

図1 2009～2014年のヒトスジシマカの生息北限



図2 2010～2014年生息調査（盛岡市内）におけるヒトスジシマカの生息状況

日本国内における疾病媒介蚊調査

分担研究者	津田良夫	国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官
協力研究者	前川芳秀	国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員
	小川浩平	国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員

研究要旨

1道7県を対象として、2014年4月から9月まで蚊相調査を実施した。調査地域内で周辺環境の異なる場所に成虫採集用のドライアイストラップを設置し、その周辺などで幼虫採集を行った。その結果、10属44種4,677個体以上を採集した。ドライアイストラップでは、9属29種3,308個体が採集された。採集した幼虫は、成虫まで飼育した10属37種1,369個体に対して形態同定を行った。熊本県と和歌山県では20種類以上の蚊が採集され、北海道と福島県、岐阜県は寒冷地や高地であるにも関わらず16種類の蚊が採集された。この事は、採集地点周辺の多様な環境が種々な発生源を創出し、豊富な蚊相を支えていることを示唆している。コガタアカイエカやシナハマダラカのような水田発生性の蚊は、稲の品種改良と共に変わった水田の水管理システムの影響を受け、発生時期などが違っていると考えられる。そのため、現在の稲作に合わせた定点観測を実施し、その生態を究明する必要がある。日本は寒冷地から温帯気候と亜熱帯気候にまで及ぶことを考慮すると、1回の調査によって生息蚊の全種類を明らかにすることは難しいと思われるため、今後も繰り返し調査する必要がある。DNAバーコーディングは、これまで21種の解析が終了した。今後もサンプル数を増やし、日本産蚊のDNAバーコード整備を進めていく予定である。

A. 研究目的

蚊媒介性感染症を考える上で、媒介蚊を正確に特定することは、感染環の解明や防除方法など具体的な対策を立てる上で大変重要である。通常、蚊の形態には発生源や発生時期、地域特異性などによる個体変異があり、形態による種同定には多数の標本の比較検討が必要である。そのためには多地域から得られた状態のよい標本が必要とされる。日本産蚊の全国的調査は、1968年に上村、1976年に田中らによって行われているが、それ以降、約40年近く実施されていない。また、日本産蚊のバーコーディングやDNA分析による種内変異の再検討は、一部のグループを除いて、行われていない。さらに、温暖化や都市開発により日本国内

の蚊相やその分布域が大きく変化していることが予想されている。一方、交通手段の発達や経済活動の活発化によりグローバル化が進み、感染症もボーダレスの時代となり、海外からのデング熱やチクングニア熱、ウエストナイル熱などの蚊媒介性疾患のわが国への侵入が危惧されている。

昨今、生物が持つ特有のDNA情報に基づいて種同定を行う技術(DNAバーコーディング)が提唱され、形態学的な分類知識や経験の有無によらずに高精度の種同定ができる方法として注目されている。DNAバーコーディングは蚊の種同定にも応用でき、さらに同胞種(sibling species)や形態同定が難しい種に対しても有用なツールである。形態同定と比べ専門性が低く汎用性が高い

ため、今後、重要な種同定方法のひとつとなると考えられる。

本研究は、我が国の蚊媒介性感染症を取巻く環境を鑑み、日本産蚊の種と分布の再調査および標本と DNA バーコーディング整備を行う事を目的として実施した。本年度は北海道、福島県、岐阜県、和歌山県、山口県、長崎県、熊本県、鹿児島県の1道7県(図1)でドライアイストラップ法(成虫)と幼虫採集を行った。作成した乾燥標本の遺伝子解析を行い、各個体の乾燥標本と遺伝子情報の整備を行った。

B. 研究方法

1. フィールド調査

調査は2014年4月25日から9月18日まで1週間屋外採集し、2週間実験室で採集蚊と幼虫の種同定と飼育、標本作成を行う作業を期間終了まで行った。成虫採集はCDC型トラップと誘引源としてドライアイス1kgのセット(ドライアイストラップ)を10か所設置し、15:00から翌朝9:00まで採集した。採集した蚊は、生かした状態でホテルに持ち帰り、クロロホルムを用いて殺し、種同定を行った。種同定後は冷凍庫あるいはドライアイスと共に保冷箱で保管した。幼虫採集はトラップ設置場所周辺等で柄杓やスポイト、網などを用いて行い、成虫になるまで飼育した。飼育幼虫は、4齢から個別飼育し、脱皮殻(幼虫と蛹)と羽化成虫の一連標本を作製した。主な採集場所は山間部、森林や水田、沼、池、湿地、河川敷、公園、海岸などを選び、各採集地点はGPSで緯度経度を記録した。

2. DNA バーコーディング

DNA バーコーディングとは、特定の遺伝子領域の塩基配列(DNA バーコード)を用いて生物種の同定を行う技術である。DNA バーコーディングの標準的なバーコード領域は、ミトコンドリアのチトクロムC酸化酵素サブユニットI(COI)遺伝子の一部

(648 bp)である。この遺伝子が選択された理由は、動物界の大部分の分類群で利用できる universal primer (LCO1490 と HCO2198)があり、種レベルでの変異を多く含むためである。

ドライアイストラップで採集した状態の良い成虫と幼虫を飼育して羽化した成虫を乾燥標本にし、各個体から中脚一本を採取してDNA バーコーディング試料とした。試料からのDNA抽出は、MagExtractor®-Genome (TOYOBO)を用い、添付のマニュアルに従い抽出作業を行った。続くDNA増幅には汎用プライマー(LCO1490 と HCO2198)と TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version を用いてPCRを行った。PCR産物は、MultiNA と試薬キット DNA-12000 (Shimadzu)により確認した。得られた増幅物は、ExoSAP (Affymetrix)により精製し、BigDye Terminator ver1.1 (Life Technologies)でシーケンシングサンプルを調整し、ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies)を用いて塩基配列を決定した。塩基配列の解析には、ATGC-Win ver.7 (GENETYX)を利用し、分子系統樹作成は、MEGA ver5.2 と GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)を用いて行った。

C. 研究結果

今回の調査では、10属44種4,677個体以上を採集した。ドライアイストラップでは、9属29種3,308個体が採集された(表1)。採集した幼虫は成虫まで飼育した10属37種1,369個体に対して形態同定を行った(表2)。飼育中に103個体の死亡個体を確認したが、他にも若齢期に死亡した個体がいるため、計1,472個体が総幼虫採集数ではない。羽化率は、種や発生源により異なるが、平均すると40%程度であった。また、幼虫飼育結果に示す *Anopheles* sp, *Culex* sp, *Ae. souleensis* は、鱗片や剛毛の欠落などにより形態の特徴が欠落して状態が悪いため、正確な種同定には至らなかった。*An.*

yatsushiroensis は, Miyazaki (1951) によって記載されたが約 50 年間採集記録がなく, 絶滅危惧種に指定されている種である. 近年, *An. yatsushiroensis* は *An. pullus* の同胞種であるという報告もあり, 韓国や中国に生息する同種との形態や遺伝的特徴の検討を行う必要性が国際的に高まっている. DNA 解析した *An. yatsushiroensis* 11 個体 (♂7, ♀4) は, *An. sinensis* (シナハマダラカ) である可能性が示されたが, ♀1 個体の形態的特徴は, 明らかに *An. yatsushiroensis* と酷似しており, *An. sinensis* と異なっていた. 未解析試料にも同様な特徴を有する個体があるため, 早急に解析し比較検討する必要がある. また, より正確な結果を得るため, 別の遺伝子領域での比較を検討している. 現在, 4 種 42 個体の DNA バーコードを解析し, 同様の手法を継続している. 表 2 と表 3 の結果は, 形態同定の結果としてまとめ, すべての DNA 解析が終了した時点で整理する事にした.

成虫採集で最も採集数が多かったのは *Cx. pipiens* grp. (アカイエカ) で 27%, 次いで *Ae. excrucians* 21%, *Cx. orientalis* (ハマダライエカ) 20% であった. 幼虫採集では, *Ae. japonicas* (ヤマトヤブカ) が 18.5%, 次いでハマダライエカ 12.4%, *Cx. tritaeniorhynchus* (コガタアカイエカ) 11% であった. アカイエカは, ウエストナイル熱などの媒介蚊であり, コガタアカイエカは, 重要な日本脳炎媒介蚊である. 採集地の違いによる種構成では, 成虫採集は熊本県が 17 種と最も多く, 次いで北海道 14 種, 岐阜県 10 種であった. 幼虫採集では, 和歌山県が 21 種, 熊本県が 18 種, 岐阜県 14 種であり, 成虫採集と比べ多様な種が採集された. また, 北海道に生息する *Ae. punctor/hokkaidensis*, *Ae. excrucians*, *Ae. esoensis* はドライアイストラップでしか採集できなかった一方, 北海道での採集蚊の 46% を占めていた.

D. 考察

本調査では, 疾病媒介蚊として重要な 12 種類, シナハマダラカ, *An. lesteri* (オオツルハマダラカ), アカイエカ, コガタアカイエカ, *Cx. pseudovishnui* (シロハイシエカ), *Ae. dorsalis* (セスジヤブカ), *Ae. japonicas* (ヤマトヤブカ), *Ae. albopictus* (ヒトスジシマカ), *Ae. flavopictus* (ヤマダシマカ), *Ae. vexans nipponii* (キンイロヤブカ), *Ae. togoi* (トウゴウヤブカ), *Ar. Subalbatus* (オオクロヤブカ) が採集された. シナハマダラカとオオツルハマダラカは 3 日熱マラリア媒介蚊, コガタアカイエカは重要な日本脳炎媒介蚊, シロハシエカは, インドとマレーシアで日本脳炎媒介蚊として記載されており, 国内でも媒介蚊である可能性がある. ヒトスジシマカはデング熱やチクングニア熱, 黄熱病, ウエストナイル熱など多くのウイルスを媒介することが分かっている. アカイエカは, ウエストナイル熱やフィラリア症, 鳥マラリア, トウゴウヤブカはフィラリア症の媒介蚊である. ウエストナイル熱媒介蚊として人や野鳥から吸血する習性を持つセスジヤブカ, ヤマトヤブカ, ヤマダシマカ, キンイロヤブカ, オオクロヤブカは各地で採集された. 成虫採集と比べ幼虫採集では多様な種が採集された一方, どちらかの採集方法でのみ採集された種は 19 種であり, 多様な蚊相を調査する場合は, 成虫と幼虫双方を採集する必要がある事が示唆された.

Ae. punctor/hokkaidensis や *Cx. pipiens* grp. のような同胞種や形態特徴が良く似た近似種などは, 鱗片や剛毛の欠落などにより形態的特徴が欠落して状態が悪い場合, 形態同定では分類が難しい事がよくある. 現在までで 21 種 (昨年 17 種, 本年 4 種) の DNA 解析が終了した. これまでの解析での問題点は, 対象種のバーコードが登録されていない, あるいは登録されていても違う領域を解析しているなど比較できないことである. そのため, 採集場所や時期など異なる

サンプルを大量に解析し、同じクレードを形成するか確認する必要がある。次に、同定者のバイアスがあるため、複数の同定者が同定した対象種を解析することを考えているが、古いサンプルの DNA は損傷が激しく、DNA が抽出できないことが多かった。そのため、古いサンプルから効率よく DNA 抽出する方法を検討している。DNA バーコーディングは、同胞種や形態同定が難しい種に対しても有用なツールである。形態同定と比べ専門性が低く汎用性が高いため、今後、重要な種同定方法のひとつとなると考えられるため、形態同定ができる専門家がいない間に、若手の育成および日本国内のすべての種の DNA バーコードを整備する必要があると考えられる。

昭和 32 年に福島県より発刊された『福島県内におけるハエとカの周年発生消長』では、福島県内の広い範囲でコガタアカイエカが採集されている一方、我々の調査では採集できなかった。これは、我々が訪れた際、ほとんどの水田に水はなく、幼虫および成虫の密度が低下していたことが原因と考えられる。そのため、コガタアカイエカ採集に適した時期に調査を行う必要がある。長崎県と山口県の調査も同様に、調査時期が 5 月上旬であったため、田植えの準備が整っておらず、コガタアカイエカ幼虫が発生していなかったと考えている。日本脳炎は毎年数例の症例報告がされており、依然として我が国において重要な蚊媒介性疾患である。近年、稲の品種改良が進み、水田の水の管理方法が変わった事で、蚊の季節消長にも影響を与えていると考えられる。この問題を解明するためにも長期に渡る定点観測を実施し、水田発生性蚊の生態を究明する必要がある。ウエストナイル熱を媒介する蚊種 9 種ならびにマラリア媒介蚊 2 種は、北海道から鹿児島まで広く分布していることが分かった。今年、デング熱の流行が起これ、我が国も蚊媒介性感染症がいつでも起きる状況にある事が証明され、

より一層我が国全土を対象とした蚊のモニタリングを行い、蚊の発生消長を観察する必要がある。

北海道でドライアイストラップにより多く採集した *Ae. punctor/hokkaidensis*, *Ae. excrucians* の幼虫は採集できなかった。これら北方系の蚊は、雪解けと共に孵化し幼虫となることが知られている。成虫が多く採集できる場所を中心に幼虫の発生源を探したが、その発見は困難を極めた。九州地方での採集では、*Ae. watasei* (ワタセヤブカ), *Ae. nipponicus* (シロカタヤブカ), *Uranotaenia novobscura* (フタクロホシチビカ) など、樹洞や竹の切り株などの小さな水域で発生する種類、*Ae. riversi* (リヴァースシマカ), *Cx. infantulus* (フトシマツノフサカ) のような琉球列島など熱帯地に多い種など多様な種類の蚊が混在し分布していることが明らかとなった。また、長崎県や熊本、鹿児島県は、温帯と熱帯気候の境界に位置し、サルや鳥など吸血源となる野生動物を多く目撃したこと、渡り鳥の飛来地が多いこと、発生源が多様であり、多くの種が混在していることから、熱帯地方の蚊の侵入を観察するに適した土地であると考えられる。

E. 結論

1 道 7 県で行った蚊相調査では、合計 10 属 44 種 4780 個体を採集した。最も採集数が多かった種は成虫採集ではアカイエカ、幼虫採集ではヤマトヤブカであった。熊本県と和歌山県では 20 種類以上の蚊が採集され、豊富な蚊相を有することがわかった。これは、多種多様な発生源や生息場所となるような湿地や水田、森、小川、樹洞などが多く残っており、吸血源となる野鳥やサルなどの動物も多いことが理由と考えられる。北海道と福島県、岐阜県は高地や寒冷地であるにも関わらず 16 種類の蚊が採集された。豊かな自然がより豊富な蚊相を支えていることを示唆している。他方、九州

地方の調査地では、樹洞や竹の切り株などの小さな水域で発生する種類の蚊（ワタセヤブカ、シロカタヤブカ、フタクロホシチビカなど）が多く採取された。温帯気候と亜熱帯気候の境界に位置することを考慮すると、1回の調査によって生息蚊の全種類を明らかにすることは難しいと思われるため、今後も繰り返し調査する必要がある。

昨年から行っている DNA バーコーディングは、21種の解析が終了している。まだ多くの試料があるため、順次解析をすすめており、同一個体の脱皮殻（幼虫と蛹）と乾燥標本、DNA バーコード一式の整備を行う予定である。それに並行して、古いサンプルからの DNA 抽出方法も検討しており、過去に採集された貴重な標本の DNA バーコード整備も検討している。

今後も日本全土で採集調査を繰り返し、蚊相の把握、日本脳炎など蚊媒介性疾患の流行状況の監視を行うとともに、その地域に生息する蚊の標本の整備を行う事が重要である。

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

前川芳秀，津田良夫，沢辺京子．岐阜県高山地方および福島県会津地方における蚊相調査 2014．第 66 回日本衛生動物学会東日本支部大会，2014 年 10 月，千葉市

前川芳秀，小川浩平，駒形修，津田良夫，沢辺京子．本州における蚊相調査ならびに分子生物学的種同定のための DNA バーコードの整備．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

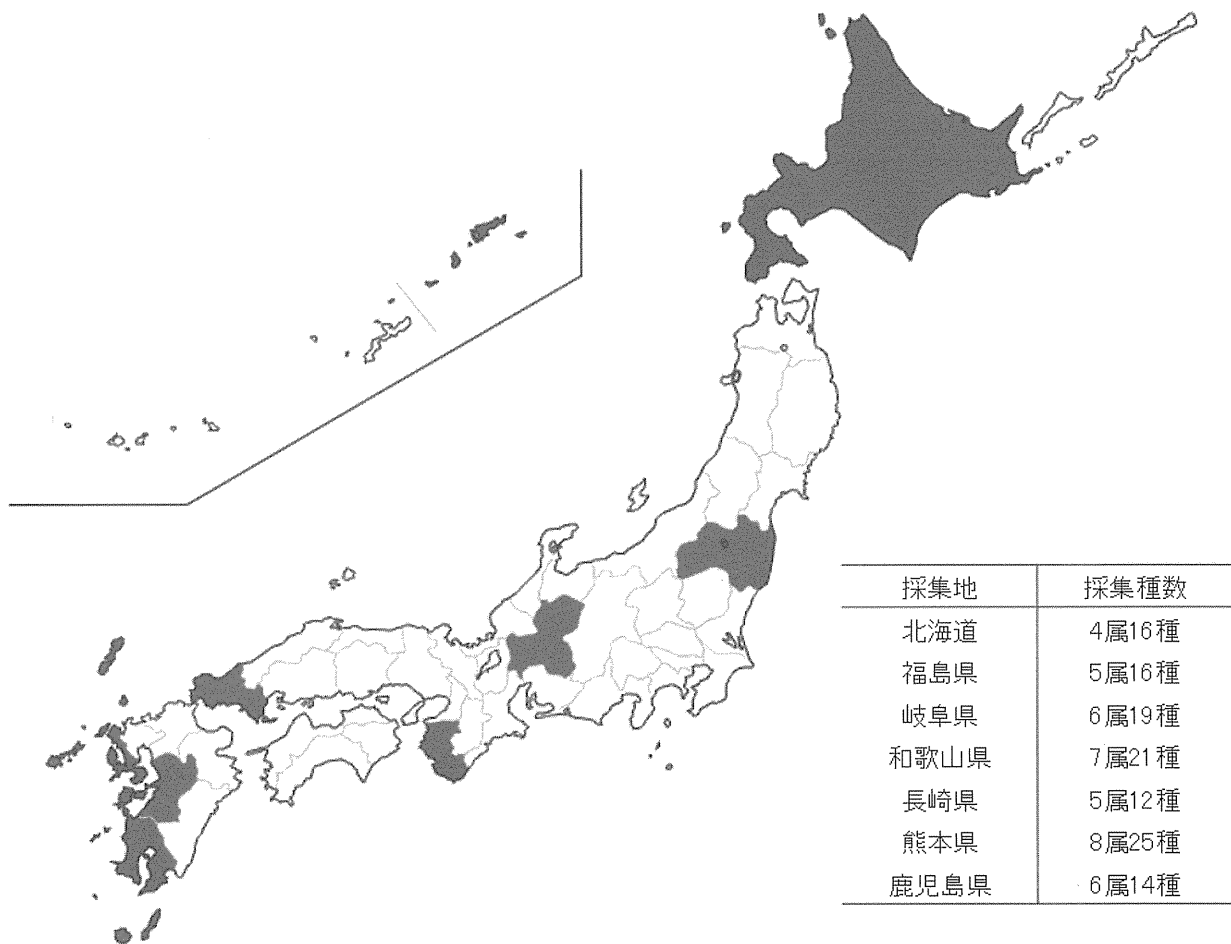


図1 疾病媒介蚊調査地（青色）と採集種数（成虫と幼虫）

表1 1道7県でのドライアイストラップ採集結果
(2014年4月25日～9月18日日)

species	Hokkaido	Fukushima	Gifu	Wakayama	Kagoshima	Kumamoto
<i>Anopheles sinensis</i>	1					1
<i>An. lesteri</i>	1					
<i>Culiseta nipponica</i>	197					
<i>Orthopodomyia anopheloides</i>						4
<i>Culex vagans</i>	22					
<i>Cx. pipiens grp</i>	225			686		3
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>			1	26		46
<i>Cx. pseudovishunui</i>					2	54
<i>Cx. orientalis</i>	518	69	88			1
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>		7	47	1	1	3
<i>Cx. sasai</i>		1	1			3
<i>Lutzia vorax</i>			1			
<i>Aedes dorsalis</i>	5					
<i>Ae. excrucians</i>	702					
<i>Ae. punctor/hokkaidensis</i>	133					
<i>Ae. japonicus</i>					1	1
<i>Ae. togoi</i>				4		3
<i>Ae. nipponicus</i>		15	24			6
<i>Ae. riversi</i>						2
<i>Ae. galloisi</i>	4		3			
<i>Ae. albopictus</i>				101	87	69
<i>Ae. flavopictus</i>	1	1	1			
<i>Ae. vexans nipponii</i>	4	6			1	21
<i>Ae. bekkui</i>		1	1			
<i>Ae. esoensis</i>	25					
<i>Ae. yamadai</i>	40					
<i>Armigeres subalbatus</i>				1	13	6
<i>Uranotaenia novobscura</i>		1				2
<i>Toripteroides bambusa</i>		1	1	1	1	9
Total	1878	102	168	820	106	234

表2 1道7県でのドライアイストラップ採集結果
(2014年4月25日～9月18日日)

species	Hokkaido	Fukushima	Gifu	Wakayama	Yamaguchi	Nagasaki	Kumamoto	Kagoshima
<i>Anopheles lindesayi japonicus</i>		5	18	1				
<i>An. koreicus</i>				4		8		
<i>An. sinensis</i>	17	2	10	2		1	58	25
<i>An. yatsushiroensis ?</i>							15	5
<i>An. sineroides</i>			22	1			1	14
<i>An. lesteri</i>	1	1				1	9	2
<i>An. sp</i>				1				
<i>Culiseta nipponica</i>	21							
<i>Orthopodomyia anopheloides</i>						1	11	
<i>Culex pipiens grp</i>		11	3	1				
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>			60	17			43	30
<i>Cx. pseudovishnui</i>							1	
<i>Cx. orientalis</i>	40	21	73	31		5		
<i>Cx. bitaeniorhynchus</i>		3						2
<i>Cx. sinensis</i>				2				
<i>Cx. rubensis</i>	2							
<i>Cx. hayashii</i>			2	21	1		1	
<i>Cx. infantulus</i>				2				
<i>Cx. nigropunctatus</i>								8
<i>Cx. kyotoensis</i>		3	1					
<i>Cx. sasai</i>		11	46	6	11		3	
<i>Cx. sp</i>				2				
<i>Lutzia vorax</i>			15	2			5	
<i>Aedes japonicus</i>	27	51	44	46	12	51	11	11
<i>Ae. hatori</i>				16				
<i>Ae. togoi</i>				28			8	
<i>Ae. soulensis??</i>						1		
<i>Ae. oreophilus</i>		3	1					
<i>Ae. nipponicus</i>		2				7		
<i>Ae. watasei</i>							4	
<i>Ae. riversi</i>						3	9	
<i>Ae. albopictus</i>				28	10		74	
<i>Ae. flavopictus</i>		7		11		10		
<i>Ae. vexans nipponii</i>						29		29
<i>Ae. yamadae</i>	5							
<i>Armigeres subalbatus</i>							4	7
<i>Uranotaenia novobscura</i>				1			17	
<i>Tripteroides bambusa</i>		21	16	3	6	1	9	
<i>Toxorhynchites towadensis</i>			2					2
Dead	11	13	27	34		1	12	5
Total	124	154	340	260	40	119	295	140

アカイエカ種群の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*) , ネットタイエカ (*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たら, 日本産アカイエカにはネットタイエカのハプロタイプが21.4%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九州のアカイエカ種群の集団間の変異を調べてみた. 5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トタイエカのハプロタイプとしたものが領域によって6.3~11.6%含まれていた. これらら合わせて6つの領域の遺伝子頻度の違いから九州の集団間を比較したところ, 鹿児島島のアカイエカ集団はネットタイエカのハプロタイプの割合がやや多かったが, 有意な差とはならなかった. 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トタイエカと同じタイプをもっていることを示しておける. アカイエカとネット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ト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*) , ネットタイエカ (*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, ネット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, 本来ネット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. 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, アカイエカとネットタイエカとの遺伝的違いや, 九州本土でのネットタ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）、熊本県（2ヶ所）、宮崎県（6ヶ所）、鹿児島県（12ヶ所）の合計37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164個体（福岡県、26個体：長崎県、15個体：大分県、40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 A C E 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°C 5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'-GTAATACGACTCACTATAGGGC ACGCGTGGTCGACGGCCCCGGGCTGGT-3' と3'末端をアミノ基で修飾した5'-ACCAGC CC-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API (5'-CCATCCTAATACGACTCACTAT AGGGC-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API₁, API₂ (5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-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、ネッタイエカで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った。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。ネッタ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'-GGTTCCCTCGTCGATGT TGTT-3', R:5'-TTGTTTCGTCCAACCTTGTTCC A-3'), CppAC012 (F:5'-GTGCC ACCTCAAG TGTCAGA-3', R: 5'-TCCGA TGTTTCATTG GTTCC-3'), Cpp4b007 (F: 5'-ATTGAATGGT TTCCCAATGT-3', R: 5'-TCGAAAACCCAC CTTGATGT-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 μlに0.5U *Ex Taq*, 1 × *Ex Taq* buffer, 2mM MgCl₂, 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回繰り返す、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

九州北部の福岡県、長崎県、大分県、熊本県、宮崎県、鹿児島県から164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個体と鹿児島県の3個体はチカイエカハプロタイプのホモとなった。これら系統のうち飼育をして無吸血産卵するかどうかを確認した3系統に関しては、全てを無吸血産卵した。またPCRでチカイエカと判定されたすべての個体は雄の外部生殖器の形態もチカイエカであった。この系統以外で飼育をして無吸血産卵するかどうかを確認した系統では、無吸血産卵は行わず、それらの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159個体のうち95匹がアカイエカハプロタイプのホモ、60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、4個体がネッタイエカハプロタイプのホモであった。4個体のうち1個体は大分県、3個体は鹿児島県で採集された。アカイエカの中でネッタイエカハプロタイプの頻度は全体の平均で22.5%だった。最も高かったのは大分県 (26.3%)、最も低かったのは福岡県だった (9.6%) だった。

2. マイクロサテライト領域を利用した検討

チカイエカ5個体についてはマイクロサテライト8領域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159個体においてマイクロサテライト8領域でその遺伝子頻度を調べた。しかし、CppAC00, CppAC012, Cpp4b007の3領域は北部九州 (福岡県, 長崎県, 大分県) では判別不明のハプロタイプの頻度が0.9~7.0%であったが、南九州 (熊本県, 宮崎県, 鹿児島県) では34.0~58.2%と極めて高い値をしめした。よって、集団間の比較には残りのCxqGT4, CxqGT6 b, CxpGT4, CxpGT12, CxpGT51の5つの領域について行うことにした (表2, 図2)。これらの領域では判断できないハプロタイプの頻度は1.9~9.4%であった。またすべての領域においてのネッタイエカのハプロタイプが存在し、その頻度は6.3~11.6%であった。5領域全体で地域別ネッタイエカのハプロタイプの頻度をみると、鹿児島県が15.2%で最も高く、福岡県が4.2%で最も低かった。

3. 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5つのマイクロサテライト領域全てで見られ、九州すべての地域で見られた。鹿児島県が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高く、福岡県が少し低い。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、九州のアカイエカは調べた全ての領域でネッ

タイイエカのハプロタイプを持つことが明らかとなった。地域間の比較では有意にはならなかったが、鹿児島県の集団ネットアイエカのハプロタイプの頻度が高く、福岡で低かった。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。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。この結果はこの3つ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かと言われていた。しかし今回の調査では九州内に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。

今回の採集ではチカイエカの頻度が少なかった(3.0%)。これは、採集方法が市街地でのOvitrapや雨水ますからの幼虫・蛹採集だったからかもしれない。今回は結果に出さなかったが、ライトトラップで採集した雌成虫をアセチルコリンエステラーゼのPCRで判別すると23.2%(26/112)であった。チカイエカを調べる際は採集方法が重要であると同じく、アカイエカに関しても採集

方法による違いの検討も必要であると思われる。

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、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

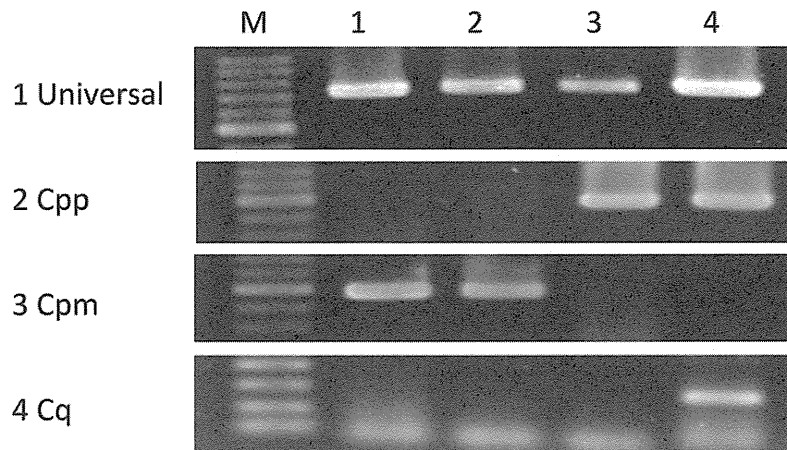


図1 アセチルコリンエステラーゼ領域による PCR

上段から 1.ユニバーサルプライマーセット (Universal), 2.アカイエカ種特異的プライマーセット (Cpp), 3.チカイエカ種特異的プライマーセット (Cpm), 4.ネッタイエカ種特異的プライマーセット (Cq) それぞれを使って行った PCR の泳動結果. M: マーカー, 1 と 2 はチカイエカのホモ, サンプル 3 はネッタイエカのホモ, 4 はアカイエカとネッタイエカのヘテロ.

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	Cq	Cpp/Cq	Cpp	Cq
Fukuoka	26	21	0	5	0.904	0.096
Nagasaki	15	8	0	7	0.767	0.233
Oita	38	19	1	18	0.737	0.263
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	159	95	4	60	0.786	0.214

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

大分で2個体と鹿児島で3個体はチカイエカと検出されたが, それはこの表には含まれていない. frequencies はアカイエカの79個体中の頻度を表している.

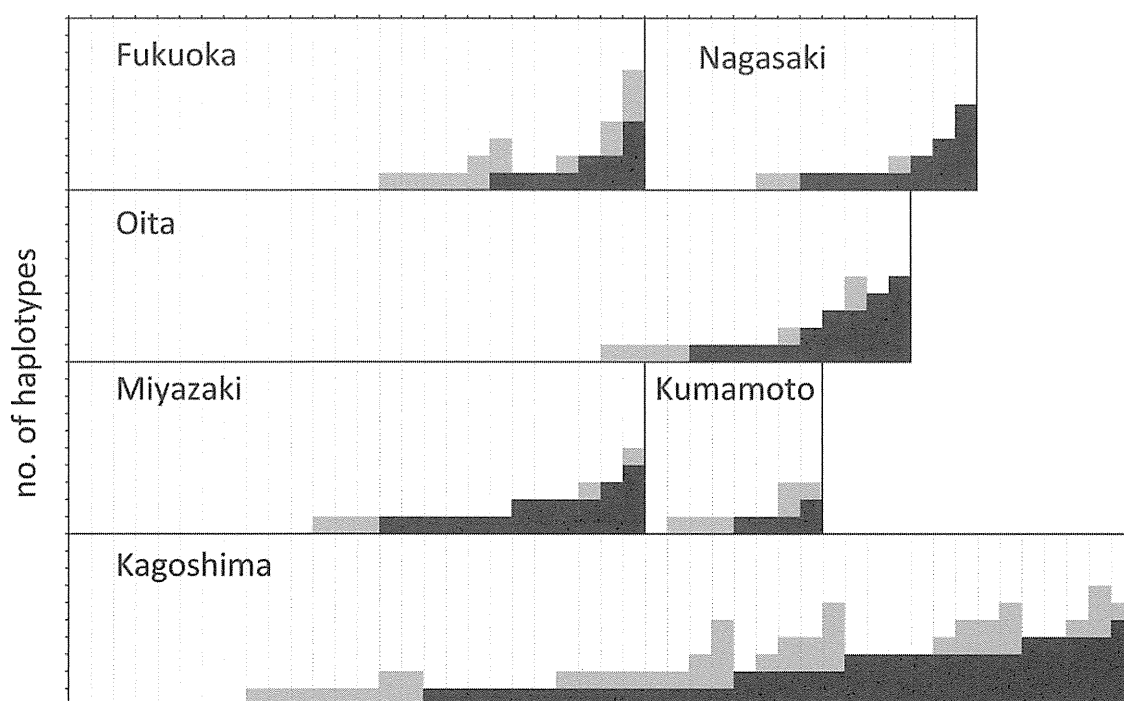


図2 マイクロサテライト5領域の頻度分布

九州(福岡, 長崎, 大分, 熊本, 宮崎, 鹿児島)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10等分(5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5領域の各ハプロタイプ数と頻度

	n	CxqGT4			CxqGT6b			CxpGT4			CxpGT12			CxpGT51		
		Cpp	Cq	nd	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	51	0	1
Nagasaki	15	25	5	0	25	5	0	27	3	0	28	1	1	27	1	2
Oita	38	69	6	1	67	9	0	74	0	2	69	7	0	72	0	4
Kumamoto	8	12	0	4	14	2	0	16	0	0	12	3	1	15	0	1
Miyazaki	24	43	4	1	45	3	0	45	2	1	41	6	1	40	6	2
Kagoshima	48	73	14	9	80	11	5	76	18	2	56	17	23	79	13	4
Total	159	271	29	18	273	35	10	286	26	6	251	37	30	284	20	14
frequencies		0.852	0.091	0.057	0.858	0.110	0.031	0.899	0.082	0.019	0.789	0.116	0.094	0.893	0.063	0.044

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
チカイエカを除いたアカイエカ 159 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.

表3 マイクロサテライト5領域をまとめた県別の数と頻度

	n	no. of haplotypes			frequency		
		Cpp	Cq	nd	Cpp	Cq	nd
Fukuoka	26	235	11	14	0.904	0.042	0.054
Nagasaki	15	132	15	3	0.880	0.100	0.020
Oita	38	351	22	7	0.924	0.058	0.018
Kumamoto	8	69	5	6	0.863	0.063	0.075
Miyazaki	24	214	21	5	0.892	0.088	0.021
Kagoshima	48	364	73	43	0.758	0.152	0.090
Total	159	1365	147	78			
frequencies		0.858	0.092	0.049			

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

鳥類吸血性蚊の生態と病原体媒介能力に関する研究

分担研究者 津田良夫 国立感染症研究所
協力研究者 金 京純 鳥取大学農学部

研究要旨

鳥類吸血性蚊の生態と鳥マラリア原虫の媒介能力の検討のために、野外調査と野外捕集蚊の分析を行った。鳥取県内4ヶ所で合計10種類3,298個体の蚊（成虫）が採集され、この地域の優占種としてアカイエカ群など5種類が確認された。また、キンイロヌマカが鳥取県にも生息することがはじめて確認された。鳥取大学構内の林は、この地方に生息する代表的な蚊が吸血のために飛来する場所であると推測された。サギの営巣コロニーでは、アカイエカ群の採集個体数が最も多く、しかもサンプル中には吸血蚊が多数含まれていた。

東京都と新潟県の調査地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、鳥マラリア原虫の媒介能力について検討した。成虫を解剖し顕微鏡によってオオシストとスポロゾイトが確認された個体について、中腸（あるいは唾液腺）サンプルをPCRによって分析し、これらの蚊によって媒介されている鳥マラリア原虫の遺伝的系統を調べた。その結果、アカイエカ群ではCXPIP09, SGS1とGRW4の3系統の媒介能力があると判定された。また、イナトミシオカでは、CXINA01, CXINA02およびCXQUI01の3系統を媒介できると結論した。

A. 研究目的

鳥類は蚊の重要な吸血源動物のひとつであり、いくつかのグループの蚊は鳥類嗜好性が強いことがわかってきた。これらの鳥類吸血性蚊の中には、鳥類だけでなく人を吸血する種類も含まれており、そのため鳥類と人に共通する病原体を媒介する能力を持つ媒介蚊も報告されている。2000年以降米国で問題となっているウエストナイルウイルスは、野鳥と蚊の間で増幅され、ウイルスに感染した蚊が人を吸血することによって患者が発生する。我が国にはウエストナイルウイルスは侵入していないため、何らかの経路でウイルスが侵入した場合、我国の蚊との間でどのような感染サイクルが形成されるかを予想することは非常に重要な課題となっている。

ウエストナイルウイルスのように未侵入の病原体や流行の実態が明らかでない病原

体の感染サイクルを予想するために、すでに野鳥類と蚊の間で維持されている鳥類の蚊媒介性病原体の感染サイクルに関する情報は生態学的な観点からとても有益である。感染サイクルを形成しているということは、野鳥類と媒介蚊の間に吸血による密接な関係が存在していることを意味しているからであり、また媒介している蚊の集団の吸血パターンや寿命などが病原体を媒介するのに適していることをも意味しているからである。そのため鳥類の蚊媒介性病原体の感染サイクルに関する情報が蓄積されれば、それによって生態学的な見地から潜在的な宿主と推測される鳥類や潜在的な媒介蚊のリストを作成することが可能になる。

本研究は我が国の鳥類吸血性蚊を明らかにするとともに、国内で流行が確認されている鳥マラリア原虫の媒介能力を調査することを目的として、鳥取市などで野外調査

を実施し調査で得られたサンプルからの鳥マラリア原虫の検出を行った。

B. 研究方法

2013年5月～8月に、鳥取県内の4か所で蚊相調査を行った。調査は1kgのドライアイス誘引源とするトラップ10台を用いた成虫採集によって行った。調査地としては蚊の発生源の周辺として蒲生川の河川敷と多鯰池を選んだ。また、野鳥類の営巣場所の周辺として鳥取大学構内の林およびサギの営巣コロニーがある湖山神社を選んだ。湖山神社では吸血蚊を対象として、捕虫網による採集も合わせて実施した。

これまで鳥マラリアの調査地としてきた東京都立林試の森公園と新潟県佐潟湿地では、鳥マラリア原虫の媒介蚊と推測されているアカイエカとイナトミシオカを採集し、媒介能力を確実に判定するための方法を検討した。林試の森公園では捕虫網採集によって、佐潟湿地ではドライアイストラップによって成虫を採集し、1個体ずつ実態顕微鏡下で解剖してオオシストの有無を調べ、オオシスト陽性個体は唾液腺を取り出してスポロゾイトの有無を調べた。また、オオシスト陽性個体の中腸（可能であれば唾液腺）は冷凍サンプルとして保存し、PCRによって鳥マラリア原虫の遺伝的系統を調べた。

C. 結果

鳥取県内の4調査地からは、合計10種類3,298個体の成虫が採集された。5月に蒲生川の河川敷に設置したトラップでは、コガタアカイエカとアカイエカ群の蚊が採集されたが、コガタアカイエカの採集個体数は予想外に多く、河川敷全体に潜伏していた可能性が示唆された。7月には8種類の蚊が採集され、蒲生川の河川敷が種類数、個体数とも最も多かった。多鯰池は砂丘の背後にある池で、蚊の重要な発生源になるように思われたが、採集された成虫は138個

体と少なく、種類もアカイエカ群、コガタアカイエカ、カラツイエカの3種類だけであった。鳥取大学構内のトラップでは、アカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、カラツイエカ、オオクロヤブカ、トラフカクイカの6種類の蚊が採集され、この地方に生息する代表的な蚊が吸血のために飛来する場所であると思われた。サギの営巣コロニーが作られている湖山神社では、アカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、カラツイエカ、オオクロヤブカの5種類が採集された。同時期にサギ山の林床で行った捕虫網による採集では、トラップで採集された5種類に加えてヤマトヤブカが採集されたが、これらの中でアカイエカ群の採集数が774個体と最も多かった。また採集されたアカイエカ群の雌成虫には吸血蚊（Full fed, Partial fed, Half gravid）が多数含まれており、サギ山とその周辺で生活するアカイエカ群の吸血源動物を調査するのに適した場所であることがわかった。

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21個体見つかった。オオシスト陽性個体の唾液腺を取り出し顕微鏡によって観察した結果、11個体でスポロゾイトが確認された。オオシスト陽性個体の中腸サンプルを分析して同定された鳥マラリア原虫の遺伝的系統は以下の4種類であった（CXPIP09, SGS1, GRW11, GRW4）。これら4系統の中でオオシストとスポロゾイトが確認されたのは、CXPIP09, SGS1, GRW4の3系統で、これらの系統はアカイエカ群が媒介できると考えられた。残りの1系統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なかったが、中腸のPCRではGRW4とGRW11がともに検出されているので、唾液腺で確認されたスポロゾイトがGRW11であるかどうかは確定できなかった。

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6個体見つかった。このうち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。PCRで検出された鳥マラリア原虫の遺伝的系統は、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。

D. 考察

2008年に我々が出雲地方で実施した疾病媒介蚊調査では、合計16種類の蚊が採れている。出雲地方で採集数が上位の4種類はアカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、カラツイエカで、本研究の調査地の結果と共通しており、いわゆる普通種と考えられる。出雲調査で採集されており、今回の鳥取県内の調査では採集されていない種類は、以下の6種類である：キンイロヤブカ、ヤマダシマカ、シナハマダラカ、アカツノフサカ、コガタキンイロヤブカ、シロカタヤブカ。また出雲では採集されず、鳥取調査でのみ採集されたのは、キンイロヌマカ1種類であった。上村(1968)は鳥取県から24種の蚊を採集し報告しているが、この時の調査ではキンイロヌマカは採集されておらず、今回の調査で鳥取県からはじめて採集された可能性が高い。

本研究でアカイエカ群のサンプルを採取した調査地では、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おり、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った。したがってこれら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。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おらず、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。

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。これら7系統の中でCXINA01とCXQUI01は検出頻度が高い系統で、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、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。

E. 結論

鳥取県の4ヶ所で合計10種類3,298個体の成虫が採集された。この中でアカイエカ群、コガタアカイエカ、ヒトスジシマカ、カラツイエカ、オオクロヤブカの5種類の捕獲個体数が多く、この地域の優占種であることがわかった。また、本研究でキンイロヌマカが鳥取県にも生息することがはじめて確認された。鳥取大学構内の林は、この地方に生息する代表的な蚊が吸血のために飛来する場所であると推測された。サギの営巣コロニーでは、アカイエカ群の採集個体数が最も多く、しかもサンプルの中には吸血蚊が多数含まれていることから、この周辺で生活するアカイエカ群の吸血源動物調査に適した場所であることがわかった。

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い、これらの蚊によって媒介されている鳥マラリア原虫の種類を調べた。その結果、アカイエカ群ではCXPIP09, SGS1とGRW4の3系統の媒介能力があると判定された。また、イナトミシオカでは、CXINA01, CXINA02およびCXQUI01の3系統を媒介できると結論した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda Y., Kim K.S. 2013. Outbreak of *Culex (Barraudius) inatomii* (Diptera: Culicidae) in disaster areas of the Great East Japan Earthquake and Tsunami in 2011, with ecological notes on their larval habitats, biting behavior and reproduction. J. Am. Mosq. Control Assoc., 29(1): 19-26.

2. 学会発表

Kim K.S., Tsuda Y. 2013. Microscopic observation of oocytes and sporozoites and subsequent PCR for identification of genetic lineage of avian *Plasmodium* spp. In natural vector, *Culex pipiens pallens*. International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife. 8月7-11日, 2013, ヴィルニス, リトアニア

Tsuda Y. Multiple transmission cycles and “incomplete transmission” of avian *Plasmodium* parasites in wild bird communities: implications of entomological studies in Japan, International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife. 8月7日-11日, 2013, ヴィルニス, リトアニア

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