

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580423

研究課題名(和文) ワクモの鶏に対する病原性とその分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of pathogenicity of chicken red mite to chickens

研究代表者

山口 剛士 (YAMAGUCHI, Tsuyoshi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：70210367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) は、鳥類に寄生する吸血性の外部寄生虫で、特に採卵鶏を中心に大きな被害が報告されている。本研究では、ワクモ吸血が鶏に与える影響を明らかにするため、ワクモが吸血時に宿主に放出する物質の性状、ワクモ寄生に対する抗体応答、各種サイトカイン応答の変化およびワクモの病原体保有状況について解析した。その結果、ワクモは吸血時に分子量53および56kDaの2分子を宿主体内に放出すること、ワクモ寄生鶏は免疫抑制状態となる可能性のあること、またワクモから複数の病原体遺伝子が検出され、生産性向上におけるワクモ制御の重要性が示された。

研究成果の概要(英文)：Chicken red mite (*Dermanyssus gallinae*) is a phlebotomic external parasite that mainly infests avian species. It has been a serious problem worldwide, especially in layer chicken farms. Here we investigated the molecular mechanisms of pathogenicity of the mites. Infested chickens developed antibodies to two proteins with sizes of 53kDa and 56kDa, which appeared to have been secreted by the mites during blood sucking. Expression levels of some cytokine genes in peripheral blood monocytes of severely infested chickens suggested suppression of the immune system. The genes of some avian pathogens were also detected in the mites. These findings demonstrate the importance of disinfection of the mites to prevent their direct harmful effects as well as the spread of infectious diseases.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用獣医学

キーワード：鶏 外部寄生虫 ワクモ *Dermanyssus gallinae* 宿主応答 病原性

1. 研究開始当初の背景

ワクモ (*Dermanyssus gallinae*) は、鳥類に寄生する吸血性の外部寄生虫で、トゲダニ目、タンバントゲダニ亜目、ヤドリダニ団、ワクモ上科、ワクモ科に属する。全世界に広く分布し、わが国でも北海道から沖縄まで全国に分布している。ワクモによる寄生は特に採卵鶏を中心に数多く報告され、吸血による貧血やストレスによる生産性への影響が知られている。しかし、ワクモ寄生が鶏の生体機能に与える影響や病原性の詳細については、これまでほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、ワクモ寄生が鶏に与える影響や病原性を明らかにするため、1) ワクモ寄生に対する宿主動物の免疫応答、2) ワクモが吸血時に宿主体内へと分泌する物質の解明、および3) ワクモの病原体保有状況について解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) ワクモ寄生に対する宿主動物の免疫応答ニワトリ

35日齢のコマーシャル採卵鶏であるボリスブラウンおよびジュリアを用いた。ワクモ寄生開始から1, 2, 3, 5および7週目に採血を行い、ワクモ抗原に対する抗体応答および免疫関連遺伝子の発現状況の解析に用いた。

ラット

SDラット2匹を用い、ワクモによる吸血を1週から2週間隔で16回行った。また、2-3週間隔で採血を実施し、抗体応答の解析に用いた。

ワクモ寄生に対する宿主の抗体応答

ワクモの成ダニ乳剤を抗原とするウェスタンブロットを実施し、ワクモ寄生下で経時的に採取した鶏およびラット血清との反応について検討した。鶏血清については、ワクモの卵、幼ダニ、若ダニ、成ダニ および成ダニ を抗原とするウェスタンブロットについても同様に行った。

ワクモ寄生鶏の末梢血単核球 (PBMC) における免疫関連遺伝子の発現状況解析

ワクモ寄生が宿主の免疫機能に与える影響を明らかにするため、ワクモ寄生から0週、3週および5週後に得た鶏血液からPBMCを調製し、IFN- γ 、IL-4およびIL-10の発現量をリアルタイムPCR法で測定した。発現量は、ワクモ寄生前の発現量との相対値とし、寄生後の推移を解析した。

鶏皮膚におけるワクモ吸血部位の局所反応

ワクモによる吸血が鶏皮膚の局所に与える影響を検討するため、ワクモ吸血鶏の刺咬部皮膚を

採取し、定法により病理組織学的検索を行った。

(2) ELISAによるワクモ寄生に対する抗体応答の検出

ワクモに寄生歴のある鶏からの抗体応答検出に有用なELISA法を確立するため、ワクモ乳剤からワクモ寄生鶏血清と反応を示す画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、ELISA用抗原として用いた。ELISAの有用性を検討するため、ワクモ寄生鶏血清の他、ワクモ寄生鶏から得た鶏卵から調製した卵黄抗体についても試験を行った。

(3) ワクモ抗原の精製および質量分析 二次元電気泳動

ワクモ抗原を定法により二次元電気泳動で分離し、ワクモ寄生7週後に得た血清を用いたウェスタンブロットに供した。

ワクモ抗原の精製

宿主に抗体応答を惹起するワクモ抗原の分子性を明らかにするため、当該抗原分子の精製を試みた。ワクモは成ダニを用い、乳剤作成後遠心し、得られた上清を陰イオン交換クロマトグラフィーで分画、ワクモ寄生鶏血清との反応を指標に目的分子を含む画分をSDS-PAGEで分子量によりさらに分画し、銀染色を行った。次に、銀染色像とウェスタンブロット像とを比較し、当該分子を含むバンドを試料として切り出し、質量分析に供した。

(4) ワクモprotein disulfide isomerase (PDI) 遺伝子のクローニングと発現

既報の節足動物PDIの塩基配列を参考に縮重プライマーを設計、RT-PCR法によりワクモのPDI遺伝子増幅を試みた。得られた増幅断片は塩基配列を解読し、大腸菌での発現を行うためプラスミドベクターにクローニングし、His \times 6タグ融合タンパク質として発現した。得られた大腸菌発現産物は精製後、BALB/cマウスに免疫し、抗ワクモPDI抗体の作成に用いた。作成した抗体は、ワクモ発育環におけるPDIの発現状況解析のため、ワクモ各発育段階の虫体を抗原とするウェスタンブロットに用いた。

(5) ワクモからの病原体遺伝子検出による病原体保有状況の解明

ワクモからの検出報告がある、豚丹毒菌、サルモネラ菌および鶏痘ウイルスの他、報告例の無い *Mycoplasma synoviae*, *M. gallisepticum*, マレック病ウイルスおよびトリアデノウイルスについてPCR法によるワクモからの遺伝子検出を試みた。ワクモは、2004年から2012年に38道府県142農場

から得た159サンプルを用いた。各サンプルのワクモ10匹からDNAを抽出し、各病原体に特異的プライマーにより遺伝子の検出を行った。遺伝子検出陽性の場合、農場で使用された生ワクチンである可能性があるため、塩基配列の解析により生ワクチンとの鑑別を行った。また、病原体遺伝子が検出されたワクモ試料は、病原体がワクモの体表か内部のいずれに存在するかを検討するため、リン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄後、再度病原体遺伝子の検出を行った。

(6) ワクモ体内での鳥インフルエンザウイルス感染価の経時的変化

ワクモを入れたガラスピペットの先端を塞ぎ、他の一端に鶏の皮膚を被せ、その上に鶏の血液を入れた容器を装着した。これにより、ピペット内のワクモが鶏皮膚を介し容器内の鶏血液を吸血する人工吸血システムを構築した。

次に、ワクモによる高病原性鳥インフルエンザウイルス伝播の可能性を検証するため、容器内の血液にH3、H5またはH7亜型の水禽由来弱毒A型インフルエンザウイルスを加え、これをワクモに吸血させた。吸血によりウイルスを取り込んだワクモは4 または25 に保存、その後、経時的にワクモから乳剤を作成し、10日齢の発育鶏卵を用いウイルス力価の推移を解析した。

4. 研究成果

(1) ワクモ吸血鶏におけるワクモ抗原に対する抗体応答

ワクモ寄生鶏の血清を用いたウェスタンブロットで、寄生2週目から、検索に供した全ての鶏にワクモ虫体の約53kDaおよび56kDa分子に対する抗体応答が認められた。ラットを用いた同様の実験でも、初回の吸血から6週後には鶏と同様に53kDaおよび56kDa分子に対する抗体応答が検出され、ワクモ吸血後の鶏およびラットでは、動物種にかかわらず同様の抗体応答の有ることが示された。また、これら2分子に対する抗体応答は、容器に入れたワクモにメッシュを介して鶏から吸血をさせた場合にも同様に認められ、この抗体応答が皮膚以外の経路から体内に取り込まれたワクモ抗原に対する反応ではなく、吸血時にワクモから宿主動物体内へと放出された抗原分子に対する反応と考えられた。

ワクモの各発育ステージから調製した抗原に対する反応性を検討したところ、53kDa抗原は、若ダニ、成ダニ および に認められ、卵及び幼ダニでは反応が認められなかった。ワクモでは、若ダニ以降のステージでのみ吸血が行われることから、53kDa分子と吸血との関連が推察された。56kDa抗原については、若ダニ、成ダニ 及び の他、微弱ながら幼ダニでも反応が認められ、卵

を除く全てのステージで発現していることが示された。

(2) ワクモ吸血鶏で抗体応答が認められたワクモ抗原分子解明の試み

二次元電気泳動

ワクモ抗原を二次元電気泳動で分画後、ワクモ寄生鶏血清を用いたウェスタンブロットを実施したところ、pI4.5-7に存在する分子量53kDaおよび56kDa分子との反応が認められた。この成績を元に、陰イオン交換クロマトグラフィーによるこれら2分子の精製を行った。

質量分析

陰イオン交換クロマトグラフィーで精製後、SDS-PAGEにより分子量で分画し銀染色を実施、ウェスタンブロットで反応が認めら2分子と同一の移動度を示すバンドを切り出し質量分析に供した。その結果、53kDa分子はダニ類のPDIと高い相同性を示した。一方、56kDa分子は既報の分子に相同性を示す分子は認められなかった。

ワクモPDI遺伝子のクローニングと発現

質量分析の成績から53kDa分子がワクモのPDIである可能性が示された。そこで、縮重プライマーを合成し、ワクモPDI遺伝子の増幅を試みた。次に、得られた増副産物を発現ベクターにクローニングし、大腸菌で組換えタンパク質として発現・精製した。得られた発現抗原に対する抗体を作成し、ワクモ抗原との反応性をウェスタンブロットで確認したところ、ワクモの分子量約53kDa分子との反応が認められた。一方、ワクモ寄生鶏血清はウェスタンブロットで、ワクモPDI発現抗原とは反応を示さなかった。このことは、寄生鶏血清との反応が認められたワクモの53kDa抗原がPDIとは異なる分子である可能性を示唆している。

(3) ワクモ寄生が鶏の免疫系に与える影響

末梢血単核球における免疫関連遺伝子発現状況の解析

ワクモ寄生鶏群から経時的に末梢血リンパ球を採取し、免疫関連遺伝子であるIFN-、IL-4およびIL-10遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法で測定した。その結果、ワクモ寄生後にIFN- およびIL-4が減少傾向を、IL-10が増加傾向を示した。細胞性免疫の活性化に關与するIFN- および液性免疫の活性化に關与するIL-4の発現が減少傾向を示し、抑制性サイトカインとして知られるIL-10に増加傾向が認められ、ワクモ寄生鶏は免疫抑制傾向にあることが示唆された。

ワクモ刺咬部における鶏皮膚の局所反応

ワクモ刺咬部を病理組織学的に検索したとこ

ろ、局所的な偽好酸球の浸潤が認められ、炎症反応の誘導が示された。今後は、皮膚局所での免疫応答を理解するため、PBMCでの解析と同様に皮膚局所での免疫関連遺伝子の動態についても検討する必要があると考えられた。

(4) ELISAによる抗ワクモ抗体検出法の確立

陰イオン交換クロマトグラフィーで得たワクモ粗精製抗原を用いたELISAにより、鶏血清からの抗ワクモ抗体検出を試みた。その結果、ワクモ寄生鶏血清は非寄生鶏血清より高い反応性を示し、今回確立したELISAが抗ワクモ抗体検出によるワクモ寄生歴の鑑別に有用である可能性が示された。この反応は鶏血清だけでなく、ワクモ寄生鶏の卵から調製した卵黄抗体でも同様で、鶏卵からもワクモ寄生歴の鑑別が可能であった。ワクモは1mm以下の微小な外部寄生虫で、主に夜間に活発に吸血する。このため、農場では発見が遅れることも多く、ELISAによる抗体検出は農場のワクモ汚染早期発見に有用と考えられた。

(5) ワクモの病原体保有状況解析

検索した159検体のうち、33検体から病原体の遺伝子が検出され、6検体からは複数の病原体遺伝子が検出された。鶏痘ウイルスは22検体から検出され、塩基配列の解析で1例が生ワクチンであること、他の21例が野外株であることが示された。鶏痘は効果的な生ワクチンの普及で発生件数は著しく減少した。しかし、今回の成績からウイルスは野外に広く分布していることが明らかになった。ワクモは鶏痘ウイルスを機械的に伝播することが知られており、疾病制御には生ワクチンだけでなく媒介者であるワクモの制御もまた重要と考えられた。また、*M. synoviae* (MS)が15検体、*M. gallisepticum* (MG)の遺伝子が2検体から検出された。MSは8例が生ワクチンと配列が異なり、野生株と考えられた。残り7例はワクチン株と同一の配列であった。MGは全てワクチン株と同一の塩基配列で、これらが生ワクチン由来である可能性が推察された。これまでワクモ虫体からマイコプラズマの検出例は無く、今回初めてワクモによるマイコプラズマ伝播の可能性が示唆された。

病原体の遺伝子が検出された33検体について、虫体を洗浄後に同様の遺伝子検出を行ったところ、鶏痘ウイルス陽性を示した3検体のみが洗浄後も遺伝子検出陽性で、他の30検体は陰性となり、今回検出されたマイコプラズマや鶏痘ウイルスの多くがワクモの体表に付着していることが推察された。

(6) インフルエンザウイルス伝播の可能性評価

ワクモに経口的に接種された弱毒の鳥インフルエンザウイルスは、ワクモ体内で徐々に感染価が

減少したが、25 では48から72時間、4 では2週間から5週間感染性を維持していた。高病原性鳥インフルエンザウイルスは鶏に全身感染するため、血液中に高力価のウイルスが存在することがある。この時ワクモによる吸血があれば、本実験同様に血中のウイルスはワクモ体内に移行すると考えられる。今回4 ではインフルエンザウイルスが数週間ワクモ体内で感染性を維持したことから、冬季であれば数週間にわたり感染性を維持し感染源となる可能性が示された。

5. 主な業績

〔学会発表〕(計4件)

小川恵実香 他6名: ワクモ *Dermanyssus gallinae* 寄生鶏特異抗体のELISAによる検出. 第155回日本獣医学会学術集会 2013年3月28日(東京)

小川恵実香 他5名: *Dermanyssus gallinae*(ワクモ)寄生に対する鶏の免疫応答. 第154回日本獣医学会学術集会 2012年9月16日(岩手)

Chu Thi Thanh Huong 他6名: *Dermanyssus gallinae*(ワクモ)体内における鳥インフルエンザウイルス感染価の経時的变化. 第154回日本獣医学会学術集会 2012年9月16日(岩手)

Chu Thanh Huong 他6名: 鳥インフルエンザウイルスおよびニューカッスル病ウイルスのワクモ (*Dermanyssus gallinae*) 体内における感染価の経時的变化. 第27回中国四国ウイルス研究会 2012年6月24日(鳥取)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 剛士 (YAMAGUCHI Tsuyoshi)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 70210367

(2) 研究協力者

鳥取大学農学部 笛吹 達史
千葉県畜産試験場 村野 多可子
山口大学大学院 連合獣医学研究科
Chu Thi Thanh Huong
鳥取大学農学部 小川 恵実香
鳥取大学農学部 西本 鉄平
鳥取大学農学部 北村 夕子
鳥取大学農学部 田中 亜依