

平成 21 年 3 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18405037

研究課題名（和文）トリパノソーマ原虫の薬剤耐性と原虫遺伝子多型の解析

研究課題名（英文）Genetic analysis of drug resistant trypanosomes

研究代表者

小沼 操 (ONUMA MISA0)

北海道大学・名誉教授

研究者番号：70109510

研究成果の概要：トリパノソーマ原虫は人、家畜および野生動物に感染し睡眠病、ナガナ病、スーラ病などを引き起こし、多大な被害を与えている。本症は、ワクチンによる制御が困難なうえ、近年、原虫薬剤耐性株の出現によって、その被害は深刻化している。そこで原虫遺伝子多型および薬剤耐性機序解明を目的として、ザンビア共和国およびフィリピン共和国における本症の分子疫学調査を行った。さらに、媒介昆虫であるツェツェバエの吸血宿主の同定、すなわち本症のレゼルボア動物の推定のために、トリパノソーマ感染ツェツェバエ由来の DNA サンプルに含まれる哺乳類動物のミトコンドリア遺伝子を検出し、その遺伝子配列解析から吸血宿主を同定した。その結果、ヒトおよびアフリカゾウ、アフリカバッファローなどの野生動物に加え、調査地区集落の主要な家畜であるヤギの遺伝子も検出されたことから、ヤギにおける本症の分子疫学調査も行い、同地区の高率な感染率を報告した。一方、フィリピン共和国において集団流産が認められた家畜の原因病原体の調査も実施するとともに、抗原虫薬剤治療歴を持つ家畜からトリパノソーマ原虫を分離し薬剤感受性ならびに病原性解析を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：トリパノソーマ、薬剤耐性、抗原虫薬、遺伝子多型

## 1. 研究開始当初の背景

(1)トリパノソーマ原虫症は、アフリカやアジアの人、家畜および野生動物に感染し、多大な被害を与えている。本症は、ワクチンによる制御が困難であるうえ、近年、原虫薬剤耐

性株の出現によってその被害は深刻化しているが、どのような機序で薬剤耐性になるかは不明であった。

(2) ザンビア共和国、フィリピン共和国、ペルー共和国およびボリビア共和国における本症の被害は報告されているが、分子疫学調査はなされておらず、家畜の感染率などの詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) アフリカトリパノソーマ症は中央アフリカに分布するツェツェバエによって伝播され、人で睡眠病 (*T.b.rhodesiense*, *T.b.gambiense*)、家畜でナガナ病 (*T.b.brucei*, *T.vivax*, *T.congolense*) を起こし、毎年多くの人、家畜が死亡する。そこで、ザンビア共和国において本症の疫学調査を行った。

(2) フィリピンを含む南アジアに分布する *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) は、家畜の Surra 病を引き起こす。本症はワクチンによる制御が困難であるうえ、近年、原虫薬剤耐性株の出現によってその被害は深刻化している。そこで、本原虫の定量的検出法を確立後、フィリピン共和国における本症の分子疫学調査を行なった。

(3) 南米ではヒトにシャーガス病を起こす *T. cruzi* の研究が主であり、家畜のトリパノソーマ病の報告は少ない。そこで、本研究では南米の家畜のトリパノソーマ病の実態を調査するため、ペルー共和国およびボリビア共和国においてウシのトリパノソーマ原虫感染の PCR 法による分子疫学調査と原虫のトランスフェリンレセプター ESAG6 遺伝子多型解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ザンビア共和国においてツェツェトラップ 10 基にて採取したツェツェバエ (*G.pallidipes*) 492 匹より DNA を抽出後、Amp-direct Plus を用いた PCR 法及び Lamp 法にて検出を行った。また、本症の伝播経路を探索するため、陽性ツェツェバエ 39 匹の体内にある脊椎動物の *Cytochrome b* 遺伝子から blastX(NCBI) を用いた既存のデータベースとの照合を行い、吸血宿主の同定を行った。

(2) フィリピン共和国ルソン島 8 地区において水牛(カラバオ)463 頭、牛 115 頭、山羊 89 頭、羊 38 頭および馬 6 頭より血液を採取し DNA を抽出後、*RoTat1.2* 遺伝子をターゲットとした Real-time PCR 法により *T. evansi* 遺伝子の検出を行なった。

(3) 2008 年 5 月ペルー共和国のリマおよびワシカヨ、ボリビア共和国のサンタクルスにおいて計 648 頭のウシから採血を行った。DNA を抽出後、*T. evansi* および *T. vivax* 感染を PCR 法にて検出した。さらに、*T. evansi* の ESAG6 遺伝子の塩基配列をシーケンシング法にて解析した。

## 4. 研究成果

(1) ザンビア共和国で分子疫学調査を行った結果、*T.b.brucei* は 18.2%、*T.v.universal* は 2.8%、*T.c.savannah* は 4.2%、*T.c.forest* は 1.2%、*T.c.kilifi* は 1.8% が陽性だった。吸血宿主として、人や野生動物とともに、10 匹のツェツェバエからこの地域の主要な家畜であるヤギが検出された。そのため、同地域の 6 つの村の土着ヤギ 86 匹の感染を調べたところ、*T.b.rhodesiense* が 1.1%、*T.b.brucei* は 40.6%、*T.v.universal* は 4.6%、*T.c.savannah* は 5.8%、*T.c.forest*、*T.c.kilifi* は 4.6% が陽性だった。本研究から、同地域ではナガナ病の汚染が深刻であること、同症の伝播に野生動物に加えてヤギが関わっている可能性があることが示唆された

(2) フィリピン共和国における *T. evansi* の分子疫学調査へ応用した新規 Real-time PCR 法の検出感度は  $10^2/\text{ml}$  濃度の原虫まで定量的検出が可能であった(\*検出は  $10^1 < \sim 10^2/\text{ml}$  でも可能(但し検量線外))。本法による疫学調査の結果、水牛 17 頭(6.0%)が陽性を示した。このことから本法による *T. evansi* の Parasitemia level での検出評価法が確立された。陽性水牛には、抗トリパノソーマ薬である Samorin による治療を受けたのにも関わらず原虫が検出された患者が含まれていたことから本法を用いて分離原虫の薬剤感受性試験が可能となった。

(3) ペルー・ボリビア共和国両国において分子疫学調査を行った結果、ペルーのリマでは104頭中6頭(5.8%)のウシから *T. evansi* が、4頭(3.8%)から *T. vivax* が検出された。一方、ワンカヨでは29頭中感染が確認されたウシはいなかった。ボリビアのサンタクルスでは510頭中59頭(11.5%)のウシから *T. evansi* が、5頭(0.9%)から *T. vivax* が検出された。さらに、サンタクルスの *T. evansi* のESAG6遺伝子多型を解析した結果、6つの多型を確認し、うち5つが新規多型が認められた。系統樹解析の結果、ボリビアの *T. evansi* のESAG6はアジアの *T. evansi* とは異なり、既に報告がある *T. brucei* や *T. equiperdum* と異なるCladeに集中していることが明らかとなった。本研究の結果から、ペルー・ボリビア両国のウシで *T. evansi*、*T. vivax* 感染がみられること、またボリビアの *T. evansi* がアジアの *T. evansi* とは異なるESAG6遺伝子を持つことが明らかとなった。

## 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4件)

- ① Konnai S, Mekata H, Mingala C.N., Abes N.S., Gutierrez C.A., Herrera R.V., Dargantes A.P., Witola W.H., Cruz L.C., Inoue N., Onuma M., Ohashi K. Development and application of a quantitative real-time PCR for the diagnosis of Surra in water buffaloes. *Infect. Genet. Evol. in press*. 2009. (査読有り).
- ② Konnai S, Mingala C.N, Sato M, Abes N.S, Venturina F. A, Gutierrez C.A, Sano T, Omata Y, Cruz L.C, Onuma M, Ohashi K. A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems. *Acta Trop.*, 105: 269-273. 2008. (査読有り).
- ③ Konnai S, Mekata H, Odbleg R, Simmunza M, Chembensof M, Witra W.H, Tembo M.E, Chitanbo H, Inoue N, Onuma M, Ohashi K. Detection of *Trypanosoma brucei* in field-captured tsetse flies and identification of host species fed on by the infected flies. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8: 565-574. 2008. (査読有り).

- ④ Mekata H, Konnai S, Simmunza M, Chembensof M, Kano R, Witra W.H, Tembo M.E, Chitanbo H, Inoue N, Onuma M, Ohashi K. Prevalence and Source of Trypanosome Infections in Field-Captured Vector Flies (*Glossina pallidipes*) in Southeastern Zambia. *J. Vet. Med. Sci.*, 70:923-928. 2008. (査読有り)

[学会発表] (計3件)

- ①目堅博久, 今内 覚, 井上 昇, 小沼 操, 大橋 和彦. 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回日本獣医学会学術集会, 2008年9月24-26日, 宮崎県宮崎市(シーガイヤ).
- ②目堅博久, 今内 覚, R.Odbileg, M.Simuunza, M.Chembensofu, W.Witola, M.Tembo, H.Chitambo, 井上 昇, 小沼 操, 大橋 和彦. ザンビア共和国におけるトリパノソーマ症の疫学調査とその伝播経路の探索. 第144回日本獣医学会学術集会. 2007年9月2-4日, 北海道江別市(酪農学園大学)
- ③ 今内 覚,目堅 博久, C.N.Mingala, N.S.Abes, C.A.Gutierrez, R.herrera, W.H.Witola, L.C.Cruz, 井上 昇, 小沼 操, 大橋 和彦. フィリピン共和国における *Trypanosoma evansi* の分子疫学調査. 第144回日本獣医学会学術集会. 2007年9月2-4日, 北海道江別市(酪農学園大学).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沼 操 (ONUMA MISAO)  
北海道大学・名誉教授  
研究者番号: 70109510

(2) 研究分担者

大橋 和彦 (OHASHI KAZUHIKO)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授  
研究者番号: 90250498

井上 昇 (INOUE NOBORU)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・准教授  
研究者番号：10271751

今内 覚 (KONNAI SATORU)  
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号：40396304

(3)連携研究者  
なし