

機関番号：10105

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19405044

研究課題名（和文）アジア・アフリカにおけるバベシア原虫の分子疫学的調査研究

研究課題名（英文）Molecular epidemiological survey on *Babesia* parasites in Asia and Africa

## 研究代表者

五十嵐 郁男（IGARASHI IKUO）

帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授

研究者番号：80159582

## 研究成果の概要（和文）：

家畜のバベシア病は、世界規模で甚大な被害を与えており、海外悪性伝染病に指定されている。本研究は、新たな診断法を開発すると共に、アジア・アフリカにおけるバベシア病の感染状況を明らかにし、日本のバベシア病に対する検疫体制強化に貢献することを目的として行われた。その結果、牛や馬のバベシア病に対する新規の血清および遺伝子診断法が開発された。これらの診断法を用いたアジア・アフリカの4カ国の牛・馬のバベシア病の疫学調査により、これらの地域で高い感染率が認められた。

## 研究成果の概要（英文）：

Babesiosis causes great economic losses to animal industry worldwide and designated as an exotic infectious disease. Objective of the present study was to develop new serological and molecular diagnostic tests against babesiosis to do molecular epidemiological survey on babesiosis in Asia and Africa, and to contribute for strength of the quarantine system in Japan. As a result, new serological and molecular diagnostics were developed against bovine and equine babesiosis. The epidemiological surveillance in four countries in Asia Africa demonstrated high prevalence of babesiosis in these regions.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究代表者の専門分野：原虫病診断学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：バベシア病、アジア、アフリカ、診断、疫学調査、遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

バベシア原虫は世界の熱帯・温帯地域に分布し、ダニによって媒介されて牛、馬などの家畜の赤血球に寄生し、重度の貧血・黄疸を主徴とする致死感染を引き起こす。しかし、バベシア病に対する有効なワクチンや治療薬はないのが現状であり、海外悪性伝染病に指定されている。

我が国では年間約2.5万頭の牛や3千頭の

馬等の家畜や畜産物等が海外から輸入されており、これらに伴うバベシア原虫の日本へ侵入する事が懸念されている。従って、本病の日本への侵入を阻止するためには、これら家畜のバベシア病に対する検疫体制の強化が急務である。そのためには、感度の高い診断法の開発と世界的な感染状況の把握が極めて重要である。

## 2. 研究の目的

家畜のバベシア病は世界的規模で経済的、社会的にも重要な影響を及ぼしている極めて重要な原虫症である。しかしながら、その診断法、治療法、予防法の確立が遅れているのが現状である。我が国には、毎年多数の家畜が輸入され、それに伴いバベシア病の日本への侵入が危惧されており、検疫体制強化が重要である。本研究では、代表研究者らが世界に先駆けて開発している血清診断法、遺伝子診断法を用いて、アジア・アフリカにおけるバベシア病の浸潤・流行状況を明らかにし、日本の動物検疫体制の強化に貢献することを目的としている。

## 3. 研究の方法

アジア・アフリカにおけるバベシアの浸潤・流行状況を明らかにするため、南アフリカ、ガーナ、タイおよび中国を調査国として選定し、下記の項目について検討を行った。

- (1) 牛、馬のバベシア症に対する血清学的調査 (ELISA, イムノクロマト法)
- (2) 牛、馬のバベシア症に対する遺伝子学的調査 (PCR, 遺伝子配列解析)
- (3) 牛、馬のバベシア原虫の培養による分離、同定
- (4) 媒介ダニに関する調査 (ダニの種同定、原虫の検出)
- (5) 現地に適した診断・予防法の確立

## 4. 研究成果

本研究において、牛や馬のバベシア病に対する新規の組換え抗原を用いた ELISA やイムノクロマト法などの血清診断法や PCR や LAMP 法などの遺伝子診断法が開発された。また、これらの診断法を用いたアジア・アフリカの4カ国の牛・馬のバベシア病の疫学調査により、これらの地域で高い感染率が認められた。今後、これらの診断技術や得られた情報が、動物検疫体制の強化に貢献する事が期待される。

### (1) 牛バベシア症に対する診断法の開発

ウシバベシア *B. bovis* と *B. bigemina* の RAP1 抗原の組換え蛋白質を用いて、それぞれに特異的なイムノクロマト法を開発した。また、*B. bigemina* の P200C 末端を含む部分の断片化により、可溶性で P200 組換え蛋白質の高い産生が可能となった。この断片化 P200 蛋白質を用いた ELISA は、*B. bovis* の抗体との交差反応が認められず、*B. bigemina* に対する高い特異性を示した。さらに、*B. bovis* のスフェリカルボディ 4 (BbSBP4) 遺伝子がコードする蛋白質を作製した。BbSBP4 を用いた ELISA は BbMSA-2c、BbRAP-1/CT、BbTRAP-T、BbSBP-1 を用いた ELISA に比較して、優れた

感度と特異性を有している事がアジアやアフリカの試料を用いて明らかとなった。

また、*B. bovis* と *B. bigemina* を同時に検出可能な LAMP 法が確立された。*B. bovis* の膜抗原遺伝子 BV5650 および BV8970 を用いた nested PCR について RAP-1 遺伝子との比較検討を行ったところ、BV5650 遺伝子を用いた nPCR が一番感度が高い事がアジア・アフリカの試料を用いて明らかとなった。

### (2) 馬バベシア症に診断法の開発

ウシバベシア *B. caballi* と *B. equi* に対する抗体検出用のイムノクロマト法は高い特異性を示した。また、同時に両原虫の遺伝子の検出を可能にする LAMP 法は PCR 法と同等の感度であった。また、ろ紙に吸着させた血液から抽出した DNA を用いた PCR は通常 DNA 抽出法と同等の検出結果を示した。更に、*T. equi* に対する Real-time PCR 法が確立された。培養原虫を用いた実験により、1.5 個/ml の原虫を検出可能である事が明らかとなった。

### (3) その他のバベシア症に対する診断法の開発

犬バベシア原虫 *B. gibsoni* のスロンボスポンディン関連接着蛋白質 (BgTRAP) を用いた ELISA 法を確立した。BgTRAP の ELISA 法は既存の組換え抗原を用いた ELISA 法よりも高い感度を示した。また、人にも感染可能な *B. microti* の BMN1-17 組換え抗原を作製し、ICT の開発について検討した。その結果、BMN1-17 組換え抗原を用いた ICT は、特異性が高く、ハムスター感染実験において、IFAT と同等の抗体検出感度を示した。また、日本で初めて検出されたヒト患者の血清にも陽性反応を示した。さらに、*B. microti* の BM94 組換え抗原を作製し、ELISA について検討した。その結果、BMN1-17 組換え抗原を用いた ELISA は、特異性が高く、マウス感染実験において、感染後約 90 日まで抗体検出が可能であった。

### (4) 南アフリカにおける疫学的調査

南アフリカの8州から集められた719例の牛血清試料について、*B. bovis* SBP-4 と *B. bigemina* の C-末端の rhoptry 関連タンパク質-1 (BbigRAP-1/CT) を用いた ELISA と IFAT を用いて、その感染状況を検討した。その結果、ELISA と IFAT により、*B. bovis* では 35.3% と 39.7%、*B. bigemina* では 30% と 36.5% がそれぞれ陽性であった。また、混合感染は、ELISA と IFAT により、それぞれ 18.2% と 26.3% に認められた。また、ウマバベシア症に対する遺伝子診断法である LAMP 法により、37例の DNA 試料のうち、*B. equi* と *B. caballi* でそれぞれ 91.8% と 45.9% の感染率

を示した。また、混合感染も 40.5%のサンプルに認められた。

#### (5) ガーナにおける疫学的調査

ガーナで集められた 80 例の牛血清試料について、*B. bovis* SBP-4 と *B. bigemina* IFAT を用いて、*B. bovis* の感染状況を検討した。その結果、ELISA と IFAT により、50%と 41%がそれぞれ陽性であった。また、40 例の牛 DNA 試料について、*B. bovis* と *B. bigemina* の RAP-1 遺伝子を標的とした LAMP 法により、それぞれ 30%および 67.5%が陽性である事が明らかとなった。また、BV5650 遺伝子を用いた nested PCR では、82.5%が *B. bovis* 陽性であった。

また、30 例の馬 DNA 試料について、18SrRNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR および nested PCR により検討したところ、53.3%が *B. equi* 陽性であった。

#### (6) タイにおける疫学的調査

タイ北部の 4 つの州から集められた 700 例の牛血清試料について、*B. bovis* および *B. bigemina* の C-末端の rhoptry 関連タンパク質-1 (BbigRAP-1/CT) を用いた ELISA と IFAT を用いて、その感染状況を検討した。その結果、ELISA と IFAT により、*B. bovis* では 73.8%と 68.8%、*B. bigemina* では 69.1%と 75.8%がそれぞれ陽性であった。また、混合感染は、ELISA により、52.9%に認められた。

また、北東部の水牛から集められた 305 例の牛血液試料を nPCR、ELISA、IFAT 法により検討した。その結果、*B. bovis* および *B. bigemina* の感染率はそれぞれ nPCR で 11.2%と 3.6%、ELISA で 14.7%と 5.9%、IFAT で 16.8%と 5.6%であった。

#### (7) 中国における疫学的調査

中国で採取された 100 例の牛血清試料について、*B. bovis* の BbSBP4、BbMSA-2c、BbRAP-1/CT、BbTRAP-T、BbSBP-1 を用いた ELISA および IFAT により感染率を検討した。その結果、それぞれ、40%、31%、27%、4%、31%、および 36%で、BbSBP4 を用いた ELISA が一番高い感染率を示した。

また、中国で採取された 55 例の馬血液 DNA 試料について LAMP 法により感染状況を検討したところ、*B. equi* と *B. caballi* でそれぞれ 81.8%と 56.3%の感染率が認められた。また、混合感染も 49.0%の馬 DNA 試料に認められた。

#### 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 19 件)

1. Terkawi MA, Huyen NX, Wibowo PE, Seuseu FJ, Aboulaila M, Ueno A, Goo YK, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. 2011. Spherical body protein 4 is a new serological antigen for the global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. Clin Vaccine Immunol. 18(2):337-342. 査読有り。
2. Ooka H, Terkawi MA, Goo YK, Luo Y, Li Y, Yamagishi J, Nishikawa Y, Igarashi I, Xuan X. 2011. *Babesia microti*: Molecular and antigenic characterizations of a novel 94-kDa protein (BmP94). Exp Parasitol. 127(1):287-293. 査読有り。
3. Iseki H, Zhou L, Kim C, Inpankaew T, Sununta C, Yokoyama N, Xuan X, Jittapalpong S, Igarashi I. 2010. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. Vet. Parasitol. 170(3-4):193-196. 査読有り。
4. Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2010. Development and evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Babesia bovis* from cattle blood. Vet. Parasitol. 172(1-2):65-70. 査読有り。
5. Iseki H, Kawai S, Takahashi N, Hirai M, Tanabe K, Yokoyama N, Igarashi I. 2010. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method as a tool for diagnosis of infection by the zoonotic simian malaria parasite *Plasmodium knowlesi*. J Clin Microbiol. 48(7):2509-2514. 査読有り。
6. Hikosaka K, Watanabe YI, Tsuji N, Kita K, Kishine H, Arisue N, Palacpac NM, Kawazu SI, Sawai H, Horii T, Igarashi I, Tanabe K. 2010. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Mol Biol Evol. 27(5):1107-1116. 査読有り。
7. Iseki H, Zhou L, Kim C, Inpankaew T, Sununta C, Yokoyama N, Xuan X, Jittapalpong S, Igarashi I. 2010. Seroprevalence of *Babesia* infections of dairy cows in northern Thailand. Vet. Parasitol. 170:193-196. 査読有り。
8. Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. 2010. Development and evaluation of a nested PCR based on spherical body protein 2 gene for the diagnosis of *Babesia bovis* infection. Vet Parasitol. 169(1-2):45-50. 査読有り。
9. Altangerel K, Alhassan A, Iseki H, Sivakumar T, Boldbaatar D, Yokoyama N, Igarashi I. 2009. Evaluation of *Babesia bigemina* 200 kDa recombinant antigen in enzyme-linked immunosorbent assay. Parasitol Res. 105(1):249-254. 査読有り。
10. Ota N, Mizuno D, Kuboki N, Igarashi I, Nakamura Y, Yamashina H, Hanzaike T, Fujii K, Onoe S, Hata H, Kondo S, Matsui S, Koga M, Matsumoto K, Inokuma H, Yokoyama N.

2009. Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. J Vet Med Sci. 71(7):937-944. 査読有り。
11. Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. 2008. Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. Vet Parasitol. 151(2-4):158-163. 査読有り。
  12. Kim CM, Blanco LB, Alhassan A, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X, Igarashi I. 2008. Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Am J Trop Med Hyg. 78:117-121. 査読有り。
  13. Alhassan A, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Motloang MY, Mbatia PA, Yin H, Katayama Y, Anzai T, Sugimoto C, Igarashi I. 2007. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosis of equine piroplasmiasis. Vet Parasitol. 143:155-160. 査読有り。
  14. Iseki H, Alhassan A, Ohta N, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Nambota A, Yasuda J, Igarashi I. 2007. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. J Microbiol Methods. 71:281-287. 査読有り。
  15. Aboge GO, Jia H, Terkawi MA, Goo Y, Kuriki K, Nishikawa Y, Igarashi I, Suzuki H, Xuan X. 2007. A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Parasitol., 149:85-94. 査読有り。
  16. Kim C, Iseki H, Herbas MS, Yokoyama N, Suzuki H, Xuan X, Fujisaki K, Igarashi I. 2007. Development of Taqman-Based Real-Time PCR Assays for Diagnostic Detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. Am J Trop Med Hyg. 77:837-841. 査読有り。
  17. Kim C, Alhassan A, Verdida RA, Yokoyama N, Xuan X, Fujisaki K, Kawazu S, Igarashi I. 2007. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. Vet Parasitol. 148:137-143. 査読有り。
  18. Alhassan A, Iseki H, Kim C, Yokoyama N, Igarashi I. 2007. Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of *Theileria equi* infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates. Trop Anim Health Prod.39:369-374. 査読有り。
  19. Alhassan A, Govind Y, Tam NT, Thekisoe OM, Yokoyama N, Inoue N, Igarashi I. 2007. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and in vitro culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. Parasitol Res. 100:1165-1168. 査読有り。
- [学会発表] (計 38 件)
1. Alaa Terkawi 他 9 名。Spherical body protein 4 is a new serological antigen for the global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. M. 45<sup>th</sup> Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases、平成 23 年 1 月 10～11 日、東京。
  2. 高橋延之他 4 名。LAMP による *Plasmodium cynomolgi* 遺伝子検出法の開発。第 51 回日本熱帯医学会大会、平成 22 年 12 月 3～4 日、仙台。
  3. Ikuo Igarashi 他 5 名。Molecular characterization of a new spherical body protein of *Babesia bovis* and evaluation of its potential use for serodiagnosis. The XIIth International Congress of Parasitology、平成 22 年 8 月 15～20 日、シドニー。
  4. Alaa Terkawi 他 7 名。Validation and evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of *Babesia bovis* infection. M. 第 79 回日本寄生虫学会大会、平成 22 年 5 月 20～21 日、旭川市。
  5. Terkawi M Alaa, Senu J, AbouLaila M, 横山直明、玄学南、五十嵐郁男。Molecular characterization of a new spherical body protein of *Babesia bovis* and evaluation its potential use for serodiagnosis. 第 149 回日本獣医学会学術集会。平成 22 年 3 月 26～28 日、武蔵野市。
  6. Terkawi M. Alaa 他 5 名。Molecular characterization of a new spherical body protein of *Babesia bovis* and evaluation its potential use for serodiagnosis. 第 148 回日本獣医学会、平成 21 年 9 月 25～27 日、鳥取市。
  7. 井関博他 3 名。人獣共通サルマラリア・*Plasmodium knowlesi* に対する遺伝子簡易検出法の開発。第 148 回日本獣医学会、平成 21 年 9 月 25～27 日、鳥取市。
  8. Iseki Hiroshi 他 4 名。Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Babesia microti* infection. XXII Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology、平成 21 年 8 月 8～13 日、カルガリー。
  9. 周麗佳、井関博、Inpankaew T、横山直明、玄学南、Jittapalapong S、五十嵐郁男。

タイにおけるウシバベシア症の疫学調査。第146回日本獣医学会学術集会、平成20年9月24日～26日、シーガイア（宮崎県）。

10. Igarashi I, Alhassan A, Kim C, Huang X, Blanco L, Iseki H, Yokoyama N, Xuan X. Application of the immunochromatographic test (ICT) for the diagnosis of tick borne disease. VI International Conference on ticks and tick-borne pathogens、平成20年9月21～26日、ブエノスアイレス。
11. 横山直明、Kim C、Blanco L、Alhassan A、井関博、玄学南、五十嵐郁男。Diagnostic real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria equi* from equine blood samples. 第145回日本獣医学会、平成20年3月28～30日、相模原市。
12. 五十嵐郁男ほか6名。Development of an immunochromatographic test for the simultaneous sero-diagnosis of bovine babesiosis. 42th Annual Meeting of the US/Japan Parasitic Diseases Joint Panels. 平成20年1月16～17日、ドイツ。
13. 五十嵐郁男他6名。Development of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (mLAMP) Method for Rapid Detection of Bovine *Babesia* parasites. The 2nd Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. 平成19年10月8日。バンコック。
14. 井関博、Alhassan A、太田奈保美、Thekisoe O、横山直明、井上昇、Nambota A、安田準、五十嵐郁男。mLAMP (Multiplex loop-mediated isothermal amplification)法を用いたガーナ及びザンビア共和国におけるウシバベシア症の疫学。第143回日本獣医学会、平成19年4月3～5日、つくば。

〔図書〕（計4件）

- ① 五十嵐郁男、講談社、イラストでみる猫の病気（小野憲一郎他編）、2008年（9版）、128-129。
- ② 五十嵐郁男、インターズー社、犬・猫の感染症と寄生虫病（長谷川篤彦監訳）、2007年、293-297、303-309、310-312、313-314、315-318、328-332、333-337。
- ③ 五十嵐郁男、医薬ジャーナル社、人獣共通感染症（木村哲・喜田宏編、改訂版）、2011年、415-418、419-422。
- ④ Mohamad Alaa Terkawi, Ikuo Igarashi、Wiley-Blackwell社、Aplicomplexan Parasites: Molecular approaches toward targeted drug development

（Katja Backer ed.）、2011年、453-468。

〔産業財産権〕  
○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.obihiro.ac.jp/~protozoa/index.html>

国際獣疫事務局（OIE）の馬ピロプラズマ病と牛バベシア病のレファレンスラボラトリーおよび専門家に認定（平成19年5月）

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
五十嵐 郁男 (IGARASHI IKUO)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授  
研究者番号：80159582

(2) 研究分担者  
玄学南 (XUAN XUENAN)  
帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授  
研究者番号：10292096

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

中村 一哉 (NAKAMURA KAZUYA)  
国立感染症研究所・ウイルス研究室・研究員  
研究者番号：00400078

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

(4) 研究協力者  
① 井関 博 (ISEKI HIROHI)  
動物衛生研究所・ウイルス病研究チーム・研究員  
② MOHAMAD ALAA TERKAWI  
帯広畜産大学原虫病研究センター・JSPS 外国人特別研究員  
③ MAHMOUD ABOULAILA  
帯広畜産大学原虫病研究センター・JSPS 外国人特別研究員