

Molecular epidemiology of *Theileria orientalis* infection in Australian cattle and development of a molecular method for differentiation of *T. orientalis* genotypes

(オーストラリアの牛における*Theileria orientalis*感染症の分子疫学解析
ならびに同原虫の遺伝子型別法の開発)

学位論文内容の要旨

Bovine theileriosis caused by *T. orientalis* is prevalent throughout Japan, Korea and parts of Russia and China. The distribution of benign *Theileria* related to *T. orientalis* often referred to as *T. buffeli* appears to be worldwide, but is less frequently associated with clinical disease although some fatal cases have been reported to occur in America. Based on the major piroplasm surface protein (MPSP) gene, there are eight genetic types (genotypes) currently comprising the *T. orientalis* complex. These types include type1 (Chitose), type2 (Ikeda), type3 (Buffeli) and type-4-8 yet to be classified with taxonomically. Mixed infection with different types of *T. orientalis* in cattle are common in Japan, Korea, and China. Herein, I report the molecular epidemiology of *T. orientalis* in Australian cattle and development of molecular diagnostic method for differentiation of *T. orientalis* genotypes.

In recent years, theileriosis been suspected of being responsible for a number of outbreaks of disease in cattle near the coast of New South Wales, Australia. Therefore, in the first part of my study, I identified and characterized the species of *Theileria* in cattle on six farms in New South Wales where disease outbreaks had occurred, and compared this with *Theileria* from three disease-free farms in Queensland that is endemic for *Theileria*. Special reference was made to sub-typing of *T. orientalis* by type-specific PCR and sequencing of the small subunit (SSU) rRNA gene, and sequence analysis of the gene encoding the major piroplasm surface protein (MPSP). Nucleotide sequencing of SSU rRNA and MPSP genes revealed the presence of four *Theileria* MPSP and SSU rRNA genotypes: Buffeli, Ikeda, Chitose and MPSP type 4, or SSU rRNA type C. The majority of animals showed mixed infections while a few showed single infection.

Noting that the current detection and identification methods for the *T. orientalis* genotypes have got limitations as mentioned above, I developed a novel easy to use sensitive and specific diagnostic method for population structure analysis of *T.*

orientalis types specifically Ikeda, Chitose and Buffeli the most frequently encountered genotypes. By applying ITS1 and ITS2 spacers in fragment genotyping, I utilized primers flanking the two ribosomal RNA internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). Due to varying degrees of sequence polymorphism in the ITS regions found within and between species, I exploited the insertions and or deletions in these regions which resulted in different fragment sizes. On the basis of fragment size polymorphism, it was able to discriminate the three commonly found types of *T. orientalis*. ITS1 was capable of discriminating all three types (Ikeda-251 bp, Chitose-274 bp and Buffeli-269 bp) in one single reaction by fragment genotyping. However, using ITS2, Ikeda (133 bp) a more pathogenic type was distinguishable from Buffeli/Chitose (139 bp). In addition, parasite load was quantified in experimental animals using ITS1. When compared with previous PCR detection method, ITS-based genotyping was found to be more sensitive methods with high specificity in population analysis and can be deployed in molecular epidemiology studies.

In conclusion, this study provides a new insight into molecular epidemiology of *T. orientalis* especially in the Oceanian regions, and a new tool of sensitive diagnosis and parasite population analysis.

学位論文審査の要旨

| | | |
|----|----|------|
| 主査 | 教授 | 杉本千尋 |
| 副査 | 教授 | 片倉賢 |
| 副査 | 教授 | 大橋和彦 |
| 副査 | 教授 | 鈴木定彦 |

学位論文題名

Molecular epidemiology of *Theileria orientalis* infection in Australian cattle and development of a molecular method for differentiation of *T. orientalis* genotypes

(オーストラリアの牛における*Theileria orientalis*感染症の分子疫学解析
ならびに同原虫の遺伝子型別法の開発)

*Theileria orientalis*はいわゆる牛の小型ピロプラズマ病の原因となる赤血球内寄生性原虫である。本種の中にIkeda, Chitose, Buffeliなど、Small subunit ribosomal RNA遺伝子 (SSUrDNA) あるいはピロプラズマ主要表面蛋白質 (Major piroplasm surface protein; MPSP) 遺伝子により型別可能ないくつかの遺伝型が存在することが報告されている。貧血と黄疸を主徴とする本原虫感染症は日本、韓国、中国の一部で発生報告があり、多くの場合、複数の遺伝型の原虫が混合感染している。類縁原虫は世界的にも報告されているが、多くは非病原性と考えられており家畜衛生の上では重要視はされてこなかった。

オーストラリアでは*T. orientalis*感染による重度の臨床症例の報告は従来はなかったが、近年、本原虫によると考えられる重度の貧血例、死亡例がNew South Wales州で報告された。そこで、これらの臨床症例の血液DNAを入手し、MPSPならびにSSUrDNAによる原虫遺伝子検出ならびに遺伝子型別により問題となった感染症の分子疫学的研究を行った。その結果、これらの検体からIkeda, Chitose, Buffeli型の原虫が検出され、これらの混合感染であることが明らかとなった。特にIkeda型は、日本、韓国など本原虫感染症が問題となっている地域で検出されていたが、それ以外の地域で検出された初めての例であった。

次に、混合感染例での原虫集団の簡易・迅速な遺伝子型別を目的として、Internal Transcribed Spacer領域 (ITS1及びITS2)を標的とするPolymerase Chain Reaction (PCR)にフラグメント解析を組み合わせた手法を検討した。すなわち、ITS1内、ITS2内配列に基づき、それぞれ特異的なプライマーを設計し、蛍光標識された増幅産物のサイズをキャピラリー電気泳動で測定する方法である。PCR産物のサイズはITS-1ではIkeda型=251bp, Chitose型=274bp, Buffeli型=269bp、ITS-2ではIkeda型=133bp, Buffeli型, Chitose型=139bpとなる。その結果、フラグメントサイズによる遺伝子型別が可能で、かつピークサイズを測定することにより、各型の原虫の相対量の解析が可能であった。この方法を用いてIkeda, Chitose型原虫を実験感染さ

せた牛の血液DNAを試料として原虫集団を解析した結果、牛体内での両型の動態を解析することが可能であった。また野外試料の解析でも原虫型別が可能であった。

本研究は、これまで発生報告のなかったオーストラリアで牛小型ピロプラズマ病の発生を初めて確認したものであり、またITS領域を標的にしたPCR/フラグメント解析により *T. orientalis* の高感度検出と簡易かつ迅速な遺伝子型別法を開発した点で、本原虫感染症の分子疫学的研究の進展に寄与するものと考ええる。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者 Joseph Muiruri KAMAU 君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。