

地球温暖化の節足動物媒介性ウイルス疾患の流行に及ぼす影響に関する研究

(2) 地球温暖化の節足動物媒介性ウイルス疾患患者数に及ぼす影響に関する研究

：地球温暖化のウイルス感染蚊に及ぼす影響

国立感染症研究所 ウイルス第一部 倉根一郎・高崎智彦

(研究委託先)

大分大学医学部 江下優樹

平成 13-17 年度合計予算額 17,850 千円

(うち平成 17 年度当初予算額 1,050 千円)

[要旨]

アルボウイルス感染症がわが国で勃発した際の蚊防除計画の一環として、わが国に生息する蚊類のウエストナイルウイルス (WNV) 感受性および地球温暖化に伴った媒介蚊の分布域拡大の可能性を検討した。そのために、大阪港湾近くの塩水湿地帯から採集したイナトミシオカ *Culex inatomi* の室内飼育法の確立、および本種の WNV 感受性を検討した。WNV ニューヨーク株の胸部接種蚊および経口感染蚊では、満腹吸液した蚊から所定日数後にウイルスゲノムが検出された。また、極めて少量のウイルス液を吸液した蚊においても、感染が認められた。唾液腺がある蚊胸部の感染が証明されたことから本種のウイルス媒介能が示唆された。地球温暖化に伴った異常気象によって汽水域の湿原拡大、媒介蚊と野鳥、媒介蚊とヒトとの接触頻度の増加など、ブリッジベクターとしての本種の重要性を監視する必要がある。

[キーワード] 媒介蚊、イナトミシオカ、ウエストナイルウイルス、媒介試験、感受性、

1. 研究目的

ウエストナイル熱 (WNF) は、蚊が媒介するウイルス性疾患であり、温帯地域でも患者が発生している¹⁾。アルボウイルス感染症がわが国で勃発した際の蚊防除計画の一環として、わが国に生息する蚊類のウエストナイルウイルス (WNV) 感受性および地球温暖化に伴った媒介蚊の分布域拡大の可能性を検討している。わが国における WNV の主要媒介蚊と目されるアカイエカ群 (*Culex pipiens* complex) のうち、アカイエカ *Cx. p. pallens*、チカイエカ *Cx. p. molestus*、およびブリッジベクターと推定されるヤブカ属ヒトスジシマカ群のヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、WNV ナイジェリア株に感受性を示し、感染したアカイエカは実験的にマウスを発症させた²⁾。本研究では、汽水

域で発生するイナトミシオカ幼虫の飼育法の確立後、WNV ニューヨーク株を用いたイナトミシオカの感受性を調べて、地球温暖化による本種の分布域拡大の可能性について考察した。

2. 研究方法

(1) イナトミシオカの実験室内飼育法の確立

イナトミシオカ幼虫の飼育に使用する塩水濃度、および継代飼育法について検討した。

① 供試蚊：大阪港湾区域で採集した本種幼虫と蛹を用いた。羽化 5-6 日後の雌成虫が無吸血的に産卵した卵を使用した。採卵にあたっては、食塩を含まない汲み置き水を含む 250ml 用のプラスチックカップを使用した。

② 塩水の調整： 汲み置き水道水と市販の食塩(塩化ナトリウム)を用いて、0.5、1.0、1.5 および 2%の食塩水を準備した。また、食塩を含まない汲み置き水を対照に用いた。

③ 蚊の飼育：幼虫の飼育にはホーロー製容器を使った。所定の食塩水を含む飼育水には、弱めのエアレーションを行い、水面にスカムが張らないようにした。幼虫の餌には、エビオスと粉砕したマウス固形飼料を等量ずつ混合して乳ばち内で液状にした溶液を用いた。幼虫の密度は 7 平方 cm あたり幼虫 1 個体の低密度で飼育した。孵化後 24 時間以内の幼虫の飼育を開始してから、毎日所定の時間に、幼虫の発育状況を観察した。特に、生存している幼虫数を記録した。また、得られた蛹は別の容器に移し、羽化成虫には 4%の砂糖水を与えた。蛹および成虫の個体数も同様に記録した。

(2) ウエストナイルウイルスに対するイナトミシオカの感受性試験

3 組の WNV プライマーセットを用いて、感染蚊の腹、胸、脚、頭部組織からのウイルスゲノムの有無を検討した。

① ウイルス：WNV ニューヨーク株として、NY99-6922 および MosqVISM2 の 2 種類(3×10^6 pfu/ml)を用いた。ウイルスに感染した C6/36 蚊培養細胞の上澄み液からストックウイルスを準備して、実験に供した。なお、WNV は、北海道大学獣医学部から大分医科大学(現 大分大学医学部)に分与されたものである。また、本研究を実施する際に、大分大学医学部動物実験委員会から承認を得た。

② 供試蚊：実験に用いたイナトミシオカは、大阪港湾区域で採集後、実験室内で 2 世代飼育した、羽化 5~6 日後の雌蚊成虫を用いた。

③ 蚊の飼育：25°C、日長 14 時間の飼育室内で蚊の飼育を行った。幼虫の餌として、エビオスと粉砕したマウス固形飼料を等量ずつ混合したものを、乳ばち内で水を加えて液状にして用いた。幼虫の密度は 7 平方 cm あたり幼虫 1 個体と低密度にして、ホーロー製容器を使って飼育した。羽化成虫には 4%砂糖水を与えて飼育を行い、羽化 5 日~6 日後に実験に供した。

④ ウイルス感染蚊の作製：感染蚊作製に関しては、Eshita *et al.* (2003) に準じて行った³⁾。イナトミシオカ成虫胸部への接種感染では、雌成虫の胸部側板内に $0.2 \mu\ell$ (6×10^2 pfu/ $0.2 \mu\ell$ /蚊 1 個体) を接種した。また、経口感染では、PBS で 3 回洗ったヒト赤血球(遠心後、上澄みを除いた packed

red blood cell) に等量のウイルス液を加え、さらに最終濃度 4%の蔗糖を加えたウイルス液を調合した。ちなみに雌蚊 1 個体が吸液したウイルス液量を $1 \mu\text{l}$ とすると、取込んだウイルス量は 3×10^3 pfu/ $1 \mu\text{l}$ となる。感染蚊は、3 重の飼育容器内に格納して 28°C で 10 日間の飼育を行った。飼育期間中は 4%の蔗糖液を含む綿からの吸液の機会を蚊に与えた。所定日数を飼育後、飼育容器を -20°C で 30 分程保管して蚊を生殺した。後日、実験に用いるまで -80°C に保存した。

⑤ 感染蚊からの総 RNA 抽出: 感染蚊からの RNA 抽出に関しては、林ら (2003) に準じて行った⁴⁾。RNeasy Mini Kit (RNeasy Mini Kit, キアゲン社製, Cat.#74103) を用いて総 RNA を抽出・精製した。手順はキアゲン社の説明書に従った。その最終段階では、RNase inhibitor (RNase out, インビトロジェン社製) を含む $50 \mu\text{l}$ の RNase free の蒸留水をカラムに加えて溶出した後、実験に使用するまで -80°C に保存した。

⑥ RT-PCR 法: 感染蚊を用いた RT-PCR に関しては、林ら (2003) に準じて行った。RT-PCR 法の手法を簡便化するために、one step RT-PCR 法 (One Step RT-PCR system with Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen company) を用いて、蚊からの WNV ゲノムの検出を行った。RT-PCR の反応条件として、RT 反応: 53°C 30 分、PCR 反応: (1 回) 94°C 1 分、(35 回) 94°C 30 秒、 53°C 30 秒、 68°C 1 分、(1 回) 68°C 2 分を設定して、MJ Research 社の PCR 増幅装置を使用した。また、WNV に特異的プライマーとして次の 3 組を使用した。NS3 領域を増幅するプライマー 1 として、Fla-U5004V (5'-3'): GGA ACD TCM GGH TCN CCH AT、および Fla-5457-NS3 (5'-3'): GTG AAR TGD GCY TCR TCC AT (THE LANCET 354:1261-1262) を使用して、453bp の特異的 PCR 産物を得た。また、E 領域を増幅するプライマー 2 として、WNNY514V-E (5'-3'): CGG CGC CTT CAT ACA CA、および WNNY904-E (5'-3'): GCC TTT GAA CAG ACG CCA TA) (高崎智彦博士、開発作製) を、また、E 領域を増幅するプライマー 3 として、WNNY514V2-E (5'-3'): CGG CGC CTT CAT ACA CW、および WNNY904-E (5'-3'): GCC TTT GAA CAG ACG CCA TA) (高崎智彦博士、開発作製) を使用して、511 bp の特異的 PCR 産物を得た。

3. 結果・考察

(1) イナトミシオカの継代飼育法

本種のウイルス感受性を詳細に検討するためには、実験室内での本種蚊の維持が必須である。本種幼虫を採集した発生水域が、海水の混じった汽水域であったことから、実験室内で真水を使って継代飼育可能かどうかを検討した。本種幼虫の発生水域の塩分濃度が 0.4~0.5% だった事に着目して、適度な塩分を含む汲み置き水での幼虫飼育を試みた。発生水域から幼虫を採集して、0~2% 塩分を含む水に幼虫を入れて、エアレーションを行いながら幼虫飼育を試みた。

その結果、0% よりも 0.5% の幼虫群から得られた羽化成虫の割合が高かった (図 1)。ちなみに、1% 以上では成虫は得られなかった。幼虫の認められる汽水域の塩分濃度が 0.5% 前後であったことから、実験室内で得られた結果は自然界の本種発生水域の塩分濃度と良く合致した値であった。

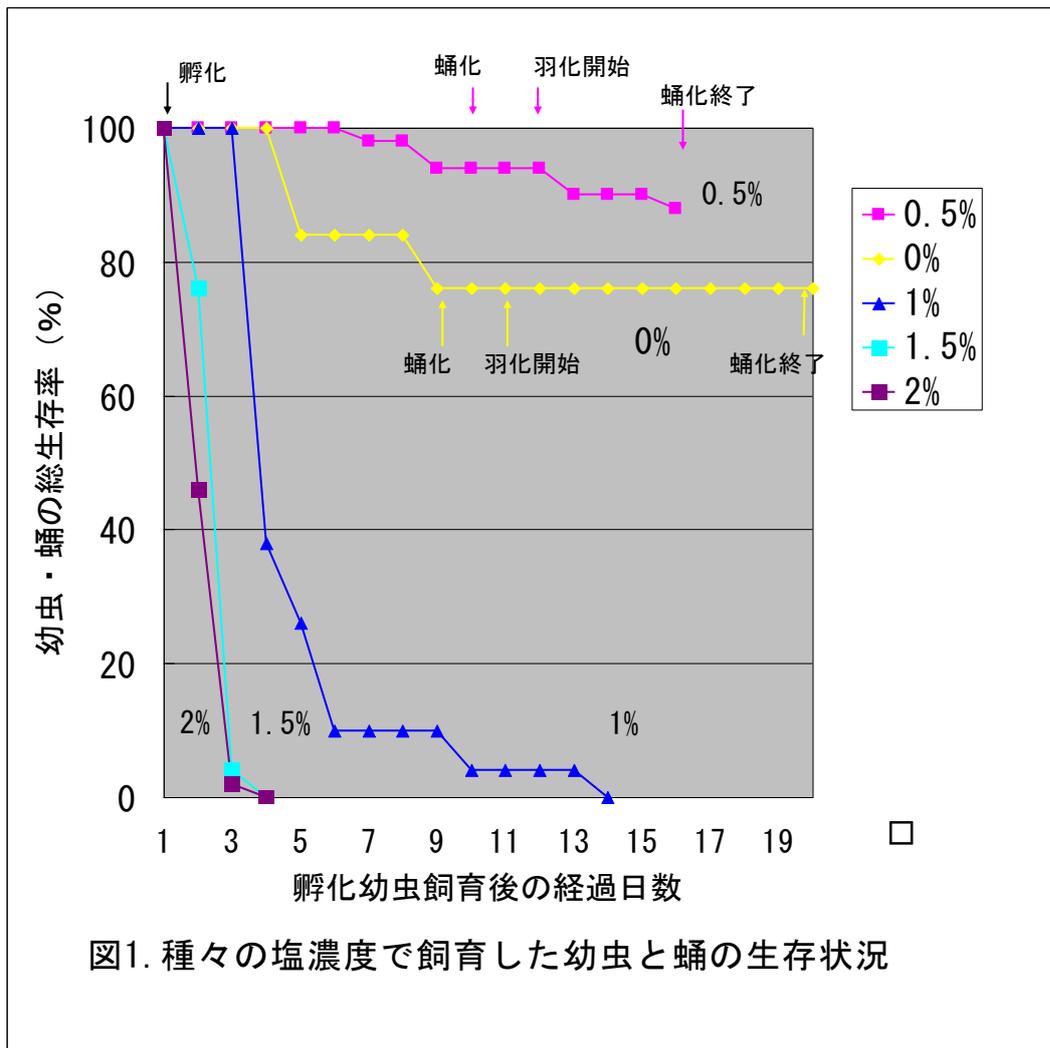


図1. 種々の塩濃度で飼育した幼虫と蛹の生存状況

0.5%の塩水を使っての本種幼虫の飼育によって、少なくともF14成虫が順調に得られていることから、イナトミシオカの継代飼育が実験室内で可能になり、本種を用いた種々の試験が可能となった。

本種の生物学的特性を考慮すると幼虫の分布域が汽水域に限定されている。しかし、地球温暖化による異常気象などで海面の上昇が起これば、一過性的な汽水域の拡大が生じる可能性を否定できない。そのような状況下では、媒介蚊と野鳥、媒介蚊とヒトを結ぶブリッジベクターとしての役割は増大する可能性が推察される。大阪には国際空港があることから、本蚊種の発生動態の拡大について監視することが今後も必要であろう。

(2) ニューヨーク株ウエストナイルウイルスに対するイナトミシオカの感受性

① プライマーの比較

胸部接種法および経口感染蚊の腹部の総 RNA 中のウイルスゲノムの有無を、3種類のプライマーセットで比較した。その結果、RT-PCR法でプライマー2を用いた際に、最も強いPCR産物が得られた(図2)。そこで、以後の実験にはプライマー2(WNNY514V-E, WNNY904-E)を用いることにした。

②胸部接種法で感染したイナトミシオカ雌成虫体内のウイルスゲノム

28℃温度で10日間飼育したイナトミシオカ雌3個体から、WNVに特異的なPCR産物が認められた(図2)。感染蚊3個体の各組織でのウイルスゲノム検出率は、腹部では100%(3個体/3個体)、胸部では100%(3/3)、脚部では67%(2/3)、頭部では33%(1/3)であった。

②経口感染したイナトミシオカ雌成虫体内のウイルスゲノム

28℃で10日間飼育した経口感染イナトミシオカ4個体中の胸部組織から、WNVに特異的なPCR産物が認められた(図3)。その内、満腹吸液した雌蚊1個体では、腹、胸、脚、頭部組織からウイルスゲノムがRT-PCRで検出された。また、少量吸液した雌3個体では、胸部は100%(3/3)、脚部は33%(1/3)、頭部では67%(2/3)であったが、腹部組織では0%(0個体/3個体)であった(図2)。

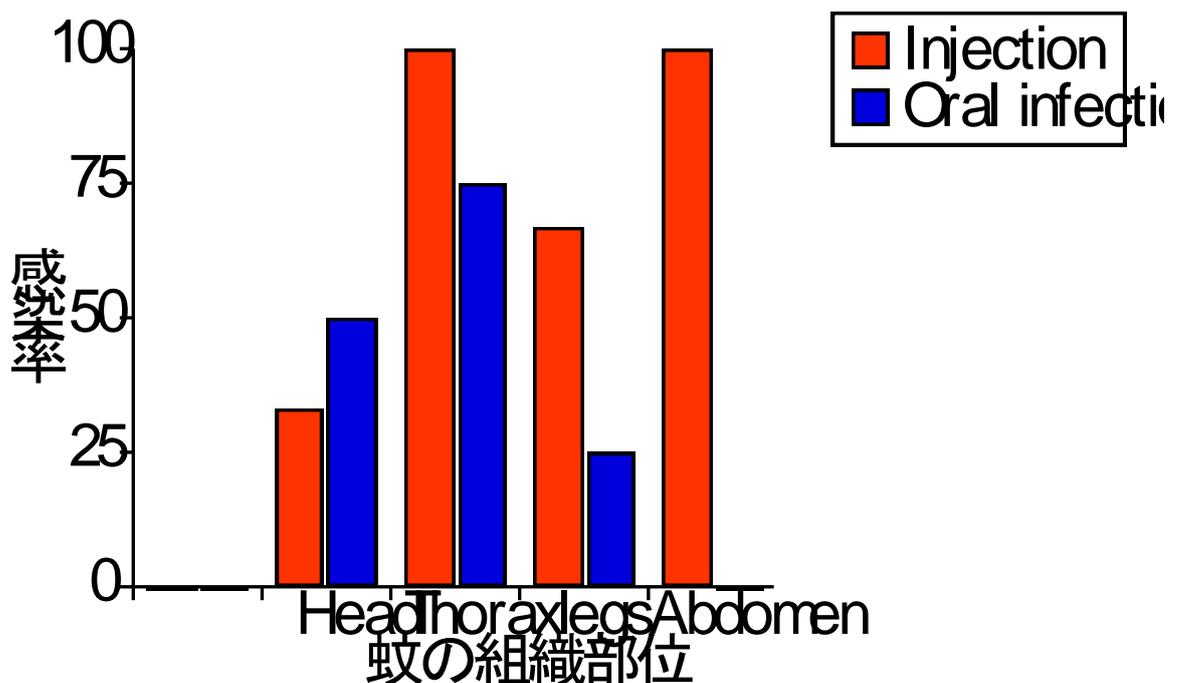


図2 胸部注射あるいは経口感染によって、ウエストナイルウイルスに感染した蚊の組織(腹, 胸, 脚, 頭部)におけるウイルスゲノムの検出率の相違

わが国におけるWNVの主要媒介蚊と目されるアカイエカ、チカイエカ、およびヒトスジシマカは、WNVナイジェリア株に感受性を示している²⁾。ウイルス株が異なるものの、ニューヨーク株のWNVにイナトミシオカが感受性を示したことから、我国では同様に媒介蚊となりうる事が初めて明らか

になった。

イナトミシオカの胸部接種蚊では、3 個体いずれも感染が成立しており、各組織の高い感染率は、胸部と腹部、脚部、頭部の順であった。一方、経口感染蚊では、全ての蚊個体からウイルスゲノムが検出されたことから、アカイエカやヒトスジシマカのそれらで得られた感染率²⁾よりも高い値を示した。また、ウイルス液を含む血液を少量吸液した経口感染蚊 4 個体中の 3 個体は、いずれも胸部組織が感染していたにも関わらず、その腹部組織からウイルスゲノムがいずれも検出できなかった。この要因として、①ウイルスを含む液には血液および 4%の蔗糖を加えているので、蚊の背側食道憩室(dorsal diverticulum: DD)に一部液が侵入して胸部から感染が広がった、②RT-PCR 反応に際して PCR 反応の阻害が起こり蚊腹部のウイルスゲノム増幅が起こらなかった、③吸液量が少量であったので、蚊の中腸までウイルス液が到達しなかったことなどが推定されるが詳細は不明である。今後、蚊体内における WNV の感染動態をさらに検討する必要がある。

本蚊種が WNV に感受性を示したことから、地球温暖化と関連した異常気象を考慮した疫学的意義を検討する価値があるように思われる。汽水性の湿原で発生する本種幼虫は、地球温暖化による海水の上昇による発生水域の拡大あるいは、異常気象に伴った渡り鳥と媒介蚊と接触頻度の増加などが推測されることから、本種の監視は必要と思われた。

4. 本研究により得られた成果

- (1) 汽水性イナトミシオカの継代飼育法を確立した。
- (2) イナトミシオカ幼虫の発育には、塩分濃度 0.5%前後が最も適していることを実験的に確かめた。
- (3) イナトミシオカ雌成虫が WNV に感受性を示すことを実験的に初めて明らかにした。
- (4) ニューヨーク株 WNV に対するイナトミシオカの経口感染率は、アカイエカのそれと同等以上と推察された。
- (5) ニューヨーク株 WNV は、ナイジェリア株 WNV よりも、日本の蚊に対する感染性が強いことが推察された。
- (6) イナトミシオカ幼虫の発生が汽水域に限定されていることから、蚊と野鳥、あるいは蚊とヒトを繋ぐブリッジベクターとしての役割が本種にあると考えられた。
- (7) 地球温暖化を伴った異常気象による海面上昇などによって、ブリッジベクターとしてのイナトミシオカの一過性的な生息域拡大の可能性があるので、本種の継続的監視が必要と結論した。

5. 引用文献

- 1) Burke, D. S. and Monath, T. P. : Chapter 33, Flaviviruses. In: Fields Virology, vol.1 (Fourth Edition), Editor-in-chief Knipe, D.M & Howley, P.M., Lippincott Williams & Wilkins,

pp1043-1125, 2001.

2) 江下優樹、高崎智彦、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 (2004) : ウエストナイルウイルスとその媒介蚊。九州実験動物雑誌、(20) :31-39。

3) Eshita, Y., Takasaki, T., Yamada, K. and Kurane, I. (2003) : Isolation of arboviruses from field-collected mosquitoes (Chapter 6). In: Anthology VI. Arthropod Borne Diseases, (Edited by Richmond, J. Y.), American Biological Safety Association. Illinois, pp.63-71.

4) 林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森 英人、井村俊郎、江下優樹、内田幸憲 (2003) : One step RT-PCR 法による媒介蚊からのフラビウイルス RNA の検出条件の検討。感染症学雑誌。77(10) :822-829.

[研究成果の発表状況]

(1) 誌上発表 (学術誌)

① Oda, T., Eshita, Y., Uchida, K., Mine, M., Kurokawa, K., Ogawa, Y., Kato, K. and Tahara, H. : Journal of Medical Entomology, 39, 1, 185 -190 (2002) 「Reproductive activity and survival of *Culex pipiens pallens* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in Japan at high temperature」

② Morales, R., Morita, K., Eshita, Y., Tsuda, Y., Fukuma, T., and Takagi, M. : Medical Entomology and Zoology, 53, 1, 21-27 (2002) 「Infection and dissemination of two dengue type 2 viruses isolated from patients exhibiting different disease severities in orally infected *Aedes aegypti* from different geographic origin」

③ 林 昭宏、鎌倉和政、多賀賢一郎、森 英人、井村俊郎、江下優樹、内田幸憲 : 感染症学雑誌。77(10) :822-829 (2003) 「One step RT-PCR 法による媒介蚊からのフラビウイルス RNA の検出条件の検討」

④ Ushijima, H., and Eshita, Y. : Pediatrics International, 46, 2, 202-206 (2004) ” Molecular epidemiology of viral infection in Asia”

⑤ Anzai, S., Fukuda, M., Otsuka, Y., and Eshita, Y. : Virus genes, 29, 2, 219-227 (2004) “Nucleotide sequence and phylogenetic analyses of dengue type 2 virus isolated in the Dominican Republic”

⑥ 江下優樹、高崎智彦、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎 : 九州実験動物雑誌、20, 31-39 (2004) 「ウエストナイルウイルスとその媒介蚊」

(2) 口頭発表

① 福田昌子、江下優樹 A 安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内

- 田幸憲、倉根一郎：第54回日本寄生虫学会南日本支部大会・第51回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会（2001）「蚊類のアルボウイルス媒介能（2）PCRを用いたウイルス媒介蚊の識別」
- ② Garca, B., Castro, M., Cesn, A. J., Valdz, S., Lora, M., Disla, M., Petit, A., Taveras, D., Shichijyo, A., Makino, Y., Eshita Y. y Takeshita M.: VI Congreso Dominicano de Infectologia (2001) 「Seroprevalencia de anticuerpo de dengue y confirmacin diagnstica por mtodos rpidos, y PCR en pacientes febriles, de junio del 2000 a octubre 2001 en la Repblica Dominicana」
- ③ 福田昌子、江下優樹、安西三郎、大塚 靖、青木千春、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、倉根一郎：第54回日本衛生動物学会大会大会（2002）「蚊類のアルボウイルス媒介能（3）PCRを用いたデングウイルス媒介蚊2種の識別」
- ④ 江下優樹、安西三郎、高岡宏行、高崎智彦、山田堅一郎、林 昭宏、鎌倉和正、多賀賢一郎、内田幸憲、倉根一郎：第55回日本寄生虫学会南日本支部大会・第52回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会（2002）「蚊類のアルボウイルス媒介能（4）ウエストナイルウイルスに対する日本産アカイエカの感受性」
- ⑤ Paeporn, P., Komalamisra, N., Thongrunkiat, S., Deesin, V., Eshita, Y., Rongsriyam, Y. : Joint International Tropical Medicine Meeting 2002 (The 8th Chamlong-Tranakchit Harinasuta Lecture) (2002) 「Potential development of temephos resistance in *Aedes aegypti* related to its mechanism and susceptibility ot dengue virus」
- ⑥ 内田桂吉、大森大二郎、江下優樹、福永昭廣：第55回日本衛生動物学会大会（2003）「アカイエカの濾胞退化とアポトーシス」
- ⑦ 佐々木年則、沢辺京子、江下優樹、伊藤美佳子、高崎智彦、倉根一郎、小林睦生：第55回日本衛生動物学会大会（2003）「VecTestによる蚊からのウエストナイルウイルスの検出」
- ⑧ 江下優樹、安西三郎、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎（2003）：第55回日本衛生動物学会大会（2003）「蚊類のアルボウイルス媒介能（5）異なる温度で飼育したアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカのウエストナイルウイルス感受性」
- ⑨ 江下優樹、安西三郎、牧野芳大、福田昌子、高岡宏行、Disla, M.、Solis M. A. T.、Cesn, A. J.、Castro, M.、板倉英世、竹下正純：第55回日本衛生動物学会大会（2003）「蚊類のアルボウイルス媒介能（6）ドミニカ共和国におけるデングウイルス媒介蚊」
- ⑩ 江下優樹、安西三郎、高崎智彦、山田堅一郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎：第38回日本脳炎ウイルス生態w研究会（2003）「日本の蚊のウエストナイルウイルス媒介能」
- ⑪ 江下優樹、Srisawat Raweewan、安西三郎、多森直樹、Narumon Komalamisra、Somjai Leemingsawat、Yupha Rongsriyam、牛島廣治：第19回日本国際保健医療学会東日本地方会（2004）「タイ国のデング熱流行地域で採集した媒介蚊からのデングウイルスゲノム検出」
- ⑫ 江下優樹、Srisawat Raweewan、多森直樹、安西三郎、高崎智彦、内田幸憲、高島郁夫、倉根一

郎：第 56 回日本衛生動物学会大会（2004）「蚊類のアルボウイルス媒介能（8）日本産 *Aedes flavopictus miyarai* と *Aedes galloisi* のデングウイルス感受性」

⑬ Eshita, Y., Takasaki, T., Imura, S., Uchida, Y., Takashima, I., Kurane, I. : Joint symposium on parasitic panel and viral disease panel, Fortieth Anniversary United States-Japan Cooperative Medical Science Program (2004) “Diagnostics on dengue and West Nile viruses in mosquitoes. *In*: Vector-borne infectious diseases and control”

⑭ 江下優樹、上田泰史、水田英生、多森直樹、東原絢子、安西三郎、Hamady Dieng、高崎智彦、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎：第 57 回日本衛生動物学会大会（2005）「蚊類のアルボウイルス媒介能（9）日本産イナトミシオカ *Culex modestus inatomii* のウエストナイルウイルス感受性」

⑮ 加藤幸太郎、水田英生、上田泰史、多森直樹、岡田貴志、東原絢子、Hamady Dieng、江下優樹（2005）：第 58 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 55 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会（2005）「無吸血産卵性イナトミシオカの継代飼育について」

⑯ 江下優樹、水田英生、上田泰史、高崎智彦、多森直樹、東原絢、加藤孝太郎、岡田貴志、DIENG Hamady、井村俊郎、内田幸憲、高島郁夫、倉根一郎（2006）：第 58 回日本衛生動物学会大会（2006）「蚊類のアルボウイルス媒介能（10）イナトミシオカのウエストナイルウイルス媒介実験」

（3）出願特許

なし

（4）受賞等

なし

（5）一般への公表・報道等

① 大分合同新聞（2005 年 4 月 24 日、地方版、夕刊 9 面参照）

② TOS テレビ大分（2005 年 6 月 11 日、ハロー大分、蚊の忌避について 5 分ほど紹介）

③ 大分合同新聞（2005 年 10 月 7 日、地方版、朝刊 1 面参照）

（6）その他成果の普及、政策的な寄与・貢献について

特になし