

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007 ～ 2010

課題番号：19255015

研究課題名（和文） 家畜・野生動物を感染源とする人アフリカトリパノソーマ症の実態調査と病原因子解明

研究課題名（英文） Surveillance of human African trypanosomiases transmitted from domestic and wild animals and detection of virulence factors

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：ザンビアでのヒトトリパノソーマ感染症の分子疫学調査を実施し、東部州で発生があることを突き止めて周辺地域での家畜、ツェツェバエでの原虫保有状況を調査した。その結果、高率にツェツェバエ(*Glossina morsitans*)が人に感染しうる *Trypanosoma brucei rhodesiense* を保有し、吸血源の分析からイボイノシシ、クドゥーが感染源である可能性が示された。スーダンにおいて *T. evansi* がラクダで高率に保有されていることも明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：Molecular epidemiological surveillance of human and animal had been conducted in Zambia and Sudan and human cases were confirmed in the Eastern Province in Zambia. Tsetse flies (*Glossina morsitans*) were infected with human-infective *Trypanosoma brucei rhodesiense* at high infection ratio, and warthog and kudu were supposed to serve as natural reservoirs. In Sudan, high infection rate with *T. evansi* was observed in camels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
総計	26,100,000	7,830,000	33,930,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：アフリカ、トリパノソーマ、ツェツェバエ、病原性、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

ツェツェバエにより媒介される人・動物のトリパノソーマ感染症はアフリカ大陸における重要な原虫性疾患である。しかしながら、1990年代以降、ザンビアなど南部アフリカ地域での発生情報は乏しく、現状調査が必要であった。特に東・南部アフリカ諸国でヒト眠り病の原因となる *T. brucei rhodesiense* は牛などの家畜、あるいは各種野生動物が感染

源となっていることから、獣医学サイドからの研究・調査が不可欠である。またツェツェバエに依存せず伝播する *T. evansi* に関しては、インドでヒトの感染例が報告されるなど人獣共通感染症としての側面もあり、類縁の *T. brucei* と本種が共存すると考えられる北部アフリカにおける情報が乏しいため、その実態調査が課題であった。

2. 研究の目的

本研究では新興人獣共通感染症としてトリパノソーマ原虫症について東・南部アフリカでの実態を把握、その病原性進化の過程を追跡することを目的としている。アジア・アフリカ大陸での温血動物におけるトリパノソーマ感染症としては *T. brucei* (*gambiense*, *rhodesiense*, *brucei* の3亜種)、*T. evansi* 感染症が知られている。これらのうち、ヒトへの病原性を有する種としては *T. brucei gambiense* (主に中央～西アフリカに分布) と *T. brucei rhodesiense* (東～南部アフリカ諸国) であり、*T. evansi* についてはヒトへの病原性を保有しないと従来考えられてきた。しかし、最近ウガンダで *T. brucei rhodesiense* の牛を原発とするヒトへの新たな感染拡大が大きな社会問題となっており、新興感染症出現の観点から新たな視点でこれらの原虫の病原性の進化を捉える必要性がでてきた。そこで本計画ではアフリカ諸国の研究者との研究ネットワークを活用して家畜・野生動物ならびに人における感染の実態を共同で調査し、原虫進化の道筋を辿ると同時に、感染巣の拡大が起きているか原発地域の周辺地域での原虫の分子疫学的モニタリングを行い、予防対策確立に必要な情報を発生各国に提供する。今回調査対象とする地域のうち、ザンビアでは人、家畜と野生動物が密接に接触する機会が多く、野生動物がどのように人、家畜トリパノソーマのレゼルボアとなっているかについても解明する。加えてベクターであるツェツェバエの各種生物学的性状をゲノム解析から明らかにして、ベクターコントロール法の開発を行い、HAT 予防対策確立においてブレークスルーを図ることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料の採取

①家畜の血液、DNA

対象とした家畜は牛、ヤギ(以上ザンビア)、ラクダ、馬(以上スーダン)である。これらは採血後、全血からDNAを精製した。一部はFTAカード上に血液を滴下し、乾燥後スポットを切り出してDNAを抽出、精製した。実施可能な場合は、毛細管遠心法により顕微鏡下で原虫

の感染を検査した。

②ツェツェバエの採取

人トリパノソーマ症の発生が確認されたザンビア東部において、トラップによりハエを捕獲し、シリカゲルで乾燥、保管した。保管試料を磨砕し、DNAを抽出した。

(2) 遺伝子検索

PCRもしくはLAMP法によりトリパノソーマ原虫遺伝子検索を実施した。

(3) マイクロサテライトマーカー解析

グラスゴー大学で開発されたマイクロサテライトマーカーから18種のマーカーを選択し、蛍光プライマーを用いたフラグメント解析を実施した。

(4) SRA遺伝子塩基配列の解析

PCR、もしくはLAMPにより *T. brucei* 陽性であった試料についてはSRA特異的プライマーにより同遺伝子の存在を確認し、*T. brucei rhodesiense* であるかを同定した。SRA陽性試料については塩基配列を決定し、既報にある配列と比較した。

4. 研究成果

(1) ザンビアにおける家畜のトリパノソーマ感染状況

ザンビア東北部、チャマ村付近で採取したウシ血液由来DNA105検体、ヤギ血液由来DNA136検体、ツェツェバエDNA1546検体をヒト急性アフリカトリパノソーマ(HAT)検出用PCR、家畜アフリカトリパノソーマ検出用PCRおよびトリパノゾーン亜属特異的LAMP法を用いて検査した。その結果、LAMP法ではトリパノソーマ保有率がウシ27%、ヤギ11%、ツェツェバエ3.5%と、極めて高い感染率であった。トリパノゾーン亜属はHATおよび家畜のアフリカトリパノソーマ症の原因となるトリパノソーマを含む分類群であるため、ツェツェバエからも高い頻度でHATが検出された結果と総合すると、調査地域のザンビア北東部では家畜がHATの待機宿主となっていることが明らかとなった。

(2) スーダンにおける家畜におけるトリパノソーマ感染状況

スーダン各地で収集した牛血液由来DNA 210検体を用いてTrypanosoma属原虫を

Internal Transcribed Spacer (ITS)領域を標的にしたPCRにより検索し、その増幅産物のサイズにより種鑑別 (*T. congolense*, *T. vivax*, *T. brucei*/*T. evansi*, *T. simiae*)を行った。その顕微鏡検査の結果では、それぞれ、10、33.3%の個体が*T. congolense*, *T. vivax*に感染していることが分かったが、PCRでは56.7%の個体がこれらのトリパノソーマ種に単独もしくは混合感染していることが明らかとなった。さらにITS領域に変異を持つ*T. simiae*が検出された。SRA遺伝子を保有している*T. brucei*は検出されなかった。

また、ラクダの血液DNA試料687検体から、同様にITS領域を標的にしたPCRにより *Trypanosoma*属原虫を検索した。その結果、陽性率は地域ごとに差が認められ、その範囲は7.1-57.1%であった。また、陽性検体のすべては*T. evansi*の単独感染例であることが明らかにされた。陽性30検体について、本種に特異的とされるRoTat1.2遺伝子を標的とするPCRをさらに実施ところ、13検体では本遺伝子陰性であり、*T. evansi*の特異的診断には他の標的領域を探しだす必要があると考えられた。

さらに、*T. evansi*陽性検体について、15のマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型別を実施し、遺伝子型に基づき原虫集団解析を行った。その結果、地域により検出される遺伝子型に偏りにがあることや、本原虫はクローナルな原虫集団で構成されていることが判明した。また、原虫間の交雑による組換えの可能性を示唆する結果も得られた。

(3) ザンビアにおけるツェツェバエのトリパノソーマ感染状況と吸血宿主

ツェツェバエは常法に従って、トラップ法によって捕獲した。ツェツェバエはトラップから回収後、ただちにオスメスを鑑別し、個別に乾燥剤入りの小型サンプルチューブに保存し、DNA抽出に供するまで室温で保存した。チャマ村付近で捕獲したツェツェバエ546匹のうち*G. m. morsitans*メスが最も多い465匹、次いで*G. pallidipes*オス54匹、*G. m. morsitans*オス27匹の順であった。

チャマ村付近で捕獲したツェツェバエのうち、トラップ回収後も生存していた個体を用いて唾液腺からのトリパノソーマ分離を試み

た。ツェツェバエは1対の唾液腺を持つが、今回は10匹分(10対)の唾液腺を1ドースとして摘出した唾液腺をリン酸緩衝液に懸濁後、マウスに腹腔内投与し、その後2週間マウスの血液顕微鏡検査を実施してトリパノソーマ感染の有無を調べた。その結果、6匹のマウスがトリパノソーマに感染し、内3匹がHATを引き起こすローデシアトリパノソーマ (*T. b. rhodesiense*: TBR) (図1)、残り3匹が動物のアフリカトリパノソーマ症を引き起こすブルーストリパノソーマ (*T. b. brucei*)であった。以上の結果から、チャマ地域は人獣共通感染性HAT高度汚染地域であることが明らかとなった。

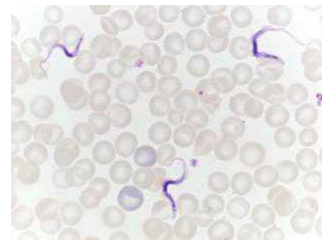


図1: ザンビアのツェツェバエから分離された *T. b. rhodesiense*

ザンビアで分離された株についてグラスゴー大学Dr. MorrisonにDNAを提供し、マイクロサテライト解析により、同国で1990年代以前に分離された株、ザンビア周辺諸国で分離された株との遺伝子型を比較した。

チャマ村でのHAT検出を受けて、HATがどのように自然界で維持され、ヒトへ感染の感染源となっているかを明らかにするべく、ツェツェバエが保有するトリパノソーマ種に加え、どのような動物から好んで吸血しているかを調査した。トリパノソーマ種の同定は特異的PCR法、ツェツェバエ消化管内に残存している動物血液の種同定はチトクロームb遺伝子のPCR増幅と塩基配列の相同性検索によって実施した。その結果、イボイノシシ、バフアロー、カバ、アフリカゾウなど、チャマ村付近に生息する野生動物に加えてヒトの血液も検出された。HAT保有ツェツェバエが最も好んで吸血していた宿主はイボイノシシとヒトであり、主として*G. m. morsitans*メスによって媒介されていることが明らかとなった(表1)。HAT媒介ツェツェバエ種が特定できたことは、ベクターコントロールによるトリパノソーマ症対策を策

定する上で極めて有用な情報である。

種名	吸血した宿主	ツェツェバエから検出されたトリパノソーム			
		TZ	TR	TC	TV
<i>G. m. morsitans</i> (オス)	イボインシ	17	4	12	36
	バフアロー	1	0	0	5
	カバ	1	0	8	8
	クダウ	7	3	5	13
	アフリカノウ	0	0	0	4
	リードバツク	0	0	1	1
ヒト	24	7	24	36	
その他	1	1	3	6	
2種以上の宿主	0	0	0	1	
<i>G. m. morsitans</i> (オス)	イボインシ	1	1	0	3
	バフアロー	0	0	0	0
	カバ	0	0	0	2
	クダウ	1	1	1	1
	アフリカノウ	0	0	0	0
	リードバツク	0	0	0	0
	ヒト	1	1	1	8
	その他	0	0	0	0
2種以上の宿主	0	0	0	1	
<i>G. pallidipes</i> (オス)	イボインシ	0	0	0	4
	バフアロー	0	0	0	1
	カバ	0	0	3	6
	クダウ	0	0	1	1
	アフリカノウ	0	0	1	1
	リードバツク	0	0	0	0
	ヒト	0	0	2	13
	その他	0	0	0	0
2種以上の宿主	0	0	3	7	

表1：ツェツェバエ吸血宿主の同定

TZ：Trypanozoon亜属
 TR：T. b. rhodesiense (HAT病原体)
 TC：T. congolense
 TV：T. vivax

(4) 家畜ならびに節足動物における各種病原体保有状況調査

今回、トリパノソームの調査を主目的に試料を採取したが、同時に採取した試料を用いて各種病原体の保有状況についても調査研究を行ったのでその概要を記載する。

スーダンにおいて採取した馬血液DNAについて馬ピロプラズマ(*Theileria equi*, *Babesia caballi*)の保有状況と他国で報告された分離株、野外株の遺伝子型と比較した。small subunit rRNA遺伝子 (SSU rDNA) を標的としたPCRにより原虫遺伝子を検出し、両原虫の感染状況を明らかにした。さらにT. equiについては増幅産物の塩基配列を決定し、従来世界各地で報告されている同原虫の遺伝子配列と比較し系統解析を行った。その結果、スーダンにおいては、従来知られていなかったSSU rDNA配列を持つT. equiが見出された。

スーダンでの採材時、牛に主に付着しているマダニを収集し、DNAを精製後、PCRによりリケッチア属細菌の検索を行ったところ、Amblyomma属マダニからRickettsia africae (人のアフリカダニ熱病原体) が検出された。

アフリカ各国に分布するリケッチアであるEhrlichia ruminantiumの分離株DNAの収集をオランダ、ベルギーの海外研究協力者の協力を得て実施した。収集したDNAの解析により、

本病原体に起因する感染症(心水症)の新規診断法(LAMP)、ならびに分子疫学調査に有用なDNA型別法を開発した。

ウシの良性タイレリアグループ原虫(*Theileria orientalis Ikeda*-, *Chitose-types*, *T. buffeli*)のITS2領域の長さの違いに注目し、本領域を特異的に増幅するPCRプライマーを設計し、蛍光標識された増幅産物のフラグメント長を解析することにより、混合感染した野外試料からでも簡便にこれらの型の原虫を定性かつ半定量的に検出する方法を開発した。

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15件)
- ① Kamau J. (他3名、4番目) Rapid discrimination and quantification of *Theileria orientalis* types using ribosomal DNA internal transcribed spacers.、Infect Genet Evol.、査読有、11、2011、407-414
 - ② Kamau J. (他5名、6番目) Emergence of new types of *Theileria orientalis* in Australian cattle and possible cause of theileriosis outbreaks.、Parasit Vectors.、査読有、21、2011、22
 - ③ Salim B. (他4名、5番目) Molecular epidemiology of camel trypanosomiasis based on ITS1 rDNA and RoTat 1.2 VSG gene in the Sudan.、Parasit Vectors.、査読有、4、2011、31
 - ④ Yokoyama, N., (他13名、12番目) Genotypic diversity of *Theileria orientalis* detected from cattle grazing in Kumamoto and Okinawa Prefectures of Japan.、J. Vet. Med. Sci.、査読有、73、2011、305-312
 - ⑤ Thekiso, O. M. (他7名、7番目) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP).、Am. J. Trop. Med.

- Hyg.、査読有、82、2010、855-860
- ⑥ Salim, B. (他4名、5番目) Nucleotide sequence heterogeneity in the small subunit ribosomal RNA gene within *Theileria equi* from horses in Sudan.、*Parasitol Res.* 査読有、106、2010、493-498
- ⑦ Thekisoe, O.M. (他11名、10番目) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the P1M and p150 genes.、*Int. J. Parasitol.*、査読有、40、2010、55-61
- ⑧ Nakao, R. (他10名、11番目) Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*.、*BMC Microbiol.*、査読有、10、2010、296
- ⑨ Thekisoe O.M. (他5名、4番目) Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. *J. Vet. Med. Sci.*、査読有、71、2009、525-527
- ⑩ Jing Z. (他6名、6番目) A field study to estimate the prevalence of bovine African Trypanosomosis in Butaleja District, Uganda.、*J. Vet. Med. Sci.*、査読有、71、2009、525-527
- ⑪ Dang Z. (他7名、8番目) Molecular cloning and characterization of a T24-like protein in *Echinococcus multilocularis*.、*Mol. Biochem. Parasitol.*、査読有、168、2009、117-119
- ⑫ Namangala B., Inoue N. and Sugimoto C.、Preliminary studies on the effects of orally-administered transforming growth factor-beta on protozoan diseases in mice. *Jpn. J. Vet. Res.*、査読有、57、2009、101-108
- ⑬ Jia H. (他11名、10番目) Characterization of a leucine aminopeptidase of *Babesia gibsoni*.、*Parasitology*、査読有、136、2009、945-952
- ⑭ Dang Z. (他10名、11番) Evaluation of *Echinococcus multilocularis* tetraspanins as vaccine candidates against primary alveolar echinococcosis.、*Vaccine*、査読有、27、2009、7339-7345
- ⑮ Gao J. (他14名、14番目) Characterization of a concealed antigen Hq05 from the hard tick *Haemaphysalis qinghaiensis* and its effect as a vaccine against tick infestation in sheep.、*Vaccine*、査読有、56、2009、171-180
- [学会発表] (計8件)
- ① Sugimoto, C.、Surveillance of Human African Trypanosomiasis in Zambia and Characterization of *Typanosoma brucei rhodesiense*.、Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2010、2010年11月12日、Hanoi (Vietnam)
- ② 中尾 亮、*Ehrlichia ruminantium*多型解析のためのMulti-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA)法の開発、第150回日本獣医学会学術集会、2010年9月16-18日、帯広畜産大学(帯広市)
- ③ 中尾 亮、Whole-genome analysis of an attenuated *Ehrlichia ruminantium* vaccine strain using next-generation sequencer、The 2nd International Young Researcher Seminar in Zoonosis Control 2010、2010年9月13-14日、北海道大学(札幌市)
- ④ 中尾 亮、Whole-genome analysis of an attenuated *Ehrlichia ruminantium* vaccine strain using next-generation sequencer、XIIth International Congress of Parasitology (ICOPA)、2010年8月15-20日、Melbourne Convention & Exhibition Centre (Melbourne, Australia)
- ⑤ 中尾 亮、次世代シーケンサーによる *Ehrlichia ruminantium* 弱毒ワクチン株の全長ゲノム解読と弱毒化機序の遺伝的背景の解析、第18回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー、2010年6月11日-13日、トキ交流会館(新潟県佐渡市)

- ⑥ 中尾 亮、次世代シーケンサーを活用した*Ehrlichia ruminantium* 弱毒ワクチン株の全ゲノム解析、第83回日本細菌学会総会、2010年3月29日、パシフィコ横浜（横浜市）
- ⑦ 中尾 亮、次世代シーケンサーによる*Ehrlichia ruminantium* 弱毒ワクチン株の全長ゲノム解読と弱毒化機序の遺伝的背景の解析、第149回日本獣医学会学術集会、2010年3月26日、日本獣医生命科学大学（武蔵野市）
- ⑧ 中尾 亮、LAMP法による*Ehrlichia ruminantium* 迅速検出法の開発、第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月26日、とりぎん文化会館（鳥取市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

梶野 喜一 (KAJINO KIICHI)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授
研究者番号：80322147

中村 一郎 (NAKAMURA ICHIROU)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・講師
研究者番号：20374241

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