

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（環境創造部門）

研究期間（ 2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	
研究結果	<p>1) 米子市で2015年（H27年度）に採取されたトクナガクロヌカカについて保有細菌探索を目的として、抽出遺伝子材料からのPCR産物の次世代シーケンサーによる塩基配列決定を本研究初年度に行った。本年度は、その結果をもとに保有細菌叢のメタゲノム解析を行い、どのような細菌を保有しているのか調べ皮膚障害との関連を解析した。</p> <p>2) 米子市では、H26年度にトクナガクロヌカカの大量発生とヒト刺咬被害を関連付けた調査が開始され、翌H27年度に本研究を開始した。H27年度のヌカカ採取期間には、トクナガクロヌカカのみが採取され、複数採取従事者らに刺咬被害が出なかった。一方、H28年度採取期間においては、トクナガクロヌカカが主に採取される中、イソヌカカも約1%の割合で採取される日もあり、複数の採取者にも刺咬被害が発生した。これらの状況からヌカカ種特異的に、かゆみ等誘導因子存在の可能性が疑われたので、各ヌカカ種抽出液のマウス接種実験によって行動変化に違いが認められるか実験条件や測定方法検討を行った。</p> <p>3) 2種のヌカカについて、遺伝子増幅法(PCR)による選別を試みた。</p>	
研究成果	<p>1) メタゲノム解析結果から、ヒトに化膿性疾患を起こす原因となるブドウ球菌を保有するヌカカ個体が存在すると考えられた（表1）。</p> <p>2) 各ヌカカ種抽出液のマウス接種実験を繰り返すことで、種特異的な行動変化が確定できるか検討している。</p> <p>3) 2種のヌカカ成虫については、遺伝子増幅法(PCR)による選別が可能であることが増幅遺伝子断片の塩基配列解析により明らかとなった。幼虫の同定については、ヌカカ以外の近縁種遺伝子増幅が現在の方法ではおこることが増幅断片の塩基配列解析からわかった。今後、ヌカカ以外の近縁種幼虫と選別可能な方法検討が必要とされる（図1、2）。</p> <p>本研究課題の一部成績を含む内容は、2016年日本化学学会中国四国支部大会・香川大会(11/5-6, 香川大学幸町キャンパス)において米子高専・竹内らが以下タイトルで発表した。“トクナガクロヌカカの生態と遺伝子情報”</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>刺咬被害の原因となっているヌカカを特定するためのマウス接種実験を繰り返すことで結果の確定と、かゆみの原因因子絞り込みを実施する。</p>	
報告責任者	所属・職 氏名	鳥取大学研究推進部研究推進課 課員 高田志保 電話番号 0857-31-5494 電子メール ken-jyosei@ml.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。

## ヌカカ個体に、化膿をおこす原因となる細菌が存在(付着?)

刺咬後に掻きむしると化膿の可能性上がるかもしれない。

黄色ブドウ球菌(Sa)検出率8.6%(7/81) トクナガクロヌカカ81匹解析からの抜粋

	ヌカカ採取日	DNA 調製日	JY_ID	18SrRNA増幅 (PanCul)	16SrRNA増幅 (V34)	Miseq_ID	
ヌカカ♀ 1	150729	151018	NKK1	good	good	NKK-1-1	Sa_0.5
ヌカカ♀ 2	150729	151018	NKK2	good	very weak	NKK-1-2	Sa_1.1
ヌカカ♀ 3	150729	151018	NKK3	good	very weak	NKK-1-3	
ヌカカ♀ 4	150729	151018	NKK4	good	good	NKK-1-4	Sa_37.1
ヌカカ♀ 5	150729	151018	NKK5	good	good	NKK-1-5	Sa_1.3
ヌカカ♀ 6	150729	151018	NKK6	good	good	NKK-1-6	
ヌカカ♀ 7	150729	151018	NKK7	good	very weak	NKK-1-7	
ヌカカ♀ 8	150729	151018	NKK8	good	good	NKK-1-8	Sa_1.6
ヌカカ♀ 1		151019	NKK9		very weak		
ヌカカ♀ 2		151019	NKK10		(-)		
ヌカカ♂10	150729	160112		good		NKK-2-60	
ヌカカ♂11	150729	160112		good		NKK-2-61	Sa_64.2
ヌカカ♂12	150729	160112		good		NKK-2-62	
ヌカカ♂13	150729	160112		good		NKK-2-63	
ヌカカ♀40	150709	160115		good		NKK-2-26	Sa_0.6
ヌカカ♀41	150709	160115		good		NKK-2-27	Sa_0.6
ヌカカ♀42	150709	160115		good		NKK-2-28	
ヌカカ♀43	150709	160115		good		NKK-2-29	
ヌカカ♀44	150709	160115		good		NKK-2-30	
ヌカカ♀45	150709	160115		good		NKK-2-31	
ヌカカ♀46	150709	160115		good		NKK-2-32	Sa_1.8
ヌカカ♀47	150709	160115		weak		NKK-2-33	

表 1

## 2016年採取されたヌカカ成虫の遺伝子レベルでの識別と ヒト遺伝子成分検出の試み

共通祖先が遠いほど違う配列部分が増えることを利用して特定遺伝子領域を増幅  
採取ヌカカからヒト由来の遺伝子増幅はされなかった(=ヒト吸血の痕跡なし)。

イソヌカカ トクナガクロヌカカ Hu

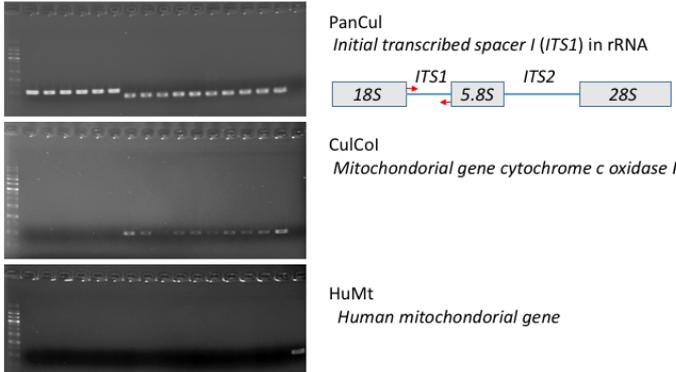
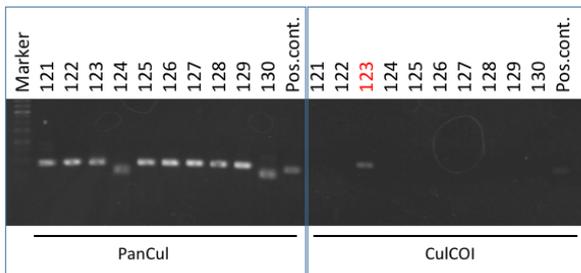


図 1

## ヌカカ幼虫生息場所を特定するための遺伝子同定法の試み



材料: 米子市の土壌から分離された微小幼虫より抽出したDNA

増幅遺伝子: 成虫同様のPanCul(ITS1) および CulCOI (cytochrome c oxidase I)

#123増幅は、ヌカカ以外の昆虫由来遺伝子であった。→プライマー改良必要

図 2