

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26304036

研究課題名(和文) アフリカ大陸におけるマダニ媒介性動物原虫感染症の流行実態の解明と予防対策の確立

研究課題名(英文) Epidemiological study on tick-borne diseases in Africa and establishment of preventive measures

研究代表者

鈴木 宏志 (Hiroshi, Suzuki)

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：60333473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：マダニ媒介感染症はアフリカにおける家畜の生産性を妨げる最も重要な要因の一つとされるが、その流行実態は解明されていない。そこで、本研究では東アフリカ(ウガンダ、ケニア、タンザニア)、西アフリカ(ベナン、ブルキナファソ)、北アフリカ(エジプト)、ならびに南アフリカにおいて、広範囲にわたり家畜(牛、羊、山羊など)のマダニ媒介感染症(バベシア症、タイレリア症、アナプラズマ症など)の疫学調査を実施し、その流行実態の一端を明らかにした。これらの成果は、今後アフリカにおけるマダニ媒介感染症に対する有効な制御戦略の確立に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Tick-borne diseases are considered to be one of the most important factors affect the productivity of livestock in Africa, but the detailed epidemiological studies have not yet been done. In this study, we have carried out the epidemiological studies on ticks-borne diseases including babesiosis, theileriosis, and anaplasmosis in livestock (cattle, sheep, goats, etc.) from East Africa (Uganda, Kenya, Tanzania), West Africa (Benin, Burkina Faso), North Africa (Egypt) and South-Africa. The results obtained are expected to be helpful for establishment of an effective control strategy for tick-borne diseases in Africa.

研究分野：原虫病学

キーワード：マダニ 原虫病 薬剤抵抗性 疫学調査 診断 治療 予防 アフリカ

### 1. 研究開始当初の背景

種々の感染症は、アフリカ大陸における家畜の生産性向上を妨げる最も重要な要因の一つとされる。とりわけ、マダニ媒介性原虫感染症による被害は深刻とされる。マダニは動物の血液を唯一の栄養源とする吸血性節足動物であり、人や動物に与える被害は吸血による直接的なもの(体力消耗)と媒介する病原体(ウイルスから寄生虫にいたるまで多くの病原体)による間接的なもの(感染症)がある。特に後者による被害は甚大とされている。バベシア・タイレリアなどマダニ媒介性原虫は特に牛、羊、山羊に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死性感染症を引き起こす。家畜のマダニとマダニ媒介原虫感染症に限定しても、その被害は世界全体で毎年300億US\$にも及ぶと報告されている(Jongean & Uilenberg, 2004)。しかしながら、アフリカ大陸におけるマダニ媒介原虫感染症に対する疫学調査や予防対策に関する研究はほとんど進んでいないのが現状である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、アフリカ大陸におけるマダニ媒介性動物原虫感染症の流行実態の解明と予防対策の確立を目指して企画した。具体的達成目標として、1)アフリカ諸国における広範囲な実地疫学調査の実施、2)現地に適した簡易・迅速診断法の開発、3)現地に適した予防対策の確立、4)関連検疫機関への適切な助言の提供等を掲げた。

### 3. 研究の方法

本研究では、アフリカ大陸におけるマダニ媒介性動物原虫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：ケニア・ウガンダ(26年度)、ブルキナファソ・ベナン(27年度)、南アフリカ(28年度)、エジプト(29年度)を疫学調査実施国とした。2)国内ラボワーク：現地疫学調査を成功裏に終わらせるために、各種動物のバベシア・タイレリア原虫の主要抗原遺伝子の探索、血清学診断法・遺伝子診断法の確立、ならびに組換えワクチン開発を国内ラボで行った。3)現地フィールドワーク：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。

### 4. 研究成果

(1)アフリカ諸国においては、マダニ媒介性感染症が家畜生産に甚大な被害をもたらしており、この大きな要因のひとつに不適切な殺ダニ剤の使用が考えられているが、その実態についての調査は乏しいものであった。そこで、ウガンダ各地の農場におけるマダニ対策の実態調査を実施し、採取したマダニに薬剤抵抗性が存在すること、およびその抵抗性遺伝子を明らかにするとともに、RFLP法による殺ダニ剤抵抗性迅速診断法を開発した。これらの成績からウガンダ各地の農場においては

殺ダニ剤抵抗性マダニに対する適切な対策法の実施が必要であると考えられたため、短期・中期的な介入プログラムを考案した。すなわち、政府関係者、医薬品販売業者、大学等の研究機関、獣医師、畜産関係者間における情報共有不足が、不適切なマダニ対策の実施に繋がっていると推測されたため、各畜産農家に対する採取したマダニの薬剤感受性判定結果の提供に加え、適切な殺ダニ剤の選択と計画的な使用法の提案を行うとともに、各関係者に向けてセミナーを開催し、ウガンダにおける殺ダニ剤抵抗性マダニ対策法確立の緊急性と重要性について啓蒙活動を実施した。これらステークホルダーからのフィードバックを集計した結果、殺ダニ剤抵抗性マダニ対策法の確立には本プログラムの推進が非常に有益であると考えられた。殺ダニ剤の不適切な供給と使用、畜産関係者の知識不足が、誤ったマダニ対策法実施の主要因であることが明らかになった。

(2)ベナン国におけるマダニ媒介感染症の疫学調査とリスク分析を行った。ブラジルからの輸入牛により侵入したとされるオウシマダニ(*Rhipicephalus microplus*)分布地域(南部地域)と非分布地域(北部地域)における牛のマダニ媒介病原体(バベシア属、タイレリア属、アナプラズマ属)の寄生状態を調べた。その結果、南部地域における感染率は、北部地域より有意に高く、オウシマダニの分布がこれらの感染率の差に影響することが示唆された。これらの結果から、オウシマダニの積極的駆除がベナン国におけるマダニ媒介感染症の制圧に有効であることが明らかとなった。

(3)南アフリカ、スーダンおよびトルコにおける小型反芻動物(羊・山羊)のマダニ媒介感染症の流行実態調査を広範囲に渡り実施した。南アフリカにおいてはアナプラズマ属(36.3%)、タイレリア属(19.8%)、エーリキア属(14.3%)が、スーダンにおいてはアナプラズマ属(60.1%)、タイレリア属(12.9%)が、トルコにおいてはアナプラズマ属(60.0%)、タイレリア属(35.9%)、バベシア属(5.2%)がそれぞれ重要なマダニ媒介病原体であることが明らかとなった。アナプラズマ属、タイレリア属、エーリキア属感染動物には顕著な臨床症状は認められなかったが、バベシア属感染動物には重症の貧血症状が認められた。これらの結果は、養羊産業が盛んなこれらの地域におけるマダニ媒介感染症制御対策の重要性を強く提起するものである。

(4)マダニに媒介される赤血球内寄生原虫であるバベシアは約100種類同定されているが、牛に寄生する3種類(*Babesia bovis*、*Babesia bigemina*、*Babesia ovata*)のみについて遺伝子組換え方法が確立されている。

他のバベシアについても遺伝子組換え方法の導入が求められている。そこで、犬に寄生するバベシア (*Babesia gibsoni*) について遺伝子組換え方法の確立を試みた。最初は、*Babesia gibsoni* の伸長因子のプロモーター領域を特定し、GFP 遺伝子発現プラスミドを構築して虫体に導入したところ、GFP 一過性発現虫体の作製に成功した。次に、伸長因子プロモーターを含む 6 種類の *Babesia gibsoni* のプロモーターの制御を受けるルシフェラーゼ発現プラスミドを作製し、異なるプロモーターの活性を測定したところ、アクチンプロモーターが最も強い活性を有することが判明した。また、*Babesia gibsoni* と *Babesia bovis* の伸長因子とアクチンプロモーターをそれぞれ、異種虫体に導入してそのプロモーター活性を調べたところ、これらのプロモーターは異種虫体においても機能することを突き止めた。さらに、これらのプロモーターを用いた、*Babesia gibsoni* の外来遺伝子安定発現系の確立にも成功した。

(5) バベシア症に対する治療薬標的分子の解析を行った。ウシバベシア原虫 (*Babesia bovis*) のヘモグロビン分解に関わると推定されるロイシニアミノペプチダーゼ (BbvLAP) 遺伝子を特定し、クローニングした。組換え BbvLAP はペプチダーゼ酵素活性を示した。この酵素活性はロイシニアミノペプチダーゼのインヒビターとして知られるベスタチンにより特異的に抑制された。また、バベシア原虫の増殖もベスタチンにより抑制された。これらの結果は、BbvLAP を標的としたウシバベシア原虫感染症の治療薬開発の可能性を示唆するものである。

(6) ネズミバベシアモデルを用いて、バベシア症に対する組換えワクチンの開発を行った。BmAMA1 ドメイン I およびドメイン II (DID11) をコードする遺伝子、および BmRON2 膜貫通領域 2~3 (TM2-TM3) をコードする遺伝子を発現・精製した。ハムスターにおいて、rBmAMA1 + rBmRON2 による免疫は *B. microti* 感染に対する部分的な防御効果を示した。攻撃後、血中虫体数は有意に低下しており、またヘマトクリット値は上昇していた。しかし、rBmAMA1 および rBmRON2 単独による免疫は、対照群と比較して有意な防御効果を示さなかった。さらに、単一および組み合わせたタンパク質で免疫した群の間で rBmAMA1 および rBmRON2 に対する抗体の総量に有意差はなかった。これらの結果は、両方の抗原の重要なエピトープを標的とする抗体が防御免疫に必要であることを示唆している。

##### 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 10 件、すべて査読有)

Vudriko P, Okwee-Acai J, Byaruhanga J, Tayebwa DS, Okech SG, Tweyongyere R, Wampande EM, Okurut ARA, Mugabi K, Muhindo JB, Nakavuma JL, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Suzuki H. Chemical tick control practices in southwestern and northwestern Uganda. Ticks Tick Borne Dis (in press)

Vudriko P, Okwee-Acai J, Byaruhanga J, Tayebwa DS, Omara R, Muhindo JB, Lagu C, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Suzuki H. Evidence-based tick acaricide resistance intervention strategy in Uganda: Concept and feedback of farmers and stakeholders. Ticks Tick Borne Dis 9: 254-265, 2018.

Adjou Moumouni PF, Aplogan GL, Katahira H, Gao Y, Guo H, Efstratiou A, Jirapattharasate C, Wang G, Liu M, Ringo AE, Umemiya-Shirafuji R, Suzuki H, Xuan X. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of veterinary important tick-borne pathogens in cattle from *Rhipicephalus microplus*-invaded and non-invaded areas of Benin. Ticks Tick Borne Dis 9: 450-464, 2018.

Ringo AE, Adjou Moumouni PF, Taioe M, Jirapattharasate C, Liu M, Wang G, Gao Y, Guo H, Lee SH, Zheng W, Efstratiou A, Li J, Inoue N, Suzuki H, Thekisoe O, Xuan X. Molecular analysis of tick-borne protozoan and rickettsial pathogens in small ruminants from two South African provinces. Parasitol Int 67: 144-149, 2018.

Vudriko P, Umemiya-Shirafuji R, Okwee-Acai J, Tayebwa DS, Byaruhanga J, Jirapattharasate C, Liu M, Adjou Moumouni PF, Fujisaki K, Xuan X, Suzuki H. Genetic mutations in sodium channel domain II and carboxylesterase genes associated with phenotypic resistance against synthetic pyrethroids by *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* ticks in Uganda. Pestic Biochem Physiol. 143: 181-190, 2017.

Zhou M, Cao S, Sevinc F, Sevinc M, Ceylan O, Ekici S, Jirapattharasate C, Moumouni PF, Liu M, Wang G, Iguchi A, Vudriko P, Suzuki H, Xuan X. Molecular detection and genetic characterization of *Babesia*, *Theileria* and *Anaplasma* amongst apparently healthy sheep and goats in the central region of Turkey. Ticks Tick Borne Dis 8(2): 246-252, 2017.

Wang G, Efstratiou A, Adjou Moumouni

PF, Liu M, Jirapattharasate C, Guo H, Gao Y, Cao S, Mo Zhou, Suzuki H, Igarashi I, Xuan X. Expression of truncated *Babesia microti* apical membrane protein 1 and rhoptry neck protein 2 and evaluation of their protective efficacy. *Exp Parasitol*. 172: 5-11, 2017.

Vudriko P, Okwee-Acai J, Tayebwa DS, Byaruhanga J, Kakooza S, Wampande E, Omara R, Muhindo JB, Tweyongyere R, Owiny DO, Hatta T, Tsuji N, Umemiya-Shirafuji R, Xuan X, Kanameda M, Fujisaki K, Suzuki H. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. *Parasit Vectors* 9: 4, 2016.

Adjou Moumouni PF, Aboge GO, Terkawi MA Masatani T, Cao S, Kamyngkird K, Jirapattharasate C, Zhou M, Wang G, Liu M, Vudriko P, Ybanez AP, Inokuma H, Umemiya-Shirafuji R, Suzuki H, Xuan X. Molecular detection and characterization of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, *Theileria* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Kenya. *Parasit Vectors* 8: 496, 2015.

Aboge GO, Cao S, Terkawi MA, Masatani T, Goo Y, AbouLaila M, Nishikawa Y, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X. Molecular characterization of *Babesia bovis* M17 leucine aminopeptidase and inhibition of *Babesia* growth by bestatin. *J Parasitol* 101: 536-41, 2015.

[学会発表](計4件)

Adjou Moumouni PF, 鈴木宏志, 玄学南: Survey of tick-borne pathogens of cattle in the Sahelian region of Burkina Faso. 第70回日本衛生動物学会, 2018年5月12日, 帯広畜産大学(帯広市)

Adjou Moumouni PF, 鈴木宏志, 玄学南: Characterization of *Babesia* species and *Anaplasma marginale* isolated from cattle in Benin. 第86回日本寄生虫学会, 2017年5月28日, 北海道大学(札幌市)

Adjou Moumouni PF, 鈴木宏志, 玄学南: Prevalence of veterinary important tick-borne pathogens in exotic and indigenous cattle reared in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* invaded areas in Benin. 第159回日本獣医学会, 2016年9月7日, 日本大学(藤沢市)

Vudriko P, 藤崎幸蔵, Acai-Okwee J, 白

藤梨可, 玄学南, 鈴木宏志: Tick acaricide resistance in Uganda: one health perspective. 第56回日本熱帯医学会, 2015年12月5日, 大阪大学(大阪市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木宏志 (SUZUKI, Hiroshi)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・  
教授  
研究者番号: 60333473

(2) 研究分担者

玄学南 (XUAN, Xuenana)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・  
教授  
研究者番号: 10292096

(3) 研究分担者

横山直明 (YOKOYAMA, Naoaki)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・  
教授  
研究者番号: 80301802

(4) 研究分担者

白藤梨可 (UMEMIYA-SHIRAFUJI, Rika)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・  
助教  
研究者番号: 00549909