

令和元年5月23日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05264

研究課題名(和文) フィリピンにおける牛のマダニ媒介性動物感染症の実態解明と診断・予防法の確立

研究課題名(英文) Epidemiological study of bovine tick-borne diseases and its establishment of diagnosis/preventive methods in Philippines

研究代表者

田中 哲也 (TANAKA, TETSUYA)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：00322842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：牛のアナプラズマ症やバベシア症含むマダニ媒介性感染症は、世界規模で甚大な被害を与えており、海外悪性伝染病に指定されている。本研究は、新たな診断法を開発すると共に、フィリピンにおける牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症の感染状況を明らかにし、日本のアナプラズマ症とバベシア病に対する検疫体制強化に貢献することを目的として行われた。その結果、牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症に対する新規の遺伝子診断法が開発された。これらの診断法を用いたフィリピンマニラ周辺地域における牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症の疫学調査により、これら病原体を含むマダニ媒介性病原体の高い感染率が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

[本研究の学術的意義] 牛のマダニ媒介性感染症として代表的なアナプラズマ症ならびにバベシア症に対するPCR法やLAMP法などの遺伝子診断法が開発された。また、これらの診断法を用いたフィリピンマニラ周辺地域における牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症の疫学調査を行ったところ、これらの地域でマダニ媒介性病原体の高い感染率が認められた。[本研究の社会的意義] 本研究で開発されたPCR法やLAMP法による診断技術が動物検疫体制の強化に貢献することが今後期待される。

研究成果の概要(英文)：Bovine tick-borne diseases including anaplasmosis and babesiosis causes great economic losses to animal industry worldwide and designated as an exotic infectious disease. Objective of the present study was to develop new gene diagnostic test against anaplasmosis and babesiosis to do molecular epidemiological survey on anaplasmosis and babesiosis in Philippines, and to contribute for strength of the quarantine system in Japan. As a result, new gene diagnostics was developed against bovine anaplasmosis and babesiosis. The epidemiological surveillance at the surround area of Manila in Philippines demonstrated high prevalence of tick-borne pathogens including anaplasmosis and babesiosis in these regions.

研究分野：マダニ媒介性感染症学

キーワード：マダニ マダニ媒介性感染症 アナプラズマ(リケッチア) バベシア タイレリア フラビウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、TPP の合意の実施により海外からの動物・畜産品の輸入が急増し、これに伴う海外の動物感染症に対する万全な監視体制を整えると共に海外の各種感染症の流行状態を把握することが強く要求されている。我が国と貿易が盛んなフィリピンは、2008 年から経済連携協定 (JPEPA) が結ばれており、フィリピンからの動物・畜産品 (一部の動物とその非加熱製品を除く) の輸入は増加の一途を辿っている。しかし、フィリピンにおける動物感染症の流行実態はほとんど明らかにされておらず、とりわけマダニ媒介性疾病に関する公式情報はほぼ皆無である。

マダニ類は魚類以外の全ての脊椎動物に寄生可能な宿主域と長時間にわたっての大量吸血、またウイルス、リケッチア、原虫など、ほぼ全ての病原体の伝播に関与しうる、他に類をみない突出した病原体媒介能を持つ。近年、アジア地域では重症性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) などの新興感染症出現の危険性が危ぶまれている。このように、感染症媒介におけるマダニの役割はより多様化している。従って、マダニおよびマダニ媒介性疾病対策は人を含めた動物の健康と畜産業においては不可欠であり、より有効な対策法の開発は今や世界的な急務である。そのため、マダニ防除のためのワクチン・治療薬開発に繋がる高度な研究に極めて重要な情報をもたらすものとして、マダニやマダニ媒介性疾病を公衆衛生学的に再評価する疫学的研究が必要とされている。

2. 研究の目的

このような背景から本研究は、フィリピンにおけるマダニ媒介性疾病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、フィリピンにおけるマダニと牛・水牛のバベシア原虫、アナプラズマ (リケッチア)、ダニ脳炎ウイルスなどマダニ媒介性病原体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。特に、バベシアなどのマダニ媒介性原虫は牛に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死性感染症を引き起こし、その多くは家畜 (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マダニの存在が確認されているために、一度国内に侵入すれば広く蔓延・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。このようにフィリピンにおけるマダニ媒介性動物感染症に焦点をあて、その流行実態を解明することにより、日本の輸入検疫体制強化とフィリピンの診断・予防対策の向上に資することを目的として企画した。

3. 研究の方法

本研究では、フィリピンにおけるマダニ媒介性動物感染症の流行実態の解明と予防対策の確立を目指し、次のような内容で実施した。(1) 実施地域：フィリピンのマニラ近郊カラバルソン地方を疫学調査実施国とした。(2) 国内準備：現地疫学調査を成功裏に終わらせるために、牛・水牛のバベシア、アナプラズマ、ダニ脳炎ウイルスの主要抗原遺伝子の探索、血清診断法・遺伝子診断法の確立を国内ラボで行った。(3) 現地調査：ラボで確立した種々の診断法や予防法のフィールド応用を図った。また、フィールド疫学調査データを、現地に適した簡易・迅速診断法ならびに予防法開発にフィードバックした。

4. 研究成果

(1) PCR 法によるアナプラズマ・バベシア・タイレリアの検出

フィリピンマニラ周辺地域 (カラバルソン地方) における農場から 250 頭の水・乳・肉牛の血液やその周辺のフラグging法によるマダニを採取し、DNA を抽出後、マダニ媒介性感染症の流行実態を nested PCR 法で調べた。また、血液については血液塗抹による病原体の確認を行った。その結果、水・乳・肉牛はアナプラズマ種が 90%、バベシア種が 20%、タイレリア種が 9% の感染率であった。それら陽性検体について PCR 産物の DNA 配列を決定したところ、*Anaplasma marginal*、*Babesia bigemina*、*B. bovis*、*Theileria orientalis*、*T. buffeli* の遺伝子と高い相同性が認められた。一部のマダニもこれらの虫体の遺伝子が検出された。血液塗抹についてはアナプラズマ様虫体が観察された。

これらの結果から、フィリピンの水・乳・肉牛はマダニ媒介性病原体を高い確率で保持していることが分かった。

(2) PCR 法によるフラビウイルスの検出

フィリピンマニラ周辺地域 (カラバルソン地方) における農場から 250 頭の水・乳・肉牛の血液やその周辺のフラグging法によるマダニを採取し、RNA を抽出後、フラビウイルス特異的 PCR を行った。その結果、フラビウイルス RNA の検出を試みたが、牛の血液ならびにマダニについては陰性であった。従って、牛がフラビウイルスに感染している可能性が低いことが示唆された。

(3) 簡易的 ELISA によるダニ媒介性脳炎に対する抗体の測定

牛血液から得られた一部の牛血清を用いて、ダニ媒介性脳炎ならびにその近縁種であるランガットウイルスに対する抗体を検出するために簡易的 ELISA を行った。その結果、これらのウイルスに対する抗体は陰性であった。従って、牛がこれらのウイルスに感染している可能性が低いことが示唆された。

(4) LAMP法によるアナプラズマ・バベシアの検出
フィリピンマニラ周辺地域(カラバルソン地方)における農場から採取したの水・乳・肉牛の血液のうち、PCR陽性検体を用いて、LAMP法によるアナプラズマならびにバベシアの検出方法を検討した。その結果、*A. marginal*については写真のようにPCR陽性検体を検出することに成功した(図1 No. 1~3)。現在、*B. bigemina*、*B. bovis*については、LAMP法の確立に向けて条件検討を行っているところである。



図1 LAMP法による*Anaplasma marginal*の検出 No. 1~3: *A. marginal* PCR陽性検体, No. 4: *A. marginal* PCR陰性検体, No. 5: 陰性コントロール(水)

(5) 今後の展望

本研究において、牛のマダニ媒介性動物感染症であるアナプラズマ症ならびにバベシア症に対するPCR法やLAMP法の遺伝子診断法が開発することができた。また、これらの診断法を用いたフィリピンマニラ周辺地域の牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症の疫学調査により、これらの地域でマダニ媒介性病原体の高い感染率が認められた。このように、本研究で得られた成果ならびに本研究で開発されたPCR法やLAMP法による診断技術が動物検疫体制の強化に貢献することが今後期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

Galay, RL., Manalo, AA., Dolores, SL., Aguilar, IP., Sandalo, KA., Cruz, K., Divina, B., Andoh, M., Masatani, T., Tanaka, T. Molecular detection of tick-borne pathogens in canine population and *Rhipicephalus sanguineus (sensu lato)* ticks from southern Metro Manila and Laguna, Philippines. *Parasit. Vectors* 査読有 11 (1): 643 (2018)

Talactac, MR., Yoshii, K., Hernandez, EP., Kusakisako, K., Galay, RL., Fujisaki, K., Mochizuki, M., Tanaka, T. Vector competence of *Haemaphysalis longicornis* ticks for a Japanese isolate of the Thogoto virus. *Sci. Rep.* 査読有 8 (1): 9300 (2018)

Galay, RL., Matsuo, T., Hernandez, EP., Talactac, MR., Kusakisako, K., Umemiya-Shirafuji, R., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. Immunofluorescent detection in the ovary of host antibodies against a secretory ferritin injected into female *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Parasitol. Int.* 査読有 67 (2): 119-122 (2018)

Talactac, MR., Yoshii, K., Hernandez, EP., Kusakisako, K., Galay, RL., Fujisaki, K., Mochizuki, M., Tanaka, T. Synchronous Langat virus infection of *Haemaphysalis longicornis* using anal pore microinjection. *Viruses* 査読有 9 (7): 189 (2017)

Talactac, MR., Yada, Y., Yoshii, K., Hernandez, EP., Kusakisako, K., Maeda, H., Galay, RL., Fujisaki, K., Mochizuki, M., Tanaka, T. Characterization and antiviral activity of a newly identified defensin-like peptide, HDefensin, in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Dev. Comp. Immunol.* 査読有 68: 98-107 (2017)

Masatani, T., Hayashi, K., Andoh, M., Tateno, M., Endo, Y., Asada, M., Kusakisako, K., Tanaka, T., Gokuden, M., Hozumi, N., Nakadohono, F., Matsuo, T. Detection and molecular characterization of *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in hard ticks collected from Kagoshima, the southern region in Japan. *Ticks Tick Borne Dis.* 査読有 8 (4): 581-587 (2017)

Maeda, H., Hatta, T., Alim, MA., Tsubokawa, D., Mikami, F., Kusakisako, K., Matsubayashi, M., Umemiya-Shirafuji, R., Tsuji, N., Tanaka, T. Initial development of *Babesia ovata* in the tick midgut. *Vet. Parasitol.* 査読有 233: 39-42 (2017)

Talactac, MR., Yada, Y., Yoshii, K., Hernandez, EP., Kusakisako, K., Maeda, H., Galay, RL., Fujisaki, K., Mochizuki, M., Tanaka, T. Characterization and antiviral activity of a newly identified defensin-like peptide, HDefensin, in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Dev. Comp. Immunol.* 査読有 68: 98-107 (2017)

Maeda, H., Hatta, T., Alim, MA., Tsubokawa, D., Mikami, F., Matsubayashi, M., Miyoshi, T., Umemiya-Shirafuji, R., Kawazu, S., Igarashi, I., Mochizuki, M., Tsuji, N., Tanaka, T. Establishment of a novel tick-*Babesia* experimental infection mode. *Sci. Rep.* 査読有 6: 37039 (2016)

Kusakisako, K., Masatani, T., Yada, Y., Talactac, MR., Hernandez, EP., Maeda, H., Mochizuki, M., Tanaka, T. Improvement of the cryopreservation method for the *Babesia gibsoni* parasite by using commercial freezing media. Parasitol. Int. 査読有 65 (5): 532-535 (2016)

Masatani, T., Yoshihara, S., Matsubara, A., Gotoh, T., Takahashi, H., Tanaka, T., Andoh, M., Endo, Y., Matsuo, T. Dynamics of *Theileria orientalis* genotype population in cattle in a year-round grazing system. Acta Parasitol. 査読有 61 (2): 419-424 (2016)

Talactac, MR., Yoshii, K., Maeda, H., Kusakisako, K., Hernandez, EP., Tsuji, N., Fujisaki, K., Galay, RL., Tanaka, T., Mochizuki, M. Virucidal activity of *Haemaphysalis longicornis* longicin P4 peptide against tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus. Parasit. Vectors 査読有 9 (1): 59 (2016)

[学会発表](計 19 件)

Remil Linggatong Galay, Anna Angelica L. Manalo, Sidney Lyndon D. Dolores, Kathlyn B. Cruz, Irene Pearl M. Aguilar, Kristina Andrea C. Sandalo, Billy P. Divina, Masako Andoh, Tatsunori Masatani, Tetsuya Tanaka, Molecular evidence of concurrent infections with tick-borne pathogens and Rickettsia in dogs from Luzon Island of the Philippine, 29th International Congress of Parasitology (ICOPA 2018), 21st August, 2018, EXCO, Daegu (South Korea)

Melbourne Talactac Rio, Kentaro Yoshii, Emmauel Hernandez Pacia, Remil Galay Linggatong, Kodai Kusakisako, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, Tetsuya Tanaka, The hard tick *Haemaphysalis longicornis* is a competent vector of the Thogoto virus, 2018ASM microbe 22th June, 2018, Georgia World Congress Center (GWCC) (USA)

Remil Linggatong Galay, Bea V. Ambita, DawnMaureen M. Chu, Andrew John M. Mariño, Irene Pearl M. Aguilar, Kristina Andrea C. Sandalo, Billy P. Divina, Masako Andoh, Tetsuya Tanaka, Molecular detection of Rickettsia spp. and Coxiella burnetii in ruminants and dogs from selected areas of Luzon Island, Philippines, 29th Meeting of the American Society for Rickettsiology, 16th June, 2018, Hyatt Regency (USA)

Remil Linggatong Galay, Bea V. Ambita, Larry Xerxes B. Capuno Jr., DawnMaureen M. Chu, Carina R. Llaneta, Maria Karla Faye B. Monreal, Antero L. Armero III, Arianne Bel D. Baluyut, Princess DLP. Collera, Kristina Andrea C. Sandalo, Billy P. Divina, Tetsuya Tanaka, Molecular studies on tick-borne pathogens in large ruminants from selected areas of Calabarzon-neglected veterinary diseases in the Philippines, 10th PSP Scientific Meeting, 8th June, 2018, The Royal Mandaya Hotel (Philippines)

Melbourne Rio Talactac, Kentaro Yoshii, Emmauel Pacia Hernandez, Kodai Kusakisako, Hiroki Maeda, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, Tetsuya Tanaka, Experimental transmission of Japan isolate Thogoto virus by *Haemaphysalis longicornis* ticks, Pullman Cairns International, One Health 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference and 1st Asia Pacific Rickettsia Conference(TTP9-APRC1), 28th August, 2017, Pullman Cairns International (Australia)

Remil Linggatong Galay, Larry Xerxes Capuno, Carina Lianeta, Kristina Andrea Sandalo, Melbourne Rio Talactac, Billy Divina, Masako Andoh, Tatsunori Masatani, Tetsuya Tanaka, Molecular detection of tick-borne pathogens in blood and ticks collected from cattle in Southern Luzon Island of the Philippines, Pullman Cairns International, One Health 9th Tick and Tick-borne Pathogen Conference and 1st Asia Pacific Rickettsia Conference(TTP9-APRC1), 28th August, 2017, Pullman Cairns International (Australia)

Melbourne Rio Talactac, Kentaro Yoshii, Emmauel Pacia Hernandez, Kodai Kusakisako, Hiroki Maeda, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, Tetsuya Tanaka, Experimental transmission of tick-borne encephalitis virus surrogate Langat virus by *Haemaphysalis longicornis*, 第 64 回日本ウイルス学会学術集会, 2016 年 10 月 23 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

Melbourne Rio Talactac, 好井健太郎, Emmanuel Pacia Hernandez, 草木迫浩大, 前田大輝, 藤崎幸蔵, 望月雅美, 田仲哲也, Survival dynamics of Japan isolate Thogoto

virus(HI-Kamigamo-25) in *Haemaphysalis longicornis*, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 9 月 7 日, 日本大学 (藤沢市)

正谷達膳, 林 慶, 立野守洋, 遠藤泰之, 松尾智英, 田仲哲也, 御供田睦代, 安藤匡子, 鹿児島県各地で採取されたマダニにおけるマダニ媒介性原虫の分子疫学的解析, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 9 月 7 日, 日本大学 (藤沢市)

前田大輝, 八田岳士, 坪川大悟, 三上房子, 松林 誠, 三好猛晴, 白藤(梅宮)梨可, 辻 尚利, 田仲哲也, *Babesia ovata* 原虫におけるマダニ中腸形態へのステージシフト誘導実験, 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016 年 9 月 6 日, 日本大学 (藤沢市)

前田大輝, 八田岳士, 坪川大悟, 三上房子, 松林 誠, 三好猛晴, 草木迫浩大, Remil Linggatong Galay, Melbourne Rio Talactac, 宮田 健, 白藤(梅宮)梨可, 河津信一郎, 五十嵐郁男, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 辻 尚利, 田仲哲也, マダニの自然免疫とバベシアとともに, 第 24 回分子寄生虫学ワークショップ第 14 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会, 2016 年 8 月 22 日, 帯広畜産大学 (帯広市)

安藤匡子, 本田俊郎, 御供田睦代, 藤田博己, 矢野泰弘, 正谷達膳, 田仲哲也, 松尾智英, 遠藤泰之, 安藤秀二, 川端寛樹, 鹿児島県屋久島のヒゲナガチマダニから分離されたリケッチア HKT-1 株の遺伝子解析, 第 68 回日本衛生動物学会大会, 2016 年 4 月 16 日, 栃木県総合文化センター (宇都宮市)

前田大輝, 八田岳士, 坪川大悟, 三上房子, 松林 誠, 三好猛晴, 白藤(梅宮)梨可, 大久保和洋, 五十嵐郁男, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 辻 尚利, 田仲哲也, フタトゲチマダニ体内における *Babesia ovata* 移行動態について, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 2016 年 3 月 20 日, 宮崎市民プラザ (宮崎市)

正谷達膳, 林 慶, 立野守洋, 遠藤泰之, 松尾智英, 田仲哲也, 御供田睦代, 関 まどか, 安藤匡子, 鹿児島県各地で採取されたマダニにおける *Theileria*, *Babesia* 及び *Hepatozoon* の分子疫学, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 2016 年 3 月 20 日, 宮崎市民プラザ (宮崎市)

草木迫浩大, 正谷達膳, 屋田 友里花, Talactac Melbourne Rio, Hernandez Emmanuel Pacia, 前田大輝, 望月雅美, 田仲哲也, 汎用的な細胞凍結保存液を用いた *Babesia gibsoni* 原虫凍結保存法の検討およびその改良, 第 85 回日本寄生虫学会大会, 2016 年 3 月 20 日, 宮崎市民プラザ (宮崎市)

正谷達膳, 吉原俊平, 松原敦子, 後藤貴文, 高橋秀之, 田仲哲也, 安藤匡子, 遠藤泰之, 松尾智英, 大分県久住高原の通年放牧牛における *Theileria orientalis* ジェノタイプの年間変動, 第 68 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 65 回日本衛生動物学会南日本支部大会合同大会, 2015 年 10 月 17 日, 長崎大学 (長崎市)

田仲哲也, 病原微生物感染に関与するマダニ生物活性分子について, 日本衛生動物学会・日本ダニ学会共催公開シンポジウム, 2015 年 9 月 12 日, 法政大学 (東京都)

前田大輝, 八田岳士, 松林 誠, 三好猛晴, 白藤(梅宮)梨可, 大久保和洋, 五十嵐郁男, 辻 尚利, 望月雅美, 藤崎幸蔵, 田仲哲也, ベクターマダニ体内における *Babesia ovata* 増殖動態についての一考察, 第 158 回日本獣医学会学術集会, 2015 年 9 月 8 日, 北里大学 (十和田市)

田仲哲也, 栗巢孔士, 前田大輝, 宮田 健, 草木迫浩大, Remil Linggatong Galay, Melbourne Rio Talactac, 望月雅美, 藤崎幸蔵, フタトゲチマダニ由来ロイシンリッチリピート保有タンパク質(HILRR)の発現動態とバベシア原虫に及ぼす影響, 第 23 回 SADI, 2015 年 6 月 26 日, 名取市文化会館 (名取市)

〔図書〕(計 2 件)

田仲哲也(編集:明石博臣、内田郁夫、大橋和彦、後藤義孝、須永藤子、高井伸二、宝達 勉)、犬のライム病(動物の感染症<第四版>)(株)近代出版 pp. 237 (2019)

田仲哲也(編集:板垣 匡、藤崎幸蔵)、節足動物 1. ダニ類(動物寄生虫病学<四訂版>)(株)朝倉書店 pp. 274-298 (2019)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-Infection/sinkoukansen/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：安藤 匡子

ローマ字氏名：(ANDOH, Masako)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：農水産獣医学域獣医学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10466914

(2)研究分担者

研究分担者氏名：正谷 達膳

ローマ字氏名：(MASATANI, Tatsunori)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：農水産獣医学域獣医学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70614072

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。