

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（ 1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・講師 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（環境部門）	
研究結果	<p>[本年度の研究結果（研究方法、実験結果、分析結果等）について、当初の研究計画に沿って端的に記すこと。詳細なデータ等については、別に添付も可。] [非公開としたい部分は、罫線で囲うなどして明確にし、その理由を記すこと。]</p> <p>ヌカカ刺咬後に生じる持続性の痒みや、拡大しやすい皮膚障害の原因について、弓ヶ浜半島に生息する吸血性ヌカカを実験試料として保有細菌を検索するため、1) ヌカカを採取し、2) 各個体からのDNA抽出および遺伝子増幅のための条件検討と最適化を行った。3) ヌカカより得られたDNAから細菌特有のDNA増幅・タグ付加、メタゲノム解析用ライブラリー構築を行い、4) 次世代シーケンサーによる塩基配列決定を行った。現在ヌカカの保有細菌叢に関する解析を進めている。4) 当初計画では予定していなかったが、米子市でヒトに刺咬被害を及ぼすヌカカ種が何か、また単一種か否かについても詳細は明らかでない。虫種依存性の病変形成の可能性も考慮し、ヌカカ遺伝子の分子系統種解析を行った。</p>	
研究成果	<p>[本年度の研究成果（知見・技術）について、具体的に記すこと。詳細なデータ等については、別に添付も可。]</p> <p>1) 2015年7月に米子市内で採取されたヌカカ91匹（♀68, ♂23）について、遺伝子抽出法および遺伝子増幅条件の最適化を行った（図1）。2) 細菌特有の16S rRNA遺伝子塩基配列決定を行う為の、遺伝子増幅およびシーケンスタグの付与およびその遺伝子断片精製を行った（図2）。3) メタゲノム解析用ライブラリー構築条件最適化を行った。4) 次世代シーケンサーによる塩基配列結果を得た。5) 今回捕獲解析したヌカカは単一種であることは推定された（図3）が、虫種同定結果の精度が十分高いとは言えない。また、被害の原因ヌカカ種が単一種かについての詳細も現時点では不明である。今後、虫体遺伝子の分子系統比較解析精度を上げるため実験条件最適化と調査が必要であろう。</p>	
次年度研究計画	<p>[次年度の研究計画について簡潔に記すこと]</p> <p>1) ヌカカ保有細菌叢解析結果の詳細を得る。 2) ヌカカ成虫発生時期に、吸血性ヌカカを採取し、虫体抽出液をマウス皮膚に接種し、かゆみの原因となる成分を特定するための解析を行う。</p>	
報告責任者	所属・職 氏名	国立大学法人鳥取大学研究協力課研究助成係・朝野弘昭 電話番号 0857-31-5494 電子メール h-asano@adm.tottori-u.ac.jp

- 注1) 表題には、環境部門、地域部門、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、環境部門のみ記載すること。
 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を併せて提出すること。

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（環境部門）

ヌカカ刺咬後に生じる持続性の痒み・皮膚障害の原因は？病原細菌との関連は？

H27年度：弓ヶ浜半島に生息する吸血性ヌカカを実験試料としての遺伝学的解析

① ヌカカの保有する細菌叢のメタゲノム解析

1) 実験条件検討と最適化

2) 次世代シーケンサーによる塩基配列決定

② ヌカカ種の解析

遺伝子増幅、塩基配列決定、分子系統比較解析

16S rRNA 遺伝子増幅のための試料調製条件検討

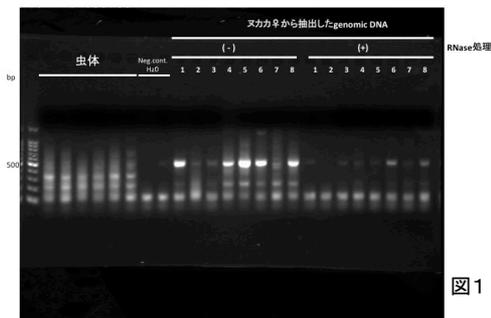


図1

増幅産物を精製し、2ndPCR (マルチプレックス用インデックスとシーケンスタグの付与)

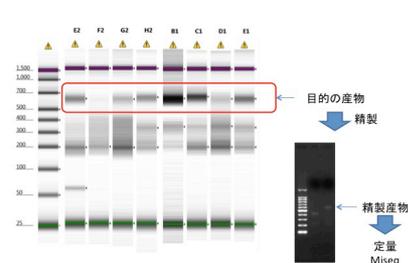
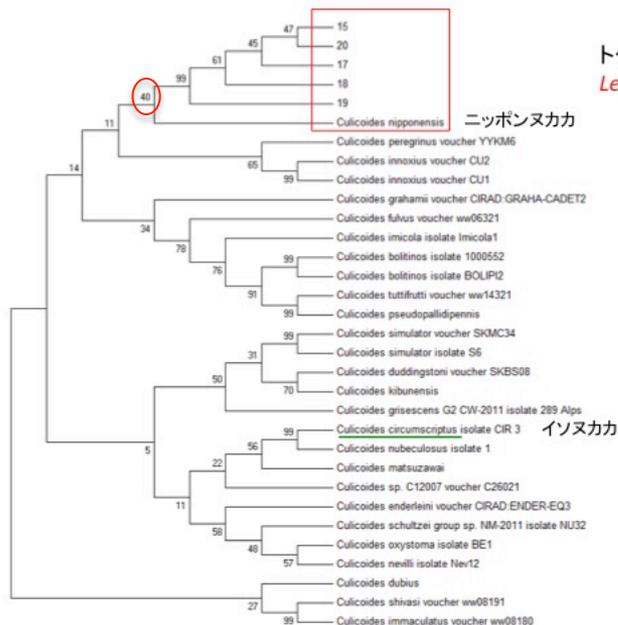


図2

米子ヌカカサンプルと*Culicoides* 属のCO1分子系統樹解析結果



トクナガクロヌカカは、*Leptoconops nipponensis*

ニッポンヌカカ

イヌヌカカ

図3

メタゲノム解析：多様な生物DNAを混合物として抽出し、このDNA混合物の塩基配列を解読することで、試料中に含まれる生物(培養できない微生物を含む)の種類やその存在比率を推定することが可能。

実験条件検討の必要性あり(赤丸部数値低いため)。