

デング熱等の蚊媒介感染症対策についての研究

徳島県立保健製薬環境センター

川上 百美子・島田 実希子*

Research on Countermeasures Against Mosquito-borne Infections Such as Dengue Fever

Yumiko KAWAKAMI and Mikiko SHIMADA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2017 年から 2018 年の間、蚊媒介感染症のデング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症について、検査の効率化、迅速化を図った。また、蚊の生息状況調査及びウイルス保有状況調査を行った。徳島県内の公園等 3 箇所計 9 地点において、5 月から 10 月までの間、人囹法及び CO₂ トラップ法による蚊の捕集を行った。捕集蚊は、人囹法で 583 匹、CO₂ トラップ法で 3,280 匹、総数 3,863 匹であった。そのうち、デング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症の媒介蚊であるヒトスジシマカの雌計 858 匹を対象として、デング、チクングニア及びジカウイルス保有状況について遺伝子検査を行った結果、各ウイルス遺伝子は検出されなかった。

Key words : 蚊媒介感染症 mosquito-borne infections, ヒトスジシマカ *Aedes albopictus*, デングウイルス dengue virus, チクングニアウイルス chikungunya virus, ジカウイルス zika virus

I はじめに

デング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症は、ウイルスを保有している蚊に吸血されることによって感染する蚊媒介感染症であり、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で全数把握対象の四類感染症に指定されている。2014 年には約 70 年ぶりとなるデング熱の国内感染例が確認され¹⁾、2016 年には中南米地域を中心に流行したジカウイルス感染症が四類感染症に追加された²⁾。

また、これら蚊媒介感染症の流行地域は世界的に拡大しており、日本における輸入症例も増加傾向にあることを受けて、蚊媒介感染症に対する対策は強化されている。

「蚊媒介感染症に関する特定予防指針³⁾」に基づき、徳島県では「蚊媒介感染症対策行動計画」が策定され、平常時の予防対策や発生動向調査の強化が求められている。これら蚊媒介感染症の病原体は、国内ではヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) が媒介するとされており、平常時の定点モニタリング調査が重要とされている。

そこで、感染症例の迅速な把握、平常時の予防対策を行うため、検査の効率化、迅速化の検討を行うとともに、蚊の生息状況について調査し、媒介蚊のデング、チクングニア及びジカウイルス遺伝子の保有状況について検査したので、その結果を報告する。

II 方法

1 検査の効率化・迅速化の検討

検査方法は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアル^{4,6)}を参考に、リアルタイム RT-PCR 法について検討を行った。

反応試薬はチクングニアウイルス検査マニュアル⁵⁾で示されている 4×TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いることとした。また、デングウイルス 1 型から 4 型、チクングニアウイルス及びジカウイルスのプライマー、プローブ濃度を統一し、試薬調製の煩雑さをなくした。

各反応液は、4×TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix、プライマー（終濃度 1 μM）及びプローブ（終濃度 0.25 μM）に遺伝子検査用検体（RNA）5 μL を加えた計 20 μL とした。Applied

*現 危機管理部消費者くらし安全局安全衛生課

Biosystems 7500Fast (Thermo Fisher Scientific) を用いて、48°C 5分、95°C 20秒、(95°C 3秒、57°C 30秒) × 40サイクルのFast モードで増幅反応を行った。

反応条件の検討のため、各ウイルスの標準コントロールについて、10倍希釈系列を調製し、二重測定を行い、検量線、検出下限値の確認を行った。

2 蚊の生息状況調査

(1) 蚊の捕集方法

蚊の捕集は、人囿法⁷⁾及びCO₂トラップ法⁷⁾の2種類の方法で実施した。人囿法は、調査員が調査地点に8分間立ち、吸血のために飛来する蚊を直径36 cmの捕虫網(志賀昆虫普及社)で捕集した。CO₂トラップ法は、捕集器としてライトトラップ(猪口鉄工所)をライトなしの状態で使用し、誘引剤として1.5 kgのドライアイスを用いた。捕集器は、調査地点の木の枝に吊るなどして地上から約1 mの高さになるように設置し、午前中から翌日の午前中までの約24時間稼働させた。

(2) 調査実施期間及び調査地点

調査実施期間は蚊の活動時期となる5月から10月までの間で、月2回(計24回)実施した。

調査箇所は、県内の公園等3箇所(A~C)を選定した。各箇所ごとに木陰や茂みなど蚊が潜んでいそうな場所を3地点ずつ選定し、合計9地点で実施した。なお、2017年度は施設Aについて、CO₂トラップ法を実施していない。

(3) 蚊の同定

人囿法及びCO₂トラップ法で捕集した蚊は、捕集網に入った状態のまま持ち帰り、4°C冷蔵庫にて数時間静置した。その後、運動性が低下した状態で形態学的な特徴を観察し、種の同定、雌雄の分類を行い、個体数を記録した。次に、デング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症の媒介蚊であるヒトスジシマカの雌を調査地点ごとに2 mLチューブに入れ、各ウイルス保有状況調査を実施するまで-40°C冷凍庫にて保管した。

なお、調査開始時及び形態学的に分類できない蚊については、種の同定確認を行った。蚊又は蚊の一部をQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNA抽出を行い、蚊の持つ遺伝子であるミトコンドリアDNAのチトクロームcオキシダーゼサブユニット1(CO1)領域をPCR法にて増幅させた。反応試薬としてPerfectShot Ex Taq (TaKaRa)、プライマーとしてLCO1490及びHCO2198を用い、94°C 1分、(94°C 10秒、45°C 30秒、72°C 1分) × 35サイクル、72°C 10分で増幅反応を行った⁸⁻⁹⁾。その後、ダイレクトシークエンスにより得られた遺伝子産物の塩基配列を決定し、BLASTを用いた相同性検索を行った。

3 媒介蚊のウイルス保有状況調査

(1) 蚊の前処理

調査日、調査地点ごとに最大30匹を1プールとした。プール検体にリン酸緩衝液(PBS)を300 µL加えた後、ビーズ(MP Biomedicals)をスパーテル1杯分加え、マルチビーズショッカー(安井器械)を用いて2,500 rpmで90秒間均一化した。蚊を粉碎後、8,000 rpmで1分間遠心し、上清を遺伝子抽出用検体とした。

(2) 遺伝子抽出

遺伝子抽出用検体は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った。なお、検体は凍結融解を繰り返さないよう、検体の前処理からウイルス遺伝子検査までは同日に実施した。

(3) ウイルス遺伝子検査

抽出RNAの一部を調査日、調査箇所ごとにまとめて(9地点から3箇所を集約)遺伝子検査用検体とし、リアルタイムRT-PCR法にてデング、チクングニア及びジカウイルス遺伝子検査を実施した。反応試薬及び反応条件は、検査の効率化・迅速化の検討で行ったものと同様とした。

III 結果及び考察

1 検査の効率化・迅速化の検討

各ウイルスの標準コントロールについて、10倍希釈系列を調製し、二重測定を行ったところ、検量線の相関係数は全てのウイルスで0.99以上となり、良好な直線性が得られた。

また、従来法との検出下限値の比較を行ったところ、従来法に比べ、検出感度は同等以上となった。

また、プライマー、プローブ濃度の統一による試薬調製の効率化、増幅反応をFastモードで行うことにより、反応時間が短縮され、検査の迅速化を図ることができた。

検討内容について再現性を確認し、検査方法の信頼性、有効性が確保されたため、検査標準作業書を制定し、以降の行政依頼検査に適用している。

2 蚊の生息状況調査結果

調査箇所(A~C)別における人囿法及びCO₂トラップ法による蚊の捕集数を表1に示す。人囿法では、計9地点で総数583匹、そのうち検査対象となるヒトスジシマカ雌は332匹を捕集した。CO₂トラップ法では、計9地点で総数3,280匹、そのうち検査対象となるヒトスジシマカ雌は526匹を捕集した。その他の蚊は、アカイエカ群(*Culex pipiens* group)が大部分を占めた。ヒトスジシマカ雌の捕集率は人囿法で57%(332/583)、CO₂トラップ法で16%(526/3,280)と、人囿法が効率的であった。

また、調査箇所(A~C)別におけるヒトスジシマカ雌の捕集数の推移を図1に示す。各調査箇所ですべて捕集される蚊の種類

表1 調査箇所ごとにおける蚊の捕集数

調査箇所	人囃法				CO ₂ トラップ法				総数
	ヒトスジシマカ		その他 の蚊	計	ヒトスジシマカ		その他 の蚊	計	
	雌	雄			雌	雄			
A	197	43	86	326	286	49	357	692	1,018
B	60	9	43	112	127	10	1,213	1,350	1,462
C	75	29	41	145	113	10	1,115	1,238	1,383
計	332	81	170	583	526	69	2,685	3,280	3,863

や数の変動は、気温、天候、風速などが大きく影響する。8月から10月にかけて捕集数が多い傾向にあったが、捕集数のピークは調査箇所ごとに異なり、調査地点によってもばらつきがあった。これは、調査地点における蚊の幼虫の発生源となる池やたまり水、成虫の潜み場所となる低木や茂みの多さなどが関係していると考えられた。

これらのことから、患者発生時における生息密度調査には、効率的で迅速性に優れた人囃法が有用であると考えられる。一方で、短時間の調査となるため天候や日内変動の影響を受けやすく、調査者による捕集成績や調査地点の選定にも注意する必要がある。

3 媒介蚊のウイルス保有状況調査結果

調査日、調査9地点ごとにプールした計148検体について、前処理及び遺伝子抽出を行った。その後、抽出RNAの一部を調査日、調査3箇所ごとに集約した計67検体について、各ウイルス遺伝子検査を行った。全検体から、デング、チクングニア及びジカウイルスは検出されなかった。蚊からデングウイルスが検出される際は、1検体(30匹プール)あたり $10^6 \sim 10^9$ copiesであったとの報告¹⁰⁾から、ウイルス保有蚊1匹あたりであっても十分なRNA量が検出されると考えられるが、検体の集約量の限界については注意が必要である。

IV まとめ

2020年の東京オリンピック・パラリンピックを控え、蚊媒介感染症などの輸入感染症リスクは高まっている。そのため、疑い症例発生時に、当センターでのデング、チクングニア及びジカウイルス検査が迅速化できたことは、感染拡大防止に大きく寄与できるものと考えられる。

また、2017年、2018年の5月から10月までの間に、人囃法及びCO₂トラップ法による蚊の生息状況調査を行った。その結果、人囃法で583匹、CO₂トラップ法で3,280匹、総数3,863匹の蚊を捕集した。検査対象となるデング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症の媒介蚊であるヒトスジシマカの雌は858匹捕集され、その捕集率はCO₂トラップ法よりも人囃法が高かった。ヒトスジシマカの雌を対象として、リアルタイムRT-PCR法にて遺伝子検査を実施したところ、各ウイルス遺伝子は検出されなかった。国内感染例が発生していない現状では、媒介蚊からのウイルス検出の可能性は低い。しかし、平常時における蚊の生息状況調査は、リスク地点の把握及びヒトスジシマカの発生状況の推移を確認でき、患者発生時に対策を行う際の指標となり得る。今回の調査結果を、今後の定点モニタリング調査に生かしていきたい。

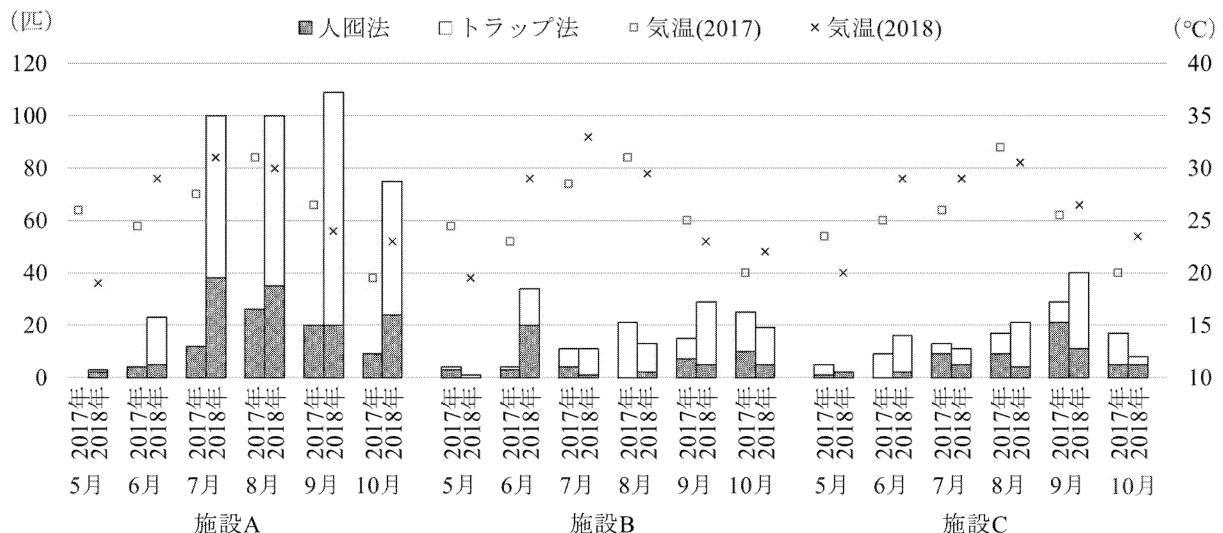


図1 ヒトスジシマカ雌の捕集数の推移

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：デング熱の国内感染症例について（第一報），平成 26 年 8 月 27 日，健感発 0827 第 1 号 (2014)
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令及び蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針の一部を改正する件の施行について，平成 28 年 3 月 30 日，健感発 0330 第 1 号 (2016)
- 3) 厚生労働省告示第 260 号：蚊媒介感染症に関する感染症特定予防指針，平成 27 年 4 月 28 日 (2015)
- 4) 国立感染症研究所：デングウイルス感染症診断マニュアル (2014)
- 5) 国立感染症研究所：チクングニアウイルス検査マニュアル (Ver.1.1)，平成 25 年 2 月 18 日 (2013)
- 6) 国立感染症研究所：ジカウイルス感染症実験室診断マニュアル（初版），2016 年 3 月 11 日
- 7) 国立感染症研究所：デング熱・チクングニア熱等蚊媒介感染症の対応・対策の手引き地方公共団体向け，平成 29 年 4 月 28 日 (2017)
- 8) Folmer O., Black M., Hoeh W., *et al.* : DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**(5), 294-299 (1994)
- 9) Taira K., Toma T., Tamashiro M., *et al.* : DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan, *Medical Entomology and Zoology*, **63**(4), 289-306 (2012)
- 10) 齊木大，長谷川道弥，岡崎輝江，他：平成 26 年度に都内で発生したデング熱に関するデングウイルス媒介蚊ならびにデングウイルス検査対応（平成 26 年度及び 27 年度の結果）2. デングウイルス検査対応，東京都健康安全研究センター年報, **67**, 27-35 (2016)