

200829026A

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

遺伝子増幅 RPA 法に基づいた媒介蚊における
迅速簡便病原体検出法の開発

(H19-新興一般-011)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 嘉 糠 洋 陸

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新興・再興感染症研究事業

遺伝子増幅 RPA 法に基づいた媒介蚊における
迅速簡便病原体検出法の開発

(H19-新興-一般-011)

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 嘉 糠 洋 陸

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

遺伝子増幅 RPA 法に基づいた媒介蚊における
迅速簡便病原体検出法の開発

嘉 棟 洋 陸 5

II. 分担研究報告

1. 原体媒介蚊における等温遺伝子増幅法の応用研究
嘉 棟 洋 陸 15
2. 媒介蚊-病原体感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発
福 本 晋 也 21
3. 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成
下 島 昌 幸 29
4. 等温遺伝子増幅産物の検出に向けた
イムノクロマト・ストリップ作成法の確立
平 田 晴 之 33
5. ネズミマラリア原虫を用いた
ヒトマラリア原虫感染モデルの構築
油 田 正 夫 37

III. 研究成果の刊行物・別刷

. 45

遺伝子増幅 RPA 法に基づいた媒介蚊における迅速簡便病原体検出法の開発

研究代表者 嘉榊 洋陸 帯広畜産大学原虫病研究センター 教授

研究要旨 マラリア、西ナイル熱、デング熱等の蚊媒介性の再興感染症は世界的に大きな脅威となっている。本研究では、これらの感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、等温遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法の確立を目的として以下の項目に分け遂行した。(1) 原虫感染モデルとしてハマダラカ-鬚歯類マラリア原虫感染モデル、ウイルス感染モデルとしてヤブカーフロックハウスウイルス感染モデル、蠕虫感染モデルとしてヤブカー-犬糸状虫感染モデルを用いた、LAMP 法に代表される等温遺伝子増幅法による病原体検出評価および準備基盤の確立に成功した。(2) 簡便な検査結果判定法を確立するため、異なる病原体株を媒介蚊に混合感染させたモデルを用いて、等温遺伝子増幅法による増幅産物をイムノクロマト法により検出する手法の開発に成功した。(3) プライマーに蛍光標識を施し、これらの標識物に対する抗体を用いたイムノクロマトストリップを作製し、簡便に遺伝子増幅産物を検出可能な系を構築することに成功した。(4) 熱帯熱マラリア流行地域である西アフリカ・ブルキナファソ国における蚊生息フィールドでの蚊サンプル採集を実施し、DNA テンプレート・ライブラリーのさらなる充実に成功した。以上の研究により、病原体媒介蚊における病原体検出に対する総合的な厚生労働行政施策を策定するための科学的基盤を進展させた。

分担研究者：

福本晋也（帯広畜産大学原虫病研究センター 講師）

下島昌幸（東京大学医科学研究所 助教）

平田晴之（大学院医学系研究科付属疾患生命工学センター 助教）

油田正夫（三重大学大学院医学系研究科 教授）

A. 研究目的

マラリア、西ナイル熱、デング熱等の蚊媒介性の再興感染症は世界的に大きな脅威となっている。本研究では、これらの感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、等温遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法の確立を目的とした。本研究で対象とする感染症では、たった一つの病原体の侵入でも人への感染成立が可能のため、高感度かつ特異的な検出法が必要であり、これらの特性に優れた PCR 法が現在の主流となっている。しかしながら PCR 法は高度な設備を必要とし、汎用性に問題がある。近年、PCR 法などの諸問題を解決する遺伝子増幅手法として、LAMP 法などに代表される等温遺伝子増幅法が開発された。等

温遺伝子増幅法は PCR 法と同様にプライマーによって反応がおこなわれる。遺伝子の増幅は一定温度下で 60 分程度と極めて短時間であり、特異性は PCR に準じ、また増幅産物をイムノクロマト法により目視による判定が原理的に可能であり、極めて迅速かつ簡便性に優れた手法と考えられる。また、一回の反応で各種病原体遺伝子を検出するマルチプレックス化により、数種類の病原体を短時間で一度に検出することが可能である。

遺伝子増幅による新規の病原体検出系の開発にあたっては、プライマーの設計など反応条件の至適化が必要なため、開発着手から実用化までに長大な時間を要する。LAMP 法など等温遺伝子増幅法の優れた点として、ひとつ

の標的遺伝子に対して4つないしは6つのプライマーの組み合わせを用いるため、比較的短時間に特異性の高い条件の設定が可能で、各種病原体への応用を迅速におこなうことができる。さらに、LAMP法はラダー状の増幅遺伝子産物が大量に生じるため、プライマー標識等による簡便検出などの更なる解析に応用可能である。

上記のように、等温遺伝子増幅法は既存の方法の持つ問題点を克服し、様々な優れた特性を有する手法である。LAMP法等の等温遺伝子増幅原理の病原体検出法としての応用開発研究は、我が国を含めた世界各国に於ける新規病原体サーベイシステムとして、多大なる貢献をもたらすものと考えられる。

B. 研究方法

本研究は、世界的な驚異となっている蚊媒介性再興感染症、特にマラリア、西ナイル熱、デング熱などの日本への侵入を防除するため、等温遺伝子増幅法を応用した迅速かつ簡便な病原体検出システムの開発を目指すものである。

研究計画の概略は以下の通りである。齧歯類マラリア原虫とブロックハウスウイルスを用いた媒介蚊-病原体感染モデルを用いることで等温遺伝子増幅法による蚊からの病原体検出システムの有効性を検証、反応条件等の最適化をおこなう。次に、本来の対象病原体である熱帯熱マラリア原虫、西ナイル熱ウイルス、デング熱ウイルスなどを検出可能な等温遺伝子増幅法の開発をおこなう。また、イムノクロマト法による増幅産物検出法を確立し、簡便な検定結果の判定法を開発する。さらに、多種の病原体を同時に検出可能な「マルチプレックス等温遺伝子増幅法-イムノクロマト法」の開発をおこなう。その後、日本国内および諸外国より収集した蚊サンプルを用いて、等温遺伝子増幅法の実用性の評価、さらに世界的な蚊媒介性再興感染症の正確な汚染状況を把握することを最終目標とする。本研究課題は三ヶ年の計画から成り、平成20年度の計画は以下に述べる。

平成19年度より開始した本研究課題では、これまでに原虫感染モデルとして齧歯類特異的なマラリア原虫を用いた「ハマダラカ-マラリア原虫感染モデル」、ウイルス感染モデルとして「ヤブカ-ブロックハウスウイルス感染モデル」の樹立を達成し、本年度も研究を順調に遂行した。上記研究基盤をもとに、平成20年度では、媒介蚊-病原体感染モデルを用

いた等温遺伝子増幅法法の評価、マルチプレックス等温遺伝子増幅法法の開発と、等温遺伝子増幅法増幅産物のイムノクロマト検出法の確立を目標とした。

以上の等温遺伝子増幅法を用いた病原体迅速・簡便検出法として応用開発研究により、媒介蚊の正確な病原体保有状況をサーベイすることが可能となり、我が国の病原体管理体制強化に大きく寄与するものと考えられる。

これらの研究は、以下の分担研究課題として遂行され、本研究の根幹として各課題が連携しながら進めた。

- (1) 媒介蚊-ウイルス感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発 (研究分担者: 嘉藤洋陸)
- (2) 媒介蚊-寄生虫感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発 (研究分担者: 福本晋也)
- (3) 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成 (研究分担者: 下島昌幸)
- (4) 等温遺伝子増幅産物の検出に向けたイムノクロマト・ストリップ作成法の確立 (研究分担者: 平田晴之)
- (5) ネズミマラリア原虫を用いたヒトマラリア原虫感染モデルの構築 (研究分担者: 平田晴之)

本年は3年計画研究の2年目であり、進捗状況および研究成果を会議等で確認・情報交換し、当該研究成果に立脚して随時研究課題を検討・修正する。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和55年総理府告示第6号)」に則り、動物実験を行う施設ごとの「動物実験に関する基本方針」や「動物実験施設管理運営規定」等を十分に遵守して研究を遂行した。

遺伝子組換え実験および微生物利用実験について、前者は文部科学省「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及びこれにもとづく政省令・告示に示される基準に適合し、かつ所属機関の承認を得て遂行する。後者についても、各研究機関の「病原体等安全管理規程」等にもとづき、実施した。

疫学研究に関わる試料採集等の研究遂行にあたっては、我が国の文部科学省・厚生労働省が共同で作成した「疫学研究に関する倫理指針(平成14年6月17日)(平成16年12月28日全部改正)(平成17年6月29日一部改

正)」に従い、流行地における疫学調査研究にも同様にあてはめた。それぞれの国・地域における対象となる住民の不利益になることの無いように最大限の配慮を注いだ。

C. 研究結果

(1) 媒介蚊-ウイルス感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発

1. 単一温度反応系遺伝子増幅法によるヤブカからの FHV 検出

まず、FHV そのものをテンプレートとして LAMP 法に供したところ、0.004 ng の FHV DNA よりウイルスを検出可能であった。次に、昆虫培養細胞(ショウジョウバエ由来)に FHV を感染させ、そのサンプルを宿主細胞と共に調整し、宿主 DNA が混在する条件にて LAMP 法による FHV 検出を試みた。その結果、このプライマーは宿主細胞の DNA を検出せずに、1 PFU に相当する FHV をも特異的に検出可能であることが判明した。さらに、各種濃度の FHV をヤブカに感染させた。検出限界を検証するため、この感染蚊から DNA を抽出し、LAMP 法による検出限界ウイルス数を測定したところ、ウイルスがたった 1 PFU 存在するだけでも LAMP 法により検出されることが明らかとなった。

(2) 媒介蚊-寄生虫感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発

1. 等温遺伝子増幅法によるハマダラカからのマラリア原虫検出モデルの開発

第一にマラリア感染赤血球をテンプレートとして LAMP 法に供したところ、 1×10^2 の感染赤血球由来 DNA よりマラリア原虫を検出可能であった。感染赤血球から DNA を精製することなく、煮沸したサンプルを LAMP 反応に供した場合においても同等の検出感度を示した。次にマラリア原虫スポロゾイトより精製した DNA を LAMP 法に供し、検出限界の解析を行ったところ、感染赤血球の場合と同様に、検出限界は 1×10^2 スポロゾイトであった。LAMP 法のハマダラカからのマラリア原虫オーシスト検出に対する有効性を検証するため、マラリア原虫を吸血させた蚊を無作為に抽出し、蛍光顕微鏡によるオーシストの確認と、LAMP 法による検出反応に供したところ、蛍光顕微鏡にてオーシストが確認可能であった全てのサンプルより LAMP 法にてマラリア原虫の検出が可能であった。マラリア原虫感染蚊を実体顕微鏡下で解剖し、オーシスト数を確認した。1~367 個のレンジでオーシストが存在する蚊

より、DNA の抽出を行い、LAMP 法に供した。その結果、たった 1 個のオーシストが存在する状態の蚊サンプルからも、LAMP 法のよりマラリア原虫を検出することが可能であった。

2. 等温遺伝子増幅法によるヤブカからのフィラリア検出法の開発

試験管内培養より分離されたマイクロフィラリア ($1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^4$) を用いて LAMP 法による感度を測定したところ、 1×10^0 のフィラリア DNA を検出することが可能であった。またフィラリアからの LAMP 増幅産物の塩基配列はフィラリア由来であることが確認された。実験的にフィラリアを感染させたヤブカを実体顕微鏡下で解剖し、マルピーギ管に 1~16 匹のフィラリアのレンジでフィラリアが存在する蚊サンプルを用意し、そのサンプルから DNA を抽出し LAMP 法に供した。その結果、一個体のフィラリア感染を LAMP 法により検出可能であることが確認された。LAMP 法がフィールドサンプルからの病原体検出にも適用可能かを検討するため、沖縄県にてフィールドサンプルを採集し、LAMP 法に供した。その結果、*Aedes albopictus* 72 匹、*Armigeres subalbatus* 43 匹、*Culex pipiens* 2 匹、*Culex vishunui comp* 2 匹、*Aedes aureostriatus* 1 匹を採集し、LAMP 法に供した。その結果 11 匹の蚊サンプルからフィラリアを検出可能であり、本法のフィールドでの有効性が示された。

(3) 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成

1. 感染性西ナイルウイルス様粒子の産生
様々な構造蛋白質の発現パターンにおいても西ナイルウイルス様粒子は $9.7 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^6$ infectious units (IU)/ml の感染価を BHK 細胞に示した。構造蛋白質を発現させなかった場合の感染価は認められなかった。

最も高い感染価は、構造蛋白質 C および prM を 1 つのプラスミドから、E を別のプラスミドから産生させた場合に見られた (C-prM + E)。よって以下の実験にはこの構造蛋白質の発現のパターンで得られた西ナイルウイルス様粒子を用いた。

2. ウイルス様粒子の感染指向性

西ナイルウイルスは BHK 細胞や Vero E6 細胞等の上皮系細胞でよく増殖し、Jurkat 細胞等の血球系細胞では殆ど増殖しないことが知られている。そこでこれらの細胞におけるウイルス様粒子の感染価を調べた。BHK 細胞、Vero E6 細胞では 1×10^6 IU/ml 弱の感染価が見られたが、Jurkat 細胞、CEM 細胞、Daudi 細胞、

THP-1 細胞で (いずれも血球系細胞) は 1×10^4 IU/ml 以下の感染価しか示さなかった。構造蛋白質 E を VSVG にした場合の血球系細胞における感染価は 1×10^4 IU/ml 以上であることから、レプリコンの複製はいずれの細胞においても十分起こるものであり、西ナイルウイルス様粒子は血球系細胞へは感染しにくいと考えられた。

また、西ナイルウイルスの感染はカルシウム依存性レクチン (C 型レクチン) である Dendritic cell intracellular adhesion molecule3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) や Dendritic cell intracellular adhesion molecule3-grabbing non-integrin-related protein (DC-SIGNR) によって高められることが知られている。そこで、Jurkat 細胞にこれら C 型レクチンを安定的に発現させたものを作製し、ウイルス様粒子の感染価の測定に用いた。その結果、DC-SIGN および DC-SIGNR を発現させた Jurkat 細胞での感染価はそうでない細胞 (Normal) での場合と比べ 10 倍 ~ 100 倍程度ウイルス様粒子の感染価が高いことが分かった。構造蛋白質 E の代わりに VSVG を用いて作製したウイルス様粒子の感染価は殆ど変化しなかった。DC-SIGN, DC-SIGNR は西ナイルウイルス様粒子の感染を増強していると考えられた。

すなわち、作製した西ナイルウイルス様粒子は本来の野生型西ナイルウイルスの感染指向性を保持していることが判明した。

3. 新たな西ナイルウイルス感染増強分子の探索

DC-SIGN, DC-SIGNR とは異なる糖鎖特異性を有する別の C 型レクチン asialoglycoprotein receptor (ASGPR) および macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) が Jurkat 細胞における感染価に影響するか否か調べた。いずれの分子も西ナイルウイルス様粒子の感染価を高めた。C 型レクチンではないが他のウイルスの感染増強に関わる ACE2 (SARS コロナウイルスの受容体) や Ax1 (エボラウイルスの細胞侵入に関わると示唆される分子) は Jurkat 細胞における感染価に影響しなかった。

(4) 等温遺伝子増幅産物の検出に向けたイムノクロマト・ストリップ作成法の確立

1. *B. gibsoni* P50 遺伝子の PCR による増幅の確認

5' 末端をそれぞれ FITC-と Biotin-ラベルした特異的プライマーで PCR 反応を行い増幅し、増幅バンドを確認した。

2. FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出のための最適なイムノクロマト・ストリップの作製とその最適条件の決定
ニトロセルロースメンブレン HF180MC100, HF135MC100, 及び HF120MC100 にそれぞれコンジュゲートパット (No. 6613, No. 1281, No. 8964: ミリポア) を用いて、イムノクロマト・ストリップを作製した。さらに、ストレプトアビジン標識金コロイド粒子及び抗 FITC 抗体を pH7.2 及び pH7.4 に調整し作製したイムノクロマト・ストリップに、FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いて評価した。その結果、メンブレンの流動速度が速い HF180MC100 は速度の遅い HF135MC100 と HF120MC100 に比べて検出感度が高く、しかも検出時間が 5 分程度であったことから、最適なメンブレンは HF180MC100 にすることに決定した。また、3 種類のコンジュゲートパットは HF180MC100 のメンブレンを用いた結果、コンジュゲートパットの吸収性、検出感度を評価した結果、No. 8964 が最適であった。

さらに、pH7.2 及び pH7.4 で調整したイムノクロマト・ストリップの検出感度を比較した結果、pH7.2 で作製したイムノクロマト・ストリップにおいて明瞭な検出バンドが認められた。以上の結果より、FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出するためのイムノクロマト・ストリップを用いて検出する最適な条件は HF180MC100 のメンブレン、No. 8984 のコンジュゲートパット、及びストレプトアビジン標識金コロイド粒子と抗 FITC 抗体の最適 pH は pH7.2 の緩衝液を利用することにそれぞれ決定した。

3. *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物のイムノクロマト法による検出限界の検討

PCR により得られた *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物が最適条件下でのイムノクロマト法による検出限界を検討した。本遺伝子増幅産物を 2, 10, 20, 30, 50 及び 100 倍希釈し、それぞれをイムノクロマト法により検討を行った。その結果、すべての希釈倍率において検出バンドが確認された。以上の結果より、本イムノクロマト・ストリップにおける *B. gibsoni* の検出感度は 100 倍以上であることを確認した。

(5) ネズミマラリア原虫を用いたヒトマラリア原虫感染モデルの構築

1. 構成的 GFP 発現コンストラクトを含む人工染色体の構築

PCR で増幅されたセントロメア候補領域をク

ローニングし、配列を決定した。その後、決定した配列のAT含量が96%以上であること、すなわち目的とするセントロメア領域を増幅できたことを確認した。これを用いて人工染色体を作成した。

2. ネズミマラリア原虫血液感染ステージへの人工染色体の導入と安定性の評価

薬剤非存在下で20日間経過後も、C-PACは、コントロールプラスミドに比べ、原虫内で有意に維持されていた。この結果から、本人工染色体は、血液ステージ原虫内で安定に維持されることがわかった。従って第5番染色体より得られた約1.4kbのセントロメア推定領域を最小機能領域として得ることができた。

3. ベクター感染ステージでの導入染色体の安定性の評価

pPBCE5A/Tを導入した原虫では、その蚊ステージの原虫の85%以上が人工染色体を保持しており、蚊ステージにおいて人工染色体は安定的に維持されていることが分かった。

D. 考察

(1) 媒介蚊-ウイルス感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発

西ナイル熱、デング熱、日本脳炎等の蚊媒介性のウイルス感染症は世界的に大きな脅威となっている。本年度の本分担研究では、これらのウイルス感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、単一温度遺伝子増幅法による迅速・簡便ウイルス検出法の確立へ向けた準備研究を実施した。このような研究を実施するにあたり、本来は実際に感染症を引き起こすウイルスを用いるべく側面があるが、研究の初期段階においてはより詳細が明らかな実験的にコントロールされたマテリアルの使用が迅速な研究の遂行には必須である。また開発使用とする方法と近縁のより確立された優れた方法と比較検討することが、研究成果の精度を高める上で重要である。そこで、我々は近年、感染症診断研究の分野で大きな注目を受け、実際にその有用性が確認されつつある等温遺伝子増幅技術であるLAMP法を用いて、基盤データを得ることとした。本研究ではLAMP法をヤブカからのモデルウイルス診断に応用し、優れた成績を得ることに成功した。これらの結果は等温遺伝子増幅技術が節足動物媒介性の感染症診断に対して極めて高い有用性を持つことを示唆するものであった。実際の媒介蚊侵入防除の現場では迅速な検査態勢の整備、また検査に供するためのサン

ル保存システムの構築が重要である。本研究において、LAMP法による等温遺伝子増幅法の有効性が示されたことにより、高度な設備を有しない感染症侵入防除の最前線である国際空港や国際港の現場でも迅速に検査結果を得ることが可能であることが示唆された。また蚊サンプルの保存に関しても特別な設備や機器を使用せず、単に濾紙に挟んで常温保存という極めて簡便な方法で、長期保存が可能であることが明らかになり、実際の検査体制を構築するのに際し極めて重要な知見を得ることとなった。

(2) 媒介蚊-寄生虫感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発

蚊媒介性感染症の日本への侵入防除のため、検査所などの実際の水際防除の現場でも実施可能な簡便かつ迅速な病原体検出システムの開発が望まれる。そこで我々はPCR法のように特別な機器を用いることなく遺伝子診断が可能な等温遺伝子増幅法に着目して研究を展開した。本年度は実験室レベルで、カ-寄生虫感染モデルを用いた実験系より得られたサンプルを用いて、等温遺伝子増幅法の有用性を検証した。マラリアのモデルとして、齧歯類マラリアとハマダラカを用いた感染モデル、寄生虫のモデルとして、フィラリアとヤブカを用いた感染モデルを使用した。

齧歯類マラリア-ハマダラカ感染モデルを用いた、等温遺伝子増幅法の解析の結果、精製した病原体を用いた場合、哺乳動物宿主および蚊の双方の病原体ステージから、100マラリア原虫が検出限界であった。この結果は既存の遺伝子診断法と比較して、優れた数値であり、本法の信頼性の高さが示されたと考えられる。また、本研究による本来の対象とは異なるが、哺乳動物宿主ステージのマラリア原虫の場合、特段DNAを抽出することなく、血液の煮沸サンプルを等温遺伝子増幅法に供しても精製DNAと同等の検出限界を示した。このことは、本法のヒトマラリアでの迅速スクリーニング検査への応用性を示す物であった。マラリア感染ハマダラカサンプルを等温遺伝子増幅法に供した場合、一個体のオーシストを検出可能であった。この結果はハマダラカにおけるマラリア感染において、等温遺伝子増幅法によって一感染ユニットを検出可能であることを示し、これはヒトにマラリアを媒介する能力を持つ蚊の検出に対して必要十分な感度を持つことを示す結果であった。以上のように、本研究で開発した等温遺伝子

増幅法はハマダラカからのマラリア原虫検出に対して高い有用性を持つことを明らかにした。

フィラリア-ヤブカ感染モデルを用いた等温遺伝子増幅法の解析の結果、精製病原体から DNA を抽出し試験に供したところ、一個体の病原体を検出可能であった。フィラリアは多細胞生物であるため、更なる検出限界の検定を実施したところ、0.1 個のフィラリア由来サンプルより、フィラリア DNA を検出可能であり、本等温遺伝子増幅法が優れた検出性能を有することが示された。実際のヤブカ感染サンプルを本法に供した場合においても、一個体のフィラリア感染を検出可能であることが示され、本法はヤブカサンプルからのフィラリア検出法として高い有用性を持つことが確認された。また、実際のフィラリア汚染地帯において本等温遺伝子増幅法の検定をおこなったところ、フィールド由来ヤブカサンプルから高感度にフィラリアを検出可能であり、本研究において開発された等温遺伝子増幅法は高い実用性を持つことが示された。

(3) 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成

マーカー遺伝子を持った西ナイルウイルス様粒子が作製できたことにより、西ナイルウイルス-蚊感染モデルの確実な構築基盤ができた。感染細胞は蛍光蛋白質を発現するようになるので、感染成立の有無が極めて容易に判断できる。また増殖性を持たないため、その扱いは比較的安全である（本来の西ナイルウイルスの扱いはBSL3）。単一温度遺伝子増幅法の確立におけるプライマー設計や感度の検定、特異性の検定に役立つはずである。西ナイルウイルス以外の蚊媒介性感染症の原因ウイルスであるデングウイルス・黄熱ウイルスも西ナイルウイルスと類似のゲノム構造をしているため、本研究と同じ戦略でウイルス様粒子を作製することができるはずである。それらの蚊感染モデルの構築も確実視される。作製した西ナイルウイルス様粒子の感染指向性は本来のウイルスのものを保持していた。よって、このウイルス様粒子は危険な西ナイルウイルス自体を用いずとも中和抗体価測定や感染指向性の解析に用いることができ、実験の安全面そして操作効率性も良い。実際我々は、このウイルス様粒子を用いて解析を行い、ASGPR および MGL という 2 つの C 型レクチンが西ナイルウイルス様粒子の感染を高めうる新規分子であることを見出した。本来

のウイルスを用いての確認実験が必要であることは否めないが、更なる感染指向性解析に有用であることは間違いない。

(4) 等温遺伝子増幅産物の検出に向けたイムノクロマト・ストリップ作成法の確立

研究分担者は準備基盤の確立を目的として既存の病原体遺伝子を用いたイムノクロマト・ストリップの作製、目視による判定および検討を行った。本研究において作製したイムノクロマト・ストリップはイヌバベシア感染症において高感度に検出することが可能であり、遺伝子診断に有用であることが示唆された。これからの検討課題として、複数の病原体遺伝子を用いたイムノクロマト・ストリップの作製及びその検出感度の検討が必要である。その際、複数の病原体遺伝子に対して、それぞれの特異性、感度を上げるために抗体の選定が重要な鍵になると考えられ、今後の検討事項である。

(5) ネズミマラリア原虫を用いたヒトマラリア原虫感染モデルの構築

今年度の研究では人工染色体を用いることによって蚊感染ステージを通じて外来遺伝子が安定に保持されることが確認された。今回の人工染色体は環状タイプのもので、テロメアは使用しなかった。しかしながらほとんど 100%に近い原虫で唾液腺内のスポロゾイトに至るまで安定に遺伝子は維持された。また導入された人工染色体の原虫内でのコピー数は原虫 1 匹あたり約コピーと推定された。この数は人工染色体を用いず環状 DNA を導入した場合に予想されるコピー数(数十コピー)に比べ明らかに少なく、等温遺伝子増幅法の検討に適していると考えられる。また遺伝子導入の効率も極めて高く、相同組換えにより外来遺伝子をネズミマラリア原虫のゲノムに組み込む方法に比べ手技も簡便である。またゲノムに組み込まないため原虫自身の表現型に影響を及ぼす可能性が低く、さらにクローン化する必要もないため、原虫自身の株の多様性を維持しながら、フィールドに近い状態で等温遺伝子増幅法の条件検討を行うことができるだろう。

E. 結論

平成 20 年度より開始した本研究課題では、これまでに媒介蚊-病原体感染モデルの樹立および汎用化、等温遺伝子増幅法による病原体検出評価を達成した。

日本における蚊媒介性感染症の発症例は、諸外国での感染に起因する輸入症例に限られているが、今後、温暖化等によりこれらの感染症流行域が日本へ拡大する可能性があり、大きな懸念となっている。人々の活動がグローバル化した現在、これらの感染症は病原体を保有した蚊が航空機や船舶に紛れて我が国に侵入し、流行が勃発する危険性がある。感染防止の為に、日本へ侵入した媒介蚊及び流行地域である諸外国に生息する媒介蚊における正確な病原体保有状況を知る必要がある。またこれらの媒介蚊が保有する病原体はごく僅かな侵入でも人への感染が可能であること、諸外国からの侵入門戸である空港や、開発途上国などの流行地域での使用を踏まえ実用性が要求されることから、本研究により等温遺伝子増幅法の応用が達成されれば、極めて高感度で迅速かつ簡便な病原体検出法を提供することになり、日本を含めた国際保健医療に多大な貢献をするものと考えられる。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文

- Aonuma H, Suzuki M, Iseki H, Perera N, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Kanuka H, Fukumoto S. Rapid identification of Plasmodium-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. *Biochem Biophys Res Commun* 376(4): 671-676, 2008
- Perera N, Aonuma H, Yoshimura A, Teramoto T, Iseki H, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Fukumoto S, Kanuka H. Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 156(1-2): 32-36, 2008
- Okado K, Shinzawa N, Aonuma H, Nelson B, Fukumoto S, Fujisaki K, Kawazu S, Kanuka H. Rapid recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 379(1): 6-10, 2009
- Takabatake N, Iseki H, Ikehara Y, Kanuka H, Yokoyama N, Sekimizu K, Igarashi I. Isolation and pathogenic characterization of an OBl variant of *Babesia rodhaini* which has a glycoporphin A-independent pathway to murine red blood cells. *Vet Parasitol* 159(2): 97-104, 2009
- Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B, Fukumoto S, Kanuka H. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasit Vectors* 2(1): 15, 2009
- Murakami S, Horimoto T, Mai le Q, Nidom CA, Chen H, Muramoto Y, Yamada S, Iwasa A, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Iwata A, Kawaoka Y. Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol* 82(21): 10502-10509, 2008
- Kakugawa S, Shimojima M, Goto H, Horimoto T, Oshimori N, Neumann G, Yamamoto T, Kawaoka Y. Mitogen-activated protein kinase-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol* 83(6): 2510-2517, 2009
- Sasaki M, Omobowale O, Ohta K, Tozuka M, Matsuu A, Hirata H, Nottidge HO, Ikadai H, Oyamada T. A PCR-based epidemiological survey of *Hepatozoon canis* in dogs in Nigeria. *J Vet Med Sci* 70(7): 743-745, 2008.
- Sasaki, M., Omobowale, O., Tozuka, M., Ohta, K., Matsuu, A., Nottidge, H. O., Hirata, H., Ikadai, H. & Oyamada, T. Molecular Survey of *Babesia canis* in Dog in Nigeria, *J Vet Med Sci* 69: 1191-1193, 2007.
- Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Mair GR, Janse CJ, Waters AP, Kato T, Kaneko I. Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. *Mol Microbiol* 71(6) 1402-1414, 2009
- Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, Kobayashi

T, Tamaru S, Nishii K, Yuda M, Shiku H, Katayama N. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gammadelta T-cell lymphoma. *Blood* 113(5) 1071-1074, 2009

Menard R, Heussler V, Yuda M, Nussenzweig V. Plasmodium pre-erythrocytic stages: what's new? *Trends Parasitol* 24(12) 564-569, 2008

Miyakoda M, Kimura D, Yuda M, Chinzei Y, Shibata Y, Honma K, Yui K. Malaria-specific and nonspecific activation of CD8+ T cells during blood stage of Plasmodium berghei infection. *J Immunol* 181(2) 1420-1428, 2008

Amino R, Giovannini D, Thiberge S, Gueirard P, Boisson B, Dubremetz JF, Prévost MC, Ishino T, Yuda M, Ménard R. Host cell traversal is important for progression of the malaria parasite through the dermis to the liver. *Cell Host Microbe* 3(2) 88-96, 2008

2. 学会発表

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアはどのようにして宿主体内への移行を理解するのか? 第77回日本寄生虫学会 2008.4.2

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 ハマダラカ中腸に存在する細菌がマラリア原虫の発育に与える影響 第77回日本寄生虫学会 2008.4.2

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Innate immune response activity correlates to diversity of *Drosophila* susceptibility to bacterial infection. 49th Annual *Drosophila* Research Conference 2008.4.4

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、河津信一郎、嘉糠洋陸 細菌感染における感受性の多様性と認識シグナル伝達メカニズム 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム

2008.5.26

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリア感染幼虫における環境依存的な脱皮関連遺伝子の探索 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム 2008.5.26

寺本時清、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 ウイルス媒介蚊における抗ウイルス反応メカニズムの解析 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム 2008.5.26

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 細菌感染におけるトランス機能による新規感染防御メカニズム 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム 2008.5.26

青沼宏佳、鈴木萌美、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、嘉糠洋陸、福本晋也 等温遺伝子増幅法(LAMP法)のマラリア原虫媒介蚊への応用 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム 2008.5.26

前川絵美、徳永史生、柿本辰男、嘉糠洋陸 蚊の吸血標的認識メカニズムの解明 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム 2008.5.26

土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 ロバストネスによるマラリア原虫温度適応メカニズム 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム 2008.5.26

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 マラリア媒介蚊における腸内細菌と病原体のインターフェース 日本分子生物学会第8回春季シンポジウム 2008.5.26

小林朋美、土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫の極性形成メカニズムとその意義は何か? 第15回分子寄生虫学ワークショップ 2008.8.4

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 マラリア媒介蚊における腸内細菌と病原体のインターフェース 第15回分子寄生虫学ワークショップ 2008.8.4

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 トランス機能は細菌感染における病原性を左右する新規感染防御機構か?

第2回細菌学若手コロッセウム 2008.8.5

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、河津信一郎、嘉糠洋陸 細菌感染における宿主抵抗性の多様性とそれを支えるメカニズム 第2回細菌学若手コロッセウム 2008.8.5

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Impact of midgut bacteria on *Plasmodium* development in mosquito 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2008.9.10

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 Cellular encapsulation-based host tolerance in bacterial infection 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2008.9.10

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 感染症媒介蚊・腸内細菌・病原体の間に存在するインターフェース 第8回昆虫病理研究会シンポジウム 2008.9.11

嘉糠洋陸 感染現象とそれと対峙する宿主の抵抗戦略 第8回昆虫病理研究会シンポジウム 2008.9.11

青沼宏佳、鈴木萌美、吉村文、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、平田晴之、嘉糠洋陸、福本晋也 等温遺伝子増幅法(LAMP法)の蚊媒介性感染症への応用 第146回日本獣医学会 2009.9.25

嘉糠洋陸 病原体媒介蚊における感染症伝播システム 第74回岩手大学 COE フォーラム 2008.10.10

嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila* Swedish-Japan STINT-meeting on Innate Immunity 2008.10.16

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 食細胞による囲い込みは細菌感染に対する tolerance 機能を宿主に付与する 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008.12.10

土井裕子、福本晋也、小林朋美、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫における温度ロバ

トネス機構 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008.12.10

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊・マラリア原虫・腸内細菌の三者の相互作用 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008.12.10

前川絵美、徳永史生、柿本辰男、嘉糠洋陸 ハマダラカには CO2 依存性熱センシング(CATS)システムが存在する 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008.12.10

嘉糠洋陸 感染症媒介蚊のバイオロジ 第8回東北大学 GCOE 生態応答セミナー 2008.12.15

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアの生活環における環境応答性トランジション機構 第78回日本寄生虫学会 2009.3.28

木村亜希子、福本晋也、野村伸彦、満山順一、井上昇、河津信一郎、五十嵐郁男 In vitro and In vivo Antimalarial activity of T-2037, a novel Arylamidine 第42回日米医学協力・寄生虫疾患部会合同会議 2009.1.7

木村亜希子、福本晋也、野村伸彦、満山順一、井上昇、河津信一郎 新規アリアルアミジン系化合物 T-2307 の抗マラリア活性 第78回日本寄生虫学会 2009.3.28

H. 知的財産権の出願・登録情報なし

媒介蚊-ウイルス感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発

研究分担者 嘉藤 洋陸 帯広畜産大学原虫病研究センター 教授

蚊媒介性病原体検出法の開発のため、病原体感染モデルを用いた等温遺伝子増幅法の有用性の検討をおこなった。ブロックハウスウイルス-ヤブカ感染モデルにより得られたサンプルを等温遺伝子増幅法に供したところ、モデル由来蚊サンプルから病原体を検出可能であった。この結果より、等温遺伝子増幅法が媒介蚊からのウイルス検出に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

近年の国際高速輸送網の発達によって、病原体媒介昆虫が本来の飛翔・移動の力を超えて国際的な移動を行う懸念が大きくなっている。事実、ヨーロッパなどの国際空港の周囲ではベクターの移入によるものと推測される感染症移入事例が多く報告されている。また、一度このような病原体感染昆虫が国内に侵入すると昨今のアメリカ合衆国における、西ナイル熱の急激なアウトブレイクが記憶に新しいように、感染が爆発的に拡大する懸念がある。幸いにも、日本では現在のところこのようなアウトブレイクの発生は報告されていないが、常にその脅威に晒されているため、水際での侵入防除対策が極めて重要となる。

そこで本研究では、ウエストナイル熱・デング熱などの蚊媒介性ウイルス感染症に焦点をあて、これらの感染症の日本への侵入防除網の高度化に寄与するため、単一温度遺伝子増幅法によるウイルス検出法の開発を目的とする。

本研究において開発を目的とするウイルス検出法の蚊由来サンプルに対する適合性を判定するためには、既知のウイルス保有サンプルと他のウイルス検出法との比較検定が必要となる。分担研究として念頭に置く西ナイル熱ウイルスやデング熱ウイルス、日本脳炎ウイルスは病原性が高く、日本国内でヤブカに対し感染実験をおこない、病原体保有サンプルを作製し研究に供することは、安全性の確保などの問題から非現実的であるといえる。そこで我々はモデル感染系として、ブロック

ハウスウイルス (FHV) 媒介システムを用いた、ウイルス-ヤブカモデルを利用することとした。FHVは、昆虫ウイルスとして知られる Black Beetle Virus と同じ属に分類されるノダウイルス属のウイルスであり、節足動物媒介性ウイルスとして問題とされているウイルスではないが、蚊において持続感染することが報告されている。また、このウイルスは、植物、節足動物、真菌類、哺乳類といった幅広い生物の細胞内で増殖することが確認されている。このような特徴は、節足動物媒介性ウイルスの特徴と似通っており、また、哺乳類に病原性を示さないという安全性から実験に用いることが容易であるという利点があり、本研究に適したウイルスであると考えた。本感染系では我々の過去の研究の研究成果によって、定量的にウイルスを感染させることが可能となっている。また研究分担者（下島）による、蛍光タンパク質をマーカーとする組換えウイルスを用いることにより、非侵襲的に感染を確認、さらに病原体を定量することが可能となる予定であり、このウイルス感染モデル由来の DNA 試料をもちいて、研究を行うこととした。病原体検出法として、優れた検出感度と特異性を有すること、病原体検査法として過去に十分使用実績が報告されていることなどの点を考慮し、我々は既知の単一温度遺伝子増幅法である LAMP 法に着目した。LAMP 法は四種類のプライマーと1種類の酵素を用いて、60度程度の一定温度状態で30～60分程度反応させることで、好感度かつ簡便に遺伝子を増幅できる方法である。LAMP 法によって得られ

た結果を性能比較検定用基礎データとして整備することとした。

本年度において、単一温度反応系遺伝子増幅法によるヤブカからの FHV 検出、これら上記 2 項目の研究により媒介蚊における迅速簡便病原体検出法の開発のための研究基盤整備を特に念頭において、研究を進めることとした。

B. 研究方法

1. FHV のヤブカへの感染実験系の確立

当研究室で飼育しているヤブカ (*Anopheles stephensi*) を用いた。12 時間明 (0500-1700 hr) 12 時間暗の明暗条件、湿度 80%以上、27°C の条件で飼育し、10%滅菌スクロースを自由に摂取させた。また、餌は 2 日おきに交換した。実験に用いる蚊は、蛹のうちに雄と雌に選別され、雌の蚊のみを 1 ケージにつき 100~500 匹飼育し、羽化直後の個体を 0 日齢とした。

ウイルスは FHV (東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より供与) を用いた。培養には ショウジョウバエ細胞である S2 細胞を用いた。細胞は Schneider's *Drosophila medium* (GIBCO) に 10% Fetal bovine serum (JRH)、5 mg/ml Bacto Peptone (DIFCO)、10 Units/ml ペニシリン・ストレプトマイシン (ナカライ) を加えたものを培養液として使用し、25°C で培養を行った。

ヤブカに CO₂ ガスで麻酔をかけ、ウイルス液の濃度を適切な濃度に合わせた。ヤブカの腹部と胸部との境目近傍にガラスニードルを刺し、Micro injector (ナリシゲ社) によりウイルス液を 1 匹につき 65nl 注入した。感染後は新しい飼育ケージに移し、29°C で飼育した。

FHV の感染力価はプラークアッセイ法により、一般的なプロトコールを参考にして行った (Selling et al., 1984)。6well プレートに S2 細胞を 100×10⁴/ml/well で 1ml ずつ添加し、25°C で 2 時間静置後、培養液を回収した。その後 200 μl/well のウイルス液を添加し、15 分ごとにプレートを浸透させながら 1 時間室温で静置しウイルスを細胞に感染させた後、ウイルス液を回収した。そして Sea Plaque Agarose (Takara) を 2.5% の濃度に溶解後、オートクレーブ処理した PBS 溶液と細胞培養液を 1:2 の割合で混合して 37°C に保存しておいた溶液を添加し、30 分室温で静置後、固まったゲルの上に細胞培養液を 1ml/well で添加し、25°C で 48 時間静置した。Neutral red (Wako) を 0.04% の濃度で PBS に

溶解後、オートクレーブ処理した溶液を 1ml/well で添加し、25°C で 24 時間静置した。その後、肉眼でプラーク数を計測し、PFU/ml を計算した。

2. 単一温度反応系遺伝子増幅法によるヤブカからの FHV 検出

FHV を上記の感染法により、ヤブカに感染させた。ヤブカへの感染一週間後、二週間後、に感染蚊のサンプリングと感染 FHV 数の算定を行った後、DNA 抽出を行い、単一温度反応系遺伝子増幅法である LAMP 法用のサンプルとして供した。FHV 感染ヤブカはプラスチックホモジナイザーによるホモジナイズ後、常法に従い DNA を精製し TE に溶解し、後の実験に供した。LAMP 反応溶液は常法にしたがい調整し、反応は 63°C にて行った。また、リアルタイム濁度計による反応のモニタリングを行った。さらに 2% アガロ-すげの電気泳動による解析も行った。LAMP 法は FHV の *coat protein precursor alpha* 遺伝子をターゲット遺伝子として選定し、栄研社 Primer Explorer V4 ソフトを用いてプライマーを設計した (図 1)。FHV 感染ヤブカより抽出した DNA を用いて、*coat protein precursor alpha* LAMP 法の蚊由来サンプルに対する有効性を検証した。また反応至適温度・時間をリアルタイム濁度計 (栄研・LA200) により解析した。次に、検出限界を検証するため、既知数の FHV から DNA を抽出し、LAMP 法による検出限界原虫数を測定した。

C. 研究結果

1. 単一温度反応系遺伝子増幅法によるヤブカからの FHV 検出

まず、FHV そのものをテンプレートとして LAMP 法に供したところ、0.004 ng の FHV DNA よりウイルスを検出可能であった (図 2)。次に、昆虫培養細胞 (ショウジョウバエ由来) に FHV を感染させ、そのサンプルを宿主細胞と共に調整し、宿主 DNA が混在する条件にて LAMP 法による FHV 検出を試みた。その結果、このプライマーは宿主細胞の DNA を検出せず、1 PFU に相当する FHV をも特異的に検出可能であることが判明した (図 3)。さらに、各種濃度の FHV をヤブカに感染させた。検出限界を検証するため、この感染蚊から DNA を抽出し、LAMP 法による検出限界ウイルス数を測定したところ、ウイルスがたった 1 PFU 存在するだけでも LAMP 法により検出されることが明らかとなった (図 4)。

D. 考察

西ナイル熱、デング熱、日本脳炎等の蚊媒介性のウイルス感染症は世界的に大きな脅威となっている。本年度の本分担研究では、これらのウイルス感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、単一温度遺伝子増幅法による迅速・簡便ウイルス検出法の確立へ向けた準備研究を実施した。このような研究を実施するにあたり、本来は実際に感染症を引き起こすウイルスを用いるべく側面があるが、研究の初期段階においてはより詳細が明らかな実験的にコントロールされたマテリアルの使用が迅速な研究の遂行には必須である。また開発使用とする方法と近縁のより確立された優れた方法と比較検討することが、研究成果の精度を高める上で重要である。そこで、我々は近年、感染症診断研究の分野で大きな注目を受け、実際にその有用性が確認されつつある等温遺伝子増幅技術である LAMP 法を用いて、基盤データを得ることとした。本研究では LAMP 法をやぶからモデルウイルス診断に応用し、優れた成績を得ることに成功した。これらの結果は等温遺伝子増幅技術が節足動物媒介性の感染症診断に対して極めて高い有用性を持つことを示唆するものであった。実際の媒介蚊侵入防除の現場では迅速な検査態勢の整備、また検査に供するためのサンプル保存システムの構築が重要である。本研究において、LAMP 法による等温遺伝子増幅法の有効性が示されたことにより、高度な設備を有しない感染症侵入防除の最前線である国際空港や国際港の現場でも迅速に検査結果を得ることが可能であることが示唆された。また蚊サンプルの保存に関しても特別な設備や機器を使用せず、単に濾紙に挟んで常温保存という極めて簡便な方法で、長期保存が可能であることが明らかになり、実際の検疫体制を構築するのに際し極めて重要な知見を得ることとなった。

以上、本研究によって得られた成果は研究課題である等温遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法の確立において、極めて重要な基礎的知見をもたらすものであり、本研究成果を基礎とした今後の開発研究の実質的推進に大いに寄与すると考えられる。

E. 結論

本研究成果によって、ウイルス検出のための単一温度遺伝子増幅法の有用性を明らかにすることが達成され、LAMP 法による新規病原体検出法の開発にあたり、確固たる準備基盤

の構築にいたった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Aonuma H, Suzuki M, Iseki H, Perera N, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Kanuka H, Fukumoto S. Rapid identification of Plasmodium-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. *Biochem Biophys Res Commun* 376(4): 671-676, 2008

Perera N, Aonuma H, Yoshimura A, Teramoto T, Iseki H, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Fukumoto S, Kanuka H. Rapid identification of virus-carrying mosquitoes using reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods* 156(1-2): 32-36, 2008

Okado K, Shinzawa N, Aonuma H, Nelson B, Fukumoto S, Fujisaki K, Kawazu S, Kanuka H. Rapid recruitment of innate immunity regulates variation of intracellular pathogen resistance in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 379(1): 6-10, 2009

Takabatake N, Iseki H, Ikehara Y, Kanuka H, Yokoyama N, Sekimizu K, Igarashi I. Isolation and pathogenic characterization of an OBl variant of *Babesia rodhaini* which has a glycophorin A-independent pathway to murine red blood cells. *Vet Parasitol* 159(2): 97-104, 2009

Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B, Fukumoto S, Kanuka H. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasit Vectors* 2(1): 15, 2009

2. 学会発表

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアはどのようにして宿主体内への移行を理解するのか? 第 77 回日本寄生虫学会 2008. 4. 2

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸
ハマダラカ中腸に存在する細菌がマラリア原虫の発育に与える影響 第 77 回日本寄生虫学会 2008. 4. 2

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸
Innate immune response activity correlates to diversity of *Drosophila* susceptibility to bacterial infection. 49th Annual *Drosophila* Research Conference 2008. 4. 4

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、河津信一郎、嘉糠洋陸
細菌感染における感受性の多様性と認識シグナル伝達メカニズム 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸
フィラリア感染幼虫における環境依存的な脱皮関連遺伝子の探索 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

寺本時靖、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸
ウイルス媒介蚊における抗ウイルス反応メカニズムの解析 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸
細菌感染におけるトレランス機能による新規感染防御メカニズム 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

青沼宏佳、鈴木萌美、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、嘉糠洋陸、福本晋也 等
温遺伝子増幅法 (LAMP 法) のマラリア原虫媒介蚊への応用 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

前川絵美、徳永史生、柿本辰男、嘉糠洋陸
蚊の吸血標的認識メカニズムの解明 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸
ロバストネスによるマラリア原虫温度適応メカニズム 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸
マラリア媒介蚊における腸内細菌と病原体のイ

ンターフェース 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム 2008. 5. 26

小林朋美、土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸
マラリア原虫の極性形成メカニズムとその意義は何か? 第 15 回分子寄生虫学ワークショップ 2008. 8. 4

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸
マラリア媒介蚊における腸内細菌と病原体のインターフェース 第 15 回分子寄生虫学ワークショップ 2008. 8. 4

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸
トレランス機能は細菌感染における病原性を左右する新規感染防御機構か? 第 2 回細菌学若手コロッセウム 2008. 8. 5

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、河津信一郎、嘉糠洋陸
細菌感染における宿主抵抗性の多様性とそれを支えるメカニズム 第 2 回細菌学若手コロッセウム 2008. 8. 5

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸
Impact of midgut bacteria on *Plasmodium* development in mosquito 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2008. 9. 10

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸
Cellular encapsulation-based host tolerance in bacterial infection 8th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2008. 9. 10

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸
感染症媒介蚊・腸内細菌・病原体の間に存在するインターフェース 第 8 回昆虫病理研究会シンポジウム 2008. 9. 11

嘉糠洋陸
感染現象とそれと対峙する宿主の抵抗戦略 第 8 回昆虫病理研究会シンポジウム 2008. 9. 11

青沼宏佳、鈴木萌美、吉村文、井関博、土井裕子、五十嵐郁男、平田晴之、嘉糠洋陸、福本晋也 等
温遺伝子増幅法 (LAMP 法) の蚊媒介性感染症への応用 第 146 回日本獣医学会 2009. 9. 25

嘉糠洋陸
病原体媒介蚊における感染症伝播

システム 第 74 回岩手大学 COE フォーラム
2008. 10. 10

嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic
encapsulation confers infection tolerance
in *Drosophila* Swedish-Japan STINT-meeting
on Innate Immunity 2008. 10. 16

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、
嘉糠洋陸 食細胞による囲い込みは細菌感
染に対する tolerance 機能を宿主に付与する
第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本
生化学会大会合同大会 2008. 12. 10

土井裕子、福本晋也、小林朋美、岡野栄之、
嘉糠洋陸 マラリア原虫における温度ロバ
ストネス機構 第 31 回日本分子生物学会年
会・第 81 回日本生化学会大会合同大会
2008. 12. 10

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸
蚊・マラリア原虫・腸内細菌の三者の相互
作用 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回
日本生化学会大会合同大会 2008. 12. 10

前川絵美、徳永史生、柿本辰男、嘉糠洋陸 ハ
マダラカには CO₂ 依存性熱センシング (CATS)
システムが存在する 第 31 回日本分子生物
学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会
2008. 12. 10

嘉糠洋陸 感染症媒介蚊のバイオロジー 第
8 回東北大学 GCOE 生態適応セミナー
2008. 12. 15

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアの
生活環における環境応答性トランジション機
構 第 78 回日本寄生虫学会 2009. 3. 28

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし



図 1 FHV coat protein precursor alpha 遺
伝子に対する LAMP プライマーの設計。プライ
マー設計領域の部分的 coat protein
precursor alpha 遺伝子の塩基配列。矢印が
それぞれのプライマー位置を示す。

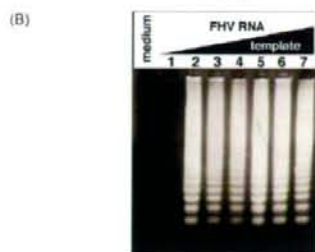
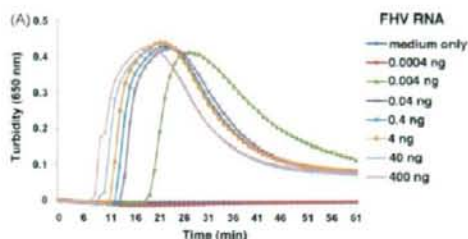


図 2 等温遺伝子増幅法による FHV の検出限
界を示す。テンプレートとして、示した量の
FHV 由来 DNA を用いた。(A) 等温遺伝子増
幅法による反応のリアルタイム濁度計を用いた
解析。(B) 反応産物のアガロースゲル電気泳
動法による解析。

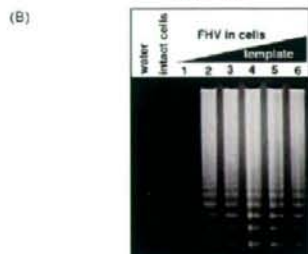
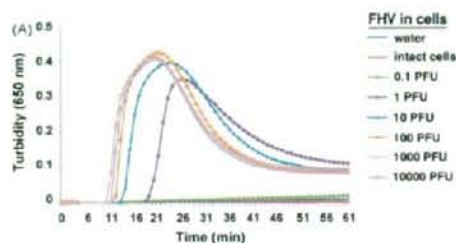


図3 宿主細胞由来サンプルを用いた、等温遺伝子増幅法による FHV の検出限界を示す。テンプレートとして、示した数の FHV 感染細胞由来 DNA を用いた。(A) 等温遺伝子増幅法による反応のリアルタイム濁度計を用いた解析。(B) 反応産物のアガロースゲル電気泳動法による解析。

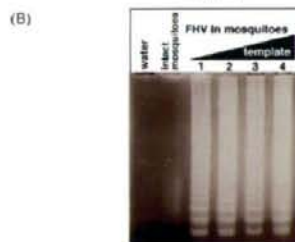
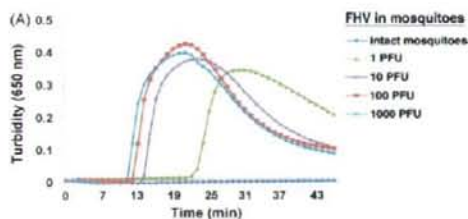


図4 ヤブカ由来サンプルを用いた、等温遺伝子増幅法による FHV の検出限界を示す。テンプレートとして、示した数の FHV 感染ヤブカ由来 DNA を用いた。(A) 等温遺伝子増幅法による反応のリアルタイム濁度計を用いた解析。(B) 反応産物のアガロースゲル電気泳動法による解析。

媒介蚊-寄生虫感染モデルの構築と等温遺伝子増幅法の開発

研究分担者 福本 晋也 帯広畜産大学原虫病研究センター 講師

蚊媒介性病原体検出法の開発のため、病原体感染モデルを用いた等温遺伝子増幅法の有用性の検討をおこなった。齧歯類マラリア原虫-ハマダラカ感染モデルとイヌフィラリア-ヤブカ感染モデルより得られたサンプルを等温遺伝子増幅法に供したところ、両モデル由来蚊サンプルから一感染ユニットの病原体を検出可能であった。この結果より、等温遺伝子増幅法が媒介蚊からの寄生虫検出に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究は日本においてアウトブレイクが危惧されている再興感染症、特に蚊などの吸血性節足動物によって媒介される疾患の防除を主目的とするものである。近年、アメリカでの西ナイル熱の急激なアウトブレイクが記憶に新しいように、この類の蚊媒介性感染症の特徴として、当該地域への病原体侵入後、汚染地域が急激に拡大することが挙げられる。したがって、本邦へのマラリア、西ナイル熱、デング熱などの病原体を保持した媒介昆虫の侵入を防除することは、わが国の保健衛生上、きわめて重要であることは理解にたやすい。そこで本研究では水際での病原体防除管理体制の向上に寄与し、等温遺伝子増幅法を応用した迅速簡便病原体検出法の開発を目指すこととした。

本研究では等温遺伝子増幅法による迅速簡便な病原体検出法の確立を主目的としているが、対象とする病原体は、きわめて病原性が高く、実験室レベルでのルーチンワークに供するには、実験施設の管理・近隣住民の理解など障害があまりにも大きい。そこで、分担研究者は等温遺伝子増幅法の蚊媒介性病原体検出法としての有効性の検証のため、モデル病原体をもちいた寄生虫疾患モデルの樹立を行った。マラリアのモデルとしてハマダラカと齧歯類マラリアを用いた、ハマダラカ-齧歯類マラリア感染系とフィラリア症モデルとして、イヌフィラリアとヤブカを用いたヤブカ-イヌフィラリア感染系である。また、これ

ら感染モデルを新規診断法開発に応用可能なよう、系の標準化などに関する研究を展開してきた（平成19年度）。そこで、平成20年度において、分担研究者は前年度において得られた以上の研究成果を基盤とし、等温遺伝子増幅法による寄生虫性蚊媒介感染症への有効性を検証するため、以下に記す2つの課題を設定し研究を遂行した。

1. 等温遺伝子増幅法によるハマダラカからのマラリア原虫検出モデルの開発
2. 等温遺伝子増幅法によるヤブカからのフィラリア検出法の開発

B. 研究方法

1. 等温遺伝子増幅法によるハマダラカからのマラリア原虫検出モデルの開発

マラリア原虫と感染蚊の作出：三重大学油田博士によって作製された HSP70 プロモーター支配下で GFP を発現する齧歯類マラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA *starain*) を BALB/c マウスに腹腔内投与し感染させ、ガメトサイテミアが高値を示した時点で、メスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) に吸血させ、19°C にて 22 日～24 日飼育し、中腸オーシスト、唾液腺スポロゾイトの存在を蛍光顕微鏡下で確認し、後の実験に供した。

DNA 抽出：マラリア原虫感染蚊をプラスチックホモジナイザーでホモジナイズ後、常法にしたがってゲノム DNA を抽出し、回収した DNA を TE 溶液に溶解し後の実験に供した。

LAMP 反応：LAMP 法による等温遺伝子増幅法の

ため、反応に用いる特異的プライマーを *P. berghei* SPECT2 遺伝子をターゲットとして設計した (Fig. 1)。このプライマーを用いて、常法に従い LAMP 反応溶液を調整し、59°C において LAMP 反応を行った。LAMP 反応はリアルタイム濁度計 (栄研・LA200)。また 2% アガロースゲル電気泳動による反応産物の解析も同様に行った。

2. 等温遺伝子増幅法によるヤブカからのフィラリア検出法の開発

虫体と感染蚊の準備：フィラリア成虫 (*Dirofilaria immitis*) を感染イヌより分離し RPMI-1640 培地にて培養し、培地中に産出されたマイクロフィラリアを培地とともに回収し 100g・4°C・10 分遠心し分離した。分離したマイクロフィラリアは血球計算板にて虫体数を確認後飼養まで -20°C にて保存した。LAMP 法によるフィラリア検出系開発のため、ヤブカ (*Aedes aegypti*) にマイクロフィラリア含有イヌ血液をパラフィルムを用いた人工膜吸血法によって、1 時間吸血させ、27°C にて 8 日かん飼育し、第二期幼虫または第三期幼虫感染ヤブカを作出した。顕微鏡下にて、ヤブカを解剖しマルピーギ管内のフィラリア虫体数のカウントを行い、-20°C にて保存後 DNA 抽出に供した。

DNA 抽出：フィラリア感染ヤブカもしくは感染マルピーギ管はプラスチックホモジナイザーによるホモジナイズ後、常法に従い DNA を精製し TE に溶解し、後の実験に供した。

LAMP 反応：LAMP 反応を用いた等温遺伝子増幅法によるフィラリア検出を行うため、チトクロームオキシダーゼサブユニット I 遺伝子をターゲットとして特異的プライマーを設計した (Fig. 5)。LAMP 反応溶液は常法にしたがい調整し、反応は 63°C にて行った。また、リアルタイム濁度計による反応のモニタリングを行った。さらに 2% アガロースゲル電気泳動による解析も行った。

フィールドにおける蚊のサンプリング：沖縄県名護市 (イヌフィラリア症汚染地域) において、スウィッピング法およびドライアイストラップを用いて蚊のサンプリングを行った。LAMP 反応産物の DNA 配列解析：LAMP 反応産物を QIAEXII (キアゲン) を用いてアガロースゲルより精製し、ABI PRISM3100 Genetic Analyzer を用いて配列の解析を行った。

C. 研究結果

1. 等温遺伝子増幅法によるハマダラカから

のマラリア原虫検出モデルの開発

等温遺伝子増幅法によるマラリア原虫検出感度：第一にマラリア感染赤血球をテンプレートとして LAMP 法に供したところ、 1×10^2 の感染赤血球由来 DNA よりマラリア原虫を検出可能であった。感染赤血球から DNA を精製することなく、煮沸したサンプルを LAMP 反応に供した場合においても同等の検出感度を示した。次にマラリア原虫スポロゾイトより精製した DNA を LAMP 法に供し、検出限界の解析を行ったところ、感染赤血球の場合と同様に、検出限界は 1×10^2 スポロゾイトであった (Fig. 2)。等温遺伝子増幅法によるハマダラカからのマラリア原虫の検出：LAMP 法のハマダラカからのマラリア原虫オーシスト検出に対する有効性を検証するため、マラリア原虫を吸血させた蚊を無作為に抽出し、蛍光顕微鏡によるオーシストの確認と、LAMP 法による検出反応に供したところ、蛍光顕微鏡にてオーシストが確認可能であった全てのサンプルより LAMP 法にてマラリア原虫の検出が可能であった (Fig. 3)。

等温遺伝子増幅法による、ハマダラカからのマラリア原虫検出感度の検証：マラリア原虫感染蚊を実体顕微鏡下で解剖し、オーシスト数を確認した。1~367 個のレンジでオーシストが存在する蚊より、DNA の抽出を行い、LAMP 法に供した。その結果、たった 1 個のオーシストが存在する状態の蚊サンプルからも、LAMP 法のよりマラリア原虫を検出することが可能であった (Fig. 4)。

等温遺伝子増幅法によるヤブカからのフィラリア検出：

2. 等温遺伝子増幅法によるヤブカからのフィラリア検出法の開発

等温遺伝子増幅法による LAMP 法によるフィラリア検出の感度の検証：試験管内培養より分離されたマイクロフィラリア ($1 \times 10^0 \sim 1 \times 10^4$) を用いて LAMP 法による感度を測定したところ、 1×10^0 のフィラリア DNA を検出することが可能であった (Fig. 6)。またフィラリアからの LAMP 増幅産物の塩基配列はフィラリア由来であることが確認された。

等温遺伝子増幅法によるヤブカからのフィラリア検出：実験的にフィラリアを感染させたヤブカを実体顕微鏡下で解剖し、マルピーギ管に 1~16 匹のフィラリアのレンジでフィラリアが存在する蚊サンプルを用意し、そのサンプルから DNA を抽出し LAMP 法に供した。その結果、一個体のフィラリア感染を LAMP 法により検出可能であることが確認された (Fig.