

[ノート]

兵庫県におけるウエストナイル熱対策の一環として実施した蚊の捕集調査

押部智宏¹ 福永真治¹ 廣田義勝² 近平雅嗣¹

Field Survey of Mosquito Associated with Control Measures to West Nile Fever in Hyogo Prefecture

Tomohiro OSHIBE^{1*}, Masaharu FUKUNAGA¹, Yoshikatsu HIROTA²,
Masatsugu CHIKAHIRA¹¹ Infectious Disease Research Division, Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences² Diseases Control Division of Hyogo prefectural government

We investigated the distribution of mosquitoes to prepare for the invasion of West Nile virus (WNV) to Hyogo prefecture. Mosquito sampling was carried out in this research center and the 13 public health centers. A total of 2,090 mosquito females were collected during the survey period, and they were classified 5 species; *Culex pipiens*, *Aedes albopictus*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Anopheles sinensis*, and *Ae. togoi* in order of the number. Two dominant species, *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens*, amounted 99.8% of the collected mosquitoes around this research center. WNV and Japanese encephalitis virus were not detected from the collected mosquitoes by RT-PCR. We identified the source of vertebrate blood by PCR-RFLP and sequencing portions of the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. Notably, *Cx. pipiens* had sucked blood from both humans and sparrows. This result suggests that *Cx. pipiens* is an important bridge vector from birds to humans in Hyogo prefecture, Japan.

I はじめに

ウエストナイル熱は従来アフリカ, 西アジア, ヨーロッパの地域で散発的に患者が発生していたが, 1999年に米国で初めての患者が確認されてからは急速に流行が拡大し, 2003年にはアラスカを除く北米大陸のほぼ全域に広がった^{1,2)}. この病原体であるウエストナイルウイルス(WNV)は自然界において多種の鳥類と蚊の間で感染環が形成されており^{1,2)}, この感染環に関わる動物種としてアオカケス, カラス, スズメなどの野鳥とイエカ, ヤブカ属の蚊が特に重要とされている^{2,3)}. これらの鳥類や蚊は国内の都市部

でもごく普通に見られることから, WNVが国内に侵入した場合, 米国と同様に流行が急速に拡大することが予想される.

WNVの侵入時の対策としては媒介蚊の防除を行うことにより, できるだけ蚊の分布密度を減らすことが最も有効である⁴⁾. 具体的には蚊の発生源の除去や殺虫剤の散布が挙げられるが, このような作業をより効果的に行うには蚊の分布状況の把握が不可欠である. しかし, 人口が集中する市街地における蚊の分布調査について, これまでほとんど行われていないのが現状である.

本調査では, 県内市街地での蚊の種やその分布状況を把握してWNV侵入の際の防除対策に資することを目的として, 県内14ヶ所で蚊の捕集調査を実施した. また捕集蚊についてWNV保有状況, およびチトクロームb遺伝子解析によって蚊が吸血した動物を推定したので併せて報告する.

1 感染症部 2 兵庫県疾病対策課

* 別刷請求先: 〒652-0032 神戸市兵庫区荒田町2-1-29
兵庫県立健康環境科学研究所センター
感染症部 押部 智宏

II 材料と方法

1. 実施期間及び蚊の捕集地点

1.1. 研究センターの定期捕集調査

2005年6月1日から11月9日まで、県立健康環境科学研究センター（神戸市兵庫区）敷地内（Fig. 1）の2ヶ所を定点として、合計92回蚊を捕集した。

1.2. 県内14ヶ所の一斉捕集調査

県疾病対策課の「ウエストナイル熱対策蚊捕獲試験実施要領」に基づき、2005年7月25日～28日および9月23日の2日間、研究センターおよび県内13ヶ所の健康福祉事務所敷地内（Fig. 1）を一斉捕集定点と定め、蚊の捕集を行った。各事務所では研修を受けた担当職員が蚊の捕集および雌雄判別を行った後、雌蚊のみを研究センターへ搬入した。宝塚健康福祉事務所については、1回目の調査を8月4日に実施した。なお、研究センターで行った本調査のデータは上記の定期調査（7月25日、9月23日分）の結果を再掲した。

2. 蚊の捕集

誘引剤にドライアイスを使用して、CDCライトトラップ（鵬図商事）で蚊を捕集した。トラップは午後4時頃に設置し、翌日の午前9時頃（約17時間）に回収した。

3. 蚊の種の同定

捕集した蚊は吸血する雌蚊のみに分別し、弓指ら⁹⁾の簡易同定表に基づき同定した。またアカイエカとチカイエカについては外見上区別ができなため、すべてアカイエカ（*Culex pipiens*）として分類した。

4. 検体の前処理

捕集蚊を定点および種類別として、50匹を1プー

ル（1検体）とし、1種類の捕集蚊が50匹に満たない場合でも1検体として供試した。1プール分をそれぞれマイクロチューブに入れ、これに0.2%ウシ血清アルブミン加里ン酸緩衝液を750 μ l加えマルチビーズショッカー（安井器械）で破碎した。

5. WNVおよび日本脳炎ウイルス遺伝子の検出

4.で調製した乳剤の遠心上清から、QIAamp Viral RNA Mini kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出、これを鋳型としてRT-PCRを行った。PCRの増幅領域はWNVのE領域、およびWNVと日本脳炎ウイルスで共通の塩基配列を持つNS3領域を対象とした。プライマーはウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル（国立感染症研究所）⁶⁾に記載の配列を使用した。

6. チトクロームb遺伝子解析による蚊が吸血した動物種の推定

4.で調製した乳剤の遠心上清から、QIAamp DNA Mini kit（QIAGEN）を用いてDNAを抽出しPCRに用いた。PCRにはミトコンドリアDNA内のチトクロームb遺伝子領域（約358bp）を増幅するプライマー^{7,8,9,10)}を用いた。このPCR産物を制限酵素Alu I, Hae III, Hinf I（日本ジーン）で切断し、2%アガロースで電気泳動した（PCR-RFLP法）。得られたRFLPパターンからBraviら⁷⁾の方法に準じて、ヒトおよびイヌ、ネコ、ニワトリ、その他の動物種を判定した。また、必要に応じてPCR産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で決定し、BLAST検索により動物種を同定した。

7. 神戸の気象観測データ

神戸の平均気温、降水量および平年値の気象観測データは気象庁ホームページ上の公表データを使用した。



Fig. 1 Map of the 14 fixed trapping points of mosquitoes Hyogo Prefectural Institute of Public Health and Environmental Sciences (this research center) (Kobe) and 13 public health center

III 結果

1. 蚊の捕集調査

研究センター定点で定期的に行った蚊の捕集状況を Table 1, 県内14ヶ所の一斉捕集の結果を Table 2, 3 に示した。全調査期間を通じて、捕集された蚊は5種2,090匹であった。

1.1. 研究センター定点の定期捕集調査

研究センター定点（Table 1）では全期間で3種1,734匹が捕集された。構成はアカイエカが990匹（57.1%）と最も多く、次いでヒトスジシマカ（*Aedes albopictus*）が740匹（42.7%）で、この2種（以下優占2種）で全捕集数の99.8%を占めていた。

Table 1 Number of collected mosquitoes at the fixed trapping point of this research center. (from June to November)

Month	Collection No.	Collection days	Collection Number /Collection days	Mosquito species		
				<i>Ae. albopictus</i>	<i>Cx. pipiens</i>	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>
Jun.	431	18	23.9	39	392	
Jul.	386	16	24.1	129	257	
Aug.	384	21	18.3	241	140	3
Sept.	345	18	19.2	260	84	1
Oct.	188	16	11.8	71	117	
Nov.	0	3	0			
Total	1734	92	18.8	740 (42.7%)	990 (57.1%)	4 (0.2%)

Table 2 Number of collected mosquitoes at the 14 fixed trapping points (25 ~ 28 July, 2005)

Region	Trapping point	Total no.	Mosquito species				
			<i>Ae. albopictus</i>	<i>Cx. pipiens</i>	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	<i>An. sinensis</i>	<i>Ae. togoi</i>
Hanshin	Ashiya	4		4			
	Takarazuka	59	39				
	Itami	5	4	1			
East Harima	Kobogawa	1		1			
	Akashi	11	3	8			
North Harima	Yashiro	39	2	5	31	1	
Center Harima	Fukusaki	12		9		3	
West Harima	Tatsuno	1		1			
	Ako	6		3	3		
	Toyooka	12	9	3			
Tajima/Tanba	Wadayama	9	1	3		5	
	Kabara	3	1	1			1
	Sumoto	17	3	14			
Kobe	Research center	28	13	15			
Total		187	75 (40%)	68 (36%)	34 (18%)	9 (4.8%)	1 (0.5%)

Table 3 Number of collected mosquitoes at the 14 fixed trapping points (September 23, 2005)

Region	Trapping point	Total no.	Mosquito species				
			<i>Ae. albopictus</i>	<i>Cx. pipiens</i>	<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	<i>An. sinensis</i>	<i>Ae. togoi</i>
Hanshin	Ashiya	6	6				
	Takarazuka	1	1				
	Itami	7	7				
East Harima	Kobogawa	74	73	1			
North Harima	Akashi						
North Harima	Yashiro	1	1				
Center Harima	Fukusaki	65	3	16	29	17	
West Harima	Tatsuno	4		2	2		
	Ako	4		2	2		
	Toyooka	12	5		7		
Tajima/Tanba	Wadayama	16	15				1
	Kabara	1	1				
	Sumoto	6	4	2			
Kobe	Research center	27	26	1			
Total		254	146 (56%)	24 (11%)	36 (16%)	17 (7.6%)	1 (0.4%)

その他にコガタアカイエカ (*Cx. tritaeniorhynchus*) が4匹捕集された。合計92回の調査回数で、1調査日あたり蚊の捕集数の平均は18.8匹であった。捕集数が最も多かった調査日は6月28日の82匹で、他の調査日は0匹~54匹の範囲で推移し、調査日毎の捕集数に大きなばらつきがみられた (Fig.2)。

1調査日当たりの平均捕集数 (Fig.3) を月別で比較すると、ヒトスジシマカの捕集数は月平均気温が25℃以上の7,8,9月で増加傾向が見られ、25℃以下となった10月に急激に減少した。また、この優占2種の構成比を比較すると、6,7月はアカイエカの割合が

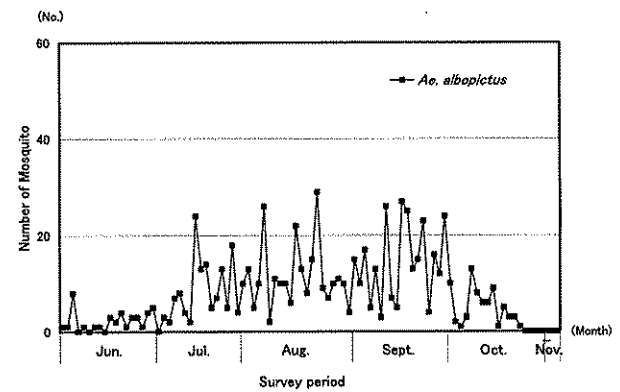
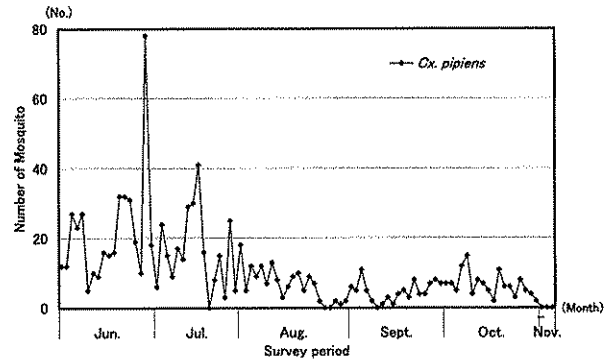


Fig.2 Number of collected Mosquito per collection day at fixed trapping point of this research center

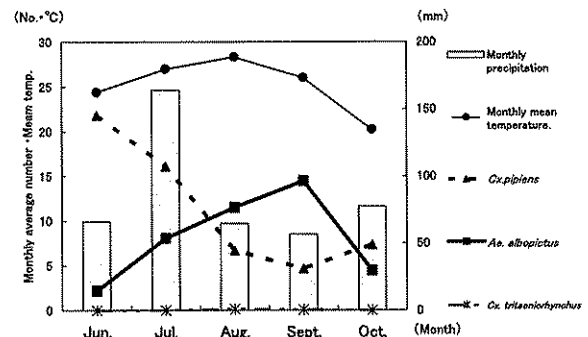


Fig.3 Average number of collected mosquitoes per month, mean temperature, and precipitation at the fixed trapping point of this research center

高かったが、8,9月にはヒトスジシマカが高くなり、10月はアカイエカが高率になった。これは10月のヒトスジシマカが激減した反面、アカイエカは微増したことにより、相対的なアカイエカの増率となった。

1.2. 県内14定点の蚊の一斉捕集調査

7月実施分では、全体で187匹捕集された (Table 2)。構成はヒトスジシマカが75匹 (40%)、アカイエカが68匹 (36%) で、優占2種が全捕集数の76%を占めていた。また、これら優占2種 (いずれかの1種のみを含む) のみが捕集されたのは9定点で、他種の蚊が捕集されたのは社の定点でコガタアカイエ

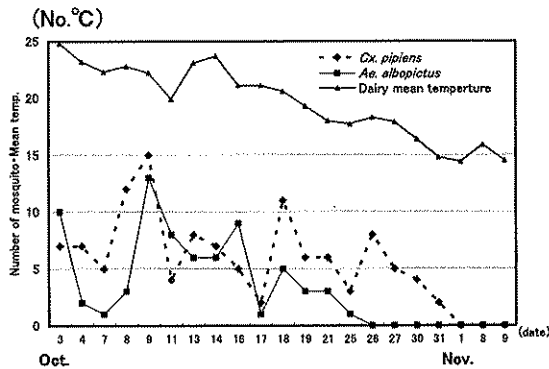


Fig.4 Seasonal changes of number of collected mosquitoes at the fixed trapping point this research center

カとシナハマダラカ (*Anopheles sinensis*), 福崎および和田山でシナハマダラカ, 赤穂でコガタアカイエカ, 柏原でトウゴウヤブカ (*Ae. togoi*) であった。4種39匹の蚊が捕集された社では, コガタアカイエカが優占2種よりも多く31匹(79%)であった。

9月実施分 (Table 3) では全捕集数は224匹で, ヒトスジシマカが146匹(65%)アカイエカが24匹(11%)となり, 優占2種が全捕集数の76%を占めており, 7月の調査と同率であった。優占2種のみ(いずれかの1種のみを含む)が捕集されたのは10定点であった。また, 他種の蚊が捕集されたのは, 福崎でコガタアカイエカおよびシナハマダラカ, 豊岡でコガタアカイエカ, 和田山でトウゴウヤブカであった。今回の調査で2回共に優占2種のみ(いずれかの1種のみを含む)が捕集されたのは, 阪神地域3定点, 研究センター, 加古川, 龍野および洲本の7定点であった。また, 優占2種の構成比では, ヒトスジシマカの割合が7月より9月が高かった。研究センター定点における定期調査でも同様の結果が得られた。

2. 蚊の捕集数の推移

研究センター定点における蚊の捕集数の推移を平均気温と共に Fig.3 および Fig.4 に示した。6月から上昇した平均気温は8月以降徐々に低下し, 10月18日以降は20°C以下となった。気温の低下と並行してヒトスジシマカは9月をピークに減少し, 10月26日以降は捕集されなくなった。アカイエカも気温の低下と共に捕集数が減少し, 日平均気温が15°C以下となった11月1日以降は捕集されなくなった。

3. WNV および日本脳炎ウイルス遺伝子の検出

捕集したすべての蚊について RT-PCR 法で, WNV および日本脳炎ウイルスの有無を検査したが, すべての検体からはこれらのウイルス遺伝子は検出されなかった。

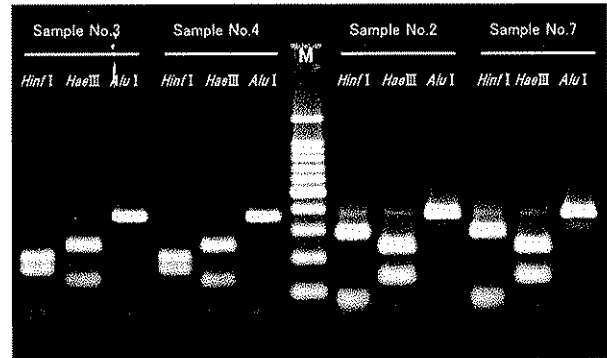


Fig.5 PCR-RFLP patterns of cytochrome b (cytb) gene digested with *Hinf* I, *Hae* III, *Alu* I. Sample nos.3,4 are Human. Sample nos.2,7 are other animal. M:100bp ladder marker

Table 4 Estimated result of mosquito bloodmeals sources by cytochrome b gene

Mosquito species	Collecting time	Trapping points	Bloodmeals source	
			Human (<i>Homo sapiens</i>)	Sparrow (<i>Passer montanus</i>)
<i>Cx. pipiens</i>	June to October	Research center	9	5
<i>Cx. pipiens</i>	From 25 to 28 on July	Ashiya · Itami	1	
<i>Cx. pipiens</i>	September 23	Kakogawa · Fukusaki	1	
<i>Ae. albopictus</i>	June to October	Research center	8	
<i>Ae. albopictus</i>	September 23	Kakogawa	1	
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	From 25 to 28 on July	Yashiro · Ako	1	
<i>Cx. tritaeniorhynchus</i>	September 23	Fukusaki · Toyooka	1	
<i>An. sinensis</i>	September 23	Fukusaki	1	

4. チトクローム b 遺伝子領域を用いた蚊が吸血した動物種の調査

PCR 法でチトクローム b 遺伝子が検出されたのは, 4種の蚊由来の28検体であった。これらのPCR産物を3種類の制限酵素で切断して得られたRFLP解析では, ヒトのパターンが23検体で認められた (Fig.5)。他の5検体はすべて同パターンであったが, Braviらが分類するいずれの動物種のRFLPパターンにも属さなかった (Fig.5)。このうちの2検体についてPCR産物から塩基配列を決定し相同性を検索したところ, 2検体共に *Passer montanus* (スズメ) cytochrome b gene の塩基配列 (accession no. AY228073) と一致した。このことから残りの3検体についても, 吸血した動物はスズメと推定した。これらの結果を合わせると, 16検体のアカイエカの11検体はヒトから吸血しており, 残りの5検体はスズメから吸血したと推定された。ちなみに, これらのスズメから吸血したアカイエカはすべて研究センターで捕集したものであった。その他ヒトスジシマカ, コガタアカイエカ, シナハマダラカが吸血した動物はすべてヒトと推定された (Table 4)。

IV 考 察

6月から11月にわたる研究センター定点の捕集調査の結果から、神戸市兵庫区に位置するセンター周辺の市街地ではアカイエカとヒトスジシマカが全体の99.8%を占めており、極めて単純な蚊の分布相であることが明らかとなった。兵庫県と隣接する大阪府が平成15年度に府内の市街地17ヶ所で行った調査⁵⁾では、1442匹中アカイエカが746匹(51.7%)、ヒトスジシマカが648匹(44.9%)と報告されており、これらを合わせると96.6%を占めており、この2種の分布やその構成比は我々の結果と一致していた。

今回14定点で行った2回の調査結果でも、優占2種が全捕集数の76%を占めており、さらに7定点では優占2種あるいはこのうちの1種しか捕集されなかったことから、県内の大半の市街地でもこの2種が優占的に分布していると考えられた。一方、社と福崎定点については優占2種の割合が低く、他の種が捕集されたことから、他定点とは異なる蚊の分布相が形成されているものと思われ、詳細な調査が必要である。

研究センター定点の調査日毎の捕集データでは、日によって大きなばらつきが見られた(Fig.3)。これはトラップ周辺の局所的な風の変化が影響していると思われる。このため捕集調査に際しては風向、風の強弱、吹きだまりなど風の動きを考慮して複数の箇所にトラップを設け、捕集も複数回を行う必要があると思われる。

研究センター定点における調査月毎の捕集データでは、月によって優占2種の構成比に変化が見られたが、14定点の7月、9月の調査でも同様の変化が認められた(Fig.4)。今回、我々が明らかにしたこの現象が毎年繰り返されるパターン化したものであれば、月によって重点的に防除する蚊種を絞り込むことで、より効率の良い防除が可能になることが考えられる。このパターンを明らかにするには、経年的なデータの蓄積や更なる調査を行っていく必要があると思われる。

蚊の捕集数の消長のデータ(Fig.5)から、日平均気温が20°C以下となった10月18日以降は、日平均気温の低下にほぼ依存して優占2種の捕集数が減少し、15°C以下となった11月1日以降はすべての蚊が捕集されなくなった。このため日平均気温15°C以下を指標として野外での蚊の活動の終息を把握できると考えられる。

今回捕集したすべての蚊からはWNV遺伝子は検

出されなかった。兵庫県内には国内最大のコンテナポートである神戸港があり、外国からの大型船舶が頻繁に出入りするため、他地域と比べWNVの侵入リスクが高く、死亡鳥を含めたWNVの侵入を監視する必要がある。

ミトコンドリアDNA内のチトクロームb遺伝子領域を用いた蚊が吸血した動物の調査では、28検体中23検体(82%)がヒトを吸血源としていることが判明した(Table 4)。ヒトが主な吸血源となったのは、市街地におけるヒトと野生動物の分布密度の違いを反映した結果であると考えられる。WNVは鳥類と蚊によって感染環が形成されており、特にスズメはWNVの増幅能力が高いとされている³⁾。今回の調査で、県内市街地のアカイエカがヒトとスズメの双方を吸血源としていたことから、アカイエカは野鳥で流行するWNVをヒトに伝播する橋渡しをするブリッジベクターとして働くことが明らかとなった。

今後は、今回得られたデータを踏まえ特に14定点を中心とした全県的な捕集調査の充実を図ることで、県下市街地での蚊の分布状況を把握するための基礎的データを蓄積していく必要があると考えられた。

謝 辞

本調査の遂行に当たり蚊の捕集、同定法、ウイルス検査法等の技術的な研修、指導をしていただきました大阪府立公衆衛生研究所弓指孝博先生、青山幾子先生、本調査の企画調整、総括をしていただきました県疾病対策課、県生活衛生課の関係者の方々、本調査にご協力いただきました芦屋、宝塚、伊丹、加古川、明石、社、福崎、龍野、赤穂、豊岡、和田山、洲本健康福祉事務所の健康増進課および薬務・生活衛生課の関係者の方々に深謝いたします。

文 献

- 1) 倉根一郎：ウエストナイル熱。日本ウイルス学会誌,53,1-6 (2003)
- 2) 今井長兵衛：ウエストナイルウイルスの米国侵入と流行実態。生活衛生, 48, 252-260 (2004)
- 3) Komar, N. Langevin, S. and Hinten, S. : Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis* ,9,311-322 (2003)
- 4) 小林陸生他：ウエストナイル熱媒介蚊に関するガイドライン, p1 - 15, 国立感染症研究所, 東京

(2003)

- 5) 弓指孝博, 瀧幾子, 斎藤浩一, 西村平和, 石田誠良, 大竹徹, 奥野良信: 大阪府におけるウエストナイル対策に関する蚊のサーベイランス (平成15年度報告). 大阪府公衛研所報, 42, 57-63 (2004)
- 6) 高崎智彦, 倉根一郎: ウエストナイルウイルス病原体検査マニュアル Ver.4,p.7, 国立感染症研究所, 東京 (2005)
- 7) Bravi, C. M., Liron, J. P., Mirol, P. M., Ripol, M. V., Peral-Garcia, P. and Giovambattista, G.: A simple method for domestic animal identification in Argentina using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Legal Medicine*, 6, 246-251 (2004)
- 8) Lanzilao, I., Burgalassi, F., Fancelli, S., Settimelli, M. and Fani, R.: Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of mitochondrial cytb gene from species of dairy interest. *J AOAC Int*, 88, 128-35 (1995)
- 9) Boakye, D. A., Tang, J., Truc, P., Merriweather, A. and Unnasch, T. R.: Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. *Med Vet Entomol*, 13, 282-287 (1999)
- 10) Meece, J. K., Reynolds, C. E., Stockwell, P. J., Jenson, T. A., Christensen, J. E. and Reed, K. D.: Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene. *J Med Entomol*, 42, 657-67 (2005)