

20093103PA

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

節足動物が媒介する感染症への効果的な対策に関する総合的な研究

(H21 新興— 一般— 005)

平成21年度総括・分担研究報告書

平成22年3月

主任研究者 小林陸生

国立感染症研究所 昆虫医科学部

## 目 次

### I. 総括研究報告書

節足動物が媒介する感染症への効果的な対策に関する総合的な研究

小林 睦生	1
健康危険情報通報	25

### II. 分担および協力研究報告書

#### 1. 岩手県におけるヒトスジシマカ分布調査

佐藤 卓他	29
-------	----

#### 2. 都市公園におけるヒトスジシマカの潜み場所に関する予備的調査

小林睦生他	37
-------	----

#### 3. 節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究

吉田政弘他	43
-------	----

#### 4. 液化炭酸ガス製剤のヒトスジシマカ成虫に対する実地効力並びに夏季から 秋季にかけての飛来消長に関する研究

武藤敦彦他	53
-------	----

#### 5. ベトナムのデング熱媒介蚊の地理的分布とピレスロイド抵抗性の分布調査および ミトコンドリア DNA ハプロタイプの解析

川田 均他	63
-------	----

#### 6. コガタアカイエカの集団飛来と越冬に関する研究（2008 年秋-2009 年春の 調査結果）

津田良夫他	71
-------	----

#### 7. 滋賀県琵琶湖湖東地域におけるコガタアカイエカの分布調査と景観解析

二瓶直子他	77
-------	----

#### 8. 彦根-近江八幡の水田地帯における水田発生性蚊幼虫の発生状況調査

津田良夫他	89
-------	----

#### 9. 2009 年の東京地方の疾病媒介蚊の発生状況（国立感染症研究所構内における モニタリングの結果）

津田良夫他	95
-------	----

#### 10. 渡り鳥飛来地における疾病媒介蚊調査（徳島県那賀川流域）

津田良夫他	101
-------	-----

#### 11. 釧路湿原における疾病媒介蚊調査

津田良夫他	109
-------	-----

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	115
13. 国内外の蚊およびシラミからの病原体の分離と検出 澤邊京子他	121
14. 渡り鳥飛来地で採集された蚊の吸血源動物と鳥マラリア原虫の感染状況 (東京港野鳥公園) 津田良夫他	129
15. 戦前戦後のマラリア流行地における 2009 年蚊の発生状況調査 渡辺 護他	133
16. 日本産哺乳類・鳥類の外部寄生虫に関する基礎的研究 ～富山県の都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長～ 山内健生他	145
17. デング 4 価 DNA ワクチンがマウスに誘導する中和抗体と感染増強抗体のバランス 小西英二	149
18. チクングニヤウイルスの迅速診断法の検討 高崎智彦他	159
19. チクングニヤウイルス検出法の検討 柴田伸一郎他	167
20. 我が国におけるチクングニア熱輸入例に関する研究 倉根一郎他	175
21. ダニにおけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの各分節遺伝子の発現と診断への応用 西條政幸	179
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	187

総括研究報告書

節足動物が媒介する感染症への効果的な対策に関する総合的な研究

主任分担者 小林睦生 国立感染症研究所・昆虫医科学

研究概要

2005～2006年にかけてインド洋諸島国、インド等で流行したチクングニア熱は、公表患者数が170万人以上に達した。レニオン島では全人口の1/3にあたる26万人以上が感染し、230人が死亡した。これらの流行地域にはネッタイシマカが分布しておらず、ヒトスジシマカが原因の流行であった。一方、2007年に北東イタリアの人口3千人ほどの村で突然チクングニア熱が流行し、約300人の患者が発生した。イタリアではヒトスジシマカが全土に分布域を広げている。2008年および2009年もインドおよびスリランカに加えて、東南アジア諸国（インドネシア、タイ、マレーシア、シンガポール等）で流行が続いている。アフリカのウイルス株に変異がおりヒトスジシマカでの増殖効率が100倍以上高まったことが明らかとなった。我が国は都市部を中心にヒトスジシマカの成虫密度が高く、夏期に感染者が帰国した場合には、チクングニア熱の流行は容易に起こることが想像される。そこで、媒介蚊の発生状況調査、成虫防除法の開発、成虫の潜み場所の特定など、媒介蚊に関する調査研究が必要となった。また、ウイルス遺伝子に変異を起こしたウイルス株の検出法も早急に確立する必要がある。また、TaqMan ProbeによるリアルタイムRT-PCR、通常のRT-PCR法もよる迅速診断法の確立も必要で、各地方自治体にこれらの診断技術の移転も必要である。また、デング熱も同様に世界的な流行がほぼ毎年起こっており、輸入症例が2008、2009年と明らかに増加している。本研究事業では、4価DNAワクチンの開発を目指し、低濃度で存在する中和抗体による感染増強活性（重症化）が生じないDNAワクチンの開発を目指している。ウエストナイル熱(WNF)はヨーロッパ型のWNウイルスの極東地域での活動が確認され、突発的に野鳥によって我が国にウイルスが運ばれて来る可能性があり、渡り鳥飛来地周辺における媒介蚊の調査、ウイルスの分離等のサーベイランスは継続する必要がある。一方、シラミ媒介性の感染症である塹壕熱の病原体の検出を、路上生活者のコロモジラミおよび海外における学童のアタマジラミから検出することを試み、大阪あいりん地区から採取したコロモジラミとマニラ郊外の子供に寄生しているアタマジラミから検出した。

また、主に 12 才以下の子供達に流行しているアタマジラミに薬剤抵抗性の発達が確認されており、全国的な調査結果から、現在約 10%のアタマジラミに抵抗性遺伝子を検出している。本研究事業は、日本脳炎媒介蚊の生態、発消長の基礎的な調査、チクングニヤ熱やデング熱の媒介蚊であるヒトスジシマカの生態、防除法の確立、チクングニヤ熱の迅速診断法の確立、デング熱の 4 価 DNA ワクチンの開発、クリミヤ・コンゴ出血熱ウイルスの検出法と診断法の確立、マダニに検出されるウイルスおよびリケッチアの検出と幅広く媒介節足動物と病原体との関係、診断法の確立、防除対策法の確立を目指しており、第 1 年目は、ある程度の評価できる結果を得られたと考えられる。コガタアカイエカやアカイエカなど日本脳炎やウエストナイル熱の重要な媒介蚊成虫がどこで越冬しているかも理解されていない現状で、あらゆる角度から、総合的な視点を持った調査研究が必要である。

#### A. 研究目的

現在、蚊媒介性感染症でインド洋島嶼国、インド、東南アジア諸国で大きな問題となっているのが、チクングニヤ熱である。アフリカ、東南アジア等で小規模な流行は報告されていたが、2005～2006 年にかけては、報告患者数のみで 170 万人を越す流行であった。2006 年にレユニオン島で分離されたウイルスの E1 タンパク質に遺伝子変異が見つかり、その結果として、今まで重要性では 2 番目の媒介蚊であるヒトスジシマカ体内での増殖活性が 100 倍以上に上昇した。実際、ヒトスジシマカのみが分布しているインド洋島嶼国で大きな流行が起こっており、2007 年にヒトスジシマカが分布する北東イタリアで 300 人規模の流行がおこり 1 名が死亡した。我が国でのヒトスジシマカの分布は青森県を除く東北地方以南に拡大しており、年平均気温が 11℃以上の地域に分布・定着が認められている。今年度は、北限地域である岩手県での詳細な分布域調査が行われ、7 年ぶりに盛岡市内でヒトスジシマカが確認された。この蚊の本来の分布域は、東南アジアであるが、卵のステージで越冬可能な系統が出現し、分布域が温帯地域に拡大したと考えられている。現在、

世界的に分布域が拡大しており、1985 年に米国で初めて分布が確認され、その後米国では急速に国内の分布域が拡大している。また、中南米、ニュージーランド、オーストラリア以外にイタリアを含むヨーロッパ諸国にも分布が拡大しており、イタリアでは全国的に分布が確認されている。この分布域拡大は、古タイヤの世界的な貿易が最も関係しており、我が国から古タイヤによっていろいろな国へ運ばれたことが推測されている。米国、ヨーロッパのヒトスジシマカは、卵で越冬できる系統であり、我が国の系統と近縁と考えられる。また、分布域の気候要因に関しても、ヨーロッパおよび米国での調査で、11℃以上の地域にほぼ限局されており、日本からの系統が世界中に広がった可能性が強く示唆されている。ヒトスジシマカ幼虫は、墓地の花立て、手水鉢、捨てられた空き缶、プラスチック製の容器、バケツ、発泡スチロールの箱、古タイヤなどに溜まった水に発生する。これらの発生源が少ない地域では蚊の発生量も少なく、古タイヤが多数積まれているような環境、廃棄物が捨てられている場所では、多数のヒトスジシマカが発生しており、近づく人や動物から執拗に吸血をくりかえす。

また、近年の我が国では、下水道が完備され、道路の側溝がU字管によって整備されて以来、多数の雨水マスが泥だめとして作られた。この構造物は、水路底面より15-20cmほど深くなっており、雨水が溜まりやすい構造になっている。都市部に見られるこれらの構造物は、現在、ヒトスジシマカとアカイエカの重要な発生源となっている。雨水マスから発生したヒトスジシマカは、近くに公園や戸建て住宅があった場合には、それらに植えられた植生に速やかに潜り込み、吸血源動物や人が近づくのを待っていると考えられている。2008年に大阪市内で、ヒトスジシマカ成虫密度の評価を8分間人囿法で行い、ヒトスジシマカが潜んでいる環境に関して種々の解析を行った。そこで、今年度は、実際公園の植生等にどの程度ヒトスジシマカが潜んでいるかを蚊帳を使って調査した。チクングニヤ熱等が我が国に侵入してきた場合に、緊急に成虫防除対策を行う必要が生ずる。その場合、患者宅周辺や公園等でどのように成虫防除を行うか予め予備的な試験を行っておくことが重要である。また、デング熱の流行地における幼虫および成虫防除にピレスロイド系の殺虫剤を処理することが一般に行われているが、この薬剤に対する抵抗性の発達も調査する事が必要で、効果が低い薬剤を使い続けることを避ける意味で重要な調査である。日本脳炎はコガタアカイエカが媒介する重要なウイルス感染症であるが、我が国では1990年代以降患者数が著しく減少し、毎年数人程度である。しかし、西日本を中心に水田地帯に存在する豚舎や牛舎でコガタアカイエカを捕集すると、年によって大きくことなるが、日本脳炎ウイルスが頻繁に分離される。これは、現在でもウイルスの活動は活発に起こっていることを示しており、ワクチン接種、蚊にさされない個人的な防御によって蚊に刺されな

い対策を行うことが重要であると考えられる。コガタアカイエカに関しては、分布域、生息密度に関係する気候要因が明確に知られておらず、東北地方は、分布は認められるが、個体群密度は相当低いことが知られている。晩秋に東京都内の公園で多数の成虫が捕集され、越冬生態との関係が強く疑われている。また、琵琶湖周辺での調査において、周辺地域によって蚊の捕集数が相当異なることが示唆された。それらの違いが周辺の土地利用とどのように関係するか解析を進めた。ウエストナイル熱の侵入は、依然として注意が必要であり、最近の極東ロシアでの抗体陽性の野鳥の存在は、我が国へのウエストナイル熱ウイルスの突発した侵入の可能性を強く示唆するものである。渡り鳥の飛来地での蚊の調査およびウイルスの検出は、ウイルスの活動が広範に拡がっていない段階でウイルスを検出できる利点があり、地道なサーベイランスを続ける必要があると考えられる。現在までに西日本を中心にコガタアカイエカ、アカイエカ等からウイルスの分離を試みており、日本脳炎ウイルスをコガタアカイエカから分離し、遺伝子解析を行っている。また、野鳥と病原体との関係に関して、トリマラリアの感染状況、我が国のイエカ類を中心とした蚊の吸血嗜好性の解析も野鳥で増殖するウエストナイルウイルス等の疫学的解析に重要な情報を提供すると考えられる。衛生害虫の殺虫剤抵抗性に関して、現在、主に12歳以下の子供達に見られるアタマジラミが大きな問題となっている。1982年以来1種類の薬剤がアタマジラミ駆除に用いられており、少数ではあるが、ピレスロイド系の薬剤に対して抵抗性を示すコロニーが出現している。抵抗性に関わる遺伝子変異を検出することによって、効果のない薬剤の使用を中止させることが可能となる。コロモジラミは壱塚熱の媒介昆虫で、先進国

の路上生活者に寄生しているコロモジラミから病原体である *Bartonella quintana* の遺伝子が検出されている。我が国では、東京での調査しか行われていなかったが、平成21年度より大阪市の路上生活者に寄生するコロモジラミの調査を開始し、遺伝子の検出を行った。太平洋戦争の前後にマラリアが大流行した5県の内、患者の発生が特徴的であった滋賀県琵琶湖湖東地域と、戦前の発生が顕著であった福井県鯖江盆地、石川県河北潟、富山県氷見市において、シナハマダラカ群の発生状況を調査し、将来のマラリアの流行可能性に関して考察した。

チクングニヤ熱に関して、RT-PCR法、リアルタイム RT-PCR法を用いた遺伝子検出法、IgM 捕捉 ELISA法、50%プラーク減少法を用いた中和法による診断法を用いた検査体制を確立し、これまでにチクングニヤ熱輸入症例の実験室内診断を行い、15例の輸入症例が確認された。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており、チクングニヤウイルス(CHIKV)が日本に侵入し、流行する可能性は否定できない。したがって媒介蚊のCHIKV感染を可能とするウイルス血症の高いCHIK熱急性期患者の迅速な把握は必須である。そこで我々は現在のCHIKV遺伝子検出系であるRT-PCRおよびリアルタイム RT-PCR法に比較してさらに迅速なHyper RT-PCR法による診断を試みた。チクングニヤ熱は、我が国では感染症法に定められていない疾患であるため、輸入例に関するデータは感染症法の枠内では報告されてこない。本研究では、これまでに経験されたチクングニヤ熱輸入例を解析し我が国におけるチクングニヤ熱患者の現状を明らかにすることを目的とした。

クリミア・コンゴ出血熱に関して、患者および流行地から採取されたダニからのS-遺伝子、M-遺伝子、L-遺伝子を増幅するnested RT-PCR法を開発した。それを用い

て、クリミア・コンゴ出血熱患者や流行地で採取されたダニからS-遺伝子、M-遺伝子、L-遺伝子の増幅を試み、ダニやヒト(クリミア・コンゴ出血熱患者)における各分節遺伝子発現の程度を比較検討した。

デング熱に関しては、初回感染と同じ型の感染に対しては終生防御されることが疫学的に知られているが、ある型に感染後、別の型に感染した場合、中和活性を持たない交差性の抗体が抗体依存性感染増強(ADE)の機構により重症型のデング出血熱を導く可能性がある。そこで、自然感染やワクチンによって誘導された抗体の中和活性および増強活性の2つのバランスを同時に検出する測定法を開発し、デング熱4価ワクチンを接種したマウスに誘導される抗体の全ての型に対する中和・感染増強活性を調べた。

## B. 研究方法

1) ヒトスジシマカの生息状況調査は2009年8~10月、岩手県盛岡市、花巻市、奥州市、一関市、大船渡市、釜石市、宮古市、住田町、大槌町及び山田町の7市3町の計99地点で行った。調査対象は主に寺院や屋外に放置された古タイヤなどとし、手水鉢や古タイヤなどのたまり水に生息している蚊の幼虫及び蛹を採取し、検体数は1地点につき1~12コロニーとした。採取した蚊の幼虫等は室温で飼育し、羽化させた成虫をエーテルで麻酔後、実体顕微鏡で観察し、形態学的に鑑別を行った。GISを利用した解析に関しては、1kmメッシュ気温データ(菅野洋光, 1997: ヤマセ吹走時におけるメッシュ日平均気温の推定, 農業気象, 53, 11-19)の1986~2009年の日平均気温について、1年間の平均(日平均気温の年平均; 以後「年平均気温」という)、1月の平均気温、10.8℃を閾値とする有効積算温度及び日平均値10.8℃以上の日数を算



出した。また、日平均気温の年平均が10.8℃以上の地域の面積を算出した。ヒトスジシマカの生息地点と気温等との関連について、2006～2009年のデータを用い、年平均気温は10.0℃から0.2℃間隔で11.6℃まで、1月の平均気温は0℃から0.2℃間隔で-2.0℃までの地域について比較検討した。解析にはGISWAY-light Ver. 2.2.3（株）ラピュール社製）を用いた。

2) ヒトスジシマカの植生内に潜んでいる成虫の調査は、3人が一組になり、兵庫県西宮市内の公園8ヶ所で、総数19ヶ所灌木をランダムに選び、蚊帳(2×2.5×1.9m)を一気にそれぞれの植生上に被せて、1人が蚊帳の中で8分間蚊を捕集した。他の2人は、蚊帳の裾から蚊が逃亡しないように、蚊帳の裾を固定することを行った(図2)。捕集された蚊は、その場で殺し、持ち帰って、種類および雌、雄の数を記録した。また、灌木等の植生は、公園管理課の専門家に植物の種類を確認した。

3) 西宮市全域にある公共公園20箇所を対象とした。幼虫対策として主たる発生源である公園内および側近にある道路雨水枡への薬剤散布を二段階設けて行った。すなわち、二週間間隔のIGR系薬剤(スミラブ発泡錠)処理が8公園、一週間間隔で薬剤処理したのが2公園である。7月6日より1錠の投入を開始し、前後での成虫密度の調査も行った。なお、一週間隔で処理した公園では公園の中心から100m半径の範囲にある全ての発生源に薬剤を処理した。各試験区での効果の評価は、幼虫および成虫密度調査を全ての対象公園で実施した。幼虫調査は、1雨水枡の4隅を柄杓(クラーク社製、容量350ml)ですくい採り、個体数および採集された蛹を持ち帰り、その羽化率をイエカ属、ヤブカ属、他の種類に分類し集計した。特にアカイエカ種群については個眼数を観察し、アカイエ

カ、チカイエカに分別した。成虫調査は全ての対象公園、1公園につき2箇所、8分間人囮法により実施した。幼虫、成虫調査はいずれもおおむね2週間に1回の間隔で実施した。

4) 液化炭酸ガス製剤を用いた屋外におけるヒトスジシマカ成虫の防除効果を検討した。実施場所は神奈川県中郡大磯町の一般民家の約200㎡の庭で、実施期間は2009年8月19日～9月27日である。薬剤処理日は2009年9月21日で、処理薬剤は液化炭酸ガス製剤(ミラクン®S)で、有効成分:フェノトリン1%(W/W)。標準処理薬量:1g/㎡である。防除効果の評価方法としては8分間人囮法によった。これは、ヒトが観察場所に立ち、飛来するヒトスジシマカを捕虫網で捕集し、その捕集数をカウントする方法で、今回の実験では、捕集した個体をカウント後に再び捕集場所に放す方法によった。今回試験を実施した庭では、薬剤処理時に対照区が設定できないことから、処理1か月前、1、2日前の計3回、8分間採集法により、ヒトスジシマカの飛来数の事前調査を行った。調査は、全て同一人が行った。薬剤の処理は、処理30分前の密度調査を行った約15分後(6:45)～30分後(7:00)にかけて、本製剤を1g/㎡の割合で庭の植込みや草むらなどを中心に噴射処理した。処理の際は、地上1m以下の範囲に対して重点的に行い、樹木の上部に対しての積極的な処理は行わなかった。なお、処理時はほとんど無風状態(風速0.2m/秒以下)であった。

5) ベトナムのネッタイシマカにおけるピレスロイド抵抗性機構の解析に関して、用いた蚊のサンプルは、2006年12月から2008年1月にかけての3年間にわたって、ベトナム北部の山間地から南部のメコンデルタ地帯の国道沿いに点在する中古タイヤから採集したネッタイシマカ幼虫を使用した。



今回は、*kdr* 様の塩基置換に注目して、PCR による遺伝子増幅とダイレクトシーケンシングによる解析により、ピレスロイド抵抗性遺伝子の解明とその地理的分布に関する解析を試みた。また、ベトナムのネッタイシマカにおけるミトコンドリアハプロタイプによる系統解析を試みた。解析には、同じテンプレート DNA を用い、採集地 1 箇所あたり、2 サンプルとした。参考として、ケニア・キスム産、インドネシア・バリ島産、タイ・チェンマイ産、エルサルバドル産のネッタイシマカを用いた。ネッタイシマカの系統解析にこれまで使われているミトコンドリア DNA の COI および ND4 タンパクコード領域を、下記のリバープライマーを用いてそれぞれ PCR 法にて増幅をおこなった。COI には 5' -GGATTATTAGGATTTATTGT-3' および 5' -GCAAATAATGAAATTGTTCT-3'、ND4 には 5' -TGATTGCCTAAGGCTCATGT-3' および 5' -TTCGGCTTCCTAGTCGTTTCAT-3' である。PCR は、94°C2 分、37°C2 分、72°C1 分の 3 サイクル、94°C30 秒、50°C30 秒、72°C1 分の 35 サイクル、72°C5 分の伸長反応でおこなった。PCR 産物の精製後、BigDye1.1 および上記のプライマーを用いてダイレクトシーケンス反応を行い、ABI3730 にて塩基配列の決定をおこなった。塩基配列の決定後、アライメント、ハプロタイプの解析を行い、ハプロタイプネットワーク図を作成した。また、ハプロタイプの地理的分布、*kdr* 遺伝子の分布との相関も調べた。

6) 東京都の林試の森公園で、2008 年 9 月～12 月まで、直径 36cm の捕虫網を用いて日の出直後に 1 時間の sweeping 採集を週あたり 2～3 回行った。採集場所は林床部で、上部を樹冠で覆われ、シャガ、ヤブラン、キチジョウソウが茂っていた。捕獲された成虫は感染研に持ち帰り、種類ごとに個体数を記録し冷凍で保存した。

これらのサンプルを解剖し卵巣の形態観察から経産雌の割合を求めた。2009 年 1 月から 3 月中旬にあたたかな日を選んで午後 1 時間の sweeping 採集を 14 回行った。2009 年 3 月中旬から 5 月初旬には朝と夕方それぞれ 1 時間の sweeping 採集を計 44 日実施した。

7) 滋賀県琵琶湖の湖東平野にあって、行政的には彦根市、東近江市、安土町、近江八幡市に属する地域でコガタアカイエカの分布調査を、畜舎の捕集には東京エーエス社製ライトトラップ (3 台) をその他の湿地、水田では 1kg ドライアイスを用いた CDC トラップ 20 台を用いて行った。捕集は 5 月 29 日から 10 月 3 日まで、3 週間毎に 2 夜連続して 7 回行った。景観解析には国土地理院発行 1:25,000 地形図、同土地条件図で、環境省生物多様性センター・生物多様性情報システムの自然環境保全基礎調査第 5 回植生調査の植生データ、1961 年から 2006 年撮影の空中写真、リモートセンシング技術センター (RESTEC) の ALOS 成果品、滋賀県琵琶湖環境科学研究センターの空中写真判読システムによる空中写真を用いた。

8) 水田に発生する蚊幼虫の調査場所として彦根市街地の南西に流れる犬上川の下流から上流に沿って、湖岸から内陸部の丘陵地の裾まで約 10km の範囲から 7ヶ所を選んだ。それぞれの採集場所で 10 枚の水田をランダムに選び、1 水田当たり柄杓で 30 杯の水を集めて採集された幼虫の数をイエカ、ハマダラカに分けて記録した。また、調査した水田の湛水率 (水田全体の何%が水で覆われているか)、水深、稲の草丈を記録した。合わせて天敵生物や浮草の有無を記録した。

9) 都市部における媒介蚊の定期調査は感染症研究所構内の 2ヶ所、地上 (1.5m) と樹上 (7.5m)、に 1kg のドライアイス を誘引源とするトラップを毎週 1 回 24 時

間設置して行った。捕獲された蚊は種類を同定し捕獲数を記録した。成虫発生の開始時期と終了時期をはっきりさせるために、調査は1月から12月まで毎週継続して52回行った。各調査週について5年間(2004~2008年)の平均捕獲個体数の50%, 90%, 150%, 300%を計算し、各調査年の密度レベルを評価した。

10) 渡り鳥飛来地の媒介蚊調査は2009年5月から10月まで、定期的に毎月1回行った。徳島県的那賀川の北部に広がる水田地帯と丘陵地を調査対象とした。第1回の調査時にトラップ設置候補地として10か所を選び、これらの中から、6ヶ所を定期調査用のトラップ設置場所を選びドライアイス1kgを誘引源とするCDC型のトラップを設置した。各捕集場所の環境をA=釣り池、B=溜池手前の湿地(イノシシ飼育場所)、C=日吉神社、D=八幡神社、E=八幡神社、F=サギ山に分けて調査結果を分析した。それぞれの場所にトラップ2台を設置し、24時間の連続採集を3日間継続して行った。サギ山では、トラップ採集に加えて、営巣林内の林床植物で休息している成虫を捕虫網によって2名で1時間採集した。採集した成虫は種類同定を行い、冷凍サンプルとして持ち帰った。

11) 釧路市動物園および釧路湿原野生生物保護センターで媒介蚊の調査を2009年8月3-5日に行った。これら施設の敷地内から各10ヶ所を選定してドライアイス1kgを誘引源とするCDC型トラップを設置し、24時間連続採集を2日間継続した。また、吸血蚊を採集するために、動物園で1回、保護センターで2回、植物上で休息している成虫を捕虫網によって捕獲した。捕獲された成虫は種類同定の後、冷凍サンプルとして持ち帰った。

12) アタマジラのピレスロイド系殺虫

剤に対する抵抗性の発達状況を調査した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>)により行った。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。抵抗性遺伝子型の検出に関して、ナトリウムチャンネルのT952とL955座位に生じたアミノ酸置換突然変異を対象としてQProbe法に基づくジェノタイピングを行った。また、Kasaiら(2009)の方法に従い、ナトリウムチャンネルのD11, M850, T952, およびL955座位に生じたアミノ酸置換突然変異を対象としてSNaPshot法に基づくジェノタイピングを行った。

13) 蚊の捕集は、主にCDC型ドライアイストラップ、捕虫網および吸虫管を用いた。2009年のコガタアカイエカの捕集は、国内6県(山形、福井、兵庫、滋賀、徳島、鹿児島県)で5~8月に実施し、フィリピンマニラ市近郊のBulacan州Bustosにおいては7月より毎月捕集調査を行った。捕集蚊は、細胞破碎機を用いて磨砕した遠心上清をヒトスジシマカ由来C6/36細胞に接種し、細胞変性効果(CPE)出現の有無を観察しながら7日間培養した。培養上清から全RNAを抽出し、real-time PCR (TaqMan法)によりJEV遺伝子を検出した(Shirato *et al.*, 2005)。ここで、JEV陽性と判断されたプールについては、エンヴェロープ(E)領域および3'非翻訳領域(3' UTR)の遺伝子解析を行った。得られたPCR産物は、ダイレクトシーケンシング法でヌクレオチド配列を決定し、GENETYXソフトウェア(Genetyx Corp., Tokyo, Japa)およびBasic Local Alignment Search Tool (BLAST)を利用して解析した。コロモジラミは大阪

市西成区内にある大阪社会医療センターを受診した路上生活者等の合計10名から入手した。一方、フィリピンマニラ市近郊のLaguna州Los Banos市において、主に寄宿舎生活の学童9名(女児8名, 男児1名, 7-18歳)の頭髪に寄生するアタマジラミを採取した。シラミ類からのバルトネラ菌遺伝子の検出はITS1領域を増幅するプライマーを用いて1st PCRを行い、さらにQHVE12/QHVE14 (Sasaki *et al.*, 2004)によりnested PCRを行った。また、クエン酸合成酵素*glta*遺伝子を検出するプライマーを用いてPCRを行った。得られたすべてのPCR産物は、ダイレクトシーケンシング法でヌクレオチド配列決定を行い、BLASTプログラムにより*B. quintana*遺伝子であることを確認した。

14) 鳥マラリアと吸血源動物の同定は、東京港野鳥公園で2007年に4月から10月に実施した定期採集より得られた7種1221個体の捕集蚊を分析に用いた。吸血蚊は1個体ずつ、腹部と胸部を切断し腹部から抽出されたDNAの分析によって吸血源動物種を同定した。また、腹部および胸部のそれぞれについて鳥マラリア原虫の検出を行った。未吸血蚊は種類ごとに1-20個体をプールして分析した。分析方法はKim *et al* (2009)によった。

15) マラリアの旧流行地における蚊の調査は、滋賀県琵琶湖湖東地域(彦根市, 東近江市, 安土町, 近江八幡市)のマラリア患者の発生が顕著であった彦根市郊外の牛舎と、その対照として近江八幡市の山際の牛舎、さらには近江八幡市街の牛舎、計3ヶ所に東京エーエス社製のライトトラップを吊るして蚊の捕集を行った。さらに、彦根城を中心とする地区、池沼を中心とする地区、西の湖を中心とする地区の3地区に区分し、各地区にCDCトラップをそれぞれ6台, 6台, 8台の合計20台を設置した。

調査期間は5月30日から10月3日まで, 3週間毎に7回2日間連続の捕集を行った。

福井県鯖江盆地では山田淳一(1941)および木水英夫(1952)が調査を行った範囲を踏襲した。盆地北端の福井市末広町に2台, 鯖江市内に13台, 越前市(旧武生市)に5台, 合計20台設置した。期間は6月25日から10月10日までの6回である。

石川県河北潟干拓地域はCDCトラップのみの調査で、干拓地の内部に5台, 外縁北東部(かほく市, 津幡町)に5台設置した。調査期間は6月10日から10月21日までに、隔週に1日行った。富山県氷見市では1995年まで富山県衛生研究所が蚊の調査定点にしていた牛舎近くの川岸にCDCトラップを2台, 丘陵部の溜池堤防に2台設置した。

16) マダニの調査地点(標高110~140m)は、富山市の都市部周辺に位置する自然林で、キツネ, タヌキ, テン, イタチ, ハクビシン, カモシカ, およびニホンノウサギなどの野生哺乳類が生息する環境である。調査地点を含む周囲一帯は、ハイキングやバードウォッチングなどに適した環境であり、休日には多くの家族連れが訪れる行楽地である。この定点において、2008年4月から2009年12月までの毎月1回、マダニ調査を実施した。調査全体を通して同一の調査者1人が、毎月前半の晴天日に、90×150cmのネル布を用いた旗ざり採集を2時間実施し、ネル布に付着したマダニ成虫全個体を採集した。採集後、マダニ類を70%エタノール液浸として保存し、実体顕微鏡下で種の同定を行なった。

17) デングウイルス(DENV2)を増殖するために、Vero細胞は、10%牛胎児血清添加のイーグルMEM培地で、C6/36細胞は、非不可欠アミノ酸添加MEM+10%FBS培地で培養した。K562細胞は、10%FBSおよび1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加RPMI-1640培地で培養した。デングウ

ウイルスは、ニューギニア C 株を用いた。DENV2 を免疫原として作製された 10 種類のマウスモノクローナル抗体を簡便化感染増強試験の評価に用いた。ウイルスの感染力価の測定は、Vero 細胞を用いて免疫染色後のフォーカスをカウントして FFU/ml として表した。

簡便化感染増強試験は、ポリ-L-リジンコートした 96 マイクロプレートを使用し、10 倍希釈した K5562 細胞、 $2.7 \times 10^5$  FFU の DENV2 を加えて培養した。培養後固定し、免疫染色により感染細胞数を求めた。マウスの実験では、デング 4 価ワクチンと DENV2 細胞外粒子を 1 群 5 匹 ICR マウスに 7 週間隔で 2 階混合投与した。中和試験は、Vero 細胞を用い、50% または 90% プラーク減少法により、血清中の中和抗体価を測定した。

1 8) チクングニヤウイルス、サギヤマウイルス、ヴェネズエラ馬脳炎ウイルス、東部馬脳炎ウイルス、シンドビスウイルス、セムリキ森林熱ウイルス、デングウイルスより High pure viral RNA kit (ロシュ) を用いてウイルス RNA を抽出し供試した。また陰性対照としてヒト全血由来核酸を用いた。CHIKV の E1 蛋白質領域をプラスミドベクター pcDNA3.1 にクローニングし、目的 RNA を得た。得られた合成 RNA の吸光度と分子量からコピー数を算出しリアルタイム PCR 法において検量線を作製した。チクングニヤウイルスの構造タンパク質コーディング領域にセンスプライマー 8 種類、アンチセンスプライマー 7 種類を設計し、検討した。Hyper RT-PCR 用に開発された PCR 機器である Hyper PCR UR MK-IV (トラスト、兵庫県加西市) を用い、遺伝子検出マーカーとして SYBR green I を添加し、470nm の波長のシグナルを検出した。サンプルをプラスチックディスク (直径 12cm, 厚さ 0.9mm) に封入し、温度条件 48°C 60 秒、95°C

60 秒、[95°C 4 秒、68°C 4 秒、68°C 4 秒] で 45 サイクル反応した。

1 9) 国立感染症研究所ウイルス 1 部で調整されたチクングニヤウイルス BH305 株 RNA の 4 乗～9 乗までの 10 倍希釈列を作成した。TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN)、通常の RT-PCR 法は OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて比較を行った。

2 step RT-PCR は逆転写反応 (RT) を pd (N9) (ランダム 9mer TaKaRa Bio)、酵素に SuperScript III (invitrogen) を使用して反応温度を 25°C から 50°C まで 25 分かけ上昇させ、50°C 30 分間の反応を実施後、PCR を EX Taq HS (TaKaRa Bio) を用いて行った。通常の RT-PCR 法により増幅した PCR 産物の確認は、688bps 以上の PCR 産物に関しては、E-Gel 48 1% Agarose (Ethidium bromide 含有、invitrogen)、688bps より小さい PCR 産物は、E-Gel 48 2% Agarose (Ethidium bromide 含有、invitrogen) で泳動後、画像撮影装置により撮影し、ドキュメンテーションした。

また、増幅した産物は、ランダムにシーケンスを行ってチクングニヤウイルス BH305 株の遺伝子が増幅されている事を確認した。

TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR のプライマー、プローブは、同じ研究班の感染研ウイルス 1 部第 2 室の情報に基づき実施した。Probe: Taq-Chik638P、Primer: Taq-Chik607F、Taq-Chik672R を合成して用いた。

2 0) これまで我が国においてチクングニヤ熱と確定診断された輸入例を感染国等の面から解析し、感染国におけるチクングニヤ熱流行状況と比較した。

2 1) 2001 年および 2002 年の 4 月に中国新疆ウイグル自治区を訪れ、クリミア・コンゴ出血熱流行地においてヒツジなどの家

畜や原野に生息するマダニを採取した。血清およびダニから RNA を精製し、さらにランダムプライマーを用いた reverse transcription 法で cDNA を作製した。

Nested RT-PCR は、テンプレート (cDNA サンプル) およびデザインされたプライマーセットを用いて、それぞれ Ready-to-Go PCR (Pharmacia 社) および High Fidelity PCR (Roche Diagnostics 社) を用いた。一回目の PCR および二回目の PCR 増幅条件は、ともに 94°C-2 分, 30 サイクルの増幅ステップ (94°C-30 秒, 52°C-30 秒, 72°C-30 秒), および, 72°C-5 分である。

### C. 研究結果

1) 岩手県内におけるヒトスジシマカの生息分布状況を明らかにするとともに、年平均気温等との関連を検討することにより、節足動物媒介性ウイルス疾患の予防対策に資することを目的として調査を行った。2009 年 8~10 月、盛岡市など岩手県内 7 市 3 町の計 99 地点で、古タイヤ等のたまり水に生息している蚊の幼虫を採取した。蚊類の同定は、実験室内で羽化させた成虫をエーテルで麻酔後、実体顕微鏡で観察し、形態学的に鑑別した。岩手県内で同蚊の生息が確認された地点は盛岡市、花巻市、奥州市、一関市、大船渡市、釜石市、住田町及び大槌町の 6 市 2 町の計 26 地点であり、生息北限は盛岡市仙北町であった。花巻市では、市街地の複数の場所で生息が確認され、同市内にはほぼ定着したものと考えられる。また、同蚊の生息が確認された地点の年平均気温は 10.8°C 以上、1 月の平均気温は -1.4°C 以上、10.8°C を閾値とする有効積算温度は 1300°C 日以上、日平均気温 10.8°C 以上の日数は年間 185 日以上であった。

2) 平成 21 年 7 月 16 日に行ったヒトスジシマカの成虫調査では、3 公園で 8ヶ所の灌木の調査を行った。ヒトスジシマカ

が捕集された灌木は 6ヶ所 (75%) で、平均捕集数は 2.9 頭であった。最高は 15 頭 (雌 14, 雄 1 頭) で、植生としてはユキヤナギであった。平成 21 年 9 月 11 日に行った 5 公園の結果では、11ヶ所の植生調査で 6ヶ所 (54.5%) から蚊が捕集され、平均捕集数は 1.5 頭であった。最高捕集数は 7 頭で、植生としてはアベリアであった。ユキヤナギからの捕集総数が 20 頭と多く (平均 6.7 匹)、アベリアからも 10 頭 (平均 3.3 頭) のヒトスジシマカが捕集された。これらの植生がヒトスジシマカによって積極的に選択されているかは、今後、より詳細な検討が必要と考えられる。これらの基礎的な調査から、緊急時のヒトスジシマカの成虫防除対策において、効果的な薬剤処理の方法が今後明らかになると考えられる。

3) 薬剤処理された公園内外の雨水枡の蚊幼虫数ならびに蛹羽化率を調査した結果、採集された 1 有水枡あたりの幼虫数の推移は、イエカ類幼虫は調査開始初期の 4 月初旬より 8 月中旬にかけて 1 週間一回および二回散布区においては、無散布区と比較して発生量が少なかったが、9 月以降の幼虫数は差が認められなかった。ヤブカ類では全調査期間、無散布区よりも明らかに少なく、2 週間 1 回散布区でも 9 月初旬まではその傾向は 1 週間 1 回散布区と同様であった。蛹数はいずれの調査区共にアカイエカ種群が最も多く、72~83% を占め、個眼数による分類でチカイエカは約 23~27% を占めていた。ヤブカ類は 17~21% を占めた。1 週間 1 回散布区では薬剤投入後は 1 個体も蛹は採集されず、2 週間 1 回散布区でもその個体数は無散布区と比較して非常に少なかった。採集蛹の羽化率はいずれの散布区共に薬剤投入前 (7 月 6 日投入) は無散布区と比較してその羽化率は大差が無かったが、投入後は無散布区と比較して極端に低い値を示した。ヒト

スジシマカ成虫の密度は、1週間1回薬剤散布区は薬剤散布前までは他の区よりも多い傾向を示し、散布後は全期間低い個体数を観察した。2週間1回薬剤散布区では8月中旬までは無散布区よりも低い個体数であったが、それ以降は無散布区とよく類似した傾向を示した。

4) 神奈川県大磯町内の一般家庭の庭(約200 m<sup>2</sup>)の植込みや草むらなどに対して、1g/m<sup>2</sup>の割合で液化炭ガス製剤を処理した場合、処理10時間後まで飛来数はほぼ0となった。処理前のレベルに回復するまでに5日間程度を要したが、2か所の観察地点のうち、植生がほとんどないエリアに面した観察場所に比べ、草むらや植生が多いエリアに近い側のほうが飛来数の回復が早い傾向が見られた。

11月下旬まで8分間人囿法により上記の庭におけるヒトスジシマカ成虫の飛来状況を調査した結果、夏から晩秋にかけ飛来数は徐々に減少したが、10月上旬で20匹以上、下旬でも10匹程度の飛来があり、飛来は11月15日まで認められた。

5) ベトナム全国に散在する中古タイヤから採集したネッタシマカ幼虫について、ピレスロイドの作用点であるナトリウムチャンネルの遺伝子変異(*kdr*)としてこれまで報告されている、ドメインII-膜貫通セグメント6(DIIS6)領域のアミノ酸置換L1014F、V1016GおよびI1011M(あるいはV)のそれぞれの変異に関して、ベトナム国内の72カ所から採集されたネッタシマカ幼虫(計860個体)につき調査した。その結果、L1014FおよびI1011M(あるいはV)変異は全く見られず、V1016G変異についてもベトナム南部からの採集幼虫からわずか2個体が確認されるに留まった。一方、近年になってタイの採集個体から発見された、上記のアミノ酸置換変異とは異なるドメインIII-セグメント6(DIIIS6)領域の新し

いアミノ酸置換変異(F1269C)について、上記幼虫サンプルに関して同様に調べたところ、高い頻度でこの変異が見つかった。同様の変異は、タイ、ミャンマー、カンボジアでも見つかっており、東南アジアに普遍的なアミノ酸置換変異の可能性が高いことが明かとなった。

また、上記幼虫サンプルにつき、ミトコンドリアDNAのCOIおよびND4領域の塩基配列を調べた結果、39個のハプロタイプが見つかった。ネットワーク図を作成したところ、系統的に3グループに分かれた。多くの個体が属するグループはベトナムに全土に分布していたが、他の2グループは中部以南に集中的に分布しており、地理的分布に違いがみられた。*kdr* 遺伝子はどのグループからもみつき、本遺伝子がベトナム全土に短期間で一斉に広まった可能性が示唆された。

6) 2007年9月~12月に休眠前のコガタアカイエカが多数飛来した東京都の都市域にある公園で、2008年秋にも同様の集団飛来が観察された。飛来の時間経過は2007年と2008年で同様で、9月中・下旬に始まり、飛来数は10月中旬にピークに達して12月に終息した。飛来したコガタアカイエカの密度は2007年よりも2008年の方が常に高く、最高密度は1時間あたり3,740個体で2007年の3.5倍であった。卵巣の形態観察の結果、飛来成虫の96.5%(222/230)は基部卵母細胞の発育ステージがNまたはI、あるいは基部卵母細胞と2番目のそれとの長さの比が1.5以下であり繁殖休眠の状態であった。2009年3、4月に実施した捕虫網採集の結果、合計211雌(内4個体は吸血個体)の越冬覚醒したコガタアカイエカが捕獲され、この採集地の近くに越冬場所が存在していることが示された。ミトコンドリアDNAのチトクロームb遺伝子あるい

は 16S rDNA 遺伝子領域の塩基配列によって吸血蚊の吸血源動物を同定した結果、2 個体はヒト、1 個体はネコを吸血していたと推定された。

7) 彦根市・近江八幡市等琵琶湖湖東地域において、コガタアカイエカを中心に感染症媒介蚊の調査を 2008 年 8 月から 10 月にかけて実施した。CDC トラップやライトトラップで捕集した結果、コガタアカイエカの捕集数に地域差が認められた。そこで 2009 年については 5 月から 10 月まで、20 箇所を定点として選び CDC トラップを設置し、コガタアカイエカの季節消長と地域差を検討した。その結果さらに地域的特徴が明らかになったので、その要因をトラップ設置場所の土地利用あるいは景観の違いから検討した。トラップからの距離が 50m, 100m, 150m, 200m, 500m, 1km, 1.5km, 2km の 8 つの半径の範囲内で、景観要素の構成比率と蚊の捕集数との回帰分析を行い、その解析における正の要因として農地や湿地、負の要因として道路などが重要な関係要因であることを明らかにした。この結果から琵琶湖孤島地域におけるコガタアカイエカの生息ポテンシャルマップを作成することが出来た。

8) 琵琶湖・湖東地域の水田発生性蚊幼虫の発生状況を調べるために、彦根市街地の南西に流れる犬上川の下流から上流に沿って、湖岸から内陸部の丘陵地の裾まで約 10km の範囲を対象にした現地調査を 6 月中旬に行った。幼虫の発生が確認された水田の比率は、上流部で 80% と最も高く、中流域では 30~40%、湖岸に最も近い下流域では調査した 30 枚の水田のうちわずかに 1ヶ所の水田で幼虫が採集された。水田発生性蚊の繁殖シーズンの初期には幼虫の分布にかなり大きな偏りがあることがわかった。

9) 国立感染症研究所構内で 2003 年より

ドライアイストラップによって継続調査している疾病媒介蚊の捕獲個体数データ（過去 7 年間）を分析した。過去 5 年間の平均捕獲個体数を基準として、2009 年の発生状況の評価を行った。ヒトスジシマカの 2009 年の捕獲総数は 264 で、過去 5 年間の平均捕獲個体数 ( $423.6 \pm 147$ ) の 62% に相当し、レベル 2 : 平年よりも低い (50-90%) 状態であった。アカイエカ群の 2009 年の捕獲総数は 120 個体で、5 年間の平均捕獲個体数 ( $361 \pm 206$ ) のわずか 33% にすぎず、平年よりもはるかに低いレベル 1 : (<50%) の発生量であった。

過去 7 年間の発生消長を比較したところ、ヒトスジシマカの発生はシーズン初期の環境条件に左右されやすく、アカイエカ群の発生は 6, 7 月の環境条件に大きく影響されることが示唆された。

10) 四国東部で渡り鳥が飛来する徳島県的那賀川流域の水田地帯を対象として、2009 年 5 月から 10 月に疾病媒介蚊調査を実施した。トラップ採集によって合計 18 種類 5172 個体が捕獲された。コガタアカイエカが全体の 60% を占め、ついでアカイエカ群、カラツイエカ、ヒトスジシマカの順であった。カラツイエカの構成割合が全体の 10% とやや高いことが、過去に調べた出雲平野などの蚊相と異なっていた。水田地帯と丘陵地帯との境界に位置する溜池の周辺では、日向や日蔭の湿地発生性種と樹洞発生性種で構成される多様な蚊群集が形成されていた。サギ山では多数の吸血蚊が採集された。総捕獲個体に占める吸血蚊の割合は、アカイエカ群が 77.7% と最も高く、ついでトラフカクイカの 66.7%、コガタアカイエカの 42.2% であった。

11) 釧路市動物園および釧路湿原野生生物保護センターでドライアイストラップおよび捕虫網による疾病媒介蚊の調査



を行った。ドライアイストラップ採集によって合計 16 種類 4545 個体が捕獲された。捕獲個体数はトラップ 1 台・1 日当たり平均 114 個体という非常に高い密度であった。エゾヤブカが最も多く捕獲され、全体の 54% を占めていた。ついでヤマトハボシカ、キンイロヤブカ、ミスジハボシカの順であった。捕虫網によって最も多く吸血蚊が捕獲されたのはエゾヤブカで、138 個体であった。half gravid や gravid のようにある程度消化が進み、卵形成が進行中の個体が 29 個体 (21%) 捕獲されていることから、吸血後の休息場所として植物が利用されていると推察された。2008 年 7 月末に行った同様の調査の採集結果と比較すると 2009 年の捕獲個体数は約 5.7 倍であり、今シーズンの捕獲個体数は非常に多かった。

1 2) 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、ピレスロイド作用点のナトリウムチャンネルに四重アミノ酸置換突然変異が共通に見出されている。これらの座位のうち 2 座位を対象にして迅速にジェノタイピング可能な QProbe 法を確立した。2009 年の駆除剤抵抗性についての全国調査は同法に基づいて行い、抵抗性コロニー率は 10.0% (供試コロニー数 110, 供試虫数 276) であった。2006 年より始めた調査結果を 4 年間通算すると、抵抗性コロニー率は 8.5% (30 都道府県由来の供試コロニー数 519) であり、抵抗性の年次増加傾向も示された。地域によっては抵抗性率が全国平均から高低それぞれに大きく隔たっているケースが示された。

1 3) 蚊における日本脳炎 (JEV) 保有状況とウイルス遺伝子変位の推移を監視することを目的として、2005 年より国内各地で捕集されたコガタアカイエカからの JEV の検出・分離ならびに遺伝子解析を

行っている。2009 年は、国内 6 県 (山形、福井、兵庫、滋賀、徳島、鹿児島県) で 5 月から 8 月にかけて捕集されたコガタアカイエカから JEV の分離を試みた。その結果、鹿児島県下の豚舎周辺で捕集されたコガタアカイエカ 1 プールから JEV が分離・検出された。分離株の遺伝子解析から、2009 年分離株は、近年東アジア地域で多く見いだされる 1 型に属していたが、その Envelope 領域の配列情報からは、2008 年よりもむしろ 2007 年分離株により近縁であると示唆された。ウイルスゲノム 3' 非翻訳領域の可変領域に見られる欠損パターンもまた、2007 年分離株と同様の傾向を認めた。大阪市西成区にある大阪社会医療センターを受診した路上生活者等の衣類に寄生していたコロモジラミから塹壕熱バルトネラ菌遺伝子の検出を行い、7 人中 3 人から得られたコロモジラミ (42.9%) に遺伝子が確認された。フィリピンマニラ市近郊の Los Banos 市では 9 人中 1 人から得られたアタマジラミ (11.1%) から *Bartonella quintana* 遺伝子が検出された。日本に限らず人口密度の高いこのような大都市においては、塹壕熱侵襲の実態把握が必要であることが示唆された。

1 4) 東京湾沿岸の渡り鳥飛来地の一つである東京港野鳥公園で 2007 年に実施した疾病媒介蚊の定期調査で、アカイエカ群を主とする 7 種の蚊が採集された。40 個体の吸血蚊の吸血源動物を同定したところ、アカイエカは 95% が鳥から吸血していたのに対して、ヒトスジシマカはすべて哺乳動物から吸血していた。これらの蚊サンプルからの鳥マラリア原虫の検出を行ったところ、アカイエカの吸血個体の 65% とアカイエカ未吸血蚊 (MIR=29.9) とチカイエカ未吸血蚊 (MIR=13.5) から鳥マラリア原虫遺伝子が検出された。さらに 1 個体のトラフカクイカ (未吸血) から原虫遺伝子が検

出された。検出された鳥マラリア原虫のチトクローム b 遺伝子の配列を調べた結果、相互に 0.21～5.86%異なる 5つの遺伝的系統が区別された。最も高い頻度で検出された鳥マラリア原虫の遺伝的系統の配列は登録されている *Plasmodium relictum*-P5のそれと 100%一致していた。

15) 太平洋戦争の前後にマラリアが流行していた滋賀県琵琶湖湖東地域、福井県鯖江盆地、石川県河北潟および富山県氷見市において、現時点での蚊の発生状況を把握する調査を行った。琵琶湖湖東地域の 3ヶ所の牛舎では合計 233,604 個体の蚊が捕集され、その 91.4%をコガタアカイエカが占めたが、シナハマダラカも 8.0%捕集された。CDC トラップでは全体で 73,045 個体が捕集され、その 89.1%がコガタアカイエカで、10%がアカイエカ、シナハマダラカは僅かに 0.3%であった。鯖江盆地の牛舎では合計 65,914 個体が捕集され、その 97.0%がコガタアカイエカ、2.6%がシナハマダラカであった。CDC トラップでは 11,541 個体が捕集され、その 71.9%がコガタアカイエカ、24.7%がアカイエカ、シナハマダラカは僅かに 0.1%であった。一方、河北潟干拓地の CDC トラップでは、12,523 個体の蚊が捕集されたが、その 61.5%がアカイエカで最も多く、コガタアカイエカは 38.0%、シナハマダラカは全く捕集されなかった。氷見市では全体で 516 個体のみの捕集であり、その 74.2%がコガタアカイエカ、19.4%がアカイエカであり、シナハマダラカは僅かに 1 個体 (0.2%) であった。

16) 富山市の都市周辺に位置する自然林において採集したマダニ成虫は合計 802 個体で、これらは次の 2 属 7 種に分類された：キチマダニ、タカサゴチマダニ、ヤマアラシチマダニ、フタトゲチマダニ、オオトゲチマダニ、タネガタマダニ、およびヤマトマダニ。採集個体数をもっとも多

かったのはキチマダニ (497 個体) で、ヤマトマダニ (288 個体) がこれに次いだ。キチマダニ成虫は一年を通して採集されたが、夏～初秋と厳寒期の採集個体数は少なかった。一方、ヤマトマダニ成虫は 3～8 月に採集された。少数の採集された残り 5 種は、タカサゴチマダニは 4 月と 7 月に、ヤマアラシチマダニは 7 月に、フタトゲチマダニは 7～8 月に、オオトゲチマダニは 4 月に、そしてタネガタマダニは 3 月と 5～8 月に採集された。

17) デング熱及びデング出血熱の防御に重要な中和抗体を誘導できるワクチンが予防に有効であると考えられているが、中和抗体は低濃度では感染増強活性が生じるため、逆に重症化を導く懸念が指摘されるようになってきた。中和活性と感染増強活性のバランスを測定できる新しい方法を開発し、デング 4 価 DNA ワクチンがマウスに誘導する抗体を解析した。その結果、ワクチンは感染増強抗体を誘導することが示されたが、補体の存在化では増強活性が消失するか中和抗体に転ずることが明らかとなった。

18) チクングニヤ熱は、発熱・関節炎・発疹の 3 主徴が特徴であり、時に出血傾向を呈するため、鑑別疾患としてデング熱があげられる。これまでに RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR 法、IgM 捕捉 ELISA 法、50% プラーク減少法による検査体制を確立しチクングニヤ熱疑い輸入症例の実験室内診断を行い、15 例の輸入症例を確認した。日本には媒介蚊であるヒトスジシマカが広く生息しており、CHIKV が日本に侵入する可能性は否定できない。したがって媒介蚊の CHIKV 感染を可能とするウイルス血症の高い CHIK 熱急性期患者の迅速な把握は必須である。そこで我々は現在の CHIKV 遺伝子検出系である RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR 法に比較してさらにより迅速な

Hyper RT-PCR 法の開発を試みた。

19) チクングニヤ熱は、輸入感染症としても注目されている。国内に浸淫していない状況でいち早く進入を検出するには、迅速診断法としての遺伝子診断が合理的と考えられる。我々は、通常の RT-PCR 法、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR を用いて、迅速かつ高感度に検出する方法を検証した。その結果、RT-PCR 法・TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR 共に迅速かつ高感度に検出できる事が判明した。また、新たに設計した複数組のプライマーペアを用い、RT-PCR 法での検出感度をさらに検証した結果、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR を凌ぐ検出感度を示すプライマーペアが見つかった。今回我々が設計したプライマーペアを用いた RT-PCR 法では、TaqMan Probe リアルタイム RT-PCR よりも 10 倍ほど高感度であった。さらなるメリットとして Genetic Analyzer を用いて塩基配列を決定し、分子疫学的解析にも応用できる可能性がある事が判明した。

20) チクングニヤ熱はアジア各国で大きな流行を起こしている。これまで我が国では 2006 年 2 例、2008 年 3 例、2009 年 10 例のチクングニヤ熱患者が確定診断された。感染国はインドネシア 6 例、インド 3 例、スリランカ 2 例、マレーシア 2 例、タイ 1 例、ミャンマー 1 例であった。アジアにおいては、2006 年、2007 年は南アジアで流行が大きかったが、2008 年、2009 年は流行が東南アジアに広がっている。我が国における輸入例の感染国が、2008 年まではスリランカ、インドが主であったが、2009 年はインドネシア、タイ、マレーシアであったことは、アジアにおける流行状況を反映していると考えられる。今後も輸入症例の数は増加することが予想されることから、一層の注意が必要な感染症といえる。

20)

21) 2001 年および 2002 年の 4 月に中国新疆ウイグル自治区を訪れ、クリミア・コンゴ出血熱流行地においてヒツジなどの家畜や原野に生息するマダニを採取した。それらのマダニからのクリミア・コンゴ出血熱ウイルスの各 RNA 分節の検出を試みた。部分 M-遺伝子は、74 プールサンプル全てから検出されなかった。一方、6 サンプルから部分 S-遺伝子が増幅され、8 サンプルから L-遺伝子が増幅された。4 サンプルからは、S-遺伝子および L-遺伝子がともに増幅された。6 サンプルからは S-遺伝子または L-遺伝子が増幅された。

#### D. 考察

2005 年以来インド洋島嶼国、インド、東南アジア諸国で流行しているチクングニヤ熱は、2005-2006 年の公表患者数のみで 170 万人以上に達し、インドでの推定患者数は 1 千万人以上と考えられている。レユニオン島では全人口の 1/3 たる 26 万人以上が感染し、230 人が死亡した。今まで死亡症例がほとんど報告されていなかったウイルス感染症であるが、2006 年以降病原性が高まった可能性が指摘されている。一方、2007 年に北東イタリアの人口 3 千人ほどの小さな村で突然チクングニヤ熱が流行し、約 300 人の患者が発生し、1 人が死亡した。イタリアでは、1990 年に初めてヒトスジシマカの分布が確認され、その後全土に分布域を広げている。2008 年以降もインドおよびスリランカに加えて、東南アジア諸国(インドネシア、タイ、マレーシア、シンガポール等)で流行が続いている。2006 年にレユニオン島で分離されたウイルス株の E1 タンパク質の 226 番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異した株が見つかり、ヒトスジシマカでの増殖効率が 100 倍以上高まったとの報告がある。この変異がネッタイシマカが分布していないインド洋島嶼国

でこの感染症が流行した理由と考えられている。我が国は都市部を中心にヒトスジシマカの成虫密度が高く、公園、墓地、戸建て住宅の庭、公共施設などで、夏期によく刺される。夏期に感染者が帰国した場合には、チクングニア熱の流行は容易に起こることが想像される。平成21年の9月に血液中にウイルスが存在していた可能性のある患者が2名成田空港経由で帰国しており、この時期は未だヒトスジシマカの活動期であったため、健康危険情報の通報を行い、厚生労働省結核感染症課より注意喚起の文書が各自治体の衛生主幹部へ配信された。このウイルス感染症は、媒介蚊の体内での増殖速度がデング熱や日本脳炎と比べて著しく早く、患者の血液中のウイルス血症も高いことが知られている。その意味で、デング熱より流行が起こりやすいと考えられる。我が国におけるヒトスジシマカの発生状況調査を詳細に行い、幼虫発生源の調査および緊急時の幼虫および成虫対策の準備をすることが重要である。平成21年10月に「チクングニア熱媒介蚊対策に関するガイドライン」を作成し、各自治体、関係団体に配布した。平常時からの防除対策を行うことが重要で、現在都市部で最も重要な幼虫発生源である雨水マスの防除対策も、今後の重要な課題である。一方、夏期に患者が確認された場合、患者宅周辺の成虫防除対策が緊急に必要となる。これは、ウイルスを持った媒介蚊が患者宅周辺に潜んでいることが予想され、薬剤処理によってウイルスを持った蚊を防除し、それ以上患者を増やさないことが大きな目的である。その意味で、今年度、炭酸ガス製剤を用いた成虫防除試験を一般戸建て住宅と墓地で行った。また、雨水マスの幼虫防除を種々の頻度で行い、防除効果を判定することを試み、防除範囲を有る程度広く設定する必要が示唆されている。また、公園や住宅など

の植生が成虫の潜み場所となっている可能性をしらべ、1ヶ所の植生に雌雄合計で15匹が捕集された。この基礎的データをより詳細に収集し、成虫防除の効率的施行にある種の提案ができると考えている。日本脳炎ウイルスの媒介蚊は地域によって成虫密度が異なることが知られていた。しかし、どのような気候要因、環境要因が関係するか明らかになっていない。また、我が国で、どのような環境で成虫が越冬しているかも知られていない。秋から晩秋にかけて、東京都の公園内で1-3万頭の成虫を捕虫網で採集した。生理的解析から捕集された成虫の多くは越冬状態に入っており、公園周辺で越冬する可能性が示唆された。実際、翌春の休眠から覚醒する3-4月に捕集を試み、平成21年には200頭以上の成虫が捕集された。コガタアカイエカが都市部の環境で越冬していることは、非常に興味あることで、今後詳細に越冬の生態と生理を解析することは重要である。

チクングニア熱が東南アジアを中心に流行している現状では、海外で感染し、我が国で発症する患者が増加する可能性がある。デング熱との鑑別診断を行うとともに、血清学およびウイルス学的検査が重要である。ウイルス遺伝子に変異を起こしたウイルス株の検出法も早急に確立必要がある。また、TaqMan ProbeによるリアルタイムRT-PCR、通常のRT-PCR法もよる迅速診断法の確立も必要であるが、感染初期の患者しかウイルス遺伝子を検出できないことから、中和抗体の検出法の確立が重要で、各地方自治体にこれらの診断技術の移転も必要である。また、デング熱も同様に世界的な流行がほぼ毎年起こっており、輸入症例が明らかに増加している。本研究事業において、4価DNAワクチンの開発を目指しているが、低濃度で存在する中和抗体による感染増強活性（重症化）が生じないワクチン

の開発が強く望まれている。ウエストナイル熱(WNF)はヨーロッパ型の WN ウイルスの極東地域での活動が確認され、突発的に野鳥によって我が国にウイルスが運ばれて来る可能性があり、渡り鳥飛来地周辺における媒介蚊の調査、ウイルスの分離等のサーベイランスは継続する必要がある。一方、シラミ媒介性の感染症である塹壕熱の病原体の検出を、路上生活者のコロモジラミおよび海外における学童のアタマジラミから検出した。また、12才以下の子供達に流行しているアタマジラミに薬剤抵抗性の発達が全国的に確認されており、全国的な調査をより詳細に行う必要がある。現在、約10%のアタマジラミに抵抗性遺伝子を検出している。日本脳炎媒介蚊の生態、越冬生理、発生消長の基礎的な調査、チクングニヤ熱やデング熱の媒介蚊であるヒトスジシマカの生態、防除法の確立、チクングニヤ熱の迅速診断法の確立、デング熱の4価DNAワクチンの開発、クリミヤ・コンゴ出血熱ウイルスの検出法と診断法の確立、富山県の低標高域におけるマダニ相の調査において、キチマダニとヤマトマダニなど人咬症が知られている種類が優占種であること、季節消長は、本州中部において広く共通したパターンである可能性が示唆され、

富山県がタカサゴチマダニとヤマアラシマダニなど南方系の両種の分布北限となることが明らかとなった。マダニからのウイルスおよびリケッチアの検出と幅広く媒介節足動物と病原体との関係、診断法の確立、防除対策法の確立を目指しており、第1年目は、評価できる結果が得られたと考えられる。

#### E. 結論

(媒介蚊に関する調査研究)

東南アジアのデング熱媒介蚊の放置タイヤにおける分布を調査し、採集幼虫を用いた簡易的な殺虫試験を行い、ピレスロ

イドの作用点であるナトリウムチャンネルの遺伝子変異(*kdr*)をベトナム国内の72カ所から採集されたネツタイシマカ幼虫(計860個体)につき調査した。その結果、近年になってタイの採集個体から発見された、ドメインIII-セグメント6(DIIIS6)領域の新しいアミノ酸置換変異(F1269C)が、高い頻度で見つかった。同様の変異は、タイ、ミャンマー、カンボジアでも見つかり、東南アジアに普遍的なアミノ酸置換変異の可能性が高いことが明らかとなった。住宅、水田、湿地、森林など生態的条件の異なる採集場所でコガタアカイエカの捕集を行い、周辺の土地利用に捕集数が関係することが示唆された。8分間人囹法によってヒトスジシマカの成虫密度やと季節消長を調査できる事が明らかとなり、チクングニヤウイルスが突発して確認された緊急時の成虫防除対策において、防除効果の評価にも応用可能であることが示された。ヒトスジシマカの北限域である岩手県内で詳細な分布調査を行い、県内に新たな分布地が確認され、7年ぶりに盛岡市内で分布が確認された。温度との関係では、年平均気温が10.8℃以上の地域に分布していることが最近の温度データを元に作成されたデジタル気候図で明らかとなった。フィリピン、ベトナムで捕集された蚊からC6/36細胞培養系でウイルス分離を行い、日本脳炎ウイルス等既知のウイルスおよび未知のウイルスの分離を試み、日本脳炎ウイルス以外のウイルスの存在も示唆された。なお、現在までに国内のイエカ類から2種類の未知と思われるウイルスを分離し、遺伝子構造解析を行っている。トコジラミに関してピレスロイド作用点の遺伝子配列を新たに決定することを計画している。なお、アタマジラミの殺虫剤抵抗性遺伝子の検