

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22371

研究課題名(和文)蚊の腸内細菌叢の破綻による蚊の発生コントロール

研究課題名(英文)Control of the breeding of mosquitoes by disruption of midgut microbiota in mosquito

研究代表者

筏井 宏実(Ikadai, Hiromi)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80327460

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):我々は、抗生物質によってハマダラ蚊の腸内細菌叢のバランスを破綻してある特定の腸内細菌を増加させると、蚊の卵巣形成機能が低下することを見出した。この特定の腸内細菌は環境中の常在菌でもあったことから、この菌を用いた蚊の発生をコントロールすることを最終目標とした。本研究は蚊の腸内細菌叢より卵巣形成機能を低下させる作用がある腸内細菌の同定後にその応用利用の可能性を検討する。さらに、本作用機序を解明することを目的として実施された。研究計画通り、卵巣形成機能を低下作用がある腸内細菌および化合物含有物質を絞り込めた。今後、卵巣形成機能効果を示す化合物の同定、さらなる卵巣形成機能抑制機序の解明が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蚊を含む節足動物が媒介する感染症は、熱帯、亜熱帯地域を中心として猛威をふるっている。これら感染症のベクター(節足動物)コントロールに用いられる殺虫剤の使用は、広い地域に繰り返し使用される事により抵抗性を持った節足動物種の出現や環境への影響など、様々な問題が出ている。今回の研究によって得られた成果は、ベクターとなる節足動物の卵巣形成機能を低下させて繁殖をコントロールする戦略を立てることが可能となる。さらに、害虫防除や様々な節足動物媒介性の感染症研究などの観点からも既存の殺虫剤が抱える問題を克服しうる点は、本研究成果の波及効果について非常に高いものであると考えられる。

研究成果の概要(英文):We have found that the ovarian formation function of Anopheles mosquitoes is reduced by the influence of the specific midgut microbiota of Anopheles mosquitoes. This midgut microbiota was also present in the environment.

This study aims to control the outbreak of mosquitoes using this midgut microbiota. Furthermore, it was carried out to elucidate the mechanism of ovarian dysplasia. As planned, we narrowed down the intestinal bacteria and compound-containing substances that have the effect of lowering ovarian formation function. In the future, it is necessary to identify compounds that have an ovarian-forming function effect and further elucidate the mechanism of suppressing ovarian-forming function.

研究分野：寄生虫学

キーワード：蚊 腸内細菌 卵形成 発生コントロール

1. **研究開始当初の背景**

蚊は衛生害虫（ペスト）の代表的存在である。殺虫剤による「化学的対策」は、他の対策に比べて費用や手間がかからないことから、広く使われてきた。しかし昨今、薬剤耐性ペストの出現や、薬剤偏重による自然環境への悪影響が問題となっており、「化学的対策」以外の環境への影響低減を考慮した新たな対策がペストコントロールにおいて重要となっている。

昆虫の腸内細菌は宿主である昆虫に対し消化や栄養、生殖に影響を与えることが報告されている。蛾においては抗生物質を摂取させて腸内細菌を減少させると、消化酵素の活性が抑制される報告がある。また、シロアリでは腸内のスピロヘータが酢酸生成と窒素固定をすることでエネルギーを提供している。ニジュウヤホシテントウでは、腸内で特定の細菌 4 種類の割合が増加すると、生殖器の発達が促進される。*Anopheles stephensi* (ハマダラ蚊) においては、腸内細菌がマラリア原虫のオーシスト形成に影響を与えることが報告されているが、宿主に与える影響は十分に検討されていない。

我々は、ハマダラ蚊と蚊の腸内細菌叢の相互関係の研究において、蚊の腸内細菌叢のバランスを破綻させると、蚊の卵巣形成機能が低下することを見出した。そこで、“抗生物質投与 腸内細菌叢の破綻 特定腸内細菌の増加 卵巣形成機能の低下” の関係が成立すると仮説を立て、蚊の発生コントロール法の開発に向けた検討を進めることとした。

2. **研究の目的**

本研究は、ハマダラ蚊の腸内細菌による卵巣形成機能低下現象の解明および環境中の常在菌を利用した蚊の発生コントロールを最終目的として、ハマダラ蚊の腸内細菌叢の解析、蚊の卵巣形成の作用機序の解明および応用利用の検討、が実施された。

3. **研究の方法**

ハマダラ蚊の腸内細菌叢の解析

(1) 腸内細菌叢の破綻：各種抗生物質含有 10%スクロースで飼育した成虫蚊のうち、マウス吸血後の蚊を解剖することにより卵巣形成機能を評価した。評価方法として、卵巣形成抑制率（吸血 2 日目に解剖した蚊のうち卵巣内に未発育な卵が存在していた蚊の割合）を用いた。使用抗生物質はペニシリン（PM）、ストレプトマイシン（ST）、カナマイシン（KM）を試験に供した。

(2) 腸内細菌叢の解析および主要腸内細菌の分離同定：卵巣形成抑制率が低下した抗生物質の条件について、蚊の腸内細菌叢をクローンライブラリー法にて比較解析を行った。その後、飼育環境水および蚊の中腸内から細菌を分離同定した。

(3) 主要腸内細菌のレスキュー試験：抗生物質処置を行った腸内細菌除去蚊を作製し、得られた分離菌を摂取させることにより腸内に定着させた。菌摂取蚊について吸血・解剖を行い、卵発

育抑制率の比較により卵巣形成を評価し、分離菌の能力を評価した。

蚊の卵巣形成の作用機序の解明および応用利用の検討

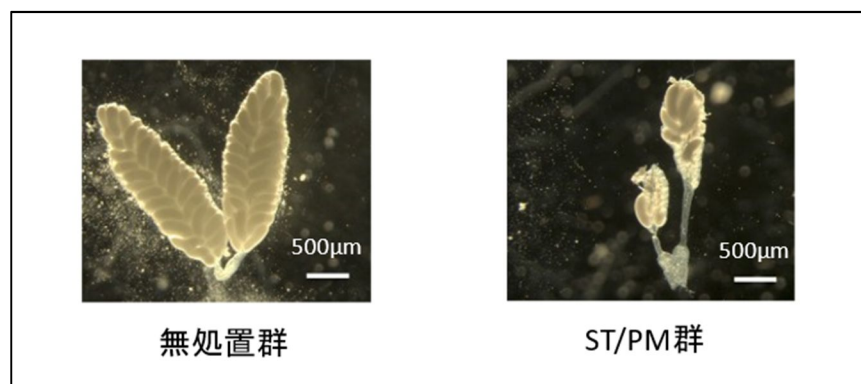
卵巣形成機能を有する分離菌については、代謝産物や菌体抗原を考慮した、蚊の卵巣形成の作用機序について解析を実施した。

4. 研究成果

ST による腸内細菌叢の破綻は卵巣形成機能を低下させた

腸内細菌叢の破綻は、抗生物質である ST および PM を 10%スクロースに添加して 2 週間飼育 (ST/PM 群) する事によって行った。10%スクロースのみで飼育した蚊 (無処置群) と比較する事で、抗生物質による腸内細菌叢の破綻がハマダラ蚊に与える影響を検討した。

まず、吸血 2 日目における ST/PM 群の卵巣は無処置群と比較して小さく、また卵黄顆粒で満たされていない未発育な卵が多数存在していることが明らかとなった。



次に両群の卵巣形成機能の程度を、卵巣形成抑制率で比較した。その結果、無処置群 $4.7\% \pm 0.015$ 、ST/PM 群 $74.6\% \pm 0.22$ となり、ST/PM 群では卵巣形成機能が低下していた。次に ST および PM 単剤を 10%スクロースに添加し 2 週間飼育した際の卵巣形成抑制率を比較したところ、無処置群 $4.7\% \pm 0.015$ 、ST 群 $76.1\% \pm 0.05$ 、PM 群 $9.2\% \pm 0.02$ となり、ST 群でのみ卵巣形成機能が低下していた。以上の結果より、ST を 2 週間添加して飼育する事によって蚊の卵巣形成機能が低下する事が明らかとなった。

ST の添加期間を吸血までの 2 週間 (ST 群)、1 週間 (ST・1wk 群)、2 日間 (ST・2dy 群)、吸血後 2 日間 (吸血後 ST・2dy 群) に分けて卵巣形成抑制率を比較したところ無処置群 $4.7\% \pm 0.015$ 、ST 群 $76.1\% \pm 0.05$ 、ST・1wk 群 $6.6\% \pm 0.05$ 、ST・2dy 群 $14.0\% \pm 0.08$ 、吸血後 ST・2dy 群 $6.2\% \pm 0.06$ となり、ST 群のみ卵巣形成機能が低下していた。

さらに ST と同じアミドグリコシド系抗生物質である KM を添加して飼育した KM 群の

卵巣形成抑制率を調べたところ、無処置群 $4.7\% \pm 0.015$ 、ST 群 $76.1\% \pm 0.05$ 、KM 群 $50.5\% \pm 0.05$ となり、KM 群においても卵巣形成機能が低下していた。以上の結果より、ST が直接蚊の生殖器官や内分泌系に作用して卵発育を抑制したのではなく、抗生物質として腸内細菌叢に作用し、それが卵巣形成機能を低下させたと考えられた。

腸内細菌叢の解析

無処置群、ST 群および KM 群の吸血 2 日目の腸内細菌叢をクローンライブラリー法で比較した。無処置群では腸内細菌叢の 78.6% が *Asaia* sp. であったのに対し、ST 群は 64.7%、KM 群では 88.9% が *Methylobacterium* sp. であった。この結果により *Methylobacterium* sp. が卵巣形成機能の低下に関与していると考えられた。

主要腸内細菌の分離同定

DNA 解析の結果により、*Methylobacterium* sp. が卵巣形成機能の低下に関与している事が示唆された為、*Methylobacterium* sp. の分離を行った。塗抹から 5 日後に飼育水から 1 株、ST 群の中腸から 3 株 *Methylobacterium* sp. の特徴であるピンク色のコロニーが発育した。発育したコロニーを解析したところ、飼育水から発育した 1 株は *Methylobacterium* A 株、ST 群の中腸から発育した 3 株は全て *Methylobacterium* R 株であった。

主要腸内細菌のレスキュー試験

羽化から 7 日間 10% スクロースのみで飼育し、その後 3 日間 ST を添加して飼育することで腸内細菌除去蚊を作製した。腸内細菌除去蚊に分離後増菌培養した *Methylobacterium* A 株および *Methylobacterium* R 株を懸濁した 10% スクロースを 3 日間経口摂取させて、*Methylobacterium* A 株摂取群および *Methylobacterium* R 株摂取群の卵巣形成抑制率を無処置群と比較したところ、無処置群 $4.2\% \pm 0.026$ 、*Methylobacterium* A 株摂取群 $26.9\% \pm 0.019$ 、*Methylobacterium* R 株摂取群 $46.1\% \pm 0.047$ となり、*Methylobacterium* R 株摂取群が最も卵巣形成機能が低下していた。また、ST 群と同様に未発育な卵が多数存在する卵巣が観察された。以上の結果から *Methylobacterium* R 株はハマダラ蚊の卵巣形成機能を低下させる作用を有している事が明らかとなった。

蚊の卵巣形成の作用機序の解明および応用利用の検討

羽化から 7 日間 10% スクロースのみで飼育し、その後 3 日間 ST を添加して飼育した腸内細菌除去蚊に、*Methylobacterium* R 株の懸濁液を経口摂取させた生菌群、懸濁液を 100 分で加熱した加熱死菌液を経口摂取させた加熱死菌群に分け、作製した小箱で 3 日間飼育し

た。それぞれの条件下での飼育が終了後、吸血を行って卵巣形成抑制率を比較した。その結果、無処置群 $12.0\% \pm 0.065$ 、生菌群 $45.6\% \pm 0.069$ 、加熱死菌群 $42.2\% \pm 0.086$ となり、加熱死菌群は生菌群と同様に卵巣形成機能が低下していた。

次に、*Methylobacterium* R 株の加熱死菌液のうち卵発育を抑制する物質の絞りこみをした。吸血までの期間を 10%スクロースのみで飼育した無処置群、羽化後 10 日目までは 10%スクロースのみで飼育した後に加熱死菌液の上清および沈殿を 3 日間経口摂取させた加熱死菌上清群、加熱死菌沈殿群に分けて飼育した。それぞれの条件下での飼育終了後、吸血を行って卵巣形成抑制率を比較した結果、無処置群 $5.6\% \pm 0.033$ 、加熱死菌上清群 $49.8\% \pm 0.060$ 、加熱死菌沈殿群 $18.8\% \pm 0.133$ となった。よって、加熱死菌上清群は卵巣形成機能が低下していた。以上のことから、*Methylobacterium* R 株の加熱死菌上清には卵巣形成機能を低下させる物質が含まれていることが推察された。

本研究ではさらに、*Methylobacterium* R 株がハマダラカの卵巣形成への作用機序卵も検討した。ハマダラ蚊の卵発育には十分量の吸血、血液消化、インスリン様ペプチドなどの各種ホルモン、卵黄タンパク質前駆体のピテロジェニン (Vg) などが必要であり、これらの因子が作用することで、卵内に卵黄が充満して吸血 2 日目に卵発育が完了する。まず、*Methylobacterium* R 株の血液消化への影響を評価した。血液消化が進行すると中腸内のタンパク質がアミノ酸に分解されることを踏まえて、無処置群と生菌群の吸血後 24 時間、36 時間での中腸内タンパク質量を比較した。その結果、吸血後 24 時間のタンパク質量は、無処置群 $151.7 \pm 44.0 \mu\text{g}$ /中腸、生菌群 $185.9 \pm 47.4 \mu\text{g}$ /中腸であった。吸血後 36 時間のタンパク質量は、無処置群 $25.2 \pm 9.48 \mu\text{g}$ /1 中腸、生菌群 $22.2 \pm 6.59 \mu\text{g}$ /1 中腸であった。よって血液消化への影響はないと考えられた。次に、Vg への影響を検討した。Vg mRNA 発現量は、吸血後 24 時間で最大値となることが報告されている。これを踏まえて、無処置群と生菌群の吸血後 24 時間における Vg mRNA 発現量をリアルタイム PCR で定量した。その結果、生菌群の Vg mRNA 発現量は、無処置群と比較して有意差はなかったものの、減少傾向が認められた。さらに *Methylobacterium* R 株の加熱死菌上清群の Vg mRNA 発現量についても同様に定量した結果、減少傾向が認められた。

以上のことから、*Methylobacterium* R 株による卵巣形成機能の低下は Vg mRNA 発現量の減少によると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 箱崎 純、福田歩夢、野々垣雄介、田邊太志、西山啓太、筏井宏実
2. 発表標題 腸内細菌がハマダラ蚊の卵巣内卵発育に与える影響
3. 学会等名 第162回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野々垣雄介、箱崎 純、田邊太志、西山啓太、筏井宏実
2. 発表標題 ハマダラ蚊の腸内細菌叢の破綻が卵巣内の卵発育を抑制する
3. 学会等名 第88回 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 箱崎 純、野々垣雄介、田邊太志、西山啓太、中山和彦、原口麻子、中村咲蓮、草木迫浩大、筏井宏実
2. 発表標題 ハマダラカの腸内細菌 <i>Methylobacterium</i> sp. が卵発育に与える影響
3. 学会等名 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 第 67 回北日本支部合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 箱崎 純、野々垣雄介、田邊太志、西山啓太、中山和彦、原口麻子、中村咲蓮、草木迫浩大、筏井宏実
2. 発表標題 <i>Methylobacterium radiotolerans</i> によるハマダラカの卵発育機能低下
3. 学会等名 第91回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------