2 系統のヒトスジシマカにおける チクングニアウイルス感受性の比較

山 西 浩* 小 西 英 二** 松 村 武 男**

* 神戸学院女子短期大学 (〒652 兵庫県神戸市兵庫区会下山 1-7)

** 神戸大学医学部医動物学教室 (〒650 兵庫県神戸市中央区楠町 6)

(受領: 1984年 3月17日)

Comparison of the susceptibility to chikungunya virus on 2 strains of *Aedes albopictus*

Hiroshi YAMANISHI*, Eiji KONISHI** and Takeo MATSUMURA**

*Kobe Gakuin Women's Junior College, Hyogo-ku, Kobe, Hyogo 652, Japan

**Department of Medical Zoology, Kobe University School of
Medicine, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650, Japan

Key words: chikungunya virus, *Aedes albopictus*.

蚊のアルボウイルスに対する感受性は通常感染率で示される。Tesh ら (1976) はチクングニアウイルスに対するヒトスジシマカの感受性を種々の系統で比較しているが、ウイルス感受性の指標としてウイルスの増殖した個体の割合、すなわち感染率を用いている。Mangiafico ら (1971), Jupp ら (1981) などと同じ手法で蚊のチクングニアウイルス感受性を報告している。感染率の値はその系統内でウイルスが体内で増殖した個体の割合を示しているが、その系統で増殖したウイルスの量は示していない。

筆者らは数種蚊に対するチクングニアウイルスの増殖性を比較するため、約 10 個体の蚊をプールしてウイルス量を測定した (山西ら, 1983)。しかし、この方法は非感染個体の存在によって感染個体のウイルス量が低く評価される。したがってウイルスの増殖性をみるとき、蚊 1 個体当たりのウイルス量を測定して、その分布を示すのがもっとも合理的ではないかと考えられた。この考えにもとづき 2 系統のヒトスジシマカのチクングニアウイルス感受性を調べ、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 蚊

チクングニアウイルス感受性の比較に用いた蚊は兵庫

系とオアフ系の 2 系統のヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) である。兵庫系は神戸市兵庫区会下山町で採集し、以来約 3 カ年累代飼育している系統である。オアフ系はハワイ、オアフ島で採集され、ハワイ大学、Arbovirus Program, Rosen 研究室で 1971 年より累代飼育されていた系統である。この系統は 1983 年 8 月に分与され、現在まで維持されている。チクングニアウイルスに高い感受性を示し、デングウイルスにも感受性を示す系統である (Tesh *et al.*, 1976; Gubler and Rosen, 1976)。これらの蚊の飼育は 26°C、相対湿度約 70%、長日条件 (16 時間: 明, 8 時間: 暗) 下で行った。

飼育中の 1 世代の期間はおよそ 1 月に 1 サイクルという状態であった。

2. ウイルス

使用したチクングニアウイルスは分離後、乳飲みマウス脳で 174 代継代したもので大阪大学微生物研究所より分与されたアフリカ株である。この系統を BHK-21 単層培養細胞で 4 代継代したものを使用した。

3. ウイルスの感染および測定方法

蚊のウイルス感染は擬吸血源法 (山西, 1982) を利用して経口的に行った。およそ 1.3×10^9 PFU/ml の感染培養液 1 ml を綿羊脱繊維血 20 ml と混合して蚊に与えた。感染ウイルス量をかえる実験では 10 倍段階の ウィ

ルス希釈血液を与えた。この場合、蚊が $2 \mu\text{l}$ 吸血したときのウイルス量を想定して、 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 PFU/mosquito 区の5段階を設定した。ウイルスを経口感染させたときの蚊の日齢は羽化後8~10日であった。ウイルス混入血液を吸血した蚊は別のケージに移して飼育し、14日後に取り出し、 -80°C に保存した。これらの蚊を1個体ずつウイルス量を測定した。ウイルス量の測定は蚊を2mlの細胞培養液中で摩砕して、3000 rpm 遠心後の上清を単層培養 BHK-21 細胞に接種しメチルセルロース重層培地を用いたブラック法で行った。

結 果

オアフ系のヒトスジシマカでウイルス感染後のウイルス量の変動を経日的に14日まで調べた（各日の測定個体数は10~42個体）。その結果と兵庫系のヒトスジシマカのウイルス量の変動(山西ら, 1983)を比較して Fig. 1 に示した。

兵庫系ではウイルスは感染後いったん減少して検出されない時期、すなわち eclipse が観察されたが、感染後5日目より上昇し、14日後には 1.0×10^3 PFU/mosquito のウイルス量を示した。一方、オアフ系ではウイルス量は減少せず徐々に上がり、14日後には 1.8×10^6 PFU/mosq. の値を示した。このようにオアフ系の感染後のウイルス量は兵庫系に対して常に著しく高い様相を示した。

兵庫系とオアフ系の両系に 10^1 PFU/mosq. から 10^5 PFU/mosq. までの5段階のウイルス希釈血液を与え、14日後の感染個体の割合を示したのが Table 1 である。兵庫系のヒトスジシマカでは 10^4 PFU/mosq. 以下の感染ウイルス量ではウイルス増殖は認められず、 10^5 PFU/mosq. 区で34.5%の感染率が示された。オアフ系では低いウイルス量から感染が認められ、 10^2 PFU/mosq. 区で7.7%であったが、 10^3 PFU/mosq. 区で50.0%と感染率は高くなり、 10^4 PFU/mosq., 10^5 PFU/mosq. 区でそれぞれ75.0, 81.3%と高い感染率が示された。蚊が感染するウイルス量は兵庫系とオアフ系でかなり異

Fig. 1 Mean virus titers of chikungunya virus in two strains of *Aedes albopictus* infected with 10^5 PFU per mosquito and incubated at 26°C . Each point on graph represents the mean titer of 8-10 mosquitoes of Hyogo strain and of 10-42 mosquitoes of Oahu strain.

なっていた。

ウイルス感染14日後に1個体のウイルス量を測定し、その分布を示したのが Table 2 である（ウイルス量は前述の実験の 10^5 PFU/mosq. 区に該当）。兵庫系では58個体調べたところ20個体でウイルス感染が認められ（感染率34.5%）、 10^3 PFU のウイルス量をもつものが8個体、 10^2 PFU は6個体、 10^1 PFU は4個体という分布を示した。 10^4 PFU 以上のものは2個体しか認められなかった。オアフ系の Exp. 1 では32個体のうち26個体で感染が認められ、感染率81.0%を示した。感染率は兵庫系に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。26個体の感染個体は 10^3 PFU から 10^4 PFU の間に15個体、 10^6 PFU から 10^7 PFU の間に11個体という分布を示した。つまりオアフ系では非感受性のグループ、低い増殖性を示すグループ、高い増殖性を示すグループの3グループに分かれた。Exp. 2, Exp. 3 ではウイルス量の値は異なっているが、やはり同様の傾向が見られた。

兵庫系のウイルス量の分布では低い増殖性を示す 10^1 PFU から 10^4 PFU の間のウイルス量をしめす個

Table 1 Infection rates of two strains of *Aedes albopictus* orally infected with 10^1 to 10^5 PFU per mosquito of chikungunya virus.

Mosquito strain	PFU of virus ingested ($1.3 \times$)				
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
Oahu	0/10 (0.0%)	2/26 (7.7%)	8/16 (50.0%)	12/16 (75.0%)	26/32 (81.3%)
Hyogo	0/6 (0.0%)	ND	0/6 (0.0%)	0/10 (0.0%)	20/58 (34.5%)

Table 2 Titer distribution of Oahu and Hyogo strains of *Aedes albopictus* orally infected with 10^5 PFU per mosquito of chikungunya virus.

PFU/mosq.	Oahu strain			Hyogo strain
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
$<10^1$	6	11	8	38
10^1	0	0	0	4
10^2	0	0	0	6
10^3	5	0	5	8
10^4	10	5	2	1
10^5	0	4	2	0
10^6	9	0	6	1
10^7	2	4	1	0
Total	32	24	24	58

Fig. 2 Titer distribution of two strains of *Aedes albopictus* orally infected with 10^5 PFU per mosquito of chikungunya virus.

体が大部分を占めたが、この違いをオアフ系の Exp. 1 の結果と比較して度数分布で示したのが Fig. 2 である。ウイルス量が 10^1 PFU, 10^2 PFU と低いところと 10^5 PFU 以上の高いウイルス量における個体の分布が著しく異なっていた。

感染時のウイルス量別に 14 日後のウイルス量の分布をオアフ系で示したのが Fig. 3 である。 10^3 PFU/mosq. と低い感染量のときでも高いウイルス量を示す個体が現れている。感受性が三つのグループに分かれたのは 10^5 PFU/mosq. のウイルス量を感染させた場合だけであった。兵庫系で 10^5 PFU/mosq. のウイルス量を感染させて得た 1 個体のウイルス量の分布 (Fig. 2) とその感染率と比較的近い率を示すオアフ系の 10^3 PFU/mosq. 感

染時のウイルス量の分布 (Fig. 3) を比較すると、兵庫系ではウイルス量が 10^1 PFU, 10^2 PFU, 10^3 PFU と連続しているのにオアフ系では感染個体は 10^3 PFU 以上のウイルス量を示し、分布の様相が異なっていた。

考 察

ウイルス感染後のウイルス量の変動, dose-response relation, ウイルス量の分布で兵庫系とオアフ系のヒトスジシマカでチクングニアウイルスに対する感受性は著しく異なっていた。Tesh ら (1976) は 13 系統のヒトスジシマカでチクングニアウイルスに対する感受性を調べている。系統間の比較に感染率を用いているが、13 系統のうちもっとも感染率の高い系統はオアフ系であっ

Fig. 3 Titer distribution of *Aedes albopictus* (Oahu strain) orally infected with 10^2 to 10^5 PFU per mosquito of chikungunya virus.

た。2系統のチクングニアウイルスに対して感受性を調べているが、Ross系に対して71%，Barsi系に対して97%の感染率を示している。この実験に用いたオアフ系のヒトスジシマカも同じ系統の蚊であるが、83%の感染率を示しており、いずれのチクングニアウイルスに対しても高い感受性を示している。一方兵庫系のヒトスジシマカは感染率34%であったが、この値はTeshらの調べた13系統のうち平均に近い値であった。

感染率は感染個体の割合を示すが、感染個体の感受性は示さない。したがって、感染率が同じであっても系統のウイルスに対する感受性は異なる場合も考えられる。たとえば 10^3 PFU/mosq. 感染後のオアフ系と 10^5 PFU/mosq. 感染後の兵庫系の1個体当りのウイルス量の分布にみられるように、感染率が近似していても（オアフ系では50.0%，兵庫系で34.5%），感染個体のウイルス量の分布は異なることも考えられる。

1個体ずつウイルス量を測定して、その分布をみるためには一定数の測定が必要で困難が伴う。McIntosh and Jupp (1970) は dose-response を調べるときに1個体ずつウイルス量を測定しているが、全体で9個体にすぎず、その分布の特徴を言及するにいたっていない。

蚊のウイルスに対する感受性が遺伝的な形質であり、かつ遺伝的に均一な系統であれば感染個体のウイルス量の分布は連続し、二項分布するであろう。このときウイ

ルス量の平均値や感染率による系統間の感受性の比較が有効である。兵庫系のヒトスジシマカのウイルス量の分布は連続性を示したが、オアフ系においてはまったく異なり、非連続な分布であった。今後この系統における遺伝的分析が必要であると思われる。

まとめ

オアフ系と兵庫系のヒトスジシマカのチクングニアウイルスに対する感受性を経口感染により比較した。感染後のウイルス量の変動は兵庫系はいったん下がってから上昇したが、オアフ系は徐々に高くなる傾向が見られた。感染時のウイルス量の差による蚊体内でのウイルス増殖量の変動でもオアフ系がより増殖性が高いことが示された。1個体ずつウイルス量を測定して頻度分布を調べたが、兵庫系ではほぼ連続した分布を示し、非感染個体をもっとも多く、感染個体では 10^3 PFU/mosq. の感受性を示すものが多かった。オアフ系ではウイルス量の分布は連続せず非感染、低増殖性（ $10^3 \sim 10^4$ PFU/mosq.）、高増殖性（ $10^6 \sim 10^7$ PFU/mosq.）の3グループに分かれた。

稿を終えるにあたり、オアフ系の *Aedes albopictus* を分与されたハワイ大学太平洋生物医学研究センターアルボウイルス部 Leon Rosen 博士に感謝の意を表する。

引用文献

- Gubler, D. J. and L. Rosen (1976): Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **25**: 318-325.
- Jupp, P. G., B. M. McIntosh, I. Dos Santos and P. De Moor (1981): Laboratory vector studies on six mosquitoes and one tick species with chikungunya virus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**: 15-19.
- Mangiafico, J. A. (1971): Chikungunya virus infection and transmission in five species of mosquito. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **20**: 642-645.
- McIntosh, B. M. and P. G. Jupp (1970): Attempts to transmit chikungunya virus with six species of mosquito. *J. Med. Entomol.*, **7**: 615-618.
- Tesh, R. B., D. J. Gubler and L. Rosen (1976): Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with chikungunya virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **25**: 326-335.
- 山西 浩 (1982): ヤブカ 類の吸血行動の一観測方

法. 衛生動物, **33** : 17-20.

山西 浩, 小西英二, 沢山俊子, 松村武男 (1983) :
数種の蚊のチクングニアウイルス感受性について. 衛生動物, **34** : 229-233.

Summary

The susceptibility of 2 strains (Oahu and Hyogo strains) of *Aedes albopictus* to oral infection with chikungunya virus was compared. These strains

showed different infection threshold and final content of the virus. Oahu strain was much susceptible than the Hyogo strain. Virus titers in individual mosquito of the Hyogo strain on 14-th day post-infection ranged continuously between 10^1 and 10^3 PFU per mosquito. On the contrary, those of the Oahu strain were fallen into 3 groups such as negative (non-infective), low virus titer (10^3 - 10^4 PFU) and high virus titer (10^6 - 10^7 PFU).