

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 1 kg 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、ミトコンドリアのシトクロム 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的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. pseudovishunui* (シロハイシエカ), *Ae. dorsalis* (セスジャブカ), *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, シロハイシエカは, 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ャブカ, 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った。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 年に福島県より発行された『福島県内におけるハエとカの周年発生活動』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。今年は、デング熱の流行が起こり、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、蚊の発生活動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

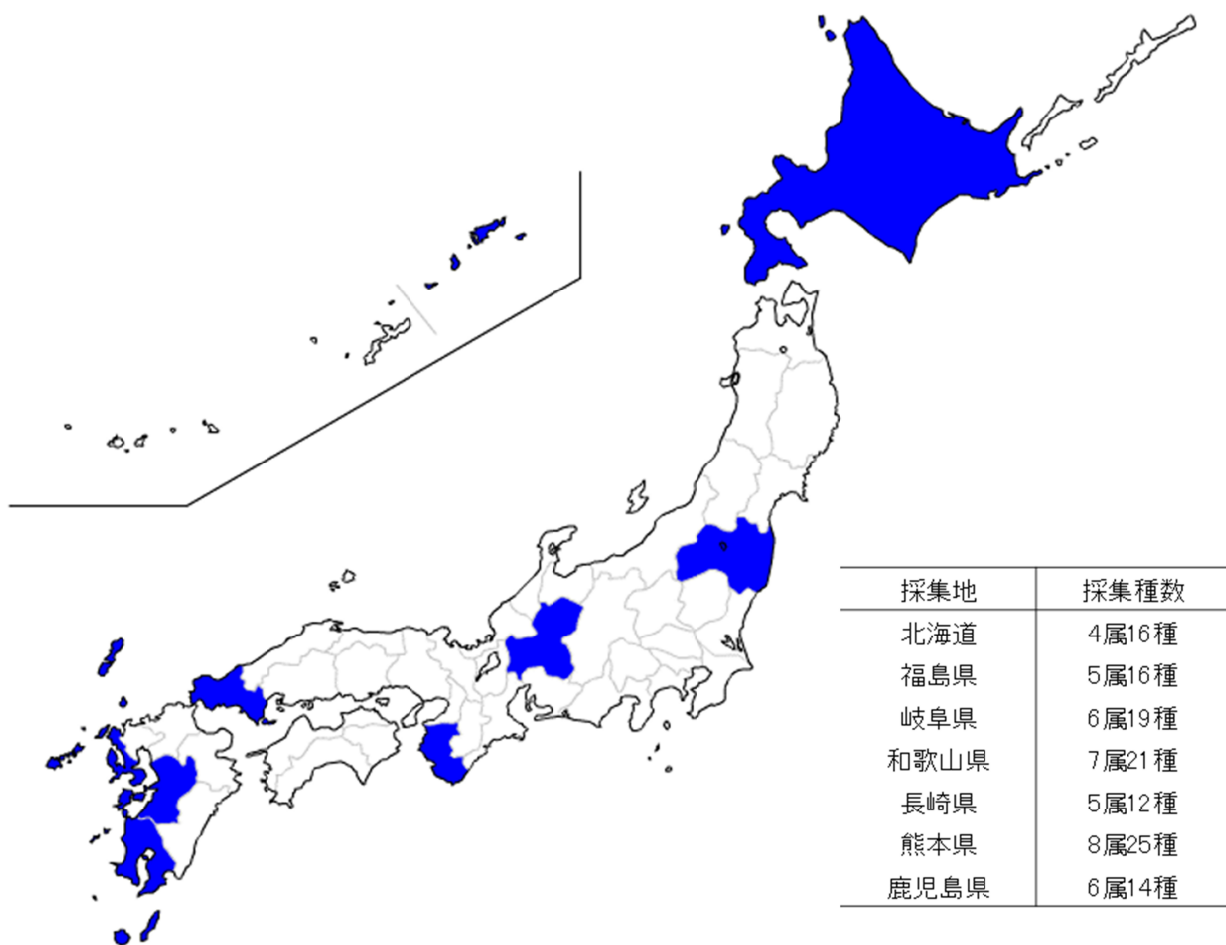


図1 疾病媒介蚊調査地（青色）と採集種数（成虫と幼虫）

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 nippoi</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. hatorii</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. yamadai</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