

## 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

#### 2005 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 西村聖美、古川徹也、河合誠義

（成田空港検疫所）

伊藤美佳子、小滝 徹、原田文植、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・中南米を中心として世界的規模で熱帯・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、極めて重要な感染症になっている。わが国では過去 60 年間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、我々の開発したリアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) によるウイルス遺伝子検出とウイルス分離および IgM-捕捉 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。2005 年は、東南アジアを中心にデング熱流行が大きく、日本人の海外渡航者も多かったことを反映して、本研究グループで診断したデングウイルス感染症は、55 例であり、感染症法に基づいた届出数は 71 件のにのぼった。また、スリランカでデング熱に感染した日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。さらに、インドネシアスマトラ島沖地震による津波災害に関連して、我々は 3 月に再び発生したスマトラ島近海のニアス島地震の被災地（ニアス島）で感染したデング熱患者から、ウイルスを分離することに成功した。このウイルスは、デングウイルス 2 型であり、2004 年に成田空港検疫所でインドネシア、ジャカルタからの輸入症例から分離されたデングウイルス 2 型と塩基配列において 98.5%という高いホモロジー相同性を示した。我々のサーベイランス事業が、厚生行政だけでなく国際貢献の面でも有用であることを示した。

#### A. 研究目的

デングウイルス感染症はわが国では過去 60 年間国内感染のない感染症であるが、熱帯・亜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け出制となり、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重要となった。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 Dengue ウイルス (1 型:Hawaii, 2 型:New Guinea C, 3 型:H87, 4 型:H241) と患者検体からの分離株を蚊由来細胞 C6/36 株で増殖させた培養上清を用いた。リアルタイム RT-PCR は伊藤ら (J. Clin. Microbiol. 42(12):5935-5937, 2004) の方法により実施した。分離ウイルスは Vero 細胞によるプラーク法、PCR 産物による遺伝子解析法で確認した。血清での抗体検査には IgM-捕捉 ELISA kit (Focus 社, CA, USA) および IgG-ELISA kit (PanBio 社) により IgM および IgG 抗体を測定した。また、Dengue 出血熱による死亡例においては、肝臓、肺、腎臓、脾臓など剖検材料からのウイルス遺伝子検出およびウイルス分離を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 輸入 Dengue 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、Dengue 感染症検査を実施した総数は 109 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、11 症例で Dengue ウイルス遺伝子陽性であった。そのうち 4 型ウイルス 4 例、1 型ウイルス 4 例、3 型ウイルス 3 例であった。

#### 2) 国内医療機関からの依頼検査成績

国内医療機関からの Dengue ウイルス

感染に関する検査依頼件数は、2005 年は 71 件であった。このうち、Dengue ウイルス感染が確認された症例は 43 例で、そのうち Dengue ウイルス 3 型が 13 例、1 型が 8 例、2 型が 5 例、病原体診断ができずに血清診断によって診断された症例が 13 例であった。男女比は男性 31、女性 12 例であった (図 2)。年齢別には、30 歳代が 16 例と最も多く、20 代が 10 例、40 代が 7 例であった (図 3)。また、10 代 1 例・10 歳以下 2 例と小児の Dengue 熱輸入症例も確認された。50 代の 3 例中には、スリランカで Dengue 熱に感染した日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。患者は、発病後 18 日目に死亡し、その剖検肝臓組織から Dengue ウイルス遺伝子を検出した。また、インドネシアスマトラ島沖地震による津波災害に関連して、我々は 3 月に再び発生したスマトラ島近海のニアス島地震の被災地 (ニアス島) で感染した Dengue 熱患者から、ウイルスを分離することに成功した。このウイルスは、Dengue ウイルス 2 型であり、2004 年に成田空港検疫所でインドネシア、ジャカルタからの輸入症例から分離された Dengue ウイルス 2 型 (GenBank No. AB180478) と塩基配列において 98.5% という高いホモロジー相同性を示した。

## 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

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、ウイルス血症が存在す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 捕捉 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を組み合わせることにより、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。

近年、わが国の輸入 Dengue 感染症は増加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、その実数は正確には把握できていない。感染患者の大半はインドネシア、フィリピン、タイ、シンガポール、マレーシアなど東南アジアからの帰国者であるが、本年は津波被害の影響もあり、タイからの輸入症例は少なく、バンラディッシュ、スリランカ、インドなど南アジアからの帰国者からも陽性例が 10 例検出されており、今後、東南アジアからだけでなく、南アジアからの帰国者の Dengue 熱の増加が懸念される。

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

近年、輸入 Dengue 症例は確実に増加傾向にあり、重症例も発生しており、本年は死亡例も発生した。また、インドネシアスマ

トラ島沖地震による津波災害に関連して、我々は 3 月に再び発生したスマトラ島近海のニアス島地震の被災地（ニアス島）で感染した Dengue 熱患者から、ウイルスを分離することに成功した。その分離ウイルスは、Dengue ウイルス 2 型であり、2004 年に成田空港検疫所でインドネシア、ジャカルタからの輸入症例から分離された Dengue ウイルス 2 型と塩基配列において 98.5% という高いホモロジー相同性を示し、我々のサーベイランス事業が、厚生行政だけでなく国際貢献の面でも有用であることが示唆された。今後は成田空港検疫所など主要国際空港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、また国内の医療機関に Dengue 熱の診断が日本国内で可能であることを周知することが望まれる。

## F. 健康危険情報

スリランカで Dengue 熱に感染した日本人が、現地で出血熱に陥り日本に帰国入院後、死亡した症例があった。本症例では、発病後 18 日目に死亡し、その剖検肝臓組織から Dengue ウイルス遺伝子を検出した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tajima S, Nukui Y, Ito M, Takasaki T, Kurane I. Nineteen nucleotides in the variable region of 3' non-translated region are dispensable for the replication of dengue type 1 virus in vitro. *Virus research*. 116:38-44(2006)

Nawa M, Takasaki T, Ito M, Inoue S, Morita K, Kurane I. Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection. Clin. Diag. Lab. Immunol. 12(10) 1235-1237. (2005)

鳥居明子、月館幸一、原田勝代、高崎智彦。来日後にデング出血熱を発症した4歳男児例。日本小児科学会雑誌。109(9) 1127-1131 (2005)

Yoko Nukui, Shigeru Tajima, Akira Kotaki, Mikako Ito, Tomohiko Takasaki, Kazuhiko Koike, Ichiro Kurane. Novel dengue virus type 1 with a 29-nucleotide deletion in the 3'NCR isolated from a traveler to Yap state, Micronesia, in 2004. Emerg. Infect. Dis. 12(2) 343-346 (2006)

## 2. 学会発表

西川由紀、武井秀信、長田陽介、小林和郎、徳永毅、湊志仁、椎貝達夫、竹内章、高崎智彦。肝障害を合併したデング熱の一例。第527回日本内科学会関東地方会例会（東京）2005年6月

Tajima Sigeru, Yoko Nukui, Takasaki Tomohiko, Ichiro Kurane. Identification and characterization of deletion in the variable region located in 3' non-translated region of dengue type 1 virus. 2<sup>nd</sup> Asian regional dengue research network meeting. (Singapore) 2005/September 28-30.

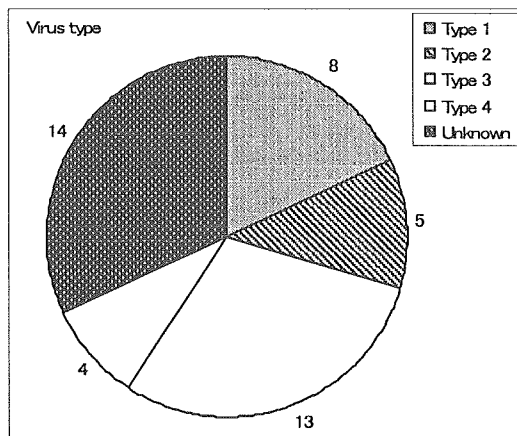
町田早苗、名和優、高崎智彦、倉根一郎。マウス樹状細胞におけるデングウイルス感染機構の解析。第53回日本ウイルス学会（横浜）2005年11月

伊藤美佳子、高崎智彦、田島茂、林昌宏、根路銘令子、倉根一郎。東チモールにおけるデング熱/出血熱流行に関する系統学的血清学的解析。第53回日本ウイルス学会（横浜）2005年11月

濱野正敬、田島茂、伊藤美佳子、小滝徹、高崎智彦、倉根一郎。小動物を用いたデングウイルス実験感染モデルの構築。第53回日本ウイルス学会（横浜）2005年11月

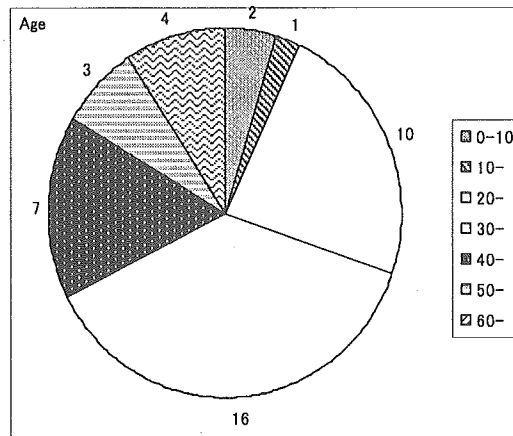
田島茂、高崎智彦、倉根一郎。デング1型ウイルス3'非翻訳領域内 variable 領域の機能解析。第53回日本ウイルス学会（横浜）2005年11月

図 1. 分離ウイルス型別



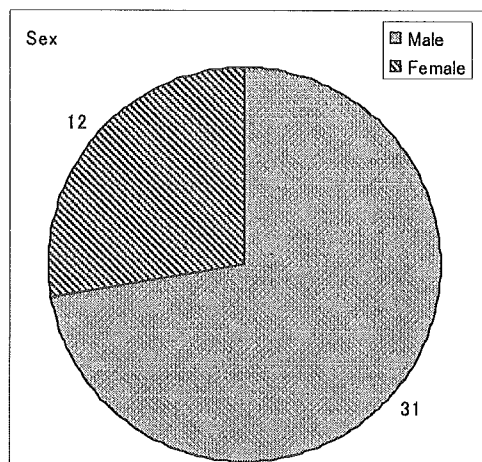
東南アジアで 4 型ウイルスが分離される傾向がある。

図 3. 患者年齢分布



30歳代が16例と最も多く、20代が10例、40代が7例であった。

図 2. デング患者性別



男女比で、女性より男性が多い。

表 1 渡航国別表

国名	患者数
Indonesia	12
Singapore	5
Philippines	5
Bangladesh	5
SriLanka	3
Malaysia	2
India	2
Myanmar	1
Cambodia	1
Thailand	1
Viet Nam	1
Thailand-Cambodia	1
Malaysia-Thailand	1
Thailand-India	1
Thailand-Bangladesh	1
Thailand-India	1
C.America	1

## 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

#### 我が国における日本脳炎ウイルスサーベイランス（2005）

分担研究者 倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
協力研究者 根路銘令子、田島 茂、小滝 徹、伊藤美佳子、田島茂、  
林 昌宏、高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）  
吉住秀隆、小川知子（千葉県衛生研究所）  
田部井由紀子（東京都健康安全研究センター）  
尾西 一（石川県保健環境センター）  
細谷佳行（静岡県西部食肉衛生検査所）  
足立 聡（静岡県環境衛生科学研究所）  
杉山 明（三重県科学技術振興センター保健環境研究部）  
多田芽生（香川県環境保健研究センター）  
桑山 勝（広島県保健環境センター）  
原田誠也（熊本県保健環境科学研究所）  
糸数清正（沖縄県衛生環境研究所）

#### 研究要旨

1990年以降、日本脳炎患者の発生は、毎年10人以下であるが、2001年には和歌山県で11年ぶりに患者が発生し、2002年には13年ぶりに広島県で患者が発生している。ブタの抗体調査によれば、依然として関東以西のブタの間では、日本脳炎ウイルスは蔓延している。我々は2002年春より「日本脳炎ワクチンの有効性評価」を狙いの一つとして、都県地方衛生研究所との共同研究の形で、ブタにおける「日本脳炎ウイルスサーベイランス」を開始し、本年度も上記10都県の11施設で実施した。近年アジア諸国では、我々が今回のブタ血清から分離したウイルスと同様に、抗原性や遺伝子型でワクチン株（3型）と異なったウイルス（1型）が多数分離されているが、この中にマウスに対して高い病原性を示すウイルス株が確認された。三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウイルス2株（Sw/Mie/34/2004, Sw/Mie/40/2004）が、E領域の塩基配列上異なるウイルスであった。また、香川県の分離株で3' NCR領域のVariable領域に新たな欠損領域を有するウイルスが確認された。2005年は沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、東京都のブタから10都県あわせて31株の日本脳炎ウイルスが分離され、日本脳炎ウイルスの活動が非常に活発であった。

#### A. 研究目的

日本脳炎ウイルスは、毎年夏期になると九州、四国地方からブタの間で流行し始め、近

畿・東海・北陸・関東地方へと侵淫地域を拡大する。しかし、三重県や静岡県は比較的早期に日本脳炎ウイルスの流行が始まり、年によっては三重県が九州や四国に先行することもある。近年の日本脳炎患者の発生数は10人以下であるが、依然としてブタの間では夏期にウイルスが蔓延しているのが、現状である。

現行日本脳炎ワクチンは「マウス脳由来不活化ワクチン」であり、国際的に認められている唯一の日本脳炎ワクチンである。また、現行ワクチン株 (Beijing-1 株) は、1949 年に中国北京市でヒトから分離された日本脳炎ウイルスで、日本では 1989 年接種のワクチンより、それまでの Nakayama-NIH 株から、免疫性が高く、抗原性が野外分離株により近いとされる Beijing-1 株に変更になり、以来 17 年が経過している。現行ワクチンの開発国である我が国は、その有効性についても責任が大きいものとする。そこで我々は、2002 年春より「日本脳炎ワクチンの有効性評価」を狙いの一つとして、12 都県地方衛生研究所等との共同研究の形で、ブタにおける「日本脳炎ウイルスサーベイランス」を開始した。日本脳炎ウイルスを分離しその分子疫学的解析を実施した結果、ブタから分離されたウイルスは、ワクチン株と異なり遺伝子型 1 型であった。近年アジア諸国では、我々が今回 2002 年のブタ血清から分離したウイルスと同様に、抗原性や遺伝子型でワクチン株から大きく変異したウイルスが多数分離されている。本研究において我々は、新しくブタから分離されたウイルスを抗原的、遺伝学的並びに進化学的に解析するだけでなく、その病原性をマウスにおける中枢神経毒性および中枢神経侵入性の面から調査し、ワクチン株との比較を試みた。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス分離

#### 分離ブタ血清の採取法

日本脳炎ウイルス IgM 抗体が陽性となった時点より、1 週ないし 2 週前のブタ血清をウイルス分離材料として用いた。

#### ウイルス分離法

分離は株化細胞による分離法を主として用いた。各施設で、乳のみマウス脳内接種法が得意な場合は、マウスによる分離を実施した。使用した細胞は Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) および C6/36 細胞 (ヒトスジシマカ由来) を用いた。

#### 遺伝子解析

分離したウイルスのうち、増殖の良いものから、E 領域と 3' NCR 領域に設定した 5 つのプライマーペアを用いて RT-PCR 法により遺伝子を増幅し、ABI prism Avant 3100 遺伝子解析装置を用いて E 領域の遺伝子解析を実施した。

#### 分離ウイルスの病原性解析

2004 年分離ウイルスの病原性を調べるために、生後 3 週令のマウスにウイルスを腹腔接種および脳内接種し、発病の有無を 3 週間観察し、その病原性を解析した。

## C. 研究結果

### ブタ血清からの日本脳炎ウイルス分離 (2005 年)

本年は 10 都県のブタ血清から日本脳炎ウイルス複数株が分離された。沖縄県、熊本県、高知県、香川県、広島県、三重県、石川県、静岡県、千葉県、東京都のブタからであり、表 1 に示す如く、10 都県あわせて 31 株の日本脳炎ウイルスが分離された。なお、現在も分離中のものも数株存在する。

#### 2004 年分離日本脳炎ウイルスの遺伝子解析

2004 年の分離ウイルス株の遺伝子解析を実施したところ、いずれも遺伝子型 1 型ウイルスであった。2004 年の分離株で特記すべきことは、三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウイルス 2 株 (Sw/Mie/34/2004, Sw/Mie/40/2004) が、E 領域の塩基配列上異なるウイルスである (ホモロジー 98.3%) ことが、判明した (図 1)。一方、香川県の分離株で 3' NCR 領域の Variable 領域に新たな欠損領域を有することウイルスであった点である (図 2)。

#### 2004 年分離日本脳炎ウイルスの病原性解析 上記三重県の分離ウイルス株 2 株

Mie34(Sw/Mie/34/2004) 、 Mie40 (Sw/Mie/40/2004) に関して、その病原性を検討するために、3週令のマウスに脳内接種したところ、表2の如くLD50を示すウイルス力価が、Mie34が2.12pfu、Mie40が0.25pfuとMie40が有意に高い病原性を示した。さらに神経侵襲性を含めた病原性をみるために、ウイルスを腹腔接種した。この場合も、LD50を示すウイルス力価が、Mie34が3.72pfu、Mie40が2.67pfuとMie40が少ないウイルス量でLD50を示した。

#### D. 考察

本邦における日本脳炎患者数は、1980年代には、20から40例の範囲にとどまっていたが、1990年に11年ぶりに50例を越えた。しかし、1991年の13例の後、1992年以降患者数は10例を越えない。しかしながら、2001年には和歌山県で11年ぶりに患者が発生し、2002年には13年ぶりに広島県で患者が3例発生している。本年度のブタからの日本脳炎ウイルスの分離株は31株であり、国内の日本脳炎ウイルスの活動が活発であったと考えられる。特に2004年には、静岡県、東京都、千葉県では、ブタのHI抗体価の上昇時期も遅くウイルスが分離できなかった。しかし、2005年は静岡県で8株、千葉県で2株、東京都でも2株分離されたことは特筆すべきことである。また、2005年には静岡県で日本脳炎患者は1名報告されており、西日本にくらべて日本脳炎という病気に対して関心が高くない東海、関東で、今後患者発生に注意する必要がある。

また、三重県の2004年の分離株Mie34とMie40は、ともに遺伝子型1型のウイルスであったが、Mie40はマウスに対して高い病原性を示した。その病原性は遺伝子型3型ウイルスである北京株よりも高いものであった。このような病原性の高い日本脳炎ウイルスが分離された翌年(2005年)に、三重県で日本脳炎患者が発生したことは注目すべきであり、今後三重県およびその周辺での日本脳炎患者発生動向に注意する必要があるだろう。

一方、日本脳炎ウイルスの地域性に関して、今までほぼ同一のウイルスが同じ地域で分離されてきたが、2004年の三重県では同じ日に同じ豚舎で分離された日本脳炎ウ

イルス2株が、異なるウイルスであった。このことは、非常に狭い地域においても複数の日本脳炎ウイルスが活動していることが示唆された。また、香川県の分離株で3' NCR領域のVariable領域に新たな欠損領域を有することウイルスであった点で、日本脳炎ウイルスも自然界で、遺伝子レベルでさまざまな変異を起こしていること明らかになった。このことはその病原性や自然界における生態も含めて変化する可能性があることを示唆している。

#### E. 結論

現在ブタの間で主として侵淫しているウイルスは、ワクチン株である北京株の遺伝子型3型と異なり、1型である。しかし、1型の中でも病原性が異なる株が存在する。

同じ豚農場においても異なる日本脳炎ウイルスが活動していることがある。

3' NCR領域に新たな遺伝子欠損のある日本脳炎ウイルスが香川県で確認された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

根路銘令子、高崎智彦. 広範囲血液・尿化学検査・免疫学的検査-日本脳炎ウイルスおよびその他のフラビウイルス. 日本臨床63(増刊号7):313-317(2005)

高崎智彦. 日本の予防接種・海外の予防接種-定期接種対象疾患:日本脳炎ワクチン. 臨床と微生物32(5):461-465(2005)

林昌宏、高崎智彦. フラビウイルス脳炎-ウエストナイルウイルスを中心に-. 臨床病理63(8)721-727(2005)

##### 2. 学会発表

桑山 勝、高崎智彦、伊藤美佳子、高尾信一、島津幸枝、福田伸治、宮崎佳都夫、倉根一郎. 小児髄膜炎患者からの日本脳炎ウイルス遺伝子の検出. 第79回日本感染症



学会（名古屋市）2005年4月

高崎智彦、根路銘令子、桑山 勝、内田陽三、西浦哲雄、松田俊二、倉根一郎、倉橋島におけるウイルス関連血球貪食症候群（virus associated hemophagocytic syndrome: VAHS）症例における日本脳炎抗体。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（箱根）2005年5月

高崎智彦、林 昌宏、濱野正敬、沢辺京子、岸 昇、桑山勝、倉根一郎。中国地方のイノシシにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の検討。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会（箱根）2005年5月

高崎智彦、倉根一郎。無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究。第9回日本ワクチン学会（大阪）2005年10月

高崎智彦、倉根一郎。無血清培地を用いた日本脳炎ワクチンの製造法に関する研究。第9回日本ワクチン学会（大阪）2005年10月

細川隆史、中島秀人、佐藤智彦、藤村智恵子、石田志門、古玉大介、杉野正一、木村文治、花房俊昭、高崎智彦。髄液から日本脳炎ウイルスが検出された無菌性髄膜炎の1例。第10回日本神経感染症学会（東京）2005年10月

石川知弘、田島茂、根路銘令子、桑山勝、高崎智彦、倉根一郎、小西英二。最近の日本脳炎ウイルス分離株に見られる3'-非翻訳領域の欠失が引き起こす培養細胞におけるウイルス増殖抑制。第53回日本ウイルス学会（横浜）2005年11月

表1 平成17年度ブタからの日本脳炎ウイルス分離状況

県名	分離株
沖縄	2
熊本	3
高知	6
香川	3
広島	1
三重	2
石川	2
静岡	8
千葉	2
東京	2

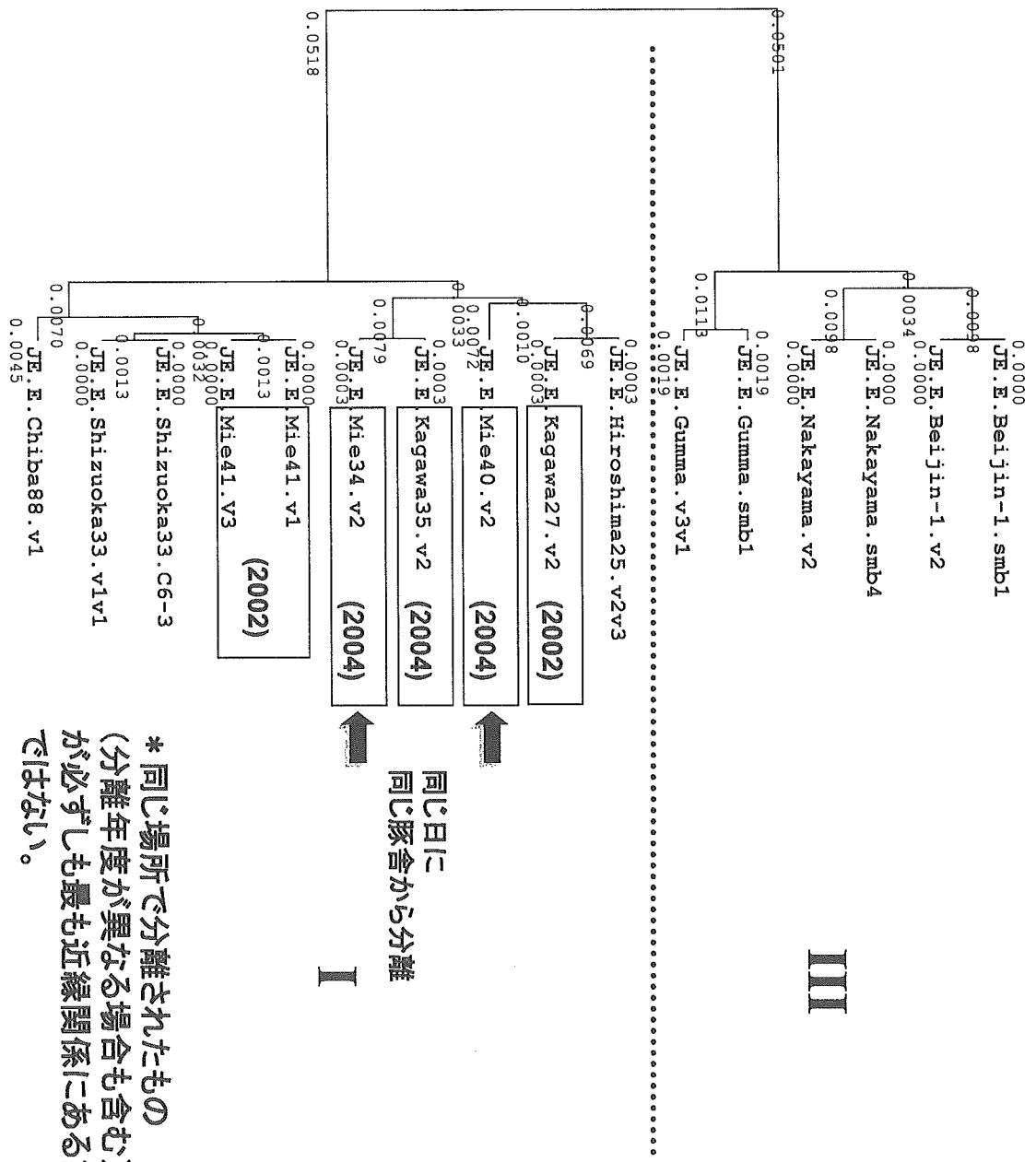
表2. ヲタから日本脳炎分離された日本脳炎ウイルスのマウスに対する病原性

Virus strain	Passage history	Neurovirulence (i.c.)		Neuroinvasiveness (i.p.)		Virulence level
		$\log_{10}$ p.f.u./LD <sub>50</sub>	Average survival days in 2 weeks (days)	$\log_{10}$ p.f.u./LD <sub>50</sub>	Average survival days in 3 weeks (days)	
<b>Vaccine strain</b>						
1 Hu/Beijing/1/1949(Beijing-1)	smb37	0.98	6.8	2.32	10.4	high
<b>2002 swine isolates</b>						
2 sw/Hiroshima/25/25/2002	Ver02/Ver03	2.48	9.9	5.13	17.1	low
3 sw/Mie/41/2002	Ver02	3.60	11.5	5.63	18.5	low
<b>2004 swine isolates</b>						
4 sw/Mie/34/2004	Ver02	2.12	9.1	3.72	15.6	middle
5 sw/Mie/40/2004	Ver02	0.25	6.3	2.67	12.9	high
6 sw/Kagawa/35/2004	Ver02	2.88	10.1	5.12	17.3	low

本研究班で分離した日本脳炎ウイルス株の病原性および神経侵襲性を、3週例のマウスに頭蓋内接種および腹腔接種により評価した。

図 1

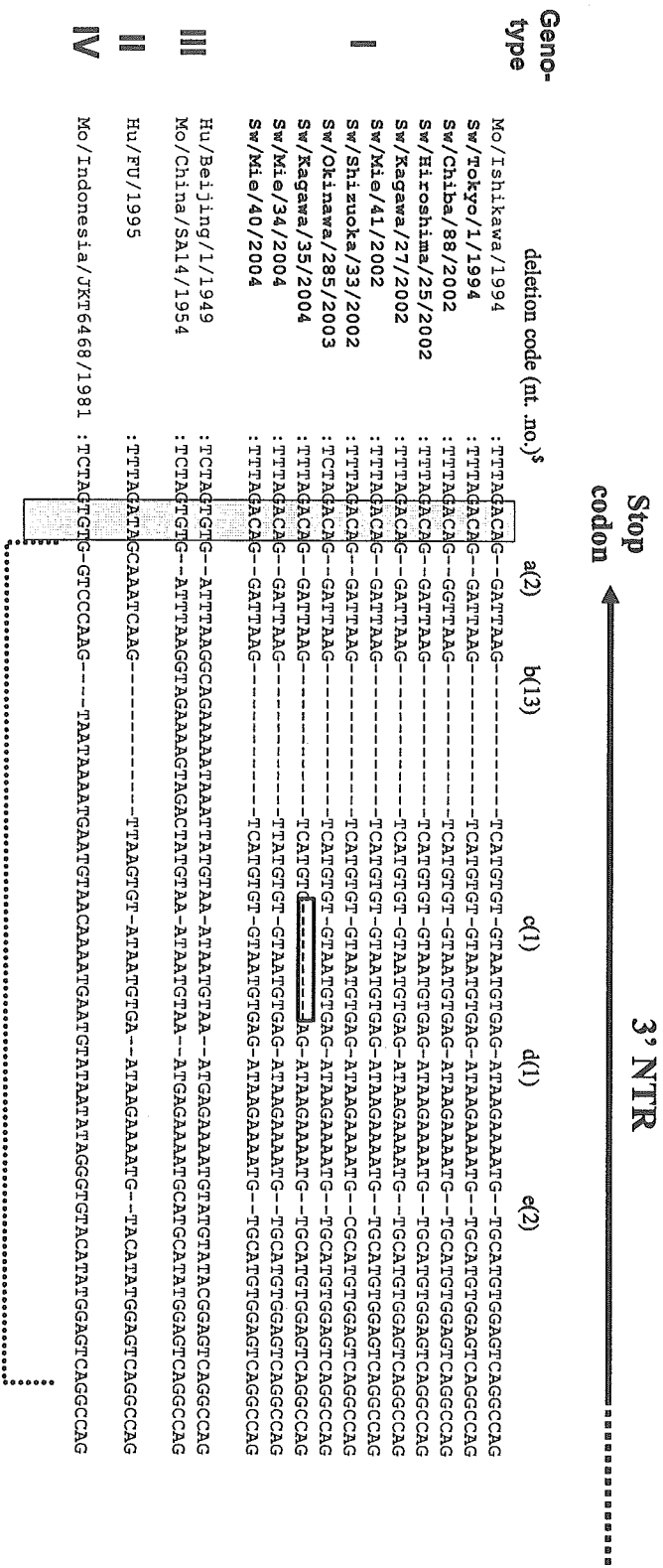
＜E領域塩基配列に基づく遺伝子系統樹＞



\* 同じ場所で分離されたもの  
 (分離年度が異なる場合も含む)  
 が必ずしも最も近縁関係にある訳  
 ではない。

図2

分離日本脳炎ウイルスの3' NTR領域における遺伝子欠損



香川県の分離株Sw/Kagawa/35/2004は、他の株にない新たな欠損領域が確認された。

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）平成17年度研究報告書

イナトミシオカのウエストナイルウイルス媒介試験、  
イナトミシオカの実験室内飼育法の確立、および野外蚊からの YOKOSE ウイルス分離の試み

分担研究者	江下優樹	大分大学医学部感染分子病態制御講座 助教授
共同研究者	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス1部 室長
	水田英生	大阪検疫所 企画調整官
	上田泰史	大阪検疫所 検疫衛生専門官
	宮城洋実	大阪検疫所 検疫専門官
	上田泰史	大阪検疫所 検疫衛生専門官
	田島章太郎	大阪検疫所 検査第一係長
	加藤孝太郎	大分大学医学部感染分子病態制御講座 大学院生
	東原絢子	大分大学医学部感染分子病態制御講座 大学院生
	岡田貴志	大分大学医学部感染分子病態制御講座 大学院生
	DIENG, Hamady	大分大学医学部 客員研究員
	川越和四	大分イカリテクノス (株) 常務
	久保勝彦	大分イカリテクノス (株) 技術員
	渡部裕司	大分イカリテクノス (株) 技術員
	田辺時男	大分イカリテクノス (株) 課長
	穴見勝美	大分イカリテクノス (株) 部長
	菊屋奈良義	大分イカリテクノス (株) 社長
	小河正雄	大分県衛生環境研究センター
	井村俊郎	神戸検疫所 課長
	内田幸憲	神戸検疫所 所長
	高島郁夫	北大・院・獣医・公衆衛生 教授
	倉根一郎	国立感染症研究所ウイルス1部 部長

研究要旨

アルボウイルス感染症のわが国での勃発時における蚊防除対策の一環として、日本に生息する蚊類のウエストナイルウイルス(WNV)感受性を検討している。2005年度の本報告書では、次の点を明らかにした。(1)媒介能を明らかにした。日本を含む極東アジアに生息するイナトミシオカ *Culex inatomi* のウエストナイルウイルス(WNV)に対する媒介能を証明した。(2)WNVを媒介可能なイナトミシオカの実験室内での継代飼育法を確立した。(3)Yokoseウイルスが分離された大分県横瀬地区で蚊の調査を実施した。その結果、本ウイルス陽性の蚊は発見されなかったが、同地区の井路にはコウモリが生息していることを確認した。

A. 研究目的

ウエストナイル熱は、アフリカ、アジア、ヨーロッパに常在するウエストナイルウイルス(WNV)感染蚊のヒト刺咬・吸血によって起こるアルボウイルス性疾患である。近年、北アメリカのカリフォルニア州で本症勃発以来、わが国への侵入が危惧されてきた。2005年に我が国において最初のWNV感染患者が報告された(小泉加奈子、中島由紀子、松崎真和、小井戸則彦、大曾根康夫、林昌宏、高崎智彦、倉根一郎、秋月哲史:本邦で始めて確認されたウエストナ

イル熱の輸入症例。感染症学雑誌、80(1):56-57, 2006)。有効なワクチンがまだ開発途上にあるので、今夏の二次感染者の発生を未然に防ぐためにも、媒介蚊対策は重要である。

わが国におけるウエストナイルウイルス(WNV)の主要媒介蚊と目されるアカイエカ群(*Culex pipiens* complex)のうち、アカイエカ *Cx. p. pallens*、チカイエカ *Cx. p. molestus*、およびブリッジベクターと推定されるヤブカ属ヒトスジシマカ群のヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、WNV ナイジェリア株に感受性を

示し、ナイジェリア株の WNV に感染したアカイエカは実験的にマウスを発症させることを報告した (平成 16 年度本研究報告)。また、前報の本報告書で、日本産のイナトミシオカ *Cx. inatomi* がニューヨーク株 (NY99-6922) の WNV に感受性を示したことから、今回は、その媒介試験を行った。また、イナトミシオカの幼虫が汽水域で発生することから、実験室内での継代飼育法を確立するために、幼虫の発育に適した塩水濃度の検討を行った。さらに、1971 年に大分の横瀬地区で採集されたユビナガコウモリの血液から分離された Yokose ウイルス (YKSV) の活動状況を知るために、2004 年に横瀬地区の井路近くで、衛生昆虫類の採集を行い、特に蚊からの YKSV 分離の有無、および井路でのコウモリの活動状況を観察したので報告する。

## B. 研究方法

### B. 1. イナトミシオカのニューヨーク株 WNV 媒介試験

**供試蚊:** 大阪湾区域の汽水域から採集したイナトミシオカ幼虫と蛹を、実験室に持ち帰り、25°C、日長 14 時間の飼育室内で飼育して成虫を得た。羽化 4 日以降に、成虫ケージ内に産卵水を入れて、無吸血産卵によって次世代の卵を得た。孵化幼虫は、後述する方法で、0.5% の食塩水を用いて、エアレーションを行い飼育した。羽化後の成虫は、4% 砂糖水を与えて、次世代の卵を得た。媒介試験には 3 世代目の成虫を用いた。

**ウイルス:** 国立感染症研究所から分与された WNV のニューヨーク株 [蚊由来の NY99-6922 および鳥由来の NY99A-301 (いずれも  $3 \times 10^6$  FFU/ml)] を用いた。

**感染蚊の準備:** ウイルス媒介試験には、羽化 5-6 日後の 3 世代目の未吸血成虫を用いた。ちなみに、本種は無吸血産卵性であることから、ウイルスを蚊に接種する前日までに、産卵済みの雌成虫を準備した。イナトミシオカ雌成虫の胸部側板内に、約 0.2ul ( $6 \times 10^2$  FFU/0.2ul) の WNV 液を接種した。接種した蚊は、3 重の飼育容器内に隔離して 28°C で 8 日間飼育した。ウイルス媒介試験に供試した蚊は、試験終了直後に冷凍生殺した。後日、ウイルスゲノムの有無を RT-PCR 法で確認するまで -80°C に保存した。

**供試マウス:** 媒介試験には、苦痛を緩和するために麻酔した 8 週令の ddY マウスの雌を用いた。なお、本実験を行うに際して、大分大学医学部実験動物委員会の承認を得た。

感染蚊を用いたマウスへの媒介試験: WNV

の感染 8 日後の蚊を閉じこめた、飼育容器のメッシュカバーを介して、麻酔したマウスから吸血の機会を約 1 時間蚊に与えた。その間、吸血した蚊の数をマウス毎に記録した。蚊によって吸血あるいはプロービングされたマウスは、その後 8-9 日間発症の有無を観察をした。異常な症状が認められたマウスは、麻酔下で臓器 (脳、肝臓、脾臓) の摘出、および心臓採血を行い、ゲノム検査まで -80°C に保管した。

**蚊およびマウス臓器からの総 RNA 抽出:** マウス臓器および血液から総 RNA を抽出するために、Trizol-LS (Gibco BRL 社製) および RNeasy Mini Kit (キアゲン社製) を併用した。抽出手順は会社の説明書に従った。抽出した総 RNA ペレットは 50ul の RNase inhibitor (RNase out, インビトロジェン社製) を含む 50 ul の RNase free の蒸留水をカラムに加えて溶出した後、実験に使用するまで -80°C に保存した。

**RT-PCR 法:** one step RT-PCR 法 (One Step RT-PCR system with Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen 社) を用いて、蚊とマウス臓器から WNV ゲノムの検出を行った。WNV ゲノムの E 領域を特異的に増幅するプライマーとして、WNNY514V-E (5' -3'): CGG CGC CTT CAT ACA CA、および WNNY904-E (5' -3'): GCC TTT GAA CAG ACG CCA TA (高崎智彦博士、開発作製) を使用して、391 bp の PCR 産物を増幅させた。RT-PCR の反応条件として、RT 反応: 53°C 30 分、PCR 反応: (1 回) 94°C 1 分、(35 回) 94°C 30 秒、53°C 30 秒、68°C 1 分、(1 回) 68°C 2 分を設定して、MJ Research 社の PCR 増幅装置を使用した。さらに、PCR 産物の有無は 1.5% アガロースゲルで泳動して特異的な PCR 産物の大きさを確認した。

### B. 2. イナトミシオカ幼虫の飼育のための塩水濃度の検討および累代飼育法の確立

**供試蚊:** A. 1. と同様に大阪湾区域で採集した幼虫と蛹を用いた。羽化 5-6 日後の雌成虫が産卵した卵を使用した。採卵にあたっては、食塩を含まない汲み置き水を使用した。

**塩水の調整:** 汲み置き水道水と食用の食塩 (塩化ナトリウム) を用いて、0.5、1.0、1.5 および 2% の食塩水を準備した。また、食塩を含まない汲み置き水を対照に用いた。

**蚊の飼育:** 幼虫の飼育にはホーロー製容器を使った。所定の食塩水を含む飼育水には、弱めのエアレーションを行い、水面にスカムが張らないようにした。幼虫の餌には、エビオスと粉砕したマウス固形飼料を等量づつ混合して乳ばち内で液状にした溶液を用いた。幼虫の密度

は7平方cmあたり幼虫1個体の低密度で飼育した。孵化後24時間以内の幼虫の飼育を開始してから、毎日所定の時間に、幼虫の発育状況を観察した。特に、生存している幼虫数を記録した。また、得られた蛹は別の容器に移し、羽化成虫には4%の砂糖水を与えた。蛹および成虫の個体数も同様に記録した。

### B. 3. 大分県横瀬地区の井路近辺での衛生害虫調査およびコウモリの生息状況の観察

1971年に大分県横瀬地区に生息するユビナガコウモリからYokoseウイルス(YKSV)が分離されて以来、YKSVの動態調査に関する情報は全くない。吸血性昆虫が媒介すると推定されるYKSVが、現在も活動しているか否かを検証する一環として、2004年5月から11月に横瀬井路の2地点で、コウモリの活動観察、飛来昆虫の定点採集を行った。週1回、午後6時から7時に採集を実施した。採集方法として、CDC捕虫機(炭酸ガス有または無)、モスキートマグネットおよび捕虫網を用いた人囿採集法を用いた。採集昆虫は吸血性と非吸血性昆虫に分けた後、吸血性昆虫では、さらに蚊または蚊以外に細分した。分類後のサンプルは、YKSV分離を行うために-80°Cに保管した。

#### (倫理面への配慮)

ウエストナイルウイルスは、国立感染症研究所および北海道大学獣医学部から大分医科大学(現大分大学医学部)に分与されたものである。また、大分大学医学部附属動物実験施設内での蚊の飼育および媒介実験に関連して、大分大学医学部動物実験委員会から承認を得た。

### C. 研究結果

#### C. 1. 感染イナトミシオカが吸血した、マウス臓器からのWNVゲノムの検出

媒介試験には、吸血意欲を高めるために一度産卵したイナトミシオカを用いた。胸部接種でWNVを蚊に感染させた後、その8日後に、8週令のマウスから吸血する機会を蚊に与えた。複数の感染蚊の入った飼育容器の上部蓋のネットの上にマウス2個体を1時間載せて、蚊の吸血の有無を観察した。番号1.1と1.2、2.1と2.2、3.1と3.2、4.1と4.2の各2個体のマウスは、同じ蚊飼育容器のネット上に麻酔した状態において、蚊からの吸血あるいは刺咬の有無を観察した(表1)。8匹のマウスの内、5個体のマウスで蚊が刺咬するのを観察した。また、6個体のマウスは、蚊に吸血された。いずれのマウスも8-9日間観察した。その間に、5個

体のマウスで、毛の逆立ちなどの症状が認められた。全てのマウスは、吸血あるいは刺咬の8-9日後に、臓器内のWNVゲノムの有無をRT-PCR法で検査した。その結果、症状の認められた5個体のマウス中、4個体からウイルスゲノムが検出された。また、症状の認められなかった2個体中2個体のマウスでウイルスゲノム陽性であった。これらのことから、8個体のマウスを刺咬・吸血した8個体の蚊の内、少なくとも6個体(75%)の蚊がWNVをマウスに伝播した。

#### C. 2. 無吸血産卵性イナトミシオカの継代飼育法の確立

イナトミシオカが、WNVを媒介することを実験的に前項で証明した。ウイルス媒介能をさらに詳細に検討するためには、実験室内での本種蚊の維持が必要である。本種幼虫を採集した発生水域が、海水の混じった汽水域であったことから、実験室内で真水を使って継代飼育可能かどうかを検討した。本種幼虫の発生水域の塩分濃度が0.4-0.5%だった事に着目して、適度な塩分を含む汲み置き水での幼虫飼育を試みた。発生水域から幼虫を採集して、0-2%塩分を含む水に幼虫を入れて、エアレーションを行いながら飼育を試みた。その結果、0%よりも0.5%の幼虫群から得られた羽化成虫の割合が高かった(図1)。なお、1%以上では成虫は得られなかった。

#### C. 3. 大分県横瀬地区のコウモリ生息環境地域で採集した衛生昆虫類

蚊類では、ヒトスジシマカ、オオクロヤブカなど、蚊以外の吸血昆虫では、ヌカカ、ブユ、非吸血昆虫では、タマバエ、チョウバエなど、非昆虫類ではクモ類が採集された。同一の採集時間帯ではあったが、薄暮から暗夜まで季節によってその時間帯が変化した。また、採集個体数は、気温、風力などの要因によっても影響した。採集方法と採集個体数を検討したところ、捕虫網を用いた人囿法が最も採集数および種類数が多かった。次に、モスキートマグネットとCDC捕虫機(炭酸ガス有)であった。YKSVゲノムは採集蚊から検出できなかったが、調査地点の井路で、コウモリの生息が観察された。

### D. 考察

D. 1. WNV感染蚊に刺咬・吸血後に症状の最も重かったマウスにおいて、ウイルスゲノムが検出されなかった。マウス血清中のWNVの抗体検査を行う必要がある。同様なことは、



ウイルスゲノム陰性であったマウス番号 2.2 についても検討する必要がある。イナトミシオカは、ヨーロッパに分布する近縁種の *Cx. modestus modestus* と同様に WNV を媒介する可能性が考えられる。また、イナトミシオカ幼虫の発生水域が汽水域に限られているが、環境の変化などによる一過性的塩水草原の拡大によって、幼虫の発生水域が一時的に広がる可能性が示唆される。また、本種幼虫の生息域が汽水域に限られていることから、WNV の主媒介蚊というよりもブリッジベクターとしての重要性が今後指摘される可能性がある。

D. 2. 0.5%の塩水を使って少なくとも F14 成虫が現在得られていることから、イナトミシオカの継代飼育が実験室内で可能になり、本種の殺虫試験等が可能であろう。また、幼虫の認められる汽水域の塩分濃度が 0.5%前後であったので、実験室内で得られた結果は自然界の本種発生水域の塩分濃度と良く合致した結果であった。

D. 3. 調査地点の井路で、コウモリの生息が観察されたことから、今後は、コウモリの動態およびそれからの YKSV 分離を検討する必要があるだろう。

## E. 結論

- (1) イナトミシオカの WNV 媒介能を実験的に証明した。
- (2) 主にマウスの脳から WNV ゲノムが検出された。
- (3) 刺咬・吸血されたマウスの臓器(脳、肝臓、脾臓)から WNV ゲノムを検出することによって蚊の媒介性を調べることが可能となった。
- (4) 0.5%前後の塩水が幼虫の発育に最も適していることが実験的に観察された。
- (5) 本種幼虫の生息域が汽水域に限られていることから、WNV の主媒介蚊というよりもブリッジベクターとなる可能性を指摘した。
- (6) YOKOSE ウイルスは採集蚊からは発見出来なかった。

## F. 健康危険管理情報

わが国の汽水域で発生するイナトミシオカのウエストナイルウイルス媒介能が、新たに判明したこと、および汽水域に発生する本種の分布域は制限されているがブリッジベクターとしての重要性を指摘した。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tang, W.F., Eshita, Y., Tadano, M., Morita, K., and Makino, Y. (2005): Molecular basis for adaptation of a chimeric dengue type-4/Japanese encephalitis virus to vero cells. *Microbiology and Immunology*, 49(3): 285-294.

Onishi, Y., Eshita, Y., Murashita, A., Mizuno, M. and Yoshida, J. (2005): Synthesis and characterization of 2-diethyl-aminoethyl dextran-methyl methacrylate graft copolymer for nonviral gene delivery vector. *J. Appl. Polym. Sci.*, 98(1):9-14.

江下優樹、牛島廣治 (2005): 再興感染症としての Dengue 熱とマラリア: 特にそれら病原体の媒介蚊について。 *小児感染免疫* 17(3):211-219.

### 2. 学会発表

Eshita, Y., Raweewan, S., Tamori, N., Higashihara, J., Anzai, S., Dieng, H., Komalamisra, N., Leemingsawat, S., Rongsriyam, Y., and Ushijima, H. (2005): Dynamics of dengue viruses in vector mosquitoes collected in the patient houses, areas, Thailand. *JSPS seminar on "Strategies for controlling emerging and re-emerging infectious diseases in Southeast Asia"*. February 7-8, 2005. The University of Tokyo, Medical library room number 333, Tokyo.

江下優樹 (2005): 開発と医療 2: 昆虫が媒介する感染症はなぜ流行するのだろうか? 国際開発学会「開発と文化」研究部会。2005年4月16日、東京、早稲田大学

江下優樹、上田泰史、水田英生、多森直樹、東原絢子、安西三郎、Hamady Dieng、高崎智彦、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎: ウエストナイルウイルス・ニューヨーク株に対するイナトミシオカの感受性。第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会、神奈川県、箱根湯本、2005年5月26日(木) - 27日(金)。日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集: 2005。日本脳炎ウイルス生態研究会報 (37): 2006。

長野佑基、佐藤朝光、水谷哲也、江下優樹、宮田 健、鹿志毛信広、見明史雄 (2005) : *Aedes* 属に対する mitogen-activated protein kinase family 阻害剤の致死効果。第 57 回日本衛生動物学会大会。2005 年 6 月 2-3 日、北海道、北海道大学国際交流会館、 Med. Entomol. Zool., 56 (大会特集号) : 36 , 2005。

Dieng, H., Tamori, N., Higashihara, J., Anzai, S. and Eshita, Y. (2005) : Ecological and physiological determinants of the midgut proteome of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). 第 57 回日本衛生動物学会大会。2005 年 6 月 2-3 日、北海道、北海道大学国際交流会館、 Med. Entomol. Zool., 56 (大会特集号) : 37 , 2005。

江下優樹、上田泰史、水田英生、多森直樹、東原絢子、安西三郎、Hamady Dieng、高崎智彦、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2005) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (9) 日本産イナトミシオカ *Culex modestus inatomii* のウエストナイルウイルス感受性。第 57 回日本衛生動物学会大会。2005 年 6 月 2-3 日、北海道、北海道大学国際交流会館、 Med. Entomol. Zool., 56 (大会特集号) : 40 , 2005。

東原絢子、大西靖彦、水野正明、吉田 純、多森直樹、Hamady Dieng、加藤幸太郎、岡田貴志、江下優樹 (2005) : 新規高分子 DEAE-デキストラン共重合体を非ウイルス性遺伝子導入キャリアーとして用いた、培養細胞への外来遺伝子導入。第 58 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 55 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2005 年 10 月 22-23 日、宮崎市、宮崎大学医学部、 Med. Entomol. Zool., 57 (2) : 2006。

加藤幸太郎、水田英生、上田泰史、多森直樹、岡田貴志、東原絢子、Hamady Dieng、江下優樹 (2005) : 無吸血産卵性イナトミシオカの継代飼育について。第 58 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 55 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2005 年 10 月 22-23 日、宮崎市、宮崎大学医学部、 Med. Entomol. Zool., 57(2) : 2006。

Dieng, H. and Eshita, Y. (2005) : Body size variation: a long standing problem of life history evolution of mosquitoes and

mosquito researchers. 第 58 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 55 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2005 年 10 月 22-23 日、宮崎市、宮崎大学医学部、 Med. Entomol. Zool., 57 (2) :2006。

川越和四、多森直樹、久保勝彦、高崎智彦、田島 茂、渡部裕司、田辺時男、穴見勝美、Hamady Dieng、東原絢子、安西三郎、牧野芳夫、小河正雄、菊屋奈良義、倉根一郎、江下優樹 (2005) : 大分県横瀬地区のコウモリ生息環境地域で採集した昆虫類について。第 21 回日本ペストロジー学会 大会、横浜、浜銀ホール・ピアマレ、2005 年 11 月 10・11 日。第 21 回日本ペストロジー学会大会プログラム・講演抄録集 :62、2005。

長野佑基、佐藤朝光、水谷哲也、江下優樹、宮田 健、鹿志毛信広、見明史雄 (2005) : *Aedes* 属に対する mitogen-activated protein kinase family 阻害剤の致死効果。第 22 回日本薬学会九州支部大会。2005 年 12 月 10-11 日、福岡市、福岡大学薬学部棟、2A-01、2005。

Eshita, Y., Mizuta, H., Ueda, Y., Takasaki, T., Tamori, N., Higashihara, J., Kato, K., Okada, T., Dieng, H., Imura, S., Uchida, Y., Takashima, I. and Kurane, I. (2006) : Vector competence of Japanese salt marsh mosquito, *Culex modestus inatomii* against two New York strains of West Nile virus. 第 12 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会学術講演会。2006 年 1 月 20 日、東京 (港区)、笹川記念会館、第 12 回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会学術講演集 :2006。

安西三郎、藤原作平、江下優樹、高岡宏行 (2006) : ドミニカ共和国で分離された Dengue 2 型ウイルスの遺伝子塩基配列、系統樹解析。日本皮膚科学会第 45 回沖縄地方会。野中薫雄教授退任記念大会。2006 年 1 月 21-22 日、沖縄、ロワージ・ホテルズ沖縄、日 {皮膚科学会第 45 回沖縄地方会。野中薫雄教授退任記念大会講演集 :2006。

江下優樹、水田英生、上田泰史、高崎智彦、多森直樹、東原絢、加藤孝太郎、岡田貴志、DIENG Hamady、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2006) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (10) イナトミシオカのウエストナイルウイルス媒介実験。第 58 回・{衛生動物学会

大会。2006年4月7-8日、長崎、長崎大学ポンペ会館、Med. Entomol. Zool., 57 (大会特集号) : 2006。

Hamady Dieng, Michael Boots, Naoki Tamori, Junko Higashihara, Takashi Okada, Kotaro Kato and Yuki Eshita (2006) : Embryogenesis in the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): ecological basis and transgenic implications. 第57回日本衛生動物学会大会。2006年4月7-8日、長崎、長崎大学ポンペ会館、Med. Entomol. Zool., 57 (大会特集号) : 2006。

Hamady Dieng, Michael Boots, Naoki Tamori, Junko Higashihara, Takashi Okada, Kotaro

Kato and Yuki Eshita (2006) : Adult feeding in the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): male effect and meal status-induced protein expression in the midgut. 第57回日本衛生動物学会大会。2006年4月7-8日、長崎、長崎大学ポンペ会館、Med. Entomol. Zool., 57 (大会特集号) : 2006。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表1. ウエストナイルウイルスに感染したイナトミシオカが吸血あるいは刺咬したマウスの発症

マウス番号	蚊の刺咬の有無	蚊の吸血の有無	ウエストナイルウイルス		マウスの症状	RT-PCR(+ or -)			ウイルス媒介の結果	媒介した蚊の数
			ニューヨーク株	起源		脳	脾臓	肝臓		
1.1	+	中吸血	NY99A-301	鳥	+++	+	+	nt	+	
1.2	-	満腹吸血	NY99A-301	鳥	++++	-	-	nt	-?	
2.1	-	小吸血	NY99A-301	鳥	+or-	+	-	nt	+	
2.2	-?	未吸血?	NY99A-301	鳥	-	-	-	nt	-	2/3=66.6%
3.1	+	満腹吸血	NY99-6922	蚊	+	+	-	nt	+	
3.2	+	満腹吸血	NY99-6922	蚊	-	+	-	nt	+	
4.1	+	小吸血	NY99-6922	蚊	++	++	-	nt	+	
4.2	+	-	NY99-6922	蚊	-	faint	-	nt	+	4/4=100%
					6	6	1	6	6	

nt: 実施しなかった。