

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5 月 31 日

採択番号	30 共同-13		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	白藤 梨可
研究課題名	<i>Spiroplasma</i> 属共生菌導入マダニを用いたマダニ共生細菌の維持機構の解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	なかお りょう 中尾 亮	北海道大学大学院獣医学研究院・准教授	
研究分担者	おがた しょうへい 小方 昌平	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	まつお かい 松尾 権	北海道大学獣医学部・学部学生	
	まつもと たてき 松本 干城	北海道大学獣医学部・学部学生	
	白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター	
研究期間	平成 30 年 4 月 1 日 ~ 平成 31 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	マダニは体内に多様な微生物を保有するが、その一部は共生細菌としてマダニの生命活動に重要な役割を持つことが知られつつある。申請者は、マダニの持つ微生物群をメタゲノム解析手法により特定し、特にマダニ集団内で多くを占める細菌群について、マダニ体内での役割解析を進めている。これまでの共同研究で、マダニの共生菌の一つである <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の単為生殖系フタトゲチマダニ（原虫研累代飼育株・岡山株）への接種試験を行い、 <i>Spiroplasma</i> 属共生菌が介卵伝播することを確認した。本研究では、 <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を両性生殖系フタトゲチマダニ（原虫研累代飼育株・大分株）に接種し、その体内での局在と宿主マダニの表現型への影響を評価することを目的とした。		
研究経過の概要	北海道で採集されたシュルツェマダニ (<i>Ixodes persulcatus</i>) からマダニ細胞 (ISE6) を用いて分離した <i>Spiroplasma</i> 属共生菌 (Sp1-1株) を実験に用いた。本菌は、昨年度実施した共同研究において単為生殖系フタトゲチマダニの成ダニにマイクロインジェクションにより投与することで、成ダニ体内に定着し、その成ダニが産卵した卵に移行することを確認している。本実験では同様のプロトコールにより <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を両性生殖系フタトゲチマダニに投与した。接種後のマダニはウサギを用いた吸血に供し、産卵に至るまでの日数、卵重量、飽血時体重飽血後体重を測定した。また、卵から DNA を抽出し PCR により <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の感染有無を評価した。		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>SP-4 無細胞培地で培養した菌体を 2 種類の濃度 (A と B (A は B の 100 倍の菌体量)) に希釈し、A 希釈菌液をオス 23 個体、メス 27 個体に自動マイクロインジェクターにより接種した。同様に、B 希釈菌液をオス 26 個体、メス 45 個体に接種した。また、陰性コントロールとして、PBS をオス 29 個体、メス 60 個体に接種した。交配の組み合わせから、以下の 8 群を準備した。①非接種オス+非接種メス、②PBS 接種オス+PBS 接種メス、③A 菌液接種オス+A 菌液接種メス、④B 菌液接種オス+B 菌液接種メス、⑤A 菌液接種オス+PBS 接種メス、⑥B 菌液接種オス+PBS 接種メス、⑦PBS 接種オス+A 菌液接種メス、⑧PBS 接種オス+B 菌液接種メス。合計 102 個体のマダニを用い、合計 4 羽のウサギを用いて吸血試験に供した。</p> <p>産卵に至るまでの日数、卵重量、卵重量と飽血時体重の比を評価したところ、コントロール群 (①および②) と比較して、③群で卵重量と雌飽血時体重の比の低下が見られた。また、卵の一部を取り分け、DNA を抽出し 16S リボソーム RNA 遺伝子をターゲットとした特異的 PCR により <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の感染有無を評価した。その結果、全ての接種群において <i>Spiroplasma</i> 属共生菌の遺伝子は検出されず、両性生殖系フタトゲチマダニにおいては、介卵伝播がみられなかった。</p> <p>以前に行った単為生殖系フタトゲチマダニを用いた <i>Spiroplasma</i> 属共生菌接種試験では、接種菌液中に抗生物質 (ペニシリン・ストレプトマイシン) が含まれていた。その結果、フタトゲチマダニが保有する <i>Coxiella</i> 属細菌の卵への伝播率の低下が観察されるなど、フタトゲチマダニが本来持つ細菌群の攪乱が示唆された。今回の接種菌液中には抗生物質は含まれていなかった。仮説の一つとして、マダニ体内の微生物叢が安定した条件下では、<i>Spiroplasma</i> 属共生菌の外部導入が困難となったことが考えられた。本仮説が正しい場合、投与する抗生物質の種類や量の条件検討することでマダニが保有する微生物叢を操作できる可能性を示すものであり、マダニと微生物の相互関係を解析する上で、優先して取り組む課題を提起したこととなる。また、別の仮説として、単為生殖系と両性生殖系で <i>Spiroplasma</i> 属共生菌に対する感受性が異なり、両性生殖系では <i>Spiroplasma</i> 属共生菌感染に抵抗性をもつことが考えられた。今後、抗生物質不使用条件下において単為生殖系フタトゲチマダニに <i>Spiroplasma</i> 属共生菌を投与する実験を行うことで、両方の仮説を検証する必要がある。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>なし</p>