

201123005B

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21～23年度 総合研究報告書

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(2009～2011年)

千崎則正・他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21

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(総合)

小林睦生・他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 27

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(総合)

吉田政弘・他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 31

4. ヒトスジシマカ成虫における防除並びに岩手県、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 他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

5. ベトナムのデング熱媒介蚊の地理的分布とピレスロイド抵抗性の分布調査
およびミトコンドリア DNA ハプロタイプの解析

川田 均・他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43

6. 新潟市内の豚舎における媒介蚊の捕集調査(平成22年度・23年度)

田中 淳 他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51

7. 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(総合)

渡辺 護 他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 55

8. 富山県の海辺における蚊類幼虫調査(総合)

山内健生・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

9. 我が国における疾病媒介蚊の発生状況と生態

津田良夫 他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 63

10. 東日本大震災の津波被害地における衛生昆虫の発生状況調査

渡辺 護 他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 71

11. 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 *kdr* 遺伝子頻度

富田隆史・他・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 77

12. 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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 81

1 3.	トコジラミの殺虫剤感受性と駆除法の検討	
	山内健生 他	85
1 4.	コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスおよび新規ラブドウイルスの分離	
	沢辺京子 他	89
1 5.	Culex flavivirus 感染性 cDNA クロームの構築	
	沢辺京子 他	95
1 6.	カが媒介するデングウイルス、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 他	99
1 7.	デング DNA ワクチンがマウスに誘導する感染中和・増強抗体及びエピトープ の解析	
	小西英二	105
1 8.	チクングニア熱実験室診断法の開発と評価	
	高崎智彦 他	111
1 9.	デングウイルスの性状解析および感染時における抗体の役割検討に関する研究	
	倉根一郎 他	117
2 0.	日本産哺乳類・鳥類の外部寄生虫に関する基礎的研究	
	山内建生 他	125
2 1.	マダニ類およびシラミ類からの病原体の分離と検出	
	沢辺京子 他	131
2 2.	クリミア・コンゴ出血熱ウイルス感染症の診断法開発および 疫学的研究	
	西條政幸 他	137
III.	研究成果の刊行に関する一覧	147

総合研究報告書

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

研究要旨

2005からインド洋島嶼国、インド、スリランカ等でヒトスジシマカが媒介するチクングニア熱の大きな流行が起こった。2007年には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。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(平成10年45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。このような意味で、媒介蚊の生態学特徴を把握し、緊急の防除対策に資することが重要となる。また、患者が発生した場合、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必要で、これらの技術を各地方自治体に移転し、検査態勢を構築することが重要である。現在、デング熱のワクチンは存在せず、安価で効果的なワクチンの開発が強く望まれている。4価DNAワクチンの開発に関して、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、野良猫等で抗体が検出され、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、8月上旬から中旬にかけて、長距離移動をする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、トコ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調査、東日本大震災被災地で採集したイエバエの殺虫剤の抵抗性の発達をモニタリングし、若干抵抗性の発達が確認された。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消長の基礎的な調査、チクングニア熱、デング熱媒介蚊であるヒトスジシマカ

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分かっていない現状で，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．

分担研究者

小西英二	神戸大学大学院保健学研究科国際 健康学領域 準教授
高崎智彦	国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長
倉根一郎	国立感染症研究所 副所長
川田 均	長崎大学熱帯医学研究所生物環境 分野 準教授
津田良夫	国立感染症研究所 昆虫医科学部 室長
澤邊京子	国立感染症研究所 昆虫医科学部 室長
山内建生	富山県衛生研究所 衛生動物学 研究員
西條政幸	国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長
富田隆史	国立感染症研究所 昆虫医科学部 室長
柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所微生物部 主任研究員

ンからバリンへ変異した結果，ヒトスジシマカ体内でのウイルスの増殖活性が 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，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，複数の幼虫発生源が市内の 3 カ所で確認された．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，多種類の人口的な水溜りに発生することが知られているが，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

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

カがどのような環境を好んで移動し、潜んでいるか、蚊帳を植生にかぶせる方法で調査した。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試験的防除を試みることは重要である。

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捕集したコガタアカイエカからは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と考えられていた。しかし、東日本大震災による津波によって破壊された宮城県、福島県の海岸地帯では、明らかにコガタアカイエカの成虫密度が上昇していた。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。わが国の日本脳炎ウイルスの越冬生態の解明に非常に興味ある調査結果である。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、コガタアカイエカから新規のラプト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、上記のラプトウイルスや、その他の昆虫特異的なフラビウイルスの存在は、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、トコジラミの問題を精力的に取り上げ、全国規模の調査を行っている。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。

チクングニア熱に関して、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、これまでにチクングニア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。日本の東北以南の平地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、チクングニアウイルス (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ウイルス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することは重要である。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。

A:研究目的

1) ヒトスジシマカは近年、その生息地が北上しており、気温の上昇が影響しているといわれている。岩手県では、2009年から2011年にかけて、県内における同蚊の生息状況を調査し及び2010年までの年平均気温等の1kmメッシュ気候値データにより生息条件との関連を検討した。

2) 雨水マスで発生したヒトスジシマカがどのように公園や戸建て住宅に植えられた植生に潜り込むのが良く分かっていない。ヒトスジシマカは、アカイエカなどと違って、潜み場所に潜んでいて、吸血源動物を待つ「待ち伏せ型」の吸血行動を示す。8分間人囀法によって、簡便に成虫密度を評価できる方法が明らかとなり、小さな公園であっても捕集する場所によって、捕集数が0~50頭と大きく異なることが明らかとなった。公園内の灌木にどの程度の数のヒトスジシマカが潜んでいるかを明らかにする。

3) 感染症特にチクングニヤ熱の媒介者として重要視されている蚊類の都市域における発生状

況を把握し、日本に本ウイルスが侵入してきた場合、その流行の予防に、蚊の防除に関する情報を提供することは重要である。特に蚊類幼虫の発生源を見極め、広域な薬剤散布による蚊幼虫防除による効果の評価、実施体制の検討は欠かせない要件である。

4) 屋外におけるヒトスジシマカの成虫対策に関する報告はほとんどないことから、屋外で殺虫剤を処理した場合の防除効果を確認する目的で一般家庭の庭を用いて実験を行った。また、本種の発生期間や発生量の推定、また、それに基づく防除期間や防除体勢の構築などの基礎資料とする目的で、岩手県から大阪府にかけての数地点において発生期間を通じた飛来消長調査を実施した。

5) ネットイシマカとヒトスジシマカの日本を含む東南アジアにおける分布をミクロな観点から詳細にマッピングすることにより、両種の棲み分けや種の置き換え現象の要因や遺伝学的背景を解析するとともに、現在防除の主流となっているピレスロイド抵抗性の分布や特性を明らかにすることによって、有効な防除法策定にあたっての情報を提供することを大きな目的とする。

6) 2007年、国立感染症研究所が行った新潟市の佐潟での調査において捕集された231頭のコガタアカイエカから日本脳炎ウイルス(JEV)が分離された。新潟市におけるコガタアカイエカの発生状況が明らかにする目的で、豚舎での調査を2010年に引き続き行った。

7) マラリアを媒介するシナハマダラカ群の分布およびその濃淡の調査成績は少ない。そこで、昭和前期にマラリアが大流行した国内5県の内、滋賀県琵琶湖湖東地域、福井県鯖江・武生地域、石川県河北潟干拓地と富山県氷見市の4県において、現時点での蚊の発生状況、とくにマラリアを媒介するシナハマダラカ群の発生状況を把握することを目的とした。

8) 富山県内の海辺における蚊類相を明らか

にするため、海辺で蚊類幼虫調査を実施した。

9) 蚊によって媒介される感染症の流行リスクを評価し適切な対策を構築するうえで、蚊相と発生密度を明らかにするとともに、吸血行動や吸血によって間接的なつながりを持つ動物種を明らかにすることは非常に重要である。本研究では蚊の重要な発生源である水田地帯を主な調査対象として、以下の研究課題を実施した。(1)都市域における蚊の発生状況のモニタリング、(2)日本脳炎媒介蚊コガタアカイエカの越冬生態、(3)渡り鳥飛来地の疾病媒介蚊調査、(4)マラリア媒介蚊の分布調査、(5)蚊類の吸血源動物の同定、(6)鳥マラリアの感染環に関する研究、(7)東日本大震災被災地における媒介蚊調査。

10) 地震・津波による下水道や排水溝の破壊と閉塞は汚物を拡散し、湿潤な環境や止水箇所を増加させ、また、津波で押し流された家屋跡に残った浄化槽・便槽、さらに、瓦礫やゴミの堆積は健康生活維持の大きな懸念材料になる。このような湿潤環境は様々な昆虫やネズミなどの多量発生を容易にし、動物媒介性感染症の発生が危惧される事態になる。そこで被災地においてどの様な衛生上問題になる昆虫類が発生しているのか、その実態を明らかにすることを目的とした。

11) 東日本大震災により生じた多量の廃棄物から発生したイエバエの防除が必要とされている。有機リン剤やピレスロイド剤抵抗性に寄与する作用点の変異は、作用点タンパク質のアミノ酸置換突然変異により生じることがほとんどである。防除しようとする野外集団にもしも抵抗性遺伝子が一定頻度で存在しているとすれば、殺虫剤の使用により、それらが淘汰され、急速に抵抗性が発達する可能性がある。そこで、本研究では被災地で採集したイエバエの殺虫剤抵抗性を生物検定し、またピレスロイド系殺虫剤抵抗性の主要な原因とされている *kdr* 変異についてその遺伝子頻度を調べた。

12) わが国におけるアタマジラミのピレスロイ

ド系駆除剤の有効性を評価することを目的とし、ナトリウムチャンネル遺伝子の分子ジェノタイプピングを行うことにより、ピレスロイド抵抗性遺伝子の頻度分布を調査した。

13) トコジラミの刺咬被害が国際的に広がっている。国内においても急激に増加しており、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。そこで国内各地からトコジラミを採集し実験室で増殖させ、室内で使用される主要な殺虫剤に対する感受性を調べることを目的とした。

14) 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(JEV)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、これまでほとんど行われてきていない。我々は、2003年より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 JEV をはじめ、複数の新規ウイルスを分離し報告してきた。

本研究では、近隣諸国からのアルボウイルス流行情報を得るために、これまで行ってきた国内調査に加え、フィリピンマニラ市近郊でも同様に調査を行った。次いで、JEV の主要媒介蚊であるコガタアカイエカから新規のラプトウイルスを分離したので、そのウイルス学的諸性状も併せて報告する。

15) 多くのフラビウイルスでは感染性 cDNA クローンによるリバーシジェネティクス系の普及により、ウイルス増殖特性等に関する分子レベルでの性状解析が急速に進んでいる。そこで本研究では、アカイエカから分離された Cx₁ のリバーシジェネティクス系を確立し、昆虫特異的フラビウイルスの増殖・病原性・宿主特異性など解析に有用な新たな実験系の構築を試みた。

16) 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集した蚊に関して、極力省力化し実施する方法を模索した

17) デングウイルスの感染において、防御の中心的役割を果たすのは中和抗体と考えられている。このため、ワクチン開発の主流は中和抗体を誘導するタイプのものである。しかし一方で、中和抗体は低濃度では感染増強活性を有することも知られている。そこで最近、中和抗体誘導型のワクチンにおける感染増強抗体の誘導が指摘されてきた。この問題を解決するためには、感染増強活性を正確に測定し、増強抗体誘導に関わる抗原エピトープを詳細に解析する必要がある。この3年間の研究班では、安全なデングワクチン開発に寄与するため、マウスを用いたデング DNA ワクチンモデルを用いて増強抗体の特性解析を行った。

18) チクングニア熱は高いウイルス血症を呈するが、本疾患の認知度がまだ低く受診あるいは検体採取の時期が遅れがちである。そのため高いウイルス血症の時に検体採取される場合は少なく、より高感度のウイルス遺伝子検出法が求められる。また、チクングニア熱は急性症状が治まっても関節痛が続くため、急性期を過ぎて病院を受診する患者も多く、その場合は抗体検査が重要である。そこで、迅速で高感度なチクングニアウイルス遺伝子検出法 (Hyper RT-PCR 法) を開発・評価した比較的早期に検出できる IgM 抗体検査キットを評価した。

19) デング熱ワクチンがいまだに実用化されていない背景には、① デングウイルスに対する防御免疫が解明されていないこと、② ワクチンの接種によって誘導された抗体が感染増強作用を保有し、症状を悪化させる可能性があることがあげられる。抗体のデングウイルスに対する中和活性は、通常、非 FcγR 発現細胞によって測定されている。しかし、従来の方法は非 FcγR 発現細胞において中和活性を検出することが可能であっても、デングウイルスの体内における標的細胞である monocyte/macrophage など FcγR 発現細胞に対する感染増強活性を同時に検出することが不可能である。本研究では、いままで確立し FcγR 発

現 BHK 細胞が中和能を有するデング患者血清における感染増強活性の検出・測定に使用可能かを検討した。さらに、確立した ADE アッセイを用いて、デング熱渡航者の血清からウイルス分離に使用可能かを検討した。

20) 哺乳類・鳥類の外部寄生虫 (マダニ類やノミ類など) は、人獣共通の感染症を媒介することによって、宿主の健康や生命に影響を与えうるものが少なくないため、医学的に重要な存在である。そこで今回は、都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長、秋季の鳥類寄生マダニ相、愛玩動物の外部寄生虫相と保有病原体、の調査を実施した。

21) 2008 年 12 月に兵庫県西宮市で捕獲されたイノシシの血清から JEV が分離され (高崎ら, 2009), コガタアカイエカの活動時期や生息場所以外での患者症例も報告されるなど、近年、ブタとコガタアカイエカ以外の感染環の存在が指摘されている。西宮市で捕獲されたイノシシには多くのマダニ類が寄生していたことから、それらマダニ類からの JEV の分離と検出を試みた。

1999-2004 年に東京都豊島区において、路上生活者対策プログラムの一環として実施された健康診断に訪れた路上生活者を対象に、シラミ保有調査と塹壕熱バルトネラ菌 *Bartonella quintana* 遺伝子の検出を行い、10%のコロモジラミが遺伝子陽性であったことを報告した。大都市での塹壕熱侵襲の実態把握が必要であると考え、大阪市西成区、ならびにフィリピンマニラ市近郊で得られたシラミ類から塹壕熱バルトネラ菌遺伝子の検出を行った。

22) クリミア・コンゴ出血熱 (CCHF) 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 CCHF 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 (CCHF 患者) における各分節遺伝子発現の程度を比較検討した。

B: 研究方法

1) 蚊類の生息状況調査を、2009年7-9月および2010年6-9月に、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134地点で実施した。

2) 2011年は西宮市内の39の公園で、それぞれ2カ所の植生を選び、総数は78ヶ所の植生の調査を行った。単独の種類の場合と、2-3種の植生が混在している場合の両方があった。これらの植生上に蚊帳(2×2.5×1.9m)を被せて、1人の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、蚊帳の裾を固定した。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) 西宮市全域にある公共公園11-20箇所を対象とし、幼虫対策として公園内および側近にある道路雨水枡への薬剤散布法を二段階設けて行った。一または二週間間隔でIGR系薬剤(スミラブ発泡錠)を雨水枡での水の有無にかかわらず1錠投入した。後者の試験区では対象公園の中心から半径100mまたは150mの範囲にある全ての発生源を対象とした。なお、この試験区では第1回目の幼虫対策時に1.5m以下の樹木に薬剤散布(トレボン)を実施した。対照として無散布の10公園を設定した。これら処理区から幼虫を採集して、薬剤の効果の判定を、蛹化率、羽化率で調べた。

4) 液化炭酸ガス製剤を用いた屋外におけるヒトスジシマカ成虫に対する防除効果(2009年度)、ヒトスジシマカ成虫の飛来消長調査(2009~2011年度)を岩手県、神奈川県、富山県、長野県、三重県、大阪府で行った。

5) ベトナムのネッタシマカにおけるピレスロイド抵抗性機構の解析、ベトナムのネッタシマカにおけるミトコンドリアハプロタイプによる

系統解析、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、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、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の調査を行った。

6) 2010年は6月から2010年9月までの14回の捕集を新潟市内の豚舎で行った。2011年は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回概ね水曜日に設置し、24時間後にトラップを回収した。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。

7) 滋賀県琵琶湖湖東地域、福井県鯖江地域(武生盆地)、石川県河北潟地域、富山県氷見地域において、東京エーエス社製ライトトラップとCDCトラップによって蚊の捕集を行った。調査期間は前2地域では2009年と2010年の5月~10月にほぼ3週毎に2日間連続で牛舎と20~22台のCDCトラップで、後2地域は2009年~2011年の5月~10月にほぼ隔週に1日間CDCトラップ10、12台もしくは4、8台を設置して捕集を行った。ドライアイス1kgを誘引源にした。

8) 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。

9) 都市域における蚊の発生状況のモニタリング (H 2 1), 日本脳炎媒介蚊コガタアカイエカの越冬生態 (H 2 1 - 2 3), 渡り鳥飛来地の疾病媒介蚊調査 (H 2 1), マラリア媒介蚊の分布調査 (H 2 1), 蚊類の吸血源動物の同定 (H 2 1), 鳥マラリアの感染環に関する研究 (H 2 1), 東日本大震災被災地における媒介蚊調査 (H 2 3) を行った。

10) 飛翔性吸血昆虫の捕集はドライアイスを用いた誘引源として CDC トラップで行った。ハエ類の採集は飛翔している個体やゴミなどに止まっている個体を捕虫網で捕ることで行い、アブの採集は自動車や調査人に飛来した個体を捕虫網で捕獲することで行った。蚊幼虫の調査は津波の被害があった地域で、様々な溜水環境を柄杓で掬い取る方法で行った。調査地は津波被災地である岩手県陸前高田市、宮城県気仙沼市、福島県南相馬市である。調査は2011年5月5日から11月12日まで、ほぼ3週間毎に行った。

11) 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。殺虫試験は局所施用により行った。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。ピレスロイド殺虫剤抵抗性に係る *kdr* 遺伝子頻度の解析をゲノム DNA の配列の解析により調べた。

12) アタマジラミ試料は、おもに、医療機関、次いでアタマジラミ症幼・小児の保護者より提供されたものを用いた。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。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。

13) トコジラミの殺虫剤感受性試験は、①濾紙継続接触法と②腹面微量滴下法によって行った。薬剤はペルメトリン5%水性乳剤、フェントリン10%水性乳剤、ディクロルボス5%乳剤、フェントロチオン10%乳剤、プロポクスル1%油剤を用いた。

14) 蚊は CDC 型ドライアイストラップ、捕虫網および吸血管を用いて、2009年5-8月に国内6県(山形、福井、兵庫、滋賀、徳島、鹿児島県)の畜舎周辺、およびフィリピンマニラ市近郊 Bulacan 州 Bustos の豚舎におい捕集した。ウイルス分離は最高20個体までを1プールとし、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。細胞変性効果 (CPE) が確認された最終ウイルス培養上清から Viral RNA Extraction Kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。遺伝子陽性プールについては、E 領域および 3' 非翻訳領域 (3'UTR) の遺伝子解析を行った。CTRV ゲノムの解析は、RT-PCR により遺伝子を増幅し、その全塩基配列を決定した。CTRV の性状解析は、感染細胞内におけるウイルス RNA の局在、ウイルス粒子形態観察、蚊由来 C6/36 細胞、哺乳動物由来 Vero 細胞および BHK21 細胞における CTRV の増殖性を調べることによる。

15) CxFV 完全長 cDNA の構築を行い、*In vitro* transcription, 組換えウイルスをリポフェクション法により C6/36 細胞に導入して行った。親株ウイルスと組換えウイルスの増殖能の比較を、等力価で C6/36 細胞に接種し、8日目までの培養上清を24時間毎に回収し、上清から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR でゲノム RNA のコピー数を定量した。ここでは、CxFV の E 領域の一部 (定量的 RT-PCR で増幅される領域を含む) を PCR および *in vitro* transcription により合成し、コピー数を測定したものを、検量線作成のためのスタンダード RNA として用いた。

16) 名古屋市内で捕集した蚊は、採取地点毎に最大 50 頭を 1 プールとした。凍結した蚊に冷凍メタルコーンと 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。冷却遠心後上清を 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。

17) 細胞は Vero, C6/36, K562, U937 及び HL60 細胞を用いた。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 (MAb) は、DENV1 あるいは DENV2 を免疫原として作製した、それぞれ 8 あるいは 10 種類のマウスモノクローナル抗体を用いた。

中和試験: Vero 細胞を用いて、50%または 90%ブランク減少法によった。競合試験では、DENV1 抗原感作プレートに、一次抗体、ビオチン化二次抗体を順次反応させ、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。

18) Hyper RT-PCR 法に関して、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 種類を設計した。また、ウイルス遺伝子 RNA 数を定量するため E1 領域をプラスミドベクター pcDNA3.1 にクローニングし、合成 RNA を合成した。これらを用いて、Hyper PCR UR MK-IV を用いて、チクングニアウイルス Hyper RT-PCR 法を開発・確立した。IgM 抗体検査法に関しては、イムノクロマト法を利用した迅速診断キットを用いた。

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.

19) 患者血清はマレーシアのペラ州在住の 80 人から 80 検体 (血清) を採取した。アフリカ渡航者 4 人から 4 検体を採取し、ウイルス分離 (感染増強活性を有する抗体 mAb4G2 を用いた Fc γ R 発現細胞によるウイルス分離法(ADE 法)および C6/36 細胞、および血清学的検査ならびにウイルス抗原検査(NS1 ELISA, BioRad 社)を行った。

20) 愛玩動物の外部寄生虫相調査では、2011 年 6~12 月に、富山県動物管理センターと富山県内の動物病院 17 施設に持ち込まれたイヌ、ネコの体表から、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をエタノール液浸とし、同定した。全てのマダニ個体と大多数のノミ個体から DNA を抽出し、2nd PCR もしくは nested PCR により、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。

21) マダニ類の捕集は 2008 年 10 月-2010 年 9 月の 2 年間に兵庫県西宮市内の六甲山系 29 地点において合計 157 頭のイノシシを捕獲し、その皮毛に寄生していたマダニ類を採取した。I 型 JEV (JaNB037) 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を解剖し、唾液腺および消化管を個別に間接蛍光抗体法により免疫染色した。ウイルス分離は、キチマダニの片方の唾液腺を磨砕し、その遠心上清をヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞に接種して行った。

シラミ類は大阪市西成区内にある大阪社会医療センターを受診した、簡易宿泊施設および臨時宿泊施設の利用者および路上生活者の合計 10 名 (男性、42-74 歳) の衣類から採取した。フィリピンマニラ市近郊の Laguna 州 Los Banos 市に住む未成年者 50 名の頭髪からアタマジラミを採取した。一方、日本国内 32 自治体の学童を主な対象とした調査で入手されたアタマジラミから合計 579 頭の個体を抽出した。シラミ類からのバルトネラ菌遺伝子の検出はシラミは個別別に破碎し、nested PCR, ならびにクエン

酸合成酵素 *gltA* 遺伝子用プライマーを用いた PCR により目的遺伝子を検出した。

22) ダニにおけるクリミア・コンゴ出血熱ウイルス (CCHFV) の各分節遺伝子の発現と診断への応用に関して、CCHF 流行地でヒツジなどの家畜や原野に生息するダニを採取した。血清およびダニから 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。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に関して、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。ウイルス遺伝子の系統樹解析は、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。CCHFV 中国分離株の L-遺伝子全塩基配列の決定に関する研究に関して、CCHFV 中国分離株の L-遺伝子塩基配列を決定した。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クエ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された。

C. 研究結果

1) 岩手県におけるヒトスジシマカの生息分布を調査した結果、盛岡市ではすでに同蚊が定着していることが確認された。北限地域は盛岡市下ノ橋付近 (39° 41' 55" N, 141° 8' 59" E) であった。また、GIS を利用し、同蚊の気温に関する生息条件として、年平均気温、1 月の平均気温、有効積算温度及び有効積算温度日数について知見を得、今後の監視・防除対策に有効であることがわかった。

2) 公園内に存在する植生に蚊帳を被せて、その植生に潜んでいるヒトスジシマカの捕集を試みた結果、ユキヤナギ、ピペリカム、キンシバイ、ツツジ、フリージア、ヨモギ、クチナシ、オカメヅタ、アベリアから 5 頭以上の蚊が

捕集された。植生の種類によって潜んでいる蚊の数に大きな違いが認められたが、その原因は不明である。今後、これらの植物が持っている安定した潜み場所としての環境要因をより詳細に解析し、緊急な成虫防除対策を行う場合の薬剤散布の効率化を目指したい。

3) ヒトスジシマカが多数生息している都市部の公園においては、1 か月に 1 回の灌木への薬剤散布と周辺環境 150m の範囲に 1 ヶ月に 1 回の雨水枡を中心とした発生源への IGR 等の薬剤散布はヒトスジシマカの発生に抑制効果が高かった。しかし、平成 23 度は幼虫対策、灌木への薬剤散布を月 1 回同時期に行った公園での成虫採集数が、灌木への薬剤散布をせず、幼虫対策のみを講じた 150m 域内での成虫採集数とあまり変わりがなかったことは、平成 23 年の 6~10 月かけての日降水量が、例年になく全国的に多かったことにより、灌木への薬剤の残効性に影響を与えたのかも知れない。

4) ヒトスジシマカ成虫に対するフェノトリンを有効成分とする液化炭酸ガス製剤の効力を一般家庭の庭で評価したところ、処理区域の成虫を駆除することが可能で、ヒトに対する飛来を処理後 10 時間に渡りほぼ抑制できることが確認できた。ヒトスジシマカ成虫のヒトへの飛来期間は地域によりやや異なるが、神奈川県、長野県、富山県、三重県、大阪府での調査では 5 月中・下旬頃から 10 月中旬~11 月下旬で、近年分布が確認された岩手県花巻市でも 10 月中旬まで飛来が認められた。発生期間はその時期の気温が関係すると考えられたが、飛来開始日や最終飛来日前後の温度には地域により違いがみられ、必ずしも温度のみが発生期間を決定する要因ではないことが示唆された。

5) ベトナムではヒトスジシマカのピレスロイド抵抗性はほとんど発達していないことから、成虫の生態がネッタイシマカとは異なっていると考えられ、デング熱流行への関与の仕方も異なっている可能性がある。日本国内では DDT に対する

抵抗性が普遍的であり、ピレスロイド抵抗性は一部の地域においてのみ散見される現象のようである。蚊に限らず多くの害虫の DDT 抵抗性はおそらく全世界規模の現象と思われる。ピレスロイドの忌避性を活用した、抵抗性を発達させない有効なコントロール方法の開発、ピレスロイドに代わる有効な殺虫剤の開発、化学防除にこだわらない生物防除、物理防除などへのシフトなどが今後の重要な課題であろう。

6) 2011 年度は 4 月中旬より実施した蚊の捕集調査において、全体の捕集数は 4,675 頭で、コガタアカイエカが 5 月 25 日より見られ、2,268 頭 (48.5%) の捕集、8 月 25 日に 752 頭が捕集されピークが認められた。アカイエカの捕集は 5 月 11 日に見られ、11 月 1 日まで認められた。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。

7) 昭和前期にマラリアが流行した琵琶湖湖東地域、福井県鯖江地域、石川県河北潟干拓地と富山県氷見地域において蚊の発生状況を調査したところ、琵琶湖湖東地域では現在もシナハマダラカの発生がみられたが、石川県河北潟干拓地では全く捕集されなかった。福井県鯖江地域と富山県氷見地域ではわずかに捕集された。懸念されているマラリアの再興は現段階では無いと考えられるが、全国的な調査が必要と思われる。コガタアカイエカは全地域、全定点で捕集され、広範囲に高密度で分布していることが明らかになった。アカイエカは石川県河北潟干拓地で多数が捕集されたが、他地域では捕集される定点に相違がみられ、分布に遍在性が認められた。ヒトスジシマカは捕集される定点とされない定点に分れ、分布に大きな偏りが示唆された。

8) 富山県内の海辺 12 地点にて、蚊類の幼虫を採集したところ、3 属 7 種が採集された。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。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。

9) 継続調査の結果に基づき東京都の都市域の代表的な疾病媒介蚊であるアカイエカとヒトスジシマカの発生密度の平年値を求め、これと比較することで当該年の蚊の発生の多寡を評価できるようになった。コガタアカイエカの越冬世代成虫の季節移動が確かめられた。徳島県と茨城県の水田地帯の主要な疾病媒介蚊がアカイエカとコガタアカイエカであることが示された。アカイエカは野鳥を吸血している個体が多く、また鳥マラリア原虫の主要媒介蚊であることが明らかになった。東日本大震災の被災地の水田地帯では、アカイエカ、コガタアカイエカ、イナトミシオカの大発生が認められた。

10) 津波によって蚊の幼虫の生育に適した溜水環境が作られ、アカイエカ、コガタアカイエカ、シナハマダラカさらに海水混じりの環境から発生するトウゴウヤブカ、イナトミシオカが大量に発生した。また、冷凍倉庫などから流れ出た魚類・加工品には大量のオオクロバエ、クロキンバエなどが発生し、打ち上げられた漁具・海草・汚泥からは多量のコバエ類が発生した。アブ、ブユ、ヌカカなどの吸血性昆虫の発生もみられたが、津波の影響で発生が多くなったとは考えにくい。何れも水系環境から発生する昆虫であるので、今後とも発生に留意する必要がある。

11) 1. 採集された石巻・気仙沼イエバエ両系統の抵抗性レベルは実験室で維持されている感受性系統と比べれば高かった。

2. 石巻・気仙沼両系統のイエバエを、過去に防除が困難であった集団と比較すると、その抵抗性レベルは低い。

3. 共力効果を調べた結果、現状では両系統とも

ペルメトリンに対する感受性の低下は解毒代謝への依存が大きかった。

4. *super-kdr* を伴う *kdr* 遺伝子が石巻 32%、気仙沼 21%の頻度で存在した。

5. 従って、現状では殺虫剤抵抗性により防除が困難になることはない。しかし、*kdr* 遺伝子が一定の割合で存在することから、殺虫剤の使用により抵抗性遺伝子が選抜されるような状況が生じれば、殺虫剤の有効性が失われる事態も生じ得る。

12) 2006～2011年の医療機関等を通じて収集した試料の解析結果に基づくと、日本本土(沖縄県を除く)のアタマジラミのピレスロイド抵抗性コロニー率は5.0%と推定された。沖縄本島におけるアタマジラミのピレスロイド抵抗性コロニー率は96%前後であると推定され、日本本土における率に比べて顕著に高かった。新規アタマジラミ駆除薬の早急な導入が必要である。

13) 千葉県、富山県、沖縄県、福岡県、石川県、新潟県、北海道で採集された10系統のトコジラミの殺虫剤感受性の試験を行った。「千葉系」がピレスロイド系のフェノトリン対して超高度の抵抗性を示し、次いで「沖縄那覇系」が高い抵抗性を示した。ペルメトリンに対しては「沖縄那覇系」が高い抵抗性を示し、「千葉系」、「新潟長岡系」が続いた。一方、「富山08系」、「北海道旭川系」は低度の抵抗性であることが明らかになった。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。さらに、ディクロルボス樹脂蒸散剤の利用や「熱殺法」を組み合わせることで、より安全で確実な駆除が可能になると思われる。

14) 1) 2009年南九州市で捕集したコガタアカイエカから分離されたJEVは、E領域および3'UTRの特徴から、近年東アジア地域で多く見いだされるI型に属し、2007年分離株により近縁であることが示唆された。

2) フィリピンBulacan州Bustosにおいて捕集された蚊(合計6属13種2,648頭)のうち、これまでに137プールをウイルス分離に供し、13プールにCPEが観察されたが、JEVは分離されなかった。

3) 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、そのウイルスゲノムは11,190 ntのRNAで、ゲノム上に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。

4) 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、前例のないラブドウイルスであることが判明した。

5) CTRVの粒子は極端に長い棒状を呈し、蚊由来C6/36細胞では増殖が認められたが、哺乳動物由来Vero細胞およびBHK21細胞での増殖は認められなかった。

15) 1) 昆虫特異的フラビウイルスであるCxFeVの感染性cDNAクローンの構築に成功した。2) 作製された組換えCxFeVは親株ウイルスと同等の細胞障害性、増殖特性、粒子形態を保持していた。3) 今後は、点変異の導入や部分欠損をもたせるように改変した組換えウイルスを作製することにより、CxFeVの増殖・病原性・宿主特異性などの解明につながる有用な情報が得られることが期待された。

16) 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。

名古屋市内で捕集された蚊からのウイルスの分離に関して、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。

17) 中和・増強活性のバランス測定法を開発し、

デング4価DNAワクチンはADE抗体を誘導するが、補体が存在すれば消失することを示した。DENV1に対して中和活性あるいは増強活性のみを示すMAbはE蛋白分子の、それぞれドメインIIあるいはドメインIに結合することを示した。抗体エンジニアリングの手法によりアイソタイプが抗体の活性を規定する重要な因子であることを示したが、エピトープの関与も示唆された。

18) チクングニアウイルス遺伝子迅速検出法としてHyper RT-PCR法を確立した。短時間でウイルス遺伝子型にかかわらず検出可能であることが確認された。IgM抗体検査キットの評価では信頼のおける抗チクングニアウイルスIgM抗体検査キットは確認されなかった。入手でき次第他のキットも評価するが、今後、*in house*キットを普及させるためには、チクングニアウイルス抗原のレコンビナント化などを考慮する必要がある。また、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に属するウイルスであり、抗アルファウイルスIgG抗体を有する日本人は稀であることから、今後は抗チクングニアウイルスIgG抗体キットを評価する予定である。

19) デング熱流行地の住民血清における中和・感染増強活性を検討したところ、FcγR発現細胞のみに検出された感染増強活性が非FcγR発現細胞においては検出された中和活性を低減させることが明らかとなった。これまでに確立したFcγR発現細胞を用いて、感染増強活性および中和活性を同時に測定する新規中和試験法を確立した。以上の結果により、非FcγR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検討されたことから、生体における抗体の機能を反映していない可能性があることが示唆された。また、ADE法を用いてアフリカ渡航者から分離し、ウイルスの性状解析を行った。FcγR発現細胞を用いたADE法によるウイルス分離法は、デング熱サーベイランスにも活用できる有用なツールであることが示唆された。

20) 富山県の都市周辺行楽地におけるマダニ類の季節消長、愛媛県における秋季の鳥類寄生マダニ相、富山県における愛玩動物の外部寄生虫相と保有病原体を調査した。典型的な南方系種とみなされていたタカサゴチマダニとヤマアラシチマダニが、北陸地方に分布する可能性が示された。紅斑熱のベクターであるヒトツトゲマダニがアオジから初めて採集された。これは本種が鳥類から採集された初めての記録となる。フタトゲチマダニ、ヤマトマダニ、およびキチマダニは、イヌに寄生することにより、山野のみならず市街地にも広く生息している可能性が示唆された。愛玩動物の行動圏内に生息するマダニ類の紅斑熱群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。

21) 1) 合計157頭のイノシシ皮毛から3属7種3,442頭、旗ざり法により4属11種1,573種のマダニ類がそれぞれ採取された。2) I型JEV (JaNB037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の唾液腺および消化管を間接蛍光抗体法により染色し、共焦点顕微鏡・蛍光顕微鏡下で免疫組織学的に観察したが、JEVは確認されなかった。3) 上述したキチマダニ唾液腺の片方、および合計260頭のキチマダニプールをC6/36およびHmLu-1細胞接種系に供したが、いずれのプールからもJEVは分離されなかった。4) 大阪市西成区で得られたコロモジラミ(遺伝子保有率60%)、およびフィリピンLos Banos市から得られたアタマジラミ(2%)に塹壕熱バルトネラ菌遺伝子が検出された。

22) クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)流行地のひとつである中国新疆ウイグル自治区で分離された7株のCCHFVのL-遺伝子の全塩基配列を決定した。ダニにおいてはS-遺伝子とL-遺伝子の発現が比較的高いことが明らかにされた。ダニからのCCHFV遺伝子増幅には、S-遺伝子とL-遺伝子のnested RT-PCR法を組み合わせることが重要であることが示された。本疫学研究では、一般的にS-遺伝子の塩基配列に基づいて分子疫学を明らか

にされているが、3分節の塩基配列を用いることでCCHFの流行をより詳細に調査できると同地域のCCHFVの進化の過程を推測することが可能であることが示唆された。

D. 考察

2005年以来インド洋島嶼国、インド、東南アジア諸国で流行したチクングニア熱は、170万人以上の患者が報告され、レユニオン島では全人口の1/3たる約26万人以上が感染し、230人が死亡した。また、2007年に北東イタリアの人口3千人ほどの小さな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。この流行においても、ヒトスジシマカが媒介蚊として報告されている。ヒトスジシマカは、1980年代から全世界に分布域を広げ、米国、中南米諸国、ヨーロッパ諸国、オセアニア、アフリカから分布・定着が報告されている。これらの分布域拡大は、古タイヤの輸出入が直接的に関わっており、世界的な温暖化傾向も分布域拡大にある種の影響を与えている。

2006年にレユニオン島で分離されたチクングニアウイルスのE1タンパク質の226番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異した株が見つかり、ヒトスジシマカでの増殖効率が100倍以上高まったとの報告がある。この変異が、ネッタイシマカが分布していないインド洋島嶼国、中国等での流行に関係していると考えられている。また、2010年にはフランスの南部のイタリア国境に近い町でチクングニアの国内感染症例が2例報告されており、ヒトスジシマカの分布域拡大と共に蚊媒介性感染症の流行域が拡大している。

我が国は都市部を中心にヒトスジシマカの成虫密度が高く、公園、墓地、戸建て住宅の庭、公共施設などで、夏期によく刺される。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が起こる可能性は否定できない。実際、イタリアでの流行では、1人のインド人の患者が原因となって300人の流行を起こしたことが疫学的に証明さ

れている。また、チクングニア熱患者の血液中に約1週間ウイルスが出現し、ウイルス量がデング熱より遙かに多いことが知られている。2010年に報告されたデング熱の輸入症例は全体で245名に達したが、その2/3相当する患者が6月から10月に帰国しており、我が国のヒトスジシマカの活動期にあたっている。我が国におけるヒトスジシマカの発生状況調査を岩手県、京都、神奈川県、長野県、富山県、三重県、大阪府、西宮市で8分間人囀法によって調査したが、5月中旬から11月上旬までヒトスジシマカの活動が観察されている。公園等での蚊の防除試験において、公園内の植生に成虫防除対策を月1回行い、公園周辺150mの範囲に存在する雨水マスに昆虫発育制御剤(I GR)を処理することによって、1ヶ月ほど効果が持続することが認められ、防除試験を行った公園内でほとんど蚊に刺されなくなった。一方、夏期に患者が確認された場合、患者宅周辺において、ウイルスを唾液腺に持ったヒトスジシマカが潜んでいる可能性があるため、成虫防除対策を緊急に行う必要がある。炭酸ガス製剤、ピレスロイド系の水和剤なども効果が確認されている。傾斜のある都市部での雨水マスでの幼虫発生状況の調査では、急な斜面に存在する雨水マスには幼虫の発生が少ない傾向が認められ、防除対策の優先順位を考慮する場合には、平地の防除を優先すべきであることが示唆された。

日本脳炎ウイルスの媒介蚊であるコガタアカイエカは地域によって成虫密度が異なることが知られていた。しかし、どのような気候要因、環境要因が成虫の発生密度に関係するか明らかになっていない。また、我が国で、どのような環境または地域で成虫が越冬しているか知られていない。秋から晩秋にかけて、東京都の公園内で1-3万頭の成虫を捕虫網で採集した。生理的解析から採集された成虫の多くは越冬状態に入っており、公園周辺で越冬する可能性が示唆された。実際、翌春の休眠から覚醒する3-4月に採集を試み、平成21年には200頭以上の成虫が採集され

た。コガタアカイエカが都市部の環境で越冬していることは、非常に興味あることで、今後詳細に越冬の生態と生理を解析することは重要である。

チクングニア熱は、デング熱との鑑別診断を行うとともに、迅速な血清学およびウイルス学的検査が重要である。ウイルス遺伝子に変異を起こしたウイルス株の検出法も可能となっている。本研究事業において、4価 DNA ワクチンの開発を目指しているが、低濃度で存在する中和抗体による感染増強活性（重症化）が生じないワクチンの開発が強く望まれている。ウエストナイル熱（WNV）はヨーロッパ型の WN ウイルスの極東地域および上海での活動が確認され、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。平成 23 年 3 月に発生した東日本大震災において、非常に破壊的な津波が発生し、福島、宮城、岩手、青森の 4 県で約 400km² が被災し、地盤沈下とともに広大な湿原が宮城県南部と福島県北部に形成された。これらの地域における媒介蚊の発生状況調査は平成 24 年度の継続する必要性が高いと考えられる。

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全国的に確認されており、全国的な調査をより、沖縄県では約 96% のアタマジラミに抵抗性遺伝子が確認された。沖縄および患児の両親から送られてきた抵抗性遺伝子の頻度が高い検体を除いた全国の抵抗性出現率は約 5% であった。

第二次世界大戦後の日本には、吸血性で、不快昆虫の代表種であるトコジラミ（南京虫）が各家庭に一般的であった。その後、DDT 等の殺虫剤を用いて、年 2 回地域全体で一斉に行っていた大掃除などで徹底的に防除対策を行い、一時的にトコジラミはほとんど問題にならなくなっていた。しかし、2000 年以降、全世界でトコジラミの被害が蔓延し始め、現在、簡易宿泊所、ホテル、旅館、一般住宅、病院などで刺咬被害が散見され初めて

いる。米国ではピレスロイド系殺虫剤に抵抗性を示すトコジラミが急激に増加し、ピレスロイド系殺虫剤による防除が困難になっている。我が国でも同薬剤に対する抵抗性のコロニーが確認されており、有機りん系の薬剤の使用や、温風や蒸気処理による物理的な防除法の確立が強く望まれている。皮膚の反応は刺咬経験や免疫状態によって大きく異なっており、今後種々の生活環境で問題となる可能性があり、注視する必要がある。

全国でコガタアカイエカを捕集し、日本脳炎ウイルスを分離する仕事から、約 10 年間で 100 株以上のウイルス株をコガタアカイエカから分離した。その過程で、分離のための培養細胞に細胞変性を起こすが、既知のウイルスとは異なるウイルスが検出された。今までにイエカから蚊に特異的なフラビウイルス（CxFV）とヤブカから異なるフラビウイルス（AeFV）を分離した。その後、コガタアカイエカ新規のラプトウイルス（CTRV）、トテウイルス（OMRV）を分離した。CxFV の感染性 cDNA クローンの構築に成功し、昆虫特異的フラビウイルスのリバースジェネティクス系が初めて確立され、今度ウイルスの増殖・病原性・宿主特異性など解析に有用と考えられる。

チクングニア熱の迅速診断法が確立され、国内に輸入症例があった場合の対応が可能となった。これは、地方衛生研究所にも技術移転されている。デング DNA ワクチン免疫マウスモデルを用いて増強抗体の本質にアプローチに関して、血清中の中和活性と増強活性のバランスを測定する方法を開発し、デングワクチンが感染増強抗体を誘導するが、補体存在下では消失することを示した。これらの抗体を用いた抗原エピトープ解析を行い、増強活性の発現には抗体のサブクラスが重要であると共に、エピトープ自体も関与している可能性を示した。

非 FcγR 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 FcγR 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示唆された。

クミアコンゴ出血熱の遺伝子の全塩基配列を決定し、これまで中国分離株の S-遺伝子および M-遺伝子の全塩基配列が決定されていたので、中国株 7 株のそれぞれの S-遺伝子、M-遺伝子、L-遺伝子の全塩基配列が決定された。この情報を専門家の間で共有することで、CCHFV に関する疫学的・基礎的研究が進むことが期待される。

E. 結論

(媒介蚊に関する調査研究)

- ・岩手県におけるヒトスジシマカの生息分布調査の結果、盛岡市ではすでに同蚊が定着していることが確認された。

- ・公園内の植生に潜んでいるヒトスジシマカの捕集を試み、多くの種類の植生から成虫を捕集できたこと、植生によっては 20 頭以上潜んでいる植生も観察された

- ・兵庫県下の西宮市において、公園周辺 150m 以内の雨水マスへの薬剤散布ならびに成虫対策として灌木への月 1 回の定期的な薬剤散布を実施し、成虫密度を顕著に低下させる効果が認められた。

- ・傾斜が急な地域に存在する雨水マスでは幼虫の発生数が少ないことが明らかとなった。これは、降雨時に雨水マスから幼虫が流される可能性が高いことを示している。

- ・ヒトスジシマカの吸血飛来期間は、神奈川県、富山県、三重県、大阪府では 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、5 月中旬から 10 月下旬～11 月上旬であった。

- ・ベトナムのネッタ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。

- ・新潟市において、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、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、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。

- ・コガタアカイエカの集団飛来調査に関して、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。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。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。

- ・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。

- ・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。

・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トラップや人囮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。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。

・岩手県陸前高田市、宮城県気仙沼市、福島県南相馬市の津波被災地で蚊の発生調査をドライアイストラップによって行った。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、特に、前2種が顕著に多数捕集された。

・東日本大震災の巨大地震と津波の影響を受けた福島県北部海岸沿いに分布する水田地帯で蚊幼虫の調査を実施した。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る。

・東日本大震災によって破壊された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、トラップを用いた成虫採集と柄杓による幼虫採集を行った。ドライアイストラップによる成虫調査では、4属9種類6,542個体の成虫が採集され、アカイエカ、イナトミシオカ、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカが優占種であった。ヒトスジシマカ

以外の優占種はみな津波被害を受けた地域での密度の方が被害を受けなかった地域よりも有意に高かった。トラップ採集によって捕獲された吸血蚊の吸血源動物を同定したところ、アカイエカはシジュウカラをイナトミシオカはドブネズミを吸血していた。水田地帯に形成された水域は平均0.47~0.21%の塩分を含んでいた。

・7月下旬から9月上旬の宮城、岩手県の津波被災地において、住宅地や低層のビルなどがあつた市街地で幼虫調査を行った。その地域には点々と浄化槽、浄化槽に関連したタンク等の構造物、トイレの便槽、建物のコンクリートで囲まれた基礎などが点在し、ほぼ全てに水が溜まっており、多くに蚊の幼虫が発生していた。蚊の種類としては、アカイエカ、トウゴウヤブカ、キンイロヤブカ、シナハマダラカの4種類であった。塩分濃度の高い水域でトウゴウヤブ、イナトミシオカ、シナハマダラカが、低い水域ではアカイエカ、ヤマトヤブカが発生していた。これらの結果から、アカイエカ、コガタアカイエカ、シナハマダラカの幼虫は1.5%未満の塩分濃度で発育できることが明らかとなった。

(媒介蚊からのウイルス検出、感染症の診断およびワクチン開発に関する研究)

・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、本ウイルスはラブド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。

・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、ヒトスジシマカ♀1499頭、アカイエカ群♀954頭、コガタアカイエカ♀116頭の計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