（別紙１）

学位論文審査の結果の要旨	
専　　　　攻	畜産衛生学専攻（博士後期課程）
氏　　　　名	Thillaiampalam Sivakumar
審査委員署名	主　査　五十嵐郁男 副　査　井上昇 副　査　玄学南 副　査　今井邦俊 副　査　横山直明
題　　　　目	Molecular diagnosis and epidemiology of bovine piroplasmosis（牛ピロプラズマ症の分子生物学的診断の開発と疫学調査に関する研究）

審査結果の要旨

牛ピロプラズマ症は、バベシアおよびタイレリアがマダニにより家畜に媒介されることにより引き起こされ、世界的規模で畜産業に莫大な経済的被害を与えている。これらの牛ピロプラズマ症の制圧戦略を構築するためには、原因となる原虫の疫学的研究が必要である。本研究で申請者は、バベシアおよびタイレリアに対する遺伝子診断法の確立と牛ピロプラズマ原虫に関する分子疫学的調査を行った。

第１章では、*Babesia bigemina* の先端膜抗原１（*AMA-1*）遺伝子を標的とした nested PCR（nPCR）を確立し、これを用いてモンゴルの牛について分子疫学的調査を行った。*B. bigemina* の *AMA-1* 遺伝子を標的とした nPCR は、従来使用されていた *SpeI-AvaI* を標的とした nPCR より特異性が高く、類似性の高い *B. ovata* と明確に区別が可能であった。また、この高い特異性は、モンゴルの牛血液サンプルを用いた解析によっても確認された。

第２章では、*Babesia ovata* の *AMA-1* 遺伝子を標的とした PCR を確立し、*Theileria orientalis* と混合感染している新日高地方の牛に関する臨床病理学的検討を行った。その結果、*B. ovata* 単独感染牛は非感染牛と同様の総赤血球数値を示した。しかし、*T. orientalis* 感染牛と混合感染牛は貧血が強く、特に混合

感染牛の貧血率は、*T. orientalis* 単独感染牛に比べて高かった。

第３章では、*Babesia bovis* のメロゾイト表面抗原（*MSAs*）遺伝子や先端膜抗原である *AMA-1* や *12D3* 遺伝子を標的とした PCR を確立し、スリランカの牛を用いてこれらの遺伝子解析を行い、ワクチン株との比較を行った。その結果、*B. bovis* の *AMA-1* や *12D3* 遺伝子はスリランカにおいてよく保存されていた。一方、*MSAs* 遺伝子は多様性に富み、４遺伝子型９クレードに分類され、オーストラリアから導入されたＫ株ワクチンとの相同性は４０～６２％と低かった。

第４章では、*T. orientalis* の主要ピロプラズマ表面抗原（*MPSP*）遺伝子を標的とした PCR を用いて、スリランカの牛について遺伝子型解析を行った。その結果、スリランカでは、４個の *MPSP* 遺伝子型（1, 3, 5, 7）が認められ、特に遺伝子型７が最も優勢であった。

以上のように、本研究において申請者は、牛に感染する *B. bigemina*、*B. ovata*、*B. bovis*、*T. orientalis* に対する特異的な遺伝子診断法を開発し、日本、モンゴルやスリランカで分子疫学的調査を行い、原虫遺伝子の多様性や病原性との関連性について明らかにした。これらの研究成果は、牛ピロプラズマ症の診断やワクチン開発における分子疫学的調査の重要性を示唆しており、今後本症の予防に貢献するものと期待される。

以上について、審査委員全員一致で本論文が帯広畜産大学大学院畜産学研究科博士後期課程の学位論文として十分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1）題　　目　Genetic diversity within *Theileria orientalis* parasites detected in Sri Lankan cattle.
　著 者 名　Thillaiampalam Sivakumar, Takeshi Yoshinari, Ikuo Igarashi, Hemal Kothalawala, Sembukutti Arachchige Eranga Abeyratne, Singarayar Caniciyas Vimalakumar, Asela Sanjeewa Meewewa, Kulanayagam Kuleswarakumar, Alawattage Don Nimal Chandrasiri, and Naoaki Yokoyama
　学術雑誌名　Ticks and Tick-borne Diseases に発表
　(巻・号・頁) (4 巻・3 号・235～241 頁)
　発 行 年 月　2013 年 4 月

2）題　　目　Genetic detection of *Babesia bigemina* from Mongolian cattle using apical membrane antigen-1 gene-based PCR assay.
　著 者 名　Thillaiampalam Sivakumar, Khukhuu Altangerel, Badgar Battsetseg, Banzragch Battur, Mahmoud AbouLaila, Tserendorj Munkhjargal, Takeshi Yoshinari, Naoaki Yokoyama, and Ikuo Igarashi
　学術雑誌名　Veterinary Parasitology に発表
　(巻・号・頁) (187 巻・2 号・17～22 頁)
　発 行 年 月　2012 年 6 月

3）題　　目　PCR detection of *Babesia ovata* from cattle reared in Japan and clinical significance of co-infection with *Theileria orientalis*
　著 者 名　Thillaiampalam Sivakumar, Michihito Tagawa, Takeshi Yoshinari, Adrian P. Ybañez, Ikuo Igarashi, Yuzuru Ikehara, Hiroshi Hata, Seiji Kondo, Kotaro Matsumoto, Hisashi Inokuma, and Naoaki Yokoyama
　学術雑誌名　Journal of Clinical Microbiology に発表
　(巻・号・頁) (50 巻・6 号・2111～2113 頁)
　発 行 年 月　2012 年 6 月