

(様式 7)

受理年月日

平成24年6月29日

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成24年 5月23日

帯広畜産大学原虫病研究センター長 殿

研究代表者 平田 晴之

所属機関 酪農学園大学

職 名 准教授

氏 名 平田 晴之



下記の共同研究について別紙のとおり報告します。

記

1. 採択番号 23・共同-14

2. 研究課題名

アライグマからイヌ科動物へのバベシア原虫感染拡大阻止のための診断法の開発

研究課題名：

アライグマからイヌ科動物へのバベシア原虫感染拡大阻止のための診断法の開発

研究代表者：酪農学園大学・獣医学群 平田晴之

1. 目的

バベシア症は赤血球内寄生原虫を病因としダニ媒介性の人獣共通感染症である。近年、野生動物において新規バベシア原虫の感染が相次いで報告されてきており、野生動物から飼育動物あるいはヒトへの感染が危惧されている。7年前の調査研究において、北海道に生息するアライグマに感染していたバベシア原虫は、イヌに感染するイヌバベシア原虫に近縁であったことから、アライグマから飼い犬への感染可能であることが示唆された。外来種によって国外から移入された病原原虫が日本在来のダニに順化する、あるいは日本在来のピロプラズマ原虫が外来種のアライグマに順化する可能性が示唆された。このことは、日本の食肉動物（野生動物、家畜動物いずれにおいても）の原虫病対策にとって大きな問題である。さらに、アライグマの野生化は全国的な問題であり、道央圏に限ったものではない。地域によって在来食肉動物の種類や分布が異なり、ダニの種類・分布も異なると考えられる。現時点で、どの様な原虫種がどこまで順化しているかを明らかにすることが重要で、急務であると考えられる。本研究では2004年から7年近くを経た現在、道央圏だけでなく日本各地のアライグマにおけるピロプラズマ目原虫感染の状況を把握するために、和歌山県で捕獲された野生のアライグマ44検体、埼玉県からの18検体、北海道十勝地方からの15検体についてnested-PCR法によってスクリーニングを行い、ピロプラズマ目原虫感染個体における原虫遺伝子の進化系統解析を行い、アライグマが保有する原虫の種類とそれぞれの感染率を調べた。

2. 研究経過

1. アライグマ血液の nested-PCR 法によるピロプラズマ目原虫の検出

和歌山県、埼玉県、北海道十勝地方で捕獲された野生アライグマの血液サンプルを対象にピロプラズマ目原虫の18S rRNA 遺伝子を広く検出するプライマーセットを用いて nested-PCR を行うことによって原虫のスクリーニングを行った。

その結果、和歌山県のサンプルでは44検体中9検体、埼玉県のサンプルでは18検体中2検体で陽性を示した。北海道十勝地方のサンプルでは15検体中、すべての検体で陰性を示した（表1）。埼玉県で捕獲された検体からの血液塗抹検査では、赤血球内寄生原虫が確認された検体はなかった。

表1. 3つの地域のアライグマ検体に対する18S rRNA 遺伝子を標的とした nested-PCR の陽性検体数

捕獲場所	血液塗抹	18S rRNA
和歌山県	—	9/44
埼玉県	0/18	2/18
北海道 十勝地方	—	0/15
合計	0/18	11/77

2. 研究経過の続き

2. 18S rRNA 遺伝子による進化系統解析

Nested-PCR 陽性を示した和歌山県の 9 検体（検体番号 2:SW-R-090105、6:SW-R-090213、8:SW-R-090424、10:SW-R-090513-K、15:SW-R-090521、23:SW-R-09090616、28:SW-R-090706、39:SW-R-090731-Y、43:SW-R-090812-Y）と埼玉県の 2 検体（検体番号 46:SAITAMA1965、48:SAITAMA1967）のうち、和歌山県の 4 検体（23、28、39、43）と埼玉県の 2 検体（46、48）の 6 検体の塩基配列を決定した。この 6 検体のうち、23 と 29 の塩基配列はダイレクトシークエンスでは決定できず、ピロプラズマ目原虫の混合感染が疑われたため、PCR 産物をプラスミドベクターにクローニングし、コロニーからインサートの塩基配列の決定を再度行った。それにより 2 つの異なる塩基配列が得られた。これら 2 つの塩基配列を 23:SW-R-09090616-Type1 (23-Type1) と SW-R-09090616-Type2 (23-Type2)、及び 39:SW-R-090731-Y-Type1 (39-Type1) と SW-R-090731-Y-Type2 (39-Type2) とした。検体 23-Type1、23-Type2、28、39-Type1、39-Type2、43、46、48 の 8 つの塩基配列から *Babesia* 属の 18S rRNA 遺伝子に基づいた系統樹を作成した（図 1）。

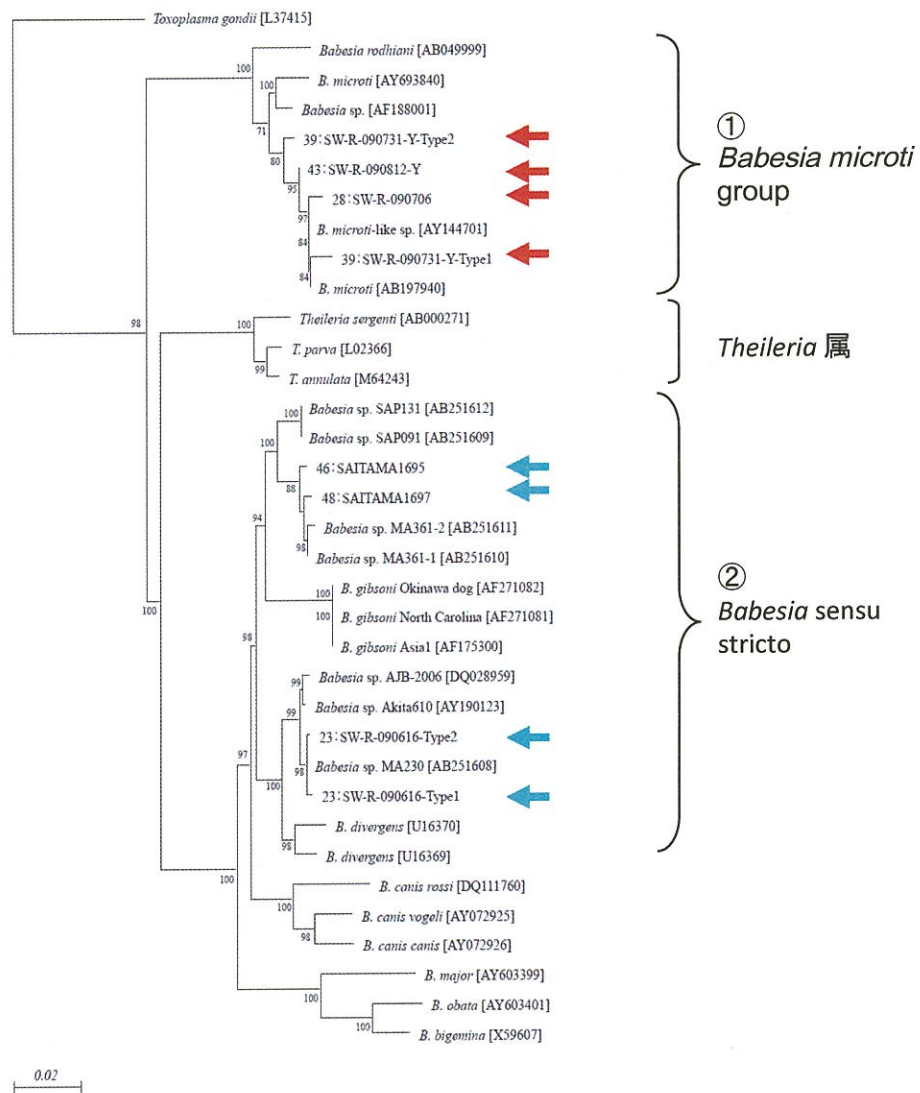


図 1. アライグマから検出されたピロプラズマ目原虫の 18S rRNA 系統樹 (NJ 法)

それぞれの系統樹の分岐した部分についての数字は、1,000 回のブートストラップ試行の結果で、値は 70 以上のものを表記した。

3. まとめ

B. microti のグループに属する食肉類の原虫は、日本においては、川瀬らが報告した *B. microti*-様原虫以外に報告されていない。しかし、今回新たにこれと異なる配列が 28、39-Type1、39-Type2、43 の 4 個検出された(図 1)。これらのうち 28、39-Type1 の 2 個は北米のアライグマの原虫や川瀬らが北海道で検出した原虫と同じクレードを形成したが、残り 2 個 (39-Type2、43) はそれぞれ独立のクレードを形成する新しい原虫種だった(図 1)。断定は出来ないが、これら原虫が北米由来とすればアライグマと媒介ダニの両方に強いボトルネック作用が働くはずで、これほど多様な原虫種の存在を説明し難い。日本在来の野生肉食獣にこれら原虫の幾つかの種類が潜んでおり、それがダニを介してアライグマに入ったものと推測された。

今回、*Babesia sensu stricto* に属する原虫の 18S rRNA 遺伝子が 4 個 (46:SAITAMA1965、48:SAITAMA1967、23:SW-R-09090616-Type1 (23-Type1) と SW-R-09090616-Type2 (23-Type2)) 検出された(図 1)。それぞれ和歌山県から 2 個、埼玉県から 2 個得られたが、前者は陣内が報告した Clade 1 に、後者は Clade 2 に所属し、これら以外のクレードに属する *Babesia sensu stricto* 原虫はなかった(図 1)。陣内らは、Clade 1 は遺伝的に多様で、Clade 2 については、アライグマから検出された 3 個の配列は完全に一致し、多様性はなかったと述べている。今回の成績でも、Clade 1 の 2 配列は遺伝的に相互にやや異なり、Clade 2 の 2 配列は完全一致ではないものの、2 つの配列とも陣内らの報告した原虫にかなり近いことが判った。これから、陣内らが考察した通り、Clade 1 と Clade 2 は、それぞれ日本在来の野生肉食動物の原虫、および北米アライグマを起源として日本にアライグマと共に侵入した原虫、である可能性が高いと推定された。

北海道十勝地方のアライグマから原虫は検出されなかった。この理由として、(1) 調査数が十分でなかった、(2) アライグマが最近定着したため在来の原虫種への順化が進んでいないなどが考えられた。

以上の結果をまとめると、(1) 外来種として全国に広まりつつあるアライグマが、地域によってはこれまで報告されていたよりも遙かに高いピロプラズマ保有率になっていることが明らかになった。(2) 検出された原虫が米国のアライグマのものか、日本在来の野生肉食動物のものかは定かでないが、いずれにしろ原虫保有率が高ければアライグマへの順化・定着の速度が増し、その種類が増える可能性があり、いったんそれらがアライグマで大量に増殖しはじめれば、増幅 (Amplification) 効果によって、在来の野生肉食動物や家畜に飛び火感染する可能性も出てくると危惧される。今回見つかった 8 個の遺伝子型の間では検出率に差はなく、順化が進んでいる遺伝子型を特定することは出来なかったが、今後も今回と同様の調査を継続する必要がある。

また「原虫保有率を指標したスクリーニング」がエマージング感染症の出現監視に有効であることを示す結果が初めて得られた。ただ、組換え蛋白を抗原とした血清学的診断法については候補蛋白を現在選定中で、期間内にアライグマ血清およびイヌ血清を用いた評価を完了出来なかった。解析を難しくする重複感染 (1 頭のアライグマに少なくとも 2 種類の遺伝子型が感染) が主な遅れの要因だが、すでに分離株のクローニング、その遺伝子解析、PCR プライマーの開発など検討を進めており、2-3 年以内に診断法を確立出来ると考える。

尚、本研究は論文投稿準備中である。