

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23849

研究課題名(和文) 糖類を用いた吸血昆虫の病原体媒介に関与する中腸要因の解析

研究課題名(英文) Study using sugars on the mechanism restricting vector competence in hematophagous arthropod midgut

研究代表者

水島 大貴 (Mizushima, Daiki)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：50843455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：マラリアやリーシュマニア症は、ヒトに深刻な症状を呈する吸血昆虫媒介感染症である。両病原体が感染可能な吸血昆虫は決まっているが、感染を規定する因子は未だ不明である。本研究は、感染規定因子の特定を目的とし、病原体発育に重要な昆虫の中腸環境を、生体調節機能を持つ糖類により変化させ、変動する因子と病原体感染性を比較解析した。病原体に直接作用せず、一因子である腸内細菌叢を変化させる糖類により感染性が顕著に低下したことから、糖類によって制御される細菌叢及び腸内免疫関連因子が病原体の感染を抑制していることが予測された。糖類により特異的に制御される腸内環境因子を特定することで、感染決定因子の特定が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、吸血昆虫媒介感染症を媒介する吸血昆虫と病原体間における宿主特異性を決定する生物間相互作用に関わる因子を明らかにすることを目的とした。本研究の成果は、吸血昆虫内における病原体媒介メカニズムについて理解を深めるだけでなく、吸血昆虫媒介感染症をコントロールするためのターゲットとなる因子を見出し、当該感染症の制圧に貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Malaria and leishmaniasis, which are caused by Plasmodium parasites and Leishmania parasites infection, are the vector transmission diseases. Although blood-sucking vectors has been defined in both causative agents, the factor deciding vector competence is unknown. The aim of this study is to define the factor deciding vector competence in both transmission models, changing midgut environment of their vectors using sugars which have a biological modulating function.

The varying of midgut microbial composition and the declining of Plasmodium parasite infectivity were clearly observed in the mosquitoes fed the sugar modulating midgut environment. These results suggested that the parasite infectivity may be regulated by midgut microbiota and/or the immune-related factors modulated by the sugar in mosquito.

研究分野：医動物学

キーワード：吸血昆虫 ハマダラカ マラリア サシチョウバエ リーシュマニア 中腸 糖類

1. 研究開始当初の背景

マラリアやリーシュマニア症といったヒトに深刻な病気をもたらす節足動物媒介感染症の病原体は、吸血昆虫（ベクター）によって哺乳動物に媒介される。

これまで、病原体の発育・ヒト感染性の獲得は、“ベクター種と病原体との組み合わせによって規定される”と考えられてきた。実際に、マラリアの病原体であるマラリア原虫はハマダラカによって媒介されるが、同じ蚊のヤブカやイエカでは媒介されない。リーシュマニア症の病原体であるリーシュマニア原虫はサンショウバエによって媒介されるが、旧大陸サンショウバエと新大陸サンショウバエとの間で媒介されるリーシュマニア原虫の種が異なることが明らかになっている。しかし、当研究室が実施した新大陸におけるリーシュマニア症とサンショウバエの疫学調査により、ある新大陸サンショウバエ種が媒介するリーシュマニア症原虫種は、分布地域によって異なるということがわかった。つまり、病原体とベクター種との関係は、必ずしもそれらの組み合わせに規定されるとは限らないことが示唆された。これらの事実は、“病原体の発育・ヒト感染性の獲得はベクター種と病原体との組み合わせによって規定される”という従来の考えに疑問を提示するものである。

吸血昆虫の中腸は病原体の発育・増殖の場として重要な微小環境である。近年、マラリア原虫を媒介するハマダラカに対して抗生物質を投与することで、その感染効率が上昇することや、成虫の血液以外の餌である糖類に、天然にごく僅かにしか存在しない糖類である希少糖を混合してハマダラカに摂取させると、その発育が阻害されることも明らかになっている。一方、サンショウバエにおいては、抗生物質を投与すると感染効率が低下することに加え、希少糖を摂取させたサンショウバエ中腸における細菌叢の変化が次世代シーケンス解析によって確認されている。このように、抗生物質だけでなく糖類も病原体の感染効率に影響を与えていることは大変興味深い。しかし、吸血昆虫の中腸において、糖類がどのような作用機序で病原体の感染効率に影響を与えているかは検討されていない。

2. 研究の目的

多くの糖類は、機能的食品や健康食品への応用研究が盛んに行われている。しかし、ベクターの病原体媒介のメカニズムを明らかにすることを目的とした研究は国内外問わず行われていない。そこで、本研究では、希少糖だけでなく、その他の糖類に中腸における病原原虫の発育を制御するものがあるか検討するとともに、糖類が有する生体調節機能を利用して、どのような中腸要因が病原体媒介能に関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 吸血昆虫体内における病原原虫の発育・増殖能の評価系確立

短時間の操作、高感度検出が可能なルシフェラーゼアッセイを基に、吸血昆虫体内（ハマダラカ、サンショウバエ）における病原原虫（ネズミマラリア原虫、リーシュマニア原虫）の発育・増殖能を定量化するため、ルシフェラーゼ発現組換え原虫を用いて *in vivo* での定量性を確認した。

2) 吸血昆虫に対する種々糖類の影響

生体調節機能を有する糖類（単糖-グルコース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、マンノース、キシロース、オリゴ糖-スクロース、マルトース、ラクトース、ラクチュロース、ラフィノース、糖アルコール-ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、希少糖-アロース、計 16 種）の吸血昆虫への影響を評価するため、上記の糖類を血液以外の餌である糖液に混合して吸血昆虫に長期間摂取させ、その際の吸血昆虫の生存率を検討した。

3) 吸血昆虫体内における病原原虫に対する糖類の影響

生体調節機能を有する糖類が吸血昆虫体内の病原原虫の発育にどのような影響を与えるのかを検討するため、上記の糖類を予め摂取させた吸血昆虫に対し組換え原虫を感染させた。その後も同一の糖類を摂取させ続け、それぞれの群の病原原虫の発育・増殖能を実験 1 で確立したルシフェラーゼアッセイにより定量した。

4) 糖類による吸血昆虫の中腸環境に与える影響

病原原虫に影響を与える糖類を吸血昆虫に投与する群としない群を設定した。それらの中腸由来 DNA を次世代シーケンサーにて、両者の中腸細菌叢の群集構造を解析した。

4. 研究成果

- 1) ハマダラカ体内のネズミマラリア原虫数(オースト数)と同一検体のルシフェラーゼの発光強度を比較したところ、病原原虫数と発光強度が高い相関性を示した(スピアマンの順位相関係数 $r=0.82$)。このことから、ルシフェラーゼアッセイによる吸血昆虫体内の病原原虫数の定量が可能であると判断し、以降の実験に用いた。一方、リーシュマニア原虫数の定量に関しては、人工吸血法によりリーシュマニア原虫感染サシチョウバエの作製を試みたが、吸血数及びリーシュマニア原虫感染率が非常に低く(3個体/40個体) 定量することが困難であった。このことから、人工吸血法の改善やリーシュマニア原虫感染マウスを用いた代替作製法が必要であることがわかった。
- 2) 16種の糖類の内、ラクトース、ラクチュロース及びマルチトールをそれぞれ摂取させ続けたハマダラカ群において、摂取後2週間までに生存率が50%まで減少した。アロース及びエリスリトールをそれぞれ摂取させ続けたハマダラカ群においては1ヶ月後までに生存率が50%以下まで低下した。それ以外の糖では生存率の顕著な変化は見られなかった。一方で、サシチョウバエに関しては、いずれの糖類も生存率に影響を与えなかった。以上のことから、ラクトース、ラクチュロース、マルチトールは、マラリア原虫がハマダラカ中腸で発育している間に、宿主昆虫を死滅させる可能性があることが示唆された。
- 3) 16種の糖類の内、アロースを摂取させ続けたハマダラカ群のみでルシフェラーゼ活性が有意に減少した。また、顕微鏡下でハマダラカ中腸のマラリア原虫の発育を観察したところ、コントロール群と比較して、アロース摂取群におけるマラリア原虫の発育は顕著に抑制されていた。さらに、*in vitro* 培養条件下におけるアロースの組換えマラリア原虫の発育への影響を検討したところ、培養期間中、コントロール群と同様のルシフェラーゼ活性を検出した。以上のことから、アロース摂取ハマダラカにおけるマラリア原虫発育の抑制は、アロースによる中腸環境の変化に起因していることが示唆された。
- 4) コントロール群において、吸血前から吸血後3日目の間で *Sphingomonas* 属と *Phyllobacterium* 属の相対存在比が逆転していることや、*Paracoccus* 属が出現したが、その後10日目までに *Paracoccus* 属は減少し、主要構成細菌のみとなった。一方、アロース摂取群においては、吸血後3日目までに *Phyllobacterium* 属、*Paracoccus* 属の存在比が減少し、*Sphingomonas* 属の存在比が増加した。10日目においては、コントロール群では見られない *Pseudomonas* 属の存在比の顕著な増加が見られた。このことから、アロースはハマダラカ中腸細菌叢を変化させる生体調節機能を有することが明らかとなった。さらに、中腸細菌叢の構成やそれに応じた免疫応答の変化によりマラリア原虫の発育が制御されていることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|