

受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 26 年 5 月 26 日

採択番号 25-共同 - 1			
研究部門	診断治療研究部門	原虫病研究センター内共同研究担当教員	横山直明
研究課題名	フィリピンの家畜動物における住血性病原体の分子疫学調査		
研究代表者	(ふりがな) 氏名 (いのくまひさし) 猪熊 壽	所属部局等・職名 帯広畜産大学・臨床獣医学研究部門	
研究分担者	(よこやまなおあき) 横山直明	帯広畜産大学・原虫病研究センター	
研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	原虫を含むベクター媒介性住血性病原体は感染動物に消耗性慢性疾患を引き起こし、世界中で畜産界に多大な被害を与えていた。現在のところ、そのほとんどが有効な治療薬やワクチンがない。また、十分な診断技術が世界に普及しておらず、その蔓延実態が不明な国が多い。本研究では、我々が確立した手法を用いて、フィリピン、とくにセブ島を中心とする家畜動物における住血性病原体（バベシア、タイレリア、トリパノソーマおよびアナプラズマ）の分子疫学調査を実施する。		
研究経過の概要	カウンターパートである Leyte State University の Dr, Ybanez AP (2013 年 3 月岐阜連大にて博士（獣医学）取得) が勤務するフィリピンセブ島を中心に調査を実施した。研究に必要なセブ島の牛末梢血検体は、放牧牛を中心に 2013 年の研究開始までに約 1000 検体を準備していた。これらのサンプルについて、以下の要領で研究を実施した。 ①DNA サンプルの分類と濃度測定、②PCR 法により原虫（バベシア、タイレリア、トリパノソーマ）およびアナプラズマの遺伝子検出。 ③住血性病原体の遺伝子解析を行い、結果を総括。		

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	<p>まず、セブ島 9 地域の牛末梢血 408 検体について、特異的 PCR により各種住血性病原体の検出を行った。<i>Anaplasma</i> spp., <i>Babesia bigemina</i>, <i>Babesia bovis</i>, <i>Trypanosoma theileri</i>, それぞれについて 54.7, 15.4, 10.0 および 12.0% のサンプルが陽性を示した。<i>Tr. evansi</i>, <i>Theileria orientalis</i>, <i>Th. annulata</i> については全て陰性であった。サンプルの 24.2% が混合感染であった。陽性サンプルの 16S rRNA 遺伝子系統学的解析の結果、今回検出された <i>Anaplasma</i> spp. 病原体は <i>A. marginale</i> または <i>A. phagocytophilum</i> に近縁であることが明らかとなった。また、<i>B. bovis</i> の RAP-1 遺伝子および <i>B. bigemina</i> AMA-1 遺伝子の解析により、それらが既知の <i>B. bovis</i> および <i>B. bigemina</i> 遺伝子配列と同一であることが分かった。さらに <i>Tr. theileri</i> cathepsin-L like-蛋白遺伝子はアメリカおよびブラジル株と 97.1-100% の相同性を示した（研究成果 1）。</p> <p>次に、日本では家畜の法定伝染病として知られている <i>Anaplasma marginale</i> の感染状況、フィリピン 6 州の牛 658 頭の末梢血を用いて調査した。熱ショック蛋白遺伝子 (<i>groEL</i>) に基づくスクリーニング PCR で検査したところ、130 頭 (19.8%) が陽性を示した。陽性牛検体について、さらにバリエーションの大きい <i>Msp1a</i> 遺伝子に基づく PCR で精査したところ 93 頭 (14.1%) が陽性となった。さらにその遺伝子解析を行ったところ、20 の新しい構造を含む 37 の tandem-repeat 構造が検出された。4 種の異なるゲノタイプの多重感染も認められた。これらの結果から、フィリピンの牛に感染している <i>A. marginale</i> は多様性に富むことが明らかとなった（研究成果 2）。</p> <p>以上の結果は、フィリピンの牛における住血性病原体に関する初めての分子生物学的調査であり、これらの病原体に対する防疫対策立案のために有効な情報となることが期待される。</p>
研究成果の発表	<p>Ybañez, A. P., Sivakumar, T., Ybañez, R. H. D., Vincoy, M. R. B., Tingson, J. A., Perez, Z. O., Gabotero, S. R., Lyra Buchorno, L. P., Inoue, N., Matsumoto, K., Inokuma, H., Yokoyama, N. Molecular survey on bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. <i>Vet. Parasitol.</i> 196 (1-2): 13-20 (September 2013)</p> <p>Ybañez, A. P., Ybañez, R. H. D., Claveria, F. G., Cruz-Flores, M. J., Xuenan, X., Yokoyama, N., Inokuma, H. High genetic diversity of <i>Anaplasma marginale</i> detected from Philippine cattle. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> 76(2): 307-312 (Februruary, 2014)</p>