

200829008B

厚生労働科学研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

(H18-新興-一般-009)

平成18～20年度 総合研究報告書

平成21年3月

研究代表者 小林睦生

国立感染症研究所 昆虫医科学部

## 目 次

### I. 総合研究報告書

#### 節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

小林睦生・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

### II. 分担研究総合報告書

#### 1. 千葉県におけるカ類の生息実態調査

藤曲正登他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41

#### 2. 我が国における疾病媒介蚊の発生状況と都市域における生態に関する研究

津田良夫他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45

#### 3. 横浜市とその近隣都市部における蚊類の生息状況調査および幼虫に対する殺虫剤効力試験

小曽根恵子他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53

#### 4. ジフルベンズロン製剤による雨水枡対策の検討

小菅皇夫他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

#### 5. ヒトスジシマカの産卵習性

金山彰宏他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 63

#### 6. 震災後に多発生が懸念された衛生害虫と媒介性感染症に関する調査結果

渡辺 護他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 67

#### 7. 戸建住宅において簡便な防蚊対策を行った場合の効果

渡辺 護他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

#### 8. 沖縄県と鹿児島県奄美大島での日本脳炎媒介蚊とシマカ類に関する調査研究

當間孝子他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75

#### 9. 西宮市における蚊防除対策の評価

吉田政弘他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 79

#### 10. 疾病媒介蚊監視システムの構築に向けて

ー西宮市における蚊発生状況の GIS による解析

二瓶直子他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 85

#### 11. 西宮市の雨水マスに発生する媒介蚊の発生状況調査および公園における

ヒトスジシマカの発生密度の評価と環境要因について

小林睦生他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 89

#### 12. アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

富田隆史他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 97

13. 蚊防除の省力化、自治体の衛生動物の防除態勢およびコロモジラミの生存条件に関する調査研究 武藤敦彦他	101
14. 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 富田隆史他	109
15. 国内産イエカ属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 澤邊京子他	113
16. 国内で捕集されたコガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析 澤邊京子他	117
17. デングウイルス抗原により前免疫したマウスにおけるデング4価DNAワクチンの中和抗体誘導能の増強及び交差免疫原性の考察 小西英二他	123
18. デング熱患者における尿および唾液中のデングウイルス遺伝子検出およびチクングニヤウイルス感染症実験室診断法の開発 高崎智彦他	129
19. 蚊類のアルボウイルス感受性、大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査、およびタイ国でのデング熱媒介蚊調査に関する研究 江下優樹他	133
20. 日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究 倉根一郎	139
21. デングウイルス感染の抗体検査に関する研究 ー抗デング特異IgA抗体検出の有用性と日本脳炎ウイルスとデングウイルス感染機構に関する研究 名和 優他	143
22. 動物モデルを用いたマラリア重症化機構に関する研究 松本芳嗣他	147
23. 変容する環境の中でのマラリア媒介蚊防除対策 高木正洋他	151
24. 薬剤耐性マラリアの流行拡散に関する疫学研究および海外の高リスク地域の評価に関する研究 小林 潤他	157
25. マラリア重症患者の管理および治療体制に関する研究 狩野繁之他	163
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	169

## 節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

研究代表者 小林 睦生 国立感染症研究所昆虫医科学部

### 研究要旨

1) 千葉県北部の成田空港周辺地域にライトトラップによる定点調査地を設定し、カ類成虫の発生状況と気象条件を観察した。平成18～20年の調査でこの地域における成虫カの通年的な活動と地域的な優占種の交代が確認された。アカイエカ群成虫の冬季活動、コガタアカイエカの秋季発生数ピークの出現と個体群中の雌雄比の変化など、各種カ類の発生動向に変化が認められた。千葉県内各地で採集されたアカイエカとヒトスジシマカ幼虫の薬剤感受性は、ウエストナイル熱媒介対策ガイドラインが示す水準Ⅰのレベルで、薬剤防除における問題点は認められなかった。

2) 都市域および渡り鳥の飛来する地域を対象として、疾病媒介蚊の発生状況調査ならびに疾病媒介蚊の生態調査を実施した。都市環境におけるアカイエカの飛翔距離を記号放逐実験によって調査し、最大飛翔距離が少なくとも1,217mであることが示された。東京都および近隣都市域におけるコガタアカイエカの生態調査によって、本種の越冬世代成虫が東京都周辺の水田地帯から数十キロ離れた都市域まで季節的に長距離移動をしていることが示唆された。トラップの設置場所による蚊捕獲数の違いに関する景観生態学的分析を行い、トラップによって捕獲される蚊の個体数に影響している環境要因について考察した。野外における吸血蚊の採集と潜伏場所に関する生態的調査を行い、林内で吸血したと思われる吸血蚊を多数捕獲することに成功し、吸血蚊の潜伏場所の生態的特徴に関する情報が得られた。東京湾沿岸の干潟地域、青森県十三湖周辺、新潟県佐潟水鳥・湿地センター、宍道湖西岸の出雲平野と丘陵地を対象として渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊の発生状況を調査した。アカイエカ、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ、イナトミシオカなどが主要な種類であり、野鳥由来の蚊媒介性病原体の侵入を監視する上で注意を要する種類である。

3) 横浜市内および近隣の都市部において蚊類の発生状況調査を、ドライアイスを用いたライトトラップを用いて成虫の捕獲を行った。延べ16地点で6属10種、アカイエカ群、コガタアカイエカ、トラフカクイカ、ヤマトクシヒゲカ、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ、オオクロヤブカ、シナハマダラカ、キンバラナガハシカ、フタクロホシチビカが捕獲された。捕獲されたアカイエカ群の亜種分類を行ったところ、横浜市中区ではチカイエカ、その他の場所ではアカイエカが優占であった。一方、雨水枡より採集したアカイエカ群幼虫はアカイエカが優占であった。横浜市内の雨水枡において、幼虫に対するIGR剤の実地効力試験を行ったが、明確な薬剤の持続効果は検証できなかった。小型容器を用いた準実地

効力試験では、長期にわたり高い効果が得られた。

4) ジフルベンズロン製剤による蚊類の防除効果について、公道上に設置されている雨水枡を用いて実地試験を行った。フェントロチオン製剤との比較を行った結果、雨水枡におけるジフルベンズロン製剤の効果は、フェントロチオン製剤より優れており、長期にわたって蚊類の発生を抑制できる可能性が示された。薬剤の効果の評価のためにドライアイス併用の CDC ライトトラップを用いて成虫を捕獲した。その結果、幼虫・蛹数と成虫の捕獲数には関連が認められた。また、対照区を設けて観察した結果、雨水枡中の幼虫・蛹平均個体数および成虫捕獲数について、処理区と対照区に差が認められ、雨水枡に対する薬剤処理が住宅地におけるアカイエカ群やヒトスジシマカなどの媒介蚊対策に有効であると推測された。

5) ヒトスジシマカの産卵習性について、ヒトスジシマカの産卵が地表からどの程度の高さまで可能か、横浜市衛生研究所（磯子区）の構内において、オビトラップを用いて産卵状況を観察した。建物の側壁、樹木を利用し、高さ 0m, 0.5m, 1m, 2m, 3m, 5m, 8m, 16m, 20m にトラップを吊り下げた。観察は 5 月から 9 月まで約 5 ヶ月間行った。その結果、ヒトスジシマカの産卵は 0~8m の高さに設置したトラップで確認された。産卵が確認された割合は、0m の地点に設置したトラップで最も高く (91%; 11/12 個)、逆に 8m では低かった (13%; 1/8)。ヒトスジシマカの屋内での産卵について、吸血個体を一般家屋内に放逐し、室内の 12 箇所に設置した産卵用容器 (8×11×高さ 11cm) と小容器 (口径: 5.5cm: 容量 50ml) への産卵を確認した。放飼後三日目までの観察で、応接、玄関、階段下部、居間、台所、洗面所、階段上部、書斎の 8 箇所 (一階: 6, 二階: 2) と台所に置いた小容器内の植物葉上、茎部への産卵が確認された。小容器への産卵もみられ、室内であっても屋外同様に小水域への産卵が可能であることが確認された。

6) 震災による家屋やライフラインの破壊、損壊が、衛生・不快害虫の発生への影響を調査するため、2007 年 7 月 16 日に起きた中越沖地震と、2008 年 6 月 14 日に起きた岩手・宮城内陸地震後に、衛生・不快害虫の発生状況と媒介性感染症の流行懸念の有無について調査を行った。中越沖地震では、震災後止水溜まりなど蚊の発生箇所が増加したが、1 ヶ月半後にはそれら止水溜まりは改修され、蚊の発生箇所数も減少した。しかし、破壊物などへの覆いに使用されたブルーシートが、新たな溜水環境を提供し蚊の発生を助長していることが確認された。一方、ハエ類は公衆トイレの放置汚物や生ゴミに少数認められたが、比較的迅速な清掃により、大きな懸念材料にはならないと思われた。岩手・宮城内陸地震は、地震規模の割には家屋やライフラインへの被害は小さく、倒壊家屋や排水路・溝の破壊はほとんどみられず、止水溜りもなく蚊の多発生は起こらないと判断された。しかし、山間地の寺社では損壊がみられ、さらに墓、灯籠、石碑などの倒壊がみられ、覆いに用いられているブルーシートには水溜りが生じ蚊の発生が危惧された。両地震とも、避難所や臨時入浴施設の周辺および公園には仮設トイレが多数設置されるとともに、それらには手指消毒液などが配置され、経口感染症などの発生防止の対策が行われていた。

7) 2003～5年に蚊の発生状況を調査して来た戸建住宅（民家）において、2006年から2008年に、容易に用品が入手出来、作業が簡便で、個人で防蚊対策が行える方法とその効果について検討を行った。2006～7年には、農村部新興住宅団地の住宅において幼虫の発生阻止を主体とする防蚊対策を行い、2007～8年には都市部住宅街の住宅において、成虫の発生阻止を主体とする防蚊対策を行った。さらに、2008年には農村部住宅団地の住宅庭において、バケツを用いたモデル的な蚊の発生抑止実験を行った。農村部の団地住宅1軒、都市部住宅2軒とも蚊の発生が少なくなった成績が得られ、対策を行わなかった住宅に比べ、防蚊効果が認められた。とくに、ヒトスジシマカに対する効果が、アカイエカに比べ大きく表われた。しかし、これらの効果は絶対的なものではなく、さらに検討を要することが示唆された。バケツを用いたモデル実験では、ヒメダカの蚊の発生抑止効果が顕著で、庭などの水溜容器への利用が考えられる。また、市販の蚊取り線香の蚊幼虫の発生抑止効果も認められ、入手と作業の簡便なことから、植木鉢の受け皿や戸別雨水枡など様々な溜水環境への利用が考えられ、日常の蚊の発生抑止に推奨できると思われる。

8) 沖縄県や鹿児島県奄美大島において日本脳炎媒介蚊（*Culex vishnui* subgroupに属する蚊3種、コガタアカイエカ *Cx. tritaeniorhynchus*、シロハシイエカ *Cx. pseudovishnui*、ウイシニイエカ *Cx. vishnui*）やシマカ類の発生状況や消長を明らかにするために調査研究を行った。調査を行った沖縄本島、西表島、伊平屋島、鹿児島県奄美大島の田芋畑、水田、休耕田や泥田には、日本脳炎媒介蚊コガタアカイエカが多数生息し、シロハシイエカも個体数は少ないが生息していた。ウイシニイエカは西表島と沖縄本島に生息し、伊平屋島と奄美大島では生息を確認できなかった。沖縄本島では本種が高頻度に生息している地域もあったが、西表島に比べると割合も個体数も少なかった。沖縄本島と西表島の人家周辺ではヒトスジシマカ、林内ではリパーズシマカ、ダウンズシマカ（又はミヤラシマカ）が採集され、ネッタシマカはいずれの地域でも採集されなかった。

9) 兵庫県西宮市の西宮浜（人工島）の7,000ヶ所以上の雨水マスに、平成19年度はピリプロキシフェン、*Bacillus thuringiensis israelensis*含有（チャブBT錠1g）、ピリプロキシフェン（スミラブ発泡錠）ジフルベンズロン（デミリン発泡錠）の3種薬剤を7, 8, 9月の初旬に散布した。平成20年度にはピリプロキシフェンの発泡錠と発泡粒剤を、5, 6, 7月初旬の3回にわたり全雨水マスに処理した。CDC型ライトトラップによる成虫調査を平成19年度は7月より9月末まで、平成20年度には5月より7月末まで各薬剤投入のおおむね1週後より週1回、および8月より10月まで行った。薬剤非散布域は全調査期間を通じて18地点（各地域2公園で、9地域）で実施した。トラップは調査終了後持ち帰り、-20℃で麻酔後、蚊を種類別、性別に同定集計した。なお、アカイエカとチカイエカの判別は雌雄蚊共に個眼数によって両種を識別した。処理雨水マス内の滞留水を用いた幼虫試験ならびに幼虫調査を行い、残留薬剤の有効性を生物試験法で確認した。その結果、薬剤処理地域の成虫捕集数に、無処理区と比べて顕著な減少が認められなかった。2年間の調査結果もほぼ同様で、豪雨以外では、雨水マス中の停滞水は成虫発生を阻止することが確

認められたが、成虫捕集数に影響を与えなかった。これらのことから、少なくともアカイエカは西宮浜周辺の未処理地域から多数飛来してきていることが強く示唆された。

10) 2006年から2008年の3年間、国立感染症研究所・いきもの研究社・西宮市環境衛生課の協力のもとに実施してきた西宮市全域を対象とした蚊相の調査のうち、主として地区別、調査区別、公園・公共施設・一戸建住宅・マンション・市営住宅などの地目別幼虫調査結果などの膨大な資料を、縮尺1:2,500西宮市国土基本図上に展開しGISで解析し、分布の特徴特に地域差を明らかにした。これらの特徴とその要因を、他のデジタル化された地理情報たとえば下水道台帳システム、都市計画地区GIS、陸域観測技術衛星ALOSと重ね合せ、また水質検査を実施して検討した。

11) 西宮市から10地区を選定し、道路、公園、学校等の公共施設、マンション、市営住宅、一戸建住宅などの雨水マスの調査を行った。調査環境によって発生している蚊の種類に特徴が見られ、公園ではアカイエカ種群の比率が高く、一戸建て住宅とマンションではヒトスジシマカの比率が明らかに高かった。道路および市営住宅の雨水マスの幼虫に関してはイエカ属とヤブカ属の比率に大きな違いが認められなかった。幼虫防除に必要な費用を昆虫発育制御剤を処理することで計算したところ、月1回の雨水マスへの薬剤の投入を市街地面積を約57km<sup>2</sup>として計算した場合、西宮市において年間約5千5百万円の経費が必要となった。チクングニヤ熱の重要な媒介蚊であるヒトスジシマカに関して、市内の10地区各2公園においてヒトスジシマカの8分間スウィーピング法による成虫発生密度の評価を5月から10月まで行った。捕集数と関係すると考えられる環境要因と平均捕集数との関係を解析した。捕集成績は、同一公園であっても平均捕集数に大きな違いが認められ、公園面積の大小、公園内の樹木密度(本数/100m<sup>2</sup>)、公園内の幼虫発生雨水マスからの距離と平均捕集数との間に相関関係は認められなかった。捕集場所周辺の環境として隣接する遮蔽物の存在と平均捕集数との間に弱い相関が認められた。8分間の平均捕集数が7-9匹で最高捕集数が20匹を超える公園は、平時から蚊の防除を行う必要があること、平均捕集数が2-4匹の公園も防除対策が強く望まれると考えられる。捕集数が多い地点の環境に関しては、樹木による日陰の存在、潜み場所としての灌木の存在、地表の草の存在、近くに壁や塀などの遮蔽物の存在が重要と考えられた。

12) 日本、米国、英国のピレスロイド系殺虫剤抵抗性アタマジラミには、ナトリウムチャンネル遺伝子に四重アミノ酸置換突然変異が共通に見出されている。これら4つの座位を対象にして、SNaPshot法によりアタマジラミ罹患患者より採取したシラミがもつナトリウムチャンネル遺伝子のジェノタイプングを行った。2006年から2008年の3年間に29都道府県より407コロニー分のシラミを収集して調査した結果、北海道と沖縄県を含む13都道府県に由来する34コロニー(8.4%)に、四重変異を共通に生じている遺伝子が含まれていた。試料収集年ごとの抵抗性遺伝子を有するコロニーの検出率は、2006年の4.8%(試験コロニー数(N)=42)、2007年の6.2%(N=178)、および2008年の11.2%(N=187)であり、抵抗性コロニーの増加傾向が示された。特定の小学校に抵抗性のシラミが蔓延しているケースも明らか

かになった。抵抗性遺伝子を保有していたアタマジラミに小児が罹患していたケース 5 例について、保護者へ駆除の経過を聴取したところ、いずれのケースでも、使用書通りの適用では駆除薬の有効性がないことが示された。

13) 銅ファイバーを用いた蚊防除実験、および薬剤を用いない方法として食塩や洗剤を用いた蚊防除の可能性について検討した。処理雨水槽から周辺雨水槽への効果の拡大は確認できず、銅ファイバーを用いた防除実験では、基礎効力試験で効果が認められた処理量において、実地では処理水域の銅イオン濃度が基礎試験時のようには上昇せず、効果は認められなかった (H18, 19 年度)。食塩水のアカイエカおよびヒトスジシマカ幼虫に対する殺虫並びに産卵抑制効果については、基礎効力試験において、いずれの種類の子虫も 1.5% の濃度で 100% の致死率が得られ、アカイエカでは 1.0% で完全な産卵抑制が認められ、ヒトスジシマカでも産卵数の減少が認められた。界面活性剤を 19% 含有する台所用洗剤では、洗剤濃度として約 0.03% で 100% の致死率が得られた (H20 年度)。防除態勢等に関する自治体に対するアンケート調査では、疾病媒介蚊に対する緊急時対応体制の構築、緊急時の対応マニュアル作成を行っている自治体は少なく、防除薬剤の備蓄を行っている自治体は半数以下であること、薬剤散布機器を保有している自治体は半数程度であること、衛生動物対策関連の予算や担当者数は減少傾向にあること、などが明らかとなった (H19 年度)。コロモジラミの生存条件に関する基礎的検討では、水または洗濯洗剤液 (0.1%) に浸漬した場合の致死率は、水での 20 時間浸漬で 0~100%、洗剤液では 90~100% であったが、6 時間浸漬では、高い場合でも洗剤水の 15% 程度にとどまった。浸漬試験でも浸漬時の水温により異なる傾向が見られたが、乾燥状態での生存期間は、温度により大きく異なり、30 および 35℃ では 4 日以内に全て死亡したが、20℃ では 7 日後まで 70% 以上の個体が生存し、全個体が死亡するのに要した日数は、9~12 日であった (H20 年度)。

14) 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出された 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* 抵抗性遺伝子について、頻度と F455 座位周辺約 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 抵抗性遺伝子が存在し、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。蚊の長距離移動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。

15) 国内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。その結果、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ことが明らかとなった。

16) 国内の蚊集団における JEV の保有状況を把握することを目的として、2006～2008 年の 3 年間に国内数カ所でコガタアカイエカを捕集し、JEV の検出、ならびに分離株の遺伝子配列をもとに系統解析を行った。コガタアカイエカは、2006 年 1 都 3 県(4 地点)、2007 年 1 都 4 県(6 地点)、2008 年 1 都 11 県(12 地点)の豚舎を含む畜舎周辺で捕集した。例年、ブタの JEV 抗体陽性率の高いことが報告されている静岡、長崎、熊本、鹿児島各県下の豚舎を含む畜舎周辺で捕集されたコガタアカイエカから高率に JEV が分離され、大規模野鳥飛来地である新潟県佐潟湿地で捕集したコガタアカイエカからも JEV が分離された(陽性プール率は 3.3-41.7%)。一方、分離された JEV 株のゲノム中のエンヴェロップ(E)領域の遺伝子配列を解析した結果、これまでに得た分離株はすべて 1 型に属し、近年、東アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁であることが示唆された。2007 年分離株はアミノ酸レベルで新たな変異が認められたものの、2008 年に分離された株は 2007 年よりもむしろ 2006 年以前の分離株に近縁であることも示唆された。3' 非翻訳領域の変異領域に 1 型株に特徴的な配列欠損が認められ、さらに新たな欠損部位も見つかった。

17) 本事業では、蛋白混合投与法や針無投与法による DNA ワクチンのドーズ低減に焦点を当てた。初年度には、この手法によりウエストナイルウイルス(WNV)のマウスモデルにおいては 0.1  $\mu\text{g}$  の 1 回接種で、また日本脳炎ウイルス(JEV)のブタモデルにおいては 1  $\mu\text{g}$  の 2 回接種で中和抗体を誘導できることを証明した。マウスにおける DNA ワクチンの初期評価に通常用いる 100  $\mu\text{g}$  と比較すると、格段のドーズ低減である。次年度には、デングウイルス(DENV)のマウスモデルを用いて、5  $\mu\text{g}$  (各型)のデング 4 価 DNA ワクチンが、全ての型に対して中和抗体を、また 1  $\mu\text{g}$  でも攻撃後に 2 次免疫応答を誘導できることを示した。最終年度は、DNA ワクチンのドーズ低減が可能となるメカニズムについて DENV モデルを用いて検討し、DNA・蛋白混合投与においてはフラビウイルス間の抗原交差性が効果的に働き、相互の免疫原性を増強する現象(交差免疫原性)に基づくことを示した。このことから、比較的頻繁に自然暴露を受ける流行地では、さらなるドーズ低減が可能と考えられた。

18) デングウイルスには 4 つの型のウイルスが存在し、抗原的に近縁であるが交差防御能は低い。近年、流行地からの入・帰国者などによって輸入感染症としてわが国に持ち込まれる症例が年間 100 例以上報告されている。通常デングウイルス検出は、急性期の血液から検出されるが、出血傾向の強いデング出血熱患者からの採血が困難な場合も多いため、尿や唾液からのウイルス遺伝子の検出を試みたところ、尿から検出できる症例があることを発見した(2006 年)。その後、61 症例に関して試みたところ、27 症例の尿、唾液 5 症例から遺伝子を検出し、8 症例に関して遺伝子解析にも成功した。尿からの遺伝子検出は、抗体が上昇しウイルスが消失した後も、ウイルス遺伝子を検出できることが確認され、ウイルス型別が特定できることから、実験室診断上有用である。また、18 年度には西インド洋諸島の国々で流行し、インド・スリランカに拡大傾向を見せていたチクングニヤ熱の実験

室診断法を確立するため陽性血清（患者血清）をフランスパスツール研究所から入手し、診断系を立ち上げた。そして平成 18 年、スリランカからの輸入症例 2 例を確認した。

19) 日本産ヤマトヤブカのウエストナイルウイルス感受性を明らかにした。アカイエカの日本脳炎ウイルス感受性は、チカイエカ、トウゴウヤブカ、ヤマトヤブカより高いことが示唆された。日本脳炎ウイルス株 4 種を接種したアカイエカでは、ワクチン株よりも 36～510 倍程高い力価が他 3 株で認められた。経口感染アカイエカでは、ワクチン株と Jath16 株が同程度の増殖であったのに対して、JaGAR01 株は 2 倍ほど、三重株は 10 倍ほどの高いウイルス力価が認められた。希釈したウイルスに経口感染した蚊では、個体間でウイルス増殖のパラツキが大きくなり、系統間にも差として現れた。

ライトトラップを用いて大分県下のアルボウイルス媒介蚊調査を行った。ドライアイスを使用した CDC ライトトラップで、牛舎で多数のコガタアカイエカとシナハマダラカを 2006 年 8 月に採集した。2006 年から 2008 年の採集個体数は、漸次少なくなる傾向にあった。

デング熱流行時期のタイにおいて、デング熱患者宅内におけるウイルス保有蚊を調査した。患者宅で採集したネッタイシマカから異なる年度にデングウイルス 2 型と 4 型を分離した。患者宅のウイルス感染蚊の割合は、年毎に変動したが、10～50% の蚊が感染していた。感染蚊の一部は、患者宅から近隣の家に移動していることが示唆されたことから、二次患者発生を阻止するために早期感染蚊検出のためのモデルを提案した。

20) 過去 3 年間に我々は、1) 日本脳炎ウイルス (JEV) リバースジェネティクス法の確立、2) JEV Beijing-1 株中の高病原性に関わる部位の同定、3) JEV Mie40 株中の高病原性に関わる部位の同定を行ってきた。1) において Mie41 株を用いて分子クローンの構築が完成した。これにより様々な変異 JEV ウイルスを作製することが可能となり、2)、3) の研究を遂行するための原動力となった。2) において、Beijing-1 株の E 領域の 1 アミノ酸がマウス病原性を規定することを明らかにした。さらに) では、Mie40 株の C 領域の 1 アミノ酸および NS4A 領域の 1 アミノ酸が病原性を規定することを明らかにした。

21) 平成 18 年度より 20 年度の 3 カ年における研究で 1. IgA 抗体捕捉酵素免疫吸着測定法 (IgA-ELISA) によるデングウイルス抗体検出法を確立し、日本人輸入感染例のみならず流行地台湾人デング患者の血清 IgA 抗体と IgM 抗体を解析し、血清 IgA 抗体が IgM 抗体検出より短期間に検出され感染様態を反映していることを示した。2. IgA-ELISA を用いて、日本人輸入デング症例での尿中、唾液中の IgA 抗体が検出され、出血熱を起こした患者における回復期での抗体診断の可能性を示唆した。3. 日本脳炎ウイルスの吸着・侵入の解析では C6/36 細胞は酸性条件では感染価が高くなり、ウイルスと細胞との融合が増強されることを示唆した。また、Vero 細胞をカルボキシリイオノフォア・モネンシンで Vero 処理し、JEV の吸着への影響をみたが、吸着を抑制しなかった。4. マウス樹状細胞とデングウイルス感染研究では、人での報告と同様に未熟な樹状細胞にデング 2 型ウイルスが感染し、感染後ウイルスが増殖していることを明らかにした。

22) 実験的脳性マラリア発症リスザル脳組織を用いた病理学的解析により、内皮細胞の変

性、血漿成分の浸出、非感染赤血球の漏出、さらには血管の破綻による輪状出血斑といった一連の病理学的変化が脳性マラリアの発症に伴って起こることを明らかにした。これらの病理学的変化は脳性マラリアで死亡した患者の脳組織においても観察され、脳性マラリアの発症に血液脳関門の破綻が深くかかわることを示唆し、脳性マラリアの発症予知に新たな視点を提供した。マラリア重症化の予知技術開発のためにバイオマーカーの探索は必須である。本研究ではマラリア重症化のバイオマーカーとして尿中肝臓型脂肪酸結合タンパク(L-FABP)に注目して検討を行った。ヒトL-FABP(hL-FABP)遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用い、マラリア感染の進行(原虫血症)に伴い尿中hL-FABP排出量が増加することを示した。これらの成果は、重症マラリアの早期診断法ならびに治療法の開発および患者管理に関する医療の向上に貢献することが期待できる。

23) 平成18年度は、マラリア媒介蚊の吸血習性について、中国雲南省とタイ北部地方の夜間成虫採集結果を分析し、種毎の現場での吸血選択の実態を明らかにした。続く平成19年度は、フィリピンにおいて過去に災害があった場所を含む5つの州でマラリア媒介蚊調査を実施し、得られたデータから有事の際のマラリア媒介蚊分布の変遷予測と対策を考えた。一方、最終年度に当たる平成20年度には、環境変化に起因するとも考えられるマラリア媒介蚊の同胞種について精査した。ベトナム山岳部のダイラスハマダラカを対象に、外部形態の再吟味と遺伝子解析を進めた結果、*An. sp. like takasagoensis*としたサンプルが、*Leucosphyrus*グループで報告されていない塩基配列を示し、系統樹内でもダイラスコンプレックスから離れた位置に付いたことから新種であると考えられた。

24) 東南アジア地域の熱帯熱マラリアの感染は1990年代の後半に開始されたメコン圏マラリア対策事業として収束にむかい、一部僻地の感染に限局されつつある。これは、ACT; Artesunate Combination Therapyによる初期治療を含んだ総合的マラリア対策の普及によるところが大きいが、ACTの不完全な普及は耐性マラリアの出現を助長する危険性があることが現在指摘されている。我々のラオスにおける僻地での調査では、ACTによる初期治療は村落ボランティアによって管理・施行され無料配布されているが、実際にはアクセスが難しい地域においては配布が適切に行われない現状があることがわかった。これらの改善のためにマラリア対策は僻地を重視した対策へとシフトされてきているが、実際にはそのアウトリーチ活動の難しさから、十分な改善にはつながっていないことがわかった。

そこで最終年度において貧困対策との関連において解析を行った。一方、アフリカ地域のマラリア感染は、アジアと比較して制圧にはいたっておらず、首都に限局した渡航においても注意が必要な状態が続いている。これは、ベクターの違い等、生物学的な要素もあるが、保健システムの脆弱性等の公衆衛生的要素が大きいは大きな要因となっていると考えられた。アジアにおいて、新たに問題となっている三日熱マラリアの感染については、再発・再燃が常に問題となるが、この背景においては不適切な投薬が関連していると推定された。このため、これに関しては更なる研究の必要と、邦人が受診する機会の多い現地医療機関や国内の医療機関での治療体制を整える必要も高いと考えられた。

25) わが国からの渡航者の数や外国からの訪日者の数が増えるに従い、マラリアの防疫にかかる予防の問題、患者管理である治療の問題が山積している。特に薬剤耐性マラリア（熱帯熱および三日熱マラリア）と重症マラリアの治療にかかる医療は、わが国での質がきわめて低く、この臨床技術の開発と全国への均霑化が強く望まれる。これらの問題に答えてゆくために、1)マラリア予防ガイドラインの改訂とその評価研究、2)ACTの有用性に関する臨床研究、3)輸入マラリア患者の臨床管理に関する研究を行い、わが国におけるマラリアの医療における最先端の臨床研究を展開した。1)では、マラリア予防ガイドラインの実施基準に照らし合わせ、国立国際医療センター国際疾病センター渡航者健康管理室を訪れた相談者の内 107 人に予防用にメフロキンを投与し、55 人がフォローアップでき、そのうち 78%が予防を徹底でき、22 人には何らかの副作用が認められた。予防の徹底率の高さ、副作用の発現率の低さが注目された。これらの運用評価の成績を受けながら、同ガイドラインの改定の作業も行った。特に、上記予防ガイドラインの改定の作業では、実施基準の項目に「渡航期間 7 日以上」という「絶対的適応」の必要条件を追加したことを特記する。2)および 3)では、マラリア新規治療法であるアーテミスニン誘導体の混合療法 (Artemisinin-derivatives Combination Therapy: ACT) の有用性に関する研究を、マヒドン大学熱帯医学部との共同臨床研究、ならびに国立国際医療センターの輸入マラリア患者を中心とした臨床研究で行った。それぞれに極めて優れた治療成績を収めた。今後、同混合療法 (ACT) の日本への適切な導入が強く期待される。

#### 分担研究者

當間孝子	琉球大学 教授
澤邊京子	国立感染症研究所 室長
江下優樹	大分大学 准教授
狩野繁之	国立国際医療センター 研究所 部長
松本芳嗣	東京大学大学院 准教授
高木正洋	長崎大学熱帯医学研究所 教授
小林 潤	国立国際医療センター 研究所 厚生労働技官
高崎智彦	国立感染症研究所 室長
小西英二	神戸大学 准教授
倉根一郎	国立感染症研究所 部長
名和 優	埼玉医科大学 講師
富田隆史	国立感染症研究所 室長

#### A: 研究目的

デング熱、チクングニヤ熱、ウエストナイル熱、黄熱、マラリアなど節足動物媒介感染症は現在も世界的に猛威をふるっており、チクングニヤ熱は 2005 年以降、インド洋島嶼国、インド、スリランカ、東南アジア諸国で大きな再興を起こしている。効果的なワクチンが未だ開発されていないデング熱は毎年のように世界規模で流行し、2008 年の輸入症例は 104 例と過去の最高数を記録した。一方、我が国の日本脳炎 (JE) 患者数は過去 10 年ほど顕著に減少が見られるが、豚の抗体保有調査が示すように、ウイルスの活動は東京以西では毎年 100% 近くの豚に新たな感染が認められている。媒介蚊であるコガタアカイエカの JEV 保有状況は地域によって非常に高い陽性率を示す

ことが確認されており、約4年間にわたって同じ地域の蚊からJEVの分離に成功した。分離株は全て1型に属し、近年東南アジア地域で分離された株と遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。日本脳炎(JE)は西日本を中心にウイルスの活動が活発に起こっているが、患者数は1960年代と比べると激減している。これはワクチン接種および蚊に刺されにくい家屋構造、媒介蚊の地域全体での発生数の減少が患者発生を抑えていると考えられている。しかし、地方または地域によっては、小児へのワクチン接種が必要であり、新しい細胞培養によるワクチンの普及が強く望まれるところである。

2005年から2006年にかけてインド洋諸島国、インド、スリランカ等で流行したチクングニヤ熱は、2004年のケニアでの大干ばつが原因であったことが示唆されているが、多くの流行国でヒトスジシマカが重要な媒介蚊であった。2005-2006年の流行では、全体で170万人以上の患者が発生し、2008年もスリランカ、マレーシア、タイ、シンガポール等を中心に流行が拡大している。これらの状況を踏まえて、我が国における媒介蚊の発生状況調査、媒介蚊の生態学的、生理学的解析、限定された地域における防除対策および防除に関する効果および費用の試算を試みた。

一方、マラリアはアフリカ大陸のサハラ砂漠以南の諸国で猛威をふるっており、インド、中近東、東南アジア、中国でも多数の患者が発生しており、毎年、80-100万人ほどの乳幼児の死亡の原因となっている。デング熱は中南米、カリブ海諸国、西太平洋諸国、インド、東南アジア等で数年おき

に世界規模の流行が起こっており、熱帯・亜熱帯地域で重要な蚊媒介性感染症である。両疾患は現在、輸入症例として50-100名ほどが報告されている。

ウエストナイルウイルス(WNV)が万が一我が国に侵入した場合には、ウイルスの増幅動物としての多種類の野鳥やウイルスを伝播する能力のあるアカイエカ種群の蚊が都市部を中心に多数生息していることを考えると、相当広範囲にWNVが広がる可能性が予想される。現在、媒介蚊の発生状況調査を行っている地方自治体は一部の府県に限られており、最近までの調査目的は日本脳炎の流行予測に関連する蚊の捕集で、郊外の水田地帯にある牛舎や豚舎での成虫捕集調査が中心であった。しかし、WNVの我が国への侵入を想定した場合、人口密度が高い都市部の媒介蚊の発生状況調査が必要である。1999年にニューヨークで突然流行が起こったウエストナイル熱は、7年間でほぼ全米にウイルスの活動域が広がり、現在までに23,707人の患者が発生し、928人が死亡している。渡り鳥、飛行機等による米国からの感染蚊の移入およびユーラシア大陸の極東地域からの感染した渡り鳥によるウイルスの持ち込みなどにより、我が国でいつウエストナイル熱が流行するか予断を許さない状況である。

日本各地で採集されたコガタアカイエカからJEVの分離を積極的に行い、得られたウイルス分離株における遺伝子解析を行うことにより、地域間に見られるウイルスの遺伝的関係を明らかにし、ウイルスの我が国での越冬生態の解明を試みた。また、我が国の都市部に分布する数種の蚊に関してJEVに対する感受性を再検討し、都市部で

捕集される数種蚊の JEV 感受性を評価した。また、東南アジアにおいて、デング熱患者が発生している地域において、ネッタイシマカを採集し、ウイルスの保有状況を解析し、住宅周辺における成虫防除の重要性を解析した。

DNA ワクチンの開発では、蛋白ワクチンとの混合投与によって従来の投与量の 1/10 ~ 1/100 程度の量で中和抗体を誘導する方法を詳細に検討した。デング熱の診断法は、急性期の血液からのウイルスの分離、遺伝子の検出が困難なため、抗体による血清診断が必要となる。また、出血傾向にある患者からの採血は困難が伴い、唾液、尿からの IgA 抗体または遺伝子の検出は有用性が高いと考えられ、基礎的な検査データを収集することが重要である。

1993 年から韓国の非武装地帯を中心に三日熱マラリアが流行し始め、その後、軍人のみならず民間人にも 5,000 名を超す患者が全国的に発生した。また、輸入感染症として我が国に発生するマラリアに関しては、医療関係者のマラリアに関する知識、理解が不足しており、適切な治療が行われているか疑問視する意見も散見される。

重症マラリアの治療、海外でのマラリア対策に関する問題点を解決する目的で、「マラリア予防ガイドライン」の評価研究を行い、同ガイドラインの改定を行った。また、また ATV (Artemisinin combination therapy) の臨床評価をマヒドン大学および国立国際医療センターで行った。東南アジアでは、熱帯熱マラリアの患者数が減少している反面、三日熱マラリアの重要性が高まっており、再発を防止するための根治療法の問題を含めて疫学的解析を行った。

重症マラリアのバイオマーカーの検索が今後の疾病管理に貢献する可能性が示唆された。

このように、我が国を取り巻く節足動物媒介性感染症の流行状況は常にある種のリスクを伴っている。我が国には、デング熱、ウエストナイル熱、チクングニヤ熱等の媒介蚊が密度高く生息しており、患者が多数入国または帰国した場合には、これらの感染症が人口密度の高い都市部で流行する可能性がある。その意味で、非常に基本的な調査として、媒介蚊の発生状況、吸血嗜好性、越冬生態、ウイルス感受性などの研究から、都市部での蚊幼虫の防除対策の立案を含めて広範な研究が必要となる。また、ウイルスの病原性に関する分子機構、アルボウイルスに関する新しいワクチンの開発、新たな診断法の確立、マラリアの予防対策の啓発および重症マラリア患者の適切な治療法の普及は重要である。開発途上国におけるマラリア対策の問題点、我が国の、特に都市部における媒介蚊の調査および防除対策に関する地方自治体の準備状況の問題点、緊急時の対応等の問題点も、本研究事業を通じて明らかになってきた。ヒトスジシマカは刺されて単に痒い蚊との認識を改めるべきである。この蚊は重要なウイルス感染症 (チクングニヤ熱) の媒介蚊であるとの視点から、積極的に防除対策を講ずる必要性が高いと考えられる。そして、流行が起こっていない平時からの媒介蚊対策が最も重要で効果的であると考えられる。

## B: 研究方法

- 1) 千葉県におけるカ類の生息実態調査  
ライトトラップの定点調査は立地条件、

環境の異なる千葉県北部の3地区で行った。千葉定点(平成18~20年度)は東京湾の海岸段丘で保存樹林と住宅地とが接する市街地の外縁部。成田定点(平成18~20年度)は北総台地に造成された大規模住宅団地。東金定点(平成19, 20年度)は九十九里平野の典型的な水田集落である。トラップは石崎製作所MC-8200型を建物軒下の地上高1.2mの高さに設置し、16時から翌朝9時まで連続運転して成虫を捕獲した。幼虫調査(平成18, 20年度)は千葉定点と鴨川市郊外の住宅地に人工的な小水域(水槽)を設定してカ幼虫の発生状況を観察した。薬剤感受性試験(平成19, 20年度)は人工容器に発生したアカイエカ、トラフカクイカ、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカの終令期幼虫を選別して用いた。薬剤は和光純薬製標準品のフェニトロチオン、フェンチオン、ダイアジノン、ペルメトリンを用い、カップ容器内の水100mlを所定の薬液濃度に調整して幼虫10個体を放ち24時間後の生死を観察した。試験は1濃度3連区で2回反復し、各濃度の平均死亡率を算出し、90%以上の死亡率が得られた濃度から薬剤感受性のレベルを検討した。

2) 我が国における疾病媒介蚊の発生状況と都市域における生態に関する研究

・東京都および近隣都市域におけるコガタアカイエカの生態をスウィーピング法で調査した。

・都市環境におけるアカイエカの飛翔距離(平成20年度): 兵庫県西宮地の野外の発生源より採集したアカイエカ幼虫を飼育し、羽化成虫を用いた記号放逐実験を行った。約10,000雌を放逐し4日間のCDCライトトラップとヒト囹法による再捕獲を行っ

た。

・トラップの設置場所による蚊捕獲数の違いに関する景観生態学的分析と考察(平成19年度)南大東島と新潟県佐潟で実施した媒介蚊調査結果を基に、トラップによって捕獲される蚊の個体数が周囲のどのような要因で決定されるのかを分析した。トラップ設置場所周辺の地域を居住区、林、湿地、水域、農耕地の5つのハビタットに区分し、それぞれのハビタットの構成比率を求めた。これらの景観要素に加えてトラップを設置した並木の方角、設置場所と林の位置関係などを説明要因として重回帰分析を行った。

・ヤマトクシヒゲカの吸血源動物同定と鳥マラリア原虫の検出(平成19年度)吸血して未消化の動物血液を体内に保持する蚊(吸血蚊)の採集を目的として、2007年4月から12月まで東京都内の公園でsweeping採集を行った。

・野外における吸血蚊の採集と潜伏場所に関する生態的調査(平成19年度)休息蚊や吸血蚊を採集するために布製赤色トラップ(直径36cm、奥行き70cmの袋状トラップ)、パイプトラップ(直径20cm長さ1mの紙製パイプを利用したトラップ)を試作し、野外における採集を試みた。また、口径36cmの捕虫網を用いて、日の出から1時間林床の植物上をゆっくり振りまわして捕獲される蚊を採集した。今回作成した2種類のトラップでは休息蚊を効率よく捕獲できなかった。

・渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査(平成18年度)渡り鳥の飛来地を対象として疾病媒介蚊の発生状況を調べた。調査地として東京湾沿岸の干潟地域を選び、ドラ

イアイストラップによって蚊の捕集を行った。

3) 横浜市とその近隣都市部における蚊類の生息状況調査および幼虫に対する殺虫剤効力試験

感染症媒介蚊対策の一環として、横浜市内および近隣の都市部において蚊類の発生状況調査を行った。ドライアイスを用いたライトトラップを用いて成虫の捕獲を行った。捕獲されたアカイエカ群の亜種分類を行った。横浜市内の雨水枡において、幼虫に対する IGR 剤の実地効力試験を行った。

4) ジフルベンズロン製剤による雨水枡対策の検討

横浜市保土ヶ谷区内の、およそ 200×200 m の範囲内を調査地とし、公道上の雨水枡 103 個を調査対象とした。18 年度は調査対象枡をジフルベンズロン製剤処理区、フェニトロチオン製剤処理区、無処理区に区分した。雨水枡の調査を平成 18 年 8 月 2 日から 12 月 20 日の間に 10 回行い、この間 8 月 2 日、8 月 18 日、10 月 17 日の 3 回薬剤処理をした。ジフルベンズロン製剤（三共ライフテック(株)製 1% デミリン発泡錠）は、1 枡に 1 錠投入した。また、フェニトロチオン製剤は、三共(株)製 10% スミチオン乳剤を用い、雨水枡中で約 2mg/l になるように希釈して散布した。19 年度は平成 19 年 6 月 13 日から 10 月 31 日まで 10 回、調査地内 50 個の雨水枡で幼虫等の発生に関する調査と 10 個のライトトラップによる成虫の捕獲を行った。この間 8 月 21 日と 10 月 5 日の 2 回、ジフルベンズロン製剤を調査地内の全雨水枡に処理した。20 年度は平成 20 年 6 月 20 日から 10 月 20 日まで、2 年目と同様に雨水枡の幼虫等調査とライトトラ

ップによる捕獲を行った。また、およそ 1 月に 1 回の割合で 4 回、ジフルベンズロン製剤を調査地内の全雨水枡に処理した。さらに処理区から約 5 キロメートル離れた約 300×200 メートル内の範囲を対照区として設定した。対照区内の雨水枡には薬剤処理をせずに、処理区と同様の調査、観察を行った。

5) ヒトスジシマカの産卵習性

・地上からの高さで産卵：調査は横浜市衛生研究所（磯子区）の建物側壁、隣立する樹木、非常階段に簡易オビトラップ（半切りペットボトル：水 約 800ml）を地表から高さ 0m, 0.5m, 1m, 2m, 3m, 5m, 8m, 16m, 20m の位置に吊り下げて行った。調査は、5 月から 8 月まで行い、延べ 81 個のトラップで産卵の有無を観察した。観察は 7～10 日おきに行い、幼虫の生息が確認されたトラップは回収し、室内で飼育、羽化成虫により種を同定した。

・屋内での産卵：市街地の一般住宅（延べ床面積約 114 m<sup>2</sup>）を実験場所に選定し、満腹に吸血した個体を一階部分で放飼した。実験は二回行い、一回目は 100 個体、二回目では 35 個体を放飼した。産卵確認用の容器としてヨーグルトの空き箱（8×11×高さ 11cm：水 350ml 入れる）を用いた。一階部分の応接、玄関、居間（2）、台所、トイレ、洗面所、階段部分（2）、二階の寝室、書斎に計 11 個を設置した。なお、台所には植物を挿した小容器（ワイングラス；口径：5.5cm：容量 50ml）を 1 個設置した。一回目では放飼から 3 日間（8/20～8/23）、二回目では放飼後 3 日目から 8 日間（9/4：放飼、9/7～9/14）容器内の産卵数を確認した。産み付けられた卵は記録後全て取り除いた。



6) 震災後に多発生が懸念された衛生害虫  
と媒介性感染症に関する調査結果

・中越沖地震： 高速道路が仮復旧し、柏崎市に一般人も入れるようになった7月20日に、被災の現状を把握し蚊やハエの発生を助長するような状況の有無、およびその可能性について実地調査を行った。蚊の調査は各所の雨水枡、雨水・排水溝の止水溜りなどでは柄杓で、公園などに放置された小さな容器や神社・寺などの手水鉢や花立などは直接スポイトや茶漉しで蚊幼虫の採集を行った。それらは調査水溜りや容器毎にポリビンに入れ、自宅に持ち帰り湯で殺したのち顕微鏡下で種を同定した。汚物が放置されている場所や仮設トイレの周辺では、ゴキブリやハエおよび小バエ類の有無を目視で調べ、存在が確認出来れば捕虫網で採集するようにした。

・岩手・宮城内陸地震： 6月20-21日に現地調査を行った。山間地での被災が中心で中越沖地震に比べライフラインなどの破壊・損壊は少なく、実際の蚊の生息調査を行った箇所数は少なかった。

7) 戸建住宅において簡便な防蚊対策を行った場合の効果

a) 幼虫対策を主とした実地試験： 富山県の農村地域の周囲が水田で囲まれた住宅団地(203区画)の1戸分敷地、南北約18m×東西約17mで実験を行った。除去することが出来ない池や水盤さらには雨水枡などには5月下旬から9月下旬までの、毎月下旬にフェニトロチオン5%・フタルスリン0.5%含有水性剤の50倍液を撒布すること、さらに、同薬剤を庭の草木の茂みにも噴霧することをを行い、敷地内に設置したCDCトラップで捕集される蚊が減少するかを調査

した。

b) 成虫対策を主とした実地試験： 2007年に都市部住宅街の住宅と、都市周縁部の住宅団地の住宅においてファン式携帯蚊取器を敷地に吊下げ、成虫を駆除することで敷地内を飛翔する成虫を減らすことが出来るかを実験した。2008年は都市部住宅街の住宅において、同様に防虫用品(虫よけネット;メトフルトリン含有、1週間で交換)を敷地の4隅とその中間の8カ所に24時間吊し、CDCトラップで捕集される蚊が減少するかを観察した。

c) バケツでの蚊発生の抑止モデル実験： 2008年に農村部の住宅団地の住宅敷地内に、モデル的に水を入れたバケツを配置して幼虫の発生阻止の実験を行った。15Lのバケツ4個を一組として、それを3組用意しそれぞれに水道水3Lを入れて、庭の北、南、東側に配置した。放置後1週間目に4個のバケツ組毎に、ヒメダカ1対を入れる、蚊取り線香(有効性分;アレスリン)3cmを入れる、防虫用品(虫こない小型;メトフルトリン含有)をバケツの内側に吊り下げる、何もしない(対照)を行い、その後の幼虫の発生状況を観察した。幼虫の発生が認められた場合は、蛹の段階で採集を行い羽化成虫で分類を行い同時に羽化数も数えた。

8) 沖縄県と鹿児島県奄美大島での日本脳炎媒介蚊とシマカ類に関する調査研究

・日本脳炎媒介蚊に関する調査： 沖縄本島における幼虫・成虫の調査は、2006年4月から2008年12月まで、北部の金武町(那覇市の北東約40km)で行った。幼虫調査は、毎月1回、田芋畑や水田、溝の6水域で行った。若令幼虫は実験室で4令幼虫になるまで飼育した。種の同定は標本を作製後、

生物顕微鏡下で行った。成虫については水田や田芋畑に近い2軒の人家(T,H)で、1週間に2回の割合でBLBライトトラップを用いて終夜採集を行った。成虫の同定は実体顕微鏡下で行い、破損がひどく形態で同定できない個体については Toma *et al.* (2000)が開発したプライマーを用いて行った。

・沖縄県伊平屋島、沖縄本島、西表島と鹿児島県奄美大島における幼虫の生息状況について：2008年に沖縄本島北西に位置する伊平屋島で水田などの20水域、沖縄本島では5月から7月に6地域(桃原、喜如嘉、羽地、金武、照間、大山)の水田、休耕田、田芋畑などで調査を行い、桃原では7、他の地域では18水域で行った。西表島では4、6月に21水域で調査を行った。奄美大島では2007年7月、2008年6月に、龍郷町と奄美市にある湿地、水田、田芋畑、泥田などの合計47水域で調査を行った。

#### 9) 西宮市における蚊防除の評価

一斉薬剤散布に先立ち西宮浜の住所区画ごとに、道路、施設、会社、マンション、一戸建て住宅別に雨水マスの数を調査し、雨水枡の位置をマップ上に記録した。使用薬剤および散布日は、平成19年度はピリプロキシフェン0.15%、*Bacillus thuringiensis israelensis*0.459%含有(チャブBT錠1g)、ピリプロキシフェン0.5%含有(スミラブ発泡錠0.5g)ジフルベンズロン1%含有(デミリン発泡錠3g)の3種薬剤を7,8,9月の初旬に散布した。平成20年度にはピリプロキシフェン0.5%含有(スミラブ発泡錠1g)ピリプロキシフェン0.5%含有(スミラブ発泡粒剤(1g)を用い、5,6,7月初旬の3回にわたり

雨水マスに、マップに基づき4班構成で人員を割り当て実施した。薬剤散布後の成虫調査は、平成19年度は7月より9月末まで各薬剤投入1週後より週1回、計11回行った。成虫採集地点は薬剤散布域である西宮浜内の6地点で、8月後半からは西宮浜以外の西宮市内の6地点を追加した。平成20年度には5月より7月末まで各薬剤投入のおおむね1週後より週1回、および8月より10月までの計22回行った。成虫採集地点は薬剤散布域では5月より8月末まで6箇所(計14回)、9月より10月末までの8回は2地点(初回よりの同一地点の公園)で行った。両年度ともに蚊成虫の採集時には市販のCDCミニチュアライトトラップを樹木(地上部からの高さは約3m)に吊るし、ドライアイス1kgを併用し、1昼夜作動させた。トラップは調査終了後持ち帰り、-20℃で麻酔後、蚊を種類別、性別に同定集計した。なお、アカイエカとチカイエカの判別は雌雄蚊共に個眼数によって両種を識別した。

#### 10) 疾病媒介蚊監視システムの構築に向けて—西宮市における蚊発生状況のGISによる解析

・供試地図および空中写真：デジタルマップとして、西宮市土木管理課が作成管理している西宮市国土基本図(地形図、1/2500DMデータ)およびデジタルマッピングデータファイル(平成11年作成、改定同17年)を、ArcViewで利用した。紙地図として、同土木管理課が販売している縮尺1:2,500西宮市地形図。これに道路雨水枡の位置を記入してスキャンした後、デジタル化して雨水枡をコード化した。下水道台帳閲覧システムによる下水道雨水・汚水の

合流・分流域分布図。西宮市都市計画情報閲覧システムから都市計画用途別地域を接合し一枚にまとめた。陸域観測技術衛星「だいち (ALOS)」その他、Landsat, Spot, Jels-1 などの衛星画像。これらは宇宙航空研究開発機構 JAXA との研究協力により提供された。

・地目別雨水枡蚊調査：道路雨水枡(計 7,682 箇所以上)、公園(全市 472 箇所のうち 52 箇所)、公共施設(学校・市の施設)(491 の内 75)、一戸建住宅(70,292 の内 500)、マンション(8,103 の内 43)、市営住宅(235 の内 235)を選び、調査面積、雨水枡の数、有水率、幼虫・蛹採集枡、採集された幼虫の数と種類を地区別調査区別に GIS にも利用できるように、Excel にまとめた。

・一戸建住宅・道路雨水枡データの GIS での展開：一戸建住宅については住宅ごとに、道路雨水枡については雨水枡ごとにコード化し、有水枡、幼虫生息枡、蚊の種類と採集数を図化し、また全市については調査区別にまとめて図化した。

・雨水枡の水質調査：蚊幼虫生息状況の地域差の要因を検討するため、公園・道路・一戸建住宅などの雨水枡で採水した検体を、水温、硝酸態窒素、アンモニア態窒素、COD、pH などを、簡易水質分析用バックテストで調べた。結果は GIS で解析できるように数値で表現した。

11) 西宮市の雨水マスに発生する媒介蚊の発生状況調査および公園におけるヒトスジシマカの発生密度の評価と環境要因について

ヒト罔法の 1 種である捕虫網を用いた 8 分間スウィーピング法および CDC トラップで捕集された蚊は種類、雌雄別に記録した。

各公園の面積は西宮市が保有している資料から入手した。3 m 以上の樹木は各公園でカウントし、地図上に樹木の位置を記録した。公園内および周辺道路の雨水マスに関しては、貯水の有無を記録し、幼虫の発生が認められる場合には、4 回の柄杓による採集を行い、持ち帰って幼虫総数を記録し、種の同定を行った。調査は 5 月 13 日から 10 月 28 日まで毎週行ったが、8 分間スウィーピング法によるヒトスジシマカの捕集数に関する解析には、5 月と 10 月の成虫発生密度がばらつくことが予想されたため、6 月から 9 月の間の 15 回の調査結果を利用した。

12) アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

アタマジラミ試料収集：2007 年度以降のアタマジラミ試料は、国立感染症昆虫医科学部のホームページに掲載した要領 (<http://www.nih.go.jp/niid/entomology/headlice/headlice.html>) で行った。おもに、医療機関、次いでアタマジラミ罹患者の保護者より試料が提供された。

分子ジェノタイプング：SNAPSHOT 法を適用し、ナトリウムチャンネルの D11E, M850I, T952I, L955F 置換変異を検出した。死亡し乾燥した状態で郵送されるシラミを使い、個体ごとに DNA を抽出し、マルチプレックス PCR でナトリウムチャンネル遺伝子の 3 断片を同時に増幅し、増幅された DNA を鋳型にして SNAPSHOT 反応を行い、最後に、対象とした 4 座位に関する遺伝子型を DNA シークエンサ上で解析した。卵の場合は、コロニーごとにまとめて DNA 抽出を行い、その中に抵抗性遺伝子が含まれていたかどうかについて解析した。

13) 蚊防除の省力化、自治体の衛生動物の防除態勢およびコロモジラミの生存条件に関する調査研究

・神奈川県川崎市川崎区内にある雨水枡(45×45 cm、滞留水量10~25 L)の水量を測定し、その水量に対し、ビニール紐でくっつけた銅ファイバー(銅イオンウール CW100)を0.5 g/L, 1.5 g/L, 4.5 g/Lになるように入れ、以後、ほぼ2週間ごとに、ひしゃく(柄杓)掬い取り法によって、幼虫密度について調査を行い、効果判定を行った。対象とした雨水枡にはイエカ群とヒトスジシマカが発生していたが、調査の際は両種を分けずにカウントした。また、実地試験を実施した公園内の雨水枡から滞留水および底土を採取して持ち帰り、持ち帰った採取水1 Lおよび底土200 gまたは脱塩素水をガラス容器に入れ、その中に銅ファイバー4.5 gを投入してそれぞれ銅イオン濃度の変動を比較検討した。

・食塩水等の殺幼虫効果および産卵抑制効果の検討：殺幼虫効果：150 mL容のプラスチック容器に、脱塩素水で所定濃度(0.75~1.75% (w/v))にした食塩水を120 mL入れて供試虫25匹を放した。少量の餌を与えて25°Cで保存し、その後、日数経過に伴う幼虫の死亡状況を観察し、得られた死亡率から、プロビット法(Litchfield-Wilcoxon法)により、50%致死濃度を算出した。また、ピレスロイド剤に対する感受性の異なるチカイエカ2系統について、食塩濃度1.5%のみで、殺幼虫効果を確認した。

・食塩による産卵抑制効果：吸血して4日間経過した蚊を入れたケージ内の底面に、アカイエカでは、脱塩素水で所定濃度(0, 0.5, 1.0% (w/v))に希釈した食塩水100 mL

を入れたプラスチック製容器(径8.5 cm)を、ヒトスジシマカでは、直径5 cm×深さ1.5 cmのガラスシャーレに上記食塩水約10 mLを注ぎ、その内周にろ紙を貼り付け、併置した。いずれのケージも産卵容器配置後、一昼夜、飼育室内(25°C, 16L:8D)で保存後、産卵(産卵舟)数を計数し下記の式により産卵抑制率を算出した。

・自治体を対象とした衛生動物への対応の現状に関するアンケート調査：全都道府県、特別区及び市町村の関連部署にアンケートを発送(計1,874通)して回答を求め、集計・解析した。質問は28項目を用意した。14) 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

コガタアカイエカの採集地は、千葉県酒々井町、富士見市、横浜市、小矢部市、岐阜市、諫早市(以上2002年採集)、南大東島、沖縄本島、西表島、ベトナム国ハノイ市、タイ国ナム・ヤ・ボン郡、スリランカ、インドネシア国ジャワ市であった。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。個体毎にゲノムDNAを抽出した。Tomaら(2000)による分子分類法を適用し、亜熱帯・熱帯地方におけるコガタアカイエカとその近縁種である*Culex vishnui*と*Cx. pseudovishnui*を予め分別した。コガタアカイエカと判定された個体のDNAを鋳型としてPCRにより*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、ダイレクト・シーケンシング法により609塩基長の配列を解析した。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として用いることにより、各