

## ウエストナイルウイルス検査結果について

石崎 徹 渡邊 英史 岡本 裕行\* 柳瀬 杉夫

キーワード：ウエストナイル熱、ウエストナイルウイルス、蚊

## はじめに

動物由来感染症の一つで、1937（昭和12）年にウガンダのWest Nile地方で発熱した女性から初めてウエストナイルウイルス（WNV）が分離された。このウイルスはフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、日本脳炎ウイルスやセントルイス脳炎ウイルスに近い。鳥類（野生と飼育の両方）に感染するが時に哺乳類にも感染する。1999年、アメリカ合衆国においてヒトに発生したウエストナイル熱は、短期間でほとんどの州で患者発生をみた。日本国内においてもWNVの媒介蚊であるイエカが生息することから、ウイルスの侵入、流行の可能性は否定できない。すでにわが国ではアメリカの流行後、鳥類のWNV環境モニタリングを全国の自治体と地研の協力のもとに開始している<sup>1)</sup>。

ウエストナイル熱発生を未然に防止することを目的として、WNVの媒介動物である蚊についてPCR法等を用いてWNV特異的遺伝子の検出を試み、京都府におけるWNVの汚染状況を調査した。

## 材料と方法

## 1. 材料

## 1.1 調査地点、調査対象及び調査期間

調査地点、調査期間等は表1のとおりである。北部は、舞鶴市由良川河川敷、舞鶴港、綾部工業団地内調節池、福知山三段池公園動物園、中部は丹波自然運動公園、南部は、山城総合運動公園、精華町下泊新池を調査地点とした。調査対象は蚊である。調査期間は2005年から2007年までの夏季(7月～9月)である。

## 2. 方法

## 2.1 検体処理

検体採取地にCDC捕虫機を設置し(図1)、捕獲された蚊を種に分類し、それぞれ種ごとに50匹を1プール(1検体)としてサンプルチューブに入れ、これを-80℃に凍結した。

凍結後、細胞破砕機にて粉碎したものに生理食塩水1mlを加え混合した。遠心後、上清をQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) でRNA抽出した。抽出方法はキット添付の説明書によった<sup>2)</sup>。抽出されたRNAは

(平成20年9月1日受理)

\*：現乙訓保健所

表1 調査地点等の概要

調査地点	調査対象	検体採取期間	採取回数
北部 舞鶴市由良川河川敷 舞鶴港 綾部工業団地内調節池 福知山三段池公園動物園	蚊	2005～2007年 7月上旬～9月中旬	1回/月
中部 ・丹波自然運動公園	同上	同上	1回/月
南部 ・山城総合運動公園 ・精華町下泊新池	同上	同上	1回/月



図1 蚊捕集器設置風景

遺伝子増幅（PCR）まで-80℃に保存した。

## 2.2 RT-PCR法

使用キットはSuperscript one-step RT-PCR system with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)である。1検体5μlあたり2×Reaction Mix 25μl、25μM sense primer 1μl、25μM antisense primer 1μl、RT/Platinum Taq HiFi Mix 1μl、DNase, RNase free water 17μlを加え、PCRを行った。プライマー及びPCR条件は図2のとおりである。PCR法の詳細については、ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアルVer.4.0<sup>3)</sup>を参照した。また、PCR機としてProgram Temp Control System PC-700(ASTEC社)を用いた。

## 結果及び考察

## 1. 捕集蚊の分類

結果を表2、3、4に示した。2005年度はコガタアカイエカ、ハマダラカ、ヤマトヤブカ、アカイエカ、オオクロ

WNV primer sets

1. E 領域 (391bp、ウエストナイルウイルス特異的)

- WNNY514 : Cgg CgC CTT CAT ACA CA
- WNNY904 : gCC TTT gAA CAg ACg CCA TA

2. NS3 領域(454bp、フラビウイルス)

- Fla-U5004 : ggAACD TCM ggH TCNCCH AT
- Fla-U5457 : gTg AAR TgD gCY TCR TCC AT

PCR 条件

53°C 40 min (Reverse Transcription)  
 92°C 60 sec (Denaturation)  
 53°C 60 sec (Annealing)  
 72°C 60 sec (Extension)  
 72°C 300 sec (Complete Extension)

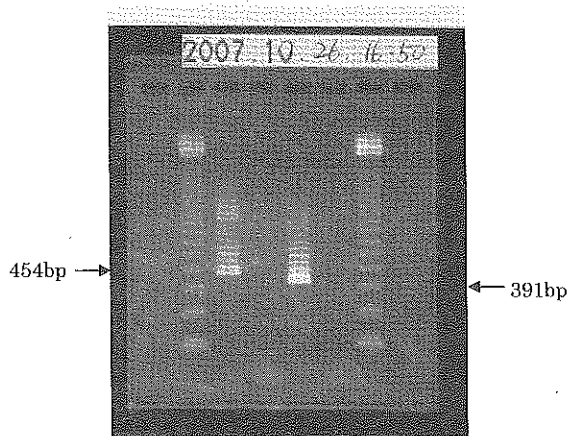
} (35回)

図2 プライマー及びPCR条件

ヤブカ、キンイロヤブカ、ヒトスジシマカの順で多く、シーズンをとおして10,926匹が捕集された。中でもコガタアカイエカは9,375匹が捕集され、9割弱を占めた。2006年度、2007年度は全体として428匹、148匹と減少した。この原因は不明である。

2 PCR結果

図3、4に示すとおり、採取された蚊、合計11,491匹を50匹ごとにプールのものについてWNV及びFlaviウイルス特異的の遺伝子についてRT-PCR法を試みたところ、それぞれの遺伝子は検出されなかった。以上の結果から、京都府においては、WNVの侵入は無かったものと考えられた。



1 2 3 4 5 6  
 Lane1, 6 : 123bp Ladder Marker  
 Lane2 : Flavi ウイルス特異的プライマー+WNV  
 Lane3 : Flavi ウイルス特異的プライマー+DDW  
 Lane4 : WNV 特異的プライマー+WNV  
 Lane5 : WNV 特異的プライマー+DDW

図3 WNVポジティブコントロールのPCR

まとめ

2005年から2007年の夏季において、府内7箇所の定点から蚊を採取した。採取された蚊は合計11,491匹であった。

これらの蚊に対するFlaviウイルス及びWNVの遺伝子検出を試みた結果、それぞれの遺伝子は検出されなかった。

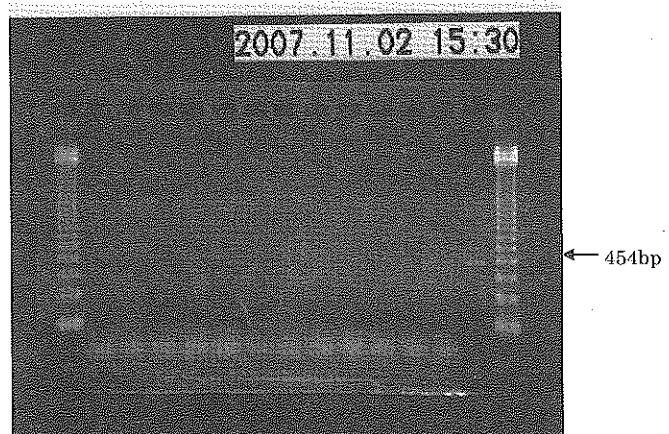
よって、京都府においては、WNVの侵入は無かったものと推察された。

謝 辞

本調査に当たり、蚊の捕集器の設置に協力いただきました舞鶴港、福知山市三段池公園動物園、綾部工業団地調節池、丹波自然運動公園、山城総合運動公園、精華町下粕新池の関係者の皆様に深謝します。

引用文献

- 1) 厚労省健康局結核感染症課：「ウエストナイル熱の早期流行予測のためのカラス等の死亡鳥類調査の実施について」、平成15年1月30日付け健感発第0130001号
- 2) QIAGEN: QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Handbook, 12/2007
- 3) 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 Ver.4.0, <http://www.nih.go.jp/vir1/NVL/WNVhomepage/WN.html>



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15  
 Lane1, 15 : 123bp Ladder Marker  
 Lane2~13 : 舞鶴港採取蚊  
 Lane14 : Positive Control (WNV)

図3 WNVポジティブコントロールのPCR

表2 捕集蚊の採取状況(2005年度)

蚊の種類	舞鶴港		山良川河川敷		綾部工業団地		福知山市三段池公園動物園		丹波自然運動公園		精華町下狛新池		山城総合運動公園		計
	7/14	8/31	7/14	8/31	7/14	8/31	7/14	8/31	7/21	8/31	7/21	8/17	7/21	8/17	
コガタアカイエカ	1,870*	14	2,287	0	945	0	4,160	21	23	22	13	0	20	0	9,375
ハマダラカ	56	0	11	0	77	0	279	31	185	11	0	1	0	0	651
アカイエカ	176	2	1	0	6	0	20	0	65	19	0	0	4	0	293
カラツ	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ヒトスジシマカ	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	10
セスジヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ヤマトヤブカ	0	0	4	0	0	0	6	0	349	0	0	0	4	0	363
キンイロヤブカ	0	0	0	0	0	0	11	0	3	0	0	0	3	0	17
オオクロヤブカ	2	1	5	0	0	0	12	0	185	0	0	0	0	0	205
計	2,109	17	2,309	0	1,029	0	4,488	52	810	52	13	1	35	0	10,915

\*:匹数

表3 捕集蚊の採取状況(2006年度)

蚊の種類	舞鶴港		綾部工業団地調節池			福知山市三段池公園動物園			丹波自然運動公園			山城総合運動公園			精華町下狛新池			計		
	7/12	8/16	9/6	7/12	8/16	9/6	7/12	8/16	9/6	7/12	8/16	9/6	7/12	8/16	9/6	7/12	8/16		9/6	
ヤマトヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	8	0	0	0	0	0	0	9
トウゴウヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6
キンイロヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	13
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	0	21
チョウセンハマダラカ	0	0	0	0	0	0	12	19	14	0	10	0	2	0	0	7	0	0	0	64
カツライエカ	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15
アカイエカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	1	3	0	0	0	0	0	0	11
コガタアカイエカ	0	0	0	0	0	2	0	24	54	0	0	0	40	0	0	167	0	0	0	287
シナハマダラカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2
計	0	0	0	0	0	2	27	43	68	1	17	3	93	0	0	174	0	0	0	428

\*:匹数

表4 捕集蚊の採取状況(2007年度)

蚊の種類	舞鶴港			綾部工業団地調節池			福知山市三段池公園動物園			丹波自然運動公園			山城総合運動公園			精華町下狛新池			計	
	7/19	8/23	9/13	7/19	8/23	9/13	7/19	8/23	9/13	7/19	8/23	9/13	7/26	8/30	9/27	7/26	8/30	9/27		
コガタアカイエカ	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
アカイエカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
カツライエカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ハマダラカ	0	0	0	0	0	0	4	0	0	124	0	0	0	0	0	0	0	0	0	128
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
セスジヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ヤマトヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
キンイロヤブカ	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
オオクロヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
計	0	0	0	1	0	0	8	0	0	139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	148

\*:匹数