

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）
「我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的対策の確立に関する研究」（H23-新興-一般-010）

分担研究報告書（H23-25 年度）

ヒトスジシマカのデングウイルス感受性の評価およびジェノタイピング法による媒介蚊の殺虫剤感受性評価に関する研究

研究分担者 澤邊京子（国立感染症研究所 昆虫医科学部長）
研究協力者 佐々木年則，葛西真治，斎藤一三，伊澤晴彦，鍬田龍星
（国立感染症研究所 昆虫医科学部）
比嘉由紀子，皆川昇（長崎大学熱帯医学研究所 病害動物部）
Arlene G. Bertuso（フィリピン大学マニラ校・寄生虫学講座）
田島茂、高崎智彦（国立感染症研究所 ウイルス第一部）

研究要旨

我が国への侵入が危惧される蚊媒介性ウイルス感染症に対する総合的防除法の確立を目指し、デングウイルスの国内産ヒトスジシマカにおける感受性を評価した。デングウイルス 1 型（DENV1）および 2 型（DENV2）を径口的に摂取させたヒトスジシマカから TaqMan プローブ法により、4 型（DENV4）以外のウイルス型のウイルスゲノム RNA が検出された。次いで、免疫蛍光抗体法をによりウイルス粒子を検出した結果、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸で確認されたが、DENV1 は観察されなかった。SYBR Green 法により国内外のヒトスジシマカのウイルス感受性を評価した結果、ヒトスジシマカのすべての系統で DENV1 は非常によく増殖したが、DENV2 の増殖率は低く、特にネッタイシマカでの増殖はほとんど確認できないほどであった。蚊種および系統によって DENV 感受性に差異はあると思われるが、少なくとも本研究で用いた国内産ヒトスジシマカにおいて、デングウイルスの増殖が確認されたことから、国内にデング熱が侵入した場合、小規模なアウトブレイクが起こる可能性はあると考えるべきであろう。また、国内でデング熱の患者が発生した場合には、患者宅周辺の蚊の密度調査を行うと同時に、殺虫剤を用いた迅速な蚊の防除を行うことが必要となる。

そこで、殺虫剤抵抗性遺伝子の変異領域をターゲットにしたジェノタイピング法により、媒介蚊の殺虫剤抵抗性を評価した。フィリピン国内で採集したネッタイシマカにおいて、薬剤感受性レベルを裏付けるように作用点ナトリウムチャンネルが変異した個体（V1016G および F1534C）が高頻度で見つかった。その一方で、抵抗性レベルが高いにもかかわらず *kdr* 遺伝子頻度が低い集団も確認された。作用点変異を指標にしたジェノタイピング法がある程度薬剤感受性の状況を反映していることが明らかになったが、*kdr* 因子以外の抵抗性要因がネッタイシマカのピレスロイド系殺虫剤抵抗性に関与していることも示唆された。今後は、ヒトスジシマカにおける作用点と解毒酵素の双方の突然変異をターゲットとしたジェノタイピング法を検討していく必要がある。

A. 研究目的

デング熱は地球温暖化と流行地の都市化現象が要因となり、流行地拡大が最も危惧される感染症である。我が国のデング熱輸入症例は年々増加し、2010年には220症例を超え、2013年は合計で249例を記録した。2013年9月には、日本各地を旅行したドイツ人女性が帰国後にデング熱を発症した。患者は日本国内で蚊に刺されたことを記憶していたこともあり国内感染が疑われた。日本国内にすでにデング熱が侵入している可能性が強く示唆された。ヒトスジシマカは日本国内に普遍的に分布するのみならず、その分布域を北に拡大させており、国内のヒトスジシマカのデングウイルス媒介能を正確に把握することが急がれる。

一方、デング熱の流行地においてはネッタイシマカは主要な媒介蚊であり、世界中の熱帯・亜熱帯地域に広く分布している。近年、成虫防除に用いられるピレスロイド系殺虫剤に抵抗性を発達させた個体群が世界各地で確認されて問題となっている。媒介蚊対策が殺虫剤による防除に頼らざるを得ない現状から鑑みると、抵抗性の発達はそのまゝ感染症に対するリスクを高めることに繋がる。野外における媒介蚊の殺虫剤感受性を把握することは、殺虫剤の防除効果を高める上で重要である。そこで、薬剤抵抗性遺伝子変異を指標としたジェノタイピング法を確立し、野外集団の薬剤感受性の状況を迅速かつ簡便に把握することを目標とした。

B. 研究方法

1. 媒介蚊のデングウイルス感受性評価

ヒトスジシマカは、2010年川崎市生田(IKT系統)、2011年神奈川県海老名市(EBN系統)、2012年ベトナム・ホーチ

ミン市(HCM系統)でそれぞれ捕集された雌成虫から採卵し、その後実験室内で維持された系統を用いた。ネッタイシマカLBN系統は、2010年フィリピン・ロスバニョス市捕集の室内維持系統である。

デングウイルス1型(DENV1)は、タイ・バンコク市(D1 11-120株)、デングウイルス2型(DENV2)は、インドネシア・バリ島から帰国した患者血清よりそれぞれ分離された(D2 11-122/1株)。加えて3型(DENV3)および4型(DENV4)も使用した(ウイルス1部から分与)。

脱繊維血と混合した $10^5 \sim 10^6$ コピー/mlの力価のウイルス液を人工膜吸血法により経口的に蚊に摂取させ、感染蚊を27°C長日条件のインキュベーター内に約20日間維持した。ウイルスRNAは、TaqManプローブ法(Callahan *et al.*, 2001)、あるいはSYBR Green法(Callahan JD *et al.*変法)により検出した。次いで、免疫蛍光抗体法により、蚊の各器官におけるウイルスの存在を顕微鏡下で観察した。

2. ジェノタイピング法による媒介蚊の殺虫剤感受性の評価

2009年~2010年にフィリピン国内の古タイヤより採集したネッタイシマカ幼虫から個別にDNAを抽出し(REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit, Sigma-Aldrich)、4カ所のアミノ産置換をターゲットとして2組のPCR(I1011MorV, L1014F, V1016G, F1534C)を行った。I1011MorV, L1014F, V1016Gを検出するためにaegSCF20/aegSCR21プライマーセット、F1534Cを検出するためにaegSCF7/aegSCR7のプライマーセットを用いて各遺伝子断片を増幅した。シーケンス解析には、I1011MorVおよびL1014F検出用としてaegSCF3プライマー、V1016G用にaegSCR22プライマー、F1534C検出用にaegSCR8プライマーを

それぞれ使用した。

C. 研究結果

1. 媒介蚊のデングウイルス感受性評価

TaqMan プローブ法により、ヒトスジシマカに経口的に感染させた DENV1 および DENV3 は、いずれも 1 コピーまで検出可能であり、DENV2 も検出されたが、DENV4 は検出できなかった。DENV2 特異的抗体を反応させた免疫蛍光抗体法により、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸においてウイルス粒子の存在が確認されたが、DENV1 は確認できなかった。

次に、SYBR Green 法により、蚊のウイルス感受性を評価した。唾液腺におけるウイルスの増殖性において、本研究に用いた国内および外国産ヒトスジシマカで DENV1 の高い増殖性は認められたが、DENV2 の増殖性は低く、特に LBN 系統ネッタシマカではほとんど確認できなかった。ウイルスの感受性は、蚊種および系統によって差異はあるものの、本研究で用いた国内産ヒトスジシマカにウイルス感受性が示唆されたことから、国内にデング熱が侵入した場合には、小規模なアウトブレイクが起こる可能性は十分にあると考えるべきである。

2. ジェノタイプング法による媒介蚊の殺虫剤感受性の評価

2009 年にフィリピン国内 30 カ所で採集された 688 頭のネッタシマカ幼虫の *kdr* 遺伝子頻度を比較した結果、これまで中南米地域で確認されている I1011 の変異はどの個体からも検出されなかったが、V1016G の変異は 0～61% の頻度で、F1534C は 0～76.3% の頻度で確認された。G1016, C1534 とともにフィリピン全土から採集されたネッタシマカから広範囲に確認され、特に地理的な偏りは見いだせ

なかった。全土的にピレスロイド系殺虫剤による淘汰が進んだため、抵抗性個体が全国的に広がったと推察された。本結果は、先行試験で、K index (薬剤感受性レベルを 1～36 でランク分け、数字が大きいほど抵抗性レベルが高いことを示すインデックス) が多くの地域で最大の 36 を示した結果を裏付けるものとなった。

D. 考察

TaqMan プローブ法によるウイルス RNA の検出において、DENV1, DENV2, DENV3 のゲノム RNA は 0.1 コピーまで検出可能であったが、DENV4 は検出できなかった。DENV4 のスタンダード RNA に問題があった可能性が考えられた。また、免疫蛍光抗体法において、DENV2 はヒトスジシマカの唾液腺と中腸のいずれにもウイルス粒子は観察されたが、DENV1 は検出できなかったことから、蚊のウイルス感受性の評価系として免疫蛍光抗体法も有効ではあるが、DENV1 以外の検出も検討すべきと考える。また、今回使用したウイルス株は海外で流行している株であることから、蚊とウイルス株の様々な組み合わせを検討する必要があると考える。

ネッタシマカ LBN 系統において、DENV2 がほとんど検出されず、ヒトスジシマカ IKT 系統の唾液腺においても DENV2 の増殖は低いレベルであった。この結果は、DENV2 に低感受性の蚊種ならびに系統が存在する可能性を否定できないものの、さらに多くの系統を評価することで結論したい。また、DENV3 および DENV4 に対する蚊のウイルス感受性の評価も必要であり、デングウイルス感染蚊が、次の世代へ持ち越せるかの評価も望まれている。しかし、少なくとも DENV1 に対しては、国内の多くのヒトス

ジシマカ集団がデングウイルス感受性である可能性は高い。従って、国内にデング熱が侵入した場合には、国内に普遍的に生息するヒトスジシマカが関与する小規模なアウトブレイクが起こる可能性は十分にあると考えるべきである。

野外における媒介蚊の殺虫剤感受性を把握することは、殺虫剤の防除効果を高める上で重要である。まずフィリピン産ネッタシマカを用いて薬剤抵抗性遺伝子変異を指標としたジェノタイプング法を確立し、その手法を国内産ヒトスジシマカに応用することを目指した。これまでにベトナムのネッタシマカ 70 地域由来の 756 頭を調べた結果、G1016 の置換はわずか 1 地域から 20% の頻度として検出されていた (Kawada et al., 2009)。今回のフィリピンの結果では、調査した 30 地域中 29 カ所から G1016 の変異が検出され、その頻度も比較的高く、事態はより深刻であることが分かった。また、V1016G のみならず F1534C を有する個体の頻度も高く、近い将来フィリピン全土において両タイプの *kdr* 遺伝子頻度が 100% に限りなく近くなる可能性も否定できない。

今回得られたデータから、G1016 の頻度と C1534 の頻度の和と、抵抗性レベルを示す K index との関係調べたところ、薬剤感受性が低いほど *kdr* 頻度も低いことが示され、*kdr* 遺伝子頻度の調査が、ピレスロイド剤感受性調査の結果をある程度反映するものであると推察された。その一方で、K index が 36 を示す個体群の *kdr* 遺伝子頻度は 5.3%~116.3% と大きな開きが認められ、*kdr* 因子以外にも解毒酵素や皮膚透過性の低下などの要因が抵抗性機構として関与している可能性が示唆された。

E. 結論

- 1) TaqMan プローブ法および SYBR Green 法により、DENV1, DENV2, DENV3 のウイルス RNA の定量・評価系を確立した。
- 2) 免疫蛍光抗体法により DENV2 感染蚊の唾液腺および中腸でのウイルスの存在を確認したが、DENV1 は確認できなかった。異なる系統とウイルス株を用いて再検討する。
- 3) 供試した国内外のヒトスジシマカにおいて DENV1 の高い増殖性が認められたが、DENV2 は増殖性が低く、ネッタシマカでは増殖はほとんど確認できなかった。
- 4) 作用点ナトリウムチャンネルの変異を指標としたジェノタイプング法は、野外蚊のピレスロイド剤感受性レベルをある程度反映していることが明らかになったが、*kdr* 因子以外の抵抗性機構も関与していることも示唆された。
- 5) 今後は、作用点変異のみならず、解毒酵素等その他の抵抗性機構を加味した簡便で迅速な薬剤感受性試験法 (ジェノタイプング法) を検討していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

佐々木年則, 比嘉由紀子, ベンツーソ G アーリン, 伊澤晴彦, 高崎智彦, 皆川 昇, 澤邊京子, 国内外で捕集された蚊のデングウイルス感受性, 第 66 回日本衛生動物学会大会, 2014 年 3 月 22 日, 岐阜大学

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし

2. 実用新案登録: なし

3. その他: なし