

201028023A

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22年度総括・分担研究報告書

平成23年3月

主任研究者 小林睦生

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

### 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(2010年)

佐藤 卓他・・ 31

#### 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調査(2)

小林睦生他・・ 41

#### 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・・ 47

#### 4. 岩手県, 神奈川県, 長野県, 富山県および大阪府におけるヒトスジシマカ成虫の 飛来消長に関する研究

武藤敦彦他・・ 59

#### 5. 霞ヶ浦周辺の疾病媒介蚊調査

津田良夫他・・ 75

#### 6. 滋賀県琵琶湖湖東地域における疾病媒介蚊の分布調査と生息ポテンシャルマップの 検証にむけて

二瓶直子他・・ 81

#### 7. 宮崎県日南市における疾病媒介蚊調査(予備調査)

津田良夫他・・ 91

#### 8. 釧路湿原における疾病媒介蚊調査

津田良夫他・・ 95

#### 9. 新潟市内の豚舎における媒介蚊の捕集調査

田中 淳他・・ 99

#### 10. トコジラミの殺虫剤感受性と駆除法の検討

渡辺 護他・・ 107

#### 11. 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・・ 117

#### 12. 昭和前期にマラリアが流行した地域における蚊の発生状況調査, 2010年の成績

渡辺 護他・・ 123

#### 13. イノシシに寄生するマダニ類からの日本脳炎ウイルス分離の試み

沢辺京子他・・ 137

14. 野鳥由来蚊媒介性病原体の潜在的な感染経路に関する研究（公園における鳥マラリア媒介蚊の研究結果からの考察）	
津田良夫他	145
15. コガタアカイエカの越冬に関する野外調査（2009 年秋・2010 年春）	
津田良夫他	149
16. 日本産哺乳類・鳥類の外部寄生虫に関する基礎的研究～愛媛県南部における鳥類寄生マダニ類調査～	
山内健生他	157
17. デング 1 型マウスモノクローナル抗体を用いた中和活性及び増強活性の解析	
小西英二	161
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	171
19. 名古屋市内で捕獲した蚊からのチクングニアウイルスはじめフラビウイルス検出の試み	
柴田伸一郎他	179
20. アフリカからのデング輸入症例と分離ウイルス株の性状解析	
倉根一郎他	187
21. クリミア・コンゴ出血熱（CCHF）患者から増幅された 3 分節遺伝子の塩基配列から解析する詳細な分子疫学的研究	
西條政幸	193
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	199

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・昆虫医科学部

研究概要

2005年からインド洋島嶼国、インド、スリランカ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。レユ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、約250人が死亡した。インド洋島嶼国にはネッタイシマカがほとんど分布しておらず、主要な媒介蚊はヒトスジシマカであった。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、1人が死亡した。イタリアでは1990年に初めて確認されたヒトスジシマカが全土に分布域を広げ、発生密度も高いと言われている。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。2006年に、アフリカのウイルス株のE1タンパク質に1個のアミノ酸変異がおこり、その結果ヒトスジシマカ体内での増殖効率が100倍以上高まったことが明らかとなった。2010年には、フランス南部の地中海沿岸でヒトスジシマカによるチクングニア熱とデング熱の国内感染症例(各2症例)が報告された。我が国は都市部の公園や戸建て住宅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、TaqMan ProbeによるリアルタイムRT-PCR法より迅速な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、我が国の輸入症例数が2008、2009年と明らかに増加している。実際、2010年に輸入症例として報告されたデング熱患者は、243名に達し、その2/3以上が6月から10月のヒトスジシマカが活動している時期に帰国し、発症している。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の野鳥における活動および中国(上海)での野犬、野良猫等で抗体検出が報告され、突発的に渡り鳥によって我が国にウイルスが運ばれて来る可能性は否定できず、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、大阪あいりん地区の路上生活者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認められており、全国規模での調査の結果、全て抵抗性を示す沖縄の結果を除くと全国で約5%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、発生消長の基礎的な調査、チクングニア熱、デング熱媒介蚊のトスジシマカの生態、防除法の確立、チクングニア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、地方自治体に媒介蚊調査およびアルボウイルス感染症の診断に関して参加をお願いし、少しずつ成果が得られてきた。日本脳炎の重要な媒介蚊であるコガタアカイエカがどの地域の、どのような環境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節足動物媒介感染症の調査研究が必要と考える。

#### A. 研究目的

チクングニア熱はインド洋島嶼国、インド、東南アジア諸国で大きな流行を起こし、問題となっている。2005～2006年以前は、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、今回のように報告患者数が170万人を越す流行は見られなかった。

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起こり、226番目のアミノ酸がアラニンからバリンへ変異したが、その結果として、今まで媒介能力がネッタシマカより劣ると考えられていた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のレユニオン島など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。昨年に引き続き、北限地域である岩手県での詳細な分布域調査が行われ、昨年、盛岡市内でヒトスジシマカが確認されたポイント周辺150m以内を詳細に調査した。その結果、多数の幼虫発生源でヒトスジシマカ幼虫が確認され、明らかに定着が起こっていることが示された。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、北米、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域が拡大しており、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、年平均気温が 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拡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、古タイヤなどの人工的な水溜まりや樹洞、竹の切り株などに発生する。また、近年の我が国では、下水道が完備され、道路の側溝がコンクリート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の庭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。典型的な待ち伏せ型の蚊である。ヒトスジシマカ成虫の密度評価を 8 分間吸血飛来してきた成虫を捕虫網で採集する方法で調査（8 分間人囿法）し、公園の植生などで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。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蚊帳を使って調査した。チクングニア熱等が我が国に侵入してきた場合、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、数種の成虫防除剤を用いて試験的防除を行った。また、デング熱の流行地で薬剤防除に使用されているピレスロイド系の殺虫剤に対する抵抗性の発達状況の調査も重要で、効果が期待されな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、年によって捕集数が大きくことなるが、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防御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し、媒介蚊のポテンシャルマップを作成した。これらのマップをもとに、2010 年は、実際の捕集結果との関連性を検討する。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、中国（上海）での野犬や野良猫での抗 WNV 抗体の存在は、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、今までに日本脳炎ウイルスをコガタアカイエカから 100 株以上分離し、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を行っており、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年以來1種類のアタマジラミ駆除剤が用いられており、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。そこで、全国規模で抵抗性に関わる遺伝子変異を検出し、沖縄県では100%抵抗性を示すこと、本州では約5%に抵抗性遺伝子が検出されることが明らかとなった。迅速な診断によって、効果のない薬剤の使用を中止させることが可能となり、物理的な駆除法の採用を症例することが可能となる。コロモジラミは塹壕熱の媒介昆虫で、先進国の路上生活者から採取された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、患者の発生数が多かった滋賀県琵琶湖湖東地域と、戦前の患者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、ハマダラカ類の発生状況を調査し、将来のマラリアの流行可能性、環境との関係を考察した。

チクングニヤ熱に関して、種々のPCR法を用いた遺伝子検出法、IgM捕捉ELISA法、50%ブラン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、現在までに19例の輸入症例が確認された。日本にはヒトスジシマカが広く、また、生息密度が高い状態で分布しており、

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急性期患者の迅速な診断は必須である。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。2010年2月に感染症法の改正が行われ、チクングニア熱が4類感染症に指定され、患者が発生した場合の届け出義務が生じた。本研究では、これまでに経験されたチクングニア熱輸入例を解析し我が国におけるチクングニア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) 岩手県内におけるヒトスジシマカの生息状況調査を昨年引き続き行った。生息状況調査は2010年6~10月、岩手県盛岡市、花巻市、遠野市、北上市、奥州市、一関市、大船渡市、釜石市、宮古市、二戸市、岩手町、紫波町、矢巾町、住田町、大槌町、山田町及び一戸町の10市7町の計102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や手水鉢などとした。2009年調査で生息北限地点であった盛岡市仙北町((38° 41' 27" N, 141° 9' 16" E)において、2010年8月に、同地点を中心として半径約150mの範囲95地点を対象とした戸別の生息分布調査を行った。1kmメッシュ気温データ(東北地方1kmメッシュ気温データ表示・検索システム:東北農業研究センター)の1986~2010年の日平均気温値から、年平均気温、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気温10.8℃以上の日数を算出した。また、1986年以降の年平均気温が10.8℃以上の地域の面積を算出した。

2) 公園内の植生にどの程度ヒトスジシマカが潜んでいるか3人が一組になり、兵庫県西宮市内の公園18ヶ所で、総数44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。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) 試験区の設定に関しては、西宮市内にある公共公園11箇所を対象とした。2公園で幼虫対策として主たる発生源である公園内および周辺にある道路雨水枡への薬剤散

布を行った。今回は、幼虫対策と樹木散布を合わせ実行した。9公園は幼虫、成虫対策を講じない無処理区とした。薬剤を処理した2公園では、2週間間隔で市販のIGR系薬剤(スミラブ発泡粒剤、有効成分ピリプロキシフェン0.5%、1g)を、対象公園の中心から150m半径の範囲内にある全ての発生源の雨水枡、側溝などへ、水の有無にかかわらず雨水枡へは1包、側溝へは1mにつき1包投入した。

各試験区での効果の評価は、幼虫および成虫調査を全ての対象公園で実施した。幼虫調査は、1雨水枡あたり柄杓(クラーク社製、容量350ml)で4隅のすくい採りによる幼虫の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、観察した。成虫調査は全ての対象11公園で実施し、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) ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* の発生状況を調査するために、これまでに対象種の生息が認められている下記の①岩手県花巻市愛宕町(地藏寺)②岩手県花巻市材木町(妙円寺)③神奈川県海老名市国分北3-13④神奈川県海老名市国分北3-15⑤神奈川県中郡大磯町大磯⑥長野県上田市常入⑦富山県富山市月岡(月岡段丘南端)⑧富山県富山市呉羽(呉羽山公園)⑨三重県名張市鴻之台⑩大阪府東成区(玉津公園)⑪大阪府中央区(大阪城公園)を調査対象とした。調査方法としては、ヒトが毎回同一の調査場所に立ち、飛来するヒトスジシマカを捕虫網で8分間捕集し、その捕集数(捕集数は以下「飛来数」とする場合がある)をカウントする8分間人囮法で実施した。捕集虫は原則として雌



雄別にカウントしたが、結果は合計数で示した。調査は基本的に晴天または曇天、また、風が弱い日を選んで実施し、調査時には天候や風の状態、気温などを記録した。また、①～⑥の地点またはその近くには、温湿度データロガー（㈱ティアンドデイ製「おんどとり TR-72Ui」）を設置し、調査期間中（一部の地点では途中から）の温湿度データを記録した。

調査（捕集）時間は各地点で異なるが、原則として、飛来数が多い朝または夕方、またはその両者の時間帯に実施することとした（詳細は報告書参照）。

5) 霞ヶ浦の媒介蚊調査に関して、霞ヶ浦自体は汽水湖であり、湖岸もよく整備されているため媒介蚊の発生源としてはよい条件とは思われない。そこで周辺地域の中から比較的広い水田地帯がある稲敷郡河内町ならびに、発生源としてよい条件を備えていると思われる牛久沼、涸沼、大貫沼、玉造町の丘陵地にある溜池周辺を選んだ。稲敷郡河内町の水田地帯には、周辺環境の異なる3つの採集場所（利根川河川敷、水田地帯の孤立した神社、集落に隣接した神社）をそれぞれ3か所ずつ合計9ヶ所選んで、6月から8月まで毎月1回（2または3日間）採集を行った。牛久沼は6月（5か所）、玉造町の溜池（2か所）は6、7月、涸沼（4か所）は7月、大貫沼は7月（7か所）、8月（11か所）に調査を実施した。採集は1kgのドライアイス誘引源とするCDC型トラップによって行った。採集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。

6) 琵琶湖湖東平野のうち2009年調査した彦根市周辺（彦根地域）では、犬上川流域の上流から下流にかけての、地形面としては扇状地の扇頂から扇央・扇端、三角州、砂

州など標高差のある各種条件の異なる12地点を調査地域とした。土地利用はいずれも水田を主とする地域である。近江八幡市周辺および西の湖等内水面地域周辺（近江八幡地域）では、ハマダラカの捕集数の多かった蛇砂川流域を主とする10地点を選んだ。その地形面は三角州や内水面湿地など低平で、葭原などの原風景である低湿地が保存・維持されていて、調査地域内では標高差も小さい。調査時期については、本年は地域差を目的としたため、2009年捕集数の少なかった時期を除き、6月18日に開始し10月2日に終了した。その間3週ごとに調査し、計6回調査した。

成虫の捕集方法は、昨年と同様、ドライアイス一日あたり1kgを誘引源としたCDCトラップを二日連続設置して捕集した。検体はドライアイスで保存し形態的に分類し、ハマダラカに関してはオオツルハマダラカと推定された場合は遺伝子解析で同定した。

景観断面図作成にあたっては、国土地理院発行1:25,000地形図で、河川縦断面に沿って上流から下流までの距離と標高を判読し、土地利用は同地図と現地調査で決定した。地形分類は主として同地図の等高線配置、空中写真・ALOS画像判読、現地調査、および既往資料を参考にして決定した。

7) 宮崎市の水田地帯を対象として、ドライアイストラップを用いた成虫調査を5月から9月まで月1回行う予定を立てていた。しかしながら、家畜の口蹄疫の感染が起り、予定していた調査地域で定期的に調査を行うことが難しくなった。そのため、今回は予備調査として、5月末に口蹄疫の被害が報告されていない日南市を調査地域に選んで、成虫調査を実施した。

1kgのドライアイス誘引源とするトラップを10ヶ所に設置して、24時間連続採集を3日間継続して行った。捕獲された成

虫は種類を同定した後、冷凍サンプルとして持ち帰った。

8) 2010年7月6~9日に釧路湿原で、疾病媒介蚊の成虫調査と幼虫調査を実施した。成虫調査は野生生物保護センターの構内に10台のドライアイストラップを設置して行った。トラップには1kgのドライアイス誘引源を用いた。24時間連続採集を3日間継続して行い、毎日捕獲された成虫を回収して種類同定を行った。これらのサンプルは冷凍サンプルとして持ち帰った。

幼虫調査は湿原と周辺部の水域を柄杓法によって調べた。ハマダラカ幼虫が生息している水域から、できるだけ多数の個体を生かして持ち帰った。これらの幼虫は発生水域ごとに個別飼育を行い、同一個体の4令および蛹の脱皮殻と共に成虫サンプルを得た。これらのサンプルの形態学的特徴を調べた。

9) 新潟市において、日本脳炎ウイルスが分離された佐潟から直線距離にして約8キロメートル離れた豚舎1箇所を捕獲場所と選定した。平成22年6月17日から9月17日まで計14回、毎週1回概ね水曜日に設置し、木曜日にトラップを回収した。設置は24時間とした。

使用したトラップはCDC型ライトトラップで、誘引源として約1kgのドライアイスを用いた。また、設置した位置は地上約2mに統一した。トラップを設置した日の気象データを新潟地方気象台より収集した。

10) 供試トコジラミの由来は日環セ系：1972年頃から(財)日本環境衛生センターで飼育維持されてきた個体群。富山01系：2001年10月に富山県黒部市のリゾートホテルで採集した。これらの個体群は温度23±2℃、照明約200ルクスの15明9暗の

飼育室で、小型水槽に潜み場所になる濾紙を折った紙辺や木片を入れ、毎週もしくは隔週に金網固定のマウスを与えて増殖維持された。試験には2週間マウスを与えていない雌雄成虫を用いた。

供試殺虫剤(全て市販製剤)は、ピレスロイドはペルメトリン5%水性乳剤とフェントリン10%水性乳剤、有機リン剤はディクロロボス5%乳剤とフェントロチオン10%乳剤、カーバメイト剤はプロポクスル1%油剤を試験に応じ、蒸留水もしくはアセトンで希釈して用いた。

試験方法としては、濾紙継続接触法、腹面微量滴下法、DDVP樹脂蒸散剤効果試験法の3種類で行った。熱殺法は、直接曝露法、間接曝露法で行った。

11) 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により行った。おもに、医療機関、次いでアタマジラミ症幼・小児の保護者より試料が提供された。2009年以降、沖縄県下の医療機関と幼児施設に向けた試料収集依頼に際し、それぞれ、琉球大学医学部皮膚科学教室と沖縄県衛生環境研究所の協力を得た。また、2010年2月には、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た。

分子ジェノタイプング：シラミのゲノムDNAを抽出し、ナトリウムチャンネル遺伝子の部分配列をPCR増幅し、QProbe法に基づく融解曲線解析を行い、隣接したT952とL955座位に生じたアミノ酸置換突然変異をジェノタイプングした。これら2座位に変異が認められた個体に関しては、さらにD11とM850の2座位を加えた4座位を対象としたSNaPshot法(一塩基伸長法に基づくミニシーケンシング法)により、四重突然変異の解析を行った。QProbe法と

SNaPshot 法の詳細は、それぞれ、昨年度の研究分担報告書と Kasai et al. (2009) の方法に従った。

1 2) 昭和前期 (1926~1946 年) にマラリア患者の発生が顕著であった彦根市郊外地域の牛舎と、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 軒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。ドライアイス 1kg を誘引源にして毎回ほぼ 10 時頃に設置、翌朝 9 時ごろに捕集蚊を回収した。調査期間は 6 月 18 日から 10 月 2 日まで、3 週間毎に 6 回 2 日間連続の捕集を行った。

福井県鯖江地域 (武生盆地) 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。盆地の南端にあたる旧武生市岩内町の牛舎にライトトラップを設置し、CDC トラップは前述の山田、木水の調査点と重なる様に、盆地の北端の福井市末広町から南下する様に鯖江市内に 12 台、越前市 (旧武生市) に 8 台、合計 22 台設置した。期間は 6 月 4 日から 10 月 29 日までの 8 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 7 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 5 月 11 日から 10 月 27 日までに、隔週に 1 日、15 時に設置、翌朝 9 時に回収した。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、丘陵部の溜池堤防などに 6 台設置した。調査期間は河北潟干拓地域と同日で、トラップの設置は 13 時、回収は翌日 12 時である。

1 3) 2008 年 10 月~2010 年 9 月の 2 年間に合計 29 地点から、兵庫県猟友会西宮支部の協力を得て、合計 157 頭のイノシシを罠および猟銃を用いて捕獲した。捕獲され

たイノシシは、性別・推定年齢・体重等を記録し、血液および皮毛を採取した。血液は血清分離後、IgM・IgG 抗体価の測定、ならびにウイルス分離と検出を行った。

捕獲されたイノシシの皮毛からマダニ類を採取し、イノシシの個体毎・ダニの種類・雌雄・発育ステージ別にマイクロチューブあるいはシャーレに移し、ウイルス分離に用いるまで -80℃ 冷凍庫に保管した。さらに、イノシシが頻繁に出没する 3 地点 (塩瀬町名塩蛇目、甲陽園目神山町、甲陽園東山町) においては、旗ずり法によりマダニ類の捕集調査を行った。JEV1 型株が血清から分離されたイノシシに寄生していたキチマダニ 11 頭 (雌 8 頭、雄 3 頭) の唾液腺および消化管を摘出し、一对の唾液腺の片方と消化管を個別に間接蛍光抗体法により免疫染色し、共焦点顕微鏡および蛍光顕微鏡下で JEV の局在を免疫組織学的に観察した。キチマダニ 11 頭から摘出した唾液腺の片方を個別に磨砕し、その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た。JaNB037 株が分離された no. 37 イノシシの捕獲地周辺の六甲山南側 7 地点から得られた合計 206 頭のキチマダニ (雌 184 頭・雄 22 頭) に関しても同様にウイルスの検出を試みた。

1 4) 東京都品川区の林試の森において、2009 年 9 月~12 月まで、直径 36cm の捕虫網を用いて日の出直後に約 1 時間の sweeping 採集を週あたり 2~3 回行った。採集場所は 2007、2008 年と同じ都立林試の森公園の南部に位置する約 600m<sup>2</sup> の林床部で、上部を樹冠で覆われ、シヤガ、ヤブラン、キチジョウソウが茂っている区画である。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。これらのサンプルは解剖して卵巣を取り出

し、1対の卵巣の片方を用いて形態観察から経産/未経産を判定した。残った片方の卵巣は、その個体が繁殖休眠にあるかどうかを判定するために、卵巣のもっとも大きい基部の卵母細胞5つを選びその大きさを測定した。卵母細胞が大きく発育段階が進んでいるものは、2番目の卵母細胞の大きさを測定し、1番目と2番目の卵母細胞の大きさの比を求めた。1番目の卵母細胞の発育段階がNあるいはI、または1番目と2番目の卵母細胞の大きさの比が1.5以下の個体は繁殖休眠であると判定した。同一個体を用いて産卵経験の有無と卵巣の発育状態を調べることによって、産卵経験と繁殖休眠の関係を分析した。

15) 都立林試の森公園において、2007年から2008年に捕虫網で採集されたアカイエカの成虫サンプルを吸血源動物、鳥マラリアに関して分析した。成虫採集は、林試の森公園の南に位置する採集場所で日出から約1時間、ジャガやヤブランなどの林床植物上で休息している蚊を捕獲した。捕獲された成虫には、吸血して未消化の動物血液を保持している個体(吸血蚊)と保持していない個体(未吸血蚊)が含まれていた。吸血蚊は1個体ごとに、吸血源動物の同定と鳥マラリア原虫の有無をPCR法によって調べた。吸血蚊からの鳥マラリア原虫の検出は、1個体を胸部と腹部の2つに分けて行い、未吸血蚊の場合は1~10個体をプールして行った。今回の分析結果と過去に分析したヒトスジシマカとヤマトクシヒゲカの結果を総合して、野鳥由来蚊媒介性病原体の潜在的な感染ルートについて考察した。

16) マダニの調査は、愛媛県久万高原町二名由良野の森(緯度33°38'、経度135°53')で実施した。秋季には夏鳥が南方へ渡るため、2008-2010年の秋季、毎年

約40日間かすみ網を調査地に設置し、鳥類を捕獲した。具体的な調査期間は以下の通りであった:2008年10月12日~12月4日、2009年10月14日~11月30日、2010年10月15日~11月29日。

生きた鳥類の体全体を調査することは困難であり、またマダニ類は主として鳥類の頭部に寄生するため、捕獲した鳥類の頭部を目視で注意深く調査し、マダニ類が寄生していた場合はピンセットを用いて採集した。採集したマダニ類は75-80%エタノール中に保存した後、分類同定した。

17) 用いられた細胞は、K562、U937、HL60細胞で、10%ウシ胎児血清(FBS)及び1%ペニシリン・ストレプトマイシン添加RPMI-1640で、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で培養した。ウイルスはDENV1(望月株)、DENV2(ニューギニアC株)、DENV3(H87株)及びDENV4(H241株)を用いた。モノクローナル抗体は、DENV1を免疫原として作製した8種類のマウスモノクローナル抗体(D1-IV-7F4、D1-IV-3B8、D1-I-11G12、D1-V-3H12、D1-III-9B1、D1-IV-1C8、D1-III-5B10、D1-III-9B6)を用いた。感染増強試験は、感染細胞率、ウイルス産生量及び感染中心数に基づく方法を用いた。ウイルス産生量に基づく方法では、この細胞をさらに24時間培養し、その培養液を回収してウイルス力価を測定した。中和・増強活性の測定は、ポリ-L-リジンでコーティングした96穴マイクロプレートを使用し、モノクローナル抗体とデングウイルスを混合した。陰性対照として、抗体を加えていない8ウェルを設けた。固定後、免疫染色により感染細胞数を求めた。用いたウイルスの力価(100 FFU)はK562細胞において得られた値である。中和活性と感染増強活性は補体レベルに依存するため、補体を含む系と含まない系で行った。U937 また HL60

細胞を用いた実験も同様に行った。

18) チクングニアウイルス S27 株, BaH306 株, SL10571 株, SL11131 株, MAL09 株, RI09 株より 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同様にウイルス RNA を抽出し供試した。さらにチクングニア熱患者血清よりウイルス RNA を抽出し用いた。チクングニアウイルスの 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 を合成した。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。チクングニア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 法のために開発されたサーマルサイクラーである Hyper PCR UR MK-IV を用いた。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] で 45 サイクル反応した。

19) 名古屋市内の公園延 34 地点で 7 月 15 日から 11 月 4 日まで名古屋市生活衛生センター職員が, 8 分間人囿法により蚊を捕集した。捕集した蚊はドライアイスで処理し雌のヒトスジシマカを選別し, 採取地点毎に最大 50 頭を 1 プールとして 2.0ml スクリューキャップチューブに詰め冷凍したまま当所へと搬入した。捕集された雌ヒトスジシマカは 1784 頭, 103 プールとなった。2.0ml チューブにプールされた雌のヒ

トスジシマカには, 冷凍したメタルコーンと 1ml の MEM を加え, マルチビーズショッカー (安井機器) により破碎し乳剤化した。このチューブを冷却遠心機で 4°C, 13,000 回転, 10 分間遠心し, 上清を 0.22  $\mu$  ポアフィルターで濾過をし, その濾液は, 24 ウェルマルチプレートに単層培養した C6/36 細胞を PBS で洗浄後, 100  $\mu$  l/ウェルの割合で 2 ウェル接種し, 28°C CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 時間吸着後, 接種液を PBS で 1 回, 2 倍量の非必須アミノ酸を添加した MEM (2xNEAA MEM) で 1 回洗浄後, 1% ウシ胎児血清加 MEM (1% FBS MEM) で培養した。C6/36 細胞によるウイルス分離は, 2 代継代して, CPE を観察した。CPE が認められない検体については, QIAamp Viral RNA Mini Kit を用い細胞培養上清より RNA 抽出を行い, ウイルス遺伝子検出を実施し確認した。

20) デングウイルス NS1 抗原検出キットの評価

ウイルス遺伝子の検出: 陽性コントロールはデングウイルス 1, 2, 3, 4 型 (感染研標準株) を蚊由来細胞 C6/36 株で増殖させた培養上清を用いた。デングウイルス型別リアルタイム RT-PCR (TaqMan 法) は Ito ら (J. Clin. Microbiol 142(12):5935-5937, 2004) の方法により実施した。

抗デングウイルス IgM 抗体検査: ① IgM 捕捉 ELISA 法 (Focus 社キット) によった。検査はキットのプロトコールに従い実施した。また, IgG ELISA 法 (panbio 社キット) もプロトコールに従い実施した。

ウイルス遺伝子解析および系統樹解析: 分離されたデングウイルスは, デングウイルス 3 型用遺伝子配列用プライマーを用いて RT-PCR 法によりウイルス遺伝子を増幅し, ダイレクトシーケンシングにより, ABI prism Avant 7100 (ABI 社) によりプロトコールに従い塩基配列を決定し, ホモロジ

一・系統樹解析した。

2 1) 中国新疆ウイグル自治区の CCHF 患者血清。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 CCHF 患者(疑い患者を含む)から診断目的に血液の提供を受けた。中国新疆ウイグル自治区の CCHF 患者血清からの CCHF ウイルス 3 分節遺伝子増幅。患者血清から 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: 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、High Fidelity PCR (Roche Diagnostics 社) を用いた nested PCR 法で各 3 分節の部分遺伝子を増幅した。新疆ウイグル自治区で分離されたウイルス: 1966 年から同地区の CCHF 患者やほ乳動物、ダニから分離されたウイルスの 3 分節遺伝子の塩基配列を用いた。系統樹解析: 得られた遺伝子塩基配列を用いて、Neighbor-joining 法により解析した。

### C. 研究結果

#### 1) 蚊類の生息状況

(i) 成虫の羽化が確認された 102 地点 310 コロニーについて、計 1,446 頭を同定した。同一地点で 2 種類以上の蚊の生息が確認された地点は 36 地点であった。今回の調査でヒトスジシマカの生息が確認された地点は、盛岡市、花巻市、北上市、大船渡市及び大槌町の 4 市 1 町の計 13 地点であった。ヒトスジシマカの生息北限は盛岡市玉山区 (38° 51' 28" N, 141° 10' 33" E) であり、2009 年に比べて更に約 20km 北上した。ほかに、2009 年の北限地点より北に位置する 1 地点 (盛岡市名須川町) においても同蚊の生息が確認された。

(ii) 調査した 95 地点のうち 38 地点 59 コロニーから蚊の幼虫等を採取し、羽化した成虫 375 頭を同定した。本調査で生息が確認された蚊は、ヒトスジシマカ、ヤマトヤブカ及びイエカ類であった。

同蚊の生息が確認された地点 (2009 年の北限地点より北に位置する 2 地点を除く) 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 1450°C 日以上、日平均気温が 10.8°C 以上の日数は年間 185 日以上であり、有効積算温度以外の生息条件は 2009 年の調査結果との差はほとんど認められなかったが、有効積算温度は 150°C 日高い値であった。

2) 平成 21 年 7 月 16 日に行った調査では、3 公園で 8 ケ所の灌木の調査を行った。蚊が捕集された灌木は 6 ケ所 (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 ケ所の植生調査で 6 ケ所 (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。

平成 22 年 6 月 ~ 10 月に 10 ケ所の公園で 20 ケ所の灌木、3 ケ所の雑草を調査対象とした。総数として灌木 39 ケ所の平均 0.95 頭 (0 ~ 6 頭) のヒトスジシマカが捕集された。最も捕集数の多い植生はユキヤナギとアヤマメからの 6 頭であった。また、地上からの高さが 50cm 以下の植物であるクロガネモチ、ヒベリカム、クローバー、その他の雑草では全く捕集されなかった。

3) 薬剤無散布区の 9 公園内でおよび薬剤

処理区の2公園の雨水枡において、薬剤無散布区の平均有水率は27%に対して薬剤処理区のそれは17.9%であった。灌木への薬剤散布薬量の設定は室内予備試験を行った。使用薬剤(エトフェン<sup>®</sup> ロックス20%と、ポリキセチレン/ニルフェルエーテル15%混合乳液)の25ml/m<sup>2</sup>散布効果は、19時間後の死亡率は希釈倍数500倍で100%、1000倍で96%であり、2000倍で90%であった。無処理区(薬剤処理と同量の)の水道水散布でのその死亡率は4%であった。上記の室内試験より実際の野外では降雨、風などの影響を受ける事を想定し、薬剤散布濃度を500倍希釈したものを1m<sup>2</sup>当たり25mlに設定して実施した。試験は2回繰り返した。放逐後30分、1時間および2時間後の人囀法による捕獲数は2回の試験合計で6個体に留まり、72時間後の生存率は1.5%で非常に高い死亡率が得られた。これらの室内試験および実地試験の結果より薬剤散布希釈倍数を500倍、散布量は灌木群5面の表面積の合計値1m<sup>2</sup>あたり25mlに設定した。

蚊幼虫数ならびに蛹の羽化率調査結果は、薬剤処理区ならびに無処理区ともにイエカ類の季節消長は類似しており、1有水枡あたりの幼虫数は処理区で幾分低い傾向を示した。採集したアカイエカ群およびヒトスジシマカの採集蛹の羽化率は処理区では薬剤投入後は顕著に抑制されていた。

8分間人囀法による成虫調査の結果、幼虫対策および灌木への成虫対策としての薬剤散布区(2公園内)では薬剤散布前までは無散布区および他の区よりも多い傾向を示したが、散布後は全期間低い個体数を観察した。

4) 飛来期間は地点により様々であったが、①の花巻市を除いた地点では、概ね5月下旬から6月上旬に飛来が始まり、最終飛来日が確認されている③、④の海

老名市、⑤の大磯町では11月中・下旬に終息した。①の花巻市および⑥の上田市の最終飛来日は10月中旬であった。なお、幼虫の発生状況は地点①と⑤で目視により調査したが、①では調査地点を変更した8月18日~9月17日まで、⑤では6月20日~10月10日まで確認された。

飛来数(捕集数)は6月中旬以降、とくに7月以降に急激に増加する地点が多く、9月中旬ごろまで多い傾向がみられた。その後徐々に飛来数は減少するが、地点③、④の海老名市や⑤の大磯町のように入ってもかなりの数が捕集される地点もあった。最多捕集数は地点⑤の79匹(8月14日)であったが、地点①の最多捕集数は5匹と少数であった。なお、雌雄の割合は地点や調査時期などにより様々であり、雄の飛来数のほうが多い場合もあったが、全般的に雌の飛来数のほうが多く、地点⑤の結果でみると、全飛来(捕集)数に占める雄の割合は、0~80%で、10~20%台であることが多かった。ヒトスジシマカが飛来した(捕集された)最低気温は、今回の調査では14℃(地点③)、次いで14.5℃(地点⑥)であった。また、他地点でも15℃前後で飛来が認められているが、14℃未満の気温で飛来が認められた地点はなかった。また、捕集時間帯別の評価が可能な地点③、④、⑤についてみると、発生初期や終期の低温期には、より温度が高い日中の時間帯の飛来が増加する傾向がみられた。一方、平均最低気温が20℃以上の条件下で飛来数が増加する傾向がみられた。

5) 霞ヶ浦の調査地ごとに採集された種類と捕獲総数をまとめたところ、8属14種、12,964個体が採集された。コガタアカイエカとアカイエカ群が全体の約93%を占め、ついでカラツイエカ、ヒトスジシマ

カの順で、これら4種で全体の98.8%に達した。この地域に特徴的な種類としては、湖沼を発生源とするアシマダラヌマカとキンイロヌマカを挙げることができる。特にキンイロヌマカは大貫沼で比較的多く採集された。調査回数が多く、多数の成虫が捕獲された稲敷郡河内町と大貫沼の7、8月の調査結果に基づいて採集場所と蚊相の関係を分析した。コガタアカイエカは河川敷でもっとも多く捕獲され、ついで孤立した神社、集落に隣接した神社の捕獲個体数はもっとも少なく、河川敷の約1/30にすぎなかった。これとは逆にアカイエカ群は、孤立した神社、集落に隣接した神社でもっとも多く、河川敷での捕獲個体数は神社での捕獲数の約1/7であった。カラツイエカはコガタアカイエカと、またヒトスジシマカはアカイエカ群と同じような傾向を示した。河川敷ではコガタアカイエカとカラツイエカが優占種であり、集落に隣接した神社ではアカイエカ群とヒトスジシマカが優占種であった。孤立した神社と大貫沼は中間の種類構成であった。

6) 彦根地域では全期間で21,236頭、各期一日当たり総数では10,618頭捕集されたことになる。総数の季節変化を見ると、6月に282頭、7月上旬に764頭、7月下旬に2,363頭、8月に6,045.5頭、9月に1,042頭、10月に121.5頭採集され、8月にピークがあり、次いで7月下旬に多かった。蚊の種類は全期を通じて一日あたり捕集コガタアカイエカが9,793頭で92.2%を占め、次いでアカイエカ群728.5頭(6.9%)、シナハマダラカ28.5頭(0.3%)で、この3種で99.4%を占めた。コガタアカイエカのピークは8月で、次いで7月下旬、9月にも採集されている。シナハマダラカは少ないながら全期間で捕集され、ピークは8月であった。ハマダラカ群は形態的にはオオツル

ハマダラカと同定される個体も含まれる。しかし遺伝子解析の結果すべてシナハマダラカで、オオツルハマダラカは確認されていない。

近江八幡地域では全数で40,347頭捕集され、各期一日当たり総捕集数は20,173.5頭で、彦根地域に比べ捕集数ははるかに多かった。優先種はコガタアカイエカで96.7%を占め、次いでアカイエカ群1.5%、シナハマダラカ1.1%で、3種の合計で99.1%であった。その他カラツイエカ、ヒトスジシマカ、オオクロヤブカ、ハマダライエカ、ヤマトヤブカが捕集された。季節消長を見ると6月317.5頭、7月上旬678頭、同下旬4,906頭、8月10,756頭、9月3,294頭、10月222頭で、8月がピークで7月下旬、9月がそれに次ぐ。この季節消長は彦根地域と同じ傾向である。シナハマダラカは7月下旬から捕集され、8月および9月に多く、特にピークが9月にあること、10月にも捕集されることが特徴的である。

7) 日南市には広い水田地帯はなく、丘陵地にある小さな沢に沿って水田が作られ、その沢の上流部に溜池が作られているという景色が今回調査した地域の典型的な農村の景観であった。そこでこのような水田とそれに隣接する溜池を景観のユニットと考え、これを単位としてトラップ設置場所を選んだ。水田と隣接する溜池5つを選びその脇に合計7台、これらとは景観が異なる場所として比較的大きな2つの河川(広渡川と酒谷川)に挟まれた中洲の先端部分に合計3台のトラップを設置した。トラップの設置場所の緯度経度を表1に示した。

すでに稲作が始まっており、ほとんどの水田に水が入っていた。数ヶ所で幼虫を採集したが、イエカの幼虫だけでハマダラカ幼虫は採集されなかった。採集した蛹から



はカラツイエカ、ミナミハマダライエカが羽化した。トラップ採集の結果を、徳島県那賀川の調査結果（2009年5月）と島根県出雲の調査結果（2008年5月）と比較したが、今回の日南市の調査では3属8種類、198個体が採集された。最も捕獲個体数が多かったのはシロハシイエカで全体の約59%を占めていた。この結果は他の地域と著しく異なっており興味深い。コガタアカイエカ、アカイエカ群、カラツイエカは徳島や出雲の調査結果と共通しており、これらが広範囲に分布する普通種であることを示している。リバースシマカとミナミハマダライエカは南方系の種類であり、徳島と出雲では採集されていない。

8) 3日間のトラップ採集によって4属9種類、139個体が捕獲された。チシマヤブカとキタヤブカは成虫の形態では分類できないので、チシマヤブカ/キタヤブカとしてまとめた。総捕獲個体数は、チシマヤブカ/キタヤブカ、ヤマトハボシカ、エゾヤブカ、アカイエカ群が10個体以上で、残りの5種類は1個体のみであった。

幼虫調査は野生生物保護センターに隣接した池に加えて、5ヶ所で実施した。どの採集場所も河川の脇にできた池や川をせき止めてつくられた池で、岸边には植物が繁茂し、水草や藻類も多く、この地域の湿原の自然環境に近いように思われた。5ヶ所でハマダラカ幼虫が採集された。

個体飼育によって羽化した成虫は、形態的特徴によって、シナハマダラカあるいはオオツルハマダラカのいずれかに分類された。シナハマダラカの特徴を有する種類は合計125個体で、オオツルハマダラカの約7倍であった。両種とも5か所の水域すべてから得られた。

9) トラップで採集された蚊の種類は7種

類で、捕集数の多い順から、コガタアカイエカ、アカイエカ、シナハマダラカ、ヒトスジシマカ、ハマダライエカ、オオクロヤブカ、カラツイエカであった。アカイエカは6月16日の第1回から採集されており、7月21日と8月19日に捕集数のピークが認められた。一方、コガタアカイエカは6月16日から7月15日まではトラップ当たり平均捕集数が1以下であったが、その後7月21日から捕集数が増加し、8月19日には平均捕集数が269頭に達した。また、コガタアカイエカのトラップ当たりの平均捕集数は9月16日の最終の採集日まで74～132頭と中程度の捕集数が維持された。ヒトスジシマカは、豚舎周辺に発生源が存在した可能性は否定できないが、予想外に捕集数が少なかった。採集されたハマダラカ類は、一部形態的にオオツルハマダラカに分類された個体が存在していたが、分子分類を行った結果、全てシナハマダラカであった（沢辺 未発表）。

10) 各地で採集したトコジラミの殺虫剤感受性に関して、試験した5薬剤ではプロポクスルで最も感受性が高く、次いでディクロルボス、フェニトロチオン、ペルメトリン、フェノトリンの順に感受性が高かった。「日環セ系」に対して、「富山01系」ではペルメトリンで4.9倍、フェノトリンで4.3倍の時間を要したが、プロポクスルでは2.6倍、フェニトロチオンで2.2倍、ディクロルボスで1.5倍の時間を要するに留まった。

DDVP蒸散剤の殺虫効果に関して、基本量(11.5g/m<sup>3</sup>)では24時間後には「千葉」系も100%の死亡が確認された。さらに、蒸散剤を2倍量にすると「日環セ」、「富山01」系は4時間後に100%死亡したが、「千葉」系は97.5%の死亡率であった。

熱殺法に関しては乾燥熱風を15秒曝露し

た成績では、30℃では死亡率が0%であったのが、50℃で100%になった。蒸気熱では同様に30℃では0%であったのが、45℃で100%になった。さらに、曝露時間を30秒に延長すると、40℃の乾燥熱風で90%、45℃で100%の死亡率を得た。蒸気熱では35℃で75%に達し、40℃では100%になり、蒸気の方が乾燥熱風に比べ速く死亡する傾向が見られた。ただ、卵に対しては十分な卵数が入手出来なかったため、確実な成績が得られなかった。

1 1) 2010年には、22都道府県(京都府を除く)を含む172コロニー分の試料を収集した。この中には、保護者より直接提供されたコロニーが22(いずれも沖縄県外)、沖縄県より収集した44のコロニーを含む。当年の抵抗性遺伝子を保有するコロニーの割合は31.4%であった。抵抗性遺伝子はすべて四重突然変異(E11, I850, I925, F955)を有するものであり、那覇市の1つのコロニーで抵抗性遺伝子のヘテロ接合体しか検出されなかった例を除き、すべてホモ接合体として検出された。沖縄県に関する2010年収集試料における抵抗性コロニー率は、沖縄本島では100%(N=41)であり、宮古島市では半数(N=2)、石垣市では収集できた1つが抵抗性コロニーであった。

34都道府県(京都府を除く)に及ぶ2006年より2010年までの5年間の調査結果を総計すると、全国の抵抗性コロニー率は14.0%であった。保護者直接提供試料に関しては、良好な駆除成果が得られないことに困窮しているコメントが寄せられていたが、この分類群に限定した抵抗性コロニー率を求めると25.0%となった(N=88)。保護者直接提供を除く試料の大部分は医療機関を通じて入手したもので、この試料における抵抗性コロニー率は12.5%であって、

保護者直接提供試料に比べて半減した。沖縄本島からは2008年より2010年までの間に8市1町3村の医療機関等(N=48)または保護者(N=5)から試料の提供を受け、総計53のコロニーが解析されているが、そのすべてが抵抗性コロニーであったことになる。

保護者直接提供と沖縄県分を除く日本本土の医療機関等からの試料に基づく5年間通算の抵抗性コロニー率は5.2%であり、総試験数や単に保護者直接提供を除く分類群におけるものより大幅に減じていた。また、抵抗性コロニー率には年次増加傾向は認められなかった。この結果は、本土における大多数のコロニーに対するピレスロイド系駆除剤の有効性を示唆する。

1 2) 彦根市郊外水田地帯の牛舎では調査1日当たり6,358.6個体の蚊が捕集され、その90.9%がコガタアカイエカであったが、シナハマダラカも9.0%捕集された。近江八幡市郊外の山際の牛舎においては1,078.0個体の捕集数の内、88.4%がコガタアカイエカ、18.9%がシナハマダラカであった。近江八幡市の市街地の牛舎では、4,000.8個体の捕集数の内92.4%がコガタアカイエカ、6.2%がシナハマダラカであった。福井県鯖江地域(武生盆地)における蚊の捕集成績では、捕集総数は43,603個体で、その内訳はコガタアカイエカが98.2%、シナハマダラカ1.3%、アカイエカ0.5%であった。2009年に比べコガタアカイエカは67%に、シナハマダラカは33%に減少した。

石川県河北潟干拓地における蚊の捕集成績に関しては、シナハマダラカは干拓地内とその周辺からは全く捕集されなかった。干拓地内とその周辺に設置した12台のCDCトラップで捕集された39,385個体の内、49.3%がアカイエカ、49.2%がコガタアカイエカ、ヒトスジシマカが1.3%であった。

1 3) イノシシの捕獲：2008年10月～2010年9月の2年間に、29地点で合計157頭のイノシシが捕獲された。マダニ類の捕集：捕獲された157頭のイノシシ皮毛から合計3属7種3,442頭が採取され、旗ずり法によって4属11種1,573種のマダニ類が捕集された。イノシシ皮毛からはキチマダニ（54%）が最も多く、次いでタカサゴチマダニ（16%）、タカサゴキララマダニ（13%）の順に多く採取された。上述したキチマダニ、タカサゴチマダニにヤマアラシチマダニを加えた3種*Haemophysalis*（チマダニ）属マダニの合計数は全体の約80%を占めていた。一方、旗ずり法によって捕集されたマダニ類においても同様に、キチマダニ（48%）、タカサゴチマダニ（18%）の順に多く捕集され、チマダニ属マダニの比率は約80%であった。しかし、旗ずり法においては、タイワンカクマダニ（1%）およびヤマアラシチマダニ（2%）の捕集数は非常に少なく、むしろアカコッコマダニ（16%）が多く捕集され、両採集方法で得られるマダニ類の種構成には有意に差があることが示唆された。ウイルス粒子の免疫組織化学的観察：JaNB037株が血清から分離されたno. 37イノシシに寄生していたキチマダニ11頭から摘出された唾液腺の片方、および消化管を個別に間接蛍光抗体法により染色を施した。共焦点顕微鏡および蛍光顕微鏡下でJEVの局在を免疫組織学的に観察したが、いずれにおいてもJEVの存在は確認されなかった。ウイルス分離：先に摘出した唾液腺の片方を個別に磨砕後、C6/36細胞接種系によるウイルス分離に供したが、JEVは分離されなかった。次いで、no. 37イノシシの捕獲地（地点10）を含む六甲山の南側7地点で捕獲されたイノシシから得られたキチマダニ206頭（雌184頭、雄22頭）をC6/36細胞接種系を用いてウイルス分離を試みた。しかし、これまでのところ、いず

れのプールからもJEVは検出されていない。

1 4) 過去2年の調査結果と同様に、2009年も9月中旬から12月までコガタアカイエカの飛来が確認された。飛来時期と捕獲個体数の時間的推移はこれまでと同様であったが、飛来個体数は非常に少なかった。捕獲総数は3,441（雌2,774、雄667）で2007年の1/5、2008年の1/8.5で、ピーク時の1時間当たり捕獲個体数は267雌にすぎなかった。経産雌の割合は6.5%で2007、2008年の結果との差は有意ではなかった。休眠率は92.5%で、2008年とは有意差がなく、2007年よりは有意に高い値であった。経産雌の休眠率は32%（6/19）で、未経産雌の98%（401/411）よりも高かった。産卵経験がありかつ休眠する個体の割合は、1.4%（6/430）であった。2010年3月、4月の調査で捕獲されたコガタアカイエカは、わずか12雌にすぎず、2007年（11）とほぼ同数、2008年（211個体）と比較して約1/18であった。

1 5) 調査期間中に採集された蚊のうち、最も捕獲個体数が多かったのは、ヒトスジシマカで全体の69.5%、ついでアカイエカが15.9%、ヤマトクシヒゲカが9%で、これら3種で全体の94.5%に達していた。さらに、トラフカクイカ（4.7%）を加えると全体の99.1%となり、これら4種が優占種であることがわかった。分析した220個体のアカイエカ（吸血蚊）は1個体を除き、すべて野鳥から吸血していた。この公園のアカイエカがもっとも多く吸血していた鳥はハシブトガラスで、全体の64%を占めていた。次に多く吸血していたのは、スズメで12.7%、ついでシジュウカラが6.8%で、これら3種類で全体の83.6%に達した。ヒトを吸血していたアカイエカはわずかに1個体のみだった。吸血蚊の腹部から鳥マラリア原虫が検出された個体は合計53個体

で、原虫陽性個体の吸血源となっていた鳥は、ハシブトガラス、スズメ、シジュウカラ、メジロ、シメの5種類であった。未吸血個体の鳥マラリア原虫保有率は33.7% (32/95 プール) であった。公園で生活するすべての動物が蚊の吸血源となっているわけではなく、その一部が利用されていること、また、蚊の種類によって吸血している動物の種類が異なることがはっきり示されている。この公園の3種の蚊が野鳥から吸血する頻度は、アカイエカが99.5%と最も高く、ついでヤマトクシヒゲカが86.7%、ヒトスジシマカは最も低く8.4%であった。これとは逆に、ヒトから吸血する頻度はヒトスジシマカで最も高く61.4%、次はアカイエカの0.5%、ヤマトクシヒゲカはヒトから吸血していた個体は得られず0%であった。アカイエカとヤマトクシヒゲカによって吸血される野鳥の中では、ハシブトガラス、スズメ、シジュウカラが吸血される機会が多いことがわかった。

16) 44種2,742羽の鳥類を調査した結果、13種82羽から6種116個体のマダニ類を採集した。採集したマダニ類のほとんどはキチマダニ *Haemaphysalis flava* とアカコッコマダニ *Ixodes turdus* であり、残り4種は少数個体が採集されたにすぎなかった。キチマダニはさまざまな鳥種から採集されたが、アカコッコマダニでは大多数の個体がアオジから採集された。20羽以上の個体を調査した鳥種のうち、マダニ寄生率がもっとも高かったのはシロハラで、14.7%であった。これは主としてキチマダニの寄生によるものであった。

17) DENV1 に対する中和・増強活性は、8種類の抗 Dengue 1 型マウスモノクローナル抗体を用いて、DENV1 に対する中和・増強活性のバランスを比較した。これらの抗

体は、種々のパターンの濃度依存性曲線を示し、そのパターンから4つのグループに分類された。第2のグループである D1-IV-1C8、D1-III-9B1 は、補体非存在下で抗体濃度に依存して中和及び増強活性を示した。また、補体非存在下で示された増強活性は、補体の添加により中和活性に転じた。第3のグループである D1-IV-7F4 は、高濃度で中和活性を示したが、低濃度では増強活性を示さなかった。また、最後のグループである D1-I-11G12、D1-V-3H12、D1-IV-3B8 は、抗体濃度の高い条件においても増強活性が認められた。D1-IV-7F4 は補体存在下で中和活性は上昇したが、一方 D1-I-11G12、D1-V-3H12、D1-IV-3B8 は補体の有無に関わらず増強活性を示した。

DENV1 に対して示された D1-IV-7F4 の中和活性は、DENV2、DENV3、DENV4 に対してはほとんど示されず、また増強活性も示さなかった。交差反応性が少ないものと考えられた。K562 細胞が有する  $Fc\gamma RIIa$  (CD32) に対する抗体で前処理した K562 細胞を用いて、D1-IV-7F4 (N-Ab)、D1-V-3H12 (E-Ab)、D1-IV-1C8 (NE-Ab) の中和・増強活性のパターンを調べ、前処理をしていない K562 細胞で得られた活性パターンと比較した。前処理した K562 細胞では、増強活性が抑制され、今回示された ADE は  $Fc\gamma$  レセプターを介して起こることが示された。

中和に関わるエピトープのマッピング：中和活性を有する抗体の存在下において DENV を培養すると、中和活性を有する抗体との結合に関わる部位に変異を生じた抗原変異株 (エスケープミュータント) が選択的に増殖することが知られており、中和に関わるエピトープの探索に利用されてきた。そこで、中和活性のみを有する D1-IV-7F4 について、エスケープミュータントを作製した。望月株とエスケープミュータントの間で、prM のシグナル配列から NS1 の 3' 末