

【短報】

徳島県における蚊の生息状況及びウイルス保有状況調査 (2017 年度)

徳島県立保健製薬環境センター

島田 実希子・川上 百美子・嶋田 啓司

Inhabitation Research of Mosquito and Inspection Result of Dengue, Chikungunya and Zika Virus in Tokushima Prefecture (2017)

Mikiko SHIMADA, Yumiko KAWAKAMI and Keiji SHIMADA

Tokushima Prefectural Public Health, Pharmaceutical and Environmental Sciences Center

要 旨

2017 年度、当センターで蚊の生息状況調査及びウイルス保有状況調査を行った。徳島県内の公園等 3 箇所計 9 地点において、2017 年 5 月から 11 月までの間、人囮法及びトラップ法による蚊の捕集を行った。捕集蚊は、人囮法で 281 匹、トラップ法で 1,527 匹、総数 1,808 匹であった。そのうち、デング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症の蚊媒介感染症の媒介蚊であるヒトスジシマカの雌計 247 匹を対象として、デング、チクングニア及びジカウイルス保有状況について遺伝子検査を行った結果、各ウイルス遺伝子は検出されなかった。

Key words : ヒトスジシマカ *Aedes albopictus*, デングウイルス dengue virus, チクングニアウイルス chikungunya virus, ジカウイルス zika virus

I はじめに

デング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症は、ウイルスを保有している蚊に吸血されることによって感染する蚊媒介感染症であり、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で全数把握対象の四類感染症に指定されている。2014 年には約 70 年ぶりとなるデング熱の国内感染例が確認され¹⁾、2016 年には中南米地域を中心に流行したジカウイルス感染症が四類感染症に追加された²⁾。

また、これら蚊媒介感染症の流行地域は世界的に拡大しており、日本における輸入症例も増加傾向にあることを受けて、蚊媒介感染症に対する対策は強化されている。

「蚊媒介感染症に関する特定予防指針³⁾」に基づき、徳島県では「蚊媒介感染症対策行動計画」が策定され、平常時の予防対策や発生動向調査の強化が求められている。これら蚊媒介感染症の病原体は、国内ではヒトスジシマカ (*Aedes*

albopictus) が媒介するとされており、平常時の定点モニタリング調査が重要とされている。

2017 年度、当センターで蚊の生息状況について調査し、媒介蚊のデング、チクングニア及びジカウイルス遺伝子の保有状況について検査したので、その結果を報告する。

II 方法

1 蚊の生息状況調査

(1) 蚊の捕集方法

蚊の捕集は、人囮法⁴⁾及びCO₂トラップ法⁴⁾の2種類の方法で実施した。人囮法は、調査員が調査地点に8分間立ち、吸血のために飛来する蚊を直径36 cmの捕虫網 (志賀昆虫普及社) で捕集した。CO₂トラップ法は、捕集器としてライトトラップ (猪口鉄工所) をライトなしの状態で使用し、誘引剤として1.5 kgのドライアイスを用いた。捕集器は、調査地点の木

の枝に吊るなどして地上から約1 mの高さになるように設置し、午前中から翌日の午前中までの約24時間稼働させた。

(2) 調査実施期間及び調査地点

調査実施期間は蚊の活動時期となる5月から11月前半までの間で、月2回(計13回)実施した。

調査箇所は、県内の公園等3箇所(A~C)を選定した。各箇所ごとに木陰や茂み等蚊が潜んでいそうな場所を3地点ずつ選定し、合計9地点で実施した。なお、人囮法は3箇所計9地点で実施したが、CO₂トラップ法は捕集器の設置許可が得られた2箇所計6地点のみでの実施となった。

(3) 蚊の同定

人囮法及びCO₂トラップ法で捕集した蚊は、捕集網に入った状態のまま持ち帰り、4°C冷蔵庫にて数時間静置した。その後、運動性が低下した状態で形態学的な特徴を観察し、種の同定、雌雄の分類を行い、個体数を記録した。その後、デング熱、チクングニア熱及びジカウイルス感染症の媒介蚊であるヒトスジシマカの雌を調査地点ごとに2 mLチューブに入れ、各ウイルス保有状況調査を実施するまで-40°C冷凍庫にて保管した。

なお、調査開始時及び形態学的に分類できない蚊については、種の同定確認を行った。蚊又は蚊の一部をQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNA抽出を行い、蚊の持つ遺伝子であるミトコンドリアDNAのチトクロームcオキシダーゼサブユニット1 (CO1) 領域をPCR法にて増幅させた。反応試薬としてPerfectShot Ex Taq (TaKaRa) , プライマーとしてLCO1490及びHCO2198を用い、94°C 1分、(94°C 10秒, 45°C 30秒, 72°C 1分) ×35サイクル, 72°C 10分で増幅反応を行った⁵⁻⁶⁾。その後、ダイレクトシーケンスにより得られた遺伝子産物の塩基配列を決定し、BLASTを用いた相同性検索を行った。

2 媒介蚊のウイルス保有状況調査

(1) 蚊の前処理

調査日、調査地点ごとに最大30匹を1プールとした。リン酸緩衝液 (PBS) を300 µL加えた後、蚊を粉碎し、8,000 rpmで1

分間遠心後の上清を遺伝子抽出用検体とした。調査開始時には、蚊の粉碎方法としてペッスル、電動ホモジナイザー、マルチビーズショッカーの3種類を試した。

(2) 遺伝子抽出

遺伝子抽出用検体は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNA抽出を行った。なお、検体は凍結融解を繰り返さないよう、検体の前処理からウイルス遺伝子検査までは同日に実施した。

(3) ウイルス遺伝子検査

抽出RNAの一部を調査日、調査箇所ごとにまとめて(9地点から3箇所を集約) 遺伝子検査用検体とし、リアルタイムRT-PCR法にてデング、チクングニア及びジカウイルス遺伝子検査を実施した。

リアルタイムRT-PCR法は、従来、臨床検体の検査については各病原体検出マニュアル⁷⁻⁹⁾に準拠して実施していたが、今回はチクングニアウイルス検査マニュアルで示されている4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix (Thermo Fisher Scientific) について検討し、用いることとした。各反応液は、4 × TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix, プライマー(終濃度1 µM) 及びプローブ(終濃度0.25 µM) に遺伝子検査用検体(RNA) 5 µLを加えた計20 µLとした。Applied Biosystems 7500Fast (Thermo Fisher Scientific) を用いて、48°C 5分, 95°C 20秒, (95°C 3秒, 57°C 30秒) ×40サイクルのFastモードで増幅反応を行った。

III 結果及び考察

1 蚊の生息状況調査結果

調査箇所(A~C) 別における人囮法及びCO₂トラップ法による蚊の捕集数を表1に示す。人囮法では、計9地点で総数281匹、そのうち検査対象となるヒトスジシマカ雌は149匹を捕集した。CO₂トラップ法では、計6地点で総数1,527匹、そのうち検査対象となるヒトスジシマカ雌は98匹を捕集した。その他の蚊は、アカイエカ群(*Culex pipiens* group) が大部分を占めた。ヒトスジシマカ雌の捕集率は人囮法で53%

表1 調査箇所ごとにおける蚊の捕集数

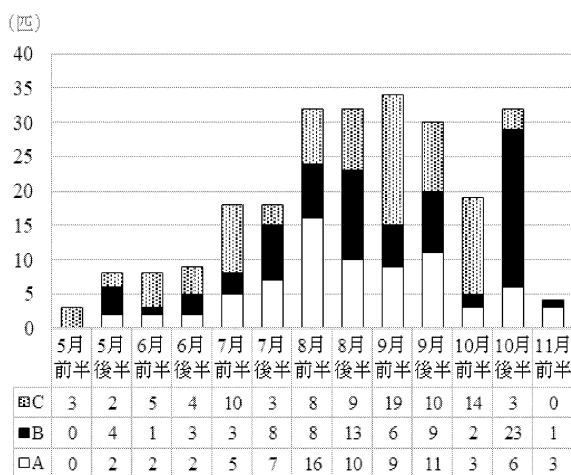
調査箇所	人囮法				CO ₂ トラップ法				総数
	ヒトスジシマカ雌	その他雄	の蚊	計	ヒトスジシマカ雌	その他雄	の蚊	計	
A	76	13	54	143	—	—	—	—	143
B	28	4	26	58	53	9	767	829	887
C	45	9	26	80	45	1	652	698	778
計	149	26	106	281	98	10	1,419	1,527	1,808

(149/281), CO₂ トラップ法で 6% (98/1,527) と, 人囮法が効率的であった。

また, 調査箇所 (A~C) 別におけるヒトスジシマカ雌の捕集数の推移を図 1 に示す。8 月から 10 月にかけて捕集数が多い傾向にあったが, 捕集数のピークは調査箇所ごとに異なり, 調査地点によってもばらつきがあった。

このことから, 患者発生時における生息密度調査には, 効率的で迅速性に優れた人囮法が有用であると考えられる。一方で, 短時間の調査となるため天候や日内変動の影響を受けやすく, 調査者による捕集成績や調査地点の選定にも注意する必要がある。

図 1 ヒトスジシマカ雌の捕集数の推移



2 媒介蚊のウイルス保有状況調査結果

(1) 前処理方法の検討

検体に PBS を 300 μ L 加えてから蚊の粉碎方法として, ペッスルを用いる方法, 電動ホモジナイザーを用いる方法, ビーズ (MP Biomedicals) をスパーテル 1 杯分加えてからマルチビーズショッカー (安井器械) を用いて 2,500 rpm で 90 秒間均一化する方法の 3 種類を試した。30 匹プールした検体について 3 種類の方法で前処理を行い, DNA 抽出, PCR 法にて CO1 領域を増幅させ遺伝子産物量を確認した。その結果, ペッスルによる遺伝子産物量がやや少なく, 電動ホモジナイザー又はマルチビーズショッカーによる遺伝子産物量は同程度であった。そのため, 操作が簡便で, 多検体処理に向いているマルチビーズショッカーを用いて前処理を行うこととした。

(2) ウイルス遺伝子検査結果

Distilled Water (DW) を用いて各ウイルス陽性コントロールの Master Stock の段階希釈系列を作製し, 従来法の反応試薬又は変更法の 4 \times TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix を用いて各ウイルス遺伝子検査を行った際の検出限界の結果を

表 2 に示す。ウイルス遺伝子の検出感度は, 従来法と同等もしくはそれ以上であることが確認できた。また, 反応時間は約 2 時間半から約 1 時間に短縮した。

調査日, 調査 9 地点ごとにプールした計 74 検体について, 前処理及び遺伝子抽出を行った。その後, 抽出 RNA の一部を調査日, 調査 3 箇所ごとに集約した計 36 検体について, 各ウイルス遺伝子検査を行った。全検体から, デング, チクングニア及びジカウイルスは検出されなかった。蚊からデングウイルスが検出される際は, 1 検体 (30 匹プール) あたり $10^6 \sim 10^9$ copies であったとの報告¹⁰⁾ から, ウイルス保有蚊 1 匹あたりであっても十分な RNA 量が検出されると考えられるが, 検体の集約量の限界については注意が必要である。

表 2 各ウイルス陽性コントロールの検出限界

	従来法	変更法
デングウイルス 1 型	10^2 倍	10^3 倍
デングウイルス 2 型	10^2 倍	10^3 倍
デングウイルス 3 型	10^2 倍	10^3 倍
デングウイルス 4 型	10 倍	10^3 倍
チクングニアウイルス	10^2 倍	10^3 倍
ジカウイルス	10 倍	10^2 倍

IV まとめ

2017 年 5 月から 11 月までの間に, 人囮法及び CO₂ トラップ法による蚊の生息状況調査を行った。その結果, 人囮法で 281 匹, CO₂ トラップ法で 1,527 匹, 総数 1,808 匹の蚊を捕集した。検査対象となるデング熱, チクングニア熱及びジカウイルス感染症の媒介蚊であるヒトスジシマカの雌は 247 匹捕集され, その捕集率は CO₂ トラップ法よりも人囮法で高かった。

また, ヒトスジシマカの雌を対象として, 各ウイルス保有状況について反応試薬を変更してリアルタイム RT-PCR 法にて遺伝子検査を実施したところ, 各ウイルス遺伝子は検出されなかった。

平常時における蚊の生息状況調査は, リスク地点の把握及びヒトスジシマカの発生状況の推移を確認でき, 患者発生時に対策を行う際の知見及びノウハウの獲得に繋がる。調査地点の選定, 捕集方法の検討等を加えつつ, 今後も調査を実施していく予定である。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知: デング熱の国内感染症例について (第一報), 平成 26 年 8 月 27 日健感発 0827 第 1 号

- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課長通知：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令及び蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針の一部を改正する件の施行について，平成 28 年 3 月 30 日健感発 0330 第 1 号
- 3) 厚生労働省告示第 260 号：蚊媒介感染症に関する感染症特定予防指針，平成 27 年 4 月 28 日
- 4) 国立感染症研究所：デング熱・チクングニア熱等蚊媒介感染症の対応・対策の手引き地方公共団体向け，平成 28 年 9 月 26 日
- 5) Folmer O., Black M., Hoeh W., *et al.* : DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**(5), 294-299 (1994)
- 6) Taira K., Toma T., Tamashiro M., *et al.* : DNA barcoding for identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) from the Ryukyu Archipelago, Japan, *Medical Entomology and Zoology*, **63**(4), 289-306 (2012)
- 7) 国立感染症研究所：デングウイルス感染症診断マニュアル (2014)
- 8) 国立感染症研究所：チクングニアウイルス検査マニュアル (2013)
- 9) 国立感染症研究所：ジカウイルス感染症実験室診断マニュアル (2016)
- 10) 齊木大，長谷川道弥，岡崎輝江，他：平成 26 年度に都内で発生したデング熱に関するデングウイルス媒介蚊ならびにデングウイルス検査対応（平成 26 年度及び 27 年度の結果）2. デングウイルス検査対応，東京都健康安全研究センター年報，**67**, 27-35 (2016)