

平成26年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

齊木 大^a, 長谷川 道弥^a, 岡崎 輝江^a, 鈴木 愛^a, 小田 真悠子^a, 角田 徳子^b, 村内 このみ^a,
柴崎 澄枝^a, 長島 真美^a, 吉田 勲^a, 原田 幸子^a, 根岸 あかね^a, 宗村 佳子^a, 森 功次^a,
永野 美由紀^a, 木本 佳那^a, 林 志直^c, 鈴木 康規^a, 小林 真紀子^a, 西野 由香里^a, 福井 理恵^a,
千葉 隆司^a, 新開 敬行^a, 平井 昭彦^a, 秋場 哲哉^a, 貞升 健志^a

平成26年8月, 約70年ぶりに発生したデング熱の国内感染事例に対する健康安全研究センターにおけるデングウイルス検査対応を報告する. 蚊のデングウイルス遺伝子検査の結果, 代々木公園で9月3日, 9月10日, 9月17日に捕集されたシマカ亜属からデングウイルス1型が検出され, 遺伝子解析により53例の患者由来ウイルスの塩基配列と同一のクラスターに属することが判明し, 感染源の推定に重要な役割を果たした.

平成27年度は媒介蚊サーベイランスで捕集した成虫2,785匹, 幼虫9,128匹のウイルス検査を実施したが, ウイルスを保有する蚊は確認されなかった. また, 報告されたデング熱患者はすべて海外からの輸入症例と考えられ, 平成26年度の国内感染事例と同一クラスターに属するデングウイルスは検出されなかった.

キーワード: デング熱, デングウイルス, ヒトスジシマカ, リアルタイムPCR, 遺伝子解析

はじめに

本稿では, 平成26年度の国内感染発生時の「デング熱患者の検査」と「蚊のデングウイルス(DENV)保有調査」におけるウイルス検査体制および平成27年度の蚊媒介ウイルス検査体制について報告する.

平成26年度DENV検査体制

1. デング熱患者の検査

8月27日の厚生労働省健康局結核感染症課通知¹⁾を受け, 積極的疫学調査にて各医療機関から保健所を経由した血清検体の搬入が開始された. 開始時点では検査要件に「発熱前概ね2週間以内に, 代々木公園周辺で蚊に刺された者」が含まれていたが, 代々木公園周辺および都内訪問歴のない者からもデング熱感染が報告されたことから, 福祉保健局感染症対策課は9月12日から「代々木公園周辺で蚊に刺された者」という要件を「国内で蚊に刺された者」へ変更した. すでに他機関で確定検査を受けている国内感染症例や輸入症例についても同様に検査を実施した.

患者検査は血清を材料とし, スクリーニング検査としてウイルス非構造蛋白(NS1抗原)検査とIgM抗体検査を実施し, 関連部署に即日検査・報告する体制を整備した. また, 精密検査としてリアルタイムPCRによる遺伝子検査を整備し, 翌日までに結果報告する体制を整えた. さ

ら東京都感染症健康危機管理情報ネットワークシステム(K-net)を活用することで速やかに検査結果を報告した.

1) 検査法

NS1抗原検査はDengue NS1 Ag Strip[®](Bio-Rad Laboratories)を使用し, IgM抗体検査はPanbio[®]Dengue IgM Capture ELISA(Alere)またはSD-BIOLINE[®]Dengue Duo NS1 Ag+IgG/IgM(Standard Diagnosis)を使用した. 使用方法および結果の判定については各キットのマニュアルに準拠した. リアルタイムPCRでは患者血清140μLを取りQIAamp[®]Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)を使用してRNAを抽出した後, DENV遺伝子の検出を行った. 抽出量は70μLとし, PCR反応にはQuantiTect[®]Probe RT-PCR Kit(QIAGEN)を用いた. プライマー, プロブはCallahan *et al.*の血清型非特異的プライマー, プロブ²⁾を一部改変したもの, および血清型特異的プライマー, プロブを使用した(表1). さらに, PCR検査でウイルス遺伝子が検出された検体について, エンベロープ領域の塩基配列(1,081bp)をダイレクトシーケンス法³⁾により解析した.

2) 検査結果

8月29日から11月12日の間, 都内の公園等でDENVに感染した可能性のある患者血清243検体を対象に検査を実施した結果, NS1抗原検査陽性は66検体(27.2%),

^a 東京都健康安全研究センター微生物部
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

^c 東京都健康安全研究センター企画調整部

IgM 抗体検査陽性は 50 検体 (20.6%) , リアルタイム PCR 検査陽性は 57 検体 (23.5%) であった. このうちいずれか 1 つの検査でも陽性となった場合にデングウイルス陽性と判定し, 全体として陽性検体は 78 検体 (32.1%) であった (図 1) .

PCR 検査陽性 57 検体の血清型は DENV-1 型が 53 検体であり, 3 型が 2 検体, 2 型と 4 型がそれぞれ 1 検体であった. 1 型の 53 検体についてダイレクトシーケンス法でエンベロープ領域の塩基配列を取得し, 分子系統樹解析を行った結果, 全てほぼ同じ塩基配列を示し, 公共データベースから取得した埼玉県在住の初発患者由来ウイルスのデータ (D1/Hu/Saitama/NIID100/2014) と単一のクラスターを形成した (図 2) . また, これら 1 型以外の 4 検体については, 疫学情報等から全て海外で感染した輸入例であると考えられた.

PCR 検査で使用した血清型非特異的プライマー, プロープと血清型特異的プライマー, プロープの検出感度の比較では, およそ 3~5 cycle ほど血清型特異的プライマー, プロープの方が優れていた.

2. 蚊の DENV 保有調査

蚊からの DENV 検査を実施するにあたり, チクングニアウイルス検査マニュアル⁴⁾を基に検討した迅速で回収率が高いウイルス核酸抽出法の構築, 導入を試みた. また, 検査はウイルス研究科のみでなく, 微生物部全体で協力体制を敷いて対応した.

1) 蚊の DENV 遺伝子検査法の構築

採取したヒトスジシマカを 1.5 mL マイクロチューブに入れた後, 300 μ L の滅菌リン酸緩衝液 (PBS) を加え, マイクロマルチミキサーを用いて蚊の形がなくなるまで (約 1 分) 粉碎した (図 3) . なお, 定点ごとに最大 30 匹を 1 検体とした. 8,000 rpm, 10 分遠心分離した上清 140 μ L を取り QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を使用して RNA 抽出を行った後, リアルタイム PCR により DENV 遺伝子の検出を行った. 試薬およびプライマー, プロープは患者の検査と同一である. 当初は血清型非特異的プライマー, プロープを使用してスクリーニングを行い, 陽性検体について血清型特異的プライマー, プロープを用いて型別を行っていたが, 蚊から DENV-1 型が検出された 9 月 17 日以降は迅速に検査を進めるために 1 型特異的プライマー, プロープを併用した. さらに, PCR 検査でウイルス遺伝子が検出された検体について, エンベロープ領域の塩基配列をダイレクトシーケンス法により解析した.

2) 遺伝子検査結果

8 月 26 日から 11 月 6 日にかけて代々木公園で採取されたヒトスジシマカ 104 検体 (856 匹) を検査した結果, 14 検体から DENV が検出された. 野生のシマカから DENV が検出されたのは日本において初めてのことであり, 蚊からの検出期間は 9 月 2 日 4 地点 (5 検体) , 9 月 9 日 4 地

点 (6 検体) , 9 月 17 日 3 地点 (3 検体) と 3 週連続し (表 2, 図 4) , その血清型はすべて DENV-1 型であった. 塩基配列から分子系統樹解析を行った結果, 初発および 53 検体の患者と同じ単一のクラスターを形成した (図 2) . 陽性検体の DENV 量をリアルタイム PCR 法により推定した結果, 1 検体 (30 匹プール) あたり $10^6 \sim 10^9$ copies であり, 蚊 1 匹あたりでは $10^4 \sim 10^8$ copies と推定された. また, 代々木公園以外の推定感染地とされた公園でも同様の調査を実施したが DENV は検出されなかった.

3) DENV 分離検査

リアルタイム PCR 法で DENV が検出された検体について培養細胞を用いたウイルス分離を行った. まず, デングウイルス感染症診断マニュアルを参考に蚊の乳剤をヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞に接種した. しかし, この方法では細胞が死滅してしまい DENV を分離することができなかった. そこで, 乳剤を PBS で 2 倍希釈し, 100 μ L を Vero E6 細胞に接種したところ, 14 検体中 8 検体で CPE が確認され DENV-1 型を分離することができた.

3. 国内感染事例のまとめ

これまで, 日本国内で捕集された蚊から DENV を検出した例はなかった. 今回, 初めてシマカ亜属から DENV が検出された. さらに, 患者から検出されたウイルス遺伝子の塩基配列が, 代々木公園で捕集された蚊由来のウイルス遺伝子と同一であることが判明し, 感染経路の解明に大きな役割を果たした. また, シマカ亜属が DENV を媒介していたこと, 3 週続けて蚊から DENV が検出されたことから, ウイルス量の多い感染蚊が比較的長期間存在していたこと, 単系統の DENV によって感染が拡大していったこと, などが考えられた.

平成 26 年事例への対応では, 代々木公園での DENV 感染をヒトと蚊の両面から直接的に証明できた. 過去に, 通常デング熱が流行していない地域においてアウトブレイクが生じた事例は複数報告されているが^{5,6)}, 蚊検体と患者から検出されたウイルスの塩基配列がほぼ一致し感染地が明らかになった事例は報告されていない. DENV 感染経路の探知には遺伝子検査による血清型の判定だけでなく, 塩基配列を取得し分子系統樹解析を行うことが重要であることが示された.

平成 27 年度蚊媒介ウイルス検査体制

東京都は平成 26 年 9 月, デング熱国内感染事例を検証し, 今後の蚊媒介感染症対策に反映するため, 「東京都蚊媒介感染症対策会議」⁷⁾を設置し検討を進めた. その中で, 平成 27 年度は前年度の検査体制をさらに整備・発展させた.

1. デング熱, チクングニア熱患者の検査

国内感染事例を受けて, 厚生労働省は, 「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」⁸⁾により, デング熱及びチ

クングニア熱を、重点的に対策を講じる必要がある蚊媒介感染症と位置付けた。当センターでは「デング熱及びチクングニア熱に関する対策について（27 福保健感第 315 号）」⁹⁾に基づき、医療機関において NS1 抗原検査未実施の場合（デング熱疑い例）には NS1 抗原検査，DENV，チクングニアウイルス（CHIKV）リアルタイム PCR 検査を実施し，NS1 抗原検査陽性（デング熱確定例）には DENV リアルタイム PCR 検査を実施し，NS1 抗原検査陰性（チクングニア熱疑い例）には CHIKV リアルタイム PCR 検査を実施した。

1) 検査法

NS1 抗原検査およびリアルタイム PCR 検査の核酸抽出および試薬は前年同様であるが，DENV 血清型非特異的プライマー，プローブは検出感度が低いこと，検査の迅速性が求められることから使用せず，国立感染症研究所の病原体検出マニュアル^{4,10)}に準拠した DENV 各血清型特異的プライマー，プローブおよび CHIKV 特異的プライマー，プローブを使用した（表 1）。また，PCR 検査で DENV 陽性の場合，エンベロープ領域の塩基配列（1,550bp）をダイレクトシーケンス法により解析した。

2) 検査結果

デング熱疑い例 66 検体，デング熱確定例 43 検体，チクングニア熱疑い例 3 検体，合計 112 検体を対象に検査を実施した結果，49 検体が DENV 陽性と判定され，NS1 抗原検査陽性は 20 検体，リアルタイム PCR 検査陽性は 45 検体であった。また，1 検体は CHIKV 陽性であった。これらはすべて海外感染例であると考えられた。検出された DENV の血清型は 1 型と 2 型がそれぞれ 16 検体，3 型が 6 検体，4 型が 7 検体であった（表 3）。4 検体は NS1 抗原検査陽性であるもののリアルタイム PCR 検査陰性であり血清型は判定できなかった。DENV-1 型陽性 16 検体についてダイレクトシーケンス法でエンベロープ領域の塩基配列を取得し，分子系統樹解析を行った結果，国内感染事例と同一クラスターに属する検体はなかった。

2. 蚊のウイルス保有調査

東京都では蚊媒介感染症対策として平成 16 年から「感染症媒介蚊サーベイランス」事業を行ってきた。現在は毎年 6 月～10 月に 10 回，都内 16 地点において蚊を捕集し，蚊の種類に応じてウエストナイルウイルス，DENV，CHIKV，マラリア原虫の保有状況を調査している。この事業でこれまでに病原体が検出されたことはないが，調査地点に代々木公園が含まれていなかった。そのため，平成 27 年度は代々木公園を含む都内 9 公園（50 地点）を対象とした「デング熱媒介蚊サーベイランス」事業（平成 28 年度に「重点サーベイランス」に名称変更）を策定した¹¹⁾。4 月～11 月の 14 回，蚊の捕集を行い，シマカ亜属については DENV，CHIKV（第 6 回より追加）の検査を行う体制を整備した。さらに，DENV を保有した蚊から卵，

幼虫へ垂直伝播したという報告もあるため，幼虫（ボウフラ）の検査も実施した¹²⁾。検査結果は健康危機管理情報課環境情報係を通じて採集週の翌週までに随時，建設局の公園管理担当部署に連絡するとともにセンターの HP から公開した¹¹⁾。

1) 蚊のウイルス検査法

成虫は平成 26 年と同様，最大 30 匹までを 1 プールとして遺伝子抽出を行った。幼虫は成虫に比べて PCR 反応を阻害する物質が多いという報告もあるため，最大 15 匹までを 1 プールとした後，成虫と同様に PBS を加えて粉碎し，上清から遺伝子抽出を行った（図 5）。平成 26 年の結果から，陽性検体にはウイルスが十分量存在すること，蚊 1 検体あたり最大 7 種類のプライマー，プローブを用いることから溶出量は 100 μ L とした。リアルタイム PCR 法の試薬およびプライマー，プローブは患者の検査と同一で，DENV 各血清型特異的プライマー，プローブおよび CHIKV 特異的プライマー，プローブを使用した。

2) 遺伝子検査結果

4 月 20 日から 11 月 13 日にかけて「デング熱媒介蚊サーベイランス」事業で捕集された成虫 389 検体（2,785 匹），幼虫 633 検体（9,128 匹）を検査した結果，全ての検体で DENV，CHIKV どちらも陰性であった（表 4）。また，既存の「感染症媒介蚊サーベイランス」事業で捕集されたシマカ亜属の成虫 168 検体（1,726 匹）についても全ての検体で DENV，CHIKV どちらも陰性であった。

総 括

2020 年の東京オリンピック・パラリンピック大会の開催に向け，当センターは輸入感染症に対して十分に警戒し，迅速な対応を取らなければならない。この一環として，デング熱などの蚊媒介感染症の発生・拡大を防止するための対策が重要である。平成 27 年度のサーベイランス事業ではウイルスを保有した蚊は確認されなかったが，デング熱患者の報告数は過去最多を更新している。また，中南米を中心にジカ熱が流行しており，胎児への影響も問題となっている。グローバル化が進み，デング熱を含む海外で流行している感染症が国内に持ち込まれ，国内で感染が拡大する可能性が危惧される。平時から蚊のウイルス保有状況を調査するとともに，患者から分離されたウイルスの塩基配列を取得し，分子系統樹解析を行うことで，国内感染が発生した場合に感染源の推定や伝播の状況の把握などに役立てることができる。平成 26 年のデング熱国内感染発生での経験を踏まえ，これからも，国内での蚊媒介感染症の拡大防止に努めなければならない。

文 献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長：健感発0827第1号，
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
 - 2) Callahan, D.J., Wu, L.S., Schultz, D.A., *et al.*: *J. Clin.
Microbiol.*, **39**, 4119-4124, 2001.
 - 3) Ito, M., Takasaki, T., Kotaki, A.: *J. Infect. Dis.*, **63**, 181-184,
2010.
 - 4) 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, 2013.
<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/CHIKV.v1.1.pdf>
(2016年6月23日現在, なお本URLは変更または抹
消の可能性がある)
 - 5) Adalja, A.A., Sell, T.K., Bouri, N., *et al.*: *Eme. Inf. Diseases*,
18(4), 608-614, 2012.
 - 6) Marchand, E., Prat, C., Jeannin, C., *et al.*: *Euro Surveill.*,
18(50), 20661, 2013.
 - 7) 東京都蚊媒介感染症対策会議報告書
[http://www.metro.tokyo.jp/INET/KONDAN/2014/12/DATA
/40oco101.pdf](http://www.metro.tokyo.jp/INET/KONDAN/2014/12/DATA/40oco101.pdf) (2016年6月23日現在, なお本URLは変
更または抹消の可能性がある)
 - 8) 厚生労働省健康局結核感染症課長：平成27年厚生労働
省告示260号, 蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指
針, 平成27年4月28日
 - 9) 東京都福祉保健局健康安全部長：27福保健感第315号,
デング熱及びチクングニア熱に関する対応について（依
頼），平成27年6月23日
 - 10) 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,
<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/Dengue2014.pdf>
(2016年6月23日現在, なお本URLは変更または抹
消の可能性がある)
 - 11) 東京都健康安全研究センター: 重点サーベイランスの
概要, 2015.
[http://www.tokyo-eiken.go.jp/kj_kankyo/mosquito/dengue-
surveillance/](http://www.tokyo-eiken.go.jp/kj_kankyo/mosquito/dengue-surveillance/) (2016年6月23日現在, なお本URLは
変更または抹消の可能性がある)
 - 12) Buckner, E.A., Alto, B.W., Lounibos, L.P.: *J. Med. Entomol.*,
50(6), 1291-1297, 2013.
 - 13) 関 なおみ, 岩下裕子, 本 涼子, 他: 日公衛誌, **62**,
238-250, 2015.
- ・吉田 勲, 長島真美, 千葉隆司, 他: ヒトスジシマカか
らのデングウイルスの検出, 平成 27 年度地方衛生研究
所全国協議会第 30 回関東甲信静支部ウイルス研究部会
(埼玉), 2015.
 - ・吉田 勲, 長島真美, 千葉隆司, 他: 2014 年に都内の
公園が感染拡大の原因となったデング熱について, 小児
科, **57**, 395-400, 2016.

発 表 実 績

- ・吉田 勲, 長島真美, 長谷川道弥, 他: 2014 年に東京
都内の公園で採取されたヒトスジシマカからのデングウ
イルスの検出, 第 56 回臨床ウイルス学会(岡山),
2015.
- ・阿保 満, 千葉隆司: 2014 年の東京都のデング熱対応,
第 36 回衛生微生物協議会(仙台), 2015.

表1. リアルタイムPCRプライマー, プローブ

血清型	名称	シーケンス (5' -3')	サイズ
Uni ¹⁾	Group forward	AAGGACTAGAGGTTAKAGGAGACCC	110
	Probe Den	FAM-AAACAGCATATTGACGCTGGGARAGACC-TAMRA	
	Group reverse	GGCGYTCTGTGCCTGGAWTGATG	
1型 ²⁾	D1MGBEn469s forward	GAACATGGRACAAYTGCAACYAT	67
	D1MGBEn493p probe	FAM-ACACCTCAAGCTCC-MGB	
	D1MGBEn536r reverse	CCGTAGTCDGTCAGCTGTATTTC	
2型 ²⁾	D2MGBEn493s forward	ACACCACAGAGTTCATCACAGA	68
	D2MGBEn545p probe	FAM-CGATGGARTGCTCTC-MGB	
	D2MGBEn568r reverse	CATCTCATTGAAGTCNAGGCC	
3型 ²⁾	DEN-3(4P) forward	GGACTGGACACACGCACTCA	73
	DEN3p-Barbara	FAM-ACCTGGATGTCGGCTGAAGGAGCTTG-TAMRA	
	DEN-3(4P) reverse	CAT GTC TCT ACC TTC TCG ACT TGT CT	
4型 ²⁾	D4Ten711s forward	GGTGACRTTYAARGTHCCTCAT	75
	D4Ten734p probe	FAM-CCAAGAGACAGGATGTGACAGTGCTRGGATC-TAMRA	
	D4Ten786c reverse	WGARTGCATRGCTCCYTCCTG	
CHIKV ³⁾	Taq-Chik607F (10849)	GCRCCMTCTKTAACGGACAT	65
	Taq-Chik638P	FAM-TACCAGCCTGCACYC-MGB	
	Taq-Chik672R (10894)	GCCCCRAAGTCKGAGGAR	

1) 2014年使用

2) 2014年,2015年使用

3) 2015年使用

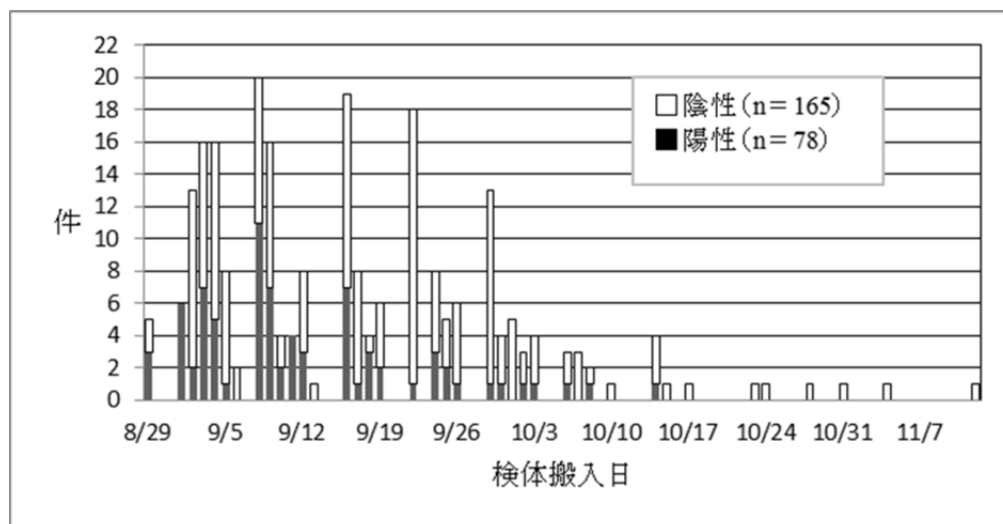


図1. デング熱疑い患者検査数

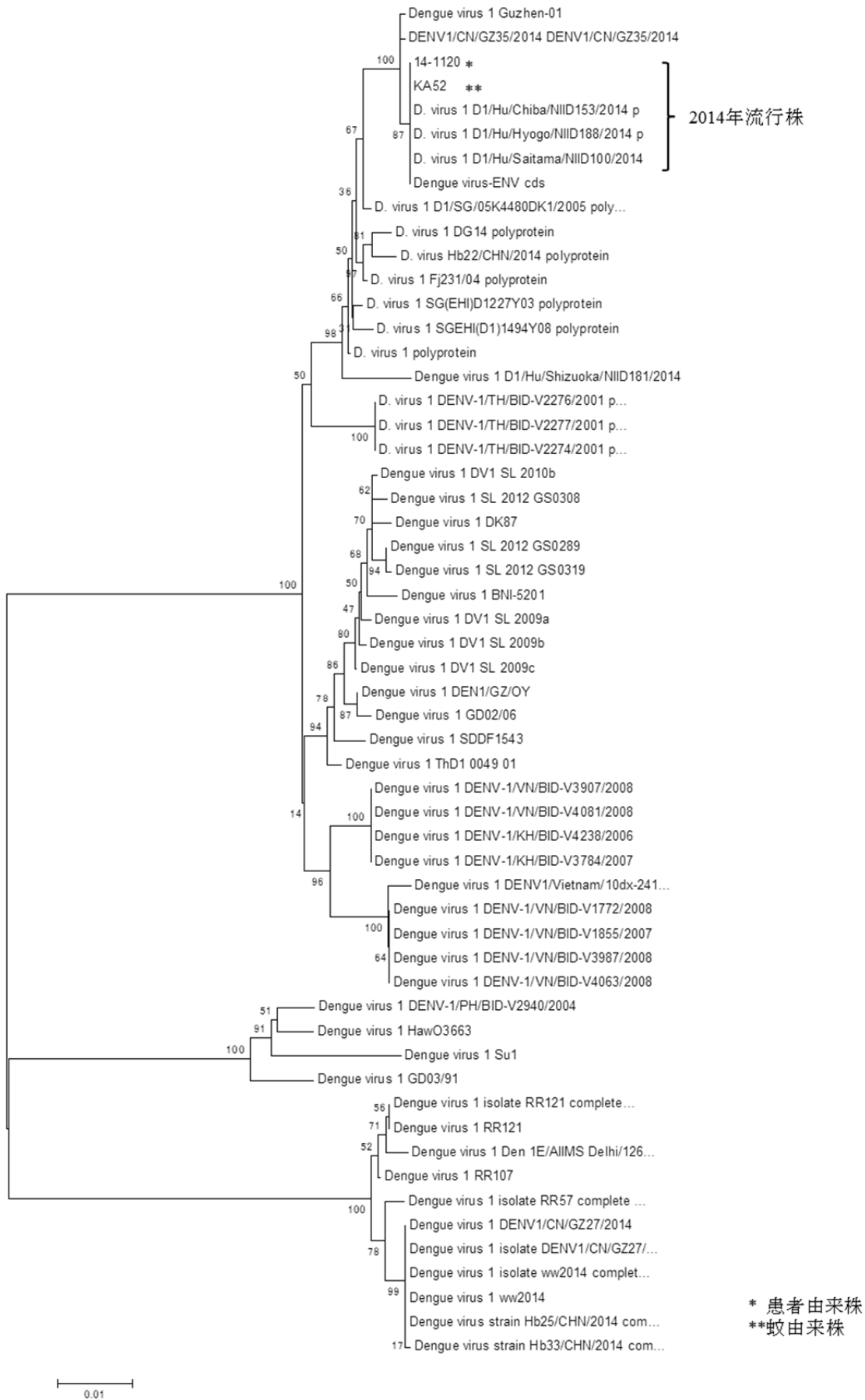


図2. デングウイルスの塩基配列解析 (NJ法)

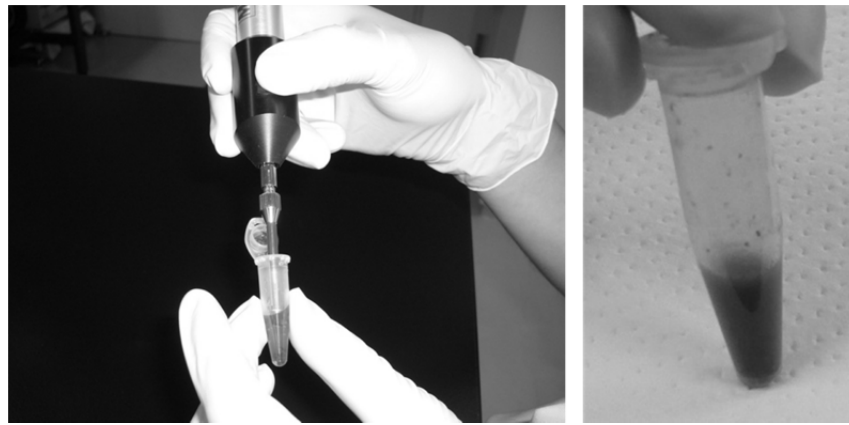


図 3. 蚊の粉砕

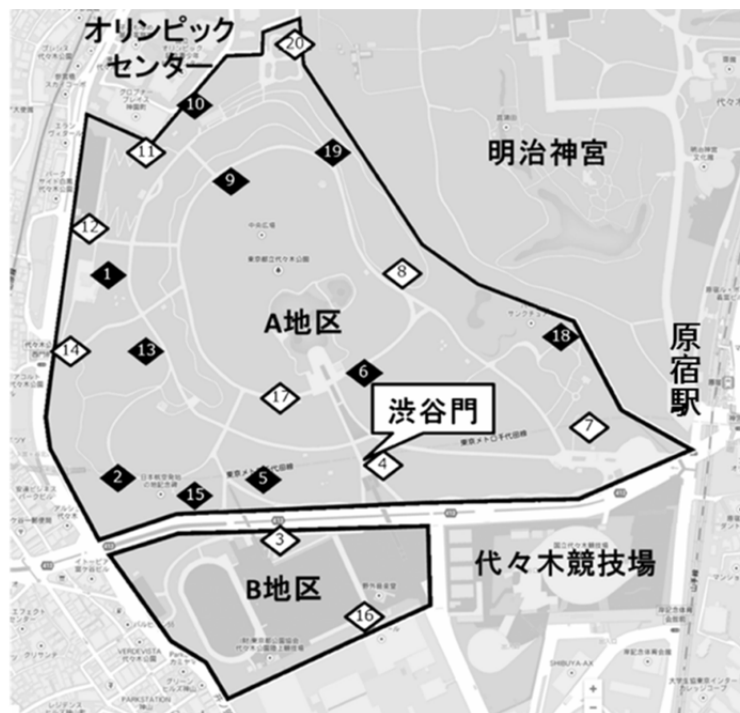
表2. 代々木公園における蚊捕獲数およびデングウイルス遺伝子の検出

	8/26-27	9/2-3	9/9-10	9/16-17	9/24-25	9/30-10/1	10/7-8	10/20-21	11/5-6
地点数	10	10	20	20	20	20	20	20	20
蚊捕獲数 (検体数)	33	276	266	191	41	23	14	11	1
デングウイルス 遺伝子検出	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

4 定点 (1,2,5,10)
蚊匹数 (28,30,29,30,16)
(下線は同一地点)

4 定点 (6,13,18,19)
蚊匹数 (30,5,30,12,19,5)
(下線は同一地点)

3 定点 (2,9,15)
蚊匹数 (21,3,8)



◇◆はトラップ設置箇所(◆は1回以上デングウイルスが検出された地点)

図 4. 代々木公園周辺の蚊捕集地点 (20 地点) ¹³⁾

表3. 患者由来デングウイルス血清型 (2015年)

	血清型				合計
	1型	2型	3型	4型	
検体数	16	16	6	7	45

表4. 蚊サーベイランス検体数(2015年)

	デング熱媒介蚊 [※]	感染症媒介蚊 ^{※※}
成虫	389検体 (2,785匹)	168検体 (1,726匹)
幼虫	633検体 (9,128匹)	

※ 「デング熱媒介蚊サーベイランス」

※※ 「感染症媒介蚊サーベイランス」

蚊

- ・蚊を採集された地点、種類別に分ける。
(成虫 30匹/1検体, 幼虫 15匹/1検体)

↓

破碎・遠心

- ・蚊にPBS 300 μ Lを加え、ミキサーで破碎し遠心 (8,000 rpm, 10分)。

↓

RNA抽出

- ・蚊の遠心上清140 μ Lを取りQIAamp[®] Viral RNA Mini Kitを使用。

↓

リアルタイムPCR 検査

図5. 蚊を対象としたウイルス検査プロトコール

Investigation of Dengue Vector Mosquitoes and the Dengue Virus in Relation to the Tokyo Dengue Fever Outbreak of 2014**2. Investigation of the Dengue Virus During and After the Dengue Fever Outbreak in Tokyo (2014-2015)**

Dai SAIKI^a, Michiya HASEGAWA^a, Terue OKAZAKI^a, Ai SUZUKI^a, Mayuko ODA^a, Tokuko TSUNODA^a, Konomi MURAUCHI^a, Sumie SHIBASAKI^a, Mami NAGASHIMA^a, Isao YOSHIDA^a, Sachiko HARADA^a, Akane NEGISHI^a, Yoshiko SOMURA^a, Kohji MORI^a, Miyuki NAGANO^a, Kana KIMOTO^a, Yukinao HAYASHI^a, Yasunori SUZUKI^a, Makiko KOBAYASHI^a, Yukari NISHINO^a, Rie FUKUI^a, Takashi CHIBA^a, Takayuki SHINKAI^a, Akihiko HIRAI^a, Tetsuya AKIBA^a and Kenji SADAMASU^a

In this report, the laboratory diagnoses of dengue virus infections that were related to the domestic outbreak of dengue fever in Tokyo in 2014 are summarized. We detected dengue virus sequences in mosquitoes obtained from Yoyogi Park using the real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. Dengue virus serotype 1 was detected in these mosquitoes, which is consistent with the viral sequence that was obtained from patients infected with dengue fever during the domestic outbreak in Japan. This sequence-based result is important in helping us to understand the infection route of dengue fever in Tokyo.

In 2015, we examined mosquitoes collected during the surveillance for dengue virus and chikungunya virus genes using real-time PCR. However, none of the sampled mosquitoes carried these viruses. The dengue fever patient believed that they had been infected while overseas.

Keywords: dengue fever, dengue virus, *Aedes albopictus*, real-time PCR, sequence analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

