

図1 銅処理後（72時間後）の中腸断面
a: 中腸皮膜細胞 P: 囲食膜 A: 異物

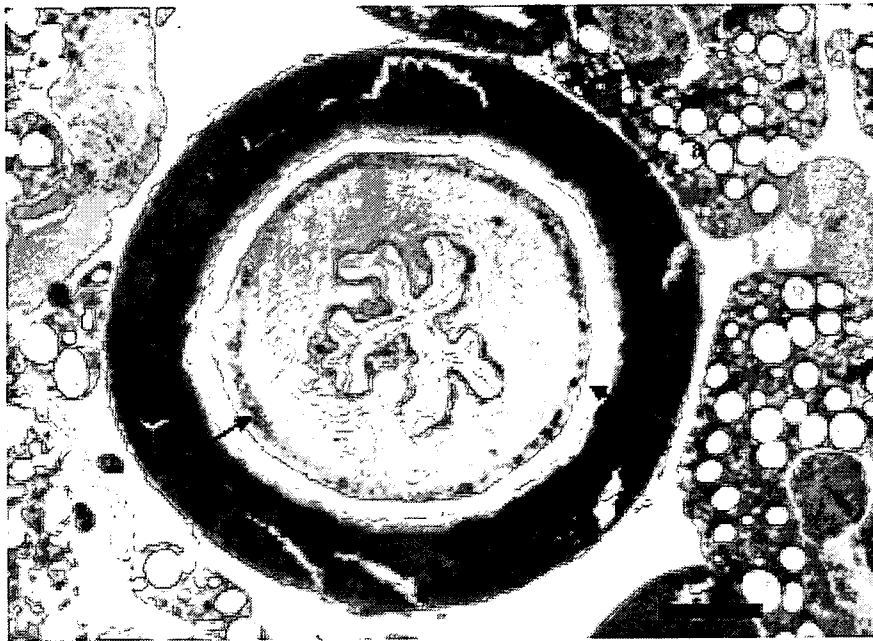


図2 コントロール（72時間後）の中腸断面
a: 中腸皮膜細胞 P: 囲食膜 c: 囲食膜外部

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

分担研究者 小林睦生(国立感染症研究所昆虫医科学部)
研究協力者 富田隆史(国立感染症研究所昆虫医科学部)
研究協力者 葛西真治(国立感染症研究所昆虫医科学部)
研究協力者 駒形 修(国立感染症研究所昆虫医科学部)

研究要旨 アタマジラミのピレスロイド駆除剤抵抗性を調査するための分子検査法を考案し、ホームページ上で試料提供要請を公開し、駆除剤感受性についての全国調査を開始した。分子検査の対象としたのは、ピレスロイド作用点のナトリウムチャンネル遺伝子に日本・米国・英国のピレスロイド抵抗性シラミに特異的にかつ共通に見いだされている四重アミノ酸置換突然変異である。餓死し自然乾燥させた標本を利用し、対象変異座位に関する遺伝子型を SNaPshot 法で同時に解析する方法を確立した。この方法により、2006 年度までに 10 都道府県より収集した 54 コロニー(126 個体)の試料を試験した。その結果、茨城県、長野県、兵庫県、香川県に由来する 4 コロニー(7%)が同じ四重変異をもつ抵抗性遺伝子を保有していた。うち 3 コロニーで試験したシラミ 8 頭はすべて抵抗性遺伝子のホモ接合体であった。2008 年 2 月までにおもに皮膚科医師と保護者より試料の提供を受け、22 都道府県から 253 コロニー分のシラミを収集することができた。

A. 研究目的

ここ数年、アタマジラミの寄生が増えているという報道が増えている。東京都の調査によると、2005 年度の都内の被害相談件数は 720 件だったが、2006 年度には約 50%増え 1,125 件に、さらに 2007 年度の終わりには、前年度の約 2 倍にあたる 2,100 件に達しようとしている。ほかにも、同様に被害相談件数が急増していて問題になっている県(秋田県、福島県、埼玉県、大阪府)や市(札幌市、岐阜市、岡山市、倉敷市)があることが報じられている。このような急増が伝えられる原因は不明である。わが国でヒトジラミ用駆除剤の販売を唯一手がけるダンヘルスケア㈱では、2007 年 10 月の報道取材に応じて、全国の年間のアタマジラミ罹患者数を約 50 万人と推定している(朝日新聞、2007 年 10 月 9 日)。

わが国でヒトジラミ駆除用に認可されている薬剤

は、一般用医薬品として販売されるスミスリン・パウダーと同シャンプーで、これらの有効成分はいずれもピレスロイド系殺虫剤のフェントリンである。ピレスロイド系殺虫剤の作用点は、神経・筋などの興奮性細胞の細胞膜に存在する膜タンパク質であるナトリウムチャンネルである。ピレスロイド系殺虫剤は、ナトリウムチャンネルの閉鎖を阻害することで、細胞膜内外の再分極化(すなわち活動電位の終息)を遅延させ、興奮の伝達を攪乱する。国立感染症研究所昆虫医科学部は、2001 年に日本で初めて東京都で採集した 3 つのコロニー(別家族に寄生するシラミ群)がピレスロイド抵抗性のアタマジラミであることを同定した(Tomita et al., 2003)。これらの抵抗性コロニーのナトリウムチャンネル遺伝子は、一致して、四つのアミノ酸置換変異(D11E, M850I, T952I, L955F)をもっていた。これらの変異のうちの 1 つ(T952I)は、農業害虫であるコナガのピレスロイ

ド抵抗性遺伝子の変異とも一致し、ピレスロイド感受性の低下をもたらす変異とみなすことができる。

ピレスロイド系駆除剤の有効性の低下は、世界的に見て、1990年代後半から頻繁に報じられるようになった。米国とデンマークでは、90%以上のコロニーがピレスロイド抵抗性となっている(Yoon et al., 2004; Kristensen et al., 2006)。これらの国で、バイオアッセイによりピレスロイド抵抗性と判定したコロニーに対して作用点遺伝子のアミノ酸置換変異の同定を行うことで、少なくとも T952I 置換変異と抵抗性との因果関係も明瞭に示されている(Yoon et al., 2003; Kristensen et al., 2006)。

当部では2001年より首都圏(東京都, 神奈川県, 埼玉県)より採取した生きたアタマジラミを使って、ろ紙接触法によるバイオアッセイと作用点遺伝子の突然変異を2006年度まで調査してきた。27コロニーについての試験を行い、上に述べた3コロニーがフェントリン抵抗性(11%)と判定された(富田ら, 2003; 未発表データ)。生きたシラミは吸血源から離すとその多くが一日以内に生存率低下をきたし、バイオアッセイに利用できなくなる。したがって、従来通りの資料収集ペースと試験方法では、抵抗性コロニー出現率の確度や分布の地域性について言及することが困難であった。そこで、ピレスロイド抵抗性特異的で共通な作用点遺伝子の突然変異を抵抗性の指標として分子検出することにより、これらの問題を解決し、日本で現在用いられているアタマジラミ駆除剤に対する抵抗性の実態をより明らかにし、同剤の有効性を評価しようと試みた。

B. 研究方法

供試虫: 2001年に東京都で採集しフェントリンに約160倍の抵抗性を示したコロニー(R2)のアタマジラミをエタノール中で保存しておいたものを、ピレスロイド抵抗性の標準虫として用いた。R2コロニーはナトリウムチャンネル(以下SCと略す)に4つのアミノ酸置換(D11E, M850I, T952I, L955F)が生じた遺伝子のホモ接合体である。2004年に札幌市で採集し国立感染症研究所で継代飼育しているNIID系統のコロモジラミを-80°Cで保存して

おいたものを、殺虫剤感受性の標準虫として用いた。2006年度に収集したアタマジラミは、石井則久(国立感染症研究所)と夏秋優(兵庫医科大学)による皮膚科医師ネットワーク、および福富裕之(榊昭和メディカルサイエンス)により提供を受けた。アタマジラミの標準虫については成虫を用い、提供試料については、餓死させ室温自然乾燥させた各齢期の幼虫または成虫を用いた。

分子ジェノタイプング: ϕ 5 mm ジルコニアボールと磨砕液(50 mL 抽出液と 12.5 mL プロテアーゼ K の混合液, REDExtract-N キットに含まれる試薬, Sigma)と一頭のシラミを 2 mL セーフロックチューブに入れ、振とう破砕機 MM300 (Retsch) でシラミ試料を破砕(1/30 秒 3 分間磨砕後スピンドウンし、さらにもう 3 分間反復)した。スピンドウンした後室温に 1 時間放置し、95°C で 3 分間インキュベートした後、中和液を 50 mL 加え、攪拌したものをゲノム DNA 溶液とした。ナトリウムチャンネル遺伝子の 3 つの断片をマルチプレックス PCR で増幅した。この反応液の液量 25 mL の組成は次の通りであった: 各 5.0 nmol の dNTP, 各 10 pmol の F52PhSC (CTTGTATTCGACCCATTCGTCG) と R55PhSC (TCCAAGTTCCAATAATGACAAGGC), 各 5.0 pmol の F56PhSC (TTCAAGGGCTTTCCGTGTTAC) と R53PhSC (CCAAAAAGTTGCATTCCCATAACG), 各 2.0 pmol の F50PhSC (GAGGTTGGGAGGGTCCTAGAG) と R51PhSC (TTTCTTGAGCAATTCGTTGTTCCG), 1.0 mL のゲノム DNA 溶液, 1X ExTaq 緩衝液, 0.125U ExTaq DNA ポリメラーゼ。PCR は、95°C 5 分間変性後 40 回の 95°C 30 秒, 50°C 30 秒, 72°C 20 秒のサイクルを行い最後に 72°C で 5 分間インキュベートした。増幅後、PCR 液 2.5 mL を ExoSAP1.0 ml(GE)とともに定法に従い処理し、未反応プライマーと dNTP を除去した。その後、蛍光標識 ddNTP を用いるプライマー伸長終止に基づく SNaPshot 標識反応をキット(ABI)の使用書通りに行った。この標識反応液(液量 10 mL)は次のものを含んだ: 3.2 pmol の F61PhSC

(CTGACTGACGGATTTTCATTCCGAGGA), 1.6 pmol の F62PhSC
((GACT)4CTGTTGGAGCTTTGGGTAATTTAA), 0.4 pmol の R63PhSC
((GACT)6CATAACGGCAAATATGAATATGAT AATGCAAA), 2.0 pmol の F64PhSC
((GACT)13GCTTTGGATCATCACGACAT), 4.5 mL の ExoSAP 処理済み DNA 溶液。その後、標識反応液と shrimp alkalinephosphatase (SAP, GE) 1.0 mL を混和し、37°C 1 時間反応により未反応 ddNTP を分解処理した。SAP 処理 DNA 溶液 1.0 mL とホルムアミド(HiDi formamid, ABI) 9.75 mL と SNaPshot 用マーカー(LIZ Gene Scan 120 Size Standard, ABI)を混和し、95°C 2 分間の加熱で DNA を変性させた後、キャピラリー電気泳動にかけ、Genetic Analyzer 3130 システム—GeneMapper v3.0 プログラムにより、蛍光シグナルの解析を行った。

アタマジラミ試料収集：2007 年度の試料収集は、国立感染症昆虫医科学部のホームページに掲載した要領 (<http://www.nih.go.jp/niid/entomology/headlice/headlice.html>)で行った。

C. 研究結果

分子ジェノタイプング法の確立：SC 遺伝子を鋳型とするマルチプレックス PCR を 2006 年度に収集したアタマジラミを用いて行った結果を図 1 に示す。同時に増幅した SC 遺伝子の 3 断片はいずれもエクソン配列で、D11 座位を含む 180 bp, M850 座位を含む 350 bp, T952I, と L955F を含む 280 bp が同程度の分子数に増幅されたことがわかる。SNaPshot 法による遺伝子型決定の対象となるアミノ酸置換座位と殺虫剤感受性と抵抗性の標準虫における変異を図 2 に示す。SNaPshot 反応に用いたプライマーは分子量の小さい順に F61PhSC, F62PhSC, R63PhSC, F64PhSC と並び、いずれも、「5'-アンカー配列+遺伝子特異的配列-3'」の構造をもち、SNaPshot 反応中に 3'末端に鋳型に相補的な標識 ddNTP が一塩基付加される。これらプライマーは、それぞれ、D11E, L955F,

T952I, M850I アミノ酸置換を生じる塩基置換をするように設計されている。ただし、mRNA に対して相補的な遺伝子特異的配列を含む RSPHSC プライマー(リバース・プライマー)のみが、コドン配列に相補的な塩基を認識し、他のプライマーは順向きの塩基を認識するよう設計されている。これらのプライマーを用い、感受性と抵抗性の標準虫の SC 遺伝子配列をキャピラリー電気泳動で解析し、蛍光標識シグナルを電氣的移動度の速い順に表示した結果を図 3 に表す。SNaPshot 法による解析で四重アミノ酸置換のそれぞれについて、明瞭に遺伝子型が決定できることが示された。

ピレスロイド抵抗性遺伝子の検出：2006 年度に 10 都道府県(北海道、東京都、茨城県、埼玉県、神奈川県、千葉県、長野県、愛知県、兵庫県、香川県)から収集した 54 コロニーのアタマジラミ 126 頭を SNaPshot 法により解析し、SC 遺伝子のアミノ酸置換変異を調べた。その結果、茨城県、長野県、兵庫県、香川県に由来する 4 コロニー(9 頭)が R2 コロニーに含まれていたのと同じ四重変異をもつ抵抗性遺伝子を保有していた(表 1)。うち 3 コロニーで試験したシラミ 8 頭はすべて抵抗性遺伝子のホモ接合体であった。

2007 年度の試料収集：国立感染症研究所ホームページで依頼したアタマジラミ試料提供依頼文を図 4 に示す。シラミ試料は 2008 年 2 月までに、おもに皮膚科医師と保護者、次いで保育園保母より提供を受け、22 都道府県から 253 コロニー分の 606 頭のシラミを収集することができた。

D. 考察

2006 年度に 10 都道府県で収集した 54 のアタマジラミコロニーのうち 4 コロニー(7%)から、四重アミノ酸置換変異をもつ SC 抵抗性遺伝子を保有していたことが確認された。この結果から、抵抗性をもたらす SC 遺伝子は全都道府県に伝播している可能性が容易に想像される。四重アミノ酸置換変異をもつ抵抗性遺伝子は、日本のみならず、米国と英国でも共通に見出されている(Lee et al., 2003)。これら 4 つの変異が独立に生じる可能性はほぼないと考えてよい。また、米国と英国においては日本

以上にピレスロイド抵抗性の拡がり深刻である。これらを考えあわせると、海外で生じた抵抗性遺伝子が遅れて進入してきて、わが国では、幸いにも低い抵抗性の出現率に留まっているとみなされる。同系の薬剤のみに頼った駆除を続ける限り、ピレスロイド系駆除薬がいずれ無効となることは、海外の例から見ても明らかである。

抵抗性シラミの蔓延を止めるためには、医療機関、保護者、学校のいずれにおいても、抵抗性コロニーの可能性に配慮し、罹患者が使用書通りに駆除剤を使ったか、期待通りの駆除効果は得られたか、について丁寧にフォローしてゆく必要がある。シラミ専用すき櫛は、外国製のものがインターネット通販によってのみ販売されているという現状である。保健所、学校、医療機関においては、抵抗性が疑われるケースに備えて、シラミ専用すき櫛を常に貸し出せるようにすることが望まれる。

わが国以上にアタマジラミの罹患率とピレスロイド抵抗性出現率が高いと推測される欧米では、前世代の駆除薬ともいえる有機リン系のマラチオン（作用点:アセチルコリンエステラーゼ）を一般用医薬品として利用できる国もあるが、一部の国ではマラチオン抵抗性も問題となっており、多様な駆除法が模索されている(Lebwohl et al., 2007)。イベルメクチンの内用（ただし血液脳関門が未完成の幼児には禁避）、マラチオン(0.5%)に2-プロパノール(78%)とテルピネオール(ティーツリーオイル抽出物;12%)を混合し効力を増強した調剤、シリコン直鎖ポリマーのジメチコン(4%)を含むローションを用いる物理的駆除(Burgess et al., 2005)、などがあり、効力には優れるとされるが普及しているわけではない。わが国においても、安全性と駆除の確実性・容易さを兼ね備えた次世代駆除剤の開発と販売が早期に望まれる。

E. 結論

・ナトリウムチャンネル遺伝子のアミノ酸置換突然変異を分子検出することにより、アタマジラミのピレスロイド抵抗性遺伝子型を推定できる方法を確立した。

・2006年度に収集した10都道県に由来するアタマジラミ54コロニー中のピレスロイド駆除剤抵抗性SC遺伝子の保有率は7%であった。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

葛西真治, 富田隆史. 2008. Question & Answer - アタマジラミは増えているのでしょうか. 健 37(1): 12-14.

富田隆史, 2007. 復活したアタマジラミ. すこやかファミリー 第575号: 22-23.

富田隆史, 葛西真治. 2008. アタマジラミ症. 健康教室 59(5): 84-87.

富田隆史, 葛西真治. 2008. アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性. 週刊日本医事新報 第4377号: 97-98.

2. 学会発表

葛西真治, 石井則久, 駒形修, 小林睦生, 富田隆史, 夏秋優. ピレスロイド剤抵抗性アタマジラミの実態調査, 日本農薬学会第33回大会, 2008年3月31日.

H. 知的財産の出願・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. ナトリウムチャンネル抵抗性遺伝子を含んでいたアタマジラミコロニー.

試料受領日	採集地	個体数	SC遺伝子型	性別	年齢	駆除剤使用歴
2006/10/14	茨城県つくば市	1	抵抗性遺伝子ホモ接合体	(不明)	(不明)	(不明)
2007/02/26	長野県長野市	5	抵抗性遺伝子ホモ接合体	女	7歳	なし
2007/03/07	兵庫県川西市	2	抵抗性遺伝子ホモ接合体:1 感受性遺伝子ヘテロ接合体:1	女	6歳	なし
2007/03/26	香川県三豊市	2	抵抗性遺伝子ホモ接合体	男	6歳	なし

抵抗性遺伝子は全て四重アミノ酸置換変異(E11-I850- I952-F955)をもつと推定された。

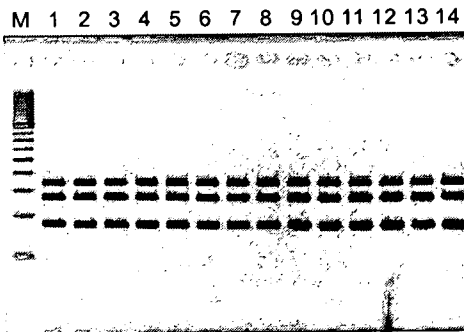


図 1. アガロースゲル電気泳動による SC 遺伝子配列のマルチプレックス PCR 産物の分離. M, 100 bp DNA Ladder; 1-14, シラミ個体別増幅産物.

	11番目	850番目	952番目	955番目
感受性系統	Asp GAT	Met ATG	Thr ACA	Leu CTT
	↓	↓	↓	↓
抵抗性個体	GAA Glu	ATI Ile	ATA Ile	ITT Phe

図 2. 分子ジェノタイプングの対象としたナトリウムチャンネル遺伝子の 4 つのアミノ酸置換突然変異. 下線を付きの塩基を解析の対象とした。

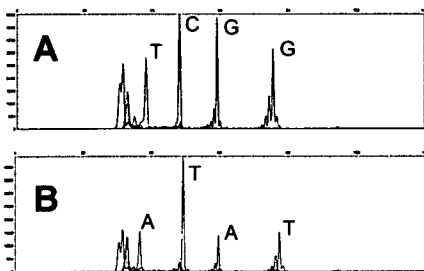


図 3. アタマジラミ標準虫の SC 遺伝子の SNaPshot 解析例.

A, 殺虫剤感受性 NIID 系統コロモジラミ; B, ピレスロイド抵抗性 R2 コロニー. SNaPshot プライマーの電気的移動度の速い順に(左から右の順に), D11, L955, T952, M850 座位の対象塩基を検出している。ただし, T952 座位については, 相補的塩基を検出している(詳細については図 2 を参照のこと)。

アタマジラミの殺虫剤感受性調査について (アタマジラミを送ってください)

平成20年3月3日
昆虫医学部 第三室

国立感染症研究所昆虫医学部では現在、アタマジラミの殺虫剤(スミスリン)抵抗性の全国調査を行っています。これまでの調査では、22都道府県より採取した253人分のシラミ606匹のうち、北海道、東京都、茨城県、長野県、兵庫県、香川県、新潟県、愛知県、千葉県、福岡県の18名から採取した61個体が抵抗性であることを確認しています(注:つまり、現段階ではほとんどのアタマジラミに対しては駆除剤が効いているということを意味しています)。
日本における抵抗性の実態をさらに詳細に把握するために、アタマジラミを送っていただける方を探しています。

|| 死んだシラミで結構です ||

私たちの研究室(殺虫剤室)では最近、遺伝子解析による抵抗性の簡易判別法を確立しました。この方法では、死んだシラミからでもDNAを抽出し、解析が行えますので、櫛で採集したアタマジラミをラップやビニール袋(その他小さなプラスチック容器など何でも結構です)に包んだ後、封筒に入れて、郵送してください。(DNA抽出効率を低下させる恐れがありますので、シラミはホルマリンに浸せきしたり、水分を含んだ紙やセロテープに包まず、乾燥状態のままお送りいただくことをお願いいたします。)

|| 判定結果をお知らせします ||

遺伝子診断の結果が出次第、シラミを送っていただいた方には診断結果を電子メールにてお知らせします。

|| シラミを送っていただく際に教えていただきたい情報 ||

1. 採取日
2. 患者さんの性別、年齢、学年(幼稚園、保育園、小学校、中学校)
3. 患者さんの髪の毛の長さ(最長部)
4. スミスリン使用歴
5. 送付者のメールアドレス(判定結果をお知らせする場合)
6. その他シラミに関する情報があれば(最近学校で流行しているとか)

これらの情報は、サンプルシート(エクセルファイルもしくはPDFファイル)に記入して送っていただいても結構です。(エクセルファイルは右クリックして保存してください)

|| アタマジラミの送付先・お問い合わせ ||

図 4. ホームページによるアタマジラミ試料提供の依頼

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性、およびタイ国のデング熱媒介蚊調査に関する研究

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・准教授)
研究協力者	高崎智彦	(国立感染症研究所ウイルス1部・室長)
	田島 茂	(国立感染症研究所ウイルス1部・主任研究官)
	山尾卓也	(福岡大学大学院薬学研究科・修士課程2年)
	木原悠希	(福岡大学大学院薬学研究科・修士課程1年)
	佐藤朝光	(福岡大学薬学部・助教)
	水谷哲也	(国立感染症研究所ウイルス第1部1室・主任研究官)
	Rawewan Srisawat	(Mahidol University, Thailand)
	Narumon Komalamisra	(Mahidol University, Thailand)
	Yupha Rongsriyam	(Mahidol University, Thailand)
	牧野芳大	(大分大学医学部感染分子病態制御講座・教授)
	住吉秀明	(大分大学医学部生体分子構造機能制御講座・助教)
	濱中良志	(大分大学医学部生体分子構造機能制御講座・講師)
	川越和四	(大分イカリテクノス(株)・常務取締役)
	菊屋恵理子	(大分イカリテクノス(株)・技術担当)
	菊屋奈良義	(大分イカリテクノス(株)・代表取締役)
	野村英俊	(大分イカリテクノス(株)・専務取締役)
	船津良生	(日東防疫(有)・代表取締役)
	長野晴雄	(コクエイ消毒(有)・代表取締役)
	水田英生	(大阪検疫所・企画調整官)
	井村俊郎	(神戸検疫所・課長)
	内田幸憲	(神戸検疫所・所長)
	牛島廣治	(鹿児島国際大学・教授)
	高島郁夫	(北海道大学大学院獣医学研究科公衆衛生学教室・教授)
	小林睦生	(国立感染症研究所昆虫医科学部・部長)
	倉根一郎	(国立感染症研究所ウイルス1部・部長)

研究要旨 アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性を接種法および経口感染実験で調べた。また、力価の高いウイルス液を接種した場合は、4株ともほぼ同程度のウイルス増殖を示したが、力価の低いウイルス液を接種した場合は、ワクチン株と36~510倍ほどの差が3株で認められた。次に、経口感染後14日経過した蚊のウイルス力価は、接種法よりも10倍から100倍ほど何れの株でも低い値であった。経口感染した蚊が取り込んだウイルス力価を考慮しても、ワクチン株とJath16株が同程度の増殖であったのに対して、JaGAR01株は2倍ほど、三重株は10倍ほどの高いウイルス力価が認められた。接種法と経口感染の差は、いわゆる感染に対する中腸バリアーによる違いと考えられた。2007年5月タイ国のデング熱患者宅で採集したネッタイシマカからデングウイルス2型を分離した。ウイルス陽性蚊を検出した家で採集した蚊の総数の5~8%がウイルス陽性蚊であった。また、患者宅から採集したネッタイシマカ幼虫プールの上澄み液をC6/36細胞に接種して、デングウイルスゲノムを調べたが、何れも陰性であった。しかし、異なるウイルス様ゲノムが検出された

ので、その性状を調査中である。

A. 研究目的

1. アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性に関する研究目的

我が国の日本脳炎ウイルス (JEV) の遺伝子型は3型に加えて1型が1990年前後から分離されるようになった。遺伝子型の変化は、蚊のウイルス感受性に变化をもたらしているのか否かについての情報は多くない。また、JEVの主媒介蚊はコガタアカイエカではあるが、環境の変化に伴って都市部において第2媒介蚊種と言われるアカイエカの生息域が現在も温存されている。前述のウイルス遺伝子型の変遷と相まって、将来の日本脳炎患者勃発時の媒介蚊対策の一環として、日本産蚊のJEV感受性を再検討する必要があると思われる。今回はアカイエカを用いて検討した。

2. タイ国のデング熱媒介蚊調査の目的

デング熱は東南アジアで増加の傾向にある。デング熱の流行には媒介蚊のデングウイルス感染が重要な鍵となるが、感染蚊が引き起こす疾患の流行動態に関する情報は多くない。蚊のデングウイルス感染状況を調べて、患者発生前のサーベイランスに適用可能かどうか、また、ウイルス潜伏箇所としての患者宅の疫学的意義を検討することは、患者発生を未然に防ぐための対策を検討する重要な情報源となる。しかしながら、患者宅に潜む媒介蚊のネッタイシマカ雌成虫がデングウイルスにどの程度感染しているかという情報は極めて少ない。患者宅内の水源に発生する蚊幼虫のウイルス感染状況を把握するために、2006年同様に2007年も調査を継続した。将来のわが国でデング熱の二次患者が発症した際に、媒介蚊の感染動態を早期に把握する方法を確立することを目的として、一連の調査を行った。

B. 研究方法

1. アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性に関する研究方法

ウイルス： JEVのワクチン標準株の北京株、日本国内で分離された遺伝子型IIIに属する、JaGAR01株(蚊から分離)、JaTh160株、および遺伝子型Iに属する三重株(ブタから分離)を用いた。それらのウイルス株は、国立感染症研究所から入手した。大分大学で必要量のストックウイルス液を製後、分注して-80℃に保管した。また、アカイエカは、大阪で採集されたものを大日本除虫菊(株)から譲り受け、大分大学の飼育施設で継代飼育しているものを使用した。

蚊の感染： 羽化後1週間程の未吸血のアカイエカ *Culex pipiens pallens* 雌成虫を用いて、その胸部に段階希釈したウイルス液を0.02ul接種した。その後、8日間28℃で飼育した。その間4%砂糖水を含む綿を蚊に与えた。ハーベストした蚊は、ウイルス力価を個体別に測定するまで、-80℃に保管した。また、蚊の経口感染では、PBS(-)液で2回洗ったヒト赤血球に等量のウイルス液を加えた液に最終濃度2%の蔗糖を加えて、蚊に与えた。経口感染で取り込んだ吸液量を約3.3ulとして、蚊個体毎のウイルス力価をPAP法で算出した。

PAP試験： アカイエカ1個体毎に150ulの2%FBS含MEMを加えてホモジナイズした。その遠心(2,500rpm、10分、4℃)上澄みの濾過液(0.22um、ミリポアー社製)を、10倍段階希釈した後に、Vero細胞に接種して、PAP試験を行った。日本脳炎ウイルスに対するウサギ免疫血清を使用した。なお、PAP試験には、陽性および陰性の対照区を毎回設定した。蚊の濾過液によるウイルスの増殖程度は、Vero細胞上に抗体で染色した細胞のフォーカス数で定量をおこない、FFU/mlで表した。

2. タイ国のデング熱媒介蚊調査の方法

2007年5月下旬から6月初旬に、デングウイルス媒介蚊の調査を行った。現地において、デング熱患者情報を当日の午前バンコク市近郊の担当地区衛生部で得た後、

殺虫剤の散布チームと一緒にデング熱患者宅を訪問して、蚊成虫・幼虫を採集した。患者宅で採集した蚊をマヒドン大学研究室に持ち帰り、蚊成虫は約7日間、幼虫は老齢幼虫まで飼育して-80℃に保管した。採集後所定日数を経過したネッタイシマカ雌成虫は、40 ul の4%FBS 含 MEM 液を蚊一頭毎に加えてホモジナイズした遠心上澄みを用いて、デングウイルスゲノムの検出および血清型判定のために RT-PCR 法を行った。

ネッタイシマカの行動範囲が 100m 程に限られていること、および 2006 年の調査では同一患者宅内に複数の感染蚊成虫を採集したことから、経卵巣伝播による蚊幼虫のウイルス感染の有無を把握のために、患者宅およびその周辺の家屋内で発生している幼虫を採集した。蚊幼虫のプールを 150ul の 2%FBS 含 MEM を加えてホモジナイズした。その遠心(2,500rpm、10分、4℃)上澄みの濾過液(0.22um、ミリポアー社製)を、C6/36 細胞に接種して、28℃の 5%炭酸ガスインキュベーター内で 8 日間培養した。その培養上澄み液を用いて、RT-PCR を行いデングウイルスゲノムの検出を試みた。

(倫理面への配慮)

日本脳炎ウイルスは、国立感染症研究所から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感染実験に関して、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

1. アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性に関する実験結果

ウイルス力価の高い日本脳炎ウイルス液を接種したアカイエカ体内のウイルス力価には、個体毎のばらつきが認められた。しかし、調査個体数を増やして 7 個体を調べた結果、何れの株での平均はほぼ同程度の値となった(表 1)。しかし、低濃度のウイルス液を蚊に接種した場合は、それぞれ蚊 2 個体の結果ではあるが、接種したウイルス量の差を勘案して比率を求めると、ワクチン株と他の株とは 35 から 500 倍ほどの差

が認められた(表 2)。

また、経口感染後 14 日間を経過した蚊のウイルス力価について、各株とも 2 個体について検討した。その結果は、接種法で得られた値よりも低い値を示した(表 3)。また、経口感染した蚊が取り込んだウイルス力価を考慮して 4 株を比較すると、ワクチン株と Jath16 株が同程度の力価であるのに対して、JaGAR01 株は 2 倍ほど、三重株は 30 倍ほどの高い力価となった(表 3)。

2. タイ国のデング熱媒介蚊調査の結果

2007 年にネッタイシマカ雌成虫からデングウイルス 2 型のゲノムが RT-PCR によって検出された。しかしながら、ネッタイシマカ幼虫からのデングウイルスゲノムは検出されなかった。デング熱患者の家から感染蚊が採集された家は、11.8%であった。また、陽性蚊を発見した家において、陽性蚊の割合は採集総数の 5-8%であった(表 4)。

なお、デングウイルスゲノムとは異なるウイルス様のゲノムが蚊幼虫プールから検出された。詳細は、現在検討中である。

D. 考察

1. アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性についての考察

日本脳炎ウイルスを接種したアカイエカ体内のウイルス力価は、個体毎のばらつきが認められた。しかし、ワクチン株の北京株は、蚊体内では増えにくいのに対して、Jath160 株、JaGAR01 株および三重株は蚊体内で増えやすい傾向があった。同様な結果は、経口感染蚊で顕著に現れ、遺伝子型 I に属する三重株(ブタから分離)に対するアカイエカの感受性は、日本国内で分離された遺伝子型 III に属する JaTh160 株より高い結果が得られたが、JaGAR01 株(蚊から分離)とほぼ同程度であった。ウイルスの分離歴・マウス継代歴などを考慮する必要があるが、ブタから分離された遺伝子型 1 の三重株はアカイエカに対して増殖性が比較的高いと言えよう。今後、コガタアカイエカおよびヤブカ類を用いた経口感染試験が必要と考えている。

2. タイ国のデング熱媒介蚊調査に関する考察

2007年はネッタイシマカ雌成虫からデングウイルス2型のゲノムが検出された。2006年に検出されたデングウイルス4型のゲノムは検出されなかった。また、2006年の調査では、陽性蚊のいた家屋毎の陽性蚊の割合は採集総数の10-50%を占めていたが、2007年の調査では、蚊の陽性率は採集総数の5-8%と低かった。デング熱患者数およびデングウイルス感染蚊の密度が2006年と2007年では異なる事が示唆された。

ネッタイシマカ幼虫からのデングウイルスが検出できなかった要因として、蚊成虫の感染率が低かったことが示唆される。2008年度の調査では、ウイルス感染蚊と患者数の増加が予測される7月上旬の調査を予定したい。

蚊幼虫プールから詳細不明のウイルス様ゲノムが検出された。Vero細胞の初回継代でそのゲノムを検出できなかったことから、哺乳動物細胞には感染性がないことが推察されるが、今後の調査結果をまっけて、結論したい。

E. 結論

1. アカイエカ体内でのJEVの増殖をPAP法で検討した。高濃度のJEV液を接種した4株はほぼ同程度に蚊体内で増殖した。しかし、低濃度のそれを接種するとワクチン株の北京株よりも30倍から500倍ほど高い値となった。また、経口感染では、ワクチン株の北京株と比較して、Jath160株は同程度、JaGA r 01株は2倍程、三重株のそれは10倍程高い価となった。

2. 2007年5月タイのデング熱患者宅で採集したネッタイシマカ雌成虫からデングウイルス2型が検出された。また、陽性蚊が採集された家における蚊の感染率は採集蚊数の5-8%であった。ネッタイシマカ幼虫は、何れもデングウイルス陰性であった。また、性状不明なウイルス様ゲノムが蚊幼虫から検出された。

G. 研究発表

1. 論文発表

江下優樹, Srisawat, R. (2007) : デング熱とシマカ。特集「熱帯病と昆虫」(皆川昇編)。昆虫と自然、42(3) : 14-17。

Dieng, H., Satho, T. and Eshita, Y. (2007): The Effects of Male on the Blood Feeding behavior of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): Implications for laboratory oral feeding of *Aedes* vectors. Jpn. J. Environ. Entomol. Zool., 18(1): 17-22.

Dieng, H., Boots, M., Tamori, N., Satho, T., Higashihara, J., Okada, T., Kato, K., Komalamisra, N., Ushijima, H., Takasaki, T., Kurane, I. and Eshita, Y. (2007): Effects of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus*. House and Household Insect Pest, 28(2): 117-127.

Dieng, H., Satho, T. Miake, F. and Eshita, Y. (2007): Copepod predation and arbovirus control: potential thinning with focus on dengue epidemics. House and Household Insect Pest, 29(1): 1-25.

Eshita, Y., Takasaki, T., Takashima, I., Komalamisra, N., Ushijima, H., and Kurane, I. (2007): Vector competence of Japanese mosquitoes for dengue and West Nile viruses (III. Biology, Natural Products and Biotechnology). In: Pesticide Chemistry. Crop Protection, Public Health, Environmental Safety, (Edited by Ohkawa, J., Miyagawa, H. and Lee, P.W.), Wiley-VCH, Weinheim, pp.217-225.

江下優樹、牛島廣治 (2007) : デングウイルス、ウエストナイルウイルス。世界的にみた感染症の検査法 (牛島廣治 編)。臨床と微生物、34(4) : 287-294。

江下優樹, Srisawat, R., 高崎智彦, 水田英生, 井村俊郎, 内田幸憲, 小林睦生, 高島郁夫, 牛島廣治, 倉根一郎 (2007) : ウエストナイルウイルスにおける吸血昆虫とウイルス増殖。日本獣医学会家禽疾病学分会会報 (15) : 3-12。

Kihara, Y., Satho, T., Eshita, Y., Sakai, K., Kotaki, A., Takasaki, T., Rongsriyam, Y., Komalamisra, N., Srisawat, R., Lapcharoen, P.,

Sumroiphon, S., Iwanaga, S., Ushijima, H., Endoh, D., Miyata, T., Sakata, A., Kashige, N., Miake, F., Fukushi, S., Saijo, M., Kurane, I., Morikawa, S., and Mizutani, T. (2007): Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J. Virol. Methods*, 146(2007): 372-374.

江下優樹 (2007) : 海外旅行中に蚊に刺された! 蚊が媒介する病気にはどんなものがある? マラリア、デング熱、日本脳炎、ウエストナイル脳炎一。(特集: 意外と知らない!? 感染症)。チャイルドヘルス、10 (11) : 764-767。

Dieng, H., Boots, M., Higashihara, J., Okada, T., Kato, K., Satho, T., Miake, F. and Eshita, Y. (2007): Two-dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* with reference to meal status. *Med. Vet. Entomol.*, 21(3): 278-283.

Yoshi, M., Mine, M., Kurokawa, K., Oda, T., Kato, K., Ogawa, Y., Eshita, Y. and Uchida, K. (2007): Human blood feeding activity of female hybrids between *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Bull. Nagasaki Univ. Sch. Health Sci.*, 20(1): 91-93.

2. 学会発表

江下優樹, Srisawat, R., 高島郁夫、高崎智彦、水田英生、内田幸憲、小林陸生、倉根一郎 (2007) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (11) 北海道産ヤマトヤブカのウエストナイルウイルス感受性。第 59 回日本衛生動物学会大会。2007 年 4 月 2-4 日、大阪市、大阪市立大学、*Med. Entomol. Zool.*, 58 (Suppl.): 26, 2007。

木原悠希、佐藤朝光、酒井宏治、江下優樹、宮田 健、鹿志毛信広、見明史雄、水谷哲也 (2007) : 未知の蚊媒介性ウイルス検出を目的とした Whole genome amplification の応用。第 59 回日本衛生動物学会大会。2007 年 4 月 3-5 日、大阪市、大阪市立大学、*Med. Entomol. Zool.*, 58 (Suppl.): 28, 2007。

江下優樹 (2007) : ウエストナイルウイルスにおける吸血昆虫とウイルス増殖 (シンポジウム: 人畜共通感染症病原体との戦い)。第 143 回日本獣医学会。2007 年 4 月 3-5 日、茨城県つくば市、つくば国際会議場 (エポカルつくば)、第 143 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集: 108 (ES-2), 2007。

水谷哲也、木原悠希、佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、高崎智彦、小滝徹、遠藤大二、福士秀悦、緒方もも子、西條政幸、倉根一郎、森川 茂 (2007) : 新興・再興ウイルスの網羅的検出方法、蚊媒介ウイルスへの応用。第 144 回日本獣医学会学術集会、北海道江別市、2007 年 9 月 2, 3, 4 日、酪農学園大学, 2007。

Diaz Aquino Jose, 湯 偉峰、石井竜一、小野哲郎、青野裕士、江下優樹、牧野芳大 (2007) : パラグアイにおけるデングウイルス 2・3 型の分子疫学、2001-2006。第 48 回日本熱帯医学会大会。2007 年 10 月 12 日 (金) - 13 日 (土)。別府市、別府ビーコンプラザ、*Trop. Med. Hlth.*, 35 (増刊号): 12D-07。

江下優樹、Srisawat, R., Komalamisra, N., Rongsriyam, Y., 青野裕士、牧野芳大、牛島廣治 (2007) : タイ国のデング熱患者宅で採集した蚊のデングウイルス感染。第 48 回日本熱帯医学会大会。2007 年 10 月 12 日 (金) - 13 日 (土)。別府市、別府ビーコンプラザ、*Trop. Med. Hlth.*, 35 (増刊号): 12D-21。

日隈晴香、中山俊之、江下優樹、牧野芳大、三舟求真 (2007) : 別府市における輸入デング熱の一症例。第 48 回日本熱帯医学会大会。2007 年 10 月 12 日 (金) - 13 日 (土)。別府市、別府ビーコンプラザ、*Trop. Med. Hlth.*, 35 (増刊号): 13D-11。

佐藤朝光、木原悠希、江下優樹、酒井宏治、見明史雄、牛島廣治、高崎智彦、小滝 徹、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川 茂、水谷哲也 (2007) : ウイルスの網羅的検出方法、RDV 法による蚊媒介性 RNA ウイルスの検出。ペスチウイ

ルス研究会、北海道札幌市、2007年10月20日、札幌コンベンションセンター、2007。

佐藤朝光、江下優樹、酒井宏治、見明史雄、牛島廣治、高崎智彦、小滝 徹、遠藤大二、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川 茂、水谷哲也 (2007) : タイで採集されたネッタイシマカからの RDV 法による RNA ウイルスの検出。第 55 回日本ウイルス学会学術集会、北海道札幌市、2007年10月21-23日、札幌コンベンションセンター、2007。

木原悠希、佐藤朝光、酒井宏治、江下優樹、宮田 健、鹿志毛信広、見明史雄、水谷哲也 (2007) : Rapid Determination of Viral RNA Sequence (RDV) 法による蚊媒介性 RNA ウイルスの検出。第 60 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 57 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会。2007年10月27-28日、熊本市、熊本市現代美術館アートロフト。

Eshita, Y., Srisawat, R., Komalamisra, N., Rongsriyam, Y., Takasaki, T., Kurane, I., Imura, S., Uchida, Y., Takashima, I., and Ushijima, H. (2007) : Experimental vectorial capacity of arbovirus-infected mosquitoes. Joint International Tropical Medicine Meeting 2007 "Health Security in the Tropics". 29-30 November, 2007. Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand. Symposium session on S12 Vector control. Abstract of Joint International Tropical Medicine Meeting 2007 (JITMM 2007): 85.

H. 知的財産の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 高濃度の日本脳炎ウイルスを接種した
アカイエカ体内でのウイルス増殖

ウイルス の株	Stock virus 力価*	蚊個体のウイルス力価* (平均)	
		接種直後**	接種8日後**
北京	1.0x10 ⁸	ND***	4.1x10 ⁷
Jath16	2.3x10 ⁸	ND	4.2x10 ⁷
JaGAR01	2.0x10 ⁸	ND	4.3x10 ⁷
三重	4.0x10 ⁸	ND	6.9x10 ⁷

* PAP法によるウイルス力価 (FFU/ml)

** 蚊 1 個体あたり接種量 : 0.02 ul (2x10³~8x10³ FFUに相当)

*** 検出限界

表2 低濃度の日本脳炎ウイルス液を接種した
アカイエカ体内での ウイルス増殖

ウイルス の株	希釈した Stock virus 力価*	蚊個体のウイルス力価* (平均)	
		接種8日後**	比率
北京	1.0x10 ⁵	4.9x10 ⁴	1
Jath16	2.3x10 ⁵	7.0x10 ⁶	61
JaGAR01	2.0x10 ⁵	5.0x10 ⁷	510
三重	4.0x10 ⁵	7.2x10 ⁶	36

* PAP法によるウイルス力価 (FFU/ml)

** 蚊 1 個体あたり接種量 : 0.02 ul (2x10⁰~8x10⁰ FFUに相当)

表3 日本脳炎ウイルス液を経口感染したアカイエカ体内でのウイルス増殖

ウイルスの株	Stock virus 力価*	経口感染したウイルス力価*	
		14日後	比率
北京	1.0x10 ⁸	2.7x10 ⁵	1
Jath16	2.3x10 ⁸	6.3x10 ⁵	1.0
JaGAR01	2.0x10 ⁸	1.0x10 ⁶	1.9
三重	4.0x10 ⁸	1.2x10 ⁷	11.1

* PAP法によるウイルス力価 (FFU/ml)

** 満腹吸液量は、平均3.3ul (3.3 × 10⁵ ~ 13.2x10⁵ FFUに相当)

表4 デング熱患者宅内で採集したネッタイシマカのデングウイルス感染状況

調査年・ 調査した 患者家数	<i>Aedes aegypti</i> 成虫			蚊陽性の家 における 感染蚊の数 (%)
	採集でき た家数 +	採集できな かった家数 -	感染蚊 陽性の 家数 (%)	
2006年 26軒	22	4	6 (23.1%)	2*/15 (13%), 2/ 4 (50%) 3/ 6 (50%), 1/10 (10%) 1/ 7 (14%), 1/ 3 (3%)
2007年 18軒	17	1	2 (11.8%)	1/12 (8%), 1/21 (5%)

* 感染蚊数 / 採集した蚊数 (感染蚊の割合)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子検出

分担研究者；高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究協力者；水野泰孝、加藤康幸（国立国際医療センター国際疾病センター）

小滝 徹、平山隆則、田島茂、倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部）

デング熱は蚊によって媒介されるデングウイルス感染により引き起こされる急性熱性疾患である。デングウイルスには4つの型のウイルスが存在し、抗原的に近縁であるが交差防御能は低い。熱帯・亜熱帯地域特に東南アジア、南アジア、中南米で大きな流行を繰り返しており、年間1億人がデング熱を発症し、50万人以上がデング出血熱を発症すると推定されている。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年間50例以上報告されている。通常デングウイルス検出は、急性期の血液中から検出されるが、出血傾向の強いデング出血熱患者からの採血が困難な場合が多いため、尿や唾液からのウイルス遺伝子の検出を33症例に関して試みたところ、12症例の尿、唾液から遺伝子を検出し、5症例に関して遺伝子解析にも成功した。現在のところ、尿からデングウイルスは分離されていない。

A. 目的

デング熱は蚊によって媒介されるデングウイルス感染により引き起こされる急性熱性疾患である。デングウイルスには4つの型のウイルスが存在し、抗原的に近縁であるが交差防御能は低い。熱帯・亜熱帯地域特に東南アジア、南アジア、中南米で大きな流行を繰り返しており、年間1億人がデング熱を発症し、50万人以上がデング出血熱を発症すると推定されている。デング出血熱では顕著な血小板減少のみならず血漿漏出による胸水・腹水貯留をきたし、重症例ではデングショック症候群に進展する。ワクチンはまだ実用化されておらず特異的

治療法はない。デングウイルス感染症の実験室診断は、通常 RT-PCR 法により血清からのウイルス遺伝子の検出および IgM 捕捉 ELISA 法による特異的 IgM 抗体の検出によって行われている。しかし、デング出血熱患者においては、出血傾向が強く採血が困難な場合が多い。このため、我々は血清でなく尿や唾液を用いた病原体検出法を検討した。

B. 方法

我々は2006年よりデング熱患者の診断検査に際し、血液とともに尿および唾液からのウイルス検出を検討した。デングウイ

ルス輸入症例 33 例につき、血液（血清）および尿、唾液を採取した。急性期から回復期まで検体が採取できた症例が 19 例、急性期のみの症例が 14 例であった。尿は簡易濃縮遠心チューブにて 5 倍に濃縮し、それぞれ 200 μ l から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) により、ウイルス遺伝子を検出した。リアルタイム RT-PCR 法は伊藤ら (J.Clin.Microbiol.42(12):5935-5937,2004) の方法により実施した。TaqMan 法で陽性であった検体に関して、通常の RT-PCR を実施し、増幅された検体については、シーケンス解析を行い血清中から検出されたウイルス遺伝子と比較検討した。

デング熱診断のための血清抗体検査は 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。リアルタイム PCR により陽性であった 4 症例の検体に関して、通常の PCR を実施したところ 2 症例の検体で産物が増幅・検出された。cDNA の増幅 (E 遺伝子領域) が確認された検体は、デングウイルス 1 型用のプライマーを用いてダイレクトシーケンスにより、ベックマンコールター社のプロトコールに従い塩基配列を決定した。

一方、ウイルス遺伝子を検出した尿はフィルターろ過した後、Vero 細胞および C6/36 細胞および Vero 細胞に接種し、ウイルス分離を実施した。

C. 結果

輸入デング熱 33 症例に関して、尿・唾液中のウイルス遺伝子検査を実施した。血清からウイルス遺伝子が検出できた症例は

19 症例で検出率は、57.6%であった。一方、尿中から遺伝子が検出された症例は 12 例で、検出率は 36.4%であった。また、33 症例のうち唾液が採取できたのは 17 症例であった。唾液からウイルス遺伝子が検出された症例は 2 例であった。尿中からデングウイルス遺伝子を検出した検体は、現在までのところ、その時点での血清抗デングウイルス抗体は陽性である。発病後 3 日目という急性期に検出した症例は、再感染例であると考えられ、その時点ですでに IgG 抗体、IgM 抗体ともに陽性であった。

尿中からデングウイルス遺伝子を検出した上記 12 症例の腎機能には特に異常を認めなかった。また、尿検体からのウイルス分離の結果、ウイルスは分離されなかった。

尿中デングウイルス遺伝子の解析にいたった症例 5 例のウイルス型別は、1 型 2 例、2 型 1 例、3 型 1 例、4 型 1 例であった。血液からのウイルス遺伝子も検出できた症例が、4 例でありいずれも尿中と血中ウイルス遺伝子配列は 100%一致した。

D. 考察

すべての症例で尿中や唾液中からウイルス遺伝子を検出できるわけではなかったが、検出できる症例が存在することが確認された。すべてのウイルス型で検出できることも確認された。ウイルス血症が消退した後にも、ウイルス遺伝子を検出できることは病原体診断上非常に意義がある。尿中および唾液中からのデングウイルス遺伝子の検出は通常臨床の現場では実施されていないが、一般的尿検査はよく実施されている。従って特に検体の採取に困難な小児や出血傾向の強い患者に対しては侵襲の少ない

わめて有用な方法であると考えられる。また検出期間も血清に比べ長期であったことより、解熱後の患者においてもウイルス遺伝子を検出できるため、ウイルス型別の診断に有用である。

また、尿中に感染性ウイルスが存在するか否かに関しては、培養細胞を用いたウイルス分離を実施したが、ウイルスが分離されなかったことから、その可能性は低いものと考えられるが、発熱中はもちろん解熱後も尿や唾液の取り扱いにあたっては通常の基本的な注意が必要である。

E. 結語

デング熱症例の中に尿中や唾液中からウイルス遺伝子を検出できる症例が存在することが確認された。そして、それらの症例ではウイルス血症が消退した後にも、ウイルス遺伝子を検出できた。このことは、デング熱の病原体診断上非常に意義があり、今後積極的に実施するべきである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Y. Mizuno, A. Kotaki, F. Harada, S. Tajima, I. Kurane, T. Takasaki. Confirmation of dengue virus infection by detection of dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma. *Trans. R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(7):738-739.

Nawa M., Machida S, Takasaki T, Kurane I. Plaque formation by Japanese encephalitis virus bound to mosquito C6/36 cells after low pH exposure on the cell surface. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2007 60: 118-120.

Dewi BE, Takasaki T, Kurane I. Peripheral

blood mononuclear cells increase the permeability of dengue virus-infected endothelial cells in association with downregulation of vascular endothelial cadherin. *J Gen Virol.* 2008 Mar;89, 642-52.

Ito M, Yamada K, Takasaki T, Pandey B, Nerome R, Tajima S, Morita K, Kurane I. Phylogenetic analysis of dengue viruses isolated from imported dengue patients: possible aid for determining the countries where infections occurred. *J Travel Med.* 2007 Jul-Aug;14(4):233-44.

Tajima S, Nukui Y, Takasaki T, Kurane I. Characterization of the variable region in the 3' non-translated region of dengue type 1 virus. *J Gen Virol.* 2007 Aug;88(8):2214-22.

Tajima S, Takasaki T, Kurane I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes.* 2008 Feb 21; [Epub ahead of print]

2. 学会発表

水野泰孝、加藤康幸、原田文植、工藤宏一郎、高崎智彦、倉根一郎. 尿および唾液中よりデングウイルス遺伝子が検出された 1 例. 第 81 回日本感染症学会 (京都) 2007 年 4 月 10-11 日

貫井陽子、田島 茂、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルス Genotype shift の生物学的意義. 第 81 回日本感染症学会第 (京都) 2007 年 4 月 10-11 日

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二. プタ流産予防を目的とした日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (石川県白山市)

田島 茂、貫井陽子、根路銘令子、高崎智彦、倉根一郎. Genotype 間キメラウイルスを用いた日本脳炎ウイルスの性状解析. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 (石川県白山市)

Meng Ling Moi, Lim Chang-Kweng, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Role of human Fc-gamma II receptor in antibody dependent enhancement of dengue viral infection. 3rd Asian Regional Dengue Research Network Meeting. 2007. August, 21-24.

高崎智彦. 輸入デング熱の診断と治療. 平成 19 年度第 2 回静岡県感染症医療関係者研修会. (静岡市) 2007 年 10 月 13 日

林 昌宏、高崎智彦、小滝 徹、モイ メンリン、伊藤美佳子、倉根一郎. チクングニヤ熱輸入症例患者血清より日本で初めて分離されたチクングニヤウイルスの性状解析. 第 55 回日本ウイルス学会 (札幌市) 2007 年 10 月.

田島 茂、高崎智彦、倉根一郎. デング 1 型ウイルス NS1 糖鎖付加部位変異がウイルス複製に及ぼす影響. 第 55 回日本ウイルス学会 (札幌市) 2007 年 10 月.

藤井克樹、北浦一孝、高崎智彦、鈴木隆二、

倉根一郎. 日本脳炎ウイルス感染マウスにおける脳内浸潤細胞の T cell receptor レパートア解析. 第 55 回日本ウイルス学会 (札幌市) 2007 年 10 月.

貫井陽子、田島 茂、根路銘令子、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎. 日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定. 第 55 回日本ウイルス学会 (札幌市) 2007 年 10 月.

高崎智彦、田島 茂、小滝 徹、水野泰孝、倉根一郎. デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子検出. 第 55 回日本ウイルス学会 (札幌市) 2007 年 10 月.

名和 優、町田早苗、高崎智彦、田島 茂、水野泰孝、倉根一郎. デングウイルス感染の抗体検査: 患者尿中の IgA 抗体検出. 第 55 回日本ウイルス学会 (札幌市) 2007 年 10 月.

H.知的財産権の出願・登録状況

なし

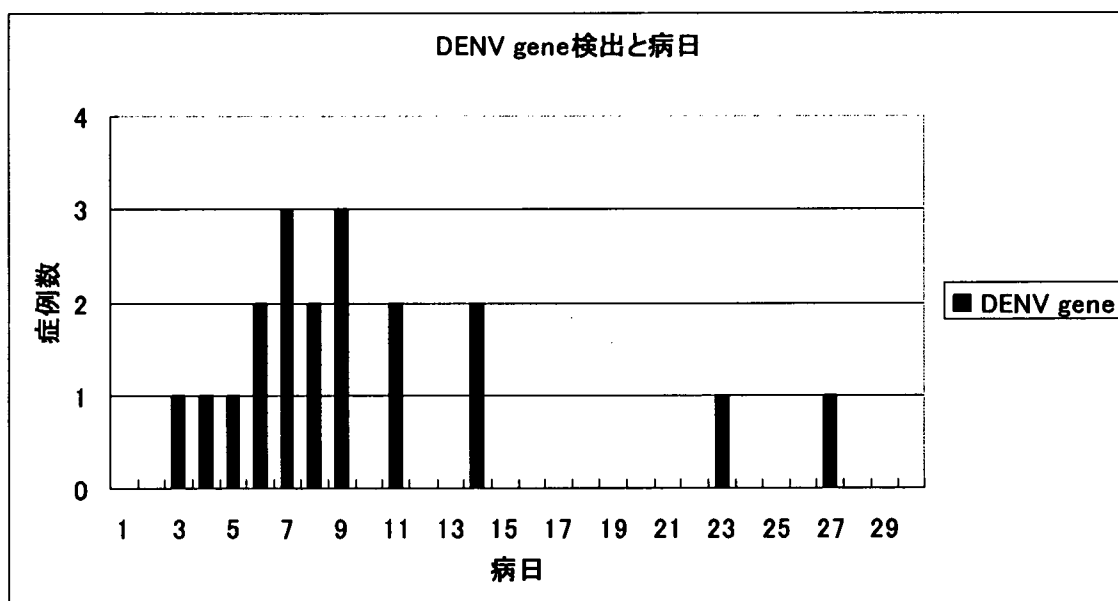
表1. 尿・唾液・血液からのデングウイルス遺伝子検出症例数と検出率 (33 症例中)

	デングウイルス検出			尿中ウイルス遺伝子の解析に至った症例
	尿	唾液	血液	
陽性数	12	2	19	5
検体数	33	17	33	33
検出率	36.4	11.8	57.6	12.1

表2. 濃縮尿からのウイルス遺伝子検出の検討

Case ID #	Sample ID #	Specimen	TaqMan PCR Virus type (Ct 値)	Days after onset
	07-63/1	血液	D2 (16.0)	1
	07-63/2	血液	D2 (26.7)	4
07-63	07-63/3	血液	D2 (32.5)	6
		尿(5倍濃縮)	D2 (29.6)	
		尿(原液)	D2 (35.5)	
	07-63/4	血液	D2 (35.5)	11
		尿 (5倍濃縮)	D2 (31.7)	

図1. 尿中からのデングウイルス遺伝子検出と病日の関係



尿中ウイルス遺伝子は、IgM抗体が上昇する4—5病日移行に検出されることが多い。3日目に検出された検体は、再感染例で3日目の時点でIgM抗体、IgG抗体ともに陽性であった。