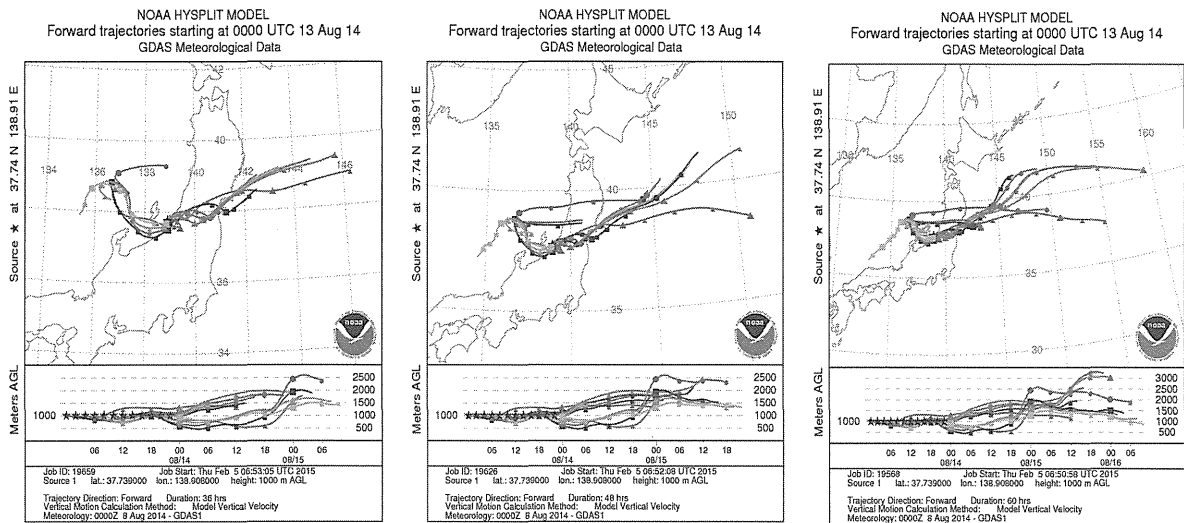


a: 36 時間前                      b: 48 時間前                      c: 60 時間前  
 図9 2014年8月13日捕集ピーク時のNOAAの後方流跡線(高度1,000m付近)



a: 36 時間前                      b: 48 時間前                      c: 60 時間前  
 図10 2014年8月13日捕集ピーク時のNOAAの前方流跡線(高度1,000m付近)

表6 2014年8月13日の指定気圧面の観測データ(輪島付近: 気象庁データ)

【輪島 2014年8月13日21時】

地上

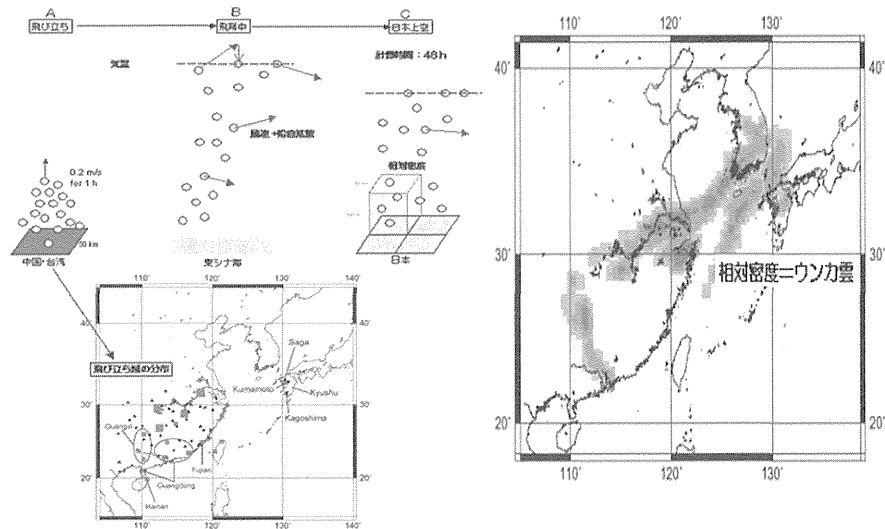
気圧(hPa)	高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1010.7	10	23.8	91	1.9	210

指定気圧面

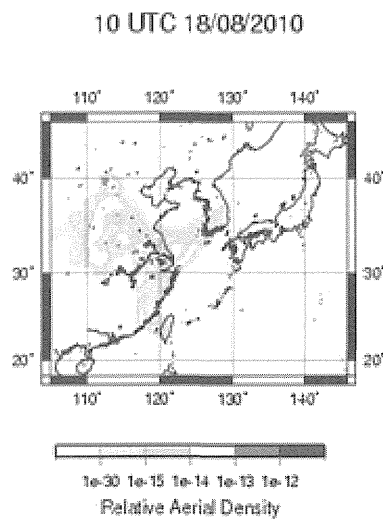
気圧(hPa)	ジオポテンシャル高度(m)	気温(°C)	相対湿度(%)	風速(m/s)	風向(°)
1000	103	23.5	90	1	231
925	784	21.0	72	1	186
900	1022	19.7	75	2	202
850	1513	16.9	85	7	242
800	2028	13.6	87	10	225
700	3141	9.2	14	8	252
600	4402	2.5	87	14	262
500	5862	-4.4	97	21	271
400	7593	-13.2	88	24	263

# ウンカ類(農業害虫)のリアルタイム飛翔予測

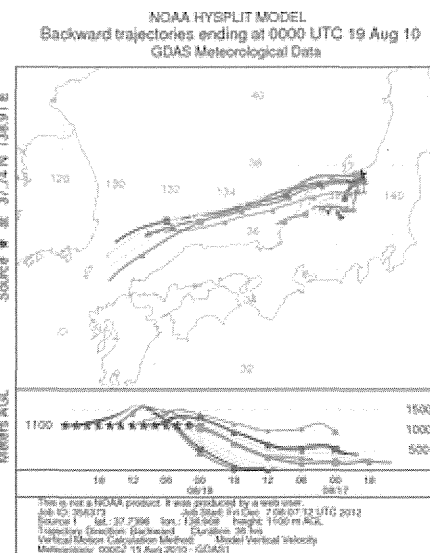
(農研機構, 中央農研, 九州沖縄農研, 日本原子力研究開発機構: 共同研究事業)



## 解析 ウンカの発生と気流の流れ



2010年8月16日~18日  
ウンカのリアルタイム飛来予測



2010年8月17日~19日

### <参考>

農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構），中央農業総合研究センター（中央農研），九州沖縄農業研究センター（九州沖縄農研），日本原子力研究開発機構の共同研究

## アカイエカ種群の南九州での集団遺伝的解析

分担研究者 大塚 靖（鹿児島大学 国際島嶼教育研究センター）

### 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、それらの九州地方南部（熊本県、宮崎県、鹿児島県）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、まず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てみると、チカイエカは全てヘテロで検出できるが、アカイエカと思われる個体には12.5~26.0%のネッタイエカのハプロタイプが含まれていた。さらに、マイクロサテライトマーカーを用いてアカイエカの集団間の変異を調べた。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したものが領域によって3.1~19.4%含まれていた。前年度までに行った北部九州と比べると、鹿児島県では若干ネッタイエカ頻度が高いが、集団的に有意な差にはならなかった。これらの結果は、九州一帯のアカイエカは一定の割合のネッタイエカと同じタイプをもっていることを示している。アカイエカとネッタイエカの違いを明らかにするためには、奄美から大隅諸島などのアカイエカとネッタイエカの境界地域で遺伝的な変異だけでなく形態的・生態的特徴と合わせて検討する必要がある。

### 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。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。前年度は北部九州で調査を行ったので、今年度は南九州において、マイクロサテライトを用いてアカイエカ種群の遺伝的構成を調べ、アカイエカとネッタイエカとの遺伝的違いや、九州本土でのネッタイエカの分布の検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. アカイエカ種群の採集

熊本県（2ヶ所）、宮崎県（6ヶ所）、鹿児島県（12ヶ所）の合計20ヶ所で、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84個体（熊本県、8個体：宮崎県、24個体：鹿児島県、52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、ネッタイエカACE quin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. マイクロサテライトによる鑑別

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確立した、CppAC009 (5'-GGTTC CTCGTCGATG TTGTT-3', R:5'-TTGTTCGTCCAACCTTGCCA-3'), CppAC012 (F:5'-GTGCCACCTCAAG TGTCAGA-3', R: 5'-TCCGATGTTTCATTGG

TTCC-3'), Cpp4b007 (F:5'-ATTGAATGGTTT-3', 5'-TCGAAAACCCACCTTGATGT-3') 3つの領域についても解析を行った。まずPCRを以下の条件で行った。20 µlに0.5U *Ex Taq*, 1x *Ex Taq* buffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mMのそれぞれのプライマー、1µl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

### 1. アセチルコリンエステラーゼ領域を利用した検討

九州南部の熊本県、宮崎県、鹿児島県から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。鹿児島県の4個体はチカイエカハプロタイプのホモとなった。これらのうちの人系統は研究室で飼育しており、無吸血産卵をしており、無吸血産卵を確認している。その他のアカイエカと思われる個体のうち47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、3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。ネッタイエカがホモだった個体はすべて鹿児島県から採集された個体であった (表1)。

### 2. マイクロサテライト領域を利用した検討

チカイエカ3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ほぼ同じアカイエカハプロタイプ (98.0%) を示した。アカイエカ80個体の結果を表2と図1に示す。判断できないハプロタイプがそれぞれの領域で1.9~58.2%存在した。特に CppAC099, CppA012, CPP4b007の3つの領域に関しては34.0~58.2%と著しく高かった。またすべての領域においてのネットアイエカのハプロタイプが存在し、その頻度は3.1~19.4%であった。また、アセチルコリンエステラーゼの領域でネットアイエカのハプロタイプがホモであった個体については、マイクロサテライトの解析ではネットアイエカのハプロタイプ頻度は6.3~18.8%であった。

### 3. 集団間の違いについて

アカイエカのなかにネットア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、熊本県、宮崎県、鹿児島県それぞれの県の集団で見られた。鹿児島県の集団でのネットア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は、アセチルコリンエステラーゼ領域の解析でアカイエカの雄がすべてネットア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)。今回北九州のアカイエカは調べた全ての領域でネットアイエカのハプロタイプを持つことが明らかとなった。前年度は同じく北部九州を調べたが、そこでも今回同様ネットアイエカのハプロタイプを持っていた。今回の地域間の比較では有意にはならなかったが、鹿児島の集団ネットアイエカのハプロタイプの頻度が高かった。また、今回のマイクロサテライトの解析では、CppAC099,

CppA012, CPP4b007の3つの領域では判別不能のハプロタイプが高頻度で出現した。この3つは西宮のアカイエカ系統をもとに作成したものである。これらは多くの候補から、大分と福岡のアカイエカの個体で有効なものを選抜して選ばれたものである。前年度はこの3つの領域を福岡県、長崎県、大分県で調べたときは判別不能のハプロタイプの頻度は0.6~7.0%と低かったのも、検証した地域によるものかもしれない。これらの結果はこのマイクロサテライト領域の有効性が失われるものの、地域によってアカイエカの遺伝変異が存在することをほのめかす結果となった。それらをふまえて、今後地域間の変異をさらに広域で検証が必要と思われる。また、日本では沖縄にはネットアイエカのみが生息しているので、九州と沖縄の間でどのように変化しているのか興味がある。これまで、鹿児島にはネットアイエカが既に生息しているのではないと言われていた。しかし今回の調査ではネットアイエカは確認されなかった。しかし温暖な条件などが整えば、生息の可能性もあるので今後の調査が必要である。今回の方法は日本のアカイエカ集団間での変異をみ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、南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。アカイエカとネットアイエカの違いを明らかにするためには、奄美から大隅諸島などのアカイエカとネットアイエカの境界

地域で遺伝的な変異だけでなく形態的・生態的特徴と合わせて検討する必要がある。

#### **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

大塚靖. アカイエカ種群の九州地域の集団遺伝的解析. 第67回日本衛生動物学会, 2015年3月, 金沢市

#### **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

表1 アカイエカ内の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	Cq	Cpp/Cq	Cpp	Cq
Kumamoto	8	6	0	2	0.875	0.125
Miyazaki	24	15	0	9	0.813	0.188
Kagoshima	48	26	3	19	0.740	0.260
Total	80	47	3	30	0.775	0.225

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  
 チカイエカと検出された3個体は除いている. frequencies はアカイエカの80個体中の頻度を表す.

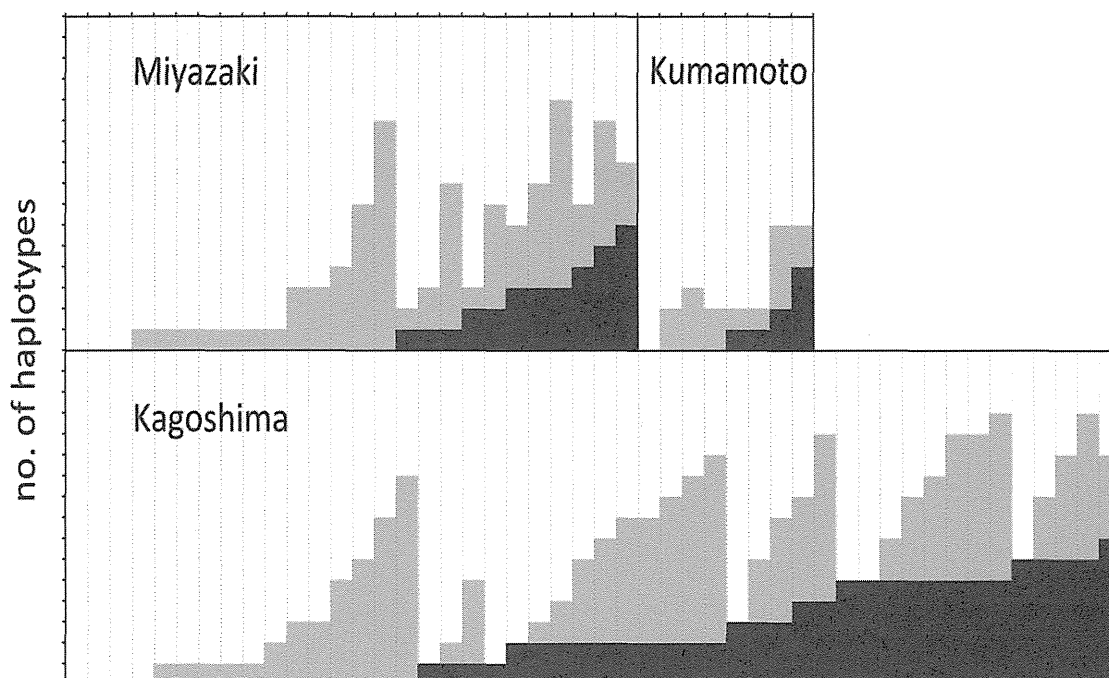


図1 マイクロサテライト8領域の頻度分布

熊本, 宮崎, 鹿児島各個体の頻度分布. 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.



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
Kumamoto	8	12	0	4	14	2	0	16	0	0	12	3	1
Miyazaki	24	43	4	1	45	3	0	45	2	1	41	6	1
Kagoshima	48	73	14	9	80	11	5	76	18	2	56	17	23
Total	80	128	18	14	139	16	5	137	20	3	109	26	25
frequencies		0.800	0.113	0.088	0.869	0.100	0.031	0.856	0.125	0.019	0.681	0.163	0.156

	n	CxpGT51			CppAC009			CppAC012			Cpp4b007		
		Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd
Kumamoto	8	15	0	1	14	1	3	12	0	4	11	2	3
Miyazaki	24	40	6	2	31	4	13	14	3	31	12	5	31
Kagoshima	48	79	13	4	48	9	39	31	6	57	42	24	30
Total	80	134	19	7	93	14	55	57	9	92	65	31	64
frequencies		0.838	0.119	0.044	0.574	0.086	0.340	0.361	0.057	0.582	0.406	0.194	0.400

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 3 個体を除いたアカイエカ 80 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.

野外捕集蚊を用いた疾病媒介蚊の媒介能力の判定法に関する研究：  
本邦産蚊の鳥マラリア原虫の媒介能力について

分担研究者 津田良夫 国立感染症研究所・昆虫医科学部  
協力研究者 金 京純 鳥取大学・農学部

### 研究要旨

野外より捕集した蚊を用いて蚊媒介性病原体の媒介能力を判定するための方法を検討した。蚊媒介性病原体である鳥マラリア原虫を材料として、顕微鏡による蚊体内の原虫の検査と PCR による原虫系統の分子分類法を組み合わせ、アカイエカ群とイナトミシオカの鳥マラリア原虫媒介能力の有無を調べた。その結果、アカイエカ群では CXPIP09, SGS1, と GRW4 の 3 系統のスポロゾイトが確認され、これらの原虫系統を媒介する能力があると判定された。イナトミシオカでは、同一個体からオオシストとスポロゾイトの両方が確認されたのは、CXINA01, CXINA02 および CXQUI01 の 3 系統であった。イナトミシオカはこれら 3 系統を媒介する能力があると結論した。

### A. 研究目的

蚊媒介性病原体がどの種類の蚊によって媒介されているかを明らかにすることは、その病気の感染サイクルと感染の時間的推移を理解する上で必須の課題であり、病気の流行リスクを評価するためにも重要な課題である。ある種の蚊が病原体を媒介する能力を有するかどうかを正確に判定するためには、感染実験を行う必要がある。しかしながら、感染実験を行うためには、問題となる蚊の飼育法を確立することや病原体を適切に維持する方法を考案することなど、いくつかの技術的に難しい問題がある。そのため、実験的な手法によることなく、野外調査によって得られた蚊サンプルを用いて、病原体の媒介能力を判定する手法を開発できればその実用的な価値は非常に高い。2000 年以降 DNA の分析技術が様々な分野で応用されるようになり、蚊媒介性病原体の検出にも広く用いられるようになった。

野外調査で採集された蚊サンプルから病原体の DNA が検出された場合、その種類の蚊がその病原体を媒介していることを示唆

することは可能である。しかしながら、検出された病原体の DNA が吸血によって摂取した動物の血液中に含まれていた可能性や蚊の体内に存在しても何らかの理由で唾液腺に侵入していない可能性を否定することはできない。そのため、蚊サンプルから病原体 DNA が検出されたという事実だけで、その蚊が媒介能力を持つと結論することはできないと考えられている。

鳥マラリア原虫 (*Plasmodium* 属) は蚊によって媒介される鳥類由来の病原体で、多くの野鳥類や飼育鳥類から数十種類が報告されている。野鳥類の鳥マラリア原虫の媒介蚊を実験的に特定することは技術的に困難であるため、最近の野外研究では野外調査で得られた蚊体内から原虫 DNA を検出する手法が主流となっている。しかしながら、上述したように DNA の検出結果だけでは媒介蚊を特定することはできない。鳥マラリア原虫の場合、媒介能力のある蚊の唾液腺にスポロゾイトが侵入することが知られており、スポロゾイトを顕微鏡によって観察して媒介能力の有無を判定することが

可能であるが、形態観察によってスポロゾイトの種類を同定することはできない。このように DNA による検出と解剖・形態観察による原虫の検出にはそれぞれに不備があるが、これらを相補的に用いることによって、媒介蚊を特定することが可能と思われる。そこで、本研究では、野外で捕集された蚊を解剖し顕微鏡観察によって原虫感染個体を選び出し、その個体の唾液腺のスポロゾイトの有無を観察して媒介可能かどうかを判断するとともに、同一個体の中腸あるいは唾液腺のサンプルから原虫 DNA を検出して種類同定を行うという手法を考案し検討を行った。

## B. 研究方法

過去の研究で野鳥類の鳥マラリア原虫が検出されているアカイエカとイナトミシオカを検討種とした。野外で捕集した成虫を解剖し、中腸壁のオオシストの有無を顕微鏡観察によって調べた。オオシストが認められた個体はさらに唾液腺を取り出し、顕微鏡観察によってスポロゾイトの有無を調べた。原虫陽性個体の中腸（2014年のイナトミシオカでは中腸と唾液腺）を冷凍サンプルとして保存し、ミトコンドリア DNA のチトクローム b 遺伝子を解析して原虫の遺伝的系統の分子分類を行った。

## C. 研究結果

野外で採集されたアカイエカ群のサンプルを解剖したところ、中腸壁面に明らかなオオシストが認められる個体が見つかった（図 1）。オオシストの数は個体によって異なり、数個しか確認できない個体から数十個のオオシストが確認される個体も見られた。これらオオシスト陽性個体の唾液腺を取り出して顕微鏡によって観察したところ、スポロゾイトが確認される個体が見られた。本研究でオオシストあるいはスポロゾイトが認められた個体と PCR による分子分類の結果を表 1 に示した。アカイエカ群の成虫

から検出された鳥マラリア原虫の遺伝的系統は 4 系統であった。CXPIP09 はオオシスト陽性で唾液腺からスポロゾイトが認められなかった個体が 6 個体見つかったが、3 個体ではオオシストとスポロゾイトの両方が確認されている。SGS1 はオオシストとスポロゾイトの両方が確認された個体は 5 個体であった。GRW4 は 2 個体でオオシストとスポロゾイトの両方が確認された。GRW11 が検出された個体はオオシストもスポロゾイトも認められたが、中腸（オオシストの発育場所）の PCR では GRW4 と GRW11 がともに検出されているので、GRW11 のスポロゾイトが存在していたかどうかは、確定できなかった。これらの結果から、アカイエカ群が媒介可能であると判定された原虫系統は CXPI09、SGS1、GRW4 の 3 つであった。

イナトミシオカの野外捕集サンプルからも、オオシストとスポロゾイトを持つ個体が見つかった（図 2）。オオシストの数はアカイエカ群の場合と同じように、個体によってかなり異なり、数個から数十個の違いがあった。2014年の陽性個体の 3 個体については、唾液腺の一部も冷凍サンプルとして保存し、中腸とは別に PCR による分子分類を試みた（表 2）。PCR で検出された遺伝的系統は、CXINA01、CXINA02、CXQUI01 の 3 系統であった。これら 3 系統はいずれも、同一個体からオオシストとスポロゾイトの両方が確認されており、イナトミシオカが媒介能力を有すると判定された。個体番号 No4 個体では、中腸からは CXINA02 のみが、唾液腺からは CXINA02 と CXQUI01 が検出された。

## D. 考察

本研究でアカイエカ群のサンプルを採取した場所では、2007年の調査によって合計 10 個の遺伝的系統が検出されている。これら 10 系統の検出頻度を比較すると、本研究でアカイエカ群が媒介可能と判定された

CXPIP09 と SGS1 はこの調査地で最も検出頻度が高い系統であることがわかる。つまりこれら 2 つの鳥マラリア原虫系統はアカイエカ群と野鳥類の間で確実に感染サイクルが成立しており、この調査地で維持されていると結論できる。本研究でアカイエカ群が媒介可能であると判定した残りの 1 系統 GRW4 は、2007 年の調査ではわずか 3 つの陽性サンプルしか得られていない。また GRW4 と混合感染していた GRW11 は、この調査地では今回初めて検出された稀な遺伝的系統である。媒介可能な蚊が生息しているにもかかわらず GRW4 の検出率が低いことは、この調査地では何らかの理由で GRW4 とアカイエカ群が関与している感染サイクルが十分に機能していないことを示唆していると思われる。したがって、単にアカイエカ群が媒介可能であるというだけでなく、成虫 1 個体がどのくらいのスポロゾイトを生産し、GRW4 に感染することが媒介蚊や宿主の野鳥にどのような負荷を与えるかなど、媒介蚊と原虫、原虫と宿主の相互関係に関する量的な研究が今後の重要な研究課題と考えられる。

野外で採集されたイナトミシオカからは 2007～2010 年の調査によって、7 つの鳥マラリア原虫の遺伝的系統が検出されている。CXINA01 と CXQUI01 は過去の調査における検出頻度が高い系統であり、イナトミシオカがこれら 2 系統の媒介能力があるという研究結果はこれまでの調査結果と矛盾しない。CXINA01 はこれまでイナトミシオカだけから検出され、同じ調査地に生息するアカイエカ群からは検出されていない。CXINA01 はこれまで海外の調査研究では報告がないユニークな原虫系統であることから、局所的な分布を示すイナトミシオカと密接に関係して維持されている原虫系統である可能性が高い。この原虫系統の宿主鳥類はよくわかっていないが、鳥マラリア原虫がある地域の野鳥群集で維持される生態的メカニズムを考察する上で、宿主鳥類

の特定は今後の重要な研究課題の一つである。

## E. 結論

本邦産蚊の鳥マラリア原虫の媒介能力を判定するために、野外より採集されたアカイエカ群とイナトミシオカを材料として、顕微鏡観察による鳥マラリア原虫陽性蚊の検出と PCR による原虫の遺伝的系統の分類を行った。その結果、アカイエカ群では CXPIP09, SGS1, と GRW4 の 3 系統のスポロゾイトが確認され、これらの原虫系統の媒介能力があると判定された。イナトミシオカでは、同一個体からオオシストとスポロゾイトの両方が確認されたのは、CXINA01, CXINA02 および CXQUI01 の 3 系統であった。

## F. 健康危機管理情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 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

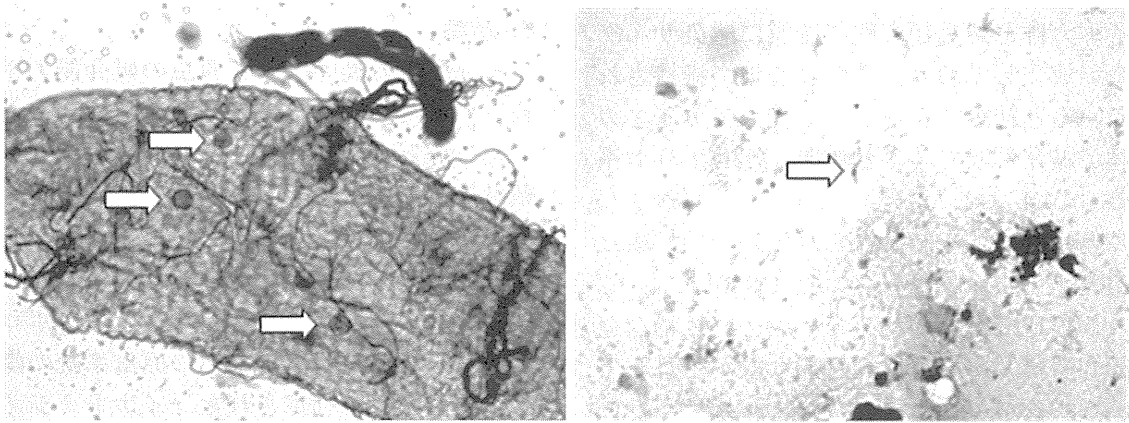


図1 野外で採集されたアカイエカ群で観察された中腸のオオシスト(左)と唾液腺のスプロゾイト(右); No. 10 個体(2012年). この鳥マラリア原虫の遺伝的系統は, SGS1 と判定された.

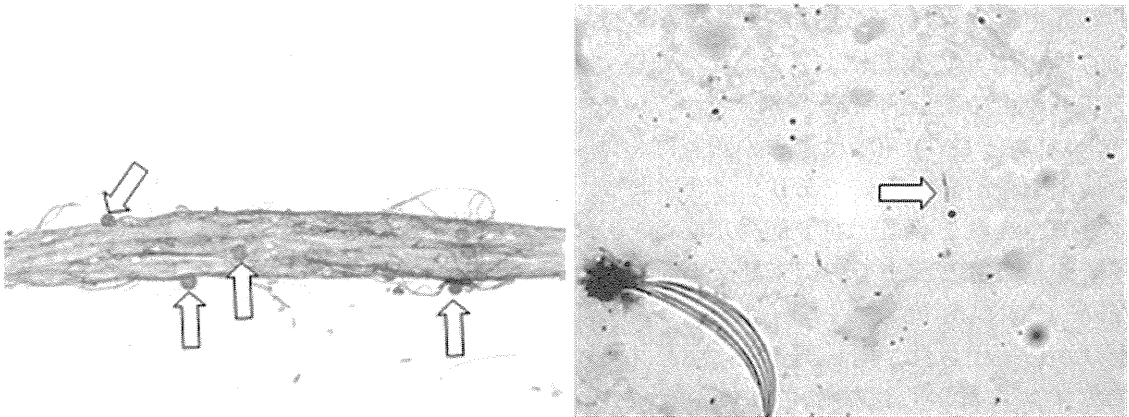


図2 野外で採集されたイナトミシオカで観察された中腸のオオシスト(左)と唾液腺のスプロゾイト(右); No. 1 個体(2014年). この鳥マラリア原虫の塩基配列は, これまで報告がなく, 新規の系統 CXINA02 と名付けた.

表1 アカイエカ群からの鳥マラリア原虫検出結果

調査年	個体番号	オオシスト	スポロゾイト	原虫の遺伝的系統	
				(中腸)	
2012年	No 2	+	-	CXPIP09	
	No 3	+	-	CXPIP09	
	No 6	+	-	CXPIP09	
	No 8	+	-	CXPIP09	
	No 5	+	-	SGS1	
	No 14	+	-	SGS1	
	No 4	+	+	CXPIP09	
	No 7	+	+	CXPIP09	
	No 20	+	+	GRW4	
	No 9	+	+	SGS1	
	No 10	+	+	SGS1	
	No 19	+	+	SGS1	
	No 29	+	+	SGS1	
	No 31	+	+	SGS1	
2013年	No2	+	-	CXPIP09	
	No3	+	+	CXPIP09	
	No4	+	-	CXPIP09	
	No1	+	-	SGS1	
	No7	+	-	SGS1	
	No5	+	+	GRW4 と GRW11	
	No6	+	+	GRW4	

表2 イナトミシオカからの鳥マラリア原虫の検出結果

調査年	個体番号	オオシスト	スポロゾイト	原虫の遺伝的系統	
				中腸	唾液腺
2013年	No.1	+	+	CXINA02	検体なし
	No.2	+	+	CXINA02	検体なし
2014年	No.1	+	+	CXINA02	検体なし
	No.2	+	+	CXINA01	CXINA01
	No.3	+	+	CXQUI01	CXQUI01
	No.4	+	+	CXINA02	CXINA02 と CXQUI01

### 国内捕集蚊から分離されたオルビウイルスの性状解析

分担研究者 伊澤晴彦（国立感染症研究所・昆虫医科学部・第二室長）  
協力研究者 江尻寛子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員）  
              鋏田龍星（国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員）  
              津田良夫（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）  
              佐々木年則（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）  
              小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）  
              澤邊京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）

#### 研究要旨

国内における節足動物媒介性ウイルス（アルボウイルス）感染症の動態を監視する上で、疾病媒介蚊類のウイルス保有状況を把握することは重要である。このため我々は、国内各所で捕集した蚊からのウイルスの分離と性状解析を継続して行ってきた。

2011年11月に東京都内で捕集された蚊からウイルス分離を試みた結果、ヤマトクシヒゲカ雌個体から直径約70 nmの球状ウイルスが分離され、Koyama Hill virus (KHV) と命名した。KHVのウイルスゲノムは10分節の2本鎖RNAであったことから、レオウイルス科オルビウイルス属に属するウイルスと考えられた。そこで、KHVの全分節の塩基配列決定し、コードされるウイルス蛋白質のアミノ配列に基づく分子系統解析を行った結果、蚊媒介性オルビウイルスの一種であるUmatilla virusに近縁なウイルスであることが判明した。KHVの増殖特性を調べたところ、蚊由来培養細胞であるC6/36細胞では効率よく増殖し、さらに鳥由来培養細胞のCCL-141細胞にも感染し増殖可能なことが判明した。また、ウイルス感染実験により、分離源であるヤマトクシヒゲカ体内における増殖性も確認された。本蚊種の吸血源は専ら野鳥であることから、本ウイルスは自然界において、主に蚊と野鳥間の伝播で維持されているアルボウイルスである可能性が示唆された。Umatilla virusの近縁ウイルスについて、東アジア地域における分布が明らかになったのは今回が初めてであり、ヒトや他の哺乳動物への感染性や病原性の有無を含めて、今後詳細な分布実態の把握と疫学的調査が必要である。

#### A. 研究目的

近年加速するグローバル化や地球規模気候変動に伴い、病原体を媒介する吸血節足動物（ベクター）の発生数の増大や分布域の拡大が予測されている。また生態系の攪乱により、野生動物によるヒトや農作物への被害が年々深刻化してきている。このように、ベクターに刺咬される機会が増加し、人間社会と野生動物間の距離が縮まることで、自然界で保有動物とベクターの間に維持されている

病原体のヒトや家畜への感染機会が増加し、今後新興・再興感染症として勃興してくることが危惧される。

国内における蚊媒介性感染症としては、日本脳炎が毎年発生しており、昨年はデング熱の国内流行が約70年ぶりに確認された。近年、国内においてもダニ媒介性のSFTS（重症熱性血小板減少症候群）の発生が顕在化した。このことは自然界には未だ我々が認知していない病原体が少なからず潜伏してい

ることを再認識させるものであった。また同時に、多くの原因不明疾患の中に未知のベクター由来感染症が潜在的に含まれている可能性も示唆している。今後起こり得るベクター由来新興・再興感染症の脅威に備えるためには、平時より媒介節足動物の病原体保有状況と最新の病原体ゲノム情報を把握し、アウトブレイク時の迅速対応につなげていく必要がある。また、保有病原体の生物学的特性や自然界での存在様式（病原性、保有宿主、感染サイクル等）を明らかにすることにより、効果的な予防対策に資する科学的知見の集積を積極的に図っていくことが重要である。

今回、国内におけるアルボウイルスの感染リスクを把握する目的で、東京都内で捕集した疾病媒介蚊のウイルス保有状況調査を実施した。その過程で、国内においてこれまでに報告のないウイルス（レオウイルス科オルビウイルス属）が分離され、詳しいウイルス遺伝子解析と性状解析を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. ウイルス分離

2011年11月に東京都林試の森公園（目黒区/品川区）において、捕虫網を用いて捕集されたヤマトクシヒゲ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、培養液（MEM）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% CO<sub>2</sub>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. ウイルスゲノム解析

分離ウイルスが含まれる細胞培養上清からISOGEN II（ニッポンジーン）を用いてRNA抽出を行った。RT-PCRによりウイルス遺伝子を増幅後、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いてウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。

ゲノム両末端配列についてはRACE法またはSPAT法で決定した。塩基配列の解析には、GENETYX-WIN ver.12およびBLASTを利用した。

### 3. ウイルス粒子の電子顕微鏡観察

ウイルス培養上清を1,600 g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12,000 g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、77,000 g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。

### 4. ウイルスの分子系統解析

他のオルビ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。解析には、分離ウイルスならびに既知オルビウイルスのVP1（Pol）、VP2（T2）、VP7（T13）遺伝子のアミノ酸配列を対象に、近隣結合法により行った。

### 5. 培養細胞における増殖特性の解析

分離ウイルス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BHK-21細胞（ハムスター腎臓由来）、およびCCL-141細胞（アヒル胚由来）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、それらの細胞培養上清を継時的に回収し、プラーク法あるいはウイルス特異的プライマーを用いた定量的RT-PCRでタイトレーションを行った。

### 6. 蚊体内における増殖能の解析

分離源蚊種におけるウイルスの増殖能を確認する目的で、野外で捕集したヤマトクシヒゲカ幼虫を実験室内で羽化させ、分離ウイ



ルスの接種試験を実施した。まず、羽化後4～10日後のヤマトクシヒゲカ雌の胸部にウイルス液を接種した。接種7日後の虫体からRNAを抽出し、real-time RT-PCRを用いてウイルスゲノムのコピー数を定量した。

### C. 研究結果

今回、ヤマトクシヒゲカから分離されたウイルスを蚊の捕集地にちなみKoyama Hill virus (KHV)と命名した。KHVを接種したC6/36細胞を透過型電子顕微鏡で観察したところ、直径70 nm程度のウイルス粒子が細胞内外で多数確認された(図1a)。また、細胞内においては繊維様の構造物が確認され(図1bおよびc)、細胞膜表面では複数のウイルス粒子が膜状構造物に包まれた様子(pseudo-envelope)も確認された(図1dおよびe)。

KHVのウイルスゲノムは10のセグメントからなる2本鎖RNA(dsRNA)であり、加えて前述のウイルス粒子構造の特徴からも、レオウイルス科オルビウイルス属に属するウイルスであることが強く示唆された。全てのセグメントを合わせたウイルスゲノム配列の全長は19,274塩基対と決定された(表1a)。ウイルスゲノム配列をBLASTxにより解析したところ、本ウイルスはオルビウイルス属のUmatilla virus (UMAV)およびStretch Lagoon orbivirus (SLOV)に近縁であることが示唆された。このことは分子系統解析の結果からも支持された(図2)。本ウイルスとUMAVおよびSLOVの塩基配列およびアミノ酸配列を比較した結果は表1に示した。KHVにおいて特徴的な点として、VP3およびNS1がそれぞれコードされているセグメント3および5において、5'末端の非コード領域の塩基配列と比較したところ、両セグメントともにKHVでは欠損配列があることが判明した(表1b)。

C6/36細胞におけるKHVの増殖様相を調べる目的で、プラーク法によりKHVのウイルス力価を算出した。その結果、KHV感染12時間後にウイルス粒子の放出が始まり、72～96時間後にほぼプラトーに達した。また、Vero、

BHK-21、CCL-141などの脊椎動物由来細胞において同様の感受性試験を実施し、real-time RT-PCRによって培養上清中のKHVのウイルスゲノムを定量した。その結果、Vero細胞およびBHK-21細胞ではウイルス量に特段の変化は認められなかったが、CCL-141細胞では接種後96～144時間後に培養上清中に含まれるウイルスゲノムのコピー数が上昇した。

さらに、蚊におけるKHVの増殖能を調べるために、実験室内で羽化させた野外のヤマトクシヒゲカ個体群の雌個体にKHVを接種した。その結果、KHVを $3.6 \times 10^4$  dsRNAコピー当量接種した12個体中5個体において、ウイルスゲノムコピー数の上昇が確認された( $1.1 \times 10^7 \sim 4.2 \times 10^9$  dsRNA copies/mosquito)。また、より低濃度の $1.2 \times 10^3$ コピー当量接種した12個体中5個体においても、ウイルスゲノムコピー数の上昇が確認された( $4.1 \times 10^7 \sim 8.5 \times 10^8$  dsRNA copies/mosquito)。

### D. 考察

今回都内の公園で捕集された蚊から、これまでに国内では報告の無いウイルスが分離された。KHVと名付けた本ウイルスは、全ゲノム解析の結果より、以前に米国、インド、イスラエル、豪州で分離報告のある蚊媒介性オルビウイルス種“Umatilla virus”に近縁なウイルスであることが明らかとなった。このウイルスは、これまでに主にイエカ属蚊や野鳥から分離されており、また豪州では家畜等の生産動物において抗体陽性が認められたことが報告されているが、実際の宿主範囲や自然生態についてはほとんど明らかになっていない。本研究により、蚊および鳥類由来の培養細胞でウイルスの増殖が確認されたことから、KHVは自然界では主に蚊と鳥類間の伝播で維持されている可能性が高いと考えられた。現時点で、ヒトや他の哺乳動物に対する感染性や病原性の有無については不明であるが、新興の人獣共通アルボウイルス感染症の備えからも詳細な実態解明が望ま

れる。今後は、国内に生息する野鳥や飼育鳥の KHV の感染（暴露）歴の調査も視野に入れ、ELISA 法等の血清疫学的診断法の確立による分布実態の解明が必要である。一方、KHV の分離源蚊種であるヤマトクシヒゲカの体内において KHV が効率的に増殖できることが確認され、本蚊種が KHV の主要媒介蚊である可能性が高いことが示唆された。今後はヤマトクシヒゲカのウイルス媒介能に関する評価を進めるとともに、他の蚊種の KHV 感受性と媒介能についても検討し、本ウイルスの自然生態を明らかにする必要がある。

本研究で得られた結果は、新興・再興アルボ感染症の対策として、平時より媒介節足動物の病原体保有状況を把握することの重要性を改めて示すものである。

#### E. 結論

1) 2011 年都内の公園で捕集した蚊から本邦未報告の *Umatilla virus* に近縁な蚊媒介性オルビウイルス *Koyama Hill virus (KHV)* を分離発見した。

2) 蚊および鳥類由来の培養細胞、さらに蚊体内でのウイルスの増殖が確認されたことから、KHV は自然界では主に蚊と鳥類間の伝播で維持されているアルボウイルスであると考えられた。

3) *Umatilla virus* の近縁ウイルスについて、東アジア地域における分布が明らかになったのは初めてであり、ヒトや他の哺乳動物への感染性や病原性の有無を含めて、今後詳細な分布実態の把握と疫学的調査が必要であると考えられた。

#### F. 健康危険管理情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kuwata R., Isawa H., Hoshino K., Sasaki T., Kobayashi M., Maeda K., Sawabe K. Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* cells persistently infected with *Culex flavivirus*. *J. Med. Entomol.* (In press).

Ejiri H., Kuwata R., Tsuda Y., Sasaki T., Kobayashi M., Sato Y., Sawabe K., Isawa H. 2014. First isolation and characterization of a mosquito-borne orbivirus belonging to the species *Umatilla virus* in East Asia. *Arch. Virol.* 159: 2675-2685.

##### 2. 学会発表

江尻寛子, 鎌田龍星, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 津田良夫, 林利彦, 小滝徹, 高崎智彦, 小林睦生, 沢辺京子 (2014). 国内で捕集された蚊およびマダニから分離された2種のオルビウイルスの性状解析. 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2014年5月, 山口市

#### 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



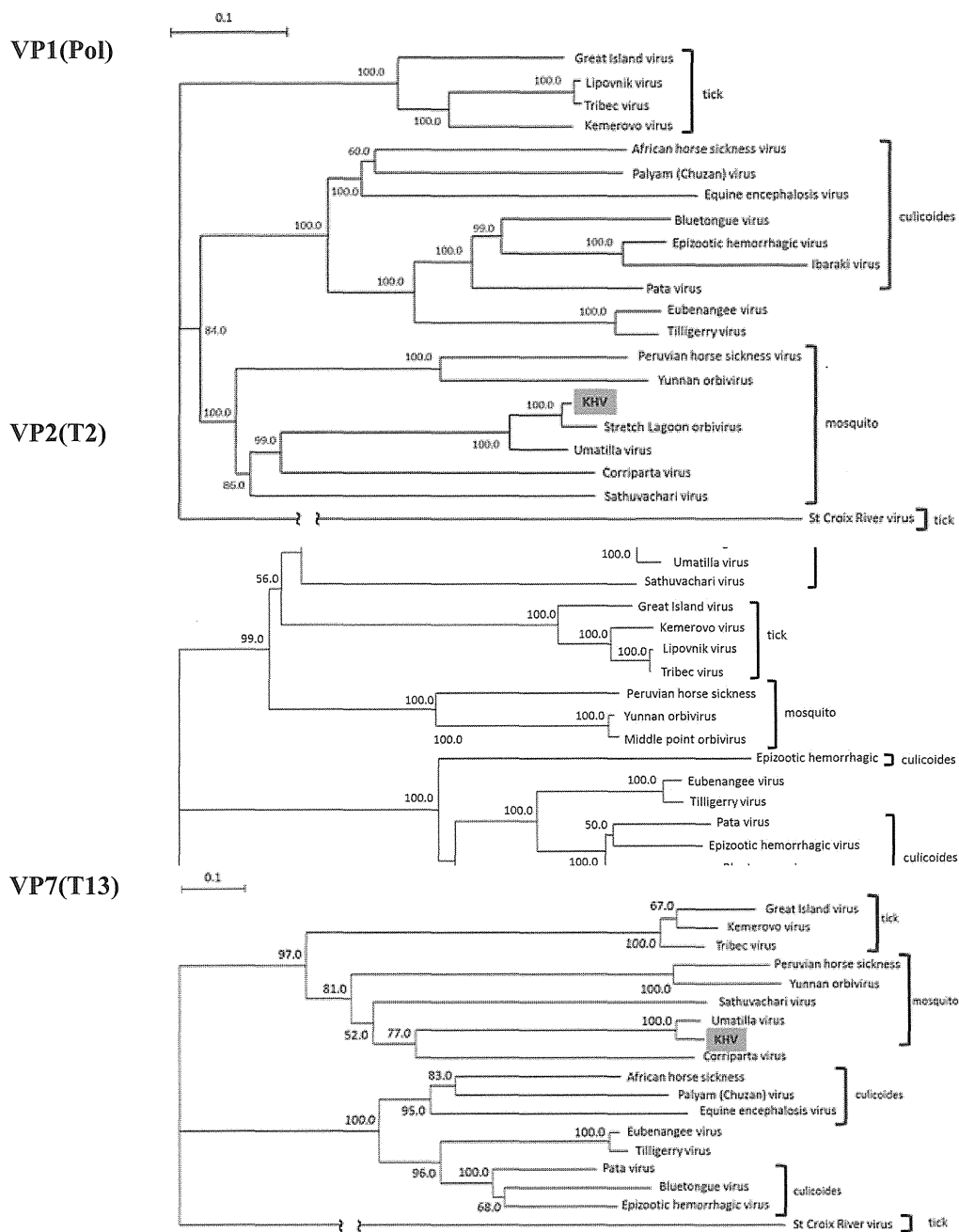


図2 ウイルス蛋白質のアミノ酸に基づく分子系統樹（近接結合法による）