

200931011B

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)

総合研究報告書

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)

総合研究報告書

研究代表者 嘉 糠 洋 陸

平成 22 (2010) 年 3 月

目 次

I. 平成 19 年度 総括・分担研究報告	5
II. 平成 20 年度 総括・分担研究報告	67
III. 平成 21 年度 総括・分担研究報告	203

I. 平成 19 年度 総括・分担研究報告

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

主任研究者 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) 検出法の妥当性の検討のため、蛍光タンパク質マーカーを発現するマラリア原虫の作出に成功した。(2) ヤブカー-犬フィラリア感染モデルの導入開発を進め、検出法の開発における病原体媒介蚊のシーズ提供の環境を構築した。(3) 同様に、ヤブカー-フロックハウスウイルス感染モデルの導入開発を実行した。(4) 単一温度反応系遺伝子増幅法開発のため、DNA 増幅酵素・DNA 結合因子等の精製法の改良を行い、一定の改善成果を得た。(5) 単一温度反応系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に成功し、ただひとつの原虫感染においても検出可能であることを示した。(6) 西アフリカ・ブリキナファソ国内のマラリア流行地域におけるハマダラカ試料の採集とその評価をおこない、DNA テンプレート・ライブラリーの構築に成功した。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）

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。この問題を解決するため、簡便に遺伝子増幅が可能な LAMP 法が近年応用されつつあるが、多数のプライマーを必要とするなど反応系の複雑性が高く、またこれに起因

した非特異反応の問題があり、実用化には多くの弊害が存在する。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、RPA 法が開発された。RPA 法は PCR 法と同様に 2 種類の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 20 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可能であり、極めて迅速かつ簡便性に優れた手法である。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 30 分程度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。RPA 法の優れた点として、現在の主流である PCR 法で培われた信頼性の高いプライマーを利用可能で、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 法と異なり、単一サイズの増幅産物が生じるため、塩基配列解析による病原体系統同定などの更なる解析に応用可能である。本年度では、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のイムノクロマト検出法の確立を目指す。

上記のように等温遺伝子増幅法は、既存の遺伝子増幅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。等温遺伝子増幅法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、反応条件等の至適化をおこなう。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 19 年度の計画は以下に述べる。

ヒトに致死性の病原性を持つ熱帯熱マラリア原虫などの本研究課題の対象病原体を用いた実験は、高度なバイオセーフティーレベル下での遂行が必要となる。そこで、代替えと

して GFP 発現組換え齧歯類マラリア原虫と、安全性の高い昆虫モデルウイルス、さらには犬に感染する犬フィラリアを用いた媒介蚊-病原体感染モデルを用いることで、媒介蚊体内からの病原体検出に対する等温遺伝子増幅法の有効性の検証と、反応条件の至適化をおこなう。特にマラリア媒介蚊において、蛍光タンパク質を発現する GFP 遺伝子を指標に、上記の病原体を有する蚊より抽出した核酸を検体とし、一個体の病原体を検出可能かつ高い特異性を持つプライマーセット、反応条件の確定等をおこなう。同時に、次年度以降の「マルチプレックス等温遺伝子増幅法-イムノクロマト法」開発を見越したイムノクロマト作成法構築をおこなう。

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) 病原体媒介蚊における等温遺伝子増幅法の応用研究 (分担研究者：嘉糠洋陸)
- (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 (分担研究者：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 (分担研究者：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 (分担研究者：平田晴之)

本年は 3 年計画研究の初年度であり、進捗状況および研究成果を班会議等で確認・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) 病原体媒介蚊における等温遺伝子増幅法の応用研究

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。委託実施期間中に、各村落において定点採集を実施した結果、総計約 4000 個体の雌ハマダラカを得た。このうち、マラリア原虫が発現する CSP タンパク質に対する抗体を用いて、ELISA 法によるマラリア原虫数の測定・評価をおこなった。各群からそれぞれお 409 匹 (Balonguen 村)、1090 匹 (Koubri 村)、および 372 匹 (Monomtenga 村) の雌ハマダラカを無作為に抽出し、細胞溶解液を調整、ELISA 反応に供した。その結果、Balonguen 村では 10-27%、Koubri 村では 0-11%、Monomtenga 村では 0-25% のマラリア原虫陽性ハマダラカが存在することが明らかとなった。

LAMP 法の検出限界を検証するため、既知数の赤内型、オーシスト、スポロゾイトのマラリア原虫から DNA を抽出し、LAMP 法による検出限界原虫数を測定したところ、オーシストについてはハマダラカ中腸内にたった 1 個存在するだけでも LAMP 法により検出されることが明らかとなった。赤内型とスポロゾイトも同様の実験により検出限界を算出し、高い検出感度を有することが明らかとなった。

さらに、現地サンプルへの応用を考え、乾燥ハマダラカサンプルに対する適応を検証した。その結果、濾紙にて挟み常温にて、9 ヶ月乾燥保存し、その後 DNA を抽出し LAMP 法に供した場合でも、LAMP 法により検出可能であることが判明した。

(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

プラスチック製保温型パラフィルム人工吸血システムを用いて、フィラリアの人工感染モデルの最適化を行い、感染血液の適切な濃度を明らかにした。またこの濃度でのヤブカ一個体あたりのフィラリア保有数は 5-10 虫体であり、吸血源のフィラリア濃度と保有虫体数は正の相関を示し、一個体のヤブカに既

知数のフィラリアを感染させることが可能であった。

マイクロインジェクターによる微量注入法により、定量的にフロックハウスウイルスをヤブカに感染させることが可能となった。ブランクアッセイ法でウイルス液の感染価を確定後、濃度を調整することにより、既知のウイルス数が感染したヤブカ-フロックハウスウイルス感染モデルを樹立することに成功した。

GFP 発現マラリア原虫をクローニング後、マウスに感染させたのちマウス尾静脈を採取、蛍光顕微鏡にて GFP の発現を確認した。また、野生型のマラリア原虫と同様の増殖性、病原性をマウスに対して有することを確認した。GFP 発現マラリアは野生型と同様にハマダラカに対して感染可能であり、実体蛍光顕微鏡を用いることで、非侵襲的にマラリア感染の有無の判定、感染マラリア原虫の定量が可能であった。

(3) 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成

ショウジョウバエ由来 D. Mel-2 細胞株に GFP 組換え VSV を接種したところ、十分な GFP の発現が観察された。GFP の発現は接種細胞を 30 日以上培養した後も観察された。ショウジョウバエの腹腔内に 1×10^4 IU の GFP 組換え VSV を投与したところ、十分な GFP の発現が観察された。ショウジョウバエの腹腔内に野生型 VSV を投与したところ、26 PFU/匹の低投与量においても VSV の増殖が認められた。VSV 投与によるショウジョウバエの死亡は 2.6×10^6 PFU/匹の高投与量でも認められなかった。分断された cDNA をもとに、西ナイル熱ウイルスの遺伝子をマーカー (蛍光蛋白質 Venus) 遺伝子と共に連結した。SP6 プロモーターを用いて RNA を in vitro で合成し 293T 細胞に導入したところ、48 時間後にはマーカー蛋白質 (Venus) の十分な発現が認められた。

(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

B. equi GST 融合 Be82 タンパク質の金コロイド粒子 (粒径サイズ 20 nm) を pH5.6, pH5.8 及び pH6.2 に調整した緩衝液で結合させ、イムノクロマト・ストリップ、*B. equi* 感染馬血清及び非感染馬血清を用いて評価した。その結果、pH6.2 で調整した緩衝液では *B. equi* 感染血清で検出バンドが認められ、非感染血清では反応が認められなかった。しかしながら、pH5.8 で調整した緩衝液では感染血清お

よび非感染血清共に検出バンドは認められ、pH5.6で調整した緩衝液では感染血清および非感染血清共に検出バンドは認められなかった。以上の結果より、GST融合Be82タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適pHはpH6.2の緩衝液を利用することに決定した。

金コロイド粒子のサイズを20 nmと50 nmの2種類の粒径を用意し、それぞれ最適pH6.2緩衝液の条件下でGST融合Be82タンパク質と結合させ、イムノクロマト・ストリップ、*B. equi*感染馬血清及び非感染馬血清を用いて評価した。その結果、金コロイド粒子の粒径が20 nmにおいて、*B. equi*感染血清で検出バンドが認められ、非感染血清では反応が認められなかった。以上の結果より、*B. equi*感染馬の検出に有用な金コロイド粒子粒径を20 nmを利用することに決定した。

上記の結果から、GST融合Be82タンパク質の金コロイド粒子を結合させる最適pH6.2、結合させる金コロイド粒子の粒径を20 nmとしてイムノクロマト・ストリップを作製した。このストリップの*B. equi*感染馬血清及び非感染馬血清を用いた評価を行った。この結果より、感染馬血清を有用に検出する可能であることを確認した。

D. 考察

(1) 病原体媒介蚊における等温遺伝子増幅法の応用研究

ブルキナファソ国の研究機関の協力によって得られたこれらの成果は、以下のように実施中の研究に反映されると考える。病原体としての熱帯熱マラリア原虫に加え、媒介蚊であるハマダラカは、それぞれ国内の複数研究機関で維持され、実験に供与されている。しかし、安全確保を熟慮した道義的問題から、熱帯熱マラリア原虫のハマダラカへの導入実験は、極めて困難であることは自明である。主任研究者の研究課題は、「蚊」体内における「病原体」の“検出・診断”を試みるものであり、国内では入手不可能な「蚊+病原体」サンプルの重要性は高い。そこで、本研究委託により、西アフリカ地域のマラリア流行国にある現地研究グループと協力し、実際に熱帯熱マラリア原虫を有するハマダラカをサンプルとして入手することに成功した今回の成果は、病原体媒介節足動物における迅速・簡便診断法の開発を強力に推進することが期待される。

本分担研究では、LAMP法をハマダラカからのモデルマラリア診断に応用し、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。

(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

新規病原体検出法の確立には、モデル系を用いた検出系の最適化が極めて重要なプロセスであるといえ、適切なモデル系確立の成否が研究の進捗を既定する。本研究では優れた病原体感染モデルを確立するため、ヤブカとイヌフィラリア・フロックハウスウイルスを用いて実験系を確立した。新規病原体検出法を開発・評価する上で、保有病原体の数と種類が既知の媒介昆虫サンプルを利用しえることは、研究完遂にあたり大きなアドバンテージを付与するものと考えられる。

このような感染モデルの標準化は新規病原体検出法の確立時には極めて重要であるが、本研究ではこの点をさらに改良するため、マーカー遺伝子を発現するマラリア原虫の作成を試みた。本研究によって作出された蛍光タンパクを発現するマラリア原虫は、現在までに困難であった非侵襲的に実際の感染病原体数を目視によって定量可能な極めて優れた方法論である。本研究における、蛍光タンパクを病原体感染のマーカーとして応用する方法論の提示は、同様の病原体検出法の開発研究の進展にも大きく寄与するものと考えられ、本研究の進展のみならず、感染症診断法開発研究全体の進展に大きく貢献するものであると考えられる。

(3) 等温遺伝子増幅法テンプレート用病原体の作成

哺乳類に対する病原体である水疱性口内炎ウイルス(VSV)が昆虫細胞に感染することや、遺伝子操作によってゲノムに組み込んだマー

カーが哺乳類細胞での VSV 感染の検出に有用であることは既に知られていた。今回の結果から、VSV が昆虫個体にも感染して増殖でき、また感染の検出に組み込んだマーカが昆虫（細胞）でも有用であることが判明した。このことは本研究で対象とする蚊媒介性ウイルス（西ナイル熱ウイルスやデングウイルス）の蚊感染モデルの構築に、ウイルスゲノムへのマーカを組み込みというものが極めて役立つものとなることを示していると考えられた。

この VSV での結果を踏まえ、本研究で対象としている病原体の一つ、西ナイル熱ウイルスに対し、そのゲノムへのマーカの組み込みを行い、レプリコンの作製に成功した。さらに、西ナイル熱ウイルスとデングウイルスは同じフラビウイルス科に属するので、同様の方法はデングウイルスに対しても可能であることが示唆された。

(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

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組換えタンパク質を用いたイムノクロマト・ストリップの作成、目視による判定および検討を行った。本研究における反応の検討課題として、タンパク質と金コロイドの結合パットの色が鮮明な赤色ではなく濃い紫色である。このことは結合が不十分であるために凝集反応を起こしていると考えられる。このことより、さらに詳細な条件検討が必要であり、増幅遺伝子の検出の場合での検討事項でもある。

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、さらに等温遺伝子増幅法を用いた病原体検出法を開発する準備基盤の確立（各種酵素および DNA 結合タンパク質の合成および精製技術）を達成した。また、(財)ヒューマンサイエンス振興財団より「外国の研究機関等への委託事業」の補助を受け、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の確保および蚊サンプル採集を実施し、これらの検体は次年度以降の研究計画に供与される。

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

1. 論文

Shimojima M, Ikeda Y, and Kawaoka Y. The mechanism of Axl-mediated Ebola virus infection. *J Infect Dis* 196 Suppl 2: S259-S263, 2007

下島昌幸 ネコ免疫不全ウイルスの感染指向性に関する研究 *ウイルス* 第 57 巻第 1 号 p75-82, 2007

Sasaki M, Omobowale O, Tozuka M, Ohta K, Matsuu A, Nottidge HO, Hirata H, Ikadai H, and Oyamada T. Molecular survey of *Babesia canis* in dogs in Nigeria. *J Vet Med Sci* 69(11): 1191-1193, 2007

Fukumoto S, Tamaki Y, Okamura M, Bannai H, Yokoyama N, Suzuki T, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X. Prime-boost immunization with DNA followed by a recombinant vaccinia virus expressing P50 induced protective immunity against *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Vaccine* 25(7): 1334-1341, 2007

Gong H, Liao M, Zhou J, Hatta T, Huang P, Zhang G, Kanuka H, Nishikawa Y, Xuan X, Fujisaki K. Gene silencing of ribosomal protein P0 is lethal to the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Vet Parasitol*

151(2-4): 268-278, 2008

2. 学会発表

下島昌幸、河岡義裕 ラッサウイルスの細胞侵入機構 第 55 回日本ウイルス学会 (名古屋) 2007. 10. 22

下島昌幸、河岡義裕 エボラウイルスおよびラッサウイルスに共通する細胞侵入機構 第 30 回日本分子生物学会 (横浜) 2007. 12. 15

前川絵美、吉村文、徳永史生、嘉糠洋陸 概日リズムによるハマダラカ CO₂ 感受性の支配 第 59 回日本衛生動物学会 (大阪) 2007. 4. 3

青沼宏佳、嘉糠洋陸 マラリア原虫認識タンパク質 Furrowed とその機能 第 7 回日本蛋白質科学会 (仙台) 2007. 5. 25

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 Fly Immunity: Drosophila Host Resistance Against Bacterial Infection ショウジョウバエ研究会第 8 回研究集会 (兵庫) 2007. 7. 3

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Fly Immunity: Diversity of Drosophila Susceptibility to Bacterial Infection ショウジョウバエ研究会第 8 回研究集会 (兵庫) 2007. 7. 3

青沼宏佳、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、David Schneider、嘉糠洋陸 What Drosophila Can Tell Us About Insect-borne Diseases: Mosquito Immune Mechanisms Against Malaria Parasite ショウジョウバエ研究会第 8 回研究集会 (兵庫) 2007. 7. 3

青沼宏佳、Stephanie Brandt、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、嘉糠洋陸、David Schneider Furrowed/CTLSE1 aborts development of Plasmodium parasite in Anopheles gambiae EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors (ギリシャ) 2007. 7. 14

前川絵美、福本晋也、徳永史生、嘉糠洋陸 Revisiting CO₂-activated mosquito behavior EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other

Disease Vectors (ギリシャ) 2007. 7. 14

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊の中腸に存在する微生物とマラリア原虫の相互作用 第 14 回分子寄生虫学ワークショップ (群馬) 2007. 7. 27

土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫、温度、ロバスト適応 第 14 回分子寄生虫学ワークショップ (群馬) 2007. 7. 27

嘉糠洋陸 スーパーモスキートへの挑戦 07 第 14 回分子寄生虫学ワークショップ (群馬) 2007. 7. 27

嘉糠洋陸 病原体媒介蚊へのいざない 日本動物学会北海道支部第 53 回大会 2007. 8. 18

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 Interaction between vectors and parasites: Filaria behavior at blood-feeding of mosquito 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

寺本時靖、宮内亜宜、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 Why can't the insect vector be killed by an arbovirus? 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

嘉糠洋陸 Mosquito and parasite interaction: friend or enemy? 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

福本晋也、青沼宏佳、嘉糠洋陸 Pattern recognition of Plasmodium parasite in mosquito 7th Awaji International Forum of Infection and Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

嘉糠洋陸 モデル生物から眺める感染抵抗性 第 18 回フォーラム・イン・ドージン (熊本) 2007. 11. 30

嘉糠洋陸 感染現象とそれを制御するシグナルの再訪 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (横浜) 2007. 12. 13

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし

病原体媒介蚊における等温遺伝子増幅法の応用研究

分担研究者 嘉糠 洋陸 帯広畜産大学原虫病研究センター 教授

単一温度遺伝子増幅法である RPA 法を用いた、蚊媒介性感染症に対する新規病原体検出法の確立のための準備研究を行った。熱帯熱マラリア流行地域であるブルキナファソ国にてハマダラカサンプルを収集、DNA テンプレート・ライブラリーの作製に供した。また LAMP 法を用いて単一温度遺伝子増幅系の蚊媒介性感染症にたいする有用性を確認し、今後の研究開発への基盤を築いた。

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・マラリア蚊媒介性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病原体検出法の開発を目的とする。

新規病原体検出法の確立を目指す本研究課題の遂行において、検査対象となる病原体保有昆虫を試料として研究を行うことが必須のステップとなる。しかしながら、本国は本研究で対象とする感染症の非汚染地域であるため、研究開発のための実験試料の入手が困難である。そこで本年度においては、準備研究として、熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) 流行地域である、西アフリカ・ブルキナファソ国においてハマダラカ (*Anopheles gambiae*) のサンプリングを試みることとした。さらに、それらのマラリア汚

染地域より集められた蚊サンプル群から DNA を抽出し、新規病原体検出法確立のための検体として用いる DNA テンプレート・ライブラリーとして確保し、本研究遂行にあたっての基盤を築くこととした。またこれらのサンプルにおける熱帯熱マラリア保有状況を標準法として採用されている抗 CS 抗体を用いた ELISA 法による検査に供し、マラリア原虫感染率・保有数などを調査し、これらの蚊サンプルの評価と DNA テンプレート・ライブラリー基盤情報を整備することとした。

本研究において開発を目的とする病原体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、既知の病原体保有サンプルと他の病原体検出法との比較検定が必要となる。分担研究として対象としたマラリア原虫は極めて病原性が高く、日本国内でハマダラ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、齧歯類特異的マラリア原虫媒介システムを用いた、ハマダラカ-マラリア感染モデルを利用することとした。本感染系では我々の過去の研究の研究成果によって、定量的にマラリア原虫を感染させることが可能となっている。また分担研究者（福本）による、蛍光タンパクをマーカースとする組換えマラリア原虫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、可能になっており、このマラリア感染モデル由来の DNA 試料をもちいて、研究を行うこととした。比較検定の

ための病原体検出法として、本研究開発と同様の病原体遺伝子検出法であること、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本研究において新規開発を目指す RPA 法の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、西アフリカ・ブルキナファソ国内の流行地域におけるハマダラカ試料の採集とその評価、単一温度反応系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、これら上記 2 項目の研究により遺伝子増幅 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. 西アフリカ・ブルキナファソ国内の流行地域におけるハマダラカ試料の採集とその評価

ブルキナファソ地域における熱帯熱マラリア原虫保有ハマダラカのサンプル収集を中心に、病原体検出法開発の準備研究を目指すため、西アフリカ・ブルキナファソ国にある国立マラリア研究・研修センター(ヌファーレ・サグノン・分子生物学ユニット長)の協力の下、熱帯熱マラリア感染ハマダラカの採集を行った。またこれらサンプルの評価と DNA テンプレート・ライブラリー化を執り行った。これらの研究の流れは以下のとおりである。

(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*) 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*) の観察・評価、(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における 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、の 5 段階に分類した。蚊の採集に当たっては CDC トラップを主に利用し、効率的かつ多岐に渡るサンプル収集を試みた。今回の採集にあたり、調査はその目的には含まれず、単一温度遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法に向けた DNA

試料の確保が最優先事項であることから、大規模な個体数の収集よりも、多点捕獲によるサンプルの多様性の維持に重点を置いた。ハマダラカの収集には、現地機関の常勤および臨時職員を雇用して動員し、蚊体内におけるマラリア原虫数の評価まで国立マラリア研究・研修センターに完全に委託した。蚊サンプルからの DNA 抽出および DNA テンプレート・ライブラリーの作成については、主任研究者および研究分担者が現地に赴き、確実な技術指導および作成試料の運搬を担当した。

2. 単一温度反応系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

GFP 発現マウスマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA 株) をマウスに感染させ、ハマダラカへの感染適期である高ガメートサイテミア期に採血により、マラリア原虫を回収し、人工吸血法により、ハマダラカに感染させた。ハマダラ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蛍光顕微鏡下において感染の判定と感染マラリア原虫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。LAMP 法はマウスマラリア原虫 SPECT2 遺伝子 (Ishino et al. 2005) をターゲット遺伝子として選定し、栄研社 PrimerExplorer V4 ソフトを用いてプライマーを設計した。マラリア原虫感染ハマダラカより抽出した DNA を用いて、SPECT2 マラリア 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、既知数の赤内型、オーシスト、スポロゾイトのマラリア原虫から DNA を抽出し、LAMP 法による検出限界原虫数を測定した。

さらに、現地サンプルへの応用を考え、蚊サンプルの保存と輸送の問題を解決するため、乾燥ハマダラカサンプルに対する適応を検証するため、濾紙にて挟み常温にて、9 ヶ月乾燥保存し、その後 DNA を抽出し LAMP 法に供した。

C. 研究結果

1. 西アフリカ・ブルキナファソ国内の流行地域におけるハマダラカ試料の採集とその評価

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。その理由として、主だった媒介蚊である *Anopheles gambiae* について、

その遺伝子型が S 型 (Balonguen 村)、M 型 (Koubri 村)、S 型と M 型の混成 (Monomtenga 村) と異なるパターンに分類されるからである。一般的に、ハマダラカのマラリア原虫伝播効率において、S 型は高く、M 型は低いことが明らかとなっている。すなわち、マラリア原虫保有率の異なる蚊サンプルの採集が期待された。委託実施期間中に、各村落において定点採集を実施した結果、総計約 4000 個体の雌ハマダラカを得た。このうち、マラリア原虫が発現する CSP タンパク質に対する抗体を用いて、ELISA 法によるマラリア原虫数の測定・評価をおこなった。各群からそれぞれおおよそ 409 匹 (Balonguen 村)、1090 匹 (Koubri 村)、および 372 匹 (Monomtenga 村) の雌ハマダラカを無作為に抽出し、細胞溶解液を調整、ELISA 反応に供した。その結果、Balonguen 村では 10-27%、Koubri 村では 0-11%、Monomtenga 村では 0-25% のマラリア原虫陽性ハマダラカが存在することが明らかとなった (数値の範囲は採集時期による個体群の差異を示す)。

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、委託実施機関名による研究材料譲渡書を携え、主任研究者と研究分担者が航路にて運搬を担当した。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。現在、これらの各蚊サンプルからの DNA 抽出を継続的に実施しており、DNA テンプレート・ライブラリーとして実験に供与する。

2. 単一温度反応系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

GFP 発現マウスマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* ANKA 株) をマウスに感染させ、ハマダラカへの感染適期である高ガメートサイテミア期に採血により、マラリア原虫を回収し、人工吸血法により、ハマダラカに感染させた。検出限界を検証するため、既知数の赤内型、オーシスト、スポロゾイトのマラリア原虫から DNA を抽出し、LAMP 法による検出限界原虫数を測定したところ、オーシストについてはハマダラカ中腸内にたった 1 個存在するだけでも LAMP 法により検出されることが明らかとなった (図 1)。赤内型とスポロゾイトも同様の実験により検出限界を算出し、高い検出感度を有することが明らかとなった。

さらに、現地サンプルへの応用を考え、乾

燥ハマダラカサンプルに対する適応を検証した。その結果、濾紙にて挟み常温にて、9 ヶ月乾燥保存し、その後 DNA を抽出し LAMP 法に供した場合でも、LAMP 法により検出可能であることが判明した (図 2)。

D. 考察

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。本委託究では、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迅速・簡便病原体検出法の確立へ向けた準備研究として、熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) 流行地域におけるハマダラカ (*Anopheles gambiae*) のサンプリングを実施した。このマラリア原虫を有する媒介蚊の入手は通常極めて困難であるため、西アフリカ・ブルキナファソ国において、実際の流行地域から蚊の採集をおこなった。それらのサンプル群をベースに、病原体検出のための DNA テンプレート・ライブラリーとして確保し、単一温度遺伝子増幅法による病原体検出法の開発の準備基盤を構築することに成功した。

ブルキナファソ国の研究機関の協力によって得られたこれらの成果は、以下のように実施中の研究に反映されると考える。病原体としての熱帯熱マラリア原虫に加え、媒介蚊であるハマダラカは、それぞれ国内の複数研究機関で維持され、実験に供与されている。しかし、安全確保を熟慮した道義的問題から、熱帯熱マラリア原虫のハマダラカへの導入実験は、極めて困難であることは自明である。主任研究者の研究課題は、「蚊」体内における「病原体」の「検出・診断」を試みるものであり、国内では入手不可能な「蚊+病原体」サンプルの重要性は高い。そこで、本研究委託により、西アフリカ地域のマラリア流行国にある現地研究グループと協力し、実際に熱帯熱マラリア原虫を有するハマダラカをサンプルとして入手することに成功した今回の成果は、病原体媒介節足動物における迅速・簡便診断法の開発を強力に推進することが期待される。この研究により構築される DNA テンプレート・ライブラリーは、主任研究者の研究課題である「RPA 法による迅速・簡便病原体検出法の確立」において、実際の病原体を検出する際の極めて有用なマテリアルとして供与され、研究の実質的推進に大いに寄与すると考えられる。

上記研究によってえられたマテリアルを用

いた、研究は極めて重要な知見をもたらすものであるが、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、本研究で開発を目指すRPA法との比較データを得ることとした。また、RPA法と同様の等温遺伝子増幅技術であるLAMP法応用を感染症診断技術の開発モデルとして解析することにより、その知見をRPA法研究に応用、開発の迅速化を行うための予備知見を得ることとした。本研究ではLAMP法をハマダラカからのモデルマラリア診断に応用し、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「RPA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、病原体検出のためのDNAテンプレート・ライブラリーの確保と単一温度遺伝子増幅法の有用性を明らかにすることができ、RPA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

Gong H, Liao M, Zhou J, Hatta T, Huang P, Zhang G, Kanuka H, Nishikawa Y, Xuan X, Fujisaki K. Gene silencing of ribosomal protein P0 is lethal to the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Vet Parasitol* 151(2-4): 268-278, 2008

2. 学会発表

前川絵美、吉村文、徳永史生、嘉糠洋陸 概日リズムによるハマダラカCO2感受性の支配 第59回日本衛生動物学会（大阪）2007. 4. 3

青沼宏佳、嘉糠洋陸 マラリア原虫認識タンパク質Furrowedとその機能 第7回日本蛋白質科学会（仙台）2007. 5. 25

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 Fly Immunity: Drosophila Host Resistance Against Bacterial Infection ショウジョウバエ研究会第8回研究集会（兵庫）2007. 7. 3

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Fly Immunity: Diversity of Drosophila Susceptibility to Bacterial Infection ショウジョウバエ研究会第8回研究集会（兵庫）2007. 7. 3

青沼宏佳、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、David Schneider、嘉糠洋陸 What Drosophila Can Tell Us About Insect-borne Diseases: Mosquito Immune Mechanisms Against Malaria Parasite ショウジョウバエ研究会第8回研究集会（兵庫）2007. 7. 3

青沼宏佳、Stephanie Brandt、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、嘉糠洋陸、David Schneider Furrowed/CTLSE1 aborts development of Plasmodium parasite in *Anopheles gambiae* EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors (ギリシャ) 2007. 7. 14

前川絵美、福本晋也、徳永史生、嘉糠洋陸 Revisiting CO2-activated mosquito

behavior EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors (ギリシャ) 2007. 7. 14

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊の中腸に存在する微生物とマラリア原虫の相互作用 第14回分子寄生虫学ワークショップ(群馬) 2007. 7. 27

土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫、温度、ロバスト適応 第14回分子寄生虫学ワークショップ(群馬) 2007. 7. 27

嘉糠洋陸 スーパーモスキートへの挑戦 07 第14回分子寄生虫学ワークショップ(群馬) 2007. 7. 27

嘉糠洋陸 病原体媒介蚊へのいざない 日本動物学会北海道支部第53回大会 2007. 8. 18

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 Interaction between vectors and parasites: Filaria behavior at blood-feeding of mosquito 7th Awaji International Forum of Infection andn Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

寺本時靖、宮内亜宜、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 Why can't the insect vector be killed by an arbovirus? 7th Awaji International Forum of Infection andn Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

嘉糠洋陸 Mosquito and parasite interaction: friend or enemy? 7th Awaji International Forum of Infection andn Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

福本晋也、青沼宏佳、嘉糠洋陸 Pattern recognition of Plasmodium parasite in mosquito 7th Awaji International Forum of Infection andn Immunity (兵庫) 2007. 9. 2

嘉糠洋陸 モデル生物から眺める感染抵抗性 第18回フォーラム・イン・ドージン(熊本) 2007. 11. 30

嘉糠洋陸 感染現象とそれを制御するシグナルの再訪 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会(横浜) 2007. 12. 13

H. 知的財産権の出願・登録情報なし

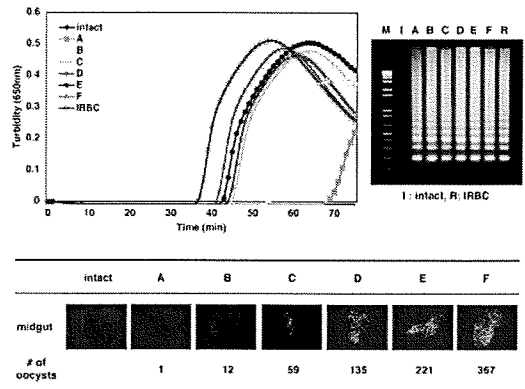


図1 ハマダラカ中腸上に存在するマラリア原虫オーシストのLAMP法による検出
GFP発現マラリア原虫をハマダラカに感染させ、中腸を取り出してオーシスト数をカウントした(下段A~F)。その後、DNAを抽出しLAMP法に供した(上段左:濁度、上段右:電気泳動)。

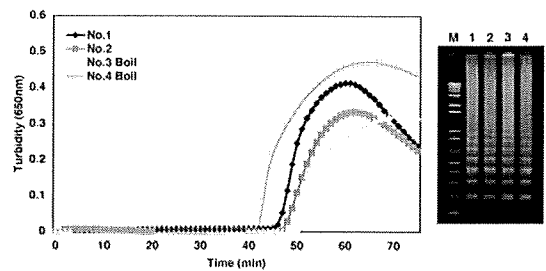


図2 乾燥ハマダラカ試料を用いたマラリア原虫のLAMP法による検出
GFP発現マラリア原虫をハマダラカに感染させ、そのハマダラカを濾紙にて挟み常温にて、9ヶ月乾燥保存した。その後DNAを抽出しLAMP法に供した(左図:濁度、右図:電気泳動)。

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

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

遺伝子増幅 RPA 法を用いた、新規病原体検出法の開発研究を円滑に遂行するため、病原体感染モデルの開発と改良を行った。定量的にヤブカにイヌフィラリアまたはフロックハウスウイルスを感染させるモデル系を確立し、また蛍光タンパクをマーカーとして発現するマラリア原虫を作出し、感染モデルとしての有効性を確認した。また小麦胚芽無細胞タンパク発現系を用いることによって、RPA 法必須酵素の発現に成功した。

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の病原体防除管理体制の向上に寄与しえる、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。

以上の研究目的を達成するため、平成19年度において分担研究者は以下に記す4つの課題を設定し研究を遂行した。

1. ヤブカ (*Aedes aegypti*) -イヌフィラリア感染モデルの導入・改良
2. ヤブカ (*Aedes aegypti*) -フロックハウスウイルス感染モデルの導入・改良
3. 検出法の妥当性検討のためのマーカー遺伝子発現マラリア原虫の作出
4. 単一温度反応系遺伝子増幅法開発のための DNA 増幅酵素・DNA 結合因子等の精製法の改良

以下に、個々の研究課題における詳細な研究目的を述べる。

研究課題 1・2

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 RPA 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感染系の樹立を行った。第一に西ナイル熱ウイルス・デング熱などのフラビウイルス性疾患のモデルとして、比較的近縁なフロックハウスウイルス-ヤブカ感染モデル、第二に寄生虫疾患モデルとして、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モデルである。しかしながらこれらの感染モデルの問題点として、感染動物に対する直接吸血を行うため作業が煩雑であること、媒介蚊体内への病原体取り込み量の制御が困難であるために、個々の蚊個体が病原体を有するのか否か、保有する病原体数が不明であること、などの問題点を有する。これらの問題のため、本研究の目指す新規診断法開発のためのモデルとして標準化するには問題がある。そこで、これらの問題を克服するため、簡便かつ定量性に優れたウイルス・寄生虫感染モデルの確立を目標とした。

研究課題 3

遺伝子検出・増幅に基づいた新規蚊媒介性病原体検出法を開発するにあたり重要となるのが、蚊由来遺伝子産物との交差性、他の標

準化された病原体検出法との検出性能比較検定である。これら上記2点の問題を解決するため、我々は蛍光タンパク発現遺伝子をマーカーとしてマラリア原虫に導入することを計画した。この蛍光タンパクをターゲットとした遺伝子検出法を精査することで、この新規病原体検出法の特異性の検証、感染蚊内におけるマラリア原虫の視覚的な定量と新規検出法の性能検定を正確に執り行うことを目標とした。

研究課題4

本研究課題で開発を目指す単一温度反応系遺伝子増幅法においては、4種類の酵素がその反応の過程で必要となる。現在のところ、これらの酵素は市販されていないため、効率的な発現・精製法の確立が本研究遂行のため必須のプロセスとなる。現在最もコンベンショナルに用いられている組換えタンパク発現法として、大腸菌発現システムが用いられている。大腸菌発現系はそのコストパフォーマンス、効率から非常に優れた方法である。しかしながら本研究で必要となる、これら4つの酵素は主にバクテリオファージ由来のタンパクであるため、大腸菌に毒性を示すことから、大腸菌をもちいた遺伝子クローニング、発現にしばしば問題を引き起こすため、通常の大腸菌発現系を用いることはきわめて困難であるのが現状である。そこで我々はこれらの諸問題を解決するため、大腸菌高度タンパク発現制御システム、大腸菌を用いない新規タンパク発現法である小麦胚芽無細胞タンパク発現システムを比較・検討した。これらの酵素の効率的に発現・精製システムの確立を目標とした。

B. 研究方法

1. ヤブカ (*Aedes aegypti*) -イヌフィラリア感染モデルの導入・改良

既知濃度のフィラリアを定量的に蚊に感染させるため、人工吸血膜フィラリア感染システムの構築を行った。フィラリア実験感染イヌ頸静脈よりヘパリンナトリウムを抗凝固剤として用いて、ミクロフィラリア含フィラリア感染血液を採取した。血液供給容器・人工吸血膜・フィラリア感染濃度の検討をおこなった。血液供給容器はガラス製温水循環型恒温血液吸血システム、プラスチック製保温型人工吸血システムをそれぞれ構築し比較を行った。人工吸血膜はマウス皮膚・パラフィルム・ラテックス膜・シリコン膜の吸血指向性、

吸血効率の比較検討を行った。また、フィラリア感染血液を非感染犬由来血液により希釈することで、ミクロフィラリア濃度を調整し、人工吸血システムを用いて蚊に感染させることで、最適感染濃度の算定とフィラリア感染数の定量化をおこなった。

2. ヤブカ (*Aedes aegypti*) -フロックハウスウイルス感染モデルの導入・改良

ヤブカに既知濃度のウイルスを感染させるため、インジェクション法によるフロックハウスウイルス感染システムの構築を行った。キイロショウジョウバエ由来の S2 細胞と Schneider メディウムを用いて、フロックハウスウイルスを培養、感染性ウイルス粒子を増幅した。また、同様の細胞培養系を用いて、ウイルス液の感染価をプラークアッセイ法により測定した。既知濃度に調整したウイルス液をナリシゲ・マイクロインジェクターを用いて、二酸化炭素麻酔下のヤブカに注入した。フロックハウスウイルス感染ヤブカ体内でのウイルス増殖はヤブカホモジネートを試料として用いたプラークアッセイ法によって行った。

3. 検出法の妥当性検討のためのマーカー遺伝子発現マラリア原虫の作出

マラリア原虫へのマーカー遺伝子の導入は、石野らが構築したマラリア原虫遺伝子強制発現ベクターを用いて行った (Ishino et al. 2005)。マラリア原虫 DHFR/ts 遺伝子座下流に熱ショックタンパク 70 プロモーターにより発現制御されるように緑色蛍光タンパク (GFP) 遺伝子を発現するトランスファーベクター pAbuGFP を構築した。マラリア原虫感染マウスより、感染血液を回収し、RPMI-1640 培養液を用いて一晩培養後、成熟シズントを密度勾配遠心法により回収した。Amara 社 Nucleofector II デバイスを用いてマラリア原虫シズント細胞核に pAbuGFP を導入後、マウスに静脈注射、ピリメタミンによる遺伝子組換えマラリアの選択後、ラットを用いて GFP 発現マラリア原虫のクローニングを行った。

4. 単一温度反応系遺伝子増幅法開発のための DNA 増幅酵素・DNA 結合因子等の精製法の改良

各 DNA 増幅酵素・DNA 結合因子遺伝子 4 種類を T4 ファージまたは *Bacillus subtilis* ゲノムから PCR 法により増幅し、高度発現制御大腸菌発現ベクター (Invitrogen, pBAD ベク

ター)と小麦胚芽無細胞発現ベクター(株式会社セルフリースサイエンス、pEUベクター)に導入した。両発現システムをもちいて、ヒスチジンタグ融合タンパクとしての発現を試みた。SDS-PAGE法とウエスタンブロット法を用いて発現産物の解析を行った。またニッケルキレートカラムを用いて発現産物の精製を行った。

(倫理面への配慮)

本研究に関わる遺伝子組換え実験の承認は当該研究機関にて得られている。

C. 研究結果

1. ヤブカ (*Aedes aegypti*) -イヌフィラリア感染モデルの導入・改良

ガラス製温水循環型恒温血液吸血システムとプラスチック製保温型人工吸血システムと比較すると、長時間単一サンプルの吸血にはガラス製温水循環型恒温血液吸血システムが優れていたが、準備が煩雑、高価である、等の点で問題があった。これに対しプラスチック製保温型人工吸血システムは極めて簡便であり、多検体の処理に非常に適しており、吸血性能もガラス製温水循環型恒温血液吸血システムに遜色なかった。以上の点からプラスチック製保温型人工吸血システムを標準人工吸血装置として採用した。マウス皮膚・パラフィルム・ラテックス膜・シリコン膜をプラスチック製保温型人工吸血システムに装着しヤブカの吸血指向性の比較を行った。その結果、パラフィルムがもっとも吸血指向性、コスト、利便性を高い次元で兼ね備えていることが明らかとなった(図1)。また、上記の研究によって確立した、プラスチック製保温型パラフィルム人工吸血システムを用いて、フィラリアの人工感染モデルの最適化を行ったところ、5マイクロフィラリア/ μl の濃度の感染血液がもっとも効率よく感染ヤブカを回収可能であることが明らかとなった。またこの濃度でのヤブカ1個体あたりのフィラリア保有数は5-10虫体であり、吸血源のフィラリア濃度と保有虫体数は正の相関を示し、1個体のヤブカに既知数のフィラリアを感染させることが可能であった(図2)。

2. ヤブカ (*Aedes aegypti*) -ブロックハウスウイルス感染モデルの導入・改良

マイクロインジェクターによる微量注入法により、定量的にブロックハウスウイルスをヤブカに感染させることが可能となった。

プラークアッセイ法でウイルス液の感染価を確定後、濃度を調整することにより、既知のウイルス数が感染したヤブカ-ブロックハウスウイルス感染モデルを樹立することに成功した。最低感染ウイルス価は 10^2 プラークフォーミングユニットであることが明らかとなった。また、マイクロインジェクション後の生存率は95%以上であり、ヤブカに対する侵襲はきわめて小さく、人工感染法として極めて優れた方法であることが示された(図3,4)。

3. 検出法の妥当性検討のためのマーカー遺伝子発現マラリア原虫の作出

GFP発現マラリア原虫をクローニング後、マウスに感染させたのちマウス尾静脈を採取、蛍光顕微鏡にてGFPの発現を確認した。また、野生型のマラリア原虫と同様の増殖性、病原性をマウスに対して有することを確認した。GFP発現マラリアは野生型と同様にハマダラカに対して感染可能であり、実体蛍光顕微鏡を用いることで、非侵襲的にマラリア感染の有無の判定、感染マラリア原虫の定量が可能であった(図5)。

4. 単一温度反応系遺伝子増幅法開発のためのDNA増幅酵素・DNA結合因子等の精製法の改良

pBAD発現システムでは4種類すべての遺伝子産物を発現することはできなかった。しかしながら、小麦胚芽無細胞発現システムを用いることで全ての因子をヒスチジンタグ融合型の組換えタンパク発現することに成功した(図6)。発現産物はニッケルキレートカラムで精製可能であった。

D. 考察

新規病原体検出法の確立には、モデル系を用いた検出系の最適化が極めて重要なプロセスであるといえ、適切なモデル系確立の成否が研究の進捗を既定する。本研究では優れた病原体感染モデルを確立するため、ヤブカとイヌフィラリア・ブロックハウスウイルスを用いて研究を行った。本研究の第一の成果として、既存の方法と比較して、極めて簡便な手段によって病原体をベクター昆虫に感染させるシステムを確立し、さらには、制御が困難であったベクター昆虫個体における、保有病原体数のコントロールを可能としたことがあげられる。新規病原体検出法を開発・評価する上で、保有病原体の数と種類が既知の媒介昆虫サンプルを利用しえることは、研究

完遂にあたり大きなアドバンテージを付与するものと考えられる。これらのモデルにより、既存の診断法と本研究で目標とする RPA 法との性能比較検定、さらには、RPA 法の病原体特異性、検出感度などの検定を極めて容易なものとする。このような感染モデルの標準化は新規病原体検出法の確立時には極めて重要であるが、本研究ではこの点をさらに改良するため、マーカー遺伝子を発現するマラリア原虫の作成を試みた。本研究によって作出された蛍光タンパクを発現するマラリア原虫は、現在までに困難であった非侵襲的に実際の感染病原体数を目視によって定量可能な極めて優れた方法論である。病原体感染の有無の評価は感染個体の死亡による判定、または他の生物学的方法による病原体検出法に依存しており、同一個体を非侵襲的に検査しさらに後の実験に供するという事は、極めて困難であった。しかしながら本研究における、蛍光タンパクを病原体感染のマーカーとして応用する方法論の提示は、同様の病原体検出法の開発研究の進展にも大きく寄与するものと考えられ、本研究の進展のみならず、感染症診断法開発研究全体の進展に大きく貢献するものであると考えられる。

本研究の主目的はこれら上記の感染モデルを有効に用いて、新規遺伝子増幅法である RPA 法による病原体検出法を開発することである。RPA 法はその反応において、4 種類の酵素を必要とするが、そのうちの 3 種類は T4 フェージ由来のタンパクである。従って、これらの酵素は本来のフェージの宿主である大腸菌に対して毒性を示す可能性が高く、現在最も広範に用いられている組換えタンパク発現システムである、大腸菌発現系が使用できない可能性が高い。事実、過去の我々の研究において、最も標準的な大腸菌組換えタンパク発現システムである、Invitrogen 社の pRSET ベクターによる発現は不成功に終わった。そこで本研究ではタンパク発現誘導がより高度に制御される同社の pBAD システムを用いたが、やはり一部のタンパクで発現が認められなかった。そこで、我々は、大腸菌を使わない小麦胚芽無細胞タンパク発現系の応用を試みた。その結果、四種類の発現産物をえることに成功し、本研究における RPA 法による新規病原体検出法の開発研究の進展に大きく貢献しえる結果をえることができたと考えられる。

E. 結論

本研究成果によって、優れた感染モデル

の樹立と、さらなる改良を行うことができた。また、小麦胚芽無細胞タンパク発現系の応用により、RPA 必須酵素の効率的な発現に成功し、本研究の進展に大いに寄与するものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、三浦正幸、嘉糠洋陸 Fly Immunity: *Drosophila* Host Resistance Against Bacterial Infection ショウジョウバエ研究会第 8 回研究集会 (兵庫) 2007. 7. 3

岡戸清、新澤直明、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 Fly Immunity: Diversity of *Drosophila* Susceptibility to Bacterial Infection ショウジョウバエ研究会第 8 回研究集会 (兵庫) 2007. 7.

青沼宏佳、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、David Schneider、嘉糠洋陸 What *Drosophila* Can Tell Us About Insect-borne Diseases: Mosquito Immune Mechanisms Against Malaria Parasite ショウジョウバエ研究会第 8 回研究集会 (兵庫) 2007. 7. 3

青沼宏佳、Stephanie Brandt、福本晋也、寺本時靖、三浦正幸、八木健、嘉糠洋陸、David Schneider Furrowed/CTLSE1 aborts development of *Plasmodium* parasite in *Anopheles gambiae* EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors (ギリシャ) 2007. 7. 14

前川絵美、福本晋也、徳永史生、嘉糠洋陸 Revisiting CO₂-activated mosquito behavior EMBO WORKSHOP "Molecular and Population Biology of Mosquitoes and Other Disease Vectors (ギリシャ) 2007. 7. 14

伴戸寛徳、青沼宏佳、福本晋也、嘉糠洋陸 蚊の中腸に存在する微生物とマラリア原虫の相互作用 第 14 回分子寄生虫学ワークショップ (群馬) 2007. 7. 27

土井裕子、福本晋也、岡野栄之、嘉糠洋陸 マラリア原虫、温度、ロバスト適応 第 14 回分子寄生虫学ワークショップ (群馬) 2007. 7. 27

吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 Interaction between vectors and parasites: Filaria behavior at blood-feeding of mosquito 7th Awaji International Forum of Infection andn Immunity (兵庫) 2007.9.2

寺本時靖、宮内亜宜、吉村文、福本晋也、嘉糠洋陸 Why can' t the insect vector be killed by an arbovirus? 7th Awaji International Forum of Infection andn Immunity (兵庫) 2007.9.2

福本晋也、青沼宏佳、嘉糠洋陸 Pattern recognition of *Plasmodium* parasite in mosquito 7th Awaji International Forum of Infection andn Immunity (兵庫) 2007.9.2

H. 知的財産権の出願・登録情報
なし

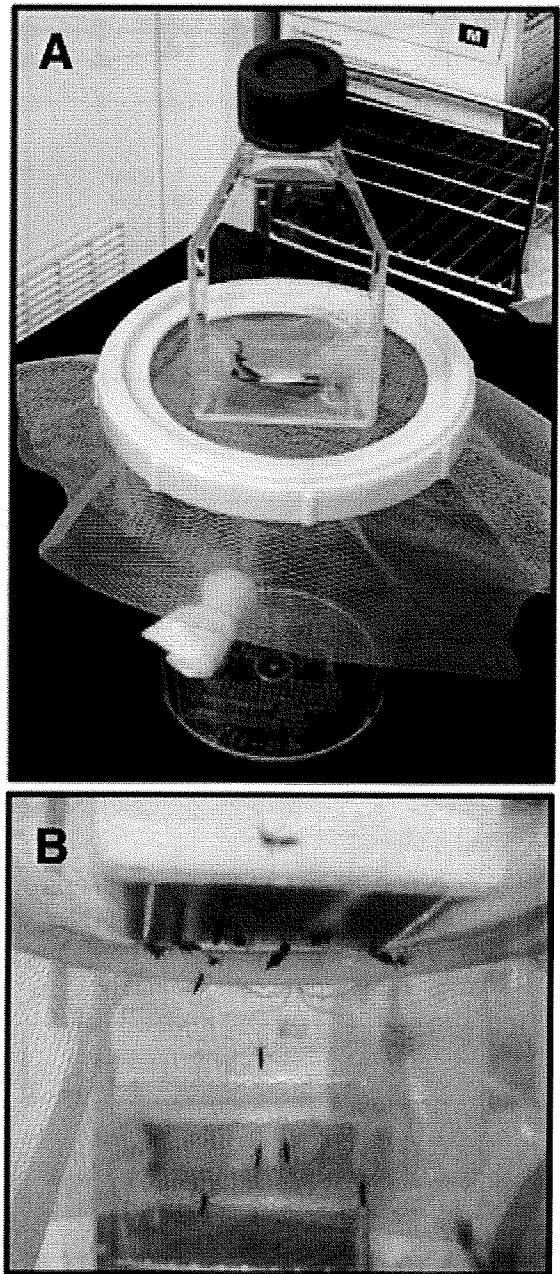


図1 プラスチック製保温型人工吸血システム。(A)吸血装置の全体像 (B)人工吸血中のヤブカ:腹部が膨満し飽血しているのが確認される