

したコガタアカイエカ雌の吸血と産卵は抑制され(栄養生殖分離), 秋に JEV を取り込み越冬する雌蚊の数は極めて少ないと考えられたからである. 本研究では, JEV の主要な媒介蚊であるコガタアカイエカに加え, 室内感染実験から JEV 媒介能があると報告されたアカイエカおよびチカイエカ(Turell *et al.*, 2006a, b)の耐低温性と栄養生殖分離(以下, 便宜上休眠と称する)の特徴から, イエカ体内での JEV の越冬の可能性を検討した.

B. 研究方法

実験に用いたイエカ類は, 2008 年出雲市捕集のコガタアカイエカ, 同年新宿区捕集のアカイエカおよび 2003 年渋谷区捕集のチカイエカである.

休眠発現の臨界日長を調べるために, 孵化後 2 日目の 1 齢幼虫を 4 つの異なる飼育条件(25°C, 16L:9D; 20°C, 11L:13D; 15°C, 11L:13D; 10°C, 10L:14D)下で飼育し, 羽化 7-10 日後の成虫飼育ケージにマウスを一晚入れ吸血を促した. 吸血した雌成虫は個別に飼育し産卵率を求めた. 次いで, 高温・長日(25°C, 16L:9D)の条件下で羽化した成虫を上述した 4 つの異なる飼育条件下で飼育し, 生存日数を調べた.

東京都内の 2 箇所(新宿区および品川区)において, それぞれアカイエカおよびコガタアカイエカを毎月 sweeping 採集し, それらの脂質含量を測定した. 埼玉県下で見出された越冬中のアカイエカに対しては, 脂質含量に加え, 脂肪酸組成を解析した(沢辺ら, 2008).

C. 研究結果

20°C 下での休眠を誘導する臨界日長

(50%の個体の吸血あるいは産卵が阻害される日長)を調べた結果, アカイエカは 12.5 時間, コガタアカイエカは 13.8 時間よりも短い日長で孵化した幼虫の羽化後の雌成虫はその吸血が抑制された(図 1). また, アカイエカは 12 時間より短い日長でも完全に吸血が阻害されることはなかった. 結果は省略するが, 両種ともに産卵率も日長が短くなると抑制された. 一方, チカイエカは短日下でも吸血や産卵が阻害されることはなく, 休眠は誘導されなかった. 先に算出した臨界日長(12.5 時間および 13.8 時間)を東京における月平均日長時間に当てはめると, 前者は 9 月下旬, 後者は 8 月下旬頃と推定される(図 2). これより遅い時期に孵化したアカイエカおよびコガタアカイエカの羽化成虫は, その吸血と産卵が阻害されると考えられる.

羽化後の成虫を上述した 4 つの条件下で飼育した結果, アカイエカは他の 2 種に比べ最も寿命が長く, 特に 15°C 短日条件下では平均 155.5 日(最長で 282 日)生存した(図 3). 結果は省略するが, 5°C 前後の非常に低い温度条件下では, アカイエカの 50%生存率は 80 日を超える(現在も調査継続中のため, 76 日目の生存率 55%より推定した)と思われるのに対し, コガタアカイエカは 22 日であり, アカイエカは有意に長命であった. 夏季に羽化したアカイエカが越冬する可能性が高いことが示唆された.

野外捕集のアカイエカおよびコガタアカイエカの脂質含量を測定した結果, 両種ともに晩秋から冬季に向かい脂肪を蓄積する傾向が認められた(図 4). 脂肪酸組成の解析から, 越冬中のアカイエカのパルミトオレイン酸含量は 50%と顕著に高かった(図 5). 以上の結果は, アカイエカが冬季低温下での

生存に適していることを示唆している。

D. 考察

1960年代後半、コガタアカイエカからのJEV分離をはじめ、蚊体内でのウイルスの越冬の可能性については多くの実験と議論がなされた。例えば、原田ら(1968)は、野外で採集されるコガタアカイエカを観察し、横浜地方においては、夏至を過ぎて日長が短くなり始めて間もなく休眠が誘導され、9月を境に急激にその割合が上昇すると報告した。和田ら(1966)、大森ら(1967)は、越冬個体群の発見と休眠性発現との関係から、本種の越冬は9月頃であろうと推定した。このように、秋にJEVを取り込み越冬するコガタアカイエカの数は極めて少ないと考えられたため、本種体内でのJEVの越冬の可能性はほとんどないと結論された(小田ら, 1978)。

一方、アカイエカにおいては、休眠誘導の臨界日長に地理的変異があるものの、11-13時間であると推定された(Oda *et al.*, 1988)。さらに、Makiya and Sakurai(1975)は、3月愛知県で越冬蚊とみなされるアカイエカを採集し、それらを水だけで飼育した際の生存日数から寿命を逆算したところ、アカイエカが晩夏にJEVを取り込み、冬季にウイルスを維持して翌春脊椎動物にウイルスを伝搬する可能性はあると考察している。

本実験で推定されたコガタアカイエカおよびアカイエカにおける休眠誘導の臨界日長は、野外捕集蚊を用いたこれら先人の観察結果とほぼ一致しており、我々も同様に、コガタアカイエカが国内で越冬できる地域は限局され、さらに、JEVを取り込んで越冬する確率は非常に低いと考えた。一方、冬季のアカイエカは、パルミトオレイン酸(融点が

-0.5°C~+0.5°Cと非常に低い脂肪酸)の蓄積によって、低温下でも長期間の生存が可能である。また、休眠に入る前に羽化したアカイエカ雌の低温下での生存日数は9か月以上を超えることを室内実験で確認し、夏季に羽化した個体が越冬する可能性は高いと推察された。このようなアカイエカの生理・生態的特徴はむしろJEVの越冬に適していることを支持しており、冬季のコガタアカイエカ以外のJEVの感染環に大きく関与すると思われる。

結果は省略したが、休眠の誘導と覚醒を再現した室内実験において、低温・短日を経験させたアカイエカ雌が8か月以上も生存し、覚醒後にその半数が吸血した。今後はこの結果をもとに、JEV感染蚊に人工的に休眠誘導と覚醒を経験させ、蚊体内でのウイルスの増減、あるいは動態を調査し、JEVの越冬に言及したい。

E. 結論

イエカ類の栄養生殖分離を発現する日長、および冬季の生存を耐寒性からJEVの蚊体内での越冬を検討した結果、コガタアカイエカが国内で越冬できる地域は限局され、その確率は低いと考えられるが、アカイエカの生理・生態的特徴はむしろJEVの越冬に適していると結論された。特にアカイエカでは、夏季にウイルスを取り込んだ雌成虫がそのまま越冬する可能性が高いことが示唆され、コガタアカイエカ以外の感染環に大きく関与するものと思われる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 沢辺京子・佐々木年則・森林敦子・葛西真治・津田良夫・小林睦生. 2010. 日本脳炎ウイルスのアカイエカ体内での越冬の可能性について. 第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島市, 2010年4月2-4日
- 2) 森林敦子・澤邊京子・金京純・津田良夫・小林睦生. コガタアカイエカの休眠導入期から覚醒期における脂質含量と脂肪酸組成の変動. 第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島市, 2010年4月2-4日
- 3) 森林敦子・澤邊京子・金京純・津田良夫・小林睦生. 2009. 東京都の公園に秋に飛来したコガタアカイエカの脂質含量と脂肪酸組成. 第61回日本衛生動物学会大会, 高松市, 2009年4月2-4日
- 4) 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). 第60回日本衛生動物学会大会, 下野市, 2008年4月17-19日

- 5) 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資質に関する室内実験. 第60回日本衛生動物学会大会, 下野市, 2008年4月17-19日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

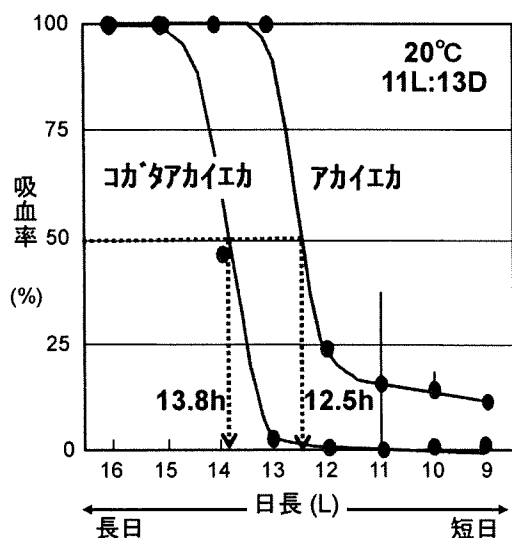


図1. 栄養生殖分離が発現する臨界日長 (50%の個体が吸血する日長)

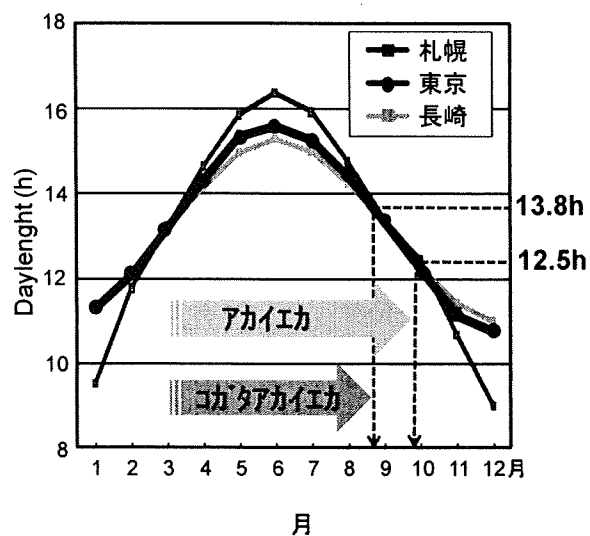


図2. 日本各地の平均日長時間

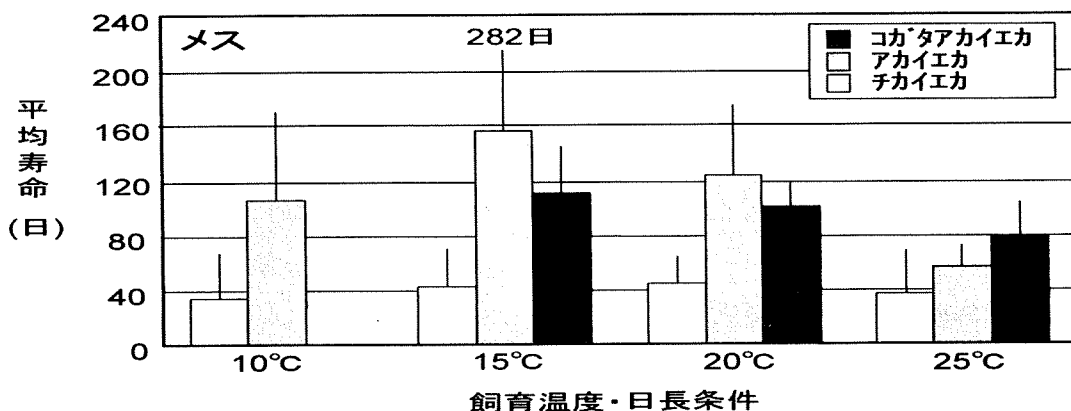


図3. 各種日長・温度条件下での生存日数

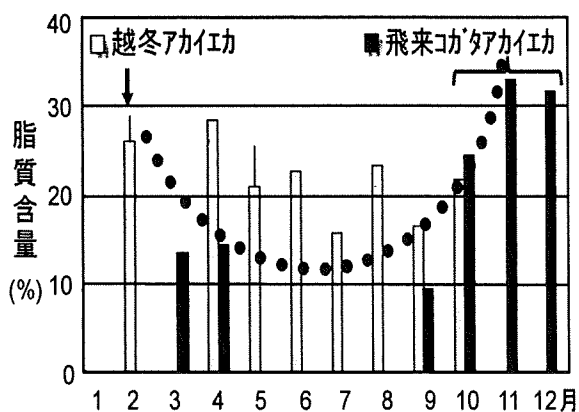


図4. 脂質含量の季節変動

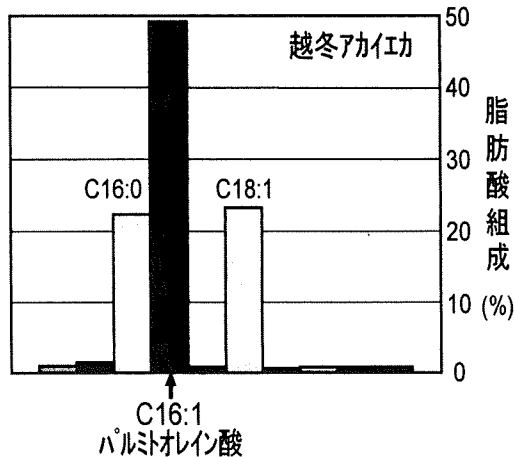


図5. 越冬アカイエカにおける脂肪酸組成

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・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
環境変化に伴う発消長と個体数の指標としての個眼数の検討

研究分担者	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
	黒川憲次	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座
	三根真理子	長崎大学原爆後障害医療研究施設
	吉井 学	学校法人 吉田学園 九州医学技術専門学校
	松本 顕	順天堂大学医学部一般教育生物学研究室 准教授
	内田桂吉	順天堂大学医学部一般教育生物学研究室 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

地上水域で採集した個々の卵舟から飼育・羽化したチカイエカ雌成虫、浄化槽で秋期に採集した個々の卵舟由来の雌成虫、およびアパートの1室で採集した吸血済のチカイエカ雌成虫の個眼数を個別に調べた。室温で羽化した雌成虫の多くは、8個の個眼数をもつチカイエカであったが、僅かではあるが9個を持つアカイエカ型が10%程認められた。これに対して浄化槽で秋に採集したチカイエカ雌は全て8個のチカイエカからなり、アカイエカ型は認められなかった。個眼数の変異は幼虫時期の環境条件の違いが影響していると考えられるが、日長、照度、餌、幼虫密度と温度など複数の要因が関係していると思われる。吸血したチカイエカ雌成虫の集団の中には、僅かではあるが、9個のアカイエカ型も混在していた。しかし、大多数は8個のチカイエカであった。これら吸血飛来したチカイエカ雌成虫は地上水域および浄化槽などの地下水域から発生した混合の個体群と考えられる。

A. 研究目的

チカイエカ *Culex pipiens molestus* Forskal とアカイエカ *Culex pipiens pallens* Coquillett は同種で、両者を含めてアカイエカ群 *Culex pipiens* Complex と言われている。これらの蚊は人獣共通感染症である犬糸状虫症の媒介蚊であり、医学的観点からみて重要な蚊である (Zaitzu, 1988)。アカイエカの幼虫は下水溝などの地上水域に発生し、その成虫はヒトを含む哺乳動物や鳥類から吸血して産卵を行う。それに対して、チカイエカの幼虫はビルの地下に設置された浄化槽などの地下水域に発生し、成虫は初回時のみ無吸血で産卵を行い、いわゆる無吸血産卵 (autogeny) により世代を繰り返している。後者の成虫は、2回目以降はアカイエカ成虫と同様に、吸血によって産卵を行う事ができる。

これら両者は形態的に酷似している。しかし、雄成虫では外部生殖器の形態で区別可能である。また雌成虫では複眼を形成している個眼数によって区別可能である。つまり、複眼の第4列または第5列目の個眼数は、多くのアカイエカでは9

個、逆に多くのチカイエカ雌では8個であり、両者の個眼数が逆転した例は少数である (Noguchi and Asahina 1966)。これら蚊の個眼数の変異には幼虫期の飼育温度が重要な要因であることが実験条件下で確かめられている (森ら、1982)。しかしながら、野外で採集されるチカイエカとアカイエカの雌の個眼数の変異について検討した報告はほとんどない。今回、気温等の環境要因の変化に伴うチカイエカ雌の個眼数の変異の有無について自然界における実態を明らかにするため、屋内で吸血したチカイエカの雌に加えて、浄化槽と地上水域で採集した幼虫と卵塊に由来する雌の個眼数を6ヶ月間の観察を通じて比較検討した。

B. 研究方法

1. 調査方法

本実験で使用した材料は次のとおりである。1976年5月から10月にかけて、長崎大学医学部構内建物に隣接した屋外に設置した ovitrap (ワラの煮汁を入れた水ガメ、容量15L、口径35cm、高さ45cm、外部表面は茶褐色) 内の水面に蚊雌成虫が産下した卵塊を個別に採取後、水道水50mlを入れた直径3cm高さ8cmのポリエチレン製のビンに移して実験室に持ち帰った。その後、室温条件下(自然日長の、外気温を直接受ける室で、半屋外条件を示す)で飼育羽化させ、3%の砂糖水を含む綿のみを成虫に与えて産卵するまで飼育した。その間に、無吸血産卵したものをチカイエカの雌として判定した。なお、産卵後の雌は、 -20°C の冷凍庫に存した。飼育条件の詳細については小田・上田 (1979) で報告した。

1983年9月~12月にかけて、長崎市南部のK学校の浄化槽から高齢幼虫と蛹(未成熟期)を月に一度採集し、前述と同様の方法で飼育を行い、無吸血産卵が確認された雌個体をチカイエカ雌(在津ら、2008)として取り扱い、それら雌成虫は、 -20°C の冷凍庫に保存した。

次に1982年5月~11月にかけて、長崎市北部にある4階建てアパートの2階の1室で吸血雌のみを採集し、実験室に持ち帰って、個別に産卵させ卵舟を得た。個々の卵舟に由来する幼虫(F1)を先に述べた同様の飼育条件下で卵舟毎に飼育・羽化させた。これら卵舟毎の羽化成虫(F1)の内、無吸血で産卵した雌(F1)の親(P)、つまりアパートの一室で採集した吸血蚊をチカイエカと判定することにした。野外で採集した雌(P)には、産卵せずに死亡したものも多く含まれている。これらも同様に -20°C の冷凍庫に保存した(Oda *et al.*, 1986)。採集した吸血蚊の内、産卵することなく死亡した雌個体(P)を便宜上、アカイエカ群として本論文では取り扱った。

前述のチカイエカとアカイエカ群の雌(本文では、アパート一室で採集した吸血蚊の内、産卵することなく死亡した蚊の総称)成虫の頭部を、10%のKOHに浸し約3分間加熱後水洗、アルコールで脱水後グリセリンアルコール浸せき処理を行なった。その後、蚊の頭部をスライドガラス上に置き、複眼背側の左側第4、5、6列の個眼数を双眼顕微鏡下で数えた(図1)。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

1. 室温条件下で羽化したチカイエカ雌の個眼数

表1に屋外条件下で飼育羽化した雌の複眼の第4、5および6列の個眼数を示した。

まず、5月に羽化した雌の複眼第4列を構成する個眼数については、約90%の雌が8個の個眼数を持っていた。また、10%以下の雌が9個の個眼数であり、10個を持った雌蚊は認められなかった。

このような個眼数の変異は複眼第5、第6列の場合にもほぼ同様であった。次に、6~10月に羽化した雌成虫蚊群について検討したところ、同様な

結果が得られた。これらの結果から、屋外で羽化した雌蚊の個眼数は季節的に大きく変化するとは思われない。今回得られた結果は森ら(1982)のそれとよく一致している。

次に、個眼数の個体変異を更に詳しく検討するため、上記の材料について、雌1個体の第4、5および6列の個眼数を1組として取り扱うために、次のようなタイプに分類した。すなわち個眼数のタイプは第4、5および6列の個眼数を888、889、898、899と999、998、989、988の8群に分け、各群に属する雌の割合を計算した(表2)。5月に羽化した雌蚊群について調べてみると90%あるいはそれ以上から888~899までのグループのチカイエカに属し、その中でも888型が最も多かった。残り10%あるいはそれ以下のものが、999~988の、いわゆるアカイエカ型となることがわかった。このことは6月以降でも同様である。すなわち第4列が8個であると、その集団の90%はチカイエカと判定され、同時にその集団の10%程はアカイエカ型と判定できることになる。

2. 浄化槽で採集されたチカイエカの個眼数

表3に、浄化槽で採集された未成熟期の幼虫・蛹から羽化した成虫の内、その後無吸血で産卵を行ったチカイエカ雌について、タイプ毎にそれぞれの割合をまとめた。

9月~12月までに羽化したチカイエカ雌成虫の99%が888型、1%が898型であった。アカイエカ型雌成虫の複眼形態は全く羽化していないことがわかる。すなわち表2で示したように地上で羽化したチカイエカ集団の中にはアカイエカ型が混在していた。しかしながら、浄化槽で採集したチカイエカ集団の中にはアカイエカ型が全く認められなかった。このことは、蚊の生理・生態面からみて興味深い。

3. 人家で吸血した雌の個眼数

吸血したチカイエカ雌成虫の個眼数の変異を

表4に示した。ほとんどが888型で変異の幅は広く、アカイエカ型も少数ではあるが認められた。この頻度分布のパターンも季節的に変化していなかった。

次に吸血したアカイエカ群の雌の内、産卵せずに死亡した雌成虫の個眼数の分布を表5に示した。表5の結果は表4のチカイエカの結果とほとんど同じであった。このことから産卵せずに死亡した雌群もやはりチカイエカ雌であると推測される。

D. 考察

これらの実験では、室温(屋外)条件下で羽化させたチカイエカ雌成虫の約95%は8個(第4列の個眼数)を持っていた。残り5%ほどは9個を持つアカイエカ型であった。これに対して9月以降に浄化槽で採集し、羽化したチカイエカ雌の全てが8個の個眼を持ち、しかもその約95%は888型で、9個を持つアカイエカ型は全く出現しなかった。森ら(1982)は幼虫期の飼育温度が21℃以上になるとチカイエカでも9個のアカイエカ型のものが少数ではあるが出現するので、飼育温度がチカイエカの個眼数の変異をもたらす重要な要因であると報告した。

上述の浄化槽の水温はほぼ気温と平行し、9月でも約25℃とかなり高いのに(在津ら、2008)、羽化したチカイエカは例外なく8個であった。従って、この場合は気温よりもむしろ、浄化槽内が全暗状態にあることからして照度・餌・幼虫個体群密度が関係しているものと推察される。更に、この結果は浄化槽のような地下水域がチカイエカの好適な棲息場所であることを示すもので、生態学的観点からも重要なことである。

次に屋内で吸血したチカイエカ雌の約95%は8個の個眼を有し、5%は9個のアカイエカ型のものであった。また、同じ吸血雌群の内、産卵することなく死亡した雌成虫も上記のチカイエカと同じ結果を示したので、やはりチカイエカ雌と判

定される。このように、前述したチカイエカ集団の中には、その約5%がアカイエカ型である。これは表2に示した室温条件で羽化した雌の結果とほぼ一致している。しかし、アパート敷地内にある浄化槽内から多くのチカイエカが飛び出していた事実、およびアカイエカの発生源が浄化槽の周囲に少なかったことを考慮すると、吸血に飛来したチカイエカ雌成虫は浄化槽と地上水域から羽化した混成の雌個体群であると考えられる。

本報の結果からチカイエカ雌の個眼数によりアカイエカの雌と区別することは、集団としては可能であるが、個別に両者を判別することは困難である。また888型の雌成虫は、チカイエカである可能性がかなり高いと思われる。野外で採集したアカイエカ雌について今後調査する必要がある。その調査の際には、個眼数の変異に加えて、遺伝子診断による両者の区別を検討することも必要であろう (Kasai *et al.*, 2008)。

E. 結論

(1) 屋外に設置した水瓶で採集した卵由来の羽化雌成虫の多くは、8個の個眼数をもつチカイエカであった。しかし、チカイエカであっても、9個の個眼数を持つアカイエカ型が10%程認められた。

(2) 浄化槽で秋に採集したチカイエカ雌は全て8個の個眼数であった。

(3) 個眼数の変異は幼虫期の日長、照度、餌、幼虫密度、温度などの環境要因が影響していると考えられた。

(4) 吸血に飛来したチカイエカ雌成虫集団(次世代の雌が無吸血産卵することを確認済)の大多数は8個のチカイエカであった。

(5) 吸血飛来したチカイエカ雌成虫(次世代の雌が無吸血産卵することを確認済)は地上水域および浄化槽などの地下水域から発生した混合の個体群と考えられた。

(6) 温暖化による気温の上昇は、幼虫の分布北

限の拡大のみならず、発生水域が一過性的に拡大する可能性がある。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Takuya Yamao, Yuki Kihara, Tomomitsu Satho, Miho Nishimura, Takeshi Miyata, Akira Sakata, Nobuhiro Kashige, Fumio Miake, Yuki Eshita, Yupha Rongsriyam, Narumon Komalamisra, Rawewan Srisawat, Shumpei Watanabe, Hiroomi Akashi, Makoto Kuroda, Tsuyoshi Sekizuka, Kouji Sakai, Shuetsu Fukushi, Mina Nakauchi, Masayuki Saijo, Ichiro Kurane, Shigeru Morikawa, Tetsuya Mizutani: Novel virus discovery from field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). Archives of Virology, 154(1):153-158, 2009.

(2) Yuki Eshita, Junko Higashihara, Masayasu Onishi, Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, Tomohiko Takasaki, Naoji Kubota and Yasuhiko Onishi: Mechanism of introduction of exogenous genes into cultured cells using DEAE-Dextran-MMA graft copolymer as non-viral gene carrier. Molecules, 14(7): 2669-2683, 2009.

(3) Tomomitsu Satho, Hamady Dieng, Tetsuya Mizutani, Yuki Eshita, Takeshi Miyata, Parimal Talukder, Nobuhiro Kashige, Abu Hassan Ahmad and Fumio Miake: Fluorescence can be used to trace the fate of exogenous micro-organisms inside the alimentary tract of mosquitoes. J. Parasitol. Vector Biol., 1(2):13-18, 2009.

2. 学会発表

(1) 西村美保, 佐藤朝光, 木原悠希, 山尾卓也, 江下優樹, Yupha Rongsriyam, Narumon Komalamisra, Raweewan Srisawat, 鹿志毛信広, 見明史雄, 水谷哲也: Rapid determination of RNA viral sequence 法 ver4.0 によるネツタイシマカ幼虫からのウイルスの検出。第61回日本衛生動物学会大会。2009年4月2-4日、香川県高松市、サンポートホール高松、Med. Entomol. Zool., 60 (Suppl.): 54, 2009.

(2) 佐藤朝光, 山尾卓也, 江下優樹, 木原優樹, 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: Rapid determination of RNA viral sequence法 ver4.0によるネツ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回日本衛生動物学会大会。2009年4月2-4日、香川県高松市、サンポートホール高松、Med. Entomol. Zool., 60 (Suppl.):55, 2009.

(3) Eshita, Y., Srisawat, R., Komalamisra, N., Rongsriyam, Y., Takasaki, T., Aono, H., Wei-feng, T., Makino Y., Ushijima, H., Takashima, I. and Kurane, I.: Vectorial capacity of Japanese mosquitoes borne diseases in West Nile and dengue viruses (Invited lecture). RGJ-Ph.D. Congress X, Pataya, Thailand, 4-6 April, 2009, Proceedings of RGJ-Ph.D. Congress X, Invited lecture (S3A-L7):96, 2009.

(5) 江下優樹, 児島奈弥, 牧野芳大, 湯 偉峰, 青野裕士, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, 成田弘成, 高崎智彦, 林 昌宏, 倉根一郎 (2009): チクングニアウイルスを用いた蚊の感染実験。第62回日本寄生虫学会・第59回日本衛生動物学会南日本支部合同大会、2009年11月7日(土)・8(日)、福岡大学文系センター棟、福岡県福岡市。第62

回日本寄生虫学会・第59回日本衛生動物学会南日本支部合同大会プログラム講演要旨集: 23, 2009.

(6) 湯 偉峰, 西村紗智子, 小河正雄, 江下優樹, 青野裕士, 牧野芳大 (2009): 大分地域における1980-2008年の日本脳炎ウイルスの分子疫学。第50回日本熱帯医学会大会、沖縄県、中頭郡、沖縄コンベンションセンター、2009年10月22日(木)・23日(金)。第50回日本熱帯医学会大会プログラム抄録集 P02-8:69, 2009.

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

Table 1. Seasonal changes in the number of ommatidia of *Culex pipiens molestus* females reared from egg rafts collected in an ovitrap at outdoor conditions in 1976

Month	No. females examined (%)		Row of compound eyes									
			4th					5th				
	Total	8	9	10	Total	8	9	10	Total	8	9	10
May	49 (100.0)	45 (91.8)	4 (8.2)	0 (0.0)	49 (100.1)	33 (67.4)	16 (32.7)	0 (0.0)	49 (100.0)	35 (71.4)	14 (28.6)	0 (0.0)
June	21 (100.0)	21 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (100.0)	21 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	21 (100.0)	21 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
July	51 (100.0)	46 (90.2)	5 (9.8)	0 (0.0)	51 (100.0)	46 (90.2)	5 (9.8)	0 (0.0)	51 (100.0)	45 (88.2)	6 (11.8)	0 (0.0)
August	42 (100.0)	37 (88.1)	5 (11.9)	0 (0.0)	42 (100.0)	38 (90.5)	4 (9.5)	0 (0.0)	42 (100.0)	37 (88.1)	5 (11.9)	0 (0.0)
September	52 (100.1)	50 (96.2)	2 (3.9)	0 (0.0)	52 (100.1)	50 (96.2)	2 (3.9)	0 (0.0)	52 (100.0)	49 (94.2)	3 (5.8)	0 (0.0)
October	51 (100.0)	50 (98.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	51 (100.0)	45 (88.2)	6 (11.8)	0 (0.0)	51 (100.0)	46 (90.2)	5 (9.8)	0 (0.0)
Total	266(100.0)	249(93.6)	17(6.4)	0(0.0)	266(100.0)	233(87.6)	33(12.4)	0(0.0)	266(100.0)	233(87.6)	33(12.4)	0(0.0)

Table 2. Seasonal changes in the number of ommatidia of *Culex pipiens molestus* females reared from egg rafts collected in an ovitrap at outdoor conditions in 1976

Month	No. females examined (%)	Types of compound eyes having ommatidial number at the 4th, 5th and 6th rows									
		888	889	898	899	988	989	988			
May	49 (99.9)	30 (61.2)	2 (4.1)	5 (10.2)	8 (16.3)	3 (6.1)	1 (2.0)	988			
June	21 (100.0)	21 (100.0)									
July	51 (100.1)	41 (80.4)	1 (2.0)	1 (2.0)	3 (5.9)	1 (2.0)	2 (3.9)	2 (3.9)			
August	42 (100.0)	36 (85.7)		1 (2.4)		3 (7.1)	2 (4.8)				
September	52 (99.9)	48 (92.3)	1 (1.9)		1 (1.9)	1 (1.9)	1 (1.9)	1 (1.9)			
October	51 (100.1)	44 (86.3)	1 (2.0)	2 (3.9)	3 (5.9)	1 (2.0)					
Total	266(100.0)	220(82.7)	5(1.9)	9(3.4)	15(5.6)	9(3.4)	5(1.9)	3(1.1)			

Table 3. Seasonal changes in the number of ommatidia at 3 rows of the compound eyes of *Culex pipiens molestus* females reared from immature stages collected at a septic tank in 1983

Month	No. females examined (%)	Types of compound eyes having ommatidial number at the 4th, 5th and 6th rows						
		888	889	898	899	998	989	988
Total	Total	888	889	898	899	998	989	988
September	22 (100.0)	21 (95.5)			1 (4.5)			
October	34 (100.0)	34 (100.0)						
November	49 (100.0)	49 (100.0)						
December	11 (100.0)	11 (100.0)						
Total	116(100.0)	115(99.1)			1(0.9)			

Table 4. Seasonal changes in the number of ommatidia at 3 rows of the compound eyes of the blood-fed females of *Culex pipiens molestus* collected in an apartment house

Month	No. females examined (%)	Types of compound eyes having ommatidial number at the 4th, 5th and 6th rows						
		888	889	898	899	998	989	988
Total	Total	888	889	898	899	998	989	988
May	7 (100.0)	6 (85.7)	1 (14.3)					
June	25 (100.0)	25 (100.0)						
July	19 (100.0)	18 (94.7)				1 (5.3)		
August	8 (100.0)	8 (100.0)						
September	74 (100.4)	68 (92.0)	1 (1.4)	1 (1.4)		1 (1.4)	2 (2.8)	
October	52 (99.9)	48 (92.3)		1 (1.9)		2 (3.8)	1 (1.9)	
November	29 (99.8)	26 (89.6)		1 (3.4)	1 (3.4)		1 (3.4)	
Total	214(100.0)	199(93.0)	2(0.9)	3(1.4)	2(0.9)	2(0.9)	4(1.9)	2(0.9)

Table 5. Seasonal changes in the number of ommatidia at 3 rows of the compound eyes of the blood-fed females of *Culex pipiens* complex collected in an apartment house

Month	No. females examined (%)	Types of compound eyes having ommatidial number at the 4th, 5th and 6th rows												
		888	889	898	899	988	989	988	989	988	988			
May	6 (100.1)	4 (66.7)		1 (16.7)										
June	6 (100.0)	5 (83.3)												
July	7 (100.0)	7 (100.0)												
August	11 (100.0)	10 (90.9)												1 (9.1)
September	68 (100.1)	66 (97.1)					1 (1.5)							
October	56 (100.0)	53 (94.6)	1 (1.8)				1 (1.8)							1 (1.8)
November	35 (100.2)	30 (85.7)	1 (2.9)		1 (2.9)		1 (2.9)						1 (2.9)	
Total	189(100.0)	175(92.6)	2(1.1)		2(1.1)		3(1.6)						3(1.6)	2(1.1)

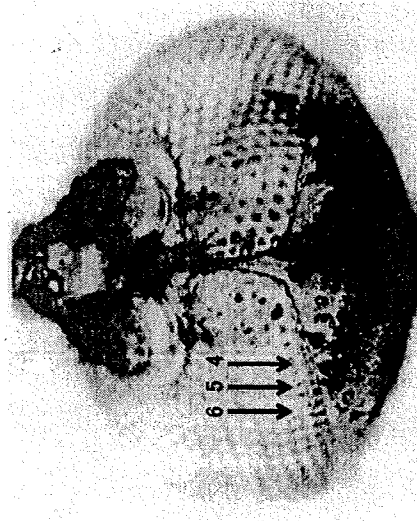


Fig. 1 Ommatidia located at rows 4, 5, and 6 shown by arrows in the compound eyes of *Culex pipiens molestus* female (dorsal view of the head)

厚生労働省科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
分担研究者報告書

富山県のイノシシと寄生マダニ類におけるリケッチア保有調査

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 (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

イノシシの分布拡大に伴ってマダニ類とリケッチアの分布が拡大している可能性について検討するため、イノシシ及びイノシシ体表より採集したマダニ類からのリケッチア検出を行った。イノシシ 21 個体及び寄生マダニ類 143 個体からは、*Rickettsia japonica* の遺伝子は検出されず、これまでに富山県において日本紅斑熱患者が報告されていないことと合わせて、*R. japonica* の浸淫の可能性は低いと考えられた。マダニ類の 12 個体 (8.4%) からは、これまでに富山県のマダニ類から検出されており、ヒトに病原性はないと推測されているリケッチアが検出された。以上のことから、県内に *R. japonica* を含む新たなリケッチアが侵入しているという証拠は得られなかったものの、イノシシに寄生したマダニ類とともにリケッチアも分布域を広げている可能性は否定できない。

A. 研究目的

マダニ類は *Rickettsia japonica* による日本紅斑熱等を媒介するベクターとして重要である。日本紅斑熱は 1984 年の発見以来、南西日本を中心に多発しているが、近年は、これまで報告のなかった地域での新たな発生や、*R. japonica* 以外の紅斑熱群リケッチア (*R. helvetica*、*R. heilongjiangensis*) による紅斑熱が報告されている。

一方、富山県では、長い間ニホンイノシシ(以下イノシシ)は分布していなかったが、1990 年頃から目撃され始め、分布域を広げている(南部久男, とやまと自然, 124:2-5, 2009)。積雪地帯でイノシシが増加したことについては、積雪量が少なくなったことが理由のひとつと考えられている。

富山県ではこれまで日本紅斑熱を含む紅斑熱患者の報告はないが、積雪量の減少に伴ってイノシシとマダニ類が県

内で分布を拡大し、その結果、リケッチアの分布も拡大している可能性は否定できない。

日本紅斑熱を含む紅斑熱群のリケッチアは、ダニからダニへの経卵感染の他に、感染動物からダニ、ダニからヒトへと感染する。イノシシについては、オランダで血液から *R. helvetica* が検出された報告がある (Sprong et al., Parasit. Vectors. 2:41, 2009) もの、日本国内のイノシシについてのリケッチア保有状況は調査されていない。また、イノシシに寄生したマダニ類のリケッチア保有についても、海外での報告はあるものの、国内での報告はない。

そこで、富山県内で捕獲したイノシシ及びイノシシに付着したマダニ類からのリケッチア検出を行った。

B. 研究方法

1. 材料

富山県内で 2008 年 2 月～2009 年 8 月に害獣として駆除されたイノシシ 21 個体から採取した脾臓 20 件及び血液 4 件を用いた。マダニ類は、2008 年 1～2 月に駆除されたイノシシ 15 頭の毛皮から採集した成虫 143 個体を用いた。

2. リケッチア検出

検体から DNA を抽出し、2nd PCR により、日本紅斑熱または紅斑熱群 (日本紅斑熱を含む) リケッチアの 17-kDa 膜蛋白質領域を対象とした遺伝子検出を

行った。得られた PCR 産物は、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した。

C. 研究結果

イノシシの検体からはリケッチア遺伝子は検出されなかった (表 1)。マダニ類については、紅斑熱群 PCR により 10 個体で陽性、日本紅斑熱 PCR により 4 個体で陽性となった (表 2)。遺伝子解析の結果、得られたリケッチアは全てこれまでに県内のマダニ類から検出されたリケッチアと近縁であり、病原性はないとされる Genotype I 及び III (Ishikura et al., Microbiol. Immunol. 47: 823-832, 2003; SADI 組織委員会編, ダニと新興再興感染症, 2007) に分類された。日本紅斑熱を対象とした PCR で陽性であった検体についても同様であった。種類別に陽性率をみると (表 3)、キチマダニのリケッチア陽性率は 5% 前後であったのに対し、ヤマトマダニからは 17.5% と比較的高率にリケッチアが検出された。リケッチア陽性となったマダニ類が寄生していたイノシシは 15 頭中 8 頭 (53.3%) であった (表 4)。

D. 考察

イノシシ及び寄生マダニ類からは、*R. japonica* の遺伝子は検出されず、これまでに富山県において日本紅斑熱患者が報告されていないことと合わせて、*R.*

japonica の浸淫の可能性は低いと考えられた。PCR により得られたリケッチアは全てこれまでに県内のマダニ類から検出されたリケッチアと近縁の型であり、病原性はないものと推測された。以上のことから、富山県内に *R. japonica* を含む新たなリケッチアが侵入しているという証拠は得られなかったが、イノシシに寄生したマダニ類とともにリケッチアも分布域を広げている可能性は否定できない。種類によっては採集数が少なく判断できなかったものの、マダニの種類によってリケッチアの陽性率に差がみられ、ヤマトチマダニは比較的高率にリケッチアを保有していることが示唆された。

少なくとも約半数のイノシシにリケッチア陽性マダニ類が寄生しており、調査したマダニ類は 143 個体であったこと、1 頭のイノシシには数百個体のマダニ類が寄生していることを考慮すると、ほとんどのイノシシにリケッチア陽性マダニ類が寄生しているものと推測された。今回調査したイノシシからリケッチアは検出されなかったことから、検出されたリケッチアはイノシシにほとんど感染しないか、感染したとしても一過性であるか、イノシシがマダニ類の寄生を受けるうちにリケッチアに感染して抗体を持ち、その後は感染しなくなった可能性が考えられる。今回のイノシシ検体について抗体調査は行っていないが、日本紅斑熱の発生がある和歌山県ではイノシシの 14.3%が日

本紅斑熱に対して抗体陽性という報告(藤田博己, 田辺鳥獣害調査研究報告書, 27-32. 2007)があり、抗体保有率はそれほど高くないことから、感染しにくい一過性である可能性が高い。しかしながら、今回は検体数が少なかったために陽性個体が発見されなかった可能性もあるため、イノシシが今回検出されたリケッチアの宿主としての役割を果たしている可能性については否定することはできない。

E. 結論

イノシシ及び寄生マダニ類からは、*R. japonica* の遺伝子は検出されず、富山県において *R. japonica* の浸淫の可能性は低いと考えられた。県内に新たなリケッチアが侵入しているという証拠は得られなかったものの、イノシシに寄生したマダニ類とともにリケッチアも分布域を広げている可能性は否定できない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamauchi, T., Tsurumi, M. and Kataoka, N. (2009) Distributional records of *Lipoptena* species (Diptera: Hippoboscidae) in Japan and Jeju-do, Korea. *Medical Entomology and Zoology*, 60(2): 131-133.
- 2) Yamauchi, T., Shimazu, Y. and Mizuta, H. (2009) A case of human

- tick bite by a nymphal tick,
Haemaphysalis hystricis (Acari:
Ixodidae), in *Japan. Medical
Entomology and Zoology*, 60(2):
135-137.
- 3) Yamauchi, T., Tabara, K., Kanamori,
H., Kawabata, H., Arai, S., Katayama,
T., Fujita, H., Yano, Y., Takada, N.
and Itagaki, A. (2009) Tick fauna
associated with sika deer density in
the Shimane Peninsula, Honshu,
*Japan. Medical Entomology and
Zoology*, 60(4): 297-304.
- 4) 山内健生・加藤治好 (2009) 富山県
の植物園展示温室に生息するゴキ
ブリ類. *衛生動物*, 60(4): 305-310.
- 5) 山内健生・高野 愛・坂田明子・
馬場俊一・奥島雄一・川端寛
樹・安藤秀二 (2010) タカサゴキ
ラマダニによる人体刺症の 5
例. *日本ダニ学会誌*, 19(1): 印刷中.
- 6) 山内健生・福井米正・渡辺 護・
中川彦人・上村 清 (2010) 富山
県におけるマダニ人体刺症の 40
例. *衛生動物*, 61(2): 印刷中.
2. 学会発表
- 1) 山内健生・小原真弓・渡辺 護・
安藤秀二・品川保弘・長谷川澄
代・中村一哉・滝澤剛則 (2009 年
4 月 3 日) 「富山県産哺乳類に寄生
していたマダニ類」 第 61 回日本
衛生動物学会大会 サポートホ
ール高松 (高松市)
- 2) 小原真弓、山内健生、渡辺 護、長谷
川澄代、滝澤剛則: 富山県におけるマ
ダニ類調査: 第 17 回ダニと疾患のイ
ンターフェースに関するセミナー、大
野市、2009 年 6 月
- 3) 山内健生・加藤治好 (2009 年 10 月
31 日) 「富山県の植物園展示温室
に生息するゴキブリ類」 第 64 回
日本衛生動物学会西日本支部大会
- 4) 小原真弓、山内健生、渡辺護、安藤
秀二、石倉康宏、品川保弘、長谷川
澄代、中村一哉、堀元栄詞、岩井雅
恵、倉田 毅、滝澤剛則: 富山県にお
けるマダニ類と保有リケッチア: 第 16
回リケッチア研究会、新宿区、2009 年
11 月
- 5) 山内健生・福井米正・渡辺 護・
中川彦人・上村 清 (2010 年 2 月 4
日) 「富山県におけるマダニ人体刺
症の概観」 第 44 回富山県公衆衛
生学会 富山市保健所 (富山市)
- G. 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

H. 謝辞

本研究の実施には、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)の協力を賜りました。ここに
深く感謝いたします。

表 1. イノシシにおけるリケッチア検出結果

番号	捕獲月	捕獲地	性別	体重 (kg)	検体	PCR	
						紅斑熱群	日本紅斑熱
1	2008年2月	南砺市湯谷	♂	40	脾臓	-	-
2	2008年3月	富山市八尾町	♀	70	脾臓	-	-
3	2008年3月	富山市八尾町	♀	26	脾臓	-	-
4	2008年3月	富山市八尾町	♀	25	脾臓	-	-
5	2008年3月	富山市八尾町	♀	24	脾臓	-	-
6	2008年3月	富山市八尾町	♀	23	脾臓	-	-
7	2008年9月	富山市須原	♀	50	脾臓	-	-
"	"	"	"	"	血液	-	-
8	2008年10月	富山市須原	♂	30	脾臓	-	-
9	2008年11月	富山市寺津	♀	61	脾臓	-	-
10	2009年1月	富山市東福沢	♀	45	脾臓	-	-
11	2009年1月	富山市東福沢	♂	52	脾臓	-	-
12	2009年1月	富山市八尾町	♂	不明	脾臓	-	-
13	2009年1月	富山市東福沢	♂	130	脾臓	-	-
"	"	"	"	"	血液	-	-
14	2009年1月	富山市榑ヶ原	♀	83	脾臓	-	-
15	2009年2月	富山市須原	♂	60	血液	-	-
16	2009年3月	富山市八尾町	♀	70	脾臓	-	-
"	"	"	"	"	血液	-	-
17	2009年7月	富山市猪谷	♂	45	脾臓	-	-
18	2009年7月	富山市小糸	♂	99	脾臓	-	-
19	2009年7月	富山市小糸	♀	37	脾臓	-	-
20	2009年8月	富山市小糸	♀	55	脾臓	-	-
21	2009年8月	富山市小糸	不明	7	脾臓	-	-

表 2. リケッチア PCR で陽性となったイノシシ寄生マダニ類

イノシシ捕獲月	地点	種類	性別	PCR	
				紅斑熱群	日本紅斑熱
2008年1月	南砺市臼中	ヤマトチマダニ	♂	+	-
2008年1月	富山市瀬戸	ヤマトチマダニ	♂	+	+
2008年1月	富山市瀬戸	ヤマトチマダニ	♂	+	-
2008年1月	富山市瀬戸	キチマダニ	♀	+	+
2008年1月	富山市今生津	タイワンカクマダニ	♂	+	-
2008年1月	富山市小谷	キチマダニ	♂	-	+
2008年1月	富山市榑ヶ原	キチマダニ	♂	+	-
2008年2月	富山市小谷	ヤマトチマダニ	♂	+	-
2008年2月	富山市小谷	キチマダニ	♂	-	+
2008年2月	富山市八尾町	ヤマトチマダニ	♂	+	-
2008年2月	富山市八尾町	ヤマトチマダニ	♂	+	-
2008年2月	富山市榑ヶ原	ヤマトチマダニ	♂	+	-

表 3. イノシシ寄生マダニ類の種類別陽性率

マダニの種類		陽性数	/	検査数	陽性率(%)
キチマダニ	♀	1	/	17	5.9
	♂	3	/	70	4.3
ヤマトチマダニ	♂	7	/	40	17.5
タイワンカクマダニ	♂	1	/	12	8.3
タカサゴキラマダニ	♂	0	/	4	0.0
合計		12	/	143	8.4

表 4. イノシシ個体別の陽性マダニ数

イノシシ				寄生マダニ類			
番号	捕獲月	捕獲地	性別	陽性数	/	検査数	陽性率(%)
1	2008年1月	富山市今生津	不明	0	/	7	0.0
2	2008年1月	南砺市臼中	♂	1	/	5	20.0
3	2008年1月	富山市今生津	♂	1	/	16	6.3
4	2008年1月	富山市瀬戸	♂	3	/	25	12.0
5	2008年1月	富山市八尾町	♂	0	/	1	0.0
6	2008年1月	富山市下双領	♀	0	/	1	0.0
7	2008年1月	富山市小谷	不明	1	/	13	7.7
8	2008年1月	富山市榑ヶ原	♂	1	/	17	5.9
9	2008年1月	富山市榑ヶ原	♀	0	/	6	0.0
10	2008年1月	富山市須原	♀	0	/	1	0.0
11	2008年2月	富山市須原	♂	0	/	7	0.0
12	2008年2月	富山市小谷	♂	2	/	11	18.2
13	2008年2月	富山市八尾町	♂	2	/	6	33.3
14	2008年2月	富山市八尾町	♂	0	/	12	0.0
15	2008年2月	富山市榑ヶ原	不明	1	/	15	6.7
合計				12	/	143	8.4

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷