

## 感染症媒介蚊サーベイランスにおけるウイルス検査法の検討

内田 悠太<sup>a</sup>, 森 功次<sup>a</sup>, 吉田 勲<sup>b</sup>, 原田 幸子<sup>a</sup>, 鈴木 愛<sup>a</sup>, 糟谷 文<sup>a</sup>, 小杉 知宏<sup>a</sup>, 千葉 隆司<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>c</sup>

感染症媒介蚊サーベイランスにおけるウイルス検査について、多検体処理による迅速化を図ること及びウエストナイルウイルスの海外での発生状況に対応した検査法を整備することを目的として、リアルタイムPCRを用いたデングウイルス検出系及びウエストナイルウイルス検出系について検討した。デングウイルスについては、4つの血清型に共通するプライマー及びプローブを設計した。合成DNAを用いて検出感度を検証した結果、各血清型に対する検出下限は10 copies/ $\mu$ L又は10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ Lであった。ウエストナイルウイルスについては、既報のプライマー及びプローブを一部改変した検出系に対する検証を行った。その結果、Lineage 1及び従来法では標的としていなかったLineage 2に対応する合成DNAを共に10 copies/ $\mu$ Lまで検出した。さらに、蚊媒介ウイルスの培養上清を用いて特異性を検証したところ、各検出系はデングウイルス及びウエストナイルウイルスをそれぞれ特異的に検出することを確認した。

**キーワード**：感染症媒介蚊サーベイランス、デングウイルス、ウエストナイルウイルス、リアルタイムPCR

### はじめに

東京都では、蚊が媒介する感染症を未然に防止するため、感染症媒介蚊サーベイランスにより都内生息蚊のウイルス保有状況などを調査している。2004年に同サーベイランスが開始されて以降、調査対象とした病原性ウイルスは検出されてこなかったが、2014年に都内の公園を中心として約70年ぶりにデング熱の国内感染事例が発生した。本事例では、都内で108名の患者が報告されるとともに<sup>1)</sup>、当該公園及びその周辺でデングウイルスの感染蚊が確認されるに至った<sup>2)</sup>。これを受けて、従来の広域サーベイランス（都内全域を網羅することを目的に公園・霊園など16施設（16箇所）を対象）に加えて、重点サーベイランス（利用者が多く、屋外イベントなどが開催される公園など9施設（50箇所）を対象）が新たに開始され、蚊が媒介する感染症の監視の強化が図られている。

感染症媒介蚊サーベイランスにおけるウイルス検査は、デングウイルス（以下、DENV）、チクングニアウイルス（以下、CHIKV）、ジカウイルス（以下、ZIKAV）及びウエストナイルウイルス（以下、WNV）を対象としてリアルタイムPCR法により実施している。このうち、DENVは1～4型の4つの血清型に型別される（以下、それぞれDENV-1～DENV-4）。DENVの検出を目的として、全ての血清型を効率的に検出できる血清型共通検出系が既に報告されているが、2015年以降は、より検出感度の優れた血清型別検出系を用いてきた<sup>3)</sup>。血清型別検出系はDENVの検出と同時に血清型が明らかとなるため、DENVの陽性率が高い検体群に対しては有用である。しかし、2015年以降都内で捕集された蚊からDENVは検出されておらず<sup>4)</sup>、こうした平常時において適用し得る効率的かつ高感度な検査

法の導入を進めることが望ましいと考えられた。

WNVは、蚊を介してヒトに感染することで発熱や脳炎を引き起こす。遺伝子解析により主に2つの系統（Lineage 1（以下、L1）、Lineage 2（以下、L2））に分類され、WNV-L1はアフリカ、ヨーロッパ、西アジア、中東、アメリカ大陸など世界の広範な地域に分布している<sup>5)</sup>。一方、WNV-L2は従来アフリカのみで存在が確認されていた<sup>6)</sup>。しかし、2004年にヨーロッパにおいてWNV-L2がアフリカ外で初めて検出された後、2010年代においてはヨーロッパ各地でWNV-L2によるヒト症例が報告されており、近年検出地域の拡大がみられている<sup>7-10)</sup>。感染症媒介蚊サーベイランスにおけるWNVの検査では、これまでWNV-L1のみを標的とした検出系を用いてきたが、本状況を踏まえて検査法を見直す必要性が生じてきた。

そこで、検査の効率化及び迅速化並びにWNVの海外における発生状況に対応した検査法を整備することを目的として、リアルタイムPCRを用いたDENV及びWNVそれぞれの共通検出系について検討したので報告する。

### 実験方法

#### 1. 材料

##### 1) 蚊検体

2020年度第1回、第2回広域サーベイランス（6月1日～5日、15日～19日）及び第4回、第5回重点サーベイランス（6月8日～11日、22日～25日）により都内で捕集された蚊（成虫656匹、幼虫792匹）を用いた。捕集地点及び蚊の種別ごとに成虫及び幼虫をそれぞれ最大30匹及び最大15匹ずつプールした上で、既報の方法<sup>11)</sup>に従い乳剤の作成及び遠心処理を行い、遠心後の上清を検査材料とした。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1  
<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科  
<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

## 2) 患者検体

感染症法に基づく積極的疫学調査により2019～2020年に搬入されたDENV陽性の患者血清又は血しょう8検体 (DENV-1～4 : 各2件) を用いた。

## 3) 培養上清

検出系の特異性を検証するため, DENV (115/H26-3-13株), CHIKV (3216DP0112株), ZIKAV (3216DP137株), WNV (分与を受けたWNV-L2の培養上清) 及び日本脳炎ウイルス (以下, JEV) (北京株) の培養上清を用いた。

## 4) DNA標準液

検出系の感度を検証するため, DENV検出系及びWNV検出系のプライマー及びプローブの標的領域の塩基配列を含む100 bpの合成DNA (Sigma-Aldrich) を用いて, RNase-Free Water (QIAGEN) により10倍希釈系列 (10 copies/ $\mu$ L $\sim$ 10<sup>5</sup> copies/ $\mu$ L) のDNA標準液を作製した。

## 2. RNA抽出

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて, 上記1)～3)の材料140  $\mu$ LからRNA抽出を行った。キット添付のElution Bufferによる溶出量は, 蚊検体では100  $\mu$ L<sup>3)</sup>, その他は60  $\mu$ Lとした。

## 3. プライマー及びプローブの設計

### 1) DENV検出系

DENV遺伝子上で塩基配列が高度に保存されている領域を探索するため, 公共の遺伝子データベース (GenBank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) からDENVの塩基配列情報を取得し, MEGA7 (<https://evolgen.biol.se.tmu.ac.jp/MEGA/>) を用いてアライメント解析を行った。プライマー及びプローブの設計には, Primer Express v3.0.1 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。プライマー及びプローブ (表1) の特異性は, BLAST解析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) により確認した。また, 血清型別検出系<sup>3)</sup>及び既報の血清型共通検出系<sup>3)</sup>との検出感度の比較を行った。

### 2) WNV検出系

Jimenez-Clavero らにより報告されたプライマー及びプローブ<sup>12)</sup>を一部改変したもの (表2) をWNV検出系の検討に用いた。また, 感染症媒介蚊サーベイランスにおいて従来用いていたWNV検出系<sup>13)</sup>との検出感度の比較を行った。

## 4. リアルタイムPCR法

リアルタイム PCR 法による標的遺伝子の検出は, 主にQuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。リアルタイムPCR反応の条件は, RNA抽出液又はDNA標準液 5  $\mu$ L を反応液 20  $\mu$ L (QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN), DENV検出系 : 各プライマー (15  $\mu$ M) 0.33  $\mu$ L, プローブ (10  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L, WNV検出系 : 各プライマー (20  $\mu$ M) 0.5  $\mu$ L, 各プローブ (10  $\mu$ M) 0.25  $\mu$ L) と混合し, 50°C30分, 95°C15分の後, 95°C15秒, 57°C1分を40サイクルとした。結果の解析はThreshold : 0.02 として行った。

DNA標準液に対する測定は, コピー数ごとに2ウェルずつ行い, 各コピー数に対するCt値の平均を算出した。

## 結 果

### 1. DENV検出系の検討

GenBankより取得したDENV遺伝子全長の配列をアライメント解析した結果, 3'UTR領域において4つの血清型間で塩基配列が高度に保存されていた。そこで, 本領域を標的としてプライマー及びプローブを設計した (表1)。なお, リバースプライマーの結合領域においてDENV-4と他の血清型とで塩基配列の相違がみられたため, DENV-1～3を標的とするプライマー (DENV1-4\_R1) 及びDENV-4を標的とするプライマー (DENV1-4\_R2) をそれぞれ設計した。特異性の確認のためにBLAST解析を行った結果, フォワードプライマーがZIKAVの塩基配列と100%の一致を示したが, リバースプライマー及びプローブについては相同性が確認されなかった。

続いて, DENV-1～4に対応するDNA標準液を用いてリアルタイムPCR測定を行った (図1)。その結果, 本DENV検出系はDENV-1～3及びDENV-4に対応するDNA標準液をそれぞれ10 copies/ $\mu$ L及び10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ Lまで検出した。血清型別検出系についても各血清型に対応するDNA標準液を用いて同様の検証を行ったところ, 検出下限は10～10<sup>2</sup> copies/ $\mu$ Lであったことから, 本DENV検出系は血清型別検出系と同等の検出感度を示すことを確認した。

検出感度について更なる検証を行うため, DENV陽性の患者検体8件を用いて既報の血清型共通検出系との比較を行った。結果として, 本DENV検出系は全ての検体からDENVを検出するとともに, 既報の血清型共通検出系

表1. DENV検出系のプライマー及びプローブ

名称	配列 (5' - 3')	ゲノム上の位置 <sup>※</sup>
DENV1-4_F	GCA TAT TGA CGC TGG GAR AGA	10614-10634
DENV1-4_R1	TTC CAT TTT CTG GCG TTC TGT	10672-10692
DENV1-4_R2	CAT CTY GCG GCG CTC TGT	10672-10689
DENV1-4_P	FAM-CCA GAG ATC CTG CTG TC-MGB	10635-10651

※ DENV-1 (Singapore S275/90株, GenBank accession no. M87512) のシーケンスに基づく位置

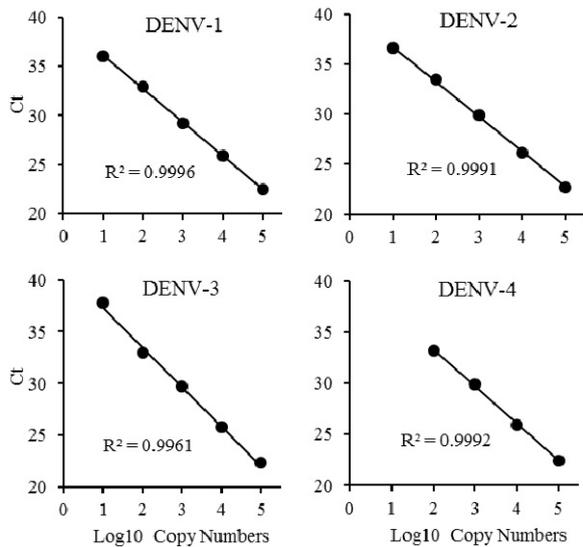


図1. DENV検出系の検出感度の検証結果

と比べて Ct 値が 2.0~4.7 低かった。

## 2. WNV検出系の検討

WNV検出系に使用するプライマー及びプローブ (表2) の検出感度を検証するため, WNV-L1及びWNV-L2に対応するDNA標準液を用いてリアルタイムPCR測定を行った (図2)。結果として, 本WNV検出系はWNV-L1及びWNV-L2に対応するDNA標準液を共に10 copies/μLまで検出することを確認した。なお, 本WNV検出系のリバープライマーは, 既報のリバープライマー上の4塩基を混合塩基に変更しており, これによりWNV-L2に対する検出感度が10倍向上した。本WNV検出系との感度の比較のため, 感染症媒介蚊サーベイランスにおける従来のWNV検出系についてもWNV-L1に対応するDNA標準液を用いて同様の検証を行ったところ, 検出下限は10 copies/μLであった。よって, 本WNV検出系はWNV-L1に対して従来法と同等の検出感度を示すとともに, 従来法では標的としていなかったWNV-L2も検出可能であることを確認した。

## 3. 特異性の検証

5種類の蚊媒介ウイルス培養上清を用いて, DENV及びWNV検出系の特異性の検証を行った (表3)。このうち, ZIKAV及びJEVはDENV及びWNVと同じフラビウイルス属に属し, CHIKVはDENVと同種の蚊によって媒介

される。リアルタイムPCR測定の結果, DENV及びWNV両検出系は対象とするウイルスを特異的に検出することを確認した。なお前述のとおり, ZIKAVの塩基配列中にDENV検出系のフォワードプライマーと100%一致する部分が確認されたが, ZIKAVとの交差反応は認められなかった。

## 4. 都内生息蚊のウイルス検査への適用

都内生息蚊 (成虫656匹, 幼虫792匹) について, 今回構築したDENV及びWNV検出系によるウイルス検査を実施した。その結果, いずれのウイルスも検出されなかった。なお, 蚊の捕集が行われた2020年6月に都内において, DENV及びWNVによる海外帰国者の輸入感染症例及び国内感染症例の報告はなく, これと矛盾しない結果が得られた。

## 考 察

今回の検討により, 高感度かつ広範囲に検出可能なDENV血清型共通検出系及びWNV検出系を構築することができた。DENVについては, 感染症媒介蚊サーベイランスが開始されて以降, 2014年を除いて都内で感染蚊の存在は確認されておらず, 本DENV検出系は, こうした平常時において蚊のDENV保有の有無を効率的にスクリーニングするためのツールとして有用である。一方, DENVが検出された場合, そのシーケンス解析を行うことは疫学調査や蚊の対策に係るエビデンスとなり得る。そのため, 国内感染症例の発生に伴い蚊からDENVが検出されるような状況においては, リアルタイムPCRによる検出とともに血清型をあらかじめ把握できる血清型別検出系への切替又は併用が望ましいと考えられる。しかし, 2014年に都内で国内感染症例が発生したものの, その後DENVの定着は確認されていない。これは温帯に位置し, 媒介蚊の季節消長がみられるフランスにおいても同様である。2010年以降, フランスではDENVの国内感染症例が散発的に発生しているがDENVの定着には至っていないことが報告されている<sup>14-15)</sup>。よって, 現状では国内感染症例が都内で発生した場合であっても, DENVが土着化する可能性は高くないと考えられる。そのため, 感染症媒介蚊サーベイランスにおけるウイルス検査を効率的に遂行するという観点からは, 平常時及び国内感染症例発生時というそれぞれの状況に応じた検査法を有することは意義があると考えられる。

表2. WNV検出系のプライマー及びプローブ

名称	配列 (5' - 3')	ゲノム上の位置 <sup>*</sup>
WN-LCV-F1	GTG ATC CAT GTA AGC CCT CAG AA	10597-10619
WN-LCV-R1mix	GTC TGA CAY TGG GCY TTG ARG YTA	10649-10672
WN-LCV-S1	FAM-AGG ACC CCA CAT GTT-MGB	10633-10647
WN-LCV-S2	FAM-AGG ACC CCA CGT GCT-MGB	10633-10647

<sup>\*</sup>WNV-L1 (NY99-flamingo382-99株, GenBank accession no. AF196835) のシーケンスに基づく位置

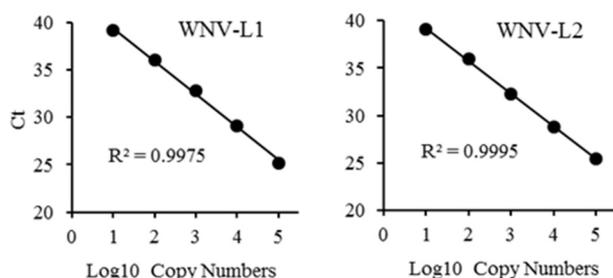


図2. WNV 検出系の検出感度の検証結果

表3. DENV 検出系・WNV 検出系の特異性の検証結果

ウイルス種	DENV	WNV	CHIKV	ZIKAV	JEV
DENV検出系	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
WNV検出系	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

WNV については、輸入症例も含めてこれまでに都内での感染者の報告例はない。WNV の感染環は蚊と鳥の間で成立しており、ヒトは終末宿主である。そのため、デング熱と比して、輸入感染症例を起点として国内感染症例が発生する可能性は低いとされている<sup>16)</sup>。一方で、1999年に米国ニューヨーク州において WNV が初めて出現し、その後米国全土に分布が拡大した。この侵入経路は明らかにされていないが、感染鳥や感染蚊を介した経路が考えられている<sup>6)</sup>。WNV は、都会に生息する蚊とカラスやスズメなどの野鳥との間で感染環が成立するため都市部での発生も多いという特徴があり<sup>17)</sup>、都においても将来的な侵入リスクに備えることは重要である。今回の検討により、WNV-L1 及び WNV-L2 が共に検出可能となったことで、WNV の侵入をより確実に監視するための検査法を整備できた。

従来、感染症媒介蚊サーベイランスにおいては、リアルタイム PCR を用いた 8 種類の検出系 (DENV : 4 種, CHIKV : 1 種, ZIKAV : 1 種, WNV : 2 種) によりウイルス検査を実施してきた。今回の検討により、DENV 及び WNV に対してもそれぞれ単一の検出系で実施できることから、リアルタイム PCR の 96 ウェルプレート上では従来の最大 10 検体から最大 22 検体の同時測定が可能となる。これにより、検査の迅速化に大きく寄与することが期待される。

蚊媒介感染症の感染拡大を未然に防止するためには、感染症媒介蚊サーベイランスなどを通して国内感染症例の発生を迅速に探知することが重要である。今後とも海外での蚊媒介ウイルスの検出状況などを注視しながら、都内における蚊媒介感染症の発生動向の監視を継続していく必要がある。

## ま と め

リアルタイムPCRを用いたDENV検出系及びWNV検出系について検討を行った。DENVについては、4つの血清

型を高感度に検出する血清型共通検出系を構築した。

WNVについては、WNV-L1及びWNV-L2の両系統を標的とした検出系を整備した。本検出系を感染症媒介蚊サーベイランスに導入することで、多検体処理による検査の迅速化及び蚊媒介感染症の発生動向のより確実な監視に寄与することが期待される。

## 文 献

- 1) 東京都：東京都蚊媒介感染症対策会議報告書，2014.
- 2) Kobayashi, D., Murota, K., Fujita, R., *et al.*: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **98**, 1460-1468, 2018.
- 3) 齊木 大, 長谷川道弥, 岡崎輝江, 他：東京健安研七年報, **67**, 27-35, 2016.
- 4) 内田悠太：東京都微生物検査情報, **40**(3), 1-3, 2019.
- 5) 高崎智彦：ウイルス, **57**, 199-206, 2007.
- 6) 倉根一郎：ウイルス, **53**, 1-6, 2003.
- 7) Bakonyi, T., Ivanics, E., Erdelyi, K., *et al.*: *Emerging Infectious Diseases*, **12**, 618-623, 2006.
- 8) Hernandez-Triana, L.M., Jeffries, C.L., Mansfield, K.L., *et al.*: *Front. Public Health*, **2**:271, 2014.
- 9) Zehender, G., Veo, C., Ebranati, E., *et al.*: *PLoS One*, **12**(7), e0179679, 2017.
- 10) Cotar, A.I., Falcuta, E., Dinu, S., *et al.*: *Parasites Vectors*, **11**:562, 2018.
- 11) 吉田 勲, 長島真美, 千葉隆司, 他：小児科, **57**, 395-400, 2016.
- 12) Jimenez-Clavero, M.A., Agüero, M., Rojo, G., *et al.*: *J. Vet. Diagn. Invest.*, **18**, 459-462, 2006.
- 13) 国立感染症研究所：ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル (第4版), 2006.
- 14) Jourdain, F., Roiz, D., Valk, H., *et al.*: *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **14**(5), e0008320, 2020.
- 15) European Centre for Disease Prevention and Control: Autochthonous transmission of dengue virus in EU/EEA, 2010-2019  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/dengue/surveillance-and-disease-data/autochthonous-transmission-dengue-virus-eueea> (2020年10月2日現在, なお本URLは変更または末梢の可能性はある)
- 16) 蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針, 平成27年厚生労働省告示第260号, 一部改正 平成28年厚生労働省告示第119号.
- 17) 貫井陽子, 高崎智彦：日本内科学会雑誌, **96**(3), 53-59, 2007.

### Examining a Virus Surveillance Method for Mosquito-Borne Infectious Diseases

Yuta UCHIDA<sup>a</sup>, Kohji MORI<sup>a</sup>, Isao YOSHIDA<sup>a</sup>, Sachiko HARADA<sup>a</sup>, Ai SUZUKI<sup>a</sup>, Fumi KASUYA<sup>a</sup>, Tomohiro KOSUGI<sup>a</sup>,  
Takashi CHIBA<sup>a</sup>, and Kenji SADAMASU<sup>a</sup>

We examined the dengue virus and West Nile virus detection systems using real-time PCR to monitor mosquito-borne infectious diseases, intending to speed up the processing of multiple specimens and establish a test method corresponding to the West Nile virus outbreaks overseas. The primers and probe specific to the four serotypes of the dengue virus were designed. The sensitivity of the detection method was verified using synthetic DNA. The detection limit for each serotype was determined to be 10–10<sup>2</sup> copies/μL. On the other hand, we verified the assay for the West Nile virus with the modified version of the previously reported primers and probes. We also used synthetic DNA to test the method's sensitivity. We detected up to 10 copies/μL of West Nile virus Lineage 1 and Lineage 2, which had not been detected by a conventional method. Furthermore, using the culture supernatants of mosquito-borne viruses, the dengue virus and West Nile virus assays were verified to be specific in detecting the dengue virus and West Nile virus, respectively.

**Keywords:** infectious disease vector mosquito surveillance, dengue virus, West Nile virus, real-time PCR

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan