一般講演

1 蚊類のアルボウイルス媒介能(4) ウエストナイルウイルスに対する日本産アカイエカの感受性 ○江下優樹¹、安西三郎¹、高岡宏行¹、高崎智彦²、山田堅一郎³、林 昭宏³、鎌倉和政³、多賀賢一郎³、井村俊郎³、内田幸憲³、倉根一郎² (¹大分医大・感染分子病態制御、²国立感染症研、³神戸検疫所)

ウエストナイル熱は、アフリカ、アジア、ヨーロッパに常在するウエストナイルウイルス(WNV)感染蚊の刺咬・吸血によって起こるアルボウイルス性疾患である。近年、北アメリカでの本症勃発以来、世界的拡大の兆候がある。WNVの媒介蚊種としてアカイエカ群(*Culex pipiens* complex)が含まれる。米国ではトビロイエカ*Cx. p. pipiens*、我国ではアカイエカ*Cx. p. pallens*、チカイエカ*Cx. p. molestus*が生息しており、また琉球列島にはネツタイエカ*Cx. p. quiquefasciatus*が分布している。かつて我国のフィラリア媒介蚊であったアカイエカはウエストナイル熱の防疫上重要な蚊種と推測される。しかし、本種の分布が日本を含む極東アジアであることから、WNVに対する本種蚊の感受性に関する情報は多くない。そこで、本邦産アカイエカ雌成虫にウガンダ産WNVを接種あるいは経口感染後、20~30℃で14日間飼育した蚊を準備した。その後、個別に総RNAを抽出・精製して、RT-PCRを行い、WNVゲノムの有無を調べた。その結果、WNVを成虫胸部に接種後、30℃ 14日間飼育した個体から、フラビウイルス共通プライマーおよびWNV特異的プライマーのいずれを用いてもWNVゲノムがRT-PCRによって検出された。また、30, 25, 20℃で14日間飼育した経口感染蚊から、WNVゲノムがいずれの温度でも検出され、蚊の感染率は、30℃で75%、25℃で12.5%、20℃で42.9%であった。本邦産アカイエカのWNV増殖が認められたことから、ウイルス媒介能を有することが推察される。また、蚊生体にはPCR反応阻害因子が含まれていることから、媒介蚊サーベイランスの実施に際しては、考慮する必要がある。

3 沖縄本島産と西表島産オオハマハマダラカ *Anopheles soperi* の形態及び rDNA の ITS2 領域における塩基配列の比較 ○比嘉由紀子、當間孝子、渡久山有子、宮城一郎 (琉大・医・保健)
Morphological variations and sequences of ITS2 region in rDNA of *Anopheles soperi* from Okinawa Island and Iriomote Island. ○Yukiko Higa, Takako Toma, Yuko Tokuyama and Ichiro Miyagi

1946年と1947年に沖縄本島及び石垣島・西表島からそれぞれ新種として記載された *Anopheles soperi* と *An. ohamai* は成虫翅脈の先白斑、中白斑の長さや幼虫頭部3・Cの分岐数の違いで区別されていた。しかし、その後の研究者らの研究により、(1)先白斑、中白斑の長さに季節変異がみられ、夏季と冬季に両種に同じような変異がみられること、(2)1000サンプル以上に及ぶ3・Cを観察した結果、毛の分岐数は両種でオーバーラップしていることが明らかとなり、現在では、形態的特徴により *An. ohamai* は *An. soperi* のシノニムとして取り扱われている。今回、これまでの形態的観察に加え、遺伝子レベルで沖縄本島産と西表島産 *An. soperi* の違いを比較した。最初に蚊からDNAを抽出し、rDNAの5.8Sと28Sに相補的な塩基配列をもつプライマーを用いてPCRでITS2領域(双翅目昆虫の種間関係を調べるのによく用いられる)を増幅した。PCR産物を精製した後、プラスミドベクターへ組換えし、大腸菌に形質転換した。大腸菌を培養してクローニングを行いITS2領域の塩基配列を調べた。ITS2領域の塩基数は329bpで、沖縄本島産と西表島産 *An. soperi* の塩基配列は全て一致しており、形態学的な観察を支持する結果が得られた。

2 琉球列島産と東南アジア産コガタハマダラカ *Anopheles minimus* の分子生物学手法による比較 ○朴 燕玉、當間 孝子、宮城 一郎 (琉大・医・保健) Study on molecular biology of *Anopheles minimus* from Ryukyu Archipelago and Southeast Asia
○Piao Yanyu, Takako Toma, Ichiro Miyagi

アジアで重要なマラリア媒介蚊コガタハマダラカ *Anopheles minimus* は同胞種 A、B、C、D が報告されている。日本では我々の調査により石垣に多数生息し、宮古島、小浜島、西表島にも個体は少ないが生息している。最近、Somboon 等によって石垣島産はタイプ E と報告されている。同胞種の研究には最近分子生物学手法がよく使われている。本研究は rDNA の高頻度反復領域 ITS2 の塩基配列について調べた。

その結果、琉球列島産の塩基配列はラオスの北部と南部産、台湾産とは異なるタイプで、ラオスの北部産はタイプ A と C で南部はタイプ A であった。

4 フサウンバチイソギンチャク溶血毒の精製と遺伝子クローニング
上地玄一郎¹、當眞 弘¹、新川 武²、佐藤良也¹ (琉球大・¹医・寄生虫、²遺伝子実験センター)

Molecular cloning and characterization of hemolytic toxin from *Actinaria villosa*

Uechi G., Toma H., Arakawa T. and Sato Y.

フサウンバチイソギンチャク (*Actinaria villosa*) はサンゴ様のイソギンチャクで沖縄のサンゴ群付近に生息している。ウンバチイソギンチャク (*Phyllosdiscus semoni*) と同様に刺胞球を持ち、刺されると患部が赤く腫れあがり火傷様の跡が残る。粗毒中には溶血活性のある毒素タンパクが存在し、その活性はウンバチイソギンチャクのもものと類似している。高速液体クロマトグラフィーを用いて溶血活性のあるタンパクを精製した結果、本毒素タンパクは分子量が約 20kDa の塩基性タンパクであり、至適温度は 37℃であることが分かった。また本毒素は酢酸により溶血活性が失活し、スフィンゴミエリンとブレインキューベーションすることにより相対的に溶血活性が阻害されることが分かった。プロテインシーケンサーによりN末端アミノ酸配列を決定後、PCR法を用いて溶血毒遺伝子をクローニングし配列を決定した結果、他のイソギンチャク溶血毒遺伝子と平均46%の相同性が見られ、遺伝子配列から予測されるアミノ酸配列も平均 56%の相同性が見られた。特にトリプトファンリッチな領域は保存性が高く、この部分が溶血活性に関わっているものと推察される。