

表3. 雨水枡採取アカイエカ幼虫に対する LC50 又は IC50 値 (ppm) : 平成14年度調査

調査地域	fenitrothion	fenthion	temefos	permethrin	pyriproxyfen	Bti
A地区	0.044 (4.4)	0.0033 (1.4)	0.0065 (9.8)	0.0034* (0.28)	0.00001* (0.16)	0.0028* (0.58)
B地区	0.410 (4.1)	0.0023 (0.96)	0.0052* (7.9)	0.0047 (0.4)	0.00001* (0.16)	0.0030 (0.63)
C地区	0.100 (10.0)	0.0059 (2.5)	0.015* (22.7)	0.0047 (0.4)	0.00001* (0.16)	0.0026 (0.54)
D地区	0.075 (7.5)	0.0029 (1.2)	0.0084 (12.7)	0.0075 (0.63)	<0.00001* (<0.16)	0.0031* (0.63)
E地区	0.034 (3.4)	0.0018 (0.75)	0.0056 (8.5)	0.0056 (0.47)	0.00004* (0.65)	0.0016* (0.33)
感受性	0.010	0.0024	0.00066	0.012	0.000062	0.0048

注) () 内数値 : 抵抗性比 = 採取蚊の LC50 値 ÷ 感受性の LC50 値

* : 大略値

表4. 都市緑地公園(神奈川県:生田緑地)におけるオビトラップへのヒトスジシマカの産卵状況

No.	設置場所	第1回設置	第2回設置
		140823-140829	140829-140905
1	生田緑地標識裏	+	+
2	モミジの木奥	不明	+
3	その横の木裏	+	+
4	朋の橋前植込み	-	不明
5	朋の橋橋下	-	+
6	あやめ田横植込み	-	+
7	マンホール奥	-	-
8	石裏	-	+
9	東屋前木横	+	+
10	東屋奥木横	+	+
11	ふじ棚地上2m	+	+
12	池左方向植込み	+	-
13	その奥大葉中	+	-
14	滝中央奥	不明	不明
15	滝最上部	+	-
16	石段植込み	+	-
17	同上6m下植込み	+	-
18	朋の橋奥橋下	-	+
19	同上	-	+
20	No-1標識石裏	-	+
21	同上木裏	+	+
22	川と田間木根元	+	+
23	土手木の横	+	+
24	川横木裏	-	-
25	土手左上	-	+
26	花根元	+	+
27	同上	-	+
28	水門右奥	-	+
29	橋下右	-	+
30	杉裏青木中	不明	+
	計	14/27	21/28
	総計	35/55(63.7)	

注) 表中の記号は短冊布への産卵あり+, なし-を表す

表5. ヒトスジシマカ終齢幼虫に対する薬剤感受性試験結果

1) 都市部緑地公園 (神奈川県: 生田緑地) 採集コロニー

供試薬剤	処理濃度						回帰式
	0.1	0.04	0.02	0.01	0.004		
fenitrothion	死虫数/供試虫数	39/39	30/36	14/35	2/35	0/40	Y=11.86+4.20logX
	致死率 (%)	100	83.3	40.0	5.7	0	
fenthion	死虫数/供試虫数	57/60	27/40	2/38	1/40		Y=13.40+4.00logX
	致死率 (%)	95.0	67.5	5.3	2.5		
temefos	死虫数/供試虫数	39/39	38/39	34/52	4/36	0/36	Y=18.05+5.28logX
	致死率 (%)	100	97.4	65.4	11.1	0	
permethrin	死虫数/供試虫数	40/40	36/40	3/40	0/39	0/20	Y=22.01+6.84logX
	致死率 (%)	100	90.0	7.5	0	0	
pyriproxyfen	死虫数/供試虫数	40/40	39/40	37/40	25/40	24/60	Y=15.44+2.31logX
	致死率 (%)	100.0	97.2	91.7	58.3	33.3	

2) 医科研 (感受性コロニー)

供試薬剤	処理濃度						回帰式
	0.03	0.02	0.015	0.01	0.0075		
fenitrothion	死虫数/供試虫数	20/20	40/40	44/55	17/39	3/17	Y=16.46+5.82logX
	致死率 (%)	100	100	80.0	43.6	17.6	
fenthion	死虫数/供試虫数	20/20	20/20	38/40	27/34	35/50	Y=18.83+6.09logX
	致死率 (%)	100	100	95.0	79.4	70.0	
temefos	死虫数/供試虫数	20/20	20/20	36/38	29/50	5/54	Y=29.11+9.45logX
	致死率 (%)	100	100	94.7	58.0	9.3	
permethrin	死虫数/供試虫数	20/20	57/60	46/57	21/56	0/20	Y=22.44+6.58logX
	致死率 (%)	100	95.0	80.7	37.5	0	
pyriproxyfen	死虫数/供試虫数	32/40	31/40	30/40	14/40	14/40	Y=10.07+1.19logX
	致死率 (%)	80.0	77.5	75.0	35.0	35	

表6. ヒトスジシマカ終齢幼虫に対する LC50 値又は IC50 値 (ppm)

	生田	医科研 (感受性コロニー)
fenitrothion	0.023 (2.1)	0.011
fenthion	0.0079 (1.5)	0.0054
temefos	0.0034 (1.2)	0.0028
permethrin	0.0033* (1.5)	0.0022
pyriproxyfen	0.000030 (0.5)	0.000056

注) *: 大略値

** : IC50 値 (ppm)

表7. フェンチオン発泡錠処理区に発生する蚊の種類と発生量

調査日	調査	投薬	調査	←	←
	7/25	7/26	8/6	8/22	9/4
1	+		-	-	+
2	+		+	+	注1)
3	-		-	-	+
4	-		-	-	++
5	+		-	-	+
6	-		-	+	+

*発生量 : 0=- 1~9=+ 10~99=++ 100<=+++

*発生種 : アカイエカ, 但し、a l bo はヒトスジシマカのみ発生

*注1) : 密度+++ , アカイエカ, ヒトスジシマカの2種採取

表8. ピリプロキシフェン発泡錠処理区に発生する蚊の種類と発生量

調査日	調査	投薬	調査	←	←
	7/25	7/26	8/6	8/22	9/4
1	+		albo+	+	+
2	-		-	-	-
3	+		albo+	+	+
4	+		-	-	+
5	注2)		注2)	+	+

*発生量 : 0=- 1~9=+ 10~99=++ 100<=+++

*発生種 : アカイエカ, 但し、a l bo はヒトスジシマカのみ発生

*注2) : 密度+ , アカイエカ, ヒトスジシマカの2種採取

表9. ピリプロキシフェン発泡錠処理区からの採取幼虫の羽化状況

雨水柵No.	1		2		3		4		5	
	観察日	観察最終日	観察日	観察最終日	観察日	観察最終日	観察日	観察最終日	観察日	観察最終日
正常羽化成虫	-	1	0	-	-	1	-	0	-	3
採集虫 蛹	1(4)	0	0	-	3(6)	0	2(6)	0	4(7)	0
採集虫 幼虫 老齢	0	0	0	-	2	0	0	0	5	1
採集虫 幼虫 中齢	1	0	0	-	5	0	0	0	7	0
採集虫 幼虫 若齢	3	0	0	-	2	0	2	0	4	0
羽化阻止率	88.9		100		94.4		100		88.9	

シラミ症流行対策と殺虫剤抵抗性の分子診断

分担研究者 富田 隆史 国立感染症研究所昆虫医科学部殺虫殺そ剤室長

協力研究者 葛西 真治 国立感染症研究所昆虫医科学部研究員

李 時雨 国立感染症研究所昆虫医科学部協力研究員

三原 実 (財)日本環境衛生センター専任講師

矢口 昇 池袋保健所生活衛生課生活衛生係員

研究要旨

(i) 昨年度に引き続き、首都圏の医療機関よりアタマジラミ罹患患者から採取した生虫の提供を受け、5コロニーを殺虫試験した結果、いずれもフェノトリン感受性を示した。2001年9月からの累積調査コロニー数15の内、3コロニー(20%)が抵抗性であった。(ii) コロモジラミ死虫より抽出した核酸を用いて、PCR増幅を安定して行うためのシラミ保存法を検討した。生虫を高純度エタノールの中に常温で浸漬保存すると、8週後に抽出したDNAを用いて0.8 kbのNa⁺チャンネル遺伝子断片が増幅できた。餓死後、シラミを常温で放置した場合にも同様な結果が得られた。しかしながら、高純度エタノールで浸漬保存した場合には、1日後に抽出したRNAを用いては問題なくRT-PCR産物が得られたものの、4日後以降に抽出したRNAを用いてはRT-PCR産物を安定して得ることが困難であった。(iii) ピレスロイド系殺虫剤の作用点であるアタマジラミのpara-orthologous Na⁺チャンネル α -サブユニット遺伝子の抵抗性に関連した点突然変異を分子診断することを試みた。日本、米国、および英国の抵抗性コロニーに共通した特異的アミノ酸置換の1つ Thr952Ileを対象として、日本産のコロニーに見出されたcDNAの塩基置換に基づき、TaqManプローブと定量PCR装置を用い、3つの遺伝子型を識別可能なマルチプレックスPCRの条件を決定した。(iv) アセチルコリンエステラーゼ(AChE)は、国外でシラミ駆除剤としてピレスロイド系殺虫剤の次に広く用いられている有機りん系殺虫剤の作用点である。最近昆虫種に見出された2番目のAChE遺伝子族(*Drosophila* Ace-paralogous AChE)に相当するコロモジラミのAChE cDNA配列を決定した。(v) 保存したヒト血液を用いてコロモジラミを人工吸血飼育した場合には、ヒトから直接吸血飼育した場合に比べて、幼虫生存率が大きく低下することが昨年度の研究によりわかった。孵化より毎日人工吸血させた幼虫が成虫に達するまで、毎日の死亡を観察した結果、各齢の幼虫齢がおもに脱皮時に死亡することを明らかにし、その原因について3つの要因を考察した。

A. 研究目的

アタマジラミ症は先進国、発展途上国の別を問わずに発生している。厚生省統計によると、わが国では、駆除薬としてのスミスリン製剤が1982年に発売されて以来、1988年にはアタマジラミ罹患患者数は1900人までに減少したが、1990年代に入ってから再び漸増傾向を示し、1999年には1万人に増加した。しかしながら、1999年のヒトジラミ駆

除用スミスリンパウダーとシャンプーの年間出荷数量が52万1千本に及んでいたことから、実際の罹患患者数は少なくとも統計数の10倍の10万人はあったと推測される。

現在、ヒトへの安全性と殺虫剤感受性シラミへの有効性から世界的にピレスロイド系殺虫剤がシラミ駆除薬として最も利用されているが、1990年代の始めからピレスロイド抵抗性アタマジラミコ

ロニーが出現し、米国、欧州諸国、イスラエルでは殺虫剤による駆除の失敗が社会問題となっている。昨年度の本研究の調査から、わが国でも始めてスミスリン抵抗性コロニーの存在が明らかにされた。

ヒトジラミの殺虫剤抵抗性機構の解明や病原体媒介能の研究は他の害虫種に比べて困難を伴う。その一つの理由として、シラミの宿主依存性により、代替の吸血源を利用した飼育が一時的でさえ困難なことがあげられる。これまでは、調査の第一段階として、首都圏の医療機関よりアタマジラミ生虫の供与を受け、殺虫試験による感受性判定とそれに引き続きピレスロイド作用点分子の構造変異の解析を行い、抵抗性に連関する変異が明らかになってきた。その成果を応用した次の研究段階として、遠隔地の不特定多数の医療機関等や罹患患者から供与される死んだシラミ試料を用いたとしても、駆除剤の有効性が推定可能な試験・検査法を開発することが、より広範な調査を実施する上で必要である。この他、病原体媒介能の研究を行う上でも、また新規駆除剤の開発を行う上でも、ボランティアに多大な負担をかけることのないように人工吸血法の改良が必要である。

今年度実施した研究の目的と概要は次の通りである。(i) 日本におけるアタマジラミの駆除剤に対する感受性の実体を明らかにするために、生虫を用いた殺虫試験を継続した。(ii) PCR 増幅に適したシラミの簡易な保存法を決めるために、コロモジラミを用い、種々の殺処理、保存液、および保存期間によるゲノム DNA と cDNA それぞれの PCR 増幅の安定性を比較検討した。(iii) 抵抗性型ピレスロイド作用点の分子診断を行うために、抵抗性特異的な Na⁺ チャンネル cDNA の 1 つの非同義置換座位について、3 つの遺伝子型を定量 PCR 装置と TaqMan プローブを用いて識別することを試みた。(iv) 海外でシラミ駆除剤の有効成分として広く使われている有機りん系殺虫剤マラチ

オンの作用点はアセチルコリンエステラーゼ (AChE) である。海外ですでに報告されているマラチオン抵抗性アタマジラミの抵抗性機構を解明することを目的として、一昨年度に行ったコロモジラミの *Drosophila Ace-orthologous* AChE に次いで、今年度は、昨年新たに見出された昆虫で 2 番目の AChE 遺伝子族となった *Ace-paralogous* AChE の cDNA 配列をコロモジラミより決定した。(v) ヒト保存血液を吸血させてコロモジラミを飼育すると、ヒトから直接吸血させて飼育した場合に比べて幼虫死亡率が高いことが前年度の研究で認められた。飼育法改良の手がかりを得るために、毎日の幼虫期の死亡を観察および記録した。

B. 研究方法

コロモジラミ：

1953年に札幌市で採取され、国立感染症研究所でボランティアからの吸血により継代飼育されている殺虫剤感受性の感染研系統 (NIID と略) のシラミ保存、抵抗性の分子診断、AChE cDNA 配列の決定、および人工飼育の対象として用いた。

アタマジラミ：

2002年度に、東京都と神奈川県で医療機関で罹患患者から採取された生虫の提供を受け、採取後 6 時間以内に殺虫試験に用いた。2001年 9 月 25 日に東京都豊島区で採取されたスミスリン抵抗性シラミ (#R1) に由来する cDNA を分子診断の材料として用いた。

殺虫試験：

殺虫試験はフェノトリンを一定濃度で浸透させたろ紙にシラミを継続的に接触させるろ紙接触法により行った。詳細は前年度報告した通りである。

核酸の抽出、逆転写、および PCR：

個体ごとのゲノム DNA 増幅には、製造者による Isogen (Nippon Gene) を用いた微量試料からの抽出の方法に従い、RNA 相に混入したゲノム DNA を用い、逆転写を行わないまま核酸抽出物

の一部をそのまま増幅に用いた。個体ごとの cDNA の増幅と配列の解析には、1頭のシラミより抽出した全 RNA を逆転写に用い、逆転写液の一部を PCR 増幅した。必要に応じてダイレクトシーケンシングにより cDNA 配列を決定した。複数のシラミに由来する cDNA の解析のためには、RNA 抽出後に Oligotex dT30 super (TaKaRa) を用いて poly(A)⁺ RNA を選抜後、逆転写反応を行った。詳細は前年度報告した通りである。

シラミ保存法の検討：

シラミ保存時のゲノム DNA と mRNA の安定性については、それぞれ、Na⁺チャンネル cDNA の #499-782 に対応するが #666/667 に376塩基の1つのイントロンを含むゲノム DNA セグメント、および cDNA の #1761-3470 セグメントの PCR 増幅産物の有無により確かめた。各処理条件とも、少なくとも2回の反復実験を行った。保存液として、99.9%と70%エタノール、アセトン、核酸保存用試薬 RNA Later (Novagen) を用いた。1頭のシラミより抽出した DNA または逆転写した 1st strand cDNA の 1/40 を鋳型として用い、0.125 U の ExTaq (TaKaRa) を含む 25 ul の反応液中で35サイクルの PCR を行い、10 ul をアガロース電気泳動にかけ、産物を確認した。

Na⁺チャンネルの対立遺伝子識別：

コロモジラミ NIID 系統とアタマジラミ #R1 コロニーにそれぞれ由来する約 1.7 kbp の Na⁺チャンネル cDNA 断片 (#1761-3470) と、両者を等モル濃度で混合したもの、計3つを各反応の鋳型として用意した。2つの TaqMan プローブは cDNA 配列 #2961-2984 のネガティブストランドに相当し、1組のプライマーは #2929-3015 セグメント (プライマー自身を含む) の増幅を行うように設計された (図1)。iTaq DNAポリメラーゼ (Bio-Rad) を含む 50 ul の反応液に、1つの鋳型 0.05 pmol, 各プライマー 0.4 uM, 各プローブ 0.1 uM を入れ、マルチプレックス PCR を iCycler iQ Real-Time

PCR Detection System (Bio-Rad) により行った。増幅条件は 95°C 15 min, 次いで 95°C 15", 60°C 1' を 45 サイクルとした。また、NIID 系統と R1 コロニーのそれぞれの成虫一頭に由来する逆転写反応液の 1/20 量を鋳型として用い、同様な PCR を行った。

AChE cDNA のプライマーウォーキング：

Anopheles gambiae, コガタアカイエカ, ミドリムギアブラムシ, モモアカアブラムシの昆虫第2族 AChE 配列の保存ペプチド配列に基づき、縮重プライマーを設計した。まずフォワードプライマー TTyGGiGAYTTyCCiGGiGcCiAC とリバースプライマー TArAAiCCiCCiCCrAAAdATCCA のセットで cDNA セグメントを増幅し、次いで、そのセグメントの中の遺伝子特異的フォワードプライマーと縮重リバースプライマー TCiCCrTGCATiACiCCiGTCCA のセットにより近隣の配列を増幅した。さらに未知の上流域と下流域は cRACE 法に基づく TaKaRa Full RACE Core Kit (TaKaRa) を用いて増幅した。また、上流域については、GeneRacer Kit with SS II RT, TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) も別途用いて増幅し、2つの 5'-RACE 法により決定した配列を比較し同一であることを確かめた。

人工吸血：

コロモジラミ NIID 系統を用いて、人工吸血による飼育を行った。基本的な方法は昨年準じ、シャーレに固定した血液パッド上に布にのせたシラミを置いて行う方式をとった。血液パッドは円形の脱脂綿 (1 mm 厚, 35 mm 径) に人血を染みこませ、これを薄く伸ばしたパラフィルムで上下よりはさみ、シャーレ上に固定した。血液は採血時にヘパリンを加えて凝血を抑制した。昨年研究では、血液中に輸血用全血保存液 CPD (1L 中にリン酸二水素ナトリウム 2.51 g, クエン酸ナトリウム 26.3 g, クエン酸 3.27 g, ブドウ糖 23.2 g) を添加した場合にわずかながら成虫脱皮率の

成績が良かったため、これを最終濃度 14% になるように添加して調製した。また、昨年度の研究で血液は凍結融解して溶血させると成虫脱皮率が上昇することが明らかになったため、すべて溶血したものを用いた。血液パッドは 37°C のヒートブロック上で保温し、孵化幼虫から 3 週間、毎日吸血させた。また今回は生育密度と生育との関係を観察するため、109, 256, 333 匹と、3 つの異なる密度で実験を行った。毎日吸血時に死亡数、脱皮数、産卵数を記録した。

C. 研究結果

アタマジラミの駆除剤感受性：

東京都と神奈川県で新たに 3 つのアタマジラミコロニーを試験し、いずれもスミスリン感受性と判定した（表 1, コロニー #S10-12）。調査を開始した昨年度からの累積調査コロニー数は 15 となり、そのうち抵抗性コロニーは 3 つ (20%) であった。

核酸抽出のためのシラミ保存法：

最初の試みとして、生虫を高純度エタノール、消毒用エタノール、および RNA Later に浸漬し、4 日後に核酸を抽出したところ、660 kbp のゲノム DNA および 1710 kbp の cDNA が増幅可能であった。また、餓死したシラミを室温 (25°C) で放置した場合には、4 日後にゲノム DNA は保存液に浸漬した場合と同様に容易に増幅された。cDNA から増幅した場合には、PCR 産物はフェイントしてのみ認められるか、あるいは確認できなかった（図 2）。遠隔地の医療機関等やシラミ罹患者よりシラミの死虫試料の提供を受けることを将来想定し、特殊な保存液を用いないシラミの保存法をさらに確かめた。ゲノム DNA の増幅については、高純度エタノールに浸漬保存した場合、および餓死させて室温に放置した場合には、少なくとも 8 週間までに DNA を抽出すれば PCR 産物が容易に得られることがわかった。しかし、消毒

用エタノールに浸漬した場合、およびジエチルエーテルで殺処理して室温に放置した場合には、1 日後を除いて PCR 産物が認められないかまたは安定して得られなかった。cDNA 増幅に関しては、高純度エタノールに浸漬した場合でも、安定して PCR 産物が得られることが確認できたのは処理後 1 日目までであった（表 2）。

抵抗性の分子診断法：

日本、米国、および英国のアタマジラミのピレスロイド殺虫剤抵抗性に共通な Na⁺ チャンネルのドメイン II セグメント 6 膜貫通ペプチド内に認められた 2 つのアミノ酸置換の内の 1 つ Thr952Ile は、日本産の抵抗性シラミでは ACA から ATA への塩基置換として現れた。この塩基置換のホモ接合体 (M/M) である抵抗性のアタマジラミと野生型遺伝子のホモ接合体 (W/W) である感受性のコロモジラミの cDNA 断片を増幅した鋳型 DNA を準備し、次に、これらを等モル比で混合してヘテロ接合体に匹敵する鋳型 (M+W) を準備した。1 つの鋳型、および野生型と突然変異型にマッチする 2 つの TaqMan プローブを同じ反応液に加え、マルチプレックス PCR を行い、対立遺伝子特異的レポーター色素の蛍光放出量をバイプロットした。その結果、疑似ヘテロ接合体と野生型ホモ接合体が偏りをもって接近したが、3 つの遺伝子型の識別は概ね可能であった（図 1）。M/M と W/W 由来の 1st strand cDNA を鋳型に用いて同様な実験を行っても類似した結果が得られた（図示せず）。

シラミ第 2 の AChE 遺伝子配列：

既知の昆虫種第 2 族 AChE の保存配列に基づき、NIID 系統コロモジラミの 2 番目の AChE cDNA 配列をプライマーウォーキングにより決定した。上流の翻訳枠内終止コードが認められなかったため、今回決定した 2661 塩基の cDNA 配列からは翻訳開始点を確定することができなかった。もっとも上流に位置する Met から数えると、少なくとも

も708アミノ酸残基から成るAChE前駆体タンパク質(pedhu-acche2)をコードしていた(図3)。活性中心部位のSer-Glu-Hisのcatalytic triad, サブユニット内で3つのジスルフィド結合を作るためのCys残基, 芳香族ゴルジに含まれる芳香族アミノ酸残基, C-末端のH-ペプチド様配列, H-ペプチドの内のN-末側に現れる2量体形成に関わる1つのCys残基からは, 既知の昆虫種の第1族と第2族のAChEに共通の特徴を示した(図示せず)。しかしながら, シグナルペプチド切断予測プログラムのSignalPプログラムを用いては, シグナルペプチド配列は推定できなかった。キイロショウジョウバエ*Ace*遺伝子の産物である第1族AChE前駆体タンパク質のLeu43-Pro139およびIle181-Val608に相同なセグメントを対象としてNJ-tree法で描いた分子系統樹を図4に示す。新たに決定したコロモジラミのAChE配列が昆虫種第2族に属することは明らかである。

人工吸血法の改良:

いずれの密度で飼育を始めた試験においても初齢幼虫に関してはこれまでの人工吸血法で効率よく吸血させることが出来た(図5-8)。そして二齢脱皮率は68%から77%と比較的高く, 死亡率を抑えることができた(表3)。しかし, 前回同様に脱皮を重ねるにつれて生存率は下がり, 成虫脱皮まで達したのは最高で33.9%, 333匹の高密度で飼育したコロニーについてはわずか7.5%という結果であった。図10に孵化後日数と生存率の関係をグラフに示したが, 一齢幼虫においては最初の脱皮が始まる5日目まで生存率はほぼ100%に近く, これ以降で死亡個体数が増えていることがわかる。そこで, 孵化後日数と死亡虫数および脱皮の関係をグラフに表した(図11)。いずれの密度で飼育した場合においても, 死亡個体数が多い日は脱皮数が多いことがわかる。この時期に死亡した個体を図12から17に示したが, これらの多くは脱皮変態を完了する前に途中で死に絶

えていることがわかる。脱皮がうまくいった個体はその後効率よく吸血し(図9), その多くは次の脱皮まで生き延びていることが図11のグラフからも窺える。

D. 考察

アタマジラミ用駆除剤の有効性については, 昨年度試験した一部のコロニーに防除不能なレベルの抵抗性が認められたが, 現時点では大半のコロニーには駆除剤が有効であると推測される。われわれが首都圏でアタマジラミ15コロニーの感受性レベルを調べて抵抗性コロニー出現率が20%であったという結果は, 限られた調査地域と数に基づくため, 抵抗性の実態について知るには全国的規模の調査が必要といえる。しかしながら, わが国において1990年代初めから末にかけて罹患者が約5倍に増加したアタマジラミ症再興現象の要因は, 薬剤抵抗性による駆除の失敗によるとは単純に結論できなかった。親の子供へのケアに割く時間の減少, 子供の集団生活, 遊び, スポーツの時間における過ごし方, 邦人海外居留者や外国人労働者の出入国の増加なども, 1990年代にシラミ症が漸増した可能性として捨てきれない。

2001年12月より東京都と神奈川県 of 皮膚科医師75名に対して, アタマジラミが診療中に発見された場合は, 生虫, 死虫, 卵を問わず, 研究試料としての供与を要請した。生虫が発見された場合は医療機関にそれを受領しに行き, 卵または死虫の場合は郵送を依頼した。その結果, これまでに18機関から37コロニー分の試料を受領した。その内訳を表4に示す。卵を受領した場合は, 孵化後の抜け殻か胚発生の途中で死亡した場合がほとんどであった。また, アタマジラミ罹患者が診察に医療機関を訪れた場合は, その時点でシラミ駆除剤を過去に用いていないケースがほとんどであった。このことから, 遠隔地の不特定の医療機関等や罹患者から今後シラミ試料の提供を受け駆除剤

感受性の推定を行う場合には、発見時に生きていて量的に最も核酸の抽出しやすい成虫（次いで幼虫）を始めから対象として試料提供を依頼するのが効率的であると考え。その際、提供者は、高純度エタノールが利用可能であればそれに浸漬保存し、そうでなければシラミを餓死により放置し、通報後研究者より送られてくるエタノール入りの適当な容器にシラミを浸漬して返送する方法が現実的であると考え。

昨年度に国産の抵抗性アタマジラミから見出したNa⁺チャンネルの4つのアミノ酸置換座位の1つについて、cDNAを鋳型とし、TaqManプローブと定量PCR装置を用いてマルチプレックスPCRを行い、容易に遺伝子型を識別することができた。簡易な方法で保存されたシラミ死虫から同様な検定を行う際は、ゲノムDNAを対象とせざる得ないことが今回の研究でわかったので、この点につきさらに試行を要する。

数多くの農業・衛生害虫種で有機りん系およびカーバメイト系殺虫剤の作用点であるAChEの感受性低下を要因とした抵抗性が報告されている。作用点分子に生じた抵抗性の原因となる構造変化としては、ハエ科昆虫であるキイロショウジョウバエとイエバエを用いた研究によると、個々のアミノ酸置換の効果を酵素の感受性比で表すと数倍から数十倍に留まる点突然変異しか知られていなかった。フェニトロオクソンに500倍以上感受性が低下したコガタアカイエカの*Ace-orthologous* AChE（第1族）の場合、その構造遺伝子からは抵抗性特異的の一次構造変異が認められておらず、また、AChE感受性低下の要因となる遺伝因子はこの構造遺伝子とは別の連鎖群にマップされている。この他にも*Ace-orthologous* AChE配列が解析された現在10を超える害虫種においても、明瞭な一次構造上の変異が認められていない。2002年には、ミドリムギアブラムシと*Anopheles gambiae*から昆虫で第2のAChE遺伝子族になる

Ace-paralogous AChE遺伝子が発見された。以来、抵抗性をコードする遺伝子として、この遺伝子族に研究者の注目が集まっており、解析が進行中である。コロモジラミで2つのAChE遺伝子の存在が認められたことにより、同胞種（または亜種）の関係にあるアタマジラミのマラチオン抵抗性の機構解明や分子診断が期待される。

今回人工吸血をさせたシラミを観察すると、死亡率が上昇する時期が脱皮の時期に重なっていることが明らかになった。また、死亡個体の多くは脱皮の途中で死に絶えていることも分かった。予想される原因として3つほど考えられた。1つ目に湿度がコントロールできていなかったことが挙げられる。通常飼育容器には吸湿剤としてシリカゲルを入れ、密閉した状態で飼育しているが（図18, 19）、使用したシリカゲルの量が少なすぎたために脱皮に最適な湿度条件下になかった可能性がある。2つ目の理由として密度が高すぎたことが挙げられる。これは今回の成虫脱皮率が、飼育密度が高いほど低かったことから予想される。密度が高いため、飼育布の上をコロモジラミが頻繁に動き回り、他個体の安全な脱皮を妨げていた可能性が考えられる。3つ目の原因として挙げられるのが血液成分である。前回の試験ではCPDの添加による生存率の影響はなく、むしろ添加することにより血液の粘性度が下がり、生存率が上がると判断されたが、未だに血液凝固阻害剤として添加しているヘパリンの影響が確かめられていない。今後、これらの可能性を一つずつ確かめていくことで、さらに成虫脱皮率は上昇するものと考察される。

E. 結論

- (i) 首都圏でこれまで殺虫試験により行ったアタマジラミのスミスリン感受性調査の結果、15コロニー虫3コロニーが抵抗性を示した。
- (ii) シラミの成虫を高純度エタノール中に浸漬保

存すか、または餓死させて保存すると、少なくとも8週間後にDNA抽出を行っても、ゲノムDNAのPCR増幅には良好な増幅が可能であったが、RT-PCRを行うことは困難であった。

(iii) シラミのスミスリン抵抗性に関連する1つのアミノ酸置換に関する3つの遺伝子型を、TaqManプローブと定量PCR装置とcDNA鋳型を用いて識別することができた。

(iv) コロモジラミから昆虫種第2のAChE遺伝子族に属するAChE配列を決定した。

(v) シラミの人保存血による人工吸血で最も問題になるのは、幼虫脱皮毎に起こる死亡である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kasai, S., Mihara, M., Takahashi, M., Agui, N. and Tomita, T. (2003) Rapid evaluation of human lice susceptibility to phenothrin. *Med. Entomol. Zool.* (in press).

2) Tomita, T., Yaguchi, N., Mihara, M., Takahashi, M., Agui, N. and Kasai, S. (2003) Molecular analysis of para-sodium channel gene in pyrethroid-resistant headlice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* (in press).

3) 富田隆史, 葛西真治, 小林睦生 (2003) シラミの駆除剤抵抗性と病原体媒介能の実態. *生活と環境* 48(2): 45-51.

2. 学会発表

4) 富田隆史, 葛西真治, 矢口昇, 三原実, 高橋正和, 安居院宣昭 (2002) アタマジラミのピレスロイド剤抵抗性(I): 日本における抵抗性コロニーの出現 第54回日本衛生動物学会大会, 4月2日 (東京).

5) 葛西真治, 富田隆史, 矢口昇, 三原実, 高橋正

和, 安居院宣昭 (2002) アタマジラミのピレスロイド剤抵抗性(II): 抵抗性コロニーにおけるナトリウムチャンネルの構造変異 第54回日本衛生動物学会大会, 4月2日 (東京).

6) Kasai, S., Yaguchi, N., Agui, N., Mihara, M. and Tomita, T. (2002) Efficacy of pyrethroid insecticide to head lice in Japan (I): emergence of phenothrin-resistant colonies. 2nd International Congress of Phthiraptera, July 9 (Brisbane, Australia).

7) Tomita, T., Yaguchi, N., Agui, N., Mihara, M. and Kasai, S. (2002) Efficacy of pyrethroid insecticide to head lice in Japan (II): point mutations of sodium channel gene in pyrethroid-resistant lice. 2nd International Congress of Phthiraptera, July 9 (Brisbane, Australia).

8) 李時雨, 葛西真治, 富田隆史 (2003) Two acetylcholinesterase genes of the body louse, *Pediculus humanus*. 第47回日本応用動物昆虫学会大会, 3月25日 (盛岡, 発表予定).

9) 富田隆史, 葛西真治, 李時雨, 矢口昇, 三原実, 安居院宣昭 (2003) アタマジラミのピレスロイド剤抵抗性に関連するナトリウムチャンネル遺伝子の点突然変異(II). 第55回日本衛生動物学会大会, 4月1日 (大分, 発表予定).

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 罹患者より採取したアタマジラミコロニーのフェノトリン感受性レベル

#	採取日	罹患者 (国籍)	採取地	採取者	供試 虫数	殺虫剤 感受性	抵抗性 比
S1	01/10/12	3歳女	埼玉県久喜市	小児科医師	1	感受性	
S2	01/10/24	3歳女	埼玉県久喜市	小児科医師	3	感受性	
S3	02/02/04	4歳	神奈川県平塚市	皮膚科医師	2	感受性	
S4	02/02/07	8歳女	東京都文京区	皮膚科医師	3	感受性	
S5	02/02/20	9歳女	神奈川県小田原市	皮膚科医師	2	感受性	
S6	02/03/06	9歳女	神奈川県横浜市	皮膚科医師	1	感受性	
S7	02/03/15	7歳女	東京都大田区	皮膚科医師	5	感受性	
S8	02/03/30	8歳男	東京都立川市	皮膚科医師	1	感受性	
S9	02/04/04	8歳女 8歳女	神奈川県大和市	保健所職員	7	感受性	
S10	02/04/16	11歳女	神奈川県小田原市	皮膚科医師	3	感受性	
S11	02/09/04		神奈川県横浜市	皮膚科医師	1	感受性	
S12	02/12/16	6歳男	神奈川県小田原市	皮膚科医師	3	感受性	
R1	01/09/25	3歳女 6歳女	東京都豊島区	保健所職員	12	抵抗性	≥ X20
R2	01/12/12	6歳女	東京都豊島区	保健所職員	3	抵抗性	≥ X80
R3	01/12/20	88歳女 (英国)	東京都新宿区	皮膚科医師	3	抵抗性	≥ X160

Table 2 PCR products from various louse preservations.

Template	Treatment	Period of preservation						
		1D	4D	1W	2W	3W	5W	8W
gDNA (RNA ext.> PCR)	100% EtOH	++	++	++	++	++	++	++
	70% EtOH	++	+/-	-	+/-	+/-		
	Killed with EtOEt	++	-	-	+/-	-		
	Died from Starvation	++	++	++	++	++	++	++
cDNA (RNA ext.> RT-PCR)	100% EtOH	++	+/-	-	-			
	70% EtOH	-	-	-	-			
	Killed with EtOEt	-	-	-	-			
	Died from Starvation	NT	NT	+/-	+/-			

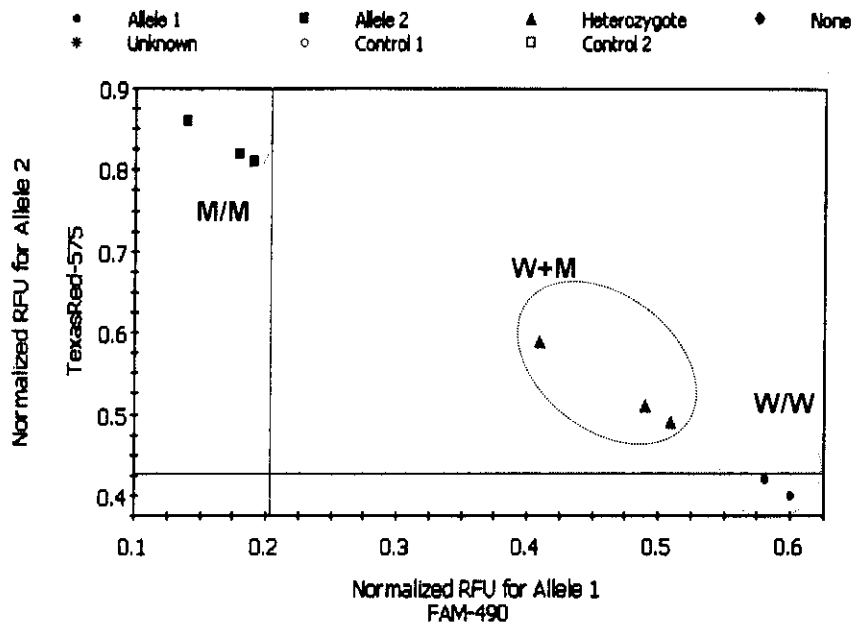
++, stably amplified; +/-, unstably amplified; -, not amplified; NT, not tested.

表3 各試験における脱皮率, 羽化率および平均産卵数の比較

試験虫数 (匹)	二齡脱皮率 (%)	三齡脱皮率 (%)	羽化率 (%)	平均産卵数 (個/♀/日)
109	77.1	61.5	33.9	1.76
256	67.6	50.4	20.7	1.55
333	68.8	44.4	7.5	2.45

表4 アタマジラミ試料受領数

生虫数		死虫数		孵化前卵数		孵化後 卵殻数
成虫	幼虫	成虫	幼虫	生卵	死卵	
35	27	7	3	2	64	53



	5'-Reporter-	Sequence	-Quencher-3'
Wild-type Probe	5'-FAM-	AT <u>G</u> TTAAATTACCCAAAGCTCCAA	-TAMRA-3'
Mutant Probe	5'-Texas Red-	AT <u>A</u> TTAAATTACCCAAAGCTCCAA	-BHQ2-3'
Forward Primer		ATTTCAATTATGGGTGGAAGT	
Reverse Primer		GCAAATATGAATATGATAATGCAA	

Fig. 1 Allele discrimination of the louse Na⁺ channel gene with TaqMan probe by Thr952Ile mutation.

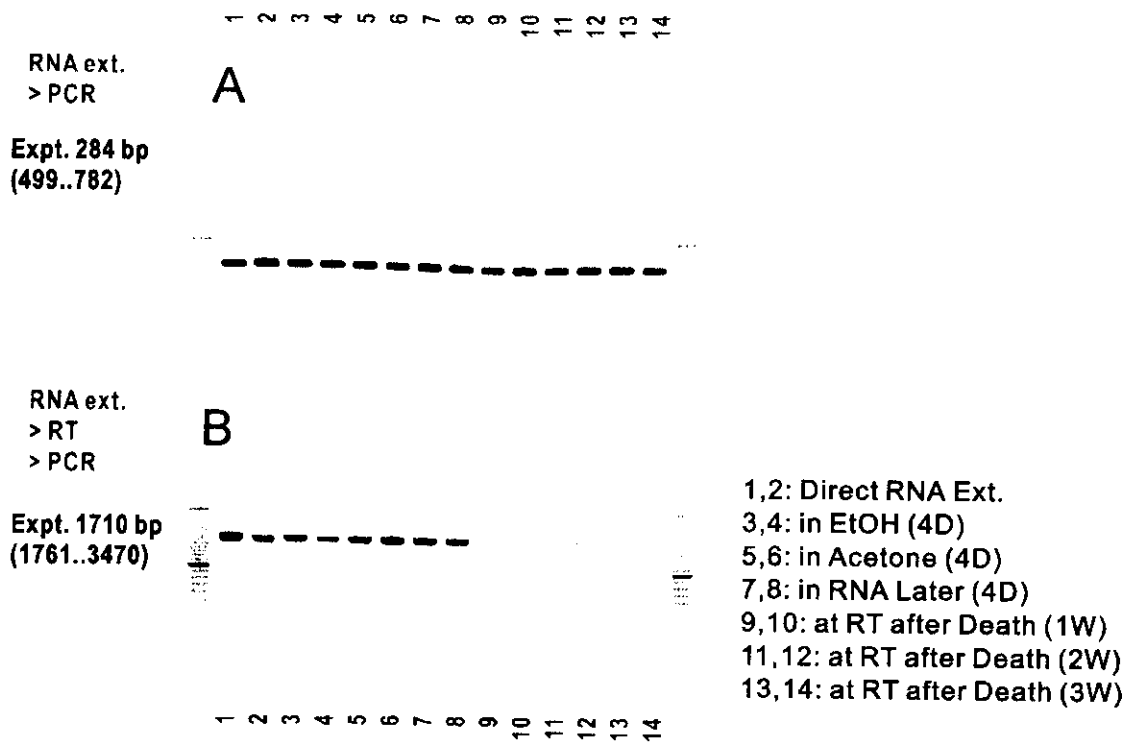


Fig. 2 Electrophoresis of PCR products from various louse preservations

```

pedhu ---MLKKDIQGVVKKRGRSTDTQDEIIRKRLQLQRTIRSRNKPHEESGGDGGGGGGGNGVSGTGGGASVQTQSAHF---VEHDS-----LKFSERMN 88
aphgo -----MDQMLLWFGYLVASTYG-----LS-----LRHARHQSVGTPAEBEILPQILIEDTDHVFPRQRASDMF-----AQEP-----EYTEKRN 69
anoga -----
cultr MRPLQAMEIRGLITRLLGPCHLRHL-ILCSLGLYSILVQSVHCRHRHDIGSSAAHQLG-SKYSQSSSLSSSSQSSSLAEERATLNKDSGHGDSVRIVDA-E 97

pedhu LGLGEG-NMHLNRKDRSEFGAQNKDLKNDYRFVDDKNDPLIVETTKGKVRGVTLQGGANGKYVDWLGIPIYAQKPIGGNLRFRHRPPIEKWD---PEIF 183
aphgo LNHRRR--SEFSGNQDTNFE-SGATYSAYT-----SDDPLIHTNKGKIRGITQEATTTGKLVDAWLGIPYAKKPIG-DLRFHRHRPIDRNDTTSPTIL 160
anoga -----AN-----DNDPLVVNTDKGRIRGITVDAPSGKKVDVWLGIPIYAQPPVG-PLRFHRHRPAEKWTG-----VL 60
cultr LGTLEREHIHSTTRRRGLTR--RHSNSDST-----DSDFLVITTDKGRITTLFAPSQKVDAMWGIPIYAQPPVG-PLRFHRHRPAERWSG-----VL 184
      .*****: * *:*:* * :.:.** **.*:*****: * * ***** :!* :
      :

pedhu NATKPPNSCVQILDTVFGDFPGATMWNPNTPLESDCLYINVVVPRPRKS-AVMVMIFGGGFYSGTATLDVYDPTLVSEENVIVVSNQYRIASLGLFY 282
aphgo NCTTPPNTCVQIFDITLFGDFPGATMWNPNTPLESDCLYINVVVPRPRP-QNAAVVMWIFGGGFYSGSATLDIYDPKILVSEENVIVVSNQYRVASLGLFY 259
anoga NTTTPPNSCVQIVDTVFGDFPGATMWNPNTPLESDCLYINVVAPRPRP-KNAAVMLWIFGGGFYSGTATLDVIDHRALASEENVIVVSLQYRVASLGLFY 159
cultr NATKPPNSCVQIVDTVFGDFPGATMWNPNTPLESDCLYINVVAPRPRP-KNAAVMLWIFGGGFYSGTATLDVIDHRALASEENVIVVSLQYRVASLGLFY 283
      * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* * *:*:*:* *
      :

pedhu FGTFDVGNAQLFDQALMALQVHDNIRSGGNPNYVTLFGESAGAVSVSTHLLSPLSRNLFSQAIMESGSFTAPWAIIPTEESILRGLRLAEAVNCPHDR 382
aphgo FDTEDVFGNAQLFDQALMALQVHENIKLFGGNPNVTLFGESAGAVSVSLHLLSPLSRNLFSQAIMESGSFTAPWALSREESFSRGLKLAAMGCPDDR 359
anoga LGTFEAPGNAGLFDQNLALRWVRDNIHRFGGDP SRVTLFGESAGAVSVSLHLLSALSRLDQRAILQSGSFTAPWALVSREERATLRALRLAEAVGCPHEP 259
cultr LGTFEAPGNAGLFDQNLALRWVRDNIHRFGGDP SRVTLFGESAGAVSVSLHLLSALSRLDQRAILQSGSFTAPWALVSREERATLRALRLAEAVNCPHDA 383
      :.* :.***** :;*:;*:* * *:* * .***** ***** :.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:
      :

pedhu FQLSAVVECLRNINSLVNNWGTGLGICFPFVVDGAFLELDELPELALANKNFKTNILMGSNTEEGYFFIYYLTELRLKEENVVNRDEFIKAVRE 482
aphgo NEIHKTVCELRKVNSSAMVEKWDHVAMCFPPVFPVVDGAFLELDDHPQKSLSTNNFKTNILMGSNTEEGYFFIYYLTELFLKKEENVVSRNFNIKAIQ 459
anoga SKLSDAVECLRGKDPHVLVNNWGTGLGICFPFVVDGAFLELDETPQRSLSAAGRFKKTEILTGSNTEEGYFFIYYLTELRLKEEGVTVTREBFQAVER 359
cultr TKLSEAVECLRKTDPNELVDNEWGTGLGICFPFVVDGAFLELDETPQRSLSAAGRFKKTEILTGSNTEEGYFFIYYLTELRLKEEGVTVSREBFQAVER 483
      : : .***** :. :*:*:* * :. :*****:*****: * : :. :.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*.*****:
      :

pedhu LNPYINNIARQAIIFETDMLNPDDPARNRDALDKMVGDYHFTCVNEFAHRYAETGNKVYMYFTHRSAGNPWPSWTVGMHGDENYIFGEPFLNPLKRY 582
aphgo LNPNDAAVKSIAIEFETDWFNPNDEKRNALDKMVGDYQFTCVNEFAHRYALTGNVYMYFTHRSAGNPWPSWTVGMHGDENYIFGEPFLNPKRY 559
anoga LNPYVNGAARQAIIVFETDWTNPNENRDLDKMVGDYHFTCVNEFAQRYAREGNVYMYLYTHRSAGNPWPSWTVGMHGDENYIFGEPFLNPLKRY 459
cultr LNPYVNGAARQAIIVFETDWTNPNENRDLDKMVGDYHFTCVNEFAQRYAREGNVYMYLYTHRSAGNPWPSWTVGMHGDENYIFGEPFLNPLKRY 583
      *** : . :.***** :;*:;*:* * *:* * .***** ***** :.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:
      :

pedhu QV-EEQELSRIMRYANFAKTGNPMSSEDTWTVPVWPEHTAHGREYLTAVNNTS TORGRPLKQCAFWKKYLPLQLLALTKNIK-SNNQIQNCQSKGSK 680
aphgo E-IEIEELSKKIMRYWTFNFAKTGNPMSSEDTWTVPVWPEHTAHGREYLTAVNNTS IGVGRPLRQCAFWKKYLPLQLLALTKNIK-KSDK-NCTTISGGTK 656
anoga T-EDEKDFSRKIMRYWTFNFAKTGNPMSSEDTWTVPVWPEHTAHGREYLTAVNNTS FVGRGRPLRQCAFWKKYLPLQLLVAATYS---S---AVCSRIYYRA 551
cultr Q-EDEKDFSRKIMRYWTFNFAKTGNPMSSEDTWTVPVWPEHTAHGREYLTAVNNTS FVGRGRPLRQCAFWKKYLPLQLLVAATYS---S---AVCSRIYYRA 679
      :* :;*:;*:* * *:* * .***** ***** :.*****:*.*****:*.*****:*.*****:*.*****:
      :

pedhu STPLHFSHFIPPYFTLLLLLLLGLKIF 708
aphgo TMNKLKLV-----TIVMTAVLML--- 676
anoga VNYGGQGH----- 559
cultr TSYRSSTLLIV--TLLLVIRFKI---- 701

```

Fig. 3 Alignment of *Drosophila para*-paralogous insect acetylcholinesterase precursors. Labels of pedhu, aphgo, anoga, and cultr denote *Pediculus humanus*, *Aphis gossipi*, *Anopheles gambiae*, and *Culex tritaeniorhynchus*, respectively.

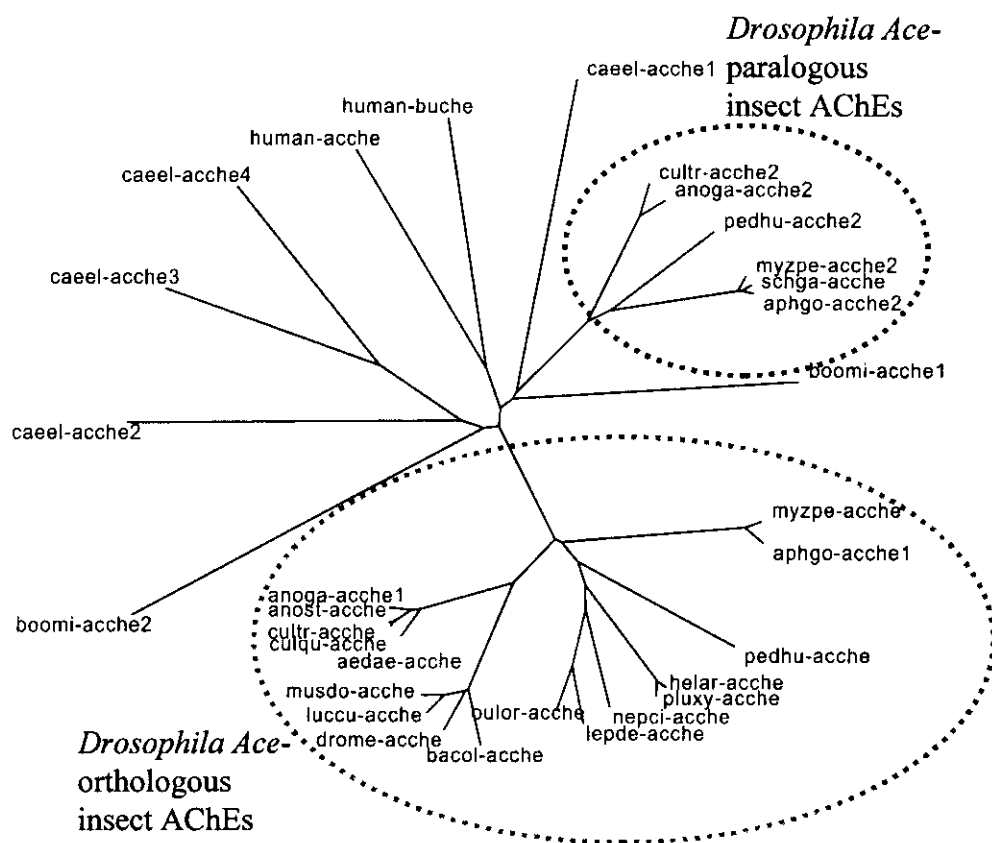


Fig. 4 Molecular phylogenetic tree of cholinesterases

drome, *Drosophila melanogaster*; luccu, *Lucilia cuprina*; musdo, *Musca domestica*; bacol, *Bactrocera oleae*; anoga, *Anopheles stephensi*; anost, *An. stephensi*; cultr, *Culex tritaeniorhynchus*; culqu, *Cx. quinquefasciatus*; aedae, *Aedes aegypti*; oulor, *Oulema oryzae*; lepde, *Leptinotarsa dceclineata*; nepci, *Nephotettix cincticeps*; pluxy, *Plutera xylostera*; helar, *Helicoverpa armigera*; pedhu, *Pediculus humanus*; aphgo, *Aphis gossipi*; myzpe, *Myzus persicae*; schga, *Schizaphis graminum*; boomi, *Boophilus microplus*; caeel, *Caenorhabditis elegans*.



図5 一齡幼虫の吸血風景1
(すぐに血液パッドへ移動)



図6 一齡幼虫の吸血風景2
(脚を固定し、吸血を開始する)

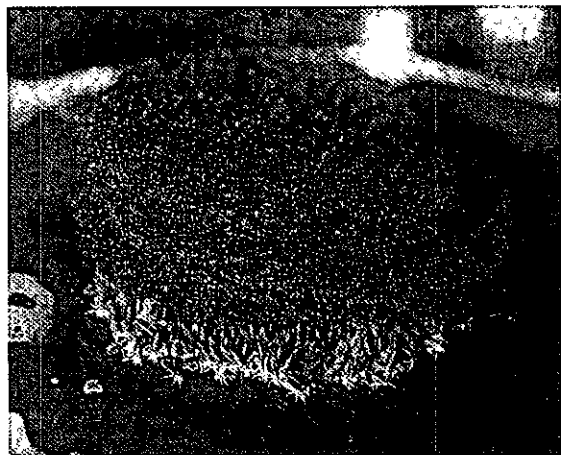


図7 一齡幼虫の吸血風景3
(吸血とともに腹部全体が膨らむ)

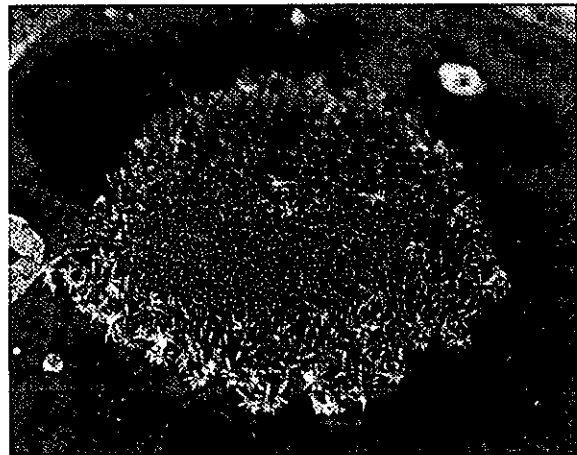


図8 一齡幼虫の吸血風景4
(吸血終盤の様子)



図9 二齡幼虫の吸血風景

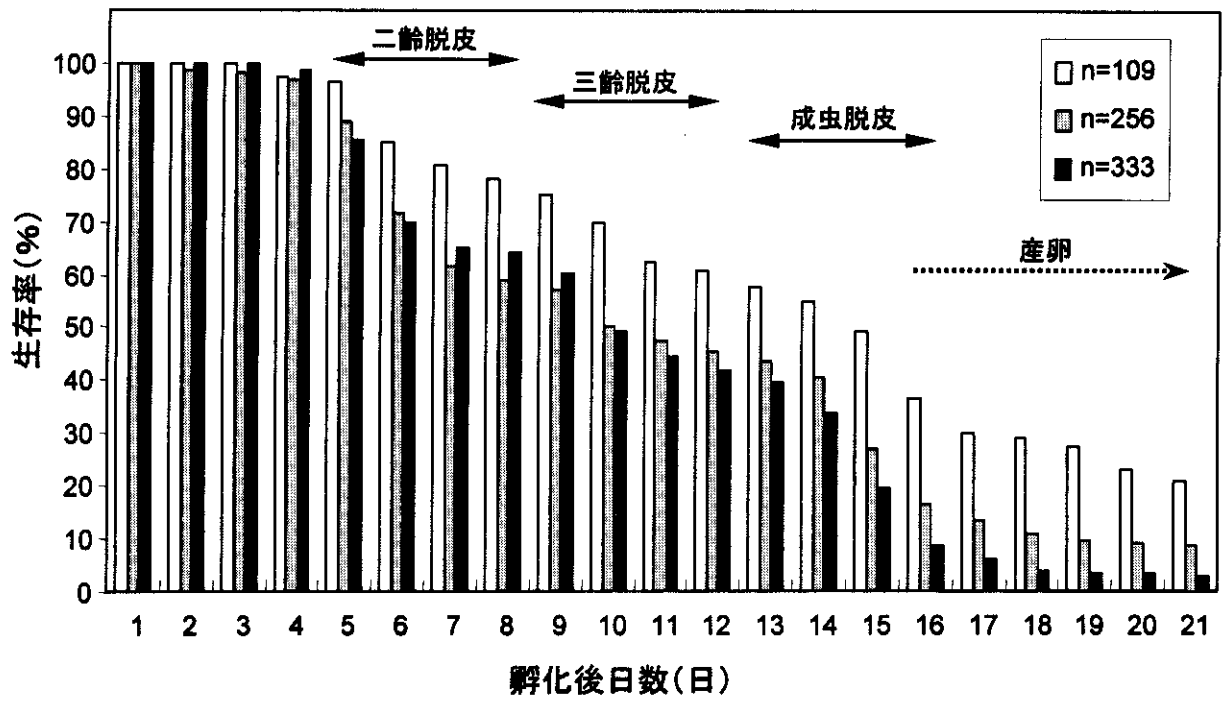


図10 孵化後日数と生存率の関係

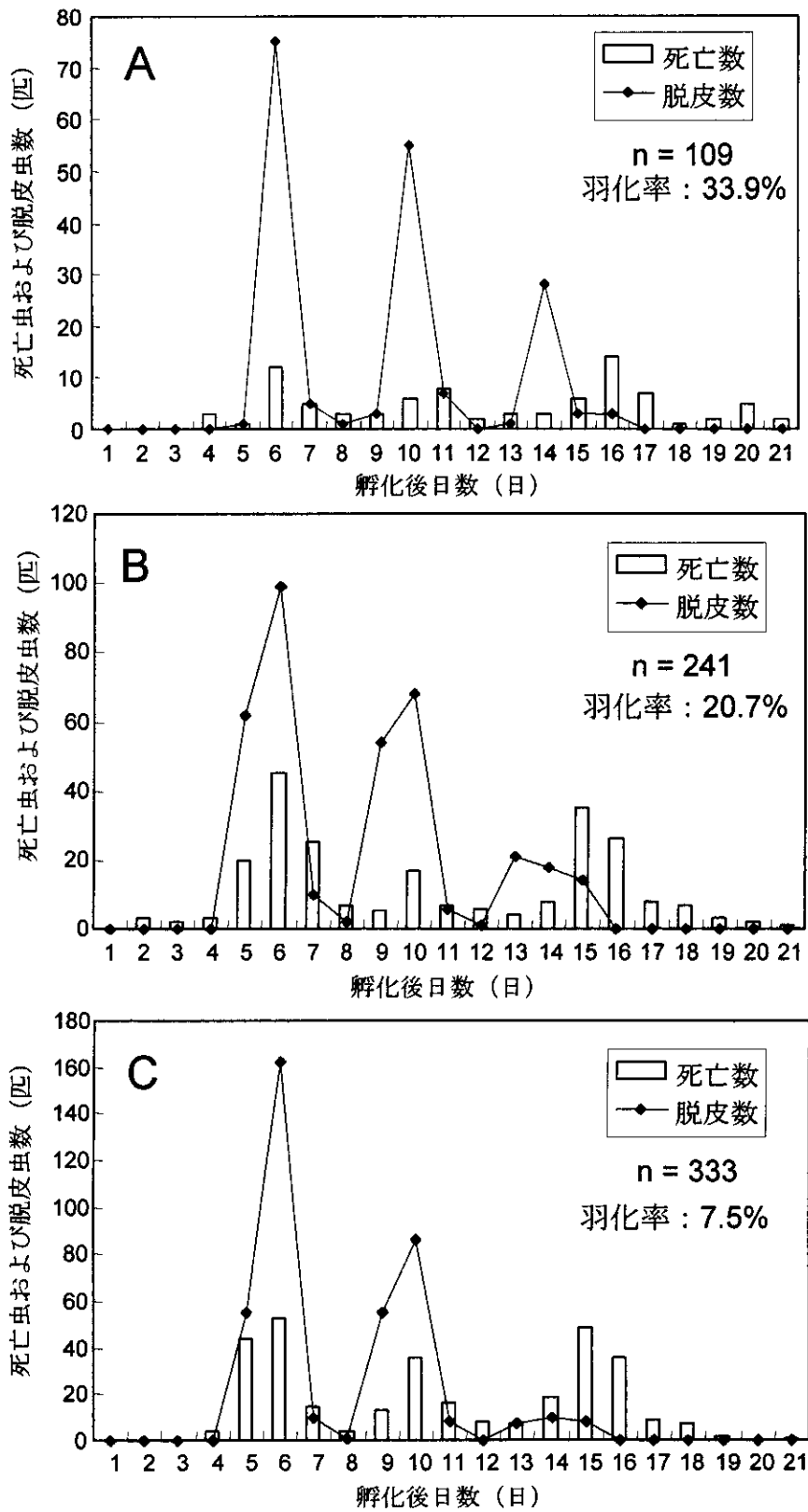


図11 異なる密度条件下におけるコロモジラミの孵化後日数と死亡虫数および脱皮数の関係。 A;小規模飼育(n=109)、 B;中規模飼育(n=241)、 C;大規模飼育(n=333)

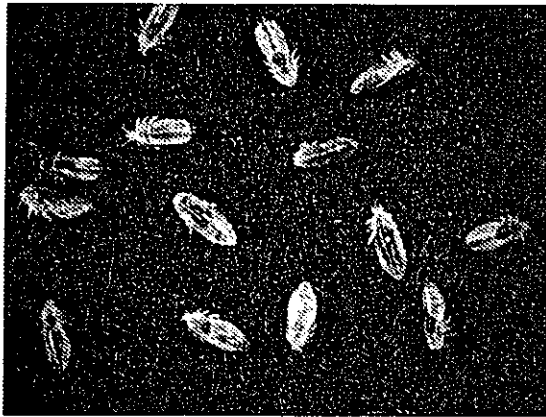


図12 脱皮に失敗した幼虫1

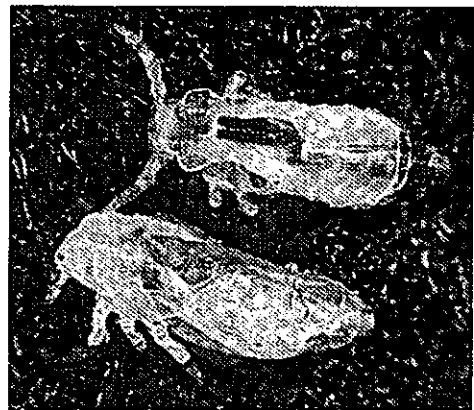


図13 脱皮に失敗した幼虫2



図14 脱皮に失敗した幼虫3

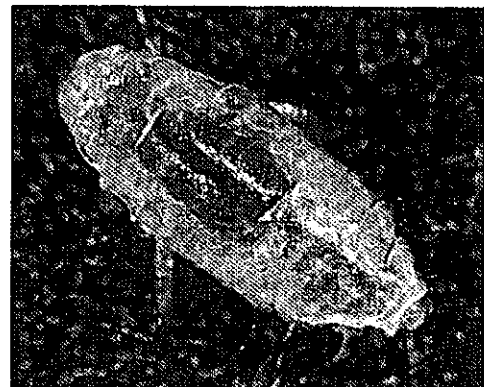


図15 脱皮に失敗した幼虫4

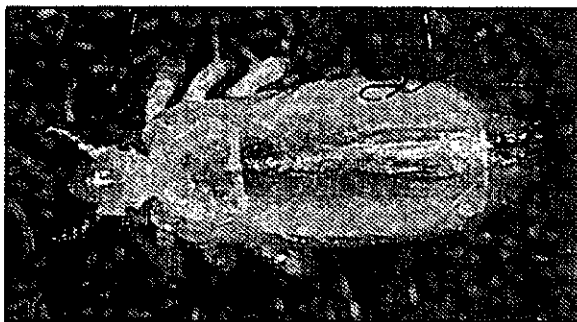


図16 脱皮に失敗した幼虫5



図17 脱皮に失敗した幼虫6

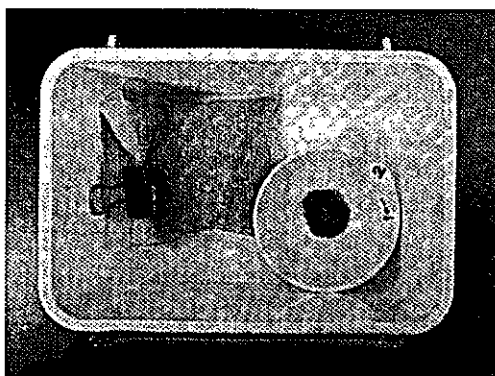


図18 飼育容器

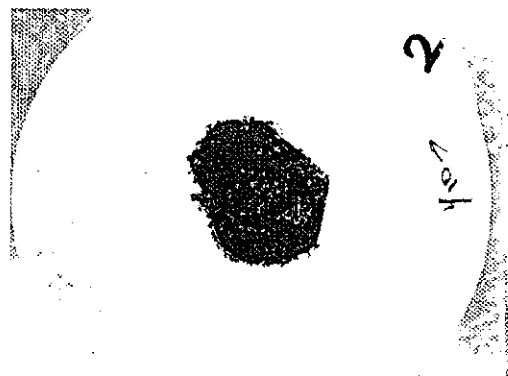


図19 飼育容器中のコロモジラム

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

侵入毒グモの分布拡大・防除に関する研究

分担研究者 吉田 政弘 大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨 セアカゴケグモの分布状況を昨年度に引き続き大阪府内を重点的に調査した。その結果、昨年度よりもさらに大阪北部域に分布を拡大し、ならびに個体数においても増大しつつある事が明らかになった。近隣の兵庫県においても大阪府内と同様に発見当初より分布域を広げている事や、和歌山県でも生息が明らかになった。ハイイロゴケグモに関しては、昨年度に残した沖縄・奄美航路の未調査地の屋久島、種子島、南大東島、宮崎県で新たに確認された。しかしながら、トカラ列島（七島）、小笠原島（父島）では生息確認されなかった。確認された地域は昨年と同様に沖縄、奄美フェリー航路と完全に一致している事が明らかになり、本種の日本における分布拡大は、フェリーで運ばれるコンテナなどの人為的な要因による事が判明した。セアカゴケグモの防除については、物理的、化学的防除にかかわらず一定の期間では極めて有効な手段ではあるが、高温期経過後の秋季には個体数が元の密度に回復する事が確認され、定期的な防除作業の必要性が再確認された。

A) 研究目的

1995年11月に大阪府内で外国からの侵入種である *Latrodectus hasseltii* (セアカゴケグモ) が初めて確認され、ほぼ同時期に三重県四日市市でも確認されてきた。*Latrodectus geometricus* (ハイイロゴケグモ) も同時期に沖縄県、福岡県、大阪府、愛知県、神奈川県、東京都の6都府県で確認された。また沖縄県では *Latrodectus indicus* (ヤエヤマゴケグモ) の生息確認された。日本全体では3種のゴケグモ類が確認された。これらのゴケグモ類は神経毒 α -ラトロトキシンを有し、オーストラリアでは毎年多数（昨年の本研究の成果での情報では年に6000名）の患者発生をみている。これらのことからゴケグモ類の分布の動向および生態的知見を集積し、被害の予防に役だてる。ヤエヤマゴケグモの学名ならびに和名については国立科学博物館の小野展嗣先生と協議した。

B) 研究方法

1) ゴケグモ類の分布調査 *Latrodectus hasseltii* (セアカゴケグモ) については大阪府内に重点的に周年現地調査を行うと共に関係行政機関での情報の提供を受ける。*Latrodectus geometricus* (ハイイロゴケグモ) については、昨年生息確認されている地点以外の、フェリー発着場周辺と空港周辺を野外現地調査を実施し、現時点での分布の概要を把握する。特にセアカゴケグモについては地理情報システム (GIS) により大阪府における分布解析を他の研究者との共同研究者に対して資料を提供する。