

鳥取県環境学術研究等振興事業費補助金研究実績報告書

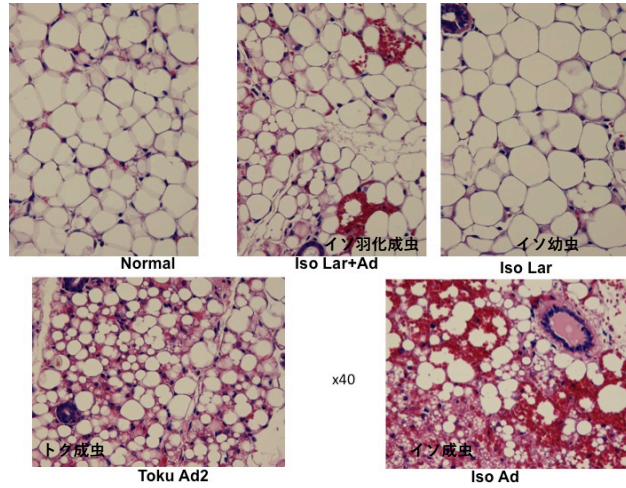
研究期間（ 3年目/ 3年間）

研究者 又は 研究代表者	氏名	(ふりがな) まつば たかし 松葉 隆司
	所属研究機関 部局・職	鳥取大学・医学部・准教授 電話番号 0859-38-6073 電子メール matsubat@med.tottori-u.ac.jp
研究課題名	ヌカカ刺咬後の皮膚障害に関する微生物免疫学的調査研究（環境創造部門）	
研究結果	<p>米子市には、ヒト吸血性のヌカカとしてトクナガクロヌカカおよびイソヌカカが生息していることが1959年の尾花らグループの報告以来知られている。本年度のヌカカ採集調査においても約1%の割合でイソヌカカが採取される日には、複数採取者に刺咬被害も発生したことから、ヌカカ種依存性の皮膚障害誘導因子やかゆみ等誘導因子の存在の可能性を想定し以下実験を行った。</p> <p>各ヌカカ種抽出液のマウス接種実験による行動変化および組織における炎症効果の有無や相違について検討した。ヌカカ抽出液をマウス皮膚に単数回～複数回接種（毎週1回で計3回）し、各接種後数日間の行動観察を行ったがマウスに著明な痒みや不快を示す行動変化は認められなかった。接種マウスについては、接種領域の組織染色標本を作製し病理学的検索を実施すると、イソヌカカ抽出液の皮膚接種を2ないし3回後に採取調製した材料で、皮下脂肪組織間への血液細胞漏出等の炎症を示唆する変化が認められた（別図1）。</p> <p>各ヌカカ種特異的に、かゆみ等の炎症誘導に関連する細菌が存在するかを調べるために、ヌカカ保有細菌叢の比較解析を次世代シーケンサーによる16S RNA遺伝子の塩基配列決定により行った。トクナガクロヌカカ成虫を目レベルで保有細菌叢をイソヌカカと比較すると3.5倍以上構成細菌が多く、皮膚化膿性炎症の原因細菌(ブドウ球菌等)をイソヌカカより高い割合で保有していた（別図2）一方イソヌカカ成虫は単一種類の細菌の占有率が著しく高く、細菌叢占有率は幼虫から羽化し成虫になると増加する傾向を示した（別図3）。</p> <p>各ヌカカ幼虫生息地把握のための簡便な遺伝子選別法開発を行った。ヌカカ幼虫・成虫問わずPCR法による遺伝子鑑別を可能とした（別図4）。</p> <p>トクナガクロヌカカ類縁種(<i>Leptoconops</i> sp.) 採集を久米島内において実施し、吸血性観察やヌカカ抽出遺伝子の比較解析を行った。現地採集者に対する吸血性向は低く、吸血を現認した後の痒みや炎症の程度は低かった。久米島のクロヌカカ遺伝子は、イソヌカカとトクナガクロヌカカ鑑別用プライマーのいずれでも増幅されず、標的遺伝子配列はトクナガクロヌカカと異なっていることを塩基配列決定により確認した。</p>	

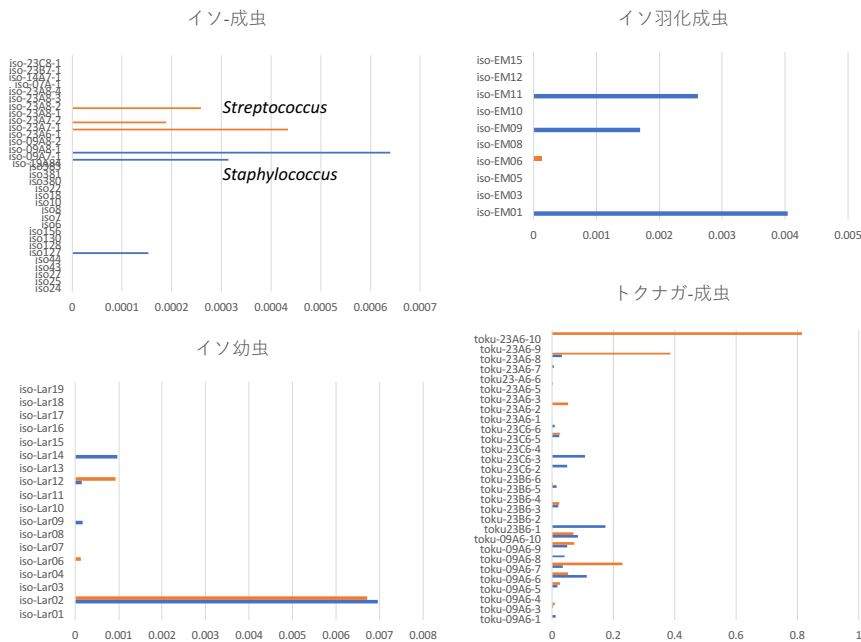
<p>研究成果</p>	<p>イソヌカカ抽出液のマウス皮膚への接種試験において、複数回接種後の皮下組織における炎症を疑わせる変化は、ヒトでの発疹様症状に相当する可能性がある。本研究助成は最終年度だが今後、保有細菌叢との関連性等についても検討継続が必要と考えている。</p> <p>メタゲノム解析結果から、ヌカカ種依存性にヒトに化膿性疾患を起こす原因となる細菌を多く保有するヌカカ個体が存在し、皮膚障害拡大因子として働く可能性が示唆された。イソヌカカの吸血後の皮膚炎症と痒み激しいことは一般によく知られているが、イソヌカカとくに成虫に、おそらく共生している主要な細菌の存在は、トクナガクロヌカカ吸血とは異なる炎症性変化と関連しているかもしれない。</p> <p>トクナガクロヌカカ鑑別用のPCRプライマーは、ヌカカ以外の昆虫遺伝子や類縁の久米島クロヌカカ遺伝子を増幅せず高特異性であること示せた。形態判別によるヌカカ採集においては低い頻度だが、誤ってヌカカ以外の双翅目昆虫が保存されていることがあった。遺伝子鑑別法はマウス接種等に用いる材料が、トクナガクロヌカカあるいはイソヌカカであるか間違いないかの実験前確認にも有用だった。このヌカカ遺伝子同定は、精度高く簡便な識別法として今後の幼虫生息場所特定にも有用と考えている。</p> <p>本研究期間中にはイソヌカカ幼虫生息場所の一つを特定し、実験室内で羽化と成虫の確保ができ形態的特徴や遺伝学的特徴の把握が行えた(別図5)。遺伝子比較解析では、トクナガクロヌカカとイソヌカカの保有細菌叢の違いや特徴ある保有細菌を明らかにできた。</p> <p>本研究成果は、以下学会において発表を行った。 「ヌカカ刺咬後の皮膚障害に関する微生物免疫学的検討」 松葉ら、第70回日本細菌学会中国・四国支部総会(東広島市)10/14-15, 2017 「弓ヶ浜半島に生息するヌカカの生態調査とその遺伝子情報」 遠藤ら、2017年日本化学学会中国四国支部大会(鳥取市)11/11-12, 2017</p>	
<p>次年度研究計画</p>	<p>{次年度の研究計画について簡潔に記すこと}</p>	
<p>報告責任者</p>	<p>所属・職氏名</p>	<p>鳥取大学 研究推進部 研究推進課 研究助成係 高田 志保 電話番号 0857-31-5494 電子メール ken-jyosei@ml.adm.tottori-u.ac.jp</p>

- 注1) 表題には、環境創造部門、地域振興部門、北東アジア学術交流部門のいずれかを記載すること。
2) 「研究期間(年目/ 年間)」及び「次年度研究計画」は、環境創造部門及び地域振興部門において記載すること。
3) 研究者の知的財産権などに関する内容等で、非公開としたい部分は、罫線で囲うなど明確にし、その理由を記すこと。
4) 研究実績のサマリー及び図表資料を併せて提出すること。

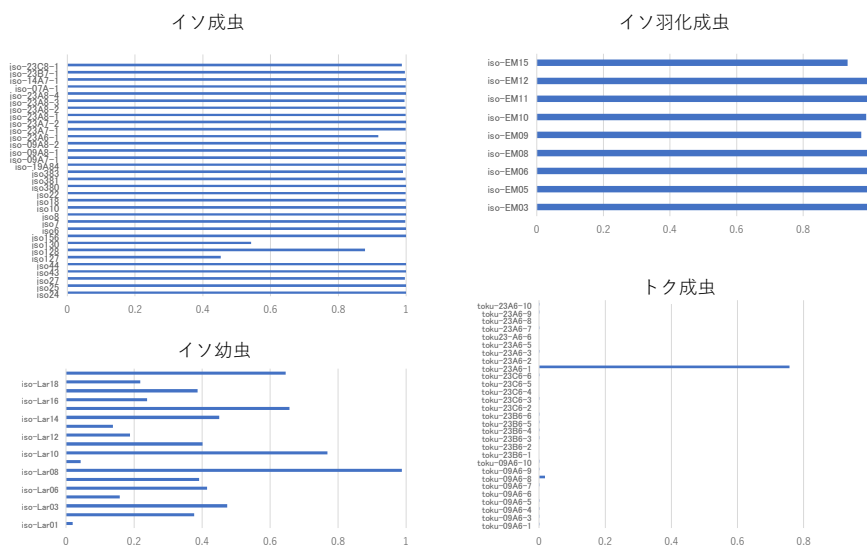
別図1 ヌカカ抽出液を接種したマウスの皮膚～皮下組織HE染色像



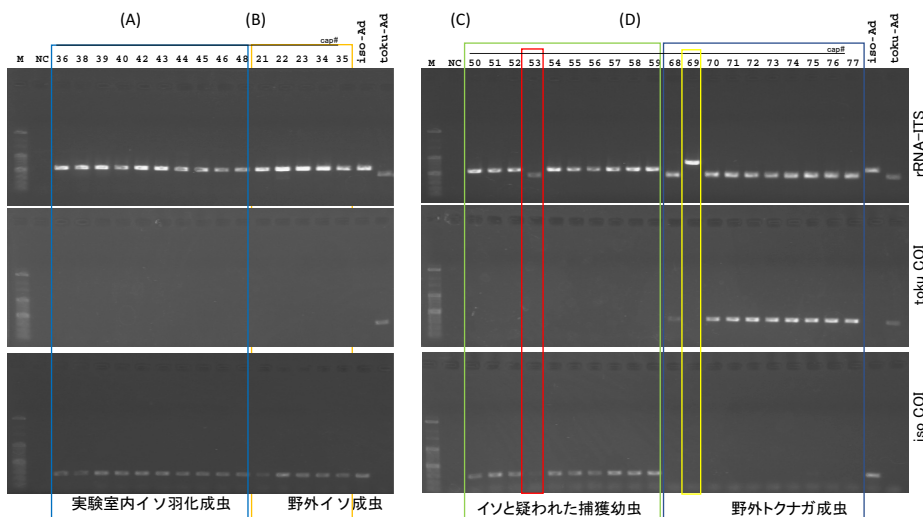
別図2 ヌカカからのグラム陽性球菌検出割合



別図3 単一属の細菌がヌカカ各個体に占める割合

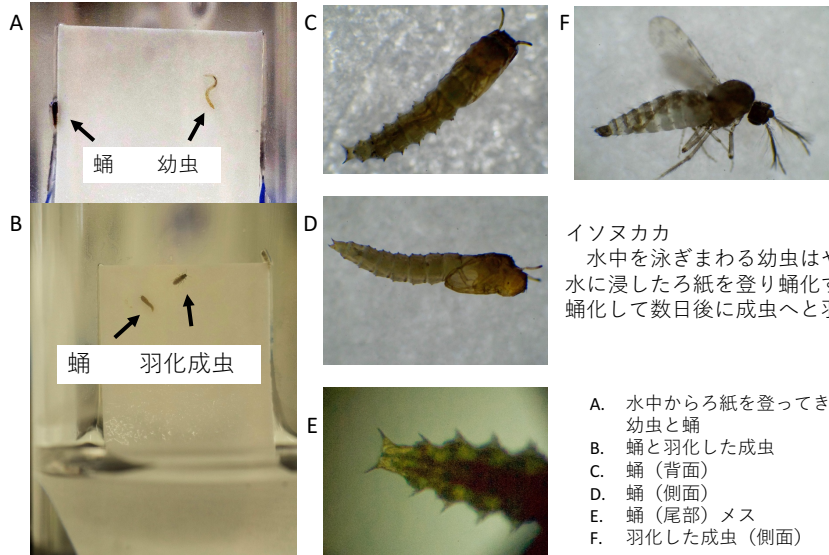


別図4 3種プライマーを用いたPCR法によるヌカカ種同定



野外イソ成虫 および野外トクナガ成虫は、形態選別された成虫由来の個体

別図5 イソヌカカ幼虫の実験室内での羽化



イソヌカカ
 水中を泳ぎまわる幼虫はやがて
 水に浸したろ紙を登り蛹化する。
 蛹化して数日後に成虫へと羽化する。

- A. 水中からろ紙を登ってきた
幼虫と蛹
- B. 蛹と羽化した成虫
- C. 蛹（背面）
- D. 蛹（側面）
- E. 蛹（尾部）メス
- F. 羽化した成虫（側面）