

平成 22 年 4 月 30 日現在

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 African trypanosomiases in domestic animals and wildlife
 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

研究代表者の専門分野：獣医原虫学

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、病原性、ゲノム

1. 研究計画の概要

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、感染巢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。さらに、ツェツェバエの各種生物学的性状をゲノム、cDNA 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イクスルーを図ることを研究の目的とする。

2. 研究の進捗状況

1) トリパノソーマ調査試料の収集：これまでにザンビア、ウガンダ、タンザニア、スーダンで現地調査もしくは研究協力者の協力を得て、家畜血液 (ウシ、ヤギ、ラクダ) DNA を 1,000 検体以上収集した。また媒介昆虫であるツェツェバエはザンビアで 2 種 (*Glossina morsitans*, *G. pallodipes*) について 1,000 検体以上収集した。さらに同地域でのマダニも採取し病原体検索試料としている。

2) 試料からトリパノソーマ原虫検索：上記検体について PCR あるいは等温遺伝子増幅法 (LAMP) を用いてトリパノソーマ遺伝子を検査している。特に、本調査では牛を主要なレゼルボアとしヒトに感染する *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Tbr) の分子疫学的調査を目的としており、ザンビア東部での患者発

生の情報を受けて、Chama 地区で 2009 年に調査を実施した。野生動物保護区周辺でのツェツェバエ採取と家畜 (ウシ、ヤギ) の採血を行い、DNA を抽出精製した。また後者では、毛細管遠心後の血液を顕微鏡観察し、原虫体の検出を行った結果、*T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* の感染が確認できた。特に、ツェツェバエならびにウシ試料から SRA 遺伝子が検出され、同地域での Tbr の存在が確認できた。しかし、免疫抑制マウスでの原虫分離、ならびに感染血液のヤギへの接種を行ったが、短期間原虫が見られた例があったものの、分離には至らなかった。スーダンでは海外研究協力者の協力を得て、ラクダの採血を実施し、DNA を採取した。それらの検体を PCR で検査したところ、地域にもよるが 20～50% の感染率であり、ITS 領域の増幅サイズから全てが *T. evansi* (もしくは *T. brucei*) であろうと考えられた。また、ウガンダ、ザンビア、タンザニアで採取されたウシならびにマダニ DNA 試料からは人獣共通感染症病原体でもある *Ehrlichia ruminantium* の検出と LAMP による新規診断法開発と応用も試みている。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している

(理由) 検体の収集についてはほぼ予定通り達成している。すなわち、解析に必要な十分数の試料 (家畜血液、ツェツェバエ) をアフリカ 4 カ国で得ることができた。野生動物血液については採材に至っていないが、ヒトでのトリパノソーマ感染がザンビア東部の動物保護区で 2009 年から確認されていることから、関係当局に調査の重要性について十分説明の上推進したい。2000 年代に入ってから

患者発生情報が乏しく、現状が把握できていなかったザンビアでの調査を重ね、国内5カ所での調査を続けた結果、患者発生地域を特定でき、周辺で飼育されている家畜の原虫保有状況についても明らかにした。これについては同国関連機関、医療関係者にも情報をフィードバックし、相手国側からも高く評価され、また周辺地域の医療関係者、住民のトリパノソーマ感染症に対する意識向上にもつながっている。

これまで感染動物血液あるいはツェツェバエからの原虫株分離を試みているが成功していない。最終年度には、感受性の高いマウスシステムを入手し採取現場で新鮮材料を接種することで分離の目的を達成したい。

ツェツェバエ完全長 cDNA 解析については10,000 クローン以上の解析を完了しデータバンクとして公開し十分目的を達成した。これに加え、ツェツェバエゲノム解析国際コンソーシアムとも情報を共有し、単なる海外調査研究にとどまらず、国際的な研究貢献を行っている。

4. 今後の研究の推進方策

詳細な遺伝子解析のためには原虫株を得ることが不可欠であることから、マウスを用いた分離を継続して試みる。Tbr の存在が確認できた Chama 地区のウシ（血液）、ツェツェバエ（唾液腺）をマウスに接種し効率的に株を得る。人あるいは家畜からの分離株間の遺伝子型比較を行うため、マイクロサテライトマーカー解析に着手する。今後、野生動物については効率的に血液試料を採取することが困難であるが、ザンビア野生動物局と交渉を続けて、患者発生地域に隣接する野生動物保護区での採材を試みる。またツェツェバエに接種された血液の由来動物種をミトコンドリア遺伝子等を解析することにより推定し、原虫保有状況と合わせて解析することで原虫の感染源となり得る野生動物種を突き止める。

5. 代表的な研究成果

(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 Jing Z, Magona JW, Sakurai T, Thekiso OM, Otim CP, Sugimoto C, Inoue N. A field study to estimate the prevalence of bovine African Trypanosomiasis in Butaleja District, Uganda. J Vet Med Sci. 2009 71(4):525-527..
- ② Thekiso OM, Bazie RS, Coronel-Servian AM, Sugimoto C, Kawazu S, Inoue N. Stability of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reagents and its amplification

efficiency on crude trypanosome DNA templates. J Vet Med Sci. 2009 71(4):471-475.

- ③ Namangala B, Inoue N, Sugimoto C. Preliminary studies on the effects of orally-administered Transforming Growth Factor-beta on protozoan diseases in mice. Jpn J Vet Res. 2009 57(2):101-108.
- ④ Namangala B, Yokoyama N, Ikehara Y, Taguchi O, Tsujimura K, Sugimoto C, Inoue N. Effect of CD4(+)CD25(+) T Cell-Depletion on Acute Lethal Infection of Mice with *Trypanosoma congolense*. J Vet Med Sci. 2008 70(8):751-759.
- ⑤ Motloang MY, Thekiso OM, Alhassan A, Bakheit M, Motheo MP, Masangane FE, Thibedi ML, Inoue N, Igarashi I, Sugimoto C, Mbatia PA. Prevalence of *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in horses belonging to resource-poor farmers in the north-eastern Free State Province, South Africa. Onderstepoort J Vet Res. 2008, 75(2):141-146.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Chihiro Sugimoto: invited lecture "Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnoses of trypanosomoses" 45th Annual Meeting of Malaysian Society of Parasitology and Tropical Medicine, Kuala Lumpur, Malaysia, 2009 March.

[図書] (計 1 件)

- ① Richard P. Bishop, David O. Odongo, David J. Mann, Terry W. Pearson, Chihiro Sugimoto, Lee R. Haines, Elizabeth Glass, Kirsty Jensen, Ulrike Seitzer, Jabbar S. Ahmed, Simon P. Graham, Etienne P. de Villiers. (2009). *Theileria*. pp.191-231. In: Genome Mapping and Genomics in Animal-Associated Microbes. Eds. V. Nene and C. Kole. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)

[その他] ツェツェバエ完全長 cDNA データバンク公開 (<http://fullmal.ims.u-tokyo.ac.jp/>)