


(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

**MALARIA PARASITE DEVELOPMENTAL ANALYSES BY NESTED POLYMERASE
CHAIN REACTION METHOD: AN IMPLICATION FOR EVALUATION METHOD FOR
MOSQUITO INFECTION RATE IN EPIDEMIOLOGICAL STUDIES**

(Nested PCR 法による蚊体内のマラリア原虫検出法の検討—疫学調査における媒介蚊原虫
保有率の評価法として—)

氏 名 Fabian Mugissa Mashauri 印 

| | | |
|--|---|--------------------------------------|
| 目的 | : | マラリア流行地における媒介蚊の |
| 特定はマラリアの予防・対策を考える上で重 | | |
| 要である。これまで媒介蚊の特定に一般的に | | |
| 使用されてきた解剖法は、一定時間内で扱え | | |
| る解剖数に限界があることや新鮮な標本しか | | |
| 使用できない等の問題があり、最近開発され | | |
| たELISA法でも種々の問題が指摘されている。 | | |
| 本研究は、マラリア原虫 18SsrRNA 遺伝子領域 | | |
| をターゲットとしたPCR法を用いて蚊体内の | | |
| マラリア原虫検出実験を行い、フィールド調 | | |
| 査への適用を検討することを目的として実施 | | |
| された。 | | |
| 方法 | : | ネズミマラリア原虫 (<i>Plasmodium yoelii</i> |
| <i>nigeriensis</i>) 感染マウスに吸血させた媒介蚊 | | |
| <i>Anopheles soperi</i> について、吸血後経時的に頭胸部 | | |
| 及び腹部に切り分け、それぞれについてPCR | | |
| 法により原虫遺伝子 (18SsrRNA) の検出を試み | | |
| た。対照として、非媒介蚊 <i>Aedes albopictus</i> を用い | | |
| て同様の実験を行った。また、蚊体内での発 | | |
| 育期を区別する指標として宿主 (マウス) 遺 | | |




| |
|--|
| 伝子 (cytochrome b) の検出を同時に行った。 |
| 結果 : 媒介蚊である <i>An. saperoi</i> では、頭胸部 |
| において、吸血直後感染血液の影響で原虫 |
| DNA が検出されるものの、吸血後 6 日目には |
| 一時的に検出できなくなかった。その後マラリ |
| ア原虫スポロゾイトが出現し始めるといわれ |
| る吸血後 8 日目から再び原虫 DNA が検出され |
| るようになり、12 日目に 71.4 % とピークに達 |
| することが確認された。また、腹部では、頭 |
| 胸部同様、吸血直後に原虫 DNA が高率に検出 |
| されるものの、6 日目には 20 % まで低下した |
| 。その後オーシストの形成に伴って原虫 DNA |
| の検出率は上昇し、10 日目には検出率 81 % の |
| 最高値に達することが確認された。一方、非 |
| 媒介蚊 <i>Ae. albopictus</i> では、腹部において、原虫 |
| DNA が吸血後 5 日目に 25 %、6 日目に 10 % の |
| 割合で確認されたが、頭胸部ではその時期に |
| はすでに確認されなくなり、非媒介蚊では時 |
| 間の経過とともに頭胸部、腹部の順に原虫 |
| DNA が検出されなくなることを確認された。 |

| |
|-----------------------------------|
| また、宿主 cytochrome b 遺伝子の検出は媒介蚊、 |
| 非媒介蚊とともに吸血後 5 日目以降検出できな |
| くなつた。この結果により、宿主 DNA を平行 |
| 検査することによって、非媒介蚊における吸 |
| 血直後の偽陽性を排除できることを明らかに |
| した。 |
| 考察：本研究で行った蚊体内のマラリア |
| 原虫の 18SsrRNA 遺伝子を標的とした nested PCR |
| 法に、宿主 DNA を検出することを組み合わせ |
| て判定する方法は有効であることが確認され |
| た。つまり、マラリア流行地において野外採 |
| 集蚊でのマラリア原虫保有率（マラリア媒介 |
| 蚊の特定のため）を調査する際、原虫 DNA 陽 |
| 性となつた個体が吸血直後の血液由来のもの |
| であるのか、或いは発育した感染ステージ由 |
| 来のものなのかを特定することができるもの |
| と判断された。今後、野外調査に導入できる |
| よう、さらに検討を加える予定である。 |
| |
| |
| |

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

(1)

| | | | | |
|--|--------------|-------------|-------|---|
| 報告番号 | * 課程博 論文博 | 第 号 | 氏名 | Fabian Mugissa Mashauri |
| 論文審査委員 | | 平成16年 3月 3日 | | |
| | | 主査教授 | 斎藤 厚 |  |
| | | 副査教授 | 野中 量雄 |  |
| | | 副査教授 | 田中 龍夫 |  |
| (論文題目) | | | | |
| MALARIA PARASITE DEVELOPMENTAL ANALYSES BY NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION METHOD: AN IMPLICATION FOR EVALUATION METHOD FOR MOSQUITO INFECTION RATE IN EPIDEMIOLOGICAL STUDIES | | | | |
| (論文審査結果の要旨) | | | | |
| 上記の論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準等につき慎重かつ公正に検討し、以下のような審査結果を得た。 | | | | |
| 1. 研究の背景と目的 | | | | |
| マラリアの予防、対策を講ずる上で重要な媒介蚊の種類の特定について、これまで標準法として使用されてきた解剖法は、膨大な数の蚊を剖検する必要があること、新鮮な標本しか使用できないこと、原虫種の同定が不可能なこと等の問題があった。また、最近開発された ELISA 法も鋭敏性に欠けるといった種々の問題が指摘されている。本研究は、マラリア原虫特定遺伝子をターゲットとした PCR 法を用いて蚊体内のマラリア原虫検出実験を実施し、疫学調査への適用の可能性について検討したものである。 | | | | |
| 2. 研究内容 | | | | |
| 方法は、ネズミマラリア原虫(<i>Plasmodium yoeli nigeriensis</i>)感染マウス血液を吸血させた媒介蚊(<i>Anopheles soperi</i>)および非媒介蚊(<i>Aedes albopictus</i>)について、吸血後経時的に頭胸部および腹部に切り分け、原虫 18S rRNA 遺伝子の検出動態について nested | | | | |

- 備考 1. 用紙の規格は、A4 とし縦にして左横書とすること。
2. 要旨は、800 字～1200 字以内にまとめること。
3. *印は記入しないこと。

論文審査結果の要旨

(2)

PCR法で解析した。同時に蚊体内での原虫の消長を把握するための指標として宿主であるマウス cytochrome b 遺伝子の検出も行った。

その結果、媒介蚊である *An. soperi* では、頭胸部、腹部とも吸血直後は感染血液の影響で原虫 DNA が検出されるものの、頭胸部では6日後に一時的に検出できなくなり、8日後から再び検出され、12日後に71.4%のピークに達する。また、腹部では、頭胸部と同様に吸血直後に原虫 DNA が効率的に検出され、6日後には一時的に20%に低下するものの、その後検出率はやはり徐々に上昇し、10日後には検出率が81%に回復した。一方、非媒介蚊の *Ae. albopictus* でも、吸血後高率に原虫 DNA が検出されたが、時間の経過とともに頭胸部、腹部の順に原虫 DNA の検出率は低下し、6日後以降には検出されなくなった。また、これらの蚊体内における宿主 cytochrome b 遺伝子の検出は媒介蚊、非媒介蚊ともに5日目まで陽性であったが、その後まったく検出できなくなった。特に非媒介蚊の *Ae. Albopictus* では、原虫 DNA と宿主 DNA がほぼ同様の経過で検出できなくなった。媒介蚊、非媒介蚊を問わず、吸血後短期間は原虫 DNA が検出されたため、原虫 DNA の検出結果だけから媒介蚊と非媒介蚊を区別することは困難であったが、非媒介蚊の場合、宿主 DNA の消退とほぼ一致して原虫 DNA も検出できなくなるため、原虫 DNA が陽性であって宿主 DNA が陰性の場合には、高い確率で媒介蚊であると推定できることが明らかになった。

3. 研究成果の意義と学術的水準

マラリア流行地において、原虫を媒介する蚊の種類は地域ごとに異なっている場合が多く、かつ媒介蚊はその種類ごとに生息域、習性が異なっているため、流行地域ごとに媒介蚊を特定することは、マラリア対策上きわめて重要である。一方、媒介蚊を特定するための方法として、従来用いられてきた解剖法では野外採集された多数の蚊を現地で解剖、鏡検する必要がある。本研究は、蚊体内でのマラリア原虫 DNA 遺伝子と宿主 DNA 遺伝子を平行検出することが媒介蚊を特定する方法として有効であることを初めて示したものである。この結果は、ヒトマラリアの媒介蚊特定のための野外調査に応用可能と思われ、採集された蚊からのヒトマラリア原虫4種の検出・同定に応用され、その予防・対策を講ずる上で重要な手法になることが期待される。よって国際的にも高く評価されるものであると判断される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。