

図 6 Total numbers of Mosquitoes sent from each Quarantine Station

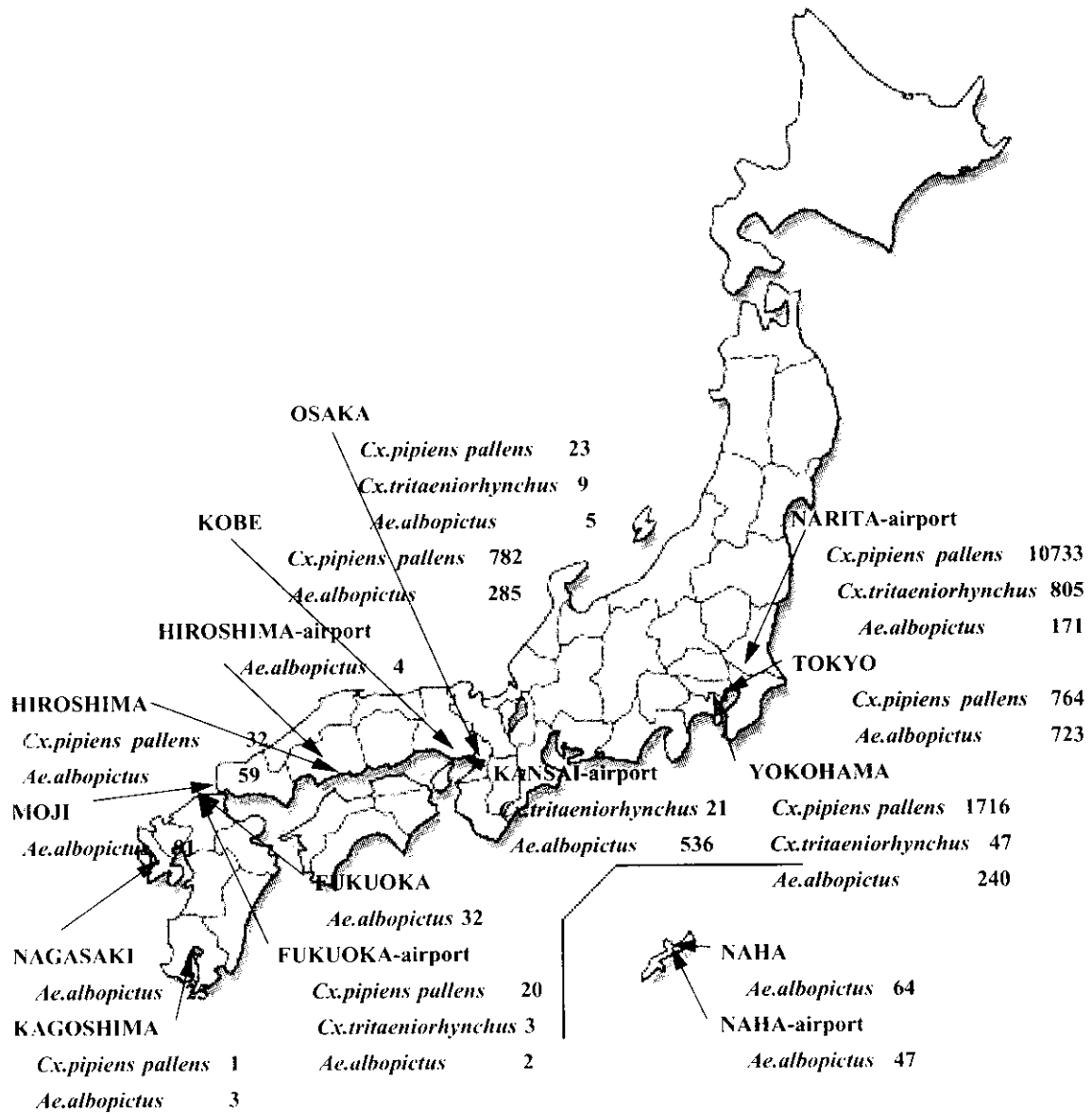


図7 Monthly total numbers mosquitoes sent from Quarantine Stations

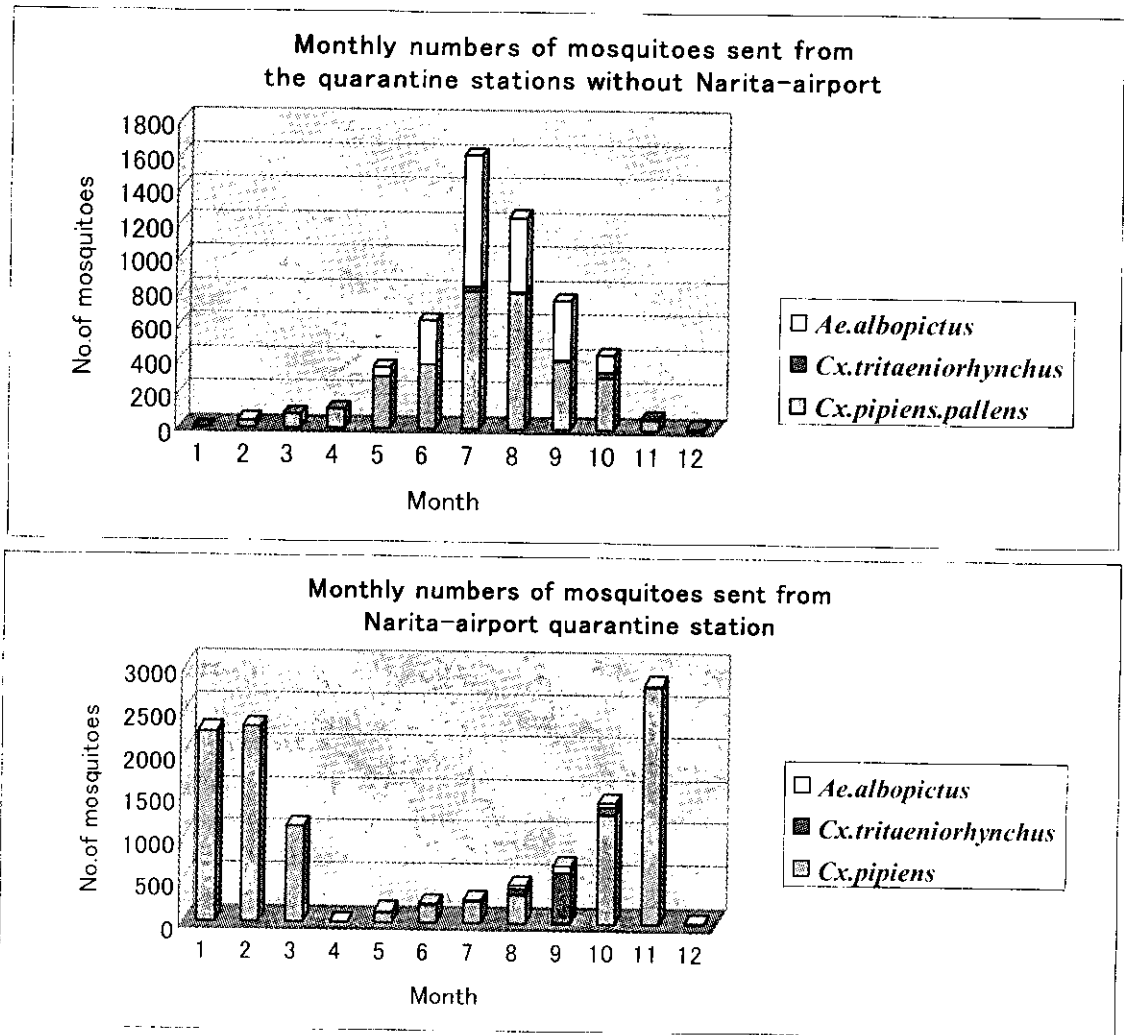
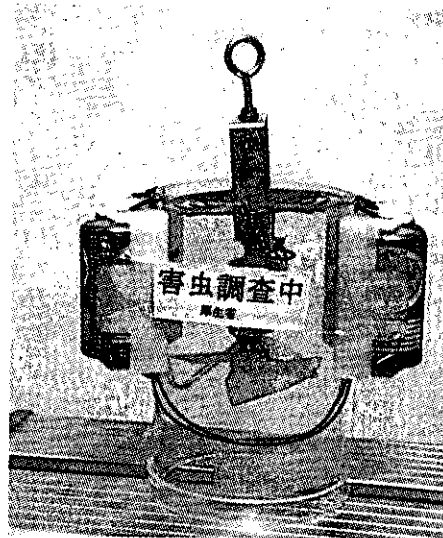


図8 Light trap running with battery to collect mosquitoes



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を抗原とした ELISA によるヒツジ血清中イムノグロブリン G 抗体の検出と RT-PCR 法によるダニからの同ウイルスゲノムの検出

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)
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)

研究要旨：組換えバキュロウイルスを用いてクリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) ウイルスの組換え核蛋白 (CCHFV rNP) を発現させ、それを抗原とした enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるヒツジ血清中の CCHF ウイルス特異的イムノグロブリン G (IgG) 抗体検出法を開発した。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、その精度と感度を評価したところ、それぞれ 86 % と 100 % であった。中国新疆ウイグル自治区 (Bachu 郡) にて採取されたダニ (*Hyalomma* 属) 約 50 匹を 17 プールに分け、それぞれのダニプールから RNA を抽出し、特異的プライマーを用いて CCHF ウイルスゲノム検出を試みた。設計されたプライマーセットの塩基配列の違いにより同ウイルスゲノムが検出されたダニプールの数が異なった。CCHF ウイルスの宿主であるダニからの同ウイルスゲノム検出のための RT-PCR 法の有用性と問題点が明らかにされた。CCHF ウイルスのヒトへの感染源として重要なヒツジ血清中の特異的 IgG 抗体を検出するための ELISA が開発された。

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感染性 CCHF ウイルスを用いた抗体検出などのウイルス学的検査は不可能であった。そこで私たちは、組換えバキュロウイルスにより CCHF ウイルスの組換え核蛋白 (CCHFV rNP) を発現させ、ヒト血清中の CCHF ウイルス抗体を検出するための CCHFV rNP を抗原とした IgG ELISA を開発した (J. Clin. Microbiol. in press)。しかし、この方法では、ヒツジ血清に応用すると非特異的反応が強くなり、高い精度と感度が得られないことが確かめられていた。そこで、IgG ELISA におけるブロッキング液および洗浄液を改良し、ヒツジ血清中の CCHF ウイルス特異的抗体を検出するための CCHFV rNP を抗原とした IgG ELISA を開発した。その精度と感度を CCHF ウイルス感染 Vero E6 細胞を抗原とし

た蛍光抗体法 (IFA, CCHFV-Vero E6 細胞 IFA) と比較して評価した。

ダニ (*Hyalomma* 属) も CCHF ウイルスのベクターおよび宿主であり、ヒトへの感染源として重要である。このダニから CCHF ウイルスゲノムの検出のための RT-PCR 法を試み、その有用性と問題点を明らかにした。

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 株の S-遺伝子に由来している。
- 2) CCHFV-Vero E6 細胞を用いた IFA 抗原の作製 : 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 °C に保存し、使用時には乾燥させてから用いた。
- 3) 組換えバキュロウイルスの作製と組換え蛋白の精製：N-末端にヒスチジンタグ (6×Hisタグ) が付加された His-CCHFV rNP を発現する組換えバキュロウイルス (*Ac*-His-CCHFV-NP) を以下の方法で作製した。CCHFV ウイルスの NP をコードする cDNA を pQE30 ベクター (QIAGEN) のクローニングサイトに His-tag とフレームに合うように挿入し、His-CCHFV rNP をコードする DNA を回収、pAcYMI ベクターに挿入した (pAcYMI-His-CCHFV-NP)。pAcYMI-His-CCHFV-NP とバキュロウイルス DNA を high five 細胞にトランスフェクションし、His-CCHFV rNP を発現する組換えバキュロウイルス (*Ac*-His-CCHFV-NP) を得た。*Ac*-His-CCHFV-NP を high five 細胞に感染させ、感染 3 日後に細胞を回収した。回収した細胞を超音波処理し、さらに 12000 回転/分で遠心することにより可溶分画である上精を得た。その上精から、Ni²⁺-カラムを用いて His-CCHFV rNP を精製した。
 - 4) 血清：CCHF 流行地である中国西部の新疆ウイグル自治区 (新疆ヒツジ血清、80 検体) および東部の山東省 (山東ヒツジ血清、39 検体) のヒツジから採取された血清を用いた。
 - 5) ダニ：新疆ウイグル自治区 Bachu 郡で採取された約 50 匹のダニ (*Hyalomma* 属) を用いた。17 プールに分けた。
 - 6) IgG-ELISA：約 100 ng/well になるように精製 His-CCHFV rNP を ELISA 用プレート (Falcon 社) に 4°C 一晩吸着させた。0.5% Tween-20, 0.5 mg/ml デキストランサルフェート, 5% 熱非働化処理済み馬血清 (Gibco) 含有 PBS (ブロッキング液) でブロッキング処理後、洗浄液 (0.25% Tween-20 含有 PBS) でそれぞれの被験血清を 100 倍から 6400 倍まで 4 倍段階希釈し、37°C 1 時間反応させた。同洗浄液で洗浄後、ペルオキシダーゼ (HRPD) 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体 (Zymed 社, 500 倍希釈) を 37°C 1 時間反応させた。T-PBS で十分洗浄後、基質である ABTS 液 (Beohlinger-Mannheim 社) を加え、37°C 30 分反応させ吸光度 (OD₄₀₅) を測定した。対照として、抗原をコートしていない well を用いて、それぞれの希釈された被験血清について同様の反応をおこなった。そして対応する OD₄₀₅ から対照の OD₄₀₅ を差し引いた値を、His-CCHFV rNP に対する反応としての OD₄₀₅ とした。
 - 7) IFA：CCHFV-Vero E6 細胞を用いた IFA 抗原に PBS で 50 倍希釈したヒツジ血清を、37 °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 社) を 37 °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。
 - 8) ダニからの RNA の抽出：ダニから、RNAzol (TEL-TEST 社) を用いて RNA を抽出し、その RNA をテンプレートとしてランダムヘキサマーを用いた逆転写反応 (Ready-to-go RT-PCR, Amersham Pharmacia Biotech 社) により、cDNA を作製した。
 - 9) RT-PCR：cDNA をテンプレートとした PCR は High fidelity PCR キット (Roche Diagnostics 社) を用いて行い、その条件は、95 °C 2 分、5 サイクルの 95 °C 30 秒、45 °C 30 秒、52 °C 30 秒、72 °C 30 秒、25 サイクルの 95 °C 30 秒、52 °C 30 秒、72 °C 30 秒、および 72 °C 5 分である。PCR に用いられたプライマーセットは、表 1 にまとめた。プライマーセット A は、論文 (Rodriguez LL, et al., Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the United Arab Emirates. *Am J Trop Med Hyg.* 57:512-8, 1997) に基づいて設計された。プライマーセット B は、中国 8402 株の S-遺伝子塩基配列に合せて設計された。それぞれのプライマーの S-遺伝子におけるアニーリング部位は図 1 に示した。Nested PCR は、95 °C 2 分、25 サイクルの 95 °C 30 秒、52 °C 30 秒、72 °C 30 秒、および 72 °C 5 分の条件で行われた。増幅された DNA は、2% アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線をあてて検出した。

C. 結果

- 1) CCHFV-Vero E6 細胞抗原を用いた IFA 法と IgG ELISA との比較 (表 2)：新疆ヒツジ血清 80 検体のうち、49 検体が IFA で CCHFV ウイルス抗体陽性を、残り 31 検体が陰性を呈した。一方、山東ヒツジ血清は IFA で全て陰性であった。IgG ELISA では、IFA 陽性新疆ヒツジ血清 49 検体すべてが陽性を呈し、IFA 陰性ヒツジ血清 31 検体のうち 9 検体が

陽性を呈した。山東ヒツジ血清の1検体がIgG ELISAで陽性を呈した。感度と精度はそれぞれ100%、86%となった。

- 2) PCRによるダニからのウイルスゲノムの検出：1回目のPCRでウイルスゲノムが検出されたのは、プール12の1検体のみであった。F2とR3のセットおよびF3とR2のセットによるnested PCRでウイルスゲノムが検出されたのはプール12のみであったが(図2a)、F2/CとR3/CのセットおよびF3/CおよびR2/Cのセットによるnested PCRでは、プール10およびプール12の2検体からウイルスゲノムが検出された(図2b)。

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。そのため、CCHFウイルス感染症の疫学を調査するうえで、ヒツジ血清中の同ウイルスに対する抗体検出のための方法は重要である。また、宿主およびベクターであるダニにおけるCCHFウイルスの存在を調査することも重要である。しかし、CCHFウイルスは、エボラウイルスなどとともに、高度安全研究施設でのみその扱いが許されている。私たちは感染性ウイルスを用いなくても、ヒト血清中の特異的CCHFウイルス抗体を検出できるシステムを開発した。しかし、その方法ではヒツジ血清中のCCHFウイルス抗体を高い感度と精度のもとで検出できなかったが(データ未公表)、ブロッキング液および洗浄液を改良することで、100%の感度と86%の精度でヒツジ血清中CCHFウイルス抗体を検出することの可能なIgG ELISAが開発された。私たちが開発したCCHFV rNPを抗原としたIgG ELISAは、ヒツジにおけるCCHFウイルス感染の流行状況を把握するのに有用である。今回の検討ではウシなどの他の動物におけるCCHFウイルス抗体検出における有用性は検討されていないが、このシステムはヒツジ以外の動物の血清中CCHFウイルス抗体検出にも応用できるも

のと考えられる。

RT-PCR法によるCCHFウイルスゲノム検出に関する論文がいくつか報告されており、その論文(前出)に基づいて設計されたプライマーセットAでは、検出できないCCHFウイルスが中国新疆ウイグル自治区に存在していることが明らかになった。今回の報告書には記載していないが、CCHFウイルスのS-遺伝子の他の部位にアニールするプライマーを設計してウイルスゲノムの検出を試みたところ、さらにいくつかのプールからウイルスゲノムが検出された(データ未公表)。このようにPCR法によるウイルスゲノム検出は、一般的に言われているように少ないウイルスゲノム数からウイルスを検出する感度に優れているものの、塩基配列の違いなどにより検出できないCCHFウイルスが存在する。今後、効率良くCCHFウイルスゲノムを検出するためのプライマーの設計、PCRの条件等、検討されなければならない課題が残っている。

E. 結論

ヒツジ血清中のCCHFウイルスIgG抗体を検出のための、CCHFウイルス組換え核蛋白を抗原としたIgG ELISAを開発した。CCHFウイルス感染Vero細胞を抗原としたIFAに比較して、そのIgG ELISAは高い感度と精度を有することが明らかにされた。本システムは疫学的研究に有用である。RT-PCR法によるCCHFウイルスゲノムの検出はウイルス抗原検出に有用であるものの、さらなる改良(プライマーの設計およびPCRの条件)が必要と考えられた。

F. 補遺

尚、CCHFウイルス感染Vero E6細胞抗原の作製、ダニからのcDNAの作製は、中国予防医学科学院流行病学微生物学研究所唐青博士のご協力により行われた。心から感謝の意を表したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 39:3267-3271, 2001.
- 2) 西條政幸. クリミア・コンゴ出血熱. 感染症免疫31:240-242, 2001.
 - 3) Ikegami T, Calaor AB, Miranda ME, Niikura M, Saijo M, Kurane I, Yoshikawa Y, Morikawa S. Genome structure of Ebola virus subtype Reston: differences among Ebola subtypes. *Archives of Virology* 146:2021-2027, 2001.
 - 4) 森川 茂, 西條 政幸, 新倉 昌浩, 倉根 一郎. ウイルス性出血熱と我国における検査体制 ウイルス, 51 : 215-224, 2001
 - 5) Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Prehaud C, Morikawa S. Immunofluorescence technique using HeLa cells expressing recombinant nucleoprotein of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Clinical Microbiology* 40:372-375, 2002.
 - 6) 西條政幸. ウイルス性出血熱. 化学療法の領域 (印刷中)
 - 7) Saijo M, Tang Q, Niikura M, Maeda A, Ikegami T, Kurane I, Morikawa S. Recombinant nucleoprotein based enzyme-linked immuno-sorbent assay for detection of immunoglobulin G to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Journal of Clinical Microbiology* (in press)
 - 8) Morikawa, S., Qing, T., Xinqin, Z., Saijo, M., and Kurane, I. (2002): Genetic diversity of the M RNA segment among Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus isolates in China. *Virology* (in press)
- M. Saijo, M. Niikura, Q. Tang, and I. Kurane 6th International Conference on emerging infectious diseases in the pacific rim (Manila), 2001
- 2) ハンタウイルスの核蛋白(NP)とユビキチン様結合酵素Ubc9との結合様式: 前田 秋彦, 新倉 昌浩, 西條 政幸, 池上 徹郎, 緒方もも子, 倉根 一郎, 森川 茂 第132回日本獣医学会, 岩手, 2001
 - 3) 1996年のフィリピンのエボラウイルスレストン株流行施設内のサルにおける抗体保有状況: 池上 徹郎, Calaor Alan B, Miranda Mary E, 新倉 昌浩, 西條 政幸, 緒方もも子, 倉根 一郎, 吉川 泰弘, 森川 茂 第132回日本獣医学会, 岩手, 2001
 - 4) エボラウイルスサブタイプを区別できる単クローン性抗体の認識する核蛋白上のリニアエピトープ: 新倉 昌浩, 西條 政幸, 池上 徹郎, 倉田 毅, 倉根 一郎, 森川 茂 第49回日本ウイルス学会, 大阪, 2001
 - 5) エボラウイルスレストン株の組み換え核蛋白発現HeLa細胞を用いたIFAの有用性: 池上 徹郎, 新倉 昌浩, 西條 政幸, 緒方もも子, 倉根 一郎, 吉川 泰弘, 森川 茂 第49回日本ウイルス学会, 大阪, 2001
 - 6) 組換え核蛋白を用いたクリミア・コンゴ出血熱(CCHF)の診断と中国における疫学的研究: 西條 政幸, 新倉 昌浩, 前田 秋彦, 池上 徹郎, 倉根 一郎, 森川 茂 第49回日本ウイルス学会, 大阪, 2001
 - 7) クリミア・コンゴ出血熱ウイルスのMセグメントRNAの塩基配列: 森川 茂, 西條 政幸, 倉根 一郎, 森川 茂 第49回日本ウイルス学会, 大阪, 2001

2. 学会発表

- 1) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus antibody detection system using its recombinant nucleoprotein: S. Morikawa,

表1. CCHF ウイルスゲノム (S-遺伝子) の増幅のための RT-PCR, nested PCR に用いられたプライマーの塩基配列.

プライマーセット	プライマー名	プライマー塩基配列
A	F2	5' -TGGACACCTTCACAAACTC -3'
	F3	5' -GAATGTGCATGGGTTAGCTC -3'
	R2	5' -GACATCACAATTCACCAGG -3'
	R3	5' -GACAAATTCCTGCACCA -3'
B	F2/C	5' -TGGTAACTTTCACAAACTC -3'
	F3/C	5' -GAGTGTGCCTGGGTTAGCTC -3'
	R2/C	5' -GACATTACAATTCGCCAGG -3'
	R3/C *	5' -GACAAATTCCTGCACCA -3'

* : R3/C の塩基配列は, R3 のそれと全く同じである.

表2. ヒツジ血清中の CCHF ウイルス抗体の CCHF ウイルスの組換え核蛋白を抗原とした IgG ELISA と CCHF ウイルス感染細胞を抗原とした IFA による検出.

		IgG ELISA					
		新疆ヒツジ血清		山東ヒツジ血清		合計	
		1*	2*	+	-	+	-
IFA	+	49	0	0	0	49	0
	-	9	22	1	38	10	60

1* : 抗体陽性

2* : 抗体陰性

図 1. プライマーセット (F2/C, R3/C) および (F3/C, R2/C) を用いた PCR で増幅される CCHF ウイルスの S-遺伝子部位.

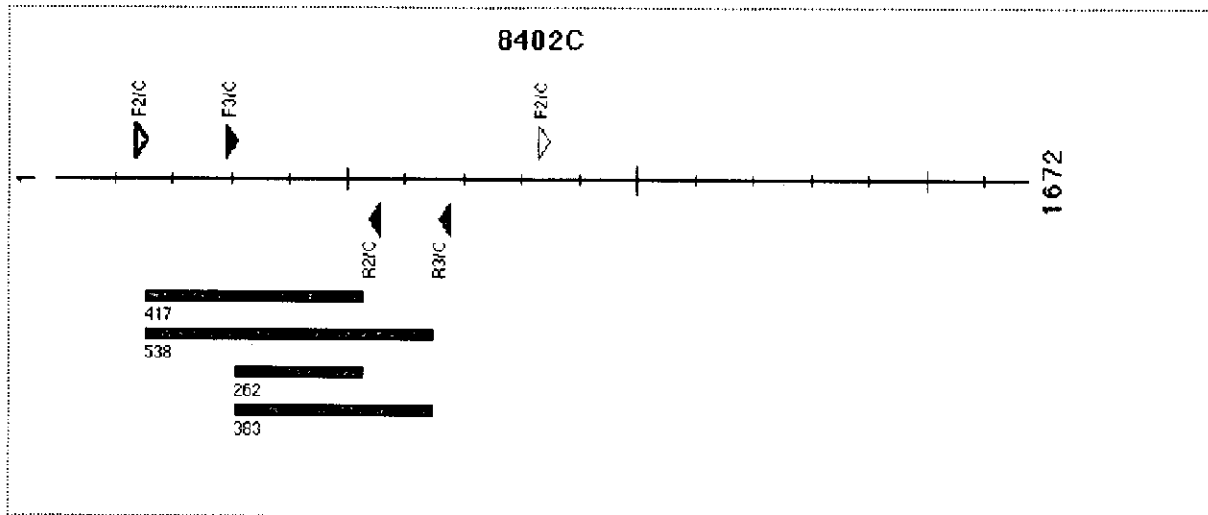
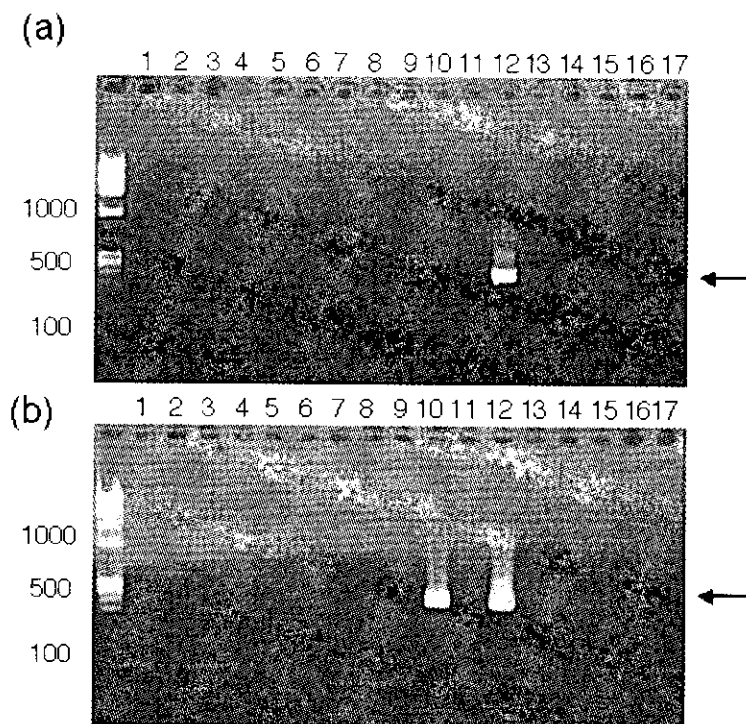


図 2. ダニの 17 プールから nested PCR で増幅された CCHF ウイルスゲノム. プライマーセット (F2 と R3) および (F3 と R2) を用いた nested PCR では, プール 12 からのみ CCHF ウイルスゲノムが検出されたが (a), プライマーセット (F2C と R3C) および (F3C と R2C) を用いた nested PCR では, プール 10 およびプール 12 の 2 サンプルから CCHF ウイルスゲノムが検出された.



人獣共通感染症に係わる侵入動物および侵入ベクターに対するサーベイランスシステムの研究（日本－韓国－台湾におけるマラリア対策）

分担研究者：高橋 央（国立感染症研究所 感染症情報センター）

協力研究者：加來 浩器（国立感染症研究所 実地疫学専門家養成コース）

研究要旨：本年度研究は、三日熱マラリアが再興した韓国と、現在はマラリアの流行はないが熱帯熱マラリア媒介可能蚊（コガタハマダラカ）が生息している台湾及び八重山でのマラリア対策を比較して、日本国内で行うべき蚊サーベイランスのあり方を検討した。韓国では、2001年のマラリア総合対策によって約4000名(2000年)の患者数を約55%減少（約1800名、2001年1月-11月）させることに成功した。台湾では、蚊のコントロールよりも、マラリア患者を24時間以内に報告させるシステム(1999年6月の伝染病対策法改正)によって、輸入感染症からの土着化防止に力を注いでいる。八重山では、過去のマラリア惨禍の風化防止と、現在進められている沖縄県の自由貿易圏化構想への対策の一環として、保健所を中心に1998年度から3年間計画で蚊サーベイランス(厚生科学研究)が行われていた。日韓台の蚊サーベイランスは、それぞれの地域におけるマラリアの歴史的背景、流行状態、媒介可能蚊生息状況等を考慮して実施されていた。国内における侵入ベクターサーベイランスを担当している検疫所は、検疫所同士の連携協力を強化する一方、周辺自治体との連携を日常的に行い、サーベイランス結果を行政対応に反映させるよう努めるべきである。国立感染症研究所は、蚊サーベイランスに関する技術支援を強化するとともに感染症の国際情報ネットワーク形成のために、中心的役割を果たすべきである。

A. 研究目的

昨年度我々は、韓国の感染症サーベイランスシステム及び侵入動物・侵入ベクターサーベイランスシステムの調査を通じて、現在韓国で再興している三日熱マラリアの現状と問題点、並びにマラリア総合対策に関する情報を得た。今年度は、韓国でのマラリア対策の進捗状況を確認するとともに、熱帯熱マラリアを媒介可能なコガタハマダラカが土着している台湾での

取り組みについて調査して、日本、韓国、台湾のマラリア対策を比較検討することにより、日本国内でマラリアが再興しないための蚊サーベイランスのあり方について考察した。

B. 研究方法

韓国におけるマラリア対策の進捗状況は、韓国保健院の対策担当からの情報提供や、メディア報道をもとに分析した。マラリア発生数は、同院

がインターネットホームページ (DisWeb) 上で公開している数をもとに算定した。

台湾のマラリア発生状況と対策の概要については、台湾疾病管制局 (CDC) が発刊している月報から情報を得るとともに、加來、高橋の2名が、平成13年8月15日 - 18日に台湾を直接訪問し、同国の検疫システムの概要と蚊サーベイランスの実態について情報を収集した。

日本のマラリア媒介蚊対策については、かつて戦争マラリア (熱帯熱マラリア) を経験した八重山地区 (石垣島) での蚊サーベイランスの現状について、平成13年7月23日 - 24日に、加來が八重山保健所を直接訪問して資料収集した。日本の検疫所における蚊サーベイランスの現状については、検疫所業務年報の資料を分析するとともに、加來が平成13年7月18日 - 19日に関西空港検疫所を直接訪問して情報収集した。検疫所が所在する地区の所轄保健所における蚊サーベイランス事業の有無については、担当への電話によるインタビューを行い、必要な情報の収集を行った。

C. 研究結果

1. 韓国でのマラリア対策の進捗状況

(1) 2001年度のマラリア対策計画

韓国では、1993年に京畿道の非武装地域 (DMZ) で勤務する韓国陸軍兵士1名が発症したことを機に、三日熱マラリアが再興するようになり、2000年には年間4000を超える患者が報告され

るようになった。昨年度の調査の結果、マラリア流行の特徴として、①マラリア媒介蚊がDMZを越えて北朝鮮から侵入している可能性が高い、②マラリア患者は、DMZ周辺での軍務経験がある (退役) 軍人か、生活歴・旅行歴のある一般人が殆どである、③近年マラリア患者に占める一般人の割合が急増している、④潜伏期が数ヶ月に及ぶことがあるため、DMZ周辺の流行地を離れた場所で発病することがある、⑤流行の中心が京畿道周辺から朝鮮半島の内陸部 (江原道) と西海岸部 (仁川市) へ移動している、⑥流行地以外での小規模なマラリア伝播が起こっている可能性があること等が判明している。(文献1)

韓国保健院は2001年度に行うマラリア対策として、①マラリア流行地を指定 (年間発生率が10万人対10を越える地域) して、集中的に予算・人員を割当てる、②媒介蚊コントロール計画を積極的に展開して、地域の特性に応じた個別のガイドラインを作成、効果的な成虫・幼虫の殺虫要領を提示、媒介蚊コントロール対策責任者へ教育・訓練を実施する、③軍と韓国保健院が退役軍人の予防内服の完了率をあげることにについて緊密な連携を図る、④北朝鮮との協力関係を構築して情報交換や民間レベルでの交流・研究ネットワークの確立を図ること等を計画した。

特に北朝鮮保健省が、マラリアの予防と根絶のために国際赤十字連盟 (IFRC) に対して、治療薬と健康教育

訓練に関する支援を要請したこと、IFRC が北朝鮮保健省の資料を引用し、2000 年の 1 年間に北朝鮮で発生したマラリア患者数が 10 万人に及ぶと報告したこと、IFRC が平安南北道と慈江道、開城など北朝鮮の 4 地域の 47 郡でのマラリア予防や撲滅計画案を作成し、必要となるマラリア治療剤支援を世界保健機関(WHO)ジュネーブ本部に要求したことに関連して、韓国政府は、資金援助と物資(蚊帳)援助を南北協力基金を通じて実施した。

(2) 蚊サーベイランスと情報還元

韓国では、①2001 年 5 月-6 月に日照が続いたため水田地域で幼虫が成育しにくかったこと、②梅雨期に降水量が増加し幼虫が定着しにくかったこと、③防疫事業が功を奏したことの理由のために、7 月第 1 週までは蚊の発生密度が低調となっていた。しかしながら韓国保健院は、7 月第 2 週からはシナハマダラカの密度が増加傾向にあるとのサーベイランスデータから、7 月 20 日に全国 17 のマラリア流行地である市・郡・区の一般住民に対して、「外出時には白い長袖、長ズボンを着用すること。」「キャンプ場での虫除けに留意して蚊に刺されないようにすること。」等の注意を呼びかけた。

(3) 2001 年のマラリア発生状況

2001 年におけるマラリア発生数(1 月-11 月)は 1861 例となり、2000 年の 4142 例の 55%減となった。(図 1) このことは、1 月-6 月までの発生数が 1999 年、2000 年の同時期の発生数

に比して半数以下となっていること、7 月以降の本格的なマラリア流行期に患者数が押さえられたことに繋がっていることが示唆され、2001 年に計画された総合マラリア対策が効果的であったと言える。

2. 台湾でのマラリア対策

(1) 台湾の感染症予防法と感染症サーベイランスシステム

台湾では 1999 年 6 月に伝染病対策法(1944 年制定)が改正され、報告対象疾患が 13 疾患から、1 類から 3 類感染症までの 3 群に分類された 37 疾患に変更された。感染症をその感染力と罹患した場合の重篤性による総合的な危険性を考慮し、行政の執るべき対応・措置に着眼した分類となっている。感染症の類型は、1 類感染症(5 疾患)が患者の即時報告と強制隔離が必要となる疾患、2 類感染症(9 疾患)が患者の 24 時間以内の報告が必要となる疾患で、うち強制隔離が必要となる疾患が亜分類 A(6 疾患)で隔離を勧告すべき疾患が亜分類 B(3 疾患)、3 類感染症(23 疾患)が隔離を必要としないが、24 時間以内の報告が必要となる疾患が亜分類 A(6 疾患)で 1 週間以内の報告が必要となる疾患が亜分類 B(17 疾患)となっている。

また 1999 年 3 月から 9 月にかけて感染症対策に関連するさまざまなガイドラインが整備されるとともに、7 月には全国の検疫組織(National Quarantine Service)や国立予防医学研究所(National Institute of Preventive Medicine)等の組織を統

合し、行政院衛生署に疾病管制局 (Center for Disease Control: CDC) を設置するなどの組織改革も行なわれた。台湾のマラリア対策の現状

台湾の土着マラリアは、1965年にWHOによる撲滅宣言を受けているが、亜熱帯地域のためにマラリアを媒介可能な蚊は常在している。1972年には、輸入熱帯熱マラリア症例から沿岸部における局所的流行が起こったこともあり、蚊のコントロールよりもマラリア患者の把握と対策に力を入れることが重要となった。

現在台湾では、海外からの労働人口の流入、台湾海峡を隔てたヒト物の交流、海外旅行のブームによる輸入感染症が社会問題となっていることから、マラリアはデング熱とともに、3類亜分類Aとして24時間以内の報告が必要となる疾患と位置付けられた。マ

ラリア媒介蚊サーベイランスの実施状況

台湾では、各主要検疫所においてCDCの協力を得て、侵入動物・ベクターのサーベイランスを実施している。しかしその主眼は、海港検疫所におけるペスト及びハンタウイルス感染症対策としての鼠族サーベイランスであり、蚊サーベイランスはオビトラップによる生態調査を行っているに過ぎず病原体調査は研究レベルに留まっていた。

3. 日本でのマラリア対策

(1) 八重山のマラリア

ア 八重山のマラリアの歴史

八重山には1530年頃、オランダ商

船によりマラリアが持ち込まれた後に土着化したことが記載されている。(文献2)その後、三浦守治博士らによって1894-1895年に、八重山のマラリアが三日熱、四日熱、熱帯熱マラリアであることが初めて確認された。

第2次世界大戦末期の1945年6月にマラリア有病地へ強制移住させられた住民が熱帯熱マラリア(患者数16,884名、死亡者数3,647名)を罹患し戦争マラリアと呼称されている。しかしながら、戦後にマラリア対策が進み1950年には患者数35名(死亡0名)にまで減少した。

また1952年には、沖縄本島での在日米軍施設整備に伴い八重山へ入植した住民が、三日熱マラリアに罹患し移入マラリアと呼称されている。

1957年-1960年にかけて、米国民政府のマラリア対策責任者であるウィラーによる指導によって、①DDT屋内残留散布、②原虫対策(患者早期発見と面前投薬、予防内服)、③地域住民の理解と協力、④資金、資材、教育、組織活動等が行われ、八重山におけるマラリア対策が本格化された。1961年ついに、西表島の5例を最後に土着マラリアは撲滅されるに至った。

イ 八重山の現状と問題点

最近沖縄県では、国際自由貿易圏構想が議論されており、空路・海路による大量のヒトや物の行き来が予測されている。八重山地区は、①台湾と同様、亜熱帯地域に属しており、熱帯熱マラリアを媒介できるコガタハマダラカと三日熱マラリアを媒介できる

シナハマダラカが生息していることが知られていること、②かつての八重山のマラリア惨禍を考慮すると輸入マラリア患者が土着の蚊を感染させる可能性があること、③空海港にマラリア感染蚊が侵入した後に定着する可能性があることなどが懸念されている。このような状況下で、八重山保健所では、1998年から蚊サーベイランスを実施して、蚊の種別毎の地理的分布、季節的な変動について検討するとともに、「八重山地域のマラリア媒介蚊生息状況調査会議」、「移入感染症対策協議会」を実施して、大学の専門家、沖縄県の行政担当者、医療機関関係者等による情報交換を行っている。

また、2001年に「八重山地域住民のマラリアに関する意識調査」が実施され、その結果5,823名中1665名(28.6%)がマラリア罹患歴を有しており、その60%以上が70歳以上の高齢者となっていることが判明した。そこで八重山のマラリアを風化させないための教育啓蒙の一環として、「マラリア体験の継承」が行われている。

しかしながら、①蚊サーベイランス事業は、3年計画で実施された厚生科学研究の一環として行われており、保健所業務としての位置付けが不明確であること、②衛生昆虫専門家の確保が困難であることなどが問題点として挙げられている。また、③患者早期発見のための検疫のあり方検討、④発生時の離島間の緊急患者搬送体制、⑤診断及び治療体制について未整備であるなどの問題点も指摘されている。

(2) 検疫所と自治体における蚊サーベイランス

ア 検疫所での蚊サーベイランス

主要空海港検疫所(図2)での蚊サーベイランスの結果は、検疫所業務年報において実施延日数、種別(ハマダラカ/シマカ)、捕獲方法(柄杓、オビトラップ、ライトトラップ)が報告されている。平成11年度には、31の検疫所・支所(空港区域10カ所、陸域内21カ所)で蚊サーベイランスが行われており、延日数が1-12日である検疫所は17カ所(55%)、13-24日は6カ所(19%)、25日以上は8カ所(26%)であった。その中で延日数が多かった検疫所は、成田空港検疫所164日、関西空港検疫所79日、横浜検疫所50日であった(表1)。この中でハマダラカが確認できた検疫所は、仙台空港検疫所、成田空港検疫所、関西空港検疫所、広島空港検疫所、東京検疫所鹿島出張所の5カ所であった。

イ 関西空港検疫所での取り組み

関西空港検疫所衛生課では、課長以下5名(技官3名、事務官2名)が港湾衛生管理業務の一環(衛生害虫調査及び改善措置)として、成虫及び幼虫の蚊サーベイランスに携わっている。成虫蚊サーベイランスとしては、①トラップを用いて捕虫(ライトトラップ、炭酸ガストラップ、電撃式トラップ:2回/月)、②機内及びコンテナ内の蚊を捕虫(アフリカからの航空機は努めて全機に実施:2回/月×4-5機/回)を行っている。また幼虫サーベイランスとしては、①オビトラップ(空港施

設内 20 ヶ所に設置) の利用、② 柄杓による捕獲(滑走路周辺の水溜り、建物周囲の溝) を実施している。これらのサーベイランスの結果から、2000 年には、空港地区に土着していない熱帯イエカ(フィラリア症を媒介)が確認されたことが新聞で取り上げられ、侵入ベクターによる疾病の伝播が危惧された。さらに航空機やコンテナによって空港に浸入してくる蚊が近隣地域に与える影響を調査するために、空港対岸地区(泉佐野)の水田・溪流における蚊の生息状況の調査も行われているが、研究レベルに留まっている。関西空港検疫所における問題点として、①衛生課の技術職員が不足している、②政令区域内でオビトラップを長期設置することが蚊の発生源となる可能性がある、③サーベイランス結果の情報還元は、原則として「検疫所業務年報」において成果報告として行われているにすぎず、情報の解析に基づいて行政対応(予算・編成事業への反映)がなされることには使われていない、④近隣の自治体等への情報提供は行われていない等が挙げられる。

ウ 自治体での取り組み

主要空海港検疫所が所在する自治体での蚊サーベイランス実施状況は、電話によるアンケートの結果、31 自治体のうち 1 ヶ所(神奈川県川崎市)で行っているにすぎないことが判明した。

川崎市では、伝染病予防法下における日本脳炎対策の一環として、1972 年からライトトラップによる成虫捕獲が行われており、1999 年 4 月以降の

感染症法施行後も継続されていた。蚊サーベイランスの実施要領は、川崎市衛生研究所の 4 月 - 11 月の毎週水曜日に、8 ヶ所の定点(羽田空港周辺を含む)で捕獲した蚊を収集し、種別分類を行っている。1999 年と 2000 年の結果によると、マラリアを媒介可能な蚊としてシナハマダラカが、8 月に麻生区から捕獲されている(図 3)。ただしこれらの結果は、年報による情報還元が行われているにすぎず、近傍の検疫所である川崎検疫所、東京空港検疫所、横浜検疫所への情報提供はなされていなかった。

D. 考察

韓国、台湾、八重山におけるマラリア媒介可能蚊の対策は、それぞれの地域での歴史的背景、流行状態、媒介可能蚊の生息状況などを考慮して実施されていた。三日熱マラリアが再興している韓国では、土着シナハマダラカのコントロールのみならず、国境を越えて侵入してくる感染蚊対策が必要となり、非政府組織を通じた北朝鮮支援事業が展開されている。その一方で、亜熱帯地域に属しており、熱帯熱マラリアの媒介可能蚊である小型ハマダラカが生息している台湾と八重山においては、現在マラリアが流行していないこともありともに蚊のコントロールは行われていないが、そのマラリア対策には差が生じている。すなわち台湾では、マラリア患者の把握と対策が重要との考え方から、患者の 24 時間以内の報告体制が図られていた。ま

た、八重山では、過去のマラリア惨禍を風化させないこと、沖縄の国際自由貿易化への対策として、蚊サーベイランス(種、地理的分布、季節的変動)について調査研究が行われていた。

また、マラリアの総合対策のためには多機関間の連携が重要である。韓国では、流行地で勤務した軍人が兵役終了後にマラリアを発症するのを防ぐために、予防内服完了率を上昇させることに関して軍と韓国保健院とが連携を図っていた。台湾では、検疫所が保健当局と組織改編により機能強化されていた。八重山では、保健所の行っている蚊の生息状況の調査に関して地方衛生研究所、大学、衛生昆虫学者が協力していた。さらに、蚊のサーベイランスを強化させる事とその情報を適時適切に還元することが、マラリア患者発生減少に繋がっていることが、2001年の韓国での事例で判明した。

日本国内におけるマラリア媒介蚊サーベイランスは、上記八重山以外の地域では、侵入ベクター対策の一環として主要検疫所・支所において実施されている。しかしながら本研究を通じて、(1)検疫所ごとに実施期間や要領が異なっている、(2)検疫所同士の連携や技術協力が行われていない、(3)周辺の自治体との交流がない、(4)サーベイランス情報が適時適切に還元されていない等の問題点が浮き彫りになったと言えよう。また、韓国及び台湾の保健当局者と意見交換を行った際に、それぞれ国立感染症研究所と

恒常的な感染症情報ネットワークを構築して、国際感染症対策に活用したいとの意見があった。特に2002年にワールドカップサッカーが日韓共同で開催されることもあり、主要空海港検疫所での蚊サーベイランス事業は、韓国各地でのマラリア患者発生状況と蚊サーベイランス結果とを考慮して強化されるべきであろう。台湾と沖縄県は、地理的気候的な共通点とマラリア媒介蚊の類似性とから、国立感染症研究所が両者の掛け橋となって共同の対策を講じることも必要となるであろう。そのためにも沖縄県では、感染症法の規定以外にマラリアに対する特別な対策が必要になると思われる。

E. 提言

本研究を通じて、日本におけるマラリア対策として以下の提言をまとめることができた。

- (1)日本の主要検疫所における蚊サーベイランスは、マラリア流行の歴史、危険性、媒介可能蚊の生息状況に応じた指針を作成して対応を強化するとともに、適時適切に情報を還元すべきである。(情報還元を行政対応に結びつける努力が必要)
- (2)専門家不足に対しては民間活用を考慮する必要がある。
- (3)検疫所と周辺自治体(保健所)との連携は日常的にすべきである。
- (4)国立感染症研究所は、国の試験研究機関として蚊サーベイランスに関する技術協力を強化する一方で、国の

サーベイランス当局として海外との連携による情報収集に勤めるなどの中心的な役割を果たすべきである。

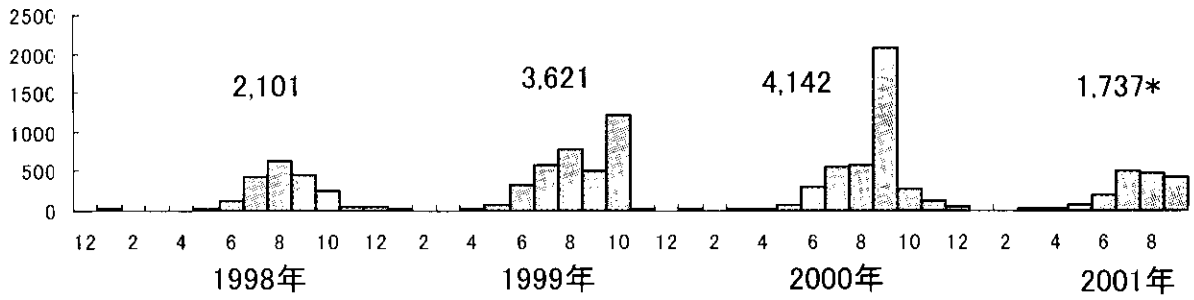
F. 文献

- 1) 高橋央、加來浩器；韓国における侵入動物及び侵入ベクターに対するサーベイランスシステムの現状と三日熱マラリア流行に関する取り組みについて、129 - 152、厚生科学研究費、生活安全総合研究事業、平成 12 年度研究成果報告書
- 2) 八重山保健所；沖縄県八重山地区におけるマラリア有病状況の推移について、1 - 3、1998. 9. 21

G. 図表

- 図 1 韓国における三日熱マラリア発生状況（1998 年－2001 年）
- 図 2 全国の主要空海港検疫所
- 図 3 神奈川県川崎市における蚊サーベイランス結果
- 表 1 平成 11 年度の主要検疫所・支所及び周辺自治体における蚊サーベイランスの実施状況(年間延日数)

図1 韓国における三日熱マラリア発生状況 (1998年-2001)



* :2001年は1月-9月までの合計。1月-6月までの発生数が1999年、2000年の同時期の発生数に比して半数以下となっており、結果的に8月-9月の発生増加を抑えることに繋がっている。

図2 調査した全国の主要空海港検疫所



- : 空港検疫所
- : 海港検疫所

図3 神奈川県川崎市における蚊サーベイランス結果
(1999年 - 2000年)

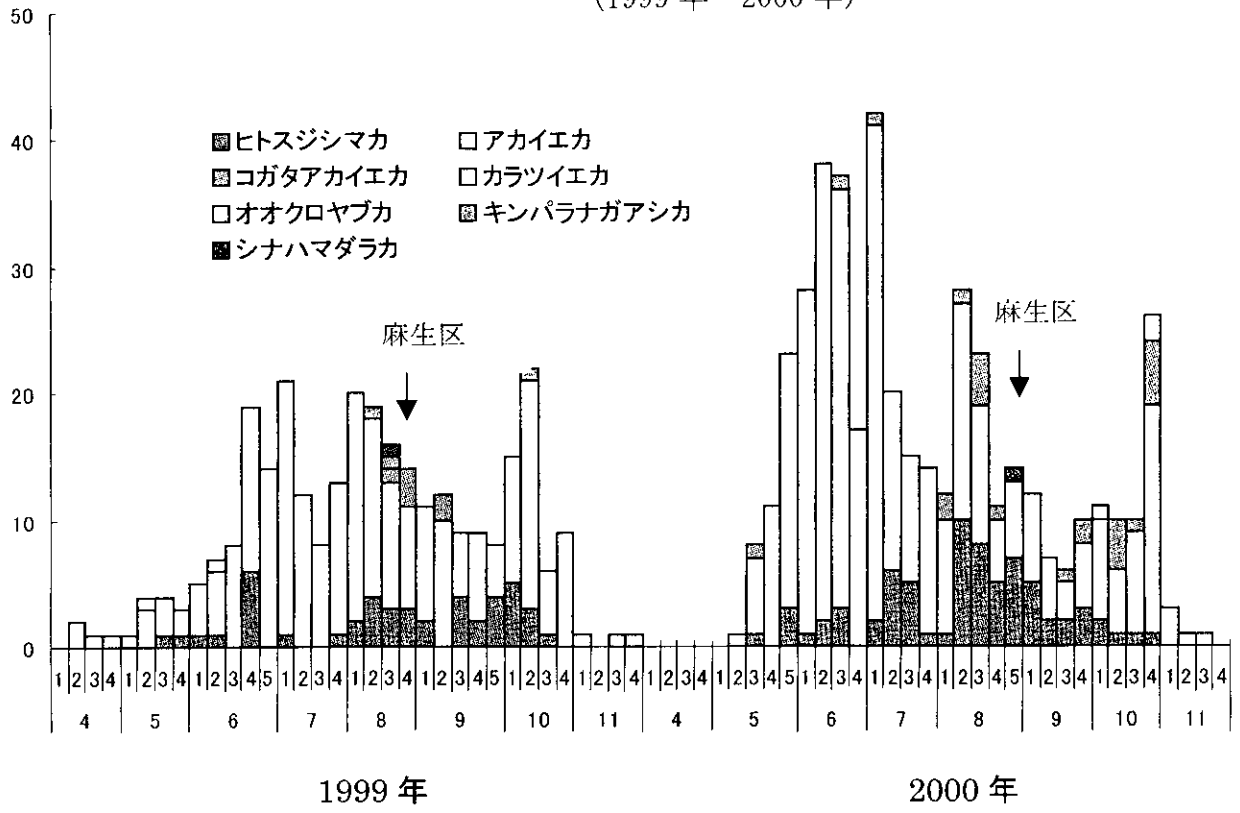


表1 平成11年度の主要検疫所・支所及び周辺自治体における蚊サーベイランスの実施状況(年間延日数)

検疫所	蚊サーベイランス	所轄保健所・研究所	蚊サーベイランス
千歳空港	9	北海道衛生研究所	×
小樽検疫所	2	小樽保健所	×
函館検疫所		函館保健所	×
仙台検疫所	11	宮城県衛生研究所	×
仙台空港	12		
成田空港検疫所	164	千葉県衛生研究所	×
		佐倉保健所	×
東京検疫所	31	東京都衛生研究所	×
鹿島	8		
千葉	8	千葉県衛生研究所	×
横須賀	24	神奈川県衛生研究所	×
川崎	32	川崎市衛生研究所	34
東京空港	21		
横浜検疫所	50	横浜市衛生研究所	×
新潟検疫所	8	新潟県環境衛生研究所	×
		新潟市衛生試験所	×
名古屋検疫所		愛知県衛生研究所	×
		名古屋市衛生研究所	×
清水	11		
四日市	10		
大阪検疫所	12	大阪府立公衆衛生研究所	×
関西空港検疫所	79	泉佐野保健所	×
神戸検疫所	32	神戸市保健所	×
広島検疫所	2	広島市衛生研究所	×
広島空港	18		
松山空港	2		
松山	9		
福岡検疫所	10	福岡市保健環境研究所	×
福岡空港	51		
門司	6		
三池	1		
唐津	1		
長崎検疫所		長崎県公害衛生研究所	×
長崎空港	2		
鹿児島検疫所	×	鹿児島県保健衛生研究所	×
那覇検疫所	18	沖縄県衛生環境研究所	×
那覇空港	19		

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）
分担研究報告書

侵入動物及び侵入ベクターに対するサーベイランス・システムの構築に関する研究－海外の現状と、日本の検疫所業務の現状と課題との比較・解析

分担研究者：高橋 央（国立感染症研究所感染症情報センター）

協力研究者：田中 毅（国立感染症研究所感染症情報センター、実地疫学専門家養成コース）

研究要旨：

厚生科学研究（生活安全総合研究）「侵入動物及び侵入ベクターに対するサーベイランス・システムの構築に関する研究」の一環として、平成11年度は10カ国にベクターサーベイランスの現状についてのアンケートを送付して解析し、12年度は回答が得られた国の中から、ニュージーランド、シンガポール、ドイツを訪問してベクターサーベイランスの現状を調査した。13年度は、海外で得られたサーベイランスの情報を、日本の現状と比較することにより、この研究の最終の提言を作成することを目的にした。具体的には、13年7月から9月の間に、国内の6検疫所、4検疫所支所を訪問して現場視察と資料収集を行なった。同時に、検疫所業務の推移、効率を数値化するため、平成2、7、12年の検疫所業務概況を解析した。

各検疫所での衛生調査、特に蚊族、ねずみ族調査を観察した結果、定点を設定して、生息の基線を把握し、異常が認められた場合、監視を強化して駆除するというサーベイランスの原則に則って調査を行ない、かつ捕獲効率を上げる工夫がなされていた検疫所があった。またマダニサーベイランス、コンテナ調査の実行に取り組んでいる状況も把握できた。しかし、これらはむしろ例外的であり、港湾衛生業務実施要領の解釈は多様で、検疫所全体として評価可能な、均一な結果が得られているとは言えなかった。また、衛生課職員の不足、政令区域指定の矛盾など様々な問題点が認められた。

また、検疫所業務概況の解析を行なったところ、検疫課、食品監視課職員の業務負担は変化が見られないものの、衛生課は衛生調査の対象面積と実施面積に大きな乖離が認められた。また平成11、12年の輸入コレラ、細菌性赤痢の検疫所での検出率を解析したところ、現行のボーダー検疫では万全でないことが認められた。

以上の結果から判明したわが国の検疫の問題点は以下のように列挙できた。

- 1) 衛生課人員の不足
- 2) ボーダーの検疫のみでは不十分
- 3) 着岸、着陸可能な空海港が過分散
- 4) 自治体との連携・協力の欠如
- 5) 動検、植防との連携・協力の欠如

以上の問題点を、平成11、12年度に、海外で得られた情報と比較検討して、最終報告書に提言を作成する。