

令和 2 年 4 月 7 日現在

機関番号：24403
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2019
課題番号：16K08025
研究課題名（和文）鶏コクシジウムをモデルとした重要原虫の弱毒化分子機構の解明と毒力評価系の構築

研究課題名（英文）Pathological and genetical analyses of chicken Eimeria species during attenuations as a model of important protozoan parasites

研究代表者
松林 誠（Matsubayashi, Makoto）
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00321076
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：鶏コクシジウム症を引き起こすEimeria 属原虫を鶏で選択的に継代することにより、弱毒化することが知られている。しかし、弱毒株の詳細な特性および弱毒化の分子メカニズムは未解明である。弱毒株を作出し解析を行ったところ、病態発現期であるシゾントの出現時期が短縮し、またその大きさが縮小していることが分かった。また継代毎の比較ゲノム解析では複数個所の遺伝子変異を決定でき、これらの変異は原虫にとって致死的ではなく、弱毒化を惹起している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Eimeria 属原虫は、ヒトに対して重篤な症状を引き起こすマラリアやトキソプラズマ原虫と同じApicomplexa 門に属する。これまでに同門の原虫ワクチン開発において、弱毒株の原虫総体による免疫賦与を行うワクチン開発が次世代の抗原虫防除ツールとして模索されている。本成果により決定された遺伝子は、弱毒化重要遺伝子である可能性があり、他種原虫での応用解析が期待される。

研究成果の概要（英文）：Chicken Eimeria spp. causing coccidiosis are attenuated by selective serial passages into chickens. However, the characteristics and molecular mechanisms of the attenuations remains unknown. The precocious strains showed rapid developments of the asexual stages and possessed smaller schizonts. By the comparative genomic analyses, some gene regions with nucleotide mutations were determined. These nucleotide mutations might be associated with attenuation of the eimerian parasites.

研究分野：原虫学

キーワード：Eimeria 原虫 弱毒化 比較ゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鶏コクシジウム症は、*Eimeria* 属原虫の感染によって引き起こされる。経口的に摂取された *Eimeria* 原虫は、鶏の消化管組織に侵入し、無性生殖により増殖する。この時、シゾンとよばれる分裂体の内部には、侵入型虫体(メロゾイト)が包蔵される。この多数のメロゾイトが放出される際、消化管組織は著しく破壊され、致死性の血便が惹起される。その後、有性生殖を経て、多量のオーシストが糞便と共に排泄される。現在使用されている抗コクシジウム剤は、飼料添加物として使用されている。しかし、鶏宿主に対して副作用を有し、低濃度で給与され、発症は抑えられるものの、原虫の生活環を遮断することはできない。その結果、感染源であるオーシストが持続的に鶏舎内に排出される。また、鶏畜産物への薬剤残留問題から、肉用鶏では使用制限があり、また採卵鶏での使用は認められていない。世界レベルでは、鶏コクシジウム症による被害および対策に費やされる経費は、年間数千億円にのぼるとされている。

鶏コクシジウムを鶏に実験的に投与し、早期に排泄されるオーシストのみを回収し、これを数十代継代することで弱毒化が可能である。この弱毒株は、オーシストの排泄期間が短縮される早熟株である。この弱毒株による感染では、血便・下痢症状はあらわれず、便中へのオーシスト排泄数も減少するため、鶏体内での原虫の増殖性が低下していると推察される。この弱毒株は、一部、生ワクチンとして販売されているが、弱毒株の詳細な特性および弱毒化の分子メカニズムは未解明である。近年、食の安全性確保のため、畜産物へ薬剤投与が困難な状況となり、今後、非薬剤防除となるワクチンの需要は増えると考えられ、弱毒株の特性解析および免疫賦与と機構の解明は急務である。

Eimeria 属原虫は、ヒトに対して重篤な症状を引き起こすマラリアやトキソプラズマ原虫と同じ Apicomplexa 門に属する。これまでに同門の原虫ワクチン開発において、弱毒株の原虫総体による免疫賦与を行うワクチン開発が模索されている。弱毒化は凍結や放射線照射等により虫体を減弱させ、生残虫体として投与を行うが、発症回避のみならず原虫排除に著効を有することが報告されており、次世代の抗原防除ツールとして期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、鶏コクシジウム原虫を Apicomplexa 門原虫のモデル生物と位置づけ、これら重要原虫の弱毒化分子機構を解き明かし、原虫総体としての防圧ワクチン開発に寄与する。原虫感染による病態の発現は、宿主体内での虫体の増殖に依存する。鶏コクシジウムの弱毒株では腸管内での致死ステージである無性生殖期の増殖性が減退することが推察されるため、その詳細な病態発現機構の解明、そして網羅的な遺伝子発現解析およびゲノム比較解析を行い、病態に関わる分子および弱毒化責任遺伝子を解析し、同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) *E. tenella* 強毒株を元株とし、幼雛に投与し、早期に糞便中に出現する原虫のみを回収した。これを新たに幼雛に投与し、20代継代を行った。各5代毎に原虫の排出期間、および量を測定した。また、親株および早熟化5代、10代、15代および20代継代株の原虫を幼雛に投与し、経時的(12時間)に感染部位である盲腸を採取し、定法に従い、組織切片を作製した。計3回の無性生殖と1回の有性生殖、特に病態発現に深く関与する第2代目の無性生殖期について、虫体の出現期間と頻度および大きさなどの形態学的特徴を観察し、弱毒化による変化を解析した。

(2) *E. tenella* 強毒株の弱毒化メカニズムを解明するため、0、5、10、15および20代継代後のオーシストを回収し、ゲノムDNAを抽出後、Illumina HiSeqにより塩基配列を決定し、1.3億リード(約13,000Mbp)~0.4億リード(約4,000Mbp)を得た。公開されている *E. tenella* の全ゲノム情報をリファレンス配列とし、5株のリード配列をマッピングした。さらに各継代株についてマッピングされたリード数から Variant Allele Frequency (VAF)を算出し、0代から20代にかけて VAF が20%以上変動している箇所を決定し、deletion やフレームシフト、アミノ酸変異の有無を解析した。

(3) 野外の *Eimeria* 原虫株について、ゲノム比較解析を行うため、*E. tenella* の単離および解析に向けた調査を実施した。21都道府県の37農場から143検体を採取した。形態学的な種の同定とPCRによる種の鑑別を行った。また、各農場において、コクシジウム症の発生状況および弱毒株ワクチンの使用状況を聴取した。

4. 研究成果

(1) *E. tenella* 強毒株を20代継代を行ったところ、糞便中の原虫の排出期間は約20時間短縮され、感染鶏において血便症状が消失または著しく減退し、本株の弱毒化に成功したことを確認した。継代的に病理組織学的解析を行ったところ、無性生殖期の回数の欠落は認められず、病態発現ステージとなる第2代無性生殖期のシゾンが早期に出現し、かつ虫体長は約1/2へと縮小していた。20代目継代株における盲腸粘膜層の炎症および出血の程度は減弱されていることが示唆された。以上より、*Eimeria* 原虫の弱毒化は第2代シゾンの早期出現および縮小化に起因することが分かった。

(2) *E. tenella* の弱毒化過程の0~20代継代後の5株のリード配列をマッピングした結果、リファレンス株と比較して、1塩基置換等の変異が認められた箇所は計112,271個であった。各継代株の VAF について、20%以上上昇している16遺伝子領域を決定した。16遺伝子領域中、11

遺伝子でアミノ酸レベルでも変異が認められた。これらの遺伝子の機能は不明なものが多かったが、微小管の重合やアクチンの核化に関連することが報告されており、これらはシゾントのセルサイクルに参与すると推定された。これらの遺伝子変異は、弱毒化に関わるシゾントの縮小に関連している可能性がある。現在もなお、解析中ではあるが、原虫の弱毒化の責任遺伝子は1つではなく、SNP や nucleotide insertion や deletion により、アクチン、チューブリンや原虫プロテアーゼ等にアミノ酸レベルでの変異が生じ、シゾントの発育に影響を与え、しかし、それは虫体にとって致命的ではなく、シゾント形成の早熟そして縮小化を引き起こし、弱毒化している可能性が示唆された。

(3)形態学およびPCRによる解析の結果、143検体中12で *E. tenella* 陽性であった。もっとも陽性率の高かった *Eimeria* 種は、*E. acervulina* と *E. mitis* で30検体が陽性であった。弱毒株となるワクチンの使用状況は、9農家で *E. tenella* のワクチン株を使用していることが分かった。現在、病原性評価、また野外および弱毒株の交雑状況を解析するため、全ゲノム解析の準備を進めているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Koji Hattori, Takuto Donomoto, Tilusha Manchanayake, Tomoyuki Shibahara, Kazumi Sasai, Makoto Matsubayashi.	4. 巻 117(11)
2. 論文標題 First surveillance and molecular identification of the <i>Cryptosporidium skunk</i> genotype and <i>Cryptosporidium parvum</i> in wild raccoons (<i>Procyon lotor</i>) in Osaka, Japan.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 3669-3674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-018-6089-y	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
1. 著者名 Yoshimasa Hirashima, Tilusha Manchanayake, Takahisa Yano, Syoei Kitahara, Terunori Koreeda, Syunsuke Kamimura, Kazumi Sasai, Makoto Matsubayashi, Tomoyuki Shibahara.	4. 巻 116(7)
2. 論文標題 Development of molecular diagnostic protocols for detecting three types of <i>Entamoeba</i> from diarrheal and asymptomatic pigs and environmental moist soils	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 2001-2007
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-017-5483-1.	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 -
1. 著者名 Terunori Koreeda, Tomo Kawakami, Ayako Okada, Yoshimasa Hirashima, Naoto Imai, Kazumi Sasai, Shogo Tanaka, Makoto Matsubayashi, Tomoyuki Shibahara.	4. 巻 116(11)
2. 論文標題 Pathogenic characteristics of a novel intranuclear coccidia in Japanese black calves and its genetic identification as <i>Eimeria subspherica</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 3243-3247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-017-5629-1.	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 -
1. 著者名 Makoto Matsubayashi, Yuu Matsuura, Satoko Nukata, Yuusuke Daizi, Tomoyuki Shibahara, Isao Teramoto, Tomohide Matsuo, Shigehiko Uni, Takeshi Hatta, Akira Kaneko, Naotoshi Tsuji, Kazumi Sasai.	4. 巻 117(1)
2. 論文標題 First detection and molecular identification of <i>Entamoeba bovis</i> from Japanese cattle	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology Research	6. 最初と最後の頁 339-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00436-017-5689-2.	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 -

1. 著者名 Makoto Matsubayashi, Yuri Sasagawa, Tsunehiko Aita, Masaharu Tokoro, Makoto Haritani, Tomoyuki Shibahara.	4. 巻 61(4)
2. 論文標題 First report of mixed Entamoeba polecki (ST 1) and E. suis infection in piglets shedding abnormal feces by histopathological and molecular surveys.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Acta Parasitologica	6. 最初と最後の頁 665-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/ap-2016-0093.	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 -

1. 著者名 Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Matsubayashi M, Miyoshi T, Umemiya-Shirafuji R, Kawazu SI, Igarashi I, Mochizuki M, Tsuji N, Tanaka T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Establishment of a novel tick-Babesia experimental infection model.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 37039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep37039.	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 -

1. 著者名 Maeda H, Hatta T, Alim MA, Tsubokawa D, Mikami F, Kusakisako K, Matsubayashi M, Umemiya-Shirafuji R, Tsuji N, Tanaka T.	4. 巻 233
2. 論文標題 Initial development of Babesia ovata in the tick midgut.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Vet Parasitol	6. 最初と最後の頁 39-42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.vetpar.2016.11.020.	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

1. 著者名 Matsubayashi Makoto, Yamaguchi Hiroki, Hatta Takeshi, Kawahara Fumiya, Hatabu Toshimitsu, Iseki Hiroshi, Yamagishi Junya, Isobe Takashi, Teramoto Isao, Kaneko Akira, Kita Kiyoshi, Tsuji Naotoshi, Sasai Kazumi	4. 巻 75
2. 論文標題 Transitions in morphological forms and rapid development of the asexual schizonts of Eimeria tenella through serial passaging in chicks	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 103993 ~ 103993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.meegid.2019.103993	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 -

1. 著者名 Matsubayashi Makoto, Inaoka Daniel Ken, Komatsuya Keisuke, Hatta Takeshi, Kawahara Fumiya, Sakamoto Kimitoshi, Hikosaka Kenji, Yamagishi Junya, Sasai Kazumi, Shiba Tomoo, Harada Shigeharu, Tsuji Naotoshi, Kita Kiyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel Characteristics of Mitochondrial Electron Transport Chain from <i>Eimeria tenella</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 29 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3390/genes10010029	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

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 <i>Eimeria tenella</i> 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161回日本獣医学会
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、寺本 勲、金子 明、磯部 尚、北 潔、辻 尚利、笹井和美。
2. 発表標題 <i>Eimeria tenella</i> 弱毒株の作出と比較ゲノム解析による弱毒化分子機構解明の試み
3. 学会等名 第87回日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 和瑛、松林 誠、稲岡 ダニエル 健、八田 岳士、寺本 勲、金子 明、所 正治、古家 優、谷 浩行、辻 尚利、笹井 和美、北 潔。
2. 発表標題 <i>Cryptosporidium parvum</i> における呼吸鎖関連酵素の特性解析。
3. 学会等名 第157回日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松林 誠、村越 奈穂子、小松 徹也、所 正治、播谷 亮、芝原 友幸.
2. 発表標題 豚に寄生するEntamoeba 属原虫の遺伝子型の同定と病原性.
3. 学会等名 第157回日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 水野 真伸、松林 誠、辻尾 祐志、正谷 達膳、田仲 哲也、松井 利博、松尾 智英.
2. 発表標題 マウス寄生性コクシジウムEimeria kriegsmanni感染の再活性化.
3. 学会等名 第157回日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 前田 大輝、八田 岳士、坪川 大悟、三上 房子、松林 誠、白藤(梅宮)梨可、辻 尚利、田仲 哲也.
2. 発表標題 Babesia ovata原虫におけるマダニ中腸形態へのステージシフト誘導実験.
3. 学会等名 第157回日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 八田 岳士、今村 憲吉、山本 健久、松林 誠、辻 尚利、筒井 俊之.
2. 発表標題 国内30府県で捕獲されたイノシシにおける旋毛虫(トリヒナ)保有調査の結果について.
3. 学会等名 第157回日本獣医学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 長濱 まどか, 佐藤 暖, 志波 智生, 松林 誠, 稲岡 ダニエル健, 辻 尚利, 北 潔, 原田 繁春.
2. 発表標題 抗鶏コクシジウム症薬の開発を目指したEimeria tenella Dihydroorotate dehydrogenaseの発現・精製と結晶化.
3. 学会等名 第88回日本生化学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松林 誠.
2. 発表標題 日本産業動物獣医学会 シンポジウム 「牛の下痢症に関する最近の知見」 産シンプ -2. 消化管寄生虫の診断と対策および今後の課題 ~特にクリプトスポリジウムについて~.
3. 学会等名 平成28年度日本獣医師会 獣医学術学会 年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鶏病研究会 (分担 松林 誠)	4. 発行年 2016年
2. 出版社 創文印刷工業株式会社	5. 総ページ数 73 (39-44, 64-67)
3. 書名 鶏病検査マニュアル	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----