

201123005A

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23年度総括・分担研究報告書

平成24年3月

研究代表者 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(2011年)

千崎則正・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

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(3)

小林睦生・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

3. 節足動物媒介感染症の効果的な防除等の対策研究：西宮市における蚊幼虫、 成虫対策の効果について

吉田政弘・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 45

4. 疾病媒介蚊監視システムの構築に向けて一西宮市における蚊幼虫相の 地域差と地表面傾斜との関係

二瓶直子・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53

5. 神奈川県、長野県、富山県、三重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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61

6. 国内で想定されるデング熱流行時に媒介蚊として危惧されるシマカ類の調査、 およびベトナムのデング熱媒介蚊の捕食者としての水生カメムシ類の調査

川田 均・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75

7. 新潟市内の豚舎における媒介蚊の捕集調査

田中 淳・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 83

8. コガタアカイエカの越冬に関する野外調査(2010年秋-2011年春)

津田良夫・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 87

9. 石川県河北潟干拓地と富山県氷見市における感染症媒介蚊の発生状況調査

渡辺 護・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 91

10. 富山県の海辺における蚊類幼虫調査

山内健生・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 101

11. 京都市市街地における疾病媒介蚊調査

生息密度の推定にむけて

二瓶直子・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 107

12. 富山県の愛玩動物における外部寄生虫調査(2011年)

山内健生・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 117

13. 東日本大震災の津波被害地における疾病媒介蚊の発生状況調査 渡辺 護	121
14. 東日本大震災の被災地における疾病媒介蚊発生状況調査： 福島県北部と宮城県南部沿岸部の比較 津田良夫	133
15. 東日本大震災の被災地における疾病媒介蚊調査（宮城県南部水田地帯） 津田良夫	141
16. 東日本大震災による津波被災市街地における蚊幼虫の発生状況(2011年) 小林睦生	149
17. 東日本大震災被災地で発生したイエバエの殺虫剤感受性および <i>kdr</i> 遺伝子頻度 富田隆史	157
18. アタマジラミのピレスロイド系駆除剤抵抗性 富田隆史	161
19. 国内数箇所で 2010 年に採集されたトコジラミの殺虫剤感受性 山内健生	167
20. 日本脳炎ウイルス主要媒介蚊から分離された新規ラブドウイルスの 性状解析 沢辺京子	175
21. 名古屋市内で捕獲したカからのデングウイルス、日本脳炎ウイルス、 ウエストナイルウイルス、チクングニアウイルス検出の試み 柴田伸一郎	183
22. <i>Culex flavivirus</i> 感染性 cDNA クローンの構築 沢辺京子	195
23. デング 1 型ウイルスエンベロープ蛋白上の中和及び増強エピトープの解析 小西英二	201
24. チクングニア熱 IgM 抗体検査キットの評価 高崎智彦	211
25. FcγR 発現細胞を用いたデング熱患者血清における抗体依存性感染増強(ADE) 活性の検討に関する研究 倉根一郎	215
26. クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) ウイルス中国分離株の L-遺伝子の全塩決定 西條政幸	221
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	231

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

研究代表者 小林睦生 国立感染症研究所・昆虫医科学部

研究概要

2005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ヒトスジシマカが主要な媒介蚊であった。一方、2007年に北東イタリアでのチクングニア熱の流行は、約300人の患者が発生し、1人が死亡した。現在、イタリアではヒトスジシマカが全土に分布域を広げ、発生密度も高い。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。我が国でのデング熱の輸入症例は、ヒトスジシマカが活動可能な5月から10月の症例が全体の80%を占め、突発した流行の可能性は否定できない。我が国は都市部の公園や戸建て住宅など植生の多い環境を中心にヒトスジシマカの成虫密度が高い。そこで、媒介蚊の発生状況調査、成虫および幼虫防除法の開発、成虫の潜み場所の特定などの調査を行った。また、TaqMan ProbeによるリアルタイムRT-PCR法より迅速なウイルス遺伝子の検出法が確立され、各地方自治体にこれらの診断技術移転が行われ、調査が一部の自治体で始まっている。本研究事業では、4価DNAワクチンの開発を目指しているが、中和活性抗体と感染増強活性(重症化)のバランスを考えたDNAワクチンの開発が必要となってくる。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。日本脳炎の媒介蚊であるコガタアカイエカの発生消長に関して、富山県、新潟県等の調査から8月の中旬以降に急激にトラップで捕集される蚊の数が増える傾向が認められており、国内の大量発生地域からの長距離移動の可能性が強く示唆されている。平成22年3月に発生した東日本大震災によって発生した津波は、主に東北3県に甚大な被害をもたらし、5月からはクロバエ類の大発生、6月からはイエバエの発生、7月以降は津波被災地で形成された水田跡地に形成された湿地帯、市街地の浄化槽等にコガタアカイエカ、イナトミシオカ、アカイエカ、トウゴヤブカなどが大量に発生していることが明らかになり、これら日本脳炎やウエストナイル脳炎媒介蚊の発生状況の調査が精力的に行われた。現地の状況が改善されていないことから、平成24年の夏季にも同様の問題が起こることが示唆される。

アタマジラミのピレスロイド系殺虫剤に対する抵抗性の発達状況の全国規模での調査が継続して行われ、沖縄県を除くと8%以下と、未だ薬剤が使用可能な状況であることが示された。本研究事業は、日本脳炎媒介蚊の生態、媒介蚊からの新規ウイルスの分離と遺伝子構造解析、コガタアカイエカの発生活長の基礎的な調査、チクングニア熱、デング熱媒介蚊である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、デング熱のワクチン開発、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に関して研究事業への参加をお願いし、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なども理解されていない現状で、種々の角度から媒介蚊の発生活長を調査し、総合的な視点を持った節足動物媒介性感染症の効果的な対策に資するを調査研究を行った。

A. 研究目的

ヒトスジシマカが重要な媒介蚊である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、大きな問題となっている。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結果、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全人口の約1/3が感染する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人規模の流行が起こり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、近年、盛岡市に定着が確認された。分布の要因としては、年平均気温が11℃以上であることが重要である。北限地域である岩手県盛岡市での詳細な分布域調査が行われた結果、複数の幼虫発生源が市内の3カ所で確認された。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、世界的には、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、古タイヤなどあらゆる人工的な水溜まりや樹洞、竹の切り株などに発生する。しかし、近年の我が国では、下水道が完備されたこ

とによって作られた道路側溝の雨水マスが重要な幼虫発生源となっている。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。雨水マスから発生したヒトスジシマカがどのような環境を好んで移動し、潜んでいるかを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、道路の雨水マス、公園の植生にみられる成虫と幼虫をどのような方法で駆除するか数種の成虫防除剤を用いて試験的防除を行った。

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高率に分離される。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、蚊に刺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。また、地域によってコガタアカイエカの捕集ピークが異なる、ある時期から急に捕集数の増加が起こることが知られており、日本海に面する富山市と新潟市で同様の結果が報告されている。晩秋に東京都内の公園で多数の雌雄成虫が捕集され、90%以上が生理的に休眠状態と判定されたが、その公園周辺で越冬しているのか、一時的な通過点なのか不明である。また、経産率が2-6%と低いことから、越冬

前に日本脳炎ウイルスを取り込んで越冬し、翌年の流行につながる可能性は低いと考えられる。ウイルスの越冬生態の解明に非常に興味ある調査結果となった。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、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、コガタアカイエカから新規のラブドウイルスを分離した。人に病原性のあるウイルスの分離の過程で、上記のラブドウイルスや、以前報告した2種のフラビウイルスは分離、同定の段階で混乱を来す可能性があり、今後も新たなウイルスの分離、同定は必要と考えられる。衛生害虫の殺虫剤抵抗性に関して、アタマジラミの問題が大きいですが、5年間の全国規模での調査において、欧米諸外国と比べると未だ薬剤の使用が可能なレベルの抵抗性の発達状況であることが明らかとなった。抵抗性のコロニーの場合には、現在の薬剤の駆除効果は期待出来ないことから、迅速な分子診断によって、効果のない薬剤の使用を中止させることが必要で、物理的な駆除法の採用を症例することが可能となる。

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%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RT-PCRおよびリアルタイムRT-PCR法よりさらに迅速なHyper RT-PCR法による診断を試み、利用可能であることが判明した。クリミア・コンゴ出血熱に関して、中国新疆ウイグル自治区で分離されたCCHFVの7株のL-遺伝子の全塩基配列を決定した。

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た。非Fc γ R発現細胞によって測定された中和抗体活性は感染増強活性が考慮されない状態で測定されていることから、デングウイルスの体内ターゲットであるFc γ Rを有する細胞に対する抗体の機能が反映されていない可能性が考えられる。そこで、デングウイルス血清学的検査法(抗体依存性感染増強(ADE)アッセイ法および新規中和試験法が感染増強活性を含んだ中和抗体の検出に使用可能かを検討した。

B. 研究方法

1) 生息北限における蚊類の生息状況調査は2011年9~10月、岩手県盛岡市内の以下の地域の計34地点で行った。すなわち

2009年調査で生息北限であった仙北町(39° 41' 15" N, 141° 9' 11" E)、2010年調査で生息北限であった玉山区(39° 51' 28" N, 141° 10' 33" E)及び2010年の調査により確認された仙北町より北に位置する名須川町(39° 42' 39" N, 141° 9' 17" E)及びその近隣の住宅地である。

調査対象は主に寺院の花生けや手水鉢、屋外に放置された古タイヤなどの人工容器の貯留水に生息する主にヤブカの幼虫及び蛹で、太口ピペットで採取した。1調査地点につき1~6人工容器を調査した。採取した蚊の幼虫を室温で飼育し、羽化させた成虫を、実体顕微鏡下で形態学的に同定した。

2) 公園内の植生に潜んでいるヒトスジシマカに関して、3人が一組になり、兵庫県西宮市内の39の公園で、各2カ所の植生を選んだ。総数は78ヶ所の植生は単独の種類の場合と、2-3種の植生が混在している場合がある。これらの植生上に蚊帳(2×2.5×1.9m)を被せて、1人が調査者が蚊帳の中で8分間蚊の捕集を行った。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1)。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) 公園でのヒトスジシマカの幼虫および成虫の防除対策に関して、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4隅のすくい採りによる(クラーク社製、容量350ml)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分間人囀法により実施した。幼虫調査は2週間

間隔、成虫調査はおおむね1週間に1回の間隔で実施した。なお、薬剤処理した西宮浜2公園では各公園の中心部より200m付近の3地点の6か所で、8分間の人囿法による成虫採集を行った。

4) 西宮市における蚊幼虫相の地域差と地表面傾斜との関係に関して、2007年以来西宮市で実施してきた蚊の調査結果を用いた。すなわち全市を10地区に分け、各地区4-5ヶ所の調査区を選び、道路雨水枡の位置を図化して番号を振り、GISに利用できるように管理した。すべての雨水枡のうち有水雨水枡を区別し、有水雨水枡の泥だめにたまった水に蚊幼虫の有無を調べ、幼虫がいる場合はヤブカ、ヒトスジシマカ等を同定した。これらの結果を地理情報システムGIS解析ソフトArcGISで図化した。西宮市全域の地表面傾斜の分布は、ArcGIS Spatial Analyst を用いて、国土地理院基盤地図情報10mメッシュ(標高)データから、傾斜角を算出し、1度以下を区分する際には、その範囲を0.1度毎に区分して図化した。10度以下を区分する際にはその間隔を0.5度毎に区分して図化した。43調査地区については、1:2,500国土基本図で標高が明記された地点について、最高地点と最低地点の差とその距離を用いて、 $\tan \theta$ から角度を算出した。道路雨水枡の泥だめの有水率、幼虫生息率などと地表面傾斜との相関を調べるため、10地域別平均斜度・43調査地区斜度と道路雨水枡数、有水率および幼虫生存率との相関を検討した。

5) ヒトスジシマカの飛来消長に関して、神奈川県、長野県、富山県、三重県および大阪府で行った。調査場所は、これまでに対象種の生息が認められている下記の地点とした。2011年の調査場所と調査期間は下記のとおりであるが、④を除く

地点については、発生終期に飛来が0になってから、さらに1週間以上調査を継続し、飛来の終息を確認した。

- ① 神奈川県海老名市国分北 3-15
2011年6月10日~12月7日
- ② 神奈川県中郡大磯町大磯 2011年
4月17日~12月4日
- ③ 長野県上田市常入 2011年6月6
日~10月23日
- ④ 富山県富山市呉羽(呉羽山公園)
2011年5月19日~10月25日
- ⑤ 三重県名張市鴻之台 2011年5月
4日~10月30日
- ⑥ 大阪市東成区(玉津公園) 2011
年4月30日~11月19日
- ⑦ 大阪市中央区(大阪城公園) 2011
年5月3日~10月30日

調査方法は、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、その捕集数をカウントする8分間採集法で実施した。なお、上記③の調査場所では、捕集時間は6分間で実施した。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。また、一部の地点では幼虫の発生状況を目視で調査した。

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。なお、飛来状況と温度の関連などの解析には、特に断りがない限り下記に示す最寄りの気象台観測所のデータを使用した。花巻市：花巻、海老名市：海老名、大磯町：辻堂(藤沢市)、上田市：上田、富山市：富山、名張市：上野(伊賀市)、大阪市：大阪

2011年の調査時間は各地点で異なり、上記①では日出1時間前、正午および日没1時間前に、②では原則として7:00~8:00または16:00以降、③では6:00と

したが、発生初期や終期の低温の時期には気温が上昇する日中の調査を追加した。④～⑥は日中（10:00～16:00）の調査が多かった。調査間隔は各地点で異なるが、一部を除き、原則として週1回程度の調査を実施し、上記①および⑥では、さらに頻回の調査を行った。

6) 国内で想定されるデング熱流行時に媒介蚊として危惧されるシマカ類の調査は、2011年11月に九州（熊本、宮崎、鹿児島）および沖縄県（本島、与那国島）において、道路脇に放置もしくは保管されている古タイヤにたまっている水溜りから、ネットによる掬い取り法によって蚊の幼虫を採集した。幼虫採集と同時に、タイヤ数、水のたまっているタイヤ数、幼虫のいたタイヤ数もカウントした。採集地点はGPSをつかって位置情報を記録した。幼虫は生かしてフィールドステーションに持ち帰り、ピレスロイド系殺虫剤（*α*-アレスリン）に対する感受性テストをおこなった。

長崎市内の公園に生息するヒトスジシマカのピレスロイド感受性調査に関しては、長崎市内に点在する公園の雨水マス等に発生するヒトスジシマカを調査対象とした。感受性調査は、前述した幼虫に対する感受性テストの他に、WHOテストキットを使用した成虫の感受性試験も実施した。また、ピレスロイドに対する抵抗性メカニズムを知る一助として、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*）を解析した。

ベトナム南部の水瓶に発生する蚊幼虫の天敵としての水生カメムシ類に関して、水瓶に発生する捕食性昆虫の種構成を明らかにするため、ベトナム南部のタンチャンにおいて調査を実施した。上記の調査で採集された水生カメムシ類が実際に蚊幼虫を捕食しているかどうかを確認するため、水生カ

メムシ類の腹部のDNAを抽出し、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* およびヒトスジシマカ *Ae. albopictus* の種同定用プライマーを用いて遺伝子の検出を試みた。

7) 新潟市内の豚舎におけるコガタアカイエカの発消長調査においては、昨年と同じ豚舎1箇所を捕集地点と選定した。当該豚舎は、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キロメートル離れているが、佐潟に一番近い豚舎である。豚舎周辺には水田地帯が広がっている。

2010年に実施した捕集調査では、発生ピークを含めた消長調査が不十分だったことから、今年度は4月20日から開始し、2週連続して捕集が認められなくなるまで実施することとした。トラップの設置は、毎週1回概ね水曜日とし、24時間後に回収した。トラップはCDC型ライトトラップ（豆電球は除去）を使用。地上約2mに設置し、誘引源として約1kgのドライアイスを入れた容器に入れ、ライトトラップ横に吊るした。トラップを設置した日の気象データは気象庁のデータを使用した。

8) 東京都内にある林試の森公園におけるコガタアカイエカの調査に関しては、2010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2007～2009年と同じ都立林試の森公園の南部に位置する約600m²の林床部である。この場所は、上部を樹冠で覆われ、低木に加えてシャガ、ヤブラン、キチジョウソウなどの多年生植物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。10月中に採集された雌成虫から210個体を選び、解剖して卵巣を取り出し、1対の卵巣の片方

を用いて呼吸管枝の形態観察から経産/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合わせて測定し、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。

2011 年 1 月から 3 月にあたたかな日を選んで午後 0.5 時間の sweeping 採集を 2 回行った。2011 年 4 月には夕方に約 0.5 時間の sweeping 採集を計 26 日(合計 17.3 時間)実施した

9) 石川県河北潟干拓地と富山県氷見市における感染症媒介蚊の発生状況調査に関して、蚊の捕集は CDC 型ライトトラップの豆電球を外し吸引のみを用いて、ドライアイス 1kg をクラフト紙で包み、それを冷蔵パックに入れトラップの真上、または真横に吊るした。トラップは 1.5m ほどの高さに吊るした。石川県河北潟では干拓地内部に 5 台、外部周辺に 7 台のトラップを毎回ほぼ 15 時に設置稼働させ、翌朝 9 時前後から回収を始めた。石川県宝達志水町では豚舎に近い水田脇に 2 台を毎回 14 時頃に設置稼働させ、翌朝 11 時前後から回収を始めた。富山県氷見市加納では牛舎(和牛 2 頭飼育)に近い川堤防と物置前の茂み、大小の溜池の周囲などに計 8 台を、毎回 12 時頃に設置稼働させ、翌日 12 時頃から回収を始めた。捕集昆虫類は捕集部の網袋を

定点毎にビニールチャック袋に入れて、アイスボックスに保存し、その日の内に研究室で検鏡分類した。調査は 3 地域とも同日に、2011 年 5 月 13 日から 10 月 19 日までにはほぼ隔週に 13 回行った。なお、吸血していたアカイエカ群は、Sawabe et al.(2010)および Kasai et al.(2009)の方法に従って、吸血源動物の同定ならびにアカイエカとチカイエカの判別を行った。

10) 富山県の海岸線における蚊類幼虫調査に関して、2011 年 6 月中～下旬と 9 月下旬に、漁港・釣り場を中心とした富山県内の海辺 12 地点にて、コンクリートの窪み、人工容器、雨水ます、および地表の水溜りなどに生息する蚊類幼虫を採集した。採集にはスポイトを用いた。調査の際、幼虫が生息していた水溜りの水温と塩分濃度をデジタル塩分計(SS-31A、積水ポリマテック株式会社)で測定した。また、水溜り内に捕食性の生物が見つかった場合は、それも別に採集した。

採集した蚊類幼虫を研究室へ持ち帰って飼育し、羽化成虫を分類同定した。

11) 京都市内の感染症媒介蚊の調査に関しては、捕集場所を京都市の行政区としては中京・上京・右京・左京・北・東区などの市街地に設定し、町屋を含む一戸建て住宅 19 か所と住宅地の一角にある大学研究室校舎一ヶ所、計 20 か所を選び、玄関前軒先や建物に隣接した樹木の枝の高さ 1-1.5m に、CDC トラップを設置した。調査期間は 2011 年 6 月 10 日～7 月 9 日とした。2 夜連続調査法で、計 5 回実施した。誘引剤としてはドライアイス 1kg を用いた。この中で住宅地 5 地点については、11 月 22 日まで捕集を継続して、蚊相の季節消長を追跡した。またこれらの地域では 8 月 19 日～9 月 16 日に 8 分間人囀法で飛来した成

虫を捕集した。捕集した成虫はすぐにドライアイス入りのクールボックスに入れ、 -80°C の冷凍庫で保管し、種の同定やウイルス検出に供した。GISの資料としては、下水道の合流・分流式、植物被覆を高・中・低、土地利用は蚊の飛翔距離を考慮して半径200m範囲を解析に用いた。

寺院の調査は、いずれも世界遺産である仁和寺及び建仁寺を選び、当該寺院が許可した場所にCDCトラップを設置した。仁和寺では敷地内8か所で捕集し、建仁寺では7か所で捕集した。期間は8月19日から9月17日の一月間で毎週金曜日にCDCトラップを設置し土曜日に回収した。さらに8分間人囮法による成虫を捕集した。このGIS解析としては緑被率、気温、湿度、日照度、発生源との距離・捕集数を考慮した。蚊の同定は実体顕微鏡下で実施し、アカイエカ群については、遺伝子解析で、アカイエカとチカイエカを同定した。

12) 富山県の愛玩動物における外部寄生虫調査に関しては、2011年6~12月に、富山県動物管理センター(立山町)と県内の動物病院17施設(富山市、射水市、高岡市、砺波市、魚津市、舟橋村)に持ち込まれたイヌ、ネコ、フェレットの体表から、獣医師あるいは施設職員が目視により可能な限り多くの外部寄生虫個体を採取した。これらの外部寄生虫は、消毒用エタノール液浸とし、冷凍庫内に保存された。

これらの外部寄生虫を、実体顕微鏡および光学顕微鏡下で分類・計数した。マダニ類についてはYamaguti et al.(1971)と藤田・高田(2007)、ノミ類についてはSakaguti(1962)に基づいて種同定を行なった。*Ctenocephalides* 属以外のノミ個体では、内部形態を観察するために水酸化カリウムによる処理を行なった後で種同定を行なった。

すべてのマダニ個体と水酸化カリウムによる処理を行わなかったノミ個体からDNAを抽出し、2nd PCRもしくはnested PCRにより、各種病原体(紅斑熱群リケッチア、エーリキア、アナプラズマ)の遺伝子検出を試みた。

13) 津波被災地の蚊の調査に関して、成虫の捕集はCDCトラップとドライアイスとを組み合わせ各定点に設置することで行った。トラップは毎回12台を原則として15時前後から設置稼働させ、翌朝9時前後から回収を始めた。吸血していたアカイエカ群は吸血源動物の同定とチカイエカとの判別をそれぞれ遺伝子解析により行った。調査地は、岩手県陸前高田市の高田小学校の周辺、長部漁港から上長部にかけての範囲、宮城県気仙沼市の南気仙沼小学校、階上地域、さらに福島県南相馬市鹿島区の真野川下流域である。調査は気仙沼市南部地域では6月3日から10月28日までほぼ3週間おきに8回行い、陸前高田市高田小学校の周辺、陸前高田市長部・上長部の地域、IV.気仙沼市階上地域は6月25日から10月27日までに7回、福島県南相馬市鹿島区においては9月18日に1回行った。幼虫調査は主に既述の成虫調査地において、津波の被害があった住宅街の道路側溝、雨水枡、流失家屋の残された土台の溜り、井戸、便槽、浄化槽、風呂、放置された大小の容器、放置された被災漁船、被災水田の溜り、被災用水路の溜り、更地後の溜り、作付け水田および無被災水田など、目に付いた溜水環境を柄杓で掬い取る方法で幼虫の採集を行った。なお、幼虫の有無に関わらず調査を行った溜りの塩分濃度はデジタル塩分計(榊水ポリマテック:SS-31A)で記録した。採集した幼虫・蛹は採集場所別に50mlのプラスチック遠心管に移し、その日の夜にまず蛹を個体別に羽化用のサンプル管に取り分け、残った幼虫に

60~70°C程の熱湯を注ぎ、死亡した幼虫を70%エタノールが入った標本管（4~10ml）に移し、後日検鏡・分類した。

1 4) 津波被災地である宮城県南部、仙台市、岩沼市、亶理郡の水田地帯を対象にして、2011年6, 7, 8月に疾病媒介蚊の発生状況を調べた。調査対象の地域から津波の被害を受けた場所3ヶ所と津波の被害を受けなかった場所2ヶ所を選んだ。それぞれの調査場所にドライアイス1kgを誘引源とするトラップを2台ずつ設置して成虫を捕獲した。トラップによる採集は3日間連続して行い、捕獲された成虫は毎朝回収して種類と個体数を記録した後、冷凍サンプルとして保存した。7月と8月は成虫の移動範囲を調べるために、海岸から内陸部にかけてほぼ直線状に並ぶ新たなトラップ設置場所を選び、7月は1日、8月は2日間成虫採集を行った。幼虫調査は被災地の水田や道路脇の陥没地に形成された水溜りを対象に行った。柄杓で水と共にすくい取られた幼虫の種類と数を調べた。また、合わせて採取した水の塩分濃度を測定した。アカイエカ群の成虫は、形態的にアカイエカとチカイエカを区別することができないので、毎月のサンプルから10個体（計30個体）をランダムに選んで、分子生物学的手法によって種類を同定した。さらに、トラップによって捕獲された成虫の中には、吸血して未消化の動物血液を保持している個体が含まれていたため、DNAを抽出して塩基配列の類似度によって吸血源となった動物種を同定した。

1 5) 津波被災地である福島県北部と宮城県南部沿岸部の媒介蚊の発生状況調査を行った。福島県中部に位置する南相馬市から宮城県南部に至る、太平洋沿岸部の

7ヶ所を調査対象とした。調査は2011年9月14日~17日に津波の被害を受けた水田とその周辺にできた水域から柄杓によって水と共に幼虫を採集して行った。発生していた幼虫の密度に応じて柄杓1~8杯の水を採取し、塩分濃度を記録した。幼虫は80%のアルコールに保存して持ち帰り、形態的な違いによって種類の同定を行った。調査した場所の緯度・経度と調査水域の種類ならびに採取したサンプル数を表1に示した。本調査の結果を宮城県南部の水田地帯の4ヶ所で2011年8月末に実施した幼虫調査の結果と比較して、津波被災地の水田地帯における疾病媒介蚊の発生状況をまとめた。

1 6) 津波に被災した市街地での幼虫調査は7月28-29日に気仙沼市、大船渡市、陸前高田市で、8月31日に気仙沼市で、9月14日に山田町、大槌町で行った。調査地域は津波で木造建築物がほとんど流出した市街地で、海岸線から500m以内の内陸地である。地域や調査時期によって、被災市街地の状況は異なるが、多くの建築物は取り壊されて、瓦礫も調査地周辺には存在していない。調査水域は主に建築物の基礎に点在する浄化槽、浄化槽関連のコンクリート製のタンク、住宅の基礎部分のコンクリートの枠などで、一部、周辺の種々の水溜りも調査した。気仙沼の波路上地区では破壊された高校周辺の大型の浄化槽を調査した。幼虫採集は約1.4mの柄杓で表面の水をすくい取る方法で行った。掬い取った水から幼虫を直接駒込ピペットで50mlの広口ビンに吸い取り、感染症研究所に持ち帰って成虫まで飼育し、種の同定を行った。なお、幼虫が発生している水域の塩分濃度をデジタル塩分計（株積水ポリマテック：SS-31A）で測定し、記録した。また、地図上での住所確認が困難な場所が多いことか

ら、将来の解析のために GPS 装置および GPS 機能付のデジタルカメラで採集場所の記録を行った。なお、本報告における *Culex pipiens* はアカイエカとチカイエカの分子分類がなされていないので、*Culex pipiens group* とし、本文中ではアカイエカ群と記述した。

17) 東日本大震災の被災地で採集したイエバエに関する殺虫剤抵抗性の調査において、イエバエは、気仙沼と石巻市の廃棄物置き場において、それぞれ、成虫をスウィーピングにより採集した。採集した世代およびニ世代室内で飼育したコロニーを塩基配列の解析に、ニ世代飼育したコロニーを殺虫試験に用いた。

局所施用により、殺虫試験を行った。薬液はフェントロチオン、ペルメトリンおよびエトフェンプロックスの原体のアセトン溶液を用いた。また、共力効果を調べるためにペルメトリンと共に共力剤としてピペロニルブトキシドを用いた。イエバエは二酸化炭素及びエチルエーテルを用いて麻酔した。麻酔されたイエバエの胸部背面に、ハミルトン社製のリピーティングディスプレイペンサーを用いて、0.5 μ L を施用した。

24 時間後に生死を確認し、LD50 を算出した。ピレスロイド殺虫剤抵抗性に係る *kdr* 遺伝子頻度の解析に関して、ナトリウムチャンネルをコードする *kdr* 変異遺伝子の頻度を、ゲノム DNA の配列の解析により調べた。イエバエの脚部を切断し、Tissue Lyser II (Qiagen 社) を用いて、ジルコニアビーズで磨砕した。

REDExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma 社) を用いてゲノム DNA を抽出した。それを鋳型にして PCR 法により、イエバエの *kdr* 変異塩基座位付近の配列を増幅した。PCR 産物は ExoSAP-IT (GE 社) により処理して配列決定のための鋳型とした。配列の決定は、BigDye 1.1 (Life Technology 社) を用いてラベリング反応を行った後、BigDye X Terminator (Life Technology 社) を用いて精製した。精

製産物を ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Life Technology 社) を用いて分析し、塩基配列を決定した。

18) アタマジラミの殺虫剤抵抗性に関しては、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。主に、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(上里博, 平良清人)と沖縄県衛生環境研究所(平良勝也, 岡野祥)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。分子ジェノタイピングは、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ピングした。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、一昨年度の研究分担報告書と Kasai et al. (2009) に記載の方法に従った。

19) 用いたトコジラミは、1) 帝京大系統(日環セ系統): 大森南三郎先生(当時帝京大学医学部)から譲与され、2) 沖縄那覇系統: 2010 年 11 月 8 日に那覇市内のビジネスホテルで採集、3) 福岡行橋系統: 2010 年 10 月 12 日にビジネスホテルで採集、4) 福岡若宮系統: 2010 年 10 月 13 - 14 日にビジネスホテルで採集、5) 石川

金沢系統：2010年10月30日に市内のビジネスホテルで採集、6)新潟長岡系統：2010年9月18日に市内のビジネスホテルで採集、7)北海道旭川系統：2010年11月15日に市内のビジネスホテルで採集した7系統を用いた。濾紙継続接触法は、径11cmのNo.131定性円形濾紙に、1%の各殺虫剤液を0.5ml均一になる様に滴下(約50ml/m²)、一晚風乾後、薬剤滴下面を内側にして二つ折りにし、その内側に5対のトコジラミ成虫を放し、経過時間毎の死亡虫を観察する方法で行った。実際には、トコジラミを放した濾紙を径12cm高さ4cmのシャーレに静置し経過時間毎に死亡虫を観察した。各薬剤2個のシャーレで2回の繰り返しを行った。試験日は2011年6月14~29日、室温23±2℃。腹面微量滴下法は、各薬剤の1%液を、リピーティングデスペンサー(Hamilton, PB600-1)に、25μl微量注射器(Hamilton, #702)を装着して、1μlずつトコジラミ成虫の腹面に滴下し、死亡までの時間を個体別に観察した。1薬剤につき、各系のトコジラミ成虫を各々20個体供試した。試験日は2011年6月16~24日、室温23±2℃

20)千葉県千葉市の畜舎で捕集されたコガタアカイエカを用いてウイルス分離を行った。

最終ウイルス培養上清からViral RNA Extraction Kit(QIAGEN)を用いてRNA抽出を行った。RT-PCRにより遺伝子を増幅後、CTRVゲノムの全塩基配列を決定した。ゲノム両末端配列はRACE法で決定した。

CTRVゲノムの全塩基配列より推定された5つのウイルス遺伝子(N, P, M, G, L)について、RACE法により転写開始点および終了点を同定した。また、L遺伝子については、Strand-specific RT-PCRならびにCTRV L遺伝子検出用RNAプローブを用いたNorthern hybridizationを行うことにより、その遺伝子発

現機構を検証した。CTRV感染C6/36を4%パラフォルムアルデヒドによりスライドグラス(Nunc社製, Lab-Tek Chamber Slide)上に固定し、CTRVゲノム検出用RNAプローブを用いて、*in situ* hybridizationにより感染細胞内におけるウイルスRNA(+鎖, -鎖)の局在を調査した。電子顕微鏡による観察においては、ウイルス培養上清を1,600gで15分間(4℃)遠心後、さらに細胞残渣を除くため、その上層を12,000gで30分間(4℃)遠心した。調整したウイルス液は超遠心機(Beckman ultracentrifuge, TLS55 rotor)を用いて、77,000gで2時間(4℃)遠心した。上清を除き、沈澱をバッファーで懸濁後、試料を2%グルタールアルデヒドで固定し、調整された試料は2%酢酸ウラニルによりネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡により、ウイルス粒子形態の観察を行った。

分子系統解析に関しては、他のラブドウイルスとの類縁関係を推定するため、詳細な分子系統解析を行った。CTRVならびに既知ラブドウイルスのアミノ酸配列から、L遺伝子ならびにN遺伝子のモチーフ配列をそれぞれ抽出し、近隣結合法による系統解析を行った。培養細胞における増殖性に関しては、CTRVの宿主範囲や自然生態を解明する目的で、蚊由来C6/36細胞、哺乳動物由来Vero細胞およびBHK21細胞のウイルス増殖性を調査した。

21)名古屋市内で捕集された蚊からのウイルスの検出にかんして、11地点延116地点で5月から10月まで名古屋市生活衛生センター職員が、ドライアイストラップ法および8分間人囮法により蚊を捕獲した。捕獲した蚊はドライアイスで処理し雌の力を種ごとに選別し、採取地点毎に最大50頭を1プールとして2.0mlチューブに詰め冷凍したまま実験に供した。2.0mlチューブにプールされた雌の力には、冷凍したメ

タルコーンと 1ml の冷却した 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 μ ポアフィルターで濾過をし、その濾液の一部は、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 μ l/ウェルの割合で 2 ウェル接種し、C6/36 細胞によるウイルス分離は、2 代継代後 Vero 細胞に継代し直し、37°C 1 週間 CPE を観察した。

カリ剤濾液の 140 μ l は直接 QIAamp Viral RNA Mini Kit を使用して RNA 抽出をし、遺伝子検査に使用した。

2 2) 2003 年東京都下で捕集されたアカイエカ種群蚊から分離された CxFV NIID21 株 (GenBank Accession No. AB377213) を C6/36 細胞に感染させウイルス RNA を抽出し、これをもとにウイルスゲノム cDNA を作製した。この cDNA をテンプレートとして、ウイルスゲノムを一部オーバーラップする 4 つの領域に分け、それぞれの領域を PCR で増幅した。その際、5'側には T7 プロモーター配列を、3'末端側には run-off product 生成のための制限酵素部位 *Kpn* I を付加するようにプライマーを設計した。それぞれの増幅断片は制限酵素処理後、順次、低コピープラスミドである pMW119 にサブクローニングした (図 1)。宿主大腸菌には DH5 α あるいは STBL2 を用いた。最終的に作製されたウイルス完全長 cDNA を含むプラスミドは、塩基配列の確認後、大量に精製し、以後の実験に用いた。

ウイルス完全長 cDNA を含むプラスミドを制限酵素 *Kpn* I で消化・精製したものをテンプレートとして T7 RNA polymerase 存在下で *in vitro* transcription を行った。次に DNase によりテンプレート DNA を消化させ、一部を変性アゲロースゲルで電気泳動し、転写された RNA を確認した。RNA はカラム精製し、滅菌

水に懸濁したものを以後の実験に用いた。組換えウイルスの作製に関して、精製したゲノム長の RNA を常法に従いリポフェクション法により C6/36 細胞に導入した。RNA 導入後の細胞は 6 日間培養し、さらに blind passage を 2 回繰り返した。組換えウイルス粒子の産生は、特異的 RT-PCR と培養上清の電子顕微鏡観察により行った。

親株ウイルスと組換えウイルスの増殖能の比較をするために定量的 RT-PCR を行った。

2 3) デング 1 型ウイルスエンベロップ蛋白上の中和及び増強エピトープの解析に関しては、Vero 細胞、C6/36 細胞、K562 細胞を用いた。K562 細胞は浮遊系の細胞であるが、接着する細胞を選択して継代し、準接着系に馴化させた。

デング 1 型ウイルス (DENV1) の望月株を用い、C6/36 細胞に感染させて得られた培養液を中和・増強活性の測定に用いた。モノクローナル抗体は DENV1 望月株を免疫原として作製した 6 種類のマウスモノクローナル抗体 (D1-IV-1C8、D1-V-8E8、D1-I-11G12、D1-V-3H12、D1-IV-3B8、D1-IV-7F4) を用いた。感染細胞率に基づく方法を用いた。1 \times 10⁵ 個の U937 細胞に、10 倍階段希釈した検体 (腹水) 50 μ l を加え、さらに 150 μ l に調製した DENV を加えて、37°C で 2 時間保温した。補体を含む系では、150 μ l の DENV1 に 10 μ l のウサギ補体 (Low-Tox[®]-M Rabbit Complement、セダレーン、カナダ) を含有させた。この細胞浮遊液を遠心後、細胞を 1 ml の培養液に再浮遊し、培養 4 日後に細胞を回収し、免疫染色により感染細胞率を求めた。従来の中和試験としては Vero 細胞を用いて、90% プラーク減少法により中和抗体価を測定した。

中和・増強活性のバランス測定法は、ポリ-L-リジンでコーティングした 96 穴マイ

クロープレートを使用し、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ウエルを設けた。固定後、免疫染色により感染細胞数を求めた。陰性対照で得られた平均値+3SD以上を示した場合に増強活性陽性、平均値-3SD以下を示した場合に中和活性陽性と判定した。抗体のアフィニティ精製及びビオチン化に関しては、Protein G Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare, England)を用いて、腹水中のIgGを精製し、EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo, Rockford, IL)を用いてビオチン化した。競合試験としては、マイクロプレートに1:1000に希釈したウサギ抗DENV1ポリクローナル抗体を感作し、0.05%Tween20及び1%ウシ血清アルブミン(BSA)添加リン酸生理緩衝液により1:4に希釈したDENV1感染Vero細胞培養液、1:20から10倍階段希釈した一次抗体、1:2500に希釈したビオチン化二次抗体、1:500に希釈したアルカリホスファターゼ標識アビジン(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を順に37°Cで1時間反応させた。一次抗体非添加ウエルで得られた吸光度と比較して阻害率を求めた。

エスケープミュータントの作製は、DENV1を低moiでVero細胞に接種した後、MAb添加培養液で7日間培養し、これを3~4回繰り返した。MAbの濃度は、中和抗体価が1:10-1:40となるように調整した。エスケープミュータントが得られにくいときには低い濃度から始め、継代ごとに濃度を高める工夫を行った。また、EAbのエピトープマッピングは、prMとE遺伝子を組み込んだプラスミドを用いて、E領域のアミノ酸に変異を入れることにより行った。ハイブリドーマからTRIZOL Reagentを用いてRNAを抽出し、cDNA合成及びPCR反応により抗体可変部の遺

伝子を増幅し、シーケンス解析を行った。プライマーには、Mouse Ig-Primer Set (Merck, Germany)を用いた。次に、抗体可変部の塩基配列に基づいて特異的なプライマーを設計し、PCR法による遺伝子増幅の後、マウスIgG発現ベクター(pFUSE, InvivoGen, San Diego, CA)に組み込んだ。

24)チクングニア熱IgM抗体検査キットの評価は、以下の4つのキットで行った。いずれも輸入品であり、日本国内で認可されたものではない。

- 1) Chikungunya (CHIKV) IgM; Millenium Biotechnology, Inc., USA/SA.
- 2) Chikungunta (IgM) Test (Cassette); AZOG, Inc., NJ USA.
- 3) Chikungunya IgG/IgM Test (Cassette); biocam Diagnostic Inc. BC Canada.

以上はイムノクロマト法を利用した迅速診断キットである。検査法は3キットともほぼ同じであり、それぞれのキットのプロトコルに基づいて検査は実施したが、例としてChikungunya IgG/IgM Test (Cassette)について簡単に記載する。

- ① Cassetteを室温に戻す。
- ② Cassetteを水平な台の上に置き、サンプルウエルに血清あるいは血漿の場合は、10μLを入れる。全血の場合は20μLを滴下する。
- ③ 同じウエルにバッファーを4滴滴下する。
- ④ 赤いバンドが見えるまで待ち、滴下後30分で判定する。

- 4) NovaLisa™ Chikungunya Virus IgM μ-capture ELISA; NovaTec Immundiagnostica GmbH. Diezenbach, GermanyはIgM抗体捕捉ELISAキットである。検査はキットのプロトコルに基づいて実施した。

25) Fc γ R 発現細胞を用いたデング熱患者血清における抗体依存性感染増強(ADE)活性の検討は、マレーシアのペラ州在住の80人から80検体の血清を用いて行った。ペラ州は、マレーシアの北部にあり、デングウイルス以外にも他のフラビウイルス(日本脳炎ウイルス等)の流行が報告されている。デングウイルス中和試験およびADE試験においてはDENV-1(NIID01-44株), DENV-2(TLC30株), DENV-3(CH53649株), DENV-4(TVP360株)を用いた。ウイルス中和試験および感染増強(ADE)試験にはヒトFc γ 受容体(Fc γ RIIA, CD32a)発現 BHK-21細胞およびBHK-21細胞を用いた。中和価試験および感染増強アッセイに関しては、デングウイルスの中和試験はFc γ R発現 BHK細胞および非Fc γ R発現 BHKを用いた50%プラーク減少法ならびに感染増強(ADE)アッセイにて検討した。マレーシアの住民80人から採取した血清を非動化し、10倍希釈後2倍階段希釈(1:10-1:2560)を行った。希釈した血清とウイルスを混合後、37°C、1時間反応を行った。各ウイルス-反応液をFc γ R発現 BHK細胞および非Fc γ R発現 BHKに接種し、37°C、1時間吸着後、1.0%メチルセルロースを加え、37°Cで5日間培養した。ホルマリンによる固定1時間後、メチレンブルーを用いて細胞を1時間染色し、ウイルス中和抗体価およびウイルス力価を算出した。デングウイルス遺伝子はRT-PCR法にて検出した。

26) クリミアコンゴ出血熱ウイルス(CCHFV)の中国分離株7株の株名等の特徴をまとめ、各株をそれぞれ乳のみマウスの脳内に接種し、脳乳剤を作製した。次いでそれをサンプルとして、ランダムプライマーを用いてリバーストランスクリプションによりcDNAを作製した。尚、この作業は中

国CDCとの共同研究でなされた。CCHFV中国分離株のL-遺伝子塩基配列の決定。これまで報告されているCCHFVのL-遺伝子の塩基配列をもとに、プライマーを適当に設計し、各CCHFVサンプルから得られたcDNAをテンプレートとしてダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。3'-側および5'-側の塩基はRACE法によりその塩基配列を決定した。

C. 研究結果

1) 岩手県におけるヒトスジシマカの分布域の調査において、2009年、2010年に引き続き、2011年にも岩手県内陸の平野部を行った。その結果、北限地域にある盛岡市に同蚊の定着が3年連続で確認された。

2) ヒトスジシマカが公園等の植生にどの程度潜んでいるのか、蚊帳を用いて調査し、植生からヒトスジシマカが捕集された率(陽性率)は植生の種類によって10~80%と異なっていた。調査時期によっても捕集数に差がみられるが、一株の植生から20頭以上の成虫が捕集された。捕集数が5頭以上の植生に関する平均捕集数はヒペリカム10頭、ツツジ5.5頭、オカメヅタ6.5頭、ユキヤナギ5.5頭などで、多くの成虫が低灌木を中心とした植生に潜っており、吸血源を待ち伏せしていることが明らかとなった。これら植生の成虫防除を緊急時に行うことが重要であることが示唆された。

3) チクングニヤ熱を媒介する主たる媒介蚊であるヒトスジシマカはわが国においては、生活環境の近くで発生し、その原因ウイルスの伝播性が非常に高い事などより、その防除法を確立する事が要求されている。昨年度に引き続き、主としてヒトスジシマ

カ対策を想起して、広域的な防除に関する情報、資料を得るため、平成18年度から平成22年度にかけ広域的な蚊防除を実施してきた兵庫県下の西宮市において、これまでに得られた資料を参考にして、幼虫発生源への薬剤散布ならびに成虫対策として低灌木への定期的な薬剤散布を実施し、その効果を評価するために、人囮法による成虫調査ならびに幼虫調査を実施し、散布区域と非散布地域より蛹を持ち帰り、羽化率を観察し、その防除効果を評価した。その結果、月1回の公園内の植生の成虫防除と半径150m以内のあらゆる幼虫発生源への薬剤の投与が成虫密度を低減させることが明らかとなった。

4) 2007年度から兵庫県西宮市の10地区における調査で、道路雨水枡の蚊幼虫相の地域差が認められ、それが下水道の雨水・汚水の分流・合流形式の違いによるものではないかと推測してきた。一方、一戸建住宅地内の雨水枡における蚊相にも地域差が認められた。これらの地域差をもたらす要因として、本年度は地表面傾斜を2種の方法で計測し、傾斜と道路雨水枡有水率、幼虫有雨水枡の割合、蚊相との関係を検討した。その結果地表面の傾斜が急な地域では幼虫の発生数が少ないことが示され、有意な相関が認められることから、日本の行政機関ならばどこでも算出できる地表面傾斜が蚊の監視指標として有効であることが分かった。今後これら幼虫のデータと成虫調査結果を重ね合わせて、蚊相の監視システムの構築へと進めていきたい。

5) ヒトスジシマカの各地での発生期間を把握する目的で、2010年に引き続き神奈川県、長野県、富山県、三重県、大阪府において、ヒトに誘引される蚊を捕虫網で8分間捕集する「8分間採集法」で調査を行った結果、飛来開始は5月中

旬から6月上旬、7月～9・10月にかけて飛来の多い状態が続き、飛来の終息は10月中旬～11月中・下旬であった。飛来開始日や終息日の地域による差は、最低気温など、気温の違いによる結果が大きいと考えられたが、気温が高くても飛来が終息する地域もあり、気温以外の要因も関与しているのではないかと思われた。

6) シマカ類の殺虫剤抵抗性とその捕食者に関して、2011年11月に九州(熊本、宮崎、鹿児島)および沖縄県(本島、与那国島)において、道路脇に放置もしくは保管されている古タイヤから蚊の幼虫を採集し、ピレスロイドに対する抵抗性調査を実施した。沖縄では本島および与那国島のいずれの島からもシマカ類が採集され、また、ベトナムのネッタイシマカにおいて観察されたようなピレスロイドに対する極度の低感受性は見られなかった。長崎市内の公園で採集されたヒトスジシマカコロニーの殺虫剤感受性を、日本各地で採集された同種コロニーと比較したところ、DDTに対する抵抗性が全国的に普遍化していることが明らかとなった。ピレスロイドに対する抵抗性も数カ所で散見されたが、ナトリウムチャンネルの遺伝子変異(*kdr*)は全く検出されず、DDTとの交差抵抗性については現在のところ確たる証拠は見つかっていない。

水瓶に発生する捕食性昆虫の種構成を明らかにするため、ベトナム南部のタンチャンにおいて調査を実施した。その結果、チビズムシ類とカタビロアメンボ類がネッタイシマカ幼虫の捕食者であることが明らかとなった。

7) 新潟市佐潟周辺における豚舎でのコガタアカイエカの発生状況を把握するため、昨年引き続き今年度(4月から11月まで)同じ豚舎において蚊の捕集調査を試みた。2010年度は、アカイエカの捕集ピー

クは7月8日と8月19日の2回認められ、コガタアカイエカの捕集ピークは8月19日に認められた。しかし、消長調査として不十分だったため、今年度は4月20日から開始し、2週連続して捕集が認められなくなるまで実施することとした。その結果、コガタアカイエカは8月25日に752頭捕集されピークが認められた。アカイエカの捕集数のピークは6月22日と8月25日の2回認められた。2010年、2011年共にコガタアカイエカのピークはアカイエカの2回目のピークと同じ捕集日であった。なお、気象庁の主な観測地点において、コガタアカイエカのピークを迎えた1週間前に湿った西よりの風が観測されており、ピークの原因が長距離飛翔によるものと示唆された。

8) コガタアカイエカの集団飛来が2010年9月中旬～12月の期間、東京都の都市域にある公園で再確認された。2010年の飛来密度は2007年と同レベルで、2008年の1/3であった。飛来個体を解剖して卵巣の形態を観察した結果、経産雌の割合は2.4%、休眠している個体の割合は90.5%で、2007年～2009年の調査結果とほぼ同様の結果であった。2008年～2010年の解剖結果を集計したところ、経産雌の休眠率は29% (7/27) で、未經産雌の96% (590/616) よりも低く、統計的に有意であった。また、産卵経験がありかつ休眠している個体の割合は、1.0% (7/640) と推定された。翌春の捕獲個体数は合計29雌であった。

9) 石川県河北潟の周辺および富山県氷見市において感染症媒介蚊の発生状況を把握することを目的に調査を行ったところ、河北潟干拓地域では7種類24,664個体の蚊が捕集され、98%をアカイエカ群とコガタアカイエカが占めた。干拓地内部では周辺外部に比べ多数のアカイエカ(57.9%)とコ

ガタアカイエカ(41.0%)が捕集された。干拓地の周辺外部ではそれとは逆にコガタアカイエカ(86.2%)の方がアカイエカに比べ明らかに多く捕集された。宝達志水町では6種類の蚊が捕集されたが、97%をコガタアカイエカが占めた。全体の捕集数は河北潟干拓地に比べ1/5と少なかった。富山県氷見市加納では10種類の蚊が捕集され、石川県では捕集されなかったシナハマダラカが少数捕集された。この地域でもコガタアカイエカが79.5%と最も多く捕集されたが、全体の捕集数は河北潟干拓地の1/8と明瞭に少なかった。

10) 2011年6月中～下旬と9月下旬に、漁港・釣り場を中心とした富山県内の海辺12地点にて、蚊類幼虫を調査した。10地点で、3属7種の蚊類が採集された。ヤマトヤブカは5地点で、ヒトスジシマカは4地点で、そしてアカイエカ群は3地点で採集され、個体数も多かった。その他の種：キンパラナガハシカ、トウゴウヤブカ、ヤマダシマカ、クシヒゲカ亜属の1種は、1、2地点で採集されたのみであった。それらのうち、海岸で発生するとされるトウゴウヤブカは東部の1地点で1頭が採れたのみであった。したがって、富山県内の海辺では、ヤマトヤブカ、ヒトスジシマカ、およびアカイエカ群による被害が発生している可能性が高いと考えられる。蚊幼虫が採集された水溜りの塩分濃度は、ヤマトヤブカとヒトスジシマカが生息していた1カ所(0.2%)を除き、すべて0%であった。また、調査時に採集した捕食性水生昆虫は、チビゲンゴロウ成虫のみであった。

11) 京都市内の蚊の発生状況を調査した。本年度は歴史的建造物も多く現存し、国内外の観光客が多く訪れる京都市内の、町屋を含む個人住宅や世界遺産に登録されている古刹の2寺院で、CDCトラップや人

囷法で成虫を採集した。その結果得られた蚊相や生息密度の地域差の要因を明らかにするため、空間解析を試みた。その結果、ある時期の寺院での成虫の人囷法では、高密度に蚊が発生していることが明らかとなった。今回は、京都の成虫の蚊相を報告し、2003-2004年にかけて実施した東京周辺の住宅地の蚊相と比較した。この結果は都市域の感染症媒介蚊の監視システム構築の基礎資料としても重要である。

1 2) 愛玩動物に寄生するマダニ類とノミ類は、人獣共通感染症の各種病原体を媒介する可能性を有する。そこで、2011年6~12月に、富山県において、愛玩動物(イヌ39頭とネコは31頭)に寄生するマダニ類とノミ類の種構成及び保有病原体について調査した。イヌからは3種のマダニ類と2種のノミ類が得られ、これらのうちフタトゲチマダニとネコノミが優占種と考えられた。ネコからはネコノミとミカドケナガノミが得られ、ネコノミが優占種と考えられた。ミカドケナガノミは、通常は野生中型肉食獣(タヌキやイタチなど)に寄生する種であることから、本調査結果は、飼育下のイヌとネコも、野生中型肉食獣の外部寄生虫に寄生されうることを示唆している。マダニ類とノミ類からDNAを抽出し、各種病原体(リケッチア、エーリキア、アナプラズマ)の遺伝子検出を試みたが、いずれも検出限界以下であった。愛玩動物の行動圏内(住宅街や公園等)に生息するマダニ類のリケッチア保有率は、山岳地帯のそれより低いと考えられた。

1 3) 震災・津波によって蚊の発生が助長され、蚊媒介性感染症の発生が懸念されたことから、岩手県陸前高田市と宮城県気仙沼市で6月から10月まで定期的に7~8回、福島県南相馬市で9月18-19日に蚊の発生調査をドライアイストラップで行った。その結果、アカイエカが一夜で3,088個体、コガタアカイエカが1,430個体、ヒトスジ

シマカが62個体、イナトミシオカが58個体、シナハマダラカが13個体、トウゴウヤブカが8個体捕集されるトラップ定点がみられ、とくに前2者が顕著に多数捕集された。幼虫が採集される溜水環境は調査地域毎に、被災した水田・家屋跡・地表の溜りなど多数が確認され、それらからはシナハマダラカとコガタアカイエカ、さらにイナトミシオカが採集された。アカイエカ群は被災地に残った井戸、水槽、用水路・側溝の溜りなどから多数が採集された。また、被災家屋跡に露出した便槽・浄化槽と被災漁船からは高率に多数のトウゴウヤブカが採集された。

1 4) 東日本大震災の巨大地震と津波による環境破壊が疾病媒介蚊の発生にどのような影響を与えているかを明らかにするため、福島県北部海岸沿いに分布する水田地帯を対象とした幼虫調査を2011年9月に実施した。得られた結果を宮城県南部で8月末に行われた幼虫調査結果と比較し、以下の結果が得られた。津波の被災地には様々な塩分濃度の水域が形成され、その約80%に蚊の幼虫が発生していた。発生が確認された種類は、イナトミシオカ、コガタアカイエカ、シナハマダラカ/エセシナハマダラカ、アカイエカであった。水域の塩分濃度が0~1%程度であれば、イナトミシオカやコガタアカイエカ、シナハマダラカの幼虫発生源として利用されうる。

1 5) 2011年3月11日に発生した東日本大震災の被災地での蚊の調査において、宮城県南部の水田地帯を対象として、津波による環境破壊が蚊の発生量と分布にどのような影響を与えているかを明らかにするため、2011年6, 7, 8月に現地調査を行った。調査はトラップを用いた成虫採集と柄杓による幼虫採集によって行った。ドライアイストラップによる成虫