

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

2022年6月10日

採択番号	2021-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	介卵伝播性時における共生菌—マダニ間のクロストーク解析		
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	
	たや ゆりえ 田谷 友里恵	北海道大学大学院国際感染症学院・大学院生	
	おおまえ はるき 大前 日希	北海道大学獣医学部・学部学生	
	しらふじ りか 白藤 梨可	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授	
研究期間	2021年4月1日 ～ 2022年3月31日		
目的・趣旨	<p>マダニは多様な微生物を保有することが知られている。一部の微生物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知されつつある。国内に分布するマダニにおいても、マダニ集団内で広く維持されているコア共生微生物の存在が明らかになり、その役割解明が待たれる。本共同研究では、コア共生微生物の中でも <i>Spiroplasma</i> を研究対象に、マダニ集団内での維持・伝播メカニズムの解明を目的とした。特に、これまでの研究により示唆された、マダニ体内での垂直および水平伝播の可能性について、帯広畜産大学原虫病研究センターのバイオリソースを活用し、検証した。</p>		
研究経過の概要	<p>研究代表者らが過去に分離した、2種類の <i>Spiroplasma</i> 分離株を実験に用いた。<i>Spiroplasma ixodetis</i> (strain 135) は、<i>Ixodes monospinosus</i> からシカダニ細胞 (ISE6) を用いて分離したもので、同細胞を用いて培養し、精製菌体を得た。<i>Spiroplasma mirum</i> (strain Q35) は、<i>Ixodes pavlovsky</i> から ISE6 細胞を用いて分離し、SP4 無細胞培地を用いて菌体の培養を行い、精製菌体を得た。接種実験には、PBS 接種群、抗生物質 (ペニシリン) 接種群、<i>S. ixodetis</i> 接種群 (4 群: 低・高濃度菌体 +/- 抗生物質)、<i>S. mirum</i> 接種群 (4 群: 低・高濃度菌体 +/- 抗生物質添加) の合計 10 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接種実験を行った。接種後マダニは、1週間飼育した後に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。<i>Spiroplasma</i> の伝播確認は、特異的 PCR を用いて実施した。加えて、<i>S. ixodetis</i> の自然感染が認められる <i>Ixodes ovatus</i> を野外採集し、吸血試験に用いた。</p>		

研究成果の概要	<p><b>【Spiroplasma 接種によるマダニへの影響】</b>  2 種の <i>Spiroplasma</i> を接種したフタトゲチマダニの産卵率(卵重量/飽血体重)および幼ダニ孵化率を算出した。PBS コントロール群と比較して、全ての接種群で有意な産卵率および孵化率の低下は認められなかった(表1)。</p> <p><b>【Spiroplasma の卵および幼ダニへの伝播解析】</b>  各飽血マダニが産卵した卵および孵化幼ダニを 10 個体プールして DNA を抽出し、PCR により <i>Spiroplasma</i> の検出を試みた。その結果、<i>S. ixodetis</i> を高濃度 (<math>5 \times 10^{11}</math> 菌体/個体) で接種した群の一部の個体で、卵および幼ダニから <i>Spiroplasma</i> が検出された(表1)。</p> <p style="text-align: center;">表1. <i>Spiroplasma</i> 接種フタトゲチマダニにおける吸血試験の結果</p> <table border="1" data-bbox="443 577 1412 974"> <thead> <tr> <th>接種群</th> <th>平均卵重量/飽血体重</th> <th>平均孵化率</th> <th><i>Spiroplasma</i> 陽性卵</th> <th><i>Spiroplasma</i> 陽性幼ダニ</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PBS</td> <td>45.1</td> <td>84.8</td> <td>0/6</td> <td>0/6</td> </tr> <tr> <td>PBS + penicillin</td> <td>44.9</td> <td>76.4</td> <td>0/7</td> <td>0/7</td> </tr> <tr> <td><i>S. mirum</i> (低濃度)</td> <td>51.1</td> <td>82.4</td> <td>0/7</td> <td>0/7</td> </tr> <tr> <td><i>S. mirum</i> (高濃度)</td> <td>49.2</td> <td>76.7</td> <td>0/7</td> <td>0/7</td> </tr> <tr> <td><i>S. mirum</i> (低濃度) + penicillin</td> <td>50.3</td> <td>66.1</td> <td>0/6</td> <td>0/6</td> </tr> <tr> <td><i>S. mirum</i> (高濃度) + penicillin</td> <td>39.3</td> <td>61.8</td> <td>0/7</td> <td>0/7</td> </tr> <tr> <td><i>S. ixodetis</i> (低濃度)</td> <td>45.9</td> <td>81.7</td> <td>0/7</td> <td>0/7</td> </tr> <tr> <td><i>S. ixodetis</i> (高濃度)</td> <td>38.3</td> <td>71.7</td> <td>2/7</td> <td>2/7</td> </tr> <tr> <td><i>S. ixodetis</i> (低濃度) + penicillin</td> <td>46.6</td> <td>80.4</td> <td>0/6</td> <td>0/6</td> </tr> <tr> <td><i>S. ixodetis</i> (高濃度) + penicillin</td> <td>46.9</td> <td>86.5</td> <td>1/3</td> <td>1/3</td> </tr> </tbody> </table> <p><b>【I. ovatus における Spiroplasma 伝播解析】</b>  過去の研究で高率に <i>S. ixodetis</i> を保有することが知られている <i>I. ovatus</i> を実験的に吸血試験に供し、卵からの <i>Spiroplasma</i> 検出を試みた。その結果、ほぼ 100% の個体で <i>Spiroplasma</i> の伝播が確認された。</p> <p><b>【まとめと考察】</b>  これまでマダニが保有する <i>Spiroplasma</i> がどのように集団内で伝播・維持されているかを調べた報告はない。本共同研究により、<i>Spiroplasma</i> を高率に保有する <i>I. ovatus</i> においては、高確率で垂直伝播が起こることが初めて実験的に証明された。また、<i>S. ixodetis</i> においては、低率ながらフタトゲチマダニへ水平的に伝播しうることが確認された。</p> <p>我々の過去の研究において、国内のマダニが保有する <i>Spiroplasma</i> の遺伝子型を調べたところ、ほとんどの遺伝子型は宿主マダニ種との相関が高く、垂直伝播によって維持されていることが示唆された。一方で、同一の <i>Spiroplasma</i> 遺伝子型が異なるマダニ種間で検出される事例もあり、その要因については不明であった。本共同研究により、<i>Spiroplasma</i> の水平伝播の可能性が示されたことから、自然界における伝播メカニズム解明への糸口となること期待できる。</p> <p><i>Spiroplasma</i> は、一部の節足動物において病原体制御の役割を持つこと等が知られており、本研究成果を基盤にマダニにおけるその機能解析を進めたい。</p>	接種群	平均卵重量/飽血体重	平均孵化率	<i>Spiroplasma</i> 陽性卵	<i>Spiroplasma</i> 陽性幼ダニ	PBS	45.1	84.8	0/6	0/6	PBS + penicillin	44.9	76.4	0/7	0/7	<i>S. mirum</i> (低濃度)	51.1	82.4	0/7	0/7	<i>S. mirum</i> (高濃度)	49.2	76.7	0/7	0/7	<i>S. mirum</i> (低濃度) + penicillin	50.3	66.1	0/6	0/6	<i>S. mirum</i> (高濃度) + penicillin	39.3	61.8	0/7	0/7	<i>S. ixodetis</i> (低濃度)	45.9	81.7	0/7	0/7	<i>S. ixodetis</i> (高濃度)	38.3	71.7	2/7	2/7	<i>S. ixodetis</i> (低濃度) + penicillin	46.6	80.4	0/6	0/6	<i>S. ixodetis</i> (高濃度) + penicillin	46.9	86.5	1/3	1/3
	接種群	平均卵重量/飽血体重	平均孵化率	<i>Spiroplasma</i> 陽性卵	<i>Spiroplasma</i> 陽性幼ダニ																																																			
PBS	45.1	84.8	0/6	0/6																																																				
PBS + penicillin	44.9	76.4	0/7	0/7																																																				
<i>S. mirum</i> (低濃度)	51.1	82.4	0/7	0/7																																																				
<i>S. mirum</i> (高濃度)	49.2	76.7	0/7	0/7																																																				
<i>S. mirum</i> (低濃度) + penicillin	50.3	66.1	0/6	0/6																																																				
<i>S. mirum</i> (高濃度) + penicillin	39.3	61.8	0/7	0/7																																																				
<i>S. ixodetis</i> (低濃度)	45.9	81.7	0/7	0/7																																																				
<i>S. ixodetis</i> (高濃度)	38.3	71.7	2/7	2/7																																																				
<i>S. ixodetis</i> (低濃度) + penicillin	46.6	80.4	0/6	0/6																																																				
<i>S. ixodetis</i> (高濃度) + penicillin	46.9	86.5	1/3	1/3																																																				
研究成果の発表	北海道大学大学院国際感染症学院学位論文 小方昌平 Studies on genetic diversity and transmission dynamics of <i>Spiroplasma</i> in ixodid ticks(マダニにおける <i>Spiroplasma</i> の遺伝的多様性と伝播動態に関する研究)																																																							