

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05968

研究課題名(和文) 小型ピロプラズマ原虫の媒介を規定するマダニ分子機構の解明

研究課題名(英文) Understanding molecular mechanism underlying Theileria orientalis transmission in the tick

研究代表者

林田 京子 (Hayashida, Kyoko)

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・助教

研究者番号：40615514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で次世代シーケンサーを用いて日本産のマダニからピロプラズマ原虫を広域に一度に検出する方法を確立した。結果、人獣共通感染症の *Babesia microti* や、中国で新たに発見された人感染性原虫 *Colpodella* を日本産マダニより初めて検出し、マダニの中の未知の人獣共通感染性の原虫を検出する上で本法が有用であることが示された。また、タイレリア感染・非感染マダニにおいて変動する遺伝子を RNAseq で探索した。結果タイレリア感染時唾液腺における数遺伝子の有意な発現上昇を確認し、原虫感染成立に關与する可能性がある遺伝子を絞りこむことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マダニが媒介するピロプラズマ原虫には畜産に大きな被害を与えるタイレリアや人獣共通感染症のパベシアなどが含まれ、これらのマダニ内における感染頻度を確認することは公衆衛生上重要である。本研究で確立したピロプラズマ原虫の検出法は今後、環境中のこれら感染症の流行を推定する際に有用である。また、実験的に絞り込んだ原虫感染時に変動するマダニ分子は、マダニにおける原虫感染成立機序の理解や今後の伝播阻止ワクチン開発に有用なデータを提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Ticks transmit several pathogens, including medically and veterinarily important *Babesia* and *Theileria* parasites. We established amplicon-NGS sequence system to detect broad range of piroplasm parasites from Ticks. Using this system, we detected several possible pathogens including zoonotic *Babesia microti* and *Colpodella* sp. from the tick collected in Japan. Genome-wide transcriptome analysis revealed that, nine genes are upregulated in the salivary gland of *Theileria orientalis* infected tick compared to the un-infected tick. These genes may involve in the protection or establishment of infection of *T. orientalis*, that provide new insights into the understanding the immune mechanisms of Ticks against *Theileria* parasites.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：マダニ タイレリア パベシア 小型ピロプラズマ 人獣共通感染症

## 1. 研究開始当初の背景

ウシ小型ピロプラズマ症は本邦の畜産業に最も深刻な被害を与えている原虫病の一つである。本原虫はフタトゲチマダニによって媒介されるが、本マダニに原虫を実験感染させると、感染が成り立つ個体と、原虫が排除される個体が存在する。これらの原虫媒介の有無は、侵入門戸である中腸において種や個体により感染応答の差異があることに起因していると考えられるが、詳細なメカニズムは全く不明である。さらに、自然界には多種多様なピロプラズマや近縁種が存在しているため、これらニッチを共有する原虫がマダニに共感染した場合、小型ピロプラズマの感染成立にも影響があるのではないかと考えた。そこで本研究課題では野外マダニ中に存在するピロプラズマ叢の解析と、小型ピロプラズマ原虫の感染成立・感染不成立が見られるマダニの実験モデルにおける中腸の遺伝子発現解析を行うことで、小型ピロプラズマ原虫の媒介を規定するマダニ分子機構を明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、小型ピロプラズマ症の病原原虫である *T. orientalis* の野外における共感染の解析を通じた干渉現象の有無の検証と、マダニ感染の成立のキーとなっている分子機構を明らかにすることである。マダニ中腸における病原体への応答解析はバベシアなどの他原虫において報告があるが、タイレリア原虫における報告は皆無であった。これは実験系の不足が大きな原因であったが、本研究では申請者らの確立した実験室内におけるマダニ感染実験系を用いることで、これまでのボトルネックが解決できると考えた。マダニにおける原虫感染に影響する近縁種の存在を同定し、また原虫感染時におけるマダニの免疫応答が明らかになることで、非病原性原虫をマダニや家畜に人為的に感染させるといった、環境保全型の全く新しい小型ピロプラズマ症防除法の開発に結びつく可能性がある。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 野外マダニ・牛血液中のピロプラズマ叢の解析

2021, 2022 年に北海道日高地方にある北大静内研究牧場、牧野内においてそれぞれ 158 個体、102 個体のマダニを採集した。同牧野内において、日本短角牛 44 個体の末梢血も採集した。一部の幼ダニについては 20 匹ずつのプールとして、PCI 法による DNA 抽出を行った。加えて、2019-2020 に日本各地 12 都道府県で収集したマダニ 200 検体 DNA を利用した。これらの検体は主に農村の林間部で採集したものである。マダニ (n=460) の DNA から汎ピロプラズマ 18SrRNA 保存領域プライマーを用いて、牛の血液 DNA から MPSP プライマーを用いた PCR 増幅した (Masatani et al., Ticks Tick Borne Dis. 8(4):581-587)。増幅産物 1.4-1.6kb をサンガーシーケンスで塩基配列を解析した。さらに、illumina 次世代シーケンスを行うためにより短い 450bp 部分を増幅し、Miseq シーケンサーで解析した。得られた塩基配列は QIIME2 を用いて Amplicon-sequence variant:ASV を構築した。得られた塩基配列は BLASTn による相同解析により種を同定した。

### 3-2. *T. orientalis* のマダニ感染実験モデルを用いた、感染応答遺伝子の同定

上記日高地方の牛血液を、脾臓摘出手術後牛の血液を腹腔内に定期的に移入した、牛血液置換 SCID マウスに接種することで *T. orientalis* 感染マウスを作成した。さらに本感染マウスに、実験室継代フタトゲチマダニを吸血させることにより、タイレリア感染フタトゲチマダニを準備した (Hayashida et al. Int J Parasitol. 2018. 28(12):915-924.)。吸血は幼ダニ期のマダニを用い飽血・落下させ、10 日後の検体を解剖して中腸から RNA を抽出した (キネート期におけるマダニ中腸。感染群 n=3, 非感染群 n=3)。また、若ダニ期へ成熟させたのちに吸血刺激を 48 時間行い、唾液腺から RNA を抽出した (スポロゾイト期におけるマダニ唾液腺。感染群 n=3, 非感染群 n=3)。これら RNA は微量であったため、SMART 法による増幅および NexteraXT キットを用いて次世代シーケンサーライブラリ作成を行った。シーケンスは Novogene 社の外注により行い、各検体 50M リードのデータ量を取得した。得られた配列は HISAT2 を用いてフタトゲチマダニ全ゲノム配列 (GCA\_013339765.2\_BIME\_HaeL\_1.3) 及び *T. orientalis* 全ゲノム配列 (GCF\_000740895.1) の双方にマッピングを行い、featureCount データから DESeq2 により各群変動遺伝子の同定を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. 野外マダニ・牛血液中のピロプラズマ叢の解析

北海道日高地方の牧場における日本短角牛のピロプラズマ陽性率は、顕微鏡及び PCR とともに 100% (44/44) であった。牛の検体では混合感染により、従来のサンガー法による direct-sequence では塩基配列解読が困難であったため、Miseq で ASV とした配列を解析した。結果、牛からは *T. orientalis* が 4ASV, *T. sinensis* が 3ASV 検出され、44 個体中 42 個体が *T. orientalis* と *T. sinensis* に混合感染をしていることが示された (表 1)。2 個体は *T. orientalis* の単独感染で

あった。今回血液検査では全ての牛が Ht  $\geq$ 30 の正常値を示し貧血の症状を呈する牛はいなかった。品種による感受性の差も否定できないが、このような低病原性遺伝子種・型が慢性的に混合感染していることが、これら牛で原虫による貧血発症を抑えている可能性が示唆された。

マダニからは、林道等で採集された 200 個体から 7 個体が(3.5%)、牧野で採集された 260 個体から 26 個体(10%)ピロプラズム陽性を示した。これら陽性検体の塩基配列は *Babesia* sp., *T. orientalis*, *Theileria* sp. *Colpodella* sp. であることがサンガー法及び NGS を用いた方法の双方において確認され、これら 2 つの方法による塩基配列の違いは完全一致した。これら陽性検体においてはピロプラズムの混合感染は認められなかった。牧野で採集されたマダニ個体群に関しては、同牧野で飼育されていた牛での高い寄生率にもかかわらず *T. orientalis* と *T. sinensis* が検出されなかったことは興味深い。同牧野には異なるベクターが存在するのか、採集した季節には PCR で検出できるだけの原虫遺伝子が含まれていないのか、さらなる検討が必要である。さらに、コルポデラは 2013 に中国人症例が報告された新興感染症原因原虫種であるが、今回北海道日高地方牧野のマダニから、中国の症例で報告された配列と 100%の相同性を有する配列が 2021 年、2022 年ともに 1 個体ずつ検出されている。他にも 4 個体から、中国のマダニで報告されている *Colpodella* に近縁の配列が検出された。コルポデラの調査報告は世界的にも少なく、日本のマダニから検出したのは初めての報告となる。今後更なる調査が必要であると考えられた。

従来の目的は *T. orientalis* と共感染するピロプラズマ原虫叢を調べることであったが、*T. orientalis* のマダニにおける陽性率が予想より低く、今回の検体からは混合感染は認めることができなかつたため、予定していた相関関係の解析は行えなかつた。しかしながら、次世代シーケンサーを用いた本手法を用いることで、複雑な混合感染を示す牛血液のような検体を効率的に配列解析できることが証明された。また、タイレリア・バベシア・近縁コルポデラのような原虫種を広く一度に、他検体検出可能なことから、様々な哺乳類・節足動物におけるピロプラズマ疫学調査方法として有用であることが示された。

表 1) 北海道日高地方における日本短角牛のピロプラズマ陽性率

Year of sampling	Animal Species	No. tested	No. of <i>T. orientalis</i> Positive (%)	No. of <i>T. sinensis</i> Positive (%)
2021	<i>Bos taurus</i> (Japanese Shorthorn)	44	44 (100%)	42 (95%)

表 2) 日本産マダニのピロプラズマ陽性率

Year of sampling	Tick Species	No. Tested	No. <i>Babesia</i> sp. Positive (%)	No. of <i>T. orientalis</i> Positive (%)	No. <i>Theileria</i> sp. Positive (%)	No. <i>Colpodella</i> .sp Positive (%)
2019-2020	<i>H. hystricis</i>	10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>I. persulcatus</i>	53	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>I. ovatus</i>	57	2 (3.51)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>H. flava</i>	22	0 (0)	0 (0)	2 (9.0)	0 (0)
	<i>D. taiwanensis</i>	1	0 (0)	1 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>I. monospinosus</i>	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Haemaphysalis</i> sp.	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>H. kitaokai</i>	13	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>H. japonica</i>	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>I. pavlovsky</i>	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>H. longicornis</i>	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>H. formosensis</i>	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>I. nipponensis</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>H. megaspinosa</i>	10	0 (0)	0 (0)	2 (20)	0 (0)
<i>A. testudinarium</i>	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
2021	<i>H. megaspinosa</i>	158	5 (3.16)	0 (0)	6 (3.8)	4 (2.5)
2022	<i>H. megaspinosa</i>	102	7 (6.86)	0 (0)	2 (12.0)	2 (2.0)

#### 4-2. *T. orientalis* のマダニ感染実験モデルを用いた、感染応答遺伝子の同定

牛血液置換 SCID マウスにおけるタイレリア感染は 5-20%の原虫赤血球寄生率を示した。本マウスの背側にプラスチック製のユニットをつけてフタトゲチマダニの幼ダニを吸血させたが、幼ダニが吸血中に全死滅、もしくはその後飼養中に死滅し、十分な数のマダニを準備するのは困難が伴った。しかしながら、統計上最低限の解析数である感染・非感染の中腸・唾液腺の各 3 匹、合計 12 の検体の調整に成功し、これらの RNAseq を実施した。RNAseq におけるマダニゲノム・タイレリアゲノムにおけるマッピング結果を表 3 に示した。結果、中腸においては原虫遺伝子の存在がリード数として確認できなかった。さらに、感染・非感染群の発現比較解析を行った

ものの、有意に発現変動を示す遺伝子が同定されなかった。唾液腺における感染・非感染群における結果も同様であり、感染 n=3, 非感染 n=3 で比較した際の有意な発現変動遺伝子は同定できなかった。感染個体内におけるタイレリア存在量が大きく異なったため、原虫リードの存在が多かった高感染個体 (SI\_rep3) を非感染群 (S\_1,2,3) と比較した場合に、9 マダニ遺伝子のタイレリア感染マダニ唾液腺における優位な発現上昇と、1 マダニ遺伝子の発現減少が検出された。この中には”salivary mucin”と”Cyclophilin ABH-like”遺伝子、及び機能不明の hypothetical protein が含まれていた。同一遺伝子ではないものの、ある種の Cyclophilin (CyP-A) はバベシア原虫感染時に発現が増加し、原虫感染防御に働いていることが示されていることから、(Bastos et al., 2009. Parasit Vectors 2:57) 本遺伝子がタイレリア感染時における感染防御に関与していること、また抗タイレリア薬としての可能性を有する可能性がある。今後、これらの同定された遺伝子のマダニと原虫の感染実験を用いた、機能解析が必要であると考えられる。また、今回同定された発現変動遺伝子が少なかった理由には、原虫がマダニに感染する程度が個体によりバラツキが大きいこと、発現解析に供すべきタイミングが適当で無かったことなど、複数の要因が考えられた。本実験系において準備できるマダニの個体数は極めて少なく、このような実験を行うための十分な個体数を準備することができなかった。今後、マウス吸血プロトコルの改良や人工吸血系の開発などの技術開発も、解決すべき課題として残された。

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林田京子
2. 発表標題 ウシ化マウス感染モデルを用いた小型ピロプラズマ原虫のマダニ体内感染動態の解明
3. 学会等名 牛臨床寄生虫研究会（招待講演）
4. 発表年 2022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	中尾 亮  (Nakao Ryo)  (50633955)	北海道大学・獣医学研究院・准教授    (10101)	

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
---------	---------