

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和3年5月27日

採択番号	2020-共同-1		
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	マダニのコア共生細菌の介卵伝播機構の解明		
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	モハメド ムスタファ Mohamed Moustafa	北海道大学大学院獣医学研究院・外国人特別研究員	
	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	
	たや ゆりえ 田谷 友里恵	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・助教	
研究期間	2020年4月1日 ~ 2021年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニは様々な微生物を保有し、その一部は共生体としてマダニの生理活動にとって重要な役割を持つことが認識されつつある。研究代表者らはこれまで、国内外のマダニが保有する微生物叢プロファイルの同定を進め、マダニ集団内で広く維持されているコア共生微生物が存在することを突き止めた。特に、本邦のマダニでは <i>Coxiella</i> および <i>Spiroplasma</i> がコア共生微生物として特定された。これらのコア共生細菌がどの様にしてマダニ集団内で維持・伝播されているのかを理解することは、それぞれの共生菌の役割を知る上で必須である。そこで、本共同研究ではマダニより分離した <i>Spiroplasma</i> を用いて、その水平および垂直伝播様式の解明を目的とした。</p>		
研究経過の概要	<p>1. 所属研究機関での準備 シュルツェマダニ (<i>Ixodes persulcatus</i>) より分離された <i>Spiroplasma</i> 分離株をマダニ細胞 (ISE6) に接種した。培養上清から菌体を精製し、帯広畜産大学実験施設へ持参し実験に用いた。</p> <p>2. 帯広畜産大学での実験 PBS 接種群、<i>Spiroplasma</i> 接種群 (低濃度菌体接種群、高濃度菌体接種群) の3群の比較群を準備した。各群 25 個体のフタゲチマダニ (原虫研累代飼育株) 成ダニに対し、マイクロインジェクションにより PBS または <i>Spiroplasma</i> を接種した。被接種マダニはウサギへの吸血試験に供し、産卵期まで飼育して採卵した。また、吸血前、飽血時、飽血後 2 日、飽血後 4 日に各群のマダニ (それぞれ5個体) を解剖し、卵巣を摘出した。</p> <p>3. 所属研究機関での解析 マダニ卵、産卵後のマダニ、吸血に試験に供したウサギ血液から DNA を抽出し、<i>Spiroplasma</i> の検出を特異的 PCR により試みた。</p>		

研究成果の概要

【マダニ吸血源動物への *Spiroplasma* 伝播について】

*Spiroplasma* を接種したマダニの吸血試験に用いたウサギから血液を採取し DNA を抽出した。*Spiroplasma* 特異的 PCR を用いて試験したが、いずれのウサギ個体からも *Spiroplasma* は検出されなかった。このことから、マダニ吸血を介した吸血源動物への *Spiroplasma* の水平伝播の可能性を示す知見は得られなかった。

【*Spiroplasma* の介卵伝播について】

*Spiroplasma* 接種個体より得られた卵から DNA を抽出し、同様に PCR により *Spiroplasma* の検出を試みたが、試験に供したすべての卵で *Spiroplasma* の伝播が確認できなかった。また、産卵終了後の雌個体より DNA を抽出したが、*Spiroplasma* を検出できなかった。以上のことから、今回用いた *Spiroplasma* 株では、産卵後までに何かの機構でマダニ体内より排除されたことが推察された。

【まとめと今後の方針】

最近の研究代表者らの調査で、本邦の野外で採集されるマダニ 20 種約 700 個体を用いて *Spiroplasma* の保有状況を調べたところ、*Spiroplasma mirum* 近縁種と *Spiroplasma ixodetis* 近縁種の大きく二つのグループが分布することがわかった(図1)。今年度の共同研究では初めて、幅広いマダニ種から検出される *S. ixodetis* 近縁種分離株を用いて接種試験を行った。しかしながら、*S. mirum* 近縁種と同様に、抗生物質無添加条件では *Spiroplasma* の介卵伝播を観察することはできなかった。今後は、抗生物質処理によりマダニ細菌叢を攪乱した後に、*S. ixodetis* 近縁種を接種することで、*S. mirum* 近縁種と同様の知見、すなわち水平伝播した *Spiroplasma* が介卵伝播するかどうかの検証を行いたい。

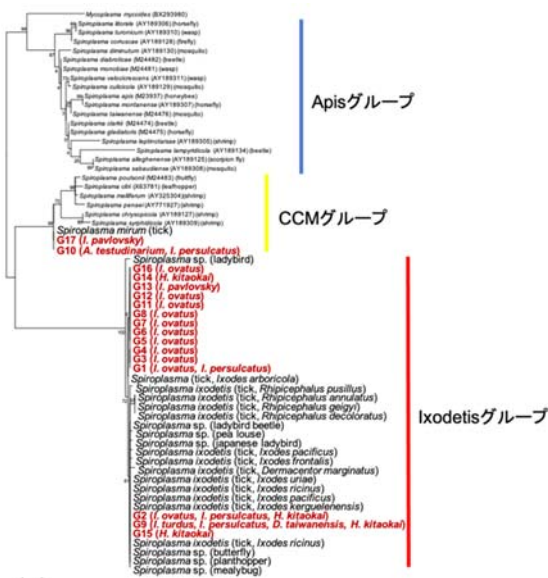


図1. 本邦のマダニから検出される *Spiroplasma* の多様性

表1. これまでの *Spiroplasma* 接種実験に用いた菌株と伝播試験の結果

菌株	抗生物質処理	介卵伝播	幼ダニへの伝播	実施年度
<i>Spiroplasma mirum</i> 近縁株	無	×	×	2018年度共同研究
<i>Spiroplasma mirum</i> 近縁株	有	○	○	2017年度共同研究
<i>Spiroplasma ixodetis</i> 近縁株	無	×	×	2020年度共同研究

一方で、上述の調査では、各マダニ種の *Spiroplasma* 保有率も算出されており、ヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) が約 80% という高い *Spiroplasma* 保有率を有することがわかった。そこで、今後野外で採集したヤマトマダニを用いて、今回の共同研究で計画した介卵伝播機構の解析、すなわち吸血開始直後から経時的にマダニ卵巣を摘出して、FISH 法および遺伝子発現解析により、介卵のタイミングとその機構を明らかにしたい。

研究成果の 発 表	なし
--------------	----