみられた。感染検体からのウイルス分離は解熱日以前の検体のみから可能であった。これらの型別および分離ウイルスは RT-PCR およびプラーク法で確認された。

患者の発熱日と解熱日から採取された検体の日数を算定して、ウイルス遺

伝子とIgM抗体の検出の関連性をみると、発熱期にはウイルス血症があり、PCRでウイルス遺伝子が検出され、ウイルス分離も可能であった。それに対し、回復期には抗体産生が高まり、IgM抗体が検出され、その後IgG抗体の上昇もみられた。

3. Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法による中和抗体価の測定

ペルオキシダーゼと抗ペルオキシダーゼの抗原抗体複合物をフォーカスとして捕らえて、ウイルス抗原を検出して感染価を測定するPAP法は、96 well plateを使用して大量の検体を短時間に検査出来る利点がある。PAP法を用いて中和抗体価を測定してVero細胞によるプラーク法と比較したところ、プラーク法での測定とほぼ同等の結果が得られた。PAP法で測定した中和抗体価の結果の一部をTable 2に示した。PCRで型別が判定された検体について Dengue ウイルス 1-4 型に対する中和抗体価を測定したところ、それぞれの型特異的に有意な中和抗体価の上昇がみられた。

D. 考 察

Dengue ウイルス感染症の診断では病原学的検索と血清学的検索の両面からなされる。PCRによるウイルス遺伝子の検出は型別まで確定することができるが、ウイルス血症がある時期の検体から検出される可能性が高い。それに

対して、IgM-ELISAによるIgM抗体は患者が解熱期に入り、回復してくる時期に検出される。即ち、PCRによるウイルス遺伝子とIgM-ELISAによるIgM抗体の検出の両検索により、初感染の Dengue ウイルス感染症はかなりの精度で確定診断が可能であると考えられる。さらに、中和抗体価を測定することにより、PCRで検出することができない回復期の血清で、型別診断も可能であると思われる。

近年、わが国の輸入 Dengue 感染症は増加の傾向にあると思われるが、全国的な検査体制が確立していないので、その実数は把握できていない。感染患者の大半はタイ、インド、フィリピン、インドネシアなど東南アジアからの帰国者であるが、タヒチ、サモア、エルサルバドルなどからの帰国者からも陽性例が検出されており、今後、東南アジアからだけでなく、南太平洋諸島、中南米などからの帰国者でも Dengue 熱の疑いのある不明熱疾患の検体も検査を行うことが肝要と思われる。年間約500万の日本人が熱帯地域に旅行し、約200万の人達が熱帯地域から日本に入国している現状を考え合わせると、帰国時での検疫所での検査およびその後の確定診断等、輸入感染症としての Dengue 熱、Dengue 出血熱の把握は益々重要であると考えられる。

E. 結 語

輸入 Dengue ウイルス感染症の診断では、PCRによるウイルス遺伝子と

IgM-ELISA による IgM 抗体の検出の両検索を行えば、初感染のデング熱の場合では、診断が可能であると考えられる。成田空港検疫所などでの帰国時での初検査と国立感染症研究所での確定診断および各地方衛生研究所並びに各検疫所との連携システムを構築し、全国的な検査・診断体制を整備することが望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ken-Ichiro Yamada, Akira Takeda, Ichiro Kurane :Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *Journal of Virological Methods* 102, 61-66. 2002

Yamada,K., Takasaki,T., Nawa,M. and Kurane,I.: Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue virus infection. *J. Clinical Virology* 24(3): 203-209, 2002.

Ken-Ichiro Yamada, Tomohiko Takasaki, Masaru Nawa, Ichiro Kurane :Increase in the sensitivity of dengue diagnosis by combination of reverse transcriptase-polymerase chain reaction and passage on cell culture. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health.* 3 470-471, 2001

Yamada,K., Takasaki,T., Nawa,M., Nakayama,M., Arai,Y.T., Morimoto,K., Yabe,S. and Kurane,I.: The demographic features of imported DF cases serodiagnosed in japan during 2000. *Dengue Bulletin* 24: 42-45, 2001.

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Takaoka, H., Igarashi, A., Uchida, Y., Takasaki, T., Yamada, K. and Kurane I. (2002): Competencia del Mosquito como Vector del Virus del Dengue. Programa Segundo Seminario Internacional de Educacion Medica, (Organizado por: Centro de Educacion Medica de Amistad Domingo Japonessa (CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agost 2001, Hotel Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana. Cemadoja Cientifica, 2: (accepted)

2. 学会発表

高崎智彦、根路銘令子、新井陽子、山田堅一郎、森本金次郎、中山幹男、倉根一郎

「日本脳炎ワクチンの西ナイル脳炎発症予防効果」第 49 回日本ウイルス学会 2001 年 11 月

高崎智彦

「ニューヨークにおける西ナイル脳炎
/今なにをすべきか」(第36回日本脳
炎生態学研究会(石川県七尾市)2001
年5月)

山田堅一郎、高崎智彦、倉根一郎:デン
グウイルス感染症の実験室内診断—病
原体診断法の検討—。第36回日本脳炎
生態学研究会(石川県七尾市)2001年
5月

田部井由紀子、吉田靖子、長谷川道弥、
長島真美、平田一郎、諸角 聖、山田堅
一郎、高崎智彦、倉根一郎「 Dengue ウイ
ルス感染症の実験室内診断—中和抗体
測定によるウイルス血清型別の検討—」
第36回日本脳炎生態学研究会(石川県
七尾市)2001年5月

倉根一郎、高崎智彦

「日本における節足動物媒介性ウイル
ス感染症の現状と問題点」第70回日本
衛生動物学会(山形)2001年4月
原田 誠、高崎智彦、山田堅一郎、倉
根一郎「Dengue Antigen Detection
Kit の評価」第42回日本熱帯医学会
(東京)2001年9月

高橋和郎、高崎智彦、倉根一郎、茂田
士郎「 Dengue 熱ウイルスに対するシア
ル酸誘導体 NMS03 のウイルス抑制効
果」第49回日本ウイルス学会(大阪)
2001年10月

Table 1 Demographic information of 35 dengue cases

No.	Age, Sex	Disease date	Type(PCR)	IgM-ELISA	IgG-ELISA	Country
1	33, F	9	-	+(1.1)**	+(7.3)	Indonesia
2	29, M	3	D2	-(0.3)	-(0.7)	Indonesia
		7	-	+(3.2)	+(3.7)	
		9	-	+(3.6)	+(4.4)	
3	30, M	14	-	+(3.7)	+(5.3)	Thailand
		6	D3	+(8.7)	-(0.6)	
4	30, M	17	nd	+(15.4)	+(3.8)	Malaysia
		6	D1	-(0.2)	-(0.6)	India
5	25, F	13	nd	+(4.0)	nd	Thailand
		8	D3	+(2.7)	+(5.9)	Cambodia
		10	nd	+(3.8)	+(7.9)	
6	49, M	13	nd	+(4.1)	+(9.1)	Tahiti
		17	nd	+(2.2)	+(9.5)	
		7	D1	+(1.5)	+(7.8)	
7	58, M	8	nd	+(2.3)	+(8.2)	Vietnam
		13	nd	+(5.2)	+(9.3)	
8	53, F	18	-	+(2.5)	+(10.6)	Philippines
		9	-	+(4.4)	+(9.2)	
9	58, M	10	nd	+(3.8)	+(9.4)	Philippines
		7	D1	+(1.7)	+(5.8)	
10	45, F	8	nd	+(2.8)	+(7.5)	Philippines
		8	-	+(1.3)	+(2.4)	
11	23, M	4	-	-(0.8)	+(4.6)	Thailand
		5	-	+(1.4)	+(6.7)	Cambodia
		6	nd	+(2.2)	+(8.6)	Laos
		13	nd	+(8.2)	+(9.3)	
12	22, F	4	D1	-(0.5)	-(1.0)	Philippines
		11	nd	+(4.1)	+(9.0)	
13	44, M	15	-	+(6.9)	+(8.1)	Thailand
		19	nd	+(6.7)	+(7.9)	
14	35, F	8	D1	+(2.2)	+(6.8)	Singapore
		19	nd	+(2.4)	+(3.0)	Malaysia Thailand Indonesia
15	42, M	2	D1	-(0.9)	-(0.7)	Samoa
		8	nd	+(5.0)	+(3.4)	
		14	nd	+(5.2)	+(1.6)	
		27	nd	+(3.4)	+(1.7)	
16	43, M	5	D1	-(0.3)	+(2.2)	Thailand
		12	nd	+(3.6)	+(3.0)	Cambodia China
17	24, F	15	-	+(4.6)	+(1.5)	Thailand
		29	nd	+(3.2)	+(1.5)	Cambodia Vietnam
18	22, M	5	D1	-(0.2)	-(0.2)	Tahiti
		9	nd	+(2.5)	-(0.9)	
19	26, M	6	D2	+(2.1)	+(1.1)	Thailand
		13	nd	+(3.1)	+(1.8)	
20	51, M	4	D2	-(0.8)	-(0.1)	Philippines
		9	nd	+(4.0)	-(0.3)	
21	32, F	8	-	+(3.0)	+(1.3)	Cambodia
		16	-	+(3.5)	+(1.6)	
22	24, F	9	-	+(3.4)	+(1.7)	India
		23	nd	+(2.8)	+(1.7)	
23	28, F	7	-	+(3.7)	nd	Thailand
		8	nd	+(6.6)	-(0.4)	Cambodia
24	22, M	4	D1	-(0.7)	-(0.1)	India
		16	nd	+(7.6)	+(10.2)	
25	26, F	8	D1	+(5.7)	-(0.4)	Thailand
		23	nd	+(8.6)	+(6.5)	
26	28, F	7	D1	+(4.9)	-(1.0)	Thailand
		16	nd	+(7.7)	+(1.8)	
27*	24, F	10	-	+(1.3)	+(2.0)	Philippines
		20	nd	+(1.1)	+(2.0)	
28	19, M	6	-	+(4.1)	-(1.0)	Thailand
		16	nd	+(6.5)	+(8.4)	
29	27, M	6	D1	-(0.8)	-(0.1)	Cambodia
		13	nd	+(5.6)	+(1.3)	
30	21, F	5	D3	-(0.7)	-(0.4)	Philippines
		6	nd	+(2.0)	-(0.9)	
		8	nd	+(3.8)	+(1.2)	
31	25, M	2	D1	-(0.7)	-(0.2)	Thailand
		7	nd	+(6.8)	-(0.1)	
32	27, F	4	D1	-(0.8)	-(0.2)	Thailand
		7	nd	+(5.1)	+(1.1)	
33	28, F	9	-	+(8.5)	+(7.9)	Thailand
34	25, F	7	D1	+(4.9)	+(1.3)	Thailand
		29	nd	+(7.0)	+(7.0)	
35	64, M	6	-	+(14.1)	+(6.9)	Myanmar
		16	nd	+(18.6)	+(8.7)	Thailand

*: secondary infection

-: not detected

nd: not done

** : Numbers in the parentheses are index values. The values greater than 1.0 were determined to be positive.

Table 2 Neutralizing antibody and HI titers in the sera from dengue cases

sample No.	dis.day	fever day	type	PRNT50, reciprocal titer						HI titer	
				D1	D2	D3	D4	JE	DEN	JE	
98-13/1	5	-1	D1	80	80	80	80	<10	80	640	
98-13/2	15	9		5,120	640	160	80		>20,480	>20,480	
98-13/3	21	15		5,120	640	160	80	40	>20,480	>20,480	
98-35/2	7	-3	D1		80	80	80	<10	20	20	
98-35/3	44	34		1,280	320	80	160		40	320	
98-35/4	198	188		80	<40	80	80	<10	2,560	10,240	
98-36/1	4	0	D1	<40	40	<40	<40	10	10	40	
98-36/2	9	5		640		80	320	40	5,120	>20,480	
98-37/1	5	-3			320	80	160		1,280	640	
98-37/2	12	4	D2	1,280	5,120	640	640	10	>20,480	>20,480	
98-37/3	23	15		640	10,240	80	320		>20,480	>20,480	
98-23/2	6	-2			80	80	160	40	40	10,240	
98-23/3	12	4	D3	160	160	1,280	80		5,120	>20,480	
98-23/4	19	11		80	160	1,280	80		10,240	>20,480	
98-23/5	30	22		80	160	640	80	40	10,240	>20,480	
98-23/6	119	111		80	160	640	40	40			
98-23/7	149	141		<40	160	320	40				
99-10/1	1	-5			<40	<40	<40	<40	<10	20	20
99-10/2	2	-4	D4	<40	<40	<40	<40		40	40	
99-10/3	4	-2		<40	<40	<40	40		320	80	
99-10/4	7	1		160	160	160	10,240		2,560	10,240	
99-10/5	11	5		160	80	160	10,240		5,120	>20,480	
99-10/6	18	12		160	160	160	10,240	40	2,560	10,240	

厚生科学研究費補助金（厚生労働省新興再興感染症研究事業）
「節足動物媒介性ウイルスに対する診断法の確立、疫学およびワクチン開発に関する研究」班

分担 研究報告書

RT-PCR法を用いたアルボウイルス媒介蚊からのウイルスゲノム検出
およびPCR法を用いた蚊種の区別に関する研究

分担 研究者	江下 優樹	大分医科大学感染予防医学講座	助教授
共同 研究者	福田 昌子	大分医科大学感染予防医学講座	助手
	山田堅一郎	国立感染症研究所ウイルス1部	研究主任
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス1部	室長
	内田幸憲	神戸検疫所	所長

研究要旨：

デング熱・デング出疹熱およびウエストナイル熱は、熱帯地域の開発途上国のみならず先進国においても公衆衛生上重要な再興感染症の一つである。我国においては流行国からの本症患者数の増加のみならず病原体保有蚊の侵入が懸念されている。そこで我々は、国内における本症媒介蚊に関する疫学情報に寄与するために、媒介蚊からの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、より簡便なone step RT-PCR法を確立した。また、我国には生息しないネッタイシマカ *Aedes aegypti* の侵入が危惧されていることから、その形態学的指標にかわる方法としてのPCR法を確立した。

少なくとも、我国に生息するヒトスジシマカ *Ae. albopictus* を含む世界各地のヒトスジシマカとネッタイシマカのrDNAシストロンのITS2領域の塩基数の差で両種が区別可能であった。さらに、外国に生息するヒトスジシマカの侵入がネッタイシマカと同様に危惧されることから、本邦産と外国産のヒトスジシマカの区別が可能かどうかに着目して、ITS 2領域の変異領域周辺での制限酵素切断部位を検討した。その結果、Hinf Iの制限酵素が本邦産と外国産ヒトスジシマカを区別できる可能性が推測された。

次に、ウエストナイルウイルスの侵入が我国でも懸念されていることから、本ウイルスに対する日本産アカイエカ *Culex pipiens pallens* の感受性を胸部接種法で検討した。ウイルス接種14日後の雌成虫体内で、ウイルスゲノムがRT-PCR法で検出されたことから、我国においては、チカイエカ *Cx. pipiens molestus* および南西諸島・琉球列島に生息するネッタイエカ *Cx. quinquefasciatus* のみならず本種をも媒介蚊種として位置付ける必要がある。

今迄に得られた知見から、アルボウイルス媒介蚊のサーベイランスを我国の検疫体制で実施する際には、蚊種の同定ならびに蚊からのウイルスゲノムの検出には、PCR装置を使った一連の手法がより簡便な手法であることからその確立が要望される。

A. 研究目的

デング熱・デング出疹熱およびウエストナイル熱は、熱帯・亜熱帯地域の国々では公衆衛生上重要な再興感染症の一つである。デング熱・デング出疹熱はネッタイシマカ *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、南北アメ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。また、ウエストナイル熱は、チカイエカ *Cx. pipiens molestus* およびネッタイエカ *Cx. quinquefasciatus* が媒介蚊種として文献上知られているが、我国にも生息が認められるアカイエカ *Culex pipiens pallens* の本ウイルス感受性は知られていない。これら2疾病の流

行地域での媒介蚊体内におけるウイルス動態には不明なところが多い。

我々は、2疾患の疫学動態を探る手法として、野外から採集された媒介蚊体内の病原体の有無をRT-PCR法で調べる方法を検討している。本ウイルスを実験的に感染させた陽性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。

次に、PCR法を用いたネッタイシマカとヒトスジシマカの区別について検討した。かつて我国では、沖縄および熊本県天草の本庄で前者の生息が報告された。しかし、水道施設の普及、および人為的な発生源の駆逐によって本種は絶滅して現在の我国にはネッタイシマカは生息していない。

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、 Dengue熱流行地から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現実問題として指摘され始めた。さらに、 Dengueウイルス保有蚊が、我国の港湾や空港で採集される可能性が推察されている。本報告では、これらのサーベイランスを実施する際に必要な項目として以下の2点を検討した。

(1) Dengue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法を検討した。

(2) 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。加齢の成虫蚊の形態学的特徴をもって蚊種を鑑別することは困難なる場合が想定されたので、日本、タイ国、オアフ島とルイジアナ州産のアメリカ2系統、およびアルバニア産のヒトスジシマカを用いて、それらのrDNAシストロンのITS 2 (Internal

Transcribed Spacer 2) 領域を比較するためのツールとして特異的な制限酵素の探索を行い、類似性が地域毎に認められるか否かを検討した。

(3) ウエストナイル熱に関連しては、アカイエカ群に属するチカイエカやネッタイエカが本ウイルスに感受性を持つことから、我国にも生息するアカイエカについてもその感受性が懸念されている。ウエストナイルウイルスをアカイエカの胸部に実験的に接種する方法で本種のウイルス感受性の有無を予備的に調べた。

B. 研究方法

B. 1. ワンステップRT-PCR法の開発

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。また、ウエストナイルウイルスは、国立感染症研究所から分与されたEg101株を使用した。

供試蚊：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。また、ウエストナイルウイルスの感染実験に使用したアカイエカについては、大阪で採集された後に、キンチョウ研究所で継代中のアカイエカの分与を受けて、実験に用いた。

ウイルス感染蚊の作製：約0.005ulの Dengueウイルス液あるいはウエストナイルウイルス液を、羽化5日後の雌ネッタイシマカあるいはアカイエ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℃で14日間飼育を行った後に-80℃で容器ごと生殺して、その後の実験に用いるまで-80℃に保存した。

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 (Table 1)。

プール蚊からのウイルスゲノムの精製： Dengue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Iosgen-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(Table 1)。

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、蚊からのデングウイルスゲノムの検出を試みた(Table 1)。

デングウイルスに特異的なプライマーとして、4つの蚊清型に共通な配列を有するDC primer (DC1 (5'-3')): TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG、およびDC2 (5'-3'): TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC)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。

また、ウエストナイルウイルスの特異的なプライマーとして、ウイルスNS5内部にある以下の配列を使用した。()内は、感染研由来株のヌクレオチドナンバーを示す。当初nested PCRを使用予定であったが、行なわなかった。WN検出の1回目のPCR (305bp); WNA-F ACTgCTggATggAgAACATCgAC 23mer, 9342-9364 (WN-NS5)、WNB-R gCTCCTCgCCATTCTCAAAC 20mer, 9627-9646 (WN-NS5); nested PCR用 (257bp) WNC-F gTTTAgCgCggTCCATCATCg 21mer, 9365-9385 (WN-NS5); WND-R ggTTCTgACCTTAgggCCTT 20mer, 9602-9621 (WN-NS5)

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。

B. 2. PCR法による蚊種の区別

蚊種: デングウイルス媒介蚊については、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)、およびアルバニア国由来のヒトスジシマカ5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砕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(表1)。

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、100 ulの蒸留水をカラムに加えて溶出した再精製DNA液は70-100 ulで、最終的な容量は65-95 ul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シストロンのITS 2 (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 (ITS 2): (5' TGT GAA CTG CAG GAC ACA T 3')、および28S primer (ITS 2): (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ITS 2領域の増幅を試みた (表1)。

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ITS 2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ITS 2領域 (Fig. 1.0) 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。

制限酵素パターンの解析：PCR産物をセントリコン・カラムチューブで精製した後に、Hinf IあるいはMlu Iの制限酵素でDNAの切断を行った。さらに、それらのバンドパターンを調べるために、1.2%アガロースゲルを用いた電気泳動を行った。

(倫理面への配慮)

ウエストナイルウイルスEg101株は、大分医科大学から国立感染症研究所への正式な分与願いに基づいて分与されたものである。また、大分医科大学医学部附属動物実験施設内での蚊の飼育および実験に関連して、蚊の吸吮源としてマウスを使用すること、および感染実験には、大分医科大学医学部動物実験委員会からの承認を得ている。

C. 研究結果

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液によって個体別に蚊から総RNAを抽出すると、RT-PCR法で特異的なPCR産物が得られた (Fig. 1)。

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10ul (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、Fig. 1のレーン1-6に示した。Fig. 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50ul (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 (Fig. 1)。

アカイエカからのウエストナイルウイルスゲノムの検出：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液によって個体別に蚊から総RNAを抽出すると、RT-PCR法で特異的なPCR産物が得られた (Fig. 1.2)。

PCR法によるネッタ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ITS 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 (Fig. 1, 図1)。ネッタシマカ (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、アルバニア) 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(図1、Fig. 1.3)。

地理的に異なった地域に生息しているヒトスジシマカの種内におけるrDNAシストロンのITS 2領域の比較：5地域由来のヒトスジシマカのITS 2領域の塩基配列を比較したところ、前回の報告と同様に多くの相同配列が認められた。しかし、いくつかの変異が配列の一部に認められたものの、産地毎の同種内での区別は困難と思われた。そこで、本邦産と外国産のヒトスジシマカの区別が可能かどうかに着目して、ITS 2領域の変異領域周辺での制限酵素切断部位を詳細に検討したところ、Hinf Iの制限酵素が本邦産と外国産ヒトスジシマカを区別する可能性が推測された。すなわち、本邦産ヒトスジシマカのITS 2領域のHinf Iによる制限酵素パターンでは、530 bp, 280 bp, 140 bp, 110 bpの4つのバンドが認められた(Fig. 2)。しかし、外国産のそれでは、530 bp, 280 bpの2つのバンドのみが認められた。ちなみに、Mlu Iによる制限酵素パターンでは、全てのサンプルに530 bp, 200 bpの共通バンドが認められた。また、本邦産のものでは、390 bp, 150 bpの2つのバンドが認められたが、タイ国産の一部にも同じ2つのバンドが認められた(Fig. 3)。これらのことから、ITS 2領域のPCR産物を少なくともHinf I制限酵素で切断したパターンを比較することによって、本邦産ヒトスジシマカと外国産の個体を区別する可能性が示唆された。

D. 考察

マラリア媒介蚊では1,000個体程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、デング熱・デング出壊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って、デング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ろう。しかし、本法を実施する際にはデング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善するために総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個体の蚊プールにデング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らかとなった。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個体の蚊プールにデング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型のデング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。

デング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。

次に、ウエストナイルウイルスの侵入が我国でも懸念されていることから、本ウイルスに対する日本産アカイエカ *Culex pipiens pallens* の感受性を胸部接種法で検討した。ウイルス接種14日後の雌成虫体内で、ウイルスゲノムがRT-PCR法で検出されたことから、我国においては、チカイエカ *Cx. pipiens molestus* および南西諸島・琉球列島に生息するネッタイエカ *Cx. quinquefasciatus* のみ

ならず本種をも媒介蚊種として位置付ける必要がある。

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、すくなくとも、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法が両種の区別に応用可能と思われる。

また、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るので、別の手法の導入が必須となった。アメリカに生息しているヒトスジシマカは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などの蚊類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る。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、地理的に大きな隔りがある地域のヒトスジシマカを分子生物学的手法で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調査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毎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候補としてあげられる。蚊の分子分類にはrDNAの解析が広く行われていることから、我々はrDNAシストロンの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推定していたが、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。今後はさらにこれら蚊種の近縁種を調べる必要がある。

世界の5地域から採集され実験室内で継代されているヒトスジシマカのrDNAシストロンのITS 2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ITS 2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ITS 2領域の塩基配列を単純に比較する解析では、アメリカ、日本、タイ国、アルバニア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。

そこで、本邦産と外国産のヒトスジシマカの区別が可能かどうかに着目して、ITS 2領域の変異領域周辺での制限酵素切断部位を詳細に検討したところ、本邦産ヒトスジシマカのITS 2領域のPCR産物をHinf Iで処理した制限酵素パターンは、外国産のそれらとは異なるバンドパターンを示した。このことから、PCR産物を制限酵素で切断したパターンを比較するRFLPを調べることによって、種内の個体を

区別する可能性が示唆された。今後は、外国産同士のRFLP比較を更に検討したい。

現在のところ、ITS 2のRFLP比較でも、アメリカ産のヒトスジシマカが日本産のそれに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。ヨーロッパのヒトスジシマカは、中国経由で持ち込まれたとされているので、今後は、この事を踏まえて、塩基配列の解析を試みたい。

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ために改良RT-PCR法を用いて実施することが可能であろう。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実施可能と考えられる。

我国における、デングウイルス媒介蚊のサーベイランスに、今回改良および開発したRT-PCR法によるデングウイルスゲノムの蚊からの検出法、およびPCR法を用いてデングウイルス媒介蚊のネッタイシマカとヒトスジシマカを区別する方法が応用可能なことが示唆された。今後は、これらの手法を用いての実際の取り組みがなされるべきであろう。また、ウエストナイルウイルスに対するアカイエカの感受性があることが示唆されたので、今後は、本ウイルスの経口感染実験によってアカイエカの自然界でのかかわりを考察したい。

E. 結論

(1) 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デングウイルスゲノムおよびウエストナイル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の再精製を行ってより精製することが必須のように思われた。

(2) 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があるネッタイシマカを区別することがPCR法で可能となった。

(3) 地理的に異なった地域に生息するヒトスジシマカ種内を区別するために、ITS 2領域のPCR産物の制限酵素切断パターンを日本産と外国産との2つにわけて比較したところ、特異的な制限酵素パターンがHinf Iで得られた。特異的な制限酵素パターンが外国産同士でも存在するかどうかを検討する今後検討する必要がある。

(4) 異なった地域に生息するヒトスジシマカのITS 2領域の塩基配列、および制限酵素パターンの結果を考慮しても、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積極的な結論は下せなかった。

(5) ウエストナイルウイルスに対するアカイエカの感受性が胸部接種法で証明された。本ウイルスの経口感染による本蚊種の感受性を今後検討する必要があると示唆された。

(6) RT-PCR法とPCR法を野外採集蚊に利用することができるようになったので、ネッタイシマカの侵入のみならず、外国産のヒトスジシマカの侵入をも監視することが可能と考えられる。

F. 健康危険情報

ネッタイシマカの我国への侵入の有無をPCR装置を使ってサーベイランスで検査する必要がある。また、我国に生息するヒトスジシマカのデングウイルス保有の有無をも検査する体制が整備される必要がある。

ウエストナイルウイルス感受性蚊として、我国ではチカイエカとネッタイエカが知られているが、近縁種のアカイエカが感受性を持つことが明かとなった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Eshita, Y., Itoh, T., Surathin, K., Miyamura, K., Kanungkit, S., Hasebe, F., Nawa, M., Chanyasanha, C., Anantapreecha, S., Saguanwongse, S., Warachit, P., Sucharit, S., Chuananon, S., Sreeta, W., Rongsriyam, Y., Yamada, K., Agui, N., Fukuma, T., Igarashi, A.: Behavior of dengue vector, *Aedes aegypti* and application of Olyset net, for its control

in houses in an endemic area. In : The 9th International Congress of Parasitology, Tada, I., Kojima, S. and Tsuji, M. (Editors), Monduzzi Editore, Bologna, Italy, pages 1049-1053 (1998).

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)。

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。

高岡宏行、江下優樹 (2001) : 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 : 17 -20.

Eshita, Y. : Vector competence of Japanese mosquitoes against dengue viruses. SP World, No. 29: 13-17, 2001.

Uchida, K., Ohmori, D., Ueno, T., Nishizuka, M., Eshita Y., Fukunaga, A. and Kominami, E. (2001): Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. Developmental Biology, 237:68 -78.

Oda, T., Eshita, Y., Uchida, K., Mine, M., Kurokawa, K., Ogawa, Y., Kato, K. and Tahara, H. (2001): Comparison of reproductive activity and survival of *Culex pipiens pallens* and *Culex quinquefasciatus* in Japan at high temperature. J. Med. Entomol. (in press)

Morales, R., Morita, K., Eshita, Y., Tsuda, Y., Fukuma, T., and Takagi, M. (2002): Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities in orally infected *Aedes aegypti* from different geographic origin. Med. Entomol. Zool. (accepted)

江下優樹 (2002) : フィリッピンにおけるデングウイルス媒介蚊の調査。しすと、34号 : (accepted)

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Otsuka, Y., Aoki, C., Takaoka, H., Matsumoto, A., Uchida, K., Igarashi, A., Uchida, Y., Takasaki, T., Yamada, K. and Kurane I. (2002): Biología y Epidemiología Molecular del Mosquito Vector del Virus del Dengue. Programa Segundo Seminario Internacional de Educacion Medica, (Organizado por: Centro de Educacion Medica de Amistad Domingo Japonessa (CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agost 2001, Hotel Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana. Cemadoja Cientifica, 2: (accepted)

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Takaoka, H., Igarashi, A., Uchida, Y., Takasaki, T., Yamada, K. and Kurane I. (2002): Competencia del Mosquito como Vector del Virus del Dengue. Programa Segundo Seminario Internacional de Educacion Medica, (Organizado por: Centro de Educacion Medica de Amistad Domingo Japonessa (CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agost 2001, Hotel Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana. Cemadoja Cientifica, 2: (accepted)

2. 学会発表

Eshita, Y., Itoh, T., Surathin, K., Miyamura, K., Kanuankid, S., Hasebe, F.,

Nawa, M., Chanyasanha, C., Anantapreecha, S., Saguawongse, S., Warachit, P., Sucharit, S., Chuananon, S., Sreeta, W., Rongsriyam, Y., Yamada, K., Agui, N., Fukuma, T., Igarashi, A.: Behavior of dengue vector, *Aedes aegypti* and application of olyset net for its control in houses in an endemic area. In: Abstracts of the 9th Intl. Congress of Parasitology, Program number (0-0585). Oral session (I-27): vectors in Insects, Chiba, Japan, August 24 - 28, 1998. *Parasitology International*, 47(Suppl.): 280 (1998).

山田堅一郎, 江下優樹, 長谷部 太, 中山幹男, 名和 優, 倉根一郎, 五十嵐 章: RT-PCR法を用いた、媒介蚊内におけるデングウイルス遺伝子の検出。第33回日本脳炎ウイルス生態学研究会、長崎、1998年6月4・5日。日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集: 34、1998。日本脳炎ウイルス生態研究会報 (30): 8-9 (1999)。

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

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.

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、第3回日本検疫学医学学術大会プログラム: 2001.

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.

福永昭廣、江下優樹、西尾恭好、内田桂吉、大森大二郎: アカイエカのピテロジェニンcDNAの解析: 卵形成期には複数のピテロジェニン遺伝子が発現する。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: 137, 2001.

高田容司、村中俊哉、江下優樹: 本邦で採集されたデイルドリン抵抗性チャバネゴキブリのGABAA受容体遺伝子の解析。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: 148, 2001.

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Otsuka, Y., Takaoka, H., Matsumoto, A., Uchida, K., Igarashi, A., Uchida, Y., and Kurane I. : *Biologia y Epidemiologia Molecular del Mosquito Vector del Virus del Dengue. Programa Segundo Seminario Internacional de Educacion Medica, (Organizado por: Centro de Educacion Medica de Amistad Domingo Japonessa (CEMADOJA) Complejo*

Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agost 2001, Hotel Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana.

Eshita, Y., Fukuda, M., Anzai, S., Otsuka, Y., Takaoka, H., Igarashi, A., Uchida, Y., and Kurane I. : Competencia del Mosquito como Vector del Virus del Dengue. Programa Segundo Seminario Internacional de Educacion Medica, (Organizado por: Centro de Educacion Medica de Amistad Domingo Japonessa (CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperacion Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agost 2001, Hotel Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana.

福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎 : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (2) PCRを用いたウイルス媒介蚊の識別. 第54回日本寄生虫学会南日本支部大会・第51回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2001年10月27日、北九州市、産業医科大学、 Med. Entomol. Zool., 52: 2001.

García, B., Castro, M., Cesin, A. J., Valdéz, S., Lora, M., Disla, M., Petit, A., Taveras, D., Shichijyo, A., Makino, Y., Eshita Y. y Takeshita M.: Seroprevalencia de anticuerpo de dengue y confirmación diagnóstica por métodos rápidos, y PCR en pacientes febriles, de junio del 2000 a octubre 2001 en la República Dominicana. VI Congreso Dominicano de Infectologia, (Organizado por: Sociedad Dominicana de Infectologia Inc.), 28 de Noviembre al 1ro de Diciembre 2001, Hotel Meliá Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana.

福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎 (2002) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (3) PCRを用いたデングウイルス媒介蚊2種の識別. 第54回日本衛生動

物学会大会大会、東京、一橋記念講堂、2002年4月2・3日、 Med. Entomol. Zool., 53 (supplement) : 2002. 印刷中

Table 1 Procedure for one tube RT-PCR

蚊からの総RNA抽出:	個別蚊: Isogen-LS (日本ジーン社製) 総RNAベレット/雌蚊 + 20 μ lの蒸留水で溶解
	プール蚊: Isogen-LS (日本ジーン社製)、RNeasy Mini Kit (Qiagen) 50個体/pool
RT-PCR反応:	One step RT-PCR system (Gibco社製)
Screening	Primer: dengue consensus primers (Lanciotti <i>et al.</i> , 1992)
Typing	プライマー: 特異的プライマーセット (Morita <i>et al.</i> , 1991)
温度設定条件:	RT反応: 53 $^{\circ}$ C 30分 PCR反応: (1回) 94 $^{\circ}$ C 2分, (45回) 94 $^{\circ}$ C 1分, 53 $^{\circ}$ C 1分, 68 $^{\circ}$ C 2分, (1回) 68 $^{\circ}$ C 7分, 4 $^{\circ}$ C
PCR 産物:	2% agarose gel

Lanciotti, R.S., Calisher, C.H., Gubler, D.J., Cheng, G.J., and Vorndam, A.V. (1992): Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 30: 545-551.

Morita K., Tanaka M. and Igarashi A. (1991): Rapid identification of dengue virus serotypes by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 29(10): 2107-2110.