

200500660B

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

感染症媒介ベクターの実態、生息防止対策に関する研究

平成15年度～17年度 総合研究報告書

平成18年3月

主任研究者 小林睦生

国立感染症研究所 昆虫医科学部

# 目 次

## I. 総合研究報告書

### 感染症媒介ベクターの実態、生息防止対策に関する研究

|      |   |
|------|---|
| 小林睦生 | 1 |
|------|---|

## II. 分担研究総合報告書

|  |     |
|--|-----|
| 1. 千葉県における感染症媒介カルの生息実態調査                                   |     |
| 藤曲正登他  | 37  |
| 2. 我国における疾病媒介蚊の発生源、発生状況、繁殖生態に関する研究                         |     |
| 津田良夫他  | 41  |
| 3. 横浜市における蚊類成虫および幼虫の生息調査                                   |     |
| 小曾根恵子他   | 49  |
| 4. 雨水枡中の幼虫発生と季節変動－横浜市緑区の事例－                                |     |
| 小菅皇夫他  | 55  |
| 5. 京浜工業地帯近隣および郊外緑地帯の住宅地における蚊発生調査とその対策について                  |     |
| 新庄五朗他  | 59  |
| 6. 北関東における野生蚊の季節消長および Kunjin virus の VERO 細胞侵入を阻止するペプチドの研究 |     |
| 松岡裕之   | 65  |
| 7. 富山県における感染症媒介蚊の発生実態と捕集蚊からのフラビウイルスの検出と炭酸ガス製剤による駆除実験       |     |
| 渡辺 護他  | 69  |
| 8. 都市域における蚊類の生態と防除   |     |
| 吉田政弘他  | 75  |
| 9. 沖縄県における疾病媒介蚊に関する調査研究                                    |     |
| 當間孝子   | 81  |
| 10. 地理情報システムを用いた媒介蚊の発生環境解析                                 |     |
| 二瓶直子他  | 87  |
| 11. 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                  |     |
| 富田隆史他  | 95  |
| 12. 国内で捕集された蚊からのフラビウイルスの検出                                 |     |
| 澤邊京子他  | 103 |

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| 1 3. 国内に生息する疾病媒介蚊の吸血嗜好性に関する研究   |       |
| 澤邊京子他                           | 1 1 1 |
| 1 4. 我が国のフラビウイルス感染症の疫学的解析       |       |
| 1)疫学調査のための日本脳炎ウイルス遺伝子検出法の開発     |       |
| 2)Yokose ウイルスの蚊およびマウスに対する感染性の検討 |       |
| 3)野生イノシシにおける日本脳炎抗体保有状況          |       |
| 高崎智彦他                           | 1 1 7 |
| Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表               | 1 2 1 |

感染症媒介ベクターの実態、生息防止対策に関する研究

主任研究者 小林 睦生 国立感染症研究所昆虫医科学部

研究要旨

1) 成虫および幼虫調査

東京、埼玉、千葉、神奈川、富山、大阪等でドライイラストラップを設置し、4月から12月、一部地域では周年にわたって成虫の捕集をおこなった。全体に捕集蚊の数は各トラップで大きく異なり、周辺環境と設置場所が関係したと思われる。都市部の捕集蚊はアカイエカ種群とヒトスジシマカがほとんどで、これらの蚊はWNVの媒介蚊であることから、平時からの発生源対策の必要性が示された。捕集蚊の種類としては、都市部では前3種以外に、コガタアカイエカが主であるが、地方によってはシナハマダラカ、ハマダライエカ、カツライエカ、オオクロヤブカ、キンイロヤブカ等が捕集された。また、従来のブラックライト型のトラップ、ドライアイスを加えたブラックライト型のトラップ、CDC型トラップ、プロパンガスを燃焼させるタイプのMosquito Magnet、産卵のために飛来した雌を捕集するGravid trap等を用いて調査を行った結果、捕集蚊数、蚊の種類、蚊以外の昆虫の捕集状況に大きな差が認められた。幼虫の発生状況調査は、人工容器、雨水マスなどの調査に加え、幼虫調査のために設置した水槽での発生幼虫の調査を行った。東京都内の公園にある雨水マスの有水率は32.6~42.0%で、幼虫発生が確認されたマスの割合は6.6~21.5%、神奈川県での有水マスの割合11~89%と大きく異なっており、幼虫発生が見られた雨水マスの率は11~14%であった。大阪府では夏期に140ヶ所の雨水マスが調査され、有水マスの割合は47~92%と高く、有水マスにはほとんどアカイエカ種群またはヒトスジシマカの幼虫が発生していた。水が溜まっている雨水マスの比率が地域、季節によって大きく異なり、地質の違いが関係していることが示唆された。都市部の雨水マスに発生する幼虫の多くは、アカイエカ種群、ヒトスジシマカ、ヤマトクシヒゲカ、ヤマトヤブカ、トラフカクイカが主要な種類であった。沖縄での人家周辺に設置した容器では約80%の容器にカクイカが発生しており、捕食者が蚊の密度の抑制に関係していることが示唆された。大阪府の冬期における幼虫発生調査においては、アカイエカが12月から2月にかけて観察され、雨水マスの水温は平均8.6℃であった。2年間の観察で冬期に幼虫が観察されたことから、一部の大都市では雨水マスの水が凍結することがなく、幼虫または蛹のステージで越冬し、翌春早く成虫になると推察された。

2) 本邦産蚊類の吸血源動物種の同定

トラップで捕集された蚊の中に非常に低率に腹部（中腸）に血液を持った蚊が混在する。

これらの蚊の血液に関してミトコンドリアDNAチトクロームb領域の部分塩基配列の解析から種の同定を行った。アカイエカ種群165頭の解析では、49.7%が鳥類のみ、38.8%が哺乳類のみ、11.5%が両方から吸血していることが明らかとなった。これらをアカイエカとチカイエカとに分子分類して解析した結果、野鳥および哺乳動物の比率に変化はなく、両種は野鳥からも哺乳動物からも吸血することが明らかとなった。鳥類の内訳は、47%と55%（アカイエカ、チカイエカ）がカモ類、40%と32%（アカイエカ、チカイエカ）がスズメ類を吸血しており、その他にカワラヒワ、ムクドリ、シジュウカラ、モズ、メジロが検出された。また、哺乳動物では両種に差が見られ、チカイエカはアカイエカよりヒト吸血嗜好性が明らかに高い傾向が認められた。ヒト以外では、イヌ、ネコ、ネズミの血液由来DNAが検出された。これらの結果は、我が国のアカイエカおよびチカイエカは野鳥に対する吸血嗜好性が高く、また、人に対しても高い吸血嗜好性があることを示しており、WNVの橋渡し役(bridge vector)になる可能性が高いことを示している。

### 3) 野外捕集蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)および新規フラビウイルスの検出

ドライアイストラップおよびブラックライト型のトラップ等で捕集された蚊からのウイルスの検出を試みた。感染研での調査では、2003～2005年の3年間に総計11属47種類、23,226個体を捕集し、これらから1,335プールを作成しRT-PCR法、培養細胞接種法を併用してウイルスの検出・分離を行った。その結果、WNVは検出されなかったが、一部都市部で捕集されたアカイエカおよびヒトスジシマカよりJEVの遺伝子を検出し、大阪市内で捕集されたアカイエカ由来のJEVに関しては塩基配列の解読を行った。富山県では2005年に民家、カラスのねぐら周辺、空港および日本脳炎発生予測に関係する定点（牛舎、豚舎）で採集を行い、コガタアカイエカ、アカイエカを中心に10,061個体を捕集し、683プールについてウイルスの検出を行った。ウエストナイルウイルス(WNV)は検出されなかったが、南砺市および富山市で8月下旬から9月にかけて捕集されたコガタアカイエカの11プールからJEVが検出され、プール陽性率は8.3～66.7%であった。一方、C6/36細胞での分離において、細胞変性が陽性にもかかわらずJEVおよびWNV遺伝子がRT-PCRで検出されないプールが富山市、射水市を中心に40プール検出され、これらは昆虫由来のウイルスである可能性が示唆された。一方、都市部を中心に捕集されたアカイエカにおいても、細胞変性を示すが、WNVおよびJEV陰性のプールが複数確認され、一部の塩基配列の解読からこれまでに報告のない新規のフラビウイルスである可能性が示唆された。その後、遺伝子構造解析を行い、ウイルスゲノムRNAは全長10,840塩基で、3,364アミノ酸からなるポリ蛋白質をコードすることが判明した。本ウイルスは近年アフリカで分離されたKamiti River virusに近縁であるが、さらに起源的な位置に存在することが分子系統樹解析で明らかとなった。また、本ウイルスは国内の複数の地域で高率に検出されることが明らかとなった。

### 4) 殺虫剤抵抗性の現状と抵抗性の分子機構

都市部の市街地で採集したヒトスジシマカ10コロニー、アカイエカおよびチカイエカの

39 コロニーについて、有機りん系、ピレスロイド系、昆虫成長制御剤を用い、幼虫の殺虫剤感受性試験を行った。アカイエカ種群では、エトフェンプロックスで、相当高い抵抗性を示すコロニーが見つかった。同薬剤の作用点であるナトリウムチャンネルの遺伝子解析の結果、膜貫通セグメント 6 にアミノ酸置換が認められ、典型的なノックダウン抵抗性型遺伝子配列が確認された。また、都内の品川区で採集されたアカイエカのコロニーから、同部位に異なるアミノ酸置換を持つ *kdr* 様遺伝子が日本産アカイエカ群で初めて確認された。オオクロヤブカの終齢幼虫を用いた 4 種薬剤の効力試験においては、有機りん系およびピレスロイド系殺虫剤に対して感受性であることが示された。コガタアカイエカの有機りん剤抵抗性の主要因であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)遺伝子である *Ace2* に生じた 1 つのアミノ酸置換変異 (Phe455Trp) が殺虫剤抵抗性をもたらすこと、この抵抗性遺伝子は日本各地にほぼ一様に高い頻度で分布していること、アミノ酸置換の近傍 200 あまりの cDNA 配列を決定した結果、この置換は単一起源性を示すことが明らかとなった。

#### 5) 都市部の幼虫および成虫の防除試験

神奈川県川崎および逗子、富山市、大阪府、徳島市等で小規模な幼虫防除および成虫防除の試験を行った。逗子の結果では、3 月下旬に昆虫発育制御剤(IGR)(ピリプロキシフェン)を投与した雨水マスでは、投与後 1~3 ヶ月間の幼虫発生開始時期の遅延が観察され、ヤマトヤブカおよびオオクロヤブカは 8 月下旬まで発生抑制が観察された。有機りん剤のジクロロボスの樹脂蒸散剤を雨水マスの内側に吊して防除効果を調査した結果、約 2 ヶ月間幼虫発生を抑制する効果が確認された。この方法は直接水系に薬剤を処理しないため、降雨などによる薬剤の流出がおこらず、効果が持続すると考えられた。IGR のスミラブ発泡錠剤による雨水マスおよび浄化槽の防除試験においては、雨水マスで約 1 ヶ月、浄化槽で 3 ヶ月間効果が持続することが確認された。

#### 分担研究者

|      |              |
|------|--------------|
| 津田良夫 | 国立感染症研究所室長   |
| 澤邊京子 | 国立感染症研究所室長   |
| 富田隆史 | 国立感染症研究所室長   |
| 高崎智彦 | 国立感染症研究所室長   |
| 松岡裕之 | 自治医科大学 教授    |
| 新庄五朗 | 日本環境衛生センター部長 |
| 當間孝子 | 琉球大学医学部 教授   |

#### A. 研究目的

蚊が媒介するウイルス感染症の流行は、患者および媒介蚊の移入、気象条件、難民等の発生、大規模な自然災害、社会経済的要因など様々な原因で起こることが知られている。1999 年にニューヨークで突然発生したウエストナイル脳炎は西半球では初めての流行であった。本来、ウエストナイルウイルス(WNV)は野鳥と蚊との間でサイクルが回っているウイルス感染症で、アフリカでの患者発生の報告はほとんど知られて

いない。米国では、1999～2001年にかけては、WNVの活動範囲は広がったものの、患者数は20～60名ほどを推移する程度で、死亡者も15名ほどであった。しかし、2002年に患者数が急激に増加し、ミシシッピ川流域の諸州で多数の患者が発生し、米国全体で4,000名を越す患者が発生し、240名が死亡した。2003年も同様に全米的に患者の発生が見られ、特にコロラド州では3,000名以上の患者が発生し、全体では9,800名を越す患者が発生し、200名以上が死亡した。米国における蚊媒介性ウイルス感染症の流行の中で、最大の患者数と死者を記録する結果となった。2004年は患者数が若干減少したが、野鳥からのウイルスの検出結果から判断すると、依然、米国全域でWNVが活発に活動していることが示された。2005年は3,000名ほどの患者が発生し、100名が死亡している。ヨーロッパ諸国、ロシアなどでは、流行がほぼ1年間で終息し、翌年に連続して流行することはない。しかし、米国においては7年間連続で流行が続いており、この違いがどのような要因によって起こるのかほとんど分かっていない。米国でのウエストナイル熱の流行は、先進諸国で起こった蚊媒介性感染症であり、その対策の実態を把握することは、将来、WNVが我が国へ侵入した場合を考えると有益である。

ベクターが関係する感染症として、その他にマラリア、デング熱、日本脳炎等の重要な疾患がある。デング熱に関しては数年おきに世界的流行が起り、2002年には台湾南部の高雄市を中心に5,000名を越す流行が起り、デング出血熱患者も240名ほど報告され、21名が死亡している。高雄市での

媒介蚊は主に高層住宅密集地域に発生していたネッタイシマカであったが、徹底的な媒介蚊対策を行った結果、現在、媒介蚊の密度は相当低い状態に保たれている。マラリア（熱帯熱マラリア）はアフリカのサハラ砂漠以南の諸国で猛威を振るっており、乳幼児の主要な死亡原因となっている。また、タイ、ミャンマー、カンボジア、中国南部の山間部および平野部においても、熱帯熱マラリアと三日熱マラリアの患者が多数発生している。また、韓国では1993年から非武装地帯を中心に三日熱マラリアが発生し、その後、軍人のみならず民間人にも5,000名を越す患者が全国的に発生した。このように、我が国を取り巻く節足動物媒介性感染症の流行状況は常にある種のリスクを伴っており、我が国の昆虫が媒介する感染症の平時からの対策立案が重要と考えられる。

我が国での媒介蚊が関係する感染症としては、1942年のデング熱の17,000名規模の流行、戦後マラリアの一時的な流行、1960年代の日本脳炎(JE)が知られているが、1990年代以降は蚊が媒介する感染症の大きな流行がなく、媒介蚊対策の重要性はともすれば多くの自治体で忘れ去られたかに見える。WNVが万が一我が国に侵入した場合には、ウイルスの増幅動物としての多種類の野鳥やウイルスを伝播する媒介蚊の存在を考えると、相当広範囲にWNVが広がる可能性が予想される。現在、媒介蚊の発生状況調査を行っている地方自治体は一部の府県に限られており、調査目的としては日本脳炎の流行予測に関連する蚊の捕集で、郊外の水田地帯にある牛舎や豚舎周辺での調査である。しかし、WNVの我が国

への侵入を想定した場合、人口密度が高い都市部の媒介蚊の発生状況調査が必要と考えられる。最近、一部の自治体の保健所、環境衛生課などで蚊の捕集調査、幼虫発生状況調査が始まったところである。これらの問題点を踏まえ、本厚生労働科学研究事業においては、都市部での蚊の発生状況を、幼虫調査、成虫のトラップによる捕集を中心に行い、どのような種がどの程度発生しているかを明らかにし、捕集蚊からのウイルスの検出、分離を行い、また、野外の蚊における殺虫剤感受性がどの程度かを、全国規模で幼虫を採集し、生物検定、分子生物学的解析を行った。また、昆虫発育制御剤(IGR)、ピレスロイド系殺虫剤、有機りん系殺虫剤等がある限られた地域の雨水マス等に処理し、防除効果を判定し、将来の防除対策の基礎的データの収集を試みた。WNV は野鳥および人を吸血する蚊によって伝播されるが、我が国の都市部に普通に存在するアカイエカ種群、ヒトスジシマカ等の吸血源動物がどのような種類かは今までに全く報告がなかった。これらの事業を行うことによって、我が国の媒介蚊の発生状況、殺虫剤抵抗性の発達状況、媒介蚊としての能力が明らかとなり、平時からの媒介蚊対策の重要性、防除対象とすべき蚊の種類、都市部における効率の良い蚊の防除法の確立が可能となると考えられる。

## B. 研究方法

### 1) 成虫の発生状況調査

北海道、岩手県、東京都、埼玉県、茨城県、千葉県、神奈川県、富山県、大阪府、兵庫県、高知県、広島県、長崎県、沖縄県で蚊の成虫および幼虫の調査を行った。成

虫に関しては、ドライアイストラップ(猪口鉄工およびCDC型ライトトラップ)、ブラックライトのトラップ、人囮法、モスキートマグネット(蚊成虫捕集装置)を用いて行った。ドライアイストラップは単1電池4本でファンが回るタイプで、電源がない場所での捕集に適している。発泡スチロールに1kgのドライアイスを入れ、トラップとほぼ同じ高さに設置し、24時間の捕集に用いた。トラップの設置は原則として、4月から12月まで週1回行ったが、一部は周年継続した。設置場所の違いが捕集数に与える影響も、同地点に複数設置することによって明らかにした。トラップで捕集された蚊は原則としてドライアイスで殺し、種の同定を行った後、日付ごとに $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に保存し、同種の蚊20匹までを1プールとしてフラビウイルス(WNVおよびJEVを含む)検出に供した。

### 2) 幼虫の発生状況調査

蚊の幼虫は、公園、道路側溝にある雨水マス、浄化槽を中心に行った。各地の調査地区を地図上で設定し、現地で側溝の雨水マスの場所、水の有無を記録し、水が溜まっている雨水マスは、柄杓で500~700mlの水を3回掬い取り、そこに含まれている幼虫の数をガイドラインの判定方法にそって記録した。また、幼虫を各実験室に持ち帰り、成虫にまで発育させて種の同定を行い、アカイエカ種群に関しては個眼数および分子同定法により詳細な分類を行った。また、一部の幼虫は、殺虫剤に対する抵抗性発達状況を調査するために、一世代飼育し、生物学的検定に供した。



### 3) 吸血源動物種の同定

トラップによる成虫捕集では、腹部（中腸）に血液をもった雌蚊が含まれる。ライトトラップではその捕集数が多いが、ドライイストラップでは全体の捕集蚊数の1%未満である。また、一部は捕虫網で採集した蚊を分析に用いた。吸血蚊の頭部を取り除いた後、虫体から PUREGENE DNA Purification Kit(Gentra) あるいは REDextract-N-Amp Tissue PCR Kit (SIGMA)を用いて DNA の抽出を行った。ミトコンドリア DNA のチトクローム b および 16S rDNA 領域を PCR 法により増幅し、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析した(ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, PE Biosystems)。野鳥と哺乳動物が吸血源と予想されたため、それぞれに対応するプライマーを作成した。得られた配列は BLAST により GenBank に登録されている配列情報と比較し、種の同定をおこなった。一部は完全な種の同定が不可能なサンプルがあり、その場合には相同性のパーセントを種類名の前に付記した。

アカイエカとチカイエカとの分子同定が可能となったため、吸血源の分析を行う前に、種の同定を6本の歩脚で行い、種ごとに吸血源動物の分類を行った。なお、キンイロヤブカ、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカの3種類に関しても吸血源動物の同定を試みた。

### 4) アカイエカとチカイエカの同定法の確立

アカイエカとチカイエカは外部形態的には区別がないが、雄成虫の生殖器の構造によってのみ分類が可能であることが知られ

ている。しかし、トラップで捕集される多くの雌成虫を形態学的に分類することは不可能で、アカイエカ種群の生態的解析を困難にしていた。今回、1966年に報告された個眼数による分類、rDNA の ITS1 の部分塩基配列を解読して同定する方法、アセチルコリンエステラーゼの配列より新たに設計されたプライマーを用いた PCR 法によって同定する方法を試みた。なお、個眼による分類では、頭部のみがサンプルとなり、分子同定では歩脚6本からの DNA の抽出で同定が可能であることが確認された。

### 5) 野外捕集蚊からのウイルスの検出

北海道、首都圏、富山、大阪、広島、高知、長崎等で捕集された蚊成虫 20 種類、全体で約 34,000 匹から約 2,000 プールを作成し、Minimum Essential Medium(MEM)中で破碎後、ヒトスジシマカ由来の細胞株である C6/36 に接種し、7日間培養した。培養上清を再度 C6/36 細胞に接種し、細胞変性効果(Cytopathic Effect, CPE)を観察した。継代培養上清からウイルス RNA を抽出し、フラビウイルス特異的な塩基配列をプライマーとして RT-PCR を行った。

また、PCR の陽性産物はダイレクトシーケンス法で塩基配列を解読した。一部の培養上清は、JEV 検出のためにリアルタイム PCR 用に開発された反応系で遺伝子の検出を試みた。また、CPE 陽性を示すが、JEV および WNV が RT-PCR で陰性のプールがアカイエカおよびコガタアカイエカから検出された。アカイエカ由来のサンプルに関しては、遺伝子構造解析を行った。

### 6) 殺虫剤感受性試験

アカイエカ種群（アカイエカ、チカイエカ）の幼虫または成虫に関する殺虫剤抵抗性の発達状況に関しては、39の室内コロニーを殺虫剤選抜なしに継代飼育し、殺虫試験に用いた。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、幼虫を野外採集した場合は羽化したコロニーにおいて、雌成虫が無吸血で産卵した卵舟より孵化した個体群を用いた。用いた薬剤は、ペルメトリン、フェノトリン、フェニトロチオン、テメホス、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である。4齢幼虫約30頭を容積100mlのプラスチックカップに入れた50mlの蒸留水に浸漬し、エタノールに溶解した殺虫剤溶液を250 $\mu$ l添加し、攪拌させた。有機りん系およびピレスロイド系薬剤は処理開始後24時間で、昆虫発育制御剤は羽化阻止率より判定を行った。

アカイエカ種群のナトリウムチャンネル遺伝子配列の解析は、幼虫1頭ごとにDNAを抽出し、F1CqSCおよびR18CqSCのプライマーを用いてイントロンを内部に含むDII-S6コード領域を増幅し、得られたPCR産物はTAクローニングで配列を決定した。また、コガタアカイエカの有機りん剤抵抗性の主要な因子であるアセチルコリンエステラーゼをコードする*Ace2*遺伝子は、1頭ごとにRNAを抽出し、逆転写反応で得られたcDNAを鋳型として、F101-Ct*Ace2*およびR102-Ct*Ace2*をプライマーとして*Ace2*cDNA断片をPCR増幅し、dNTPとssDNAを分解する反応を行った。この産物を鋳型として対立遺伝子特異的プライマーと共通プライマーを用いて、cDNA配列に

含まれるPhe455Trp置換変異を標的とする対立遺伝子特異的PCRを行った。

## C. 研究結果

### 1) 都市部における蚊の発生状況調査

#### a. 成虫の調査結果

東京、埼玉、千葉、神奈川、富山、大阪、沖縄等でドライアストラップを設置し、一部、人囹法でネットによって成虫の捕集を行った。一部の地域は設置期間が短いが多き場合は5月から12月まで週1回の調査が行われた。トラップの設置環境は、戸建ての低層住宅と高層住宅とがあり、捕集数を単純に比較することはできない。首都圏における2003年の捕集数と2004年の捕集数とを比較した場合、明らかに2004年の捕集数が多く、富山県での調査結果とは大きく異なった。捕集蚊の種類としては、アカイエカ、ヒトスジシマカが捕集蚊の90%以上であるが、千葉県では、上記2種以外にコガタアカイエカ、ハマダライエカ、カツライエカ、オオクロヤブカ、キンイロヤブカが加わり、富山県では水田に隣接した住宅地でコガタアカイエカが多数捕集された。大阪の都市部においても、コガタアカイエカが捕集されることから、水田地帯に隣接している地域においては、日本脳炎媒介蚊の存在を認識する必要がある。

沖縄県での捕集においては、2003年と同様に2004年の都市部でのネットイエカとヒトスジシマカの捕集数が予想外に少なかった。そこで、トラップの設置場所周辺での幼虫調査を行ったところ、水が溜まっている雨水マス为数が非常に少なく、これが捕集数に影響している可能性が考えられた。これは、沖縄本島の地質学的な性質に

関係していることが考えられる。

トラップの種類による捕集数の違いを検討するため、ドライアイストラップ、ブラックライトのトラップ、ブラックライトのトラップ+ドライアイスの組み合わせで行われたが、従来のブラックライトのトラップは、吸血昆虫以外の昆虫類が多数捕集され、短時間に蚊を他の捕集昆虫から選別することに大きな問題がある。

感染研での2003年から2005年の3年間行われたドライアイストラップの捕集結果においては、合計で2,440頭が捕集され、蚊以外の昆虫も10,062頭捕集された。優占種がヒトスジシマカとアカイエカ種群の2種類であり、これ以外にはカラツイエカとクシヒゲカが少数捕集された。蚊以外の双翅目昆虫としては、タマバエ科、チョウバエ科、クロバネキノコバエ科、ユスリカ科、ヌカカ科、ガガンボ科、キノコバエ科など21科に属する昆虫類が捕集され、環境評価の指標にこれら蚊以外の昆虫相が利用できる可能性が示唆された。捕獲個体数の年次変動はヒトスジシマカで0.16~1.02倍、アカイエカ種群で0.12~1.93倍であった。なお、アカイエカ種群は2月から少数捕集され、年間の活動時期がヒトスジシマカより長いことが示された。アカイエカ種群の捕集に関する季節消長は6月から7月にかけてピークがあり、10月以降急激に減少した。

アカイエカの成虫越冬に関しては、埼玉県内都市部の暗渠内で多数の成虫を採集し、捕集したアカイエカ種群は全てアカイエカであることが分子同定で確認された。2006年2月にも同じ暗渠で調査を行ったが、2005年と同様にアカイエカ成虫の越冬が確認された。また、大阪府の都市部におい

ても、同様に越冬アカイエカを用水路暗渠、汚水管内で確認し、アカイエカ以外にコガタアカイエカの越冬成虫を観察することができた。発育零点を超える水温を保っている暗渠や汚水管では周年アカイエカが発生している可能性が示唆された。

トラップの設置の高さを感染研と富山市で検討し、地上約8mの樹幹部と地上1mに設置したトラップでの捕集蚊の種類および捕集蚊数に関しては大きな違いがあることが明らかとなった。

日本脳炎の媒介蚊として重要なコガタアカイエカを広島県の倉橋町で2005年4月から1ヶ月に1回の頻度で調査を行った。その結果、コガタアカイエカの捕集数が最も多く、総捕集数787頭中68%を占めた。また、4月の捕集数が最も多く、ウイルスの活動状況によっては、4~5月に患者が発生する可能性が示唆された。また、倉橋町ではイノシシの生息数が数千頭と推定されており、居住地区に出没することも知られていることから、コガタアカイエカとイノシシとの関係も今後調査する必要がある。実際、広島県におけるイノシシの日本脳炎中和抗体の調査においては、41頭中IgM抗体陽性が1頭、IgG抗体陽性が22頭確認された。また、島根県での調査を含めると、イノシシの約3割が日本脳炎ウイルス抗体を保有していることから、民家周辺に出現する野生のイノシシがJEVの増幅動物になっている可能性を考慮する必要があると考えられた。一方、ほぼ毎年6月中旬に豚の日本脳炎抗体価が上昇することが知られている高知県の安芸市、大月町等でコガタアカイエカの調査を行った。コガタアカイエカ以外にシロハシイエカ、ヒトスジシマ

カ、アカイエカ種群、シナハマダラカ等の14種が捕集されたが、コガタアカイエカの捕集数が多いことが種類構成における大きな特徴であった。また、調査した地域の周辺には広い水田地帯が存在しており、このような環境がこの地域の日本脳炎の豚での流行を支えていると考えられた。横浜市、埼玉県の市街地における成虫調査において、アカイエカ種群およびヒトスジシマカが全体の65%以上を占め、地域によっては90%以上を示した。一方、水田地帯においては、コガタアカイエカが優占種となり、その他オオクロヤブカ、シナハマダラカが捕集された。

都市部に存在する動物園や水族館には外来性の哺乳動物のみならず多数の鳥類が飼育されている。これら鳥類は周辺に生息している蚊類から吸血される可能性が高く、ウエストナイル熱やその他のウイルス感染症および鳥マラリアの流行を考えた場合、どのような蚊が吸血する可能性があるかを把握し、可能な対策を講ずることは重要である。そこで、関東近郊に存在する2カ所の施設で蚊の捕集を行った。その結果、アカイエカ種群、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ、トラフカクイカ、ヤマトヤブカの6種類、合計で約2,200頭の蚊成虫を捕集した。アカイエカ種群の捕集数が全体の約61%と最も高く、野鳥吸血嗜好性を考えた場合、動物園等の施設における媒介蚊対策の重要性が強く示唆された。

#### b. 幼虫の調査結果

幼虫の発生状況調査は、東京、横浜市、川崎、富山県、大阪市を中心に行われた。富山県における幼虫発生源では、ある地域

に存在する発生源となる容器または水たまり全てを調査対象とした。発生源としては、バケツ、空き缶、フライパン、発泡スチロール箱、手水鉢、竹の切り株、古タイヤ、墓地の花立て、樹洞、ブロックの穴、野鳥の餌台、雨水マス、排水溝、水槽、風呂桶、ドラム缶、かめ、ガラスコップ、池などである。幼虫は多い順からヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、アカイエカ、トラフカクイカの順であるが、圧倒的にヒトスジシマカの幼虫が多く採集された。2004年に引き続き、2005年にも各種の水が溜まっていると思われる発生源において、幼虫の生息調査を行った。公共施設、一般民家、寺・墓地、神社、公園など合計35カ所で33種類、261個の溜まり水の調査を行い、23種類、83個の人工的な発生源から幼虫を確認し、6種2,466個体の幼虫を採集した。ヒトスジシマカの単独生息が27個、アカイエカ単独生息が16個、ヤマトヤブカ単独生息が8個で残りは上記蚊の種々の混生であった。アカイエカは公園の環境で、ヤマトヤブカは一般民家で多く採集される傾向が認められたが、ヒトスジシマカは種々の発生源で確認された。

大阪市での調査では、ある地点から半径500m以内の地域に存在する古タイヤと雨水マスを調査対象として選び、定期的に全ての場所で水が溜まっているか、幼虫が発生しているかを調査した。その結果、幼虫が発生している雨水マスは1km<sup>2</sup>当たり503ヶ所存在していることが示され、古タイヤは131個であった。また、発生幼虫はアカイエカとヒトスジシマカで、7月には雨水マスにおける幼虫発生が高率に確認され、その後9月から11月にかけて明らか

に減少した。古タイヤでは4月に水が溜まっているタイヤが多く、発生幼虫の多くがトウゴウヤブカであった。トウゴウヤブカは一般に海岸地帯の海水が混入するロックプールに発生するが、大阪市内のトウゴウヤブカは淡水で系統が維持されている系統である。一方、アカイエカなどの重要な発生源である雨水マスに殺虫剤を含む網（オリセットネット）を設置し、ある団地内に未処理区と処理区を設定して幼虫発生状況を継続して調査した。その結果、ネットを処理した雨水マスでは、4ヶ月経過してもほとんど幼虫が発生せず、防除効果が非常に高いことが示された。また、目の粗いオリセットネットを特注し、2004年と同様の試験を行ったが、幼虫発生を抑える効果は認められた。

大阪府における冬期の公共雨水マスでの幼虫調査において、昨年と同様にアカイエカ種群およびヤマトクシヒゲカ幼虫を確認した。12月以降新たな幼虫発生は確認されないが、2月中旬まで幼虫と蛹の生存が認められた。アカイエカ種群の認められた雨水マスの12月中旬から2月中旬までの平均水温は約8.6°Cで、アカイエカの発育零点と非常に近い温度であった。

川崎市内の幼虫発生源調査においては、調査地点によって水が溜まっている雨水マスの率が大きく異なっていたが、6～7月の調査で幼虫が発生している雨水マスの率が最も高い傾向があった。浄化槽内のチカイエカの防除に関しては、浄化槽の清掃で一時的に蚊の発生が抑制されるが、1.5ヶ月ほど経過すると成虫の発生が顕著になる。しかし、蒸散剤等を用いることによって、発生を抑えることが可能であることが明ら

かとなった。浄化槽内で発生するチカイエカが、その後、開放空間に出て、アカイエカと同様に野鳥等から吸血する可能性があることから、これら設備から発生するチカイエカ対策も重要と考えられる。

沖縄本島、石垣島、西表島でのコガタアカイエカの生息状況調査では、水田および休耕田の53.5～75%に幼虫の発生が認められた。人工的な容器に発生するヒトスジシマカおよびネッタイイエカの幼虫数と捕食者であるカクイカ幼虫との関係を調査したが、カクイカ幼虫の発生状況は調査容器の設置場所によって大きく異なっていた。

## 2) 都市部で捕集されたアカイエカ種群におけるチカイエカの占める割合

首都圏を中心にドライイストラップで捕集された蚊は、多くがアカイエカ種群であった。しかし、今までこれら捕集蚊のアカイエカ種群にどの程度チカイエカが含まれているか詳細な調査は行われていなかった。今回、複眼の一定の列における個眼数を数える方法とITS1の部分配列の解読および新たに設計されたプライマーを用いたアセチルコリンエステラーゼ部分配列のPCR産物の有無によって分子的に同定を行った。分子同定法では、系統維持された両種を用いた解析でその有用性が確認され、野外捕集蚊に対しても応用できることが明らかとなった。これらの分類法を用いて行った両種の同定の結果は採集地によって大きく異なるが、年間の捕集蚊の80%以上がチカイエカである採集地が3カ所(3/17)あり、40%以上がチカイエカである地点が9カ所(9/17)あった。一方、捕集蚊の80%以上がアカイエカである地点は2カ所(2/17)

のみで、今までドライアイストラップで捕集されていたアカイエカ種群の相当部分はチカイエカであることが明らかとなった。チカイエカの捕集率が高い2カ所の地点におけるチカイエカの捕集率の季節的变化を調べたところ、4~6月と8月~10月に高い傾向が認められた。

### 3) 吸血源動物種の同定について

昨年引き続きトラップで捕集された蚊およびネットで捕集した蚊の腹部(中腸)の血液を用いて、ミトコンドリアDNAチトクロームbおよび16S rDNA領域の部分塩基配列の解析から種の同定を行った。千葉県で採集されたキンイロヤブカ56頭の解析では、全てが哺乳動物の血液を吸血しており、ウシとブタが主な吸血源で、若干ヒトの血液が検出された。これは、ある限定された地域における結果であるが、キンイロヤブカが野鳥からWNVを取り込んで感染する可能性は低く、感染野鳥から吸血したとしても、その後1~2週間後にヒトを吸血する頻度は相当低いものと考えられた。

アカイエカとチカイエカの分類を個眼数、アセチルコリンエステラーゼの部分配列、rDNAのITS1の塩基配列で判定する有効な方法確立し、これをもとにアカイエカおよびチカイエカの種別ごとの吸血源動物の同定が可能となった。まず、アカイエカ種群165頭の解析では、約50%が野鳥のみ、約40%が哺乳動物のみ、残りの11.5%が両方から吸血していた。一方、分子分類後、アカイエカとチカイエカを種別に解析したところ、チカイエカ38頭中、44.7%が野鳥のみ、42.1%が哺乳動物のみ、残りの13%

が両方から吸血していた。一方、アカイエカでは、51.3%が野鳥から、37.8%が哺乳動物から、残りの11%は両方から吸血していた。これらの結果から、両種は明らかに野鳥と哺乳動物の両方から吸血する傾向が示され、種間で差は見られなかった。哺乳動物の内訳ではヒトの血液がアカイエカでは40.7%(24/59)であったが、チカイエカではその率が81.0%(17/20)と高い傾向が認められた。鳥類の内訳は、アカイエカとチカイエカとで大きな違いが認められず、47%と55%がカモ類、40%と32%がスズメ類から吸血していた。その他の野鳥としてカワラヒワ、ムクドリ、シジュウカラ、モズ、カラスがそれぞれ1~2個体含まれていた。この結果は、我が国のアカイエカ(*Culex pipiens pallens*)およびチカイエカ(*Cx. pipiens molestus*)は、野鳥の吸血嗜好性が高く、また、ヒトに対しても高い嗜好性があることを示しており、WNVを野鳥からヒトへ橋渡しする媒介蚊(bridge vector)としては非常に重要であると判断された。

ヒトスジシマカは、捕集個体数114頭の解析では、約7%が鳥類のみ、76%が哺乳動物のみを吸血しており、約4%は両方から吸血していた。また、牛舎および豚舎で捕集されたコガタアカイエカ(46頭)は、その95%以上がウシあるいはブタを吸血していた。

### 4) 野外捕集蚊からのウイルス検出および新規フラビウイルスの同定

千葉県、富山県、東京都、埼玉県等で主にドライアイストラップ、ブラックライトのトラップ、捕虫網で捕集された蚊からのウイルスの検出を試みた。2005年富山県で

捕集された蚊 10,061 頭から 683 プールを作成して C6/36 細胞に接種し、CPE が観察された検体を中心にウイルスの検出をおこなった。その結果、WNV は検出されなかったが、水田地帯の牛舎および豚舎で捕集したコガタアカイエカの 11 プールから JEV を検出・分離した。また、CPE を認めたが、RT-PCR 法で WNV および JEV が陰性である検体が 40 プール認められた。これは、2004 年にアカイエカから検出・分離された新規フラビウイルスの結果と共通するもので、今後詳細な解析が必要である。また、2005 年の富山県におけるコガタアカイエカの JEV に関する平均プール陽性率は 60% であり、地域および季節によっては相当高率に JEV が検出・分離されることが明らかとなった。一方、感染研でのウイルスの検出・分離に関しては、2003 年から 2005 年の 3 年間に国内各地で捕集された蚊からウイルスの検出を RT-PCR 法および培養細胞への接種を組み合わせで行った。現在までのところ、全てのプールから WNV は検出されていない。一方、2003 年および 2004 年、都市部で捕集したアカイエカおよびヒトスジシマカから JEV の遺伝子が検出され、川崎および大阪のアカイエカから検出された JEV の塩基配列が一部解読されている。これらの結果は、豚舎などが存在しない都市部の環境において、JEV の感染環が回っていることを示している。アカイエカの複数のコロニーから確認された新規フラビウイルスに関して、遺伝子構造解析によりゲノムの全長は 10,840 塩基で、ウイルスタンパク質は 3,346 アミノ酸から構成されていることが明らかとなった。近年発見された Kamiti River virus などの昆虫フラ

ビウイルスに近縁なウイルスで、分子進化的にも非常に興味深い関係にあることが推察された。本ウイルスは国内のかなりの範囲でしかも高率に存在していることが明らかとなり、アカイエカ以外の種類での同様のウイルスの解析が急務である。

#### 5) 殺虫剤抵抗性の現状および抵抗の分子機構

全国的に各地の都市部から採集されたアカイエカ種群 57 コロニー(アカイエカ 36、チカイエカ 19、ネッタイエカ 2)に対し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、昆虫成長制御剤のディミリンとピリプロキシフェンの原体を用い、幼虫の殺虫剤感受性試験を行った。アカイエカ種群では、エトフェンプロックス以外の薬剤では、薬剤の用法・用量に定められている有効成分濃度以下で全ての幼虫が死亡し、有効性が確かめられた。エトフェンプロックスに関して抵抗性の発達が明らかになり、一部、ピリプロキシフェン、ジフルベンズロン、テメフォスにも抵抗性個体が存在することが示された。エトフェンプロックスの抵抗性の主な要因としては、チカイエカに関しては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アミノ酸置換 (kdr 置換) が認められ、また、チトクロム P450 解毒酵素の活性増大も関わっていることが示された。また、エトフェンプロックスに抵抗性を示す幼虫は、その他のピレスロイド系殺虫剤に対しても交差抵抗性を示すことが示され、今後の防疫用殺虫剤による防除および家庭用殺虫剤の使用に関して重要な情報を提供した。今後、継続

して都市部におけるアカイエカ種群の薬剤感受性試験を行うことが重要と判断された。

ナトリウムチャンネルの遺伝子解析の結果、膜貫通セグメント6にアミノ酸置換が認められ、典型的なノックダウン抵抗性型遺伝子配列が確認された。また、都内の品川区で採集されたアカイエカのコロニーから、同部位に異なるアミノ酸置換を持つ、*kdr* 様遺伝子が日本産アカイエカ群で初めて確認された。コガタアカイエカの有機りん剤抵抗性の主要因であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)遺伝子である *Ace2* に生じた1つのアミノ酸置換変異 (Phe455Trp) が殺虫剤抵抗性をもたらすこと、この抵抗性遺伝子は日本各地にほぼ一様に高い頻度で分布していること、アミノ酸置換の近傍200あまりのcDNA配列を決定した結果、この置換は単一起源性を示すことが明らかとなった。

#### 6) 都市部の幼虫および成虫の防除試験

幼虫防除試験に関しては、昆虫発育制御剤(IGR)、有機りん剤を用い、都市部の公共施設、公園、道路等の雨水マスを中心に行った。川崎市内では、雨水マスにジクロロボスの樹脂蒸散剤を吊して効果判定を行った。この薬剤は直接水中に薬剤を処理しない剤型であるが、幼虫発生を8週間以上抑えることが確認された。神奈川県で採集されたオオクロヤブカを用いて、4種薬剤に対する感受性を検討した。その結果、Permethrin > BTi > Etofenprox > Fenitrothion > Diazinon の順で効力が高いことが示され、いずれの薬剤に対しても感受性であることが明らかとなった。徳島市で行われたIGR(スマラブ発泡剤)2gによる

雨水マスでの効果判定試験では、雨水マスによって効果持続期間に大きな差が認められたが、大雨などの影響を受けなかった場合には1ヶ月以上の効果が認められた。また、密閉性の高い空間である浄化槽では3ヶ月以上の効果の持続が確認された。

大阪府で2005年行われたオリセットネットを雨水マスの蓋に設置する方法で、幼虫の発生を長期間抑える効果のあることが明らかとなった。2004年のネットは網戸などと同じサイズのメッシュ(2mm)で、砂等によって目詰まりしやすい構造であった。2005年は、4mmメッシュのオリセットネットを特注して、処理区および無処理区を用いて蚊幼虫発生に与える影響を調査した。その結果、若干、処理した雨水マスで幼虫の発生が確認されたが、防除効果は昨年と同様に認められた。

成虫に対する防除効果の判定は、ジクロロボス蒸散剤、フェニトロチオン、ペルメトリン、シフェノトリンを用いて行った。富山県での炭酸ガス製剤(フェノトリン1%、シフェノトリン1%)では、噴射口から3~5mに配置したアカイエカおよびヒトスジシマカ成虫、幼虫にほぼ100%の殺虫効果が確認され、7.5m, 10mでは生存個体が残る可能性が見られた。駆除試験を行った4軒の民家の内3軒で有効性が確認されたが、周辺民家の蚊の発生状況等の影響を考慮して判定する必要がある。また、水田で隔離された神社での試験では、効果が少なくとも1週間は持続することが明らかとなった。

神奈川県で民家で行われたフェニトロチオン乳剤とペルメトリン乳剤を用いた駆除試験においては、処理区で人囮法による蚊



の捕集数が無処理区と比べて明らかに減少した。しかし、成虫密度が処理日からの日数が経過するに従って徐々に高くなる傾向が認められた。この上昇は、周辺環境からの新たな蚊の侵入が関係しており、成虫防除の効果は一般的に持続しない傾向と一致していた。

茨城県のゴルフ場の松食い虫対策として行われたフェニトロチオン 80%乳剤の航空機散布において、散布エリア内に配置したアカイエカ成虫および幼虫がどの程度殺虫されるか検討した。その結果、風がなく、航空機の操縦が完璧に行われた場合、薬剤はエリア内に的確に散布されること、ターゲットの昆虫と薬剤の接触がおこり、高い殺虫効果が発揮されることが明らかとなった。しかし、これを人口が密集している都市部で行うことは、住民および居住環境への影響、効果の持続性、費用対効果など種々の問題があり、実行不可能であると考えられる。

#### D. 考察

##### 1) 都市部における蚊の発生状況調査

大阪府での冬期(1~2月)の幼虫調査で越冬期の雨水マスにアカイエカ幼虫や蛹が採集され、2005, 2006年に同様の結果を得た。雨水マスの水温をデータロガー(自動温度記録計)で継続して測定し、冬期間の平均水温は8℃以上であることが明らかとなった。文献的に調査したアカイエカの発育零点と非常に近い値である。近年、水道水の温度が明らかに上昇傾向にあり、水道水が流れ込む水域での平均温度の上昇、都市部でのヒートアイランド現象などの影響の可能性は十分考えられる。2005年および2006

年の厳冬期に埼玉県都市部の暗渠において、アカイエカの越冬生態を調査し、多数の雌成虫の越冬が確認された。なお、越冬蚊が存在する暗渠と存在しない暗渠では、入り口(開放部)から吹き込む風の強さ、暗渠内の湿度などが微妙に異なっている傾向が認められ、安定した温湿度が越冬環境に関係していることが強く示唆された。なお、これらアカイエカが越冬している暗渠、用水路、污水管などが詳細に特定できれば、冬期における殺虫剤防除が可能になると考えられ、翌春の個体群密度を低下させる効果が期待できる。

成虫の捕集に関しては、特に都市部において、アカイエカ種群およびヒトスジシマカの全体に占める割合が高く、首都圏での防除対象蚊種は上記3種に絞ることが可能と考えられる。しかし、地方都市や首都圏の大都市においても、水田が存在する環境ではコガタアカイエカが捕集されることから、この蚊に関しても注意して発生動向を調査する必要がある。

##### 2) 吸血源動物種の同定について

吸血源動物の同定をアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ、キンイロヤブカに対して行った。その結果、アカイエカ種群165頭の解析では、約50%が野鳥のみ、約40%が哺乳動物のみ、残りの11.5%が両方から吸血していることが明らかとなった。アカイエカ種群を分子分類後、アカイエカとチカイエカそれぞれで解析したところ、ほぼ同様の吸血嗜好性が確認された。これらの結果から、両種は明らかに野鳥と哺乳動物から吸血する傾向が示された。都市部での捕集蚊が多い関係から、

哺乳動物の内訳ではヒト、イヌ、ネコ、ネズミの血液が、野鳥ではカモ類、スズメ類から吸血していた個体が多く認められた。スズメでは WNV が血中に高濃度に検出されることが知られており、カラス、アオカケスなどと異なり、死亡率も低い。これらのことを考えると、我が国の都市部に普通に生息しているスズメの WNV の増幅動物としての役割が大きな問題となることが示された。我が国のアカイエカ(*Culex pipiens pallens*)およびチカイエカ(*Cx. pipiens molestus*)は、野鳥の吸血嗜好性が高く、また、ヒトに対しても高い吸血嗜好性を示すことから、WNV を野鳥からヒトへ橋渡しする媒介蚊(bridge vector)としては相当重要であると判断された。

居住地域、公園、墓地等に高密度で分布するヒトスジシマカに関しても、人吸血性および野鳥吸血性が確認され、WNV が我が国へ侵入した場合、防除対象種とすべきことが示された。

### 3) 野外捕集蚊からのウイルスの検出

北海道、首都圏、富山、大阪、広島、高知、長崎等で捕集された蚊成虫 20 種類、3 年間の全体で約 34,000 頭から約 2,000 プールを作成しフラビウイルスの検出および分離を試みた。WNV は全く検出されなかったが、都市部で捕集されたアカイエカおよびヒトスジシマカから JEV 遺伝子の一部が RT-PCR 法で検出された。JEV 陽性のプールが都市部で捕集された蚊から確認されたことは興味あることで、近くに豚舎などが存在する環境ではないことが特徴である。1970 年代から一部の地方衛生研究所等では、コガタアカイエカのみを対象にウイル

スの検出および分離を行っていたが、アカイエカ、ヒトスジシマカからのフラビウイルスの検出は全く行われていなかった。今回、WNV の検出が目的に加わった関係で都市部に分布するアカイエカ、ヒトスジシマカ等からの JEV 遺伝子の検出がなされ、新たな発見につながったと考えられる。野鳥が増幅動物となる新たな感染環の存在が示唆されることから、今後、都市部における捕集蚊からのウイルスの検出、分離を継続して行うことが重要と考えられた。富山県では水田地帯の牛舎で捕集されたコガタアカイエカの 11 プールから JEV を検出、分離した。プール陽性率は捕集時期によって異なるが、平均で 60%と高く、8 月下旬から 9 月上旬に捕集した蚊からの分離であった。我が国の JEV の活動時期は毎年沖縄から始まり、徐々に北へ移動することが、ブタの血清抗体調査で明らかとなっている。これらの結果がコガタアカイエカの発生消長と一致するのか、より詳細に検討する必要がある。

捕集蚊からのウイルスの検出を RT-PCR 法ならびに C6/36、Vero、BHK などの培養細胞への接種により行った。培養細胞で観察される細胞変性(CPE)は、何らかのウイルスの増殖と関係する場合が多く、詳細に検討してウイルスの検出を行った。JEV および WNV が RT-PCR で陰性であるが、CPE 陽性のプールが全国的に捕集したアカイエカから見つかри、詳細に検討した結果、新規のフラビウイルスであることを確認した。また、本ウイルスゲノム約 11,000 塩基を全て解読し、系統発生的位置を解析した。その結果、アフリカのヤブカ属(*Aedes macintoshii*)から分離されたウイルスと一

部類似しているが、塩基配列は明らかに異なることが判明し、より起源の古いウイルスである可能性が強く示唆された。この昆虫由来と考えられるフラビウイルスの存在が脊椎動物に病原性のある他のフラビウイルスの蚊体内での増殖に係わるかなど不明の点が多く、感染経路、蚊体内の増殖部位など明らかにすることが重要である。また、富山県捕集のコガタアカイエカからも同様のウイルスの存在が示唆されており、我が国の蚊での感染状況を全国的に調査する必要性が高いと考えられた。

#### 4) 殺虫剤抵抗性の分子機構および都市部の幼虫および成虫の防除試験

都市部で採集されたアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカの殺虫剤感受性を調査し、ピレスロイド系殺虫剤のエトフェンプロックスには抵抗性の発達が一部のコロニーで認められた。幼若ホルモン様物質のピリプロキシフェンに関しては、アカイエカ種群のコロニー全般と一部のヒトスジシマカに若干の効力の低下が認められた。

コガタアカイエカの有機りん剤抵抗性に関与するアセチルコリンエステラーゼ遺伝子に生じたアミノ酸置換変異が殺虫剤に対する抵抗性に関係していること、抵抗性遺伝子は日本各地にほぼ一様に高い頻度で認められ、Phe455 座位近傍の 200 余りの cDNA 配列を決定した結果、このアミノ酸置換変異は単一起源性であることが強く示唆された。これは、どこかで発生した抵抗性の変異が過去数十年間で全国的に分布を広げたことを意味している。チカイエカおよびアカイエカにおけるピレスロイド系殺虫剤に対する抵抗性が今後どのような広が

り示すか注視する必要がある。

幼虫防除に関しては、IGR、有機りん剤等を用い、都市部の公共施設、公園、道路等の雨水マスを中心に試験的に行った。ジクロロボスの樹脂蒸散剤を吊した雨水マスで幼虫発生を抑えることが確認された。IGR(スミラブ発泡剤)2g による雨水マスでの効果判定試験では、雨水マスによって効果持続期間に大きな差が認められたが、大雨などの影響を受けなかった場合には1ヶ月以上の効果が認められた。また、密閉性の高い空間である浄化槽では3ヶ月以上の効果の持続が確認された。今後、このような防除試験をいろいろな環境で行い、基礎的なデータを蓄積することが重要と思われる。

炭酸ガス製剤(フェノトリン1%、シフェノトリン1%)では、5m以内に置かれた幼虫、成虫のほぼ100%の殺虫効果が確認された。駆除試験を行った民家で有効性が確認されたが、周辺民家の蚊の発生状況等によっては、短期間で周辺から移入してくることが考えられることから、防除は地域全体で一斉に行うことが重要であることが示された。IGRを用いた防除試験を複数地域で行ったが、効果はその地域の環境、降水量などの要因によって大きく異なった。薬剤が1回の大雨で流失した場合、未処理区と同様に幼虫発生が始まり、1ヶ月以内に幼虫密度が急激に高まることが明らかとなった。しかし、大雨等の影響を受けない場合には、薬剤の影響が1ヶ月以上持続することが一部の雨水マスで確認された。ほぼ密閉されている浄化槽では効果が3ヶ月以上持続することも確認された。幼虫防除は成虫防除と比べて、効力の持続が期待で

きる。平常時から継続して地域全体の幼虫対策を行うことが重要である。幼虫防除対策がウエストナイル熱の患者数を減少させるとの報告が米国の複数の州から既に報告されており、我が国においても、媒介蚊の個体群密度をある程度下げる努力が必要と考えられる。

## E. 結論

### 1) 成虫および幼虫の発生状況調査

東京、埼玉、千葉、神奈川、富山、大阪等での捕集蚊は、都市部ではアカイエカ種群、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカが主であるが、地方によってはシナハマダラカ、ハマダライエカ、カラツイエカ、オオクロヤブカ、キンイロヤブカ等が捕集された。全体に捕集蚊数は地域や各トラップで大きく異なり、周辺環境が関係したと思われる。幼虫の発生状況調査では、雨水マスに水が溜まっている有水マスの比率は地域、季節によって大きく異なり、地質の違いが関係している。都市部の雨水マスに発生する幼虫の多くは、アカイエカ種群、ヒトスジシマカ、ヤマトクシヒゲカ、ヤマトヤブカ、トラフカクイカが主要な種類であった。大阪府の冬期における幼虫発生調査においては、アカイエカ種群が12月から2月にかけて観察され、雨水マスの水温は平均8.6℃であった。一部の大都市では雨水マスの水が凍結することがなく、幼虫または蛹のステージで越冬している可能性が示唆された。

### 2) 吸血源動物種の同定について

蚊の吸血源動物の同定をアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ、キンイロヤブカで行った。その結果、

アカイエカ種群の解析では、約50%が野鳥のみ、約40%が哺乳動物のみ、残りの11.5%が両方から吸血していることが明らかとなった。種群を分子分類後、アカイエカとチカイエカで解析したところ、ほぼ同様の吸血嗜好性が確認された。これらの結果から、両種は明らかに野鳥と哺乳動物から吸血する傾向が示された。都市部での捕集蚊が多い関係から、哺乳動物の内訳ではヒト、イヌ、ネコ、ネズミの血液が、野鳥ではカモ類、スズメ類から吸血していた個体が多く認められた。我が国のアカイエカおよびチカイエカは、野鳥の吸血嗜好性が高く、また、ヒトに対しても高い吸血嗜好性を示すことから、WNVを野鳥からヒトへ橋渡しする媒介蚊(bridge vector)としては非常に重要であると判断された。

### 3) 野外捕集蚊からの日本脳炎ウイルス(JEV)および新規フラビウイルスの検出

トラップで捕集された蚊からのウイルスの検出を試みた。富山県の2005年の結果ではコガタアカイエカの11プールからJEVが検出され、プール陽性率は8.3~66.7%であった。C6/36細胞での分離において、細胞変性は起こるが、RT-PCRでJEV、WNVが陰性のプールが40プール検出された。これらは2004年アカイエカで検出された昆虫由来のウイルスと類似したウイルスである可能性が示唆された。一方、2004年、都市部を中心に捕集されたアカイエカで確認された新規フラビウイルスに関して、ウイルスゲノム全長10,840塩基を決定し、ポリ蛋白質は3,364アミノ酸から構成されていることを明らかにした。また、本ウイルスは国内の複数の地域で高率に検出されるこ