

た、高知県で捕集されたシロハシエカにおける CxFV の存在も確認された。

2) アカイエカとチカイエカの分子分類およびそれらからの WN、JE ウイルスの検出

大仙市、秋田市および春日部市で捕集された蚊集団はすべてアカイエカであった。川崎市高津区、西宮市、高知市および長崎市ではアカイエカの割合がチカイエカよりも高いものの両種が同所的に存在することが示唆された。一方、吹田市、東大阪市および呉市倉橋町ではむしろチカイエカの比率が高かった。アカイエカ種群はそれぞれ種別にウイルス検出を行ったが、WN、JE いずれのウイルスも検出されなかった。

3) アカイエカ種群から分離された新規フラビウイルス (CxFV) の性状解析

2003 年 7 月新宿区戸山で捕集されたアカイエカ種群から新規フラビウイルス (CxFV) を分離し、NS3 および NS5 領域を基点に RT-PCR を行った後 RACE 法によってウイルスゲノムの全長配列を解読した。本ウイルスはゲノム全長 10,840 塩基、ウイルス蛋白質 3,364 アミノ酸からなるウイルスであることが明らかになった。NS5 領域 (全長約 900 アミノ酸) の配列からフラビウイルス科の分子系統樹を作成したところ、CxFV は近年発見された昆虫フラビウイルスの Kamiti river ウイルス (KRV, Sang ら, 2003; Crabtree ら, 2003) や Cell fusing agent (CFA, Stollar and Thomas, 1975; Cammisa- Parks ら, 1992) と同じクラスターに位置するものの、それ以外の既知のフラビウイルスに対して最も起源的な位置にあることが示唆された。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、アカイエカ以外の種類でも、それぞれに特異的な CxFV と同類のウイルスが

存在することも確認された。

D. 考察

2003-2005 年の 3 年間にわたり WN ウイルスの日本国内への侵入を監視する目的で WN ウイルスを含むフラビウイルス全般を網羅するウイルス検出を全国レベルで行ってきたが、国内 12 地域で捕集した蚊プールのいずれからも WN ウイルスは検出されなかった。本検出作業によって、わが国への WN ウイルスの侵入監視が完全に行われているとは言えないまでも、蚊集団から検出されるレベルまで WN ウイルスが国内に定着はしていないと判断された。

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ることが示唆されたが、都市部住宅地で捕集されたアカイエカとヒトスジシマカからも検出されたことは大変興味深い。人への JE ウイルスの感染経路を改めて見直す必要性が提起された。

2003 年 10 月初旬に JE ウイルスが分離された川崎市高津区捕集のアカイエカ種群は、当時の分類法ではアカイエカとチカイエカの区別はなされなかった。近年我々は両種を精度よく分類することができる分子分類法を開発したことから、2004 年以降は一部その分類法を用いて両種を区別してウイルス分離を行った。その結果、WN も JE も両ウイルスともに検出されなかったが、国内のかなりの地域で地上 1.5 メートルに設置したトラップにチカイエカも多数捕集されることが判明し、チカイエカが屋内の狭い空間で生息しているであろうという従来の概念を完全に覆す結果が示唆された。アカイエカとチカイエカは形態学的に非常に似ており鑑別が困難であるが、生態学的にも生理学的にもその性質は大きく異なる。また、チカイエカは無吸血産卵性ではあるが、その病原体

媒介能は詳細に検討されるべきである。

我々が見出したCxFVは、これまでに知られているすべての既知のフラビウイルスに対して進化学的に最も起源的な位置にあるウイルスであると想像されたことから、本ウイルスの遺伝的および生物学的特性を追求することは、純粋に進化学的議論を行う上で重要な意味を持つと考えられる。本ウイルスに関しては、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野外調査で明らかになったが、自然界における生態学的な知見はほとんど得られていない。例えば、潜在的に本ウイルスを保有している蚊体内で、同じフラビウイルスの仲間であるJEウイルス、あるいはWNウイルスなどが感染した場合に、蚊虫体に、あるいは互いのウイルスに対してどのような影響を与えるか。共感染した場合の蚊体内におけるウイルスの局在・動態について、自然界における伝播様式は経卵巣伝播であるのか、など今後検討すべき課題は多い。

E. 結論

- 1) 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。国内約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イルスの検出を行ったが、すべての蚊プールからWNウイルスは検出されなかった。本結果から、未だ日本へのWNウイルスの侵入はないと結論した。
- 2) JEウイルスは増幅動物の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が提起された。

3) アカイエカ種群を分子分類によりアカイエカとチカイエカに分類することを可能にした。本来屋内の狭い空間で生活していると思われていたチカイエカは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今後詳細に検討されるべきである。

4) イエカ属蚊から新規フラビウイルス(CxFV)を分離し、その全塩基配列を決定した。本ウイルスは昆虫フラビウイルスに近縁であるが、既知のフラビウイルスの中で進化学的に最も起源的な位置にあることが判明した。また、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った。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 津田良夫, 比嘉由紀子, 倉橋弘, 林利彦, 星野啓太, 駒形修, 伊澤晴彦, 葛西真治, 佐々木年則, 富田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林睦生. 都市域における疾病媒介蚊の発生状況調査—ドライアイストラップを用いた2年間の調査結果— (Med. Entomol. & Zool., 印刷中).
- 2) Higa, Y., Hoshino, K., Tsuda, Y., Kobayashi, M. Dry ice-trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern Hokkaido, Japan (Med. Entomol. & Zool., in press).
- 3) Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M. and Sawabe, K. Isolation and genetic characterization of a new flavivirus from *Culex pipiens* mosquito in Japan (投稿準備中).
- 4) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 江下優樹, 小

林睦生. 蚊からのウエストナイルウイルスの検出法および分離法の検討(投稿準備中).

2. 学会発表

- 1) 佐々木年則, 沢辺京子, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 倉根一郎, 江下優樹, 小林睦生. VecTest による蚊からのウエストナイルウイルスの検出. 第 55 回日本衛生動物学会. 4 月, 大分市(2003)
- 2) 沢辺京子, 佐々木年則, 伊澤晴彦, Sudipta Roychoudhury, 小林睦生. 野外採集蚊からのウエストナイルウイルスの検出—2003 年度前期報告—. 第 55 回日本衛生動物学会東日本支部大会. 10 月, 横浜市(2003)
- 3) 小林睦生, 津田良夫, 沢辺京子, 佐々木年則, 伊澤晴彦, 二瓶直子, 栗原毅:北海道、能取湖においてドライイストラップと人囿法で採集されたアカエゾヤブカについて. 第 55 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 10 月, 横浜市(2003)
- 4) 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イストラップによる蚊類の発生状況調査. 第 55 回日本衛生動物学会大会, 4 月, 福井市(2004)
- 5) 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. ドライイストラップで捕集された都市域の昆虫類. 第 55 回日本衛生動物学会大会, 4 月, 福井市(2004)
- 6) 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 55 回日本衛生動物学会大会, 4 月, 福井市(2004)
- 7) 伊澤晴彦, 沢辺京子, 佐々木年則, 津田良

- 夫, 倉橋弘, 高崎智彦, 吉田政弘, 渡辺護, 小林睦生. 本邦野外捕集蚊からのアルボウイルスの分離. 第 55 回日本衛生動物学会大会, 4 月, 福井市(2004)
- 8) 小林睦生, 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, 吉田政弘. 都市部を中心としたウエストナイル熱媒介蚊の発生状況. 第 39 回日本脳炎生態研究会, 6 月, 神戸市(2004)
- 9) 伊澤晴彦, 星野啓太, 佐々木年則, 沢辺京子, 津田良夫, 倉橋弘, 高崎智彦, 吉田政弘, 渡辺護, 小林睦生. 本邦生息蚊類のウイルス保有状況調査. 第 39 回日本脳炎生態研究会, 6 月, 神戸市(2004)
- 10) 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, 10 月, 川崎市(2004)
- 11) 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, 10 月, 川崎市(2004)
- 12) 沢辺京子, 伊澤晴彦, 星野啓太, 佐々木年則, 福士克男, 宮川憲三, 田村安雄, 佐藤英毅, 津田良夫, 比嘉由紀子, 小林睦生. 本邦産野外捕集蚊からのウエストナイルウイルスの検出—2004 年度前期報告—. 第 56 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 10 月, 川崎市(2004)
- 13) 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 比嘉由紀子, 高崎智彦, 小滝徹, 小林睦生, 矢野和彦, 澤邊京子. 本邦生息蚊類が保有するウイルスの検出およびその性状解析.

第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 5月, 箱根(2005)

14) 小林睦生, 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, 吉田政弘. 都市部を中心としたウエストナイル熱媒介蚊の発生状況. 第40回日本脳炎生態研究会, 5月, 箱根(2005)

15) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 比嘉由紀子, 葛西真治, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 小林睦生. 日本産ウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血嗜好性とアカイエカ種群の分子分類. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 5月, 箱根(2005)

16) 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 比嘉由紀子, 當間孝子, 佐藤英毅, 高崎智彦, 小林睦生, 澤邊京子. 本邦野外捕集蚊からのアルボウイルスの検出. 第57回日本衛生動物学会大会, 6月, 札幌市(2005)

17) 當間孝子, 比嘉由紀子, 宮城一郎, 澤邊京子. 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). 第55回日本衛生動物学会第58回日本寄生虫学会南

日本支部合同大会, 10月, 宮崎市(2005)

18) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 比嘉由紀子, 津田良夫, 伊藤美佳子, 高崎智彦, 小林睦生. 蚊からのウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスの検出と吸血嗜好性から見た疾病媒介能の検討, 日米医学協力寄生虫疾患専門部会研究成果報告会, 2月, 東京(2006)

19) K. Sawabe, H. Isawa, Y. Higa, S. Kasai, K. Hoshino, T. Sasaki, Y. Tsuda and M. Kobayashi. Host feeding patterns of several mosquito species in Japan. 2006 National Conference West Nile Virus, 2月, San Francisco, USA (2006)

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

国内に生息する疾病媒介蚊の吸血嗜好性に関する研究

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	(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)
	西海 功	(国立科学博物館・動物研究部)
	久居 宣夫	(同・自然教育園)
	濱尾 章二	(同・自然教育園)

研究要旨： 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。わが国において WN ウイルスの侵入がみられた場合に感受性種と想定される蚊種を中心に吸血源動物種の同定を試みた。吸血蚊に含まれる動物由来のミトコンドリア DNA チトクローム b および 16S リボソーム DNA 領域の部分塩基配列を解析し吸血源動物種を特定した。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、キンイロヤブカはほとんどがウシあるいはブタを吸血源としていた。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。日本脳炎 (JE) ウイルスの主たる媒介種であるコガタアカイエカは大型のほ乳類を好むが、一部鳥類からも吸血しており、野鳥からブタなどの増幅動物に JE ウイルスを伝播する可能性が示唆された。

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アカイエカ (沖縄地方ではネッタイエカ) とチカイエカが分布しているが、従来の形態学的特徴ではアカイエカとチカイエカを鑑別することが困難であることから、我々はアセチルコリン分解酵素 (ACE) 遺伝子および ITS1 領域に見られる塩基配列の違いに着目し分子分類法を開発した。本手法により、特に首都圏では、地上部で捕集されたアカイエカ種群の約 3 割がチカイエカであることが分かり、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示唆された。また、両種の吸血嗜好性に有意差はなく、鳥類とほ乳類をほぼ同程度に吸血していることも明らかになった。吸血嗜好性から WN ウイルス媒介能を考えた場合、チカイエカは無吸血産卵性であることを除けば、アカイエカ同様に評価されるべきであると言える。

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することのできる種類に限られる。米国で WN ウイルス感受性蚊とみなされた種の中の 4 種類(アカイエカ種群、ヒトスジシマカ、キンイロヤブカ、ヤマトヤブカ)は、同一種あるいは近縁の種が日本にも生息している。そこで主にそれらの蚊を対象に吸血源動物種の同定を行った。アカイエカ種群に対しては、ITS1 領域の遺伝子情報(沢辺ら、投稿準備中)と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(葛西ら、投稿準備中)によりアカイエカとチカイエカを分類し、種別に吸血嗜好性を評価した。

B. 研究方法

1. 吸血蚊の捕集

蚊は、捕虫網、CDC 型背負い式電動吸引機、吸血管などを用いて採集、あるいは CDC 型ドラリアイストラップにより捕集した。主な捕集地は以下のとおりである。

- 1) 北海道:網走市卯原能取湖、釧路市
- 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) 成田:成田市十余三、印旛郡酒々井町、山武郡成東町熊野神社
- 4) 首都圏:さいたま市浦和区、鶴ヶ崎市脚折町、春日部市大沼、東京都新宿区戸山、新宿区西早稲田、東京都中野区落合、東京都品川区小山台、目黒区林試の森公園、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、川崎市高津区下作延、横浜市青葉区、横浜市戸塚区上柏尾、川崎市宮前区鷺沼、相模原市淵野辺
- 5) 富山:富山市城跡公園、富山市小杉町鶏

杉、新湊市海老名、黒部市萩生

- 6) 大阪/兵庫:高槻市栄町、四條畷市米崎町、豊中市箕輪、大阪市東成区、東大阪市中
小阪、西宮市西宮浜、西宮市枝川町
- 7) 岐阜:恵那市岐阜県畜産研究所
- 8) 長崎:長崎市坂本町
- 9) 沖縄/石垣:中頭郡西原町琉球大学構内、
石垣市

2. 吸血源動物種の同定

吸血源動物由来の DNA は、頭部を切り離れた蚊虫体から PURESCRIPT Blood RNA Isolation Kit(Gentra)あるいは REDextract-N-Amp Tissue PCR Kit(SIGMA)を用いて抽出した。ミトコンドリア DNA チトクローム b および 16S リボソーム DNA 領域に作成した 3 種類のプライマーセットを用い、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)を用いてダイレクトシーケンシング法を試みた。遺伝子解析は BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)および GENETYX-WIN ver.6 を用いて行った。

3. 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、ACE 遺伝子および ITS1 領域の配列差異を用いた分子分類法で両種を判別した。蚊は頭部を切り離し、上記の方法で個別に DNA を抽出し PCR を行った。

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ところ、いくつかの部位で違いが見られた。つまり、配列差異が見られる2箇所のうちにも配列に欠損が見られるものをチカイエカと推定した。

C. 結果

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)の各10個体ずつに対してACE遺伝子マーカーによる分類(葛西ら)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が確認されチカイエカであると判定された個体に対する結果を同様に照合した。その結果、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おり、両種の分類に使用できることが分かった。以下分子分類結果を基にアカイエカ種群を分類した。

北海道、盛岡、成田で捕集されたアカイエカ種群はすべてアカイエカであり、沖縄捕集蚊はネッタイエカであった。富山、大阪/兵庫、長崎ではチカイエカの存在も確認された(順に9%、14%、66%)。首都圏以外の捕集数は3-16個体と少なく信頼性は劣るが、捕集個体数の多かった首都圏(111個体)においては、アカイエカ種群の約30%がチカイエカであり、この結果は、チカイエカはアカイエカと同じ地上部で活発に活動し、さらに吸血活動も行っていることが推察された。

国内各地で捕集されたアカイエカ種群吸血蚊165個体は、アカイエカ、チカイエカともにその約60%が鳥類を、50%がほ乳類を吸血していた(10%はその両方の動物を重複吸血していた)。両種ともにほ乳類では人、イヌ、ネコの順に多く吸血し、鳥類種ではカモ類、スズメが多かった。両種間で吸血嗜好性に有意な差は

認められなかったが、アカイエカがほ乳類6種、鳥類8種類を吸血していたのに対し、チカイエカは、ほ乳類、鳥類ともに3種類ずつしか吸血源として利用しておらず、後者の活動範囲は前者に比べ限られた狭い範囲であることが推察された。

ヒトスジシマカ(108個体)の80%以上はほ乳類(主に人)を吸血していたが、鳥類(主にカモ類)、およびその他の種類として両生類、爬虫類なども検出され、吸血源が多種類にわたることが分かった。キンイロヤブカ(71個体)およびコガタアカイエカ(46個体)はそのすべてがほ乳類(ウシとブタの合計はどちらも90%以上であった)を吸血していた。一方、豚舎および牛舎周辺で捕集されたコガタアカイエカの一部に鳥類を吸血(7%)した個体が見つかった。

D. 考察

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、チカイエカおよびヒトスジシマカの3種類(沖縄地方ではネッタイエカ)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た。一方、キンイロヤブカは米国の実験ではWNウイルスに対する感受性が非常に高い種であるとみなされているが、わが国のキンイロヤブカは主にウシやブタを吸血していたことから、少なくとも国内で実際にWNウイルスの人へのブリッジベクターとして役割を果たす可能性は低いと思われる。

トビイロイエカ *Culex pipiens pipiens* は米国および欧州各地に広く分布しているが、両大陸における本種蚊の吸血嗜好性は大きく異なると言われている。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ないと推察されている (Fonseca ら, 2003)。トビロイエカとは近縁の日本産アカイエカ種群は、3 種類とも米国産トビロイエカに近い吸血嗜好性を示すことが分かり、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。

アカイエカ種群の形態的特徴は酷似しており、特にアカイエカとチカイエカを区別する指標としては、野口・朝比奈(1966)による個眼数の相違、あるいは雄の外部生殖器の形態学的差異(野口, 1962)が知られているのみである。本研究で開発した分子分類法により両種を精度よく分類することが可能になり、都市域住宅地の地上部で捕集されたアカイエカ種群吸血蚊のうち約 30%がチカイエカであることが判明した。チカイエカは屋内の狭い空間で活動し、しかも無吸血産卵性が大きな特徴であるとされていたが、予想以上に地上部で活動し、吸血活動も行っていることが示されたことは新たな発見である。また、アカイエカは鳥類嗜好性でチカイエカはほ乳類嗜好性であるとも推察されていたが、本研究で両種間の吸血嗜好性に有意差はなく、ほぼ同程度に鳥類とほ乳類を吸血することが示唆され、これまでの概念を覆す新たな知見となった。蚊の吸血嗜好性から WN ウイルス媒介能を考えた場合、チカイエカは無吸血産卵性ではあるものの、アカイエカと同程度の評価をすべきであろう。

日本脳炎 (JE) ウイルスの主要な媒介種であるコガタアカイエカは、本来大型のほ乳類を好むが、鳥類も吸血することが判明し、野鳥からブタなどの増幅動物へ JE ウイルスを伝播する可能性が示唆された。自然界での JE ウイルス

感染環を推定する上での一つの根拠が得られたと言える。

E. 結論

1) 哺乳類および鳥類の血液由来 DNA を選別するプライマーをミトコンドリア DNA チトクローム b 領域および 16S リボソーム DNA 領域にそれぞれ設計し、得られた PCR 産物から部分塩基配列を解析することで種のレベルでの同定を行う方法を確立した。

2) 国内に生息する WN ウイルス感受性種と想定される蚊種の中で、アカイエカ種群は鳥だけではなく人も好んで吸血する米国産トビロイエカと同様の吸血嗜好性を持つ蚊であることが判明し、アカイエカ種群とヒトスジシマカが主に都市域住宅地で、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になり得ることが推察された。

3) 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結果、両種とも鳥類もほ乳類もほぼ同程度に吸血し、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。吸血嗜好性から WN ウイルス媒介能を考えた場合、アカイエカとチカイエカ間に有意な差異はなく、疾病媒介能は同程度に評価されるべきであろう。

4) 日本脳炎媒介蚊であるコガタアカイエカは大型のほ乳類を好むが、鳥類も吸血し得ることが分かり、野鳥からブタなどの増幅動物へ JE ウイルスを伝播する可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 沢辺京子, 小林陸生. 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

- 1) 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, 1月, 東京(2004)
- 2) 津田良夫, 倉橋弘, 林利彦, 葛西真治, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤辺京子, 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55回日本衛生動物学会大会, 4月, 福井市(2004)
- 3) 倉橋弘, 津田良夫, 林利彦, 葛西真治, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤辺京子, 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55回日本衛生動物学会大会, 24月, 福井市(2004)
- 4) 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55回日本衛生動物学会大会, 4月, 福井市(2004)
- 5) 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55回日本衛生動物学会大会, 4月, 福井市(2004)
- 6) 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, 6月, 箱根(2004)
- 7) 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, 9月, 秋田市(2004)

- 8) 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, 10月, 川崎市(2004)
- 9) 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, 10月, 川崎市(2004)
- 10) K. Sawabe, H. Isawa, T. Sasaki, S. Roychoudhury, Y. Tsuda, Y. Higa, S. Kasai and M. 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, 12月, 京都市(2004)
- 11) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 比嘉由紀子, 葛西真治, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 小林睦生. 日本産ウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血嗜好性とアカイエカ種群の分子分類. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 5月, 箱根(2005)
- 12) 澤邊京子, 伊澤晴彦, 比嘉由紀子, 葛西真治, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 小林睦生. 日本に分布するウエストナイルウイルス感受性蚊の吸血源動物種. 第57回日本衛生動物学会大会, 6月, 箱根(2005)
- 13) 當間孝子, 比嘉由紀子, 宮城一郎, 澤邊京子. 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). 第55回日本衛生動物学会第58回日本寄生虫学会南

日本支部合同大会, 10 月, 宮崎市(2005)

14) 澤邊京子・星野啓太・伊澤晴彦・佐々木年則・比嘉由紀子・津田良夫・伊藤美佳子・高崎智彦・小林睦生:蚊からのウエストナイルウイルスおよび日本脳炎ウイルスの検出と吸血嗜好性から見た疾病媒介能の検討. 日米医学協力寄生虫疾患専門部会研究成果報告会, 2月, 東京(2006)

15) K. Sawabe, H. Isawa, Y. Higa, S. Kasai, K. Hoshino, T. Sasaki, Y. Tsuda and M. Kobayashi. Host feeding patterns of several mosquito species in Japan. 2006 National Conference West Nile Virus, San Francisco, USA, 2月(2005)

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

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

- 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

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
協力研究者 田島 茂（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
濱野正敬（国立感染症研究所 ウイルス第一部）
桑山 勝（広島県保健環境研究センター）
岸 昇（広島県立畜産技術センター）
江下優樹（大分大学医学部感染分子病態制御講座）

研究要旨

蚊や動物組織からの日本脳炎ウイルスの高感度遺伝子検出法を開発し、実際のサーベイランスに応用した。1971年に大分県横瀬水路でユビナゴウモリの血液から分離したヨコセウイルスは遺伝子解析結果からフラビウイルスであることが確定したため、蚊およびマウスに対する感染性、病原性を検討した。その結果、成熟マウスに対して、強い病原性は示さなかった。ヨコセウイルスのヒトスジシマカ由来細胞（C6/36細胞）への感染能・増殖能は非常に弱いながら存在する可能性が示唆された。一方、近年西日本を中心に居住地域に頻回に出没するようになった野生イノシシは、ブタと近縁な動物であることから日本脳炎ウイルスの新たな増殖動物である可能性があると考えて、疫学調査を実施したところ、広島県、島根県の野生イノシシの約3割が日本脳炎抗体陽性であった。

研究目的

我が国においては、日本脳炎ワクチンの予防接種制度、住環境の整備などの要因もあり、日本脳炎患者発生数は、1992年以降患者発生数は年間10人を超えることはない。しかしながら、毎年夏季に、ブタの間で日本脳炎ウイルスが活動していることは、感染症流行予測調査からも明らかである。我々は、日本脳炎その他のフラビウイルスに関してより高感度

のウイルス遺伝子検出法、血清診断法を開発・確立し、日本脳炎ウイルスを中心に我が国のフラビウイルスに関する疫学調査を実施した。

研究方法

日本脳炎ウイルス用のリアルタイム RT-PCR（TaqMan法）を開発した。プライマー・プローブは下記のものである。

JEen562s-585p/623cset :
CTGGAYTGTGARCCAAGGA、

JEen623c-585p/562sset :
GAHCCCACGGTCATGAC、

JEen585p562s623c :
FAM·ACTRAACACTGAAGCGT·MGB。

また、大分県でユビナガコウモリから分離されたヨコセウイルスに関しては、その全遺伝子配列が決定され、フラビウイルスであることが確定したことから、本研究班では蚊に対する感受性およびマウスやヒトに対する病原性を検討し、血清学的検査に必要な、抗ヨコセウイルスマウス血清を作製した。

一方、ブタ用の日本脳炎 IgG ELISA 系および IgM 捕捉 ELISA 系を開発し、このアッセイ系が、ブタと近縁動物であるイノシシにも応用できることを確認した。そこで、広島県および島根県の猟友会等の協力を得て、狩猟期間の野生のイノシシの血清を集め、病原体検査・血清抗体検査を実施した。

研究結果

都市部のアカイエカから日本脳炎ウイルス遺伝子を検出した。ヨコセウイルスはマウスに対して、脳内接種では病原性を示すが、腹腔接種では強い病原性は示さなかった。一方、*in vivo*ではヒトスジシマカ由来の C6/36 細胞には感染が成立したが、ウイルス力価は 6 日後や 10 日後でも 10^3 /ml 以下であった。ヒトヘパトーマ細胞 Huh-7 にも感染が成立し、感染後 6 日後に 10^7 /ml 以上の高いウイルス力価が観察された。また、蚊に対しては、胸部接種では感受性があることが示唆された。しかし、経口接種ではウイルス遺伝子を検出できず、ウイルスも分離されなかった。

一方、広島県および島根県のイノシシにつ

いて広島県のイノシシ血清 41 頭のうち、IgM 抗体陽性であったものは 1 頭のみであった。一方 IgG 抗体は、強陽性は 22 頭、弱陽性は 4 頭であった。島根県のイノシシでは、IgG 抗体強陽性 4 頭であった。広島県のイノシシに関して IgG 抗体が陽性であった 19 検体の血清について、17 頭で中和抗体価陽性を示した。

考 察

日本脳炎ウイルスは、我が国においてはコガタアカイエカが主たる媒介蚊であるが、都市部のアカイエカからもウイルス遺伝子を検出した。このことは、主たる増幅動物であるブタへの感染機会が減った日本脳炎ウイルスが、他の動物や鳥類をその増幅動物として利用している可能性が示唆された。そこで、我々はまず、ブタの近縁動物であるイノシシに着目した。イノシシはその生息域である野山の減少に伴い、近年ヒトの居住地にしばしば出現するようになった。その傾向は、特に西日本で顕著であり、広島県や島根県では駆除対策を実施している。これらの地域のイノシシが日本脳炎抗体を保有していたことから、近くにブタが飼育されてなくても、イノシシが出現する地域では、日本脳炎に対する注意が必要である。今後、夏季のイノシシの血液から日本脳炎ウイルスの分離および遺伝子検出を実施する必要があると考えている。

ヨコセウイルスは、大分県でユビナガコウモリから分離されたフラビウイルスであり、その病原性およびウイルス生態学は不明であるが、蚊によって媒介されている可能性が示唆された。さらにヨコセウイルスがヒト細胞内で増殖する能力を有することが明らかとなった。今後は、日本に生息するコウモリの血清疫学調査や大分県地域の蚊の調査、ヒトの抗

体保有調査が、必要であると思われる。また、ヨコセウイルスの事例からも明らかであるが、節足動物媒介性ウイルスには、まだまだ自然宿主や媒介昆虫の不明な未知のウイルスが存在すると考えられ、これらの未知のウイルスがヒトに感染性を有するウイルスに変異し、新興感染症を引き起こす可能性もある。従って、本研究のような地道な疫学調査は、非常に有用な研究であり、ヒトの健康に寄与するものと考えている。

結 論

- 1) 都市部の蚊にも日本脳炎ウイルスを保有する蚊がいることを確認した。
- 2) 最近ヒトの居住区に頻回に出現する野生のイノシシの中には、日本脳炎抗体を保有する個体が存在した。今後イノシシおよびその吸血蚊（媒介蚊）に関する調査を含めて、西日本を中心としたより広範囲な調査が必要である。
- 3) ヨコセウイルスは蚊由来細胞およびヒト肝臓由来細胞内で増殖する能力を有することが明らかとなった。蚊に関しては、ウイルスを胸部接種することで感染が成立した。マウスを用いた動物実験では、明らかな病原性は示さなかった。

F. 健康危険情報

野生のイノシシが、日本脳炎ウイルスに感染しており、ブタ同様に増幅動物となっている可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Tajima, S., Takasaki, T., Matsuno, S., Nakayama, M., Kurane, I. (2005): Genetic characterization of Yokose virus, a flavivirus isolated from the bat in Japan. *Virology* 332: 38-44.

2. 学会発表

Tajima, S., Takasaki, T., Eshita, Y., and Kurane, I. Characterization of Yokose virus, a flavivirus, which was isolated from the bat in Japan. 40th Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program. 2004.12

田島茂、高崎智彦、江下優樹、倉根一郎：日本で分離されたフラビウイルスYokoseウイルスの性状解析 第39回日本脳炎ウイルス生態学会、2004年6月

高崎智彦、林 昌宏、濱野正敬、澤邊京子、岸 昇、桑山勝、倉根一郎. 中国地方のイノシシにおける日本脳炎ウイルス抗体保有状況の検討. 第40回日本脳炎ウイルス生態学会 (箱根) 2005年5月

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし

研究成果の刊行に関する一覧表（平成15年度）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Eshita Y, Takasaki T, Yamada K, Kurane, I.	VI. Arthropod Borne Disease Isolation of Arboviruses from Field-collected Mosquitoes	Jonathan, Y	Anthology of Biosafety	American Biological Safety Association	Richmond	2003	63-71
小林睦生	衛生害虫	三橋 淳	昆虫学大事典	朝倉書店	東京	2003	920-933

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nihei N, Yoshida M, Kobayashi M, Kaneta H, Shimamura R, Agui N	Geographic information systems (GIS) analysis of the distribution of the redback spider <i>Latrodectus hasseltii</i> (Araneae: Theridiidae) in Osaka, Japan	Medical Entomology and Zoology	54	177-188	2003
Kobayashi M, Nihei N, Kurihara T	Analysis of northern distribution of <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system		39	4-11	2002
Tsuda Y, Yotopranoto S, Bendryman SS, Rosmanida, Dachlan YP, Takagi M	Seasonal changes in variation of dorsal scale pattern of <i>Aedes aegypti</i> (L.) (Diptera: Culicidae) in Surabaya, Indonesia	Medical Entomology and Zoology	54	73-80	2003
Dieng H, Boots M, Tuno N, Tsuda Y, Takagi M	Life history effects of prey choice by copepods: implications for biocontrol of vector mosquitoes	Journal of American Mosquito Control Association	19	67-73	2003
Satho T, Tsuda Y, Sombon P, Kawada H, Takagi M	Difference in the larval susceptibility to pyriproxyfen in nine colonies of six vector mosquito species	Medical Entomology and Zoology	54	155-160	2003

Dieng H, Boots M, Mwandawiro C, Satho T, Hasegawa M, Nyambura GJ, Saita S, Kawada H, Tsuda Y, Takagi M	Effects of a copepod predator on the survivorship and development of <i>Aedes albopictus</i> (Diptera: Culicidae)	Medical Entomology and Zoology	54	87-192	2003
Tsuda Y, Maekawa Y, Saita S, Hasegawa M, Takagi M.	Dry ice-trap collection of mosquitoes flying near a tree canopy in Nagasaki, Japan with special reference to <i>Aedes albopictus</i> (Skuse) and <i>Culex pipiens pallens</i> Coquillett (Diptera: Culicidae)	Medical Entomology and Zoology	54	325-330	2003
Hu X-M., Tsuda Y, Takagi M	Survival and development of larvae of three tropical malaria vectors (Diptera: Culicidae) under a seasonally changing temperature condition in Nagasaki, Japan	Medical Entomology and Zoology	54	371-379	2003
Nagao Y, Dachlan YP, Soedarto, Hidajati S, Yotopranoto S, Kusmartisnawati, Sri Subekti, Ideham B, Tsuda Y, Takagi M	Distribution of two species of malaria, <i>Plasmodium falciparum</i> and <i>Plasmodium vivax</i> , on Lombok Island, Indonesia	Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health	34	495-500	2003
Tuno N, Tsuda Y, Takagi M, Suwonkerd W	Pre-and postprandial mosquito resting behavior around cattle hosts	Journal of American Mosquito Control Association	19	211-219	2003
Toma T, Miyagi, I	<i>Armigeres (Armigeres) laoensis</i> sp. nov. (Diptera: Culicidae) from Khammouane Province, Lao PDR	Medical Entomology and Zoology	54	169-172	2003
Higa Y, Toma T, Saita S, Takei A, Miyagi I	Laboratory rearing method of <i>Anopheles minimus</i> (Diptera: Culicidae) from Ishigaki Island, the Ryukyu Archipelago, Japan	Medical Entomology and Zoology	54	257-266	2003
Toma T, Miyagi I, Murakami H, Nerome H, Yonamine M,	Distribution and seasonal prevalence of <i>Anopheles minimus</i> Theobald (Diptera: Culicidae) in the Yaeyama Island group (except Ishigaki	Medical Entomology and Zoology	54	267-274	2003

Higa Y, Tokuyama Y	Island) , Ryukyu Archipelago, Japan,1999-2000				
Miyagi I, Toma T, Higa Y	A new species of <i>Mimomyia</i> (<i>Ingramia</i>) from Indonesia (Diptera: Culicidae)	Medical Entomology and Zoology	55	11-20	2004
Tomita T, Yaguchi N, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Kasai S	Molecular analysis of a <i>para</i> sodium channel gene from pyrethroid-resistant head lice, <i>Pediculus humanus capitis</i> (Anoplura: Pediculidae)	Jounal of Medical Entomology	40	468-474	2003
Kasai S, Tomita T	Male specific expression of a cytochrome P450 (<i>Cyp312a1</i>) in <i>Drosophila melanogaster</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications	300	894-900	2003
Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y	An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb resistant strains of the peach potato aphid, <i>Myzus persicae</i> .	Biochemical and Biophysical Research Communications	307	12-22	2003
Anazawa Y, Tomita T, Aiki Y, Kozaki T, Kono Y	Sequence of a cDNA encoding acetylcholinesterase from susceptible and resistant two-spotted spider mite, <i>Tetranychis urticae</i>	Insect Biochemistry and Molecular Biology	33	509-514	2003
Kasai S, Mihara M, Takahashi M, Agui N, Tomita T	Rapid evaluation of human lice susceptibility to phenothrin	Medical Entomology and Zoology	54	31-36	2003
N XY, Tomita T, Kasai S, Kono Y	cDNA and deduced protein sequence of acetylcholinesterase from the diamondback moth, <i>Plutella</i> <i>xylostella</i> (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)	Applied Entomology and Zoology	38	49-56	2003
Nabeshima T, Mori A, KozakiT, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T	An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, <i>Culex</i> <i>tritaeniorhynchus</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications	313	794-801	2004
Takasaki T, Yabe S, Nerome R, Ito M, Yamada K, Kurane I	Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice	Vaccine	21	4514- 4518	2003
Mizutani T, Kobayashi M,	Involvement of the JNK-like protein of the <i>Aedes albopictus</i> mosquito cell	Insect Molecular Biology	12	491-499	2003

Eshita Y, Shirato K, Kimura T, Ako Y, Miyoshi H, Takasaki T, Kurane I, Kariwa H, Umemura T, Takashima I	line, C6/36, in phagocytosis, endocytosis and infection of West Nile virus				
小林陸生	疫学調査の重要性	生活と環境	48 (6)	11	2003
小林陸生	「ウエストナイル熱媒介対策に関するガイドライン」解説	生活と環境	48 (7)	40-43	2003
小林陸生	Seminar: [蚊が媒介する感染症] ウエストナイル熱—米国での流行から何を学ぶか—	感染症	33 (4)	33-39	2003
小林陸生 二瓶直子 栗原 毅	わが国のデング熱媒介蚊であるヒトスジシマカの分布拡大について	病原微生物検出情報	25 (2)	10-11	2004
小林陸生	海外旅行と感染症—虫よけ	治療学	38 (3)	42-44	2004
吉田永祥 吉田政弘 岩上泰雄 瀧 幾子 藪 輝久 内野清子 田中智之	セアカゴケグモ <i>Latrodectus hasseltii</i> (Araneae: Theridiidae) 除去後の個体群動態	Medical Entomology and Zoology	54	361-366	2003
吉田政弘	日本における毒グモ咬症の今後の動向	日本医事新報	4155	25-28	2003
當間孝子	地球温暖化と蚊媒介性感染症デング熱, 西ナイル熱とマラリア	公衆衛生	67(4)	296-300	2003
葛西真治 富田隆史	cDNA アレイ法によるチトクロム P450 発現の解析: 殺虫剤新規作用点の探索と抵抗性機構の解明にむけて	日本農薬学会誌	28	473-478	2003
伊藤美佳子 高崎智彦	新興輸血感染症「ウエストナイル熱・ウエストナイル脳炎」	血液フロンティア	13(5)	613-617	2003
高崎智彦 伊藤美佳子	ウイルス性脳炎～ウエストナイル脳炎～	化学療法の領域	19(5)	797-801	2003
高崎智彦	感染症診療・投薬ガイド 第II部 疾患各論 ウエストナイル熱	総合臨床	52	351-355	2003
高崎智彦	ウエストナイル熱(West Nile Fever)	CURRENT CONCEPTS IN INFECTIOUS DISEASES	22(3)	18-19	2003
高崎智彦	ウエストナイルウイルス感染症	畜産技術	581 (10)	28-31	2003

高崎智彦	ウエストナイル熱	臨床医	29 (10)	1779- 1782	2003
高崎智彦	フラビウイルス感染症およびその 流行における鳥類の役割	鶏病研究会報	39 増刊号	1-6	2003
高崎智彦	ウエストナイルウイルス感染症の 動向	Medicament News	1759 号	4-6	2003
高崎智彦 根路銘令子 倉根一郎	2002 年日本におけるブタから分離 された日本脳炎ウイルスの解析	病原微生物検出情報	24(7)	153	2003
桑山 勝 高尾信一 福田伸治 島津幸枝 宮崎佳都夫 倉根一郎 高崎智彦 他 11 名	2002 年に発生した日本脳炎 3 事例 についての詳報ー広島県	病原微生物検出情報	24(7)	152-153	2003

研究成果の刊行に関する一覧表（平成16年度）

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
二瓶直子	感染症と GIS	中谷友樹, 谷村 晋, 二瓶直子, 堀越洋一	保健医療のた めの GIS	古今書院	東京	2004	127-165

雑 誌

発表者氏名	論 文 タ イ ト ル 名	発 表 誌 名	巻名	ページ	出版年
Saitoh Y, Hattori J, Chinone S, Nihei N, Tsuda Y, Kurahashi H, Kobayashi M	Yeast-generated CO ₂ as a convenient source of carbon dioxide for adult mosquito sampling.	Journal of American Mosquito Control Association	20	261-264	2004
Nihei N, Yoshida M, Kaneta H, Shimamura R, Kobayashi M	Analysis of the dispersal pattern of newly introduced <i>Latrodectus hasseltii</i> (Araneae: Theridiidae) in Japan by spider diagram	Journal of Medical Entomology	41	269-276	2004
Moribayashi A, Sugie H, Katagiri C, Uchida K, Kobayashi M, Agui N	Polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, mediates larval-pupal and pupal-adult development in the malarial vector mosquito, <i>Anopheles stephensi</i>	Medical Entomology and Zoology	55	59- 66	2004
Suwonkerd W, Tsuda Y, Overgaard HJ, Chawprom S, Tsuno N, Prajakwong S, Takagi, M.	Changes in malaria vector densities over a twenty-three year period in Mae Hong Son province, northern Thailand	Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health	35	316-324	2004
Kawada H, Maekawa Y, Tsuda Y, Takagi M	Laboratory and field evaluation of spatial repellency with metofluthrin-impregnated paper strip against mosquitoes in Lombok Island, Indonesia	Journal of American Mosquito Control Association	20	293-298	2004
Kawada H, Maekawa Y,	Trial of spatial repellency of metofluthrin-impregnated paper strip	Journal of American Mosquito Control	20	434-477	2004

Tsuda Y, Takagi M.	against <i>Anopheles</i> and <i>Culex</i> in shelters without walls in Lombok, Indonesia	Association			
Kobayashi J, Phompida S, Toma T, Looareensuwan S, Toma T, Miyagi I	The effectiveness of impregnated bed net in malaria control in Laos	Acta Tropica	89	299-308	2004
Miyagi I, Toma T Higa Y	A new species of <i>Mimomyia</i> (<i>Ingramia</i>) from Indonesia (Diptera: Culicidae)	Medical Entomology and Zoology	55	11-20	2004
Okudo H, Toma T, Sasaki H, Higa Y, Fujikawa M, Miyagi I, Okazawa T	A crab-hole mosquito, <i>Ochlerotatus baisasi</i> , feeding on mudskipper (Gobiidae: Oxudercinae) in the Ryukyu Islands, Japan	Journal of American Mosquito Control Association	20	134-137	2004
Miyagi I, Toma T Lien JC	<i>Ochlerotatus</i> (<i>Geoskusea</i>) <i>timorensis</i> (Culicidae: Diptera), a new species from crab-holes, West Timor, Indonesia	Medical Entomology and Zoology	55	107-114	2004
Toma T, Higa Y, Tokuyama Y, Miyagi I	Comparison of rDNA ITS2 sequence of <i>Anopheles sapersoi</i> (Diptera: Culicidae) from two islands of the Ryukyu Archipelago, Japan	Medical Entomology and Zoology	55	115-120	2004
Sasaki H, Fujikawa M, Toma T, Miyagi I	Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) collected at Iriomote Island, Ryukyu Archipelago, Japan, and their blood source	Medical Entomology and Zoology	55	125-127	2004
Toma T, Higa Y	A new species of <i>Ficalbia</i> (Diptera: Culicidae) from Iriomote Island, Okinawa, Ryukyu Archipelago, Japan	Medical Entomology and Zoology	55	195-199	2004
Nihei N, Kajihara N, Kirinoki M, Chigusa Y, Saitoh Y, Shimamura R,	Fixed-point observation of <i>Oncomelania nosophora</i> in Kofu Basin-establishment of monitoring system of schistosomiasis japonica in Japan	Parasitology International	53	199-205	2004