The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Rapid identification of Plasmodium-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification |
| Author(s) | 青沼, 宏佳 |
| Citation | 大阪大学, 2008, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/49894 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【32】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 青　沼　宏　佳（あお　ぬま　ひろ　か） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２２５６９　号 |
| 学位授与年月日 | 平成 20 年 12 月 19 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>医学系研究科情報伝達医学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Rapid identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification<br>（マラリア原虫媒介蚊における迅速簡便病原体検出法の応用） |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　八木　　健<br>（副査）<br>教　授　堀井　俊宏　　教　授　堀口　安彦 |

## 論　文　内　容　の　要　旨

〔　目的　〕

マラリア、フィラリア、西ナイル熱、日本脳炎などは、全て蚊に代表される節足動物によって媒介され

る感染性疾患であり、依然として世界的に大きな問題となっている。節足動物のコントロールは感染症制圧の重要なキーのひとつであり、ヒトの発症予測や感染症拡大防止策の遂行には、媒介者である節足動物の病原体保有状況を正確に把握することが不可欠である。これまで、媒介節足動物の病原体保有率の調査には、主としてPCR法やELISA法が用いられてきた。しかし、これらの手法には高度な機器が必要であり、コストや時間もかかるため、実際の流行地域での汎用性には問題があると思われる。そこで本研究では、流行地域での利用を目的とし、特異性が高く、等温・短時間で媒介節足動物の病原体保有の有無を容易に診断することのできるシステムの開発とその評価をおこなった。

〔　方法ならびに成績　〕

LAMP（loop-mediated isothermal amplification）法（Notomi *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 28, e63(2000)）は、４種のプライマーと、高い鎖置換活性を持ちながらDNA合成を進行させる*Bst* DNA polymeraseただ一種の酵素のみを使用することにより、一定温度で反応が進行する等温核酸増幅法である。このような特徴から、LAMP法を感染症診断に応用することにより、短時間で容易に媒介節足動物の病原体保有診断をおこなうことが可能であると考えられた。また、４種類のプライマーを用いることによる高い特異性から、信頼性の高い結果を得ることができると予測された。そこで本研究では、LAMP法による感染蚊からの病原体検出システムの構築と、その評価を実施した。

マラリアは、蚊の一種であるハマダラカ（*Anopheles*）が、マラリア原虫（*Plasmodium*）をヒトからヒトへ運ぶことによって感染を引き起こす、死亡率の高い感染性疾患である。本研究では、研究室レベルでの実験が可能な、げっ歯類特異的マラリア原虫（*Plasmodium berghei*）とハマダラカ（*Anopheles stephensi*）を用いた「ハマダラカ-マラリア原虫感染モデル」により、感染蚊を確実に同定するシステムを構築した。初めに、感染血液を用いて、様々な条件で反応を繰り返し、複数設計したプライマーセットの中からの最適プライマーセットの決定、および至適反応条件を決定した。次にそれらの条件を適用し、蚊体内からのマラリア原虫の検出を試みた。約200匹の蚊に、GFP発現マラリア原虫感染血液の吸血を促し、16日間飼育した。これら感染蚊と非感染蚊の混在している中から、蚊をランダムに抽出し、蛍光顕微鏡を用いて蚊の体外から感染状況の観察をおこなった。次に、これらの蚊から抽出した核酸をLAMP反応に供し、濁度計と電気泳動により反応の検出をおこなった。その結果、蛍光顕微鏡観察と完全に一致する結果を得た。すなわち、GFP蛍光が観察された感染蚊は全てLAMP反応においても陽性を示し、非感染蚊はLAMP反応でも陰性として検出された。

さらに本研究では、マラリア原虫感染血液を吸血させた蚊の中腸オーシストについて、顕微鏡観察とLAMP法による病原体検出の両方をおこない、より精密な結果の比較を実施した。まず、感染部位である中腸におけるオーシスト数を蛍光顕微鏡観察により定量し、観察後の中腸は他の組織とともに回収した。次に、この感染蚊一匹分の組織から核酸を抽出し、LAMP法によるマラリア原虫の検出を実施した。その結果、蚊が保有するマラリア原虫オーシストがわずか１個体の場合にも、正確に検出することに成功した。すなわち、マラリア感染を引き起こす可能性がある蚊を、高精度で検出するシステムの構築に成功した。

〔　総括　〕

本研究では、LAMP法を用いて、病原体媒介節足動物である蚊が保有している病原体を高精度で検出するシステムを構築した。このシステムは、反応に関わる作業が容易であるのみでなく、短時間で信頼性の高い診断結果を得ることができる優れたシステムである。また、高度な機器を必要としない点から野外における診断も可能であり、感染症流行地において、媒介節足動物を監視するための有用な手段となると予測される。従って、本研究成果は、これまでの感染症対策に新たな手法を提案すると同時に、感染症拡散予防に大きく貢献するものである。

## 論文審査の結果の要旨

感染地域におけるヒトの発症予測、および感染拡大防止策の遂行には、媒介節足動物の病原体保有状況を正確に把握することが不可欠である。青沼宏佳は、等温遺伝子増幅法であるLAMP法を用いることにより、特異性が高く、単一温度で簡単に、蚊体内の病原体を検出することができるシステムの構築をおこなった。さらに、研究室レベルでの実験が可能な「ハマダラカ-マラリア原虫感染モデル」により、この検出システムの評価を実施した。その結果、蚊が保有するマラリア原虫オーシストがわずかひとつの場合にも、検出が可能であることを明らかにした。従って、構築したシステムを用いることにより、ハマダラカ体内におけるマラリア原虫の存否を簡便・迅速に判別することが可能であることが示された。以上の結果は、この新規システムの高い信頼性を示しており、感染地域における利便性を示唆するものである。

以上の青沼宏佳の論文は、感染症拡散の防止対策や本邦への侵入予防に貢献するものと考えられ、学位に値するものと認める。