

図1 野外捕集蚊からの WNV 遺伝子の検出と分離法

表 1. 2003-2006 年野外で捕集された蚊種

<p><i>Aedes albopictus</i> ヒトスジシマカ <i>Ae. esoensis</i> エゾヤブカ <i>Ae. flavopictus</i> ヤマダシマカ <i>Ae. galloisi</i> ミスジシマカ <i>Ae. riversi</i> リバーズシマカ <i>Ae. togoi</i> トウゴウヤブカ <i>Ae. vexans</i> キンイロヤブカ <i>Ae. yamadai</i> ヤマダヤブカ</p> <p><i>Anopheles minimus</i> コガタハマダラカ <i>An. lesteri</i> オオツルハマダラカ <i>An. sinensis</i> シナハマダラカ</p> <p><i>Armigeres subalbatus</i> オオクロヤブカ</p> <p><i>Ochlerotatus dorsalis</i> セスジヤブカ <i>Oc. excrucians</i> アカンヤブカ <i>Oc. hokkaidensis/punctor</i> キタヤブカ/チシマヤブカ <i>Oc. japonicus</i> ヤマトヤブカ <i>Oc. nipponicus</i> シロカタヤブカ</p> <p><i>Uranotaenia annandalei</i> オキナワチビカ <i>Ur. jacksoni</i> ストウンチビカ <i>Ur. macfarlanei</i> マクファレンチビカ <i>Ur. nivipleura</i> ムネシロチビカ <i>Ur. novobscura</i> フタクロホシチビカ <i>Ur. ohhamai</i> シロオビカニアナチビカ <i>Ur. yaeyamana</i> ハラグロカニアナチビカ</p>	<p><i>Culex bitaeniorhynchus</i> カラツイエカ <i>Cx. brevipalpis</i> クロウスカ <i>Cx. halifaxii</i> トラフカクイカ <i>Cx. infantulus</i> フトシマツノフサカ <i>Cx. kyotoensis</i> キョウトクシヒゲカ <i>Cx. modestus inatoni</i> イナトミシオカ <i>Cx. nigropunctatus</i> クロフクシヒゲカ <i>Cx. okinawae</i> オキナワクロウスカ <i>Cx. orientalis</i> ハマダライエカ <i>Cx. pallidothorax</i> アカクシヒゲカ <i>Cx. pipiens pallens</i> アカイエカ <i>Cx. pipiens from molestus</i> チカイエカ <i>Cx. pseudovishnui</i> シロハシイエカ <i>Cx. quinquefasciatus</i> ネットアイエカ <i>Cx. ryuukyensis</i> リュウキュウクシヒゲカ <i>Cx. sasai</i> ヤマトクシヒゲカ <i>Cx. sitiens</i> ヨツホシイエカ <i>Cx. tritaeniorhynchus</i> コガタアカイエカ <i>Cx. tuberis</i> カニアナツノフサカ</p> <p><i>Orthopodomyia anopheloides</i> ハマダラナガスネカ <i>Culiseta kanayamensis</i> ミスジハボシカ <i>Cu. nipponica</i> ヤマトハボシカ <i>Tripteroides bambusa</i> キンバラナガハシカ <i>Coquilletidia crassipes</i> ムラサキヌマカ <i>Co. ochracea</i> キンイロヌマカ <i>Mansonia uniformis</i> アシマダラヌマカ</p>
---	---

野外より採集されたアカイエカとチカイエカの寿命について

分担研究者	小林陸生	国立感染症研究所
協力研究者	津田良夫	国立感染症研究所
	金 京純	国立感染症研究所
	比嘉由紀子	長崎大学
	片野理恵	麻布大学
	星野啓太	国立感染症研究所
	葛西真治	国立感染症研究所
	林 利彦	国立感染症研究所
	澤邊京子	国立感染症研究所

蚊成虫の野外における平均寿命は疾病媒介能力を評価する際に非常に重要な生態的パラメーターである。アカイエカおよびチカイエカの野外個体群を対象として平均寿命の評価を行った。ドライアイストラップによってアカイエカとチカイエカの成虫を捕獲し、室温 27°C、相対湿度 55%の飼育室で砂糖水を与えて飼育し、飼育条件下での寿命を調べた。調査は 2005 年と 2006 年の 2 シーズン、感染症研究所構内、落合、春日部など数ヶ所を対象として行った。2 シーズンの調査結果はほぼ同様で、アカイエカの平均寿命 (36~37 日) の方がチカイエカの平均寿命 (17~22 日) よりも有意に長かった。実験室内で得られた生存曲線に基づいて期待寿命を求め、両種の疾病媒介能力について比較考察を行った結果、アカイエカの媒介能力のほうがチカイエカよりも高いことが示唆された。

A. 研究目的

疾病媒介蚊が病原体を媒介する能力 (媒介能力) はいくつかの生態的形質と関連している。マラリア媒介蚊の場合、媒介能力は **Vectorial Capacity** と呼ばれ、(1)マラリア原虫に対する感受性、(2)蚊の密度、(3)人に対する嗜好性、(4)期待寿命の関数として定義されている。基本的にはこの考え方を踏まえつつ、北米大陸で 1999 年以来大流行を続けているウエストナイル熱の媒介蚊に関して、人への感染能力に基づく媒介蚊のリスク評価が行われている。その際リスク評価で考慮されている媒介蚊の生態的性質は、(1)蚊の密度、(2)人に対する嗜好性、(3)ウエストナイルウイルスの保有率の 3 つである。**Vectorial Capacity** で考慮されている期

待寿命は含まれていない。

疾病媒介蚊の野外における寿命を推定することは難しく、よい方法がいまだに考案されていないのが現状である。そのため媒介能力の評価では期待寿命は考慮されていない。しかしながら感染可能になった蚊がその後の生涯で新たに感染させる人の数は、明らかに蚊の寿命 (期待寿命) に比例するため、期待寿命は媒介能力の大きさをかなり大きく左右する性質と考えられている。

本研究では野外で捕獲されたアカイエカ群の成虫を、温湿度条件が一定に保たれた環境で飼育して余命を測定し、種間の比較ならびに採集場所や季節による寿命の違いを分析した。

B. 研究方法

ドライアイストラップによって吸血のために飛来するアカイエカ群成虫を捕獲した。捕獲された成虫は室温 27°C, 相対湿度 55%の飼育室で砂糖水を与えて飼育し、飼育条件下での寿命を調べた。

死亡個体の有無を 1 または 2 日毎に調べ、死亡個体は冷凍で保存した。すべての個体が死亡した後に個体毎に個眼数を調べ、中央から 5 列目の個眼数が 9 個以上の個体をアカイエカ、8 個以下の個体をチカイエカと同定した。種毎に生存曲線、期待寿命、平均寿命を求め比較を行った。

C. 研究結果

2005 年と 2006 年に野外で捕獲され実験室内で飼育したアカイエカとチカイエカの生存曲線を図 1 に示した。チカイエカは捕獲後 10 日頃から死亡個体が増え 30 日目までにほとんどの個体が死亡した。これに対してアカイエカはチカイエカよりも 10 日ほど遅れて死亡個体が多くなり、60 日目ではほとんどの個体が死亡した。2006 年の結果では両種の生存曲線にさらにはっきりした違いが観察された。アカイエカの生存曲線は 2005 年とほぼ同様であったが、チカイエカの死亡は捕獲直後から始まり 30 日目までに約 90%が死亡した。

2005 年のチカイエカは 4 月と 5 月の捕獲個体では平均寿命に有意な違いがみられ、5 月に捕獲された個体のほうが約 5 日長命であった。アカイエカは春日部と感染研構内の 2 ヶ所で捕獲された個体について調査したが、場所による平均寿命の違いは有意ではなかったため、これらの個体をプールして分析を行った。チカイエカに比べアカイエカの平均寿命は有意に長く、およそ 2 週間から 20 日の違いがあることが分かった (表 1)。

2006 年は横浜市で捕獲されたチカイエ

カと感染研構内で捕獲されたアカイエカについて同様の分析を行った。チカイエカの平均寿命は 16.8 日でアカイエカの 36.9 日より明らかに短命であった。

2006 年の調査結果に基づいて捕獲後 x 日令の個体の期待寿命を計算して図 2 に示した。期待寿命は x 日まで生存した個体その後さらに生存する平均日数を意味しており、捕獲直後の期待寿命は表 1 に示した平均寿命に相当する。アカイエカの期待寿命は捕獲直後の個体が約 37 日で、捕獲後の日数の経過に伴って徐々に短くなり、捕獲後 40 日目に期待寿命が 12 日よりも短くなった。これに対してチカイエカは捕獲直後であっても期待寿命は約 17 日と短く、捕獲後 20 日目に期待寿命が 12 日よりも短くなった。

D. 考察

吸血によってウエストナイルウイルスを取り込んだ成虫が感染可能になるのに要する期間 (Extrinsic incubation period) は飼育条件 (特に気温) や蚊の種類、系統によって異なるが、早くても 12 日ほどである。つまり、感染した野鳥などから吸血した個体その後 12 日以上生存して初めて感染能力を獲得できる。感染可能になった個体は吸血するたびにウイルスを伝播していくので、長命であるほど多くの動物を新たに感染させることができる。仮に今回の調査で捕獲された個体が捕獲された日に感染している野鳥から吸血してウイルスを取り込んだとする。図 2 に示した期待寿命をみると捕獲後 12 日令 (感染可能になった日) の期待寿命はアカイエカが 27 日、チカイエカが 15 日で、アカイエカはチカイエカの約 1.8 倍長命であり、感染可能になってから以降の吸血回数はアカイエカの方が多いと考えられる。

図 2 に示したように、期待寿命が感染

可能になるのに要する期間（12日）よりも長いのはアカイエカの場合、捕獲後40日令までである。したがって仮にアカイエカが捕獲されなかったとして、採集を行った日から40日の間に感染した動物から吸血することができればウイルスを伝播することができる。これに対してチカイエカは捕獲後20日令の期待寿命が12日より短くなるので、採集を行った日から20日目以降に感染動物から吸血したとしても感染可能になるのに十分な期間生存できずウイルスを伝播できない。したがって成虫がウイルスを媒介できるようになる確率はアカイエカのほうがチカイエカよりも2倍高いといえる。

E. 結論

野外より捕獲されたアカイエカとチカイエカを室温27℃、相対湿度55%の飼育室で砂糖水を与えて飼育し、飼育条件下での寿命を調べた。2005年と2006年の

2シーズンの調査結果はほぼ同様で、アカイエカの平均寿命（36～37日）の方がチカイエカの平均寿命（17～22日）よりも有意に長かった。実験室内で得られた生存曲線に基づいて期待寿命を求め、両種の疾病媒介能力について比較考察を行った結果、アカイエカの媒介能力のほうがチカイエカよりも高いことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

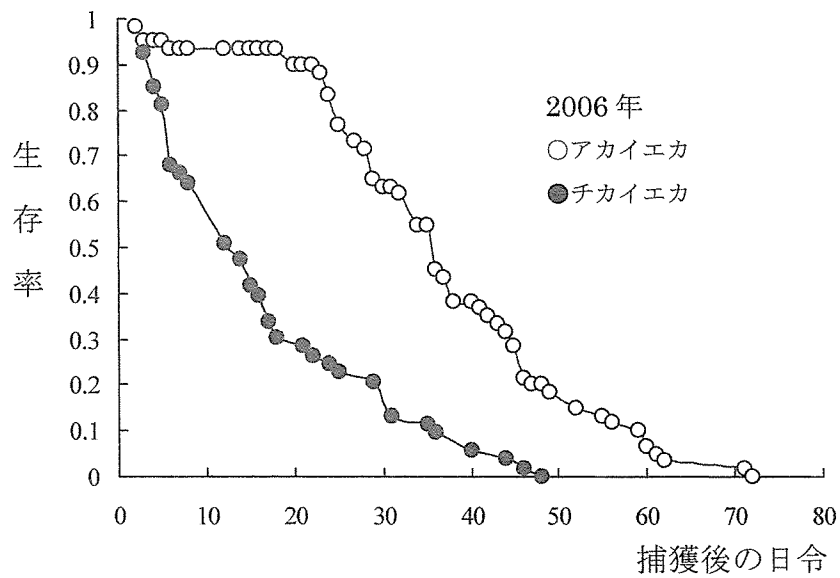
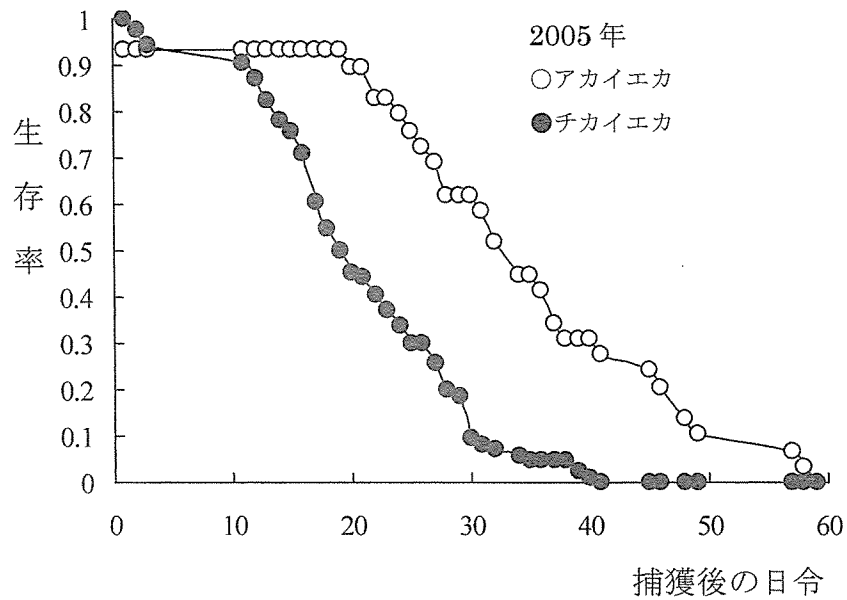


図 1. 2005 年と 2006 年に野外で捕獲され実験室内で飼育したアカイエカとチカイエカの生存曲線.

表 1. 2005 年, 2006 年に調査したアカイエカとチカイエカの平均寿命の比較

年 度	採集地	採集時期	種 類	個体数	平均寿命	SD
2005	落合	4 月	チカイエカ	36	16.7	7.0
		5 月	チカイエカ	38	22.1	8.1
	春日部+NIID	6-10 月	アカイエカ	41	36.3	16.5
2006	横浜	6, 10, 11 月	チカイエカ	53	16.8	12.7
	NIID	5-9 月	アカイエカ	60	36.9	15.5

同一年度のアカイエカとチカイエカの違いは統計的に有意であった (t-検定, $p < 0.0001$).

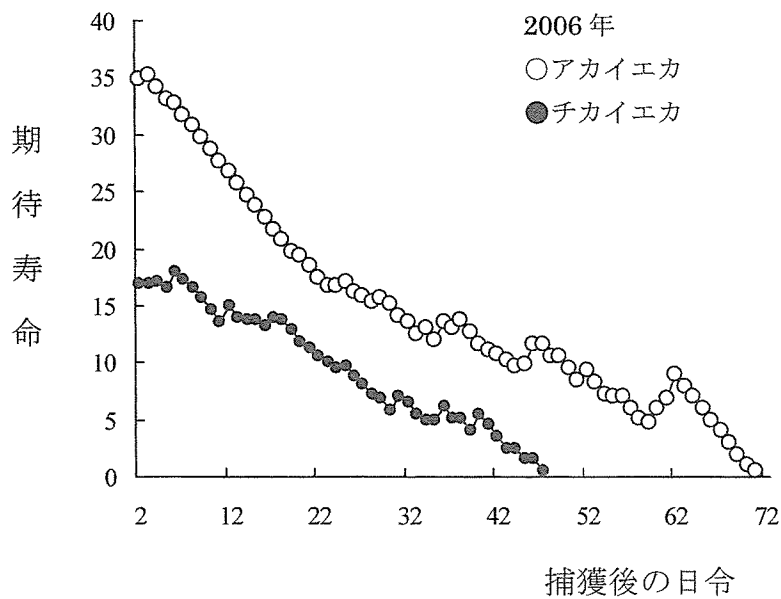


図 2. 2006 年の調査結果に基づいて計算した捕獲後の日令と期待寿命の関係

マルチプレックス PCR 法による日本産アカイエカ、チカイエカおよび ネッタイエカの簡易判別法

分担研究者；小林睦生（国立感染症研究所昆虫医科学部部長）

協力研究者；葛西真治、駒形修、金京純、津田良夫、沢辺京子、富田隆史（国立感染症研究所昆虫医科学部）

アカイエカ、チカイエカおよびネッタイエカは我が国における代表的なアカイエカ群種蚊である。これらの蚊はウエストナイル熱の媒介蚊と考えられているが、形態的な判別が難しいため、それぞれのベクター能がいまだ評価されていない。本研究では、マルチプレックス PCR の原理を応用して、これら 3 亜種の分子分類法を確立することを目指した。ACE オーソログス・アセチルコリンエステラーゼ (o-ACE) 上に見いだされた多型領域を利用してアカイエカおよびチカイエカに特異的なプライマー (ACEpall7、ACEpip2) をデザインし、3 亜種共通のプライマー 2 種 (F1457、B1246s) とともに PCR を行うことで、亜種分類を試みた。アニーリング温度やアニーリング時間を検討した結果、分子分類に最適な PCR 条件を見出すことに成功した。アカイエカ、チカイエカおよびネッタイエカのそれぞれ 3 コロニー、計 54 匹を用いて個々に PCR を行うことで、今回考案した手法が高い精度をもって亜種の判別を行うことが可能であることを確認した。さらに、今回用いたゲノム抽出法では、成虫の脚 1 本由来のテンプレートを用い、35 サイクルの PCR で十分量の DNA が増幅されること、また卵舟由来のゲノムを用いても判別可能であることが明らかとなった。今回確立したマルチプレックス PCR 法を用いることにより、今後は亜種ごとの吸血源動物の同定および季節消長、チカイエカの地上における生態解明などが進み、各亜種のウエストナイル媒介能の評価に結びつくものと期待される。

A. 目的

アカイエカ種群に属する蚊はフィラリア症やウエストナイル熱といった疾病の主要な媒介蚊である。日本においては、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*)、チカイエカ (*Cx. p. form molestus*)、ネッタイエカ (*Cx. quinquefasciatus*) が優占種となっている。アカイエカ、チカイエカが日本全土に広く分布するのに対し、ネッタイエカは熱帯、亜熱帯

を主たる分布域とし、日本では南西諸島や九州、四国の一部でのみ生息が確認されている。これら 3 亜種は生態学、生理学的にみて様々な異なる性質をもっている (表 1)。まず、アカイエカ、ネッタイエカ幼虫が地上域の流れのない小水系全般を生息地としているのに対し、チカイエカ幼虫は一部で井戸や雨水ますで確認されるものの、その多くがビル地下の排水・汚水槽、地下

水槽といった地下水域に認められる。チカイエカ成虫は冬でも比較的温暖な地下の閉鎖空間に生息することが多いため休眠性をもたず、狭所交尾が可能である。このような空間はまた吸血源に乏しいため雌は無吸血で1度目の産卵を行うことができる。チカイエカが好むビルの地下水槽は、通常いくつかの細かい水槽に仕切られているが、その間を地下水は自由に流れ、それとともにチカイエカ幼虫も移動することができる。したがって、このような水域では殺虫剤を均一に行き渡らせることが困難であるとともに、頻繁に浸出してくる地下水によって殺虫剤は薄められ効果を持続させにくいため、チカイエカの防除はアカイエカやネツタイエカに比べ遙かに困難であるとされる。このようにアカイエカ種群蚊が生理、生態学的に異なる特徴をもつ一方で、形態学的にこれら3亜種を区別することは容易ではない。雄は外部生殖器の形態が異なり、背側突起と腹側突起の相対的位置関係によりある程度区別できることが知られているが、緯度による変異が確認されており、地域によってはその数値が重複する場合がある。また、この方法は病原体を運ぶ肝心の雌には適用出来ない。アカイエカとチカイエカは複眼中的個眼数に違いが見いだされ、判別が可能であるという報告があるが、これも個体間変異が認められ、数字ではっきりと区別するのは難しい。さらに、チカイエカ成虫は近年、地上空間にも頻繁に出現し、人家に侵入していることが確認されている

が、野外で採集されるアカイエカ種群のうちの何割がチカイエカか、またその季節的消長など未知な部分が多い。

ウエストナイル熱は米国では1999年にニューヨーク州で初めて患者が確認され、感染地域は瞬く間に全米へと拡大した。2003年度には264名の死者を含む9862名が感染した。このことは、グローバル化が進んだ現代においてはもはや、先進国においても本ウイルスの上陸対象の例外とはならないことを示した。ウエストナイルウイルスは鳥によって保持され、蚊が中間宿主として感染に深く関与している。媒介蚊としての重要性は蚊自身のウイルス感受性に加え、蚊の吸血嗜好性の要因が大きい。つまり、鳥からヒトへウイルスを運搬する蚊が媒介昆虫としての役割を果たすためには、その蚊は鳥とヒトをともに吸血対象としている必要がある。したがって、日本に分布する蚊の媒介能力を評価する上で、これら蚊の吸血嗜好性の調査は必要不可欠となる。また、万が一ウエストナイルウイルスが日本に侵入した場合、防除が困難とされるチカイエカを防除対象とするか除外するかは、効率的な媒介蚊の防除戦略を立てる上でも重要な要素となりうる。しかしながら、これまで蚊の野外調査において、アカイエカ、チカイエカはほとんど区別されることなくアカイエカ種群として統計上まとめて整理されてきた。それは、これらアカイエカ種群蚊の分類がこれまで極めて困難であったことに起因する。それゆえ、生理、生態学的特徴がアカイエカやネ

ツタイイエカのそれらとは大きく異なるチカイエカの、吸血嗜好性を含めた媒介蚊としての能力はいまのところ未知数である。ウエストナイルウイルスが侵入する前に、チカイエカの媒介蚊としての重要性を適正に評価することが望まれている。

私たちはこれまでに以上の理由から、アカイエカ種群蚊を分類する目的でショウジョウバエの *Ace* オーソログス・アセチルコリンエステラーゼ遺伝子を解析し、その中で亜種特異的な変異領域の存在を見だし、これを用いてプライマーをデザインすることで、PCR 反応によって亜種を分類する方法を確立した。この方法は高い亜種判別能を示した一方で、一個体を解析するのに3種類の PCR 反応液を調整する必要があったため、時間と経費の両面で負担のかかる方法であり、改良の余地があると考察された。そこで本研究では、これら3反応を1本の PCR 溶液中で同時に行うマルチプレックス PCR 法の技術を応用した新しい解析法を検討し、その結果、より安価で簡便にアカイエカ種群蚊を判別する方法を確立した。

B. 方法

アカイエカ種群蚊

アカイエカは林試系(東京都品川産)、チカイエカは新宿系、ネツタイイエカは JPal-per 系を用いた。これらは野外で採集されて少なくとも2年間(20世代以上)室内で累代飼育された系統である。JPal-per 系統は1980年にサウジアラビアで採集されたコロニーをピレ

スロイド系殺虫剤であるペルメトリンで20世代淘汰して確立した抵抗性系統である。PCR 条件の検討実験には、すべてこれら3系統を用いた。確立した方法を複数個体を対象に検証する実験では、アカイエカ(林試、藤沢、長崎系)、チカイエカ(新宿、横浜、福岡系)、ネツタイイエカ(JPal-per、小笠原、沖縄系)を用いた。

ゲノム抽出

カからのゲノム抽出は REDEExtract-N-Amp Tissue PCR kit (SIGMA) を用いて行った。また、抽出方法は原則的に添付のプロトコールに従ったが、抽出スケールはプロトコールに指示された量の半量で行った。すなわち成虫1個体を Extraction Solution (50 μ l) と Tissue Preparation Solution (12.5 μ l) の混合液中で摩砕し、室温に10分間放置後 95^l で3分間インキュベートした後、Neutralization Solution B (50 μ l) を加え、激しく攪拌した。ゲノム溶液は調製後、-20 $^{\circ}$ C で保存した。試料の摩砕はペレットペッスルホモジナイザー(1.5 ml 用、KONTES) と専用電動モーター(KONTES) を組み合わせて、約30秒間で行った。ゲノム抽出スケール縮小化の検討実験では、等倍、半量に加え、プロトコール指定の1/3、1/4倍スケールでも抽出可能か検討した。

PCR 反応

PCR 反応液の調製法は Table1 に示した。反応条件はそれぞれの Figure の注釈に示した。サイクル数は基本的に全て30サイクルで行った(少量サンプル

の解析条件検討で変化させた)。PCR条件の検討実験には Bio Rad 社製サーマルサイクラー (MyCycler thermal cycler) を用いて行った。あらかじめ行った予備試験では、DNA の増幅効率にアニーリング温度、アニーリング時間、変性時間が影響することがわかったので、さらに厳密にこれら条件の最適化をはかった。サイクル反応前の変性は全て 95^L、5 分間行った。最適アニーリング温度の検討実験では、変性を 95^C、30 秒に、伸長反応を 72^L、1 分間に、アニーリング時間を 1 分間に固定し、アニーリング温度を 50^C から 5^C 刻みで 65^C まで 4 段階で行った。最適アニーリング時間の検討実験では、変性を 95^C、30 秒間に、伸長時間を 72^C、1 分間に、アニーリング温度を 63^C に固定し、アニーリング時間を 30 秒間から 15 秒刻みで 75 秒までの 4 段階で行った。最適変性時間の検討では、変性温度を 95^C に、アニーリングを 63^C、1 分間に、伸長反応を 72^C、1 分間に固定し、変性時間を 10 秒間から 10 秒刻みで 30 秒まで 3 段階で行った。サイクル反応の後、72^C で 5 分間インキュベートした後、電気泳動による解析まで 4^C で保存した。鋳型として用いるゲノム DNA はサンプルあたり 1 μ l を用いた。脚由来のゲノムを使った判別では、REDExtract-N-Amp Tissue PCR kit のプロトコール指定の半量を用いて雌成虫の脚 1 本または 6 本よりゲノム DNA を抽出し、うち 1 μ l を鋳型として用いた。95^C 5 分間反応後、95^C 30 秒、63^C 1 分、72^C 1 分を 30 サイク

ルから 5 サイクル刻みで 50 サイクルまで 5 段階で行った。最後に 72^C 5 分間インキュベートし、電気泳動による解析まで 4^C で保存した。各反応後のサンプルは 2%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した後、UV トランスイルミネーター上で観察、もしくはデジタルカメラで撮影し、記録した。

C. 結果

昨年度までの厚生科学研究で、*ACE* 同祖性アセチルコリンエステラーゼ遺伝子(*o-ACE*)上の約 700 bp 中には唯一亜種の特徴を表す多型領域が 1 カ所存在することが判明していた。だが、この領域から 2 つの種特異的プライマー (ともに Forward として) をデザインしたこれまでの手法では、亜種を分類するために 3 種類の PCR 反応液を調製する必要があり、時間と経費の面で効率的ではなかった。本研究では、この領域からチカイエカ特異的な Forward プライマー (*ACEpip2*) を、アカイエカ特異的なプライマー (*ACEpall7*) を reverse プライマーとしてデザインし、3 亜種に共通なプライマー (*F1457*、*B1246s*) とともに PCR を行うことで亜種判別が可能ではないかと考えた (図 1)。PCR の原理から考えて、アカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカのすべての亜種由来のゲノムを鋳型とした場合、ともに *F1457* と *B1246s* がもたらす 730 bp の PCR バンドが増幅される。アカイエカの場合はそれに加えて *F1457* と *ACEpall7* がもたらす 280 bp

のバンドが、チカイエカの場合は ACEpip2 と B1246s がもたらす 500 bp のバンドが増幅される。ネッタイエカでは原理上後者のどちらも増幅されることはない（図 1）。しかしながら、実際にマルチプレックス PCR を行ってみると、条件によってバンドの現れ方が不安定になり、現れてはいけないうバンドが非特異的に出現することが判明した。特にアニーリング温度と時間が正確な分子判定を行う上で重要であることが予備試験により判明した。したがって、まずはアニーリング時間を 60 秒に固定したうえでアニーリング温度を 50、55、60、63、65℃と振って PCR を行った（図 2A）。50℃ではチカイエカ、ネッタイエカを鋳型とした場合にアカイエカでのみ出現するはずの 280 bp のバンドが非特異的に増幅された。また、55℃においてもネッタイエカでわずかに 280 bp の DNA が増幅された（図 2A）。したがって、プライマーの特異性を上げるためになるべく高いアニーリング温度を設定する必要があると考えられたが、65℃に設定すると今度は全体的に DNA の増幅効率が低下し、バンドが薄くなる傾向が認められた。したがって、図 2A の結果から判断して最適アニーリング温度を 63℃と設定した。さらに、最適アニーリング時間を検討するために、アニーリング温度を 63℃に固定した上で、時間を 30 秒から 15 秒刻みで 75 秒まで行った（図 2B）。45 秒から 75 秒までの間では遺伝子増幅の傾向に大きな違いは認められなかったが、30 秒にした

場合でのみ増幅バンドが薄く出る傾向が認められた。この傾向は予備試験でも経験した現象であったため、アニーリング時間が短い場合に起きる現象ではないかと考察される。これらの結果から、アニーリング時間を 60 秒に設定することとした。この条件で PCR を行うとアカイエカとチカイエカの雑種個体由来のゲノムでも 500 bp と 280 bp のバンドがほぼ同じ割合で増幅されることもわかった（図 2）。

アニーリングを 63℃、60 秒と条件決定した上で、今回考案した分類法が野外の蚊で普遍的に応用可能かどうかを確認するために、3 亜種それぞれ 3 コロニー、雄雌 3 匹ずつ、計 54 匹からゲノムを抽出し、個体別にマルチプレックス PCR を試みた（図 3）。その結果、アカイエカでは 730 bp と 280 bp の、チカイエカでは 730 bp と 500 bp の、ネッタイエカでは 730 bp のバンドのみが増幅され、調べた限りにおいては採集地によらず、亜種判別が可能であることが確認された。また、雌雄間で増幅パターンに違いは認められなかった。

実際に、亜種判別法を吸血源の同定やウイルス検出に応用する場合、蚊の一部からのみゲノムを抽出し、それを鋳型として亜種判別ができることが理想的である。そこで、成虫の脚 1 本および 6 本から抽出したゲノムを鋳型として PCR を行い、判別可能かどうかを確認した（図 4）。30 サイクルでは DNA の増幅が十分ではなく、バンドが薄く検出されたが、35 サイクル以上反応さ

せた場合、十分に亜種判別が可能なほど DNA は増幅されることが確認された。この結果は脚 1 本でも 6 本でも大きな違いは認められず、アカイエカとチカイエカの間でも同様な結果が得られた (図 4)。実際には、試料の鮮度がゲノム抽出効率および PCR の結果に影響する可能性があるが、少なくとも新鮮な個体を用いた場合は脚 1 本を用いても亜種判別が可能であることが確認された。

D. 考察

本研究では、日本に分布する主要なアカイエカ種群蚊であるアカイエカ、チカイエカおよびネッタイエカを分子生物学的に判別する方法の確立を試み、4 種のプライマーを 1 反応液中で用いるマルチプレックス PCR を応用することで、高い精度で亜種判別できることを確認した。

今回考案された亜種判別法は、3 亜種間での判別のみならず、アカイエカとチカイエカの雑種も判別することができることを確認している。昨年度までの厚生科学研究 (小林研究班) において、我が国のチカイエカは殺虫剤に高い頻度でピレスロイド型殺虫剤に抵抗性を発達させていることが判明した。ビル地下など閉鎖的空間に生息し、殺虫剤による防除対象となりやすいチカイエカが抵抗性を発達させている一方で、雨水ますのように殺虫剤の処理がなされにくい水系に生息するアカイエカは比較的殺虫剤感受性が高い。仮にアカイエカとチカイエカが自然界で容

易に交雑し、抵抗性に関与する遺伝子がチカイエカからアカイエカへ受け渡されるような現象が起きているとすれば、我が国にウエストナイル熱が上陸した場合、それらの抵抗性遺伝子は容易に殺虫剤の使用とともに広がり、殺虫剤は効力を失うことが予想される。室内実験では、アカイエカとチカイエカは交雑可能であるという報告例があるが、自然界でそれが起こっているかどうかは全くわかっていない。今回確立された亜種判別法は、アカイエカとチカイエカの自然界における交雑の頻度調査に生かされるものと考察される。

本研究では、シグマ社の REDEExtract-N-Amp-tissue PCR kit を用いてゲノム DNA の抽出を行った。このキットは、蚊を磨砕溶液でホモジナイズしたのち、短時間加熱し、中和溶液を加えて攪拌するだけで PCR に用いることができる鑄型が準備できる簡便な方法である。蚊の亜種判別のように数を多くこなす必要がある実験に向いており、また使用する溶液も少量で済む。データとしては示していないが、実際にはキットの推奨容量の 1/4 量でゲノムを抽出しても亜種判別は問題なく行えることを確認している。実売価格で算出すると、ゲノム抽出が 1 個体当たり 84 円、DNA ポリメラーゼが約 36 円であり、単価もかなり低く抑えられることがわかった。成虫の脚 1 本からでも分類が可能であることは、今後残りの組織を利用して吸血源動物を同定し、ウイルス検出を行う上でも都合がよい。すでに昨年度までの厚生科

学研究で考案した亜種判別法を用いて吸血源動物を同定した結果では、チカイエカはアカイエカ同様にヒトもトリも同じように吸血源として利用していることが明らかになりつつある（参考図 5）。つまり、チカイエカはアカイエカ同様にウエストナイル熱の重要なベクターとなるのではないかという証拠が得られつつある。今後は、さらに簡便化した今回の判別法を用いて、より迅速に亜種判別が行えるとともに、アカイエカ種群蚊のベクター能の評価への貢献が期待される。

E. 結語

今回の研究では、1つのPCR反応によってアカイエカ、チカイエカ、およびネッタイエカの種判別を行う手法を確立した。簡便で安価にゲノムを抽出する手法と組み合わせ、容易にかつ短時間のうちに亜種判別することが可能になった。今後はこの手法を用いることにより、アカイエカ種群、特に未

知な部分が多いチカイエカの生態解明、およびウエストナイル熱の媒介能の評価等に応用されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Shinji Kasai, Osamu Komagata, Yoshio Tsuda, Takashi Tomita and Mutsuo Kobayashi (2007) A simplified molecular identification of the vectors of West Nile fever, *Culex pipiens* complex collected in Japan. 41st Joint Conference on Parasitic Diseases, February 3, 2007, The University of Tokyo, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

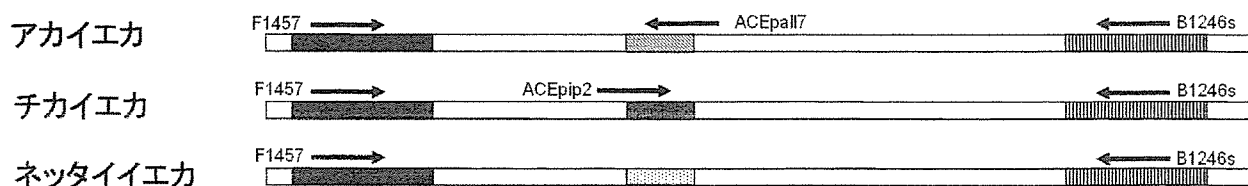
表1 アカイエカとチカイエカの生理学的な違い

アカイエカ (<i>Culex pipiens pallens</i>)	チカイエカ (<i>Culex pipiens form molestus</i>)
幼虫は地上の水域で発生	主に主に地下の水域で発生
産卵に吸血が不可欠	1回目は無吸血で産卵
冬季成虫休眠	休眠せず通年発生
広所交尾性	狭所交尾性

表2 亜種分類に用いたプライマー配列

名称	配列 (5' → 3')
F1457	GAGGAGATGTGGAATCCCAA
B1246s	TGGAGCCTCCTCTTCACGG
ACEpall7	CTCAGTTAGTTCTCATATTCATGCG
ACEpip2	GTGGAAACGCATGATACCAG

図1 共通プライマーと種特異的プライマー4種の混合プライマーを用いたマルチプレックスPCR



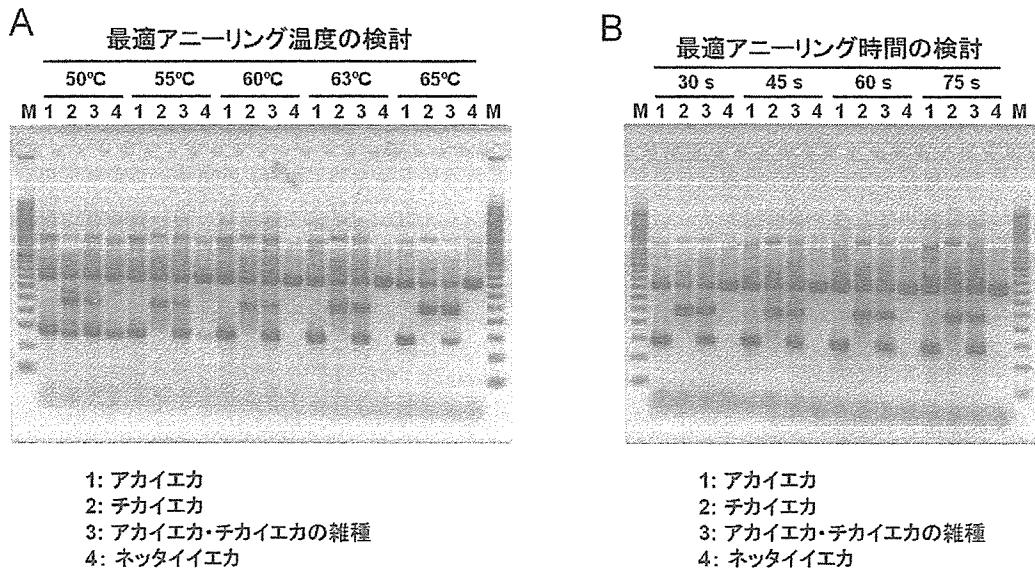


図2 マルチプレックスPCR条件の検討

A: 最適アニーリング温度の検討。アニーリング温度を50、55、60、63、65°Cに設定して行った。アニーリング時間は60秒に固定して行った。

B: 最適アニーリング時間の検討。アニーリング温度を63°Cに固定し、アニーリング時間を30、45、60、75秒に変えて行った。

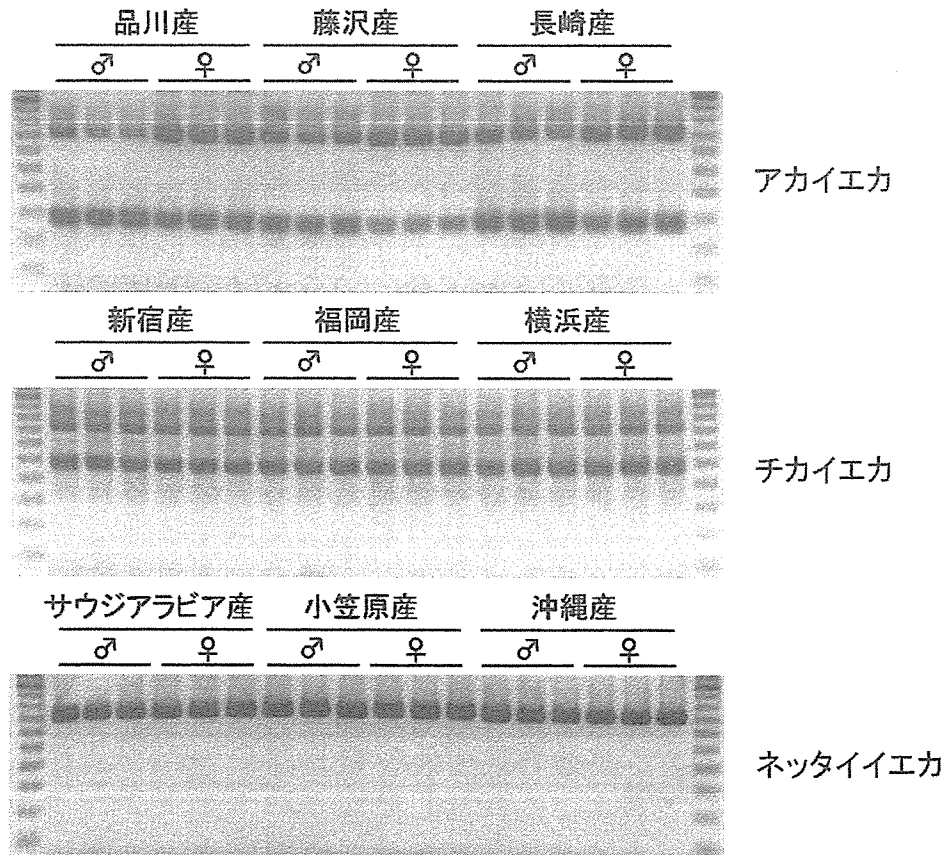


図3 各地域より採集したコロニーを用いた検出精度の検討試験

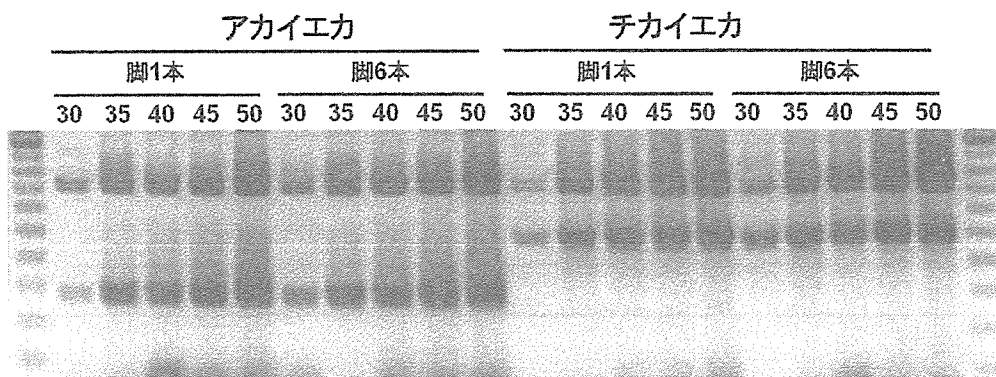
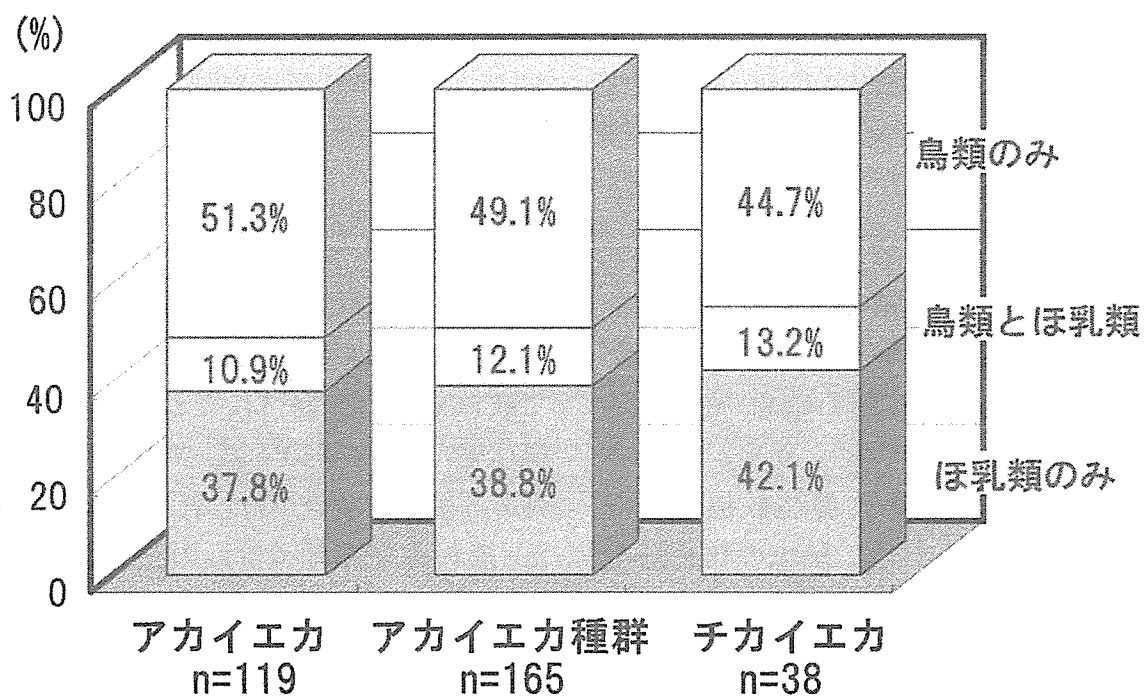


図4 成虫の脚由来のゲノムを鋳型として行ったPCRの結果。PCRは30サイクルから5サイクル刻みで50サイクルまで行った。



(参考) 図5 アカイエカ種群蚊の吸血嗜好性

富山県における蚊の発生調査とウイルス保有調査

分担研究者 滝澤剛則(富山県衛生研究所)

協力研究者 小原真弓 渡辺護 長谷川澄代 倉田毅(富山県衛生研究所)

研究要旨

蚊媒介性感染症対策として、現在の状態を把握するため、蚊の発生状況とウイルス保有状況、幼虫の発生源を調査した。蚊の成虫は、農村住宅を除く民家とカラスのねぐら近くではヒスジシマカとアカイエカが多数捕集され、農村住宅と畜舎付近ではコガタアカイエカが捕集された。このように調査定点により種構成と発生数に違いがみられた。蚊からウエストナイルウイルス・日本脳炎ウイルスは分離されなかった。幼虫の発生源は、3年間の調査において184種類1,053個の溜水環境を調べ、有水率76.5%、幼虫生息率26.9%であった。蚊の種類としては、ヒスジシマカの幼虫が多く、多くの場所に分布し、しかも多数生息していることが示唆された。

A. 研究目的

県内における蚊の発生状況を把握するとともに、県内の蚊が現時点で、ウエストナイル熱や日本脳炎の原因ウイルスを保有しているかを調べることで、蚊媒介性感染症の監視体制の確立・整備を図ることを目的とする。また、幼虫が発生する溜水環境の種類と、発生蚊種の分布を明らかにすることで、幼虫の発生源を事前に把握しておき、駆除が必要になった際に迅速な対策がとれるよう体制を整備することを目的とする。

B. 研究方法

1. 蚊の成虫調査

蚊の成虫調査は、主に CDC 型の乾電

池駆動豆電球トラップにドライアイスを約1kg 添加することで行った。調査地点は一般民家6軒、カラスのねぐら近く3箇所、富山空港、農村地域の厩舎・牛舎で、ほぼ6月から10月までの午後から翌朝まで蚊を捕集した(表1)。ただし、都市周縁住宅は7~8月の4週、農村住宅は9月の5週間で調査が行われなかった。また、農村住宅団地では蚊の発生を防ぐ「防蚊対策」実験が行われた(詳細は省略)。

2. 蚊のウイルス保有調査

捕集蚊を地点・捕集日・種類・雌雄別に分け、最大50個体までを1プールとして細胞維持培地で磨砕し、遠心上清をヒスジシマカ由来のC6/36細胞に接種し

て培養した。同時にアフリカミドリザル由来の Vero9013 細胞にも接種し、いずれも 7±1 日間観察して細胞変性の有無を確認後、培養上清を新しい細胞に接種して培養と観察を繰り返した。さらに C6/36 細胞に継代して観察を続けた。細胞変性が現れた検体の培養上清からウイルス RNA の抽出を行い、フラビウイルス NS3 領域を対象としたプライマーセットを用いて RT-PCR を実施した。

3. 蚊の幼虫調査

厚生センターおよび富山市保健所において、蚊が発生する可能性がある様々な溜水環境を調べた。さらに、溜水環境に幼虫が生息していた場合には採集し、幼虫の分類計数を行った。

C. 研究結果

1. 蚊の成虫調査

表 2 に、捕集成績をまとめて示した。成虫については、都市部住宅ではヒトスジシマカが多数捕集され、都市周縁住宅ではヒトスジシマカがアカイエカよりもわずかに多く捕集された。都市部団地住宅と海岸地域住宅ではアカイエカがヒトスジシマカよりも多く捕集され、農村住宅団地ではコガタアカイエカが最も多数捕集された。

カラスのねぐら近くの高岡古城公園では下トラップではアカイエカよりもヒトスジシマカが多く捕集されたが、上トラップでは顕著にアカイエカが多数を占めた。富山城址公園の 1m トラップではアカイエカ 31 個体、ヒトスジシマカ 4 個体などが捕集されたが、高さ 20m、12m のトラップでアカイエカのみが捕集された。衛研隣の

杉林では 1m トラップでヒトスジシマカが最も多く、6.5m トラップではアカイエカが最も多数捕集された。

富山空港ではアカイエカ 15 個体とコガタアカイエカ 5 個体が捕集された。厩舎では圧倒的にコガタアカイエカが多数捕集され、ヤマトヤブカも少数捕集された。牛舎においても、コガタアカイエカが最も多く捕集された。

2. 蚊のウイルス保有調査

成虫調査で得られた捕集蚊に、日本脳炎流行予測調査の定点である豚舎 3 箇所、で捕集した未吸血蚊を加えた計 4,347 個体(536 プール)の蚊(表 3-1、3-2)についてウイルス分離を行った。その結果、PCR で陽性となった検体はなく、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスともに分離されなかった。

3. 蚊の幼虫調査

幼虫調査は、平成 16～18 年の 3 年間の調査において一般民家 50 箇所、公共施設 28 箇所、神社 25 箇所、寺・墓地 11 箇所、大規模公園 14 箇所、小規模公園 5 箇所、その他畑地や道路など 22 箇所の合計 155 箇所、で幼虫の生息確認が行われた(表 4)。184 種類 1,053 個の溜水環境が調べられ、有水率 76.5%(806 個/1053 個)、幼虫生息率 26.9%(217 個/806 個)であった(表 5)。この幼虫生息率は調査した箇所(場所)で異なり、一般民家(33.8%)や寺・墓地(34.5%)が高く、逆に最も低かったのは神社の 11.2%であった。

今回の調査で 8 種類の蚊の幼虫が採集され、ウエストナイルウイルスの媒介に関与する重要なアカイエカは県下の一

般民家、公共施設、大規模公園、その他の箇所でも多数採集された(表 6)。同じくウエストナイルウイルスの媒介に関与すると予想されるヒトスジシマカは大規模公園で多数を占め、小規模公園を除いた箇所でも広くみられた。ヤマトヤブカは全ての調査箇所でも確認された。全体の幼虫数に占める種の割合はヒトスジシマカが 43.1%、アカイエカ 34.6%、ヤマトヤブカ 18.6%であり、生息溜水環境に占める割合はヒトスジシマカ 50.2%、ヤマトヤブカ 35.0%、アカイエカ 27.2%であった。

D. 考察

蚊の成虫調査では、アカイエカ・ヒトスジシマカ・コガタアカイエカの発生が大部分を占めたが、定点によりその割合が異なっていた。民家やカラスのねぐら近くでは、アカイエカとヒトスジシマカが多く捕獲され、農村や畜舎ではコガタアカイエカが多くを占めた。また、カラスのねぐら近くの高所のトラップでは、高岡古城公園でハマダライエカが 15 個体みられた以外にはアカイエカが多数を占め、他の種類はほとんどみられなかった。特に、富山城址公園の 12m、20m トラップではアカイエカのみであり、このことは、アカイエカは少なくとも樹木の上のカラスのねぐら付近である高さ 20m までは飛翔していることを示唆している。

今回、調査した蚊 536 プール(4,347 個体)からはウエストナイルウイルスは検出されなかったため、これまでのところ富山県内にウエストナイルウイルスの侵入はないと考えられる。一方、日本脳炎ウイルスも分離されなかったが、日本脳炎

流行予測事業として調査している、畜舎におけるコガタアカイエカ捕集数の平均は、2003 年～2005 年が 20,000～30,000 個体であったのに対し、2006 年は約 7,000 個体と減少していた。18 年度は、日本脳炎ウイルスの主な媒介者であるコガタアカイエカの発生が少なかったため、ウイルスがあまり活発ではなく、ウイルスが検出されなかったものと考えられる。なお、日本脳炎ウイルスは 17 年度の調査で蚊・豚から確認されている。富山県の結果を含め、複数の県や国立感染症研究所による調査において、蚊からウエストナイルウイルスは検出されていないことから、国内にはまだ侵入していないことが示唆される。しかしながら平成 17 年度、1 例のウエストナイル熱輸入例があったことに加え、米国の患者は 16 年度 2,470 名、17 年度 3,000 名、18 年度 4,256 名(2007 年 3 月 6 日現在)と増加しており、予断を許さない状況である。

幼虫調査では、ウエストナイルウイルスの媒介に関与するアカイエカが県下の一般民家、公共施設、大規模公園、その他の箇所でも多数採集された。さらに、ウエストナイルウイルスの感受性が高いヒトスジシマカは大規模公園で多数を占めたが、小規模公園を除いた箇所でも広くみられた。同様に感受性が高いヤマトヤブカは、生息数は少ないものの全ての調査箇所でも確認された。また、アカイエカとヒトスジシマカ、ヒトスジシマカとヤマトヤブカの混棲が多くみられた。幼虫の採集数・分布箇所の結果から、富山県ではヒトスジシマカが多くの場所に分布し、しかも多数生息していることが示唆される。地

点別にみると、一般民家と寺・墓地の幼虫生息率が最も高く、特に一般民家は有水率も 81.8%と高かったことから、防除の際には重要な場所になると考えられる。

E. 結論

蚊媒介性感染症対策として、現在の状態を把握するため、蚊の発生状況とウイルス保有状況、幼虫の発生源を調査した。蚊の成虫は、農村住宅を除く民家とカラスのねぐら近くではヒトスジシマカとアカイエカが多数捕集され、農村住宅と畜舎付近ではコガタアカイエカが多く捕集された。高所のトラップでは、主にアカイエカが捕集され、アカイエカは少なくとも樹木の上のカラスのねぐら付近である高さ 20m までは飛翔していることが示唆された。調査した蚊 536 プール(4,347 個体)からはウエストナイルウイルスは検出されなかったため、これまでのところ富山県内にウエストナイルウイルスの侵入はないと考えられる。幼虫の発生源は、平成 16 年から 18 年の 3 年間の調査において 85 種類 1,053 個の溜水環境を調べ、有水率 76.5%、幼虫生息率 26.9%であった。蚊の種類としては、ウエストナイルウイルスの媒介に関与するアカイエカが県下の一般民家、公共施設、大規模公園、その他の箇所でも多数採集された。ウエストナイルウイルスの感受性が高いヒトスジシマカの幼虫は多くの場所に分布し、しかも多数生息していることが示唆された。地点別には、一般民家の幼虫生息率・有水率が高かった。

F. 研究危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

小原真弓、長谷川澄代、滝澤剛則、堀元栄詞、岩井雅恵
富山県内の蚊媒介性ウイルス調査
(2005 年)
第 54 回日本ウイルス学会学術集会
(名古屋市)11 月

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I. 謝辞

蚊の採集にご協力くださったボランティアの方々、施設関係者、検疫所、厚生センターの関係各位、また幼虫調査を実施してくださった厚生センター、富山市保健所の皆様に厚く御礼申し上げます。ウイルス分離法をご教授くださった国立感染症研究所ウイルス第一部、昆虫医科学部の方々に心より感謝いたします。