

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05804

研究課題名(和文)世界各地に分布するワクモの遺伝子多型解析および抗ワクモワクチン候補分子の探索

研究課題名(英文) Analysis of genetic polymorphism of poultry red mites in the world and search for candidate molecules of anti-mite vaccines

研究代表者

大橋 和彦 (OHASHI, Kazuhiko)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：90250498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：世界各地で養鶏業に大きな被害をもたらす鶏の外部寄生虫であるワクモ (*Dermanyssus gallinae*) の新規防除法として抗ワクモワクチンを開発するために、世界各地でワクモ材料を採取し、ワクチン候補分子として同定したワクモ遺伝子群について多型解析を実施した。そして、同定した分子群について、ワクモの *in vitro* 吸血システムや吸血攻撃試験でその有効性を検証した結果、同定した分子群を用いた抗ワクモワクチンはワクモに対する防御効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ワクモは、世界各地の養鶏場で大きな被害をもたらしているが、その対策は、主に駆虫剤による防除に依存している。しかし薬剤耐性ワクモの出現が数多く報告され、駆虫剤の効果減少や駆虫剤残存による動物衛生環境の悪化などが問題となっており、駆虫剤以外の新規防除法の開発が急務となっている。本研究は、新規防除法としてワクモ分子を標的とした抗ワクモワクチンの可能性を提示したものであり、本研究の成果は、鶏の感染症制御に大きく貢献できると思われる。さらに本研究の手法は、他の外部寄生虫研究分野へも広く応用可能で汎用性が高く、制御困難な種々の外部寄生虫に対する防除法の開発にも大きく貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Poultry red mites (PRMs), *Dermanyssus gallinae*, are blood-sucking ectoparasites of chickens, which cause huge economic losses in the poultry industries worldwide. To establish a new effective control method for PRMs, we have searched for and identified candidate antigens which are not polymorphic among PRMs from different areas in the world to develop anti-PRM vaccines. Several antigens identified in this study showed anti-PRM effects determined by *in vitro* feeding assay using sera from immunized chickens.

研究分野：獣医学

キーワード：ワクモ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) は、鶏など鳥類に寄生する体長 1mm の外部寄生虫で全世界の温帯から寒帯にかけて分布しており、近年、世界各地の近代鶏舎において通年の大量発生により、吸血による養鶏の貧血 (重度寄生で死亡) や削瘦・産卵率低下や汚卵の発生など大きな被害を出している。さらにワクモの寄生は、種々のワクチンの効果低減や、鶏痘ウイルスなどの病原体の媒介にも関与していることや、ヒトでも、皮膚炎やアレルギーを引き起こすことが報告されている。このようにワクモは、養鶏場における衛生管理では、最も重要な防除対象となっており、ワクモ防除対策は産業動物生産のみならず公衆衛生領域においても重要な問題となっている。

ワクモ (成ダニや若ダニ) は、一般に夜間に鶏体上を移動して吸血するが、吸血は短時間であり (約 1 時間以内) 鶏舎内の棲み家では吸血しなくても、(産卵はできないが) 長期間生存できることが報告されており、鶏舎からの防除は困難を極める。現在、鶏舎におけるワクモの防除には、市販の駆虫剤が使用され有効であると考えられてきたが、薬剤耐性ワクモの出現が世界各地で数多く報告され、駆虫剤の効果減少や駆虫剤残存による動物衛生環境の悪化などが問題となっており、駆虫剤以外の新規防除法の開発が急務となっている。

ワクモ防除のひとつの方法として抗ワクモワクチンにより、ワクモの吸血を阻害する方法があるが、前述のとおり、ワクモの吸血時間は非常に短く、吸血時間が比較的長い hard tick の場合に観察される効果は期待できない可能性がある。しかし、ワクモなどダニには吸血時に宿主に放出される暴露型抗原と中腸などダニ体内に存在して暴露されない非暴露型抗原があり、後者の非暴露型抗原の場合、即効性はないが、ワクモの吸血後の生存阻害やワクモの産卵阻害など吸血時間が短いワクモに対しても持続的な防除効果が期待できる。なおこのような効果は既に他の hard tick に対するワクチンでも報告されている。しかし、抗ワクモワクチン候補抗原などワクモ由来分子に関する情報は、申請者らが実施している EST 解析による発現分子の同定など、ごく少数であり、あまり研究が進展していない。また世界各地に分布するワクモ間で種々の遺伝子に多型が存在するかどうかとも判明しておらず、抗ワクモワクチンに使用可能な抗原の選抜が困難となっている。以上より、抗ワクモワクチン候補分子や薬剤耐性に関わる分子群を探索・同定してその性状を解析して、さらにそれら因子の遺伝子多型の有無等を確認することは、世界各国など、より広い地域で効果的な新規ワクモ防除法を開発するための研究基盤を確立する上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

ワクモの新規防除法の樹立を目指して、抗ワクモワクチンを開発するために、世界各地でワクモ材料を採取して、申請者らの発現遺伝子 (expressed sequence tags, EST) 解析の成果をもとに選抜したワクモ遺伝子群 (フェリチン 2 (FER2) など) について、その遺伝子の多型解析を実施して、世界各地で存在するワクモ間で保存性が高い抗ワクモワクチン候補分子の探索・同定を行う。そして、同定したワクモ分子群について、組換え抗原を調製して抗ワクモワクチンを試作して、その有効性 (ワクモに対する致死効果などの防御能) を *in vitro* 吸血システムを用いて検証する。またワクモに対する直接的な致死効果がより期待できるワクモ中腸細胞膜上に発現する新規抗原などを探索して、多型解析や防御効果等を解析する。

3. 研究の方法

これまで当研究室で実施したワクモ遺伝子の EST 解析により、既に種々の抗ワクモワクチンの候補抗原やワクモの薬剤耐性に関わる因子の遺伝子が同定されている。またこれらのいくつかは、既にワクモ吸血鶏由来の血清と反応することやワクモ中腸などで発現していることが示されている。そこで本研究では、ワクチン抗原候補因子として、多くのダニ種で保存性が高い分子である鉄輸送タンパク質フェリチン 2 (FER2) に注目して検討を行った。ワクモ cDNA 試料からマダニのフェリチン 2 遺伝子の配列を参考に RACE 法により *DgFER2* 遺伝子の同定を行った。そしてブレビパチルス発現系を用いて組換え *DgFER2* を作成して鶏に免疫して抗血清を得た。その血漿を含む血液を *in vitro* 吸血システムによりワクモ群に吸血させ、2 週間生死判定を行い、ワクチンとしての抗ワクモ効果の検討を行った。なお、既に我々が同定したワクチン候補抗原であるカテプシン L2 (*DgCatL2*) との併用効果についても、鶏に対するワクモの攻撃実験系を用いて抗ワクモ効果を検討した (ワクチノーバ株式会社種子野博士の協力のもと)。さらに新規抗ワクモワクチン候補分子の探索を実施し、ワクモの中腸に発現する分子 (非暴露型抗原) を同定した。同定した分子を組換え体として調製し、鶏に免疫することで抗血清を作成した。そしてこの抗血清のワクモに対する防除効果を *in vitro* 吸血システムで解析した。

次に今回同定したワクチン候補分子の遺伝子多型の有無を検討するため、国内及びアジア (ミャンマー) や欧州 (ドイツなど) において分布するワクモの材料を採取して、その性状解析を行った。各地の養鶏場で外部寄生虫を採取し、その形態や actin 遺伝子等の系統樹解析によりワクモを同定した。そして採取したワクモ材料よりゲノム試料を調製して、同定したワクチン

抗原候補因子における遺伝子多型解析を行った。なお、ミャンマーでは、ミャンマー国内における病原体の分布状況に不明な点が多いため、各地の養鶏場における鶏の代表的な病原体の疫学調査も併せて実施した。

4. 研究成果

(1) 同定したワクモ因子の抗ワクモ効果の検討

本試験では、ワクモの新規防除法の樹立のために、抗ワクモワクチンの開発を目指してワクモ由来ワクチン候補抗原の探索を行った。これまでも、ワクチンの候補抗原としていくつかのワクモ由来を同定してきたが、今回は、ワクチン抗原候補因子として、マダニ等の多くのダニ種で保存性が高い分子である鉄輸送タンパク質フェリチン 2(FER2)に注目し検討を行った。ワクモ cDNA からマダニのフェリチン 2 遺伝子の配列を参考に 5' -及び 3' -RACE 法によりワクモフェリチン 2 (DgFER2) 遺伝子を同定した。DgFER2 遺伝子の RT-PCR 法にて、ワクモ器官別、発育ステージ別及び吸血状態別の発現解析を行ったところ、吸血を行う各発育ステージにおいて DgFER2 遺伝子の発現が確認され、各器官別の解析では中腸においてその発現が確認された。次に、同定した遺伝子配列を基に組換え DgFER2 タンパク質を調製して、フェリチンとしての機能解析を行った結果、組換え DgFER2 は、鉄イオンとの結合能を有することが確認された。次に DgFER2 の抗ワクモワクチンへの応用を検討するために、調製した組換え DgFER2 を鶏に免疫して抗 DgFER2 抗体を含む免疫血漿を作成した。そしてこの免疫血漿を含む血液を *in vitro* 吸血システムによりワクモに吸血させて、2 週間、経時的に吸血したワクモの生死判定を行いワクチン効果の検討を行った。その結果、対照群に比べて、免疫血漿を吸血させたワクモ群において死亡率の上昇傾向が観察された。以上の結果より、今回同定した DgFER2 は抗ワクモワクチンに応用可能な有用な候補抗原となることが示唆された。

さらに、これまでに我々がワクチン候補抗原として同定したワクモ由来因子であるカテプシン L2(DgCatL2) との併用(カクテルワクチンへの応用を目指して)による抗ワクモ効果を *in vitro* 吸血システム及び鶏に対するワクモ実験攻撃系を用いて検討した。その結果、併用群(DgFER2+DgCatL2)では、単独投与群や対照群に比べて、より顕著な吸血阻止効果が観察され、生存するワクモ個体数の減少や産卵率の低下も観察された。以上の結果より、これらの分子がワクモの防除において、抗ワクモワクチンの有用な候補抗原となることが示唆された。これらの因子が汎用性のあるワクチン候補抗原となりうるかについて、世界各地に生存するワクモ材料を用いて検討する必要があると思われる。

(2) 海外におけるワクモ材料の採取・多型解析および吸血性外部寄生虫の疫学調査

今回同定したワクチン候補分子の遺伝子多型の有無を検討するため、アジアにおけるワクモの材料採取および性状解析を行った。ミャンマー国内の主要 4 都市計 29 ヶ所の養鶏場で外部寄生虫を採取し、その形態や *actin* 遺伝子等の系統樹解析によりワクモの同定を試みた。その結果、何カ所かの養鶏場にて外部寄生虫を採取した。そして形態学的検索や *actin* 遺伝子や *COI* (*Cytochrome c oxidase I*) 遺伝子を用いた系統樹解析より、採取した外部寄生虫は、ワクモやトリサダニ (*Ornithonyssus sylviarum*) とは異なることが判明した。さらに詳細な解析の結果、今回採取した外部寄生虫は、ミナミトリサダニ (*Ornithonyssus bursa*)、あるいはその近縁種であることが示され、ミャンマー国ではこの種が優位に分布していることが示唆された。

そこで次に日本国内およびヨーロッパに分布するワクモによる検討を実施するためにドイツの養鶏場においてワクモを採取し、これまでの試験でワクチンとしての有効性が示されたフェリチン 2 (DgFER2) 及びカテプシン L2 (DgCatL2) について多型解析を実施した。その結果、いずれの分子にも大きな遺伝子多型は認められなかったため、同定したこれらの分子はワクチン抗原候補因子として有用であることが示唆された。

また、ミャンマー国では、各養鶏場において、総排泄腔スワブや血液等の生体試料を採取して、鶏の主要病原体の疫学調査も実施した。その結果、呼吸器病を引き起こすウイルス群、サルモネラ菌やマイコプラズマ菌等が検出された (Fijisawa *et al.*, 論文投稿中)。今後より詳細な解析が必要であると思われる。

(3) 抗ワクモワクチンの開発に向けた新規分子の探索

本研究では、フェリチン 2 (DgFER2) やカテプシン L2 (DgCatL2) が抗ワクモワクチンの候補分子として有効であることが示された。しかし、より防御効果を期待できるワクチン候補分子を探索することも重要であり、非暴露型抗原として効果が期待できるワクモ中腸(吸血した血液の消化に参与する)細胞膜上に発現する分子の探索・同定を行った。その結果、ワクモの中腸細胞膜上に発現が予想される分子として、Adipocyte plasma membrane-associated protein (APMAP) を同定した。次に APMAP 遺伝子の発現をワクモの器官別、吸血を行う発育ステージ別及び吸血状態別(吸血前後)に解析した結果、APMAP 遺伝子は中腸で発現すること、吸血を行う全発育ステ

ージで、吸血の有無に関係なく恒常的に発現していることが示され、抗ワクモワクチンの候補分子として有用であることが示唆された。そこで、この分子を組換え体として調製し、鶏に免疫することで抗血清（血漿）を作成した。得られた免疫血漿を含む鶏血液を再構築して in vitro 吸血システムを用いてワクモに吸血させて、その傷害効果を検討した。その結果、免疫血漿を吸血させたワクモにおいて、生存率の有意な低下が観察され、APMAP が抗ワクモワクチン候補分子となる可能性が示された。今後、本研究で採取した国内及び国外試料を用いて、遺伝子多型などを詳細に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

Della Noce, B., Carvalho Uhl, M.V., Machado, J., Waltero, C.F., de Abreu, L.A., da Silva, R.M., da Fonseca, R.N., de Barros, C.M., Sabadin, G., Konnai, S., da Silva Vaz, I. Jr, Ohashi, K., and Logullo, C. 2019. Carbohydrate metabolic compensation coupled to high tolerance to oxidative stress in ticks. *Sci. Rep.* 9: 4753. 査読有, DOI:10.1038/s41598-019-41036-0.

Fujisawa, S., Konnai, S., Okagawa, T., Maekawa, N., Tanaka, A., Suzuki, Y., Murata, S., and Ohashi, K. 2019. Effects of bovine tumor necrosis factor alpha decoy receptors on cell death and inflammatory cytokine kinetics: potential for bovine inflammation therapy. *BMC Vet. Res.* 15:68. 査読有, DOI:10.1186/s12917-019-1813-0.

Sajiki, Y., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Maekawa, N., Goto, S., Ikebuchi, R., Nagata, R., Kawaji, S., Kagawa, Y., Yamada, S., Kato, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S., Mori, Y., and Ohashi, K. 2018. Prostaglandin E₂ induction suppresses the Th1 immune responses in cattle with Johne's disease. *Infect. Immun.* 86: e00910-17. 査読有, DOI:10.1128/IAI.00910-17.

Seixas, A., Alzugaray, M.F., Tirloni, L., Parizi, L.F., Pinto, A.F.M., Githaka, N.W., Konnai, S., Ohashi, K., Yates Iii, J.R., Termignoni, C., and da Silva Vaz, I. Jr. 2018. Expression profile of *Rhipicephalus microplus* vitellogenin receptor during oogenesis. *Ticks Tick Borne Dis.* 9: 72-81. 査読有, DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.10.006.

Maekawa, N., Konnai, S., Balbin, M.M., Mingala, C.N., Gicana, K.R.B., Bernardo, F.A.E.M., Murata, S., and Ohashi, K. 2018. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Ehrlichia canis* in a Philippine dog. *Ticks Tick Borne Dis.* 9: 266-269. 査読有, DOI:10.1016/j.ttbdis.2017.09.012.

Machida, A., Murata, S., Matsuyama-Kato, A., Isezaki, M., Taneno, A., Sakai, E., Konnai, S., and Ohashi, K. 2017. Isolation and purification of *Gallid herpesvirus 2* strains currently distributed in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 115-122. 査読有, DOI:10.1292/jvms.16-0329.

Rangel, C.K., Parizi, L.F., Sabadin, G.A., Costa, E.P., Romeiro, N.C., Isezaki, M., Githaka, N.W., Seixas, A., Logullo, C., Konnai, S., Ohashi, K., and da Silva Vaz, I. Jr. 2017. Molecular and structural characterization of novel cystatins from the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Ticks Tick Borne Dis.* 8: 432-441. 査読有, DOI:10.1016/j.ttbdis.2017.01.007.

Costa, E.P., Façanha, A.R., Cruz, C.S., Silva, J.N., Machado, J.A., Carvalho, G.M., Fernandes, M.R., Martins, R., Campos, E., Romeiro, N.C., Githaka, N.W., Konnai, S., Ohashi, K., Vaz, I.S. Jr, and Logullo, C. 2017. A novel mechanism of functional cooperativity regulation by thiol redox status in a dimeric inorganic pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861: 2922-2933. 査読有, DOI:10.1016/j.bbagen.2016.09.017.

Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Murata, S., and Ohashi, K. 2017. Molecular epidemiological survey and genetic characterization of *Anaplasma* species in Mongolian livestock. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 17: 539-549. 査読有, DOI:10.1089/vbz.2017.2111.

Sharav, T., Konnai, S., Ochirkhuu, N., Ts, E.O., Mekata, H., Sakoda, Y., Umemura, T., Murata, S., Chultemdorj, T., and Ohashi, K. 2017. Detection and molecular characterization of equine infectious anemia virus in Mongolian horses. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 1884-1888. 査読有, DOI:10.1292/jvms.17-0202.

Ochirkhuu, N., Konnai, S., Odbileg, R., Murata, S., and Ohashi, K. 2017. Molecular epidemiological survey and genetic characterization of ovine gammaherpesvirus-2 in

Mongolian livestock. *J. Vet. Med. Sci.* 79: 2040-2042. 査読有,
DOI:10.1292/jvms.17-0203.

Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Kato, Y., Murata, S., and Ohashi, K. 2016. Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine oral melanoma. *PLoS One*. 11: e0157176. 査読有,
DOI:10.1371/journal.pone.0157176.

Okagawa, T., Konnai, S., Deringer, J.R., Ueti, M.W., Scoles, G.A., Murata, S., Ohashi, K., and Brown, W.C. 2016. Cooperation of PD-1 and LAG-3 contributes to T-cell exhaustion in *Anaplasma marginale*-infected cattle. *Infect. Immun.* 84: 2779-2790. 査読有, DOI:10.1128/IAI.00278-16.

〔学会発表〕(計7件)

Murata, S., Takehara, M., Katakura, K., Hmoon, M.M., Win, S.Y., Isezaki, M., Konnai, S., and Ohashi, K. Molecular detection of Marek's disease virus in poultry farms in Myanmar. The 12th International Symposium on Marek's disease and Avian Herpesviruses 揚州大学(中国) 2018年

竹原昌生、村田史郎、片倉賢、Hmoon M.M.、Win S.Y.、Bawm S.、Htun L.L.、Aung Y.H.、Win M. M.、伊勢崎政美、今内覚、大橋和彦。ミャンマー連邦共和国における鶏の吸血性外部寄生虫の分布状況調査。第161回 日本獣医学会学術集会 つくば国際会議場(茨城) 2018年

大橋和彦、村田史郎、町田柚香、伊勢崎政美、今内覚。マレック病ウイルスの病原性進化機構の解明-病原性試験や全ゲノム解析の試み。第161回 日本獣医学会学術集会 つくば国際会議場(茨城)、2018年

青山珠里愛、村田史郎、伊勢崎政美、種子野章、酒井英史、今内覚、大橋和彦。マレック病ウイルス弱毒株を用いた新規抗ワクモワクチン開発に向けた基礎研究。第160回 日本獣医学会学術集会 鹿児島大学(鹿児島)、2017年

村田史郎、種子野章、酒井英史、町田柚香、松山あゆ美、伊勢崎政美、今内覚、大橋和彦。日本に分布するマレック病ウイルス野外株の病原性の検討。第160回 日本獣医学会学術集会 鹿児島大学(鹿児島)、2017年

伊勢崎政美、村田史郎、酒井英史、矢吹卓也、種子野章、市居修、伊東拓也、今内覚、大橋和彦。抗ワクモ(*Dermyssus gallinae*)ワクチン開発に向けたワクモ由来フェリチン2の性状解析。第159回 日本獣医学会学術集会 日本大学(藤沢)、2016年

村田史郎、町田柚香、伊勢崎政美、今内覚、大橋和彦。マレック病ウイルス日本分離株の全ゲノム解析。第159回 日本獣医学会学術集会 日本大学(藤沢)、2016年

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Method for controlling red mites and proteins used therein.

発明者: Ohashi, K., Murata, S., Isezaki, M., Konnai, S., Taniguchi, A., Hojoh, T.

権利者: 同上

種類: 特許

番号: EP15800403.6

出願年: 2016年

国内外の別: 国際(EU)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 今内 覚

ローマ字氏名:(KONNAI, Satoru)

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 大学院獣医学研究院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 40396304

研究分担者氏名: 村田 史郎

ローマ字氏名:(MURATA, Shiro)

所属研究機関名: 北海道大学

部局名：大学院獣医学研究院

職名：助教

研究者番号(8桁)：10579163