

**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**

研究分担者 津田 良夫 国立感染症研究所・昆虫医科学部  
研究協力者 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πο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πο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ποロゾイトが侵入することが知られており、スπο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 *ctt1* 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

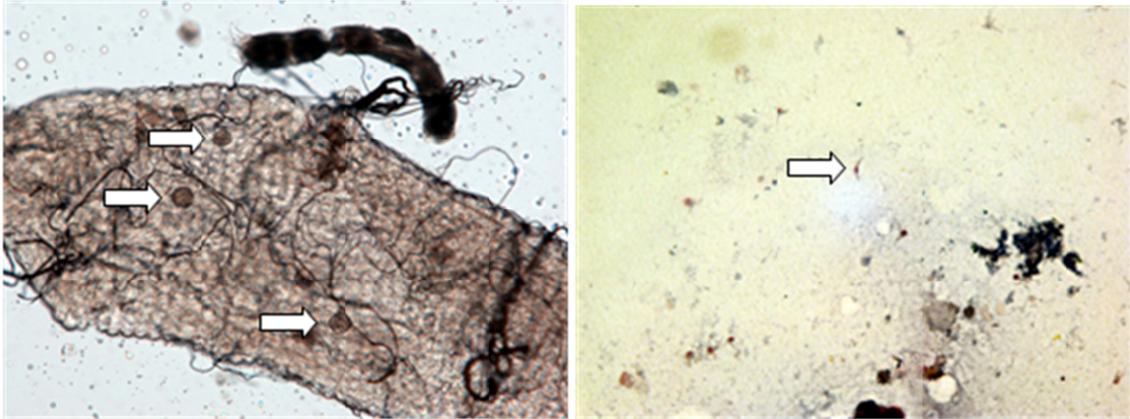


図1 野外で採集されたアカイエカ群で観察された中腸のオオシスト(左)と唾液腺のスποロゾイト(右); No. 10 個体(2012 年). この鳥マラリア原虫の遺伝的系統は, SGS1 と判定された.

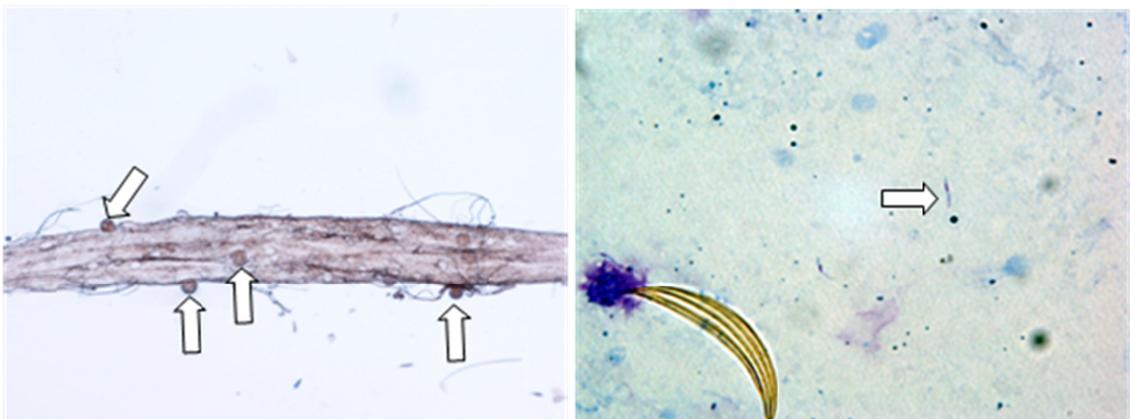


図2 野外で採集されたイナトミシオカで観察された中腸のオオシスト(左)と唾液腺のスποロゾイト(右); No. 1 個体(2014 年). この鳥マラリア原虫の塩基配列は, これまで報告がなく, 新規の系統 CXINA02 と名付けた.

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)	
				中腸	唾液腺
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