

表 3. サギ山で採集された蚊サンプルの吸血状態

種 類	full fed	partial fed	half gravid	gravid	unfed	合計	%fed
<i>Cx. pipiens</i> gr	151	25	130	36	98	440	77.7
<i>Ae. albopictus</i>			2		150	152	1.3
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	8	4	7		26	45	42.2
<i>Ae. vexans</i>					32	32	0
<i>Ar. subalbatus</i>					6	6	0
<i>Lt. vorax</i>	2		1	1	2	6	66.7
<i>Ae. flavopictus</i>					3	3	0
<i>Ae. japonicus</i>					2	2	0
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>			1			1	100
合 計	161	29	141	37	319	687	53.6

表 4. 渡り鳥飛来地における主要媒介蚊の構成比率

	調査時期	種数	pip gr	trit	albo	Total
青森県十三湖	2007年7月	8	87	0	0	87
新潟(佐潟)	2007年5-10月	11	61	16	5	82
東京港野鳥公園	2007年4-10月	6	46	8	41	95
出雲	2008年5-10月	15	17	77	1	95
徳島県那賀川	2009年5-10月	19	17	60	7	84

pip gr=*Cx. pipiens* gr., trit=*Cx. tritaeniorhynchus*, albo=*Ae. albopictus*

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

釧路湿原における疾病媒介蚊調査

研究分担者 津田良夫 国立感染症研究所
研究協力者 金京純 岐阜大学大学院

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。

A. 研究目的

北海道の蚊相は、寒冷な気候を反映して独特なグループの蚊によって構成されており、我が国の他地域とはかなり異なっている。特に雪解け水によって形成される湿地や一時的な池には北方系のヤブカ類が多数発生することが知られている。釧路湿原は北海道東部における広大な湿地帯のひとつで、ここは渡り鳥の飛来地あるいは中継地としても有名である。この地帯に飛来する渡り鳥と湿地発生性蚊類の間には、吸血によるコンタクトがあることは容易に推察される。しかしながら、北方系蚊類の潜在的な疾病媒介能力に関してはまったく分かっておらず、温帯地域に比べて蚊の発生期間が短いこと

から、北海道に生息する蚊によって野鳥由来の病原体が媒介される可能性があるか否かは疑問である。近年侵入が警戒されているウエストナイルウイルスが極東ロシアで野鳥から検出されていることから、ロシアを経由して渡り鳥によってウエストナイルウイルスが持ち込まれる可能性は否定できないため、北海道に生息する蚊の生態的性質に関して調査し、潜在的な疾病媒介能力を評価する必要性が高まっている。

本研究は北海道に生息する蚊の潜在的な疾病媒介能力を評価するのに必要な生態的情報を収集することを目的として行われた。現地調査によって蚊の種類相、生息密度を調べるとともに、吸血源動物

種を特定するために吸血蚊の採集を行った。

B. 研究方法

調査地として釧路市動物園および釧路湿原野生生物保護センターを選び、2009年8月3-5日に現地調査を行った。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。

C. 研究結果

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。最も個体数が多かったのはエゾヤブカで全体の54%を占めていた(表1)。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。捕獲個体数が二ケタ以上の種類は8種類でこのうちシナハマダラカを除く7種類は北方系の種類であった。捕獲個体数が3個体と少ないが、イナトミシオカが釧路市動物園で捕獲された。園内の池や一時的な水たまりで発生していると思われる。釧路での本種の生息確認は北海道東部における初めての記録である。アカイエカ群の総捕獲個体数がわずかに6個体で非常に少なかった。

捕虫網採集では多数の吸血蚊が捕獲された(表2)。吸血蚊は中腸内の血液の量と消化具合によって、full fed, partial fed,

half gravid, gravidの4カテゴリーに分けて記録した。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思われる。

今シーズンの釧路地方の日照時間と日平均気温の変化を図1に示した。5月下旬から6月中旬にかけて約1ヶ月間、日照時間は昨年よりも少ない状態が続き、この期間の日照時間は昨年の約52%に過ぎなかった。気温は6月下旬を除いて6月上旬から7月下旬まで、昨年よりも低いかほぼ等しい状態が続いており、冷涼な気候だったことを示している。

D. 考察

釧路湿原に季節的に現れる湿地や池を発生源とする多種類の蚊が捕獲された。これらの種類の多くは薄明薄暮に吸血活動が盛んになると予想されるが、イナトミシオカやアカエゾヤブカのように昼間でも盛んに吸血する種類も含まれていた。したがって、成虫発生の最盛期には湿原やその周辺に生息している動物が、昼行性と夜行性の蚊によって頻繁に吸血されているものと思われる。

本研究と同じ調査場所で2008年7月末に行った同様の調査では、捕獲総個体数は802個体であった。これと比較すると2009年の捕獲個体数は4545と約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。捕獲された種類は多くが湿地発生性の種類であるので、今年6、7月の低温や5月から6月にかけての日照不足が影響して、恐らく蚊の発育が例年より遅れ、調査を実施した8月上旬に成虫発生がピークを迎えていたものと思われる。このように気象条件の年変動によって成

虫の発生時期が大きく変化することは、蚊と野生動物の接触を考慮する際に非常に重要であり、今後も調査を継続してどの程度の年変化が見られるのかを明らかにしておくことは重要だろう。

E. 結論

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。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。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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

表 1. 釧路市動物園，釧路湿原野生生物保護センターにおける媒介蚊調査結果（2009年8月3-4日）

種 類	捕虫網			ドライアストラップ			合 計
	センター	動物園	小 計	センター	動物園	小 計	
エゾヤブカ	652	14	666	1752	33	1785	2451
ヤマトハボシカ	28		28	1710	199	1909	1937
キンイロヤブカ	27	14	41	288	67	355	396
ミスジハボシカ	4		4	192	11	203	207
チシマヤブカ/キタヤブカ	23	4	27	116	13	129	156
アカエゾヤブカ	19		19	65	7	72	91
アカンヤブカ	1	16	17	3	47	50	67
シナハマダラカ				16		16	16
ヤマトヤブカ	3		3		4	4	7
アカイエカ群	1		1	1	4	5	6
シロカタヤブカ				2	1	3	3
イナトミシオカ					3	3	3
スジアシイエカ				1	1	2	2
ヤマダシマカ					1	1	1
ミスジシマカ					1	1	1
オオツルハマダラカ				1		1	1
未同定	2		2	3	3	6	8
総 計	760	48	808	4150	395	4545	5353

ドライアストラップは動物園とセンターで各10台を2日間設置した。
 捕虫網による採集は動物園で1回，センターで2回実施した。

表 2. 捕虫網採集で捕獲された蚊の吸血状況

種 類	full fed	partial fed	half gravid	gravid	合計
<i>Aedes esoensis</i>	89	20	28	1	138
<i>Culiseta nipponica</i>	9	14	1		24
<i>Ae. vexans nipponii</i>	13	2			15
<i>Ae. punctor/hokkaidensis</i>	3	2			5
<i>Ae. yamadai</i>		2	1		3
<i>Cs. kanayamensis</i>	1			1	2
<i>Ae. excrucians</i>	1				1

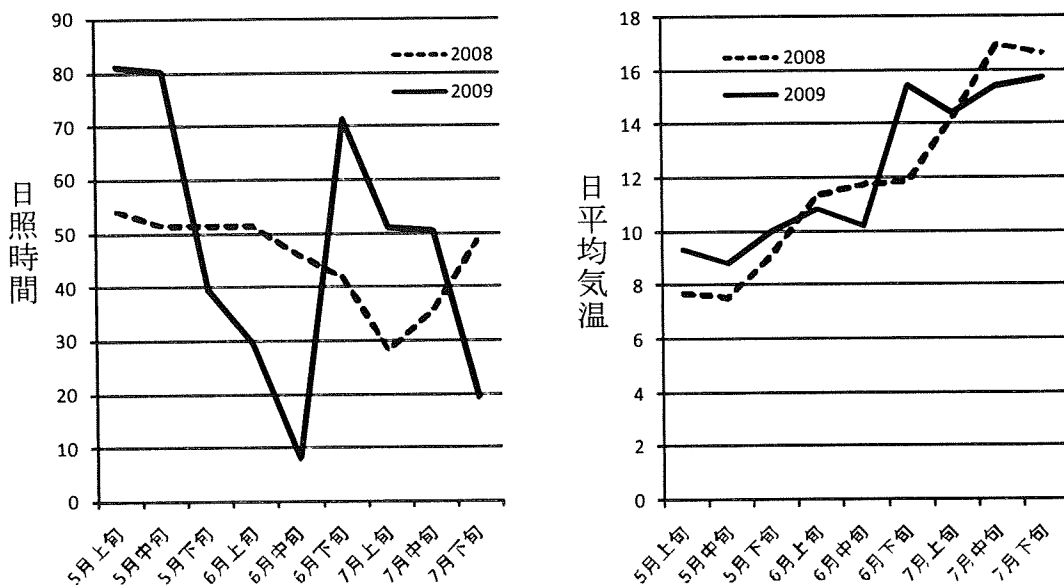


図 1. 釧路地方の日照時間(左)と日平均気温(右)
(2008年と2009年の5月～6月の観測結果)

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

アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性

研究分担者 富田隆史(国立感染症研究所昆虫医科学部)
協力研究者 葛西真治(国立感染症研究所昆虫医科学部)
協力研究者 駒形 修(国立感染症研究所昆虫医科学部)

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プング可能な 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。自治体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。

A. 研究目的

2000 年代後半より, 自治体に寄せられるアタマジラミ被害相談が増えているという報道がくり返されている。東京都福祉保健局の調査によると, 被害相談件数が 2005 年度以来3年間に前年比約 1.5 倍ずつ増大が記録され, 被害の問題がとくに客観的に示されてきたが, 2008 年度の集計では, 前年の約半分の件数に転じており, 都独自の啓発活動による成果の表れであると報じられた(毎日新聞, 2009 年 7 月 6 日)。2007 年に実施されたインターネットを利用した抽出調査に基づき, 年間 83 万軒の家庭にアタマジラミの発生があったと推定されている(Seki and Kobayashi, 2009)。

わが国でアタマジラミ駆除用に認可されている薬剤は, 一般用医薬品として販売されるスミスリン・パウダーと同シャンプーで, これらの有効成分はいずれもピレスロイド系殺虫剤のフェントリンである。ピレスロイド系殺虫剤の作用点は, 神経・筋などの興奮性細胞の細胞膜に存在する膜タンパク質であるナトリウムチャンネルである。ピレスロイド系殺虫剤は, ナトリウムチャンネルの閉鎖を阻害することで, 細胞膜内外の再分極化(すなわち活動電位の終止)を遅延させ, 興奮の伝達を攪乱する。

国立感染症研究所昆虫医科学部では, 2001 年より 2006 年まで, 首都圏(東京都, 神奈川県, 埼玉県)より採取した生きたアタマジラミを使って, ろ紙接触法に基づくピレスロイド抵抗性の判別と作用点のアミノ酸置換変異の検出を行った。この調査で殺虫試験でフェントリン抵抗性と判定された3コロニーは, 一致して, 作用点遺伝子に四重アミノ酸置換変異(D11E, M850I, T952I, L955F; 順に, N 末端近傍, DIIS1-2 細胞外ループ, DIIS5 膜貫通セグメント, 同左)を生じていた。

ピレスロイド系駆除剤の有効性の低下は, 世界的に見て, 1990 年代後半から学術誌でも頻繁に掲載されるようになってきている。米国とデンマークでは, 90%以上のコロニーがピレスロイド抵抗性となっている(Yoon et al., 2004; Kristensen et al., 2006)。これらの国で, 殺虫試験によりピレスロイド抵抗性と判定したコロニーに対して作用点遺伝子のアミノ酸置換変異の同定を行うことで, まず, 少なくとも T952I 置換変異と抵抗性との因果関係が明瞭に示された(Yoon et al., 2003; Kristensen et al., 2006)。最近の神経生理学的研究により, 四重アミノ酸置換変異のうち E11 を除く残りの3つの変異は, いずれもピレスロイド感受性の低下に影響を及ぼすことが確かめられている(Yoon et al.,

2008)。

2006年から始めたピレスロイド作用点遺伝子の変異のみに基づく SNaPshot 法を用いた3年間の調査では、総計で8.4%のコロニーが抵抗性であり(29都道府県由来の供試コロニー数407)、抵抗性率の年次増大が懸念されていた。これらの試験で抵抗性と判定した34コロニーは、共通して上に述べたナトリウムチャンネルの四重アミノ酸置換突然変異が生じた同一タイプの遺伝子を保有していた。今年度は、これらの四重突然変異のうち、T952IとL955Fの2つの置換を対象として、より迅速で操作手順の少ない QProbe 法 (<http://www.j-bio21.co.jp/tech/qpmethod.htm>)に基づくジェノタイピングを開発し、同法を用いて2009年に収集した試料を解析した。

B. 研究方法

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>)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。

QProbe 法: 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。核酸の抽出と抽出液の保存は、REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich)に含まれる試薬を用い、SNaPshot法(Kasai et al., 2009)で実施したのと同様な方法に従い、個体ごとに行った。PCR反応液は、25 µL 液量の中に 10X Ex-Taq buffer (Takara) 16.9 µL, 鋳型 DNA 溶液は、1 µL, Ex-Taq HS (Takara) 0.125 µL を含み、フォワード・プライマー (GGAACCTGGACTGGAAAACG), リバース・プライマー (CCAAAAAGTTGCATTCCCATAACG), および QProbe (GGGTAATTTAACATTCGTCCTTTGCATTATC-3Gfluophor, J-Bio21)の最終濃度がそれぞれ 4 nM, 12 nM, および 40 nM となるように常温下で調整した。PCR 反応とそれに引き続く融解曲線解析は、次の温度制御条件で iCycler (Bio-Rad)を

用いて行った:95°C 3 min, [95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s]を40回;引き続き, 37°C 1 min の後, 蛍光測定を40°Cより始め, 各温度段階を10秒間保ちつつ80°Cになるまで温度を0.5°Cずつ上昇させた。蛍光の検出にはCYBR Green用フィルターを用いた。

SNaPshot 法: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。

C. 研究結果

QProbe法の確立:使ったQProbe-3Gは, シトシンを3'末端とし, 検出したい塩基置換座位をその中ほどにカバーした殺虫剤感受性シラミに現れる配列をもつ31塩基鎖長のDNAプローブで, 3'末端のシトシンは蛍光物質で標識されている。融解曲線の解析において, QProbeが完全に相補的な相補鎖に対し融解温度以下の温度にある場合には, 二重鎖を形成したプローブ末端に修飾された蛍光標識は消光し, その融解温度以上にある場合には, 解離したプローブの蛍光標識は蛍光を発する。同じQProbeがミスマッチのあるDNA配列と不完全二重鎖を形成する場合の融解温度は, 完全二重鎖を形成する際の融解温度に比べて下回る(図1)。以上に述べたQProbe法の原理により, 融解温度は観察される蛍光強度の温度依存変位より推定され, 識別したい対象配列のタイプは融解温度の違いにより特定可能である。

ナトリウムチャンネルDIIS5膜貫通セグメント内のT952IとL955F置換に関して取りうる4つのハプロタイプをシラミDNAのPCRまたはPCR mutagenesisにより合成した。T952-L955(S型, GGGTAATTTAACATTCGATTTTGCATTATC)は殺虫剤感受性シラミに, I952-F955(R12型, GGGTAATTTATCATTCGTTTTTGCATTATC)は汎世界的四重突然変異型のシラミに見出されているが, S型とR12型のハプロタイプ間の組換えで生じ得るI952-L955とT952-F955のハプロタイプ(それぞれ, R1型とR2型とする)は, それらの存在は現在確認されていないものである。これら4つのハプロタイプをそれぞれ鋳型とするPCR

産物の融解曲線(微分型)を図1に示す。R1型とR2型の識別はできなかったが、これらを込みにした群、S型、およびR型の間の融解温度は、それぞれ、約62°C、67.5°C、および54.5°Cであり、融解曲線上で容易に識別可能であった(図2)。2つの異なるハプロタイプを示すDNAを等量ずつ鋳型とした場合には、それぞれのハプロタイプのみで示される融解曲線を融合した曲線となることを全てのハプロタイプの組合せで確認し(データ表示なし)、3群(S型、R12型、およびR1またはR2型)の間で可能な3通りのホモ接合体と3通りのヘテロ接合体を容易に識別できると期待された。

SNaPshot法に基いた2006年から2008年にかけての調査の結果、四重突然変異の抵抗性遺伝子を保有すると判定されたコロニー($N=33$)、および2009年の調査でQProbe法に基づきI952-F955の二重突然変異をコードすると判定されたコロニー($N=11$)の中から、併せて53のホモ接合変異体を選び、さらに、異なるコロニーよりそれぞれ選んだ100の野生型ホモ接合体とともに、QProbe融解曲線を比較した(図3)。突然変異体と野生型の二群の融解曲線は、それぞれ期待される融解温度を中心とする単峰性を示したことから、QProbe配列のカバーする供試虫が保有していたDIIS5コード配列には、S型またはR12型の二型のみを含んでいたことが強く示される。したがって、考案したQProbe法に基づく分子ジェノタイピングは、わが国においてピレスロイド作用点の感受性低下をもたらす抵抗性遺伝子の調査に有効であるといえる。

2009年の全国調査:2009年には、110コロニー分(276頭)の試料を収集し、T952IとL955Fの2座位の置換に関してQProbe法に基づきピレスロイド作用点の抵抗性遺伝子の保有を調べた。この内、11コロニー(10.0%)の供試虫が抵抗性遺伝子をホモ接合で保有していた。抵抗性遺伝子を保有すると判定した個体は、さらに、他の2座位も対象とするSNaPshot法でもジェノタイピングを行った結果、全てが日本、米国、英国で共通に見出されている四重アミノ酸置換突然変異体であることを確認した。2009年分を含む過去4年間の調査を総計すると、30都道府県より収集した519コロニー分のシラミについて、抵抗性率は8.5%で

あった(表1)。

D. 考察

抵抗性遺伝子分子ジェノタイピングのためのアタマジラミ試料の収集は、おもに国立感染症研究所ホームページと皮膚科医師ネットワークを通じて行ってきた。前者による収集において、アタマジラミ罹患者の保護者より試料が提供されるケースが2009年までの過去4年間の調査で64コロニー分(約12%)あった。これら保護者提供ケースを減じて年次抵抗性コロニー率を再集計した結果を表1に併記した。いずれの集計方法においても、抵抗性率の年次増加傾向が認められたが、調査各年における抵抗性コロニー率は、保護者提供試料を除いた集計において全試料に基づく値を下回った。調査全年で集計した保護者提供を除いた試料に基づく抵抗性コロニー率は6.2%となり、全試料に基づく値より2.3%低い値となった。この理由として、保護者が試料を提供したケースでは、すでに駆除剤を用いた駆除を試料採取前に行い駆除剤抵抗性の疑いを抱いていた保護者が、医療機関を受診した保護者に比べ、より多く含まれていることが考えられる。

2006年以来4年間分の調査を都道府県別に集計した結果を表2に示す。試料提供数が30コロニーを上回った都県は、多い順に、東京都(115コロニー)、兵庫県(99)、新潟県(93)、神奈川県(42)、埼玉県(34)であった。東京都と兵庫県における抵抗性コロニー率は、それぞれ、9.6%と10.1%であり、全国平均をやや上回るレベルであったが、新潟県、神奈川県、および埼玉県では全国平均を大幅に下回っていた。ただし、兵庫県の場合、赤穂市の一つの医療機関より提供された試料(16コロニー)では、抵抗性率が50%であった。新潟県における抵抗性コロニー率には、本県由来の試料の大部分を占める長岡市の一つの医療機関より提供された試料(90コロニー)における抵抗性率(1.1%)が大きく反映しているといえる。以上の再解析結果に基づくと、アタマジラミ罹患の機会の大きさは、家族内を除けば、アタマジラミ罹患小児の通う学校・施設内にあることから、ピレスロイド系駆除剤の有効性を論じる際には、最小自治体(市・区・町・村)または個々の学校・施設に

おける抵抗性の広まりにも注意を払う必要があるといえる。

調査例は少ないものの、茨城県(4コロニー)と沖縄県(9コロニー)では、供試コロニーの全てが抵抗性遺伝子を保有していた。茨城県の場合、つくば市由来の3コロニー分を含む試料はいずれも保護者から直接提供されたことを考慮すると、本県における抵抗性率に言及するには、さらに調査例数が必要であるといえる。沖縄県の調査例は、2008年と2009年の2年間に沖縄本島の5つの市町村における保護者と医療機関の提供を受けた、それぞれ、5つと4つのコロニーを含んでいた。この結果から、沖縄本島または他島を含む本県全域への抵抗性の蔓延がとくに懸念され、今後重点的に駆除剤の有効性に関わる調査を進めてゆく必要がある。本分担研究者らは、琉球大学医学部皮膚科学教室(里中博教授)の協力を得て、皮膚科を診療科目として含むことを標榜する沖縄県下210の医療機関にアタマジラミ試料収集を依頼状により依頼し(2010年2月)、さらに調査例を加えていく予定である。

E. 結論

1. 日本を含みアタマジラミに汎世界的に分布するナトリウムチャンネルのピレスロイド抵抗性を表す四重アミノ酸置換突然変異ハプロタイプのうち、T952IとL955Fの二重変異を従来法に比べより簡敏にジェノタイピング可能なQProbe法を開発した。
2. 2006年から2009年の4年間に30都道府県から収集した519コロニー分のアタマジラミを検査したところ、抵抗性ナトリウムチャンネル遺伝子の保有率は8.5%であった。
3. 抵抗性遺伝子を保有するコロニーの出現率には年次増加傾向がうかがえ、2009年に収集した試料における抵抗性遺伝子保有コロニーの率は10.0%であった。
4. 試料提供数の比較的大きかった最小自治体単位(市区町村)で見た抵抗性コロニー率には、全国平均から著しく大きいかまたは小さい抵抗性率の偏りが散見された。
5. 沖縄本島のアタマジラミにおいては、ピレスロ

イド系駆除剤の有効性がほぼ失われている可能性が指摘された。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kasai S, Ishii N, Natsuaki M, Fukutomi H, Komagata O, Kobayashi M, Takashi T, 2009. Monitoring of *kdr*-mediated pyrethroid resistance in head louse colonies in Japan. *In: Advances in Human Vector Control* (Eds. by Clark M, Bloomquist JR, Kawada H), pp 217-224, ACS Publications, Washington.

富田隆史, 2009. スミスリン耐性のアタマジラミへのよい対処法を教えてください. 健康教室 60: 22-25.

富田隆史, 2009. 殺虫剤抵抗性アタマジラミ対策が喫緊の課題. ペストコントロール, 2009年4月号:33-37.

富田隆史, 駒形修, 葛西真治, 2009. アタマジラミとスミスリン抵抗性. 皮膚病診療 31: 906-913.

2. 学会発表

葛西真治, 石井則久, 夏秋優, 駒形修, 小林睦生, 富田隆史. (2009). 駆除薬抵抗性アタマジラミの迅速分子診断法確立と2008年の調査結果. 第61回日本衛生動物学会大会, 2009年4月3日.

H. 知的財産の出願・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

表 1. 年次別に見たピレスロイド抵抗性ナトリウムチャンネル遺伝子を含むアタマジラミコロニーの検出率

採集年	全コロニー			保護者提供を除く		
	試験数	抵抗性数	抵抗性率	試験数	抵抗性数	抵抗性率
2006	42	2	4.8%	40	1	2.5%
2007	179	12	6.7%	163	9	5.5%
2008	188	19	10.1%	165	10	6.1%
2009	110	11	10.0%	87	8	9.2%
総計	519	44	8.5%	455	28	6.2%

コロニーとは、一人の患者もしくは一つの家族から採取されたアタマジラミの集団をさす。

表 2. 都道府県別に見たピレスロイド抵抗性ナトリウムチャンネル遺伝子を含むアタマジラミコロニーの検出率

採集地	試験数	抵抗性数	抵抗性率	保護者提供数	保護者提供抵抗性数
北海道	8	1	12.5%	0	0
青森県	1	0	0.0%	0	0
宮城県	2	0	0.0%	2	0
秋田県	4	0	0.0%	0	0
山形県	4	0	0.0%	0	0
福島県	7	0	0.0%	1	0
茨城県	4	4	100.0%	3	3
(つくば市)	3	3	100.0%	3	3
(北茨城市)	1	1	100.0%	1	1
埼玉県	34	0	0.0%	5	0
千葉県	9	1	11.1%	2	1
東京都	115	11	9.6%	14	2
(江東区)	61	6	9.8%	0	0
(江東区除く)	54	5	9.3%	14	2
神奈川県	42	1	2.4%	8	1
新潟県	93	1	1.1%	3	0
(長岡市)	90	1	1.1%	0	0
(長岡市除く)	3	0	0.0%	3	0
長野県	2	1	50.0%	1	0
岐阜県	2	0	0.0%	0	0
静岡県	5	0	0.0%	0	0
愛知県	8	1	12.5%	4	1
三重県	14	0	0.0%	1	0
大阪府	7	0	0.0%	1	0
兵庫県	99	10	10.1%	4	0
(赤穂市)	16	8	50.0%	0	0
(赤穂市除く)	83	2	2.4%	4	0
奈良県	3	0	0.0%	0	0
和歌山県	6	0	0.0%	0	0
岡山県	3	0	0.0%	2	0
広島県	1	0	0.0%	0	0
香川県	14	1	7.1%	0	0
愛媛県	9	0	0.0%	0	0
高知県	1	0	0.0%	1	0
福岡県	5	2	40.0%	4	2
長崎県	4	0	0.0%	1	0
大分県	1	1	100.0%	1	1
鹿児島県	2	0	0.0%	0	0
沖縄県	9	9	100.0%	5	5
(浦添市)	4	4	100.0%	1	1
(うるま市)	1	1	100.0%	1	1
(北中城村)	1	1	100.0%	1	1
(北谷町)	1	1	100.0%	1	1
(那覇市)	2	2	100.0%	1	1
送付元不明	1	0	0.0%	1	0
総計	519	44	8.5%	64	16

コロニーとは、一人の患者もしくは一つの家族から採取されたアタマジラミの集団をさす。

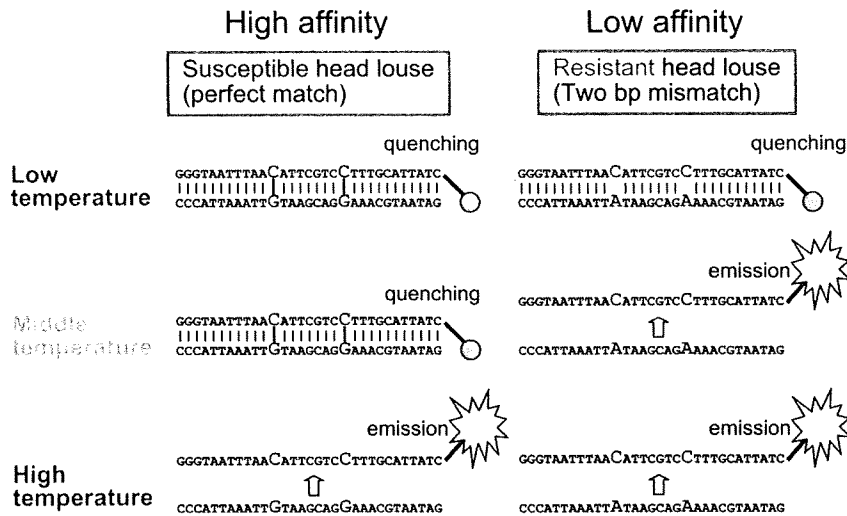
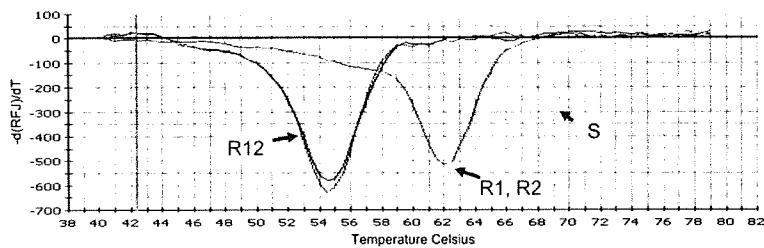


図 1. QProbe 法に基づく塩基置換突然変異検出の原理



感受性型 S	gggtaatttaacattcgtatttgcattatc
	G N L T F V L C I I
汎世界的多重突然変異型 R12	gggtaatttatcattcgtttttgcattatc
	G N L I F V F C I I
(未報告の型) R1	gggtaatttatcattcgtatttgcattatc
	G N L I F V L C I I
(未報告の型) R2	gggtaatttaacattcgtttttgcattatc
	G N L T F V F C I I

図 2. アタマジラミのナトリウムチャンネル T952-L955 座位に関して想定される 4 通りのハプロタイプを示す融解曲線

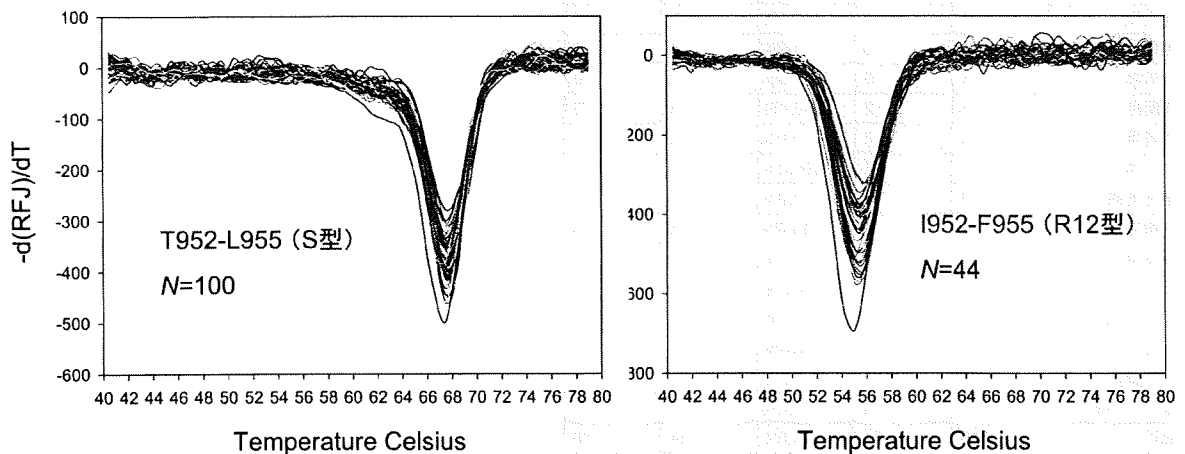


図 3. QProbe 法によるアタマジラミのナトリウムチャンネル遺伝子の二重突然変異体の解析例

国内外の蚊およびシラミからの病原体の分離と検出

分担研究者 澤邊 京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)
研究協力者 鋤田 龍星・伊澤 晴彦・佐々木 年則・星野 啓太(同・昆虫医科学部)
山川睦・梁瀬徹(動物衛生研究所九州支所)
Arlene G. Bertuso (Parasitology, University of the Philippines, Manila)
比嘉由紀子(長崎大学熱帯医学研究所)
平山幸雄(大阪社会医療センター)
吉田英樹(大阪市保健所)

研究要旨

我々は、年毎の蚊における日本脳炎(JEV)保有状況とウイルス遺伝子の変化や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'非翻訳領域の変異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医療センターを受診した簡易宿泊施設、臨時宿泊施設の利用者および路上生活者(42-74歳)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った。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(7-18歳)の頭髪に寄生するアタマジラミから*Bartonella quintana* 遺伝子の検出を試みた。大阪市では7人中3人から得られたコロモジラミ(42.9%), Los Banos市では9人中1人から得られたアタマジラミ(11.1%)から遺伝子が検出された。両市とも東京23区とほぼ同じか、むしろそれよりも人口密度が高い都市であり、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。

A. 研究目的

国内における日本脳炎ウイルス(JEV)の活動は、西日本を中心に増幅動物(ブタ)や

媒介蚊(コガタアカイエカ)の中では依然として活発であり、毎年数名の患者が報告されている。しかし、2008年12月西宮市で捕獲

されたイノシシの血液から JEV が分離され (高崎ら, 2009), コガタアカイエカの活動時期や生息場所以外での患者症例も報告されるなど, ブタとコガタアカイエカ以外の感染環, およびウイルスの国内での越冬の可能性が指摘されている。一方で, 最近の JEV 遺伝子に見られる変異から, JEV は毎年東南アジア諸国から渡ってきていることも推察されている (Nga *et al.*, 2004, Nabeshima *et al.*, 2009, Morita, 2009)。このような背景のもとに我々は, 2005 年から国内で捕集された蚊から JEV を分離し, 遺伝子解析を行うとともに, コガタアカイエカ以外の蚊種における JEV 伝播と越冬の可能性を探ってきた (厚生労働省研究事業 H20-新興-一般-015)。2009 年は, 近隣諸国からの JEV 情報を得るために, 国内 6 県に加え, 新たにフィリピン国マニラ市近郊での捕集調査を計画した。

1999~2004 年に東京都豊島区において, 路上生活者対策プログラムの一環として実施された健康診断に訪れた路上生活者を対象に, シラミ保有調査と塹壕熱バルトネラ菌 *Bartonella quintana* 遺伝子の検出を行った結果, 得られたコロモジラミの 10% (6/60) が陽性であったことを報告した (Sasaki *et al.*, 2006)。東京 23 区内に限らず, 同様の大都市における路上生活者ならびに簡易宿泊施設利用者等の環境や衛生状況は類似していると考えられることから, 大都市での塹壕熱侵襲の実態把握が必要であると考えた。そこで 2009 年は, 大阪市西成区, ならびにフィリピン国マニラ市近郊を調査地を選び, それぞれ得られたコロモジラミおよびアタマジラミから塹壕熱バルトネラ菌遺伝子の検出を行った。

B. 研究方法

1-1. コガタアカイエカの捕集

蚊の捕集は, 主に CDC 型ドライアストラップ, 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。詳細は表 1 に示した。

1-2. 捕集蚊からのウイルス分離ならびに遺伝子解析

捕集蚊は, 捕集地および捕集日時ごとに最高 20 個体までを 1 プールとしてマイクロチューブに回収し -80°C で保存した。このうち吸血後のため腹部に動物血液を有する蚊については, 少なくとも 1 週間砂糖水のみで飼育して消化管内の血液を完全に消化させ血液中の残存ウイルスならびに中和抗体の影響を極力排除した。細胞破砕機 (MM300, QIAGEN) を用いて磨砕した遠心上清をヒトスジマカ由来 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 28°C, 5%CO₂ 存在下で 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。使用したプライマーは ①JEV E 領域特異的プライマー 3 組, ②JEV 3'UTR 特異的プライマー 1 組 (いずれも配列は省略) である (Hoshino and Isawa *et al.*, 2007 および Hoshino *et al.*, 2009 を参照)。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 (ABI

PRISM310, 3130, Applied Biosystems, Foster City, CA), GENETYXソフトウェア (Genetyx Corp., Tokyo, Japa) および Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を利用して解析した。

2-1. コロモジラミおよびアタマジラミの入手

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、簡易宿泊施設および臨時宿泊施設の利用者および路上生活者の合計10名(男性, 42-74歳)の衣類に寄生していたコロモジラミを採取した。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)の頭髮に寄生するアタマジラミを採取した。アタマジラミの採取にあたり、個別に専用のすき櫛を用いて極力コンタミネーションを防いだ。得られたシラミは室温輸送で当室に搬入し、遺伝子検出を行うまで-80°C 冷凍庫内で保管した。

2-2. シラミ類からのバルトネラ菌遺伝子の検出

シラミはそれぞれ個体別にチューブに入れ、細胞破砕機(MM300)を用いて碎破し、REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma社)により全DNAを抽出した。ITS1領域を増幅するプライマー、QHVE1/QHVE3 (Roux and Raoult, 1999)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、CSBAR218/CSBAR698 (Roux and Raoult, 1999)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。

C. 結果

1. 2009年は、2007年以降3年にわたって継続調査している鹿児島県南九州市の豚舎周辺で、9月3日に捕集した蚊からJEVが1株分離された(表1)。プール陽性率は1.7%、MIRは0.85と推定された。本年のブタのHI抗体保有状況調査(日本脳炎速報-2009年第17報, 国立感染症研究所感染症情報センター)では、鹿児島県をはじめ九州全域が80%以上の高い抗体保有率を示す地域であり(佐賀県は50-79%)、蚊の捕集を行った9月上旬の鹿児島県ではすでに90%以上の値を示していた。徳島県ではブタHI抗体価は7月下旬にすでに90%以上と高かったが、捕集蚊からはJEVは分離されなかった。兵庫県、滋賀県ではブタのHI抗体価の上昇は見られなかった(山形県および福井県は未報告)。

E遺伝子のアミノ酸配列を基に系統樹を作成したところ、2009年の分離株は、近年、東アジア地域および日本を中心に分離されている1型分離株と遺伝的に極めて近縁であることが確認された(図1)。また、2009年分離株は、明らかにそれ以前までの分離株とは異なるクラスターを作った多くの2007年分離株と同じクラスターに属していた。500アミノ酸のうち5アミノ酸(1%)に変異が見られた(図2)。例えば、E123番目ではS(セリン)とN(アスパラギン酸)、E261はG(グリシン)とS(セリン)、E295はA(アラニン)とT(チロシン)、E339はI(イノシン)とV(バリン)、E366はS(セリン)とP(プリン)の違いが認められた。一方、ゲノム中の3'UTRの翻訳停止コドン下流の可変領域と呼ばれる領

域の塩基配列を比較した結果、2塩基、13塩基、1塩基の配列欠損(図中の↓)が、近年の1型分離株に共通して認められるが、それ以外に特徴的な欠損部位が2か所で見られる分離株が認められた。2009年鹿児島県分離株の3'UTRにおける特徴は、近年の分離株の典型的な欠損パターンを示していた。

フィリピンBulacan州Bustosにおいて毎月定期的に蚊の捕集調査を行い、現在までに合計6属13種2,648頭を捕集し、ウイルス分離のために137プールを作成した。図3に示すように、7月からの7カ月間では、7月が捕集数(596頭)および種類数ともに最も多く、コガタアカイエカをはじめとし、東南アジア諸国でJEVの媒介種とされるイエカ類5種(*Cx. pseudovishnui*, *Cx. gelidus*, *Cx. vishnui*, *Cx. fuscocephala*)が捕集された。また、採集場所が住居と豚舎が隣接している場所であることから、いずれの時期も *Cx. quinquefasciatus*が多く捕集された。現在までに618頭43プールからウイルス分離を行い、13プールにCPEが観察されたがJEVは分離されなかった。

2. 大阪市西成区において、簡易宿泊施設・臨時宿泊施設の利用者、ならびに路上生活者の7人中3人から得られたコロモジラミから *B. quintana* 遺伝子が検出された。陽性率は42.9% (3/7頭)であった(図4)。一方、Los Banos市の、主に寄宿舍居住者である5~18歳の学童9人中1名から得られたアタマジラミが遺伝子陽性であった(1/9、陽性率は11.1%)。

D. 考察

1. 我々の2009年までの5年間の調査の中で、長崎県で4年、鹿児島県で3年続けて、それ

ぞれ同じ場所で蚊の捕集を行い、JEV遺伝子の変異を追跡してきた。本結果から、2007年に新たな変異株が現れたことが示唆された。しかし、鹿児島県においては2007年変異株だけでなく、2008年分離株のように従来のタイプも存在していた。長崎県においても同様の傾向が見られたことから、九州地方、特に長崎県、鹿児島県の両県は、農業害虫を含む昆虫類の海外よりの飛来侵入が示唆されている地域でもあることから、ウイルスが海外よりもたらされた可能性は高いと思われる。事実、2006年の北ベトナムで捕集された蚊からの分離株の特徴は、国内で2007年に形成された新たなグループの中に位置することを考えると、この仮説も支持されるかもしれない。今後も鹿児島県においては継続して調査し、蚊およびJEVの海外よりの侵入の観点からも検討していきたい。

上述したように、海外調査の重要性が示唆されたため、2009年よりフィリピンマニラ市近郊で同様のウイルス保有調査を計画し、Bulacan州Bustosを定点として毎月調査を実施した。フィリピンにおける蚊の種構成、あるいは季節消長などの基礎的な情報はもとより、JEVの情報もほとんど報告されていない。従って、媒介蚊ならびにウイルスの両面から得られる本研究の成果は、将来的にも重要な情報になることが期待される。現在までにBustos捕集蚊からJEVは分離されていないが、CPEが得られた蚊プールは13プールあった。JEV以外のウイルスが分離・検出される可能性が示唆された。

2. 1999~2004年に東京都豊島区で実施された路上生活者対策において、我々が調査したコロモジラミにおけるバルトネラ菌遺伝子の

保有率は10%(60人中6人から得られたコロモジラミで遺伝子陽性)であった。本調査により明らかになった大阪市西成区でのコロモジラミの陽性率は42.9%であり、検査数が少なかったが非常に高い値であった。2010年1月の推計では、東京23区の人口は約880万人で人口密度は約14,157人/km²である。一方、大阪市(24区)の人口は約266万人であるが、人口密度は約11,981人/km²と、東京23区とほぼ同じである。東京のみならず、人口の多い大都市においては、いずれも路上生活者や簡易宿泊・臨時宿泊施設等に同様の衛生上の問題点が潜んでいる可能性があると思われるが、まさに本結果は、大阪市においても、そのような集団の中に塹壕熱バルトネラ菌が潜伏していたことを示唆している。近年、サンフランシスコの路上生活者由来コロモジラミの33.3%(Bonilla *et al.*, 2009)が*B. quintana*遺伝子陽性であり、仏国マルセイユおよびネパールではいずれも20%(Brouqui *et al.*, 1999, Sasaki *et al.*, 2006)、ロシアで12.3%(Rydkina *et al.*, 1999)と世界各地で高い陽性率が得られており、東京同様の大都市において塹壕熱再興感染が危惧されている。

アタマジラミに関しては、これまでに塹壕熱をはじめその他病原体の伝搬に関するという報告はない。しかし、2002年、我々がネパールの学童を対象に行った調査において、アタマジラミの9.5%から*B. quintana*遺伝子が検出されたことが初めての知見となった。その後サンフランシスコの路上生活者由来のアタマジラミの25%が陽性であったことが報告され(Bonilla *et al.*, 2009)、本調査において、フィリピンLos Banos市の学童9人から得られたアタマジラミの陽性率が11.1%であったことは不思議ではない。Laguna州Los Banos市は、首

都マニラから車で1時間ほどの距離にある、大都市近郊の住宅地区である。ここでもマニラ市同様に路上生活者だけでなくStreet childrenの増加が社会的な問題となっている。このような環境下に生活している学童期の子供たちに塹壕熱が蔓延している可能性が示唆されたことは、公衆衛生上にも重要な問題であることを意味している。日本国内においては、幼稚園や小学校を中心に、アタマジラミの寄生が報告されており、国内における調査も望まれる。

E. 結論

1) 2009年5月から8月にかけて捕集されたコガタアカイエカ(山形、福井、兵庫、滋賀、徳島、鹿児島県)のうち、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が検出・分離された。分離株の遺伝子解析から、2009年分離株は、例年同様、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、2007年分離株により近縁であることが示唆された。

2) 大阪市西成区で得られたコロモジラミ、およびフィリピン国マニラ市近郊のLos Banos市において得られたアタマジラミから塹壕熱バルトネラ菌遺伝子陽性率は前者で42.9%、後者で11.1%と高い値であった。

謝辞: 蚊の捕集、シラミの採取、ならびにそれらからの病原体の分離と検出を実施するにあたり、以下の方々にご協力をいただいた。ここに記して深謝する(敬称略)。Myra S. Mistica (Parasitology, University of the Philippines, Manila), 福永哲也・鮫島弘和(鹿児島県南薩家畜保健衛生所), 堀内早苗(宮崎家畜場), 一木智子・中尾美樹(九州大

学農学部), 高崎智彦・小滝徹・倉根一郎(国立感染研・ウイルス第1部).

G. 研究発表

1. 論文発表: なし

2. 学会発表

1) 鍬田龍星・伊澤晴彦・星野啓太・佐々木年則・津田良夫・金京純・梁瀬徹・白藤浩明・山川睦・今田忠男・小林睦生・澤邊京子.
2009年国内捕集コガタアカイエカの日本脳炎ウイルスの保有調査. 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) 澤邊京子・鍬田龍星・星野啓太・伊澤晴彦・佐々木年則・比嘉由紀子・津田良夫・

Nguyen Thi Yen・Phan Thi Nga・高木正洋・小林睦生. 2006-2008年ベトナムにおける日本脳炎ウイルスおよび媒介蚊調査. 第62回日本衛生動物学会大会, 鹿児島市, 2010年4月2-4日

H. 私的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし.

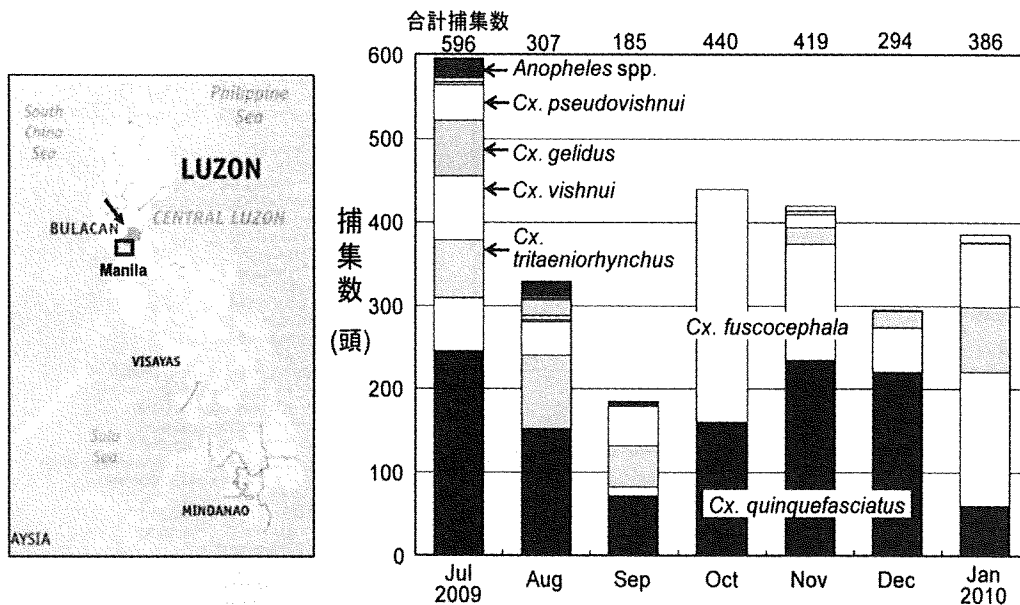


図 3. フィリピン Bulacan 県 Bustos における 2009 年捕集蚊の種構成

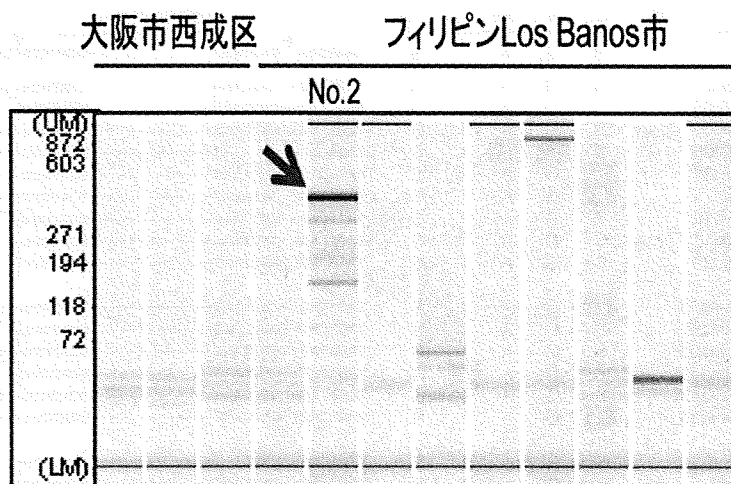


図 4. ITS1 領域 nested-PCR 法による *B. quintana* 遺伝子断片の検出