

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月28日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580352

研究課題名（和文）イントロンの一次塩基配列に基づくヒトバベシア原虫及びその近縁種の進化解析法の開発

 研究課題名（英文）Intron Sequences in the *CCT7* gene Show Diverse Evolutionary Histories of the Four Lineages within the “*Babesia microti*-Group,” a Genetically Related Species-Complex Including Pathogens of Humans.

研究代表者

石原 智明 (ISHIHARA CHIAKI)

酪農学園大学・獣医学群・教授

研究者番号：90082172

研究成果の概要（和文）：ヒトバベシア症の病原虫 *Babesia microti* は複合種だが、各系列（U.S., Kobe, Munich, Hobetsu 系列）の遺伝的構造は不明である。そこで *CCT7* 遺伝子のイントロン配列を使って解析したところ、U.S. と Kobe はそれぞれ 3 と 2 亜系に分かれるが、Hobetsu と Munich はクローナルだった。次に、同所的に 2 系列が分布している根室市と淡路島洲本町で、原虫系列と媒介ダニの関連性を検討した。原虫の遺伝子型別から、ヤマトマダニ *I. ovatus* が Hobetsu 原虫を、シュルツマダニ *I. persulcatus* が U.S. 原虫を特異的に媒介することが明らかになった。Kobe 系列については媒介ダニの特定に至らなかった。

研究成果の概要（英文）：*Babesia microti*, the main causal agent of human babesiosis, is a species-complex comprised of at least four taxa (the U.S., Kobe, Munich and Hobetsu). To further assess micro-evolutionary history and genetic variability within the taxon, we used a set of 6 introns in the *CCT7* gene as a rapidly evolving DNA marker. Phylogenetic and comparative sequence analysis subdivided the U.S. taxon into three geographic subclades - North America, western to central Eurasia, and northeastern Eurasia. The Kobe taxon, which occurs only in a few geographic foci in Japan could further be subdivided into two subgroups. The Munich and Hobetsu taxa, common to Europe and Japan, respectively, exhibited little or no pairwise sequence divergence among geographically diverse samples, suggesting an extreme population bottleneck in the recent histories. We further conducted a field investigation at Nemuro on Hokkaido island and Sumoto on Awaji island, where up to two lineages co-occur with similar frequency in reservoir. Lineage specific PCR for rDNA-positive samples demonstrated that *I. ovatus* and *I. persulcatus* carried, respectively, the Hobetsu and U.S. parasites. No Kobe-parasite carrying tick was detected. This result indicate that, for the first time, Hobetsu and U.S. parasites are vectored by different Ixodid species.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用獣医学

キーワード：(1) *Babesia microti* (2) 進化系統解析 (3) *CCT7* 遺伝子 (4) イントロン

1. 研究開始当初の背景

真核生物であるバベシア原虫は、有性生殖<染色体交換>により集団単位で様々な遺伝特性(病原性・薬剤耐性・宿主域特性)を共有する。従って生殖集団レベルで、原虫集団の進化系統関係を解明しておくことが、病気の診断や防御対策の立案に必要である。しかし、ヒトバベシア症の病因 *B. microti* の研究領域では未だこのレベルでの解析報告はない。

2. 研究の目的

進化速度が速いイントロン配列を用いて、*B. microti* の生殖集団レベルでの進化系統関係の解析が可能か検討した。さらに解析によって明らかになった *B. microti* グループの内部集団(進化系列、亜系列)の生殖隔離要因の特定を試みた。

3. 研究の方法

CCT7 遺伝子のイントロン位置パターンを利用して *B. microti*-group の初期進化を解析したところ、驚くべきことに、*B. microti* が *Babesia sensu stricto* と *Theileria* とも違う独立の新集団であることが明らかになった(イントロンの位置マトリックス及び 19-23 bp の極小サイズの存在で他から区別される (Nakajima, Ishihara, et al., 2009)。この際、近縁種間でのイントロン位置及びサイズ保存性がほぼ完全で容易にアライメント出来る、すなわち、高感度進化マーカーとして利用出来る可能性があることがはじめて明らかになった。

Table 1. CCT7 genes of "B. microti-group" parasite strains used

Taxon	Strain ¹⁾	Origin	Geographical origin	Gene size ²⁾ (CDS) ³⁾	Accession No.	Location and sizes of CCT7 introns												
						1 ⁴⁾	2 ⁴⁾	3 ⁴⁾	4 ⁴⁾	5 ⁴⁾	6 ⁴⁾	7 ⁴⁾	8 ⁴⁾	9 ⁴⁾	10 ⁴⁾	11 ⁴⁾	12 ⁴⁾	
Gray	Gray	human	U.S.A.	2009 (1829)	AB362586	21	22	-	20	-	49	-	-	-	547	-	21	
	GI	human	U.S.A.	2009 (1829)	AB362581	21	22	-	20	-	49	-	-	-	547	-	21	
	NM69	vole	Hokkaido, Japan	2010 (1829)	AB362582	21	22	-	20	-	49	-	-	-	548	-	21	
	AK2273	mouse	Hokkaido, Japan	2010 (1829)	AB362587	21	22	-	20	-	49	-	-	-	548	-	21	
	Vladivostok ⁵⁾	vole	Vladivostok, Russia	2010 (1829)	AB362584	21	22	-	20	-	49	-	-	-	548	-	21	
	Ikutak16	vole	Ikutak, Russia	2010 (1829)	AB366748	21	22	-	20	-	49	-	-	-	548	-	21	
	Korui ⁶⁾	mouse	Korea	2010 (1829)	AB362583	21	22	-	20	-	49	-	-	-	548	-	21	
	Xinjiang1637	vole	Xinjiang, China	2009 (1829)	AB362585	21	22	-	20	-	49	-	-	-	547	-	21	
	HK	vole	Hammov, Germany	2008 (1829)	AB366747	21	22	-	20	-	48	-	-	-	547	-	21	
	Kishida ⁷⁾	human	Kobe, Japan	1888 (1829)	AB366755	20	22	-	20	-	45	-	-	-	532	-	20	
Kobe	Hanahyoshi ⁸⁾	mouse	Shimane, Japan	1888 (1829)	AB383230	20	22	-	20	-	45	-	-	532	-	20		
	Mikura ⁹⁾	rat	Mikura Island, Japan	1916 (1829)	AB383231	20	22	-	20	-	72 ¹⁰⁾	-	-	533	-	20		
Munich	mouse	Germany	2003 (1829)	AB362588	21	22	-	20	-	49	-	-	-	541	-	21		
	Poland5	sisk	Poland	2003 (1829)	identical ¹¹⁾	21	22	-	20	-	49	-	-	541	-	21		
	Poland6	sisk	Poland	2003 (1829)	identical ¹¹⁾	21	22	-	20	-	49	-	-	541	-	21		
Munich	UK5	vole	England	2003 (1829)	identical ¹¹⁾	21	22	-	20	-	49	-	-	541	-	21		
	UK6	vole	England	2003 (1829)	identical ¹¹⁾	21	22	-	20	-	49	-	-	541	-	21		
Hobetsu	Hc234	mouse	Hokkaido, Japan	1813 (1829)	AB366750	21	22	-	20	-	46	-	-	54	-	21		
	Tsukiy ¹²⁾	mouse	Tokushima, Japan	1813 (1829)	AB383229	21	22	-	20	-	46	-	-	54	-	21		
	Takazono ¹³⁾	mouse	Akita, Japan	1813 (1829)	AB383228	21	22	-	20	-	46	-	-	54	-	21		
	Akashi ¹⁴⁾	vole	Hokkaido, Japan	1813 (1829)	AB383227	21	22	-	20	-	46	-	-	54	-	21		
	Ooi	mouse	China, Japan	1813 (1829)	AB366754	21	22	-	20	-	46	-	-	54	-	21		
	Awa ¹⁵⁾	mouse	Hyogo, Japan	1813 (1829)	AB383226	21	22	-	20	-	46	-	-	54	-	21		
	Dai16	mouse	Shimane, Japan	1813 (1829)	AB366753	21	22	-	20	-	46	-	-	54	-	21		
	Parasites related distantly to "B. microti-group"																	
	Parasite of raccoon	raccoon	Hokkaido, Japan	2199 (1829)	AB366751	21	22	-	20	-	254	-	-	-	231	-	23	
	<i>B. rodhaini</i>	vole	Africa ¹⁶⁾	1752 (1829)	AB366752	21	22	-	21	-	19	-	-	-	43	-	20	

¹⁾ Accession indicates sequences determined newly in this study. Other sequences were reported previously (17).

²⁾ Nucleotide length (nt) from 5' end to 3' end of CCT7 gene including coding sequence and introns.

³⁾ Nucleotide length (nt) of the complete coding sequence (CDS) of CCT7 gene.

⁴⁾ The nucleotide sequence was 100% identical to that of Munich strain.

⁵⁾ Number indicates intron size (nt).

⁶⁾ --- indicates lack of intron at the location.

⁷⁾ A single 27-nt insertion (CGCCT AATA-TATAT AATA-TGTTA TA) was found after 10th position of this intron.

そこで本研究では、世界各地で分離収集し、あるいは分与された *B. microti*-group 原虫 26 株 (Table 1) の CCT7 イントロンの配列を決定・アライメントし、原虫株相互の進化系統関係の解明を行った。さらに、こ

の解析から *B. microti*-group の複数の内部集団が同所的に分布することが判ったため、どの様な要因によって生殖隔離が行われているか検討した。

4. 研究成果

① 進化解析マーカーとしての CCT7 イントロン配列の有用性評価

B. microti 原虫 26 株のイントロン配列を決定しアライメントの難易度や解析精度を検討した。その結果、これまでの推測とは異なり、イントロン長は亜種毎にほぼ一定で (Table 1)、MacVector10.5 の Clustal W で容易にアライメント出来た。A+T 比の近似性に基づくグルーピングパターン、一次塩基配列に基づく進化系統樹の樹系、および分岐順序 (258 塩基長のイントロンは単独、19~23 塩基長のそれは結合配列を使用) は、既報の β -tubulin (Zamoto, Ishihara et al., 2004) および

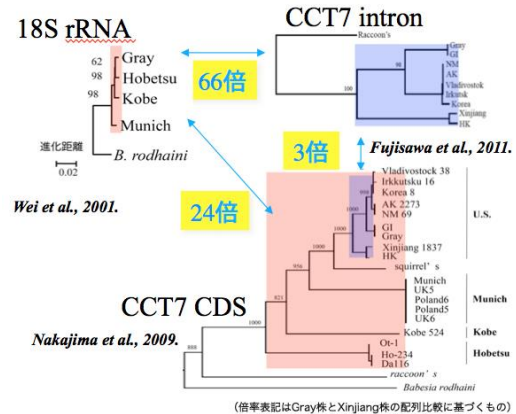


Fig. 1. Phylogenetic relationships of *B. microti* parasites as revealed by 3 nuclear DNA markers.

CCT7 遺伝子の coding sequence (Nakajima, Ishihara, et al., 2009) に基づく進化系統樹の分岐順序と一致し、イントロン配列に基づく進化系統解析が可能 (信頼性確保) なことが判った (Fujisawa, Ishihara, et al., 2011)。またイントロンの塩基置換率は、18S rRNA と *CCT7* 遺伝子のそれぞれ数十倍および 3 倍の感度であり、高い解析精度が期待出来ることが解った (Fig. 1, Fujisawa et al., 2011)。

② *B. microti*-group の集団の遺伝的構造

次に、*CCT7* 遺伝子の 6 個のイントロンの結合塩基配列を用いて株間相互の配列比較及び進化系統解析を行った。その結果、*B. microti* グループの U.S.、Kobe、Munich、Hobetsu の 4 系列中、U.S. と Kobe 系列については、それぞれさらに 3 亜系と 2 亜系に細分されることが明らかになった (Fig. 1, 2)。この場合、配列差のほとんど (90% ≤) が亜系間の差で占められ、亜系内の株間差が占める配列差はわずか (10% >) でしかなかった (Fig. 2)。このため *CCT7* イントロンの塩基配列置換

の大部分は進化的な事象を映す指標であって、生殖集団内のアレル変異や遺伝子型の違いを反映するものではないことが判明した。Munich と Hobetsu 系列は、それぞれヨーロッパ3ヶ国あるいは日本の異なる地域に由来するサンプルである。それにもかかわらず、Munich と Hobetsu 系列には配列差が0個またはごく僅か(1個)しか認められなかった。(Fig. 2)。DNA マーカーの種類にもよるが、Munich と Hobetsu 系の進化系統樹の枝長は U.S. 系列の3-5倍ある(Fig 1)。これは、それぞれの原虫集団が内部に遺伝的多様性(系統樹が分岐する)を形成する十分

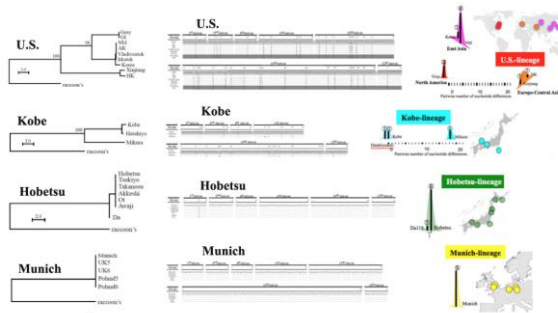


Fig. 2. Genetic structures of the 4 *B. microti*-lineages (U.S., Kobe, Hobetsu and Munich) as revealed by CCT7 intron sequences. (Fujiwara et al., 2011)

な進化時間があったことを示すものである。おそらく両系列とも一旦は遺伝的な多様性を獲得した(多数の内部亜系を持った)が、その後何らかの環境変化が発生し、絶滅に近い危機を過ごしたのち(”瓶の口効果”; ”Bottleneck effect”がおきた)、たまたま残された1つのクローンから現在の復活し、現況に至ったと推測された。”瓶の口効果”が原虫集団そのものにおこったのか、それとも宿主である哺乳類動物やダニの絶滅など、間接的なものだったかは不明である。

一方 Kobe 系列に関しては、進化系統樹の枝長は十分に長いものの(Fig. 1)分布は日本の幾つかのスポットに局限したかたちを示している(伊豆小笠原諸島の御蔵島、淡路島洲本町、島根県雲南市大東町で、宿主はアカネズミ、ヤチネズミ、ドブネズミなど)(Fig 2)。これらの結果から推察すると、Munich や Hobetsu 系列と同様に、Kobe 系列にも”瓶の口効果”がおきたと考えられる。ただし、系列内に大きな遺伝的多様性が存在し、内部亜系が存在することから、(i) 2つの遺伝的に異なるクローンが絶滅を免れた、(ii) 1つのクローンが生き残ったが、ニッチの競争の少ない海洋孤島にたどり着いた原虫が急速に進化し、大きな遺伝的差異を持つことになった、の両方の解釈が可能である。後者の説明にやや有利なデータとして、Mikura 株のイントロン塩基配列にみつける19個の株間変異のうち、1箇所は27ntの挿入変異である(図2)。Kobe 系列の分布状況から判断してサン

プル密度を増やすのは難しく、この面からの回答は期待出来ないが、CCT7 遺伝子以外の遺伝子からも塩基配列情報を集め、それらを使って詳細に解析すれば Kobe 系列のより詳しい進化史が明らかになるかもしれない。

B. microti グループの4系列の間あるいはそれぞれの系列内での遺伝的多様性の程度を2種類のDNAマーカー、すなわち CCT7 CDS と CCT7 イントロン塩基配列を使って測定した。(Fig. 3) U.S. 系列は北米とアジアを含む北半球全域に分布し、Kobe 系列は日本国内に限られたスポットにしか存在しないが、ほぼ同レベルの遺伝的多様性があることが判った。すなわち、U.S. および Kobe 系列の系列内の株間比較でイントロン配列差の最大はそれぞれ7.8%および7.3%だった(これらの値は原虫系列間の遺伝的距離の1/4~1/5に相当する)。これに加えて、*B. microti* グループの4系列については次の様な違いもすでに報告されている:(1) 遺伝的差異(配列変異の程度)を β -tubulin および CCT7 CDS で求め、他のプロプラズマ原虫種間の差異と比較すると、それぞれ別種扱いとなっている *B. odocoilei* と *B. divergence* の種間進化距離に近い。(2) CCT7 イントロンのサイズは系列内ではよく保存されていて1bp以内の違いしかないが、系列と系列の間には大きなサイズの違いがある。(19-254 bp; Nakajima et al., 2009; Fujisawa et al., 2011) (3) U.S. 系列(Gray株)と Kobe 系列(Kobe株)の間には免疫学的な交叉反応性(間接蛍光抗体法による)がほとんどない。U.S. 東アジア亜系(NM69株)と U.S. 亜系(Gray株)には交叉反応があるが、同系同士の抗原抗体反応よりも弱い、など明らかな抗原レベルの違いがある(Tsuji, Ishihara, et al., 2001)。

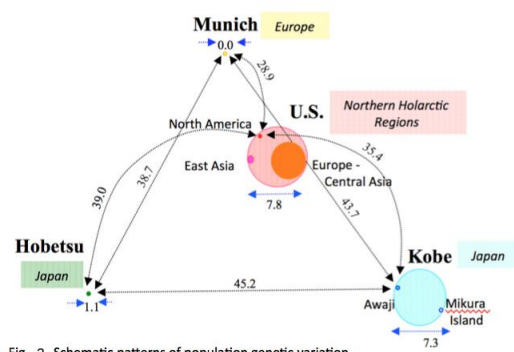


Fig. 3. Schematic patterns of population genetic variation

Percent of evolutionary distance (number of observed pairwise nucleotide differences) within and between the 4 lineages (U.S., Munich, Kobe and Hobetsu) of the *B. microti*-group parasites were generated in two ways. First, the within lineage diversity was measured by comparing with paired intronic sequences of all samples by each of the lineages or sub-lineages (see footnote in Fig. 9.) and the maximum extent of sequence diversity in percent is illustrated as to the diameter of circle. Second, percent of evolutionary distance was determined by comparing two pairs of CCT7 ORF sequences from representative samples of each lineage and multiplied by the proportional value (x2.6, described in the section of “(3) Nuclear DNA markers for assessing shallow phylogenetic relationships”). A three dimensional representation of evolutionary distance is illustrated.

③ 集団の遺伝的構成と生殖隔離要因

CCT7 イントロンの塩基配列解析から、*B. microti*-group の4系列(U.S., Kobe, Hobetsu,

Munich) がそれぞれ異なる集団構造をもつことが明らかになった(Fujisawa, Ishihara, et al., 2011; Nakajima, Ishihara, et al., 2009)。これらの集団の遺伝的構造の決定に、どのような要因(原虫の地理的な拡散や宿主あるいはベクターへの順化)が関わったかを調べるため、次の検討を行った。

(1) *B. microti*-group 4 系列とその宿主

U.S. 系列は北半球温帯域に広く分布し(ヨーロッパ~中央アジア、東アジアおよび北アメリカ大陸)、小型齧歯類から食虫類(モグラの仲間)まで幅広い動物種に感染している(Zamoto, Ishihara, et al., 2004, Hunfeld et al., 2008)。U.S. 系列の宿主として、北米では、*Peromyscus* や *Microtus* の複数種(齧歯類)と *Blarina* (食虫類)が、日本を含むユーラシアでは *Apodemus*、*Myodes* (旧名 *Clethrionomys*)、*Microtus* の複数の種類(齧歯類)と *Sorex* の複数種(食虫類)が宿主となっている。(Zamoto, Ishihara, et al., 2004A, Hunfeld et al., 2008)。Hobetsu と Munich 系列はそれぞれ日本とヨーロッパに分布し、U.S. 系列と分布域が重なるほか、宿主域特性(小型齧歯類から食虫類まで幅広い動物種に感染)でも U.S. 系列と区別することが出来ない(Zamoto, Ishihara, et al., 2004A, Hunfeld et al., 2008)。Kobe 系列は限られた小区域に局限しているが(伊豆小笠原諸島の中の御蔵島、淡路島の洲本町、島根県雲南市大東町)、宿主は他の 3 系列とほぼ同じで {*Myodes*、*Apodemus* (齧歯類)のほか、ヒトにも感染する} で、区別出来ない(Wei, Ishihara, et al., 2001; Zamoto, Ishihara, et al., 2004., Tabara, Ishihara, et al., 2006)。以上より、系列に固有の宿主特異性はないと考えられた。

(2) 媒介ダニ

米国北東部のヒトバベシア症については、*B. microti* (U.S. 系列中の北米亜系)が病因で、その主ベクターは *Ixodes scapularis* (別名 *I. dammini*) (Hunfeld et al., 2008)と確定している。しかしそれ以外の地域では、原虫-ベクター関係は明らかでない。なかでも日本には 2 つ以上の原虫系列が重複分布する地域(北海道根室市は U.S. と Hobetsu 系列が、淡路島洲本町は Kobe と Hoabetsu 系列が重なる: Tsuji, Ishihara, et al., 2001; Zamoto, Ishihara, et al., 2004)があるため、それらが地理的要因以外の何らかの(生態学的)要因によって生殖隔離されている可能性が考えられる。そこでこの 2 箇所とその周辺域でダニを捕獲しダニの種類と原虫系列の関連の有無を調べた (Table 2, after Zamoto-Niikura, Ishihara, et al., 2012)。

上記 2 地点とその周辺地域で旗振り法を行い、6 種、4010 匹のダニを採取した。PCR 法(全ての *Babesia* 種の 18S rDNA に反応するプライマー)で検査したところ、*I.*

ovatus と *I. persulcatus* だけが陽性となった。淡路島では、*B. microti*-group 原虫陽性ダニは *I. ovatus* の 11/36 (6.1%) に認められたが、型別 PCR で全てが Hobetsu 系列となり、結局 Kobe 系列陽性ダニは見つからなかった。

Table 2. Detection of *B. microti* parasites in ticks by species specific amplification of the 18S ribosomal DNA

species	Ticks examined number	Minimum Infection Rates	
		Hobetsu	U.S.
<i>I. ovatus</i> adults	48	4/19 (8.3%)	0/19 (0.0%)
<i>I. persulcatus</i> adults	139	0/33 (0.0%)	2/33 (1.4%)

Ticks were collected by flagging at Nemuro, Hokkaido, where two (the Hobetsu and U.S.) of the *B. microti* lineages co-occur.

一方根室市では、*I. ovatus* と *I. persulcatus* の両種から *B. microti*-group 原虫陽性反応が得られた。型別 PCR の結果 *I. ovatus* は Hobetsu, *I. persulcatus* は U.S. 系列に陽性で、この逆はなかった。さらに、北海道全域に *I. ovatus* も *I. persulcatus* も同程度に分布し、*Apodemus*、*Myodes*、*Microtus*、*Sorex*などを吸血している(Hobetsu 系列原虫は日本中のこれら動物に広く感染し、時に同一個体に混合感染する)。それにもかかわらず Hobetsu 系列陽性の *I. scapularis* は一匹も見つからなかった。この結果から、*I. ovatus* が種別系列原虫を、*I. persulcatus* が U.S. 型原虫を、特異的に媒介している可能性が極めて高いと判断された(Zamoto-Niikura, Ishihara, et al., 2012)。

今回の研究で北半球温帯域に広く分布する U.S. 系列原虫は、北米、東アジア、ヨーロッパ・中央アジアの地理的 3 亜系に分かれた (Fig 2)。進化系統樹の樹形と枝長から (Fig 3)、またその広い分布域から推察して、U.S. 系列が *B. microti*-group 4 系列の中では最も最近出現した原虫集団で、最近急速に分布域を拡張しつつある集団と考えられる。これに加えて、ベクターダニ種がそれぞれ北米では *I. scapularis*、ヨーロッパでは *I. ricinus* となっており (Hunfeld et al., 2008)、今回日本のベクターが(多分東アジア全体も) *I. persulcatus* となった (Table 2, Zamoto-Niikura, Ishihara, et al., 2012) ことは、*B. microti*-group の進化史を考える上でたいへん興味深い。すなわち、*I. ricinus*、*I. scapularis*、*I. persulcatus* は *I. ricinus* complex に属する姉妹ダニ種で進化関係としては非常に近いが、Hobetsu 系列を媒介する *I. ovatus* は進化系統学的にこれとは遠縁である。この点は U.S. 3 亜系の進化系統関係と一致する。そこで、想定される U.S. 系列原虫の進化史として、次のシナリオが有力である。
-- U.S. 系列原虫の共通祖先が *I. ricinus* complex の共通祖先に取り憑き(ベクターシフト)し、その後、媒介ダニ(*I. ricinus* complex)の世界的な繁栄に乗じて原虫も北

半球全域に分布域を拡大した。その過程が進むとベクターダニの生殖集団相互に地理的要因に基づく隔離がおり、やがてベクターダニが種分化した、それに伴って原虫集団の亜系化（共進化）も進行した (Nakajima, Ishihara, et al., 2009; Fujisawa, Ishihara, et al., 2011; Zamoto-Niikura, Ishihara, et al., 2012)、である。

捕獲ダニの最小感染率 (Minimum infection rate; MIR) からベクター活性 (原虫を伝達する危険度) の推定出来る。そこで、U.S. 北米亜系を媒介する *I. scapularis* の MIR と U.S. 東アジア亜系を媒介する *I. persulcatus* の MIR を比較してみると *I. scapularis* のベクター活性が数~10 倍高い可能性が出て来た。この結果は、近縁原虫が世界中に分布しているにも関わらず、米国北東部に患者発生が集中している理由を説明する有力な仮説となる。

付) 本文中の引用文献 (本研究結果以外)

- 1) Tsuji M., Qiang W., Zamoto A., Morita C., Arai C., Shiota T., Fujimagari M., Itagaki A., Fujita H., Ishihara C. (2001) Human Babesiosis in Japan: Epizootiologic Survey of Rodent Reservoir and Isolation of New Type of *Babesia microti*-Like Parasite. J. Clin. Microbiol., 39: 4316-4322.
- 2) Zamoto A., Tsuji M., Qiang W., Cho S-H., Shin E-H., Kim T-S., Leonova GN., Hagiwara K., Asakawa M., Kariwa H., Takashima I., Ishihara C. (2004) Epizootiologic Survey for *Babesia microti* among Small Wild Mammals in Northeastern Eurasia and a Geographic Diversity in the beta-Tubulin Gene Sequences. J. Vet. Med. Sci. 66: 785-792.
- 3) Nakajima R., Tsuji M., Oda K., Zamoto-Niikura A., Qiang W., Kawabuchi-Kurata T., Nishida A., Ishihara C. (2009) *Babesia microti*-Group Parasites Compared Phylogenetically by Complete Sequencing of the CCTeta Gene in 36 Isolates. J. Vet. Med. Sci. 71: 55-68.
- 4) Hunfeld K-P., Hildebrandt A., Gray JS. (2008) Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. Int. J. Parasitol. 38: 1219-1237.
- 5) Wei Q., Tsuji M., Zamoto A., Kohsaki M., Matsui T., Shiota T., Telford III SR., Ishihara C. (2001) Human babesiosis in Japan: Isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. J. Clin. Microbiol. 39: 2178-2183.
- 6) Tabara K., Arai S., Kawabuchi T., Itagaki A., Ishihara C., Satoh H., Okabe N., Tsuji M. (2007) Molecular survey of *Babesia microti*, *Ehrlichia* species and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in wild rodents from Shimane prefecture, Japan. Microbiol. Immunol., 51: 359-367.

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 2 件)

①Fujisawa K., Nakajima R., Jinnai M., Hirata H., Zamoto-Niikura A., Kawabuchi-Kurata T., Arai S., Ishihara C. Intron sequences from the CCT7 gene exhibit diverse evolutionary histories among the four lineages with the *Babesia microti*-group, a genetically related species complex that includes human pathogens. Jpn. J. Infect. Dis., 64 : 403-410, 2010.

②Zamoto-Niikura A., Tsuji M., Qiang W., Nakao M., Hirata H., Ishihara C. Detection of two zoonotic *Babesia microti*, *Hobetsu* and U.S. lineages, respectively, in sympatric tick species, *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus*, in Japan. Appl Env Microbiol., 78 : 3424-3430, 2012.

[学会発表] (計 1 件)

○藤澤幸平・中嶋瑠衣・陳内理生・平田晴之・新倉綾・倉田貴子・石原智明. *B.microti* 原虫類の進化解析マーカーとしてのイントロン配列の有用性評価. 第150回日本獣医学会学術集会総会, 2010年9月17日, 帯広市稲田町 帯広畜産大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.rakuno.ac.jp/hp/wp/wp-content/uploads/2011/03/602295bc62ebd6997835355fb8515af>

[51.pdf](#)

<http://www.rakuno.ac.jp/hp/wp/wp-content/uploads/2011/03/Whats-microti-again-HP-1.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 智明 (ISHIHARA CHIAKI)
酪農学園大学・獣医学群・教授
研究者番号：90082172

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()