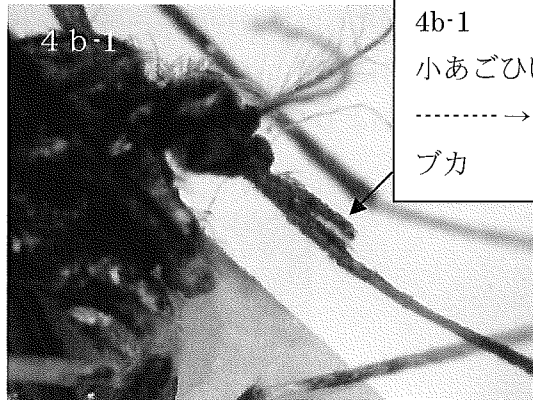
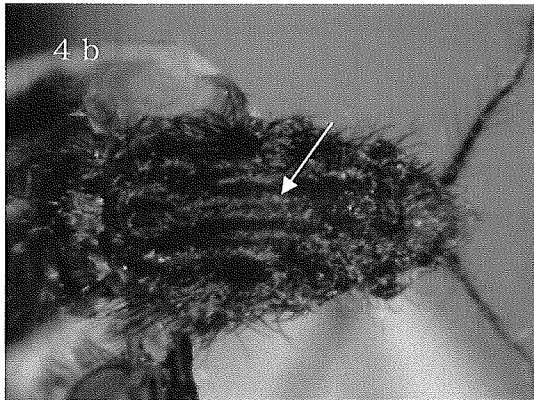
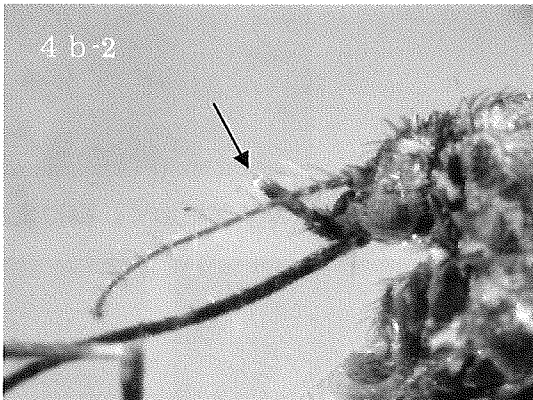


4 b : 背面中央に黒ずんだ黄色ないし黄金色の縦条斑がある。-----→トウゴウヤ  
ブカ、ヤマトヤブカ他

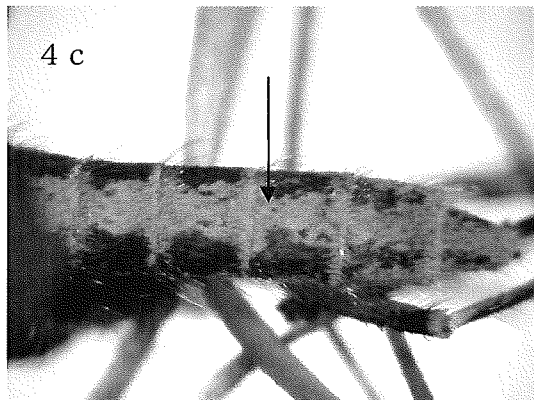
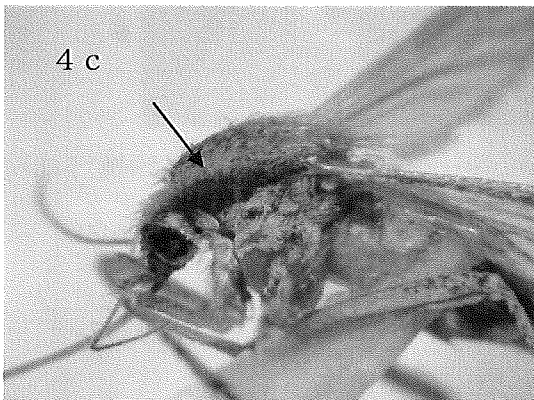


4b-1  
小あごひげは黒い。  
-----→ヤマトヤ  
ブカ

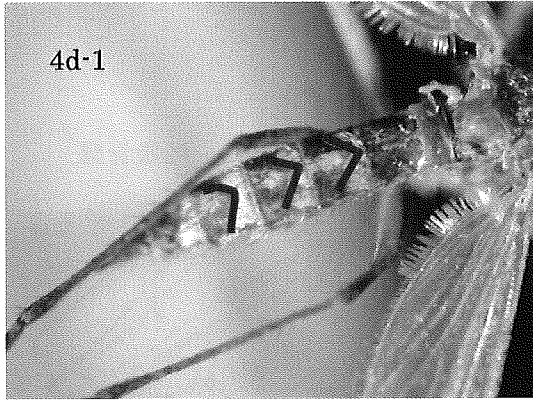


4b-2 小あごひげの先  
端が白い。  
-----→トウゴ  
ウヤブカ

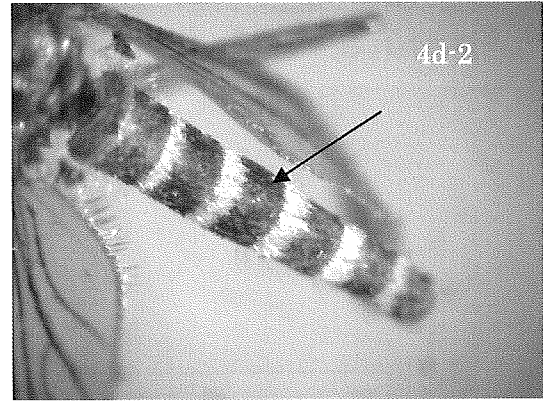
4 c : 胸部背面中央とその両側および肩部に赤褐色縦条斑がある。腹部背板の中央に幅広  
の白色縦線がある。-----→セスジヤブカ



4 d : 胸部背面に縦条線はない。

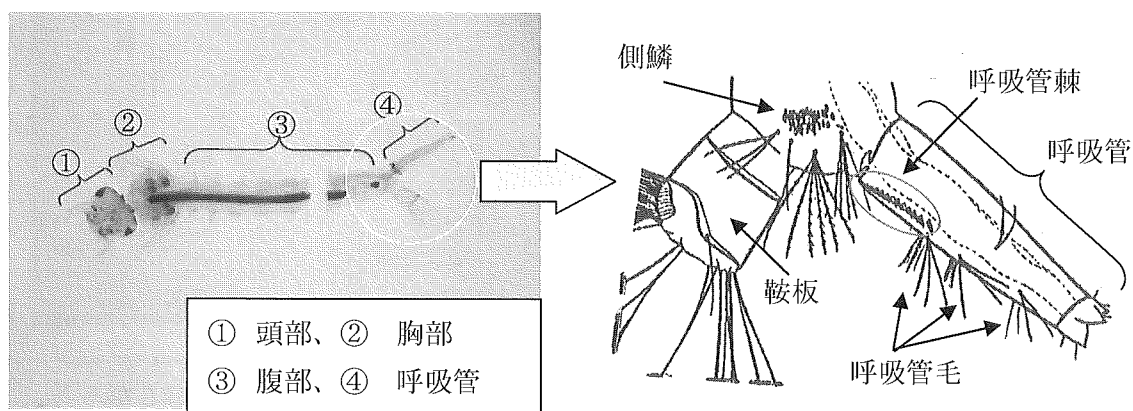


4d-1: 腹部背面 2～7 節に逆 V ないし W 字型横白帯がある。各ふ節の基部に黄白帯がある。-----キンイロヤブカ



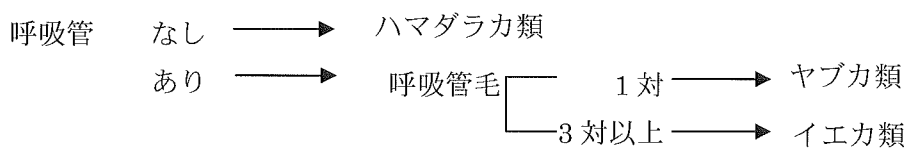
4d-2 : 腹節基部に明瞭な横白帯がある。脚は黒又は褐色、白帯はない。-----アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ

2-2. 幼虫の同定：幼虫の同定には呼吸管、腹部末端節側面の構造、胸部の体毛の形状と長さなどが使われる。



幼虫の体構造を長期に保存し詳しく観察するためにはアルコールで脱水した後、バルサムで封入したスライド標本作製する必要がある。しかしながら、この処理には時間がかかるので、市販されているスライド標本作成液（ネオシガラル液）あるいはホイヤー液を使用すると、70%アルコールに保存したサンプルからそのままスライド標本作製でき効率がよい。この方法で作成した標本は数年経過すると色が黒ずんでくるが、短期間であれば十分同定できる。

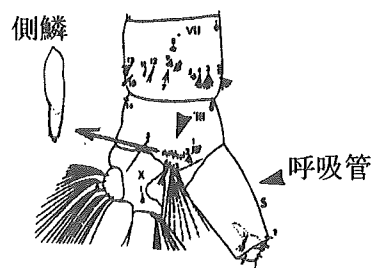
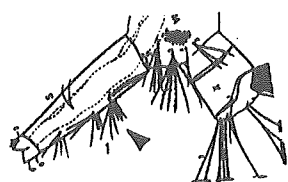
幼虫の呼吸管を観れば、容易にイエカ類、ヤブカ類、ハマダラカ類の3つに分けることができる。まず、ハマダラカ類の幼虫には呼吸管がない。呼吸管に呼吸管毛が1対しかなければヤブカ類の幼虫である。呼吸管が細長く呼吸管毛が3対以上あればイエカ類の幼虫と考えておおよそ間違いはない。



水域によって発生する幼虫の種類は限られている。そこで、以下の10タイプの水域に発生する幼虫の同定について解説する。

- |                      |          |            |
|----------------------|----------|------------|
| 1. 汚水溜・下水溝           | 2. 雨水枡   | 3. 水田・池    |
| 4. 小型人工容器・墓の花立て・古タイヤ | 5. 水がめ   | 6. 竹切り株    |
| 7. 樹洞                | 8. 岩のくぼみ | 9. 動物舎の汚水溜 |
| 10. 汽水性湿地            |          |            |

1. 汚水溜・下水溝 (アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカ、オオクロヤブカ、トラフカクイカ)

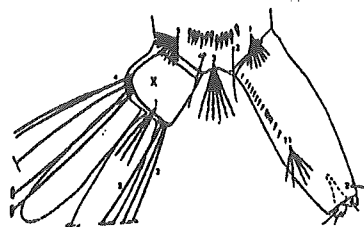


呼吸管は細長く、呼吸管毛は3対以上ある。  
アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカ

呼吸管の長さは、鞍板の長さより短い。捕食性。トラフカクイカ

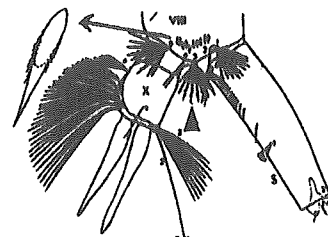
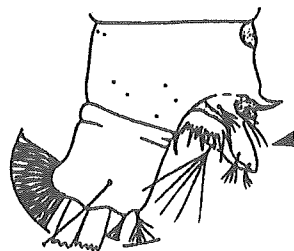
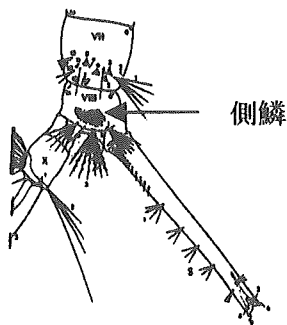
呼吸管は短く、棘を欠く。側鱗の形状は一様。体を小刻みに震わせて泳ぐ。オオクロヤブカ

2. 雨水枡 (アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカ、ヒトスジシマカ、トラフカクイカ)  
アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカ、オオクロヤブカ、トラフカクイカについては、1汚水溜・下水溝を参照。



呼吸管毛は一对。呼吸管棘がある。側鱗は牛角状。  
-----ヒトスジシマカ

3. 水田・池 (コガタアカイエカ、シナハマダラカ、キンイロヤブカ)



呼吸管は細長く、呼吸管毛は4~5対。  
側鱗はしゃもじ形で小さく20~40個がほぼ3列に並ぶ。  
-----コガタアカイエカ  
注) 側鱗が棘状で数が少ないのは他のイエカの仲間。

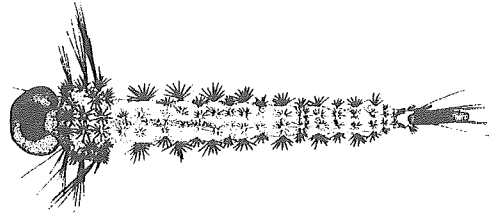
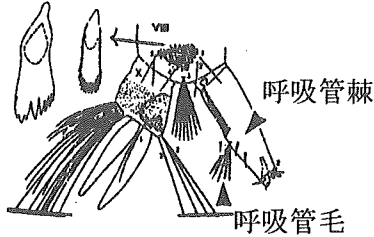
呼吸管がなく、幼虫は水面に平行に浮かぶ。  
-----シナハマダラカ

呼吸管毛は一对。側鱗は牛角状で7から11個がほぼ2列に並ぶ。  
-----キンイロヤブカ

4. 小型人工容器・墓の花立て・古タイヤ (ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、キンパラナガハシカ、アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカ、イエカのなかま)

ヒトスジシマカ、アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカについては1. 汚水溜・下水溝、2. 雨水マスを参照。

側鱗



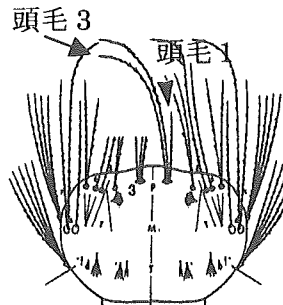
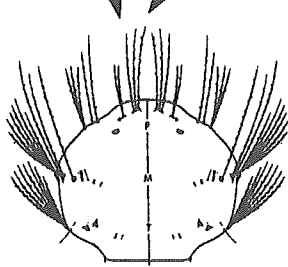
呼吸管毛は一对。呼吸管棘の先端数個は通常離れて存在し、呼吸管毛1対は呼吸管棘列内に生える。側鱗の先端は丸く32~93個が斑をなす。

-----→ヤマトヤブカ

胸部・腹部に真直ぐな太い放射状剛毛を多く生じて毛深い。

-----→キンパラナガハシカ

頭毛3 頭毛1



呼吸管が細長く、呼吸管毛が3対以上あるイエカ属の幼虫が発生することがある。しかし前胸部の第3毛が第1毛より短い場合は、重要な種類ではない。

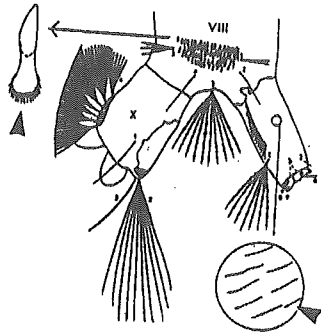
5. 水がめ (ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、イエカのなかま。水質が悪くなるとアカイエカ、ネッタイエカ、オオクロヤブカが発生する。)

幼虫の同定には、1. 汚水溜・下水溝、2. 雨水マス、4. 小型人工容器を参照。

6. 竹切り株、7. 樹洞 (ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカ、キンパラナガハシカ、イエカのなかま)

幼虫の同定には、1. 汚水溜・下水溝、2. 雨水マス、4. 小型人工容器を参照。

8. 岩の窪み (ヤマトヤブカ、イエカのなかま、海岸にある場合、トウゴウヤブカ)



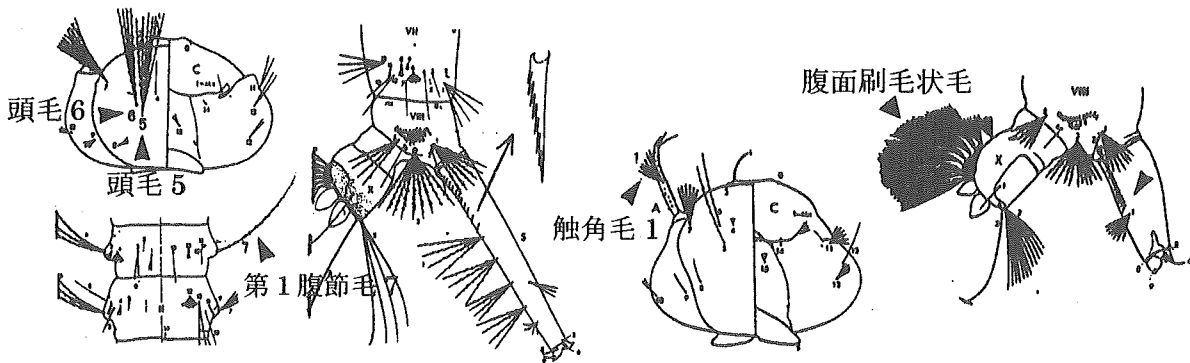
呼吸管毛は1対。呼吸管前面には明瞭な短横線が認められる。側鱗の先端は太まりヒレ状。

-----トウゴウヤブカ

9. 動物舎の汚水溜 (オオクロヤブカ、アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカ)

幼虫の同定には、1. 汚水溜・下水溝、2. 雨水マス、4. 小型人工容器を参照。

10. 汽水性湿地 (ヨツホシイエカ、セスジヤブカ)



頭毛5は5~7分岐、頭毛6は4~6分岐。第1腹節毛7は分岐しない。呼吸管毛は管幅の2倍近い長さのものが4~5対、管幅より短いものが2対。  
ヨツホシイエカ (南日本のみ分布)

腹面刷毛状毛は15房以上、呼吸管毛は1対。呼吸管棘の先端棘は呼吸管基部側45~51%の位置にある。触角毛1は5~12分岐。

-----セスジヤブカ

## 資料 3

### 蚊からのウイルス検出法

WNV はフラビウイルス科フラビウイルス属に属されるが、フラビウイルス属の中でも特に日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マレー溪谷脳炎ウイルス、クンジンウイルスと相同性が高く、抗原的に交叉反応を示す日本脳炎血清型群に分類される。フラビウイルス属のウイルスを蚊から検出する方法としては RT-PCR によるウイルス遺伝子の検出が一般的であるが、近年、ウイルス抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた抗原検査法が WNV に対しても開発され、簡便な検査キット「VecTest<sup>®</sup>」(Medical Analysis System 社) が市販された。本項ではこの 2 種検査法を紹介する。

WNV の取り扱いについて、国立感染症研究所の規定では、ウイルスの増殖を行う場合は P3 (物理的封じ込めレベル 3) の実験施設内で BSL3 (バイオセーフティレベル 3) の取り扱い基準に従い、また、検出のみの場合は P2 の施設で BSL2 の取り扱い基準に従って実施することが規定されているが、本ガイドラインに従って各自治体で検査を行うに当たっては、各自治体で定められた病原体取り扱い基準に従い実施するようにする。

#### 3-1. ウイルス検査を行うべき蚊の種類と検査個体数

米国での調査結果によれば、WNV は 30 種類以上の蚊から検出されている。わが国に生息する蚊の発生量、吸血嗜好性や人との関わりの密接さなどを考えると、わが国で特に注意を要する種類として、アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、キンイロヤブカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカ、シナハマダラカ、セスジヤブカの 11 種類が選ばれるであろう (資料 2 参照)。これらの種類については、常にウイルス検査を行うようにすべきである。

検査された蚊プール数 (50 匹を 1 プールとすることが多い) に対するウイルス陽性プール数の割合は、米国の例では数%から十数%である。従って、約 100 プール (1 プール 50 匹の場合は個体数にして 5000 匹) は調査することが望ましい。蚊の発生消長には明らかな季節変化があるので、発生量が最も多くなる時期 (おおよそ 6 月から 9 月) の個体を用いるのが効率的である。発生量が少なく採集個体数が少ない種類であっても、一ヶ月間の採集個体を集めて、少なくとも一月毎にはウイルス検出を行うようにする。

#### 3-2. 捕集蚊の保存

野外で捕集された蚊は、検査が実施される施設まで搬送され、あるいは一定数の蚊が集まるまでの期間保存されることになるが、WNV の遺伝子が RNA であることから、その間の保存状態によっては RNase などの影響を受けることが予想される。また、抗原タンパクの消化などによってウイルスの検出感度が著しく低下することも考えられる。従って、種の同定、雌雄の選別を行った後はできるだけ早く、ウイルス検査用の雌蚊を  $-80^{\circ}\text{C}$  (なければ  $-20^{\circ}\text{C}$ ) に保管する。

### 3-3. 蚊からの粗抽出液作成

後述 (3-6) するが、RT-PCR は VecTest よりも検出感度に優れている。すなわち、VecTest で陽性であれば間違いなく感染蚊が存在すると言えるが、陰性の場合でも感染蚊が存在しないとは言い難い。従って、VecTest で陰性の場合、その後 RT-PCR で確認することが望ましい。VecTest、RT-PCR 法のどちらも単独で実施することができるが、同じ蚊プールを用いて両検査法を行うことを想定した場合、まず、リン酸緩衝液 (PBS) で蚊を磨砕後遠心して得た上清を粗抽出液として作成しておいた方が便利である。また、蚊虫体を直接検査に用いるよりも判定しやすいきれいな結果が得られる。使用する器具類などは滅菌したものを使う。PBS 粗抽出液の作成は以下のとおりである。

雌蚊 50 匹を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、約 250  $\mu$ l の PBS (1% NaCl, 0.025% KCl, 0.143% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.025% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2) を加えマイクログラインダーを手動で動かし磨砕する。この際、捕集蚊の中に WNV 感染蚊を含むことが予想されるので内容物が溢れ出ないように慎重に行う。十分に磨砕した後 1,000 回転、約 5 分間遠心し、上清を回収する。回収した上清が 200  $\mu$ l に満たない場合は、沈殿物に適当量 (50~100  $\mu$ l) の PBS を加え、ボルテックスした後遠心し再度上清を回収する。回収した上清を加えて最終量約 200  $\mu$ l の粗抽出液とし、その半量 100  $\mu$ l づつをそれぞれの検出法に用いる。粗抽出液を作成後、すぐに検査に用いない場合、あるいは一つの検査法だけに用い、半量を残す場合は、すみやかに -80°C 冷凍庫に保存する。

### 3-4. VecTest による抗原検出法

VecTest は、近年 WNV 検出に対応して米国で開発された抗原検出キットで、操作が非常に簡単で、検査結果が得られるまでの時間が 1 時間以内と非常に短いこと、結果の判定が容易であるなどから米国では広く普及している。しかしながら、キットの値段が高価であること、50 匹中に 1 匹の感染蚊が存在する割合でも陽性判定を得ることは可能であるが、媒介蚊の種によってはウイルスの増殖に差があり、検出可能な濃度まで増えずに反応が弱く出る場合や陰性になる場合もあり、RT-PCR に比べると検出感度はやや劣る短所もある。

#### 3-4-1. VecTest の検査手順

1. 前項 (3-3) で作成した 100  $\mu$ l の PBS 粗抽出液に 1 ml の Grinding Solution を加え軽くピペッティングし混和する。
2. 上記混和液 250  $\mu$ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し、付属のテストストリップをマイクロチューブの中に入れる (液はテストストリップの ↓ ↓ の下の線が浸るくらいである)。
3. このまま約 15~30 分間静置した後、判定を行う。

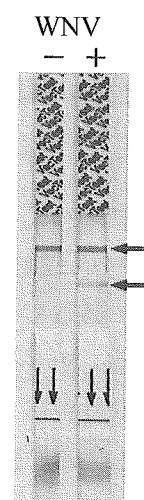


<備考> 蚊虫体を直接 VecTest に用いる場合は以下の手順に従う。

1. 付属のプラスチックチューブに雌蚊 50 匹を入れる。
2. 2.5 ml の Grinding Solution を加え銅製のビーズを 4 個入れる。
3. 付属の蓋をしっかりと締め、高速で約 1 分間ボルテックスし、虫体を磨砕する。  
<補足 1> ここで雌蚊が 50 匹集まらなければ全体的にスケールダウンしても検出はできる。例えば、20 匹の場合は Grinding Solution を 1 ml にしてもよい。  
<補足 2> 蚊の種類によっては比重が軽く液面に浮いてしまい、十分に磨砕できない場合もある。この場合も Grinding Solution の量を少なくすると確実に磨砕できる。50 匹当たり 1 ml でも判定は可能であるが、このような場合を除いては、なるべく用法どおりに実施する事が望ましい。
4. 軽く遠心 (5,000 回転、5 分程度) し、上清 250  $\mu$ l を 1.5 ml マイクロチューブに移し、付属のテストストリップをマイクロチューブの中に入れる。約 15~30 分間静置した後判定を行う。  
<補足 3> 遠心せずに上清のみをチューブに移してその後の判定に用いてもよいが、遠心した上清のみを回収した方がよりきれいな結果が得られる。

### 3-4-2. 結果判定

正しい手順で行えば、15~30 分後には上部から約 1/3 の位置に赤い線が現れる (図 1 上の矢印)。WNV 陽性であればその下に、さらにもう 1 本赤い線が現れてくる (図 1 下の矢印)。つまり、検査した蚊プール 50 匹の中に 1 匹でも WNV 感染蚊がいた場合は赤い線が 2 本、すべての蚊が陰性であればコントロールの 1 本だけが現れることになる。テストストリップを液の中に 30 分以上浸してもバンドが濃くなることはないので、判定は 30 分程度で終了させる。赤い線が薄くて見えにくい場合はテストストリップを室温で乾燥させてから観察すると見やすくなる。WNV は乾燥すると不活化するが、テストストリップの判定は慎重に行う。



(図 1)

### 3-5. RT-PCR による WNV 遺伝子 (RNA) の検出

ウイルス全般に対して行われる一般的な検出法で非常に感度がよく、プライマーセットを選択するだけで WNV 以外のフラビウイルス RNA の検出も可能になることなどからもその汎用性は非常に高い。しかしながら、RNA の抽出から RT-PCR までの手順は非常に複雑で、使用する試薬類ならびに器具類などは多岐にわたり、それらの取り扱いには熟練を要する。ここで用いるペストル、マイクロチューブ、およびチップ類は RNase free のディスプレイタイプにすることが望ましいが、再利用する場合は通常の 2 倍念入りに滅菌されたものを使用することを心がける。

### 3-5-1. 蚊からのウイルス RNA の抽出と精製

ウイルス RNA の抽出に関しては、いくつかのキットが市販されているが（参考資料 1）、ここではその中の High pure viral RNA kit（Roche）を使用した場合の手順を紹介する。ウイルス抽出に関わる試薬類は添付の操作マニュアルに従い、事前に溶解、希釈しておく。

1. 前項（3-3 参照）で得た 100  $\mu$ l の PBS 粗抽出液を 1.5 ml マイクロチューブに入れ、Working solution 200  $\mu$ l を加えピペティングし混和する。ここでウイルス本体は不活化されるが一連の操作は慎重に行う。
2. 回収チューブの上に乗せたフィルターチューブに 300  $\mu$ l の上記混和液を注ぐ。
3. 10,000 回転、15 秒間遠心する。
4. フィルターチューブを新しい回収チューブに連結させ、500  $\mu$ l の Inhibitor removal buffer（Vial.3a）を加え、8,000 回転、1 分間遠心する。
5. フィルターチューブを新しい回収チューブに連結させ、450  $\mu$ l の Wash buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心する。
6. フィルターチューブを新しい回収チューブに連結させ、再度 450  $\mu$ l の Wash buffer を加え、8,000 回転、1 分間遠心する。
7. 回収チューブを外し、空のチューブを連結し、12,000 回転、10 秒の遠心によってサンプル中のアルコールを完全に飛ばす。
8. 回収チューブを捨て、新しい 1.5 ml マイクロチューブにフィルターチューブを入れる。
9. 50  $\mu$ l の Elution buffer（Vial.4）を加え、10,000 回転、1 分間遠心する。
10. 得られた精製 RNA はすぐに使用しない場合は  $-80^{\circ}\text{C}$  冷凍庫で保存する。

### 3-5-2. RT-PCR 用プライマー

エンベロープ（Env）領域と非構造タンパク質（NS3）領域の 2 種類のプライマーがある。前者は WNV 特異的であるが、後者はフラビウイルス全般に反応するもので、検出感度は高いが日本脳炎ウイルスも増幅される。従って NS3 のプライマーによりバンドが得られた場合は、その後の遺伝子解析が必要となる。合成したプライマーは、それぞれ 100 pmol/ $\mu$ l になるように希釈し、マイクロチューブなどに小分けしてそれぞれ  $-20^{\circ}\text{C}$  に保管し、凍結・融解の回数を減らすことに留意する。

プライマーセット 1 : Env 領域
WNNY514 : Cgg CgC CTT CAT ACA CA
WNNY904 : gCC TTT gAA CAg ACg CCA TA
プライマーセット 2 : NS3 領域
Fla-U5004 : ggA ACD TCM ggH TCN CCH AT
Fla-U5457 : gTg AAR TgD gCY TCR TCC AT

### 3-5-3. RT-PCR 反応

逆転写反応と PCR 反応をワンステップで行う簡便な RT-PCR キットが市販されているが

(参考資料 2)、ここでは AccessQuick RT-PCR System (Promega) を用いた方法を紹介する。

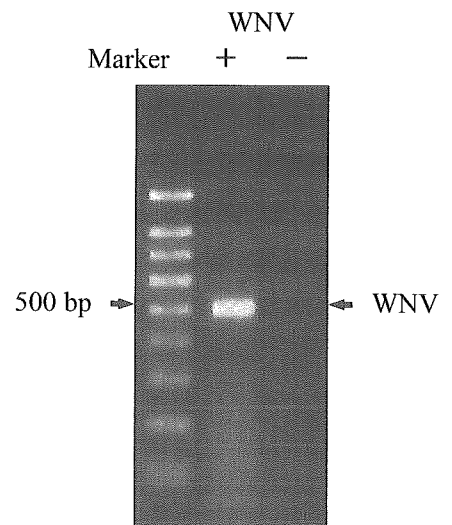
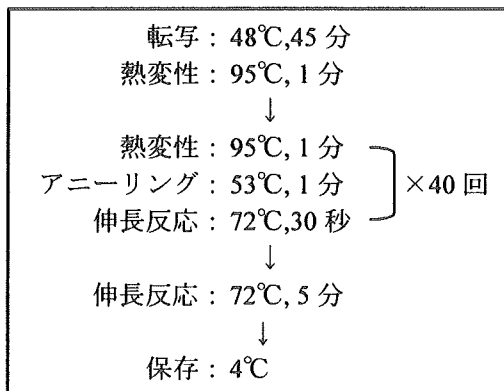
1. 前項 (3-5-1) で精製したウイルス RNA は、逆転写反応・PCR 反応に用いる前に分光光度計によってその RNA 量を測定し、最終濃度  $1.0\text{pg}/\mu\text{l}$ ~ $1.0\mu\text{g}/\mu\text{l}$  に調整する。RNA 溶液  $1\mu\text{l}$  を蒸留水  $500\mu\text{l}$  に加えた場合の RNA 量は以下の式によって簡単に求められる。

$$\text{RNA 量 } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = 1/25 \times \text{OD}_{260} \times 500$$

2.  $0.2\text{ml}$  PCR チューブ内で以下の試薬と溶液を混和する (\*最終産物量を  $25\mu\text{l}$  にしたい場合はすべてを半量にしてもよい)。

	最終濃度
AccessQuick Master Mix(2×)	$25.0\mu\text{l}$ ( $1.0\mu\text{M}$ )
プライマー1 ( $100\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	$0.5\mu\text{l}$ ( $1.0\mu\text{M}$ )
プライマー2 ( $100\text{pmol}/\mu\text{l}$ )	$0.5\mu\text{l}$
RNA テンプレート ( $1\text{pg}$ – $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	$1.0\mu\text{l}$
ANV Reverse Transcriptase	$22.0\mu\text{l}$ (5U)
Nuclease-Free Water(pH7.0)	$25.0\mu\text{l}$
<hr/>	
Total	$50.0\mu\text{l}^*$

### 3. Thermal Cycle Condition



(図 2)

#### 3-5-4. 結果判定

RT-PCR 終了後、反応生成物  $5\mu\text{l}$  を 2% アガロースゲル電気泳動 ( $100\text{V}$ 、約 35 分) を行い、エチジウムブロマイド溶液 ( $10\text{mg}/\text{ml}$ ) に 10~20 分染色し、PCR によって増幅された DNA 断片を確認する (図 2)。エチジウムブロマイドは発ガン性物質なので、取り扱う際には使い捨てのビニール製手袋などを着用し、染色容器も専用の容器を用意する。廃液の処

理は水質汚濁防止法に従って執り行われることが義務づけられているので注意する。

### 3-6. VecTest と RT-PCR の比較

粗抽出液作成以降の必要器材および試薬類、所要時間、検出感度、必要経費などを両者間で比較した。

	VecTest <sup>®</sup>	RT-PCR
必要器材および試薬類 <sup>1)</sup>	検査キット一式 ボルテックス <sup>2)</sup>	RNA 抽出キット ワンステップ RT-PCR キット プライマーセット  PCR 機 電気泳動装置 ゲル染色装置 写真撮影装置
抽出から結果判定までの時間	約 1 時間	約 24 時間
検出可能なウイルスプラーク数	10 <sup>6</sup> PFU/ml <sup>3)</sup> 以上	10 <sup>3</sup> PFU/ml <sup>3)</sup> 以上
蚊 50 匹 1 プールにかかる費用	約 2,000 円	約 1,000 円

1) PBS 粗抽出液を作成する際に用いる、ペストル、マイクロチューブ、マイクロチップ、遠心機などは両検査法に共通しているのでここでは省略した。

2) PBS 粗抽出液を用いる場合は不要になる。

3) 培地上に形成される 1 ml 当たりのウイルスプラーク数。この数字は、1 匹の感染蚊が 10<sup>6</sup> 個、10<sup>3</sup> 個以上のウイルスプラークを持てば、それぞれの検出法で検出されことを示しているが、実際に WNV に感染した (WNV ウイルス血症の) 野鳥から蚊が吸血して感染蚊となり得るには、野鳥体内で 10<sup>5</sup> PFU/ml 以上のウイルス量であれば十分である。

#### <参考資料 1> 市販されている RNA 抽出キット

High pure viral RNA kit	Roche
SepaGene RV-R	三光純薬株式会社
Sepasol RNA I , Sepasol RNA II	ナカライテスク
ISOGEN-LS	日本ジーン社
TRIzol Reagent, TRIzol LS Reagent	Invitrogen

#### <参考資料 2> 市販されているワンステップ RT-PCR キット

AccessQuick RT-PCR	Promega
SuperScript One-Step RT-PCR System	Invitrogen
GeneAmp Gol RNA PCR Kit, GeneAmp EZ-The RNA PCR Kit	Applied Biosystems

## 資料 4

### 殺虫剤感受性試験法

単一の殺虫剤を長期間使用し続ければ、蚊はいずれ抵抗性を発達させることになる。しかし、防除効果が上がらない原因は必ずしも抵抗性の発達によるものとは限らない。蚊の発生数は生息域のわずかな環境変化によって影響を受けるし、また防除すべき発生源が完全に抑えられていない可能性も考えられる。したがって、薬剤による防除効果が上がらない場合には、安易に薬剤を変えることなく、まずは簡単に殺虫試験を行うことで薬剤の効力を判定することが勧められる。ここでは、殺虫剤原体もしくは製剤を用いた薬剤感受性試験法を紹介する。

#### 4-1. レベル判定による薬剤感受性試験法

##### (1) 試験法

診断濃度による浸漬試験

##### (2) 供試虫

供試幼虫群の中から目的種を選定し、さらにこの中から3～4齢幼虫を選ぶ。

##### (3) 手順：

1. 腰高シャーレまたはこれに準ずる容器に水 200mL を入れる。供試虫（老令幼虫）を 20 匹ほど入れた容器を必要数用意する。1 診断濃度の試験は 20 匹 2 区で行い、殺虫剤を加えない対照区を置くことを原則とする（合計 8 試験区）。
2. 供試薬剤と診断濃度（レベル 1～3）を決めた後、表 1 に示した濃度に調製した滴下液（薬剤所定濃度アルコール液又は所定濃度製剤液）を 0.8mL 加えよく攪拌する。昆虫成長制御剤であるピリプロキシフェンを試験する時は、2 週間後の羽化阻止率を観察するため、供試虫の餌としてラット・マウス用固形飼料を 5-10 mg 程度加え、金網蓋をして保存する。これ以外の薬剤は餌を与えず 24 時間後の致死率を観察する。
3. 試験結果から感受性レベルを判定する。

##### (4) 判定

レベル 1 の濃度で 95%以上の致死率が得られる場合は、試験薬剤に対する感受性が高いと判定される。レベル 2 で 50%以下の致死率しか得られない場合は、供試集団は 10 倍以上の抵抗性を有していると判定され、同じくレベル 3 で 50%以下の場合は 100 倍以上の高度の抵抗性を発達させていると考えられる（表 1 参照）。

表1 殺虫剤の感受性試験に用いる薬剤濃度とレベル判定

薬剤名（アカイエカ群の半数致死濃度 ppm <sup>a</sup> ）	薬剤抵抗性診断濃度（ppm <sup>a</sup> ） （滴下液の濃度 <sup>b</sup> ）				
	アカイエカ群の診断基準			ヒトスジシマカの診断基準	
	レベル1	レベル2	レベル3	レベル1	レベル2
Fenitrothion (0.007)	0.03 (7.5)	0.1 (25)	1.0 (250)	0.08 (20)	0.3 (75)
Fenthion (0.002)	0.008 (2.0)	0.03 (7.5)	0.3 (75)	0.03 (7.5)	0.1 (25)
Temefos (0.0008)	0.003 (0.75)	0.01 (2.5)	0.1 (25)	0.015 (3.75)	0.05 (12.5)
Permethrin (0.008)	0.03 (7.5)	0.1 (25)	1.0 (250)	0.015 (3.75)	0.05 (12.5)
Etofenprox (0.01)	0.04 (10)	0.15 (37.5)	1.5 (375)	0.02 (5.0)	0.07 (17.5)
Pyriproxyfen (0.00005)	0.005 (1.25)	0.001 (0.25)	0.01 (2.5)	0.001 (0.25)	0.01 (2.5)

<sup>a</sup> ppm は parts per million の略で、溶媒 1 kg 中に殺虫剤原体が 1 mg 溶けている状態をいう。

<sup>b</sup> 水 250 に対し滴下液 1 の割合で希釈液を調製する。

#### 4-2. 製剤を用いた簡易試験法

ここでは、用法・用量に示された濃度に調製した殺虫剤製剤を用いて行う簡易試験法を、フェニトロチオン乳剤を例に紹介する。

#### 有機リン系殺虫剤フェニトロチオンの乳剤を用いた殺虫試験の例

（殺虫剤製剤の容器上の表示）

〔成分・分量〕 フェニトロチオン 10%

〔用法・用量〕 蚊幼虫に対して：発生場所の水量 1 m<sup>3</sup> につき、本剤の 20 ml（有効成分 2 ppm\*）を適宜水で希釈して散布する。

効力判定は、用法・用量にある濃度（500 倍希釈）で行う。この濃度は、100 ml の水に乳剤が 0.2 ml 溶けている状態である。0.2 ml の乳剤を測り取ることは容易ではないので、実際には試験濃度の 100 倍に調製した殺虫剤（=5 倍希釈溶液）を少量準備し、幼虫の入った 99 ml の水の中に 1 ml の殺虫剤を加えることで調製するのが便利である。

### (1) 準備するもの

- ・ 150 ml 以上のプラスチックコップ
- ・ 100 ml が計れる計量カップ
- ・ ガラスピペット（1 ml と 4 ml が測定できるものなら何でも良い）
- ・ 割り箸（攪拌用）
- ・ スポイト（蚊を計量カップへ移すための）
- ・ 採集した幼虫
- ・ 水（水道水でよい）

### (2) 5 倍希釈液の調製

プラスチックコップ中で水 4 ml と乳剤 1 ml を混合する。

### (3) 試験の手順

1. 上記に従い乳剤の 5 倍希釈液を調製する。
2. 幼虫（10～50 匹）をスポイトなどで吸い採り計量カップに入れ、水で全体量を 100 ml\* にした後、プラスチックコップに移す。十分な数のボウフラが採集できた場合はこれを 2 つ準備する（\*正確には 99 ml であるが、結果に大きく影響しないので、100 ml として問題ない）。
3. 幼虫の入ったプラスチックコップに 5 倍希釈した乳剤を 1 ml 加え、割り箸などで攪拌する。
4. 室温（25℃前後）に置き、24 時間後の生存率を観察する。

### (4) 注意点

- ・ 殺虫剤の取扱いは、説明書に従って安全に行う。
- ・ これは、比較的即効性（24 時間以内）のある殺虫剤の効果判定に有効な方法。スミラブ（ピリプロキシフェン）のように蛹の羽化を阻害するような成長制御剤では即効性が認められにくいので、この方法は適さない。作用機構や剤型に応じた試験を行う必要がある。
- ・ 野外で採集された蚊の幼虫は、齢期にばらつきがあるが、効力判定に大きな影響を与えるものではないため、そろえる必要はない。
- ・ 幼虫の数に余裕がある場合は、用量の 10 倍（=50 倍希釈液）に調製した殺虫剤液でも同時に試験を行うことで、抵抗性の度合いを把握することが出来る。

### (5) お願い

著しい抵抗性の発達が確認された場合には、国立感染症研究所昆虫医科学部第三室（殺虫殺室・03-5285-1147）にご一報をお願いします。全国的な抵抗性発達の実態把握に役立つとともに、抵抗性機構の解明を行うことで、その後の防除に役立つ情報を収集したいと考えています。

## 資料 5

### 殺虫剤抵抗性の発達とその対策

殺虫剤を使い始めた当初は使用書にある用法・用量通りに散布して十分な殺虫効果が得られていたのに、同じ殺虫剤を使い続けていると効果が次第になくなる場合がある。そのような場合は殺虫剤抵抗性が発達したことが疑われる。殺虫剤抵抗性は、殺虫剤の透過、活性化、解毒、排出に関わるタンパク質や殺虫剤の作用点分子をコードする遺伝子に生じた突然変異、およびそれらの遺伝子発現を調節する遺伝子に生じた突然変異によりもたらされる遺伝的な現象である。抵抗性遺伝子をもつ個体が殺虫剤散布を施された環境のもとでより多く生き残り、同じ抵抗性遺伝子をもつ子孫の割合が次第に増してゆき、昆虫集団に抵抗性が発達する。高度な抵抗性が発達する場合には、しばしば、異なる遺伝子座に属する複数の抵抗性遺伝子が集団内に蓄積されている。

#### 5-1. 殺虫剤抵抗性の事例

**事例 1:** チカイエカの Shinjuku コロニーは 1988 年東京都新宿区内のビルの地下汚水槽 C での採集に由来する有機りん剤抵抗性コロニーであり、多くの有機りん剤に対して約 100 倍またはそれを超える抵抗性を示す (表 1)。おもな抵抗性要因はカルボキシルエステラーゼの活性増大にある。同時期に同ビルの隔離された殺虫剤を散布していない汚水槽 A、散布がもっとも徹底して行われた汚水槽 C、散布歴が汚水槽 C には及ばない汚水槽 B の間で、各有機りん剤に対する抵抗性比を比較したところ、もっとも抵抗性の発達が著しいクロルピリフォス-メチルに対して、汚水槽 A, B, C コロニーの順に、22 倍、170 倍、690 倍であった。

**事例 2:** 成田空港内の空港駅地下汚水槽と滑走路周辺雨水枡でそれぞれ採取したチカイエカとアカイ

表 1. チカイエカの殺虫剤抵抗性

殺虫剤	LC <sub>50</sub> (ppm)		抵抗性比
	感受性系統	Shinjukuコロニー	
有機りん剤			
フェニトロチオン	0.01	1	100
フェンチオン	0.0067	1.1	160
マラチオン	0.03	10	340
ダイアジノン	0.032	1.2	36
ジクロロボス	0.014	1.3	91
テメフォス	0.0008	0.17	210
クロルピリフォスメチル	0.0083	5.7	690
クロルピリフォスエチル	0.0002	0.028	160
プロペタンフォス	0.017	3.3	190
プロチオフォス	0.058	0.49	8.4
カーバメイト剤			
プロポクスル	0.39	0.73	1.8
ピレスロイド剤			
ペルメトリン	0.0095	0.14	15
フェノトリン	0.0087	0.28	32

川上 (1989) より改変。



エカの F<sub>1</sub> コロニーを用いて殺虫剤の感受性レベルを試験した (表 2)。テメフォス、ペルメトリン、ピリプロキシフェンの異なる種類の殺虫剤に対して、チカイエカは約 30 倍の中度の抵抗性比を示したが、アカイエカには防除上大きな問題となる感受性の低下は認められなかった。

表 2. 成田空港施設内で採集したアカイエカ種群コロニーの殺虫剤感受性

殺虫剤	LC <sub>50</sub> (ppm)		抵抗性比	LC <sub>50</sub> (ppm)		抵抗性比
	感受性系統	チカイエカコロニー		感受性系統	アカイエカコロニー	
有機りん剤						
フェニトロチオン	0.007	0.042	6	0.007	0.063	9
テメフォス	0.0008	0.0064	8	0.0008	0.024	30
ピレスロイド剤						
ペルメトリン	0.008	0.008	1	0.008	0.28	35
昆虫成長抑制剤						
ピリプロキシフェン	0.0001	0.0001	1	0.0001	0.0028	28

水谷ら (2001) より改変。

## 5-2. 抵抗性に関する問題点

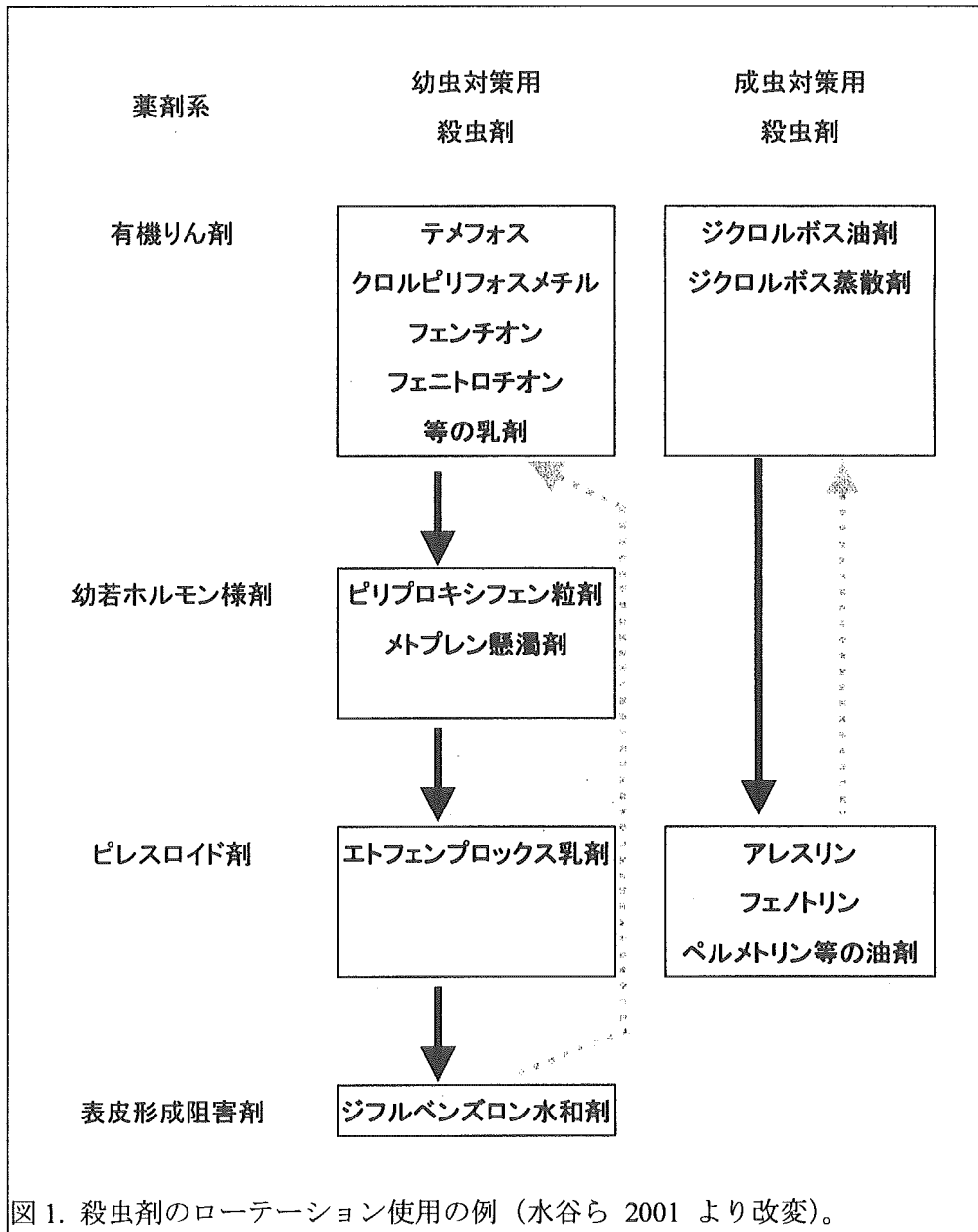
アカイエカ種群のチカイエカとアカイエカのうち、ビルの地下汚水槽など地表からやや隔たった環境に多く生息するのはチカイエカの幼虫である。ビル管理法の規定により、建築物の管理者は年に 2 回以上定期的に害虫類を防除しなければならないため、アカイエカに比べチカイエカは殺虫剤抵抗性がより早く発達しやすいと考えられる。わが国のチカイエカ集団では、有機りん系殺虫剤に対する抵抗性が発達しつつあり、殺虫剤の有効性についてとくに注意を払う必要がある。国内外におけるイエカ属とヤブカ属の蚊については、Medline データベースを検索する限り、現時点では、幼若ホルモン様剤および表皮形成阻害剤に対する顕著な抵抗性の発達に関して報告例がない。

ヒトスジシマカはこれまで国内では防疫用殺虫剤による一貫した防除を受けることはまれであった。そのため、ヒトスジシマカはアカイエカに比較して、現時点では幼虫防除に際して抵抗性の問題が小さいものと考えられる。

## 5-3. 殺虫剤抵抗性蚊の対策

殺虫剤の使用書にある用法・用量は防除対象昆虫への殺虫効果だけではなく、人への安全性と生物環境の保全をも考慮して決められており、それを守って使わなければならない。したがって、殺虫効果を上げるために規定の用量を超えて散布することは差し控えねばならない。抵抗性発達の疑いがあれば、その場に生息していた昆虫コロニーを用いて室内で

殺虫剤の簡易効力試験を行い、抵抗性が認められた場合には、抵抗性昆虫にも有効性が期待される同じ薬剤系の別の殺虫剤、または作用点の全く異なる他の薬剤系の殺虫剤に切り替えるべきである。現在使用している殺虫剤の効力をより永く維持する目的で、顕著な抵抗性が発達する前に使用する殺虫剤を換えて、ローテーションを考えて使用してゆくことが勧められる。その例を図1に示す。



## 資料 6

### 調査結果記入法

サーベイランスの結果は、他地域との情報交換や長期間のデータの蓄積を考慮し、同じ様式の調査票（記録用紙）にまとめて保管する。幼虫発生源調査、成虫調査およびウイルス検出用サンプルの記録用紙の例を以下に示す。

調査票の住所は、数値地図などを利用したコンピューターソフトによって場所の特定ができるように、できるだけ詳しく記録しておくことよい。記録内容はすべてコンピューターに入力し、必要に応じて担当地域の現状を的確に把握できるよう努める。

通番号	幼虫発生源調査票				
採集地名	採集年月日		採集者		
住 所	採集方法：				
周囲の状況	住宅地、公園、農村、水田地帯、その他（ ）				
発生場所（○をつける）	汚水溜・下水溝、雨水マス、水田・池、小型人工容器・墓の花立て・古タイヤ、水がめ、竹切り株、樹洞、岩の窪み、動物舎の汚水溜、汽水性湿地、その他（ ）				
発生水域の状況	大きさや数：				
種 類	個体数		種 類	個体数	
防除対策： 実施せず 実施した					
対策の内容：					
対策の効果：実施前の幼虫発生密度（ ）					
実施後の幼虫発生密度（ ） 判定日					
備考：					

通番号	成虫調査票				
採集場所	採集年月日	採集者			
住所					
採集方法	採集時刻	時～	時		
周囲の状況	住宅地、公園、農村、水田地帯、その他（ ）				
種類	個体数	種類	個体数		
成虫対策： 実施せず 実施した 対策の内容：  対策の効果：実施前の成虫捕獲数（ ） 実施後の成虫捕獲数（ ） 判定日 備考：					

通番号	ウイルス検出用プール記録用紙					
記入年月日	記録者					
採集場所*	プール番号	採集日	蚊の種類	蚊数	陽性/陰性	試験日

\*採集場所名は成虫調査票の記録と合わせる。