

図1. 捕集場所の環境表現の一般化

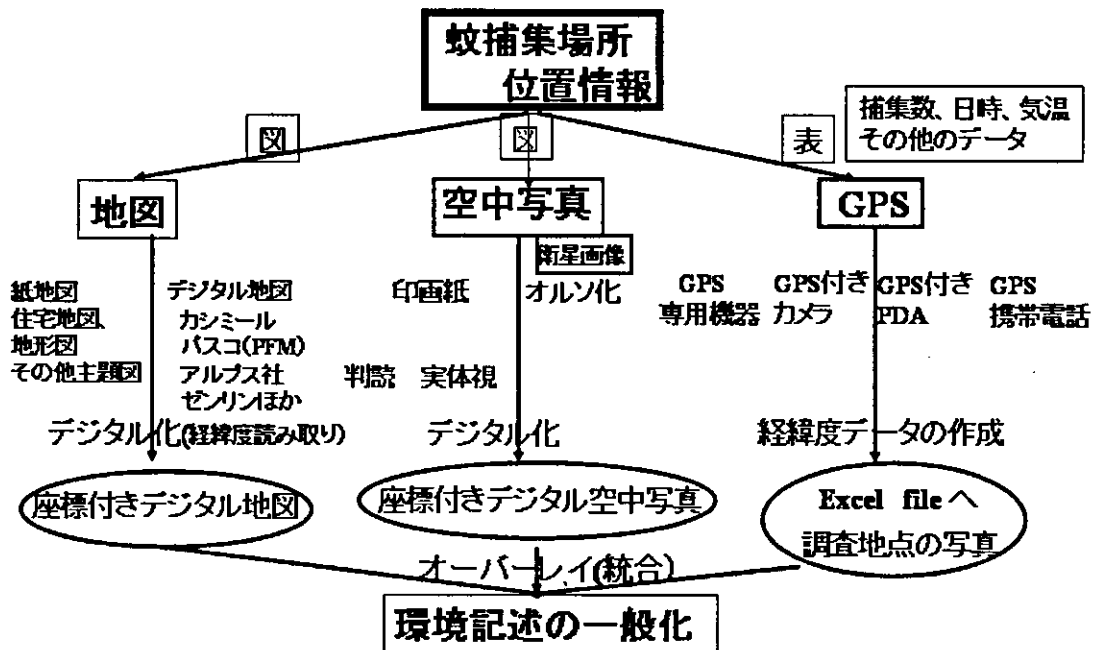


図2. カシミールでの検索

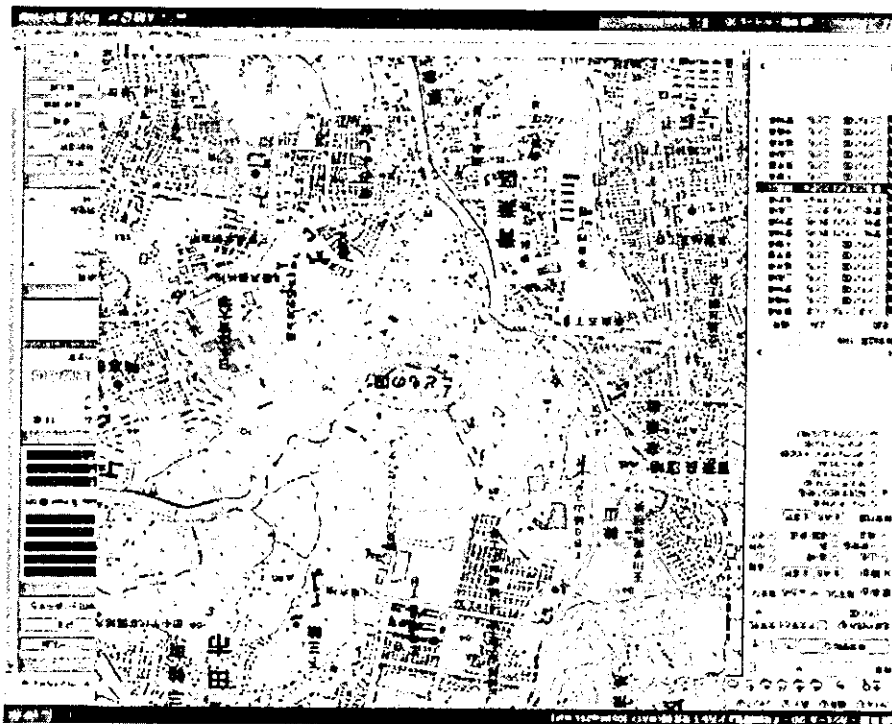


図3. 「カシミール」による津田らの公園調査位置

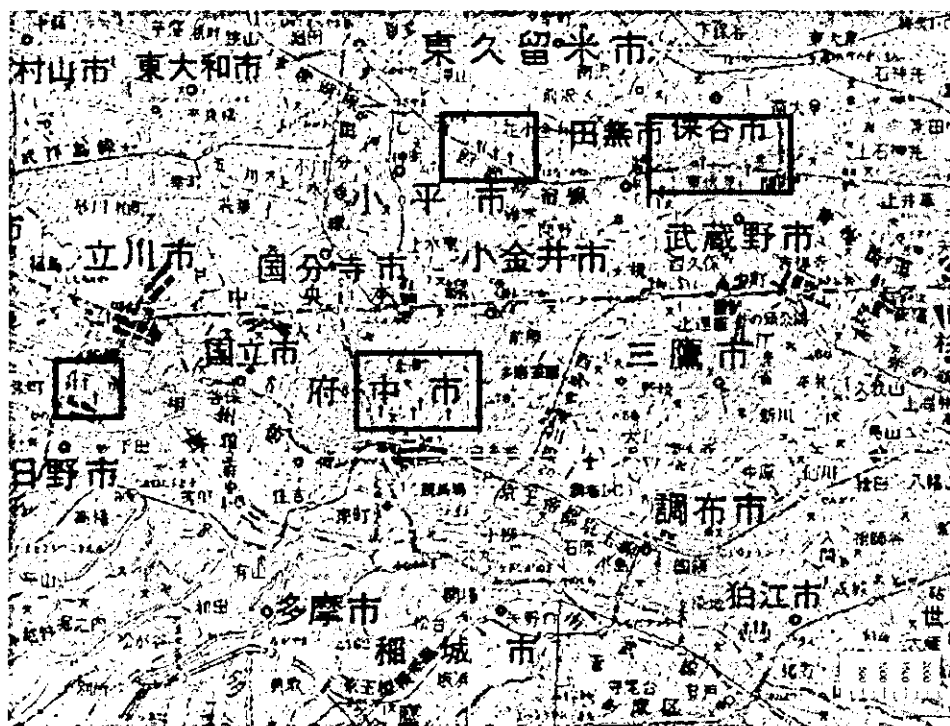
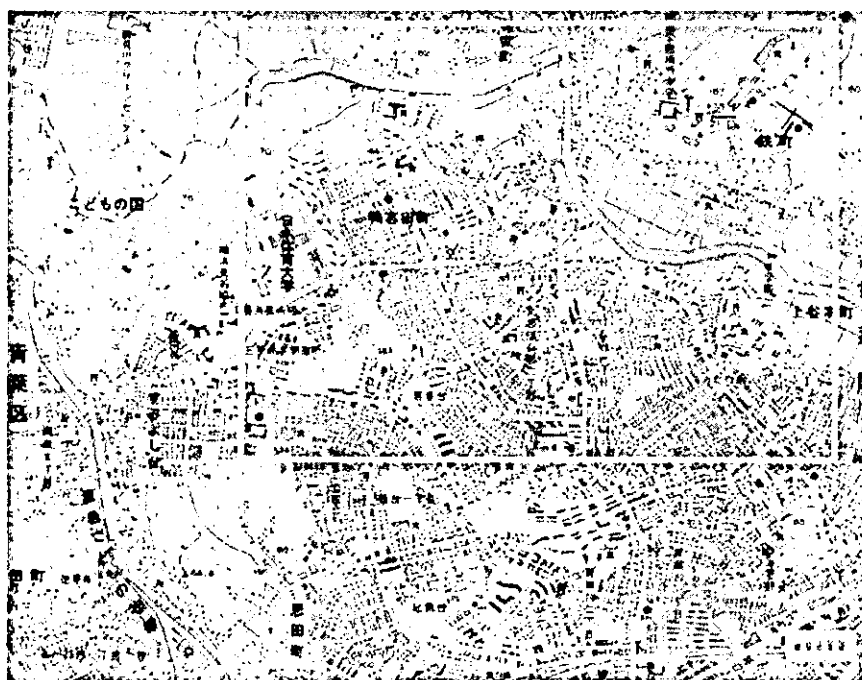


図4. 「カシミール」による横浜市青葉区周辺地形図



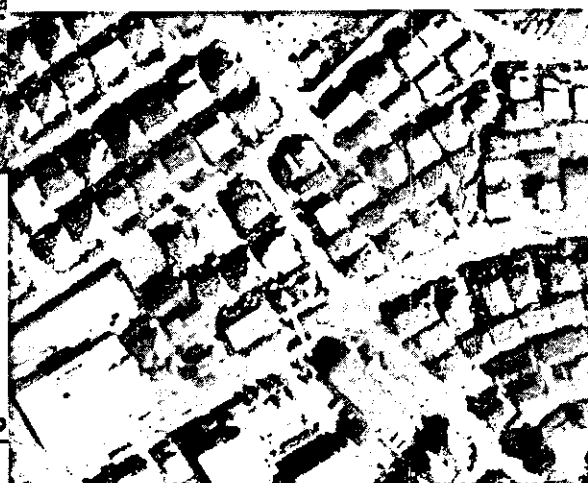
**図5. 横浜市青葉区たちばな台周辺の空中写真**



横浜市青葉区

調査定点を撮影年代・縮尺  
(約1:10,000)などほぼ同一  
条件で得られる密着写真

トラップ設置場所



青葉区たちばな台2

**図6. 成田周辺のドライアイストラップ設置定点  
周辺のオルソカした空中写真と詳細地図**



図7. Aグループに属するドライアイス設置場所

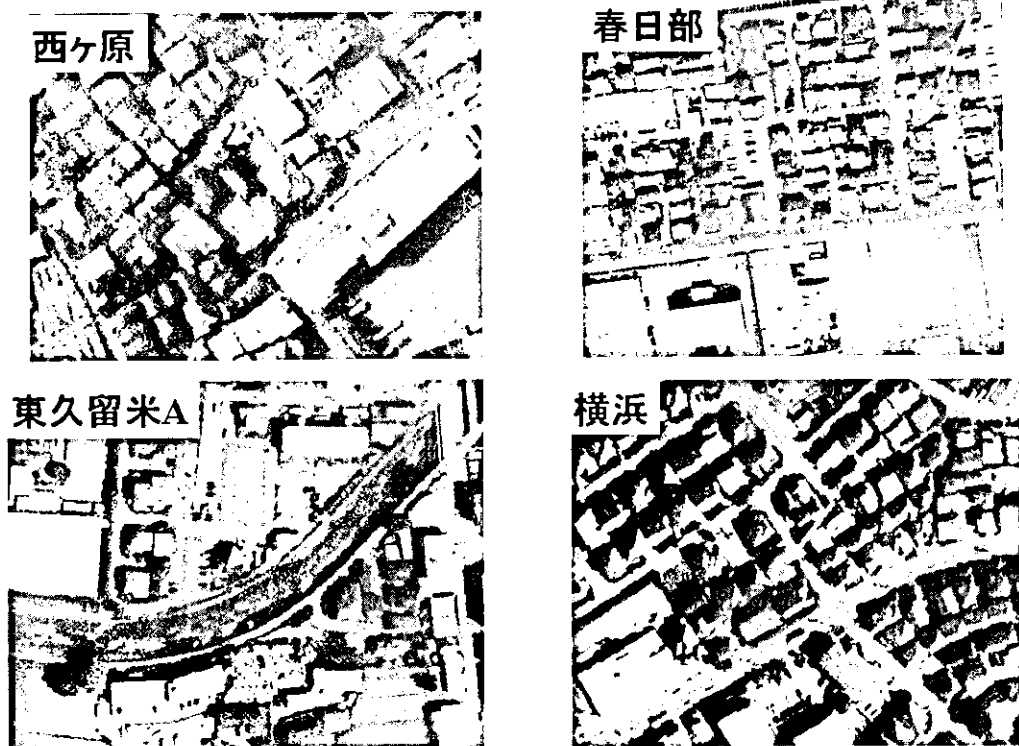


図8. Bグループに属す  
ドライアイス設置場所

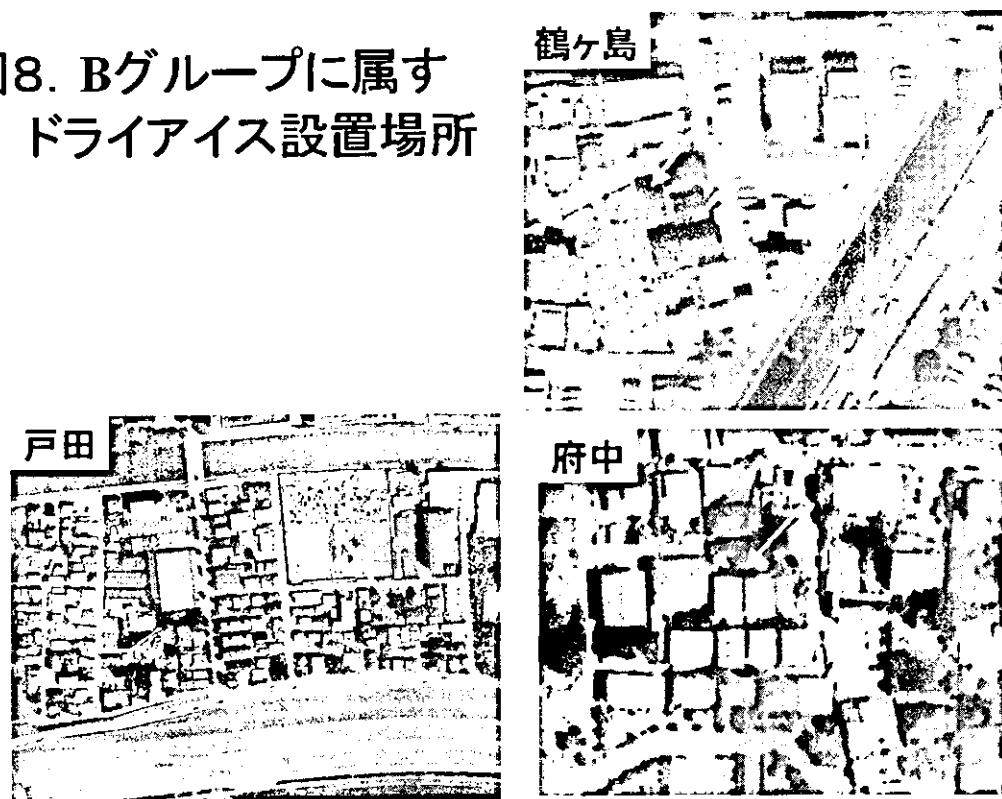


図9. Cグループに属するドライアイス設置場所



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

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）

協力研究者：葛西 真治，駒形 修，正野 俊夫，津田 良夫（国立感染症研究所）

元木 貢（(株)アベックス産業）

高橋 朋也（(株)フジ環境サービス）

谷川 力（(株)イカリ消毒）

橋本 知幸，新庄五朗（(財)日本環境衛生センター）

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の1つとなるアカイエカ種群蚊について、幼虫の殺虫剤感受性レベル、殺虫剤抵抗性機構、ならびに蚊亜種分子判別法についての調査・研究を行った。2004年に新たに41地点での採集に由来する室内コロニーの殺虫試験を行い、前年度調査分と併せて56コロニー分の5つの殺虫剤に対する感受性レベルを比較した。殺虫剤感受性対照系統に関する $LC_{99} \times 100$ の濃度で10%以上の生存率を示したコロニーがもっとも多かったのはピレスロイド系薬剤のエトフェンプロックスの場合であり、アカイエカ、チカイエカともに約4割のコロニーがこれに該当した。ピリプロキシフェン、ジフルベンズロン、テメホスについては、両亜種のそれぞれで、試験したうちの少数のコロニーに抵抗性個体が存在することを認めた。フェニトロチオンについては、殺虫剤感受性対照系統に関する $LC_{99} \times 10$ の濃度で生存する個体はなかった。いずれの殺虫剤に関しても抵抗性個体を分離する頻度はチカイエカの方がアカイエカよりも高かった。2つから4つの複数の殺虫剤に関して、抵抗性個体を分離するコロニーを両亜種に認めた。エトフェンプロックス抵抗性の主要因にはシトクロムP450による解毒活性の増大とkdr様変異(L999FとL999S)による作用点の感受性低下が含まれると推定した。エトフェンプロックス抵抗性は、少なくとも幼虫の範囲で、同系のペルメトリンとフェノトリンにも交差抵抗性を示した。各種殺虫剤の抵抗性要因となるP450分子種を解明するために、ネッタイシマカ由来のP450 cDNAの半網羅的クローニングを行い、現在までに62の異なる分子種をコードするP450 cDNA部分配列を決定した。有機りん系殺虫剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼ遺伝子のイントロン領域に含まれる配列多型に基づき亜種特異的プライマーを設計し、ゲノムDNAを鋳型とするPCRにより、日本産アカイエカ種群亜種の判別を試みた。9都府県38地点より採集した170頭のアカイエカ（吸血産卵性蚊）およびチカイエカ（無吸血産卵性蚊）を使って試験を行った結果、例外なく分子分類が可能であることを確認した。冬季に鳥インフルエンザが鶏舎で発生する際に、近隣の鶏舎に病原体を媒介するおそれのあるハエ種の1つであるオオクロバエについて、2003年に山口市で採集したハエを直接用いてフェニトロチオンとペルメトリンに対する感受性を調べた。テストしたオオクロバエは両薬剤に対し、殺虫剤感受性イエバエ系統の感受性に同等もしくはそれ以上の感受性レベルを示した。

## A. 研究目的

昆虫に対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り、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。とくに蚊種の中には、室内飼育環境に順化して生殖・発育を行うために多くの世代数を要するものがある。その過程で、野外で採集した個体もつ遺伝的多様性が実際にどの程度供試虫の世代に伝えられているか不明になるという欠点も併せもつ。数多くの野外コロニーに関する殺虫剤の有効性を評価するには、殺虫試験による調査は難のある方法といえる。殺虫試験にかかるコストと元来の遺伝的構成に関する情報の劣化を解決するための手段として、殺虫剤抵抗性遺伝子の分子判別を可能にする必要がある。

昆虫種においてシトクロム P450 は、昆虫ホルモンやフェロモンなどの生理活性物質、植物毒素、殺虫剤など、多様な脂溶性物質の代謝を行っている。昆虫種でゲノムプロジェクトが終了したキイロショウジョウバエと *Anopheles gambiae* では P450 の遺伝子は、それぞれ、89 個と 100 個あることが最近明らかにされている。昆虫成長阻害剤を含む広範な殺虫剤の解毒を P450 が担い、P450 の解毒活性増大が殺虫剤解毒機構の主要因となっている抵抗性昆虫の例が数多く知られている。しかしながら、分子量の似かよった多数の P450 分子種が 1 つの個体に含まれること、P450 分子種それぞれの基質とする物質の範囲が重なり合っていること、昆虫種 P450 の *in vitro* 再構成系が得にくかったことなどの理由から生化学的アプローチは困難を極め、殺虫剤抵抗性に係わる個々の分子種に

ついては、ほとんど未解明といってもよい状況にあった。最近になって、CYP6G1 遺伝子の過剰な転写現がキイロショウジョウバエに DDT 抵抗性をもたらすことが証明されたに過ぎない。ゲノムプロジェクトの予定されていない昆虫種であっても、ほぼ世界中に分布し、ウエストナイル熱やフィラリア症の重要な媒介蚊となっているアカイエカ種群蚊でも、各種殺虫剤の解毒機構に含まれる P450 分子種を明らかにし、抵抗性の分子判別を可能にする必要がある。

チカイエカとアカイエカは両者を形態で区別することが困難であるが、無吸血産卵性や越冬性の有無、発生源において違いがあり、吸血嗜好性、行動の光周期依存性、亜種間の相互交雑性について未解明な点が多い。害虫の化学的防除上もっとも重要な観点は、チカイエカとアカイエカの相互交雑性の有無にあるといえる。旧ビル管理法により定期的に建築物内の害虫を駆除するように定められていて、地下の水溜まりにおいておもに生息し、永きにわたり防除の対象となっていたチカイエカでは、殺虫剤抵抗性の選択圧がアカイエカに比べ大きく働いていたと考えられる。ウエストナイル熱のような蚊媒介性疾病がわが国に流行する際は、主たる媒介蚊であるアカイエカ種群蚊が真っ先に化学的防除の対象となる。より集団のサイズが大きいとみなされるアカイエカ集団に対し、チカイエカ集団内で出現した抵抗性遺伝子が亜種交雑により移入すると、アカイエカの防除を瞬く間に困難にしてしまう恐れがある。こうした亜種をめぐる研究上の課題の解明をより効率よく行うために、現在は無吸血産卵性や差異の微小な形態学的特徴で分別されている両亜種について、分子マーカーを使ったより簡便な分別を可能にする必要がある。

本分担研究では、最終的にアカイエカ種

群蚊を対象にして、実験室内において抵抗性遺伝子の分子判別する方法を確立し、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標とする。昨年度は、おもに首都圏地域に発生したアカイエカ種群蚊 15 コロニーの各種殺虫剤に対する感受性レベルを調査し、チカイエカにエトフェンプロックス抵抗性コロニーが存在し、抵抗性個体はピレスロイド低感受性の原因となる作用点遺伝子 (*kdr*) を保有することを明らかにした。今年度は、殺虫剤感受性についての調査地点を拡大して感受性レベルの現状をより詳しく把握するとともに、チカイエカとアカイエカそれぞれのエトフェンプロックス抵抗性コロニーに含まれる主要な抵抗性要因と交差抵抗性を解析した。公開されている 2 種双し目昆虫の P450 遺伝子データベースに基づき、その中に含まれる相同性の高い領域を利用して縮重プライマーをデザインし、RT-PCR を行うことで、アカイエカ種群蚊に含まれる P450 cDNA の半網羅的クローニングを行った。日本産アカイエカ種群蚊の分子判定については、本蚊種群内に変異性に富む塩基配列があるが、アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカの 3 亜種内では一定の配列を保っていると予想された部位につき、対立遺伝子特異的 PCR を適用し、考案した亜種の分子判定方法が広範な蚊のサンプルに対して有効であるかを検証した。

2004 年 2 月に鳥インフルエンザが発生した京都府丹波町では、最初の発生源となった船井農場鶏舎から近隣の高田農場鶏舎に感染が広がった。本研究事業の一環として、国立感染症研究所は、発生直後に船井農場から 600 - 2250 m 離れた地点で採取したオオクロバエとケブカクロバエの消化管から鳥インフルエンザの H5N1 型ウイルスが同定された。また、2004 年 11 月に山口県阿東町でハエの移動距離の推定を

行い、オオクロバエは 1 日に少なくとも 1.5 km 飛翔することが確かめられている。これらの調査結果を考慮すると、鶏糞を摂食するハエの防除が感染拡大の防止に必要な対策として十分に講じられる必要があるといえる。本分担研究では、動物用医薬品に分類される殺虫剤のうち、ハエ成虫駆除用途の製剤に有効成分として含まれている有機りん系のフェニトロチオンとピレスロイド系のペルメトリンを用い、野外採集したオオクロバエを直接用いてその感受性を調べた。

## B. 研究方法

### 昆虫：

2004 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 39 の室内コロニーを殺虫剤選抜なしに継代飼育し、殺虫試験に供した。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を同亜種として扱った。一方、未吸血産卵をまったく示さ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 °C、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。2003 年に実施した 15 コロニー分の結果と併せて感受性レベルを評価した。

ネッタイエカのピレスロイド抵抗性系統 JPal-per を用いて P450 cDNA の増幅を行った。

2004 年に 38 の地点で採集した 164 頭のアカイエカ種群蚊を亜種の分子判定の材料として使った。



2004年11月30日に山口市で腐敗した魚を誘因物として捕虫網により採集したオオクロバエ雌成虫を殺虫試験に用いた。

殺虫剤：

次の殺虫剤原体または製剤の供与を受け、殺虫試験に用いた。ペルメトリン、フェノトリン、フェニトロチオン（原体：住友化学工業）；テメホス（原体：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：

アカイエカ種群蚊については、4齢幼虫約30頭を底面直径6cm、容積100mLのプラスチックカップに入れた50mL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 $\mu$ L添加し十分攪拌した。フェニトロチオン、テメホス、エトフェンプロックスの効力は処理開始24時間後の致死率により判定した。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。各地での野外採集蚊に基づく室内コロニーの殺虫試験は、殺虫剤感受性のアカイエカ洞穴系統に関する各殺虫剤のLC99の等倍、10倍、100倍の三つの濃度を設定し、処理区あたり20頭の幼虫を用い各濃度ごとの反復なしで行った。殺虫剤感受性対照系統と抵抗性系統を用いた殺虫剤試験では、処理区あたり30頭の幼虫を用い各濃度あたり処理を2回反復し、殺虫剤の効力はSPSSプログラム(SPSS Inc.)を用いてプロビット法により解析した。

オオクロバエについては、フェニトロチオンとペルメトリンの局処施用により殺虫試験を行い24時間後の生死を判定した。1つの薬剤濃度あたり10頭のを反復なしで用いた。

遺伝子解析：

アカイエカ種群蚊のナトリウムチャンネル遺伝子配列の解析には、幼虫から1頭ごとにIsoQuick (ORCA Research)により抽出したゲノムDNAを用いた。ExTaq DNAポリメラーゼ(Takara)、CTTCACCGACTTCATGCAC (F1CqSC)とCACGGACGCAATCTGGCTTG (R18CqSC)プライマーを使い、ナトリウムチャンネル遺伝子の1つのイントロンを内部に含むDII-S6コード領域を増幅した。得たPCR産物は、直接鋳型として用いるか、またはTA Cloning kit (Invitrogen)でクローニングして、配列を決定した。シーケンシング反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing kit v1.1 (ABI)により、DNA配列の解析はABI Prism 3100 System (ABI)により行った。

ネッタイエカのP450 cDNAを半網羅的にPCR増幅するために、卵、終齢幼虫、成虫（雌雄）のそれぞれよりRNAをIsogen (Nipponn Gene)で抽出し、ReverTra Ace (Toyobo)で逆転写した。次に、3種類のcDNA溶液を均等な割合で混合したcDNAを鋳型とし、ExTaq DNAポリメラーゼを用い種々のサイクル条件でPCRを行い、アガロース電気泳動により約350bpの産物を分離し、切り出し、そして精製を行った。遺伝子データベースに登録されているキイロシヨウジョウバエと*Anopheles gambiae*のタンパク質配列を参考にし、シトクロムP450遺伝子族に比較的保存されているP450還元酵素結合領域とヘム結合領域のアミノ酸配列に対応する、それぞれ、約20塩基長のフォワードとリバースの縮重プライマーを亜族ごとにデザインし、PCRに用いた。増幅産物のクローニングとシーケンシングの方法は上に述べたとおりである。翻訳後に得た約100アミノ酸残基のタンパク質配列について、

公表済みの昆虫 P450 遺伝子との類似性を ClustalW プログラムで解析した。

アカイエカ種群蚊の亜種判別には、アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の配列多型をターゲットとして、フォワードプライマーを GTGGAAACGCATGATACCAG (ACEpip2) または GTGGAGACGCATGACGCAT (ACEpall2), リバースプライマーを TGGAGCCTCCTCTTCACGG (B1246s), ゲノム DNA を鋳型とし, 94°C 5min, [94°C 3s, 55°C 30s, 72°C] を 30 サイクル, 次いで 72°C 5min というサイクル条件で, 対立遺伝子特異的 PCR を行った。アガロース電気泳動法により PCR 産物の有無を確かめた。

### C. 研究結果

#### 1. アカイエカ種群蚊の殺虫剤感受性

野外採集蚊の殺虫剤感受性レベル:

2003 年と 2004 年に採集しコロニー化したチカイエカ, アカイエカ, ネットアイエカの由来を表 1 に, これらコロニーのエトフェンプロックス, テメフォス, フェニトロチオン, ピリプロキシフェン, ジフルベンズロンに対する感受性を図 1 に示す。殺虫剤感受性対照系統として用いたアカイエカ洞穴で得た LC99 値を基準として, その等倍, 10 倍, 100 倍の濃度における各コロニーの生存率の分布を総合的に評価すると, チカイエカとアカイエカを併せて抵抗性個体の出現する頻度およびその抵抗性レベルの双方において著しかった殺虫剤は, エトフェンプロックス, これをかなり下回り, ピリプロキシフェン, テメフォス, ジフルベンズロンの順となった。フェニトロチオンは LC99 X10 の濃度で例外なく有効 (死亡率 0%) であった。LC99 X100 の濃度で 10%以上の生存率をみたコロニーを数えても, 多い順に上に述べた殺

虫剤の並びと一致した。チカイエカをエトフェンプロックスで処理した場合に, 抵抗性レベルの著しく高い群とそうでない群にほぼ二分された。実用濃度またはそれを上まわる濃度で 10%以上の生存率をみたコロニー数が多い順に, エトフェンプロックス (22 コロニー), ジフルベンズロン (2 コロニー), テメフォス (1 コロニー) となった。感受性系統における LC99 X10 または X100 の濃度で複数の殺虫剤に対する生存率が 10%以上の抵抗性個体を分離したコロニーを表 2 に示す。チカイエカでは, エトフェンプロックスを含み, 他にテメフォス, ピリプロキシフェン, およびジフルベンズロンの中から 1 つまたは 2 つの薬剤の組合せにおいて上に述べた基準の抵抗性に該当するコロニーが 6 つあった。アカイエカでも, エトフェンプロックスと他 3 薬剤の中から 1 つの組合せにおいて該当するコロニーが 7 つあった。チカイエカの大手町コロニーでは 4 薬剤, 横浜と鳩ヶ谷コロニーでは 3 薬剤に対して該当する抵抗性個体が分離した。1 つの個体が殺虫剤系の異なる複数の薬剤に対して抵抗性を表したのか, または複数の薬剤のいずれかに抵抗性を示す個体が含まれていたのかについては不明である。

エトフェンプロックス抵抗性機構:

殺虫試験に用いた薬剤のうち, もっともアカイエカ種群蚊で抵抗性が発達しているとみなされたエトフェンプロックスについて, その抵抗性機構を調べるために, アカイエカの林試の森コロニーとチカイエカの新宿 04 コロニーをエトフェンプロックスで選抜し, 同殺虫剤感受性に関してほぼ均一な室内コロニーを得た。選抜に伴う林試の森コロニーのエトフェンプロックス感受性の変動のようすを表 4 と図 2 に示す。選抜前のコロニー (G0) は, 濃度-死亡率応答からみて感受性レベルが不均一な個体

が混合しており、エトフェンプロックス LC50 は 0.11 mg/L であったが、7 世代におよぶ選抜の後、殺虫剤感受性に関する均一性が増し、LC50 は 51 mg/L に達した。新宿 04 コロニーは選抜前にも殺虫剤感受性に関する均一性と抵抗性レベルが高く（資料省略）、2 世代の選抜により LC50 が 13.7 mg/L から 21.8 mg/L へと増大した（表 5）。洞穴系統を殺虫剤感受性の対照系統として用い、上に述べた林試の森と新宿 04 の選抜後のコロニー、および室内で選抜は行わなかったが元来エトフェンプロックス抵抗性レベルが高く均一性も有していたチカイエカの 4 つのコロニーの計 6 コロニーを対象として、シトクロム P450 分子族酵素の一般的阻害剤であるピペロニルブトキサイド (PBO) の共力効果を解析した。エトフェンプロックスのみを用いた場合のこれら 6 コロニーで得られた抵抗性比は 102-103 オーダーの範囲にあったが、PBO をエトフェンプロックスに添加した場合、抵抗性レベルがほぼ感受性系統の LC50 値（エトフェンプロックス単独の場合の値）に匹敵するほどまでに大きく低下した。「感受性系統蚊における PBO の共力効果」で除算した「抵抗性コロニーにおける PBO の共力効果」は、P450 の解毒活性増大に基づく抵抗性要因の強度とみなすことができる。また、共力剤を加えた場合の抵抗性比は、その他の要因による抵抗性要因の強度とみなすことができる。大手町コロニーを除き、林試の森 - 7 世代選抜、新宿 04 - 2 世代選抜、福岡、千葉、渋谷の 5 コロニーでは、P450 に基づく抵抗性要因の強度がその他に基づく強度に匹敵するかそれを上回ると推定した。昨年度の研究において、LC99 濃度で生残したチカイエカ幼虫からは、ピレスロイド抵抗性要因としてイエバエとチャバネゴキブリで認められている低感受性ナトリウムチ

ャンネル変異 *kdr* (L999F, イエバエの座位で表すと L1014F) を同定し、同様に生残したアカイエカ幼虫からは同座位に生じた異なるアミノ酸置換 L999S を同定した（図 3）。L999S 置換が *kdr* 遺伝子に含まれる置換と同様に、作用点の感受性低下に寄与している可能性を検討した。先ほど述べたエトフェンプロックスによる選抜前のアカイエカ林試の森コロニーには、L999/S999 のヘテロ接合体の存在が確認されていた（図 4）。S999 遺伝子頻度は選抜前 (G0) には 18% であったものが選抜とともに増大し、選抜 7 世代後 (G7) には 99% にまで達した。選抜を続ける中で、G1 から G4 にかけては S999 遺伝子頻度の上昇が停滞したが、これに符合して抵抗性に関する選抜効果も小さかったことが示されている（表 3, 図 2）。その理由は不明である。チカイエカにのみ見出されたナトリウムチャンネルの L999S 置換も *kdr* と同様に作用点の低感受性に寄与している可能性が十分あるといえる。表 5 に示すように、抵抗性要因の強度（すなわち抵抗性比）に占めるその他の要因（P450 解毒活性増大を除くもの）の強度として、先に述べた林試の森 - 7 世代選抜、新宿 04 - 2 世代選抜、福岡、千葉、渋谷、大手町の 6 つのコロニーでは、11-58 の値が得られていた。この範囲の値は、イエバエの *kdr* ホモ接合体において *kdr* 変異が抵抗性比に 10 倍またはそれ以上寄与すると推定されている範囲に対して、非常によく一致する。

#### 殺虫剤交差抵抗性：

アカイエカ林試の森 - 7 世代選抜コロニーとチカイエカ福岡コロニーの幼虫は、エトフェンプロックスに関して約 2,000 倍という強い抵抗性比を示した。蚊幼虫駆除用の製剤には含まれないが成虫駆除用製剤には含まれるピレスロイド系のペルメト

リンとフェノトリンに対するこれら二つのコロニーの交差抵抗性を幼虫を使って調べた(表5)。いずれのコロニーにおいてもエトフェンプロックスに関する抵抗性比にやや劣るものの、ペルメトリンとフェノトリンに対して強い抵抗性レベルを示し、交差抵抗性を生じることがわかった。*kdr* 変異はピレスロイド系殺虫剤のみならず DDT に対しても作用点の感受性低下をもたらすことが知られている。これら3種の薬剤の構造にはフェノキシベンジルアルコール基が含まれている。アカイエカ種群蚊の1つであるネッタイエカの体内では、P450の働きによりペルメトリンのフェノキシベンジル基の6位と4位の炭素が水酸化を受け代謝されることがペルメトリンの解毒機構として明らかにされている(Kasai et al., 1998)。よって、解毒酵素の活性増大もこれらのピレスロイド系薬剤間の交差抵抗性の要因となっている可能性があるといえる。

## 2. ネッタイエカ P450 cDNA の半網羅的クローニング

シトクロム P450 の C 末端側半分には位置し、P450 還元酵素結合領域とヘム結合領域に挟まれた約 100 のアミノ酸残基をコードする cDNA クローンを約 1,000 個解析した結果、現在までに 62 個の異なる P450 分子種をコードする配列を得た(表6, 図5)。この数はゲノムプロジェクトが終了したことにより P450 遺伝子の全数が明らかになっているショウジョウバエと *An. gambiae* のそれぞれと比較して、それらの 70%と 60%に相当した。キイロショウジョウバエと *An. gambiae* にもっとも数の多かった CYP6 と CYP4 の亜族に関しては、ネッタイシマカを用いても同様に豊富な数の分子種が存在することを示した。キイロショウジョウバエになく、*An. gambiae* にのみに存在する CYP325 亜

族に関しては、ネッタイエカからは相同性の高い分子種の存在は確認できなかった。キイロショウジョウバエのエクダイソン合成経路で最近明らかになった ketotriol を deoxyecdysone に変える CYP302, ecdysone を 20-hydroxyecdysone に変える CYP314 に比較的相同性の高い分子種の存在も確認した(表6)。ここに取り上げた3種双し目昆虫で配列が既知の P450 は、同じ亜族に分類しうる分子種であっても、相同性が比較的低く、分子進化の速度が大きいものであることがわかる(図5)。

### 3. アカイエカ種群蚊の亜種判別

Smith and Fonseca (2004)は、主として北米大陸産のアカイエカ種群蚊と一部日本産のアカイエカをもちいて、トビロイエカ、ネッタイエカ、アカイエカの分子分類を試みた。アセチルコリンエステラーゼ遺伝子(*Ace*)のエクソン2から3の領域にかけて同定された亜種特異的な配列多型をプライマー部位として利用し、対立遺伝子特異的 PCR を行い、亜種特異的 PCR 産物の有無により亜種を同定したものであった(図6A)。そこでは、チカイエカはトビロイエカ亜種の中の無吸血産卵性を示すコロニーとして解釈されており、分子判別の対象として扱われていなかった。われわれは原法を適用して、コロニー化して間もない日本産のいくつかのアカイエカとチカイエカのコロニー、およびネッタイエカ系統を対象として分子判別を試みたが、3つの亜種を明瞭に識別することはできなかった(資料省略)。*Ace* のイントロン2とその両端に位置するエクソンの部分配列を含む 875-880 塩基長の配列に関して、日本産のアカイエカとチカイエカがもっていた配列をクローニングし決定したところ、アカイエカとチカイエカにはそれぞれの亜種に固有の配列上の変異があることを確認した(図8)。データベースで公表さ

れている米国産トビイロイエカの該当する領域は日本産のチカイエカに非常に類似することも確かめた。そこで、われわれは亜種特異的プライマーの特異性をより高めることで Smith and Fonseca の原法に改良を加え、日本産アカイエカとチカイエカを分子分類することにした。われわれの考案した亜種特異的プライマー部位および共通プライマー部位の配置を図 6B に示す。アカイエカとチカイエカにそれぞれ特異的なプライマー、ACEpall2 と ACEpip2, ならびにそのプライミング部位近傍の *Ace* 遺伝子配列の解析例を図 8 に示す。分子判別に用いた雌蚊の採集地と無吸血産卵性の有無を表 7 に示す。アカイエカと予想した非無吸血産卵蚊は 18 地点から計 80 頭を選び試験し、チカイエカと予想した無吸血産卵蚊は 20 地点から計 84 頭を選び試験した (表 7)。対立遺伝子特異的 PCR 法による分子判別結果の例を図 9 に示す。ACEpall2 を用いてはアカイエカのみ、ACEpip2 を用いてはチカイエカのみで試験した全個体に関して増幅産物が得られ、2 つのネットアイエカ系統の蚊を用いてはいずれのプライマーセットを用いても増幅産物が確認できなかった。本研究で改良した対立遺伝子特異的 PCR 法によって、日本産のチカイエカとアカイエカを無吸血産卵性の有無で分類する場合と同等な判別が行える可能性が非常に大きい。

#### 4. オオクロバエの殺虫剤感受性

山口市で採集したオオクロバエ雌を供試虫として局処用法による殺虫試験を行い、2 種の殺虫剤に対する感受性を調べた結果を表 8 と図 10 に示す。フェニトロチオンとペルメトリンの  $LD_{50}$  値は、それぞれ、 $0.078 \mu\text{g}$  と  $0.0136 \mu\text{g}$  であった。オオクロバエの殺虫剤感受性系統が対照として利用できなかったため、オオクロバエとイエバエとの体重比を考慮して、オオク

ロバエの感受性をイエバエの殺虫剤感受性系統 SRS と比較することにした。殺虫剤処理後 24 時間後のオオクロバエ雌の平均体重は  $58 \text{ mg}$  ( $N=250$ )、羽化後 2 日目の SRS イエバエ雌の体重は  $20 \text{ mg}$  ( $N=11$ ) であった。これらを基に、イエバエの体重あたりに換算したオオクロバエの  $LD_{50}$  値は、フェニトロチオンの場合  $0.027 \mu\text{g}$ 、ペルメトリンの場合  $0.0047 \mu\text{g}$  となる。同じ殺虫剤原体を用いて SRS イエバエの  $LD_{50}$  値は、それぞれ、 $0.025 \mu\text{L}$  と  $0.0207 \mu\text{g}$  であった。よって、オオクロバエのこれら 2 薬剤に対する感受性は、イエバエ感受性系統と同等またはそれ以上と推察する。

#### D. 考察

チカイエカとアカイエカの多数のコロニーから高いレベルのエトフェンプロックス抵抗性を示す個体が存在することを確認した。日本産のアカイエカ種群蚊の野外集団に対して、殺虫剤の効力の持続が現在ももっとも憂慮されるのはピレスロイド系殺虫剤といえる。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、または空中に散布する ULV の有効殺虫成分としてピレスロイド系化合物が幅広く利用されている。エトフェンプロックスに強い抵抗性を示すチカイエカおよびアカイエカの幼虫がペルメトリン、フェノトリンにも同レベルの交差抵抗性を示すことが示された。このような蚊コロニーについては、成虫のピレスロイド系殺虫剤に対する感受性および忌避性についてもさらに試験をする必要がある。

アカイエカ種群の 1 つであるネットアイエカから、1 つの昆虫種が保有するであろうと考えられる遺伝子数の過半数にあたる 62 個のシトクロム P450 DNA の部分

配列を決定した。これらの cDNA を使って cDNA マイクロアレイを作製し、殺虫剤抵抗性蚊で高い発現を示すようになった P450 遺伝子を解析することを出発点として、各種殺虫剤の解毒を行う P450 分子種を実験的に証明してゆきたい。アカイエカ種群蚊の殺虫剤感受性を調査する中で、われわれはピレスロイド系殺虫剤、有機りん系殺虫剤、皮膚形成阻害剤、幼若ホルモン様物質に関するいくつかの抵抗性コロニーを得た。ピレスロイド系に分類されるエトフェンプロックスに関しては、P450 解毒酵素の活性増大による抵抗性要因がもっとも大きいことを示した。他の殺虫剤系に関する抵抗性コロニーについても、室内選抜を十分に行った後に、同様な解毒機構の増強が抵抗性要因となっていることを確かめたい。このようにして得られる種々の殺虫剤抵抗性系統を利用し、マイクロアレイ解析により、抵抗性蚊における個々の P450 遺伝子発現量を感受性蚊と比較し、殺虫剤抵抗性の解毒機構に含まれる P450 分子種を絞り込んでゆきたいと考える。

本研究により、日本産アカイエカとチカイエカの分子判別が可能になった。この成果を裏返すと、少なくともわが国においては両亜種間に交雑が事実上進んでないことを示す。エトフェンプロックス抵抗性のチカイエカからのみナトリウムチャンネルの L999F の *kdr* 変異が見出され、またアカイエカの同剤抵抗性アカイエカからのみ L999S の *kdr* 様変異が見出されていることもまた、同じ仮説を支持する。この分子判別法を用いて、両亜種における発生源、吸血源や吸血嗜好性、行動範囲、殺虫剤抵抗性遺伝子の特徴もしくは差異を簡便かつ詳細に調査することが可能になると期待できる。本研究では蚊亜種を対立遺伝子特異的 PCR 法により判別した。蚊 1 個体から抽出可能な DNA をさらに有効利用して、

亜種の判別に留まらず、吸血源となった動物種、殺虫剤抵抗性をもたらす点突然変異などを 1 つの反応液の中で同時に試験できる方法が開発されれば、なおいっそう本種群蚊の調査・研究の効率が上がる。複数の遺伝子座に生じた塩基置換を対象にして、1 個体に由来する核酸の処理が常に 1 つの反応液の中で処理でき、同時に分子判別結果が得られる効率的な手法の 1 つとして、マルチプレックス PCR 法と Dye Terminator サイクルシーケンシング法を順番に組み合わせて応用した SnapShot 法がある。次年度にはこの手法の適用も考慮に入れて亜種判別法をさらに改良したい。

本研究で殺虫試験の供試虫としたものは、山口市の 1 地点という限られた場所で捕獲したハエで、フェニトロチオンとペルメトリンに対して感受性を示した。オオクロバエは飛翔距離の長いハエ種として知られている。成虫雌は夏期に成虫休眠するための気温の比較的低い場所を求めて移動することも知られている。おもに畜舎で発生し、発生場所に留まる傾向があるために、殺虫剤抵抗性の発達が発生場所の殺虫剤散布歴を反映しやすいイエバエなどとは異なり、オオクロバエの場合には、本研究結果で求めた  $LD_{50}$  値と大きく異なる感受性レベルを示す集団となっている可能性もある。

## E. 結論

1. 試験した蚊幼虫駆除用殺虫剤の中でアカイエカ種群蚊の抵抗性がもっとも顕著なのはエトフェンプロックスであった。
2. アカイエカ種群蚊幼虫のエトフェンプロックス抵抗性の主要因は、シトクロム P450 解毒活性の増大とピレスロイド作用点の低感受性である。
3. アカイエカ種群蚊のピレスロイド低感

受性はナトリウムチャンネルの L999S の *kdr* 様変異によっても生じる可能性がある。

4. ネットアイエカの 62 のシトクロム P450 分子種の cDNA 配列を決定した。

5. 日本産アカイエカとチカイエカのそれぞれには明瞭に識別可能な亜種特異的な配列変異がある。これを利用した分子判別法は十分実用的であることを例証した。

6. 山口市で採集したオオクロバエは、フェニトロオクソンとペルメトリンに対して感受性であった。

#### F. 健康危険情報

(無し)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Toda S, Komazaki S, Tomita T, Kono Y. Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology*, 13: 549-553 (2004).

葛西真治. ピレスロイド抵抗性要因としてのシトクロム P450 に関する研究. *日本農薬学会誌*, 29: 234-239 (2004).

Kasai S. Role of Cytochrome P450 in mechanism of pyrethroid resistance. *Japanese Journal of Pesticide Science*, 29: 220-221 (2004).

##### 2. 学会発表

富田隆史, 正野俊夫, 津田良夫, 小林睦生, 葛西真治. 首都圏を中心としたウエストナイル熱媒介蚊の殺虫剤感受性試験: ピレスロイド剤抵抗性アカイエカ群の確認. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4 月 7 日.  
葛西真治, 李時雨, 正野俊夫, 津田良夫,

小林睦生, 富田隆史. ピレスロイド剤抵抗性アカイエカ群の抵抗性機構について: 日本産アカイエカからの *kdr* 遺伝子の初確認. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4 月 7 日.

Kasai S, Shono T, Komagata O, Tomita T. Role of P450s in pyrethroid resistance of *Culex pipiens* complex. 7th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology. August 1, 2004.

Kasai S, Tomita T. Male specific expression of a cytochrome P450 (Cyp312a1) in *Drosophila melanogaster*. 7th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology. August 1, 2004

富田隆史, 葛西真治, 駒形修, 谷川 力. チャバネゴキブリ野外コロニーにおける *kdr* 遺伝子の分布. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2004 年 10 月 25 日.  
葛西真治, 駒形修, 正野俊夫, 富田隆史, 沢辺京子, 比嘉由紀子, 津田良夫, 元木貢, 高橋朋也, 谷川力, 吉田政弘, 小林睦生. 日本産アカイエカとチカイエカの分子生物学的判別法. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2004 年 10 月 25 日.

駒形修, 葛西真治, 富田隆史. 殺虫剤抵抗性アカイエカ種群におけるシトクロム P450 遺伝子解析. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2004 年 10 月 25 日.  
駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ピレスロイド抵抗性ネットアイエカのシトクロム P450 遺伝子群の解析. 第 49 回日本応用動物昆虫学会大会, 2005 年 3 月 26 日.

葛西真治, 駒形修, 正野俊夫, 富田隆史, 澤邊京子, 比嘉由紀子, 津田良夫, 小林睦生.  
アセチルコリンエステラーゼ遺伝子によるウエストナイル脳炎媒介蚊の分子分類. 第 49 回日本応用動物昆虫学会大会, 2005 年 3 月 25 日.

H. 知的財産の出願・登録状況	(無し)
1. 特許取得	3. その他
(無し)	(無し)
2. 実用新案登録	



表 1. 殺虫剤感受性供試コロニーの由来

記号*	名称	採集年	採集地
<i>Culex pipiens molestus</i>			
M01*	市川	2003	千葉県市川市
M02*	渋谷	2003	東京都渋谷区
M03	柏	2003	千葉県柏市
M04	倉橋A	2003.12.2	東京都東久留米市氷川台
M05	倉橋B	2003.12.2	東京都東久留米市氷川台
M06	新宿04	2004.4	東京都新宿区
M07	大門	2004.5.5	東京都東久留米市大門町
M08	鳩ヶ谷	2004.6.24	埼玉県鳩ヶ谷市
M09	中町公園	2004.6	長崎県長崎市中町公園
M10	福岡	2004.7.9	福岡県福岡市
M11	吉祥寺	2004.7.2	東京都武蔵野市吉祥寺
M12	大手町	2004.7.24	東京都千代田区大手町
M13	千葉	2004.7.26	千葉県千葉市
M14	鴨川	2004.7.26	千葉県鴨川市
M15	日環セ	2004.8.18	神奈川県川崎市
M16	堺A	2004.8.23	大阪府堺市旭ヶ丘中町4-4(病院前)
M17	横浜	2004.9.7	神奈川県横浜市
<i>Culex pipiens pallens</i>			
P01*	戸山東	2001.6	東京都新宿区戸山東公園
P02*	林試の森	2003.4	東京都目黒区林試の森公園
P03*	盛岡	2003.7	岩手県盛岡市
P04*	日野市	2003.9.9	東京都日野市市民の森スポーツ公園
P05*	立川市	2003.9.9	東京都立川市立川諏訪の森公園
P06*	稻荷木	2003.9.23	東京都府中市稻荷木公園
P07*	玉川野毛町	2003.9.23	東京都世田谷区玉川野毛町公園
P08*	北府中	2003.9	東京都府中市北府中
P09*	駒沢公園	2003.9.29	東京都世田谷区駒沢公園
P10*	戸越公園	2003.9.29	東京都品川区戸越公園
P11*	狛江市	2003.10.2	東京都狛江市西河原公園
P12*	砧公園	2003.10.2	東京都世田谷区砧公園
P13*	萩中公園	2003.10.7	東京都大田区萩中公園
P14	春日部	2004.4	埼玉県春日部市
P15	麻布大	2004.5.9	神奈川県相模原市
P16	熱研	2004.6	長崎県長崎大医学部熱研
P17	山王公園	2004.6	長崎県長崎市山王公園
P18	中町公園	2004.6	長崎県長崎市中町公園
P19	大阪城	2004.7.4	大阪市中央区大阪城内
P20	玉津B	2004.7.4	大阪市東成区玉津1-9
P21	玉津A	2004.7.11	大阪市東成区玉津1-8
P22	小橋	2004.7.11	大阪市東成区小橋
P23	堺A	2004.8.23	大阪府堺市旭ヶ丘中町4-4(病院前)
P24	堺B	2004.8.23	大阪府堺市旭ヶ丘南町4-1(三稜側)
P25	堺C	2004.8.23	大阪府堺市旭ヶ丘南町4-1(公園側)
P26	名古屋	2004.7	愛知県名古屋
P27	熊野神社	2004.9	千葉県松尾町熊野神社
P28	三河島公園	2004.9.21	東京都荒川区三河島公園
P29	荒川公園	2004.9.21	東京都荒川区荒川公園
P30	西ヶ原	2004.9.21	東京都北区西ヶ原2丁目
P31	板谷公園	2004.9.22	東京都板橋区板谷公園
P32	平和公園	2004.9.23	東京都板橋区平和公園
P33	向台公園	2004.9.24	東京都西東京市向台第2公園
P34	東部公園	2004.9.24	東京都小平市東部公園
P35	水木公園	2004.9.28	東京都羽村市水木公園
P36	高原公園	2004.9	東京都練馬区谷原1-18-1
P37	林試の森2	2003.4	東京都目黒区林試の森公園
<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>			
Q01	西原	2004.5.29	沖縄県那覇市西原
Q02	那覇	2004.5.29	沖縄県那覇市内

表 2. 複数の薬剤に対する抵抗性個体を分離する蚊コロニーの各種殺虫剤感受性

Mosquito colony		Insecticide Conc.	Survival Rate (%) <sup>#</sup>				
Code	Name		EP *1	TP *2	FT *3	PX *4	DB *5
<i>Cx. p. molestus</i>							
M06	新宿04	LC99 X10	96	86	0	4	0
		LC99 X100	41	0	0	4	0
			**	*			
M08	鳩ヶ谷	LC99 X10	86	62	0	75	0
		LC99 X100	90	0	0	27	0
			**	*		**	
M12	大手町	LC99 X10	95	100	0	100	18
		LC99 X100	73	67	0	57	0
			**	**		**	*
M13	千葉	LC99 X10	100	18	0	0	0
		LC99 X100	100	0	0	0	0
			**	*			
M10	福岡	LC99 X10	100	0	0	84	0
		LC99 X100	100	0	0	10	0
			**			**	
M17	横浜	LC99 X10	100	10	0	100	95
		LC99 X100	100	0	0	50	47
			**			**	**
<i>Cx. p. pallens</i>							
P30	西ヶ原	LC99 X10	35	0	0	14	5
		LC99 X100	13	0	0	0	0
			**			*	
P28	三河島公園	LC99 X10	59	59	0	0	0
		LC99 X100	27	9	0	0	5
			**	*			
P21	玉津A	LC99 X10	35	5	0	14	0
		LC99 X100	14	0	0	0	0
			**			*	
P15	麻布大	LC99 X10	31	0	0	27	0
		LC99 X100	13	0	0	0	0
			**			*	
P02*	林試の森	LC99 X10	15	0	0	58	0
		LC99 X100	15	0	0	0	0
			**			*	
P11*	狛江市	LC99 X10	45	0	0	15	5
		LC99 X100	41	0	0	0	5
			**			*	
P23	堺A	LC99 X10	70	0	0	0	14
		LC99 X100	0	0	0	0	14
			*			**	

# LC99 X100 における生存率が10%以上の場合には \*\* を、また、その場合に該当しないが LC99 X10 における生存率が10%以上の場合には \* を付した。

\*1 etofenprox; \*2 temephos; \*3 fenitrothion; \*4 pyriproxyfen; \*5 diflubenzuron

表 3. 林試の森コロニーのエトフェンプロックス選抜による殺虫剤感受性の変動

世代	選抜濃度 (mg/L)	供試数	死亡率 (%)	LC50* (mg/L)
G0				0.11
G1	0.25	1576	71.0	1.3
G2	5.00	1998	62.3	5.9
G3	20	893	60.6	19
G4	30	1433	36.4	21
G5	60	2234	46.0	> 60
G6	60	1389	31.7	> 60
G7	60	919	13.8	51

\* 選抜により生残した個体の次世代子孫を用いての試験結果(ただし, G7のLC50については孫世代子孫を用いた結果)。

表 4. アカイエカ種群蚊コロニー幼虫のエトフェンプロックス感受性とPBOの共力効果

Species	Code	Colony	Treatment	N	Slope	LC50 (mg/L)	SR *1	RR *2	IRF *3	
									P450 *4	Others *5
<i>Cx. p. pallens</i>	-	洞穴	Etofenprox	357	6.9±0.59	0.026	8.4	-		
			+PBO	359	6.2±0.56	0.0031				
	P02	林試の森	Etofenprox	1221	0.9±0.05	0.11	21	4.2	3	2
			+PBO	506	4.2±0.31	0.0052		1.7		
	-	林試の森— 7世代選抜	Etofenprox	538	1.5±0.19	51.2	1551	1969	185	11
			+PBO	419	2.7±0.21	0.033		11		
<i>Cx. p. molestus</i>	M06	新宿04	Etofenprox	403	1.5±0.11	13.7	548	527	65	8
			+PBO	263	3.1±0.32	0.025		8.1		
	-	新宿04— 2世代選抜	Etofenprox	357	2.1±0.18	21.8	303	838	36	23
			+PBO	306	4.4±0.37	0.072		23		
	M10	福岡	Etofenprox	103		>60	>545	>2307	>65	36
			+PBO	198	4.0±0.49	0.11		36		
	M13	千葉	Etofenprox	249	1.3±0.24	27.3	364	1050	43	24
		+PBO	219	4.1±0.47	0.075		24			
M01	渋谷	Etofenprox	828	1.9±0.12	23.9	285	919	34	27	
		+PBO	575	2.8±0.22	0.084		27			
M12	大手町	Etofenprox	359	1.4±0.14	10.3	57	396	7	58	
		+PBO	308	2.8±0.25	0.18		58			

\*1 共力比; \*2 抵抗性比; \*3 抵抗性要因の強度; \*4 抵抗性コロニーのSR/感受性系統のSR(=真の共力効果); \*5 +PBOの場合のRRに相当

表 5. 蚊コロニーに認められた3種ピレスロイド系殺虫剤に対する幼虫の交差抵抗性

Insecticide	N	Slope (SE)	LC50 (mg/L)	95% CL (mg/L)	RR
林試の森-7世代選抜 *1					
Etofenprox	1221	1.5 (0.2)	51.2	33.2 - 109	1969 *
Permethrin	285	1.4 (0.1)	1.7	1.2 - 2.4	425 **
Phenothrin	245	1.7 (0.2)	16.7	12.3 - 22.4	1043 **
福岡 *2					
Etofenprox	103	-	> 60	-	> 2307 *
Permethrin	285	1.6 (0.1)	2.3	1.9 - 2.8	523 **
Phenothrin	245	2.1 (0.2)	19.2	9.2 - 39.9	1200 **

\* 対照系統は洞穴(アカイエカ); \*\* 対照系統は小笠原(ネッタイエカ)

\*1 アカイエカ, エトフェンプロックスで室内選抜

\*2 チカイエカ, 室内殺虫剤選抜なし

表 6. 昆虫種のP450亜族と遺伝子数

P450 subfamily	キイロ ショウジョウ バエ	An. gambiae	ネッタ イエカ
CYP6	24	29	20
CYP4	22	28	28
CYP325	0	14	
CYP9	6	8	8
CYP12	7	4	2
CYP305	1	3	
CYP304	1	2	
CYP307	1	2	
CYP301	1	1	1
CYP302	1	1	1
CYP303	1	1	
CYP306	1	1	
CYP314	1	1	1
CYP315	1	1	
CYP49A	1	1	1
CYP4AA	1	1	
その他	19	2	
合計	89	100	62