

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06421

研究課題名(和文)メタボローム解析による昆虫体内フィラリア感染幼虫の効率的検出法の開発とその応用

研究課題名(英文)Development of a metabolomics-based detection method of filarial infective larvae from blood-sucking insects

研究代表者

福田 昌子(FUKUDA, Masako)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：00156788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：人獣共通オンコセルカ(フィラリア)症の感染予防には、フィラリアの媒介者(吸血性昆虫)の検索が不可欠である。昆虫内のフィラリア感染幼虫(第3期幼虫)を、メタボローム解析により効率的に検出する方法の開発を試みた。感染実験により昆虫内でフィラリア幼虫を4つの発育ステージ(ミクロフィラリア、第1期幼虫、第2期幼虫、第3期幼虫)まで生育させた。各幼虫の代謝物をトリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS/MS)で測定し多変量解析した結果、4種の幼虫を区別することができた。メタボローム解析が媒介者検索の有用な手段となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

吸血性昆虫内の感染幼虫を顕微鏡下で形態観察により同定する従来の媒介者検索法は煩雑であった。そのため人獣共通オンコセルカ(フィラリア)症の伝播サイクルの解明は進んでいなかった。メタボローム解析による今までにない効率的なフィラリア感染幼虫の検出法が実用化できれば、媒介者の検索が容易になる。本症の感染予防を促進するだけでなく、新たな人獣共通フィラリア症発生の可能性を予測することにも寄与できる。

研究成果の概要(英文)：To prevent zoonotic filarial infections, searching for the natural vectors (blood-sucking insects) of filariae is needed. We tried to develop a novel efficient method for the detection of filarial third-stage larvae from blood-sucking insects. Microfilariae of *Onchocerca japonica* (the causative agent of zoonotic onchocercosis in Japan) were injected intrathoracically into newly-emerged black flies for larval development. Metabolites in microfilariae, first-, second-, and third-stage larvae obtained from the flies were analyzed using a gas chromatography-mass spectrometer. Multivariate analysis of the data showed the complete separation of the four developmental stage groups. Metabolome analysis may be a useful tool for detection of filarial third-stage larvae.

研究分野：衛生動物学、医昆虫学

キーワード：メタボローム解析 吸血性昆虫 ブユ フィラリア感染幼虫 野生動物 人獣共通オンコセルカ症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物に寄生するオンコセルカ（フィラリア、糸状虫）の人体感染が、新興人獣共通感染症として世界的に増えている。吸血性昆虫が媒介者となる本症の感染予防には、起因種であるフィラリアの生活史の解明、すなわち媒介者の検索が不可欠である。しかし、人獣共通感染症の観点から、フィラリア、宿主動物および媒介者を包括的に調査した研究はほとんどなかった。

(2) 動物に寄生するフィラリアの幼虫（マイクロフィラリア）は、昆虫が動物を吸血する時に取り込まれ、昆虫体内で第1期幼虫、第2期幼虫、第3期幼虫（感染幼虫）へと発育を遂げ、次に昆虫がヒトを吸血する時に感染する。フィラリアの媒介者の検索には、野外採集した吸血性昆虫を個別に顕微鏡下で解剖し、フィラリアの第3期幼虫を見だし、形態的に同定する必要がある。形態観察でしか第3期幼虫を確認する方法がないため、その煩雑さが媒介者検索の障害となっていた。

(3) 人獣共通オンコセルカ症が日本で初めて報告された大分県では、我々の調査により、媒介者が吸血性昆虫ブユであることが分かっている。しかし、その他の県では媒介者や本症の有無そのものが不明であったため、本症の予防と発生の予測をするためには媒介者の検索が急務であった。

2. 研究の目的

(1) メタボローム解析による新しい媒介者検索法の開発

生体反応の結果生じる代謝物の変動を調べるメタボローム解析を利用して、吸血性昆虫内のフィラリア感染幼虫を、形態観察に頼らずに効率的に検出する全く新しい媒介者検索法を開発する。

(2) ブユのフィラリアの自然感染の調査

① 奄美大島におけるブユの吸血源とフィラリア感染調査

新しい媒介者検索法を応用するために、予めブユの吸血被害のある地域でブユ採集を行い、従来法を用いてフィラリアの自然感染の調査を行なう。奄美大島の山間部ではブユによる吸血被害が知られている。ブユは本州や九州では動物に寄生する *Onchocerca* 属のフィラリアを媒介しているが、奄美大島では詳細は明らかになっていないので、奄美大島でのブユのフィラリアの媒介状況を明らかにする。

② ブユ種の分類

フィラリアの媒介者を決定するにはブユ種の正確な同定が重要である。日本のアカクラアシマダラブユ *Simulium rufibasis* は人吸血嗜好性で、感染実験によりイノシシ寄生性 *Onchocerca japonica*（日本の人獣共通オンコセルカ症起因種、2020年に亜種 *O. dewittei japonica* から種に引き上げられた）のマイクロフィラリアを体内で第3期幼虫まで発育させる能力を有することが分かっているため、人獣共通オンコセルカ症の媒介者となりうる。本ブユ種は東洋区および旧北区に生息する広域分布種で、形態的に類似した複数の種からなる可能性があるため調査を行う。

3. 研究の方法

(1) メタボローム解析による新しい媒介者検索法の開発

大分県のイノシシの皮膚から採取した *O. japonica* のマイクロフィラリアを、蛹から羽化させたブユ雌成虫の胸部に注入し、ブユを飼育した。経時的にブユを解剖し、取り出したマイクロフィラリア、第1期幼虫、第2期幼虫および第3期幼虫（感染幼虫）をメタボローム解析用試料とした。マイクロフィラリアはイノシシから直接採取したものも試料とした。試料を前処理・誘導体化し、トリプル四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS/MS）で、代謝物成分（469化合物）の測定を行った。得られたデータを用いて多変量解析（SIMCA13）によるメタボローム解析を行い、4種類の発育ステージの幼虫群を区別できるか調べた。さらに、S-plot法を行い各幼虫2群間で大きく変動した代謝物を抽出し、それらをパスイエイ解析（MetaboAnalyst5.0）した。

(2) 奄美大島におけるブユの吸血源とフィラリア感染調査

奄美大島湯湾岳近くでブユ雌成虫を人囮法で採集し、フィラリアの検索と吸血源の同定を試みた。採集したブユは80%アルコールに入れ研究室に持ち帰り、顕微鏡下で解剖を行った。解剖した個体の中で腸管に血液を保持する個体について、血液からDNAを抽出し、ミトコンドリア cytochrome *b* 領域および16SリボソームRNA領域のPCR増幅により吸血源を同定した。

血液にフィラリアが含まれているかを確認するために、フィラリアのミトコンドリア COI 領域の PCR を行い、塩基配列を決定し、他のフィラリア種との近縁関係を調べた。

(3) ブユ種の分類

日本各地で採集したアカクラアシマダラブユ成虫のミトコンドリア COI 遺伝子の一部領域の塩基配列を決定し、タイと台湾における同種および類似種と比較した。同時に形態観察と染色体分析も行った。

4. 研究成果

(1) メタボローム解析による新しい媒介者検索法の開発

ブユの感染実験により得られた *O. japonica* のマイクロフィラリア、第1期幼虫、第2期幼虫および第3期幼虫をメタボローム解析した結果、4種類の幼虫が4群に分かれた。(図1)。さらに、各2群間の違いを S-plot 法で解析した。形態的に最も異なるマイクロフィラリアと第3期幼虫の2群間の S-plot 図を図2に示した。青と赤の点がそれぞれの群で有意に変動した代謝物で、下の表にその名前を示した。この群間では Hydroxylamine, Thymine などが変動していた。同様に他の2群間でも解析した結果、マイクロフィラリアと第1期幼虫間では Thymine、マイクロフィラリアと第2期幼虫間では Thymine, Adenine、第1期幼虫と第2期幼虫間では Phosphoric acid, Acetoacetic acid、第1期幼虫と第3期幼虫間では Hydroxylamine, Acetoacetic acid、第2期幼虫と第3期幼虫間では Hydroxylamine, 2-Hydroxybutyric acid などが有意に変動していた。6つの2群間の比較をまとめた結果、有意に変動した代謝物として Hydroxylamine, 2-Hydroxybutyric acid, Thymine, Acetoacetic acid, Phosphoric acid, Adenine など合計55化合物が抽出された。これらの代謝物をパスウェイ解析すると、アミノアシル tRNA 合成、グルタミン酸代謝、アラニン・アスパラギン酸・グルタミン酸代謝などの代謝経路中の化合物が、各発育ステージ幼虫群間の差に関与している可能性があることが分かった。アミノ酸の合成経路が亢進していることが示唆された。また、マイクロフィラリアには Thymine, Adenine, Uracil, Hypoxanthine などの核酸類が特徴的に見られた。今後さらにデータを精査する予定である。

現在、野外で採集したブユからメタボローム解析で *O. japonica* 第3期幼虫を実際に検出できるかも解析中である。もし本法を用いて、自然界で採集したブユから動物への感染力を有するフィラリア第3期幼虫を検出できるようになれば、顕微鏡下でブユを解剖して第3期幼虫を探す必要がなくなり、作業の煩雑な形態観察による同定に頼らずに感染幼虫(第3期幼虫)を検出することができるようになる。この方法が実用化できると人獣共通フィラリア症の伝播サイクルの解明(媒介昆虫種の決定)や発生の予測(媒介昆虫存在の証明)が容易になり、新しい効率的な媒介者検索法の開発として画期的な成果となる。

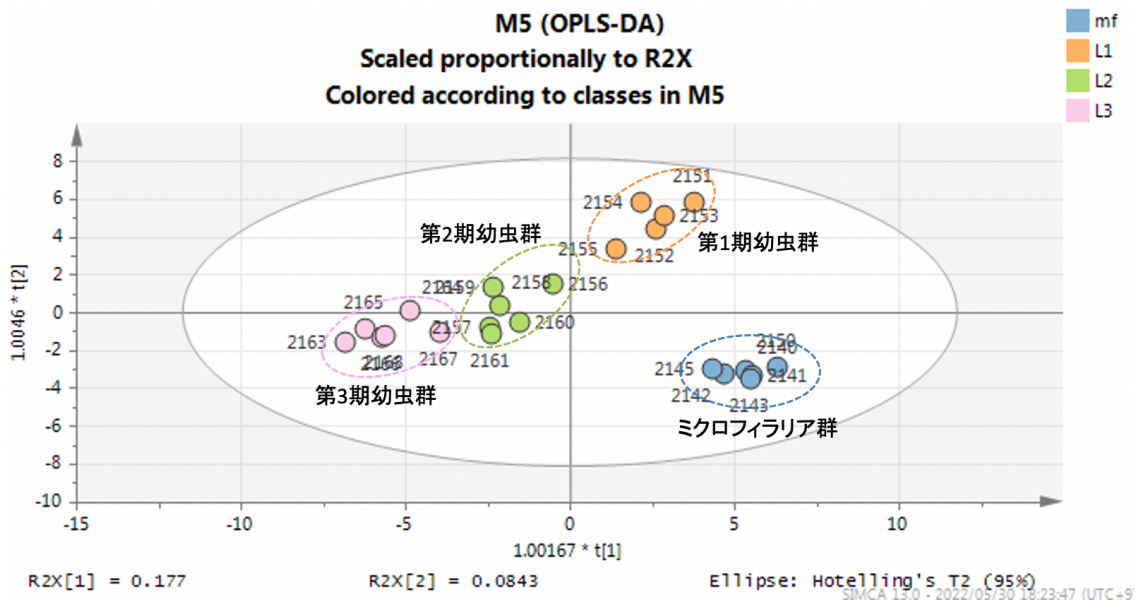
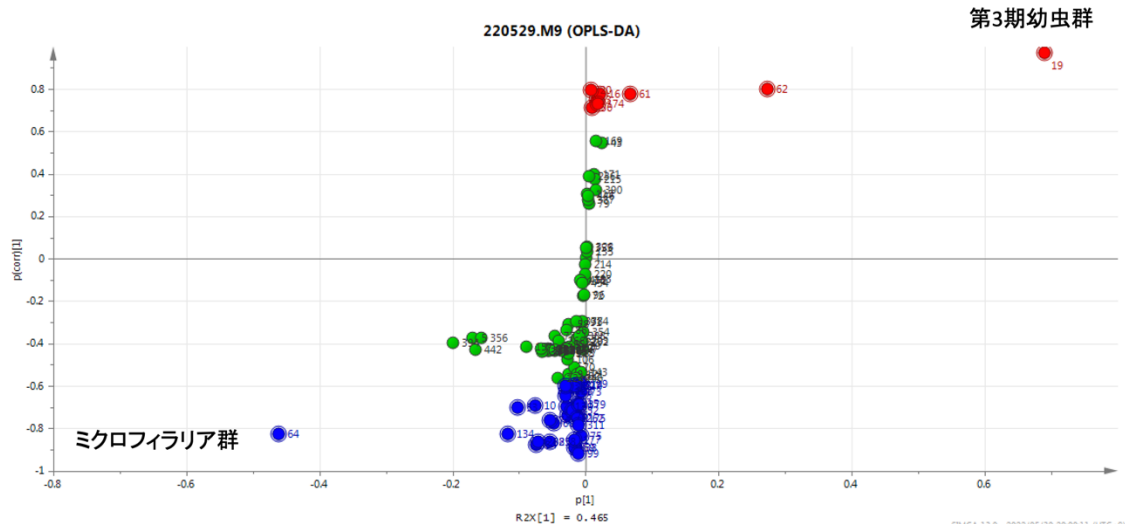


図1 *Onchocerca japonica* 幼虫のメタボローム解析 (Score Plot)



| マイクロフィラリア群から抽出された化合物 | | | | 第3期幼虫群から抽出された化合物 | | | |
|----------------------|-----------------------------|-------------|---------------|------------------|-------------------------------|------------|---------------|
| Var ID (Primary) | Var ID (化合物名) | M9.p[1] | M9.p(corr)[1] | Var ID (Primary) | Var ID (化合物名) | M9.p[1] | M9.p(corr)[1] |
| 99 | Thymine-2TMS | -0.01093930 | -0.920583 | 19 | Hydroxylamine-3TMS | 0.69027600 | 0.970033 |
| 59 | Acetoacetic acid-oxime-2TMS | -0.01614420 | -0.890851 | 62 | 2-Aminoethanol-3TMS | 0.27239600 | 0.799821 |
| 38 | Malonic acid-2TMS | -0.01453570 | -0.889169 | 20 | 2-Hydroxybutyric acid-2TMS | 0.00872018 | 0.794706 |
| 84 | Uracil-2TMS | -0.07376600 | -0.878903 | 61 | Glycerol-3TMS | 0.06757360 | 0.775700 |
| 288 | Adenine-2TMS | -0.07181910 | -0.865280 | 16 | Oxalic acid-2TMS | 0.02145970 | 0.775548 |
| 258 | Hypoxanthine-2TMS | -0.05290800 | -0.862938 | 3 | 2-Aminoethanol-2TMS | 0.01671080 | 0.751039 |
| 177 | 4-Hydroxybenzoic acid-2TMS | -0.01739370 | -0.852265 | 174 | Cadaverine-3TMS | 0.01876180 | 0.730372 |
| 75 | Phenylacetic acid-TMS | -0.00587332 | -0.837530 | 30 | 3-Hydroxyisobutyric acid-2TMS | 0.00960788 | 0.712445 |
| 134 | 5-Oxoproline-2TMS | -0.11663100 | -0.828279 | | | | |
| 64 | Phosphoric acid-3TMS | -0.46156000 | -0.827058 | | | | |
| 311 | Lysine-4TMS | -0.01047040 | -0.786703 | | | | |
| 60 | Octanoic acid-TMS | -0.04712320 | -0.773454 | | | | |
| 74 | Proline-2TMS | -0.05383900 | -0.761195 | | | | |
| 262 | Arginine-3TMS | -0.01245370 | -0.754098 | | | | |
| 175 | Glutamic acid-3TMS | -0.00898462 | -0.751764 | | | | |
| 76 | Succinic acid-2TMS | -0.02659790 | -0.737219 | | | | |
| 232 | Putrescine-4TMS | -0.01912620 | -0.715939 | | | | |
| 53 | Urea-2TMS | -0.10160900 | -0.702829 | | | | |
| 130 | Aspartic acid-3TMS | -0.02848800 | -0.697474 | | | | |
| 10 | Caproic acid-TMS | -0.07631450 | -0.690059 | | | | |
| 379 | Guanine-3TMS | -0.00986908 | -0.688862 | | | | |
| 15 | Glycine-2TMS | -0.01096260 | -0.682148 | | | | |
| 325 | 1-Hexadecanol-TMS | -0.03062060 | -0.647428 | | | | |
| 73 | Maleic acid-2TMS | -0.00612875 | -0.625345 | | | | |
| 128 | 3-Aminoglutaric acid-2TMS | -0.02850110 | -0.621735 | | | | |
| 383 | Octadecanol-TMS | -0.03071570 | -0.599809 | | | | |
| 327 | Tyrosine-3TMS | -0.01636270 | -0.597742 | | | | |
| 314 | Tyramine-3TMS | -0.01404860 | -0.594740 | | | | |
| 199 | Homocysteine-3TMS | -0.00626365 | -0.590944 | | | | |

図2 *Onchocerca japonica* のマイクロフィラリアと第3期幼虫のメタボローム解析 (S-plot)

(2) 奄美大島におけるブユの吸血源とフィラリア感染調査

アシマダラブユ (*S. japonicum*) 813 個体、オキナワナンヨウブユ (*S. okinawense*) 4 個体、ミエツノマユブユ (*S. mie*) 1 個体を顕微鏡下で解剖したが、フィラリア幼虫は検出されなかった。解剖した個体の中で腸管に血液を保持する個体について、血液から DNA を抽出し、ミトコンドリア cytochrome *b* 領域および 16S リボソーム RNA 領域の PCR 増幅により吸血源の同定を試みた。その結果、アシマダラブユ 23 個体の保有していた血液を同定し、21 個体はブタ・イノシシ、2 個体はヒトであった。さらに、これらの血液にフィラリアが含まれているかを確認するために、フィラリアのミトコンドリア COI 領域の PCR を行ったところブタ・イノシシと同定された 2 個体の血液からフィラリア DNA を検出した。その塩基配列を比較したところイノシシに寄生する *O. japonica* と最も近く、その違いは 0.5-1.2% であった。今回はブユ雌成虫からフィラリア幼虫が検出されなかったが、アシマダラブユは *Onchocerca* 属フィラリアを保有するブタ・イノシシを吸血していることから、今後は顕微鏡下またはメタボローム解析でそのフィラリアの第3期幼虫の検出を目指し、媒介者を決定していきたい。

(3) ブユ種の分類

日本のアカクラアシマダラブユの COI 遺伝子の塩基配列は既知のどの配列とも一致しなかった。形態観察と染色体分析の結果も同様であった。さらに、タイのアカクラアシマダラブユよりも台湾の *S. arisanum* と近縁で、新種であることが分かった。日本のアカクラアシマダラブユを新種 *S. yamatoense* として記載した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Takaoka Hiroyuki, Otsuka Yasushi, Huang Yao-Te, Low Van Lun, Fukuda Masako, Ya'cob Zubaidah | 4. 巻 227 |
| 2. 論文標題 Descriptions of two new species of the Simulium (Simulium) striatum species-group (Diptera: Simuliidae) from Taiwan and Japan, and a revised description of S. (S.) quinquestriatum (Shiraki) | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Acta Tropica | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actatropica.2021.106293 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Uni Shigehiko, Fukuda Masako, Uga Shoji, Agatsuma Takeshi, Nakatani Jun, Suzuki Kazuo, Yokohata Yasushi, Kimura Daisuke, Takaoka Hiroyuki | 4. 巻 83 |
| 2. 論文標題 Prevalence of Onchocerca japonica and O. takaokai infections in the Japanese wild boar, Sus scrofa leucomystax, and the Ryukyu wild boar, S. s. riukiuanus, in Japan | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Parasitology International | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2021.102313 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Fukuda Masako, Uni Shigehiko, Igari Takahiro, Utsumi Yasufumi, Otsuka Yasushi, Nakatani Jun, Uga Shoji, Hara Tatsuru, Hasegawa Hideo, Takaoka Hiroyuki | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Human case of Onchocerca dewittei japonica infection in Fukushima, Northeastern Honshu, Japan | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Parasitology International | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101943 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Adler Peter H, Fukuda Masako, Takaoka Hiroyuki, Reeves Will K, Kim Sam-Kyu, Otsuka Yasushi | 4. 巻 57 |
| 2. 論文標題 Revision of Simulium rufibasis (Diptera: Simuliidae) in Japan and Korea: Chromosomes, DNA, and Morphology | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Medical Entomology | 6. 最初と最後の頁 388 ~ 403 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jme/tjz197 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 大塚靖、福田昌子、高岡宏行 |
| 2. 発表標題 奄美大島で採集したブユの吸血源とフィラリア感染について |
| 3. 学会等名 第74回日本衛生動物学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 福田昌子 |
| 2. 発表標題 ブユを利用した人獣共通オンコセルカ症の検索 |
| 3. 学会等名 第73回日本衛生動物学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 大塚靖 |
| 2. 発表標題 鹿児島県中之島のブユ対策の現状と今後について |
| 3. 学会等名 日本島嶼学会2020年次大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 福田昌子、大塚 靖、高岡宏行 |
| 2. 発表標題 日本のアカクラアシマダラブユ <i>Simulium rufibasis</i> の遺伝子解析 |
| 3. 学会等名 第71回日本衛生動物学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 大塚 靖 |
| 2. 発表標題 鹿児島県中之島の秋季におけるブユ対策について |
| 3. 学会等名 第71回日本衛生動物学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yasushi Otsuka |
| 2. 発表標題 Black fly control in Nakanoshima-Island, Kagoshima Prefecture, Japan |
| 3. 学会等名 The 7th East Asia Island and Ocean Forum (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Yasushi Otsuka, Ryuta Terada, Satoru Nishimura | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 Hokuto Shobo | 5. 総ページ数 163 |
| 3. 書名 The Tokara Islands: Culture, Society, Industry and Nature | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|--|----|
| 研究 分担者 | 大塚 靖 (Otsuka Yasushi) (00244161) | 鹿児島大学・総合科学域総合研究学系・准教授 (17701) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 高岡 宏行 (Takaoka Hiroyuki) | | |
| 研究協力者 | 酒井 久美子 (Sakai Kumiko) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |