

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語)医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業
(英語)International Collaborative Research Program for Tackling the NTDs
(Neglected Tropical Diseases) Challenges in African countries

研究開発課題名 : (日本語)西アフリカ・ブルキナファソにおけるデング熱媒介蚊制御のための集学的研究
(英語) Integrated research program for the control of dengue fever mosquito in
Burkina Faso, West Africa

研究開発担当者 (日本語)嘉糠洋陸(東京慈恵会医科大学・衛生動物学研究センター・センター長)
所属 役職 氏名 : (英語)Hirotaka KANUKA (Director, Jikei Center for Medical Entomology, The
Jikei University School of Medicine)

実施期間: 平成28年4月1日 ~ 平成29年3月31日

分担研究 (日本語)ヤブカに対する迅速簡便遺伝子診断法の開発研究
開発課題名: (英語)Development of rapid diagnosis methods in dengue-vector mosquito
研究開発分担者 (日本語)青沼宏佳(東京慈恵会医科大学・衛生動物学研究センター・助教)
所属 役職 氏名: (英語)Hiroka AONUMA (Assistant Professor, Jikei Center for Medical
Entomology, The Jikei University School of Medicine)

分担研究 (日本語)ヤブカにおけるデングウイルス保有状況と媒介能の疫学調査研究
開発課題名: (英語)Epidemiological analysis of vectorial capacity in dengue-vector mosquito
研究開発分担者 (日本語)山地佳代子(東京慈恵会医科大学・衛生動物学研究センター・助教)
所属 役職 氏名: (英語)Kayoko YAMAJI (Assistant Professor, Jikei Center for Medical
Entomology, The Jikei University School of Medicine)

分担研究 (日本語)ヤブカ感染コンピテンシー制御法の基盤研究
開発課題名: (英語)Development of novel methods regulating vectorial competency in
dengue-vector mosquito
研究開発分担者 (日本語)櫻井達也(東京慈恵会医科大学・衛生動物学研究センター・講師)

所属 役職 氏名: (英 語) Tatsuya SAKURAI (Associate Professor, Jikei Center for Medical Entomology, The Jikei University School of Medicine)

分担研究 (日本語) ヤブカ吸血行動の神経行動学的制御の基盤研究

開発課題名: (英 語) Development of neuro-ethological methods to regulate host-seeking and blood-sucking behavior in dengue-vector mosquito

研究開発分担者 (日本語) 佐久間知佐子(東京慈恵会医科大学・衛生動物学研究センター・助教)

所属 役職 氏名: (英 語) Chisako SAKUMA (Assistant Professor, Jikei Center for Medical Entomology, The Jikei University School of Medicine)

II. 成果の概要(総括研究報告)

デング熱は、NTDs(“顧みられない熱帯病”)に分類されるウイルス性疾患であり、ヤブカの吸血によって媒介される感染症である。本研究は、西アフリカ・ブルキナファソにおけるデング熱媒介蚊の制御を主たる目的とし、媒介者であるヤブカ種の①診断②疫学③性状④行動について多角的なアプローチにより先導的研究を推進するものである。その基盤成果を以て集学的に統合することにより、西アフリカ地域において **First in Field** で応用可能な、**Integrated Vector Management**(統合的ベクター種制御)の要素となりうるベクターコントロールの技術開発を実施する。そのため、実験室レベルに留まっていた最先端技術によるヤブカ等ベクターに関する研究を、少人数の研究開発グループ(MU)構成を通じて、ブルキナファソのデング熱流行地域において“入れ子”形式で実施することにより、より実践的なベクター制御法開発を指向している。

平成28年度は、上記の目的のもと、前年度に実施した研究環境整備を継続するとともに、各研究開発項目の準備研究を本格的な研究へと段階的に移行した。前年度に編成したモバイルユニットの活動を通じて、フィールド研究から本研究への移行を進め、西アフリカ地域の野外生息ヤブカ種および実験室系統ヤブカにおけるデングウイルス等の動態を包括的に把握した。また、ウイルスおよび宿主に対するヤブカ側応答および生理機構を統合的に理解するためのシーズを複数見出すことに成功した。

ベクター診断MUでは、デング熱を媒介するヤブカ種とデングウイルス等蚊媒介性ウイルスを対象に、検出法の開発と感染症流行状況の把握等多角的なストラテジーを展開した。LAMP 法を適用した、マルチプレックス等温遺伝子増幅法を基盤とする各種改良と最適化により、ベクター1匹からの正確なデングウイルス・ジカウイルス保有状況を把握する技術基盤を構築した。

ベクター疫学MUは、ブルキナファソに生息するヤブカ種を対象に、ベクター生息エリアの変化、ベクター個体数の季節消長、ベクター種の構成状況、および殺虫剤耐性等を解析し、デング熱流行状況および拡大リスク等をベクター側から解析した。また、シュードウイルスおよび単回感染性粒子等の *in vivo* イメージング観察実験環境を整え、昆虫体内におけるウイルスの挙動を可視化することに成功した。

ベクター性状MUは、ヤブカとデングウイルスを対象に、媒介節足動物としてのコンピテンシー(病原体感受性)とレジスタンス・トレランスの連携を多角的に解析した。媒介蚊に共生しうる微生物群を用いた、ベクターの性質を変えるパラトランスジェネシスについて、細胞内共生微生物であるボルバキアと、昆虫寄生性糸状菌である *Beauveria* 属真菌に着目し、それらと媒介蚊の相互作用を明らかにした。加えて、媒介蚊のコンピテンシーの人為的制御を指向し、任意の遺伝子を生物集団内に優先的に拡散可能な「遺伝子ドライブ」技術を導入した。

ベクター行動MUでは、神経行動学的アプローチにより、ヤブカの宿主認識行動と吸血行動メカニズムの解析を試みた。ヤブカの吸血促進を制御する分子(受容体)候補の同定に成功し、擬似的に吸血停止状態を誘導するための分子基盤構築が大きく進展した。ヤブカがヒト宿主を認識するために必要な嗅覚受容体および責任神経を同定する目的で、異なる吸血宿主に対する馴化に関するネッタイシマカ脳内遺伝子群を同定した。

以上の研究開発を通じて、デング熱媒介蚊制御法開発にむけてコアとなる知見の集積に至った。

Dengue fever is a viral vector-borne disease caused by infection of four dengue virus serotypes (DENV1-4) via blood-sucking of *Aedes* mosquito. In Burkina Faso, dengue represents an added burden in an epidemiological landscape dominated by malaria. Although *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are present in Burkina Faso, there has been no recent entomological study that would provide information about its distribution, especially in the country's large cities, where populations of this very urban mosquito have likely become widespread. Additional new strategy to control the vector should absolutely be developed and involved in integrated vector management

(IVM), because it is one of the most effective means to deal with the problem while waiting for a vaccine or another effective dengue control strategy. In the proposed project of fiscal year 2016, based on collaboration between Japan and Burkina Faso, entomological studies promoting multilateral approaches has been performed to gather fine knowledge of diagnosis, ethology, immunity, and epidemiology of vector species on effective vector control, as described below:

1) *In vivo* pathogen detection system (LAMP: loop-mediated isothermal amplification) rapidly identifying the dengue virus (DENV) and zika virus (ZIKV) in vector mosquito was established. This method with an optimized primer set enables us to distinguish different RNA genome of ZIKV, based on high fidelity of *Bst* DNA polymerase.

2) A mosquito specimen library was constructed in which mosquito samples were deposited when we collected *Aedes* mosquitoes via manual catching from approximately 1,000 residences at Ouagadougou, Burkina Faso. Images of representative samples from each household were digitally captured and used for identification of mosquito species. *In vivo* imaging system to make spatio-temporal map of the proliferation and environmental adaptation of the virus in *Aedes* mosquitoes was established using pseudo-type virus and single-round infection particle.

3) Several methods for paratransgenesis, the modification of symbiotic organisms to deliver anti-pathogen effector molecules, were developed for a novel strategy against dengue virus proliferation in mosquito vectors. *Wolbachia pipientis*, an obligate intracellular bacterium, has been employed as a biocontrol strategy against dengue because it limits replication of the virus in the mosquito. We identified a secreted protein of *Wolbachia* that can suppress propagation of arbovirus such as ZIKV.

4) We developed a genetically modified strain of *Aedes* mosquito lacking a candidate gene encoding a taste receptor protein that can detect host blood, and observed these mosquitos showed impaired blood-sucking behavior. We established *Ae. aegypti* strains reared with mice, rabbits, chickens, common marmosets, and horses as sources of blood meal. RNA-seq analysis showed that expression of a set of neuronal genes are altered in the brain of these mosquito strains, suggesting that short-term plasticity as a possible key of mosquito host selection.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0件、国際誌 0件)

該当無し

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The role of gut in pathogen-transmitting insects: barrier or gate?, 招待講演, 嘉糠洋陸, *The 1st International Symposium for Infectious Diseases: Vector-borne Disease*, 2016/6/1, 国外.
2. Dissecting molecular mechanism of taste sensation of ATP in fly and mosquito, 口頭発表, 佐久間知佐子, 嘉糠洋陸, 第 37 回台湾昆虫学会, 2016/10/15, 国外.
3. Generation of transgenic mosquito harboring pseudotype virus, 招待講演, 嘉糠洋陸, International conference on Dengue and Dengue prevention, 2017/3/7, 国外.
4. マダニ刺咬症と感染症のリスクを知る, 招待講演, 嘉糠洋陸, 第 115 回日本皮膚科学会, 2016/6/4, 国内.
5. 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, 口頭発表, 嘉糠洋陸, 第24 回分子寄生虫学ワークショップ/第14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2016/8/21, 国内.
6. 共生細菌ボルバキアによるヤブカとショウジョウバエの操作, ポスター発表, 大手学, 上山 盛夫, 嘉糠洋陸, 山元 大輔, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/12/1, 国内.
7. 重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスのマダニ内伝播メカニズムの解析, 口頭発表, 山地佳代子, 下島昌幸, 西條政幸, 嘉糠洋陸, 第 68 回日本衛生動物学会, 2016/4/16, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. なぜ蚊は人を襲うのか, 嘉糠洋陸, 在ルワンダ日本大使館 医療講演会, 2017/2/23, 国外.

(4) 特許出願

該当無し