

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

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

研究分担者 山内健生 富山県衛生研究所 主任研究員
研究分担者 小林睦生 国立感染症研究所昆虫医科学部 部長
研究協力者 渡辺 護 国立感染症研究所昆虫医科学部 客員研究員

2010 年に「沖縄那覇」「福岡行橋」「福岡若宮」「石川金沢」「新潟長岡」「北海道旭川」で採集されたトコジラミの内、「沖縄那覇」がピレスロイド系のフェントリンとペルメトリンに対して高度の抵抗性を示し、「北海道旭川」が低度の抵抗性であることが明らかになった。先に試験した「千葉」や「富山」などと比較すると、「千葉」が最も低抵抗性比が高く、「沖縄那覇」はそれに次いだ。全般的には各地のトコジラミともピレスロイド剤に高い抵抗性の発現が認められ、実質的な駆除は望めないと思われる。有機リン剤とカーバメイト剤に対しても低度の抵抗性が認められるが、丁寧な散布を行うことで駆除は可能と考えられる。

A. 研究目的

先に、2001 年～2009 年に富山県、石川県、千葉県で採集されたトコジラミに対する殺虫剤の感受性を報告した。それによると 3 県のトコジラミともにピレスロイド系のフェントリンとペルメトリンに対して高度の抵抗性、有機リン系のディクロルボスとフェントロチオンに対して低度の抵抗性の発現を確認した。とくに、千葉市の簡易ホテルから採集されたトコジラミはフェントリンとペルメトリンに対して高度の抵抗性が発現していることが明らかになり、採集地域によって殺虫剤に対する感受性が異なることが強く示唆された。

一方で、2006 年頃から国内各地でトコジラミの吸血被害が増加しており、害虫駆除

業者などによって駆除作業が行なわれているが、一部で駆除に失敗する例が問題になっている。その失敗の原因の一つにトコジラミの殺虫剤に対する抵抗性の発現が考えられ、国内各地のトコジラミの殺虫剤感受性レベルを把握する必要がある。今回、沖縄県、福岡県、石川県、新潟県、北海道のビジネスホテルで採集したトコジラミを入手し、飼育群の確立が出来たので主要 5 種殺虫剤に対する感受性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 供試トコジラミの由来

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、

1972年頃から(財)日本環境衛生センター環境生物部で飼育維持されてきた系統。殺虫剤感受性系統。2006年11月28日に日本環境衛生センターから分与を受け、その後富山県衛生研究所で飼育繁殖してきた個体群。

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した♀10♂10個体と幼虫12個体を出発個体群として富山県衛生研究所で飼育繁殖してきた系統。

3) 福岡行橋系統：2010年10月12日にビジネスホテルで採集した♀11♂6個体と幼虫13個体を出発個体群として富山県衛生研究所で飼育繁殖してきた系統。

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した♂1個体と老齢幼虫4個体を出発個体群として富山県衛生研究所で飼育繁殖してきた系統。

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した♂1個体と老齢幼虫3個体を出発個体群として富山県衛生研究所で飼育繁殖してきた系統。

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した♀2♂2個体と幼虫6個体を出発個体群として富山県衛生研究所で飼育繁殖してきた系統。

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♀8♂4個体と老齢幼虫11個体を出発個体群として富山県衛生研究所で飼育繁殖してきた系統。

これらの個体群は温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、照度約200ルクスの15明9暗の飼育室で、小型水槽(18L×28W×23H)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て来た。なお、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。

2. 供試殺虫剤

全て市販製剤を用いた。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%水性乳剤を、有機リン剤はディクロルボス5%乳剤とフェントロチオン10%乳剤を蒸留水で1%に希釈して、カーバメイト剤はプロポクスル1%油剤をそのまま試験に用いた。

3. 試験方法

1) 濾紙継続接触法：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 $50\text{ml}/\text{m}^2$)、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 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

2) 腹面微量滴下法：各薬剤の1%液を、リピーティングデスペンサー(Hamilton, PB600-1)に、 $25\mu\text{l}$ 微量注射器(Hamilton, #702)を装着して、 $1\mu\text{l}$ 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 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

C. 研究結果

表1に、殺虫剤の残渣面に触れる効果を想定した、濾紙継続接触法による成績を示した。「福岡若宮」と「石川金沢」はトコジラミ個体数が少なく試験を行わなかった。殺虫剤感受性の「帝京大系」は、試験した5薬剤ではプロポクスルで最も感受性が高く50%致死時間(LT50値)は21分であった。次いでディクロルボスの35分、フェントロチオンの90分、ペルメトリンの210分、フ

フェノトリンの330分であった。これに対して各地採集トコジラミの感受性をみると、プロポクスルに対しては「沖縄那覇」のLT50値が最も短く28分20秒、逆に最も長いのは「福岡行橋」の46分であり、最長と最短の比は1.63で差は小さいと考えられる。ディクロルボスでは「北海道旭川」の94分20秒が最短で、「沖縄那覇」の230分が最長であり、その比は2.44でプロポクスルよりも差は大きくなった。同じ有機リン系のフェニトロチオンでは最短が「北海道旭川」の145分30秒、最長が「沖縄那覇」の500分で、その比は3.44でさらにプロポクスルよりも差は大きくなり、地域差が示唆される。一方、ピレスロイド系のペルメトリン、フェノトリンに対しては24時間経過後まで観察を行ったが、各地から採集したトコジラミのLT50値は求められなかった。最終的には12日経過後(288時間=17,280分)の死亡率を観察して、実験を打ち切った。フェノトリンをみると「北海道旭川」が12日後の死亡率が90%で最も高く、「沖縄那覇」が20%で最も低かった。単純にその比を計算すると4.5になり、地域差が大きくなったと思われる。同様にペルメトリンでは「北海道旭川」で100%が死亡し、「沖縄那覇」では20%の死亡率で最も低かった。単純にその比を計算すると5.0になり、地域差はさらに大きくなった。

表2に、速効的效果を知る方法として、1%剤の腹面滴下法の成績を死亡までの最短と最長時間、平均時間と標準偏差で示した。「帝京大系」ではプロポクスルの平均時間は8秒15で極めて短時間で死亡する。一方、ディクロルボスは2分2秒、フェニトロチオンは20分31秒、ペルメトリンは9分31秒、フェノトリンは17分52秒であり、フェニトロチオンが最も時間を要した。この殺虫剤感受性系の「帝京大系」に対して、「沖縄那覇」に対するプロポクスルでは

2.20倍、フェニトロチオンで2.83倍、ディクロルボスで2.49倍の時間を要した。ペルメトリンとフェノトリンでは滴下後24時間まで観察を行ったが平均時間は求められなかった。最終的には濾紙継続接触法と同様12日後までの観察で打ち切った。両薬剤とも死亡個体が現れたのは192時間後であった。「福岡行橋」の「帝京大系」に対する比はプロポクスルで2.01倍、フェニトロチオンでは3.86倍、ディクロルボスでは2.64倍の時間を要したが、ペルメトリンでは死亡個体が現れたのは72時間後、フェノトリンで144時間後であった。同様に「帝京大系」に対する比は、「福岡若宮」ではプロポクスルで2.50倍、フェニトロチオンで4.10倍、ディクロルボスでは3.73倍の時間を要したが、ペルメトリンでは死亡個体が現れたのは「福岡行橋」と同じく72時間後、フェノトリンで144時間後であった。

「石川金沢」ではプロポクスルで2.63倍、フェニトロチオンで4.31倍、ディクロルボスで3.68倍の時間を要したが、ペルメトリンでは591.2倍の時間を要し、さらにフェノトリンでは最初の死亡個体が現れたのは滴下後168時間であった。「新潟長岡」ではプロポクスルで2.33倍、フェニトロチオンで2.85倍、ディクロルボスで2.33倍の時間を要したが、ペルメトリンでは死亡個体が現れたのは96時間後、フェノトリンで144時間後であった。「北海道旭川」ではプロポクスルで1.45倍、フェニトロチオンで1.95倍、ディクロルボスで1.84倍と、他の採集地トコジラミに比べ最も低い倍率であった。ピレスロイドにおいても、150分までに全個体が死亡し平均値が求められ、その比はペルメトリンで5.76倍、フェノトリンでは4.87倍の時間を要するに留まり、今回試験を行った各地採集トコジラミの中では最も感受性が高かった。

なお、対照として蒸留水、70%エタノー

ル、アセトンの試験も行ったが、24時間経過しても死亡する個体は現れなかった（一部は288時間後まで観察を行ったが死亡個体は現れなかった）。ただ、70%エタノールで滴下直後に仰転する個体が多くみられたが、数時間後には蘇生し288時間は生存した。

先に報告した「富山01」、「富山08」、「石川」、「千葉」との比較を試みたのが表3である。同時に全てのトコジラミを共試するのが良いが、観察容器と場所の準備が出来なかったので、別々の試験成績で比較を行った。濾紙継続接触法ではLT50値を求められなかった場合があり、その場合は288時間後の死亡率で基準となる「帝京大系」との比を下式によって求めた。つまり、288時間後(17,280分)に50%が死亡した場合、「帝京大系」が50%死亡した時間(LT50値)で除することで、おおよその比が求められると判断した。

$$\{17,280 \times (50/288 \text{ 時間後の死亡率}) / \text{帝京大系の LT50 値}\} = \text{帝京大系との比}$$

例、フェノトリンでの「沖縄那覇」の場合 = $\{17,280 \times (50/20) / 330\} = 130.9$
また、腹面微量滴下法においても死亡までの平均時間が求められない場合があり、その場合には各地採集トコジラミの各殺虫剤に対する最短死亡時間を、「帝京大系」の最短時間で除することで求めた。

なお、先の試験成績（渡辺，2010）と、今回の成績において「帝京大系」の値が微妙に異なるが、それは無視して比較を試みた。

濾紙継続接触法では「千葉系」においてフェノトリンに対して、倍率が求められない極めて高度な抵抗性の発現が認められた。「千葉系」の他は「沖縄那覇」で130.9倍と最も高く（抵抗性比が高い）、「福岡行橋」、「新潟長岡」の65.5、「石川」の42.1などであり、「富山08」が3.5倍と最も低かつ

た（抵抗性比が低い）。ペルメトリンに対しては「沖縄那覇」で205.7倍と最も高く、「千葉系」が127.8、「新潟長岡」が102.9と続き、「富山08」が1.2倍と最も低かった。有機リン剤では「沖縄那覇」においてディクロルボスで6.6倍、フェニトロチオンで5.6倍が最も高く、「富山08」において最も低く前者で1.3倍、後者で1.2倍であり全般的にピレスロイドよりも明らかに低い。カーバメイト系のプロポクスルではさらに、「帝京大系」との比は小さく、「福岡行橋」の2.2倍から「富山01」の1.1倍の範囲であった。腹面微量滴下法でも「千葉系」はフェノトリンに対して倍率が求められない極度の抵抗性の発現が認められた。「千葉系」の他は「沖縄那覇」で743倍と高く、「石川金沢」666倍、「福岡行橋」、「福岡若宮」、「新潟長岡」の557倍と高度の抵抗性を示したが、「石川」、「富山08」、「北海道旭川」、「富山01」は8.2倍から4.3倍と低い抵抗性を示した。ペルメトリンに対しては「沖縄那覇」1,843倍、「新潟長岡」921倍、「千葉」827倍と明瞭に高く、「福岡行橋」、「福岡若宮」691倍、「石川金沢」591倍と高く、「石川」、「北海道旭川」、「富山01」、「富山08」は8.7倍から4.5倍と低度の抵抗性比を示した。有機リンのディクロルボスでは「福岡若宮」と「石川金沢」の3.7倍から「富山01」の1.5倍の範囲で、フェニトロチオンでは「石川金沢」の4.3倍から「千葉」の1.8倍であった。カーバメイト系のプロポクスルでは「石川金沢」「富山01」「富山08」の2.6倍から「北海道旭川」の1.5倍の範囲で、今回試験した殺虫剤の中では最も抵抗性比が小さかった。

D. 考察

全般的には「北海道旭川」、「富山01」のトコジラミが「帝京大系」との比が小さく、抵抗性が低く、「千葉系」、「沖縄那覇」で抵

抗性が高い。とくに、「千葉系」のフェノトリンに対する抵抗性は極度に高いと言える。フェノトリン、ペルメトリンなどのピレスロイドに対しては「福岡行橋」「福岡若宮」「石川金沢」「新潟長岡」も比較的高度な抵抗性を発現しており、「北海道旭川」「富山01」「富山08」「石川」の低度の抵抗性とは異なり、トコジラミの採集地によって殺虫剤の効果が異なることが示唆され、各採集地で独自に抵抗性を発現させたか？または、国内各地で吸血被害が急激に増えている現状から、国内外から同時の持ち込み・移動が疑われる。

ピレスロイド剤に対して強度の抵抗性であることは、ピレスロイド剤は駆除作業が容易であることと、人畜に対する毒性が比較的低いことから、国内ではフェノトリンやペルメトリンの空間噴霧 (ULV) が多用され、諸外国では lambda-cyhalothrin や deltamethrin など多種のピレスロイドが利用され、それが抵抗性発現の一因になった可能性は否定出来ない。一方で、トコジラミは帝京大系の成績から、DDT と同様に元々ピレスロイドには低感受性であったと思われる。何れにしても、ピレスロイドが主剤の ULV、煙霧剤、蒸散剤、噴射剤などは駆除には寄与しないと考えるべきと思われる。

今回の試験成績からは、トコジラミの駆除にはプロポクスの利用が考えられるが、実際の施工には臭いや油染みに注意が必要と思われる、更に一般家庭では毒性についても考慮する必要がある

E. 結論

今回「沖縄那覇」「福岡行橋」「福岡若宮」「石川金沢」「新潟長岡」「北海道旭川」で採集したトコジラミの内、「沖縄那覇」がピレスロイド系のフェノトリンとペルメトリンに対して高度の抵抗性を示し、「北海道旭

川」が低度の抵抗性であることが明らかになった。先に試験した「千葉」や「富山」などと比較すると、「千葉」が最も低抵抗性比が高く、「沖縄那覇」はそれに次いだ。全般的には各地のトコジラミともピレスロイド剤では確実な駆除は望めないと思われる。有機リン剤とカーバメイト剤に対しては低度の抵抗性が認められるが、丁寧な散布を行うことで駆除は可能と考えられる。

F. 健康危険度情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

渡辺 護・谷口敬敏・山内健生. 2010年に国内数箇所では採集したトコジラミの殺虫剤感受性. 衛生動物学会第64回大会発表予定, 2012年3月29-31, 上田市.

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 濾紙継続接触法による各系トコジラミ成虫に対する5種殺虫剤の50%死亡時間(図解法)

殺虫剤	トコジラミの系統				
	日環セ	沖縄	福岡行橋	新潟長岡	北海道旭川
フェントリン 1% 乳剤	330分	1)	3)	5)	7)
ペルメトリン 1% 乳剤	210分	2)	4)	6)	8)
ディクロルボス1%乳剤	35分	230分	130分	185分	94分20秒
フェニトロチオン1%乳剤	90分	500分	1901分	220分	145分30秒
プロポクスル 1% 油剤	21分	28分20秒	46分	36分10秒	30分

1)12日(17,280分)経過後の死亡率20%.

2)12日経過後の死亡率20%.

3)12日経過後の死亡率40%.

対照(蒸留水)の12日経過後の死亡率 0%.

4)12日経過後の死亡率70%.

5)12日経過後の死亡率40%.

6)12日経過後の死亡率40%.

7)12日経過後の死亡率90%.

8)12日経過後の死亡率100%.

表2 腹面微量滴下法による各系トコジラミ成虫に対する5種殺虫剤の死亡までの時間

殺虫剤	時間	トコジラミの系統						
		日環セ	沖縄	福岡行橋	福岡若宮	石川10	新潟長岡	北海道旭川
フェントリン 1% 乳剤	最短	15分30秒	192時間	144時間	144時間	172時間	144時間	60分
	最長	22分						150分
	平均	17分52秒	1)	2)	3)	4)	5)	86分54秒
	S.D.	2分15秒						22分56秒
ペルメトリン 1% 乳剤	最短	6分15秒	192時間	72時間	72時間	48時間	96時間	30分
	最長	17分30秒				144時間		95分
	平均	9分31秒	6)	7)	8)	93時間36分	9)	54分45秒
	S.D.	3分10秒				25時間		20分49秒
ディクロルボス1%乳剤	最短	1分10秒	3分30秒	4分15秒	6分30秒	6分30秒	3分15秒	2分00秒
	最長	3分30秒	7分00秒	7分30秒	9分00秒	8分30秒	7分00秒	5分30秒
	平均	2分02秒	5分04秒	5分22秒	7分35秒	7分29秒	4分44秒	3分45秒
	S.D.	3分10秒	1分01秒	59秒	42秒	35秒	1分01秒	59秒
フェニトロチオン1%乳剤	最短	10分	45分	50分	55分	60分	45分	25分
	最長	33分	90分	120分	130分	115分	90分	54分
	平均	20分31秒	58分06秒	79分12秒	84分12秒	88分30秒	58分24秒	40分06秒
	S.D.	6分50秒	10分43秒	23分44秒	20分46秒	15分05秒	10分45秒	14分05秒
プロポクスル 1% 油剤	最短	5秒	12秒	10秒	15秒	15秒	15秒	7秒
	最長	12秒	25秒	25秒	25秒	27秒	25秒	15秒
	平均	8秒15	17秒90	16秒40	20秒40	21秒45	18秒95	11秒85
	S.D.	2秒00	3秒90	4秒00	3秒00	3秒69	3秒93	2秒54

1) 288時間後の死亡率は15%.

2) 288時間後の死亡率100%.

3) 288時間後の死亡率 0%.

4) 288時間後の死亡率 25%.

5) 288時間後の死亡率 25%.

6) 288時間後の死亡率 30%.

7) 288時間後の死亡率 25%.

8) 288時間後の死亡率 30%.

9) 288時間後の死亡率 45%.

表3 各地採集トコジラミの帝京大系に対する感受性の比(=抵抗性比)

1) 濾紙継続接触法(LT50値の比較)

殺虫剤	トコジラミの系統 ¹⁾								
	帝京大系	沖縄那覇	福岡Y	新潟長岡	北海道旭川	富山01	富山08	石川	千葉
フェントリン 1% 乳剤	1.0	130.9	65.5	65.5	29.3	30.8	3.5	42.1	²⁾
ペルメトリン 1% 乳剤	1.0	205.7	58.4	102.9	41.1	5.4	1.2	6.1	127.8
ディクロルボス1%乳剤	1.0	6.6	3.7	5.3	2.7	1.4	1.3	1.7	3.2
フェニトロチオン1%乳剤	1.0	5.6	2.1	2.4	1.6	1.5	1.2	1.9	3.6
プロポクスル 1% 油剤	1.0	1.4	2.2	1.7	1.4	1.1	1.7	1.8	2.0

¹⁾富山01、富山08、石川、千葉は渡辺(2010)の成績から引用作成した。

²⁾288時間後の死亡率0%。

網掛け数値は288時間後の死亡率から算出した。

2) 腹面微量滴下法(死亡までの平均時間で比較)

殺虫剤	トコジラミの系統 ¹⁾										
	帝京大系	沖縄那覇	福岡Y	福岡W	石川金沢	新潟長岡	北海道旭川	富山01	富山08	石川	千葉
フェントリン 1% 乳剤	1.0	743	557	557	666	557	4.9	4.3	6.0	8.2	³⁾
ペルメトリン 1% 乳剤	1.0	1,843	691	691	591	921	5.8	4.9	4.5	8.7	827
ディクロルボス1%乳剤	1.0	2.5	2.6	3.7	3.7	2.3	1.8	1.5	1.8	1.8	2.0
フェニトロチオン1%乳剤	1.0	2.8	3.9	4.1	4.3	2.9	2.0	2.2	2.0	2.3	1.8
プロポクスル 1% 油剤	1.0	2.2	2.0	2.5	2.6	2.3	1.5	2.6	2.6	2.2	1.8

³⁾96時間後の死亡率0%。

網掛け数値は最短死亡時間との比で示した。

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)
分担研究報告書

日本脳炎ウイルス主要媒介蚊から分離された新規ラプトウイルスの性状解析

分担研究者 沢辺京子 (国立感染症研究所・昆虫医科学部)

研究協力者 鎌田龍星・伊澤晴彦・星野啓太・津田良夫・佐々木年則(同・昆虫医科学部)

梁瀬 徹 (動物衛生研究所九州支所ウイルス部門)

研究要旨

国内で捕集されたコガタアカイエカから棒状の特異な粒子形態を持つ未知ウイルスが分離された。本ウイルスゲノムの全塩基配列を決定し、遺伝子構造解析ならびに分子系統解析を行った結果、本ウイルスはラプトウイルス科に属する新規 RNA ウイルスであることが判明し、*Culex tritaeniorhynchus rhabdovirus* (CTRV)と命名した。特筆すべきは、CTRVは自身のゲノム中にスプライセオソーム型のイントロンを有しており、宿主のRNA スプライシング機構を利用して成熟 mRNA を発現するという、これまでに全く例のない新規のラプトウイルスであることが明らかになった。さらに、CTRV のウイルス学的諸性状を明らかにすることを目的として、感染細胞内におけるウイルス RNA の局在ならびに各種培養細胞における増殖性について検討した。

A. 研究目的

蚊は吸血により人に重篤な感染症をもたらすウイルス等の病原体を媒介するため、公衆衛生上、特に重要な衛生害虫である。世界では日本脳炎やデング熱などに代表される蚊媒介性ウイルス(アルボウイルス)感染症の流行が続いており、それらの自然生態や流行動態の把握は、予防対策上、極めて重要である。

我が国におけるウイルス保有蚊調査は、コガタアカイエカの日本脳炎ウイルス調査に代表されるが、その他のアルボウイルスを対象とした網羅的な調査は、これまでにほとんど行われてこなかった。我々の研究グループでは、2003 年以降、国内捕集蚊からのウイルス分離調査を継続して行い、これまでに複数の新規ウイルスを分離・発見してきた。本研究では、日本脳炎ウイルスの主要媒介蚊であるコガタアカイエカから分離された新規ラプトウイルスについて、そのウイルス学的諸性状を明らか

にしたので報告する。

B. 研究方法

1. ウイルス分離

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。捕集蚊を 20 個体 1 プールとし、MEM 培養液中で細胞破砕機 MM300 (QIAGEN) を用いて蚊を破砕し、ウイルス分離用乳剤を調整した。乳剤を蚊由来培養細胞 C6/36 に接種し、28°C, 5% CO₂ 条件下で 7 日間培養した。その後、同条件下で 2 代盲継代培養を行った。

2. ゲノムの全塩基配列決定

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、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer を用いて 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。

3. 遺伝子解析

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。

4. 感染細胞におけるウイルスRNAの局在

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)上に固定した。固定された細胞は、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。

5. 粒子の形態観察

ウイルス培養上清を1,600gで15分間(4°C)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°C)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°C)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%グルタルアルデヒドで固定した。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。

6. 分子系統解析

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。

7. 培養細胞における増殖性

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(アフリカミドリザル腎臓由来)およびBHK21細胞(ハムスター腎臓由来)でのウイルス増殖性を調査した。各培養細胞にそれぞれウイルスを接種後、3代盲継代培養を行い、それらの細胞培養上清からRNAを抽出し、CTRV特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。

C. 結果

1. ゲノムの全塩基配列決定

CTRV ゲノムは全長 11,190 nt で構成され、ゲノム上には一般的なラブドウイルスが持つ5つのウイルスタンパク質(N-P-M-G-L)に対応する各遺伝子が同様の順序でコードされていた(図 1)。また、CTRV ゲノムの両末端には、モノネガウイルス目の RNA ウイルスに共通する、パンハンドル構造をとりうる相補的塩基配列が認められた(図 2)。

2. 遺伝子解析

CTRV 各遺伝子の 5'側, 3'側末端にそれぞれ AACAU と UGAAAAAAAA のコンセンサス配列が認められ、CTRV の各遺伝子は、これら転写開始および終了シグナルにより制御されていることが推定された(表 1)。また、G 遺伝子の終点付近と L 遺伝子の始点付近は一部重複しており、このことが、CTRV の L 遺伝子の発現制御に関わる可能性が示唆された。

また、シグナル予測解析の結果、CTRV の L 遺伝子にはスプライセオソーム型のイントロン(76 nt)が存在することが示唆された。Strand-specific RT-PCR(図 3)ならびに Northern hybridization(図 4)を行った結果、CTRV は転写の過程において、宿主の RNA スプライシング機構を利用して遺伝子発現を行うことが示唆された。

3. 感染細胞におけるウイルス RNA の局在

in situ hybridization の結果, 感染細胞において, CTRV ゲノムの -鎖 (=ゲノム RNA) は核に局在し, +鎖 (=アンチゲノム RNA, mRNA) は核および細胞質に局在することが明らかとなり(図 5), CTRV は専ら宿主感染細胞の核内で複製・転写を行うことが強く示唆された。

4. 粒子の形態観察

電顕観察の結果, CTRV は特異な粒子構造をとり, 表面構造および内部構造は既知のラブドウイルスに類似しているものの, その形態は, 典型的な砲弾状ではなく, 極端に長い棒状であることが明らかになった(図 6)。

5. 分子系統解析

分子系統解析の結果, CTRV は既知のラブドウイルスとは離れた類縁関係にあり, 現時点では, ラブドウイルス科のいずれの属にも属しないと考えられた(図 7)。

6. 培養細胞における増殖性

各種培養細胞でのウイルス増殖性を調査した結果, 蚊由来 C6/36 細胞では CTRV の増殖が認められたものの, 哺乳動物由来 Vero 細胞および BHK21 細胞では CTRV の増殖は確認されなかった。

D. 考察

日本脳炎ウイルスを媒介するコガタアカイエカからこれまでに報告のない新規ラブドウイルスが分離・発見された。今回の調査では哺乳動物由来培養細胞でのウイルス増殖は明確には認められなかったものの, ラブドウイルスには, 一部アルボウイルスも含まれることから, 今後は CTRV がある種の脊椎動物への感染性を有するアルボウイルスである可能性も視野に入れ, その自然生態や宿主域など

を詳細に検討する必要がある。

CTRV は転写の過程において, 宿主の RNA スプライシング機構を利用して遺伝子発現を行うことが明らかになった。これまでスプライシングに依存した遺伝子発現を行う RNA ウイルスは, インフルエンザウイルス, トゴトウイルス(ともにオルソミクソウイルス科), ボルナウイルス(ボルナウイルス科)のみが知られており, 今回初めて, ラブドウイルスにおいてもスプライシング依存型の遺伝子発現機構が存在することが確認された。一般に, RNA ウイルスにおけるスプライシングの意義は, 選択的スプライシングによる発現遺伝子の多様化が考えられる。しかし, CTRV における今回の発見は選択的スプライシングとは明らかに異なることから, 発現遺伝子の多様化とは別の意義が考えられる。G 遺伝子との重複も併せて, CTRV の L 遺伝子発現は高度に制御されていると考えられる。

多くのラブドウイルスは感染細胞の細胞質内で遺伝子の複製・転写が行われるが, CTRV は宿主細胞の核内で遺伝子の複製・転写を行うことが判明した。このことは, 前述のスプライシングに大きく関わる特性であるが, 一方で, RNA ウイルスにとっては, 感染細胞内において, 細胞質よりも核にゲノムを移行するほうが, 宿主の自然免疫応答を回避する点で有利である可能性も考えられる。同時に, RNA ウイルスにとってゲノムを宿主細胞の核内に持ち込むことは, 次代へのウイルスゲノムの移行の点で有利となる可能性も考えられる。RNA ウイルスの構成タンパク質には核移行シグナルを含むものが多く存在するが, その生物学的意義は不明な点が多い。CTRV におけるウイルスゲノムの核移行の意義やメカニズムの解明は, RNA ウイルスの進化を考える上で非常に重要である。

E. 結論

- 1) 千葉県千葉市の畜舎で捕集されたコガタアカイエカから新規ラブドウイルス CTRV が分離された。
- 2) CTRV のゲノムは 11,190 nt の RNA で、ゲノム上には、一般的なラブドウイルスが持つ 5 つのウイルスタンパク質をコードする遺伝子 (N-P-M-G-L) がコードされていた。
- 3) CTRV は感染細胞の核内で複製・転写を行うことにより、宿主の RNA スプライシング機構を利用して遺伝子発現を行う、これまでに前例のないラブドウイルスであることが明らかになった。
- 4) CTRV の粒子形態は、ラブドウイルスに典型的な砲弾状ではなく、極端に長い棒状であった。
- 5) CTRV は蚊由来 C6/36 細胞では増殖が認められたものの、哺乳動物由来 Vero 細胞および BHK21 細胞では増殖が認められなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表:

Kuwata, R., Isawa, H., Hoshino, K., Tsuda, Y., Yanase, T., Sasaki, T., Kobayashi, M., and Sawabe, K. (2011) RNA splicing in a new rhabdovirus from *Culex* mosquitoes. *Journal of Virology*, 85: 6185–6196.

2. 学会発表:

鍬田龍星, 伊澤晴彦, 星野啓太, 佐々木年則, 津田良夫, 金京純, 小林睦生, 沢辺京子. 国内捕集コガタアカイエカから分離された新規ラブドウイルスの性状解析. 第 62 回日本衛生動物学会, 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

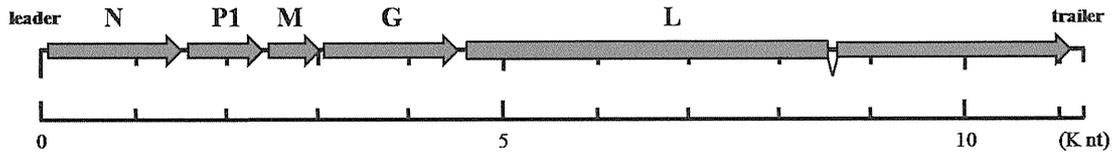


図 1. CTRV のゲノム構造

leader 3' - UGCUACUGUUUUUCUUGUGUUUGAACG ...
 trailer 5' - ACGAUGACAACAAGACAACAAACUAGC ...

図 2. CTRV ゲノムの末端配列

表 1. CTRV 遺伝子末端のコンセンサス配列

Gene junctions	Gene end	IGR	Gene start
leader/N			AACAUUAGUCA
N/P	AUUCAUGAAAAAAA	CAUC	AACAUUAAUCA
P/M	AAACGUGAAAAAAA	CUC	AACAUCACUCU
M/G	GCUCAUGAAAAAAA	CUCUU	AACAUGAAUCA
G/L	CAAAAACAUUAACAUAACUAACUCGAACUCAUGAAAAAAAACAU		
L/trailer	UCACGUGAAAAAAA		

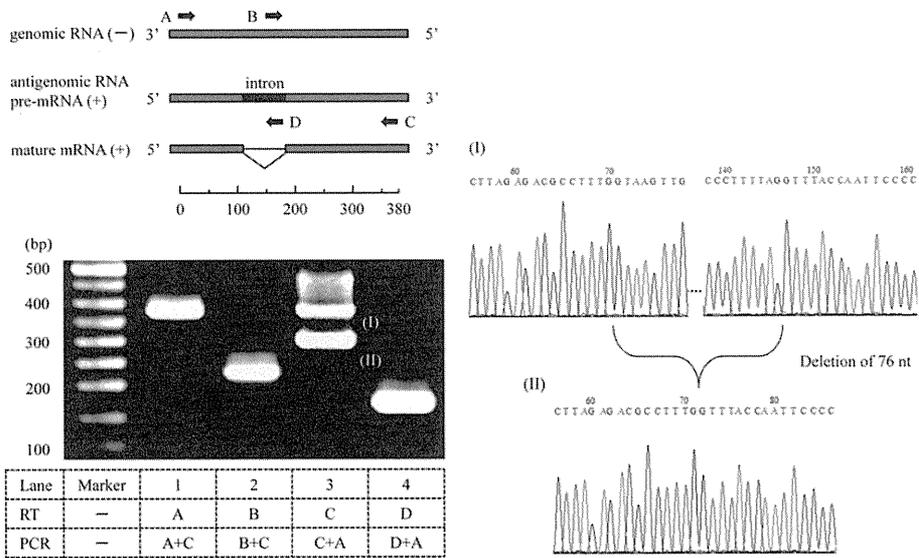
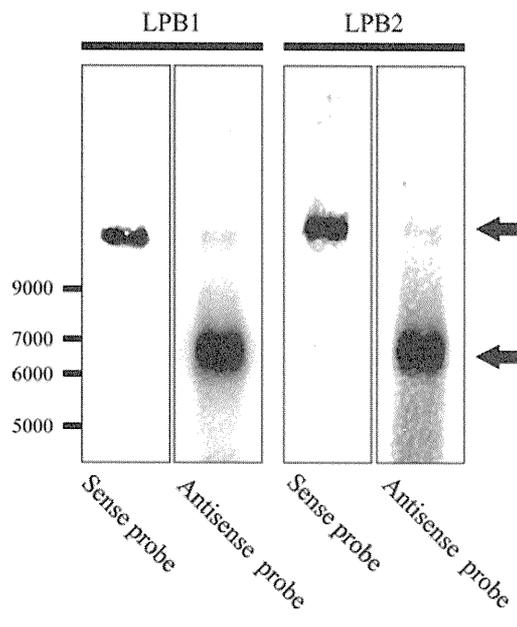
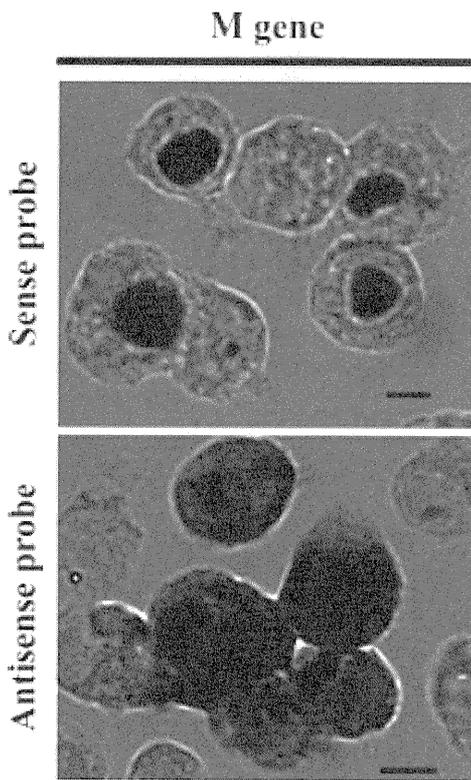


図 3. Strand-specific RT-PCR



☒ 4. Northern hybridization



☒ 5. *in situ* hybridization

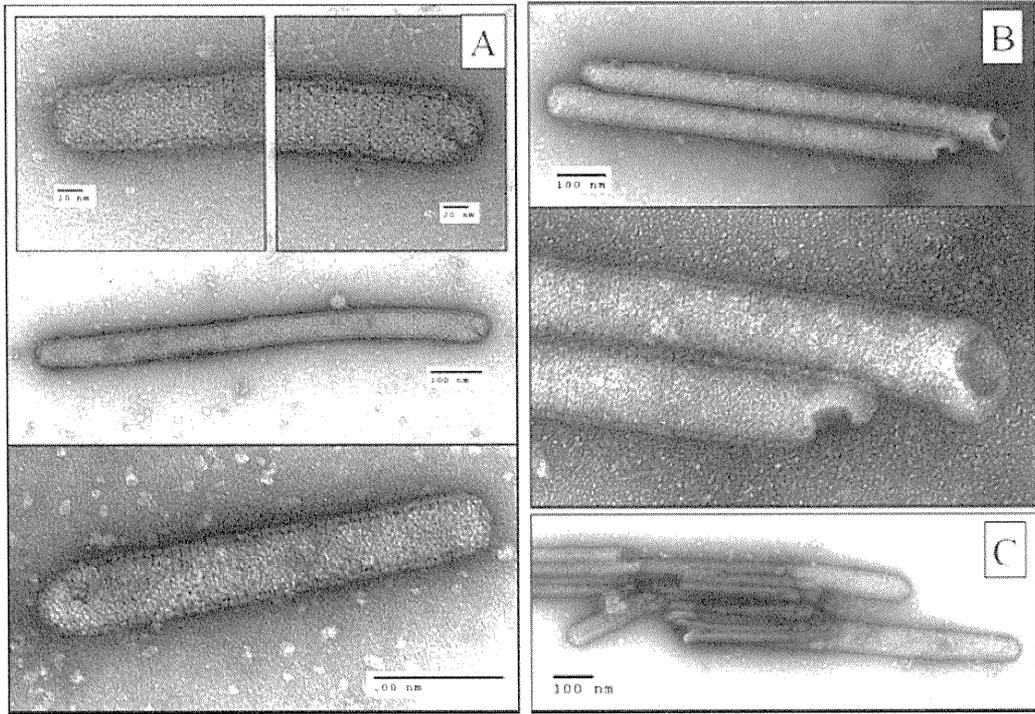


図 6. CTRV 粒子の形態

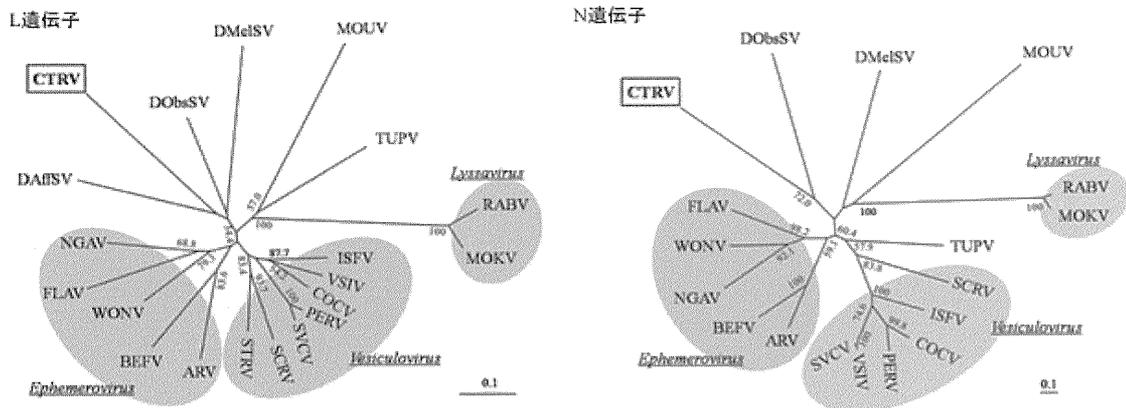


図 7. 分子系統解析

厚生労働科学研究補助金 (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

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

研究分担者 柴田 伸一郎 (名古屋市衛生研究所 主任研究員)

研究協力者 小平 彩里 (名古屋市衛生研究所 研究員)

研究要旨

アルボウイルスは節足動物によって媒介されるが、旧来より日本に存在する日本脳炎ウイルスそして日本脳炎ウイルスに血清学的に近縁なウエストナイルウイルス、さらには東南アジア諸国からの輸入が多いデングウイルス、近年東南アジアで急拡大中のチクングニアウイルスがよく知られている。平成 21 年度の本研究で日本脳炎ウイルスとウエストナイルウイルスの同時検出法を開発した。さらに、平成 22 年度の本研究においてチクングニアウイルス検出法を共同研究者の高崎らの方法を用いて蚊からのウイルス検出を試みた。平成 23 年度は 1 型から 4 型までの血清型の存在するデングウイルス検出法の効率を上げることを目的として、検査法の改良を行った。この改良検査法は、デングウイルス 1 型から 4 型遺伝子型検出を同一ウエル内で一度に検出できるよう改良を加えたマルチプレックスリアルタイム PCR 法で、デングウイルス 1 型から 4 型それぞれのウイルス RNA に対する検出に対応できることが分かった。

これらのそれぞれの検査法を用いてドライアイストラップ法あるいは 8 分間人囀法により捕獲したカに対して、C6/36 細胞から Vero 細胞への継代によるウイルス分離、高崎らのリアルタイム RT-PCR 法でチクングニアウイルスを、柴田らの RT-PCR 法で日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子検出、さらに今年度改良を試みたマルチプレックスリアルタイム PCR を用いたデングウイルス遺伝子の検出を試みた。

2011 年 5 月から 11 月の間、名古屋市内の公園延 34 ヶ所、シナハマダラカ♀2 頭、2 検査単位 (1 検査単位: 最少 1 頭~最大 50 頭を 1 プールとして処理)、ヒトスジシマカ♀1499 頭 87 検査単位、アカイエカ群♀954 頭 88 検査単位、コガタアカイエカ♀116 頭 9 検査単位、計 2571 頭 186 検査単位を調査した。

結果 C6/36 細胞から Vero 細胞によるウイルス分離ではチクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルスはじめウイルス分離はされなかった。また、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス、デングウイルスに対するそれぞれの遺伝子検出も実施したが、いずれのウイルス遺伝子も検出されなかった。

A. 研究目的

衛生研究所は、検疫所と並び防疫の最前線である。2000年に入ってウエストナイル熱の米国内での流行が始まり、2005年9月には国内への輸入症例が報告された。我々は以前より名古屋市内で捕獲した雌のカを乳剤にしてウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス分離、遺伝子検出を実施してきた。

チクングニア熱は、平成23年2月より感染症法の4類感染症として登録された。この感染症を引き起こす病原体であるチクングニアウイルスは、トガウイルス科アルファウイルス属に属するRNAウイルスである。自然界では、カ→サル→カ、カ→ヒト→カの感染環を持ち、アフリカ、インド、東南アジア諸国で、チクングニア熱が蔓延している。2007年7月には、インドで感染した人によりイタリア北部農村でチクングニアウイルスが持ち込まれ、最終的には334名に感染疑い、284症例を実験室診断した結果204名に感染が確認され、1名が死亡するという集団感染が起こった。また、2010年9月チクングニア熱のフランス国内での感染例が報告された。

日本におけるチクングニアウイルスの主たる媒介蚊は、ヒトスジシマカである。ヒトスジシマカの生息域は、日本の温暖化により北限が拡大していることが知られている。また、チクングニア熱の輸入症例数も2006年11月以降19例報告されており、いつイタリアやフランスのような国内での感染が起きても不思議ではない状態となっている。

デング熱に関しては、戦後日本で20万人

もの患者を出したが、現在は国内にウイルスは存在しない。しかし媒介蚊であるヒトスジシマカは国内に広く分布しており、再びデングウイルスが国内に常在化する危険性もある。

そこで、我々は以前より存在する日本脳炎ウイルス、そして媒介カが存在し、輸入感染症として国内に常在しかねないチクングニアウイルス、デングウイルス、ウエストナイルウイルスの調査を名古屋市内で捕獲したカに対して極力省力化し実施する方法を模索した。

B. 研究方法

名古屋市内の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(表2.)および8分間人囮法(表3.)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カを種ごとに選別し、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。捕獲されたカの内訳は、シナハマダラカ♀2頭、2プール、ヒトスジシマカ♀1499頭87プール、アカイエカ群♀954頭88プール、コガタアカイエカ♀116頭9プール、計2571頭186プールとなった。(表2.3.)

2.0mlチューブにプールされた雌のカには、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℃、13,000回転、10分間遠心し、上清を0.22μポアフィルターで濾過をし、その濾液の一部は、24ウエ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/ウエルの割合で 2 ウエル接種し、28°C CO₂ 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 代継代後 Vero 細胞に継代し直し、37°C 1 週間 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、各々のウイルス遺伝子検出を RT-PCR、マルチプレックスリアルタイム PCR を実施し確認した。

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

チクングニアウイルス遺伝子検出は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit を使用して、本研究班員の高崎氏らが開発した TaqMan プロブリアルタイム RT-PCR 法を用いた。プローブ：TaqMan MGB Probe Taq-Chik638P : FAM-TACCAGCCTGCACYC-MGB-3' プライマー (F) : Taq-Chik607F (10849) : GCR CCM TCT KTA ACG GAC AT プライマー (R) : Taq-Chik672R (10894) : GCC CCC RAA GTC KGA GGA R の プライマー・プローブセットを用い以下の反応条件で実施した。逆転写反応 48°C 30min.、PCR 酵素活性 95°C 10min.、2steps PCR 95°C 15sec. & 60°C 1min. を 45 サイクル実施した。

日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子検出は、以下のコンベンショナル RT-PCR の系を用いた。

cDNA 合成：逆転写反応は、SuperScript

III (Lifetechnologies) を用いて実施した。反応液の調整は、添付のマニュアルに従い、逆転写用プライマーは、WN Outer C : tcc gar acr gtw yyg agg gct t を使用し 30 μ l の反応系で実施した。逆転写反応は、50°C 30 分で実施後、70°C 20 分加熱し酵素を失活させた。逆転写反応により得られた cDNA、5 μ l を用いて PCR 反応を実施した。

1st PCR は、プライマーペア WN Outer S: tgg atw gar gar aat gaa tgg at / WN Outer C : tccgaracrgtwyaggaggctt で PrimeStar GXL DNA Polymerase (タカラバイオ) 98°C 10 秒、50°C 10 秒、68°C 60 秒の 3 ステップを 45 サイクル実施した。さらに Nested PCR は WN Inner S: gar gac aty tgg tgy gg / WN Inner C: cag gca gca ccg tmt rcy ca プライマーペアを用いて同様の反応条件で実施した。

デングウイルスに関しては、カより QIA amp Viral RNA Mini Kit で抽出した RNA を PrimeScript RT Reagent Kit (TakaraBio) に添付の仕様書に従い Oligo dT と Random 6 mers で逆転写を実施後、QuantiTect Multiplex PCR Kit (QIAGEN) を用いてマルチプレックス PCR (表 1.) により、1 型から 4 型の検出を一度に実施した。

C. 研究結果

デングウイルス遺伝子検出マルチプレックス PCR 系

デングウイルス検出用リアルタイム PCR 法では、FAM 一色の蛍光により 1 型から 4 型までを検出していたため 1 検体につき最低 4 種類の反応系を必要としていたため多検体検出を実施するには、時間と多

くの試薬を必要とした。今回 1 型検出に FAM-MGB、2 型検出に NED-MGB、3 型検出に VIC-MGB、4 型検出に ROX-BHQ プローブを用いることにより、デングウイルス検査を従来の 1/4 の試薬量、検体は、4 倍処理することができるようになった。

(表 1.) デングウイルスの 1 型から 4 型の陽性コントロール (10^4 、 10^2 コピー) をマルチプレックス系での検出調整例を示す。1 型から 4 型それぞれのデングウイルス遺伝子を検出することができることが分かった。

(図 1.~4.)

ウイルス分離による成績

C6/36 細胞によるウイルス分離は、ウイルス接種後 1 週間 CPE の出現の有無を観察したが CPE は見られなかったため、1 代目の細胞を上清とともに凍結融解を行い 2 代継代した。さらに CPE を観察し、CPE が見られなかったウエルについては、細胞、上清ともに凍結融解を実施後、Vero 細胞に継代した。最終的に CPE の出現は認められず、デングウイルス、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス等の分離はできなかった。

ウイルス分離上清、カ乳剤からのウイルス遺伝子検出

チクングニアウイルス遺伝子検出系リアルタイム RT-PCR では、陽性コントロール RNA は RT 反応で逆転写され、PCR 反応で増幅曲線が検出されていたが、蚊の検体から直接、もしくは、C6/36 細胞 2 代継代後 Vero 細胞継代上清からの抽出 RNA からは、増幅曲線が見られずチクングニアウイルス遺伝子は全く検出されなかった。

日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルス検出系コンベンショナル RT-PCR においては、蚊検体直接の抽出遺伝子から日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子は検出されなかった。C6/36 細胞 2 代継代後の上清からの抽出遺伝子からも日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスの遺伝子は検出されなかった。

デングウイルス遺伝子今回開発した検査法で多検体処理したが、検出されなかった。

D. 考察

日本で、デングウイルスやチクングニアウイルスを媒介しうるヒトスジシマカ、その他市内で捕獲されたシナハマダラカ、アカイエカ群、コガタアカイエカに対して、デングウイルス、チクングニアウイルス、日本脳炎ウイルス、ウエストナイルウイルスのウイルス分離、カ乳剤からの遺伝子検出、分離培養産物からの遺伝子検出を実施したが、これらのウイルスを分離または遺伝子検出することはなかった。各々のウイルスの陽性コントロール RNA を使った遺伝子増幅の確認により、検出系が機能していることを確認しているため、今回調査した名古屋市内で捕獲されたヒトスジシマカは、これらウイルスを保有していないことがわかった。

また日本に由来から存在し、国内で患者発生報告がされている日本脳炎ウイルスが検出されなかったのは、都市部の調査であるためと推測された。

現在東南アジアを中心に感染拡大が続いており、一昨年 243 名もの輸入感染症が起きているチクングニアウイルス、今年度新たに調査対象に加えたデング熱の

原因であるデングウイルスに対しても、ウイルス分離、検体から直接または培養後においてもウイルス遺伝子を検出することはなかった。

E. 結論

デングウイルス、チクングニアウイルス、ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルスこれらウイルスのうち日本に従前から存在している日本脳炎ウイルスを除いたそれぞれのウイルスは、日本にいつ侵入・定着するのかわからない状況である。実際、2005年9月にはウエストナイルウイルスの国内輸入例が発生した。また、デングウイルスは毎年のように国内に持ち込まれている。チクングニアウイルスも海外での感染者急増により国内に持ち込まれる事例が多数報告されだ

した。さらにこれらウイルスに感染し、増幅することのできるヒトスジシマカ等の生息域が日本の約90%を占めることを考慮すると、海外より持ち込まれたこれらのウイルスが日本に定着してもおかしくない状況である。今後もこれらウイルスやカの動向に注目していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
2. 学会発表

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

図1. マルチプレックスPCRによるデング1型検出例

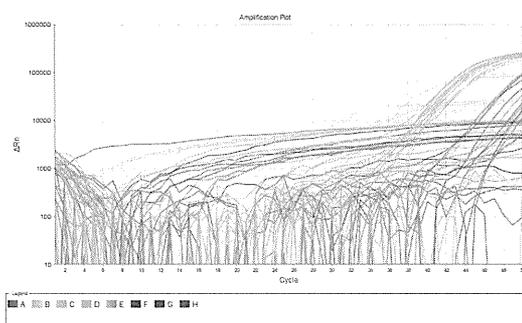


図2. マルチプレックスPCRによるデング2型検出例

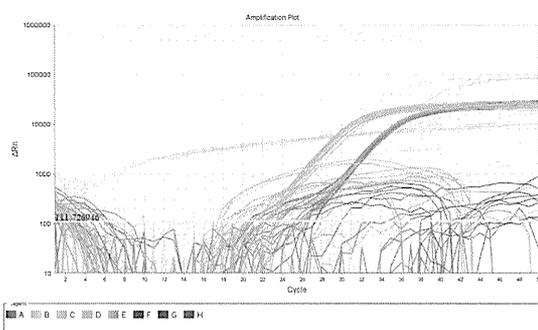


図3. マルチプレックスPCRによるデング3型検出例

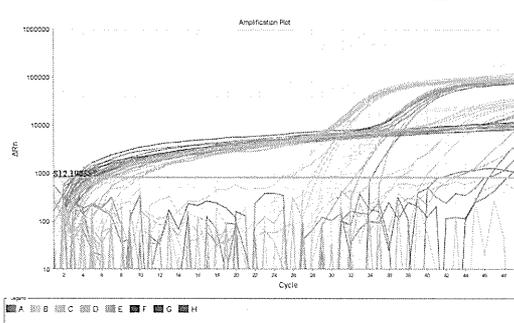


図4. マルチプレックスPCRによるデング4型検出例

