

我が国における初めてのトビイロイエカ及びトビイロイエカとチカイエカの 交雑個体の分子生物学的確証

吉田永祥、芝田有理（現堺市保健所環境薬務課）、中谷誠宏、三好龍也、内野清子
岡山文香、小林和夫

要旨: *Culex pipiens pipiens* Linnaeus は日本を含む温帯地方に最も広範囲に生息するベクター蚊である。この蚊には形態学的には区別出来ないが習性や生理学的特性に大きな違いがみられる 2 つの form あるいは biotype ; トビイロイエカとチカイエカが存在する。我々は Ace gene assay と CQ11 rapid assay を使ってこれら 2 つの form あるいは biotype を識別した。堺市で捕集された 303 個体の *Cx. p. pipiens* の中で 17.5% が日本には生息しないとされているトビイロイエカであり 4.0% がトビイロイエカとチカイエカの交雑個体であった。これらは本邦におけるトビイロイエカ及びトビイロイエカとチカイエカの交雑個体の最初の分子生物学的証明である。一方、アカイエカや Ace gene assay において quin/B1246s プライマーセットに陽性を示した個体群でも CQ11 rapid assay でチカイエカやトビイロイエカ検出バンドに似たバンドが検出され、この迅速アッセイ使用には制限があると推測された。

Key words: *Culex pipiens* form pipiens, CQ11 microsatellite, Sakai City

緒言

我々は平成 15 年(2000 年)より蚊の生息調査を実施しているが、アカイエカ群の蚊が最も多く捕集される。アカイエカ群の蚊はフィラリア症やウエストナイル熱などの重要なベクターとして知られているが^{1,2)}、形態的なレベルですべてのメンバーを明確に識別することが困難なため、アカイエカ群の分類と系統発生は、専門家の間で意見の一致を見ない。アカイエカ群 (Pipiens Subgroup³⁾, Mosquito Taxonomic Inventory (<http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>)) には 2 つの広範囲に分布する蚊 *Culex pipiens* Linnaeus, 1758 と *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 が含まれ、それぞれ世界の温帯と熱帯地域におけるベクター種である。他の 2 種である *Culex australicus* Dobrotworsky &

Drummond 1953 と *Culex globocoxitus* Dobrotworsky, 1953 はオーストラリアに分布が限定される⁴⁾。*Culex pipiens* は 2 つの亜種、*Cx. pipiens pipiens* と温帯アジアで発生する *Culex pipiens pallens* Coquillett, 1898 が認められている。さらに、*Cx. p. pipiens* は 2 つの疫学的に異なった form または生物型の pipiens と molestus が確認されており、病原体媒介能力に影響を及ぼすいくつかの行動的・生理的特徴が劇的に異なる。日本のアカイエカ群にはアカイエカ *Cx. p. pallens* Coquillett、チカイエカ *Cx. p. form molestus* Forskal、ネッタイエカ *Cx. quinquefasciatus* Say が含まれ、トビイロイエカ *Cx. p. form pipiens* は日本には生息していないとされている¹⁾。チカイエカは初回無吸血産卵 (autogeneus) を行い、休眠せず

(homodynamic)、狭所交尾が可能(stenogamous)でアカイエカとトビイロイエカは、吸血産卵(anautogeneus)、休眠(heterodynamic)を行い交尾にはある程度の空間が必要(eurygamous)である。また、ネッタイイエカは吸血産卵性、無休眠性、狭所交尾が可能である等、その習性や生理的特性には大きな違いがみられる^{5, 6)}。従って、これらを分類することは薬剤耐性、宿主嗜好性、吸血行動など病原体媒介能力に関する事項や防除の面で非常に重要であるが、アカイエカ群は形態的には区別が困難であるため、我々は平成 21 年(2009 年)より、**Drosophila Ace-orthologous acetylcholinesterase(Ace) gene assay⁷⁾**による分子生物学的方法により、アカイエカ群の分類を実施している。捕集地点は野外地上部のみであるが Ace gene 領域で pipiens 検出プライマーに反応する個体が多くみられる。わが国にはトビイロイエカが生息しないとされているため¹⁾、これらの個体群すべてをチカイエカとしていたが、その中にトビイロイエカが混在している可能性を探るため、**Flanking region of the CQ11 microsatellite PCR(CQ11 rapid assay)^{8, 9, 10, 11)}**を用いてチカイエカとトビイロイエカの識別を試みた。

材料及び方法

採集地点(Fig. 1)及び捕集方法

堺市内各区役所管内の住宅地、公園等 12 ヶ所で、これらの調査地点に装置のライトを外した CDC 型ミニチュアトラップ (John. W. Hock Company、#512 型 CDC 捕虫機) を設置し、1 kg のドライアイスによる誘引により捕集した。装置は約 1.5 m 高に設置し、24 時間後に捕集された昆虫類を回収した。

材料

上記調査地点にて 2014 年度に捕集され、形態的特徴により、アカイエカ群と分類した蚊を対象とした。

DNA 抽出及び PCR による分子分類

DNA 抽出

抽出用材料として、捕集された蚊の脚部を使用した。体部より取り除いた脚部は 1.5 ml マイクロチューブに入れ、DNA 抽出まで -80℃ で保存した。脚部の欠損した個体については頭部あるいは胸部を使用した。コンタミネーション防止のため、使用ピンセットは 1 個体毎にエタノールで湿らせたキムワイプを使って拭き取り洗浄した。

PCR

Ace gene assay は葛西らの方法⁷⁾に従ったが PCR 用試薬については REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix に加えて KAPA2G Fast Multiplex PCR キット及び KAPATaq Extra Hotstart Ready Mix with dye も使用した。まず、ACEpall2・ACE quin/B1246s プライマーセットと ACEpip2/B1246s プライマーセットによる PCR を実施した。前者の PCR には KAPA2G Fast Multiplex PCR キット又は REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix を使用し、後者の PCR には KAPATaq Extra Hotstart Ready Mix with dye を使用した。今回 ACEpip2/B1246s プライマーセットによる PCR に反応性を示した個体は *Cx. p. pipiens* とした。ACE quin/ B1246s プライマーセットによる PCR に反応した検体及び 2 種類以上の遺伝子を検出した検体についてはそれぞれ単独のプライマーセットによる PCR による再検査を行った。すべての PCR が陰性の場合や塩基配列の確認が必要な検体に対し

では、F1457/B1246s プライマーセットによる PCR を実施し、陽性の場合はその PCR 産物の塩基配列を確認した。サ

ーマルサイクラーは TaKaRa Thermal Cycler Dice TP600 あるいは TP650 (TAKARA BIO INC., Otsu, Shiga,



Fig. 1. Maps showing the location of Sakai City, Osaka, Japan and distribution of 12 collection sites examined in this study.

Japan) を使用した。増幅産物は GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA) 添加 1% アガロースによる電気泳動を実施し、UV トランスイルミネーター (AE-6414, ATTO K. K, Tokyo, Japan) により確認した。

CQ11 rapid assay は BAHNCK と FONSEKA の方法⁸⁾に従った。Ace gene assay で ACEpip2/B1246s プライマーセットに反応した検体(ハイブリッドを含む)及び ACEpall2/B1246s に反応しアカイエカと識別された検体、ACEquin/B1246s プライマーセットに反応した検体についても CQ11 rapid assay を実施した。PCR 用試薬については REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix を使用し、トビイロイエカ特異バンド及びチカイエカとトビイロイエカ両方の form が検出された検体及び Ace gene assay でアカイエカと同定された検体と ACEquin/B1246s プライマーセットに反応した検体についてはそれぞれ単独のプライマーセットによる PCR を KAPATaq Extra Hotstart Ready Mix with dye を使って実施した。また、一部の PCR 産物についてはその塩基配列を確認した。

どちらの方法においても 2 種以上の遺伝子が検出されたものをハイブリッドとした。

塩基配列解析

DNA の塩基配列はそれぞれの PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA) により精製した後、directly sequence を実施した。サイクルシーケンス反応は ABI PRISM Dye Terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer Corp., USA) を用いて行い、反応生成物は

DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen, Valencia, Calif., USA) により精製後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer Corp., USA) により実施した。塩基配列の決定はフォワード、リバースの両鎖から BioEdit(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>) により実施した。ホモロジーの検索は DDBJ の BLAST プログラムにより、アライメントは同じく DDBJ-Clustal W プログラムにより実施した。

結果

2014 年度の調査で捕集された蚊のなかで、形態学的特徴によりアカイエカ群と分類した雌蚊は 1183 個体であった。その中で、Ace gene assay において ACEpip2/B1246s プライマーセットによる PCR で陽性を示し *Cx. p. pipiens* 遺伝子が検出されたものはハイブリッドを含め 344 個体であった。これらのサンプルについて CQ11 rapid assay を実施した結果、チカイエカの遺伝子が検出されたものは 263 個体、トビイロイエカの遺伝子が検出されたものは 62 個体、両方の遺伝子が検出されたものは 17 個体、両方の遺伝子ともに検出されなかったものは 2 個体であった。そのうち Ace gene assay で ACEpip2/B1246s プライマーセットによる PCR のみに陽性を示し *Cx. p. pipiens* と分類されたものは 303 個体であり、チカイエカと同定されたものは 237 個体、トビイロイエカと同定されたものは 53 個体、チカイエカとトビイロイエカのハイブリットと同定されたものは 12 個体であった。(Table1) (Fig. 2, 3, 4)

Ace gene assay において、ACEpall2/B1246s プライマーセットに

よる PCR で陽性を示し、アカイエカと識別された検体について CQ11 rapid assay を実施した結果、pipCQ11/CQ11F2、molCQ11/CQ11F2 プライマーセットに反応するものが半数以上認められ (Fig. 5)、ACEquin/B1246s プライマーセットに反応した検体も同様に CQ11 rapid assay に反応した (Fig. 6)。

考察

今回使用した標本は全て野外採集蚊であり、産卵形態や、休眠の有無、狭所交尾性などの習性や生理特性を確認した個体群ではない。分子生物学的分類のみの結果であるため、結果の解析には慎重が必要であるが、少なくとも堺市で捕集した *Cx. p. pipiens* には CQ11 rapid assay においてチカイエカ(78.2%) とトビロイエカ(17.5%) の2つの form 及

Table 1. Frequency of forms of *Culex p. pipiens* in Sakai City

		Flanking region of the CQ11 microsatellite				
		f. mol	f. pip	mol/pip	unkown	total
Ace gene	<i>pip</i>	237	53	12	1	303
	<i>pip/pall</i>	24	9	4	1	38
	<i>pip/quin</i>	2	0	1	0	3

pip, *Cx. p. pipiens*; *pip/pall*, hybrid between *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. pallens*; *pip/quin*, hybrid between *Cx. p. pipiens* and positive mosquito with ACEquin/B1246s primer set in Ace gene assay; f. mol, *Cx. pipiens* form molestus; f. pip, *Cx. pipiens* form pipiens; mol/pip, hybrid of *Cx. pipiens* form molestus and *Cx. pipiens* form pipiens

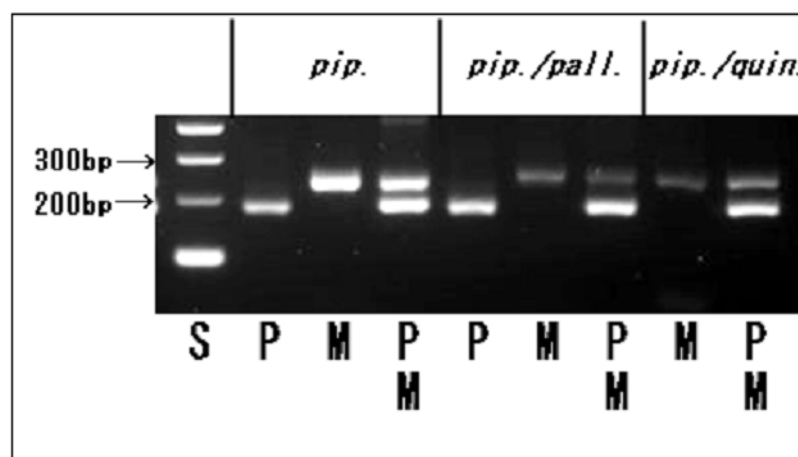


Fig 2. Example of fragment amplified using PCR of flanking region of the CQ11 microsatellite. S, size standard (100bp ladder); P, *Cx. pipiens* f. pipiens; M, *Cx. pipiens* f. molestus; PM, hybrid between f. pipiens and f. molestus; *pip.*, *Cx. p. pipiens*; *pip./pall.*, hybrid between *Cx. p. pipiens* and *Cx. p. pipiens pallens*; *pip./quin.*, hybrid of *Cx. p. pipiens* and positive mosquito with ACEquin/B1246s primer set of Ace gene assay.

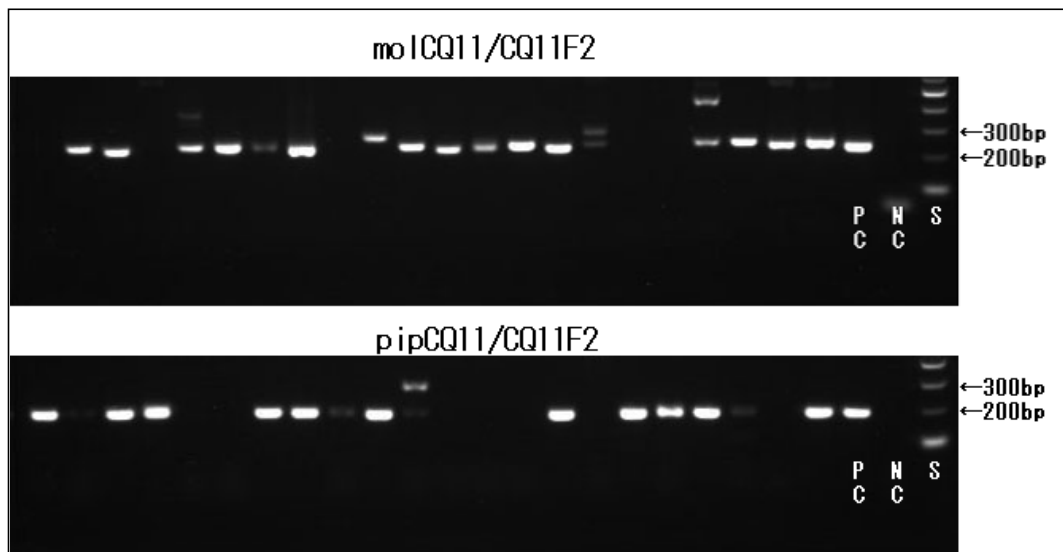


Fig. 5. Results of flanking region of the CQ11 microsatellite PCR of *Cx. pipiens pallens*. Above are fragments amplified using molCQ11 and CQ11F2 primer set, under are fragments amplified using pipCQ11 and CQ11F2 primer set. PC, positive control (2014Cx1182); NC, negative control; S, size standard (100bp ladder); Above lane and under lane are same samples.

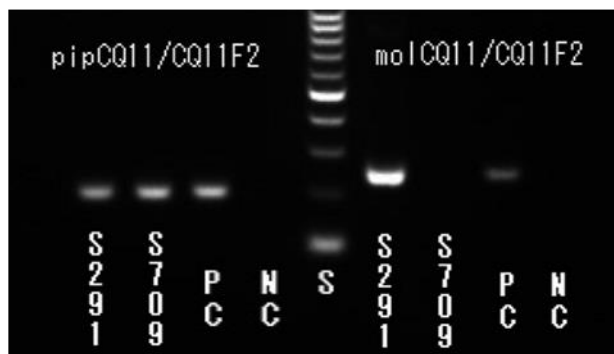


Fig. 6. Results of flanking region of the CQ11 microsatellite PCR of positive mosquitoes with ACEquin/B1246s primer set of Ace gene assay. PC, positive control (2014Cx1182); NC, negative control; S, size standard (100bp ladder)

びこれらのハイブリッド(4.0%)を示す遺伝子が確認され、我が国にもトビイロイエカが存在する可能性が分子生物学的に初めて示唆された。一方 *Cx. p. pipiens* とアカイエカや ACEquin/B1246s プライマーセットによる PCR 陽性個体群(ネッタイエカの遺伝子と断定できないため^{7, 12)}、ACEquin/B1246s プライマー

セットによる PCR 陽性個体とした)とのハイブリッド個体群における CQ11 rapid assay の結果を考察するために、Ace gene assay においてアカイエカと同一個体群及び ACEquin/B1246s プライマーセットのみに反応した個体群について CQ11 rapid assay を実施した。その結果両方

の個体群においてもチカイエカあるいはトビイロイエカと同位置付近に検出バンドが認められた。これらの検体については塩基配列の確認を実施していないが、このような検出バンドが出現することは *Cx. p. pipiens* とアカイエカなどのハイブリッド群への迅速アッセイとしては不適であり、CQ11 rapid assay は Ace gene assay において ACEpip2/B1246s プライマーセットにのみ反応する *Cx. p. pipiens* だけに利用可能であると考ええる。トビイロイエカとチカイエカのハイブリッドは米国におけるウエストナイル熱の大流行に大きな役割を演じていると考えられており¹³⁾、これらを分類することは重要である。我が国でのトビイロイエカ及びトビイロイエカとチカイエカのハイブリッドの存在の確証には習性・生態、生理的特性を含めた更なる調査・研究が必要である。

引用文献

- 1) Tanaka, K., Mizusawa, K. and Saugstad, E. S. 1979. A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu archipelago and the Ogasawara islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contr. Am. Entomol. Inst.*, 16: 1-987.
- 2) Turell, M. J., Dohm, D. J., Sardelis, M. R., O'Guinn, M. L., Andreadis, T. G and Blow, J. A. 2005. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: culicidae) to transmit West Nile Virus. *J. Med. Entomol.*, 42: 57-62.
- 3) Sirivanakarn, S. 1976. Medical entomology studies – III. A revision of the subgenus *Culex* in the Oriental Region (Diptera: Culicidae). *Contributions of the American Entomological Institute* 12(2): iii + 1-272.
- 4) Mattingly PF. The systematics of the *Culex pipiens* complex. *Bull WHO* 1967; 37: 257-261. PMID:5300063
- 5) 佐々 学. 1971. アエイエカとコガタイエカにおける種の問題. 衛生動物の進歩 第一集(佐々 学編), P. 49-65. 学術書出版会, 東京.
- 6) Vinogradova, E. B. 2000. *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria.
- 7) Kasai, S., Komagata, O., Tomita, T., Sawabe, K., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Ishikawa, T., Motoki, M., Takahashi, T., Tanikawa, T., Yoshida, M., Shinjo, G., Hashimoto, T., Higa, Y. and Kobayashi, M. 2008. PCR-Based Identification of *Culex pipiens* Complex Collected in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 61: 184-191.
- 8) Bahnck, C.M. and D.M. Fonseca. 2006. Rapid assay to identify the two genetic forms of *Culex* (*Culex*) *pipiens* L. (Diptera: Culicidae) and hybrid population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75: 251-255.
- 9) F. Amraoui, M. Tijane, M. Sarih, A-B Failloux. 2012. Molecular evidence of *Culex pipiens* form molestus and hybrids pipiens/molestus in Morocco,

- North Africa. *Parasites & Vectors* 5: 83
- 10) M. T. AL-Hussaini, A. K. Muhammed Ali, H. M. Al-Rubae. 2013. PCR Based identification of *Culex pipiens* complex(Diptera: Culicidae) collected in Al-Najaf governorate. *Magazin of Al-Kufa University for Biology*. 5: 2
 - 11) C. B. E. M. Reusken, A. de Vries, J. Buijs, M. A. H. Braks, W. den Hartog and E.-J. Scholte. 2010. First evidence for presence of *Culex pipiens* biotype molestus in the Netherlands, and of hybrid biotype pipiens and molestus in northern Europe. *Journal of Vector Ecology*. 35, 1: 210-212
 - 12) 吉田永祥, 芝田有理, 三好龍也, 内野清子, 岡山文香, 田中智之, 堺市生活衛生センター. 2013. 堺市におけるウエストナイルウイルスに関する蚊の調査(平成 25 年度). 堺市衛生研究所年報, 31: 54-62
 - 13) Fonseca, D.M., N. Keyghobadi, C.A. Malcolm, C. Mehmet, F.Schaffner, M. Mogi, R.C. Fleischer, and R.C. Wilkerson. 2004. Emerging vectors in the *Culex pipiens* complex. *Science* 303: 1535-1538.

First molecular evidence of *Culex pipiens* form pipiens and hybrids pipiens/molestus in Sakai City, Osaka, Japan

Hisayoshi YOSHIDA, Yuri SHIBATA, Tomohiro NAKATANI, Fumika OKAYAMA,
Kiyoko UCHINO, Tatsuya MIYOSHI, Kazuo KOBAYASHI

Culex pipiens pipiens Linnaeus is the most widespread mosquito vector in temperate regions including Japan. This mosquito has two forms; pipiens and molestus are morphologically indistinguishable with distinct behavior and physiologic characteristics. We employed Ace gene assay and CQ11 rapid assay for identification of two forms. Although it is considered that *Cx. pipiens* form pipiens does not inhabit Japan, 17.5% were identified as form pipiens and 4.0% as hybrids between form pipiens and form molestus among 303 *Cx. p. pipiens* mosquitoes collected in Sakai City, Osaka, Japan. In this study, we provide the first molecular evidence for the presence of both *Cx. pipiens* forms and hybrid in Japan. On the other hand, the reason CQ11 rapid assay should be used under the limit, that *Cx. p. pallens* Coquiliet and positive mosquitoes with ACEquin/B1246s primer set of Ace gene assay also were observed the amplified fragments at CQ11 rapid assay.

Key words: *Culex pipiens* form pipiens, CQ11 microsatellite, Sakai City