

本県に生息するデングウイルス媒介蚊の生息状況 及び蚊からのウイルス検出に関する研究

有馬茉莉 井上志穂 野町太朗¹⁾ 三浦美穂 吉野修司 萩平敦朗²⁾ 元明秀成

Studies on The Habitat Status of Dengue Virus-borne Mosquitos Inhabiting This Case and Detection of Virus from Mosquitoes

Shiori ARIMA, Shiho INOUE, Taro NOMACHI, Miho MIURA, Shuji YOSHINO,
Atsuro HAGIHIRA, Hidenari GANMYO

要旨

宮崎県における蚊媒介感染症に対する対策として、県内の主要な観光地等を対象に、蚊のモニタリング調査を実施した。2016年6～9月、2017年6～9月まで調査を実施した結果、4属9種437匹の蚊が採取され、調査地点ごとに蚊の種類・数に特徴がみられた。ヒトスジシマカについてはデング、チクングニア、ジカウイルスの保有状況調査を実施したが、いずれのウイルス遺伝子も検出されなかった。

蚊からの遺伝子抽出法について、スピнкаラム法とフェノール法の効率性を比較した。その結果、スピнкаラム法が作業効率・感度の面で優れていた。

キーワード：デング熱、デングウイルス、ヒトスジシマカ、スピнкаラム法、フェノール法

はじめに

国際交流の活発化に伴う海外渡航者の増加や地球温暖化による媒介動物の生息域の変化により、これまでみられなかった輸入感染症の増加が懸念されている。その一例として、2014年8月、約70年ぶりにヒトスジシマカによって媒介されるデング熱の国内感染例が東京で報告された。また、本県でも毎年1～2例の輸入感染例が発生しており、感染拡大の未然防止を図る必要がある。

そこで、宮崎県蚊媒介感染症対策行動計画に基づき、昨年度から定点モニタリング調査として、感染症媒介蚊（成虫）の生息状況及びデングウイルス等の保有状況調査を実施したのでその結果を報告する。

また、蚊媒介感染症が県内で発生した場合に備え、検査体制を整えておく必要があることから、蚊からの遺伝子抽出法を検討し、効率の良い検査法を選定したので、併せて報告する。

方法

1 定点モニタリング調査

1) 調査期間

2016年6～9月、2017年6～9月の期間、月に1回、計8回調査を行った。

宮崎市中央公園は2016年6～9月、11～12月、2017年1月～2018年3月の計21回調査を行った。

微生物部 ¹⁾現都城食肉衛生検査所 ²⁾現小林保健所

2) 調査地点

2016年度は、高千穂神社、西都原古墳群、鵜戸神宮、えびの高原及び宮崎市中央公園の計5カ所で調査を行い、1カ所につき4ポイントを設定した。2017年度は、えびの高原を青島神社に変更して実施した。

3) 調査方法

a) 定点モニタリング調査

蚊は8分間人囀法で採取し、種の同定、雌雄の鑑別、数の把握を行った。なお、宮崎市中央公園においては年間を通して蚊を採取し、気温との関連性を調査した。採取した蚊のうち、ヒトスジシマカの雌については各採取地点のポイントごとに、雄については4ポイントをまとめて最大20匹までを1プールとし、蚊の乳剤を作製した。

b) ウイルス検出法

QIAamp Viral RNA Mini Kit を用いてRNAを抽出し、デングウイルス、チクングニアウイルス及びジカウイルス遺伝子の検出を行った。各ウイルスの検査は、デングウイルス感染症診断マニュアル¹⁾、チクングニアウイルス検査マニュアル²⁾、ジカウイルス感染症実験室診断マニュアル³⁾に従って行った。なお、陽性が疑わしい場合にはダイレクトシーケンスを実施し、塩基配列を確認した。

c) 蚊からの遺伝子抽出法の検討

ISOGEN II を用いたフェノール法と QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いたスピнкаラム法における遺伝子増幅効率の比較を行うため、蚊乳剤を 10^2 まで希釈し、蚊の18SrRNAの特異プライマー(18S417、18S920c)⁴⁾を用いたPCR後、増幅遺伝子を確認し、感度を比較した。

結果

1 モニタリング調査結果

各採取地点において、4属9種437匹の蚊が採取された。調査地点別に比較すると、高千穂神社、西都原古墳群では約4分の3をヒトスジシマカが占めたのに対し、鵜戸神宮、青島神社では、半数

以上がオオクロヤブカであり、ヒトスジシマカは約4分の1であった。宮崎市中央公園は採取されたすべての蚊がヒトスジシマカであった(表1)。

気温との関連性を調査した結果、気温の上昇と採取数は相関せず、 20°C 以下では蚊は採取できなかった(図1)。えびの高原では採取期間中、蚊は1匹も採取できなかった。

採取したヒトスジシマカから、デングウイルス、チクングニアウイルス及びジカウイルスの遺伝子は検出されなかった。

2 遺伝子抽出法の検討結果

フェノール法では蚊の乳剤原液のみ遺伝子が検出されたが、スピнкаラム法では 10^2 希釈まで遺伝子が検出された。

考察

鵜戸神宮、青島神社でオオクロヤブカ等のその他の蚊が占める割合が高かった理由として、これらの2地点が海に面しており、ヒトスジシマカが生息しやすいとされている環境が整っていないためと考えられた。

えびの高原は、蚊の採取日・採取ポイントを増やしたが採取できなかった。その理由として、えびの高原の標高は1200mで、夏の平均気温が 24°C 、最低気温は 15°C 以下と冷涼であり、ボウフラが発生しやすいとされる 25°C 以上という条件を満たしていないこと、発生源となるような雨水溝などの水辺があまりないことが理由として考えられた。また聞き取り調査においても蚊の生息が確認できなかったため、えびの高原に蚊が存在している可能性は低いと考えられた。

蚊の活動温度としては $22\sim 31^{\circ}\text{C}$ が適温であるとされており、本県では11月末まで蚊の生息を確認できたことから、温暖な気候の宮崎では蚊媒介感染症に注意する期間が長くなると考えられる。また、採取地点における蚊の種類や数、季節消長をモニタリングする場合は、採取者によるばらつきがでにくいトラップ法を用いるなどして、調査目的により蚊の採取法を選択する必要があると考えられた。

蚊からのRNA抽出法について、スピнкаラム法の方が、より高倍率希釈まで検出できたという

結果に加え、フェノール法は操作が煩雑で、作業者の技量の差が結果に影響するといった短所があることから、迅速な検査結果が求められる蚊媒介感染症の場合はピンカラム法で行う方が簡便かつ効率的であると考えられた。

今回採取されたヒトスジシマカからデング、チクングニア、ジカウイルス、いずれのウイルス遺伝子も検出されなかったが、蚊が媒介するウイルスは他にもウエストナイルウイルスをはじめと

して多数あり、臨床症状だけでは区別が困難であることから、複数のウイルスを一度に検出できる方法を検討することが今後の課題として挙げられる。

謝辞

今回蚊の採取にご協力いただいた各保健所と関係者の皆様に深謝いたします。

表1 モニタリング調査結果

採取地点	種類	採取数				合計
		6月	7月	8月	9月	
高千穂神社	ヒトスジシマカ	2	24	38	9	73
	ヤマトヤブカ	1	1			2
	オオクロヤブカ		2	5	6	13
	キンイロヤブカ	1				1
	キンパラナガハシカ				1	1
	ヤマトクシヒゲカ		1			1
	アカイエカ		1			1
	コガタアカイエカ			1	1	2
西都原古墳群	ヒトスジシマカ	15	16	4	7	42
	アカイエカ	5	1			6
	ハマダライエカ	1				1
	コガタアカイエカ			1		1
鵜戸神宮	ヒトスジシマカ	2	3	1		6
	オオクロヤブカ	5	3	7		15
	キンパラナガハシカ	1	1			2
	アカイエカ	2				2
青島神社	ヒトスジシマカ			1		1
	オオクロヤブカ	1		1		2
宮崎市中央公園	ヒトスジシマカ	12	54	134	65	265
計		48	107	193	89	437

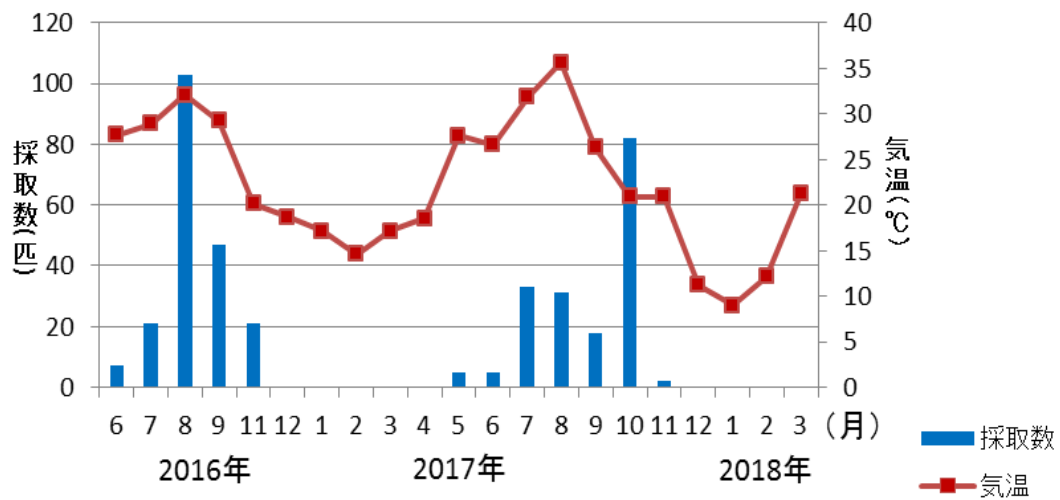


図1 中央公園における採取数と気温の関係

参考文献

- 1) 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
- 2) 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 Ver.1.1
- 3) 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
- 4) Hoffmann PR, Woodon RJ, Calimmlim PS, Effler RPV, Miyamoto V, Imarie A, et al(2004) West Nile Virus Surveillance : A Simple Method for Verifying the Integrity of RNA in Mosquito(Diptera:Culicidae) Pools. J Med Entomol, 41(4):731-735