

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15990

研究課題名（和文）日本産マダニにおける完全な人工吸血系の確立とマダニ吸血機構解析への応用

研究課題名（英文）Establishment of complete artificial blood-feeding system on Japanese ticks and application of the established system to analysis of tick blood-feeding mechanism

研究代表者

草木迫 浩大（Kusakisako, Kodai）

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：10838220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,600,000円

研究成果の概要（和文）：日本産マダニを用いた完全な人工吸血系確立のための基盤的な研究を行った。まず、人工吸血系が確立されている海外産マダニの人工吸血装置を使用し、日本産マダニの人工吸血を試みたが、吸血に至らなかった。そこで、確立されている人工吸血装置を日本産マダニに適応するために、人工膜ならびに動物被毛由来マダニ誘引物質の検討を行った。その結果、日本産マダニの人工吸血装置への適応に耐えうると考えられる人工膜の作製に成功した。また、吸血行動を誘発する動物被毛由来抽出物を実験動物や家畜、野生動物より抽出・検討したところ、全ての抽出物においてマダニの宿主探索行動を誘発し、日本産マダニを活性化する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダニは、すべての発育期で吸血を必要とする偏性吸血性節足動物で、吸血に際して様々な病原体をヒトや動物に伝播し、その健康を脅かし、甚大な被害を及ぼしている。このため、マダニの防圧法の確立は重要な課題である。そこで、マダニの効率的な防圧法を検討するために、マダニと宿主または病原体間の相互関係を個別に解析可能な人工吸血系の確立が重要と考えた。これまでの報告で、日本に存在するマダニ種はチマダニ属マダニが優勢種であり、本マダニの半人工吸血系は開発されたが、完全な人工吸血系はいまだ確立していない。そこで、日本におけるマダニの優勢種であるチマダニ属マダニの完全な人工吸血系を確立のための基盤的な研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Fundamental research was conducted to establish a complete artificial blood-feeding system on Japanese ticks. First, an artificial blood-feeding system on ticks in overseas, where the system had already been established, was attempted to Japanese ticks, but they did not blood-feed on the system. Therefore, in order to adapt the established artificial blood-feeding system in overseas to Japanese ticks, some artificial membranes were tried to prepare adjust to Japanese ticks and their stimulants which will induce tick blood-feeding behavior were investigated. As a result, producing artificial membranes succeeded that could be adapted to the artificial blood-feeding system for Japanese ticks. In addition, tick stimulants extracted from animal hairs of a laboratory animal, a livestock, and wild animals were examined for their ability to induce blood-feeding behavior of Japanese ticks.

研究分野：寄生虫学

キーワード：マダニ 人工吸血 人工膜 動物被毛由来マダニ誘引物質

1. 研究開始当初の背景

マダニは、すべての発育期で吸血を必要とする偏性吸血性節足動物である。マダニは、吸血に際し、ウイルス・細菌・原虫といった様々な病原体をヒトや動物に媒介し、その健康を脅かし、甚大な被害を及ぼしている。近年、重症熱性血小板減少症候群やダニ媒介性脳炎といったマダニ媒介性感染症による国内でのヒトの死亡例も報告されている。このため、マダニの防圧法の確立は重要な課題である。

そこで、マダニの効率的な防圧法を検討する際に大きな問題となるのが、マダニの生活史に由来する要因が解析を複雑化することがあげられる。つまり、マダニは脊椎動物宿主を吸血するため、宿主側の因子がマダニ体内に流入し、マダニは病原体を媒介するため病原体感染に反応する因子も体内に存在し、前述の要因を合わせたマダニ体内での三者間の相互作用が存在する。このため、マダニと宿主または病原体間の相互関係を個別に解析可能な手法が必要と考えた。

2. 研究の目的

前述の解析法を確立するために効率的な方法として、マダニの人工吸血系を用いた実験手法が有効である。これまでの報告で、日本に存在するマダニ種はチマダニ属マダニが優勢種であり、本マダニの半人工吸血系(Hatta et al., 2012)は近年開発されたが、完全な人工吸血系はいまだ確立していない。完全な人工吸血系の利点は、半人工吸血系に比べ、宿主因子の影響を受けず、実験動物の使用数を減らすことができ、マダニの回収効率が良いことである。また、チマダニ属を除く他のマダニ種において、完全な人工吸血系が確立され、マダニと宿主由来因子や病原体由来因子との相互作用の詳細な解析が盛んに行われている(Hart et al., 2018; Koci et al., 2018)。そこで、日本におけるマダニの優勢種であるチマダニ属マダニの完全な人工吸血系を確立のための基盤的な研究を行った。

3. 研究の方法

(1)海外産マダニの人工吸血に用いられている装置を使用した日本産マダニの人工吸血実験

海外産マダニで人工吸血実験を行っているドイツ・ベルリン自由大学の Ard Nijhof 博士に海外産マダニを用いた人工吸血技術の教授を受け、海外産マダニ式人工吸血装置を用いて日本産マダニを使用した人工吸血実験を行った。日本産マダニの優勢種であるフタトゲチマダニならびに海外産マダニで人工吸血法が確立しているマダニ属と同属の日本産マダニであるヤマトマダニの雌成ダニを実験に供した。吸血装置は、ベルリン自由大学で作製したものをを使用した。6穴プレートに0.1M ATPを添加したウシ血液を分注し、その上に吸血装置を設置した。ATP添加ウシ血液は24時間毎に交換した。吸血装置に接着した人工シリコン膜の厚さは、フタトゲチマダニ用で10 μm、ヤマトマダニ用で80 μmのものをそれぞれ使用した。マダニが接着する膜面には牛の被毛由来の抽出物を塗布し、マダニの吸血行動誘引物質として用いた。マダニを装置内に入れ、37 °C・相対湿度 90%・明/暗= 16時間/8時間の条件下で吸血実験を行った。

(2)日本産マダニにおける人工吸血法確立のための人工膜の検討

(1)で教授された材料、特に人工膜の作製に必須のシリコン剤は日本では取り扱いが無いことが判明したため、代替品として日本で入手可能なシリコン剤を用いて人工膜の検討を行った。また、人工膜作製の際、海外産マダニ用の人工吸血装置で使用されるレンズクリーンペーパー(LCP)またはゴールドピーターズスキン(GBS、ウシの腸管を叩いて展ばしたものを)を基本素材として、この素材にシリコン剤を混和したシリコンミックスを薄く伸ばして塗布し、人工膜を試作した。また、GBSを用いた人工膜を5枚、LCPのものを6枚それぞれ用意した。人工膜の厚さを測定するために人工膜[5 cm (縦)×15 cm (横)]を縦に2等分・横を3等分し、6箇所を測定した。

(3)日本産マダニにおけるマダニ誘引物質の検討

人工吸血を効率的に行うために重要なマダニの吸血行動を誘発する動物被毛からの抽出物の検討を行った。動物被毛はマウス、ウシ、ツキノワグマ、ヒグマの4種類を用いた。抽出はMcMahon et al., 2003を参考にし、Dichloromethane (DCM)を用いて行った。動物被毛よりのマダニ誘引物質の抽出は論文の手順に従って行った。動物被毛由来抽出物50 μlを一辺が1.5 cmの正方形に裁断したろ紙に添加し、1分間風乾した。その後、ろ紙を直径9cmの円形シャーレの隅に設置し、3分間静置した。静置したろ紙の反対の隅に日本におけるマダニの実験室継代株であるフタトゲチマダニの雌成ダニを3匹置き、2分間測定してシャーレの中央よりろ紙側に寄ったマダニの数をカウントした。マダニは5分間のインターバルを置き、全ての動物被毛由来抽出物について同一のマダニ3匹について観察を行った。また、陰性対照として抽出に用いたDCMを使用した。

4. 研究成果

(1) 海外産マダニの人工吸血に用いられている装置を使用した日本産マダニの人工吸血実験

海外産マダニで使用される人工吸血装置でフタトゲチマダニならびにヤマトマダニの雌成ダニを吸血させたところ、10日間実験を継続したがどちらのマダニも吸血には至らず、人工膜への誘引・固着も起こらなかった(図1)。以上の結果から、日本産マダニの吸血行動誘発物質の検討が必須であると考えられた。また、実際にマダニを用いた人工吸血実験を行ったことで人工吸血実験におけるいくつかの改良点も見出された。

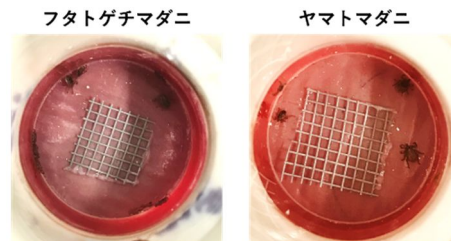


図1. 海外産マダニ用人工吸血装置を使用した日本産マダニ人工吸血の開始後10日目の様子

(2) 日本産マダニにおける人工吸血法確立のための人工膜の検討

日本で利用可能なシリコン剤を使用して人工膜の作製を試みたところ、LCPを膜素材として使用した場合は平均 $164 \pm 31 \mu\text{m}$ ($111-266 \mu\text{m}$)の厚さであり、GBSの場合は平均 $64 \pm 21 \mu\text{m}$ ($33-106 \mu\text{m}$)であった(図2ならびに表1)。海外産マダニの人工吸血装置で用いられる人工膜の厚さが $80-120 \mu\text{m}$ であることならびに日本産マダニが吸血に際して使用する口器の長さが海外産マダニに比べ短いことから、GBSを基本素材として作製した人工膜は日本産マダニを用いた人工吸血用の人工膜として有用であると考えられた。一方、今回用いたLCPは素材の厚さが厚かったことが推察されたため、LCPの素材自体についても検討の余地があると考えられた。



図2. 作製した人工膜の厚さ測定箇所

表1. 作製した人工膜の各測定箇所における厚さの検討

膜素材	人工膜 No.	人工膜の厚さの測定箇所 / 厚さ (mm)						平均	標準偏差
		①	②	③	④	⑤	⑥		
Lens clean paper (LCP)	1	0.156	0.175	0.18	0.17	0.16	0.157	0.164	0.031
	2	0.111	0.127	0.128	0.229	0.143	0.167		
	3	0.179	0.142	0.154	0.266	0.215	0.183		
	4	0.155	0.155	0.166	0.185	0.179	0.169		
	5	0.194	0.158	0.193	0.168	0.144	0.136		
	6	0.176	0.139	0.152	0.135	0.131	0.128		
Goldbeaters skin (GBS)	1	0.046	0.049	0.076	0.058	0.055	0.042	0.064	0.021
	2	0.044	0.037	0.033	0.071	0.061	0.106		
	3	0.060	0.086	0.097	0.095	0.056	0.061		
	4	0.062	0.073	0.057	0.065	0.048	0.041		
	5	0.088	0.093	0.103	0.041	0.057	0.053		

LCPならびにGBSを用いてそれぞれ6枚ならびに5枚ずつ人工膜を作製し、人工膜の厚さを測定した。平均ならびに標準偏差は全ての人工膜ならびに測定箇所の厚さより算出した。

(3) 日本産マダニにおけるマダニ誘引物質の検討

日本産マダニを用いた人工吸血系を確立するために重要なマダニ吸血行動誘引物質の検討を行った。動物被毛由来抽出物の全てにおいてマダニの誘引が観察され、特にウシの被毛由来抽出物においては3匹中2匹のマダニの誘引が観察された(表2ならびに図3)。また、陰性対照ではマダニの宿主探索行動は観察されなかったが、動物被毛由来抽出物に対しては全ての群で宿主探索行動が確認された。以上の結果から、日本産マダニはツキノワグマやヒグマといった日本の野生動物や家畜であるウシ、実験動物であるマウスの被毛由来抽出物に誘引され、特にウシの被毛由来抽出物に強い反応を示すことが明らかとなった。

表2. 日本産マダニを用いたマダニ吸血行動誘引物質の検討

由来動物	DCM	マウス	牛	ツキノワグマ	ヒグマ
マダニ数	3	3	3	3	3
誘引数	0	1	2	1	1
誘引率 (%)	0	33	67	33	33

DCM (Dichloromethane) は陰性対照として使用した。使用したマダニ3匹は全ての抽出物において同一の3匹を使用した。

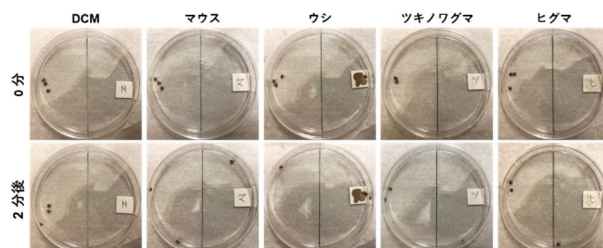


図3. 日本産マダニにおけるマダニ吸血行動誘引物質の検討

これまでの研究により、日本産マダニを用いた完全な人工吸血系の確立に向け、基礎的なデータを収集できたと考える。今後、これらのデータを集約し、本研究課題の達成につなげる。

参考文献

- Hart T., Yang X., Pal U., Lin YP. 2018. Identification of Lyme borreliae proteins promoting vertebrate host blood-specific spirochete survival in *Ixodes scapularis* nymphs using artificial feeding chambers. *Ticks Tick Borne Dis.* No.9, Vol.5, pp. 1057-1063.
- Hatta T., Miyoshi T., Matsubayashi M., Islam M.K., Alim M.A., Anisuzzaman, Yamaji K., Fujisaki K., Tsuji N. 2012. Semi-artificial mouse skin membrane feeding technique for adult tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Parasit. Vectors* No.5, pp. 263.
- Koci J., Bernard Q., Yang X., Pal U. 2018. *Borrelia burgdorferi* surface protein Lmp1 facilitates pathogen dissemination through ticks as studied by an artificial membrane feeding system. *Sci. Rep.* No.8, Vol.1, pp. 1910.
- McMahon C., Kröber T., Guerin P.M. 2003. *In vitro* assays for repellents and deterrents for ticks: differing effects of products when tested with attractant or arrestment stimuli. *Med. Vet. Entomol.* No.17, Vol.4, pp. 370-378.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 草木迫浩大、中尾亮
2. 発表標題 日本産マダニを用いた人工吸血系の検討
3. 学会等名 第27回ダニと疾患のインターフェイスに関するセミナー（SADI2019）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------