

表 7. アカイエカ種群亜種の分子判別に用いた蚊の採集地と無吸血産卵性

非無吸血産卵個体		無吸血産卵個体	
採集地	個体数	採集地	個体数
東京都立川市	2	渋谷区渋谷	2
東京都日野市	2	新宿区	2
東京都府中市	8	累代飼育系(新宿)	4
品川区戸越	3	累代飼育系(東大)	4
東京都狛江市	5	東京都武蔵野市	4
世田谷区駒沢	2	東京都東久留米市A	2
世田谷区野毛	2	東京都東久留米市B	4
東京都品川区	18	新宿区高田馬場	10
新宿区戸山	4	新宿区落合	2
埼玉県春日部市	4	大手町	8
神奈川県相模市淵野辺	4	千葉県柏市	2
千葉県熊野神社	4	千葉県市川市	2
愛知県名古屋市	4	埼玉県鳩ヶ谷市	4
大阪市大阪城	4	累代飼育系(静岡)	4
大阪市東成区	2	福岡県	4
長崎県山王公園	4	長崎県中町	4
長崎県長崎大	4	長崎県長崎大学	10
長崎県中町公園	4	千葉県鴨川市	4
		千葉県千葉市	4
		神奈川県川崎市	4
合計	80	合計	84

表 8. 野外採集したオオクロバエの殺虫剤感受性

Fenitrothion					Permethrin				
N	Slope	SE	LD50 ( $\mu\text{g}/\text{fly}$ )	95%CL	N	Slope	SE	LD50 ( $\mu\text{g}/\text{fly}$ )	95%CL
110	1.30	0.28	0.078	0.006-0.205	110	1.14	0.25	0.0136	0.007-0.025

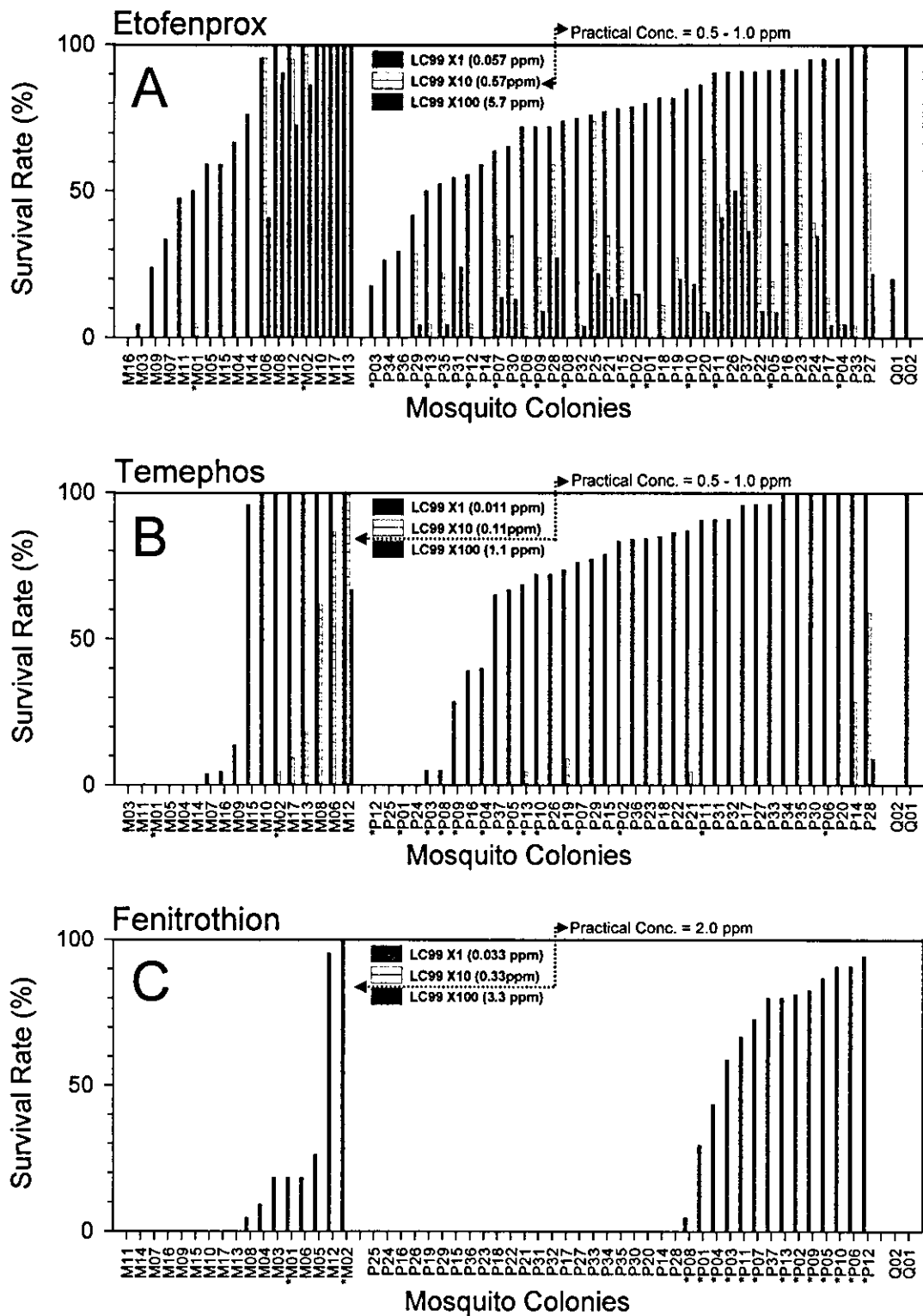


図 1. アカイエカ種群蚊幼虫の各種殺虫剤に対する感受性  
 A, エトフェンプロックス; B, テメホス; C, フェニトロチオン; D, ピリプロキシフェン; E, ジフルベンズロン。  
 LC99 はアカイエカ殺虫剤感受性系統 Horaana の 99% 死亡濃度。蚊コロニーを表すコードは表2に対応する。

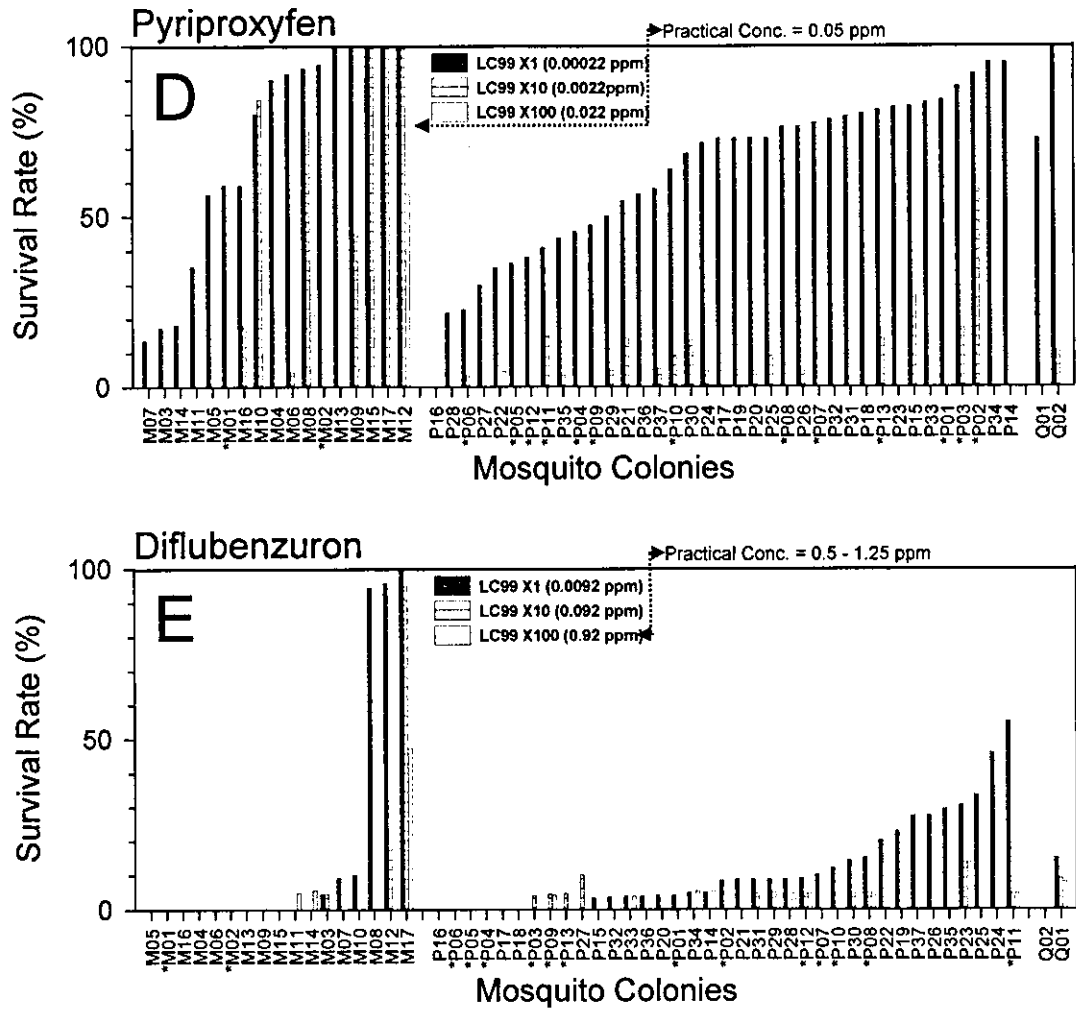


図 1. アカイエカ種群蚊幼虫の各種殺虫剤に対する感受性(前頁より続く)

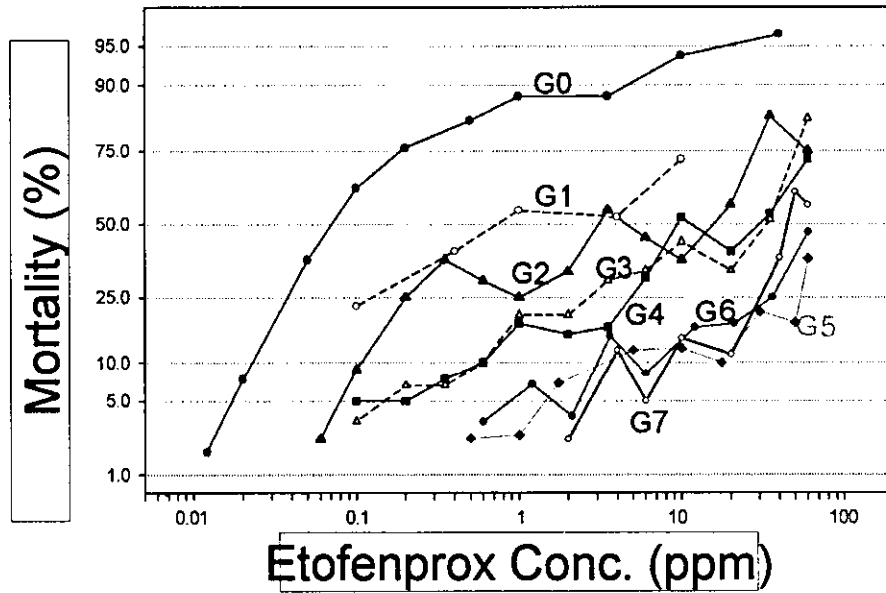


図 2. 林試の森コロニーのエトフェンプロックス選抜による殺虫剤感受性の変動

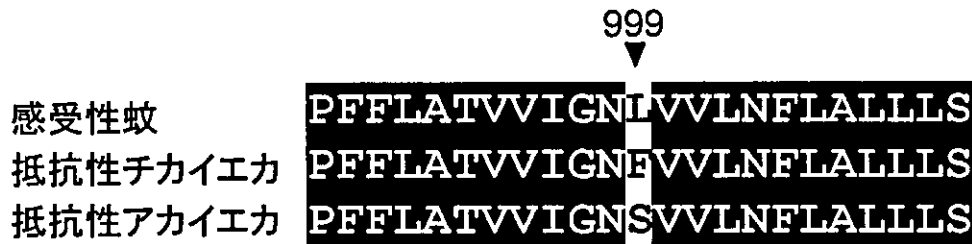


図 3. アカイエカ種群蚊ナトリウムチャンネル DII-S6 領域にある Leu999 座位に生じていた置換

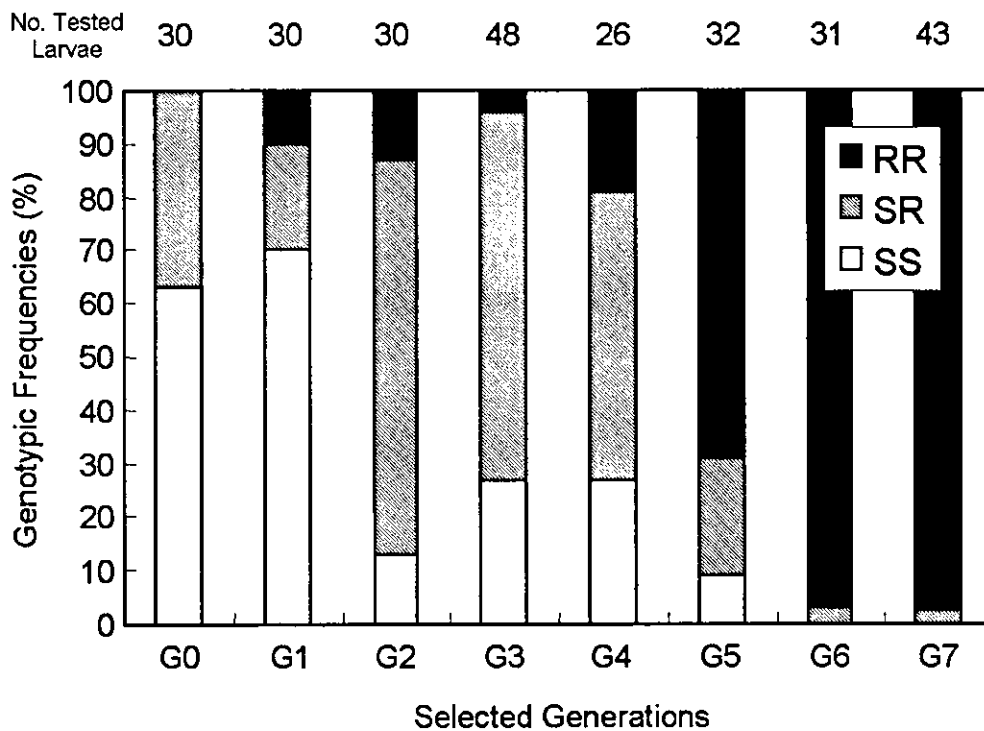


図 4. 林試の森コロニーのエトフェンプロックス選抜によるナトリウムチャンネル Leu999 座位に関する遺伝子型頻度の変動  
R, Ser999; S, Leu999



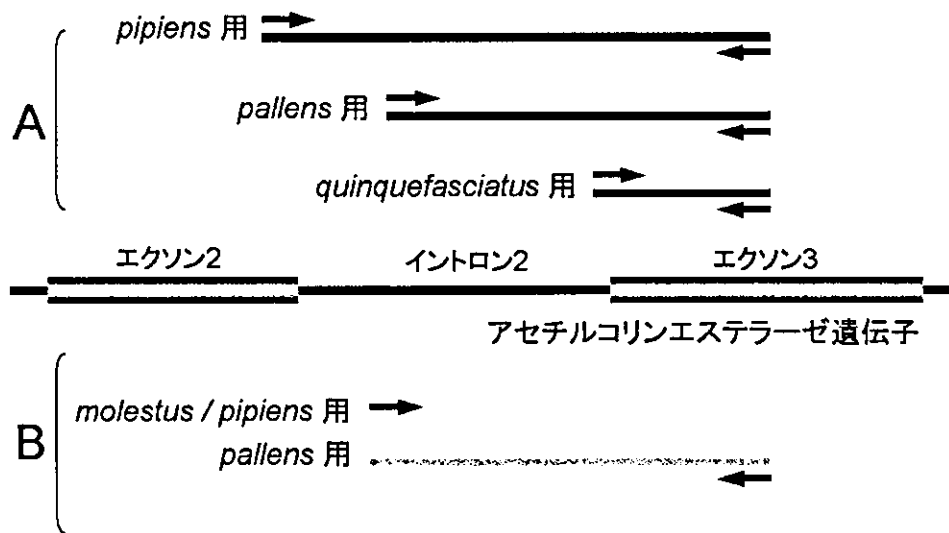


図 6. アカイエカ種群蚊の亜種を分子判別するために考案された亜種特異的プライマーの配置  
A, Smith and Fonseca (Am. J. Trop. Med. Hyg., 2004) によるもの; B, 本研究によるもの

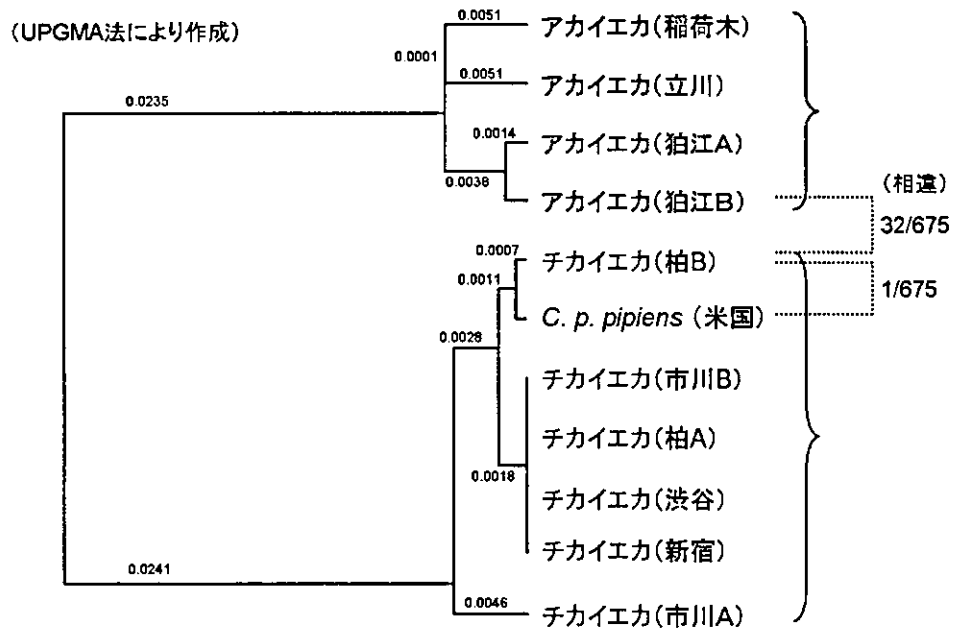


図 7. 日本産アカイエカ種群蚊の *Ace* 遺伝子配列に基づく分子系統樹  
イントロン2とその両隣のエクソン部分配列を含む 675-680 塩基長の配列多型により得られた。

ACEpip2 プライマー  
GTGGAAACGCATGATACCAG →

<i>p. pipiens</i> (USA)	A--TATTGAAATGGTGGAAACGCATGATACCAGA-TA
<i>p. molestus</i> (渋谷)	A--TATTGAAATGGTGGAAACGCATGATACCAGA-TA
<i>p. molestus</i> (新宿)	A--TATTGAAATGGTGGAAACGCATGATACCAGA-TA
<i>p. molestus</i> (市川)	A--TATTGAAATGGTGGAAACGCATGATACCAGA-TA
<i>p. molestus</i> (柏A)	A--TATTGAAATGGTGGAAACGCATGATACCAGA-TA
<i>p. molestus</i> (柏B)	A--TATTGAAATGGTGGAAACGCATGATACCAGA-TA
<i>p. pallens</i> (狛江A)	AAATATTGAAATGGTGGAGACGCATGACGCATGAATA
<i>p. pallens</i> (狛江B)	AA-TATTGAAATGGTGGAGACGCATGACGCATGAATA
<i>p. pallens</i> (立川)	AA-TATTGAAATGGTGGAGACGCATGACGCATGAATA
<i>p. pallens</i> (稲荷木)	ATATATTGAAATGGTGGAGACGCATGACGCATGAATA

GTGGAGACGCATGACGCAT →  
ACEpall2 プライマー

図 8. 日本産アカイエカとチカイエカの分子判別に利用可能な *Ace* 遺伝子の配列多型  
A, Smith and Fonseca (Am. J. Trop. Med. Hyg., 2004) によるもの; B, 本研究によるもの

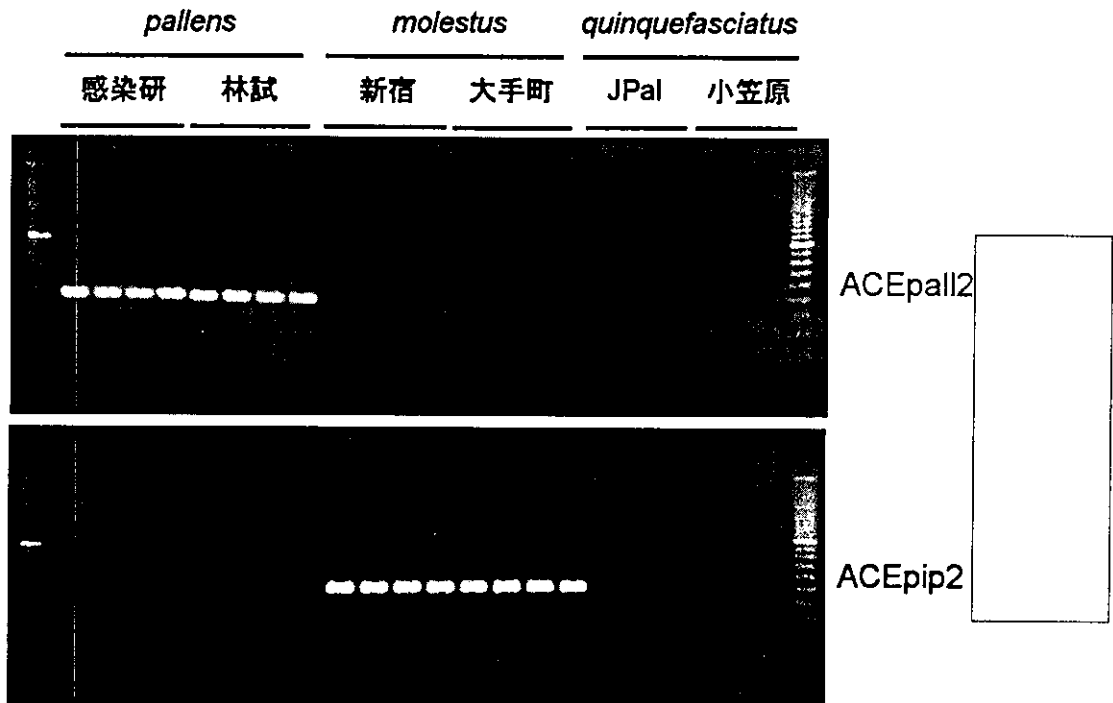


図 9. 2種の対立遺伝子特異的プライマーを用いた日本産アカイエカ, チカイエカ, およびネッタイエカの分子判別例  
ACEpall2, アカイエカ特異的プライマー; ACEpip2, チカイエカ/トビロイエカ共通プライマー

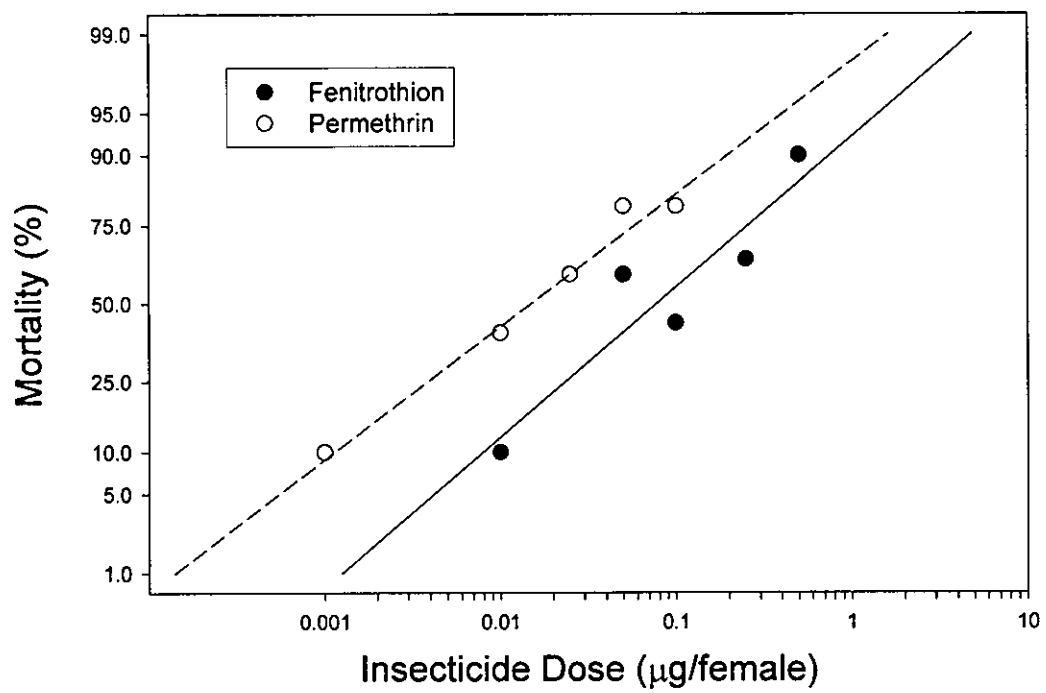


図 10. 野外採集したオオクロバエの殺虫剤感受性



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吸血源動物種の同定

分担研究者 澤邊 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部 室長）  
研究協力者 伊澤 晴彦（同・昆虫医科学部 研究員）  
星野 啓太（同・昆虫医科学部 流動研究員）  
佐々木年則（同・昆虫医科学部 主任研究官）  
比嘉由紀子（同・昆虫医科学部 流動研究員）  
葛西 真治（同・昆虫医科学部 主任研究官）  
津田 良夫（同・昆虫医科学部 室長）  
小林 睦生（同・昆虫医科学部 部長）

**研究要旨**

わが国においてウエストナイル（WN）ウイルス感受性種と想定される蚊種（アカイエカ種群、ヒトスジシマカ、キンイロヤブカ）の吸血源動物種を同定し、人へのウイルス媒介性を評価した。都市部に生息するアカイエカ種群とヒトスジシマカは、鳥類、ほ乳類ともに吸血する種類の蚊であり、キンイロヤブカはそのすべてがほ乳類を吸血し、ウシ、ブタが主たる吸血源であった。この結果は、わが国でWNウイルスの人への伝播を考えた場合、アカイエカ種群とヒトスジシマカが人と鳥との間のブリッジベクターとして最も重要な媒介蚊であることを示唆している。

国内にはアカイエカ種群の蚊として生態学的、生理学的に異なる性質を有する3種類（アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ）が分布しているが、従来の形態学的特徴では、特にアカイエカとチカイエカの分類が困難であることから、新たに着目したアセチルコリン分解酵素（ACE）遺伝子をマーカーとする方法（葛西ら、投稿準備中）および ITS1 領域で判別する方法によって分子分類法を行った。この結果を基に、アカイエカ種群の吸血源動物種を評価したところ、都市部の地上部で捕集されたアカイエカ種群中の約3割がチカイエカであり、予想以上にチカイエカが地上部で吸血活動を行っていることが明らかになった。また、アカイエカの鳥類吸血性はほ乳類よりも15%も高かったのに対し、チカイエカはほぼ同程度に鳥類とほ乳類を吸血しており、後者はより人嗜好性が強い種であることが判明した。

**A. 研究目的**

ウエストナイル（WN）ウイルスの人への感染で重要になる蚊の種類は、吸血源として鳥と人の両方を利用しうる種類に限られる。米国でWNウイルス感受性蚊とみなされる種のうちの4種類は、同種あるいは近縁の種が日本に生息している。それらはアカイエカ種群（*Culex pipiens*

complex）、ヒトスジシマカ（*Aedes albopictus*）、キンイロヤブカ（*Aedes vexans*）、ヤマトヤブカ（*Ochlerotatus japonicus*）であるが、これら本邦産WNウイルス媒介性の評価を行う目的で、上述した蚊4種を対象に吸血源動物種を同定した。

吸血源動物種の同定は、これまでミトコンドリア DNA チトクローム b 領域で差異が得られるように作成したプライマーを用いて行ってきたが、米国ではキンイロヤブカがほ乳類以外にも両生類あるいは爬虫類などを吸血するとの報告があることから、両生類や爬虫類の種をも検出し得るミトコンドリア 16S リボソーム RNA 領域でプライマーを作成し、共通プライマーとして用いた。

国内にはアカイエカ種群の蚊として生態学的、生理学的に異なる性質を有する 3 種類 (アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ) が分布しているが、特にアカイエカとチカイエカにおいては、従来の形態学的特徴では分類が困難であることから、分子分類法の開発が期待されていた。著者らは Miller ら (1996) が報告した ITS1 領域の遺伝子情報に注目し、日本産アカイエカ (佐賀市採集) と米国産チカイエカ (マサチューセッツ州採集) の配列に違いを見出した。その領域の構造解析を行うことで両種を区別できると考えた。

近年、葛西らがアセチルコリン分解酵素 (ACE) 遺伝子をマーカーとした分子分類法を開発した (葛西ら、投稿準備中)。また、従来よりの形態学的特徴による分類結果 (個眼数の相違、雄蚊の外部生殖器の形態) を参考に、これら結果と ITS1 領域からの分類結果とを照合しながら、本分類法の精度を評価した。得られる分類結果を基にアカイエカとチカイエカを精度よく判別し、2003~2004 年の 2 年間に捕集された両種の吸血嗜好性を再評価した。

## B. 研究方法

### 1. 吸血蚊の捕集

2003 年 5 月から 2004 年 12 月までに、主に猪口製ドライアイストラップを用いて国内 9 箇所吸血蚊を捕集した。ヒトスジシマカに対しては、昨年ドライアイストラップでは捕集されにくいことが分かっていたので、主に sweep netting 法に

より捕集を試みた。

### 2. 吸血源動物種の同定

吸血源動物由来の DNA は、頭部を切り離した蚊虫体からフェノール・クロロホルム法 (PURESCRIPT Blood RNA Isolation kit および PUREGENE DNA Purification kit, Gentra) により抽出した。ミトコンドリア DNA チトクローム b および 16S リボソーム RNA 領域を増幅する 3 種類のプライマーペアを用い、PCR 法によって増幅した (94°C2 分、94°C30 秒→55°C30 秒→72°C90 秒を 35 回繰り返す、次いで 72°C4 分間熱変性を加えた) (PC-701, アステック)。得られた PCR 産物からの遺伝子解析は PE/ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (PE/ABI) を用いたダイレクトシーケンシング法により実施した。遺伝子解析は BLAST-search および GENETYX-WIN ver.5 を用いて行った。

### 3. チカイエカとアカイエカの ITS1 領域による分子分類

ITS1 領域を増幅できるようなプライマー 1 ペアを作成し (配列は省略)、PCR を行った (94°C30 秒→55°C30 秒→72°C90 秒を 35 回繰り返す、次いで 72°C4 分間熱変性を加えた) (PC-701, アステック)。

ACE 遺伝子をマーカーとした分子分類法は葛西らの方法に従った。形態学的分類は、雌蚊に対しては個眼数 (野口ら, 1964) を比較し、雄蚊に対しては外部生殖器の形態によって分類を行った。

## C. 結果

調査したアカイエカ種群 159 個体の約 50% が鳥類のみ、38% がほ乳類のみを吸血し、13% がその両方の動物から吸血していた (図 1)。キンイロヤブカはそのすべてがほ乳類を吸血し、ウシ、ブタがその主たる吸血源であった (96%) が、わずかに 3 個体は人からも吸血していた。ヒトスジシマカとコガタアカイエカは本年の

結果であるが、ヒトスジシマカの 50%が鳥類のみを、29%がほ乳類のみ、21%が両方の動物を重複吸血しており、アカイエカ種群とほぼ同様の吸血嗜好性を示していた。また、コガタアカイエカはそのほとんどが豚舎で捕集された個体ではあったが、そのすべてがブタのみを吸血しており、キンイロヤブカと同様にほ乳類を好む傾向が強かった。

国内 9 箇所 で捕集されたアカイエカ種群を地域別に示した (図 2)。捕集数は 3 ~ 16 個体と少なかったが、首都圏を除くすべての地域で鳥類を好む傾向が見られた (沖縄/石垣島捕集個体はネッタイエカである)。首都圏では 111 個体のアカイエカ種群が捕集され、ほ乳類のみを吸血していた個体は 52%で、鳥類のみは 34%であった。両動物を重複吸血していた個体を合わせると、ほ乳類を好む個体は半数を上回り (約 66%) 鳥類を好む割合は半数を下回った (約 48%)。捕集された地域によってアカイエカ種群の吸血嗜好性は大きく異なっていた。

図 3 に日本産アカイエカと米国産チカイエカの ITS1 領域の配列を比較した。いくつかの部位で両者に違いが見られたが、特に図中①、②の 2 つの領域でチカイエカの配列に特徴的な欠失が見られた。この部位の配列に注目し両者の判別に用いた。まず実験室維持系統のアカイエカ (洞穴系統) およびチカイエカ (戸塚系統) 10 個体ずつを用いて ACE 遺伝子マーカーによる分類結果との照合を行った。次いで 2004 年 4 月 28 日に首都圏で捕集され、その後実験室内で無吸血産卵性であることを確認した個体の判別に供したが、いずれの蚊集団においても、ACE、ITS1 の判別結果はすべて一致していた (結果は省略)。以下、ACE 遺伝子、ITS1 領域での判別結果が一致した個体のみを分類結果とし、一致しなかったものは不明と位置付けた。

首都圏捕集の 111 個体はアカイエカ

63%、チカイエカ 30%の割合に分けられ、予想以上にチカイエカが地上部で吸血活動を行っている事が判明した (表 1)。同じく大都市である大阪/兵庫地域では捕集数が 14 個体と少なかったせいか、チカイエカの割合は 14%程度であったが、盛岡およびその他の地域 (結果は省略) では、ほとんどがアカイエカであった。チカイエカは首都圏、大阪/兵庫、長崎でのみ捕集された。アカイエカ種群として吸血嗜好性を集計した結果と比較すると、アカイエカは鳥類のみを吸血する個体が 53%、ほ乳類のみが 36%と鳥類を好む割合が高かったのに対し (図 4)。チカイエカはほ乳類、鳥類、ともに同じ割合で吸血して (いずれも 43%)、明らかに鳥も人も同程度に好きな蚊種であることが示された。

吸血源動物種の詳細は表 2 に示すように、ほ乳類種ではアカイエカ、チカイエカともに人、イヌ、ネコの順で多く、アカイエカは 6 種の動物から吸血していたのに対し、チカイエカはそのほとんどが人を吸血していた (81%)。鳥類種では、両種ともにカモ類、スズメの順に多く吸血していた。また、前者が 8 種類の鳥類種を吸血していたのに対し、後者は 3 種類のみで、ほ乳類種と同様にチカイエカの好む種類数は非常に少なかった。

#### D. 考察

国内に分布するアカイエカ種群の蚊 3 種類、特にアカイエカとチカイエカの形態的特徴は酷似している。両者を区別するには、野口・朝比奈 (1966) の個眼数の相違による分類法、あるいは雄の外部生殖器の形態によって分類する方法 (野口, 1962) がある。本研究で用いた ACE 遺伝子および ITS1 領域での差異による分子分類結果と、上述した形態学的分類結果とを照合したところ (結果は省略)、分子分類結果はほぼ一致していたが、形態学的分類結果とは 8 割程度しか一致しなかった。後者は季節的な変異あるいは環

境などによる影響を受けやすいことが考えられ、その結果、両分類結果に誤差が生じたのかもしれない。ACE 遺伝子による分類法がプライマーを使用するだけで肉眼的に判別が可能であるのに対し、ITS1 領域での判別は配列の差異を読み取る必要があるためより煩雑である。今後特異的なプライマーの設計など行うことが必要と考えている。

本分子分類の結果を基に、本邦産 WN ウイルス感受性種と思われる 5 種類（アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカ、ヒトスジシマカ、キンイロヤブカ）の吸血嗜好性を評価したところ、アカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカはほぼ同等に鳥類とほ乳類の両者を吸血することができる種であった。また、アカイエカは多くのほ乳類と鳥類種を吸血していたのに対し、チカイエカは都市部の人のある環境に見られる動物種のみを吸血しているように見受けられた。両種の生息環境を反映していると思われる。キンイロヤブカにおいてはブタ、ウシ、人のほ乳類のみを吸血しており、前出した蚊種とは明らかに嗜好性が異なっていた。

以上の結果は、わが国に WN ウイルスが侵入し、人への伝播を考えた場合、アカイエカ種群の蚊およびヒトスジシマカの 4 種類が、鳥と人との間のブリッジベクターとして大きな役割を果たすであろうと推察される。一方、キンイロヤブカは米国の実験ではウイルス感受性が非常に高いとされたが、わが国において実際にブリッジベクターとして役割を果たす可能性は非常に低いであろう。キンイロヤブカは都市部では全く捕集されていないので、人への嗜好性が本結果で示されたほど低いかについて議論はできないが、少なくとも WN ウイルスの人へのブリッジベクターとしては重要な種ではないと思われる。

*Culex pipiens pipiens* トビイロイエカと学名を同じくする種類の蚊が、米国でも

欧州でも広く分布しているが、両者の吸血嗜好性は大きく異なるようである。つまり、米国のトビイロイエカの多くは鳥も人も吸血するタイプであり、WN ウイルスの人へのブリッジベクターとなり得るが、一方、欧州のトビイロイエカは主に鳥のみを吸血するため WN ウイルスの人への感染にはほとんど関与していないと推察されている (Fonseca *et al.*, 2003)。それらトビイロイエカとは近縁である本邦産アカイエカ種群の蚊は、いずれの種も米国産と同じ吸血嗜好性を示した。このことは、一旦日本国内に WN ウイルスが侵入すると、米国同様に大流行が起こる可能性を示唆している。

2002 年、西シベリア南部で死亡した野鳥から WN ウイルスが検出され、遺伝子解析からそのウイルスはカスピ海地域と西シベリアで感染循環している WN ウイルスに関連があることが示唆された。また、2004 年にはシベリア西部で初めて WN 熱の患者が確認され、シベリアからは長距離の感染拡大に重要な役割を果たすとされる渡り鳥が日本全国に多数飛来していることから、わが国への WN ウイルスの侵入がにわかに現実味を帯びてきている。このような背景の下に、吸血嗜好性の観点から、上述した 4 種類の蚊を重要視したが、WN ウイルスを含むフラビウイルスの検出に関する報告書において、これら 4 種類には、固有のフラビウイルスが潜在的に感染していることを明らかにしており、様々な観点から、WN ウイルスのベクターとしての評価を正確に行う必要がある。

## E. 結論

1) アカイエカとチカイエカを ACE 遺伝子および ITS1 領域の差異に基づく分子分類法によって区別し、吸血源動物種の同定を行った。その結果、いずれの種も鳥類とほ乳類の両者を好んで吸血することが判明したが、チカイエカのほ乳類嗜好

性はアカイエカより 10%程度高かった。

2) 都市部の地上部で捕集されたアカイエカ種群中の約 3 割がチカイエカであり、予想以上にチカイエカが地上部で吸血活動を行っていることが明らかになった。

3) チカイエカの吸血源動物種数は少なく、都市部の人のいる環境に見られる動物種（人、ペットのほ乳類、スズメ、カモ類）のみを吸血しているように見受けられた。

4) 本邦産 WN ウイルス感受性種と想定される蚊種の中で、アカイエカ種群 3 種蚊とヒトスジシマカは人と鳥との間のブリッジベクターとして最も重要な媒介蚊であることを推察した。

## F. 健康危険情報

米国および中米地域における WN ウイルスの流行は今年度も拡大してきているが、日本国内における流行は現在のところみられていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

沢辺京子, 小林睦生. ウエストナイル熱媒介蚊と吸血嗜好性. *ファルマシア*, 40: 527-531 (2004).

### 2. 学会発表

沢辺京子, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 小林睦生. チトクローム b 遺伝子解析による吸血源動物種の同定. 日米医学協力寄生虫疾患専門部会研究成果報告会, 2004 年 1 月 23 日.

津田良夫, 倉橋弘, 林利彦, 葛西真治, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 沢辺京子, 富田隆史, 二瓶直子, 小林睦生. 都市域におけるドライアイストラップによる蚊類の発生状況調査. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4

月 7 日.

倉橋弘, 津田良夫, 林利彦, 葛西真治, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 沢辺京子, 富田隆史, 二瓶直子, 小林睦生. ドライアイストラップで捕集された都市域の昆虫類. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4 月 6 日.

小林睦生, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 二瓶直子, 沢辺京子, 津田良夫. 北海道能取湖におけるドライアイストラップによる蚊の捕集: 設置場所と捕集数に関する考察. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4 月 6 日.

沢辺京子, 伊澤晴彦, 佐々木年則, Sudipta Roychoudhury, 西海功, 濱尾章二, 津田良夫, 小林睦生. チトクローム b 遺伝子解析による吸血源動物種の同定. 第 56 回日本衛生動物学会大会, 2004 年 4 月 7 日.

沢辺京子, 小林睦生, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫. チトクローム b 遺伝子解析による吸血源動物種の同定. 第 39 回日本脳炎生態研究会, 2004 年 6 月 17 日.

沢辺京子. ウエストナイル熱媒介蚊と吸血嗜好性—遺伝情報から探る蚊の吸血源動物種—. 第 51 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会, 2004 年 9 月 17 日.

比嘉由紀子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 二瓶直子, 沢辺京子, 津田良夫, 小林睦生. 北海道東部におけるドライアイストラップによる蚊の捕集. 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.

Kyoko Sawabe, Haruhiko Isawa, Toshinori Sasaki, Sudipta Roychoudhury, Yoshio Tsuda, Yukiko Higa, Shinji Kasai, Mutsuo Kobayashi. Identification of bloodmeals in field collected mosquitoes based on cytochrome b sequences.  
The 40th Joint Conference on Parasitic Diseases, The Japan-United States Cooperative Medical Science Program, 2004年12月12日.

#### 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

種	首都圏 (%)	大阪/兵庫 (%)	盛岡 (%)	川崎市 <sup>b</sup> (%)
アカイエカ種群	111	14	16	83
アカイエカ	70(63.1)	12(85.7)	16(100)	58(69.9)
チカイエカ <sup>a</sup>	33(29.7)	2(14.3)	0	23(27.7)
未同定	8(7.2)	0	0	2(2.4)

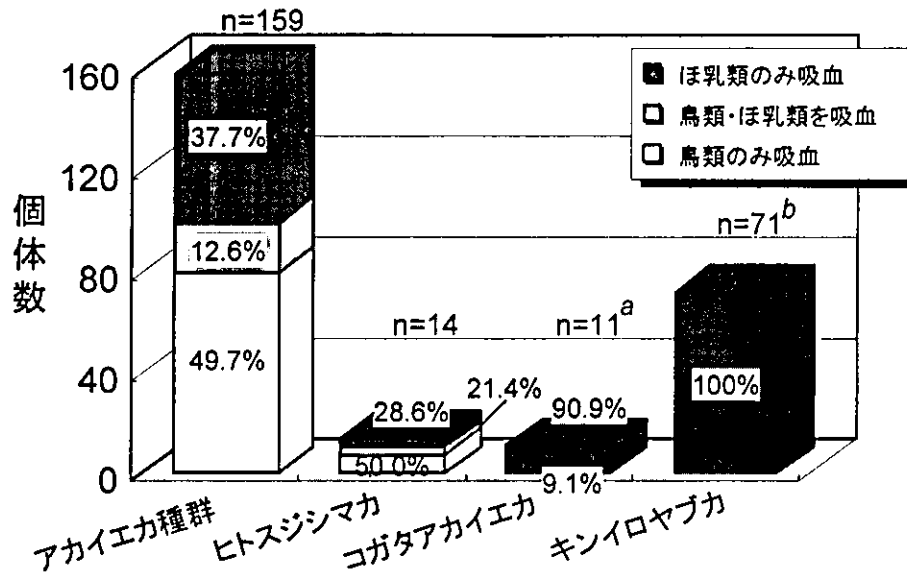
<sup>a</sup>チカイエカは首都圏、大阪/兵庫、長崎で捕集された。

<sup>b</sup>ドライアイストラップに捕集された蚊(吸血蚊ではない)

表1 アカイエカ種群吸血蚊におけるアカイエカとチカイエカの割合

表2 アカイエカとチカイエカの吸血源動物種

吸血源動物種	アカイエカ (n=71)	チカイエカ (n=33)
ほ乳類を吸血した個体	55	21
ヒト	24 (43.6%)	17 (81.0%)
イヌ	10 (18.2%)	1 (4.8%)
ネコ	10 (18.2%)	1 (4.8%)
ネズミ	2 (3.6%)	
ウシ	1 (1.8%)	
ブタ	1 (1.8%)	
未同定	7 (12.7%)	2 (9.5%)
鳥類を吸血した個体	74	21
カモ類 (カルガモ, マガモなど)	35 (47.3%)	12 (57.1%)
スズメ (ニューナイスズメ含む)	29 (39.2%)	6 (28.6%)
シジュウカラ	2 (2.7%)	1 (4.8%)
カラス科 (ハシブトガラス含む)	2 (2.7%)	
メジロ	2 (2.7%)	
カワラヒワ	1 (1.4%)	
ムクドリ	1 (1.4%)	
93%モズ	1 (1.4%)	
未同定	2 (2.7%)	2 (9.5%)



a: 1個体を除いてすべて豚舎前のトラップで捕集された。  
 b: 成田熊野神社において主にsweep netting によって捕集された。

図1 4種蚊の吸血源動物種

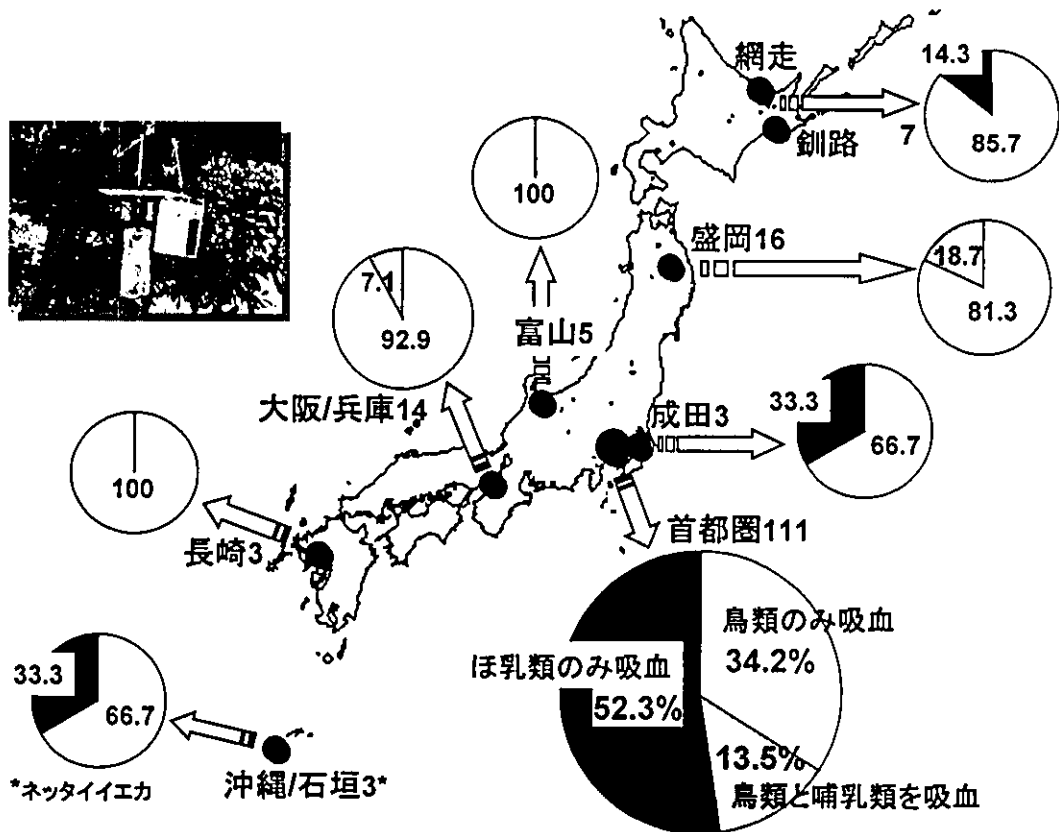


図2 国内9箇所て捕集されたアカイエカ種群蚊の吸血嗜好性



*pallens* { paja6j11 1: AAGGTTCCGTAG TGAACCTC GAAGGATCATTACCGTAACACACTTCATACCATGACAG CATA 70  
 paja6j32 1: AAGGTTCCGTAG TGAACCTC GAAGGATCATTACCGTAACACACTTCATACCATGACAG CATA 70  
*molestus* { Pma6j11 1: AAGGTTCCGTAG TGAACCTC GAAGGATCATTACCGTAACACACTTCATACCATGACAG 66  
 Pma6j32 1: AAGGTTCCGTAG TGAACCTC GAAGGATCATTACCGTAACACACTTCATACCATGACAG 65

paja6j11 71: TGACAGCGTACACGTAAATGTG CTTGTGAGGGAAAGTT GAGGAGGAAGGAAGGAAGG CTCTCGGG 140  
 paja6j32 71: TGACAGCGTACACGTAAATGTG CTTGTGAGGGAAAGTT GAGGAGGAAGGAAGGAAGG CTCTCGGG 140  
 Pma6j11 67: TGACAGCGTACACGTAAATGTG ----- GAGGAGGAAGGAAGG ----- CTCTCGGG 116  
 Pma6j32 66: TTAACAGGTAACACGTAAATGTG ----- GAGGAGGAAGGAAGG ----- CTCTCGGG 115

paja6j11 141: TCGTCTCTGGCCGGTCTCCGATCAAAATGTCGAGTTCCGGCACGCACAAC GAAACACACAGG 210  
 paja6j32 141: TCGTCTCTGGCCGGTCTCCGATCAAAATGTCGAGTTCCGGCACGCACAAC GAAACACACAGG 210  
 Pma6j11 117: TCGTCTCTGGCCGGTCTCCGATCAAAATGTCGAGTTCCGGCACGCACAAC GAAACACACAGG 185  
 Pma6j32 116: TCGTCTCTGGCCGGTCTCCGATCAAAATGTCGAGTTCCGGCACGCACAAC GAAACACACAGG 184

paja6j11 211: TGGCCCACTGTA CAGTGTGATCACCAGTCC ----- TCCGGACCCCTCCCGGTGATCACAGACACA 277  
 paja6j32 211: TGGCCCACTGTA CAGTGTGATCACCAGTCC ----- TCCGGACCCCTCCCGGTGATCACAGACACA 277  
 Pma6j11 186: TGGCCCACTGTA CAGTGTGATCACCAGTCCCA TCCGGACCCCTCCCGGTGATCACAGACACA 255  
 Pma6j32 185: TGGCCCACTGTA CAGTGTGATCACCAGTCCCA TCCGGACCCCTCCCGGTGATCACAGACACA 254

paja6j11 278: ----- CTCCGTCTCTGTGTCGGTCCGCAAA ATTTCCAGG GCAAGCUL ----- IACAGAGAACAAAG 337  
 paja6j32 278: ----- CTCCGTCTCTGTGTCGGTCCGCAAA ATTTCCAGG GCAAGCUL ----- IACAGAGAACAAAG 337  
 Pma6j11 256: ----- CTCCGTCTCTGTGTCGGTCCGCAAA ATTTCCAGG GCAAGCUL ----- IACAGAGAACAAAG 315  
 Pma6j32 255: ACAG CTCCGTCTCTGTGTCGGTCCGCAAA ----- GCAAGCUL GAGCGG IACAGAGAACAAAG 316

paja6j11 338: IACGAGAGAGACCGA 352  
 paja6j32 338: IACGAGAGAGACCGA 352  
 Pma6j11 316: IACGAGAGAGACCGA 330  
 Pma6j32 317: IACGAGAGAGACCGA 331

(Miller et al., 1996, Insect Mol. Biol., 5:93-107)

図3 ITS1 部分配列によるアカイエカ(*pallens*)とチカイエカ(*molestus*)の判別

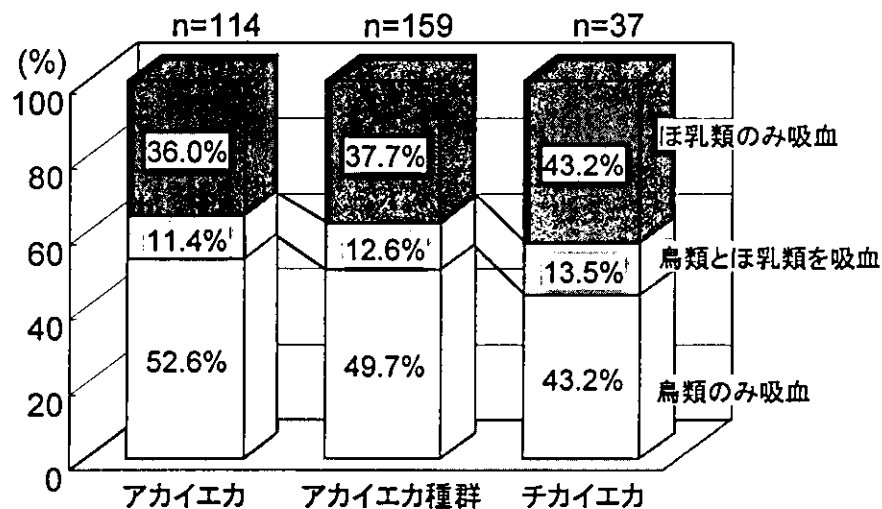


図4 アカイエカ種群蚊の吸血嗜好性

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

本邦産ウエストナイル(WN)ウイルスを含むフラビウイルスの検出

分担研究者 澤邊 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部 室長）  
研究協力者 伊澤 晴彦（同・昆虫医科学部 研究員）  
星野 啓太（同・昆虫医科学部 流動研究員）  
佐々木年則（同・昆虫医科学部 主任研究官）  
小滝 徹（同・ウイルス一部 協力研究員）  
高崎 智彦（同・ウイルス一部 室長）  
津田 良夫（同・昆虫医科学部 室長）  
小林 睦生（同・昆虫医科学部 部長）

**研究要旨**

2004年3月～2005年2月にかけて国内8ヶ所で、主にドライイストラップにより捕集された蚊集団に対してウエストナイル（WN）ウイルスを含むフラビウイルスの検出を行った。10属44種合計11,667個体から754プール（雌10,517個体631プール、雄1,150個体116プール）を作成し、Vero、BHK21およびC6/36細胞の培地上清からRNAを抽出しRT-PCRおよびTaqMan RT-PCRでウイルスゲノムの検出を行った。昨年と同じ捕集地から得た蚊プールにおいては、昨年新たに見いだしたフラビウイルスの存在によるCPE観察への影響を避けるため、ほ乳類由来細胞（VeroおよびBHK21細胞）への接種をC6/36細胞に先んじて行った。WNウイルスの検出においては、すべての蚊プールでウイルス陰性結果が得られた。その他のフラビウイルスについては、本年新たに加えた捕集地については昨年同様にC6/36細胞への接種を行った結果、三重および沖縄から得られた蚊プールにCPEが観察され、一部RT-PCRによるウイルス陽性判定も得た。昨年の結果と総合すると、国内のかなりの地域でしかも高率にある種のフラビウイルスが存在していることが明らかになった。現在、本ウイルスに関する遺伝子構造解析およびウイルス学的性状解析を進め詳細を検討している。

また、カラスの死亡例が報告された茨城県内2箇所において、WNウイルスのみを対象とした媒介蚊調査およびウイルス検出を実施したが、6属11種741個体38プールの蚊からはWNウイルスは検出されなかった。

**A. 研究目的**

米国におけるWN熱の流行は、2004年12月までに西へと流行域を拡大し、現時点で未だ、蚊、馬、人のいずれにも感染例のない州はアラスカ、ハワイ、ワシントンの3州のみとなり、わが国へのWNウイルスの侵入への危機感も次第に増してきた。そこで2003年より実施しているフラビウイ

ルス全般に対するウイルス検出を本年も継続して行うと同時に、野鳥類などにWNウイルス感染死亡例が疑われる場合の実際的な検出方法を検証した。

2003年は、国内合計8箇所、主にドライイストラップにより捕集された蚊7,281個体から320プールを作成し、C6/36

細胞へ接種し、変性細胞（CPE）を観察した。しかし、これまでの結果から、ある種のフラビウイルスが国内の蚊集団に潜在的に広く存在していることを確認しており、これら新規フラビウイルスの存在が、WNウイルスを始めとする既知のフラビウイルスにおける CPE 判定およびウイルス分離に何らかの影響を及ぼす可能性があることが危惧された。そこで本年は、新規捕集地域のみ従来の方法で C6/36 細胞を用いて培養後、ウイルスゲノムの検出を行うこととし、昨年からの継続地域についてはすでに新規フラビウイルスの存在を確認しているため、まず、ほ乳類由来の Vero および BHK21 細胞に接種、盲継代後、C6/36 細胞に接種し、その後のウイルスゲノム検出に供することにした。

## B. 研究方法

### 1. 野外捕集蚊

2004年3月～2005年2月にかけて国内8ヶ所で、主にドライアイストラップにより捕集された蚊集団は、10属44種合計11,667個体（雌10,517、雄1,150）で、それらから754プール（雌631プール、雄116プール）を作成した。捕集蚊の種名および捕集数の詳細は表1に示した。

1) 成田：成田市周辺3地点（成田市十余三、山武郡松尾町、山武郡成東町熊の神社）、6～10月、月1回捕集

2) 首都圏：東京都および近郊3県16地点（さいたま市浦和区、鶴ヶ崎市脚折町、春日部市大沼、戸田市川岸、新宿区戸山、新宿区西早稲田、品川区小山台、中野区落合、足立区西河原、府中市栄町、目黒区林試の森公園、東久留米市大門町、東久留米市冰川台、柏市新柏、市川市南行徳、横浜市青葉区）、3～11月、週1回捕集

3) 長崎：長崎市坂本町、6月14～17日捕集

4) 石垣/沖縄：石垣市5、9月、沖縄：那

覇市および中頭郡西原町、4～10月、週1回捕集

5) 広島：安芸郡倉橋町8月6～8日、庄原市8～10月、週1回捕集

6) 北海道：釧路市8月6～8日捕集

7) 茨城：猿島郡総和町および東茨城郡美野里町9月1～3日捕集

8) 三重：津市9月21～22日捕集

### 2. アカイエカとチカイエカの分子分類

首都圏捕集箇所のうち、川崎市高津区役所内で捕集された蚊はアカイエカ種群とヒトスジシマカのみであったが、アカイエカ種群に対しては、葛西らが開発したアセチルコリン分解酵素（ACE）遺伝子、および著者らが注目した ITS1 領域の配列差異を用いた分子分類法（葛西らの報告、吸血源動物種の同定の項でそれぞれ紹介）によりアカイエカとチカイエカに区別してウイルス検出を行った。

蚊サンプルは切り離した脚6本と翅2枚から、REDextract-N-Amp Tissue PCR Kit（SIGMA）を用いて個別にDNAの抽出とPCRを行った。

### 3. ウイルス分離

#### 培養細胞系によるCPEの観察

昨年からの変更点は2点あり、まず蚊の処理個体数を最高30個体までを1プールとした（図1）。次いで、蚊プールはMEM培養液中細胞破砕機MM300（QIAGEN）を用い乳剤を作成、軽く遠心後回収した上清を培養細胞に接種した。昨年からの継続地域で捕集された蚊に対しては、ほ乳類由来VeroおよびBHK21細胞に接種し36℃下で約5日間、2代盲継代培養した。培地上清をそれぞれ回収し、両者を混合した後C6/36細胞に植え継ぎ、28℃、5%CO<sub>2</sub>下で約7日間培養した。新規捕集地産蚊プールに対しては従来どおりC6/36細胞に接種し2代盲継代後RNAを抽出した。

#### フラビウイルスの検出：

それぞれの培地上清からRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いてウイルスRNAの抽出を行った。RT-PCRはAccessQuick RT-PCR System (プロメガ) およびTakara RNA PCR Kit (AMV) により、53°C30分、92°C2分、(92°C1分→53°C1分→72°C×1分を40回繰り返し)、72°C10分の熱変性を加えた。用いたプライマーは、

NS3領域(Fla- U5004: ggAACDTCMggHT-CNCCHAT、Fla-L5457: gTgAARTGDgCYT-CRTCCAT)と独自に作成したNS5領域の2種類(配列情報は省略し、便宜上NS5SとNS5Lとする)の合計3種類である。

#### WNウイルスの検出:

野生動物などに WN ウイルス感染死亡例が疑われる場合の実際的な検出方法を検討した。培養細胞による接種の行程を経ることなく、MEM 乳剤の半量からまず RNA を抽出し (RNeasy Mini Kit, QIAGEN)、TaqMan RT-PCR によりウイルス検出を行った。用いたプライマー・プローブセットは WNENV-forward(1160-1180), WNENV-reverse(1209-1229), WNENV-probe(1186-1207)、および WN3'NC-forward (10668-10684), WN3'NC-reverse(10770-10756), WN3'NC-probe(10691-10714) を用い、TaqMan RT-PCR は、48°C30分、95°C10分、(95°C15 秒→60°C1 分を 45 回繰り返した) (iCycler, BioRad) で行った。

ウイルス陽性プールが得られた場合は、半量残した MEM 乳剤を Vero および C6/36 細胞に接種してウイルス分離を試みる。本方法はカラスの死亡例が報告された茨城県下 2 箇所からの捕集個体に適用した。

#### C. 結果

2004 年 3 月～2004 年 11 月にかけて国内 8 ヶ所で、主にドライアイストラップにより捕集された蚊の詳細は表 1 に示した。2003 年からの継続捕集地においてはほ乳類細胞を用いたことで、C6/36 細胞培地上に図 2 に見られるような CPE はほとんど見られ

なくなり、従って既知のフラビウイルスの存在は検出しやすくなると予想された。WN ウイルス検出結果はすべて陰性であり、新たに蚊の捕集を行った地域から得られた蚊プールからも WN ウイルスを含む既知のフラビウイルスの存在は否定された。

一方、昨年見出した新規フラビウイルスは本年新たに加えた捕集地のうち三重および沖縄から得られた蚊プールに CPE が観察され、RT-PCR によるウイルス陽性判定を得た蚊プールもあった。昨年の結果と総合すると、国内のかなりの地域でしかも高率にある種のフラビウイルスが存在していることが明らかになった。現在までに、主にアカイエカ種群が有していた新規フラビウイルスに関しての遺伝子構造解析はほぼ終了し、遺伝子の全長を得る事に成功している(結果は省略)。分類学的な位置付けを検討するとともに、ウイルス学的性状解析を進めている。

川崎市高津区役所捕集のアカイエカ種群 83 個体は、全体の約 70% (58 個体) がアカイエカと分類されたが、28% (23 個体) はチカイエカが混在していることが分かった(表 2)。ヒトスジシマカも含めたこれら 3 種類のいずれの蚊プールからも WN ウイルスを含む既知のフラビウイルスは検出されなかったが、2003 年 10 月に捕集されたアカイエカ種群の蚊から日本脳炎 (JE) ウイルスが検出された経緯があることから、本捕集蚊においても C6/36 培地上清から RNA を抽出し、TaqMan RT-PCR により、両種に分けてウイルスゲノムの有無を確認する予定である。

茨城県内 2 箇所(図 3)において、WN ウイルスのみを対象とした媒介蚊調査およびウイルス検出を実施し(図 4)、6 属 11 種 741 個体 38 プールの蚊から、WN ウイルスのみを対象として TaqMan RT-PCR によりウイルスゲノムの検出を試みた。結果は、すべての蚊プールでウイルス陰性であった(表 3)。