

# ヤブカ属(Aedine mosquitoes)2種のアカバネウイルス媒介能

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	山下, 伸夫 坂口, 実 斉藤, 久孝 ほか1名,
巻/号	52巻12号
掲載ページ	p. 763-767
発行年月	1999年12月

ヤブカ属 (*Aedine mosquitoes*) 2種のアカバネウイルス媒介能山下伸夫<sup>1)</sup> 坂口 実<sup>1)</sup> 斉藤久孝<sup>2)</sup> 千葉 伸<sup>2)</sup>

1) 農林水産省東北農業試験場 (〒020-0123 盛岡市下厨川赤平4)

2) 岩手県盛岡家畜保健衛生所 (〒020-0173 岩手県滝沢村滝沢字砂込387-9)

(1998年12月16日受付・1999年6月22日受理)

## 要 約

2種のヤブカ属の蚊におけるアカバネウイルス媒介能を明らかにするため、そのウイルス保持期間と吸血間隔を調べ、伝達試験を行った。ウイルス混合血液を吸血させて2日間飼育したヒトスジシマカでは頭胸部からウイルスが検出されたが、ヤマダシマカでは検出されなかった。ヒトスジシマカの未飽血個体ではその約70%の個体がウイルス保持期間内の吸血後2日に再吸血した。ウイルス混合血液を吸血したヒトスジシマカによる子牛へのウイルス伝達試験では、子牛のウイルス中和抗体価の上昇は認められず、ヒトスジシマカのアカバネウイルス媒介は確認できなかった。

——キーワード：ヒトスジシマカ，ヤマダシマカ，アカバネウイルス，伝達試験，ベクター。

日獣会誌 52, 763～767 (1999)

アカバネ病は、牛や羊の流早死産および関節湾曲症・水無脳症候群を特徴とする先天性異常子の分娩などの牛異常産を起こす家畜重要疾病であり、子牛生産に甚大な被害を及ぼす。病原であるアカバネウイルスはブニヤウイルス科ブニヤウイルス属のシンプ血清群に属し、節足動物によって媒介される。わが国におけるアカバネ病の発生は沖縄県から北海道まで幅広くみられる [6]。

アカバネウイルスのベクターは、疫学的証拠等から西南暖地においてはウシヌカカ (*Culicoides oxystoma*) であると考えられている [5]。しかし、ウシヌカカが分布しない北東北や北海道でもアカバネ病の流行がみられた [3] ことから、これらの地域ではウシヌカカ以外のベクターの存在も考えられるが、依然としてベクターは特定されていない。

アカバネ病においては、その予防に有効なワクチンが開発され多くの地域で普及しているが、流行周期が5～10年と不規則なことなどから、年や地域によってはワクチン接種が徹底されているとはいえない状況にある。また本ウイルスの抗原性の変異も明らかにされ [8]、ワクチンのみによる予防対策に支障を来す可能性も推察され、ベクター対策を考慮することも必要と考えられる。

媒介昆虫を特定するためには、吸血昆虫が感染家畜から吸血する時にウイルスを取り入れ、未感染家畜から再吸血するまでの間に、ウイルスが昆虫体内で増殖または保持されることを明らかにしたうえで動物試験を行い再吸血させて動物に感染するかどうかを確認する必要がある。

アカバネウイルスは日本でキンイロヤブカ (*Aedes vexans*) とコガタイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*) の

体内より初めて分離されたこと [9] に加え、ヤブカ属の1種であるヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) 由来の株化細胞で細胞変性効果 (CPE) を示さずに接種後1～2日以内に指数的に増殖し、長期間にわたって細胞外に放出される [1] ことが知られている。以上のように蚊とアカバネウイルスとの関連を示唆する情報はあがあるが、動物を用いた伝達試験はこれまで行われておらずベクターの特定にはいたっていない。そこで本研究では、わが国の広い地域において優占種であり、動物吸血性が高いことが知られているヒトスジシマカとヤマダシマカ (*Aedes flavopictus*) の2種のヤブカ属の蚊 [2] について、それらのウイルス保持期間および吸血間隔を調べたうえで、子牛を用いたアカバネウイルス伝達実験を行い、ウイルス媒介能を明らかにすることを目的とした。

## 材料および方法

供試蚊：蚊は農林水産省東北農業試験場家畜虫害研究室で10代以上累代飼育した盛岡由来のヤマダシマカと、長崎大学より譲り受けて10代以上累代飼育したヒトスジシマカのそれぞれ羽化後7～10日経過した成熟雌を用いた。蚊の飼育と実験は、気温を24℃に保ち、16時間明/8時間暗の日長条件下で行った。幼虫の餌にはマウス用固形飼料<sup>a)</sup>を粉末にしたものと乾燥酵母<sup>b)</sup>を与えた。成虫の餌には3%ショ糖水を用い、産卵用の吸血源には金網ではさんで保定したマウスを飼育ケージに入れて与えた。マウスあるいはウイルス混合血液を飽

a) CE-2, 日本クレア, 東京.

b) エビオス, 田辺製薬, 大阪.

血状態の半分程度吸血した時点で吸血管で取り去ったあと2日間給水のみ行った個体を未飽血蚊として用いた。

使用ウイルスと検査法：アカバネウイルスはハムスター由来株化細胞であるHmLu細胞を用いて盛岡家畜保健衛生所で継代保存されているJaGAR-39株を使用した。吸血試験用のウイルス混合血液は、アカバネウイルス抗体陰性の凍結羊血液9ml（ヘパリン含量10U/ml）に $10^6$ TCID<sub>50</sub>/mlのウイルス液2mlを混合して作製した。したがってこのウイルス混合血液のウイルス価は約 $10^{5.3}$ TCID<sub>50</sub>である。

中和試験はKurogiら [4] の方法に従い、アフリカミドリザル由来株化細胞であるVero細胞を用いたマイクロタイター法により行い、中和抗体価を求めた。

蚊体内におけるウイルス保持能試験：

①ウイルス混合血液を取り込ませる方法

ウイルス混合血液（ウイルス価 $10^{5.3}$ TCID<sub>50</sub>）を脱脂綿に含ませ、擬吸血源法 [11] を用いて蚊に吸血させた。本法は、両口を金網でふさいだガラス管にマウスを1頭入れてマウスが排出する炭酸ガスや乳酸等の化学物質で脱脂綿近くに蚊をおびき寄せて吸血を促す方法である。

②蚊からのウイルス分離

混合血液を吸血させたヤマダシマカおよびヒトスジシマカをそれぞれ飼育ケージに移し、ショ糖水を与えて飼育し、飼育開始後2, 4, 6, 8, 10, 18および28日にそれぞれの生存個体を5個体ずつ採取し、各個体を頭胸部と腹部に分けた。5個の頭胸部と腹部をそれぞれプールして、これに2.5mlのイーグル培養液を加えて氷水中で乳剤を作り、3,000rpmで10分間遠心して得た上清をウイルス分離材料とした。ウイルス分離菌は、分離材料を10倍階段希釈し、各希釈をVero細胞を単層培養した小試験管4本に0.1mlずつ接種して、37℃・7日間で回転培養を行った。CPEを指標としてウイルスを検出し、Behrens and Karber法によりウイルス価を求めた。

③蚊の吸血間隔の測定

マウスから飽血吸血させたヤマダシマカおよびヒトス

ジシマカをそれぞれ42個体ずつ、20cm立方のケージに入れて飼育した。毎日16時に金網で保定したマウスをケージに入れ、1時間後に飽血吸血した個体数を記録した。ヒトスジシマカについてはさらに、未飽血後の場合における再吸血までの期間も調べた。すなわち半分程度吸血していた未飽血個体43個体を2日間給水だけで飼育した後、これを同様にケージに入れて保定したマウスから再飽血するまでの日数を調べた。

牛を用いた伝達試験：

①媒介試験用ネットケージにおける吸血率試験

4m四方の部屋の中に、塩化ビフェニル製パイプで枠組みを作り、それを白色寒冷紗で覆って作製した2.5m四方、高さ1.6mの蚊帳様のネットケージを設置した。この中に黒毛和種の子牛を係留し、1日間給水だけで飼育しておいたヒトスジシマカ174個体を放飼した（図1）。1時間後にケージ内の牛体上、床面、ネット側面に止まっていた蚊を捕集し吸血の有無を調べた。

②ヒトスジシマカによるウイルス伝達試験

アカバネウイルス中和抗体陰性の4カ月齢の子牛6頭（日本短角種4頭、黒毛和種2頭）を、各群2頭ずつ、3つの実験群に分けた。24℃に保った4m四方の人工照明室内に前述のネットケージを設置しその中に1頭の子牛を係留した。2日前にウイルス混合血を飽血状態の半分程度吸血させた後、給水のみで飼育した未飽血状態のヒトスジシマカ100個体をケージ内に1時間放飼した後、ケージ内の蚊を吸血管で捕集し吸血個体数を計数し、これを処理群とした。一方、ウイルスを含まない血液を未飽血吸血させた蚊と同様に牛から吸血させた群（吸血対照群）および $10^6$ TCID<sub>50</sub>/mlのウイルス液を1ml皮下接種した群（接種対照群）を設けた。実験期間中、子牛からは1週間間隔で4週間抗体検査用に血清を、7日間毎日ウイルス検出用に血液（ヘパリン含量10U/ml）を採取した。放飼1時間後に回収した蚊は、総個体数と再吸血個体数を計数した後、ウイルス分離を行った。

成 績

蚊体内におけるウイルス保持能：ヒトスジシマカでは吸血後2日の頭胸部と腹部よりウイルスが検出された

表1 アカバネウイルス混合血液を吸血したヒトスジシマカとヤマダシマカの経時的ウイルス価

供試蚊	部位	ウイルス混合血液吸血後の日数					
		2	4	6	8	10	18 28
ヒトスジシマカ	頭胸部	2.0*	-**	-	-	-	-
	腹部	3.5	-	-	-	-	-
ヤマダシマカ	頭胸部	-	-	-	-	-	-
	腹部	2.3	2.0	-	-	-	-

\* 数値はウイルス価 ( $\log_{10}$ TCID<sub>50</sub>/ml)

\*\* -はウイルスは検出されず

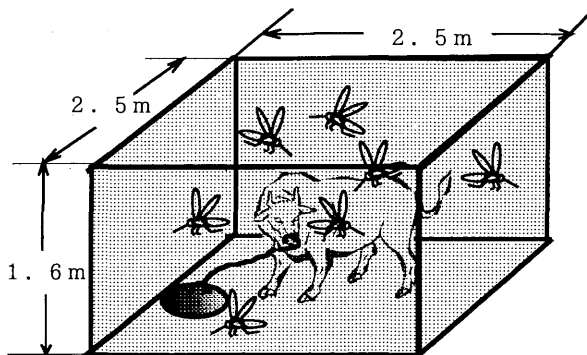


図1 ウイルス伝達試験用ネットケージ。塩化ビフェニル製パイプの立体枠組みに白色の寒冷紗を張り付けた。

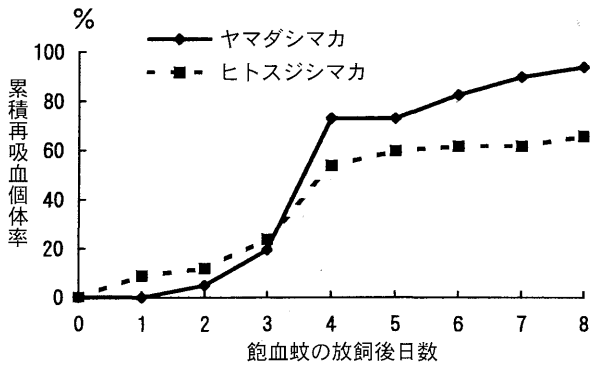


図2 飽血したヒトスジシマカとヤマダシマカの再吸血率の経時的変化

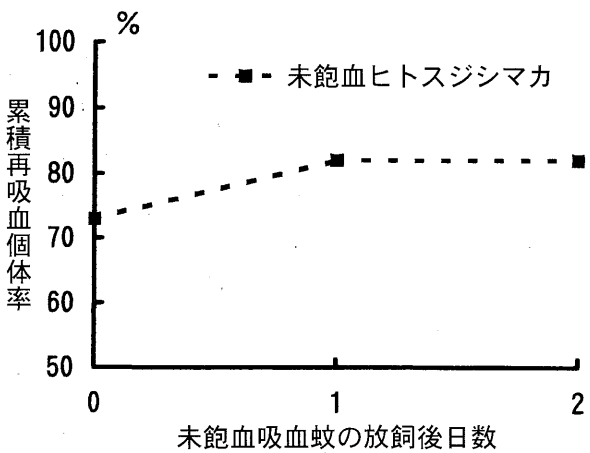


図3 未飽血吸血後給水のみで48時間飼育したヒトスジシマカの再吸血率の経時的変化

が、ヤマダシマカでは吸血後2日と4日に腹部のみよりウイルスが検出された(表1)。ウイルス価は、いずれも $10^{2.0} \sim 10^{3.5}$ TCID<sub>50</sub>/mlであった。両種ともウイルス混合血液吸血後6日以降はウイルスは分離されなかった。対照として、両種のウイルス混合血液を吸血していない個体についても同様に、頭胸部と腹部に分けてウイルス検出を試みたがウイルスは検出されなかった。

蚊の吸血間隔：飽血吸血させたヤマダシマカとヒトスジシマカでは、それぞれの73%および56%の個体が飽血後4日までに再吸血を行った(図2)。特に、ヒトスジシマカにおいて未飽血後2日間吸水のみさせた場合、累積再吸血個体率は、直後では72%、1日後で81%、2日後も81%であった(図3)。

牛を用いた伝達試験：

①媒介試験用ネットケージにおける吸血率

ネットケージにおける吸血率試験では、放飼1時間後にヒトスジシマカの放飼個体の87%を回収した。さらに放飼個体のうち81%(回収個体のうち93%)の個体が吸血していた。

②ウイルス混合血を吸血したヒトスジシマカによる伝達試験

表2 牛を用いたアカバネウイルス伝達試験で放飼したヒトスジシマカの再吸血率

実験群*	子牛No.	回収個体数**	吸血個体数	非吸血個体数	吸血率(%)	ウイルス回収***
吸血対照群	N506	55	36	19	65.5	-
	B518	76	46	32	60.5	-
処理群	N507	94	53	41	56.4	+(2.5)
	N509	91	36	55	39.6	+(2.5)

\* 吸血対照群はウイルスフリー蚊に吸血させた群；処理群はウイルス取込み中途吸血蚊に吸血させた群。

\*\* 放飼蚊の個体数は各群とも牛1頭につき100個体。

\*\*\* -は回収できなかったことを、+は回収したことを示す。

( )の数值はウイルス価(log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/ml)。

表3 伝達試験後の供試子牛におけるアカバネウイルス中和抗体価の推移

実験群*	子牛No.	抗体価				
		試験前	7日後	14日後	21日後	28日後
吸血対照群	N506	<2	<2	<2	<2	<2
	B518	<2	<2	<2	<2	<2
接種対照群	N508	<2	<2	8	8	8
	B519	<2	2	4	4	8
処理群	N507	<2	<2	<2	<2	<2
	B509	<2	<2	<2	<2	<2

\* 吸血対照群はウイルスフリー蚊に吸血させた群；処理群はウイルス取込み中途吸血蚊に吸血させた群；接種対照群はウイルスを皮下接種した群。

ネットケージ内でのウイルス伝達試験では、放飼個体の55~94%が回収され、このうち40~65%の個体が再吸血していた(表2)。再吸血した蚊からはアカバネウイルスが検出され、ウイルス混合血液の吸血でウイルスが蚊体内に取り込まれていることが確認できた。

吸血試験後の子牛の中和抗体価の推移はウイルス接種対照群の牛で接種後7日から抗体価の上昇がみられたが、処理群では吸血対照群と同様に中和抗体は検出されなかった(表3)。また処理群の牛の血液からはウイルスは分離されなかった。

考 察

蚊によるウイルス媒介は、蚊がウイルス感染家畜から吸血した時に取り込んだウイルスが胸部唾液腺に移り、ふたたび他の牛より吸血するときに唾液とともに牛体内に送りこまれることで成立する。このため蚊の再吸血時に胸部唾液腺にウイルスが存在しているか否かが媒介能を評価するうえで重要となる。蚊体内におけるウイルス保持能については、ウイルスが腹部でのみ検出されたヤマダシマカより唾液腺を含む頭胸部からウイルスが検出されたヒトスジシマカの方が媒介能を有する可能性は高いと考えられた。

再吸血時にウイルスを体内に保持するだけでは媒介能

虫として特定はできず、媒介性を有する昆虫と対象動物を用いた伝達試験による実証が必要である。その際、昆虫が対象動物から効率的に吸血する試験環境を設定することが不可欠である。ヤブカ類の吸血生態として、20cm 四方程度の狭い飼育ケージ内ではマウスから高率に吸血することは知られているが [11], 2m 四方以上の大きさの人工的空間における動物への吸血行動は知られていない。人為的環境においては昆虫の吸血活動が低下する可能性も考えられるが、用いたネットケージ内では、回収個体の大部分で吸血が確認されたことから、このネットケージが牛等の大型家畜に対するヤブカ類のウイルス伝達の実証試験には有用であると考えられた。

牛を用いた伝達試験では、吸血率を高めるため未飽血状態の蚊を用いて媒介性を調べたのであるが、野外においても未飽血吸血の状態におかれることがあるかについては、吸血昆虫は家畜による頻繁な忌避行動をうけるため吸血を中断することも多い [7, 10] ことからその可能性は十分考えられる。

ベクターは生物学的ベクターと機械的ベクターに大別される。生物学的ベクターとは体内でウイルス等の病原体を増殖させ長期にわたり保持するもので、マラリアにおける蚊やフィラリアにおけるブユなどがこれに含まれる。機械的ベクターとは病原体を増殖させないが、体内や体表等にしばらく保持し単に病原の運搬を行うにとどまり、病原を保持している期間に家畜等に接触することで機械的に感染させるベクターである。本研究で用いたヒトスジシマカおよびヤマダシマカにおいてはウイルスの保持期間が2~4日と短く、ウイルスが体内で増殖し、長期にわたり保持されることは確認されなかったため、これらの蚊が生物学的ベクターである可能性は低いと考えられた。

本研究の伝達試験ではウイルス感染蚊から牛へのウイルス伝達は認められなかったが、これには蚊が保持していたウイルス量が少なく感染するのに必要な量に達していなかったことや唾液腺自体にウイルスが移行していなかったことなどが考えられる。伝達試験においては感染に要する最少所要量をあらかじめ明らかにしたうえで、蚊体内の中でもとりわけ唾液腺におけるウイルス量を経

時的に把握し、供試蚊個体数を決めることが必要と考えられる。今回の伝達試験のみでは、ヒトスジシマカのアカバネウイルス媒介能は否定しきれないが、供試した2種のヤブカそれぞれが生物学的ベクターの特徴を備えていないことから、これらがアカバネウイルスの主要なベクターとなる可能性はきわめて低いと考えられる。

アカバネウイルスは、蚊類ではキンイロヤブカとコガタイエカの体内から初めて分離され [9], ケニヤにでもハマダラカの1種である *Anopheles funestus* から分離されているが、これらの種の体内でウイルスを増殖させることはなく、これらについても生物学的ベクターであることは否定されている。保毒虫数が多ければ機械的にウイルス伝播が行われる可能性はないとはいえないが、まず生物学的ベクターであるかどうかを明らかにすることが重要である。そしてウイルスを増殖させ長期にわたり保持するものについて、それがベクターであることを特定するには、牛が感染するのに必要なウイルス量と蚊1個体あたりの唾液腺内ウイルスの定量から蚊の個体数を設定した伝達試験を行うことが望まれる。

#### 引用文献

- [1] Han HD : Jpn J Vet Sci, 43, 689-697 (1981)
- [2] 上村 清 : 蚊の科学, 佐々 学編著, 第1版, 150-288, 北隆館, 東京 (1976)
- [3] 北岡茂男 : 家衛試験報, 46, 45-51 (1963)
- [4] Kurogi H, Akiba K, Inaba Y, Matsumoto M : Vet Microbiol, 15, 243-248 (1987)
- [5] 黒木 洋, 稲葉右二, 高橋英司, 佐藤邦彦, 黒田一幸, 大森常良 : 家衛試験報, 75, 1-8 (1977)
- [6] 大池裕治, 吉田欣也, 南野久晃 : 日獣会誌, 41, 246-250 (1988)
- [7] 松村 雄, 早川博文, 長谷川 勉 : 東北農試研究資料, 1, 45-53 (1978)
- [8] Miyazato S, Miura Y, Hase M, Kubo M, Goto Y, Kono Y : Jpn J Vet Sci, 51, 128-136 (1989)
- [9] Oya A, Okuno T, Ogata T, Kobayashi I, Matsuyama T : Jpn J Med Sci Biol, 14, 101-108 (1961)
- [10] Robert A, Reinhart B : J Med Entomol, 34, 95-101 (1997)
- [11] 山西 浩 : 衛生動物, 33, 17-20 (1982)

Vectorial Role of Aedine Mosquitoes in Akabane Virus Transmission

Nobuo YAMASHITA\*, Minoru SAKAGUCHI, Hisataka SAITO and Shin CHIBA

\* Tohoku National Agricultural Experiment Station, 4 Akahira, Shimo-Kuriyagawa, Morioka 020-0123, Japan

SUMMARY

To investigate the possible vectorial role of aedine mosquitoes in Akabane-virus transmission, periods of virus persistence in the insects' bodies and hematophagical intervals were studied and transmission tests were performed. Most individuals of *Aedes arbopictus* insufficiently fed on blood can suck blood again while the Akabane virus remains in their bodies. Mosquitoes fed on blood containing the Akabane virus were introduced into a net cage with a susceptible calf. Since no increase in the calf's neutralizing-antibody titers were observed, the vectorial role of the mosquitoes in Akabane-virus transmission was not confirmed.

— Key words : *Aedes arbopictus*, *Aedes flavopictus*, Akabane virus, transmission test, vector.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 52, 763 ~ 767 (1999)



高単位総合ビタミン剤

**リケビタン**

高単位VA特殊調整 1000万IU 100ml

**エクセレントA-1000 液**

投与量：200cc

総合強壮・強肝内服液

**パラゲノール**

投与量：〈分娩時〉500cc

高単位ビタミンAD3E内服薬 1 ℓ

**ビタオイル 2液**

投与量：〈分娩時〉200cc

マイシリン製剤20g

**乾乳用ホーミングDC**

〈乾乳時〉1容器全量注入

マイシリン製剤20g

**ホーミングMC**

〈泌乳時の乳房炎治療〉1容器全量注入

ジクロキサシリン製剤20g

**ホーミングDX**

〈泌乳時の乳房炎治療〉1容器全量注入



理研畜産化薬株式会社

本社／東京都杉並区高円寺南2-41-12

工場／埼玉県川口市元郷4-1-8

TEL 048 (224) 8451 (代)

FAX 048 (224) 1079