

表2 エタノール、ショ糖、洗剤のアカイエカ幼虫に対する殺虫効果  
(2反復平均)

a. エタノール

|     | エタノール |      |      |      |
|-----|-------|------|------|------|
|     | 0.5   | 1    | 2    | 4(%) |
| 1日後 | 4.1   | 13.3 | 79.6 | 100  |
| 3日後 | 19.0  | 38.1 | 100  | 100  |

b. ショ糖 (ザラメ)

|     | ショ糖(ザラメ) |      |       |
|-----|----------|------|-------|
|     | 5        | 10   | 20(%) |
| 1日後 | 0        | 10.9 | 100   |
| 3日後 | 38.2     | 95.2 | 100   |

a. 台所用洗剤

|     | 台所用洗剤  |        |        |          |
|-----|--------|--------|--------|----------|
|     | 0.0156 | 0.0313 | 0.0625 | 0.125(%) |
| 1日後 | 0      | 89.1   | 100    | 100      |
| 3日後 | 7.4    | 100    | 100    | 100      |

表3 チカイエカ感受性および抵抗性系統に対する食塩水の殺虫効果  
(2反復平均)

|     | 1.5%食塩水中の致死率 |      |
|-----|--------------|------|
|     | 感受性          | 抵抗性  |
| 1日後 | 4.1          | 26.0 |
| 3日後 | 100          | 100  |

表4 食塩水に対する成虫の産卵状況  
(2反復合計)

|            | 産卵(舟)数(産卵抑制率) |             |            |
|------------|---------------|-------------|------------|
|            | 0             | 0.5         | 1.0        |
| アカイカ(卵舟数)  | 52            | 66 (0)      | 0 (100)    |
| ヒスジシマカ(卵数) | 2324          | 1503 (35.3) | 453 (80.5) |

※数値は2反復の合計

アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

研究分担者 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)

日本、米国、英国のピレスロイド系殺虫剤抵抗性アタマジラミには、ナトリウムチャンネル遺伝子に四重アミノ酸置換突然変異が共通に見出されている。これら4つの座位を対象にして、SNaPshot法によりアタマジラミ罹患患者より採取したシラミがもつナトリウムチャンネル遺伝子のジェノタイプングを行った。2006年から2008年の3年間に29都道府県より407コロニー分のシラミを収集して調査した結果、北海道と沖縄県を含む13都道県に由来する34コロニー(8.4%)に、四重変異を共通に生じている遺伝子が含まれていた。試料収集年ごとの抵抗性遺伝子を有するコロニーの検出率は、2006年の4.8%(試験コロニー数(N)=42)、2007年の6.2%(N=178)、および2008年の11.2%(N=187)であり、抵抗性コロニーの増加傾向が示された。特定の小学校に抵抗性のシラミが蔓延しているケースも明らかになった。抵抗性遺伝子を保有していたアタマジラミに小児が罹患していたケース5例について、保護者へ駆除の経過を聴取したところ、いずれのケースでも、使用書通りの適用では駆除薬の有効性がないことが示された。

A. 研究目的

ここ数年、自治体に寄せられるアタマジラミ被害相談が増えているという報道がくり返されている。東京都の調査によると、2005年度の都内における被害相談件数は720件だったが、2006年度には1,125件に、さらに2007年度には1,864件に達し、毎年約5割増のペースで増加した。ほかにも、同様に被害相談件数が急増し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)があると報じられている(週刊SPA!, 2007年10月30日)。被害の急増が伝えられる原因は不明である。わが国でヒジラミ用駆除剤の販売を唯一手がける製薬会社は、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患者数を約50万人と推定した(朝日新聞, 2007年10月9日)。

わが国でヒ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。

我々が国立感染症研究所昆虫医科学部で2001年より2006年まで、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、ろ紙接触法に基づく抵抗性の判別を調査してきた。その結果、27コロニー中の3コロニーがフェントリン抵抗性と判定された。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、四重アミノ酸置換変異(D11E, M850I, T952I, L955F; 順に、N末端近傍, DIIS1-2細胞外ループ, DIIS5膜貫通セグメント, 同左)を生じていた。

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年代後半から学術誌でも頻繁に掲載されるようになってきている。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、殺虫試験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、まず、少なくとも T952I 置換変異と抵抗性との因果関係が明瞭に示された(Yoon et al., 2003; Kristensen et al., 2006)。最近の神経生理学的研究により、四重アミノ酸置換変異のうち E11 を除く残りの 3 つの変異は、いずれもピレスロイド感受性の低下に影響を及ぼすことが確かめられている(Yoon et al., 2008)。

アタマジラミは吸血源から離すとその多くが一日以内に死に始め、バイオアッセイに利用できなくなる。したがって、従来通りの試料収集ペースと試験方法では、抵抗性コロニーが出現する頻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、本研究開始に際し、まず、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ために SNaPshot 法を確立した。この分子検出法に基づき、日本で現在用いられているピレスロイド系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ようと試みた。

昨年度の研究報告では、SNaPshot 法による抵抗性ナトリウムチャンネル遺伝子検出法の開発とそれを利用した 2006 年度末までに採取された試料 ( $N=54$ ) についての解析結果を述べた。本報告書ではその結果も採録した上で、それ以降 2008 年 12 月末までに採取された試料 ( $N=353$ ) につき併せて解析した結果を述べる。

## B. 研究方法

アタマジラミ試料収集: 2007 年度以降のアタマジラミ試料は、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。おもに、医療機関、次いでアタマジラミ罹患者の保護者より試料が提供された。

分子ジェノタイプング: SNaPshot 法を適用し、ナトリウムチャンネルの D11E, M850I, T952I, L955F 置換変異を検出した。死亡し乾燥した状態で郵送されるシラミを使い、個体ごとに DNA を抽出し、マルチプレックス PCR でナトリウムチャンネル遺伝子の 3 断片を同時に増幅し、増幅された DNA を鋳型にして SNaPshot 反応を行い、最後に、対象とした 4 座位に関する遺伝子型を DNA シークエンサ上で解析した。卵の場合は、コロニーごとにまとめて DNA 抽出

を行い、その中に抵抗性遺伝子が含まれていたかどうかについて解析した。詳細については昨年の報告書に記載したとおりである。

## C. 研究結果

2006 年から 2008 年末までの 3 年間に採取されて解析可能であったシラミの個体数とコロニー数を表 1 に示す。同一家族の複数名が寄生していて、それらのシラミが採取された場合は、一つのアタマジラミコロニーから採取された試料と数えた。3 年間の調査を通算して、407 コロニー分、1005 個体(複数の卵をまとめて処理したケースも 1 個体として数に換算)を試験した。試料は 29 都道府県より寄せられ、このうち、抵抗性遺伝子を含むコロニーは北海道と沖縄県を含む 13 都道県で見つかった(図 1)。抵抗性コロニーの出現率は、3 年間の通算で 8.4%であった。各年別に見ると、2006 年の 4.8% (試験コロニー数 ( $N$ )=42)、2007 年の 6.2% ( $N=178$ )、および 2008 年の 11.2% ( $N=187$ ) であり、抵抗性コロニーが増加した傾向も示された(表 1)。

抵抗性遺伝子は全部で 34 のコロニーから検出された。その採集情報と抵抗性遺伝子の接合性については表 2 に示す。抵抗性遺伝子は、検査対象とした 4 座位に関し、すべて四重アミノ酸置換変異 (D11E, M850I, T952I, L955F) を有していた。また、抵抗性遺伝子のヘテロ接合体しか見出されなかった 4 コロニーを除く残りの 30 コロニーからは、ホモ接合体の存在が確認された。アミノ酸置換を生じている相同座位はアタマジラミの場合と異なるものの、イエバエのピレスロイド低感受性変異をコードするナトリウムチャンネル遺伝子(抵抗性遺伝子)は遺伝学的に完全劣性に近い。一方、アタマジラミの場合、四重アミノ酸置換を生じている突然変異遺伝子が示す優性の度合いは不明である。アタマジラミの抵抗性遺伝子がイエバエと同様な優性の度合いを示すと仮定すると、ピレスロイド系駆除薬の利用以前に駆除薬の効力が失われていると見なされるコロニーが大半であったことがわかる。同じ医療機関で別家族より採取された抵抗性遺伝子を含むシラミコロニーの例が、東京都江東区で 5 件、兵庫県赤穂市で 8 件あった。採集情報によるといずれの医療機関の場合も、それぞれの地域で同じ小学校に通う小児たちに見出された。

#### D. 考察

われわれは、従来、四重アミノ酸置換変異を生じている抵抗性型ナトリウムチャンネル遺伝子をホモ接合でもつアタマジラミがピレスロイド抵抗性の原因であることを、殺虫剤含浸ろ紙への継続接触法による殺虫試験で示してきた(Kasai et al., 2003; Tomita et al., 2003, 2005)。今回の研究を進める中で、アタマジラミ駆除薬として販売されているシャンプー製剤を実際に用いた場合の経過について、抵抗性遺伝子が検出された試料を提供した保護者からコメントが試料とともに送られてきた(資料 1)。抵抗性遺伝子を保有するアタマジラミに寄生されていたいずれのケースでも、駆除剤の効力がなかったことが示されていた。2つの例では、1クールの駆除剤適用で、その期間中の2回目以降の処理において、コーミングで補足されるシラミの数が期待通りに減らないことから、駆除薬の効力が無いことに気づいた(資料 1A, B)。他の3例では、駆除薬の効力を疑いながらも結果的に2クール以上の駆除剤使用に至り、最終的には、駆除薬の利用を自主的に止めるか、または感染研からの抵抗性遺伝子検査結果に基づき利用を止めた(資料 1C, D, E)。資料 1B, E のケースでは、感染研昆虫医学部発の抵抗性情報を紹介した新聞記事(または学校配付のプリント)を読んだことが直接のきっかけとなり、駆除薬の効力に疑問をいだいたことがわかる。資料 1C のケースでは、駆除薬適用1クール後に保護者が駆除の失敗を駆除薬販売元に報告したが、その後も3クール目まで駆除薬を利用し続けた。このケースでは、保護者からのクレームに際して、駆除剤の販売元がピレスロイド抵抗性情報を適切に与えなかったことが疑われる。

欧米の例から見ても明らかのように、今後、わが国でアタマジラミ駆除薬としてピレスロイド系の薬剤しか利用できないとすると、抵抗性コロニーの発生率が上昇し、駆除法をめぐってそうした混乱が予想される。本研究では、ピレスロイド抵抗性アタマジラミが蔓延していると疑われる施設が少なくとも2つの自治体にあったことが指摘された(表 1: 東京都江東区、兵庫県赤穂市)。現在、わが国におけるアタマジラミ駆除は、ピレスロイド系駆除薬とシラミ駆除専用すき櫛に頼るしかない。学校や保健所が保護者に向けて発する情報も、いずれかの手段を保護者の

判断に委ねて選択させるものである。抵抗性コロニーの出現率は約 1割と推定されたことを考慮すると、ほとんどのアタマジラミ罹患患者にとっては、使用書通りに使えば10日間の処理期間後に駆除が行える駆除薬の利用が、確実に楽な駆除方法といえるかもしれない。しかしながら、抵抗性が蔓延していると疑われる施設においては、学校または保健所等がいち早くそれに気づき、櫛を使った物理的駆除方法に切り替えを行うよう、注意喚起または勧告が発せられるべきである。そのためには、ふだんより抵抗性シラミの存在と対策について適切な情報を自治体や学校レベルでも保護者に向けて与えておくことが必要である。また、アタマジラミの発見方法や駆除方法を知らせるだけにとどまらず、駆除が確実になされたかを確認することも必要である。保護者の側においては、駆除薬を使用書通りに処理するだけでなく、処理直後または入浴後のすき櫛を使ったコーミングにより、捕まるシラミの数を入念にモニターし、駆除効果を確認することが重要である。駆除薬として用いられるスミスリン製剤をピレスロイド感受性シラミに対して使用書通りに処理すれば、1回目の処理を終えた後にほとんどの幼虫と成虫が取り除かれるはずであり、その後2日ずつ置いて2~3回繰り返す処理では、卵から孵化した1齢幼虫を取り除くことを主な目的としている。この点を念頭に置けば、抵抗性シラミに罹患していた場合、捕獲されるシラミ数が処理の回を重ねても容易に減少しないことから、抵抗性の疑いをもつことができる。

これまでに、沖縄県で発生した3コロニー分のシラミを試験したが、そのすべてが抵抗性遺伝子をもつコロニーであった(表 2)。調査例をさらに重ね、他県とは大きく異なる抵抗性シラミの蔓延がないか、注視する必要がある。

現在の SNaPshot 法による解析には、ほとんどの場合、2日間を要していた。34コロニーから検出されたナトリウムチャンネル抵抗性遺伝子は、一貫して四重アミノ酸置換突然変異を有していたことから、解析の対象を DIIS5 膜貫通セグメント内で近接する T952I と L955F の2つの変異に絞り、より手順と所要時間をセーブする分子ジェノタイプ法に替えることも必要である。現在、新たな方法を開発し検討中である。地方自治体等の検査機関でも抵抗性の分子検査が実施されるようになることが望ましい。分子検

査は、抜き取り調査であったにせよ、不適切な駆除処理による駆除失敗の可能性を排して、抵抗性シラミの存在を客観的に示すことができる。アタマジラミ発生の事実は、とすると、学校や地域の評判を気にして、学校名や地域名を公にすることがはばかられたり、遅れたりしがちである。自治体の衛生研究所がこうした検査を行うことができれば、管轄域の教育委員会や保健所等との対策協議がより円滑に行われるようになるものと期待される。

英国では、これまで化粧品成分として利用されてきたジメチコンとミスチン酸イソプロピルをそれぞれ有効成分とする新しいアタマジラミ駆除薬が現在利用可能になっている。カナダ、米国、オーストラリア、および、ほかの欧州諸国でも同様に利用可能になりつつある。これらの有効成分はいずれもシラミ気門または皮膚による体内水分量調節を阻害する作用を示し、これらを使った駆除薬は、原理的に抵抗性発達の恐れのないものと考えられている。わが国においても、現駆除薬の効力低下が今後大きな社会問題化する前に、新薬の開発や既開発品の登録が急がれる。

#### E. 結論

1. 2006年から2008年の3年間に29都道県から収集した407コロニー分のアタマジラミを検査したところ、抵抗性ナトリウムチャンネル遺伝子の保有率は8.4%であった。
2. 抵抗性遺伝子を保有するコロニーの出現率には増加傾向がうかがえ、2008年に収集した試料における抵抗性遺伝子保有コロニーの率は11.2%であった。
3. 抵抗性アタマジラミは全国に分布していると推測されるが、特定の施設に通う小児の間に抵抗性シラミが蔓延しているケースも認められた。

#### F. 研究危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kasai S, Ishii N, Natsuaki M, Fukutomi H, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T, Prevalence of *kdr*-like mutations associated with pyrethroid resistance in human head louse populations in Japan, *Journal of Medical Entomology*, 46: 77-82, 2009.

富田隆史, アタマジラミの現状と対策, 保育と保健ニュース, 第42号: 4, 2008

富田隆史, 薬学の時間 2008年4月3日放送「アタマジラミの流行」,

<http://medical.radionikkei.jp/premium/entry-157465.html?login>

##### 2. 学会発表

Kasai S, Ishii N, Natsuaki M, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T, Monitoring of *kdr*-mediated pyrethroid resistance in Japanese colonies of head lice, 4th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, June 2, 2008.

葛西真治, 石井則久, 駒形修, 小林睦生, 富田隆史, 福富裕之, 夏秋優, ピレスロイド剤抵抗性アタマジラミの分子診断法, 第60回日本衛生動物学会大会, 2008年4月19日.

富田隆史, 石井則久, 夏秋優, 福富裕之, 駒形修, 小林睦生, 葛西真治, アタマジラミのピレスロイド抵抗性遺伝子の保有率, 第60回日本衛生動物学会大会, 2008年4月19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. ビレスロイド抵抗性ナトリウムチャンネル遺伝子を含むアタマジラミコロニーと個体の割合

| 採集年  | 個体ベースの解析数 |             |      | コロニーベースの解析数 |               |      |
|------|-----------|-------------|------|-------------|---------------|------|
|      | 全個体       | 抵抗性遺伝子をもつ個体 | %    | 全コロニー       | 抵抗性遺伝子をもつコロニー | %    |
| 2006 | 92        | 2           | 2.2  | 42          | 2             | 4.8  |
| 2007 | 448       | 30          | 6.7  | 178         | 11            | 6.2  |
| 2008 | 465       | 62          | 13.3 | 187         | 21            | 11.2 |
| 総計   | 1005      | 94          | 9.4  | 407         | 34            | 8.4  |

コロニーとは、一人の患者もしくは一つの家族から採取されたアタマジラミの集団をさす。

表 2. 抵抗性遺伝子が検出されたアタマジラミコロニーの採集情報と遺伝子型

| 試料受領日      | 採取地     | 性別   | 年齢    | 薬剤使用歴 | 個体数  | 遺伝子型* |
|------------|---------|------|-------|-------|------|-------|
| 2006/08/26 | 神奈川県川崎市 | 女    | 7     | あり    | 1    | ホモ    |
| 2006/10/14 | 茨城県つくば市 | 不明   | 不明    | 不明    | 1    | ホモ    |
| 2007/02/26 | 長野県長野市  | 女    | 7     | なし    | 5    | ホモ    |
| 2007/03/07 | 兵庫県川西市  | 女    | 6     | なし    | 1    | ヘテロ   |
| 2007/03/26 | 香川県三豊市  | 男    | 6     | なし    | 2    | ホモ    |
| 2007/10/18 | 東京都板橋区  | 女    | 10    | あり    | 1    | ホモ    |
| 2007/11/01 | 兵庫県赤穂市  | 女    | 8     | なし    | 7    | ホモ    |
| 2007/11/21 | 東京都中野区  | 女    | 8     | あり    | 4    | ヘテロ   |
| 2007/11/26 | 兵庫県赤穂市  | 女    | 8     | あり    | 5    | ホモ    |
| 2007/12/14 | 新潟県長岡市  | 女    | 8     | なし    | 卵 1  | ホモ    |
| 2007/12/18 | 東京都江東区  | 男    | 9     | なし    | 1    | ホモ    |
| 2007/12/21 | 兵庫県赤穂市  | 女    | 9     | なし    | 卵 5  | ホモ    |
| 2007/12/25 | 兵庫県赤穂市  | 女    | 7     | なし    | 2    | ヘテロ   |
| 2008/01/23 | 兵庫県赤穂市  | 男    | 7     | 不明    | 1    | ヘテロ   |
| 2008/01/28 | 愛知県大府市  | 女    | 6     | 不明    | 卵 9  | ホモ    |
| 2008/02/08 | 茨城県つくば市 | 女, 女 | 8, 9  | あり    | 8    | ホモ    |
| 2008/02/12 | 北海道浦河郡  | 女    | 6     | なし    | 1    | ホモ    |
| 2008/02/19 | 千葉県船橋市  | 女    | 49    | なし    | 10   | ホモ    |
| 2008/02/21 | 兵庫県赤穂市  | 男    | 8     | 不明    | 卵 5  | ホモ    |
| 2008/02/28 | 福岡県筑紫野市 | 女    | 6     | あり    | 8    | ホモ    |
| 2008/06/07 | 兵庫県加古川市 | 女    | 9     | なし    | 4    | ホモ    |
| 2008/06/20 | 兵庫県赤穂市  | 女    | 7     | 不明    | 卵 5  | ホモ    |
| 2008/06/20 | 兵庫県赤穂市  | 女    | 8     | 不明    | 卵 10 | ホモ    |
| 2008/07/03 | 東京都江東区  | 女    | 6     | なし    | 1    | ホモ    |
| 2008/07/18 | 沖縄県中城村  | 女    | 8     | あり    | 1    | ホモ    |
| 2008/07/30 | 東京都江東区  | 女    | 6     | なし    | 卵 3  | ホモ    |
| 2008/08/13 | 東京都江東区  | 女    | 6     | なし    | 2    | ホモ    |
| 2008/08/14 | 大分県大分市  | 女    | 11    | なし    | 5    | ホモ    |
| 2008/09/02 | 茨城県つくば市 | 女    | 10, 8 | なし    | 9    | ホモ    |
| 2008/08/21 | 沖縄県那覇市  | 女    | 8     | あり    | 1    | ホモ    |
| 2008/10/16 | 沖縄県浦添市  | 女    | 10, 5 | あり    | 3    | ホモ    |
| 2008/11/10 | 福岡県福岡市  | 女    | 12    | 不明    | 1    | ホモ    |
| 2008/12/06 | 新潟県長岡市  | 女    | 6     | なし    | 卵 4  | ホモ    |
| 2008/12/12 | 東京都江東区  | 女    | 6     | あり    | 1    | ホモ    |

試験した個体が保有する抵抗性遺伝子は、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。

\* ホモ, 抵抗性遺伝子のホモ接合体が検出された;ヘテロ, 抵抗性遺伝子のヘテロ接合体のみ検出された。

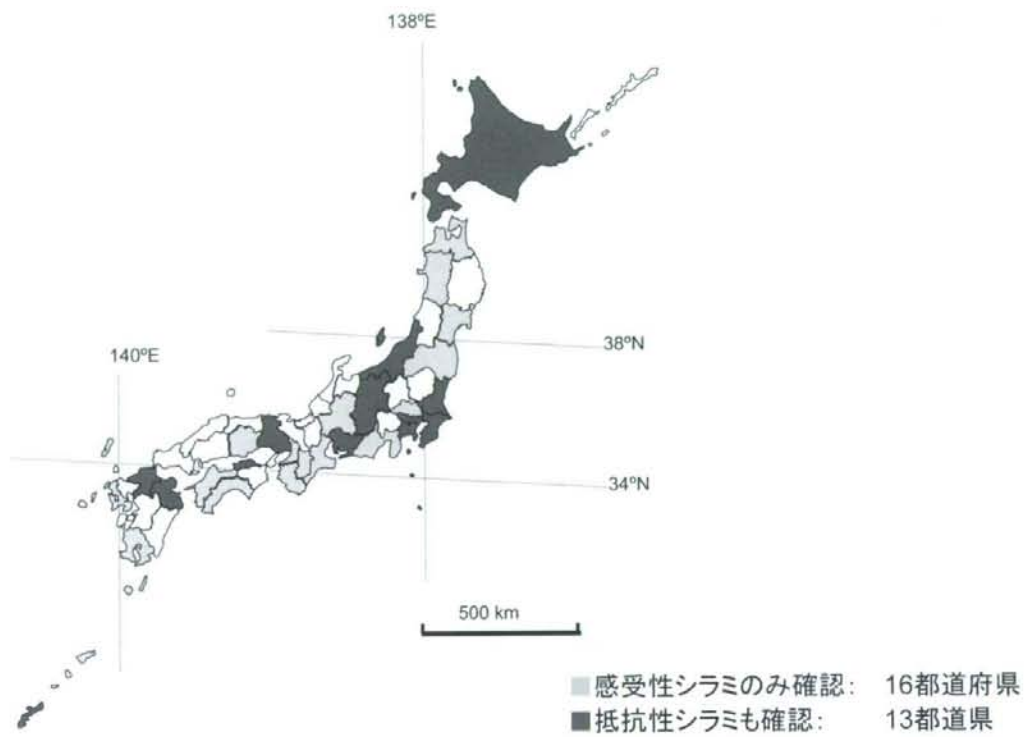


図 1. アタマジラミ試料の提供を受けた都道府県

A.

1. 2007年10月10日、長女と次女の頭からシラミの卵を発見。その日のうちにスミスリンシャンプーを購入し、使用。
2. 2007年10月13日、スミスリン2回目使用。
3. 2007年10月14日、ブラッシング中に長女の髪に動くものを発見。すき櫛で一頭捕獲。サイズと時期を考慮してもスミスリンの効果がないように思えて、このシラミを感染研に送付した。
4. テストしたシラミは抵抗性遺伝子のホモ接合体と判定された。
5. 感染研の報告によりスミスリン使用を中止し、洗髪リンス時のすき櫛と朝のブラッシングによる卵除去によりシラミは徐々に減少。
  - スミスリンシャンプーに付属してきたすき櫛では卵はおろか幼虫も除去することができない。
  - ライスマイスターが簡単に入手できない。
  - 母親について抵抗性のシラミを除去するのが大変だった。

B.

- 6歳女兒と4歳男児。2人とも、2006年に保育園に入園して以来、3~4回アタマジラミに感染。これまでは、スミスリンで駆除できていた。
1. 今回の感染では、スミスリンシャンプーで処理した後、付属の櫛で梳くと、生きたシラミが捕れる状態が続いていた。
  2. 2008年2月25日の(アタマジラミの駆除剤抵抗性にふれた)西日本新聞の記事を読んで、感染研にシラミを送ることになった。
  3. テストしたシラミ8頭は、全て抵抗性遺伝子のホモ接合体と判定された。

C.

1. 2007年7月、8歳女兒と9歳女兒にシラミを発見。使用書通りにスミスリンを使用した。使用後に動く虫がいたり、成虫が残るので、製薬会社に電話した。
2. 2007年11月、再びシラミを発見したため、スミスリンを使用。ペット用櫛ですくと、姉からシャンプー中に20頭、シャンプー後に約40頭の虫が見つかる。
3. 2007年12月24日、妹の頭に成虫を発見。スミスリンを使用した駆除できないので、感染研にシラミを送付。
4. テストした8頭は、全て抵抗性遺伝子のホモ接合体と判定された。

D.

1. 2007年8月後半、8歳女兒と6歳女兒にシラミ発見。使用書通りスミスリンを使用。
2. 2007年10月後半、使用書通りスミスリンを使用。
3. 2007年11月20日現在、また頭部にシラミ!
4. 送付された卵7個のうち、4個は抵抗性遺伝子のヘテロ接合体と判定された。

E.

1. 当初、卵を発見して、早急にスミスリンにて2日おきに4回処理した。4回目の処理後、卵も発見できなかったためそのまま終了した。
2. その後、2週間後くらいに再び卵を発見し、スミスリンにて処理を開始した。
3. (2本目で)4回処理後、念のためもう1本(3本目)を購入し5回目の処理をしたところで、学校より「アタマジラミ」に関するプリントが届き、国立感染症研の(抵抗性シラミ分子検査)情報が添付してあり、サンプルを送付した。
4. 校内の状況は把握していないが、資料がまわってきたことから推測すると(駆除剤抵抗性シラミが)流行しているのかもしれない。
5. 子女のその後については、丁寧に梳き櫛ですいた後、明るい電灯の下で目視で除去している。現在のところ、目視では卵は発見できない状況。
6. テストしたシラミ1頭は、抵抗性遺伝子のホモ接合体と判定された。



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

蚊のウイルス感受性、およびデング熱媒介蚊調査

|       |  |
|-------|--|
| 研究分担者 | 江下優樹（大分大学医学部感染予防医学講座・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）                            |
|       | Rawewan Srisawat (Mahidol University, Thailand)    |
|       | Narumon Komalamisra (Mahidol University, Thailand) |
|       | Yupha Rongsriyam (Mahidol University, Thailand)    |
|       | 牧野芳大（大分大学医学部公衆衛生・疫学講座・教授）                          |
|       | 湯 偉峰（大分大学医学部公衆衛生・疫学講座・助教）                          |
|       | 船津良生（日東防疫（株）・代表取締役）                                |
|       | 川越和四（イカリ消毒（株）・環境衛生担当）                              |
|       | 菅野格朗（環境機器（株）・開発担当）                                 |
|       | 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）                          |
|       | 水田英生（神戸検疫所・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（藍野大学藍野健康科学センター・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経口感染法で調べた。ウイルス力価の高い液（10の5〜6乗FFU/雌成虫1個体）を経口摂食した蚊は、ウイルス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（10の4乗FFU/雌1個体）を摂食した蚊は、蚊個体間およびウイルス株間で差が認められた。50%の蚊が経口感染するウイルス量は、10の4乗FFUを蚊が摂食した際に認められた。しかし、10の3乗FFUでは蚊の経口感染は成立しなかった。アカイエカ、チカイエカ、およびヤマトヤブカのウイルス感受性を蚊胸部接種法で比較したところ、アカイエカのウイルス親和性が高く、チカイエカ、ヤマトヤブカの順で親和性は若干低下した。2008年7月タイ国のデング熱患者宅での調査から、患者発生前の感染蚊発見による二次患者発生阻止についての戦略モデルを提示した。

A. 研究目的

1. 蚊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変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。今回はアカイエカの経口感染で摂食するウイルス量による感染の割合を検討した。また、蚊の胸部接

種法で、アカイエカ、チカイエカおよびヤマトヤブカの感受性を比較検討した。

## 2. デングウイルス感染蚊の早期発見の目的

デング熱の流行にはデングウイルスに感染した媒介蚊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、2007年同様、2008年もタイでの調査を継続した。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. 蚊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作製後、分注して $-80^{\circ}\text{C}$ 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、チカイエカ *Culex pipiens molestus*、ヤマトヤブカ *Ochlelotatus japonicus* を用いた。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 3.3  $\mu\text{l}$  として、蚊個体毎のウイルス力価を PAP 法

で算出した。また、蚊の接種感染では、ウイルス液を 0.2  $\mu\text{l}$  接種した。その後、8 日間  $28^{\circ}\text{C}$  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、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保管した。

PAP 試験： アカイエカ 1 個体毎に 150  $\mu\text{l}$  の 2% FBS 含 MEM を加えてホモジナイズした。その遠心 (2,500 rpm、10 分、 $4^{\circ}\text{C}$ ) 上澄みの濾過液 (0.22  $\mu\text{m}$ 、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. デング熱媒介蚊調査の方法

2008 年 6 月下旬から 7 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にバンコク市近郊の担当地区衛生部で得た後、殺虫剤を散布チームと一緒にデング熱患者宅を訪問して、蚊成虫・幼虫を採集して、デングウイルスゲノムの検出を行った。また、一次患者発生後の感染蚊を早期検出のための案を検討した。

#### (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

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、蚊の感染率は、ウイルス取り込み量が少なくなると感染率が低下した (表 1)。この経口は、4 株ともに認められた (表 1)。蚊 1 個体が取り込んだウイルス量が約  $3.3 \times 10^4$  の 4 乗程度で、50% の感染蚊が得られた。しかし、さら

に 10 倍薄いウイルス量では感染は成立しなかった (表 1)。

次に、10 の 5 乗から 6 乗を取り込んだ蚊での 14 日後のウイルス力価を調べたところ、いずれの株でも、ほぼ  $3 \times 10^6$  の 6 乗までウイルスは増えていた (表 2)。しかしながら、50% 感染率をしめしたウイルス量つまり  $3.3 \times 10^4$  の 4 乗では、感染が成立した蚊個体間でのウイルス量のバラツキと同様に、株間でも差が認められた (表 3)。蚊から分離された JaGar01 株は、薄い濃度のウイルスでも感染しやすい株と思われた。反対に、ワクチン株は蚊体内では増えにくい株といえよう。

接種法での蚊感染率は、経口法よりも高いことが既にわかっているが、チカイエカとヤマトヤブカ成虫に 200 から 800FFU を接種した蚊での 8 日後のウイルス量は、若干チカイエカのほうが多いように思われた (表 4)。また、10 倍薄いウイルス量を摂取したアカイエカとの比較では、前 2 者よりもウイルス増殖量は多い傾向があった (表 5)。アカイエカ、チカイエカ、ヤマトヤブカの順にウイルスの増殖は低くなるように推察された。また、アカイエカの接種法でも少ない量のウイルスを接種した場合は、蚊から分離された JaGRA01 株でウイルス増殖が多く、北京株では少ない傾向が認められた (表 5)。

## 2. デング熱媒介蚊調査を通じての早期感染蚊検出のためのモデル

2008 年に採集した蚊からのウイルスゲノムは現在検討中であるが、1 個体の蚊から複数のウイルスゲノムが検出された可能性があり、詳細を解析中である。

2006-2008 年にかけての媒介蚊調査を通じて、早期感染蚊検出のためのモデルを提案した。(1) 患者宅周囲 50m 以内からの感染蚊の早期発見のために、実験室での感染蚊早期検出をおこなう。(2)

2-3 日以内に県衛生局に連絡して、あらたに発見した感染蚊生息の家周囲 50m 以内からの感染蚊の早期発見のため、実験室での感染蚊早期検出、(3) 前述 (2) の繰り返しを行うことによって、スポット的なデング熱患者、特に二次患者発生数を減らす。この方法を確立するためには、ウイルスゲ

ノムを検出するための研究機関および、対策を実施する行政との連絡が重要な鍵となる。

## 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経口摂取したアカイエカ体内のウイルス力価は、十分量のウイルス量を摂取した場合は、系統間、個体間での差は認められなかった。しかし、少量のウイルス量を摂取した場合は、個体間および系統間でばらつきが認められた。このことから、ウイルス量が少なくなるに従って、中腸細胞にウイルスが吸着する機会が少なくなるためと推察された。

### 2. デング熱媒介蚊調査に関する考察

2008 年はネッタイシマカ雌成虫からデングウイルスゲノムが検出されたが、混合感染の可能性がある。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。2008 年度の結果を得てさらに考察したい。デング熱患者数およびデングウイルス感染蚊の密度が年ごとに異なることが示唆された。2008 年度は、雨期が 10 月まで伸びたが、そのぶん、従来の雨期には雨がさほど降っていないことから、蚊の発生数が 2008 年は少ないように思われた。

デング熱の二次患者数を少なくするためには、同じ地域での集中的な感染蚊調査を行う必要が有ると思われたので、そのためのモデルを提案した。

## E. 結論

1. 蚊の感染率はウイルス摂取量が多いほど高くなった。50% の蚊が経口感染するウイルス量は、約  $3.3 \times 10^4$  の 4 乗 FFU であった。感染成立の閾値のウイルス量を経口摂取した蚊では、個体間のバラツキと株間で差が認められた。ウイルスを胸部接種したアカイエカ、チカイエカ、ヤマトヤブカのウイルス増殖は、この順位で低くなるように思われた。

2. 研究機関と行政との連携による、迅速

な感染蚊検出システムを構築することによって、二次患者の発生数を減らすことができる可能性がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) 在津 誠、小川保徳、黒川憲次、三根真理子、吉井 勇、内田桂吉、江下優樹、小田 力 (2008) : 浄化槽における犬糸状虫伝搬蚊、チカイエカ *Culex pipiens molestus* Forskal 幼虫の季節的変化、特に夏季における高温の影響。長崎県生物学会誌、(64):4-10.

(2) Jose D. J. Diaz Aquino, Wei-Feng Tang, Ryoichi Ishii, Tetsuro Ono, Yuki Eshita, Hiroshi Aono and Yoshihiro Makino (2008) : Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001- 2006: The association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res.* (2008), doi:10.1016/j.virusres.2008.07.011

(3) 牧野芳大、江下優樹 (2008) : 地球温暖化の影響による亜熱帯地域の感染症拡大に関する疫学研究。国立大学法人 大分大学 環境報告書 2008 (2007年度)、41pp、2008年9月大分大学発行 2007:25-26.

### 2. 学会発表

(1) 山尾卓也、江下優樹、木原悠希、佐藤朝光、鹿志毛信広、見明史雄、Narumon Komalamisra、Raweevan Srisawat、Yupha Rongsriyam、水谷 哲也 (2008) : 蚊媒介性ウイルス検出を目的としたRDV法の改良。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月17-19日、群馬県、自治医科大学、*Med. Entomol. Zool.*, 59 (Suppl.): 61, 2008.

(2) 江下優樹、牧野芳大、湯 偉峰、青野裕士、高崎智彦、田島 茂、高島郁夫、小林睦生、倉根一郎 (2007) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (12) アカイエカ体内における日本脳炎ウイルスの増殖。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月17-19日、群馬県、自治医科大学、*Med. Entomol. Zool.*, 59

(Suppl.): 61, 2008.

(3) 湯 偉峰、吉用省三、吉田知佳子、江下優樹、青野裕士、牧野芳大 (2008) : 大分地域における日本脳炎ウイルスの活動。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会、香川県、観音寺市、2008年5月30日(金) - 31日(土)。日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集: 16, 2008.

(4) 江下優樹、牧野芳大、湯 偉峰、青野裕士、高崎智彦、田島 茂、高島郁夫、小林睦生、倉根一郎 (2008) : アカイエカにおける日本脳炎ウイルスの増殖について。第43回日本脳炎ウイルス生態研究会、香川県、観音寺市、2008年5月30日(金) - 31日(土)。第43回日本脳炎ウイルス生態研究会 プログラム・抄録集: 34, 2008.

(5) 村田 亮、好井健太郎、菊和宏明、江下優樹、高島郁夫 (2008) : ウエストナイルウイルスのE蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会、香川県、観音寺市、2008年5月30日(金) - 31日(土)。日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集: 48, 2008.

(6) 水谷哲也、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、佐藤朝光、黒田誠、関塚剛史、西村美保、酒井宏治、福士秀悦、緒方もも子、中内美奈、倉根一郎、森川茂 (2008) : ウイルスの網羅的方法の改良と新しいブニヤウイルスの発見。第146回日本獣医学会学術集会、宮崎県宮崎市ワールドコンベンションセンター・サミット(シーガイア)、2008年9月24日-26日、宮崎大学、2008.

(7) Yuki Eshita, Raweevan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Hiroshi Aono, Yoshihiro Makino, Tomohiko Takasaki and Hiroshi Ushijima (2008) : Dengue infection's dynamics of vector mosquitoes in the patient's houses, Thailand. Ordinary session on Vector-virus interaction. The Second International conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2008, "Global

Innovation for Combating Dengue Infection". October 15-17, 2008., Phuket, Thailand. Abstract of The Second International conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2008: 147.

(8) Yuki Eshita (2008): Arbovirus infection's dynamics of vector mosquitoes in experimental and natural conditions. Parasite Vector Genomics Symposium II in Sapporo, Oct. 21-22, 2008

(9) 水谷哲也、山尾卓也、江下優樹、片野晴隆、黒田誠、関塚剛史、渡辺俊平、明石博臣、大場邦弘、上村茂、梅村陽、竹原一明、木原悠希、佐藤朝光、西村美保、酒井宏治、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、中内美名、倉根一郎、森川茂 (2008): ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見。岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月25日(土)第15回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会

(10) 村田 亮、江下優樹、前田秋彦、前田潤子、秋田紗希、田中智久、好井健太、苅和宏明、梅村孝司、高島郁夫 (2008): ウエストナイルウイルスの E 蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月26日(日) - 28日(火)。日本ウイルス学会学術集会・抄録集: ID05、2008.

(11) 佐藤朝光、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweevan Srisawat、中島 学、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也: Rapid determination of RNA viral sequence (RDV) 法の改良法によるネッタシマカ幼虫からの新しいブニアウイルスの検出。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月26日(日)、27日(月)、28日(火)。日本ウイルス学会学術集会・抄録集: 2P048、2008.

(12) 山尾卓也、江下優樹、佐藤朝光、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweevan Srisawat、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也 (2008): Rapid determination of RNA viral sequence (RDV) 法の改良によるネッタシマカ幼虫からの新しいブニアウイルスの検出。第 61 回日本寄生虫学会・第 58 回日本衛生動物学会南日本支部合同大会、2008年11月1日(土)・2日(日)、沖縄産業支援センター、沖縄県那覇市

(13) 佐藤 朝光、山尾 卓也、江下優樹、木原 悠希、西村 美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweevan Srisawat、鹿志毛 信広、見明 史雄、森川 茂、水谷 哲也 (2008): Rapid determination of RNA viral sequence 法の改良と本法によるネッタシマカ幼虫からブニアウイルスの検出。第 25 回日本薬学会九州支部大会、宮崎県延岡市、2008年12月6-7日、九州保健福祉大学、講演要旨集: 1B-20.

#### 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 カ価の異なる(約 $10^3 \sim 10^6$ )日本脳炎ウイルス液を経口摂取した、アカイエカのウイルス感染率

| ウイルス株     | Stock virus<br>カ価 * | 経口感染14日後の生存雌蚊    |
|-----------|---------------------|------------------|
|           |                     | 感染蚊数*/供試数 (%) ** |
| 北京(ワクチン株) | $1.0 \times 10^8$   | 4 / 4 (100%)     |
|           | $1.0 \times 10^7$   | 2 / 4 (50%)      |
|           | $1.0 \times 10^6$   | 0 / 1 (0%)       |
| Jath16    | $2.3 \times 10^8$   | 4 / 4 (100%)     |
|           | $1.0 \times 10^7$   | 2 / 4 (50%)      |
|           | $1.0 \times 10^6$   | 0 / 1 (0%)       |
| JaGAR01   | $2.0 \times 10^8$   | 4 / 4 (100%)     |
|           | $1.0 \times 10^7$   | 2 / 4 (50%)      |
|           | $1.0 \times 10^6$   | 0 / 1 (0%)       |
| 三重41      | $4.0 \times 10^8$   | 4 / 4 (100%)     |
|           | $1.0 \times 10^7$   | 2 / 4 (50%)      |
|           | $1.0 \times 10^6$   | 0 / 1 (0%)       |

\* PAP法によるウイルスカ価 (FFU/ml)

\*\* 蚊1個体の吸液量: 3.3ul ( $3.3 \times 10^5 \sim 1.32 \times 10^6$ ,  $3.3 \times 10^4$ ,  $3.3 \times 10^3$  FFU相当)

表2 約 $10^5 \sim 10^6$ の日本脳炎ウイルス液を経口摂取して、感染したアカイエカのウイルス増殖量

| ウイルス<br>の株 | Stock<br>カ価*      | 経口感染したウイルスカ価*<br>14日後(4個体平均) |
|------------|-------------------|------------------------------|
| 北京         | $1.0 \times 10^8$ | $3.6 \times 10^6$            |
| Jath16     | $2.3 \times 10^8$ | $4.8 \times 10^6$            |
| JaGAR01    | $2.0 \times 10^8$ | $3.6 \times 10^6$            |
| 三重         | $4.0 \times 10^8$ | $4.2 \times 10^6$            |

\* PAP法によるウイルスカ価 (FFU/ml)

\*\* 蚊1個体の満腹吸液量は、平均3.3ul ( $3.3 \times 10^5 \sim 1.32 \times 10^6$  FFUに相当)  
4個体雌蚊の平均

表3 約 $10^4$ の日本脳炎ウイルス液を経口摂食して感染したアカイエカのウイルス増殖量

| ウイルス株     | Stock virus<br>力価* | 経口感染したウイルス力価*     |         |
|-----------|--------------------|-------------------|---------|
|           |                    | 14日後(2個体平均)       | おおよその比率 |
| 北京(ワクチン株) | $1.0 \times 10^7$  | $2.4 \times 10^3$ | 1       |
| Jath16    | $1.0 \times 10^7$  | $1.5 \times 10^6$ | 625     |
| JaGAR01   | $1.0 \times 10^7$  | $2.4 \times 10^7$ | 10,000  |
| 三重41      | $1.0 \times 10^7$  | $2.0 \times 10^4$ | 8.3     |

\* PAP法によるウイルス力価 (FFU/ml)

\*\* 蚊1個体の満腹吸液量は、平均3.3ul ( $3.3 \times 10^4$  FFUに相当)  
蚊4個体中の感染蚊2個体の平均

表4 約 $10^2$ の日本脳炎ウイルス液を蚊胸部に接種した、チカイエカ、ヤマトヤブカのウイルス増殖量

| ウイルス<br>の株 | Stock virus<br>力価 * | 蚊個体のウイルス力価* (平均)  |                   |
|------------|---------------------|-------------------|-------------------|
|            |                     | チカイエカ             | ヤマトヤブカ            |
| 北京(ワクチン株)  | $1.0 \times 10^6$   | $4.9 \times 10^5$ | $5.7 \times 10^5$ |
| Jath16     | $2.3 \times 10^6$   | $1.6 \times 10^6$ | $5.9 \times 10^5$ |
| JaGAR01    | $2.0 \times 10^6$   | $3.3 \times 10^5$ | $1.1 \times 10^5$ |
| 三重41       | $4.0 \times 10^6$   | $4.5 \times 10^6$ | $1.1 \times 10^6$ |

\* ウイルス接種4日後の、PAP法によるウイルス力価 (FFU/ml)。

\*\* 蚊1個体の接種量：0.2ul ( $2 \times 10^2 \sim 8 \times 10^2$  FFUに相当)。蚊2個体の平均

\*\*\* 検出限界

表5 約10の日本脳炎ウイルス液を蚊の胸部に接種したアカイエカのウイルス増殖量

| 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 <sup>5</sup>  | 4.9x10 <sup>4</sup> | 1     |
| Jath16  | 2.3x10 <sup>5</sup>  | 7.0x10 <sup>6</sup> | 143   |
| JaGAR01 | 2.0x10 <sup>5</sup>  | 5.0x10 <sup>7</sup> | 1,020 |
| 三重41    | 4.0x10 <sup>5</sup>  | 7.2x10 <sup>6</sup> | 147   |

\* PAP法によるウイルス力価 (FFU/ml)

\*\* 蚊1個体の接種量: 0.2 ul (2x10<sup>1</sup>~8x10<sup>1</sup> FFUに相当)、蚊2個体の平均

表6. デングウイルス感染蚊を発見したデング熱患者宅の割合

| 調査年  | 調査したデング熱患者の家数 | 患者宅で蚊を採集した家の数 | 患者宅で、デングウイルス陽性蚊を発見した家の数 |
|------|---------------|---------------|-------------------------|
| 2003 | 14            | 13 (92.9%)    | 4 (28.6%)               |
| 2004 | 7             | 7 (100%)      | 3 (42.9%)               |
| 2006 | 26            | 22 (84.6%)    | 6 (23.1%)               |
| 2007 | 18            | 17 (94.4%)    | 2 (11.1%)               |

ネッタイシマカ成虫は、デング熱患者宅で普通に生息しているが、デングウイルス陽性蚊は11から43%の患者宅から見つかった。



## 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

研究分担者；高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部）

研究協力者；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）

竹下 望（国立国際医療センター国際疾病センター）

**研究要旨** 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100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も多いため、尿や唾液からのウイルス遺伝子の検出を61症例に関して試みたところ、27症例の尿、唾液5症例から遺伝子を検出し、8症例に関して遺伝子解析にも成功した。尿からの遺伝子検出は、抗体が上昇しウイルスが消失した後も、ウイルス遺伝子を検出できることが確認され、ウイルス型別が特定できることから、実験室診断上有用である。

### 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61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。尿は粗遠心し沈査を除去した後、その上清を簡易濃縮遠心チューブ(VivaSpin20<sup>®</sup>)にて5倍に濃縮し、それぞれ200 $\mu$ 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27症例の検体に関して、通常のPCRを実施したところ8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、デングウイルス型別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61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。61症例中にはすでに回復期に入った症例も含まれる。血清からウイルス遺伝子が検出できた症例は37症例で検出率は、60.7%であった。一方、尿中から遺伝子が検出された症例は27例で、検出率は44.3%であった。また、61症例のうち唾液が採取できたのは18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5例で検出率は27.8%であった(表1)。尿中からデングウイルス遺伝子を検出した検体は、27例中26については、採尿の時点での血清抗デングウイルス抗体は陽性であった。

尿中からデングウイルス遺伝子を検出した上記27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8例のウイルス型別は、1型3例、2型1例、3型1例、4型3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ではいずれも尿中と血中ウイルス遺伝子配列は100%一致した。尿中デングウイルス遺伝子は、血中のウイルス遺伝子が検出できない急性期以降でも検出できる症例があった(図1)。尿からのウイルス分離も試みたがウイルスが分離された検体はなかった。

## D. 考察

すべてのデング熱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（1～4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も、ウイルス遺伝子を検出できることは、ウイルス型別が特定でき、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も少なく非常に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、昨年より検出率も上昇した。そして、それらの症例ではウイルス血症が消退した後も、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

Tajima S, Takasaki T, Kurane I. Characterization of Asn130-to-Ala mutant of dengue type 1 virus NS1 protein. *Virus Genes*. 36:323-329 (2008)

2. 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*. 89:642-652 (2008)

##### 2. 学会発表

Meng Ling Moi, Chang-Kweng Lim, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane. Determination of the regions in human FcγRIIA receptor responsible for the antibody dependent enhancement in dengue virus infection. The seventh Japan-China International Conference of Virology. June 1-3, 2008. (Tokyo)

Takasaki Tomohiko, A. Kotaki, S. Tajima, T. Hirayama, Y. Mizuno, N. Takeshita, I. Kurane. Diagnosis of dengue virus infection by detection of dengue virus genome in urine and saliva. The second international conference on dengue and dengue haemorrhagic fever (Phuket, Thailand) 2008. October.

大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝裕子、中村紳一郎、明里宏文、高崎智彦、倉根一郎。マーマセットを用いたデングウイルス感染モデルの構築。第56回日本ウイルス学会学術集会。Oct. 26-28.2008(岡山市)

高崎智彦。昆虫媒介感染症～デング熱を中心に～。第23回 Transfusion Medicine Conference. 2009年1月31日(神奈川県葉山町)

|                 |        |
|-----------------|--------|
| H.知的財産権の出願・登録状況 | なし     |
| 1. 特許取得         |        |
| なし              | 3. その他 |
|                 | なし     |
| 2. 実用新案登録       |        |