

厚生労働省科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）

「地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法の確立に関する研究」班

（分担） 研究報告書

ウエストナイルウイルス媒介チカイエカの幼虫期における高温の影響

分担研究者	江下優樹	大分大学医学部感染予防医学講座 准教授
研究協力者	小田 力	学校法人 吉田学園 九州医学技術専門学校 副校長
	在津 誠	佐世保市役所環境保全課
	小川保徳	長崎市役所環境保全課
	黒川憲次	長崎大学医歯薬総合研究科免疫学講座
	三根真理子	長崎大学原爆後障害医療研究施設
	吉井 勇	長崎県立大学大学院経済学研究科
	内田桂吉	順天堂大学生物学研究室 准教授
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス1部 室長
	倉根一郎	国立感染症研究所ウイルス1部 部長

研究要旨

ウエストナイルウイルス感受性のチカイエカ *Culex pipiens molestus* Forskal に対する季節的に変動する気温の影響を把握するために、屋外に設置された浄化槽内のチカイエカ幼虫の季節的消長を調べた。浄化槽内の水温は、外気温と同様に季節的に変化した。水温が約20℃になる5月下旬から6月にかけて、幼虫は最も多くなった。その後、7月には減少を始め、30℃になる8月と9月には幼虫はほとんど採集されなかった。10月には水温が20℃に下がり、幼虫は再び増えた。夏季の高温下では、1齢幼虫がほとんど採集されなかった。また採集された卵塊の卵は胚子に発育していたがふ化できなかった。これらのことから、夏季の気温上昇による高温はチカイエカ幼虫個体群の激減の重要な要因である可能性が高い。また、温暖化による気温の上昇は、幼虫の分布北限を拡大する可能性があること、および、異常気象による冷夏・暖冬では、チカイエカ個体数の急激な増加の可能性が示唆される。

A. 研究目的

チカイエカ *Culex pipiens molestus* Forskal は、形態分類学上のアカイエカ *Culex pipiens pallens* と同種で、形態的にはたがいによく似ている。しかし、生理生態学的観点からは、かなりの相違がみられる。両者を含めてアカイエカ群 *Culex pipiens* Complex と言われている。これら蚊種は、人獣共通感染症であるウエストナイルウイルスの媒介蚊であり、医学上からも

重要な蚊である。

チカイエカ幼虫は主として汚水槽、浄化槽、井戸などの地下水域で発生し、その成虫は無吸血産卵で増殖し、休眠せずに越冬する。一方、アカイエカ幼虫は道路の側溝のような地上水域に発生し、成虫は吸血産卵によって増殖を繰り返して、秋には吸血しない休眠状態に入って雌のみが越冬する (Oda, 1968)。

アカイエカ群の研究が進むにつれて、チカイ

エカの卵塊や幼虫が、アカイエカの発生源である地上水域でも発見され、秋から冬にかけてホテルなどでヒトから吸血することが明らかになった(朝比奈ら, 1962; 米本, 1971; 小田・上田, 1979)。チカイエカの地上水域における吸血・産卵活動は春と秋に活発となり、夏には低下する。この活動の変化には気温が関係していること、および地上で活動する成虫の多くは浄化槽などの地下水域で発生した成虫に由来することが推測された(Oda and Fujita, 1986; 在津ら, 1987)。これらの疑問点の詳細明らかにするために、浄化槽におけるチカイエカ幼虫個体群の季節的を調査した。

B. 研究方法

B. 1. 調査方法

調査した浄化槽は、長崎市の南部地区にあった K 小学校校舎屋外に隣接して設置されたものである。総コンクリート製の浄化槽の内部構造を図 1 に示した。浄化槽は総面積 34.3 m²、深さ 2m で、2 個の腐敗槽、1 個の酸化槽および 1 個の消毒槽から構成され、この内の酸化槽のマンホールの蓋のみが開閉可能であった。しかも酸化槽に蚊幼虫が発生しているのを確認したので、酸化槽を調査対象に選んだ。調査は 11 時~15 時の間に行った。この時間帯に水銀温度計を用いて水温と気温を測定・記録した。調査の都度、3 齢と 4 齢幼虫を含む老齢幼虫と蛹を柄杓で採集して実験室に持ちかえり、約 23℃の室温で羽化させて、約 20 個体の雌成虫には個別に産卵させる機会を与えた。また、同時に雄成虫の外部生殖器の形態を小田ら(1975)の方法に準じて調べた。ちなみに、無吸血産卵した雌成虫をチカイエカと同定した。供試した全ての雌成虫が無吸血産卵を行ったので、酸化槽から採集した幼虫個体群はチカイエカであると判定した。また、全ての雄成虫はチカイエカ特有の外部生殖器の構造をもってい

た(Tanaka *et al.*, 1979)。

次にチカイエカ幼虫(幼虫と蛹を含む、長さ 100cm の柄付の柄杓(直径 16cm、深さ 3cm)によるすくい取り法で採集した。10 回のすくい取りをくりかえし、各回に採集した未成熟幼虫を 70%アルコール中に保存した。双眼顕微鏡下で、幼虫の固定標本の頭幅を計測して齢期を判定し、その個体数を記録した。酸化槽の調査は 3 月から 8 月まで、原則として月 1 回行い、夏季には調査回数を増やした。なお、調査に際して、酸化槽内で採集した蚊の卵塊を、実験室に持ち帰り室温で卵塊別にふ化卵数を調べた。ちなみに、酸化槽とはばつ気によって処理水に旋回流をつくり酸素を供給して、微生物の作用により汚水をさらに浄化処理する槽である。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

図 2 に気温、水温およびチカイエカ未成熟幼虫個体数の季節的を示した。水温の季節的变化は気温の変動によって変化した。酸化槽内の水温は気温より 2~3℃低いことが確かめられた。幼虫の季節的变化をみると、20℃位まで水温が上昇する 6 月頃に幼虫数は急激に増加した。しかし、水温が次第に高くなり 30℃近くの高温になる 7~8 月には、幼虫数は逆に減少した。水温が 20℃以下に低下する 10 月には、6 月ほどではないが再び幼虫数が増加した。気温の影響を強く受ける浄化槽においては、蚊幼虫数の変化は一般な現象と考えられる。しかしながら、秋頃に観察された幼虫の増加は関しては後で吟味する。

先に述べた幼虫個体数の季節的变化と水温との関係を更に明確にするために、幼虫個体群の齢構成の季節的变化を検討した(図 3)。

次に図 1 に示した各採集時の幼虫の齢構成の季節的变化を図 2 に示した。4~7 月までは 1

～4 齢幼虫と蛹が採集された。しかし、8月になると1 齢幼虫が採集され、8月下旬と9月中旬には1 齢幼虫は全く採集されなかった。それとは対照的に、9月下旬～12月までは1 齢幼虫が増加した。この傾向は年ごとに繰り返されると推察される。

このように、成虫が観察されるにもかかわらず1 齢幼虫が夏季に激減したこと、および1 齢幼虫が採集できなかったことから、卵がふ化しなかった可能性が要因の一つとして考えられた。

そこで、8月から11月までの卵塊を酸化槽から採集して、実験室内の室温で孵化させてふ化率を表1にまとめた。その結果、8月に採集した多くの卵塊の卵は、胚子を保有しているにも関わらず、未ふ化のものが多かった。ところが、8月を除く他の時期に採集した卵塊のほとんどは正常にふ化した。このような未孵化卵が高頻度に出現する現象は、28℃以上の高温で羽化後受精したチカイエカ成虫によって産下した卵で認められることが実験的に確かめられている (Oda *et al.*, 1986; 1996)。酸化槽で観察された夏期の幼虫数激減の要因の一つとして、高温の影響が考えられる。

D. 考察

伊藤 (1971) は、ビルの地下室に設置された地下水槽 (浄化槽) 内のチカイエカ幼虫数の周年の消長を調査し、秋から春にかけて幼虫は増加し、初夏から夏の間は少なくなることを報告した。またこの間の地下水槽 (浄化槽) の水温は 19～23℃であることから、夏の幼虫個体群の減少と水温とは関係ないであろうと述べている。

和田・大藤 (1962) は、ビルの地下室の汚水槽での本種幼虫の季節的消長を調査し、夏から冬にかけて幼虫発生数は多くなり春に減ったと報告している。4月旬の水温は 22℃、真夏の

それは 28℃近くになる、冬でも 20℃以下に下がることはなかった。このことから幼虫の発生数の変化は温度とは関係せず、汚水槽にたまった水の自働的排水に起因すると報告している。このように、ビル地下室に設置された地下水槽内の幼虫発生数の季節的变化は、屋外設置型の浄化槽内のそれとは明らかに異なることがわかる。

今回調査に使用した酸化槽を含む浄化槽は屋外に設置されたもので、槽内の水温は外気温の影響を強く受け、水温の季節的变化は気温のそれにおおむね並行して変化していた。すなわち、ビルの地下室に設置された地下水槽と今回調査した酸化槽の環境条件は明らかに異なっていた。本調査では、水温が 20℃に達した 5～6月に、幼虫個体数最も多くなった。しかし、25℃位になる 7月以降はその数が減りはじめ、8～9月には幼虫密度は最低となり、その後水温が上昇して 20℃位になる 10月には再び幼虫数が増えることがわかった。したがって、この酸化槽内の幼虫数の季節的变化には、特に夏季における高温が関係していると考えられる。先に述べたように 8～9月にかけては少数の幼虫個体しか採集されず、いずれの幼虫も 2～4 齢で、1 齢幼虫は全く採集できなかった。この観察結果に加えて、8月に採集した卵塊は未ふ化卵を有するものであった。このタイプの卵塊を構成する多くの卵は胚子形成が進んでいるにも関わらず、ふ化できなかったものである。同様な現象は、28℃以上の温度条件で羽化・交尾後のチカイエカ雌成虫が産下した卵塊で実験的に確かめられている (Oda *et al.*, 1996)。また 30℃の水温下でチカイエカ幼虫を飼育すると特に雌の羽化率が極端に低くなり、その生存率も著しく低下して短命となる。また、生存した雌成虫が産下した卵塊当たりの卵粒数は減少する (Oda *et al.*, 1996)。嘉村 (1956) は、チカイエカ成虫の羽化率低下および卵粒数の減

少が 27℃で観察されたことから、それ以上の温度はチカイエカに不適温度かもしれないと報告している。

以上の結果、7~9月におこる幼虫個体数の減少には種々の環境要因が関与していることが考えられる。しかし、主要な要因の一つとして、夏季の高温による幼虫の生存率への悪影響と成虫の生殖障害が重要な要因となっている可能性が高いことが推察される。10月以降には幼虫個体数は増加した。この事実は今回の調査では明らかである。しかし、1齢幼虫は採集されており、水温は 20℃であるので生殖障害によるとは考えにくい。

屋外型の浄化槽の一部から多くのチカイエカが屋外に飛び出して、ビルの住民から吸血したという報告がある (Oda *et al.*, 1972)。このことから屋内に設置された浄化槽より屋外型浄化槽から羽化したものが野外に飛び出している可能性が高い。

夏季の気温上昇による高温はチカイエカ幼虫個体群の激減の重要な要因である可能性が高い。また、温暖化による気温の上昇は、幼虫の分布北限を拡大する可能性があること、および、異常気象による冷夏・暖冬では、チカイエカ個体数の急激な増加の可能性が示唆される。

E. 結論

(1) 浄化槽内のチカイエカ幼虫数は、季節的に変動した。

(2) 幼虫数の変動要因として、水温(気温)が関係している。

(3) 20~25℃前後では、多数の幼虫が発見された。しかし、29℃の高温が認められた8月~9月では、幼虫個体数が急激に少なくなった。

(4) 異なる水温下での蚊卵の孵化率を検討した結果、高温は孵化率の低下を示し、その原因は、

卵内の胚子死亡および胚子発育を阻害していると考えられた。

(5) チカイエカの分布要因として、幼虫に対する水温(気温)の影響が重要である。

(6) 温暖化による気温の上昇は、幼虫の分布北限を拡大する可能性がある。

(7) 異常気象による冷夏・暖冬では、チカイエカ個体数増加の可能性はある。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 在津 誠、小川保徳、黒川憲次、三根真理子、吉井 勇、内田桂吉、江下優樹、小田 力 (2008) : 浄化槽における犬糸状虫伝搬蚊、チカイエカ *Culex pipiens molestus* Forskal 幼虫の季節的变化、特に夏季における高温の影響。長崎県生物学会誌、(64):4-10。

(2) Jose D. J. Diaz Aquino, Wei-Feng Tang, Ryoichi Ishii, Tetsuro Ono, Yuki Eshita, Hiroshi Aono and Yoshihiro Makino (2008) : Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: The association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res.* (2008), doi:10.1016/j.virusres.2008.07.011

(3) 牧野芳大、江下優樹 (2008) : 地球温暖化の影響による亜熱帯地域の感染症拡大に関する疫学研究。国立大学法人 大分大学 環境報告書 2008 (2007年度)、41pp、2008年9月大分大学発行、2007:25-26。

2. 学会発表

(1) 山尾卓也、江下優樹、木原悠希、佐藤朝光、鹿志毛信広、見明史雄、Narumon Komalamisra、

Raweewan Srisawat, Yupha Rongsriyam, 水谷 哲也 (2008) : 蚊媒介性ウイルス検出を目的とした RDV法の改良。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月17-19日、群馬県、自治医科大学、Med. Entomol. Zool., 59 (Suppl.): 61, 2008。

(2) 江下優樹, 牧野芳大, 湯 偉峰, 青野裕士, 高崎智彦, 田島 茂, 高島郁夫, 小林睦生, 倉根一郎 (2007) : 蚊類のアルボウイルス媒介能 (12) アカイエカ体内における日本脳炎ウイルスの増殖。第60回日本衛生動物学会大会。2008年4月17-19日、群馬県、自治医科大学、Med. Entomol. Zool., 59 (Suppl.): 61, 2008。

(3) 湯 偉峰, 吉用省三, 吉田知佳子, 江下優樹, 青野裕士, 牧野芳大 (2008) : 大分地域における日本脳炎ウイルスの活動。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会、香川県、観音寺市、2008年5月30日(金)～31日(土)。日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集: 16, 2008。

(4) 江下優樹, 牧野芳大, 湯 偉峰, 青野裕士, 高崎智彦, 田島 茂, 高島郁夫, 小林睦生, 倉根一郎 (2008) : アカイエカにおける日本脳炎ウイルスの増殖について。第43回日本脳炎ウイルス生態研究会、香川県、観音寺市、2008年5月30日(金)～31日(土)。第43回日本脳炎ウイルス生態研究会 プログラム・抄録集: 34, 2008。

(5) 村田 亮, 好井健太郎, 荻和宏明, 江下優樹, 高島郁夫 (2008) : ウエストナイルウイルスのE蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響。第43回日本脳炎ウイルス生態学研究会、香川県、観音寺市、2008年5月30日(金)～31日(土)。日本脳炎ウイルス生態研究会プログラム・抄録集: 48, 2008。

(6) 水谷哲也, 山尾卓也, 江下優樹, 木原悠希, 佐藤朝光, 黒田誠, 関塚剛史, 西村美保, 酒井宏治, 福士秀悦, 緒方もも子, 中内美奈, 倉根一郎, 森川茂 (2008) : ウイルスの網羅的方法の改良と新しいブニヤウイルスの発見。

第146回日本獣医学会学術集会、宮崎県宮崎市ワールドコンベンションセンター・サミット(シーガイア)、2008年9月24日～26日、宮崎大学、講演集: ??, 2008。

(7) Yuki Eshita, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, Hiroshi Aono, Yoshihiro Makino, Tomohiko Takasaki and Hiroshi Ushijima (2008) : Dengue infection' s dynamics of vector mosquitoes in the patient' s houses, Thailand. Ordinary session on Vector-virus interaction. The Second International conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2008, "Global Innovation for Combating Dengue Infection". October 15-17, 2008., Phuket, Thailand. Abstract of The Second International conference on Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever 2008: 147.

(8) Yuki Eshita (2008) : Arbovirus infection' s dynamics of vector mosquitoes in experimental and natural conditions. Parasite Vector Genomics Symposium II in Sapporo, Oct. 21-22, 2008

(9) 水谷哲也, 山尾卓也, 江下優樹, 片野晴隆, 黒田誠, 関塚剛史, 渡辺俊平, 明石博臣, 大場邦弘, 上村茂, 梅村陽, 竹原一明, 木原悠希, 佐藤朝光, 西村美保, 酒井宏治, 福士秀悦, 西條政幸, 緒方もも子, 中内美名, 倉根一郎, 森川茂 (2008) : ウイルスの網羅的検出法(RDV法)と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見。岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月25日(土)第15回トガ・フラビ・ベスチウイルス研究会

(10) 村田 亮, 江下優樹, 前田秋彦, 前田潤子, 秋田紗希, 田中智久, 好井健太郎, 荻和宏明, 梅村孝司, 高島郁夫 (2008) : ウエストナイルウイルスのE蛋白上糖鎖付加がウイルス増殖に与える影響。第56回日本ウイルス

学会学術集会、岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月26日(日)～28日(火)、日本ウイルス学会学術集会・抄録集：ID05、2008.

(11)佐藤朝光、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweewan Srisawat、中島 学、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也：Rapid determination of RNA viral sequence (RDV) 法の改良法によるネッタイシマカ幼虫からの新しいブニヤウイルスの検出。第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山県、岡山市、岡山コンベンションセンター、2008年10月26日(日)、27日(月)、28日(火)、日本ウイルス学会学術集会・抄録集：2P048、2008.

(12)山尾卓也、江下優樹、佐藤朝光、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweewan Srisawat、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也(2008)：Rapid determination of RNA viral sequence (RDV) 法の改良によるネッタイシマカ幼虫からの新しいブニヤウイルスの検出。第61回日本寄生虫学会・第58回日本衛生動物学会南日本支部合同大会、2008年11月1日(土)・2日(日)、沖縄産業支援センター、沖縄県那覇市

(13)佐藤朝光、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、西村美保、Yupha Rongsriyam、Narumon Komalamisra、Raweewan Srisawat、鹿志毛信広、見明史雄、森川 茂、水谷哲也(2008)：Rapid determination of RNA viral sequence法の改良と本法によるネッタイシマカ幼虫からブニヤウイルスの検出。第25回日本薬学会九州支部大会、宮崎県延岡市、2008年12月6-7日、九州保健福祉大学、講演要旨集：1B-20.

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

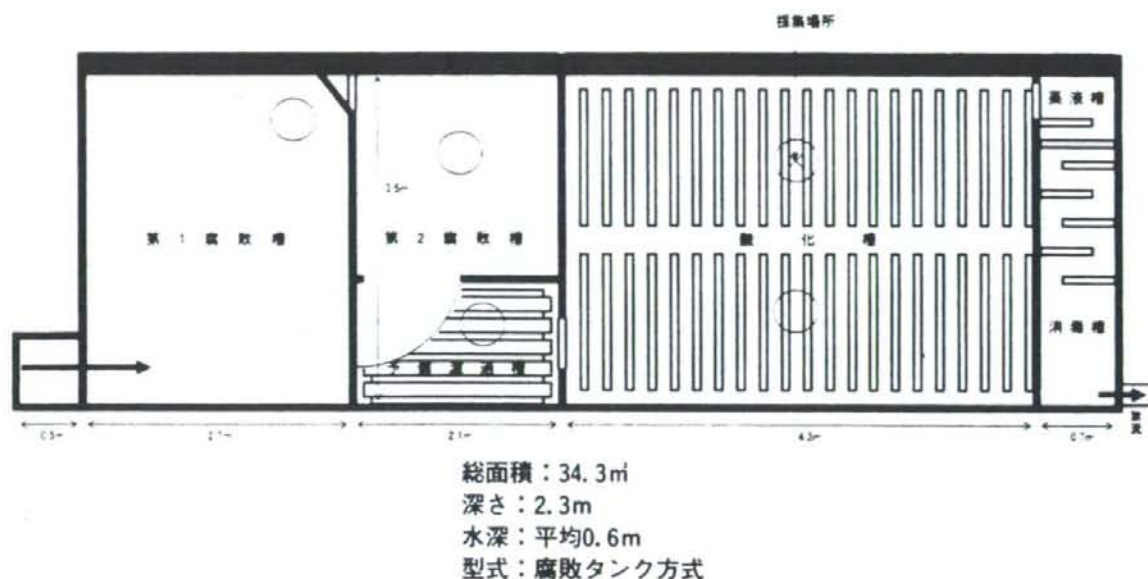


図1 屋外に設置された浄化槽

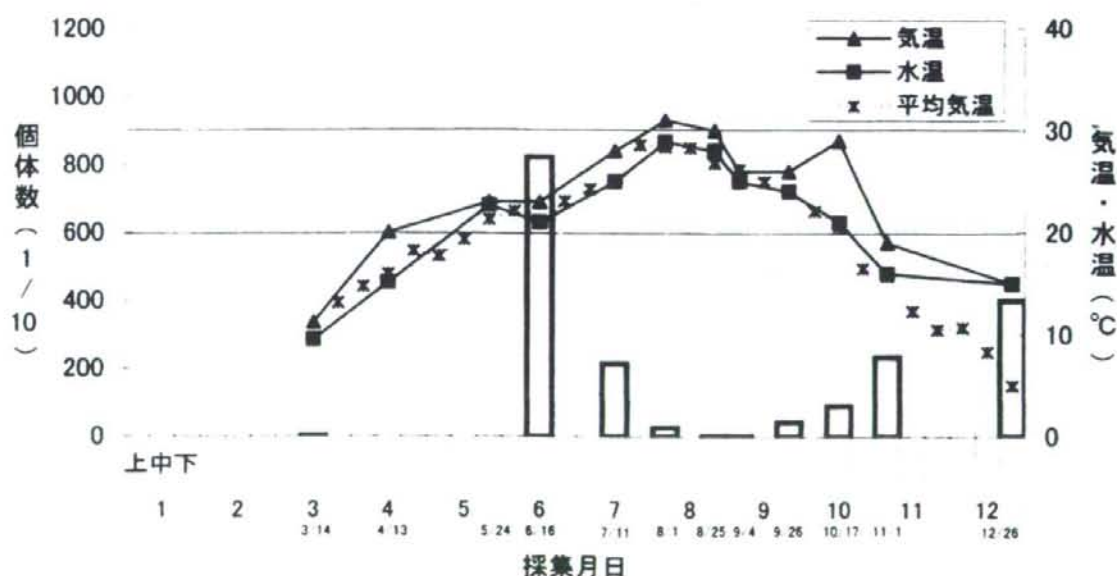


図2 浄化槽におけるチカイエカ幼虫数の季節的変化
 (平均気温は、長崎海洋气象台による。)

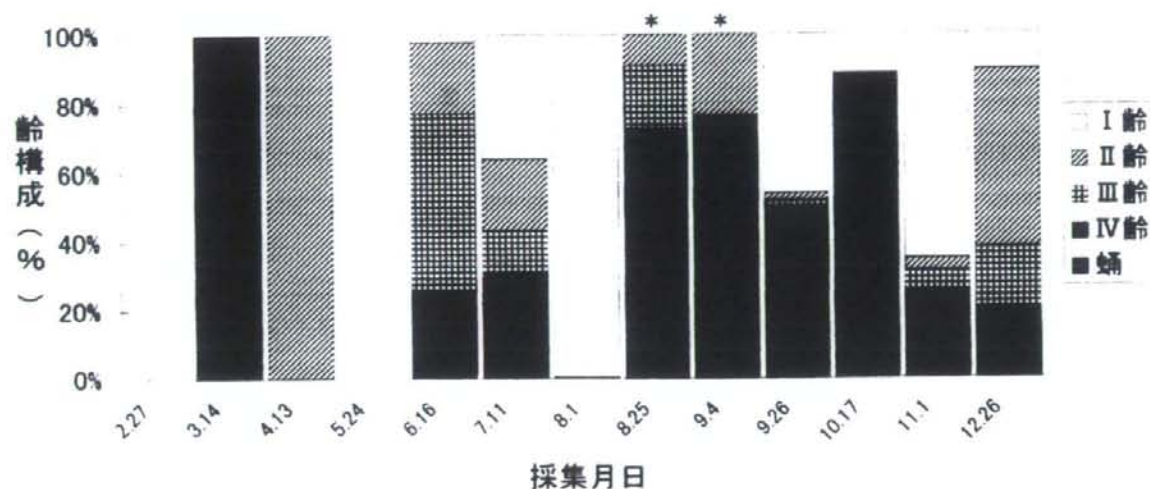


図3 浄化槽におけるチカイエカ幼虫の年齢構成の季節的変化

表1 浄化槽内から採取した卵塊の孵化率

採取月日	水温	卵塊数	総卵数	孵化卵数		未孵化卵数			
				個数	%	胚子あり	%	胚子なし	%
7月16日	25℃	30	1635	1578	96.5	12	0.7	45	2.8
8月1日	29℃	10	419	102	24.3	229	54.7	88	21.0
9月26日	24℃	22	1925	1844	95.8	33	1.7	48	2.5
10月17日	21℃	12	615	607	98.7	1	0.2	7	1.1
11月11日	16℃	15	659	639	97.0	10	1.5	11	1.7
12月26日	15℃	5	407	373	91.6	4	1.0	30	7.4

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

イノシシと共に分布を拡大しつつあるマダニ類に関する研究

分担研究者：滝澤剛則（富山県衛生研究所）

協力研究者：山内健生、小原真弓（富山県衛生研究所）

渡辺 護（国立感染症研究所・昆虫医科学部 客員研究員）

研究要旨

積雪量の多い富山県では、従来はイノシシが分布していなかったが、近年、主として岐阜県からイノシシが富山県内に侵入し、分布域を拡大しつつある。2008年に富山県内で捕獲されたイノシシの外部寄生虫を調査したところ、富山県では初の記録となるタカサゴチマダニと、野外において未確認であったタカサゴキララマダニを含む5種のマダニ類が採集された。タカサゴチマダニは、南西諸島や東南アジアなどに広く分布する南方系の種であり、富山県が本種の分布北限となる。タカサゴキララマダニは、南西諸島や東南アジアなどに広く分布する南方系の種であり、富山県では本種による1例の人体刺咬症例が報告されていたが、野外での採集例はなかった。両種は、富山県衛生研究所が1991年から実施している富山県内のマダニ調査で一度も発見されていないことから、近年のイノシシの分布拡大にともなって岐阜県から富山県へ分布を拡大しつつあるのかもしれない。

A. 研究目的

ニホンイノシシ（以下、イノシシ）は、本州～九州に分布し、本州では雪の少ない地方の里山に生息する。富山県では1925年頃より最近までイノシシの記録がほとんどみられず、稀に岐阜県境などで目撃される程度であったことから、この70～80年間はイノシシが分布していなかったと考えられている（南部，2002）。しかし、近年、主として岐阜県からイノシシが富山県内に侵入し、県内で分布域を拡大しつつある。このことは、1987年以降の暖冬で富山県内でも里山の積雪が少なくなったことが原因の一つであると考えられている（南部，2002）。

富山県ではこれまでに2科12種のマダニ

類が記録されており（近藤ら，1976；Yamauchi et al., 2009）、近隣諸県と比較してマダニ相の解析が進んでいる県だといえる。我々は、イノシシと共に富山県内へ分布を拡大しつつあるマダニ類が存在するのか否かを確認するため、県内においてイノシシの寄生マダニ類を調査した。

B. 研究方法

富山県内（図1）で2008年に害獣として駆除されたイノシシ16頭の毛皮を研究室へ持ち帰り、目視にてマダニ類を採集した。採集したマダニ類を70%エタノール中に保存し、顕微鏡下で同定を行なった。

C. 研究結果

5種 555 個体のマダニ類が採集された。もっとも個体数が多かったのはキチマダニで、ヤマトチマダニがこれに次いだ。

D. 考察

採集された 5 種のうち、タカサゴチマダニは富山県では初の記録となる。タカサゴチマダニは、南西諸島や東南アジアなどに広く分布する南方系の種であり、現時点では富山県が本種の分布北限と推定される。なお、四国と九州で採集された本種からは日本紅斑熱リケツシア (*Rickettsia japonica*) が検出されている。

タカサゴキララマダニは富山県の野外で初めて採集された。タカサゴキララマダニは、南西諸島や東南アジアなどに広く分布する南方系の種であり、富山県では本種による 1 例の人体刺咬症例が報告されていたが、野外での採集例はなかった。本種は病原性不明の *Rickettsia tamurae* を保有する。

両種は、富山県衛生研究所が 1991 年から実施している富山県内のマダニ調査でこれまで一度も発見されておらず、近年のイノシシの分布拡大にともなって岐阜県から富山県へ分布を拡大しつつあるのかもしれない。

このことは、国内各地において、地球温暖化にともなうイノシシの分布拡大にともなってマダニ類などの感染症媒介動物も分布を拡大している可能性を示唆するものである。

E. 結論

富山県内で捕獲されたイノシシに富山県新記録となるタカサゴチマダニと野外において未確認であったタカサゴキララマダニの寄生を確認した。このことから、積雪が

少なくなったことにより分布を拡大したイノシシと共に、南方系のマダニ類が分布を拡大しつつあることが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 山内健生・渡辺 護 (2008) 富山県衛生研究所における同定依頼検査で記録した富山県内のノミ被害。昆虫 (ニューシリーズ), 11(2): 95-98.

2) 渡辺 護 (2008) 2007 年 7 月の中越沖地震後に多発生が懸念された衛生害虫などの現地調査報告。ペストロジー, 23(1): 17-22.

3) 渡辺 護 (2008) 大規模災害と昆虫等媒介性感染症。資源環境対策, 44(9): 46-51.

4) Yamauchi, T. & Kuroki, T. (2009) Occurrence of epidermoptid mites (Acari: Astigmata: Epidermoptidae) in Japan, with its hyperparasitic record on the louse fly *Ornithomya avicularia aobatonis* (Diptera: Hippoboscidae). Comparative Parasitology, 76(1): 93-99.

5) Yamauchi, T., Obara, M., Watanabe, M., Ando, S., Ishikura, M., Shinagawa, Y., Hasegawa, S., Nakamura, K., Iwai, M., Kurata, T. & Takizawa, T. (2009) Survey of tick fauna possessing the ability to act as vectors of rickettsiosis in Toyama Prefecture, Japan. Medical Entomology and Zoology, 60(1): in press.

6) 谷口隆敏・黒田昭吉・渡辺 護 (2008) 新潟県内のリゾートホテルにおけるトコジラミ駆除事例. ペストロジー, 23(2): in press.

2. 学会発表

1) 山内健生・岸本年郎・角坂照貴・杉浦真治・岡部貴美子・藤田博己 (2008年4月19日) 「小笠原諸島の弟島と父島で採集されたマダニ類」 第60回日本衛生動物学会大会 自治医科大学 (下野市)

2) 山内健生・小原真弓・渡辺 護・安藤秀二・品川保弘・滝澤剛則・堀元栄詞・長谷川澄代・中村一哉・倉田 毅 (2008年9月16日) 「富山県のマダニ相と紅斑熱リケッチア」 日本昆虫学会第68回大会 香川大学 (高松市)

3) 渡辺 護・小原真弓・山内健生 (2008年11月3日) 「1民家における蚊の捕集成績 (2003~08年)」 第63回日本衛生動物学会西日本支部大会 神戸大学医学部 (神戸市)

4) 山内健生・小原真弓・渡辺 護・上田泰史・滝澤剛則 (2008年11月3日) 「富山県の住家性ネズミ類に寄生するノミ類」 第63回日本衛生動物学会西日本支部大会 神戸大学医学部 (神戸市)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

謝辞

本研究を実施するにあたり、赤座久明副主幹 (富山県自然保護課)、横畑泰志准教授 (富山大学)、南部久男学芸員 (富山市科学博物館) から材料と情報の提供を受けた。ここに記して深謝する。

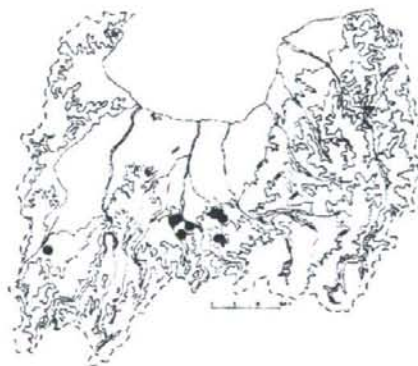


図1. マダニが寄生していたイノシシの捕獲地点

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

6

Epidemiological study of Flaviviruses in Guangdong province, China, 2005-2007

Hongbo Ma¹, Chang-Wen Ke², Junko Maeda³, Ikuo Takashima⁴, Ichiro Kurane⁵, Akihiko Maeda^{3*}

1. Zhuhai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong province, Zhuhai, P.R. China, 2. Center for Diseases Control and Prevention of Guangdong province, Guangzhou, P. R. China, 3. Department of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Japan, 3. Laboratory of Public Health, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Japan, 4. Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, Japan

Abstract

We performed an epidemiological study of mosquito-borne flaviviruses in humans, animals, and mosquitoes in Guangdong province, China, from 2005 to 2007. Cases of dengue (DEN) and Japanese encephalitis (JE) were analyzed at the Center for Diseases Control and Prevention in the province. A total of 1,430 cases of DEN were reported in Guangdong province from 2005 to 2007, while 236 suspected cases of human JE were reported within the same period. During 2005 and 2006, 2,763 mosquitoes were collected

Correspondence/Reprint request: Dr. Akihiko Maeda, Department of Prion Diseases, Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Kita 18, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-0818 Japan, E-mail: amaeda@vetmed.hokudai.ac.jp

belonging to 4 genera and 8 species. We inoculated the 132 pools of mosquito suspensions into a mosquito cell culture to isolate the viruses. JEV was identified using a real-time reverse transcription and polymerase chain reaction, and was isolated from one pool of Culex Sitiens obtained from a hoggery. Herein, we discuss the risk factors of mosquito-borne flavivirus infection in Guangdong province, China.

Introduction

The genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae* comprises over 70 viruses. Many flaviviruses are transmitted from animals to humans via arthropod vectors, mainly mosquitoes or ticks. Arbovirus transmission allows the viruses to cross species barriers as the arthropod, after biting one animal, can then bite other birds, reptiles or mammals that rarely come into contact with one another [1]. The viruses persistently infect insects and are transmitted through the trans-ovarian pathway and can persist in vertebrates such as birds, pigs and monkeys. Mosquito-borne flaviviruses, such as dengue (DEN) viruses (DENV), Japanese encephalitis (JE) virus (JEV), West Nile (WN) virus (WNV), St. Louis encephalitis virus, and yellow fever virus are important human pathogens, [2, 3]. These viruses cause a variety of symptoms, which range from a mild rash to life-threatening hemorrhagic fever in infected individuals. JE and DEN, in particular, are prevalent in southern China, and flavivirus infections have been a major public health concern in China since the early 1900s.

JE is one of the most important flaviviruses as worldwide epidemic encephalitis has been reported to infect an estimated 35,000 to 50,000 persons and cause 10,000 to 15,000 deaths annually [4]. The first reported JE epidemic occurred in 1871 in Japan. Since then, major JE epidemics have occurred in 1924, 1935, and 1948 [5]. JE was one of the most serious viral diseases in the early 1950s. Its incidence reached 15 to 20 cases per 100,000 people and the case fatality rate was as high as 30%. More than 20,000 cases were reported annually all over the world until 1992. Since 1993, the number of reported cases has been decreasing. In 1996, the number of JE cases fell below 10,000 cases [6]. As reported in the *Disease Surveillance Journal of China*, issued by the Institute of Epidemiology and Microbiology of the Chinese Academy of Preventive Medicine, there were 12,047 cases in 1998, 8,104 cases in 1999 and 11,565 cases in 2000. In October, 2000, 1,426 cases with 34 deaths were reported in Sichuan Province. This JE outbreak was an example of the hyper-endemic cases common to southern China.

DENV causes serious human diseases including dengue fever/dengue hemorrhagic fever (DF/DHF), which is prevalent in over 100 countries



Fig. 1. Geographical location of the cities and counties of Guangdong province, and other provinces surrounding Guangdong province, China

with over 2 billion people live in dengue-endemic areas [7]. A DF epidemic occurred in Jakarta in 1779 and then spread to dozens of countries. In China, DF was first reported in 1873 in Xiamen province, and the prevalence of the disease in China, became more serious from 1940 to 1945. Thereafter, DF/DHF was not generally observed for more than 30 years. However, the disease reemerged in Foshan, Guangdong province, 1978 [8] (Fig. 1). Since then, DF has intermittently occurred in Guangdong, Guangxi, and Hainan province (Fig. 1). Statistical studies indicated that the number of infected patient has reached 680,000 cases including more than 500 deaths. DENV type 1 to 4 (DENV-1 to -4) commonly occurs in China and a DENV-4 outbreak appeared in 1978 in Foshan in Guangdong province. In 1990, DENV-4 again broke out in Guangzhou, Guangdong province. DENV-3 infections were observed on Hainan Island in October, 1979, and soon spread to Zhanjiang, Foshan, Guangzhou, Shantou, and Shaoguan in Guangdong province (Fig. 1), and Beihai and Hepu in Guangxi province. Multiple outbreaks of DENV-1 were reported in Guangdong province in 1979, 1985, 1991, 1995, 1997, 1999, and 2000, with a particularly large outbreak reported in 2006 (Table 1). An outbreak of DENV-2 infection began in September, 1985, in the northern parts of Hainan Island, and spread to Guangzhou, Guangdong, and Beihai, Guangxi province. Further DENV-2 epidemics occurred in Guangdong province in 1993 and 1998, and in Fujian Province in 1999. In this review, we will discuss the epidemiological situation of recent DENV and JEV epidemics in Guangdong province, China.

Table 1. Dengue fever epidemics in Guangdong province in 2005 -2007

Year	No. of cases	Morbidity (1:100,000)	Death	Mortality (1:100,000)	Districts (No. of case)	Serotype ¹
2005	23	0.03	0	0	Guangzhou (12), Shenzhen (8), Zhuhai (1), Zhangshan (1), Dongguan (1)	DENV-1
2006	1010	1.1	0	0	Guangzhou (765), Shantou (177), Foshan (30), Yangjiang (22), Chaozhou (15), Shenzhen (1)	DENV-1
2007	397	0.43	0	0	Zhanjiang (205), Zhuhai (129), Guangzhou (309), Zhangshan (19), Chaozhou (5), Shenzhen (4), Foshan (2), Zhaoqing (1), Shantou (1), Dongguan (1)	DENV-1

1. Causative agent of outbreak

1. Materials and methods

1.1. Human case studies

Case studies of DF and JE were performed in the Center for Diseases Control and Prevention in Guangdong province from 2005 to 2007. Data regarding DF cases in 2005, 2006, and 2007 are shown in Table 1.

1.2. Collection of pig sera

Pig sera were collected from piglets from 4 hoggeries in Zhuhai, Guangdong province. A total of 1,318 pig serum samples were collected from 2005 to 2006. In 2007, 710 pig blood serum samples during the pre-epidemic season from March to May, and 718 serum samples during the post-epidemic season from November to December, were collected to examine the JEV infection rate. A pig anti-JEV IgG ELISA kit (Wuhan Animal Biologicals Co., China) was used to detect anti-JEV IgG in this study.

1.3. Mosquito capture and the production of the mosquito suspension

Mosquitoes were captured by mosquito-light-trap in 4 hoggeries and at the ports around Zhuhai from January 2005 to December 2006. A total of 2,763 mosquitoes were captured, of which 2,543 mosquitoes were from Zhuhai and the remaining 220 mosquitoes from other cities in Guangdong province. Mosquito samples were sorted after species identification. Suspensions, each containing 20 female mosquitoes per sample, were made by grinding the mosquitoes and were stored at -80°C until use.

1.4. Collection of human sera or cerebrospinal fluid

A total of 236 human sera or cerebrospinal fluid samples from suspected cases of JE were collected between 2005 and 2007. A further 1,036 serum samples from healthy persons from Zhanjiang city and

Fengkai county (Fig. 1) were collected for the detection of anti-JEV IgG and IgM in 2007. Anti-JEV IgG and IgM ELISA kits (Zhongshang Biotechnology Co., China) were used to detect antibodies against JEV.

1.5. Cell culture and virus isolation

The mosquito cell line, C6/36, was maintained in Eagle's Minimum Essential Medium with Earle's balanced salt solution supplemented with 5% fetal calf serum, 2% L-glutamine, 1% sodium bicarbonate, 2% penicillin-streptomycin-amphotericin B, and 1% non-essential amino acid. Monolayer cells were inoculated with 100 μ l of mosquito suspension and then incubated at 35°C for 7 days. Regular observation under an inverted microscope was maintained to detect visible cytopathic effects (CPE). Blind passaging was repeated 3 times. The supernatants of culture showing a CPE were collected and stored at -80°C until use.

1.6. RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA was extracted from 200 μ l of the mosquito suspensions, and the supernatants of cell cultures inoculated with the mosquito suspensions using a High Pure Viral RNA Kit (Roche, Germany). RT-PCRs were performed according to a standard RT-PCR protocol using a TaKaRa OneStep RT-PCR Kit (TaKaRa BioTech, Japan). Each 50 μ l of the reaction mixture contained 5 μ l of 10 x buffer, 10 μ l of 25mM MgCl₂, 5 μ l of each 10mM dNTP, 40U of recombinant RNasin, 5U of AMV reverse transcriptase (RTase), 5U of Taq DNA polymerase, 25 pmol of both the forward and reverse primer, and 5 μ l of template RNA. RT was performed at 50°C for 30 min, following an initial denaturation at 95°C for 2 min, and the reactions were performed for 35 cycles of heat denaturation at 94°C for 1 min, primer-annealing at 55°C for 1 min, DNA extension at 72°C for 1 min, and were completed by a final extension of 10 min at 72°C. Subsequently, we performed electrophoresis using 10 μ l of the amplicons in a 1.2% Tris EDTA-Acetate-agarose gel. The gel was soaked in ethidium bromide (Et-Br), and the DNA bands stained with Et-Br were observed under UV light.

1.7. Real-time RT-PCR

TaqMan MGB real-time RT-PCR assays were performed to detect JEV, DENV or WNV RNA. RNAs were extracted from the mosquito suspensions as well as from the cell supernatants, and were inoculated with the mosquito suspension. A TaKaRa One Step RT-PCR Kit was used for the assays. Each 20 μ l of the reaction mixture containing 10 μ l of 2x One Step RT-PCR buffer, 0.4 μ l of TaKaRa Ex Taq HS (5U/ μ L), 0.2 μ l of M-MLV RTase (200U/ μ l), 0.4 μ l of RNasin (40U/ μ l), 2.6 μ l of the primer mixture and TaqMan MGB probe (Table 2), and 4 μ l of template RNA was

Table 2. Oligonucleotides used in this study for WNV, DV and JEV TaqMan MGB Real-time RT-PCR

Virus	Primer and probe ¹	Location	Sequence
WNV	WNV-FP	132-153	5'-GGCTGTCAATATGCTAAAACGC-3'
	WNV-RP	204-182	5'-GCTCAACATAGCCCTTTCAGTC-3'
	WNV-probe	165-181	5'-FAM-CGTGTTGTCCTTGATTG-MGB-3' ²
DENV	Den-FP		5'-GCATATTGACGCTGGGAGAGA-3'
	Den-RP		5'-GGCGTTCTGTGCCTGGAAT-3'
	Den-probe		5'-FAM CAGAGATCCTGCTGTCTC MGB-3' ²
JEV	JE-FP		5'-GCATCAAACAGCATATTGACACC-3'
	JE-RP		5'-GGCGCTCTGTGCCTAGTAGC-3'
	JE-probe		5'-TET-CTGCTCTATCTCAACATC MGB-3' ²

1. FP, RP, and probe indicate forward, reverse, and fluorescein-conjugated probes, respectively.

2. FAM- or TET -conjugated MGB real time RT -PCR probes

subjected to the assay. Real-time RT-PCR was carried out in an ABI PRISM[®] 7000 Sequence Detection System for 45 cycles at 42°C for 15 min, at 95°C for 2 min, at 95°C for 10 sec and at 62°C for 30 sec.

1.8. Nucleotide sequencing

The RT-PCR amplicons were purified with a QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, German), and cloned into a pGEM[®]-T Easy Vector (TAKARA, Japan). Subsequently, the plasmids were purified using a QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, German). Nucleotide sequencing of the inserts was performed according to the cycle sequencing protocol (Sangon, Shanghai China).

2. Results

2.1. DF in Guangdong province between 2005 and 2007

A total of 1,430 local cases of DF were reported in Guangdong province between 2005 and 2007 (Table 1). The annual incidence was from 0.03 to 1.1 cases per 100,000 people. DF repeatedly occurred in 10 cities, and clustered in areas of Guangzhou, Shantou, Zhanjiang, and Zhuhai cities (Table. 1) from March to December. Epidemics ran from June to November and peaked from August to October (Fig.2). We can not explain why the peak month of the DF epidemics differed between 2006 and 2007. Cases were reported in each age group with the majority of reported cases occurring in those aged between 15 and 54 years. Most cases were household workers, persons waiting for employment, peasants, student-workers. Cases imported from foreign countries were also reported each year, mainly originating in Southeast Asian countries such as Singapore,

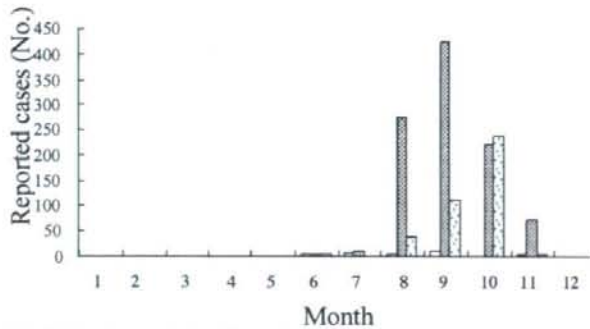


Fig. 2. Monthly incidence of DF in Guangdong province between 2005 and 2007

The monthly number of DF cases between 2005 and 2007 in Guangdong province are plotted. The incidence of DF in 2005, 2006, and 2007 are shown as open, cross-hatched, and dotted bars, respectively.

Indonesia, and Cambodia. The primary serotype of the DENVs causing the outbreaks was the type I strain (Table 1).

In 2006, a DENV-1-related DF outbreak occurred in Guangdong province. Phylogenetic analysis of the outbreak by analyzing the sequence of DENV E genes indicated that DENV-1 is currently circulating in the province and was the cause of the DF epidemic [9].

A total of 129 cases of DF were reported during a DF outbreak in the suburbs of Zhuhai, Guangdong Province, from August to October, 2007 (Table 1). The incidence in those aged between 20 and 39 years was the highest at the peak of infection during the first ten days in September. The pathogenic virus was identified as DENV-1. The reason why the recent DF outbreaks in China were localized in Guangdong province, might be the increasing frequency of rain, the long-term accumulation of stagnant water, and the subsequent rapid multiplication of vector mosquitoes in the province. The Breteau Index was higher than in previous outbreaks, and the wave crest occurred in both August and October in these outbreaks (Fig. 2).

2.2. JE in Guangdong province, China

2.2.1. Sero-surveillance of JE in human

A total of 236 suspected cases of JE were reported between 2005 and 2007, of which 178, 31 and 27 sera and cerebrospinal fluid samples were obtained from the patients in 2005, 2006 and 2007, respectively. Of these samples, 57 were found to be anti-JEV IgM-positive in 2005, 6 in 2006 and 27 in 2007.

Table 3. Serological test of serum JEV IgG in pigs in Zhuhai, Guangdong province

Hoggery ¹	Sample No.	Positive No.	Positive Rate (%)
No. 1	296	132	44.6
No. 2	300	118	39.3
No. 3	317	145	45.7
No. 4	405	94	23.2

1. We collected the pig serum samples from 4 hoggeries in Zhuhai, Guangdong province for this experiment.

Immunity level against JE was examined in healthy persons sampled during the pre- (April to May) and post-epidemic seasons (November to December) in 2007. A total of 160 pre-epidemic season and 273 post-epidemic serum samples were collected in Zhanjiang city for the detection of anti-JEV IgG. The positive rate for JE antibodies was 19.38% (31/160) in the pre-epidemic samples, whereas that in the post-epidemic samples was 42.12% (115/273). A further 300 pre-epidemic and 294 post-epidemic serum samples were collected and examined in Fengkai county. The positive rate for pre-epidemic samples was 38.0%, whereas that for post-epidemic samples was 43.19% (127/294).

2.2.2. Sero-surveillance of JE in pigs

In 2005 and 2006, 1,318 pig serum samples were collected from pigs in 4 hoggeries (No.1 to 4) in Zhuhai to examine the incidence of JE IgG as part of a sero-surveillance program in pigs (Table 3). The total positive rate for JE antibodies was 37.1% (489/1318). Among them, the highest positive rate was in No.3 hoggery (45.7%), followed by No.1 hoggery (44.6%) and No.2 hoggery (39.3%). No.4 hoggery had the lowest positive rate (23.2%). These results suggest that vaccination efficiency was dependent on the hoggery.

In 2007, a JE outbreak occurred in Zhuhai, Guangdong province. We compared the incidence of anti-JEV antibodies in pigs pre- and post-epidemic (Table 4). In the pre-epidemic season, from March to May, 710 pig serum samples were collected from 3 hoggeries in Zhuhai, and the

Table 4. Serological test of serum JEV IgG in pigs during the pre- and post-epidemic seasons in 2007

Hoggery	Pre-epidemic season ¹			Post-epidemic season ²		
	Sample No.	Positive No.	Positive rate (%)	Sample No.	Positive No.	Positive rate (%)
A	230	95	41.3	238	216	90.76
B	240	60	25	240	223	92.92
C	240	55	22.92	240	225	93.75

1. Pig sera were collected March to May in Zhuhai city.

2. Pig sera were collected November in Zhuhai city.