

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

本邦生息蚊から発見された新規フラビウイルスの遺伝子構造解析

分担研究者 澤邊 京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長)
研究協力者 星野 啓太 (同・昆虫医科学部・流動研究員)
伊澤 晴彦 (同・昆虫医科学部・研究員)
津田 良夫 (同・昆虫医科学部・室長)
佐々木年則 (同・昆虫医科学部・主任研究官)
小滝 徹 (同・ウイルス第一部・協力研究員)
高崎 智彦 (同・ウイルス第一部・室長)

研究要旨：本邦野外捕集蚊からフラビウイルスの検出および分離を実施した結果、アカイエカをはじめとするイエカ属蚊類から新規フラビウイルスを見出し、*Culex flavivirus* (CXFV) と命名した。東京都新宿区産アカイエカから分離された CXFV の1株について、形態学的、血清学的手法による性状解析を行い、さらに CXFV ゲノムの全ヌクレオチド配列決定を試みた。これらの結果から CXFV はフラビウイルスの起源的なタイプとされる昆虫フラビウイルスに属するが、多くの新たな特徴を有する新規フラビウイルスであることが明らかとなった。

A. 研究目的

フラビウイルスは日本脳炎ウイルス、ウェストナイルウイルスなどのヒトに対する病原性を有するウイルスを多く含んでおり、そのほとんどは節足動物により媒介されるが、とくに蚊とのかかわりが深いことが知られている。本邦生息蚊のうちイエカ属蚊類は、日本脳炎ウイルスの媒介蚊として認識されているだけでなく、ウェストナイルウイルスなどの媒介能を有するとされる種類も含まれるため、フラビウイルスの媒介蚊類として重要視されている。今回本邦イエカ属蚊類から発見された新規フラビウイルスは、フラビウイルスと蚊類との進化的な関係および生態学的なかかわりについての重要な情報をもたらすものと予想された。そこで本ウイルスに

関する様々な性状解析を実施するとともに、多くの重要情報を包含するゲノムの遺伝子構造解析を重点的に行いその本質を捉えることを目的とした。

B. 研究方法

1. 顕微鏡観察

細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)は、ウイルス接種細胞を接種後7日まで位相差顕微鏡で観察することで行った。ウイルス粒子の電子顕微鏡観察は、Yano et al. (1996)にしたがって行った。すなわち、感染細胞を 5% glutaraldehyde および 1% osmic acid で固定脱水後、Epon 812 樹脂で包埋し、これの切片を uranyl acetate 染色し電子顕微鏡観察を行っ

た。

2. ウイルス粒子精製および構成タンパクの解析

ウイルス粒子精製はウイルスストック(4回継代培養上清)を原液として開始した。本ストックは、7.5% polyethylene glycol、0.5M NaClの条件で混合し、氷上で2時間置いた後、遠心(10,000 g, 30min., 4°C)し、得られた沈殿を新たに TSE buffer (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH7.4)で懸濁した。この懸濁液を 30% glycerol - 45% potassium tartrate、続いて 5 - 40% sucrose の密度勾配遠心(25,000 - 30,000 g, 2 - 2.5 hrs., 4°C)を行い、得られたウイルスバンド画分は回収後透析により TSE buffer に置き換えウイルス精製粒子とした。本精製粒子は、ウイルス構成タンパクの解析および抗体作成の抗原として使用した。ウイルス構成タンパクの解析には、10-20% gradient gel (e-PAGEL gel, ATTO Corp., Tokyo, Japan) および Immunoblot Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)を使用した。

3. ヌクレオチド配列決定および系統解析

ウイルス RNA は、ウイルスストック(3回継代培養上清)から RNeasy Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA)を用いて抽出した。E、NS3 および NS5 のそれぞれの領域にプライマーを設計し、TaKaRa RNA LA PCR KIT ver. 1.1 (TAKARA BIO、Shiga, Japan)を用いて Long-PCR によるウイルスゲノムの大部分を包含する断片の増幅を行った。反応後産物は精製しサイクルシーケンシング法でヌクレオチド配列決定(ABI PRISM310, 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用)を行った。さらに得られた配列情報から E および NS5 の

両領域に特異的プライマーを設計し、GeneRacer Kit (Invitrogen Corp.) を用いて RACE 法によるウイルスゲノムの 5'および 3'末端部の増幅を試み、上記と同様にヌクレオチド配列決定を行った。使用プライマーおよび配列決定の概念を図1に示した。決定された配列情報は GENETYX ソフトウェア (Genetyx Corp., Tokyo, Japan) および Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)プログラム (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)を利用して解析した。ヌクレオチドあるいはアミノ酸配列は、各解析領域について、Clustal W による alignment を行い、MEGA program ver. 3.1 (Kumar et al., 2004)を用いて、neighbor-joining 法による系統学的な推定を試みた。

C. 結果

CXFV は蚊由来細胞系に接種した場合にのみ RT-PCR により検出が可能であり、CPE は弱い傾向にあり、出現しない場合も見られた(図2)。電子顕微鏡観察では、小胞体内にフラビウイルスの特徴を有する粒子が確認された(図3)。CXFV 抗血清によるウェスタンブロット解析では、CXFV 構成タンパクである E (60kDa)、prM (20kDa)、C (15kDa)そして M (7kDa)と思われるバンドが検出された(図4)。決定された CXFV ゲノムは 10,834 ヌクレオチドで構成され、3,362 アミノ酸から成る1つのポリペプチドをコードした ORF を含んでおり、さらに 5'および 3'末端部にそれぞれ 91、657 ヌクレオチドの非翻訳領域を有するものであった(図1)。またアミノ酸配列情報から CXFV を構成する各種タンパクを生成するのに必要である開裂部位が予測され、そのほとんどがそれぞれの開裂条件に適合するものであり、3つの構成タンパクおよび7つの非構成タンパクの生

じうることが確認できた(表1)。CXFVを構成する10種類の各タンパクについて、昆虫フラビウイルス(Cell fusing agent:CFA、Kamiti river virus :KRV)、本邦における既分離フラビウイルス(Japanese encephalitis virus:JEV、Yokose virus:YOKV、Tick borne encephalitis virus:TBEV、Apoi virus:APOIV)および Dengue type 2 virus (DEN2V)との相同性の比較を行った結果、prM、EについてはCFAに最も相同性が高く、NS3、NS5についてはCFAおよびKRVとの相同性が高かった(表2)。これらのウイルス間における系統関係について、構成タンパクEおよび非構成タンパクNS5について Tamana bat virus (TABV)および Hepatitis C virus (HCV)を加えて解析したところ、CXFVはいずれの場合もCFA、KRVと同じcladeに配置され、Eに関してはCFAとともにフラビウイルスの尤も外側に配置されることが推定された(図5)。さらにこれまでに分離されたCXFV8株について、E領域のヌクレオチド配列に基づきその系統関係を推定したところ、すべてCFAあるいはKRVとは離れたひとつのcladeに包含されることが確認された(図6)。

D. 考察

本邦イエカ属蚊類から発見された新規フラビウイルスCXFVは、今回そのゲノムの全ヌクレオチド配列情報が決定された結果、遺伝子構造レベルにおいてもまたフラビウイルスの基本的特徴を有することが明らかとなった。したがってCXFVは、その遺伝子構造の特徴、さらに構成タンパクのプロフィール、電子顕微鏡観察などから、既知のフラビウイルスに普遍的な複製様式等を保持することが予測された。しかしながら、CXFVはフラビウイルス属ウイルスの中にあつて未分類とされていたCFAと系統

学的に近縁であり、さらに分離状況あるいは増殖様式における蚊への特異性が高いという特徴においてもCFAとの共通点を多く有するものであった。また近年アフリカから記載されたKRVもまた、採集された幼虫から羽化させた *Aedes macintoshi* オス成虫から分離されており、多くの点でCXFV、CFAとの類似性を有することが認められた。ゆえにCXFVはフラビウイルスのなかで明らかにCFA、KRVと同じ分類群に包含されるものであり、近年提唱されているように昆虫フラビウイルスという新たなcladeを形成するものと考えられた。ところで、CXFVは昆虫フラビウイルスにおいて、初めてイエカ属蚊類から発見されたものであるが、9分離株はその由来種、採集地点に関わらず1つのcladeを形成したことから、CXFVはイエカ属蚊類の特異性が高いことが推察された。イエカ属蚊類は病原性を有する諸フラビウイルス(日本脳炎ウイルス、ウェストナイルウイルスなど)を媒介可能であるとされるが、CXFVと他種フラビウイルスとの相互関係は現在のところほとんど不明である。したがって今後、CXFVを詳細に解析することで、その伝播様式あるいは生活環などのフラビウイルスとイエカ属蚊類とのかかわりについてより明らかになるものと考えられた。さらに、今回のCXFVの分子レベルにおける性状解析は、蚊からのフラビウイルスの検出におけるプライマー設計などの技術的改変に対しての有益な情報となりうるものと考えられた。

E. 結論

1. 本邦イエカ属蚊類から新規フラビウイルスを発見し、*Culex flavivirus* (CXFV)と命名した。
2. CXFVはフラビウイルスの遺伝子構造的

徴を有することが明らかとなった。

3. CXFV は昆虫フラビウイルスの clade に配置され、さらにイエカ属蚊類に特異性の高い新たなグループであることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hoshino, K., Isawa, H., Tsuda, Y., Yano, K., Sasaki, T., Yuda, M., Takasaki, T., Kobayashi, M. and Sawabe, K. Genetic characterization of a new insect flavivirus isolated from *Culex pipiens* mosquito in Japan. *Virology* 359: 405-414 (2007)

2. 学会発表

星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 比嘉由紀子, 矢野和彦, 高崎智彦, 小林睦生, 澤邊京子. 本邦生息蚊類が保有するフラビウイルスの検出および性状解析. 第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2006年5月26-27日, 長崎

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

表 1. Predicted cleavage sites in CxFV polyprotein

Cleavage	CxFV	CFA ^a	KRV ^b	Other flaviviruses ^{c,d}
AnchC/virion C	ALEAKR ↓ SAKNA	ALESRR ↓ TTGNP	RLEKQR ↓ SGPNL	after KR, RR, KK, mediated by NS3-NS2B
C/prM	MMVLGA ↓ VVIDM	TVLCGC ↓ VVIDM	LGLCYG ↓ EMLRY	signalase-like cleavage
pr/M	KKRERR ↓ VASTN	KKREKR ↓ SREPP	QVRRRR ↓ APQPQ	golgi apparatus protease
prM/E	RTTVKG ↓ EFVEP	WTTVKG ↓ EFVEP	WNVVKA ↓ SSIEP	signalase-like cleavage
E/NS1	FYYTKA ↓ DVGCG	FYYVRA ↓ DLGCG	VRSVSA ↓ DVGCG	signalase-like cleavage
NS1/NS2A	EVTIDA ↓ DGEDM	YGKANA ↓ QSDFR	YGKAHA ↓ CSDFR	signalase-like cleavage
NS2A/NS2B	LRASRR ↓ SLVAG	WAAEKA ↓ HQPTV	WAAERA ↓ QQPTI	after KR, RR, effected by serine protease NS3
NS2B/NS3	CWWNKR ↓ ARVAT	LTASNR ↓ SDDL	LSEQNR ↓ SDDL	after KR, RR, QR, effected by serine protease NS3
NS3/NS4A	NELDKR ↓ SKIML	EWETRK ↓ VSIDF	EWDTRK ↓ LSIEF	after KR, RR, RK, effected by serine protease NS3
NS4A/NS4B	VNGVVA ↓ WEMDL	ICGVLA ↓ WEMRM	VCGLVA ↓ WEMRL	signalase-like cleavage, effected by serine protease NS3
NS4B/NS5	SRMALR ↓ SLVKT	FNQFRA ↓ LEKST	FNQFRA ↓ LEKST	after KR, RR, effected by serine protease NS3

^a Data for cell fusing agent was taken from Cammisa-Parks *et al.*, 1992

^b Data for Kamiti river virus was taken from Crabtree *et al.*, 2003

^c See Chambers *et al.*, 1990

^d See Westaway and Blok, 1997

表 2. Comparison of the sequences of the viral proteins of CxFV with those of other flaviviruses^a

Protein	CxFV		CFA		KRV		JEV		DEN2		YOKV		TBEV		APOIV	
	aa ^b	% ^c	aa	% ^c	aa	%	aa	%	aa	%	aa	%	aa	%	aa	%
C	139		136	37.1	143	28.6	127	25.5	100	21.5	128	24.3	112	23.7	110	22.0
prM	143		142	69.5	143	41.1	167	20.8	166	17.8	168	21.3	168	25.0	161	18.0
E	427		427	69.0	432	33.5	500	20.9	495	20.0	490	21.5	496	22.8	485	19.2
NS1	369		390	39.3	390	40.2	352	26.7	352	22.8	353	27.1	352	30.1	353	24.1
NS2A	230		232	22.7	232	22.1	227	21.0	218	17.7	227	20.0	230	21.5	225	21.8
NS2B	127		124	18.8	124	15.8	131	20.0	130	25.2	130	25.2	131	20.9	130	20.0
NS3	592		577	42.5	577	43.9	619	31.6	615	32.9	620	31.8	621	29.7	616	31.2
NS4B	166		135	21.9	145	25.0	126	18.7	127	21.4	126	18.1	126	20.5	119	23.5
2K	23		23	37.5	23	45.8	23	26.1	23	21.7	23	21.7	23	13.0	23	21.7
NS4B	257		258	21.6	261	25.0	255	18.8	248	22.1	254	17.4	252	19.3	252	19.5
NS5	889		887	58.1	887	57.6	905	43.5	900	42.8	906	41.4	903	42.3	897	43.0
polyprotein	3362		3331	46.7	3357	40.4	3432	29.1	3374	28.8	3425	28.8	3414	29.3	3371	28.7

^a Information of other flaviviruses was described in Materials and methods; CFA, cell fusing agent; KRV, Kamiti river virus; JEV, Japanese encephalitis virus; DEN2, Dengue type 2 virus; YOKV, Yokose virus; TBEV, tick-borne encephalitis virus; APOIV, Apoi virus

^b Number of amino acid of viral protein in each viruses.

^c Percent identity value calculated based on alignment using with the GENETYX software.

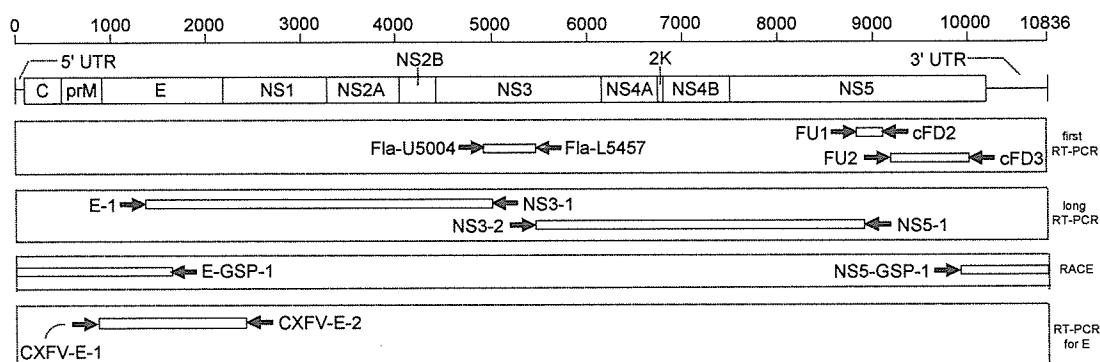


図 1 CxFV ゲノムおよび遺伝子構造解析の概念図

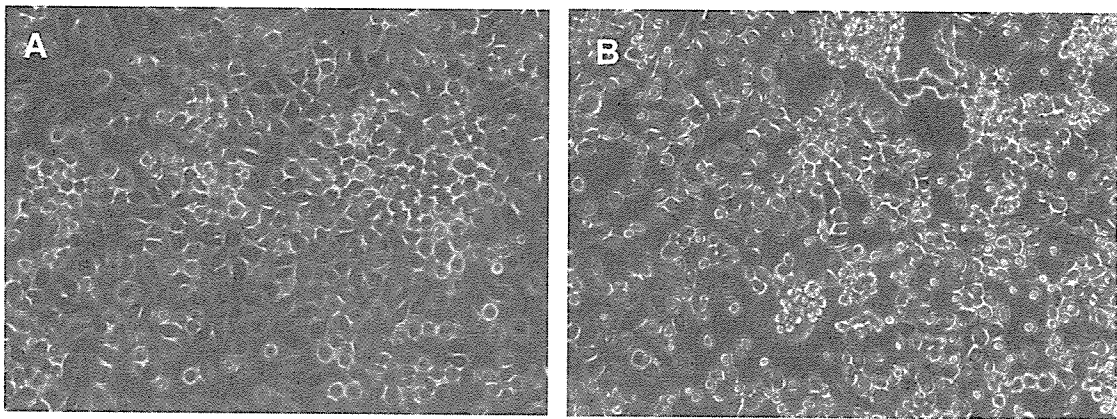


図2 CXFV 接種84時間後の C6/36 細胞(B)およびコントロール(A)の位相差顕微鏡像

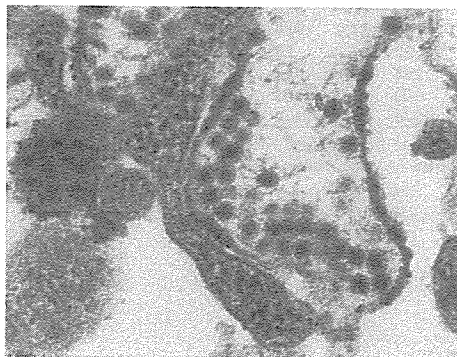


図3 CXFV 粒子の電子顕微鏡像

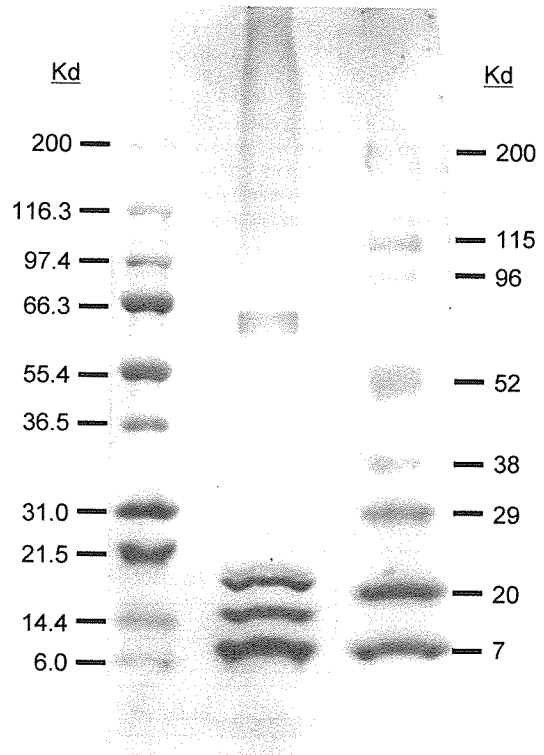


図4 CXFV 構成タンパクの western blot による解析

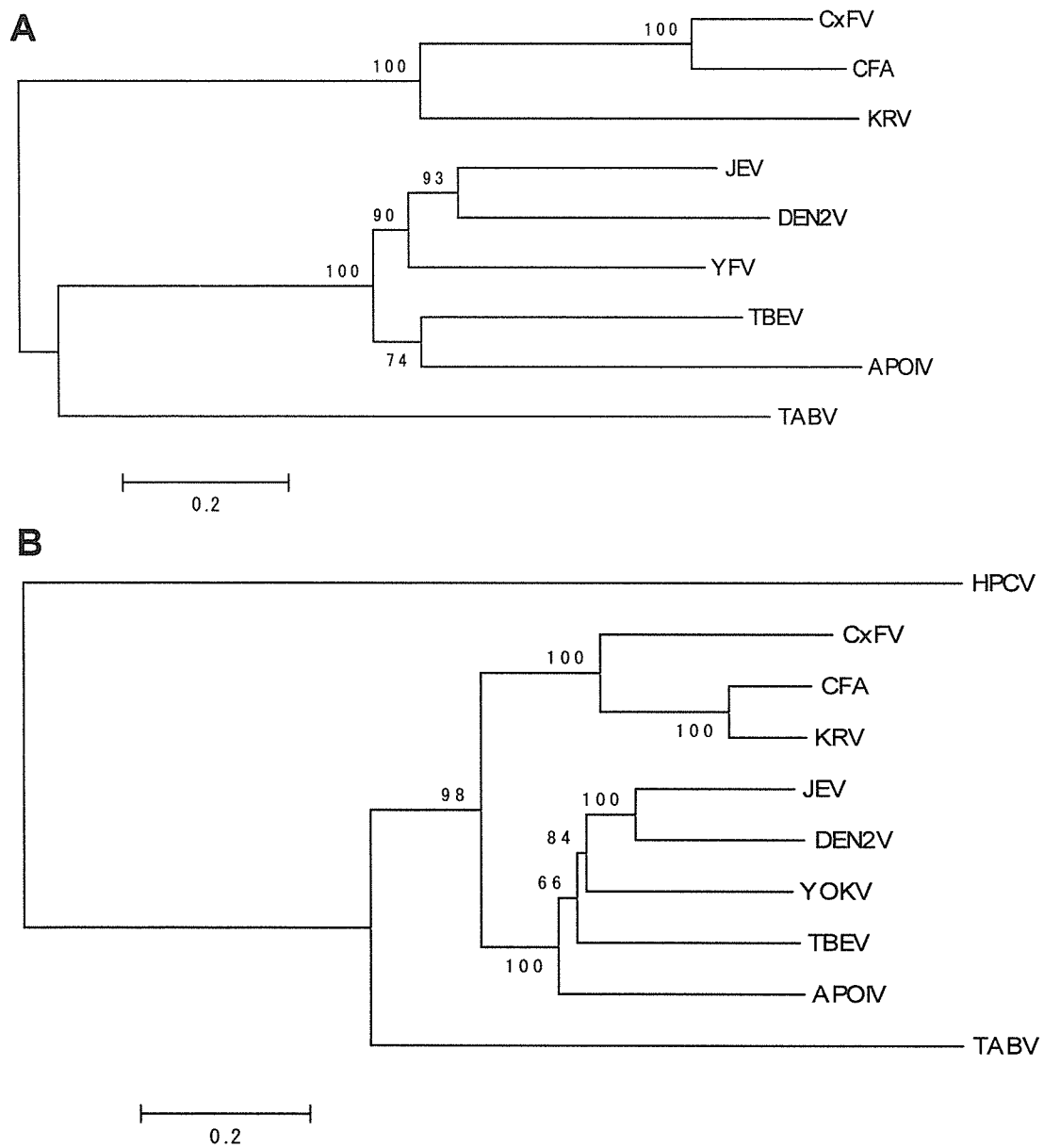


図5 CxFLVのE(A), NS5(B)領域に関する neighbor-joining 法により推定された系統図

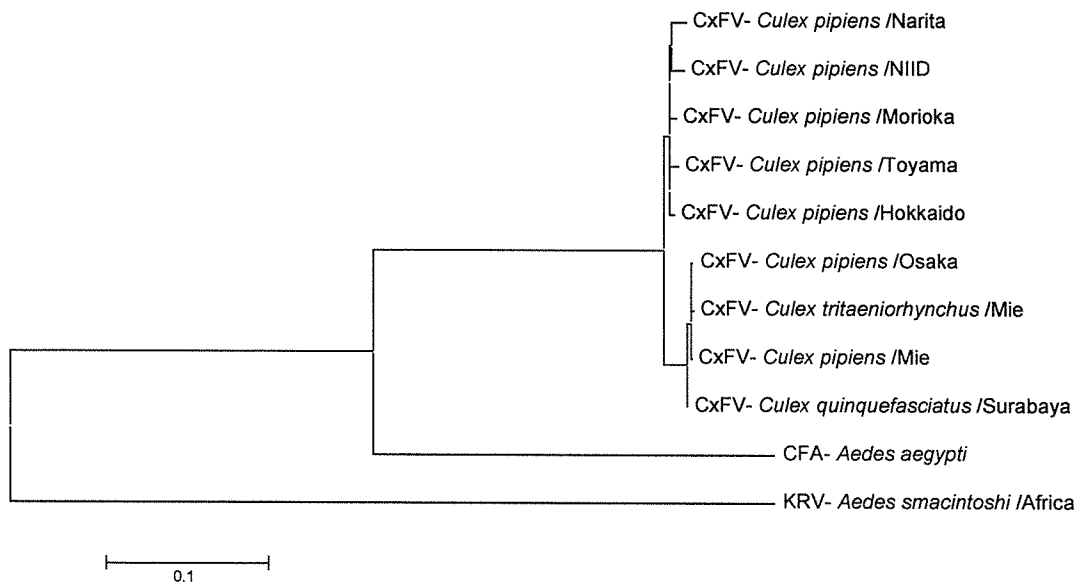


図 6 昆虫フラビウウイルスの E 領域に関する neighbor-joining 法により推定された系統図

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

養豚場周辺のコガタアカイエカの動静と養豚場内の日本脳炎ウイルス保有蚊の
活動状況に関する研究 第1報

分担研究者 水田英生（大阪検疫所 次長）
研究協力者 後藤郁夫（神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター 副統括検査官）
森 英人（神戸検疫所 輸入食品・検疫検査センター 副統括検査官）
白石祥吾（神戸検疫所 検疫衛生課 衛生管理官）

近年、日本脳炎患者の発生のピークは7・8月から8・9月へと移行するなど日本脳炎ウイルス（JEV）の活動は過去とは異なってきている。今日、養豚場内で何が起きているのか、養豚場内におけるJEVの活動を明らかにするため、ライトトラップを養豚場内3ヶ所に設置し、養豚場内各所に侵入してくる媒介蚊を経時的に採集すると共に、採集した蚊を種別後、日本脳炎媒介蚊の雌を抽出し、吸血の有無、さらには脚部と胴部に分けJEVの遺伝子を検出し、養豚場内のJEV活動状況を調査した。また、養豚場周辺の媒介蚊の発生状況も併せて調査した。

採集されたJEV媒介蚊はコガタアカイエカ（C.tri）1種だけであった。田植準備前、養豚場周辺地域でC.triの幼虫は採集されなかったが、豚舎前で成虫が採集された。田植えが始まる5月中旬、C.triの幼虫発生に伴い、豚舎内でも成虫が採集されるようになった。7月には、豚舎内で採集される成虫が多くなり、8月はじめには、豚舎内で感染蚊が採集されるようになった。幼虫発生率が最高に達した8月中旬には、豚舎内で感染豚を吸血した非感染蚊、ウイルス増殖蚊、媒介可能な蚊など多種のウイルス保有蚊と思われる蚊が採集された。稲刈り前の9月上旬、幼虫の発生率は大幅に減少し、豚舎内で採集される成虫も大幅に減少したが、豚舎前や養豚場の外れにある住居前で媒介可能な蚊が採集された。稲刈りが終了する9月末、さらなる幼虫発生率の減少に伴い、豚舎内で採集される蚊もごくわずかとなり、ウイルス保有蚊はまったく採集されなくなった。しかし、この時期、成虫の採集数は豚舎内より豚舎前の方が多くなった。10月下旬では幼虫の発生が見られなくなり、養豚場内においても成虫の採集はなくなった。

今回の調査で、稲刈り前の9月上旬に豚舎前や住居前でも有毒蚊が採集されたことは、現在日本脳炎患者が、8・9月に多発していることに関連しているようと思われる。気象状況の変化等を踏まえ、日本脳炎感染防御には単年度の調査だけでなく、さらなる調査が必要であると思われる。

A. 研究目的

現在、JEVの活動状況を把握するため、養豚場でライトトラップを用いて蚊を採集し、採集した蚊からウイルスの検出を行っている研究所等が存在するが、採集方法については、養豚場内の1ヶ所にライトトラップを設置しているところが多く、また検出方法も採集した雌蚊のうち、吸血している蚊は7~10日間生存させた後に試験に供したり、吸血蚊を除いて試験に供したり、あるいは吸血、非吸血にかかわらず試験に供したりと様々である。このように一部で行われている日本脳炎のサーベイランスは、そこにJEVが存在するか、そこに媒介可能な蚊が存在するか、あるいは、それらが検出されるのは何時からかだけを調査するものであった。

我々は養豚場周辺の蚊の発生状況と養豚場内でのJEV保有媒介蚊の動静を明らかにし、JEVが豚から蚊へ、そして蚊から人へどのような状況下で伝播されるのか、そして蚊から人への伝播を断ち切る方法を検討するため本研究を実施した。

B. 研究方法

I. 養豚場及びその周辺におけるJEV媒介蚊の調査

1) 調査場所及び調査期間

兵庫県姫路市の山間部にある小さな水田地帯を調査地区とした(図1)。

幼虫調査は2006年4月22日から2006年10月22日までとし、調査間隔を原則3週間隔としたが、田植えの始まる5月20日までは1週間隔ないし2週間隔で、全期間を通じては計11回実施した。なお、7月後期の調査は豪雨のため、予定より1週間後方にずらして実施した。

成虫蚊の調査は、細長い水田地帯のほぼ真ん中に位置している養豚場において、2006年4月29日から2006年10月22日まで3週間隔で実施したが、7

月29日から30日にかけて実施した調査において、豚舎内に設置した採集器具に不備があり、採集蚊が得られなかったので、8月2日から3日にかけて再調査を実施した。7月後期の調査は、幼虫調査と同様に予定より1週間後方にずらして実施した。

なお、調査対象の養豚場は、300頭前後の仔豚を肥育しており、親豚等の成豚は飼育していない。

2) 幼虫の調査

日本脳炎媒介蚊の調査として、調査区内にある池、水田、水田を取り囲む水田用側溝、灌漑用水路、灌漑用側溝柵、草地の水溜まり、川を調査した。

幼虫の採集は柄杓を用い、灌漑用側溝柵以外は1m以上の間隔をあけてすくい採り、池、水田および草地の水溜まりでは原則40すくい、水田用側溝では原則20すくい、灌漑用水路および川では原則30すくいして幼虫を採集した。参考調査として、調査区内等にあるバスタブ、古タイヤ、鍋等を散発的に調査した。採集した蛹と高齢幼虫の一部は成虫にし、他はできる限り高齢幼虫にして種の同定を行った。

3) 成虫の採集

養豚場に採集器具として、CDCミニチュアライトトラップ・モデル512(John W. Hock社製)を設置して実施した。ライトトラップの設置は豚舎内、豚舎前そして養豚場の外れ農道に面した住居前に各1器ずつ設置し、ほぼ15時30分から翌朝ほぼ9時まで作動させて成虫蚊の採集を行った(図1)。

採集した成虫蚊のうち日本脳炎媒介蚊についてはJEV保有の確認を行った。

II. 採集媒介蚊におけるJEV保有の確認

1) 確認方法

採集した成虫蚊はエタノールガスで死亡させ、種の同定後、日本脳炎媒介蚊の雌を抽出し、RT-PCR法でJEV遺伝子(RNA)の検出を行うことにより確認した。

2) 採集蚊のプール分け

日本脳炎媒介蚊はまず種毎、次に肉眼的に吸血蚊と非吸血蚊に分けそれぞれ原則50個体を限度としてプールした。さらに、各プールの蚊群を脚部と胴部分け、1プール2検体として乳剤を作製し、JEV遺伝子の検出に供した。ただし、トラップ1器の採集蚊数が1,000個体を越える場合は、1プールあたり原則100個体を限度とした。

3) ウイルスRNAの検出

ウイルスRNAの抽出は、まず、蚊乳剤をQIA amp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)によりキットに記載されている方法でカラム精製した。ウイルスRNAの検出はOne step RT-PCRとSYBR Greenを用いたリアルタイムRT-PCRの2つのRT-PCR法で実施した。

(倫理面への配慮)

調査研究に協力していただく養豚場には、研究の趣旨や、方法について充分説明し、調査結果がまとまり次第報告することを約束し、養豚場主及び従業員の了解の元、本調査研究を実施した。

C. 結果

I. 調査区における媒介蚊の調査

1) 採集された幼虫蚊の種

調査期間中に調査区域内(養豚場周辺)で採集された蚊の幼虫は5属(6属)12種であり、日本脳炎媒介蚊はC.triのみで、水田、水田用側溝、草地の水溜まり

そして池から採集された(表1)。

2) コガタアカイエカの発生率

C.triの発生状況は5月中旬、平均気温が15℃前後になり、田植えが始まるころから幼虫が採集されはじめ、採集は9月末まで続いた。発生率(発生水域数/調査水域数)は5月20日の25%を皮切りに次第に上昇する傾向であったが、7月に一旦10%台に落ち込んだ。しかし、8月には急速に回復し、8月19日には56%とピークに達した。その後は急激減少し、9月末には10%台に、そして、10月下旬には0%となった(表2)。

3) 採集された成虫蚊の種と採集数の推移

調査期間中に養豚場内(住居前、豚舎前、豚舎内)で採集された蚊の成虫は5属6種であったが、多く採集されたのは、日本脳炎媒介蚊のC.triと三日熱マラリア媒介蚊のシナハマダラカ(A.sin)だけで、他の種の採集は非常に少なかった(表3)。C.triとA.sinが最も多く採集されたのは豚舎内で、他の場所はそれほど多く採集されなかった。最初にC.triが採集されたのは田植え前の4月下旬、豚舎前でわずかに採集されたが、その後は豚舎内で5月、6月とごくわずかに採集されるにとどまった。7月上旬になって、4月以降再び豚舎外でも採集されはじめ、ピーク時の8月中旬に向け、すべての場所で採集数が増加した。豚舎内では7月以降急激に採集数が増加し、8月中旬末には約1,500個体が採集されたが、その後は、9月下旬にかけて急激に数を落とし、10月上旬にはまったく採集されなくなった。豚舎外でも同様の経過をたどったが、ピーク時の8月中旬末の数は50個体にも満たなかった。しかし、豚舎前では10月はじめ豚舎内より採集数が多くなった。A.sinでは、豚舎外での採集傾

向は *C.tri* とほぼ同様であったが、豚舎内では 6 月上旬になってはじめて採集され、7 月に入った直後にピークに達し、116 個体が採集された。その後は 9 月上旬まで約 30 個体から約 90 個体を維持したが、10 月はじめにはごくわずか採集されるだけになり 10 月下旬にはまったく採集されなくなった (表 3)。

4) コガタアカイエカとシナハマダラカの吸血率の変化

採集された *C.tri* と *A.sin* の雌成虫の吸血率は、*C.tri* では豚舎内が相対的に高く、中でも最初に吸血蚊が採集された 7 月 2 日が最も高く 67% を示した。その後は 10 月 1 日まで 43% から 33% の間を行き来した。*A.sin* では 7 月から 8 月にかけて *C.tri* とほぼ同様の傾向を示したが、9 月上旬には *C.tri* とは異なり、豚舎前と豚舎内が急激に高くなった (表 4)。

II. 採集コガタアカイエカにおける JEV 保有の確認

ウイルス遺伝子が初めて検出されたのは 8 月はじめ豚舎内で、吸血蚊の脚部 1 プールと非吸血蚊の胴部 2 プールからであった。8 月中旬には豚舎内でさらに検出数が増加し、吸血蚊の胴部・脚部 2 プールからと非吸血蚊の胴部 2 プールと胴部と脚部 1 プールから検出されるようになったが、9 月上旬には減少し吸血蚊の胴部 1 プールからと非吸血蚊の胴部 1 プールと胴部と脚部 1 プールから検出されるだけになった。ところが、豚舎内で検出数が減少した反面、はじめて豚舎外、すなわち豚舎前で非吸血蚊の脚 1 プールから、そして養豚場のはずれにある住居前で非吸血蚊の胴部と脚部 1 プールからウイルス遺伝子が検出された (表 5、図 2)。

なお、参考までに当該養豚場から出荷された 6 ヶ月肥育豚の HI 抗体価は、7

月 11 日が 0%、8 月 29 日が 0%、9 月 5 日が 100%、9 月 21 日が 100% であった (兵庫県立環境科学研究センター資料提供)。

D. 考 察

兵庫県の四方を山で囲まれた小さな水田地帯で実施した今回の調査では、田植えが始まる前の 5 月上旬まで *C.tri* の発生する環境がほとんどなかったかが、水田等に水が入り田植えが始まる 5 月中旬頃から *C.tri* の発生を見るようになり、そして、6 月中旬にかけ発生率は急速に高くなった。しかし、7 月上旬、発生率が 10% 台に落ち込んだが、これは、6 月中旬から下旬にかけての断続的な集中豪雨の発生と、7 月中旬に起こった短期の連続した集中豪雨の結果、幼虫の多くが流されたものと思われる。

養豚場内のライトトラップによる調査において、豚舎内で採集された *C.tri* は、7 月以降順調に採集数を増やし、幼虫の発生率が減少した 7 月から 8 月のはじめにかけても成虫採集数には大きな減少は見られなかった。このことは、成虫蚊が集中豪雨に遭遇しても、その間建物内等から外には出ず、天候を見定め産卵に行くものと思われる。また、集中豪雨時、豚舎外にいた成虫蚊の一部が豚舎内に避難してきたのかも知れない。したがって、6 月下旬以降、断続的な集中豪雨か晴れ間のない長雨が 8 月末まで続かない限り、JEV の活動は大きな影響を受けないと思われる。また、幼虫の発生を確認できなかった 4 月末に豚舎前で少数の *C.tri* が採集されたが、これは越冬していた *C.tri* か、越冬していた *C.tri* が、越冬地付近で一次繁殖したものが豚舎に引き寄せられてやって来たものと解され、やがて繁殖母体になっていったものと思われる。

吸血率に関し、豚舎内で初めて吸血蚊が採集された 7 月はじめに吸血率が最も

高くなったことは、周辺水域で成育した蚊の羽化が目立ち始める頃、豚舎内に侵入した蚊の多くが侵入後直ちに吸血行動に移るものと思われる。その後の吸血率の低下は、侵入蚊が多くなるにつれ、吸血前後に休息する蚊も増え、このことにより、採集される吸血蚊の個体数が増えたにもかかわらず、吸血率が低下したものと思われる。

採集した *C.tri* における JEV 保有に関し、1 個体ずつのウイルス遺伝子検査をした場合、非吸血蚊において、胴部と脚部双方とも陰性のものは非感染蚊、胴部のみ陽性のものはウイルスが中腸壁細胞に侵入し増殖した感染初期の蚊、脚部のみ陽性のものはウイルスが中腸壁を突破後、全身に拡散増殖した感染中期の蚊、胴部と脚部双方とも陽性のものはウイルスが全身に拡散増殖後、唾液腺でも高濃度にウイルスを増殖させた感染末期の蚊、若しくは感染中期の蚊が高濃度ウイルス血漿血を吸血したもの、吸血蚊において、胴部と脚部双方とも陰性のものは非感染血又は低濃度ウイルス血漿血を吸血した非感染蚊、胴部のみ陽性のものは高濃度ウイルス血漿血を吸血した直後の非感染蚊か感染血あるいは非感染血を吸血した感染初期の蚊、脚部のみ陽性のものは非感染血又は低濃度ウイルス血漿血を吸血した感染中期の蚊、胴部と脚部双方とも陽性のものは高濃度ウイルス血漿血を吸血した感染蚊か非感染血又は低濃度ウイルス血漿血を吸血した感染後期の蚊と解することができる。ただし、通常のウイルス検出試験では、検査対象蚊をプールして試験しており、今回の調査でも、最大ほぼ 50 個体、又は最大 100 個体を 1 プールとして試験を実施している。したがって、試験結果を解析する場合、単一個体の試験のような単純なものではなく、胴部と脚部双方が陽性になる場合には種々のウイルス保有状態の蚊が混合して

いることが推察され、特に、吸血蚊ではより複雑になるものと思われる（表 6）。しかし、今回の調査では予想に反し、胴部や脚部のみからも遺伝子が検出された。この現象は、豚舎内におけるウイルス活動が活発になる前後でより多く見られたことから、蚊の生息数が少ないか、ウイルス汚染量が少ないことが原因ではないかと思われる。

8 月末から 9 月上旬にかけて、はじめて感染蚊が豚舎外で採集されたことは、この時期、幼虫の発生率があまり減少していないにもかかわらず、豚舎内の採集数が大幅に減少し、それに関連し、感染蚊の採集数も減少していたこと、そして、この時期に *A.sin* の吸血率が急激に高くなったことなどを考え合わせると、感染蚊の豚舎外への離散と停滞は、蚊の発生量や豚舎内の感染蚊の数には関係なく、媒介蚊それ自体の生理的変化によるものと思われ、その生理的変化は、気象あるいは繁殖場所周辺の自然環境変化によるものなのかは現在不明である。

なお、今回の調査はライトトラップという一手法でのみ蚊を採集しており、ライトトラップが *C.tri* の一般的な採集方法とはいえ、他の手法で蚊を採集した場合には違った結果が出るかも知れない。また、単年度の調査であったため偶然の結果であったかも知れない。

E. 結論

兵庫県南部に存在する山間部にある養豚場を有する小さな水田地帯では、4 月下旬に何処からともなく越冬蚊に起因すると思われるコガタアカイエカが豚舎周辺に引き寄せられ、やがて田植えが始まり本格的に水田に水が張られ、付属の側溝等にも水が入る 5 月下旬から 6 月上旬、引き寄せられた蚊が繁殖母体となり、本格的な *C.tri* の繁殖が始まり、急速に発生率を上げるようであった。幼虫が成育

し多くの成虫が発生する7月はじめには、豚舎内に侵入する蚊も多くなり、盛んに豚を吸血するようになった。この時期、集中豪雨が数回有り、幼虫の発生率は大幅に減少したが、豚舎内の成虫蚊には大きな影響はなく、採集される蚊の数は増え続けた。採集される幼虫や成虫蚊の数が増えるにしたがい、8月はじめには、豚舎内で感染初期の蚊や豚にウイルスを感染させたと思われる蚊が現れ、8月中旬には、感染血を吸血した非感染蚊、感染後期の蚊、そして感染血を吸血した感染蚊などが入り乱れるようになった。この時期、採集された感染蚊の各種感染ステージから、豚舎内の豚の多くが高ウイルス血漿になっているようであった。9月に入り、豚舎周辺で稲刈りの準備が始まり、平均気温も25℃を大きく下回るようになると、感染中期の蚊や感染後期の蚊など有毒蚊が初めて豚舎外へ離散停留するようになった(図2)。9月まででも当然有毒蚊が産卵のため豚舎から飛散したと思われるが、この時は豚舎と水田等の繁殖地とを直行往復しており、豚舎前や住居前で停留はせず、9月に入って停留するようであった。この離散停留の理由は、媒介蚊の大量発生や豚舎内での有毒蚊の大量発生とは関係なく(当然、離散する数には関係すると思われるが)、蚊自体の生理的変化によるものと思われる。この生理的変化は、周辺の環境によるものか、気候の変化によるものか、その他の要因によるものかは不明である。

今回の調査結果は単年度のものであり、偶然の結果が現れたのかも知れない。したがって、生理的変化の要因を探るためにも、数年の調査が必要であり、また、ライトトラップによる成虫蚊の採集という一手法のみ調査であったため、結果に偏りがあるかも知れない。他の採集法による成虫蚊の採集を実施する必要があると思われる。

また、日本脳炎の防除のため、豚舎における平時の蚊の駆除法及び集中駆除法やその時期の検討資料の収集も重要である。

F. 健康危険情報

周辺部に *C.tri* の発生源を多く有する養豚場において、8月中旬末に、豚舎内で JEV 感染蚊が多数発生し、9月上旬、豚舎外に有毒蚊が離散停留した。

G. 研究発表

1. 論文発表

水田英生・森 英人・後藤郁夫・白石祥吾・杉本昌生・藤川和生：疫学調査における蚊からのフラビウイルス検査法についての一考察（日本検疫医学会誌、投稿中）

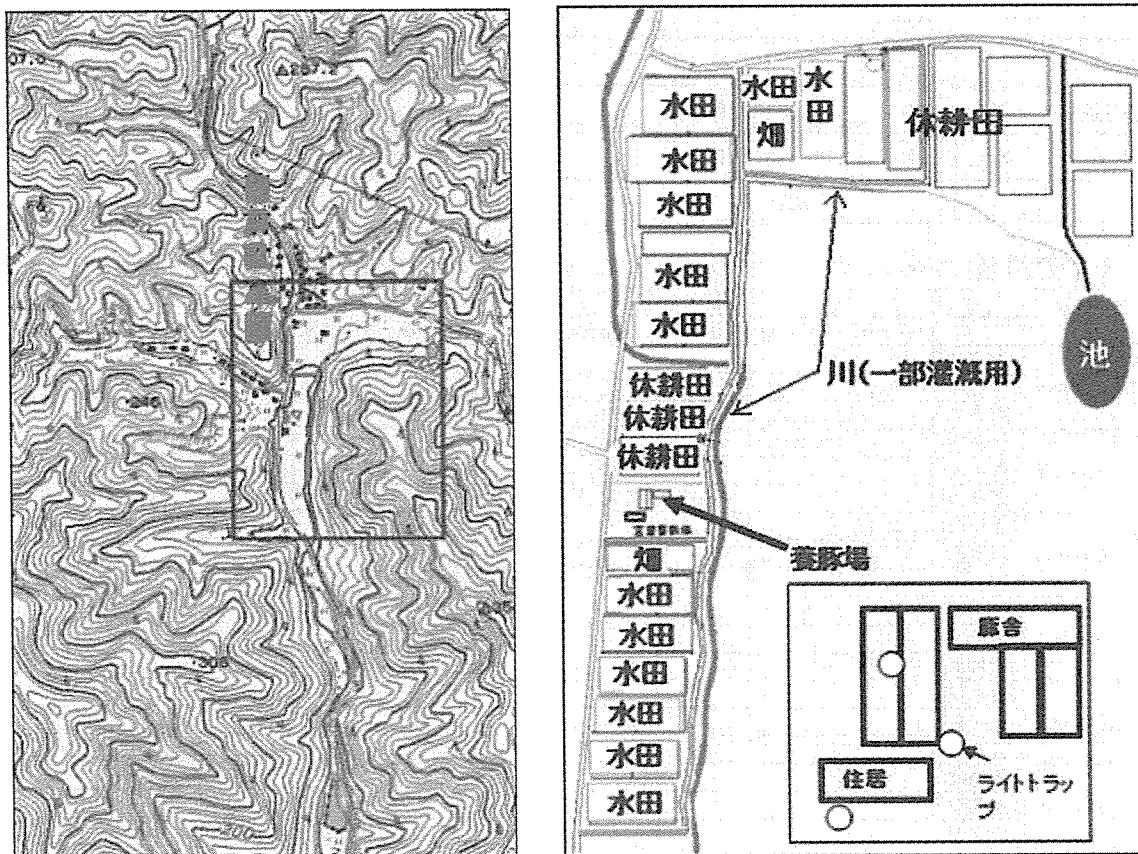
2. 学会発表

水田英生・森 英人・後藤郁夫・白石祥吾・杉本昌生・藤川和生：疫学調査における蚊からのフラビウイルス検査法についての一考察（2006）. 日本検疫医学会第9回学術大会. 2007年1月26日. 常滑市。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

図1. 調査区及び養豚場周辺の自然環境



調査区（左図黒枠内）は山間の水田地帯、養豚場は水田地帯のほぼ中央にある（右図）。

表1. 養豚場周辺で採集された蚊の幼虫

種	放置バスタブ	鍋	古タイヤ	灌漑用水路	小川	水田用側溝	農業用拵	水田	水溜まり	池	農業用水瓶	池	沼	小川
<i>An. korei.</i>				○	○	○	○	○		○		○	○	○
<i>An. l. ja.</i>				○										
<i>An. sinen.</i>				○	○	○	○	○	○	○		○	○	○
<i>Cx. orien.</i>													○	
<i>Cx. vagan.</i>						○								
<i>Cx. trita.</i>						○		○	○	○				
<i>Cx. hayas.</i>				○			○			○		○		
<i>Cx. sasai</i>											○			
<i>Cx. halif.</i>	○		○											
<i>Oc. japon.</i>	○		○								○			
<i>Ar. subar.</i>		○									○			
<i>Ur. n. no.</i>											○			

○は採集

An. korei. = チョウセンハマダラカ

An. l. ja. = ヤマトハマダラカ

An. sinen. = シナハマダラカ

Cx. orien. = ハマダライエカ

Cx. vagan. = スジアシエカ

Cx. trita. = コガタアカイエカ

Cx. hayas. = ヤマトクシヒゲカ

Cx. sasai = コガタクロウスカ

Cx. halif. = *Lt. vorax* トラフカクイカ

Oc. japon. = ヤマトヤブカ

Ar. subar. = オオクロヤブカ

表2. 養豚場周辺におけるコガタアカイエカ幼虫の発生状況

	4月22日	4月29日	5月7日	5月20日	6月10日	7月2日	7月29日	8月19日	9月9日	9月30日	10月21日
水域数	3	3	3	16	20	20	21	18	11	9	5
発生源数	0	0	0	4	7	3	2	10	4	1	0
発生率	0%	0%	0%	25%	35%	15%	10%	56%	36%	11%	0%

表3. 養豚場においてライトトラップにより採集された成虫蚊の変化

採集種	採集場所	調査日(トラップ回収日)と採集数									
		4月30日	5月21日	6月11日	7月2日	7月30日	8月3日	8月20日	9月10日	10月1日	10月22日
<i>Cx. tritaenio.</i>	住居前					9(0)	21(0)	39(1)	1(0)		
	豚舎前	4(0)			7(1)	9(0)	4(0)	44(2)	18(0)	14(0)	
	豚舎内		1(0)	2(0)	69(0)	非調査	184(0)	1593(0)	202(0)	3(0)	
<i>An. sinensis</i>	住居前				3(0)	4(0)	2(0)	14(1)	3(0)		
	豚舎前				10(2)	3(0)	5(0)	20(1)	4(0)		
	豚舎内			3(0)	116(17)	非調査	32(0)	93(4)	64(0)	1(0)	
<i>An. koreicus</i>	住居前	1(1)									
	豚舎前										
	豚舎内					非調査					
<i>Ur. novobsc.</i>	住居前										
	豚舎前					2(0)	3(0)				
	豚舎内					非調査					
<i>Ae. f. flavop.</i>	住居前										
	豚舎前						1(0)				
	豚舎内					非調査					
<i>Ar. subalbat.</i>	住居前										
	豚舎前										
	豚舎内					非調査		1(0)			

()内は雄の数

Cx. tritaenio. =コガタアカイエカ

An. sinensis =シナハマダラカ

An. koreicus =チョウセンハマダラカ

Ur. novobsc. =フタクロホシチビカ

Ae. f. flavop. =ヤマダシマカ

Ar. subalbat. =オオクロヤブカ

表4. 採集されたコガタアカイエカとシナハマダラカの吸血率の変化

種	採集場所	項目	調査日(回収日)と吸血状況									
			4月30日	5月21日	6月11日	7月2日	7月30日	8月3日	8月20日	9月10日	10月1日	10月22日
<i>Cx. tri.</i>	住居前	採集蚊数					9	21	38	1		
		吸血蚊数					1	0	1	0		
		吸血率					11%	0%	3%	0%		
	豚舎前	採集蚊数	4			6	9	4	42	18	14	
		吸血蚊数	0			0	5	0	7	4	0	
		吸血率	0%			0%	56%	0%	17%	22%	0%	
	豚舎内	採集蚊数		1	2	69	ライトトラップ不調・データなし	184	1,593	202	3	
		吸血蚊数		0	0	46		79	527	78	1	
		吸血率		0%	0%	67%		43%	33%	39%	33%	
<i>An. sin.</i>	住居前	採集蚊数				3	4	2	13	3		
		吸血蚊数				0	0	0	0	0		
		吸血率				0%	0%	0%	0%	0%		
	豚舎前	採集蚊数				8	3	5	19	4		
		吸血蚊数				0	0	0	2	3		
		吸血率				0%	0%	0%	11%	75%		
	豚舎内	採集蚊数			3	99	ライトトラップ不調・データなし	32	89	64	1	
		吸血蚊数			0	38		6	11	34	1	
		吸血率			0%	38%		19%	12%	53%		

Cx. tri. =コガタアカイエカ

An. sin. =シナハマダラカ

表5. ウイルス遺伝子検出結果

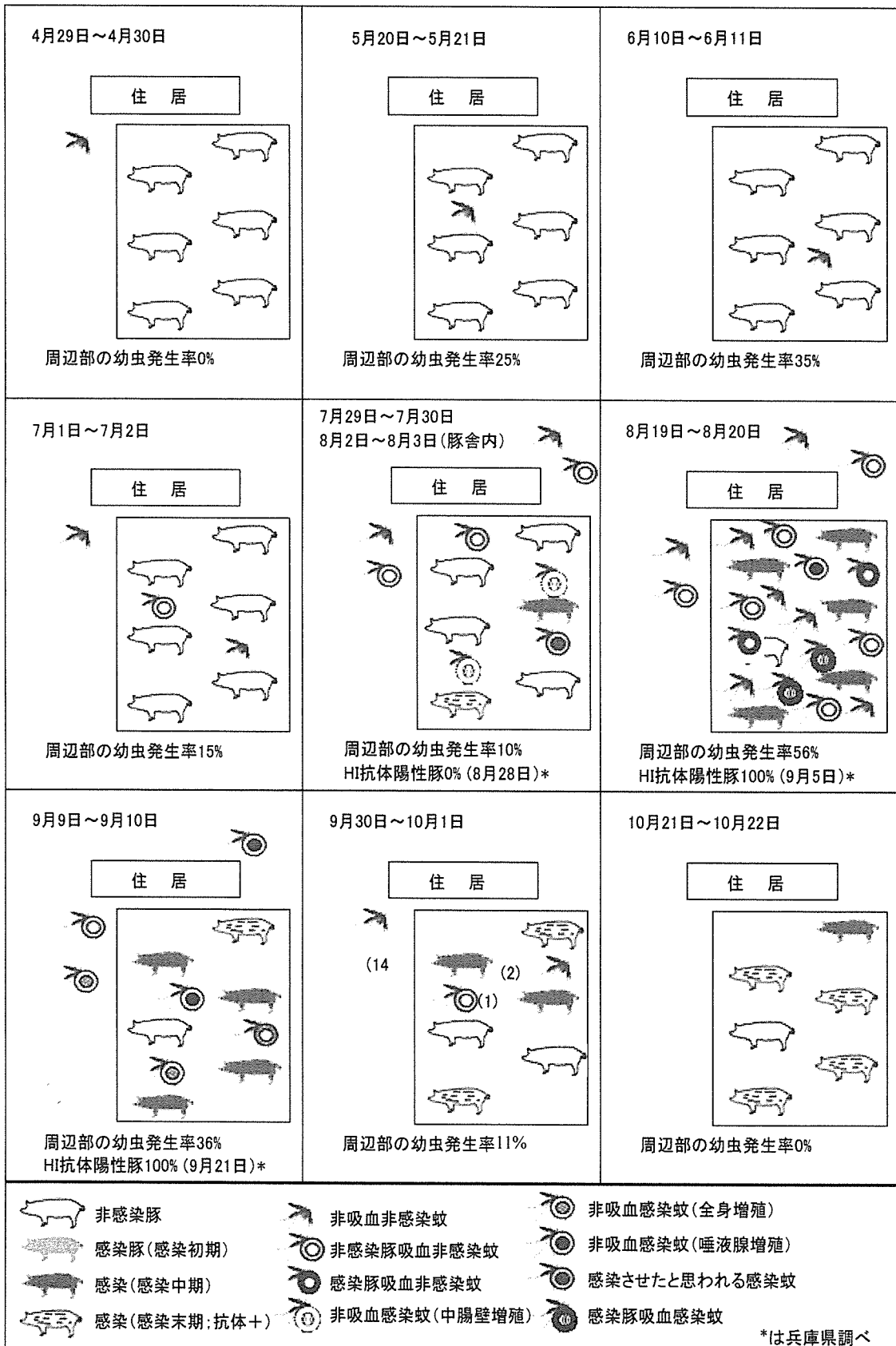
採集場所	吸血・非吸血	検査部位	項目	調査月日(トラップ回収日)と各陽性率											
				4月30日	5月21日	6月11日	7月2日	7月30日	8月3日	8月20日	9月10日	10月1日	10月22日		
住居前	吸血	胸部	検査蚊数					1		1					
			検査プール数					1		1					
			陽性プール数					0		0					
		陽性率					0%		0%						
		脚部	検査プール数					1		1					
			陽性プール数					0		0					
	陽性率						0%		0%						
	非吸血	胸部	検査蚊数					8	21	37	1				
			検査プール数					1	1	1	1				
			陽性プール数					0	0	0	1(1)				
		陽性率					0%	0%	0%	100%					
		脚部	検査プール数					1	1	1	1				
陽性プール数							0	0	0	1(1)					
陽性率						0%	0%	0%	100%						
豚舎前	吸血	胸部	検査蚊数					5		7	14				
			検査プール数					1		1	1				
			陽性プール数					0		0	0				
		陽性率					0%		0%	0%					
		脚部	検査プール数					1		1	1				
			陽性プール数					0		0	0				
	陽性率						0%		0%	0%					
	非吸血	胸部	検査蚊数	4			6	4	4	35	4	14			
			検査プール数	1			1	1	1	1	1	1			
			陽性率	0%			0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%		
		脚部	検査プール数	1			1	1	1	1	1	1			
			陽性プール数	0			0	0	0	0	0	1	0		
陽性率			0%			0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%			
豚舎内	吸血	胸部	検査蚊数				46			79	527	78	1		
			検査プール数				1			2	6	1	1		
			陽性率				0%			0%	0%	2(2)	1	0	
		脚部	検査プール数				1			2	6	1	1		
			陽性プール数				0			1	2(2)	0	0		
			陽性率				0%			50%	33%	0%	0%		
	非吸血	胸部	検査蚊数		1	2	23			105	1066	124	2		
			検査プール数		1	1	1			2	11	2	1		
			陽性率		0%	0%	0%			2	3(1)	1	0		
		脚部	検査プール数		1	1	1			2	11	2	1		
			陽性プール数		0	0	0			0	1(1)	2	0		
			陽性率		0%	0%	0%			0%	9%	100%	0%		

()は胸部・脚部双方から検出されたプール数

表6. ウイルス遺伝子検出結果の解析

吸血の有無	結果	解析
非吸血蚊	胸部・脚部 陰性	①非吸血非感染蚊
	胸部のみ 陽性	②感染蚊(中腸壁ウイルス増殖)
	脚部のみ 陽性	③感染蚊(全身でウイルス増殖)
	胸部・脚部 陽性	④感染蚊(唾液腺でもウイルスが増殖した感染蚊又は②③あるいは④の混合)
吸血蚊	胸部・脚部 陰性	⑤非感染蚊(非感染血又は低濃度ウイルス血漿血を吸血)
	胸部のみ 陽性	⑥非感染蚊(非感染蚊が高濃度ウイルス血漿血を吸血;感染蚊になるかは未定)又は⑦感染蚊(感染初期の蚊が感染あるいは非感染血を吸血)
	脚部のみ 陽性	⑧感染蚊(感染蚊が非感染血又は低濃度ウイルス血漿血を吸血)
	胸部・脚部 陽性	⑨感染蚊(感染蚊が高濃度ウイルス血漿血を吸血又は⑥⑦⑧あるいは⑨の混合)

図2. 養豚場内の蚊の活動とJEVの経時的活動状況の変化（推定）



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

アジアの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分布

分担研究者	小林睦生	国立感染症研究所
研究協力者	富田隆史	国立感染症研究所
	葛西真治	国立感染症研究所
	駒形修	国立感染症研究所
	津田良夫	国立感染症研究所
	李時雨	国立感染症研究所
	比嘉由紀子	国立感染症研究所

Indira S Weerasinghe Med Res Inst, Sri Lanka

アセチルコリンエステラーゼ 2 (Ace2) のアシルポケット座位に見いだされた F455W 置換は、コガタアカイエカの有機リン剤抵抗性のおもな要因である。日本本土、南大東島、沖縄本島、西表島、タイ、ベトナム、セイロン島、およびジャワ島における W455 変異をもつ Ace2 抵抗性遺伝子の頻度と F455 座位周辺の約 0.6 kb の塩基置換多型を調べた。ジャワ島を除く各地方集団では W455 抵抗性遺伝子が含まれ、F455 感受性遺伝子に対して優勢であった。W455 遺伝子には 2 つのタイプがあったが、これらが同時に含まれていたのは西表島においてのみで、一方のタイプがジャワ島を除く全ての地方集団に全て含まれていた。蚊の移住と水田での有機リン系農薬の散布により、1 つの突然変異起源に由来する抵抗性遺伝子が過去半世紀の間にアジア広域に分布を広げたことが示された。

A. 研究目的

日本脳炎の流行がわが国で最盛期であった 1960 年代までの過去においても、水田に発生する主要媒介蚊のコガタアカイエカを殺虫剤で防除するという発想はなかった。しかしながら、イネ害虫の防除を目的として散布された農薬殺虫剤の選抜により、日本本土のコガタアカイエカ集団に強度の有機リン剤抵抗性が発達したことが 1980 年代に明らかになった (Yasutomi and Takahashi 1986)。おもな抵抗性機構は有機リン系・ピレスロイド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) の非感受性であることも示された

(Takahashi and Yasutomi 1986)。その後、昆虫種に 2 つある AChE 遺伝子の一方、Ace2、に殺虫剤非感受性の原因となるアミノ酸置換突然変異、F455W、が有機リン剤抵抗性の富山系統の蚊から同定された (Nabeshima et al, 2004)。

イネの害虫防除の目的でわが国では全国的に似通った農薬の散布を行ってきたこと、およびコガタアカイエカは飛翔能力の高い蚊種とみなされていることから、抵抗性遺伝子の起源が新しくその数が限られていれば、遺伝的組換えの影響を最小限に免れたままに抵抗性遺伝子ハプロタイプの地理的流布が観察できると考えた。

本研究では、日本を含むアジアのいくつかの地点で採集した蚊を使い、*Ace2* 遺伝子の F455 座位をコードする 1 つのエクソン塩基配列を決定し、コガタアカイエカ地方集団における *Ace2* 遺伝子の遺伝的多様性、F455W 置換を指標とする抵抗性遺伝子の頻度、ならびに抵抗性遺伝子に認められるハプロタイプの種類について解析した。

B. 研究方法

コガタアカイエカの採集地を表 1 に示す。西表島では終齢幼虫を採集し、他の採集地点では成虫を採集した。個体毎に Extract-N-Amp (Sigma) を用いてゲノム DNA を抽出した。亜熱帯・熱帯地方におけるコガタアカイエカの近縁種である *Culex vishnui* と *Cx. pseudovishnui* を分別するために、Toma ら (2000) による分子分類法を適用した。コガタアカイエカと判定された個体の DNA を鋳型として ExTaq (Takara) を用いた PCR で *Ace2* 遺伝子の F455 座位を含む 1 つのエクソンの一部を増幅した。次いで、ExoSAP-IT (Amersham) で処理した PCR 産物を鋳型として BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 (ABI) を用いた標識反応を行い、Genetic Analyzer 3130 システム (ABI) で 609 塩基長の配列を解析した。PCR に用いたプライマーは ATGCGACCAAGTTGAGCGAAG と GACCAGTATCGCATGATCTTCC のセットであった。DNA シークエンシングに用いたプライマーは、正配列と相補配列用に、それぞれ、GAGCTGGTTGATAACGAGTGG と GCTAAAGTCCTTCTCGTCCTC であった。

ダイレクトシークエンシングで得たヘテロ接合体の配列は、ホモ接合体に含まれ一意的に決まるハプロタイプを最初の手がかり

りとして用いることにより、各採集地点のサンプル全体に含まれるハプロタイプの種類が最少となるように暫定的に 2 つのハプロタイプに分解した。

C. 研究結果

Ace2 に最も遺伝子配列の多様性が認められた西表島サンプルの解析例を図 1 に示す。ダイレクトシークエンシングの結果、試験した 57 個体の中に 35 の塩基置換多型座位が関わる 26 種類の異なる遺伝子型が含まれていた。F455 座位の置換に基づいて遺伝型を抵抗性ホモ接合体 (W455/W455)、感受性ホモ接合体 (F455/F455)、およびヘテロ接合体 (W455/F455) の 3 つに分類し、抵抗性遺伝子 (W455) の頻度を 62% と推定した。抵抗性に関する 3 つの遺伝子型頻度の Hardy-Weinberg 平衡遺伝子型頻度への適合性を検定したところ ($Df=1$, $\chi^2=0.13$), 有意差はなかった。西表島ではすくい取りにより幼虫を採集したが、この検定結果によれば、サンプリングに偏りはなく、任意交配集団からランダムに幼虫をサンプリングしたものとみなされる。F455 座位の周辺配列における塩基置換から、抵抗性ホモ接合体の中には 2 つのハプロタイプが含まれ、それぞれのハプロタイプに関するホモ接合体も存在した。1 つは富山系統で最初に見いだされたハプロタイプと同一で、他方は西表島のみから見いだされたハプロタイプであった。これら 2 つの抵抗性型ハプロタイプを富山型 (TYM) と西表型 (IRO) と呼ぶことにする。抵抗性と感受性のヘテロ接合体は、全て TYM または IRO のいずれかを保有しているものとして矛盾なく 2 つのハプロタイプに分離できた。推定した感受性ハプロタイプの種類は全部で 13 で、感受性遺伝子 (F455) の頻度が 38% と劣勢であったにもかかわらず、抵抗性遺伝