

キンイロヤブカやコガタアカイエカの幼虫は園内の池や湿地、オオクロヤブカの幼虫は有機質の多い水域に好んで生息する種である。デング熱ウイルスや WNV の媒介蚊として知られているヒトスジシマカや、マラリア媒介蚊であるシナハマダラカ *Anopheles sinensis* も捕獲された。7 月下旬から 11 月までの調査期間において、最も多くの蚊が捕獲されたのは 9 月であった。WNV は嘉手納町役場や子供未来ゾーンで採れた蚊からは検出されなかった。

市街地での蚊の調査は 5 家庭で行ったが、最も多いところでも 14 回の調査で 51 個体であった。4 家庭では、ネッタイエカとヒトスジシマカの 2 種のみであった。1 家庭から 2 種に加え、コガタアカイエカが 1 個体だけ採集された。WNV はいずれの家庭の蚊からも検出されなかった。沖縄の市街地での捕獲蚊が他の地域(大阪、東京、千葉、神奈川、富山)に比べてかなり少ない。當間ら (1978) は沖縄県那覇市でネッタイエカの調査をしているが、個体数は 5 月に最大のピークを示している。今回の結果で蚊の発生消長がはっきりみることが出来なかったのは、調査開始時期が遅く、すでに発生の第一のピークが過ぎていたと考える。来年度は速い時期に調査を開始し、いつ頃が蚊の発生のピークになるのか明らかにしたい。

蚊の捕獲方法については、同じ条件で比較したデータがあまりない。今回は、多くの蚊の種類や個体数が得られる西表島で、ライトトラップの 2 種類とドライアイスの有り、無しで 4 通りで、捕獲法

の違いによる雌蚊、雄蚊、全個体数、蚊の種類数を比較した。比較は林内と住宅地の 2 地域で行った。その結果、林内のトラップに誘引された蚊の種類数は住宅地より明らかに多かったが、いずれの地域においても、従来から使用されているライトトラップにドライアイスを用いたほうが、雌蚊、雄蚊、全個体数、蚊の種類数いずれも多い傾向を示したが、統計的な差はみられなかった。これらの結果から、最近使用されはじめているドライアイストラップも蚊の採集に有効であるといえる。

これまで使用されているライトトラップを用いて人里離れた森林内で蚊を捕獲する場合には、発電機が必要である。発電機は重く、調査地までの運搬にかなりの労力を要する。また、終夜採集を行う時には、途中でガソリンの補給も必要である。深夜の作業は大変であり、人的なエネルギーの損出は多大である。その点、ドライアイスライトトラップは電池で行えるため、電気のない所でも気軽に行え、どこまでも簡単に運べ、終日採集も容易に行うことができる。特に、電源の無い地域での調査には、ドライアイスライトトラップ法は威力を発揮する。

E. 結論

沖縄県の米軍の空港周辺と市街地における媒介蚊調査を行い、WNV の検出を試みた結果、嘉手納飛行場に隣接する嘉手納町役場では蚊の発生数は少なく、1.2km 離れた沖縄子供未来ゾーンでは蚊の発生が多かった。沖縄子供未来ゾーンでは、調査した期間の中では、9 月に個

体数が多くなり、大動物嗜好性が高く、池や湿地に幼虫が発生する種が多いことが明らかになった。市街地では発生個体数はかなり少なかった。捕獲蚊はヒトスジシマカとネッタイエカの2種がほとんどで、全捕獲数の99.4%を占めた。

蚊の捕獲方法の検討については、西表島で行った。ライトトラップの2種類とドライアイスの有り、無しの4通りで、捕獲法の違いによる蚊個体数、種類数を比較した。その結果、林内、住宅のいずれの地域においても、従来から使用されているライトトラップにドライアイスを併用したほうが、雌蚊、雄蚊、全個体数、蚊の種類数いずれも多い傾向を示したが、統計的な差はみられなかった。これらの結果から、最近使用されはじめているドライアイストラップは亜熱帯環境下の沖縄でも蚊の採集に有効であり、特に、電源のない地域ではその威力を発揮することが明らかになった。

F. 健康危険情報

今回空港周辺や市街地で、蚊を捕獲したが、それらの個体からは、WNVは検出されず、現在、沖縄県において健康危険の情報はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

當間孝子(2003)：地球温暖化と蚊媒介性感染症デング熱，西ナイル熱とマラリア。公衆衛生, 67:296-300.

Higa, Y., Toma, T., Saita, S., Takei, A., Miyagi, I. (2003): Laboratory rearing

method of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) from Ishigaki Island, the Ryukyu Archipelago, Japan. Med. Entomol. Zool., 54: 257-266.

Toma, T., Miyagi, I., Murakami, H., Nerome, H., Yonamine, M., Higa, Y., Tokuyama, Y. (2003): Distribution and seasonal prevalence of *Anopheles minimus* Theobald (Diptera: Culicidae) in the Yaeyama Island group (except Ishigaki Island), Ryukyu Archipelago, Japan, 1999-2000. Med. Entomol. Zool., 54: 267-274.

Toma, T., Miyagi, I. (2003). *Armigeres (Armigeres) laoensis* sp. nov. (Diptera: Culicidae) from Khammouane Province, Lao PDR. Med. Entomol. Zool., 54: 169-172.

Miyagi, I. Toma, T., Higa, Y. (2004). A new species of *Mimomyia (Ingramia)* from Indonesia (Diptera: Culicidae). Med. Entomol. Zool., 55: (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 嘉手納町役場における蚊採集結果
(7月24日～11月27日、採集32回)

種 類	♀数	♂数	計
<i>Ae. albopictus</i>	1	0	1
<i>Ae. v. nipponii</i>	3	0	3
<i>Ar. subalbatus</i>	0	1	1
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	2	1	3
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	5	0	5
合 計	11	2	13

表 2 沖縄子供未来ゾーンにおける採集蚊種
(7月24日～11月27日、採集33回)

種 類	♀数	♂数	計
<i>An. sinensis</i> g.	16	1	17
<i>Ae. albopictus</i>	71	27	98
<i>Ae. (Stg.) g.</i>	5	1	6
<i>Ae. v. nipponii</i>	328	0	328
<i>Ar. subalbatus</i>	146	134	280
<i>Ma. uniformis</i>	0	1	1
<i>Cx. quinquefasciatus</i>	24	11	35
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	645	11	656
<i>Cx. vishunui</i> subg.	36	1	37
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>	6	1	7
<i>Cx. (Cux) sp.</i>	4	5	9
<i>Ur. n. ryukyuana</i>	1	2	3
<i>Ur. annandalei</i>	1	0	1
<i>Mi. luzonensis</i>	6	0	6
unknown	0	1	1
合 計	1289	196	1485

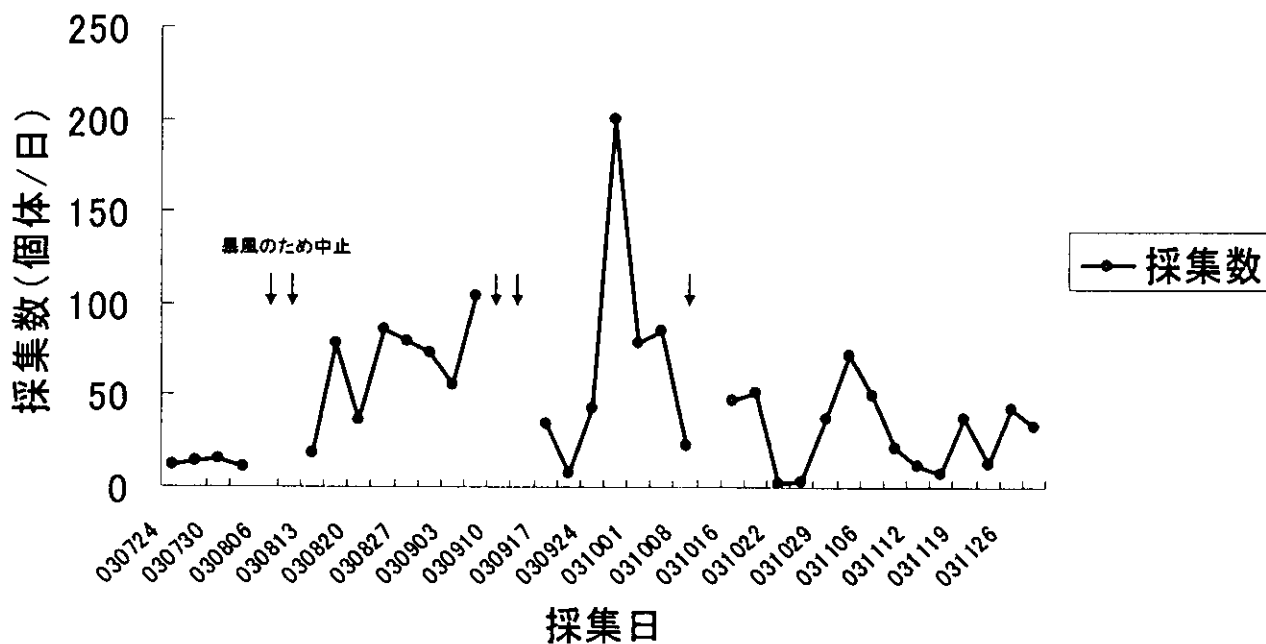
表3 沖縄県市街地でのライトトラップ、ドライアイス併用法による蚊採集結果
(平成15年7月下旬～11月)

場所	方法	採集回数	個体数			合計
			ネッタイエカ(♂)	ヒトスジシマカ(♂)	他	
那覇市						
YH	ドライアイスライトトラップ	14	30(3)	21(12)		51(15)
YT	ドライアイスライトトラップ	13	23(2)	10(4)		33(6)
TT	ライトトラップ+DI	12	6(2)	19(6)	1(0)*	26(8)
浦添市						
TM	ドライアイスライトトラップ	13	6(0)	30(8)		36(8)
西原町						
IM	ライトトラップ+DI	12	0(0)	29(6)		29(6)

*コガタアカイエカ

DI:ドライアイス

図1 子供未来ゾーンにおける蚊採集結果(2003年7月～11月)



那覇市(TT)

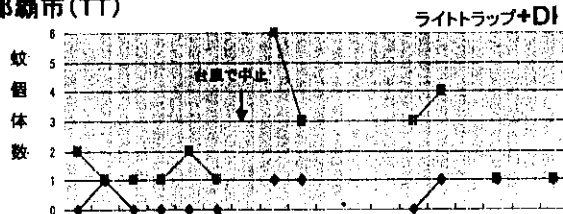
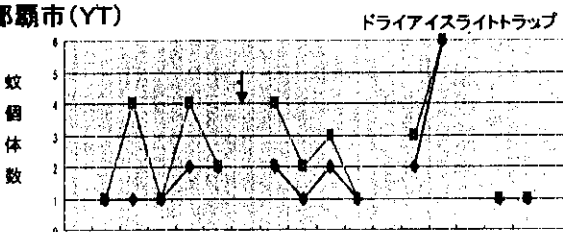


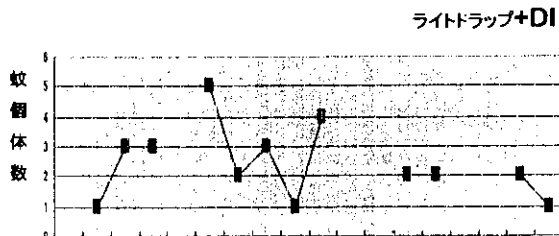
図2ライトトラップ、ドライアイス併用による市街地での蚊採集結果

(2003年7月下旬～11月)

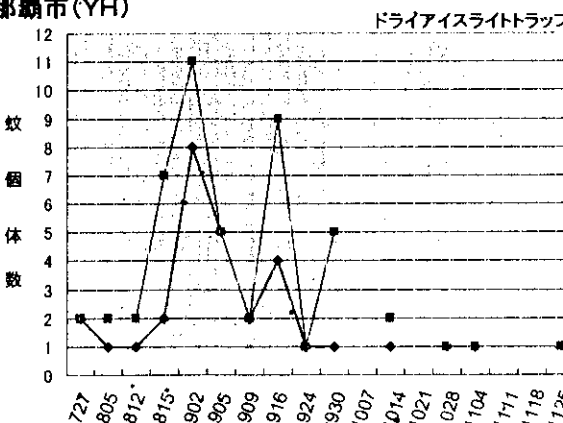
那覇市(YT)



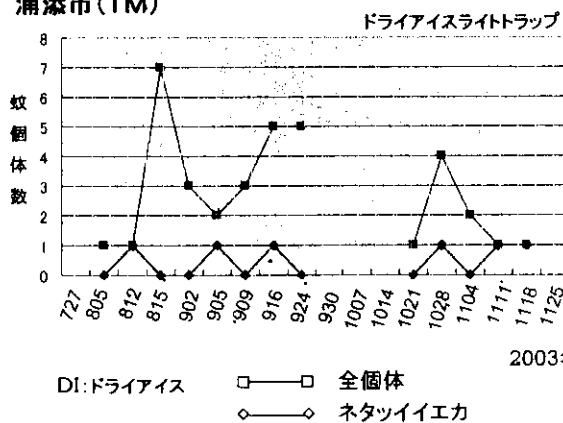
西原町(IM)



那覇市(YH)



浦添市(TM)



DI:ドライアイス □ 全個体 ◇ ネットツイエカ

2003年

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
研究報告書

ウエストナイルウイルス媒介蚊の殺虫剤感受性調査および抵抗性簡易検出法の確立

分担研究者 富田 隆史 国立感染症研究所昆虫医科学部室長
協力研究者 葛西 真治 国立感染症研究所昆虫医科学部主任研究官
津田 良夫 国立感染症研究所昆虫医科学部室長
石川 剛 シェル商事(株)
正野 俊夫 国立感染症研究所昆虫医科学部客員研究員

わが国にウエストナイルウイルスが侵入した際に市街地において最も重要な媒介蚊となる可能性のあるヒトスジシマカとアカイエカ種群蚊について、殺虫剤に対する感受性レベルならびに抵抗性機構の推定を行い、殺虫剤抵抗性に関連づけられる作用点遺伝子の構造変化を解析した。2003年におもに首都圏の市街地で採取したヒトスジシマカの10コロニーおよびアカイエカとチカイエカの合わせて15のコロニーについて、有機りん系殺虫剤のフェニトロチオンとテメフォス、ピレスロイド系のエトフェンプロックス、昆虫成長抑制剤のディミリンとピリプロキシフェンを使い、幼虫の殺虫剤感受性試験を行った。アカイエカ種群蚊に関しては、エトフェンプロックスを除いた各殺虫剤では、同一の殺虫剤を唯一の有効成分として含む製剤の用法用量に定められている有効成分の濃度以下で有効性を確認した。エトフェンプロックスを用いた試験では、8コロニーが感受性対照系統の示すLC99の100倍濃度における死亡率が90%以下であり、中でも、チカイエカの渋谷コロニーは、20%を下回る死亡率であり、著しい感受性低下を示した。アカイエカ種群の蚊集団に対してはエトフェンプロックスの効力が低下していると推測される。渋谷コロニーとアカイエカ林試の森コロニーの蚊に関しては、主要なエトフェンプロックス抵抗性要因として、チトクロムP450酸化酵素による解毒作用の増大のほか、ピレスロイド系殺虫剤の作用点であるナトリウムチャンネルの構造変化による殺虫剤感受性低下が含まれていた。渋谷コロニーを含む2つのチカイエカコロニーの蚊からは、ナトリウムチャンネルのドメインII-膜貫通セグメント6にLeu999Phe置換をもつ典型的なノックダウン抵抗性(knock down resistance: *kdr*)型遺伝子が、また、林試の森コロニーを含む6つのアカイエカコロニーの蚊からは、同座位の異なる置換にあたるLeu999Ser置換をもつ*kdr*様遺伝子が、それぞれ、日本産のアカイエカ種群蚊から初めて同定された。アカイエカ種群蚊では、ピレスロイド作用点低感受性型変異をもたらす点突然変異を分子診断することがピレスロイド剤抵抗性の検出に有効であるといえる。一方、ヒトスジシマカに関しては、各種殺虫剤の用法用量内の濃度で使用して著しい効力低下をきたす殺虫剤は確認できなかった。

A. 研究目的

1999年に米国で勃発し、その後全米に感染の分布を拡大し2003年も終息の兆しがみえないウエストナイル熱(WNF)の対策として、米国ではウエストナイルウイルス(WNV)媒介蚊の化学的防除が行われており、幼虫または成虫対策用として、有機りん系・ピレスロイド系殺虫剤、昆虫成長抑制剤(IGR)、およびBti剤(バチラス菌内毒素またはその産生菌)の使用が防除指針に掲げられ使用されている。さまざまなWNF調査研究活動に関する全米会議が、WNF勃発年の翌年から毎年開催されているが、米国でWNV媒介蚊対策として行われている大規模かつ持続的な化学的防除がもたらした蚊種集団への遺伝学的影響は調査研究の対象となっているとはいえない。WNVの主要媒介蚊の一つであるアカイエカ種群蚊のトビイロイエカ、アカイエカ、チカイエカ、およびネツタイエカは亜寒帯から熱帯にかけて世界的に分布している。世界的にみてまだ一部の地域に限られた現象ではあるが、米国の防除指針に掲げられている各種の殺虫剤(またはそれと同系の薬剤)に対して、殺虫剤作用点の感受性低下または解毒活性の亢進(または活性化の後退)などに起因する抵抗性の出現が確認されており、一部の抵抗性分子機構も解明されている。

わが国の市街地環境でヒトを吸血するおもな蚊種はアカイエカ種群のアカイエカ(*Culex pipiens pallens*)とチカイエカ(*Cx. p. molestus*)、ならびにヒトスジシマカ(*Aedes albopictus*)である。アカイエカとチカイエカの発生源は、それぞれ、側溝や雨水ますの水たまりおよび建築物地下の空間にできた水たまりや汚水槽である。両種の形態学的形質の差異は不明瞭で、両種の吸血嗜好性や行動範囲の違い、集団の隔離の度合いは十分研究されていない。最初の

産卵が未吸血で行えるチカイエカは地下汚水槽などのように閉ざされた空間で継代を重ねることが可能であり、ビル管理法に対応して防除の対象になり、幼虫の駆除には有機りん系、ピレスロイド系、昆虫成長抑制剤に分類される殺虫剤が使われている。家屋に侵入した成虫蚊対策にはピレスロイド系殺虫剤を有効成分とするスプレー缶、蚊取り線香、電気蚊取りが用いられている。ヒトスジシマカのおもな発生源は野外に放置された容器、古タイヤ、竹切り株などの小さな水たまりであり、アカイエカ種群蚊に比べるとヒトスジシマカは体系だった化学的防除を受けているとはいえないが、ヒトスジシマカがアカイエカの発生源所に同棲していたり墓石に発生する場合は、幼虫を対象として化学的防除を施されることもある。日本産アカイエカ種群蚊とヒトスジシマカの各種殺虫剤系についての感受性レベルの現状に関しては調査・研究報告例がほとんどないのが現状である。WNV侵入時にベクター対策としてわが国で同様な化学的防除措置がとられる際に備えて、現時点で有効な薬剤または将来殺虫剤抵抗性が急激に発達するおそれのある薬剤を把握しておく必要がある。

害虫種の野外コロニーに関する殺虫剤の有効性は、殺虫試験により評価するのが通例である。個体のレベルで示される殺虫剤感受性を評価するには殺虫試験に代わるものはないといえる。しかしながら、そのためには、殺虫試験に先立ち、新たに採取した野外コロニーを室内で継代飼育し、発育ステージの揃った多数の虫を準備する必要がある。蚊種ではとくに室内飼育環境に順化して生殖・発育が行えるようようになるには世代数を要する。その過程で、野外で採集した個体をもつ遺伝的多様性が実際にどの程度子試虫の世代に伝えられているか不明になるという弊害を伴う。野外コロ

ニーに関する殺虫剤の有効性を評価するには、殺虫試験は時間と労力に関するコストを要し、数多くのコロニーについて感受性レベルを調査するに難のある方法といえる。

殺虫剤抵抗性は、1つの昆虫集団に一樣に発達するものではなく、殺虫剤散布歴による選択圧や近隣のコロニーとの間に起こる昆虫の移動の程度に依存して、集団内に現れるものである。昆虫が1つの殺虫剤に対して抵抗性を示す場合には、殺虫剤作用点の感受性低下により生じる場合、解毒作用の増大により生じる場合、またはその両方による場合などいろいろな原因がある。害虫集団内の抵抗性個体の頻度や分布を監視し、抵抗性が発達した場合には交差抵抗性を生じない他の有効な代替薬剤を選択可能にするためには、殺虫試験により感受性レベルを推定すること、および、主要な抵抗性機構に含まれる変異型作用点や解毒作用の増大を生理・生化学的に推定することに頼るのが従来の方法であった。主要な抵抗性機構の要因となる生体分子と変異の型が特定されているならば、より簡易な遺伝子診断にもとずいて抵抗性遺伝子の頻度分布を調査することにより、抵抗性の監視と有効な薬剤の選択が可能である。抵抗性コロニーが、例えば作用点の殺虫剤非感受性構造変化とある解毒酵素の過剰発現というように、1つの殺虫剤に関して複数の主要な抵抗性機構を含んでいる場合にも、個体レベルで抽出した核酸に基づき、それぞれをコードする遺伝子の点突然変異と転写産物量（または遺伝子量）の差異として、一律に実験的に取り扱うことが可能である。

本研究では、ヒトから吸血をすることでウエストナイルウイルス日本侵入時に問題になる可能性のある主要な蚊種を対象にし、発生源対策として重要でかつ成虫に対

する化学的防除に比べ住民や環境への配慮の面から実施が容易といえる幼虫に対する化学的防除の有効性を調査することを目的とする。さらに、殺虫剤抵抗性コロニーに含まれる抵抗性要因を解析し、抵抗性遺伝子の分子診断法確立とそれにより各害虫種集団の抵抗性遺伝子頻度分布を調査することを目的とする。本年度はおもに首都圏地域に発生したアカイエカ種群蚊とヒトスジシマカの幼虫防除に用いられている各種殺虫剤に対する感受性レベルを調査し、ピレスロイド抵抗性コロニーに含まれていた主要な抵抗性機構およびの作用点遺伝子の抵抗性型突然変異を明らかにした。

B. 研究方法

昆虫：

2003年にアカイエカ種群蚊の幼虫または成虫を採集し、それぞれに由来する16の室内コロニーを殺虫剤選抜なしに継代飼育した。チカイエカコロニーは、成虫を野外採集した場合は次世代の室内飼育コロニーにおいて、または幼虫を野外採集した場合は羽化したコロニーにおいて、雌成虫が未吸血で産卵した卵舟より孵化した個体群に基づき判別した。未吸血産卵をまったくしなかった室内コロニーをアカイエカコロニーと判別した。アカイエカ種群蚊の殺虫剤感受性対照系統として国立感染症研究所で維持しているアカイエカ洞穴系統とネッタイエカ小笠原系統を用いた。蚊の飼育は室温25℃、湿度65%、日長条件16L-8Dに保った恒温室内で行い、マウスを吸血源とした。

殺虫剤：

次の殺虫剤原体または製剤の供与を受け、蚊幼虫の殺虫試験に用いた。フェニトロチオン（原体と10%乳剤、住友化学工業）； テメフォス（原体と5%水和剤、三共ライフテック）； エトフェンプロック

ス（原体，三井化学）；ジフルベンズロン（デミリン水和剤 25%，三共ライフテック）；ピリプロキシフェン（シントースミラブ S 粒剤 0.5%，シントーファイン）。

殺虫試験：

4 齢幼虫約 30 頭を底面直径 6 cm，容積 100 mL のプラスチックカップに入れた 49.75 mL の蒸留水に浸漬し，エタノールに溶解（または十分に懸濁させた）殺虫剤溶液を 250 μ L 添加し十分攪拌した。フェニトロチオン，テメフォス，エトフェンプロックスの効力は処理開始 24 時間後の死亡率により判定した。ジフルベンズロンとピリプロキシフェンの効力は羽化阻止率により判定した。各濃度あたり処理を 3 回反復した。殺虫剤感受性対照系統に対する殺虫剤の効力は，SPSS ソフトウェアを用いプロビット法により解析した（SPSS Inc.）

遺伝子解析：

アカイエカ種群蚊の遺伝子配列解析には，それぞれ，幼虫全体と成虫頭部を使い，いずれも Isogen (NipponGene) を使い 1 頭ごとに核酸を抽出した。アカイエカ種群蚊のナトリウムチャンネル遺伝子配列に関しては，Total RNA 抽出物に残存する DNA を鋳型として利用し，ExTaq DNA ポリメラーゼ (Takara)，CTTCACCGACTTCATGCAC (F1CqSC) と CACGGACGCAATCTGGCTTG (R19CqSC) プライマーを使い，ナトリウムチャンネル遺伝子の DII-S6 コード領域を増幅した。増幅産物は TA Cloning kit (Invitrogen) でクローニングし，クローン化した遺伝子配列を解析に用いた。F1CqSC-R19CqSC プライマーセットにより増幅された遺伝子断片を鋳型にして ACGTGTCTGCATTCCGTTC (F11CqSC) と CTTGATCCAGTTGGAGAAGC (R18CqSC) プライマーで内側の配列を増

幅し，その産物に含まれる 1 つのイントロン配列のサイズをアガロースゲル電気泳動により検出した。BigDye Dye-Terminator Cycle Sequencing kit v1.1 (ABI) によりシーケンシング反応を行い，ABI Prism 310 System (ABI) で DNA 配列を決定した。

C. 研究結果

野外コロニーの殺虫剤感受性調査法：

ヒトスジシマカとアカイエカの殺虫剤感受性対照系統，それぞれ，医科研と洞穴に対する各種殺虫剤の効力を表 1 に示す。用いた殺虫剤は，わが国で蚊幼虫の防除に登録のある殺虫剤の中から，原体または 1 つの殺虫剤を有効成分として含み，共力剤を含まないものを選んだ。フェニトロチオンとテメフォスのそれぞれに関しては，原体と製剤を用いて殺虫試験を行ったが，ヒトスジシマカとアカイエカともに，剤型による効力の違いはほとんど見られなかった。エトフェンプロックス原体を除く試した各殺虫剤について，チカイエカ医科研系統はアカイエカ洞穴系統に比べて数倍（1.4 ~ 5.4 倍）の感受性の低さを示した。有機りん系のフェニトロチオンとテメフォス，ピレスロイド系のエトフェンプロックス各原体，および昆虫成長抑制剤に分類される皮膚形成阻害剤のジフルベンズロンと幼弱ホルモン様剤のピリプロキシフェンの各製剤を野外コロニーの感受性レベルの調査に用いることにした。この調査に用いた各殺虫剤の濃度は，各蚊種の感受性対照系統の示す LC99 値に基づき，LC99 値の等倍，10 倍，100 倍の 3 濃度とした（表 2）。表 2 には，表 1 に示したフェニトロチオン，テメフォス，ジフルベンズロン，ピリプロキシフェン各製剤に定められている用法・用量に相当する有効殺虫成分濃度を付した。エトフェンプロックスに関しては，

本剤のみを有効成分として含む蚊幼虫防除用製剤が登録されていないため、共力剤を含むレナトップ乳剤に定められている用法・用量に相当するエトフェンプロックス濃度を参考のため付した。

野外コロニーの殺虫剤感受性：

2003年夏期と秋期に、アカイエカの盛岡コロニーを除き、首都圏内の14地点で採集して得たヒトスジシマカのべ10コロニー、アカイエカのべ13コロニーとチカイエカ2コロニーを数世代室内飼育し殺虫試験に用いた(表3)。

ヒトスジシマカ野生コロニーに対する各種殺虫剤の効力を図1に示す。幼若ホルモン様剤のピリプロキシフェンに関して、調査した10コロニー全てが感受性系統の示すLC99濃度において死亡率が90%を下回った(図1, E)。谷中霊園(東)、野毛町公園、北府中コロニーの同濃度での死亡率は、それぞれ、約40%、60%、70%であり、ピリプロキシフェン抵抗性の個体が含まれていたといえるが、用法・容量に示される0.05 ppmよりも低いLC99 X10濃度では、ピリプロキシフェンは試験した全コロニーに対して良好な効力を示した。チカイエカ野生コロニーは、その他の殺虫剤に対しては十分な効力を示した(図1, A-D)。

アカイエカ種群蚊の野生コロニーに対する各種殺虫剤の効力を図2に示す。有機りん系のフェニトロチオンとテメフォスに関しては、感受性系統の示すLC99濃度においてコロニー間の感受性に違いが認められたが、LC99 X10の濃度では調べた全コロニーに対して高い効力を示した(図2, AとB)。これら2つの殺虫剤の用法用量の範囲はともにLC99 X10とLC99 X100の間に位置することから、これら殺虫剤の現在の野外集団蚊に対する有効性が推測される。ピレスロイド系のエトフェン

プロックスに関しては、試験した15コロニー中8コロニーがLC99 X100の濃度において90%以下の致死率しか示さなかった(図2, C)。とくにチカイエカの渋谷コロニーの致死率は20%を下回る感受性の低下を示し、アカイエカの狛江と林試の森コロニーがこれに次ぐ感受性の低下を示した。アカイエカ種群蚊の集団にエトフェンプロックス抵抗性が発達する過程にあるといえる。皮膚形成阻害剤のジフルベンズロンに関しては、LC99 X10濃度において調べた全コロニーに対して高い効力を示した(図2, D)。幼弱ホルモン様剤のピリプロキシフェンに関しては、LC99およびLC99 X10の濃度において、コロニー間の感受性に違いが認められたが、LC99 X100の濃度では調べた全コロニーに対して高い効力を示した(図2, E)。ジフルベンズロンとピリプロキシフェンの殺虫剤の用法用量の範囲は、それぞれ、LC99 X100に重なるか同じオーダーのレベルにあることから、これら殺虫剤の現在の野外集団蚊に対する有効性が推測される。

殺虫剤解毒機構：

エトフェンプロックスに対して著しい抵抗性を示すことが確認されたチカイエカの渋谷コロニーに関して、一般的な加水分解酵素の阻害剤であるDEF(S,S,S-tributyl phosphate)とチトクロムP450酸化酵素の阻害剤であるPBO(piperonyl butoxide)それぞれのエトフェンプロックスの効力への共力効果をバイオアッセイにより検討した。その結果、DEFとPBOそれぞれの一定濃度添加によるエトフェンプロックス感受性低下への効果が認められた(図3)。殺虫剤感受性対照系統への同様な試験は未だ実施していないことと、エトフェンプロックスが一般的なピレスロイド系化合物と異なりその化学構造にエステル結合を含まないことから、DEFの加水分解酵素によ

る共力効果は現時点では評価し難いものがある。一方、PBO添加によるエトフェンプロックス感受性低下への効果は著しく、その共力効果は現時点で疑いないものと考えられる。エトフェンプロックスに関する殺虫剤感受性のネッタイエカ小笠原系統に対する渋谷コロニーの抵抗性比は1046倍と推定された(表4)。また、PBO添加による共力比285倍からは、P450の解毒活性増大が渋谷コロニーのエトフェンプロックス抵抗性の主要な抵抗性機構として関与しているといえる(表4)。アカイエカ林試の森コロニーは、エトフェンプロックス抵抗性個体を20%前後含んでおり、PBOの添加によってエトフェンプロックスに対する感受性が低下するものの、「死亡率-殺虫剤濃度」の主応答から外れる低感受性個体が低い頻度で残存した(図4と表4)。ナトリウムチャンネルの*kdr*型構造変化：

ナトリウムチャンネルは神経軸索に存在しナトリウムイオンの細胞への流入の開閉により活動電位発生の継続/終止を司る生体分子で、DDTとピレスロイド系殺虫剤の作用点である。多くの衛生・農業害虫種でこの作用点のアミノ酸置換による構造変化がピレスロイド抵抗性の原因になっている。とくに、イエバエの座位番号で表してナトリウムチャンネルの1014番目の座位Leu(Leu1014)がPheに置換している遺伝子(または表現型)を*kdr*(knock down resistance)遺伝子(または表現型)とよび、相同座位に生じたイエバエとチャバネゴキブリの*kdr*型遺伝子がナトリウムチャンネルの殺虫剤低感受性をもたらすことが実験的に証明されているほか、少なくとも6つの害虫種でこの座位に生じたアミノ酸置換が殺虫剤抵抗性系統に特異的な構造変化として表れることが明らかになっている。

エトフェンプロックスの殺虫効力が著し

く低下している個体を含んでいたアカイエカ種群蚊の野生コロニー8つに関して、ネッタイエカのLeu999(イエバエ座位で表すとLeu1014)を含むエクソンとその3'側に位置する次のエクソンの一部、およびそれらエクソンの間に挟まれたイントロンをPCR増幅し、その内側のDNA配列をクローニングにより解析した(図5)。その結果、チカイエカの渋谷と市川コロニーからはLeu999Phe置換(TTA to TTT)を有する典型的な*kdr*遺伝子を保有する蚊が検出された(図6)。渋谷コロニーは野外で採集した2頭の雌成虫から出発して室内コロニーを増殖させたが、テストした10個体すべてが*kdr*遺伝子をホモ接合体として有していた。また、アカイエカの稲荷木、林試の森、狛江、野毛町公園、日野、駒沢公園コロニーの蚊からは*kdr*型変異と同座位に生じているが置換したアミノ酸が異なる*kdr*様変異、Ser999(TCA)、が検出された。これら6つのアカイエカコロニーからは見つかった*kdr*様遺伝子はホモ接合体としてではなく、ヘテロ接合体として見いだされたが、そのヘテロ接合体のコロニー内に占める割合は一律に少数であった(データ詳細略)。今回の調査により初めて、日本産蚊からナトリウムチャンネル遺伝の*kdr*型と*kdr*様の、それぞれ、Leu999PheとSer置換変異がアカイエカ種群蚊から見い出された。

Ser1014置換をコードする*kdr*様遺伝子がエトフェンプロックス抵抗性の遺伝的要因になりえるかを検討するために、林試の森コロニーから抽出した幼虫を用い、母集団より無作為に抽出した幼虫と一定濃度のPBOを添加したエトフェンプロックスで処理した後に生残した幼虫の遺伝子型を比較した(図7)。選抜処理に用いたエトフェンプロックス濃度は0.01, 0.015, および0.02 ppmで、図3に示したとおり、PBO

添加を伴う「死亡率－エトフェンプロックス」応答において高濃度で少数の生残個体が観察された濃度であった。これら3つの濃度に関してあらためて殺虫試験を行い、濃度の低い順にそれぞれ4/67, 2/79, および2/64の割合で生残個体を得た。林試の森コロニーには、Leu999をコードするエクソンの3'側に隣接するイントロンサイズが317 bpのハプロタイプとSer999をコードし隣接するイントロン長が224 bpのハプロタイプが主要なタイプとして含まれていた(データ詳細省略)。F11CqSC－R18CqSCプライマーセットにより、これらの合わせて8つの生残個体のPCR産物のサイズを調べた結果、6個体が短いイントロンと長いイントロンをもつハプロタイプヘテロ接合体で、他の2個体は長いイントロンをもつハプロタイプのホモ接合体であった。一方、母集団から殺虫剤選抜なしに無作為に選んだ幼虫8個体は長いイントロンをもつハプロタイプのホモ接合体であった。イントロンサイズの長／短が、それぞれ、Leu999型(殺虫剤感受性型遺伝子)／Ser999型(*kdr*様遺伝子)に関連づけられるため、Ser型のナトリウムチャンネル遺伝子はエトフェンプロックスにより選抜されたといえ、エトフェンプロックス抵抗性要因となる可能性が示唆される。

アカイエカ種群蚊の8つのコロニーから選んで、19のナトリウムチャンネル遺伝子ゲノムDNA配列を増幅し(図5)、DNA多型を解析した(図8)。中央部に挿入されているイントロン配列は長さや塩基置換の双方に関して多型的であった。そのイントロンの両端に位置するエクソン配列も含めて全部で15のハプロタイプが同定された。解析したDNA配列の類似性を分子系統樹に表したものが図9である。今回解析したゲノムDNA配列からはチ

カイエカとアカイエカを区別すること、またはDNA配列のサイズから*kdr*型遺伝子と*kdr*様遺伝子を区別することはできないことが示された。しかしながら、解析したハプロタイプの範囲内では、チカイエカから*kdr*型(Phe)遺伝子のみが、アカイエカからは*kdr*様(Ser)遺伝子のみが同定されているので、ナトリウムチャンネル遺伝子のLeu999座位の置換の違いはチカイエカとアカイエカの違いに対応している。

D. 考察

殺虫剤感受性レベルを調査したヒトスジシマカ、およびアカイエカとチカイエカの野生コロニーに対して、ピレスロイド系のエトフェンプロックスを除く殺虫剤は、製剤の用法・用量に定められた濃度で十分な効力を表した。有機りん系のフェニトロチオンとテメフォスに関しては、アカイエカ感受性対照系統が示すLC99の濃度において、コロニー間に著しい効力の違いがあり、コロニーによるフェニトロチオンとテメフォスの効力の大きさには相関性がみられた。かつて、新宿区のビル地下に発生したチカイエカコロニーには多種の有機りん剤に100倍以上抵抗性を示すコロニーが見つかり(川上1989)、その抵抗性要因はesterase遺伝子のDNA増幅に基づく加水分解酵素の活性増大にあった(Kono and Tomita 1993; Tomita et al 1996)。同様な抵抗性要因が今回調べた野生コロニーの一部にも含まれていると推測される。幼若ホルモン様物質のピリプロキシフェンに関しては、LC99の濃度で調べたアカイエカ種群蚊コロニー全般に対する効力の低下とヒトスジシマカの一部のコロニーに対する効力の低下が認められた。その理由は不明であるが、イエバエは本剤に対する抵抗性にチトクロムP450酸化酵素による解毒作用の増大が大きく寄与していることが

報告されている (Zhan et al 1997; 1998) ので、蚊種においても同様な解毒機構との関連が疑われる。

調べたアカイエカ種群蚊 15 コロニー中 8 コロニーで、LC99 X100 濃度のエトフェンプロックスに対する効力低下が認められた。この濃度はエトフェンプロックス製剤 (エトフェンプロックス 5%, S-421 11% 含有乳剤) の用法用量に定められている希釈液中のエトフェンプロックス濃度の数倍にほぼ匹敵する。実際の蚊幼虫防除には作用性が十分に解明されていない共力剤 S-421 を含有する製剤が使用されているので、野生コロニーに対するエトフェンプロックス効力の低下は現れにくい可能性がある。とくに著しい感受性低下を表したチカイエカの渋谷とアカイエカの林試の森コロニーについては、P450 による解毒作用の増大が幼虫のエトフェンプロックス抵抗性に大きく関与していることが示された。

エトフェンプロックス感受性が低下していた 8 つの蚊コロニーには、ピレスロイド作用点であるナトリウムチャンネル遺伝子に、他の昆虫種でチャンネルの殺虫剤感受性低下をもたらすことが明らかになっている *kdr* 型 (Leu999Ser) と *kdr* 様 (Leu999Ser) 置換変異が同定された。渋谷コロニー蚊は *kdr* 型遺伝子のホモ接合体であった。他の 7 つのアカイエカとチカイエカコロニーでは、*kdr* 型または *kdr* 様遺伝子は頻度が低くヘテロ接合体として存在した。イエバエの *kdr* 遺伝子は抵抗性表現型に関して劣性の度合いの大きい不完全劣性遺伝子として知られるが、アカイエカ林試の森コロニーの *kdr* 様遺伝子はヘテロ接合体であってもエトフェンプロックス処理による選抜を受けることを確かめた。アカイエカ種群蚊においては Phe999 置換および Ser999 置換をもつ遺伝子が、それぞれ、米国とチュニジアおよび中国のピレ

スロイド抵抗性コロニーから見い出されている (Martinez-Torres et al 1999)。これらの海外で見出された抵抗性に関連づけられるハプロタイプは、抵抗性伝播のダイナミズムを知る上で貴重な手がかりになるが、その塩基配列が未だ公表されていないため抵抗性遺伝子の起源については不明である。

本研究で調べた限り、Phe999 置換はチカイエカのみから、Ser999 置換はアカイエカのみから見つかっている。首都圏以外の地方でもこれら遺伝子が 2 つの蚊集団に同様に分布しているかについて、継続して調査する必要がある。アカイエカ種群蚊コロニーからエトフェンプロックス抵抗性幼虫が見つかったことで、成虫蚊防除の目的で家庭で使われている蚊取り線香、電気蚊取り、蚊取りマット、殺虫スプレー、または疾病媒介蚊防除の目的で空中に散布される可能性がある ULV の有効殺虫成分がピレスロイド系化合物であることに注目し、野外集団の成虫蚊のピレスロイド系殺虫剤に対する感受性を調査する必要がある。本研究で日本産のアカイエカ種群蚊より初めてピレスロイド作用点遺伝子に抵抗性型点突然変異が同定された。これらの突然変異を対立遺伝子特異的 PCR または TaqMan プローブ法等により個体レベルで簡易に検出する方法を確立したい。

E. 結論

1. 1993 年に首都圏で採集して得た 10 のヒトスジシマカコロニーの幼虫に対して、フェニトロチオン、テメフォス、エトフェンプロックス、ジフルベンズロン、ピリプロキシフェンの殺虫剤は用法・用量の濃度以下の施用で有効であった。
2. 1993 年におもに首都圏で採取して得た 15 のアカイエカ種群蚊コロニーの幼虫

に対して、フェニトロチオン、テメフオス、ジフルベンズロン、ピリプロキシフェンは用法・用量の濃度以下の施用で有効であった。

3. 少なくとも 8 つのアカイエカ種群蚊コロニーに、幼虫防除に影響するレベルのエトフェンプロックス感受性低下がみられた。
4. アカイエカ種群蚊のエトフェンプロックス抵抗性には、チトクロム P450 酸化酵素の解毒作用増大が主要因の 1 つとなっている。
5. ピレスロイド剤低感受性型アミノ酸置換 Leu999Phe と Leu999Ser をもつナトリウムチャンネル遺伝子が、それぞれ、エトフェンプロックス抵抗性の日本産チカイエカとアカイエカコロニーの中から初めて同定された。

F. 健康危険情報 (無し)

G. 研究発表

1. 論文発表

Kasai S, Tomita T. Male specific expression of a cytochrome P450 (Cyp312a1) in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300: 894-900 (2003).

Ni X-Y, Tomita T, Kasai S, Kono Y. cDNA and deduced protein sequence of acetylcholinesterase from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38: 49-56 (2003).

Kasai S, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Tomita T. Rapid evaluation of human louse susceptibility to phenothrin. *Medical Entomology and Zoology*, 54: 31-36 (2003).

Anazawa Y, Tomita T, Aiki Y, Kozaki T, Kono Y. Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychis urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 509-514 (2003).

Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307: 12-22 (2003).

Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Kasai S. Molecular analysis of para-sodium channel gene in pyrethroid-resistant headlice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, 40: 468-474 (2003).

葛西真治, 富田隆史. cDNA アレイ法によるチトクロム P450 発現の解析: 殺虫剤新規作用点の探索と抵抗性機構の解明に向けて. *日本農薬学会誌*, 28: 473-478 (2003).

Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313: 794-801 (2004).

2. 学会発表

葛西真治, 李時雨, 富田隆史. ピレスロイド剤抵抗性ネッタイエカの作用点変異. 第 55 回日本衛生動物学会大会, 2003

- 年 4 月 1 日.
- 富田隆史, 葛西真治, 李時雨, 矢口昇, 三原実, 安居院宣昭. 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. 第 55 回日本衛生動物学会大会, 2003 年 4 月 1 日.
- Tomita T, Kasai S, Nabeshima T, Kozaki T, Kono Y. Insecticide-resistance due to structural changes of target sites in medical pests. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 28, 2003.
- Lee S-W, Tomita T, Kasai S. Preservation of louse, *Pediculus humanus*, DNA for PCR with gene specific primers. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 30, 2003.
- Kozaki T, Tomita T, Kono Y. Structural changes of acetylcholinesterase accompanied the insecticide resistance in the housefly, *Musca domestica*. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 30, 2003.
- Kasai S, Tomita T. Sex specific expression of cytochrome P450s in *Drosophila melanogaster*. Korea-Japan Joint Conference on Applied Entomology and Zoology 2003, May 30, 2003.
- Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Agui N, Kasai S. Sodium channel point mutations associated with pyrethroid-resistance in the head louse. 3rd Pan-Pacific Conference on Pesticide Science, June 3, 2003.
- 富田隆史, 葛西真治. 殺虫剤作用点探索と抵抗性機構解明のためのチトクロム P450 遺伝子発現の解析. 第 48 回日本応用動物昆虫学会大会「昆虫ゲノムの解析と利用」小集会, 2004 年 3 月 27 日 (予定).
- 李時雨, 葛西真治, 富田隆史. コガタアカイエカ集団における殺虫剤抵抗性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の全国的分布. 第 48 回日本応用動物昆虫学会大会, 2004 年 3 月 28 日 (予定).
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得
(無し)
 2. 実用新案登録
(無し)
 3. その他
(無し)

表1. 殺虫剤感受性対照系統に対する殺虫剤の効力

殺虫剤	ヒトスジシマカ(<i>Aedes arbopictus</i>)医科研系統				LC50比
	供試虫数	回帰係数 * ±SE	LC50 (ppm)	95%信頼限界	<i>Ae.a./</i> <i>Cx.p.p.</i>
フェントロチオン原体	298	4.4 ± 0.41	0.041	0.037-0.045	-
フェントロチオン10%乳剤	218	4.8 ± 0.52	0.029	0.026-0.032	-
テメフォス原体	170	13 ± 1.6	0.023	0.022-0.024	-
テメフォス5%水和剤	228	5.5 ± 0.78	0.021	0.019-0.023	-
エトフェンプロックス原体	341	3.7 ± 0.37	0.025	0.022-0.027	-
ジフルベンズロン25%水和剤	411	4.1 ± 0.38	0.0031	0.0028-0.0034	-
ピリプロキシフェン0.5%粒剤	296	4.1 ± 0.37	0.00028	0.00025-0.00031	-

殺虫剤	アカイエカ(<i>Culex pipiens pallens</i>)洞穴系統				LC50比
	供試虫数	回帰係数 * ±SE	LC50 (ppm)	95%信頼限界	
フェントロチオン原体	133	9.6 ± 1.40	0.019	0.018-0.020	2.2
フェントロチオン10%乳剤	361	6.3 ± 0.66	0.016	0.015-0.017	1.8
テメフォス原体	328	6.0 ± 0.75	0.0045	0.0041-0.0048	5.1
テメフォス5%水和剤	340	8.6 ± 0.83	0.0039	0.0029-0.0047	5.4
エトフェンプロックス原体	357	6.9 ± 0.59	0.026	0.020-0.036	0.96
ジフルベンズロン25%水和剤	418	3.8 ± 0.33	0.0022	0.0020-0.0025	1.4
ピリプロキシフェン0.5%粒剤	341	6.2 ± 0.68	0.000094	0.000087-0.000102	3.0

* プロビット vs 対数濃度

表2. 野外コロニー蚊の殺虫試験に用いた殺虫剤濃度(ppm)

殺虫剤	ヒトスジシマカ *1			アカイエカ *2			用法・用量
	LC99 X1	LC99 X10	LC99 X100	LC99 X1	LC99 X10	LC99 X100	
フェントロチオン	0.14	1.4	14	0.033	0.33	3.3	2.0
テメフォス	0.034	0.34	3.4	0.011	0.11	1.1	0.5-1.0
エトフェンプロックス	0.11	1.1	11	0.057	0.57	5.7	0.5-1.0 *3
ジフルベンズロン	0.011	0.11	1.0	0.0092	0.092	0.92	0.5-1.25
ピリプロキシフェン	0.0010	0.010	0.10	0.00022	0.0022	0.022	0.05

*1, チカイエカ医科研系統のLC99値に基づく; *2, アカイエカ洞穴系統のLC99値に基づく; *3, 他に共力剤を含むレナトップ乳剤(エトフェンプロックス 5%, S-421 11%, 乳剤)中のエトフェンプロックス濃度に換算して

表3. 野外より採集して得た蚊コロニー

名称	採集年	採集地	名称	採集年	採集地
ヒトスジシマカ(<i>Aedes arbopictus</i>):			アカイエカ (<i>Culex pipiens pallens</i>):		
雑司ヶ谷霊園02	2003	東京都豊島区雑司ヶ谷霊園	盛岡	2003	盛岡市
雑司ヶ谷霊園03	2003	(同上)	富山東	2003	東京都新宿区戸山東公園
林試の森	2003	東京都目黒区林試の森公園	林試の森1	2003	東京都目黒区林試の森公園
戸山	2003	東京都新宿区戸山公園	林試の森2	2003	東京都目黒区林試の森公園
谷中霊園(東)	2003	東京都台東区谷中霊園東部	日野	2003	日野市市民の森公園
谷中霊園(西)	2003	東京都台東区谷中霊園西部	立川	2003	立川市立川諏訪ノ森公園
北府中	2003	府中市北府中公園	稲荷木	2003	府中市稲荷木公園
駒沢公園	2003	東京都世田谷区駒沢公園	野毛町公園	2003	東京都世田谷区玉川野毛町公園
下丸子公園	2003	東京都大田区下丸子公園	戸越公園	2003	東京都品川区戸越公園
日野	2003	日野市	狛江	2003	狛江市狛江西河原公園
			砧公園	2003	東京都世田谷区砧公園
			荻中公園	2003	東京都大田区荻中公園
			北府中	2003	府中市北府中公園
			チカイエカ (<i>Culex pipiens molestus</i>):		
			渋谷	2003	東京都渋谷区
			市川	2003	市川市

表4. アカイエカ種群蚊の野外コロニーに対するエトフェプロクスの効力と解毒酵素阻害剤の共力効果

系統またはコロニー	処理	供試虫数	回帰係数 *1 ±SE	LC50 (ppm)	95%信頼限界	共力比	抵抗性比
小笠原系統 *2	エトフェプロックス	439	6.7 ± 0.40	0.017	0.016-0.018	-	-
渋谷 *3	エトフェプロックス	828	1.9 ± 0.12	23.9	18.2-33.1	285	1046
	+PBO	575	2.8 ± 0.22	0.084	0.063-0.013	-	-
林試の森 *4	エトフェプロックス	589	1.1 ± 0.085	0.12	0.022-0.32	32	7.1
	+PBO	554	3.2 ± 0.25	0.0038	0.0031-0.0046	-	-

*1, プロビット vs 対数濃度; *2, ネットアイエカ殺虫剤感受性対照系統; *3, チカイエカ; *4, アカイエカ

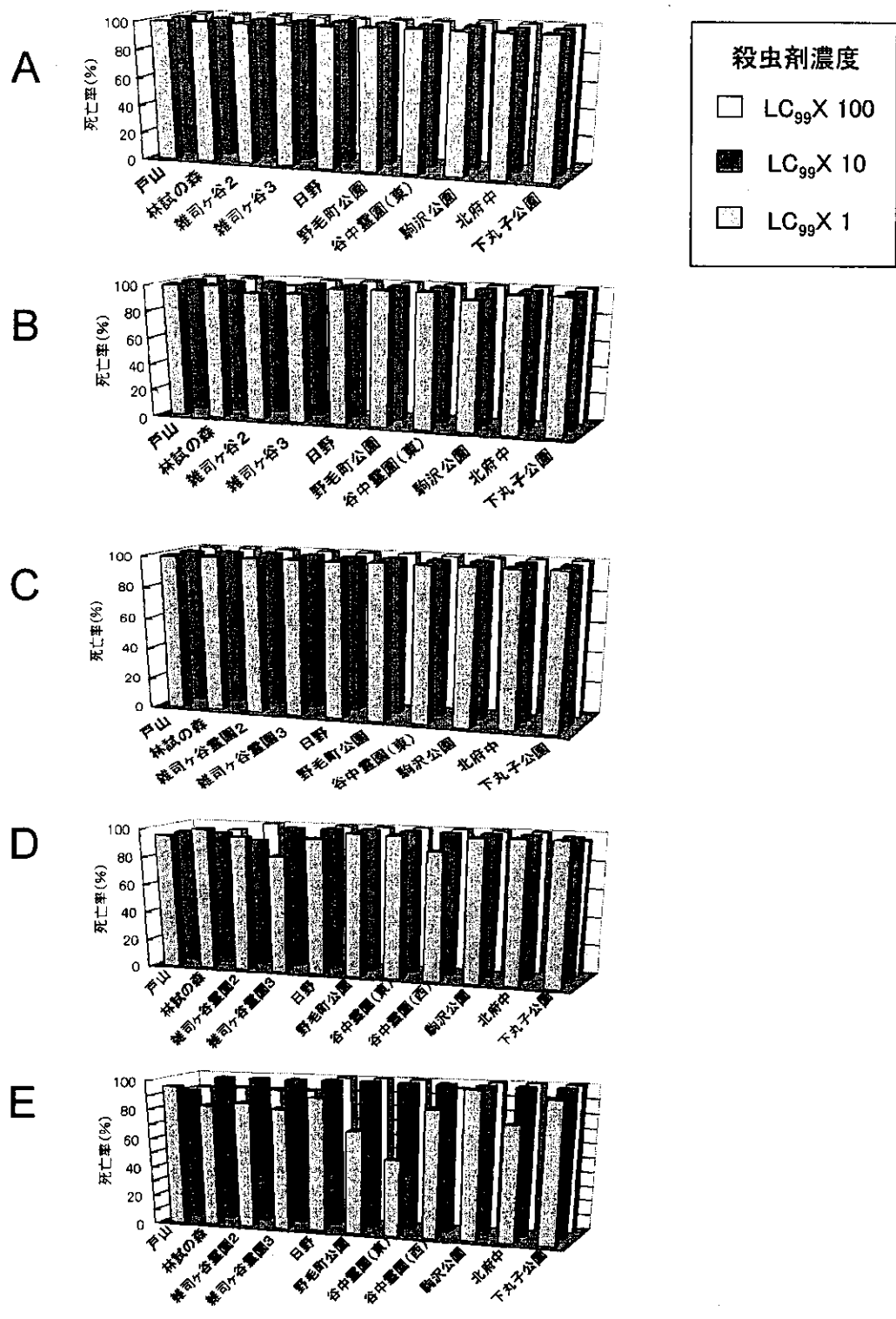


図1. ヒトスジシマカの野生コロニーに対する殺虫剤効力
 A, フェニトロチオン; B, テメフォス; C, エトフェンプロックス; D, ジフルベンズロン; E, ピリプロキシフェン。
 用いた殺虫剤濃度はヒトスジシマカ医科研究系統が示す LC_{99} 値の倍数で示してある。

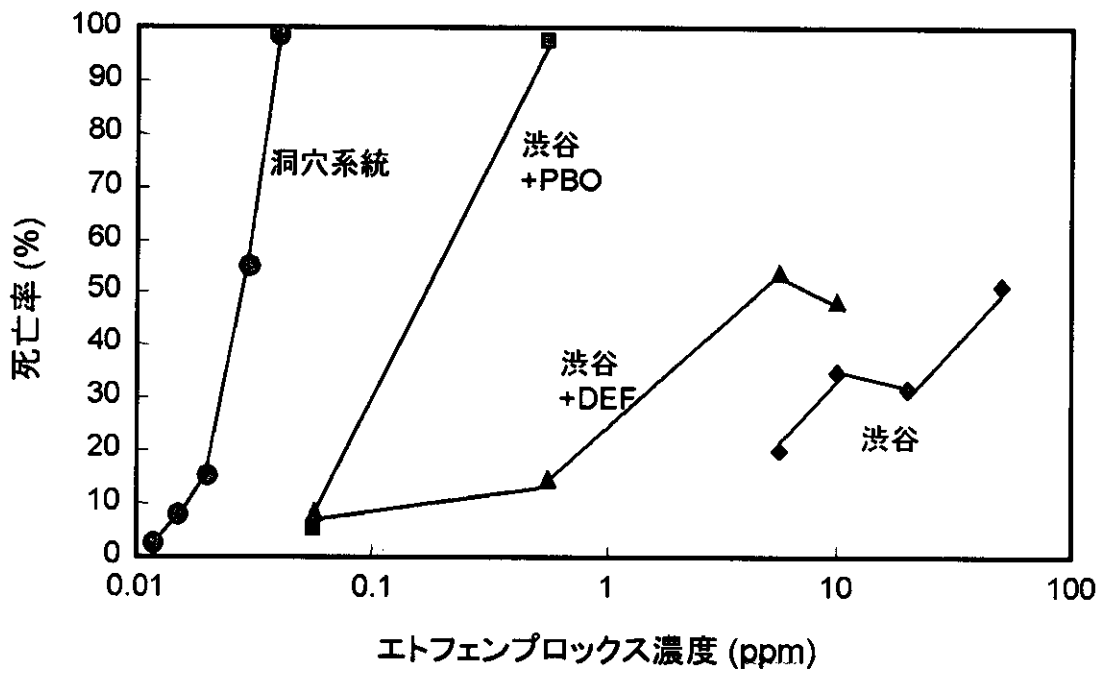


図3. チカイエカ渋谷コロニーに対するエトフェンプロックスの効力と解毒酵素阻害剤の共力効果

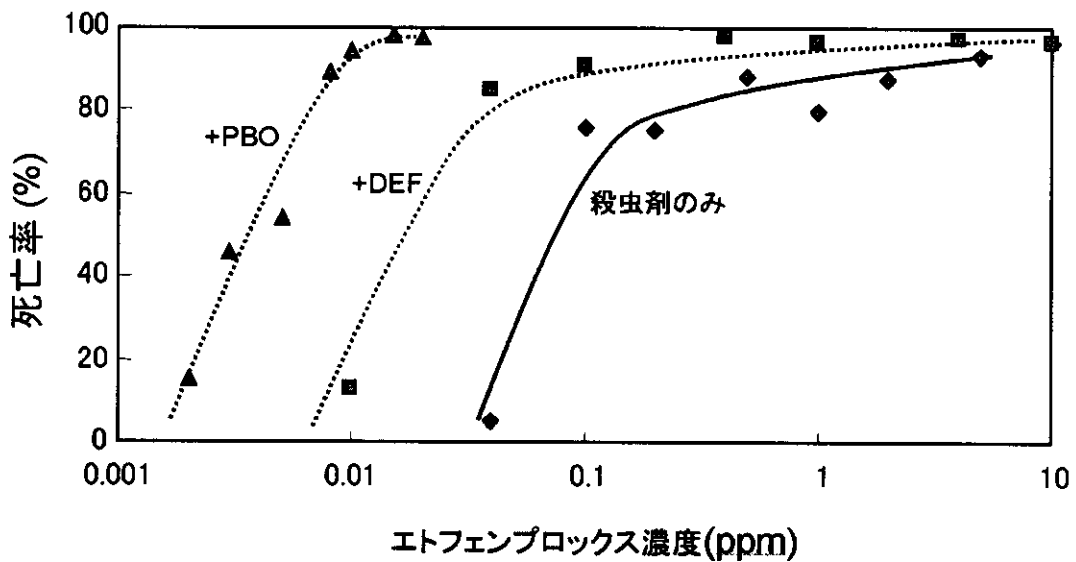


図4. アカイエカ林試の森コロニーに対するエトフェンプロックスの効力と解毒酵素阻害剤の共力効果