

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

**感染症を媒介する節足動物の分布・生息域の変化、
感染リスクの把握に関する研究**
(H24 - 新興 - 一般 - 007)

平成 24 ~ 26 年度 総合研究報告書

研究代表者 澤邊 京子

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告

感染症を媒介する節足動物の分布・生息域の変化、感染リスクの把握に関する研究 澤邊 京子	1
--	---

II. 分担研究報告

1. 東日本大震災津波被災地における疾病媒介蚊の発生状況に関する研究 津田良夫	25
2. 岩手県における東日本大震災被災瓦礫集積場におけるハエ類発生調査（2012年） 林 利彦	31
3. 海外からのデング熱媒介蚊の侵入ならびにデング熱流行時の媒介蚊対策に関する研究 津田良夫	38
4. 神奈川県および長野県におけるヒトスジシマカ成虫の飛来消長に関する研究 武藤敦彦・畠田隆史	42
5. 長野県内における感染症媒介蚊の分布調査と発生動態（2012～2014の3年間の調査 結果のまとめ） 平林公男	44
6. 岩手県におけるヒトスジシマカ分布調査（2012～2014年） 佐藤 卓・澤邊京子	52
7. 日本国内における疾病媒介蚊調査 津田良夫	59
8. アカイエカ種群の九州での集団遺伝的解析 大塚 靖	67
9. 鳥類吸血性蚊の生態と病原体媒介能力に関する研究 津田良夫	74
10. 国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析 伊澤晴彦	78
11. 日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発「日本脳炎ウイルス 国内分離株のゲノムと病原性の監視」 高崎智彦	86

12. 六甲山系で採取されたマダニにおけるウイルス保有調査 林 昌弘	96
13. シラミ媒介性細菌 <i>Bartonella quintana</i> などによる感染症の疫学研究 佐々木年則・澤邊京子	103
14. トコジラミの殺虫剤抵抗性に関する全国調査 富田隆史	106
15. 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 富田隆史	115
16. 鳥取県, 島根県, 広島県におけるマダニ類の生息調査(2013~2014年度) 山内健生	119
17. マダニ相に関する全国調査の試み 澤邊京子	122
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	128

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）
総合研究報告書

感染症を媒介する節足動物の分布・生息域の変化、感染リスクの把握に関する研究

研究代表者 澤邊 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）

研究要旨

近年の地球温暖化の進行や大規模自然災害による環境変化により、疾病媒介蚊の生息域が拡大し、発生数も増大することで、アルボウイルス感染症の発生リスクが高まっている。既存の感染症対策に留意するとともに、新たな侵入感染症と媒介者への対策が求められている。本研究課題では、国内において外来性の感染症および媒介節足動物の国内侵入を監視するとともに、国内に生息する媒介者を介した国内流行に備え、その感染リスクを調査することを目的とし、これらの成果により感染症媒介節足動物に対する総合的な厚生労働行政施策を策定するための科学的基盤および情報基盤の構築に貢献する。

I. 疾病媒介節足動物の分布に関する国内調査、ならびにそれら媒介者に関する基礎的研究

東日本大震災被災地において、復興が進むことによってハエ類の大発生は収束し、蚊相は4年間でほぼ安定したと結論した。2014年のデング熱国内発生対応において、これまでに構築したヒトスジシマカの科学的基盤と情報基盤をもとに媒介蚊対策を実施した。自治体および関連機関への研修・技術講習を通して具体的に助言・指導し、特定感染症予防指針の策定に協力した。SFTS対応のマダニ全国調査を2013年秋と2014年春に実施し、定点調査地からは詳細な季節消長を収集した。富山県・新潟県のコガタアカイエカの季節消長と各種気象データから本種の国内外での長距離移動と分散を解析した。アセチルコリンエステラーゼ(AChE)領域およびマイクロサテライト領域の解析により、南九州のアカイエカにはネット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を明らかにした。

II. 媒介節足動物からの病原体の分離と検出、ならびに検出法の開発に関する研究

野外捕集蚊およびマダニから新規オルビウイルスをそれぞれ分離発見し、乳のみマウスを用いた病原性の検討を行った。長崎県の定点で捕集されたコガタアカイエカからは、毎年I型日本脳炎ウイルス(JEV)が分離され、I型JEVに対する現行ワクチン(III型から作成)の有効性も確認された。V型JEVは強い病原性を維持している可能性があり、現行ワクチンの中和効果はI型やIII型JEVに比べて弱いと推察された。コロモジラミから塹壕熱バルトネラ菌遺伝子が検出され、患者のIgG抗体保有率も明らかになった。路上生活者の間で着実に塹壕熱が広まっている可能性が示唆された。

III. 蚊およびトコジラミの殺虫剤抵抗性に関する量的形質剤の解析と全国調査

量的形質遺伝子座(QTL)解析により、ピレスロイド系殺虫剤に抵抗性のネットタイシマカのペルメトリン抵抗性に関する原因遺伝子を解析し、第1染色体上にあるCYP6AA5v2がペルメトリンの代謝量増大に関連する遺伝子として最有力の候補であることを確認した。トコジラミのピレスロイド低感受性をもたらす変異型遺伝子の検出法を開発し、抵抗性遺伝子の国内分布を調査した。次いでAChE阻害剤抵抗性個体のAChEの殺虫剤感受性低下と構造変異を解析し、感受性低下に関連するアミノ酸置換変異を標的とする分子ジェノタイピング法を考案した。本法による全国調査の結果、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た。

分担研究者 高崎智彦（国立感染症研究所ウイルス第一部・第二室長）
林 昌宏（国立感染症研究所ウイルス第一部・第三室長）
林 利彦（国立感染症研究所昆虫医学部・第一室長）
伊澤晴彦（国立感染症研究所昆虫医学部・第二室長）
富田隆史（国立感染症研究所昆虫医学部・第三室長）
津田良夫（国立感染症研究所昆虫医学部・主任研究官）
平林公男（信州大学・繊維学部・教授）
山内健生（兵庫県立大学・自然環境科学研究所・准教授）
大塚 靖（鹿児島大学・国際島嶼教育研究センター・准教授）

A. 研究目的

2011年3月11日に発生した東日本大震災では、巨大地震とそれによって引き起こされた巨大津波によって、東北地方の太平洋沿岸を中心として甚大な人的被害と環境破壊がもたらされた。環境の劇的な変化がそこに生息する蚊に対して大きな影響を与えたことは想像できるが、このような過去に例を見ない著しい環境変化の中で、疾病媒介蚊の分布と発生量がどのように変化していくかを詳細に調査し、科学的な記録を残すことは非常に重要な課題であると考え、主として宮城県南部水田地帯と福島県南相馬の水田地帯を対象として2011年から2014年まで調査を実施した。

近年、チクングニア熱やデング熱の輸入症例は増加し、媒介蚊が航空機等により国内に侵入した事例も頻発している。特に、デング熱は、アジア諸国で流行が続き、わが国でも約70年ぶりの国内流行を経験した。急遽、媒介蚊対策が実施されることになったが、媒介蚊の分布や成虫密度などに関する基礎的情報は不足しており、外来性感染症流行への対応は十分とは言えない。特に自治体担当者を対象とした技術研修の必要性が指摘された。国内における媒介蚊対策を立案するために、媒介蚊のウイルス感受性や成虫・幼虫の詳細な発生密度調査を実施し、それら基礎的な情報をもとに「デング熱国内感染事例発生時の対応・対策の手引き 地方公共団体向け」（第1版）を作

成したが、2014年のデング熱国内発生時に実施した媒介蚊対策の経験を参考に、実際に即した手引きへの更新が望まれている。ウエストナイルウイルスは極東ロシアや中国での活動が確認され、国内侵入の可能性も高まったことから、国内に生息する潜在的媒介蚊であるアカイエカ種群を鑑別同定し、モニタリング体制を維持することが必要である。一方、国内感染が毎年報告されている日本脳炎に関しては、日本脳炎ウイルス（JEV）を保有した媒介蚊が国内のどこで越冬するのか、あるいは海外からどのようなルートで長距離移動をしてくるのか、などの基本的な問題は未だ解決されていない。ウイルスの疫学的解析、コガタアカイエカを始めとする媒介蚊の生態・越冬生理、長距離移動に関する調査研究を推進する必要がある。

2013年1月、国内で初めて重症熱性血小板減少症候群（SFTS；severe fever with thrombocytopenia syndrome）の患者が発生し、2015年3月までに110名の患者（うち32名が死亡）が報告された。これまでの調査で、複数種のマダニからウイルス遺伝子が検出され、遺伝子陽性マダニは全国に分布すること、ウイルス抗体価の高い野生動物が存在することなどが明らかになったが、SFTSウイルスの感染環は依然として不明である。国内において、マダニ媒介性感染症は日本紅斑熱やライム病がよく知られており、流行地にあってはマダニの捕集調査

は熱心に行われてきたが、主に病原体の検出を目標とした調査のため、統一された方法で評価されていなかった。そこで我々は、1地点あたり1人30分間のフランNEL法を基本として全国調査を行い、捕集数と種構成を評価することを計画した。これまでに国内外の蚊およびマダニから複数の新規ウイルスを分離してきたが、蚊やマダニが保有するウイルス種の探索を継続し、それら媒介動物が保有するウイルス叢全体を把握し、媒介節足動物における病原体の遺伝子診断をより簡素化し、必要な技術開発と標準化を行うことも重要な課題である。

衛生害虫の殺虫剤抵抗性の発達状況は継続して調査する必要があり、特に津波被災地でのイエバエ、不快害虫としてのシラミやトコジラミの抵抗性の発達に関する調査・研究も重要な課題である。近年、デング熱の発生は世界規模へと拡大しており、現在では全世界の40%の人々がデング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】に焦点をあてている。シンガポールで採集されたネッタイシマカのピレスロイド抵抗性系統(SP系統)の代謝抵抗性に関する原因遺伝子の解明を試みた。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)。国内では、1960年台以降、トコジラミの発生が問題視されることはなかったが、2005年からの8年間で東京都における被害相談件数は約13倍に増大している(東京都福祉保健局, 2014)。そこで、ピレスロイド作用点にピレスロイド低感受性をもたらす変異型の電位依存性ナトリウムチャンネル(VSSC)遺伝子の検出法を開発し、抵抗性遺伝子の国内分布を

調査した。また、日本で唯一確認されているアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害剤抵抗性コロニー(防府コロニー; HOF)におけるAChEの殺虫剤感受性低下と構造変異を解析した。次いで、殺虫剤感受性低下に関連するアミノ酸置換変異を標的とする分子ジェノタイピング法を考案し、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

本研究は、主任研究者:澤邊京子、分担研究者9名(高崎智彦、林昌宏、津田良夫、林利彦、伊澤晴彦、富田隆史、山内健生、平林公男、大塚靖)によって遂行された。総括研究報告として、以下の17課題について解説する(方法の詳細は各分担者の項を参照)。

1. 東日本大震災津波被災地における疾病媒介蚊の発生状況に関する研究
(津田良夫)
2. 岩手県における東日本大震災被災瓦礫集積場におけるハエ類発生調査(2012年)
(林利彦)
3. 海外からのデング熱媒介蚊の侵入ならびにデング熱流行時の媒介蚊対策に関する研究(津田良夫)
4. 神奈川県および長野県におけるヒトスジシマカ成虫の飛来消長に関する研究
(武藤敦彦・富田隆史)
5. 長野県内における感染症媒介蚊の分布調査と発生動態(2012-2014の3年間の調査結果のまとめ)(平林公男)
6. 岩手県におけるヒトスジシマカ分布調査(2012~2014年)(佐藤卓・澤邊京子)
7. 日本国内における疾病媒介蚊調査(津田良夫)
8. アカイエカ種群の九州での集団遺伝的解析(大塚靖)

9. 鳥類吸血性蚊の生態と病原体媒介能力に関する研究（津田良夫）
10. 国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析（伊澤晴彦）
11. 日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発「日本脳炎ウイルス国内分離株のゲノムと病原性の監視」（高崎智彦）
12. 六甲山系で採取されたマダニにおけるウイルス保有調査（林 昌弘）
13. シラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* などによる感染症の疫学研究（佐々木年則・澤邊京子）
14. トコジラミの殺虫剤抵抗性に関する全国調査（富田隆史）
15. 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（富田隆史）
16. 鳥取県、島根県、広島県におけるマダニ類の生息調査（2013～2014 年度）（山内健生）
17. マダニ相に関する全国調査の試み（澤邊京子）

研究はこれらの各分担者が独立して実施するだけでなく、各研究者が有機的に連携して行えるよう代表研究者が責任を持って進めた。また、確立した技術や情報の共有を積極的に行うよう努めた。

C. 結果

1. 東日本大震災津波被災地における疾病媒介蚊の発生状況に関する研究

宮城県南部水田地帯と福島県南相馬市の沿岸部水田地帯を対象として、東日本大震災で津波被害を受けたエリアと被害を受けなかったエリアの蚊の発生状況を調べた。宮城県南部の津波被災地では、2011 年からの 4 シーズンで、10 種類 15,050 個体、非被災地では 11 種類 1,966 個体の成虫が捕獲さ

れた。津波被災地では、2011 年にアカイエカ群とコガタアカイエカ、イナトミシオカの大発生が認められたが、アカイエカ群とイナトミシオカは年々減少し、4 年目には非被災地との差がほとんどなくなった。

福島県南相馬の津波被災地では、2012 年からの 3 シーズンで 12 種 20,202 個体、非被災地では 15 種 1,233 個体の成虫が捕獲された。津波被災地では、アカイエカとコガタアカイエカは年々増加したが、イナトミシオカは 3 年間ほぼ同じレベルを保っていた。この地域の蚊の発生には今後も注意が必要であると考える。

2. 岩手県における東日本大震災被災瓦礫集積場におけるハエ類発生調査（2012 年）

2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災および津波被災地では、その後ハエ類の大量発生によって周辺住民や避難所で暮らす人々に多大な被害を与える結果となった。翌 2012 年に岩手県の 2 力所の瓦礫集積所でハエ類の発生調査を行った結果、両瓦礫集積場ともに採取された個体数は最高でも 10 数個体であった。複数の種類のハエが採取されたが、特定の種類が多く発生しているという事実は確認されなかった。2012 年には津波被害に起因するハエ類の大量発生は観察されなかったと結論された。大規模災害によりハエ類大量発生の問題が引き起こされたとしても、翌年にその問題が持ち越されることはないことが示唆された。

3. 海外からのデング熱媒介蚊の侵入ならびにデング熱流行時の媒介蚊対策に関する研究

成田国際空港では 3 年連続してネッタイシマカの発生が確認され、本種の侵入リスクが高まっていることから、国際空港でのベクターサーベイランスの重要性が再確認された。ネッタイシマカの幼虫発育と気温の関係を分析し 1 令幼虫の発育限界温度は 10.6 ℃ 4 令幼虫は 11.6 ℃ 付近と推定された。

国際空港のターミナルビルは常に温度管理が行われているため、屋外では冬季に生存できない寒冷な地域であっても、屋内に侵入したネッタイシマカが越冬できる可能性は高いと思われる。

2014年8月～10月に代々木公園とその周辺で起きたデング熱の流行で、公園など5ヶ所で媒介蚊の生息密度を調査した。推定感染場所とされた2つの公園で生息密度を調査した結果、ヒトスジシマカの平均密度は、8分間当たり 10.2 ± 16.5 と 11.4 ± 8.8 であった。この生息密度を一つの目安と考え、デング熱流行の予防対策として、平時から適切な幼虫対策を実施して成虫密度を8分間あたり平均10個体より低く保つことが必要であると推測した。

4. 神奈川県および長野県におけるヒトスジシマカ成虫の飛来消長に関する研究

ヒトスジシマカの異なる環境での発生期間を把握する目的で、神奈川県中郡大磯町および長野県上田市の2地点において、人囮法により飛来消長調査を行った。

2010年～2014年の5年間の調査で、大磯町では5月9日～23日、上田市では6月5日～18日の間に飛来が始まり、大磯町では7月上旬～10月上・中旬、上田市では7月中旬～9月下旬にかけて飛来の多い状態が続き、飛来の終息確認日は、大磯町で11月9日～30日、上田市で10月5日～15日であることが明らかになった。飛来開始日や終息日の地点間の違いは、気温の違いによると考えられた。

5. 長野県内における感染症媒介蚊の分布調査と発生動態

2012年から2014年にかけて、ヒトスジシマカの長野県内における水平分布と垂直分布を調査した。成虫は、合計72地点（のべ82回；北緯35度30分21.24秒～36度55分28.23秒、標高317m～1,534m）でCO₂トラップにより捕集した。幼虫は、合計54

地点（128ヶ所）の神社、仏閣を中心とし、墓石の花立てや石盤、線香立てなどに溜まった小水域から採集した。ヒトスジシマカ成虫は合計139個体捕集された（23.4%，平均捕獲数1.7個体/トラップ/日）。ヒトスジシマカは全県にわたって分布することが明らかになった（飯山市から飯田市まで）。調査地最北端の木島平村や飯田市、上田市では捕集されたが、軽井沢町、上高地、菅平高原、上田市真田地区など、標高が800mを超える地域では、成虫も幼虫も確認できなかった。極めて成虫の捕集数が少なかつた地域においては、今後もモニタリングが必要であると思われる。

6. 岩手県におけるヒトスジシマカ分布調査（2012～2014年）

岩手県における節足動物媒介性ウイルス疾患の予防対策に資するため、2009年から岩手県におけるヒトスジシマカの生息分布調査を行ってきた。2014年までの調査で、岩手県内陸の平野部における北限地域にある盛岡市の市街地ではヒトスジシマカはすでに定着しており、また、着実に生息範囲を拡大していることが明らかになった。さらに、2014年には北上高地に位置する花巻市東和町において、初めてヒトスジシマカの生息が確認された。今後もヒトスジシマカの生息分布や生息条件等についてさらに監視が必要である。

7. 日本国内における疾病媒介蚊調査

国内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。調査地域内で成虫採集用のドライアイストラップを設置し、その周辺で幼虫採集を行った。合計で10属44種4,677個体以上が採集された。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。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。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が、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。

8. アカイエカ種群の九州での集団遺伝的解析

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*)、ネッタイイエカ (*Culex quinquefasciatus*) が存在する。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が、今回、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および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査した結果、日本産アカイエカにはネッタイイエカのハプロタイプが含まれていることが判明した。九州一帯のアカイエカは一定の割合のネッタイイエカと同じタイプが存在することが示唆された。アカイエカとネッタイイエカの違いを明らかにするためには、遺伝的な変異でだけでなく形態的・生態的特徴と合わせて検討する必要があると結論された。

9. 鳥類吸血性蚊の生態と病原体媒介能力に関する研究

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 個体の成虫が採集された。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、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。

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の鳥マラリア原虫の媒介能力について検討した結果、アカイエカ群では 3 種の鳥マラリア原虫 (CXP1P09, SGS1 と GRW4) に対して媒介能力があると判定された。イナトミシオカにおいては、CXINA01, CXINA02, CXQUI01 の 3 種の媒介が可能であると推察された。

10. 国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析

国内における日本脳炎の主要な媒介蚊であるコガタアカイエカの JEV 保有状況の把握とウイルス遺伝子解析を主な目的として、国内各地で捕集された蚊からの JEV の検出と分離、ならびにウイルス遺伝子の分子系統解析を 2005 年以降継続して行ってきた。

2011 年は石川県七尾市、熊本県合志市、2012 年は長崎県諫早市、群馬県前橋市、2013 年は長崎県諫早市の畜舎とその周辺においてコガタアカイエカを捕集した。捕集蚊は最高 25 個体までを 1 プールとして乳剤を調製し、C6/36 細胞を用いてウイルス分離を試みた結果、2012 年および 2013 年の長崎県諫早市捕集蚊のそれぞれ 1 プールから JEV が分離された。分離株のゲノム中のエンベロープ (E) 領域の遺伝子配列を解析した結果、ウイルスの遺伝子型は 1 型であり、近年日本を含む東アジア地域で報告されている株と遺伝的に極めて近縁であることが確認された。今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況を調査し、分離株の遺伝子解析を継続することで、JEV 媒介蚊からの感染リスクを把握しておくことは予防対策上重要であると考えられる。

11. 日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発「日本脳炎ウイルス国内分離株のゲノムと病原性の監視」

近年国内外で分離された JEV 株の性状解析およびこれらの株に対する現行ワクチンの効果を調査した。具体的に 1) 高病原性型と考えられる NS4A 3-Ile 型株の分離株中の

割合は約 20%であること。また 3-Ile 型でも高病原性を示さない株が存在することを明らかにした。2) 遺伝子型 III 型ベースで生産されている現行ワクチンは I 型株・III 型株のいずれにも中和効果があることを明らかにした。3) 一方、遺伝子型 V 型に対する現行ワクチンの中和効果は I 型・III 型株に比べ低く、V 型 Muar 株のマウス病原性は比較的強いことが明らかになった。

現在の主要型である遺伝子型 I 型に対してはこれまでの対応で特に問題ないことを示す一方で、V 型 JEV が国内に侵入した場合は、ワクチン接種をしていても不安が残ることが示唆された。ワクチン接種したヒト血清を用いた解析、蚊での媒介能力など、更なるウイルス性状解析が必要である。

12. 六甲山系で採取されたマダニにおけるウイルス保有調査

マダニ類はウイルス、細菌、リケッチア等の病原体を媒介することが知られているが、その他のダニによって媒介されるウイルスの分布状況は明らかにされていない。兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたマダニのウイルス保有状況を調査した結果、細胞培養を用いたウイルス分離において、これまで日本においてその存在が知られていなかったレオウイルス科オルビウイルス属 Great Island virus group に属するウイルスおよびブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される Uukuniemi 様 virus が分離された。これらのウイルスを乳のみマウスの脳内接種により継代したところ、乳のみマウスに病原性を示す株がそれぞれ分離された。

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

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行った。2013 年～2014 年に合計 29 名のコロモジラミを保有する患者から血液およびシラミの提供があり、臨床情報とともに解析した。シラミ 26 個体からの *B. quintana* 遺伝子検出結果は、全て陽性であった。シラミ保有者の血液は、*B. quintana* に対する IgG 抗体保有率は 52%，*B. quintana* に対する IgM 抗体保有率は 76% であった。シラミからは *B. quintana* 遺伝子が検出され、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%) が確認された。

14. トコジラミの殺虫剤抵抗性に関する全国調査

過去 3 年間に北海道から沖縄県にかけて採集された 80 コロニーの日本産トコジラミを収集し、QProbe 法により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 座位に関する遺伝子型を解析した。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で失われていることが明らかになった。

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。数種の AChE 阻害剤に抵抗性であるトコジラミ (防府コロニー, HOF) の粗酵素液を用いた酵素阻害試験を行った結果、10³ 倍レベルのフェニトロオクソン IC₅₀ 値低下で示される AChE の感受性低下が示された。AChE 遺伝子 (*p-Ace*) の活性ゴルジ内のアシル結合部位 F348 (331) Y アミノ酸置換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、全国規模の調査を行った。その結果、HOF も含めた 4 コロニーに Y348 (331) 変異を保有する個体が検出されたが、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た。

15. ネッタイシマカのビレスロイド代謝抵抗性に関する量的形質座位解析

ネッタイシマカ抵抗性系統 (SP 系統 ; シンガポールで採集) のペルメトリン抵抗性に関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 33 座位の分子マーカーを開発した。SMK♂×SP♀の交配に基づく F2 雌成虫 96 個体に対して ¹⁴C 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。第 1 染色体上の QTL 近傍には、少なくとも 8 つの P450 遺伝子が存在することがわかったが、これらの中で CYP6AA5v2 が代謝抵抗性要因の最有力候補と考えられた。

16. 鳥取県、島根県、広島県におけるマダニ類の生息調査 (2013~2014 年度)

中国地方では、マダニ媒介感染症である重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) や日本紅斑熱の患者が各地で発生している。しかし、中国地方におけるマダニ類の分布及び季節消長については知見が少なく、不明な点が多い。そこで、中国地方の鳥取県、島根県、広島県においてマダニ類の調査を実施した。鳥取県西部と島根県東部 (2013 年 5 月 ~ 10 月と 2014 年 4 月 ~ 11 月) および広島県広島市安佐北区 (2013 年 4 月 ~ 2014 年 1 月と 2014 年 4 ~ 12 月) でマダニ類の採集を試みた。各県の 1 定点では、マダニ類の季節消長を調べるために、フランNEL 法を用いて植生上のマダニ類を定期的に採集した。

鳥取県西部と島根県東部では、2 種の鳥取県新記録種を含む 11 種、広島県では 7 種のマダニ類がそれぞれ採集された。島根県の定点調査では、全調査期間を通してキチマダニが採集されたが、6 月下旬 ~ 8 月上旬はヤマアラシチマダニが多く採集された。広島県の定点調査では 9 月中旬 ~ 10 月上旬に優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニに劇的に変化した。ニホンジカ生息地では春から秋にかけてフタトゲチマダニの密度が非常に高くなることから、この時期にニホンジカ生息地を訪れる際にはフタトゲチマダニによる刺症に注意することが望ましいといえる。

17. マダニ相に関する全国調査の試み

SFTS ウィルスの感染環を解明するためには、2013 年・2014 年に全国規模でのマダニ調査を行った。2013 年は 10 月 ~ 11 月に国内 24 都道府県下の 54 地点で、それぞれマダニと人との接触が予想される環境を調査地点とした。北海道ではヤマトマダニのみが採集され、本州と九州地方ではキチマダニが優先種であったが、それ以外に本州ではオオトゲチマダニ、九州ではタカサゴチマダニが多く捕集されることがわかった。また、隣接した調査地であっても、採集数や種構成が大きく異なる地域があることも明らかになった。2014 年は 4 月下旬から 5 月上旬にかけて、昨年秋とほぼ同じ地点とさらに 3 府県 28 地点を追加し、合計 27 都道府県下の 82 地点で調査を行った。その結果、全国的に昨年秋よりも本年春の捕集数は多く、フタトゲチマダニの捕集数が多調査地点で多いことが示唆された。

D. 考察

I. 疾病媒介節足動物の分布に関する国内調査、ならびにそれら媒介者に関する基礎的研究

2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災から 4 年が経過した。巨大地震とそれが引

き起こした巨大津波によって、東北地方の太平洋沿岸を中心に甚大な人的被害と環境破壊がもたらされた。このような環境の劇的な変化がそこに生息する蚊や感染症の発生に影響を与えるであろうことは容易に想像できるが、実際に、著しい環境変化の中で、疾病媒介蚊の分布と発生量がどのように変化していくかを科学的に調査し、記録を残すことができたことは大きな意義がある。全体的には津波による環境変化はほぼ復元され、蚊類の発生状況も津波被災前の状態に戻ったということができる。しかし、復旧作業が遅れた地域では、幼虫発生源は依然として残り、蚊相は未だ安定していないと思われた。復興が進めば、かなり早い期間で蚊相は安定すると推察された。懸念された津波被災地での感染症の流行が起らなかつたことは幸いであった。

2014年春のマダニ調査は、前年秋の調査地(24都道府県54地点)に28地点を加え、合計27都道府県下の82地点で行った。秋と春の2回の調査、ならびに数か所の定点調査地から得られる季節消長等の情報から、近距離に位置する調査地であってもマダニの捕集数や種構成に大きな差異が見られることが明らかになり、季節が異なると種構成が大きく異なることも判明した。この結果は、マダニのSFTS伝搬を考察するためには、できるだけ患者発生地周辺で、時期も考慮してマダニ調査を行う必要があることを強く示唆するものである。しかし、現時点では、地域や行政の協力が得られる場所はかなり限られており、できるだけ多くの地域からマダニの基礎的情報を収集・蓄積し、情報を公開していくことが、今、我々にできることの一つであると考えている。SFTS対策を考える上で、SFTS流行地と非流行地で異なる要因を探すことが重要であり、それら基礎情報に加え、野生動物の分布や植生等の環境要因も考慮し、SFTSウイルスのヒトへの感染リスクを評価したいと考えている。

2014年夏に日本は約70年ぶりのデング熱国内発生事例を経験した。各自治体を中心に行われた媒介蚊対策に感染症研究所は協力し、具体的な技術指導も行った。しかし、本来配属されていなければならぬはずの害虫対策の専門家は不足し、媒介蚊対策にあたる関係者の知識と技術は十分ではなかった。人材不足に関しては、社会全体で長期的に取り組むべき問題である。また、調査・対策を行う上での情報共有がなされなかつたことは現場の混乱を招く大きな要因となり、今後改善されるべきことである。殺虫剤の散布方法や薬剤選定に関しては、経験不足が露呈したが、一方で、適切に媒介蚊対策を施せば、成虫密度は下がることが確認されたことは高く評価されるであろう。種々輸入感染症例が増加する日本にあり、今夏蚊の発生はもとより、デング熱やチクングニア熱等の蚊媒介性感染症の国内発生の可能性は高い。昨年の経験を活かし、今後の国内発生事例に備えたい。

岩手県・神奈川県・長野県で継続されたヒトスジシマカの生息調査の結果は、今般のデング熱媒介蚊対策を立案する上で貴重な基礎的情報となった。これらの科学的基盤および情報基盤をもとに、厚生労働省が発出予定の「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」の策定に協力した。予防指針は3月までに策定が終了し、4月中旬には発出・適用される見込みである。アカイエカ種群の鑑別やコガタアカイエカの国内外の長距離移動に関しては、前者がウエストナイル熱、後者が日本脳炎の流行に媒介者として密接に関係するため、基礎的情報の蓄積が必要であり、今後も調査・研究を継続することが必要である。

II. 媒介節足動物からの病原体の分離と検出、ならびに検出法の開発に関する研究

我々の調査地点は長崎県諫早市内のJEVの增幅動物であるブタが肥育されている畜舎で、周辺にはコガタアカイエカの

発生源となる水田が点在している環境であり、ヒトの生活環境も近い。同地域で過去に行った調査でも、ほぼ同じ時期に採集された蚊から高率にウイルスが分離されていることから、毎年 JEV の活動が活発な地域であることが伺える。このように JEV が蔓延していると推測される地域では、JEV に対する免疫が低い周辺住民への感染リスクは依然として高いと推定される。また、ワクチン接種が行われていない国や地域からの渡航者が日本国内で日本脳炎に感染するリスクは高いと考えられる。このため、今後急速に増加が見込まれる海外からの渡航者に向けた日本脳炎の感染リスクの周知と防蚊対策の啓発も重要である。今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況とウイルス遺伝子の変化と推移を把握しておくことは疫学上重要であり、分離株の増殖性や病原性を詳細に解明し、予防対策につなげていくことが望まれる。

日本国内に蔓延している JEV の主要型は現在 I 型と考えられるが、実際に使用されている日本脳炎ワクチンは III 型から製造されたものである。幸いにも現行のワクチンは I 型にも III 型と同等の効果があることが示されたが、近年、中国および韓国で立て続けに新たな遺伝子型 V 型のウイルスが分離同定され、現行ワクチンが V 型ウイルスにも効果があるのかが懸念されている。V 型 JEV は 1952 年に初めて分離されたが (Muar 株)、この一度きりでその後約 60 年間報告がなかった。そのため V 型株に関する知見は遺伝子配列情報以外皆無であった。Muar 株に対する現行ワクチンの中和能およびウイルスの病原性を調べたところ、ワクチン効果が低い傾向がみられ、病原性も高い可能性が示唆された。現行ワクチンの汎用性に対し問題提起できたことは高く評価される。

野外捕集蚊から、これまでに国内では報告のないウイルス（蚊媒介性オルビウイル

ス種 Umatilla virus に近縁なウイルス）が分離された。一方、マダニからもオルビウイルス属のウイルス（ダニ由来 Great Island virus group に属するウイルス）とブニヤウイルス科フレボウイルス属ウイルス（Uukuniemi virus に近縁）がそれぞれ分離された。これらの多くの新規ウイルスは、現時点ではヒトや他の哺乳動物に対する感染性や病原性の有無については不明であるが、今後新興するかもしれない人獣共通アルボウイルス感染症に対して備える意味からも詳細な実態解明が望まれる。本研究で得られた結果は、新興・再興アルボ感染症の対策として、平時より媒介節足動物の病原体保有状況を把握することの重要性を改めて示すものであり、継続する必要がある。

III. 蚊およびトコジラミの殺虫剤抵抗性に関する量的形質剤の解析と全国調査

ハエ科を除く昆虫種は二種の AChE 遺伝子 (*p-Ace* と *o-Ace*) を保有しているが、*p-Ace* のみが薬剤低感受性に関連づけられる変異として知られている。国内の 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。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。

2013 年 9 月に日本を旅行したドイツ人がデング熱を発症し、日本国内での感染が強く疑われた。さらに、2014 年には都内の公園が感染地と推定される合計 162 名のデング熱国内感染患者が確認された。国内ではヒトスジシマカが主要な媒介蚊であるが、

近年，外来種であるネッタイシマカの国内侵入例も頻発している。これまでに，シンガポールのデング熱流行地で採集されたネッタイシマカのピレスロイド抵抗性系統のペルメトリン抵抗性に関する原因遺伝子を解明するために解析法を開発し，SP 系統の代謝抵抗性要因の最有力候補を絞ることができた。2014 年のデング熱国内発生時には，殺虫剤が多用された公園や地域もあると思われることから，このような状況が続く限り，国内でのヒトスジシマカにも早晚抵抗性を示す集団が出現する可能性も危惧される。本検出法を開発したことにより，ヒトスジシマカの抵抗性遺伝子の解析が可能になることが期待できる。

本研究の成果として、「マダニ対策、今できること」と題した一般向けリーフレットを感染症研究所ホームページ上に掲載した（<http://www.nih.go.jp/niid/ja/sfts/2287-ent/3964-madanitaisaku.html>）。また，地方自治体担当者を対象にした技術研修会「蚊類調査に係る技術研修」（第 2 回：2013 年 5 月 30 日～31 日，第 3 回：2014 年 6 月 12 日～13 日）を開催した。2014 年は，国民，地方自治体へのデング熱への啓発として，国内に分布するヒトスジシマカ対策を念頭に置き「デング熱国内感染事例発生時の対応・対策の手引き 地方公共団体向け（案）」を作成し，関係機関に配布した。また，8 月末のデング熱国内発生を受け，「感染症媒介蚊対策に関する実技検討会」を愛知県衛生研究所・岡山県衛生会館（2014 年 10 月 22 日～10 月 23 日），福岡県保健環境研究所（2014 年 10 月 29 日～10 月 30 日），東京都港区保健所（平成 27 年 2 月 3 日）をはじめ，各地で開催し，前出の手引きを第 1 版に更新した。

E. 結論

1) 東日本大震災から 4 年が経過し宮城県南

部水田地帯では震災と津波被害からの復旧がほぼ完了して，2011 年に大発生していたアカイエカ群やイナトミシオカの生息密度は低下し蚊相も安定してきた。これに対して，福島県南相馬の水田地帯の復旧作業は進展が遅れており，そのため農耕地には降雨によってできた水たまりが出現して幼虫発生源となっている。コガタアカイエカとアカイエカ群の生息密度は過去 3 年間の調査で増加を続けているため，今後の密度変化に十分注意する必要がある。

2) 2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災および津波被災地では，その年にハエ類の大量発生が起こり社会問題化したが，翌 2012 年岩手県の 2 力所の瓦礫集積所ではいずれもハエ類の大量発生は確認されなかつた。2012 年には他の被災地でもハエ類が大量に発生し，問題となったとの報告や報道は皆無であった。以上のことから，大規模災害でハエ類が大量に発生し，住民に対し被害が生じた場合，行政が当該年度にしっかりととした対策を行う事が重要であり，それによって次年度以降にハエ問題が継続することは無いであろうという結論された。

3) 成田国際空港では 3 年連続してネッタイシマカの発生が確認され，本種の侵入リスクが高まっていることから，国際空港でのベクターサーベイランスの重要性が再確認された。ネッタイシマカ 1 令幼虫の発育限界温度は 10.6，4 令幼虫は 11.6 付近であると推定された。国際空港のターミナルビルは常に温度管理が行われ，ネッタイシマカの幼虫発育に必要な温度条件が満たされているため，屋外では冬季に生存できない寒冷な地域であっても，屋内に侵入すればネッタイシマカが越冬できる可能性は高い。そのため，夏季だけでなく冬季にも，空港ターミナルビル内で媒介蚊のモニタリングや発生源調査を行うことが必要である。

デング熱の推定感染場所とされた 2 つの

公園で実施した生息密度調査の結果，ヒトスジシマカの生息密度は，8 分間当たり 10.2 ± 16.5 と 11.4 ± 8.8 であった。この生息密度を一つの目安と考え，デング熱流行の予防対策として，平時から適切な幼虫対策を実施して成虫密度を 8 分あたり 10 個体の密度よりも低く保つことが必要と推測した。

4) ヒトスジシマカ成虫の各地での発生期間を把握し，防除態勢の構築期間などの基礎資料を得る目的で，2010～2014 年に 8 分間（大磯）または 6 分間（上田）の人囮法による調査を行った。その結果，飛来数が多い期間は，大磯町，上田市ともに 6 月下旬～7 月上旬以降，大磯町では 10 月上・中旬まで，上田市では 9 月中・下旬であり，この期間が成虫対策における防除重点期間と判断された。飛来期間や，飛来消長は地域によってかなり異なると考えられ，今後も日本各地での同様な調査の継続的な実施によるデータの蓄積や解析が必要と判断された。

5) 長野県内の 72 地点に CO_2 トランプを設置しヒトスジシマカ成虫の生息調査を行った。ヒトスジシマカ幼虫については，全 54 地点 128 ポイントで調査した。合計 139 個体の成虫が CO_2 トランプで捕獲された（23.4%）。ヒトスジシマカの平均捕獲数は，1.7 個体/トランプ/日であった。特に飯田市，上田市は平均捕獲数が多かった。軽井沢町，上高地，菅平高原，上田市真田地区など，標高が 800 m を超える地域では，幼虫も成虫も捕獲されなかった。白馬村，大町市，東御市，諏訪市，岡谷市では，極めて成虫の捕獲数が少なかった。これらの地域においては，今後モニタリング調査が必要であると思われる。

6) 2012～2014 年に実施した岩手県におけるヒトスジシマカの生息分布調査の結果，盛岡市市街地では，その生息分布が着実に拡大していることがわかった。2009 年に初め

て採集され 2010 年に拡散と定着が推定された仙北町，下ノ橋町では引き続きヒトスジシマカが採集されており，また，2013 年に初めて確認された下ノ橋町より北西に位置する天昌寺町でも，2014 年にもヒトスジシマカが確認された。東北地方の主要幹線道路が貫通し県庁所在地でもある盛岡市では，生息地からのヒトスジシマカの移入も頻繁で，温暖化や，ヒトスジシマカの生態的適応や社会・経済的環境の変化に伴い分布の北上・定着を繰り返しつつ，徐々に北上を続けていると考えられる。特に盛岡市の中心部への定着も懸念されることから，今後とも生息状況を確認することは，防除対策上重要である。

7) 国内 1 道 7 県で行った蚊相調査で，合計 10 属 44 種 4,780 個体を採集した。成虫はアカイエカが最も多く，幼虫はヤマトヤブカが最も多く採集された。熊本県と和歌山県では 20 種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。北海道，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。九州地方では，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。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，これまでに 21 種の解析が終了した。未解析の試料は順次解析を進めており，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。それと並行して，古いサンプルからの DNA 抽出方法も検討し，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。

8) 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タタイ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、ネッタタイイエカを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できると考えられる。アカイエカとネッタタイ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タタイイエカの境界地域で遺伝的な変異でだけでなく形態的・生態的特徴と合わせて検討する必要がある。

9) 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。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、吸血蚊も多数採集されたことから、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。

10) 2011年に石川・熊本、2012年に長崎・群馬、2013年に長崎の各県下の豚舎を含む畜舎で捕集されたコガタアカイエカからウイルス分離を行なった。2012年および2013年の長崎県捕集蚊のそれぞれ1プールからJEVが分離された(2012年:プール陽性率; 2.4%, MIR; 1.06, 2013年: プール陽性率; 2.2%, MIR; 0.89)。E領域の配列解析から、

それらは、近年日本を含めた東アジア地域で多く検出されているI型のウイルスと遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなつた。豚舎を含む畜舎周辺で捕集されたコガタアカイエカはJEVを高率で保有する可能性があり、ブタと蚊の感染状況からJEVが蔓延していると推測される地域では、ヒトへの感染リスクが高くなっていると考えられる。

11) JEVのNS4A遺伝子領域に焦点を当て、近年の野外分離株の遺伝子解析を行った。約20%が高病原性型である3-Ile型株であった。3-Ile型の分離株計5株のin vitroでの増殖性を調べた。哺乳動物由来株化細胞において差異は認められなかつたが、蚊由来細胞C6/36細胞において数倍の差異が観察された。上記の株についてマウスに対する病原性を比較したところ、1株が他の3-Ile株に比べ有意に低い病原性を示した。

現在国内に蔓延しているI型JEVに対してもIII型から製造された日本脳炎現行ワクチンは有効であると考えられた。一方、V型JEVに対する現行の日本脳炎ワクチンの中和効果は、I型・III型JEVに比べて弱い可能性が示唆された。V型ウイルスは強い病原性を維持している可能性も示唆され、今後も注意深く監視を続けることが重要である。

12) 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。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つたオルビウイルス属ウイルスおよびフレボウイルス属ウイルスをマダニより分離した。

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していく必要性が示唆された

13) *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。

14) 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連関している。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。

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。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と結論された。

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。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。国内でトコジラミ *p-Ace* F348 (331)Y 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。

15) QTL 解析によって、ピレスロイド抵抗性系統 (SP 系統) におけるペルメトリンの代謝量増大に関連する遺伝子は、第 1 染色体上にあることが示された。候補となるシトクロム P450 遺伝子は 8 個存在しており、その内 *CYP6AA5v2* は SP 系統でのみ発現しており、最有力候補として挙げられる。

16) 島根県の定点調査では、キチマダニが

ほぼ全調査期間を通して採集されたが、6 月下旬から 8 月上旬にかけては、ヤマアラシチマダニがキチマダニよりも多く採集された。この結果から、日本紅斑熱の媒介者であると推測されているヤマアラシチマダニは、夏季に注意すべき種であることが示された。広島県の定点調査では 9 月中旬から 10 月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ劇的に変化した。ニホンジカ生息地では春から秋にかけてフタトゲチマダニの密度が非常に高くなることから、この時期にニホンジカ生息地を訪れる際にはフタトゲチマダニによる刺症に注意することが望ましいといえる。

17) 2013 年 10 月～11 月、および 2014 年 5 月に、調査地 1 か所につき、一人 30 分間のフランネル法により捕集されたマダニの捕集数と種構成を比較した。調査実施者の技術の優劣は、本法にはほとんど影響しないことが確認された。距離的に近い調査地であっても採集数や種構成が異なり、季節によって種構成や捕集数が異なる地点が多かった。これら基礎情報に加え、野生動物の分布や植生等の環境要因も考慮し、SFTS ウィルスのヒトへの感染リスクを評価することが必要である。

以上の研究により、感染症媒介節足動物に対する総合的な厚生労働行政施策を策定するための科学的基盤および情報基盤の構築に貢献する。

F. 健康危険管理情報

なし

G. 研究発表

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)
- Kuwata R., Isawa H., Hoshino K., Sasaki T., Kobayashi M., Maeda K., Sawabe K. Analysis of mosquito- borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* cells persistently infected with Culex flavivirus. J. Med. Entomol. (In press).
- Hirabayashi K., Takeda M., Tsuda Y. Tow-year aftereffects of Tsunami on abundance of mosquitoes in suburban Sendai Area in Miyagi Prefecture, Japan in 2013. Entomological Research Bulletin. 30(2) (In print).
- Arima Y., Matsui T., Shimada T., Ishikane M., Kawabata K., Sunagawa T., Kinoshita H., Takasaki T., Tsuda Y., Sawabe K., Oishi K. 2014. Ongoing local transmission of dengue in Japan, August to September 2014. WPSAR, 5(4). doi:10.5365/wpsar.2014.5.3.007
- Hirabayashi K., Takeda M., Nihei N., Kobayashi M., Tuda Y., Sawabe K. 2014. Distribution of *Aedes albopictus* mosquitoes in an inland climate mountain area, Nagano Prefecture, Japan. Proceedings of the 8th International Conference on Urban Pests, Gabi Muller, Reiner Pospischil and William H Robinson (Edits.) Printed by OOK-Press Kft., H8200 Veszrem, Papai u.37/A, Hungary. 125-129.
- Kobayashi M., Komagata O., Yonejima M., Maekawa Y., Hirabayashi K., Hayashi T., Nihei N., Yoshida M., Tsuda Y., Sawabe K. 2014. Retrospective search of dengue vector mosquito, *Aedes albopictus* in area visited by a German traveler that has contracted dengue Disease. Int. J. Infect. Dis., 26: 135-137.
- Tsuda Y., Hayashi T. 2014. Results of mosquito surveillance using dry-ice traps from 2003 to 2013 at the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan. Med. Entomol. Zool., 65: 131-137.
- Ejiri H., Kuwata R., Tsuda Y., Sasaki T., Kobayashi M., Sato Y., Sawabe K., Isawa H. 2014. First isolation and characterization of a mosquito-borne orbivirus belonging to the species *Umatilla virus* in East Asia. Arch. Virol., 159: 2675-2685.
- Takeshita N., Lim CK, 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., 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, 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., 159(7): 1687-1696.
- Hirata K., Komagata O., Itokawa K., Yamamoto A., Tomita T., Kasai S. 2014. A single crossing-over event in voltage-sensitive Na^+ channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides. PLoS Negl. Trop. Dis. 8, e3085.
- 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: 620- 626.

Kuwata R., Satho T., Isawa H., Yen NT., Phong TV., Nga PT., Kurashige T., Hiramatsu Y., Fukumitsu Y., Hoshino K., Sasaki T., Kobayashi M., Mizutani T., Sawabe K. 2013. Characterization of Dak Nong virus, an insect nidovirus isolated from *Culex* mosquitoes in Vietnam. Arch. Virol., 158: 2273-2284.

Kuwata R., Nga P.T., Yen N.T., Hoshino K., Isawa H., Higa Y., Hoang N.V., Ttang B.M., Loan D.P., Phong T.V., Sasaki T., Tsuda Y., Kobayashi M., Sawabe K., Takagi M. 2013. Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008. Am. J. of Trop. Med. Hyg., 88: 681-688.

Obara-Nagoya M., Yamauchi T., Watanabe M., Hasegawa S., Iwai-Itamochi M., Horimoto E., Takizawa T., Takashima I., Kariwa H. 2013. Ecological and genetic analyses of the complete genomes of *Culex* flavivirus strains isolated from *Culex tritaeniorhynchus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) group mosquitoes. J. Med. Entomol., 50: 300-309.

Yamaguchi Y., Nukui Y., Kotaki A., Sawabe K., Saijyo M., Watanabe H., Kurane I., Takasaki T., Tajima S. 2013. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. J. Gen. Virol., 94: 90-96, 2013.

Wong K.T., Ng K.Y., Ong K.C., Ng W.F., Shankar S.K., Mahadevan A., Radotra B., Su I.J., Lau G., Ling A.E., Chan K.P., Macorell P., Vallet S., Cardosa M.J., Desai A., Ravi V., Nagata N., Shimizu H., Takasaki T. 2012. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA. Neuropath. Appl. Neurobiol., 38:

443-453.

Kuwata R., Hoshino K., Isawa H., Tsuda Y., Tajima S., Sasaki T., Takasaki T., Kobayashi M., Sawabe K. 2012. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). In Vitro Cellular & Developmental Biology, 48(6): 369-376.

小林睦生 . 2015 . ヒトスジシマカとデング熱 - 2014 年の騒動より学ぶこと . ペストコントロール , 169: 18-25 .

沢辺京子 . 2015 . SFTS 対策に向けたマダニ類の全国調査 . ペストコントロール , 169: 33-39 .

渡辺護 . 公衆衛生学的視点からみた三陸海岸被災地におけるハエと力の大発生 . 2014 . CLEAN LIFE , 2014 年号: 19-26 .

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 . 化学療法の領域 , 30 (2): 106-113.

沢辺京子 . 2014. 日本脳炎ウイルスの国内越冬と海外飛来 . 化学療法の領域 , 30: 39-49.

沢辺京子 . 2014 . わが国におけるマダニ類の分布状況について . マダニを取り巻く環境と SFTS , 生活と環境 , 699: 18-22.

津田良夫 , 助廣那由 , 梅澤昌弘 , 稲垣俊一 , 村上隆行 , 木田中 , 土屋英俊 , 丸山浩 , 沢辺京子 . 2013 . 成田国際空港におけるネッタイシマカの越冬可能性に関する実験的研究 . 衛生動物 , 65: 209-214.

白鳥 (田島) 茂 , 高崎智彦 . わが国と世界の日本脳炎の現状と問題点 . 2013 . 小児内科 , 予防接種 Q&A 改訂第 3 版 , 第 45 卷増刊号 432-437.

高崎智彦 . 2013 . 感染症ワクチン：最近の話題，課題「日本脳炎」. BIO Clinica , 28: 332-336.

白鳥(田島)茂, 高崎智彦 . 2012 .「日本脳炎ワクチンの品質管理」臨床とウイルス , 40: 297-305 .

学会発表

1. 国際学会

Hirabayashi K., Takeda M., Tsuda Y. 2014. After-effects of Tsunami on distribution of mosquitoes in the suburbs of Sendai City in Miyagi Prefecture, Japan in 2013. The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia. June 5-7, Busan, Korea.

Hirabayashi K., Takeda M., Nihei N., Kobayashi M., Tuda Y., Sawabe K. 2014. Distribution of *Aedes albopictus* mosquitoes in an inland climate mountain area, Nagano Prefecture, Japan. The 8th International Conference on Urban Pests. July 20-23, Zurich, Switzerland.

Lim C.K., Moi M.L., Kotaki A., Saijo M., Kurane I., Takasaki, T. 2012. Molecular diagnosis and analysis of imported chikungunya virus strains, Japan, 2006-2011. The 9th Japan-China International Conference of Virology. June 12-13, Sapporo, Japan.

Komagata O., Kasai S., Itokawa K., Tomita T. 2012. Proliferation of pyrethroid-resistant bed bugs in Japan, 24th International Conference of Entomology. August 19- 25, Daegue, Korea.

Kobayashi M., Komagata O., Nihei N. 2012. Future prospect of northern expansion of *Aedes albopictus* in Japan. Symposium S1303 Impact of climate change and natural disaster in arthropod vector, XXIV International Congress of Entomology. August 19-25, Daegue, Korea.

Kasai S., Tabaru Y., Kobayashi M. 2012. Outbreak of medically important pest insect in

Tsunami affected areas in Tohoku Distric, Japan. Symposium S1303 Impact of climate change and natural disaster in arthropod vector, XXIV International Congress of Entomology. August 19-25, Daegue, Korea.

Itokawa K., Komagata O., Kawada H., Tomita T. 2012. Spread of overexpressing *CYP9M10* (cytochrome P450) haplotypes in southern house mosquito and its possible implication for vector control. Symposium S1306 Insecticide Resistance in Medically Important Insects, XXIV International Congress of Entomology. August 19-25, Daegue, Korea.

Komagata O., Kasai S., Itokawa K., Tomita T. 2012. Proliferation of pyrethroid-resistant bed bugs in Japan. Symposium S1306 Insecticide Resistance in Medically Important Insects, XXIV International Congress of Entomology. August 19-25, Daegue, Korea.

Bertuso A.G., Kobayashi M., Sawabe K. 2012. Molecular evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Pediculidae: Anoplura) infesting young people in selected villages in Laguna province, Philippines. S1307 *Bartonella* in arthropod vectors, XXIV International Congress of Entomology. August 19-25, Daegue, Korea.

Imanishi N., Takai K., Kim K.S., Tsuda Y., Kobayashi M., Itoyama K., Sawabe K. 2012. Morphological and molecular phylogenetic studies on a novel anopheline species collected in Kushiro wetland, northern Japan. XXIV International Congress of Entomology. August 19-25, Daegue, Korea.

Lim C.K., Kotaki A., Omatsu T., Moi M.L., Kurane I., Saijo M., Takasaki T. 2012. 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, Rio de Janeiro, Brazil.

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

2. 国内学会

武藤敦彦, 平林公男, 沢辺京子, 小林睦生, 富田隆史. 神奈川県大磯町および長野県上田市におけるヒトスジシマカ成虫の5年間(2010~2014年)の発生消長. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

平林公男, 武田昌昭, 中山貴雄, 津田良夫, 二瓶直子, 小林睦生, 沢辺京子. 長野県内におけるヒトスジシマカの分布. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一, 渡辺護, 平林公男, 鍋田龍星, 前田健, 岩永史朗, 安藤勝彦, 鎮西康雄, 佐藤智美, 前川芳秀, 林利彦, 佐々木年則, 小林睦生. SFTS対策に向けたマダニ類の全国調査. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

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

津田良夫, 石田恵一, 打田憲一, 沢辺京子. 東日本第震災の津波被災地における疾病媒介蚊発生状況調査: 宮城県南部水田地帯と福島県南相馬市における被災4年目の状況. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

津田良夫. ヒトスジシマカの生息密度調査に基づくデング熱感染リスク評価と媒介蚊

対策. 第67回日本衛生動物学会大会 緊急シンポジウム, 2015年3月, 金沢市

渡辺護, 渡辺はるな, 沢辺京子. 東日本第震災の津波被災地における被災4年目の蚊の発生状況. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

佐藤卓, 西井和弘, 二瓶直子, 小林睦生. 岩手県におけるヒトスジシマカの分布とその生息条件の推移. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

小林睦生, 二瓶直子, 西井和弘, 佐藤卓, 小川浩平, 沢辺京子. 東北地方におけるヒトスジシマカの分布と20年間の年平均気温11以上の確立との関係. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

小川浩平, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ネッタイシマカのペルメトリン解毒代謝酵素に関するQTL解析. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

橋本知幸, 沢辺京子. 神奈川県および山梨県におけるマダニの発生消長調査事例. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

江尻寛子, 伊澤晴彦, 林昌宏, 小滝徹, 高崎智彦, 林利彦, 佐々木年則, 小林睦生, 西條政幸, 沢辺京子. 国内で捕集されたマダニから分離されたオルビウイルスの性状解析. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

小林睦生, 前川芳秀, 山内健生, 野田伸一, 二瓶直子, 沢辺京子. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)患者が発生した地域の植生の特徴. 第67回日本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

山内健生，石原貴子，沢辺京子. 鳥取県，島根県，広島県におけるマダニ定点調査 . 第 67 回日本衛生動物学会大会，2015 年 3 月，金沢市

佐藤智美，山内健生，林利彦，前川芳秀，小川浩平，佐々木年則，小林睦生，糸山享，沢辺京子. 環境の異なる地域におけるマダニ相および植生解析，2015 年 3 月，金沢市

佐々木年則，伊藤航人，久保田眞由美，山岸拓也，川崎麻紀，十菱大介，平尾磨樹，伊澤晴彦，足立智英，大石和徳，柴山恵吾，澤邊京子. 2012 年から 2014 年におけるシラミ媒介性細菌 *Bartonella quintana* の疫学研究 . 第 67 回日本衛生動物学会大会，2015 年 3 月，金沢市

沢辺京子 . 東京都内で実施したデング熱媒介蚊対策 . 特別講演：衛生害虫の最新情報と動向 . 第 30 回日本ペストロジー学会大会，2014 年 11 月，新潟市

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，Moi Meng Ling，林昌宏，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦 . 遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルス株に対する日本脳炎ワクチンの中和効果 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会，2014 年 11 月，横浜市

平林公男 . デング熱媒介蚊ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* の吸血飛来時間帯 . 第 26 回環動昆大会，2014 年 11 月，長崎市

武田昌昭，市川誠，中山雄貴，平林公男長野県北部（飯山地方）の蚊相について（予報）. 第 40 回日本陸水学会甲信越支部大会，2014 年 11 月，安曇野市

武田昌昭，中山雄貴，市川誠，平林公男，二瓶直子，小林睦生，津田良夫，沢辺京子 . 長野県北信地方（白馬村，大町市）における蚊相の研究 . 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

る蚊相の研究 . 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

佐藤智美，林利彦，前川芳秀，糸山享，沢辺京子 . 神奈川県厚木市におけるマダニ相および植生調査 . 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

渡辺護，渡辺はるな，沢辺京子 . 筑前高田市における蚊の発生状況，4 年間の変遷 . 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

谷川力，山内雅充，石原新市，富岡康浩，木村吾朗，田中和之，駒形修，津田良夫，沢辺京子 . 2014 年千葉市稻毛区におけるデング熱媒介ヒトスジシマカの防除事例 . 緊急企画：デング熱媒介蚊についての現状と今後の対策について . 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

沢辺京子 . 2014 年東京都で発生したデング熱の国内感染事例 . シンポジウム . 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

江尻寛子，鍬田龍星，伊澤晴彦，佐々木年則，津田良夫，林利彦，小滝徹，高崎智彦，小林睦生，沢辺京子 . 国内で捕集された蚊およびマダニから分離されたオルビウイルスの性状解析 . 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014 年 5 月，山口市

沢辺京子，山内健生，橋本知幸，野田伸一，渡辺護，鍬田龍星，前田健，佐藤智美，前川芳秀，林利彦，小林睦生 . マダニ相に関する国内調査 . 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014 年 5 月，山口市

田島茂，谷ヶ崎和美，小滝徹，中山絵里，モイメンリン，西條政幸，倉根一郎，高崎智彦 .

日本脳炎ウイルス遺伝子型I型，Ⅱ型およびV型株に対する不活化日本脳炎ワクチンの効果.第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014年5月，山口市

小川浩平，糸川健太郎，駒形修，葛西真治，富田隆史. ネッタイシマカペルメトリン抵抗性に関する量的形質遺伝子座の探索. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会，2014 年 3 月，高知市

津田良夫，石田恵一，助廣那由，打田憲一，澤辺京子. 東日本大震災の津波被災地における疾病媒介活性状況調査：宮城県南部水田地帯と福島県南相馬市における被災 3 年目の状況. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

渡辺護，渡辺はるか，沢辺京子. 日本大震災被災地における 3 年目の蚊の発生調査、発生は落ち着いたか？第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

助廣那由，木田中，梅澤昌弘，村上隆行，信太歩，神内恒貞，稻垣俊一，土屋英俊，三宅智，津田良夫. 成田国際空港におけるネッタイシマカの侵入事例について(続報). 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

前川芳秀，津田良夫，星野啓太，沢辺京子. 日本産蚊の分布ならびに蚊相に関する全国調査. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

小林睦夫，西井和弘，二瓶尚子，沢辺京子. 東北地方におけるヒトスジシマカの分布拡大とヤマダシマカの分布との関係. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

小林睦生，橋本知幸，林利彦，沢辺京子.

都市部の公園にマダニ類は生息するか. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

前川芳秀，小林睦生，安藤勝彦，鎮西康雄，林利彦，二瓶直子，沢辺京子. 2013 年 10 月伊勢志摩地方におけるマダニ相と生息環境調査. 2014 年 3 月，岐阜市

野田伸一，小林睦生，林利彦，沢辺京子. 鹿児島県薩摩半島におけるマダニ類の季節消長. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

山内健生，渡辺護. 富山県の市街地植生上で採集したマダニ類. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

佐藤智美，林利彦，糸山享，沢辺京子. 2013 年から 2014 年の神奈川県厚木市におけるマダニ類の季節消長調査. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

沢辺京子，山内健生，橋本知幸，野田伸一，渡辺護，平林公男，鍬田龍星，前田健，安藤勝彦，鎮西康雄，佐藤智美，前川芳秀，林利彦，小林睦夫. 2013 年晚秋に実施したマダニ相に関する国内調査. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

小林大介，伊澤晴彦，江尻寛子，佐々木年則，砂原俊彦，二見恭子，吉川亮，松本文昭，吾郷昌信，津田良夫，鍬田龍星，田島茂，皆川昇，小林睦生，太田伸生，沢辺京子. 2012 年に国内で捕集されたコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* のウイルス保有状況調査. 第 66 回日本衛生動物学会大会. 2014 年 3 月，岐阜市

駒形修，糸川健太郎，小川浩平，葛西真治，數間亨，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

畠田隆史 , 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

畠田隆史 , 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 , 數間亨 , 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

永井義 , 瑞慶覧光 , 山寄健人 , 武田昌昭 , 平林公男 . 長野県中部地域における感染症媒介蚊の分布調査 (予報) . 第 39 回日本陸水学会甲信越支部大会 . 2013 年 12 月 , 北杜市清里

平林公男 , 山本優 , 津田良夫 . 津波被災地における沼沢池の塩分濃度の違いがユスリカ類の発生に与える影響 . 第 39 回日本陸水学会甲信越支部大会 . 2013 年 12 月 , 北杜市清里

武田昌昭 , 永井義成 , 山寄健人 , 津田良夫 , 平林公男 . 東日本大震災津波被災地における感染症媒介蚊の発生状況 : 仙台市内に焦点をあてて . 第 39 回日本陸水学会甲信越支部大会 . 2013 年 12 月 , 北杜市清里

武田昌昭 , 瑞慶覧光 , 平林公男 , 二瓶直子 , 小林睦生 , 沢辺京子 . 長野県南信地方における蚊相の研究 . 第 29 回ペストロジー学会 . 2013 年 11 月 , 岐阜市

渡辺護 , 渡辺はるな . 津波被災地において何故ハエ類と蚊類の多量発生が起こったの

か ? 第 29 回ペストロジー学会大会 . 2013 年 11 月 , 岐阜市

山内健生 , 名古屋真弓 , 渡辺護 , 稲崎倫子 , 滝澤剛則 . 富山県の市街地に生息するマダニ類 . 第 29 回日本ペストロジー学会大会 . 2013 年 11 月 , 岐阜市

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 ウィ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. 第 61 回日本ウィルス学会学術集会, 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 回日本ウィルス学会学術集会. 2013 年 11 月, 神戸市

田島茂, 小滝徹, 谷ヶ崎和美, 小林大介, 谷脇妙, 沢辺京子, 高崎智彦. Flap 配列を付加したフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーの評価とゲタウイルス検出の実例について. 第20回トガ・フラビ・ペストウイルス研究会 2013 年 11 月, 神戸市

渡辺護, 渡辺はるな, 沢辺京子. 東日本大震災被災地の石巻市における蚊の発生状況. 第 65 回日本衛生動物学会東日本支部大会. 2013 年 10 月, 川口市

平林公男, 山本優, 津田良夫. 東日本大震災の津波被災地域から発生するユスリカ類 - 仙台空港周辺、ならびに南相馬地域に焦点をあて. 第65回日本衛生動物学会東日本支部大会. 2013年10月, 川口市

山内健生, 名古屋真弓, 渡辺護, 稲崎倫子, 滝澤剛則. 富山県の市街地に生息するマダニ類. 日本昆虫学会第 73 回大会. 2013 年 9 月, 札幌市

沢辺京子, 今西望, 鍬田龍星, 伊澤晴彦, 佐々木年則, 新井智, 小林睦生, Nga PT., Phong TV., Yen NT. アジアにおける日本脳炎媒介蚊 *Culex vishnui* subgroup の季節消長とウィルス保有について. 第 48 回日本脳炎

ウイルス生態学研究会. 2013 年 5 月, 熱海市

江尻寛子, 伊澤晴彦, 津田良夫, 鍬田龍星, 石田恵一, 小林睦生, 佐々木年則, 沢辺京子. 2011 年から 2012 年にかけて国内で捕集された蚊のウィルス保有状況の調査. 第 48 回日本脳炎ウイルス生態学研究会. 2013 年 5 月, 熱海市

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

渡辺護, 渡辺はるな, 沢辺京子. 東日本大震災被災地における 2 年目の蚊の発生状況. 第 64 回日本衛生動物学会大会. 2013 年 4 月, 江別市

平林公男, 武田昌昭, 二瓶直子, 小林睦生, 沢辺京子. 中央高地型気候地域におけるヒトスジシマカの分布とその要因. 第65回日本衛生動物学会大会. 2013年4月, 江別市

佐々木年則, 久保田眞由美, 澤邊京子, 平山幸雄, 鍬田龍星, 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* 痘学研究. 第 65 回日本衛生動物学会大会. 2013 年 4 月, 江別市

沢辺京子, Arlene G. Bertuso, 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* 遺伝子保有調査. 第 65 回日本衛生動物学会大会. 2013 年 4 月, 江別市

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 ,

田島茂 , 西條政幸 , 倉根一郎 , 高崎智彦 . デンゲウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染細胞における細胞側遺伝子発現動態の網羅的解析 . 第 19 回トガ・フラビ・ペストウイルス研究会 . 2012 年 11 月 , 大阪市

田島茂 , 山口幸恵 , 小滝徹 , 新井智 , 沢辺京子 , 西條政幸 , 倉根一郎 , 高崎智彦 . 日本脳炎ウイルス NS4A 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

林 昌宏 , 綱 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靈長類モデルの検討 , 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 : 乾燥組織培養不活性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

谷口敬敏 , 渡辺 譲 . 高湿度環境下におけるトコジラミの観察 . 第 28 回ペストロジー学会 . 2012 年 11 月 , 神戸市

渡辺 譲 , 渡辺はるな . 津波被災地における 2012 年の蚊の発生状況 . 第 28 回ペストロジー学会 . 2012 年 11 月 , 神戸市

武田昌昭 , 平林公男 . 長野県軽井沢町における蚊相の調査 (予報) . 第 28 回ペストロジー学会 . 2012 年 11 月 , 神戸市

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

渡辺 譲 , 渡辺はるな , 沢辺京子 . 陸前高田市と気仙沼市における 2011 年と 2012 年の蚊発生状況の比較 . 第 64 回日本衛生動物学会東日本支部大会 . 2012 年 10 月 , 川崎市

平林公男 . 長野県上田市一般民家におけるヒトスジシマカの発生動態 (第 2 報) . 第 64 回日本衛生動物学会東日本支部大会 . 2012 年 10 月 , 川崎市

渡辺 譲 , 渡辺はるな , 沢辺京子 . 被災地においてなぜ 2012 年はハエの発生が少なかったか? 第 67 回日本衛生動物学会西日本支部大会 . 2012 年 10 月 , 伊勢市

渡辺 譲，渡辺はるな．津波被災地における 2012 年の衛生害虫の発生状況および発生予測．北陸病害動物研究会第 30 回大会．2012 年 6 月，坂井市

山口幸恵，小滝徹，新井智，沢辺京子，倉根一郎，西條政幸，高崎智彦，田島茂．非構造蛋白質 NS4A に着目した日本脳炎ウイルスの分子疫学的解析．第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会．2012 年 5 月，阿蘇市

沢辺京子，新井智，大塚彰，松村正哉，衛藤友紀，梁瀬徹，井上英明，今西望，Sudipta Roychoudhury，鍬田龍星，多屋馨子，小林睦生．コガタアカイエカの海外からの飛来とその飛翔能力の評価．第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会．2012 年 5 月，阿蘇市

鍬田龍星，伊澤晴彦，星野啓太，佐々木年則，小林睦生，沢辺京子．Culex flavivirus 持続感染コガタアカイエカ細胞に対する蚊媒介性フラビウイルスの重複感染．第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会．2012 年 5 月，阿蘇市

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

H. 私的財産権の出願・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

東日本大震災津波被災地における疾病媒介蚊の発生状況に関する研究

分担研究者	津田良夫	国立感染症研究所
協力研究者	石田恵一 打田憲一 山内 繁 助廣那由 梅澤昌弘 柳 大樹 新妻 淳 岡本徳子	仙台検疫所 仙台検疫所 仙台検疫所 成田空港検疫所 成田空港検疫所 成田空港検疫所 東京検疫所 東京検疫所

研究要旨

宮城県南部水田地帯と福島県南相馬市の沿岸部水田地帯を対象として、東日本大震災で津波被害を受けたエリアと被害を受けなかったエリアの蚊の発生状況を調べた。宮城県南部の津波被災地では、2011年～2014年の4シーズンで、10種類 15,050個体、非被災地では11種類 1,966個体の成虫が捕獲された。津波被災地では2011年にアカイエカ群とコガタアカイエカ、イナトミシオカの大発生が認められた。その後アカイエカ群、イナトミシオカともに平均密度は年々低下して、非被災地との密度の差が小さくなってきた。コガタアカイエカは被災地の平均密度の方が高い傾向があるものの、個体数の年変動が大きく安定していなかった。

福島県南相馬の津波被災地では、3シーズンで12種類 20,202個体、非被災地では15種類 1,233個体の成虫が捕獲された。宮城県南部とは異なり、この地域の津波被災地では、アカイエカとコガタアカイエカの平均密度は年々増加していた。イナトミシオカの平均密度は0.37～5.28の間で変動していたが、3年間ほぼ同じレベルを保っていた。この地域の蚊の発生には今後も注意が必要である。

A. 研究目的

2011年3月11日に起きた東日本大震災では、巨大地震とそれによって引き起こされた巨大津波によって、東北地方の太平洋沿岸を中心として甚大な人的被害と環境破壊がもたらされた。環境の劇的な変化がこの地域に生息する蚊に対しても大きな影響を与えたことはまちがいないが、幼虫の発生水域が破壊され消失する一方で陥没などによる地形の変化が新たな発生水域の出現につながるため、疾病媒介蚊の発生量と分布がどのように影響されたかを予測すること

は非常に難しい。このような過去に例を見ない著しい環境変化の中で、疾病媒介蚊の分布と発生量がどのように変化していくかを詳細に調査し、科学的な記録を残すことは非常に重要な課題であると考えて、2011年から2014年まで、主として宮城県南部水田地帯と福島県南相馬の水田地帯を対象とした現地調査を継続してきた。

B. 研究方法

調査地は宮城県南部水田地帯（主として岩沼市）と福島県南相馬市の沿岸部水田地

帯を対象として、津波被害を受けたエリアと被害を受けなかったエリアで成虫調査並びに幼虫調査を実施した。調査期間は2012年5月～9月、2013年6月～9月、2014年7、8月で、原則として毎月1回実施した。2012年には福島県南部沿岸地帯の状況を調べるために、いわき市でも6月～9月に調査を行った。

調査方法は、ドライアイストラップによる成虫採集と、柄杓法による幼虫採集であった。乾電池駆動式の吸引トラップの脇に1kgのドライアイスを誘引源として吊るし、24時間後に捕獲された成虫を回収した。トラップ採集は原則として、連続した2日間実施した。

幼虫採集は、各調査地の津波被災地域と津波被害を受けなかった地域（水田）のそれぞれから、合計30～90カ所の水域を選んで実施した。原則として1水域から柄杓10あるいは20杯の水を採取し、その場で水温と塩分濃度を測定した。採集された幼虫はすべて持ち帰り、アルコール標本として保存した。宮城県南部の岩沼市では津波被災水田の一部で冬季に注水と排水を繰り返す除塩作業が行われ、塩分が除去された場所では稻作が行われていた。この水田も“除塩田”として区別し幼虫採集を行った。南相馬市の津波被害を受けなかった水田では稻作がおこなわれていなかったため、代わりに約10km北西に位置する相馬市の水田地帯で幼虫採集を行った。

C. 研究結果

宮城県南部の津波被災地では、2011年～2014年の4シーズンで、10種類15,050個体、これに対して非被災地では11種類1,966個体の成虫が捕獲された。津波被災地では2011年にアカイエカ群とコガタアカイエカ、イナトミシオカの大発生が認められた。しかしながら、アカイエカ群、イナトミシオカとともに平均密度は年々低下して、非被災地との密度の差が小さくなってきた（表1）。

コガタアカイエカは被災地の平均密度の方が高い傾向があるものの、個体数の年変動が大きく安定していなかった。

福島県南相馬の津波被災地では、2012年～2014年の3シーズンで、12種類20,202個体、非被災地では15種類1,233個体の成虫が捕獲された。宮城県南部とは異なり、この地域の津波被災地では、アカイエカとコガタアカイエカの平均密度は年々増加している（表2）。イナトミシオカの平均密度は0.37～5.28の間で変動していたが、ほぼ同じレベルを保っていた。過去3シーズンの蚊密度の増加は非被災地でも観察された。

いわき市における2012年の蚊の発生状況では、津波被災地と非被災地で大きな違いは認められなかった。違いが見られたのは8月のアカイエカ群の密度で、しかも、非被災地の密度の方が高い結果だった。

幼虫が発生していた水域の割合は、宮城県南部の場合年々変化していた。変化の傾向は津波被災地と非被災地とで異なり、津波被災地では2011年の62%から毎年減少して、2014年には25%に達した。一方非被災地では幼虫が採集された水域の割合は年々高くなり、2011年5.1%から2014年には30.4%に達した。福島県南相馬市の水域における幼虫発生割合は津波被災地で37～53%，非被災地では57～91%を示し、常に非被災地の水域（水田）の方が幼虫の発生頻度は高かった。成虫密度が激減したイナトミシオカの場合、幼虫が発生していた水域の割合は宮城県で15.3%（2011年）から3.1%（2014年）に変化した。福島県南相馬でもこれと似た変化が観察された。

D. 考察

津波被害を受けた農耕地の復旧度合いは地域によって大きく異なっている。宮城県南部の水田地帯は復旧作業の進展が早く、2011年の津波によって海岸線に多数出現した塩性湿地は2014年にはほぼすべて消滅した。これに対して、福島県南相馬市の海

岸線の農耕地では、津波によって運ばれたり破壊された建造物の瓦礫の除去は概ね完了したが、用水路や取水用のポンプの復旧はほとんど行われていない。このような復旧度合いの違いが蚊相の変化にも反映していると思われる。

津波被害によって起きたイナトミシオカの大発生は、大地震と津波による多数の塩性湿地の出現を背景としていた。宮城県南部では復旧作業が進みイナトミシオカの主要発生源であった塩性湿地が埋め立てられ、用水路が整備され農耕地からは水溜りがなくなった。このことが、本種の生息域の縮小と成虫密度の低下をもたらしたと推測される。また同じ理由でアカイエカ群の成虫密度も年々低下しているように思われる。コガタアカイエカの場合、イナトミシオカやアカイエカ群のようなはっきりした密度変化は認められなかった。恐らくコガタアカイエカは飛翔能力が高いために、津波によって新しく出現した水域以外にも好適な発生源を利用することができ、そのことが津波の影響を小さくしたのではないかと思われる。宮城県南部の調査地に関する限り、被災地全体の蚊の平均密度は年々低下しており、農耕地の復旧が進み幼虫発生源も激減しているので、この地域の蚊相は安定な状態に達しつつあるように思われる。

福島県南相馬市の津波被災地は復旧作業が遅れており、そのため農耕地には降雨によって水溜りが出現する。この水溜りはボウフラの発生源となりうるのだが、発生水域の存続は降雨と水の浸透・蒸発のバランスに大きく依存しているため、やや不安定な発生源となっていると推察される。コガタアカイエカとアカイエカ群は本研究を実施した3シーズンで増加傾向を示しているため、今後の密度変化には十分注意する必要があると思われる。

E. 結論

東日本大震災から4年が経過し宮城県南部水田地帯では震災と津波被害からの復旧がほぼ完了して、2011年に大発生していたアカイエカ群やイナトミシオカの生息密度は低下し蚊相も安定してきた。これに対して、福島県南相馬の水田地帯の復旧作業は進展が遅れており、そのため農耕地には降雨によってできた水たまりが出現してボウフラの発生源となっている。コガタアカイエカとアカイエカ群の生息密度は過去3年間の調査で増加を続けているため、今後の密度変化に十分注意する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

津田良夫、石田恵一、山内繁、新妻淳、助廣那由、梅澤昌弘、柳大樹、岡本徳子、沢辺京子。2013.東日本大震災の津波が蚊の分布と発生数に与えた影響：宮城県南部水田地帯と福島県沿岸部における2012年の調査結果。衛生動物, 4: 175-181.

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

津田良夫、石田恵一、山内繁、新妻淳、助廣那由、梅澤昌弘、柳大樹、岡本徳子。東日本大震災の津波被災地における疾病媒介蚊の発生状況：宮城県南部水田地帯と福島県2地域における2012年の調査結果。第65回日本衛生動物学会大会, 2013年4月5-7日, 江別市

津田良夫、石田恵一、助廣那由、打田憲一、澤辺京子。東日本大震災の津波被災地における疾病媒介蚊発生状況調査：宮城県南部

水田地帯と福島県南相馬市における被災 3
年目の状況 . 第 66 回日本衛生動物学会大会 ,
2014 年 3 月 21-23 日 , 岐阜市

津田良夫 , 石田恵一 , 打田憲一 , 澤辺京子 .
東日本第震災の津波被災地における疾病媒
介蚊発生状況調査 : 宮城県南部水田地帯と
福島県南相馬市における被災 4 年目の状況 .
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

表1 宮城県南部水田地帯で採集された成虫の種類とその平均密度 (/トラップ/日)

種類	非被災地域				被災地域			
	2011	2012	2013	2014	2011	2012	2013	2014
アカイエカ群	10.3	7.8	13.6	6.17	83.1	35.9	48.2	15.5
コガタアカイエカ	3.03	0.08	10.8	0.42	21.8	0.85	40.6	1.36
イナトミシオカ	0.06	0.1	0.14	0.25	30.9	15	18.4	8.96
ヒトスジシマカ	9.28	0.58	2.79	0.42	0.08	0.18	2.21	1.21
ハマダライエカ	0.06	0.13	0.32	0.17	0.04	0.15	0.36	0.29
コガタキンイロヤブカ	0	0	0	0	0	0	0.07	0
オオクロヤブカ	0.19	0	0.18	0	0	0	0	0
カラツイエカ	0.03	0	0	0	0	0.02	0.05	0
シナハマダラカ	0.03	0.03	0.14	0	0.04	0.02	0.21	0.11
キンパラナガハシカ	0	0.18	0	0	0	0	0	0
キンイロヤブカ	0.03	0	0	0	0	0	0	0
シロカタヤブカ	0	0	0	0.17	0	0	0	0
ハマダラカの一種	0	0	0	0	0.04	0.02	0	0
イエカの一種	0	0	0	0	0	0.03	0	0
合計	23.0	8.88	28.0	7.58	136.0	52.2	110.0	27.4

表2 福島県南相馬の水田地帯で採集された成虫の種類とその平均密度 (/トラップ/日)

種類	非被災地域			被災地域		
	2012	2013	2014	2012	2013	2014
アカイエカ群	2.97	4.85	19.6	33.0	52.8	298.9
コガタアカイエカ	0.14	16.9	16	1.46	133	688.1
イナトミシオカ	0	0	0.25	5.28	0.37	6.6
ヒトスジシマカ	1.39	5.85	8.75	0.85	6.1	16.5
ハマダライエカ	0.25	0.65	0.75	0.09	0.4	1.8
コガタキンイロヤブカ	0.03	4.75	0.25	0	0	0
オオクロヤブカ	0.11	0.15	0.13	0	0.97	0.5
カラツイエカ	0	0.05	1	0.02	0.1	1.5
シナハマダラカ	0	0	0.13	0	0	0.1
キンパラナガハシカ	0.08	0.2	0	0	0	0
キンイロヤブカ	0	0	0.38	0	0	0.7
シロカタヤブカ	0	0.15	0.13	0	0	0
ハマダラカの一種	0	0	0	0.04	0	0
フタクロホシチビカ	0	0.1	0	0	0	0.1
ヤマダシマカ	0	0	0.25	0	0	0
ヤマトヤブカ	0	0	0.13	0	0	0
アカツノフサカ	0	0	0	0	0	0.1
合計	4.97	33.6	47.8	40.8	194	1014.8

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

岩手県における東日本大震災被災瓦礫集積場におけるハエ類発生調査（2012年）

分担研究者	林 利彦	国立感染症研究所
協力研究者	菊池恭志	大船渡保健福祉環境センター
	木村文彦	岩手県保健福祉環境部

研究要旨

2011年3月11日に発生した東日本大震災および津波被災地では、その後ハエ類の大量発生によって周辺住民や避難所で暮らす人々に多大な被害を与える結果となった。翌2012年にもこのような被害が引き続き発生するのかを検証するため、岩手県の2カ所の瓦礫集積場でハエ類の発生調査を行った。調査地は大槌町と陸前高田市に設置された瓦礫集積場で、粘着トラップを用いて調査した。5から10月まで、月に1度1週間トラップを設置し、捕集されたハエ類の種構成と数を記録した。また、これらから特定種が大量発生していた場合に、それがどのあたりまで影響を与えるのかを調べるために、瓦礫集積場から300mた場所にもトラップを仕掛け、比較を行った。両瓦礫集積場共に採取された個体数は最高でも10数個体であった。種類も多種が採取され、特定の種類が多く発生しているという事実は確認されなかった。周辺地域との比較でも瓦礫集積場ではむしろ発生個体数は少なく、結果として2012には津波被害に起因するハエ類の大量発生は観察されなかった。大規模災害によりハエ類大量発生の問題が引き起こされたとしても、翌年にその問題が持ち越されることはないということが判明した。

A. 研究目的

2011年3月11日に発生した東日本大震災および津波被災地では、流出した水産物や穀類から大量のハエ類が発生し、避難所や周辺に暮らす人々に大きな被害を与えた。流出した水産物は7月中にはほぼ処理が終了し、それとともにハエの大量発生も終息した。しかし、瓦礫中には処理されずに有機物が残され、引き続きハエ発生の可能性が危惧された。被災地周辺には大量の瓦礫が集積されている。本研究は2012年に再びこれらから大量にハエ類が発生するかどうかを岩手県の瓦礫集積場で調査し、その結果に基づき、適切な防除計画を策定することを目的として発生調査を行った。

B. 研究方法

岩手県の2カ所の瓦礫集積場（大槌町お

よび陸前高田市、図1）に粘着式トラップ（パタリンシート、30×34cm）を設置し、ハエ類の捕集を試みた。設置場所は入り口にある事務所の壁面である。2012年5月から10月まで、月に1度、主に第3週目に1週間設置し、回収後研究室にて数のカウントと種の同定を行った。大槌町の瓦礫集積場は海岸近くに位置し、瓦礫は分別されることなく置かれていた。陸前高田市の場合は内陸に位置し、大規模で、可燃物・不燃物・金属というように分別されていた。これらの場所から大量のハエ類が発生した場合、それがどの程度の距離まで影響を及ぼすかを調べるために、集積場から約300m離れた人家の壁面にも粘着トラップを設置し、ハエ類相と数の比較を行った。なお、この地域は津波被害が及ばない場所に位置していた。

データ集計には有弁翅ハエ類のみを用いた。無弁翅ハエ類やノミバエ類（いわゆるコバエ類）は一般に飛翔力が弱く、地表近くを飛ぶことが多く、今回の粘着トラップ設置の際に地表からの高さを統一しなかつたため、同じ条件で比較することが困難だった。ハマベバエに関しては無弁翅類であるが、津波被災直後に広範な地点に見られたため、結果に含めた。

C. 研究結果

粘着トラップによって瓦礫集積場で捕集されたハエ類は表1の通りであった。

種までの同定が可能なものに関しては種まで同定し、ニクバエやヤドリバエ等種までの同定が難しいグループに関しては科までの同定にとどめた。

各月の捕集個体数は0から17で、種類（グループ）数は陸前高田市で5種、大槌町では11種であった。個体数、種類数共に陸前高田市よりも大槌町のほうが多い。最も多く採集されたのは両地点共にニクバエ類で、次いでヤドリバエ類、ヒメイエバエと続いた。

表2では大槌町瓦礫集積場および300m離れた地点で採集されたハエ類の比較を行った。種類数は瓦礫集積場の方が多かったが、個体数に関しては月によりまちまちであった。瓦礫集積場が海岸に近いという事もあり、ツマグロイソハナバエやハマベバエといった海岸性の種類も採集されている。

表3では陸前高田市瓦礫集積所および300m離れた地点で採集されたハエ類の比較を示した。瓦礫集積場に比べ、300m離れた地点は種類・個体数共に多くのハエ類が捕集された。これらの事実から、瓦礫集積場でのハエ発生は周辺地でのハエ類発生よりもむしろ少なく、粘着トラップで捕集されたハエ類の発生場所は瓦礫ではなく、むしろ周辺地で発生したハエ類が集積場に侵入して捕集された可能性も考えられた。

無弁翅ハエ類やノミバエ類は今回の結果

に含めなかったが、多く捕集される種類は無く、有弁翅ハエ類同様瓦礫からの発生は無いものと思われた。

D. 考察

本研究は東日本大震災および津波被害によって引き起こされたハエ類の大量発生問題が翌年にも継続して発生するかどうかを岩手県の2カ所の瓦礫集積場で調べたものである。2011年のハエ類大量発生の際の調査結果は表4に示した。この年のハエ類大量発生では、問題となった種類は主にオオクロバエ、クロキンバエ、イエバエの3種であった。2012年の瓦礫集積場での捕集結果では大槌町の10月の調査でイエバエが1個体得られただけで、他の2種は全く採集されなかった。各月の捕集結果では多い月でも10数個体であった。最も多く採集されたのは大槌町の10月であったが、17個体の内、8個体がヤドリバエ科のハエであった。このグループのハエ類は昆虫寄生性であり、津波被害によって流出した腐敗物から発生する種類ではなく、瓦礫からの発生とは無関係である。ハエ問題のピークであった2011年6月の宮城県石巻市での調査では、同様の調査で、1日あたり約150個体の有弁翅ハエ類が捕集されている。それと比較した場合、瓦礫集積場でのハエ発生はほとんど問題とならないレベルであると考えられた。

瓦礫集積場から300m離れた地点との比較では、大槌町では両地点での結果に大きな違いは見られなかったが、陸前高田市では明らかに瓦礫集積場よりも周辺地の方が多数の発生が見られた。これは周辺地の環境が自然度豊かで、多くの昆虫が生息している環境であることが理由と思われる。陸前高田市の場合、瓦礫集積場が広大で、裸地上に瓦礫が集積されていたため、瓦礫から発生しない場合、敷地内でハエの発生源が無かつたために捕集数が少なかったものと思われる。ヤドリバエ類は昆虫寄生性の

ハ工類であり、自然度が豊であるかどうかの指標となる昆虫であるが、周辺地で多くの個体が捕集されていることからも周囲の自然度の豊かさが証明される。瓦礫集積場で捕集されたハ工類は周辺地で発生したものが集積場に侵入した際に捕集されたものかもしれない。

2011年に大発生したオオクロバエは陸前高田市の瓦礫集積場から300m離れた地点で10月に5個体、クロキンバエは大槌町の瓦礫集積場から300m離れた地点で6月に1個体採集されたのみであった。オオクロバエは晩秋から初春にかけて見られる種で、今回の調査では季節的にあまり捕集されなかったが、本来それほど少ない種ではない。クロキンバエは2011年に最も多く発生し、問題となった種であるが、本来それほど多く見られる種ではなく、今回の調査での結果が本来の生息密度と考えられる。津波被災後海岸性のツマグロイソハナバエとハマベバエが内陸部で広く見られたが、今回大槌町の瓦礫集積場で少数捕集された。これは瓦礫置き場が海岸に面しており、本来の生息地にあるためであり、津波被災の影響とは無関係と思われた。全ての時期、地点で最も多く捕集されたのはニクバエ類であった。このハ工類は比較的新しい死体(肉)や腐敗物から発生するが、被災後のハ工類大量発生の際にはほとんど採集されなかつた。それ故今回の発生は津波の影響とは無関係と思われた。

以上の結果から考えられる事は、2012年には瓦礫からのハ工類発生はほとんど無かったということである。2011年には瓦礫中の漁網やそれに付着した魚貝類には多くのハ工類が集まり、発生していたが、今回の結果は瓦礫にハ工類を集める要素が無く、発生源ともなっていないということを示している。

E. 結論

2011年3月11日に発生した東日本大震災および津波被災地ではその年にハ工類の大発生が起こり、社会問題化したが、2012年のシーズンには岩手県の2カ所の瓦礫集積所では共にハ工類の大発生は確認されなかった。2012年には他の被災地でもハ工類が大量に発生し、問題となったとの報告や報道は皆無であった。以上のことから、大規模災害でハ工類が大量に発生し、住民に対し被害が生じた場合、行政が当該年度にしっかりと対策を行う事が重要であり、それによって次年度以降にハ工問題が継続することは無いであろうという結論を得ることができた。

F. 健康危険情報

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

TOHOKU
東北地方

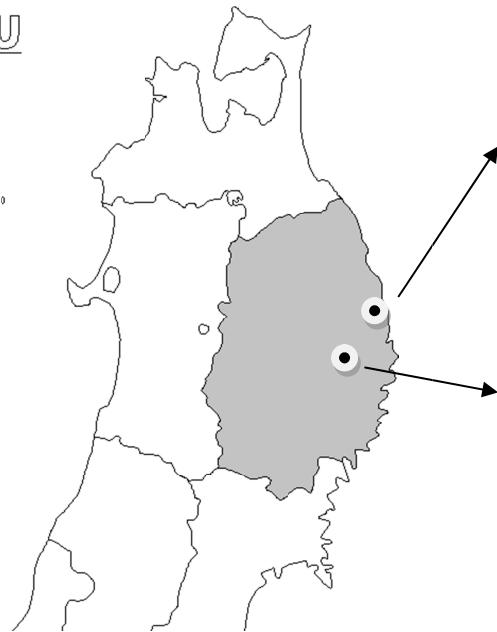
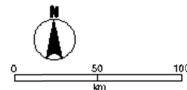


図1 調査地となる瓦礫集積所を示す地図

表1 2012年岩手県瓦礫集積所で採集されたハエ類（主として有弁翅類）

種類	陸前高田市						大槌町					
	5月	6月	7月	8月	9月	10月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
ヒロズキンバエ	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1
イエバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
オオイエバエ	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ヒメクロバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
ハナレメイエバエ属												
の1種	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
イエバエ科の1種	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
ヒメイエバエ	0	1	0	0	0	0	8	2	0	0	0	0
ツマグロイソハナバ												
エ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0
ニクバエ科	0	1	5	4	1	0	0	2	13	3	1	4
ヤドリバエ科	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	2	8
ハマベバエ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
合計	1	3	6	4	2	0	13	6	14	5	5	17

表2 2012年大槌町瓦礫集積場および300m離れた地点で採集されたハエ類
(主として有弁翅類)

種類	大槌町											
	瓦礫集積場						瓦礫集積場から300m離れた地点					
	5月	6月	7月	8月	9月	月	5月	6月	7月	8月	9月	月
ケブカクロバエ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ヒロズキンバエ	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ミヤマキンバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
クロキンバエ	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
イエバエ	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
オオイエバエ	0	1	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
ヒメクロバエ	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0
ハナレメイエバエ属												
の1種	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
イエバエ科の1種	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
ヒメイエバエ	8	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
クロヒメイエバエ	0	0	0	0	0	0	0	37	4	0	0	0
ツマグロイソハナバ												
エ	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
ニクバエ科	0	2	13	3	1	4	0	4	7	4	0	0
ヤドリバエ科	0	0	0	2	2	8	0	1	0	2	0	3
ハマベバエ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合計	13	6	14	5	5	17	0	48	12	7	3	3

表3 2012年陸前高田市瓦礫集積所および300m離れた地点で採集されたハエ類
(有弁翅類)

種類	陸前高田市											
	瓦礫集積場						瓦礫集積場から300m離れた地点					
	5月	6月	7月	8月	9月	10月	5月	6月	7月	8月	9月	10月
オオクロバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
ヒロズキンバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3	2
ミヤマキンバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
イトウコクロバエ	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	5
イエバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
オオイエバエ	0	1	0	0	0	0	1	7	1	0	11	6
ヒメクロバエ	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
ハナレメイエバエ属 の1種	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
イエバエ科の1種	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
ヒメイエバエ	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
コブアシヒメイエバ エ	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
クロヒメイエバエ	0	0	0	0	0	0	0	35	0	0	0	43
コガタヒメイエバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
クロオビハナバエ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
ハナバエ科の1種	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
ニクバエ科	0	1	5	4	1	0	1	2	0	3	39	2
ヤドリバエ科	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0	8	15
合計	2	3	6	4	3	0	6	48	5	5	68	86

表4 2011年津波被災地で見られたハエ類（林ら, 2012年を改変）

	陸前高田市気仙町					気仙沼市南部					気仙沼市階上														
	5月	6月	7月	8月	10月	5月	6月	7月	8月	10月	6月	7月	8月	10月											
	7	4	26	17	4	26	8	27	6	4	26	17	4	27	7	27	3	25	15	5	25	6	27		
	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日	日		
オオクロバエ	-																				
オオクロバエ																									
フカオクロバエ																									
イトウコクロバエ																									
クロキンバエ						
ヒロズキンバエ																									
ヒツヅキンバエ																									
ホリニクバエ																									
センチニクバエ																									
イエバエ			
オオイエバエ																	
モモクロオオイエバエ																									
ヒメクロバエ																									
トウヨウカリバエ																									
クロオオイエバエ																									
サシバエ																									
ツマグロイソハナバエ																							
ヒメイエバエ																									
ハナシヒメイエバエ																									
コブアシヒメイエバエ																									
コガタヒメイエバエ																									
クロヒメイエバエ																									
ハマベニア																							

+ 少数, ++ やや多い, +++ 多数

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

海外からのデング熱媒介蚊の侵入ならびにデング熱流行時の媒介蚊対策に関する研究

分担研究者	津田良夫	国立感染症研究所
協力研究者	助廣那由	成田空港検疫所
	梅澤昌弘	成田空港検疫所
	稻垣俊一	成田空港検疫所
	村上隆行	成田空港検疫所
	木田中	成田空港検疫所
	前川芳秀	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
	糸川健太郎	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	駒形 修	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	佐々木年則	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	富田隆史	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
	林 利彦	国立感染症研究所・昆虫医科学部
	澤邊京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部

研究要旨

海外からのデングウイルスとデング熱媒介蚊の侵入の問題とウイルスが侵入した場合のデング熱媒介蚊の防除対策に関する問題を検討した。成田国際空港では3年連続してネッタイシマカの発生が確認され、本種の侵入リスクが高まっていることから、国際空港でのベクターサーベイランスの重要性が再確認された。ネッタイシマカの幼虫発育と気温の関係を分析し1令および4令幼虫の発育限界温度は10.6と11.6付近と推定された。国際空港のターミナルビルは常に温度管理が行われているため、屋外では冬季に生存できない寒冷な地域であっても、屋内に侵入したネッタイシマカが越冬できる可能性は高い。2014年8月~10月に代々木公園とその周辺で起きたデング熱の流行で、公園など5ヶ所で媒介蚊の生息密度を調査した。推定感染場所とされた2つの公園で実施した生息密度調査の結果、ヒトスジシマカの平均生息密度は、8分間当たり 10.2 ± 16.5 と 11.4 ± 8.8 であった。この生息密度を一つの目安と考え、デング熱流行の予防対策として、平時から適切な幼虫対策を実施して成虫密度を8分間あたり平均10個体の密度よりも低く保つような努力が必要と思われた。

A. 研究目的

我が国におけるデングウイルスの侵入や国内感染・流行と関連して、デング熱媒介蚊に関する二つの問題を区別できる。ひとつは海外からのデングウイルスとデング熱媒介蚊の侵入の問題であり、もう一つはこれらが

侵入した場合のデング熱媒介蚊の防除対策に関する問題である。本研究は前者の問題について、成田国際空港におけるネッタイシマカの侵入と対策を成田空港検疫所の協力を得て検討した。また、後者の問題に関しては、2014年9月~10月に代々木公園とその周辺で

起きたデング熱の流行に際して実施された調査と媒介蚊対策の事例を整理し検討を行った。

B. 研究方法

成田国際空港で実施されているベクターサーベイランスで,空港に設けた監視エリア内に設置したオビトラップから,我が国には生息していないネッタイシマカの幼虫と蛹が採集された.成田国際空港におけるネッタイシマカの侵入は,2012年8月,2013年8月および9月,2014年9月にそれぞれ1回確認されており,緊急の媒介蚊対策が実施された.これらの侵入事例の詳細や対策に関する記録を整理し,国際空港における媒介蚊対策について検討した.また,ネッタイシマカが成田空港で越冬する可能性に関する実験を実施した.空港ターミナルビルの屋内および屋外に温湿度記録計と共に飼育ケースを設置し,ネッタイシマカ幼虫を飼育して冬季の幼虫生存率を推定した.さらに同じ場所でネッタイシマカの卵を保管し,屋内外での冬季の卵の生存率を推定した.得られた結果からネッタイシマカが越冬可能な条件について検討した.

代々木公園とその周辺で起きたデング熱流行に関連して,代々木公園,明治神宮,オリンピック記念青少年総合センター(オリンピックセンター),新宿中央公園,外濠公園などで媒介蚊の生息密度調査と駆除対策を行った.これらの事例について,経緯,調査結果,駆除作業とその効果判定を整理して,デング熱の国内感染が起きた場合の有効な媒介蚊対策について検討した.

C. 研究結果

成田国際空港ではベクターサーベイランスのために,大きさ 1 km^2 の政令区域 12 個を定め,このうち 6 区域に産卵用のオビトラップを設置した.2 週間間隔でボウフラ発生の有無を調べたところ,以下に示すように 2012 年から 2014 年の 3 年間で 4 か所のトラ

ップからネッタイシマカの幼虫と蛹が発見された; 2012 年 8 月 9 日第 2 旅客ターミナルビルサテライト 88SPT のオビトラップ 1 個より, 幼虫および蛹が採集されネッタイシマカ 27 個体が羽化した. 2013 年 8 月 7 日第 2 旅客ターミナルビル本館 76SPT のオビトラップ 1 個より, 幼虫および蛹が採集され, ネッタイシマカ 16 個体 (6♀, 10♂) が羽化した. 2013 年 9 月 12 日貨物ターミナル地区第 7 貨物ビル北側のオビトラップ 1 個より, 幼虫および蛹が採集され, ネッタイシマカ 21 個体 (7♀, 14♂) が羽化した. 2014 年 9 月 30 日第 2 旅客ターミナルビルサテライト 94SPT のオビトラップ 1 個より, 幼虫および蛹が採集され, 19 個体 (13♀, 7♂) のネッタイシマカが羽化した.

これらの事例ではネッタイシマカの発生が確認された直後に,問題のオビトラップの設置場所を中心として,半径 400 m の範囲を緊急対策範囲として定め,オビトラップと成虫捕獲用のドライアイストラップを集中的に配置した.また,ターミナルビル内の幼虫発生源調査の実施と空港内の幼虫発生源となりうる雨水マス等への殺虫剤処理を行った.いずれの事例でも,その後の調査でネッタイシマカの成虫も幼虫も発見されなかつたことから,侵入したネッタイシマカは定着できなかつたと結論した.

空港ターミナルビルの屋外の実験場所における調査期間中 (12 月 11 日 ~ 3 月 22 日) の平均気温は最も低く 5.2 度, 特に 1 月および 2 月の日平均気温は 5 度を下回る日が多く, この場所に設置された 1 令幼虫は発育できずにすべて死亡した. 同じ場所に 1 月 ~ 3 月まで設置された卵からは 6% の幼虫がふ化したが, 成虫まで発育した個体はいなかつた. これに対して調査期間中の屋内の平均気温は 13.9 ~ 19.4 度, 80% 以上の幼虫が生存していた. 幼虫発育と気温の関係を分析したところ 1 令幼虫の発育限界温度は 10.6 度, 4 令幼虫は 11.6 度付近であると推定された.

代々木公園とその周辺で起きたデング熱

流行では,代々木公園を管理する東京都や隣接するオリンピックセンターと明治神宮,また周辺の公園を管轄する区保健所から媒介蚊であるヒトスジシマカの生息密度調査と成虫対策への協力要請があった.いずれの場合も,調査に引き続き,その日のうちに殺虫剤散布の実施が予定されており,調査と対策方法の検討のために与えられた時間は短く,2~3時間であった.そこで,生息密度調査はそれぞれの調査地をいくつかの区画に分割し,それぞれの区画を一人の採集者が担当して区画内の2~7箇所で8分間の人囮による捕虫網採集を行った.その結果,成虫の平均生息密度は以下のようであった:オリンピックセンター = 5.5 ± 4.9 (n=14), 代々木公園 = 10.2 ± 16.5 (n=30), 明治神宮 = 5.5 ± 8.91 (n=43), 新宿中央公園 = 11.4 ± 8.8 (n=27), 外濠公園 = 5.8 ± 7.9 (n=20). また,江東区保健所が主体で行った上野公園でのヒトスジシマカの平均生息密度は, 3.6 ± 5.7 (n=30) であった.

それぞれの調査結果から分布の集中度を示す分散係数(分散/平均)を求めたところ 4.4~26.6 であり,成虫の分布は集中分布であることがわかった.成虫が局所的に分布していることから,生息密度の平均値を基準として,平均値よりも生息密度が高い場所とその周辺をデング熱の感染リスクが高い場所と考えて,成虫駆除を優先的に実施するよう助言を行った.成虫駆除はピレスロイド系殺虫剤の散布によったが,その目的はウイルスを保持する蚊(感染蚊)を殺すこととした.そのため成虫の潜伏場所に効果的に殺虫剤が散布されるように,小さな植え込みなどではハンドスプレーヤーを用い,公園など広い範囲に点在する茂みや道路に沿った藪などに対しては動力噴霧,代々木公園と明治神宮の境界部に密に生育する藪には炭酸ガス製剤を用いるなど,適切な散布方法を選択して実施するよう助言を行った.駆除作業を実施した場合は,数日後に改めて生息密度調査を実施して,駆除の効果を判定するよう指導した.オリンピックセンター,明治神宮,新宿

中央公園,外濠公園,上野公園で実施した効果判定では,いずれも生息密度の低下が確認された.

D. 考察

成田国際空港では3年連続してネッタイシマカの発生が確認されており,本種の侵入リスクが高いことが示唆されている.2013年9月には羽田空港でもネッタイシマカの雌成虫1個体がドライアイストラップで捕獲されており,国際空港でのベクターサーベイランスの重要性が高まっている.成田国際空港を利用している航空会社は34か国101都市に及び,ネッタイシマカの発生が確認されたターミナルは様々な航空会社によって利用されていたため,侵入したネッタイシマカの由来地を特定することはできなかった.最近,分子生物学的な手法を用いてネッタイシマカの由来地を推測する方法が考案されている.本研究でも成田国際空港で得られたサンプルを用いて,複数の遺伝子の変異を調べ由来地域の推定を試みた.しかし,比較のために必要な世界各地のネッタイシマカの遺伝子情報が十分整備されておらず,特に東南アジアの集団に関する遺伝的データが不十分なため信頼度の高い推定ができなかつた.ネッタイシマカに限らず,医学的に重要な疾病媒介蚊の遺伝情報蓄積して,データベースを整備することが必要と思われる.

ネッタイシマカは屋内の人工容器などを幼虫の発生源として生息することができる.本研究で明らかになったように,国際空港のターミナルビルは常に温度管理が行われ,ネッタイシマカの幼虫発育に必要な温度条件が満たされていることから,屋外では冬季に生存できない寒冷な地域であっても,屋内に侵入してしまえばネッタイシマカは越冬できる可能性が高い.したがって夏季だけでなく冬季にも,空港ターミナルビル内で媒介蚊のモニタリングや発生源調査を行うことが必要と思われる.

デング熱に感染した患者が発症前に訪れ

て蚊に刺されたという事例が複数報告され , 感染場所と推定された代々木公園と新宿中央公園では , ヒトスジシマカの生息密度は , 8 分間当たり 10.2 ± 16.5 と 11.4 ± 8.8 であった . この値はデング熱の流行が起こる媒介蚊密度の参考として重要である . 蚊媒介性感染症の予防対策としては , 病気が流行した時よりもむしろ平時の対策が重要であり , 適切な幼虫対策を実施して 8 分あたり 10 個体の密度よりも低い成虫の生息密度に保つような努力が必要と思われる .

E. 結論

成田国際空港では 3 年連続してネッタイシマカの発生が確認され , 本種の侵入リスクが高まっていることから , 国際空港でのベクターサーベイランスの重要性が再確認された . ネッタイシマカの幼虫発育と気温の関係を分析したところ 1 令および 4 令幼虫の発育限界温度は 10.6 および 11.6 付近であると推定された . 国際空港のターミナルビルは常に温度管理が行われ , ネッタイシマカの幼虫発育に必要な温度条件が満たされているため , 屋外では冬季に生存できない寒冷な地域であっても , 屋内に侵入すればネッタイシマカが越冬できる可能性は高い . そのため , 夏季だけでなく冬季にも , 空港ターミナルビル内で媒介蚊のモニタリングや発生源調査を行うことが必要と思われる . デング熱の推定感染場所とされた 2 つの公園で実施した生息密度調査の結果 , ヒトスジシマカの生息密度は , 8 分間当たり 10.2 ± 16.5 と 11.4 ± 8.8 であった . この生息密度を一つの目安と考え , デング熱流行の予防対策として , 平時から適切な幼虫対策を実施して成虫密度を 8 分あたり 10 個体の密度よりも低く保つような努力が必要と思われる .

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sukehiro N., Kida N., Umezawa M., Murakami T., Arai N., Jinnai T., Inagaki S., Tsuchiya H., Maruyama H., Tsuda Y. 2013. First report on invasion of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, at Narita International Airport, Japan in August 2012. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 66: 189-194.

津田良夫 , 助廣那由 , 梅澤昌弘 , 稲垣俊一 , 村上隆行 , 木田中 , 土屋英俊 , 丸山浩 , 沢辺京子 . 2013 . 成田国際空港におけるネッタイシマカの越冬可能性に関する実験的研究 .衛生動物 , 64: 209-214.

2. 学会発表

助廣那由 , 木田中 , 梅澤昌弘 , 村上隆行 , 荒井直子 , 神内恒貞 , 稲垣俊一 , 土屋英俊 , 丸山浩 , 津田良夫 . 成田国際空港におけるネッタイシマカの侵入事例について . 第 65 回日本衛生動物学会大会 , 2013 年 4 月 , 江別市

助廣那由 , 木田中 , 梅澤昌弘 , 村上隆行 , 信太歩 , 神内恒貞 , 稲垣俊一 , 土屋英俊 , 三宅智 , 津田良夫 . 成田国際空港におけるネッタイシマカの侵入事例について (続報) . 第 66 回日本衛生動物学会大会 , 2014 年 3 月 , 岐阜市

津田良夫 . ヒトスジシマカの生息密度調査に基づくデング熱感染リスク評価と媒介蚊対策 . 第 67 回日本衛生動物学会大会緊急シンポジウム , 2015 年 3 月 , 金沢市

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得 : なし
- 実用新案登録 : なし
- 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

神奈川県および長野県におけるヒトスジシマカ成虫の飛来消長に関する研究

分担研究者　　富田隆史　　国立感染症研究所・昆虫医学部・第三室長
協力研究者　　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
　　　　　　　　平林公男　　信州大学・繊維学部・応用生物学系

研究要旨

ヒトスジシマカの各地での発生期間を把握する目的で、神奈川県中郡大磯町および長野県上田市の2地点において、ヒトに誘引される蚊を捕虫網で一定時間捕集する方法で飛来消長調査を行った。その結果、2010～2014年の調査で、大磯町では5月9日～23日、上田市では6月5日～18日の間に飛来が始まり、大磯町では7月上旬～10月上・中旬、上田市では7月中旬～9月下旬にかけて飛来の多い状態が続き、飛来の終息確認日は、大磯町で11月9日～30日、上田市で10月5日～15日であった。飛来開始日や終息日の地点間の違いは、気温の違いによると考えられた。地点ごとに見た飛来開始日および終息日の違いは、5年間の調査で10～21日であり、開始日、終息日に年によって若干の違いが認められ、大磯町における調査では、2014年の飛来開始日が5年間の調査で最も早い一方で終息日は最も遅く、上田市における調査での終息日は2014年が最も早かった。

A. 研究目的

わが国の東北地方以南に分布するヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、都市部でも雨水樹などの小水域から多数発生し、朝から夕方にかけて屋外でヒトから激しく吸血する蚊として知られている。本種は、現在、熱帯地方を中心に行き、わが国でも多くの輸入症例が報告されているデング熱やチクングニア熱の媒介蚊であることから、これらの感染症が本種により国内で媒介される懸念が以前から指摘され、2014年には東京都内などで160名のデング熱の国内感染が起こった。また、本種はウエストナイル熱の媒介也可能であることが報告されている。本種は、屋外で昼間に吸血することから、屋内への侵入防止対策や屋内での駆除を実施すれば吸血被害を軽減できる夜間吸血性の蚊に比べて、個人防御を行いにくい蚊であり、本種が媒介する感染症の国内侵入・発生時には、緊急的に野外における成虫駆除やその態勢整備のための防除期間の設定、住民への注意喚起が必要となる。そのためには本種成虫の吸血飛来期間やその変動の基礎資料を得るために継続的な調査が必要であることから、2010年～2014年にかけて、神奈川県および長野県の2地点でヒトに対する飛来状況の調査を行った。

B. 研究方法

1. 調査対象種

ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* (成虫)

2. 調査場所と調査期間

調査場所は、下記の2地点とした。なお、いずれの地点でも、発生終期に飛来が0になつてから、さらに1週間以上調査を継続し、飛来の終息を確認した。

神奈川県中郡大磯町大磯（標高約5m）
毎年、4月下旬～11月下旬または12月上旬の間

長野県上田市常入（標高約450m）
毎年、5月下旬または6月上旬～10月中・下旬の間

3. 調査方法

同一人が毎回同一の調査場所に立ち、飛来するヒトスジシマカを捕虫網で地点では8分間、地点では6分間捕集し、その捕集数（「捕集」は以下「飛来」とする場合がある）をカウントする方法（人囮法）で実施した。また、地点では幼虫の発生状況を目視で調査した。

調査は基本的に晴天または曇天、また、風が弱い日を選んで実施し、調査時には天候や

風の状態、気温などを記録した。

4. 調査時間および調査間隔

調査（捕集）時間は各地点で異なり、地点では原則として7:00～8:00、では6:30としたが、地点では毎年、地点では一部の年に、発生初期や終期などの低温の時期において気温が上昇する日中や夕刻の調査を追加した。調査間隔は、地点では原則として週1回以上、地点では不在時を除いて、ほぼ毎日の調査を行った。

（倫理面への配慮）

環境や人獣に対する影響は考えられないことから、倫理面への配慮は特に行わなかった。

C. 研究結果および考察

飛来開始確認日は、地点 大磯町で 2010 年が 5 月 23 日、2011 年が 5 月 15 日、2012 年が 5 月 13 日、2013 年が 5 月 12 日、5 月 9 日であり、上田市では、それぞれ 6 月 5 日、6 月 10 日、6 月 18 日、6 月 9 日、6 月 9 日であった。飛来終息日は、地点 で 2010 年が 11 月 14 日、2011 年が 11 月 20 日、2012 年が 11 月 18 日、2013 年が 11 月 9 日、2014 年が 11 月 30 日で、地点 ではそれぞれ 10 月 12 日、10 月 15 日、10 月 6 日、10 月 12 日、10 月 5 日であった。これらの飛来期間の違いは、4～5 月、10～11 月の両地域の気温、とくに最低気温の違いによるものと思われた。また、両地点とも飛来開始は、最低気温が 15 を上回る日が多くなる時期、終息は最低気温が 10 を下回るようになる日が多くなる時期であった。

最多飛来日は、調査年によって異なるが、地点 では 7 月中旬から 9 月下旬の間、地点

では 8 月上旬から下旬の間に認められ、最多飛来数は、地点 が 37 (2013 年)～79 頭 (2010 年)、地点 が 16 (2010 および 2013 年)～24 頭 (2012 および 2013 年) であった。また、発生期間を通じた飛来消長の状況は年によって若干異なった。なお、飛来開始初期や終期の低温時には、温度が上昇する昼～夕方の時間帯の時間帯の飛来が朝方の低温時よりも増加する傾向が認められた。

飛来時の最低気温は、地点 大磯町では

14.4、地点 では 11.6 であったが、いずれの年も、捕集時の気温が高いほど飛来数が多い傾向が認められ、気温が発生消長や飛来数に影響を及ぼしていることが強く示唆された。

E. 結論

ヒトスジシマカ成虫の各地での発生期間を把握し、防除態勢の構築期間などの基礎資料を得る目的で、2010～2014 年にかけて、8 分間（大磯）または 6 分間（上田）採集法（人囮法）による調査を行った。

その結果、飛来数が多い期間は、大磯町、上田市ともに 6 月下旬～7 月上旬以降、大磯町では 10 月上・中旬まで、上田市では 9 月中・下旬であり、この期間が成虫対策における防除重点期間と判断された。

飛来期間や、飛来消長は今回の一連の調査でも明らかのように、地域によってかなり異なると考えられ、今後も日本各地での同様な調査の継続的な実施によるデータの蓄積や解析が必要と判断された。

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

平林公男・長野県上田市一般民家におけるヒトスジシマカの発生動態（第 2 報）、第 64 回日本衛生動物学会東日本支部大会、2012 年 10 月、川崎市

武藤敦彦・平林公男・沢辺京子・小林睦生・富田隆史・神奈川県大磯町および長野県上田市におけるヒトスジシマカ成虫の 5 年間（2010～2014 年）の発生消長、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

- 特許取得： なし
- 実用新案登録： なし
- 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

**長野県内における感染症媒介蚊の分布調査と発生動態
(2012-2014 の 3 年間の調査結果のまとめ)**

分担研究者	平林公男	信州大学・繊維学部・応用生物学系
協力研究者	武田昌昭	信州大学・繊維学部・応用生物学系
	津田良夫	国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官
	二瓶直子	国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員
	小林睦生	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

2012 年から 2014 年にかけて長野県全県において蚊相の調査を行ってきた。本報告ではヒトスジシマカに注目して、長野県内における水平分布と垂直分布について報告する。成虫を対象とした調査では、全 72 地点（のべ 82 回；緯度は北緯 35 度 30 分 21.24 秒～36 度 55 分 28.23 秒の範囲、標高は 317 m～1534 m の範囲）で、CDC トランプを設置した。幼虫を対象とした調査では、全 54 地点から 128 ポイントからサンプルを得た。神社、仏閣を中心に基石の花立てや石盤、線香立てなどに溜まった小水域から生きた幼虫をピペットにより採取した。その結果、全体で 139 個体のヒトスジシマカ成虫が CDC トランプで捕獲され、全蚊の 23.4% を占めた。また、本種の長野県内における平均捕獲数は、1.7 個体/トランプ/日であった。本種は、北は飯山市から南は飯田市まで、全県にわたって分布していた。調査地最北端の木島平村（北緯 36 度 51 分 59.35 秒）からも 4 個体/トランプ/日の捕獲があった。特に飯田市、上田市は平均捕獲数が多かった。一方、軽井沢町、上高地、菅平高原、上田市真田地区など、標高が 800 m を超える地域では、成虫も幼虫も捕獲されなかった。白馬村、大町市、東御市、諏訪市、岡谷市では、極めて成虫の捕獲数が少なかった。これらの地域においては、今後、モニタリング調査が必要であると思われる。

A. 研究目的

長野県内における蚊科についての調査報告は、これまでに町田・古越（1951）、上村（1968）、Oguma and Kanda（1977）、内川（1977）、Kurihara *et al.*（2000）、白井ら（2002）、平林（2012）、平林ら（2013）、武田ら（2012, 2013）によるものがある。町田・古越（1951）は長野市において、Oguma and Kanda（1977）、武田ら（2012）は軽井沢町において調査を行った結果の報告である。いずれの報告でも、ヒトスジシマカの捕獲報告は無い。上村（1968）は、県内の詳しい地域は記載していないが、長野県内

において、ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* の捕獲を報告している。また、Kurihara *et al.*（2000）は、長野市、松本市、上田市において、ヒトスジシマカの大量捕獲を報告している。近年、平林（2012）によって上田市、平林ら（2013）によって長野市、武田ら（2013）によって南箕輪村、伊那市、宮田村、駒ヶ根市、飯田市において、永井ら（2013）によって諏訪市、岡谷市、松本市において、ヒトスジシマカの捕獲を報告している。また、武田ら（2014a, b）により、長野県北部地域においてもヒトスジシマカの生息・定着が確認され、冬期積雪の多い

場所でも分布することが明らかとなった。

そこで、本研究では、2012年から2014年にかけて長野県全県において蚊相の調査を行ってきた結果を基に、内陸性気候地域の蚊相の分布の特徴を明らかにすることを目的として、本報告ではヒトスジシマカに注目して報告することとした。

B. 研究方法

1. 調査地点と調査期間

調査は2012年8月(軽井沢町),9月(上田市,長野市),2013年7月,8月(松本市,諏訪市・岡谷市),9月(伊那市,南箕輪村,駒ヶ根市,宮田村,飯田市),2014年8月(白馬町,大町市,上高地),9月(信濃町,飯山市,木島平村,野沢温泉町,東御市,菅平,真田)で行った。成虫を対象とした調査では、これまでに72地点のべ82回(緯度は北緯35度30分21.24秒~36度55分28.23秒の範囲,標高は317m~1534mの範囲),CDCトラップを設置した。また、幼虫を対象とした調査では、全54地点,128ポイントからサンプルを得た。神社,仏閣を中心に墓石の花立てや石盤,線香立てなどに溜まった小水域から生きた幼虫をピペットにより採集した。

2. 採集方法

1) 成虫調査

成虫調査は寺院や神社内においてCDCトラップを設置して行った。CDCトラップは、地上約1.5mの場所に設置し、ドライアイス(1kg)を誘引源として用いた。多くの蚊類の飛翔時間である薄暮れ時(津田,2007)に間に合うように設置し、翌日、サンプルを回収して実験室に持ち帰り、冷凍殺虫した。さらに、CDCトラップ設置時に捕虫網によるスイーピング調査も併せて行った。その後、実体顕微鏡下で種類を分類し、種類毎にスクリュー管に入れて70%アルコールで固定し保存した。

2) 幼虫調査

幼虫調査は、寺院においては、花立てや線香立て、石の蹲といった小水域、古タイヤに溜まった水などで行った。10mL駒込ピペットの先端の直径が7~8ミリになるよう削って加工したものを用いて、幼虫ごと小水域の水を吸い上げ、一定時間(約5分)内に採集したものを50mLポリビンに入れて実験室に持ち帰った。サンプルは恒温室(23,12時間点灯12時間消灯)にて飼育し、羽化させてから吸虫管で成虫を回収した。吸虫管に入った個体をクロロホルム(CHCl₃)で処理した後、マイクロチューブに入れ、速やかに冷凍殺虫した。その後、冷凍殺虫した成虫を実態顕微鏡下で分類し、70%エタノールで固定した。成虫、ならびに幼虫の分類には、Tanaka *et al.*(1979)の検索表を用いた。本研究においては、アカイエカ *Culex (Culex) pipiens pallens* とチカイエカ *Culex pipiens form molestus* を区別はせずに、アカイエカ群 *Culex pipiens Complex* として扱った。

C. 結果

CDCトラップでは2012年から2014年までの3年間に595個体の蚊類が捕獲され、長野県内全体におけるCDCトラップの平均捕獲数は7.3個体/トラップ/日であった。幼虫調査により集められた個体から羽化して成虫となったものは185個体であった。

CDCトラップで最も多く捕獲された種はアカイエカ群で312個体、全体の52.4%となかった。また、本種の長野県内における平均捕獲数は3.8個体/トラップ/日であった。一方、ヒトスジシマカの場合、全体で139個体の成虫がCDCトラップで捕獲され、全蚊の23.4%を占めた。また、本種の長野県内における平均捕獲数は、1.7個体/トラップ/日であった。この2種で全体の蚊の75.8%を占めた。

図1にヒトスジシマカ成虫の県内におけるCDCトラップによる平均捕獲数の分布を示した。北は飯山市から南は飯田市まで、

全県にわたって分布している。調査地最北端の木島平村（北緯 36 度 51 分 59.35 秒）からも 4 個体/トラップ/日の捕獲があった。特に飯田市、上田市は平均捕獲数が多かった。一方、軽井沢町、上高地、菅平高原、上田市真田地区など、標高が 800 m を超える地域では、捕獲されない。白馬村、大町市、東御市、諏訪市、岡谷市では、極めて捕獲数が少ない。

幼虫調査と成虫調査の結果をあわせて示したもののが図 2 である。軽井沢町、上高地、菅平高原、上田市真田地区では、幼虫も捕獲されていない。したがって未だ定着はしていないものと思われる。白馬村、大町市、諏訪市、岡谷市では、成虫数がわずかに捕獲されたが、幼虫は捕獲されていないため、定着がしつつある場所ではないかと推測される。さらなる幼虫調査、成虫のモニタリング調査が必要である。

図 3 にヒトスジシマカ成虫の捕獲数と、調査地点の標高との関係を示した。また、標高別には飯山市本学寺 317 m から岡谷市照光寺 789 m の範囲にかけて幅広く捕獲でき、標高が低い地域ほど捕獲数が多い傾向を示した。しかし、標高が 800 m 以上の地域からは成虫の捕獲はできなかった。調査地点の緯度と捕獲数との関係を解析したが、明確な傾向は認められなかった。

D. 考察

長野県内においては、ヒトスジシマカが生息・定着しているところ（成虫と幼虫が確認されている：区分 1）、生息しているところ（成虫のみわずかに確認されている：区分 2）、生息していないところ（成虫も幼虫も捕獲されていない：区分 3）の 3 区分に分類できそうである。区分 1 の代表として、長野、松本、上田などについては、Kurihara *et al.* (2000) が報告しているように、多くの成虫、幼虫が捕獲される。また、飯田市や信濃町についても同様である。とくに長野市は門前町であり、ヒトの居住区

とヒトスジシマカの発生源が近接しているために、注意が必要である。一方、区分 2 の代表として、諏訪市、岡谷市、大町市、白馬村では、年平均気温は 10 ~ 11 の範囲である。今後、気温の上昇と共に、生息密度が高くなる可能性が示唆され、モニタリング調査が必要であると思われる。区分 3 の代表としては、上高地、菅平高原、軽井沢である。いずれの地区も、年平均気温が 5.5, 6.7, 8.6 と極めて低い。本研究で着目したヒトスジシマカは、Kobayashi *et al.* (2002) によると、年平均気温 11 度以上の地域に分布する。本研究においても、Kobayashi *et al.* (2002) の報告と同様な傾向を示した。

謝辞

本調査にご協力いただいた寺院、神社関係者の皆様、卒業研究の一環として、野外における蚊の調査を行い、データをまとめた信州大学繊維学部応用生物学系平林研卒業生の皆さんに深く感謝を申し上げる。

E. 結論

- 1) ヒトスジシマカ成虫を対象とした調査では、全 72 地点（のべ 82 回；緯度は北緯 35 度 30 分 21.24 秒 ~ 36 度 55 分 28.23 秒の範囲、標高は 317 m ~ 1,534 m の範囲）に CDC トランプを設置した。
- 2) ヒトスジシマカ幼虫を対象とした調査では、全 54 地点から 128 ポイントからサンプルを得た。
- 3) 全体で 139 個体のヒトスジシマカ成虫が CDC トランプで捕獲され、全蚊の 23.4% を占めた。また、本種の長野県内における平均捕獲数は、1.7 個体/トランプ/日であった。特に飯田市、上田市は平均捕獲数が多かった。
- 4) 軽井沢町、上高地、菅平高原、上田市真田地区など、標高が 800 m を超える地域では、

幼虫も成虫も捕獲されなかった。白馬村、大町市、東御市、諏訪市、岡谷市では、極めて成虫の捕獲数が少なかった。これらの地域においては、今後モニタリング調査が必要であると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 (2010-2014年の3年間)

1. 論文発表

Hirabayashi K., Takeda M., Nihei N., Kobayashi M., Tsuda Y., Sawabe K. 2014. Distribution of *Aedes albopictus* mosquitoes in an inland climate mountain area, Nagano Prefecture, Japan. Proceedings of the 8th International Conference on Urban Pests, Gabi Muller, Reiner Pospischil and William H Robinson (Edits.) Printed by OOK-Press Kft., H8200 Veszrem, Papai u.37/A, Hungary. 125-129.

Kobayashi M., Komagata O., Yonejima M., Maekawa Y., Hirabayashi K., Hayashi T., Nihei N., Yoshida M., Tsuda Y., Sawabe K. 2014. Retrospective search of dengue vector mosquito, *Aedes albopictus* in area visited by a German traveler that has contracted dengue Disease. Int. J. Infect. Dis. 26: 135-137.

Hirabayashi K., Takeda M., Tsuda Y. 2014. Tow-year aftereffects of Tsunami on abundance of mosquitoes in suburban Sendai Area in Miyagi Prefecture, Japan in 2013. Entomol. Res. Bull. 30(2) (In press).

2. 学会発表

平林公男。長野県上田市一般民家におけるヒトスジシマカの発生動態(第2報)。第64回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2012年10月, 川崎市

武田昌昭, 平林公男。長野県軽井沢町における蚊相の調査(予報)。第28回日本ペストロジー学会, 2012年11月, 神戸市

平林公男, 武田昌昭, 二瓶直子, 小林睦生, 沢辺京子。中央高地型気候地域におけるヒトスジシマカの分布とその要因。第65回日本衛生動物学会大会, 2013年4月, 江別市

平林公男, 山本優, 津田良夫。東日本大震災の津波被災地域から発生するユスリカ類 - 仙台空港周辺, ならびに南相馬地域に焦点をあて。第65回日本衛生動物学会東日本支部大会, 2013年10月, 川口市

武田昌昭, 瑞慶覧光, 平林公男, 二瓶直子, 小林睦生, 沢辺京子。長野県南信地方における蚊相の研究。第29回ペストロジー学会, 2013年11月, 岐阜市

永井義成, 瑞慶覧光, 山寄健人, 武田昌昭, 平林公男。長野県中部地域における感染症媒介蚊の分布調査(予報)。第39回日本陸水学会甲信越支部大会, 2013年12月, 北杜市清里

平林公男, 山本優, 津田良夫。(2013)津波被災地における沼沢池の塩分濃度の違いがユスリカ類の発生に与える影響。第39回日本陸水学会甲信越支部大会, 2013年12月, 北杜市清里

武田昌昭, 永井義成, 山寄健人, 津田良夫, 平林公男。東日本大震災津波被災地における感染症媒介蚊の発生状況: 仙台市内に焦点をあてて。第39回日本陸水学会甲信越支部大会, 2013年12月, 北杜市清里

Hirabayashi M., Takeda M., Tsuda Y. 2014. After-effects of Tsunami on distribution of mosquitoes in the suburbs of Sendai City in Miyagi Prefecture, Japan in 2013. The 2nd Symposium of Benthological Society of Asia. Busan, Korea. 5-7, June

Hirabayashi K., Takeda M., Nihei N., Kobayashi M., Tuda Y., Sawabe K. 2014.

Distribution of *Aedes albopictus* mosquitoes in an inland climate mountain area, Nagano Prefecture, Japan. The 8th International Conference on Urban Pests, Zurich, Switzerland. 20-23, July.

武田昌昭・中山雄貴・市川誠・平林公男・
二瓶直子・小林睦生・津田良夫・沢辺京子・
長野県北信地方(白馬村,大町市)における蚊
相の研究.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

平林公男. デング熱媒介蚊ヒトスジシマカ
*Aedes albopictus*の吸血飛来時間帯. 第26回
環動昆, 2014年11月, 長崎市

武田昌昭, 市川誠, 中山雄貴, 平林公男.
長野県北部(飯山地方)の蚊相について(予
報). 第40回日本陸水学会甲信越支部大会,
2014年11月, 安曇野市

武藤敦彦, 平林公男, 沢辺京子, 小林睦生,
富田隆史. 神奈川県大磯町および長野県上
田市におけるヒトスジシマカ成虫の5年間
(2010~2014年)の発生消長. 第67回日
本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

平林公男, 武田昌昭, 中山貴雄, 津田良夫,
二瓶直子, 小林睦生, 沢辺京子. 長野県内
におけるヒトスジシマカの分布. 第67回日
本衛生動物学会大会, 2015年3月, 金沢市

沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一,
渡辺護, 平林公男, 鍬田龍星, 前田 健, 岩
永史朗, 安藤勝彦, 鎮西康雄, 佐藤智美,
前川芳秀, 林利彦, 佐々木年則, 小林睦生.
SFTS対策に向けたマダニ類の全国調査. 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

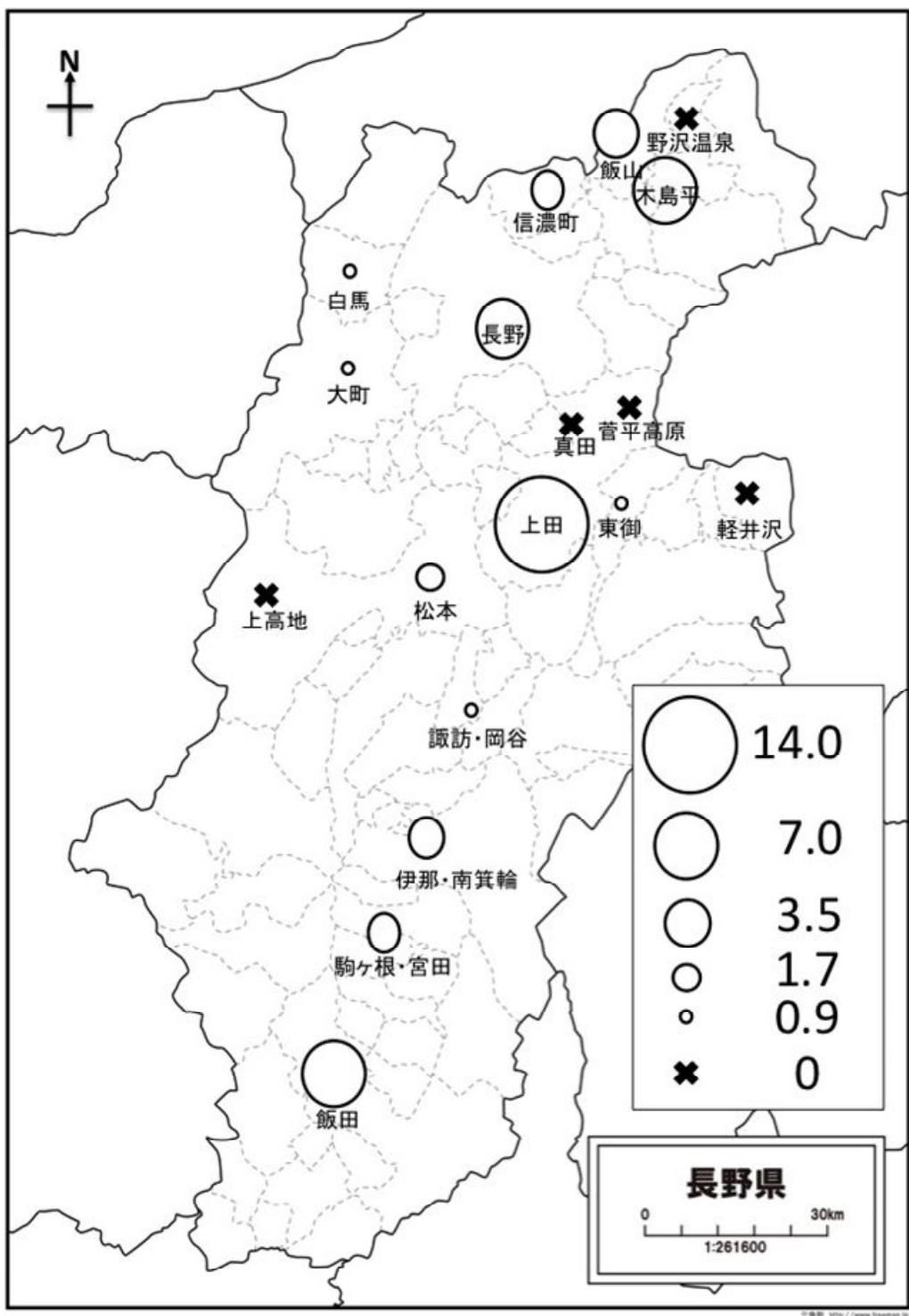


図1 ヒトスジシマカ成虫の平均捕獲個体数の分布

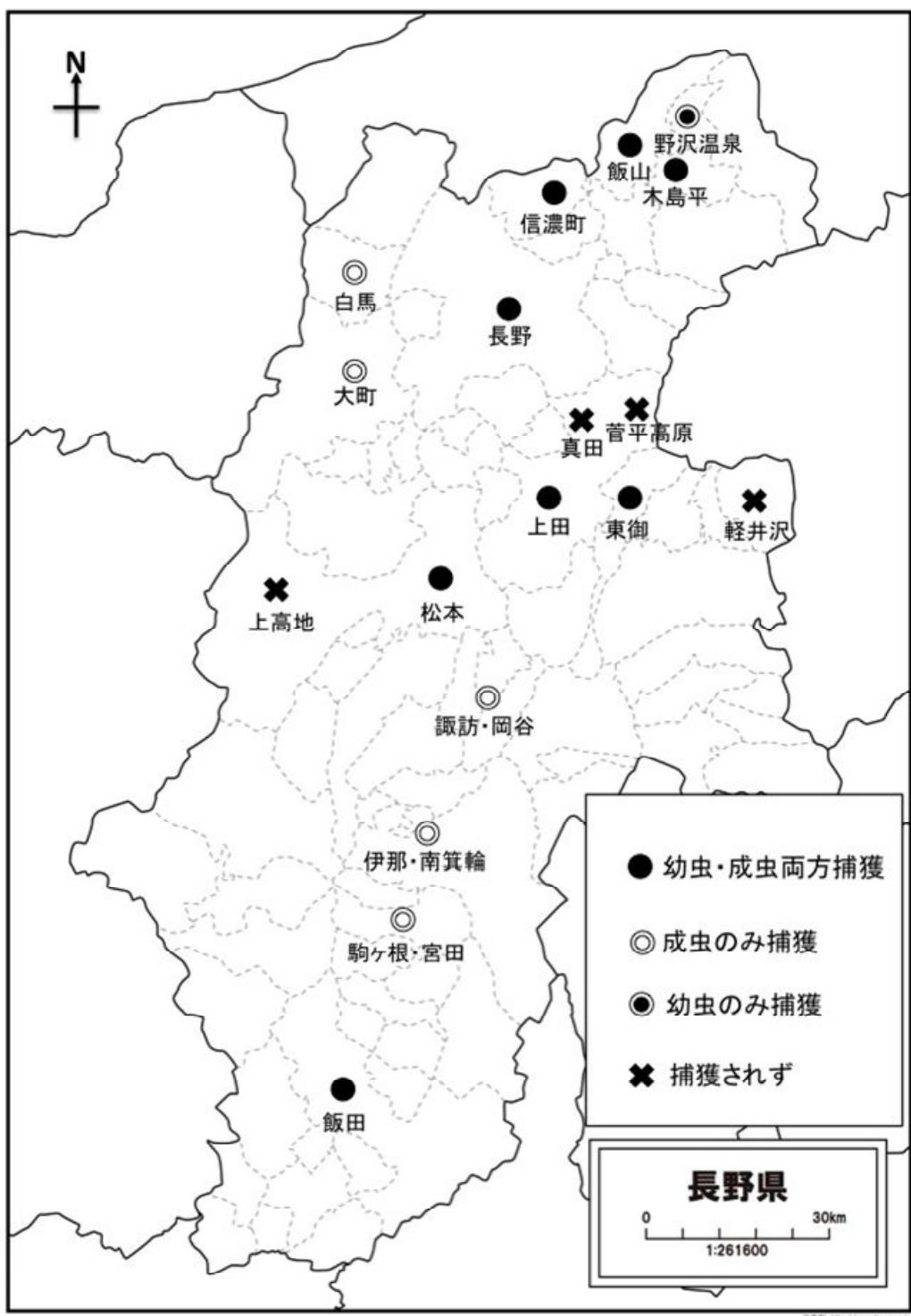


図2 ヒトスジシマカの採集成績の概要

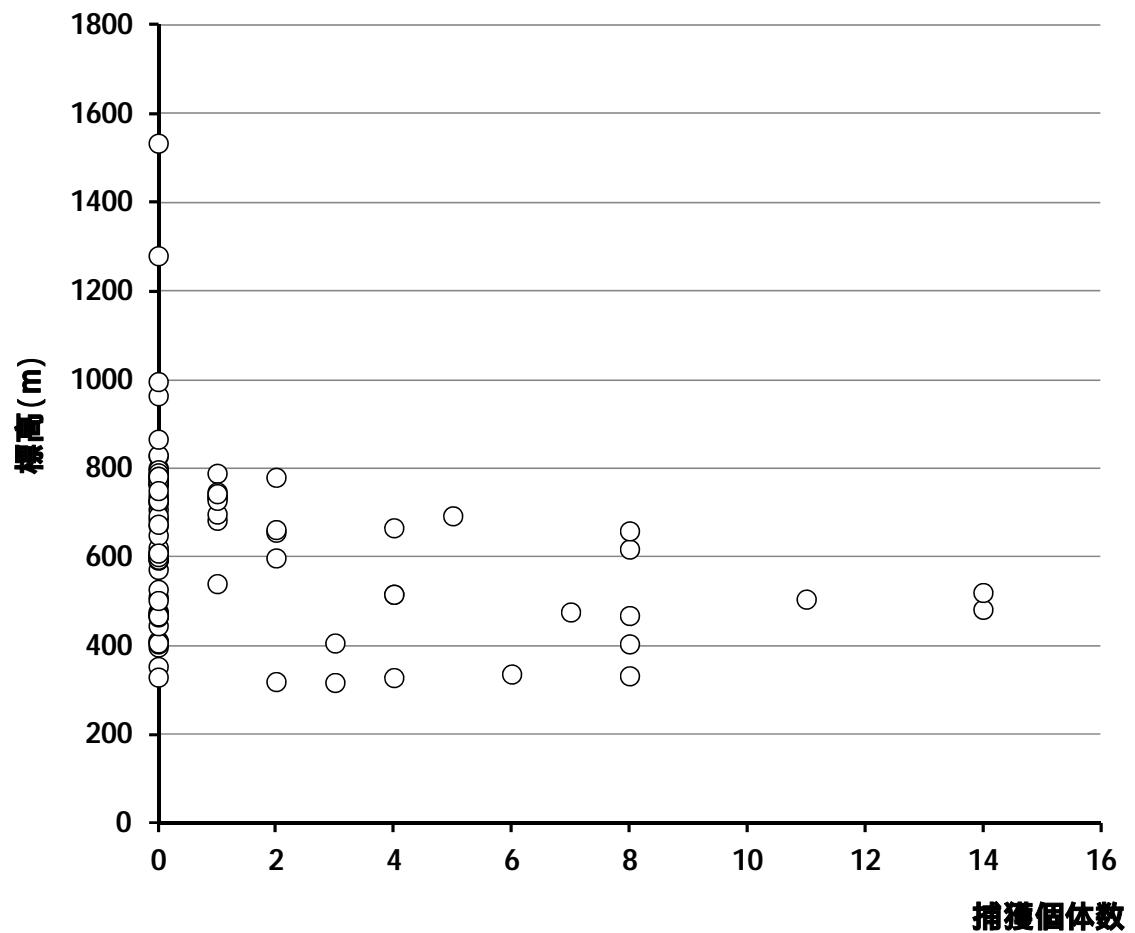


図3 捕獲された地点の標高とヒトスジシマカの捕獲数

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

岩手県におけるヒトスジシマカ分布調査(2012~2014年)

分担研究者	澤邊京子	国立感染症研究所 昆虫医科学部
協力研究者	西井和弘	岩手県環境保健研究センター 地球科学部
	佐藤 卓	岩手県環境保健研究センター 地球科学部
	永村桂一	岩手県環境保健研究センター 地球科学部
	小林睦生	国立感染症研究所 昆虫医科学部
	二瓶直子	国立感染症研究所 昆虫医科学部

研究要旨

東北地方におけるヒトスジシマカの分布北限は、気温の上昇などに起因して次第に北上してあり、2010年には初めて青森県の一地域で生息が確認された。岩手県における節足動物媒介性ウイルス疾患の予防対策に資するため、我々は、2009年から岩手県におけるヒトスジシマカの生息分布調査を行ってきた。2014年までの調査では、岩手県内陸の平野部における北限地域にある盛岡市の市街地ではヒトスジシマカはすでに定着しており、また、着実に生息範囲を拡大していることがわかった。さらに、2014年には北上高地に位置する花巻市東和町において、はじめてヒトスジシマカの生息が確認された。同年には国内においてデング熱の地域流行が発生したこともあり、今後もヒトスジシマカの生息分布や生息条件等についてさらに監視が必要である。

A. 研究目的

ヒトスジシマカは、デング熱等のウイルス性疾患を媒介する感染症対策上重要な節足動物である。近年、東北地方において、その生息域が北へ拡大しており、気温の上昇が影響しているといわれている。岩手県環境保健研究センターでは、2009年から、国立感染症研究所昆虫医科学部の協力を得て岩手県内における同蚊の生息分布の調査を行ってきた。2012~2014年は、東日本大震災の復興に関連してヒトスジシマカ常 在地からの車両・物資・人等の移動による流入機会の増加も予測されるため、岩手県内陸部におけるヒトスジシマカの北限として注視されている盛岡市、更に内陸北部、盛岡以南で未確認だった地点、沿岸部の宮古市周辺の生息状況を調査した。

B. 研究方法

蚊類の生息状況調査は毎年の6~10月、岩手

県盛岡市、宮古市、花巻市、二戸市、花巻市、遠野市、滝沢市、雫石町、岩手町、大槌町、山田町、岩泉町、洋野町、野田村、普代村及び一戸町の7市6町2村の延べ189地点で行った。

調査対象は主に寺院の花生けや手水鉢、屋外に放置された古タイヤなどの人工容器の貯留水に生息する蚊の幼虫及び蛹で、太口ピペットで採取した。1調査地点につき1~12人工容器を調査した。採取した蚊の幼虫を室温で飼育し、羽化させた成虫を、実体顕微鏡下で形態学的に同定した。

C. 研究結果

成虫の羽化が確認された延べ189地点719人工容器について、計3,468頭を同定した。蚊類の採集結果を表1に示す。2012~2014年に採集された蚊の種類はヤマトヤブカ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、オオクロヤブカ、キンパラナガハシカ、およびイエカ類であった。このう

ちヤブカ類では、ヤマトヤブカは全採集地点189地点のうち169地点で確認され、調査地点全域において優先種であった。次いで多く採集されたのはヤマダシマカ及びイエカ類で、県内延べ24地点で採集された。ヒトスジシマカは、盛岡市市街地を中心に採集され、また、盛岡以南で未確認だった北上高地に位置する花巻市東和町で初めて生息が確認された。沿岸では2012年に宮古市と久慈市において、ヒトスジシマカとヤマダシマカの中間的形態の成虫が1頭ずつ採集された。

また、同一地点で2種類以上の蚊が採集された地点は延べ95地点であった。2種類以上の蚊が確認された地点の内訳を表3に示す。ヤマトヤブカとヒトスジシマカが同時に確認された地点は延べ20地点、22人工容器であった。

この結果今回の調査でヒトスジシマカの生息が確認された北限地域は、盛岡市天昌寺町(39°42'42"N, 141°07'16"E)であった。2009~2014年の年ごとの生息北限を図1に、2010~2014年の盛岡市市街地における調査結果を図2に示す。

2010年にヒトスジシマカの北限として確認された玉山区及び過去数年に1度の割合で確認されている名須川町においては、2010年以来、生息は確認できなかった。

D. 考察

2009年の調査で初めて確認され、北限地域であった仙北町では、2014年においてもヒトスジシマカの分布が認められ、この地域では同蚊がすでに定着していることが推定される。また、2012年の北限であった下ノ橋付近でも、同様に同蚊が定着していることが認められた。下ノ橋地点は、近くに中津川や北上川が位置する場所であるため、気温等も安定していることが考えられ、生息条件が整った地域に同蚊が輸送された場合、容易に繁殖し地域に定着することが示唆された。また、同地点は、盛岡市の中心部に近い地区のため、人口密度も高く人の出入りも頻繁に見られ、同蚊の侵入頻度も高く生息域が

拡大することも考えられ、防除対策上重要な地点として監視する必要があると考えられる。

2010年にヒトスジシマカの北限として確認された玉山区及び盛岡市の市街地名須川町においても調査を行ったが生息は確認できなかった。2010年における同地点におけるヒトスジシマカの生息は夏季の偶発的な移動によるもので、その要因として、2010年の記録的な猛暑と秋期における高い気温の継続が考えられる。

2014年までの調査では、ヒトスジシマカの生息北限は盛岡市天昌寺町であり、定着が認められた。天昌寺町は、盛岡市中心部から国道46号で秋田方面に向かう途中にあり、交通量が多い地域である。

ヒトスジシマカは、地球温暖化などによる気温の上昇に伴う分布域の拡大が予想される一方、北限地域においては各年の気温の変化の影響を受けて、分布が縮小・拡大しつつ、定着域を拡大していくと考えられる。同蚊の寒冷地適応による分布拡大の可能性もあるかもしれない。同蚊の生態学的な適応も考慮に入れ、また、GISを利用した気温データとの関連も検討し、今後も長期的に監視を継続することが重要と考えられる。

E. 結論

2012~2014年に実施した岩手県におけるヒトスジシマカの生息分布調査の結果、盛岡市市街地では、その生息分布が着実に拡大していることがわかった。2009年に初めて採集され2010年に拡散と定着が推定された仙北町、下ノ橋町では引き続きヒトスジシマカが採集されており、また、2013年に初めて確認された下ノ橋町より北西に位置する天昌寺町でも、2014年にもヒトスジシマカが確認された。東北地方の主要幹線道路が貫通し県庁所在地でもある盛岡市では、生息地からのヒトスジシマカの移入も頻繁で、温暖化や、ヒトスジシマカの生態的適応や社会・経済的環境の変化に伴い分布の北上・定着を繰り返しつつ、徐々に北上を続けていると考えられる。特に盛岡市の中心部への定着も懸念

されることから、今後とも生息状況を確認することは、防除対策上重要である。

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

佐藤卓、西井和弘、二瓶直子、小林睦生。岩手県におけるヒトスジシマカの分布とその生息条件の推移。第67回日本衛生動物学会大会、2015年3月、金沢市

小林睦生、二瓶直子、西井和弘、佐藤卓、小川浩平、澤辺京子。東北地方におけるヒトスジシマカの分布と20年間の年平均気温11 以上の確立との関係 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

表1 盛岡市内における蚊類の生息状況調査結果

仙北町			大慈寺町			茶畑・八幡町			下の橋付近			名須川町～ 北山周辺			天昌寺町			
2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	
調査地点数	3	4	4	4	4	5	-	2	1	8	4	8	14	12	7	-	1	2
ヒトスジシマカ	2	1	1	0	1	2	-	0	0	2	3	5	0	0	0	-	1	1
ヤマトヤブカ	2	3	4	4	4	5	-	2	1	8	3	7	14	12	7	-	0	1
ヤマダシマカ	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
イエカ類	1	1	0	0	2	0	-	0	0	1	2	1	1	2	0	-	1	0
オオクロヤブカ	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
調査人工容器数	11	16	7	16	21	23	-	9	3	29	31	16	74	70	26	-	7	8
ヒトスジシマカ	3	2	1	0	1	2	-	0	0	4	11	7	0	0	0	-	6	5
ヤマトヤブカ	4	6	7	16	17	22	-	7	3	20	13	11	64	40	23	-	0	2
ヤマダシマカ	0	0	0	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
イエカ類	3	3	0	0	2	0	-	0	1	1	4	2	1	2	3	-	1	0
オオクロヤブカ	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
判別個体数	34	31	44	113	98	94	-	33	29	168	102	83	503	177	162	-	39	45
ヒトスジシマカ	10	11	19	0	3	3	-	0	0	71	22	24	0	0	0	-	34	27
ヤマトヤブカ	16	13	25	113	87	90	-	33	26	95	66	53	497	168	159	-	0	18
ヤマダシマカ	0	0	0	0	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
イエカ類	8	7	0	0	8	0	-	0	3	2	14	6	6	9	3	-	5	0
オオクロヤブカ	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
新庄			上米内			川目			盛岡市街計			玉山区			盛岡市合計			
2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	
調査地点数	-	1	-	-	2	1	1	-	-	30	30	30	2	4	11	32	34	41
ヒトスジシマカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	4	6	9	0	0	0	4	6	9
ヤマトヤブカ	-	1	-	-	2	1	1	-	-	29	27	27	2	4	8	31	31	35
ヤマダシマカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0	1
イエカ類	-	1	-	-	0	0	0	-	-	3	9	2	0	3	0	3	12	2
オオクロヤブカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0	1
調査人工容器数	-	6	-	-	6	2	1	-	-	131	166	88	6	30	26	137	196	114
ヒトスジシマカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	7	20	15	0	0	0	7	20	15
ヤマトヤブカ	-	3	-	-	3	2	1	-	-	105	89	72	6	17	19	111	106	91
ヤマダシマカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	0	0	1	0	0	1	0	0	2
イエカ類	-	3	-	-	0	0	0	-	-	5	15	7	0	3	0	5	18	7
オオクロヤブカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	2	0	0	2
判別個体数	-	28	-	-	21	9	2	-	-	820	529	477	28	74	123	848	603	600
ヒトスジシマカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	81	70	73	0	0	0	81	70	73
ヤマトヤブカ	-	11	-	-	21	9	2	-	-	723	399	387	28	60	105	751	459	492
ヤマダシマカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	0	0	1	0	0	2	0	0	3
イエカ類	-	17	-	-	0	0	0	-	-	16	60	16	0	14	0	16	74	16
オオクロヤブカ	-	0	-	-	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	16	0	0	16

表2 岩手県内における蚊類の生息状況調査結果

盛岡市				盛岡市玉山区				零石町			滝沢市			岩手町			花巻市大迫町			花巻市東和町			
2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014			
延べ調査地点数	30	30	30	2	4	11	-	-	1	-	2	-	3	3	-	-	-	2	-	-	2		
ヒトスジシマカ	4	6	9	0	0	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	1		
ヤマトヤブカ	28	27	27	2	4	8	-	-	1	-	1	-	3	3	-	-	-	2	-	-	2		
ヤマダシマカ	0	0	0	0	0	1	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	1		
イエカ類	3	9	2	0	3	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	0		
オオクロヤブカ	0	0	0	0	0	1	-	-	0	-	0	-	0	1	-	-	-	0	-	-	0		
キンパラナガハシカ	0	0	0	0	0	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	0		
調査人工容器数	131	166	88	6	30	26	-	-	1	-	5	-	4	13	-	-	3	-	-	7			
ヒトスジシマカ	7	20	15	0	0	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	2		
ヤマトヤブカ	105	89	72	6	17	19	-	-	1	-	5	-	4	10	-	-	-	3	-	-	7		
ヤマダシマカ	0	0	1	0	0	1	-	-	0	-	0	-	0	1	-	-	-	0	-	-	2		
イエカ類	5	15	7	0	3	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	0		
オオクロヤブカ	0	0	0	0	0	2	-	-	0	-	0	-	0	1	-	-	-	0	-	-	0		
キンパラナガハシカ	0	0	0	0	0	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	0		
判別個体数	820	529	477	28	74	123	-	-	2	-	11	-	19	54	-	-	13	-	-	31			
ヒトスジシマカ	81	70	73	0	0	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	2		
ヤマトヤブカ	723	399	387	28	60	105	-	-	2	-	11	-	19	52	-	-	-	13	-	-	27		
ヤマダシマカ	0	0	1	0	0	1	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	2		
イエカ類	16	60	16	0	14	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	0		
オオクロヤブカ	0	0	0	0	0	16	-	-	0	-	0	-	0	2	-	-	-	0	-	-	0		
キンパラナガハシカ	0	0	0	0	0	0	-	-	0	-	0	-	0	0	-	-	-	0	-	-	0		
遠野市				大槌町				宮古市			山田町			岩泉町			普代村			久慈市			
2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014			
延べ調査地点数	-	-	14	-	-	1	4	6	3	-	-	2	4	4	-	1	-	-	4	-	-		
ヒトスジシマカ	-	-	0	-	-	0	1	0	0	-	-	0	0	0	-	0	-	-	1	-	-		
ヤマトヤブカ	-	-	13	-	-	1	2	5	3	-	-	2	3	4	-	1	-	-	4	-	-		
ヤマダシマカ	-	-	0	-	-	0	4	3	3	-	-	1	1	1	-	1	-	-	2	-	-		
イエカ類	-	-	1	-	-	0	0	2	0	-	-	1	0	1	-	0	-	-	0	-	-		
オオクロヤブカ	-	-	0	-	-	0	1	3	2	-	-	0	0	0	-	0	-	-	0	-	-		
キンパラナガハシカ	-	-	1	-	-	0	1	3	0	-	-	0	0	2	-	0	-	-	2	-	-		
調査人工容器数	-	-	34	-	-	14	16	34	15	-	-	13	7	10	-	4	-	-	14	-	-		
ヒトスジシマカ	-	-	0	-	-	0	1	0	0	-	-	0	0	0	-	0	-	-	1	-	-		
ヤマトヤブカ	-	-	30	-	-	13	8	17	10	-	-	3	5	5	-	2	-	-	13	-	-		
ヤマダシマカ	-	-	0	-	-	0	6	8	5	-	-	5	2	1	-	1	-	-	5	-	-		
イエカ類	-	-	3	-	-	0	0	4	0	-	-	1	0	1	-	0	-	-	0	-	-		
オオクロヤブカ	-	-	0	-	-	0	1	5	4	-	-	0	0	0	-	0	-	-	0	-	-		
キンパラナガハシカ	-	-	1	-	-	0	3	4	0	-	-	0	0	2	-	0	-	-	2	-	-		
判別個体数	-	-	224	-	-	88	115	78	66	-	-	26	61	32	-	12	-	-	89	-	-		
ヒトスジシマカ	-	-	0	-	-	0	1	0	0	-	-	0	0	0	-	0	-	-	1	-	-		
ヤマトヤブカ	-	-	191	-	-	88	66	26	43	-	-	12	55	27	-	9	-	-	71	-	-		
ヤマダシマカ	-	-	0	-	-	0	32	13	11	-	-	5	6	2	-	3	-	-	12	-	-		
イエカ類	-	-	33	-	-	0	0	26	0	-	-	9	0	1	-	0	-	-	0	-	-		
オオクロヤブカ	-	-	0	-	-	0	6	10	12	-	-	0	0	0	-	0	-	-	0	-	-		
キンパラナガハシカ	-	-	0	-	-	0	10	3	0	-	-	0	0	2	-	0	-	-	5	-	-		
洋野町				野田村				二戸市			一戸町			合計									
2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014	2012	2013	2014			
延べ調査地点数	4	-	-	1	-	-	4	6	1	4	3	3	61	58	70								
ヒトスジシマカ	0	-	-	0	-	-	0	0	0	0	0	0	6	6	10								
ヤマトヤブカ	4	-	-	1	-	-	4	6	0	4	1	3	56	51	62								
ヤマダシマカ	1	-	-	1	-	-	1	0	0	2	1	0	13	5	6								
イエカ類	0	-	-	0	-	-	2	0	0	0	0	0	5	15	4								
オオクロヤブカ	0	-	-	0	-	-	1	0	0	1	0	0	3	4	3								
キンパラナガハシカ	0	-	-	0	-	-	2	0	1	1	2	1	6	7	3								
調査人工容器数	10	-	-	4	-	-	14	16	1	6	13	14	216	287	216								
ヒトスジシマカ	0	-	-	0	-	-	0	0	0	0	0	0	9	20	17								
ヤマトヤブカ	8	-	-	2	-	-	12	14	0	7	11	13	67	168	171								
ヤマダシマカ	3	-	-	1	-	-	1	0	0	2	2	0	21	12	14								
イエカ類	0	-	-	0	-	-	3	0	0	0	0	0	8	23	11								
オオクロヤブカ	0	-	-	0	-	-	1	0	0	2	0	0	4	6	6								
キンパラナガハシカ	0	-	-	0	-	-	2	0	1	1	2	1	8	8	3								
判別個体数	82	-	-	7	-	-	126	46	3	150	17	65	1509	841	1118								
ヒトスジシマカ	0	-	-	0	-	-	0	0	0	0	0	0	83	70	75								
ヤマトヤブカ	73	-	-	6	-	-	86	46	0	131	9	62	1267	630	930								
ヤマダシマカ	9	-	-	1	-	-	2	0	0	4	3	0	69	18	21								
イエカ類	0	-	-	0	-	-	31	0	0	0	0	0	47	101	58								
オオクロヤブカ	0	-	-	0	-	-	4	0	0	9	0	0	19	12	28								
キンパラナガハシカ	0	-	-	0	-	-	3	0	3	6	5	3	24	10	6								

表3 岩手県内で同一地点または同一人工容器で2種類以上の蚊が確認された地点の内訳

	延べ地点数			延べ人工容器数			
	2012	2013	2014	2012	2013	2014	
2種の蚊が同一 地点、人工容器 で生息	ヒトスジシマカ+ヤマトヤブカ	2	8	10	2	9	11
	ヒトスジシマカ+イエカ類	0	4	1	0	1	1
	ヤマトヤブカ+イエカ類	1	13	4	1	7	4
	ヤマトヤブカ+オオクロヤブカ	3	3	3	3	0	1
	ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ	9	5	7	11	5	7
	ヤマトヤブカ+キンパラナガハシカ	4	5	1	4	3	1
	ヤマダシマカ+オオクロヤブカ	0	0	2	0	0	1
	ヤマダシマカ+キンパラナガハシカ	1	4	0	1	3	0
	イエカ類+オオクロヤブカ	0	2	0	0	0	0
	イエカ類+キンパラナガハシカ	0	2	0	0	0	0
3種の蚊が同一 地点、人工容器 で生息 [*]	オオクロヤブカ+キンパラナガハシカ	0	1	0	0	0	0
	ヒトスジシマカ+ヤマトヤブカ+アカイエカ	0	3	1	0	1	1
	ヒトスジシマカ+ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ	1	0	0	1	0	0
	ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ+オオクロヤブカ	1	0	0	1	0	0
	ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ+キンパラナガハシカ	1	4	0	1	0	0
	ヤマトヤブカ+イエカ類+キンパラナガハシカ	0	1	0	0	0	0
	ヤマトヤブカ+イエカ類+オオクロヤブカ	0	1	0	0	0	0
	イエカ類+オオクロヤブカ+キンパラナガハシカ	0	1	0	0	0	0

* 2種の蚊の同一地点、人工容器での生息確認数の内数

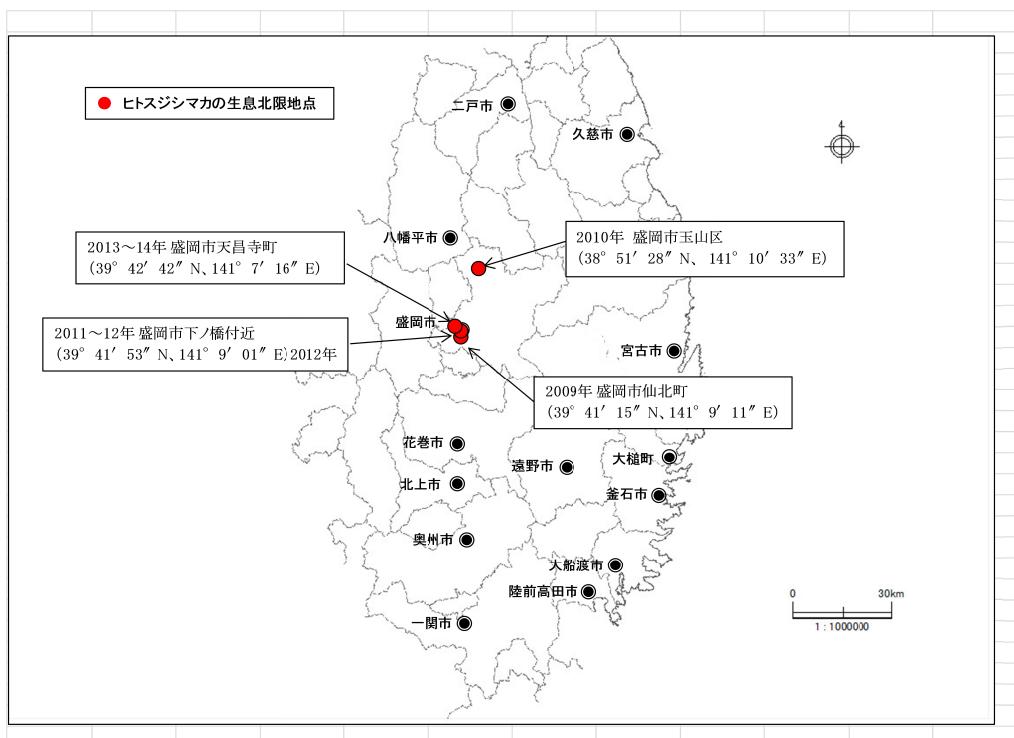


図1 2009～2014年のシトスジシマカの生息北限

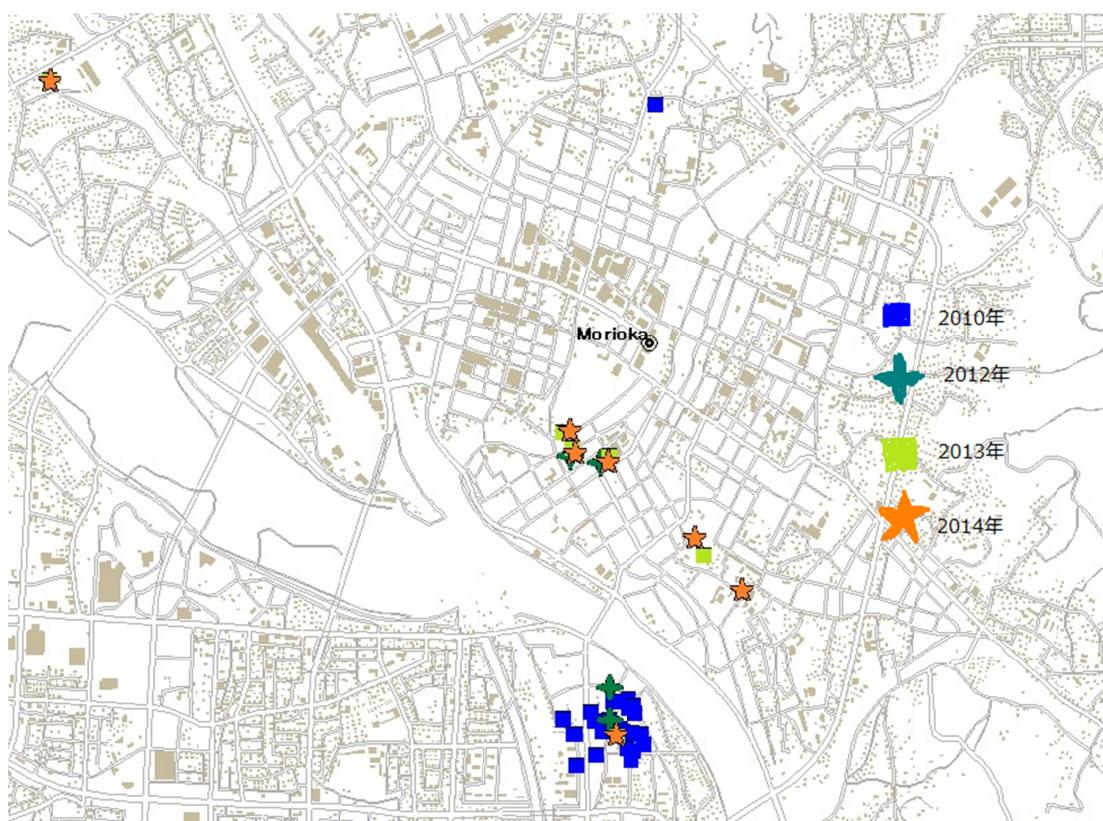


図2 2010～2014年生息調査（盛岡市内）におけるヒトスジシマカの生息状況

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

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・昆虫医学部・研究員
	小川浩平	国立感染症研究所・昆虫医学部・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ット、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. soulensis*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に, 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 nippoi* (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 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がある。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る間に、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、稻の品種改良が進み、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. crucians* 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), *Uranothaenia novoboscura* (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撲したこと、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、順次解析をすすめしており、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

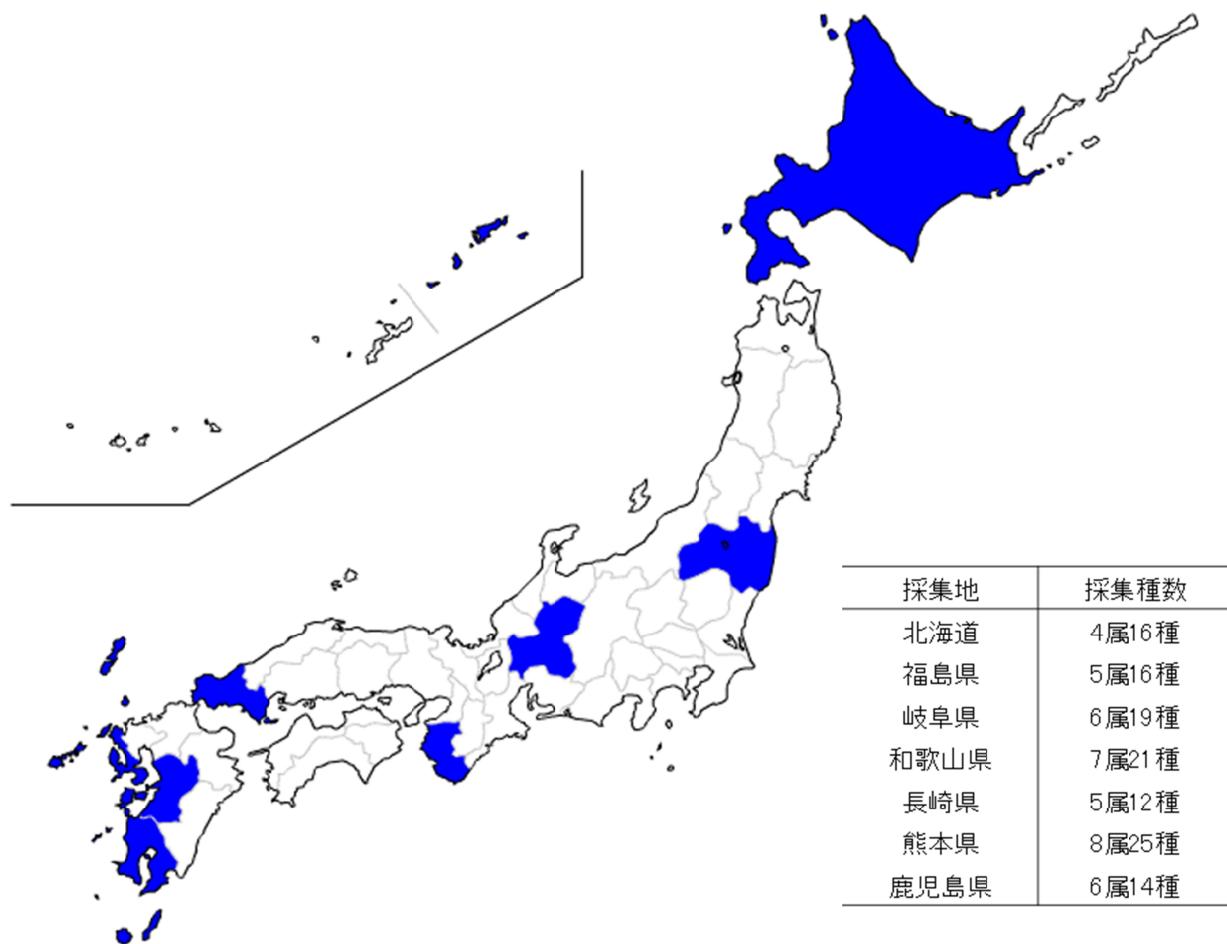


図1 疾病媒介蚊調査地(青色)と採集種数(成虫と幼虫)

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 vagsans</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 nippoii</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)

species	Hokkaido	Fukushima	Gifu	Wakayama	Yamaguchi	Nagasaki	Kumamoto	Kagoshima
<i>Anopheles lindseyi 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. sinuoides</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</i> grp		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. sihensis</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. yamadae</i>	5							
<i>Armigeres subalbatus</i>							4	7
<i>Uranotaenia novoboscra</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

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

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*) , ネッタタイエカ (*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タ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タ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, 鹿児島のアカイエカ集団はネッタタイエカのハプロタイプの割合がやや多かったが, 有意な差はとはならなかった。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タタイエカと同じタイプをもっていることを示しておいる。アカイエカとネッタ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タタイエカの境界地域で遺伝的な変異でだけでなく形態的・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*) , ネッタタイエカ (*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, ネッタ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, Fonseca *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, 本来ネッタタイエカは日本では南西諸島にのみに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, アカイエカとネッタタイエカとの遺伝的違いや, 九州本土でのネッタ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94.5分の後、96.30秒、55.30秒、72.1分を35サイクル行った後72.5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'-GTAATACGACTCACTATAGGGACCGCGTGGTCGACGGCCGGCTGGT-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AP1(5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-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AP1, AP2(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'-GGTCCTCGTCGATGTTGTT-3', R: 5'-TTGTTCGTCCAACTTGTCC A-3'), CppAC012(F: 5'-GTGCC ACCTCAAG TGTCAAGA-3', R: 5'-TCCGA TGTTTCATTG GTTCC-3'), Cpp4b007(F: 5'-ATTGAATGGTTCCCAATGT-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, 1 μlの抽出DNAを加え, 96.5分の後, 96.30秒, 54.30秒, 72.30

秒を35回繰り返し,最後に72~5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とした(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,福岡県が少し低いが,AMOVAでは有意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、鹿児島の集団ネッタタイ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タタイ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、鹿児島にはネッタタイ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タタイ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タタイ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、ネッタタイイエカを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。アカイエカとネッタタイ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タタイイエカの境界地域で遺伝的な変異でだけでなく形態的・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

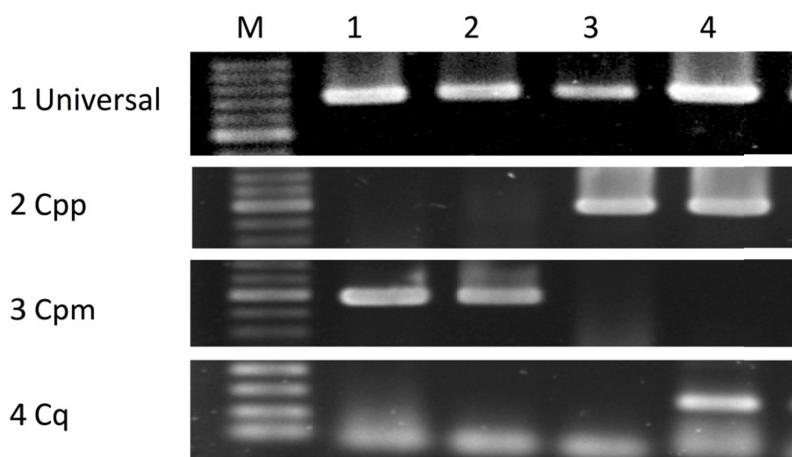


図1 アセチルコリンエステラーゼ領域による PCR

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	
		C _{pp}	C _q		C _{pp}	C _q
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

C_{pp} : アカイエカハプロタイプ, C_q : ネッタ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.

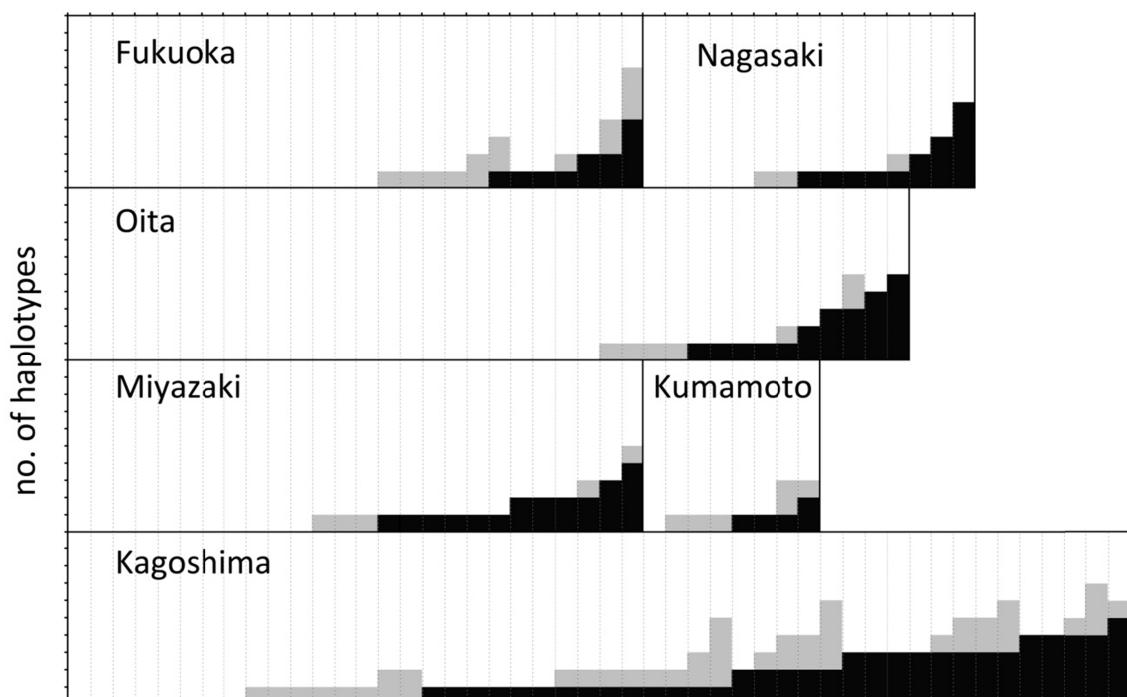


図2 マイクロサテライト5領域の頻度分布

九州(福岡, 長崎, 大分, 熊本, 宮崎, 鹿児島)の各個体の頻度分布. 黒がネッタ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, ネッタ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
freqencies		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 : ネッタイ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			
freqencies		0.858	0.092	0.049			

Cpp : アカイエカハプロタイプ , Cq : ネッタイイエカハプロタイプ , nd : 判別不能

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

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プロ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の蚊の中には、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のドライアイスを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プ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と思われたが、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個体でスプ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プ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プロゾイトも認められたが、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プロゾイトが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

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

国内捕集コガタアカイエカからの日本脳炎ウイルスの検出と遺伝子解析

分担研究者	伊澤晴彦	国立感染症研究所・昆虫医学部・第二室長
協力研究者	小林大介	国立感染症研究所・昆虫医学部・研究生
	江尻寛子	国立感染症研究所・昆虫医学部・流動研究員
	鍬田龍星	国立感染症研究所・昆虫医学部・協力研究員
	津田良夫	国立感染症研究所・昆虫医学部・主任研究官
	佐々木年則	国立感染症研究所・昆虫医学部・主任研究官
	澤邊京子	国立感染症研究所・昆虫医学部・部長

研究要旨

近年の日本国内における日本脳炎患者数は年間 10 人以下で推移しているが、野外環境下での日本脳炎ウイルス (JEV) の活動は依然として活発であると考えられる。我々は、国内における日本脳炎主要媒介蚊であるコガタアカイエカの JEV 保有状況の把握とウイルス遺伝子解析を主な目的として、国内各地で捕集された蚊個体からの JEV の検出と分離、ならびにウイルス遺伝子の分子系統解析を 2005 以降継続して行ってきた。

2011 年は石川県七尾市(9/11)および熊本県合志市(8/29)、2012 年は長崎県諫早市(9/3-4)および群馬県前橋市(8/31-9/1)、2013 年は長崎県諫早市(9/4-5)の畜舎とその周辺においてコガタアカイエカを捕集した。捕集蚊は最高 25 個体までを 1 プールとして乳剤を調製し、C6/36 細胞を用いてウイルス分離を試みた。その結果、2012 年および 2013 年の長崎県諫早市捕集蚊のそれぞれ 1 プールから JEV が分離された。分離株のゲノム中のエンベロープ (E) 領域の遺伝子配列を解析した結果、ウイルスの遺伝子型は 1 型であることが判明し、近年日本を含む東アジア地域で報告されている株と遺伝的に極めて近縁であることが確認された。

今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況を調査し、分離株の遺伝子解析を継続することで JEV 媒介蚊からの感染リスクを把握しておくことは予防対策上重要であると考えられる。

A. 研究目的

日本脳炎ウイルス Japanese encephalitis virus (JEV) は東南アジアに広く分布し、WHO の報告では世界中で年間 3~5 万人の患者が発生していると推定されている。近年の日本国内における日本脳炎患者数は、年間十例以下と低く推移している。これには、現行の日本脳炎ワクチンによる予防接種が大きく寄与していると考えられる。しかしながら、西・南日本の高齢者を中心に日本脳炎患者の発生は毎年途切れることなく続いている。症例として顕在化していない不顕性感染

者も相当数あると推定される。また、近年の急速な遺伝子検出技術の向上を背景に、これまで原因不明の脳炎・無菌性髄膜炎あるいは意識障害と診断された症例の中には、JEV 感染が関与している場合が少なからず含まれていることも報告されている。一方、毎年継続的に行われている全国的なブタの JEV 抗体価の調査からは、依然として JEV の地域的な蔓延が強く示唆されており、主要媒介蚊であるコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* の発生も毎年広範囲で確認されることから、国内における JEV の感染リスク

は依然として高いものと考えられる。

我々は、媒介蚊の JEV 保有状況と感染リスクを把握する目的で、2005 年以降、日本各地で捕集したコガタアカイエカから JEV の分離を試み、得られた分離株の遺伝子解析を継続して行ってきた。本研究では 2011-2013 年の夏期に国内各所で捕集したコガタアカイエカからの JEV の分離を試み、分離株の遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1. コガタアカイエカの捕集

コガタアカイエカは各調査地点の状況に応じ、捕虫網、吸虫管あるいはドライアイストラップを用いて捕集した。

2. 捕集蚊の処理とウイルス分離

捕集蚊は捕集地および捕集日ごとに最高 25 個体までを 1 プールとしてマイクロチップに回収し -80°で保存した。このうち、吸血直後のため腹部に動物血液を有する蚊個体については、少なくとも 1 週間砂糖水のみで飼育を継続して消化管内の血液を完全に消化させるか、あるいは卵の産下後に回収することで、血液中の残存ウイルスならびに中和抗体の影響を極力排除した。これら蚊プール検体を 2% 牛胎児血清および 0.2 mM 非必須アミノ酸液を添加したイーグル最少培地の中で破碎した。この破碎蚊乳剤を遠心分離にかけ、得られた遠心上清の一部を口径 0.45 μm の濾過フィルターに通したのち、ヒトジシマカ由来 C6/36 細胞に接種した。接種後は細胞変性効果の出現の有無を確認しながら 28°、5%CO₂ 存在下で 7 日間培養した。さらに少なくとも 2 代盲継代を繰り返した後、培養上清を回収し -80° で保存した。

3. JEV ゲノムの検出と遺伝子解析

検体接種後の培養上清からの全 RNA 抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。各抽出操作は基本的に添付のマニュアルに従った。続く JEV ゲノム検

出には、Kuno (1998) により報告されているフラビウイルス汎用プライマーセット (FU1 & cFD2 および FU2 & cFD3) を用いた One step RT-PCR で行った。反応後産物は 2% アガロースゲル電気泳動により確認した。これにより、フラビウイルス陽性と判定された検体については、エンベロープ (E) 領域の解析のための遺伝子増幅を行った。まず、SuperScript III first strand synthesis system for RT-PCR (Life Technologies) を用いて first strand cDNA を合成した。プライマーにはキットに内包のランダムヘキサマーを用い、逆転写反応は添付のマニュアルで推奨されている条件で行った。逆転写後の PCR は、KOD plus ver.2 (TOYOBO) で行った。プライマーには、JEV E 全領域をカバーするように設計した特異的プライマー 3 組 (配列省略) を用い、反応条件は製品添付のマニュアルに従った。反応後の PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動により確認した。得られた増幅産物はゲルから抽出・精製後、BigDye Terminator ver.1.1 (Life Technologies) でシーケンシングサンプルを調製し、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、GENETYX-WIN ver.12 および BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用した。分子系統樹作成は、MEGA ver.5.1 を用いて行った。

C. 結果

今回、2011-2013 年夏期に 4 県の畜舎で捕集したコガタアカイエカからウイルス分離を試みた結果、2012 年および 2013 年の長崎県諫早市の同地点で捕集されたコガタアカイエカそれぞれ 1 プールから JEV が分離された (2012 年 : 検査蚊個体数 940 頭、陽性プール数 1/検査プール数 42, プール陽性率 2.4%; 2013 年 : プール陽性率 2.2%) (表 1)。最小感染率 MIR (陽性プールに最低 1 頭の感染蚊が存在すると仮定した場合の 1000 頭中の感染蚊個体数) は、2012 年は

1.06, 2013年は0.89と算出された。長崎県は例年ブタにおけるHI抗体保有率は80%を超え,これまでの媒介蚊調査からもJEVの保有がほぼ毎年確認されることから,JEVの感染リスクが高い地域といえる。一方,他の地域の蚊からはJEVは分離されなかつたが,蚊特異的ウイルスと考えられるコガタアカイエカラブドウイルス(CTRV)は,長崎県を含むいずれの地域でも高率に分離された(表1)。

分離されたJEV株のE領域の塩基配列を決定し,これを基に分子系統樹を作成した(図1)。その結果,今回分離されたウイルス株の遺伝子型は1型であり,近年東アジア地域から報告された株や2002年以降西・南日本を中心に分離された株と遺伝的にみて極めて近縁あることが確認された。また,これまで我々が解析した国内分離株と比較したところ,塩基配列レベルで若干の多様性が認められるものの,そのほとんどがコード蛋白質のアミノ酸変異を伴わない置換であった。一方,ウイルスの病原性に関連のあるとされるE蛋白質の123番目のアミノ酸残基について,近年国内で分離される1型株は,アスパラギン(N)あるいはセリン(S)のほぼいずれかであることが報告されているが,今回の2つの分離株も,アスパラギン(N)ならびにセリン(S)であった。

D. 考察

今回JEVが分離された長崎県諫早市の蚊捕集場所は,JEVの増幅動物であるブタが肥育されている畜舎で,周辺にはコガタアカイエカの発生源となる水田が点在している環境である。また,ヒトの生活環境にも程近い。JEVが分離された時期には,例年ブタのHIおよび2-ME感受性抗体の上昇が確認されており,捕集されたコガタアカイエカの中には,ウイルス血症を呈した時期のブタを吸血した経験のある個体が少なからず含まれていたと考えられる。ウイルス遺伝子の分子系統解析の結果,2分離株ともに同一のクラスター

を形成した。このことは,近年東アジア地域で流行している株が毎年当地域に侵入してくる可能性,あるいは当地域周辺においてJEVが年を越えて維持・伝播されている可能性も考えられる。さらに,同地域で過去に行った調査でも,ほぼ同じ時期に採集された蚊から高率にウイルスが分離されていることから,毎年JEVの活動が活発な地域であることがうかがえる。現在では,日本脳炎ワクチンの普及や生活環境の変化により,ブタの感染状況と患者発生は必ずしも一致していない。しかし,ブタや媒介蚊のウイルス感染状況からJEVが蔓延していると推測される地域では,JEVに対する免疫が低い周辺住民への感染リスクは依然として高いと推定される。実際,西・南日本の高齢者を中心とした散発的な患者発生は,JEV保有コガタアカイエカによる刺咬が直接的な原因と考えられる。日本国民においてはワクチンの定期接種により効果的な感染阻止が図られているが,日本脳炎ワクチンの接種が行われていない国や地域からの渡航者が日本国内で日本脳炎に感染するリスクはより高くなると考えられる。このため,今後急速に増加が見込まれる海外からの渡航者に向けた日本脳炎の感染リスクの周知と防蚊対策の啓発も重要である。

JEVは増幅動物や媒介蚊によってインド以東のアジア広域に拡散すると考えられており,その流行に伴って日本におけるJEVの遺伝子型が,1990年ごろを境に3型から1型へと遷移したことが報告されている。遺伝子解析の結果,今回分離された株は1型に属しており,近年日本をはじめとする東アジア各地域で分離された株と極めて近縁であることが判明した。今後,これら分離株の増殖性や病原性を詳細に解明し,予防対策につなげていくことが重要である。

本研究により,依然として地域や時期によっては,JEVがコガタアカイエカからヒトへ媒介される可能性があることが強く示唆さ

れ、今後も国内における媒介蚊の JEV 保有状況とウイルス遺伝子の変化と推移を把握しておくことは、疫学上重要であると考えられる。

E. 結論

- 1) 2011 年に石川、熊本、2012 年に長崎、群馬、2013 年に長崎の各県下の豚舎を含む畜舎で捕集されたコガタアカイエカからウイルス分離を行なった結果、2012 年および 2013 年の長崎県捕集蚊のそれぞれ 1 プールから JEV が分離された (2012 年: プール陽性率 ; 2.4% , MIR ; 1.06 , 2013 年 : プール陽性率 ; 2.2% , MIR; 0.89) .
- 2) E 領域の配列解析の結果から、今回分離されたウイルス株は、近年日本を含めた東アジア地域で多く検出されている 1 型のウイルスと遺伝的に極めて近縁であることが明らかとなった。
- 3) 豚舎を含む畜舎周辺で捕集されたコガタアカイエカは JEV を高率で保有する可能性があり、ブタと蚊の感染状況から JEV が蔓延していると推測される地域では、ヒトへの感染リスクが高くなっていると考えられる。

謝辞

コガタアカイエカの捕集とウイルス検出を実施するにあたり、以下の方々にご協力いただきました (敬称略)。

砂原俊彦、二見恭子、今西望、皆川昇 (長崎大学 热帯医学研究所 病害動物分野)
吉川亮、松本文昭、吾郷昌信 (長崎県 環境保健研究センター)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kuwata R, Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y,

Tajima S, Sasaki T, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K. 2012. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). In Vitro Cell Dev Biol Anim. 8:369-376.

Kuwata R, Nga PT, Yen NT, Hoshino K, Isawa H, Higa Y, Hoang NV, Trang BM, Loan DP, Phong TV, Hien NT, Sasaki T, Tsuda Y, Kobayashi M, Sawabe K, Takagi M. 2013. Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008. Am J Trop Med Hyg. 88:681-688.

Kuwata R, Isawa H, Hoshino K, Sasaki T, Kobayashi M, Maeda K, Sawabe K. 2015. Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) cells persistently infected with *Culex* flavivirus (Flaviviridae). J Med Entomol. in press.

Hoshino K, Isawa H, Kuwata R, Tajima S, Takasaki T, Iwabuchi K, Sawabe K, Kobayashi M, Sasaki T. 2015. Establishment and characterization of two new cell lines from the mosquito *Armigeres subalbatus* (Coquillett) (Diptera: Culicidae). In Vitro Cell Dev Biol Anim. in press.

2. 学会発表

田島茂、小滝徹、谷ヶ崎和美、小林大介、谷脇妙、沢辺京子、高崎智彦. Flap 配列を付加したフラビウイルス共通プライマーおよびアルファウイルス共通プライマーの評価とゲタウイルス検出の実例について. 第20回トガ・フラビ・ペストウイルス研究会 2013 年11月、神戸市

小林大介、伊澤晴彦、江尻寛子、佐々木年則、砂原俊彦、二見恭子、吉川亮、松本文昭、吾郷昌信、津田良夫、鍬田龍星、田島茂、皆川昇、小林睦生、太田伸生、沢辺京子. 2012 年に国内で捕集されたコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* のウイルス

保有状況調査 .第 66 回日本衛生動物学会大会 , 2014 年 3 月 , 岐阜市

小林大介 , 伊澤晴彦 , 江尻寛子 , 佐々木年則 , 前川芳秀 , 吉川亮 , 松本文昭 , 吾郷昌信 , 津田良夫 , 鍋田龍星 , 田島茂 , 小林睦生 , 太田伸生 , 沢辺京子 . 2012 年および 2013 年に長崎県で捕集されたコガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* のアルボウイルス保有状況調査 . 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会 , 2014 年 5 月 , 山口市

小林大介 , 伊澤晴彦 , 前川芳秀 , 糸川健太郎 , 砂原俊彦 , 今西望 , 吉川亮 , 松本文昭 , 吾郷昌信 , 津田良夫 , 江尻寛子 , 佐々木年則 , 小林睦生 , 小滝徹 , 高崎智彦 , 皆川昇 , 太田伸生 , 沢辺京子 . 2013 年に長崎県で捕集されたコガタアカイエカのウイルス保有状況調査 . 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

表1 2011 - 2013年国内捕集コガタアカイエカからのウイルス分離成績

捕集地	♂/♀	捕集日	個体数	プール数	分離結果	
					JEV	CTRV
熊本県合志市	♀	2011年8月29日	177	18	0	4
石川県七尾市	♀	2011年9月11日	38	4	0	2
群馬県前橋市	♀	2012年8月31日・9月1日	121	6	0	6
長崎県諫早市	♀	2012年9月3・4日	940	42	1	14
長崎県諫早市	♀	2013年9月4・5日	1125	45	1	8

図1 エンベロープ(E)領域の塩基配列に基づく分子系統解析(近接結合法による系統樹)

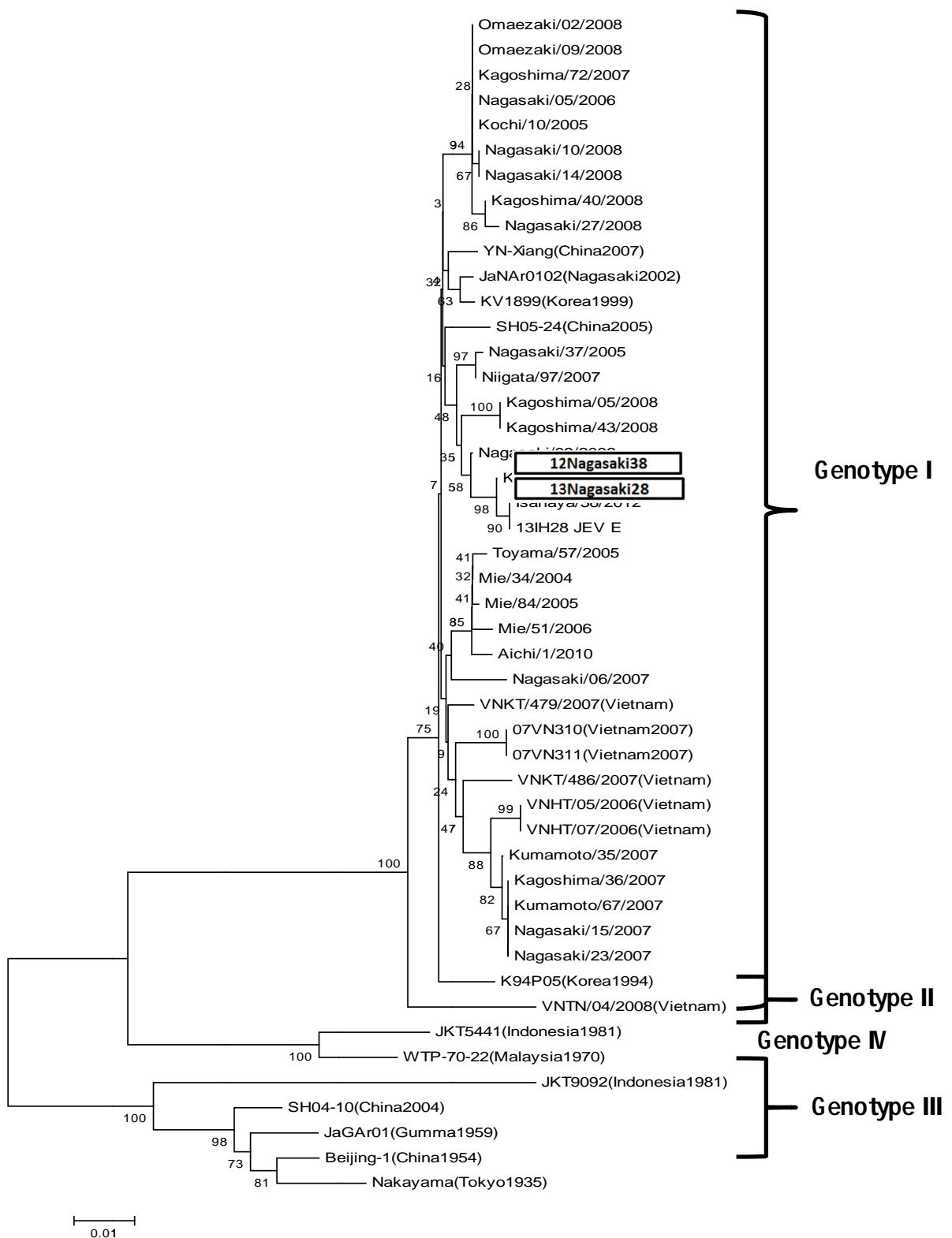


図2 近年のJEV国内分離株におけるエンベロープ蛋白質の123番アミノ酸残基に見られる変異

分離年代			↓	
2005年	05Kochi05aa	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	05Nagasaki37aa	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	05Toyama57aa	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
2006年	Nagasaki0506_1	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	Nagasaki0906_1	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	07KGM36-Env_1	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP		
	07KGM72-Env_1	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	07Kumamoto35	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP		
2007年	07Kumamoto67	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP		
	07Nagasaki06	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	07Nagasaki15	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP		
	07Nagasaki23	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP		
	07Niigata97	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	08Kagoshima05	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	08Kagoshima40	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	08Kagoshima43	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	08Nagasaki10	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
2008年	08Nagasaki14	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	08Nagasaki27	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	08Omaezaki02	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	08Omaezaki09	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
2009年	09Kagoshima53	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP		
2010年	Aichi_1_2010	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
	05Kochi10	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		
2012年	12Nagasaki38	IDTCAKFSCTNKAIGRMIQP		
2013年	13Nagasaki28	IDTCAKFSCSTS KAIGRMIQP		

Genotype I

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

**日本脳炎ウイルスの病原性に関する研究と遺伝子型別検出法開発
「日本脳炎ウイルス国内分離株のゲノムと病原性の監視」**

分担研究者 高崎智彦 ウィルス第一部・第二室長
協力研究者 田島 茂 ウィルス第一部・主任研究官

研究要旨

本研究事業において我々は主に蚊によって媒介される日本脳炎ウイルス（JEV）について、近年国内外で分離された JEV 株の性状解析およびこれらの株に対する現行ワクチンの効果を調べてきた。本研究期間中の研究成果として、1) 高病原性型と考えられる NS4A 3-Ile 型株の分離株中の割合を調べ、約 20% であることを示した。また 3-Ile 型でも高病原性を示さない株が存在することを明らかにした。2) 遺伝子型 III 型ベースで生産されている現行ワクチンは I 型株に対しても III 型と同様に中和効果があることを明らかにした。3) 一方、遺伝子型 V 型に対する現行ワクチンの中和効果は I, III 型に比べ低く、また V 型 Muar 株のマウス病原性は比較的強いことを明らかにした。我々の結果は、現在の主要型である遺伝子型 I 型に対してはこれまでの対応で特に問題ないことを示す一方で、現在のところ国内で確認されていない V 型が侵入した場合には、ワクチン接種をしていても不安が残ることを示唆している。V 型株はこれまでに世界でも 3 株しか分離されていないことから解析が進んでおらず、性状も不明な点が多いためこの先蔓延する可能性があるのか予測できない。今後はワクチン接種したヒト血清を用いた解析や、蚊での媒介能力など更なるウイルス性状解析が必要となるだろう。

A. 研究目的

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）の感染が原因の中枢神経の疾患である。感染しても多くの場合不顕性感染に終わるが、発症した場合には致死率は 20~40% に達する重篤な感染症である。JEV は水田等に発生するコガタアカイエカなど、イエカにより媒介され、ブタや水鳥などのウイルス増殖動物とともに感染環を形成する。一方ヒトは終宿主に当たる。日本脳炎の発生地域は、東アジアから東南アジア、南アジアと広範囲に及ぶ。日本国内での日本脳炎患者数は 1990 年以降 10 例以下で推移している。しかし WHO の推計では、世界で年間約 4 万 3 千人が日本脳炎を発症し、うち約 1 万 1 千人が死亡、約 9 千人が重篤な超える後遺症に苦しんでいるとされる。このように世界

的にみれば日本脳炎は決して過去の疾患ではなく、現在も警戒すべき感染症である。また日本国内でも JEV は現在も毎年分離され続けており、国内での感染リスクは消滅していない。

JEV には 5 つの遺伝子型があるが、国内で分離されるウイルスは 90 年代初頭を境に III 型から I 型へと変化した。同様の変化は日だけでなく、韓国やベトナムでもほぼ同時期に起こっている。さらに近年では中国、台湾、タイ、インドでも同様の変化が認められている。これまでに我々は I 型 JEV 分離株の性状解析を続けてきた。分離株のマウスに対する病原性を調べてきたところ、1 つの株（Mie/40/2004 株）が他に比べ顕著に高い病原性を示した。その原因を探ったところ、ウイルスの非構造蛋白質 NS4A 蛋

白の3番目のアミノ酸をValからIleへ変化させることにより病原性が強くなることを見出した(Yamaguchi *et al.* 2011)。しかし本部位がValであるJEV分離株はMie/40/2004株のみしか知られておらず、どの程度3-Ile株が蔓延しているかは不明である。

現在流通している日本脳炎ワクチンは開発された50年以上前よりIII型のJEVより製造されて今日に至っている。ワクチン製造株と流行株(I型)との間の遺伝子型の齟齬については国外でも心配されており、すでにこの件について検証した結果が数件報告されている。しかし現行の国内ワクチンはこれら海外のワクチン株とは異なることから、別途解析が必要である。

近年、中国と韓国で相次いで遺伝子型V型の日本脳炎ウイルスが蚊から約60年ぶりに分離同定された。V型ウイルスは今回の中国、韓国の中ものを含め3株しか分離されていない。系統樹解析からは、現在の主流であるI型、III型からは遺伝学的に少し離れていることがわかっているが、その他ウイルス性状等についてはほとんど解析されていない。

以上の背景を踏まえ、本研究事業において我々は、1年目に国内および国外での3-Ile株の蔓延状況を把握し、かつMie/40/2004株以外の3-Ile株の性状解析を行った。2年目には近年分離された遺伝子型I型JEVに対するIII型ベースで生産されている現行ワクチンの有効性について調べた。さらには3年目にはV型JEVに焦点をあて、我々が唯一所有するV型株であるMuar株を使用し、現行ワクチンのV型株に対する有効性やV型株の病原性解析を進めた。

B. 研究方法

我々の所有するI型JEV分離株98株のNS4AおよびE遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。データベースに登録されている国内外のJEV配列と比較し、3-Ile型株の地理的分布状況を調べた。3-Ile

型JEV分離株5株の全塩基配列を決定し、既知の株の配列と比較した。またこれらの株について、各種培養細胞中での増殖速度を調べた。

3-Ile型分離株のマウスに対する病原性を調べるため、3週齢のマウス(ddY系統)に 1×10^5 pfu/mLの各ウイルス液を腹腔接種し、21日間経過観察した。生存曲線を作成し、log-rank法により3-Val型Mie/41/2002株との差異を比較検討した。

ワクチン接種用のマウスは、通常日本脳炎ワクチンの国家検定にも使用されているddY系統(4週齢、メス、SPF)を使用した。接種ワクチンは中山株および北京株より製造された日本脳炎ワクチン参照品2種類をしようした。これらのワクチンを規定量の滅菌蒸留水にて溶解し、それを2倍および8倍に希釈して、1匹あたり500マイクロリットルずつ10匹に接種した。1週間後に同量を追加接種し、その1週間後、初回免疫から2ヶ月後および4ヶ月後に全採血し、中和反応に使用するプール血清を得た。

中和反応の攻撃用ウイルスとして、昨年度使用した株(ワクチン株である中山株と北京株、遺伝子型III型野外株として、JaTAn1/75, JaTAn1/90, JaTH160の3株、遺伝子型I型野外株としてHiroshima/46/98, Mie/41/02, Tokyo602/05, Mie/51/06, Kochi/25/05, Kumamoto/65/05, Kumamoto/81/06, Kumamoto/104/06, Chiba/103/08, Chiba/150/07, JaNBo37の11株)、これらに加えV型のMuar株(1952年にマレーシアで分離された)を使用した。中和解析はVero細胞を用いてブラーク減少法で行った。血清を10倍から640倍まで2倍階段希釈し、適当に希釈したウイルス液と混合後35度90分間中和反応した。反応後細胞に接種し、メチルセルロース重層培地の下4~6日間35度にて培養した。ホルマリンで固定後、メチレンブローラ液で染色し、ブラーク数をカウントした。各条件における減少率(50%, 70%および90%減少率)を算出しウイルス

間で比較した。

すでに作製済みの遺伝子型 I 型ベースの組換え JEV キメラクローン (rJEV-E^{Beijing-1}-M41/pMW119 および rJEV-E^{Nakayama}-M41/pMW119) に加え, 今回新たに 2 種類の組換えキメラクローン (rJEV-E^{Muar}-M41/pMW119 および rJEV-E^{XZ0934}-M41/pMW119) を作製した。Muar 株由来配列は Muar 株ゲノム RNA から作製し, XZ0934 株由来配列は登録されている塩基配列情報から合成 DNA を作製して使用した。各クローニングから全長の組換えウイルス RNA を in vitro で合成し, それを Vero 細胞にトランスフェクトした。培養上清中に分泌されるウイルス液を回収し, 感染力価を測定後解析に用いた。

マウスに対する病原性を調べるため, 3 週齢の ddY 系統マウスに 3 種類のウイルス (Beijing-1 株, Mie/41/2002 株および Muar 株) をそれぞれ $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ pfu ずつ (各群 10 匹) を腹腔より接種し, 3 週間経過観察した。

C. 研究結果

1994 年～2010 年に国内で分離された I 型 JEV 分離株 98 株の NS4A 領域の塩基配列を決定した (各ウイルスの分離地域は以下の通りである: 東京都, 千葉県, 静岡県, 新潟県, 石川県, 三重県, 兵庫県, 広島県, 島根県, 香川県, 高知県, 長崎県, 熊本県, 鹿児島県および沖縄県)。20 株 (20.4%) が 3-Ile 型であった (表 1)。3-Ile 型株はすべて 2004 年～2008 年に分離されたもので, 地域は本州西部～東日本 (広島県, 兵庫県, 三重県, 石川県, 静岡県および千葉県) にわたっていたものの, 九州や四国では 1 株も同定されなかった。三重県では 3 年連続で 3-Ile 型のウイルスが分離されていることがわかった。NS4A 配列をもとにした系統樹上において, 1 株の例外を除き 3-Ile 型株が 1 つのクラスターを形成した (図 1)。E 配列を用いた場合にも同様のクラスターを形成した。国外の分離株についても調べたと

ころ, 中国において日本とほぼ同時期 (2004 年～2008 年) に各々隣接していない 3 省で 3-Ile 型株が分離・同定されていた。そのうちの 1 株は日本脳炎患者から分離されたものであった。我々が同定した 3-Ile 型株の中から 5 株 (Mie/34/2004, Mie/84/2005, Mie/51/2006, Tokyo/373/2005, Tokyo/602/2005) を選択し全塩基配列を決定したところ, Mie/84/2005 株は Mie/40/2004 株とアミノ酸配列が完全に一致したが, 他 4 株はそれぞれ Mie/34/2004 株で 2 残基, Mie/51/2006 株で 5 残基, Tokyo/373/2005 株で 1 残基, Tokyo/602/2005 株で 4 残基が異なっていた。3 種の哺乳動物由来培養細胞を用いた in vitro での感染実験において, 3-Ile 株間で増殖速度に顕著な差異は認められなかった。一方蚊由来株化細胞 C6/36 細胞においては, 同じ 3-Ile 型株である Tokyo/602/2005 株 (低増殖性株) と Mie/51/2006 株 (高増殖性株) 間で 7 倍以上の差異が認められた。各 3-Ile 型株のマウスに対する病原性 (神経浸潤毒性) を調べたところ, Mie/34/2004 株, Tokyo/373/2005 株および Tokyo/602/2005 株は Mie/40/2004 株とほぼ同等の病原性を示した。一方 Mie/51/2006 株は Mie/40/2004 株に比べ顕著に病原性が弱く, その程度は Mie/41/2002 株とほぼ同等であった (図 2)。

方法欄に記したワクチン接種マウス血清およびウイルス株を用いて中和解析を行った (表 2)。遺伝子型 I 型, III 型については, ワクチン株を除いていずれの条件においても株間で顕著な差異は認められなかった。一方, Muar 株については, いずれの条件においても常に中和力価が低く, 他に比べて 4 倍程度低い場合が半数程度の条件で観察された。このことから, 現行のワクチンは他の株に比べ Muar 株を中和しにくいことが明らかとなった。中和反応においてもっとも重要な役割を果たす E 蛋白質のアミノ酸配列を今回使用したウイルス間で比較した。すると, Muar 株以外はワクチン株との差異が 2.4% 以下であるのに対し Muar 株は

8.2% (北京株) および 8.8% (中山株) であった。また他の V 型株についても Muar 株と同等あるいはそれ以上であった (8.2~9.2%)。次に 4 種類の組換え E 領域キメラウイルスを使用して上記で使用したワクチン接種血清を用いて中和反応を行った (表 3)。中山株, 北京株, Muar 株由来 E 蛋白に置換したキメラウイルスはいずれもそれらの由来ウイルスと同様の中和力値を示した。このことから E 蛋白置換キメラウイルスでその由来ウイルスのワクチン感受性を判定可能であることが確認された。XZ0934 株の E 蛋白を持つキメラウイルスを用いた場合, Muar キメラウイルスと同等あるいはそれよりも中和力値が低かった。よって V 型ウイルスは I 型, III 型ウイルスに比べ現行のワクチンに中和されにくいと考えられた。V 型 JEV のマウスに対する病原性を明らかにするため, Muar 株, および強毒株である北京株 (III 型), 比較的病原性が低くまた今回用いた組換えウイルスクローニング株でもある Mie/41/2002 株 (I 型) の 3 種類の JEV 株を 5 段階の濃度に希釈後マウスに接種し経過観察した(図 3)。10¹pfu 接種ではいずれのウイルスでも死亡は確認されなかった。生存曲線から Muar 株は北京株と類似した比較的強い病原性を示すことが明らかとなった。

D. 考察

本研究により 3-Ile 株は主要株ではないものの, 本州の広範囲に存在していたことが判った。また, Obara ら (2011) の報告と我々のデータと統合すると, 今回調べていない富山県でも 2005 年から 2009 年に 3-Ile 型の JEV が存在していたことが示唆された。以前我々は, 3-Ile 型ウイルスと 3-Val 型ウイルスで *in vitro* での増殖性に顕著な差異が認められないことを示した (Yamaguchi *et al.*, 2011)。今回の結果も哺乳動物由来株化細胞を使用した場合はほぼ同様であった。一方, 蚊由来培養細胞 C6/36 細胞を使用したとき,

3-Ile 株間で最大 7 倍以上の差異が観察された。この解析で高増殖性を示した Mie/51/2006 株は, 3-Val 型株である Mie/41/2002 と同等であり, さらにともにマウスを用いた病原性解析では両ウイルスとも Mie/40/2004 株に比べ有意に低い病原性を示した。C6/36 細胞での増殖性とマウス病原性が逆相関しているようなデータであり興味深いが, その理由は不明である。Mie/51/2006 株は今回性状解析した株の中では最も Mie/40/2004 株とアミノ酸が異なる株であり, E 領域に 2 ケ所, NS4B 領域に 1 ケ所, NS5 領域に 2 ケ所差異がある。これらの部位は他の株とは共通していないことから, これらのうちの何処かが病原性の弱さに関与しているものと想像される。このような部位を同定することにより, 新たな病原性規定部位を明らかにすることが可能であろう。

日本国内に蔓延している JEV の主要型は現在 I 型と考えられる。しかし, 一方で使用されている日本脳炎ワクチンは III 型から製造されたものである。我々はこの III 型由来のワクチンが国内で分離された複数の I 型株に対し中和能を保持しているかを調べた。その結果国内で生産されている現行ワクチンは I 型にも III 型と同等の効果があることが明らかとなった。近年, 中国および韓国で立て続けに新たな遺伝子型 V 型のウイルスが分離同定された。V 型株は 1952 年に初めて分離されたのだが, この一度きりでその後約 60 年間報告がなかった。そのため V 型株に関する知見は遺伝子配列情報以外皆無であった。そこで本研究では V 型株に対する現行ワクチンの中和能およびウイルスの病原性を調べた。するとワクチンは効きにくい傾向がみられ, 病原性も高い可能性が示唆された。ワクチン効果については, やはり E 蛋白の相同性が低いことが影響していると考えられる。遺伝子型は違っても I 型と III 型では 3% も違わない。それに対し V 型はこれらと 8% 以上異なる。

実際に今回我々は、E 蛋白を I 型から V 型に置換することで、中和力価が 8 倍もしくはそれ以上低下することを示した。今回用いたのは現行ワクチンを接種したマウス血清であることから、必ずしもヒトで同様の結果になるかは限らない。今後は実際にワクチン接種前後のヒト血清を用いた研究が必要であろう。しかし今回の我々のデータは現行ワクチンの汎用性に対し問題提起できたということで価値があると考えている。またもう一つの成果として、Muar 株が比較的（我々が調べた多くの I 型分離株と比べて）強いマウス病原性を有していることが明らかとなったことである。ただし、V 型が全般的に強毒であると結論づけるのは早計である。Muar 株のような何十年も前に分離されたウイルスはマウス脳への接種により分離・増殖・継代させてきたものが多い。するとマウスに順化している可能性も高く本来の性状を維持・反映しているかは不明である。一方、最近分離同定された株はそのような影響は少ない。今回我々は、E 蛋白のみ XZ0934 株のものに置換したキメラウイルスを作製した。さらに我々のグループを含め多くの研究室で E 蛋白が病原性を規定しているとの発表がなされている。今後このキメラウイルスの病原性を解析することにより、V 型本来の性状を解明していくと考えている。

E. 結論

JEV の NS4A 遺伝子領域に焦点を当て、近年の野外分離株の遺伝子解析を行った。約 20% が高病原性型である 3-Ile 型株であった。3-Ile 型の分離株計 5 株の *in vitro* での増殖性を調べた。哺乳動物由来株化細胞において差異は認められなかつたが、蚊由来細胞 C6/36 細胞において数倍の差異が観察された。上記の株についてマウスに対する病原性を比較したところ、1 株が他の 3-Ile 株に比べ有意に低い病原性を示した。

現在国内に蔓延している JEV はほとんど

が I 型であるが、これらに対しても III 型から製造された日本脳炎ワクチンは有効であると考えられた。一方、近年中国と韓国で相次いで分離同定された遺伝子型 V 型日本脳炎ウイルスに対する現行の日本脳炎ワクチンの中和効果は、遺伝子型 I 型や III 型株に比べて弱い可能性が示唆された。また V 型ウイルスは強い病原性を維持している可能性も示唆された。国内で V 型株が確認されたとの報告はないが、今後も注意深く監視を続けることが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yamaguchi Y., Nukui Y., Kotaki A., Sawabe K., Saijyo M., Watanabe H., Kurane I., Takasaki T., Tajima S. 2013. Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein. *J. Gen. Virol.*, 94: 90-96.

白鳥（田島）茂、高崎智彦。「日本脳炎ワクチンの品質管理」2012. 臨床とウイルス、第 40 卷第 5 号: 297-305.

2. 学会発表

山口幸恵、小滝徹、新井智、沢辺京子、倉根一郎、西條政幸、高崎智彦、田島茂。非構造蛋白質 NS4A に着目した日本脳炎ウイルスの分子疫学的解析。第 47 回日本脳炎ウイルス生態学研究会、2012 年 5 月、阿蘇市

田島茂、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦。デングウイルスおよび日本脳炎ウイルス感染細胞における細胞側遺伝子発現動態の網羅的解析。第 19 回トガ・フラビ・ペストウイルス研究会、2012 年 11 月、大阪市

田島茂、山口幸恵、小滝徹、新井智、沢辺京子、西條政幸、倉根一郎、高崎智彦。日

本脳炎ウイルス NS4A 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

田島茂 , 小滝徹 , 谷ヶ崎和美 , 小林大介 ,
谷脇妙 , 沢辺京子 , 高崎智彦 . Flap 配列を
付加したフラビウイルス共通プライマーお
よびアルファウイルス共通プライマーの評
価とゲタウイルス検出の実例について . 第
20 回トガ・フラビ・ペストウイルス研究会 ,
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

田島茂 , 谷ヶ崎和美 , 小滝徹 , 中山絵里 ,
モイメンリン , 西條政幸 , 倉根一郎 , 高崎
智彦 . 日本脳炎ウイルス遺伝子型 I 型 ,
型および V 型株に対する不活化日本脳炎ワ
クチンの効果 . 第 49 回日本脳炎ウイルス生
態学研究会 , 2014 年 5 月 , 山口市

田島茂 , 谷ヶ崎和美 , 小滝徹 , 中山絵里 ,
Moi Meng Ling , 林昌宏 , 西條政幸 , 倉根一
郎 , 高崎智彦 . 遺伝子型 V 型日本脳炎ウイ
ルス株に対する日本脳炎ワクチンの中和効
果 . 第 62 回日本ウイルス学会学術集会 ,
2014 年 11 月 , 横浜市

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

表1 使用したJEV株の分離年、地域およびNS4Aの3番目のアミノ酸の種類

地域	1990s	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
九州		Okinawa/28 V 5/2003 al		Kumamoto/5 V 4/2005 al	Kumamoto/81 V al/2006	Kumamoto/86 V al/2007	Kagoshima/0 V al/2008	Kagoshima/53 V al/2009	Kumamoto/94 V al/2010	
				Kumamoto/5 V 6/2005	Kumamoto/84 V al/2006	Kumamoto/15 V al/2007	Kagoshima/4 V al/2008	Kumamoto/94 V al/2009	Kumamoto/95 V al/2010	
				Kumamoto/6 V 5/2005	Kumamoto/88 V al/2006		Kagoshima/4 V 3/2008 al	Kumamoto/97 V al/2009	Kumamoto/96 V al/2010	
				Nagasaki/37/ V 2005	Kumamoto/90 V al/2006		Nagasaki/10/ V 2008	Kumamoto/98 V al/2009	Kumamoto/12 V al/2010	
					Kumamoto/10 V 4/2006 al		Nagasaki/14/ V 2008	Kumamoto/16 V al/2009	Kumamoto/13 V al/2010	
					Kumamoto/11 V 6/2006 al		Nagasaki/27/ V 2008			
					Kumamoto/12 V 0/2006 al					
					Kumamoto/12 V 2/2006 al					
					Kumamoto/14 V 7/2006 al					
四国		Kagawa/27/2 V 002 al		Kagawa/35/2 V 004 al	Kochi/1/2005 V al		Kochi/12/2007 V al			
					Kochi/4/2005 V al		Kochi/13/2007 V al			
					Kochi/5/2005 V al		Kochi/19/2007 V al			
					Kochi/8/2005 V al					
					Kochi/25/200 V 5 al					
					Kochi/41/200 V 5 al					
					Kagawa/21/2 V 005 al					
					Kagawa/22/2 V 005 al					
					Kagawa/24/2 V 005 al					
中国	Hiroshima/ V a/46/1998 al	Hiroshima/2 V 5/2002 al	Shimane/101 V al/2003	Hiroshima/4 I 3/2004 e	Hiroshima/45 V 2005 al					
			Shimane/107 V 2003 al	Hiroshima/5 V 4/2004 al						
			Shimane/112 V 2003 al							
			Shimane/113 V 2003 al							
			Shimane/114 V 2003 al							
			Shimane/117 V 2003 al							
			Shimane/129 V 2003 al							
近畿		Mie/41/2002 V al		Mie/34/2004 I e	Mie/83/2005 I e	Mie/51/2006 II e		JaNBo37/200 II e		
				Mie/40/2004 I e	Mie/84/2005 II e					
北陸					Toyama/57/2 V 005 al	Ishikawa/79/2 II 7 al	Niigata/97/200 V al			
東海		Shizuoka/33/ V 2002 al		Shizuoka/117 II 2005 e	Shizuoka/272/ V 2007 al	Shizuoka/271 V al/2008	Shizuoka/53/2 V al/2009			
		Shizuoka/39/ V 2002 al		Shizuoka/128 II 2005 e	Shizuoka/274/ II 2007 e	Omaezaki/02 V 2008 al	Shizuoka/131/ V 2009 al			
				Shizuoka/201 II 2005 e	Shizuoka/284/ V 2007 al	Omaezaki/09 V 2008 al	Shizuoka/169/ V 2009 al			
				Shizuoka/221 II 2005 e	Shizuoka/291/ V 2007 al					
				Shizuoka/223 II 2005 e						
				Shizuoka/241 II 2005 e						
				Shizuoka/243 II 2005 e						
関東	JaTAn1/1 V 994 al02	Chiba/88/20 V al		Tokyo/373/20 II 05 e		Chiba/150/200 V 7 al8	Chiba/79/200 V al			
				Tokyo/602/20 II 05 e		Chiba/178/200 V 7 al08	Chiba/103/20 V al			
				Chiba/65/200 II 5 e			Chiba/181/20 V 08 al			
				Chiba/123/20 II 05 e						

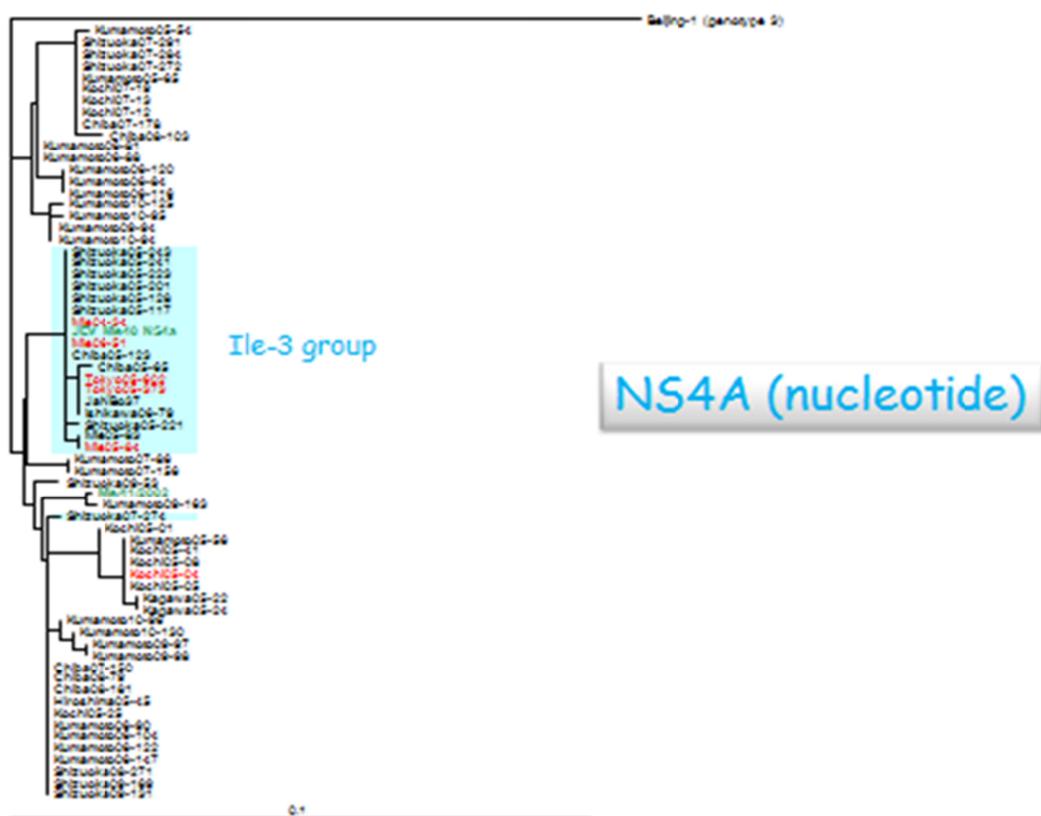


図1 分離株の系統樹解析 (NS4A 遺伝子)

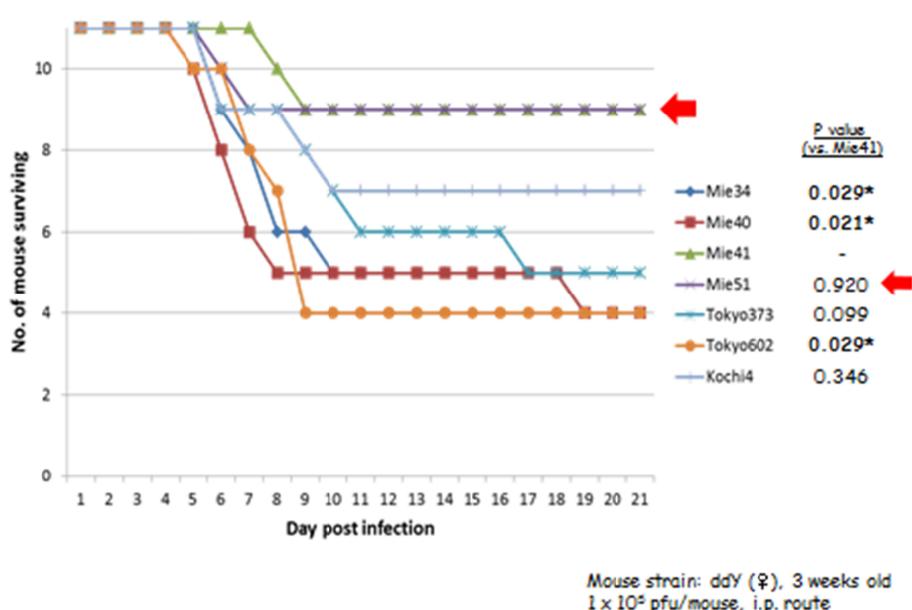


図2 3-Ile 型 JEV のマウスに対する病原性の比較 (生存曲線)

表2 初回免疫から2週間経過したマウスの血清を用いた中和試験 (PRNT50)

Genotype	Strain	Nakayama vaccine		Beijing-1 vaccine	
		x2 dilution	x8 dilution	x2 dilution	x8 dilution
Vaccine	Nakayama(NIID)	>640	320	320	160
strain	Beijing-1(NIID)	80	40	320	160
GI	Hiroshima/46/1998	80	40	160	80
	Mie/41/2002	320	80	160	80
	Tokyo602/2005	160	40	80	80
	Kochi/25/2005	160	40	160	40
	Kumamoto/65/2005	80	40	160	40
	Mie/51/2006	160	80	80	80
	Kumamoto/81/2006	80	40	80	40
	Kumamoto/104/2006	80	40	80	40
	Chiba/150/2007	160	40	160	40
	Chiba/103/2008	80	40	80	40
	JaNBo37/2008	160	80	160	80
	GMT of GI viruses	124.4	48.3	116.8	54.8
GIII	JaTH160/1960	80	40	160	80
	JaTAn1/75/1975	160	40	80	80
	JaTAn1/90/1990	160	80	160	160
	GMT of GIII viruses	127.0	50.4	127.0	100.8
GV	Muar/1952	20	<10	20	10

表3 キメラウイルスを用いた中和試験 (PRNT50)

Recombinant virus	Nakayama vaccine		Beijing-1 vaccine	
	X2 dilution	X8 dilution	X2 dilution	X8 dilution
Mie/41/2002 (parent virus)	160	80	160	80
rJEV-E ^{Nakayama}	>1280	640	640	160
rJEV-E ^{Beijing-1}	40	10	160	40
rJEV-E ^{Muar}	10	<10	20	<10
rJEV-E ^{XZ0934}	<10	<10	10	<10

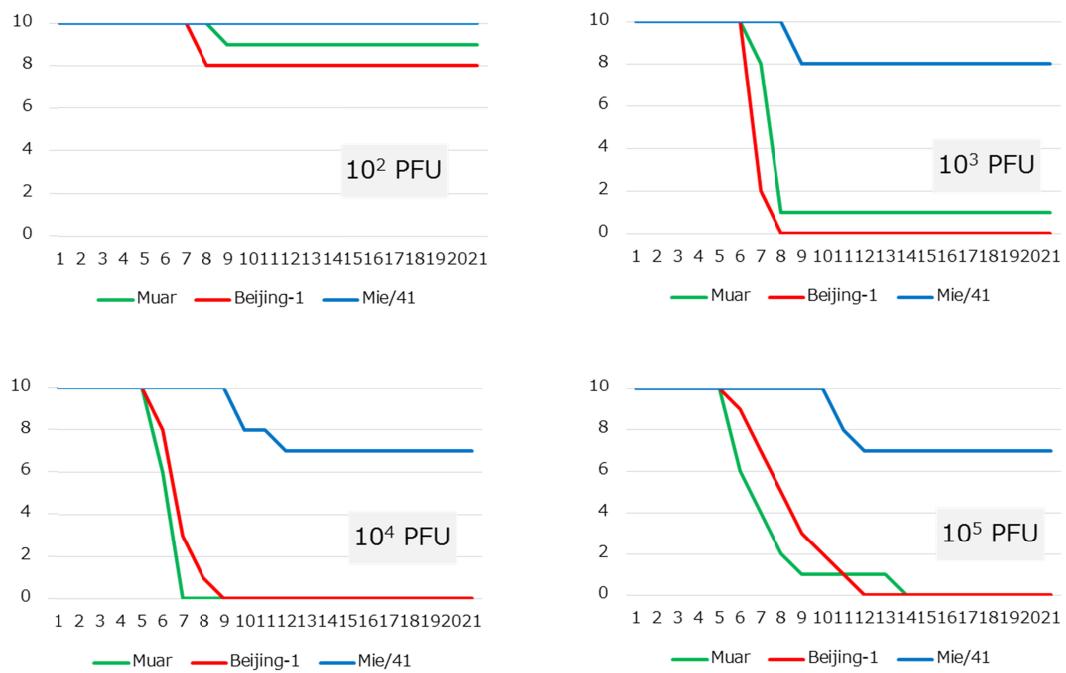


図3 マウスにおける病原性解析（生存曲線：X軸は接種後の生存日数，Y軸は匹数）

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

六甲山系で採取されたマダニにおけるウイルス保有調査

分担研究者	林 昌宏	国立感染症研究所ウイルス第一部第3室長
協力研究者	伊澤晴彦	国立感染症研究所昆虫科学部第2室長
	江尻寛子	国立感染症研究所昆虫科学部
	伊藤（高山）睦代	国立感染症研究所ウイルス第一部主任研究官
	山口（木下）一美	国立感染症研究所ウイルス第一部
	鍬田龍星	国立感染症研究所昆虫科学部
	垣内五月	国立感染症研究所ウイルス第一部
	堀谷まどか	国立感染症研究所ウイルス第一部
	高崎智彦	国立感染症研究所ウイルス第一部第2室長
	澤邊京子	国立感染症研究所昆虫医学部長
	西條政幸	国立感染症研究所ウイルス第一部長

研究要旨

マダニ類はウイルス、細菌、リケッチャ等の病原体を媒介することが知られている。またこれまでに多くのダニ媒介性アルボウイルスが報告されている。我が国においても重症熱性血小板減少症候群ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスが常在することが明らかになっているが、その他のダニによって媒介されるウイルスの分布状況は明らかにされていない。そこで兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行った。その結果、細胞培養を用いたウイルス分離においてこれまで日本においてその存在が知られていなかったレオウイルス科オルビウイルス属 Great Island virus group に属するウイルス (Ix-7V) およびブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される Uukuniemi 様 virus (T-32V) をダニサンプルより分離した。これらのウイルスを乳のみマウスの脳内接種により継代したところ、乳のみマウスに病原性を示す株がそれぞれ分離された。

A. 研究目的

古くからダニ類のうちマダニ類はウイルス、細菌、リケッチャ、原虫等の病原体を媒介することが知られている。我が国においてもこれまでにダニ媒介性脳炎ウイルス、ライム病ボレリア、紅斑熱群リケッチャ、バベシア原虫等の病原体がマダニ類から分離されている。マダニ類は幼虫、若虫、成虫の各発育期のすべてが吸血寄生性で、主に山林内のササ類に生息し、ネズミやイノシシ等の野生動物に寄生する。ヒトにも寄生し、吸血されると吸血部位にわずかな痒み、痛み、違和

感等を生じる場合がある。しかしながらマダニ類の吸血には数日から1週間を要するにもかかわらず多くの場合、全く自覚症状がない。近年ダニに関連するウイルス感染症が国内外を問わず、新興・再興感染症として注目されている。我が国においても2013年2月には重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) の発症例が報告された。SFTSV はブニヤウイルス科フレボウイルス属に分類される3分節の1本鎖(-)RNAウイルスであり、マダニ類のダニによって媒介される。疫学解析の結果

日本で流行している SFTSV は中国で流行している SFTSV とは独立したクラスターを形成し独自の進化を経ていることが報告されている。その他に国内外においてはダニによって媒介されるウイルスとしてブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類されるクリミア・コンゴ出血熱、オルトミクソウイルス科トゴトウイルス属に分類されるトゴトウイルスおよびドーリウイルス、フラビウイルス科フラビウイルス属に分類されるロシア春夏脳炎ウイルス、中央ヨーロッパダニ脳炎ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、キャサヌール出血熱ウイルス、ランガットウイルスおよびポワッサンウイルス、レオウイルス科オルビウイルス属に分類されるケメロボウイルス、同じくレオウイルス科コルチウイルス属に分類されるコロラドダニ熱ウイルス等の多くのウイルスが知られている。しかしながらこれらウイルスの国内における分布は明らかにされていない。そこで我々は兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシおよびイノシシの生息域周辺から採取されたダニにおけるウイルス保有状況の調査を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. ダニ

兵庫県六甲山系で捕獲されたイノシシの被毛から採取されたマダニ類およびイノシシ生息域周辺の地点において旗振り法により採取されたマダニ類より 10% 乳剤を作製しウイルス分離を行った。用いたダニはフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)、キチマダニ (*H. flava*)、タカサゴチマダニ (*H. formosensis*)、ヤマアラシチマダニ (*H. hystricis*)、オオトゲチマダニ (*H. megaspinosa*)、タネガタマダニ (*Ixodes nipponensis*)、アカコッコマダニ (*I. turdus*)、ヤマトマダニ (*I. ovatus*)、タカサゴキララマダニ (*Amblyomma testudinarium*)、タイワンカクマダニ (*Dermacentor taiwanensis*) であった。得られたダニは 1~52 頭を 1 プールとし、

192 プールを作製した。次に作製したダニプールを用いて 10% ダニ乳剤を作製した。ダニ乳剤を 0.22 μm あるいは 0.45 μm のフィルターでろ過し、ウイルス分離に供試した。

2. 培養細胞と動物

ウイルス分離にはサル腎由来 Vero 細胞 (American Type Culture Collection) およびシリアンハムスター腎由来細胞である BHK-21 細胞 (American Type Culture Collection) を用いた。また、2 日齢の乳飲みマウス (ddY) をウイルス分離に供試した。

3. 培養細胞を用いたウイルス分離

10% ダニ乳剤を作製し、Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種し 7 日間観察した。

4. 乳飲みマウスを用いたウイルス分離

10% ダニ乳剤を作製し、1 腹 8 匹の乳飲みマウスの脳内に 20 μl 接種した。接種後 14 日間観察し採脳した。

5. ウィルス遺伝子の検索

採取したサンプルよりウイルス遺伝子を抽出し、逆転写(RT)-PCR 法によりフラビウイルス属およびブニヤウイルス属の検索を行った。また次世代シークエンサーを用いてダニから得られたウイルスの遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

1. ダニ類の採取

兵庫県六甲山系でダニ類の採取を行った。兵庫県六甲山系におけるイノシシの被毛より採取されたマダニ類はキチマダニ 54%，タカサゴチマダニ 16%，タカサゴキララマダニ 13%，ヤマアラシチマダニ 9%，タイワンカクマダニ 8% であった。

2. 培養細胞を用いたウイルス分離

マダニサンプルより 10% ダニ乳剤を作製し、Vero 細胞および BHK-21 細胞に接種し

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 ウィルス (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 ウィルス (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 ウィルス (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 ウィルス (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 繼代した結果接種 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 繼代目では接種 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 繼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 繼代を行った。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 を鑄型として 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 繼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-7V 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 繼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の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学的に解析した結果、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 ウィルス (KEMV), Lipovnik ウィルス (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 ウィルス (BAHV) 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。BAHV 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., Suzuki 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., Saito 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, 綱康至, 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

斎藤悠香, 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. Fc γ R 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. チク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 ウィ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., Omatsu 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 , 白井顯治 , 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靈長類モデルの検討 . 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
	久保田真由美	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に、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。患者ルーティンから年齢、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、抗生素投与の有無、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%CO₂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，肺膿，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，臨床的に壘瘻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/ μ 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%)となつた。

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の値が低いため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。化学療法の領域、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、久保田真由美、澤邊京子、平山幸雄、鍬田龍星、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* 痘学研究。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

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）
分担研究総括報告書

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学部
協力研究者	駒形 修	国立感染症研究所昆虫医学部
	渡辺 譲	国立感染症研究所昆虫医学部
	葛西 真治	国立感染症研究所昆虫医学部
	糸川 健太郎	国立感染症研究所昆虫医学部
	小川 浩平	国立感染症研究所昆虫医学部
	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
	數間 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に抵抗性要因が含まれているかどうかも不明であった.

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ピング法を開発し, 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ピング法を考案し, 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(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. 酶素阻害試験

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) を用いて磨碎した . 次いで , ホモジナイザーのフィルターをそのまま用いて , 磨碎液を $1,000 \times g$ 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 $170 \mu\text{L}$ 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 (ACh) 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 ℃ 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ることで , 酵素比活性とした .

4. 分子ジェノタイピング

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 , 標的点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 增幅後に增幅 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 , 点突然変異多型 (SNP) 判別を可能とする . DNA 抽出は , REDEExtract-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 (CIS-C-QP5Y-F1: CTACCTCGTCAACTTGATTTA; CIS-C-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 mM , CIS-C-F15 (GAGGACG TGGCACATGTTGTTCTTC) 45 nM , CIS-C-R16 (GAGGACCTTAGCTTGAGCTGCTTC) 756 nM , CIS-C-QP5Y-F1 0.2 uM , 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 の上で行い、PCR サイクリング条件は、95 2' > [95 15" > 55 30" > 68 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 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クエンシングを行った。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 → 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 CCTGAACAACT 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)-

aataaaataa 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 uL 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"] × 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、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考 DNA として選んだ。ここに、V419 と L925 に関する参考 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—I925)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、これらの参考 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 IC_{50} 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 变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あり, 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* 分子ジェノタイピング法の確立

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クエ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だであるが、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—I925(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主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 AChE 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 と殺虫剤感受性系統 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連関している。
- 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

れないと推定される。

生動物学会大会，2014年3月，岐阜市

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, 數間亨, 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

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, 數間亨, 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

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

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・昆虫医学部・室長
協力研究者 小川浩平 国立感染症研究所・昆虫医学部・研究員
駒形 修 国立感染症研究所・昆虫医学部・研究員
糸川健太郎 国立感染症研究所・昆虫医学部・流動研究員
葛西真治 国立感染症研究所・昆虫医学部・主任研究官
澤邊京子 国立感染症研究所・昆虫医学部・部長

研究要旨

ネッタイシマカ抵抗性系統 SP は、ナトリウムチャネルに 2箇所の点突然変異を持ち、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 ¹⁴C 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。これらの内で 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デング熱などの蚊媒介性疾病対策の有効性は、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デング熱は世界規模へと拡大しており、現在では全世界の 40% の人々がデング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デング熱を発症しており、さらに 2014 年には、160 人のデング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 ¹⁴C 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 μl 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 ¹⁴C 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 (TOYOB0) 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 を錆型として用いた。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、ダイレクトシークエンスを行った。

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 を鑄型として用いた。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-Supermix (Bio-Rad) を用いて行い、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 ± 0.064 、 0.425 ± 0.010 、 0.607 ± 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、1,515

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 節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 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)。ネット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取り除くことができた。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

えられる。

現在のところ、ネッタイシマカのシトクロム P450 遺伝子数は 169 個がデータベースに登録されており、そのうち本研究で明らかとなった第 1 染色体上の QTL 近傍に存在するシトクロム P450 は、*CYP6BB2*, *CYP6CC1*, *CYP18A1*, *CYP306A1*, *CYP6AA5*, *CYP6BZ1*, *CYP6P12*, *CYP4H29* の 8 個であった。Kasai *et al.* (2014) は、本研究で用いた SP 系統と SMK 系統間でマイクロアレイによるシトクロム P450 を対象とした発現解析を行っている。そのデータに今回の QTL 近傍に存在する P450 を照合したところ、*CYP6AA5* の発現量が SP 系統において 2.39 倍高いことが明らかとなった。

本研究では、SP 系統と SMK 系統間で塩基配列と発現量が等しい *CYP6AA5v1* と SP 系統でのみ発現している *CYP6AA5v2* の存在が明らかとなった。QTL 解析を行った F2 個体を用いて、この v2 に対するジェノタイピングを行った結果、確かにこの v2 も第 1 染色体上の QTL 近傍に存在していることが判明した。

QTL 解析では解析に用いた形質に関連する遺伝子が染色体のどこに存在するのかということまでしか明らかにすることができない。このため、形質に関連する候補遺伝子を対象とした逆遺伝学的な研究による表現型での検証が行われることにより、初めて形質に結びつく遺伝子が同定される。そこで、今回の研究により明らかにされた QTL 近傍のシトクロム P450 遺伝子をターゲットとして、ゲノム編集技術に基づき SP 系統から作出されるノックアウト個体を用いて逆遺伝学的な解析を行いペルメトリン代謝に関連する遺伝子を明らかにすることが、今後の研究課題となる。

E. 結論

QTL 解析によって、SP 系統におけるペルメトリンの代謝量増大に関連する遺伝子は、第 1 染色体上にあることが示された。候補

となるシトクロム P450 遺伝子は 8 個存在しており、その内 *CYP6AA5v2* は SP 系統でのみ発現しており、最有力候補として挙げられる。

F. 健康危険情報

現時点で特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirata K., Komagata O., Itokawa K., Yamamoto A., Tomita T., Kasai S. 2014. A single crossing-over event in voltage-sensitive Na^+ channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides. PLoS Negl., Trop., Dis., 8, e3085.

2. 学会発表

小川浩平, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ネッタイシマカペルメトリン抵抗性に関与する量的形質遺伝子座の探索. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 2014 年 3 月, 高知市

小川浩平, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ネッタイシマカのペルメトリン解毒代謝酵素に関する QTL 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

厚生労働省科学研究費補助金（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

鳥取県、島根県、広島県におけるマダニ類の生息調査（2013～2014年度）

分担研究者 山内健生 兵庫県立大学・自然・環境科学研究所
協力研究者 石原貴子 松江市
澤邊京子 国立感染症研究所・昆虫医科学部

研究要旨

中国地方では、マダニ媒介感染症である重症熱性血小板減少症候群（SFTS）や日本紅斑熱の患者が各地で発生している。しかし、中国地方におけるマダニ類の分布及び季節消長については知見が少なく、不明な点が多い。そこで、中国地方の鳥取県、島根県、広島県においてマダニ類の調査を実施した。

鳥取県西部と島根県東部では、2013年5月～10月と2014年4月～11月に、広島県広島市安佐北区では2013年4月～2014年1月と2014年4～12月に、マダニ類の採集を試みた。各県の1定点では、マダニ類の季節消長を調べるため、フランNEL法を用いて植生上のマダニ類を定期的に採集した。

鳥取県西部と島根県東部では、2種の鳥取県新記録種を含む11種のマダニ類が採集された。広島県では7種のマダニ類が採集された。島根県の定点調査では、全調査期間を通してキチマダニがほぼ採集されたが、6月下旬から8月上旬にかけてはヤマアラシチマダニがキチマダニよりも多く採集された。広島県の定点調査では2年連続して9月中旬から10月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ劇的に変化した。このことから、この劇的な変化は普遍的な現象であると推測された。ニホンジカ生息地では春から秋にかけてフタトゲチマダニの密度が非常に高くなることから、この時期にニホンジカ生息地を訪れる際にはフタトゲチマダニによる刺症に注意することが望ましいといえる。

A. 研究目的

マダニ類は、主として山林に生息する節足動物で、吸血の際に様々な感染症（重症熱性血小板減少症候群、日本紅斑熱など）を媒介する場合がある。

我が国において、重症熱性血小板減少症候群（SFTS）患者の発生は兵庫県以西に限られ、中国地方でも各地で患者が発生している。また、日本紅斑熱の患者も中国地方の全県で発生している。このように中国地方はマダニ媒介感染症の患者が比較的多く報告されてきた地域であるが、中国地方におけるマダニ類の分布及び季節消長については知見が少なく、不明な点が多い。そ

こで、中国地方の鳥取県、島根県、広島県においてマダニ類の調査を実施した。

B. 研究方法

調査地は、鳥取県西部と島根県東部、および広島県広島市安佐北区である。鳥取県米子市淀江町福岡、島根県安来市清水町、広島県広島市安佐北区可部町大字上原の3地点では、基本的に毎月上下旬に以下に示すフランNEL法でマダニ類を採集した（鳥取県と島根県では2014年のみ）。これらのうち、広島県の調査地にはニホンジカが高密度で分布し、鳥取県と島根県の調査地にはニホンジカが分布していない。

調査地では、30分間、90×150 cm の白いネル布（フランネル）を用いて下草や地表を撫でながら歩いた。そして、ネル布に付着したマダニ類の成虫と若虫をピンセットにより全て採取した。また、広島県では、狩猟で得られたニホンジカ、飼育されていたイヌ、ヒト（5歳女児）の体表に寄生していたマダニ類を目視で採取した。

これらのマダニ類を、実体顕微鏡及び光学顕微鏡下で分類・計数した。

（倫理面への配慮）

本研究は、植生上で採取されたマダニ類を対象としており、倫理面への配慮を必要としない。

C. 結果

鳥取県西部と島根県東部では11種のマダニ類が採取された。フタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* は、ニホンジカが分布する出雲市の2地点で多く採取された。逆に、キチマダニ *H. flava* は、ニホンジカが分布する出雲市の2地点では採取されなかつたが、それ以外のすべての地点で採取された。米子市久米町の調査地は、米子市中心部に存在する孤立した低山で、米子市民の憩いの場である。この低山ではキチマダニのみが採取された。鳥取県の定点調査では、全調査期間を通じてキチマダニが多く採取され、その他の5種は少数が採取されたのみであった。島根県の定点調査では、キチマダニ、ヤマアラシチマダニ *H. hystricis*、ヤマトマダニ *Ixodes ovatus* が多く採取された。キチマダニはほぼ全調査期間に採取されたが、ヤマアラシチマダニは8月18日を最後に採取されなくなった。なお、6月下旬から8月上旬にかけては、ヤマアラシチマダニの方がキチマダニよりも多く採取された。

広島県では7種のマダニ類が採取された。ニホンジカからは4種が採取され、フタトゲチマダニの個体数が特に多かった。イヌ

とヒトからはフタトゲチマダニのみが採取された。広島県の定点調査では2年連続して9月中旬から10月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニ *H. megaspinosa* へ劇的に変化した。

D. 考察

フタトゲチマダニとオオトゲチマダニは、先行研究によりニホンジカを主要な宿主とすることが知られている。フタトゲチマダニとオオトゲチマダニは、ニホンジカが分布する広島県の調査定点で多く採取された。一方、ニホンジカが分布しない鳥取県と島根県の調査定点ではキチマダニがもっとも多く採取され、フタトゲチマダニは少数が採取されたに過ぎず、オオトゲチマダニにいたってはまったく採取されなかった。このことから、ニホンジカの分布状況は、マダニ間に大きな影響を与えるものと考えられる。

島根県の調査定点では、キチマダニがほぼ全調査期間を通して採取されたが、6月下旬から8月上旬にかけては、ヤマアラシチマダニの方がキチマダニよりも多く採取された。ヤマアラシチマダニは、広島県や愛媛県などで日本紅斑熱の媒介者であると推測されており、本種は夏季に注意すべき種であることが示された。

広島県の調査定点では、9月中旬から10月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ劇的に変化することが示された。優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ変化する時期が2013年と2014年の調査でほぼ同じであったことから、これは普遍的な現象であると推測される。フタトゲチマダニは人体刺症の原因となり、日本紅斑熱やSFTSを媒介する可能性も指摘されている。春から秋にかけてニホンジカ生息地ではフタトゲチマダニの密度が非常に高くなることから、この時期にニホンジカ生息地を訪れる際には

フタトゲチマダニによる刺症に注意することが望ましいといえる。

E. 結論

島根県の定点調査では、キチマダニがほぼ全調査期間を通して採集されたが、6月下旬から8月上旬にかけては、ヤマアラシチマダニがキチマダニよりも多く採集された。この結果から、日本紅斑熱の媒介者であると推測されているヤマアラシチマダニは、夏季に注意すべき種であることが示された。広島県の定点調査では9月中旬から10月上旬にかけて優占種がフタトゲチマダニからオオトゲチマダニへ劇的に変化した。ニホンジカ生息地では春から秋にかけてフタトゲチマダニの密度が非常に高くなることから、この時期にニホンジカ生息地を訪れる際にはフタトゲチマダニによる刺症に注意することが望ましいといえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

山内健生. 2014. 病原体媒介動物としてのマダニの生態. 人と動物の共通感染症研究会ニュースレター, (13): 7-11

山内健生, 高田歩. 2015. 日本本土に産するマダニ科普通種の成虫の図説. ホシザキグリーン財団研究報告, 18: 287-305

2. 学会発表

山内健生, 渡辺護. 富山県の市街地植生上で採集したマダニ類. 第 66 回日本衛生動物学会大会, 2014 年 3 月, 岐阜市

沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一, 渡辺護, 鍬田龍星, 前田健, 佐藤智美, 前川芳秀, 林利彦, 小林睦生. マダニ相に関する国内調査. 第 49 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 2014 年 5 月, 山口市

山内健生, 石原貴子, 沢辺京子. 鳥取県, 島根県, 広島県におけるマダニ定点調査. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

小林睦生, 前川芳秀, 山内健生, 野田伸一, 二瓶直子, 沢辺京子. 重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) 患者が発生した地域の植生の特徴. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

佐藤智美, 山内健生, 林利彦, 前川芳秀, 小川浩平, 佐々木年則, 小林睦生, 糸山享, 沢辺京子. 環境の異なる地域におけるマダニ相および植生解析, 2015 年 3 月, 金沢市

沢辺京子, 山内健生, 橋本知幸, 野田伸一, 渡辺護, 平林公男, 鍬田龍星, 前田健, 岩永史朗, 安藤勝彦, 鎮西康雄, 佐藤智美, 前川芳秀, 林利彦, 佐々木年則, 小林睦生. SFTS 対策に向けたマダニ類の全国調査. 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

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

マダニ相に関する全国調査の試み

分担研究者	澤邊京子	国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長
協力研究者	林 利彦	国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長
	山内健生	兵庫県立大学自然・環境科学研究所
	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
	渡辺 譲	国立感染症研究所・昆虫医科学部・協力研究員
	小林睦生	国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官
	橋本知幸	一般財団法人日本環境衛生センター
	野田伸一	鹿児島大学・国際島嶼教育研究センター
	平林公男	信州大学・纖維学部
	佐藤智美	明治大学・農学部
	鍬田龍星	山口大学・共同獣医学部
	前田 健	山口大学・共同獣医学部

研究要旨

2013年1月、国内で初めて重症熱性血小板減少症候群（SFTS）の患者が発生し、2015年3月までに110名の患者（うち32名が死亡）が報告されている。これまでの調査で、複数種のマダニからウイルス遺伝子が検出され、遺伝子陽性マダニは全国に分布すること、ウイルス抗体価の高い野生動物が存在することなどが明らかになったが、SFTSウイルスの感染環は依然として不明である。SFTS感染が多いと予想される5月にマダニ相調査を行った。2013昨年10月に行った予備的調査から、調査実施者の技術の優劣は、本法にはほとんど影響しないことが確認されたため、マダニの生息数の多い地域、マダニの種構成が全国規模で比較した。

2013年は10月～11月に国内24都道府県下の、それぞれマダニと人との接触が予想される環境で調査を行った結果、北海道ではヤマトマダニのみが採集され、本州と九州地方ではキチマダニが優先種であったが、それ以外に本州ではオオトゲチマダニ、九州ではタカサゴチマダニが多く捕集されることが判明した。また、隣接した調査地であっても、採集数や種構成が大きく異なる地域があることも明らかになった。2014年は、4月下旬から5月上旬にかけて、昨年秋とほぼ同じ地点とさらに3府県と28地点を追加し、合計27都道府県下の82地点を調査地点とした。その結果、全国的に昨年秋よりも本年春の捕集数は多く、フタトゲチマダニの捕集数が多調査地点で多いことが示唆された。

A. 研究目的

国内において、マダニ媒介性感染症は日本紅斑熱やライム病がよく知られており、その流行地にあっては、マダニの捕獲調査は熱心に行われてきている。しかし、それらの調査

は主に病原体の検出を目標とした調査であるため、捕集方法は統一されていないことが多かった。そこで我々は、まず捕集方法を統一し、国内のなるべく多くの地域でマダニを採取した。具体的には、調査地1カ所につき

一人 30 分間のフランNEL法でマダニを捕集し, 生息密度や種構成を全国的に評価した. SFTS とマダニの関連性を探るために, 患者発生が多いと推定される 5 月に調査を行うことが重要であるが, まず, 予備的な調査を 2013 年 10 月下旬から 11 月上旬にかけて, 国内 24 都道府県において, それぞれマダニと人との接触が予想される環境を想定し, 合計 55 地点を選定した. 予備的調査から, 調査実施者の技術の優劣は, 本法にはほとんど影響しないことが確認されたため, マダニの生息数の多い地域, マダニの種構成が全国規模で比較できると考えた.

B. 研究方法

2013 年は 10 月下旬から 11 月上旬にかけて, 調査地 1 か所につき一人 30 分間のフランNEL法によりマダニを捕集した. 国内 24 都道府県において, それぞれマダニと人との接触が予想される環境を想定し, 合計 55 地点を選定した.

2014 年は 4 月下旬から 5 月上旬にかけて, 昨年秋とほぼ同じ地点とさらに 3 府県と 28 地点を追加し, 合計 27 都道府県下の 82 地点を調査地点とした.

調査地の温度・湿度を測定し, 野生動物の存在等も含めた周辺の環境情報をできるだけ多く入手することを心がけた. 捕集されたマダニは, 外部形態により種の同定を行い集計した.

C. 研究結果

1. マダニ相の比較

1) 2013 年 10 ~ 11 月の調査 (図 1 上)

北海道における調査は, 本州との気温差を考慮して 9 月 26 日に実施したが, 帯広市近郊の調査地で捕集されたマダニはすべてヤマトマダニであった. 一方, 本州と九州地方における優先種はキチマダニであったが, オオトゲチマダニが多い地点や, タカサゴチマダニが多い地点が確認された. 総捕集数を比較すると, 広島県の 1 地点 (65 頭/人/30 分),

神奈川県の 2 地点 (45 頭, 34 頭) と続き, この時期のマダニの生息数が多い地域であると考えられた.

福島県, 千葉県, 石川県, 三重県, 広島県, 長崎県および鹿児島県の調査地でも一人当たり平均 20 頭以上が捕集され, マダニの生息密度が比較的高い地域であると推察された. 三重県志摩半島では, 合計 6 地点の調査地の一人当たりの捕集数は 5 ~ 26 頭とばらつき, キチマダニよりもオオトゲチマダニが多い地点, ヒゲナガチマダニが生息する地点があった. 山口県下の 2 調査地は, 入江を挟んで数キロ以内の距離しか離れていないにもかかわらず, 一方ではキチマダニが優先種であったが, 他方ではアカコッコマダニが半数を超えて捕集されるなど, 調査地間の距離に関わらず, マダニ捕集数や種構成が大きく異なることも明らかになった.

2) 2014 年 4 ~ 5 月の調査 (図 1 下)

前年と同様の理由で, 北海道での調査は 6 月 4 日に実施した. 帯広市で捕集されたマダニは, 昨年同様にすべてヤマトマダニであったが, 総捕集数は一人 30 分で昨年秋よりも有意に高い捕集数であった (120 頭・40 頭). キチマダニは昨年秋と同様に国内に広範で捕集されたが, フタトゲチマダニが優先種となり, かつ捕集数が非常に多い地点が確認された. 本調査で, 春の捕集数は秋より 2 倍以上多いこと, 秋はキチマダニが優占種であり, 春はフタトゲチマダニが優占種となる地点が多く, 種構成もかなり異なることが明らかになった.

3) 三重県におけるマダニ相の比較

三重県の調査地は, 2012 年に過去最多の 51 名の日本紅斑熱の患者を記録し, 7 年連続で全国最多の患者数を記録した伊勢志摩地域である. 志摩半島の 6 地点で 2013 年 10 月 30 日と 2014 年 5 月 10 日の 2 回定点調査を行った. 秋の捕集数は少なく (5 ~ 26 頭/人/30 分), オオトゲチマダニが優占種である

地域が多かった。捕集数は少なかったが、すべての地点でタカサゴキララマダニが捕集されたことは興味深い。一方春は、37~86頭と秋に比べてすべての地点で捕集数は多く、種構成も明らかに異なりフタトゲチマダニが優先種であった(37~85%)。また、この時期にタカサゴキララマダニの個体数が多い地域は他ではなく、捕集率の高い地点も確認された(26.5%)。

4) 鹿児島県におけるマダニ相の比較

2013年6~8月に、薩摩半島と大隅半島で行った調査では、薩摩半島の2地点の一人30分当たりの捕集数は15.7頭、その53%がフタトゲチマダニであった。一方、大隅半島の2地点では平均18.5頭と29頭、前者より多数のマダニが捕集されたが、フタトゲチマダニの割合は非常に低く(0%, 3%), むしろタカサゴキララマダニ(51%, 21%)やその他の種(ヤマアラシチマダニやタカサゴチマダニ)の捕集数が多かった。鹿児島県ではこれまでに、東部の大隅半島、西部の薩摩半島のいずれの地域からもSFTSの患者発生が報告されており、今回得られた結果からは、SFTSウイルスを媒介するマダニの種類は一種類ではないと推察された。

2. マダニの季節消長

1) フタトゲチマダニの季節消長

2013~2014年の鹿児島県日置市における定点調査では、フタトゲチマダニの若虫は4月から6月にかけて発生のピークがあり、7~8月に成虫が出現した。10月初旬に若虫が出現したが冬季は全く捕集されず、次に出現したのは翌2014年の2月下旬であった。距離的に遠く離れている神奈川県小田原市の定点調査地の捕集数は鹿児島県に比べて非常に少なく、春の出現時期が鹿児島県よりも1か月遅かったが、その消長はほぼ同じ傾向を示していた。両地点において成虫の活動が5~9月に観察されたことから、フタトゲチマダニは夏型の季節消長を示す種類である

ことが確認された。

2) キチマダニの季節消長

鹿児島県日置市では、8~9月の夏季に捕集数が減少したものの、ほぼ1年中捕集された。特に成虫のピークは2月の初旬にあり、若虫の消長も成虫とほぼ同じ傾向を示した。一方、神奈川県では、若虫は8月を除きほぼ一年中捕集されたが、成虫は6~8月にはほとんど見られず、2月下旬からその発生数が増加した。いざれの地域においても、キチマダニは冬季に捕集数が多い種類であり、冬型のマダニであると言える。

D. 考察

マダニの移動は、基本的には宿主である野生動物の移動範囲に限られるため、比較的小規模なホットスポットが存在すると考えられている。事実、今回の調査でも、近距離に位置する調査地であっても、マダニの捕集数や種構成に大きな差異が見られることが明らかになった。また、季節が異なると種構成が大きく異なることも明らかになった。この結果は、マダニのSFTS伝搬を考察するためには、できるだけ患者発生地周辺で、時期も考慮してマダニ調査を行う必要があることを強く示唆するものである。しかし、現時点では、地域や行政の協力が得られる場所はかなり限られており、できるだけ多くの地域からマダニの基礎的情報を収集・蓄積し、情報を公開していくことが、今、我々にできることの一つである。

本調査で、マダニの生息数の多い環境や種類構成の異なる環境が明らかになった。今後は、それら基礎情報に加え、野生動物の分布や植生等の環境要因も考慮し、SFTSウイルスのヒトへの感染リスクを評価したいと考えている。北欧では、30年前からノロジカの個体数が増加し、ダニ媒介性脳炎の患者も増加してきた。地球温暖化が野生動物やマダニ類の個体群密度の増加に関係しているとの指摘もあるが、シカやイノシシ等の大型

の哺乳動物は、マダニの繁殖や維持に必要な吸血源として、主要な野生動物である。わが国においても、ニホンジカやイノシシなどの大型哺乳動物の個体数は急激な増加傾向にあり、民家周辺に出現する事例も多くなってきた。畑や水田の周囲にシカやイノシシ対策の電気柵が張り巡らされ、囲い罠が設置されている風景もよく見かけるようになってきた。事実、SFTS 患者はそのような環境下で発生することが多い。これまで山奥で密かに感染環を回していたウイルスが、環境変化や温暖化、マダニとその宿主動物の分布域の拡大などによって活動域が広がり、ヒトの生活圏に侵入してきたのではないだろうか。現時点では、有効な治療薬はなく、個人レベルでマダニ刺咬を防ぐ以外に防除法はない。しかし、マダニをむやみに恐れることはなく、草むらがあるところではできるだけ肌を露出しない、忌避剤を効果的に使用する等の基本的な対策を取ることで身を守ることは可能である。

謝辞

マダニの捕集にあたり、以下の方々にご協力いただいた（敬称略）。平良雅克・竹村明博・小池裕（千葉県衛生研究所）、武田昌昭（信州大学・纖維学部）、安藤勝彦（三重大学・医学部）、鎮西康雄（鈴鹿医療科学大学・医学部）、平良常弘（西宮市環境局・環境衛生課）、石原貴子（島根県松江市）、早坂大介（長崎大学熱帯医学研究所）。各氏に深く感謝する。

E. 結論

- 1) 2013年10月～11月、および2014年5月に、調査地1か所につき、一人30分間のフランNEL法により捕集されたマダニの捕集数と種構成を比較した。
- 2) 調査実施者の技術の優劣は、本法にはほとんど影響しないことが確認された。

3) 距離的に近い調査地であっても採集数や種構成が異なり、季節によって種構成や捕集数が異なる地点が多かった。

4) これら基礎情報に加え、野生動物の分布や植生等の環境要因も考慮し、SFTS ウィルスのヒトへの感染リスクを評価することが必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

沢辺京子。2014。わが国におけるマダニ類の分布状況について。マダニを取り巻く環境とSFTS。生活と環境、699: 18-22。

沢辺京子。2015。SFTS 対策に向けたマダニ類の全国調査。ペストコントロール、169: 33-39。

2. 学会発表

沢辺京子。重症熱性血小板減少症候群(SFTS)の発見と感染症対策について。第65回日本衛生動物学会大会、緊急シンポジウム、2013年4月、江別市

小林睦生、橋本知幸、林利彦、沢辺京子。都市部の公園にマダニ類は生息するか。第66回日本衛生動物学会大会、2014年3月、岐阜市

前川芳秀、小林睦生、安藤勝彦、鎮西康雄、林利彦、二瓶直子、沢辺京子。2013年10月伊勢志摩地方におけるマダニ相と生息環境調査。第66回日本衛生動物学会大会、2014年3月、岐阜市

野田伸一、小林睦生、林利彦、沢辺京子。鹿児島県薩摩半島におけるマダニ類の季節消長。第66回日本衛生動物学会大会、2014年

3月，岐阜市

山内健生，渡辺護.富山県の市街地植生上で採集したマダニ類.第66回日本衛生動物学会大会，2014年3月，岐阜市

佐藤智美，林利彦，糸山享，沢辺京子.2013年から2014年の神奈川県厚木市におけるマダニ類の季節消長調査.第66回日本衛生動物学会大会，2014年3月，岐阜市

沢辺京子，山内健生，橋本知幸，野田伸一，渡辺護，平林公男，鍬田龍星，前田健，安藤勝彦，鎮西康雄，佐藤智美，前川芳秀，林利彦，小林睦夫.2013年晚秋に実施したマダニ相に関する国内調査.第66回日本衛生動物学会大会，2014年3月，岐阜市

江尻寛子，鍬田龍星，伊澤晴彦，佐々木年則，津田良夫，林利彦，小滝徹，高崎智彦，小林睦生，沢辺京子.国内で捕集された蚊およびマダニから分離されたオルビウイルスの性状解析.第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014年5月，山口市

沢辺京子，山内健生，橋本知幸，野田伸一，渡辺護，鍬田龍星，前田健，佐藤智美，前川芳秀，林利彦，小林睦生.マダニ相に関する国内調査.第49回日本脳炎ウイルス生態学研究会，2014年5月，山口市

佐藤智美，林利彦，前川芳秀，糸山享，沢辺京子.神奈川県厚木市におけるマダニ相および植生調査.第67回日本衛生動物学会東日本支部大会，2014年10月，千葉市

橋本知幸，沢辺京子.神奈川県および山梨県におけるマダニの発生消長調査事例.第67回日本衛生動物学会大会，2015年3月，金沢市

江尻寛子，伊澤晴彦，林昌宏，小滝徹，高崎智彦，林利彦，佐々木年則，小林睦生，西條政幸，沢辺京子.国内で捕集されたマダニから分離されたオルビウイルスの性状解析.第67回日本衛生動物学会大会，2015年3月，金沢市

小林睦生，前川芳秀，山内健生，野田伸一，二瓶直子，沢辺京子.重症熱性血小板減少症候群(SFTS)患者が発生した地域の植生の特徴.第67回日本衛生動物学会大会，2015年3月，金沢市

山内健生，石原貴子，沢辺京子.鳥取県，島根県，広島県におけるマダニ定点調査.第67回日本衛生動物学会大会，2015年3月，金沢市

佐藤智美，山内健生，林利彦，前川芳秀，小川浩平，佐々木年則，小林睦生，糸山享，沢辺京子.環境の異なる地域におけるマダニ相および植生解析，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

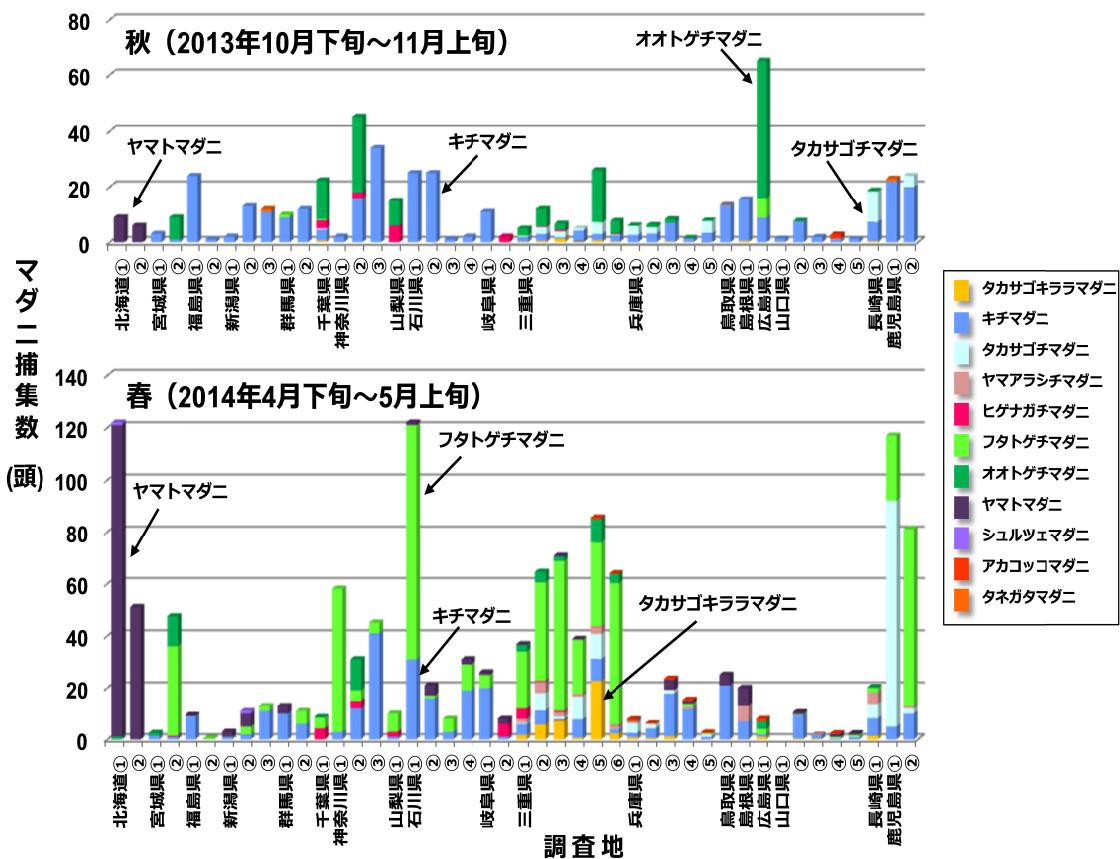


図1 定点調査地におけるマダニ捕集数および種構成

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	発表年
Hirabayashi K. Takeda M. Tsuda Y.	Tow-year aftereffects of Tsunami on abundance of mosquitoes in suburban Sendai Area in Miyagi Prefecture, Japan in 2013	Entomological Research Bulletin.	30		2015 In press
Kuwata R. Isawa H. Hoshino K. Sasaki T. Kobayashi M. Maeda K. Sawabe K.	Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in <i>Culex tritaeniorhynchus</i> cells persistently infected with Culex flavivirus	Journal of Medical Entomology	52	222-229	2015
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 (<i>Callithrix jacchus</i>) after passive transfer of antidengue virus monoclonal antibodies and infection with dengue virus.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene	92	370-376	2015
Arima Y. Matsui T. Shimada T. Ishikane M. Kawabata K. Sunagawa T. Kinoshita H Takasaki T. Tsuda Y. Sawabe K. Oishi K.	Ongoing local transmission of dengue in Japan, August to September 2014	Western Pacific Surveillance and Response Journal	5	doi:10.5365/wpsar.2014.4.5.3.007	2014
Ejiri H. Kuwata R. Tsuda Y. Sasaki T. Kobayashi M. Sato Y. Sawabe K. Isawa H.	First isolation and characterization of a mosquito-borne orbivirus belonging to the species Umatilla virus in East Asia	Archives of Virology	159	2675-2685	2014
Hirabayashi K. Takeda M. Nihei N. Kobayashi M. Tsuda Y. Sawabe K.	Distribution of <i>Aedes albopictus</i> mosquitoes in an inland climate mountain area, Nagano Prefecture, Japan	Proceedings of the 8th International Conference on Urban Pests, Gabi Muller, Reiner Pospischil and William H Robinson (Eds.) Printed by OOK-Press Kft., H8200 Veszrem, Papai u.37/A, Hungary	37	125-129	2014

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	発表年
Hirata K. Komagata O. Itokawa K. Yamamoto A. Tomita T. Kasai S.	A single crossing-over event in voltage-sensitive Na^+ channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides	PLoS Neglected Tropical Diseases	8	e3085	2014
Kobayashi M. Komagata O. Yonejima M. Maekawa Y. Hirabayashi K. Hayashi T. Nihei N. Yoshida M. Tsuda Y. Sawabe K.	Retrospective search of dengue vector mosquito, <i>Aedes albopictus</i> in area visited by a German traveler that has contracted dengue Disease	International Journal of Infectious Diseases	26	135-137	2014
Nakamichi K. Lim C.K. Saijo M.	Stability of JC virus DNA in cerebro-spinal fluid specimens preserved with guanidine lysis buffer for quantitative PCR testing	Japanese Journal of Infectious Diseases	67	307-310	2014
Nakamichi K. Tajima S. Lim CK. Saijo M.	High-resolution melting analysis for mutation scanning in the non-coding control region of JC polyomavirus from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy	Archives of Virology	159	1687-1696	2014
Takayama-Ito M. Nakamichi K. Kinoshita H. Kakiuchi S. Kurane I. Saijo M. Lim C.K.	A sensitive in vitro assay for the detection of residual viable rabies virus in inactivated rabies vaccines	Biologicals	42	42-47	2014
Takeshita N. Lim C.K. Mizuno Y. Shimbo T. Kotaki A. Ujiie M. Hayakawa K. Kato Y. Kanagawa S. Kaku M. Takasaki T.	Immunogenicity of single-dose Vero cell-derived Japanese encephalitis vaccine in Japanese adults	Journal of Infection and Chemotherapy	20	238-242	2014
Tsuda Y. Hayashi T.	Results of mosquito surveillance using dry-ice traps from 2003 to 2013 at the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan	Medical Entomology and Zoology	65	131-137	2014

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	発表年
Kuwata R. Satho T. Isawa H. Yen N.T. Phong T.V. Nga P.T. Kurashige T. Hiramatsu Y. Fukumitsu Y. Hoshino K. Sasaki T. Kobayashi M. Mizutani T. Sawabe K.	Characterization of Dak Nong virus, an insect nidovirus isolated from <i>Culex</i> mosquitoes in Vietnam.	Archives of Virology	158	2273-2284	2013
Matsuoka M. Sasaki T. Seki N. Kobayashi M. Sawabe K. Sasaki Y. Shibayama K. Sasaki T. Arakawa Y.	Hemin- binding proteins as potent markers for serological diagnosis of infections with <i>Bartonella quintana</i> .	Clinical Vaccine and Immunology	20	620-626	2013
Kuwata R. Nga P.T. Yen N.T. Hoshino K. Isawa H. Higa Y. Hoang N.V. Ttang B.M. Loan D.P. Phong T.V. Sasaki T. Tsuda Y. Kobayashi M. Sawabe K. Takagi M.	Surveillance of Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes in Vietnam from 2006 to 2008.	American Journal of Tropical Medicine and Hygiene	88	681-688	2013
Obara-Nagoya M. Yamauchi T. Watanabe M. Hasegawa S. Iwai-Itamochi M. Horimoto E. Takizawa T. Takashima I. Kariwa H.	Ecological and genetic analyses of the complete genomes of <i>Culex</i> flavivirus strains isolated from <i>Culex tritaeniorhynchus</i> and <i>Culex pipiens</i> (Diptera: Culicidae) group mosquitoes.	Journal of Medical Entomology	50	300-309	2013

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	発表年
Yamaguchi Y. Nukui Y. Kotaki A. Sawabe K. Saijyo M. Watanabe H. Kurane I. Takasaki T. Tajima, S.	Characterization of a serine-to-asparagine substitution at position 123 in the Japanese encephalitis virus E protein.	Journal of General Virology	94	90-96	2013
Wong K.T. Ng K.Y. Ong K.C. Ng W.F. Shankar S.K. Mahadevan A. Radotra B. Su I.J. Lau G. Ling A.E. Chan K.P. Macorells P. Vallet S. Cardosa M.J. Desai A. Ravi V. Nagata N. Shimizu H. Takasaki T.	Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA.	Neuropathology and Applied Neurobiology	38	443-453	2012
Kuwata R. Hoshino K. Isawa H. Tsuda Y. Tajima S. Sasaki T. Takasaki T. Kobayashi M. Sawabe K.	Establishment and characterization of a cell line from the mosquito <i>Culex tritaeniorhynchus</i> (Diptera: Culicidae).	In Vitro Cellular & Developmental Biology	48	369-376	2012

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	発表年
小林睦生	ヒトスジシマカと Dengue熱 - 2014年の騒動より学ぶこと	ペストコントロール	169	18-25	2015
沢辺京子	SFTS対策に向けたマダニ類の全国調査	ペストコントロール	169	33-39	2015
渡辺 譲	公衆衛生学的視点からみた三陸海岸被災地におけるハエとカの大発生	CLEAN LIFE	2014年	19-26	2014
佐々木年則 関なおみ	シラミ媒介性感染症、特に塹壕熱の現状と今後の課題	化学療法の領域	30	106-113	2014
沢辺京子	日本脳炎ウイルスの国内越冬と海外飛来	化学療法の領域	30	39-49	2014
沢辺京子	わが国におけるマダニ類の分布状況について。マダニを取り巻く環境とSFTS	生活と環境	699	18-22	2014
津田良夫 助廣那由 梅澤昌弘 稻垣俊一 村上隆行 木田中 土屋英俊 丸山浩 沢辺京子	成田国際空港におけるネッタイシマカの越冬可能性に関する実験的研究	衛生動物	65	209-214	2013
白鳥（田島）茂 高崎智彦	わが国と世界の日本脳炎の現状と問題点	小児内科, 予防接種 Q&A 改訂第3版	45 増刊	432-437	2013
高崎智彦	感染症ワクチン：最近の話題，課題「日本脳炎」	BIO Clinica.	28	332-336	2013
白鳥（田島）茂 高崎智彦	日本脳炎ワクチンの品質管理	臨床とウイルス	40	297-305	2012