

数が多い傾向がみられたが、統計的に有意差はなかった。雄個体数、総数、種類数、住宅地でも同様な結果であった。

V. 「カエルの鳴き声」に誘引され、吸血行動を開始する蚊: 西表島の地点1, 2で、カエルの鳴き声に誘引・捕獲された蚊はそれぞれ644, 244個体であった。多く捕獲された種はマックファレンチビカ(mac)で86.2-90.1%であった。蚊をサキシマヌマガエルが入ったケージ内に放すと、かなりの割合でカエルを吸血した。

D. 考察

沖縄県は日本で唯一の亜熱帯地域であり、年中温暖で、もし、外国から媒介蚊が侵入すれば、定着し、分布の拡大が起り易い地域である。また、全日本にある米軍基地の75%が沖縄県に集中し、米軍の空港も2つあり、アメリカや東南アジアの国々からの飛行機の飛来も多い。アメリカではウエストナイル熱も流行し、日本に入ってきてもおかしくない状況にある。現在の沖縄県でのWNV媒介蚊の発生状況や、それらの消長を明らかにすることは重要なことであり、さらにウイルスを保有する蚊がいるのかどうかについても明らかにする必要がある。

15・16年度は米軍嘉手納飛行場周辺の施設、動物園、市街地で調査を行った。動物園を除いて蚊の捕獲個体数が少なかった。嘉手納飛行場から1.2km離れた動物園は樹木も生い茂り大型の動物や、ワニや亀など水棲の動物も多く養われ、蚊成虫にとって吸血源は豊富である。また、園内には人工容器や池もあり幼虫の発生にとっても良い環境がある。成虫は多く

の種が採集され、個体数も多かった。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qui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。今回の結果は、當間ら(1978)の結果と比較すると、捕獲個体数が著しく少ない。その理由は環境の整備、側溝の整備などが関係していると考えられる。種々の方法で捕獲した蚊からはWNVは検出されなかった。

Lut 幼虫は市街地の人家周辺にはかなりの頻度で生息していることが明らかになった。Lut 幼虫数が多くなるとその他の蚊幼虫(qui, alb)数が減少する傾向はいずれの場所でもみられたが、調査した2カ所では残存しているqui, alb数には違いがみられた。住宅周辺の環境が大きく影響していることが考えられる。

visは東南アジアでは日本脳炎の媒介蚊であり、重要な蚊である。本種は1990年に初めて国内での生息がMiyagi et al. (1992)による石垣島での調査で報告された。triは調査した伊平屋島、沖縄本島、石垣・西表島で生息していた。visは沖縄本島、石垣・西表島で生息を確認したが、伊平屋島では生息が確認されなかった。今後さらに調査をつづける必要がある。

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DI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 LT に DI 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。これまで使用されている LT を用いて人里離れた森林内で蚊を捕獲するには場合には、発電機が必要で、トラップ設置地点が制限される。DILT は電池で作動のため、簡単に運べ、終日採集も容易に行うことができる。

自然界で冷血動物を吸血する蚊については良くわかっていない。今回、西表島で行った調査結果では、溪流に幼虫が生息する mac がカエルの鳴き声に最も多く誘引され、カエルを吸血した。

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。その結果、捕獲数は市街地では少なく、動物園では多かった。市街地での捕獲蚊は alb と qui の 2 種がほとんどで、全捕獲数の 97% 以上を占めた。捕獲された蚊から WNV は検出されなかった。

Lut 幼虫は市街地の人家周辺に高頻度に生息し、Lut 幼虫数が多くなるとその他の蚊幼虫数が減少した。

東南アジアで日本脳炎媒介蚊として知られる vis は、沖縄本島、石垣・西表島に生息していた。

蚊の捕獲方法の検討については、従来から使用されている LT に DI 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、統計的な差はなかった。最近使用されている

DILT は電源のない地域では威力を発揮することが明らかになった。mac はカエルの声に誘引され、カエルを吸血した。

G. 研究発表

1. 論文発表

Toma, T., Miyagi, I. (2005): Redescription of *Armigeres* (*Armigeres*) *conjungens* Edwards (Diptera: Culicidae) collected from the Peninsular Malaysia. *Med. Entomol. Zool.*, 56: 1-9.

Toma, T., Miyagi, I., Higa, Y., Okazawa, T., Sasaki H. (2005): Culicid and Chaoborid flies (Diptera: Culicidae and Chaoboridae) attracted to a CDC miniature frog call trap at Iriomote Island, the Ryukyu Archipelago, Japan. *Med. Entomol. Zool.*, 56: 65-71.

Toma, T., Miyagi, I. (2005): Notes on mosquitoes in Chichi-jima, Ogasawara Archipelago, Japan and Biology of *Culex* (*Sirivanakarnius*) *boninensis* (Diptera: Culicidae). *Med. Entomol. Zool.*, 56: 237-241.

Miyagi, I., Toma, T. (2005): *Topomyia roslihashimi*, a new species of the subgenus *Suaymyia* (Diptera: Culicidae) from Gombak, Peninsular Malaysia. *Med. Entomol. Zool.* 55: 107-114.

Noda, S. Gilmatam, J., Ogino, K. Toma,

T., Miyagi, I. (2005) : Mosquitoes collected on Yap Islands and Ulithi Atoll, Yap State, Federated States of Micronesia (Diptera: Culicidae). Med. Entomol. Zool. 56: 349-353.

Miyagi, I., Toma, T., Okazawa, T. Mogi, M. Hashim, R. (2005): Female *Armigeres (Leicesteria) flavus* holding an egg raft with her hind legs. J. Am. Mosq. Control Assoc. 21: 466-468.

2. 学会発表

當間孝子、比嘉由紀子、宮城一郎、岡澤孝雄、奥土晴夫(2004) : 西表島における蚊捕獲のための4ライトトラップ法の比較. 第56回日本衛生動物学会大会

當間孝子、宮城一郎、比嘉由紀子(2005) : 沖縄県における *Culex vishnui* の分布について. 第57回日本衛生動物学会大会.

宮城一郎、當間孝子、比嘉由紀子、岡澤孝雄、宮城一郎、佐々木均(2005) : 沖縄県西表島の森林内で「蛙の鳴き声」に誘引され、吸血行動を開始する蚊類. 第57回日本衛生動物学会大会.

當間孝子、比嘉由紀子、宮城一郎、澤部京子(2005): 沖縄本島における主として人家周辺での蚊成虫の捕獲成績(2003-2005年). 第58回日本衛生動物学会南日本支部大会.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究総合報告書

地理情報システムを用いた媒介蚊の発生環境解析

分担研究者	小林陸生	国立感染症研究所昆虫医科学部	部長
研究協力者	二瓶直子	国立感染症研究所昆虫医科学部	客員研究員
	津田良夫	国立感染症研究所昆虫医科学部	室長
	駒形 修	国立感染症研究所昆虫医科学部	リサーチレジデント
	比嘉由紀子	国立感染症研究所昆虫医科学部	リサーチレジデント
	倉橋 弘	国立感染症研究所昆虫医科学部	客員研究員
	斎藤康秀	麻布大学獣医学部	助教授

研究要旨 新興・再興感染症のモニタリングのため、日本各地の住宅地で CDC 型ドライアイストラップを設置して蚊類を定期的に捕集した結果を用いて、媒介蚊の生息予測を行った。2004 年度はその設置場所の環境を定性的に把握するため、位置情報の収集と蚊相の解析のための簡便・安価で正確な方法として、デジタル地図、空中写真、GPS 付きデジタルカメラによる調査を提言した。2003 年の捕集成績から昆虫相により、定点をクラスター分析し 3 型に分け、特に空中写真を用いて、その環境条件の特徴を明らかにした。2005 年度は、2003-4 年の首都圏の定点捕集結果から蚊類の空間分布を推定するため、吸血蚊として主要蚊のアカイエカ群およびヒトスジシマカの雌蚊の捕集数や混合比などから、定点を 5 類型に分けた。この類型の特徴を都市情報システムデータと比較して、より広域かつ迅速な蚊相の空間分布を東京都について推測した。

A. 研究目的

2004 年度は分担研究者らによって実施されているトラップ設置場所の環境を的確に表現し、データを比較する方法を開発するために、捕集場所の位置情報の収集法と環境表現法について、空中写真、デジタル地図、各種の GPS 機器を用いて検討し、本研究班で統一できる方法と基準を示すことを目的とした。2005 年についてはま

ず吸血蚊である雌蚊の結果から、定点を類型区分した。この結果を東京都の都市計画地理情報システムに重ね合わせて、より広域な地域の蚊の生息状況を簡便・迅速に推定する方法を開発し、さらに定点調査の位置の検証に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

2004年

資料：2003年本研究班報告書に記載されている感染研、千葉県、横浜市、川崎市、富山、大阪市、沖縄市などが実施しているドライアイストラップ設置場所の位置情報と蚊の捕集結果および、2004年度感染研のドライアイストラップにより捕集された蚊その他の双翅目昆虫の捕集結果を用いた。

方法：2003年度の報告書に記載されている設置場所については、蚊の種構成およびその数、捕集総数を一覧表にまとめ、アカイエカ群(アカイエカおよびチカイエカ)、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ、その他の蚊の種類構成比や捕集数からタイプ分けし、後述する空中写真や地図から判読される家屋形態、土地利用、開発の時期などの環境との関係について検討した。位置情報の環境表現は本研究班で共有できる方法として、空中写真(平成14年1:10,000の空中写真(株)パスコ撮影)、デジタル地図、GPS測量のほか、携行用GPS専用機器、GPS内臓カメラ、GPSカード付きデジタルカメラ、GPS内臓PDA、GPSカード付きPDA、GPS携帯などを用いた。

2005年

資料：首都圏における蚊類の生息状況に関する資料としては、感染研昆虫医科学部による定点調査結果のうち雌蚊の捕集数や種類、1トラップ1回あたりの捕集数を用いた。

東京都都市計画情報システムデータ：東京都知事から平成22年3月までの使用承諾書を受けた。このデータは東京都縮尺1:2,500地形図上に、都市計画情報システムのデータを重ね合わせた

もので、用途地域(平成16年6月24日現在)、土地利用現況・建物現況(平成13年及び14年度)を利用した。

解析方法：蚊相による定点の環境分類は、主要蚊のアカイエカ群(アカイエカおよびチカイエカ)とヒトスジシマカを指標にして、アカイエカ群(アカイエカおよびチカイエカ)の捕集数の多寡とヒトスジシマカの捕集数を補完的に用いて行った。各定点の環境は空中写真を用いて判読し、さらに家屋形態、土地利用、開発の時期、建ぺい率、容積率、地上階数、地下階数などを、都市GISデータをArcGIS 9.1で展開して、読み取った。その結果から、捕集数を多数、中間値、少数にわけ、東京都都市GISデータの各項目毎に色分けして図化して生息予測を行い、さらに調査定点の位置検証を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

2004年

1)捕集場所の位置情報の取得法

既往のトラップ設置場所の詳細な住所から位置を確認する方法として、地図、空中写真、衛星画像を用い、また資料を収集して、GISにて管理した。ここで用いた紙地図は国土地理院発行の地形図、住宅地図(地籍図)のほか、市販の各種地図、公的機関からの主題図などである。一方、インターネットから取得できる広域の地図としては、パソコンフリーソフトの「カシミール」を用いた国土地理院発行の地図利用があ

る。空中写真や衛星画像による判読は、地図では把握できない、時々刻々と変化する住宅地周辺の人工改変の状況を知る上で有用であり、種々の専門技術を用いると幅広い活用が可能である。

簡単な位置情報の取得法としては、GPSカード付きデジタルカメラのデータを、Excelファイルに変換して位置や環境把握に用いた。これらの地図などに座標をつけて重ね合わせGISによる総合的把握が可能となった。これらに空間的情報に加えて、さらに移動する位置情報の収集も可能となった。

2) 感染研ドライアイストラップ設置場所について

津田らの報告した感染症研究所の2004年度の昆虫相による環境の類型化では、A昆虫相の捕集数が多く種類も多い群、C昆虫数が少なく種類も少ない群、その中間値Bに分類された。この環境判読には空中写真が有効で、Aは丘陵地を人工改変して建設した低層住宅で、緑被が多く、湿気の多いところ、Cは市街地の中高層住宅で緑被が少なく乾燥しているところ、Bは古くからの住宅地で低層住宅としては乾燥しているところであった。

2005年

1) 首都圏における蚊の調査結果：ドライアイストラップで捕集される首都圏の主な蚊はアカイエカ群とヒトスジシマカで、雌蚊の資料を検討した。捕集数は1頭以下から1,200頭以上で、捕集回数は22~33回、トラップ一回あたりの捕集数は1頭以下から10頭以上などに分かれ、5

類型に区分できた。捕集数の中間値を示す類型にはヒトスジシマカが混入する場合が多い。

2) GIS データを用いた東京都全域あるいは23区における蚊相の予測

雌蚊捕集数の多い条件は東京都のGISデータで、建ぺい率50%以下、用途地区コードで第1種低層住居専用地域で、容積率80%以下、地上階数では1階、用途区部では独立住宅であった。そこで、東京都の蚊の生息予測としては、建ぺい率、容積率、地域区分（第1種あるいは2種低層住居専従地域、第1種および第2種中高層住居専従地域、その他住居地域、商業地域、工業地域など）でまとめて区分した。そのほか、用途地域区分図上に、高さ制限、地上階数、地下階数などを重ね合わせて分布図を作成した。ここではモノトーンの印刷上の制約からその一部を図化した。都市GISの各項目ごとに、あるいは複数項目を重ね合わせて生息状況を推測したが、いずれの項目からも多いと推測された環八外縁と、いずれの項目からも少ないと推測された文京・千代田・中央区以東など、典型的な地点もあった。少ないと推測された地域はもともと定点としてトラップを設置できる適地がなく、今後の検証の必要性の有無を検討している。両地域の遷移帯は色々な環境要因が混在していることから、今後さらに検証していく必要がある。

D. 考察

2004年

ドライアイストラップは設置位置により、蚊

の捕集数や種類に差が認められる。全国調査の際には設置位置の共通化が重要であろう。空中写真は、国土地理院、NTTはじめ種々の機関で、対象(都市部か、林野か)、縮尺、時期の異なる条件で撮影されているが、今回は2002年の、同一季節で、縮尺1:10,000で、市街地のほとんどが入手できる(株)パスコの空中写真を用い、スキャンによってデジタル化して解析を容易にした。

2003年度報告書の蚊捕集データについては各機関で捕集条件を統一していないことから、蚊種と捕集場所を参照して特徴を検討した。この結果を用いて、地形や地質を用いた関東地方の自然分類により、蚊の分布を推定している。

感染研関連の設置場所については、都市部に見られるすべてのタイプが確認され、調査定点は、蚊の捕集場所を代表する点として妥当であったと考えられる。津田らによる昆虫相の構成比による定点のグルーピングは、空中写真によって相当部分説明できると考えられる。今回、空中写真による判読範囲を、蚊の捕集数については半径50m以内、種類については1km以内で検討しているが、空中写真のデジタル化の必要性を考慮しながら、判読範囲の設定についてはさらに検討している。

2005年

蚊の捕集結果について、昆虫相による環境の類型化では、定点は3類型に分けられたが雌蚊の捕集数と蚊の種類から定点は5つの類型に分けられ、都市GISデータの解析は各項目により3~5の段階に分けられ、各項目について分布図

を重ね合わせて推定される生息数をランク付けした。今後はこれらのデータを重し付けして、より詳細な分布予測につなげる方法を検討したい。

蚊捕集定点の位置検証については今後ここで得られた類型の典型的な場所を選んで定点調査を追加実施すべきか検討したい。

都市部の夜間人口・昼間人口の差、住民の年齢層、人の行動も吸血の機会に差異をもたらす。今回の東京都のGISデータによる蚊の生息予測は、国土基盤データなどデジタル化されたデータと重ねあわせることができることから、地域差に根ざした吸血の危険性を解析することが可能である。

CDC型ドライアイストラップのCO₂発生装置の開発：代替のCO₂源として、昨年はドライイーストを検討したが、炭酸ガス発生時間の長期化や選択的に蚊を誘引する方法を開発している。

E. 結論

2004年

CDC型ドライアイストラップの設置場所の位置情報を容易で安価に研究班で共有できる方法として、パソコンソフトによる地図の取得法と使用法を示した。全トラップ設置場所の縮尺約1:10,000カラー空中写真を整備し、周囲の環境判読を可能にした。位置情報取得法としてGPSカメラによるデータの収集と、データをExcelファイルへの変換を行い、GISによる展開を可能にした。

ドライアイス設置場所を、捕集蚊の種類や総数と、周辺環境から住宅地を3タイプに分けた。この結果を利用して住宅地の環境から、蚊相の推定が可能であると考えられる。

感染研で定期的実施している「ドライアイスストラップで捕獲された昆虫相による生息環境の類型化」(本報告書、津田ら)による昆虫相の3タイプは、空中写真によって昆虫相の推測が可能であることを示唆している。

2005年には病原体媒介蚊のより広域な生息状況を把握するため、感染研で定期的実施してきた住宅地周辺の蚊捕集資料の中から、雌蚊のみに着目してデータ整理を行った。

捕集蚊のうちアカイエカ群の捕集数の大小にヒトスジシマカの数をもとに、定点を5類型に分類できた。2004年の昆虫相による分類と比べ可能であり、より簡便な解析が期待される。

この結果と、東京都都市計画地理情報システムを参照するとことにより、蚊の捕集数の多い住宅地の地理情報による環境が推測されたことから、蚊の捕集数に差をもたらすGISデータを各項目について、あるいはそれを重ね合わせて、東京都あるいは23区における蚊の捕集数、あるいは蚊の種類が推測が可能であることを図化することができた。

首都圏におけるアカイエカ群にはアカイエカとチカイエカが含まれ、2003-2004年の捕集定点調査実施時には判別が不可能であったが、少なくとも3種の方法で判別が可能であることが明らかになってきたことから、今後はアカイエカ群を区別して検討できるものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

2004年

Nihei, N., Kajihara, N., Kirinoki, M., Chigusa, Y., Saitoh, Y., Shimamura, R., Kaneta, H., and Matsuda, H. (2004)

Fixed-point observation of *Oncomelania nosophora* in Kofu Basin-establishment of monitoring system of schistosomiasis japonica in Japan. *Parasitology International* 53, 199-205.

Saitoh, Y., Hattori, J., Chinone, S., Nihei, N., Tsuda, Y., Kurahashi, H. and Kobayashi, M. (2004)

Yeast-generated CO₂ as a convenient source of carbon dioxide for adult mosquito sampling. *J. American Mosquito control Association* 20: 261-264.

Nihei, N., Yoshida, M., Kaneta, H., Shimamura, R. and Kobayashi, M. (2004) Analysis on the dispersal pattern of newly introduced *Latrodectus hasseltii* (Araneae: Theridiidae) in Japan by spider diagram. *J. Medical Entomology*, 41, 269-276.

中谷友樹・谷村晋・二瓶直子・堀越洋一編著
(2004) 保健医療のためのGIS. 古今書院

2005年

二瓶直子・津田良夫・小林陸生(2005): 空中写真で衛生環境がどこまで読み取れるか。生活と環境、9、48-53.

Nihei, N., Kajihara, N., Kirinoki, M., Chigusa, Y., Matsuda, H., Saitoh, Y., Shimamura, R., Kaneta, H. and Nakamura, S. (2006); Establishment of a GIS monitoring system for schistosomiasis japonica in Kofu, Japan. *Annals of Tropical Medicine and*

Parasitology, 100, 143-153.

工藤翔二・岩崎恵美子・二瓶直子(2005): 鼎談、感染症の予防と治療—宇宙からみた地球と感染症。日医雑誌、134、121-128

学会発表

2004年

津田良夫、倉橋弘、林利彦、葛西真治、伊澤晴彦、佐々木年則、澤邊京子、富田隆史、二瓶直子、小林睦生(2004)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、平成16年4月6日、福井。

倉橋弘、津田良夫、林利彦、葛西真治、伊澤晴彦、佐々木年則、澤邊京子、富田隆史、二瓶直子、小林睦生(2004)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、平成16年4月6日、福井。

二瓶直子(2004)地理情報システムと衛生動物—画像化して考える—。第56回日本衛生動物学会大会シンポジウム「衛生動物学と関連分野の協調」、平成16年4月6日、福井。

二瓶直子、小林睦生、橋田良彦、金田弘幸、川端真人、太田伸生、Bakote' e, B、Leafasia, J、石井明(2004)地理情報システムGISによるソロモン諸島国マラリアリスクの推定、第56回日本衛生動物学会大会、平成16年4月7日、福井。
小林睦生、伊澤晴彦、佐々木年則、二瓶直子、澤邊京子、津田良夫(2004)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、平成16年4月6日、福井。

比嘉由紀子、星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、二瓶直子、澤邊京子、津田良夫、小林睦生(2004)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、川崎。

Nakamura, S., Matsuda, H., Kirinoki, M., Habe, S., Kitikoon, V., Watanabe, T. and Nihei, N. (2004) Reconfirmation on high prevalence of *Schistosomiasis mekongi* infection in southern part of Khong district, Champasack province, Lao PDR. Proceedings of the 2nd Vietnam-Laos-Cambodia Symposium. 236-237

2005年

二瓶直子(2005)空間情報技術を応用した医療・保健。日本学術会議地理研連主催、日本衛生動物学会ほか後援、[空間情報社会]シンポジウム、空間情報科学技術で築く快適・安全・活力のある社会。平成17年3月4日、東京

Nakamura, S., Matsuda, H., Kirinoki, M., Habe, S., Kitikoon, V., Watanabe, T., Nihei, N., Phommassack, B., Phommala, S., Akkhavong, K. and Boupha, B. (2005): Present situation of *Schistosomiasis mekongi* and other helminth infections at Khong district in Champasack province, Lao People's Democratic Republic. Proceedings of International Conference on Emerging Snail Borne Helminthic Diseases, The Loyal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, June 21-22.

Nihei, N., Nakamura, S., Matsuda, H., Kajihara, N., Saito, Y., Mochizuki, K. and Kobayashi, M. (2005):

Oncomelania snail monitoring after control project for schistosomiasis japonica in Yamanashi prefecture, Japan. . Proceedings of International Conference on Emerging Snail Borne Helminthic Diseases, The Loyal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, June 21-22.

Nakamura, S., Matsuda, H., Kirinoki, M., Habe, S., Kitikoon, V., Watanabe, T., Nihei, N., Akkhavong, K. and Bouppha, B. (2005): Present situation of *Schistosoma mekongi* infection in Champasack province, Lao PDR. Proceedings of Medicine and Health in Tropics, Marseille, France, September 11-15.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究総合報告書

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）
研究協力者：李時雨，駒形修，葛西真治（国立感染症研究所）

WNE 媒介蚊の殺虫剤感受性と抵抗性機構：2003 年と 2004 年の採集に基づき室内でコロニー化したアカイエカ種群蚊 56 コロニーとヒトスジシマカ 10 コロニーについて、蚊幼虫駆除用に登録されている 5 つの殺虫剤に対する幼虫の感受性レベルを調べた。アカイエカ種群蚊については、殺虫剤感受性対照系統に関する *LC99* 値の 100 倍の濃度で 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で試験した場合であり、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，テメホスで試験をした場合は、それぞれの亜種で、少数のコロニーに抵抗性個体が分離した。フェニトロチオンで試験をした場合、殺虫剤感受性対照系統に関する *LC99* 値の 10 倍の濃度で生存する個体は分離しなかった。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。アカイエカ種群蚊の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作用点のアミノ酸置換変異，L999F と L999S，による感受性低下が含まれていた。エトフェンプロックス抵抗性のアカイエカ種群蚊幼虫は、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。ヒトスジシマカは、これらの 5 つの殺虫剤に感受性であった。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、ネッタイエカ由来の P450 cDNA の半網羅的クローニングを行い、62 の異なる P450 分子種をコードする cDNA 部分配列を決定した。抵抗性アカイエカ種群蚊の各系統より抽出した全 RNA をマイクロアレイ解析に供し、感受性系統と遺伝子発現の比較を行った結果、P450 分子種の中には抵抗性系統で過剰発現しているものが複数存在することが示された。また幾つかの分子種は、系統や種を超えて過剰発現していることが示唆された。

アカイエカ種群亜種の分子分類：アカイエカ種群蚊 *Acel* 遺伝子のイントロン領域に含まれる配列多型に基づき、ゲノム DNA を鋳型とする対立遺伝子特異的 PCR (AS-PCR)により、日本産亜種の分子分類を試みた。9 都府県 38 地点より採集した 170 頭のチカイエカ（無吸血産卵性蚊）とアカイエカ（非無吸血産卵性蚊）を使い AS-PCR 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。

コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性遺伝子の頻度分布：アセチルコリンエステラーゼ (AChE) の殺虫剤感受性低下は、コガタアカイエカの有機りん剤抵抗性の主要因である。AChE をコードする *Ace2* 遺伝子に生じた F455W 置換変異が AChE の殺虫剤非感受性をもたらす。この抵抗性 *Ace2* 遺伝子の国内における頻度分布を、本州，九州，沖縄を含む 7 つの地点での採集にもとづき調査した。抵抗性遺伝子は約 90%またはそれ以上の高い頻度で日本各地にほぼ一様に分布していると推定した。W455 の近傍の cDNA 配列の同一性から、F455W 置換変異は単一起源とみなされる。

A. 研究目的

WNE 媒介蚊の殺虫剤感受性と抵抗性機構：ウエストナイルウイルス (WNV) がわが国に侵入した際に主要な媒介蚊となる可能性が高い蚊種について、蚊の防除用途で登

録されている殺虫剤の有効性を把握しておく必要がある。また、殺虫剤抵抗性が認められる場合には、有効な薬剤や他の防除法に切り替える必要がある。殺虫剤抵抗性

の検出には、従来、室内コロニーを作り供試虫を用意した後にバイオアッセイを行うという手法に頼っているが、感受性を正しく評価できる反面、野外集団が本来もっていた遺伝的多様性をコロニー化の際に失うこと、生きた昆虫を一定数捕獲して実験室に持ち込む必要があること、飼育にコストを要するなどの難点もある。抵抗性をもたらす分子機構が明らかになれば、それを標的にして抵抗性を簡易に分子診断することができる。以上をふまえて、わが国の都市部で主要な WNV 媒介蚊になると考えられるアカイエカ種群蚊とヒトスジシマカについて、殺虫剤感受性レベルを調査し、抵抗性の分子機構を明らかにすることを目的とした。

アカイエカ種群亜種の分子分類：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。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。地下の水溜まりにおもに発生し、旧ビル管理法の定めるところにより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。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、亜種特異的な遺伝子配列を標的とする分子分類法を確立することを目的とした。

コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性遺伝子の頻度分布：1980年代に、わが国のコガタアカイエカ集団には著しい有機りん殺虫剤抵抗性が発達していることが明らかにされた。抵抗性のおもな要因は、有機りん系・カーバメイト系殺虫剤の作用点であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の感受性低下による。Ace2 遺伝子にコードされる AChE は、1つのアミノ酸置換 F455W により殺虫剤非感受性となっていることが2004年に立証された。近年、日本の水田で

農薬として使われる主力殺虫剤には変遷があり、AChE とは作用点異なる薬剤も加わっているが、コガタアカイエカ集団における有機りん剤感受性がどのように推移したかについては明らかでない。日本脳炎の地方的再興、WNV の日本侵入などに備え、農村地域での人家と畜舎などでコガタアカイエカ成虫を化学的に防除する際に、主要な防疫用・家畜用殺虫剤成分である有機りん剤の有効性を評価することを目的として、Ace2 抵抗性遺伝子の頻度分布を調査した。

B. 研究方法

WNE 媒介蚊の殺虫剤感受性と抵抗性機構：採集地ごとに、捕集したヒトスジシマカとアカイエカ種群蚊の成虫または幼虫を室内でコロニー化し、数世代繁殖させ、幼虫を殺虫試験に供試した。アカイエカ Horaana 系統を殺虫剤感受性の対照系統として用いた。有機りん系のフェントロチオン、テメフォス、ピレスロイド系のエトフェンプロックス、皮膚形成阻害剤のジフルベンズロン、幼若ホルモン類縁体のピリプロキシフェンの殺虫効力を試験した。各殺虫剤は、Horaana 系統が示す LC99 値の1倍、10倍、100倍の3つの濃度で適用した。いくつかのチカイエカとアカイエカのコロニーについては、エトフェンプロックス選択により殺虫剤感受性に関して均一性の高い抵抗性系統を確立した。それらの抵抗性系統を使い、ピペロニルブトキサイドを用いた共力試験を行い、シトクロム P450 による解毒活性亢進の関与を調べた。また、エトフェンプロックス選択の開始前、選択中の各世代、選択の終了後に抽出した個体を用い、ナトリウムチャンネル遺伝子の部分配列を PCR 増幅し、L999 座位のアミノ酸置換変異を direct sequencing により決定した。昆虫種 P450 に保存されている P450 還元酵素結合領域とヘム結合領域のタンパク質配列に基づき縮重プライマーを設計し、ネッタイシマカ Jpal-per 系統蚊に由来する P450 cDNA 断片を PCR 増幅し、クローニングと配列決定を行った。解読した P450 cDNA 配列に基づきオリゴ DNA マイクロアレイを作成した。アカイエカ種群各亜種の殺虫剤感受性系統とピレスロイド

抵抗性系統の蚊の間の各 P450 遺伝子の転写産物量比をマイクロアレイ法により測定した。

アカイエカ種群亜種の分子分類：アカイエカ種群蚊の *Ace1* 遺伝子の intron 2 に含まれる塩基挿入／欠失多型および塩基置換多型をターゲットとして、アカイエカ、チカイエカの配列にそれぞれに特異的配列を含むフォワード・プライマーと亜種に共通なリバース・プライマーを設計し、ゲノム DNA を鋳型とし、対立遺伝子特異的 PCR (AS-PCR) を行い、アガロース電気泳動による産物の有無とサイズを調べた。供試虫には無吸血産卵性について確認を行ったアカイエカとチカイエカの多数のコロニーを用いた。

コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性遺伝子の頻度分布：生きた雌成虫を断頭し、頭部は酵素阻害試験に、残りを RNA 抽出に用いた。フェニトロオクソンを AChE 阻害剤としアセチルチオコリンを基質として Ellman の DTNB 法に基づき AChE 活性を測定した。Ace2 cDNA の PCR 増幅断片を鋳型とし、F455W 置換多型（殺虫剤感受性型コドン TTT, 非感受性型 TGG）を標的として対立遺伝子特異的 PCR (AS-PCR) を行い、感受性と非感受性それぞれに特異的なプライマーを含む 2 つの反応の間で比較 C_t 値を求め、F455 座位の遺伝子型推定を行った一部の個体については、direct sequencing により F455 座位とその近傍の cDNA 配列を決定した。

C. 研究結果

WNE 媒介蚊の殺虫剤感受性と抵抗性機構：2003 年と 2004 年の採集に基づき室内でコロニー化したアカイエカ種群蚊 56 コロニーとヒトスジシマカ 10 コロニーについて、蚊幼虫駆除用に登録されている 5 つの殺虫剤に対する幼虫の感受性レベルを調べた。殺虫剤感受性対照系統に関する LC99 値の 100 倍の濃度で 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分離した。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 LC99 値の 10 倍の濃度で生存する個体は分離しなかった。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が両亜種に存在した。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作用点であるナトリウムチャンネルの *kdr* 様変異 (L999F と L999S) による感受性低下が含まれることを明らかにした。幼虫が示したエトフェンプロックス抵抗性は、同系のペルメトリンとフェントリンにも交差した。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、ネッタシマカ由来の P450 cDNA の半網羅的クローニングを行い、62 の異なる P450 分子種をコードする cDNA 部分配列を決定した。マイクロアレイ法により解析した結果、アカイエカ種群のピレスロイド抵抗性系統の蚊で遺伝子転写産物量が 3 倍以上に上昇している分子種が少なくとも 6 つ存在することを明らかにした。

アカイエカ種群亜種の分子分類：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 地点での採集に基づくそれぞれの室内飼育コロニーの中から 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。

コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性遺伝子の頻度分布：千葉、埼玉、神奈川、富山、岐阜、長崎、沖縄の 7 県から採集した合わせて 161 個体について、Ace2 F455 座位に関する遺伝子型を推定した。その結果、対象となった 322 の Ace2 遺伝子に抵抗性遺伝子が 306 含まれると推定された。埼玉県で採集した蚊を用いて W455 遺伝子の頻度が 82%であったことを除き、他の 6 サンプルでの同遺伝子の頻度は 92-100%であった。

有機りん剤作用点に感受性低下をもたらす *Ace2* 抵抗性遺伝子は、全国的に様に高い頻度で分布しているものと推測される。16 の Phe455 をコードする感受性遺伝子からは、少なくとも7種類の異なるハプロタイプが含まれていると推定されたが、Trp455 置換変異を含む抵抗性遺伝子ハプロタイプは同一で一つの起源に由来するものとみなされる。

D. 考察

WNE 媒介蚊の殺虫剤感受性と抵抗性機構：チカイエカとアカイエカの多数のコロニーに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幼虫を用いて確かめた。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アカイエカ種群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した。幼虫のピレスロイド抵抗性が、成虫の感受性と忌避性の低下にどのように交差するかについて、さらに検討を要する。

アカイエカ種群亜種の分子分類：*Acel* 遺伝子配列の亜種特異性を標的にした AS-PCR により、日本産アカイエカとチカイエカの分子分類が可能であることを確かめた。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 変異が見出され、アカイエカの同剤抵抗性アカイエカからのみ L999S 変異が見出されていることもまた、同じ仮説を支持する。この分子分類法を用いて、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。

コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性遺伝子の頻度分布：コガタアカイエカは毎年大陸より飛来し、そのことが日本脳炎ウイルスの国内における供給源となっているとい

う仮説も唱えられている。アジア各国の水田において害虫防除のために散布されるおもな農薬は、現在に至るまで、有機りん系とカーバメイト系の殺虫剤である。本種の広域移動と殺虫剤抵抗性遺伝子の起源を考える上でも、アジア各国における殺虫剤抵抗性 *Ace2* 遺伝子の多型性について分子解析を進める必要がある。

E. 結論

WNE 媒介蚊の殺虫剤感受性と抵抗性機構：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蚊幼虫駆除に用いられる殺虫剤は、用法用量に定められた濃度以下で、ヒトスジシマカ幼虫に対して十分な有効性を示した。これら5つの殺虫剤のうち、アカイエカ種群蚊の抵抗性をもっとも顕著なのはピレスロイド系のエトフェンプロックスに対してであった。同剤に対する抵抗性はチカイエカ集団の中により発達していた。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った。アカイエカ種群蚊のピレスロイド作用点の低感受性は、ナトリウムチャンネルの L999F または L999S の置換変異による。

アカイエカ種群亜種の分子分類：*Acel* 遺伝子イントロンの亜種特異的な塩基配列を利用して、日本産アカイエカとチカイエカの分子分類する対立遺伝子特異的 PCR 法を確立した。

コガタアカイエカ殺虫剤抵抗性遺伝子の頻度分布：アセチルコリンエステラーゼに殺虫剤非感受性をもたらす *Ace2* 遺伝子の F455W 置換変異が、90%またはそれ以上の頻度で全国的に分布していると推定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

Ni X-Y, Tomita T, Kasai S, Kono Y (2003) cDNA and deduced protein sequence of

- acetylcholinesterase from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Applied Entomology and Zoology*, 38: 49-56.
- Kasai S, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Tomita T (2003) Rapid evaluation of human louse susceptibility to phenothrin. *Medical Entomology and Zoology*, 54: 31-36.
- Anazawa Y, Tomita T, Aiki Y, Kozaki T, Kono Y (2003) Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, *Tetranychis urticae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 509-514.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y (2003) 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.
- Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Kasai S (2003) Molecular analysis of *para*-sodium channel gene in pyrethroid-resistant headlice, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, 40: 468-474.
- 葛西真治, 富田隆史 (2003) 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.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T (2004) 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.
- Toda S, Komazaki S, Tomita T, Kono Y (2004) 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.
- Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Agui N, Kasai S (2005) Sodium channel point mutations associated with pyrethroid resistance in the head louse, *Pediculus humanus capitis*. In: *Environmental Fate And Safety Management Of Agrochemicals* (eds. Clark JM, Ohkawa H), pp. 234-243, American Chemical Society.
- Oh S-H, Kozaki T, Mizuno H, Tomita T, Kono Y, (2006) Expression of *Ace*-paralogous acetylcholinesterase of *Culex tritaeniorhynchus* with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system, *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: xxx-xxx (in press).
- Kono Y, Tomita T (2006) Amino acid substitutions conferring insecticide insensitivity in *Ace*-paralogous acetylcholinesterase, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: xxx-xxx (in press).
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シトクロム 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.
- 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.
- 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. ピレスロイド剤抵抗性ネッタ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.
- 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 57 回日本衛生動物学会大会, 2005 年 6 月 2 日.
- 葛西真治, 駒形修, 正野俊夫, 富田隆史, 倉橋弘, 沢辺京子, 比嘉由紀子, 津田良夫, 小林睦生, 元木貢, 高橋朋也, 谷川力, 吉田政弘, 橋本知幸, 新庄五朗, *Ace* 遺伝子をマーカーとした日本産 *Culex pipiens* complex の簡易判別法, 第 57 回日本衛生動物学会大会, 2005 年 6 月 2 日.
- 葛西真治, 駒形修, 正野俊夫, 富田隆史, 津田良夫, 小林睦生, 元木貢, 高橋朋也, 谷川力, 吉田政弘, 橋本知幸, 新庄五朗, 2003 年と 2004 年に行ったアカイエカ種群蚊の殺虫剤感受性調査, 第 57 回日本衛生動物学会大会, 2005 年 6 月 2 日.
- 比嘉由紀子, 津田良夫, 倉橋弘, 林利彦, 葛西真治, 沢辺京子, 星野啓太, 駒形修, 伊澤晴彦, 佐々木利則, 富田隆史, 二瓶直子, 小林睦生, 関東地方におけるチカイエカとアカイエカの地上での発生状況 (個眼数による判別の試み), 第 57 回日本衛生動物学会大会, 2005 年 6 月 2 日.
- Kasai S, Komagata O, Shono T, Tomita T. Mechanisms of insecticide resistance in West Nile virus-transmitting mosquitoes, 2005 Annual Meeting of Entomological Society of America, 17 December 2005.
- Oh S-H, Kozaki T, Tomita T, Kono Y. Expression of *Ace*-paralogous acetylcholinesterase of *Culex*

tritaeniorhynchus with an amino acid substitution conferring insecticide insensitivity in baculovirus-insect cell system, 5th Asia-Pacific Congress of Entomology, 19 Oct. 2005.

葛西真治, 駒形修, 正野俊夫, 富田隆史,
ウエストナイル熱媒介蚊のピレスロイ
ド剤抵抗性とマイクロアレイ法を用い
た抵抗性機構の解明, 日本農薬学会第 31
回大会, 2006 年 3 月 22 日.

呉承協, 古崎利紀, 富田隆史, 河野義明,
活性中心のアミノ酸置換が AChE の特性
に及ぼす影響, 日本応用動物昆虫学会第
50 回大会, 2006 年 3 月 29 日.

葛西真治, 駒形修, 正野俊夫, 富田隆史,
殺虫剤抵抗性アカイエカのシトクロム
P450 (1) 抵抗性アカイエカの出現, 日本
応用動物昆虫学会第 50 回大会, 2006 年 3
月 29 日.

駒形修, 葛西真治, 正野俊夫, 富田隆史,
殺虫剤抵抗性アカイエカのシトクロム
P450 (2) 遺伝子発現のマイクロアレイ解
析, 日本応用動物昆虫学会第 50 回大会,
2006 年 3 月 29 日.

富田隆史, 駒形修, 正野俊夫, 葛西真治,
殺虫剤抵抗性アカイエカのシトクロム
P450 (3) 過剰発現とその機構, 日本応用
動物昆虫学会第 50 回大会, 2006 年 3 月
29 日.

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)

厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究総合報告書

国内で捕集された蚊からのフラビウウイルスの検出

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)
協力研究者	伊澤 晴彦	(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)
	小滝 徹	(同・ウイルス第一部 協力研究員)
	高崎 智彦	(同・ウイルス第一部 室長)

研究要旨: 2003-2005 年の 3 年にわたり主に都市部住宅地を中心に蚊の捕集を行った。国内 12 地域で捕集した蚊(合計 11 属 47 種類 23,226 個体)に対して細胞培養系による WN ウイルスを含むフラビウウイルスの検出を行ったが、いずれからも WN ウイルスは検出されず、未だ日本への WN ウイルスの侵入はないと結論した。JE ウイルスはブタなどで抗体価が上昇する時期のコガタアカイエカに高率に検出された。都市部住宅地においてはアカイエカおよびヒトスジシマカからも JE ウイルスが検出され、人への JE ウイルスの感染経路を改めて見直す必要性を提起した。アカイエカ種群は分子分類によりアカイエカとチカイエカに分類してウイルス検出に供したが、どちらの種からもウイルスは検出されなかった。また、屋内の狭い空間に生息していると思われていたチカイエカが、地上部でも活発に活動し吸血活動をしていることが明らかになり、その病原体媒介能は詳細に検討されるべきことが示唆された。

一連の作業の中で、アカイエカ種群から WN でも JE ウイルスでもない新規フラビウウイルス(CxFV と仮称する)を分離することに成功した。次いで RT-PCR 法により本ウイルスの全塩基配列を決定し構造解析を行い、本ウイルスのゲノム全長は 10,840 塩基、ウイルス蛋白質 3,364 アミノ酸から構成されており、昆虫フラビウウイルスに近縁なウイルスではあるが、これらよりもさらに起源的な位置にある進化学的にも非常に興味深いウイルスであることが判明した。また、本ウイルスは国内のかなりの地域でしかも高率に存在していることが明らかになり、アカイエカ以外にも同様のウイルスが存在することが分かってきた。フラビウウイルスに対する実験系モデルとしてウイルス感染実験などへの利用が期待されるだけでなく、フラビウウイルス全体の生態、進化、および分布拡散を考察する上での重要なツールとなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

北米大陸においてはウエストナイル(WN)熱の流行が年々西へと拡大し、東南アジア諸国においては、依然としてデング熱や日本脳炎(JE)が各地で流行している。このように世界的にも蚊媒介性ウイルス(アルボウイルス)感染症の流行は拡大の一途にある現状である。このような背景のもとに、わが国においてもフラビウイルスの最新の分布状況を把握する必要性から、各種蚊からのウイルス検出を実施した。3年間のウイルス検出結果を報告する。

B. 研究方法

1. 野外捕集蚊

2003-2005年の3年間で、国内12地域で蚊の捕集を行った。CDC-styleトラップにドライアイスを目安に発泡スチロール製の箱に入れてトラップ横に置き、地上から約1.5メートルの高さに吊るして24時間の連続捕集を行った。3年間の捕集蚊合計11属47種類23,226個体から1,335プールを作成しウイルス分離およびウイルスゲノムの検出に用いた。捕集地点は以下の通りである。

- 1) 北海道:網走市卯原能取湖、釧路市、根室市風連湖
- 2) 秋田・岩手:大仙市、秋田市、盛岡市下厨川東北農研センター
- 3) 茨城:猿島郡総和町、東茨城郡美野里町
- 4) 成田:成田市十余三、山武郡松尾町、印旛郡酒々井町、山武郡成東町熊野神社
- 5) 首都圏: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、東京都新宿区戸山、新宿区西早稲田、東京都中野区落合、東京都北区西ヶ原、東京都品川区小山台、目黒区林試の森公園、東久留米市大門町、東久留米市氷川台、東京都府

中市栄町、柏市新柏、市川市中山、市川市南行徳、川崎市高津区下作延、横浜市青葉区、横浜市戸塚区上柏尾

- 6) 富山:富山市衛生研究所、城跡公園、高岡市古城公園、富山市小杉町黒河、富山市小杉町太閤、富山市小杉町山本新、新湊市海老名、富山市婦中町、薬事研究所、富山市大山町、富山市鹿島町、新川郡上市町
- 7) 三重:津市三重大学構内
- 8) 大阪・兵庫:高槻市栄町、四条畷市米崎町、吹田市豊津町、豊中市箕輪、大阪市東淀川区、大阪市東成区、東大阪市下小阪、東大阪中小阪、和泉市山荘町、和泉市内田町、西宮市西宮浜、西宮市枝川町
- 9) 広島:庄原市広島県立大学畜舎、呉市倉橋町
- 10) 高知:高知市、安芸市、幡多郡大月町
- 11) 長崎:長崎市坂本町、長崎市金毘羅山、諫早市小川町
- 12) 沖縄:那覇市、中頭郡西原町琉球大学構内、石垣市

2. 細胞培養およびウイルス分離

蚊プールはMEM培養液中細胞破碎機MM300(QIAGEN)を用いて破碎し、軽く遠心回収した上清を培養細胞に接種した。ヒトスジシマカ由来C6/36細胞(ヒューマンサイエンス細胞資源バンクより購入C6/36株)、ほ乳類由来のVero細胞(ヒューマンサイエンス細胞資源バンクより購入Vero 9013株)およびBHK細胞(北海道大学農学部より分与BHK21株)の3種類の細胞を組み合わせて3代盲継代を行った。適宜変性細胞(CPE)を観察し、最終培地上清からウイルスRNAを抽出した。

3. ウイルスゲノムの検出および解析

ウイルスRNAはHigh pure viral RNA kit (Roche)あるいはRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出を行った。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回繰り返した)、72°C10分の条件でRT-PCRを行った。用いたプライマーは、NS3領域(Fla-U5004, Fla-L5457; 配列は省略、Thomasら, 1999から引用)とNS5領域の2種類(FU1F, CFD2R; FU2f, CFD3R, 配列は省略、Kunoら, 1998から引用)の合計3種類である。塩基配列はPE/ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer(PE/ABI)を用いて解読し、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)およびGENETYX-WIN ver.6により解析を行った。

4. アカイエカとチカイエカの分子分類

形態学的特徴ではその分類が非常に困難であるアカイエカ種群(アカイエカとチカイエカ)の分類に、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で両種を分類した。蚊の脚6本と翅2枚を切り離し、REExtract -N-Amp Tissue PCR Kit(SIGMA)を用いて個別にDNAの抽出とPCRを行った。胸部および腹部はウイルス検出に供した。

C. 結果

1) 捕集蚊からのウイルス遺伝子検出とウイルス分離

2003年7,485個体から50個体までを1プールとし348プールを作成した。MEM乳剤をC6/36細胞に接種し3代盲継代を行った後CPE

を観察した。約30%の蚊プールに何らかの陽性反応が現れた。細胞上清から抽出したRNAからRT-PCRおよびTaqMan RT-PCRでウイルスゲノムの検出を行い、36%がフラビウイルスに対して陽性を示し、野外捕集蚊においてある種のフラビウイルス(以下 CxFV と仮称する)が存在していることが確認された。WNウイルス遺伝子の検出結果はすべて陰性であった。都市部住宅地を主な調査対象とした媒介蚊調査において、東京都および首都圏3県、大阪府、兵庫県で捕集されたアカイエカ種群(8プール)およびヒトスジシマカ(5プール)からJEウイルス遺伝子が検出され、各地域における陽性プール率はどちらも5%以上であった。

2004年は、11,938個体から最高30個体までを1プールとし752プールからウイルス検出を行った。新規捕集地域のみC6/36細胞を用いて3代培養後に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、ほ乳類由来細胞(VeroおよびBHK21)に接種し2代盲継代した後にC6/36細胞に接種した。検出結果はWN、JEウイルスのいずれも陰性であった。

次いで、カラスの死亡が報告された茨城県内においてWNウイルスのみを対象とした2夜連続での捕集調査を行い、2箇所で6属11種741個体を捕集した。38プールを作成しTaqMan RT-PCRによりWNウイルス遺伝子の検出を行ったが、結果はすべて陰性であり、懸念されたWNウイルスの侵入はないと判断された。

2005年は3,803個体から最高20個体までを1プールとし、昨年度同様の細胞培養系により235プールからウイルス検出を行った。WNウイルスは検出されなかったが、諫早市、富山県上市町、安芸市および高知県大月町で捕集されたコガタアカイエカからJEウイルスが高率に検出され、ウイルスも分離された。ま