

表3 新潟市の豚舎周辺におけるドライイストラップによるコガタアカイエカ雌成虫の捕集数

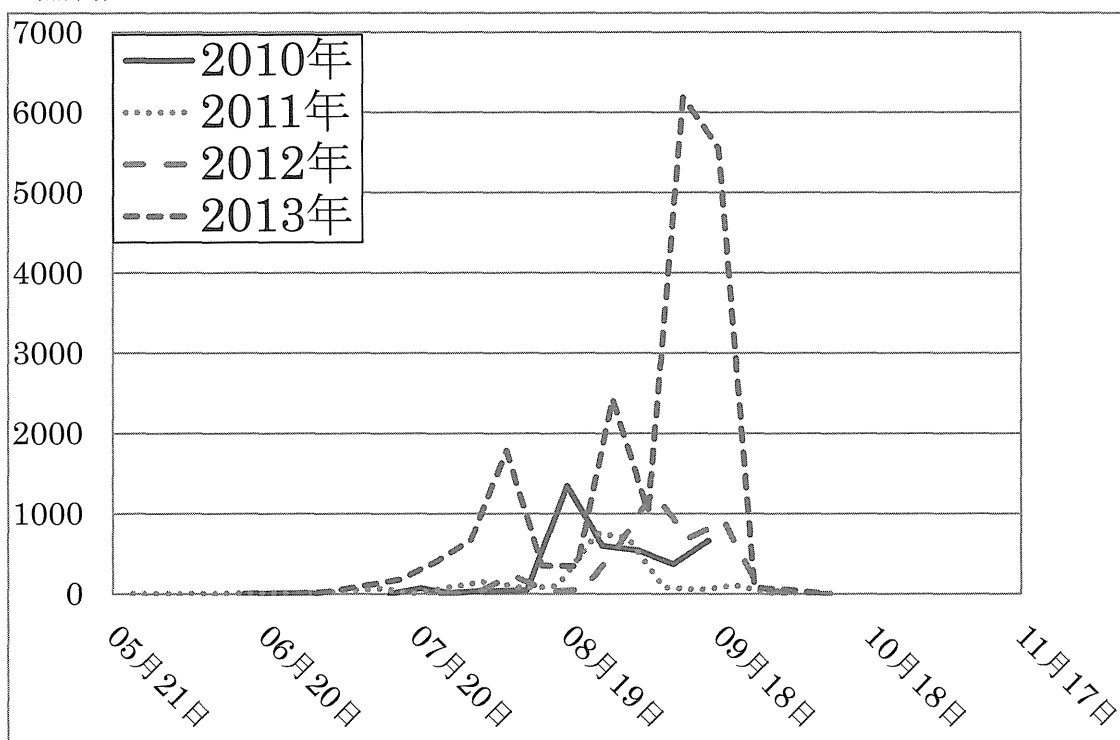
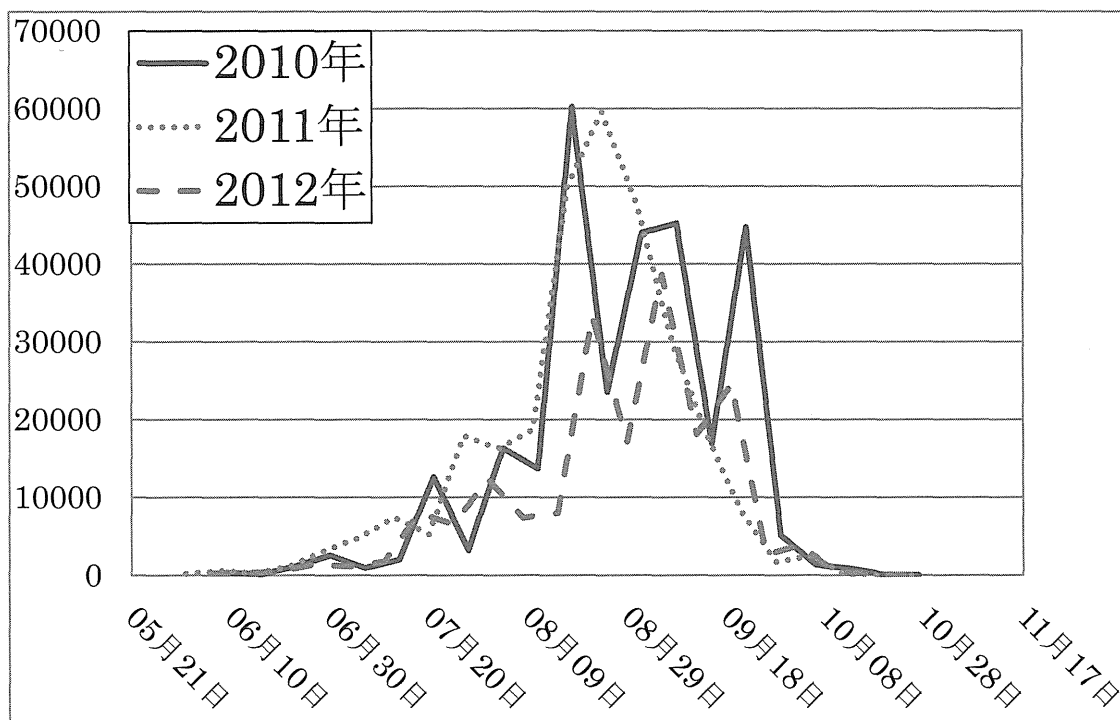


表4 富山県内の畜舎におけるライトトラップによるコガタアカイエカ雌成虫の捕集数



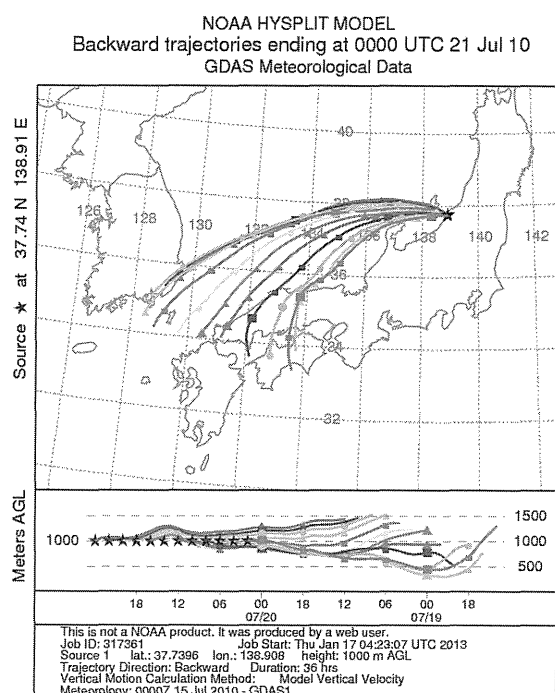
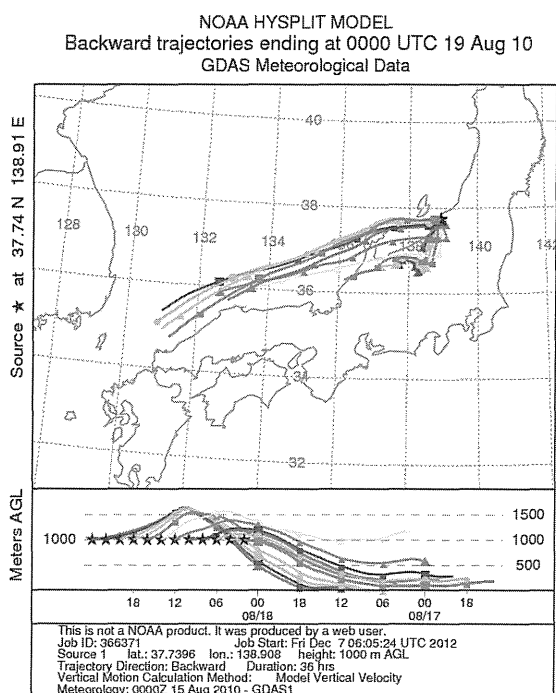


図 1. 2010 年のコガタアカイエカ捕集ピーク時の NOAA の後方流跡線 (高度 1,000m 付近) (左) 2010 年 8 月 19 日、(右) 2010 年 7 月 21 日

表 5 2010 年の指定気圧面の観測データ (輪島付近: 気象庁データ)

【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

【輪島 2010年7月21日9時】

地上

気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1016.5	10	30.1	64	1.9	10

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	156	27.8	70	2	99
925	845	24.3	61	3	277
900	1085	22.3	71	2	279
850	1580	18.9	71	2	222
800	2100	16.6	76	3	226
700	3228	11.0	56	3	236
600	4500	4.2	46	3	305
500	5956	-4.6	25	4	252
400	7677	-13.9	8	12	272

(左) 2010 年 8 月 19 日、(右) 2010 年 7 月 21 日

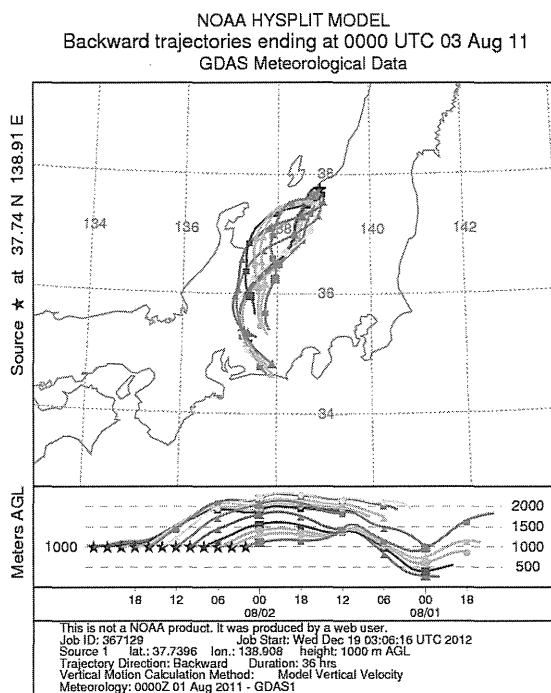
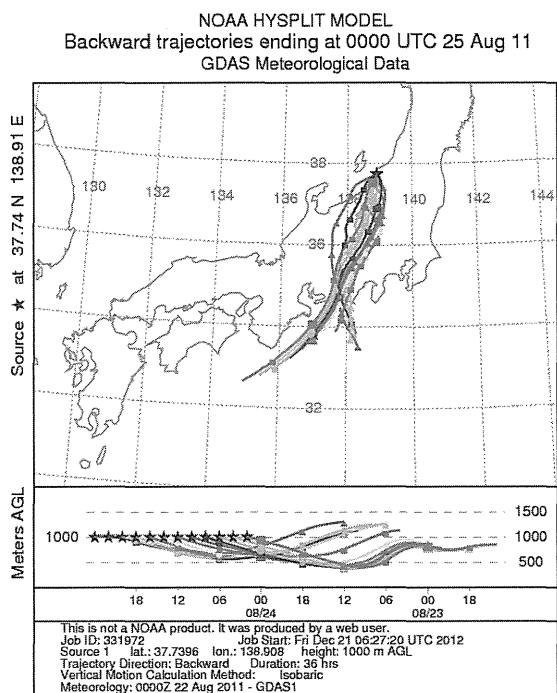


図 2. 2011 年のコガタアカイエカ捕集ピーク時の NOAA の後方流跡線
(高度 1,000m 付近) (左) 2011 年 8 月 25 日、(右) 2011 年 8 月 3 日

表 6 2011 年の指定気圧面の観測データ (輪島付近: 気象庁データ)

【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

【輪島 2011年8月3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	27.6	71	2.3	50

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	26.0	66	2	35
925	801	22.4	59	3	269
900	1039	20.1	73	1	282
850	1530	16.9	81	3	102
800	2046	13.6	93	3	161
700	3164	9.4	49	2	90
600	4428	2.3	60	2	285
500	5880	-5.8	84	5	335
400	7603	-15.3	72	6	282

(左) 2011 年 8 月 25 日、(右) 2011 年 8 月 3 日

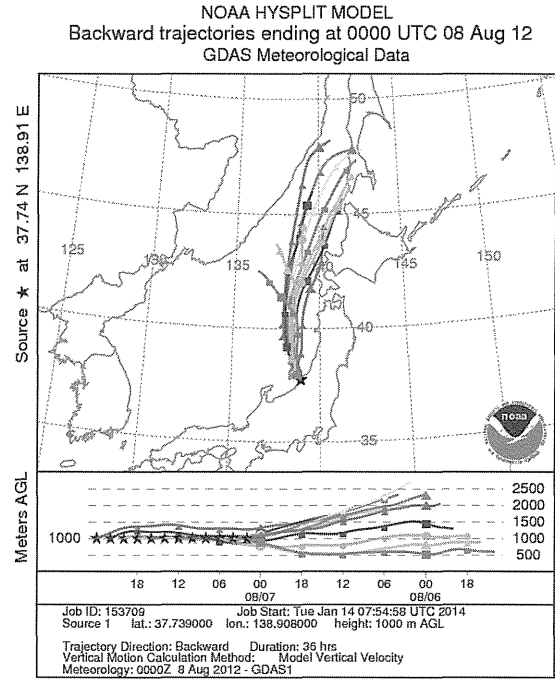
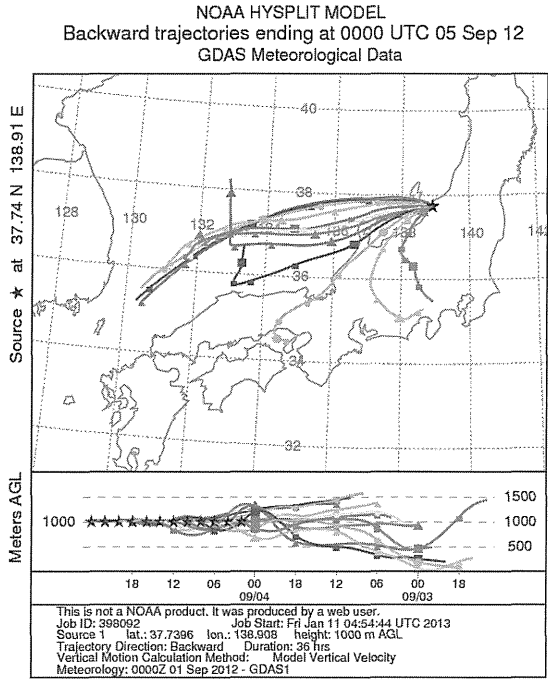


図 3. 2012 年のコガタアカイエカ捕集ピーク時の NOAA の後方流跡線
(高度 1,000m 付近) (左) 2012 年 9 月 5 日、(右) 2012 年 8 月 8 日

表 7 2012 年の指定気圧面の観測データ (輪島付近: 気象庁データ)

【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

【輪島 2012年8月8日9時】

地上

気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1007.5	10	25.4	65	3.9	40

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	76	24.1	65	3	32
925	751	17.3	90	4	27
900	985	15.5	95	5	42
850	1469	12.5	92	6	62
800	1980	15.3	35	11	21
700	3103	10.8	12	10	5
600	4377	6.0	4	15	10
500	5847	-2.4	24	13	11
400	7575	-15.0	15	18	17

(左) 2012 年 9 月 5 日、(右) 2012 年 8 月 8 日

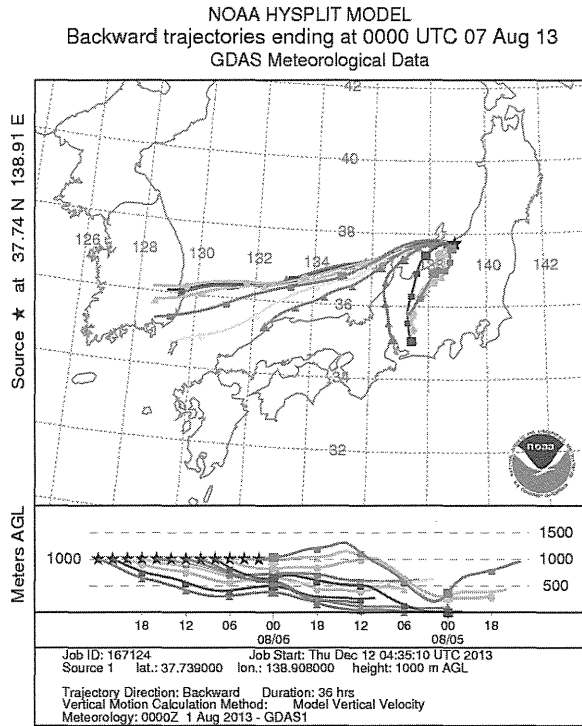
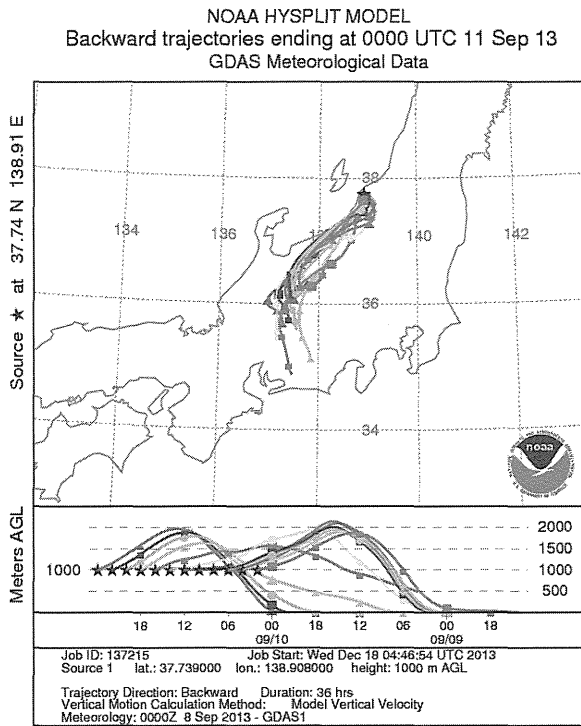


図 4. 2013 年のコガタアカイエカ捕集ピーク時の NOAA の後方流跡線
(高度 1,000m 付近) (左) 2013 年 9 月 11 日、(右) 2013 年 8 月 7 日

表 8 2013 年の指定気圧面の観測データ (輪島付近 : 気象庁データ)

【輪島 2013年9月11日9時】

地上

気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1014.8	10	25.8	74	2.1	170

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	139	23.5	79	2	158
925	816	19.2	69	2	212
900	1051	17.8	59	2	221
850	1538	14.7	70	5	218
800	2048	11.1	61	5	241
700	3159	8.5	44	8	238
600	4413	-0.6	88	12	252
500	5853	-6.8	72	12	252
400	7564	-15.8	53	19	242

【輪島 2013年8月7日9時】

地上

気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1006.7	10	29.8	71	4.6	210

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	70	28.8	70	4	223
925	757	21.7	96	5	255
900	995	20.4	90	6	250
850	1490	20.1	42	4	283
800	2010	16.2	61	3	279
700	3134	9.2	67	9	286
600	4395	3.2	37	11	313
500	5855	-4.8	38	11	321
400	7572	-15.5	7	18	306

(左) 2013 年 9 月 11 日、(右) 2013 年 8 月 7 日

アカイエカ種群の九州地域の集団遺伝的解析

分担研究者 大塚 靖（大分大学・医学部）

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 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っておく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。そこでマイクロサテライトマーカーを用いて九州地方北部（福岡県、長崎県、大分県）のアカイエカ種群の集団間の変異を調べてみた。8つの領域について検討した結果、日本産アカイエカにはネッタイエカのハプロタイプとする領域が0.6~20.3%含まれていた。また、アセチルコリンエステラーゼ領域の種特異的プライマーセットでこれら集団を調べたところ、日本産アカイエカにはネッタイエカのハプロタイプが20.3%含まれていた。これらを合わせた9つの領域の遺伝子頻度の違いから福岡、長崎、大分の集団間を比較したところ、福岡のアカイエカ集団ではネッタイエカのハプロタイプの割合がやや少なかったが、有意な差は認められなかった。これらの結果は、北部九州のアカイエカは一定の割合でネッタイエカと同じハプロタイプを持っていることを示しており、アカイエカとネッタイエカの遺伝的違いを明らかにするために、さらなる広域での調査が必要であることが示唆された。

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 molestus*)、ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が存在する。アカイエカ種群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って置く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 *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)。

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に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。そこでマイクロサテライトを用いて九州地方のアカイエカ種群の遺伝的構成を知り、アカイエカとネッタイエ

エカとの遺伝的違いや、九州本土でのネットアイエカの分布調査を行った。

B. 研究方法

1. アカイエカ種群の採集

福岡県（5ヶ所）、長崎県（4ヶ所）、大分県（8ヶ所）の合計17所で、Ovitrapまたは雨水マス等からの幼虫・蛹を採集し、実験室で成虫とした。一部の成虫は無吸血産卵の有無を確かめるため実験室で飼育した。さらに一部の雄の外部生殖器の形態を確認した。成虫からQIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kitを使用して81個体（福岡県、26個体；長崎県、15個体；大分県、40個体）からDNAを抽出した。

2. アセチルコリンエステラーゼ領域を利用した種の鑑別

Kasai et al. (2008) により、種特異的プライマーでPCRを使うことによって3種の鑑別する方法が開発されている。F1457-B1246Sのユニバーサルプライマーセットで増幅を確認した後、アカイエカはACEpall2、チカイエカはACEpip2、ネットアイエカACEquinの種特異的プライマーとB1246SでPCR増幅を行った。PCRのサイクルは94°C5分の後、94°C30秒、55°C30秒、72°C1分を35サイクル行った後72°C5分で行った。PCR産物を電気泳動しその増幅の有無を確認した。

3. マイクロサライトによる鑑別

解析に使用した領域はFonseca et al. (1998)、Keyghobadi et al. (2004)、Smith et al. (2005) でこれまでに使われている5領域（CxqGT4、CxqGT6b、CxpGT4、CxpGT12、CxpGT51）を使用した。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、Lian et al. (2001) が考案した ligation-mediated

suppression PCR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'-GT AATACGACTCACTATAGGGCACGCGT GGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3' と 3' 末端をアミノ基で修飾した5'-ACCAGCCC-3'）を付加した。(CA)_nのおよび(TACA)_nのマイクロサテライト領域を増幅するために(CA)₁₀およびDB(TACA)₆TA、BV(ACAT)₆A、VB(CATA)₆、BD(ATAC)₆A 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'-CCAT CCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') を用いて PCR を行った。PCR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'-CTATA GGGCACGCGTGGT-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、ネットアイエカでPCR増幅出来るかを調べ、3種で反復数に違いがあるかを確認していた。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。ネットア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。その結果 CppAC009 (5'-GGTT CCTCGTCGATGTTGTT-3', R: 5'-TTGTTTCGTCCA ACTT GTCC A-3'), CppAC012 (F: 5'-GTGCCACCTCAAGTGTCAGA-3', R: 5'-TCCGATGTTTCAT TGGTTCC-3'), Cpp4 b007 (F: 5'-ATTGAATGGTTTCCCAATGT-3', R: 5'-TCGAAAACCCACCTTGATGT-3') の3つ領域が有効で

あることがわかった。合わせて8つの領域でマイクロサテライトの解析を行った。まず、PCRを以下の条件で行った。20 μ lに0.5U *Ex Taq*、1×*Ex Taq* buffer、2 mM $MgCl_2$ 、0.2 mMのそれぞれのプライマー、1 μ 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。片方のプライマーの5'側は蛍光色素(6-FAM/ VIC/NED/PET)で標識している。Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzerでフラグメント解析を行い、それぞれのPCR産物の長さを調べた。新規の長さの産物が出た場合はクローニングして配列を確認した。集団間の違いはそれぞれの領域のハプロタイプの頻度の違いからAMOVAで *arlequin3.5* (Excoffier and Lischer, 2010) を用いて検討した。

C. 研究結果

アセチルコリンエステラーゼ領域を利用した検討

九州北部の福岡県、長崎県、大分県から81個体についてDNAを抽出し、アセチルコリンエステラーゼ領域のPCR法で種の鑑別を行った(図1, 表1)。大分県の2個体はチカイエカハプロタイプのホモとなった。この系統は無吸血産卵をしており、雄の外部生殖器の形態もチカイエカであった。この系統以外は、すべて無吸血産卵は行わず、雄の外部生殖器の形態はアカイエカであった。アカイエカ79個体のうち48匹がアカイエカハプロタイプのホモ、30個体がアカイエカとネッタイエカハプロタイプのヘテロ、1個体がネッタイエカハプロタイプのホモであった。アカイエカの中でネッタイエカハプロタイプの頻度は20.3%だった。

マイクロサテライト領域を利用した検討

チカイエカ2個体についてはマイクロサテライトにおいてもコントロールと同じチカイエカハプロタイプを示した。アカイエカ79個体の結果を表2と図2に示す。判断できないハプロタイプがそれぞれの領域で0.6~7.0%存在した。また、すべての領域におけるネッタイエカのハプロタイプが存在し、その頻度は0.6~20.3%であった。

集団間の違いについて

アカイエカのなかにネッタイエカのハプロタイプはアセチルコリンエステラーゼと8つのマイクロサテライト領域全てで見られ、福岡、長崎、大分それぞれの県の集団で見られた。福岡県の集団でのネッタイエカのハプロタイプの頻度が他の県に比べて少し低いが、AMOVAでは有意な差は見られなかった。

D. 考察

アカイエカにはネッタイエカのハプロタイプが一定の割合で含まれていることは、アカイエカの雄がすべてネッタイエカのハプロタイプを持つことなどから、予想はされていた(Kasai et al., 2008)。今回北部九州のアカイエカは調べた全ての領域でネッタイエカのハプロタイプを持つことが明らかとなったことから、今後アカイエカ内でのネッタイエカハプロタイプの地理的分布に関心が向けられるであろう。さらにネッタイエカハプロタイプは2種が分化した時から持っているものなのか、それとも2種が現在でも稀に交配している結果なのか興味を持たれる。今回は西宮のアカイエカ系をコントロールに使ったが、何をアカイエカのスタンダードなハプロタイプとするかも検討が必要である。それによってか

マイクロサテライトでネットアイエカを同定する根拠が変わってくる恐れがある。また、今回の方法は日本のアカイエカ集団間での変異を見つけることが出来ることから、今後の集団遺伝的解析に有効であると思われる。

E. 結論

アセチルコリンエステラーゼ領域のPCRやマイクロサテライト領域の解析で、北部九州のアカイエカにはネットアイエカのハプロタイプが一定の割合で含まれていることが分かった。ここで示した解析方法はアカイエカの集団遺伝的解析を行うのに有効であるとともに、今後各地のアカイエカ遺伝情報を集めることによって、ネットアイエカをPCRやマイクロサテライト法などの分子的手法での同定を確実にすることができる。

F. 健康危険情報

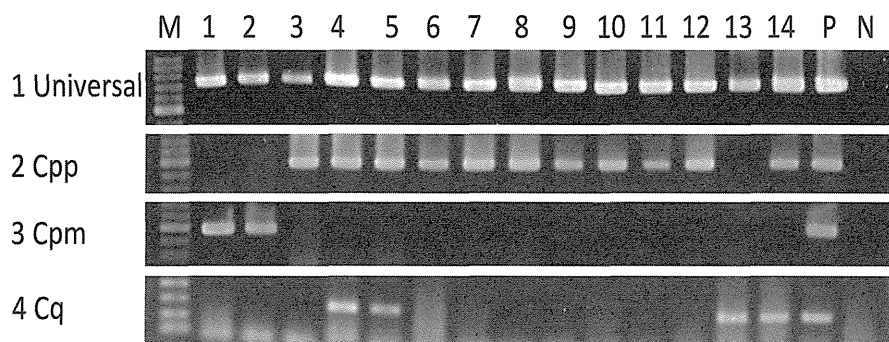
なし

G. 研究発表

1. 論文発表： なし
2. 学会発表： 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



上段から 1: ユニバーサルプライマーセット、2: アカイエカ種特異的プライマーセット、3: チカイエカ種特異的プライマーセット、4: ネットタイエカ種特異的プライマーセットそれぞれを使って行った PCR の泳動結果. M: マーカー、1~14: アカイエカ種群サンプル、P: positive control、N: negative control. サンプル 1 と 2 はチカイエカのホモ. サンプル 4、5、14 はアカイエカとネットタイエカのヘテロ. サンプル 13 はネットタイエカのホモ. 他のサンプルはアカイエカのホモ.

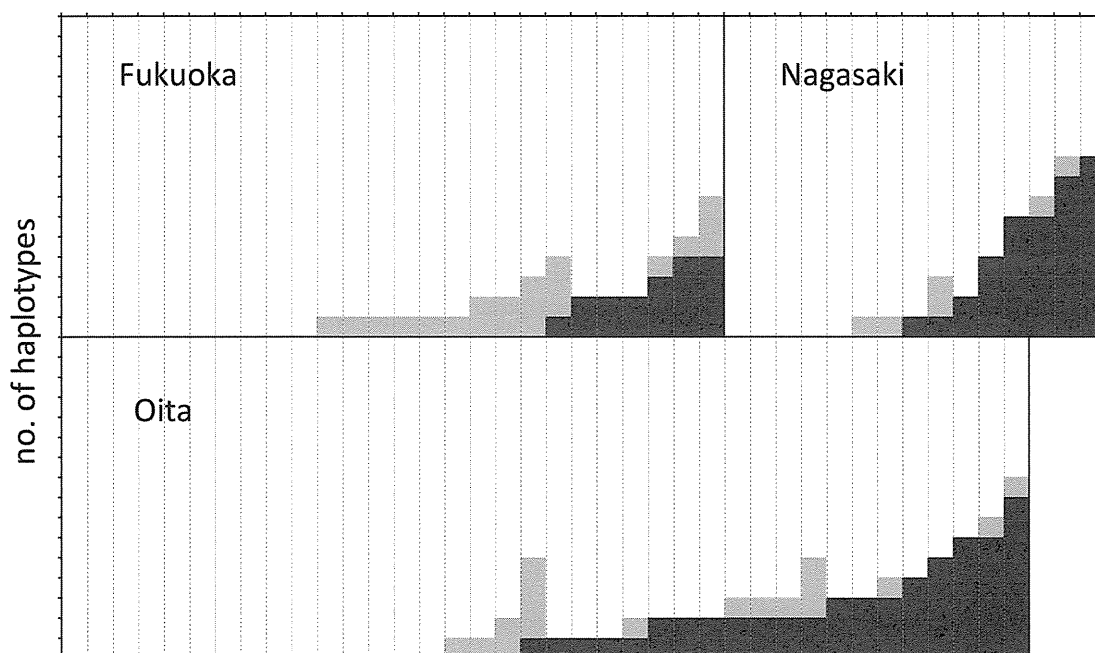
図 1 アセチルコリンエステラーゼ領域による PCR

表 1 アセチルコリンエステラーゼ領域の各ハプロタイプ数と頻度

	n	homo			hetero	frequencies	
		Cpp	Cpm	Cq	Cpp/Cq	Cpp	Cq
Fukuoka	26	21	0	0	5	0.904	0.096
Nagasaki	15	8	0	0	7	0.767	0.233
Oita	40	19	2	1	18	0.737	0.263
Total	81	48	2	1	30	0.797	0.203

Cpp : アカイエカハプロタイプ、Cpm : チカイエカハプロタイプ、Cq : ネットタイエカハプロタイプ

frequencies はアカイエカの 79 個体中の頻度を表している



福岡、長崎、大分の各個体の頻度分布。黒がネットアイエカハプロタイプ、白がアカイエカハプロタイプ、グレイが判別不能。点線で区切られたタテのボックスが一つの個体を表す。一つのボックスが16等分(8領域×2倍体)されており、領域にかかわらず、ネットアイエカのハプロタイプは下に置かれている。

図2 マイクロサテライト8領域の頻度分布

表2 マイクロサテライト8領域の各ハプロタイプ数と頻度

	n	CxqGT4			CxqGT6b			CxpGT4			CxpGT12		
		Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd
Fukuoka	26	49	0	3	42	5	5	48	3	1	45	3	4
Nagasaki	15	25	5	0	25	5	0	27	3	0	28	1	1
Oita	38	69	6	1	67	9	0	74	0	2	69	7	0
Total	79	143	11	4	134	19	5	149	6	3	142	11	5
frequencies		0.905	0.070	0.025	0.848	0.120	0.032	0.943	0.038	0.019	0.899	0.070	0.032

	n	CxpGT51			CppAC009			CppAC012			Cpp4b007		
		Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd
Fukuoka	26	51	0	1	46	4	2	51	0	1	45	3	4
Nagasaki	15	27	1	2	21	7	2	23	7	0	21	8	1
Oita	38	72	0	4	50	21	5	70	6	0	62	8	6
Total	79	150	1	7	117	32	9	144	13	1	128	19	11
frequencies		0.949	0.006	0.044	0.741	0.203	0.057	0.911	0.082	0.006	0.810	0.120	0.070

Cpp : アカイエカハプロタイプ、Cq : ネットアイエカハプロタイプ、nd : 判別不能
チカイエカ2個体を除いたアカイエカ79個体のみ頻度を表す。

Frequencies は Total でのハプロタイプの頻度を表す。

トコジラミの有機リン剤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・第三室長）
研究協力者 駒形修（国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員）
糸川健太郎（国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員）
小川浩平（国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員）
渡辺 護（国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員）
武藤敦彦（日本環境衛生センター環境生物部）
橋本知幸（日本環境衛生センター環境生物部）
皆川恵子（日本環境衛生センター環境生物部）
數間 亨（日本環境衛生センター環境生物部）

研究要旨

日本のトコジラミ集団にピレスロイド系殺虫剤抵抗性が発達したため、本種の防除にはアセチルコリンエステラーゼ（AChE）阻害剤と総称される有機リン系・カーバメイト系殺虫剤の利用が普及しつつある。現在、日本で唯一飼育コロニーとして数種の AChE 阻害剤に抵抗性であると確認されている防府コロニー（HOF）について粗酵素液を用いた酵素阻害試験を行った結果、 10^3 倍レベルのフェントロオクソン IC_{50} 値低下で示される AChE の感受性低下が示された。HOF トコジラミの AChE 遺伝子 (*p-Ace*) のコード配列を感受性系統と比較した結果、一つだけ、活性ゴルジ内のアシル結合部位に F348(331)Y アミノ酸置換変異が存在した。この点突然変異を標的とする分子ジェノタイプピング法を Cycling Probe 法に基づき設計し、27 都道府県よりおもに 2010 年以降に採集された 98 コロニー分のトコジラミ試料を解析した。その結果、HOF も含め 4 コロニーに Y348(331)変異を保有する個体を同定した。現時点では、AChE 阻害剤に対する作用点変異に基づく抵抗性コロニーの拡散は軽微であると推測される。

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 8 年間に東京都における被害相談件数は約 13 倍に増大している（東京都福祉保健局, 2014）。

昨年度と同補助金研究事業において、本研究分担者らは、ピレスロイド作用点にピレスロイド低感受性をもたらす変異型の電位依存性ナトリウムチャンネル（VSSC）遺伝子の分布に関する全国調査を行った結果を報告し、最近の日本のトコジラミコロニーの 9 割が抵抗性遺伝子を保有していたことを明らかにした。ピレスロイド系の他に、わが国でトコジラミの防除に適用のある医薬品・防除用医

薬部外品には、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤である有機リン系・カーバメイト系の殺虫剤がある。トコジラミ集団内のピレスロイド抵抗性発達の情報は、害虫防除業社の協会などを通じて周知され、トコジラミ駆除用殺虫剤のおもな利用は AChE 阻害剤へと移りつつあるため、今後は、その抵抗性発達状況を監視すること、ならびにその抵抗性機構を解明することが重要である。

2011 年に採集され飼育コロニーとして維持されている防府コロニー (HOF) は、日本で唯一確認されている AChE 阻害剤抵抗性コロニーで、フェニトロチオン、プロペタンフォス、DDVP、プロボクスルをそれぞれ有効成分とするトコジラミ用殺虫剤製剤に抵抗性を示すことが確認されている (数間, 未発表)。今年度は、本システムにおける AChE の殺虫剤感受性低下と構造変異を解析し、その結果推定された感受性低下に関連するアミノ酸置換変異について、変異を標的とする分子ジェノタイピング法を考案し、その方法により AChE 阻害剤抵抗性作用点遺伝子の保有状況を調査した。

B. 研究方法

1. 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 (TKD) と 2011 年の山口県防府市での採集に由来する AChE 阻害剤抵抗性の防府コロニー (HOF) (いずれも日本環境衛生センター提供) を用いた。

2. 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 年から 2013 年にかけて試料を収集した。

3. 酵素阻害試験

アセチルコリンエステラーゼの活性は、Ellman ら (1961) による「AChE 活性の比色検出法」の原法をマイクロプレートリーダーによる測定に適合するように改変した方法により測定した。吸血後 7 から 14 日目のトコジラミ成虫の頭部を切断し、3 頭分の頭部を 0.3 mL のリン酸緩衝液 (pH7.0) 中でホモジナイザー (BioMasher III, ニッピ) を用いて磨砕した。次いで、ホモジナイザーのフィルターをそのまま用いて、磨砕液を 1,000 ×g で 1 分間遠心し、フィルターを通過した液を粗酵素液とした。30°C に保温したリン酸緩衝液 170 μL に対し、発色剤として dithionitrobenzoic acid (DTNB) 溶液 10 μL、阻害剤フェニトロオクソンのアセトン希釈液 (またはアセトンのみ) 1 μL、および粗酵素液 10 μL を 96 穴マイクロタイタープレートに加えた。その後、前阻害を恒温槽内で 30°C に保ち 20 分間行った後、基質としてアセチルチオコリン (ATCh) 溶液 10 μL を加え、マイクロプレートリーダー (LB940, ベルトールド) 内で反応液を攪拌させた後、30°C で波長 405 nm における 20 分間の吸光度変化を測定した。最終的に、Ellman の係数 ($1.36 \times 10^4 = (\Delta \text{absorbance}/\text{min})/(\text{mol/L}/\text{min})$) を用い、1 分間あたりの吸光度の変化を酵素の活性度 (mol/min) に変換した。別途、粗酵素液のタンパク量を Protein Assay Kit で定量した。Ellman らの方法による酵素活性度をタンパク量で除すことで、酵素比活性とした。

4. 塩基配列決定

トコジラミ *p-Ace* の完全長コード配列

(GenBank JQ349159.1; 1791 bases) に基づき、CapFishing Kit (Seegene) を用いて rapid amplification of cDNA ends (RACEs) を行い、個体ごとに TKD と HOF の *p-Ace* cDNA の 5'-UTR と 3'-UTR の配列を決定した。次いで、それらの UTR 配列に基づき、GAGTACAGAGCA GTCTTCACTC と CAT CATCTCTTTGGT GGCCTT をプライマー対として用い、完全長 cDNA をターゲットとする PCR を行い、その PCR 産物につきダイレクトシーケンシングを行った。

5. 分子ジェノタイプング

Cycleave PCR Kit (Takara) を用いて Cycling Probe 法に基づくゲノム DNA を鋳型とする PCR を行い、トコジラミ *p-Ace* タンパク質前駆体配列の F348 (AChE 標準配列では F331) 座位のアミノ酸がチロシンに置換したこと (TTC→TAC) にかかる T/A 置換を標的とする遺伝子型判別を行った。本法は、「PCR サイクリング中にプローブが DNA 鎖と完全な相補対を形成した場合にのみ、反応試薬に含まれる RNase H がプローブ内の RNA を切断し、蛍光を発する」という原理に基づく方法である。用いたプライマー対は、ATATCCTGATGGGCAGCAAC と CCTGAACAACCTCGGTGAGGT、"T"と"A"の検出用アンチセンス蛍光プローブは、それぞれ、5'(Eclipse)-aataaataatg(A) ag-(FAM)3' と 5'(Eclipse)-gT(a)tagtatcc-(ROX)3' とした。ここに、プローブ配列の大文字は SNP サイト、括弧内は RNA を表す。一試料の解析に 10 μ L の PCR 液を用い、プライマーとプローブの最終濃度はキットのプロトコールに従い、反応はリアルタイム PCR 装置 (PikoReal, Thermo) の上で 95°C 30" > [95°C 5" > 55°C 10" > 72°C 20"] \times 50 のサイクリン

グ条件で行った。

C. 研究結果

AChE の阻害剤感受性

AChE の阻害剤として、有機リン剤の一つであるフェニトロチオンの動物体内活性フォームであるフェニトロオクソンを使い、AChE の残存 ATCh 加水分解活性を粗酵素液を使い測定した (図 1)。推定された TKD と HOF に関するフェニトロオクソン IC₅₀ 値、それぞれ、 7.04×10^{-9} M と 4.28×10^{-5} M に基づき、HOF の AChE のフェニトロオクソン感受性は TKD に比べ約 6,000 倍低下していることが示された。

AChE の構造変異

TKD と HOF の *p-Ace* の完全長コード配列を比較した結果、HOF の *p-Ace* にはアミノ酸置換変異として唯一 F348(331)Y 変異を保有していることが示された。HOF の複数の直接採集個体と室内飼育個体のすべてがこの変異のホモ接合体であったため、HOF は同変異の保有に関して遺伝的に均質なコロニーと推定される。

AChE の標準配列に基づく F331 座位は、活性ゴルジ内での基質の定位に関わる機能部位とされており、多くの害虫種で殺虫剤抵抗性に関連していくつかの異なるアミノ酸残基への置換が生じており、阻害剤感受性に関わる重要な部位とされている (Kono & Tomita, 2006)。トコジラミ HOF に示される変異と同じ Tyr への変異は、ナミハダニのモノクロトフォス抵抗性コロニーに唯一見出されている (Kwon et al., 2010)、ナミハダニにおける Y331 変異体 AChE の酵素学的諸特性については不明である。

p-Ace 分子ジェノタイプリング法の確立

TKD と HOF の *p-Ace* の F348 座位を含む PCR 産物 (646 bp) を鋳型として利用し、F348 座位の遺伝子型判別を *Cycling Probe* 法により行い、PCR サイクル進行に伴う蛍光量推移を解析した。TKD と HOF 由来の *p-Ace* DNA の PCR 産物をそれぞれ単独で 2.5 fM 含まれる 2 つの反応液、および両者が等比で合わせて 2.5 fM 濃度含まれる反応液に関する FAM/ROX 蛍光量曲線を解析した結果、二種波長の蛍光測定に基づく 2 つの曲線で表される各反応の応答は、互いに明瞭に識別できた (図 2)。塩基配列決定により F348 ホモ接合体であることが判明した異なる採集地に由来するトコジラミ 12 個体を用い *Cycling Probe* 法を実施した結果によっても、その遺伝子型が正しく判定された (図示なし)。

p-Ace 変異遺伝子の分布調査

AChE 阻害剤抵抗性に関連する *p-Ace* F348(331)Y の保有を調査した。27 都道府県の 98 のトコジラミコロニーに由来する直接採集個体または飼育コロニーの個体 912 頭を *Cycling Probe* 法により遺伝子型判別した (表 1)。トコジラミ試料のコロニーの 84% は 2010 年以降に採集されたものであったが、試料の一部には 2010 年の収集依頼開始時期に先立ち採集され提供者により保存されていた個体も含まれていた (表 2)。これらの供試コロニーの内、4 つのコロニーから Y348 変異保有個体がいずれもホモ接合体として同定された (表 3)。これらの内、2011 年に山口県防府市で採集されていた HOF の現地発生コロニー (表 3 の #050) は大多数が Y348 変異のホモ接合体であったと推測される。2010 年と 2013 年にそれぞれ大阪府と神奈川県で採集され

ていた試料 (#007 と #083) に関しては、個体群の一部が Y348 変異を保有していた。少なくとも 1970 年代に Y348 変異保有個体が存在していたことが示された (W-01)。以上の結果から、現時点では、AChE 阻害剤に対する作用点変異に基づく抵抗性コロニーの拡散は軽微であると推測される。

Y348 変異遺伝子のハプロタイプ

上に述べた 4 つのコロニーに由来する 4 個体を使い、F348 座位を含む PCR 産物の配列をダイレクトシーケンシングにより解析した。これらの個体はすべて Y348 (コドン TAC) のホモ接合体であることを検証したが、解析した約 0.5 kbp の範囲には合わせて 14 塩基部位に塩基置換多型が認められた。そこで、個体ごとの直接配列決定の結果に基づき、これらの配列を、ハプロタイプ数が最少となる条件のもと、個体あたり 2 つのハプロタイプが生じるように分解した (図 3)。HOF 個体は同一なハプロタイプ (A 型ハプロタイプとよぶ) を 2 つ保有していた。その他の 3 個体には A 型とは 9 塩基異なるハプロタイプ (B 型ハプロタイプとよぶ) を一つずつ保有するが、各個体の他方のハプロタイプは、A 型 (#083-02)、B 型と比べて、それぞれ 1 塩基と 3 塩基が異なり、B 型より派生したとみなされる互いに異なる B 亜型 (#007-24 と W-01) を保有していた。以上の解析から、F348(331)Y 変異には少なくとも 2 つの突然変異の起源があると推定される。

D. 考察

ハエ科を除く昆虫種は二種の AChE 遺伝子 (*p-Ace* と *o-Ace*) を保有しており、それらは昆虫種の祖先より存在していたものと考えられている。ハエ科昆虫は、

o-Ace のみ保有し、薬剤低感受性の原因となる変異がこの遺伝子に生じているが、ハエ科を除く昆虫種では薬剤低感受性に関連づけられる変異として明らかになっている例は、現在までに *p-Ace* のみであるため、*p-Ace* 遺伝子が発現した AChE 分子種が神経系における神経伝達物質アセチルコリンの代謝をおもに担うと考えられている。一方、ハエ科を除く昆虫種における *o-Ace* 発現物の機能は不明である。粗酵素液を用いた本研究の酵素阻害試験では、フェニトロオクソン感受性が 10^3 倍レベルまで低下している HOF トコジラミに関する「阻害剤-相対 ATCh 加水分解残存活性」の応答 (図 1) を示したが、その応答には複数の阻害特性を表す AChE 酵素群の混成は認められなかったため、おもに一方の AChE 遺伝子の酵素発現物の「阻害-残存活性」応答が測定されており、他方の AChE 遺伝子による発現物の応答は基質分解活性の低さのため、その応答が検出されていないものとみなすことができる。われわれは、トコジラミの *p-Ace* のみならず、*o-Ace* のコード配列全長に関する HOF と殺虫剤感受生系統 TKD の比較も行い、両者の間には非同義置換が存在しなかったことも確認している (図示なし)。以上の考察から、HOF 粗酵素液の応答に表れた AChE 酵素活性は *p-Ace* の発現物に基づくものであり、*p-Ace* の F348(331)Y 変異がトコジラミの有機リン系殺虫剤作用点の低感受性の原因であることが強く示唆される。その実験的証明ならびに AChE 阻害剤化合物の中で同変異をもつトコジラミに対して交差抵抗性を免れる化合物の探索を行うためには、異種細胞発現により単離・精製された *p-Ace* を用いて酵素動力学的解析を進めることが今後の重要な研究課題となる。

日本の 98 コロニーより採取されたトコジラミの殺虫剤抵抗性に関連する *p-Ace* の変異遺伝子の保有を調べた結果、4%のコロニーから変異遺伝子が検出された。この結果から、現在のほとんどの国内のコロニーに対してトコジラミ適用のある有機リン系・カーバメイト系の殺虫剤は有効である可能性が示された。HOF の AChE 阻害剤抵抗性機構に代謝抵抗性の要因が含まれているかは現在不明である。有機リン剤の代謝抵抗性機構として、一般的にはシトクロム P450、グルタチオン転移酵素、エステラーゼなどの活性増大が知られている。HOF トコジラミを用いて、これらの酵素群が関わる可能性を、酵素阻害剤を利用する殺虫剤共力試験、生化学解析、遺伝子発現解析などにより確かめることも今後の研究課題である。本研究で考案された AChE 変異遺伝子の分子ジェノタイプング法など簡易な試験法に基づき、今後もトコジラミ集団の AChE 阻害剤の有効性につき監視を続ける必要があるといえる。

E. 結論

- 1) トコジラミの AChE 阻害剤抵抗性機構には AChE の殺虫剤感受低下が含まれる。
- 2) トコジラミ AChE の殺虫剤感受性低下は *p-Ace* のアシル結合部位に生じた F348(331)Y 変異によりもたらされている可能性が非常に高い。
- 3) 日本国内の *p-Ace* F348(331)変異を保有するコロニーの率は非常に低く、現在は AChE 阻害殺虫剤の有効性はほぼ保たれていると推定される。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表： なし

2. 学会発表：

駒形修, 糸川健太郎, 小川浩平, 葛西真治, 數間亨, 皆川恵子, 橋本知幸, 武藤敦彦, 足立雅也, 渡辺護, 小林睦生, 富田隆史. 有機リン剤抵抗性トコジラミにおける変異型アセチルコリンエステラーゼ. 第 66 回日本衛生動物学会大会, 2014 年 3 月, 岐阜市

富田隆史, 駒形修, 糸川健太郎, 小川浩平, 葛西真治, Tawatsin A, Thavara U, 佐々木均. 二種トコジラミの分子分類. 第 66 回日本衛生動物学会大会, 2014 年 3 月, 岐阜市

富田隆史, 駒形修, 糸川健太郎, 小川浩平, 葛西真治, 小林睦生, 渡辺護, 足立雅也, 數間亨, 皆川恵子, 橋本知幸, 武藤敦彦. トコジラミの有機リン剤抵抗性に関連するアセチルコリンエステラーゼの変異. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 2014 年 3 月, 高知市

富田隆史, 駒形修, 糸川健太郎, 葛西真治. 日本のトコジラミの殺虫剤抵抗性の現状. 日本衛生動物学会シンポジウム「トコジラミにどう対処するかー最前線を探る」, 2013 年 4 月, 岐阜市

H. 知的財産の出願・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

表1 トコジラミ採集地

都道府県	コロニー数	都道府県	コロニー数
北海道	6	三重県	2
宮城県	1	滋賀県	1
福島県	1	京都府	6
栃木県	1	大阪府	19
埼玉県	1	兵庫県	7
千葉県	4	和歌山県	1
東京都	8	広島県	2
神奈川県	7	山口県	2
新潟県	2	愛媛県	1
富山県	6	福岡県	3
石川県	3	熊本県	1
長野県	2	大分県	1
静岡県	1	沖縄県	4
愛知県	2	(不明)	3
合計			98

表2 トコジラミ採集年

採集年	コロニー数
1970s	1
≤1972	1
1972	1
2001	2
2007	1
2008	6
2009	4
2010	31
2011	22
2012	12
2013	17
合計	98

表3 *p-Ace* F348(331)Y 変異を保有したトコジラミコロニー

コロニー#	採集年	採集地	住居形態	試験個体数	Y331保有個体数*
W-01	1972	富山県	(不明)	1	1
#007	2010	大阪府	一般アパート	25	1
#050	2011	山口県	ビジネスホテル	22	22
#083	2013	神奈川県	一般住宅	4	1

* いずれの個体もY331ホモ接合体として検出された。

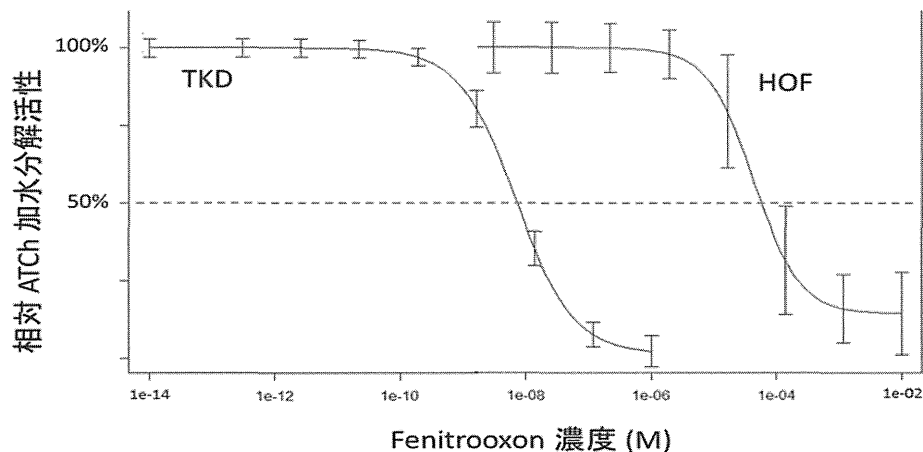


図 1. トコジラミ粗酵素液を用いた AChE 阻害曲線

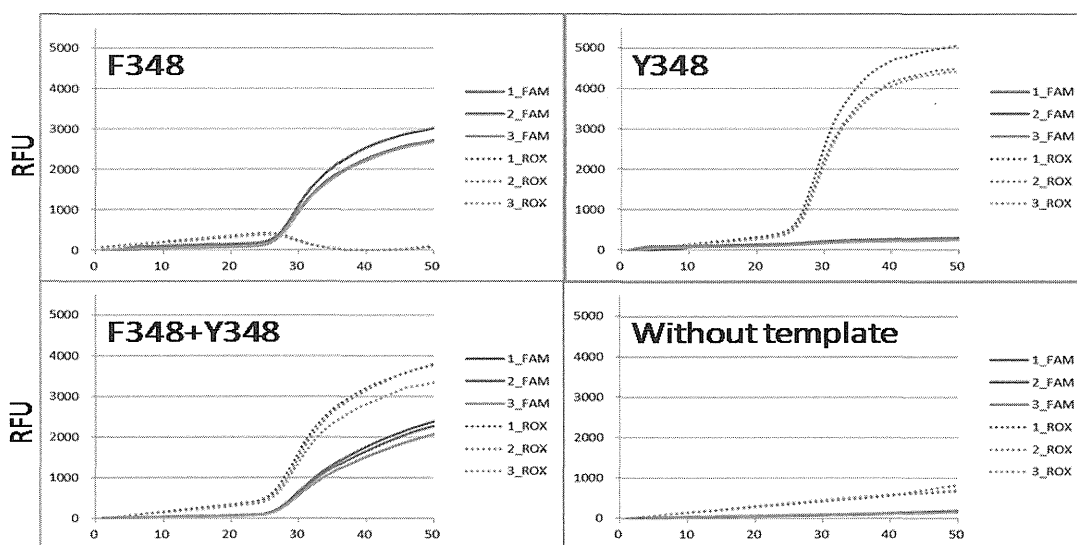


図 2. Cycling Probe 法に基づく *p-Ace* F348 座位に関する遺伝子型判別

	926	929	966	977	1009	1017	1043	1055	1071	1122	1164	1179	1271	1287	1362	塩基座位*	塩基															
	Y	Y	M	R	Y	Y	A	R	Y	Y	R	Y	R	Y	M																	
HOF	T	T	A	A	C	C	A	A	C	C	G	C	A	C	C	→	T	T	A	A	C	C	A	A	C	C	G	C	A	C	C	A type
	T	T	A	A	C	C	A	A	C	C	G	C	A	C	C	→	T	T	A	A	C	C	A	A	C	C	G	C	A	C	C	A type
#083-02	T	T	M	A	Y	Y	A	A	Y	Y	R	Y	A	Y	M	→	T	T	A	A	C	C	A	A	C	C	G	C	A	C	C	A type
	T	T	M	A	Y	Y	A	A	Y	Y	R	Y	A	Y	M	→	T	T	C	A	T	T	A	A	T	T	A	T	A	T	A	B type
W-01	Y	Y	C	A	T	T	A	R	T	T	A	T	R	T	A	→	C	C	C	A	T	T	A	G	T	T	A	T	G	T	A	B-S3 type
	Y	Y	C	A	T	T	A	R	T	T	A	T	R	T	A	→	T	T	C	A	T	T	A	A	T	T	A	T	A	T	A	B type
#007-24	T	T	C	R	T	T	A	A	T	T	A	T	A	T	A	→	T	T	C	G	T	T	A	A	T	T	A	T	A	T	A	B-S1 type
	T	T	C	R	T	T	A	A	T	T	A	T	A	T	A	→	T	T	C	A	T	T	A	A	T	T	A	T	A	T	A	B type

* Met^tコドンから始まる番号づけ

図 3. *p-Ace* Y348 変異のホモ接合体から推定されるハプロタイプ

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

フタトゲチマダニ若虫に対する各種殺虫剤の効力評価に関する基礎研究

分担研究者 富田隆史（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第三室長）
研究協力者 武藤敦彦（一般財団法人日本環境衛生センター・環境生物部）
橋本知幸（一般財団法人日本環境衛生センター・環境生物部）
皆川恵子（一般財団法人日本環境衛生センター・環境生物部）
数間 亨（一般財団法人日本環境衛生センター・環境生物部）

研究要旨

ゴキブリおよび/またはイエダニに対する効力が承認されている医薬品および医薬部外品防疫用殺虫剤のフタトゲチマダニ若虫に対する殺虫効力を、野外での準実地試験法により評価した。その結果、殺虫剤によって致死にかかる日数などに差は見られるものの、全ての試験区において最終的な致死率は100%となり、現在市販されている各種防疫用殺虫剤のフタトゲチマダニ若虫に対する高い殺虫効力が確認された。

A. 研究目的

これまでに、マダニに対する効能・効果について承認された医薬品および医薬部外品はなく、実際に一般家庭の庭や室内でマダニの駆除に使用できる製剤はなかった。そのため、すでに医薬品および医薬部外品として承認されている防疫用殺虫剤のマダニに対する効力を確認するため、残留処理の用法・用量通りにマダニに処理し、その効果を検討した。

B. 試験方法

1. 供試ダニ

供試ダニとして、住化テクノサービス株式会社より分譲されたフタトゲチマダニ若虫を使用した。試験供試時点でのマダニの脱皮後日数は、13～16日。

2. 供試薬剤

- 1) d,d-T-シフェノトリンフロアブル剤
- 2) フェニトロチオン、フタルスリン混合フロアブル剤

- 3) プロペタンホス水性乳剤
- 4) フェニトロチオンマイクロカプセル剤
- 5) プロペタンホスマイクロカプセル剤
- 6) エトフェンプロックス乳剤
- 7) エトフェンプロックス水性乳剤
- 8) フェニトロチオン乳剤
- 9) フェンチオン水性乳剤
- 10) フェニトロチオンフロアブル剤
- 11) フェニトロチオン、d,d-T-シフェノリン混合フロアブル剤
- 12) フェンチオン、フタルスリン混合乳剤
- 13) トリクロロホン、ジクロロボス混合乳剤
- 14) フェノトリン炭酸ガス製剤
- 15) フェニトロチオン粉剤
- 16) フェンチオン粉剤
- 17) トリクロロホン粉剤

3. 実施方法（準実地試験法）

内径 8.5 cm、深さ 5.5 cm のガラス製腰高シャーレの底面にろ紙（東洋濾紙№5 A）を敷き供試ダニ 1 群（8～10 頭）を入