

剤抵抗性には解毒酵素の関与が疑われている。そこで本研究では、SP 系統の代謝抵抗性に関与する原因遺伝子の解明を試みた。

## B. 研究方法

### 1. QTL 解析

#### 1) 供試虫

本研究で用いたネッタイシマカ感受性系統(SMK 系統)は、2009 年に住友化学(株)より分与された。SMK 系統はアメリカで採集され、その後少なくとも 20 年以上は薬剤による淘汰は受けていない系統である。一方、2009 年にシンガポールで採集された SP 系統は、ペルメトリンによる 10 世代にわたる選抜の結果、SMK 系統に対して抵抗性比 1647 倍を示した。また SP 系統は、ピレスロイド系殺虫剤の作用点である電位依存性ナトリウムチャンネルに 2 つの点突然変異を持つことが明らかにされている。

#### 2) 交配

QTL 解析には、SMK♂と F1♀(SMK♂ x SP♀)を交配した BC1 系統と F1(SMK♂ x SP♀)どうしを交配した F2 系統を用いた。実験には、この作出した両系統の羽化 4 日後の雌成虫を用いた。

#### 3) 薬剤試験

##### 1) 生/死による形質判定

1 頭の BC1 雌成虫に対して 5 ng のペルメトリンを局所施用した。処理した雌成虫は、300 ml の三角フラスコに入れ、ネットケージに移した。処理 1.5 時間後に三角フラスコを脱出し、ケージ内を飛翔していた個体を「抵抗性」、24 時間後にケージ内を飛翔していた個体を「回復」、三角フラスコ内で死亡していた個体を「死亡」と判断し、各形質にそれぞれ 2, 1, 0 のスコアを割り当てた。この試験は 162 個体の雌成虫を用いて行い、そのうちの 112 個体を QTL 解析に利用した。

##### 2) ペルメトリン代謝量による形質判定

1 頭の F2 雌成虫に対して  $^{14}\text{C}$  標識されたペルメトリンを 0.88 ng (600 dpm)を局所施用した。処理した雌成虫は、個別にバイアルに移した。18 時間後、各雌成虫は 1.5 ml チューブに移し、100  $\mu\text{l}$  メタノール溶液中でホモジネート後、その残渣を新しいバイアルに移した。各バイアルに 3 ml の液体シンチレーションカクテルを加えて、排泄物または成虫体内の  $^{14}\text{C}$  を測定し、個体毎の排泄率を求めた。この試験は 96 個体の雌成虫を用いて行った。

#### 4) 遺伝子型判別

BC1 雌成虫および F2 雌成虫の遺伝子型判別は、開発した多型的なマイクロサテライトや SNPs, 挿入/欠失を利用した遺伝子マーカーを用いた。BC1 および F2 で用いたマーカー数はそれぞれ、28, 33 であった。

#### 5) データ解析

BC1 および F2 ごとの連鎖地図作製や QTL 解析には、統計ソフト R のパッケージ R/qtl を用いて行った。

## 2. QTL 近傍シトクロム P450 の解析

### 1) 塩基配列の決定

CYP6AA5 の遺伝子コード領域全長の塩基配列の決定には、各系統の未交尾雌成虫の虫体から MagExtractor-Genome-(TOYOBO)を用いて抽出した gDNA および ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて抽出した total RNA を逆転写した cDNA を鋳型として用いた。PCR のためのプライマーは、Vectorbase に登録されているネッタイシマカ Liverpool 系統の CYP6AA5 (AAEL012492) の配列から設計した。PCR 産物は ExoSAP-IT (Affymetrix) で一本鎖 DNA や dNTP を除去した後に、ダイレクトシーケンスを行った。

### 2) CYP6AA5 の定量 PCR

CYP6AA5 の定量 PCR は、各系統の 8 個

体の未交尾雌成虫の虫体から ISOGEN (NIPPON GENE)を用いて抽出した total RNA を逆転写した cDNA を鋳型として用いた。定量 PCR のためのプライマーは、事前に決定した塩基配列を基に設計した。また相対定量のためのハウスキーピング遺伝子には、Ribosomal protein S3 (RPS3)を用いた。定量 PCR は SsoFast- EvaGreen-Supremix (Bio-Rad)を用いて行い、 $\Delta\Delta Ct$  法により各系統の CYP6AA5 の相対発現量を比較した。

## C. 研究結果

### 1. QTL 解析

#### 1) 生/死を形質とした解析

QTL 解析の結果、第 1 および第 3 染色体に QTL の存在が明らかになった(図 1)。第 3 染色体上の QTL 近傍のマーカー 186a は、特に個体の生/死に関与が高かった。また第 1 染色体上の QTL 近傍のマーカーは 125b であった。

#### 2) 代謝量を形質とした解析

QTL 解析の結果、第 1 および第 3 染色体に QTL の存在が明らかになった(図 2)。第 1 染色体上の QTL 近傍のマーカー 125b は、特にペルメトリン代謝量に関与が高かった。また第 3 染色体上の QTL 近傍のマーカーは 702 であった。

125b の遺伝子型が感受性ホモ(AA)、ヘテロ(AB)、抵抗性ホモ(BB)を持つ個体の排泄率 $\pm$ 標準誤差はそれぞれ、 $0.321\pm 0.064$ 、 $0.425\pm 0.010$ 、 $0.607\pm 0.017$  であった(図 3)。

### 2. QTL 近傍シトクロム P450 の解析

SP 系統と SMK 系統の CYP6AA5 の完全長コード配列(1515 bp)を比較したところ、全配列が両系統で一致していた。しかし SP 系統には、CYP6AA5 が遺伝子重複したと思われる CYP6AA5v2 を持つことが判明した。以後、両系統が同じ配列を持つものを CYP6AA5v1、SP 系統のみが持つものを CYP6AA5v2 とした。v1 と v2 の間では、1515 bp 中 31 箇所の塩基置換があり、相同性は

97.95 %であった。またアミノ酸配列では、504 bp 中 9 箇所のアミノ酸置換があり、相同性は 98.21 %であった。さらに両系統が持つ v1 の発現量を比較したところ  $\Delta\Delta Ct$  値は 0.4 であった。

## D. 考察

本研究に用いた SP 系統は、ピレスロイド系殺虫剤の作用点である電位依存性ナトリウムチャンネル (VGSC) に S989P-V1014 の二重アミノ酸置換変異が存在することが明らかにされている (Kasai *et al.*, 2014)。ネッタイシマカにおけるこの変異遺伝子のピレスロイド抵抗性に関する優性の度合いは不明であったが、多くの昆虫種の VGSC で最も多く確認されピレスロイド感受性低下の原因変異として知られる L1014F の優性の度合いに関しては、劣性または半優性とする諸説があるものの、少なくとも半優性を上回る優性の効果はないと考えられていた。そのため、生/死を形質として QTL 解析を行うにあたっては、感受性系統で F1 の戻し交配を行った BC1 子孫を用いれば、この作用点変異の影響が可能な限り排除され、代謝抵抗性の原因遺伝子が明確になると予め考えられた。しかしながら、生/死の形質に最も関与が高かった第 3 染色体の QTL の近傍には、電位依存性ナトリウムチャンネルをコードしている遺伝子が存在しており、おそらく作用点変異は、感受性と抵抗性のヘテロ接合体であっても殺虫剤抵抗性に関与していると思われる。

形質としてペルメトリン代謝量を利用することにより、QTL 解析において作用点変異の影響を完全に排除することができた。その結果、生/死を形質として QTL 解析を行ったときに確認された第 1 染色体上の QTL のペルメトリン代謝に対する関与がより明確になった。このため、第 1 染色体の QTL 近傍にあるシトクロム P450 が SP 系統のペルメトリン代謝を増大させていると考えられる。

現在のところ、ネッタイシマカのシトクロム P450 遺伝子数は 169 個がデータベースに登録されており、そのうち本研究で明らかとなった第 1 染色体上の QTL 近傍に存在するシトクロム P450 は、CYP6BB2, CYP6CC1, CYP18A1, CYP306A1, CYP6AA5, CYP6BZ1, CYP6P12, CYP4H29 の 8 個であった。Kasai et al. (2014) は、本研究で用いた SP 系統と SMK 系統間でマイクロアレイによるシトクロム P450 を対象とした発現解析を行っている。そのデータに今回の QTL 近傍に存在する P450 を照合したところ、CYP6AA5 の発現量が SP 系統において 2.39 倍高いことが明らかとなった。

本研究では、SP 系統と SMK 系統間で塩基配列と発現量が等しい CYP6AA5v1 と SP 系統でのみ発現している CYP6AA5v2 の存在が明らかとなった。QTL 解析を行った F2 個体を用いて、この v2 に対するジェノタイプングを行った結果、確かにこの v2 も第 1 染色体上の QTL 近傍に存在していることが判明した。

QTL 解析では解析に用いた形質に関連する遺伝子が染色体のどこに存在するのかということまでしか明らかにすることができない。このため、形質に関連する候補遺伝子を対象とした逆遺伝学的な研究による表現型での検証が行われることにより、初めて形質に結びつく遺伝子が同定される。そこで、今回の研究により明らかにされた QTL 近傍のシトクロム P450 遺伝子をターゲットとして、ゲノム編集技術に基づき SP 系統から作出されるノックアウト個体を用いて逆遺伝学的な解析を行いペルメトリン代謝に関連する遺伝子を明らかにすることが、今後の研究課題となる。

## E. 結論

QTL 解析によって、SP 系統におけるペルメトリンの代謝量増大に関連する遺伝子は、第 1 染色体上にあることが示された。候補となるシトクロム P450 遺伝子は 8 個存在し

ており、その内 CYP6AA5v2 は SP 系統でのみ発現しており、最有力候補として挙げられる。

## F. 健康危険情報

現時点で特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hirata K., Komagata O., Itokawa K., Yamamoto A., Tomita T., Kasai S. 2014. A single crossing-over event in voltage-sensitive Na<sup>+</sup> channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides. PLoS neglected tropical diseases 8, e3085.

### 2. 学会発表

小川浩平, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ネッタイシマカペルメトリン抵抗性に関連する量的形質遺伝子座の探索. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 2014 年 3 月, 高知市

小川浩平, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ネッタイシマカのペルメトリン解毒代謝酵素に関する QTL 解析. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

## H. 知的財産権の出願・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

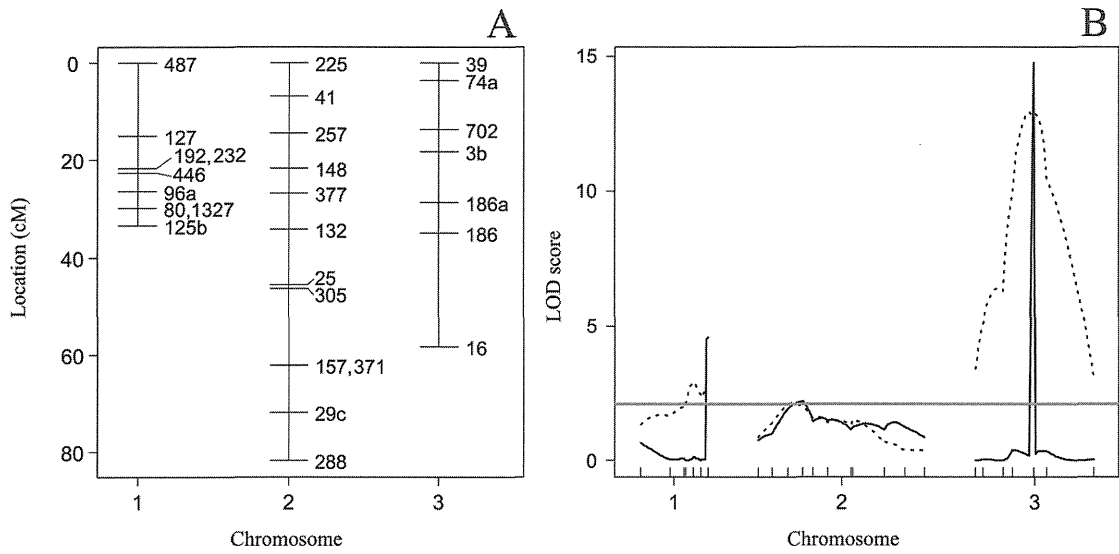


図1 BC1系統を用いた連鎖地図 (A) と QTL 解析結果 (B). 区間マッピング (点線), 複合区間マッピング (黒線), 1%有意水準 (グレー).

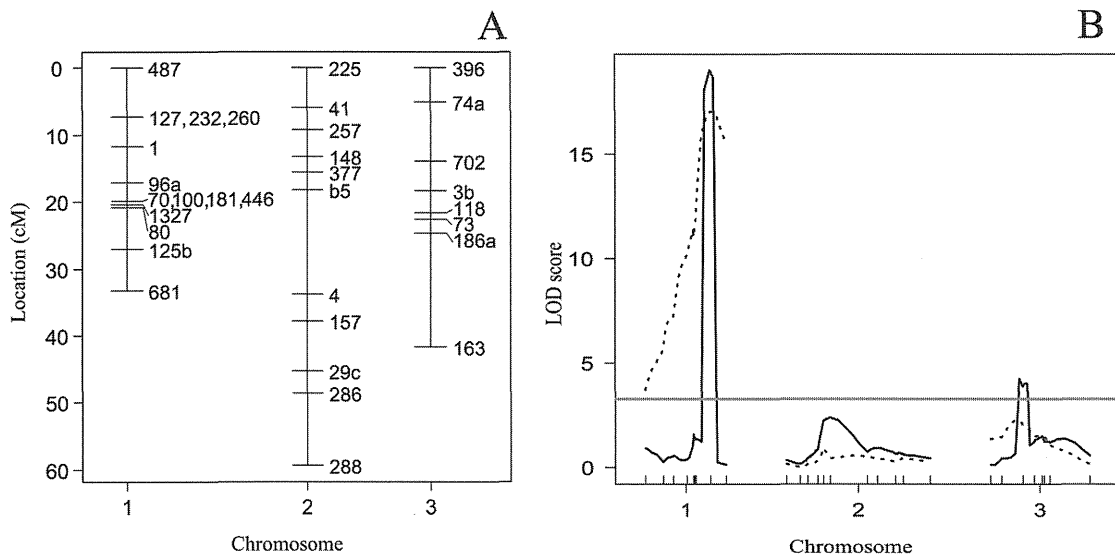


図2 F2系統を用いた連鎖地図 (A) と QTL 解析結果 (B). 区間マッピング (点線), 複合区間マッピング (黒線), 1%有意水準 (グレー).

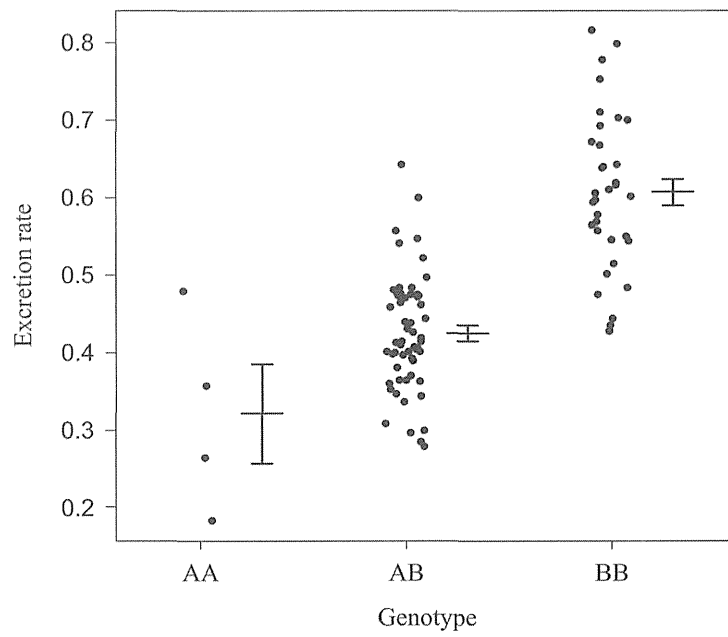


図3 F2雌成虫におけるContig125bの遺伝子型とペルメトリン排泄率. 感受性ホモ(AA), ヘテロ(AB), 抵抗性ホモ(BB). 図中の実線は, 平均と標準誤差を示す.

鳥取県，島根県，広島県におけるマダニ類の生息調査（2014年度）

分担研究者 山内健生 兵庫県立大学・自然・環境科学研究所

協力研究者 石原貴子 松江市

澤邊京子 国立感染症研究所・昆虫医科学部

**研究要旨**

中国地方では，マダニ媒介感染症である重症熱性血小板減少症候群（SFTS）や日本紅斑熱の患者が各地で発生している。しかし，中国地方におけるマダニ類の分布及び季節消長については知見が少なく，不明な点が多い。そこで，中国地方の鳥取県，島根県，広島県の各1地点において，2013年度に引き続きマダニ類の調査を実施した。

これらの調査地では，フランネル法を用いて植生上のマダニ類を定期的に採集した。調査は2014年4月から開始し，鳥取県と島根県では同年11月まで，広島県では同年12月まで実施した。

鳥取県では6種，島根県では5種，広島県では6種のマダニ類が採集された。鳥取県では，キチマダニが多く採集され，その他の5種は少数が採集されたのみであった。島根県では，キチマダニがほぼ全調査期間を通して採集されたが，6月下旬から8月上旬にかけては，ヤマアラシチマダニがキチマダニよりも多く採集された。広島県では9月中旬から10月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ劇的に変化した。優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ変化する時期が昨年度の調査とほぼ同じであったことから，これは普遍的な現象であると推測された。

**A. 研究目的**

マダニ類は，主として山林に生息する節足動物で，吸血の際に様々な感染症（重症熱性血小板減少症候群，日本紅斑熱など）を媒介する場合がある。

我が国において，重症熱性血小板減少症候群（SFTS）患者の発生は兵庫県以西に限られ，中国地方でも各地で患者が発生している。また，日本紅斑熱の患者も中国地方の全県で発生している。このように中国地方はマダニ媒介感染症の患者が比較的多く報告されてきた地域であるが，中国地方におけるマダニ類の分布及び季節消長については知見が少なく，不明な点が多い。そこで，中国地方の鳥取県，島根県，広島県において2013年度に引き続きマダニ類の調査を実施した。

**B. 研究方法**

調査地は，鳥取県米子市淀江町福岡，島根県安来市清水町，広島県広島市安佐北区可部町大字上原の3地点である。これらのうち，広島県の調査地にはニホンジカが高密度で分布し，鳥取県と島根県の調査地にはニホンジカが分布していない。

鳥取県と島根県の調査地では，2014年4月から11月まで，広島県の調査地では2014年4月から12月まで，基本的に毎月上下旬に以下に示すフランネル法でマダニ類を採集した。

調査地では，30分間，90×150cmの白いネル布（フランネル）を用いて下草や地表を撫でながら歩いた。そして，ネル布に付着したマダニ類の成虫と若虫をピンセットにより全て採集した。

これらのマダニ類を、実体顕微鏡及び光学顕微鏡下で分類・計数した。

(倫理面への配慮)

本研究は、植生上で採取されたマダニ類を対象としており、倫理面への配慮を必要としない。

### C. 研究結果

鳥取県の調査地では6種、島根県の調査地では5種、広島県の調査地では6種のマダニ類が採集された(表1-3)。

鳥取県の調査地(表1)では、全調査期間を通じてキチマダニ *Haemaphysalis flava* が多く採集され、その他の5種は少数が採集されたのみであった。

島根県の調査地(表2)では、キチマダニ、ヤマアラシチマダニ *H. hystricis*、ヤマトマダニ *Ixodes ovatus* が多く採集された。キチマダニはほぼ全調査期間に採集されたが、ヤマアラシチマダニは8月18日を最後に採集されなくなった。なお、6月下旬から8月上旬にかけては、ヤマアラシチマダニの方がキチマダニよりも多く採集された。ヤマトマダニは、春に比較的多く採集されたが、7月6日を最後に採集されなくなった。

広島県の調査地(表3)では、キチマダニ、フタトゲチマダニ *H. longicornis*、オオトゲチマダニ *H. megaspinosa* の3種が多く採集された。キチマダニは4月、および8月下旬から調査を終了した12月中旬にかけて採集され、特に10月から11月に採集個体数が増加した。フタトゲチマダニは4月上旬から11月初旬まで採集され、4月から9月中旬までの間は最優占種であった。オオトゲチマダニは4月から5月中旬、9月中旬から調査を終了した12月中旬まで採集され、9月下旬から1月中旬までの間は最優占種であった。

### D. 考察

フタトゲチマダニとオオトゲチマダニは、先行研究によりニホンジカを主要な宿主とすることが知られている。フタトゲチマダニとオオトゲチマダニは、ニホンジカが分布する広島県の調査地で多く採集された。一方、ニホンジカが分布しない鳥取県と島根県の調査地ではキチマダニがもっとも多く採集され、フタトゲチマダニは少数が採集されたに過ぎず、オオトゲチマダニにいたってはまったく採集されなかった。このことから、ニホンジカの分布状況は、マダニ相に大きな影響を与えるものと考えられる。

島根県の調査地では、キチマダニがほぼ全調査期間を通して採集されたが、6月下旬から8月上旬にかけては、ヤマアラシチマダニの方がキチマダニよりも多く採集された。ヤマアラシチマダニは、広島県や愛媛県などで日本紅斑熱の媒介者であると推測されており、本種は夏季に注意すべき種であることが示された。

広島県の調査地では、9月中旬から10月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ劇的に変化することが示された。優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ変化する時期が昨年度の調査とほぼ同じであったことから、これは普遍的な現象であると推測される。フタトゲチマダニは人体刺症の原因となり、日本紅斑熱やSFTSを媒介する可能性も指摘されている。春から秋にかけてニホンジカ生息地ではフタトゲチマダニの密度が非常に高くなることから、この時期にニホンジカ生息地を訪れる際にはフタトゲチマダニによる刺症に注意することが望ましいといえる。

### E. 結論

鳥取県では6種、島根県では5種、広島県では6種のマダニ類が採集された。鳥取県では、キチマダニが多く採集され、その

他の5種は少数が採集されたのみであった。島根県では、キチマダニがほぼ全調査期間を通して採集されたが、6月下旬から8月上旬にかけては、ヤマアラシチマダニがキチマダニよりも多く採集された。この結果から、日本紅斑熱の媒介者であると推測されているヤマアラシチマダニは、夏季に注意すべき種であることが示された。広島県では9月中旬から10月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ劇的に変化した。優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ変化する時期が昨年度の調査とほぼ同じであったことから、これは普遍的な現象であると推測された。ニホンジカ生息地では春から秋にかけてフタトゲチマダニの密度が非常に高くなることから、この時期にニホンジカ生息地を訪れる際にはフタトゲチマダニによる刺症に注意することが望ましいといえる。

#### F. 健康危険管理情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一, 渡辺護, 鋤田龍星, 前田健, 佐藤智美, 前川芳秀, 林利彦, 小林睦生. マダニ相に関する国内調査. 第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2014年5月, 山口市

山内健生, 石原貴子, 沢辺京子. 鳥取県, 島根県, 広島県におけるマダニ定点調査. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

佐藤智美, 山内健生, 林利彦, 前川芳秀, 小川浩平, 佐々木年則, 小林睦生, 糸山享, 沢辺京子. 環境の異なる地域におけるマダニ相および植生解析, 2015年3月, 金沢市

小林睦生, 前川芳秀, 山内健生, 野田伸一, 二瓶直子, 沢辺京子. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)患者が発生した地域の植生の特徴. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一, 渡辺護, 平林公男, 鋤田龍星, 前田健, 岩永史朗, 安藤勝彦, 鎮西康雄, 佐藤智美, 前川芳秀, 林利彦, 佐々木年則, 小林睦生. SFTS対策に向けたマダニ類の全国調査. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

#### H. 知的財産権の出願・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 フランネル法（1回30分間）による鳥取県米子市淀江町福岡でのマダニ調査結果  
（2014年）

| 学名                      | 4月26日          | 5月3日 | 5月17日 | 6月1日 | 6月21日 | 7月6日 | 7月22日 | 8月5日 | 8月18日 | 9月6日 | 9月20日 | 10月4日 | 10月19日 | 11月16日 | 合計 |    |
|-------------------------|----------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|--------|--------|----|----|
|                         | 17.2℃<br>52.2% | 20.6 | 21.0  | 21.8 | 23.7  | 26.6 | 29.1  | 30.0 | 30.4  | 26.3 | 22.2  | 21.2  | 16.6   | 14.2   |    |    |
| <i>A. testudinarium</i> | 若虫             |      |       |      |       |      |       |      | 1     |      |       |       |        |        | 1  |    |
|                         | ♀成虫            |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |
|                         | ♂成虫            |      |       | 1    |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 1  |    |
| <i>H. flava</i>         | 若虫             | 17   | 10    | 7    | 14    | 13   | 3     | 4    | 2     | 1    | 3     |       | 8      | 7      | 7  | 96 |
|                         | ♀成虫            | 2    | 1     | 1    | 2     |      |       |      |       |      |       |       |        |        |    | 6  |
|                         | ♂成虫            | 2    | 2     | 2    | 1     |      |       |      |       |      | 1     | 1     | 1      | 1      |    | 11 |
| <i>H. hystricis</i>     | 若虫             |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |
|                         | ♀成虫            |      |       |      |       |      |       | 1    |       | 1    |       |       |        |        | 2  |    |
|                         | ♂成虫            |      | 1     |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 1  |    |
| <i>H. longicornis</i>   | 若虫             |      |       |      |       |      | 2     |      |       |      |       |       |        |        | 2  |    |
|                         | ♀成虫            |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |
|                         | ♂成虫            |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |
| <i>I. ovatus</i>        | ♀成虫            | 2    |       | 2    |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 4  |    |
|                         | ♂成虫            | 2    |       | 1    | 2     |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 5  |    |
| <i>I. turdus</i>        | 若虫             |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       | 1      |        | 1  |    |
|                         | ♀成虫            |      |       | 1    |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 1  |    |
|                         | ♂成虫            |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |

表2 フランネル法（1回30分間）による島根県安来市清水町でのマダニ調査結果  
（2014年）

| 学名                      | 4月26日          | 5月3日 | 5月17日 | 6月1日 | 6月21日 | 7月6日 | 7月22日 | 8月7日 | 8月18日 | 9月6日 | 9月20日 | 10月4日 | 10月19日 | 11月16日 | 合計 |    |
|-------------------------|----------------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|--------|--------|----|----|
|                         | 24.9℃<br>23.0% | 18.6 | 21.9  | 28.5 | 24.8  | 26.6 | 30.4  | 29.3 | 30.7  | 28.4 | 24.0  | 19.4  | 24.1   | 20.4   |    |    |
| <i>A. testudinarium</i> | 若虫             |      |       |      |       |      | 2     |      | 1     |      |       |       | 1      |        | 4  |    |
|                         | ♀成虫            |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |
|                         | ♂成虫            |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |
| <i>H. flava</i>         | 若虫             | 8    | 6     | 2    | 5     | 2    |       | 4    | 2     |      | 4     | 1     | 3      | 3      | 13 | 53 |
|                         | ♀成虫            |      |       | 1    |       |      |       |      |       |      |       | 1     |        | 1      | 2  | 5  |
|                         | ♂成虫            | 1    | 1     | 1    |       |      |       |      |       |      |       | 1     | 3      | 1      |    | 8  |
| <i>H. hystricis</i>     | 若虫             | 1    | 4     | 1    |       | 2    |       |      |       |      |       | 1     |        |        | 9  |    |
|                         | ♀成虫            |      |       |      | 2     | 5    |       | 5    | 4     | 1    |       |       |        |        | 17 |    |
|                         | ♂成虫            |      | 2     | 2    | 1     | 4    |       | 4    | 3     |      |       |       |        |        | 16 |    |
| <i>H. longicornis</i>   | 若虫             | 1    |       |      |       | 1    |       |      |       |      |       |       |        |        | 2  |    |
|                         | ♀成虫            |      |       |      |       |      | 1     | 1    |       |      |       |       |        |        | 2  |    |
|                         | ♂成虫            |      |       |      |       |      |       |      |       |      |       |       |        |        | 0  |    |
| <i>I. ovatus</i>        | ♀成虫            | 1    | 3     | 1    | 2     | 2    |       |      |       |      |       |       |        |        | 9  |    |
|                         | ♂成虫            | 4    | 4     | 4    | 1     | 2    | 1     |      |       |      |       |       |        |        | 16 |    |

表3 フラソネル法（1回30分間）による広島県広島市安佐北区可部町大字上原での  
マダニ調査結果（2014年）

| 学名                      |     | 4月9日 | 4月21日 | 5月12日 | 6月7日 | 6月23日 | 7月6日 | 7月26日 | 8月2日 | 8月30日 | 9月16日 | 9月27日 | 10月5日 | 10月19日 | 11月2日 | 11月30日 | 12月14日 | 合計  |     |
|-------------------------|-----|------|-------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|-----|-----|
| <i>A. testudinarium</i> | 若虫  | 1    | 2     | 1     | 2    | 3     | 1    | 1     | 3    | 1     |       |       |       |        |       |        |        | 15  |     |
|                         | ♀成虫 |      |       |       |      |       |      |       |      |       |       |       |       |        |       |        |        | 0   |     |
|                         | ♂成虫 |      |       |       |      |       |      |       |      |       |       |       |       |        |       |        |        | 0   |     |
| <i>H. flava</i>         | 若虫  | 1    | 2     |       |      |       |      |       |      | 6     | 7     | 5     | 5     | 4      | 8     | 19     | 6      | 63  |     |
|                         | ♀成虫 |      | 2     |       |      |       |      |       |      |       |       | 1     | 4     | 2      | 2     | 3      | 2      | 16  |     |
|                         | ♂成虫 |      | 1     |       |      |       |      |       |      |       |       | 1     | 1     | 7      | 5     | 1      | 4      | 20  |     |
| <i>H. kitaokai</i>      | ♀成虫 |      |       |       |      |       |      |       |      |       |       |       |       |        | 1     |        | 1      | 2   |     |
|                         | ♂成虫 |      |       |       |      |       |      |       |      |       |       |       |       |        |       |        |        | 0   |     |
| <i>H. longicornis</i>   | 若虫  | 119  | 133   | 77    | 138  | 105   | 71   | 10    | 17   | 40    | 40    | 12    |       | 6      | 2     |        |        | 770 |     |
|                         | ♀成虫 | 1    | 2     | 1     | 11   | 19    | 29   | 7     | 17   | 9     |       |       | 1     |        |       |        |        | 97  |     |
|                         | ♂成虫 | 1    | 2     |       | 8    | 11    | 10   | 12    | 13   | 2     |       |       |       |        |       |        |        | 59  |     |
| <i>H. megaspinosa</i>   | 若虫  | 2    | 1     | 1     |      |       |      |       |      |       |       | 1     | 8     | 63     | 29    | 150    | 171    | 54  | 480 |
|                         | ♀成虫 | 1    | 2     |       |      |       |      |       |      |       |       | 1     | 9     | 8      | 14    | 7      | 1      | 2   | 45  |
|                         | ♂成虫 |      | 2     |       |      |       |      |       |      |       |       | 6     | 11    | 10     | 3     | 3      | 2      | 1   | 38  |
| <i>I. turdus</i>        | 若虫  | 1    |       |       |      |       |      |       |      |       |       |       |       |        |       |        |        | 1   |     |
|                         | ♀成虫 |      |       |       |      |       |      |       |      |       |       |       |       |        |       |        |        | 0   |     |
|                         | ♂成虫 |      |       |       |      |       |      |       |      |       |       |       |       |        |       |        |        | 0   |     |

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

マダニ相に関する全国調査の試み（2014年5月）

分担研究者 林 利彦（国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長）  
協力研究者 山内健生（兵庫県立大学自然・環境科学研究所）  
橋本知幸（一般財団法人日本環境衛生センター）  
野田伸一（鹿児島大学・国際島嶼教育研究センター）  
平林公男（信州大学・繊維学部）・  
鍬田龍星（国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員）  
前田 健（山口大学・共同獣医学部）  
佐藤智美（明治大学・農学部）  
前川芳秀（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）  
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

2013年1月、国内で初めて重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の患者が発生し、2013年だけで40名の患者（うち13名が死亡）が報告された。これまでの調査で、複数種のマダニからウイルス遺伝子が検出され、遺伝子陽性マダニは全国に分布すること、ウイルス抗体価の高い野生動物が存在することなどが明らかになったが、SFTSウイルスの感染環は依然として不明である。SFTS感染が多いと予想される5月にマダニ相調査を行った。2013 昨年10月に行った予備的調査から、調査実施者の技術の優劣は、本法にはほとんど影響しないことが確認されたため、マダニの生息数の多い地域、マダニの種構成が全国規模で比較できると考えた。

2014年は、4月下旬から5月上旬にかけて、昨年秋とほぼ同じ地点とさらに3府県と28地点を追加し、合計27都道府県下の82地点を調査地点とした。その結果、全国的に昨年秋よりも本年春の捕集数は多く、フタトゲチマダニの捕集数が多調査地点で多いことが示唆された。

A. 研究目的

国内において、マダニ媒介性感染症は日本紅斑熱やライム病がよく知られており、その流行地にあつては、マダニの捕獲調査は熱心に行われてきている。しかし、それらの調査は主に病原体の検出を目標とした調査であるため、捕集方法は統一されていないことが多かった。そこで我々は、まず捕集方法を統一し、国内のなるべく多くの地域でマダニを採取した。具体的には、調査地1カ所につき

一人30分間のフランネル法でマダニを捕集し、生息密度や種構成を全国的に評価した。SFTSとマダニの関連性を探るためには、患者発生が多いと推定される5月に調査を行うことが重要であるが、まず、予備的な調査を2013年10月下旬から11月上旬にかけて、国内24都道府県において、それぞれマダニと人との接触が予想される環境を想定し、合計55地点を選定した。予備的調査から、調査実施者の技術の優劣は、本法にはほとんど

影響しないことが確認されたため、マダニの生息数の多い地域、マダニの種構成が全国規模で比較できると考えた。

## B. 研究方法

2014年4月下旬から5月上旬にかけて、昨年秋とほぼ同じ地点とさらに3府県と28地点を追加し、合計27都道府県下の82地点を調査地点とした(図1)。

調査地の温度・湿度を測定し、野生動物の存在等も含めた周辺の環境情報をできるだけ多く入手することを心がけた。捕集されたマダニは、外部形態により種の同定を行い集計した。

## C. 研究結果

### 1. マダニ相の比較

北海道での調査は昨年と同様の理由で、6月4日に実施した。帯広市(北海道①②)で捕集されたマダニは、昨年同様すべてヤマトマダニであったが、総捕集数は一人30分で120頭と40頭を越え、いずれの地点も昨年秋よりも有意に高い値であった(図2)。キチマダニは昨年秋と同様に国内に広範で捕集されたが、フタトゲチマダニが優先種となり、かつ捕集数が非常に多い地点(宮城県②: 47.5頭/人/30分、神奈川県①: 58頭、石川県①: 122頭、三重県: 37~86頭、鹿児島県①②: 117頭、81頭)が確認された。本調査で、春の捕集数は秋より2倍以上も多いこと、秋はキチマダニが優先種であり、春はフタトゲチマダニが優先種となる地点が多く、種構成もかなり異なることが明らかになった。

三重県の調査地では、秋の調査結果(5~26頭/人/30分)(図3左)に比べてすべての地点で捕集数は多かった(37~86頭)(図3右)。また、種構成も明らかに秋とは異なり、5月はフタトゲチマダニが優占種であることが示唆された(37~85%)。この時期にタカサゴキララマダニの個体数が多い地域は他にはなく、特に三重県⑤では捕集率も高かった(26.5%)。

### 2. マダニの季節消長(結果は省略)

2013~2014年の鹿児島県日置市における定点調査では、フタトゲチマダニの若虫は4月から6月にかけて発生のピークがあり、7~8月に成虫が出現した。10月初旬に若虫が出現したが冬季は全く捕集されず、次に出現したのは翌2014年の2月下旬であった。距離的に遠く離れている神奈川県小田原市の定点調査地の捕集数は鹿児島県に比べて非常に少なく、春の出現時期が鹿児島県よりも1か月遅かったが、その消長はほぼ同じ傾向を示していた。両地点において成虫の活動が5~9月に観察されたことから、フタトゲチマダニは夏型の季節消長を示す種類であることが確認された。

キチマダニは、鹿児島県日置市では、8~9月の夏季に捕集数が減少したものの、ほぼ1年中捕集された。特に成虫のピークは2月の初旬にあり、若虫の消長も成虫とほぼ同じ傾向を示した。一方、神奈川県では、若虫は8月を除きほぼ一年中捕集されたが、成虫は6~8月にはほとんど見られず、2月下旬からその発生数が増加した。いずれの地域においても、キチマダニは冬季に捕集数が多い種類であり、冬型のマダニであると言える。

## D. 考察

マダニの移動は、基本的には宿主である野生動物の移動範囲に限られるため、比較的小規模なホットスポットが存在すると考えられている。事実、今回の調査でも、近距離に位置する調査地であっても、マダニの捕集数や種構成に大きな差異が見られることが明らかになった。また、季節が異なると種構成が大きく異なることも明らかになった。この結果は、マダニのSFTS伝搬を考察するためには、できるだけ患者発生地周辺で、時期も考慮してマダニ調査を行う必要があることを強く示唆するものである。しかし、現時点では、地域や行政の協力が得られる場所はかなり限られており、できるだけ多くの地域からマダニの基礎的情報を収集・蓄積し、情報

を公開していくことが、今、我々にできることの一つである。

本調査で、マダニの生息数の多い環境や種類構成の異なる環境が明らかになった。今後は、それら基礎情報に加え、野生動物の分布や植生等の環境要因も考慮し、SFTS ウイルスのヒトへの感染リスクを評価したいと考えている。北欧では、30年程前からノロジカの個体数が増加し、ダニ媒介性脳炎の患者も増加してきた。地球温暖化が野生動物やマダニ類の個体群密度の増加に関係しているとの指摘もあるが、シカやイノシシ等の大型の哺乳動物は、マダニの繁殖や維持に必要な吸血源として、主要な野生動物である。わが国においても、ニホンジカやイノシシなどの大型哺乳動物の個体数は急激な増加傾向にあり、民家周辺に出現する事例も多くなってきた。畑や水田の周囲にシカやイノシシ対策の電気柵が張り巡らされ、囲い罫が設置されている風景もよく見かけるようになってきた。事実、SFTS 患者はそのような環境下で発生することが多い。これまで山奥で密かに感染環を回していたウイルスが、環境変化や温暖化、マダニとその宿主動物の分布域の拡大などによって活動域が広がり、ヒトの生活圏に侵入してきたのではないだろうか。現時点では、有効な治療薬はなく、個人レベルでダニ刺咬を防ぐ以外に防除法はない。しかし、マダニをむやみに恐れることはなく、草むらがあるところではできるだけ肌を露出しない、忌避剤を効果的に使用する等の基本的な対策を取ることで身を守ることは可能である。

## 謝辞

マダニの捕集にあたり、以下の方々にご協力いただいた（敬称略）。平良雅克・竹村明博・小池裕（千葉県衛生研究所）、武田昌昭（信州大学・繊維学部）、安藤勝彦（三重大学・医学部）、鎮西康雄（鈴鹿医療科学大学・医学部）、平良常弘（西宮市環境局・環境衛生課）、石原貴子（島根県松江市）、早坂大介

（長崎大学熱帯医学研究所）。各氏に深く感謝する。

## E. 結論

- 1) 2014年5月に一斉調査および定点における季節消長調査を継続した。
- 2) 調査地1か所につき1人当たり30分間のフランネル法により捕集されたマダニの種構成および捕集数を比較した。
- 3) 距離的に近い調査地であっても採集数や種構成が異なり、季節によって種構成や捕集数が異なる地点が多かった。
- 4) これら基礎情報に加え、野生動物の分布や植生等の環境要因も考慮し、SFTS ウイルスのヒトへの感染リスクを評価することが必要である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

沢辺京子. 2014. わが国におけるマダニ類の分布状況について. マダニを取り巻く環境とSFTS, 生活と環境, 699: 18-22.

沢辺京子. SFTS 対策に向けたマダニ類の全国調査. 2015. ペストコントロール, 169: 33-39.

### 2. 学会発表

江尻寛子, 鋤田龍星, 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. 国内で捕集された蚊およびマダニから分離された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

沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一, 渡辺護, 鋤田龍星, 前田健, 佐藤智美, 前川

芳秀, 林利彦, 小林睦生. マダニ相に関する国内調査. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2014 年 5 月, 山口市

佐藤智美, 林利彦, 前川芳秀, 糸山享, 沢辺京子. 神奈川県厚木市におけるマダニ相および植生調査. 第 67 回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2014 年 10 月, 千葉市

橋本知幸, 沢辺京子. 神奈川県および山梨県におけるマダニの発生消長調査事例. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

江尻寛子, 伊澤晴彦, 林昌宏, 小滝徹, 高崎智彦, 林利彦, 佐々木年則, 小林睦生, 西條政幸, 沢辺京子. 国内で捕集されたマダニから分離されたオルビウイルスの性状解析. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

小林睦生, 前川芳秀, 山内健生, 野田伸一, 二瓶直子, 沢辺京子. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 患者が発生した地域の植生の特徴. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

山内健生, 石原貴子, 沢辺京子. 鳥取県, 島根県, 広島県におけるマダニ定点調査. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

佐藤智美, 山内健生, 林利彦, 前川芳秀, 小川浩平, 佐々木年則, 小林睦生, 糸山享, 沢辺京子. 環境の異なる地域におけるマダニ相および植生解析, 2015 年 3 月, 金沢市

## II. 知的財産権の出願・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

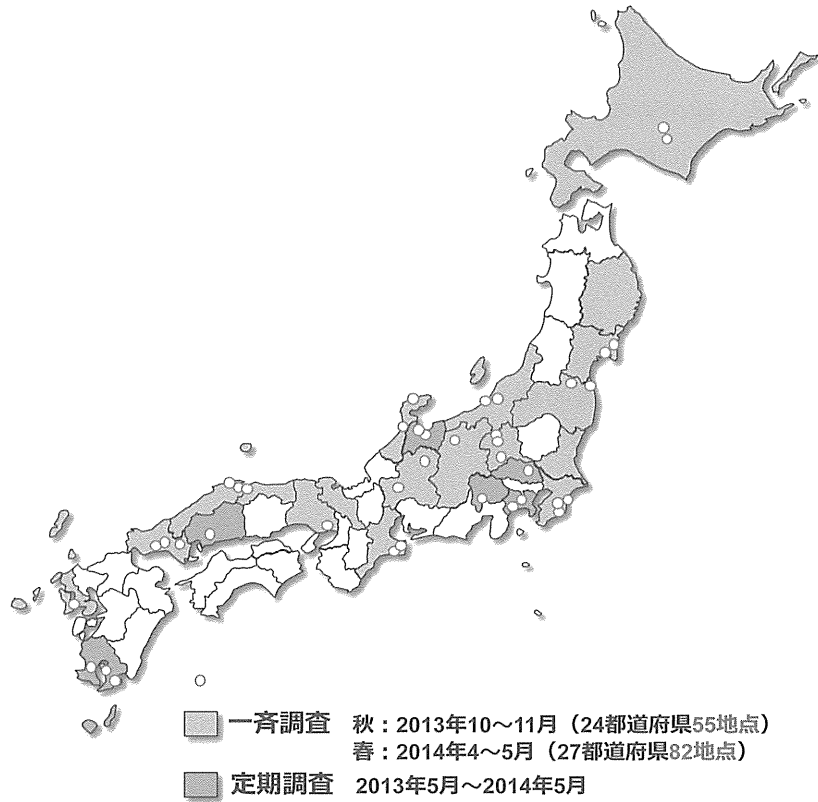


図1 調査地点

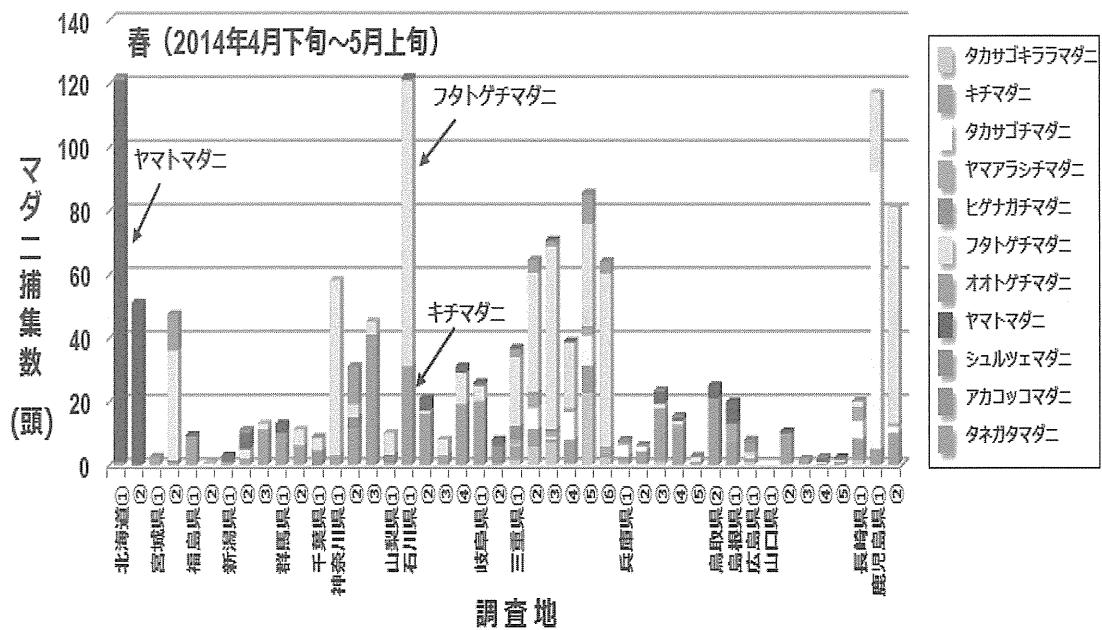


図2 定点調査地におけるマダニ捕集数および種構成

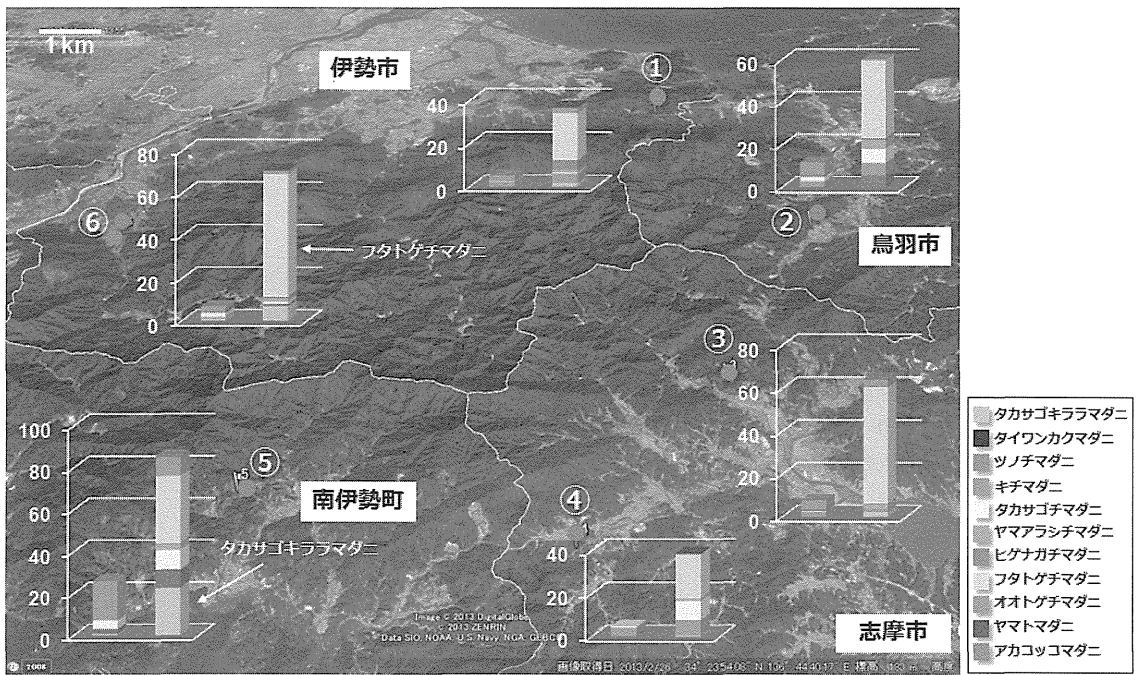


図3 三重県におけるマダニ種構成の比較（左：2013年10月，右：2014年5月）



### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者名   | 論文タイトル名   | 発表雑誌名  | 巻名  | ページ                         | 発表年              |
|--|---|--|-----|-----------------------------|------------------|
| Hirabayashi K.<br>Takeda M.<br>Tsuda Y.  | Tow-year aftereffects of Tsunami on abundance of mosquitoes in suburban Sendai Area in Miyagi Prefecture, Japan in 2013   | Entomological Research Bulletin.   | 30  |                             | 2015<br>In press |
| Kuwata R.<br>Isawa H.<br>Hoshino K<br>Sasaki T.<br>Kobayashi M.<br>Maeda K.<br>Sawabe K.   | Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in <i>Culex tritaeniorhynchus</i> cells persistently infected with Culex flavivirus  | Journal of Medical Entomology  |     |                             | 2015<br>In press |
| Moi M.L.<br>Ami Y.<br>Shirai K.<br>Lim C.K.<br>Suzaki Y.<br>Saito Y.<br>Kitaura K.<br>Saijo M.<br>Suzuki R.<br>Kurane I<br>Takasaki T            | Formation of infectious dengue virus –antibody immune complex in vivo in marmosets ( <i>Callithrix jacchus</i> ) after passive transfer of antidengue virus monoclonal antibodies and infection with dengue virus | American Journal of Tropical Medicine and Hygiene  |     |                             | 2015<br>In press |
| Arima Y.<br>Matsui T.<br>Shimada T<br>Ishikane M<br>Kawabata K.<br>Sunagawa T.<br>Kinoshita H<br>Takasaki T.<br>Tsuda Y.<br>Sawabe K<br>Oishi K. | Ongoing local transmission of dengue in Japan, August to  | Western Pacific Surveillance and Response Journal  | 5   | doi:10.5365/wpsar.2014.5.3. | 2014             |
| Ejiri H.<br>Kuwata R.<br>Tsuda Y.<br>Sasaki T.<br>Kobayashi M.<br>Sato Y.<br>Sawabe K.<br>Isawa H.   | First isolation and characterization of a mosquito-borne orbivirus belonging to the species Umatilla virus in East  | Archives Virology  | 159 | 2675-2685                   | 2014             |
| Hirabayashi K.<br>Takeda M.<br>Nihei N.<br>Kobayashi M.<br>Tsuda Y.<br>Sawabe K.   | Distribution of <i>Aedes albopictus</i> mosquitoes in an inland climate mountain area, Nagano Prefecture, Japan   | Proceedings of the 8th International Conference on Urban Pests, Gabi Muller, Reiner Pospischil and William H Robinson (Edits.) Printed by OOK-Press Kft., H8200 Veszrem, Papai | 37  | 125-129                     | 2014             |

| 発表者名   | 論文タイトル名  | 発表雑誌名  | 巻名    | ページ       | 発表年  |
|--|--|--|-------|-----------|------|
| Hirata K.<br>Komagata O.<br>Itokawa K.<br>Yamamoto A.<br>Tomita T.<br>Kasai S.   | A single crossing-over event in voltage-sensitive Na <sup>+</sup> channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides                    | PLoS neglected tropical diseases             | 8     | e3085     | 2014 |
| Kobayashi M.<br>Komagata O.<br>Yonejima M.<br>Maekawa Y.<br>Hirabayashi K.<br>Hayashi T.<br>Nihei N.<br>Yoshida M.<br>Tsuda Y.<br>Sawabe K.    | Retrospective search of dengue vector mosquito, <i>Aedes albopictus</i> in area visited by a German traveler that has contracted dengue Disease                          | International Journal of Infectious Diseases | 26    | 135-137   | 2014 |
| Nakamichi K.<br>Lim CK.<br>Saijo M.  | Stability of JC virus DNA in cerebro-spinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing   | Japanese Journal of Infectious Diseases      | 67    | 307-310   | 2014 |
| Nakamichi K.<br>Tajima S.<br>Lim CK.<br>Saijo M.   | High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy | Archives Virology                            | 159   | 1687-1696 | 2014 |
| Takayama-Ito M.<br>Nakamichi K.<br>Kinoshita H.<br>Kakiuchi S.<br>Kurane I.<br>Saijo M.<br>Lim C.K.  | A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines  | Biologicals                                  | 42    | 42-47     | 2014 |
| Takeshita N.<br>Lim C.K.<br>Mizuno Y.<br>Shimbo T.<br>Kotaki A.<br>Ujiie M.<br>Hayakawa K.<br>Kato Y.<br>Kanagawa S.<br>Kaku M.<br>Takasaki T. | Immunogenicity of single-dose Ver cell-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese adults  | Journal of Infection and Chemotherapy        | 20    | 238-242   | 2014 |
| Tsuda Y.<br>Hayashi T.   | Results of mosquito surveillance using dry-ice traps from 2003 to 2013 at the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan                                    | Medical Entomology and Zoology               | 65    | 131-137   | 2014 |
| 沢辺京子   | SFTS対策に向けたマダニ類の全国調査  | ペストコントロール                                    | 169   | 33-39     | 2015 |
| 渡辺 護   | 公衆衛生学的視点からみた三陸海岸被災地におけるハエとカの大発生  | CLEAN LIFE                                   | 2014年 | 19-26     | 2014 |

| 発表者名          | 論文タイトル名                                       | 発表雑誌名   | 巻名  | ページ     | 発表年  |
|---------------|---|---------|-----|---------|------|
| 佐々木年則<br>関なおみ | シラミ媒介性感染症, 特に壱塚熱<br>の現状と今後の課題                 | 化学療法の領域 | 30  | 106-113 | 2014 |
| 沢辺京子          | 日本脳炎ウイルスの国内越冬と<br>海外飛来                        | 化学療法の領域 | 30  | 39-49   | 2014 |
| 沢辺京子          | わが国におけるマダニ類の分布<br>状況について. マダニを取り巻<br>く環境とSFTS | 生活と環境   | 699 | 18-22   | 2014 |

