

PIXEによる日本脳炎媒介蚊コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*)

発生源推定の試み

鈴木弘行¹、沢辺京子²、駒形 修²、後藤祥子³、高橋千衣子³、齊藤義弘³、世良耕一郎⁴

¹千葉大学大学院薬学研究院
263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33

²国立感染症研究所昆虫医科学部
162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

³日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

⁴岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 緒言

2014年度、本邦においてデング熱患者が多数発生し、発生源とされた都内の代々木公園は閉鎖されるに至った¹。デング熱の流入経路は不明であるが、拡散には本邦の代表的な蚊であるヒトスジシマカが関与していることが知られている。蚊が媒介する疾病にはデング熱以外にも、チクングニア熱、黄熱病、マラリア、西ナイル熱等があるが、本邦においては、コガタアカイエカが媒介する日本脳炎が最も良く知られている。本邦における日本脳炎の流行は近年でこそ稀であるが、厚生労働省によるブタの日本脳炎ウイルス抗体獲得状況調査によると日本脳炎ウイルスの活動は未だ活発であるため、依然として防疫上の注意が必要である²。

蚊が媒介する疾病の拡大を防ぐには発症した患者を隔離するだけでなく、媒介蚊を駆除することも重要となる。しかし、ウイルスを保有する蚊が生息する地域を絞ることは難しく、蚊の発生源を特定することも困難であることから、駆除には薬剤散布を広域的に行う必要がある。その場合、生態系に悪影響を及ぼす危険がある一方、その薬剤散布で十分な効果が得られるかどうかは、現状ではあらかじめ予測することができない。なぜならば媒介蚊の行動、特に移動に関しては知見が限られているためである。

蚊の行動範囲を調査するためにはオビトラップや炭酸ガストラップ、人囮法等での捕集を広域的に行う必要があるが、そのためには多大な時間と労力が必要となる。このため、無機元素組成によって感染症を保有する個体に生息地や侵入経路を特定することができれば、駆除の効率化など防疫上有益である。

近年、食品等の産地判別に無機元素組成による多変量解析技術が用いられているが^{3,4}、同様の手法が蚊に適用できるかはこれまで検討されてこなかった。試料とする蚊は1mg以下と小さく一匹の個体に対し通常の方法を適用することは不可能である。そこで2013年度は無機元素組成による多変量解析技術を蚊に適用する上で核となる無標準PIXE法の開発に取り組み、ヒトスジシマカとコガタアカイエカについては1個体全体だけでなく脚部や翅部などの部位別でも定量分析が可能となった⁵⁻⁷。本報告では2013年度から2014

年度にかけて継続して行った測定結果に基づき、無機元素組成による多変量解析技術を用いたコガタアカイエカの発生源推定に関する進捗状況を報告する。

2 測定方法

2.1 蚊試料

分析試料としたコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) とヒトスジシマカ (*Aedes (Stegomyia) albopictus*) の採取日および採取地などについて表 1 に示した。採取後、各蚊は氷点下 20℃ の冷凍庫内で凍死させた。凍死個体はシリカゲルを含むデシケーター内で 1 週間乾燥した。乾燥後、蚊はプラスチックピンセットを用いて「頭部と胸部」、腹部、脚部、翅部に分け測定用の試料とした。図 1 に試料とした蚊についての特性と各部位のおおよその分離位置を示した。測定に用いた蚊の試料数は「頭部と胸部」、腹部は 3~5 点、脚部と翅部は 3~5 匹分を 1 つにまとめたものを 1 点ずつ用意した。ただし、2008.8 に採取したヒトスジシマカ (西千葉メス) の脚部と翅部は 2 点ずつ用意した。

表 1 PIXE 分析した蚊試料の論文内呼称、採取地、採取日、性別、クラスター分析時の番号

蚊	論文内での呼称	採取地	採取日	メス	オス	クラスター番号
コガタアカイエカ	宍道湖メス	島根県出雲市宍道湖	2008.6.20	●		6
コガタアカイエカ	長崎メス	長崎県長崎市高浜小学校前	2008.6.27	●		10
コガタアカイエカ	近江八幡安土町メス	滋賀県近江八幡市安土町	2008.8.02	●		5
コガタアカイエカ	Tay Ninh Long Trungメス	越南 Tay Ninh Long Trung	2008.6.04	●		3
コガタアカイエカ	徳島メス	徳島県小松島市	2009.5.26~28	●		12
コガタアカイエカ	徳島オス	徳島県小松島市	2009.5.26~28		●	11
コガタアカイエカ	千葉オス	千葉県千葉市若葉区古泉町	2009.8.13		●	13
コガタアカイエカ	Bulacan Bustosメス	比律賓 Bulacan Bustos	2010.05.12	●		4
コガタアカイエカ	NIID屋内メス	感染研 屋内飼育	2009.5	●		8
コガタアカイエカ	NIID屋内オス	感染研 屋内飼育	2009.5		●	7
コガタアカイエカ	NIID屋内メス	感染研 屋内飼育	2013.9	●		9
ヒトスジシマカ	西千葉メス	千葉県稲毛区弥生町1-33	2013.8.7~23	●		2
ヒトスジシマカ	感染研メス	東京都新宿区戸山1-23-1	2013.9.4	●		1
ヒトスジシマカ	西千葉メス	千葉県稲毛区弥生町1-33	2014.8.29	●		15
ヒトスジシマカ	西千葉オス	千葉県稲毛区弥生町1-33	2014.8.29		●	14
ヒトスジシマカ	西千葉メス	千葉県稲毛区弥生町1-33	2014.10.3	●		17
ヒトスジシマカ	西千葉オス	千葉県稲毛区弥生町1-33	2014.10.3		●	16

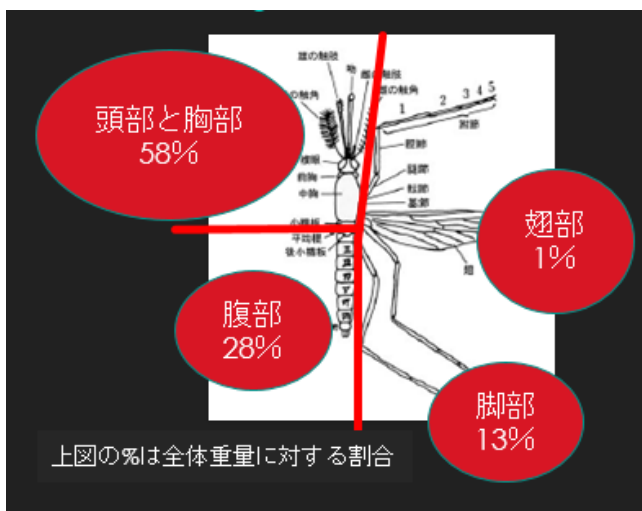


図 1 各部位のおおよその分離位置部位の下側の数字はヒトスジシマカ (西千葉) の全体の乾燥重量を 100 とした場合の各部位の重量比を示す。(図中の蚊の図は新井⁸より複製引用した)。

2.2 測定と解析

蚊の元素分析は日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンターで行った。乾燥した蚊試料はマイラー膜上で希釈したコロジオンを用いて固定し、PIXE 測定試料とした。小型サイクロトロンからの 2.9MeV の陽子ビーム（直径 6 mm）を真空チャンバー内で試料に照射し、これにより発生した特性 X 線を低エネルギー用と高エネルギー用の 2 台の Si(Li)検出器で同時に測定して X 線スペクトルを得た。スペクトルの解析と無標準法による解析は世良ら^{5,7}の方法によった。

測定結果の解析は、「頭部と胸部」と腹部については元素含有率を多重検定（Tukey 法）で比較した。脚部と翅部については試料数の関係から多重検定は行わず、元素含有率についての傾向を述べるに留めた。

また、飛来源推定のため元素含有率を基にウォード法によるクラスター解析を行った。多重検定（Tukey 法）はフリー統計ソフト EZR（Easy R）⁹、クラスター解析（ウォード法）は KT software and Consulting 菊池富男作成によるフリーソフトを使用した¹⁰。クラスター解析ではデータを正規化して解析を行った。

3 結果および考察

全ての蚊の各部位からは 13 種類の元素（Na、Mg、P、S、Cl、K、Ca、Mn、Fe、Cu、Zn、Br、Sr）が共通して検出された。各試料の結果はヒトスジシマカ（メス）、ヒトスジシマカ（オス）、コガタアカイエカ（屋内）、コガタアカイエカ（屋外）、コガタアカイエカ（海外）としてまとめ、その平均値を図 2～図 5 に示した。

「頭部と胸部」の場合（図 2）、Tukey 法によって P、Zn、Sr を除く 10 元素について危険率 5%水準で試料間に有意差が認められた。各元素の含有率は、P、S、Cl、K、Ca がほぼ 1000～1 万 mg/kg の範囲に分布、Na、Mg、Fe は 100～1000mg/kg の範囲に分布、Mn、Cu、Zn、Br、Sr はほぼ 100mg/kg 以下の範囲に分布していた。

一方、「腹部」の場合（図 3）、Tukey 法によって K と Br を除く 11 元素について危険率 5%水準で試料間に有意差が認められた。各元素の含有率は、P、S、Cl、K、Ca がほぼ 1000～1 万 mg/kg の範囲に分布、Na、Mg、Mn、Zn は 100～1000mg/kg の範囲に分布、Fe、Cu、Br、Sr はほぼ 100mg/kg 以下の範囲に分布していた。「頭部と胸部」と「腹部」における元素の含有率の傾向は Mn、Fe、Zn を除いて類似していた。

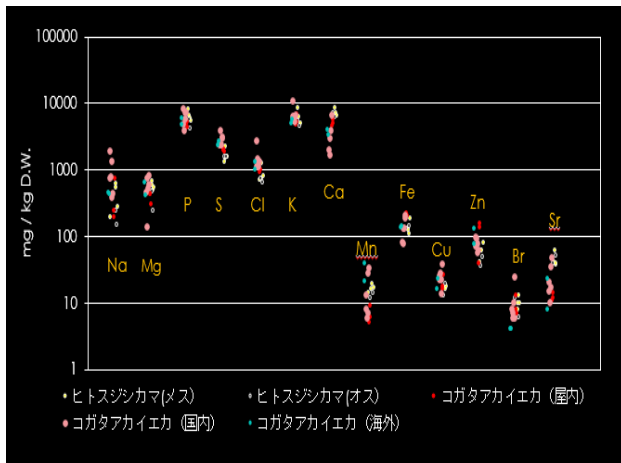


図 2 蚊試料の「頭部+胸部」における元素含有率

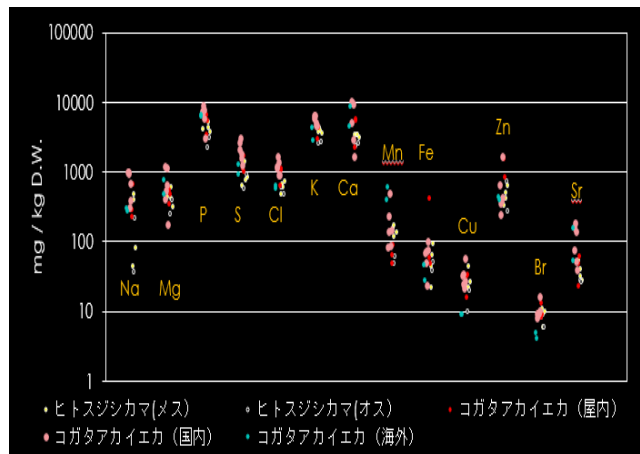


図 3 蚊試料の「腹部」における元素含有率

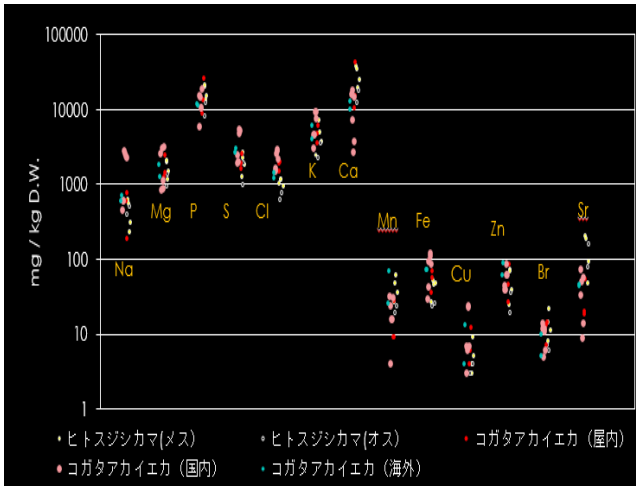


図4 蚊試料の「脚部」における元素含有率

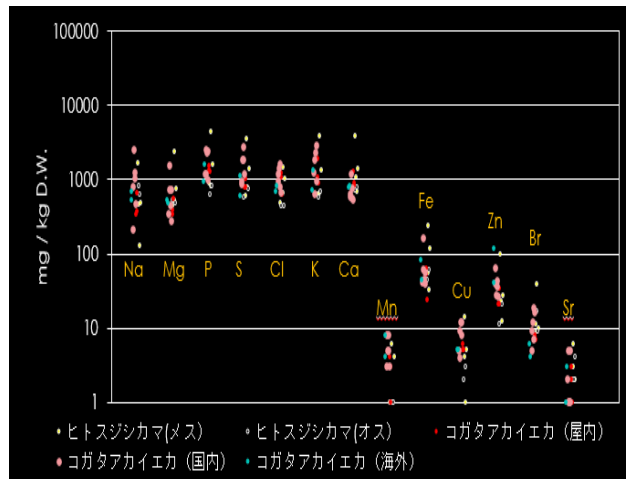


図5 蚊試料の「翅部」における元素含有率

「脚部」の場合(図4)、PとCaの含有率が他の元素に比べて高く、特にPはコガタアカイカ2点(宍道湖メスとNIID屋内オス)、ヒトスジシマカの西千葉オス(2014.10)を除いた試料、Caについてはコガタアカイカ4点(Bulacan Bustoメス、宍道湖メス、徳島のオスとメス)を除いた試料で含有率が1万mg/kg以上であった。元素含有率がほぼ1000~1万mg/kgの範囲に分布した元素はMg、S、Cl、Kであった。元素含有率が主に100~1000mg/kgの範囲に分布した元素はNaのみであり、Mn、Fe、Cu、Zn、Br、Srがほぼ100mg/kg以下に分布していた。

「翅部」の場合(図5)、Na、Mg、P、S、Cl、K、Caの含有率はほぼ1000mg/kg前後の範囲に分布し、Fe、Zn、Brはほぼ10~100mg/kgの範囲に、Mn、Cu、Srはほぼ10mg/kg以下の範囲に分布していた。

これらの各部位の元素含有率に基づいて行ったクラスター解析の結果は図6~9に示した。

クラスター解析の結果を考察する上では2つの採取時期(2009.5と2013.9)のコガタアカイエカNIIDメスのデンドログラム上の距離関係に注目した。その理由は、「採取地が同一と予想される個体については生育環境が同じであることから蚊の元素組成が近似しデンドログラム上では近い位置関係が見られる」と考えられたので、デンドログラム上で結果を比較する上で基準となる距離が必要と考えたためである。

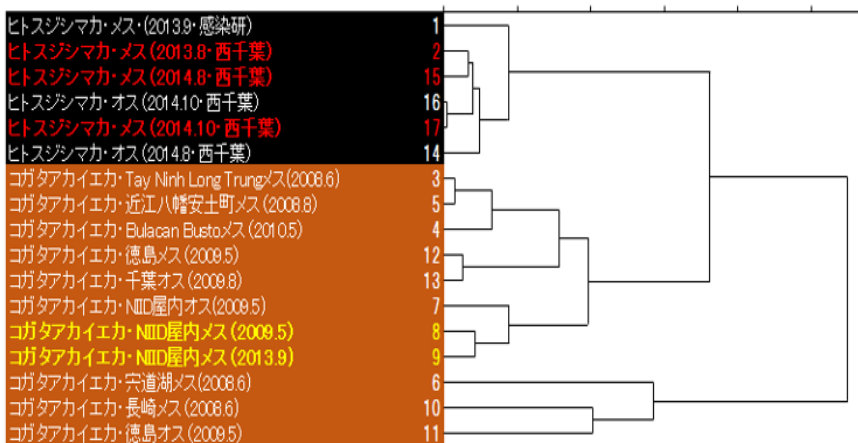


図6 「頭部と胸部」のクラスター解析結果

図中のデンドログラムは平方距離に基づく。距離は1目盛が20に相当する。

「頭部と胸部」の元素含有率に基づくクラスター解析結果(図6)では2つの採取時期(2009.5と2013.9)のコガタアカイエカNIIDメスは隣り合わせで小クラスターを形成していた。デンドログラム上ではコガタアカイエカNIIDメス同士の距離よりも短かった例がTay Ninh Long Trungメスと近江八幡安土町メスと

の間あるいは徳島メスと千葉オスとの間で認められた。コガタアカイエカ NIID メス同士の距離を類似性の基準と考えた場合、前者、後者共に、元素の含有率組成が NIID メス同士よりも類似している事を示している。前者の Tay Ninh Long Trung メスと近江八幡安土町メスの場合はメスの個体同士の比較であるので、元素組成の類似の原因としては両採取地での生育環境は極めて類似しているのか、あるいは近江八幡安土町メスの個体が国外から飛来している可能性が考えられる。一方、後者の徳島メスと千葉オスについては元素の含有率組成の類似性はあるものの、コガタアカイエカにおける性差の問題が関係している可能性がある。本デンドログラム上でも徳島のオスとメスについては NIID のオスとメスの場合より、離れた距離関係が認められた。このため、蚊の飛来源推定においては採取個体の性別について分けた上での評価が必要であるのかもしれない。

また、本デンドログラムの特長としては 3 つに分岐した一つの区分がヒトスジシマカのみで占められていた点も挙げられる。このことは「頭部と胸部」における元素の含有率組成にはヒトスジシマカとコガタアカイエカとの間で違いがあることを示唆していると思われる。ヒトスジシマカについては、3 つの採取時期(2013.8、2014.8、2014.10) からなる西千葉メスのクラスター間距離も 2 つの採取時期(2009.5 と 2013.9) のコガタアカイエカ NIID メスの場合とほぼ同じであった。このため、「頭部と胸部」の元素含有率に基づくクラスター解析はヒトスジシマカの発生源推定にも適用できる可能性があるのかもしれない。

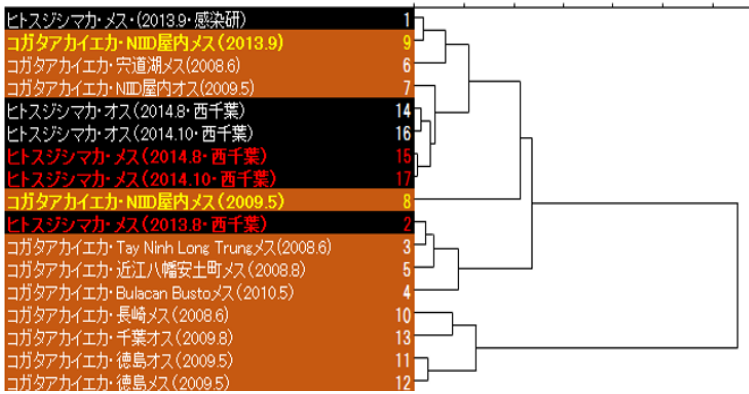


図 7
「腹部」のクラスター解析結果

図中のデンドログラムは平方距離に基づく。距離は 1 目盛が 25 に相当する。

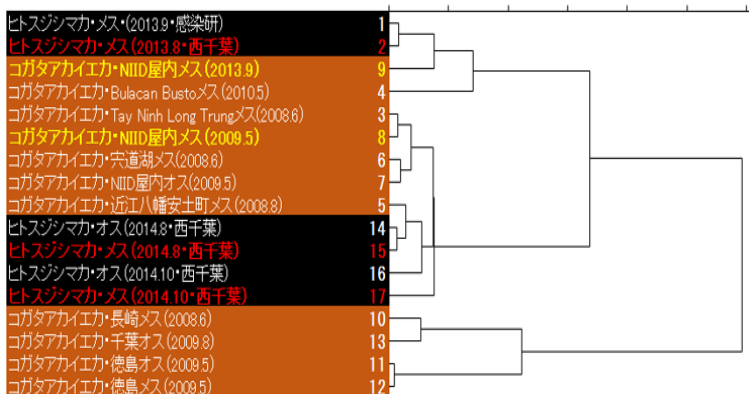


図 8
「脚部」のクラスター解析結果

図中のデンドログラムは平方距離に基づく。距離は 1 目盛が 25 に相当する。

一方、「腹部」の元素含有率に基づくクラスター解析結果(図 7)や「脚部」の元素含有率に基づくクラスター解析結果(図 8)においては、2 つの採取時期(2009.5 と 2013.9) のコガタアカイエカ NIID メスのデンドログラム上での距離はかなり離れており、「頭部と胸部」の場合のような小クラスターは認められなかった。このため、「腹部」や「脚部」の元素含有率に基づくクラスター解析結果から蚊の発生源を推定することは難しいと考えられた。

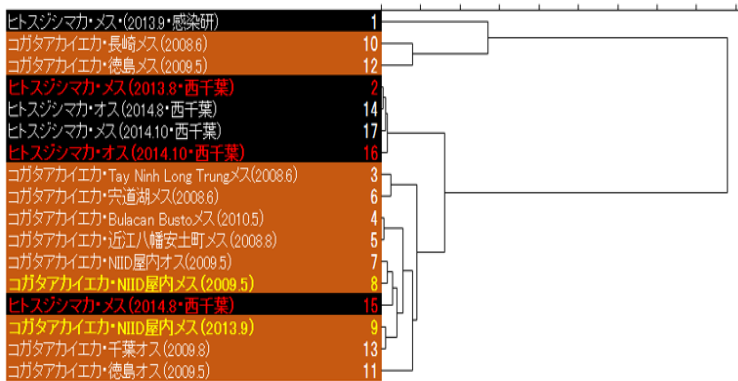


図9
「翅部」のクラスター解析結果

図中のデンドログラムは平方距離に基づく。距離は1目盛が25に相当する。

「翅部」の元素含有率に基づくクラスター解析結果(図9)においては、2つの採取時期(2009.5と2013.9)のコガタアカイエカ NIID メスのデンドログラム上での距離は比較的近いが、コガタアカイエカの千葉オスやヒトスジシマカの西千葉メス(2014.8)とほぼ同じ距離でクラスターを形成していた。また、全体としてデンドログラム上の距離が短い所で、Tay Ninh Long Trung メス、宍道湖メス、Bulacan Busto メスなど多数の試料とクラスターを形成しているため、「翅部」の元素含有率に基づくクラスター解析の結果から蚊の発生源を推定することは特徴が現れにくく難しいと考えられた。

翅試料は他の部位に比べて元素含有率が低く、測定環境のバックグラウンドやノイズなど元素分析時の誤差による影響がクラスター解析の結果に影響を及ぼすことも考えられる。このため、「翅部」の元素含有率を蚊の発生源推定に利用するためには分析上の感度を改善する必要もある。

以上のことから、現在までに PIXE による元素分析が終了した蚊試料の測定結果に基づくと、コガタアカイエカの飛来源を推定する手法としては「頭部と胸部」を対象とした13元素によるクラスター解析が有望であると思われる。今後、採取蚊の数を増やし、さらに解析を進めたい。また、今回の結果で飛来源を推定する上では不相当と考えられた「腹部」や「脚部」については前者をウイルス検査、後者を蚊の遺伝子検査に用いることができる。このため、1匹の個々の蚊について部位を目的別に分けた分析を行うことで将来的には飛来地・感染性・系統の情報を持った防疫上有益な解析が可能になるかもしれない。

参考文献

- 1) 東京都福祉保険局, 東京都蚊媒介感染症対策会議報告書(2014)
<http://www.metro.tokyo.jp/INET/KONDAN/2014/12/DATA/40oco101.pdf>
- 2) 感染症研究所(ウイルス第一部) 日本脳炎 <http://www.nih.go.jp/niid/ja/diseases/na/je.html>
- 3) 野地美樹, 福島あや, 内田 治, 吉田宗広, 安藤達彦, コーヒー豆中の微量元素を用いた多変量解析による地域特定, *Trace Nutrients Res.*, **25**, 142-146 (2008)
- 4) 安井明美, 進藤久美子, 玄米中の無機元素組成による産地判別, *分析化学*, **49**, 405-410 (2000)
- 5) 世良耕一郎, 鈴木弘行, 沢辺京子, 駒形 修, 後藤祥子, 高橋千衣子, 齋藤義弘, 蚊・小バエに対する無調製・無標準定量法の開発, NMCC 共同利用研究成果報文集(2013), **20**, 144-159 (2014)
- 6) 鈴木弘行, 沢辺京子, 駒形 修, 後藤祥子, 高橋千衣子, 齋藤義弘, 世良耕一郎, ヒトスジシマカとコガタアカイエカに含まれる元素の PIXE 分析, NMCC 共同利用研究成果報文集(2013), **20**, 160-170 (2014)
- 7) K. Sera, H. Suzuki, K. Sawabe, O. Komagata, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, "Standard-Free Method for Quantitative Elemental Analysis of Mosquitoes and Small Flies", *Int'l Journal of PIXE*, **23**, 93-109 (2013)

- 8) 新井明治, 日本における感染症媒介蚊 (蚊 後編), *モダンメディア*, **58**, 231-235 (2012)
- 9) Kanda, Y., Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics, *Bone Marrow Transplantation*, **48**, 452-458 (2013)
- 10) <http://ktsc.cafe.coocan.jp/>

Trial of the estimation of migration source for vector of Japanese encephalitis
(*Culex tritaeniorhynchus*) by PIXE

H. Suzuki¹, K.Sawabe², O.Komagata², S. Goto³, C. Takahashi³, Y. Saitoh³ and K. Sera⁴

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University
1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba-shi, 263-8522, Japan

¹ Department of Medical Entomology, National Institute of Infectious Diseases
Toyama 1-23-1, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

⁴Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

The objective of this study was to determine the migration source of *Culex tritaeniorhynchus* by its element composition. In 17 samples consist of *Culex tritaeniorhynchus* from Japan, Vietnam and Philippines and Asian tiger mosquito (*Aedes (Stegomyia) albopictus*) from Japan, elements in “head and chest”, abdomen, leg and wing were determined by PIXE at NMCC. 13 elements (Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br and Sr) were detected in “head and chest”, abdomen, leg and wing. Using the analytical results of 13 elements, mosquito samples were analyzed using statistical software, including cluster analysis to categorized into particular groups. As a result, cluster analysis (Ward method) using 13 elements in “head and chest” seemed then effective in the method for estimation of the migration source of *Culex tritaeniorhynchus* than the analyzed case of abdomen, leg and wing.