

Kobayashi, M. and Sawabe, K. (2007)  
Genetic characterization of a new insect  
flavivirus isolated from *Culex pipiens*  
mosquito in Japan. *Virology*. 359: 405-414.

2. 学会発表:

1) 星野啓太, 伊澤晴彦, 津田良夫, 矢野和彦, 佐々木年則, 高崎智彦, 小林陸生, 澤邊京子. 本邦イエカ属蚊類から分離された新規フラビウイルスの性状解析. 第 59 回日本衛生動物学会大会. 2007 年 4 月 2-4 日, 大阪

2) 星野啓太, 伊澤晴彦, 津田良夫, 佐々木年則, 高崎智彦, 澤邊京子, 小林陸生. 本邦生息蚊における昆虫フラビウイルスの検出およびその性状解析. 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2007 年 5 月 18-19 日, 石川

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

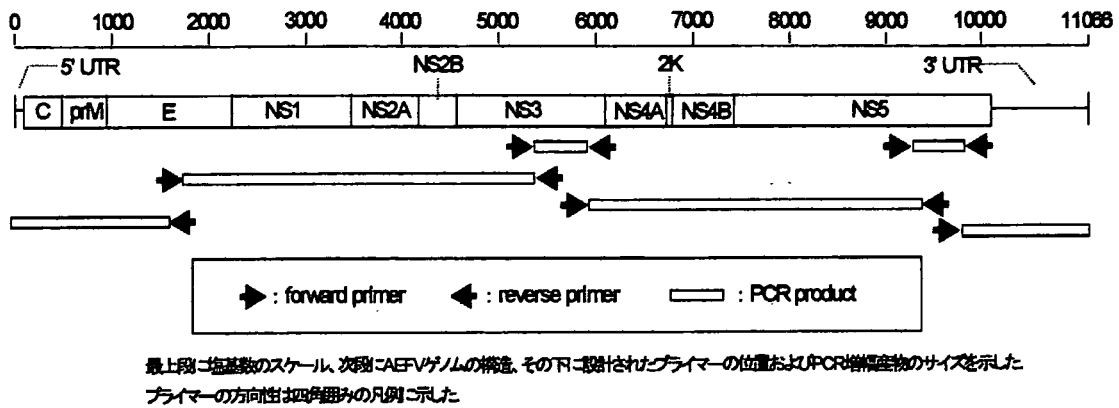


図1 AEFV ゲノムおよび遺伝子構造解析の概念図

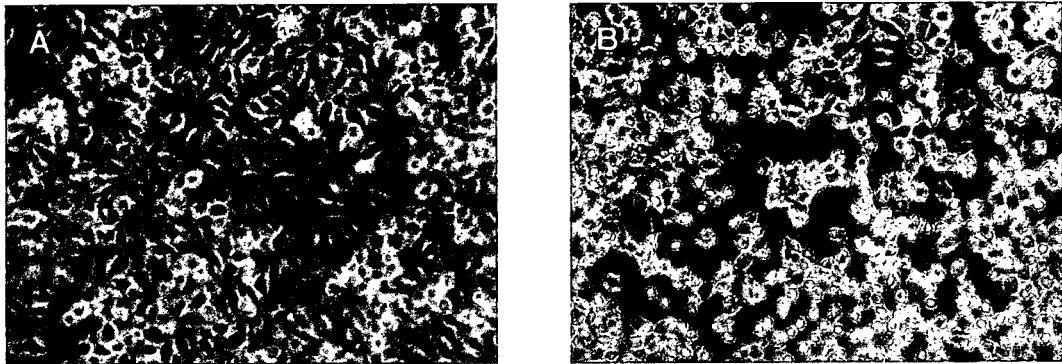


図2 AEFV 接種 84 時間後の C6/36 細胞(B)およびコントロール(A)の位相差顕微鏡像

Table 1

Predicted cleavage sites in QFV and AEFV polyprotein

Cleavage	QFV	QFA <sup>a</sup>	KRV <sup>b</sup>	AEFV	Other flaviviruses <sup>c,d</sup>
Arnd/C/virion C	ALEAKR   SAKNA	ALESFR   TTQNP	RLEKQR   SQFNL	FLEAGR   SHSPV	after KR, RR, KK, mediated by NS3-NS2B
C/prM	MMMLG   VMIM	TVLGGC   VMIM	LCYVVG   EMLRY	FQLALS   ETURY	signalase-like cleavage
pr/M	KKFRER   VASTN	KKFRER   SFREP	QVRRFR   ARCPQ	TKRQFR   SSFQR	gclgi apparatus protease
pr/E	RITVKG   EFVEP	WITVKG   EFVEP	WNVVKA   SSIEP	WNVVFA   TSIEP	signalase-like cleavage
E/NS1	FVYTKA   DVGGG	FYYVFA   DLGGG	VFSVSA   DVGGG	YFRRVA   CDIGG	signalase-like cleavage
NS1/NS2A	EVTIDA   DGEDM	YQKANA   QSDFR	YQKAAH   CSDFR	YQKADA   TADRH	signalase-like cleavage
NS2A/NS2B	LRASFR   SLVAG	WAABKA   HQPTV	WAABFA   QOPTI	WAABFA   DHFSA	after KR, RR, effected by serine protease NS3
NS2B/NS3	QWANK   ARVAT	LTASNR   SDLL	LSEGNR   SDLL	INBICR   SDLL	after KR, RR, QR, effected by serine protease NS3
NS3/NS4A	NELDKR   SKML	ENETRK   VSDF	EADTRK   LSEF	EADQFR   LSEIM	after KR, RR, RK, effected by serine protease NS3
NS4A/NS4B	VNGV   WEMDL	IGMLA   WEMFM	VGMLA   WEMRL	MCSMLA   WEMRL	signalase-like cleavage, effected by serine protease NS3
NS4B/NS5	SFMALR   SLVKT	RNGFFA   LKST	RNGFFA   LKST	FSKFFA   LKST	after KR, RR, effected by serine protease NS3

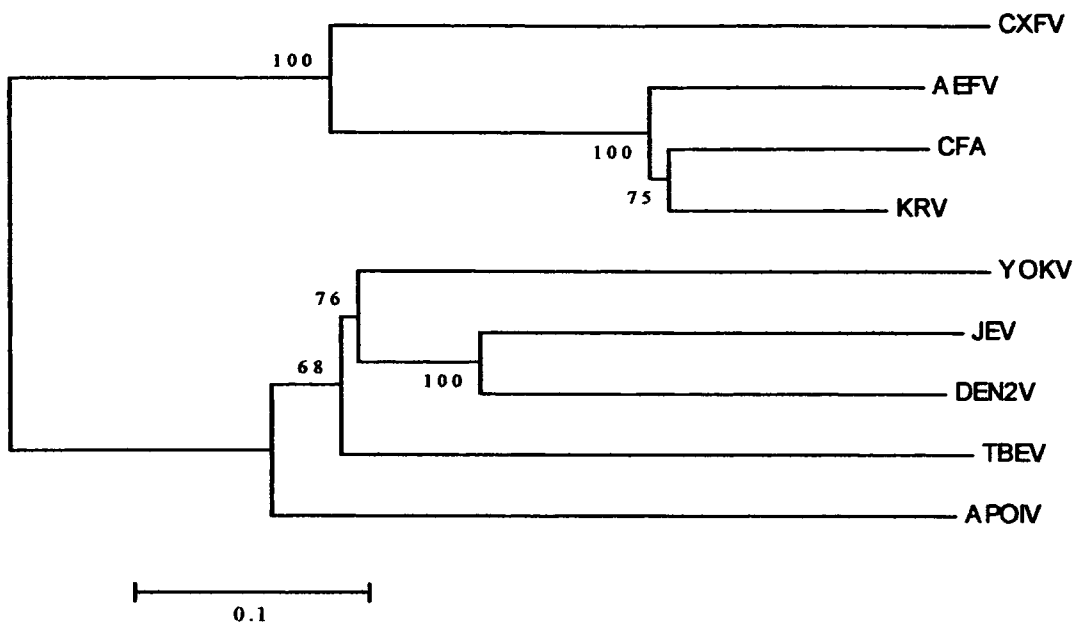
<sup>a</sup> Source: Camrisa-Paris *et al.*, (1992).

<sup>b</sup> Source: Oribtree *et al.*, (2003).

<sup>c</sup> See Chambers *et al.*, (1990).

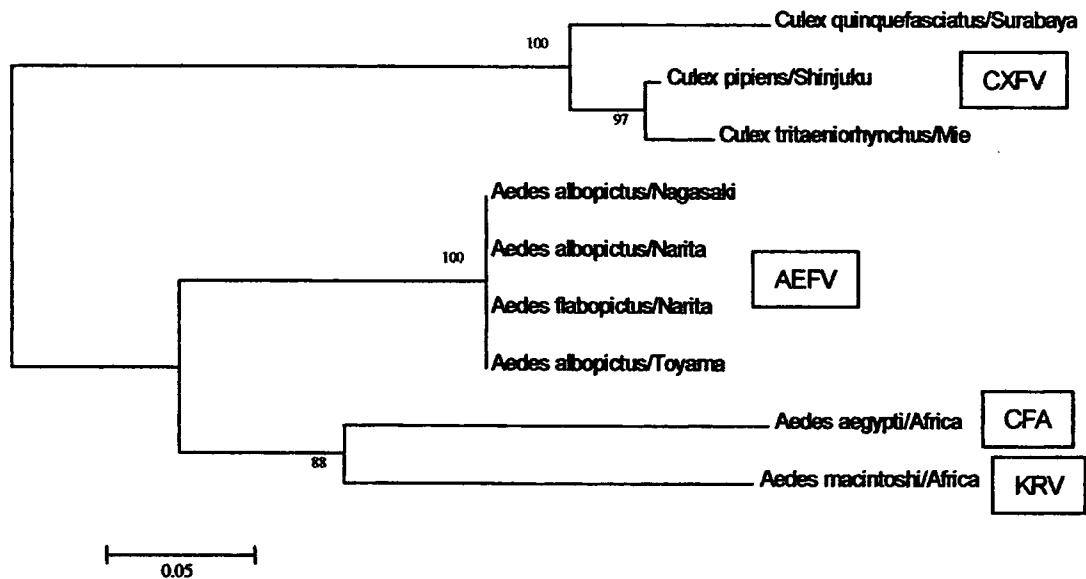
<sup>d</sup> See Westzantav and Elck, (1997).

表1 AEFV ポリプロテインにおける開裂部位の予測と比較



NS5タンパクに関するneighbor-joining法により推定された系統図を示した。ウイルス名は本文中に記載し省略形で示した。

図3 AEFVのフラビウイルス属ウイルスにおける系統関係



NS5タンパク部分配列に関するneighbor-joining法により推定された系統図を示した。ウイルス名は本文中に記載し省略形で四角囲みで示した。CXFV, AEFV, CFA, KRVの各分離株の由来蚊種および採集地点を記載した。

図4 昆虫フラビウイルスの系統関係

厚生労働省科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)  
分担研究報告書

富山県における蚊の発生調査(2003～2007年)とウイルス浸淫状況

分担研究者 滝澤剛則(富山県衛生研究所 ウイルス部長)  
協力研究者 小原真弓, 山内健生, 渡辺 護, 長谷川澄代, 倉田毅  
(富山県衛生研究所)

研究要旨

ウエストナイルウイルス(WNV)の侵入監視のため、富山県内における蚊の発生状況を調査した。5年間の蚊成虫調査で6属13種9850頭(9649♀, 201♂)が捕集され、アカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒスジシマカの3種で96.3%を占めた。コガタアカイエカは、水田近くの一般住宅で特に多く捕集された。アカイエカ群は都市部や海岸付近において多く捕集された。ヒスジシマカも都市部で多く採集された。海岸付近の一般住宅では、イヌが死亡した後に捕集されるアカイエカ群の個体数が大幅に減少した。トラップを樹上にも設置した地点では、アカイエカ群とハマダライエカが樹上において有意に多く捕集された。成虫調査を補完するため4地点で行った幼虫の調査では、アカイエカ群およびヒスジシマカが多く採集され、コガタアカイエカは採集されなかった。

現時点での富山県内のWNVと日本脳炎ウイルス(JEV)の浸淫状況を把握するため、蚊におけるウイルス保有状況、カラスおよびコウモリの抗体保有状況を調べた。調査した蚊14,146個体(514プール)からWNVは検出されなかったが、10プールからI型のJEVが分離された。カラスおよびコウモリからはWNVおよびJEVに対する抗体は検出されなかった。蚊のウイルス保有調査と野生動物の抗体調査を統合すると、現時点で県内におけるWNVの浸淫の可能性は少ないと考えられる。

A. 研究目的

ウエストナイルウイルス(WNV)は、多種の蚊が媒介に関わると共に、多種の野鳥が感受性を有することから、さまざまな拡散経路が想定されている。わが国の

都市部にもWNV媒介能を有する蚊が分布するため、WNVの侵入を監視するための蚊類調査が国内各地の地方自治体や検疫所を中心に実施されてきた。しかし、北陸地方の都市部ではこのような

調査がなされたことはなく、都市環境における蚊類の生態や分布についても知見が乏しかった。そこで、2003年から、富山県内の身近な生活環境において、蚊類の生態、分布などの把握を目的とした調査を実施した。今回、2003年から2007年にわたる5年間の蚊の調査成績を報告する。

さらに、現時点でのウイルス浸淫状況を把握するため、県内の蚊が WNV や日本脳炎ウイルス (JEV) を保有しているか確認するとともに、WNV や JEV に対する抗体が検出されることが報告されている、カラスおよびコウモリの抗体保有状況を調査した。

## B. 研究方法

### 1. 蚊の調査

#### (1) 成虫の調査

調査地と調査期間を表 1 に示した。一般住宅 (調査地点 1、2、4~8、11) およびカラスのねぐら周辺 (調査地点 3、9、10) に、週 1 回、CO<sub>2</sub> 供給源 (1kg のドライアイスあるいは CO<sub>2</sub> ボンベ) を吸引式ライトトラップあるいは吸引式トラップと組み合わせて設置し、17~24 時間後に捕獲された昆虫類を回収した。調査地はいずれも富山県内の平野部であった。

一般住宅では庭の地上約 1m の高さにトラップを設置した。ただし、調査地点 1 の A 地点では、地上約 1m に加えてカ

キの樹木上 (地上約 3m) にもトラップを設置した。

カラスのねぐら周辺では、地上約 1m に加え、カラスのねぐらにより近いと考えられる高所にもトラップを設置した。調査地点 3 では、コンクリート建造物 4 階の回廊 (地上約 12m)、および 6 階の回廊 (地上約 20m) にトラップを設置した。調査地点 9 ではスギの樹木上 (地上約 6.5m) に、調査地点 10 では広葉樹の樹木上 (地上約 8m) にトラップを設置した。

多くの調査地点では、トラップ設置地点の周囲に吸血源となりうる動物は飼育されていなかったが、次の 3 地点では吸血源となりうる動物が飼育されていた。すなわち、調査地点 9 では、ニワトリとイヌがトラップから 6m 離れた地表の開放空間で飼育されており、調査地点 10 でも、チンパンジーやフラミンゴなどの各種動物がトラップ付近の地表で飼育されていた。調査地点 7 では 1 頭のイヌがトラップ設置地点のそばで飼育されていたが、2006 年 6 月下旬に死亡し、それ以降は周囲で吸血源となりうる動物が飼育されていなかった。

トラップ回収後、捕獲された昆虫類を冷凍し、蚊類を分別して Tanaka et al. (1979) に従って分類同定を行った。

#### (2) 幼虫の調査

成虫の採集成績を補完するため、調査地点 1、3、7、10 において、6 月から 9 月にかけて幼虫の調査を実施した。小さ

な水溜りでは全水を採取し、大きな水溜りでは柄杓を用いて幼虫をできるだけ多く採集した。採集した幼虫をガム・クロールでプレパラート封入標本とし、分類同定した。

## 2. 蚊のウイルス保有調査

捕集蚊(表 2)を地点・捕集日・種類・雌雄別に分け、原則として最大 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 C6/36 細胞に接種して培養した。同時に、Vero9013 細胞にも遠心上清を接種した。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。さらに培養上清を 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。陽性であった検体については、JEV エンベロープ領域を対象とした RT-PCR、nested PCR、WNV エンベロープ領域を対象とした RT-PCR を行った。

蚊から得られた PCR 産物については、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を解析した。

## 3. カラスおよびコウモリの抗体保有調査

平成 18 年 12 月から平成 20 年 1 月にかけて、都市部で採取したカラス血清 100 検体および、山岳部と平野部で採取したコウモリ血清 20 検体(血清の採取

できなかった死亡個体 1 検体は除く)について、中和試験(WNV:FCG 株、JEV:富山県分離株)により抗体価を測定した。血清は 10 倍希釈し、ウイルスと混合して、37°C1 時間の中和反応ののち、Vero Osaka 細胞に感染させた。37°C1 時間ウイルスを吸着させたのち、培養液を追加し、37°Cで 30~40 時間置いてウイルスを増殖させた。細胞を洗浄・固定後、抗 WNV、JEV 血清を用いた peroxidase-anti-peroxidase 法によってウイルスフォーカスを染色した。ウイルスコントロールと比較して、フォーカス数が 90%以上減少したものを陽性とした。

## C. 研究結果

### 1. 蚊の調査

#### (1) 成虫の調査

5 年間の調査で、6 属 13 種 9850 頭(9649 ♀, 201 ♂)の蚊成虫が捕集された(表 3)。総捕獲個体数は、アカイエカ群がもっとも多く、次いでコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus*、ヒトスジシマカと続いた。これら 3 種で総捕獲個体数の 96.3%を占めた。

地表付近に設置したトラップで捕獲された蚊の種類と総捕獲個体数を図 1 に示した。コガタアカイエカは、周囲に水田が広がる一般住宅(調査地点 1)で特に多く捕集され、都市部(調査地点 2~6)においても少数が捕集された。アカイエカ群は、都市部や海岸付近において多

く捕集された。ヒスジシマカも都市部で多く採集された。捕集されたコガタアカイエカとアカイエカ群の率(コガタアカイエカ/アカイエカ群の値)を調査地点ごとに比較すると、富山市の中心地付近(調査地点 2~6)および沿海域(調査地点 7)では、コガタアカイエカ/アカイエカの値が 0.01~0.17 の間にあり、それら以外の地域ではその値が 0.37 以上(最高は 15.46)であった。

調査地点 7 ではアカイエカ群が非常に多く捕集されていたが、2006 年 6 月下旬にトラップ設置地点のイヌが死亡した後は、捕集されるアカイエカ群の個体数が大幅に減少した(図 2)。なお、イヌが死亡した後に、アカイエカ群以外の蚊の捕集個体数等に明瞭な変化はみられなかった。

カラスのねぐら周辺(調査地点 9、10)でトラップを樹上(地上 6.5m と 8m)に設置したところ、同じ地点で地上 1m に設置したトラップと比較して捕集蚊の種構成に差がみられた(表 4、5)。コガタアカイエカ、ヒスジシマカ、キンパラナガハシカ *Tripteroides bambusa* は、樹上よりも地表付近において有意に多く捕集され、アカイエカ群とハマダライエカ *Culex orientalis* は、地表付近よりも樹上において有意に多く捕集された。

カラスのねぐら周辺(調査地点 3)で、トラップをコンクリート建造物の 4 階(地上 12m)と 6 階(地上 20m)の外壁に設

置したところ、同じ地点で地上 1m に設置したトラップと比較して捕集蚊の種数・個体数とも高度が上がるごとに減少した(表 6)。

## (2) 幼虫の調査

幼虫の調査地点でみられた水域は、雨水枡、排水溝、樹洞などといった小規模なものであり、面積の広い水域を見出すことはできなかった(表 7)。これらの水域で調査を実施した結果、アカイエカ群および(あるいは)ヒスジシマカが多く採集された。コガタアカイエカはまったく採集されなかった。一方、成虫採集では少数が捕獲されたにすぎないトラフカクイカ *Culex halifaxii* が調査地点 10 で、ヤマトヤブカ *Aedes japonicus* が調査地点 1 で比較的多く採集された。

## 2. 蚊のウイルス保有調査

調査した蚊から WNV は検出されなかった。豚舎および牛舎周辺で捕集したコガタアカイエカ 10 プールより JEV が分離検出された(表 8)。分離された JEV は、エンベロープ領域 346bp を比較した遺伝子解析により、いずれも I 型であると考えられた。

## 3. カラスおよびコウモリの抗体保有調査

いずれの検体においても WNV 及び JEV に対する抗体は検出されなかった(表 9、10)。

## D. 考察

5年間の調査を通じて、富山県平野部でCO<sub>2</sub>および灯火に誘引される主要な蚊はアカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカの3種であった。このことから、本県平野部ではこれら3種が重要な疾病媒介蚊となる可能性が高いと考えられた。ただし、トラップによる捕集効率が蚊の種ごとに異なる可能性もあるため、トラップで捕集された個体数にもとづいて、それぞれの種の発生数を比較することはできない。成虫の採集成績を補完するために実施した幼虫採集では、調査地点1と10で、成虫調査ではほとんど捕集されなかったトラフカクイカが比較的多く採集されるなど、成虫とはかなり異なった結果が得られた。このことは、種によってCO<sub>2</sub>や灯火への誘引されやすさが異なっていることを示している。今後の研究によって、トラップによる蚊の種ごとの捕集効率を明らかにしていきたい。

アカイエカ群とヒトスジシマカは、比較的小さな水域において幼虫が発生することから、小さな水域の多い都市部においてこれらの成虫が多く採集されたことと合致する。コガタアカイエカの幼虫は水田のような広い水域で発生することから、水田の多い農村地帯で成虫が多く採集されたことと合致する。しかしながら、すべての幼虫採集地点においてコガタアカイエカの幼虫が採集されなかったのに対して、近隣に幼虫の発生源を欠くと考えられる都市部を含むすべての地点で

コガタアカイエカの成虫が採集された。このことは、コガタアカイエカの成虫が、発生水域を離れて遠方にまで移動することを示唆している。

地表付近と樹上にトラップを設置したところ、アカイエカ群とハマダライエカは、地表付近よりも樹上において有意に多く捕集された。この結果は、蚊類成虫の駆除を行う際、地表付近のみを標的としても十分ではなく、樹上部などをも考慮することが必要であることを示している。さらに、樹上で多く採集されたアカイエカ群は、ヒトと鳥類のどちらも好んで吸血することから、WNVがわが国に侵入した場合は、ウイルスの増幅動物である鳥からヒトへとウイルスを運ぶ可能性がある。高所における蚊類の生態を把握することは、蚊の駆除の面からも重要である。今後は、アカイエカ群が、樹上と地表付近をどのように移動しているのかを探る必要があるだろう。

調査地点7で、トラップ設置地点のイヌが死亡した後に、捕集されるアカイエカ群の個体数が大幅に減少したことは、吸血源となる動物を除去したことによる影響と考えられる。今後、除去実験などにより、愛玩動物の存在と蚊類の捕集数との関係を明らかにしていきたい。

今回の調査で、蚊からWNVは分離されなかった。一方、JEVが分離されたことから、富山県の畜舎周辺では、I型JEVが9～10月頃に流行しており、コガ



タアカイエカと豚(増幅動物)との関係が保たれていることが示唆された。また、カラスのねぐら・空港といった、コガタアカイエカや増幅動物の少ない地点では、蚊から JEV は分離されなかった。この結果は平成 17 年度の調査と同様であった。

カラスとコウモリの抗体調査の結果と蚊のウイルス分離の結果から、富山県内における WNV の浸淫の可能性は少ないと思われる。これまでの調査で、本県の畜舎周辺での JEV の存在は明らかとなっているため、今回、カラスとコウモリに抗 JEV 抗体を持つ個体が発見されなかった理由として、調査地点付近での JEV が少ないことも考えられる。今後、他の地点や他の種類の野生動物についても WNV と JEV の浸淫状況を調査していく必要がある。

本研究の結果を含め、これまでの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 WNV は検出されていないことから、現時点で国内に WNV は侵入していないことが示唆される。しかしながら、流行地から渡り鳥がウイルスを運ぶ、空港や港を介してウイルスを持った蚊が侵入する、といった事態に備え、今後も調査を続けることが重要である。

## E. 結論

5 年間の蚊成虫調査で 6 属 13 種 9850 頭(9649 ♀, 201 ♂)が捕集され、アカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシ

マカの 3 種で総捕獲個体数の 96.3% を占めた。コガタアカイエカは、水田近くの一般住宅で特に多く捕集された。アカイエカ群は都市部や海岸付近において多く捕集された。ヒトスジシマカも都市部で多く採集された。

海岸付近の一般住宅では、イヌが死亡した後に捕集されるアカイエカ群の個体数が大幅に減少した。これは吸血源となる動物が排除された影響と考えられた。トラップを樹上にも設置した地点では、アカイエカ群とハマダライエカが樹上において有意に多く捕集された。これは、蚊類成虫の駆除を行う際、樹上部なども考慮することが重要であることを示している。

幼虫の調査地点では、小規模な水域が多く、アカイエカ群およびヒトスジシマカが多く採集された。コガタアカイエカは採集されなかった。

カラスのねぐら周辺で捕集した成虫蚊に、富山空港および畜舎で捕集した蚊を加えた計 14,146 個体(514 プール)の蚊についてウイルス分離を行った。その結果、WNV は検出されなかったが、10 プールから I 型の JEV が分離された。カラスおよびコウモリからは、WNV および JEV に対する抗体は検出されなかった。蚊のウイルス保有調査と野生動物の抗体調査から、県内における WNV の浸淫の可能性は少ないと考えられる。

## 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

- 1) 小原真弓、渡辺 護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則: 富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況: 平成 18 年度日本獣医師会、さいたま市、2007 年 2 月
- 2) 小原真弓、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則、倉田毅: 富山県内の蚊と豚における日本脳炎ウイルス保有状況(2004 年～2006 年): 第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、白山市、2007 年 5 月
- 3) 山内健生、小原真弓、長谷川澄代、堀元栄詞、岩井雅恵、林美貴子、米田 豊、安藤秀二、堀田 和、城石将幸、出村尚子、松浦涼子、廣瀬 修、渡辺 護: 富山県の平野部における感染症媒介蚊の生息調査(2003～2007 年): 第 62 回日本衛生動物学会西日本支部大会、大津市、2007 年 10 月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

## I. 謝辞

本研究の実施には、下記の方々ならびに機関の協力を賜りました。ここに深く感謝いたします。

蚊の成虫調査にご協力くださったボランティアの方々、高岡厚生センター、国立感染症研究所昆虫医科学部、国立感染症研究所ウイルス第一部第二室、国立感染症研究所獣医科学部今岡浩一先生、富山市環境部環境保全課、丸三製薬株式会社、富山県鳥獣保護センター湯浅純孝先生、富山県厚生部生活衛生課

表 1. 蚊成虫調査の調査地点と調査年.

番号	調査地点		調査年				
	地名*		2003	2004	2005	2006	2007
1	富山市津羽見	(A)	○	◎	◎	○	○
1	同上	(A: 3.5m)	○	○	○	○	○
1	同上	(B)	○	○	○		
1	同上	(C)		○	○	○	○
1	同上	(D)				○	○
2	富山市富岡町			○	○	○	
3	富山市丸の内		○	◎	○	○	○
3	同上	(4F: 12m)	○	○	○	○	
3	同上	(6F: 20m)	○	○	○	○	
4	富山市鹿島町		○	○	○	○	○
5	富山市西田地方町						○
6	富山市呉羽町			○	○	○	○
7	射水市海老江		○	◎	○	○	○
8	射水市太閤山		○	○	○		
9	射水市黒河		○	○	○	○	○
9	同上	(樹上: 6.5m)	○	○	○	○	○
10	高岡市古城公園		○	◎	◎	○	○
10	同上	(樹上: 8m)	○	○	○	○	○
11	南砺市安居			○	○		○

○ : 成虫捕集用トラップを設置.

◎ : 成虫捕集用トラップを設置し、幼虫調査を実施.

\*数字はトラップ設置高度 (特記なきかぎり地上1m).

表 2. ウイルス分離検査に用いた蚊類 (地点別)

採集地		プール数	個体数	
カラスの ねぐら	高岡古城公園	地上8m	23	196
		地上1m	42 (1)	188 (1)
	富山市丸の内	地上1m	29 (5)	41 (5)
		地上6.5m	21	52
	射水市黒河	地上1m	41 (3)	82 (5)
空港	富山空港	北	6	9
		南	15	19
畜舎	豚舎	南砺市	136	6284
		上市町	63 (1)	1991 (1)
		黒部市	11	274
	牛舎	富山市	104	4391
		小矢部市	1	17
	厩舎	婦中町	22	602
合計		514 (10)	14146 (12)	

カッコ内は♂

表 3. 蚊類成虫の採集成績(5年間の合計).

種名	♀	♂	合計
コガタアカイエカ <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	3871	18	3889
アカイエカ群 <i>Culex pipiens complex</i>	4486	33	4519
ハマダライエカ <i>Culex orientalis</i>	39	11	50
カラツイエカ <i>Culex bitaeniorhynchus</i>	5	0	5
フトシマツノフサカ <i>Culex infantulus</i>	18	0	18
トラフカクイカ <i>Culex halifaxii</i>	3	0	3
ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	1125	126	1251
ヤマダシマカ <i>Aedes flavopictus</i>	8	4	12
ヤマトヤブカ <i>Aedes japonicus</i>	37	4	41
キンバラナガハシカ <i>Tripteroides bambusa</i>	39	2	41
フタクロホシチビカ <i>Uranotaenia novobscur.</i>	12	1	13
オオクロヤブカ <i>Armigeres subalbatus</i>	4	0	4
ハマダラカ属の1種 <i>Anopheles sp.</i>	0	2	2
不明	2	0	2
合計	9649	201	9850

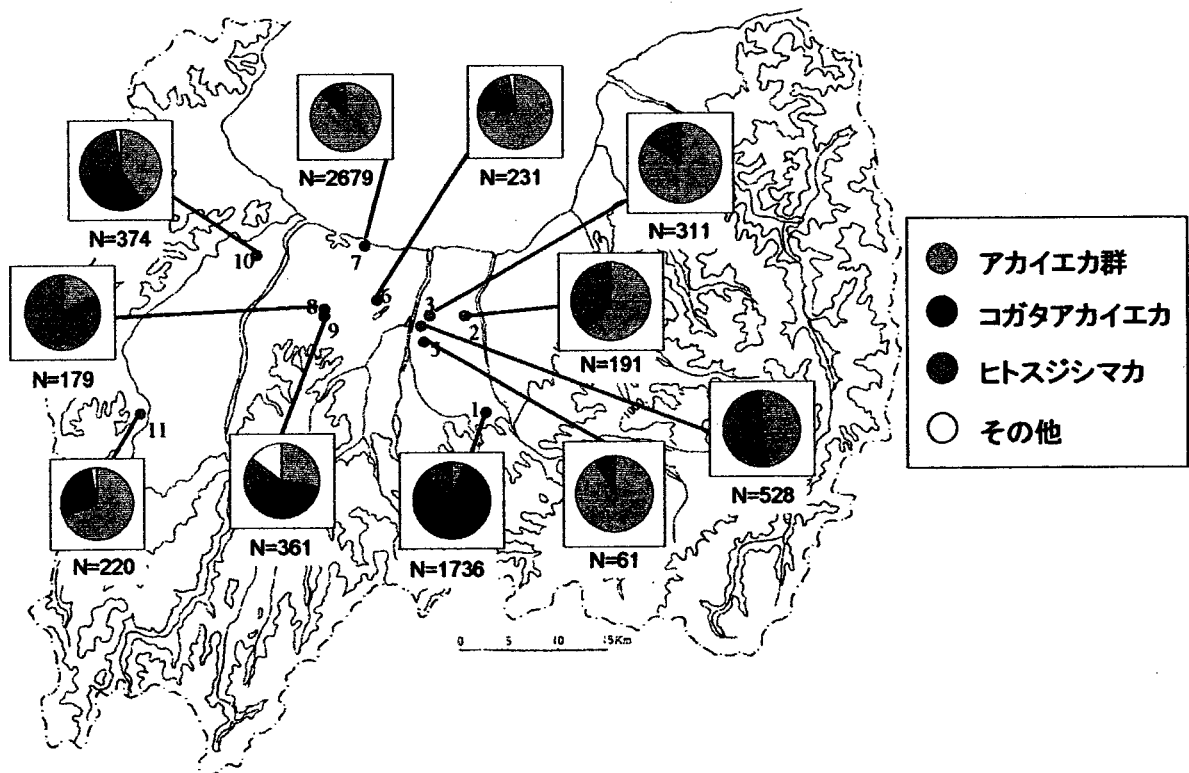


図 1. 地表部における雌成虫採集成績(5年間の合計)

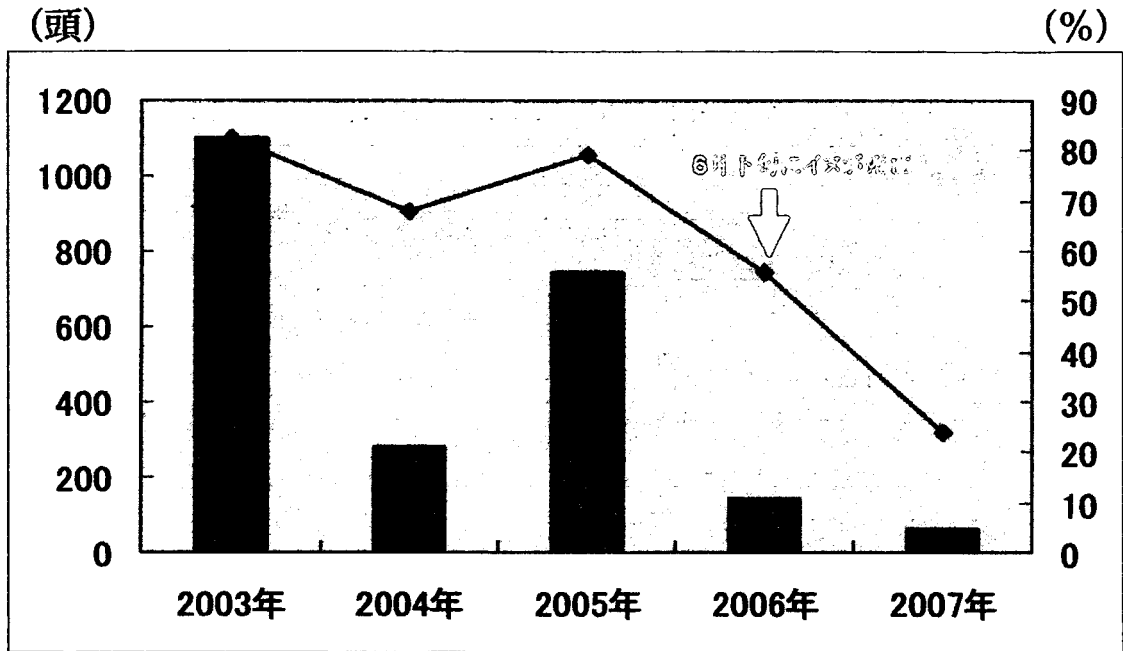


図 2. 調査地点 7 におけるイヌの影響. 棒グラフ: 地点 7 におけるアカイエカ群採集個体数(頭). 折れ線グラフ: 6 つの地点(1, 3, 4, 7, 9, 10)で採集されたアカイエカ群の合計個体数に占める地点 7 の採集個体数(%).

表 4. 地点 9 における蚊類成虫の採集成績(2003~2007 年).

種名	トラップ設置高度		P
	1m	6.5m	
♀ コガタアカイエカ <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	145	29	<0.001
アカイエカ群 <i>Culex pipiens complex</i>	99	158	<0.001
ハマダライエカ <i>Culex orientalis</i>	0	2	
カラツイエカ <i>Culex bitaeniorhynchus</i>	0	1	
フトシマツノフサカ <i>Culex infantulus</i>	0	4	
ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	64	1	<0.001
ヤマダシマカ <i>Aedes flavopictus</i>	1	0	
ヤマトヤブカ <i>Aedes japonicus</i>	8	2	
キンバラナガハシカ <i>Tripteroides bambusa</i>	35	1	<0.001
フタクロホシチビカ <i>Uranotaenia novobscura</i>	7	2	
オオクロヤブカ <i>Armigeres subalbatus</i>	2	0	
♀合計	361	200	
♂ コガタアカイエカ <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	1	0	
ハマダライエカ <i>Culex orientalis</i>	0	2	
ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	8	0	
キンバラナガハシカ <i>Tripteroides bambusa</i>	1	0	
フタクロホシチビカ <i>Uranotaenia novobscura</i>	0	1	
ハマダラカ属の1種 <i>Anopheles sp.</i>	0	1	
♂合計	10	4	
合計	371	204	

表 5. 地点 10 における蚊類成虫の採集成績(2003~2007 年).

種名	トラップ設置高度		P
	1m	8m	
♀ コガタアカイエカ <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	119	31	<0.001
アカイエカ群 <i>Culex pipiens complex</i>	151	447	<0.001
ハマダライエカ <i>Culex orientalis</i>	2	25	<0.001
カラツイエカ <i>Culex bitaeniorhynchus</i>	1	1	
フトシマツノフサカ <i>Culex infantulus</i>	1	2	
トラフカクイカ <i>Culex halifaxii</i>	0	3	
ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	95	2	<0.001
ヤマダシマカ <i>Aedes flavopictus</i>	1	0	
ヤマトヤブカ <i>Aedes japonicus</i>	3	1	
不明	1	0	
♀合計	374	512	
♂ アカイエカ群 <i>Culex pipiens complex</i>	2	1	
ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	19	0	
ハマダラカ属の1種 <i>Anopheles sp.</i>	0	1	
♂合計	21	2	
合計	395	514	

表 6. 地点 3 における蚊類成虫の採集成績(2003~2006 年).

種名	トラップ設置高度			P
	1m	12m	20m	
♀ コガタアカイエカ <i>Culex tritaeniorhynchus</i>	12	0	0	
アカイエカ群 <i>Culex pipiens complex</i>	261	20	8	<0.001
フトシマツノフサカ <i>Culex infantulus</i>	2	0	0	
ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	35	0	0	
フタクロホシチビカ <i>Uranotaenia novobscura</i>	1	0	1	
不明	0	1	0	
♀合計	311	21	9	
♂ アカイエカ群 <i>Culex pipiens complex</i>	9	0	0	
ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	6	0	0	
♂合計	15	0	0	
合計	326	21	9	

表 7. トラップ設置地点における幼虫調査(2004~2005 年)

番号	調査地点	種名	個体数	水域
1	富山市津羽見	アカイエカ群 <i>Culex pipiens</i> complex	114	人口容器、雨水枡、小池
		トラフカウイカ <i>Culex halifaxii</i>	4	人口容器、雨水枡
		ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	210	人口容器、雨水枡
		ヤマトヤブカ <i>Aedes japonicus</i>	21	人口容器
3	富山市立図書館	アカイエカ群 <i>Culex pipiens</i> complex	20	雨水升、ポール穴
		ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	2	雨水升
7	射水市海老江	アカイエカ群 <i>Culex pipiens</i> complex	14	雨水升、排水溝
10	高岡市立動物園	アカイエカ群 <i>Culex pipiens</i> complex	361	人口容器、雨水升、溝
		トラフカウイカ <i>Culex halifaxii</i>	49	人口容器、雨水枡
		ヒトスジシマカ <i>Aedes albopictus</i>	805	人口容器、樹洞、雨水升
		ヤマダシマカ <i>Aedes flavopictus</i>	1	樹洞
		ヤマトヤブカ <i>Aedes japonicus</i>	9	樹洞、雨水枡

表 8. 日本脳炎ウイルスが分離された検体(蚊)

番号	種名	雌雄	数	定点名	捕集日	細胞変性	
						Vero9013	C6/36
2347	コガタアカイエカ	♀	50	富山市牛舎	2007/9/5	—	+
2441	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/9/18	—	+
2462	コガタアカイエカ	♀	50	富山市牛舎	2007/9/19	—	+
2506	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/9/25	—	+
2507	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/9/25	—	+
2513	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/9/25	+	+
2554	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/10/1	+	+
2556	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/10/1	+	+
2567	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/10/1	—	+
2569	コガタアカイエカ	♀	50	南砺市豚舎	2007/10/1	+	+

表 9. 野生カラスの抗体調査(平成 18～19 年度)

採血日	種類	調査数	中和試験
			WN,JE
2006/12/8	ハシブトorハシボソ	6	-
2006/12/12	ハシブトorハシボソ	4	-
2006/12/19	ハシブトorハシボソ	11	-
2006/12/22	ハシボソ	10	-
2006/12/26	ハシブト	5	-
2006/12/26	ハシボソ	14	-
2007/1/9	ハシブト	7	-
2007/1/9	ハシボソ	3	-
2007/10/9	ハシボソ	7	-
2007/10/9	ハシブト	3	-
2007/11/13	ハシブト	6	-
2007/11/13	ハシボソ	4	-
2007/12/11	ハシブト	5	-
2007/12/11	ハシボソ	5	-
2008/1/8	ハシブト	6	-
2008/1/8	ハシボソ	4	-
計		100	

NT:検査せず

表 10. 野生コウモリの抗体調査(平成 19 年度)

番号	調査日		捕獲地	種類	性別	備考	中和試験
	捕獲	採血					WN,JE
1	2007/7/29	2007/7/30	富山市山岳部	キクガシラ	♀		-
2	2007/7/29	2007/7/30	富山市山岳部	キクガシラ	♂		-
3	2007/8/7	2007/8/8	富山市山岳部	キクガシラ	♀		-
4	2007/8/7	2007/8/8	富山市山岳部	キクガシラ	♀	死亡	-
5	2007/8/7	2007/8/8	富山市山岳部	キクガシラ	♂	死亡、血清なし	NT
6	2007/8/7	2007/8/8	富山市山岳部	キクガシラ	♀		-
7	2007/8/7	2007/8/8	富山市山岳部	ホオヒゲ	♂		-
8	2007/8/7	2007/8/8	富山市山岳部	ホオヒゲ	♀		-
9	2007/8/13	2007/8/14	富山市山岳部	カグヤ	♂		-
10	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-
11	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-
12	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-
13	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-
14	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-
15	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-
16	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♀		-
17	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♀		-
18	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♀		-
19	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♀		-
20	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-
21	2007/11/7	2007/11/8	富山市平野部	アブラ	♂		-

NT:検査せず



厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告

ウエストナイルウイルス媒介蚊アカイエカ種群の越冬に関する生理学的研究

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 澤邊 京子 (同・昆虫医科学部 室長)

森林 敦子 (同・客員研究員)

津田 良夫 (同・昆虫医科学部 室長)

葛西 真治 (同・昆虫医科学部 主任研究官)

伊澤 晴彦 (同・昆虫医科学部 主任研究官)

林 利彦 (同・昆虫医科学部 主任研究官)

金 京純 (同・研究生)

**研究要旨:** 2005年2月上旬、埼玉県K市の用水路内に見出したアカイエカ越冬個体の脂肪酸分析を行い、シス型パルミトオレイン酸(C16:1)含量が全体の50%近くを占めていることを明らかにした。次いで、感染研敷地内で周年実施している捕集調査から、2007年に捕集されたアカイエカ種群蚊の脂質含量および脂肪酸組成を調べたところ、アカイエカの脂質含量は5月上旬から下旬にかけて徐々に低下したが9~10月と再び増加し、その増減に伴いパルミトオレイン酸含量も変動することが判明した。アカイエカは、低温・短日の環境変化に向けてパルミトオレイン酸含量を増加させることが推察された。室内実験において、種々の温度・日長条件下でのアカイエカおよびチカイエカの成虫の生存日数を比較したところ、すべての飼育条件においてアカイエカはチカイエカよりも長命であった(雌 1.4~1.9倍、雄 2.6~8倍)。この寿命の違いを脂質含量および脂肪酸組成から検討した結果、アカイエカでは低温(10℃)条件下で羽化20日目以降シス型パルミトオレイン酸の占める割合が全体の50%以上になり、体重に占める脂質含量が2倍以上に増加することが分かった。一方、チカイエカでは、羽化時のパルミトオレイン酸含量20%はその後ほとんど変動せず、脂質含量の増加も見られなかった。

パルミトオレイン酸は融点が $-0.5^{\circ}\text{C}$ ~ $+0.5^{\circ}\text{C}$ (昆虫のリン脂質中では $-40^{\circ}\text{C}$ ~ $+40^{\circ}\text{C}$ )の凍結し難い脂肪酸である。アカイエカは低温下でもパルミトオレイン酸量を増加することができることで低温下での生存を有利にし、越冬を可能にしていると推察された。

## A. 研究目的

2000年冬、ニューヨーク市で採集されたトビイロイエカ越冬個体からウエストナイルウイルス(WNV)が検出・分離され、蚊の体内でWNVが越冬する事実が明らかになった(Nasci et al. 2001)。我国には、トビイロイエカの近縁種であるアカイエカ種群(本研究ではアカイエカとチカイエカに注目した)が都市部を中心に全国的に広く生息しており、それらのWNV媒介能も示唆され(江下ら, 2004)、国内にWNVが侵入した場合はそれらが主要な媒介種となることが予想される。また、アカイエカ種群蚊はWNV以外にも日本脳炎ウイルス(JEV)の宿主になり得ること(Weng et al., 2000, Turell et al., 2006)、近年イエカ属蚊から分離された新規昆虫フラビウイルス(*Culex* フラビウイルス)に不顕性様に感染していること(Hoshino & Isawa et al., 2007)などもしられている。これらフラビウイルスの伝播様式を考える上で、主要な宿主となるアカイエカ種群蚊の越冬生理を詳細に検討する必要があると考えた。

本研究で注目したアカイエカ種群の越冬に関する研究は、1970年代までは、JEVの主要な媒介蚊であるコガタアカイエカに対してと同様に活発に行われ、アカイエカ越冬個体の観察、栄養生殖分離を誘起する臨界日長の検討(長崎産で約12.5時間)(Oda & Wada, 1977)や、その誘導に幼若ホルモン(JH)の関与が示唆される(野口&大滝, 1973)など、多くの成果がもたらされた。しかし、日本脳炎患者数の激減とともにコガタアカイエカ同様、1980年代以降新しい知見はほとんど得られていない。この間、地球温暖化の影響などで蚊の分布域が拡大した可能性(Kobayashi et al., 2002)が報じられるなど、

媒介蚊を取り巻く環境は著しく変化し、媒介蚊に関する最新の情報が必要とされている。そこで本研究では、本蚊における越冬生理を詳細にして従来のアカイエカの越冬に関する情報を再評価するとともに、実験室内で越冬・栄養生殖分離を誘導・覚醒させることを目標とした。最終的には各種フラビウイルスのアカイエカへの感染実験を実施し、ウイルスの宿主蚊体内での越冬の可能性に言及したい。

我々は、2005年2月上旬、埼玉県春日部市の用水路内に越冬蚊を見出し、遺伝子マーカーを用いた判定法(ACE2-assay: Kasai et al., 2008, ITS1-assay: Sawabe et al., 2008)により、それらがすべてアカイエカ(コガタアカイエカ1頭を含む)であることを確認した。そこで、それら越冬個体の脂質含量ならびに脂肪酸分析を行うとともに、2007年感染研敷地内で周年実施している捕集調査で得られたアカイエカ種群蚊についても同様の分析を行い、野外において捕集される蚊の脂質含量および脂肪酸組成の季節変動を調べた。次いで、室内実験において、種々の温度・日長条件下でのアカイエカおよびチカイエカ成虫の生存日数(寿命)を比較し、脂肪酸合成系の働きが低温、短日条件下における寿命に及ぼす影響を考察した。本研究では、これらの結果から、わが国におけるアカイエカ種群蚊の冬季、低温下における生理機能を明らかにした。

## B. 研究方法

### 1. アカイエカ種群蚊の捕集

2005年2月9日、埼玉県春日部市の2箇所の用水路内で越冬蚊を観察し、吸虫

管を用いて用水路 A で 163 頭、用水路 B で 51 頭を捕集した(小林ら, 2005)。感染研 敷地内においては、ドライアイスと CDC 型 サクシントラップを組み合わせたトラップによる 定点捕集調査を周年実施しており(津田 ら, 2006)、2007 年 3~11 月に得られたアカ イエカ種群蚊を実験に供した。

それらの野外捕集蚊は 2 種類の遺伝子マ ーカーを用いた PCR 法(ACE2-assay)(18 年度本 研究報告書, Kasai et al., 2008)、PCR および 遺伝子解析法(ITS1-assay)(Sawabe et al., 2008) によって、アカイエカとチカイエカに判別した。

## 2. 室内実験における日長・温度の設定

室内実験に用いた蚊は、25°C16L:8D の 高温・長日条件で飼育されたアカイエカ(林 試系統)およびチカイエカ(渋谷 black 系統) である。羽化後 24 時間以内の雌雄 50 頭ず つを、蒸留水を含ませた脱脂綿を挿したフ ラスコと角砂糖 2 個の入った 20×20×30cm の ケージ内に放し、各温度・日長条件下で死 亡するまで飼育した。その間 1~2 日毎に生 存個体数を記録した。飼育条件は、 25°C16L:8D、20°C11L:13D、15°C11L:13D、 10°C11L:14D の 4 種類に設定した。各条件 下で 5, 10, 20, 30, 50 日間飼育した雌成虫 10 頭ずつを脂質分析に供した。

## 3. 脂質分析

脂質量は、Bligh & Dyer 法(1959)にて測 定し、乾燥重量当たりの脂質量を脂質含量 (%)とした。抽出した粗脂肪は、5%塩酸メタ ノールを用いて 110°C で 1 時間加熱して脂 肪酸のメチル化を行った後、ガスマスマトグ ラフィー(GC-MS, JMS-SX102A, JEOL)お

よびガスクロマトグラフィー(GC, Shimadzu GC6A)(Moribayashi et al., 1996)によって 脂肪酸種の同定ならびに定量を行った。

## C. 結果

### 1. 野外捕集蚊における脂質分析

2007 年、感染研トラップに捕集されたアカ イエカ種群蚊は、3 月 27 日から捕集され始 め、7 月 3 日と 10 日に 100 頭を越す大きな ピークがあり、次いで 24 日にも 63 頭の 2 つ 目のピークが認められた(図 1)。ACE2-assay ならびに ITS1-assay によってア カイエカとチカイエカに判別したところ、7~8 月の夏季に捕集された集団はほとんどがア カイエカであった。それ以外の時期、3~6 月、9~11 月では、ほぼ同率かむしろチカイ エカの割合が多い傾向にあった。

春日部市用水路で採集された越冬アカイ エカの脂質含量は 26.2%であり(図 2a)、シ ス型パルミトオレイン酸(C16:1)含量が全体 の 50%近くを占めて顕著に多く、次いで、オ レイン酸(C18:1)、パルミチン酸(C16:0)の 順に多く含まれていた(図 2b)。一方、越冬 前後の時期のアカイエカでは、脂質含量は 5 月上旬から下旬にかけて徐々に低下した が、9~10 月と再び増加し(図 2a)、結果は 省略するが、その増減に伴いパルミトオレイ ン酸含量も変動することも明らかになった。

### 2. 異なる温度・日長条件下における寿命と 脂質に関する室内実験

アカイエカは、いずれの飼育条件下にお いてチカイエカよりも長命であった(雌 1.4~ 1.9 倍、雄 2.6~8 倍)。一番長寿であった条 件は、アカイエカで 15°C11L:13D であり、メ スの平均寿命は 81 日、最長 209 日間生存し

た。チカイエカにおいては、20℃11L:13Dで平均寿命44日、最長生存日数は89日であった。両者間でもっとも寿命の差が表れたのは低温・短日(10℃10L:14D)条件下であった(アカイエカ雌:最長237日、チカイエカ雌:最長146日)(表3)。

この低温下における寿命の違いを脂質含量および脂肪酸組成から検討した(図4)。アカイエカの体重に占める脂質含量は羽化後徐々に増加し、羽化30日目以降は約2倍の26.9%まで上昇した。この値は越冬蚊に含まれていた割合とほぼ同じ値である。一方、チカイエカではそのような増加は認められず、羽化後減少する傾向にあった。また、脂肪酸組成の分析から、シス型パルミトオレイン酸のみ羽化後増加し、20-30日後には全体の50%以上を占めるまでになった(図5)。一方、チカイエカでは、羽化時に20%であったパルミトオレイン酸量は低温下でほとんど変動せず一定であり、アカイエカにみられたような特異的な脂質含量の増加は認められなかった(図5)。

#### D. 考察

用水路内で越冬中のアカイエカの脂質含量およびパルミトオレイン酸含量は、いずれも夏季の個体(感染研トラップに捕集)に比べ顕著に高かった。本結果は、アカイエカが秋から冬に向かう、低温・短日の環境変化に伴いパルミトオレイン酸含量を増加させ、そのことによって越冬に適した生理状態を作り出していることが示唆された。低温・短日条件下で見られたアカイエカの寿命の長さも、脂質含量ならびにシス型パルミトオレイン酸含量の多さに起因すること示唆しており、この脂肪酸合成系が働くことによって低温下

での生存が可能になると推察された。

昆虫の脂肪酸合成系は哺乳類とほぼ同じであり、すなわち、炭素数18、不飽和度1(C18:1)のオレイン酸までは昆虫体内で合成できるとされる。昆虫が低温下での生存を有利にするためには、オレイン酸よりもより流動性の高い脂肪酸(例えば、パルミトオレイン酸C16:1など)に作り変える必要がある。本研究で判明した越冬蚊で増加するパルミトオレイン酸は、融点が-0.5℃~+0.5℃の凍結しにくい脂肪酸であり、特に昆虫類に含まれるリン脂質中では-40℃~+40℃で生体膜の機能を維持できる、非常に耐低温性に優れた脂肪酸である。近年、冬季に活動期を迎えるオオクロバエ、ケブカクロでもこの脂肪酸が特異的に増加することが確認され(森林ら, 2003)、アカイエカにおいても、低温下でこの生体維持システムが機能していることが明らかになった。

一方、チカイエカにおいては、野外捕集蚊、飼育室内のいずれの結果もアカイエカとは大きく異なり、成虫での脂質量もパルミトオレイン酸量も増加しなかった。しかし、高温・長日(25℃16L:8D)下に同じ栄養条件で飼育された個体の、幼虫期、蛹期における脂質含量(中性脂肪量に換算)に大きな差異はない(Sawabe & Moribayashi, 2000)。本実験では、蛹期までを高温・長日下で飼育した成虫を羽化後から異なる条件下に移した。従って、アカイエカは、成虫期に入ってから急激な温度の低下にも耐えられることが示唆されるのに対し、一方、チカイエカでは、そのような適応性はなく、低すぎる低温環境下にあっては死滅してしまうことが想像される。アカイエカは、夏後半のまだ長日下にある時期に羽化した成虫が、そのまま冬を