

令和元年6月19日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2018

課題番号：26304038

研究課題名(和文)ベクター病原体媒介能におけるビオティック・アビオティック因子の相関に関する研究

研究課題名(英文)Study on correlation of biotic and abiotic factors in vector competency

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) 12,300,000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地として、マラリアに代表される蚊媒介性感染症に着目して、どのような因子が媒介に重要なのかを解析することを目的とした。その結果、蚊の生物学的因子として殺虫剤抵抗性、非生物学的因子として農薬等の殺虫剤使用がマラリア対策上極めて重要な局面に来ていることを明らかにした。殺虫剤はマラリア対策に重要であるが、農業用途による使用も含めて包括的かつ継続的に監視をする必要性が高いことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブルキナファソ西部では綿花栽培に使用される農薬である有機リン剤の影響により、マラリアを媒介する蚊が、有機リン剤系殺虫剤に耐性を高い割合で持ちつつあることが明らかとなった。この殺虫剤耐性変異をホモ接合体として持つ個体も発見され注意が必要である。首都ワガドゥーグーではデング熱が問題となっており、その媒介蚊であるネッタイシマカはピレスロイド耐性を示すが有機リン剤に対しては感受性を維持している。これらの結果はブルキナファソにおける蚊媒介性感染症対策指針策定にあたり重要な基礎的知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze what factors are important for pathogens transmission, focusing on mosquito-borne diseases such as malaria, in Burkina Faso, West Africa. As a result, it has become clear that insecticide resistance as a biological factor of mosquitoes and the use of insecticides such as pesticides as a non-biological factor have come to an extremely important aspect for malaria control. Although insecticides are important for malaria control, it has been identified that there is a high need for comprehensive and continuous monitoring, including use for agricultural applications.

研究分野：獣医学

キーワード：ベクター マラリア ハマダラカ 殺虫剤耐性

1. 研究開始当初の背景

蚊やダニ等の節足動物によって伝播される疾患、すなわち“ベクター媒介性感染症”の制御は、ベクター対策の成否に依存している。ベクターは病原体拡散者として重要であり、哺乳動物間の直接伝播と比較し、効率的に病原体の拡散を行うことができる。つまり、これらの感染症対策においては、ベクター対策が重要かつ必須となるのである。ベクター対策において考慮すべき点として、特定のベクター個体・集団における病原体媒介能がある。マラリア汚染地域のアフリカでの知見として、ベクター生態学的環境が類似しているにも関わらず、地域間においてマラリアの発生頻度が異なることが知られている。また、同一地域においても季節・年ごとに流行の違いがある。このようなマラリア発生の非普遍性は環境や生物学的因子によるベクターに対する様々な選択圧が、病原体媒介能に変化を与えることによるものと考えられている。

病原体媒介能規定因子はベクター自身に由来する生物学的因子と、取り巻く環境に由来する非生物学的因子の2つに分けられる。生物学的因子の例として同種の蚊においても潜在的な染色体多型があり、病原体媒介能が異なることが報告されている。非生物学的因子の例としてマラリアの雨期流行性がある。ポウフラの生息場所が増えることによって、ベクターのハマダラカ成虫が増加するためである。また、気温も重要な因子である。ハマダラカの生育スピードは温度に依存するため、高気温によりベクター数が増加する。さらに、ベクター内の病原原虫の成長も早まり、短期間で感染性原虫が形成される。このように、種々の因子が複雑に絡み合い、ベクター個体・集団の病原体媒介能が規定されるのである。

したがって、ベクターによる病原体伝播を紐解くには様々な観点から、ベクターと病原体およびそれを取り巻く環境を個々に解析し、知見を積み重ねて行く必要がある。申請者らの過去の研究において、ブルキナファソでのマラリア媒介ハマダラカの腸内細菌の解析により、一部の腸内細菌の表現型多型性の増加がマラリア原虫の感染性と相関することを明らかにした。これらの研究成果は種々の生物学的因子によりベクターの病原体伝播能が規定されていることを示すものであった。

2. 研究の目的

本研究は西アフリカ・ブルキナファソを調査対象国とし、ベクター媒介性感染症における病原体媒介能規定因子を包括的に解析することで、これら感染症の制圧に資することを目的とするものである。マラリアをモデルとして用いることで、ハマダラカの病原体媒介能規定因子について、ベクター自身と、それを取り巻く環境の両側面から解析し情報を蓄積する。これらの知見をベクター・患者双方の疫学情報と共に包括的に解析し、現在もなお不明な点が多く残るベクターの病原体媒介能規定因子と感染症発生の相関関係を明らかにすることを目的として、ブルキナファソにおけるフィールド調査を行った。本研究課題においては生物学的因子として蚊の殺虫剤耐性変異、非生物学的因子として殺虫剤使用を取り巻く環境に特に注目して、媒介蚊におけるマラリア原虫疫学調査を併せて解析することに主眼を置いた。

3. 研究の方法

マラリアおよびデング熱をベクター媒介性感染症のモデルとし、その重度汚染地帯であるサブサハラアフリカに位置する、西アフリカ・ブルキナファソ国を調査実施国とした。ブルキナファソ国立マラリア研修・研究センター、国立ワガドゥグー大学による体制により実施した。

ブルキナファソでマラリアおよびデング熱の主要な媒介蚊であるガンビアハマダラカおよびネッタイシマカの幼虫及び成虫のサンプリングを行った。幼虫サンプリングについては柄杓法により幼虫ブリーディングサイトで捕集し、ワガドゥグー大学研究協力者実験室に持ち帰り、ラボで育成・成虫を分離し、遺伝子解析・殺虫剤バイオアッセイ等の研究に供した。ハマダラカ成虫については主としてCDCライトトラップによる捕集を行った。幼虫、成虫の捕集は主として7地域で行った。首都のワガドゥグーから30キロ東方に位置する Goden、55キロ北東に位置する Koubiri。首都から約120キロ離れた農村部である Reo、Seboun、Vrou。首都から200キロ西部に位置する Bobo Dioulasso と320キロ西部に位置する Hounde などサンプリングを行った。収集したハマダラカ成虫サンプルについては種の分類を行った。ブルキナファソにおける主要なマラリアベクターはガンビアハマダラカとフネスタスハマダラカであり、その他数種の存在が確認されている。実体顕微鏡を用いた形態解剖学的手法により、現地テクニシャンにより種の分類を行った。分類後、その後の解析に供するため、実体顕微鏡下で頭胸部、中腸を解剖・分離・保存した。哺乳動物感染ステージのスポロゾイトが蓄積されている唾液腺の存在する頭胸部よりDNAを抽出し、原虫感染率を解析した。原虫感染率の解析においては、既存法の妥当性検証を行った。また、バイオアッセイとともに、殺虫剤耐性遺伝子変異の解析を行った。殺虫剤耐性遺伝子変異はS型染色体に随伴して拡散する頻度が高いとの報告がある。ピレ

スロイド・DDT・有機リン剤などの4殺虫剤に対する耐性変異を解析対象とした。これらは既知の殺虫剤耐性に関与する点突然変異(SNP)の解析を既存のPCR-RFLP、新規に確立したLAMPにより解析した。

また、殺虫剤の使用状況調査とともに、デング熱の主要ベクターであるネッタイシマカについても、バイオアッセイによる殺虫剤耐性アッセイ、PCR-RFLP、シーケンス法の3者による比較解析に供した。以上の解析により蚊における病原体媒介における生物学的因子と非生物学的因子の相関を明らかにすることを旨とし研究を行った。

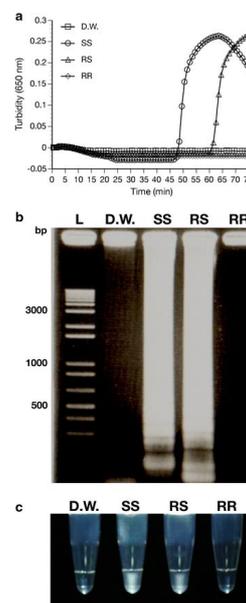
4. 研究成果

本研究では主として、病原体媒介蚊における生物学的因子である殺虫剤耐性と非生物学的因子である殺虫剤および病原体保有率の関係について特に注力して研究を展開した。本研究の実施においてはハマダラカからのマラリア原虫検出が極めて重要な実験系である。人への感染性ステージであるマラリア原虫スポロゾイトの標準的検出法は蚊頭胸部抽出物からのELISA法によるスポロゾイト特異的抗原検出法である。この方法はマラリアの主要汚染地域であるアフリカの開発途上国においても特別な設備・機器を用いることなく実施可能であることから、広く使用されている。しかしながらトレードオフとして特異性および感度が低いとの問題がある。一般に病原体検出にはPCR法による遺伝子検出などが広く用いられているが、サーマルサイクラーなどの設備が必要となる。また、これらの手技への精通が必要となる。本研究実施にあたり、ブルキナファソで実装可能なハマダラカからのマラリア原虫遺伝子検出に関する技術導入を行うことを検討した。マラリア原虫の遺伝子検出は主として人血液材料を対象としているしたが、蚊からの検出についてはその方法が標準化されているとは言い難い。そこで、各種マラリア原虫検出PCR法のハマダラカ由来サンプルにおける妥当性確認を行い、ハマダラカからのマラリア原虫検出に最も優れたPCR法を確立することを目指した。その結果、Pf364をターゲットとしたPCR法(Allison et al, JCM, 2011)が、ハマダラカ由来サンプルからのマラリア原虫の検出に優れていることを明らかにした。本PCR法はリアルタイムPCR法による結果とも高い相関性を示すことを確認した。

次にLAMP法による新規殺虫剤耐性変異検出法の確立を行った。特異的にSNPを検出することを可能とするため、変異領域および第2位に位置するヌクレオチドに変異を導入したプライマーを設計した。このプライマーによりLAMP法により特異的にアセチルコリンエステラーゼ遺伝子の変異ace-1(R)を検出することを可能にした。この新規方法を既存のPCR-RFLP法およびリアルタイムPCR法との比較に供したところ、それぞれに対して検出率・特異性に有意差を示さなかった。また、ブルキナファソ由来フィールド蚊サンプルを用いたアッセイにおいて優れた検出性能を示した。以上の結果より、我々が開発した新規殺虫剤検出法は実際のフィールドでの利用において高い性能を示し、優れた実用性を持つことが証明された。以上をまとめると新規LAMP法は、60分以内にace-1(R)変異を検出することができ、これは従来のPCR-RFLPが40時間以上の時間を要するのと比較すると、極めて短時間に殺虫剤耐性を検出することが可能となった。この方法は、設備の整っていない実験室においても、ace-1(R)変異を迅速に検出するために使用され得るものであり、開発途上国でのマラリア対策策定において大きく貢献するものであった。

これらの方法および過去の研究において我々が開発および最適化した方法を用いてハマダラカからのマラリア原虫検出および殺虫剤耐性の解析を行った。その結果、有機リン剤耐性遺伝子の蔓延がブルキナファソ西部において大きな懸念材料となっていることが明らかとなった。非生物学的因子情報の解析の結果、ブルキナファソ西部地域では綿花栽培が盛んであり、農業害虫に対して有機リン剤が多用されていることが明らかとなった。間接的な有機リン剤の暴露によりマラリア媒介蚊であるハマダラカにおいて有機リン剤耐性変異が増加していることが明らかとなった。有機リン剤耐性をもたらずace-1(R)変異の保有率は西部の蚊においておよそ10%であった。これは、更なる継続的な有機リン剤使用を続けた場合容易に、ace-1(R)変異蚊がマジョリティーとなる数値であり、農業における有機リン剤使用政策において極めて重要な情報となった。これらのace-1(R)変異蚊の大部分はヘテロであったが、1検体についてはホモであった。ace-1(R)変異ホモの存在はマラリア対策上、重要な懸念材料であり早急な対策が必要であることが明らかとなった。マラリア原虫スポロゾイトの解析の結果、およそ25%が陽性であった。また、ハマダラカにおけるマラリア原虫と殺虫剤耐性変異には正の相関があることが明らかになっている。マラリア汚染地域においては一般的に殺虫剤によるベクターコントロールプログラムが計画的に実行されている。媒介蚊に対する農業による間接的な非計画的殺虫剤暴露はマラリアコントロールをより困難にする危険性を孕むものであり、重大な注意が必要であることが確認された。

近年、ブルキナファソではデング熱の流行が問題となってきている。そこで我々はデング熱



の主要ベクターであるネッタイシマカの殺虫剤耐性検出法の最適化を行った。アレル特異的 PCR 法と PCR-シーケンス法の最適化を行うと共に、バイオアッセイの結果とともに共解析することでその信頼性を解析した。その結果、フィールドサンプル解析において両方法の信頼性を確保することが可能であることを確認した。ブルキナファソにおけるフィールドサンプルの解析を行った。ネッタイシマカを捕集し、ピレスロイド耐性に関連する殺虫剤耐性プロファイルと KDR 変異を解析した。ワガドゥーグーでサンプリングしたネッタイシマカはバイオアッセイにおいて、ペルメトリンの死亡率は 15%、デルタメトリンの死亡率は 37%であった。カルバメートに対する耐性は、プロポキシルで 55%、ベンジオカルブで 90%の死亡率であった。有機リン酸塩（マラチオンおよびフェニトロチオン）に対しては高い感受性を示した（死亡率> 97%）。アレル特異的 PCR 法と PCR-シーケンス法の結果、97%と非常に高い頻度で F1534C KDR 変異を持つことが明らかとなった。一方、V1016I KDR 変異は 46%であった。両変異の保有はペルメトリン耐性と相関することが明らかとなった。農薬および殺虫剤使用状況などの非生物学的因子情報と総合的に解析すると、首都近郊では綿花栽培が盛んではないため、農薬間接的暴露による有機リン剤耐性が低いことが明らかとなった。しかし蚊の刺咬対策には市民が一般的にピレスロイド剤を用いるため耐性蚊の選択が起きてしまっていることが明らかとなった。以上を総合するとブルキナファソ首都のワガドゥーグーにおけるデング熱対策を鑑みた場合、ピレスロイド剤はすでに有効性を持たないためその使用は望ましくない。したがって有期リン剤系殺虫剤の使用が望ましいがこれに対する耐性を優占化させないため、その使用には殺虫剤耐性率のモニタリングとともに細心の注意を払う必要があることが確認された。

以上、生物学的因子である殺虫剤耐性および非生物学的因子である殺虫剤はベクター媒介性感染症対策の上で極めて重要であり、その動態については継続的に注視していくことが重要であることが確認された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Sombie, A., Saiki, E., Yameogo, F., Sakurai, T., Shirozu, T., Fukumoto, S., Sanon, A., Weetman, D., McCall, P. J., Kanuka, H., Badolo, A.: High frequencies of F1534C and V1016I kdr mutations and association with pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* from Somgande (Ouagadougou), Burkina Faso. *Trop Med Health*, 47 2, 2019 (査読有) DOI: 10.1186/s41182-018-0134-5
2. Yusuf, Y., Yoshii, T., Iyori, M., Yoshida, K., Mizukami, H., Fukumoto, S., Yamamoto, D. S., Alam, A., Emran, T. B., Amelia, F., Islam, A., Otsuka, H., Takashima, E., Tsuboi, T., Yoshida, S.: Adeno-Associated Virus as an Effective Malaria Booster Vaccine Following Adenovirus Priming. *Front Immunol*, 10 730, 2019 (査読有) DOI: 10.3389/fimmu.2019.00730
3. Soga, A., Ko-Ketsu, M., Fukumoto, S.: Development of a bsd-blasticidin selection system in *Plasmodium berghei*. *FEBS Lett*, 592:1847-55, 2018 (査読有) DOI: 10.1002/1873-3468.13100
4. Soga, A., Bando, H., Ko-Ketsu, M., Suganuma, H., Kawazu, S., Fukumoto, S.: High efficacy *in vitro* selection procedure for generating transgenic parasites of *Plasmodium berghei* using an antibiotic toxic to rodent hosts. *Sci Rep*, 7:4001, 2017 (査読有) DOI: 10.1038/s41598-017-04244-0.
5. Mizutani, M., Fukumoto, S., Soubeiga, A. P., Soga, A., Iyori, M., Yoshida, S.: Development of a *Plasmodium berghei* transgenic parasite expressing the full-length *Plasmodium vivax* circumsporozoite VK247 protein for testing vaccine efficacy in a murine model. *Malar J*, 15:251, 2016 (査読有) DOI: 10.1186/s12936-016-1297-3
6. Badolo, A., Bando, H., Traore, A., Ko-Ketsu, M., Guelbeogo, W. M., Kanuka, H., Ranson, H., Sagnon, N., Fukumoto, S.: Detection of G119S *ace-1* (R) mutation in field-collected *Anopheles gambiae* mosquitoes using allele-specific loop-mediated isothermal

amplification (AS-LAMP) method. *Malar J*, 14:477, 2015 (査読有) DOI: 10.1186/s12936-015-0968-9

7. Mizutani, M., Iyori, M., Blagborough, A. M., Fukumoto, S., Funatsu, T., Sinden, R. E., Yoshida, S.: Baculovirus-Vectored Multistage *Plasmodium vivax* Vaccine Induces Both Protective and Transmission-Blocking Immunities against Transgenic Rodent Malaria Parasites. *Infect Immun*, 82:4348-57, 2014 (査読有) DOI: 10.1128/IAI.02040-14

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Shinya Fukumoto, Takahiro Shirozu, Dissecting vectorial capacity for the dog heartworm disease in *Aedes aegypti* to establish the genetically modified non-vector mosquito, The 10th Joint Symposium of Veterinary Research in East Asia, 2019

2. Akira Soga , Mami Ko-ketsu, Shinya Fukumoto, Development of high efficacy in vitro drug selection systems for generating transgenic parasite of *Plasmodium berghei*, 14th International Congress of Parasitology, 2018

3. Shinya Fukumoto, Aya Yoshimura, Hirotaka Kanuka, Thermoregulation controls the developmental host transition in filarial parasites *Dirofilaria immitis*, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2017

4. S. Fukumoto, A. Yoshimura, H. Kanuka, Filarial nematode *Dirofilaria immitis* diverts thermoregulation to developmental transition following transmission by *Aedes* mosquito, Molecular Helminthology: An Integrated Approach Conference, 2017

5. 齊木 選射、長尾 健児、石上 盛敏、福本 晋也、クルドウスッドゥ スリヴィッチャ、櫻井 達也、坂内 慎、狩野 繁之、嘉糠 洋陸、アミノ酸摂取量の調整によるマラリア制御の可能性、第 85 回日本寄生虫学会大会、2016

6. アタナセ バドロ、纈纈摩美、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、2015

7. 曾賀晃、アタナセ バドロ、纈纈摩美、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、2015

8. Athanase Badolo, Wamdaogo M. Guelbeogo, N' Falé Sagnon, Antoine Sanon, Shinya Fukumoto, and Hirotaka Kanuka, Comparison of loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) and RT-PCR methods for *Plasmodium falciparum* detection in field-collected *Anopheles gambiae* mosquitoes, EMOB conference on Molecular and population biology of mosquitoes and other disease vectors Current, resurgent and emerging diseases, 2015

9. 曾賀晃、纈纈摩美、福本晋也、In vitro-puromycin システムによる高効率遺伝子組換え *Plasmodium berghei* 選択法の開発、第 38 回日本分子生物学会年会、2015

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.obihiro.ac.jp/facility/protozoa/>

6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：アサナセ バドロ

ローマ字氏名：Athanase Badolo

連携研究者氏名：相内 大吾

ローマ字氏名：Daigo Aiuchi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。