

佐々木年則，澤邊京子，鍬田龍星，金京純，  
津田良夫，伊澤晴彦，小林陸生．蚊の日本  
脳炎ウイルス感受性．第 62 回日本衛生動  
物学会大会，2010 年 4 月

沢辺京子，佐々木年則，森林敦子，葛西真  
治，津田良夫，小林陸生．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，2010  
年 4 月

森林敦子，澤邊京子，金京純，津田良夫，  
小林陸生．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，  
2010 年 4 月

#### 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 1型JEVの蚊の各器官での増殖性の比較

蚊の種類	感染後1 - 4日			8 - 14日			22 - 29日		
	唾液腺	中腸	他	唾液腺	中腸	他	唾液腺	中腸	他
コガタアカイエカ	1	1	1	1	1	1	6	5	4
アカイエカ	1	1	1	1	1	1	1	1	1

評価 1:<10コピー/組織, 4:1000~5,000, 5:5,000~10,000, :10,000<

図2 蚊唾液腺におけるJEV変異株増殖性の比較

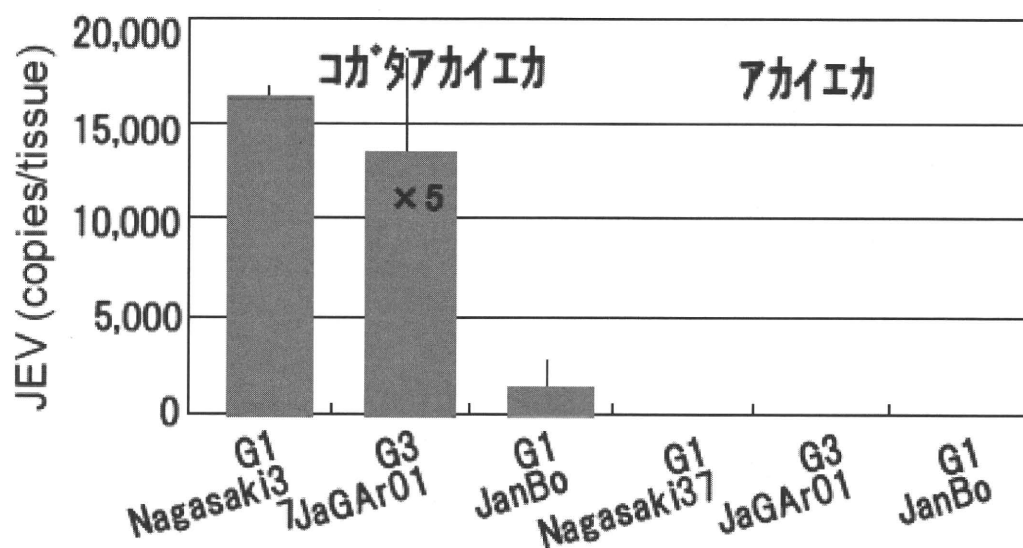
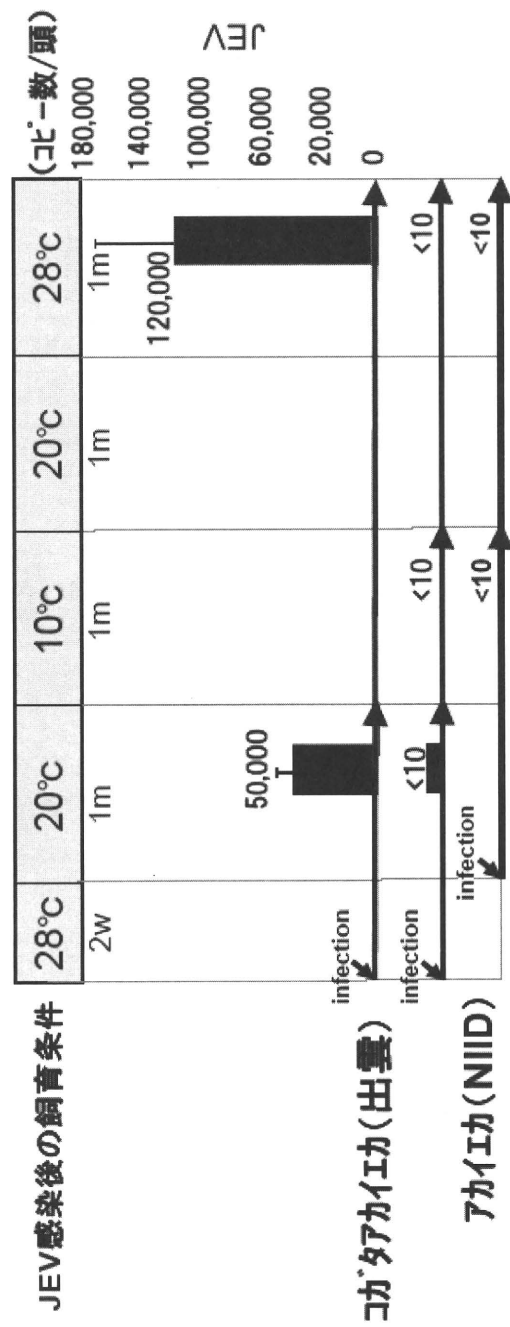


図3. ウイルス感染後、蚊を異なる飼育条件で維持した際のJEVの増殖



G1-Nagasaki37(10<sup>6</sup>コピー/ml)を経口的に摂取した蚊を異なる温度条件下に維持した

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確立に関する研究」班

分担研究報告書

### RT-LAMP 法を用いた媒介蚊からのデングウイルスゲノム検出

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	Lucky R. Runtuwene	大分大学医学部感染予防医学講座 大学院研究生
	Raweewan Srisawat	Department of Medical Entomology, Mahidol University, Scientist
	Narumon Komalamisra	Department of Medical Entomology, Mahidol University, Associate Professor
	Bouasy Hongvanthong	Center for Malariaology, Parasitology and Entomology, Lao PDR, Director
	山中敦史	神戸大学大学院医学研究科（インドネシア拠点）
	小西英二	神戸大学大学院保健学研究科 准教授
	森田公一	長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野 教授
	杉本千尋	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 国際協力・教育部門
	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 副所長

#### 研究要旨

RT-LAMP 法を用いて、デングウイルス（DENV）感染蚊からのウイルスゲノム検出の条件を検出した。DENV を経口感染させたネッタイシマカ雌を 28°C で 14 日間飼育した後、蚊の検査を行うまで -80°C に保管した。後日、個別の蚊から精製した RNA を鋳型として、RT-LAMP 法を実施した。栄研科学（株）の RNA 増幅試薬キット（RT-LAMP）のプロトコールに従って鋳型 RNA を含む反応液に、蛍光・目視検出試薬を加えて、63°C で 1 時間反応させた。ゲノムの増幅が認められたマイクロチューブは、目視で黄色に染まっていた。ゲノムの増幅を確認のために、電気泳動を行い、ラダー状の特異的な複数の泳動バンドを確認した。次に、デング熱流行地のラオス国において、確立した上記方法を実施した。ラオス保健省の協力を得て、デング熱患者宅で蚊の採集を行った。1 日半の調査で 5 軒の患者宅を訪問して、薄暗い家屋内から、ネッタイシマカ成虫を 1 軒につき 10 個体ほどを採集した。ラオス保健省の実験室において、DENV

の 4 つの血清型に特異的なプライマーおよび、蛍光・目視検出試薬を用いた RT-LAMP 法を実施した。その結果、DENV 1 型と 2 型が別々の蚊から検出された。患者は、ベトナムからラオスへ戻って来た直後に発熱したことから、ベトナムで感染したと推察された。以上の結果から、電気泳動を省略可能な RT-LAMP 法は、RT-PCR よりも迅速なため、流行地での感染蚊の有無を短時間で把握出来ることから、感染蚊対策にも有用な方法と考えられた。

#### A. 研究目的

デング熱流行地でデングウイルスに感染した媒介蚊の動態を把握して早期に駆除することは、患者発生を未然に防ぐ方策にもつながる。この目的のためには、採集した蚊からのウイルスゲノム検出を迅速に行う必要がある。RT-PCR 法は蚊の感染の有無をより早く決定できる方法ではある。しかしながら、より迅速な診断を求めた際に近年開発された RT-LAMP 法の検討が必要となった。

RT-LAMP 法の長所として、(1) 63~65°Cの一定の温度による1時間の反応でゲノム増幅が可能である。(2) ゲノム増幅反応の際に蛍光色素を加えると、ゲノムの増幅が生じた際にのみ、目視で緑色を確認できる。

媒介蚊からのゲノム検出に RT-LAMP 法を応用した例が少ないことから、感染蚊を使った実験室内での検討、およびデング熱流行地の患者宅で採集した蚊を用いての検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験室内での材料および方法

実験室内での検討では、飼育中のネッタイシマカ *Aedes aegypti* (LIV 系統) を用いた。マウスに短時間の人為的ウイルス血症を起こさせて、その間に蚊に吸血する機会を与えた。吸血14日後に、生存している雌蚊個体を実験に用いた。実験に使用するまで、-80°Cに保管した。

個々の蚊からの総 RNA 抽出には Trizol LS (Invitrogen 社) で粗精製を行い、その後 RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) のカラムで再精製した。精製した総 RNA を鋳型として RT-LAMP 法に用いた。

RT-LAMP (栄研・株・製) の処方および蛍光・目視検出試薬 (栄研・株・製) の追加処方は、それぞれのキットに添付されていた説明書に準じた。温度は 63°C 一定、反応は1時間で行った。

### 2. 流行地での試験方法

ラオス国のデング熱流行地域に住む患者宅でネッタイシマカの採集を行った (写真1)。ラオス保健省の実験室に蚊を持ち帰り、RNeasy Mini Kit を用いて個々の蚊から総 RNA を精製した。その後、デングウイルスの4つの血清型に特異的プライマーおよび、蛍光・目視検出試薬を用いた RT-LAMP 法を実施して、ウイルスゲノムの有無を目視で検討した。なお、実験室で Water bath が得られなかったが、ステンレス・バット (20 x 30 x 5cm 高さ) にお湯 (高さ 2cm) を張って、ホット

プレートで 63°C 前後を保持する方法を用いた。

(倫理面への配慮)

なし

## C. 研究結果

### 1. 感染蚊を使った実験室内での RT-LAMP 法の検討

個別の蚊から精製した総 RNA を用いて、RT-LAMP 法を実施した。感染6日後では、供試蚊10個体中8個体、また14日後では7個体が目視検査で緑色を呈した陽性であった (表1)。確認のために、1.5%アガロース電気泳動を行って、はしご状のラダーバンドを確認した。

### 2. デング熱流行地の患者宅で採集した蚊を用いた検討

ラオスのデング熱流行地で報告されたデング熱患者宅を訪問して、室内に潜むネッタイシマカを採集した。採集した蚊はラオス保健省の研究室に持ち帰り、蚊種の同定、その後、雌蚊の個体別に2%FBSを含むMEMを用いて蚊乳剤を作製した。

RT-LAMP 用の試薬を節約するために、4から5個体の蚊乳剤の一部を混合してプールで精製した総 RNA を準備した。その後、処方どおりに行って、反応1時間後に、緑色を呈したチューブを得た。なお、プライマーは、DEN1-4型のものを別々に用いた。DEN1型に3プールが陽性、DEN2型に1プールが陽性の緑色を呈した (Table 2)。

陽性を示したプールの内、デング2型に注目して個別のサンプルから総 RNA を抽出して、DEN2型特異的プライマーによる RN-LAMP を実施した。

その結果、1 tube のみが緑色を呈していた。ちなみに、キットに添付されている蒸留水は発色が起こらないが、自己で準備した再蒸留水、あるいは RNeasy Mini kit に添付されている水の使用は、擬陽性を生じる可能性があることがわかった。

#### D. 考察

デングウイルスに実験的に感染したネッタイシマカの個々の雌成虫から、ウイルスゲノムを RT-LAMP 法で、目視で検出可能であった。このことは、RT-PCR のように電気泳動による結果を待つことなく判定する事ができるので、検出時間の短縮につながるといえよう。ちなみに、目視による判断の場合には、蒸留水のみでも緑色がつくことがあることから、キットに添付されている蒸留水を用いる事が極めて重要と思われた。

蚊からの総 RNA 抽出には通常、Trizol LS (Invitrogen 社) で粗精製を行い、その後 RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) のカラムで再精製していたが、デング熱流行地では Trizol LS の入手は困難な場合が多い。今回の流行地での結果では、RNeasy Mini Kit (Qiagen 社) のみでも蚊からウイルスゲノムを検出できたことから、精製方法の簡略化が示唆された。また、小型の遠心器 (8,000rpm) による RNA 精製を実施したが、支障なかった。小型のブロックヒーター 器を探し得ている。

以上の結果から、媒介蚊からのウイルスゲノム検出に、RT-LAMP 法を用いることは感染蚊の有無を迅速に把握する方法として推奨されるべき方法と考えられた。さらなる、方法の簡略化および装置の小型化により、RT-LAMP 法が容易に流行地でも利用可能なように、システムを構築することはさほど困難ではないように思われる。

#### E. 結論

(1) 実験的に経口感染したネッタイシマカから精製した RNA を鋳型とした RT-LAMP 法を行い、増幅を示す緑色の発色を得た。

(2) アガロース電気泳動で増幅産物の確認をして、RT-LAMP に特異的なラダーバンドを得た。

(3) デング熱患者宅で採集した蚊から精製した RNA を用いた RT-LAMP 法でウイルスゲノムを得ることができた。

(4) RT-LAMP 法に蛍光・目視検出試薬を加えることにより、蚊からのウイルスゲノムの有無を 2 時間程で確定可能であったことから、流行地での蚊からのウイルスゲノム検出の迅速な診断法として応用可能と考えられた。

#### F. 健康危険管理情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Wei-Feng Tang, Masao Ogawa, Yuki Eshita, Hiroshi Aono and Yoshihiro Makino (2010) : Molecular evolution of Japanese encephalitis virus isolates from swine in Oita, Japan during 1980-2009. *Infect. Genet. Evol.*, 10(2): 329-336.

(2) Ryo Murata, Yuki Eshita, Akihiko Maeda, Junko Maeda, Saki Akita, Tomohisa Tanaka, Kentaro Yoshii, Hiroaki Kariwa, Takashi Umemura, and Ikuo Takashima (2010): Glycosylation of the West Nile Virus envelope protein increases in vivo and in vitro viral multiplication in birds. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 82(4):696-704.

(3) Raweewan SRISAWAT, Narumon KOMALAMISRA, Yuki ESHITA, Mingqi ZHENG, Katsushige ONO, Taichi Q. ITOH, Akira MATSUMOTO, Songsak PETMITR, Yupha RONGSRIYAM (2010) Point mutations in domain II of the voltage-gated sodium channel gene in deltamethrin-resistant *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 45(2): 275-282.

(4) Kenji Kurokawa, Kunihiro Iida, Mariko Mine, Manabu Yoshii, Keikichi Uchida, Yuki Eshita, and Tsutomu Oda (2010) : Variation in the number of ommatidia in valid female *Culex pipiens molestus* Forskal, a vector of *Dirofilaria immitis*, collected from an ovitrap, a septic tank, and an apartment in Nagasaki city. *House and Household Insect Pest*,

32(1): 1-8, July 2010

(5) Yuki Eshita, Junko Higashihara, Masayasu Onishi, Masaaki Mizuno, Jun Yoshida, Tomohiko Takasaki, Hidekatsu Yoshioka, Naoji Kubota and Yasuhiko Onishi (2011) : Mechanism of the introduction of exogenous genes into cultured cells using DEAE-Dextran-MMA graft copolymer as a non-viral gene carrier. II. Its thixotropy property. J. Nanomed. Nanotech. 2:105.

## 2. 学会発表

(1) 江下優樹, 高崎智彦, 林 昌宏, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Yupha Rongsriyam, 湯 偉峰, 青野裕士, 牧野芳大, 成田弘成, 牛島廣治, 倉根一郎(2010): タイ国産ネッタイシマカのチクングニアウイルス感受性。第62回日本衛生動物学会大会、2010年4月3日(土)・4(日)、鹿児島大学郡元キャンパス、鹿児島県鹿児島市。Med. Entomol. Zool., 61 (大会特集号) :70, 2010.

(2) Yuki Eshita, Josef Sem Berth Tuda, Lucky Ronald Runtuwene, Prima Pratama, Toshiaki Katayama, Shuichi Kawashima, Kazushi Hiranuka, Tomohiko Takasaki, Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Hironari Narita, Hiroshi Ushijima, Hiroshi Aono, Yoshihiro Makino, Miho Imada, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Junichi Watanabe (2010): Biological and ecological aspects of chikungunya and malaria vector mosquitoes in Southeast Asia. Parasite pathgen genomics: Prospect for tropical disease control. International scientific meeting in line with the 51<sup>st</sup> anniversary of Faculty of Medicine Sam Ratulangi University (The Watanabe Memorial Symposium), Manado, Indonesia, 27 May 2010.

(3) Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Miho Imada, Yuki Eshita, Josef Sem Berth Tuda, Chihiro Sugimoto, Ryuichiro Maeda, Jun-ichi Watanabe (2010):

Transcriptome Analysis of Malaria Parasites, Vector Insects and Infected Humans. Parasite pathgen genomics: Prospect for tropical disease control. International scientific meeting in line with the 51<sup>st</sup> anniversary of Faculty of Medicine Sam Ratulangi University (The Watanabe Memorial Symposium), Manado, Indonesia, 27 May 2010.

(4) Raweewan Srisawat, Narumon Komalamisra, Chamnam Apiwathnasorn, Yupha Rongsriyam, Yuki Eshita (2010): Evidence of mutations in sodium channel domain IIS6 in field-collected permethrin-resistant *Aedes aegypti*. The Fourth ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, SINGAPORE, 2-4 JUNE 2010.

## 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



写真1 患者宅内での蚊の採集

表1 DEN2感染マウスから吸血したネッタイシマカの、RT-LAMPによるウイルス感染状況

経口感染6日後	経口感染14日後	未感染吸血のみ	対照区	
			未吸血蚊	鑄型RNA無
8*/10**	7/10	0/5	0/5	0/1
80%	70%	0%	0%	0%

\*RT-LAMP陽性蚊数

\*\*供試蚊数



Table 2 Amplification of dengue viral genome with the type specific primers using pooled total RNA derived from field-collected mosquitoes

	Microtube number						Control	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	Positive	Negative
No. females pooled	5	5	4	5	5	6		
RT-LAMP for DEN 1	+	+	+	-	-	-	NT**	NT
RT-LAMP for DEN 2	-	-	++	-	-	-	++	-

	No.1 and No.2		No.3 and No.4		No.5 and No.6		Control	
	10		10		10			
RT-LAMP for DEN 3	-		-		-		NT	NT
RT-LAMP for DEN 4	-		-		-		NT	NT

\* Aliquot of individual mosquito homogenate were pooled, and then the total RNA was extracted by using RNeasy Mini Kit (Qiagen).

\*\* NT: not tested

Dengueウイルス1から4型に特異的プライマーを用いたRT-LAMPの結果(各Microtubeには、プールした蚊乳剤の総RNAを含む)

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

研究分担者 滝澤剛則 (富山県衛生研究所)

研究協力者 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)

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 31 頭からリケッチアは検出されなかった。イノシシ寄生マダニ類から *R. japonica* の遺伝子は検出されなかったものの、214 個体中 14 個体 (6.5%) から、ヒトへの病原性は不明のリケッチアが検出された。ヤマトチマダニからは比較的高率にリケッチアが検出された。イノシシの 37.7% にリケッチア陽性マダニが寄生していた。以上のことから、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と考えられた。

A. 研究目的

マダニ類は日本紅斑熱等を媒介するベクターとして重要である。*Rickettsia japonica* によって引き起こされる日本紅斑熱は、1984 年の発見以来、南西日本を中心に多発している。しかし、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。日本紅斑熱を含む紅斑熱群のリケッチアは、経卵によるダニからダニへの感染の他に、感染動物からダニ、ダ

ニから動物へも感染すると考えられている (小川, 感染症発生動向調査週報. 2002 年 25 号. 11-15. 2002 ; Piranda et al., Vector Borne Zoonotic Dis. 11:29-36. 2010; Freitas et al., Exp. Appl. Acarol. 47:321-345. 2009)。

マダニ類は吸血性の外部寄生虫であるため、宿主となる大型哺乳類 (ニホンイノシシなど) の分布は、マダニ類やマダニ媒介感染症の分布に大きく影響する。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, 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。しかし、イノシシとマダニ類が隣県から本県へ分布を拡大し、その結果、病原リケッチアが本県へ侵入する可能性は否定できない。

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12月に害獣として駆除されたイノシシ31頭から採取した脾臓30件及び血液4件を用いた。マダニ類は、2008年1～2009年1月に駆除されたイノシシ27頭の毛皮から採集した成虫214個体を用いた。

### 2. リケッチア検出

検体からDNAを抽出し、1st及び2nd PCRにより、日本紅斑熱または紅斑熱群(*R. japonica*を含む)リケッチアの17-kDa膜蛋白質領域、もしくはgltA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。

(倫理面への配慮)

本研究は駆除された野生動物及び外部寄生虫を対象としており、倫理面への配慮を必要としない。

## 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。マダニ類については、紅斑熱群PCRにより12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1)。遺伝子解析の結果、紅斑熱PCRにより検出されたリケッチアは、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、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、病原性は不明であった。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2)、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、ヤマトチマダニからは14.0%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27頭中10頭(37.7%)であった(表3)。

## D. 考察

オランダでイノシシの血液から*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、イノシシ寄生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。したがって、今回の調査結果は、日本で初めてのイノシシとイノシシ寄生マダニ類からの紅斑熱群リケッチア検出例となる。

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、病原性は不明であった。しかしながら、*R. tamurae*のように、病原性がないと思われていたリケッチアが患者発生に関わった報告(金子ら, 感染症学雑誌, 84:681-682, 2010)があることから、今回検出されたリケッチアも全く病原性がないとは断定できない。

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40%弱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214個体であったこと、通常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る。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, 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、感染しにくいか一過性である可能性が高い。しかしながら、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否定することはできない。

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。

今回、富山県に分布を広げている動物として、イノシシを対象にしたが、ニホンジカもそのような動物の1種であり、富山県内に長い間生息していなかったが、近年徐々に確認個体数が増加している(南部, とやまと自然, 124:2-5, 2009)。島根県では、ニホンジカの分布域、*R. japonica*陽性マダニ類の分布域、日本紅斑熱患者の発生地域が重なるという報告がある(田原ら, 厚生労働科学研究

費補助金新興・再興感染症研究事業「リケッチア感染症の国内実態調査及び早期診断体制の確立による早期警鐘システムの構築」平成19年度総括・分担研究報告書, 87-98, 2008)。富山県においても、今後、ニホンジカとともに *R. japonica* が侵入する可能性について考慮する必要がある。

#### E. 結論

イノシシからリケッチアは検出されなかったが、寄生マダニ類からヒトへの病原性は不明のリケッチアが検出された。以上のことから、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と考えられた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表:なし
2. 学会発表
  - 1) 小原真弓、山内健生、渡辺護、滝澤剛則「富山県のイノシシと寄生マダニ類からのリケッチア検出」第65回日本衛生動物学会西日本支部大会、2010年11

#### 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. 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	富山市棚ヶ原	キチマダニ	♂	+	-
2008年1月	魚津市虎谷	キチマダニ	♂	+	-
2008年2月	富山市棚ヶ原	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	富山市棚ヶ原	ヤマトチマダニ	♂	+	-

表 2. イノシシ寄生マダニ類の種類別陽性率

マダニの種類	検査数	陽性数	陽性率(%)	
キチマダニ	♀	19	1	5.3
	♂	128	5	3.9
ヤマトチマダニ	♂	50	7	14.0
タイワンカクマダニ	♂	13	1	7.7
タカサゴキラマダニ	♂	4	0	0.0
合計		214	14	6.5

表 3. イノシシ個体別の陽性マダニ数

No.	イノシシ捕獲月	マダニ検査数	陽性数	陽性率(%)
1	2008年1月	7	0	0.0
* 2	2008年1月	5	1	20.0
* 3	2008年1月	16	1	6.3
* 4	2008年1月	25	3	12.0
5	2008年1月	1	0	0.0
6	2008年1月	1	0	0.0
* 7	2008年1月	13	1	7.7
* 8	2008年1月	17	1	5.9
9	2008年1月	6	0	0.0
10	2008年1月	1	0	0.0
11	2008年1月	11	0	0.0
* 12	2008年1月	21	1	4.8
13	2008年2月	11	0	0.0
* 14	2008年2月	11	2	18.2
* 15	2008年2月	6	2	33.3
16	2008年2月	14	0	0.0
* 17	2008年2月	15	1	6.7
18	2008年2月	1	0	0.0
* 19	2008年2月	5	1	20.0
20	2008年3月	3	0	0.0
21	2008年3月	2	0	0.0
22	2008年12月	3	0	0.0
23	2009年1月	2	0	0.0
24	2009年1月	1	0	0.0
25	2009年1月	12	0	0.0
26	2009年1月	3	0	0.0
27	2009年1月	1	0	0.0
合計		214	14	6.5

\*リケッチア陽性マダニが付着したイノシシ

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)  
分担研究報告書

中部山岳国立公園立山の観光ルート沿いにおける蚊類幼虫調査

研究分担者 滝澤剛則 (富山県衛生研究所)

研究協力者 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)

研究要旨

2010年7月、8月、および10月に、中部山岳国立公園の立山観光ルート沿い(標高約500~2,000m)において、蚊類幼虫を採集し、その垂直分布を調査した。その結果、計973個体の蚊類が採集され、これらは少なくとも8種に分類された。個体数をもっとも多かったのはヤマトヤブカ *Ochlerotatus japonicus* (439個体)で、キンパラナガハシカ *Tripterooides bambusa* (430個体)がこれに次いだ。ヤマトヤブカはすべての調査地点で採集された。本年の調査では、昨年と異なり、ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は採集されなかった。このことから、昨年、標高1,200m地点で採集されたヒトスジシマカは、何らかの理由で一時的に発生していたものと推定された。

A. 研究目的

ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、日本の代表的なヤブカ類の1種であり、海外ではウエストナイル熱やデング熱の主要な媒介種でもある。従来、ヒトスジシマカはわが国の東北地方以南に広く分布することが知られていたが、近年、東北地方において本種の分布北限が北へ拡大していることが判明し、地球温暖化との関連性から注目されている。

地球温暖化がヒトスジシマカの分布に影響を与えるならば、本種の分

布は、北方だけでなく、垂直方向で高標高域へと広がることが予想される。しかし、我が国においてヒトスジシマカをはじめとした蚊類の垂直分布に関する研究例はほとんどなく、その詳細は不明である。

中部山岳国立公園の立山観光ルート沿いでは、1989~1994年に富山県衛生研究所によって蚊類の垂直分布が調査された。そこで、現在の蚊類の分布を過去の分布と比較するため、中部山岳国立公園の立山観光ルート沿い(標

高約 500~2000m)において、蚊類幼虫の分布調査を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 調査地

調査は、富山県南東部に位置する中部山岳国立公園立山観光ルート沿いの5地点:千寿ヶ原(標高 500m)、美女平(標高 980m)、ブナ坂(標高 1,200m)、上ノ小平(標高 1,500m)、および追分(標高 1,900~1,980m)で実施した。

千寿ヶ原は、ミズナラ、サワグルミ、トチノキ、コナラ、イタヤカエデなどを主体とする落葉広葉樹林でおおわれる。ここでの調査は千寿ヶ原の立山カルデラ砂防博物館付近で実施した。

美女平には一帯に樹齢数百年のスギ林が存在する。ここでの調査は美女平の立山ケーブルカーの駅(美女平駅)付近で実施した。

ブナ坂はブナの原生林で部分的にスギ・ミズナラなどが混生する。

上ノ小平はブナ坂と追分の間中間的な要素を持つ地点である。

追分は、冬季には 5m 程度の積雪があるため、無雪期間は 150 日程度と短く、池塘と呼ばれる水たまりが点在し、多くの湿性植物が生育する高層湿原である。ここでの調査は立山有料道路の追分料金所付近で実施した。

これらの地点には、登山ブームの影響もあり、多くの観光客が訪れる

が、立山有料道路の桂台検問所よりも上部にある美女平~追分には、環境保全のため自家用車の乗り入れが禁止されている。

### 2. 調査方法

現地での幼虫採集(採水)は、2010年7月20日、8月16日、および10月6日に、実施した。千寿ヶ原では、地表のビニールシートに溜まった水をスポイトで採取した。美女平では、ブナの木の地上 2m に位置する樹洞に溜まった水をスポイトで採取し、また、林内の地表に置かれたタイヤに溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。ブナ坂では、林内の地表に置かれたタイヤおよび倒木の樹洞に溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。上ノ小平では、地表に置かれたタイヤと道路脇のポールを差し込むための穴に溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。追分では、地表の水溜りと道路脇のポールを差し込むための穴に溜まった水を柄杓とスポイトで採取した。

採取した水は研究室へ持ち帰り、水中から羽化した成虫を同定・計数した。(倫理面への配慮)

本研究は野外の水溜りに生息する蚊幼虫を対象としており、倫理面の問題はない。

## C. 研究結果



7月20日に採取した水からは471個体、8月16日に採取した水からは191個体、そして10月6日に採取した水からは311個体の蚊類が羽化した(表1-3)。これらの蚊類は少なくとも8種に分類された。個体数がもっとも多かったのはヤマトヤブカ *Ochlerotatus japonicus* (439個体)で、キンパラナガハシカ *Tripteroides bambusa* (430個体)がこれに次いだ。本年の調査では、昨年と異なり、ヒトスジシマカは採集されなかった。

ヤマトヤブカはすべての調査地点で採集された。ヤマダシマカ *Ae. flavopictus* は標高1,500m地点以外のすべての調査地点で採集された。クシヒゲカ亜属 *Culex* (*Culiciomyia*)の種(キョウトクシヒゲカ *Culex kyotoensis* とヤマトクシヒゲカ *Cx. sasai* を含む)は標高500m地点以外のすべての調査地点で採集された。一方、ハマダラカ属 *Anopheles* の1種は標高500m地点でのみ、コバヤシヤブカ *Ae. kobayashii* は標高約1,000m地点の樹洞でのみ、トラフカクイカ *Lutzia vorax* は標高1,500m地点のタイヤでのみ採集された。

蚊類が採集された地点のうちもっとも高標高である標高約2,000m地点では、ヤマトヤブカ、ヤマダシマカ、ヤマトクシヒゲカ種群のみが採集された。

標高1,500m地点と標高約2,000m地点にみられた地表の水溜りの多くでは、アメンボ類、ゲンゴロウ類、キクロプス目

ケンミジンコ (*Eucyclops serrulatus* など)などの捕食性水生動物がしばしば観察された。

#### D. 考察

ヒトスジシマカは、2009年の調査では標高1,200m地点で14個体が採集されたが、2010年の調査ではまったく採集されなかった。すなわち、ヒトスジシマカは立山の高標高域に定着しているのではなく、2009年には何らかの理由で一時的に発生していたものと推定される。このことは、何らかの理由で高標高域へヒトスジシマカが運ばれて産卵する可能性があることを示している。この時、ヒトスジシマカ卵が越冬可能な条件がそろっていれば定着する可能性があるものと考えられる。

ヤマダシマカは、1989～1994年の立山観光ルート沿いにおける調査では、分布上限が標高1,200mであった。今回標高約2,000mで本種が1個体採集されており、これは本種の分布新記録となる。しかし、採集個体数が少ないため、本種の分布上限が上昇したのか、あるいは何らかの理由で高標高域へ運ばれたのかを判断することはできない。

キンパラナガハシカは、標高約1,000m～1,500m地点では採集個体数が多かったが、人嗜好性が低いとされており、本種による吸血被害が生じる可能性は低いと考えられる。

ヤマトヤブカはウエストナイルウイルスを媒介可能で、しばしば人を襲うことが知られている。立山の高標高域で晩夏～秋に蚊に襲われる被害が出たとするならば、原因種として本種をまず疑うべきであると考えられた。立山の高標高域では、ポール穴も本種の重要な発生源となっており、駆除を実施する際の対象にすべき水溜りであると考えられた。

## E. 結論

地球温暖化の影響により、ヒトスジシマカなどの感染症媒介蚊の分布が、高標高域へと広がっているという証拠を見出すことはできなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Obara, M., Yamauchi, T., Watanabe, M., Hasegawa, S., Ueda, Y., Matsuno, K., Iwai, M., Horimoto, E., Kurata, T., Takizawa, T., Kariwa, H., Takashima, I. Continuity and change of Japanese encephalitis virus in Toyama prefecture, Japan. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*. in press.

### 2. 学会発表

1) 小原真弓、山内健生、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、滝澤剛則「コガタアカイエカから分離された *Culex flavivirus* の解析及び日本脳炎ウイルスの増殖への干渉」第45回日本脳炎ウイルス生態学研究会、新宿区、2010年5月

2) 小原真弓、山内健生、渡辺護、長谷川澄代、岩井雅恵、堀元栄詞、倉田毅、滝澤剛則「*Culex flavivirus* の解析及び日本脳炎ウイルスの増殖への干渉」第58回日本ウイルス学会、徳島市、2010年11月

## 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

野外調査に協力していただいた富山県衛生研究所の高森亮輔研究員にお礼申し上げます。

表 1. 立山観光ルート沿いにおける 2010 年 7 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類									合計	
	500		980		1200		1500		1900-1980		
	人口容器	樹洞	タイヤ	樹洞	タイヤ	ボール穴	タイヤ	ボール穴	地表の水溜り		
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
トワダオオカ	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
キンバラナガハシカ	0	1	83	2	107	0	—	0	0	193	
ヤマトヤブカ	20	5	28	0	23	74	—	8	111	269	
ヤマダシマカ	0	0	1	6	0	0	—	0	1	8	
コバヤシヤブカ	0	0	0	0	0	0	—	0	0	0	
トラフカクイカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
* <i>Culex (Culicomyia)</i> spp.	0	0	1	0	0	0	—	0	0	1	
合計	20	6	113	8	130	74	—	8	112	471	

\*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む。

表 2. 立山観光ルート沿いにおける 2010 年 8 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類									合計	
	500		980		1200		1500		1900-1980		
	人口容器	樹洞	タイヤ	樹洞	タイヤ	ボール穴	タイヤ	ボール穴	地表の水溜り		
<i>Anopheles</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
トワダオオカ	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
キンバラナガハシカ	0	1	4	0	15	0	0	0	0	20	
ヤマトヤブカ	2	3	49	3	1	37	4	37	0	136	
ブナノキヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ヤマダシマカ	1	0	0	3	6	0	0	0	0	10	
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
コバヤシヤブカ	0	9	0	0	0	0	0	0	0	9	
トラフカクイカ	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	
* <i>Culex (Culicomyia)</i> spp.	0	0	0	0	0	2	2	7	0	11	
合計	3	13	53	6	23	39	10	44	0	191	

\*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む。

表 3. 立山観光ルート沿いにおける 2010 年 10 月の蚊類幼虫採集成績

種名	標高(m)と水溜りの種類									合計	
	500		980		1200		1500		1900-1980		
	人口容器	樹洞	タイヤ	樹洞	タイヤ	ボール穴	タイヤ	ボール穴	地表の水溜り		
<i>Anopheles</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
トワダオオカ	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
キンバラナガハシカ	0	0	34	10	67	0	106	0	0	217	
ヤマトヤブカ	9	0	0	5	15	0	5	0	0	34	
ブナノキヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ヤマダシマカ	0	1	7	22	0	0	0	0	0	30	
ヒトスジシマカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
コバヤシヤブカ	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	
トラフカクイカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
* <i>Culex (Culicomyia)</i> spp.	0	0	0	0	1	0	4	19	0	24	
合計	10	6	41	37	83	0	115	19	0	311	

\*ヤマトクシヒゲカとキョウトクシヒゲカを含む。

「地球温暖化に伴い変化する感染症に対する早期防御法確立に関する研究」  
—フラビウウイルスのウイルス様粒子作製法の改良についての研究—

研究代表者：	倉根 一郎	国立感染症研究所・副所長
研究分担者：	前田 秋彦	京都産業大学・教授
研究協力者：	前田 潤子	北海道大学・研究員
	染谷 梓	京都産業大学・助教
	西野 佳以	京都産業大学・准教授
	村田 英雄	京都産業大学・教授

**研究要旨：**昨年度開発したフラビウウイルスのウイルス様粒子（VLP）中和試験法に使用する VLP 作製の簡易法の開発を試みた。通常の VLP 作製法では、レプリコンを *in vitro* で転写し、これを構造蛋白質発現ベクターと細胞に共発現する 2 つのステップで VLP を得る。しかし、簡易法では予めレプリコン持続複製細胞を樹立し、本細胞に構造蛋白質発現ベクターを導入する 1 つのステップで VLP が得られるため、非常に簡便である。本法によって得られる VLP 量は通常法と同等であり、本法は VLP 作製法として有用であると考えられる。

#### A. 研究目的

わたしたちは本研究課題を通して、ウエストナイルウイルス（WNV）のウイルス様粒子（VLP）を作製し、当該ウイルスの検査や診断法への応用を試みてきた。VLP 作成の従来法では、ウイルスのゲノム RNA より粒子形成に必要な構造蛋白質遺伝子領域を欠損させたレプリコンとウイルスの構造蛋白質発現ベクターを細胞に一過性に共発現させ、2～3 日後に培養上清中に放出される VLP を回収している。しかし本法は手間と時間がかかるため、より簡便な VLP の作製法を樹立することにより VLP を用いる感染診断法の汎用性を向上できるものと考えられる。そこで本研究では、より簡便な VLP 作製方法の確立を目的として、レプリコンを持続的に発現する細胞を樹立し、本細胞にウイルスの構造蛋白質を発現することで VLP を作製することが可能であるかどうか検討した。

#### B. 研究方法

前年度までの研究で開発した赤色蛍光蛋白質（DsRed2）を発現レポーターとして持つウエストナイルウイルス（WNV）レプリコンを、BHK-21 細胞に電気穿孔法により導入

した。DsRed2 発現細胞を限界希釈法によりクローニングを 3 回繰り返し行い、DsRed2 を高発現する RprBHK-2G2 細胞を樹立した。RprBHK-2G2 細胞内でのレプリコンの複製を、DsRed2 遺伝子をプローブとするノーザンブロット法により解析した。また、レプリコン蛋白質の発現をウエスタンブロット解析した。最後に、RprBHK-2G2 細胞に WNV の C と prM 蛋白質発現ベクターを共導入することにより本システムにおける VLP の産生性を検討した。

（倫理面への配慮）

特に考慮の必要はない。

#### C. 研究結果

##### (1) レプリコン持続複製細胞の樹立

$1 \times 10^4$  個の BHK-21 細胞に  $4 \mu\text{g}$  のレプリコンを電気穿孔法により導入した。限界希釈法により 3 回クローニングを繰り返し、1 株の DsRed2 発現する細胞（RprBHK-2G2）を分離した。レプリコン導入後 2 ヶ月以上経過した後、RprBHK-2G2 細胞内で持続的に複製するレプリコンをノーザンブロット解析した（図 1）。さらに、RprBHK-2G2 細胞内で持続的に複製するレプリコンの遺伝子配列を解析したところ、導入したレプリコン