

然として終息の兆しは見えない。そこで我々は、日本国内で日本脳炎あるいはウエストナイル脳炎が疑われた急性脳炎症例について、ウエストナイルウイルス感染の除外診断を実施し、わが国へのウエストナイルウイルスの侵入の有無を確認してきた。

B. 研究方法

日本国内で日本脳炎あるいはウエストナイル脳炎が疑われた急性脳炎症例について、急性期の検体が得られないことが多いため、主として、血清学的に鑑別診断を実施した。病初期の検体がある場合は、病原体診断（遺伝子診断）を実施した。日本脳炎ウイルスに関して、IgM 捕捉 ELISA 法 (in house)、IgG ELISA 法 (in house) および Beijing1 株を用いたフォーカス減少法により中和抗体価を測定した。ウエストナイルウイルスに関しては NY99-6922 株を用いたフォーカス減少法を用いた。ウエストナイルウイルス IgM 捕捉 ELISA、IgG ELISA は米国 Focus 社のキットを使用した。

C. 研究結果

2005 年は、ウエストナイル熱・脳炎を疑った検査依頼が 13 件、日本脳炎の検査依頼が 12 件の計 25 件があった。そのうち、日本脳炎が 5 例、ウエストナイル熱が 2 件であった。ウエストナイル熱はどちらも米国ロサンゼルスで感染した輸入症例で、中枢神経系の症状はなかった。どちらも血清学的診断により確定した。2006 年は、ウエストナイル熱・脳炎症例はなく、日本脳炎が 4 例であった。2007 年もウエストナイル熱・脳炎症例はなく、日本脳炎が 6 例であった。2006 年の日本脳炎症例のなかの 1 例は、発病後 7

ヶ月に渡って経時的に抗体価を測定した。急性期の検体（血清、髄液）は得られなかった。最初の血清は、発病後 21 日めであった。この血清中の IgM 抗体は、日本脳炎ウイルス (JEV) に対して Index20 以上、ウエストナイルウイルス (WNV) に対しては Index=3.04 とどちらも陽性であったが、日本脳炎に有意に高かった。また、中和抗体は、日本脳炎に対して 2560 倍（陽性）、ウエストナイルウイルスに対して 80 倍（陽性）であった。IgM 抗体は、発病後 4 ヶ月では陰性となったが、抗 WNV 中和抗体は 4 ヶ月目まで 80 倍を維持し、5 ヶ月目に 40 倍に低下したが、7 ヶ月後でも 40 倍を維持した。一方抗 JEV 中和抗体は、7 ヶ月後も 2560 倍を維持した。また、IgG 抗体に関しては、発病後 21 日目、28 日目の時点で抗 JEV IgG 抗体は陽性であったが、抗 WNV IgG 抗体は陰性であった。その後、抗 JEV IgG 抗体はさらに上昇し、抗 WNV IgG 抗体も陽性となった。しかし、抗 WNV IgG 抗体は、84 日目をピークに減少傾向を示した。抗 JEV IgG 抗体は 7 ヶ月後まで上昇傾向を示した。

D. 考察

2005 年は 25 症例中 5 例が日本脳炎、2 例がウエストナイル熱であった。2006 年は 10 症例を検査し、4 例が日本脳炎でウエストナイル脳炎は無かった、2007 年は 13 症例を検査し、日本脳炎が 6 症例でウエストナイル脳炎は無かった。いずれの症例も日本脳炎とウエストナイル熱・脳炎の血清学的鑑別診断は容易であった。発病後 7 ヶ月間にわたり血清を得られた日本脳炎症例では、WNV に対する交叉抗体は、中和抗体および IgM 抗体に関しては、4 ない

し5ヶ月以後低下あるいは陰性化したことから、発病早期に血清学的鑑別診断が困難であった場合も、発病後5ヶ月以降の血清により、確認検査を実施することで鑑別が可能であることが示唆された。また、IgG抗体は、発病後21日目、28日目の時点で抗JEV IgG抗体は陽性であったが、抗WNV IgG抗体は陰性であったことから、JEVとWNV間において交叉反応の強いIgG ELISAも鑑別診断に有用である場合があり、実施すべき検査であると考えられる。米国における2007年の患者数は3598人、カナダの患者数は2353人であり、依然として終息の兆しは見えない状況であり、今後も日本脳炎患者あるいは日本脳炎を疑われる患者において、ウエストナイル脳炎は、依然として重要な鑑別疾患であり、今後も除外診断が必要である。

E. 結論

過去3年間に、日本脳炎患者15症例、ウエストナイル熱患者2例について鑑別診断を実施したが、IgM捕捉ELISAおよび中和試験を実施することで、鑑別診断が可能であった。日本脳炎患者の1例は発病後、7ヶ月後まで検体(血清)を得ることができた。日本脳炎に対して非常に高い抗体を示し続けたにもかかわらず、ウエストナイルウイルスに対しては、発病4ヶ月後から低下を認めた。今後も日本脳炎患者あるいは日本脳炎を疑われる患者において、ウエストナイル脳炎は、依然として重要な鑑別疾患であり、今後も除外診断が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Kurane, I. Vero cell-derived inactivated West Nile (WN) vaccine induces protective immunity against lethal WN virus infection in mice and shows a facilitated neutralizing antibody response in mice previously immunized with Japanese encephalitis vaccine. *Virology* 2008 Jan 21; [Epub ahead of print]

小泉加奈子, 中島由紀子, 松崎真和, 小井戸則彦, 大曾根康夫, 林昌宏, 高崎智彦, 倉根一郎, 秋月哲史. 本邦で初めて確認されたウエストナイル熱の輸入症例. *感染症学雑誌* 80(1):56-57 (2006)

Hamano, M., Lim, C.K., Takagi, H., Sawabe, K., Kuwayama, M., Kishi, N., Kurane, I., Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection*, 12, 1-4, 2007

Nerome, R., Tajima, S., Takasaki, T., Yoshida, T., Kotaki, A., Lim, C.K., Ito, M., Sugiyama, A., Yamauchi, A., Yano, T., Kameyama, T., Morishita, I., Kuwayama, M., Ogawa, T., Sahara, K., Ikegaya, A., Kanda, M., Hosoya, Y., Itokazu, K., Onishi, H., Chiya, S., Yoshida, Y., Tabei, Y., Katsuki, K., Tabata, K., Harada, S.,

Kurane, I. **Molecular epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Japan from 2002 to 2004.** *J. Gen. Virol.*, 2007. 88(Pt 10):2762-8.

Fumiue Harada, Chang Kweng Lim, Mikako Ito, Hiroataka Takagi, Akira Kotaki, Reiko Nerome, Shigeru Tajima, Ichiro Kurane, Tomohiko Takasaki
Cross Neutralizing Antibodies to West Nile Virus in Japanese Dengue Fever Patients in Japan. *J. Virol. Method.* (in submission).

2. 学会発表

[海外]

Lim, C.K., Takasaki, T., Kotaki, A., Ishikawa, T., Kurane, I. **Mouse Antibody Response to novel Vero-Cell-derived Inactivated Human West Nile Vaccine for Immunization against West Nile virus.** 第 41 回日米医学ウイルス性疾患専門部会 2007 年 7 月

Moi, M.L., Lim, C.K., Takasaki, T., Kurane, I. **Role of Fc-gamma II receptor in antibody dependant enhancement of dengue viral infection.** 第 3 回デングウイルス研究ネットワーク会議 2007 年 8 月

[国内]

貫井陽子、田島 茂、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：**日本脳炎ウイルス Genotype shift の生物学的意義**、第 81 回日本感染症学会 2007 年 4 月

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、宇田川晴英、向田嘉宏、小西英二：**ブタ流産予防を目的とした日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合投与方法及び針無投与方法の併用効果**、第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2007 年 5 月

高崎智彦、林 昌宏、小滝 徹、水野泰孝、加藤康幸、工藤宏一郎、渡邊香奈子、倉根一郎：**チクングニヤ熱輸入 2 症例と実験室診断法**、第 42 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 2007 年 5 月

貫井陽子、田島 茂、根路銘令子、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：**日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定**、第 12 回日本神経感染症学会 2007 年 10 月

モイ メンリン、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：**デング出血熱における Fc γ IIA (CD32) 受容体を介した抗体依存性感染増強 (ADE) メカニズムの解析**、第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月

貫井陽子、田島 茂、根路銘令子、林 昌宏、高崎智彦、倉根一郎：**日本脳炎ウイルスの病原性を規定するウイルス因子の同定**、第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月

井本淳一、石川知弘、山中敦史、小西美佐子、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、小西英二：**ブタにおける日本脳炎 DNA/蛋白ワクチン混合針無投与方法の有用性評価**、第 55 回日本ウイルス学会 2007 年 10 月

林 昌宏、高崎智彦、小滝 徹、モイメンリン、伊藤美佳子、倉根一郎：チクングニヤ熱輸入症例患者血清より日本で初めて分離されたチクングニヤウイルスの性状解析、第55回日本ウイルス学会 2007年10月

濱野正敬、林 昌宏、高木弘隆、澤邊京子、桑山 勝、岸 昇、高崎智彦、倉根一郎。広島県内の野生イノシシにおける日本脳炎ウイルスに対する抗体保有状況。第141回日本獣医学会学術集会（つくば市）2006/3/18-20

原田文植、高崎智彦、高木弘隆、林 昌宏、伊藤美佳子、倉根一郎：日本人デング熱患者における抗ウエストナイルウイルス交差中和抗体に関する検討、第80回日本感染症学会2006年4月

高崎智彦、小滝 徹、根路銘令子、林 昌宏、伊藤美佳子、田島 茂、倉根一郎：本邦原因不

明脳炎・無菌性髄膜炎における日本脳炎ウイルス関与に関する回顧的調査、第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会2006年5月

林 昌宏、高崎 智彦、根路銘令子、伊藤美佳子、田島 茂、森田公一、石川豊教、倉根一郎：日本脳炎ウイルス中和抗体保有マウスのウエストナイル不活化ワクチンによる免疫応答の検討、第54回日本ウイルス学会2006年11月

井本淳一、石川知弘、村上賢二、林 昌宏、濱野正敬、高崎智彦、倉根一郎、小西英二：ブタにおける日本脳炎DNAワクチンおよびタンパクワクチンの混合投与による中和抗体の誘導、第54回日本ウイルス学会 2006年11月

厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

総合研究報告書

1. 野外捕集蚊からのウエストナイルウイルスおよび昆虫フラビウイルスの検出
 - 1) 日本国内における蚊からのウエストナイルウイルス検出法の検討(平成 17 年度)
 - 2) 2003～2006 年国内における蚊からのウエストナイルウイルス検出成績(平成 18 年度)
 - 3) 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(平成 19 年度)
2. ウエストナイルウイルス媒介蚊アカイエカ種群蚊における生理・生態学的基礎研究
 - 1) アカイエカ種群の個眼数の変異(平成 17 年度)
 - 2) 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(平成 18 年度)
 - 3) 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(平成 18 年度)
 - 4) 国内産アカイエカ種群の越冬に関する生理学的研究(平成 19 年度)

分担研究者:小林 陸生(国立感染症研究所・昆虫医科学部 部長)

協力研究者:澤邊京子、津田良夫、星野啓太、伊澤晴彦、佐々木年則、葛西真治、駒形修、富田隆史、林利彦、金京純、森林敦子(国立感染症研究所・昆虫医科学部)、小滝徹、高崎智彦(国立感染症研究所・ウイルス第一部)、比嘉由紀子(長崎大学)、中口梓(国立がんセンター研究所)、片野理恵(麻布大学)

研究要旨:

1. 蚊からのウエストナイルウイルス(WNV)の検出法として、VecTest、RT-PCR 法、TaqMan 法について、その経済性、検出限界ウイルス力価、迅速性、および煩雑性などを比較検討し、本ウイルスの侵入が確認されていない我国においては、蚊乳剤をまず Vero あるいは BHK 細胞接種後少なくとも 2 代盲継代した後に C6/36 細胞接種系に移し、RT-PCR 法あるいは TaqMan (RT-PCR) 法でウイルス遺伝子を検出する方法が推奨された。その方法に従って 2003～2006 年の 4 年間で 11 属 50 種、合計 24,407 頭の蚊を捕集し、作成した 1,431 プールからウイルス分離および遺伝子検出を行った。これまでのすべての検体から WNV は検出されず、本ウイルスの日本国内への侵入は未だ見られないと結論された。また、WNV 検出過程でヤブカ属蚊 3 種から新規フラビウイルスを見出し、*Aedes flavivirus* (AEFV) と命名した。そのウイルスゲノムの配列情報から、本ウイルスは昆虫特異的なフラビウイルスであり、国内産アカイエカから分離された *Culex flavivirus* (CXFV) とは異なる系統のものであることが明らかになった。

2. 雌成虫の外部形態では分類が困難であるアカイエカとチカイエカを判別するために、成虫の個眼数による同定法を再検討した。飼育系統を用いた限りでは複眼の 5 あるいは 6 列目の個眼数が 8 個の個体をチカイエカ、9 個をアカイエカと判定してもよいと思われた。しか

し、個眼数は幼虫発育時の気温に依存して変動し、さらに、地理的変異も存在した。個眼数によって判別された野外捕集のアカイエカとチカイエカの平均寿命を比較したところ、アカイエカの平均寿命(36-37日)はチカイエカ(17-22日)よりも有意に長く、これらの結果から、アカイエカの疾病媒介能はチカイエカよりも高いと評価された。次いで、アセチルコリンエステラーゼ(ACE)上に見出される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をそれぞれ作成し、それらを一度のPCRで判定するマルチプレックスPCR法を確立した(ACE2-assay)。本法は成虫の脚1本、および卵舟由来のテンプレートを用いても目的領域が増幅できる非常に感度に優れる方法である。ACE2-assayによって野外捕集蚊をアカイエカとチカイエカに判別し、それぞれの脂質および脂肪酸含量を比較した。アカイエカ越冬成虫は脂質(26%)およびシス型パルミトオレイン酸(C16:1)(50%以上)を多く含み、アカイエカは、低温・短日の冬季への環境変化に向けてパルミトオレイン酸量を増加させることが示唆された。また、この傾向は低温・短日条件下で飼育されたアカイエカにも見られたことから、低温下でもパルミトオレイン酸量を増加させることができるアカイエカは低温下での生存が有利になり、越冬を可能にしていると推察された。

A. 研究目的

1. 野外捕集蚊からのウエストナイルウイルスおよび昆虫フラビウイルスの検出

1999年ニューヨーク市に始まった北米大陸でのウエストナイル(WN)熱の流行は、2008年3月現在で、アラスカとハワイ州を除く米国のすべての州に拡大し、62種類以上の蚊からウイルスが検出されている(CDC, 2007)。わが国においては、米国から帰国後に日本国内でWN熱を発症した事例が2005年に報告されたが(小泉ら, 2006)、現在までのところ感染蚊の検出には至っていない。WN熱の小規模な流行は、北米大陸のみならず、ヨーロッパ諸国、ロシア、極東地域においても散発的に起こっていることから(Dauphin et al., 2004)、わが国へのWNVの侵入は、NY99株に代表される強毒タイプの北米大陸からのみならず、それ以外の地域からの異なったタイプのウイルスの侵入に対しても注意する必要がある。従って、わが国におけるWNVの検出は、様々な変異株にも広く対応でき、かつ、

迅速で精度の高い、蚊からの検出法の確立が求められる。そこで我々は、国内における蚊からの効果的な検出法を検討し提案するとともに、2003~2006年の4年間の国内捕集蚊からWNVの分離と検出を行った。

WNV検出の過程で、蚊に対してのみ宿主特異性を有する昆虫フラビウイルスに分類される*Culex flavivirus*(CXFV)がアカイエカから分離された(Hoshino & Isawa et al., 2007)。昆虫フラビウイルスは、現在までにアフリカとプエルトリコ産ヤブカ属蚊からそれぞれCell fusing agent(CFA)(Stollar & Thomas, 1975)とKamiti river virus(KRV)(Sang et al., 2003, Crabtree et al., 2003)の2種類が分離されており、WNV媒介能を有する蚊種に存在する同属ウイルスの性状を把握することは、WNVを含むフラビウイルスの検出・分離などの検査作業の向上に極めて重要である。今回、ヤブカ属蚊3種から見出された新規昆虫フラビウイルス *Aedes*

flavivirus(AEFV)の性状解析を行った。

2. ウエストナイルウイルス媒介蚊アカイエカ種群蚊における生理・生態学的基礎研究

2000年冬、ニューヨーク市で採集されたトビロイエカ越冬個体から 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)。わが国には、トビロイエカの近縁種であるアカイエカ種群蚊が都市域を中心に全国的に広く生息しており、WNV 媒介能も示唆されている(江下ら, 2004)。国内に WNV が侵入した場合の主要な媒介種となることが予想される。アカイエカ種群は 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)、昆虫フラビウイルス(CXFBV)に不顕性様に感染していること(Hoshino & Isawa et al., 2007)なども知られており、WNV を含む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生態学的、生理学的特徴を正確に把握する必要がある。

WNV 媒介蚊のヒトへの感染能力を評価する際に考慮される媒介蚊の生態的性質は、「蚊の密度」、「ヒトに対する嗜好性」、「ウイルス保有率」の3点である。この中に、マリア媒介蚊に関して考慮されている「期待寿命」は含まれていない。我々は、「期待寿命」は蚊の媒介能力の大きさを左右する重要な性質であると捉え、野外で捕集されたアカイエカおよびチカイエカからその余命を測定し、両者の WNV 伝播能力を評価した。

アカイエカ種群の越冬に関する研究は、1970年代には活発に行われ、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(Oda & Wada, 1977)や、内分

泌学的アプローチ(野口&大滝, 1973)などによる成果がもたらされたが、1980年代以降の新しい知見はほとんど得られていない。我々は、関東地方で越冬蚊を見出したことをきっかけに、それら野外捕集蚊、および温度・日長を変えた室内で飼育した成虫を用いて脂質含量の測定ならびに脂肪酸分析を行い、アカイエカ種群の越冬生理、特に耐低温性からウイルスの越冬を考察した。

上記のような調査・研究を行うためには、アカイエカとチカイエカは精度よく判別されなければならない。国内産のアカイエカとチカイエカは外部形態が酷似しているため、これまで一般的に用いられてきた分類法は雄成虫の交尾期の形態に基づいていた。また、チカイエカとアカイエカの主要な幼虫発生源の違いから、屋内の地下で採集された場合はアカイエカ、屋外で採集された場合はアカイエカと考える傾向があった。しかしながら、我々のこれまでの野外調査によって、国内の広い範囲でチカイエカが吸血のために地上で活躍していることが判明し、アカイエカとチカイエカの野外発生状況を詳細に把握する必要が急務となった。まず、従来用いられている複眼の個眼数による同定法を再検討した。次いで、遺伝子マーカーを用いた判別法の確立を試みた。我々は、これまでにアセチルコリンエステラーゼ(ACE)遺伝子にアカイエカとチカイエカに特異的な変異領域の存在を見出し、その部位にプライマーを設計することで PCR 法により両者の判別を可能にしている(Kasai et al., 2008)。本研究では、時間と経費の両面の負担を軽減する目的で、先の方法に改良を加え、マルチプレックス PCR 法による新しい判別法(ACE2-assay)を確立しようと考えた。

B. 研究方法

1-1) WNV 遺伝子検出法の検討に用いたウイルス液およびウイルス感染蚊は、NY99 株 (ウイルス第一部より)、およびFCG株を雌成虫胸部に接種して作成した個体である(大分大学医学部、江下優樹氏作成)。蚊 50 頭を1プールとし、MEM培養液中細胞破砕機MM300(QIAGEN)を用いて蚊乳剤を作成した。軽く遠心した上清を VecTest(イムノクロマトグラフィ法)、RT-PCR 法および TaqMan RT-PCR 法の3種類に供して検出感度を比較した。ウイルス RNA は、High pure viral RNA kit(Roche)あるいは RNeasy Mini Kit(QIAGEN)により抽出した。RT-PCR は AccessQuick RT-PCR System(Promega)あるいは Takara RNA PCR Kit (AMV)を用いた。エンベロープ(E)領域(WNNY514/WNNY904)および非構造蛋白質領域 NS3(Fla-US004/Fla-L5457)に作成したプライマーを使用した(プライマー配列ならびに PCR 反応は国立感染症研究所, 2008)。TaqMan RT-PCR に用いたプライマー・プローブセットは E 領域および3'非翻訳領域に設計した WNENV および WN3'NC の各セットである(Lanciotti, 2000)。

1-2) 国内における蚊の捕集は主に CDC 型サクショントラップにドライアイス(約 1kg/24 時間)を用いて実施した。2003 年 5 月~11 月、国内 8 ヶ所で合計 3,485 頭の蚊を捕集し、原則として最高 50 頭までを1プールとして合計 348 プールをウイルス分離および検出に供した(以下、捕集場所の詳細は省略する)。2004 年 3 月~11 月、前年とほぼ同じ地点で合計 11,990 頭捕集し、最高 30 頭を1プールとし 747 プールを作成した。2005 年は 2 月に捕集した越冬蚊、ならびに 4 月~10 月に得ら

れた捕集蚊の合計 1,831 頭、2005 年以降は最高 20 頭を1プールとして合計 147 プールを作成した。2006 年は関東地方の渡り鳥の飛来地 2 地点(東京港野鳥公園、谷津干潟)で 6 月~10 月に定期調査を行い、北海道サロベツ原野では 7 月に蚊を捕集した。合計 3,085 頭、184 プールをウイルス分離に供した。蚊乳剤は、ヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞、ほ乳類由来 Vero(Vero9013 株)および BHK21 細胞に接種し、2 代盲継代後 RNA を抽出した。RT-PCR には NS3 領域(前出)に NS5 領域(FU1F/CFD2R, FU2F/CFD3R, Kuno et al., 1998)を追加した 2 種類のプライマーを用いて行った。陽性バンドが確認された場合は、ダイレクトシーケンス法によりゲノム配列を決定し、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。

1-3) AEFV の分離は、C6/36 細胞を用いてウイルス接種後 7 日まで位相差顕微鏡による観察(Yano et al., 1996)を行った。ウイルス RNA は、3 回継代後の培養上清から RNeasy Mini Kitを用いて抽出し、前出の E、NS3 および NS5 の 3 種類のプライマーを用いて TaKaRa RNA LA PCR KIT ver. 1.1 (TAKARA BIO)により Long-PCR を行い、ウイルスゲノムの大部分を包含する断片の増幅を試みた。PCR 産物から得たヌクレオチド配列情報を基に Gene Racer 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。ヌクレオチドあるいはアミノ酸配列は、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。

2-1) 個眼数の比較には、感染症研究所構内、春日部市、品川区(林試の森公園)で採集された集団をそれぞれ 27℃の恒温室内で飼育したアカイエカの各系統、ならびに福岡、大手町、渋谷、横浜から得られ、同様に実験室で維持されたチカイエカの各系統を用いた。個眼数の季節変化を見るために、温度調整の行われていない住居内でアカイエカおよびチカイエカ幼虫を飼育し、得られた成虫の個眼数を調査した。個眼数の観察は Noguchi & Asahina (1966) に概ね従った。

2-2) 2005 年および 2006 年に野外で捕集したアカイエカ種群蚊を 27℃相対湿度 55% の条件下で飼育し、砂糖水を与えて死亡個体を調査した。すべてが死亡した後、個眼数によりアカイエカとチカイエカに判別し、生存曲線、期待寿命(捕獲後×日令)、平均寿命を求めた。

2-3) マルチプレックス PCR 法確立のために用いたアカイエカは林試、藤沢、長崎系、チカイエカは新宿、横浜、福岡系、ネットアイエカは JPal-per、小笠原、沖縄系である。蚊からのゲノム抽出は、REDExtract-N-Amp Tissue PCR kit (SIGMA) を用い、原則的に添付のプロトコールに従った。PCR 反応の条件を検討した。

2-4) 2005 年 2 月 9 日埼玉県春日部市の用水路内に見出した越冬蚊(用水路 A で 163 頭、用水路 B で 51 頭)、および感染研敷地内で実施している定点捕集調査(津田ら、2006)において 2007 年 3~11 月に捕集されたアカイエカ種群蚊の脂質分析を行った。野外捕集蚊は ACE2-assay および ITS1-

assay (Sawabe et al., 2008) によりアカイエカとチカイエカに判別された。蛹期まで 25℃, 16L:8D の高温・長日条件で維持されたアカイエカ(林試系統)およびチカイエカ(渋谷 black 系統)の羽化 24 時間以内の成虫を雌雄 50 頭ずつ、それぞれの飼育条件下(25℃, 16L:8D、20℃, 11L:13D、15℃, 11L:13D、10℃, 11L:14D)で飼育し、1~2 日毎に生存個体数を記録した。また、各条件下の雌成虫を脂質分析に供した。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。脂肪酸種の同定と定量は、GC-MS (JMS-SX102A, JEOL) および GC (Shimadzu GC6A) (Moribayashi et al., 1996) を用いて行った。

C. 結果

1-1) ウイルスの侵入が未だ確認されていないわが国においては、蚊乳剤をまず Vero あるいは BHK 細胞接種後少なくとも 2 代盲継代した後に C6/36 細胞接種系に移し、RT-PCR 法あるいは TaqMan (RT-PCR) 法でウイルス遺伝子を検出する方法が推奨された。一方、WNV によるカラスや他の野鳥の死亡が確認された場合は、速やかに蚊プールからのウイルス遺伝子検出を TaqMan 法により実施し、陽性蚊プールが得られた場合は、前述した細胞接種系を経てウイルス分離を行うべきであろう。

1-2) 2003~2006 年の 4 年間で計 11 属 50 種 24,407 頭の蚊を捕集し、作成した 1,431 プールからウイルス分離および遺伝子検出を行ったが、すべての検体から WNV は検出されず、本ウイルスの日本国内への侵入は未だ見られないと結論された。

1-3) WNV 検出過程でヤブカ属蚊 3 種から新規フラビウイルスを見出し、*Aedes flavivirus* (AEFV) と命名した。決定された 11,066 ヌクレオチドで構成される AEFV ゲノムの配列情報から、AEFV は CXFV、CFA、KRV と同じ昆虫フラビウイルスの clade に配置されることが推定された。さらに、分離された 4 株の AEFV4 について昆虫フラビウイルス内の系統関係を推定したところ、すべて CXFV、CFA、KRV とは離れたひとつの clade に包含され、ヤブカ属由来の CFA、KRV とより近縁であることが分った。

2-1) アカイエカとチカイエカの個眼数による変異を調べた結果、実験室系統においては、複眼の 5 あるいは 6 列目の個眼数が 8 個の個体をチカイエカ、9 個をアカイエカと判定してもよいと思われた。しかし、個眼数は幼虫発育時の気温によって変動し、生育温度が低いと個眼数は少なく、温度が高いと多くなる傾向が示された。個眼数による判別結果と ACE2-assay による結果との一致度を調べたところ、アカイエカもチカイエカもどちらにも地理的な変異があることが示唆された。

2-2) 2005 年および 2006 年野外で捕集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には明らかな違いが見られ、両年ともにアカイエカの寿命はチカイエカよりも長く、2 週間から 20 日の有意な差があった。2006 年の調査結果に基づいて算出した期待寿命も、アカイエカがチカイエカよりも約 1.8 倍長く(捕獲後 12 日令)、捕獲後の吸血回数においてもアカイエカがチカイエカよりも多いことが判明した。

2-3) 3 種類のアカイエカ種群蚊を判別法する方法として、チカイエカに特異的な

Forward プライマー (ACEpip2) と、アカイエカに特異的 Reverse プライマー (ACEpal17) を、ネッタイエカを含む 3 種類に共通なプライマー (F1457, B1246s) とともに PCR を行うマルチプレックス PCR 法の条件を検討した。アニーリング温度を 63°C、時間を 60 秒に設定した場合に最もよい結果が得られ、実験的に作成したアカイエカとチカイエカの交雑個体由来のゲノムでも、500bp (チカイエカ) と 280bp (アカイエカ) のバンドがほぼ同じ割合で増幅された。また、野外捕集蚊に対しても精度よく判別でき、反応を 35 サイクルで行えば、脚 1 本からでも判別可能であることが確認された。

2-4) 2005 年 2 月 9 日埼玉県春日部市の用水路内から得られた越冬蚊は、前出の ACE2-assay、ITS1-assay (Sawabe et al., 2008) により、すべてアカイエカであると判定された。それら越冬個体の脂質含量は 26.2%、シス型パルミトオレイン酸 (C16:1) 含量は 50% 以上であった。一方、感染研敷地内で得られた 2007 年 3~11 月の捕集蚊は、7~8 月の夏季はほとんどがアカイエカであったが、それ以外の時期 (3~6 月、9~11 月) ではチカイエカの割合が多い傾向があった。アカイエカは低温・短日の冬季に向けてパルミトオレイン酸量を増加させることが示唆された。実験室内のすべての温度・日長条件下において、アカイエカはチカイエカよりも長命であった。両者間でもっとも寿命に差が見られたのは 10°C, 10L:14D であり (アカイエカ雌: 最長 237 日、チカイエカ雌: 最長 146 日)、アカイエカでのみ脂質量は増加し (26.9%)、シス型パルミトオレイン酸量も増加した。

D. 考察

1. WNV の日本国内への侵入を監視する目的で、2003～2006 年の 4 年間、ウイルス分離を全国レベルで行ってきた。2007 年も継続してウイルス分離作業を行ったが、現在までに検査した国内産蚊プールのいずれからも WNV は検出されなかった。わが国への WNV の侵入経路を考えた場合、渡り鳥により持ち込まれる可能性が最も高いとされるが、いくつかの野鳥の飛来地で捕集した蚊プールからも WNV は分離されなかった。しかし、近年、WNV と同様に渡り鳥由来で国外から侵入する可能性が示唆される JEV が、新潟市佐潟湿地で分離されたことは大変興味深い(著者ら, 2008)。海外からのこれらウイルスの侵入を監視するためには、今後も渡り鳥の飛来経路上での蚊の捕集調査は継続して実施されるべきであろう。

一連のウイルス分離過程において、蚊集団に潜在的に感染している新規フラビウイルスである CXFV (Hoshino et al., 2007) および AEFV を見出したが、これら昆虫ウイルスの存在が、WNV を始めとする既知のフラビウイルスの C6/36 細胞などの蚊由来細胞培地上での増殖を困難にしていることが懸念された。そこで、昆虫由来細胞である C6/36 細胞への接種に先んじて、ほ乳動物由来の Vero あるいは BHK21 細胞への接種・継代を試みたが、野外において WNV 感染蚊が存在しない現時点では WNV の増殖にどの細胞接種系が適しているのかに対する解答を得ることはできなかった。今後視点を変えさらに検討する必要があるだろう。従って、現時点では、蚊乳剤をまず Vero あるいは BHK 細胞など哺乳類由来細胞系に接種後、C6/36 細胞接種系に移すことを推奨したい。

本研究期間中に分離された AEFV 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、KRV、CXFV と系統学的に近縁であり、さらに蚊由来細胞でのみ分離され、弱い CPE を示すなど、蚊への特異性が高いという特徴においてこれらのウイルスとの共通点を多く有するものであつた。AEFV はフラビウイルスのなかで明らかに CFA、KRV、CXFV と同じ分類群に含まれるものであり、共に近年提唱されている昆虫フラビウイルスという新たなグループを形成するものと考えられるが、CXFV とは異なり、本邦産ヤブカ属蚊類に特異性が高いことが予想された。イエカ属、ヤブカ属蚊は、それぞれ宿主特異的な昆虫フラビウイルス (CXFV および AEFV) に潜在的感染していることから、WNV、JEV などとの相互作用、あるいは干渉作用などについて今後精査してゆく必要があると思われる。もたらされる情報は、WNV の国内侵入の監視を実施する上で、蚊からのウイルス検出における感度の向上、誤同定の回避に貢献する有益な情報となることが期待される。

2. わが国には、米国で WNV の主要な媒介種であるトビイロイエカと近縁な種であるアカイエカとチカイエカが都市部を中心に広く生息している。両者は形態学的には分類が困難であるが、生態学的にも生理学的にも大きく異なる性質を持っていることから、ヒトへのウイルス媒介者としての役割は正確に評価されなければならないと考えてきた。そこで、従来用いられてきた個眼数に基づく同定法を再検討した。本同定法は、遺伝子操作を必要とする ACE2-assay に比べて容易で安価である。しかしながら、個眼数は、季

節的にも地理的にも変動し、地域的に見ると、関東以北ではアカイエカは8個、チカイエカは9個という基準でかなり正確な同定が期待されるが、西日本では、幼虫時の高温によって個眼数が多くなる傾向があった。関東地方以外ではその精度が落ちることが示唆されたが、安価で簡便な方法であることに変わりはない。ある程度の誤差があることを了解すれば利用は可能である。

次いで検討したマルチプレックス PCR 法 (ACE2-assay) は、比較的安価 (1 サンプル当たり約 120 円) で、脚 1 本からでも判別可能であり、非常に精度が高いと評価された。今後の研究を遂行する上で重要なツールとなると思われる。実際に、これまでに、吸血源動物種をアカイエカとチカイエカを別々に評価し、両者ともにヒモトリも同程度に吸血する嗜好性であることを明らかにした。また、冬季用水路内で越冬している集団がアカイエカであることも確認され、夏季のアカイエカ成虫との比較から、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。パルミトオレイン酸は、融点が $-0.5^{\circ}\text{C} \sim +0.5^{\circ}\text{C}$ の凍結し難い脂肪酸であり、特に昆虫類に含まれるリン脂質中では $-40^{\circ}\text{C} \sim +40^{\circ}\text{C}$ 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。夏後半のまだ長日下にある時期に羽化したアカイエカ成虫が、そのまま冬を越すこ

とも可能であることが示唆された。夏季の活発な活動期に、吸血によってウイルスを取り込みそのまま越冬すれば、ウイルスの越冬に大きく貢献することになる。

また、わが国のチカイエカ集団が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も明らかになった。反面、雨水ますのような比較的殺虫剤の処理がなされ難い水系に生息するアカイエカでは比較的感受性が高いことも示唆された。もし、自然界でアカイエカとチカイエカが容易に交雑するならば、チカイエカが持っている抵抗性遺伝子がアカイエカに受け継がれ、WNV が侵入した際の殺虫剤の使用により、その抵抗性遺伝子は容易に広がり、殺虫剤は効力を失うことが予想される。室内実験では両者の交雑は可能であるという報告例はあるが (Sasa et al., 1966)、自然界での交雑の頻度を調べた報告はない。本判別法では、両者の交雑個体でも判別できることが確認されていることから、自然界における交雑の頻度調査への有用性も高いと思われる。

E. 結論

1) 国内における野外蚊からの WNV 検出法として、蚊乳剤を C6/36 細胞などの接種系で盲継代し、RT-PCR 法あるいは TaqMan (RT-PCR) 法により遺伝子検出を行う方法を推奨した。

2) 2003-2006 年の 4 年間で 11 属 50 種、合計 24,407 頭 1,431 プールからウイルス分離および検出を試みたが、WNV は検出されず、本ウイルスの日本国内への侵入は未だ見られないと結論された。

3) ヤブカ属蚊 3 種から昆虫特異的なフラビウイルス AEFV を見出し、昆虫フラビウイルスのグループに属するヤブカ属蚊類に特異性の高いものであることが示唆された。

4) 成虫の複眼の 5 あるいは 6 列目の個眼数が 8 個の個体をチカイエカ、9 個をアカイエカと判定してもよいと思われたが、個眼数は幼虫発育時の気温に変動し、地理的変異も示唆された。

5) アカイエカの平均寿命 (36-37 日) はチカイエカ (17-22 日) よりも有意に長く、アカイエカの疾病媒介能はチカイエカよりも高いと評価された。

6) アカイエカおよびチカイエカに特異的なプライマー 3 種類を、一度に反応させるマルチプレックス PCR 法による判別法を確立し (ACE2-assay)、成虫の脚 1 本、および卵舟由来のテンプレートを用いても目的領域が増幅できることが示唆された。

7) アカイエカ越冬成虫、および低温・短日条件下で飼育されたアカイエカは脂質含量ならびにシス型パルミトオレイン酸 (C16:1) 含量が高く、低温下でもパルミトオレイン酸量を増加させることができるアカイエカは低温下での生存が有利になり、越冬を可能にしていると推察された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表:

1) Kasai, S., Komagata, O., Tomita, T., Sawa-

be, K., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Ishikawa, T., Motoki, M., Takahashi, T., Tanikawa, T., Yoshida, M., Shinjo, G., Hashimoto, T., Higa, Y. and Kobayashi, K. PCR-Based identification of *Culex pipiens* complex collected in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* (in press).

2) Sawabe, K., Isawa, H., Hoshino, K., Sasaki, T., Roychoudhury, S., Higa, Y., Kasai, S., Tsuda, Y., Nishiumi, I., Hisai, N., Hamao, S. and Kobayashi, M. Host-feeding habits of potential bridge vectors of West Nile virus in Japan, especially focusing on the *Culex pipiens* species (Diptera: Culicidae), with the molecular identification based on ITS 1 sequence polymorphism. *J. Med. Entomol.* (in submitting).

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

4) 澤邊京子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 伊藤美佳子, 高崎智弘, 江下優樹, 小林睦生 (2006). 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. *Med. Entomol. & Zool.* 57: 279-286.

5) 津田良夫, 比嘉由紀子, 葛西真治, 伊澤晴彦, 星野啓太, 林利彦, 駒形修, 澤邊京子, 佐々木年則, 富田隆史, 二瓶直子, 倉橋弘, 小林睦生 (2006). 成田国際空港近接地と周辺地域の媒介蚊調査

(2003, 2004年). *Med. Entomol. & Zool.* 57: 211-218.

6) 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, 冨田隆史, 澤邊京子, 二瓶直子, 小林睦生(2006). 都市域における疾病媒介蚊の発生状況調査—ドライアストラップを用いた2年間の調査結果—. *Med. Entomol. & Zool.* 57: 75-82.

7) Higa, Y., Hoshino, K., Tsuda, Y., Kobayashi, M. (2006) Dry ice-trap and human bait collection of mosquitoes in the eastern Hokkaido, Japan. *Med. Entomol. & Zool.* 57: 93-98.

2. 学会発表:

1) 澤邊京子, 森林敦子, 津田良夫, 葛西真治, 伊澤晴彦, 林利彦, 金京純, 小林睦生(2008) 日本産アカイエカ種群蚊の越冬に関する研究(1) 野外捕集蚊における脂質含量と脂肪酸組成の季節変動. 第60回日本衛生動物学会大会. 4月. 下野市

2) 森林敦子, 澤邊京子, 津田良夫, 葛西真治, 小林睦生(2008) 日本産アカイエカ種群蚊の越冬に関する研究(2) アカイエカおよびチカイエカの寿命と脂質に関する室内実験. 第60回日本衛生動物学会大会. 4月. 下野市

3) 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, 小林睦生. 本邦生息蚊における昆虫フラビウウイルスの検出およびその性状解析(2007) 第42回日本

脳炎ウイルス生態学研究会. 5月. 石川県

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

5) 津田良夫, 星野啓太, 伊澤晴彦, 伊澤晴彦, 中口梓, 葛西真治, 片野理恵, 金京純, 駒形修, 冨田隆史, 佐々木年則, 林利彦, 澤邊京子, 小林睦生(2007) 渡り鳥飛来地における蚊の捕集とウエストナイル熱病原体の検出結果. 第59回日本衛生動物学会大会. 4月. 大阪市

6) Kasai, S., Komagata, O., Tsuda, Y., Tomita, T. and Kobayashi, M. (2007) A simplified molecular identification of the vectors of West Nile fever, *Culex pipiens* complex collected in Japan. 41th Joint Conference on Parasitic Diseases. 2月. 東京

7) 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(2006) 本邦生息蚊類が保有するフラビウ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. 5月. 長崎市

8) 津田良夫, 比嘉由紀子, 星野啓太, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 澤邊京子, 小林睦生(2006) 広島県倉橋島における日本脳炎媒介蚊の発生状況. 第41回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 5月. 長崎市

9) 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, 高崎智弘, 小林睦生(2006). 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

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

11) 小林睦生, 葛西真治, 伊澤晴彦, 林利彦, 二瓶直子, 津田良夫(2005)都市部におけるアカイエカ越冬個体の観察. 第57回日本衛生動物学会大会. 6月. 札幌市

12) 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(2005)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

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(2005)本邦生息蚊類が保有するウイルスの検出および性状解析. 第40回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 5月. 箱根

14) 小林睦生, 津田良夫, 林利彦, 葛西

真, 佐々木年則, 沢辺京子, 富田隆史, 二瓶直子, 吉田政弘(2005)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回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 5月. 箱根

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

厚生労働省科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
分担研究総合報告書

富山県における蚊の発生調査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と幼虫の発生源を調査した。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。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。

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。2006～2007年に調査した蚊から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総合すると、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

蚊媒介性感染症の監視体制の確立・整備を図るため、2003年から2007年の5年間にわたり、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。また、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して、幼虫が発生する溜水環境の種類と、蚊種の分布を調査した。

さらに、現時点でのウイルス浸淫状況を把握するため、県内の蚊がウエストナイルウイルス(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

2003～2007 年にかけて、一般住宅、カラスのねぐら周辺の計 11 地点で蚊の成虫調査を行なった。6 月から 10 月までの週 1 回、CO₂ 供給源とトラップを設置し、17～24 時間後に捕獲された蚊類を回収し、分類同定を行った。2006 年には、富山空港および農村地域の厩舎・牛舎での調査も行った。

(2) 幼虫の調査

成虫の採集成績を補完するため、一部の成虫調査地点において、2004～2005 年の 6 月から 9 月にかけて幼虫の調査を実施した。また、2004～2006 年にかけて、厚生センターおよび富山市保健所の協力により、蚊が発生する可能性がある様々な溜水環境を調べた。いずれの場合も、溜水環境に幼虫が生息していた場合には採集し、幼虫の分類同定を行った。

2. 蚊のウイルス保有調査

捕集した蚊を地点・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、乳剤上清を C6/36 細胞と Vero9013 細胞に接種し、3 代にわたり観察を続けた。細胞変性が現れた検体について、フラビウイルス、WNV、JEV の PCR を実施した。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

2006～2008 年に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。

C. 研究結果

1. 蚊の調査

(1) 成虫の調査

一般住宅、カラスのねぐら周辺の 11 地点で行った 5 年間の調査では、6 属 13 種 9850 頭(9649 ♀, 201 ♂)の蚊成虫が捕集された。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、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。コガタアカイエカは、周囲に水田が広がる一般住宅で特に多く捕集されたが、都市部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。ヒトスジシマカは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および沿海域では、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(最高は農村部団地住宅の 15.46)であった。

海岸付近の一般住宅では、イヌが死亡した後にアカイエカ群の捕集数が大幅に減少した。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において、トラップを樹上にも設置した地点では、コ

ガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、キンパラナガハシカが、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が樹上において有意に多く捕集された。また、トラップを地上1mおよびコンクリート建造物の4階(地上12m)と6階(地上20m)の外壁にも設置した地点では、捕集蚊の種数・個体数とも高度が上がるごとに著しく減少した。

2006年に行った富山空港および畜舎の調査では、空港でアカイエカとコガタアカイエカが少数捕集された。厩舎では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) 幼虫の調査

成虫調査地点のうち、幼虫調査も行った4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。これらの水域で幼虫調査を実施した結果、アカイエカ群および(あるいは)ヒト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、一部の地点では、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やヤマトヤブカが比較的多く採集された。

2004～2006年の3年間の調査において、一般民家50地点、公共施設28地点、神社25地点、寺・墓地11地点、大規模公園14地点、小規模公園5地点、その他(畑地や道路など)22地点の合計155地点で幼虫の生息確認が行われた。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。この幼虫生息率は調査した地点で異なり、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、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。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場所で広くみられた。ヤマトヤブカは全ての調査箇所を確認された。コガタアカイエカはその他の1ヶ所の溜水環境でのみ採集された。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、幼虫が生息する溜水環境数の割合は、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。

2. 蚊のウイルス保有調査

2006～2007年の2年間で、カラスのねぐら周辺、一般住宅、富山空港および畜舎で捕集した計18,493個体(1,050プール)の蚊成虫を調査したが、WNVは分離されなかった。一方、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が分離された。分離されたJEVは、エンペロープ領域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。

D. 考察

5年間の調査を通じて富山県平野部でCO₂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。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、2地点で、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CO₂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。ただし、幼虫採集を実施したすべての成虫調査地点においてコガタアカイエカの幼虫は採集されなかったが、成虫の調査では、近隣に発生源を欠くと考えられる都市部をも含むすべての地点でコガタアカイエカが採集された。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しているのかもしれない。

海岸付近の一般住宅で、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、吸血源となる動物が除かれ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。

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唆している。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ことが確認された。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。

空港の調査では、外来種と思われる蚊は捕集されなかった。畜舎ではコガタアカイエカが多く捕集され、農村地帯の一般住宅と同様の傾向であった。

3年間の幼虫調査では、WNV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、その他の地点で多数採集された。さらに、WNV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。

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)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。これは 2005 年に行った調査と同様の結果であった。なお、JEV は 2006 年には分離されなかったが、2006 年は、JEV の主な媒介者であるコガタアカイエカの採集数が少なかったため、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。

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を総合すると、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。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

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浸淫状況、幼虫の発生源を調査した。

5 年間の蚊成虫調査で、富山県平野部ではアカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカの 3 種が重要な疾病媒介蚊となる可能性が高いと考えられた。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アカイエカ群の採集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。幼虫の調査も行った 4 地点では、アカイエカ群およびヒトスジシマカの幼虫が多く採集された。コガタアカイエカの幼虫は採集されなかったことから、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が示唆された。

幼虫の発生源は、3 年間の調査にお