

学 位 論 文 題 名

Polymerase chain reaction を用いた小型ピロプラズマの
DNA 型別と原虫集団の動態解析

学位論文内容の要旨

これまで *Theileria sergenti* のピロプラズム主要表面抗原(p32)に対するモノクローナル抗体およびDNAプローブをもちい p32 の多型性の解析が行われてきた。その結果日本国内の分離株において遺伝子型および抗原性を異にする複数のタイレリア原虫の存在が確認されてきている。本研究では国内に複数の遺伝子型が存在するタイレリア原虫をそれぞれ型特異的に検出する方法を開発し、宿主体内での原虫集団の動態を解析した。

まず p32 遺伝子の型別とその国内分布状況についての調査を行った。これまでの成績から、国内のタイレリアは限られた少数の p32 の型に分けられることが予想された。そこで、国内に存在が確認されている2つの型、すなわち、池田 (I) 型、千歳 (C) 型、ならびに存在が疑われる *T. buffeli* (B) 型を特異的に検出できる polymerase chain reaction (PCR) の系を確立した。この PCR 法を用いて、国内各地(沖縄を除く)のタイレリア感染牛 22 頭および豪州からの輸入牛 6 頭より採取された原虫 DNA について調べた。国内の感染牛においては、I、C、B の 3 つの型が同時に同一牛から検出された例 3 頭、I と C の 2 つの型が検出された例 12 頭、I または C 型のみの検出例が 7 頭であった。輸入牛からは 6 頭全てにおいて B と C の 2 つの型が検出された。しかし、これら 3 つの型に属さない原虫は検出されなかった。すなわち、p32 遺伝子を用いた PCR 法で日本国内に分布する *T. sergenti* は少なくとも 3 つの型に分類され、感染牛の多くが 2 ないし 3 つの型の混合感染をおこしていることが明らかとなった。さらに、感染(伝播)方法ならびに長期間持続感染中のウシ体内での原虫集団の動態について検討した。その結果、感染血液を介した伝播では優位を占める原虫型の変化は観察されなかったものの、ダニを介した伝播においては優位をしめる原虫型が変わりうる

ことが観察された。このことからベクターを介することにより原虫群の抗原性にも変化が生じてくることが予想された。また、持続感染中においても優位を占める原虫群の変化が観察された。これらの実験感染系を用いて明らかにされた原虫の動態が、野外における本原虫感染症にもあてはまり、その宿主寄生体関係を複雑化させているものと考えられる。

次に、細胞内において、特殊な機能を有し他の生物間においてもそのアミノ酸配列において高い相同性が報告されている熱ショック蛋白質(hsp70)の遺伝子を用いて、PCR法により既知のタイレリア属原虫の検出が可能か否か検討した。まず、*T. sergenti* のhsp 70遺伝子のクローニングおよび遺伝子のシーケンスを行なった。そして、すでに報告されている*T. annulata* のhsp 70遺伝子との比較を行いPCRプライマーを設計し、*T. parva* および*T. annulata* をも同時に検出できるPCR法の開発を行った。このプライマーを用いてPCRを行うことにより*T. sergenti* のI型とC型、*T. buffeli* Warwick株(豪州由来I・C混合型)、*T. parva*、*T. annulata* (Gansu株)の全てのhsp 70遺伝子を増幅することが可能となった。さらにPCR産物の制限酵素を用いた解析の結果、hsp 70遺伝子においてもp32遺伝子と同様に、複数の遺伝子型が存在することが明らかになった。

これまで、複数のタイレリア種を同時に検出する方法はなく、PCRを用いることにより1度に多検体を処理でき、さらに必要に応じて特異性の幅を広げて解析を進めることができるため、hsp 70遺伝子を用いたPCR法による解析は多種のタイレリアが混在する地域において画期的な原虫検出法となることが期待される。

本研究では、*T. sergenti*は多様性に富んだ原虫集団として哺乳動物－ダニ間で伝播しており、各種の生物学的要因がその集団の構成比率に影響を与えることが明らかにされた。ワクチン等による本病の防圧法を開発する上で、原虫集団の動態解析は不可欠であり、本研究で開発されたPCR法が、その解析の有力な手段となるであろう。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	神 谷	正 男
副 査	教 授	前 出	吉 光
副 査	助教授	杉 本	千 尋

学 位 論 文 題 名

Polymerase chain reaction を用いた小型ピロプラズマの DNA 型別と原虫集団の動態解析

小型ピロプラズマ病は*Theileria sergenti* 感染に起因する放牧病であり、防除法の開発が急務である。*T. sergenti* のピロプラズムの主要表面抗原(p32)の解析から日本国内分離株には遺伝子型および抗原性を異にする複数のタイレリア原虫の存在が確認されている。本研究では国内に複数の遺伝子型が存在するタイレリア原虫をそれぞれ型特異的に検出する方法を開発し、宿主体内での原虫集団の動態を解析した。

まず p32 遺伝子の型別とその国内分布状況についての調査を行った。国内に存在が確認されている2つの型、すなわち、池田(I)型、千歳(C)型、ならびに存在が疑われる *T. buffeli* (B)型を特異的に検出できる polymerase chain reaction (PCR) の系を確立し、国内各地のタイレリア感染牛28頭から採取した原虫 DNA について調べた。その結果、日本国内に分布する *T. sergenti* は少なくとも3つの型に分類され、感染牛の多くが2ないし3つの型の混合感染をおこなっていることが明らかとなった。さらに、感染(伝播)方法ならびに持続感染中のウシ体内での原虫集団の動態について検討した。その結果、ダニを介した伝播および持続感染中において優位を占める原虫型の変化が観察された。

次に、細胞内において、特殊な機能を有し他の生物間においてもそのアミノ酸配列において高い相同性が報告されている熱ショック蛋白質(hsp 70)の遺伝子を用いて、PCR法により既知のタイレリア属原虫の検出が可能か否か検討した。まず、*T. sergenti* の hsp 70 遺伝子のクローニングおよび遺伝子のシーケンスを行なった。そして、すでに報告されている *T. annulata* の hsp 70 遺伝子との比較を行いPCRプライマーを設計した。このプライマーを用いてPCRを行うことにより *T. sergenti*、*T. parva*、*T. annulata* の全ての hsp 70 遺伝子が増幅され、タイレリア属原虫の検出が可能となった。

本研究により混在して存在する *T. sergenti* を型別することが可能となり、本法を用いることにより宿主体内での原虫の動態が明らかとなった。この研究はワクチン等による本病の制圧にとり重要な知見を提供するものである。よって、審査員一同は久保田修一氏が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。