

機関番号：10105

研究種目：基盤研究B（海外）

研究期間：2008～2010

課題番号：20405041

研究課題名（和文）東部アフリカにおけるツェツェバエ生息状況およびトリパノソーマ保有状況調査

研究課題名（英文）Studies on tsetse-transmitted trypanosomoses in eastern Africa

研究代表者

井上 昇（INOUE NOBORU）

国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授

研究者番号：10271751

研究成果の概要（和文）：本研究の成果によって（1）ヒトと家畜のアフリカトリパノソーマを媒介するツェツェバエの種類およびトリパノソーマの野生動物待機宿主を明らかにした。（2）現在正確で感度の高い血清診断法が無いアフリカトリパノソーマ症に対して、新たな簡易血清診断用抗原候補を同定することができた。今後さらに研究を発展させることで、アフリカトリパノソーマ症の疫学と早期簡便診断法、ひいては同感染症のコントロールに貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Prominent achievements of this research project are: (1) Identification of a wild animal reservoir of human and animal African trypanosomosis, and of tsetse fly species that predominantly transmit the diseases in studied area. (2) Discovery of novel serodiagnostic antigen candidates for development of point-of-care diagnostics for African trypanosomoses. By carrying out this study forward, we will be able to contribute better understanding of epidemiology, improvement of diagnostics, and eventually control of African trypanosomoses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	12,000,000	3,600,000	15,600,000

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：アフリカトリパノソーマ、ツェツェバエ、海外学術調査

1. 研究開始当初の背景

ツェツェバエ (*Glossina*) はアフリカトリパノソーマを媒介する唯一の媒介昆虫である。現在までに、31の種および亜種が確認されているが、すべてサハラ砂漠以南のアフリカ諸国にのみ分布している。31種のツェツェバエは形態学的特徴などから *Morsitans*, *Palpalis* および *Fusca* の3つのグループに分類できる。これらグループのうち最も効率よ

く全ての種類のアフリカトリパノソーマを媒介できるのは *Morsitans* グループである。一方、*Palpalis* グループのトリパノソーマ媒介効率は悪く、*Fusca* は家畜トリパノソーマ症病原体として重要な *T. vivax* と *T. congolense* を効率よく媒介する。*Morsitans*, *Palpalis* および *Fusca* は分布地域と環境も異なっており、それぞれ乾燥～半乾燥地帯 (*Morsitans*) および熱帯雨林地帯 (*Palpalis*)

と *Fusca*) である。本研究課題で調査対象とする東アフリカ地域 (ケニア・タンザニア・ザンビア) ではトリパノソーマを最も効率よく媒介する *Morsitans* グループが優勢である。

ツェツェバエはイエバエやカと異なり卵胎生である。メスは10日に1度3齢幼虫を1匹だけ出産し、3齢幼虫は産まれて数時間以内に地中に潜りサナギとなって30日後に成虫へと羽化する。このように特異な生活史を有するため、成虫を駆除することによってツェツェバエの生息数を大幅に減らすことが可能である。過去に殺虫剤の大量散布によってトリパノソーマ症が激減したこともあるが環境汚染やコストが問題となり中止された結果トリパノソーマ症例が再度増加した。現在では環境に配慮し、トラップを用いたツェツェバエ駆除法が考案され、現在最も有効なトリパノソーマ症対策として認知されている。トラップ法によって効率よくツェツェバエを捕獲するためには正確にツェツェバエ分布状況を把握し、最適な場所にトラップを仕掛ける必要がある。

ツェツェバエは本来狭い地域に限局して生息しており、このような地域はツェツェベルトと呼ばれる。したがってこれまでの東アフリカ地域におけるツェツェバエ分布状況およびトリパノソーマ保有状況調査は各国単位での小規模な調査が主体であった。しかしながらツェツェバエの広範囲にわたる移動はないが、トリパノソーマに感染した家畜および野生動物がツェツェベルト間を移動することは十分想定され、それによってそれぞれのツェツェバエ集団内で流行しているトリパノソーマ種が変化していくと考えられる。そこで申請者らは国際的規模でのツェツェバエ分布状況調査を企画した。本研究計画はこれまで行われてきたツェツェバエ分布状況調査としては最も大規模であり、調査対象国のツェツェバエ及びアフリカトリパノソーマ症対策に貢献できる。

2. 研究の目的

本研究では、海外共同研究者および北海道大学ザンビア研究拠点の協力を得て、ケニア・タンザニアおよびザンビアにおけるツェツェバエ分布状況及びトリパノソーマ感染状況を調査する。ツェツェバエのサンプリングは調査地のツェツェバエ捕獲係官の協力を仰ぎ、トラップ法によって実施する。トラップあたり数十から数百匹/日の効率でツェツェバエが捕獲できる。捕獲したツェツェバエは形態的特徴から雌雄、種を同定し、生存個体は解剖して唾液腺および中腸にトリパノソーマが感染しているか否かを検索する。隣り合ったツェツェベルト間のツェツェバエ交雑あるいは隔離状況は1塩基多型 (SNP) 解析と集団遺伝学的手法で調査する。

全てのツェツェバエ唾液腺および中腸からDNAを抽出し、トリパノソーマ種特異的LAMP法およびPCR法によって、トリパノソーマ感染率およびトリパノソーマ種を同定する。ツェツェバエが吸血した宿主動物の同定は中腸由来DNAからミトコンドリアDNAチトクロームb領域をPCR増幅後、クローニングし、塩基配列を決定して実施する。

3. 研究の方法

ツェツェバエの捕獲はHarris式、Biconical式あるいはPyramidal式などのツェツェバエ用トラップを使用するのがもっとも効果的である。これらのトラップは海外共同研究者を通じて現地ツェツェバエ捕獲係官から借り上げてフィールドに設置した。通常ツェツェバエ分布地帯では1トラップあたり1日に数10~数100匹のツェツェバエが捕獲できる。捕獲したツェツェバエのうち生存していたものは小型プラスチック容器などに移して現地研究所まで持ち帰った。すでに死んでいた個体についてはトリパノソーマ感染ツェツェバエから未感染ツェツェバエへのトリパノソーマDNAの汚染を防ぐため、個別にフタ付の1.5mlプラスチックチューブに保管して研究所に持ち帰った。

ツェツェバエサンプルの検査項目は①雌雄および種の同定、②唾液腺および中腸の解剖とトリパノソーマ感染の顕微鏡検査、③卵巣および子宮の顕微鏡検査によるツェツェバエ日齢判別、④唾液腺および中腸から抽出したトータルDNAからのLAMP法およびPCR法によるトリパノソーマ遺伝子種特異的検出、⑤中腸内血液からのミトコンドリアチトクロームb遺伝子増幅と配列解析による由来動物の同定、⑥SNP解析によるツェツェバエ集団の遺伝学的解析の6項目であった。ツェツェバエからのDNA抽出までを現地で実施し、その後のDNA解析は日本で実施した。DNAサンプルの場合日本への輸入禁止品には該当しないが、ツェツェバエDNAサンプル輸入に際しては動物検疫所担当官に連絡し、適切なアドバイスを得た。

4. 研究成果

本研究によって調査対象地域の家畜におけるトリパノソーマ感染率がウシ27%、ヤギ11%、ツェツェバエでは3.5%と、極めて高いことを明らかにした。また、人獣共通感染性のトリパノソーマ(HAT)がザンビア北東部で採取したツェツェバエから高頻度に検出されたことから、同地域がHATの高度流行地域で家畜が待機宿主となっていることも明らかにした。

本調査では検体のトリパノソーマ感染を証明できる方法として遺伝子増幅法(PCRとLAMP)を用いたが、現場レベルでは野

外調査で実施可能な簡便血清診断法の必要性が高い。現在利用可能なアフリカトリパノソーマ用血清診断法はその精度と感度に問題が多いと指摘されていることから、我々は新規血清診断法の開発にも取り組んだ。アミノ酸配列の反復を持つ抗原 (TR 抗原) はアフリカトリパノソーマと近縁のリーシュマニアで診断用抗原として実用化されていることから、トリパノソーマのTR 抗原をバイオインフォマティクスによって同定し、その分子性状を解析して論文発表した (Goto Y. et al. 2011)。なかでも Tb b GM 6 抗原が診断用抗原として優れている結果を得たので、同抗原の評価検討を実施し、診断用抗原として有望であることを見出した。

ベクター・パラサイト相互作用に関する研究では世界で初めてツェツェバエ体内型トリパノソーマであるエピマスティゴートステージ特異的に発現する主要表面分子 (CESP) のクローニングに成功し、分子寄生虫学分野ではトップレベルの学術雑誌に成果を報告した (Sakurai ら (2008) Mol. Biochem. Parasitol.). この成果はツェツェバエの体内でいかにしてトリパノソーマが発育増殖し、新たな動物宿主へと感染していくのか、解明する上で意義深い。

本研究の成果によって東部アフリカ地域のトリパノソーマ流行状況、媒介ツェツェバエ種、新規血清診断用抗原、ベクター・パラサイト相互作用にかかわる新規トリパノソーマ細胞表面分子、が明らかとなったが、疾病の流行状況は季節や年ごとに遷移していく。よって、今後も同様の疫学調査を継続し、疾病流行のダイナミズムをマクロとミクロの視点から研究していく必要がある。アフリカトリパノソーマ症は「顧みられない熱帯病」の筆頭格であり、流行国の農畜産業と人々の健康を著しく脅かしている。よって我国の学術面での国際貢献としても本研究プロジェクトを実施できた意義は大きかったと考えており、今後もさらなる外部資金を獲得して継続発展していく価値がある。

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 25 件)

1. Amer, S., Ryu, O., Tada, C., Fukuda, Y., Inoue, N. and Nakai Y. (2011) Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. Acta Tropica 117 (1) 39-46. 査読有
2. Goto, Y., Duthie, M. S., Kawazu, S-I., Inoue, N. and Carter, D. (2011) Biased

- cellular locations of tandem repeat antigens in African trypanosomes. Biochemical and Biophysical Research Communications 405 (3) 434-438. 査読有
3. Nakao, R., Stromdahl, E. Y., Magona, J. W., Faburay, B., Namangala, B., Malele, I., Inoue, N., Geysen, D., Kajino, K., Jongejan, F. and Sugimoto, C. (2010) Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*. BMC Microbiology 10: 296. 査読有
 4. Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, K., Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H. and Kita, K. (2010) Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. Parasitology International 59 (4) 560-564. 査読有
 5. Thekiso, O. M. M., Rambritch, N. E., Nakao, R., Bazie, R. S., Mbatia, P., Namangala, B., Malele, I., Skilton, R. A., Jongejan, F., Sugimoto, C., Kawazu, S. and Inoue, N. (2010) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes. International Journal for Parasitology 40 (1) 55-61. 査読有
 6. Hayashida, K., Hattori, M., Nakao, R., Tanaka, Y., Kim, J-Y., Inoue, N., Nene, V. and Sugimoto, C. (2010) A Schizont-derived protein, TpSCOP, is involved in the activation of NF-kappa B in *Theileria parva*-infected lymphocytes. Molecular and Biochemical Parasitology 174 (1) 8-17. 査読有
 7. Goto, Y., Carter, D., Guderian, J., Inoue, N., Kawazu, S. and Reed, S. G. (2010) Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania amastigotes*. Infection and Immunity 78 (5) 2138-2145. 査読有
 8. Thekiso, O. M. M., Rodriguez, C. V., Rivas, F., Coronel-Servian, A. M., Fukumoto, S., Sugimoto, C., Kawazu, S. and Inoue, N. (2010) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal

- amplification (LAMP). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 82 (5) 855-860. 査読有
9. Herbas, M. S., Thekisoe, O. M. M., Inoue, N., Xuan, X., Arai, H. and Suzuki, H. (2009) The effect of alpha-tocopherol transfer protein gene disruption on *Trypanosoma congolense* infection in mice. Free Radical Biology and Medicine 47 (10) 1408-1413. 査読有
 10. Tanaka, M., Sakurai, T., Yokoyama, N., Inoue, N. and Kawazu, S-I. (2009) Cloning and characterization of peroxiredoxin in *Babesia bovis*. Parasitology Research 105 (5) 1473-1477. 査読有
 11. Zhang, H. M., Thekisoe, O. M., Aboge, G. O., Kyan, H., Yamagishi, J., Inoue, N., Nishikawa, Y., Zakimi, S., and Xuan, X. (2009) *Toxoplasma gondii*: Sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Experimental Parasitology 122 (1) 47-50. 査読有
 12. Mekata, H., Konnai, S., Witola, W. H., Inoue, N., Onuma, M. and Ohashi, K. (2009) Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. Infection, Genetics and Evolution 9 (6) 1301-1305. 査読有
 13. Namangala, B., Inoue, N. and Sugimoto, C. (2009) Preliminary studies on the effects of orally-administered transforming growth factor-beta on protozoan diseases in mice. Japanese Journal of Veterinary Research 57 (2) 101-108. 査読有
 14. Konnai, S., Mekata, H., Mingala, C. N., Abes, N. S., Gutierrez, C. A., Herrera, J. R. V., Dargantes, A. P., Witola, W. H., Cruz, L. C., Inoue, N., Onuma, M. and Ohashi, K. (2009) Development and application of quantitative real-time PCR for the diagnosis of Surra in water buffaloes. Infection, Genetics and Evolution 9 (4) 449-452. 査読有
 15. Sakurai, T., Tanaka, M., Kawazu, S. and Inoue, N. (2009) Establishment of an *in vitro* transgene expression system in epimastigotes of *Trypanosoma congolense*. Parasitology International 58 (1) 110-113. 査読有
 16. Jing, Z., Magona, J. W., Sakurai, T., Thekisoe, O. M. M., Otim, C. P., Sugimoto, C. and Inoue, N. (2009) A field study to estimate the prevalence of bovine African trypanosomosis in Butaleja district, Uganda. The Journal of Veterinary Medical Science 71 (4) 525-527. 査読有
 17. Thekisoe, O. M. M., Bazie, R. S., Coronel-Servian, A. M., Sugimoto, C., Kawazu, S. and Inoue, N. (2009) Stability of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. The Journal of Veterinary Medical Science 71 (4) 471-475. 査読有
 18. Li, S. Q., Reid, S. A., Fung, M. C., Inoue, N. and Lun, Z. R. (2009) Analysis of gene expression profiles in the liver and spleen of mice infected with *Trypanosoma evansi* by using a cDNA microarray. Parasitology Research 104 (2) 385-397. 査読有
 19. Mekata, H., Konnai, S., Simuunza, M., Chembensofu, M., Kano, R., Witola, W. H., Tembo, M. E., Chitambo, H., Inoue, N., Onuma, M. and Ohashi, K. (2008) Prevalence and source of trypanosome infections in field-captured vector flies (*Glossina pallidipes*) in southeastern Zambia. The Journal of Veterinary Medical Science 70 (9) 923-928. 査読有
 20. Motloang, M. Y., Thekisoe, O. M. M., Alhassan, A., Bakheit, M., Motheo, M. P., Masangane, F. E. S., Thibiedi, M. L., Inoue, N., Igarashi, I., Sugimoto, C. and Mbatia, P. A. (2008) Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballii* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State Province, South Africa. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 75 (2): 141-146. 査読有
 21. Konnai, S., Mekata, H., Odbileg, R., Simuunza, M., Chembensof, M., Witola, W. H., Tembo, M. E., Chitambo, H., Inoue, N., Onuma, M. and Ohashi, K. (2008) Detection of *Trypanosoma brucei* in field-chaptured tsetse flies and identification of host species fed on by the infected flies. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 8 (4): 565-573. 査読有
 22. Guan, G. Q., Chauvin, A., Luo, J. X.,

- Inoue, N., Moreau, E., Liu, Z. J., Gao, J. L., Thekiso, O. M. M., Ma, M. L., Liu, A. H., Dang, Z. S., Liu, J. L., Ren Q. Y., Jin, Y. R., Sugimoto, C. and Yin, H. (2008) The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of *Babesia* spp. infective to sheep and goats in China. *Experimental Parasitology* 120 (1): 39-44. 査読有
23. Harakawa, S., Nedachi, T., Hori, T., Takahashi, K., Tochio, K. and Inoue, N. (2008) Effect of electric field in conditioned aversion response. *The Journal of Veterinary Medical Science* 70 (6): 611-613. 査読有
24. Sakurai, T., Sugimoto, C. and Inoue, N. (2008) Identification and molecular characterization of a novel stage-specific surface protein of *Trypanosoma congolense* epimastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 161 (1): 1-11. 査読有
25. Namangala, B., Yokoyama, N., Ikehara, Y., Taguchi, O., Tsujimura, K., Sugimoto, C. and Inoue, N. (2008) Effect of CD4+CD25+ regulatory T cell-depletion on acute lethal infection of mice with *Trypanosoma congolense*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 70 (8): 751-759. 査読有

[学会発表] (計12件)

1. Thuy, N. T., Goto, Y., Kawazu, S. and Inoue, N. 2010年10月2-3日、札幌. Evaluation of Tandem Repeat Antigens in ELISA to detect antibodies to *Trypanosoma evansi*. 第56回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会
2. 菅沼啓輔、竹本知代、櫻井達也、河津信一郎、井上昇. 2010年9月25-27日、鳥取. ツェツェバエ体内における *Trypanosoma congolense* CESP 発現パターンの解析. 第148回日本獣医学会
3. 竹本知代、菅沼啓輔、櫻井達也、河津信一郎、井上昇. 2010年9月25-27日、鳥取. *Trypanosoma congolense* CESP の多型解析. 第148回日本獣医学会
4. Laohasinnarong, D., Kawazu, S., Villacorte, E., Leonardo, L., Rivera, P. and Inoue, N. 2010年8月23-26日、Bangkok-Thailand. Comparison of PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for *Trypanosoma evansi* detection in water buffaloes of The Philippines. 13th AITVM Conference
5. 山際慶典、後藤康之、井上昇、河津信一郎. 2010年3月26-28日、東京. ガメトサイト形成能の異なるローデントマラリア原虫間でのプロテオーム解析. 第149回日本獣医学会
6. 増田裕乃、山際慶典、福本晋也、木村亜希子、櫻井達也、井上昇、河津信一郎. 2009年4月2-4日、つくば. ミトコンドリア局在ペルオキシダーゼ (TPx-2) ノックアウトがマラリア原虫赤内型の発育に及ぼす影響の解析. 第147回日本獣医学会
7. 田中みほ、櫻井達也、井上昇、横山直明、玄学南、河津信一郎. 2009年4月2-4日、つくば. バベシア原虫における遺伝子改変技術の開発. 第147回日本獣医学会
8. 島田亜希子、櫻井達也、河津信一郎、井上昇. 2009年4月2-4日、つくば. アフリカトリパノソーマのメタサイクロジェネシスには細胞周期の進行が必要か? 第147回日本獣医学会
9. Sakurai, T., Sugimoto, T. and Inoue, N. 2008年9月24-29日、Göttingen, Germany. Identification and molecular characterization of a novel stage-specific surface protein of *Trypanosoma congolense* epimastigotes. The 16th Japanese-German Cooperative Symposium on Protozoan Diseases
10. 目堅博久、今内覚、井上昇、小沼操、大橋和彦. 2008年9月24-26日、宮崎. ペルー共和国およびボリビア共和国における牛トリパノソーマ病の分子疫学調査. 第146回日本獣医学会
11. テキソエ オリエル、ランブリッチ ナターシャ、ラティフ アブダーラ、杉本千尋、河津信一郎、井上昇. 2008年9月24-26日、宮崎. LAMP法によるタイレリアパルバ特異的検出法の開発. 第146回日本獣医学会
12. 田中みほ、櫻井達也、横山直明、井上昇、河津信一郎. 2008年3月28-30日、麻布. *Babesia bovis* 2-Cys 型ペルオキシレドキシシン (BbTPx) のクローニングと機能解析. 第145回日本獣医学会学術集会

[その他]

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~trypan>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

井上 昇 (INOUE NOBORU)

国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号：10271751

(2) 研究分担者
河津 信一郎 (KAWAZU SHIN-ICHIRO)
国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授
研究者番号：60312295

後藤 康之 (GOTO YASUYUKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：50553434

(3) 連携研究者
杉本 千尋 (SUGIMOTO CHIHIRO)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
研究者番号：90231373