

た結果いくつかのサンプルにおいて CPE が観察された。CPE を呈した培養上清を採取し大量培養後、核酸を抽出し次世代シーケンサーによって解析した結果レオウイルス科オルビウイルス属のウイルスである Great Island virus group に属するウイルス Ix-7 ウイルス (Ix-7V) とブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類されるウイルス T-32 ウイルス (T-32V) がそれぞれ分離された。Ix-7V の遺伝子配列を系統樹解析した結果、Ix-7V は Great Island virus group のウイルスの中でも特に Tribec ウイルス (TRBV) に近縁であることが示唆された。また T-32V の遺伝子配列を系統樹解析した結果、T-32V はフレボウイルスの中でも Uukuniemi ウイルス (UUKV) に近縁であることが示された。

### 3. 乳飲みマウスを用いた Great Island virus group 分離株 Ix-7V の病原性の検討

2 日齢の乳飲みマウス脳内に Ix-7V 培養上清を接種し 14 日間観察した。Ix-7V を接種した乳飲みマウス (初代培養) では感染 13 日後に接種 16 匹中 2 匹のマウスに発育不良と異常行動が認められた。分離ウイルスを 1 継代した結果接種 12 日後に 8 匹中 1 匹のマウスに発育不良と行動異常がみとめられた。さらに 2 継代目では接種 9 日後にすべてのマウスが発症し、6 匹中死亡 2、麻痺 3、シック 1 であり、翌日には死亡率 100% (6/6 匹) であった。臨床症状として発育不良、異常行動、麻痺を示し、剖検所見では点状出血が観察された。さらに 1 継代を行うことにより発症日接種 7 日後となり、8 日後には死亡率 100% であった (図 3A)。以上のことより乳飲みマウスに対して強毒性を示す Ix-7V が分離されたことが示唆された。

### 4. Ix-7V 接種乳のみマウス脳からの Ix-7 遺伝子の検出

乳のみマウス脳に Ix-7 を接種し、10% マウス乳剤を作製、乳のみマウス脳にて計 5 継代を行った。各継代における乳のみマウスより採

脳を行い、RNA を抽出した。抽出した RNA を鋳型として Ix-7V segment 5 に対するプライマーを用いて RT-PCR を実施した。その結果、初代培養から 5 継代のすべての脳において Ix-7V が検出された (図 3B)。このことから Ix-7 は乳のみマウス脳内において増殖していることが示唆された。

### 5. 乳飲みマウスを用いた Uukuniemi 様 virus 分離株 T-32V の病原性の検討

次に 2 日齢の乳飲みマウス脳内に T-32V の培養上清を接種し 14 日間観察した。T-32V 接種群においては接種 16 匹中 1 匹に発育不良が認められた。そこで、さらに 1 継代して観察した結果、接種した 8 匹のマウスのうち 2 匹のマウスが死亡した。以上のことより乳飲みマウスに対して強毒性を示す T-32V が分離されたことが示唆された。

### 6. フラビウイルスおよびフレボウイルス遺伝子の探索

培養細胞上清より拡散を抽出し、RT-PCR 法を用いてフラビウイルス属共通プライマーおよびブニヤウイルス属の内 SFTSV および CCHFV 遺伝子の検出をターゲットとしたプライマーによる探索を行ったところ目的増幅産物は得られなかった。

### D. 考察

兵庫県六甲山系において採取されたマダニ類におけるウイルス保有状況を検討した。その結果培養細胞を用いたウイルス分離によりレオウイルス科オルビウイルス属 Great Island virus group に属する Ix-7V とブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される T-32V をそれぞれ分離した。またこれらの分離ウイルスをそれぞれ乳飲みマウスを用いて継代した結果、乳のみマウスに病原性を示すそれぞれの株を分離した。次世代シーケンサーを用いて Ix-7V および T-32V の遺伝子配列を系統的に解析した結果、Ix-7V は TRBV に、T-32V は UUKV に近縁であるこ

とが示された。

Great Island virus group のウイルスのうち、TRBV, Kemerovo ウイルス (KEMV), Lipovnik ウイルス (LIPV) はヒトに感染し特に KEMV はヒトにまれに脳炎を起こすことがこれまでに知られている。また TRBV および LIPV は実験的にアカゲザルに髄膜炎を起こすことが報告されている。また TRBV および KEMV はヨーロッパからロシアにかけてユーラシア大陸にその存在が知られていたが、これまでに日本におけるダニ媒介性オルビウイルスの報告はなかった。したがって今後、本研究において分離された Ix-7V の性状解析あるいはマウスに対する毒性を解析する必要がある。フレボウイルスのうち UUKV はヒトに対する病原性を示さないが近縁の Bhanja ウイルス (BHAV) はダニによって媒介される神経系ウイルスとして知られている。BHAV は 1954 年にインドのダニから分離されたウイルスで、中欧からアフリカ、中東、インドにかけて分布するヒトにまれに熱性疾患および脳炎を起こすウイルスである。したがって今後分離された T-32V の性状解析あるいはマウスに対する毒性を解析する必要がある。

この他にもトゴトウイルス属、オルトブニヤウイルス属等のウイルスは日本にも生息するダニによって媒介されるアルボウイルスであるため、今後も引き続きダニにおけるウイルス保有調査を行う必要が考えられる。各ウイルスはゲノム構造、感染様式、臨床症状、毒性がそれぞれ異なるため検出方法の多様化も必要であると考えられた。

## E. 結論

急速な都市化と森林部への人口拡張により今後もアルボウイルス感染症が問題となることが予想される。また我が国および周辺国においても SFTSV, ダニ媒介性脳炎ウイルス, クリミア・コンゴ出血熱ウイルス等の重篤な疾患の原因となるダニ媒介性のウイルスが常在することが明らかとなり、ダニに

よって媒介されるウイルスの詳細な調査が求められている。本研究において我々はこれまで日本においてその存在が知られていなかったオルビウイルス属に属するウイルスおよびフレボウイルス属に属するウイルスをダニサンプルより分離した。今後さらなる詳細を解析するとともに、今後もダニにおけるウイルス保有調査を引き続き行っていく必要性が示唆された

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Moi M.L., Ami Y., Shirai K., Lim C.K., Suzaki Y., Saito Y., Kitaura K., Saijo M., Suzuki R., Kurane I., Takasaki T. Formation of Infectious Dengue Virus–Antibody Immune Complex In Vivo in Marmosets (*Callithrix jacchus*) After Passive Transfer of Antidengue Virus Monoclonal Antibodies and Infection with Dengue Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (In press)

Takeshita N, Lim C.K., Mizuno Y., Shimbo T., Kotaki A., Ujiie M., Hayakawa K., Kato Y., Kanagawa S., Kaku M., Takasaki T. 2014. Immunogenicity of single-dose Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese adults. *J. Infect. Chemother.* Apr; 20(4): 238-242.

Takayama-Ito M., Nakamichi K., Kinoshita H., Kakiuchi S., Kurane I., Saijo M., Lim C.K. 2014. A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines. *Biologicals.* Jan; 42(1): 42-47.

Nakamichi K., Lim C.K., Saijo M. 2014. Stability of JC virus DNA in cerebrospinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing. *Jpn. J. Infect. Dis.* 67(4): 307-310.

Nakamichi K., Tajima S., Lim C.K., Saijo M. 2014. High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Arch. Virol. Jul; 159(7): 1687-1696.

## 2. 学会発表

西條政幸, 伊藤 (高山) 睦代, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 林昌宏. リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染症に対する非増殖型組換え狂犬病ワクチンの開発. 第 19 回日本神経感染症学会総会, 2014 年 9 月, 金沢市

中道一生, 林昌宏, 西條政幸. 日本における進行性多巣性白質脳症の実験室サーベイランスおよびその発生動向の解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 西條政幸. 非増殖型組換え狂犬病ウイルスを用いたアレナウイルスに対するワクチンの開発. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

Moi M.L., 白石健二, 網康至, 宮田幸長, 林昌宏, 須崎百合子, 北浦孝一, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. Demonstration of common marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for dengue vaccine development. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

齋藤悠香, Moi M.L., 竹下望, 林昌宏, 司馬肇, 細野邦明, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. FcγR 発現細胞を用いた新規中和アッセイにて日本脳炎ワクチン被接種者におけるデングウイルスに対する中和・感染増強能の検討. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会,

2014 年 11 月, 横浜市

山口幸恵, 林昌宏, 伊藤 (高山) 睦代, 垣内五月, 堀谷まどか, 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎, 渡邊治雄, 西條政幸. 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性決定に関与する炎症性サイトカインの解析. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

林昌宏, van den Braak W., 堀谷まどか, 伊藤 (高山) 睦代, 山口幸恵, 垣内五月, 西條政幸. Expression of rabies virus glycoprotein G by using recombinant baculovirus. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

中山絵里, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林昌宏, 西條政幸, 高崎智彦. チングニア熱の輸入症例の報告および血清学的診断法の開発. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

田島茂, 谷ヶ崎和美, 小滝徹, 中山絵里, Moi ML, 林昌宏, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. 第 62 回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月, 横浜市

山口幸恵, 林昌宏, 伊藤 (高山) 睦代, 垣内五月, 田島茂, 高崎智彦, 倉根一郎, 渡邊治雄, 西條政幸. 日本脳炎ウイルスの神経侵襲性を決定する宿主側因子の解析, 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 林昌宏, 西條政幸, 高崎智彦. 製造株と異なる遺伝子型のウイルスに対する日本脳炎ワクチンの中和能の解析. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 森本金次郎, 垣内五月, 山口幸恵, 堀谷まどか, 西條政幸. ラッサウイルスなどのアレナウイルスに対

する非増殖型組換え狂犬病ウイルスワクチンの開発. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

垣内五月, 王麗欣, 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 西村秀一, 辻正徳, 谷口修一, 水口雅, 岡 明, 西條政幸. 造血幹細胞移植におけるアシクロビル耐性単純ヘルペスウイルス 1 型感染症の臨床的意義に関する研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

佐藤正明, 垣内五月, 木下 (山口) 一美, 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 西條政幸. ウイルス分離が不可能なヘルペス脳炎病原ウイルスの薬剤感受性試験法の開発と臨床応用. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

中道一生, 田島茂, 林昌宏, 西條政幸. JC ウイルスゲノムの転写調節領域に生じるランダムな変異をスキャンするための高解像度融解曲線分析法の確立. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

齋藤悠香, モイメンリン, 林昌宏, 司馬肇, 細野邦昭, 西條政幸, 倉根一郎, 高崎智彦. 日本脳炎ワクチン接種により誘導された抗体のデングウイルスに対する免疫反応の検討. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会, 2013 年 11 月, 神戸市

伊藤 (高山) 睦代, 中道一生, 山口 (木下) 一美, 王麗欣, 林昌宏, 西條政幸. Establishment of the in vitro test for residual virulent rabies virus in inactivated rabies vaccines. 第 11 回狂犬病研究会, 2012 年 4 月, 東京都

Lim C.K., Moi M.L., Kotaki A., Saijo M., Kurane I., Takasaki T. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China Inter-

national Conference of Virology, June 12-13, 2012, Sapporo, Japan.

Lim C.K., Kotaki A., Omatu T., Moi M.L., Kurane I., Saijo M., Takasaki T. A Rapid Non-nested Reverse Transcriptase-PCR Assay for Vertebrate Flavivirus Subgroups Using a Novel Universal Single Primer Pair Based on a Conserved Region of NS5 Gene Sequences. The XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM). September 23-27, 2012, Rio de Janeiro, Brazil.

中道一生, 井上直樹, 倉根一郎, 林昌宏, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症が疑われた患者の脳脊髄液におけるヘルペスウイルスの出現プロファイルの解析. 第 17 回日本神経感染症学会総会, 2012 年 10 月, 京都市

林昌宏, 網康至, 藤井克樹, 北浦一孝, モイメンリン, 白井顕治, 小滝 徹, 須崎百合子, 森川茂, 西條政幸, 鈴木隆二, 倉根一郎, 高崎智彦. マーモセットを用いたチクングニアウイルスの霊長類モデルの検討. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月, 大阪市

垣内五月, 木下 (山口) 一美, 伊藤 (高山) 睦代, 西村秀一, 林昌宏, 西條政幸. 造血幹細胞移植病棟にみられたパラインフルエンザウイルス 3 型感染症流行の分子疫学的解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月, 大阪市

伊藤 (高山) 睦代, 中道一生, 林昌宏, 山口 (木下) 一美, 垣内五月, 王麗欣, 倉根一郎, 西條政幸. 乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン国家検定法における 3Rs の導入. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月, 大阪市

山口 (木下) 一美, 中道一生, 伊藤 (高山) 睦代, 林昌宏, 倉根一郎, 西條政幸. LAMP 法を用いた PML 患者の脳脊髄液中の JC ウ

イルスの検出および定量試験. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月, 大阪市

中道一生, 林昌宏, 西條政幸. 進行性多巣性白質脳症患者の脳脊髄液中に検出された JC ポリオーマウイルスの経時的なゲノム変異パターンの解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 2012 年 11 月, 大阪市

Moi M.L., Lim C.K., Saijo M., Takasaki T., Kurane I. Re-assessment of dengue neutralizing antibody and viremia titers in dengue patients using FcγR-expressing cells. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) 61st Annual Meeting. November 11-15, 2012, Atlanta, Georgia USA.

#### **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

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）  
分担研究総括報告書

シラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* などによる感染症の疫学研究

分担研究者	澤邊京子	国立感染症研究所	昆虫医科学室長
協力研究者	佐々木年則	国立感染症研究所	昆虫医科学部
	伊澤晴彦	国立感染症研究所	昆虫医科学部
	久保田眞由美	国立感染症研究所	細菌第2部
	柴山恵吾	国立感染症研究所	細菌第2部
	山岸拓也	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	大石和徳	国立感染症研究所	感染症疫学センター
	伊藤航人	東京都済生会中央病院	
	川崎麻紀	東京都済生会中央病院	
	十菱大介	東京都済生会中央病院	
	平尾磨樹	東京都済生会中央病院	
	足立智英	東京都済生会中央病院	

研究要旨

感染症を媒介する節足動物による感染リスクを把握する目的で、東京都済生会中央病院と共同で、シラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* に対する疫学研究を始めた。東京都内から路上生活者が運び込まれてくる同院は、東京のシラミ媒介性細菌 *B. quintana* に対する疫学研究をする上で、最適の場所である。

2013年度から2014年度29名のシラミを持つ患者から血液、シラミの提供や臨床情報の提供を得た。シラミから *B. quintana* の遺伝子検出を行い、26サンプルで全て陽性であった。血液において *B. quintana* に対するIgG抗体保有率は52%で、*B. quintana* に対するIgM抗体保有率は76%であった。菌の分離に関して、*B. quintana* は分離されなかった。シラミから *B. quintana* が検出され、なおかつ血清抗体価が上がっている患者を認め、*B. quintana* の感染を疑わせる症例として24名中20名(83.3%)を確認することができた。

A. 研究目的

近年、先進諸国の大都市部において、路上生活者における *Bartonella quintana* 感染が問題となっている (Brouqui *et al.*, 1999)。ドキシサイクリン等の抗生物質投与による治療で治癒するが、無治療の場合1%未満で死亡する。そこで、正しい処置が求められる。悪化した場合、心内膜炎にいたることが報告され、気をつけなければならない再興感染症として世界中から注目されている。日本において、希少感染症と考えられる *B. quintana* 感染症の疫学研究を行い、国民に

情報提供さらには *B. quintana* 感染症対策へ貢献することを目的とした。

B. 研究方法

東京都済生会中央病院において、2013年1月30日から2015年1月5日まで、初診時にシラミが見つかった住所不定者、あるいは生活保護受給者を対象にした。患者カルテから年齢、性別、路上生活歴、主な生活場所、入院時の病名、体温、血圧、脈拍、頭痛の有無、湿疹の有無、抗生剤投与の有無、既往歴、血液検査で判明した項目およ

び結果，シラミの有無，シラミ採取部位，血液培養の施行有無の基本情報，臨床情報を得た。

シラミ陽性患者が見つかった場合，病院でシラミと日常臨床上の検査で余った血液検体を利用した。血液検体は，残血を病院で血清と血餅に分離し 4℃で保存の上，培養検体は採取 2 週間後，シラミは数日以内に研究協力者が病院から回収した。また，病院検査部からは血液培養結果を入手した。

遺伝子検出は，*Bartonella* 属，あるいは *B. quintana* 特異的 PCR を行った。シラミからの菌分離は，シラミをヨード・エタノールで滅菌後，シラミを 2 分割し一方を PCR に用いた。残りを羊血液寒天培地に塗布し 37℃，5%CO<sub>2</sub> 下で 1 ヶ月から 3 ヶ月間培養した。ELISA は，久保田らが開発した方法に従った (Matsuoka *et al.*, 2013)。

シラミ，血液，アンケートは，本人に対し十分な説明を行い，同意のもと提供された。なお，この調査は，国立感染症研究所ヒトを対象とする医学倫理審査委員会（受付番号 372）および東京都済生会中央病院倫理委員会の承認を得て行われた。

### C. 研究結果

2013 年 1 月から東京都済生会中央病院の協力を得て，27 名の患者からシラミおよびバルトネラについて調査することが出来た。23 名 95.8%男性で，45 歳から 75 歳にわたる。中央値が 66 歳であり中高齢者となった。

路上生活歴は，半年から 30 年と幅が広く，中央値として 5 年となった。主な生活場所として，渋谷 3 名，代々木公園，新宿，東京駅，青山，浅草，日本橋各 2 名，渋谷区宮下公園，山谷，秋葉原，両国，代々木，上野，港区（氷川神社），高輪各 1 名となった。入院時の病名は，蜂窩織炎 3 名，低体温 2 名，臀部褥瘡，肺炎，脳梗塞，頸椎症，慢性心不全，アルコール性肝硬変，顔面・頭部外傷，シラミ症，多発痛風結節，下腿潰瘍，胃潰瘍，腹痛，腰痛，ショック，貧

血，胼胝，結核，リンパ節腫脹各 1 名と多岐にわたった。体温について，36℃未満の患者が 10 名，37.3℃以上患者が 4 名であり，発熱をしていた患者が 17%であったが，臨床的に塹壕熱が疑われる患者はいなかった。頭痛の患者は報告されなかった。白血球数は，11,300/ $\mu$ l と多く，またヘモグロビン (Hb) が 11.0 g/dl と低い値を示した。抗菌薬は 9 名 (38%) で，初診時診療前に投与されていた。

血液培養液から *B. quintana* に対する PCR を行ったところ，13 検体全て陰性であった。さらに，シラミから *Bartonella* 属に対する PCR を行うと 26 検体全て陽性であった。シラミから培養を行うと 17.4%菌分離が陽性で，その中に *Acinetobacter baumannii* が 2 株分離された。シラミ PCR 陽性かつ抗体検査陽性患者は，24 名中 20 名 (83.3%) となった。

### D. 考察

このような調査を行い，以前に行った調査と同様の年齢層となった。白血球数が多く，何かに感染していくことが考えられ，Hb の値が低いと貧血であることがわかった。シラミや血餅 PCR 陽性率の高さと抗体陽性率の低さを説明するのに，*Bartonella quintana* に対する IgG や IgM が産生されるのに少ない *Bartonella quintana* の感染量かもしれない。コロモジラミから *B. quintana* は，分離されなかったが，サンプル数が少ないため東京近辺の状況を表しているとは言えず，今後継続的な検査が必要と思われた。ELISA による *B. quintana* に対する検出系もサンプル数を増やすため，継続的な検査を必要すると考えられた。敗血性ショックで亡くなられた患者がいた。どの細菌による敗血性ショックかはわからないが，*Bartonella quintana* 等による可能性が考えられる。また，亡くなられた方の血液を調べることができず，情報が必要と思われた。

## E. 結論

*B. quintana* の遺伝子は、検出されているものの、分離には至っていない。*B. quintana* に対する IgG は 52%、*B. quintana* に対する IgM は 76%と遺伝子検出率からすれば低い。2 年間の疫学研究のため、さらに継続的な疫学研究を行い、サンプル数を増やして *B. quintana* の感染状況を把握する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

佐々木年則，関なおみ．2014．シラミ媒介性感染症，特に塹壕熱の現状と今後の課題．化学療法領域，30 (2): 106-113.

Matsuoka M., Sasaki T., Seki N., Kobayashi M., Sawabe K., Sasaki Y., Shibayama K., Sasaki T., Arakawa Y. 2013. Hemin-binding proteins as potent markers for serological diagnosis of infections with *Bartonella quintana*. Clin. Vaccine Immunol., 20 (4): 620-626.

### 2. 学会発表

佐々木年則，久保田眞由美，澤邊京子，平山幸雄，楢田龍星，伊澤晴彦，針原重義，柴山恵吾，小林睦生．最近のシラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* 疫学研究．第 65 回日本衛生動物学会大会，2013 年 4 月，江別市

沢辺京子，Bertuso A.G.，佐々木年則，葛西真治，富田隆史，小林睦生．アタマジラミにおける塹壕熱病原菌 *Bartonella quintana* 遺伝子保有状況．第 65 回日本衛生動物学会大会，2013 年 4 月，江別市

## 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



### トコジラミの殺虫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
協力研究者	駒形 修	国立感染症研究所昆虫医科学部
	渡辺 護	国立感染症研究所昆虫医科学部
	葛西真治	国立感染症研究所昆虫医科学部
	糸川健太郎	国立感染症研究所昆虫医科学部
	小川浩平	国立感染症研究所昆虫医科学部
	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

米国のピレスロイド抵抗性トコジラミには、ピレスロイド作用点の電位依存性ナトリウムチャンネル（VGSC）の2座位にアミノ酸置換変異（V419LとL925I）が、それぞれ、単一突然変異または二重突然変異として見出されており、ピレスロイド抵抗性の要因とみなされている。我々は、過去3年間に北海道から沖縄県にかけて採集された80コロニー分の日本産トコジラミを収集し、QProbe法によりVGSCのこれら2座位に関する遺伝子型を決定した。その結果、野生型ハプロタイプのみ検出されたコロニーは11%に過ぎず、ピレスロイド系殺虫剤のトコジラミ駆除への有効性が日本の大多数のコロニーにおいて失われていることを明らかにした。変異ハプロタイプとしては、V419—I925単一変異型が二重変異型に対して優勢であった。これらの変異ハプロタイプのいずれかがコロニーに含まれる場合は、その変異ハプロタイプの頻度が固定もしくは高頻度で含まれるコロニーが多数であった。日本では現在、トコジラミ防除薬剤として、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、 $10^3$ 倍レベルのフェニトロオクソンIC<sub>50</sub>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 6 年間に東京都における被害相談件数は約 10 倍に増大している (東京都福祉保健局, 2013).

日本も含め, 近年のトコジラミの防除は, 人畜への毒性の低さと臭気性の低さから, ピレスロイド系殺虫剤に依存してきた. 室内試験に基づくピレスロイド抵抗性とその抵抗性機構に関する研究成果は 2000 年台後半になって米国の研究グループにより最初に報告された. それによると, 米国産トコジラミのピレスロイド抵抗性機構には, 作用点の電位依存性ナトリウムチャンネル (VGSC) の感受性低下 (Yoon *et al.*, 2008) とシトクロム P450 の代謝活性亢進 (Romero *et al.*, 2009) が含まれていた. 作用点の感受性低下には, VGSC の V419L と L925I の 2 つのアミノ酸置換変異のいずれかまたは両方が係わることが示されている (Zhu *et al.*, 2010). また, これらの内のいずれかの変異を保有するコロニーが全米で優勢になっていることが明らかにされている (Zhu *et al.*, 2010). 日本においては, 抵抗性比で 10 倍以上となるような防除上明らかに問題となる感受性低下を表すピレスロイド抵抗性系統は, 2010 年までに 1 つのコロニーの例しか報告されていなかった (渡辺, 2010). また, 米国産トコジラミと共通な抵抗性要因が含まれているかどうか不明であった.

ピレスロイド系に加え, 日本でトコジラミの防除に適用のある薬剤には, 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.

以上の背景をふまえ, 2012 年度の研究では, 米国における先行研究の成果に基づき, 上述のピレスロイド作用点変異を保有することが国内においてもピレスロイド抵抗性の指標となりうることを検証し, それらの変異を対象とした分子ジェノタイプング法を開発し, これを適用して抵抗性コロニーの頻度分布を推定するための全国調査を行った. 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, プロポ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). 2013 年度の研究では, 本系統における 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プング法を考案し, 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

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 (日本環境衛生センター (JESC) 提供) と 2009 年と 2010 年に採集に由来するピレスロイド抵抗性の, それぞれ, 千葉コロニー CHB (JESC 提供) と池袋コロニー IKB (矢口昇提供), 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 (JESC 提供) などを用いた. 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㈱, 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 年より 2012 年にかけて試料を収集した. 収集試料の一部にはこの収集期間に先立ち採集され保存されていたものも含まれていた.

## 2. 殺虫試験

ろ紙継続接触法に基づき殺虫剤感受性を判定した. デルタメトリン (和光純薬) を  $0.13 \text{ mg/cm}^2$  濃度となるよう処理したろ紙をシャーレ底に置き, その上にトコジラミを置き,  $25^\circ\text{C}$  に保ち, 24 時間後の生死を観察した. 設定したデルタメトリンのろ紙処理濃度は, 殺虫剤感受性系統を 100% 殺す濃度の少なくとも 30 倍の濃度に相当する (Romero *et al.*, 2009).

## 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  $0.3 \text{ mL}$  のリン酸緩衝液 ( $\text{pH}7.0$ ) 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  $1,000\times g$  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.  $30^\circ\text{C}$  に保温したリン酸緩衝液  $170 \mu\text{L}$  に対し, 発色剤として dithionitrobenzoic acid (DTNB) 溶液  $10 \mu\text{L}$ , 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)  $1 \mu\text{L}$ , および粗酵素液  $10 \mu\text{L}$  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  $30^\circ\text{C}$  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  $10 \mu\text{L}$  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,  $30^\circ\text{C}$  で波長  $405 \text{ nm}$  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 ( $1.36\times 10^4 = (\Delta\text{absorbance}/\text{min}) / (\text{mol}/\text{L}/\text{min})$ ) を用い, 1 分間あたりの吸光度の変化を酵素の活性度 ( $\text{mol}/\text{min}$ ) 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. 分子ジェノタイプング

### 1) VGSC 遺伝子

相補対形成/解離により消光/発光状態を可逆的に繰り返すことが可能な蛍光消光 DNA プローブ (QProbe) を用いる QProbe 法に基づき, 標的 point 突然変異部位の遺伝子型を決定した. その原理は次のとおりである. 野生型遺伝子に相補的な QProbe を設計し, このプローブを添加して解析対象配列領域を PCR 増幅し, PCR 増幅後に増幅 DNA と QProbe をハイブリダイズさせ, 蛍光を消光させた状態から温度を徐々に上げていくと, QProbe が解析対象配列から解離した時に (すなわち融解温度を超えた時に) 蛍光が観察されるようになる. ミスマッチのある変異遺伝子はミスマッチのない野生型の遺伝子よりも低い温度で蛍光が観察されるため, point 突然変異多型 (SNP) 判別を可能とする. DNA 抽出は, REExtract-N

(Sigma) キットを用いてトコジラミ幼・成虫の個体ごとに行った. VGSC の野生型遺伝子配列 (GenBank# FJ031996) に基づき, V419L (GTC→CTC) と L925I (CTT→ATT) のアミノ酸置換変異部位をそれぞれカバーする蛍光標識プローブ QProbe (CISC-QP5Y-F1: CTACCTCGTCAACTTGATTTTA; CISC-QP3G-R2: AATTACCAAGGGC ACCCAC) を受託合成した (日鉄住金環境). V419L を標的とする対象配列の PCR 液 ( $25 \mu\text{L}$  中) は, ExTaq HS (Takara)  $0.125 \mu\text{L}$ ,  $1\times$  ExTaq buffer, dNTP  $0.2 \text{ mM}$ , CISC-F15 (GAGGACGTGGCACATGTTGTTCTTC)  $45 \text{ nM}$ , CISC-R16 (GAGGACCTTAGCTTGAGCTGCTTC)  $756 \text{ nM}$ , CISC-QP5Y-F1  $0.2 \mu\text{M}$ , DNA 抽出

液 1 uL とした. L925I を標的とする対象配列の PCR 液 (25 uL 中) は, 上記の組成の内, CISC-F15, CISC-R16, および CISC-QP5Y-F1 をそれぞれ CISC-R20 (CAACTGCA TTCCCATCACAG), CISC-F19 (GTCATGGC CAACACTCAATC), CISC-QP3G-R2 に置き換えたものであった. PCR 及び融解曲線解析は ABI 7500 Real-Time PCR System の上でを行い, PCR サイクリング条件は, 95°C 2' > [95°C 15" > 55°C 30" > 68°C 15"] × 40 で, それに引き続く融解曲線解析は, 熱変性後のアニーリング温度を 40°C としたほかはシステムの標準プログラム通りに行った.

## 2) AChE 遺伝子

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, GAGTACA GAGCAGTCTTCACTC と CATCATCTCTTT GGTGGCCTT 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. 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, ATATC CTGATGGGCAGCAAC と CCTGAACAACCT CGGTGAGGT, "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)-

aataaataa tg(A) ag-(FAM)3' と 5'(Eclipse)-gT(a) gtagtat cc-(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 μL 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"] × 50 のサイクリング条件で行った.

## C. 結果

### 1. VGSC アミノ酸置換変異

#### 1) ピレスロイド感受性と作用点変異の関連性

実験室飼育系統 (またはコロニー) または直接採集個体に関する VGSC 遺伝子型とピレスロイド系殺虫剤感受性を試験した. 殺虫剤感受性の TKD コロニーでは, VGSC 変異遺伝子は検出されず, デルタメトリンを用いた殺虫試験ですべて死亡した. これに対し, CHB と IKB のコロニーでは, 供試虫は全て I925 単一変異遺伝子のホモ接合体で, デルタメトリンを用いた殺虫試験では全て生残した. 一方, 富山 01 系統とその他の 4 コロニー (富山 08, 旭川, 石川, 那覇) に関しては, 系統 (またはコロニー) 内で I925 単一変異または二重変異遺伝子が含まれないか, もしくは存在していても低頻度であり, ペルメトリンを用いた殺虫試験でも試験系統 (またはコロニー) に高い抵抗性比もしくは実用上問題となりうる生残率は示されなかった. 直接採集個体を供試虫とした場合, 16 のコロニーに由来するトコジラミ試料のそれぞれには, デルタメトリンを用いた殺虫試験で半数またはそれ以上の高率で生残個体が観察された. その内の 1 つのコロニー「成田市 2012 年採集」の 2 頭の供試虫に関しては, VGSC 遺伝子の変異検出対象部位に変異が存在しなかったが, その他の 15 のコロニーの供試虫はいずれも I925 単一変異または二重変異をホモ接合の状態でも保有していた. 「成田市 2012 年採

集」コロニーでは、何らかの代謝抵抗性要因のみにより実用上問題となる抵抗性を表したものと推察される。これらの結果から、実用上問題となりうるピレスロイド抵抗性の調査を VGSC 遺伝子の分子ジェノタイプングにより簡易に実施できることが示された。

## 2) QProbe 法による VGSC 遺伝子型決定

まず、いくつかの系統と直接採集個体群を用い、V419 と L925 座位のそれぞれに関して、DNA シークエンシングにより QProbe 配列に対応する領域の DNA 配列を決定した。その結果として、各座位の野生型または変異型のホモ接合体であることが判明した以下に述べる 3 つの系統（または個体群）が保有した DNA を QProbe 法に基づく融解曲線解析の参照 DNA として選んだ。ここに、V419 と L925 に関する参照 DNA は TKD 系統（V419—L925）のもの、L419 に関する対照 DNA は「金川市 2010 年 10 月 30 日採集」個体（L419—L925）のもの、I925 に関する対照 DNA は CHB コロニー（V419—I925）のものとした。なお、配列決定を行ったいずれのホモ接合体も、Yoon ら（2008）により最初に決定された米国産の FL-BB 系統（V419—L925）または NY-BB 系統（L419—I925）に示された DNA 配列と完全に一致していた。次に、これらの参照 DNA をそれぞれ鋳型として用い、PCR 増幅を行い、続いて融解曲線解析を行った。V419 座位に関しては、V419 と L419 のそれぞれのホモ接合体を用いた QProbe の融解温度差は概ね 6°C、L925 座位に関しては、L925 と I925 のそれぞれのホモ接合体を用いた QProbe の融解温度差は概ね 6°C あり、各座位に関して 2 型のホモ接合体を明瞭に判別できた。また、各座位に関して、両ホモ接合体に基づくそれぞれの PCR 産物を等モル量で混合した DNA 試料を PCR の鋳型として用いても、両型の存在により生じた融解曲線において二重の融解温度ピークが識別でき、ヘテロ

接合体の判別にも問題なく対応できることを確認した。以上により、VGSC の V419L と L925I 置換変異のそれぞれを対象とする QProbe を用いた分子ジェノタイプング法を確立した。

## 3) 変異 VGSC 遺伝子の頻度分布に関する全国調査

23 の都道府県の 80 のコロニーから採集したトコジラミ試料を対象として、VGSC の V419 と L925 座位におけるアミノ酸置換変異の分子ジェノタイプングを行った。両座位に関する遺伝子型を同時に決定することができた個体は 696 頭あり、これらの個体に含まれる 2 座位に関するハプロタイプと遺伝子型を推定した。その結果、野生型ハプロタイプのほかに 2 つの変異型ハプロタイプが同定された。供試虫ベースで集計した各ハプロタイプは頻度順に、V419—I925（単一変異型、77%）、V419—L925（野生型、16%）、L419—I925（二重変異型、7%）であった。2 種の変異ハプロタイプに共通して含まれる変異は I925 であり、この変異を保有するコロニーは全調査コロニーの 89%に及んだ。これらのコロニーの大多数では、I925 を運ぶ変異型が野生型に対して優勢で、変異型のホモ接合体として存在していた。

## 2. AChE アミノ酸置換変異

### 1) 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。推定された TKD と HOF に関するフェニトロオクソン IC<sub>50</sub> 値、それぞれ、 $7.04 \times 10^{-9}$  M と  $4.28 \times 10^{-5}$  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。

## 2) 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が (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。

## 3) *p-Ace* 分子ジェノタイプング法の確立

TKD 系統と HOF コロニーの *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。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。

## 4) *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。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。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。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 (#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。

## 5) Y348 変異遺伝子のハプロタイプ

上述の 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。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

トコジラミのVGSCのV419座位に相同なオオタバコガの座位では、ピレスロイド抵抗性に連関して、トコジラミとは異なるVal→Metへの置換を生じている(Park *et al.*, 1997)。一方、トコジラミのL925I置換に関しては、タバココナジラミのピレスロイド抵抗性に連関して、トコジラミと同一な置換を生じている(Morin *et al.*, 2002)。また、キイロショウジョウバエではL925の相同座位に生じているIleへの置換がピレスロイド非感受性の原因となることも電気生理学的に確かめられている(Usherwood *et al.*, 2007)。トコジラミのVGSCに生じている2つの置換変異に関しては、電気生理学的な証明は未了であるが、他昆虫種における相同座位の変異と抵抗性への関連性、ならびにこれらの変異が米国と日本におけるトコジラミのピレスロイド抵抗性に連関性が高いことを考慮すると、ピレスロイド抵抗性コロニーの分布を確かめる全国調査にこれらの変異の保有を指標として用いたことは妥当なことと考えられる。

本研究に先立ち、米国の110のトコジラミコロニーにおいて同様なVGSC遺伝子を対象とする調査が行われている(Zhu *et al.*, 2010)。それによると、I925を運ぶ変異遺伝子(単一変異と二重変異)の頻度がその他の遺伝子を凌駕している点は日本と同様であった。相違点としては、米国においてはV419—I925(単一変異)とL419—I925(二重変異)ハプロタイプが同程度に分布する点、またL419—L925(単一変異)ハプロ

タイプも野生型ハプロタイプに劣る頻度で存在することが確かめられている点であった。

トコジラミのピレスロイド抵抗性機構に関する今後の課題としては、I925単一変異ハプロタイプと二重変異ハプロタイプとの間で殺虫剤感受性に及ぼす効果にどの程度の差異があるかを確かめることが挙げられる。研究結果の項で述べたように、作用点変異を保有しない直接採集個体を使った室内殺虫試験において抵抗性と判定される個体があったことから、代謝抵抗性に係る分子の特定とその変異が抵抗性に及ぼす効果についても確かめることが必要である。

本研究結果から、ピレスロイド系殺虫剤を有効に利用できるコロニーはごく少数の割合に限られていることが明らかとなった。防除の現場でピレスロイド抵抗性遺伝子を含まないコロニーだと簡易に判定することは困難であることから、今後は他の作用点を阻害する薬剤系と物理的駆除法を併用してトコジラミの防除が行われるべきである。欧米諸国では現在はアセチルコリンエステラーゼを阻害する薬剤系(有機リン系とカーバメイト系)がトコジラミへの適用を外れている場合がほとんどであるが、わが国では、これらの薬剤系が家庭内の衛生害虫・不快害虫の防除に一貫して利用可能であった歴史をもつだけでなく、トコジラミへの適用に特化した製剤も最近利用可能になっている。そのため、わが国ではこれらの薬剤系への抵抗性が最初に露呈するおそれも十分ある。これらの系に属する各種殺虫剤に対する感受性の低下を検出可能な調査研究を進めることも緊急の課題といえる。

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連関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。この結果に基づけば、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。以上の考察から、HOF トコジラミ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ピ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。

## E. 結論

- 1) トコジラミ VGSC の L925I 置換変異は、一部の例外を除き、国内のピレスロイド抵抗性に強く関連している。
- 2) トコジラミ VGSC の V419L と L925I 変異を対象とした QProbe 法に基づく分子検出法を確立した。
- 3) トコジラミ VGSC の L925I 置換変異は 89%の国内のトコジラミコロニーに保有されていた。
- 4) トコジラミを完全に駆除するために用いる殺虫剤の第一選択肢としては、ピレスロイド系殺虫剤を推奨できない。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 国内でトコジラミ *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. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

富田隆史. 衛生害虫の殺虫剤抵抗性. 2012. ペストロジー, 27: 19-27.

富田隆史. 2013. わが国における殺虫剤抵抗性の現状. トコジラミ読本 (トコジラミ研究会 監修), 一般財団法人日本環境衛生センター, 川崎, 2013, pp. 75-78.

### 2. 学会発表

Komagata O., Kasai S., Itokawa K., Tomita T. Proliferation of pyrethroid-resistant bed bugs in Japan, 24th International Conference of Entomology. 2012年9月, 大邱市, 韓国.

富田隆史. 害虫の殺虫剤抵抗性機構. 第155回日本獣医学会学術集会/日本比較薬理・毒性学会における企画シンポジウム「薬剤耐性の分子メカニズム」, 2013年3月, 東京都

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

駒形修, 糸川健太郎, 小川浩平, 葛西真治, 数間亨, 皆川恵子, 橋本知幸, 武藤敦彦, 足立雅也, 渡辺護, 小林陸生, 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, 小林陸生, 渡辺護, 足立雅也, 数間亨, 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

## 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

### ネッタイシマカのピレスロイド代謝抵抗性に関する量的形質座位解析

分担研究者	富田隆史	国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長
協力研究者	小川浩平	国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員
	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
	葛西真治	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

ネッタイシマカ抵抗性系統 SP は、ナトリウムチャンネルに 2 箇所の変異を持ち、ペルメトリンによる 10 世代の室内淘汰により感受性系統 SMK と比べ 1647 倍の抵抗性比を示すが、SP 系統の抵抗性比は PBO による解毒酵素シトクロム P450 の阻害により 33 倍にまで減少することから、同系統の殺虫剤抵抗性には作用点変異に加えて解毒酵素の関与が疑われる。そこで SP 系統のペルメトリン代謝抵抗性に関与する原因遺伝子を解明するために、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行った。QTL 解析のために、殺虫剤感受性 SMK 系統と SP 系統の識別が可能なマイクロサテライト、SNPs、および DNA 配列挿入/欠失を利用した分子マーカーを開発した。SMK♂×SP♀の交配に基づく F2 雌成虫に対して <sup>14</sup>C 標識されたペルメトリンの局所施用を行い、個体毎に排泄されたペルメトリン量を測定するとともに、33 座位の遺伝子型を決定した。F2 の排泄量とマーカー型を基にした QTL 解析の結果、第 1 および第 3 染色体に排泄量増大に関与する QTL の存在が明らかになった。排泄量への関与が特に大きかった第 1 染色体上の QTL 近傍には、少なくとも 8 つの P450 遺伝子が存在した。これらの中で SP 系統でのみ発現している *CYP6AA5v2* は、SP 系統の代謝抵抗性要因の最有力候補として挙げられる。

#### A. 研究目的

ハエや蚊などの畜産・衛生害虫対策において、殺虫剤抵抗性の発達は害虫防除の妨げとなる。ことに、媒介蚊の防除に強く依存している Dengue 熱などの蚊媒介性疾患対策の有効性は、殺虫剤抵抗性の発達に大きく左右される。このため、殺虫剤抵抗性の原因変異を特定することは、野外個体群の抵抗性発達の監視や防除対策において公衆衛生学上にも重要な意義がある。

熱帯地域を中心として発生する Dengue 熱は世界規模へと拡大しており、現在では全世界の 40% の人々が Dengue 熱のリスクにさらされていることなどから、世界保健機関

(WHO) は「世界保健デー2014」のテーマとして節足動物が媒介する感染症に焦点をあてた。日本においては、2013 年 9 月に日本を旅行したドイツ人が Dengue 熱を発症しており、さらに 2014 年には、160 人の Dengue 熱国内感染患者が確認された。

シンガポールでの採集に由来するネッタイシマカのピレスロイド抵抗性系統 SP 系統は、ペルメトリンによる 10 世代の室内淘汰により、感受性系統 SMK と比べ 1647 倍のピレスロイド抵抗性を表す。SP 蚊に解毒酵素 P450 の阻害剤である PBO を共力剤として用いた場合、SP 系統の抵抗性比は 33 倍にまで減少することから、SP 系統の殺虫

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 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♂×SP♀）を交配した BC1 系統と F1（SMK♂×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 と 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. 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。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。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。

### 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 (1,515 塩基) 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

塩基中 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 塩基中 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