

200931011A

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 嘉糠洋陸

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 嘉 糠 洋 陸

平成 22 (2010) 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

嘉糠 洋陸 5

II. 分担研究報告

1. 等温遺伝子増幅法による病原体媒介蚊の
殺虫剤耐性変異の SNP 検出
嘉糠 洋陸 13
2. 蛍光マルチプレックス等温遺伝子増幅法の開発
福本 晋也 19
3. 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作製
下島 昌幸 27
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 嘉糠 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-齧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-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-犬糸状虫感染モデルを用いた、蛍光プライマーによるマルチプレックス等温遺伝子増幅法の開発および、病原体検出評価に成功した。(2) 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。(3) 病原体媒介蚊における殺虫剤耐性の検出法の開発のため、等温遺伝子増幅法による SNP 検出の有用性を検討した。(2) 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、病原体保有率および殺虫剤耐性蚊の生息状況調査に成功した。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（酪農学園大学大学院獣医学研究科 准教授）

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なため、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フ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。本研究課題は三年の計画から成り、平成21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「ヤブカー-フ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21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の開発と、等温遺伝

子増幅法増幅産物による SNP 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) 等温遺伝子増幅法による病原体媒介蚊の殺虫剤耐性変異の SNP 検出 (研究分担者: 嘉糠洋陸)

(2) 蛍光マルチプレックス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製 (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: 油田正夫)

本年は3年計画研究の最終年度であり、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・修正した。

(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) 等温遺伝子増幅法による病原体媒介蚊の殺虫剤耐性変異の SNP 検出

1. AS-LAMP 法によるハマダラカ殺虫剤耐性 SNP の検出

殺虫剤耐性をもたらす *kdr* 遺伝子の変異にはいくつかの種類が知られている。そのうち、西アフリカ型の変異では、*kdr* 遺伝子の 1104 番目の塩基が A から T に置換されることにより、該当するアミノ酸がロイシンからフェニルアラニンに変化する。そこで、野生型と西アフリカ型のこの一塩基の差異を検出するように FIP 及び BIP プライマーを設計し、AS-LAMP 反応に供与した。その結果、テンプレートとして (1) *kdr* 遺伝子の cDNA を持つプラスミド、および (2) ハマダラカ DNA を用いた双方において、特異的な増幅に成功した。特にハマダラカにおいては、西アフリカ型と野生型のヘテロの遺伝子型を有するサンプルも区別可能なことが判明し、AS-LAMP 法の高い特異性が示された。また、従来の SNP 検出のための AS-PCR 法との比較を実施したところ、ほぼ同等の性能か、特異性については PCR を上回る結果を得た。また、この AS-LAMP 法を用いて、ブルキナファソから採集した蚊サンプル群について *kdr* 遺伝子の性状解析を実施したところ、3 地点において 10-26% の蚊が殺虫剤耐性となっていることが明らかとなった。

(2) 蛍光マルチプレックス等温遺伝子増幅法の開発

1. 蛍光標識プライマーを用いた等温遺伝子増幅反応の検討

蛍光標識プライマーが LAMP 法による等温遺伝子増幅反応に影響を与えるのか否かを検討した。1、10、または 100 個のマラリア感染赤血球より抽出した DNA、もしくは 1、10、または 100 ミクロフィラリア虫体より抽出した DNA をテンプレートとして蛍光標識プライマーを用いた LAMP 法の増幅効率を検証した。マラリア感染赤血球の場合、蛍光非標識プライマーを使用した場合、検出限界は 1×10^2 の感染赤血球由来 DNA であった。一方、標識プライマーを使用した場合、検出感度は 1×10^2 感染赤血球由来 DNA であり、検出感度の低下は認められなかった。フィラリアの場合も同様に非標識プライマーを用いた場合、標識プラ

イマーを用いた場合、の比較を行ったところ検出限界に差は無く、一個体のミクロフィラリア DNA 由来サンプルを検出可能であり、プライマー標識による検出限界の低下は認められなかった。

単一チューブ内の反応においてマラリア原虫、フィラリア双方の DNA を検出するマルチプレックス化を検証するため、フィラリア検出プライマー、マラリア検出プライマーを混合し、感染赤血球由来 DNA、またはミクロフィラリア由来 DNA を検体として LAMP 法に供した。その結果、混合標識プライマーの使用においても特異的に病原体 DNA を検出することが可能であった。しかしながら検出限界の低下が認められ、50 マラリア感染赤血球由来 DNA が必要であった。

蛍光標識プライマーによる等温遺伝子増幅法が病原体感染蚊由来 DNA サンプルに対しても同様に適用可能なのかを確認するため、オーシストステージのマラリア原虫感染ハマダラカ、またはフィラリア第 2 期幼虫感染ネッタイシマカ由来サンプルをテンプレートとして LAMP 法に供した。感染蚊を実体顕微鏡下で解剖し感染病原体数を確認した後に、LAMP 反応に供した。マラリア原虫オーシスト数は 1 ハマダラカあたり 1~974 個の範囲内であり、1 ネッタイシマカあたりのフィラリア第 2 期幼虫数は 1~7 虫体であった。これらのサンプル由来 DNA を両病原体検出プライマーがミックスされた反応系でそれぞれ LAMP 法に供したところ、マラリア原虫においては 19 オーシストが感染しているハマダラカ、フィラリアにおいては、1 虫体の第 2 期幼虫が感染しているネッタイシマカから病原体 DNA を検出可能であることが明らかになった。

(3) 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作製

1. C 型レクチンによる感染性西ナイルウイルス様粒子の感染増強作用の機序

感染性西ナイルウイルス様粒子の感染は、昨年度報告したように、C 型レクチンである DC-SIGN (Dendritic cell intracellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin)、DC-SIGNR (Dendritic cell intracellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin-related protein)、ASGPR (asialoglycoprotein receptor) および MGL (macrophage galactose-type C-type lectin) によって 10 倍から 100 倍ほど増強される。C 型レクチンは本来糖鎖を認識して病原体の排除等に関わる分子であるため、C 型レクチ

ンによる感染性西ナイルウイルス様粒子の感染増強に西ナイルウイルス E 蛋白質の糖鎖が関与することが予想される。E 蛋白質の 154 番目のアミノ酸アスパラギン (N154) は N 型糖鎖修飾を受けるので、このアミノ酸をアラニンにして N 型糖鎖修飾を受けないようにした E 蛋白質変異体 (N154A) を作製し、野生型のものと同様に感染性西ナイルウイルス様粒子を作製した。N154A 変異体のウイルス様粒子は C 型レクチンを発現していない Jurkat 細胞では野生型ウイルス様粒子と同程度の感染性を示した。このことは N154A の変異がウイルス様粒子の形成性や C 型レクチンを介さない感染には影響しないことを示すと考えられる。しかし C 型レクチン発現細胞への感染は、N154A 変異体ウイルス様粒子の場合には全く増強されなかった。西ナイルウイルス E 蛋白質の 154 番目アミノ酸の糖鎖付加が C 型レクチンによる感染増強に関与することが示された。

2. 組換えインフルエンザウイルスの作製

インフルエンザウイルス (感染昆虫細胞が蛍光蛋白質を発現するようになるもの) の低温馴化にあたり、まず低温馴化株 FluMist のウイルス各遺伝子を用いた方が後の低温馴化が行いやすいと考えた。そこで VSVG(HA) (インフルエンザウイルス WSN 株の HA 分節に VSVG 遺伝子を入れたもの) と Venus(NA) (WSN 株 NA 分節に Venus) 以外の 6 分節をすべて FluMist 由来のものにしてリバースジェネティクスを行ったが、増殖性のあるウイルスは得られなかった。そこで 5 分節を WSN 株由来、1 つのみ FluMist 由来としてウイルス回収を試みたところ、PB1, NP, PA, NS 分節を FluMist 由来にした場合に増殖性のウイルスを得ることができた。M, PB2 分節を FluMist にした場合には増殖性ウイルスは得られなかった。その他いくつかの組み合わせで検討を行なったところ、8 種の分節組み合わせで増殖性のあるウイルスが得られた。

(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. 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

ニトロセルロースメンブレン HF180MC100, ストレプトアビジン標識金コロイド粒子をコンジュゲートパットに浸漬させ乾燥させたコンジュゲートパット (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。作製したイムノクロマト・ストリップの Sample application pad に 1 で増幅させた FITC-と Biotin-でラベルした *B. gibsoni* P50 遺伝子の PCR 増幅産物を用いて評価した。その結果、原虫感染の明瞭な検出バンドが認められた (Detection band)、しかしながら、コントロールバンドには認められなかった。イムノクロマト・ストリップを半年間室温に保存し、PCR により得られた *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いて検討を行った。その結果、半年前と同様の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* の検出は少なくとも半年は使用可能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. ネズミマラリア原虫テロメア配列のクローニング

PCR にてネズミマラリア原虫ゲノムよりテロメアのクローニングを試みたところ 200-300bp の DNA 断片が増幅された。増幅した断片をプラスミドにクローニングし配列を確認した。その結果、Ponzi M. らと同様の 5' -TT (T/C) AGGG-3' 配列が反復した約 200bp のテロメア配列をクローニングすることに成功した。これを用いて人工染色体構築を試みた。構築した人工染色体の概略図を示す。最終的に得られる直鎖状の人工染色体は (Linear Plasmodium Artificial chromosome : L-PAC) と名づけた。

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

構築した PAC をネズミマラリア原虫へと導入した。その結果、導入後の寄生率 (全赤血球に対する感染赤血球の割合 (%)) の上昇は明らかに L-PAC の方が環状人工染色体やコントロールプラスミドより速いことが示された。寄生率の差から導入効率を予測し、比較すると、L-PAC は環状人工染色体と比べ、約 100 倍、コントロールプラスミドとは約 1000 倍以上、遺伝子導入効率が上昇した結果となった。

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

続いて PAC の原虫内での安定性を評価した。その結果、PAC は環状人工染色体と同程度の安定性を持つことが明らかとなり、テロメアの付加と直鎖化が人工染色体の分配に影響を与えないことが示された。蚊ステージについ

でも検討した結果、唾液腺スポロゾイトの約90%がL-PACを安定的に維持していることが明らかとなった。更に肝臓ステージを通過した原虫での安定性を評価した結果、約65%の原虫がL-PACを維持しており、環状人工染色体と比較して、約2.5倍程度、安定性が向上することが示された。この結果よりセントロメアに加え、テロメアが肝臓ステージでの染色体分配において役割を果たすことが推定された。また、L-PACは原虫の生活環を通じ、常に直鎖状を維持していることも明らかとなり、加えて原虫染色体とは相同組換えを起こさないことも示された。

D. 考察

(1) 等温遺伝子増幅法による病原体媒介蚊の殺虫剤耐性変異のSNP検出

マラリア、デング熱、日本脳炎等の蚊媒介性の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蚊側殺虫剤耐性SNP検出法の確立へ向けた研究を実施した。

ピレスロイド系殺虫剤処理をした蚊帳はマラリアを防ぐ効果を失いつつあるという報告が相次いでいる。その遺伝子を有する蚊はピレスロイドの神経毒性に影響を受けにくいという、特異的*kdr*遺伝子変異が広まっているアフリカのベニン地域においては、殺虫剤処理蚊帳は媒体蚊のハマダラカのわずか30%にしか有効でないことが明らかとなっている。同タイプの*kdr*遺伝子変異がほとんど見つかからない地域では、殺虫剤処理蚊帳が蚊の98%を殺している。これらの知見は、高いレベルで*kdr*遺伝子変異を持つハマダラカの集団を制御することに、ピレスロイドは有効でないことを明確に示している。殺虫剤処理蚊帳は、マラリアが流行している諸国ではマラリア対策の主要な手段であることを考慮すると、このような発見は大きな問題の出発点であると見受けられる。*kdr*遺伝子変異の流布は他のいずれの流行地域においても存在し得るが、十分に厳格な調査は実施されていないのが現状である。

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、SNP検出のための遺伝子検出技術(AS-LAMP法)開発を実施した。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として、PCR法によるSNP検出も同時に実施した。その結果、AS-LAMP法をハマダラカの*kdr*遺伝子変異検出に応用し、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感染症媒介蚊の殺虫剤耐性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。

(2) 蛍光マルチプレックス等温遺伝子増幅法の開発

本分担研究では、PCR法におけるサーマルサイクラーのように特別な高額実験機材を必要としない遺伝子診断法である、等温遺伝子増幅法を応用することで簡便な遺伝子診断システムの開発を行った。本年度の研究では昨年度までに開発した診断システムの改良を行い、更なる簡便性と利便性をもたらすことを目標として研究を展開した。

自然界において、一個体のベクター蚊が単一の病原体のみを保持するとは限らない。単一のベクターが様々な病原体種を同時に保有することは良く知られている事実である。したがって、同一検体に対して一度の検査で様々な感染症を検出する遺伝子診断法の実現は、実際の現場での利便性を更に高めることが可能である。LAMP法はPCR法と同様に多種のプライマーの混合によりマルチプレックス化が可能であることが本年度の研究において明らかになった。しかしながらLAMP法の問題点として、増幅され他DNAはスミア状に様々な名サイズのバンドができあがるために、PCR法のように、アガロースゲル電気泳動法では識別が不可能である。そこで分担研究者らはその問題を解決するため、プライマーを病原体種ごとに異なる蛍光色素で標識し、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で識別することを可能とした。特異的病原体DNAとそれに対応する特異的検出プライマーセットでLAMP法による等温遺伝子増幅反応を行ったところ、非標識のプライマーを用いた場合と比較して検出感度の低下は起こらなかった。感染蚊由来病原体DNAサンプルを供したところ、非標識プライマーと比較し若干の検出感度の低下

が認められた。しかしながら、検出感度の低下は実用範囲に影響を与えるものではなく、それでも尚、他の研究者によって報告されている LAMP 法と比較しても遜色ない検出感度を維持していた。したがって、蛍光色素による標識プライマーを使用した LAMP 法は極めて実用的な検査ツールとして使用可能であることが確認された。

2 種の病原体を検出する混合プライマーを用いたマルチプレックス LAMP 法において、既知の病原体 DNA を含む検体から病原体 DNA を検出することが可能であった。しかしながら、若干の検出感度の低下が起り、単細胞生物のマラリアの場合、ハマダラカ中腸内オーシストの検出限界は 19 個となった。非標識プライマーかつ単一病原体プライマーの反応系では 1 個のオーシストを検出可能であった。したがってプライマーの標識と多種プライマーの混合は様々な相互作用のもと、反応系において何らかの抑制的作用を発現することが明らかとなった。この抑制効果は限定的で、実際のフィールドでベクター昆虫が保持する病原体数を勘案すると十分に実用的な範囲内の検出限界低下ではあったが、今後の研究課題として、反応系における負の相互作用を改善することが望まれる。

本研究では等温遺伝子増幅法における蛍光プライマーの有用性を明らかにした。本年度の分担研究者の研究においては、電気泳動と蛍光検出器による解析を行ったため、簡便性という観点からは問題が生じた。しかしながら、蛍光検出法には様々な方法があり、他の分担研究者が開発に成功した簡便な標識検出法と組み合わせられることで、極めて簡便に多種の病原体を検出することが可能になることが期待される。

(3) 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作製

1999 年にアメリカの東海岸に上陸した西ナイルウイルスは、それまでアフリカやヨーロッパで流行していた西ナイルウイルスと比べ病原性が高い。この病原性の差の原因は現在も解明されていないが、本実験でも用いたニューヨーク分離株(New York 99, NY99)など北アメリカ分離株の E 蛋白質に N 型糖鎖付加部位が出来ているという違いがあり、病原性との関連が示唆される。C 型レクチンの 1 つ DC-SIGNR がこの糖鎖修飾により西ナイルウイルスの増殖を高めることが報告されていた (Davis et al., 2006, J. Virol.) が、他の C 型レ

クチンについては不明であった。今回の研究により、西ナイルウイルス NY99 株が DC-SIGNR 以外にも複数の C 型レクチンの発現細胞に効率よく感染すること、またその感染増強には E 蛋白質の 154N の糖鎖が関わっていることが考えられた。C 型レクチンは様々な分化ステージのマクロファージや樹状細胞、肝細胞に発現しており、今後はこれらの細胞への感染効率もしくは感染能力と病原性の関連を調べる必要がある。

これまでの年度で、蚊などからの当温遺伝子増幅法の確立に有効と考えられるウイルス系のテンプレート、つまり蛍光蛋白質を発現する水疱性口炎ウイルスと西ナイルウイルス様感染性粒子を作製した。今回新たに作製したテンプレートは、哺乳類細胞に 29°C で感染・増殖し蛍光蛋白質を発現するインフルエンザウイルスベースのものである。昆虫由来の細胞への感染性や増殖性は検討していないが、感染するのであれば、当温遺伝子増幅法の確立において、特に有用なコントロールとしてのテンプレートになると考えられる。

(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。しかしながら、今回検討したコントロールラインは検出できなかった。この原因としてストリップに何らかの理由で biotin が固相化できなかったため、ストレプトアビジン標識金コロイド粒子がトラップされずに流れていったことが考えられる。これからの検討課題として、コントロールラインに固相化するタンパク質の選定と条件検討、さらに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原及び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直鎖状タイプのもので、両末端にテロメア配列を持つ。この人工染色体はほとんど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1-1.5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(プラスミド)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。また通常、遺伝子導入の際には環状のDNAのほうが直鎖状DNAよりも立体障害等の理由により、効率が良いことが知られている。しかし、今回得られた結果は、L-PACは環状人工染色体と比べ、約100倍導入効率が低いという全く正反対の結果であり、非常に興味深い。現在のところ、この遺伝子導入の改善が如何なる原因によるものか不明ではあるが、少なくとも直鎖化し、実際の染色体様の構造としたことが原因のひとつであると考えられる。

人工染色体を用いた遺伝子導入法は、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19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。感染防除の為には、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

- 論文
- Shinzawa, N., Nelson, B., Aonuma, H., Okado, K., Fukumoto, S., Miura, M. & Kanuka, H. (2009) p38 MAPK -dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*, *Cell Host Microbe*. 6, 244-52.
- Aonuma, H., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Okado, K., Badolo, A., Nelson, B., Kanuka, H. & Fukumoto, S. (2010) A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes, *Exp Parasitol*. 125, 179-83.
- Fukumoto, S., Tamaki, Y., Igarashi, I., Suzuki, H. & Xuan, X. (2009) Immunogenicity and growth inhibitory efficacy of the prime-boost immunization regime with DNA followed by recombinant vaccinia virus carrying the P29 gene of *Babesia gibsoni* in dogs, *Exp Parasitol*. 123, 296-301.
- Thekisoe, O. M., Rodriguez, C. V., Rivas, F., Coronel-Servian, A. M., Fukumoto, S., Sugimoto, C., Kawazu, S. & Inoue, N. (2010) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* Infections from *Rhodnius pallescens* Bugs by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), *Am J Trop Med Hyg*. 82, 855-60.
- Herbas, M. S., Ueta, Y. Y., Ichikawa, C., Chiba, M., Ishibashi, K., Shichiri, M., Fukumoto, S., Yokoyama, N., Takeya, M., Xuan, X., Arai, H. & Suzuki, H. (2010) Alpha-tocopherol transfer protein disruption confers resistance to malarial infection in mice, *Malar J*. 9, 101.

- Matsuno K, Kishida N, Usami K, Igarashi M, Yoshida R, Nakayama E, Shimajima M, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J Virol* 84:5140-7, 2010.
- Nishimura Y, Shimajima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand -1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:794-7, 2009.
- Itoh Y, Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki H, Horimoto K, Shimajima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamoto M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460:1021-5, 2009. Kakugawa S, Shimajima M, Neumann G, Goto H, Kawaoka Y. RuvB-like protein 2 is a suppressor of influenza A virus polymerases. *J Virol* 83:6429-34, 2009.
- Kobayashi K, Kato K, Sugi T, Yamane D, Shimajima M, Tohya Y, Akashi H. Application of retrovirus-mediated expression cloning for receptor screening of a parasite. *Anal Biochem* 389:80-2, 2009.
- Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, Kakugawa S, Shimajima M, Yamada S, Neumann G, Kawaoka Y. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 83:4153-62, 2009.
- Kakugawa S, Shimajima 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* 83:2510-7, 2009.
- Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP. Functional Identification of the *Plasmodium* Centromere and Generation of a *Plasmodium* Artificial Chromosome. *Cell, Host & Microbe*. 7, 3, 245 (2010)
- Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I.: Transcription Factor AP2-Sp and its Target Genes in Malarial Sporozoites. *Mol Microbiol*. 2009, 75, 4, 854-863
- 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*. 2009, 71, 6, 1402-1414
- 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 gamma/delta T-cell lymphoma. *Blood* 113(5) 1071-1074, 2009

2. 学会発表

各分担研究報告書項目を参照

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし

等温遺伝子増幅法による病原体媒介蚊の殺虫剤耐性変異の SNP 検出

研究分担者 嘉糠 洋陸 帯広畜産大学原虫病研究センター 教授

病原体媒介蚊における殺虫剤耐性の検出法の開発のため、等温遺伝子増幅法による SNP 検出の有用性を検討した。ピレスロイド系殺虫剤耐性蚊をモデルに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殺虫剤耐性制御遺伝子の一塩基置換を検出可能であることが分かった。この結果より、等温遺伝子増幅法が媒介蚊の殺虫剤耐性能の迅速かつ簡便な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、ピレスロイド系殺虫剤に対する耐性を制御する遺伝子に焦点を当て、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殺虫剤耐性遺伝子変異検出法の開発を目的とする。

蚊は、その特別な行動と生理的特性と、人間との密接な関係により、マラリアや、 Dengue 熱、日本脳炎や糸状虫感染症などの感染症の最も重要な媒介者として機能する。主要な病原体媒介節足動物である蚊は、Culex（イエカ属）、Aedes（ネッタイマシカ）、および Anopheles（ハマダラカ属）によって構成される。長年に渡り、世界の農業と公衆衛生において使用された多量の化学殺虫剤は、直接的および間接的に蚊の個体群に重い淘汰性をもたらし、結果的にこれらの昆虫に耐性を発達

させることになった。この殺虫剤耐性機構は、主に 2 つの群に分類される。ひとつは新陳代謝における耐性（非特異性カルボキシエステラーゼ、P450 モノオキシゲナーゼなどの解毒蛋白質、グルタチオン S - 転移酵素の活性や濃度における変化）、もうひとつは標的部耐性（アセチルコリンエステラーゼ、GABA 受容体、および電位依存性ナトリウムチャンネル遺伝子における突然変異）となっている。

昆虫神経系の電位依存性ナトリウムチャンネルにおいて、kdr (pyrethroid knockdown resistance) 変異と命名されているロイシンからフェニルアラニンへの置換で起こる殺虫剤への感受性ターゲット部位の消失は、殺虫剤耐性に重要である。アフリカ地域での主だった媒介蚊である *Anopheles gambiae* および *Anopheles funestus* について、その殺虫剤感受性を規定する kdr 遺伝子の遺伝子型が野生型および西アフリカタイプ kdr 変異型と、異なるパターンに分類されている。kdr 遺伝子はチャンネルタンパク質をコードし、ピレスロイド系の殺虫剤はこのチャンネルを阻害することで殺虫効果を発揮する。この kdr 遺伝子のある一塩基置換（西アフリカ型 kdr 変異）を有する蚊は、ピレスロイドの神経毒性に影響を受けにくい。近年、この遺伝子型がマラリア流行地域の蚊に拡がりつつあることで、殺虫剤によるコントロールが困難になっている事例が多く報告されている。そこで、本研究では単一温度遺伝子増幅法を応用し、殺虫剤耐性に関わる一塩基置換 (SNP) を検出する部位特異的 LAMP 法 (AS-LAMP 法) の開発を実施

した。

一塩基置換 (SNP) を検出する部位特異的 LAMP 法 (AS-LAMP 法) の概略は以下の通りである。LAMP 法による SNP タイピングは、LAMP 法の高い特異性によって、近似する塩基配列を持つ遺伝子の中から標的遺伝子のみを増幅する方法である。また、その増幅反応特性から、複製する度に表裏両方の SNP 箇所のチェックを行うため、1 塩基の違いを厳密に区別し、増幅の有無だけで SNPs タイピングを 1 ステップで行うことが可能となっている。プライマーは、従来の LAMP 法に供与される FIP 及び BIP の設計において、その 5' 末端に SNP の 1 塩基がくるように設計する。このプライマーを用いることで、標的遺伝子がこの SNP を含む場合には、LAMP 法の増幅サイクルの起点構造であるダンベル構造からの DNA 合成反応が起こり、増幅反応が連続的に進行する。反対に、標的遺伝子がこの SNP を持たない場合には、ダンベル構造からの DNA 合成反応が起こらないため、増幅反応は進行しない。仮に、ミスコピーにより合成反応が起こったとしても、繰り返し同じ箇所がチェックされるため、増幅反応が止まるか、あるいは遅延することが分かっている。上記の原理応用し、単一温度反応系遺伝子増幅法による殺虫剤耐性遺伝子の SNP 検出を目指し、以下の研究を実施した。

B. 研究方法

1. 西アフリカ地域でのハマダラカの採取

本研究では、その試料として熱帯熱マラリア原虫を媒介するハマダラカが必須である。ハマダラカ (*Anopheles gambiae* 等) は、西アフリカ・中央アフリカ・東アフリカの限られた地域に分布している。ブルキナファソ国立マラリア研究・研修センターのヌファール・サグノン博士 (分子生物学ユニット長) は、これまでに「ハマダラカにおける病原体の相互作用に関する研究」を分担研究者と共同で展開しており、相方の研究協力体制が既に構築されている。

サンプリングは、以下の各ステップに則り遂行された。(1)ブルキナファソ国内の熱帯熱マラリア流行地域における、ハマダラカ (*Anopheles gambiae* および *Anopheles funestus*) の定点採集、(2) 採集したハマダラカの解剖および熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) の LAMP 法および PCR 法による検出、(3) 解剖後の蚊サンプルの不活性化および採集地域とそれらの地域お

ける prevalence にもとづく分類、(4) 蚊サンプルの安全かつ迅速な日本への輸送、および (5) DNA テンプレート・ライブラリーの作成、(6) 単一温度遺伝子増幅法 (特に AS-LAMP 法) による迅速・簡便病原体検出法の検証、の 6 段階に分類した。ブルキナファソ地域において、熱帯熱マラリアの流行がある村落三カ所 (Balonguen 村・Koubri 村・Monomtenga 村) を蚊サンプル採集場所として設定した。蚊の採集に当たっては殺虫剤によるスプレーキャッチングを主に利用し、効率的かつ多岐に渡るサンプル収集を試みた。また、殺虫剤耐性を検討する蚊サンプルの収集にあたっては、昆虫採集器によるマニュアルキャッチングを実施した。今回の採集にあたり、特定の塩基置換を検出する単一温度遺伝子増幅法開発に向けた DNA 試料の確保が重要であることから、大規模な個体数の収集よりも、殺虫剤耐性・感受性を示す両群サンプルのバランスに重点を置いた。

以上の過程によって得られた蚊サンプルは、乾燥による蚊および内部マラリア原虫の不活性化の後、プラスチックチューブにシリカゲルとともに厳重に封入し、航路にて運搬した。これらの蚊サンプルは、現在帯広畜産大学原虫病研究センターにて管理・保管中である。これらの各蚊サンプルからの DNA 抽出を継続的に実施し、DNA テンプレート・ライブラリーとして以下の実験に供与した。

2. 一塩基置換 (SNP) を検出する部位特異的 LAMP 法 (AS-LAMP 法)

LAMP 法に供する通常のプライマーセットのうち、ハマダラカ (*Anopheles gambiae*) の *kdr* 遺伝子情報をもとに、FIP 及び BIP プライマーを設計した (図 1)。他のプライマーは栄研社 PrimerExplorer V4 ソフトを用いて設計したそれぞれのプライマーは、野生型または西アフリカ型の特異的 SNP を含んだ配列を認識する。テンプレートとして、野生型および西アフリカ型 *kdr* 遺伝子の cDNA フラグメントを pBSSK に組み込んだプラスミドに加え、AS-PCR およびシーケンス決定により判別したハマダカラ由来の DNA を用いた。LAMP 反応溶液は常法に従って調整し、反応は 63°C にて行った。また、リアルタイム濁度計 (栄研・LA200) による反応のモニタリングを行った。さらに 2% アガロースゲルによる電気泳動による解析も行った。

3. 一塩基置換 (SNP) を検出する部位特異的 PCR 法 (AS-PCR 法)

PCR法による点突然変異の検出については、マラリア研究標準試薬機構(MR4)にて提供されている方法に準拠した。PCRは、プライマーの3'末端の塩基が鋳型と一致していない場合、増幅されないという性質を有する。プライマーの3'末端に変異の部分が配置されるようにプライマーをデザインし、定法のPCRを行うことで、変異を検出することが可能である。AS-PCR法に供する通常のプライマーセットは、ハマダラカ(*Anopheles gambiae*)の*kdr*遺伝子情報をもとに設計した。

C. 研究結果

1. AS-LAMP法によるハマダラカ殺虫剤耐性SNPの検出

殺虫剤耐性をもたらす*kdr*遺伝子の変異にはいくつかの種類が知られている。そのうち、西アフリカ型の変異では、*kdr*遺伝子の1104番目の塩基がAからTに置換されることにより、該当するアミノ酸がロイシンからフェニルアラニンに変化する。そこで、野生型と西アフリカ型のこの一塩基の差異を検出するようにFIP及びBIPプライマーを設計し、AS-LAMP反応に供与した(図1)。その結果、テンプレートとして(1)*kdr*遺伝子のcDNAを持つプラスミド、および(2)ハマダラカDNAを用いた双方において、特異的な増幅に成功した(図2および図3)。特にハマダラカにおいては、西アフリカ型と野生型のヘテロの遺伝子型を有するサンプルも区別可能なことが判明し、AS-LAMP法の高い特異性が示された。また、従来のSNP検出のためのAS-PCR法との比較を実施したところ、ほぼ同等の性能か、特異性についてはPCRを上回る結果を得た(表1)。また、このAS-LAMP法を用いて、ブルキナファソから採集した蚊サンプル群について*kdr*遺伝子の性状解析を実施したところ、3地点において10-26%の蚊が殺虫剤耐性となっていることが明らかとなった。

D. 考察

マラリア、デング熱、日本脳炎等の蚊媒介性の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蚊側殺虫剤耐性SNP検出法の確立へ向けた研究を実施した。

ピレスロイド系殺虫剤処理をした蚊帳はマラリアを防ぐ効果を失いつつあるという報告が相次いでいる。その遺伝子を有する蚊はピレスロイドの神経毒性に影響を受けにくいと

いう、特異的*kdr*遺伝子変異が広まっているアフリカのベニン地域においては、殺虫剤処理蚊帳は媒体蚊のハマダラカのわずか30%にしか有効でないことが明らかとなっている。同タイプの*kdr*遺伝子変異がほとんど見つからない地域では、殺虫剤処理蚊帳が蚊の98%を殺している。これらの知見は、高いレベルで*kdr*遺伝子変異を持つハマダラカの集団を制御することに、ピレスロイドは有効でないことを明確に示している。殺虫剤処理蚊帳は、マラリアが流行している諸国ではマラリア対策の主要な手段であることを考慮すると、このような発見は大きな問題の出発点であると見受けられる。*kdr*遺伝子変異の流布は他のいずれの流行地域においても存在し得るが、十分に厳格な調査は実施されていないのが現状である。

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、SNP検出のための遺伝子検出技術(AS-LAMP法)開発を実施した。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として、PCR法によるSNP検出も同時に実施した。その結果、AS-LAMP法をハマダラカの*kdr*遺伝子変異検出に応用し、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感染症媒介蚊の殺虫剤耐性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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Shinzawa, N., Nelson, B., Aonuma, H., Okado, K., Fukumoto, S., Miura, M. & Kanuka, H. (2009) p38 MAPK -dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*, *Cell Host Microbe*. 6, 244-52.

Aonuma, H., Yoshimura, A., Kobayashi, T., Okado, K., Badolo, A., Nelson, B., Kanuka, H. & Fukumoto, S. (2010) A single fluorescence-based LAMP reaction for identifying multiple parasites in mosquitoes, *Exp Parasitol*. 125, 179-83.

2. 学会発表

新澤直明、青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila*. Jacques Monod Conference "Insect immunity in action: from fundamental mechanisms of host defense to resistance against infections in nature" 2009. 5. 25

新澤直明、青沼宏佳、岡戸清、Bryce Nelson 福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila* 第9回ショウジョウバエ研究会 2009. 7. 6

伴戸寛徳、青沼宏佳、岡戸清、新澤直明、Guelbeogo Moussa, N' Fale Sagnon、福本晋也、嘉糠洋陸 *Serratia marcescens* regulates *Plasmodium* development in mosquito midgut EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors" 2009. 7. 22

土井裕子、小林朋美、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫の細胞骨格システムトランジション 第15回分子寄生虫学ワークショップ 2009. 8. 7

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアの脱皮システムトランジション 第15回分子寄生虫学ワークショップ 2009. 8. 7

吉村文、岡戸清、波田一誠、丹羽隆介、福本晋也、嘉糠洋陸 Transcription-linked

developmental transition in filarial parasites during a bridge between vector and host 9th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2009. 9. 9

新澤直明、Bryce Nelson 青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 p38 MAPK-dependent phagocytic encapsulation confers infection tolerance in *Drosophila* 9th Awaji International Forum of Infection and Immunity 2009. 9. 9

嘉糠洋陸 ベクターバイオロジー：モデル生物による新展開 平成21年度国立大学附置研究所・センター長会議 第2部会シンポジウム 2009. 9. 19

伴戸寛徳、青沼宏佳、岡戸清、新澤直明、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148回日本獣医学会学術集会 2009. 9. 25

新澤直明、青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 細菌感染に対する宿主側トレランス機能の解明 第148回日本獣医学会学術集会 2009. 9. 25

岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 ハエ類の自然免疫と病原体伝播メカニズム 第55回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 フィラリアの環境応答性トランジション機構の解明 第55回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

新澤直明、Bryce Nelson 青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 食食性困い込みは細菌感染に対するトレランス機能を制御する 第55回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

土井裕子、小林朋美、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫における二温度域性アクチン動態制御メカニズム 第55回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 2009. 10. 3

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55回日本寄生虫学会・日本衛生動物学

会 2009. 10. 3

前川絵美、長田宏二、徳永史生、柿本辰男、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊の標的認識における熱アンテナの探索 第8回分子寄生虫マラリアフォーラム 2009. 10. 8

嘉糠洋陸 そこに在る「病原体」と「場」を理解する：モデル生物から眺める感染抵抗性 Advanced Seminar Series on Microbiology and Immunology 2009. 10. 20

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32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

岡戸清、新澤直明、福本晋也、嘉糠洋陸 機械的な病原体伝播と自然免疫の相互作用 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

吉村文、岡戸清、波田一誠、丹羽隆介、福本晋也、嘉糠洋陸 Filarial parasites: Developmental transition mechanism mediated by environmental stimuli during a bridge between vector and host 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

鹿島千紗子、新澤直明、高橋慧、福本晋也、下島昌幸、河岡義裕、嘉糠洋陸 トランスジェニック蚊を用いたウイルス生ワクチン産生の試み 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

小林朋美、土井裕子、福本晋也、嘉糠洋陸 マラリア原虫における細胞骨格構築による極性形成メカニズム 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

新澤直明、Bryce Nelson 青沼宏佳、岡戸清、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 ハエ不顕性感染モデル～食性困り込みは細菌感染に対するトレランス機能を制御する～ 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

土井裕子、小林朋美、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫の細胞骨格再編成における二温度域性メカニズム 第32回日本分子生物学会年会 2009. 12. 12

嘉糠洋陸 Midgut-based insect and parasite interaction in malaria vector

Anopheles mosquitoes STINT workshop on Invertebrates 2010. 3. 16

H. 知的財産権の出願・登録情報なし

TTTTCTTAATATACTTTTCCAGATAATGTGGATAGATT

CCCCGACCATGATCTGCGCAAGATGGAATTTACAGATTTTC

F3

ATGCATTCCCTTCATGATTGIGTCCCGTGTGCTATGCGGAG

F2

AATGGATTGAATCAATGTGGGATTGTATGCTTGTCCGGTGA

F1c

B1c

TGTATCCTGCATACCATTTTTCTTGGCCACTGTAGTGATA

GGAAATTTAGTCGTAAGTAATGCAAATTA

B2

ACATGGACCAAGATCGTTTTTACATGACATTGTTTTGCAG

B3

GTGCTTAACCTTTTCTTAGCCTTGCTTTTGTCAAATTTTG

GTTCATCATCCTTGTCTGCACCAACGGCAGATAATGAGAC

CAACAAGATTGCAGAAGCGTTCAACAGAATATCA

図1 ハマダラカ *kdr* 遺伝子に対するAS-LAMPプライマーの設計。プライマー設計領域の部分的 *kdr* 遺伝子の塩基配列を示す。変異部位は太字、PCRサブクローニングに用いた配列は赤字で示す。

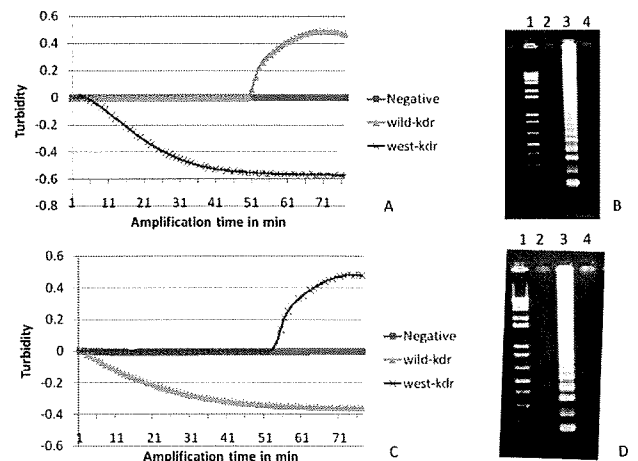


図2 *kdr* 遺伝子を組み込んだプラスミドを用いた、AS-LAMP法によるSNP検出を示す。テンプレートとして、野生型 (wild-*kdr*: A および B) および西アフリカ型 (west-*kdr*: C

およびD) それぞれの cDNA 断片を持つプラスミド、加えて検出するためのプライマーセットを使用した。(A および C) AS-LAMP 法による反応のリアルタイム濁度計を用いた解析。(B および D) 上記実験における反応産物のアガロースゲル電気泳動法による解析。レーン 1 : DNA マーカー、レーン 2 : 陰性対照、レーン 3 : 陽性プラスミドサンプル、レーン 4 : 陰性プラスミドサンプル。

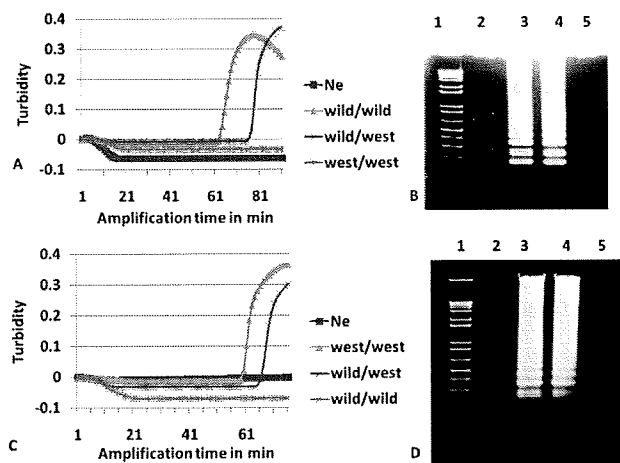


図3 ハマダラカ由来 DNA を用いた、AS-LAMP 法による SNP 検出を示す。テンプレートとして、野生型(wild/wild)、ヘテロ型(wild/west) および西アフリカ型 (west/west) それぞれのハマダラカ由来 DNA を使用した。また、プライマーセットはそれぞれを検出するものを用いた。(A および C) AS-LAMP 法による反応のリアルタイム濁度計を用いた解析。(B および D) 上記実験における反応産物のアガロースゲル電気泳動法による解析。レーン 1 : DNA マーカー、レーン 2 : 陰性対照、レーン 3 : 陽性 DNA サンプル (ホモ型)、レーン 4 : 陽性 DNA サンプル (ヘテロ型)、レーン 5 : 陰性 DNA サンプル。

表1 ハマダラカ由来 DNA を用いた、AS-LAMP 法と AS-PCR 法の比較。テンプレートとして、野生型 (wild/wild)、ヘテロ型 (wild/west) および西アフリカ型 (west/west) それぞれのハマダラカ由来 DNA を使用した。また、プライマーセットはそれぞれを検出するものを用いた。ゲノムのダイレクトシーケンスによる SNP 型の判別に照らし、それぞれ感受性 (sensitivity) と特異性 (specificity) を算出した。

| Method | Non-identified | wild/wild | <i>kdr-w/wild</i> | <i>kdr-w/kdr-w</i> |
|----------------|----------------|-----------|-------------------|--------------------|
| AS-LAMP | 7 (2) | 70 (0) | 20 (2) | 23 (3) |
| Sensitivity | - | 93.3% | 94.1% | 91.7% |
| Specificity | - | 100% | 96.1% | 98.9% |
| AS-PCR | 9 (5) | 73 (3) | 18 (3) | 20 (0) |
| Sensitivity | - | 93.3% | 94.1% | 83.3% |
| Specificity | - | 93.3% | 98.0% | 100% |

蛍光マルチプレックス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

マラリア・リンパ管フィラリア症などの蚊媒介性感染症を惹起する病原体は、同一ベクター個体内に共感染しているケースが多く知られている。したがって同一個体から同時かつ簡便に複数の病原体を検出する診断技術の開発が望まれている。本研究ではマラリア原虫とフィラリアを同時に検出することを目的として、蛍光標識プライマーを用いたマルチプレックス等温遺伝子増幅法の開発を試みた。蛍光標識プライマーを用いた反応系においても十分な検出感度を示すことが明らかになった。また、マラリア検出プライマー、フィラリア検出プライマーを混合した、マルチプレックス LAMP mixture 検出系においても、各病原体を特異的かつ高感度に検出することに成功した。以上の結果は、蛍光マルチプレックス等温遺伝子増幅法がベクター媒介性感染症サーベイに際して極めて有用となり得ることを示すものであった。

A. 研究目的

本研究は、ベクターの侵入による海外からのベクター媒介性感染症の侵入を防除すべく、簡便かつ迅速な遺伝子診断法を樹立し、本邦の保健衛生上の懸念を払拭しようとするものである。蚊は病原体媒介ベクターとして極めて重要な生物種であり、様々な感染症の媒介者として知られている。世界で最も被害が深刻なベクター媒介性感染症のマラリアをはじめとして、各種のウイルス・細菌・寄生虫性疾患を媒介する。したがって、感染症の防除を考慮した場合、一個体のベクター蚊に対し単一種の病原体検査のみを行うのではなく、多種の病原体検査を実施する必要がある。同一検体に対し、完全に独立した検査系をそれぞれ行うことは、実際の水際での防除現場での使用を考慮すると、試験の煩雑さ、所用時間の増大などの様々な不利益が発生する。したがって、同一反応系で一度に多種の病原体を検査可能なマルチプレックス診断系の開発が望まれる。そこで平成 21 年度における研究では、現在までの研究によって分担者らが開発に成功した等温遺伝子増幅法を用いた迅速簡便な病原体検出法を基盤とし、更なる改良を加えることでより簡便に多種の病原体を検出する方法の開発を目指すこととした。

における研究で、病原体を保持する蚊から、LAMP 法による等温遺伝子増幅法を応用した遺伝子診断法によって、マラリア原虫またはフィラリアを特異的かつ高感度に検出する診断法の樹立を世界に先駆け行ってきた。これらの診断系は病原体媒介ベクターにおける病原体検出法として、等温遺伝子増幅法の有用性を示すものであり、更なる研究の展開が各方面より切望されてきた。そこで平成 21 年度の研究においては分担研究者らが現在までの研究により樹立してきた媒介蚊からのマラリア検出 LAMP 法とフィラリア検出 LAMP 法を基盤として、これらの病原体を単一反応系で検出する遺伝子診断法の開発に着手することとした。リンパ管フィラリア症とマラリアの発生地域は重複していることが知られており、ガンビアハマダラカを代表とする種のハマダラカがフィラリアとマラリア原虫を同時に保持し媒介することが知られている。したがって、ハマダラカからフィラリアとマラリア原虫を同時に検出する診断系は極めて高い有効性を持つこととなる。しかしながら、ハマダラカにおけるヒト感染性のフィラリア、マラリア媒介実験系は安全上の問題から困難である。そこで我々は前年度までの研究によって樹立した、齧歯類特異的マラリア原虫媒介系とイヌフィラリア媒介系の 2 つの実験モデルを利用

することで、同時に多種の病原体を等温遺伝子増幅法によって検出する系の開発を進めた。マラリア検出、フィラリア検出それぞれの LAMP プライマーに異なった波長の蛍光標識を施し、反応増幅産物の識別によって同時に多種の病原体を検出開発に着手し、その有用性と実用化の可能性を模索することとした。

B. 研究方法

1. マラリア原虫・フィラリア感染蚊の作製
マラリア原虫と感染蚊の作出：分担研究者の三重大学油田博士らによって作製された、マラリア原虫 HSP70 プロモーターの制御下で GFP を原虫ステージ非特異的に恒常的に発現する齧歯類マラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA strain) 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、-20°C で保存、その後の解析に供した。
フィラリア感染蚊の作出：フィラリア媒介蚊モデルとしてネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) とイヌフィラリア (*Dirofilaria immitis*) を用いた。フィラリアの DNA スタンダードとして、RPMI1640 メディウムにて培養したフィラリア成虫培養液より産出されたマイクロフィラリアを 130 g・4°C で遠心分離、回収し後の実験に供した。フィラリア感染蚊の作製は人工吸血法を用いておこなった。フィラリア感染ビーグルより末梢血を採取し、蚊を誘因するため温湯を内部に入れた NUNC 製細胞培養フラスコ (T25) の底部に人工吸血膜としてパラフィルムを張り、パラフィルムとフラスコ底部の隙間にマイクロフィラリア含有血液を入れ、人工吸血システムとして実験に供した。メスネッタイシマカ 100 匹を含む紙製容器にネットを張り、そこに前述の人工吸血システムをセットし 1 時間自由吸血させることにより、ネッタイシマカに対しマイクロフィラリアを感染させた。吸血後 27°C にて 8 日間にわたり蚊を飼育し第二期幼虫までフィラリアを分化させた。第二期幼虫を含むマルピーギ管を顕微鏡下で分離し後の実験に供した。
DNA 抽出：マラリア原虫感染蚊、フィラリア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。また既知数の感染赤血球を含むマラリア感染血液、及びマイクロフィラリア

を検体として DNA 抽出に供し、遺伝子増幅系のスタンダードとして用いた。

2. 蛍光等温遺伝子増幅法による媒介蚊からの病原体検出

LAMP 反応：マラリア原虫およびフィラリアを検出する LAMP 用プライマーは研究分担者らの平成 19 年度、平成 20 年度の研究成果で得られたものを使用した (青沼ら、2008 年・2009 年、図 1B 参照)。マラリアまたはフィラリアを検出するプライマーセットのそれぞれ FIP プライマーに異なる波長の蛍光標識を行った。マラリア LAMP プライマーには FITC 標識、フィラリア LAMP プライマーには Cy5.5 で標識を行い両者の増幅産物を蛍光識別可能にした (図 1A 参照)。LAMP 反応は全量 12.5ul の反応系で行った。反応は、1ul の DNA 溶液・各 2.5pmol の F3、B3 プライマー・6.25ul の 2xReaction mixture・0.5ul の Bst DNA 合成酵素の組成で行った。遺伝子増幅反応は 60°C で 90 分間、リアルタイム濁度計 (LA-200、栄研化学) を用いて行った。遺伝子増幅反応は 95°C 2 分間の熱処理を行う事により、酵素不活化を行うことで停止させた。

LAMP 反応産物の解析：LAMP 法による病原体遺伝子の等温増幅反応はリアルタイム濁度計でモニタリングを行った。また、反応産物 1ul を 2% アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色によりバンドパターンの解析を行った。さらにアガロースゲルをイメージアナライザー (LAS3000、富士フィルム) にて蛍光パターンの解析を行った。

C. 研究結果

1. 蛍光標識プライマーを用いた等温遺伝子増幅反応の検討

蛍光標識プライマーが LAMP 法による等温遺伝子増幅反応に影響を与えるのか否かを検討した。1、10、または 100 個のマラリア感染赤血球より抽出した DNA、もしくは 1、10、または 100 マイクロフィラリア虫体より抽出した DNA をテンプレートとして蛍光標識プライマーを用いた LAMP 法の増幅効率を検証した。マラリア感染赤血球の場合、蛍光非標識プライマーを使用した場合、検出限界は 1×10^2 の感染赤血球由来 DNA であった。一方、標識プライマーを使用した場合、検出感度は 1×10^2 感染赤血球由来 DNA であり、検出感度の低下は認められなかった (図 2 参照)。フィラリアの場合も同様に非標識プライマーを用いた場合、標識プライマーを用いた場合、の比較を行っ

たところ検出限界に差は無く、一個体のマイクロフィラリア DNA 由来サンプルを検出可能であり、プライマー標識による検出限界の低下は認められなかった。

単一チューブ内の反応においてマラリア原虫、フィラリア双方の DNA を検出するマルチプレックス化を検証するため、フィラリア検出プライマー、マラリア検出プライマーを混合し、感染赤血球由来 DNA、またはマイクロフィラリア由来 DNA を検体として LAMP 法に供した。その結果、混合標識プライマーの使用においても特異的に病原体 DNA を検出することが可能であった (図 2B 参照)。しかしながら検出限界の低下が認められ、50 マラリア感染赤血球由来 DNA が必要であった。

蛍光標識プライマーによる等温遺伝子増幅法が病原体感染蚊由来 DNA サンプルに対しても同様に適用可能なのかを確認するため、オーシストステージのマラリア原虫感染ハマダラカ、またはフィラリア第 2 期幼虫感染ネッタイシマカ由来サンプルをテンプレートとして LAMP 法に供した。感染蚊を実体顕微鏡下で解剖し感染病原体数を確認した後に、LAMP 反応に供した。マラリア原虫オーシスト数は 1 ハマダラカあたり 1~974 個の範囲内であり (図 3A) であり、1 ネッタイシマカあたりのフィラリア第 2 期幼虫数は 1~7 虫体であった。これらのサンプル由来 DNA を両病原体検出プライマーがミックスされた反応系でそれぞれ LAMP 法に供したところ、マラリア原虫においては 19 オーシストが感染しているハマダラカ、フィラリアにおいては、1 虫体の第 2 期幼虫が感染しているネッタイシマカから病原体 DNA を検出可能であることが明らかになった。

D. 考察

西ナイル熱などの日本には未だ発生が確認されていない感染症の海外からの侵入が現在危惧されている。これらの感染症の一部は蚊などの昆虫が病原体を伝播するベクター媒介性感染症である。これらの感染症の特徴として、病原体を保持したベクター昆虫等の輸入により病原体が侵入する可能性があること、またこれらの感染症を媒介可能なベクター昆虫がすでに日本に存在することがあげられる。したがって、一度病原体が日本に侵入したばあい、近年のアメリカ合衆国における西ナイル熱の爆発的な感染拡大の例のように、日本中に当該感染症の発生が蔓延する可能性が拭いされない。したがって蚊媒介性感染症の日

本への侵入防除のため、感染症防除における日本の水際といえる検疫所などの現場でも実際に簡便かつ迅速に運用可能な病原体検出システムの開発が望まれる。そこで我々は平成 19 年度~平成 21 年度の研究において、PCR 法におけるサーマルサイクラーのように特別な高額実験機材を必要としない遺伝子診断法である、等温遺伝子増幅法を応用することで簡便な遺伝子診断システムの開発を行った。本年度の研究では昨年度までに開発した診断システムの改良を行い、更なる簡便性と利便性をもたらすことを目標として研究を展開した。

自然界において、一個体のベクター蚊が単一の病原体のみを保持するとは限らない。単一のベクターが様々な病原体種を同時に保有することは良く知られている事実である。したがって、同一検体に対して一度の検査で様々な感染症を検出する遺伝子診断法の実現は、実際の現場での利便性を更に高めることが可能である。LAMP 法は PCR 法と同様に多種のプライマーの混合によりマルチプレックス化が可能であることが本年度の研究において明らかになった。しかしながら LAMP 法の問題点として、増幅され他 DNA はスメア状に様々な名サイズのバンドができあがるために、PCR 法のように、アガロースゲル電気泳動法では識別が不可能である。そこで分担研究者らはその問題を解決するため、プライマーを病原体種ごとに異なる蛍光色素で標識し、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で識別することを可能とした。特異的病原体 DNA とそれに対応する特異的検出プライマーセットで LAMP 法による等温遺伝子増幅反応を行ったところ、非標識のプライマーを用いた場合と比較して検出感度の低下は起こらなかった。感染蚊由来病原体 DNA サンプルを供したところ、非標識プライマーと比較し若干の検出感度の低下が認められた。しかしながら、検出感度の低下は実用範囲に影響を与えるものではなく、それでも尚、他の研究者によって報告されている LAMP 法と比較しても遜色ない検出感度を維持していた。したがって、蛍光色素による標識プライマーを使用した LAMP 法は極めて実用的な検査ツールとして使用可能であることが確認された。

2 種の病原体を検出する混合プライマーを用いたマルチプレックス LAMP 法において、既知の病原体 DNA を含む検体から病原体 DNA を検出することが可能であった。しかしながら、若干の検出感度の低下が起り、単細胞生物のマラリアの場合、ハマダラカ中腸内オーシ