

地球一括計上

課題名	アルボウイルス、水系細菌叢、媒介生物のモニタリングによる温暖化の影響評価に関する研究		
担当研究機関	厚生労働省国立感染症研究所		
研究期間	平成20－24年度	合計予算額 (当初予算額 ベース)	68,827 千円 (うち24年度 10,871 千円)
研究体制	<p>(1) ブタ・イノシシにおける日本脳炎ウイルス感染と気象要因の解析(国立感染症研究所)</p> <p>(2) 地球温暖化により変動する水系細菌叢ゲノムの網羅的解析による評価(国立感染症研究所)</p> <p>(3) 媒介生物による温暖化評価(国立感染症研究所)</p>		
研究概要	<p>1. 序 (研究背景等)</p> <p>IPCC の報告書が指摘しているように、地球規模での温暖化は近年急速に進行しており、ウイルスを含む微生物の活動、疾病媒介昆虫の分布等に顕著な影響を与えることが予想されている。しかし、食物生産に係わる作物への影響や植物の分布域・漁業資源・大型動物の分布域などに関する研究は散見されるが、ヒトの健康に害を与える病原体や媒介生物の生態に与える影響に関して総合的な研究はほとんど行われていない。本研究では、地球規模での温暖化が近い将来に顕在化すると考えられる太平洋沿岸の地域を中心に、調査対象地域を設定し、長期間にわたって媒介生物に与える温暖化の影響をわかりやすい形で提示し、温暖化の影響を啓発することを目的とした。</p> <p>近年の我が国の日本脳炎患者数は10名以下であるものの、日本脳炎ウイルス (JEV) の活動は、蚊が活動する夏季を中心にそのシーズンのブタにおいては依然として活発である。近年は、関東・東海地方でも患者が報告され、患者発生時期も8月より9月・10月が多い傾向にあり、温暖化との関係が示唆される現象である。そこで、近年日本国内で活動している JEV の分子疫学的な解析を行った結果、1990年以降、我が国で分離された JEV の遺伝子型はほぼ全て I 型であることが判明した。一方、最近の中国・韓国では遺伝子 V 型の JEV が分離されており、中国大陸から V 型 JEV や新たなウイルス株が何らかの方法でわが国に移動してくることも示唆されている。また、冬季に捕獲されたイノシシからも初めて JEV が分離されたが、そのウイルスの性状を解析した結果、遺伝子 III 型ウイルス (Beijing-1 株) で製造されている現行日本脳炎不活化ワクチンが、遺伝子 V 型ウイルスやイノシシからの分離株 (遺伝子 I 型) に対して有効かを中和抗体により検討することは重要であること。また、将来の温暖化が媒介蚊や増幅動物として知られている野鳥の移動等に影響を与える可能性が否定できない状況から新たなウイルス株の侵入に備えることが重要であることも示唆された。</p> <p>水系や土壌などの地球環境中には、数多くの未同定種を含む多数の微生物が存在し、互いのバランスを保った生活圏を形成するとともに、より高等な動植物等による生態系全体の底辺を構成する。特に、世代時間が極めて短い細菌群は、温暖化など環境の変動に極めて鋭敏に反応する指標生物となり得る。このような細菌群は異なる種が集合する細菌叢としてそれぞれの環境でバランスを保ちながら存在しており、そのバランスの構成要素は環境の変化によって大きく変動することが知られている。したがって、そのような細菌集団の全体像や個々の菌種の存在比を同定することで、地球温暖化の鋭敏な指標となるものと考えられる。食物連鎖の底辺にある細菌群の変動は、最終的に魚類など水産資源に影響を及ぼす。また、熱帯・亜熱帯地域沿岸の海水に存在すると言われている病原性細菌が日本沿岸で検出されるかどうかにも極めて興味を持たれる。しかしながら、実験的に培養や同定できる種は僅か1%以下であり、その全体像を明らかにすることは困難であった。近年、メタゲノム解析の手法が開発されたことにより、培養操作を経ることなく、サンプル中のゲノム情</p>		

報を大量に得てバイオインフォマティクス解析を行うことが可能となった。本研究では、地球温暖化の影響によって大きく変動することが予想される生活圏における水系細菌のメタゲノム解析を行い、温暖化と細菌フローラの相関を解明し、人間生活に及ぼす影響を予測することを目的とした。

夏季に毎年流行する JEV は国内で越冬するのか？あるいは毎年海外から侵入してくるのか？JEV の主要な媒介種であるコガタアカイエカの長距離移動と越冬の実態解明が望まれている。1960 年代後半、東シナ海洋上の定点観測船上でウンカ類が多数捕獲され、大陸や東南アジアから毎年飛来する農業害虫の存在が広く知られるきっかけとなった。それら昆虫類の中にコガタアカイエカが見出されたことから、本種の長距離移動性も注目されるようになってきた。一方、蚊体内での JEV の越冬の可能性についてはこれまでに多くの議論がなされ、その可能性はほとんどないと結論された。つまり、短日下で羽化したコガタアカイエカ雌の吸血と産卵は抑制され（栄養生殖分離）、秋に JEV を取り込み越冬する雌蚊の数は極めて少ないと考えられたからである。ところが、様々な温度と日長条件下でイエカ類の寿命を比較した実験において、高温・長日下で羽化した雌の寿命は予想外に長く、15°C 下で最長 150 日以上も生存することが分かり、夏季に羽化した個体が越冬する可能性が示唆された。一方野外では、繁殖休眠状態のコガタアカイエカが 9 月下旬から 12 月上旬にかけて東京都内の公園に集団飛来し、翌年 4 月には同じ公園内で少数ながらコガタアカイエカの雌成虫が採集されたことから、秋に集団飛来したこれらコガタアカイエカの一部はそのまま公園内で越冬している可能性が示唆された。本研究では、コガタアカイエカの越冬と JEV の越冬を室内実験ならびに野外実験から検証する。

アメリカ大陸とヨーロッパ大陸に生息するトビイロイエカは、ウエストナイルウイルス（WNV）の主要な媒介種である。一方、日本国内に生息するアカイエカ種群（アカイエカ・チカイエカ・ネッタイエカ）はトビイロイエカとは近縁の種であり、いずれも WNV 媒介能があることが報告されている。冬季に捕獲されたイノシシから I 型 JEV（JaNB037 株）が分離されたが、コガタアカイエカの活動が想定される時期以外（4 月・5 月あるいは 10 月以降）にアカイエカが捕集されたことから、本種による JEV 媒介の可能性も浮上した。アカイエカが日本を含む極東アジアに生息するのに対し、チカイエカは気温との関係よりもむしろ適した環境があることが指摘されている。今後、国内の温暖化が進むことにより、両種の分布域が拡大するとは断言できないが、温度・日長への反応性に劣るチカイエカが生き残る可能性は否定できない。一方、ネッタイエカは熱帯地域から東南アジアの亜熱帯地域にかけて広く分布し、国内においては八重山諸島から屋久島の南西諸島と小笠原諸島に分布していることが記録されている。近年、鹿児島県下にネッタイエカが定着していると推察され、さらに、九州北部の壱岐島からも本種が捕集されたことで、温暖化の影響が示唆された。これまでにネッタイエカが捕集された鹿児島県と長崎県北部の 1980～2000 年の最寒月 3 ヶ月間の月最低気温の平均は 4～10°C であり、冬季でも凍結があまり生じない温暖な地域であると思われた。将来の温暖化によって、ネッタイエカがアカイエカの国内定着、ならびにアカイエカ種群が関与するアルボウイルス感染症の国内侵入と流行域の拡大を考察する。

2. 研究目的

日本国内で現在活動している JEV を分離し、分子疫学的にその特徴を解析する。1980 年代に京都で蚊から分離された JEV をその対照とし、ウイルス遺伝子の相違を検討した。最近ヒトの住環境にしばしばイノシシが出現するという状況は、西日本だけでなく東日本にも拡大する傾向にある。ブタと近縁な野生動物であり、JEV の増幅動物としての可能性を解明することを目的とし、抗日本脳炎抗体およびウイルス遺伝子検査、およびウイルス分離を実施した。対象地域は、野生イノシシが住環境に出現する事例の多い兵庫県西宮市周辺である。また、近年、中国・韓国において JEV 遺伝子 V 型が分離されている。中国大陸からのウイルスの飛来を示唆する報告もあり、すでに日本に侵入している可能性も危惧されている。また、イノシシから新たに JEV が分離され、国内の土着した感染環の存在も示唆され、これらのウイルスに対するワクチンの反応性を調べることを望まれる。そこで、遺伝

子Ⅲ型ウイルス（Beijing-1株）で製造されている現行日本脳炎ワクチンが、遺伝子V型ウイルスや新たにイノシシから分離されたウイルス株に対して有効かを中和抗体により検討することで、将来のV型ウイルスの侵入に備えることを目的とする。

地球温暖化をはじめとする地球規模で起こる気候変動・環境変化の問題について、気温や海面水位といったマクロな視点の指標測定がなされている。それらの結果から、気温および海面水位の上昇を伴う今後の温暖化進行シナリオが予測されており、気候変動モデルとして、より破壊力の強い熱帯低気圧の増加、水循環の変動、海洋生産性の減少、様々な生物の絶滅、感染症の分布拡大などが推測されている。一方で、気候変動が実際の生命・生態系に及ぼす影響については、現在多方面で実証が試みられているものの未だ明確な指標は得られていない。近年、多くの細菌のゲノムDNA塩基配列のデータベースが整備され、また、DNAマイクロアレイの技術が進歩し、多数のプローブを搭載したアレイ解析が実用的な価格で可能となり、さらに極微量のDNAを増幅するwhole genome amplification (WGA)などの技術が確立された。これらの進歩により、培養という煩雑で多数の菌種の同定には不向きな操作を経ることなく、サンプル中のゲノム情報を大量に得てバイオインフォマティクス解析を行うことが可能となった。我々の研究は、そのような技術的進歩を取り入れて、これまでに無い手法を用いて地球温暖化のモニタリングに応用する可能性を検討し、その応用を目指すものである。本研究では、日本各地の水系から採取したDNAサンプルを用いてアレイ解析を行うことで、存在する細菌叢の全体像を明らかにする。さらに、サンプル間で細菌叢の構成が共通する点及び相違する点を見出し、採取地、水温、海流と細菌叢の相関を検討する。最終的に、水系細菌叢の変化の網羅的モニタリングによって、温暖化が生態系に与える影響を早期に反映する指標として有用性であるかについて評価を行うことを目的とする。

JEVのコガタアカイエカ体内での越冬の可能性については、これまでに多くの議論がなされ、その可能性はほとんどないと結論された。本研究では、コガタアカイエカの生態に与える影響を、まず東北地方と西日本で得られるトラップ当たりの平均捕集数の差異に注目し、気象条件との関係を解析した。また、一部の地域で成虫越冬すると推察されるコガタアカイエカの低温耐性と栄養生殖分離をもとに室内実験を行う。年平均気温が蚊の分布を規定する要因の一つであることが多種の蚊で既に報告されていることから、気象条件との関係を解析し、都市域の人工的な環境における媒介蚊の越冬の問題を考察する。さらに、公園の自然環境を模した屋外飼育ケージを都内某所に設置し、秋に公園で採集したコガタアカイエカをそのケージ内へ移動させ、これらコガタアカイエカがケージ内で4月まで生存可能かどうかを調査した。室内実験と野外観察の両面から、JEVの蚊体内での越冬の可能性を検証することを目的とした。一方、アカイエカ種群の国内分布は、我々のこれまでの調査で概ね明らかになってきたが、今回行った室内実験によって、生育温度が蚊の生存に及ぼす影響を評価し、キロメッシュ気候図を利用して、今後の生息地の拡大あるいは縮小の可能性を考察する。本課題で実施された調査によってアカイエカ種群の最近の国内分布を明らかにするとともに、それら温度・日長への反応性を室内実験を通して評価し、特にネッタイエカの九州地方への侵入と定着について考察する。

3. 研究の内容・成果

(1) ブタ・イノシシにおける日本脳炎ウイルス感染と気象要因の解析

近年の我が国の日本脳炎患者数は10名以下ではあるものの、蚊が活動するシーズンのブタにおいてはウイルスの活動は依然として活発である。最近、我が国でブタから分離されるJEVは遺伝子I型がほとんどであるが、それらのウイルス遺伝子を解析すると、3'非翻訳領域に塩基配列欠損が認められることが明らかになった。この現象が近年の地球温暖化に伴う蚊の生態と何らかの関連があるかを、1980年代に京都で蚊から分離されたJEVに関して比較解析した結果、JEVの3'非翻訳領域の遺伝子欠損は1980年代から認められることが判明した。また、近年の温暖化傾向に伴って国内生息域を拡大しているイノシシのJEV感染、およびウイルス増幅動物としての能力について検討した結果、2008年12月に西宮市内（関西学院大学から西へ約2.5km）で捕獲されたオスのイノシシからJEVが分離された

(JaNB037株) (表1)。2009年3月と5月に捕獲されたイノシシからもウイルス遺伝子が検出され、いずれもI型であった。しかし、2010年の3月下旬に捕獲されたイノシシからは、遺伝子III型JEVが検出された。このことから、遺伝子III型のJEVは日本国内から消失したわけではなく、活動は活発ではないが存在していることが確認された。また、中国・韓国において、遺伝子V型のJEVが分離されていることから、イノシシの血液中のV型ウイルス遺伝子の有無を検討したが、すべて陰性であった。さらに、依然として米国で流行を繰り返しているWN熱に関しても遺伝子検出、特異的抗体検査を実施したがいずれも陰性であった。JEV遺伝子V型ウイルス (Muar株) に対する中和抗体価はワクチン製造株であるBeijing-1株に対する中和抗体価に比較して、平行線定量法により解析したところ相対力価0.51とかなり低い値を示した (表2)。これは、JaNB037株 (遺伝子I型) に対しては相対力価が0.67であったことと比較しても有意に低いと考えられる。

表1 日本脳炎ウイルス遺伝子を検出したイノシシ

個体番号	雌雄	捕獲日	推定年齢	体重(Kg)	IgM 抗体
Bo37	♂	12月12日	1歳	25	陰性
Bo66	♀	3月27日	1歳	20	陽性
Bo76	♀	5月5日	1歳半	15	陰性

表2 日本脳炎ワクチンの遺伝子V型 (Muar株) と遺伝子型III型に対する中和抗体価

ワクチン 希釈率	Beijing 1 株 (遺伝子型III)	Muar 株 (遺伝子型V)	相対力価
2倍	2.76	2.26	-0.34885
4倍	2.64	2.08	-0.19709
8倍	2.59	1.94	-0.14849
16倍	1.66	1.27	-0.45164

(2) 地球温暖化により変動する水系細菌叢ゲノムの網羅的解析による評価

2008年から2012年にわたり、日本全国13地点の河川・湖沼および海水から計37箇所の水を採取し、DNAを抽出して細菌DNAマイクロアレイ解析を行った (図1)。アレイはDDBJ 16S rRNA DB([http:// www.ddbj.nig.ac.jp/](http://www.ddbj.nig.ac.jp/))の登録配列情報を元に抽出した真正細菌・古細菌の16S rRNA可変領域の配列を標的にNimbleGenのプロープ設計方法に基づいて設計を行い、ArrayScribe (NimbleGen) によりアレイ上に配置を行った。その結果、全97,927標的に長さ29ntの複数のプロープを合計203,492個設計可能であり、各種コントロール配列と共にアレイに搭載した。アレイ解析により、平均値+3SD以上のシグナル値を有するプロープ由来のデータをサンプル間でのマイクロアレイシグナル強度のパターンが類似した菌種をクラスターにまとめるために、クラスタリング解析に供した。その結果、各水域において存在する細菌群の中から、複数の水域に存在する共通性の高い菌種とともに、それぞれの水域に特徴的に存在する菌種をより



図1 2008年～2012年のサンプリング箇所

高い精度で同定するとともに病原性細菌を同定することが出来た。また、採取地点ではなく採取時期に応じた類似性を有するクラスターも同定された。一方で、全サンプルで強いシグナルを示した菌種は日本近海の普遍種であると考えられた。2011年の東北大震災約半年後に採取した岩手県大槌町および山田町の細菌叢は最も特異的なクラスターを形成したが、その中には窒素固定菌などの土壌細菌が多く含まれており、津波の影響で大量の土砂が海に流出した影響を反映するものと考えられた。このように、海水中に存在する普遍種と地域固有種の区別が可能となり、固有種の存在比変化が温暖化による海水環境の変化を鋭敏に反映する指標となると考えられた。したがって、これらの菌種を指標生物として、国内外における分布の解析と種特異的配列データの取得、プローブの量や質を向上させたアレイによるパターン解析を行うことで、温暖化・富栄養化・災害などに応答した細菌生態系変動のモニタリングに用いることが出来る可能性が示された。

(3) 媒介生物による温暖化評価

東北・中部・中国等の各地方におけるコガタアカイエカの個体数の比較を行うため

に、牛舎・豚舎および湖沼・湿地において、

2種類のトラップを用いて捕集調査を行った。東北地方と西日本の調査地域のコガタ

アカイエカのトラップ当たりの平均捕集数には、10～100倍ほどの大きな差異が存在し、

東北地方における低い媒介蚊密度は、日本脳炎患者発生数に大きく影響している

と考えられた(図2)。気象条件との種々関係を解析した結果、最寒月の最低気温の平均と捕集数とに相関が認められた。コガタ

アカイエカは本来、熱帯・亜熱帯性の蚊であり、低温に対する耐性が低いと考えられるが、

近年、都市部の下水道関係の施設(暗渠等)で、越冬しているコガタアカイエカが

初めて捕集され、都市部の人工的な環境に適応し、越冬している可能性が強く示唆された。

初めて捕集され、都市部の人工的な環境に適応し、越冬している可能性が強く示唆された。

コガタアカイエカの孵化幼虫を様々な温度・日長条件下で飼育し、栄養生殖分離を発現する臨界日長を検討した結果、20°Cの温度条件下で、アカイエカは12.5時間、コガタアカイエカは13.8時間(関東地方では9月下旬および8月下旬に相当)以降の短い日長条件下に孵化した雌は、その成虫の吸血と産卵が阻害された。次いで、羽化後の成虫を種々飼育条件下での生存日数を比較した結果、コガタアカイエカはいずれの条件下においてもアカイエカよりも短命であった。特に5°C前後の低温下での50%生存率は約21日であり、アカイエカの82日に比べると有意に短かった。一方、自然環境を模して都内某所に設置された屋外ケージ内で蚊の生存を確認した調査において、2011年度はコガタアカイエカ3,000頭以上、アカイエカ18頭を供したが、ともに4月までは生存できなかった。しかし、2012年度は6頭中2頭のアカイエカの生存が4月に確認されたが、406頭のコガタアカイエカは2月中旬以降の生存は確認されなかった。室内実験および野外調査の結果は概ね一致していたと言える。

日本国内で捕集されたアカイエカ種群(合計1,824頭)を県別・採集年毎に集計した結果、捕集数に大きな差異はみられたが、アカイエカは北海道から九州地方までの国内各地に広く生息することが分かった。一方、ネッタイエカの分布の最北は屋久島であり、九州および東京都の島嶼域からのみ生息が報告されていた。2007年8月に鹿児島県下の豚舎で捕集された集団の中に本種の存在が明らかになり、その後2009年・2010年と同地域で多数捕集された。本地域においては、アカイエカよりもネッタイエカの割合が高い傾向にあった。さらに、2010年には九州北部の壱岐島からも本種

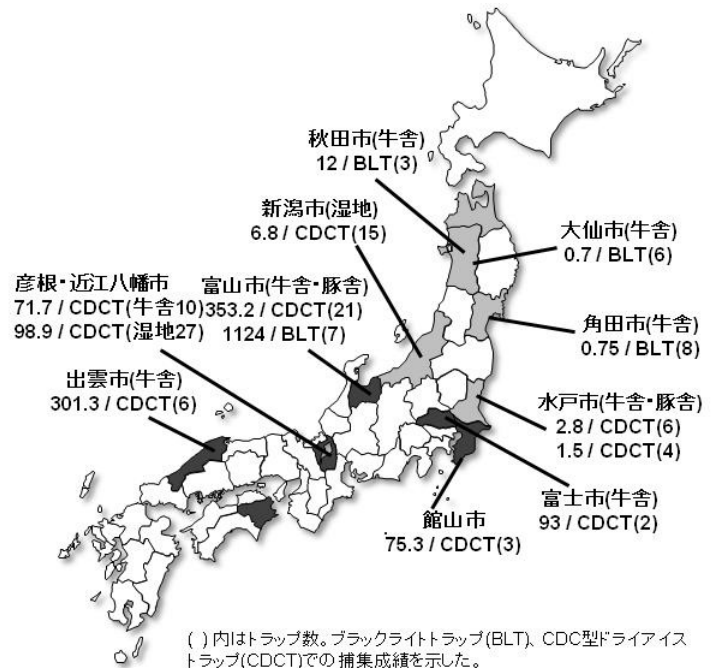


図2 コガタアカイエカの捕集地および捕集数

が捕集され、それらが島外から飛来・侵入した蚊集団である可能性は否定できないものの、定着に関する詳細な調査が望まれる事案であることが示唆された。また、アカイエカ成虫はいずれの飼育条件下においてもチカイエカ成虫よりも長命であり（雌1.4～1.9倍、雄2.6～8倍）、特に低温・短日（10°C10L:14D）下での生存率は顕著であった（アカイエカ雌は最長237日、チカイエカ雌は最長146日）。また、幼虫の生存を比較したところ、アカイエカは比較的温度の低い環境下での生息に適していたが、温度や日長に対する反応性に劣ることが明らかになった。

4. 考察

(1) 我が国の年平均気温は、過去20年間ほどの上昇が顕著であり、微生物を含むあらゆる生物に対して種々の影響があったと考えられる。この期間にJEVの遺伝子型はⅢ型からⅠ型に変化し(genotype shift)、1990年代からのブタおよびコガタアカイエカからの分離株はほとんど全てが遺伝子Ⅰ型であった。JEVの1980年代および最近の分離株を経年的に解析した結果、非翻訳領域における遺伝子欠損は約30年前から存在していたこと、遺伝子型の変化は認められるが、この欠損が病原性に直接関わっていないことが明らかとなった。2008年12月に西宮市内で捕獲されたオスのイノシシ（1歳・体重25kg）の血液からJEV（JaNB037株）が分離されたことは、JEVは海外から移動してくるだけでなく、野生動物のなかで越冬する土着ウイルスも存在すると考えられた。また、2010年の3月下旬に捕獲されたイノシシから、遺伝子Ⅲ型のJEV遺伝子を検出した。このことから、遺伝子Ⅲ型のJEVは日本国内から消失したわけではなく、活動は活発ではないが存在していることが確認された。JEV遺伝子V型ウイルス（Muar株）に対する中和抗体価はワクチン製造株であるBeijing-1株に対する中和抗体価と比較して、平行線定量法により解析したところ相対力価0.51とかなり低い値を示した。これは、JaNB037株（遺伝子Ⅰ型）に対しては相対力価が0.67であったことと比較しても有意に低いと考えられる。そこで、遺伝子V型JEVに特異的で高感度なプライマーを設計し、兵庫県下で2008年秋から2010年3月までに捕獲された120頭の野生のイノシシから採取された血液を再検査したところ、イノシシの血清から遺伝子V型のウイルス遺伝子は検出されなかった。将来我が国へ侵入する可能性のあるV型のJEVや、野生動物であるイノシシから分離されたウイルスに対して、継続して中和抗体の力価を解析することは重要と考えられる。また、JEVと近縁であり米国で流行を繰り返しているWNVの遺伝子あるいは特異的抗体も陰性であったが、今後も検討する必要があると考える。

(2) 従来、メタゲノム解析は莫大なコストや時間を要したが、我々が確立したDNAマイクロアレイ解析により、実用的なコストで、これまでにゲノム情報がデータベースに登録されているほとんど全ての細菌の存在情報を明らかにすることが出来た。実際に、本研究の結果特定した地域特異的クラスターには、いずれも大量の菌種未同定なプローブが含まれており、従来の細菌学的な手法では解析し得なかった細菌を数多く解析対象とすることができた。

本研究により、環境水中の細菌集団全体のモニタリングが可能となり、日本近海の普遍種、各地域の固有種、季節を反映する種、病原性を有する種、津波による環境変化を反映する種など、多様な情報を取得することが出来た。すなわち、DNAマイクロアレイによる細菌叢の変動解析手法は、様々な環境を反映する手法として有用であることが示された。今後さらに判定精度を改善するために、16S rRNA以外の種同定マーカー遺伝子配列の利用を検討することができる。これらの情報を活用することで、温暖化のみならず様々な環境変化を反映する生物指標を得ることが可能となる。水系細菌を対象としたこれらの研究をさらに進めることにより、温暖化などの全球的気候変動だけでなく、大規模災害などの細菌叢変動要因が海洋生態系を通じて漁業などの産業に与える影響を早期に定量的に観測する手法の確立につながることを示された。一方で、大量のデータが得られることから、温暖化、種多様性と取り巻く細菌叢といったデータの評価項目の策定とその簡便な解析方法の確立が今後の課題となろう。特に、DNAマイクロアレイによるDNA検出データから実際の菌を生物学的に同定したり、未同定細菌をそれ以上解析することは困難であり、あくまでアレイ解析による網

羅的データであることに留意する必要がある。いずれの採集地においても *Rhizobium* 属の根粒菌のような土壌性の細菌の検出が散見されているが、これは採集法が岸壁からであることの影響が考えられ、陸上の生態系や気候、産業活動の影響を考慮したい場合には、海岸や河川のサンプルを解析することが有効であると考えられる。一方で海洋生態系に限定した解析を目的とする場合にはより沖合でのサンプリングが好ましいことが示唆された。

本研究の結果を受けて、今後、特定の指標生物に特化して、より迅速かつ安価な解析方法を確立すれば、さらに簡便な解析手法として広く普及させることが可能であると期待される。本研究によって、そのような細菌叢変動評価系の確立への基礎を築くことができた。さらに、今後同様の手法を用いることにより、水中だけでなく、土壌や人間の生活環境においても指標細菌を同定し、細菌叢変動のモニタリングに用いることも可能と考えられた。

(3) 2005年以降の日本脳炎患者の発生県は、茨城県3名、石川県2名以外は静岡県以西の地域に限局されており、栃木・福島・新潟県以北では全く患者が発生していない。動物と蚊で感染環が成立している日本脳炎では、ウイルスの増殖動物の存在と媒介蚊の発生密度が重要な要因となる。我が国の JEV の活動は依然として活発に起こっており、関東以北のブタの日本脳炎抗体価も上昇することは知られているが、抗体保有率は西日本と比べて明らかに低い。この傾向は、媒介蚊の密度と関係している可能性がある。事実、西日本の調査地域のコガタアカイエカのトラップ当たりの平均捕集数は東北地方に比べて 10~100 倍も多く、関東地方と新潟県を結ぶ線の西側と東側で捕集数に大きな違いあることが本研究で明らかになった。コガタアカイエカは、その分布域の気候から熱帯・亜熱帯由来の蚊と考えられているが、北海道でも札幌近郊と帯広近郊で幼虫を採集した記録があり、幼虫数は少ないが北海道にもコガタアカイエカが分布していることが報告されている。コガタアカイエカは非常に長距離を飛翔することが可能であることから、夏季の一時期に北海道に飛来したコガタアカイエカが産卵した結果、幼虫が採集された可能性は否定出来ず、今後のより詳細な調査が望まれる。また、将来的に東北地方で温暖化による気温の上昇が起こった場合、現在の媒介蚊密度が西日本と同様に高まる可能性も危惧されることから、今後も継続したモニタリングが必要である。

コガタアカイエカは成虫で越冬することから、越冬環境がより安定し、ある程度の温度が保たれていれば翌春まで生存することが可能と考えられる。兵庫県の暗渠内で 2007~2008 年の冬季に越冬していると思われるコガタアカイエカが捕集された。都市部での特殊な構造物を巧みに利用して、コガタアカイエカが越冬している可能性が示唆され、都市部での下水道関連の構造物がこれらの媒介蚊の越冬にどの程度関与するか、より詳細な調査が必要である。非休眠の野外採集コガタアカイエカの次世代成虫の 5°C 下での平均生存日数は 2.4 日であった。非休眠状態の親から産まれた次世代成虫は低温に対して非常に弱く、休眠の生理状態が低温耐性に重要であることが示唆された。また、室内実験において、非休眠状態のコガタアカイエカ成虫は、5°C の全暗条件では 2~3 ヶ月でほぼ全ての成虫が死亡したが、15°C・短日条件で全体の 20%以上の個体が 4~5 ヶ月間生存した。5 ヶ月以上の生存は、前年の晩秋に羽化した雌成虫が翌春の 3 月から 4 月まで生存できる可能性を示しており、冬季の平均気温が 10-15°C 以上の地域では越冬が可能であることが推察された。一方、休眠状態の雌成虫を 5°C 下で飼育したところ、最初の 10 日間で約 75%が死亡し、約 2 ヶ月で全てが死亡した。東京都の過去 11 年間 (2001~2011 年) の 1 月の平均気温は 6.15°C で、コガタアカイエカの越冬には相当厳しい温度と考えられた。しかし、野外でコガタアカイエカ雌成虫の越冬を評価した 2 年間の調査では、3,000 頭以上のコガタアカイエカ成虫を東京都内の屋外ケージに放しても 1 頭も越冬の確認が出来なかった。また、室内実験においても、越冬状態に入った雌成虫であっても平均気温 5°C の低温条件に対して著しく弱いことが明らかになった。東京都内の公園でコガタアカイエカは越冬すると考えられるものの、その割合は極めて低いと推察された。このことから、冬季の平均気温が高い地域で越冬した成虫または海外で発生した成虫が 7~8 月にかけて長距離を飛翔し、九州、四国、関西、中部、関東地方に飛来し、最終的に東北地方まで到達するとの説が強く支持された。

日本国内で捕集されたアカイエカ種群を遺伝子分類法により判別した結果、合計 1,824 頭の捕集蚊がアカイエカ、チカイエカおよびネッタイイエカに判別された。アカイエカの成虫および幼虫の温度と日長に対する反応性から、アカイエカは比較的温度の低い環境下での生息に適していることが示唆された。一方、チカイエカは成虫の結果だけではあるが、アカイエカに比べてすべての環境下で寿命が短く、また、温度や日長に対する反応性に劣ることが明らかになった。今後、温暖化が進むことによって、アカイエカおよびチカイエカの分布域が拡大するとは断言できないが、温度・日長への反応性に劣るチカイエカが生き残る可能性が高いことは否定できない。これまでにネッタイイエカの生息が確認された地域、例えば、鹿児島県（屋久島・南さつま市・南九州市を含む）と長崎県壱岐島の 1980～2000 年の最寒月 3 ヶ月間の月最低気温の平均は 4～10℃であった（図 3 左）。この設定温度での解析が妥当か否かについては、今後の検証が必要ではあるが、少なくともこれらの地域は、冬季でも凍結があまり生じない温暖な地域であると言える。また、今後 2035 年までにこの温暖な地域は北上し、さらに内陸部へも地域を拡大することが予想された（図 3 右）。将来の温暖化によって、ネッタイイエカがアカイエカの生息地に侵入・定着する可能性が示唆され、種間競争がどのように起こるのか、種間雑種の問題も含めてより詳細な検討が必要である。

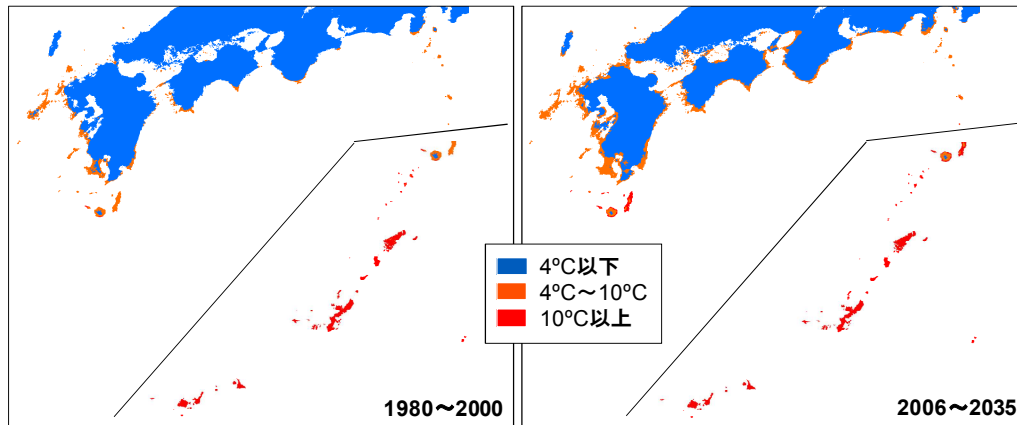


図 3. 冬季（12～2月）3 ヶ月の月最低気温の平均を示すキロメッシュ気候図