

# 生体アミン誘発性行動の脳内機構に関する研究

造山帯の表層および深部地質過程研究チーム（課題番号：157003）

研究期間：平成 27 年 7 月 28 日～平成 30 年 3 月 31 日

研究代表者：三島健一 研究員：見明史雄，鹿志毛信広，佐藤朝光，本多健治

## I. 研究概要

### 1. 研究開始当初の背景

経済発展に伴ったヒトやモノの移動量の増加は、媒介蚊の移動や感染症の拡大を容易にし、蚊媒介性感染症の危険性を増大させた。代表的な蚊媒介性感染症であるデング熱は、世界人口の約半数に罹患するリスクがあるとされている（WHO：Fact sheet Dengue and severe dengue）。日本も例外ではなく、2014年8月、東京都においてヒトスジシマカが媒介するデング熱が発生した（Seki, N. *et al.* Nihon Koshu Eisei Zasshi62, 238-250 (2015)）。これは、1945年以来初となる国内感染事例である。さらに、越冬能力を有するヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) での増殖が可能となったチクングニアウイルス (A226V) をはじめとした、ウイルス突然変異株の出現は、突如として全く新しい蚊媒介性ウイルス感染症が世界の広範な地域で新興する可能性を一層高めた（Kumar, N. P. *et al.* J Gen Virol 89, 1945-1948 (2008)）。これを機に、2010年、我が国ではチクングニアウイルスによって引き起こされるチクングニア熱が、感染症法4類感染症に指定された。

このように蚊媒介性ウイルス感染症の対策は、我が国の公衆衛生上、ますます重要な課題の一つとなっている。ワクチンなどの存在しない新興の蚊媒介性ウイルス感染症の予防は、“媒介蚊に刺されないこと”が重要となることから、監視体制の強化にあわせて媒介蚊の制御が急務である。現在、蚊の制御における主要なツールは、殺虫剤及び忌避剤である。殺虫剤は、蚊の繁殖域に散布し、個体数を減らすという比較的簡便なツールであるが、蚊以外の益虫なども殺してしまうため生態系の破壊が危惧されている。一方、忌避剤は、殺虫剤と比較して生態系への影響は少ないが、個人で塗布を行う必要があり、手間と個人の感染症への意識の継続が必要である。した

がって、蚊の特性を知り、生態系に悪影響が少なく、散布が可能な新しい蚊の「制御ツール」の創出が望まれている。

本研究は、蚊に特徴的な“雌蚊が吸血対象を探索する行動（宿主探索行動）”に着目した。宿主探索行動を抑制するツールは、吸血行動に至る蚊の数を減らし、蚊媒介性感染症を予防することが期待される。また、このツールは、環境や人体への悪影響を減らすため、蚊と他の生物種で異なる分子を標的とすることが望まれる。これまで野外で採取したヒトスジシマカを用いてトランスクリプトーム解析を行い、868個の塩基配列を決定し、他の生物種と相同性の低い266個の未知の塩基配列を検出している。これは、蚊に特異的なタンパク質が存在することを強く示唆しており、蚊に特異的な宿主探索行動制御タンパク質を標的とすることで、蚊に選択的で、環境や人体へ悪影響のないツールの創出ができる可能性を示している。しかし、宿主探索行動の制御機構は不明な点が多いため、標的とするタンパク質を選定することはできない。そこで、まず、宿主探索行動の制御機構を明らかにするため、昆虫の中枢において自発運動や睡眠・覚醒、記憶学習といった様々な行動の制御に関与する生体アミンのドパミン (DA) とオクトパミン (OA) に注目した（Yamamoto, S. & Seto, E. S. Japanese Association for Laboratory Animal Science63, 107-119 (2014)）。雌蚊において、頭部DA量は羽化後徐々に減少する。興味深いことに、この期間、宿主探索行動は増加する（Andersen, J. P. *et al.* Journal of insect physiology52, 1163-1170 (2006)）。よって、DAが宿主探索行動を制御する因子の1つであると予想した。また、ショウジョウバエの性行動は、DAとOAによる重複した制御を受ける（Chen, A. *et al.* Genetics193, 159-176 (2013)）。このため、OAは、DAとともに雌蚊の宿主探索行動を制御すると推測された。本研究は、DAとOAが宿主探索行

動に及ぼす影響が明らかになることで、蚊に特異的な宿主探索行動制御タンパク質を標的とした、新しい抑制ツールが創出できると予想された。

## 2. 研究の目的

本研究は、蚊の宿主探索行動の制御における生体アミンの役割をDAだけでなく、OAなども含め明らかにする。また、得られた知見をもとに蚊に特異的な宿主探索行動制御タンパク質を標的とした、新しい抑制ツールの創出を目指した。

## 3. 研究の方法

### 3-1. ヒトスジシマカの飼育

実験には、福岡大学3号館裏においてヒューマンバイト法で採集したヒトスジシマカを室内で継代飼育したものをを用いた。蚊は、日照時間light/dark 16h (AM 10:00 ~) / 8h (AM 2:00 ~) 湿度 $70 \pm 10\%$  RH、温度 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ に設定したインキュベーター内で継代して、飼育した。

#### 3-1-1. 卵の孵化

縦横深さ $23 \times 33 \times 5$  cmのバットに脱塩素した水道水(水道水を1日程インキュベーター内に静置したもの)を適量入れた。次いで、蚊の卵のついた紙と少量の幼虫用餌をバットに入れ半日~1日静置した。

#### 3-1-2. 幼虫期~蛹期 (1齢幼虫は卵を水に浸してから半日~1日で出現する。)

蚊の幼虫期用の餌を毎日適量与えた。蛹化した個体は駒込ピペットを用いて回収した。シャーレの蓋にコットンを敷き、その上に蛹を並べ、飼育用ケージ(20×20×30cm)内に静置した。

#### 3-1-3. 成虫期

羽化した成虫には、餌として3%スクロースを飼育用ケージ内に静置した。3%スクロースは、スクロース15gをイオン交換水で溶解し、500mLにメスアップして調整した後、冷蔵保存した。小瓶に詰めた綿に3%スクロースを染み込ませて与えた。

#### 3-1-4. 産卵期

吸血は、雌雄蚊を同ケージに入れ2日以上経ってから行った。吸血から2、3日後に飼育用ケージ内に卵回収用容器を約1日設置し、卵を回収した。卵回収用容器は、茶色い容器に脱塩素した水道水を入れ、容器の内側にキムタオルを巻いたものを用意した。回収した卵は、飼育用ケージの外で更に一日、回収容器に入れたまま静置した。その後、回収容器から卵のついたキムワイブを取り出し、乾燥させた。乾燥した卵は、湿度 $70 \pm 10\%$  RH、温度 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ に設定したインキュベーター内で保存し

た。保存した卵は、3ヶ月以内に使用した。

### 3-1-5. 蚊の群分け

蛹期に実体顕微鏡下で尾の形態学的違いを基に雌雄に分離し(図1)、紙コップに移してそれぞれ羽化させた。この時使用した紙コップは、中にコットンを敷き、蛹を並べた後、実験用ケージと同様の布にて蓋をした。同日に羽化した成虫蚊は、吸管管を用いて雌雄各100匹となるように、実験用ケージ(20×20×30cm)に移した。そして、羽化直後から、3%スクロース、3.5mM L-DOPA、30mM OAを実験用ケージ内に静置し自由飲水させた。

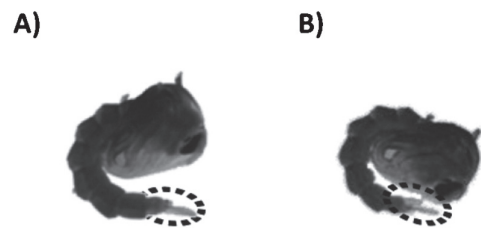


図1. 蚊の蛹 A) 雌、B) 雄

### 3-2. 薬剤処置による生存率への影響

同日羽化した雌蚊を紙コップに20匹ずつ移した。その後、紙コップの上にコットンを置き、その上に薬剤を1mL滴下した。薬剤は、羽化後0日目から6日目まで毎日与えた。羽化後6日目までに死亡した雌蚊を数え、アボットの補正式を用いて補正死亡率を算出し(補正死亡率 =  $\frac{\{(\text{薬剤処理区の死亡率}) - (\text{対照区の死亡率})\}}{100 - (\text{対照区の死亡率})}$ )、補正死亡率から生存率を求めた(生存率 =  $1 - \text{補正死亡率}$ )。その後、算出した生存率からシグモイド曲線を作成し、LC50を得た。シグモイド曲線は、Origin 8.1を使って作成した。L-DOPAは、10mM以上は溶解できなかったことから0、0.3、1、3、10mMを処置した。一方OAは、0、0.3、1、3、10、30、100、300mMを与えた。各薬剤濃度の検討は、3~6回繰り返した。

### 3-3. HPLCを用いたDA及びOA量の測定

吸血行動の観察後、雌蚊に氷麻酔を施した。実体顕微鏡下、雌蚊頭部を切り出した。切り出した雌蚊頭部1匹分をHPLC用ホモジナイズ溶液50  $\mu\text{l}$ に入れ、バイオマッシャーII(ニッピ)を用いてホモジナイズした。その後、15000rpm、4  $^\circ\text{C}$ 、20minで遠心し、得られた上清は新しい1.5mLチューブに移した。そして、上清20  $\mu\text{l}$ をHPLCに注入し、DA量とOA量を測定した。同日に羽化した成虫蚊は、雌雄各100匹となるように実験用ケージに移した。そして、羽化直後から、3%スクロース(Control群)、3.5mM L-DOPA(DA群)、30mM OA(OA

群)を実験用ケージ内に静置し、自由飲水させた。羽化後0、3、6日目に実験用ケージから雌蚊を回収し、実体顕微鏡下で頭部を切り出した。そして、内部標準を含んだ0.1M 過塩素酸中でホモジナイズし、その上清中のDA及びOA量を、電気化学検出器を組み合わせた高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) で測定した (表1)。各群は、12サンプルずつ測定した。

表1. HPLCの測定条件

検出器	950mV versus an Ag/AgCl reference electrode	
カラム	EICOM PAK SC-50DS (150 x 3.0 mm; EICOM)	
設定温度	25°C	
流速	0.5 ml/min	
移動相	pH 5.0 0.1M クエン酸-酢酸ナトリウム	80%
	メタノール	20%
	1-ドデカンスルホン酸ナトリウム	130mg
内部標準	3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA)	

### 3-4. 宿主探索行動の測定

羽化日を羽化後0日目とし、羽化後0~6日目まで毎日、1日に1回PM 7:00 (インキュベータ内が明期になって9時間後) に行った。また、宿主探索行動は飼育条件と同じ湿度70±10%RH、温度27±2°Cの環境下で行った。実験開始前に、測定装置内に5分間、蚊の入った実験用ケージを入れ静置した。その後、麻酔を施したBALB/c雌マウスと3%スクロースを実験用ケージ内に30分間静置し、観察を行った。観察中、静置したマウスに止まった雌蚊は、宿主探索行動を行ったとみなし、吸虫管により吸引回収し、カウントした (図2, 3)。観察終了後、回収した雌蚊を同ケージに戻し、宿主探索行動を示した雌蚊の割合を算出した (雌蚊の宿主探索行動%) = (マウスに誘引された雌蚊数) / (ケージ内の雌蚊総数) × 100。



図2. 宿主探索行動の測定法

同日に羽化した成虫蚊は、雌雄各100匹となるように実験用ケージに移した。そして、羽化直後から、3%スクロース (Control群)、3.5mM L-DOPA (DA群)、

30mM OA (OA群) を実験用ケージ内に静置し、自由飲水させた。そして、羽化後0日目から6日目まで毎日宿主探索行動を観察した。各群は、6回繰り返し測定を行った。

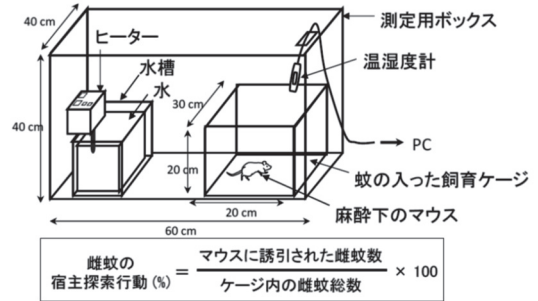


図3. 宿主探索行動測定装置

### 3-5. 餌摂取量の測定

同日に羽化した成虫蚊は、雌雄各100匹となるように実験用ケージに移した。そして、羽化直後から、3%スクロース (Control群)、3.5mM L-DOPA (DA群)、30mM OA (OA群) を実験用ケージ内に静置し自由飲水させた。羽化後2日目に0.01%プリリアントブルーFCFを混ぜた3%スクロース、3.5mM L-DOPA、30mM OAを実験用ケージ内にそれぞれ設置した。そして、羽化後3日目に雌蚊を回収した。回収した雌蚊は、2匹ずつ全身をPBS (-) 100ulに入れホモジナイズした。ホモジナイズ液は、15000rpm 15minで遠心し、その上清90ulを96wellプレートに移した。そして、Immuno Mini NJ-2300で吸光度を測定した。波長は、630nmを使用した。

### 3-6. 雌蚊の交尾率の測定

同日に羽化した成虫蚊は、雌雄各100匹となるように実験用ケージに移した。そして、羽化直後から、3%スクロース (以下Control群)、3.5mM L-DOPA (以下DA群)、30mM OA (以下OA群) を実験用ケージ内に静置し、自由飲水させた。羽化後3日目に実験用ケージから雌蚊を回収し、実体顕微鏡下で貯精嚢を切り出した。そして、正立顕微鏡 (400倍) にて精子の有無を観察した (図4)。精子が観察された個体は、交尾ありと判定した。交尾率は、交尾の確認を行った雌蚊数あたりの交尾ありの雌蚊数の百分率として算出した。

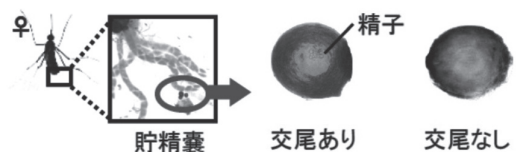


図4. 雌蚊貯精嚢中の精子

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 薬剤処置が蚊の生存率に与える影響

L-DOPAを処置した群は、全ての濃度で生存率は低下せず、LC50は算出できなかった(図5A)。一方、OAを処置した群の生存率は、30mMから100mMの間で減少し、LC50は39.5mMとなった(図5B)。以上の結果から、L-DOPA 処置濃度は3.5mM、OA 処置濃度は30mMとした。また、3%スクロース(Control群)、3.5mM L-DOPA (DA群)、30mM OA (OA群)を実験用ケージ内に静置し自由飲水させた。羽化後6日目までに死亡した雌蚊を数え、アボットの補正式を用いて生存率を求めた。その結果、DA群の生存率は、100.0%、OA群の生存率は、99.9%であった。以上の結果から、実験に使用した薬剤処置は蚊の生存率に対して影響はないことが示唆された。

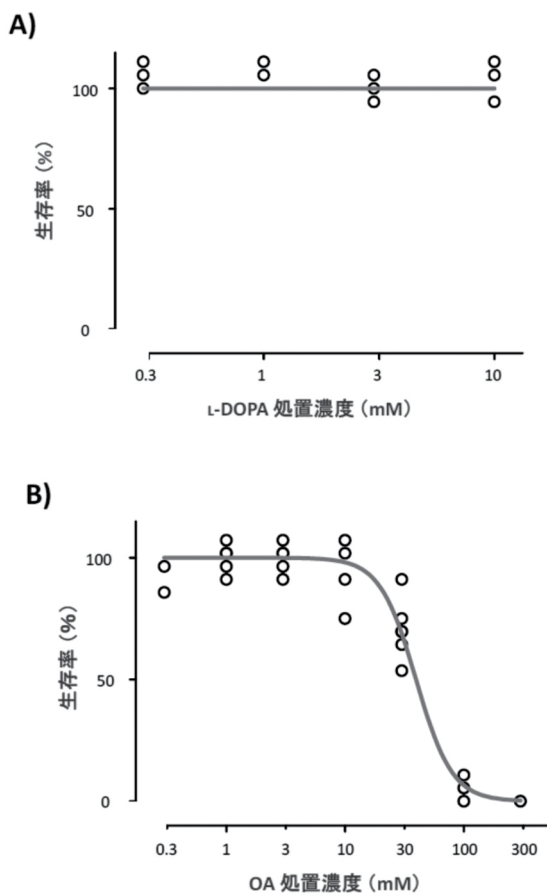


図5. 薬剤の処置濃度と蚊の生存率

##### 4-2. 薬剤処置後の雌蚊頭部のDA・OA量

Control群において雌蚊頭部のDA量は、羽化後0日目に高く、その後減少した(day 0:26.5±2.5; day 3:3.7±0.4; day 6:1.9±0.2pmol/head)。これに対し、DA群のDA量は、Control群のような減少が見られず、羽化後3日目と6日目で有意に増加した(day 0:25.3±2.4; day 3:21.9±6.2; day 6:23.3±4.5pmol/head)。OA群の

DA量は、Control群と同様に羽化後減少し、Control群と有意な差は見られなかった(day 0:28.9±1.8; day 3:4.0±0.7; day 6:2.0±0.4pmol/head、図6)。次に、雌蚊頭部のOA量を測定した結果、Control群とDA群のOA量は、羽化後増加する傾向がみられた(Control群: day 0:0.29±0.03; day 3:0.75±0.06; day 6:0.86±0.07pmol/head、DA群: day 0:0.32±0.02; day 3:0.60±0.06; day 6:0.73±0.05pmol/head)。OA群のOA量は、Control群と比べて羽化後3日目と6日目に有意に増加した(day 0:0.34±0.03; day 3:61.96±23.34; day 6:102.27±28.52 pmol/head、図6)。以上のことから、L-DOPAを処置したDA群でのみDA量が増加すること、OAを処置したOA群でのみ、OA量が増加することが示唆された。

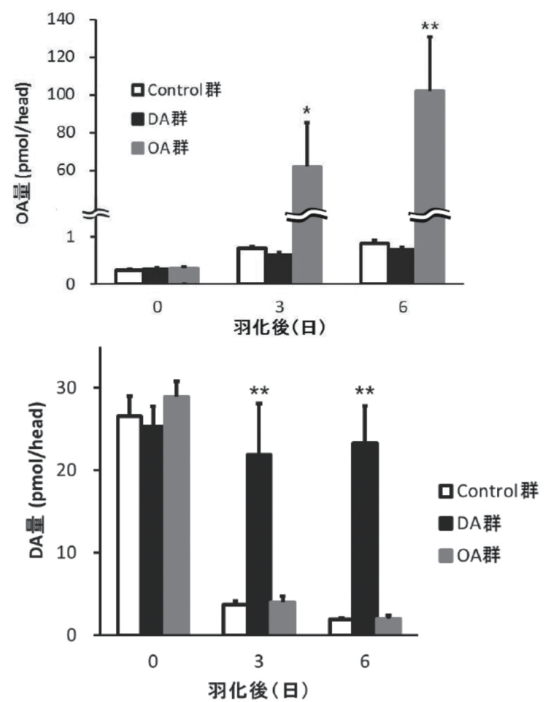


図6. 薬剤処置後の雌蚊頭部のDA・OA量

##### 4-3. DAとOAが宿主探索行動に及ぼす影響

Control群において、雌蚊の宿主探索行動は、羽化後徐々に増加した(Control群 (vs DA群): day 0:0.0±0.0%; day 1:4.9±2.6%; day 2:17.2±3.9%; day 3:25.5±3.6%; day 4:23.5±3.9%; day 5:27.1±3.1%; day 6:35.7±2.6%、Control群 (vs OA群): day 0:0.2±0.2%; day 1:3.2±1.1%; day 2:16.0±3.9%; day 3:22.3±4.1%; day 4:26.4±1.7%; day 5:35.1±2.3%; day 6:32.5±4.0%)。これに対し、DA群とOA群の宿主探索行動は、Control群のような増加が見られず、結果として、羽化後3日目から6日目にかけて有意に減少した(DA群: day 0:0.8±0.4%; day 1:3.7±1.4%; day 2:10.7±3.3%; day 3:13.0±1.8%; day 4:15.1±3.4%; day 5:16.1±2.6%; day 6:13.9±5.1%、OA群: day 0:0.0±0.0%; day

1:  $3.9 \pm 1.9\%$ ; day 2:  $13.8 \pm 2.4\%$ ; day 3:  $13.8 \pm 1.7\%$ ; day 4:  $16.2 \pm 2.6\%$ ; day 5:  $14.9 \pm 1.5\%$ ; day 6:  $14.0 \pm 3.6\%$ 、図7)。以上のことから、DAとOAは雌蚊の宿主探索行動の制御することが示唆された。

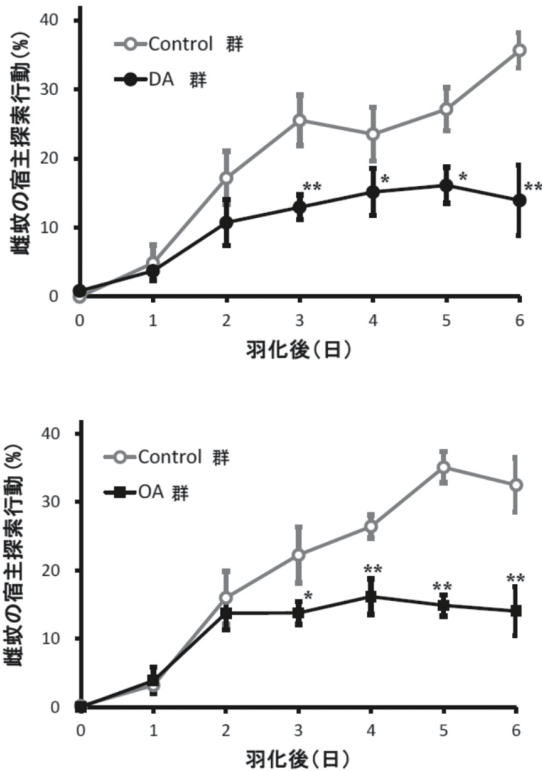


図7. DAとOAが雌蚊の宿主探索行動に与える影響

#### 4-4. DA とOAが蚊の餌摂取量に与える影響

DA群とOA群の吸光度は、Control群と比較して有意な差はなかった (Control群:  $0.048 \pm 0.007$ 、DA群:  $0.053 \pm 0.009$ 、OA群:  $0.040 \pm 0.003$ 、図8)。以上のことから、DAとOAは雌蚊の餌摂取量に影響を与えないことが示唆された。

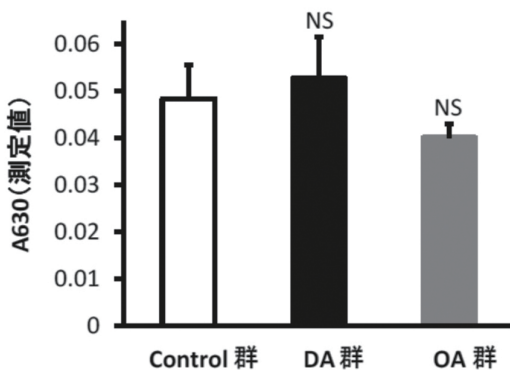


図8. DA とOAが蚊の餌摂取量に与える影響

#### 4-5. DA とOAが蚊の交尾に与える影響

DA群およびOA群の交尾率は、Control群の交尾率と比較して有意な差はなかった (Control群:  $100 \pm 0.0\%$ 、

DA群:  $95 \pm 5.0\%$ 、OA群:  $100 \pm 0.0\%$ 、図8)。以上のことから、DAとOAは雌蚊の交尾率に影響を与えないことが示唆された。

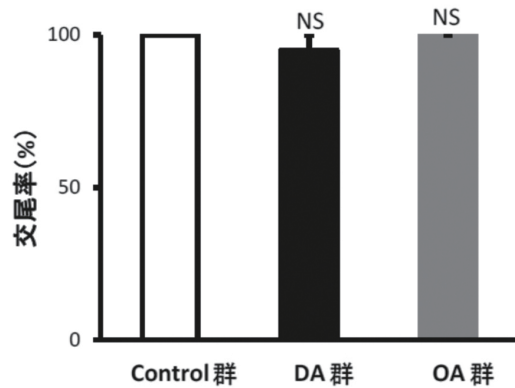


図9. DA とOAが蚊の交尾に与える影響

本研究は、DAとOA が宿主探索行動に影響を及ぼすことを明らかにするため、雌蚊のDA量とOA量を増加させ、宿主探索行動の変化を観察した。その結果、DAおよびOA量を増加させることで、羽化後3日目から6日目において雌蚊の宿主探索行動が減少することを示した。また、本研究成果より、DA量の増加はOA量を有意に増減しないこと、OA量の増加も同様に、DA量を有意に増減しないことを明らかにした。

羽化後、DA量は減少する。実験結果より、この時DA量を増加させ、DA量の減少を抑えることで宿主探索行動が減少することを示した。これに対して、OA量は、羽化後、増加する傾向が見られた。そして、この時OA量を増加させることで宿主探索行動は減少することを示した。羽化後のDA量とOA量の挙動が異なることから、DAとOAによる宿主探索行動の制御機構は異なることが予想された。しかしながら、本章で検討した宿主探索行動、交尾、餌摂取量においてDAとOAの効果の違いは見られなかった。よって、DAとOAによる宿主探索行動の制御機構の違いについて、更なる検討が必要であると考えられた。

今後、本研究成果を応用して、忌避剤のように宿主であるマウスに薬剤を塗布するのではなく、直接蚊に薬剤を処置することで、宿主探索行動を制御できることを示した。これらの成果を応用して、新たな宿主探索行動を抑制するツールを創出できることが期待された。

## II. 業績一覧

〔雑誌論文〕(計7件)

- ①Dieng H, Satho T, Suradi NFB, Hakim H, Abang F, Aliasan NE, Miake F, Zuharah WF, Kassim NFA, Majid AHA, Fadzly N, Vargas REM, Morales NP, Noweg GT.

Presence of a predator image in potential breeding sites and oviposition responses of a dengue vector  
*Acta Trop.* 2017 176 : 446-54

②Dieng H, Satho T, Abang F, Miake F, Ghani IA, Latip NA, Aliasan NE, Noor S, Ahmad AH, Ahmad H, Zuharah WF, Majid AHA, Nolasco-Hipolito C, Enrique Morales Vargas R, Phumala Morales N, Noweg GT.

Anti-oviposition activities of used sock media against a dengue vector: prospects of eco-friendly control and solutions to pollution.

*Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017 24(26) : 21375-85

③Dieng H, Ellias SB, Satho T, Ahmad AH, Abang F, Ghani IA, Noor S, Ahmad H, Zuharah WF, Morales Vargas RE, Morales NP, Hipolito CN, Attrapadung S, Noweg GT.

Coffee, its roasted form, and their residues cause birth failure and shorten lifespan in dengue vectors

*Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2017 24(17) : 14782-94

④Dieng H, Satho T, Abang F, Meli NKKB, Ghani IA, Hipolito CN, Hakim H, Miake F, Ahmad AH, Noor S, Zuharah WF, Ahmad H, Majid AHA, Morales Vargas RE, Morales NP, Attrapadung S, Noweg GT.

Sweet waste extract uptake by a mosquito vector: Survival, biting, fecundity responses, and potential epidemiological significance.

*Acta Trop.* 2017 169 : 84-92

⑤Dieng H, Mohd RZ, Tan Yusop NS, Ahmad AH, Abang F, Ghani IA, Satho T, Ahmad H, Zuharah WF,

Green tea and its waste attract workers of formicine ants and kill their workers – implications for pest management.

*Ind. Crop. Prod.* 2016 89 : 157-66

⑥Dieng H, Tan Yusop NS, Kamal NN, Ahmad AH, Ghani IA, Abang F, Satho T, Ahmad H, Zuharah WF, Majid AH, Morales RE, Morales NP, Hipolito CN, Noweg GT.

Exposure of a Dengue Vector to Tea and Its Waste: Survival, Developmental Consequences, and Significance for Pest Management.

*J. Agric. Food. Chem.* 2016 64(18): 3485-91.

⑦Dieng H, Seow OH, Hassan AA, Abang F, Ghani IA, Satho T, Miake F, Ahmad H, Fukumitsu Y, Zuharah WF, Majid AH, Kassim NFA, Aida NH, Nolasco-Hipolito C.

Changes in the biting activity of a dengue vector relative to larval and adult nutritional histories: implications for preventive measures.

*J. Asia-Pacific Ent.* 2015 18(3) : 507-13

〔学会発表〕 (計3件)

①佐藤朝光、入江圭一、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、ヒトスジシマカから単離された新しいEnterococcus属細菌について、第70回日本寄生虫学会南日本支部大会、第67回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会 (2017年11月4日 – 5日)

②福光由起、佐藤朝光、入江圭一、上田紗織、百武美香、弟子丸正伸、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、ヒトスジシマカマイクロアレイを用いた宿主探索行動を制御する遺伝子の調査、日本昆虫学会第76回大会 / 第60回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会 (大阪府堺市 2016年3月26 – 29日)

③Tomomitsu Satho, Yuki Fukumitsu, Keiichi Irie, Yukihiko Nakashima, Change on mRNA Expression in Growth Process of Adult Female Aedes albopictus. Joint International Tropical Medicine Meeting 2015 (Bangkok, Thailand, 2015年12月)