

平成21年6月5日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17405043
 研究課題名（和文）韓国及び中国東北地方におけるダニ媒介性動物原虫感染症の分子疫学的調査研究
 研究課題名（英文）Epidemiological study on animal tick-borne protozoan diseases in Korea and China
 研究代表者
 玄 学南（XUAN XUENAN）
 国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
 研究者番号：10292096

研究成果の概要：

本研究は、日本と地理的にもっとも近い韓国及び朝鮮半島と国境を接している中国東北地方におけるダニ媒介性動物原虫感染症の流行の実態を明らかにし、日本の輸入検疫体制強化と韓国及び中国の原虫病診断技術の向上と普及に資することを目的として実施した。得られた主な成果として、（1）新規血清・遺伝子診断法の確立、（2）新規治療・予防法の開発、（3）韓国・中国の一部地域における牛・馬・犬などのバベシア原虫感染症の流行実態の解明、（4）韓国・中国の動物検疫関係機関への技術移転などが挙げられる。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2005年度 | 4,500,000 | 0 | 4,500,000 |
| 2006年度 | 3,600,000 | 0 | 3,600,000 |
| 2007年度 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 総計 | 13,200,000 | 1,530,000 | 14,730,000 |

研究分野：原虫病学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：原虫感染症、ダニ媒介、バベシア原虫、血清診断、遺伝子診断、疫学調査、韓国、中国

1. 研究開始当初の背景

海外からの動物感染症の侵入を未然に防ぐ有効な方策として、輸入検疫を強化する「国内対策」と海外で発生している感染症の情報の的確に収集・分析する「国外対策」が挙げられる。本研究では、日本と地理的にもっとも近い韓国及び朝鮮半島と陸続きで国境を接している中国東北地方における

動物原虫感染症の流行の実態を明らかにすることに着目した。その第一歩として、韓国及び中国東北地方における動物のバベシア、タイレリアなどダニ媒介性原虫感染症の流行実態を分子疫学的手法により調査することを企画した。ダニ媒介性原虫は特に牛と馬に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死性の感染症を引き起こし、その多くは法定

伝染病として指定され、日本国内には存在しない。しかし、日本にはこれらの原虫を媒介しうるダニの存在が確認されているために、一旦国内に侵入されれば広く蔓延・浸潤する可能性が大きく、その清浄化は非常に困難と想定される。

2. 研究の目的

そこで、本研究では韓国及び中国東北地方におけるダニ媒介性動物原虫感染症の浸潤・流行状況を明らかにし、日本の輸入検疫体制強化と韓国及び中国の原虫病診断技術の向上と普及に資することを目的とした。

3. 研究の方法

以下の手順に沿って実施した。(1)韓国及び中国東北地方におけるダニ媒介性動物原虫感染症の流行状況に関する聞き取り調査ならびに文献サーベイ、(2)小規模な野外調査地域の設定と予備調査、(3)本格的な野外調査(血清診断とDNA診断)、(4)各種原虫の培養・分離・同定、(5)分離株の生物学的性状解析、(6)分離株の遺伝子解析、(7)現地に適した診断・予防法の確立、(8)日本・韓国・中国の動物検疫関連機関への適切な助言の提供。

4. 研究成果

(1)血清診断法の確立：①ウシ・ウマ・イヌバベシア原虫感染血清を用いたcDNAライブラリーのイムノスクリーニングにより、多くの新規診断用抗原遺伝子を同定・クローニングした。②上記で得られた各種原虫の主要抗原遺伝子を大腸菌などで大量に発現・精製した。得られた組換えタンパク質を抗原としたELISA法・ICT法を確立した。

(2)遺伝子診断法の確立：ウシ・ウマ・イヌバベシア原虫特異遺伝子を増幅できるPCR法・LAMP法を確立した。

(3)治療法の開発：バベシア原虫のESTデータベースを作製し、原虫の葉酸代謝経路の必須酵素として知られるDihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase (DHFR-TS)同定し、その性状解析を行った。また、ジヒドロ葉酸レダクターゼの抑制剤(葉酸拮抗剤)として知られているピリメタミン(PYR)、メトトレキセート(MTX)、トリメトプリム(TMP)などを用いてDHFR-TSの酵素活性抑制能を調べたところ、濃度依存性の酵素抑制活性が認められた。さらに、これらの酵素抑制剤の抗原

虫作用をin vitro培養系で調べたところ、いずれも原虫増殖抑制効果を示したが、特にMTXがバベシア症の治療薬として有望であることが示唆された。

(4)予防法の開発：①人獣共通バベシア症を引き起こすネズミバベシア虫体から、ワクチン候補分子としてBmP0遺伝子をクローニングし、組換えBmP0試作ワクチンのマウスにおける感染防御効果を確認した。②ダニ媒介性原虫感染症を制御する上でダニの駆除が不可欠である。そこで、ダニの唾液腺よりmRNAを抽出し、cDNAライブラリーを構築した。特異血清を用いたcDNAライブラリーのイムノスクリーニングにより幾つかのワクチン候補遺伝子のクローニングに成功した。

(5)韓国における疫学調査：韓国全州・晋州・済州島地域における牛、犬の血液サンプルを採集し、ELISA法或いはICT法による抗体調査を行ったところ、ウシバベシア原虫とイヌバベシア原虫特異抗体が検出された。また、PCR法によりウシバベシアとイヌバベシア特異遺伝子の増幅が認められた。イヌバベシア原虫遺伝子の塩基配列を解析したところ、日本の分離株に非常に近縁であることが明らかとなった。今後は韓国ウシバベシア原虫分離株の遺伝子解析が待たれる。

(6)中国における疫学調査：朝鮮半島と広く国境を接している中国東北地方ならびに西部地域における牛・馬・驢馬・犬の血液サンプルを採集し、ELISA法或いはICT法による抗体調査を行ったところ、一部の地域においてウシバベシア原虫、ウマバベシア原虫或いはイヌバベシア原虫特異抗体が高率に検出された。この結果より、特にウシ・ウマ・ロババベシア症は中国東北ならびに西部地域に広く流行しており、これらのバベシア症の制圧対策は当該地域の家畜の生産性向上に重要であることが示唆された。また、PCR法によりウシバベシアとウマバベシア特異遺伝子の増幅が認められた。今後は中国のウシ・ウマバベシア原虫分離株の遺伝子解析が待たれる。

(7)周辺国における疫学調査：①中国南部と国境を接しているタイ国北部の牛の血液サンプルを採集し、ELISA法による抗体検査を行ったところ、ウシバベシア原虫特異抗体が高率で検出された。この結果より、ウシバベシア症はタイ国北部地域に広く流行しており、本症の制圧対策は当地域の牛の生産性向上に重要であることが示唆された。②中国北部と国境を接しているモンゴル国中央地域の馬の血液サンプルを採集し、ELISA法による抗体検査を行ったところ、ウマバベシア原虫特異抗体が高率で検出され

た。この結果より、ウマバベシア症はモンゴル中央地域に広く流行しており、本症の制圧対策は当地域の牛の生産性向上に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 70 件)

- ① Jia, H., Aboge, G.O., Terkawi, M.A., Goo, Y.K., Nishikawa, Y., Kuriki, K., Lee, K.K., Jang, H.K., Kim, S., Fujisaki, K., Xuan, X.: Genetic diversity of two selected antigen loci in *Babesia gibsoni* Asian genotype obtained from Japan and Jeju island of South Korea. *Vet. Parasitol.* 162: 142-146, 2009. (査読有り)
- ② Aboge, G., Jia, H., Terkawi, M., Goo, Y.K., Nishikawa, Y., Sunaga, F., Namikawa, K., Igarashi, I., Suzuki, H., Fujisaki, K., Xuan, X.: Cloning, expression and characterization of *Babesia gibsoni* dihydrofolate reductase-thymidylate synthase: inhibitory effect of antifolates on its catalytic activity and the parasite proliferation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 4072-4080, 2008. (査読有り)
- ③ Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I.: Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. *Vet. Parasitol.* 151: 158-163, 2008. (査読有り)
- ④ Kim, C.M., Blanco, L.B., Alhassan, A., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I.: Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78: 117-121, 2008. (査読有り)
- ⑤ Kim, C., Iseki, H., Herbas, M.S., Yokoyama, N., Suzuki, H., Xuan, X., Fujisaki, K., Igarashi, I.: Development of Taqman-based real-time PCR assays for diagnostic detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 837-841, 2007. (査読有り)
- ⑥ Kim, C., Alhassan, A., Verdida, R.A., Yokoyama, N., Xuan, X., Fujisaki, K., Kawazu, S.I., Igarashi, I.: Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 148: 137-143, 2007. (査読有り)
- ⑦ Terkawi, M.A., Jia, H., Gabriel, A., Goo, Y.K., Nishikawa, Y., Yokoyama, N., Igarashi, I., Fujisaki, K., Xuan, X.: A shared antigen among *Babesia* species: Ribosomal phosphoprotein P0 as a universal babesial vaccine candidate. *Parasitol. Res.* 102: 35-40, 2007. (査読有り)
- ⑧ Liao, M., Zhou, J., Hatta, T., Umemiya, R., Miyoshi, T., Tsuji, N., Xuan, X., Fujisaki, K.: Molecular characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 homologue from *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Vet. Parasitol.* 146: 148-157, 2007. (査読有り)
- ⑨ Terkawi, M.A., Jia, H., Zhou, J., Lee, E.G., Igarashi, I., Fujisaki, K., Nishikawa, Y., Xuan, X.: *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* infection in mice. *Vaccine* 25: 2027-2035, 2007. (査読有り)
- ⑩ Fukumoto, S., Tamaki, Y., Okamura, M., Bannai, H., Yokoyama, N., Suzuki, T., Igarashi, I., Suzuki, H., Xuan, X.: Prime-boost immunization with DNA followed by a recombinant vaccinia virus expressing P50 induced protective immunity against *Babesia gibsoni* infection in dogs. *Vaccine* 25: 1334-1341, 2007. (査読有り)
- ⑪ Chahan, B., Jian, Z., Miyahara, K., Tanabe, S., Xuan, X., Sato, Y., Moritomo, T., Nogami, S., Mikami, T., Maruyama, S., Inokuma, H.: Detection of DNA closely related to 'Candidatus Rickettsia principis' in *Haemaphysalis danieli* recovered from cattle in Xinjiang Uygur Autonomous Region area, China. *Vet. Parasitol.* 144: 184-187, 2007. (査読有り)
- ⑫ Zhou, J., Zhang, G., Fukumoto, S.,

- Yokoyama, N., Suzuki, H., Igarashi, I., Fujisaki, K., Lin, J., Xuan, X.: A *Babesia gibsoni* thrombospondin related anonymous protein (BgTRAP) is an immunodominant antigen involved in the erythrocyte invasion. Mol. Biochem. Parasitol. 148: 190-198, 2006. (査読有り)
- ⑬ Huang, X., Xuan, X., Verdida, R., Zhang, S., Yokoyama, N., Xu, L., Igarashi, I.: An immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of both *Babesia equi* and *B. caballi* infections in horses. Clin. Vaccine Immunol. 13: 553-555, 2006. (査読有り)
- ⑭ Huang, X., Xuan, X., Yokoyama, N., Katayama, Y., Anzai, T., Igarashi, I.: Evaluation enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens for the serodiagnosis of equine *Babesia* infection. Vet. Parasitol. 140: 158-161, 2006. (査読有り)
- ⑮ Chahan, B., Zhang, S., Seo, J., Nakamura, C., Zhang, G., Bannai, H., Jian, Z., Inokuma, H., Tuchiya, K., Sato, Y., Kabeya, H., Maruyama, S., Mikami, T., Xuan, X.: Seroepidemiological evidence for the possible presence of *Babesia (Theileria) equi* and *Babesia caballi* infections in donkeys in Western Xinjiang, China. J. Vet. Med. Sci. 68: 753-755, 2006. (査読有り)
- ⑯ Boonchit, S., Alhassan, A., Chan, B., Xuan, X., Yokoyama, N., Ooshiro, M., Goff, W.L., Waghela, S.D., Wagner, G., Igarashi, I.: Expression of C-terminal truncated and full-length *Babesia bigemina* rhoptry-associated protein 1 and their potential use in enzyme-linked immunosorbent assay. Vet. Parasitol. 137: 28-35, 2006. (査読有り)
- ⑰ Boldbaatar, D., Xuan, X., Battsetseg, B., Igarashi, I., Battur, B., Batsukh, Z., Bayambaa, B., Fujisaki, K.: Epidemiological study of equine piroplasmiasis in Mongolia. Vet. Parasitol. 127: 35-38, 2005. (査読有り)
- ⑱ Hirata, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Fujisaki, K., Suzuki, N., Igarashi, I.: Cloning of a novel *Babesia equi* gene encoding a 158-kilodalton protein useful for serological diagnosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 334-338, 2005. (査読有り)
- ⑲ Verdida, R.A., Xuan, X., Fukumoto, S., Huang, X., Zhou, J., Igarashi, I., Claveria, F. G., Nagasawa, H.: Development of a practical immunochromatographic test with recombinant P50 for the diagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs. Parasitology 131: 769-774, 2005. (査読有り)
- ⑳ Chahan, B., Jian, Z., Xuan, X., Sato, Y., Kabeya, H., Tuchiya, K., Itamoto, K., Okuda, M., Mikami, T., Maruyama, S., Inokuma, H.: Serological evidence of infection of Anaplasma and Ehrlichia in domestic animals in Xinjiang Uygur Autonomous Region area, China. Vet. Parasitol. 134: 273-278, 2005. (査読有り)
- [学会発表] (計 50 件)
- ① 大岡秀雄、五十嵐郁男、玄学南 (その他 4 名): *Babesia microti* 新規抗原 BmP49 の同定と性状解析。第 147 回日本獣医学会 (宇都宮)、2009 年 4 月 3 日。
- ② 具潤景、藤崎幸蔵、玄学南 (その他 6 名): バベシア症に対するアーツネートの治療効果。第 147 回日本獣医学会 (宇都宮)、2009 年 4 月 3 日。
- ③ 周麗佳、横山直明、玄学南、五十嵐郁男 (その他 3 名): タイにおけるウシバベシア症の疫学調査。第 146 回日本獣医学会 (宮崎)、2008 年 9 月 25 日。
- ④ Aboge G., Igarashi, I., Fujisaki, K., Xuan, X. (その他 5 名): Antifolate drugs target dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Babesia gibsoni*. 第 146 回日本獣医学会 (宮崎)、2008 年 9 月 25 日。
- ⑤ Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I. (その他 4 名): Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* blood samples. 第 145 回日本獣医学会 (相模原)、2008 年 3 月 29 日。
- ⑥ Jia, H., Fujisaki, K., Xuan, X. (その他 5 名): Characterization of leucyl aminopeptidase kinase of *Babesia gibsoni*. 第 144 回日本獣医学会 (江別)、2007 年 9 月 3 日。
- ⑦ Kim, C., Iseki, H., Yokoyama, N., Xuan, X., Igarashi, I.: Development of real-time PCR assays for detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*.

第 143 回日本獣医学会 (つくば)、2007 年 4 月 4 日。

- ⑧ Terkawi, A., Jia, H., Xuan, X., Fujisaki, K.: *Babesia gibsoni* ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* in mice. 第 141 回日本獣医学会 (つくば)、2006 年 3 月 20 日。
- ⑨ 中村千夏、玄学南 (その他 4 名): ワクシニアウイルスベクターを用いた犬 *Babesia gibsoni* TRAP 遺伝子の発現と性状解析。第 141 回日本獣医学会 (つくば)、2006 年 3 月 20 日。
- ⑩ 辻尚利、玄学南、藤崎幸蔵 (その他 12 名): フタトゲチマダニの臓器別完全長 EST データベースの解析。第 140 回日本獣医学会 (鹿児島)、2005 年 9 月 30 日。
- ⑪ Liao, M., Xuan, X., Zhou, J., Fujisaki, K.: Cloning and expression of Bm86 analogue from *Haemaphysalis longicornis* tick. 第 140 回日本獣医学会 (鹿児島)、2005 年 9 月 30 日。
- ⑫ Jia, H., Fujisaki, K., Xuan, X. (その他 6 名): Identification of a novel gene encoding secreted antigen BgSA1 from *Babesia gibsoni*. 第 140 回日本獣医学会 (鹿児島)、2005 年 9 月 30 日。
- ⑬ 玄学南、五十嵐郁男 (その他 10 名): 中国新疆地域におけるウマ・ロババベシア原虫感染症の疫学調査。第 140 回日本獣医学会 (鹿児島)、2005 年 9 月 30 日。

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ① 五十嵐郁男、黄曉紅、玄学南: ウマバベシア診断キット。特願 2005-8062, 2005。
- ② 藤崎幸蔵、八田岳士、玄学南、辻尚利: マダニのロイシンアミノペプチダーゼ。出願番号: 特願 2005-65550, 2005。
- ③ 玄学南、賈洪林、周金林、鈴木宏志、藤崎幸蔵、五十嵐郁男: バベシア・ギブソニの分泌抗原 1 タンパク質及びこのタンパク質をコードする DNA、並びにそれらの利用。特願 2005-244508, 2005。

[その他]

研究室のホームページ (<http://www.obihiro.ac.jp/~geneticbiochem/>)にて関連研究活動・業績等を発信している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玄学南 (XUAN XUENAN)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授
研究者番号: 10292096

(2) 研究分担者 (2005 年度～2007 年度)

藤崎 幸蔵 (FUJISAKI KOZO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号: 00292095

五十嵐 郁男 (IGARASHI IKUO)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号: 80159582

横山 直明 (YOKOYAMA NAOAKI)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号: 80301802

岩田 晃 (IWATA AKIRA)

財団法人日本生物科学研究所・主任研究員

研究者番号: 70193745

平田 晴之 (HIRATA HARUYUKI)

酪農学園大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 70381077

(3) 連携研究者 (2008 年度)

藤崎 幸蔵 (FUJISAKI KOZO)

鹿児島大学・農学部・教授

研究者番号: 00292095

五十嵐 郁男 (IGARASHI IKUO)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号: 80159582

横山 直明 (YOKOYAMA NAOAKI)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号: 80301802

岩田 晃 (IWATA AKIRA)

財団法人日本生物科学研究所・主任研究員

研究者番号: 70193745

平田 晴之 (HIRATA HARUYUKI)

酪農学園大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 70381077