

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

地理的に異なった地域に生息するヒトスジシマカをPCR法で区別する試み

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となってきた。ウイルス性疾患である本症は蚊によって媒介される。現在の我国にはネッタイシマカ *Aedes aegypti* は生息していない。しかし、交通機関の発達に伴って本種の侵入が少なからず危惧されている。現在の我国には本症の媒介蚊であるヒトスジシマカ *Aedes albopictus* が生息している。これら蚊2種は、外部形態だけでは種の鑑別が困難となることが加齢とともに多くなる。そこで両種をPCR法で区別することを検討して、一部は平成12年度研究成果報告書に述べた。今回の報告書では、ヨーロッパ（アルバニア産）のヒトスジシマカを追加して、PCR産物およびITS 2領域の塩基配列を、今まで得られた結果と比較検討した。その結果、アルバニア産ヒトスジシマカのPCR産物の大きさは、他地域のヒトスジシマカのそれと同じであった。したがって、PCR産物の大きさを比較することによって、世界各地に分布するヒトスジシマカとネッタイシマカを区別可能と思われた。また、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。その結果、Hinf I および Mlu I の2種類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。その結果、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。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 (Fig. 2)。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。

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。かつて我国では、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、デングウイルス保有蚊が、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) 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、一部は既に平成12年度研究成果報告書に述べた。今回はヨーロッパ産の蚊を加えて検討した。両蚊種の鑑別を行った。

(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。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に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。

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)、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℃、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℃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。

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)。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、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。

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。その結果、Hinf IおよびMlu Iの2種類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。その結果、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。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(Fig. 2)。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

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、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

思われたので、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で検出する場合には、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) 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PCR法によって容易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、アメリカ国およびアルバニア由来のヒトスジシマカのrDNAシストロンのITS 2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) 前回の報告と同様に、今回追加された塩基配列、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) 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方法の一つとして、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必要があるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

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。
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) : フィリピンにおける Dengue 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): *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 Agosto 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 operacion Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agosto 2001, Hotel Santo Domingo, Santo Domingo, Republica Dominicana. *Cemadoja Cientifica*, 2: (accepted)

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 Dengue 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 : Dengue 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.

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 Dengue 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. : *Biología y Epidemiología Molecular del Mosquito Vector del Virus del Dengue*. Programa Segundo Seminario Internacional de Educación Médica, (Organizado por: Centro de Educación Médica de Amistad Domingo Japonesa (CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperación Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agosto 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 Educación Médica, (Organizado por: Centro de Educación Médica de Amistad Domingo Japonesa (CEMADOJA) Complejo Hospitalario "Dr. Luis E. Aybar" y Agencia de Cooperación Internacional del Japon (JICA)). 22, 23, 24, 25 de Agosto 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., Cesín, 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 Infectología, (Organizado por: Sociedad Dominicana de Infectología 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 Dengue 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

表1 PCRの改良方法

蚊のゲノムDNA抽出：個別蚊、IsoQuick (MicroProbe Corporation社製、東京 種橋機械店販売)

ゲノムDNAベレット/雌蚊 + 20μlの蒸留水で溶解

ゲノムDNAの再精製：DNeasy Tissue Kit (Qiagen社製) 最終容量100μl

PCR反応：PCR SUPER Mix High Fidelity (Gibco BRL社製)

Primers (Oligonucleotide sequence: 5' → 3')*

5.8S primer (ITS 2) TGT GAA CTG CAG GAC ACA T

28S primer (ITS 2) TTG CTT AAA TTT CAG GGG GT

* Conserved primers for amplification of ITS2 from many Diptera

0.5ml Microtube使用 (ASTECC社装置使用)

Template DNA 1.5 μl (約50 ng) 注意：1 μlの場合はdH2Oを0.5 μl追加

5.8S primer(10 pmol/μl) 0.5 μl

28S primer(10 pmol/μl) 0.5 μl

Super Mix (Gibco BRL社製) 22.5 μl

Total volume 25 μl

注意：template DNAが1.5 μl以内におさまらないときは、
total volumeが少し超えてもPCR可能 (例：26.5 μl)

温度設定条件：PCR反応：(1回) 94℃ 2分、(35回) 94℃ 1分、53℃ 1分、68℃ 2分、(1回) 68℃ 7分、4℃

PCR産物：1.2% agarose gel 電気泳動

* Paskewitz, S.M. and Collins, F.H. (1997): PCR amplification of insect ribosomal DNA. In: The molecular biology of insect disease vectors. A methods manual (Edited by J.M.Crampton, C.B.Beard, and C.Louis), 374-383. Chapman & Hall

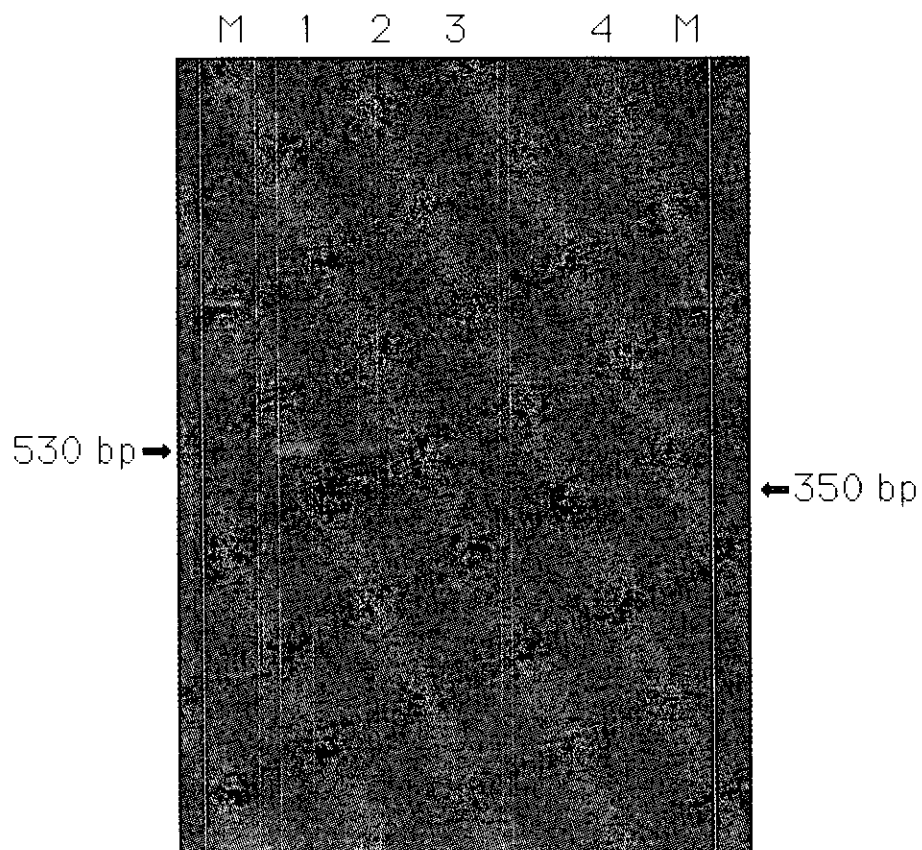


Fig. 1 PCR products of geographically different *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes

M: 100bp ladder DNA marker; 1: *Aedes albopictus* from Thailand; 2 and 3: *Aedes albopictus* from Italy; 4: *Aedes aegypti* from Thailand

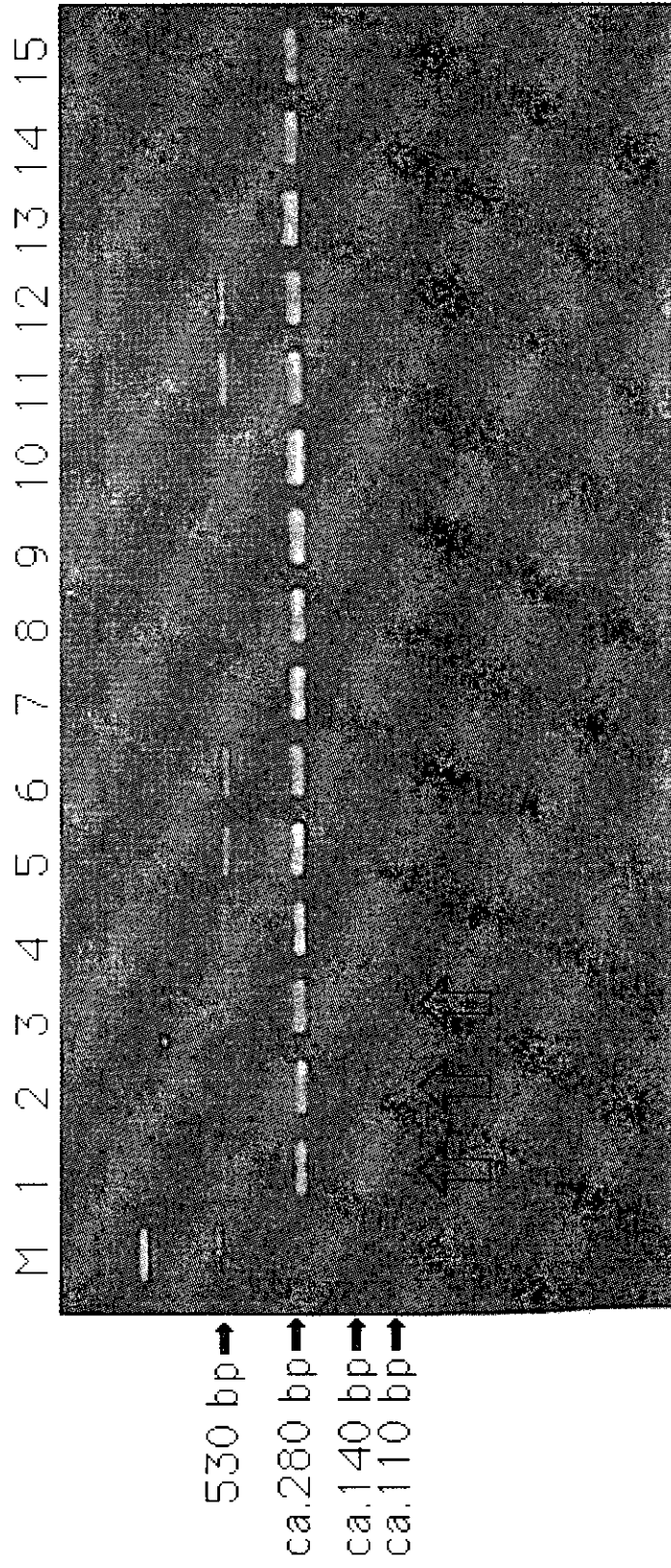


Fig. 2 Hin f1 digested PCR products derived from geographically different *Aedes albopictus* mosquitoes

M: 100 bp ladder DNA marker; 1-3: Japan; 4-6: Thailand; 7-9: Oahu from USA; 10-12: Louisiana from USA; 13-15: Albania from Italy; ↑ :140 and 110 bp bands

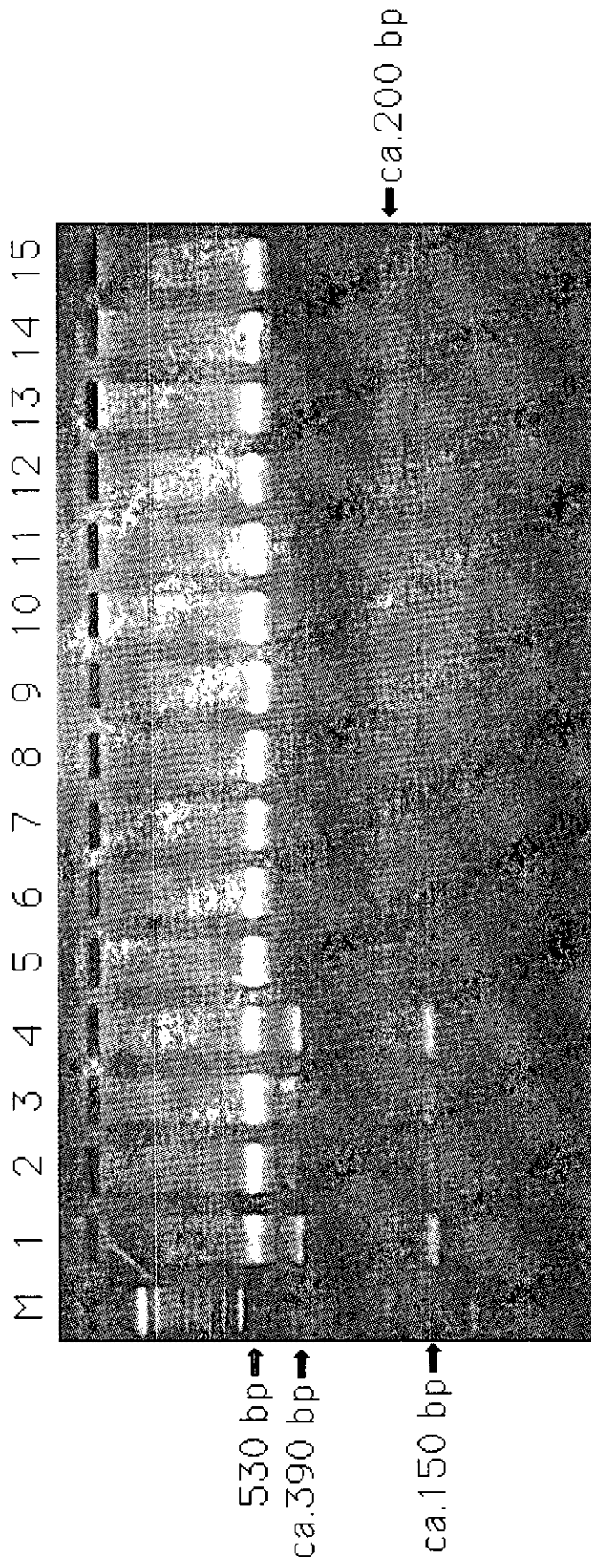


Fig. 3 Mlu I digested PCR products derived from geographically different *Aedes albopictus* mosquitoes

M: 100 bp ladder DNA marker; 1-3: Japan; 4-6: Thailand; 7-9: Oahu from USA; 10-12: Louisiana from USA; 13-15: Albania from Italy

蚊からのフラビウイルス（デング・黄熱・日本脳炎・ウエストナイル）
ゲノム検出法の改良及び侵入ベクターサーベイランスへの活用

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)
江下優樹 (大分大学医学部)

研究要旨

フラビウイルスに係る蚊の病原体検索システムを構築し、侵入ベクターサーベイランスシステムの一つとして活用するため、昨年度は、蚊のフラビウイルス保有の有無を検査するための RT-PCR 法の導入を検討した。その結果、フィールドで採取した蚊の 100 匹をプールして検査を実施した場合でも、その中に 1 匹の感染蚊（ウイルス量にして 10^3 pfu）が存在すれば、One step RT-PCR 法によりフラビウイルス（デング、黄熱、日本脳炎）の特異遺伝子が検出可能であることが確認できた。また、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、デング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、RT-PCR 法によりウイルス特異遺伝子の検出を行った結果、ウイルス RNA は保存温度が低いほど長期間保存されていることが確認され、また、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 が保存されることも確認できた。

今年度は、PCR 条件を改良することで RT-PCR 法をより高感度なものとすると共に、本法のウエストナイルウイルスへの適用の可否を検討した。その結果、昨年度と比較し、約 100 倍程度感度が向上し、またウエストナイルウイルス遺伝子の検出感度は他のフラビウイルスに比べやや低いもののスクリーニングとしては十分適用可能であることが確認された。

これらの検討をもとに、蚊の採取、保存、ウイルス学的検査の条件を設定した後、蚊のフラビウイルスサーベイランスを全国規模で開始し、ヒトスジシマカ 2,287 匹、コガタアカイエカ 885 匹、アカイエカ 14,071 匹の遺伝子検査を実施した。計 17,243 匹の海港、空港で採取された蚊からはフラビウイルスは検出されなかった。

海外からの病原体の侵入を監視するためのベクターサーベイランスの一つとして非常に有効なシステムが構築できたものと考えられる。

A. 研究目的

日本のゲート地域である空港、海港は常に海外からの感染症或いはそれらを媒介するベクターの侵入の危機に面している。国内で患者の発生がみられない場合においても、危機管理の観点から、輸入感染症監視システムの一つとしてベクターサーベイランスシステムを構築、機能させることは大変重要と考えられる。

そのため、フィールドで採取した蚊から効率的にウイルス特異遺伝子の検出を行うため、昨年度から本研究において開発・改良した RT-PCR 法¹⁾²⁾を、より高感度なものとすると共に、本邦への侵入の危険性の高

いウエストナイルウイルスへの適用の可否も併せて検討した。

さらに、全国の海港、空港で採取された蚊のフラビウイルス保有の有無の検査を本法により実施すると共に、構築したサーベイランスシステムの有効性並びに問題点を検証したのでここに報告する。

B. 研究方法

1. RT-PCR 法の改良

(I) ウイルスストック液の作製

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（JaGar 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³⁾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) ウイルスストック液を用いた RT-PCR 感度の確認

ウイルスストック液を培養液で希釈し ISOGEN-LS (ニッポンジーン) で抽出を行った (図 1) ものをテンプレートとして、フラビ共通 (YF1,3)、黄熱特異 (YF-C10,S10)、デング共通 (DC1,2)、日本脳炎特異 (JE8K,JEER) の各プライマー対による RT-PCR を実施した。プライマーシーケンスは表 1 に示した^{4),5)}。

(3) 蚊からのウイルスゲノムの抽出

未感染蚊 (ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ、アカイエカ) 1 匹、10 匹、50 匹、及び 100 匹にそれぞれ希釈したウイルスストック液を加え、1 匹の場合は ISOGEN 抽出のみを、10、50、100 匹の場合はホモジナイズ後の遠沈上清を用いて ISOGEN 抽出を行い、蚊からのウイルスゲノムを抽出し RT-PCR を実施した。蚊とウイルスの関係は以下に示した。

黄熱ウイルス : ネッタイシマカ
デングウイルス : ヒトスジシマカ、
ネッタイシマカ
日本脳炎ウイルス : アカイエカ

(4) RT-PCR 条件の検討

昨年度の検討で使用した逆転写酵素 (Wako) 及び Taq ポリメラーゼ (TAKARA, Ex-taq) に換えて RT/Platinum taq mix (GIBCO) を使用した。PCRmixture の組成及び cDNA 合成、PCR 増幅条件は表 2 に示した。即ち、精製 RNA 5µl に 25µl の 2xReaction mix (GIBCO)、RNase inhibitor 0.2µl (20U/50µl)、0.5µl の各プライマー (100µM)、1.0µl の逆転写酵素・Taq ポリメラーゼ Mix (RT/PLATINUM Taq Mix, GIBCO) 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 pfu として求めた。

2. 改良 RT-PCR 法によるウエストナイルウイルスの検出感度の確認

(1) ウイルスストック液での検出感度の検討

ウエストナイルウイルスは Eg101 株 10⁷pfu/ml のウイルスストック液を用いて ISOGEN 抽出したものを 10 倍段階希釈し、YF1,3 及びウエストナイル特異プライマー (WNC3,S3)⁶⁾ (表 1) を用い、検討した条件で RT-PCR を実施した。

(2) ウエストナイルウイルス感染蚊を用いた検討

アカイエカの胸部に 10³pfu のウイルス量のウエストナイルウイルスを接種し⁷⁾、28℃で 1 週間飼育したもの (感染蚊) を -80℃で殺した後、ISOGEN 抽出し、YF1,3 及び WNC3,S3 プライマー対を用いて検討した条件で RT-PCR を実施した。

3. フィールドで採取された蚊の病原体保有調査

(1) 全国の検疫所で採取された蚊のフラビウイルスゲノム保有検査の開始

厚生労働省医薬局食品保健部企画課検疫所業務管理室から全国の検疫所へ連絡文書 (図 2) を送付し、検疫法 27 条に基づく検査として蚊のフラビウイルス遺伝子検査を開始した。

検査対象とする蚊はネッタイシマカ、ヒトスジシマカ、アカイエカ、コガタアカイエカとし、種の同定終了後、採取年月日、採取場所、種類ごとにプールして冷凍状態で送付することとした。

また、東日本地域の検査を担当する横浜検疫所輸入食品・検疫検査センターとの検査手技の統一化を図った。

(2) 構築したサーベイランスシステムの有効性並びに問題点の検証

検体数、検体の採取方法、送付された状態、検査結果等から蚊の病原体保有調査の有効性、問題点を検討し、今後の侵入動物サーベイランスシステムの在り方を考察した。

C. 研究結果

1. RT-PCR 条件の検討

(1) RT-PCR の各ウイルスの検出感度

RT-PCR 産物の電気泳動像は図3に示した。

RT/Platinum taq mix (GIBCO) を用いた検出感度と従来の条件での検出感度は表3に示したように、ウイルスストック液及び1匹の蚊にウイルスストック液を加えた場合は従来法に比べ約10倍感度が高くなった。また10、50、100匹の蚊にウイルスストック液を加えた場合には100倍程度の感度の向上がみられた。

2. 改良 RT-PCR 法によるウエストナイルウイルスの検出感度

(1) ウイルスストック液での検出感度

10⁷pfu/ml のウイルスストック液を ISOGEN 抽出したウイルスゲノムを蒸留水で10倍段階希釈し、プレート中の絶対量として YF1,3 で10¹pfu、WNS3,C3で10⁰pfuの検出感度が得られた(図4)。

(2) 感染蚊からのウイルスゲノムの検出

実験に供した4匹のウエストナイルウイルス感染蚊の RT-PCR 結果は図5に示した。全ての蚊から YF1,3 及び WNS3,C3 により特異バンドが検出された。

3. フィールドで採取された蚊の病原体保有調査

(1) フラビウイルス遺伝子検査

平成13年6月20日付「検疫法第27条の規定による蚊族のウイルス検査に係る検体の保存・送付方法について」により全国的な蚊のフラビウイルス遺伝子検査を開始した。全国の検疫所で採取されたヒトスジシマカ、アカイエカ及びコガタアカイエカの匹数は図6に示した。計17,243匹について検査を実施したところ、全て陰性であったが、非特異的なバンドが出現したものが数件みられた。

また、月ごとの採取蚊の匹数を図7に示した。成田空港検疫所を除く検疫所の月ごとの検体数は5月から増加しはじめ、7月にピークとなり、11月に減少した。この傾向はアカイエカよりヒトスジシマカの方が顕著であった。成田空港検疫所においては通常の野外蚊の調査では、同様な傾向がみられるものの、本年に限り、イエカ類の調査を実施したため、特に空港施設建物内でチカイエカ(*Cx.pipiens molestus*)が多く捕集されたため、他の検疫所の傾向に比べ全

く正反対の傾向を示した。

(2) フラビウイルスサーベイランスシステムの有効性及び問題点

検体の採取法について、成虫の採取には家庭用電源で稼働するライトトラップを多くの検疫所は使用している。採取開始時間、ドライアイスとの併用等により多くの蚊を採取することが可能であるが、電源の確保の関係から、使用できる場所に制限がある。また、粘着剤による蚊の採取も実施されているが、虫体に付着した粘着剤の影響により RT-PCR 感度が低下することが我々の実験で確認されている。

送付された検体の約1割は幼虫を採取し飼育した後、羽化させた成虫であった。

採取場所については、検疫法で指定された政令区域内に各検疫所ごとに計画、設定した場所を定期的に調査している。蚊の生息、発生場所が環境整備に伴い減少していること、採取法の電源確保等の条件により限定される等の問題がある。また、数を多く採ることが先行した調査を実施しているところもあった。

検体の送付については、全ての検体が-20℃以下の冷凍状態として送付された。頻繁な検体の送付に当たり、送付容器等の確保も地方の検疫所では問題となっていた。

D. 考察

平成10年度に one-step RT-PCR 法を蚊からの Dengue ウイルスの検出に適用し、その可能性を確認した。11年度には、さらに黄熱、日本脳炎の各フラビウイルスの検出感度の確認と、蚊からのウイルスゲノム抽出法を検討した。また、採取された蚊を検査に供するまでの保存の条件がウイルスゲノムの増幅にどの様に影響するのかを確認し、より実際に則した形で蚊の採取から種の同定、保存、遺伝子検査と一連の条件を検討した。

本年度は RT-PCR 法の PCR 条件を改良し、さらに高感度なものとした。昨年度と比較し、約100倍程度感度が向上した。

また、アメリカにおいて蚊および鳥のウエストナイルウイルス保有検査は PCR 法により実施されておりその有効性は高く評価されている⁹⁾。

そこで、本研究で開発した RT-PCR 法をウ

エストナイルウイルスへ適用したところ、YF1,3で 10^3 pfu、WNS3,C3で 10^0 pfuの検出感度が得られた。また、感染蚊からも接種量に比べ明らかに濃いバンドが検出され、日本産のアカイエカ体内でもウエストナイルウイルスが増殖していることも示唆され、今後の本ウイルスのサーベイランスの重要性が再認識された。

今回はウイルスゲノムを用いた実験のため、他のフラビウイルスに比べ検出感度がやや劣り、ウイルスそのものを用いた再試験も必要と考えるが、スクリーニング検査としては十分使用可能であることが確認された。

昨年度構築し、今年度さらに改良した蚊のフラビウイルスサーベイランスシステムを全国的に開始した。全国の海港、空港で採取、同定されたヒトスジシマカ 2,287 匹、コガタアカイエカ 885 匹、アカイエカ 14,071 匹、計 17,243 匹について検査を実施したところ、全て陰性であった。

また、送付された検体の約 1 割は幼虫を採取し飼育した後、羽化させた成虫であり、本来、侵入ベクターのサーベイランスとしては成虫に主眼を置くべきであることは言うまでもないが、フラビウイルス感染蚊の経卵感染も報告されており¹⁰⁾⁻¹²⁾、頻度は低いものの病原体の定着という点においては本調査も重要と考えられる。また、成虫の採取数を増やすためには電池式のライトとラップ等(図8)の整備も必要と思われる。今後、侵入ベクターサーベイランスの在り方として、病原ウイルスを保有しないことの確認ということも大切であるが、蚊特にフラビウイルス陽性蚊を効率的に調査することにも主眼を置き、そのためには、見張り動物(Sentinels)の配置を含めた調査区域、調査方法の再考が必要である。即ち、海外からの侵入門戸のみにおける蚊のみを対象としたサーベイランスではなく、内陸部の保税倉庫、コンテナヤード等において、フラビウイルス増幅動物、見張り動物の抗体調査、それらの周辺からの蚊の採取などよりアクティブなサーベイランス¹³⁾⁻¹⁴⁾が要求されると考える。

E. 結論

本研究で検討、確立した RT-PCR 法をさ

らに改良して高感度なものとし、ウエストナイルウイルスにも適用できることを確認した。昨年度と今年度に検討した内容に基づきフラビウイルスサーベイランスシステムとして全国的に起動させた。

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、橋本智、江下優樹、内田幸憲：
検疫所で捕獲された蚊のフラビウイルス検査結果について、第4回日本検疫医学会学術大会、東京、第4回検疫医学会大会プログラム・抄録集

H. 文献

1) 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

2) 林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森英人、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、平成 12 年度厚生科学研究報告書、87-99,2001

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

4) 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

5) Robert S. Lanciotti, Charles H. Calisher, Deane J. Gubler, Gwong-Jen chang, A. Vance Vorndam Rapid determination and typing of dengue viruses from clinical sample by using reverse transcriptase-polymerase chain

- reaction: *Journal of Clinical Microbiology*, Vol.30,No.3,545-551,1992
- 6) Mariko Tanaka :Rapid identification of flavivirus using the polymerase chain reaction.*Journal of Virological Methods*, 41, 311-322, 1993
- 7) 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
- 8) Pei-Yong Shi,Elizabeth B. Kauffman, Ping Ren, Andy Felton, Jennifer H. Tai, Alan P. Dupuis II, Susan A. Jones, et al: High-throughput detection of west nilwe virus RNA:*Journal of Clinical Microbiology*, Vol.39,No.4,1264-1271,2001
- 9) Dennis J.White, Laura D.Kramer, P.Bryon Backenson, Gary Lukacik, Geraldine Johnson, JoAnne Oliver, et al: Mosquito surveillance and polymerase chain reaction detection of west nile virus ,New York State: *Emerging Infectious Diseases*, Vol.7, No.4, 631-635,2001
- 10) Chen WJ, Tsai SM, Chen SL, Ko YC, Fang AH:A study on transovarial transmission of dengue type I virus in *Aedes aegypti*.*Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi*.Vol.23, No.4, 259-270, 1990
- 11) Hull B,Tikasingh E,de Souza M,Martinez R:Naturaltransovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Thailand.*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* Vol.33,No.6,1248-1250, 1984
- 12) Khin MM,Tham KA:Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature,..:*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* Vol.32,No.3,590-594, 1983
- 13) Millicent Eidson,Laura Kramer, Ward Stone, Yoichiro Hagiwara,Kate Schmit:Dead bird surveillance as an early warning system for west nile virus.:*Emerging Infectious Diseases*,Vol.7,No.4,631-635,2001
- 14) CDC:Epidemic/epizootic west nile virus in the United States;Guideline for surveillance, prevention, and control: Workshop in Fort Collins, Colorado, 1999

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 WNV 760,834	1987
YF-S10	GTAACAGTTACATCGCYGAG	278	Rice et al.
YF-C10	AGCAAGAAACATGTCCACCA		1987
DC1	TCAATATGCTGAAACGOGCGAGAAACCG	511	Lanciotti et al.
DC2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTT		1992
JE8K	ATGGAACCCCCCTTC	385	Morita et al.
JEER	AGCATGCACATTGGTTCGCTA		1991
WN-S3	CACAGCGGGCTTTACTATCT	229	Castle et al,1985,
WN-C3	CATTCCAGCAGCTAGGACC		Wengler et al,1985

表 2 RT-PCR protocol

Components	Volume/50µl	cDNA synthesis and pre-denaturation
2x Reaction mix	25µl	Perform 1 cycle of:
Template RNA	5µl	53 °C for 10min
Sense Primer (100µM)	0.5µl	92 °C for 5min
Anti-sense Primer (100µM)	0.5µl	
RT/PLATINUM Taq Mix	1µl	PCR amplification
RNase inhibitor (20U/50µl)	0.2µl	Perform 35 cycles of:
Autoclaved D.W.	17.8µl	Denature, 92 °C for 1min
		Anneal, 53 °C for 1min
		Extend, 72 °C for 1min
		1 cycle of:
		72 °C for 5min

表 3 Comparison of the detection limit by RT-PCR

Number of Mosquitoes	Virus		1		10		50		100	
	Takara	GIBCO	Takara	GIBCO	Takara	GIBCO	Takara	GIBCO	Takara	GIBCO
YFV										
YF1,3	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ¹	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10 ²
YF-S10,C10	10 ⁰	10 ⁰	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ⁰	10 ³	10 ¹	10 ³	10 ¹
DV2										
YF1,3	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ¹	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10 ²
DC1,2	10 ⁰	10 ⁰	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ⁰	10 ³	10 ¹	10 ³	10 ¹
JEV										
YF1,3	10 ¹	10 ⁰	10 ²	10 ¹	10 ³	10 ¹	10 ⁴	10 ²	10 ⁴	10 ²
JE8K,JEER	10 ⁰	10 ⁰	10 ²	10 ⁰	10 ³	10 ⁰	10 ⁴	10 ¹	10 ⁴	10 ¹

図 1 RNA extraction method from Mosquito ISOGEN extraction

Put a mosquit into 1.5ml microtube
 | +Virus stock 100μl
 Homogenize (on ice)
 | +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)
 | +DEPC 100μl
 | (+RNase inhibitor 1U/μl)
 Store at 4 °C for 30min
 |
 RT-PCR

図 2 検疫所への連絡文書

検疫法第 27 条の規定による蚊族のウイルス検査に係る 検体の保存・送付方法について

1. 採取した蚊の検体・送付方法
 - (1) 検体の包装
 検疫法第 27 条による蚊族の検体は、フラジール（凍結・ショック）の各検体ウイルスのスクリーニング検査として送付する PCR 反応 (RT-PCR法) を実施することとした。RT-PCR法により、フラジール共通の特異的 PCR 反応を認めることでの蚊のウイルス感染の有無を確認するもので、一度に 100 匹の蚊を検査することが可能である。
 本邦で検査を実施するためには、採取された蚊の検体内でウイルスが検出しないように、蚊の脱殻、脱肛、送付時の温度条件に注意を要する。
 ウイルス RNA は、常温で保存した場合でも 10 日間ほどは本邦により検出可能であったが、できる限り低温に保存することが望ましい。
 - (2) 検査対象蚊
 検査対象となる蚊の種類は本来ネグティブコントロール、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカの成虫であるが、アカイエカ等も対象とする。
 なお、脚で採取された蚊で検査を実施する場合には、明記させて送付したものを併用する。
 - (3) 検体の採取
 平成 11 年 9 月 30 日付 厚生省衛生検査所長官品保部検疫検査所業務管理課長通知「感染症発生管理課業務について」の別添 2「調査マニユアル」の 15 頁「蚊の採取」をマニユアルに基づいて採取する。できる限り、既述しない方法で採取すること。
 * 脱肛スプレーによる採取方法も検討されているが、使用された薬剤により、RT-PCR法に影響が出ることも懸念されるため、病態が明確になるまで、ウイルス検査に供する検体の採取には本邦法を用いない。
 - (4) 生存蚊の処理
 検査後、ライトトラップ等で採取した成虫蚊で生存しているものは、ビニール袋等に入れ、低温で冷却して保存。
 -20℃の場合では 1 週間程度で死亡する。4℃で長時間冷却した場合は、養生することがあるのではある。また、殺虫剤等の使用は避けること。
 - (5) 調査終了までの保存条件
 乾燥状態を保つことで調査条件でよい。
 - (6) 調査終了後の保存・送付条件
 採取年月日、調査区域、同一標ごとに区分けしてプラスチックチューブに入れ、凍結状態で送付する。ドライアイスを入れることが望ましい。
 月に複数回の調査を行う場合には、上記区分方法で、-20℃以下で保存すれば、一ヶ月分の検体をまとめて送付することも可能である。

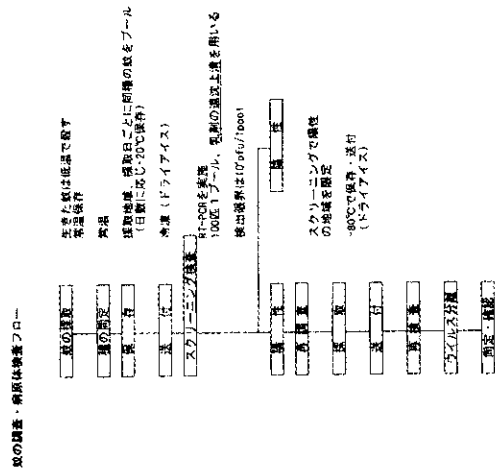
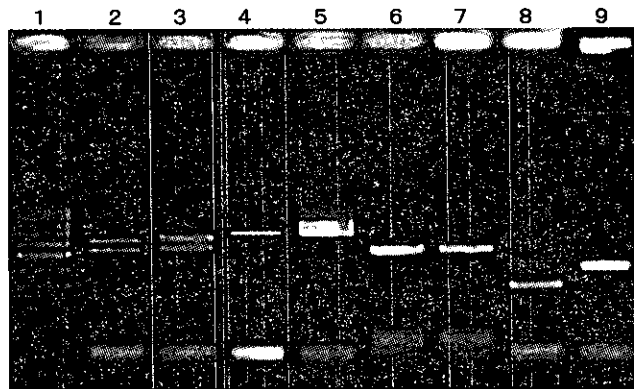
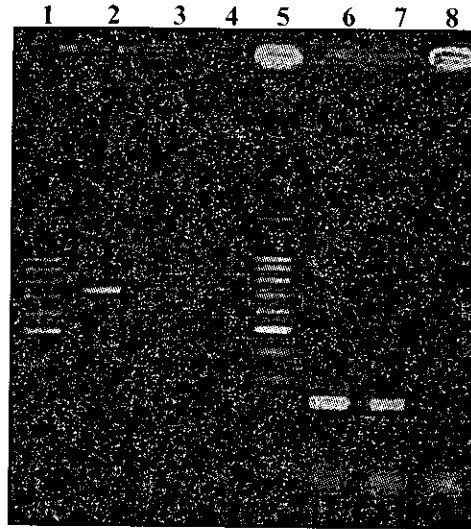


図3 Detection of DV1,2, YFV and JEV by RT-PCR



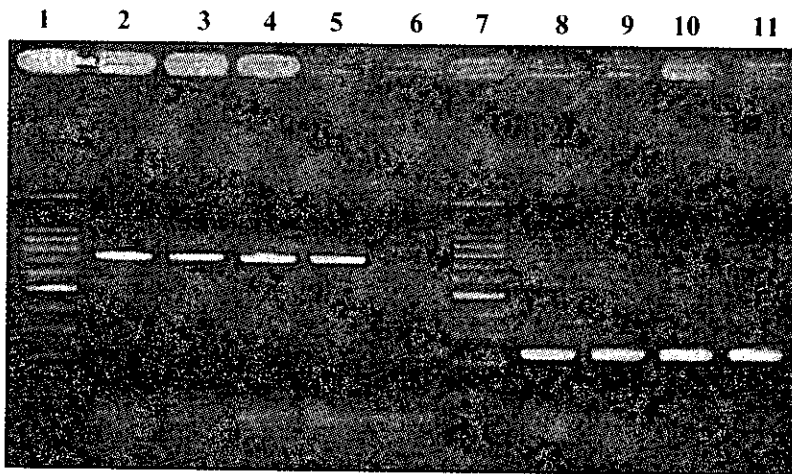
Lane No.	Virus Marker	Primer
1	Marker	
2	DV1	YF-1,3
3	DV2	
4	YFV (17D)	
5	JEV	
6	DV1	DC-1,2
7	DV2	
8	YFV (17D)	YF-C10,S10
9	JEV	JE8K,JEER

图 4 WNV detection by RT-PCR



Lane No.	Virus	Primer
1	Marker	
2	WNV (10 ⁴ pfu)	YF-1,3
3	WNV (10 ⁴ pfu)	YF-1,3
4	DW	
5	Marker	
6	WNV (10 ⁴ pfu)	WN-C3,S3
7	WNV (10 ⁴ pfu)	WN-C3,S3
8	DW	

图 5 WNV detection from infected mosquito (*Cx.pipiens pallens*) by modified RT-PCR



Lane No.	Primer:YF1,3	Lane No.	Primer:WNC3,S3
1	Marker	7	Marker
2	Mosquito No.1	8	Mosquito No.1
3	Mosquito No.2	9	Mosquito No.2
4	Mosquito No.3	10	Mosquito No.3
5	Mosquito No.4	11	Mosquito No.4
6	No sample		