

堺市における蚊の調査 平成 28(2016)年度

三好 龍也、吉田 永祥、中谷 誠宏、岡山 文香、内野 清子、小林 和夫

要旨

蚊媒介感染症の侵入監視のため、蚊の捕集調査とフラビウイルス遺伝子の検出を行った。平成 27 年度の調査地点 12 地点の内、5 地点を変更し、調査対象を公園中心とした。合計 132 回の調査で 5 種 2 生態型を含めた 1,296 頭が捕集された。構成比率はアカイエカ (40.12%)、ヒトスジシマカ (34.26%)、チカイエカ (11.27%)、コガタアカイエカ (5.09%)、トビイロイエカ (0.77%)、トウゴウヤブカ (0.08%)、シナハマダラカ (0.08%) であった。交雑個体を含むその他アカイエカ群が 8.18% であった。昨年度より捕集回数が減少したが、総捕集数は増加した (昨年度同期間 931 頭)。アカイエカ、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカの捕集数が増加し、チカイエカ、トビイロイエカの捕集数が減少した。特にヒトスジシマカが増加し、調査地点の変更等の影響が考えられた。捕集されたこれらの蚊から、デングウイルス遺伝子及びフラビウイルス遺伝子は検出されなかった。本調査から得られる平常時のデータの蓄積が蚊媒介感染症の侵入監視や侵入した場合の防疫対策に重要な情報を与えると考える。

キーワード：蚊媒介感染症、フラビウイルス、アカイエカ群、ヒトスジシマカ、分子生物学的方法

緒言

ウエストナイルウイルス(WNV)は、自然界ではトリと蚊の感染環で維持されており、ヒトはウイルスに感染した蚊に刺されることにより、WNV に感染する。1999 年に WNV によるウエストナイル熱の患者が発生した米国では、感染が急速に広がり、4 年後には、ほぼ全米で感染者がみられるようになった。日本では平成 15 年(2003) に厚生労働省から「ウエストナイル熱の媒介蚊対策に関するガイドライン」¹⁾ が出された。これを受け、各自治体では蚊や野鳥の調査が実施されるようになり、堺市においても、平成 15 年から継続して蚊の調査を実施している。平成 26 年 8 月の国内でのデングウイルス感染事例の発生や平成 27 年 4 月 28 日に「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針」²⁾ が告示されたことに

より、堺市において「蚊媒介感染症対策における蚊捕獲調査実施要領」を改定し、平成 28 年度は調査地点をすべて公園等に変更し、調査を実施した。

日本のアカイエカ群にはアカイエカ *Culex pipiens pallens* Coquillett, 1898、チカイエカ *Culex pipiens form molestus* Forskal , ネットアイイエカ *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 が含まれ、幼虫発生源、狭所交尾性、休眠性、初回の無吸血産卵など生態学的性質に相違がみられる³⁾。しかし、これらを形態的なレベルで明確に識別することが困難なため、分子生物学的方法⁴⁾ によりアカイエカ群の分類を実施した。また、国内にはトビイロイエカ *Culex pipiens form pipiens* が生息しないとされているが⁵⁾、トビイロイエカの存在の可能性を探るため、Flanking region of

the CQ11 microsatellite PCR⁶⁻⁹⁾ を用いてチカイエカとトビイロイエカの識別を試みた。

調査方法

1. 捕集期間

A～J 地点は平成 28 年 5 月から 10 月の 6 ヶ月間、L 地点は平成 28 年 4 月から平成 28 年 11 月までの 8 ヶ月間、M 地点は平成 28 年 4 月から平成 29 年 1 月までの 10 ヶ月間、捕集を実施した。

2. 捕集地点

捕集地点を表 1 及び図 1 に示す。平成 27 年度の調査地点の内、公共施設など 4 か所を大規模公園に変更し、大規模公園 1 か所については、別の公園に変更した。

3. 捕集方法

捕集方法、分類方法は既報¹⁰⁾ のとおりであり、L・M 地点は原則毎週捕集した。

4. フラビウイルス遺伝子検出法

1) RNA 抽出

1 プール最大 30 頭とし、Lysing Matrix H (MP Biomedicals) に捕集した蚊とイーグル MEM 培地 (0.2%BSA

添加) を 200 μ L を入れ、Fast Prep-24 (MP Biomedicals) を用いて、6M/s、20s 破碎処理を行った。MEM 培地 (0.2% BSA 添加) を 500 μ L を加え、11,000 $\times$ g、20 min、4 $^{\circ}$ C で遠心し、上清を回収した。更に 4 $^{\circ}$ C、17,000 $\times$ g で 15 min、4 $^{\circ}$ C 遠心し、その上清を RNA 抽出に用いた。RNA 抽出は、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のマニュアルに従って行った。

2) フラビウイルス検出法

使用ブラマーは既報¹⁰⁾ の通りであるが、One Step RT-PCR を用いた。反応液組成は Distilled Water 9.75 μ L、5 $\times$ QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (QIAGEN) 5.0 μ L、10mM dNTPs (QIAGEN) 1.0 μ L、10 μ M Reverse Primer 1.5 μ L、10 μ M Forward Primer 1.5 μ L、40u/ μ l RNase Inhibitor (TaKaRa) 0.25 μ L、QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme mix (QIAGEN) 1.0 μ L、抽出 RNA 5 μ L。反応条件は 50 $^{\circ}$ C 30 min、95 $^{\circ}$ C 15 min の後、94 $^{\circ}$ C 30 s、53 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min を 35 サイクル、final extension 72 $^{\circ}$ C 5 min とした。

表1.捕集地点

識別記号	区	名称
A	堺区	大規模公園
B	中区	大規模公園
C	東区	大規模公園*
D	堺区	大規模公園*
E	西区	大規模公園*
F	南区	大規模公園*
G	南区	体験型農業公園
H	北区	大規模公園
I	北区	大規模公園
J	美原区	大規模公園*
L	堺区	個人住宅
M	堺区	公共施設・衛生研究所

* 平成28年度変更した調査地点

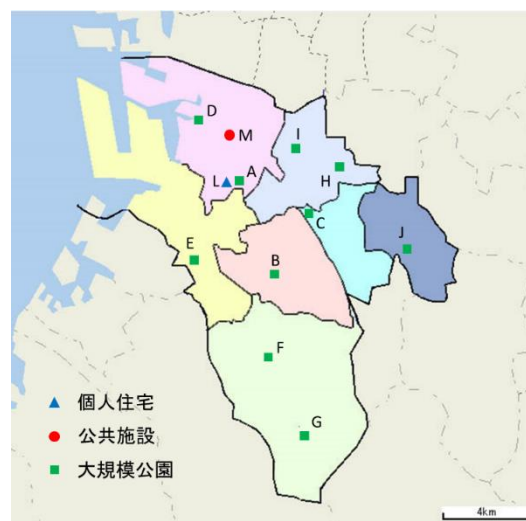


図 1 捕集地点の場所

5. アカイエカ群の分子生物学的分類法

CQ11 rapid assay は BAHNCK と FONSEKA の方法⁶⁾に従った。Ace gene assay で ACEpip2/B1246s プライマーセットの PCR のみに反応し、*Cx p. pipiens* とされた検体について CQ11 rapid assay を実施した。ACEpip2/B1246s プライマーセットおよび ACEpall2/B1246s あるいは ACEquin/B1246s プライマーセット両方の PCR に反応を示した検体については、CQ11 rapid assay を実施せず、*Cx p. pipiens* の交雑個体と表記した。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特異バンドが検出され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 を使って再検査した。また、一部の PCR 産物についてはその塩基配列を確認した。

Ace gene assay、CQ11 rapid assay 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交雑個体とした。

結果及び考察

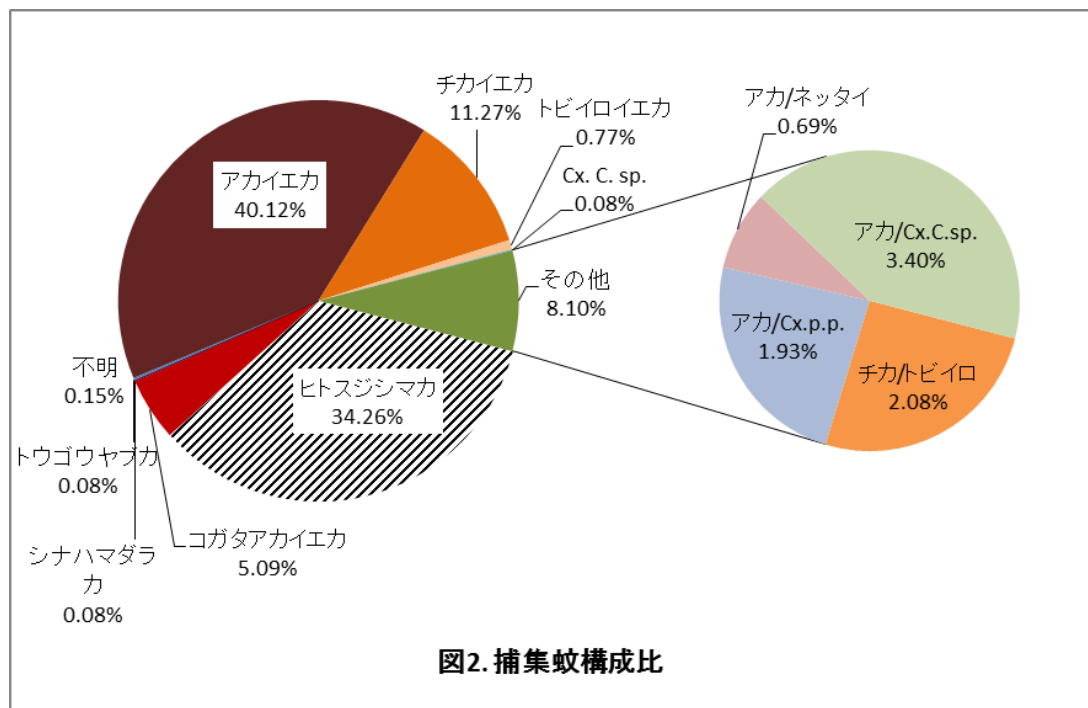
1. 蚊の捕集成績

1) 種類別捕集結果 (表 2) および構成比 (図 2)

今回の調査の捕集結果を種類別・月別に表 2 に示す。全地点の合計 132 回の捕集で、5 種 2 生態型を含めた 1296 頭が捕集された。最も多く捕集された種類はアカイエカ 520 頭 (40.12%) で、次いでヒトスジシマカ *Aedes albopictus* Skuse 444 頭 (34.26%)、チカイエカ 146 頭 (11.27%) が捕集され、この 2 種 1 生態型で全体の約 86% を占めた。以下コガタアカイエカ *Cx. Tritaeniorhynchus* Giles 66 頭 (5.09%)、トビイロイエカ 10 頭 (0.77%)、トウゴウヤブカ *Aedes togoi* Theobald 1 頭 (0.08%)、シナハマダラカ *Anopheles sinensis*

表2. 種類・月別捕集数

	4月	5月	6月	7月	H28 8月	9月	10月	11月	12月	H29 1月	合計	H27.4~ H28.1
アカイエカ群												
アカイエカ	8	72	140 (1)	186	75	14	24	1			520 (1)	446
チカイエカ	6	28	36	26	14	10	19	5	2		146	218
トビイロイエカ	1	4	4	1							10	45
チカ/トビイロ	2	3	6	6	1	2	5	2			27	11
<i>Cx. C. sp.</i>			1								1	2 (1)
アカ/ <i>Cx.p.p.</i>	1	5	5	7	4		2	1			25	27
アカ/ネット		2	1	2	3	1	0				9	4
アカ/ <i>Cx.C.sp.</i>		5	16	15	4	1	3				44	32
<i>Cx.p.p./Cx.C.sp.</i>												3 (1)
ネット/ <i>Cx.C.sp.</i>												0 (1)
不明												1
ヒトスジシマカ		24 (1)	30 (5)	42	65	91 (2)	191 (9)	1			444 (17)	127
コガタアカイエカ		23	6	7	16	14					66	9
オオクロヤブカ												1
シナハマダラカ					1						1	1
トウゴウヤブカ		1									1	2
カラツイエカ												1
不明				2							2	1
H28年度捕集蚊数	18	167 (1)	245 (6)	294	183	133 (2)	244 (9)	10	2	0	1296 (18)	931
捕集回数	8	18	18	18	19	16	20	8	3	4	132	156
H27年度捕集蚊数	31	153	167	252 (1)	117 (1)	90	74	44 (1)	2	1	931	
捕集回数	19	17	20	18	18	19	19	18	4	4	156	
チカ/トビイロ : チカイエカとトビイロイエカの交雑個体と思われるもの												
<i>Cx. C. sp.</i> : Ace gene assay で ACEquin/B1246s プライマーセットに反応する種不明の個体												
アカ/ <i>Cx.p.p.</i> : アカイエカと <i>Cx. p. pipiens</i> の交雑個体と思われるもの												
アカ/ネット : アカイエカとネットイカエカの交雑個体と思われるもの												
アカ/ <i>Cx.C.sp.</i> : アカイエカと <i>Cx. C. sp.</i> の交雑個体と思われるもの												
<i>Cx.p.p./Cx.C.sp.</i> : <i>Cx. p. pipiens</i> と <i>Cx. C. sp.</i> の交雑個体と思われるもの												
ネット/ <i>Cx.C.sp.</i> : ネットイカエカと <i>Cx. C. sp.</i> の交雑個体と思われるもの												
() の数字は捕集蚊数中の σ 捕集数												



Wiedemann1 頭 (0.08%) であった。その他、チカイエカとトビイロイエカの交雑個体が 27 頭 (2.08%)、アカイエカと *Cx.p.pipiens* 交雑個体が 25 頭 (1.93%)、アカイエカとネッタイエカ交雑個体が 9 頭 (0.69%) 捕集された。アカイエカとチカイエカ両方の検出プライマーには反応せず、ネッタイエカ検出プライマーのみに反応し、ネッタイエカが疑われた種不明の個体¹¹⁾ 1 頭 (0.08%、以下 *Cx. C.sp.*) が今年度も確認された。加えて、アカイエカと *Cx. C.sp.* の交雑個体が 44 頭 (3.40%) 確認され、今年度も交雑個体群の中で最も個体数が多いグループであった。昨年度同期間と比較して、アカイエカ、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカの捕集数が増加し、チカイエカ、トビイロイエカの捕集数が減少した。全体としては、昨年度同期間の捕集数 931 頭より大きく増加した。

②捕集地点別結果 (表 3)

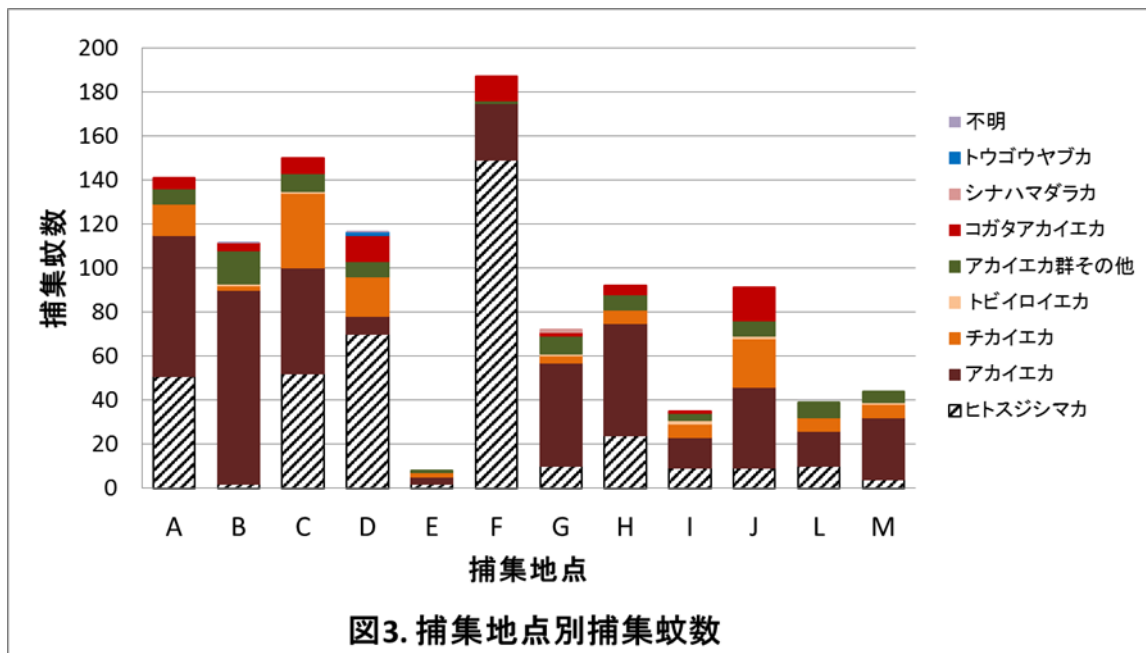
今年度は従来の捕集地点から 5 ヶ所の変更があった。変更が無かった 7 地点のうち、昨年度と比較して、I と M 地点は捕集数が減少したが、その他は増加した。アカイエカ、ヒトスジシマカは全地点で捕集され、チカイエカは F を除く全地点で、コガタアカイエカは E と M を除く全地点で捕集された。トビイロイエカは 12 地点の内 7 地点 (B、C、G、I、J、L、M) で確認された。シナハマダラカは G 地点での捕集であり、ここではこれまでも捕集が確認されている。トウゴウヤブカは D 地点での捕集であった。*Cx. C.sp.* は L 地点で捕集された。その他、2 種類の遺伝子が検出された交雑個体が表 3 に示すように複数個所で確認された。

L、M 地点は他の地点と調査期間、回数が異なるので、各地点における捕集状況の比較のため、捕集日・捕集回数が同一になるように調整した結果を示す (図 3)。

表3. 捕集地点別捕集数

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	合計
アカイエカ群													
アカイエカ	64 (1)	88	48	8	3	26	47	51	14	37	79	55	520 (1)
チカイエカ	14	2	34	18	2		3	6	6	22	14	25	146
トビイロイエカ		1	1				1		2	1	1	3	10
チカ/トビイロ		1	2	3	1			1		1	5	13	27
<i>Cx. C. sp.</i>											1		1
アカ/ <i>Cx.p.p.</i>	2	3	3	1			2	1	2	3	3	5	25
アカ/ネッタイ		1		1				1		2		4	9
アカ/ <i>Cx. C. sp.</i>	5	10	3	2		1	6	4	1	1	8	3	44
ヒトスジシマカ	51	2	52 (1)	70 (1)	2	149 (12)	10	24 (1)	9	9 (2)	28	38	444 (17)
コガタアカイエカ	5	3	7	12		11	2	4	1	15	6		66
シナハマダラカ							1						1
トウゴウヤブカ				1									1
不明		1		1									2
H28年度捕集蚊数	141 (1)	112	150 (1)	117 (1)	8	187 (12)	72	92 (1)	35	91 (2)	145	146	1296 (18)
捕集回数	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	32	40	132
H27.4~H28.1捕集蚊数	91 (1)	93	4	51	3	38	54	64	58 (1)	147	125 (1)	203	931 (7)
捕集回数	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	33	43	156

チカ/トビイロ : チカイエカとトビイロイエカの交雑個体と思われるもの
Cx. C. sp. : Ace gene assay でACEquin/B1246sプライマーセットに反応する種不明の個体
 アカ/*Cx.p.p.* : アカイエカと*Cx. p. pipiens*の交雑個体と思われるもの
 アカ/ネッタイ : アカイエカとネッタイイエカの交雑個体と思われるもの
 アカ/*Cx. C. sp.* : アカイエカと*Cx. C. sp.*の交雑個体と思われるもの
Cx.p.p./Cx. C. sp. : *Cx. p. pipiens*と*Cx. C. sp.*の交雑個体と思われるもの
 ネッタイ/*Cx. C. sp.* : ネッタイイエカと*Cx. C. sp.*の交雑個体と思われるもの
 () の数字は捕集数中の♂捕集数
 ■ は平成28年度に変更した調査地点



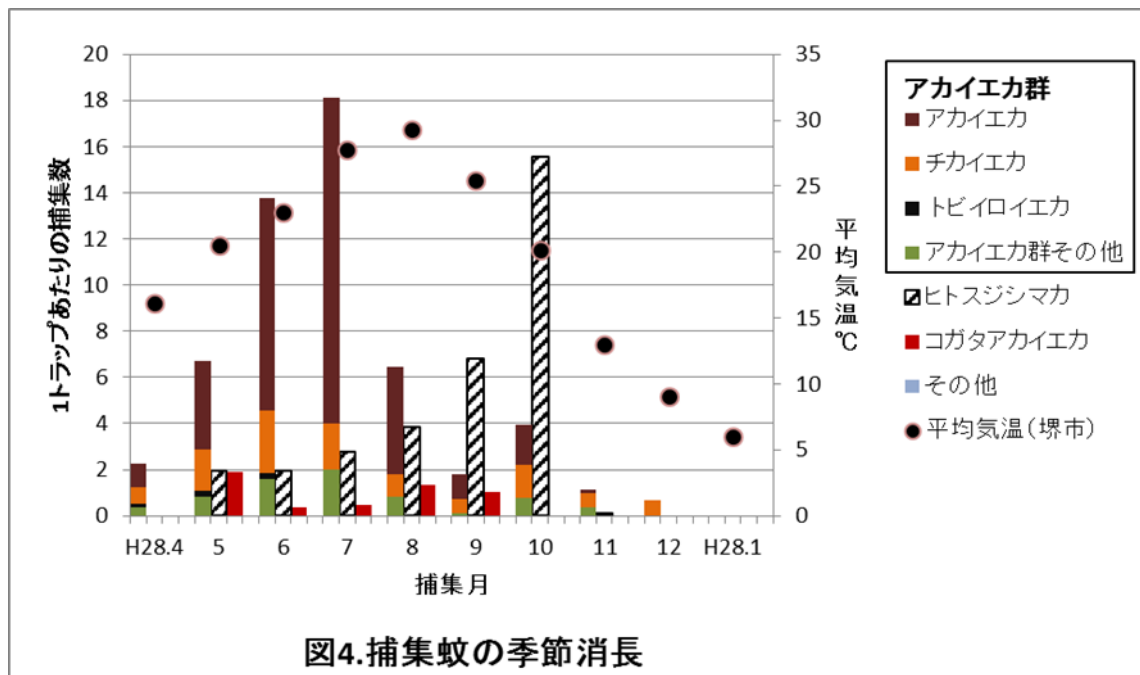
DとF以外の地点においてアカイエカ群が優占した。アカイエカ群の中では、その10地点すべてでアカイエカの割合が大きかった。DとF地点では、ヒトスジシマカが優占した。

3) 季節消長 (表2、図4)

1 トラップあたりの平均捕集数を図4に示す。

アカイエカは4~11月、チカイエカは

4~12月、トビイロイエカは4~7月と、*Cx. C. sp.*は6月に捕集された。ヒトスジシマカは5~11月まで、コガタアカイエカは5~9月までの捕集であった。シナハマダラカは8月に、トウゴウヤブカは5月に捕集された。アカイエカ群の捕集数は7月かけて増加し、8、9月と減少したが、10月に再び増加した。チカイエカの総捕集数はアカイエカの約28%であ



ったが、4、5、9、10、11、12月ではチカイエカの割合が増加した(39~100%)。ヒトスジシマカは、5~10月にかけて捕集数が増加した。

2. フラビウイルス遺伝子検出結果

すべての捕集雌蚊からフラビウイルス遺伝子は検出されなかった。

考察

調査期間の短縮に伴い、調査回数が減少したにもかかわらず、総捕集数は昨年度より3割程度増加した。多くの調査地点で捕集数が増加していること、平成18~26年の平均総捕集数が1,456頭であることなどを考慮すると、平成27年度の捕集数が少なかったと考えられた。捕集される蚊の種は、昨年と同様にアカイエカ、チカイエカ、ヒトスジシマカが多かったが、ヒトスジシマカの割合が増加した。本年度より変更した5地点でのヒトスジシマカの捕集が多く、その影響のためである。

調査地点別にみると、D、F地点ではヒ

トスジシマカの割合が高く、その他の地点ではアカイエカやチカイエカ等のアカイエカ群の割合が高かった。C、D、J地点については、他の地点に比べてチカイエカの割合が高く、E地点は捕集数が非常に少なかった。これらのことより、蚊の捕集は、トラップを設置する場所、その周りの環境に大きく影響を受けると考えられた。

気温が高くなる6、7、8月にはアカイエカの割合が高くなり、気温が低くなる9月以降はチカイエカの割合が高くなる傾向であった。これらの結果は例年と同様であった。通常、ヒトスジシマカは10月以降には減少すると考えられるが、10月に最も多く捕集された。今年度から調査地点を変更した影響も考えられるが、原因を特定することはできなかった。

トビロイエカは国内に生息していないと考えられているが、分子生物学種別法でトビロイエカと識別される個体が7地点で確認された。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

ていないが、我が国にもトビイロイエカが生息する可能性が示唆された。また、ネッタイイエカについても分子生物学種別法でネッタイイエカのプライマーと反応する個体が確認されており、国内にネッタイイエカが侵入している可能性も考えられた。アカイエカ群内の識別は、形態学的方法では難しい。そのため分子生物学的方法での識別を試みたが、一部識別の困難な個体はあるが、アカイエカ、チカイエカ等の種別に有用であった。

堺市では、平成 15 年からウエストナイル熱対策のために蚊の調査を実施してきた。国内の患者数はデング熱が最も多く、平成 26 年には国内流行も発生したこともあり、今年度より調査地点の変更等を行い、デング熱対策を優先した調査へ変更した。調査開始以来、ウエストナイルウイルス等のフラビウイルス遺伝子は検出されていない。蚊媒介感染症には、デング熱、チクングニア熱、ウエストナイル熱など多くの感染症がある。デングウイルスはヒトスジシマカ等、ウエストナイルウイルスはアカイエカ等、日本脳炎ウイルスはコガタアカイエカなどウイルスにより主要な媒介蚊の種が異なる。蚊の種ごとに生態も異なるためそれぞれの感染症の媒介蚊の対策には、それに応じた対策が必要となる。本調査から得られる平常時のデータの蓄積が蚊媒介感染症の侵入監視や侵入した場合の防疫対策に重要な情報を与えると考える。

まとめ

今年度は、平成 27 年度の調査地点 12 地点の内、5 地点を変更し、主に公園を対象として蚊の生息調査を実施した。合計 132 回の調査で 5 種 2 生態型を含めた 1,296 頭が捕集された。本調査から得られる継続的な蚊の生息調査結果は、蚊媒介感染症の対策に有用な情報を与えると考える。

参考文献

- (1) 「ウエストナイル熱の媒介蚊対策に関するガイドライン」作成に関する研究班：ウエストナイル熱の媒介蚊対策に関するガイドライン. 2003
- (2) 平成 27 年厚生労働省告示第 260 号 (一部改正 平成 28 年厚生労働省告示第 119 号) 蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針
- (3) 佐々 学：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). 東京：学術書出版会. 1971; P. 49-65.
- (4) 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.: PCR-Based Identification of *Culex pipiens* Complex Collected in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2008; 61: 184-191.
- (5) Tanaka, K., Mizusawa, K. and Saugstad, E. S. : A revision of the adult and larval mosquitoes of Japan (including the Ryukyu archipelago and Ogasawara islands) and Korea (Diptera: Culicidae). *Contr. Am. Entomol. Inst.*, 1979; 16, 1-987.
- (6) 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.
- (7) 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
- (8) 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
- (9) 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
- (10) 吉田永祥, 松尾光子, 三好龍也, 内野清子, 西口智子, 田中智之, 堺市生活衛生センター: 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 22 年度). 堺市衛生研究所年報. 2010; 28:42-49