

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 年 月 日

採択番号	30 共同-3		
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	バングラデシュにおけるタイレリア感染牛摘発技術の開発		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	たかしま やすひろ 高島 康弘	岐阜大学応用生物科学部・准教授	
研究分担者	たにぐち ゆうじ 谷口 祐二	岐阜大学・連合獣医学研究科・大学院生	
	さいとう だいぞう 齋藤 大造	岐阜大学・連合獣医学研究科・大学院生	
	もいずーる らーまん Moizur Rahman	Rajshahi Univ. Faculty of Agriculture, Associate Professor	
	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・教授	
研究期間	平成 30年 5月 9日 ~ 平成31年 3月 31日		
目的・趣旨	ウシには数種のタイレリア ( <i>Theileria</i> ) が感染するが、これらを区別できる種特異的 PCR がいくつか報告されている。しかしタイレリアの遺伝子配列は種内変異があるため既報のプライマーが別の地域でもうまく機能するとは限らない。申請者らは、インドの <i>T. annulata</i> と <i>T. orientalis</i> を区別できる既報のプライマーについて、バングラデシュの原虫ではアニーリング部位に変異があるためうまく機能しないことを確認している。そこで本研究ではバングラデシュにおいて使用できる種特異的 PCR を開発し、同国におけるタイレリアの分布状況を明らかにする。総研究費の 80% 程度を占める現地調査費は他の経費でまかない、本共同研究費は検出系の開発にしばって研究をすすめる。		
研究経過の概要	バングラデシュのウシ血液 DNA サンプルを既報の方法に従って PCR に供し [PLoS ONE 12(3): e0174595.] タイレリア遺伝子の検出を試みたところ、報告にある種特異的プライマーでは病原性の低い <i>T. orientalis</i> と病原性の高い <i>T. annulata</i> を PCR では区別できなかった。そこで 2 組のプライマーを新たに設計し、これらのプライマーを用いればバングラデシュの sample についても <i>T. orientalis</i> と病原性の高い <i>T. annulata</i> を区別できることを確認した。これらのプライマーを用いて、症状からピロプラズマ症を疑うウシの血液 DNA を調べたところ、その一部から <i>T. annulata</i> DNA が検出された。また、無症状のウシから <i>T. annulata</i> DNA が検出された。本研究により、バングラデシュのウシにおける <i>T. orientalis</i> 感染症の存在が初めて証明された。		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p> Bangladesh の臨床獣医師に聞き取りを行い、近年 <i>T. annulata</i> 感染が疑われる症例が見られた農村 2 か所を調査地とした。これらの農村で無症状の在来牛（あるいは在来牛を親とする交雑種）60 頭から採血し、DNA を得た。この DNA を新たに設計した <i>T. annulata</i> 特異的プライマーをもちいた PCR に供したところ、いずれの農村からも陽性を示す個体がみられた。陽性となったサンプルについては、改めて <i>Theileria</i> の COX3 領域をターゲットとする PCR に供し、増幅された箇所の塩基配列を決定して既報の各種 <i>Theileria</i> と比較したところ、既報の <i>T. annulata</i> の配列と 99% 以上の一致率を見た。系統樹を作成したところ、高いブートストラップ値で <i>T. annulata</i> とクレードを形成した。以上から、これらの個体は <i>T. annulata</i> に不顕性感染していることが分かった。さらに臨床症状から熱帯ピロプラズマ病（<i>T. annulata</i> 感染症）と仮診断された 5 個体の血液についても同様に解析した。このうち 1 頭で <i>T. annulata</i> 特異的 PCR 陽性となった。</p> <p>以上の成果から、Bangladesh における <i>T. annulata</i> の存在が初めて証明された。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>2019 年 5 月現在、以下の論文を投稿中  Mst. Ishrat Zerine MONI, Kei HAYASHI, Thillaiapalam SIVAKUMAR, Moizur RAHMAN, Lovely NAHAR, Md. Zakirul ISLAM, Naoaki YOKOYAMA, Katsuya KITO, Cornelia APPIAH-KWARTENG, Yasuhiro TAKASHIMA. <b>First Molecular detection of <i>Theileria annulata</i> in Bangladesh</b></p>