

against Japanese encephalitis virus nonstructural 1 protein in subclinically infected humans. The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (CMSP). 14th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim. 2010年10月

瀧澤 山人、小西 英二：インドネシア流行株およびプロトタイプに基づくデングワクチンの中和抗体誘導能の比較。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

田淵 裕子、山中 敦史、小西 英二：インドネシア住民におけるデングウイルス感染増強抗体の血清疫学。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

山中敦史、小西英二：2008年にインドネシア国スラバヤ市で起きたデング2型から1型への流行型シフト。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

武田 祥子、田淵 裕子、小西 英二：デング1型ウイルス感染増強活性あるいは中和活性のみを示すモノクローナル抗体の性状解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

石川 知弘、小西 英二：ベネズエラウマ脳炎ウイルスレプリコン発現システムを用いた日なし

本脳炎ウイルスNS1発現系の構築およびその性状解析。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月

Atsushi Yamanaka, Kris C. Mulyatno, Helen Susilowati, Eryk Hendrianto, Amor P. Ginting, Dian D. Sary, Fedik A. Rantam, Soengeng Soegijanto and Eiji Konishi: Predominant dengue virus shifted from type 2 to type 1 in Surabaya, Indonesia, 2008-2009. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010. 2010年11月

小瀧将裕、瀧澤山人、小西英二：数株のデング1型および3型ウイルスに対して数種のモノクローナル抗体が示す感染増強活性の比較。第16回トガ・フラビ・ペスチウイルス研究会、2010年12月

桑原 三和、小西 英二：日本脳炎ウイルス抗原を連続発現する昆虫細胞由来蛋白のワクチンおよび診断用抗原への適用。第14回日本ワクチン学会学術集会、2010年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

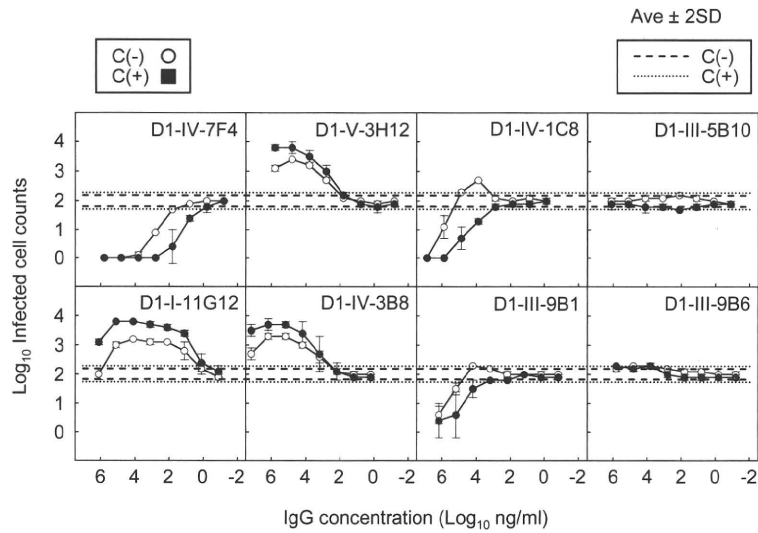


図 1. 抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体における中和・増強活性。8 種類の抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体の、DENV1 に対する中和・増強活性のバランスを、K562 細胞を用いて補体存在下 (●) と補体非存在下 (○) で調べた。点線は補体存在下、破線は補体非存在下の中和活性及び感染増強活性を判定するボーダーラインを表す。各データは 2 回の実験で得られた平均値を示し、誤差棒は標準偏差を示す。

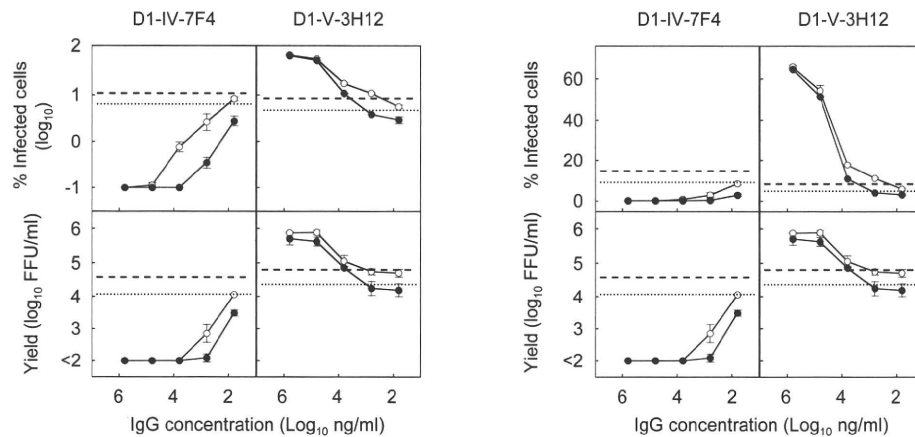


図 2. 従来の感染増強試験法との比較。D1-IV-7F4 (N-MAb) 及び D1-V-3H12 (E-MAb) を用いて、感染細胞率 (左) 及びウイルス産生量 (右) を指標にした従来の感染増強試験で比較した。K562 細胞を用いて補体存在下 (●) と補体非存在下 (○) で行った。点線は補体存在下、破線は補体非存在下の感染増強活性を判定するボーダーラインを表す。各データは 2 回の実験で得られた平均値を示し、誤差棒は標準偏差を示す。

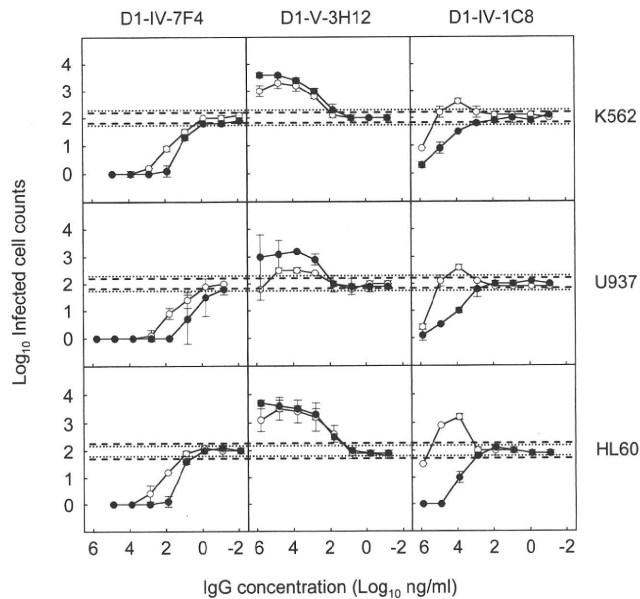


図 3. 他の細胞種を用いて得られた中和・増強活性。D1-IV-7F4 (N-MAb)、D1-V-3H12 (E-MAb) 及び D1-IV-1C8 (NE-MAb) の中和・増強活性を、K562、U937 及び HL-60 細胞を用いて、補体存在下 (●) と補体非存在下 (○) で調べた。点線は補体存在下、破線は補体非存在下の中和活性及び感染増強活性を判定するボーダーラインを表す。各データは 2 回の実験で得られた平均値を示し、誤差棒は標準偏差を示す。

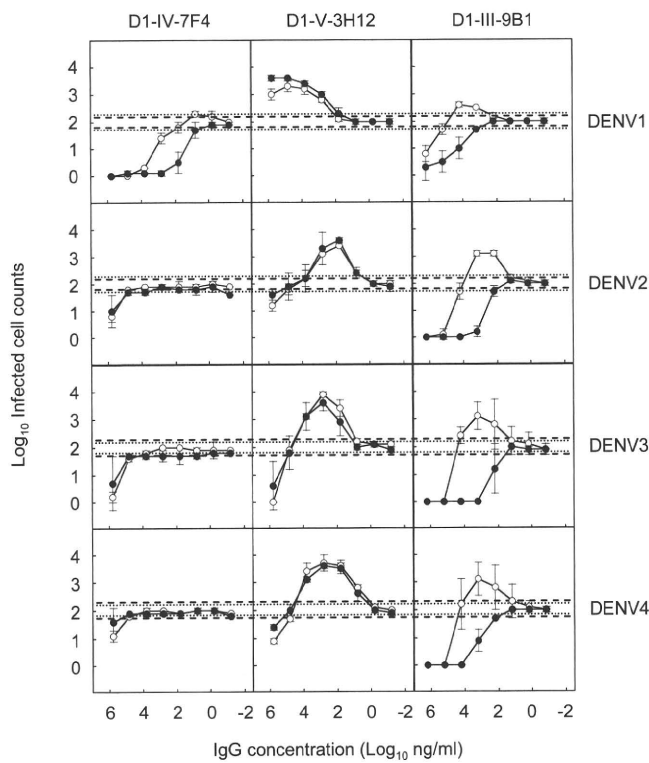


図 4. 他の型のデングウイルスに対する中和・増強活性。D1-IV-7F4 (N-MAb)、D1-V-3H12 (E-MAb) D1-IV-9B1 (NE-MAb) を用いて、他の型のウイルスに対する中和・増強活性を調べた。K562 細胞を用いて、補体存在下 (●) と補体非存在下 (○) で行った。点線は補体存在下、破線は補体非存在下の中和活性及び感染増強活性を判定するボーダーラインを表す。各データは 2 回の実験で得られた平均値を示し、誤差棒は標準偏差を示す。

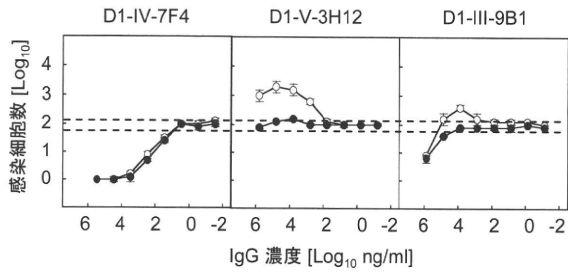


図 5. ADE における $Fc\gamma$ レセプターの関与。抗 CD32 抗体で前処理した K562 細胞 (●) と前処理していない K562 細胞 (○) で得られた中和・増強活性パターンを示した。破線は中和活性及び感染増強活性を判定するボーダーラインを表す。各データは 2 回の実験で得られた平均値を示し、誤差棒は標準偏差を示す。

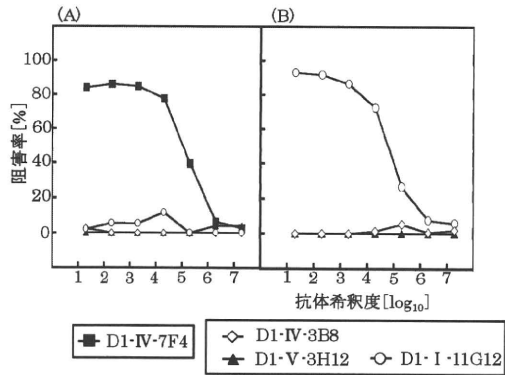


図 6. 競合試験によるエピトープの位置的関係の解析。(A) ビオチン標識 D1-IV-7F4 (N-Ab) を用いて行った。(B) ビオチン標識 D1-I-11G12 (E-Ab) を用いて行った。

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

チクングニアウイルスの迅速診断法の検討

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部第二室長）
協力研究者 林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官）
藤本嗣人（国立感染症研究所感染症情報センター第四室長）
小長谷昌未（国立感染症研究所感染症情報センター）
倉根一郎（国立感染症研究所ウイルス第一部長）

研究要旨

チクングニアウイルス(CHIKV)はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される RNA ウイルスで、蚊によって媒介され、ヒト→蚊→ヒトの感染環をもつ。その主たる媒介蚊はヤブカ属の蚊である。チクングニア熱は平成 23 年 2 月に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)において 4 類感染症に指定されており、今後ともその動向の把握が求められる。これまでに RT-PCR 法, リアルタイム RT-PCR 法, IgM 捕捉 ELISA 法, 50%ブランク減少法による検査体制を確立しチクングニア熱疑い輸入症例の実験室内診断を行い, 19 例の輸入症例を確認した。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており, チクングニアウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。したがって媒介蚊のチクングニアウイルス感染を可能とするウイルス血症の高いチクングニア熱急性期患者の迅速な把握は必須である。そこで我々は現在のチクングニアウイルス遺伝子検出系である RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR 法に比較してさらにより迅速な Hyper RT-PCR 法の開発を試みた。その結果, 複数の遺伝子型のチクングニアウイルスを検出できる比較的特異性の高い Hyper real time RT-PCR を開発したので報告する。

A. 研究目的

チクングニア熱(Chikungunya fever)は1952年にアフリカのタンザニアでデング熱様疾患として初めて報告された人獣共通感染症であり、時に激しい関節痛、発疹、悪寒、頭痛、悪心、嘔吐、筋肉痛を伴うウイルス性急性熱性疾患である。チクングニア熱の病因ウイルスであるチクングニアウイルス(Chikungunya virus)はトガウイルス科アルファウイルス属に分類される一本鎖の(+)-RNA ウイルスであり、チクングニア熱の原因ウイルスである。チクングニアウイルスには東・中央アフリカ型、アジア型、西アフ

リカ型の3つの遺伝子型が存在する。チクングニアウイルスは昆虫媒介性ウイルスであり、その媒介蚊はネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)や日本にも広範囲に生息するヒトスジシマカ(*A. albopictus*)などのヤブカ属のカである。自然界では霊長類、げっ歯類、翼手類からチクングニアウイルスが分離されている。近年のチクングニア熱の流行は2004年にケニア沿岸において確認され、インド洋諸島、インド、東南アジアに急速にその流行域を拡大した。インドでは2005-2009年に少なくとも160万人の症例が報告されている。インドでの流行はスリランカに拡大

し2006年から2009年にかけてチクングニアウイルス感染症例が57,000例以上報告された。さらにチクングニア熱の流行は東南アジアに拡散し、シンガポール、マレーシア、タイでの流行が確認されている。シンガポールではこれまでに900例以上のチクングニア熱症例が報告されている。またマレーシアでも2010年までに11,000症例以上の患者が報告された。タイでは2008年にマレーシアとの国境付近に位置する南部地方を中心にチクングニア熱が報告されたが2009年には流行地域がタイのほぼ全土に拡大し2010年までに60,000症例以上の患者が報告されている。また2007年には温帯地域における初めての国内流行がイタリアで、さらに2010年にはフランスで発生した。イタリア、フランスでの国内流行は日本にも生息するヒトスジシマカにより媒介されたと考えられており、日本国内への侵淫の可能性は否定できない。したがってチクングニア熱の流行地域に渡航する場合はカに吸血されにくい服装や忌避剤の使用等の予防対策が必須である。チクングニア熱は平成23年2月に「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(感染症法)において4類感染症に指定されており、今後ともその動向の把握が求められる。これまでに我々はRT-PCR法、リアルタイムRT-PCR法を用いた遺伝子検出法、IgM捕捉ELISA法、50%ブランク減少法を用いた中和法による診断法を用いた検査体制を確立し、これまでにチクングニア熱輸入症例の実験室内診断を行い、19例の輸入症例が確認された。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており、チクングニアウイルスが日本に侵入する可能性は否定できない。したがって媒介蚊のチクングニ

アウイルス感染を可能とするウイルス血症の高いチクングニア熱急性期患者の迅速な把握は必須である。そこで我々は現在のチクングニアウイルス遺伝子検出系であるRT-PCRおよびリアルタイムRT-PCR法に比較してさらに迅速なHyper RT-PCR法の開発を試みたので報告する。

B. 研究方法

ウイルス:チクングニアウイルス S27 株, BaH306 株, SL10571 株, SL11131 株, MAL09 株, RI09 株より High pure viral RNA kit (ロシュ)を用いてウイルス RNA を抽出し供試した。またサギヤマウイルス, ヴェネズエラ馬脳炎ウイルス, 東部馬脳炎ウイルス, シンドビスウイルス, セムリキ森林熱ウイルス, デングウイルスより同様にウイルス RNA を抽出し供試した。さらにチクングニア熱患者血清よりウイルス RNA を抽出し用いた。陰性対照としてヒト全血由来核酸を用いた。

合成チクングニアウイルス RNA を用いた RNA コピー数の検討:チクングニアウイルスの E1 蛋白質領域をプラスミドベクター pcDNA3.1 にクローニングし, 目的 RNA を合成した。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した。

プライマーの設計:チクングニアウイルスの構造タンパク質コーディング領域にセンスプライマー8種類, アンチセンスプライマー7種類を設計し, 検討した。

Hyper RT-PCR 法:Hyper RT-PCR 法のために開発されたサーマルサイクラーである Hyper PCR UR MK-IV (トラスト, 兵庫県加西市)を用いた。遺伝子検出マーカーとして SYBR green I を添加し, 470nm の波長のシグ

ナルを検出した。サンプルをプラスチックディスク（直径 12cm, 厚さ 0.9mm）に封入し、温度条件 48°C60 秒, 95°C60 秒, [95°C4 秒, 68°C4 秒, 68°C4 秒]で 45 サイクル反応した。

C. 研究結果

D. 考察

これまでに我々はチクングニア熱の実験室診断法として RT-PCR 法, リアルタイム RT-PCR 法 (TaqMan 法) を用いた遺伝子検出法, IgM 捕捉 ELISA 法, 50%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を確立した。しかしながら既存の RT-PCR 法では 1 時間以上の時間を要する。そこで我々は Hyper RT-PCR 法によるチクングニアウイルスの迅速診断系を確立した。Hyper RT-PCR の第一の特徴プライマーの設計とプライマーペアのチクングニアウイルスに対する特異性の検討：チクングニアウイルスの構造タンパク質である E1 領域にセンスプライマー 8 種類アンチセンスプライマー 7 種類を設計し様々な組み合わせを検討したところ、センスプライマー-CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー-CHIK10798 r の組み合わせを用いて温度条件 48°C60 秒, 95°C60 秒, [95°C4 秒, 68°C4 秒, 68°C4 秒]で 45 サイクル反応させたところチクングニアウイルス S27 株を特異的に増幅した。このときフラビウイルスであるデングウイルス, 他のアルファウイルスであるサギヤマウイルス, ベネズエラ馬脳炎ウイルス, 東部ウマ脳炎ウイルス, シンドビスウイルス, セムリキ森林熱ウイルスおよびヒト血液由来核酸に対して非特異反応は観察されなかった (図 1)。

プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r のチクングニアウイルス RNA に対する感度の検討：チクングニアウイルスの E1 蛋白質領域をプラスミドベクター-pcDNA3.1 にクローニングし, 目的 RNA を合成した。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム RT-PCR 法における検出感度を検討した。10⁵ の合成 RNA を 10 倍階段希釈し, 各コピー数におけるプライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の反応を検討した結果チクングニアウイルスに対して 1 コピー-RNA/サンプルの検出感度を示した。さらに RNA の検出においては定量性が認められた (図 2)。

様々なチクングニアウイルス株に対するプライマーペアの検討：プライマーペア CHIK10572f/ CHIK10798 r の他のチクングニアウイルス株への反応性を検討した結果アジア型のチクングニアウイルス BaH306 株, 東・中央アフリカ型のチクングニアウイルス S27 株においても目的産物の増幅が認められた (図 3)。またスリランカからの輸入症例患者血清における反応性を検討した結果同一患者由来の急性期血清 (2 病日) においては目的産物が検出されたが回復期血清 (8 病日) の患者血清においては目的産物が検出されなかった (図 3)。また 2 病日患者血清より分離された SL10571 株および SL11131 株に対しても同様に目的産物が検出された (図 3)。はその迅速性である。Hyper RT-PCR 法においては RT 反応から融解曲線解析を終了するまで約 15 分で終了する。またその後の反応産物のアガロースゲルでの解析およびシーケンスでの遺伝子配列の確認も可能

であるためチクングニアウイルスの遺伝子型の解析も容易である。我々はセンスプライマー8種、アンチセンスプライマー7種を設計し、様々な組み合わせの特異性および感度を検討した。その過程でHyper RT-PCR法はアニーリング温度から熱変性温度までのスピードが迅速なため伸長効率が高く、かつ非特異的な増幅が起きにくいプライマー設計および温度条件の設定が重要であることを確認した。その結果チクングニアウイルスを特異的に検出し、感度が1コピーRNA/サンプルのプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r を作成した。さらにプライマーペア CHIK10572f/CHIK10798 r を用いて様々なウイルス株に対する増殖性を検討したところアジア型およびアフリカ型の両遺伝子型のウイルスに対して増幅産物が得られた。さらにチクングニア熱患者血清を用いた検討においても急性期患者血清中のウイルス RNA を検出した。このとき回復期患者血清からはチクングニアウイルス RNA は検出されなかったが、このことは以前我々が報告したTaqMan real time RT-PCR法の結果と一致した。また急性期患者血清より分離したウイルス株であるSL10571株およびSL11131株のウイルス RNA も同様に検出した。以上より本プライマーは複数の遺伝子型のチクングニアウイルスを迅速に検出できることが示唆された。今後は西アフリカ型のチクングニアウイルスに対しても検討を要する。

E. 結論

チクングニア熱の治療法は確立されておらず、チクングニアウイルスの動向にはヒト、蚊、気候、環境等の要因が複雑に関わり、その状況の予測は困難であり、日本におい

ても媒介蚊であるヒジシマカが生息することからチクングニアウイルスの我が国への侵入は予断を許さない。急速な輸送手段の発達とネッタイシマ蚊、ヒトスジシマ蚊の分布拡大、熱帯雨林地域への人口拡張により世界の熱帯・亜熱帯地域、特に東南アジアにおいてチクングニア熱は今後も流行が続くことが予想される。さらに2010年1月までに日本において19例の輸入症例が確認されている。ワクチンが実用化されていない現在、旅行先におけるチクングニア熱の流行状況を把握し、蚊対策に十分考慮すると共に、医療機関、地域住民、行政、研究機関の一層の協力体制を確立するために今後も関係各機関にこれまでの成果を提供する。

F. 健康危険情報

2007年初頭に2例のスリランカからの輸入症例が日本で初めて確認されて以来、2011年1月までに日本において19例の輸入症例が確認されている。温帯地方であるイタリアでは2007年に、フランスでは2010年にそれぞれチクングニア熱の国内流行が報告されており、このときの媒介蚊は日本にも生息するヒトスジシマカであったため、日本においてもチクングニアウイルスの侵淫の可能性は否定できない。現在もインドおよび東南アジア地域を中心にチクングニア熱の流行は拡大しており、早期の防疫体制の確立が求められる。

G. 研究発表

Lim, C. K., Kurane, I., and Takasaki, T. (2010) Re-emergence of chikungunya virus, pp. 1-22. In Maeda, A. (ed), Animal Viruses. Transworld Research Network., Kerala, India.

Aoyama, I., Uno, K., Yumisashi, T., Takasaki, T., Lim, C.K., Kurane, I., Kase, T., Takahashi, K. A Case of Chikungunya Fever Imported from India to Japan, Follow-Up of Specific IgM and IgG Antibodies over a 6-Month Period. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2010. 63(1):65-66.

林 昌宏, 高崎智彦. 近年のチクングニア熱の流行状況. 公衆衛生, 75(1): 39-42, 2011.

H. 学会発表

Lim, C.K., Takasaki, T., Moi, M.L., Omatsu, T., Kotaki, A., Chua, K.B., Kurane, I. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus in Malaysia. 第8回日中国際ウイルス学会. ハルピン, 中国, 2010.

Takasaki, T., Moi, M.L., Lim, C.K., Kurane, I. Imported Chikungunya fever and dengue fever in JAPAN. 第7回日台ワクチンおよび旅行医学シンポジウム. 台北, 台湾, 2010.

Lim, C.K., Takasaki, T., Moi, M.L., Omatsu, T., Kotaki, A., Chua, K.B., Kurane, I. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus in Malaysia. 第9回国際プラス鎖RNAウイルス学会, アトランタ, アメリカ, 2010.

林 昌宏, 藤本嗣人, 小長谷昌美, モイメンリン, 小滝 徹, 倉根一郎, 高崎智彦. 近年のチクングニア熱の流行と迅速診断法の検討. 第58回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010.

青山幾子, 弓指孝博, 加瀬哲男, 高橋和郎, 高崎智彦, 林 昌宏, 倉根一郎. 大阪府における Dengue 熱・チクングニア熱の検査体

制. 衛生微生物技術協議会第31回研究会, 鹿児島, 2010.

高崎智彦, 小滝 徹, 田島 茂, 林 昌宏, モイ メンリン, 倉根一郎. 輸入 Dengue 熱・チクングニア熱 検査・診断状況 (2008-2010). 衛生微生物技術協議会第31回研究会, 鹿児島, 2010.

林 昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎. チクングニア熱の流行状況と実験室診断法. 衛生微生物技術協議会第31回研究会, 鹿児島, 2010.

林 昌宏, 高崎智彦, モイ メンリン, 大松 勉, 倉根一郎. 近年のチクングニア熱流行におけるチクングニア熱疑い患者血清の病原体および血清学的解析. 第84回日本感染症学会総会・学術講演会, 京都, 2010.

江下優樹, 高崎智彦, 林 昌宏, Srisawat, R., Komalamisra, N., Rongsriyam, Y., 湯偉峰, 青野裕士, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, 倉根一郎. タイ国産ネッタイシマカのチクングニアウイルス感受性. 第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島, 2010.

高崎智彦, 林 昌宏. 拡大するチクングニア熱の現状と臨床. 平成21年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2010.

林 昌宏. チクングニア感染症の診断法. 平成21年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2010.

I. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

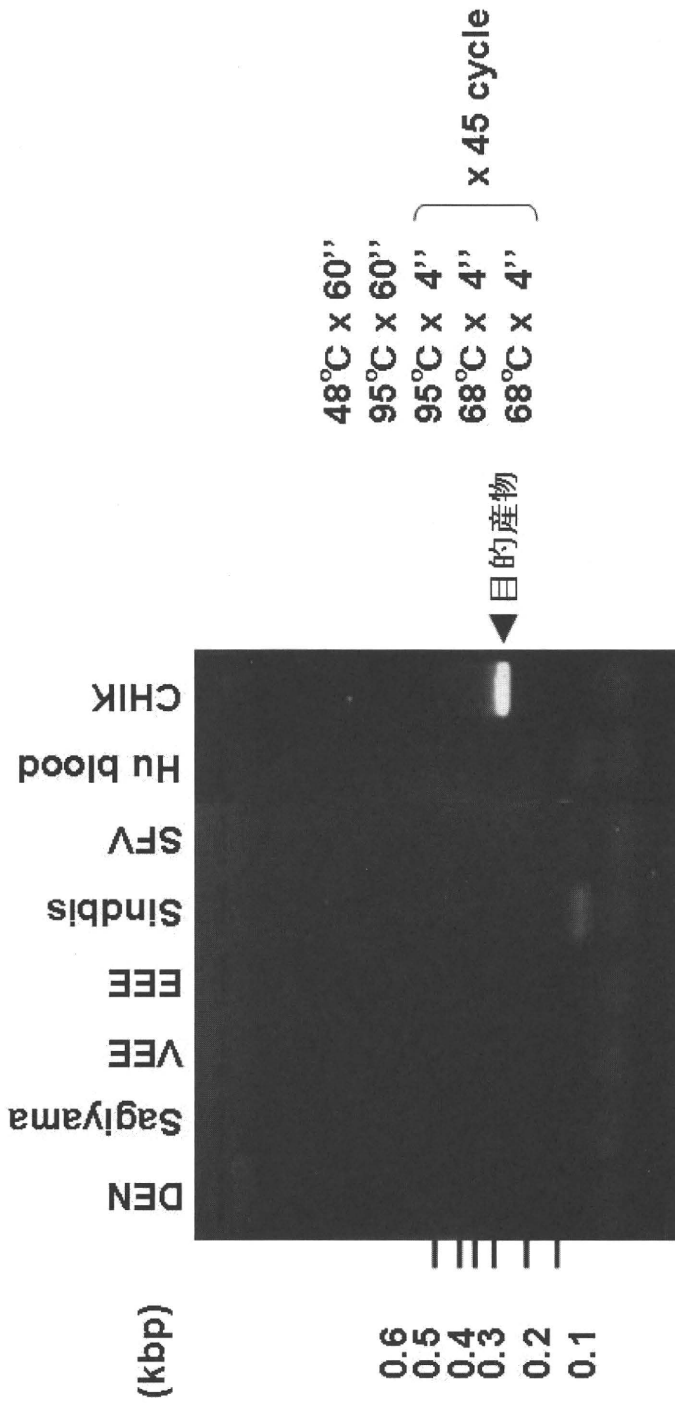


図1. チャクングニアウイルス検出用 Hyper RT-PCR 用プライマーの特異性の検討：設計したプライマーの様々な組み合わせを検討した結果センスプライマー-CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー-CHIK10798r の特異性が確認された。このときこれらプライマーを用いることによりフラビウイルスであるデングウイルス、他のアルファウイルス及びヒト血液由来核酸に対して非特異反応は観察されなかった。

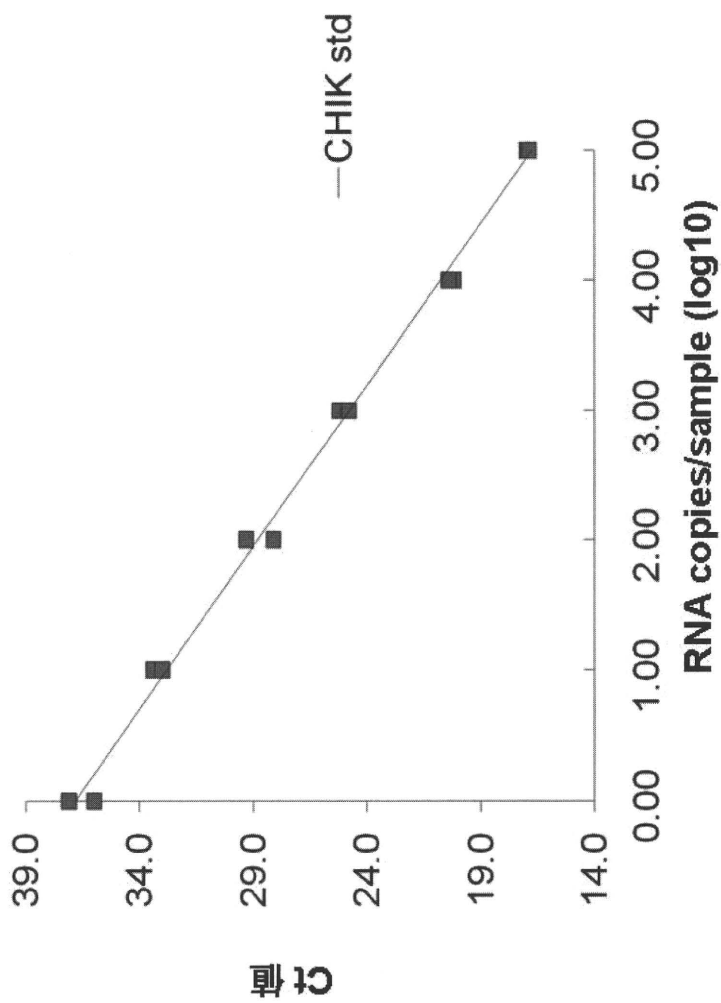


図2. チクングニアウイルス検出用 Hyper RT-PCR 用プライマーのリアルタイム RT-PCR への応用: チクングニア合成 RNA (10^5 RNA copies) を 10 倍階段希釈し, センスプライマー-CHIK10572f 及びアンチセンスプライマー-CHIK10798 r を用いて, その定量性を検討したところ 1 コピー-RNA/サンプルの検出感度を示し, さらに RNA の検出においては定量性が認められた.

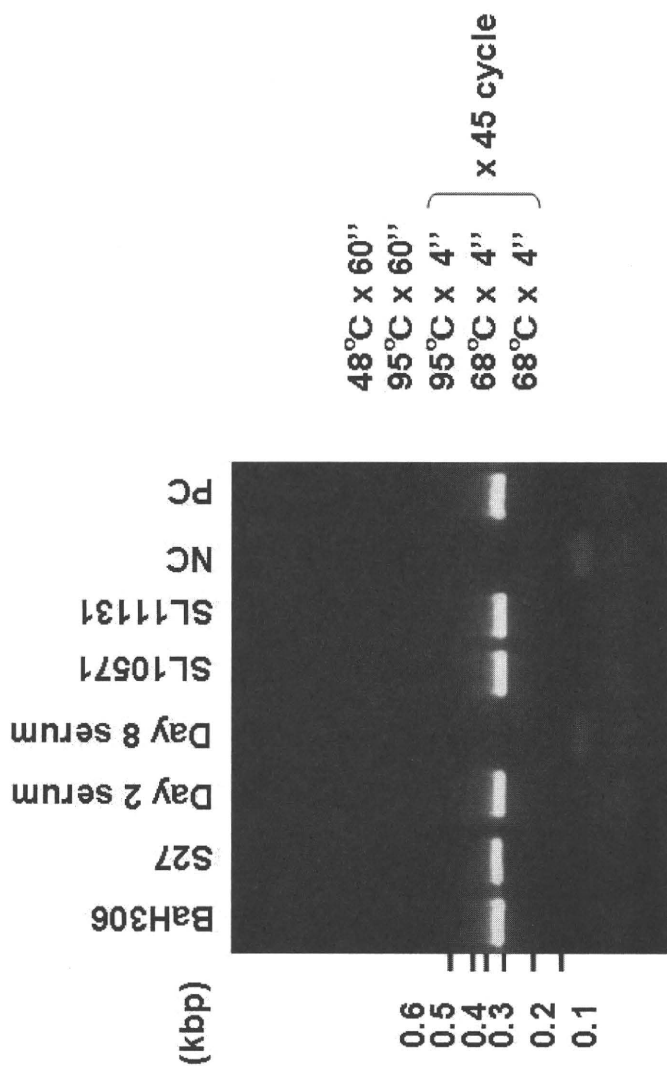


図3. Hyper RT-PCR 用プライマーの様々なチクングニアウイルス株およびチクングニア熱患者血清への応用：プライマー CHIK10572f/CHIK10798 r の様々なチクングニアウイルス株に対する特異性を検討したところ、アジア型の BaH306 株、東・中央アフリカ型の S27 株に対して目的産物が増幅された。またチクングニア熱 2 病日患者血および 2 病日患者血清より分離された SL10571 株および SL11131 株においても目的産物の増幅が確認された。このとき同一患者の 8 病日患者血清においては目的産物の増幅は認められなかった。NC (陰性対照), PC (陽性対照)。

厚生労働科学研究補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究報告書

名古屋市内で捕獲した蚊からのチクングニアウイルスはじめフラビウイルス検出の試み

研究分担者 柴田 伸一郎 (名古屋市衛生研究所 主任研究員)
研究協力者 小平 彩里 (名古屋市衛生研究所 研究員)

研究要旨

チクングニア熱の診断検査法は、昨年の本研究班の分担研究として、我々が開発した方法と、本研究班の高崎氏らが開発した方法とがある。より簡便な高崎氏らの方法を実際にフィールドの蚊に対して実施した。8分間人囷法により捕獲した蚊に対して、C6/36細胞によるウイルス分離、リアルタイム RT-PCR法でチクングニアウイルスを、RT-PCR法で日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子検出を試みた。

2010年7月から11月の間、名古屋市内の公園延34ヶ所、ヒトスジシマカ♀1784頭103検査単位(プール)を調査したが、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスはじめウイルス分離はされなかった。チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子も検出されなかったが、2検体について不明瞭なバンドを検出したが、2010年に捕獲した蚊からは、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスを分離・検出することはなかった。

A. 研究目的

チクングニア熱は、平成23年2月より感染症法の4類感染症として登録された。また、この感染症を引き起こす病原体であるチクングニアウイルスは、トガウイルス科アルファウイルス属に属するRNAウイルスである。自然界では、カーサルーカ、カーヒトーカの感染環を持ち、アフリカ、インド、東南アジア諸国で、チクングニア熱が蔓延している。2007年7月には、インドで感染した人によりイタリア北部農村でチクングニアウイルスが持ち込まれ、最終的には334名に感染疑い、284症例を実験室

診断した結果204名に感染が確認され、1名が死亡するという集団感染が起こった。また、2010年9月チクングニア熱のフランス国内での感染例が2例報告された。

日本におけるチクングニアウイルスの主たる媒介蚊は、ヒトスジシマカである。ヒトスジシマカの生息域は、日本の温暖化により北限が拡大していることが知られている。また、チクングニア熱の輸入症例数も2006年11月以降19例報告されており、いつイタリアやフランスのような国内での感染が起きても不思議ではない状態となっている。

そこで、我々は国内での主たる媒介蚊となりうるヒトスジシマカについてチクングニアウイルスの保有を調査することとした。また同時に日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスについても調査した。

B. 研究方法

名古屋市内の公園延 34 地点で 7 月 15 日から 11 月 4 日まで名古屋市生活衛生センター職員が、8 分間人囀法により蚊を捕集した。捕集した蚊はドライアイスで処理し雌のヒトスジシマカを選別し、採取地点毎に最大 50 頭を 1 プールとして 2.0ml スクリューキャップチューブに詰め冷凍したまま当所へと搬入した。捕集された雌ヒトスジシマカは 1784 頭、103 プールとなった。

2.0ml チューブにプールされた雌のヒトスジシマカには、冷凍したメタルコーンと 1ml の MEM を加え、マルチビーズショッカー (安井機器) により破碎し乳剤化した。このチューブを冷却遠心機で 4°C、13,000 回転、10 分間遠心し、上清を 0.22 μm ポアフィルターで濾過をし、その濾液は、24 ウェルマルチプレートに単層培養した C6/36 細胞を PBS で洗浄後、100 μl/ウェルの割合で 2 ウェル接種し、28°C CO₂ インキュベーターで 1 時間吸着後、接種液を PBS で 1 回、2 倍量の非必須アミノ酸を添加した MEM (2xNEAA MEM) で 1 回洗浄後、1% ウシ胎児血清加 MEM (1% FBS MEM) で培養した。C6/36 細胞によるウイルス分離は、2 代継代して、CPE を観察した。CPE が認められない検体については、QIAamp Viral RNA Mini Kit を用い細胞培養上清より RNA 抽出を行い、ウイルス遺伝子検出を実施し確認した。

濾液の 140 μl は直接 QIAamp Viral RNA Mini Kit を使用して RNA 抽出をし、以下の遺伝子検査に使用した。

チクングニアウイルス遺伝子検出は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit を使用して、本研究班員の高崎氏らが開発した TaqMan プローブリアルタイム RT-PCR 法を用いた。プローブ: TaqMan MGB Probe Taq-Chik638P : FAM-TACCAGCCTGCACYC-MGB-3' プライマー (F): Taq-Chik607F (10849) : GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT プライマー (R): Taq-Chik672R (10894) : GCC CCC RAA GTC KGA GGA R のプライマー・プローブセットを用い以下の反応条件で実施した。逆転写反応 48°C 30min.、PCR 酵素活性 95°C 10min.、2steps PCR 95°C 15sec. & 60°C 1min. を 45 サイクル実施した。

日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子検出は、コンベンショナル RT-PCR の系を用いた。

cDNA 合成: 逆転写反応は、SuperScript III (Lifetechnologies) を用いて実施した。反応液の調整は、添付のマニュアルに従い、逆転写用プライマーは、WN Outer C: tcc gar acr gtw yyg agg gct t を使用し 30 μl の反応系で実施した。逆転写反応は、50°C 30 分で実施後、70°C 20 分加熱し酵素を失活させた。逆転写反応により得られた cDNA、5 μl を用いて PCR 反応を実施した。

PCR 反応は、1st PCR は、プライマーペア WN Outer S: tgg atw gar gar aat gaa tgg at / WN Outer C で PrimeStar GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) 98°C 10 秒、50°C 10 秒、68°C 60 秒の 3 ステップを 45 サイクル実施した。さらに

Nested PCR も WN Inner S: gar gac aty tgg tgy gg / WN Inner C: cag gca gca ccg tmt rcy ca プライマーペアを用いて同様の反応条件で実施した。

C. 研究結果

C6/36 細胞によるウイルス分離は、ウイルス接種後 1 週間 CPE の出現の有無を観察したが CPE は見られなかったため、2 代継代した。継代終了時に CPE の出現は認められず、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等の分離はできなかった。(表 1.)

チクングニアウイルス遺伝子検出系リアルタイム RT-PCR では、陽性コントロール RNA は RT 反応で逆転写され、PCR 反応で増幅曲線が検出されていたが、蚊の検体から直接、もしくは、C6/36 細胞 2 代継代細胞上清からの抽出遺伝子からは、増幅曲線が見られずチクングニアウイルス遺伝子は全く検出されなかった。(表 1.)

日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス検出系コンベンショナル RT-PCR においては、蚊検体から直接の抽出遺伝子から日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子は検出されなかった。(表 1.) C6/36 細胞 2 代継代後の上清からの抽出遺伝子からも日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子は検出されなかった。しかしながら、109-2, 109-3 プールに関しては、ウエストナイルウイルス陽性コントロール RNA の増幅産物に近似した増幅産物らしき不明瞭なバンドが認められたが、特定はできなかった。

D. 考察

日本で、チクングニアウイルスの媒介蚊となりうるヒトスジシマカに対して、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスのウイルス分離、遺伝子検出を実施したが、これらのウイルスを分離、遺伝子検出することはなかった。陽性コントロール RNA を使った遺伝子増幅の確認により、検出系が機能していることを確認しているため、今回調査した名古屋市内で捕集されたヒトスジシマカは、これらウイルスを保有していないことがわかった。日本脳炎ウイルスが検出されなかったのは、都市部の調査であるためと推測された。

現在東南アジアを中心に感染拡大が続いており、昨年 243 名もの輸入感染症が起きているデング熱の原因であるデング熱ウイルスに対しても今後調査の必要性があると思われた。

E. 結論

名古屋市内で捕集されたヒトスジシマカから日本脳炎ウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルスは検出されなかった。日本在来の日本脳炎ウイルスを除いたチクングニアウイルス、ウエストナイルウイルスは、未だ国内に浸潤していないと思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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. ヒトスジシマカの捕集日程、ウイルス分離、遺伝子検出結果

番号	日付	区	地点	蚊の 数	チクングニヤ ウイルス		ウエストナイル ウイルス		日本脳炎ウイルス	
					分離	遺伝子 検出	分離	遺伝子 検出	分離	遺伝子 検出
35	7月15日	中	仲ノ町公園	26	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
36	7月15日	中	葉場公園	104	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
37	7月15日	名東	西一社中央公園	32	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
38	7月15日	名東	瓶ノ井公園	35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
40	7月16日	昭和	鶴舞公園(ゲートボール 場)	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
41	7月16日	中村	則武公園	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
42	7月20日	瑞穂	衛生研究所	27	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
43-1	7月21日	守山	小幡稲荷公園	44	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
43-2	7月21日	守山	小幡稲荷公園	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
47	7月22日	中川	中須公園	11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
48	7月22日	中川	荒子公園	19	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
50	7月23日	中川	下之田公園	14	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
51	7月23日	港	戸田川緑地	23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45-1	7月30日	守山	雨池公園	45	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
45-2	7月30日	守山	雨池公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
52	8月2日	中川	的場公園	25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
64	8月2日	中川	荒越公園	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
68	8月3日	瑞穂	衛生研究所	22	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
70	8月4日	西	鷹匠公園	11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
55-1	8月5日	港	浜町公園	43	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
55-2	8月5日	港	浜町公園	31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
56	8月5日	港	港陽公園	31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
60	8月6日	港	岸北公園	9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
71	8月10日	瑞穂	衛生研究所	37	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
72	8月13日	中川	荒越公園	19	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

73	8月13日	中川	荒越北公園	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
74	8月16日	西	榎公園	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
75-1	8月16日	西	押切公園	31	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
75-2	8月16日	西	押切公園	20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
77-1	8月17日	天白	薦谷公園	34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
77-2	8月17日	天白	薦谷公園	18	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
78	8月17日	天白	第四十四号表山緑地	10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
79	8月17日	瑞穂	衛生研究所	29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
82	8月20日	中川	荒越公園	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
84	8月24日	瑞穂	衛生研究所	25	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
85	8月25日	中	仲ノ町公園	34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
86	8月25日	中	藁場公園	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
87-1	8月27日	熱田	名古屋国際会議場	48	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
87-2	8月27日	熱田	名古屋国際会議場	39	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
87-3	8月27日	熱田	名古屋国際会議場	43	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
87-4	8月27日	熱田	名古屋国際会議場	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
87-5	8月27日	熱田	名古屋国際会議場	35	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
87-6	8月27日	熱田	名古屋国際会議場	38	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
88-1	8月27日	熱田	熱田神宮公園	47	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
88-2	8月27日	熱田	熱田神宮公園	46	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
89	8月31日	瑞穂	衛生研究所	12	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
90	9月2日	熱田	白鳥公園	29	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
91	9月3日	中川	荒越公園	9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
92	9月3日	中川	荒越北公園	11	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
93	9月6日	南	中江公園	8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
95	9月6日	瑞穂	衛生研究所	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
96	9月9日	緑	鳴子螺貝公園	42	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
97	9月9日	緑	旭高根公園	15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
98-1	9月10日	千種	赤坂公園	37	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
98-2	9月10日	千種	赤坂公園	40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
98-3	9月10日	千種	赤坂公園	46	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
99-1	9月10日	千種	清明山公園	45	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
99-2	9月10日	千種	清明山公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
100	9月14日	瑞穂	衛生研究所	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
101	9月17日	中川	荒越公園	15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

102	9月17日	中川	荒越北公園	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
103-1	9月17日	千種	赤坂公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
103-2	9月17日	千種	赤坂公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
103-3	9月17日	千種	赤坂公園	41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
104-1	9月17日	千種	清明山公園	34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
104-2	9月17日	千種	清明山公園	34	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
104-3	9月17日	千種	清明山公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
106	9月22日	昭和	花見緑地	21	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
107	9月22日	昭和	前山緑地	41	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
108	9月28日	瑞穂	衛生研究所	51	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
109-1	9月29日	千種	赤坂公園	39	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
109-2	9月29日	千種	赤坂公園	43	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
109-3	9月29日	千種	赤坂公園	31	(-)	(-)	(-)	(-)*	(-)	(-)*
110-1	9月29日	千種	清明山公園	40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
110-2	9月29日	千種	清明山公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
110-3	9月29日	千種	清明山公園	33	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
110-4	9月29日	千種	清明山公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
110-5	9月29日	千種	清明山公園	47	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
111	10月1日	中川	荒越公園	13	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
112	10月1日	中川	荒越北公園	23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
113	10月5日	瑞穂	衛生研究所	20	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
114	10月7日	昭和	花見緑地	8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
115	10月7日	昭和	前山緑地	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
116	10月8日	千種	赤坂公園	50	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
117-1	10月8日	千種	清明山公園	42	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
117-2	10月8日	千種	清明山公園	40	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
117-3	10月8日	千種	清明山公園	33	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
118	10月12日	瑞穂	衛生研究所	17	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
119	10月14日	千種	赤坂公園	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
120-1	10月14日	千種	清明山公園	32	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
120-2	10月14日	千種	清明山公園	28	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
123	10月19日	瑞穂	衛生研究所	8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
127	10月22日	千種	赤坂公園	23	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
128-1	10月22日	千種	清明山公園	42	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
128-2	10月22日	千種	清明山公園	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

127-2	10月22日	千種	赤坂公園	15	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
132	10月29日	千種	赤坂公園	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
133-1	10月29日	千種	清明山公園	44	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
133-2	10月29日	千種	清明山公園	30	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
135	11月4日	千種	赤坂公園	48	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
136-1	11月4日	千種	清明山公園	48	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
136-2	11月4日	千種	清明山公園	48	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
136-3	11月4日	千種	清明山公園	36	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

* : 不明瞭なバンド葉認められた検体

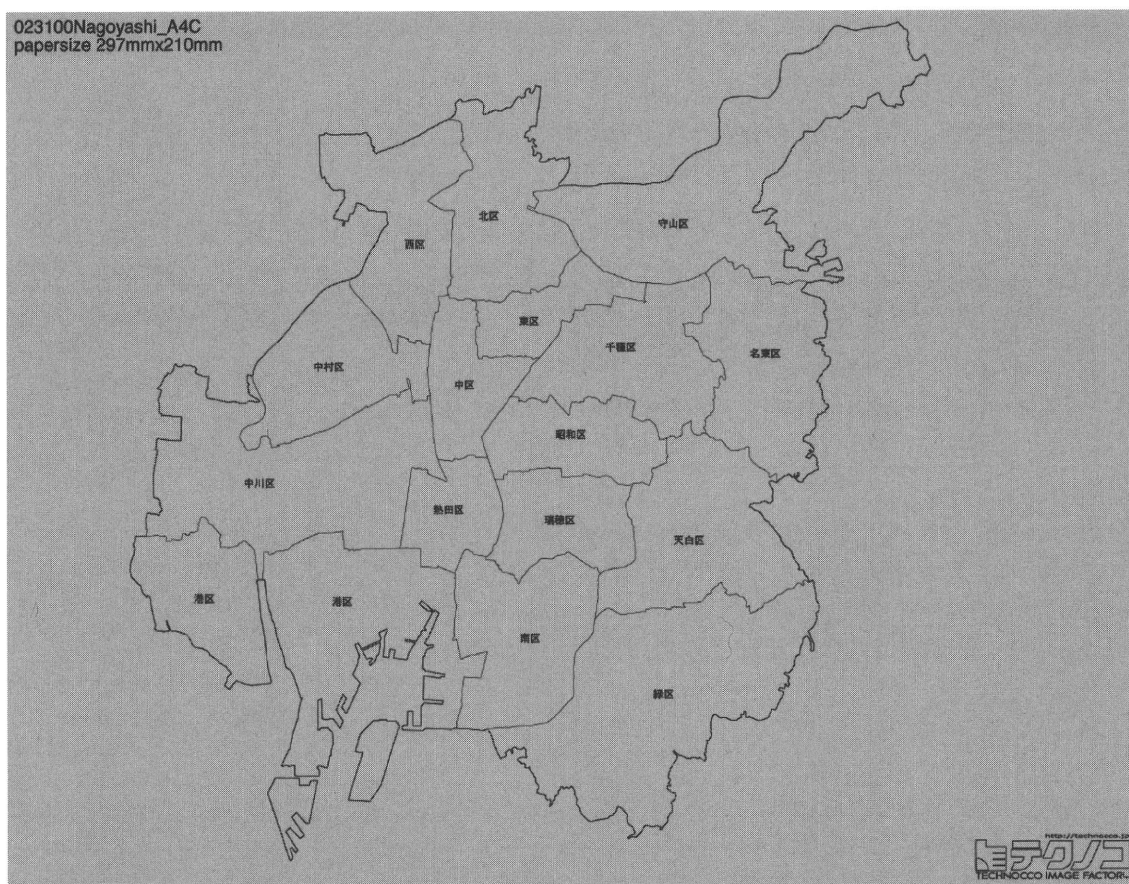


図 1. 名古屋市行政区配置図

厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

アフリカからのデング熱輸入症例と分離ウイルス株の性状解析

研究分担者 倉根一郎 (国立感染症研究所)

協力研究者 モイ メン リン、小滝 徹、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)

我が国のデング熱輸入症例は、1999年の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は増加傾向にあり、2010年は輸入患者数が243症例と近年の100例前後を大きく上回った。日本国内にはデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、輸入症例の診断は非常に重要である。我が国のデング熱輸入症例の大半は、東南アジアからの輸入症例であるが、この3年間で我々はアフリカからの輸入症例を4例経験し、ウイルスを2株分離した。そのうち、1例に関しては出血傾向を疑うエピソードもあり、今後アフリカからのウイルス性出血熱は、デング出血熱は鑑別疾患として重要である。

A. 目的

我が国のデング熱輸入症例は、1999年の感染症法施行以来、デング熱輸入症例は増加傾向にあり、2007から2009年は100例前後が報告されていた。しかし、2010年は243例と急増し、2011年に入ってもこの傾向は継続している。日本国内にはデングウイルスの媒介蚊であるヒトスジシマカが東北地方以南に生息していることもあり、その実験室診断をより迅速で確実なものにする必要がある。アフリカからのデング熱輸入症例およびその分離株に関して、解析・検討した。

B. 方法

1. デングウイルス NS1 抗原検出キットの
評価

1) ウイルス遺伝子の検出

陽性コントロールはデングウイルス 1、2、3、4型 (感染研標準株) を蚊由来細胞 C6/36 株で増殖させた培養上清を用いた。デングウイルス型別リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) は Ito ら (J.Clin.Microbiol. 42(12):5935-5937,2004) の方法により実施した。

2) 抗デングウイルス IgM 抗体検査

① IgM 捕捉 ELISA 法 (Focus 社キット) によった。検査はキットのプロトコールに従い実施した。また、IgG ELISA 法 (panbio 社キット) もプロトコールに従い実施した。

3) ウイルス遺伝子解析および系統樹解析

分離されたデングウイルスは、デングウイルス 3 型用遺伝子配列用プライマーを用いて RT-PCR 法によりウイルス遺伝子を増幅し、ダイレクトシーケンシングにより、ABI prism Avant 7100 (ABI 社) によりプロトコ