【Ⅶ－12】

フィリピンのターラックシティにおけるデング熱媒介蚊の RNA を用いたウイルス検出

愛媛大学大学院　学生会員　○大岸航平
愛媛大学大学院　非会員　Thaddeus M. Carvajal
愛媛大学大学院　正会員　渡辺幸三

１．はじめに

近年，フィリピンではデング熱が流行している．ルソン島中部に位置するターラックシティは，ターラック州全体のデング熱患者の約 4 割を占める地域である．デング熱はネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）などによって媒介されるウイルス感染症である. デングウイルス（以下, DENV）には 4 つの異なるタイプ（DENV-1, DENV-2, DENV-3，DENV-4）が存在し，ヒトや蚊の RNA に組み込まれる形で感染する．現在，効果的なワクチンが普及しておらず，感染を未然に防ぐことが一番の予防策となっている．そのためには，デング患者が発生した時に，早急に正確に地域住民にアラート（警報）する必要がある．

本研究は，ターラックシティで採取したネッタイシマカから RNA を抽出し，Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction（RT-PCR）法により DENV を検出し，蚊の DENV 感染率を調査した．

２．方法

2015 年 1 月 19 日～2 月 13 日の日曜日を除く 23 日間にターラックシティの San Sebastian, San Vicente, San Rafael の 3 地域の 42 家庭で調査した．42 家庭のうち，3 家庭が 2 週間以内にデング患者が発生した家庭であった．調査は 1 日 5～10 の家庭で行い，1 つの家庭につき 1～5 日間（平均 2.8 日）継続調査した．蚊は夕方にモスキートトラップを家庭敷地内の屋内もしくは野外に設置し，翌朝採取した．モスキートトラップは，捕獲口の赤外線蛍光灯により蚊を引きつけ，内部のファンにより蚊を採取する仕組みである．外付けで発電機とバッテリーを接続して一晩稼働し続けられるようにした（図 1）．また，デング患者が発生した 3 家庭ではモスキートトラップに加えて，夕方の約 1 時間家庭に滞在して，目視で確認した蚊を能動的に採取できるアスピレーターを用いて調査した（図 1）．アスピレーターとは，本研究グループが開発した先端に吸引ファンと発電機を内蔵した採取機である．全長は約 1m である．採取したネッタイシマカは採取日時と場所ごとに分けて 1.5ml マイクロ遠心チューブに入れ，RNA later（QIAGEN）で固定し，現地医療機関に設置された冷蔵庫内で-20℃で保存し，愛媛大学の実験室に持ち帰った．現地で採取された DENV 感染に関与しないイエカとクロヤブカは，チューブに何も加えずに乾燥保存した．

RNA 抽出の前に，爪楊枝で蚊の頭部と腹部，翅と足に分解して後者を 99.5%エタノールで固定した．頭部と腹部試料からフェノール・クロロホルム法で Total RNA を抽出し，22μl の RNase free water で溶出した．そのうち 2μl の Total RNA を用いてフルオロメーター（Promega）で濃度を測定した．残りの 20μl の Total RNA を用いて Two-Step RT-PCR 法で逆転写・PCR 増幅を行った．増幅した遺伝領域の大きさは，DENV-1，2，3，4 でそれぞれ 490bp，230bp，320bp，398bp である．また，RT 反応では SuperScript 3 First-Strand Synthesis SuperMix（Invitrogen）付属のランダムプライマーを用い，PCR では 4 つの DENV に相補的なプライマー（Morita *et.* al, 1991）を用いた．この時，得られた 20μl の cDNA を 4 等分し，それぞれ 5μl ずつ DENV プライマーに使用した．

図 1．モスキートトラップ（左）とアスピレーター（右）赤で囲っている機械

PCR 産物を 1.2%アガロースゲルで電気泳動し，

表 1. 各地域における採取した蚊の個体数（かっこ内はデング患者が発生した家庭の数値を示す.）

	家庭数	述べ調査日数（日×家庭数）	採取した蚊の個体数		
			ネッタイシマカ	イエカ属	クロヤブカ属
San Sebastian	15(1)	39(2)	9(0)	1326(60)	135(83)
San Vicente	14(2)	35(5)	7(3)	1188(129)	99(0)
San Rafael	13(0)	42(0)	5(0)	1350(0)	40(0)
合計	42(3)	116(7)	21(3)	3864(189)	274(83)

ゲルドック（BIO-RAD）で DENV の対象領域長の産物の有無を確認し，DENV を検出した.

３．結果および考察

調査の結果，採取されたのはネッタイシマカ 21 個体の他にイエカ属（*Culex*）3864 個体，クロヤブカ属（*Armigeres*）274 個体であった（表 1）．ネッタイシマカの採取数は，San Sebastian で 9 個体，San Vicente で 7 個体および San Rafael で 5 個体だった．また，デング患者が発生した 3 家庭で 3 個体のネッタイシマカが採取され，そうでない 39 家庭で 18 個体のネッタイシマカが採取された.

採取されたネッタイシマカ 21 個体から DENV は検出されなかった．ベネズエラにおける先行研究（Urdaneta *et* al., 2005）では 845 の家庭を調査し，デング患者が発生した家庭から 469 個体，その周辺の家庭から 1163 個体のネッタイシマカを採取している．この時の DENV 検出率が，前者が 5.2%で後者が 12.7%であった。また，サウジアラビアの先行研究（El-Badry *et* al., 2012）では，463 個体のネッタイシマカを採取しているが，DENV は検出されていない．2 つの先行研究とも，本研究よりも多くの家庭で調査し，多くのネッタイシマカを採取している．それでも，結果として DENV が検出できない場合や，10%前後の検出率になる可能性がある．よって，DENV が全く検出できない可能性も十分にあると考えられる．したがって，今回の結果となった要因は，採取したネッタイシマカの個体数が少なすぎたことであると言える．採取できなかった理由として，ネッタイシマカの生態が大きく関わっていると考えられる．ネッタイシマカは昼行性の蚊であるが夜間も活動することが報告されていて，周囲の環境の照度に影響されることが分かっている（Chadee *et* al., 2000）．よって，モスキートトラップを設置する場所の照度を明るくできれば，採取数が増加する可能性がある．また，イエカ属の蚊が水面に卵を産むのに対し，ネッタイシマカは水溜めの容器の縁に卵を産む．長期間雨が降らないと，容器内の水溜めが減少するので，水面に産み付けた卵は孵化できるが，縁に産み付けた卵は孵化できなくなる．よって，今回の調査でネッタイシマカの採取数が少なくなったと考えられる（Costanzo *et* al., 2005）．したがって，フィリピンで最も雨量が多くなる 8，9 月に調査を行うことで，採取数が増加する可能性がある.

４．おわりに

ターラックシティの 40 家庭で採取した 21 個体のネッタイシマカから DENV の検出を試みたが全個体が陰性であった．ネッタイシマカの DENV 感染率を推定するには，今回の調査より多くの個体数を採取することが求められる.

５．参考文献

El-Badry. A *et* al.(2012) Sci Parasitol 13(4): 133-138; Costanzo. K *et* al.,(2005) J. Med. Entomol. 42(4): 559D570; Morita. K *et* al.(1991) Journal of clinical Microbiology 2107-2110; Urdaneta. L *et* al.(2005) Infection, Genetics and Evolution 5 177-184