

東京都におけるウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスを媒介する蚊の生息状況

田部井 由紀子, 岩崎 則子, 岡崎 輝江, 長谷川 道弥, 保坂 三継, 甲斐 明美

Distribution and Seasonal Occurrence of Mosquitoes as Vectors of West Nile Virus and Japanese Encephalitis Virus in the Tokyo Area

Yukiko Tabei, Noriko Iwasaki, Terue Okazaki, Michiya Hasegawa, Mitsugu Hosaka and Akemi Kai

東京都健康安全研究センター研究年報 第60号 別刷
2009

東京都におけるウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスを媒介する蚊の生息状況

田部井 由紀子*, 岩崎 則子*, 岡崎 輝江*, 長谷川 道弥*, 保坂 三継*, 甲斐 明美**

ウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスを媒介する蚊の都内における生息状況を把握するため、2007年6月から2007年12月まで及び2008年4月から2008年12月までの期間に都内の2定点において蚊の捕集を行った。その結果、3,380匹の蚊が捕集され、これら捕集蚊はアカイエカ、ヒトスジシマカ及びコガタアカイエカ等のウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスを媒介する蚊であった。これら蚊の捕集期間は、アカイエカが4月から12月まで、ヒトスジシマカが6月から10月まで、コガタアカイエカが8月から11月までであった。また、今回、捕集した蚊について、ウエストナイルウイルス及び日本脳炎ウイルスの保有の有無を調査した結果、全てでウイルスを保有していないことを確認した。

キーワード：ウエストナイルウイルス、日本脳炎ウイルス、フラビウイルス、蚊、アカイエカ、ヒトスジシマカ、コガタアカイエカ

はじめに

近年、米国ではウエストナイル熱・脳炎の流行地域拡大が大きな問題となっている¹⁾。また、日本脳炎については東南アジア、インドを中心に多数の患者発生が報告されている²⁾。これらの疾患の原因ウイルスは、それぞれフラビウイルス属のウエストナイルウイルス（以下WNV）及び日本脳炎ウイルス（以下JEV）であり、いずれも蚊によってヒトに媒介される。現在、国内においてウエストナイル熱・脳炎の患者発生は輸入症例以外には認められていないものの³⁾、国際的な輸送網の発達により多くの人や物が短期間に行き交う現状に加えて、これらウイルスの增幅動物や媒介蚊が国内に多数生息していることから、WNVが国内に侵入する危険性及び侵入後に流行へと発展する危険性が懸念されている^{4,5)}。また、日本脳炎については、1992年以降、患者数は年間10人以下となっているが、近年、低年齢層において抗体保有率が低下していることから再燃が危惧されている⁶⁾。こうした背景の中、東京都では「ウエストナイル熱媒介蚊サーベイランス事業」及び「流行予測調査事業」を実施して、6月～10月における蚊の発生状況及び蚊におけるウイルス保有の有無を調査している。

今回、WNV及びJEVを媒介する蚊の発生状況、それら蚊の発生期間及び発生のピーク時期を明らかにするため、当センター内の2定点において継続的に蚊の捕集及び分類を行うと共にこれらウイルスの保有調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 蚊の捕集及び分類

蚊の捕集は、2007年6月から2007年12月まで及び2008年4月から2008年12月までの期間に東京都健康安全研究センター敷地内の2ヶ所を捕集場所とし、夕方から翌朝までライトトラップを設置して、週におよそ3回、計203回行った。

ライトトラップは地面より1.5 mの高さに設置し、CO₂を発生させるために、発泡スチロール容器に入れた約1 kgのドライアイスをライトトラップ横の同じ高さに併設して用いた。

捕集した蚊については、-20 °Cにて数時間静置後、形態的な特徴^{4,7,8)}によって種類を同定し、捕集日別及び蚊の種類別に1チューブあたり最大30匹ずつに保存して、蚊プール試料とした。

2. ウィルス遺伝子検査

1) 蚊からのRNA抽出

蚊プール試料は、400 μlのPBS(-)を加えて、マイクロマルチミキサー（池田貿易株式会社）を用いて乳剤に調製後、8,000回転、10分間の遠心処理によって上清を採取し、蚊試料とした。これら蚊試料300 μlからセパジーンRV-R（三光純薬）を用いてRNA抽出を行い、滅菌蒸留水20 μlで再浮遊したものを供試RNAとした。

2) リアルタイムPCR法によるWNV遺伝子の検出

リアルタイムPCR法によるWNV遺伝子検出は、既報⁹⁾に準じて行った。すなわち、供試RNA 5 μlにリアルタイム-PCR試薬〔2×Master Mix without UNG(ABI) 12.5 μl, 40×MultiScribe and RNase Inhibitor Mix(ABI) 0.6 μl〕13.1 μl、表1に示した20 pmolプライマー(WNENV-forward, WNENV-reverse, WN3'NC-forward及びWN3'NC-reverse)を各0.8 μlならびに15 pmolプローブ(WNENV-probe及びWN3'NC-probe)を各1.0 μlを加え、さらに滅菌蒸留水を6.7 μlを加えて総量25 μlとした反応液をABI Prism 7900HT(ABI)を用いて、48 °C、30分間、94 °C、10分間の逆転写反応後、94 °C、15秒間及び60 °C、1分間の増幅反応を45回繰り返した。また、WNV遺伝子の2領域を同時検出するために、2つのプライマーペア及びFAMとVICの異なる標識をした2つのプローブ（表1）を同一チューブ内に入れて反応を行った。

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

** 東京都健康安全研究センター微生物部 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

3) リアルタイムPCR法によるJEV遺伝子の検出

リアルタイムPCR法によるJEV遺伝子検出は、既報¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、供試RNA 5 µlにリアルタイム-PCR試薬13.1 µl、表1に示した20 pmolプライマー(JENS3F及びJENS3R)各0.8 µlならびに15 pmol JENS3probe 1.0 µlを加え、さらに滅菌蒸留水を9.3 µlを加えて総量25 µlの反応液とし、48 °C、30分間、94 °C、10分間の逆転写反応後、94 °C、15秒間及び60 °C、1分間の增幅反応を45回繰り返した。

表1. リアルタイムPCR法によるウエストナイルウイルスならびに日本脳炎ウイルスの遺伝子検出に使用したプライマーとプローブ

検出ウイルス	プライマーと プローブ	配 列	標的 部位	増幅 サイズ (bp)
ウエストナイル ウイルス	WNENV-forward	5'-TCAGCGATCTCCACCAAAG-3'	E	103
	WNENV-reverse	5'-GGGTCAACGACGTTGTATTG-3'		
	WNENV-probe	FAM-TGCCCCGACCATGGGAGAAGCTC-TAMRA		
ウエストナイル ウイルス	WN3'NC-forward	5'-CAGACCACCGCTACGGCG-3'	3' NC	70
	WN3'NC-reverse	5'-CTAGGGCCGCGTGGG-3'		
	WN3'NC-probe	VIC-TCTGCCGAGAGTGCAGTCTGCCAT-TAMRA		
日本脳炎 ウイルス	JENS3F	5'-AGAGCACCAAGGAAATGAAATAGT-3'	NS3	96
	JENS3R	5'-AATAGTTGATTTGGGACTCTG-3'		
	JENS3probe	FAM-CCACGCCACTCGACCCATAGACTG-TAMRA		

結果及び考察

1. 蚊の捕集状況

2007年6月から2007年12月まで(以下2007年度と記す)及び2008年4月から2008年12月まで(以下2008年度と記す)の期間に東京都健康安全研究センター敷地内にて捕集された蚊の捕集結果を表2に示した。2007年は89回にわたって総数2,115匹の蚊を捕集し、その内訳はアカイエカ1,882匹、ヒトスジシマカ160匹、コガタアカイエカ72匹、オオクロヤブカ1匹であった。また、2008年は114回にわたって総数1,265匹の蚊を捕集し、その内訳はアカイエカ915匹、ヒトスジシマカ241匹、コガタアカイエカ109匹であった。捕集された蚊は、アカイエカが最も多く、2007年、2008年共に捕集蚊の総数の70%以上を占めており、次いで多く捕集されたヒトスジシマカの捕集数と合わせると、これら2種類のみで捕集蚊の総数の90%以上を占めていた。

表2. 2007年及び2008年における蚊の捕集結果

捕集期間	2007年6月 ~2007年12月	2008年4月 ~2008年12月	2007年6月 ~2008年12月
捕集日数	89	114	203
アカイエカ	1,882	915	2,797
ヒトスジシマカ	160	241	401
コガタアカイエカ	72	109	181
オオクロヤブカ	1	0	1
総捕集数	2,115	1,265	3,380

国内で生息しているWNV媒介可能な十数種類の蚊の中で、アカイエカ及びヒトスジシマカは、ウイルス増幅量及び生息数が多いことから、WNVが国内に侵入した際の主要な媒介蚊になることが推察されている⁴⁾。今回の調査により、都内において捕集される蚊の90%以上は、WNVの主要な媒介蚊であることが明らかとなったことから、都内にWNV

が侵入した際には流行に至る可能性も少なくないと思われ、これら媒介蚊についての生息調査及びウイルス保有調査を継続して行う必要性が示された。

また、JEVの主要な媒介蚊であるコガタアカイエカは、一般的には主として田園地域に生息する蚊であり、近年の都内における生息調査では、生息が確認されていなかった¹¹⁾。しかしながら、今回の調査においては、捕集された蚊の総数に占めるコガタアカイエカの割合は2007年が3.4%、2008年が8.6%と低率ではあるものの生息が確認された。

JEVについては、増幅動物であるブタのJEV感染が都内においても毎年、確認されており^{12, 13)}、さらに媒介蚊であるコガタアカイエカの生息が確認されたことにより、患者発生及び再流行が懸念される。今回の調査により、JEVについてもWNVの対策と同様に媒介蚊及びウイルスの動向を監視を継続して行う必要があると思われた。

2. 蚊の生息期間

捕集された蚊のうち、WNVまたはJEVの主要な媒介蚊であるアカイエカ、ヒトスジシマカ及びコガタアカイエカの生息期間及び生息のピーク時期を明らかにするため、捕集日別のそれぞれの蚊の捕集数を図1、2及び3に示した。

蚊の種類別に捕集された期間をみると、アカイエカが捕集された期間は、2007年においては調査を開始した6月29日から12月22日まで、2008年においては4月22日から12月3日までであり、ヒトスジシマカが捕集された期間は、2007年においては7月12日から10月31日まで、2008年においては6月5日から10月10日まで、コガタアカイエカが捕集された期間は、2007年においては8月30日から10月30日まで、2008年においては8月13日から11月14日までであった。

3種の蚊のうちで生息期間が最も長期に亘るのは、アカイエカであり、その生息期間は4月から12月と春季から冬季にまで及んでいた。ヒトスジシマカの生息期間については6月から10月、コガタアカイエカの生息期間については8月から11月と、どちらも夏季から秋季であったが、ヒトスジシマカは初夏から、コガタアカイエカは夏季の中盤から終盤にかけて捕集され始めていた。

また、捕集蚊が最大数であった時期については、アカイエカは2007年が10月10日に87匹、2008年が6月6日と6月10日に33匹、ヒトスジシマカは2007年が9月4日に12匹、2008年が8月12日に18匹、コガタアカイエカは2007年が10月5日に17匹、2008年が9月10日に12匹と最も多く捕集された。最も多く蚊が捕集される時期が調査年ごとに若干の差がみられたことは、調査年の気温、降水量及び台風等の影響によるものと推察されたものの、全般的に、アカイエカについては初夏から夏と秋の2回、捕集数が増え、ヒトスジシマカについては初夏から夏に、コガタアカイエカについては夏から秋に捕集数が増える傾向がみられた。このことから、各種類の蚊における生息ピーク時期は、これらの時期であったものと推察された。

3. 捕集蚊におけるウイルス保有調査

捕集された蚊についてWNV及びJEV保有の有無を確認

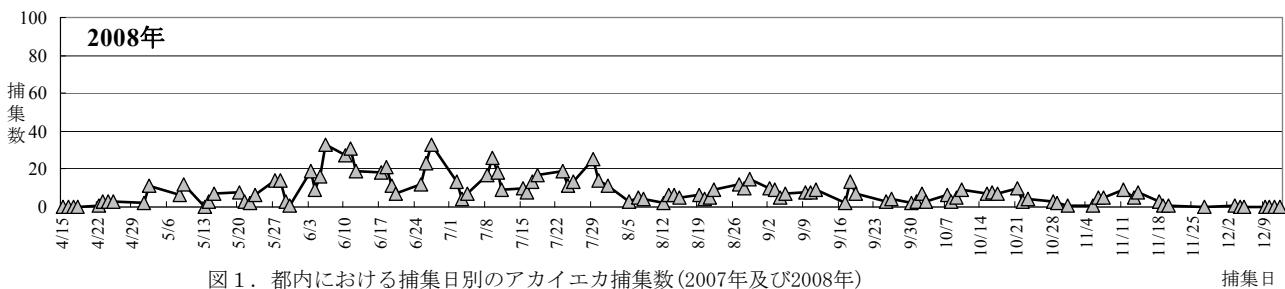
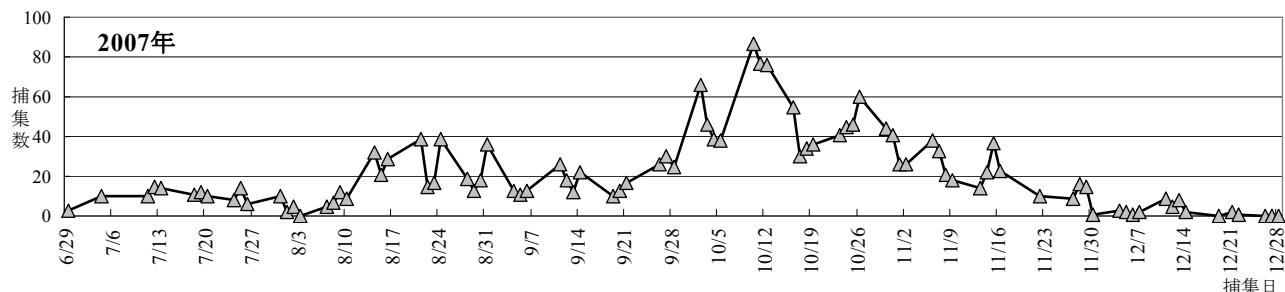


図1. 都内における捕集日別のアカイエカ捕集数(2007年及び2008年)

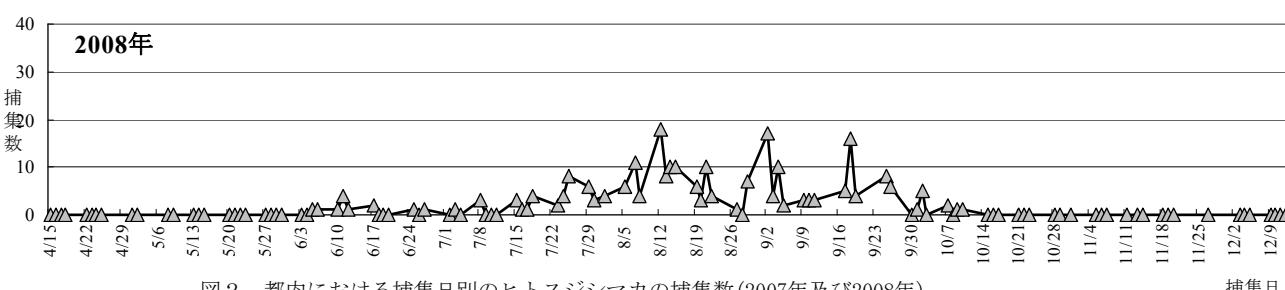
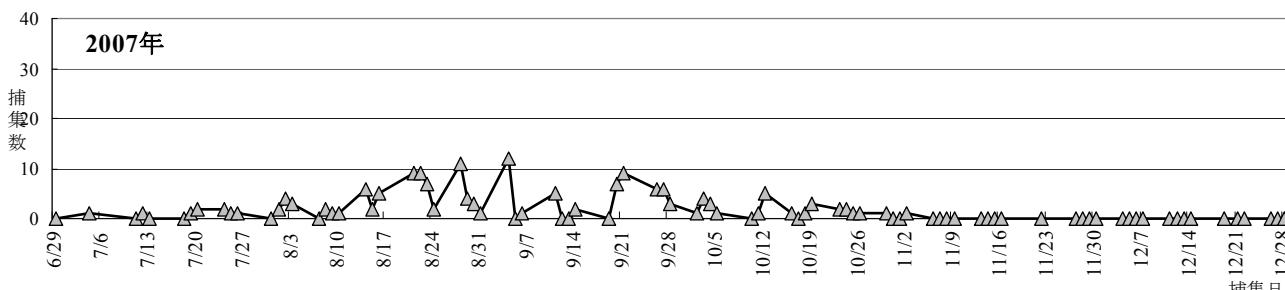


図2. 都内における捕集日別のヒトスジシマカの捕集数(2007年及び2008年)

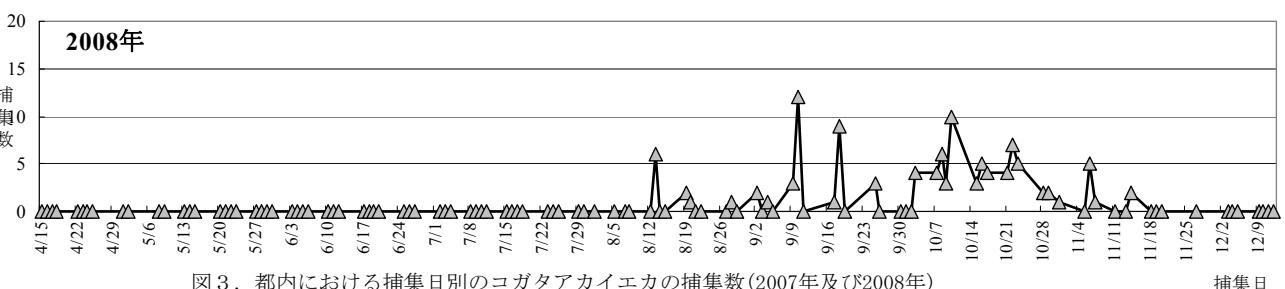
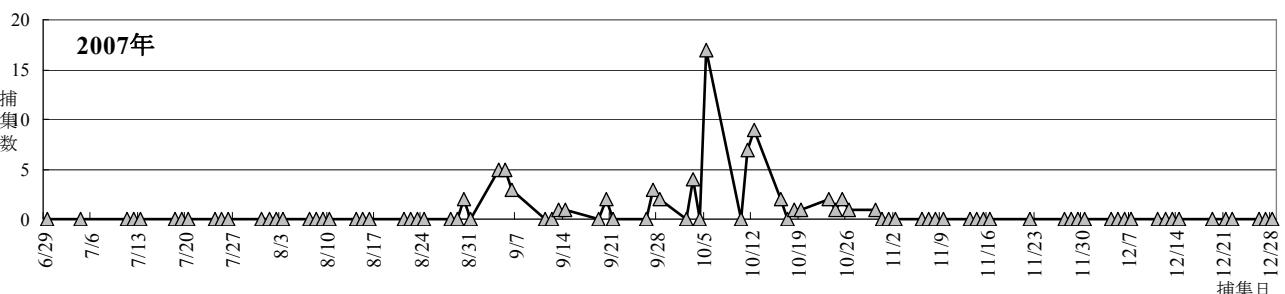


図3. 都内における捕集日別のコガタアカイエカの捕集数(2007年及び2008年)

するため、捕集日別及び種類別に1チューブあたり最大30匹ずつに保存した蚊プール試料からRNA抽出を行い、リアルタイムPCR法によるWNV及びJEV遺伝子の検出を行った。その結果、調査対象とした捕集蚊全てにおいて、WNV遺伝子、JEV遺伝子共に検出されず、今回の調査において、これらウイルスを保有した蚊は都内に生息していなかったことが確認された。

米国においては、1999年にヒトのWNV感染例が確認され、それ以降、毎年夏期を中心にWNV感染症が流行している¹⁾。ヒトのWNV感染例が確認される以前には鳥及び蚊のWNV感染が確認されることから、米国の公衆衛生当局は、WNVの流行を早期に探知し、蔓延防止のための策を講じるため、鳥及び蚊のWNV保有調査（サーベイランス）を行っている^{14,15)}。日本国内においては2005年に米国からの帰国者でWNV感染例が初めて確認されたものの、国内での患者発生は未だ確認されていない³⁾。しかしながら、海外旅行者の増加、旅行地域の拡大、輸送機関の発達により、多くの人や物が短期間に行き交う現状においてはWNVが国内に侵入するのは近い将来であると考えられる。さらに、国内にはWNVを媒介可能な蚊が数十種類確認されており、生活環境の周辺にはウエストナイルウイルスの主な增幅動物であるカラス等の鳥も多く生息していることから、WNVが国内に侵入し、增幅動物に感染した場合には国内でヒトのWNV感染例が発生することが予想される⁴⁾。それゆえ、東京都内におけるWNV侵入状況を把握するため、我々は2002年より都内の公園内で捕集した蚊ならびに同園内で捕獲及び死亡したカラスについてWNVの保有調査を行ってきた¹⁶⁾。さらに、現在では「ウエストナイル熱媒介蚊サーベイランス事業」を実施して、蚊の発生状況及び蚊におけるWNV保有の有無を調査している。

また、日本国内における日本脳炎の患者発生は、1967年のワクチン接種開始以前には年間1千人にも達していたが、近年では10人程度に激減している¹⁷⁾。しかし、2002年には髄膜炎症状のみを呈した非定型患者から日本脳炎ウイルスが検出されたこと¹⁸⁾や、これまで見られなかった幼児での患者発生が報告¹⁹⁾されるなど、発生状況に変化が見られつつある。また、日本脳炎ワクチン接種者が急性散在性脳脊髄炎（ADEM）を発症したことが明らかとなったことから²⁰⁾、厚生労働省は2005年5月から日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨を差し控えたことにより²¹⁾、低年齢層における抗体保有率の低下も懸念されている。こうした背景の中で、JEVについては「流行予測調査事業」を実施し、ブタにおけるJEV感染状況、ヒトにおける抗体保有調査ならびにコガタアカイエカの発生状況及び蚊におけるJEV保有の有無を調査している。

今回の調査では、これらWNV及びJEV媒介蚊についての調査事業の基礎資料とするべく、捕集されるWNV及びJEV媒介蚊が実際にはどれ位の期間で捕集され、且つ、その捕集数のピーク時期は何時なのかを明らかにするため、当センター内の2定点において、長期間に亘り継続的に蚊の捕

集を行うと共にこれらウイルスの保有調査を行った。今回の調査定点は当センターのみであったため、都内全体について同じことが言えるわけではないものの、都内にはWNVの主要な媒介蚊であるアカイエカ、ヒトスジシマカ及びJEVの主要な媒介蚊であるコガタアカイエカが多数存在し、また、これまで実施してきた調査事業の調査期間（6月から10月）よりも長期間に亘ってこれら媒介蚊が発生していることが確認された。

都内へのWNV侵入及びJEV再流行を早期に探知し、的確な対策を迅速に講じるために、WNV及びJEV媒介蚊についての生息調査及びウイルス保有調査は、これまで以上に重要性が高まるものと推察されることから、調査期間の延長ならびに発生ピーク時期における調査回数の増加等による調査内容の強化も視野に入れる必要があると考える。

ま と め

WNV及びJEVを媒介する蚊の発生期間及び発生のピーク時期を明らかにするため、当センター内の2定点において継続的に蚊の捕集及び分類を行うと共にウイルスの保有調査を行った。その結果、アカイエカ、ヒトスジシマカ及びコガタアカイエカ等が捕集された。これらの蚊の捕集期間は、アカイエカが4月から12月まで、ヒトスジシマカが6月から10月まで、コガタアカイエカが8月から11月までであった。また、捕集蚊についてWNV及びJEV保有調査を行った結果、WNV及びJEV共に保有していないことを確認した。

文 献

- 1) CDC: West Nile Virus Activity -United States, 2007., MMWR, 57(26), 720-723, 2008
- 2) Erlanger, T., E., Weiss, S., Keiser, J., et al.: *Emerg. Infectious. Dis.*, 15(1), 1-7, 2009.
- 3) 小泉加奈子、中島由紀子、松崎真和、他：感染症学雑誌, 80(1), 56-57, 2006.
- 4) 津田良夫、比嘉由紀子、伊澤晴彦、他：臨床とウイルス, 33(1), 17-21, 2005.
- 5) U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC, NCID Division of Vector-borne Infectious Disease: Epidemic / Epizootic West Nile Virus in the United States: Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control (3rd revision)., 2003.
- 6) 佐藤弘、多屋馨子、岡部信彦、他：病原微生物検出情報, 30(6), 1-6, 2009.
- 7) 佐々学、栗原毅、上村清：蚊の科学, 1976, 北陸館.
- 8) ウエストナイル熱媒介蚊対策研究会：ウエストナイル熱媒介蚊対策ガイドライン, 161, 2003, 日本環境衛生センター.
- 9) Lanciotti, R.S., Kerst, M.J., Nasci, R.S., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 38, 4066-4071, 2000.
- 10) Huang, J.L, Lin,H.T., Wang, Y.M., et al.: *J. Med. Virol.*,

- 74, 589-596, 2004.
- 11) 東京都福祉保健局健康安全室感染症対策課, 東京都健康安全研究センター微生物部: 平成17年度感染症流行予測調査結果報告書, 1-7, 2007.
- 12) 田部井由紀子, 長谷川道弥, 岩崎則子, 他: 東京健安研七年報, **57**, 87-90, 2006.
- 13) Yoshida, Y., Tabei, Y., Hasegawa, M., et al.: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **58**, 259-261, 2005.
- 14) Eidson, M., Komar, N., Sorhage, F., et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 615-629, 2001.
- 15) White, D.J., Kramer, L.D., Backenson, P.B., et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, **7**, 643-649, 2001.
- 16) Tabei, Y., Hasegawa, M., Iwasaki, N., et al.: *Jpn. J. Infect. Dis.*, **60**, 413-416, 2007.
- 17) 厚生労働省健康局結核感染症課, 国立感染症研究所感染症情報センター: 平成18年度 感染症流行予測調査報告書, 74-79, 2008.
- 18) Kuwayama, M., Ito M., Takao S., et al.: *Emerg. Infect. Dis.*, **11**, 471-473, 2005.
- 19) 国立感染症研究所ウイルス1部: 日本脳炎患者情報, <http://www.nih.go.jp/vir1/NVL/JEVMeeting.htm> (2009年7月10日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 20) 岡部信彦: 日本脳炎ワクチン問題 その背景, ウイルス, **55**(2), 303-306, 2005.
- 21) 厚生労働省健康局結核感染症課長勧告“定期の予防接種における日本脳炎ワクチン接種の積極的勧奨の差し控えについて” 平成17年5月30日健感発第0530001.

Distribution and Seasonal Occurrence of Mosquitoes as Vectors of West Nile Virus and Japanese Encephalitis Virus in the Tokyo Area

Yukiko TABEI*, Noriko IWASAKI*, Terue OKAZAKI*, Michiya HASEGAWA*, Mitsugu HOSAKA* and Akemi KAI**

Mosquitoes, which are potential vectors of West Nile virus (WNV) and Japanese encephalitis virus (JEV), were captured at 2 points in the Tokyo area from June to December 2007, and from April to December 2008, to investigate their distribution and seasonal occurrence. The total number of mosquitoes captured in 2007 and 2008 was 3,380. The dominant species among the captured mosquitoes were *Culex pipiens pallens*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus*, all of which act as vectors of WNV and JEV. These mosquitoes were captured over relatively long periods as follows: from April to December for *C. pipiens pallens*, from June to October for *A. albopictus*, and from August to December for *C. tritaeniorhynchus*. No WNV and JEV were detected in any of the mosquitoes captured in this study.

Keywords: West Nile Virus, Japanese Encephalitis Virus, Flavivirus, mosquito, *Culex pipiens pallens*, *Aedes albopictus*, *Culex tritaeniorhynchus*

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Department of Microbiology, Division of Virology
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Department of Microbiology
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan