

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04641

研究課題名(和文) ケニアとウガンダにおける殺ダニ剤抵抗性マダニの分布調査と迅速検査法の開発

研究課題名(英文) Survey and development of rapid test for acaricide resistance in ticks in Kenya and Uganda

研究代表者

八田 岳士 (Hatta, Takeshi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00455304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：アフリカ地域の畜産経済振興において、ウシマダニ亜属の *Rhipicephalus decoloratus* の吸血とマダニ媒介感染症の蔓延は、重大な障害となっている。本研究では、殺ダニ剤に依拠した従来のマダニ駆除プロトコールの問題点である殺ダニ剤抵抗性形質診断手法の迅速化技術の開発を図るものである。特にホルムアミジン系殺ダニ剤であるアミトラスの標的分子オクトパミン受容体をコードする遺伝子の変異に着目し解析を行った。SNP解析の結果、少なくとも3か所以上のアミノ酸置換を伴う変異を見出し、cAMP解析においても野生型と比べて高値を示すSNP変異を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

殺ダニ剤抵抗性を有する *Rhipicephalus decoloratus* は、アフリカ地域優占種ということもあり、遺伝子情報が不足している。殺ダニ剤抵抗性の診断は従来の虫体を使用した暴露試験で行われているが、これに代替する遺伝子診断手法が希求されている。本研究結果は、殺ダニ剤アミトラスの抵抗性形質に関与する遺伝子のSNP検出法の開発に寄与するものであり、学術的にも社会的にもインパクトの大きい成果といえる。

研究成果の概要(英文)：In the promotion of livestock economy in the African region, the blood-feeding of *Rhipicephalus decoloratus* and the spread of tick-borne infection are serious obstacles. This study aims to develop a rapid technique for diagnosing acaricide-resistance in tick, which will solve the problem of conventional diagnostic bioassay protocols. In particular, this study was performed focusing on the mutation of the octopamine receptor gene encoding the target molecule of amitraz, a formamidine-based acaricide. As a result of SNP analysis, so far, we found at least 3 SNPs with amino acid substitutions, and succeeded in finding one SNP mutation conferring higher production of cAMP than that of wild type in cAMP analysis.

研究分野：分子ベクター学

キーワード：R. decoloratus 殺ダニ剤抵抗性 ケニア ウガンダ amitraz octopamine receptor SNP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マダニはヒト以外の動物では最も重要な感染症媒介者で、ヒトでも蚊に次いで重要な吸血性節足動物である。そのため、畜産振興上の最重要課題は世界各国でマダニとマダニ媒介性疾病被害の防除に向けられている。アフリカ大陸において重要なマダニ *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* (Rd) と *R. appendiculatus* (Ra) (図1) は、通年野外で認められることが多く、いずれも致死性の家畜伝染病であるピロプラズマ症を家畜に伝播するベクターであり、近年になって有機リン系(OP)、ピレスロイド系(SP)、アミトラス(Amt)の殺ダニ剤に抵抗性を獲得したマダニ種が顕在化している。さらに抵抗性マダニが常在している地域では、ピロプラズマ病やアナプラズマ病等のマダニ媒介感染症の有病率が高く、薬剤抵抗性マダニの制圧は、医学・獣医学・畜産学における喫緊の課題といえる。しかし、オーストラリアや南米などの畜産大国で分布しているマダニ種がアフリカ固有種とは別種であることから、世界的にも顧みられておらず、アフリカの殆どの国では未だに正確な分布調査や有効な対策がなされていない。

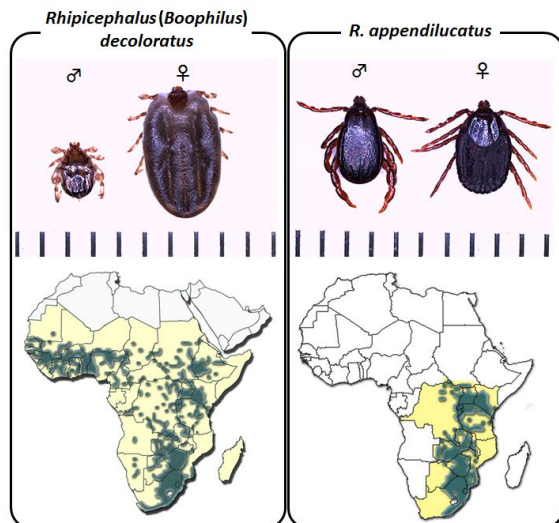


図1 アフリカ大陸における重要なマダニ種とその分布国(淡色)と地域(濃色)

両種ともに、家畜伝染病ピロプラズマ症のベクターであり、多くの地域で殺ダニ剤に対する抵抗性が顕在化している。

2. 研究の目的

アフリカ地域の畜産経済振興において最大の障害は感染症による家畜の損耗である。とりわけマダニ媒介感染症による飼養家畜の集団感染ならびに斃死は、経済的損失を引き起し、飼養家畜の体表上で吸血により日々大きくなるマダニを、苦々しく手ずから抜去している畜主にとっては、精神的徒労感が最も大きい重大な事故の一つである。本研究は、アフリカ中東部において顕在している殺ダニ剤抵抗性マダニの抜本的対策技術の確立を企図し、以てマダニ媒介感染症による家畜の集団事故の予防対策に資することを目的とし、ケニア・ウガンダなどアフリカを対象とした殺ダニ剤抵抗性マダニの分布調査を行い、既存の薬剤感受性試験に替わる簡便な検査技術開発の方向性を明らかにするため、抵抗性形質獲得メカニズムの分子生物学的解析、および迅速診断法の開発と現地調査への試行・応用を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) マダニのサンプリング: 海外研究協力者らとともに、各地域農場へ向かいサンプルを取得した。

採集マダニは、ナイロビ大学 Dr. Odongo および Dr. Aboge の研究室へと持ち帰られた。Dr. Odongo、Dr. Muinde 両名の協力のもと約 1.5 か月の間湿潤箱にて産卵させ、孵化した幼ダニを回収した。Bioassay (Larval Packet Test, LPT)により、既存殺ダニ剤暴露条件下での生存率を解析した。Dr. Aboge によって余剰幼ダニから、核酸 (Genome DNA 及び Total RNA) を抽出し、日本へと持ち帰った。さらに、ガーナ大学野口記念研究所 NMIMR にて Dr. Dadzie、Dr. Ladzekpo 両名の協力のもと約 1.5 か月の間湿潤箱にて産卵させ、孵化した幼ダニを回収した。マダニの Bioassay を標準化するため、マダニのコロニー化実験を行った。

(2) 4Gb スケールでの illumina HiSeq2000 RNAseq 解析

牛体表上で半飽血状態のウシマダニ亜属 *Rhipicephalus Boophilus decoloratus* の成ダニ(全虫体)より抽出した全 RNA を用い、次世代シーケンスによる RNAseq 解析を行い、網羅的な転写産物カタログの作成を行った。

(3) サンガーシーケンスによるアンプリコンシーケンス解析

持ち帰った DNA 及び RNA をサンプルとし、特に OR 各遺伝子を特異的に増幅するプライマーにて PCR 増幅し、得られた産物のアンプリコンシーケンスを行った。アミノ酸配列の非同義置換を伴う SNP について、遺伝子及び採材地域・農場ごとにカタログ化した。

(4) SNP ジェノタイピング解析

現地での抵抗性マダニ迅速診断への応用を狙った LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification, ループ介在等温増幅) 法を利用した SNP タイピング法の開発を目指し、必要であれば、制限酵素を利用した RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型) についても検討した。

4. 研究成果

(2017 年度) RNAseq 解析による網羅的な転写産物カタログ作成を行った。R (B). *decoloratus* は、近縁マダニの R (B). *microplus* とは異なり、ゲノム情報が整備されていない。そこで得られたリード配列について de novo アッセムブリーにより contig 配列を作製し、NCBI の蛋白質データバ

ースを対象に blastx を行いアノテーション付けた。

アフリカで通常使用されている殺ダニ剤は、大別して有機リン系、合成ピレスロイド、ホルムアミジン系の3種類であり、それぞれの標的分子は、コリンエステラーゼ、電位依存性ナトリウムチャンネル、アドレナリン様オクトパミン受容体である。作製した遺伝子カタログを精査したところ、神経膜上に発現する電位依存性ナトリウムチャンネルおよびアドレナリン様オクトパミン受容体については該当する配列が認められなかった。しかしアセチルコリンエステラーゼ (Acetylcholinesterase, AChE) の遺伝子全長の同定に成功した。このことから、ケニアやウガンダにて問題となっている有機リン系殺ダニ剤抵抗性マダニの分布調査および抵抗性形質獲得の分子メカニズムの解明にむけ、次年度以降の研究標的を決定することができた。

(2018年度)ホルムアミジン系殺ダニ剤アミトラス抵抗性のマダニより得た標的分子をコードする遺伝子 β -adrenargic-like octopamine receptor (β AOR) について、その RNA 情報、ゲノムにおける遺伝子構造、SNP 情報と採取地域ごとの分布率について纏めた前年度成果をもとに、cell-based assay を構築して細胞生物学的に、SNP の存在が及ぼす β AOR の分子活性の違いについて解析を行った(図2)。

哺乳類細胞発現プラスミドベクター pFLAG-CMV に、参照株由来の野生型 β AOR (w β AOR) 遺伝子配列 ORF を組み込み、HEK293 細胞へトランスフェクションにより導入した。実験区には変異型 SNP を有する β AOR (m β AOR) 遺伝子配列 ORF を組み込み、同様に細胞へ導入した。アゴニストであるオクトパミンにて賦活化したところ、m β AOR 導入細胞にて、細胞内 cAMP 濃度が wAOR 導入細胞より高いという結果を得た。このことが直接アミトラス抵抗性をマダニに付与しているとは言えないが、少なくとも mAOR はアゴニストに対する感受性が上昇していることが示唆される。

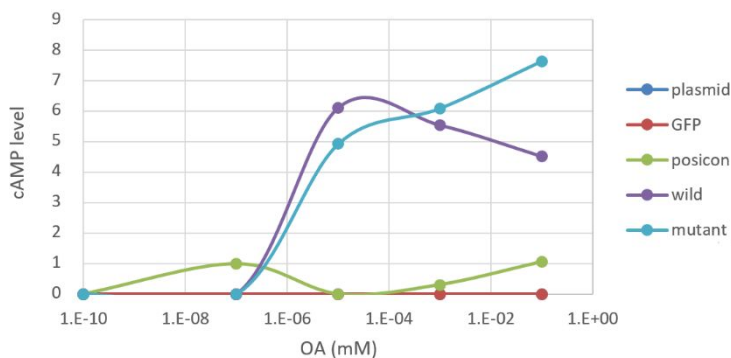


図2 野生型 AOR と変異型 AOR における cAMP 産生量の比較

(最終年度)これまでに採集したケニアの農業畜産が盛んな地域に位置する野外農場にて、牛体表上で半飽血状態のウシマダニ亜属 Rhipicephalus Boophilus decoloratus の成ダニ(全虫体)由来ホルムアミジン系殺ダニ剤アミトラス抵抗性のマダニより得た標的分子をコードする遺伝子 β -adrenargic-like octopamine receptor (β AOR) について、さらに SNP 検出をこころみた。参照マダニ株由来の野生型 β AOR 遺伝子配列 ORF と抵抗性系統由来の β AOR 遺伝子配列 ORF を比較したところ、これまで少なくとも3か所以上の SNP が存在していた。第2膜貫通領域にある SNP について、さらに PCR-RFLP を応用した LAMP-RFLP による検出・識別方法の開発に成功した。本手法を用い実際に西アフリカの農場にて採取されたマダニで予備試験を行ったところ、これまでは薬剤投与による生死判定によってのみ診断していた一月以上の時間を要する抵抗性判別方法と比較し、約5~7日で判定が行えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yasin MG, Alim MA, Anisuzzaman, Ahasan SA, Munsu MN, Chowdhury EH, Hatta T, Tsuji N, Mondal MMH.	4. 巻 80
2. 論文標題 Trematode infections in farm animals and their vector snails in Saint Martin's Island, the southeastern offshore area of Bangladesh in the Bay of Bengal.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci.	6. 最初と最後の頁 684-688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.17-0308.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maeda H, Hatta T, Tsubokawa D, Mikami F, Nishimaki T, Nakamura T, Anisuzzaman, Matsubayashi M, Ogawa M, da Costa CP, Tsuji N.	4. 巻 67
2. 論文標題 Positive phototropism is accelerated in Biomphalaria glabrata snails by infection with Schistosoma mansoni.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitol Int.	6. 最初と最後の頁 609-611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2018.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hernandez Emmanuel Pacia, Kusakisako Kodai, Talactac Melbourne Rio, Galay Remil Linggatong, Hatta Takeshi, Matsuo Tomohide, Fujisaki Kozo, Tsuji Naotoshi, Tanaka Tetsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization and expression analysis of a newly identified glutathione S-transferase of the hard tick Haemaphysalis longicornis during blood-feeding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasites & Vectors	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13071-018-2667-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Takeshi HATTA
2. 発表標題 Acaricide resistance in African cattle ticks: an attempt in developing a field-tailored diagnostic system
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八田岳士
2. 発表標題 東アフリカにおける殺ダニ剤抵抗性マダニの調査研究
3. 学会等名 第70回日本衛生動物学会東日本支部大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daigo Tsubokawa, Takeshi Hatta, Taisei, Kikuchi, Fusako Mikami, Haruhiko Maruyama and Naotoshi Tsuji.
2. 発表標題 RNAi mediated suppression of venestatin in the subcutaneous migration of <i>Strongyloides venezuelensis</i>
3. 学会等名 Forum Cheju-20, Trends in Parasitology in Korea and Japan. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi HATTA
2. 発表標題 Acaricide resistance in African cattle ticks: an attempt in developing a field-tailored diagnostic system
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松林誠、川原史也、山岸潤也、八田岳士、畑生俊光、山口浩貴、寺本勲、金子明、磯部尚、北潔、辻尚利、笹井和美
2. 発表標題 Eimeria tenella弱毒株の作出と比較ゲノム解析による弱毒化分子機構の解明.
3. 学会等名 第160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八田岳士, 坪川大悟, 前田大輝, 松林 誠, Martin D. Muinde, Aboge G. Oluga, David O. Odongo, 竹中昭雄, Esther W. Ngethe, 辻尚利
2. 発表標題 ケニア産Rhipicephalus decoloratusにおける アドレナリン様オクトパミン受容体 OAR cDNAのクローニングによる非標準的スプライシングの発見
3. 学会等名 第86回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017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
研究分担者	白藤 梨可 (Shirafuji Rika) (00549909)	帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教 (10105)	
研究分担者	中尾 亮 (Nakao Ryo) (50633955)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	