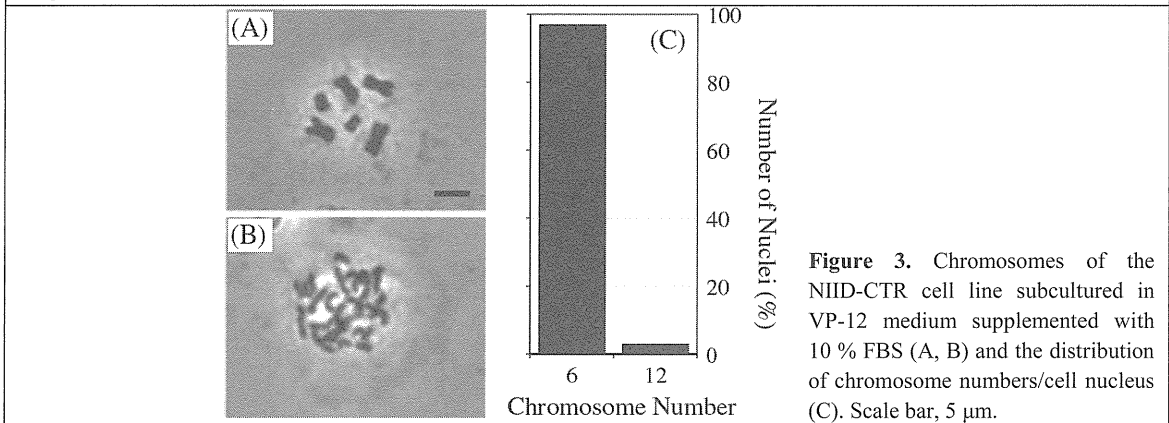
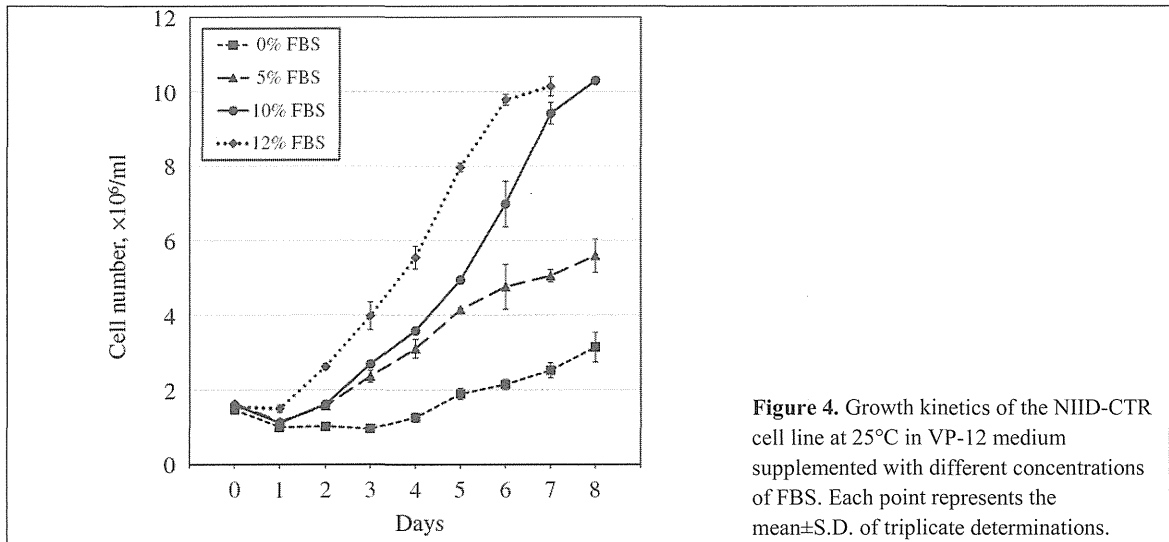
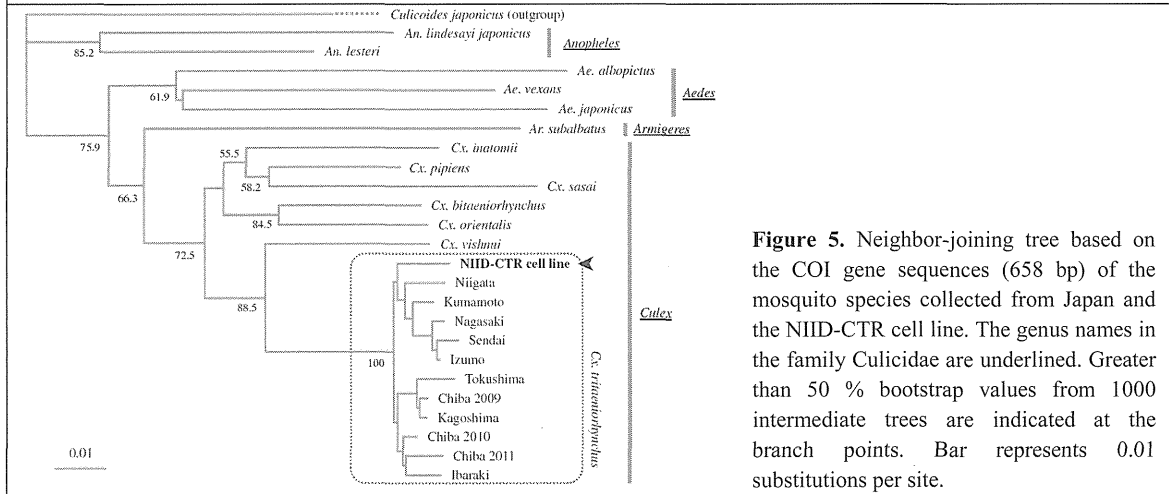


**Figure 2.** Monolayer of *C. tritaeniorhynchus* cells. In the figure, the upper three images show the cells at the 1st (A), 3rd (B), and 7th (C) passages. The lower three images show the cells at the 60th passage under  $\times 100$  (D),  $\times 200$  (E), and  $\times 400$  (F) magnification. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

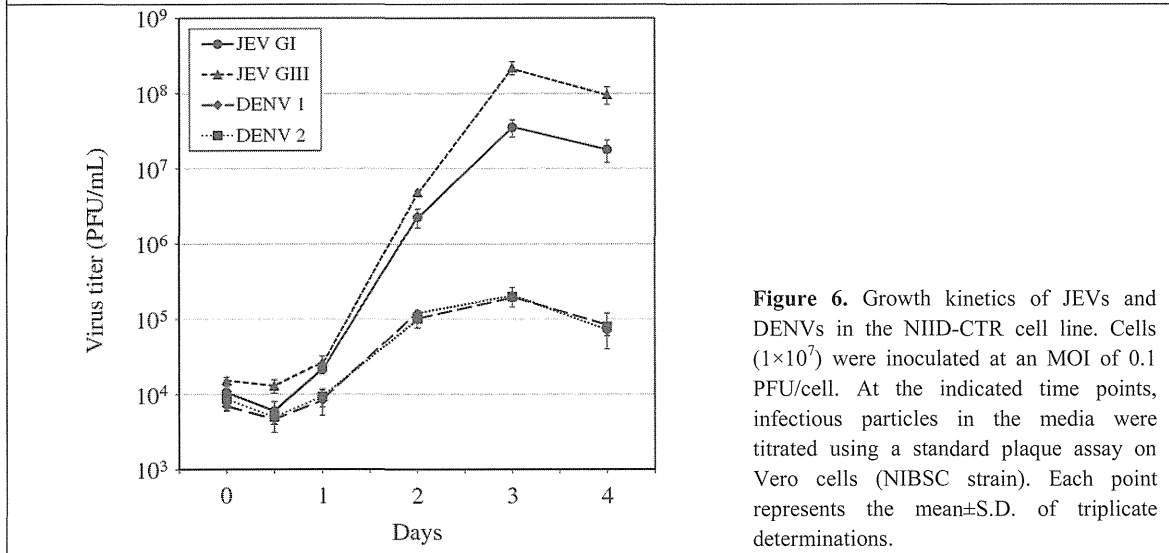




**Figure 4.** Growth kinetics of the NIID-CTR cell line at 25°C in VP-12 medium supplemented with different concentrations of FBS. Each point represents the mean±S.D. of triplicate determinations.



**Figure 5.** Neighbor-joining tree based on the COI gene sequences (658 bp) of the mosquito species collected from Japan and the NIID-CTR cell line. The genus names in the family Culicidae are underlined. Greater than 50 % bootstrap values from 1000 intermediate trees are indicated at the branch points. Bar represents 0.01 substitutions per site.



**Figure 6.** Growth kinetics of JEVs and DENVs in the NIID-CTR cell line. Cells ( $1 \times 10^7$ ) were inoculated at an MOI of 0.1 PFU/cell. At the indicated time points, infectious particles in the media were titrated using a standard plaque assay on Vero cells (NIBSC strain). Each point represents the mean±S.D. of triplicate determinations.

気象解析に基づく日本脳炎ウイルス媒介蚊コガタアカイエカの移動と分散に関する研究

協力研究者	田中 淳	新潟市保健衛生部保健所・環境衛生課
協力研究者	井川 穰	新潟市保健衛生部保健所・環境衛生課
協力研究者	齊藤 哲也	新潟市保健衛生部衛生環境研究所
協力研究者	山内 健生	富山県衛生研究所
協力研究者	渡辺 護	富山県衛生研究所
協力研究者	澤邊 京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部

研究要旨

各種病原体の人及び家畜への伝播を正しく評価するためには、野外蚊集団内の病原体保有状況や、現在の流行株に対する情報の蓄積が必要であるとの観点から、2003年より全国各地において蚊を捕集し、それら捕集蚊の病原体保有状況を調査してきた。特に、日本脳炎ウイルス（JEV）分離を目的として、2005年からの5年間で1都20県において蚊捕集調査を実施し、うち7県の捕集蚊から合計124株の日本脳炎ウイルスを分離した。分離株の多くは四国・九州で捕集した蚊から得られたが、東日本でも静岡県、富山県、新潟県の蚊が日本脳炎ウイルスを保有していることも判明した。新潟県においては、2007年に新潟市佐潟で捕集されたコガタアカイエカ（231頭）からJEVが分離され、ブタのHI抗体価も年によっては上昇している。このように、ブタ及び蚊体内でのJEVの活動は依然として活発であり、全国的に日本脳炎の流行が危惧される状況にあると言える。近年のウイルス分離株とコガタアカイエカの遺伝子解析から、そのどちらも海外から侵入しているであろうことが強く示唆されている。そこで我々は、2010年、2011年に九州各地で捕集された蚊の発消長、及び同年に得られた富山県、新潟県における捕集成果を中心に、気象データとの照合を試み、コガタアカイエカの海外からの移動とその後の国内各地への移動と分散を評価するための研究を行うこととした。新潟県におけるコガタアカイエカの調査として、佐潟周辺の豚舎で、2010年、2011年、2012年に捕集調査を行い、得られた蚊の捕集成績に関し、詳細な気象解析を実施した。捕集はドライアイスを誘引源としたCDC型ライトトラップを用いた。

A. 研究目的

日本脳炎の媒介蚊としてコガタアカイエカ（以下「本種蚊」という）は重要であるが、我が国の成虫の生息密度には大きな地域差があるとされている。

国立感染症研究所が2005年からの5年間で1都20県において蚊捕集調査を実施し、うち7県の捕集蚊から合計124株の日本脳炎ウイルス（JEV）を分離した。分離株の多くは四国・九州で捕集した蚊から得られたが、東日

本でも静岡県、富山県、新潟県の蚊がJEVを保有していることも判明した。2007年、国立感染症研究所の先行研究として新潟市佐潟で行った調査において、捕集された231頭の本種蚊から本ウイルスが分離された（沢辺ら2008）。日本脳炎は、1992年以降、国内での患者数は年間10人以下となっている。しかし、ブタのHI抗体価も年によっては上昇している。ブタ及び蚊体内でのウイルスの活動は依然として活発であり、全国的に日本脳炎の流

行が危惧される状況にあると言える。

JEV が分離された新潟市では、それまで豚舎周辺でのトラップを用いた蚊の調査が行われておらず、豚舎周辺における本種蚊の発生状況が明らかになっていないことから、2010年、2011年、2012年に豚舎での蚊の捕集調査を実施した。

近年のウイルス分離株と媒介蚊である本種蚊の遺伝子解析から、そのどちらも海外から侵入しているであろうことが、強く示唆されている。本研究は、当市で得られた捕集結果をもとに、本種蚊の国内外からの移動と分散を気象解析結果から考察し、本種蚊の長距離移動についての実態を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

2010年、2011年、2012年ともに同じ豚舎（定点：37°73'6" N, 138°9'08" E）で捕集した本種蚊を対象とした。当該豚舎は、2007年9月に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 km 離れているが、佐潟に一番近く、その西側に位置した豚舎である。

トラップは、毎週1回、24時間設置とした（概ね水曜日に設置、木曜日回収）。トラップはCDC型ライトトラップ（豆電球は取外し）を使用。地上約2 m に設置し、誘引源としてドライアイス約1 kg 容器に入れ、トラップ横に吊るした。過去の気温のデータは気象庁の指定気圧面観測データ（捕集地点のデータがないため輪島上空のデータを参考にした）及びNOAA（アメリカ海洋大気庁）の気象データ（解析モデル：Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory Model）により、高層観測等と高度100 m から3,000 m の後方・前方流跡線の気象解析を行い、豚舎周辺で得られた本種蚊の捕集成績と富山県衛生研究所が行った畜舎（6定点）での発生活長を引用し、本種蚊の国内外からの移動と分散を考察した。

## C. 研究結果

2010年、本種蚊の総捕集数は3,691頭（捕集総数の60%）で、8月19日に前週の30倍以上の1,346頭が捕集されたため、捕集ピークと思われた（表1）。しかし、調査を14週で終了したため発生活長調査としては、不十分であった。そのため、2011年、2012年は4月中旬より開始し、捕集が認められなくなるまで実施した。一方、富山県衛生研究所が畜舎（6定点）で行っている本種蚊の捕集結果では、新潟市の捕集ピークの前日、8月18日に6定点合計で60,219頭が捕集され（表2）、畜舎（6定点）での2010年の捕集ピークであった。

2011年は2,268頭捕集されたが（捕集総数の48.5%）、初めて捕集が確認されたのは5月25日で、8月25日に捕集ピークが認められた（表3）。一方、富山県の本種蚊の捕集数は、前年同様に1日前の8月24日に59,564頭に達し、2011年の捕集ピークであった（表4）。

2012年は合計3,828頭が捕集され（捕集総数の65.5%）、初めて捕集が認められたのは7月25日と前年より約2ヶ月遅く、8月8日に若干のピークが見られ、8月29日から9月19日の間に多くの捕集があり、特に9月5日には捕集ピークが認められ、捕集が見られなくなったのは前年とほぼ同じ10月10日であった（表5）。新潟市の9月5日の捕集データと富山県の本種蚊の捕集ピークの比較を、今年度も行う予定であったが、富山県内の畜舎での捕集数が膨大なため、現在解析中である。

新潟市と富山県におけるアカイエカの捕集ピークは、2010年、2011年、2012年ともに、6月の下旬又は、7月上旬に1度目の捕集ピークがあり、2度目の捕集ピークは本種蚊の捕集ピークにほぼ一致していた。以前より、アカイエカの捕集ピークは2度、本種蚊は1度と言われていたが、本種蚊については捕集データを視るだけでは2度のピークとして確認は出来ない。しかし、2011年、2012年に若干ではあるが2度のピークがあったことから、本種蚊の捕集ピークの回数等、今後も捕集調

査を行い注視していきたい。

図1にNOAA（アメリカ海洋大気庁）による1,000 mおよび1,600 m上空の後方流跡線解析から24時間前からの気流を推定した。2010年の捕集ピークが認められた8月19日捕集の本種蚊（表1）と、前日に富山県で捕集された蚊（表2）は同じ気流で飛翔又は移動してきた可能性がある（図1）。気象庁の指定気圧面観測データでは、2010年8月19日の上空約1,100 m（900 hpa）で、気温21.1℃、湿度74%、約1,600 m（850 hpa）で、気温21.3℃、湿度21%が確認されている（表6）。

2011年は、8月25日に捕集ピーク（表4）が認められ、富山県の捕集ピーク（表5）は、前年同様に1日前の8月24日に59,564頭に達した。8月25日のNOAAの後方流跡線気象データ（図2）は、前年のピーク一致日（8月19日）とは異なる気流であったことが推察されたが、気象庁のデータでは、上空約1,000 m（900 hpa）で、気温20.3℃、湿度85%、約1,500 m（850 hpa）で、気温17.3℃、湿度94%が確認されている（表7）。

2012年、新潟市・富山県の本種蚊の捕集ピークの比較は実施中であるが、2012年9月5日の上空約1,100 m（900 hpa）で、気温20.1℃、湿度72%、約1,600 m（850 hpa）で、気温16.8℃、湿度86%が確認された（表8）。同日のNOAAによる後方流跡線気象データ（図3）は、2010年8月19日の推定気流（図1）と類似し、気象庁のデータも類似していた（表8）。

なお、本種蚊を用いた日本脳炎のウイルス検査については、2010年は新潟検疫所が行い、2011年、2012年については新潟市衛生環境研究所で行ったが、全て陰性であった。

#### D. 考察

フライトミル飛翔実験によると、25℃で飼育し20℃下で飛翔させた場合に最も飛翔（最高38時間連続で飛翔）することが明らかになっている。そのため、NOAAの後方流跡線（図1）が示す高度1,600 mで気温21.3℃であれば、本種蚊が長距離飛翔を行う事が可能な条件が

あったと推測でき、国内外からの長距離飛翔又は下層ジェット気流（700～900 hpa）で運ばれてきた可能性が考えられる。

本種蚊の長距離飛翔に関しては、海外より日本に飛来侵入する可能性について沢辺らが2011年および2012年の第63回・64回日本衛生動物学会で示唆している。

次年度以降も引き続き豚舎周辺の捕集調査を継続し、本種蚊の発消長や捕集ピークの確認、富山県や他県で行われている本種蚊の捕集調査による発消長を基に、NOAAの気象データ、気象庁の観測データ等により国内外からの本種蚊の長距離飛翔と分散を解析したい。

#### E. 結論

日本脳炎ウイルス（JEV）は、2005年からの5年間で1都20県において、7県の捕集蚊から合計124株を分離した。多くは四国・九州で捕集した蚊から得られたが、東日本でも静岡県、富山県、新潟県の蚊が日本脳炎ウイルスを保有していることも判明した。新潟県においては、2007年に新潟市佐潟で捕集されたコガタアカイエカ（231頭）からJEVが分離され、ブタのHI抗体価も年によっては上昇している。このように、ブタおよび蚊体内でのJEVの活動は依然として活発であり、全国的に日本脳炎の流行が危惧される状況にあると言える。近年のウイルス分離株とコガタアカイエカの遺伝子解析から、そのどちらも海外から侵入しているであろうことが強く示唆されている。解析するにあたっては、国内での本種蚊の捕集調査が必要不可欠と言える。そして、これらに従事する人材育成が急務である。

#### F. 健康危機情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

なし

#### 学会発表

1. 沢辺京子, 新井智, 大塚彰, 松村正哉, 衛藤友紀, 梁瀬徹, 井上英明, 今西望, Sudipta Roychoudhury, 楸田龍星, 多屋馨子, 小林睦生. コガタアカイエカの海外からの飛来とその飛翔能力の評価. 第47回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 阿蘇市, 2012年5月

#### 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 2010年 新潟市西蒲区豚舎周辺におけるコガタアカイエカ等雌成虫捕集結果

週	月日	種別						合計
		アカイエカ	コガタ	ヒトスジ	オオグロ	ハマダラ	ハマダライエ	
第1週	6月16日	23	2					25
第2週	6月24日	76	7	2		1	1	88
第3週	7月1日	297	1	2		2		302
第4週	7月8日	437		1	2	1		441
第5週	7月15日	141	4					145
第6週	7月21日	287	69	3		11	1	371
第7週	7月27日	100	12	1		1		114
第8週	8月3日	153	35			31		219
第9週	8月11日	142	42	1		8	1	194
第10週	8月19日	371	1346			80		1797
第11週	8月26日	91	599	1	1	16		708
第12週	9月2日	86	542			15		643
第13週	9月9日	27	370	1		7	1	406
第14週	9月16日	20	662	1		6	1	690
合計		2251	3691	13	3	179	5	6143

表2 2010年富山県内6定点(畜舎)におけるコガタアカイエカ雌成虫の週1日捕集数

調査日	調査地点						合計
	1.黒部	2.上市	3.黒牧	4.大井	5.小矢部	6.婦中	
6月9日	1	5	5	286	24	4	325
16日	3	12	1	19	50	15	100
23日	4	1	1	1,096	17	16	1,135
30日	9	50	8	2,283	216	-	2,566
7月7日	18	18	6	535	195	146	918
14日	35	36	4	1,608	196	125	2,004
21日	-	26	14	11,241	1,066	293	12,640
28日	38	79	11	2,621	422	-	3,171
8月4日	67	637	114	13,084	2,396	-	16,298
11日	292	733	159	5,163	1,144	6,182	13,673
18日	871	3,243	155	15,138	8,856	31,956	60,219
25日	1,308	1,590	515	9,065	6,762	4,318	23,558
9月1日	-	2,313	517	25,480	11,819	3,888	44,017
8日	3,108	-	47	18,801	23,278	-	45,234
15日	1,669	715	174	3,258	9,524	1,610	16,950
22日	944	4,212	55	34,487	3,023	2,016	44,737
29日	391	404	11	2,696	1,412	221	5,135
10月6日	23	166	2	411	629	95	1,326
13日	25	97	2	554	166	8	852
20日	6	10	-	-	32	9	57
27日	0	0	-	-	5	0	5
計	8,812	14,347	1,801	147,826	71,232	50,902	294,920

「-」はトラップの故障等による欠測を示す。

表3 2011年 新潟市西蒲区豚舎周辺におけるコガタアカイエカ等雌成虫捕集結果

週	月日	種別						合計
		アカイエカ	コガタ	ヒトスジ	オオグロ	ハマダラ	ハマダライエ	
第1週	4月20日							0
第2週	4月27日							0
第3週	5月11日	1						1
第4週	5月18日							0
第5週	5月25日		2					2
第6週	6月1日	8	2					10
第7週	6月8日	255	1					256
第8週	6月15日	432	8					440
第9週	6月22日	498	12					510
第10週	6月29日	269	6					275
第11週	7月6日	317	32	12				361
第12週	7月13日	65	68	3				136
第13週	7月20日	5	3	3		1		12
第14週	7月27日	22	86	4		1		113
第15週	8月3日	33	152	8		3		196
第16週	8月10日	17	74			3		94
第17週	8月17日	9	98	3		1		111
第18週	8月25日	111	752	1		6		870
第19週	8月31日	82	703	5	1	3		794
第20週	9月7日	49	82	2		1		134
第21週	9月14日	42	47	13				102
第22週	9月21日	49	109					158
第23週	9月28日	21	12	6				39
第24週	10月5日	1	18	8				27
第25週	10月12日		1	9				10
第26週	10月19日			6				6
第27週	10月26日			1				1
第28週	11月1日	1		15				16
第29週	11月9日			1				1
第30週	11月16日							
第31週	11月24日							
合計		2287	2268	100	1	19	0	4675

表4 2011年富山県内6定点(畜舎)におけるコガタアカイエカ雌成虫の週1日捕集数

調査日	調査地点						合計
	1. 黒部	2. 上市	3. 黒牧	4. 大井	5. 小矢部	6. 婦中	
6月1日	3	-	7	157	4	3	174
8日	24	32	15	405	69	22	567
15日	10	10	2	148	49	8	227
22日	61	18	13	790	201	145	1,228
29日	91	-	6	2,426	439	226	3,188
7月6日	159	36	0	3,898	-	760	4,853
13日	283	99	28	3,973	1,646	1,382	7,411
20日	-	66	7	2,414	1,741	1,022	5,250
27日	-	1,156	28	9,771	2,918	4,020	17,893
8月3日	-	574	24	7,140	5,212	3,321	16,271
10日	2,223	1,200	8	9,981	2,017	3,232	18,661
17日	15,219	2,426	88	21,169	3,003	8,021	49,926
24日	11,976	7,926	223	21,012	7,028	11,399	59,564
31日	-	3,718	117	27,726	14,237	1,877	47,675
9月7日	3,068	1,806	110	23,135	1,463	491	30,073
14日	2,443	481	15	9,949	4,882	253	18,023
21日	1,343	721	29	5,708	-	291	8,092
28日	-	343	-	720	627	38	1,728
10月5日	48	236	2	1,621	510	30	2,447
12日	14	25	0	23	21	-	83
19日	1	2	-	-	2	1	6
26日	4	0	-	-	-	1	5
計	36,970	20,875	722	152,166	46,069	36,543	293,345

「-」はトラップの故障等による欠測を示す。



表5 2012年 新潟市西蒲区豚舎周辺におけるコガタアカイエカ等雌成虫捕集結果

週	月日	種別							合計
		アカイエカ	コガタ	ヒトスジ	オオグロ	ハマダラ	ハマダライエ	カラツ	
第1週	4月25日								0
第2週	5月1日	1							1
第3週	5月9日								0
第4週	5月16日								0
第5週	5月23日	1							1
第6週	5月30日	4		3					7
第7週	6月6日	12		2					14
第8週	6月13日	54		2					56
第9週	6月20日	14							14
第10週	6月27日	314		19					333
第11週	7月4日	259		1					260
第12週	7月11日	292		1					293
第13週	7月18日	41		4					45
第14週	7月25日	57	5						62
第15週	8月1日	27	8	2					37
第16週	8月8日	133	235	2		7			377
第17週	8月15日	181	32	7		1			221
第18週	8月22日	104	47	2					153
第19週	8月29日	87	578	11		2			678
第20週	9月5日	90	1265	4		4			1363
第21週	9月12日	46	693	17		4			760
第22週	9月19日	69	903	8		2			982
第23週	9月26日	38	56	11		2			107
第24週	10月3日	11	5	19					35
第25週	10月10日	5	1	11					17
第26週	10月17日	1		18					19
第27週	10月24日	1		2					3
第28週	10月31日								
第29週	11月7日								
第30週	11月14日								
第31週	11月21日								
合計		1842	3828	146	0	22	0	0	5838

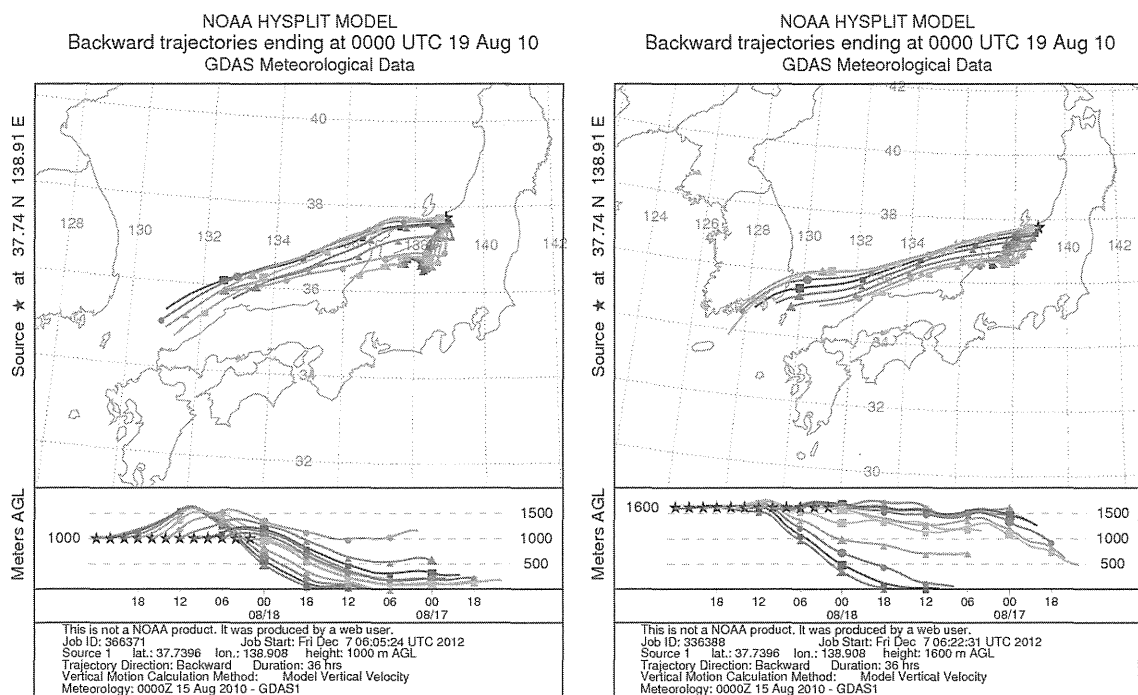


図1 NOAA（アメリカ海洋大気庁）による高度1,000mおよび1,600m地点における後方流跡線（Backward）解析。日時：2010年8月19日，蚊捕集地：新潟県新潟市西蒲区馬堀（緯度：37,7396度，経度：138,908度）

表6 2010年輪島市における指定気圧面の観測データ（気象庁による）

【輪島 2010年8月19日9時】

地上

気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1020.2	10	27.7	78	2.2	30

指定気圧面

気圧(hPa)	ジオポテンシャル高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1000	187	24.7	88	3	45
925	871	22.1	74	2	109
900	1109	21.2	74	0	-
850	1605	21.3	21	1	282
800	2126	17.6	45	2	301
700	3254	11.1	57	7	297
600	4524	3.9	51	7	285
500	5987	-4.2	39	4	306
400	7714	-15.2	23	4	23

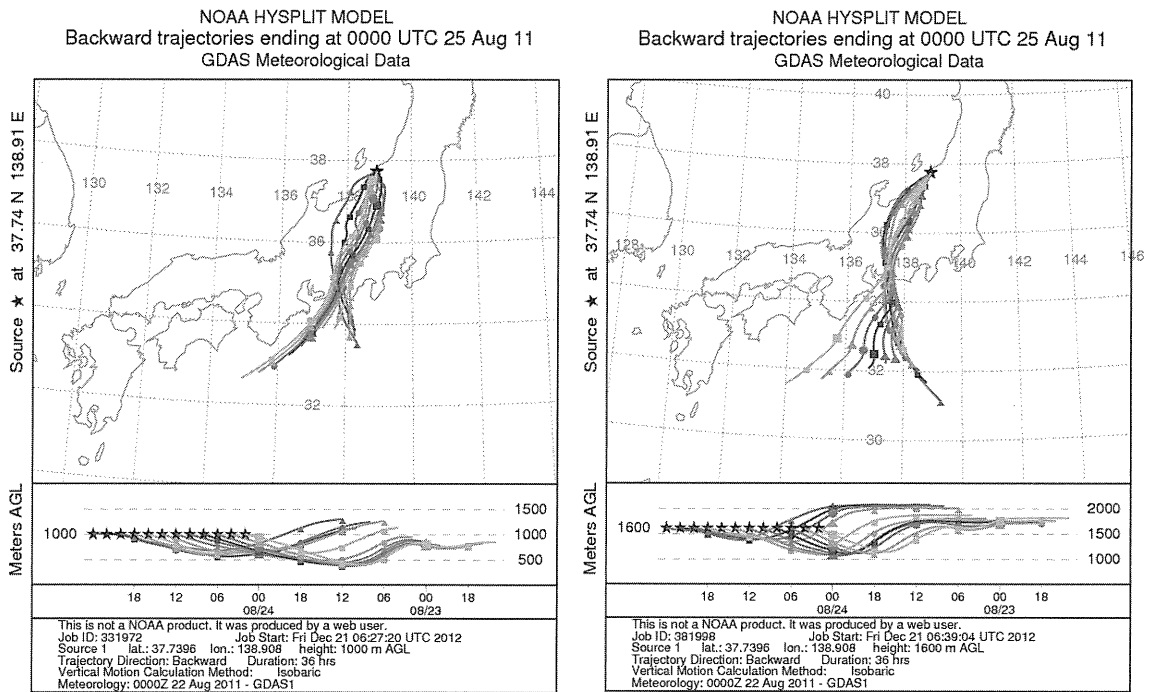


図2 NOAA（アメリカ海洋大気庁）による高度1,000mおよび1,600m地点における後方流跡線（Backward）解析。日時：2011年8月25日，蚊捕集地：新潟県新潟市西蒲区馬堀（緯度：37,7396度，経度：138,908度）

表7 2011年輪島市における指定気圧面の観測データ（気象庁による）

【輪島 2011年8月25日9時】

地上

気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1012.1	10	27.9	79	0.8	140

指定気圧面

気圧(hPa)	ジオポテンシャル高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1000	117	26.9	77	4	315
925	803	22.1	77	7	283
900	1041	20.3	85	7	266
850	1534	17.3	94	9	234
800	2051	14.1	95	10	220
700	3169	8.4	64	14	227
600	4428	1.9	44	14	232
500	5879	-5.5	74	19	249
400	7599	-16.2	75	22	249

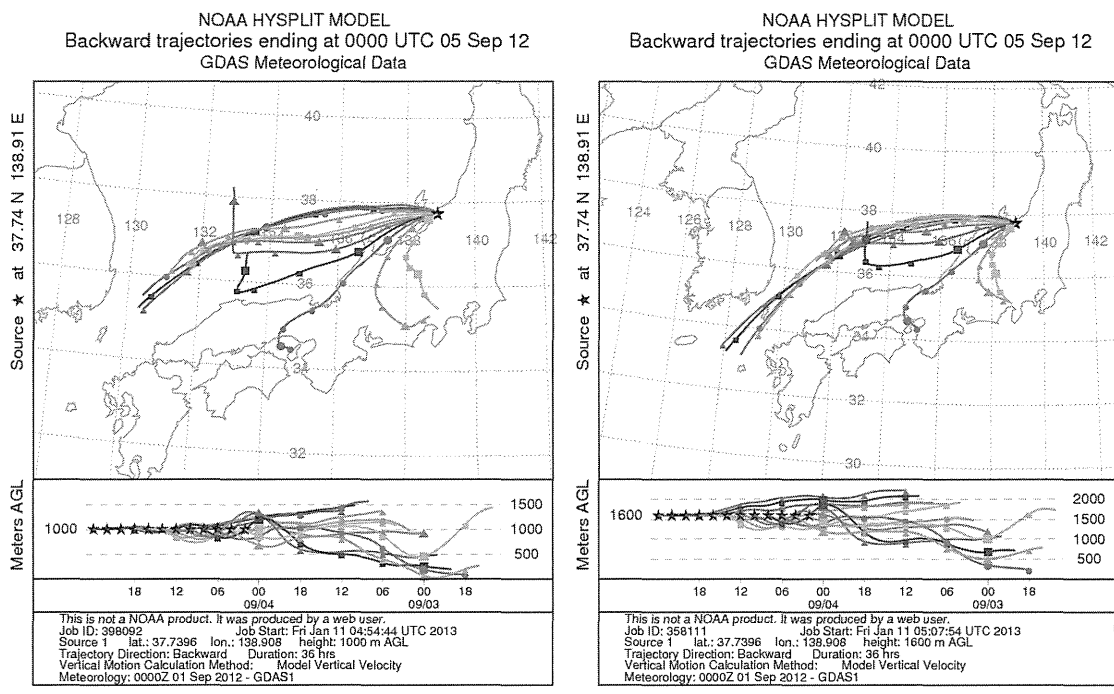


図3 NOAA (アメリカ海洋大気庁) による高度 1,000m および 1,600m 地点における後方流跡線 (Backward) 解析. 日時: 2012年9月5日, 蚊捕集地: 新潟県新潟市西蒲区馬堀 (緯度: 37,7396 度, 経度: 138,908 度)

表8 2012年輪島市における指定気圧面の観測データ (気象庁による)

【輪島 2012年9月5日9時】

地上

気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1017.9	10	26.3	80	2.2	220

指定気圧面

気圧(hPa)	ジオポテンシャル高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1000	167	24.8	77	2	191
925	849	22.0	61	2	213
900	1087	20.1	72	3	213
850	1578	16.8	86	7	219
800	2093	13.4	89	8	232
700	3208	7.3	75	8	235
600	4465	2.0	30	6	205
500	5910	-7.1	53	9	227
400	7613	-18.8	59	8	192

九州地方におけるアカイエカ種群の分布に関する遺伝学的解析のための  
マイクロサテライト領域の検索

分担研究者 大塚 靖（大分大学・医学部）  
協力研究者 澤邊京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部）

研究要旨

アカイエカ種群は日本においてはアカイエカ (*Culex pipiens pallens*)、チカイエカ (*Culex pipiens form molestus*)、ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が存在する。これらアカイエカ種群の種はウエストナイルウイルスが日本に侵入した場合、主要な媒介蚊となる可能性が指摘されており、これらの種の分布を正確に知ることが重要となってくる。これら 3 種は形態だけでなく遺伝的にも近似しており、それらの地理分布を DNA レベルで検討することが難しかった。しかし近年マイクロサテライトマーカーを用いてアカイエカ種群の分布を調べるようになってきた。しかしこれまで東アジアに分布するアカイエカ (*Culex pipiens pallens*) に対しては検討されていなかった。日本産のアカイエカ種群の分布を調べるにはアカイエカに有効なマイクロサテライト領域が必要となる。そこでこれまでのアカイエカ種群に用いられた領域を日本産アカイエカ種群に有効かどうかを確認した。用いた 13 の領域のうち 5 領域が有効なことを確認した。さらに多くの有効なマイクロサテライト領域を得るため、日本産アカイエカのゲノム DNA より新規の 29 のマイクロサテライト領域を得た。これら新規の領域については集団での変異を確認する必要がある。今後これらマイクロサテライトマーカーを用いて、九州におけるアカイエカ種群の地理的分布、特にネッタイエカが九州本土に定着しているかどうかを調べて行く。

A. 研究目的

アカイエカ種群は日本においてはアカイエカ (*Culex pipiens pallens*)、チカイエカ (*Culex pipiens form molestus*)、ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が存在する。これらアカイエカ種群蚊は、ウエストナイルウイルスが日本に侵入した場合、主要な媒介蚊となる可能性が指摘されており、それらの分布を正確に知ることが重要となっている。しかし、この3種は形態では非常に似ており、特に雌成虫での同定は難しい。これらのアカイエカ種群は遺伝的にも近似しており、種分類でよく使われるミトコンドリア領域の配列

は極めて近く、ミトコンドリア領域で正確に3種を分けることは難しい。近年、マイクロサテライトを用いた解析によりトビイロイエカ (*Culex pipiens pipiens*)、チカイエカ、ネッタイエカの遺伝的違いや地理的分布を調べている(Fonseca et al., 2004, Fenseca et al., 2006, Huang et al., 2008)。しかし、それらの研究では東アジアに分布しているアカイエカに関しては行なわれていない。

九州地方のアカイエカ種群の分布に関しては、本来ネッタイエカは日本では南西諸島にのみ分布しているとされるが、九州本土にも生息(または飛来)しているのではな

いかとの考えもあるので、アカイエカ種群の正確な分布を調べる必要がある。

本研究では日本産アカイエカ種群の遺伝解析に有用なマイクロサテライト領域を決定する。

## B. 研究方法

### 1. これまでに報告されているマイクロサテライト領域の検討

アカイエカ種群のマイクロサテライトによる研究としては、Fonseca et al. (1998), Keyghobadi et al. (2004), Smith et al. (2005) などがあり、それらの研究で使われている13領域(CQ11, CQ26, CQ29, CQ41, CxqGT4, CxqGT6, CxqGT17, CxpGT4, CxpGT9, CxpGT12, CxpGT12, CxpGT46, CxpGT51)のプライマーが日本産のアカイエカ、チカイエカ、ネッタイエカで増幅出来るかを試みた。使用したアカイエカ、チカイエカは国立感染症研究所で継代飼育されている西宮、新宿系統をそれぞれ使用した。ネッタイエカは琉球大学で継代飼育されている系統を使用した。蚊のゲノムDNAは1匹の成虫からQIAGEN DNeasy Blood & Tissue kitを使用しkitに添付のAE溶液200  $\mu$ lで抽出した。PCR条件は20  $\mu$ lに0.5U *Ex Taq*, 1 $\times$ *Ex Taq* buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mMのそれぞれのプライマー, 1  $\mu$ lの抽出DNAを加え, 96°C5分の後, 96°C30秒, 54°C30秒, 72°C30秒を35回繰り返し, 最後に72°C5分で増幅を行なった。PCR産物は2%アガロースゲルで泳動し, エチジウムブロマイドで染色して増幅を確認した。3種とも増幅した領域の一方のプライマーを蛍光色素(6-FAM/VIC/NED/PET)で標識し, Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzerでフラグメント解析が行えるか確認した。

### 2. 新規のマイクロサテライト領域の検索

日本産アカイエカ種群に有効なマイクロ

サテライト領域をさらに得るために, ligation-mediated suppression PCR(Lian et al., 2001)を利用して新規のマイクロサテライト領域を検索した。国立感染症研究所で継代飼育しているアカイエカ西宮系統から抽出したDNAを*EcoRV*で切断し, そのDNA断片にアダプター(5'-GTAATACGACTCAC TATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCC GGGCTGGT-3'と3'末端をアミノ基で修飾した5'-ACCAGCCC-3')を付加した。(CA)<sub>n</sub>および(TACA)<sub>n</sub>のマイクロサテライト領域を増幅するために(CA)<sub>10</sub>およびDB(TACA)<sub>6</sub>TA, BV(ACAT)<sub>6</sub>A, VB(CATA)<sub>6</sub>, BD(ATAC)<sub>6</sub>A混合プライマー(Yuskianti et al., 2012)とアダプターの一部配列からなるプライマーAP1(5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3')を用いてPCRを行った。PCRの条件はLian et al. (2001)に従った。増幅したPCR産物をクローニングにして, 得られた組み換え体の配列を決定した。決定した配列から特異的プライマーを2個設計し, アダプターに含まれるAP1, AP2(5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3')でNested PCRを行い隣接領域の塩基配列を決定した。これらのマイクロサテライトの両側の配列からプライマーを設定し, 日本産のアカイエカ, チカイエカ, ネッタイエカでPCR増幅出来るかを試みた。PCR条件は上記の方法と同じである。またLian et al. (2006)の(AC)<sub>6</sub>(AG)<sub>5</sub>, または(TC)<sub>6</sub>(AC)<sub>5</sub>を使って片方の近隣領域を決めるだけでマイクロサテライト領域を決定できる方法も検討してみた。

## C. 研究結果

### 1. これまでに報告されているマイクロサテライト領域の検討

既知の13領域のプライマーをなかで5領域(CxqGT4, CxqGT6b, CxpGT4, CxpGT12, CxpGT51)が日本産アカイエカ種群の3種で安定的に増幅することができた(Table

1). さらにそれぞれの領域の片側のプライマーを蛍光標識しApplied Biosystems 3130 Genetic Analyzerでフラグメント解析をおこなった. その結果, CxqGT6b, CxpGT51には今回使用したサンプルが飼育系統にもかかわらず, 多型が見られた. しかし, 他の8領域 (CQ11, CQ26, CQ29, CQ41, CxqGT17, CxpGT9, CxpGT12, Cxp GT46)では安定的に増幅することができなかった.

## 2. 新規のマイクロサテライト領域の検索

アカイエカのゲノムDNAから合計52個のマイクロサテライト領域の配列を決定した. その内訳はCA反復が10領域, TACA反復が8領域, (AC)6(AG)nが15領域, (TC)6(AC)nが19領域である. CA反復とTACA反復領域については両側, (AC)6(AG)nと(TC)6(AC)n領域については片側のプライマーを用意し, 日本産アカイエカ種群の3種でPCR増幅するかどうか確かめた. その結果CA反復が4領域, TACA反復が5領域, (AC)6(AG)nが9領域, (TC)6 (AC)nが11領域の計29領域について3種での増幅が確認された. これらプライマーの配列とTm値およびアカイエカでのPCR産物のサイズ, 反復の数をTable 2に示した.

## D. 考察

既知のマイクロサテライト領域のプライマーも日本産アカイエカ種群に全て増幅する訳ではなかった. 増幅しない領域については, アカイエカで増幅しないことが多かった. よって新規マイクロサテライト領域ではアカイエカのゲノムDNAを使った.

今回は, Lian et al. (2006)で示された方法でマイクロサテライト領域を多く得られた. この方法は片側のプライマーを決定するだけでよいのでLian et al. (2001)に比べて大変簡便である. しかし得られた領域では反復数が少ないものがあった. 反復数が少ないと

種間および種内での変異が期待できなくなり, 解析に不適な場合がある. 今後は野外で採集したサンプルを用いてこれら領域がすべての個体に有効か, また種内に十分な多型が存在するかを確認して行きたい.

## E. 結論

日本に分布するアカイエカ種群であるアカイエカ, チカイエカ, ネットアイエカの地理的分布を遺伝解析するためのマイクロサテライトマーカを既知の領域から5領域について確認し, 日本産アカイエカのゲノムDNAより29領域について新規に開発した. 今後これらのマイクロサテライトマーカを利用して, 九州地方に分布するアカイエカ種群の地理的分布を検討して行く.

## F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

## G. 研究発表

1. 論文発表: なし
2. 学会発表: なし

## 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

Table 1, 日本産アカイエカ種群 3 種で有効な既知マイクロサテライト領域

Locus	Primer	size (bp)		
		アカイエカ	チカイエカ	ネッタイエカ
CxqGT4	F3: 5'-ATAGAACTTGTCGCCGTCTC-3' R: 5'-TCTAAACACGCACCACGTACA-3'	152	152	155
CxqGT6b	F: 5'-CAACCAGCAAAACCTCATC-3' R: 5'-TAGCCGGGCAGATTCATTAC-3'	131-139	141-139	131
CxpGT4	F: 5'-GTCGTCGCTAACCCCTTGTT-3' R: 5'-CGCGATAGTCGGTAATCGT-3'	141	145	143
CxpGT12	F: 5'-AACGTGAGCGTGATTGCTC-3' R: 5'-CAGCTGTTGCACCAATGTC-3'	158	156	152
CxpGT51	F: 5'-GAGTATCGCTCGTTGGAGATT-3' R: 5'-ACCCTCTTTTCTTTCTATGTCTGT-3'	143	134-153	104-122

Table 2, 新規に開発した日本産アカイエカ種群に対するマイクロサテライト領域

Locus	primer	Tm (°C)	Size (bp)*	repeat*
Cpp-AC-009	F: 5'-GGTTCCTCGTCGATGTTGTT-3'	63.9	135	(AC)12
	R: 5'-TTGTTTCGTCCTCAACTGTCCA-3'	64.2		
Cpp-AC-012	F: 5'-GTGCCACCTCAAGTGTGAGA-3'	64.1	98	(AC)18
	R: 5'-TCCGATGTTTCATTGGTTCC-3'	64.6		
Cpp-AC-014	F: 5'-CGGGCTGGTTAGAGATATGG-3'	63.2	78	(AC)25
	R: 5'-ACCACCATTTTCAGCGTGTA-3'	62.9		
Cpp-AC-033	F: 5'-ATCTGCATGGCTTAGATTCC-3'	60.6	158	(AC)35
	R: 5'-ATCTGCGGAATTAGATTTGC-3'	60.6		
Cpp-4b-003	F: 5'-GACTTCGGATGATCGAGTTT-3'	60.6	189	(TACA)32
	R: 5'-TTGTTTAAATGTGCGTGTGAATG-3'	63.2		
Cpp-4b-004	F: 5'-ATTGTGCTGCTTGAGGAGTGT-3'	61.3	121	(TACA)10
	R: 5'-5'-CATGCAAAAAGTTTCCAAATG-3'	60.5		
Cpp-4b-007	F: 5'-ATTGAATGGTTTCCCAATGT-3'	60.5	210	(TACA)41
	R: 5'-TCGAAAACCCACCTTGATGT-3'	64.2		
Cpp-4b-008	F: 5'-CGACTCAGAATCGAAAATG-3'	60	87	(TACA)13
	R: 5'-AGATCTCCTTTTTCGAGCAC-3'	63.4		
Cpp-4b-025	F: 5'-CAGAGCTGAGCCAGTCCTTT-3'	63.6	145	(TACA)21
	R: 5'-TTGTTTTACTCAAGCGTTTT-3'	60.2		
Cpp-ACAG-001	F: 5'-TAATCGTTGGAAGCACCAT-3'	60.5	78	(AG)8
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-ACAG-014	F: 5'-TTACAACCCAAACTCACCAC-3'	59.9	98	(AG)11
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-ACAG-014	F: 5'-GACAGCTCCTTAACATTTTCG-3'	60.4	106	(AG)8
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-ACAG-015	F: 5'-CGGGCTGGTTCAAATAAAT-3'	61.2	128	(AG)10
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-ACAG-016	F: 5'-GAAAATTGCGACATAGCTGA-3'	60.4	148	(AG)8
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-ACAG-027	F: 5'-CCTTCTCAACAGCCGAGTAT-3'	60.8	189	(AG)8
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		

(づづく)



Table 2(つづき)

Cpp-ACAG-030	F: 5'-GGTCAAACGGTTCGAGTAGA-3'	61.7	141	(AG)9
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-ACAG-032	F: 5'-CCAATGGGCGTTTAATTG-3'	61.3	74	(AG)8
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-ACAG-037	F: 5'-GCTAACCGGTAGCGAAATTA-3'	60.6	88	(AG)8
	R: 5'-ACACACACACACAGAGAGAGAG-3'	59.6		
Cpp-TCAC-001	F: 5'-TAATCGTTGGAAGCACCAT-3'	60.3	92	(TC)12
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-004	F: 5'-GTATCAACTCGGATCGACCT-3'	60.5	114	(TC)8
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-008	F: 5'-CGGCTGATCTATTTTGTGAA-3'	60.1	154	(TC)26
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-010	F: 5'-GATAGCAGCATCAACAGC-3'	61	135	(TC)9
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-011	F: 5'-ATTTGGTGTCAAAGGGACTT-3'	59.8	126	(TC)8
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-014	F: 5'-GCAAGCCAGAAGGTAAAATC-3'	60.2	154	(TC)10
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-015	F: 5'-TAATTTCCGGTATTCCGGTGA-3'	61.6	96	(TC)8
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-016	F: 5'-ACGTATCTACCACCGAGAGC-3'	60.7	134	(TC)12
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-022	F: 5'-CGATCATCAAGGTAGGAAGG-3'	61	124	(TC)14
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-032	F: 5'-GGTGATAGTCACAACCAGCA-3'	61.2	114	(TC)8
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		
Cpp-TCAC-033	F: 5'-CTCTCGATTGACGAAAGACC-3'	61.4	171	(TC)8
	R: 5'-TCTCTCTCTCACACACACAC-3'	59.7		

\* size と repeat 数はアカイエカからクローニングした配列より

## トコジラミのピレスロイド抵抗性に関する全国調査

分担研究者 富田隆史（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
協力研究者 駒形 修（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
協力研究者 葛西真治（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
協力研究者 渡辺 護（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
協力研究者 糸川健太郎（国立感染症研究所昆虫医科学部）  
協力研究者 武藤敦彦（日本環境衛生センター環境生物部）  
協力研究者 橋本知幸（日本環境衛生センター環境生物部）  
協力研究者 皆川恵子（日本環境衛生センター環境生物部）  
協力研究者 數間 亨（日本環境衛生センター環境生物部）

### 研究要旨

米国のピレスロイド抵抗性トコジラミには、ピレスロイド作用点のナトリウムチャンネルの 2 座位にアミノ酸置換変異（V419L と L925I）が、それぞれ単一突然変異または二重突然変異として見出されており、ピレスロイド抵抗性の要因とみなされている。デルタメトリン含浸ろ紙継続接触法により処理し抵抗性と判定された 16 の日本産コロニーにおいても、一例を除き、これら 2 座位に関する単一変異または二重変異ハプロタイプのホモ接合体であり、作用点の変異がピレスロイド抵抗性コロニーの発生状況を知る有効な手がかりになることが示された。主に過去 3 年間に北海道から沖縄県にかけて採集された 80 コロニー分の日本産トコジラミを収集し、QProbe 法によりナトリウムチャンネル 2 座位に関する遺伝子型を決定したところ、野生型ハプロタイプのみ検出されたコロニーは 11%に過ぎず、ピレスロイド系殺虫剤のトコジラミ駆除への有効性が日本の大多数のコロニーにおいて失われていることが明らかになった。変異ハプロタイプとしては、V419—I925 単一変異型が二重変異型に対して優勢であった。これら変異ハプロタイプのいずれかがコロニーに含まれる場合は、その変異ハプロタイプの頻度が固定もしくは高頻度で含まれるコロニーが多数であった。

### A. 研究目的

トコジラミの吸血により生じる皮膚炎は、トコジラミ刺傷と呼ばれ、幼虫と成虫が吸血する際に注入する唾液腺物質に対するアレルギー反応であり、激しい痒みを伴うことが多い。トコジラミは 2000 年頃より米国、EU、オーストラリアで顕著に再増加してきたといわれているが、その最大の要因は、殺虫剤抵抗性の発達もしくは有効な殺虫剤が利用不能となっていたことにあると指摘されている(Boase, 2008)。日本においては、明確な統計はないものの、1960 年台以降よ

り近年まで、害虫駆除業者の活動などから見て、トコジラミの発生が問題視されることはなかったが、2005 年度より 6 年間に東京都における被害相談件数は約 10 倍に増大している（東京都福祉保健局，2013）。

日本も含め、近年のトコジラミの防除は、人畜への毒性の低さと臭気性の低さから、ピレスロイド系殺虫剤に依存してきた。室内試験に基づくピレスロイド抵抗性とその抵抗性機構に関する研究成果は 2000 年台後半になって米国の研究グループにより最初に報告された。それによると、米国产トコ

ジラミのピレスロイド抵抗性機構には、作用点ナトリウムチャンネルの感受性低下 (Yoon et al., 2008) とシトクロム P450 の代謝活性亢進 (Romero et al., 2009) が含まれていた。作用点の感受性低下には、ナトリウムチャンネルの V419L と L925I の 2 つのアミノ酸置換変異のいずれかまたは両方が係わることが示されている (Zhu et al., 2010)。また、これらの内のいずれかの変異を保有するコロニーが全米で優勢になっていることが明らかにされている (Zhu et al., 2010)。日本においては、抵抗性比で 10 倍以上となるような防除上明らかに問題となる感受性低下を表すピレスロイド抵抗性系統は、2010 年までに 1 つのコロニーの例しか報告されていなかった (渡辺, 2010)。また、米国産トコジラミと共通な抵抗性要因が含まれているかどうか不明であった。

本研究では、米国における先行研究の成果に基づき、上述のピレスロイド作用点変異を保有することが国内においてもピレスロイド抵抗性の指標となりうることを検証し、それらの変異を対象とした分子ジェノタイプング法を開発し、これを適用して抵抗性コロニーの頻度分布を推定するための全国調査を行った。

## B. 研究方法

トコジラミ系統：1972 年以前の採集に由来する殺虫剤感受性の帝京大系統 (日本環境衛生センター (JESC) 提供) と 2009 年と 2010 年に採集されその後室内で飼育しているピレスロイド抵抗性の、それぞれ、千葉コロニー (JESC 提供) と池袋コロニー (矢口昇提供) を用いた。

トコジラミ試料収集：トコジラミの送付はおもに東京ペストコントロール協会、大阪ペストコントロール協会、鵬図商事(株)、イカリ消毒(株)、矢口昇 (東京都豊島区池袋保健所)、夏秋優 (兵庫医科大学) に依頼し、2010 年より 2012 年にかけて試料を収集した。収集試料の一部にはこの収集期間

に先立ち採集され保存されていたものも含まれていた。

殺虫試験：ろ紙継続接触法に基づき殺虫剤感受性を判定した。デルタメトリン (和光純薬) を  $0.13 \text{ mg/cm}^2$  濃度となるよう処理したろ紙をシャーレ底に置き、その上にトコジラミを置き、 $25^\circ\text{C}$  に保ち、24 時間後の生死を観察した。設定したデルタメトリンのろ紙処理濃度は、殺虫剤感受性系統を 100% 殺す濃度の少なくとも 30 倍の濃度に相当する (Romero et al., 2009)。

分子ジェノタイプング：相補対形成/解離により消光/発光状態を可逆的に繰り返すことが可能な蛍光消光 DNA プロブ (QProbe) を用いる QProbe 法に基づき、標的 point mutation 部位の遺伝子型を決定した。その原理は次のとおりである。野生型遺伝子に相補的な QProbe を設計し、このプロブを添加して解析対象配列領域を PCR 増幅し、PCR 増幅後に増幅 DNA と QProbe をハイブリダイズさせ、蛍光を消光させた状態から温度を徐々に上げていくと、QProbe が解析対象配列から解離した時に (すなわち融解温度を超えた時に) 蛍光が観察されるようになる。ミスマッチのある変異遺伝子はミスマッチのない野生型の遺伝子よりも低い温度で蛍光が観察されるため、point mutation 多型 (SNP) 判別を可能とする。DNA 抽出は、REDExtract-N (Sigma) キットを用いてトコジラミ幼・成虫の個体ごとに行った。ナトリウムチャンネルの野生型遺伝子配列 (GenBank# FJ031996) に基づき、V419L (GTC→CTC) と L925I (CTT→ATT) のアミノ酸置換変異部位をそれぞれカバーする蛍光標識プロブ QProbe (CISC-QP5Y-F1: CTACCTCGTCAACTTGATTTTA; CISC-QP3G-R2: AATTACCAAGGGCACCAC) を受託合成した (日鉄住金環境)。V419L を標的とする対象配列の PCR 液 (25  $\mu\text{L}$  中) は、ExTaq HS (Takara) 0.125  $\mu\text{L}$ , 1  $\times$  ExTaq buffer, dNTP 0.2 mM, CISC-F15 (GAGGACGTGGCA CATGTTGTTCTTC) 45 nM, CISC-R16 (GAG GACCTTAGCTTGAGCTGCTTCC) 756 nM,

CISC-QP5Y-F1 0.2 uM, DNA 抽出液 1 uL とした. L925I を標的とする対象配列の PCR 液(25 uL 中)は, 上記の組成の内, CISC-F15, CISC-R16, および CISC-QP5Y-F1 をそれぞれ CISC-R20 (CAACTGCATTCCCATCACA G), CISC-F19 (GTCATGGCCAACACTCAAT C), CISC-QP3G-R2 に置き換えたものであった. PCR 及び融解曲線解析は, ABI 7500 Real-Time PCR System の上で行い, PCR サイクリング条件は, 95°C 2' > [95°C 15" > 55°C 30" > 68°C 15"]×40 回で, それに引き続く融解曲線解析は, 熱変性後のアニーリング温度を 40°C としたほかはシステムの標準プログラム通りに行った.

### C. 研究結果

ピレスロイド感受性と作用点変異の関連性: 実験室飼育系統 (またはコロニー) または直接採集個体に関するナトリウムチャンネル遺伝子型とピレスロイド系殺虫剤感受性を表 1 に示す. ここに, 本研究で実施した殺虫試験の結果はデルタメトリン含浸ろ紙継続接触法による「24 時間後の生存率」で表わされ, また, 引用した殺虫剤試験の結果はペルメトリン含浸ろ紙継続接触法による「抵抗性比」(感受性対照系統との比較に基づく) または「12 日後生存率」で表わされている. 殺虫剤感受性の帝京大系統では, ナトリウムチャンネル変異遺伝子は検出されず, デルタメトリンを用いた殺虫試験ですべて死亡した. これに対し, 千葉コロニーと池袋コロニーでは, 供試虫は全て I925 単一変異遺伝子のホモ接合体で, デルタメトリンを用いた殺虫試験では全て生残した. 一方, 富山 01 系統とその他の 4 コロニー (富山 08, 旭川, 石川, 那覇) に関しては, 系統 (またはコロニー) 内で I925 単一変異または二重変異遺伝子が含まれないか, もしくは存在していても低頻度であり, ペルメトリンを用いた殺虫試験でも試験系統 (またはコロニー) に高い抵抗性比もしくは実用上問題となりうる生残率は示されなかった (表 1 の上段). 直接採

集個体を供試虫とした場合 (表 1 の下段), 16 のコロニーに由来するトコジラミ試料のそれぞれには, デルタメトリンを用いた殺虫試験で半数またはそれ以上の高率で生残個体が観察された. その内の 1 つのコロニー「成田市 2012 年採集」の 2 頭の供試虫に関しては, ナトリウムチャンネル遺伝子の変異検出対象部位に変異が存在しなかったが, その他の 15 のコロニーの供試虫はいずれも I925 単一変異または二重変異をホモ接合の状態でも保有していた. 「成田市 2012 年採集」コロニーでは, 何らかの代謝抵抗性要因のみにより実用上問題となる抵抗性を表したものと推察される. これらの結果から, 実用上問題となりうるピレスロイド抵抗性の調査をナトリウムチャンネル遺伝子の分子ジェノタイプングにより簡易に実施できることが示された.

QProbe 法によるナトリウムチャンネル遺伝子型決定: まず, いくつかの系統と直接採集個体群を用い, V419 と L925 座位のそれぞれに関して, DNA シークエンシングにより QProbe 配列に対応する領域の DNA 配列を決定した. その結果として, 各座位の野生型または変異型のホモ接合体であることが判明した以下に述べる 3 つの系統 (または個体群) が保有した DNA を QProbe 法に基づく融解曲線解析の参照 DNA として選んだ. ここに, V419 と L925 に関する参照 DNA は帝京大系統 (V419—L925) のもの, L419 に関する参照 DNA は「金川市 2010 年 10 月 30 日採集」個体 (L419—L925) のもの, I925 に関する参照 DNA は千葉コロニー (V419—I925) のものとした. なお, 配列決定を行ったいずれのホモ接合体も, Yoon ら(2008)により最初に決定された米国産の FL-BB 系統 (V419—L925) または NY-BB 系統 (L419—I925) に示された DNA 配列と完全に一致していた. 次に, これらの参照 DNA をそれぞれ鋳型として用い, PCR 増幅を行い, 続いて融解曲線解析を行った. 融解曲線解析の結果の