

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22405038

研究課題名(和文)ベクター“フローラバーコード”解析による病原体伝播能予測モデル

研究課題名(英文)The estimation model of vectorial capacity depend on midgut flora in mosquito.

研究代表者

福本 晋也 (Fukumoto, Shinya)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：50376422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は西アフリカ・ブルキナファソを調査対象国とし、病原体媒介ベクターの腸内フローラと病原体伝播能の相関関係を明らかにしようとするものである。ベクター媒介性感染症のモデルとしてマラリアを用い、ベクターであるハマダラカの腸内フローラ、ベクター病原体保有率、感染症発生状況等の情報を包括的に解析し病原体の媒介メカニズムを明らかにすることを目的とするものである。

調査の結果ハマダラカの腸内細菌の表現型多様性がマラリア原虫の感染性に対して影響を与えていることが明らかとなった。この結果はベクター腸管が侵入門戸となる他のベクター媒介性病原体についても応用可能な有用な知見であることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to investigate the correlation of midgut flora of malaria vector and vectorial capacity in anopheline mosquito of Burkina Faso. We analyzed the vector flora, prevalence in vector, and prevalence in human using Malaria as the study model for vector-borne diseases. As the result of the survey, it was demonstrated that the phenotypic variation of vector flora correlated to vectorial capacity of the mosquitoes. This finding indicated that artificial flora manipulation strategy to the vector insects is useful for the control of vector-borne diseases.

研究分野：節足動物感染免疫学

キーワード：ベクター 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

蚊やダニに代表される節足動物ベクターは、ウイルス・細菌・寄生虫など、各種の病原体を媒介し、獣医学領域上重要なものとして、日本脳炎・ウエストナイル熱・バベシア・フィラリアなどが挙げられる。感染症対策上、一般的な感染症では動物宿主間で直接的に病原体が伝播するため、この2者関係のみを念頭に置けば良い。一方、ベクターが介在する感染症では、動物宿主間の関係だけではなく、ベクターと動物の相互関係についても考慮する必要があり、そのコントロールは飛躍的に難しくなる。一例として、我が国におけるイヌフィラリア症は感染防御が可能な予防薬が一般的に使用されているのにも関わらず、この感染症は未だ淘汰されていない。また、アメリカ合衆国においても、約10年前に蚊媒介性感染症のウエストナイル熱が侵入して以降、その被害は拡大し続けている。これらの感染症が、先進諸国においても依然として猛威を振るい続けられるのは、ベクターによって媒介されるというその際だった生物学的特徴による。感染動物に治療を施したとしても、病原体はベクターの体内にリザーブされ、そこから新規の感染が生み出される。また、少数の未治療キャリアが数多くのベクターへの病原体リソースとなってしまう。したがって生物界を包括的にとらえた場合、限局的な対策のみでは有効的な病原体保有生物の個体数削減には至らず、コントロールが非常に困難なのである。

上述の理由から、ベクター媒介性感染症の対策には、動物宿主側のみならず、ベクター側のコントロールが重要となる。ベクターによる病原体の伝播は、吸血行動の反復による機械的なものではなく、その体内での病原体の多様なライフサイクルの結果としてもたらされる。また、ベクターと病原体の間には特異的な種間関係が存在し、その適合の結果、初めて吸血生物はベクターとして機能し、病原体の伝播に寄与することができる。種間関係の特異性は病原体・ベクター両者が持つ様々な因子の相互作用の結果として生じ、その複雑な相関関係の結果として感染症の伝播が初めて成立する。この複雑な関係を規定する因子の大部分は未だ未解明なのが現状であり、その解明は、ベクター媒介性感染症を制圧するにあたり、極めて重要な知見となる。

申請者らは、病原体とベクターの種間関係を規定する因子の一つとして、腸管内環境に着目した。ベクターの腸管は各種病原体に共通する最初の侵入門戸であり、その内部環境は病原体の伝播に対して極めて重要であると推測される。そこで申請者らは、この仮説を検証するため、ハマダラカとマウスマラリア原虫をモデルとして、実験的に腸内フローラが存在しない蚊と、人為的に腸内フローラをマニピレートした蚊に

おいて、マラリア原虫の感染表現型を解析した。その結果、腸内フローラの存在により、ハマダラカに対するマラリア原虫の感染数が20%程度に減少することを明らかにした。また、同一バクテリア種においても、株によってマラリア原虫感染に対し抑制型・非抑制型の2種が存在することを発見した。この結果は蚊の腸内フローラが病原体とベクターの2者関係を規定する因子として関与していること明らかにするものであり、さらに腸内フローラ構成の違いがベクターの病原体伝播能をコントロールする因子として機能していることを示すものであった。

2. 研究の目的

申請者らは、このような現象がフィールドの病原体媒介ベクターにも存在し、腸内フローラの解析により病原体伝播能を予測可能なのではないかと推測した。腸内フローラと病原体伝播能の関係を解明するには、腸内フローラ・ベクター病原体保有率・感染症発生状況の3つの情報を統合的に解析する必要がある。ベクター媒介性感染症の多くは開発途上国で発生し、獣医学上問題となっている感染症においては、このような点に関して信頼性の高い情報が担保されない。そこで申請者らはマラリアに着目した。マラリアは現在もなお年間200万人程度の死者を出す最も被害が深刻なベクター媒介性感染症であり、開発途上国においても疫学情報基盤が比較的整備されている。申請者らは、全世界のマラリア死者の9割を輩出するサブサハラアフリカ地域に位置し、マラリア汚染地帯の中心となっているブルキナファソを調査対象国とした。ブルキナファソでは乾燥地帯に集落が点在する形で存在し、各集落群のベクター蚊は独立した環境で生息している。

そこで本研究では、ハマダラカとマラリア原虫をベクター媒介性感染症のモデルとし、腸内フローラと病原体伝播能の関係を明らかにするため、ブルキナファソ国の複数の独立集落でハマダラカをサンプリングし、そのフローラ構成の詳細を解析する。調査によって得られた情報、すなわち、フローラを構成する細菌種・ポピュレーションなどの情報を多次的に収集し、ベクター“フローラバーコード”として蓄積する。フローラバーコードとハマダラカ病原体保有率・感染者発生数などの情報の総合的な解析により、フローラバーコードと病原体伝播能の相関関係を明らかにすることで、病原体媒介能予測モデルを樹立し、ベクター媒介性感染症の制圧に向けた基盤的知見の整備を目的として研究を展開することとした。

3. 研究の方法

申請者らのこれまでの研究から、腸内フ

ローラがベクターに対する病原体感染の制御因子として機能していることが明らかとなった。また、“フローラバーコード”と病原体伝播能に何らかの相関関係の存在することが予備調査により推測された。そこで、フローラバーコードと病原体伝播の相関関係を明らかにするため、西アフリカ・ブルキナファソにおいて独立集落よりハマダラカを採集する。各ポイントで採集されたハマダラカの腸内フローラ、マラリア原虫感染率の解析、患者発生情報を収集する。これらの情報の統合的解析により、ベクターのフローラバーコードと病原体伝播能の相関関係を明らかにすることとした。現地研究協力者と研究機関による現在までの研究により、ブルキナファソ・中部地方に点在する独立集落間において、ハマダラカのマラリア原虫保有率に有意な差が存在することが明らかとなっている。この情報を基盤とし、ハマダラカのマラリア原虫保有率によって各集落を分類し、調査対象集落を選定した。ハマダラカのサンプリングは主として家屋内殺虫剤噴霧法により実施した。ハマダラカ成虫は主として民家内に生息するため、家屋内での採集が最も効率的である。調査対象地域では一軒の家屋(20平米程度)から、平均100匹程度のハマダラカが採集可能であった。一集落につき1,000匹のハマダラカを解析単位として研究に供した。ハマダラカのマラリア原虫感染率を明らかにするため、次世代の感染を惹起可能なスポロゾイトと呼ばれるステージの原虫が存在する蚊の頭部のみを検体として用い、原虫感染率の解析を実施した。本解析は、ブルキナファソから日本への蚊サンプル輸送が法的・物理的問題から困難なこと、現地研究協力者が十分な経験を有していること、などの点を勘案して現地研究機関で実施した。サンプル処理数を考慮すると、PCRによる従来法では、現地研究機関保有機器の処理能力から問題が生じる。この問題を解決するため、PCR法に変わる遺伝子検出法としてLAMP法を採用した。LAMP法は60程度の一定温度下で遺伝子増幅が可能であり、PCR法のようにサーマルサイクラーなどの高額機器を必要とせず、ウォーターバスなどの安価な装置で遺伝子検査が可能である。また、遺伝子増幅の反応副産物としてマグネシウム塩結晶による反応液の白濁が起こるため、遺伝子断片増幅の有無を目視により判定が可能である。したがって、電気泳動法による解析が不要となるため、設備的問題を解消すると同時にコスト的な問題も緩和可能であり、本調査研究において、有効に機能する方法であった。マラリア感染者の疫学情報の入手については現地協力機関の疫学情報収集部門の協力により実施した。この疫学部門はブルキナファソ全体でのマラリア発生動向はもとより、本研究に必要となる各集落にお

ける疫学情報、さらには個別感染者の稟告に至るまで様々な情報が収集されている。これらの情報は全て、デジタルデータとして蓄積、それを必要に応じて様々な角度から分析するシステムが運用されている。

これら上記の情報の統合的解析により腸内細菌とマラリアの発生頻度の相関解析を行い、各種のベクター媒介性感染症制御に対し、横断的に応用可能な基盤的知見を得ることを目標とした。

4. 研究成果

西アフリカ・ブルキナファソにおける主要マラリアベクターであるガンビアハマダラカのサンプリングを、疫学情報を基盤とし手選定した各ポイントにて実施した。それぞれのポイントで得られたハマダラカについて、腸内細菌とマラリア原虫感染性ステージ原虫保有率を解析した。マラリア感染率の高い地域、低い地域における腸内フローラ構成細菌叢については有意な差異を検出するには至らなかった。そこで、フローラ構成細菌における遺伝子発現パターン、一般性状学的表現型解析を実施した。その結果、同種細菌種間内における細胞性状多様性に差異を有することが明らかとなった。この細胞表現型多様性が大きいもの、小さいものにおける抗原虫効果をラボシステムのハマダラカと齧歯類特異的マラリア原虫感染モデルを用いて検証を行った。その結果、細胞表現型多様性とマラリア原虫に対する抑制効果に相関関係があることが明らかとなった。各ポイントにおけるハマダラカベクターにおけるマラリア原虫保有率は腸内細菌叢構成細菌の細胞表現型多様性がこれを制御する一因子として機能していることが示唆された。この細胞表現型多様性を誘導する因子の解析の結果、f1hDC遺伝子の関与が明らかとなった。遺伝学的解析の結果、このf1hDCが抗マラリア応答のレギュレーターであることが確認された。また、調査研究データの解析から、ハマダラカの殺虫剤耐性遺伝子とマラリア原虫媒介能に関連性があることを示唆する結果が得られた。一般的な殺虫剤耐性検出法は手技が煩雑なため、調査対象国現地においても実装可能なLAMP法による検出法の開発も実施した。その結果、ブルキナファソにおいて主として問題となっている、殺虫剤耐性変異であるKDRとAce1Rの簡便検出法の開発に成功した。以上の結果より、腸内フローラ構成細菌の性状がベクターの病原体媒介能を規定する因子の一つであることが明らかになり、この知見はこれらの感染症制御において有用な知見となることが示唆された。今後、ベクターの殺虫剤耐性等の他のファクターとの統合的解析により、ベクター媒介性感染症制御につながるより有用な知見が集積されていくものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Aonuma, H., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Okado, K., Badolo, A., Nelson, B., Kanuka, H., and Fukumoto, S. (2010) A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes. *Experimental Parasitology* 125, 179-183, DOI: 10.1016/j.exppara.2009.12.023 (査読有)
2. Doi, Y., Shinzawa, N., Fukumoto, S., Okano, H., and Kanuka, H. (2010) ADF2 is required for transformation of the ookinete and sporozoite in malaria parasite development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397, 668-672, DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.05.155 (査読有)
3. Zhang, H., Ibrahim, H. M., Fukumoto, S., Jin, L., Ishii, M., Takeo, S., Igarashi, M., Yokoyama, N., Xuan, X., Kojima, N., Tsuboi, T., and Nishikawa, Y. (2010) Identification of cross-reactive antigen of Plasmodium falciparum able to control Toxoplasma gondii infection. *Journal of Protozoology Research* 20, 82-88 (査読有)
4. Doi, Y., Shinzawa, N., Fukumoto, S., Okano, H., and Kanuka, H. (2011) Calcium signal regulates temperature-dependent transformation of sporozoites in malaria parasite development. *Experimental Parasitology* 128, 176-180, DOI: 10.1016/j.exppara.2011.02.011 (査読有)
5. Maekawa, E., Aonuma, H., Nelson, B., Yoshimura, A., Tokunaga, F., Fukumoto, S., and Kanuka, H. (2011) The role of proboscis of the malaria vector mosquito Anopheles stephensi in host-seeking behavior. *Parasites & Vectors* 4, DOI: 10.1186/1756-3305-4-10 (査読有)
6. Usui, M., Fukumoto, S., Inoue, N., and Kawazu, S.-i. (2011) Improvement of the observational method for Plasmodium berghei oocysts in the midgut of mosquitoes. *Parasites & Vectors* 4, DOI: 10.1186/1756-3305-4-118 (査読有)
7. Aiuchi, D., Saito, Y., Tone, J., Kanazawa, M., Tani, M., and Koike, M. (2012) The effect of entomopathogenic Lecanicillium spp. (Hypocreales: Cordycipitaceae) on the aphid parasitoid Aphidius colemani (Hymenoptera: Aphidiinae). *Applied Entomology and Zoology* 47, 351-357, DOI: 10.1007/s13355-012-0125-7 (査読有)
8. Badolo, A., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Aonuma, H., Bando, H., Fukumoto, S., Sagnon, N. F., and Kanuka, H. (2012) Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in Anopheles gambiae s. l. *Malaria Journal* 11, DOI: 10.1186/1475-2875-11-227 (査読有)
9. Kimura, A., Nishikawa, H., Nomura, N., Mitsuyama, J., Fukumoto, S., Inoue, N., and Kawazu, S.-i. (2012) In Vitro and In Vivo Antimalarial Activities of T-2307, a Novel Arylamidine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 2191-2193, DOI: 10.1128/aac.05856-11 (査読有)
10. Bando, H., Okado, K., Guelbeogo, W. M., Badolo, A., Aonuma, H., Nelson, B., Fukumoto, S., Xuan, X., Sagnon, N. F., and Kanuka, H. (2013) Intra-specific diversity of Serratia marcescens in Anopheles mosquito midgut defines Plasmodium transmission capacity. *Scientific Reports* 3, DOI: 10.1038/srep01641 (査読有)
11. Nelson, B., Freisinger, T., Ishii, K., Okado, K., Shinzawa, N., Fukumoto, S., and Kanuka, H. (2013) Activation of Imd pathway in hemocyte confers infection resistance through humoral response in Drosophila. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430, 1120-1125, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.027 (査読有)

12. Saiki, E., Nagao, K., Aonuma, H., Fukumoto, S., Xuan, X., Bannai, M., and Kanuka, H. (2013) Multivariable analysis of host amino acids in plasma and liver during infection of malaria parasite *Plasmodium yoelii*. *Malaria Journal* 12, DOI: 10.1186/1475-2875-12-19 (査読有)
13. Mizutani, M., Iyori, M., Blagborough, A. M., Fukumoto, S., Funatsu, T., Sindén, R. E., and Yoshida, S. (2014) Baculovirus-Vectored Multistage *Plasmodium vivax* Vaccine Induces Both Protective and Transmission-Blocking Immunities against Transgenic Rodent Malaria Parasites. *Infection and immunity* 82, 4348-4357, DOI: 10.1128/IAI.02040-14 (査読有)

〔学会発表〕(計16件)

石山海嗣, 竹下隼也, 小池正徳, 福本晋也, 嘉糠洋陸, 相内大吾, *Anopheles stephensi* 雌成虫に対する蚊由来昆虫寄生性アナモルフ菌類の感染性の評価、第55回日本応用動物昆虫学会大会、平成23年3月27-29日、九州大学箱崎キャンパス(福岡県・福岡市)

竹下隼也, 石山海嗣, 小池正徳, 福本晋也, 嘉糠洋陸, 相内大吾、野生蚊由来の昆虫寄生性アナモルフ菌類の分離およびその潜在感染率の評価、第55回日本応用動物昆虫学会大会、平成23年3月27-29日、九州大学箱崎キャンパス(福岡県・福岡市)

Hironori Bando, Hiroka Aonuma, Kiyoshi Okado, Naoaki Shinzawa, Guelbeogo Moussa, N' Fale Sagnon, Shinya Fukumoto, and Hirota Kanuka, Midgut-based insect and parasite interaction in malaria vector *Anopheles mosquitoes*, 第5回病原体媒介節足動物国際会議、平成23年7月23日-30日(Crete・Greece)

Badolo A. Okado K., Aonuma H., Guelbeogo W.M., Bando H., Yoshimura A. Fukumoto S., Sagnon N' F and Kanuka H. Development of allele-specific loop-mediated isothermal amplification method (AS-LAMP) for detection of the L1104Fkdr- mutation in *Anopheles gambiae* s.l., Gordon Research conference, 平成23年7月31日-8月5日(Pisa, Italy)

伴戸寛徳、岡戸清、Moussa Guelbeogo、Athanasé Badolo、青沼宏佳、福本晋也、

N' Fale Sagnon、嘉糠洋陸、非共生細菌の表現型揺らぎが規定する宿主-寄生虫間相互作用、第71回日本寄生虫学会東日本支部大会、平成23年10月1日、杏林大学(東京都・三鷹市)

石井嶺広、竹下隼也、石山海嗣、小池正徳、福本晋也、嘉糠洋陸、相内大吾、野生蚊由来の昆虫寄生性アナモルフ菌類のハマダラカ雌成虫(*Anopheles stephensi*)に対する病原性・感染性の評価、第73回昆虫病理研究会、平成23年12月3日、東京大学(東京都・文京区)

Hironori Bando, Kiyoshi Okado, Moussa Guelbeogo, Athanasé Badolo, Hiroka Aonuma, Shinya Fukumoto, N' Fale Sagnon, and Hirota Kanuka, Impact of intra-specific diversity of mosquito midgut bacteria on *Plasmodium* development, 第80回米国熱帯医学会、平成23年12月4日-8日(Philadelphia・USA)

伴戸寛徳、岡戸清、Moussa Guelbeogo、Athanasé Badolo、青沼宏佳、福本晋也、N' Fale Sagnon、嘉糠洋陸、腸内細菌の“ゆらぎ”が宿主-病原体相互作用に与える影響、第34回日本分子生物学会、平成23年12月13日-16日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

石井嶺広、竹下隼也、石山海嗣、小池正徳、嘉糠洋陸、福本晋也、相内大吾、野生蚊の虫体および虫体内から分離された昆虫寄生性アナモルフ菌類の *Anopheles stephensi* 雌成虫に対する致死性・感染性の比較、第56回日本応用動物昆虫学会大会、平成24年3月27日-29日、近畿大学奈良キャンパス(奈良県・奈良市)

嘉糠洋陸、伴戸寛徳、岡戸清、Guelbeogo Wandaogo, Badolo Athanasé, 青沼宏佳、福本晋也、N' Fale Sagnon、非共生細菌の表現型揺らぎが規定するベクター・寄生虫間相互作用、第82回日本寄生虫学会、平成25年3月29日-31日、東京医科歯科大学(東京都・文京区)

竹下隼也、石井嶺広、小池正徳、福本晋也、嘉糠洋陸、相内大吾、長残光性蓄光材の *Anopheles stephensi* に対する誘引性の評価、第57回日本応用動物昆虫学会大会、平成25年3月27日-29日、日本大学(神奈川県・藤沢市)

A. Badolo A., Fukumoto S., Okado K., Aonuma H., Guelbeogo W.M., Bando H., Yoshimura A., Sagnon N' F and Kanuka H. Development of LAMP-based method to detect 1014F kdr and 119S ace-1R mutations in

field collected *Anopheles gambiae* s.l.
EMBO conference on Molecular and
Population Biology of Mosquitoes and Other
Disease Vectors: From Basic Vector Biology
to Disease Control. 平成 25 年 7 月 15 日- 19
日 (Crete・Greece)

伴戸寛徳、岡戸清、青沼宏佳、福本晋也、
嘉糠洋陸、西アフリカに生息するマラリア媒
介蚊の腸内細菌種内多様性に関する研究、第
156 回日本獣医学会、平成 25 年 9 月 20 日-22
日、岐阜大学 (岐阜県・岐阜市)

A. Badolo A., Fukumoto S., Okado K.,
Aonuma H., Guelbeogo W.M., Bando H.,
Yoshimura A., Sagnon N'F and Kanuka H.
Development of LAMP-based method to detect
1014F kdr and 119S ace-1R mutations in
field collected *Anopheles gambiae* s.l.,
6th MIM Pan-African Malaria Conference.
"Moving towards malaria elimination:
Investing in research and control" 平成
25 年 10 月 6 日- 10 日、(Durban, South
Africa)

曾賀晃、アタナセ バドロ、瀧澤摩美、
福本晋也、フィールド採集ハマダラカからの
等温遺伝子増幅法による熱帯熱マラリア原
虫検出法の検討、第 67 回日本衛生動物学会、
平成 26 年 3 月 27 日-29 日、金沢大学宝町キ
ャンパス (石川県・金沢市)

アタナセ バドロ、瀧澤摩美、福本晋也、
LAMP 法による G119S Ace1R 変異検出法の開発
と西アフリカ-ブルキナファソ採集ガンビア
ハマダラカでの検証、第 67 回日本衛生動物
学会、平成 26 年 3 月 27 日-29 日、金沢大学
宝町キャンパス (石川県・金沢市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
福本 晋也 (FUKUMOTO, Shinya)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・
准教授
研究者番号：50376422

(2) 研究分担者
嘉糠 洋陸 (KANUKA, Hirotaka)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：50342770

小池 正徳 (KOIKE, Masanori)
帯広畜産大学・畜産学部・教授
研究者番号：00205303

(3) 連携研究者
()

研究者番号：