

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25303020

研究課題名(和文) フィリピンにおけるデング熱媒介蚊の集団遺伝学的研究：飛翔パターンと感染経路

研究課題名(英文) A Landscape Genetic Study of Dengue Vector Mosquitoes in The Philippines: Dispersal Pattern and Infection Route

研究代表者

渡辺 幸三 (Watanabe, Kozo)

愛媛大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：80634435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：フィリピンのメトロマニラとターラックにおいて、デングウイルスを媒介するネッタイシマカ成虫を採捕して、DNA多型解析を行った。その結果、蚊の交流範囲や蚊の飛翔範囲が5 km未満など、デングウイルスの伝播範囲の予測に繋がるベクターの空間生態を明らかになった。また、メトロマニラの全604行政区における洪水強度と土地利用区分に関するGISデータを整備し、これらを説明変数として、行政区間のデング感染率(人口当たり感染数)の違いを記述する回帰木モデルを作成した。高い精度で実測されたデング感染率を説明するモデルが構築され、洪水がリスク因子としての寄与率が高いことも示された。

研究成果の概要(英文)：We assessed the spatial population genetic structure of dengue vector mosquito *Aedes aegypti* in Metro Manila and Tarlac city in the Philippines. The analysis inferred a strong dispersal activity of *Ae. aegypti* based on the observed low genetic differentiation among populations. However, fine scale population structuring was also detected based on the generated dendrogram and the identification of 3 genetic populations. Based on auto-correlation among local populations, their flight distance was estimated < 5km. In addition, we also developed a GIS-based prediction model of local dengue risk focusing on flood intensity and land use classification in all 604 administrative district in Metro Manila. Using these data, we constructed a regression tree model that describes the spatial variation of dengue infection rate of the administrative section. The model was estimated with high accuracy, and flooding has also been shown that a high contribution as a risk factor.

研究分野：生態疫学

キーワード：デング熱 ベクター感染症 集団遺伝 蚊 フィリピン

1. 研究開始当初の背景

デング熱はフィリピンを含む熱帯・亜熱帯地域に広く分布する熱性・発疹性疾患である。デングウイルスはネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) などの蚊によって媒介される。重症化してデング出血熱をきたすと致命的になる場合もある。近年、デング熱は世界的に流行しているが、特にフィリピンでは患者数・死亡者数共に急増しており、その対策が急務とされている。しかし、有効なワクチンはなく、予防策は蚊に刺されないようにすることのみである。したがって、適切な媒介蚊 (ベクター) コントロールや地域住民への注意喚起が強く求められている。

デング熱患者の疫学データが多く集積しているのに対して、媒介蚊の生態学的データは極めて限られている。幼虫 (ボウフラ) が淀んだ水域に生息することは知られているが、成虫の生態には未知な部分が多い。特に、飛翔行動について、成虫の最大飛行距離や、水域から都市への移動経路などの基礎的知見も不明のままとされている。これら知見が科学的に明らかになれば、費用対効果を最大化する殺虫剤散布の経路や時期、さらに近郊でデング熱が大発生した時にアラート (警報) を出す地域住民の範囲設定など、効果的な予防に繋がられる。

従来、蚊に限らず昆虫の飛翔行動はマーク & リキャプチャー法などの古典的な手法で調査することが多かった。しかし、都市全体などの広域に渡る個体追跡は不可能であり、飛翔行動の全容を解明するには十分ではない。これまで研究代表者・渡辺は、同種個体間の遺伝的違いを検出する DNA 多型分析に着目し、ユスリカやトビケラなどの水生昆虫の地域間交流を推定してきた。地域集団間の対立遺伝子頻度の類似性を解析することで、これまで未解明だった地域間移動の強さや経路の推定に成功した。類似する手法をフィリピンのデング媒介蚊に適用すれば、成虫の飛翔経路や距離の全容解明が期待できる。また、これに合わせて、蚊のデングウイルス感染率の地域的違いも明らかにすれば、感染した蚊成虫が多く飛翔している地域や経路を特定できる。

近年、フィリピンでは大洪水が頻発しており、気候変動の影響が推測されている。洪水で土地が冠水すると、蚊の産卵場や幼虫が生息できる淀んだ水域が増えるため、デング流行の要因となる。デング熱患者は毎年 6~9 月の雨期に増加する。蚊成虫の発生源となる水域の位置や面積を、航空写真や GIS 解析で把握することで、洪水によるデング媒介蚊の増加を予測する生態学的モデルを作成できる可能性がある。このモデルは、洪水氾濫 (気候変動) のデング感染リスクの議論へ活用できる。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、デング媒介蚊の都市内の幼虫発生源 (水域) から感染地域への成虫の移動経路と距離を集団遺伝学的アプローチから解明することである。第二の目的は、媒介蚊の感染率を疫学的調査で明らかにし、感染蚊が多く飛翔するエリアを特定することである。第三の目的は、近年フィリピンで頻発している大洪水に伴う媒介蚊個体数 (生息面積) の増加と人のデング感染リスクの関係をモデル化し、感染リスクを予測することである。

3. 研究の方法

本研究は 5 つの研究課題から構成される (図 1)。調査はフィリピンで人口とデング流行度が大きく異なる 2 都市 (マニラ、タクラバン) で行う。課題 1 は各都市において媒介蚊の採取と環境調査を行う。課題 2 は集団遺伝解析により、都市内の蚊の移動経路と距離を解明する。課題 3 は RT-PCR 分析で媒介蚊からデングウイルスを検出し、蚊の感染率が高い地域を明らかにする。課題 4 は水面積と蚊個体数の関係をモデル化し、洪水氾濫のデング感染リスクを評価する。課題 5 は上記成果を統合し、デング熱予防に向けた媒介蚊のコントロール計画案を示す。

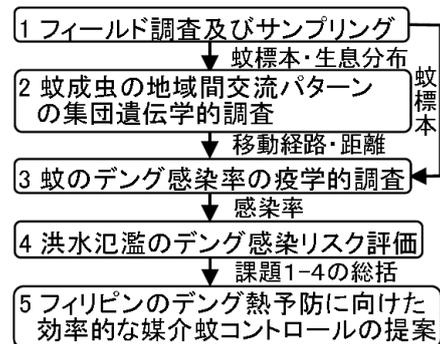


図 1 本研究を構成する研究課題

4. 研究成果

課題 1 「フィールド調査および生物サンプリング」

2014 年 1~12 月にフィリピンのメトロマニラでネッタイシマカのサンプリングを行った (図 2)。南北 42.5km、東西 16.5km の範囲を 125 のグリッドに分割した。そして、モスキートトラップと呼ばれる捕獲口の赤外線蛍光灯により蚊を引きつけ、内部のファンにより採取する機器を使用して蚊の成虫を採取した。モスキートトラップにバッテリーと変圧器を組み合わせ、長時間稼働できるようにした (図 3)。これを屋内もしくは住居敷地内の野外で一晩稼働させ、翌日採取した。採取した蚊は、ピンセットとルーペを用いて

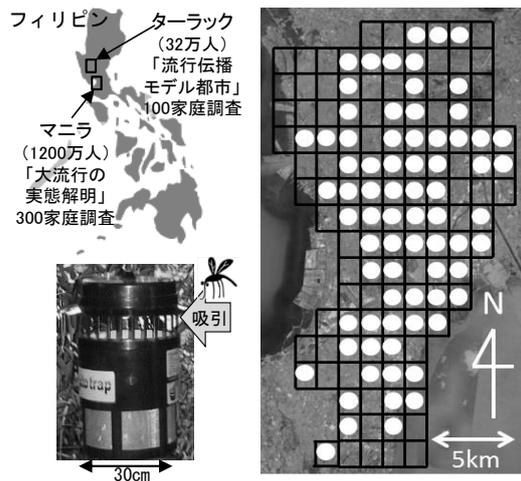


図2 フィリピンのメトロマニラ全域に分布する125グリッドの各3家庭で採取調査を行い、○で示した75グリッドからネットアイシマカを採取した。電動採捕器(左下)で蚊成虫を採取した。



図3 家庭に設置したモスキートトラップ(上写真)と採取した蚊の形態同定の様子(下写真)

形態同定し、ネットアイシマカと他種に分別した。以上の調査の結果、メトロマニラの75グリッドから計725個体のネットアイシマカが採取された。

マニラの北側に車で約3時間の場所に位置するターラックでも同様の調査を行った。2014年2月および2015年9月のそれぞれ約1か月に集中的に蚊の採取調査を行った。

2月は、調査した40家庭から21個体のみネットシマカが採取された。その一方で、デングウイルスを媒介しないイエカ属(*Culex*)クロヤブカ属(*Armigeres*)が多く捕獲された。8月は、デング患者の13家庭を含む49家庭で採取した。その結果、計586個体のネットアイシマカが採取された。フィリピンの乾季(1~2月)にはデングウイルスを媒介しないイエカ属が多く、逆に雨季(8~9月)ではネットアイシマカが増加するという、蚊の種構成に明瞭な季節的消長が明らかになり、雨季に大流行するデング熱の季節変化をモデル化する上で重要な知見が得られた。

課題2「蚊の地域間交流パターンの集団遺伝学的調査」

メトロマニラで採取したネットアイシマカのうち527個体を11個のマイクロサテライトマーカでジェノタイピングした。また、このうち300個体では、翅の幾何学的形態測定解析によるフェノタイピングも行った。これらデータを使って、空間集団遺伝構造を調査した。

マイクロサテライトマーカに基づく遺伝構造の自己相関分析の結果、蚊の交流範囲や蚊の飛翔範囲が5km未満であることが示された。また、75グリッドを地域当たりの解析個体数が30個体以上になるように14地域に集約し、地域間の遺伝距離を調べた(図4)。まず、全体的に地域間の遺伝距離は小さく、メトロマニラ全体で強い遺伝子流動が起こり、集団遺伝構造が均一化していることがわかった。遺伝距離に基づくクラスター分析により、その中でも特に類似した地域グループを見つけた。これら類似グループの都市内での位置から、メトロマニラ広域に渡る長距離の遺伝子流動は幹線道路に沿った経路で起きている可能性が示された。また527個体のマイクロサテライトデータのSTRUCTURE解析の結果、マニラ都市圏の中に5つの遺伝集団が共存していることが示された。また、翅の幾何学的形態測定解析の結果、オス個体よりもメス個体の方が空間遺伝構造が均一化しており、地域間交流が活発に行われている

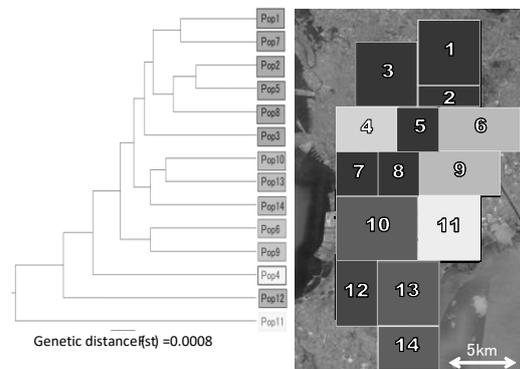


図4 メトロマニラの14地域間の遺伝距離に基づくクラスター分析の結果(左)と遺伝的類似グループの空間分布の結果(右)

ることが示唆された。

課題3 「蚊のデング感染率の疫学的調査」

ターラックの乾季（2014年2月）の調査で採取した21個体のネッタイシマカからRNAを抽出し、デングウイルスの4つの血清型に特異的なプライマーによるRT-PCRと増幅を行った。その結果、いずれの個体からもデングウイルスは検出されなかった。雨季（2015年8月）に採取した計586個体では、ウイルスの検出効率を上げるために、real time RT-PCRによるプロトコルを最適化し、ウイルス陽性サンプルを用いた最適化の確認も行った。雨季サンプルからのウイルス検出は、今後行われることになった。

課題4 「洪水氾濫によるデング感染リスクの評価」

メトロマニラで全604バラングイ（行政区）における4段階の洪水強度と住宅地、産業地域、商業地域、農業地域、水源、森林な

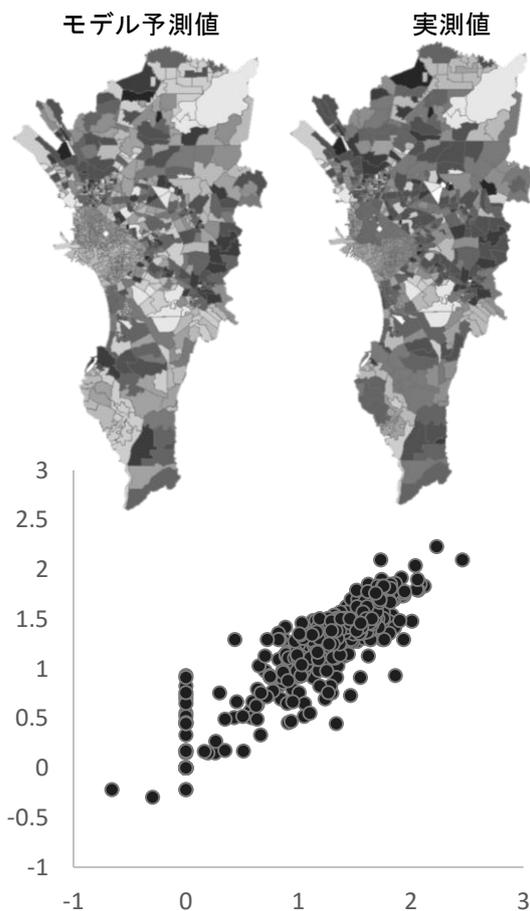


図5 メトロマニラの各バラングイのデングリスク（人口当たりのデング感染者数）。左が本研究で開発した回帰木モデルによる予測値、右は実測値（2012年）。色が濃いバラングイほどデングリスクが高い。下は、モデル予測値（Y軸）と実測値（X軸）の相関図。値はLog10。決定係数 $R^2=0.82$

ど30カテゴリーの土地利用区分の面積率に関するGISデータを整備した。これら31変数を説明変数として、バラングイ間の2012年に観測されたデング感染率（人口当たり感染者数）の空間変動を説明する回帰木モデルを作成した。

その結果、決定係数0.82という高い精度で2012年に実測された各バラングイのデングリスクを説明するモデルが構築された。比較対象として、洪水強度を説明変数に入れないモデルも推定したが、その決定係数は0.65に留まった。このことは、土地利用区分だけではなく、各バラングイの洪水特性も各バラングイのデングリスクを規定する要因として重要であることを説明している。また、商業地などの人が集まりやすい傾向がある土地利用区分の割合が高いバラングイほどデングリスクが高まる傾向も見られた。

課題5 「デング熱の予防に向けた効果的な媒介蚊コントロールの提案」

課題2で明らかにされたデング媒介蚊の遺伝子流動のパターンから、メトロマニラの幹線道路に沿って、強い遺伝子流動が起きている可能性が示唆された。ネッタイシマカが人に近づく修正から、乗車する人間と一緒に自動車等と一緒に移動している可能性が考えられる。このことは、デング患者が多く発生した地域から車両等で遠方に移動する場合には、車内に殺虫剤をするなどの対策が求められる可能性もある。課題4のデング感染リスクモデルの結果は、洪水が起きやすかったり、強度が強い地域ほど、デング感染リスクが高いことを説明している。つまり、洪水が起きやすい地域には、洪水後に住民にアラートを発するなどの対策を施す必要がある。

上記の研究成果を報告する場として、以下二つの研究集会を愛媛大学で開催した。

1) 2013年9月20日に、愛媛大学が主催する形で、本科研プロジェクトを中心とする研究グループらが研究発表を行うデング熱シンポジウム「Broadening Perspectives and Methods in Studying Dengue」をマニラのファー・イースタン大学で開催した。当日は70名以上の学生や若手研究者が集まり、有益な意見交換ができた。



2) 2015年12月にインドネシア・バンドンにおいて、国際シンポジウム“Overview of Facts In The Field Against Mosquitoes, Dengue Virus, Human And Problems in Bandung City”を開催し、気候変動や社会変

動に伴うデング感染リスクに関する研究発表や意見交換を行った。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Thaddeus M. Carvajal, Lara Fides T. Hernandez, Howell T. Ho, Menard G. Cuenca, Bianca Marie C. Orantia, Camille R. Estrada, Divina M. Amalin, and Kozo Watanabe, Spatial Analysis of Wing Geometry in Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti* (L.) (Diptera; Culicidae) Populations in Metropolitan Manila, Philippines, *Journal of Vector Borne Diseases*, Accepted, 2016, 査読有
2. Fuminari Miura, Toru Watanabe, Kozo Watanabe, Kazuhiko Takemoto, and Kensuke Fukushi, Comparative Assessment of Primary and Secondary Infection Risks in a Norovirus Outbreak Using a Household Model Simulation, *Journal of Environmental Sciences*, Accepted, 2016, 査読有
3. Bin Li, Kozo Watanabe, Dong-Hwan Kim, Sang-Bin Lee, Muyoung Heo, Heui-Soo Kim and Tae-Soo Chon, Identification of Outlier Loci Responding to Anthropogenic and Natural Selection Pressure in Stream Insects Based on Self-Organizing Map, *Water*, 8(5), 188, 2016, DOI: 10.3390/w8050188, 査読有
4. Kei Nukazawa, So Kazama, and Kozo Watanabe, A Hydrothermal Simulation Approach to Modelling Spatial Patterns of Adaptive Genetic Variation in Four Stream Insects, *Journal of Biogeography*, 42, 103–113, 2015, DOI: 10.1111/jbi.12392, 査読有
5. Thaddeus M. Carvajal and Kozo Watanabe, Environmental determinants in the control of dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*, Proceedings of 7th ASEAN Environmental Engineering Conference featuring the 5th Seminar on Asian Water Environment, , WW19, 2014, 査読有

6. Toru Watanabe, Kohei Ozawa, Hiroaki Ito, Ryo Honda, Wilai Chiemchaisri, Kozo Watanabe, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* for Its Source Tracking, Proceedings of 7th ASEAN Environmental Engineering Conference featuring the 5th Seminar on Asian Water Environment, ES03, 2014, 査読有
7. 三浦郁修, 渡部徹, 渡辺幸三, 福士謙介, 家庭内二次感染を考慮した下痢症の地域内伝播モデルの構築と検証, 土木学会論文集G(環境), 70(7), III_295-III_304, 2014, 査読有
8. Kozo Watanabe, So Kazama, Tatsuo Omura, and Michael T Monaghan, Adaptive Genetic Divergence along Narrow Environmental Gradients in Four Stream Insects, PLoS ONE, 9(3), e93055, 2014, 査読有
9. 高瀬陽彦, 糠澤桂, 風間聡, 渡辺幸三, 分布型水文モデルと確率密度関数を用いた底生動物の生息環境および種多様性評価, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.70, No.4, I_1297-I_1302, 2014, 査読有
10. 糠澤桂, 風間聡, 高瀬陽彦, 渡辺幸三, 水生生物の生息場適性度と遺伝的多様性の関係, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.70, No.4, I_1405-I_1410, 2014
11. Sakiko Yaegashi, Kozo Watanabe, Michael T Monaghan, and Tatsuo Omura, Inferring Fine-scale Dispersal in the Caddisfly *Stenopsyche marmorata* (Trichoptera; Stenopsychidae) Using Spatial Autocorrelation of Microsatellite Markers, *Freshwater Science*, Vol. 33, No. 1, 172-180, 2014, 査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. Kozo Watanabe, Advancement of genome analysis in aquatic insects, Seminar for Genetics-Ecology-Evolution-Modeling, Busan (South Korea), 2016. 3.19
2. Kozo Watanabe, Climate change detected by molecular ecology and evolution, Seminar for Genetics-Ecology-Evolution-Modeling, Busan (South Korea), 2016. 3.18
3. Thaddeus M. Carvajal, Howell T. Ho, Yoshiki Kubo, Lara Fides Hernandez, Katherine Viacrusis, Divina Amalin, Kozo Watanabe, Impacts of Climate Change on Dengue in Metro Manila, Philippines, Symposium on Climate Change

- Adaptation in Indonesia, Balli (Indonesia), 2016. 3.11
4. Thaddeus M. Carvajal, Kohei Ogishi, Sakiko Yaegeshi, Lara Fides T. Hernandez and Katherine M. Viacrusis, Kozo Watanabe, Genetic inference of spatial dispersal pattern of dengue vector mosquito *Aedes aegypti* in Metro Manila, Philippines, 3rdJSPS-AASPP/GRENE-EcoHealth joint International Symposium on Development of International Network on Health Risk Assessment in Urban Area, Balli (Indonesia), 2016. 3.11
 5. Kozo Watanabe, Eco-epidemiologic Study of Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*, In The Philippines., Seminar on the Overview of Facts In The Field Against Mosquitoes, Dengue Virus, Human And Problems in Bandung City, Bandung (Indonesia), 2015. 12.8
 6. 大岸航平, Thaddeus M. Carvajal, 八重樫咲子, 渡辺幸三, マイクロサテライトマーカーを用いたマニラのデング熱媒介蚊の遺伝子流動の評価, 応用生態工学会第19回大会, 日本大学 (福島県・郡山市), 2015. 9.10
 7. 大岸航平, Thaddeus M. Carvajal, 渡辺幸三, フィリピンのターラックシティにおけるデング熱媒介蚊の RNA を用いたウイルス検出, 土木学会四国支部第21回技術研究発表会, 香川大学 (香川県・高松市), 2015. 5.23
 8. Thaddeus M. Carvajal, 渡辺幸三, Population biology and ecology of dengue vector mosquito, *Aedes aegypti* in Metro Manila, Philippine and its implications towards vector control and prevention, 第2回環境水質工学シンポジウム, 山形大学 (山形県・鶴岡市), 2015. 5.9
 9. Carvajal Thadeus, Watanabe Kozo, Environmental Determinants in the Control of Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*, 7th ASEAN Environmental Engineering Conference featuring the 5th Seminar on Asian Water Environment (Asian Core Program of JSPS, NRCT and EEDT), Palawan (Philippines), 2014. 11.21
 10. Thaddeus M. Carvajal, 渡辺幸三, Environmental Determinants in the Control of Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*, 5th Forum of Network Association of Microbiologists in Ehime, 愛媛大学 (愛媛県・松山市), 2014. 10.25
 11. 大岸航平, Thaddeus Carvajal, 渡辺幸三, マニラにおけるデング熱媒介蚊の遺伝子流動の評価を目的とした DNA 抽出及び PCR の最適化, 土木学会四国支部第20回技術研究発表会, 徳島大学 (徳島県・徳島市), 2014. 5.31
 12. Kozo Watanabe, Thaddeus M. Carvajal, The Use of Population Genetics on Dengue Mosquitoes for Effective Vector Control in Manila, Philippines, JSPS-AASPP/GRENE-EcoHealth joint International Symposium on Development of International Network on Health Risk Assessment in Urban Area, Hue (Vietnam), 2013. 12.15
 13. Kozo Watanabe, Population genetics in the dengue surveillances: Dispersal pattern of mosquitoes, JSPS International Symposium on Broadening Perspectives and Methods in Studying Dengue, Manila (Philippines), 2013. 9.20
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
○出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
ホームページ等
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
渡辺 幸三 (WATANABE, Kozo)
愛媛大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 80634435
 - (2) 研究分担者
大村 達夫 (OMURA, Tatsuo)
東北大学・未来科学技術共同研究センター・教授
研究者番号: 30111248

渡部 徹 (WATANABE, Toru)
山形大学・農学部・教授
研究者番号: 10302192
 - (3) 連携研究者
押谷 仁 (OSHITANI Hiroshi)
東北大学・医学研究科・教授
研究者番号: 30111248

齊藤 麻理子 (YAEGASHI Sakiko)
東北大学・医学研究科・助教
研究者番号: 30111248