

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 倍レベルのフェントロオクソンIC₅₀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プング法を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.

ピレスロイド系の他に, 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, プロパタンフォス, DDVP, プロボ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

(数問, 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, 鵬函商事(株), 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 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 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 mL のリン酸緩衝液 (pH7.0) 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 に保温したリン酸緩衝液 170 μL に対し, 発色剤として dithionitrobenzoic acid (DTNB) 溶液 10 μL , 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 μL , および粗酵素液 10 μL 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 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 μL 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 で波長 405 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 ($1.36 \times 10^4 = (\Delta \text{absorbance}/\text{min}) / (\text{mol/L} / \text{min})$) を用い, 1 分間あたりの吸光度の変化を酵素の活性度 (mol/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 \rightarrow CTC) と L925I (CTT \rightarrow 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 μL 中) は, ExTaq HS (Takara) 0.125 μL , $1 \times$ ExTaq buffer, dNTP 0.2 mM, CISC-F15 (GAGGACG TGGCACATGTTGTTCTTC) 45 nM, CISC-R16 (GAGGACCTTAGCTTGAGCTGCTTC) 756 nM, CISC-QP5Y-F1 0.2 μM , DNA 抽出

液 1 μ L とした。L925I を標的とする対象配列の PCR 液 (25 μ L 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 2' > [95 15" > 55 30" > 68 15"] \times 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 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 \rightarrow 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 CCTGAACAAC 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 μ L 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 30" > [95 5" > 55 10" > 72 20"] \times 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ピ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、配列決定を行っていないのホモ接合体も、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、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 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ピング法を確立した。

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ピングを行った。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 IC₅₀ 値、それぞれ、 7.04×10^{-9} M と 4.28×10^{-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。

ハ工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。ハ工科昆虫は、*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、ハ工科を除く昆虫種では薬剤低感受性に関連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プ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剤としては、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 - 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, 小林睦生, 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, 小林睦生, 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